

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 細胞凋亡訊息與存活訊息途徑的探討:Hsp70 與 WOX1 在抑制 ceramide 誘導之細胞凋亡機制中所扮

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2320-B-040-052-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：中山醫學大學醫學系微生物及免疫學科

計畫主持人：詹明修

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 31 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

細胞凋亡訊息與存活訊息途徑之探討：Hsp70 與 WOX1 在抑制  
ceramide 誘導之細胞凋亡機制中所扮演的角色

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 91 - 2320 - B - 040 - 052 -

執行期間：91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

計畫主持人：詹明修

共同主持人：

計畫參與人員：

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

中華民國 92 年 10 月 16 日

## 中英文摘要

關鍵字: 細胞凋亡, ceramide, ERK

鋰離子具有抑制 ceramide 誘發之細胞凋亡, 而 PD98059 具有部分抑制鋰離子抗凋亡之效應。在 JC-1 測定 MMPT 與 caspase 3 活性實驗中, 我們發現鋰離子影響 ceramide 的作用機轉發生於粒線體進行 MMPT 之前, 但對於 PARP 的降解則與 ERK 活化與否無關。Hsp70、Hsp90 等在本系統中無顯著變化。另一方面, 我們發現在細胞內所偵測到的 WOX1 蛋白質分子量與先前所稱之 46kDa 不同 (>73 kDa), 且隨細胞給予 ceramide 誘發細胞凋亡時, 蛋白質分子量更大, 然而給予鋰離子抑制細胞凋亡則可抑制 ceramide 所促進之分子量增加的現象, 我們目前認為此分子量之增加可能是蛋白質受到修飾或是抗體所偵測到的是其他 WOX family members。已知 c-Myc 在 ERK 下游, 且 c-Myc 蛋白質在凋亡訊息中扮演雙面刃的角色。結果顯示 c-Myc 蛋白質的表現量於實驗各組之間無明顯差異, 但是在給予 ceramide 後 c-Myc 磷酸化有短暫之增加, 在一小時培養時增加, 之後又降低, 然而鋰離子可以抑制 ceramide 促進之 c-Myc 磷酸化。初步的結果顯示以抑制 c-Myc translocation 之 c-Myc 抑制劑可以影響鋰離子所造成的抑制凋亡作用。

Keywords: apoptosis, ceramide, ERK

We had demonstrated lithium could block ceramide-induced apoptosis. The effects of ERK activation and anti-apoptosis by lithium could partially inhibited by PD98059 pretreatment. Our results indicated ceramide induced caspase 3 activation before MMPT. Lithium treatment could block ceramide induced MMPT, but PD98059 did not have any effects on lithium-induced MMPT. Furthermore, PD98059 pretreatment could partially reverse lithium-blocked caspase 3 activation. We could not conclude the lithium effect on the expression of Hsp70 and Hsp90. On the other hand, ceramide induced highly molecular weight WOX protein expression, and lithium could reverse this effects. We suggest this molecular weight of WOX could be change by post-translational modification or alternative splicing. Some studies indicated c-Myc could be phosphorylated by ERK and JNK, and could upregulated Hsp70 expression. In our system, either in ceramide- or lithium-treated condition, the c-Myc expression did not have significantly change, but ceramide-treatment could transiently enhance c-Myc phosphorylation. In addition, c-Myc translocation inhibitor could enhance ceramide-induced apoptosis and reverse the antiapoptotic effect of lithium.

## 前言

熱休克蛋白 70 (Hsp70) 被認為具有保護細胞免於凋亡的作用，其機制可能與結合 AIF 或是 Apaf-1 等促細胞凋亡之蛋白質並抑制之有關 (Mosser et al., 2000; Ravagnan et al., 2001; Cande et al., 2002; Rubio et al., 2002)。由於 Fas 活化可以抑制 HSF-1 活性並抑制 Hsp70 表現 (Schett et al., 1999)，另一方面，Hsp70 具有抑制 TNF- $\alpha$  所誘發之致死性發炎休克反應 (Molle et al., 2002)，顯示細胞凋亡訊息與 Hsp70 的表現與功能扮演著相互調節的作用。我們之前初步的研究發現 ceramide，一促進細胞生長、分化以及凋亡的 secondary messenger，在促進 10I T 細胞凋亡過程中，Hsp70 似有進一步降解的作用。Ceramide 目前被歸類於許多細胞凋亡刺激物質傳遞凋亡訊息的重要因子，我們認為造成 Fas 抑制細胞內 Hsp70 表現是透過 ceramide 造成，抑或是 ceramide 下游是否抑制 HSF-1 等 transcription factor 的作用。我們先前的研究也顯示鎂離子具有保護細胞免於死亡的作用，我們發現鎂離子促進 MEK/ERK 及 PI3K/Akt 訊息途徑，另一方面，ceramide 卻是抑制此兩細胞存活之途徑，然而鎂離子可以阻斷 ceramide 抑制 ERK 訊息途徑的作用卻無法恢復 ceramide 對 Akt 之去活化。所以我們之前初步認為鎂離子透過 ERK 訊息途徑保護細胞免於 ceramide 誘發之細胞凋亡。為了更進一步證實鎂離子可能透過 ERK 下游的訊息傳遞，也包括 HSF-1 活化，的確造成抑制細胞凋亡，我們給予細胞於 ceramide 以及鎂離子處理之前，預先加入細胞 MEK/ERK 活化抑制劑 PD98059，觀察 ERK 下游可能訊息活化情形與 PD98059 抑制鎂離子抗凋亡的效果。近年來 WOX 蛋白質促進 TNF 誘發之細胞凋亡訊息已被報導 (Chan et al., 2001)。我們也進一步觀察 ceramide 誘發凋亡以及鎂離子保護細胞之機制是否經過 WOX 的調節。

## 研究方法

我們將 10I 細胞給予 40  $\mu$ M ceramide、20 mM 氯化鎂或 PD98059，於培養不同時間後收取細胞並製成蛋白質溶液，進行蛋白質電泳，並以特定蛋白之抗體，或是其磷酸化蛋白之抗體進行分析蛋白質在細胞內之含量與磷酸化的狀態。我們也以 propidium iodide 進行 DNA 染色並以流式細胞儀分析凋亡程度，對於細胞凋亡下游途徑的機制，也以蛋白質電泳與 active-form caspase 3 抗體與 caspase substrate PARP 專一抗體證實凋亡發生與否，並以 JC-1 染色並以流式細胞儀分析，來了解鎂離子等各試劑的作用是否影響粒線體。在 ERK 下游，與 Hsp70 表現之訊息有關之 transcription factors 除了 HSF-1 尚有 c-Myc，我們也給予細胞 c-Myc 抑制劑以觀察是否阻斷鎂離子的作用。

## 結果與討論

鎂離子具有抑制 ceramide 誘發之細胞凋亡，而 PD98059 具有部分抑制鎂離子抗凋亡之效應 (data not shown)，我們觀察該作用是否是顯示 PD98059 抑制鎂離子作用於粒線體。在 JC-1 染色之後測定細胞粒線體的 permeability transition，我們發現 ceramide 在作用細胞三小時以後方促使 MPT 發生，且鎂離子可以抑制 ceramide 對粒線體的作用。然而 PD98059 預先處理並無法阻斷鎂離子的作用(圖一)。顯示鎂離子的作用可能在粒線體凋亡反應之下游，亦或是鎂離子透過 ERK 抑制凋亡的途徑非經由粒線體 粒線體 MMTP 下游透過活化 caspase 3 並切割 PARP 等蛋白質，圖二 A 顯示 ceramide 作用三小時活化 caspase 3，而鎂離子可以阻斷之，此與圖一顯示之 JC-1 染色結果顯示 ceramide 對粒線體的作用較活化 caspase 3 遲，由於 caspase 3 受 ceramide 活化可不經過粒線體即可發生，而此途徑可受鎂離子經由 ERK 訊息途徑阻斷。我們初步的結果顯示 PARP 受 ceramide 作用於細胞而分解，鎂離子抑制 PARP 分解並不受到 PD98059 的影響，顯示可能除了 caspase 3 外，尚有其他 caspase 的作用於 PARP，且該 caspase(s) 活化與 ERK 訊息途徑無關但仍受鎂離子的抑制(圖二 B)。Hsp70 在細

胞內的表現量即非常的高，我們先前在給予 ceramide 處理之下，細胞內的 Hsp70 含量有降低的趨勢，而給予鋰離子則有抑制 Hsp70 減少的作用。然而，我們並無法十分明確的證明這一點，Hsp70 的表現在不同次的實驗中，時有未明顯變化或是因處理各種試劑後培養時間不同而有不同的趨勢（圖三），另一方面，Hsp90(圖三)與 Hsp72(data not shown)的表現亦無明顯變化。雖我們目前認為 Hsp70 的蛋白質表現影響可能不顯著，然而 Hsp70 的 translocation 或是否有其他 modification 如 phosphorylation 是我們繼續要觀察的項目。

另一方面，我們也偵測 WOX1 蛋白質的表現，以及其磷酸化的變化是否與凋亡發生有關？我們發現在細胞內所偵測到的 WOX1 蛋白質分子量與先前所稱之 46kDa 不同 (>73 kDa)，且隨細胞給予 ceramide 誘發細胞凋亡時，蛋白質分子量更大，然而給予鋰離子抑制細胞凋亡則可抑制 ceramide 所促進之分子量增加的現象，我們目前認為此分子量之增加可能是蛋白質受到修飾或是抗體所偵測到的是其他 WOX family members。其中有關修飾的部分，ubiquitination 及 sumoylation 是我們想進一步觀察的方向。有趣的是，細胞預處理 PD98059 後鋰離子造成之 WOX 的分子量改變之效應會恢復（圖五）。

已知 c-Myc 在 ERK 下游，且 c-Myc 蛋白質在凋亡訊息中扮演雙面刃的角色。一方面 c-Myc 與增加 Hsp70 表現，可抑制細胞凋亡，另一方面，c-Myc 大量表現又與促進凋亡有關。我們遂偵測 c-Myc 蛋白表現量與磷酸化的變化是否與鋰離子作用或是 Hsp70 表懸等作用有相關性。如圖五顯示，c-Myc 蛋白質的表現量於實驗各組之間無明顯差異，但是在給予 ceramide 後 c-Myc 磷酸化有短暫之增加，在一小時培養時增加，之後又降低，然而鋰離子可以抑制 ceramide 促進之 c-Myc 磷酸化。給予 PD98059 對於鋰離子的作用與 ceramide 作用無明顯影響。由於 JNK 與 ERK 可磷酸化 c-Myc，並促進之後的降解，此降解受到作用也受到 Akt/GSK-3 $\beta$ 的作用，值得注意的是，我們先前的發現顯示鋰離子雖可恢復受 ceramide 作用而降低的 ERK 活性，但是對於 Akt 去活化則沒有影響，所以我們推測 ceramide 促進 JNK 與 GSK-3 $\beta$  活性將增加 c-Myc 被磷酸化以及留在細胞質內，近一步可能被降解，但是鋰離子增加之 ERK 活性與抑制 GSK-3 $\beta$  活性將使 c-Myc 之 Thr58 無磷酸化，進一步可能增加糖化(glycosylation)現象，如此 c-Myc 得以進入細胞核。為了了解 c-Myc 在 ceramide-induced apoptosis 過程中可能無法進入細胞核，而鋰離子可能促進 c-Myc 進入細胞核，我們給予一個 c-Myc 抑制劑，該試劑是 oligopeptides 可阻止 c-Myc 進入細胞核內進行 transcription modulation。圖六顯示 c-Myc 抑制劑可以影響鋰離子所造成的抑制凋亡作用，雖然這僅是初步的結果尚須進一步證實。

## 參考文獻

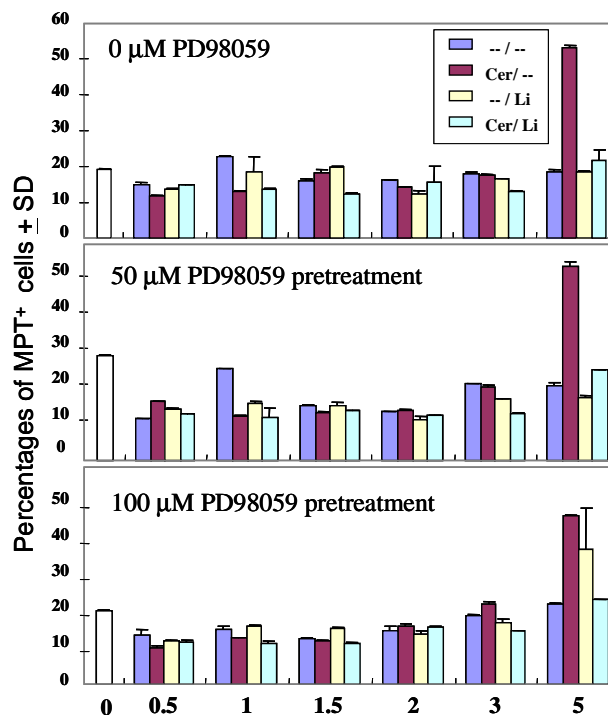
- Cande, C., I. Cohen, E. Daugas, L. Ravagnan, N. Larochette, N. Zamzami, and G. Kroemer. 2002. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*. 84:215-22.
- Chang, N.-S., N. Pratt, J. Heath, L. Schultz, D. Sleve, G. B. Carey, and N. Zevotek. 2001. Hyaluronidase induction of a WW Domain-containing oxidoreductase that enhances tumor necrosis factor cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 276:3361-3370.
- Molle, W. V., B. Wielockx, T. Mahieu, M. Takada, T. Taniguchi, K. Sekikawa, and C. Libert. 2002. HSP70 protects against TNF-induced lethal inflammatory shock. *Immunity* 16: 685-695.
- Mosser, D. D., A. W. Caron, L. Bourget, A. B. Meriin, M. Y. Sherman, R. I. Morimoto, and B.

- Massie. 2000. The Chaperone Function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 20:7146-7159.
- Ravagnan, L., S. Gurbuxani, S. A. Susin, C. Maise, E. Daugas, N. Zamzami, T. Mak, M. Jaattela, J. M. Penninger, C. Garrido, and G. Kroemer. 2001. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nature Cell Biol.* 3:839-43.
- Rubio, E., A. I. Valenciano, C. Segundo, N. Sanchez, F. de Pablo and E. J. de la Rosa. 2002. Programmed cell death in the neurulating embryo is prevented by the chaperone heat shock cognate 70. *Eur. J. Neurosci.* 15:1646-1654.
- Schett, G., C.-W. Steiner, M. Groger, S. Winkler, W. Graninger, J. Smolen, Q. Xu, and G. Steiner. 1999. Activation of Fas inhibits heat-induced activation of HSF1 and up-regulation of hsp70. *FASEB J.* 13: 833-842.

## 計畫成果自評

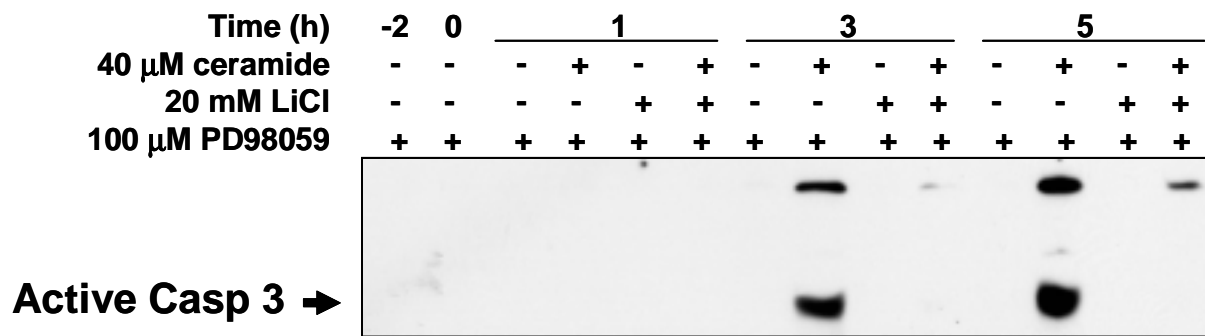
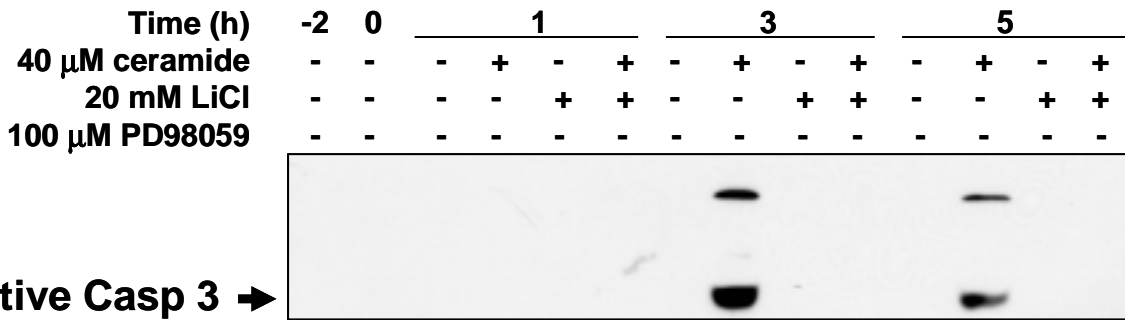
雖然我們對於 Hsp70 在鋰離子抑制 ceramide 誘導之細胞凋亡過程中所扮演的角色尚無法給予定論，但是在鋰離子作用之下游訊息中發現 MEK/ERK 所扮演的角色是重要的，同時也發現 ceramide 短暫促進 c-Myc 的磷酸化，鋰離子可抑制此磷酸化。同時，我們發現 WOX 在 ceramide 誘導細胞凋亡時產生分子量增加的趨勢，可能是受到修飾或是產生不同的 isoform。過去對於蛋白質在凋亡過程中被修飾的多著重在磷酸化與否，吾人認為 ubiquitination 及近年來所重視的 sumoylation 可能扮演角色。由於 WOX 是一 tumor suppressor，WOX1 是否需要進一步修飾來改變其功能將是重要且有趣的問題。吾人認為對 ERK 對於影響 ceramide 誘導之細胞凋亡途徑有顯著調控之作用。我們將繼續探討此一問題，另 c-Myc 在此系統中的角色亦將做持續的研究。

## 附錄

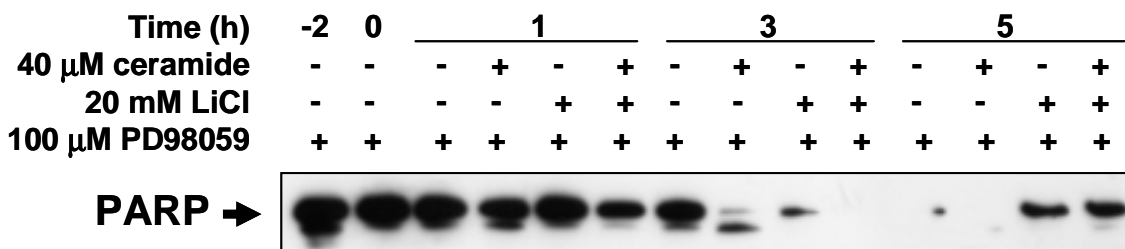
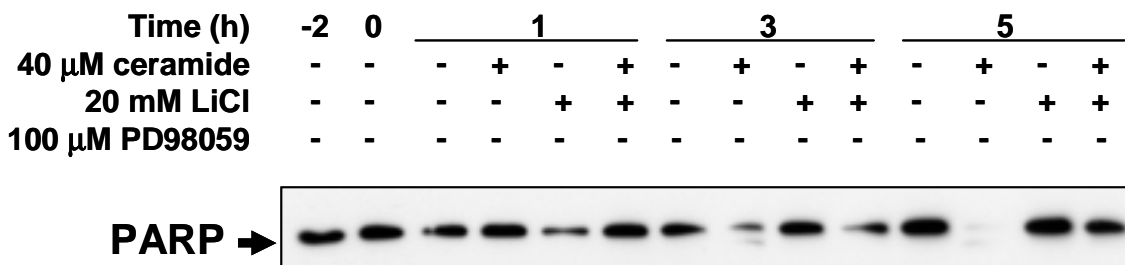


**Figure 1.** PD98059 could not block the effects of lithium on ceramide-induced mitochondria permeability transition. 10I cells were cultured for the indicated hours in medium either without or containing ceramide, lithium chloride and/or PD98059. After harvest cells, cells were cultured with JC-1 for 10 min and washed with PBS. The fluorescence and the percentage of MPT+ cells were analyzed by flow cytometry.

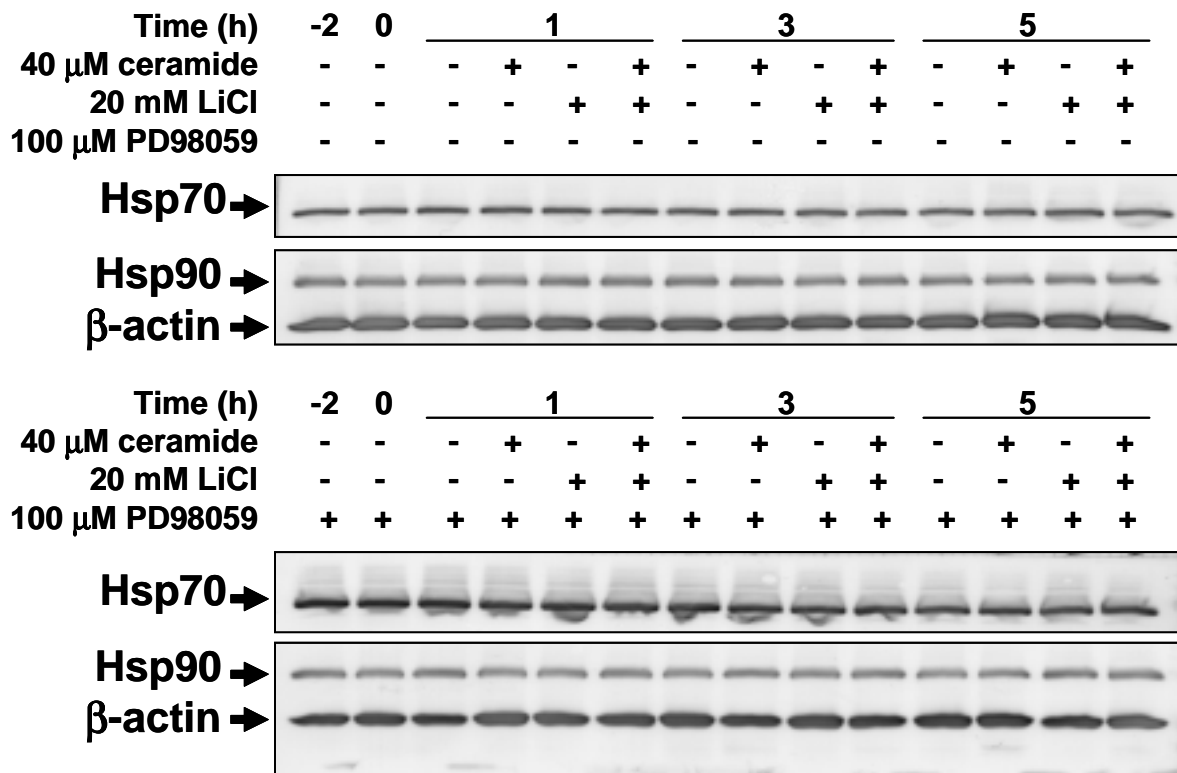
**A**



**B**

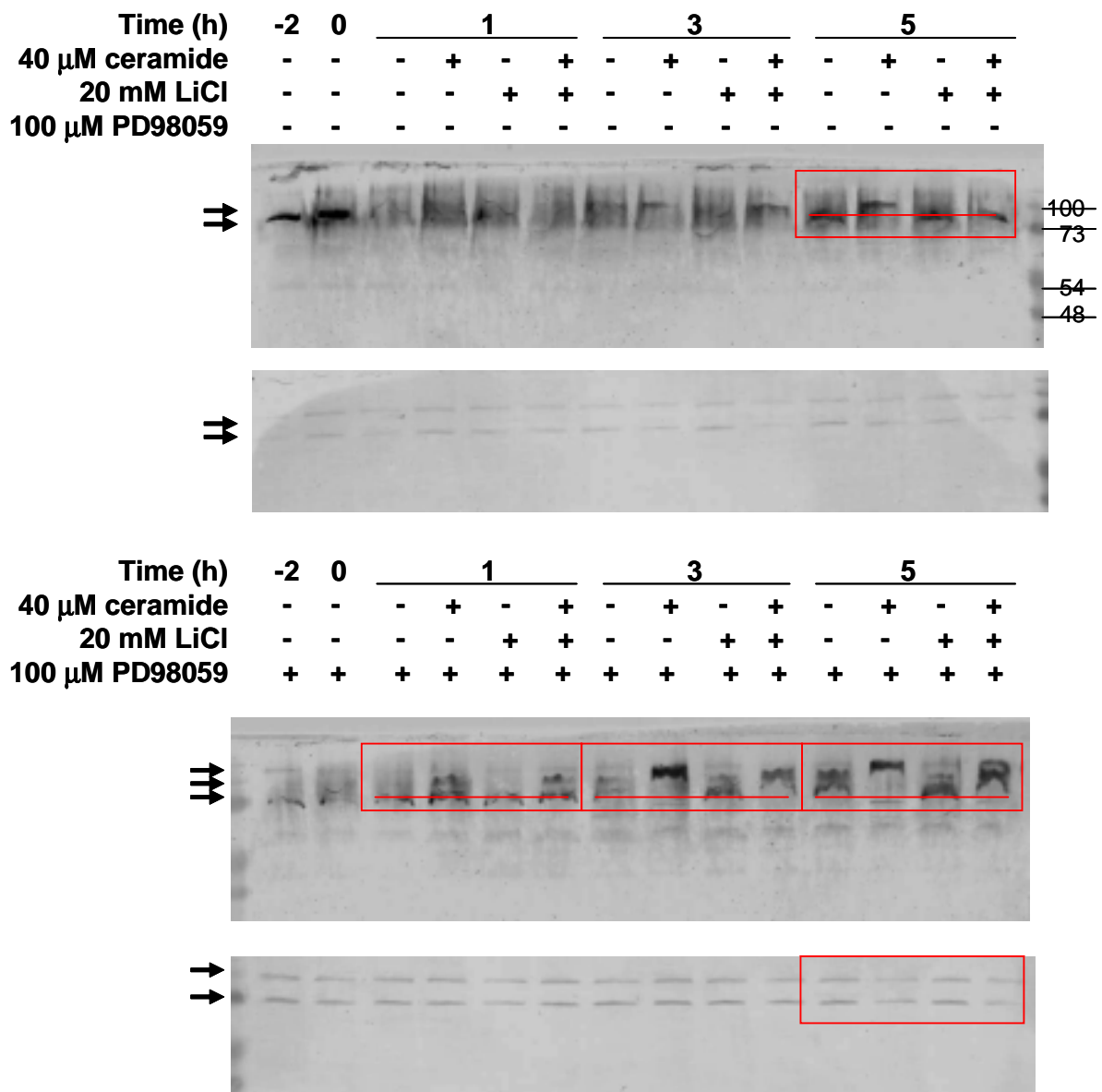


**Figure 2.** Profile of caspase 3 activity and PARP degradation on apoptotic cells. 10I cells were pretreated with or without 100  $\mu$ M PD98059 for two hours and then cultured for additional periods in medium either without or containing ceramide, lithium chloride, and/or PD98059. The active caspase 3 and PARP were detected with specific antibodies by western blotting.

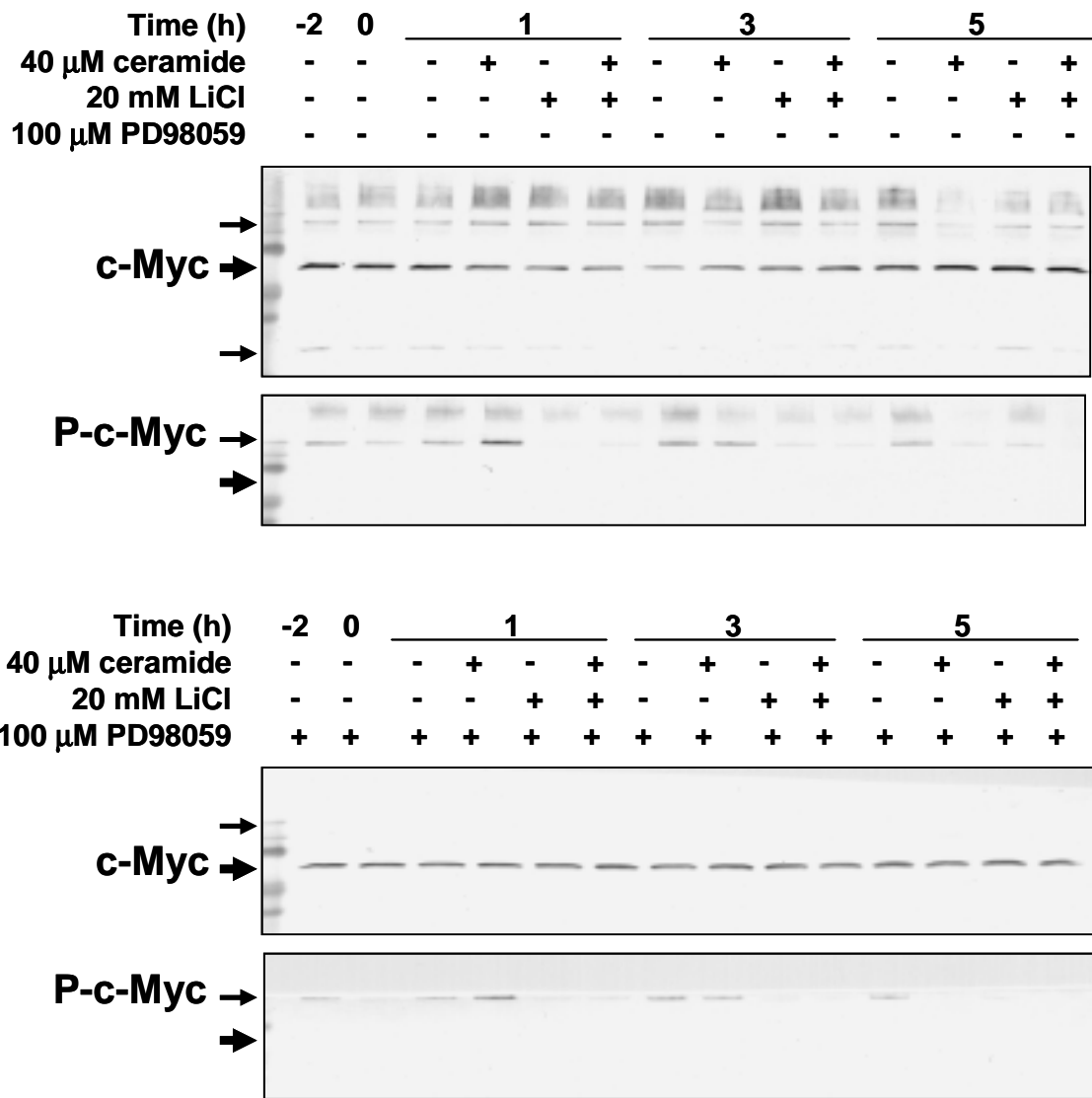


**Figure 3.** Profile of Hsp70 expression on apoptotic cells. 10I cells were pretreated with or without 100  $\mu$ M PD98059 for two hours and then cultured for additional periods in medium either without or containing ceramide, lithium chloride, and/or PD98059. The Hsp70 and  $\beta$ -actin protein were detected with specific antibodies by western blotting.

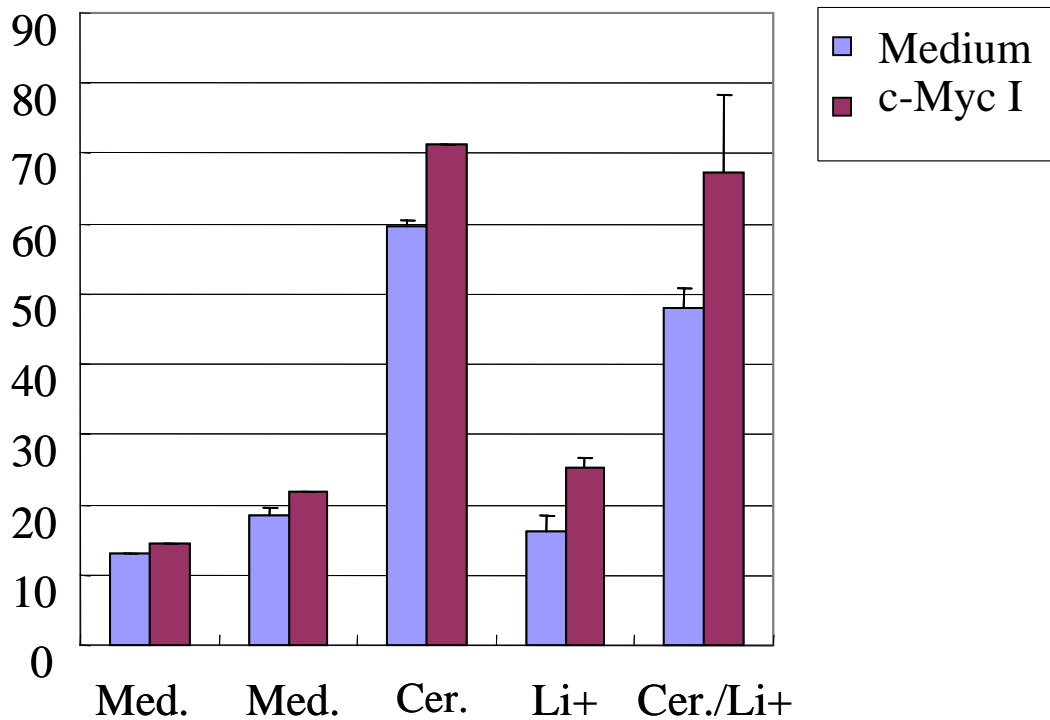




**Figure 4.** Profile of WOX1 expression and phosphorylation on apoptotic cells. 10I cells were pretreated with or without 100  $\mu$ M PD98059 for two hours and then cultured for additional periods in medium either without or containing ceramide, lithium chloride, and/or PD98059. The WOX1 protein and phospho-WOX were detected with specific antibodies by western blotting.



**Figure 5.** Profile of c-Myc expression and phosphorylation on apoptotic cells. 10I cells were pretreated with or without 100  $\mu$ M PD98059 for two hours and then cultured for additional periods in medium either without or containing ceramide, lithium chloride, and/or PD98059. The c-Myc protein and phospho-c-Myc were detected with specific antibodies by western blotting.



**Figure 6.** 10I cells were pretreated with or without 10  $\mu$ M c-Myc inhibitor for 24 hours and then culture with 40 mM ceramide and/or 20 mM lithium chloride for additional culture period. After culture for six hours, cells were harvest and then fixed with 70% ethanol and 30% PBS. The fixed cells were analyze for the percentage of apoptotic cells by propidium iodide staining and flow cytometry.