

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

亞砷酸鈉及過氧化氫造成人類臍靜脈內皮細胞蛋白質羰基
化:模式蛋白質及蛋白質體學探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2314-B-040-028-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系

計畫主持人：王祖興

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 24 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

(計畫名稱)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC94-2314-B-040-028

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

計畫主持人：王祖興

共同主持人：

計畫參與人員：林艾璇、張永聰

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

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

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學學系

中文摘要

工業污染及水源污染使人暴露於無機砷的環境，導致慢性砷中毒。流行病學研究證實慢性砷中毒與許多慢性疾病發生有關，其機轉與砷增加體內氧化壓力有關。活性氧造成胞內蛋白質氧化，改變蛋白質功能或影響訊號傳遞，使得細胞生理特性發生變化，最後產生病變。本實驗探討在亞砷酸鈉處理下，胞內蛋白質是否發生羰基化。人類臍靜脈內皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell) 分別以 0.5~50 μM 亞砷酸鈉、4 mM 過氧化氫處理 30 分鐘，再以二維電泳結合西方墨點法偵測羰基化蛋白質，經軟體比對及質譜儀序列分析，鑑定出參與醱解作用之酵素 α -Enolase、肌動蛋白結合蛋白質 Fascin 及中間絲

(intermediate filaments) 蛋白質 Vimentin 是亞砷酸鈉誘發羰基化之標的蛋白。進一步分析 Enolase 酵素活性變化並進行胞內 Fascin 與 Vimentin 染色觀察。結果顯示：亞砷酸鈉處理以劑量依賴關係造成 Enolase 酵素活性降低，在 50 μM 砷處理下，胞內 Fascin 分佈由規則絲狀轉變成不規則分散狀，細胞形態也從紡錘狀變成圓形，且延伸出許多突刺。因此，推測砷經由增加胞內氧化壓力，使得胞內 Enolase、Fascin 與 Vimentin 發生羰基化修飾作用，進而降低細胞內醱解反應進行，並影響細胞架構蛋白穩定性。

關鍵字：砷、蛋白質羰基化、二維電泳、Enolase、Fascin

英文摘要

The pollution of drinking water endanger people exposing to the inorganic arsenic that causes the chronic arsenic poisoning. Many epidemiologic studies have demonstrated that the chronic arsenic exposure is associated with increasing chronic diseases. People exposed to arsenic would induce ROS overload and result in protein oxidation. In this study, we examined the arsenite induced protein carbonylation and the functional effects of carbonylated proteins in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). By two-dimensional gel electrophoresis and matrix assist laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) analyzed methods, three of the arsenic-sensitive carbonylated proteins were identified as α -Enolase, Fascin and Vimentin. We examined further α -Enolase by enzyme activity assay. The results showed that arsenite decreased the Enolase activity in dose-dependent. In addition, we also observed that the arsenite would disturb the F-actin filament by carbonylation of Fascin. As these results, we suggest that the protein which was modified by arsenite would lead to protein carbonylation and further to effect physiological state of cells.

Keywords : arsenite、 carbonylation、 2D electrophoresis、 Enolase、 Fascin

報告內容

前言

自然環境中砷分為無機砷和有機砷兩大類，無機砷常見者三價及五價砷兩種，有機砷則以甲基化砷最多，如單甲基砷酸(monomethylarsinic acid)及雙甲基砷酸(dimethylarsinic acid)(Bertolero et al., 1987)。不同型態砷化合物其生物毒性有些不同，但目前的研究顯示不論有機或無機砷對哺乳動物均具有明顯的遺傳毒性(Gomez et al., 2005; Guillamet et al., 2004; Kligerman et al., 2003; Wang et al., 2002)。砷造成細胞毒性的原因複雜，造成細胞內含氧自由基增加在砷遺傳毒性中扮演重要角色(Del Razo et al., 2001)，細胞內氧化壓力增加，降造成細胞中要物質磷脂質、蛋白質及核酸的傷害，因而導致基因突變或細胞死亡(Hei et al., 1998; Lynn et al., 2000)。除增加細胞內氧化壓力增加外，砷會與蛋白質雙硫醇基行成強烈鍵結，進而抑制酵素活性，例如 DNA ligase，使 DNA 修補受阻(Lynn et al., 1997)，造成細胞遺傳毒性。除遺傳毒性外，砷暴露所引起的氧化傷害應直接或間接攻擊胞內重要蛋白質，並影響其活性其訊息連絡的生理功能，然而有關砷暴露對細胞蛋白質的氧化修飾作用的研究，目前仍無研究報導，因此本研究是以西方轉漬合併蛋白質體學分析，找尋砷處理在人類臍靜脈內皮細胞可能的蛋白質羰基化標的，並進一步驗證這些標的蛋白在砷遺傳毒性或細胞致毒性之意義。

研究目的

流行病學研究顯示砷暴露增加許多慢性疾病的盛行率，其分子機轉與砷增加體內氧化壓力有密切關係。活性氧物種(reactive oxygen species)造成胞內蛋白質氧化，改變蛋白質功能或影響訊號傳遞，使得細胞生理特性發生變化，最後產生病變。本實驗室先前研究發現參與醣解作用之酵素— α -Enolase 及肌動蛋白結合蛋白質—Fascin 是亞砷酸鈉誘發血管內皮細胞發生羰基作用之標的蛋白，但羰基化是否因此影響 α -Enolase 與 Fascin 的功能，則仍不清楚。因此，本研究進一步研究：(1)羰基化蛋白質功能性評估；(2)除 α -Enolase 與 Fascin 外，還有哪些血管內皮細胞蛋白質也可能是亞砷酸鈉誘發羰基化的標的。

文獻探討

砷是自然存在於地球表面土壤以及水中的元素，其豐富的藏量在所有元素的排名中佔第二十位，多數以硫化型態存在或結合在多種金屬礦中。砷及其化合物在自然環境中可因物理化學條件變化而轉變，就岩石中的硫化砷(arsenic sulfides)而言，岩石的風化作用可促使硫化砷轉變成三氧化二砷(arsenic trioxide)，接著進入土壤或溶解於雨水、河水或地下水，形成砷循環 (Mandal, 2002)。地殼中砷的含量估計約 1.8 mg/kg，自然的土體中，砷的平均濃度則為 5 mg/kg，海水中砷的平均濃度為 3 μ g/L，大氣中的砷主要來自土壤和植物體的釋出，估計每年從地表以蒸氣型態逸出至大氣中的砷，約有 2.37×10^7 kg (劉鎮宗, 1995)。除了自然分佈在環境中的砷外，工業和農業對砷化物的運用也增加了我們生活環境中的砷含量，因而也提高人類對砷的暴露風險。砷的主要污染源分別來自工業與農業，工業方面，主要來自冶金工業、電子業、紡織業、煉油工業、稀土金屬工業等排放的廢水及其他金屬礦場的沖出物；農業方面，則是因為大量及長期使用含砷農藥，砷因此進入土壤

並殘留，不但影響植物的生長，甚至發生毒害作用(王俊麟, 2002; 劉鎮宗, 1995)。人類接觸砷化物主要有兩大途徑：一是來自職業及工作場所的暴露，另一則是來自於受到砷污染的飲用水；其中，部份地區飲用水和灌溉水受到砷污染，對該地區數百萬生命造成不小威脅。

長期過量的砷進入人體後會引發慢性中毒，導致人類多種器官發生疾病，其中包括：(1) 癌症：皮膚癌、肺癌、肝癌、膀胱癌、前列腺癌，及腎癌等；(2) 皮膚病：皮膚炎，色素沉澱及皮膚角質化等；(3) 肝臟疾病：肝腫大及肝硬化；(4) 心臟血管疾病：最著名例子即是早期發生在台灣西南沿海地區的烏腳病，它被認為與該地區井水受到砷污染有關，因而導致末梢血管阻塞，其他與砷有關的心臟血管疾病，尚有粥狀動脈硬化、腦血管疾病、神經病變、糖尿病等慢性疾病(Buchet et al., 1984; Izquierdo-Vega et al., 2006; Jiang et al., 2002; Uddin et al., 2005)。砷致病致癌的可能原因有許多假說，包括：砷引起氧化緊迫、引起染色體異常、引起基因的增幅作用(gene amplification)、改變 DNA 修復功能(DNA repair)、改變生長因子、抑制 *p53* Gene、擴大細胞增殖、促進癌化(Kitchin, 2001)。雖然不少流行病學研究證實砷暴露是造成多種疾病發生的危險因子，但是確實的致病機制目前仍不清處，但砷暴露造成細胞氧化壓力增加是一重要的病因。

許多研究結果皆表示砷在細胞內的代謝過程中會生成 ROS 和 RNS，但是對於其生成機制仍未完全明瞭，目前被提出的可能原因包括(1)粒線體是產生 ROS 的主要來源之一：砷暴露增加電子傳遞鏈的過程裡電子從路徑中流失，而流失的電子直接把氧分子還原成超氧化物(Corsini et al., 1999)；Lynn 等人(2000)研究也顯示砷會活化哺乳動物細胞的 NADH oxidase 而產生超氧化物。(2)砷的代謝產物衍生而來：砷經由生物體代謝生成二甲基砷酸鹽(dimethylarsine)，在有氧環境下將和氧分子反應生成高活性的自由基產物 $(\text{CH}_3)_2\text{AsOO}\cdot$ (Yamanaka et al., 2001)；此過程同時也可能產生超氧陰離子(Yamanaka & Okada, 1994)。(3)砷物種使鐵蛋白釋出鐵，引起 Haber-Weiss reaction：甲基化的砷物種會使鐵蛋白釋出具氧化還原活性的鐵離子，游離鐵再促進 O_2^- 和 H_2O_2 轉換生成活性更高的氫氧自由基(Ahmad et al., 2000)。(4)三價砷轉變成五價砷過程中產生 H_2O_2 。另外也有報導指出，在低濃度($< 2 \mu\text{M}$, 48 h)無機砷處理下，砷可透過誘發 ROS 生成，活化 nuclear factor- κB (NF- κB)和 activator protein 1(AP-1) (Woo et al., 2004)，因此向上調節部份基因表現，包括 glutathione S-transferase Pi (Liu et al., 2001a)、熱休克蛋白、heme oxygenase-1 (Del Razo et al., 2001; Liu et al., 2001b)，以幫助細胞適應生理環境的變化；然而，在高濃度的狀況下($500 \mu\text{M}$, 處理 30 分鐘)，無機砷則會抑制 NF- κB 活化(Roussel & Barchowsky, 2000)，也會抑制細胞增殖並且誘發細胞凋亡(Felix et al., 2005)。

研究方法

細胞存活率試驗：將 6×10^4 人類臍帶靜脈內皮細胞種植於 24 孔盤中，培養 48 小時後，分別給予 0、0.5、5、50 μM 亞砷酸鈉或 4 mM 過氧化氫處理，處理時間為 0.5、4、8 或 24 小時。處理完畢後，以 PBS 清洗二次，加入 0.5 ml 含 MTT (0.5 mg/ml) 之 Medium-199 培養液，於 37°C 暗反應 3 小時，MTT 為一種水溶性、呈現黃色的 terazolium 鹽類，若與存活細胞粒線體中的去氫酶作用，其鹽類結構中的 terazolium ring 會被切斷，形成紫色非水溶性的 Formazan (1-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenylformazan)，移除

培養液，加入 0.5 ml isopropanol 後，會溶出紫色產物，震盪混勻，反應 10 分鐘，吸取並放入 eppendorf 微量離心管中，以 7000xg 離心 5 分鐘，取上層液 200 μ l，置於 96 well 中，讀取波長 570 nm 吸光值。所得吸光值與對照組比較，即可求得相對存活率。

免疫沉澱法：將各樣品蛋白質濃度調整為 1 μ g/ μ l，取 300 μ l，加入 1.5 μ l 抗體 (200:1)，於 4°C 下反應 6 小時，再加入 15 μ l 0.1mg/ml Protein A Sepharose，溫和地混合均勻，於 4°C 下反應一小時，接著以 13,200 xg 離心 10 分鐘，吸除上清液，以 IP buffer 重複清洗四次，最後加入 20 μ l 2X sample buffer 混合均勻，以 95°C 煮沸 5 分鐘，冷卻之後即可進行電泳分析。

西方墨點法：利用標準迷你二維式蛋白質電泳方法，分離總細胞溶解液中各個蛋白質後，切取大小與膠片相等之 PVDF 膜，先以甲醇浸泡 3 分鐘再以去離子水泡 1 分鐘，隨後與大小相同之濾紙一起浸泡於轉漬緩衝液(含 80% 25 mM Tris-HCl/192 mM glycine 溶液與 20% methanol)中，依序將濾紙、PVDF 膜及膠體放入轉漬板上並將氣泡趕出，接上電源供應器後以 100 伏特通電 90 分鐘。電泳結束後，取下 PVDF 膜，先以 PBS 緩衝液清洗，接下來的步驟再依實驗目的區分為羰基化蛋白質分析與一般蛋白質表現量分析。在分析羰基化蛋白質部份，PVDF 膜先與 10 mM DNPH 反應 15 分鐘，之後以 2N HCl 清洗 3 次，每次 5 分鐘，100% 甲醇清洗 7 次，每次 5 分鐘，最後再以 PBST 緩衝液(PBS 含 0.05% Tween 20)清洗 5 分鐘，將 PVDF 膜置於 5% 脫脂牛奶/PBST 溶液中，室溫進行 2 小時的 blocking 反應，以 PBST 緩衝液清洗 5 分鐘後，將 HRP-labeled anti-dinitrophenyl antibody 加入 5% 脫脂牛奶/PBST 溶液中(1:1000 稀釋)，室溫下反應 90 分鐘，最後以 PBST 清洗 6 次，每次 5 分鐘，即可進行 ECL 影像擷取。在 Fascin, Actin 與 Vimentin 表現量分析部份，則是在轉印完成取出 PVDF 膜後，以 buffer A (含 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.3% Tween 20, pH 7.4) 清洗 3 次，每次 5 分鐘，再以 buffer B (含 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) 製備 5% 脫脂牛奶溶液，室溫下進行 2 小時 blocking 反應，再以 buffer A 清洗 2 次，每次 5 分鐘，之後置於以 buffer B 稀釋之一級抗體緩衝液中(fascin、vimentin:buffer B=1:500)，室溫反應 2 小時，以 buffer A 清洗 2 次，每次 5 分鐘，置入以 buffer B 稀釋之 Horseradish peroxidase-conjugated 二級抗體溶液中，室溫反應一小時後，以 buffer A 清洗 4 次，每次 5 分鐘，最後加入 Enhanced Luminol reagent (ECL kit) 呈色，利用冷光螢光數位分析系統 (LAS-1000, FUJIFILM) 定量蛋白質表現。二維蛋白質電泳圖譜影像擷取與比對分析二維蛋白質電泳圖譜影像擷取使用的儀器為冷光螢光數位分析系統及數位化影像處理系統 (Alpha Imager 2000)，影像比對分析使用的軟體為 PDQuest 7.4 版 2D analysis software (Bio-Rad)，可進行不同膠片的蛋白質圖譜比對以及蛋白質點的相對定量分析。

Enolase 活性分析：依 Pal-Bhowmick 等人(2004)之方法，蛋白質定量後，調整濃度為 1 μ g/ μ l，取 300 μ l 細胞質液，加入 700 μ l 受質反應液(50 mM Tris-HCl 含 1.1 mM PEP, 1.5 mM MgCl₂, pH 7.4)，利用細胞質液中 enolase 將受質 phosphoenolpyruvate (PEP) 轉變成 2-phosphoglycerate (2-PG)。PEP 可吸收波長 240 nm 的光，它在溶液中的濃度會與該波長的吸光值呈正比關係，因此以分光光度儀測定波長 240 nm 下 5 分鐘吸光值變化，即可換算 enolase 的比活性(μ mol/min/mg)。在本研究中 Enolase 活性分析以 phosphoenolpyruvate 作為受質，偵測 240 nm 之吸光值變化，所得之數據以 Beer-Lambert law: $A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} C l$ 計算。C 代表待測物濃度，l 代表待測物總體積， ϵ_{λ} ：為一比例常數 (proportionality constant)，稱為該化學物質在波長 λ 的 extinction

coefficient, 單位為 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$, 可經由實驗求得: 先配製不同濃度的化學物質, 在波長 λ 及固定寬度的石英管中, 測定吸光值, 即可依實驗所得的數據求得。由 PEP 濃度與吸光曲線(如下圖)求得 PEP 1.1 mM $\epsilon_{\lambda} = 0.708 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$, 因此將單位時間內吸光值變化代入公式, 經過換算即可求得酵素比活性。

結果與討論

人類臍靜脈內皮細胞分別以 0、0.5、5 和 50 μM 亞砷酸鈉或 4 mM 過氧化氫處理 30 分鐘之後, 以 MTT 測定細胞存活率。結果顯示: 所有處理劑量下的細胞存活率與對照組細胞存活率相較無顯著差異($p = 0.67$)(圖一)。以 Control 組的細胞存活率表示為 100%, 4 mM 過氧化氫、0.5、5 和 50 μM 亞砷酸鈉處理組之細胞存活率分別為 98、96、96 和 90%。若處理時間延長至 24 小時, 0.5 μM 亞砷酸鈉處理不影響細胞, 而 4 mM 過氧化氫或 50 μM 亞砷酸鈉處理組的細胞嚴重受影響, 存活率皆小於 10%。

臍靜脈內皮細胞分別以 0.5 和 5 μM 亞砷酸鈉或 4 mM 過氧化氫處理 30 分鐘, 收取細胞, 製備總細胞溶解物(cell lysates), 利用二維蛋白質電泳分析處理組與對照組細胞中蛋白質羰基化之差異。結果發現: 亞砷酸鈉或過氧化氫處理後, 皆能誘發各組細胞發生蛋白質羰基化作用(圖三); 比較亞砷酸鈉或過氧化氫誘發蛋白質羰基化的差異性, 過氧化氫造成的蛋白質羰基化程度最高(圖三 C), 然而, 亞砷酸鈉產生的效果則似乎是有選擇性, 因為, 亞砷酸鈉對某些蛋白質造成的羰基化程度明顯高於過氧化氫組細胞, 然而大多數蛋白質羰基化卻不如過氧化氫組(圖三 D、E)。利用 PDQuest 軟體分析差異性蛋白質表現, 以圖譜縱橫座標方式給予蛋白質點編號(圖二), 並予以比對分析、定量, 挑出 5 個處理前後產生差異性的蛋白質點(表一)。表一為差異性蛋白質點定量表, 目標鎖定比值高於 2 倍以上者, 表中顯示亞砷酸鈉處理下較具專一性的羰基化蛋白質點為 SSP-3503, 至於在過氧化氫或亞砷酸鈉處理下皆明顯增加羰基化的蛋白質點為 SSP-1404、3601、9301 及 9302。

本實驗室先前研究已鑑定出兩個易受砷處理誘發羰基化的蛋白質點, 分別是 Fascin (SSP-9301) 和 Enolase (SSP-9302), 本次實驗除了再次重現之前研究結果外, 並鑑定出一個易受砷誘發羰基化的蛋白質點, 編號為 SSP-1404(圖四)。酵素性水解後, 以 MALDI-TOF 質譜儀分析獲得蛋白質肽片段如圖五所示, 利用 MALDI-TOF 及 MS/MS 分析獲得各肽質荷比(m/z)的圖譜與質量數據, 進一步透過 Mascot 網站上做 peptide mass fingerprint 及 MS/MS Ion search 連結至 SWISS-PORT 資料庫進行比對(圖六), 蛋白質身分鑑定結果發現: SSP-1404 蛋白質點的身分為屬中間絲蛋白質之一的 Vimentin, 分子量為 53 kDa, pI 為 5.06。編號 SSP-3503、SSP-3601 之蛋白質點經由質譜儀分析鑑定次數不足三重複, 但是可能身份為 Protein disulfide-isomerase A3 和 Heat shock cognate 71 kDa protein。

細胞分別以亞砷酸鈉(0.5、5、50 μM)或過氧化氫(4 mM)處理 30 分鐘, 製備細胞溶解物(cell lysates), Enolase 酵素活性係利用細胞溶解物中的 enolase 將受質 phosphoenolpyruvate (PEP) 轉變成 2-phosphoglycerate (2-PG) 的程度表示之。結果顯示, 4 mM H_2O_2 和 50 μM 亞砷酸鈉處理組細胞 Enolase 活性明顯低於對照組細胞, 分別僅為對照組的 78.8% 及 56.3% (圖七), 亞砷酸鈉 5 μM 處理組的 Enolase 活性(90.8%)則略低於對照組, 而低濃度 0.5 μM 砷處理下的 Enolase 活性與對照組無顯著差異。

此實驗以 0.5 和 5 μM 亞砷酸鈉或 4 mM 過氧化氫處理細胞 30 分鐘，探討亞砷酸鈉與過氧化氫誘發細胞內羰基化蛋白質生成，並比較兩者間差異。結果發現 5 μM 亞砷酸鈉與 4 mM 過氧化氫處理之下，細胞內蛋白質羰基化程度均大於未處理組，過氧化氫誘發羰基化程度整體而言大於 5 μM 亞砷酸鈉處理組，然而 5 μM 砷處理組分子量約為 55 kD 處羰基化程度明顯高於 H_2O_2 組(圖八 A.)。由於 Fascin 和 Vimentin 分子量非常相近，因此利用免疫沉澱法分離 Fascin、Vimentin，並結合 Western blotting 偵測其羰基化程度，結果證實 5 μM 亞砷酸鈉或 4 mM H_2O_2 處理下確實會顯著增加羰基化程度。為避免 DNPH 抗體所測得羰基化蛋白質差異是因蛋白質總量的差異，另以免疫墨點法分析胞內 Fascin 和 Vimentin 蛋白質表現，結果顯示：胞內這兩種蛋白質表現量在亞砷酸鈉或過氧化氫處理組並無差異(圖八 B)。

HUVECs 在分別以 5 和 50 μM 亞砷酸鈉或 4 mM H_2O_2 處理 30 分鐘，以細胞螢光染色法觀察胞內 Fascin 分佈及細胞形態(圖九)。(A) Untreated 組的 Fascin 呈現絲狀分佈且細胞核周圍密度高，細胞形態完整，細胞邊緣有明顯的 Fascin 表現；(B) 4 mM H_2O_2 處理下，Fascin 均勻散佈在細胞內，無法清楚分辨細胞質與核，細胞形態皺縮呈細長狀；(C) 而 5 μM 亞砷酸鈉處理組，其 Fascin 雖然仍集中於細胞核周圍，但不呈現絲狀分佈，細胞形態偏圓，細胞大小與對照組相比稍小；(D) 50 μM 亞砷酸鈉處理下，Fascin 分散於細胞質，細胞形態偏圓且細胞邊緣無明顯的 Fascin 表現。HUVECs 以 50 μM 亞砷酸鈉處理 30 分鐘後，以細胞螢光雙染色法同時觀察胞內 Fascin 和 F-actin 分佈及細胞形態(圖十)。A、B 圖對照組的 Fascin 和 F-actin 呈現絲狀分佈且位置一致，細胞核周圍密度高，細胞形態完整；由 C、D 圖可以看到 50 μM 亞砷酸鈉處理下，Fascin 分散於細胞質且不見完整的絲狀 F-actin，細胞形態不完整。

參考文獻

- 劉鎮宗 (1995) 砷與生態環境的關係。科學月刊雜誌, 0302 期。
- 王俊麟 (2002) PAG蛋白質對三氧化二砷誘發急性前骨髓性白血癌細胞毒性之角色研究。(國立中央大學生命科學研究所碩士論文)
- 李叔蓮 (2004) 亞砷酸鈉誘發人類臍靜脈內皮細胞蛋白質羧基化及硝基化之探討: 二維電泳分析。(中山醫學大學營養科學研究所碩士論文)
- Ahmad, S., Kitchin, K. T., and Cullen, W. R. (2000). Arsenic species that cause release of iron from ferritin and generation of activated oxygen. *Arch Biochem Biophys* 382, 195-202.
- Bertolero, F., Pozzi, G., Sabbioni, E., and Saffiotti, U. (1987). Cellular uptake and metabolic reduction of pentavalent to trivalent arsenic as determinants of cytotoxicity and morphological transformation. *Carcinogenesis* 8, 803-808.
- Buchet, J. P., Geubel, A., Pauwels, S., Mahieu, P., and Lauwerys, R. (1984). The influence of liver disease on the methylation of arsenite in humans. *Arch Toxicol* 55, 151-154.
- Del Razo, L. M., Quintanilla-Vega, B., Brambila-Colombres, E., Calderon-Aranda, E. S., Manno, M., and Albores, A. (2001). Stress proteins induced by arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 177, 132-148.
- Gomez SE, del Razo LM, Munoz Sanchez JL. Induction of DNA damage by free radicals generated either by organic or inorganic arsenic (AsIII, MMAIII, and DMAIII) in cultures of B and T lymphocytes. *Biol Trace Elem Res.* 2005 Winter;108(1-3):115-26.
- Guillamet E, Creus A, Ponti J, Sabbioni E, Fortaner S, Marcos R. In vitro DNA damage by arsenic compounds in a human lymphoblastoid cell line (TK6) assessed by the alkaline Comet assay. *Mutagenesis.* 2004 Mar;19(2):129-35.
- Hei, T. K., Liu, S. X., and Waldren, C. (1998). Mutagenicity of arsenic in mammalian cells: role of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8103-8107.
- Izquierdo-Vega, J. A., Soto, C. A., Sanchez-Pena, L. C., De Vizcaya-Ruiz, A., and Del Razo, L. M. (2006). Diabetogenic effects and pancreatic oxidative damage in rats subchronically exposed to arsenite. *Toxicol Lett* 160, 135-142.
- Jiang, S. J., Lin, T. M., Wu, H. L., Han, H. S., and Shi, G. Y. (2002). Decrease of fibrinolytic activity in human endothelial cells by arsenite. *Thromb Res* 105, 55-62.
- Kitchin, K. T. (2001). Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* 172, 249-261.
- Kligerman AD, Doerr CL, Tennant AH, Harrington-Brock K, Allen JW, Winkfield E, Poorman-Allen P, Kundu B, Funasaka K, Roop BC, Mass MJ, DeMarini DM. Methylated trivalent arsenicals as candidate ultimate genotoxic forms of arsenic: induction of chromosomal mutations but not gene mutations. *Environ Mol Mutagen.* 2003;42(3):192-205.
- Liu, J., Chen, H., Miller, D. S., Saavedra, J. E., Keefer, L. K., Johnson, D. R., Klaassen, C. D., and Waalkes, M. P. (2001a). Overexpression of glutathione S-transferase II and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic. *Mol Pharmacol* 60, 302-309.
- Liu, J., Kadiiska, M. B., Liu, Y., Lu, T., Qu, W., and Waalkes, M. P. (2001b). Stress-related gene expression in mice treated with inorganic arsenicals. *Toxicol Sci* 61, 314-320.
- Lynn, S., Gurr, J. R., Lai, H. T., and Jan, K. Y. (2000). NADH oxidase activation is involved in arsenite-induced oxidative DNA damage in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 86, 514-519.
- Lynn, S., Lai, H. T., Gurr, J. R., and Jan, K. Y. (1997). Arsenite retards DNA break rejoining by inhibiting DNA ligation. *Mutagenesis* 12, 353-358.
- Roussel, R. R., and Barchowsky, A. (2000). Arsenic inhibits NF-kappaB-mediated gene transcription by blocking IkappaB kinase activity and IkappaBalpha phosphorylation and degradation. *Arch Biochem Biophys* 377, 204-212.
- Uddin, A. N., Burns, F. J., and Rossman, T. G. (2005). Vitamin E and organoselenium prevent the cocarcinogenic activity of arsenite with solar UVR in mouse skin. *Carcinogenesis* 26, 2179-2186.
- Wang TS, Chung CH, Wang AS, Bau DT, Samikkannu T, Jan KY, Cheng YM, Lee TC. Endonuclease III, formamidopyrimidine-DNA glycosylase,

- and proteinase K additively enhance arsenic-induced DNA strand breaks in human cells. *Chem Res Toxicol.* 2002 Oct;15(10):1254-8.
- Woo, S. H., Park, I. C., Park, M. J., An, S., Lee, H. C., Jin, H. O., Park, S. A., Cho, H., Lee, S. J., Gwak, H. S., *et al.* (2004). Arsenic trioxide sensitizes CD95/Fas-induced apoptosis through ROS-mediated upregulation of CD95/Fas by NF-kappaB activation. *Int J Cancer* 112, 596-606.
- Yamanaka, K., Mizol, M., Kato, K., Hasegawa, A., Nakano, M., and Okada, S. (2001). Oral administration of dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenic, in mice promotes skin tumorigenesis initiated by dimethylbenz(a)anthracene with or without ultraviolet B as a promoter. *Biol Pharm Bull* 24, 510-514.
- Yamanaka, K., and Okada, S. (1994). Induction of lung-specific DNA damage by metabolically methylated arsenics via the production of free radicals. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 3, 37-40.

計畫成果自評

本研究利用二維電泳合併西方墨點法，探討亞砷酸鈉在人類臍靜脈內皮細胞造成蛋白羰基化之圖譜，進而網羅砷可能進行氧化修飾之蛋白質，並確認 alpha-enolase 及 fascin 氧化修飾蛋白質在砷毒性之腳色與原計畫相符一致，研究成果與預期目標大體相近，但因砷造成細胞內蛋白質氧化修飾之標的很多，且不同實驗間之訊號出現不一致的情形，因此目前仍有一些砷可能的氧化標的蛋白質身份仍在確認中。

本研究主要發現包括：(1)亞砷酸鈉會誘發人類臍靜脈內皮細胞 Enolase、Fascin 和 Vimentin 蛋白質羰基化。(2)亞砷酸鈉以劑量依賴關係降低人類臍靜脈內皮細胞 Enolase 酵素活性。(3)亞砷酸鈉處理會造成人類臍靜脈內皮細胞胞內 Fascin 分佈異常，破壞細胞骨架穩定性，引起細胞形態改變。這些結果顯示：亞砷酸鈉處理造成 Enolase 酵素活性降低及 Fascin 分佈異常、細胞形態改變，可能是砷暴露造成慢性疾病致病過程之一。本研究透過蛋白質體探討砷毒性可能機制是一創新的研究方向，其成果對了解砷細胞毒性可提供一全面性的闡釋，對砷毒性之檢測與預防也有其應用價值，在期刊發表是非常合適的。

附圖

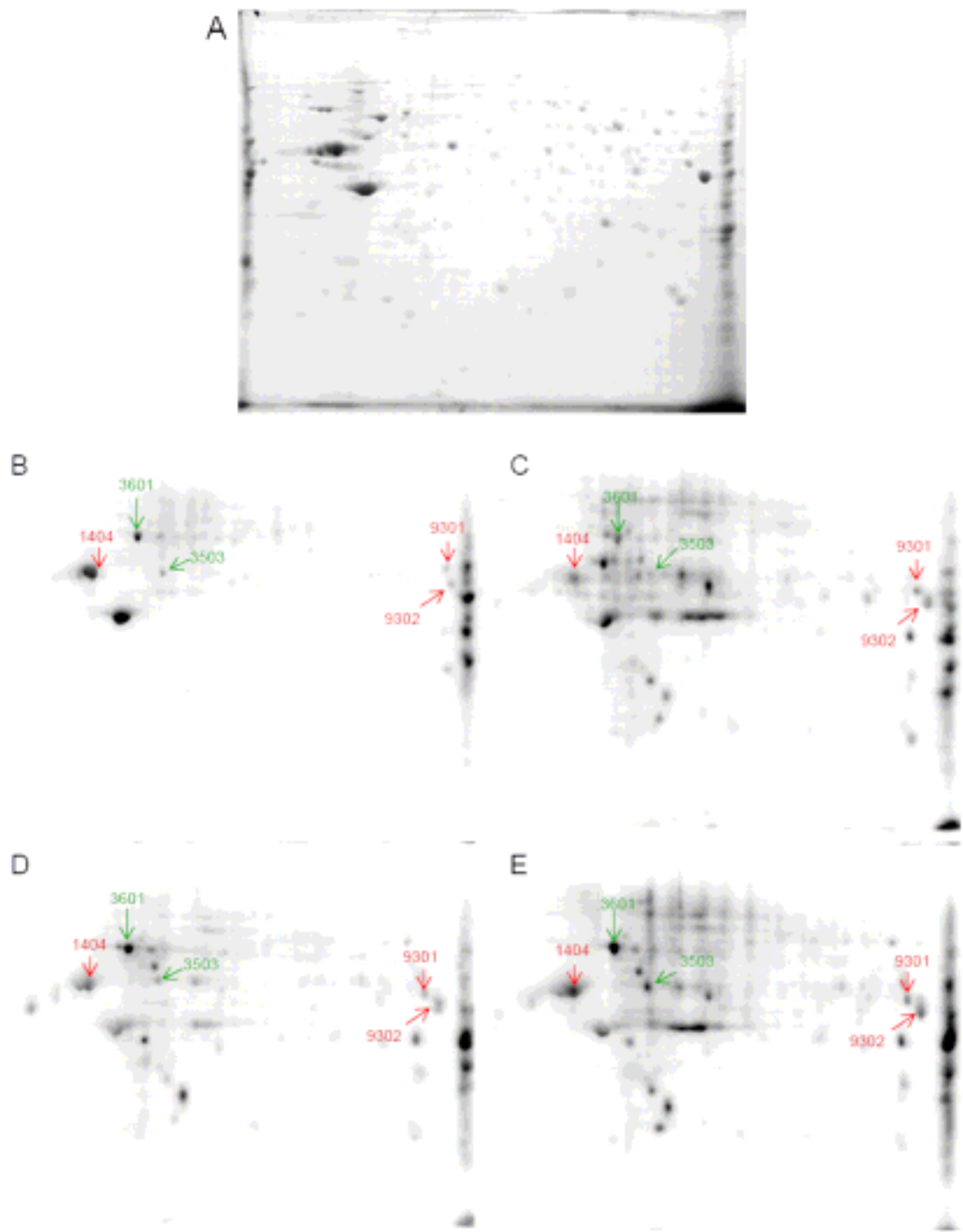
表一、差異性蛋白質點相對定量表

SSP	control	H ₂ O ₂	Ratio ^a	0.5 μ M As	Ratio ^a	5 μ M As	Ratio ^a	已鑑定身分
9301	90887 ^b	251238	3	192479	2	340681	4	Fascin
9302	132917	686722	5	502870	4	890544	7	α-Enolase
1404	11938	108025	9	131361	11	245178	21	Vimentin
3601	121538	258329	2	374697	3	588411	5	HS7C_HUMAN ^c
3503	104392	84991	0.8	192635	2	504288	5	PDIA3_HUMAN ^c

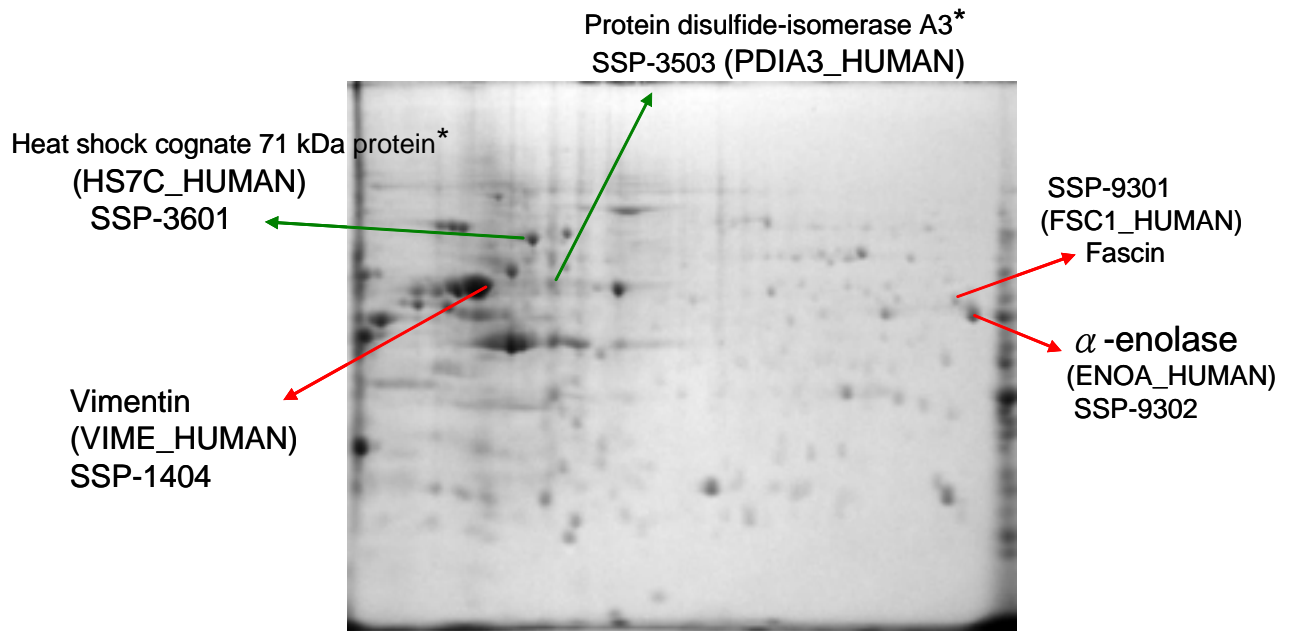
a. 各處理組特定蛋白質點強度與對照組之比值

b. 以 PDQuest 軟體分析所得到之蛋白質點強度

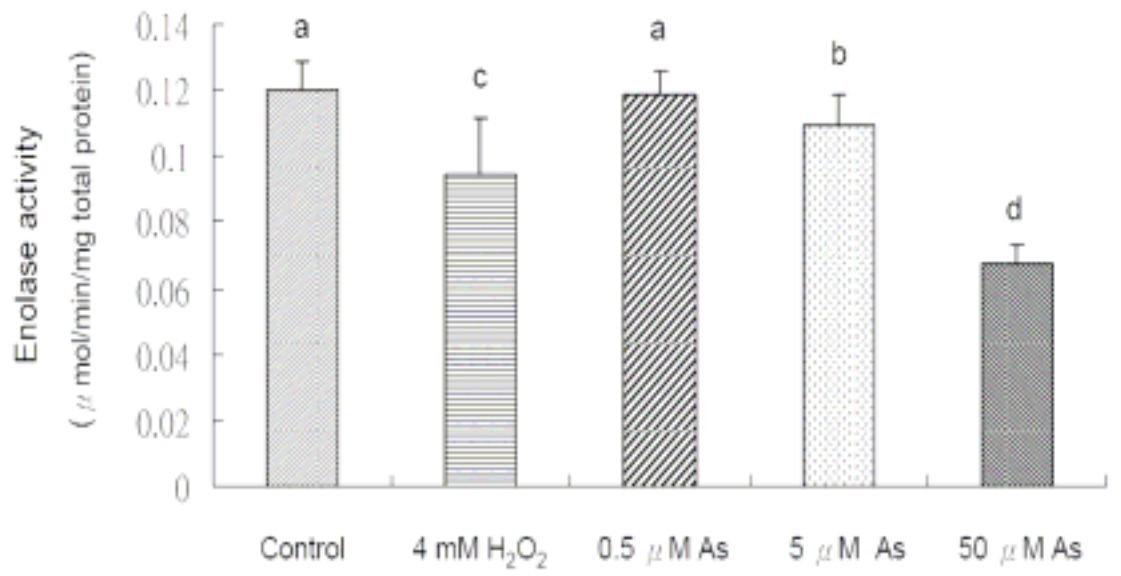
c. 已鑑定蛋白質身分但是鑑定次數不足三重複



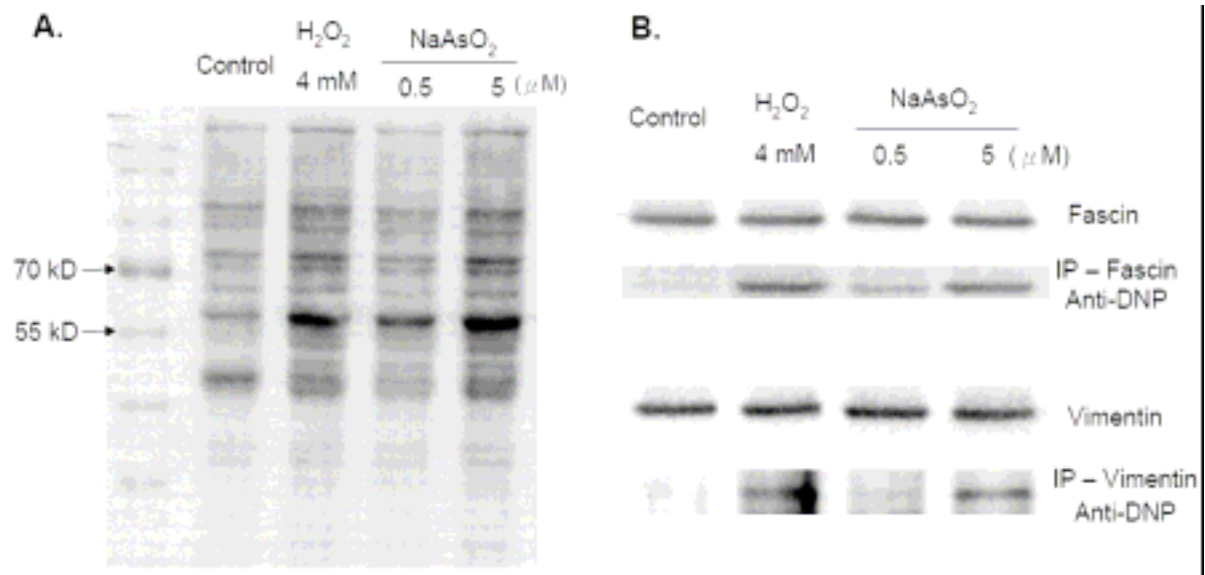
圖一、亞砷酸鈉或過氧化氫誘發 HUVECs 羰基化蛋白質表現之二維電泳圖譜。人類臍靜脈內皮細胞分別以 0、0.5 和 5 μM 亞砷酸鈉或 4 mM 過氧化氫處理 30 分鐘，以二維電泳分析羰基化蛋白質。(A) 對照組以 Coomassie blue 染色；分別以 anti-dinitrophenyl 抗體偵測羰基化蛋白質表現：(B)對照組 (C) 4 mM H_2O_2 (D) 0.5 μM NaAsO_2 (E) 5 μM NaAsO_2 。



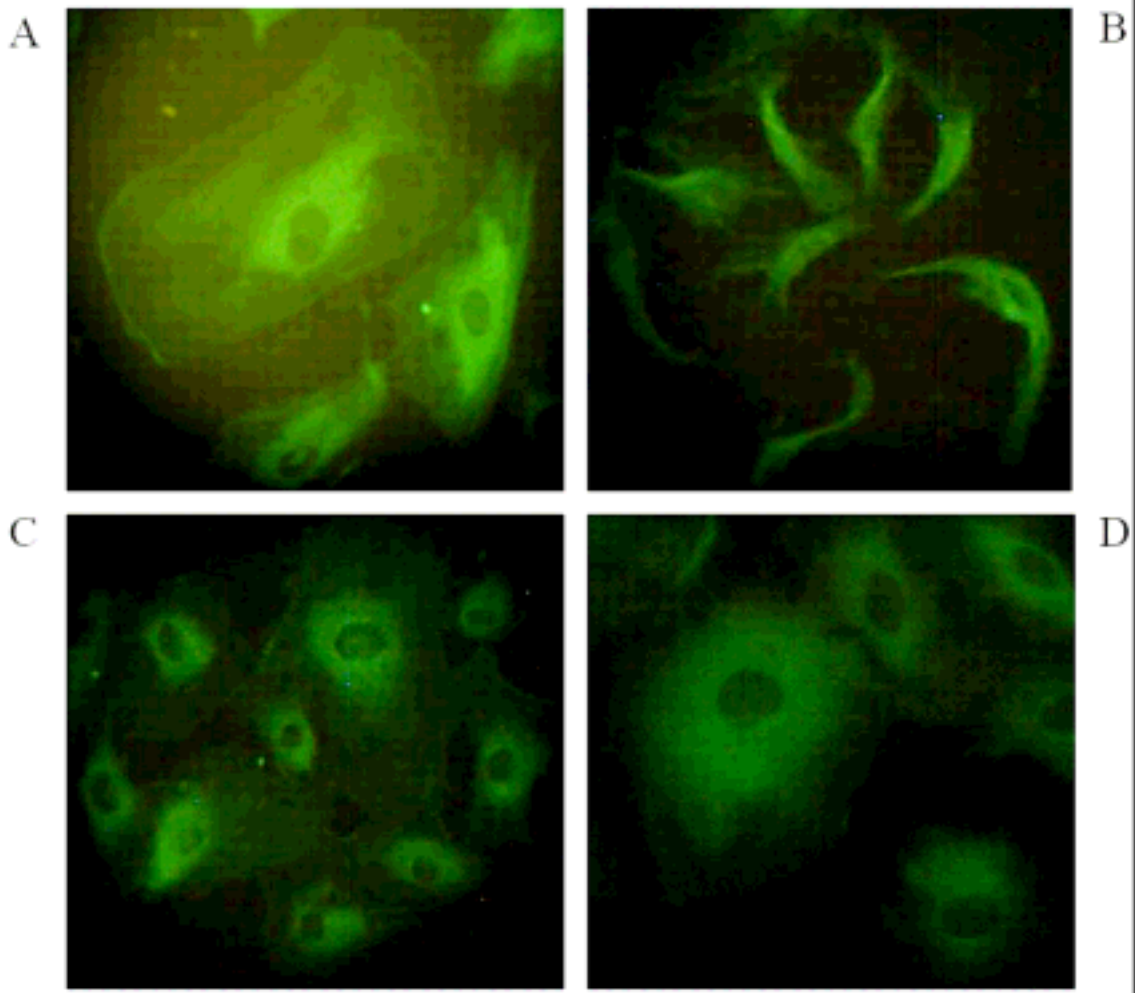
圖二、本研究分析之五個羰基化蛋白質點及其編號。利用 PDQuest 7.4 分析軟體比對後，挑出五個與對照組差異兩倍以上的蛋白質點分別為 SSP-1404、SSP-3601、SSP-3503、SSP-9301、SSP-9302。



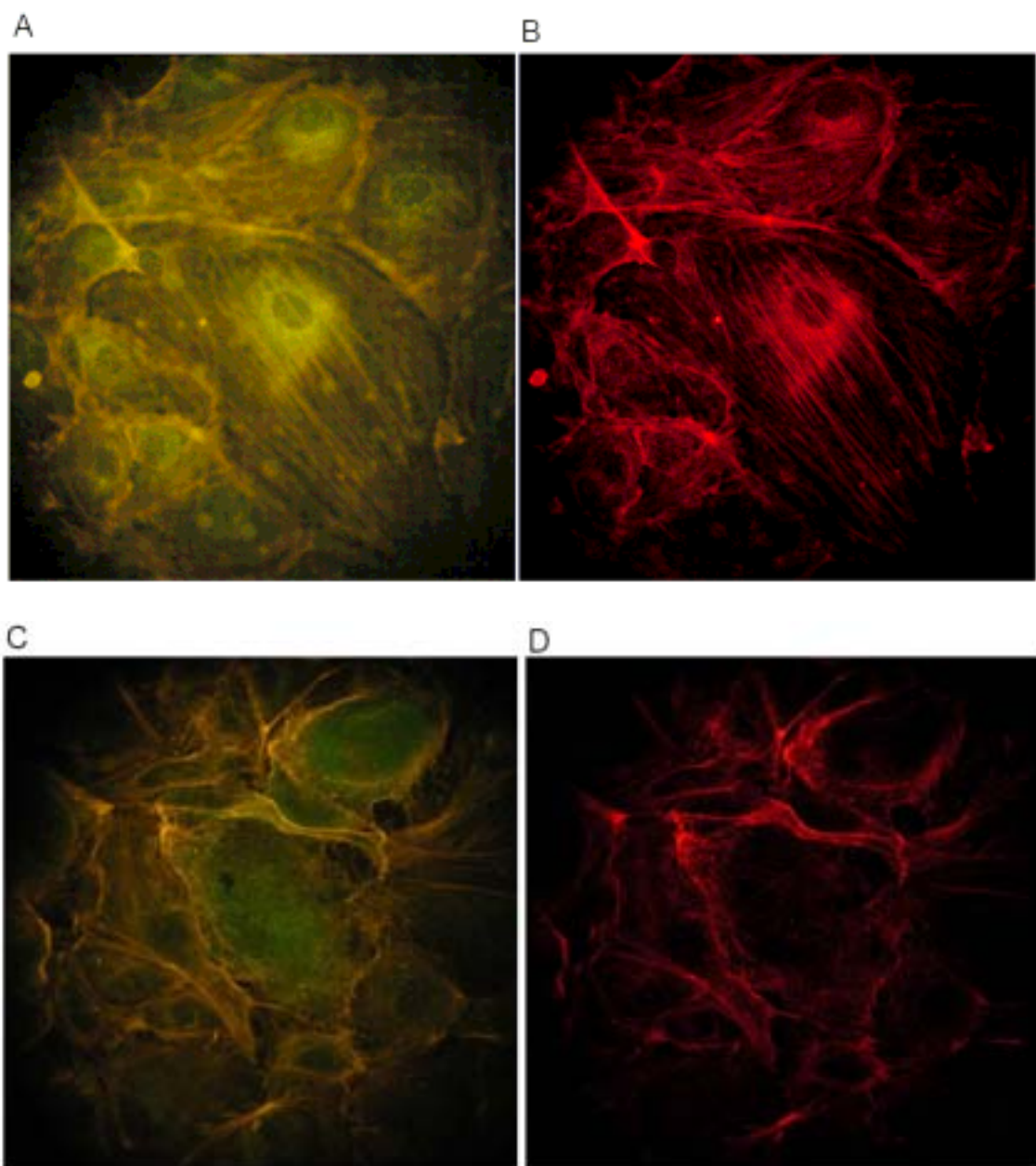
圖三、亞砷酸鈉影響臍靜脈內皮細胞 Enolase 酵素比活性。縱軸表示比活性(μmole/min/mg total protein)，橫軸為不同處理組，處理時間為 30 分鐘。對照組、4 mM H₂O₂、0.5、5 和 50 μM NaAsO₂處理組的 Enolase 比活性分別為 0.120±0.008 (100%)、0.095±0.017 (79%)、0.118±0.008 (98%)、0.109±0.009 (91%) 和 0.068±0.006 (56%) μmole/min/mg total protein。Means±SD, n=4；不同英文字母標示表示各組有顯著差異(p<0.05)。



圖四、亞砷酸鈉誘發臍靜脈內皮細胞 Fascin、Vimentin 羰基化及其蛋白質表現。(A)HUVECs 處理 0.5 和 5 μ M 亞砷酸鈉或 4 mM H₂O₂ 30 分鐘後，收取細胞製備細胞總細胞溶解物，與 DNP 反應，分析蛋白質羰基化。(B)以 Western blotting 分析胞內 Fascin、Vimentin 蛋白質表現；以及利用免疫沉澱分離 Fascin、Vimentin 並結合 Western blotting 偵測其羰基化程度。



圖五、羧基化蛋白質 Fascin 對細胞形態表現之影響。HUVECs 處理 5 和 50 μM 亞砷酸鈉或 4 mM H_2O_2 30 分鐘後，以細胞染色觀察胞內 Fascin 分佈及細胞形態；(A) Untreated；(B) 4 mM H_2O_2 ；(C) 5 μM 亞砷酸鈉；(D) 50 μM 亞砷酸鈉。



圖六、以雙染色法觀察砷處理誘發羧基化時 HUVECs 的形態與 F-actin/Fascin 分佈。A、B 圖為對照組，C、D 圖是 50 μ M 亞砷酸鈉處理組；綠色螢光表示 Fascin 分佈位置，紅色螢光表示 F-actin。