

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號：NSC 89-2320-B-041-017

執行期限：89 年 11 月 1 日至 90 年 7 月 31 日

主持人：劉怡文 嘉南藥理科技大學藥學系

一、中文摘要

哺乳類動物因感染引發的敗血症中，脂多糖扮演著一個重要的角色，因為脂多糖可以活化宿主的先天免疫反應。已知在哺乳類免疫細胞中，脂多糖除了可以增進發炎性的間質素表現之外，最近則是發現它也可以促進抗發炎性的間質素表現。在間質素促進間質素表現的研究上，曾有報導指出脂多糖是透過啟動子上的 Sp1 結合位置(位在-89 到-78bp 上)來使間質素基因表現。而我們在這篇的研究當中更是發現，脂多糖是透過 MAPKKK—MAPKK—MAPK 訊息傳遞路徑誘導 Raw264.7 細胞的間質素表現。由於已知 Sp1 的蛋白質量以及其結合上間質素啟動子的能力，皆不因脂多糖刺激而有所增加，因此我們推測有可能是其他的轉錄因子透過啟動子上的 Sp1 結合點誘導間質素啟動子活性。在這研究結果發現，脂多糖刺激細胞後可以觀察到 c-Jun 與 c-Fos 蛋白質增加；此外，如果讓 Raw264.7 細胞大量表現 c-Jun，也會同時誘導間質素啟動子之活性。

關鍵詞：間質素、啟動子之調節、轉錄因子 Sp1、轉錄因子 c-Jun、轉錄因子 c-Fos

Abstract

It is well known that lipopolysaccharide (LPS) plays a key role in the septic shock syndrome due to activation of mammalian innate immune system. Except activation of pro-inflammatory cytokines, it was recently found that LPS also induces expression of anti-inflammatory cytokine interleukin (IL)-10. It has been revealed that an Sp1 binding site residing at -89 to -78 bp was essential for LPS-induced IL-10 promoter. In this

study, we found that LPS increased the amount of IL-10 protein through MAPKKK—MAPKK—MAPK signal pathway in Raw264.7 cells. According to Brightbill's result (2), The amount of Sp1 on its binding activity to IL-10 promoter was not increased after LPS stimulation, so we speculate other transcription factors might play a role in LPS-induced IL-10 promoter through this Sp1 binding site. In our subsequent study, LPS also induced c-Jun and c-Fos expression in Raw264.7. Besides, overexpression of c-Jun could increase IL-10 promoter activity in Raw264.7 cells.

Keywords: interleukin-10, promoter regulation, transcription factor Sp1, transcription factor c-Jun, transcription factor c-Fos

二、緣由與目的

哺乳類動物因細菌感染而引發的敗血症中，脂多糖扮演著一個重要的角色，因為脂多糖是細菌的一種內毒素，它可以活化宿主的先天免疫反應。在哺乳類免疫細胞的先天性免疫反應中，脂多糖扮演著可活化嗜中性血球與巨噬細胞的重要角色，連帶的也促進許多發炎性的間質素表現，因而導致感染所引發來的發炎反應(1)。既然有發炎反應發生，邏輯推理上，我們的生理反應接下來應該能啟動抗發炎機制，以防止發炎反應之持續擴大。果真，最近幾年來發現脂多糖也可以促進抗發炎性的間質素表現(如間質素-10) (2)。目前已知間質素-10在免疫作用的調控上扮演一個很重要的角色，因為它可以抑制巨噬細胞與 T 細胞的免疫反應，以阻止發炎性免疫反應之再進行(3, 4)。最近，在脂多糖促進間質素表現的研究上，Brightbill 等人利用一系列的啟動子突變報告基因分析與電泳位

移試驗,發現脂多糖是透過啟動子上的 Sp1 結合位置(位在-89 到-78bp 上)來使間質素十基因表現,因此增加間質素十 mRNA 與蛋白質的量(2)。但是利用 EMSA 的實驗分析,卻觀察不到 Sp1 結合上間質素十啟動子的能力有因脂多糖刺激而增加。這些現象非常類似我以前研究上皮生長因子對十二酯氧酵素基因誘導之機轉(5)。上皮生長因子可以透過十二酯氧酵素啟動子上之 Sp1 結合位置,誘導十二酯氧酵素表現,但是 Sp1 的蛋白質量以及其結合上十二酯氧酵素啟動子的能力卻不因上皮生長因子刺激而有所改變。當時我們尚不知如何解釋此機轉,但陸續在這二、三年來的持續研究中發現,上皮生長因子誘導十二酯氧酵素基因表現(6, 7),以及 TGF- α 誘導 p21 基因表現中發現(8): Sp1 必須與 c-Jun 結合才能活化基因表現,而 Sp1 很可能是一個攜帶者的角色,再靠著 Sp1 與 c-Jun 的結合能力把 c-Jun 帶到 DNA 上而活化基因表現。

由於 Sp1 同時在十二酯氧酵素與間質素十之基因活化中扮演一個不可或缺色,因此本計畫將探討兩個有趣的問題:[1] 有哪些訊息傳遞因子參與在脂多糖與 Sp1 間,誘導間質素十基因表現?[2] Sp1 因子是否也在此誘導系統中扮演攜帶者的角色?

三、結果與討論

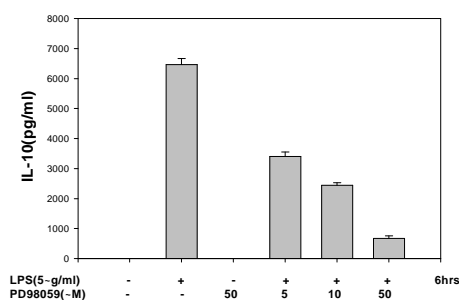
在我的初步實驗系統建立結果發現,脂多糖確實可以增加老鼠巨噬細胞株 Raw264.7 的間質素十 mRNA 與蛋白質的表現:在間質素十 mRNA 的表現方面,在脂多糖刺激細胞 1 小時後,即可以 RT-PCR 的偵測方法觀察到 mRNA 的增加,此現象持續增加到 9 小時的時候;間質素十蛋白質的分泌情形則是以 ELISA 方式定量,當脂多糖刺激細胞 3 小時後,可見到間質素十蛋白質開始增加,且一直增加持續到 9 小時。

前一兩年研究學者們逐漸確認脂多糖刺激免疫細胞的方式,是透過細胞膜上的 TLR4 接受體(9, 10)。而當 TLR4 接受體被活化後便藉由一些特定分子把訊息傳遞下

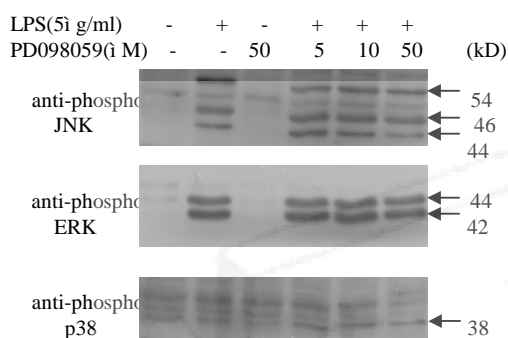
去,這些特定分子即所謂的訊息傳遞因子,目前已知包括有 MAPKKK—MAPKK—MAPK 與 NF- κ B 這兩大途徑(11, 12)。其後者 NF- κ B 被認為與脂多糖間誘導人類間質素十的表現可能較無關(13),因此我們便直接先觀察 MAPKKK—MAPKK—MAPK 路徑參與之可能性。欲觀察訊息傳遞路徑的方式之一即是利用專門的抑制劑,因此我們選用 3 種抑制劑: PD098059 為 MEK1/2 抑制劑、U0126 也是一種 MEK1/2 抑制劑、SB203580 為 p38 抑制劑。所謂 MEK1/2 抑制劑主要是抑制 MEK1/2 的磷酸化活化,因此接下來的 ERK1/2 之磷酸化活化也連帶受到抑制;而 p38 抑制劑則是抑制 p38 的磷酸化與活性;以上所提到的 ERK1/2 與 p38 皆歸屬於 MAPK 這一系列之訊息傳遞分子,而 MEK1/2 與 p38 的上游 MKK3/6 則同屬於 MAPKK 這一系列。除了以上所提的 MEK1/2—ERK1/2 與 MKK3/6—p38 這兩大路徑外,另外還有 MKK4/7—JNK 之訊息傳遞途徑也是屬於 MAPKK—MAPK 系列,但到目前為止,這路徑並無專門的抑制劑可供研究使用。(圖一)為利用 PD098059 來探討 MEK1/2—ERK1/2 是否參與脂多糖誘導 Raw264.7 間質素十蛋白質之表現:(A) PD098059 (5、10、50 μ M) 皆在脂多糖刺激 Raw264.7 前 1 小時先行加入細胞,而它們抑制間質素十蛋白質表現的比例分別為 47%、61%與 88%;(B) 為 PD098059 (5、10、50 μ M) 抑制 JNK、ERK1/2 與 p38 的磷酸化活化情形。5 μ M 與 10 μ M 的 PD098059 可以部分抑制間質素十蛋白質之表現,但對 JNK、ERK1/2 與 p38 的活化情形改變似乎不明顯,而當 PD098059 量提高到 50 μ M 時,抑制間質素十蛋白質之能力達最高(88%),此時的 JNK 磷酸化活化有減弱現象,其中又以 44kD 最明顯,但 ERK1/2 與 p38 的活化仍然沒有改變。

若改用 U0126 (0.1、1、5 μ M)則分別有 40%、79%與 100 % 的抑制能力(對間質

(A)



(B)



(圖一) PD098059 對脂多糖誘導 Raw264.7 細胞間質素十表現之影響。三種不同濃度之 PD098059 於脂多糖刺激 Raw264.7 細胞前先行加入細胞培養基中，置於 37 培養箱 1 小時後，再加入 5 μ g/ml 脂多糖。(A) 脂多糖刺激 Raw264.7 細胞 6 小時後，以 ELISA 方式定量細胞培養基中間質素十之含量；(B) 脂多糖刺激 Raw264.7 細胞 10 分鐘後，以 Western blot 方法偵測 JNK、ERK1/2 與 p38 磷酸化活化的情況。

素十蛋白質之表現)；值得注意的是，當 5 μ M 的 U0126 (100 %抑制力)加入時，44kD JNK 與 42/44kD ERK1/2 的磷酸化活化幾乎完全被抑制，而 p38 則完全不受影響。另一類抑制劑 SB203580 (0.1、0.5、1 μ M) 分別有 58%、83%與 83%的抑制能力(對間質素十蛋白質之表現)；在這樣的情況下，不同劑量的 SB203580 有隨著劑量抑制 p38 的磷酸化活化，但 1 μ M 濃度時沒有達到 100%抑制力；相對的，SB203580 對 JNK 與 ERK1/2 則完全沒有影響 因此綜合以上 3 個不同抑制劑的結果，我們歸納出下列結論：(1) 44kD JNK 的角色似乎對脂多糖誘導間質素十蛋白質表現很重要。(2)當 44kD

JNK 與 42/44kD ERK1/2 的磷酸化活化完全被抑制時，間質素十蛋白質表現也完全被抑制。(3)到以上兩個結論時，似乎可將 p38 完全忽略，但抑制 p38 的 SB203580 對間質素十也有 83%的抑制力。因此 p38 也會影響細胞間質素十之產生，所以我們推論 JNK、ERK1/2 與 p38 的下游可能有共同點，所以當我們用任何一種抑制劑抑制了 JNK、ERK1/2 或 p38 的任一分子時，都會影響細胞間質素十之產生。

在整理性文獻的報告中，我們已知 ERK1/2 可活化具有 SRE site 的起動子，如 c-fos 基因(11)；而 JNK 與 p38 則是皆可活化具有 SRE site 或 AP-1 site (如 c-jun 基因)的起動子(11)。雖然老鼠間質素十起動子 (-122bp 到+64bp)上篩選不到 SRE site 或正向之 AP-1 site，但或許 c-Fos 或 c-Jun 可透過 Sp1 site 與 Sp1 蛋白質結合達到活化基因之目的，因為最近幾年來，類似這種蛋白質交互作用以達活化基因的報導越來越多(7, 8, 14-17)，因此我們也不放棄懷疑其他可被脂多糖誘導之轉錄因子線索。在我們的系統中，脂多糖刺激 Raw264.7 細胞 1 小時即可觀察到 c-Jun 蛋白質增加，且增加一直到 9 小時；如果讓 Raw264.7 細胞大量表現 c-Jun，也會同時誘導間質素十起動子活性。另外，脂多糖刺激 Raw264.7 細胞也可觀察到 c-Fos 蛋白質增加。根據我的初步結果與相關文獻報導，我推測 c-Jun 之所以會誘導間質素十起動子活性，極有可能是透過起動子上的 Sp1 結合點，而 c-Fos 可能也有參與性。

四、計畫成果自評

這 9 個月來的研究工作進度雖然沒有完全達成，但從這個新的研究當中，我們獲得了許多成長經驗。

(一) 免疫細胞之培養嚴謹度

由於我們是第一次培養免疫細胞，再加上 Raw264.7 是屬於單核球/吞噬細胞兩種可變化型態的細胞，這細胞對於外在環境之刺激非常敏感，原本他是屬於單核球細胞型態，稍受刺激即轉變成吞噬細胞型態，由於我們的間質素十基因研究必須使用單核球細胞型態，若變成吞噬細胞型態

則間質素十的誘導作用會消失。而一開始因為不熟悉細胞型態之重要性，加上我們選擇較經濟的玻璃器具做為培養細胞之使用，因此 Raw264.7 往往養了一陣子之後，細胞外觀與部分生理反應都會逐漸改變。後來與一些專家討論以及搜尋培養條件資料，漸漸將我們的培養細胞環境改善(如改用無菌塑膠製材等)，現在我們的 Raw264.7 已經可以很穩定的以單核球細胞型態培養續代。

(二) 質體 DNA 抽取之嚴謹度

由於我們的實驗是以 LPS 為刺激物質，所以對於外界任何含細菌內毒素的污染源，皆會影響我們所要觀察的現象。而抽取 DNA 質體的產物中，都會有細菌內毒素的污染存在。現在有一種產品具有去除細菌內毒素污染的試劑，因此我們實驗所使用的 DNA 質體都最好採用這種安全性較高之產品。

(三) 目前尚未能解決之難題：我們面臨的一個問題是 IG122 (含間質素十啟動子-122 bp 到 +64 bp 之 luciferase expression plasmid) 的啟動子活性無法被 LPS 誘導增加，這點與 Brightbill 等人(2)的結論不同。雖然 IG122 啟動子活性無法增加，但我們卻可在同一盤細胞測到間質素十蛋白質的增加，如此說明 Raw264.7 細胞的活性仍舊存在，但似乎 IG122 無法代表 LPS 誘導間質素十的全部故事，這點也是我們目前正積極在探討的地方。

而綜合我們所要研究的專題上，應該可以提供以下幾個重要資訊，以供生物醫學研究之進展與應用。

(一) 間質素十基因表現調節之重要性：

正因為間質素十扮演著減緩免疫反應的角色，所以若將老鼠的間質素十基因剔除，會因此加重老鼠的發炎性疾病進行(如腸炎等)(18)。因此如果有病人的間質素十基因表現低於正常人的話，可能就很容易發炎過度。現在已知有許多疾病是和發炎過度有關，包括我們台灣人也不少的肝硬化也是其中之一。所以美國 DNAX 生技公司已經研發生產間質素十蛋白質製劑，目前正在進行一些人體臨床實驗(包括腸炎之治療、C 型肝炎之治療等)。這些純化的蛋白質製劑已經可以運用在疾病治療上

面，但間質素十基因本身的生理調節機轉還不是非常清楚，因此我們的研究目的就是想要更了解生物體內間質素十表現之架構。

(二) 蛋白質與蛋白質交互作用在基因表現調節之重要性：

現在蛋白質與蛋白質交互作用的研究發展越來越快速，也越來越了解其重要性，尤其在基因表現調節的影響程度更是重要。在我們研究間質素十基因表現的故事中，因為有單一蛋白質無法解釋的現象存在，所以我們也積極的把蛋白質與蛋白質交互作用的思考模式運用進來，希望能挖掘更豐富的細胞生理知識。

五、參考文獻

1. Aderem, A. and Ulevitch, RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. (2000) *Nature* 406:782-787.
2. Brightbill, HD., Plevy, SE., Modlin, RL. and Stephen, ST. A prominent role for Sp1 during LPS-mediated induction of the IL-10 promoter in macrophage. (2000) *J. Immunol.* 164:1940.
3. Moore, KW., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R., Vieira, P., and Mosmann, TR. Interleukin-10. (1993) *Annu. Rev. Immunol.* 11: 165-190.
4. Moore, KW., de Waal Malefyt, R., Coffman, RL., O'Garra, A., (2001) *Annu. Rev. Immunol.* 19: 683-765.
5. Liu, YW., Arakawa, T., Yamamoto, S. and Chang, WC. Transcriptional regulation of human 12-lipoxygenase gene promoter is mediated through Sp1 consensus sites in A431 cells. (1997) *Biochem. J.* 324:133.
6. Chen, BK., Kung, HC., Tsai, TY. and Chang, WC. Essential role of mitogen-activated protein kinase pathway and c-Jun induction in epidermal growth factor-induced gene expression of human 12-lipoxygenase. (2000) *Mol. Pharmacol.* 57:153.
7. Chen, BK. and Chang, WC. Functional interaction between c-Jun and promoter factor Sp1 in epidermal growth

- factor-induced gene expression of human 12(S)-lipoxygenase. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:10406-10411.
8. Kardassis, D., Papakosta, P., Pardali, K. and Moustakas, A. c-Jun transactivates the promoter of the human p21^{WAF1/Cip1} gene by acting as a superactivator of the ubiquitous transcription factor Sp1. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:29572-29581.
 9. Wong, PMC., Chung, SW. and Sultzter, BM. Genes, receptors, signal and responses to lipopolysaccharide endotoxin. (2000) *Scand J. Immunol.* 51:123-127.
 10. Aderem, A. and Ulevitch, RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. (2000) *Nature* 406:782-787.
 11. Guha, M. and Mackman, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. (2001) *Cellular Signalling* 13: 85-94.
 12. Rao, KMK. MAP kinase activation in macrophages. (2001) *J. Leukoc. Biol.* 69: 3-10.
 13. Bondeson, J., Browne, KA., Brennan, FM., Foxwell, BM., Feldmann, M. Selective regulation of cytokine induction by adenoviral gene transfer of I- β into human macrophage: lipopolysaccharide-induced, but not zymosan-induced, proinflammatory cytokines are inhibited, but IL-10 is nuclear factor- β independent. *J. Immunol.* 162: 2939-2945.
 14. Perkins, ND., Edwards, NL., Duckett, CS., Agranoff, AB., Schmid, RM. and Nabel, GJ. A cooperative interaction between NF κ B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. (1993) *EMBO J.* 12:3551-3558.
 15. Karlseder, J., Rotheneder, H. and Wintersberger, E. Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F. (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16(4):1659-1667.
 16. Nishitani, J., Nishinaka, T., Cheng, CH., Rong, W., Yokoyama, KK. and Chiu, R. Recruitment of the retinoblastoma protein to c-Jun enhances transcription activity mediated through the AP1 binding site. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:5454-5461.
 17. Feng, XH., Lin, X. and Derynck, R. Smad2, Smad3 and Smad4 cooperate with Sp1 to induce p15^{Ink4B} transcription in response to TGF β . (2000) *EMBO J.* 19:5178-5193.
 18. Murray, PJ. And Young, RA. Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice. (1999) *Infect. Immun.* 67:3087.

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

脂多糖刺激老鼠間質素 10 基因表現之細胞內訊息傳遞路徑研究
Signal Transduction of LPS-induced Gene Expression of Mouse Interleukin-10

計畫類別：C 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC89 - 2320 - B - 041 - 017 -

執行期間：89 年 11 月 1 日至 90 年 7 月 31 日

計畫主持人：劉怡文

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：嘉南藥理科技大學藥學系

中 華 民 國 90 年 10 月 23 日