

嘉南藥理科技大學 96 年度教師研究計畫成果報告

計畫名稱：S-腺核昔同半胱胺酸對 RAW264.7 巨噬細胞在
LPS 誘發免疫反應下的影響

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

執行期間：96 年 1 月 1 日至 96 年 12 月 31 日

計畫主持人：蔡新茂

計畫參與人員：卓心媛

執行單位：嘉南藥理科技大學休閒保健管理系

中華民國 96 年 3 月 12 日

計畫成果報告

S-腺核甘同半胱胺酸對 RAW264.7 巨噬細胞在 LPS 誘發免疫反應下的影響

計畫編號：CN9649

執行期限：96 年 1 月 1 日至 96 年 12 月 31 日

主持人：蔡新茂 嘉南藥理科技大學休閒保健管理系

摘要

流行病學調查顯示同半胱胺酸(Hcy)是心血管疾病、神經缺陷相關疾病、慢性腎病和免疫相關疾病的危險因子之一。目前，Hcy 造成疾病的原因可能是血管內皮細胞損傷、DNA 斷裂、抑制 DNA 合成，基因表現的調控和影響發炎反應等。這些主要的傷害作用被認為與 Hcy 在體內產生活性氧(ROS)有關，然而此假說仍被質疑，因為許多細胞試驗發現，Hcy 要達到產生 ROS 並造成細胞傷害的濃度需高達 1~10 mM；近來，也有些大型研究發現 Hcy 與高同半胱胺酸血症、心血管疾病以及中風之間無明顯相關性。事實上，越來越多的證據證明 Hcy 生合成的前驅物 S-腺核甘同半胱胺酸(SAH)與 Hcy 相關疾病也呈現明顯相關性。然而，SAH 是否在人體中扮演重要角色及其可能的作用機制，目前尚不清楚。有研究指出 SAH 造成細胞損傷可能與免疫反應相關。因此，本計畫將釐清 SAH 是否會刺激免疫反應，造成發炎現象，而使細胞損傷。我們發現 SAH 會促進 BALB/C 小鼠 RAW264.7 巨噬細胞模式探討細胞處於 lipopolysaccharide (LPS) 誘發發炎情況下 nitric oxide 生合成與合成酶(iNOS)的蛋白質表現增加。SAH 確實能刺激免疫反應，造成發炎現象，未來可進一步探討其機制並提供可能造成心血管疾病之一個新可能機制。

前言

有文獻報告指出體內 SAH 累積時，會抑制細胞內的許多甲基轉移酶，包括 DNA methyltransferase (16), protein methyltransferase (17), and catechol O-methyltransferase (18)。已有許多研究指出 SAH 與 DNA 低甲基化有顯著相關性(19-21)。正常人血漿、淋巴球中 SAH 增加時，DNA methylation 會顯著增加(19)。Fu 等人(20)指出：Hcy 會造成內皮細胞傷害，是因 SAH 使得內皮細胞凋亡，且可能是透過對蛋白質和基因的低甲基化。在中風老鼠的腎臟中也發現，由於 SAH 的累積，而造成甲基化的能力顯著降低(21)。SAH 除了與甲基化相關之外，另一有研究指出 SAH 能造成 yeast 生長毒性，而非 Hcy(22)。而且 Yang 等人在 2003 年發表在 Nutr. Cancer 的研究顯示：SAH 可能是藉由抑制細胞 DNA repair 能力，進而促進 H₂O₂ 對細胞的 DNA 傷害(23)。文獻報導中認為 SAH 造成細胞的毒性可能是(a) 抑制了 DNA、RNA、脂質和蛋白質的甲基化(24)；(b) 基因活化的調控者(25)；(c) 細胞分化和免疫反應(26)。Dayal 等人(27)結果顯示小鼠之血

管內皮功能受損，顯著地與肝及腦中 SAH 增加及 SAM/SAH 比例下降相關。甚至我們發現許多研究認為 Hcy 造成疾病之原因可能是 kinase、phosphatase 訊息傳遞途徑的活化、基因表現的調控(28)、caspase、poly-ADP-ribose polymerase (PARP)之抑制劑(29)、免疫細胞的刺激(29)，都伴隨著 SAH 上升。同時我們亦發現極少研究針對 SAH 對 NO 及 NO 合成酶的影響做探討。

基於上述，SAH對於細胞的傷害及作用機制上仍有許多問題等待釐清，包括 SAH是否會影響免疫細胞，降低NO(Nitric oxide)形成，造成血管損傷。實際上，已有一些臨床試驗顯示心血管疾病和阿茲海莫症病人中血漿中 SAH濃度顯著地增加，其靈敏度比Hcy高(30, 31)。在共同申請人過去的研究經驗中，亦發現細胞中SAH的改變是較Hcy靈敏的。因此，為更進一步了解SAH在發炎反應的生理壓力下所扮演的角色，本計畫擬利用BALB/C小鼠RAW264.7巨噬細胞模式探討SAH處於lipopolysaccharide (LPS)誘發發炎情況下(可模擬人體處於發炎情形下，SAH對人體的影響)，SAH對細胞的NO合成、合成酶(iNOS)的影響。我們期望對SAH產生的影響機制能有更透徹的瞭解，以及提供可能造成心血管疾病之一個新可能機制。

材料與方法

1.1. 細胞培養及處理

RAW264.7 細胞以含 10%FBS 之 DMEM 培養基，放置於 37°C 含有 5% CO₂ 培養箱中培養至 8 分滿後，先加入 1 µg/ml LPS (誘發巨噬細胞產生發炎反應之致發炎物質)培養 3 hrs (32)，之後以 PBS 清洗兩次後，再加入 0.1~10 µM SAH 培養 12~48 hrs，同樣收集細胞及培養基，保存於-80°C 冰箱中，以進行下列各項分析。

1.2. 細胞存活率分析 (MTT viability assay) (33, 34)

為瞭解 SAH 或是 LPS 在此培養條件下是否造成細胞死亡或是生長抑制，我們進行細胞存活率分析。MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenol tetrazolium bromide] 為 tetrazolium salt，經細胞內粒腺體去氫酶 (dehydrogenase) 的分解，由透明無色產生藍色 formazan 晶體。將細胞置於 24 孔的微量平盤，每孔有 1 ml 之新鮮的培養液及約 10⁴ cells，培養隔夜後，經過不同的處理再進行細胞存活力之測定。在測定前，先將 MTT 以未含有 FBS 的 DMEM 培養液稀釋成 0.2 mg/ml，將 1 ml 之 MTT 稀釋液加入每孔細胞中，於 37°C 下培養 1 小時，於倒立顯微鏡下可觀察到細胞內藍色結晶的生成。將 24 孔的微量平盤倒蓋，移去培養液，再以 1 ml 之 DMSO 加以溶解，搖晃 5 分鐘直到看不到晶體後，在 492 nm 讀取其吸光值。

1.3. NO assay (35)

各樣品取 100 μ l medium 至 96 孔盤中，加入 100 μ l Griess reagent (1% sulfanilamide and 0.1% naphthylendiamine in 5% phosphoric acid)，反應呈色，避光反應約 15 分鐘後，以 ELISA reader (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtechnologies GmbH, Germany) 測定吸光波長 570 nm 的 OD 值，同時以 sodium nitrite 作為標準品、做標準曲線，計算樣品 NO 濃度。

1.4. iNOS 蛋白質表現分析(36)

西方轉漬法分析 (Western blot analysis)：將細胞 pellet 加入 sample lyses buffer (20% SDS, 1mM PMSF)，置於冰上，再以 sonicator 將細胞震破，離心(12000, 4 $^{\circ}$ C, 20 min)，收集上清液，以 Bio-Rad protein assay kit 定量蛋白質。取 40 μ g 蛋白質樣品進行 SDS-PAGE 分析後，再轉漬到 NC-membrane 上，以 5% non-fat block solution 進行 blocking 後，即與 first antibody over night 反應，再與 second antibody 反應 1 小時，以 ECL kit 冷光呈色。

結果與討論

1. 細胞存活率分析

在 RAW264.7 cells 中，5~20 μ M SAH 皆顯著的抑制了細胞存活率(抑制率可達 64%)；而且這個作用具有劑量效應；且隨著培養時間增加，抑制效果亦顯著增加(Fig. 1)。而溶劑組(0.2% DMSO)並不會改變細胞的存活率(Data not shown)。另外，以 Hcy 處理 CL.2 與 BV-2 細胞後，我們發現 5 mM Hcy 能顯著的抑制細胞存活率(抑制率可達 36%)，且具有時間效應；但 1 mM 和 2 mM Hcy 則無明顯的改變(Fig. 2)。

2. NO 含量分析與 iNOS 的表現量

在 RAW264.7 cells 中，5~20 μ M SAH 皆顯著的促進了細胞 NO 產生(增加可達 31%)；而且這個作用具有劑量效應(Fig. 3)。且亦能促進 iNOS 的表現量(Fig.4)。

我們認為 SAH 對於細胞的傷害及作用機制上仍有許多問題等待釐清，包括 SAH 是否會影響免疫細胞，降低 NO(Nitric oxide)形成，造成血管損傷。實際上，已有一些臨床試驗顯示心血管疾病和阿茲海莫症病人中血漿中 SAH 濃度顯著地增加，其靈敏度比 Hcy 高。過去的研究經驗中，我們亦發現細胞中 SAH 的改變是較 Hcy 靈敏的。為此，了解 SAH 在發炎反應的生理壓力下所扮演的角色，是相當重要的。本計畫利用 BALB/C 小鼠 RAW264.7 巨噬細胞模式探討 SAH 處於 lipopolysaccharide (LPS) 誘發發炎情況下(可模擬人體處於發炎情形下，SAH 對人體的影響)，SAH 對細胞的 NO 生合成、合成酶(iNOS)的影響。我們的結果發現 SAH 確實能刺激免疫反應，造成發炎現象。未來期望對 SAH 產生的影響機制能有更透徹的瞭解，以及提供可能造成心血管疾病之一個新可能機制。

Figure 1. Effect of SAH on cells viability in RAW264.7 cells were treated with different concentrate of SAH for 24 h~72 h. Cell viability was determined by MTT and expressed as a percentage of viable cells in the total number of cells counted. The figure shows means \pm SD ($n \geq 5$) for each treatment.

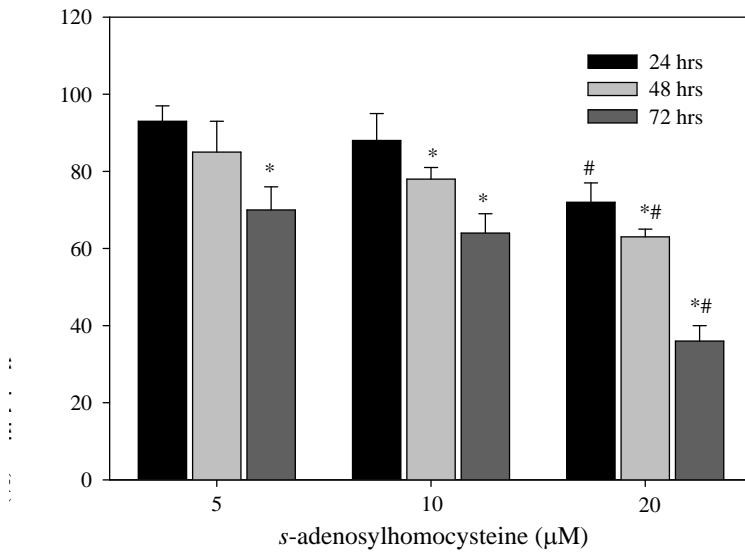


Figure 2. Effect of Hcy on cells viability in RAW264.7 cells were treated with different concentrate of Hcy for 24 h~72 h. Cell viability was determined by MTT and expressed as a percentage of viable cells in the total number of cells counted. The figure shows means \pm SD ($n \geq 5$) for each treatment.

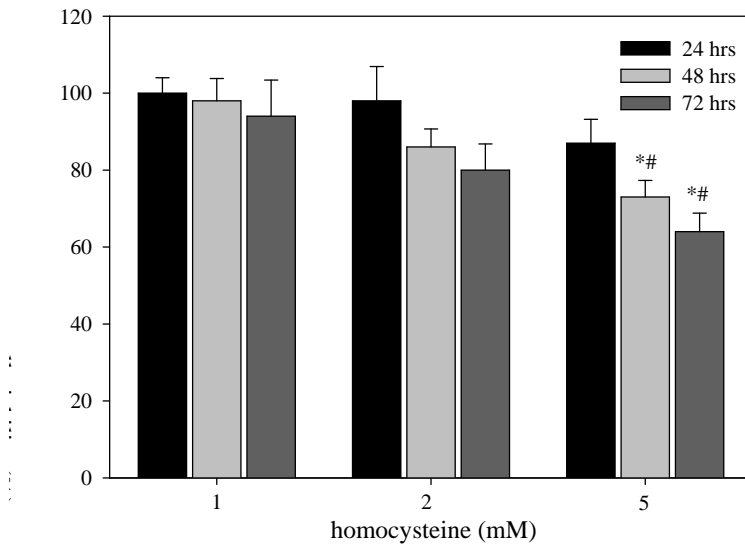


Figure 3. SAH影響LPS刺激細胞產生一氧化氮

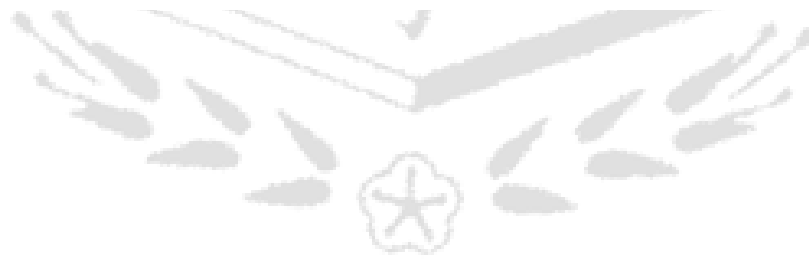
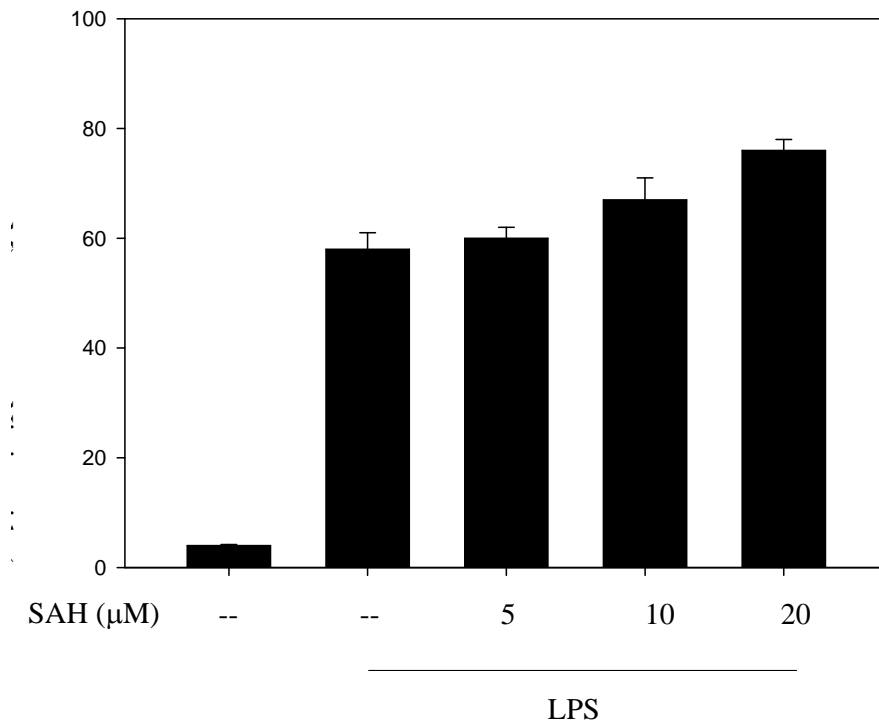
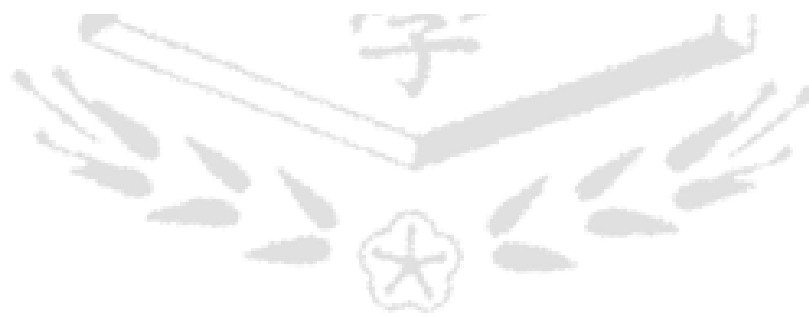
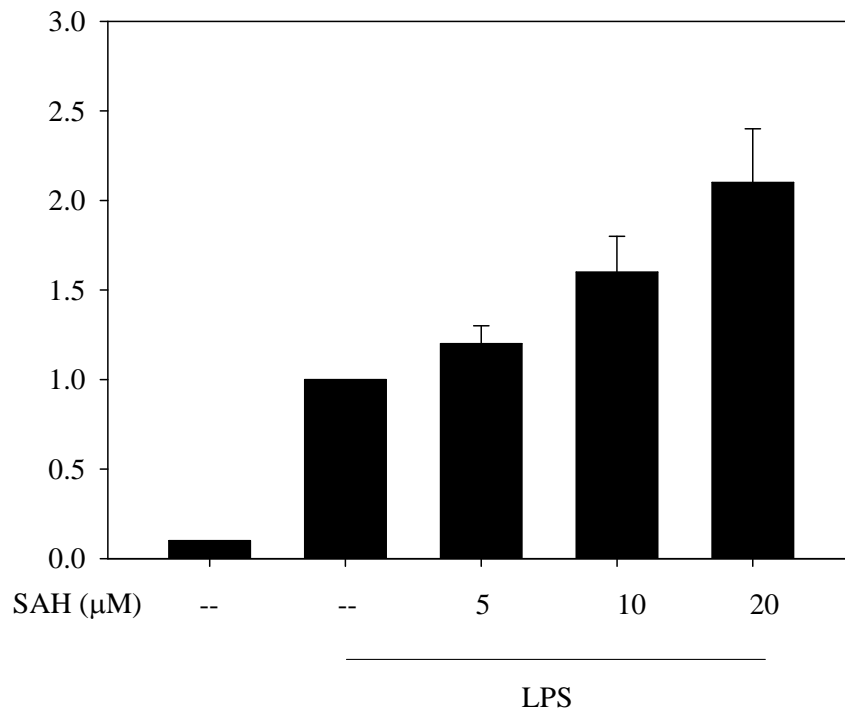


Figure 4. SAH影響LPS刺激細胞產生一氧化氮合成酶



參考文獻

1. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. 1998. *NEJM*. 338: 1042-1050.
2. Verhoef P, Hennekens CH, Malinow R, Kok FJ, Willett WC, Stampfer MJ . A prospective study of plasma homocyst(e)ine and risk of ischemic stroke. 1994. *Stroke*. 25: 1924-1930.
3. Malaguarnera M, Ferri R, Bella R, Ala gona G, Carnemolla A, Pennisi G. Homocysteine, vitamin B12 and folate in vascular dem entia and in Alzheimer disease. 2004. *Clin. Chem. Lab. Med.* 42:1032-1035.
4. Woodside JV, Fogarty DG, Lightbody JH, Loughrey CM, Yarnell JWG, Maxwell AP, Young IS. Homocysteine and B-group vitamins in renal transplant patients. 1999. *Clinica Chimica Acta* 282: 157-166.
5. Granholm N. Homocysteine and immune injury. 1999. *Clinical Immunology Newsletter*. 19: 107-111.
6. Dawson H, Collins G, Pyle R, Deep -Dixit V, Taub DD. The immunoregulatory effects of homocysteine and its intermediates on T-lymphocyte function. 2004. *Mechanisms of Aging and Development*. 125: 107-110.
7. Welch GN, Upchurch JGR, Loscalzo J. Homocysteine, oxidative stress, and vascular disease. 1997. *Hosp. Pract.* 81-92.
8. Tyagi SC. Homocysteine redox receptor and regulation of extracellular matrix components in vascular cells. 1998. *Am. J. Physiol.* 274: 396-405.
9. Blom HJ, Kleinveld HA, Boers GH, Demacker PN, Hak-Lemmers HL, Te Poele-Pothoff MT, and Trijbels JM. Lipid peroxidation and susceptibility of low-density lipoprotein to in vitro oxidization in hyperhomocysteinemia. 1995. *Eur. J. Clin. Invest.* 25: 149-154.
10. Lee ME, and Wang H. Homocysteine and hypomethylation: A novel link to vascular disease. 1999. *Trends Cardiovasc. Med.* 9: 49 -54.
11. Jacobsen DW. Hyperhomocysteinemia and oxidative stress: time for a reality check? 2000. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 1182 -1184.
12. Fallon UB, Ben-Shlomo Y, Elwood P, et al. Homocysteine and coronary heart disease in the Caerphilly cohort: a 10 year follow up. 2001. *Heart*. 85: 153-158.
13. Thogersen AM, Nilsson TK, Dahlen G, et al. Homozygosity for the C6773T mutation of the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and total plasma homocyst(e)ine are not associated with greater than normal risk of a first

- myocardial infarction in northern Sweden. 2001. *Coron Artery Dis.* 12: 85-90.
14. Kennedy BP, Bottiglieri T, Hansen A, and Masliah E. Elevated S-adenosylhomocysteine in Alzheimer rain: influence on methyltransferases and cognitive function. 2004. *J. Neural. Transm.* 111: 547-567.
15. Duthie SJ, Narayanan S, Blum S, Pirie L, Brand GM. Folate deficiency in vitro induces uracil misincorporation and DNA hypomethylation and inhibits DNA excision repair in immortalized normal human colon epithelial cells. 2000. *Nutr. Cancer.* 37: 245-251.
16. Trinh BN, Long TI, Nickel AE, Shibata D, Laird PW. DNA methyltransferase deficiency modifies cancer susceptibility in mice lacking DNA mismatch repair. 2002. *Molecular and Cellular Biology.* 22: 2906-2917.
17. Gillet L, Looze Y, Deconinck M, Leonis J. Binding capacities of various analogues of S-adenosyl-L-homocysteine to protein methyltransferase II from human erythrocytes. 1979. *Experientia.* 35: 1007-1009.
18. Birdard JN, Sokoloff P, Cronenberger L, Pacheco H. Effect of S-adenosyl-L-homocysteine of dopamine catabolism. 1979. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 87: 253-264.
19. Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribna IP, Hine RJ, and James SJ: Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. 2000. *J. Biol. Chem.* 275: 29318-29323.
20. Fu W, Dudman NPB, Perry MA, Young K, and Wang XI: Interrelations between plasma homocysteine and intracellular S-adenosylhomocysteine. 2000. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271: 47-53.
21. Kloor D, Delabar U, Mühlbauer B, Luippold G, and Osswald H: Tissue levels of S-adenosylhomocysteine in the rat kidney: effects of ischemia and homocysteine. 2002. *Biochem. Pharmacol.* 63: 809-815.
22. Christopher SA, Melnyk S, James SJ, Kruger WD. S-Adenosylhomocysteine, but not homocysteine, is toxic to yeast lacking cystathionine β -synthase. 2002. *Molecular Genetics and Metabolism.* 75: 335-343.
23. Yang TH, Yang NC, Hu ML. S-Adenosylhomocysteine enhances hydrogen peroxide-induced DNA damage by inhibition of DNA repair in two human cell lines. 2003. *Nutr. Cancer.* 47: 70-75.
24. Ueland PM. Pharmacological and biochemical aspects of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase. 1982. *Pharmacol.* 34: 323-

25. Chiang PK, Burbelo PD, Brugh SA, Gordon R, Fukuda K, Yamada Y. Activation of collagen IV gene expression in F9 teraocarcinoma cells by 3-deazaadenosine analogs. 1992. *J. Biol. Chem.* 267: 4988-
26. Medzihradsky JL, Zimmerman TP, Wolberg G, Elion GB. Immunosuppressive effects of the S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-deazaadenosine. 1982. *J. Immunopharmacol.* 4: 29-
27. Dayal S, Bottiglieri T, Arning E, Maeda N, Malinow MR et al. 2001. Endothelial dysfunction and elevation S-adenosylhomocysteine in cystathionine β -synthase-deficient mice. 2001. *Circ. Res.* 88: 1203-1209.
28. Mattson MP, Kruman II, Duan W. Folic acid and homocysteine in age-related disease. 2002. *Ageing Res. Rev.* 1: 95-111.
29. Dawon H, Collins G, Pyle R, Deep-Dixit V, Taub DD. The immunoregulatory effects of homocysteine and its intermediates on T-lymphocyte function. 2004. *Mechanisms of Aging and Development.* 125: 107-110
30. Kerins DM, Koury MJ, Capdevila A, Rana S, and Wagner C: Plasma S-adenosylhomocysteine is a more sensitive indicator of cardiovascular disease than plasma homocysteine. 2001. *Am. J. Clin. Nutr.* 74: 723-729.
31. Kennedy BP, Bottiglieri T, Hansen A, and Masliah E. Elevated S-adenosylhomocysteine in Alzheimer rain: influence on methyltransferases and cognitive function. 2004. *J. Neural. Transm.* 111: 547-567.
32. Park EK., Shin YW., Lee HU., Kim SS., Lee YC., Lee BY., Kim DH. Inhibitory effect of ginsenoside Rb1 and compound K on NO and prostaglandin E2 biosyntheses of RAW264.7 cells induced by lipopolysaccharide. 2005. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 652-656.
33. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immuno. Meth.* **65**, 55-63, 1983.
34. Loveland, B. E., Johns, T. G., Mackay, I. R., Vaillant, F., Wang, Z. X. and Hertzog, P. J. Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assays. *Biochem. Intern.* **27**, 501-510, 1992.
35. Nathan C. Nitric oxide as a secretory roduct of mammalian cells. 1992. *FASEB Journal* 6:3051-3064.
36. Jung WJ, Sung MK. Effects of major dietary antioxidants on inflammatory markers of RAW 264.7 macrophages. 2004. *Biofactors.* 21: 113-117.