

台灣二〇〇五年國際科學展覽會

科 別：醫學與健康科學

作品名稱：STATIN 類降血脂藥物對血管平滑肌細胞一氧化
氮合成酶的基因調控作用

得獎獎項：大會獎:佳作

學 校：台北市立第一女子高級中學

作 者：謝佩芬, 林桂卉

評語與建議事項：

1.數據很多，理論基礎很好。2.須加強邏輯嚴謹度。

科別：醫學與健康科學

作品名稱：STATIN 類降血脂藥物對血管平滑肌細胞一氧化氮合成酶的
基因調控作用

作者姓名：謝佩芬，林桂卉

就讀學校：台北市立第一女子高級中學

指導教師姓名：許一懿老師

(任職：台北市立第一女子高級中學)

林琬琬老師

(任職：台大醫學院藥理科)

STATIN 類降血脂藥物對血管平滑肌細胞 一氧化氮合成酶的基因調控作用

壹、摘要

一、中文摘要

動脈硬化是個致病率和致死率相當高的慢性發炎疾病。HMG-CoA 還原酵素抑制劑類藥物，簡稱 statin，是一類強效的降血脂藥物，而且在臨床上對於心血管疾病有廣泛的治療效果。然而近年來的研究報導指出，statin 會有如此廣效治療效果，其原因不僅僅是因為它的降血脂能力，而是 statin 也具有抑制發炎作用的效果。雖然臨床上已經證實 statin 可以減緩動脈硬化的病程，但是 statin 對於誘發型一氧化氮合成酵素(iNOS)表現的調控機制還不明確。有文獻指出 NOS 代謝產物 nitric oxide (NO)可以改善血流，而可能在動脈硬化上扮演保護角色。值得一提的是雖然適量 NO 有維持血管恆定的功能，過量時則會造成血壓過低休克的現象，這就是細菌感染後因內毒素 lipopolysaccharide (LPS) 作用引發敗血性休克的主要原因之一。在本實驗中，我們使用 fluvastatin、lovastatin、pravastatin 和 atorvastatin 這四種 statins 來探討它們對於血管平滑肌細胞由 LPS 及 IL-1 β 誘導 iNOS 基因表現的影響。我們發現，statin 可以抑制 LPS 所誘發的 NO 和 iNOS 表現，但卻會促進 IL-1 β 所誘發的反應。NF- κ B 在 iNOS 的基因調控上扮演重要的角色，而在探討 NF- κ B 被 LPS 和 IL-1 β 活化的情形中，statin 同樣會促進 IL-1 β 活化 NF- κ B，但抑制 LPS 活化 NF- κ B。我們也發現 fluvastatin 對於 IL-1 β 所引發 NO 的產生、iNOS 的表現、NF- κ B 的活化，以及 p65 向細胞核移動的促進作用，在 ROCK 抑制劑 Y-27632 的處理後可以看到相同的現象。IKK kinase assay 顯示 Y-27632 對於 LPS 所促進的 IKK 活性影響很小，但是會促進 IL-1 β 的活化作用。接著，在 ROCK 的活性方面，LPS 會抑制原本已表現的 ROCK 活性，而相反的，IL-1 β 會增加 ROCK 的活性。總括來說，這些結果顯示 ROCK 在血管平滑肌細胞中扮演 IKK/NF- κ B 的負向訊息調控者角色，而這個機制在 LPS 和 IL-1 β 的訊息傳遞路徑中有不同的調控。即 ROCK 以負向調控機制角色影響 IL-1 β 的訊息傳遞，卻不存在於 LPS 的情況中。就是因為透過反轉這個負向調控的機制，statins

和 ROCK 抑制劑對於 LPS 及 IL-1 β 引發血管平滑肌細胞的 iNOS 表現，呈現相反的調控結果。這些作用可能參與 statin 預防血管再阻塞，抗發炎，抗動脈硬化的作用。此外 Statin 抑制 LPS 的 iNOS 表現作用或許將來可運用於治療敗血性休克。利用基因微陣列分析也偵測到一些受 fluvastatin 正向或負向調控的基因，目前我們正朝鑑定基因的表現改變及確認其功能，生理意義進行實驗中。

二、英文摘要

The 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors, statins, are potent inhibitors of cholesterol synthesis and have wide therapeutic use in cardiovascular diseases. Recent evidence, however, suggests that the beneficial effects of statins may extend beyond their action on serum cholesterol levels. Although statins have been shown to reduce progression of atherosclerosis, little is known about mechanism by which statins affect iNOS expression. Optimal level of NOS product, NO, possesses the anti-inflammation and anti-proliferation effects in atherosclerosis, while large amount of NO contributes to the septic shock in response to bacterial endotoxin, lipopolysaccharide (LPS). In this study, we investigated the effects of fluvastatin, lovastatin, pravastatin and atorvastatin on IL-1 β - and LPS-induced NO production in cultured rat vascular smooth muscle cells (VSMC). We found statins can inhibit LPS-induced iNOS expression and NO production, while they can potentiate IL-1 β -elicited responses. In studying the activity of NF- κ B, which plays an important role for iNOS gene induction, we found that fluvastatin can increase IL-1 β -induced p65 nuclear translocation and NF- κ B activity, while inhibit those induced by LPS. The potentiation effects of fluvastatin on IL-1 β -induced NO production, iNOS expression, NF- κ B activation and p65 nuclear translocation were all mimicked by a ROCK inhibitor, Y-27632. IKK kinase assay showed that Y-27632 itself has minimal effect on LPS-induced IKK activation, while enhances the response of IL-1 β . Studies on examining ROCK activity showed LPS can downregulate constitutive ROCK activity, while IL-1 β oppositely increases ROCK activity. Taken together these data suggest ROCK is a crucial negative regulator of IKK/NF- κ B signaling pathway in VSMC, and this negative control is existing in the action IL-1 β , but is absent in the action of LPS. Through abrogating the function of this negative regulator, statins and ROCK inhibitor thus differentially regulate iNOS expression induced by LPS and IL-1 β in VSMC. These results suggest that stimulation of iNOS expression in the presence of IL-1 β might contribute to the beneficial effects of statins in atherosclerotic process in terms of vasodilation, anti-inflammation and inhibition of smooth muscle cell proliferation. In contrast, the diminishing effect on LPS-induced NO response possibly may provide new therapeutic strategy in sepsis. All these results strengthen the pleiotropic actions of statins in anti-inflammation and anti-atherosclerosis. Preliminary microarray analysis further revealed several genes either upregulated or downregulated by fluvastatin. The identification of these genes and studying their functional roles in atherosclerosis are currently in progress.

貳、內文

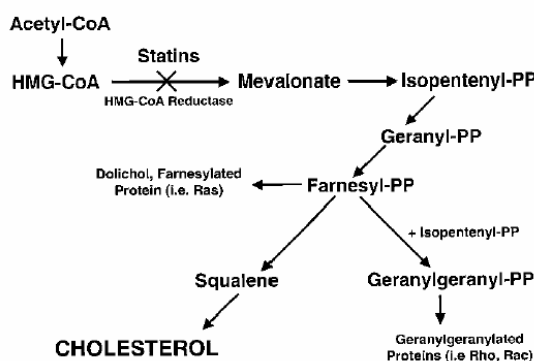
一、研究動機與目的

1、降血脂藥物 STATIN 與動脈硬化

動脈硬化是個致病率和致死率相當高的疾病，為台灣十大死因之一，其併發症也是西方社會最常見的死因，但是其致病因目前尚未十分明確。在臨床及病理觀察顯示，血中膽固醇過高為動脈硬化的一大危險因子，其會誘發一連串的發炎反應驅使血管壁內皮細胞功能喪失，血壓上升，平滑肌細胞增生等。因為當血中低密度脂蛋白 (LDL) 過多的時候，便會受氧化，被巨噬細胞吞噬而沉積在血管壁上，降低血管的彈性，造成所謂的硬化，因此目前便是以降血脂藥物來治療動脈硬化。近年來發現，動脈硬化其實是個慢性發炎疾病。在血管受到傷害、血脂堆積的時候，血管表面會表現出 ICAM、VCAM 等附著因子，並且會釋放 MCP-1、IL-1 β 、TNF- α 等發炎媒介物質或化學趨向物質，吸引單核球進入血管壁，並使平滑肌細胞增生等等一連串的發炎反應 (Glass & Witztum, 2001, Libby, 2002)。

Statin 是目前臨床上十分有效的降血脂藥物，其機制在於抑制了膽固醇合成酵素 --- 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA reductase)，因而能有效降低血中膽固醇及低密度脂蛋白。但是近年來在臨床觀察中發現，約有半數的動脈硬化的病人血脂含量正常，且臨床研究和統計顯示，statin 降低心血管疾病致病和致死率的能力，和其降低血中脂肪的能力並沒有絕對正相關性，反而指出 statin 可以直接作用在血管壁上來達到保護心血管的作用 (Laufs & Liao, 2000; McFarlane et al., 2002; Werner et al., 2002)。例如抑制血管平滑肌細胞的增生，移行。

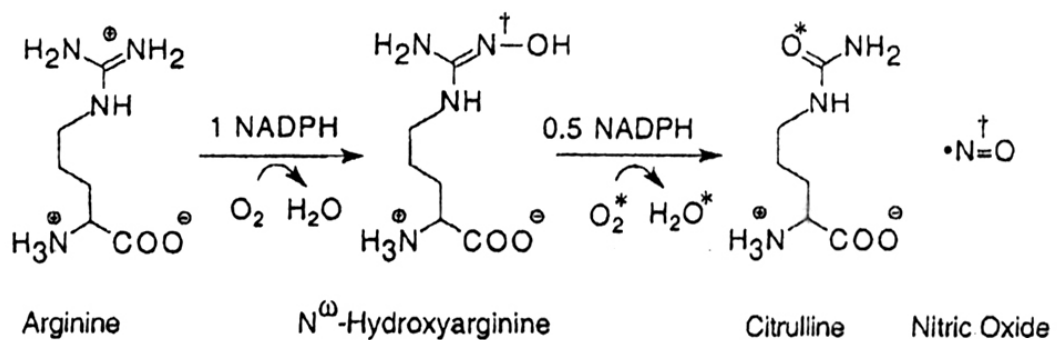
在近年的研究中指出，動脈硬化的進程是一連串的發炎反應，因此有越來越多實驗在探討 statin 在抗發炎方面的作用。目前所發現的一些抗發炎方面的作用機制主要是因 statin 減少細胞中 small G proteins (如 Ras, Rac, Rho, Cdc42) 的訊息傳遞功能。Small G proteins 的活性除需要與 GTP 結合外，還需要與 farnesyl pyrophosphate (FPP) 或 geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) 產生化學結合反應，即所謂的 isoprenylation，才能使這些負責多種細胞功能的重要蛋白轉移至細胞膜上發揮調節的作用，例如可經引發訊息傳遞路徑，活化基因轉錄因子，而啟動基因轉錄的調節作用。因為 statin 是臨床上廣用且深具抗發炎效果的一類藥物，將來或許還有臨床上的其他運用價值，因此其在血管的相關作用值得深入探討。



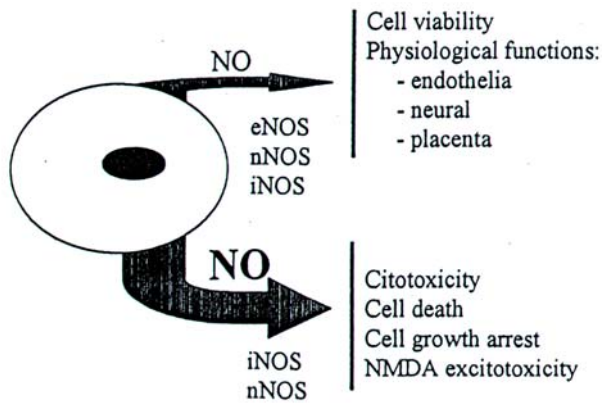
2、iNOS 與發炎反應的關係

一氧化氮 nitric oxide (NO) 是一種具有多種生物活性的自由基，可由 nitric oxide synthase (NOS) 的催化而產生。NOS 一共有三種亞型，包括 eNOS，iNOS，nNOS。一般 eNOS 及 nNOS 是在平常狀態即存在 (constitutive expression)，以維持正常的生理功能。相反的 type II NOS，又稱作 inducible NOS (iNOS)，它在平常的細胞中並

沒有表現，只有在受到發炎等刺激下才會被誘發出來，使細胞內的 L-arginine 轉化為 NO，釋放到細胞外 (Moncada et al., 1991; Nathan, 1997)。許多血管中的細胞，例如巨噬細胞、平滑肌細胞和纖維母細胞等，在受到發炎細胞激素的刺激都會表現出 iNOS，所以當動脈硬化的時候，在動脈硬化斑的部位都可以測到大量的 iNOS 表現 (Luoma & Yla-Herttuala, 1999)。雖然 iNOS 對於動脈硬化究竟是利還是弊，目前有許多的爭議，但是在動物實驗中可以看出，適當濃度的 NO 對於血管是有正面助益的。在正常的血管中，內皮細胞藉由 eNOS 產生適量 NO 來保護血管，包括抑制血小板凝集、抑制白血球黏著到血管壁，放鬆血管張力避免血壓升過等 (Lloyd-Jones & Bloch, 1996)。但在動脈硬化發生處，內皮細胞會因受傷害而剝落或者喪失原有保護血管壁的能力，因此平滑肌細胞藉由 iNOS 所產生的 NO 可以代償 eNOS 的作用，使得血管舒張 (Fukumoto et al., 1997)，抑制血管平滑肌細胞增生 (Tanner et al., 2000)，血小板附著 (Yan et al., 1996) 及 LDL 的氧化 (Rikitake et al., 1998)，而且可以看到原本增厚的血管壁有漸漸復原的趨勢。雖然 NO 如上述有保護的角色，但實際上它的作用是一刀的兩面，其在不同的病理狀態下有時反而是一有害的分子。舉例來說，因革蘭氏細菌感染產生敗血症時，細菌細胞膜上的組成，內毒素 lipopolysaccharide (LPS)，即會誘發 iNOS 大量表現，產生大量的 NO 而導致血管舒張、血壓下降、休克及多重器官衰竭。因此同樣一種分子所扮演的角色是保護性還是傷害性，會因其釋放量的高低及在不同病理狀況下而呈現不同的作用。除 LPS 外，iNOS 的表現也受細胞激素的調節。例如在動脈硬化處常釋放之細胞激素- interleukin-1 β (IL-1 β) 就具有刺激血管平滑肌細胞表現 iNOS 的作用。由 T 淋巴球細胞釋放的 interferon- γ (IFN- γ) 在發炎反應過程中也扮演一個重要角色，因為它可以加強 LPS 誘發許多發炎媒介物質的基因表現，iNOS 即是其中一例。



在一些 cofactors (如 NADPH, FAD, FMN) 及氧氣的共同存在下，NOS 酵素會催化 L-arginine 轉變成 NO 及 citrulline。不穩定的 NO 很快會氧化成穩定的產物亞硝酸 (nitrite) 或硝酸 (nitrate)。

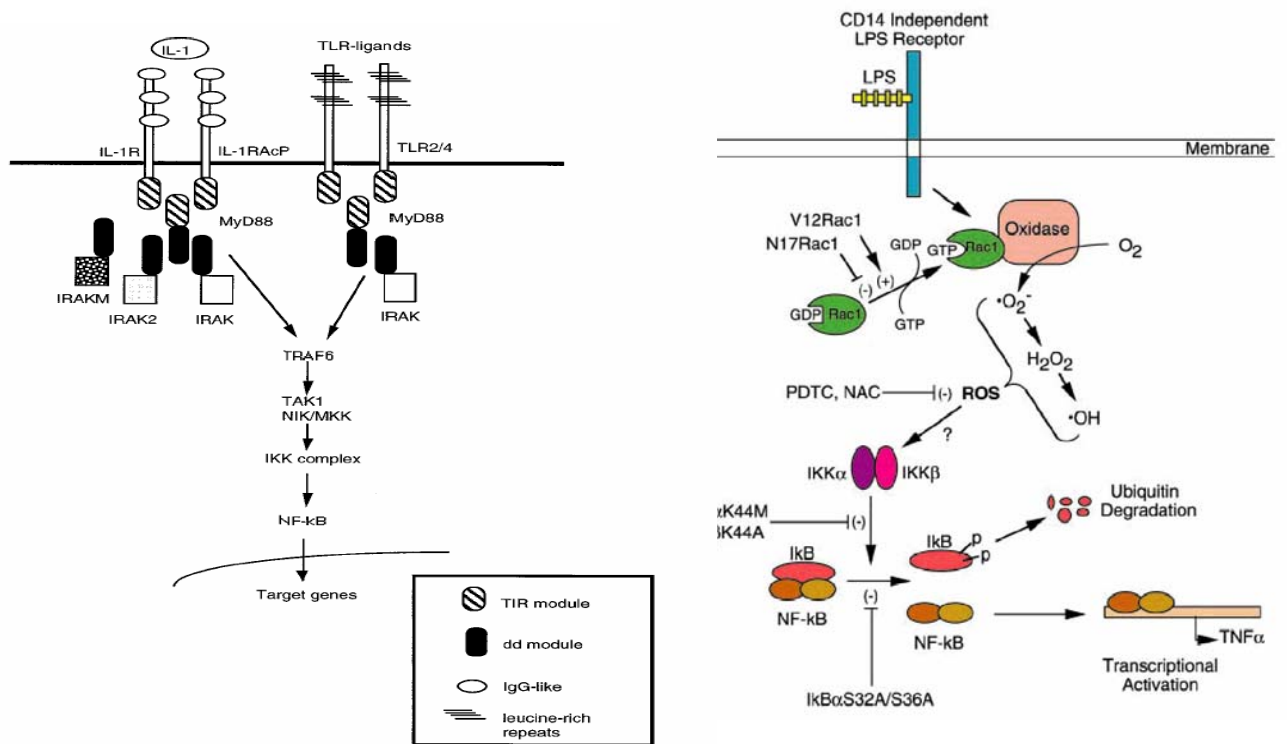


NO 的作用是一刀的兩面，適量有維持正常生理功能，長期過量表現則是有害的分子，造成細胞死亡。

3、NF- κ B 轉錄因子活性是啓動 iNOS 基因轉錄的必要因素

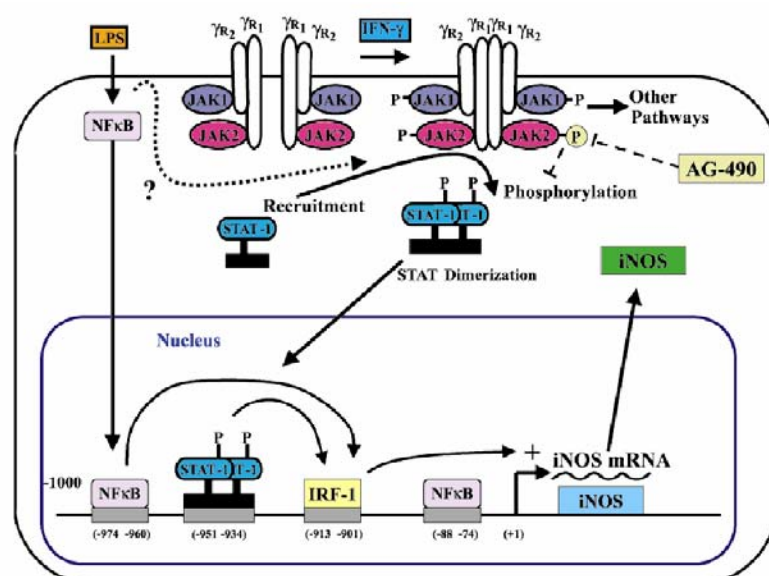
在啓動 iNOS 基因轉錄的 promoter 上可以受到 nuclear factor- κ B (NF- κ B)、AP-1、C/EBP、ATF/CREB 和 STAT1 等轉錄因子的調控，其中，NF- κ B 受到廣泛的研究，已經確定 NF- κ B 在 LPS 和 IL-1 β 刺激 iNOS 表現的訊息傳遞途徑上，扮演重要不可或缺的角色 (Hecher et al., 1999)。老鼠的 iNOS promoter 上共有三個 NF- κ B binding sites，分別位於 (-965 to -956 bp)、(-901 to -892) 和 (-107 to -98) 的位置。當血管平滑肌受到 LPS 或是 IL-1 β 的刺激，就會使原本連結在 NF- κ B 上的抑制蛋白 I κ B 被蛋白激酶 (protein kinase) IKK 磷酸化後而被 proteasome 辨識分解掉，因此位在細胞質的 NF- κ B 便可以進入細胞核，而和 iNOS 上的 NF- κ B binding site 結合，而啓動 iNOS 基因的轉錄。一般 NF- κ B 是以 p65/p50 形成 heterodimer 形式存在。LPS 及 IL-1 β 在訊息傳遞路徑的相似處是，二者均藉由 IRAK 蛋白與受體連結後再與 TRAF 蛋白結合而傳遞訊號，活化下游的 IKK 及 NF- κ B。儘管如此，LPS 及 IL-1 β 在訊息傳遞路徑中也稍有不同之處。例如 LPS 可經由活化 Rac 產生 reactive oxygen species 進而啓動 IKK 的活性。

老鼠的 iNOS promoter 上還具有受 IFN- γ 活化的轉錄因子結合部位。當 IFN- γ 和細胞膜上的受體鍵結便會活化連接於受體上位於膜內的激酶-JAK1 和 JAK2，進而將散佈於細胞質中的轉錄因子 STAT1 招攬至受體上並將其 tyrosine 701 的位置磷酸化，而被磷酸化的 STAT1 便會彼此鍵結形成 homodimer，轉移至細胞核中和具有 GAS 序列的片段鍵結，啓動鄰近的基因表現；IRF-1 便是其中的基因之一。IRF-1 爲一種轉錄因子，當細胞受到 IFN- γ 刺激時便會大量表現，並且參與更下游的基因表現，啓動具有 ISRE 序列的基因表現。在鼠類的 iNOS 的基因上便含有至少十段 IRE，三段 GAS 以及兩段 ISRE (Lowenstein et al., 1993; MacMicking et al., 1997)。IFN- γ 活化 iNOS 基因的訊息傳遞已確定是經由 JAK/STAT 路徑 (Lowenstein et al., 1993; Heitmeier et al., 1999)，而且 IRF-1 也是必要的轉錄因子 (Matrin et al., 1994)。



LPS 與 IL-1 β 活化 NF- κ B 的共通訊息傳遞路徑：
活化各自受體後經 IRAK，TRAF6
而活化 IKK，促進 I κ B 分解，

LPS 啓動 NF- κ B 需要上游作用
分子 Rac 活化而產生 ROS



LPS 藉由活化 NF- κ B，IFN- γ 藉由活化 STAT1 而
協同啓動 iNOS 基因轉錄

4、STATIN 調節 NO 表現的作用與 small G protein 的關係

已有許多文獻指出 statin 可藉由增加血管內皮細胞表現 eNOS 而有保護血管功能。至於 statin 對 iNOS 的調節作用目前結果顯示有紛歧，這可能與細胞種類及不同的誘導刺激物有關。在 astrocyte, microglia, macrophages, lovastatin 會經由抑制 Ras 而降低 LPS 誘導 iNOS (Pahan et al., 1997; Huang et al., 2003)，此作用與干擾 Ras 傳遞訊息活化 IKK/NF- κ B 有關。相反 statin 在血管平滑肌細胞 (Chen et al., 2000)，氣管表皮細胞 (Kraynack et al., 2002)，fibroblasts (Hausding et al., 2000)，心肌細胞 (Ikeda et al., 2001) 會經由干擾 Rho 而增加細胞激素(例如 IL-1 β) 誘導 iNOS。在氣管表皮細胞的研究發現 Rho 下游的作用分子 ROCK 可能參與抑制 iNOS mRNA (Kraynack et al., 2002)。在 C6 glioma cells 的研究也發現 ROCK 可能參與抑制 IKK (Rattan et al., 2003)。雖然在血管平滑肌細胞 ROCK 也能降低 IL-1 β 誘導 iNOS 表現，但是否與影響 NF- κ B 有關仍受爭議 (Chen et al., 2000; Muniyappa et al., 2000; Yamamoto et al., 2003)。

5、目的

鑒於 iNOS 會隨動脈硬化發生而在動脈硬化斑增加表現，且 NO 依濃度不同而有保護或細胞毒殺的相異結果，因此我們十分好奇是否 statin 會影響兩種不同刺激物 (IL-1 β 及 LPS) 對血管平滑肌細胞誘發的 iNOS 作用，而達到進一步保護血管的效果。希望藉由此研究更加了解導致上述結果的作用機制是否與影響 ROCK, NF- κ B 有關。此外除影響 iNOS 基因轉錄外 statin 更廣泛的基因調控作用也將利用基因微陣列分析而獲知。

二、研究方法

1、材料

培養液 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)、盤尼西林與鏈黴素 (Penicillin-Streptomycin)、胎牛血清 (fetal bovine serum)、phosphate buffered saline (PBS) 購自 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)。Rabbit polyclonal against iNOS、ROCK、IKK α / β 抗體購自 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)。IFN- γ 和 IL-1 β 購自 R&D (Minneapolis, MN, USA)。Horseradish peroxidase-coupled anti-rabbit 抗體、enhanced chemiluminescence (ECL) 測定溶劑購自 Amersham Biosciences (Piscataway, NY, USA)。MYPT-1 購自 Upstate (Charlottesville, VA, USA)。pGEX-I κ B α (amino acids 5-55) 質體由 Dr. Frank S. Lee (Pennsylvania Medical Center, PA, USA) 所提供。iNOS promoter-luciferase reporter 質體由 Dr. C.K. Glass (Department of Medicine, University of California, San Diego, CA, USA) 所提供。此外由三個 NF- κ B binding sites 建構得到 κ B-luciferase 質體。 $[\gamma$ -³²P]ATP (3000 Ci/mmol) 購自 NEN (Boston, MA, USA)。NF- κ B TransAM kit 購自 Active Motif (Carlsbad, CA, USA)。Atorvastatin、fluvastatin、pravastatin 分別由 Pfizer (NY, USA)、Novartis (Basel, Switzerland)、Sankyo (Tokyo, Japan) 所提供。Y27632 購自 Tocris (Ellisville, MO, USA)。Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 所需材料購自 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)。LPS、lovastatin 以及其它藥品則購自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。

2、方法

2-1、細胞培養及免疫螢光染色

大鼠血管平滑肌細胞是取自 Sprague-Dawley rat 的主動脈。以併用麻醉藥及斷頸法犧牲大鼠後，打開胸腔沿著脊柱取下主動脈，用 PBS 把其中的凝血塊沖出。之後在無菌操作條件下移去黏附在血管上的肌肉和結締組織，再用 0.05% collagenase 和 5 mM 的 dithiothreitol (DTT) 溶液沖洗之。最後將血管剪成約 1 mm 高的環，直立放在裝有 1 ml 含有 10% 胎牛血清及抗生素 (100 U/ml penicillin 及 100 μ g/ml streptomycin) DMEM 的六孔培養盤中，每兩天換一次培養液，直到細胞爬滿整個 well，再移到 75T flask。細胞都放置於 5% CO₂，37°C 培養箱中培養。當鑑定大鼠血管平滑肌細胞之純度時是在玻片上種好細胞，以 10% 福馬林固定，再用 PBS 進行 blocking。加入 α -actin 抗體處理 15 分鐘，用 PBS 清洗 3 次，再加入二級抗體和 Hoechst 33328。用 PBS 清洗 3 次後，封片固定，再用螢光顯微鏡觀察之。

2-2、Nitrite 產量之測定

Nitrite 的產量可做為 iNOS 活性的指標。將細胞培養在 24-well plates 中，直到細胞長滿後，換成 500 μ l 新鮮培養液，加入 IFN- γ 、LPS、IL-1 β 和不同濃度的 statin，24 小時後收集細胞培養液然後測量 nitrite 含量。Nitrite 測定是取 100 μ l 培養液加入 100 μ l 的 Griess reagent (1% sulfanilamide 及 0.1% naphthylethylenediamide 溶於 5% phosphoric acid)，用 microplate reader 測定 nitrite

含量，其吸收波長為 550 nm (A_{550} nm)。而 nitrite 之標準濃度曲線圖則用不同濃度 sodium nitrite (X 軸) 泡在培養液中當做標準液，求得 A_{550} nm 吸光值 (Y 軸)。樣品之 nitrite 含量是將其 A_{550} nm 值以內插法方式求出濃度。

2-3、細胞總抽取物之製備

將細胞培養在 12-well dish 中，分別加藥反應適當時間之後，將培養液吸走，以冰冷的 PBS 清洗兩次然後置於冰上終止反應，加入適量的 lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH7.5, 125 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM PMSF, 25 mM β -glycerophosphate, 50 mM NaF, 100 μ M sodium orthovanadate, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin)，將細胞完全收集至離心管，靜置 30 分鐘，以 14,000 rpm, 4°C 離心 30 分鐘，取上清液即為細胞抽取物。

2-4、SDS-PAGE 及西方點墨法 (蛋白質轉印)

利用 Bradford 方法測定蛋白質的含量，取一定量的蛋白質，加入 5X Laemmli buffer (最終濃度組成為 1% (v/v) glycerol, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 0.00125% bromophenol blue, 0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8)，在 100°C 下煮 5 分鐘。依 Laemmli (1970) 的方法，利用 SDS-PAGE 電泳分離蛋白質。電泳完畢後，利用半乾式石墨電極板 (Multiphor II NovaBlot Unit, Amersham Biosciences) 進行轉印。首先裁好 6 張與蛋白膠同樣大小之濾紙 (Whatman Co.) 及一張 nitrocellular paper，蛋白膠同樣以 transfer buffer (0.39 M glycine, 0.48 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.375 % SDS) 潤溼，依 3 張濾紙、nitrocellular paper、蛋白膠、3 張濾紙順序由正極向負極方向層疊，小心避免產生氣泡，並趕走氣泡，架設好轉印設備，以固定電流 (蛋白膠片長 x 寬 x 0.8 毫安培/cm²) 1~2 小時作轉印，可以 Amido Black (Sigma Co.) 溶液檢驗轉印效率，並作標記。

2-5、免疫染色法

將轉印上蛋白質之 nitrocellular paper 浸泡於 blocking 溶液 (含有 5% 脫脂奶粉) 中，室溫下輕輕搖晃 1 小時，以含有 0.5 % Tween 20 之 Tris-base saline (TBS) 洗去 blocking 溶液 (5 分鐘)，泡入以適量 TBST 溶液 1:1000 稀釋之特定抗體，室溫下作用 90 分鐘，使抗體和特定蛋白質結合。接著以 TBST 清洗 3 次 (每次 10 分鐘)，再泡入含有結合酵素之 1:2000 稀釋第二抗體的 TBST 溶液中，使之與第一抗體結合，同樣作用 90 分鐘，以 TBST 清洗 3 次後，加入 ECLTM 溶液 (Amersham Biosciences) 以 X 光片偵測特定蛋白質的表現。

2.6、反轉錄—聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

為了偵測細胞中 iNOS mRNA 的表現，合成選擇性的 primers 以便觀察。其 primers 合成的序列為：sense (3128-3152), 5'-CCC TTC CGA AGT TTC TGG CAG CAG C-3' 和 antisense (3600-3625), 5'-GGC TGT CAG AGC CTC GTG GCT TTG G-3'; β -actin mRNA 當作對照組，其 primers 的序列為：sense (613-632), 5'-GAC TAC

CTC ATG AAG ATC CT-3'和 antisense (1103-1122), 5'-CCA CAT CTG CTG GAA GGT GG-3'。將細胞培養在 60 mm dishes 中, 等細胞長滿後, 給予藥物處理, 利用 RNazol 試劑收集總量 RNA, 利用 RNA PCR kit (Gibco) 依照說明書指示操作進行 RT-PCR 的實驗。使用 10 μ g 的 total RNA 當作模板, 合成出 cDNA, 再取 1 μ g 的 cDNA 利用 Taq polymerase 放大 iNOS cDNA, 其放大條件為 94°C 反應 45 秒, 65°C 反應 45 秒, 72°C 反應 2 分鐘, 總共反應 35 個循環, 所放大 cDNA 利用含有 ethidium bromide 1% agarose gel 觀察 mRNA 的變化。

2-7、細胞核萃取物的製備和 NF- κ B DNA binding activity

將細胞種在 1.5 ml 的試管中, 加藥反應適當時間後, 以 2000 rpm 離心 3 分鐘, 吸去上清液, 然後以 PBS 清洗細胞。接著將細胞混合在 30 μ l buffer A (10 mM HEPES, pH7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT and 0.2 mM PMSF), 震盪 15 秒, 靜置冰上反應 10 分鐘, 2000 rpm 離心 2 分鐘, 底部 pellet 重新混合在 buffer C 中 (20 mM HEPES, 25% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF), 靜置冰上反應 30 分鐘, 14000 rpm 離心 2 分鐘, 收集上清液即為細胞核萃取物。之後, 取 2 μ g 的細胞核萃取物以 NF- κ B DNA binding assay kits (TransAM NF κ B, Active Motif) 的廠商步驟來測定其和 DNA 結合的能力。

2-8、免疫沈澱法測定 IKK 及 ROCK 激酶的活性

將細胞培養在 6 cm dishes 上, 加入刺激劑, 反應所欲測試時間後, 以冰冷的 PBS 清洗兩次, 以 lysis buffer (含有 50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1 mM EDT, pH 7.4, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml aprotinin, 20 mM β -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate) 將細胞刮下, 置於冰上 30 分鐘後, 以 14,000 x g 離心 30 分鐘, 除去胞器及細胞殘骸。將上清液取出, 每管樣品加入 IKK α/β 或是 ROCK 抗體 5 μ l, 蛋白 A/G-agarose beads 15 μ l (Santa Cruz), 於 4°C 狀態下震搖 24 小時, 之後將樣品取下以 8,000 x g 離心 10 秒鐘, 吸走上清液, 以 lysis buffer 清洗兩次。每管先保留 1/2 的樣品, 以進行西方點墨法, 偵測 IKK α/β 或是 ROCK 的含量是否均等。剩餘的 1/2 樣品再以 1X kinase buffer 清洗一次, 之後加入含有 25 mM HEPES, 20 mM MgCl₂, 100 μ M Na₃VO₄, 2 mM DTT, 25 μ M ATP, 3 μ Ci [γ -³²P]ATP, 受質 (1 μ g GST-I κ B 或 MYPT-1) 的 kinase buffer, 每支 20 μ l, 於 37°C 下反應 30 分鐘, 反應結束以 5X Laemmli sample buffer 終止反應, 加熱煮沸 5 分鐘, 置冷, 離心, 然後跑 12% SDS-PAGE, 之後將膠片取下以 gel dryer 加熱烘乾, 最後以 Hyperfilm 底片感應放射線來測量結果。

2-9、轉形作用(transformation) 和質體純化

將勝任細胞 (去細胞壁的大腸桿菌) 和含有 NF- κ B binding site DNA 的質體 (plasmid) --- pGL2-ELAM-Luc (κ B-Luc) 均勻混合, 使得質體可以結合到勝任細胞表面。再利用 heat shock 的方法, 因為加熱會導致細胞膜流動性增加的原理, 使

質體順利進入到勝任細胞中。待反應 30 分鐘後，將菌液塗在含有抗生素 ampicillin 的 agar plate 上，即可培養出含有 pGL2-ELAM-Luc 的大腸桿菌。因為 pGL2-ELAM-Luc 中含有對 ampicillin 具有抗藥性的 DNA 片段，因此可以成功在含有 ampicillin 的 agar plate 上長出來的菌，變是轉形成功的菌株。第二天，挑出成功轉形的菌，在 LB 培養液中大量培養。接著，我們利用 Quantagen 的 plasmid extraction kits 純化出大腸桿菌中的 pGL2-ELAM-Luc (κ B-Luc)。同樣步驟我們也純化出 iNOS-promoter-Luc 質體。

2-10、細胞轉染 (transfection) 和報告基因試驗 (reporter gene assay)

利用 Promega 公司的 TransFast transfectionTM reagent 來進行 transfection，把質體送入血管平滑肌細胞中。首先將 TransFast 和 pGL2-ELAM-Luc 或 iNOS-promoter-Luc 與 β -galactosidase expression vector (pCR31lacZ; Pharmacia, Sweden) 一起依廠商的步驟混合，再到前一天已經種好 5×10^5 cells/well 的 12 well plate 中，在 37°C 的條件和細胞反應 1 小時，再將每一個 well 加入 1 ml 的 DMEM，置入培養箱中培養。第二天再移去 well 中的溶液，更換成新鮮的 DMEM，之後加藥處理細胞。六小時後，將 medium 移除並用 PBS 清洗一次，然後加入 50 μ l 的 reporter lysis buffer (Promega) 將細胞刮下來。離心 13000 rpm 30 秒後，取 5 μ l 的上清液到黑色閉光的 96-well plate 中，之後每個 well 都加入 50 μ l 的 luciferase substrate (Promega)，利用冷光讀盤儀測定其 luciferase 的活性。而所得到的 luciferase activity 的值，會用 β -galactosidase 的表現量作為標準化的依據。

2-11、基因微陣列分析(Microarray)

加入藥物處理反應 10 小時後，利用 RNazol B reagent 收集總量 RNA，再利用 MessageAmpTM aRNA Kit (Ambion[®]) 並依照其說明書指示操作以合成並純化 antisense RNA (aRNA)，經過反轉錄反應之後，合成單股 cDNA probe，並將 aRNA 破壞去除。將上述獲得的 cDNA 純化之後，以 3-amino-3-deoxydigoxigenin-9-dUPT 標記，雜交 (hybridization) 至事先點上老鼠 6144 個基因的基因微陣列薄膜 (microarray membrane)，清洗後，開始進行呈色反應：我們所使用的是 Diogoxigenin 與 anti-DIG-AP 系統。

為測量基因表現的程度，顯色薄膜須先轉為數位影像，利用 UMAX scanner 將雜交呈色後所得的薄膜掃描成圖片檔，再利用 GenePix2(Axon2) 這軟體將每一呈色點定量，並對應至其相對位置的基因資料，運用 Excel 將定量好的數值篩選(以排除誤差)、運算(為了將各時間點之間的差異性縮小，我們將過大或過小的數值向中心趨近)之後，使用 Cluster(史丹佛大學所發展)挑選出差異性大的基因(各組數值內的最大與最小值差異在至少 2 倍以上)，並將之標準化(normalization)後，再用 Gene Cluster 1.0(麻省理工學院所發展)將各組數值作圖並分組。利用 NIH-DAVID 此免費軟體找出上述所挑選出差異性大基因的生理功能及其於訊息傳導路徑中的定位，以進一步做結果的分析。

2-12、MTT 測定

將細胞養在 96-well plate中，待細胞長滿後，加入 5 mg/ml 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5 -diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) solution 培養一小時，此時粒線體中琥珀酸去氫酶會將 MTT之 tetrazolium 轉為藍色之產物 MTT formazan，並堆積在細胞內，且 formazan 形成量與粒線體去氫酶活性呈正比。之後吸乾上清液，加入 DMSO 溶解 MTT formazan，再測定吸光值(OD₅₅₀-OD₆₃₀)。因為 MTT 的測定值代表粒線體的活性，因此可間接作為細胞存活率的指標。

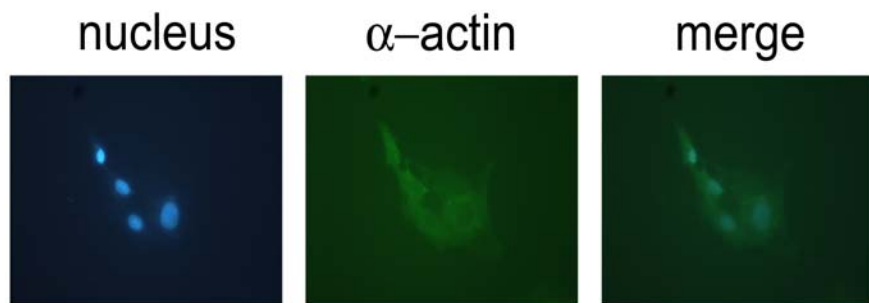
2-13、資料分析

所有資料皆以平均值±標準誤差 (mean ± S.E.M.) 表示，統計資料以 Student's t-test 分析是否為有意義差異，*p<0.05 為有顯著差異。

三、研究結果與討論

1、血管平滑肌細胞型態及純度鑑定

實驗中所使用的血管平滑肌細胞，因為是初級細胞培養，為了解我們所得到的細胞中，是否為血管平滑肌細胞或是雜有其他的細胞，我們利用血管平滑肌細胞特有的 marker， α -actin，來鑑定初級細胞的型態和純度。我們同時也使用 hochechst 33328 來染細胞核。從螢光顯微鏡的圖中可以清楚的看見，被 hochechst 33328 染到的細胞核呈現出藍色，而 α -actin 則呈現出綠色，將兩張圖合併在一起，可以發現幾乎所有的細胞都含有 α -actin。在本次實驗用的多批細胞中，每一批的純度都大於 98%。



綠色的部分是染血管平滑肌細胞特有的 marker-- α -actin (圖中)，藍色的部分是染細胞核(圖左)，而圖右則是前兩圖的合併。這三張圖都是相同的細胞。可清楚看出幾乎所有的細胞都是血管平滑肌細胞。

2、Statin 抑制 LPS 所促進的 NO 及 iNOS 表現，但是會促進 IL-1 β 所誘發的 NO 及 iNOS 表現

首先我們先確定 LPS、IL-1 β 和 IFN- γ 促進動脈平滑肌細胞生成 NO 的能力。利用 Griess reaction，測量培養液中 nitrite 的含量來代表細胞釋放 NO 的能力，結果發現 (圖 1)，LPS (10 μ g/ml) 處理 24 小時後有明顯 nitrite 的產生。相較於 LPS 產生的 3.5 倍刺激 nitrite 產生作用，IL-1 β (10 ng/ml) 之反應較弱，約只增加 2.3 倍。IFN- γ 本身並不會誘使血管平滑肌細胞產生 nitrite，但是當 IFN- γ 和 LPS 合用時卻可顯著加強 LPS 的作用，使 nitrite 的生成量達 9 倍之多。結果顯示 IFN- γ 並不會去影響 IL-1 β 的 nitrite 產生量。

Statin 本身不會促使平滑肌細胞產生 nitrite，但是前處理 statin 30 分鐘，再給予 LPS (10 μ g/ml)，發現平滑肌細胞的 nitrite 生成會受到抑制。從圖 2A 中發現，不同的 statin 對 LPS 所誘發的抑制效果不同，其中，pravastatin 幾乎沒有抑制的能力，其餘 statin 的抑制能力則為：fluvastatin > lovastatin > atorvastatin。不論各種 statin 的抑制能力如何，都具有濃度正相關性 (dose-dependent) 的抑制作用，在 30 μ M 時效果最為顯著。fluvastatin 在 30 μ M 的濃度下可以將 nitrite 的釋放降低為對照組的 30%。

當 LPS 和 IFN- γ 合併使用時，亦可同樣看到 statin 抑制 nitrite 的結果 (圖 2B)。利用 Western blot 測定 iNOS 蛋白表現量也可看到 (圖 2C)，以 LPS 刺激所表現的 iNOS 會受到 lovastatin 及 fluvastatin 的抑制。IFN- γ 合併使用時，可增加 LPS 所誘導的 iNOS 蛋白表現，而此時 lovastatin 及 fluvastatin 對 iNOS 的抑制作用仍然存在。在上述這些藥物的處理狀況下，經 MTT assay 證實並不會影響血管平滑肌細胞的存活率 (結果未列出)。

同樣是 NO 的促進劑，IL-1 β 和 statin 合用時反而有相反的結果 (圖 3A) 在 IL-1 β 的刺激下， statin 反而會促進 NO 的表現。前處理 statin 30 分鐘，使 IL-1 β 誘發的 NO 生成更為增加，而且濃度越高效果越明顯。在四種 statin 中，促進的效果依舊是 fluvastatin > lovastatin > atorvastatin > pravastatin，雖然 pravastatin 也對 IL-1 β 有促進的效果，但是要在高濃度 (100 μ M) 下才有效果。此外，statin 加強 IL-1 β 促使 NO 釋放的作用在 IFN- γ 合用時仍然存在 (圖 3B)。利用 Western blot 測定 iNOS 蛋白表現量也可看到 (圖 3C)，以 IL-1 β 刺激所表現的 iNOS 會受到 lovastatin 及 fluvastatin 的促進。上述實驗，同樣經 MTT assay 證實 statin 在測試濃度下不會影響平滑肌細胞存活率。在上述實驗中，我們發現 30 μ M fluvastatin 的作用最顯著，故往後的實驗都選用 fluvastatin 做為代表。

3、對於 LPS 或 IL-1 β 所刺激的 iNOS 基因轉錄及 NF- κ B 活化，fluvastatin 具有不同的調節功能。

為了解 statin 調整 iNOS 蛋白表現作用是否與 iNOS 基因轉錄有關，我們進行 RT-PCR 實驗。圖 4A 顯示在無加藥處理或單獨加入 fluvastatin (30 μ M) 的血管平滑肌細胞都沒有 iNOS mRNA 的表現。單獨加入 LPS 或 IL-1 β 6 小時後可發現 iNOS mRNA 明顯增加。若再合併使用 fluvastatin，則分別是抑制及增強的作用。同樣地，利用 iNOS luciferase assay，圖 4B 顯示上述藥物處理對 iNOS promoter 的活性影響，與 RT-PCR 的結果相同。

接著在基因轉錄的實驗，藉由細胞轉染和 DNA binding activity 可以發現，在 NF- κ B 轉錄因子的活性上依然可見 statin 對於 LPS 和 IL-1 β 的訊息傳遞有相反的調控。首先在細胞轉染測定 κ B 報導基因活性實驗中，當我們以 LPS 或是 IL-1 β 來活化 κ B-Luc 的時候，fluvastatin 可以分別抑制及促進 κ B-Luc 的表現 (圖 5A)；而在 DNA binding activity 的實驗，我們發現 LPS 在加藥處理 1 小時後，對於 NF- κ B DNA binding activity 的促進效果最強，之後在加藥處理 3 或 6 小時後其能力略有減低。IL-1 β 對於 NF- κ B DNA binding activity 的促進效果則維持到 6 小時。但不論作用時間為 1, 3 或 6 小時，fluvastatin 依舊保有上述的特性，會抑制 LPS 所促發的 NF- κ B DNA binding activity，但增加 IL-1 β 所促進的 NF- κ B DNA binding activity (圖 5B)。綜合以上的實驗發現，statins 會以不同作用方式，分別去抑制或促進 LPS、IL-1 β 所誘導的 NO 表現，是因為 statins 會對這兩種刺激物活化的 NF- κ B DNA binding activity 和轉錄的能力有相反的作用所致。

4、ROCK 抑制劑可增強 IL-1 β 所誘發的 iNOS 表現，但卻不影響 LPS 的作用

有論文指出 ROCK 可抑制 IL-1 β 所引起 iNOS 表現增加，故我們使用 ROCK 抑制劑 Y27632。圖 6 結果顯示 Y27632 可以像 fluvastatin 一樣的增強 IL-1 β 所誘發的 NO 產生及 iNOS 的表現增加，且對 NO 產生的增強作用 Y27632 與 fluvastatin 並無相加成性。基於 statins 是 small G protein 的抑制劑(包括抑制 Rho-dependent ROCK)，故我們猜測 statins 增強 IL-1 β 所誘發的 iNOS 基因表現是經由抑制 ROCK。此外圖 6 結果也顯示 Y27632 無類似 fluvastatin 可抑制 LPS 誘發 NO 產生及 iNOS 表現的作用。故猜測 ROCK 相關的訊息傳導路徑在 LPS 及 IL-1 β 所引起的訊息傳導是扮演不同的作用，也因此 statins 在分別併用兩種刺激劑會產生不同結果。

5、ROCK 抑制劑經由不同的方式來調節 LPS 及 IL-1 β 所造成的 NF- κ B 活化

如圖 7A 所示，Y27632 不改變由 LPS 所活化的 κ B-luciferase activity，卻可增強由 IL-1 β 所活化的 κ B-luciferase activity。對於 NF- κ B subunit p65 的細胞核轉位 (為 NF- κ B 要與 DNA 結合進而驅動 gene promoter 的一重要步驟)，Y27632 亦有上述相同的結果 (圖 7B)。在 IKK 的 in vitro kinase assay 的實驗中，我們發現 Y27632 只能增強 IL-1 β 所引起的 IKK 活化，對 LPS 則無影響 (圖 7C)。

6、LPS 及 IL-1 β 會相反的調節 ROCK

上述 ROCK 抑制劑及 fluvastatin 的結果，讓我們猜測也許在血管平滑肌細胞中，LPS 及 IL-1 β 對於 ROCK 的活性調節是不同的。如圖 8 所示，在 ROCK kinase activity assay 中可以得知，血管平滑肌細胞中的 ROCK 是平常就持續在活化的狀態，但當單獨使用 fluvastatin 及 Y27632 時，都會抑制之。有趣的是，我們發現 LPS 會抑制 ROCK 的活性，但 IL-1 β 卻大量增加 ROCK 的活性，而在併用 fluvastatin 或 Y27632 的情形下，IL-1 β 的作用卻顯著減少，而 LPS 的抑制作用則仍然存在。

7、基因微陣列分析

fluvastatin (3, 10 μ M)處理細胞 10 小時後以基因微陣列分析發現，隨 fluvastatin 濃度增加而遞增 mRNA 的基因數目有 23 個，隨 fluvastatin 濃度增加而遞減 mRNA 的基因數目有 110 個。

8、討論

因為 statin 會抑制膽固醇的生成，具有良好的降血脂的作用，而且副作用相較於其他降血脂藥物為低，所以在冠心病、動脈硬化等和高血脂有關的疾病中，statins 都是臨床上倚重的藥物。Statin 降膽固醇的效果和劑量有關，適當劑量可降低總膽固醇及 LDL 膽固醇達 25-35%，另外可適當增加血中 HDL 濃度。最近的臨床試驗已證明，不論有冠狀動脈疾病的病人血中膽固醇有或沒有上升，statins 可降低他們發生缺

血性腦中風的機率將近 30%。Statin 具有抗粥狀動脈硬化及抗血栓形成的特性，可能是這類藥物可降低腦血管疾病的藥理基礎。此外，研究顯示 statin 穩定粥狀動脈硬化斑塊的機轉也是多方面的，其中包含降低巨噬細胞活化，減少 foam cell 的形成，降低 tissue factors 的表現，降低 cytokine 釋放，以及抑制平滑肌細胞增生和活化等作用。除了減少動脈硬化斑塊之大小外，statin 尚可減緩其破裂、出血、及血栓產生之機會。也有報導指出，statin 具有抗血小板凝集和促進血栓溶解等作用，因此可降低血栓之傾向。

平滑肌細胞在動脈硬化上扮演了相當重要的角色，其增殖、移行、inflammatory factors 和 collagens 的釋放，都加速了動脈硬化及其他新血管疾病的病程，因此我們很有興趣的來探討 statin 對於平滑肌細胞的影響，希望能因此更加了解 statins 在治療上的機轉。

在此篇實驗中，我們發現 statin 具有直接調控血管表現 iNOS 的作用。在正常的血管中，內皮細胞會表現 eNOS 而釋放 NO 使血管得以舒張，但是在動脈硬化發生的部位，該處血管的內皮細胞會受到損傷、甚至剝落，如此 eNOS 的保護作用就不見了，使得動脈收縮而血壓上升，此外，也會使血小板活化易形成血管栓塞 (thrombosis)，而且會引發發炎反應並且釋放細胞激素，例如 IL-1 β ，吸引免疫細胞黏附到血管上並且浸潤血管壁、促使平滑肌細胞增生及潛移。在我們的實驗中發現，當血管平滑肌細胞在受到細胞激素 IL-1 β 的刺激下，statin 會大量增加 IL-1 β 所誘發的 iNOS 表現，使血管平滑肌細胞可以放出更多 NO，以取代 eNOS 的角色來保護血管。這個結果顯示，statin 可以避免血管在受到傷害時過度收縮而血壓上升、抑制血小板的凝集和減少白血球黏附到血管上的機會而避免動脈硬化斑的形成。

當血管受到細菌感染時，例如敗血症，血管會受到細菌內毒素 LPS 的刺激，而使血管壁釋放過量的 NO，引發血壓降低及正常組織細胞死亡，甚至會發生敗血性休克及多重器官衰竭。有趣的是本篇實驗發現，statin 對 LPS 所誘發血管平滑肌細胞產生過量 NO 的情形，不同於對 IL-1 β 的結果，具有抑制的效果。此結果與過去我們在巨噬細胞 (macrophage) (Huang et al., 2002) 及其他學者在膠質細胞 (astrocyte) 及小神經膠質細胞 (microglia) (Pahan et al., 1997) 的發現一致。因此在不同細胞 statin 抑制 LPS 誘導 iNOS 表現的類似作用推測是具有生理意義的。因為在敗血症的情況下 LPS 已因產生大量的 NO 而導致休克組織傷害，因此降低 NO 合成對休克的病人是必要的治療對策。而 statin 可以降低各組織，包括血管，受到細菌感染時嚴重發炎反應的傷害，避免全身性發炎反應的產生。由對這兩種不同刺激物誘發 iNOS/NO 反應相反的結果，更加印證 statin 確實對不同心血管的疾病是有助益的。

在我們的實驗中也證實 statin 對於 LPS 和 IL-1 β 的訊息傳遞途徑的影響可能是不同的，因為 statin 會藉由抑制 NF- κ B 和 DNA binding activity 及轉錄活性來抑制 LPS 誘發過量 NO 產生；反之 statin 會促進 IL-1 β 引起的 NF- κ B 和 DNA binding activity 及轉錄活性來協同 IL-1 β 產生適量 NO，以達到舒張血壓及維持血液恆定的功效。依據過去報導 statin 抑制 LPS 引起 NF- κ B 活性主要是抑制 Ras 的作用。在此我們也不排除可能與抑制 Rac 有關。本實驗有趣的發現是 LPS 和 IL-1 β 調節 Rho 下游 ROCK 的訊息傳遞途徑是不同的作用。利用 ROCK 抑制劑，我們發現 ROCK 具有負向調節 IKK/NF- κ B 訊息傳遞的作用，LPS 因已減少此負向調節機制，

因此不再受 statin 對此訊息傳遞的影響。換言之，LPS經由 Rho/ROCK調節 IKK/NF- κ B的作用與statin的作用方向是一致的，因此 statin 顯現其抑制其他small G proteins (Ras, Rac)的作用而達到抑制 LPS 誘發 iNOS 的現象 (見圖9)。相反的，IL-1 β 可促進Rho 下游 ROCK的負向訊息調節途徑，因此產生較LPS低的NO反應來提供生理保護性所需的NO含量，而不像LPS因大量NO造成有害的病理現象。正因IL-1 β 此負向訊息調節途徑會受statin抑制，因此驗證本實驗的發現，即statin會增加IL-1 β 誘發 iNOS 的現象 (見圖9)。

從上述實驗結果可以發現，statin 可以藉由精密調節不同病理狀況下刺激劑誘發的 iNOS 及 NO 反應，來維持血管的平衡狀態及功能，並且減緩血管壁的發炎反應，以改善心血管疾病的病情，降低其病發的發生及致死率。因此，statin 在臨床治療上可以成為心血管疾病的一大利器。動脈硬化如同其他的心血管疾病一樣，都是由種種複雜的病因所致，而且大部分的患者都沒有明確的主因，因此他們的治療方法只能從緩和症狀下手。Statin 除了降血中脂肪的功能外，還有調節 NO 釋放的功效，可以有效且全方位的治療像動脈硬化這類的疾病。同時，我們也正朝由基因微陣列分析所發現的一些基因表現差異，著手探討 statin 可能對其他基因轉錄的調節作用，希望將來的持續研究有助於了解更多此類臨床有益藥物的作用機轉。另外實驗得知各種 statin 有不同的抗發炎效力，例如水溶性的 pravastatin 無太大影響 iNOS 的作用，此與其細胞膜通透性差有關。又像脂溶性的 statin 中以 fluvastatin 影響 iNOS 的作用最明顯，因此將來是否我們也可依病人的病情不同，而可予適當的 statin? 這是一個值得繼續探討的問題。例如，對於血脂正常但局部發炎情況嚴重的病人，我們可以選擇使用降血脂能力低但抗發炎能力強的 fluvastatin，而可以達到個人化給藥的設計。總結，對於 statin 的機制和其訊息傳遞的調控尚需更進一步的認識和研究，以期可以更好、更確實的使用 statins 來治療心血管疾病，並且可以利用 statin 的知識來開發更安全有效的新藥。

四、結論與應用

心血管疾病一直名列國人的十大死因，是致病率高且併發症複雜的疾病，因此在臨床治療上一直是相當棘手的問題。這次實驗所評估的藥物，statin，是膽固醇生成酵素 HMG-CoA reductase 的抑制劑，因而可以降低血中膽固醇，減少動脈病變發生的機率。在此篇實驗中，我們發現 statin具有調節血管中，NO供需平衡的能力，對於不同刺激物誘發的 iNOS 是藉由相異的調控方式，以維持最適量的 NO 來保護血管功能。這個相異的調控方式與刺激物本身的訊息傳遞有關，特別是在 ROCK 擔任的負向調節 IKK/NF- κ B 作用上。在我們闡述了過去未曾發現有關 IL-1 β 及 LPS 在血管平滑肌細胞上的訊息傳遞差異性後，使我們得以領略到訊息傳遞看似細微複雜，但又符合生理需求的奧妙之處。Statin 有許多新的臨床運用正漸漸受重視，因此更透徹明白 statin 多元性的作用，了解新的作用機制及所調節的基因功能後，相信應可貢獻於將來研發 statin 在心血管疾病方面的新用途。例如最近 statin 在缺血性中風病人的臨床試驗就極受重視。

五、參考文獻

- Chen, H., Ikeda, U., Shimpo, M., Ikeda, M., Minota, S. and Shimada, J. (2000) Fluvastatin upregulates inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 36: 923-928.
- Fukumoto, Y., Shimokawa, H., Kozai, T., Kadokami, T., Kuwata, K., Yonemitsu, Y., Kuga, T., Egashira, T., Sueishi, K. and Takeshita, A. (1997) Vasculoprotective role of inducible nitric oxide synthase at inflammatory coronary lesions induced by chronic treatment with interleukin-1 β in pigs in vivo. *Circulation* 96: 3104-3111.
- Glass, C.K. and Witztum, J.L. (2001) Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 104: 503-516.
- Hausding, M., Witteck, A., Rodriguez-Pascual, F., Von Eichel-Streiber, C., Forstermann, U. and Kleinert, H. (2000) Inhibition of small G proteins of the Rho family by statins or *Clostridium difficile* toxin B enhances cytokine-mediated induction of NO synthase II. *Br. J. Pharmacol.* 131: 553-561.
- Hecker, M., Cattaruzza, M. and Wadreas, A.H. (1999) Regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells. *Gen. Pharmacol.* 32: 9-16.
- Heitmeier, M.R., Scarim, A.L. and Corbett, J.A. (1999) Prolonged STAT1 activation is associated with interferon- γ priming for interleukin-1-induced inducible nitric-oxide synthase expression by islets of Langerhans. *J. Biol. Chem.* 274: 29266-29273.
- Huang, K.C., Chen, C.W., Chen, J.C. and Lin, W.W. (2003) HMG-CoA reductase inhibitors inhibit inducible nitric oxide synthase gene expression in macrophages. *J. Biomed Sci.* 10: 396-405.
- Ikeda, R., Shimpo, M., Ikeda, N., Minota, S. and Shimada, M. (2001) Lipophilic statins augment inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated cardiac myocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 38: 69-77.
- Kraynack, N.C., Corey, D.A., Elmer, H.L. and Kelley, T.J. (2002) Mechanisms of NOS2 regulation by Rho GTPase signaling in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 283: L604-661.
- Laufs, U. and Liao, J.K. (2000) Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends in Cardiovascular Medicine* 10: 143-148.
- Libby, P. (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 420: 868-874.
- Lloyd-Jones, D.M. and Bloch, K.D. (1996) The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu. Rev. Med.* 47: 365-375.
- Lowenstein, C.J., Alley, E.W., Raval, P., Snowman, A.M., Snyder, S.H., Russell, S.W. and Murphy, W.J. (1993) Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon γ and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9730-9734.
- Luoma, J.S. and Ylä-Herttuala, S. (1999) Expression of inducible nitric oxide synthase

in macrophages and smooth muscle cells in various types of human atherosclerotic lesions. *Virchows Arch.* 434: 561-568.

MacMicking, J., Xie, Q.W. and Nathan, C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 323-350.

Martin, E., Nathan, C. and Xie, Q.W. (1994) Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *J. Exp. Med.* 180: 977-984.

McFarlane, S.I., Muniyappa, R., Francisco, R., Sowers, J.R. (2002) Pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond, *J. Clin. Endo. Meta.* 87: 1451-1458.

Moncada, S., Palmer, R.M.J. and Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43:109-142.

Muniyappa, R., Xu, R., Ram, J.L. and Sowers, J.R. (2000) Inhibition of Rho protein stimulates iNOS expression in rat vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278: H1762-H1768.

Nathan C. (1997) Inducible nitric oxide synthesis: what difference does it make? *J. Clin. Invest.* 100: 2417-2423.

Pahan, K., Sheikh, F.G., Namboodiri, A.M. and Singh, I. (1997) Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *J. Clin. Invest.* 100: 2671-2679.

Rattan, R., Giri, S., Avtar, K. and Singh, I. (2003) Rho a negatively regulates cytokine-mediated inducible nitric oxide synthase expression in brain-derived transformed cell lines: negative regulation of IKK α . *Free Radic. Biol. Med.* 35: 1037-1050.

Rikitake, Y., Hirata, K., Kawashima, S., Akita, H. and Yokoyama, M. (1998) Inhibitory effect of inducible type nitric oxide synthase on oxidative modification of low density lipoprotein by vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 136: 51-57.

Tanner, F.C., Meier, P., Greutert, H., Champion, C., Nabel, E.G. and Lüscher, T.F. (2000) Nitric oxide modulates expression of cell cycle regulatory proteins: a cytostatic strategy for inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation.* 101: 1982-1989.

Werner, N., Nickenig, G. and Laufs, U. (2002) Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Basic Res. Cardiol.* 97: 105-116.

Yamamoto, T., Takeda, K., Harada, S., Nakata, T., Azuma, A., Sasaki, S. and Nakagawa, M. (2003) HMG-CoA reductase inhibitor enhances inducible nitric oxide synthase expression in rat vascular smooth muscle cells; involvement of the Rho/Rho kinase pathway. *Atherosclerosis* 166: 213-222.

Yan, Z.Q., Yokota, T., Zhang, W. and Hansson, G.K. (1996) Expression of inducible nitric oxide synthase inhibits platelet adhesion and restores blood flow in the injured artery. *Circ. Res.* 79: 38-44.

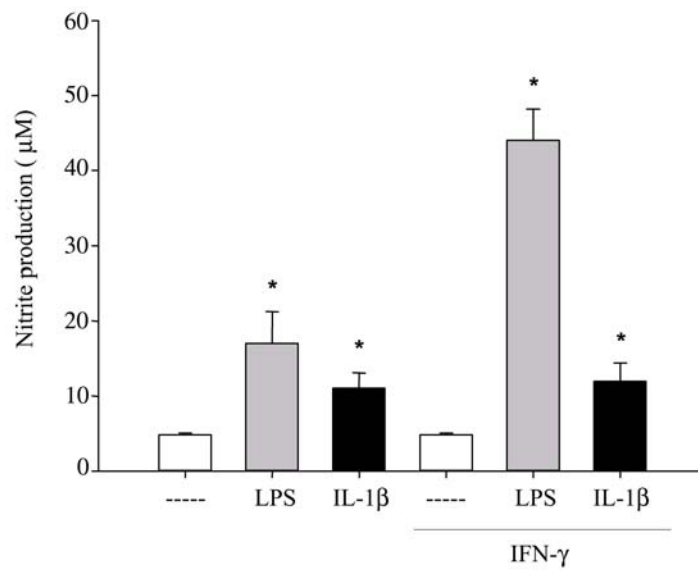


圖 1. LPS, IL-1 β 和 IFN- γ 刺激大鼠血管平滑肌細胞產生 nitrite

以 LPS (10 $\mu\text{g/ml}$), IL-1 β (10 ng/ml)或和 IFN- γ (10 ng/ml)合用, 處理大鼠血管平滑肌細胞 24 小時可刺激血管平滑肌細胞產生 nitrite。

*表示 nitrite 釋放與對照組(vehicle 處理組)相較在統計上有意義的差別。

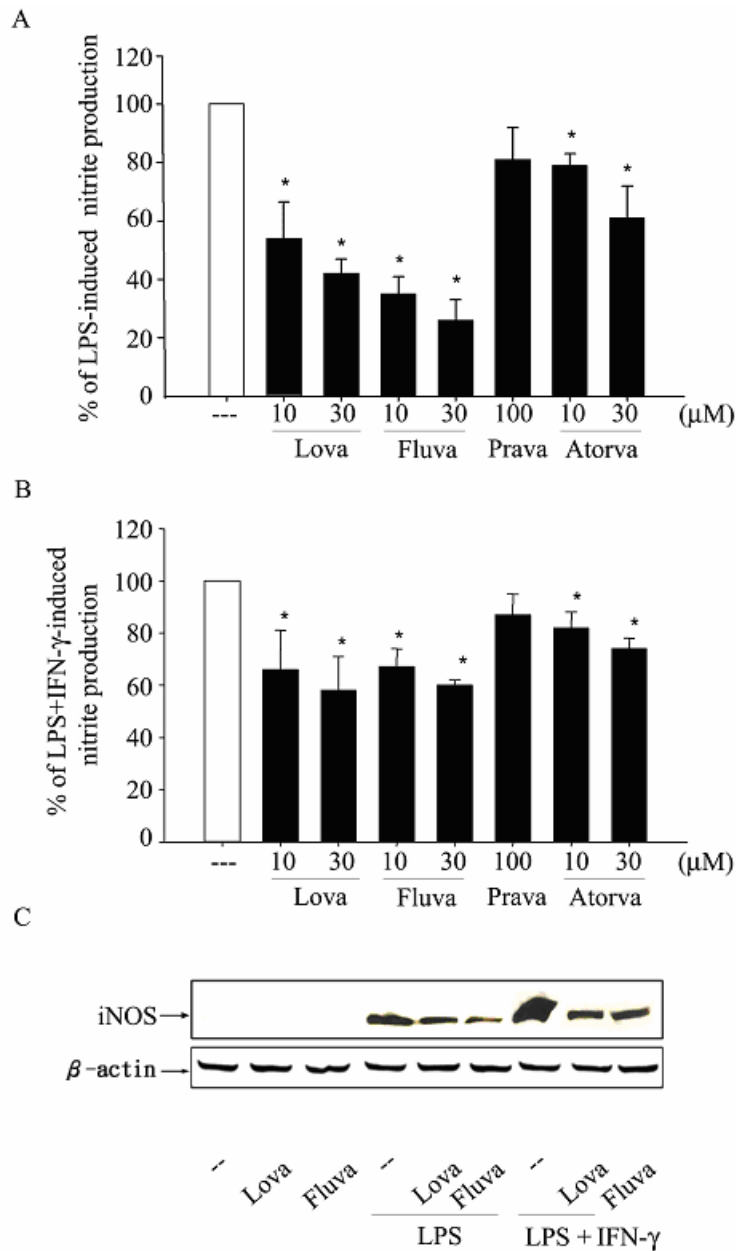


圖 2. STATIN 抑制 LPS 和 IFN- γ 誘發細胞釋放 nitrite 及合成 iNOS 蛋白

- 2A. 將大鼠血管平滑肌細胞前處理 STATIN 30 分鐘，再給予 LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) 24 小時，看不同 STATIN 抑制 LPS 所誘發細胞釋放 nitrite 的能力。
- 2B. 將大鼠血管平滑肌細胞前處理 STATIN 30 分鐘，再給予 LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) 和 IFN- γ (10 ng/ml) 24 小時，看不同 STATIN 抑制 LPS/IFN- γ 所誘發細胞釋放 nitrite 的能力。
- 2C. 以 LPS (10 $\mu\text{g/ml}$), IFN- γ (10 ng/ml), lovastatin (30 μM) 或 fluvastatin (30 μM) 處理大鼠血管平滑肌細胞 24 小時，再以西方點墨法偵測 iNOS 的表現。以 β -actin 的表現量作為 internal control 的依據。本圖代表經重複三次實驗後類似的結果。
- *表示 nitrite 釋放與對照組(vehicle 處理組)相較在統計上有意義的差別。

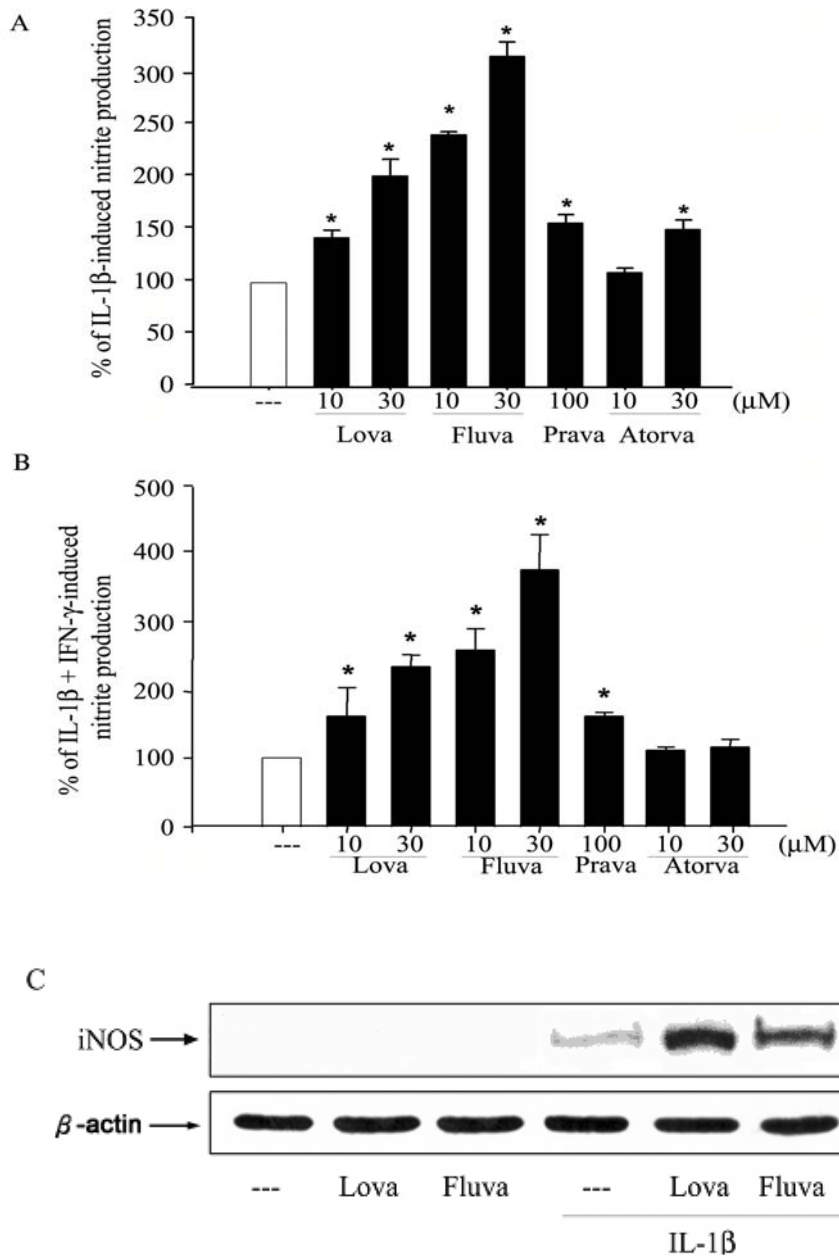


圖 3. STATIN 促進 IL-1 β 誘發細胞釋放 nitrite 及合成 iNOS 蛋白

- 3A. 將大鼠血管平滑肌細胞前處理 STATIN 30 分鐘, 再給予 IL-1 β (10 ng/ml) 24 小時, 看不同 STATIN 促進 IL-1 β 所誘發細胞釋放 nitrite 的能力。
- 3B. 將大鼠血管平滑肌細胞前處理 STATIN 30 分鐘, 再給予 IL-1 β (10 ng/ml) 和 IFN- γ (10 ng/ml) 24 小時, 看不同 STATIN 促進 IL-1 β 所誘發細胞釋放 nitrite 的能力。
- 3C. 以 IL-1 β (10 ng/ml), lovastatin (30 μ M) 或 fluvastatin (30 μ M) 處理大鼠血管平滑肌細胞 24 小時, 再以西方點墨法偵測 iNOS 的表現。以 β -actin 的表現量作為 internal control 的依據。本圖代表經重複三次實驗後類似的結果。
- *表示 nitrite 釋放與對照組(vehicle 處理組)相較在統計上有意義的差別

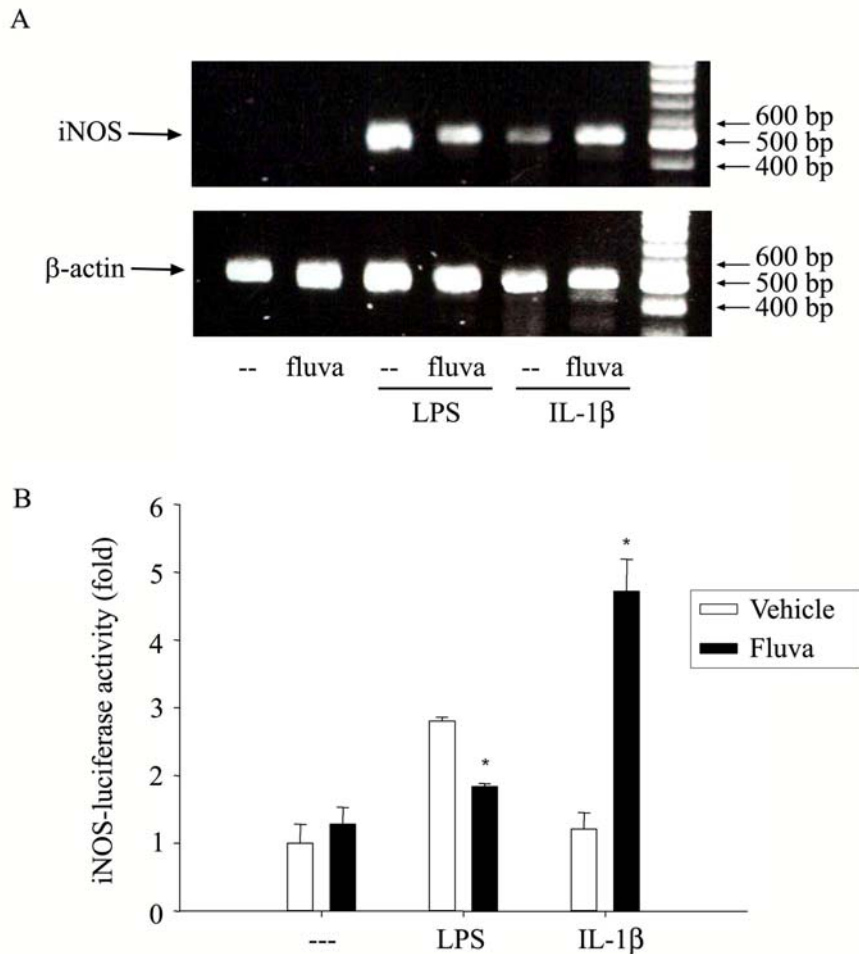


Fig. 4. STATIN 對 LPS 及 IL-1 β 誘導 iNOS 基因表現的影響

- 4A. 大鼠血管平滑肌細胞前處理 fluvastatin (30 μ M) 30 分鐘後給予 LPS (10 μ g/ml) 或 IL-1 β (10 ng/ml) 6 小時, 再以 RT-PCR 測定 iNOS mRNA 的表現量。以 β -actin mRNA 的表現量作為 internal control 的依據。本圖代表經重複三次實驗後類似的結果。
- 4B. 將已轉染 iNOS promoter 載體的大鼠血管平滑肌細胞前處理 fluvastatin (30 μ M) 30 分鐘, 再給予 LPS (10 μ g/ml) 或 IL-1 β (10 ng/ml) 6 小時。之後以 β -luciferase/galactosidase 活性來代表 iNOS 基因啓動的能力。*表示 fluvastatin 在統計上有意義影響 LPS 或 IL-1 β 的作用。

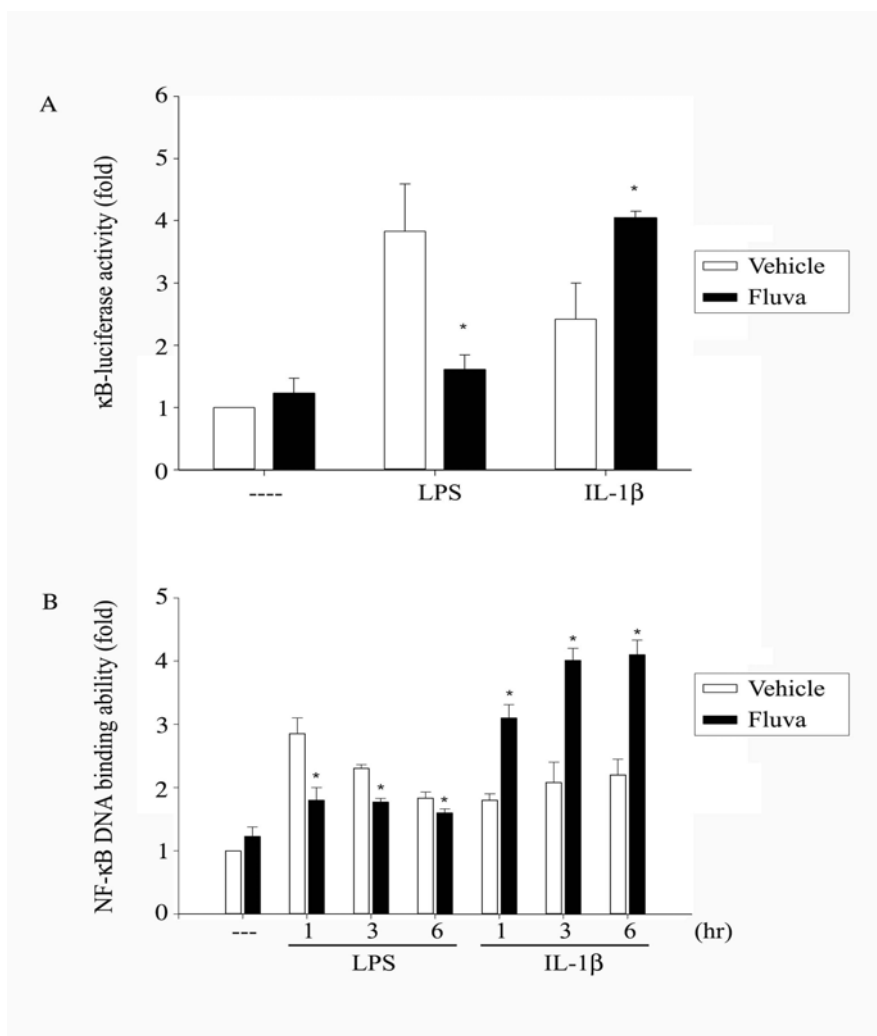


Fig. 5. STATIN 對 LPS 及 IL-1β 誘導 NF-κB 活化的影響

- 5A. 將已轉染 κB reporter 載體的大鼠血管平滑肌細胞前處理 fluvastatin (30 μM) 30 分鐘, 再給予 LPS (10 μg/ml) 或 IL-1β (10 ng/ml) 6 小時。之後以 β-luciferase/galactosidase 活性的比值來代表 NF-κB 的活性。*表示 fluvastatin 在統計上有意義影響 LPS 或 IL-1β 的作用。
- 5B. 將大鼠血管平滑肌細胞前處理 fluvastatin (30 μM) 30 分鐘, 再給予 LPS (10 μg/ml) 或 IL-1β (10 ng/ml) 不同時間 (1, 3, 6 小時)。製備細胞核蛋白後以等量利用 TransAM kits 測定與 DNA 結合的程度來反映 NF-κB 的活性。*表示 fluvastatin 在統計上有意義影響 LPS 或 IL-1β 的作用。

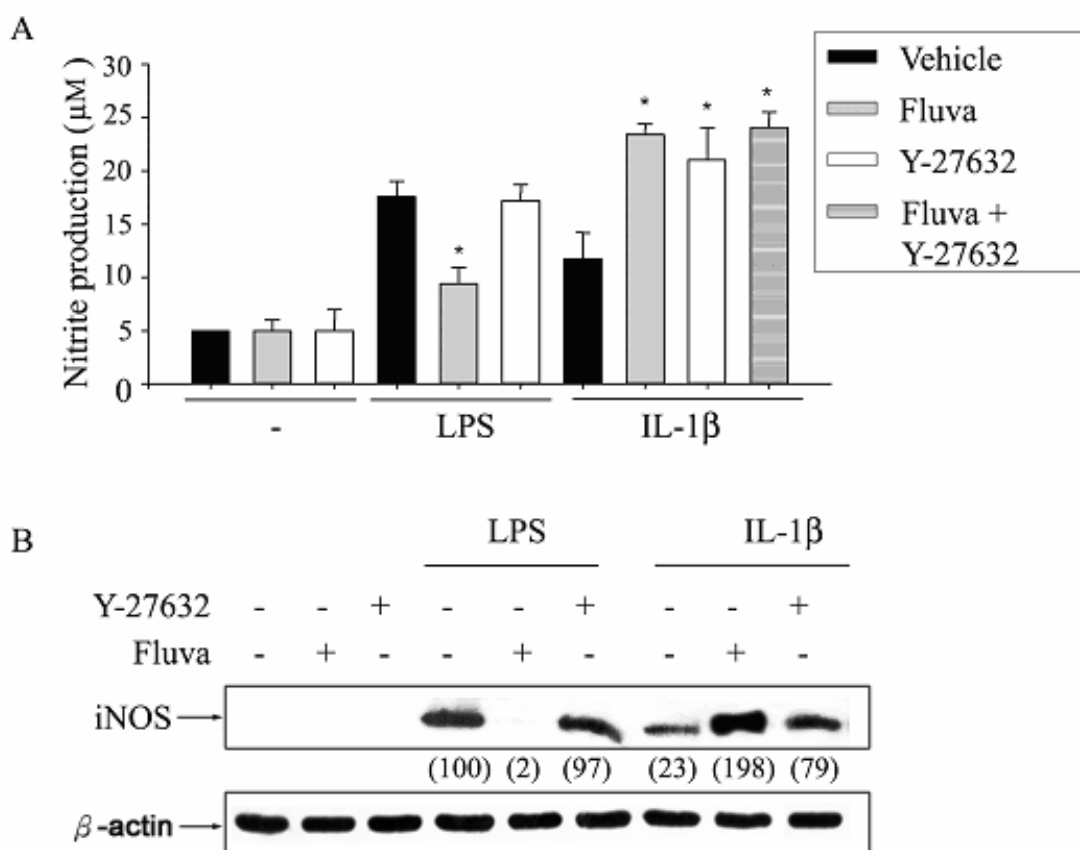


Fig. 6. Y-27632 對 LPS 及 IL-1β 誘發細胞釋放 nitrite 及合成 iNOS 的影響

6A. 將大鼠血管平滑肌細胞前處理 fluvastatin (30 µM) 或 Y-27632 (10 µM) 30 分鐘, 再給予 LPS (10 µg/ml) 或 IL-1β (10 ng/ml) 24 小時。以 Griess reaction 測定 nitrite 的表現量。

*表示 fluvastatin 或 Y-27632 在統計上有意義影響 LPS 或 IL-1β 的作用。

6B. 同上處理細胞後以西方點墨法測定 iNOS 蛋白表現量。以 β-actin 的表現量作為 internal control 的依據。本圖代表經重複三次實驗後類似的結果。

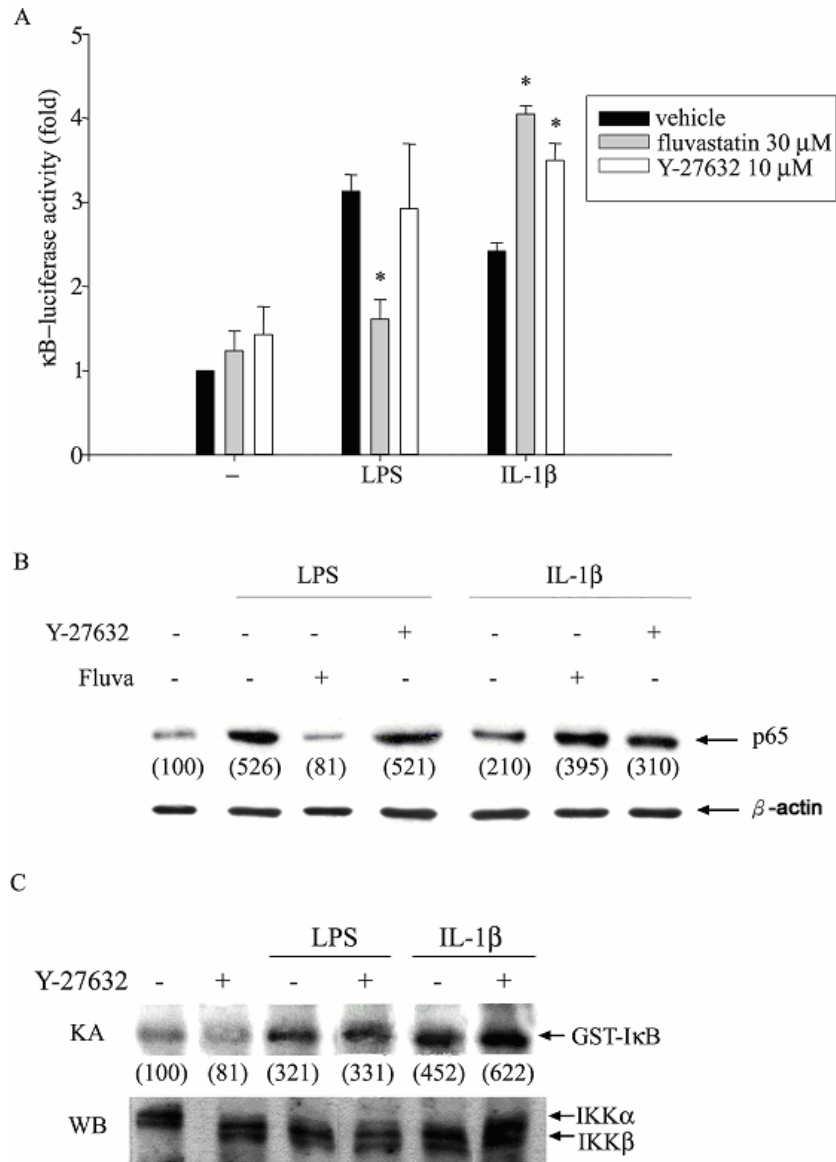


Fig. 7. Y-27632 及 fluvastatin 對 LPS 及 IL-1β 活化 NF-κB, p65 nuclear translocation 及 IKK 活性的影響

7A. 方法如 Fig. 5A 所述, 測定 fluvastatin (10 μM), Y-27632 (10 μM) 對 LPS (10 μg/ml) 或 IL-1β (10 ng/ml) 誘導κB-luciferase 的影響。*表示 fluvastatin 或 Y-27632 在統計上有意義影響 LPS 或 IL-1β的作用。

7B. 細胞處理 fluvastatin (10 μM), Y-27632 (10 μM) 30 分鐘後對 LPS (10 μg/ml) 或 IL-1β (10 ng/ml) 作用 1 小時後誘導 p65 轉移到細胞核中的影響。是以西方點墨法測定 p65 蛋白表現, 且以β-actin 的表現量作為 internal control 的依據。本圖代表經重複三次實驗後類似的結果。

7C. 同 Fig. 7B 處理細胞後, 以免疫沉澱法得到 IKK complex, 再以 kinase assay 測定 IKK 活性。同時取等量免疫沉澱物進行 IKKα, IKKβ 的蛋白量。本圖代表經重複三次實驗後類似的結果。

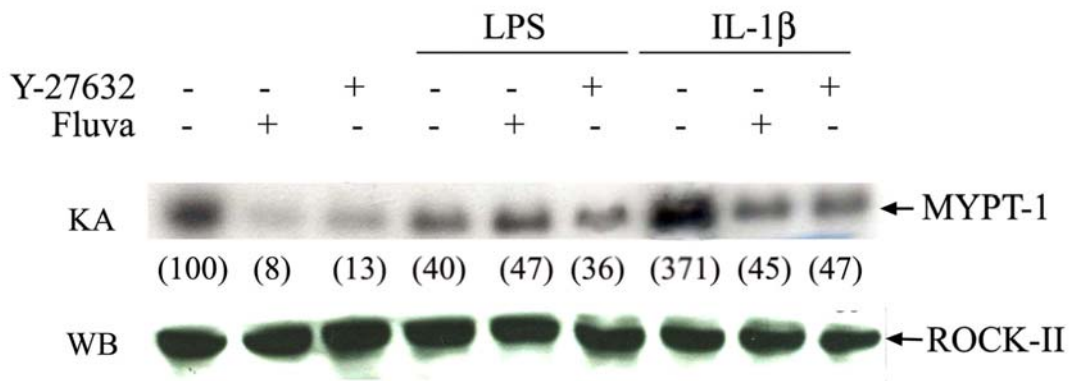


Fig. 8. Y-27632 及 fluvastatin 對 LPS 及 IL-1 β 影響 ROCK 活性的作用

細胞處理 fluvastatin (10 μ M), Y-27632 (10 μ M) 30 分鐘後以 LPS (10 μ g/ml) 或 IL-1 β (10 ng/ml) 作用 10 分鐘。以免疫沉澱法得到 ROCK, 再以 kinase assay 測定 ROCK 活性。同時取等量免疫沉澱物進行 immunoblot 測定 ROCK 的蛋白量。本圖代表經重複三次實驗後類似的結果。

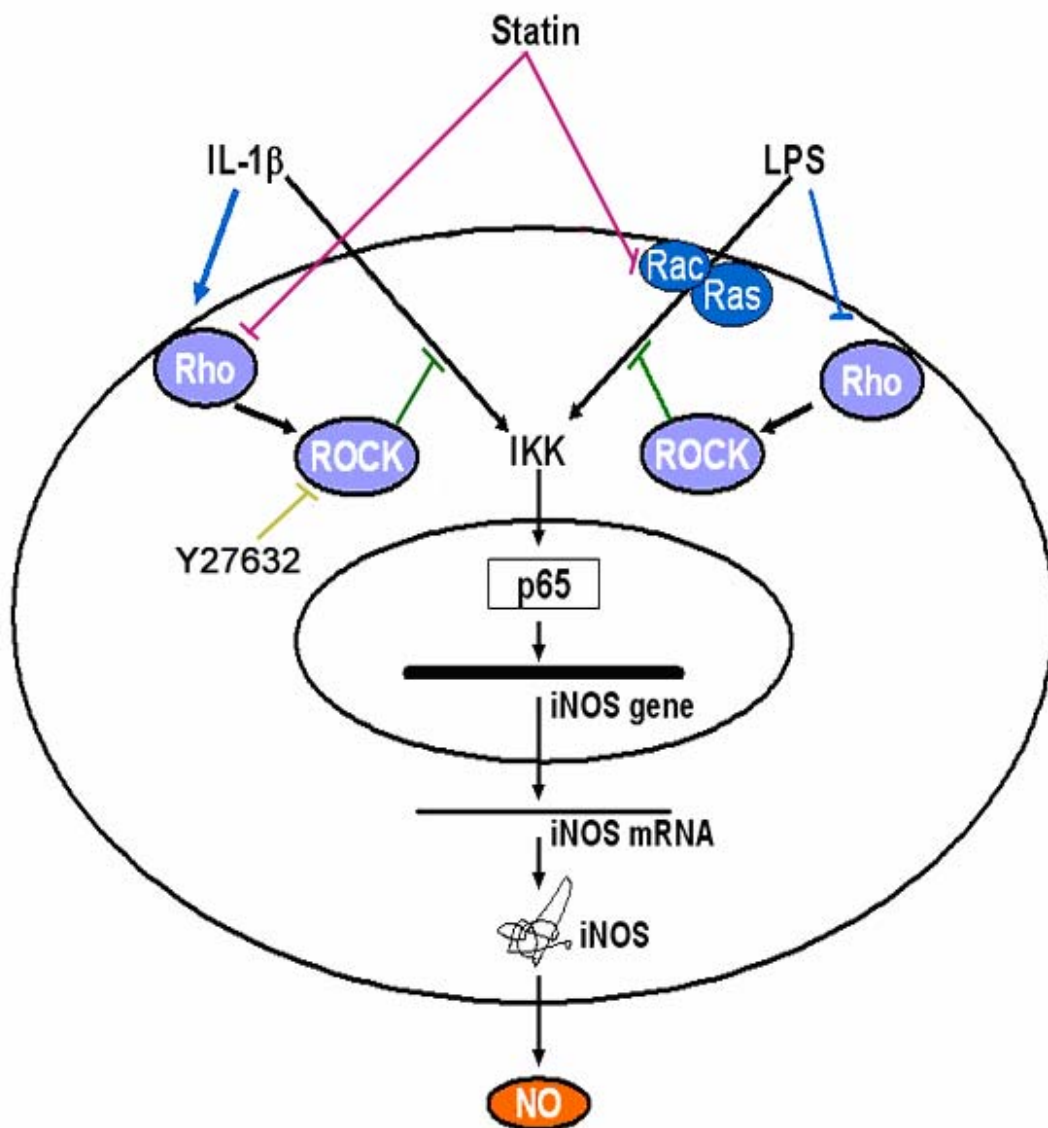


Fig. 9. STATIN 在血管平滑肌細胞抑制 LPS 誘導 iNOS/NO 表現，卻增加 IL-1 β 誘導 iNOS/NO 表現的作用機轉示意圖

實驗結果推測 Rho 蛋白的下游活化分子 ROCK 具有負向調控 IKK/NF- κ B 訊息傳遞的作用。此作用參與抑制 iNOS 基因轉錄, iNOS 蛋白表現及 NO 的合成。此外, Ras 或 Rac 相反的具有啓動 IKK/NF- κ B 訊息傳遞的作用。實驗結果顯示 IL-1 β 會活化 ROCK, LPS 卻會抑制 ROCK。STATIN 具有同時抑制 Rho, Ras, Rac 的作用, 因此會阻斷 IL-1 β 引起的負向調控機制而增加 NF- κ B-dependent iNOS 基因轉錄。相反的 STATIN 因抑制 LPS 引起的 Ras, Rac 而降低 NF- κ B-dependent iNOS 基因轉錄。