

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

細胞激素細胞激素與雙股 RNA 對血管內皮細胞基因表現之影響

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2314-B-040-010-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：中山醫學大學免疫學研究所

計畫主持人：陳孟琦

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 2 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

細胞激素細胞激素與雙股 RNA 對血管內皮細胞基因表現之影響

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 92-2314-B-040-010

執行期間：2003/08/01 ~ 2004/07/31

計畫主持人：陳孟琦

共同主持人：

計畫參與人員：蔡嘉哲，詹坤振，莊千純

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 免疫研究所

中 華 民 國 93 年 10 月 30 日

1. INTRODUCTION.....	1
1.1. 動脈硬化症.....	1
1.1.1. 血管壁的發炎反應及動脈粥樣硬化的病程.....	1
1.1.2. 細胞激素及趨化因子在動脈硬化症的角色.....	2
1.1.3. 雙股核糖核酸.....	2
1.2. 血管內皮細胞基因表現對動脈硬化的影響.....	3
1.3. 研究目的.....	3
2. MATERIALS AND METHODS.....	3
2.1. ECV 細胞培養 (Cell culture) .....	3
2.2. RNA 萃取及 RT-PCR .....	3
2.3. 以基因晶片分析病毒感染對 ECV304 基因表現之影響.....	4
3. RESULTS.....	4
3.1. 比較細胞激素及 poly IC 對 ECV 304 基因表現之影響.....	4
3.2. NFκB 及 MAPK 訊號訊號傳遞路徑之研究 .....	5
3.3. 以基因晶片分析病毒感染對 ECV304 基因表現之影響.....	5
4. DISCUSSION .....	9
4.1. 結論.....	錯誤! 尚未定義書籤。
5. REFERENCE:.....	11

縮寫 ECV: vascular endothelial cells; ERK: extracellular regulated kinase; ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1; IκB: inhibitory protein-κB; IRF-1: interferon regulatory factor-1; IL: interleukin; IFN-γ: interferon-γ; IP-10: IFN-γ-inducible protein 10; MAPK: mitogen-activated protein kinase; MIP-1α: macrophage inflammatory protein-1α; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; MMP: matrix metalloproteinase; MnSOD: manganese superoxide dismutase; OAS: 2',5'-oligoadenylate synthetase; PCR: polymerase chain reaction; PDTC, pyrrolidine dithiocarbamate, PKR: dsRNA-activated protein kinase; RANTES: regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted; TNF-α: tumor necrosis factor-α; VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1

# 1. INTRODUCTION

## 1.1. 動脈硬化症

目前已有許多文獻報導自體免疫疾病如類風濕性關節炎病人容易產生心血管方面疾病，且併發心血管疾病是造成類風濕性關節炎病人死亡的主要原因 [1, 2]。血管壁的發炎反應會吸引單核球到細胞激素濃度高的部位，對細胞碎片、脂質進行吞噬作用造成血管壁改變，這種改變容易加速動脈硬化的產生。自體免疫疾病病人併發心血管疾病並無法用傳統的心血管危險因子（如：高血壓、高脂血症、糖尿病和抽煙）來解釋，雖然其機制還沒完全被解開，但內皮細胞經自體抗原 (autoantigen) 活化似乎是其中的一個原因。因為內皮細胞活化造成內皮細胞損壞，可以想像慢性的內皮細胞損壞（自體免疫疾病的病人也有此現象）是心血管疾病發生率增高的原因 [3]。

### 1.1.1. 血管壁的發炎反應及動脈粥樣硬化的病程

動脈粥樣硬化 (atherosclerosis) 是一種脂質與發炎細胞的聚積並伴隨著平滑肌細胞 (smooth muscle cell, SMC) 增生與細胞外間質液分泌 (extracellular matrix secretion) 所引起的細胞內膜纖維變性 (intimal fibrosis)，這是動脈硬化斑生長的主要現象。這些異常的區域顯示出血管內細胞的完整性被破壞，而使細胞外的低密度脂蛋白 (LDL) 聚集在這些區域，這些內皮細胞的異常可能是很多心血管疾病的誘因。

在動脈粥樣硬化發展的過程中，有幾個步驟會發生：(1). 血管局部損傷，會釋放出趨化因子吸引血球細胞進行受損細胞的清除，以及血管生長因子以進行修補，細胞外的低密度脂蛋白此時會由損壞的內膜進入細胞內。(2). 單核細胞 (monocytes) 會向內皮的表面黏著並藉趨化因子 (chemokines) 及黏附蛋白 (adhesion molecules) 進入內膜，單核細胞因細胞激素而改變形態成巨噬細胞 (macrophages)。(3). 接著在病灶處活化的巨噬細胞會釋放出自由基如 NO、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，這些化學分子會造成低密度脂蛋白過氧化 (lipid peroxidation) 轉變成氧化型低密度脂蛋白 (oxidized LDL, ox-LDL)，這種受到氧化的 LDL 不再被 LDL 接受體所辨識。反而與巨噬細胞上的接受器 (scavenger receptors) CD36 有極高的親合力。巨噬細胞因吞噬 ox-LDL 變成泡沫細胞 (foam cell)，是粥樣硬化過程中在電子顯微鏡下可見最早可辨識的病灶。大量的脂質持續的聚集在泡沫細胞，最後使細胞破裂，結果大量的細胞外脂質取代了正常的細胞與間質，而形成一個明顯的以脂質為核心，外環包圍著死亡巨噬細胞的粥瘤 (atheroma) 病灶。

### 1.1.2. 細胞激素及趨化因子在動脈硬化症的角色

細胞激素是一群小的蛋白質 (約 25 kDa)，可由體內不同細胞所釋放，與一些刺激反應有關，可透過接受器而活化。IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  是主要的促發炎細胞激素。IL-1 $\beta$ 及 TNF- $\alpha$  為多功能的細胞激素，可由內皮細胞、平滑肌細胞及巨噬細胞產生；且與刺激其它細胞激素產生有關 [4]。在急性冠狀動脈症，白血球與血小板黏附增加在血液中，可能造成梗塞，而白血球結合至活化的血小板可產生 IL-1 $\beta$ 、IL-8 和 MCP-1；這些發現認為白血球與血小板黏附可能導致急性的發炎反應 [5]。

趨化因子屬於細胞激素的一種 (約 8-12 kDa)，能吸引免疫細胞到免疫反應部位。趨化因子在人體的免疫防禦和調節、血管生成、愛滋病病毒 (HIV) 感染等方面發揮重要作用。發炎反應的趨化因子表現在許多細胞，主要可趨化作用細胞 (effector cells) 至發炎反應處，如：顆粒球 (granulocytes)、單核球 (monocytes)、自然殺手細胞 (NK cells) 等。而趨化因子會與其接受器作用，協同細胞移動 [6]。趨化因子在動脈硬化的角色逐漸被重視。單核球的移動是形成動脈硬化最早的指標；而單核球移動到血管壁主要是由趨化因子所調控，特別是單核球趨化因子，如 MCP-1 [7]。MCP-1 可由內皮細胞、平滑肌細胞和單核球產生，可趨化單核球移動通過內皮障壁 [8]。MCP-1 在動脈硬化的主要角色，已由一些研究所證實，在 apolipoprotein E (apoE) 剔除的老鼠中，再剔除 MCP-1 之 receptor CC chemokine receptor (CCR2)，可抑制巨噬細胞累積在內皮，明顯減少動脈硬化 [9]。此外趨化因子如 IL-8，MCP-1 也和發炎造成的新血管生成 (angiogenesis) 有關，相反的，IP-10/CXCL10 則是屬於抗發炎及抗血管新生 [10-18]。MCP-1/CCL2 可趨化單核球、T 淋巴細胞、NK 細胞和嗜鹼性球 [19]。其它趨化因子像 Fractalkine/CX3CL1 可趨化單核球及淋巴球且可作為細胞的黏附因子 [19,20]。

### 1.1.3. 雙股核醣核酸

雙股核醣核酸 (double-stranded RNA, dsRNA) 是 RNA 病毒感染時，複製過程中的產物，會造成感染細胞凋亡 [21]。雙股核醣核酸活化蛋白激酶 (dsRNA activated protein kinase, PKR) 是一種絲胺酸/酪胺酸蛋白激酶，IFN- $\gamma$  可使雙股核醣核酸表現量增加而雙股核醣核酸、細胞激素、生長因子和壓力訊息可活化之，且 PKR 可自體磷酸化 [22]。

Poly IC 是一種由 inosinic 和 cytidylic acids 化學合成的 dsRNA 類似物，經常被用來模擬 dsRNA 病毒感染的情形 [23]。在一些文獻中，dsRNA 可經由產生趨化因子引起胰島炎，並結合局部的細胞激素造成  $\beta$ -cell 死亡 [24]。以 dsRNA 刺激內皮細胞 (HUVEC)，可比 IL-1 $\beta$  產生較高量的 IL-6、OAS、PKR、IRF-1 等抗病毒基因 [25]。在老鼠主動脈內皮細胞用 poly IC 和 TNF- $\alpha$  刺激所產生 E-selectin 的過程中，是需要 PKR 的參與 [26] 且可使 VCAM-1 表現量增加

[27]，因此猜測 PKR 也與白血球的吸附作用有關。

## 1.2. 血管內皮細胞基因表現對動脈硬化的影響

在血管發炎反應過程中，經由一連串的調控，趨化血球至發炎反應處。在 TNF- $\alpha$  與 IL-1 $\beta$  刺激的內皮細胞會表現吸附因子，如：ICAM-1；另外也會刺激鄰近的細胞產生趨化因子，以趨化血球 [28]。現已發現有許多與血球吸附及趨化有關的基因，(1). 細胞激素：IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , MCP-1, RANTES。(2). 黏附因子：E-selectin, ICAM-1, VCAM-1。(3). 免疫調控：MHC-I, MHC-II, IRF-1。(4). 其它：iNOS, COX-2, MnSOD, MMP-2, MMP-9 [29]。

## 1.3. 研究目的

動脈硬化是由發炎免疫反應所引起，其中免疫細胞所分泌的細胞激素造成血管內皮細胞產生變化是重要成因之一；因此，我們利用血管內皮細胞株 (ECV304)，以不同的發炎細胞激素及模擬病毒感染等刺激，研究其和發炎反應有關之基因表現，並找出可能參與基因調控的訊號傳遞路徑。

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. ECV 細胞培養 (Cell culture)

人類血管內皮細胞細胞株 (human vascular endothelial cells, ECV304) 平均培養在 6 公分的培養皿上，使用的培養基為 M199 (Gibco, Cat. 31100-035) 另加 10 % fetal bovine serum (FBS, Gibco, Cat. 10270-106)。細胞靜置隔夜使之穩定後，以藥物或細胞激素刺激，使用的藥物有：50 U/ml IL-1 $\beta$  (PeproTech)、100 U/ml TNF- $\alpha$  (Biosource)、100 U/ml IFN- $\gamma$  (Biosource)、100  $\mu$ g/ml poly (IC) (Sigma) 及訊息傳遞路徑 NF- $\kappa$ B 抑制劑：100 $\mu$ M PDTC (Sigma)，25 $\mu$ M MG-132 (Calbiochem)；MAPK 抑制劑：p38 inhibitor 10 $\mu$ M SB203580 (Calbiochem)，ERK inhibitor 100 $\mu$ M PD98069 (Calbiochem)。細胞刺激 6 至 24 小時，收集細胞萃取 RNA 及作 RT-PCR。

### 2.2. RNA 萃取及 RT-PCR

使用 Dynabeads<sup>®</sup> mRNA DIRECT Kit 萃取細胞之 mRNA (poly (A)<sup>+</sup> RNA)。此方法利用包覆 oligo dT 的細珠去吸附真核細胞的 mRNA (含 poly A tail)，細胞以 lysis buffer 破碎後加入 oligo dT 的細珠，利用磁座 (Calbiochem, Cat. 69964-3) 將磁珠吸住，以 100  $\mu$ l 緩衝液洗二次，再於 65  $^{\circ}$ C 水浴槽中 2 分鐘，使 mRNA 與磁珠分開，取上清液 (含 mRNA) 冷藏在 -20 $^{\circ}$ C。每 10  $\mu$ l 的總

反應體積，含 3  $\mu$ l 的 mRNA 及 7  $\mu$ l 的反應溶液 (Promega), 0.5 mM of each dNTP, 2.5  $\mu$ M random hexamer primers, 2.5 U/ $\mu$ l RNase inhibitor, 12.5 U/ $\mu$ l M-MLV reverse transcriptase (Promega), 陰性對照組使用滅菌水代替 mRNA。在 37°C 反應 1 小時。PCR 使用 0.2ml 薄壁管在聚合酶連鎖反應熱循環儀 (GeneAmp PCR System 2700) 反應。加 2.5  $\mu$ l cDNA 的 PCR 反應溶液，總體積為 25  $\mu$ l。反應條件為 94°C、5 分鐘，接著 94°C、45 秒，58°C、45 秒，72°C、1 分 20 秒，各組引子的最佳 PCR 循環數皆經過實驗選定，最後一個循環再於 72°C 反應 10 分鐘。每個 RT-PCR 實驗在逆轉錄實驗時都用滅菌水替代 mRNA 做為陰性對照組。每次實驗自細胞培養基算起，重複 3-5 次。

### 2.3. 以基因晶片分析病毒感染對 ECV304 基因表現之影響

約  $10^7$  ECV304 細胞經 100  $\mu$ g/ml poly(IC) 培養 6 h 之後(對照組不加)，經 total RNA 萃取，分別標記紅及綠色之螢光，於基因晶片 (Agilent Whole Genome Oligonucleotide Microarray 40K) 競爭雜合，再以高靈敏度之紅(635 nm)、綠(532 nm) 螢光偵測，比較每組檢體間之基因表現之差異。

## 3. RESULTS

### 3.1. 比較細胞激素及 poly IC 對 ECV 304 基因表現之影響

促發炎反應細胞素可能可以誘發 MCP-1 基因表現，我們使用 RT-PCR 方法來觀察基因表現的變化，以 IL-1 $\beta$  (50U/ml) + IFN- $\gamma$  (100U/ml) + TNF- $\alpha$  (100U/ml) 刺激內皮細胞 6 及 24h，嚐試找出最佳 PCR 循環數以偵測細胞激素及對基因表現的影響，6 及 24h 對照組無 MCP-1 表現，經 3 種 cytokines 刺激 6 小時即可偵測到 MCP-1 mRNA 上升且在 24h 持續增強 (Fig 1)。

接著分別用不同的細胞激素，IL-1 $\beta$  (50U/ml)、IFN- $\gamma$  (100U/ml)、TNF- $\alpha$  (100U/ml) 個別或合併刺激內皮細胞，刺激 6 小時後以 RT-PCR 測基因表現，與對照組比較後，發現只有 IL-1 $\beta$  能使 MCP-1 mRNA 表現，IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  單獨刺激則不能使 MCP-1 表現，但 IFN- $\gamma$  可增強 IL-1 $\beta$  的刺激作用。GAPDH 為對照組 (Fig 2)。

使用 poly IC 模擬病毒感染，並與 IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$  刺激所表現的基因做比較。使用 IL-1 $\beta$  (50U/ml)、IFN- $\gamma$  (100U/ml)、PIC (100  $\mu$ g/ml) 刺激細胞 6 小時後以 RT-PCR 測基因表現。發現 Fractalkine、MCP-1 可同時被 IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、PIC 所刺激表現，PKR、IP-10 則可由 IFN- $\gamma$  及 PIC 所刺激表現，而 IL-8、MnSOD 可被 IL-1 $\beta$  及 PIC 所刺激表現 (Fig 3)。

### 3.2. NF $\kappa$ B 及 MAPK 訊號訊號傳遞路徑之研究

NF $\kappa$ B 路徑之研究：使用 NF- $\kappa$ B 的抑制劑，PDTC (100  $\mu$ M) 和 MG-132 (25  $\mu$ M) 提前培養細胞 1 個小時，之後再以 IL-1 $\beta$  (50U/ml)、IFN- $\gamma$  (100U/ml)、PIC (100  $\mu$ g/ml) 刺激細胞 6 小時後以 RT-PCR 檢測基因表現。發現由 poly IC 所誘發的 MnSOD、MCP-1、Fractalkine 和 PKR 是經由 NF- $\kappa$ B 路徑表現 (Fig 4)。探討其他基因表現是否藉由 MAPK 路徑，實驗中使用 p38 及 MAPK 抑制劑，PD98059 (為 MEK1/2 抑制劑，抑制 ERK1/2 路徑) (100  $\mu$ M)、SB203580 (抑制 p38 MAPK 路徑) (10  $\mu$ M) 提前培養細胞 1 個小時，之後再以 IL-1 $\beta$  (50U/ml)、IFN- $\gamma$  (100U/ml)、PIC (100  $\mu$ g/ml) 刺激細胞 6 小時後以 RT-PCR 測基因表現。發現由 IL-1 $\beta$  及 poly IC 誘發的 MCP-1 mRNA 不僅經由 NF- $\kappa$ B 路徑，也經由 p38 MAPK 路徑；另外經由 p38 MAPK 路徑的基因還由 IL-1 $\beta$  及 poly IC 刺激所產生的 IL-8 (Fig 5)。

### 3.3. 以基因晶片分析病毒感染對 ECV304 基因表現之影響

以基因晶片分析病毒感染對 ECV304 基因表現之影響，結果顯示 ECV304 細胞經 100  $\mu$ g/ml poly(IC) 培養 6 h 之後，部分的基因表現有上升（超過 2 倍）的現象：

- 和 MHC-I 相關：MHC-1 heavy chain A, B, C, E, F, G 等； $\beta$ 2m, TAP (Transporter of Ag Processing), TAP binding protein
- cytokine 或 chemokines: IP-10, Fractalkine, GRO- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , RANTES, MIP-3 $\alpha$ 等
- 黏附分子 (Adhesion molecules) 或與血管新生 (angiogenesis) 相關：ICAM, integrin, syndecan, trypsin-like serine protease, endothelial cell protease inhibitor, metastasis-related proteins: MMP inhibitors, tight junction proteins 等
- 和 Apoptosis, defense 相關：Bcl-2 related pro-apoptotic, MnSOD, metallothionein proteins, TNF- $\alpha$  and TNFR associated proteins 等
- 和訊號傳遞路徑 (signal transduction) 或基因轉錄 (transcription factors) 有關：jun, NF $\kappa$ B, I $\kappa$ B, STAT1, IRF-1, IRF-7, PKR, Guanylate-binding proteins (GBP), IFN-induced RAR corepressor 等
- 抗病毒反應 Antiviral response and RNA editing: RNA adenosine deaminase, 2-5 oligoadenylase synthase (OAS) 等



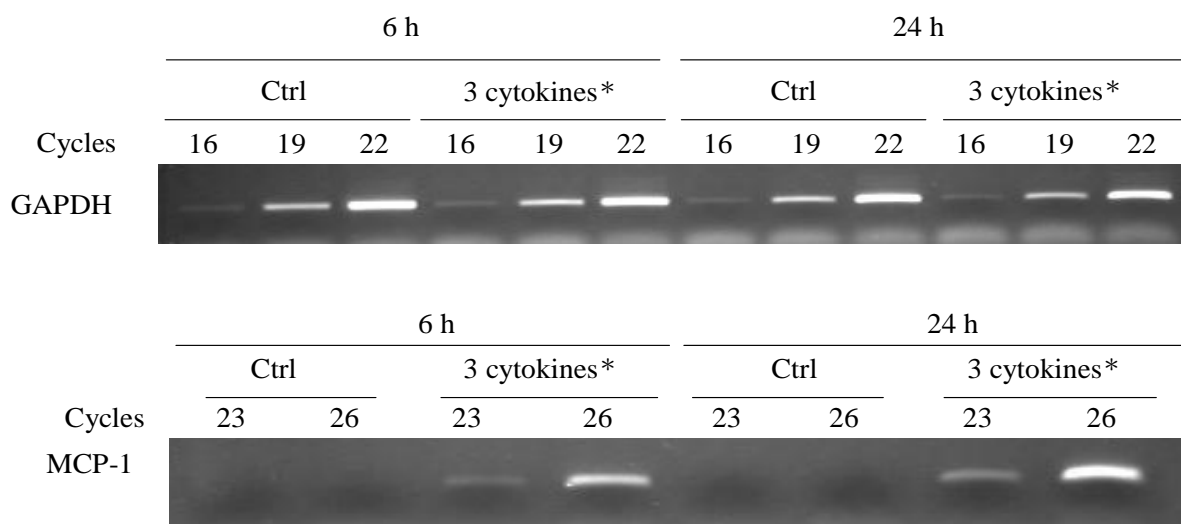


Fig. 1 使用 RT-PCR 方法來觀察基因表現的變化, 以 IL-1 $\beta$  (50U/ml) + IFN- $\gamma$  (100U/ml) + TNF- $\alpha$  (100U/ml) 刺激內皮細胞 6 及 24h, 嘗試找出最佳 PCR 循環數以偵測細胞激素及對基因表現的影響, Ctrl 為對照組 cytokines 刺激 6 小時即可偵測到 MCP-1 mRNA 上升且在 24h 持續增強, GAPDH 作為檢測 mRNA 的量

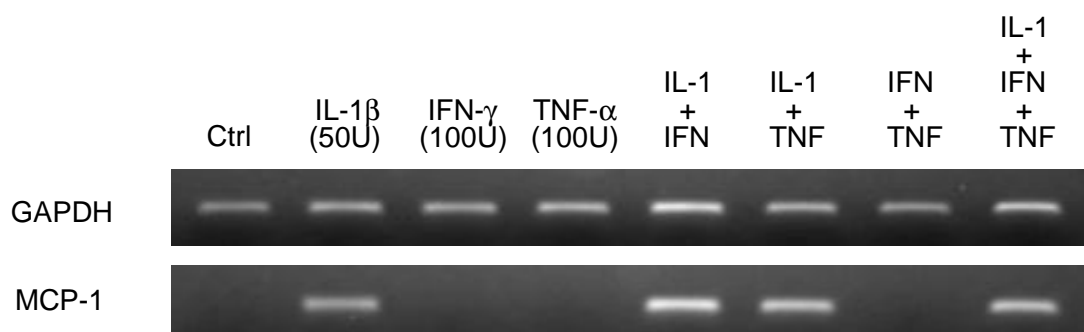


Fig. 2 分別用不同的細胞激素, IL-1 $\beta$  (50U/ml)、IFN- $\gamma$  (100U/ml)、TNF- $\alpha$  (100U/ml) 個別或合併刺激內皮細胞, 刺激 6 小時後以 RT-PCR 測 MCP-1 基因表現, Ctrl 為對照組, GAPDH 作為檢測 mRNA 的量。

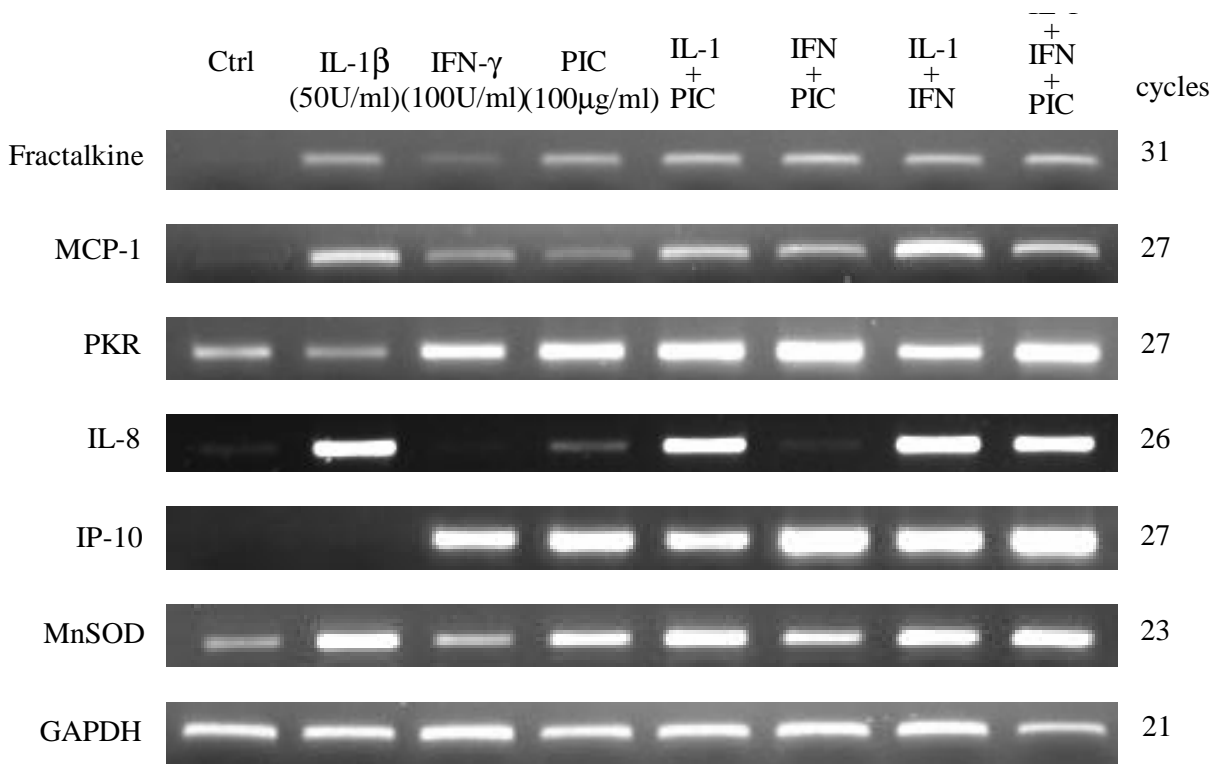


Fig. 3 比較細胞激素，IL-1 $\beta$  (50U/ml)、IFN- $\gamma$  (100U/ml)、及 poly (IC) (100  $\mu$ g/ml) 個別或合併刺激內皮細胞，刺激 6 小時後以 RT-PCR 測不同基因表現，Ctrl 為對照組，GAPDH 作為檢測 mRNA 的量。

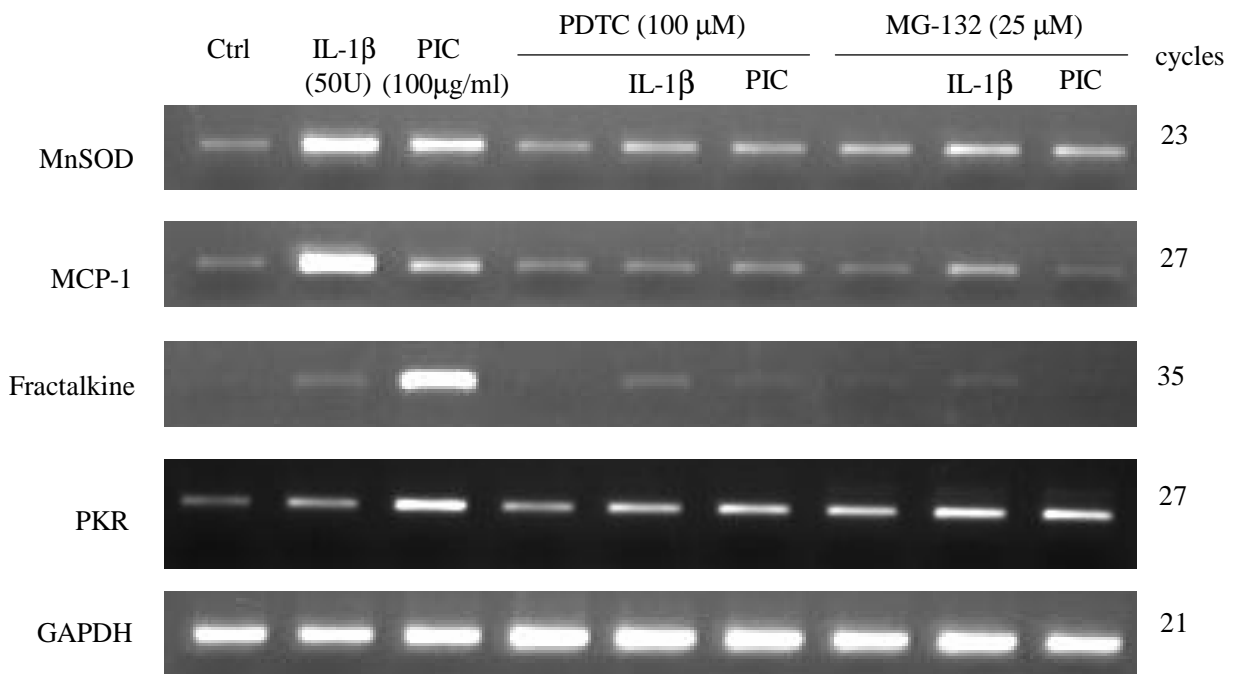


Fig. 4 NF $\kappa$ B 路徑之研究：使用 NF- $\kappa$ B 的抑制劑，PDTC (100  $\mu$ M) 和 MG-132 (25  $\mu$ M) 提前培養細胞 1 個小時，之後再以 IL-1 $\beta$  (50U/ml)、IFN- $\gamma$  (100U/ml)、PIC (100  $\mu$ g/ml) 刺激細胞 6 小時後以 RT-PCR 檢測基因表現。

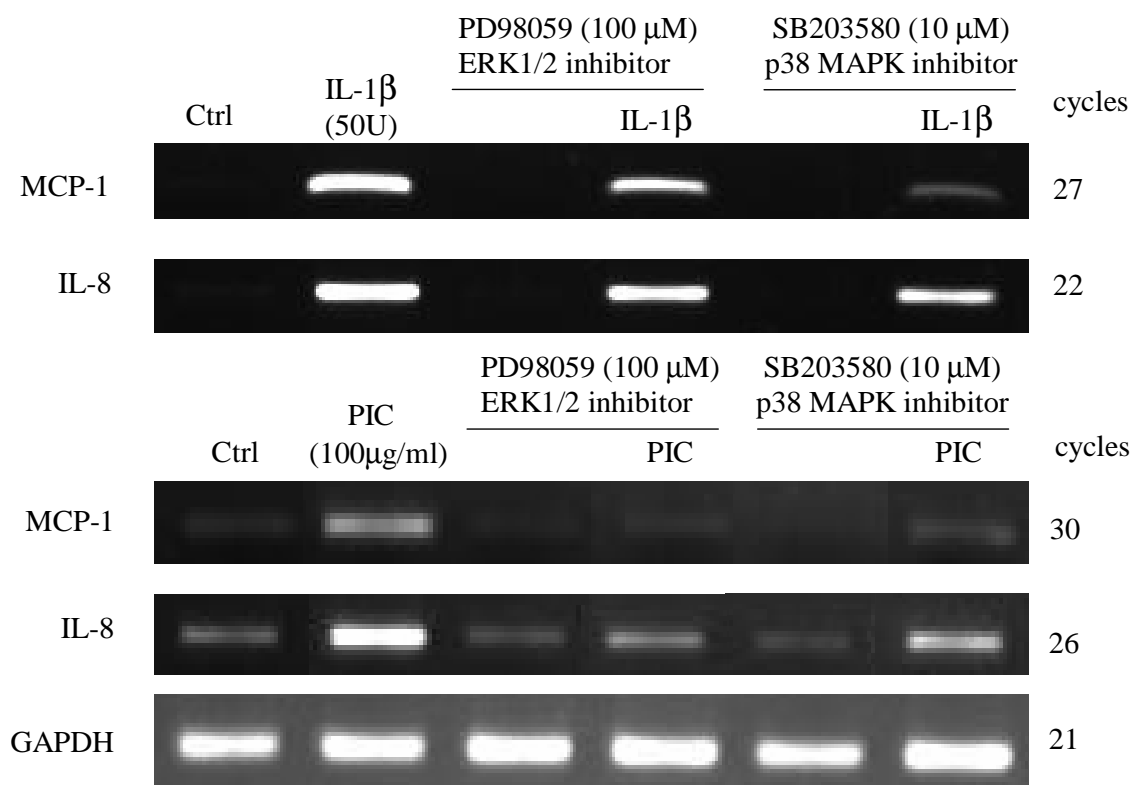


Fig. 5 MAPK 路徑之探討， PD98059 (為 MEK1/2 抑制劑，抑制 ERK1/2 路徑) (100  $\mu$ M)、SB203580 (抑制 p38 MAPK 路徑) (10  $\mu$ M) 提前培養細胞 1 個小時，之後再以 IL-1 $\beta$  (50U/ml)、IFN- $\gamma$  (100U/ml)、PIC (100  $\mu$ g/ml) 刺激 ECV 細胞 6 小時後以 RT-PCR 測基因表現。

## 4. DISCUSSION

內皮細胞損壞是形成動脈硬化的首要條件，而已知許多的細胞激素或趨化因子會造成內皮損壞，一些報導發現，當細胞激素增加時，可刺激內皮細胞產生發炎相關的細胞激素或趨化因子，如：IFN- $\gamma$  刺激人類臍帶靜脈細胞 (HUVEC) 會產生很強的 RANTES mRNA；另外的研究，以細胞激素刺激肺部微管內皮細胞會表現 IL-8 和 MCP-1 的 mRNA (詳見[30])。

因此我們使用促發炎反應細胞激素 (IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ )，刺激內皮細胞 (ECV304)，當三種細胞激素同時刺激內皮細胞時，在 6 小時即可使 MCP-1 的基因開始表現 (Fig 1)，24 小時可更強。由此推測內皮細胞在發炎的時候，會表現 MCP-1。而單核球的趨化及活化變成巨噬細胞都需靠 MCP-1，巨噬細胞會吞噬 ox-LDL 形成泡沫細胞，是引起動脈硬化的主要原因 [31, 32]，因此，我們認為在細胞激素或病毒感染的刺激之下，內皮細胞 (ECV304) 所表現的 MCP-1 或其它動脈硬化相關的基因，會促進動脈硬化形成。

個別用不同細胞激素刺激內皮細胞 6 小時，發現只有 IL-1 $\beta$  可誘發 MCP-1 基因表現，其它二個細胞激素則不行 (Fig 2)，且 IFN- $\gamma$  可增強 IL-1 $\beta$  的效果，使 MCP-1 表現更強。表示內皮細胞在發炎反應時，主要是被 IL-1 $\beta$  所誘發產生 MCP-1 基因。已有文獻指出 IL-1 $\beta$  刺激 islet  $\beta$  細胞可誘發 MCP-1 mRNA 表現並分泌蛋白質至培養基中，但 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  無法誘發 MCP-1 mRNA 表現也無法增強 IL-1 $\beta$  的效應 [33]。這與我們的結果相符合，而且我們的結果中，IFN- $\gamma$  會增強 IL-1 $\beta$  的效應。這現象在 islet  $\beta$  細胞是沒有看到的，可能是細胞株不同，對細胞激素刺激反應的路徑也不同所造成。

病毒感染也是疾病造成的主要原因，有報導指出，病毒感染也會使 MCP-1 表現量上升 [34]，所以我們使用 poly IC，一種模擬病毒感染的藥物刺激細胞，看是否與 IL-1 $\beta$  刺激所表現的基因一樣，在 IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、poly IC 各別或協同刺激 6 小時後，發現 fractalkine、MCP-1 可同時被 IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、PIC 所刺激表現，PKR、IP-10 則可由 IFN- $\gamma$ 、PIC 所刺激表現，而 IL-8、MnSOD 可被 IL-1 $\beta$ 、poly IC 所刺激表現 (Fig 3)。由此可知，不論在發炎反應或病毒感染時，均有一些基因被誘發，目的是為了清除發炎反應，但若產生過量可能會造成細胞損壞或病變。

了解有那些基因表現後，我們想知道它們經由的路徑是如何，最近的研究證實 MCP-1 的表現是經由 NF- $\kappa$ B，也有文獻指出在人類的動脈硬化部位偵測到 NF- $\kappa$ B 活化的現象 [35]，所以我們利用 NF- $\kappa$ B 抑制劑，看是否能抑制住基因的表現；發現 MnSOD、MCP-1、Fractalkine 和 PKR 是經由 NF- $\kappa$ B 路徑調控 (Fig 4)。抑制劑對 poly IC 和 IL-1 $\beta$  的效果是一樣的，猜測 poly IC 和 IL-1 $\beta$  有共同的 NF- $\kappa$ B 路徑。另外有文獻發現，IL-1 $\beta$  也可能經 MAPK 路徑調控基因表現，已發現促發炎細胞激素可活化 MAPK 路徑，引發基因的表現，已知的 MAPK 路徑有 ERK1/2, JNK/SAPK, p38, ERK 和 p38 路徑分別可被 PD98059 及 SB203580 所阻斷，當使用 MAPK 路

徑的抑制劑，由 poly IC 所誘發的 MCP-1 及 IL-8 的確被 MAPK 路徑 (ERK1/2 及 p38) 所調控 (Fig 5)，可由此推測出當病毒感染時，所引起 MCP-1 mRNA 表現的路徑可透過 NF- $\kappa$ B 及 MAPK。由以上結果，可知發炎反應和病毒感染可引起 MCP-1 或其它趨化因子的基因表現，而 MCP-1 經由刺激表現的路徑可經由 NF- $\kappa$ B 和 MAPK。猜測這些經由刺激產生的趨化因子和細胞激素，可能影響內皮細胞，進而造成動脈硬化的產生。

細胞激素與病毒感染可分別引起血管內皮細胞多和發炎或抗病毒反應基因的表現，這些基因的表現需要訊號傳遞路徑的活化及轉錄因子的參與，IL-1 $\beta$ ，IFN- $\gamma$ 及 dsRNA 分別有共同的路徑，我們已經以基因晶片可血管細胞做一系列關於發炎反應所表現的基因篩檢，將來繼續對基因的功能做進一步分析這些分子在動脈硬化及血管新生的角色。同時我們也在進行 dsRNA 對巨噬細胞活化的影響。

## 5. REFERENCE:

1. Bacon PA, Stevens RJ, Carruthers DM, Young SP and Kitas GD. (2002) Accelerated atherogenesis in autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun Rev* 1:338-347.
2. Park YB, Ahn CW, Choi HK, Lee SH, In BH, Lee HC, Nam CM and Lee SK. (2002) Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: morphologic evidence obtained by carotid ultrasound. *Arthritis Rheum* 46:1714-1719.
3. Bijl M. (2003) Endothelial activation, endothelial dysfunction and premature atherosclerosis in systemic autoimmune diseases. *Neth J Med* **61**:273-277.
4. Lind L. (2003) Circulating markers of inflammation and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **169**:203-214.
5. Loetscher P and Moser B. (2002) Homing chemokines in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* **4**:233-236.
6. Van Doornum S, McColl G and Wicks IP. (2002) Accelerated atherosclerosis: an extraarticular feature of rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* **46**:862-873.
7. van Aalst JA, Burmeister W, Fox PL and Graham LM. (2004) Alpha-tocopherol preserves endothelial cell migration in the presence of cell-oxidized low-density lipoprotein by inhibiting changes in cell membrane fluidity. *J Vasc Surg* **39**:229-237.
8. Terkeltaub R, Boisvert WA and Curtiss LK. (1998) Chemokines and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **9**:397-405.
9. Boring L, Gosling J, Cleary M and Charo IF. (1998) Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* **394**:894-897.
10. Koch AE, Kunkel SL, Burrows JC, Evanoff HL, Haines GK, Pope RM and Strieter RM. (1991) Synovial tissue macrophage as a source of the chemotactic cytokine IL-8. *J Immunol* **147**:2187-2195.
11. Hogan M, Sherry B, Ritchlin C, Fabre M, Winchester R, Cerami A and Bucala R. (1994) Differential expression of the small inducible cytokines GRO alpha and GRO beta by synovial fibroblasts in chronic arthritis: possible role in growth regulation. *Cytokine* **6**:61-69.
12. Koch AE, Kunkel SL, Harlow LA, Mazarakis DD, Haines GK, Burdick MD, Pope RM, Walz A and Strieter RM. (1994) Epithelial neutrophil activating peptide-78: a novel chemotactic cytokine for neutrophils in arthritis. *J Clin Invest* **94**:1012-1018.
13. Koch AE, Kunkel SL, Shah MR, Hosaka S, Halloran MM, Haines GK, Burdick MD, Pope RM and Strieter RM. (1995) Growth-related gene product alpha. A chemotactic cytokine for neutrophils in rheumatoid arthritis. *J Immunol* **155**:3660-3666.
14. Narumi S, Tominaga Y, Tamaru M, Shimai S, Okumura H, Nishioji K, Itoh Y and Okanoue T. (1997) Expression of IFN-inducible protein-10 in chronic hepatitis. *J Immunol* **158**:5536-5544.
15. Wooley PH, Schaefer C, Whalen JD, Dutcher JA and Counts DF. (1997) A peptide sequence from

- platelet factor 4 (CT-112) is effective in the treatment of type II collagen induced arthritis in mice. *J Rheumatol* **24**:890-898.
16. Nanki T, Hayashida K, El-Gabalawy HS, Suson S, Shi K, Girschick HJ, Yavuz S and Lipsky PE. (2000) Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* **165**:6590-6598
  17. Buckley CD, Amft N, Bradfield PF, Pilling D, Ross E, Arenzana-Seisdedos F, Amara A, Curnow SJ, Lord JM, Scheel-Toellner D and Salmon M. (2000) Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-beta 1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium. *J Immunol* **165**:3423-3429.
  18. Szekanecz Z and Koch AE. (2001) Chemokines and angiogenesis. *Curr Opin Rheumatol* **13**:202-208.
  19. Szekanecz Z, Kim J and Koch AE. (2003) Chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis. *Semin Immunol* **15**:15-21. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A and Schall TJ. (1997) A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* **385**:640-644.
  20. Ruth JH, Volin MV, Haines GK, 3rd, Woodruff DC, Katschke KJ, Jr., Woods JM, Park CC, Morel JC and Koch AE. (2001) Fractalkine, a novel chemokine in rheumatoid arthritis and in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum* **44**:1568-1581.
  21. Iordanov MS, Paranjape JM, Zhou A, Wong J, Williams BR, Meurs EF, Silverman RH and Magun BE. (2000) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase by double-stranded RNA and encephalomyocarditis virus: involvement of RNase L, protein kinase R, and alternative pathways. *Mol Cell Biol* **20**:617-627.
  22. Williams BR. (1999) PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* **18**:6112-6120.
  23. Auch CJ, Saha RN, Sheikh FG, Liu X, Jacobs BL and Pahan K. (2004) Role of protein kinase R in double-stranded RNA-induced expression of nitric oxide synthase in human astroglia. *FEBS Lett* **563**:223-228.
  24. Liu D, Cardozo AK, Darville MI and Eizirik DL. (2002) Double-stranded RNA cooperates with interferon-gamma and IL-1 beta to induce both chemokine expression and nuclear factor-kappa B-dependent apoptosis in pancreatic beta-cells: potential mechanisms for viral-induced insulinitis and beta-cell death in type 1 diabetes mellitus. *Endocrinology* **143**:1225-1234.
  25. Harcourt JL, Hagan MK and Offermann MK. (2000) Modulation of double-stranded RNA-mediated gene induction by interferon in human umbilical vein endothelial cells. *J Interferon Cytokine Res* **20**:1007-1013.
  26. Bandyopadhyay SK, de La Motte CA and Williams BR. (2000) Induction of E-selectin expression by double-stranded RNA and TNF-alpha is attenuated in murine aortic endothelial cells derived from double-stranded RNA-activated kinase (PKR)-null mice. *J Immunol* **164**:2077-2083.

27. Offermann MK, Zimring J, Mellits KH, Hagan MK, Shaw R, Medford RM, Mathews MB, Goodbourn S and Jagus R. (1995) Activation of the double-stranded-RNA-activated protein kinase and induction of vascular cell adhesion molecule-1 by poly (I).poly (C) in endothelial cells. *Eur J Biochem* **232**:28-36.
28. Lentsch AB and Ward PA. (2000) Regulation of inflammatory vascular damage. *J Pathol* **190**:343-348.
29. De Martin R, Hoeth M, Hofer-Warbinek R and Schmid JA. (2000) The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**:E83-88.
30. Reape TJ and Groot PH. (1999) Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **147**:213-225.
31. Froberg MK, Adams A, Seacotte N, Parker-Thornburg J and Kolattukudy P. (2001) Cytomegalovirus infection accelerates inflammation in vascular tissue overexpressing monocyte chemoattractant protein-1. *Circ Res* **89**:1224-1230.
32. Rott D, Zhu J, Burnett MS, Zhou YF, Wasserman A, Walker J and Epstein SE. (2001) Serum of cytomegalovirus-infected mice induces monocyte chemoattractant protein-1 expression by endothelial cells. *J Infect Dis* **184**:1109-1113.
33. Chen MC, Proost P, Gysemans C, Mathieu C and Eizirik DL. (2001) Monocyte chemoattractant protein-1 is expressed in pancreatic islets from prediabetic NOD mice and in interleukin-1 beta-exposed human and rat islet cells. *Diabetologia* **44**:325-332.
34. Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O and Imai T. (2004) Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**:34-40.
35. Goebeler M, Gillitzer R, Kilian K, Utzel K, Broucker EB, Rapp UR and Ludwig S. (2001) Multiple signaling pathways regulate NF-kappaB-dependent transcription of the monocyte chemoattractant protein-1 gene in primary endothelial cells. *Blood* **97**:46-55.