

國立臺灣大學工學院化學工程學研究所

碩士論文

Department of Chemical Engineering

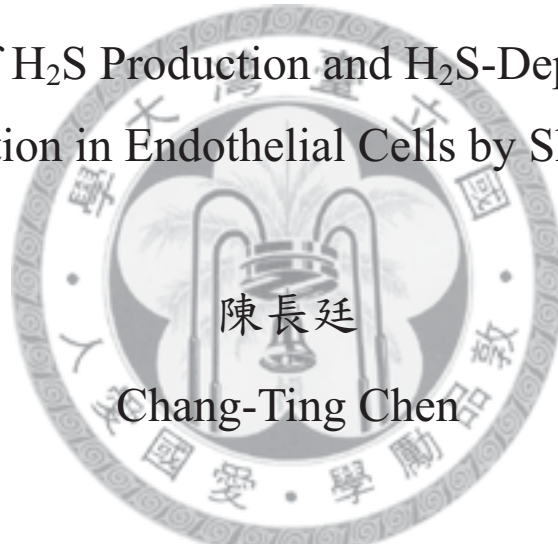
College of Engineering

National Taiwan University

Master Thesis

剪力對內皮細胞中硫化氫生成之調控與訊息傳導之影響

Regulation of H₂S Production and H₂S-Dependent Signal
Transduction in Endothelial Cells by Shear Stress



陳長廷

Chang-Ting Chen

指導教授：謝學真 博士

王 寧 博士

Advisors: Hsyue-Jen Hsieh, Ph.D.

Danny Ling Wang, Ph.D.

中華民國 100 年 7 月

July 2011

致謝

如果有人問我研究所這兩年對我人生產生了甚麼意義，現在的我大概答不出來，因為此時內心百感交集。當初碩一剛入學時，看著申請到國外學校的同學們展開新的生活，其實相當懊悔自己留在台大念碩士班的決定。如今兩年過去了，回頭看這兩年生活的一點一滴，卻也不知不覺的豐富了我的求學生涯，現在反而覺得，如果少了這兩年，我的生命或許就錯過了許多精彩的事情。

碩士班兩年的研究生活其實是非常愉快的，我想主要要歸功於中研院生醫所王寧老師以及台大化工系謝學真老師兩位指導教授的悉心指導，讓我既能夠有足夠的空間與資源獨立的去實踐我在研究上的想法，又能夠適時的得到重要的指導。謝學真教授是我所見過最兼具學術涵養與人格修養的教授之一，跟謝老師的談話無論是實驗上的還是生活上的，都令人感覺如沐春風，且收穫良多；王寧老師在學術上的知識以及地位更是不在話下，此外，王老師在實驗資源上的支持，以及精闢的建議，讓我這個半路出家作生物研究的學生有了最堅強的後盾。在此由衷感激兩位老師的教導。除了兩位指導教授以外，在我實驗啟蒙階段其實還有第三位重要的老師，那就是中研院生化所劉靜安博士。靜安學姊在我剛剛跨入分子生物實驗時給予了最踏實的訓練，無論是觀念上或者實際操作上，都替我奠定了堅實的基礎，在此要向她致上謝意。此外，也要感謝中研院王寧老師實驗室的學長姊以及台大化工生醫工程實驗室的小周、林雨利、小逸學長還有婷芸學姊，在實驗室生活上的幫忙。

跟作研究同樣重要的，我想就是自己的生活了吧！這兩年的光陰多虧了一起打球的吉米，一起衝浪聊天吃飯的侯冠宇，三不五時會碰頭的高中同學們，還有 ISO 的大家，才不致讓我研究生活以外留白。

最重要的，我要感謝我的家人，我的爸媽、阿公阿嬤，還有我阿姨，他們為我提供了最溫暖的後盾，讓我知道無論我的選擇是甚麼，他們永遠支持我，讓我知道我累的時候有一個家可以回去。研究所畢業對我一個人來說只是完成了一個階段，但是我的家人無論是在大學畢業或者研究所畢業，都堅持特地從台北來參加我的畢業典禮，深深的讓我感受到他們以我為榮，我完成的不只是個人的一小步，對他們來說，是一個成就。雖然尚未為國家社會奉獻甚麼的我，對這樣的重視難免覺得愧疚，但我永遠心懷感激，並期待自己未來能夠做個真正讓我的家人引以為傲的人。

未來當兵、出國、甚至是工作的生活對我來說是未知的，剛剛畢業，站在人生的十字路口上的我，內心充滿著對美好未來的期待，也有對於未知生活的不安。希望無論以後到哪裡、遇到甚麼事、碰上甚麼人，都能夠如此刻般心懷感激，並且“昂首闊步，不留一絲遺憾”。



中文摘要

硫化氫是近年來受到許多研究關注的細胞內氣體傳導分子 (gasotransmitter)，在心血管系統中，硫化氫產生許多的保護作用。層流剪力 (laminar shear stress) 亦是提供心血管保護作用的因子之一，且剪力與硫化氫所誘發的訊息傳導多有類似之處。然而，目前關於剪力對硫化氫生成量的影響，乃至於硫化氫在剪力誘導的訊息傳導方面的知識非常有限，因此，本論文將對此課題作深入討論，主要討論方向有兩點：第一，剪力是否增加細胞內硫化氫生成量；第二，硫化氫對剪力誘導的訊息傳導之影響。

由於在心血管系統中血液流動所產生的剪力最主要作用在血管內皮細胞 (vascular endothelial cells) 上，因此，本論文主要以人類臍帶靜脈內皮細胞 (HUVECs) 以及牛大動脈內皮細胞 (BAECs) 為研究對象。實驗發現，層流剪力在作用 30 分鐘之後，會使 BAECs 內的硫化氫生成速率提升 5 倍。然而，三種可能參與硫化氫生成的酵素：cystathionine- γ -lyase (CSE)、cystathionine- β -synthase (CBS) 與 3-mercapto-sulfurtransferase (3-MST) 的蛋白質質量在剪力作用 30 分鐘後皆無明顯變化，顯示剪力可能透過增加上述硫化氫生成酵素之活性來提高硫化氫之生成量。至於探討硫化氫對剪力誘導的訊息傳導之影響方面，主要使用 CSE、CBS 與 3-MST 的 siRNA 分別抑制其表現量，再觀察剪力刺激下細胞內訊息傳導的變化。結果發現 pAkt 在受剪力刺激後所被誘導的程度會被上述三種 siRNA 所抑制，可以推論剪力作用所造成的 pAkt 上升，部分是由於細胞內硫化氫增高所導致。

綜合以上研究結果，可以發現剪力所產生的心血管保護作用可能部份來

自於內皮細胞中硫化氫濃度升高的效應，且 CSE、CBS 以及 3-MST 可能是負責硫化氫生成主要的酵素。此外，實驗結果更進一步指出 pAkt 可能在硫化氫相關的心血管保護作用中扮演重要的角色。

關鍵詞：剪力；硫化氫；內皮細胞；心血管保護；Akt。



Abstract

Hydrogen sulfide (H₂S) is a novel gasotransmitter in cardiovascular system, it renders multiple cardioprotective effects. Laminar shear stress is also a cardioprotective factor in cardiovascular system, which shares many similarities in downstream signal transduction pathways with H₂S. However, knowledge about the regulation of H₂S production by shear stress and the role of H₂S in shear-induced signal transduction is still limited. In the present study, efforts were made to investigate the effect of shear stress on H₂S production. Furthermore, the role of H₂S in shear-induced cell signaling is also discussed.

In cardiovascular system, shear stress exerted by blood flow mainly affects vascular endothelial cells (ECs). Thus, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and bovine aortic endothelial cells (BAECs) are used in present study. After laminar shear stress stimulation for 30 minutes, H₂S production rate is enhanced by 5 fold in BAECs. Three enzymes possibly involved in H₂S production—cystathionine- γ -lyase (CSE), cystathionine- β -synthase (CBS), and 3-mercapto-sulfurtransferase (3-MST)—are not significantly affected by shear stress in terms of protein and mRNA level, implying the possibility that shear stress enhances H₂S production rate by increasing CSE, CBS, and 3-MST enzyme activities. In order to study the role of H₂S in shear-induced cell signaling, CSE, CBS, and 3-MST were knocked down by siRNAs before HUVECs were stimulated by shear stress. Results show that shear-induced Akt phosphorylation is inhibited by CSE, CBS, and 3-MST siRNAs.

In conclusion, shear-induced cardioprotective effect might be partly a result of increased H₂S concentration in ECs. Further, shear stress induces Akt phosphorylation in a H₂S-dependent way.

Keywords : shear stress, hydrogen sulfide, endothelial cells, cardioprotective, Akt.



目錄

致謝	I
中文摘要	III
Abstract.....	V
目錄	VII
圖目錄	X
表目錄	XIII
縮寫與符號說明	XIV
中英文名詞對照	XVII
第 1 章 文獻回顧	1
1.1. 常見心血管疾病	1
1.1.1. 動脈粥狀硬化 (Atherosclerosis).....	1
1.1.2. 高血壓 (Hypertension).....	6
1.2. 血管內皮細胞與剪力	8
1.2.1. 血管內皮細胞.....	8
1.2.2. 剪力對血管內皮細胞之影響	12
1.3. 硫化氫與其生理功能	17
1.3.1. 硫化氫在生理上的特性	17
1.3.2. 硫化氫之生成.....	18
1.3.3. 硫化氫對心血管系統之影響	24
1.4. Akt 訊息傳導	30
1.4.1. Akt 於心血管系統扮演之角色	30
1.4.2. 剪力對 Akt 訊息傳導之調控	34
1.5. 一氧化氮 (Nitric Oxide) 訊息傳導	35

1.5.1.	一氧化氮於心血管系統之生成與扮演之角色	35
1.5.2.	剪力對一氧化氮訊息傳導之調控	39
1.6.	ERK 訊息傳導	40
1.6.1.	ERK 於心血管系統扮演之角色	40
1.6.2.	剪力對 ERK 訊息傳導之調控	44
1.7.	研究動機與目的	45
第 2 章	實驗材料、儀器、原理與方法	47
2.1.	實驗材料	47
2.1.1.	細胞培養及流動實驗	47
2.1.2.	西方墨點轉印法	48
2.1.3.	siRNA 轉染	49
2.1.4.	硫化氫測定	49
2.1.5.	反轉錄	49
2.1.6.	即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time quantitative PCR) ...	50
2.1.7.	免疫沉澱(Immunoprecipitation)	50
2.1.8.	實驗耗材	50
2.2.	實驗儀器	52
2.3.	實驗原理與方法	53
2.3.1.	初級人類臍帶靜脈內皮細胞培養	53
2.3.2.	人類臍帶靜脈內皮細胞繼代培養	54
2.3.3.	牛主動脈內皮細胞繼代培養	54
2.3.4.	內皮細胞繼代培養於玻片	54
2.3.5.	流動實驗	55
2.3.5.1.	流動室之設計	55
2.3.5.2.	流動實驗之設計與流程	60
2.3.6.	細胞內蛋白質抽取	63

2.3.7.	蛋白質含量測定.....	63
2.3.8.	西方墨點法.....	63
2.3.9.	細胞內 total RNA 之抽取.....	64
2.3.10.	反轉錄.....	65
2.3.11.	即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time quantitative PCR) ...	65
2.3.11.1.	DyNAmo™ Flash SYBR® Green qPCR	65
2.3.11.2.	TaqMan® Gene Expression Assay.....	66
2.3.12.	siRNA 轉染	67
2.3.13.	免疫沉澱.....	67
2.3.14.	硫化氫測定.....	67
2.3.15.	量化與統計方法.....	70
第 3 章	實驗結果與討論.....	71
3.1.	剪力對硫化氫生成速率之調控.....	71
3.2.	剪力對硫化氫合成酵素之影響.....	73
3.2.1.	剪力對硫化氫合成酵素 mRNA 之調控.....	73
3.2.2.	剪力對硫化氫合成酵素蛋白質表現之調控	76
3.3.	Calmodulin 對硫化氫生成酵素之調控.....	78
3.4.	硫化氫對內皮細胞之影響.....	81
3.5.	剪力誘導之訊息傳導與硫化氫之關係.....	86
3.5.1.	硫化氫清除劑對剪力誘導之訊息傳導之影響	86
3.5.2.	硫化氫生成酶 siRNA 對剪力誘導之訊息傳導之影響	89
3.6.	綜合討論.....	103
第 4 章	結論.....	109
4.1.	結論.....	109
4.2.	未來研究方向.....	111
參考文獻	113

圖目錄

Fig. 1.1 Four stages of Atherosclerosis	5
Fig. 1.2 Structure of a typical artery.....	10
Fig. 1.3 Hemodynamic forces that affect endothelial cells	11
Fig. 1.4 The range of wall shear stress in normal human veins, arteries, and low-shear or high-shear pathologic states	14
Fig. 1.5 Flow pattern in a detailed model of human carotid artery	15
Fig. 1.6 The heterogeneous response of the endothelium to various shear stress patterns.....	16
Fig. 1.7 Transsulfuration pathway.....	20
Fig. 1.8 Formation of hydrogen sulfide.....	21
Fig. 1.9 CSE is activated in the presence of calcium and calmodulin	22
Fig. 1.10 Regulation of CBS activity by calcium and calmodulin.....	23
Fig. 1.11 Hydrogen sulfide-mediated cardioprotection and its signal pathways .	29
Fig. 1.12 The structure of Akt and mechanism of activation	32
Fig. 1.13 Cellular functions of ten Akt substrates	33
Fig. 1.14 NO production and reaction of NO with other molecules	37
Fig. 1.15 NO regulates protein functions by different post-translational modifications	38
Fig. 1.16 The mitogen-activated protein kinase (MAPK) core signaling module	42
Fig. 1.17 MAPK phosphorylation systems	43
Fig. 1.18 Scheme of current research	46
Fig. 2.1 Parallel plate laminar flow chamber	56
Fig. 2.2 The geometry of flow chamber	58

Fig. 2.3 Flow chamber system.....	62
Fig. 2.4 Hydrogen sulfide assay calibration curve	69
Fig. 3.3 Shear stress does not affect CSE mRNA expression levels in endothelial cells.....	75
Fig. 3.4 Effect of shear stress on expression levels of hydrogen sulfide producing proteins in endothelial cells.....	77
Fig. 3.5 CSE and CBS are not associated with calmodulin after BAECs were treated with calcium ionophore, A23187.....	80
Fig. 3.6 Effect of hydrogen sulfide donor on Akt, ERK, and eNOS phosphorylation in BAECs.....	84
Fig. 3.7 Effect of hydrogen sulfide donor on Akt, ERK, and eNOS phosphorylation in HUVECs.....	85
Fig. 3.8 Effect of hydrogen sulfide scavenger on shear-induced cell signaling...88	
Fig. 3.9 Effect of CBS siRNA on cell signaling after shear stress stimulation (western blot).....	91
Fig. 3.10 Effect of CBS siRNA on cell signaling after shear stress stimulation (statistic figure).....	93
Fig. 3.11 Effect of CSE siRNA on cell signaling after shear stress stimulation (western blot).....	95
Fig. 3.12 Effect of CSE siRNA on cell signaling after shear stress stimulation (statistic figure).....	97
Fig. 3.13 Effect of 3-MST siRNA on cell signaling after shear stress stimulation (western blot).....	99
Fig. 3.14 Effect of 3-MST siRNA on cell signaling after shear stress stimulation (statistic figure).....	101
Fig. 4.1 Laminar shear stress enhances H ₂ S production in endothelial cells and	

results in Akt phosphorylation in a H₂S-dependent way 110



表目錄

Table 1.1 Definition of hypertension.....7



縮寫與符號說明

3MP	3-mercaptopyruvate
3-MST	3-mercapto-sulfurtransferase
AMPK	AMP-activated protein kinase
ARE	antioxidant responsive element
BAEC	bovine arotic endothelial cell
CAT	cysteine aminotransferase
CBS	cystathionine- β -synthase
CPR	cardiopulmonary resuscitation
CSE	cystathionine- γ -lyase
CX43	connexin43
EC	endothelial cell
EDFR	endothelium-dependent relaxing factor
Egr1	early growth response 1
ELAM-1	endothelial-leukocyte adhesion molecule-1
eNOS	endothelial cell nitric oxide synthase
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
ET-1	endothelin-1
FAK	focal adhesion kinase
FOXO3a	forkhead transcription factor 3a
HO-1	heme oxygenase-1
HSP	heat shock protein
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IL-1	interleukin-1
IL-8	interleukin-8
I/R injury	ischemia-reperfusion injury
K _{ATP} channel	ATP-sensitive K ⁺ channel

LDL	low density lipoprotein
MAP3K	MEK kinases
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MEK	mitogen-activated ERK kinase
MMP	matrix metalloprotease
MPTP	mitochondrial permeability transition pore
NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
Nrf2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2
OPN	osteopontin
oxLDL	oxidized low density lipoprotein
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PCAM-1	platelet cell adhesion molecule 1
PDGF	platelet derive growth factor
PDK	phosphoinositide-dependent kinase
PH	pleckstrin homology
PI3K	phosphatidylinositol 3 kinase
PIP ₃	phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PKA	protein kinase A
PKB	protein kinase B
PKC	protein kinase C
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10
RISK pathway	reperfusion injury salvage kinase pathway
ROS	reactive oxygen species
SERCA	sarco-endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase
SHP2	Src homology 2-containing tyrosine phosphatase
siRNA	small interfering RNA
SP-1	sphingosine-1-phosphate

SSRE	shear stress response element
STAT-3	signal transducers and activators of transcription-3
TGF	transforming growth factor
TM	thrombomodulin
TNF α 、 β	tumor necrosis factor α 、 β
tPA	tissue plasminogen activator
Trx	thioredoxin
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VSMC	vascular smooth muscle cell



中英文名詞對照

adhesion molecules	附著分子
adrenomedullin	腎上腺髓質素
adventitia	外膜層
allosteric activation	異位活化
antioxidant responsive element	抗氧化基因
aorta	大動脈
apoptosis	程式化細胞凋亡
atheromatous plaque	動脈粥狀硬化斑塊
atherosclerosis	動脈粥狀硬化
ATP-sensitive K ⁺ channel	K _{ATP} 通道
BAEC	牛動脈內皮細胞
calmodulin	攜鈣素
calpain	鈣蛋白酶
cardiomyocytes	心肌細胞
cardioprotection	心血管保護
cardiopulmonary resuscitation	心肺復甦術
cell junction	細胞通道
chemokine	趨化激素
collagenase	膠原蛋白酶
cysteine	半胱氨酸
cytokine	細胞激素
disturbed flow	擾流
EC junction	內皮細胞連接處
elastic lamella	彈性纖維板
endothelial cell	內皮細胞
endothelial-leukocyte adhesion molecule-1	內皮細胞與白血球黏著分子
endothelin-1	內皮素-1
endothelium-dependent relaxing factor	內皮細胞鬆弛因子



eNOS	內皮細胞一氧化氮合成酶
fibrinolysis	纖維蛋白溶解
fibroblast	纖維母細胞
foam cell	泡沫細胞
glutathione	穀胱甘肽
growth factor	生長因子
heat shock protein	熱休克蛋白質
hepatic vascular bed	肝血管床
hepatocyte	肝細胞
hippocampal long-term potentiation	海馬長效增益作用
homocysteine	同胱胺酸
homocysteinemia	同胱胺酸過高症
hormone	荷爾蒙
HUVEC	人類臍帶靜脈內皮細胞
hyperpolarization	過極化
hypoxia	缺氧
ICAM-1	細胞間附著分子
infarction	梗死
inflammation	發炎
inositol	肌醇
insulinoma	胰島素瘤細胞
intercellular adhesion molecule-1	細胞間附著分子-1
interleukin-1	一號介白素
interleukin-8	八號介白素
intima	血管壁內膜
ischemia	缺血
ischemia-reperfusion injury	缺血-再灌注傷害
laminar flow	層流
L-arginine	左旋精胺酸
L-citrulline	瓜胺酸



low-density lipoprotein	低密度脂蛋白
macrophage	巨噬細胞
macrophage colony-stimulating factor	巨噬細胞群落刺激因子
matrix metalloprotease	基質金屬蛋白酵素
media	中膜
methionine	蛋胺酸
mitochondria	粒線體
mitochondrial respiration	粒線體呼吸作用
monocyte chemotactic protein-1	單核白血球趨化蛋白-1
myocardial infarct size	心肌梗死面積
myocardial ischemic injury	心肌缺血傷害
myocardium	心肌
nervi vascularis	小神經
nitration	硝化反應
nitric oxide	一氧化氮
nitric oxide synthase	一氧化氮合成酶
nitrosothiol	亞硝基硫醇
normal stress	正向應力
osteopontin	造骨蛋白
oxidative stress	氧化逆境
oxidized low-density lipoprotein	氧化態低密度脂蛋白
plasminogen activator inhibitor-1	血纖維蛋白溶酶原激活劑抑制劑-1
plaque	斑塊
platelet-derived growth factor	血小板衍生生長因子
polysulfide	多硫化物
portal vein	門靜脈
post-translational modification	轉譯後修飾
primary hypertension	原發性高血壓
proinflammatory molecules	促發炎因子
promoter	啟動子



prostacyclin	環前列腺素
protein kinase A	蛋白激酶 A
protein kinase B	蛋白激酶 B
protein kinase C	蛋白激酶 C
pyruvate	丙酮酸
reactive oxygen species	活性氧族群
redox stress	氧化還原逆境
S-adenosylmethionine	S-腺苷基蛋氨酸
secondary hypertension	繼發性高血壓
serine	絲胺酸
shear stress	剪應力
subendothelial layer	內皮下層
subendothelium	內皮細胞下層
superoxide anion	超氧陰離子
tensile stress	抗張應力
thrombin	凝血蛋白酵素
thrombosis	血栓
tissue factor	組織因子
tissue plasminogen activator	組織型纖溶酶原激活劑
T-lymphocyte	T 型淋巴球細胞
transforming growth factor	轉化生長因子
transsulfuration pathway	轉硫化代謝反應
tunica media	血管中層
vasa vasorum	小血管
vascular cell adhesion molecule-1	血管細胞附著分子-1
vascular endothelium	血管內皮層
vascular smooth muscle cell	血管平滑肌細胞
vasorelaxation	放鬆血管
vesicle	胞內泡囊
viscous drag	黏滯曳力



第1章 文獻回顧

1.1. 常見心血管疾病

1.1.1. 動脈粥狀硬化 (Atherosclerosis)

動脈粥狀硬化 (atherosclerosis) 乃好發於動脈的疾病，主要為病患因抽煙、高血壓、高膽固醇飲食、微生物感染、糖尿病、遺傳基因、缺乏運動等因素而造成(Lloyd-Jones et al., 1999)並導致內皮細胞 (endothelial cells)功能異常並受到損害，最終導致心臟病及中風(謝, 2007)。動脈粥狀硬化的可能致病機制，主要在1973年由Ross提出，並隨後在1993與1999年予以修正(Ross, 1993, 1999)，其中指出動脈粥狀硬化屬於一種慢性發炎疾病(Libby, 2001)。

在過去利用基因轉殖及基因標的小鼠的實驗下，已瞭解有關動脈粥狀硬化的致病的分子機轉(Smithies and Maeda, 1995)，目前文獻上(Faxon et al., 2004; Ross, 1999)將其大致分為四個階段(Fig. 1.1)：

<I>血液中過多的低密度脂蛋白 (low-density lipoprotein, LDL) 透過內皮細胞連接處 (EC junction) 進入內皮細胞下層(subendothelium)並開始堆積，其間被巨噬細胞(Macrophage)或平滑肌細胞 (VSMC) 氧化形成氧化態低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, oxLDL)後，開始刺激內皮細胞表現多種促發炎因子(proinflammatory molecules)以及附著分子 (adhesion molecules) (Collins et al., 2000)，例如VCAM-1以及PCAM-1，可誘導白血球與血小板的沾黏進而引起發炎反應；並降低一氧化氮合成酶 (eNOS) 的活性，抑制一氧化氮生成，使血壓上升

(Knowles et al., 2000)。

<II>高度氧化的低密度脂蛋白在特定酵素的輔助下，會被巨噬細胞吞噬 (Marathe et al., 1999)，進而在血管壁內膜 (intima) 下方形成泡沫細胞 (foam cell)。而此時平滑肌細胞(VSMC) 在巨噬細胞以及T細胞所分泌的細胞激素 (cytokine) 以及生長因子 (growth factor) 的刺激下開始由中層遷移至內膜，兩者的增殖與累積使血管內壁開始形成斑塊 (plaque)。

<III> 此時內皮細胞、血小板和巨噬細胞會分泌一些物質，例如：platelet derive growth factor (PDGF)、insulin-like growth factor-1 (IGF-1)、interleukin-1 (IL-1)、tumor necrosis factor α 、 β (TNF α 、 β) 等刺激血管中層(tunica media)的平滑肌細胞移行至內層，並將其表現型 (phenotype) 由收縮型(contractile phenotype)轉變為分泌型(synthetic phenotype)。此後的平滑肌細胞會開始增生大量膠原蛋白，彈力蛋白，以及蛋白多醣及醣蛋白，並分泌更多生長及趨化因子(Mazzone et al., 1983)，造成斑塊表面纖維化，形成更緊密的粥狀物，而其內部堆積更多壞死的細胞與脂質，進而使斑塊往周圍蔓延。

<IV>動脈粥狀硬化晚期，纖維性胞外間質被特定酵素分解致使斑塊不穩定而破裂，例如凝血蛋白酵素(thrombin)、基質金屬蛋白酵素 (matrix metalloprotease, MMP)，使產生血栓 (thrombosis) 的機率將大幅增加。

動脈粥狀硬化在致病的過程中，發炎反應 (inflammation response) 扮演十分重要的角色(Hansson, 2005; Libby, 2002)，而其中多種血球細胞以及其所分泌的細胞激素 (Cytokine)、趨化激素 (chemokine) 皆有參與反應，並開

始表現多種附著分子(adhesion molecule) 以及受器 (receptor)。研究指出，當血液中膽固醇濃度上升時，會導致內皮細胞通透性變大(Hennig and Boissonneault, 1987)，並刺激內皮細胞在一週內開始表現 P-selectin，使巨噬細胞及 T 型淋巴球細胞 (T-lymphocyte) 易於沾黏在內皮細胞上；另外內皮細胞也會分泌 E-selectin，但數量並不多。接著內皮細胞開始大量表現血管細胞附著分子(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 或細胞間附著分子 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)，亦使白血球與血小板更容易沾黏在內皮細胞上。而此時在巨噬細胞沾黏較多的區域會分泌較多的單核白血球趨化蛋白 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)，促使白血球穿過單層的內皮細胞而遷移至動脈管壁內(Nelken et al., 1991; Takeya et al., 1993; Yla-Herttuala et al., 1991)。另外八號介白素 (interleukin-8, IL-8) 和造骨蛋白 (osteopontin, OPN) 也可促進白血球的遷移以及發炎反應(Bruemmer et al., 2003)。此時在動脈粥狀硬化斑塊 (atheromatous plaque) 處的內皮細胞或平滑肌細胞會分泌巨噬細胞群落刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) (Rosenfeld, 1992)，而穿過內皮細胞的單核白血球則會受到巨噬細胞群落刺激因子的誘導而分化成為巨噬細胞(Qiao et al., 1997)。活化的巨噬細胞 (macrophage) 會吞噬氧化的低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, LDL) 而形成泡沫細胞(Lusis, 2000)，並堆積在內膜下方。

綜觀整個動脈粥狀硬化的過程，最重要的因素便屬血液中膽固醇的濃度、細胞中的氧化逆境 (oxidative stress) 以及發炎反應(Faxon et al., 2004b)。近來有研究顯示，對於高膽固醇的兔子，若餵食抗氧化劑可以縮減斑塊的大小 (Wu et al., 1998)，說明了抗氧化劑有防止動脈粥狀硬化生成的功效。在人體實驗上，口服抗氧化劑維生素E確實可以防止人體內LDL的氧化，而口服的劑量越高，體內oxLDL含量越低，產生心肌梗塞的機會就越小(Stephens et al., 1996)；在動脈粥狀硬化形成的初期，主要就是因為氧化的低密度脂蛋白堆

積並氧化所造成，而LDL氧化的主要原因便是血管內皮細胞或是巨噬細胞所產生的活性氧族群（reactive oxygen species，簡稱ROS）（Berliner and Heinecke, 1996）。對於動脈粥狀硬化的高危險群而言，其內皮細胞一氧化氮合成酶（eNOS）的活性下降，造成一氧化氮（NO）生成量減少；或者是所產生的NO被超氧陰離子（superoxide anion）結合形成過亞硝酸根（Peroxynitrite），使ROS的量相對提高，形成氧化逆境（Lahera et al., 2007）。而發炎反應在整個動脈粥狀硬化的過程中，從一開始斑塊的形成，到最後斑塊破裂造成血栓，均扮演重要的角色，因此各種抗發炎藥物、或者是任何與發炎有關的生物標記（biological marker）均成為治療或診斷動脈粥狀硬化的熱門指標（Libby et al., 2002）。

根據臨床證據顯示，動脈粥狀硬化大多發生於體內血管分佈的特定位置如血管分支處（Malek et al., 1999），在此處血液的流動型態為擾流（disturbed flow），甚至有回流的現象，造成低剪力區域。而高剪力層流區域則少有動脈粥狀硬化的發生。近年來許多實驗室利用微陣列（microarray）方式分析剪力對內皮細胞內基因表現的影響（Brooks et al., 2002; McCormick et al., 2003）發現高剪力下內皮細胞中許多與抗氧化、抗凝血、抗血栓、抗發炎等相關基因的表現均提升；而低剪力、擾流則會造成許多附著因子以及與發炎、細胞凋亡等相關基因的表現量增加，顯示在動脈粥狀硬化中，血液流態扮演了關鍵的角色，且生理上較高的剪力對於心血管系統有較佳的保護作用。

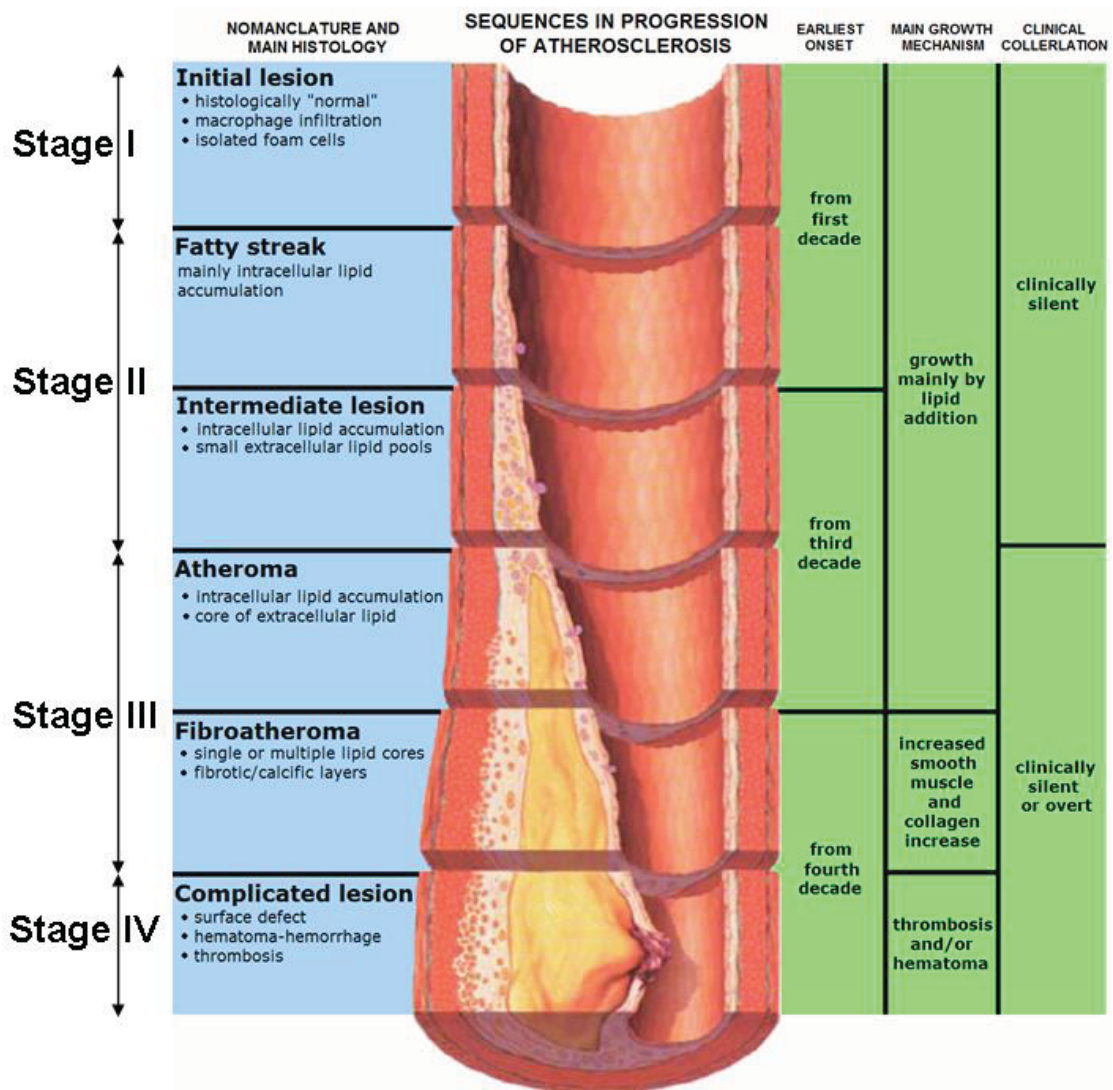


Fig. 1.1 Four stages of Atherosclerosis. Stage I: Intracellular LDL migrates to subendothelium and is oxidized by macrophage or vascular smooth muscle cell to become ox-LDL. Stage II: The formation of foam cells and VSMC migrate to intima and proliferate to form plaque. Stage III: The formation of fibrotic/calcific layers. Stage IV: Thrombosis.

(http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Endo_dysfunction_Athero.PNG)

1.1.2. 高血壓 (Hypertension)

高血壓是一種相當常見的心血管疾病，顧名思義，此疾病即是患者有血壓過高的症狀，其定義於 1999 年 2 月由世界衛生組織提出，如 Table 1.1。高血壓為近年來重要的死因之一，威脅國人健康甚巨，據統計，國人每年約五十到七十萬人死於高血壓相關疾病(來源:中華民國行政院衛生署)。

高血壓可分為原發性高血壓(primary hypertension)與繼發性高血壓(secondary hypertension)。90-95%的高血壓病人為原發性高血壓(Carretero and Oparil, 2000)，顧名思義，原發性高血壓沒有明顯的病理成因，但目前已知抽菸、喝酒、肥胖、生活壓力、缺乏維生素 D 等都可能增加罹患機率(Djousse and Mukamal, 2009; Haslam and James, 2005; Kyrou et al., 2006; Lackland and Egan, 2007; Lee et al., 2008; Tuohimaa, 2009; Wofford and Hall, 2004)，此外，老化(aging)以及家族遺傳也是高血壓的風險因子之一(Dickson and Sigmund, 2006; Kosugi et al., 2009)。繼發性高血壓佔患者中較少數，約 5-10%，主要由腎臟病所造成，內分泌系統方面的疾病也可能造成繼發性高血壓。

Table 1.1 Definition of hypertension. Normal blood pressure and different stages of hypertension are defined by systolic pressure and diastolic pressure. (來源:中華民國防高血壓協會)

正常血壓		
血壓分類	收縮壓(毫米汞柱)	舒壓(毫米汞柱)
理想血壓	正常血壓	正常但偏高
<120毫米汞柱	<130毫米汞柱	130-139 毫米汞柱
及<80 毫米汞柱	及<85毫米汞柱	或85-89 毫米汞柱
高 血 壓		
血壓分期	收縮壓(毫米汞柱)	舒壓(毫米汞柱)
第一期	第二期	第三期
140-159 毫米汞柱	160-179 毫米汞柱	>=180 毫米汞柱
或90-99 毫米汞柱	或100-109 毫米汞柱	或>=110 毫米汞柱



1.2. 血管內皮細胞與剪力

1.2.1. 血管內皮細胞

血管的構造如 Fig. 1.2 所示(Lusis, 2000)。最外層為外膜層 (adventitia)，該層主要是由膠原蛋白所形成的纖維束組合而成的強韌肌肉結構，由於管壁厚，故許多供養管壁的小血管 (vasa vasorum) 以及支配血管的小神經 (nervi vascularis) 分布在此層，另外也有纖維母細胞 (fibroblast) 生長。第二層為中膜 (media)，為三層中最厚的一層，由層層交互排列的平滑肌細胞與彈性纖維板 (elastic lamella) 構成，而彈性組織與平滑肌細胞的量取決於血管所在的位置，另外養分、氣體可在此層自由通過。最內層為內膜層 (intima)，其中與血液直接接觸的是內皮層 (endothelium)，由於受到血流的影響，因此會沿與血管長軸平行的方向排列，細胞之間以 tight junction (zonula adherens) 和 gap junction (nexus) 相接，前者構成穿越障礙，後者溝通周圍細胞。內皮下層 (subendothelial layer) 是少量的平滑肌細胞 (smooth muscle cell) 縱向分布(謝, 2007；郭, 2010)。此區尚有巨噬細胞 (macrophage) 進行免疫作用。而血管中的內皮細胞即為本篇論文主要研究的對象。

內皮細胞長度約為 25 ~ 50 μm ，寬度約為 10 ~ 15 μm ，中心核部份厚度約為 3 μm ，周圍厚度則為 0.1 ~ 1 μm ，在血管內部所佔之總表面積則可達到 250 m^2 ，而其總重量大約可達到 1 公斤之譜。由於其數量的龐大以及功能之重要，因此常被視為一個具有重要功能的單一器官。內皮細胞之生長會受到細胞間接觸抑制 (contact inhibition) 的調控，形成汰換率低且持續具有生理活性的單層細胞 (monolayer)。內皮細胞於正常狀況下周轉率相當低，基本上是處於一種最終極分化之穩定狀態，以放射元素標定之胸腺嘧啶攝取方法測量估計發現，內皮細胞之完全取代複製週期 (turnover time) 大約是介於 47

至 23,000 天不等(Hobson and Denekamp, 1984)。

內皮細胞與血液直接接觸，其功用可作為血液與其他組織細胞之間的一個具有選擇性的屏障；在與血流直接接觸的情況下，內皮細胞持續受到各種不同的機械應力 (mechanical force)，包括有：剪應力 (shear stress)、抗張應力 (tensile stress) 及正向應力 (normal stress)，如Fig. 1.3 所示(Busse and Fleming, 2003)。當血液流過內皮細胞時，血液的黏度會對內皮細胞產生黏滯曳力 (viscous drag)，此即為血管承受之剪力，也是本論文探討內皮細胞所受到的主要機械應力。此外，血液流動產生的作用力也會影響血管內皮細胞層的通透性(permeability)，就內皮細胞佔血管中的組成比例來看，在不同大小的血管中，內皮細胞與平滑肌細胞的比例可由1:3 到1:70 不等(Ishida et al., 1997)，因此就小血管較不易發生動脈粥狀硬化現象來說，佔有較高比例的內皮細胞可以產生較好的保護效果。

綜合以上各點，血管中內皮細胞的重要功能有以下幾項：

1. 形成一層抗凝血表面。
2. 形成一個通透上的阻礙來控制大分子經由內皮細胞之間細胞通道 (cell junction) 或胞內泡囊 (vesicle) 輸送穿越內皮細胞的速率。
3. 與平滑肌細胞相互作用，以控制血管收縮、舒張與管徑大小。
4. 當血管受到損傷時，具有增加白血球黏著與移動至內皮細胞下層的功用。



Fig. 1.2 Structure of a typical artery. A large artery consists of three morphologically distinct layers. The intima, the innermost layer, is bounded by a monolayer of endothelial cells on the luminal side and a sheet of elastic fibres, the internal elastic lamina, on the peripheral side. The normal intima is a very thin region (size exaggerated in this figure) and consists of extracellular connective tissue matrix, primarily proteoglycans and collagen. The media, the middle layer, consists of smooth muscle cells (SMCs). The adventitia, the outer layer, consists of connective tissues with interspersed fibroblasts and SMCs (Lusis, 2000).

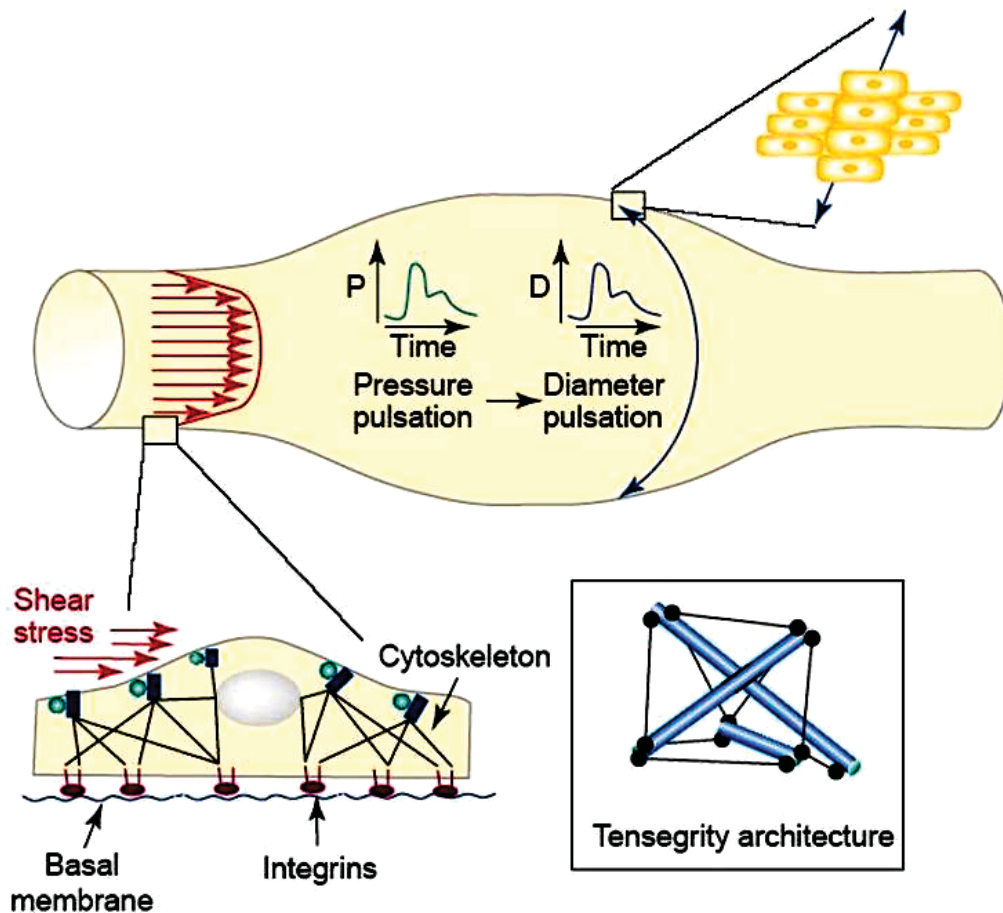


Fig. 1.3 Hemodynamic forces that affect endothelial cells. Blood flowing over the endothelial cell surface exerts a viscous drag (shear stress). Because blood flow is pulsatile, the flow profile is flattened compared with the parabolic flow profile present under steady-state conditions, which results in a greater shear stress at the endothelial cell surface. The simultaneous pressure (P) pulse distends the vessel diameter (D) and stretches endothelial cells in the range of 1–5% strain. The insert shows the basic tensegrity model, which consists of a series of compression resistant structures (blue) connected via a series of tensile elements (black). Application of the tensegrity model to endothelial cells implies that the entire endothelial cytoskeleton is under a given tension, even in the absence of an external stimulus. Shear stress or stretch at the endothelial cell surface redistributes these forces across the entire cell so that a stimulus at the cell surface is translated into a chemical signal at the end of a filament/fibre, be it within caveolae, in the vicinity of the cell–cell adhesion points or within the integrin-rich focal adhesion contacts that anchor the cell to the basal membrane. (Busse and Fleming, 2003)

1.2.2. 剪力對血管內皮細胞之影響

綜觀歷來研究結果，已有越來越多的文獻指出血液流動所產生的剪力可以調節血管內皮細胞的結構與功能，包括影響內皮細胞的通透性、脂蛋白的堆積以及不同流態對內皮細胞的影響(Davies et al., 2001; Gimbrone et al., 2000);另外也有研究指出藉由改變血管結構，例如以手術的方式藉由 ligation 改變血管管徑，所引起的各種急性或慢性的疾病也都與內皮細胞有關(Langille and O'Donnell, 1986)。至今已確定內皮細胞會受流體剪力的型態、大小的影響而產生快速或是緩慢的反應；其中快速的反應包括了蛋白質的氧化(oxidation)(Harrison et al., 2003)、S-nitrosylation(Hess et al., 2005)、磷酸化(Park et al., 2006)等等，進而改變原本細胞內的訊息傳遞路徑。而較緩慢的反應則包括活化上游啟動子(promoter)序列中具有 shear stress response element(SSRE)的基因，而從轉錄轉譯的層面去調控(Chien et al., 1998; 郭, 2010)。

隨著人體中血管位置的不同，內皮細胞受到不同程度的剪力作用，為了調控血流上的變化，內皮細胞會製造一些調控血管收縮與舒張的物質(Cines et al., 1998)，如內皮素-1(endothelin-1, ET-1)(Morawietz et al., 2000)、環前列腺素(prostacyclin)(Frangos et al., 1985)和一氧化氮(nitric oxide, NO)(Kuchan et al., 1994)等，以及調控血栓(thrombosis)和血液中纖維蛋白溶解(fibrinolysis)的物質，如組織型纖溶酶原激活劑(tissue plasminogen activator, tPA)(Diamond et al., 1989)、血纖維蛋白溶酶原激活劑抑制劑-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)、組織因子(tissue factor)等。此外，與細胞增生相關的有血小板衍生生長因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、轉化生長因子(transforming growth factor, TGF)等。另外與白血球黏著(leukocyte adhesion)有關的有單核白血球趨化蛋白(monocyte chemoattractant protein-1,

MCP-1)、細胞間附著分子 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 以及血管細胞附著分子 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)、內皮細胞與白血球黏著分子(endothelial-leukocyte adhesion molecule-1, ELAM-1) 等的表現量，也都會因血液流動的變化而有所調整(Brach et al., 1992; Tzima et al., 2005)。

體內不同位置之血管內壁所承受之剪力大小各不相同，如 Fig. 1.4 (Ishida et al., 1997)所示，生理上，靜脈血管的剪力大小約為 $1\sim 6 \text{ dyn/cm}^2$ ，動脈血管則是 $10\sim 70 \text{ dyn/cm}^2$ ，某些特定位置則會產生剪力為 $-4\sim 4 \text{ dyn/cm}^2$ 含有順流及逆流 (flow reversal) 的振盪流動(oscillatory flow)。而在瓣膜或血管即將阻塞處，血流的通道突然縮小，致使血液加速流動，導致大於 70 dyn/cm^2 的極高剪力。由此可知，剪力隨著動靜脈或位置的不同，其大小的差異性非常大。血管內皮細胞所受到的流動型態也和動脈硬化有關，粥狀硬化斑塊經常堆積在冠狀動脈、頸動脈和股動脈中的特定位置，尤其是在血管分支處，因幾何形狀的改變，血液由分支處分流後，易在兩條血管的外側成流線分離 (stream separation) 並且伴隨一些渦流 (eddy) 的產生，使此處的剪力降低，如 Fig. 1.5 所示(Stone et al., 2003)。Fig. 1.6 即為內皮細胞受到不同型態剪力所誘發的不同反應(Resnick et al., 2003)。在一般剪力層流(laminar flow)的區域中，剪力在短時間內可促進內皮細胞的遷移 (migration) 以及存活 (survival)；而長期的反應則有抗發炎以及抗細胞凋亡 (anti-apoptosis) 的功能，並使細胞沿流動方向排列，對心血管具有保護的效果。然而若為擾流 (disturbed flow) 或是低剪力區域，在短時間內會使內皮細胞對脂質的通透性變大 (Langille, 1996)，長時間則會誘發許多引起發炎、造成動脈粥狀硬化、驅使血液凝結與白血球遷移的基因表現，例如 VCAM-1、PDGF-A、connexin 43 (Gabriels and Paul, 1998)與 Egr1 基因 (McCaffrey et al., 2000)。

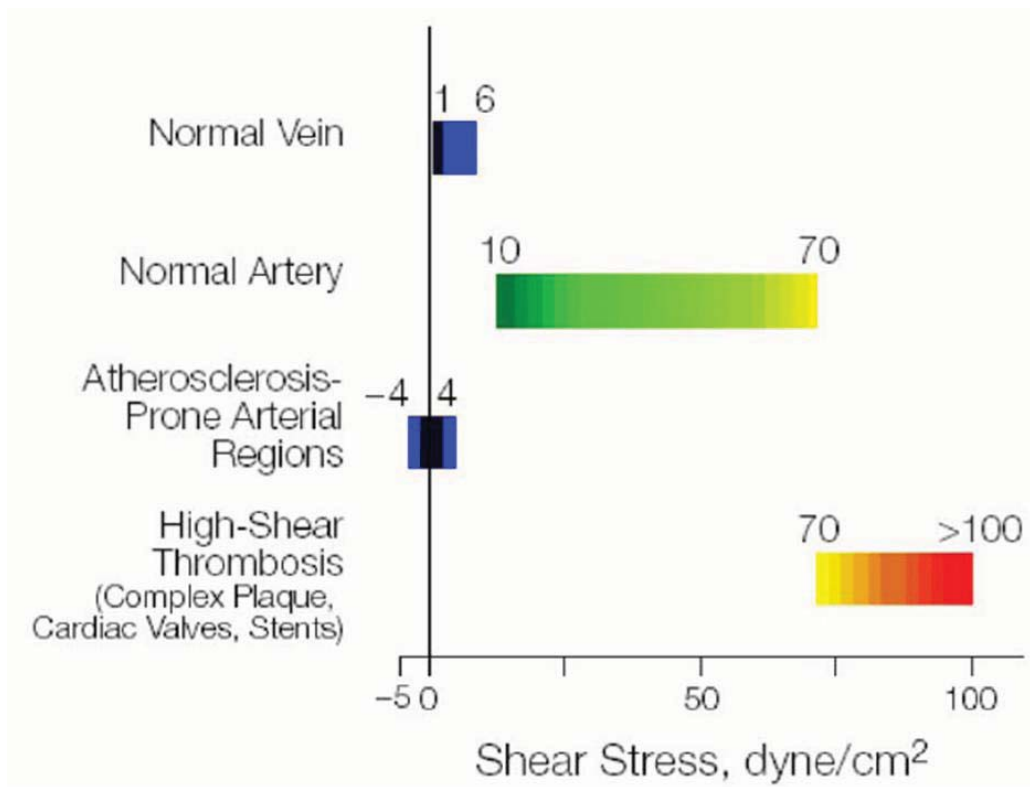
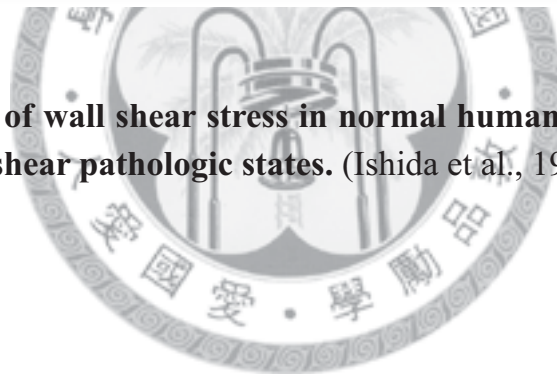


Fig. 1.4 The range of wall shear stress in normal human veins, arteries, and low-shear or high-shear pathologic states. (Ishida et al., 1997).



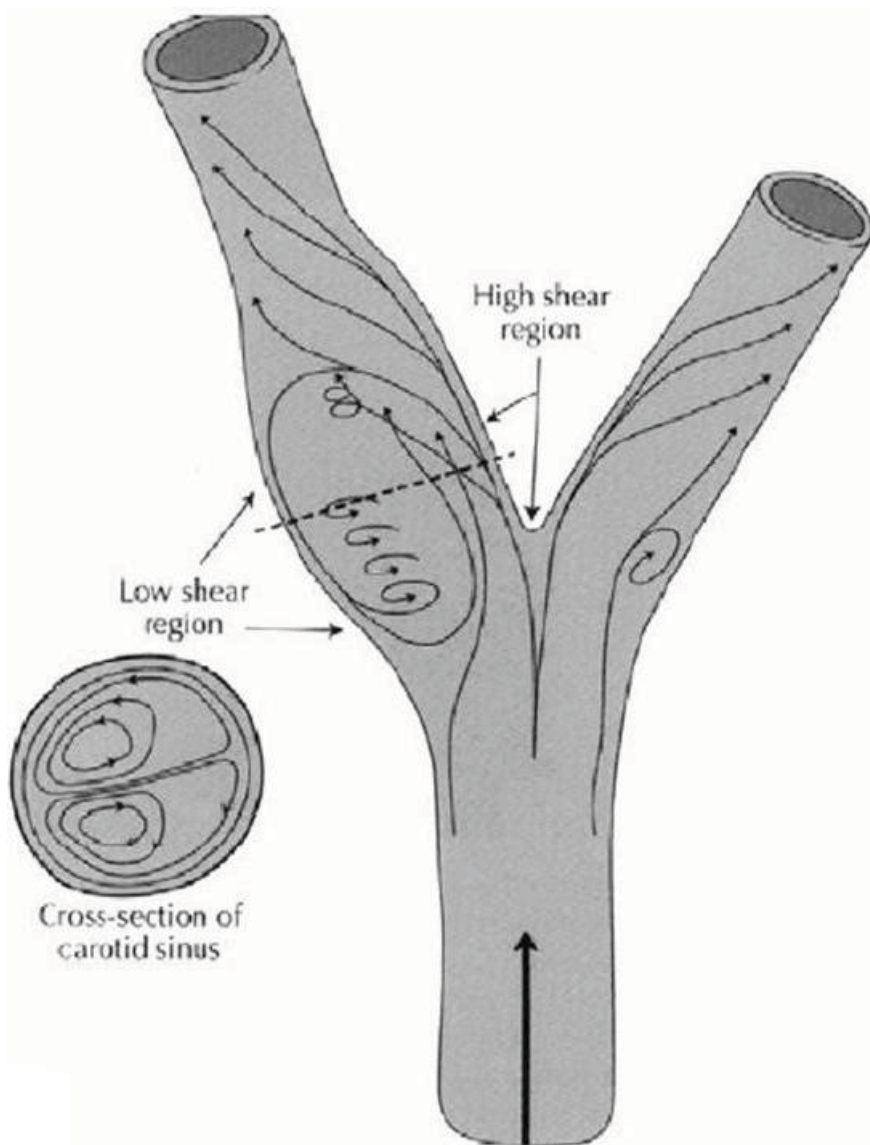


Fig. 1.5 Flow pattern in a detailed model of human carotid artery. (Stone et al., 2003)

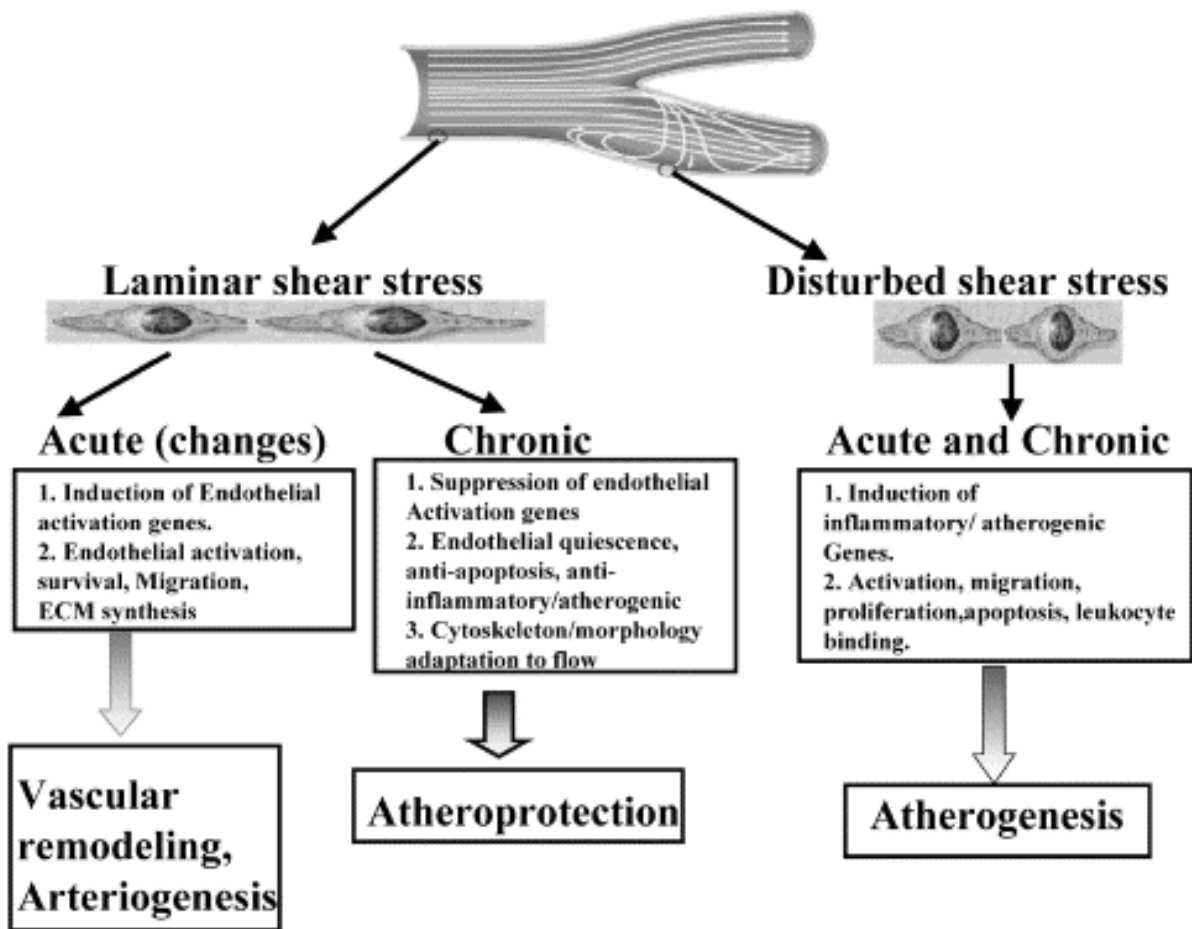


Fig. 1.6 The heterogeneous response of the endothelium to various shear stress patterns. Localized as an interface between the blood and other tissues, endothelial cells are constantly exposed to shear stress. Shear forces along the arterial tree vary, in both pattern and magnitude. In vitro and in vivo studies pointed at the ability of the endothelium to respond specifically to temporal and spatial shear stress patterns, and translate the force into a biological response. These multiple responses may have physiological or pathological outcomes to the cardiovascular system. (Resnick et al., 2003).

1.3. 硫化氫與其生理功能

1.3.1. 硫化氫在生理上的特性

硫化氫是一種無色、具有腐敗雞蛋味道的氣體，擁有良好的水溶性(20 °C下1 g硫化氫可溶於242 mL水中)並可自由穿透細胞膜，在正常生理的酸鹼度之下(pH 7.4)，大部分以硫氫根離子(HS⁻)的形式存在(Li and Moore, 2008)。因為測量方法的限制，硫化氫在體內的濃度目前還未有定論，部分文獻指出硫化氫在體內的濃度約為10–100 μM(Hongfang et al., 2006 ; Hyspler et al., 2002 ; Olson, 2009)，但也有其他文獻認為其濃度在nanomolar等級(Furne et al., 2008 ; Whitfield et al., 2008)。

長久以來，硫化氫一直都被認為是具有生理毒性的物質，在 100 ppm 左右，會導致嗅覺喪失與眼睛刺激，1000 ppm 以上更可能導致意識不清或死亡(Beauchamp et al., 1984)。直到近年，越來越多的研究指出硫化氫在生物系統中扮演了重要的調控角色：在神經傳導上，Abe 和 Kimura (1996)指出硫化氫可以藉由增加神經元中 NMDA 受器的活性以及鈣離子流入而誘導海馬長效增益作用(hippocampal long-term potentiation)；在內分泌系統方面，外加硫化氫或者過度表現(over expression)硫化氫生成酵素，都會抑制胰島素瘤細胞(insulinoma)的胰島素製造(Yang et al., 2005)，Yusuf et al. (2005)也發現，製造硫化氫的酵素在糖尿病大鼠的胰臟表現量比正常來得高，這些證據顯示了硫化氫很可能與胰島素調控息息相關。在心血管方面，硫化氫更有許多的保護作用，此部分將在下面小節詳述。

1.3.2. 硫化氫之生成

在哺乳類細胞中，硫化氫主要來自半胱胺酸(cysteine)的脫硫作用(desulfhydration)，其中有三種主要的作用酵素，分別是 cystathionine- γ -lyase (CSE)、cystathionine- β -synthase (CBS)與 3-mercapto-sulfurtransferase (3-MST) (Qu et al., 2008 ; Stipanuk et al., 1982)。CSE 與 CBS 已被研究數十年，主要是在轉硫化代謝反應(transsulfuration pathway)方面的研究，轉硫化代謝反應指的是蛋胺酸(methionine)與半胱胺酸之轉換(Fig. 1.7)，是一條重要的硫化物代謝路徑，其中包括了同胱胺酸(homocysteine)的代謝，研究指出，CBS 缺陷是造成遺傳性同胱胺酸過高症(homocysteinemia)的主因(Kraus, 1998)，CSE 也被證實參與了同胱胺酸的代謝(Chiku et al., 2009)，而過高的同胱胺酸會增加罹患動脈硬化與其他心血管疾病的風險(Eikelboom et al., 1999 ; Hofmann et al., 2001)，因此，CSE 與 CBS 在心血管疾病方面扮演了一定的角色。

CBS與CSE是較早被發現製造硫化氫的酵素。CSE可透過將半胱胺酸分解，產生硫化氫與副產物丙酮酸(pyruvate)與氨，也可透過分解同胱胺酸生成硫化氫，(Chiku et al., 2009)，CBS則可以分解半胱胺酸產生硫化氫與絲胺酸(serine)(Fig. 1.8)。3-MST一開始被認為在生理狀態之下並非硫化氫生成酵素(Stipanuk et al., 1982)，但Shibuya et al. (2009a ; 2009b)發現，血管內皮細胞與腦細胞皆有3-MST的表現，並且參與硫化氫的生成，其代謝路徑是先經由cysteine aminotransferase (CAT)將胱胺酸轉換成3-mercaptopyruvate (3MP)，3-MST再將3MP轉換成硫化氫及丙酮酸(Fig. 1.8)。

此三種硫化氫生成酵素在不同組織的表現量不同，其調控的機制也不盡相同。CSE 在腦、肝、腎、動脈、胰島及胎盤中都有表現(Diwakar and Ravindranath, 2007 ; Hosoki et al., 1997 ; Kaneko et al., 2006 ; Patel et al., 2009 ;

Vitvitsky et al., 2006), 在心血管組織當中是主要的硫化氫生成酵素(Wang, 2002), 其活性受到攜鈣素(calmodulin)以及鈣離子濃度的調控, Yang et al. (2008)指出, 在純化過的 CSE 中加入鈣離子以及攜鈣素, 會增高 CSE 的活性 (Fig. 1.9), 然而其中詳細機制尚待進一步研究。CBS 同樣在腦、肝、腎、胰島及胎盤中皆有表現(Enokido et al., 2005; Ichinohe et al. 2005), 在腦以及神經系統中是主要的硫化氫生成酵素, 其受到 S-腺苷基蛋氨酸(S-adenosylmethionine)的異位活化(allosteric activation)(Singh et al., 2009)。此外, CBS 亦會受到攜鈣素結合而活化, CBS 在 C 端有攜鈣素結合區域, 此區域在未受攜鈣素結合前會阻擋 CBS 的催化區域(catalytic domain), 當 CBS 與攜鈣素結合後, 攜鈣素結合區域就會離開催化區域, 使 CBS 活性增高, 如 Fig. 1.10 (Kimura, 2002)。3-MST 在腦部以及血管內皮層(vascular endothelium)皆被發現有參與生成硫化氫(Billaut-Laden et al., 2006; Shibuya et al., 2009a; Shibuya et al., 2009b), 但詳細調控機制未明。

除了在細胞內合成以外, 硫化氫也可能在血液中被合成。Benavides et al. (2007)證明, 大蒜在體內所產生的多硫化物(polysulfide)會被紅血球轉換成硫化氫, 此外, Bearden et al. (2010)發現, 血管內皮細胞與肝細胞(hepatocyte)會分泌 CBS 以及 CSE 到血液中, 將同胱胺酸轉換成硫化氫。

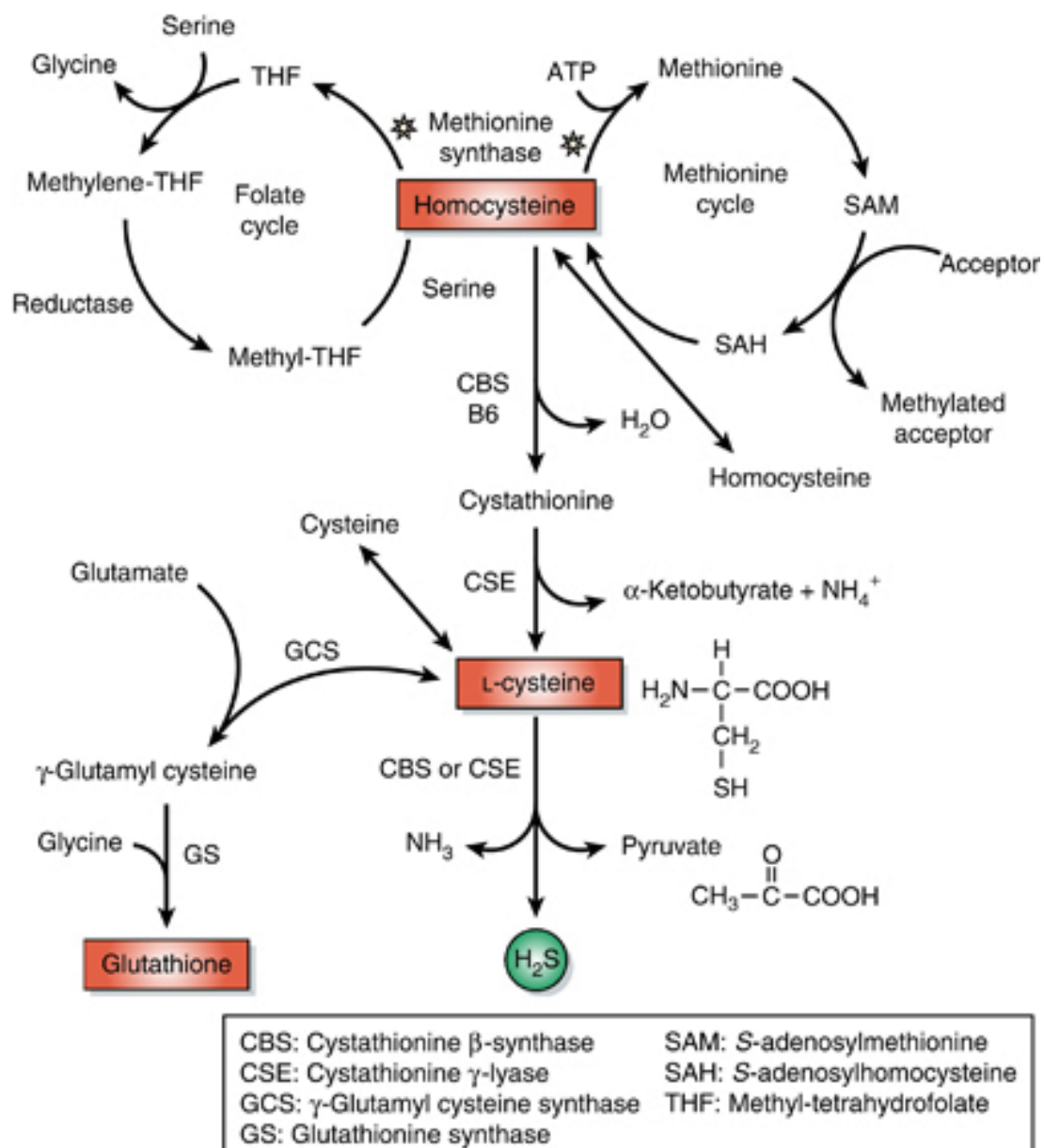


Fig. 1.7 Transsulfuration pathway. In methionine cycle, methionine is converted to SAM, followed by acceptor methylation and conversion of SAM to SAH. SAH is hydrolysed to homocysteine by S-adenosylhomocysteine hydrolase. Homocysteine can be recycled back to methionine cycle by being converted to methionine by methionine synthase or be converted to cysteine by CBS and CSE. (Wang, 2009)

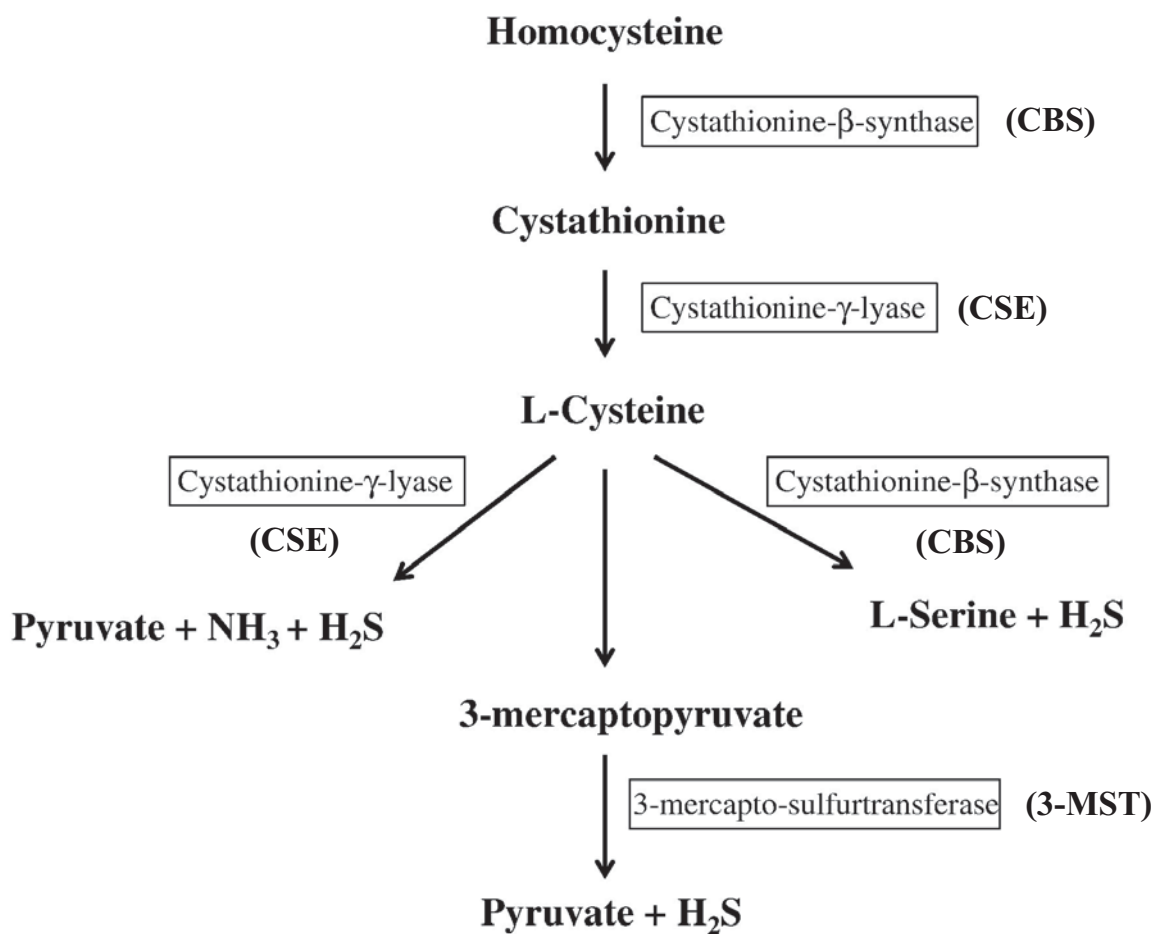


Fig. 1.8 Formation of hydrogen sulfide. In mammalian cells, homocysteine is converted to cysteine by cystathionine- γ -lyase (CSE) and cystathionine- β -synthase (CBS) in transsulfuration pathway. Cysteine is used as substrate in hydrogen sulfide producing reaction which is catalyzed by CSE, CBS and 3-mercapto-sulfurtransferase. (Modified from : Hughes et al., 2009)

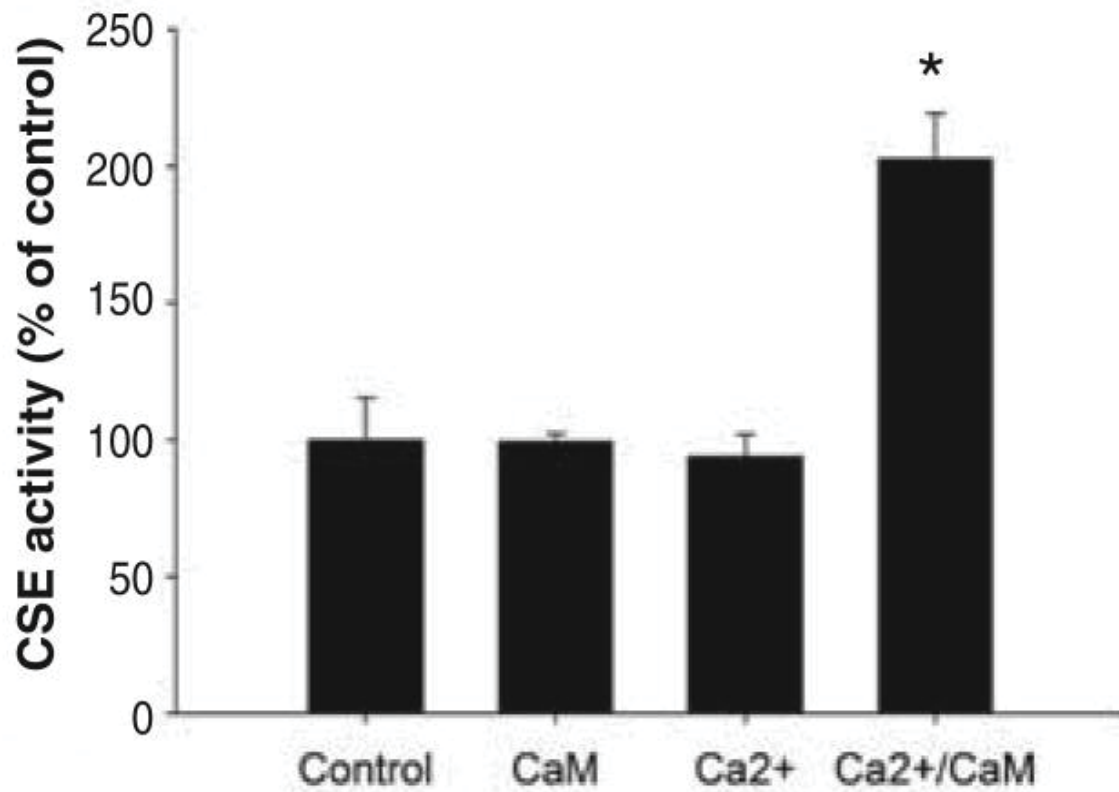


Fig. 1.9 CSE is activated in the presence of calcium and calmodulin. Calcium (1 mM) and calmodulin (5 μ M) together increases the activity of CSE. No effect was observed when calcium or calmodulin were reacting with CSE separately. (Yang et al., 2008)

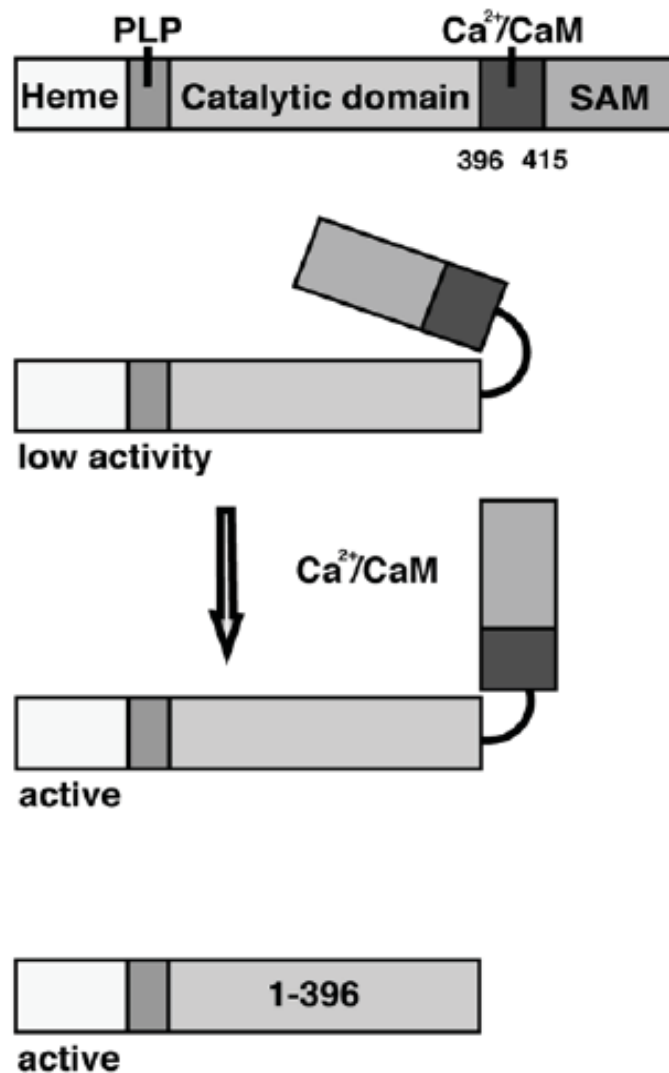


Fig. 1.10 Regulation of CBS activity by calcium and calmodulin. CBS consists of domains for heme binding (Heme), pyridoxal-5'-phosphate binding (PLP), catalytic, calmodulin binding ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) and S-adenosyl-L-methionine binding (SAM). Without calmodulin binding, the carboxyl-terminal domain of CBS covers the catalytic domain and CBS is at low activity. Calmodulin binding activates CBS by changing the conformation of carboxyl-terminal domain and expose the catalytic domain. (Kimura, 2002)

1.3.3. 硫化氫對心血管系統之影響

硫化氫具有放鬆血管(vasorelaxation)的作用，大動脈(aorta)、門靜脈(portal vein)、肝血管床(hepatic vascular bed)等血管都受到硫化氫作用而放鬆(Ali et al., 2006；Fiorucci et al., 2005；Hosoki et al., 1997；Zhao et al., 2001)，其他間接證據也証實硫化氫的放鬆作用，例如 CSE 基因剔除小鼠以及長期施打 CSE 活性抑制藥物的大鼠血壓較對照組高(Yang et al., 2008；Zhao et al., 2003)，而施打硫氫化鈉(硫化氫 donor)則會造成血壓下降(Ali et al., 2006；Zhao et al., 2001)。硫化氫放鬆血管的作用機制是透過打開血管平滑肌細胞(smooth muscle cells)的 K_{ATP} 通道(ATP-sensitive K^+ channel, K_{ATP} channel)，細胞膜產生過極化現象(hyperpolarization)，使平滑肌細胞放鬆(Wang, 2009)。硫化氫對血管的放鬆作用是具內皮依存性的(endothelium-dependent)，研究顯示，將大鼠大動脈內皮移除後，硫化氫所引發的放鬆效應會降低，半數有效濃度(50% effective concentration, EC_{50})由 136 μM 升至 273 μM (Zhao and Wang, 2002)，在大鼠腸繫膜動脈(mesenteric artery)中效應更是明顯， EC_{50} 由 25 μM 升高約七倍至 161 μM (Cheng et al., 2004)。

硫化氫有心血管保護(cardioprotection)的作用，可減低心血管在缺血(ischemia)狀態下的傷害。在心臟缺血的實驗中，預先處理(preconditioning)硫化氫可以透過活化 extracellular signal-regulated kinase(ERK1/2)以及 Akt 來減少缺血所造成的傷害，降低心肌梗死面積(myocardial infarct size)，減緩缺血所造成的硫化氫生成量下降(Bian et al., 2006；Hu et al., 2008)。而在缺血-再灌注傷害(ischemia-reperfusion injury, I/R injury)的實驗中，於再灌注時注射硫化氫也可降低心肌梗死面積，並保護粒線體的功能與結構(Elrod et al., 2007)。另外，在心跳停止(cardiac arrest)的小鼠注射硫氫化鈉(硫化氫 donor)，可提高小鼠在心肺復甦術(cardiopulmonary resuscitation, CPR)恢復心臟功能

後的存活率，以及降低心跳停止所造成的粒線體(mitochondria)傷害，實驗發現，注射硫化鈉的小鼠在心臟停止、再復甦後的 Akt 磷酸化的程度較對照組高，eNOS 以及 AMP-activated protein kinase (AMPK)去磷酸化的程度則被減緩，顯示硫化氫可能透過這些訊息傳導路徑保護心血管組織(Minamishima et al., 2009)。

除了上述外加硫化氫的實驗，細胞內生(endogenous)硫化氫方面的研究也顯示出硫化氫的保護作用。Bliksoen et al. (2008)指出，預先施加 CSE 抑制劑的心臟，在缺血實驗後所產生的心肌梗死面積增加了 38%，Sivarajah et al. (2006)也觀察到類似的結果。值得一提的是，目前已知的硫化氫生成酶抑制劑並非高度的專一性，上列實驗結果的代表性有限(Calvert et al., 2010)。因此，Calvert et al. (2010)以及 Elrod et al. (2007)使用 CSE 基因剔除或者過度表現(overexpression)的小鼠來驗證硫化氫的作用，避免抑制劑所產生的疑慮。結果如同預期，CSE 基因剔除小鼠在缺血實驗中表現出較大的心肌梗死面積，而過度表現 CSE 則有效降低缺血所造成的梗死面積(Calvert et al., 2010；Elrod et al., 2007)。

目前有許多研究報告提出硫化氫心血管保護作用的機制，如 Fig. 1.11 所示。根據研究結果，硫化氫會活化 K_{ATP} 通道(Calvert et al., 2010；Wang, 2009)，並且透過此機制保護缺血-再灌注傷害所造成的心肌(myocardium)受損(Geng et al., 2004)。然而硫化氫如何活化 K_{ATP} 通道並保護心血管的詳細分子機制仍然未知，可能是透過硫化氫的還原力改變通道構型而活化(Tang et al., 2005；Wang, 2003)，並且進一步活化蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC) (Bian et al., 2006)。Pan et al. (2008)指出，硫化氫會活化三種 PKC 異構物(isoform)，PKC α 、PKC ϵ 以及 PKC δ ，其中 PKC ϵ 以及 PKC δ 的活化與 K_{ATP} 通道有關，是可能的傳導路徑。PKC ϵ 活化以後，能夠進一步活化 Ras，透過下游的 ERK 達到

保護細胞的作用；PKC 亦可以活化 sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA)，降低細胞內鈣離子濃度，抑制 mitochondrial permeability transition pore (MPTP) 以及鈣蛋白酶(calpain)，保護粒線體正常功能並抑制細胞程式化凋亡(apoptosis)(Aon et al., 2006；Sharma et al., 2004；Usachev et al., 2006)。

硫化氫也會透過活化 reperfusion injury salvage kinase pathway (RISK pathway) 來產生細胞保護作用(Bliksoen et al., 2008；Hu et al., 2008；Yong et al., 2008)。RISK pathway 顧名思義與缺血再灌注傷害關係密切，指的是 PI3K-Akt、PKC、Erk1/2 等促進細胞存活的訊息傳導路徑，文獻指出，這些路徑能夠在缺血再灌注傷害中保護心血管，降低細胞程式化凋亡(Yellon et al., 1999)。RISK pathway 的下游傳導路徑尚未完全被了解，目前已知在硫化氫的作用下，Erk1/2 會活化 signal transducers and activators of transcription-3 (STAT-3)、p90RSK、Bcl-2、Bcl-xL、熱休克蛋白質(heat shock proteins, HSP)(Calvert et al., 2010)，PKC ϵ 在磷酸化之後則會活化 STAT-3，並增加 HSP90、HSP70、Bcl-2 以及 Bcl-xL 的表現量，同時抑制促進細胞程式化凋亡的 Bad(Calvert et al., 2009)。此外，RISK pathway 也被報導能夠透過抑制 MPTP 來降低缺血再灌注所引發的細胞程式化凋亡(Churchill et al., 2007)。

在循環系統中，硫化氫可能有抗氧化的作用。Bearden et al. (2010)指出，血液中 CBS 以及 CSE 將心血管疾病危險因子同胱胺酸轉換成硫化氫，可保護血管抵抗氧化還原逆境(redox stress)。同樣的，硫化氫在細胞中也扮演著對抗氧化逆境(oxidative stress)的角色(Geng et al., 2004；Kimura et al., 2004；Yan et al., 2006)。在缺血再灌注的實驗中，硫化氫會抑制粒線體呼吸作用(mitochondrial respiration)，減少活性氧族群(reactive oxygen species, ROS)的產生(Chen et al., 2006)。此外，硫化氫會透過清除(scavenge)ROS 或者提升抗氧化機制的方式來對抗氧化逆境。Geng et al. (2004)指出，硫化氫會清除

(scavenge)過氧化物(Peroxide)以及過氧化氫(hydrogen peroxide)，降低心肌缺血傷害(myocardial ischemic injury)；另一方面，Kimura et al. (2004)則發現在神經(neuron)中硫化氫會增加抗氧化劑穀胱甘肽(glutathione)，減低谷氨酸誘發(glutamate-induced)的氧化逆境及細胞程式化凋亡。硫化氫也會增加細胞核中 nuclear factor erythroid 2-related factor 2(Nrf2)的量，活化抗氧化基因(antioxidant responsive element, ARE)，誘導下游抗氧化蛋白質如 heme oxygenase-1(HO-1)、thioredoxin(Trx)等的生成，保護細胞對抗氧化逆境(Calvert et al., 2009)。

大蒜方面的研究，也提供了硫化氫抗氧化的間接證據。攝取大蒜有助於預防或減緩高血壓等心血管疾病(Banerjee et al., 2002)，Benavides et al. (2007)發現，大蒜在體內所產生的多硫化物(polysulfide)會被紅血球轉換成硫化氫，產生心血管保護作用。

硫化氫與心血管系統中重要的氣體訊息傳導分子一氧化氮與其生成酵素會互相影響，改變彼此在細胞內的作用。硫化氫與一氧化氮會產生亞硝基硫醇(nitrosothiol)，可能是調控細胞內硫化氫與一氧化氮交互作用的重要反應(Whiteman et al., 2006)，然而，目前詳細機制仍不明確，甚至有矛盾的結果出現。例如 Whiteman et al.(2006)發現，細胞預先處理(pre-treating)硫化氫會抑制 sodium nitroprusside (一氧化氮 donor)所產生的血管放鬆作用，但其它研究結果卻顯示相反的結果，指出硫化氫會增強一氧化氮所引發的血管放鬆作用(Zhao et al., 2002)。此外，部分研究指出硫化氫會抑制內皮細胞一氧化氮合成酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS)的活性、蛋白質表現量以及 mRNA 表現量，並降低製造一氧化氮所需的左旋精胺酸(L-arginine)的輸送(Geng et al., 2007; Kubo et al., 2007)，而 Minamishima et al. (2009)及 Yong

et al. (2008)卻發現硫化氫可以透過活化或者抑制去磷酸化 eNOS 來達到保護心血管的作用。

另一方面，一氧化氮會增加硫化氫在心血管組織的釋放量，並且提升血管平滑肌細胞(vascular smooth muscle cells)中 CSE 的蛋白質以及 mRNA 表現量(Zhao et al., 2001)，長期施用一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)抑制劑的大鼠，循環系統中硫化氫的量、CSE 的活性、蛋白質量以及 mRNA 量都被降低(Lowicka and Beltowski, 2007)。目前這些研究結果的生理意義尚待進一步研究來解釋，硫化氫與一氧化氮互相調控的機制也尚待釐清。



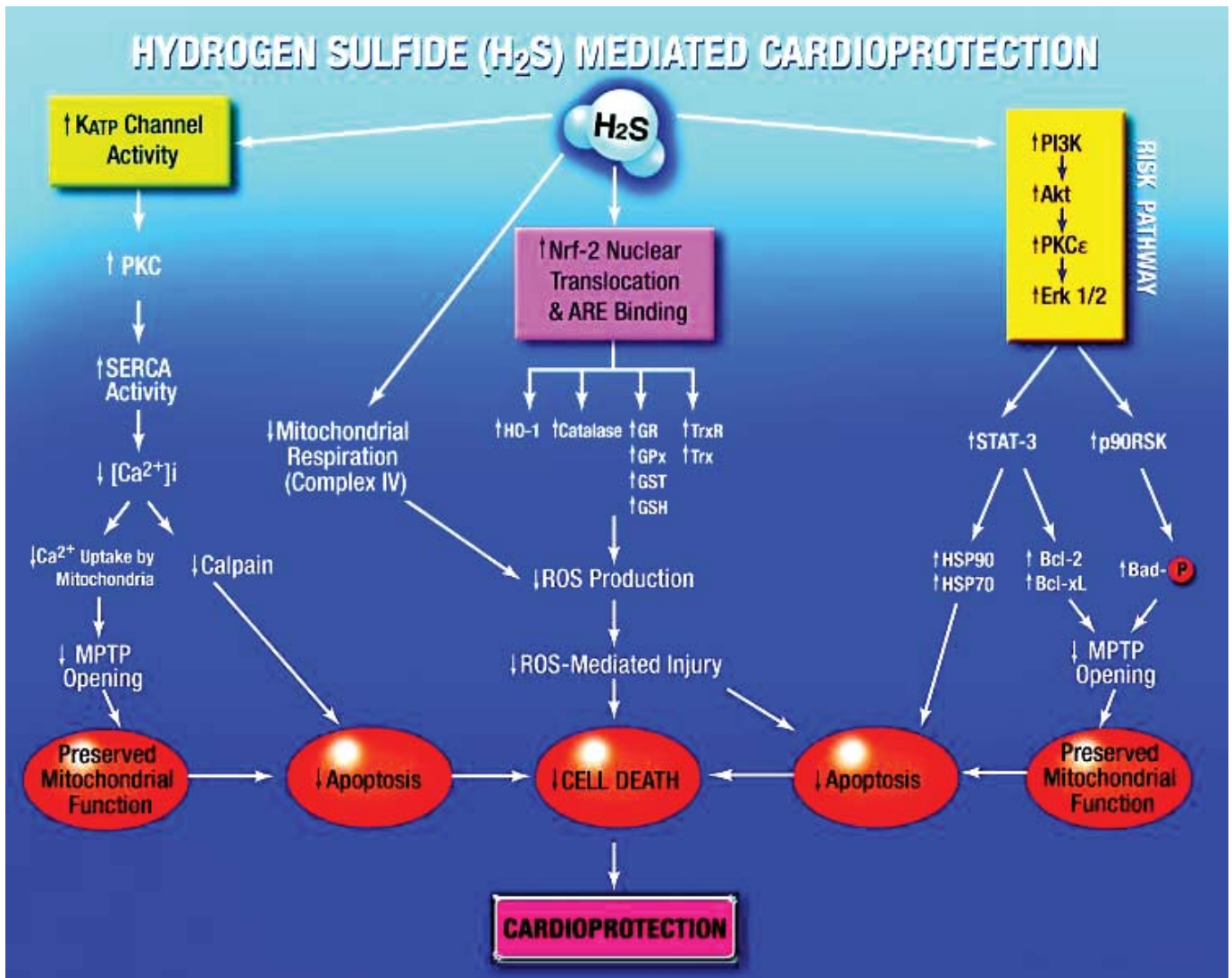


Fig. 1.11 Hydrogen sulfide-mediated cardioprotection and its signal pathways. Hydrogen sulfide renders multiple cardioprotective effects including anti-apoptosis effect, preservation of mitochondrial function and inhibition of cell death. Hydrogen sulfide inhibits apoptosis and preserve mitochondria function by activates K_{ATP} channel and downstream PKC. PKC affects cells by reduces calpain activity and MPTP opening. Hydrogen sulfide is also capable of fighting against oxidative stress by scavenging ROS, inhibit mitochondrial respiration, and enhance Nrf2 translocation followed by ARE activation. RISK pathway is another pathway by which hydrogen sulfide protects cardiovascular cells. Activation of RISK pathway leads to upregulation of STAT-3, Hsp70, Hsp90 as well as inhibition of MPTP. GPx, glutathione peroxidase ; GR, glutathione reductase ; GST, glutathione S-transferase ; HO-1, hemoxygenase-1 ; Hsp, heat shock protein ; MPTP, mitochondrial permeability transition pore ; Nrf-2, nuclear-factor-E2-related factor ; PKC, protein kinase C ; ROS, reactive oxygen species ; SERCA, sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase ; Trx, thioredoxin ; TrxR, thioredoxin reductase ; STAT-3, signal transducers and activators of transcription-3 ; RISK, reperfusion injury salvage kinase. (Calvert et al., 2010)

1.4. Akt 訊息傳導

1.4.1. Akt 於心血管系統扮演之角色

Akt 又名蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 於 1991 年被 Bellacosa et al. (1991) 發現。其為 serine/threonine kinase，目前已知有三種異構物 (isoform)：Akt1/PKB α 、Akt2/PKB β 、Akt3/PKB γ (Downward, 1998)，近年來的研究指出 Akt 與細胞生存 (cell survival) 有密切的關係，其可抑制細胞程式化凋亡 (apoptosis) 以及增進細胞生長 (proliferation) (Cross et al., 2000)。Akt 的結構及其功能如 Fig. 1.12 所示 (shiojima et al., 2002)，包括一個 N 端的 pleckstrin homology (PH) 區域、中間的激酶區域以及 C 端的調節區域。當細胞未受刺激時，Akt 存在於細胞質中且 threonine (308) 和 serine (473) 處於未磷酸化的狀態，一旦細胞受到外界刺激，如生長因子等，上游之 PI3K 會遷移至細胞膜附近並活化，接著將鑲嵌在膜上的肌醇 (inositol) 磷酸化，磷酸化的肌醇再將膜上的 phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) 與 PDK2 活化，活化的 PDK1 以及 PDK2 便吸引 Akt 至細胞膜附近，並分別造成 Akt threonine (308) 和 serine (473) 之磷酸化，進而活化 Akt (Alessi et al., 1996；Alessi et al., 1997；Cohen et al., 1997)，一旦 Akt 經活化之後，便會脫離細胞膜，在細胞質間進行訊息傳導之作用 (郭, 2010)。

Akt 可以藉由抑制 caspase-9 的活化，降低細胞程式化凋亡 (apoptosis) 的程度 (Cardone, 1998)，或者藉由磷酸化 FOXO3a (Forkhead transcription factor 3a) 降低細胞程式化凋亡相關因子的轉錄 (Brunet, 1999)。此外 Akt 可以磷酸化 eNOS，增加一氧化氮的生成 (Dimmeler, 1999；Fulton, 1999)，達到保護心血管的效果 (Hafezi-Moghadam, 2002)。因此，Akt 在心血管系統中扮演著保護的作用，Fujio et al. (2000) 指出，小鼠心臟轉染活化的 Akt 可以降低缺血-再

灌注傷害(Ischemia-reperfusion injury, I/R injury)所造成的細胞程式化凋亡，Matsui et al. (1999)也觀察到 Akt 活化能夠有效抑制心肌細胞(cardiomyocytes)在缺氧(hypoxia)狀態下所造成的細胞程式化凋亡。

除了抑制細胞凋亡以外，Akt 也有促進血管增生以及器官生長的作用。研究指出，sphingosine-1-phosphate(SP-1)以及 vascular endothelial growth factor(VEGF)皆會經由 PI3K-Akt 的路徑來增進血管增生或內皮細胞遷移(migration)(Dimmeler, 2000; Kureishi, 2000; Lee, 1999; Morales-Ruiz, 2000; Panetti, 2000)。而器官生長與血管增生息息相關，因此 Akt 也在此扮演了重要的調控角色，Cho et al. (2001)指出，Akt 基因剔除的小鼠在胚胎以及新生後都表現出發育遲緩的現象。Fig. 1.13 綜合 Akt 各項生理上的功能，並列舉其下游蛋白質，可以從中發現 Akt 對細胞生理影響廣大，其重要性不言而喻。



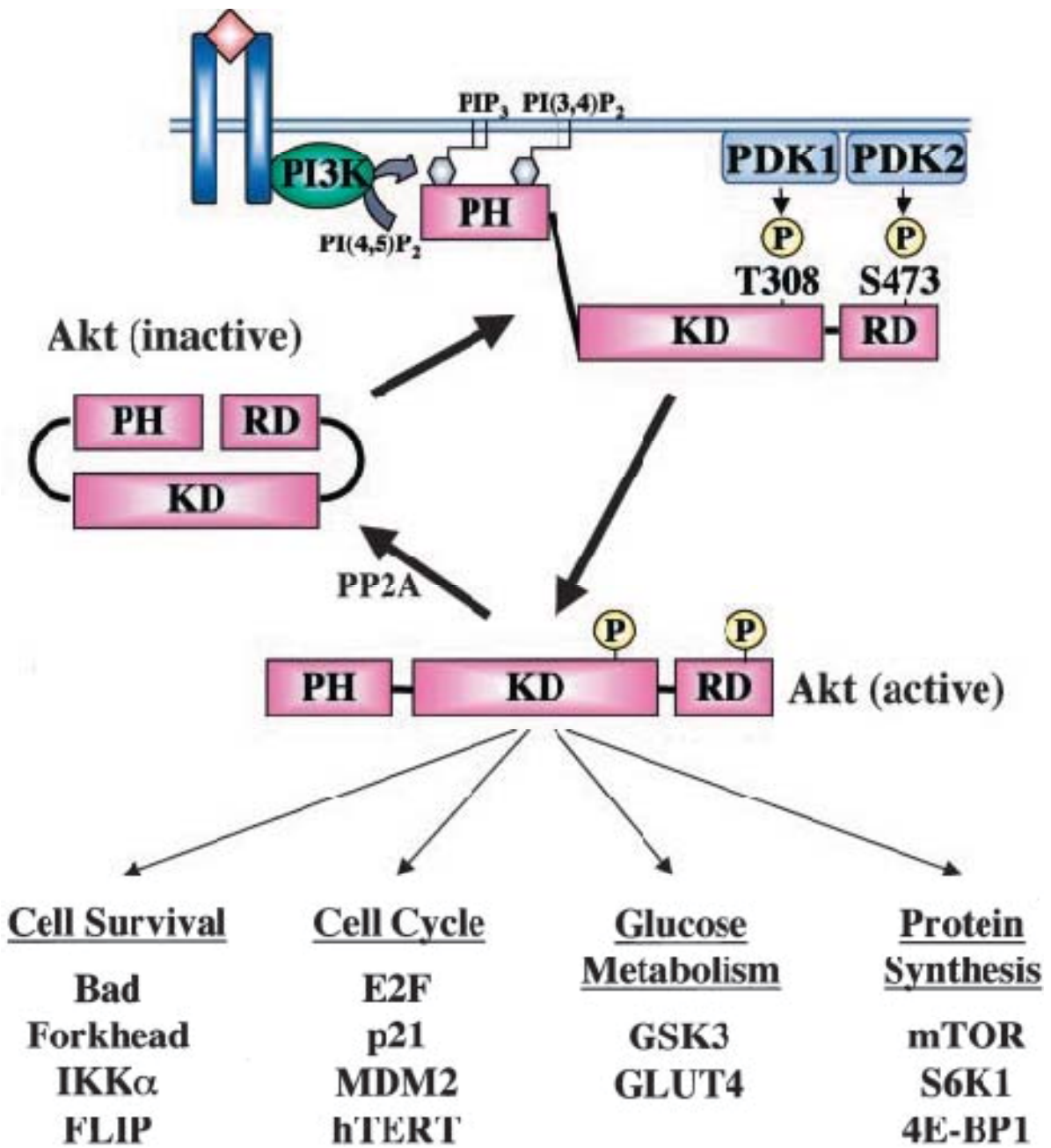


Fig. 1.12 The structure of Akt and mechanism of activation. Akt is comprised of PH domain, kinase domain and regulation domain. Upon stimulation, Akt is activated in a PI3K-dependent way when two residues are phosphorylated by PDK1(T308) and PDK2(S473). Direct or indirect down stream targets are listed below according to their functions. (shiojima et al., 2002)

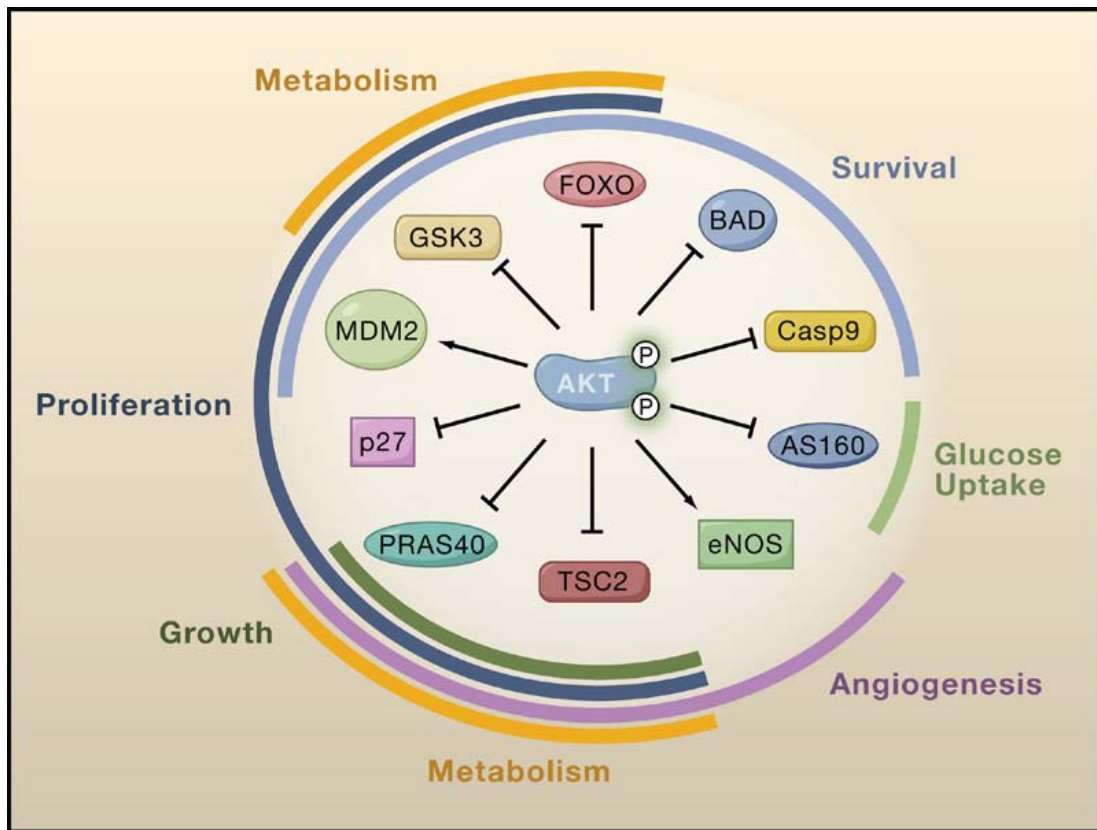


Fig. 1.13 Cellular functions of ten Akt substrates. Akt-mediated phosphorylation of these proteins leads to their activation (arrows) or inhibition (blocking arrows). Regulation of these substrates by Akt contributes to activation of the various cellular processes shown (i.e., survival, growth, proliferation, glucose uptake, metabolism, and angiogenesis). As illustrated by these ten targets, a high degree of functional versatility and overlap exists amongst Akt substrates. See text for detailed descriptions of substrates and functions. (Manning and Cantley, 2007)

1.4.2. 剪力對 Akt 訊息傳導之調控

研究指出內皮細胞受剪力作用時，會造成 Akt 之磷酸化並在1小時達高峰，之後便逐漸去磷酸化而回復至基礎狀態。Akt 之活化乃透過其上游 PI3-K 之訊息傳導而來，當內皮細胞受剪力作用而活化 Akt 之後，可以抑制細胞凋亡以減低細胞更新 (turnover) 之速率 (Dimmeler, 1998)，此外，受流體剪力刺激之內皮細胞會藉由活化 Akt，直接使 eNOS 在 serine 1179 之位置被磷酸化而提高酵素活性，活化的 eNOS 可製造 NO，達到保護心血管系統之目的 (Dimmeler, 1999)。



1.5. 一氧化氮 (Nitric Oxide) 訊息傳導

1.5.1. 一氧化氮於心血管系統之生成與扮演之角色

一氧化氮首先在 1980 年被 Furchgott 與 Zawadzki 發現，但當初僅瞭解內皮細胞會分泌一種特殊的因子，來調節血管收縮與舒張，故一開始命名為內皮細胞鬆弛因子 (endothelium-dependent relaxing factor, EDRF) (Furchgott and Zawadzki, 1980)；後來經過近 20 年的研究，才確認該因子為一氧化氮 (nitric oxide) (Behrendt and Ganz, 2002)；由於一氧化氮屬氣體分子，故可在細胞組織間自由擴散，與其他分子進行交互作用，例如氧分子、鐵離子及一些由氧轉化的分子等，有關 NO 在細胞內與其他分子之間的交互反應可參考 Fig. 1.14 (Mocellin et al., 2007)；NO 的另一項特性即其為不穩定分子，半衰期僅有 7 秒鐘，對細胞而言可利用 NO 快速調控血管舒張，且快速消除 NO 的影響，可作為一種即時反應的分子(郭, 2010)。

血管內皮細胞產生的 NO，是藉由與細胞膜相連的內皮細胞一氧化氮合成酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 受到活化而產生。eNOS 可將氧及精胺酸 (L-arginine) 轉變為 NO 及瓜胺酸(L-citrulline)，此一過程需要五種輔助因子：FMNH₂、FADH、NADPH、calmodulin、及 tetrahydrobiopterin；與兩種陽離子：Ca²⁺、Fe²⁺來維持適當的 eNOS 活性 (Michel and Feron, 1997)。產生的 NO 會擴散到血管平滑肌細胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC)，藉由活化 soluble guanylate cyclase (sGC) 來增加 cGMP 而使血管舒張來調節血管內的生理平衡(Gow, 2005)。

NO 除了調節血管的舒張外，對內皮細胞也具有保護的效果。文獻指出 NO 會抑制促進發炎的細胞激素、趨化激素與白血球附著分子的表現，例如

ICAM-1、VCAM-1(Kinlay et al., 2001)與 E-Selectin(Kosonen et al., 2000)；增加 HO-1 與 HSP70(Marshall et al., 2000)；也會讓促進內皮細胞生長的因子與賀爾蒙表現量增加，例如腎上腺髓質素(adrenomedullin)(Drake et al., 2001)；抑制 VSMC 的生長、血小板的聚集 (platelet aggregation)、NO 亦有抑制 tissue factor 表現的效果，避免血栓的形成。

除了基因層次的調控之外，NO 也可透過對蛋白質進行轉譯後修飾 (post-translational modification)，直接改變蛋白質的活性，影響其下游訊息傳遞，使細胞產生快速反應。一般來說 NO 對於蛋白質產生直接修飾作用的方法大約有兩種：第一種即為 S-nitrosylation，乃是利用蛋白質上 Cys 的殘基含有尚未反應的-SH group，而 NO 可與之反應形成-SNO，為可逆反應(Hess et al., 2005)；另一種即為硝化反應 (nitration)，乃是利用蛋白質上 Tyr 的殘基含有尚未反應的-OH group，而 NO 可與之反應形成 Tyr-NO₂(Ji et al., 2006)。而另一種則是透過間接的影響激酶或去磷酸酶的活性，使其受質的磷酸化程度改變，造成下游訊息傳遞的不同，例如 SHP2 (Src homology 2-containing tyrosine phosphatase) 與 PTEN 均被報導能被 S-nitrosylation 而暫時抑制 (transient inhibition) 其去磷酸酶的活性。Fig. 1.15 即為 NO 對蛋白質進行轉譯後修飾而調節細胞功能的示意圖(Mocellin et al., 2007)。

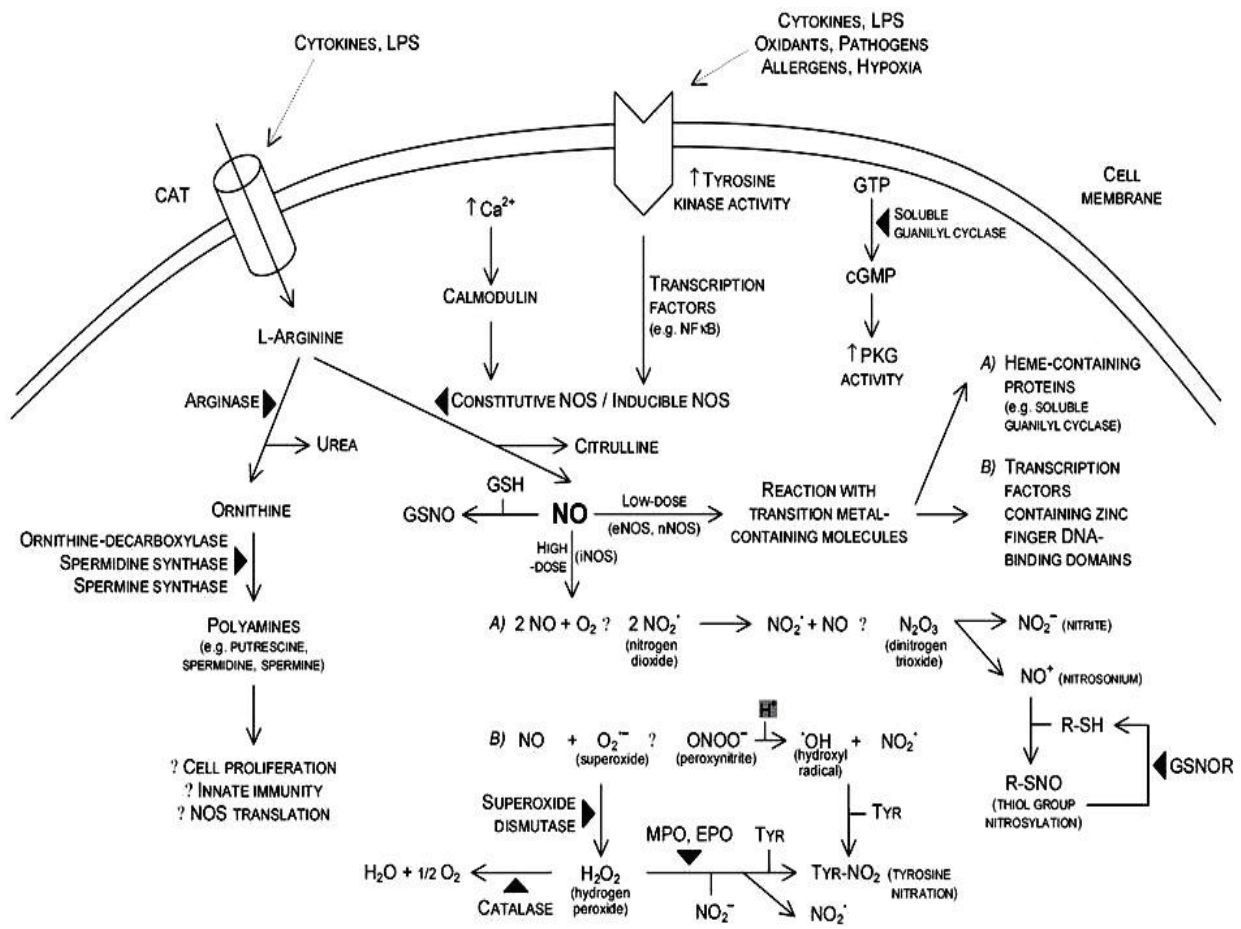


Fig. 1.14 NO production and reaction of NO with other molecules. At low concentrations (<1 mM) NO can directly react with transition metals of proteins containing either heme groups or zinc-finger DNA-binding domains. On the other side, high concentrations of NO (>1 mM) can result in auto-oxidation and the production of dinitrogen trioxide (N_2O_3), which is believed to be the primary mediator of S- or N-nitrosylation, the reaction in which S-nitrosothiols (RSNO) and N-nitrosamines (RNNO) are formed. Although classical chemical nomenclature defines “nitrosation” as addition of NO^+ and “nitrosylation” as addition of NO^- to another reactant to form a nitroso or nitrosyl species, respectively, the two terms are often used as synonyms. When high concentrations of NO coexist with strong oxidants, peroxynitrite can be formed. Peroxynitrite reacts with the phenol moiety in tyrosine resulting in nitrotyrosine: as with nitrosylation, nitration has been shown to affect the function of several proteins. (Mocellin et al., 2007)

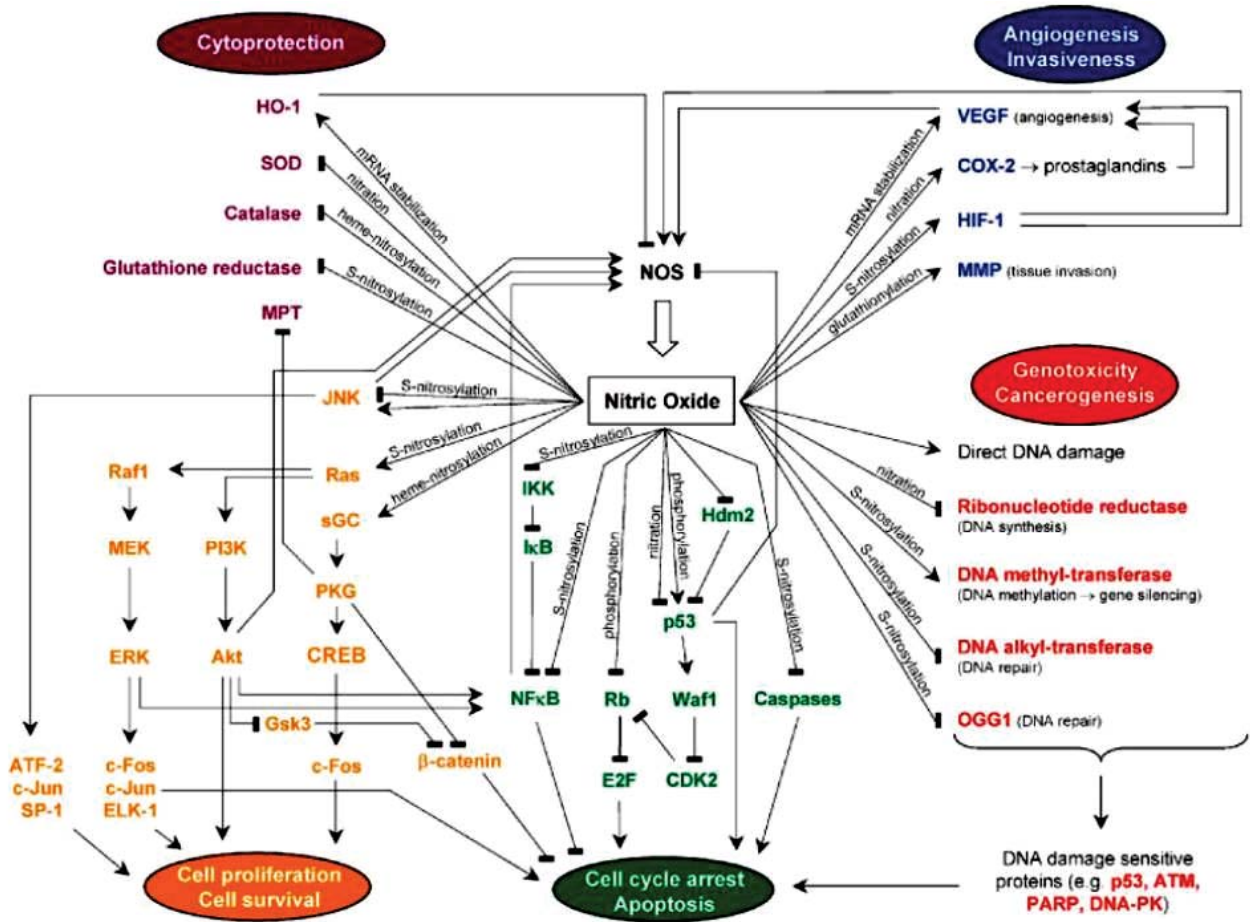


Fig. 1.15 NO regulates protein functions by different post-translational modifications. (Mocellin et al., 2007)

1.5.2. 剪力對一氧化氮訊息傳導之調控

在剪應力的作用之下，血管內皮細胞中的 eNOS 會被活化而誘發一氧化氮的生成(Kuchan et al., 1994；Rubanyi et al., 1986)，其中的機制相當複雜，許多細節尚待進一步的研究加以釐清。目前已知的調控機制之一為 heat shock protein 90 (Hsp90)，內皮細胞受剪力刺激之後，會增加 Hsp90 與 eNOS 的結合，使 eNOS 活化，增加一氧化氮生成量(Brouet et al., 2001；Garcia-Cardena et al., 1998；Pritchard et al., 2001)。此外磷酸化也是另一個調控機制：在受到剪力刺激之後，eNOS 上的 serine 635 和 serine 1177 皆會被磷酸化並導致 eNOS 活化(Boo et al., 2003)。Boo et al. (2002)指出，內皮細胞在剪力作用之後，會透過與蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA)相關的路徑，磷酸化 Ser1177，此路徑與蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB)無關，但一氧化氮的生成卻仍需 PKB，其中的細節尚待進一步研究；另一方面，AMP-activated protein kinase (AMPK) 與 PKA 在剪力下則會磷酸化 Ser635 (Chen et al., 2009；Michell et al., 2002)，此二處的磷酸化皆會活化 eNOS，增加一氧化氮的生成(Boo et al., 2003)。除了磷酸化與 Hsp90 之外，酰化反應(acylation)與易位(translocation)皆參予了 eNOS 在剪力下的調控 (Liu et al., 1994；Prabhakar et al., 1998；Venema et al., 1996)

1.6. ERK 訊息傳導

1.6.1. ERK 於心血管系統扮演之角色

Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 是 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 訊息傳導中重要的一環。MAPK 訊息傳導是細胞內重要的訊息傳導路徑，所有的真核細胞都有多種 MAPK pathways，當細胞受到不同的外來刺激如：生長因子 (growth factor)、荷爾蒙 (hormone)、輻射和各種機械力 (mechanical forces) 等，細胞會將這些刺激往下傳遞，並由 MAPK pathways 活化許多下游轉錄因子如：bZIP (通常為 c-Jun 及 JunD)、*fos* (c-*fos*)、Elk、*myc*、NF- κ B、ATF2 等，調控細胞之生長 (cell growth)、增殖 (proliferation)、分化 (differentiation)、遷移 (migration) 乃至於發炎、凋亡 (apoptosis)、細胞癌化 (cancer) (Wagner and Nebreda, 2009；郭, 2010)。所有的 MAPK pathways 都包含三種主要的蛋白激酶：MEK kinases (MAP3K)、MAPK/extracellular signal-regulated kinase -kinases (MEKs) 和 MAPKs。這些蛋白激酶透過一連串之磷酸化過程調控其活性，當上游之 MAP3Ks 和 MEKs 相繼活化後，將催化 MAPK 之磷酸化使其具有活性，如 Fig. 11.6 (Kyriakis and Avruch, 2001)。

ERK 是 MAPK family 之成員，除了 ERK 以外，還有諸如 JNK1-3、p38 等其他蛋白質，分別受不同 MEK 活化，不同 MAPKs 在細胞內所扮演的角色也有所差異，如 Fig. 1.17 (Johnson and Lapadat, 2002)。Xia et al. (1995) 指出，ERK 與 JNK、p38 的訊息傳導會互相影響，ERK 主要造成細胞生長與抗程式化凋亡的效應，而 JNK、p38 則會導致細胞凋亡，當其中一條傳導路徑活化，另一條就會被抑制，以調控細胞對特定刺激的反應。在細胞內，ERK1 與 ERK2 含量很多，二者胺基酸序列相似度高達 85%，ERK2 有兩

個磷酸化位置：Tyr185 及 Thr183，兩個位置皆被磷酸化後，連同 Glu184 形成活化之 TEY motif，並改變 ERK2 之構形 (conformation) 而使 ERK2 活化 (Payne et al., 1991)。ERK1 活化的機制也大致相同。ERK1/2 受到上游 MEK1/2 之調控，MEK1/2 受上游 Raf、Mos 和 MEKK1-4 之調控，形成完整的 ERK1/2 cascade，活化的 ERK1/2 進入細胞核內並活化轉錄因子，進一步影響細胞之基因表現。

ERK在調控細胞生長與分化方面扮演了重要的角色，除了受到細胞激素 (cytokine) 和生長因子(growth factor)等活化以外(He et al., 1999 ; Johnson et al., 1994)，ERK也會被外在的逆境所活化，以利細胞存活。研究指出，氧化逆境(oxidative stress)會造成ERK的活化(Aikawa et al., 1997)，同樣的，在動脈硬化的組織當中，ERK的表現量也比正常高且被活化(Hu et al., 2000)，Yue et al. (2000)更指出，抑制ERK會加劇I/R injury所產生的細胞凋亡。綜合以上文獻，可以得知ERK具有抵抗外在逆境的作用。

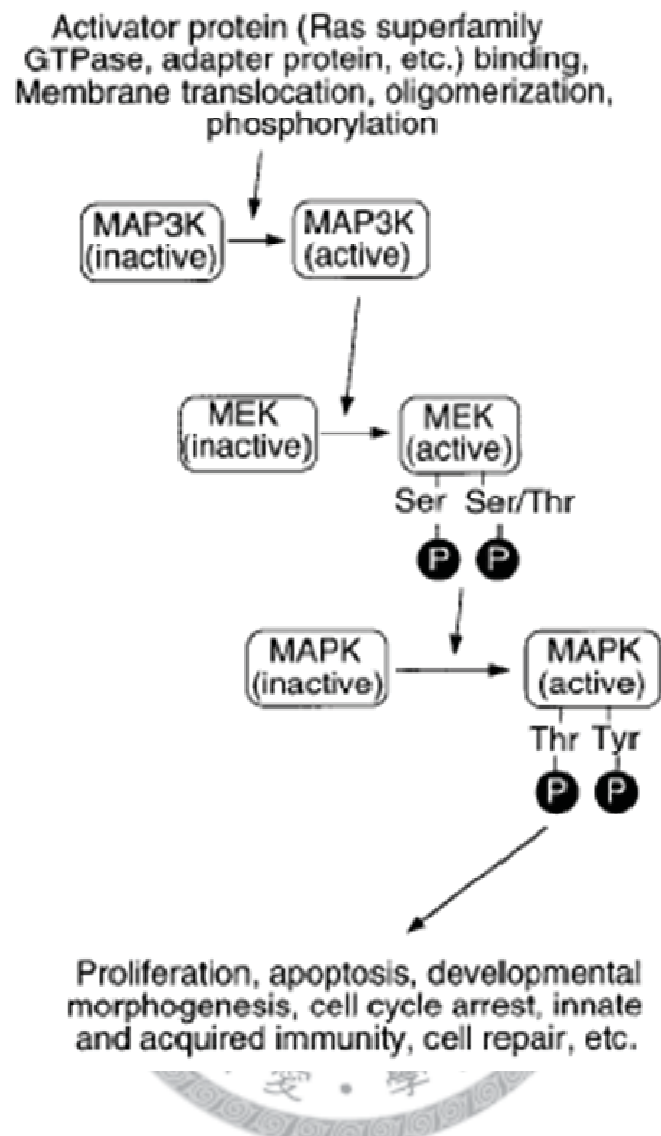


Fig. 1.16 The mitogen-activated protein kinase (MAPK) core signaling module. Divergent inputs feed into core MAPK-kinase-kinase (MAP3K) · MAPK-kinase (MEK) · MAPK core pathways which then recruit appropriate responses. (Kyriakis and Avruch, 2001)

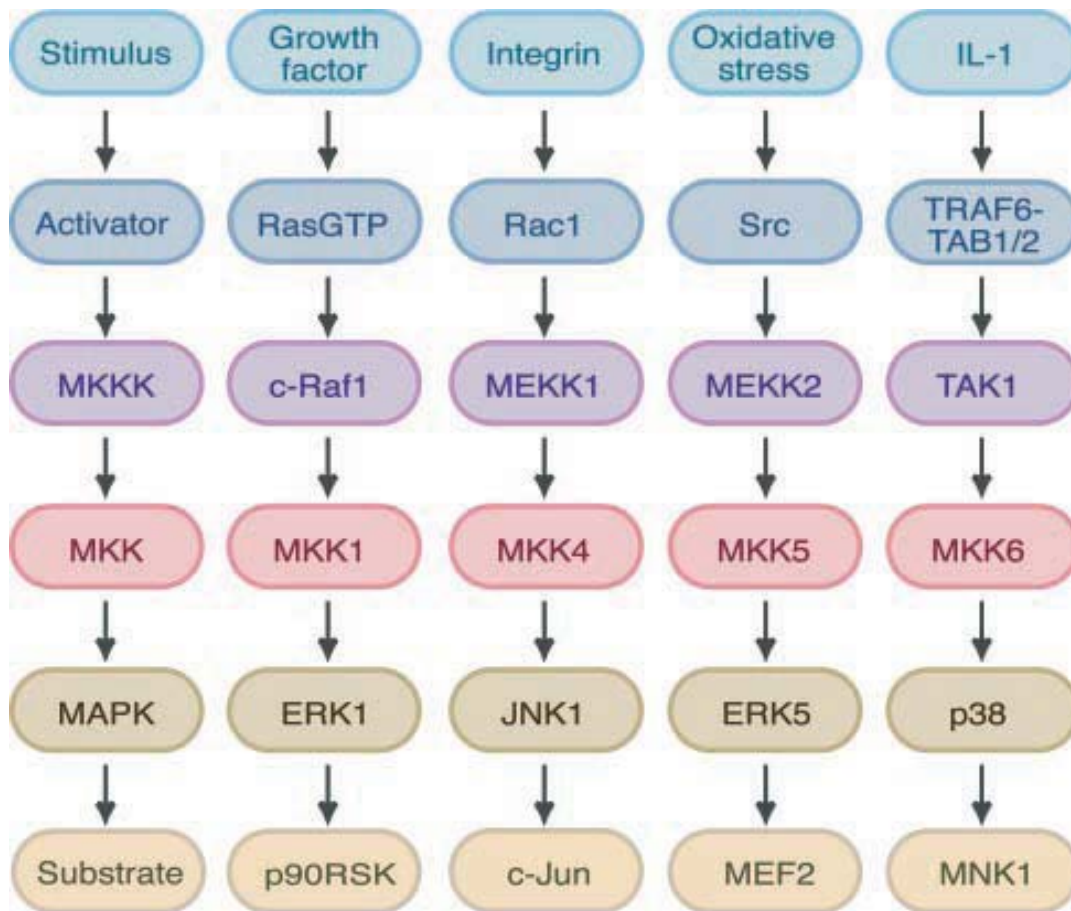


Fig. 1.17 MAPK phosphorylation systems. The modules shown are representative of pathway connections for the respective MAPK phosphorelay systems. There are multiple component MKKKs, MKKs, and MAPKs for each system. For example, there are three Raf proteins (c-Raf1, B-Raf, A-Raf), two MKKs (MKK1 and MKK2), and two ERKs (ERK1 and ERK2) that can compose MAPK phosphorelay systems responsive to growth factors. The ERK, JNK, and p39 pathways in the STKE Connections Map demonstrate the potential complexity of these systems. Our understanding of the connections within the MAPK systems is incomplete and often controversial and continues to be defined in different cell types. GTP, guanosine triphosphate ; p90RSK, 90-kD ribosomal protein S6 kinase, Src, an oncogenic tyrosine kinase ; MEF2, myocyte enhancer factor 2 ; IL-1, interleukin 1 ; TRAF6, tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 ; TAK1, transforming growth factor-activated protein kinase 1 ; MNK1, MAPK-interacting kinase 1. (Johnson and Lapadat, 2002)

1.6.2. 剪力對 ERK 訊息傳導之調控

已有許多報導指出 MAPK family 中之 ERK1/2、JNK 和 p38 會受到剪力的影響而活化，不過這三種訊息傳導分子隨時間變化的活化程度不盡相同，內皮細胞受到穩定流刺激時，ERK1/2 的活化在 10 分鐘達到高峰 (Bao et al., 2001)，JNK 和 p38 則是在 30 分鐘時達最大活化程度 (Chien, 1998；Li et al., 2005)。JNK 和 p38 活化達高峰的時間比 ERK1/2 晚一些，但三者隨時間而活化的情況頗為相似，受剪力作用的瞬間，內皮細胞突然感受到流動，造成短時間內 ERK1/2、JNK 和 p38 暫時活化，隨著刺激時間延長至 1~2 小時以上，內皮細胞慢慢適應穩定的層流流動，這三種分子漸漸去活化。剪力活化 MAPK pathways 與許多上游的訊息傳導分子有關，實驗發現 G protein 有參與其中，經由 $G_{\alpha i2}$ 會活化 ERKs，經由 $G_{\beta/\gamma}$ 則活化 JNK (Jo et al., 1997)。PKC ϵ 也位在 ERK1/2 上游，與 ERK1/2 之活化有關。此外，ERKs 和 JNK 之活化皆與 focal adhesion kinase (FAK) 以及 Ras 之磷酸化有關 (Li et al., 2005)。

1.7. 研究動機與目的

由前面章節的文獻回顧可以發現，層流(laminar flow)所產生的剪力對於內皮細胞有保護的作用，其中 Akt、eNOS、ERK 扮演著相當重要的角色。而硫化氫對於心血管組織以及內皮細胞亦有保護作用，許多研究指出，硫化氫所產生的保護作用，正可能是透過 Akt、eNOS、ERK 的訊息傳導。

然而，目前對於硫化氫與剪力的交互作用了解甚少，若能夠了解內皮細胞於剪力作用之下硫化氫的生成情形，可以進一步了解剪力所產生的血管保護作用其中的作用機制；此外，目前對於硫化氫與剪力所產生的下游訊息傳導的調控大多是分開的獨立研究，但實際在生物體內兩者的作用是並行的，若能夠釐清兩者共同作用下對下游訊息傳導的調控，或許能夠對生理上剪力以及硫化氫的作用有更深入的了解。

本研究之目的主要有三個方向，如 Fig. 1.18 所示。第一為釐清剪力作用下硫化氫生成速率是否受到調控，第二為探討剪力如何調控內皮細胞硫化氫的生成，第三為研究硫化氫在剪力所誘導的訊息傳導中扮演何種角色。剪力與硫化氫對細胞皆有保護作用，且其下游傳導路徑類似，因此，剪力有可能透過增加硫化氫的生成來達到保護細胞的作用，測量剪力作用下內皮細胞硫化氫生成量，可以回答此一疑問；此外，兩者下游傳導路徑類似，表示其中很可能有互相調控的機制，因此，剪力以及硫化氫兩者對重要的下游傳導分子 Akt、eNOS、ERK 的影響，亦是本篇論文探討重點。

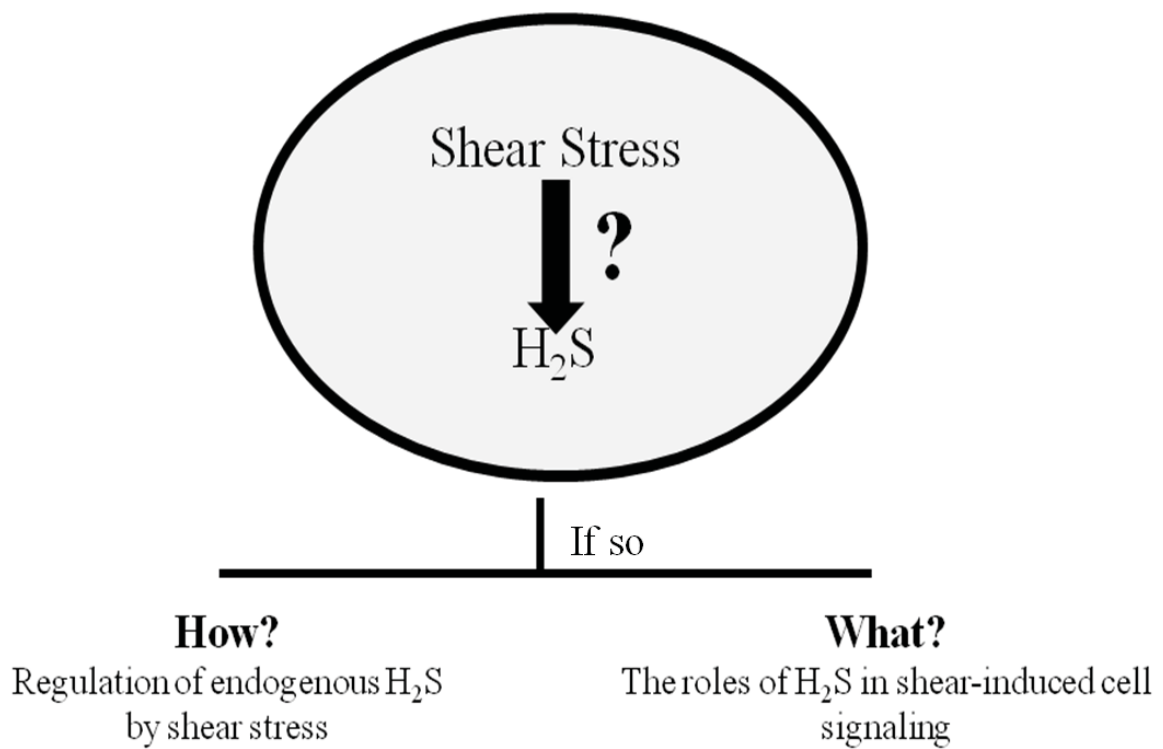


Fig. 1.18 Scheme of current research. There are three main purposes in the current study. First, to investigate the effect of shear stress on H₂S production. Second, to elucidate the mechanism by which shear stress affects H₂S production. Third, to study the roles of H₂S in shear-induced cell signaling.

第2章 實驗材料、儀器、原理與方法

2.1. 實驗材料

2.1.1. 細胞培養及流動實驗

膠原蛋白 (Collagen) : #08-115, Millipore (MA, U.S.A.)

Dulbecco's modified eagles medium (DMEM) : # 12100-046, Gibco, Invitrogen Co. (NY, USA)

胎牛血清 (Fetal bovine serum, 簡稱 FBS) : # 10437-028, Gibco BRL (NY, USA)

纖維網狀蛋白 (Fibronectin) : # 356008, BD Biosciences (MA, USA)

HEPES (2-[4-(2-Hydroethyl)-1-piperazinyl] ethane-sulfonic Acid) : # 1.10110, Merck (Darmstadt, Germany)

Medium 199 : #31100-035, Gibco BRL (NY, USA)

玻片 (Micro slides, plain) : # 2947, Corning (NY, USA)

Phosphate Buffered Saline (PBS buffer) : 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄

P/S 抗生素 (Penicillin/Streptomycin antibiotic) : # 15140122, Gibco BRL (NY, USA)

Sodium hydrogen carbonate (NaHCO₃) : # 1.06329, Merck (Darmstadt, Germany)

胰蛋白酶 (Trypsin 10X) : # 15400-054, Gibco BRL (NY, USA)

2.1.2. 西方墨點轉印法

Anti-Akt : #610861, BD Biosciences Pharmingen (NJ, USA)

Anti-Calmodulin : #05-173, Millipore (MA, USA)

Anti-eNOS : #610297, BD Biosciences Pharmingen (NJ, USA)

Anti-eNOS : #610299, BD Biosciences Pharmingen (NJ, USA)

Anti-ERK : #610030, BD Biosciences (NJ, USA)

Anti-phospho-Akt (Ser473) : # 4060S, Cell Signaling (USA)

Anti-phospho-eNOS (pSer1179) : #612393, BD Biosciences Pharmingen (NJ, USA)

Anti-phospho-eNOS (pSer635) : # 07-562, Upstate Biotechnology (NY, USA)

Anti-phospho-Erk (pThr-202 and pTyr-204) : # 05-481, Millipore (MA, USA)

Anti-tubulin mAb : MS581P, Neomarkers (CA, USA)

Immobilon[®]-P PVDF transfer membrane : IPVH00010, Millipore (MA, USA)

Immobilon[™] western chemiluminescent HRP substrate : WBKLS0500, Millipore (MA, USA)

Laemmli sample buffer (5X) : 0.3M Tris-HCl, 10% SDS, 50% glycerol, 25% β -mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue, pH 6.8

SDS-PAGE running buffer : 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycine, 0.1% SDS

SuperSignal[®] west femto maximum sensitivity substrate : #34096 Thermo Scientific (IL, USA)

Transfer buffer : 25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycine, 20% Methanol

Tris Buffered Saline : TBS buffer, Tris-HCl 10 mM, NaCl 0.15 M, pH=7.5

Tween-20 : # X251-07, J.T.Baker (NJ, USA)

濾紙 : # 1001-110, Whatman (England)

2.1.3. siRNA 轉染

TurboFect™ *in vitro* transfection reagent : #R0531, Fermentas (IL, USA)

CBS siRNA : Dharmacon® ON-TARGET plus SMART pool human CBS
#L-008617-00, Thermo Scientific (IL, USA)

MPST siRNA : Dharmacon® ON-TARGET plus SMART pool human MPST
#L-010119-00, Thermo Scientific (IL, USA)

CSE siRNA : 參考 Yang et al. (2006)所設計之序列，由生工有限公司(Taiwan)
合成，序列如下：

Sense 5'-GGUUAUUUAUCCUGGGCUGdTdT-3'

Anti-sense 5'-CAGCCCAGGAUAAAUAACCDdTdT-3'

2.1.4. 硫化氫測定

Cryogenic vial : #430488, Corning (NY, USA)

L-cysteine : Sigma-Aldrich (MO, USA)

N,N-dimethyl-p-phenylenediamine sulfate: #A14175, Alfa Aesar (MA, USA)

Pyridoxal 5'-phosphate : #P9255, Sigma-Aldrich (MO, USA)

Reaction mixture : 100mM potassium phosphate buffer, pH7.4 ; 10mM

L-cysteine ; 2mM pyridoxal 5'-phosphate

濾紙: #1001070, Whatman (England)

2.1.5. 反轉錄

dNTP : Invitrogen (CA, USA)

0.1M Dithiothreitol (DTT) : Invitrogen (CA, USA)

5X First-Strand buffer : Invitrogen (CA, USA)

Random primers : #58875, Invitrogen (CA, USA)

RNaseOUT™ recombinant ribonuclease inhibitor : #10777-019, Invitrogen (CA, USA)

SuperScript® III reverse transcriptase : #18080-044, Invitrogen (CA, USA)

2.1.6. 即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time quantitative PCR)

DyNAmo™ Flash SYBR® Green qPCR Kit : #F-415L, Finnzymes (02150 Espoo, Finland)

TaqMan® Gene Expression Assay : Bovine cystathionine gamma lyase (CSE) (bt03220298_g1) ; Bovine GAPDH (bt03210913_g1), Applied Biosystems (CA, USA)

TaqMan® 2X PCR Master Mix : #4304437, Applied Biosystems (CA, USA)

2.1.7. 免疫沉澱(Immunoprecipitation)

Anti-Calmodulin : #05-173, Millipore (MA, USA)

IP washing buffer : 10mM Tris pH8.0 ; 400mM NaCl ; 1% Triton X-100 ; 0.5% NP-40

Protein G UltraLink® resin : #53126, Thermo Scientific (IL, USA)

2.1.8. 實驗耗材

MicroAmp® optical 96-well reaction plate : #N8011-0506, Applied Biosystems

(CA, USA)

MicroAmp[®] optical adhesive film : #4311971, Applied Biosystems (CA, USA)

Parafilm M[®] : #PM996, Pechiney Plastic Packaging (IL, USA)

三向閥 (Three-way stopcock) : Top Co. (Tokyo, Japan)

手術手套 (Surgeon's gloves) : CSDC Co. (Taipei, Taiwan)

吸管 (Pipet) : # 7543 (5 ml) ; # 7551 (10 ml), Falcon (NJ, USA)

注射筒 (Syringe ; 25 ml) : Terumo Co. (Tokyo, Japan)

玻片 (Glass Slides) : # 2947, Corning (NY, USA)

培養皿 (Petri-Dish) : # 3003, Falcon (NJ, USA)

可調式微量吸管 (P100、P200、P1000、P5000) : Gilson (Middleton, WI, USA)

離心管 : #430791 (15mL) ; #430829 (50mL), Corning (NY, USA)



2.2. 實驗儀器

Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System : Applied Biosystems (CA, USA)

Electrophoresis Unit : SE260, Hoefer (MA, USA)

Kinetic microplate reader : Molecular Devices (CA, USA)

PCR thermocycler : T3000, Biometra (Goettingen, Germany)

Tank transfer unit : #GE-80-6204-26, GE Healthcare Bio-Sciences Corp. (NJ, USA)

VERSA max tunable microplate reader : Molecular Devices (CA, USA)

加熱器 (Heat Gun) : Master Appliance (Racine, WI, U.S.A.)

定壓輸送液幫浦 (Roller pump) : Flex, Cole-Parmer Instrument (IL, U.S.A.)

抽氣吸附系統 (Vacuum Blotting System) : Pharmacia LKB Biotechnology (Uppsala, Sweden)

恆溫水槽 : model 850-S2, Hotech Instruments (Taipei, Taiwan)

恆溫培養箱 (Water-Jacketed Incubator) : Forma Scientific (Marietta, OH, U.S.A.)

無菌無塵操作台 (Biocare Hood) : Baker (ME, U.S.A.)

離心機 (Centrifuge) : model 2420 ; model 1700 ; model 3500, Kubota (Japan)

超音波振盪器 (Ultrasonic Homogenizer) : model UP50H, Hielscher (Germany)

顯微鏡 (Microscope) : Microphot-FX, model TMS and model Diaphot, Nikon (Japan)

高壓蒸氣滅菌器 : model TM-326, Tomin Medical Instrument CO.

微量樣品偵測儀 Nano Drop® : # ND-1000, Nanodrop Technology (DE, U.S.A.)

富士冷光影像分析系統 (Camera Image System) : LAS-3000, Fuji Film (Japan)

2.3. 實驗原理與方法

2.3.1. 初級人類臍帶靜脈內皮細胞培養

在無菌無塵操作台內將新鮮的人類臍帶 (在 4°C 下保存約 24~48 hrs；來源：台安醫院，Taiwan Adventist Hospital；萬芳醫院，Municipal Wan Fang Hospital) 放入燒杯中，並加入 100 mL PBS 浸泡。在臍帶靜脈兩端剪去一小段後，裝入三向閥 (three-way stop cock)，並以束線帶固定；封閉一端三向閥，由另外一端三向閥灌入臍帶緩衝液 (cord buffer)，灌滿後打開另一端三向閥，使 cord buffer 流出，藉此清洗臍帶內部的血液，並檢查臍帶有無破損。之後封閉一端三向閥，由另外一端三向閥灌入包含 0.01% (w/v) 膠原蛋白酶 (collagenase) 的臍帶緩衝液。從操作台取出，放入恆溫培養箱 (40°C，5 % CO₂ + 95 % air) 作用 8 分鐘後，移回無菌操作台內，搓揉臍帶，使內皮細胞脫落，而後用兩注射筒吸取適量培養基 (Medium 199 + 1 % PS)，分別自臍帶之兩端的三向閥打入來回沖洗約 10 次，再對臍帶施以適當搓揉；將臍帶靜脈內含有細胞之培養基全部取出，放入 50 mL 離心管，以 1000 rpm 的離心速度 (model C-150；祥泰精機)，離心 6 分鐘；吸除上清液，留下管底沉澱之細胞，加入含有 20 % (v/v) 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 的培養基，再以吸管來回吸排方式打散細胞，使細胞重新均勻懸浮，加適量的細胞懸浮液於 10 cm 組織培養皿上，放入恆溫培養箱內；經 12~24 小時的恆溫培養後，用臍帶緩衝液清洗 1~2 次，以去除殘留的紅血球，重新加入新鮮的培養基 (含 20 % FBS+10 % EGM)，約 1~2 天後，人類臍帶靜脈內皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 便在 10 cm 組織培養皿上形成緊密的單層 (monolayer)。

2.3.2. 人類臍帶靜脈內皮細胞繼代培養

將已長成一緊密單層的內皮細胞培養皿中的原有培養基吸除，用 PBS 緩衝液沖洗；加入 2 mL 胰蛋白酶溶液 (Trypsin) 後，放入 37°C 恆溫培養箱中作用 2 分鐘並略微敲打，使細胞懸浮，加入含 20 % FBS 的培養基，以中和胰蛋白酶的作用，收集培養皿中所有的培養基後，以 1000 rpm 之轉速離心 10 分鐘，吸除上清液，留下沉澱於管底的細胞，加入新鮮培養基重新均勻懸浮細胞。

2.3.3. 牛主動脈內皮細胞繼代培養

將已長成一緊密單層的牛主動脈內皮細胞 (bovine aortic endothelial cells, BAECs) 培養皿中的原有培養基吸除，用 PBS 沖洗；加入 2 mL 胰蛋白酶溶液 (1X Trypsin) 後，放入 37°C 恆溫培養箱作用 1 分鐘，使細胞懸浮，加入含 10 % FBS 的培養基，以中和胰蛋白酶的作用，收集培養皿中所有的培養基後，以 1000 rpm 之轉速離心 5 分鐘，吸除上清液，留下沉澱於管底的細胞，加入適量含有 10 % FBS 的新鮮培養基重新均勻懸浮細胞，以 1:3 或 1:2 的比例分配至 10 cm 培養皿。

2.3.4. 內皮細胞繼代培養於玻片

利用高溫火焰將原本浸泡於無水酒精中的玻片 (75 mm x 38 mm (L x W)) 經燒灼滅菌、冷卻後，放入培養皿 (100 mm x 20 mm (D x H))，玻片上覆蓋 3 mL 的 fibronectin (50 g/mL)，靜置兩小時後，將上層的液體吸除。將已長成一緊密單層的內皮細胞培養皿中的原有培養基吸除，用 PBS 緩衝液沖洗；加入 2 mL 胰蛋白酶溶液 (1X Trypsin) 後，放入 37°C 恆溫培養箱中

作用 2 分鐘並略微敲打，使細胞懸浮，加入含 FBS 的培養基，以中和胰蛋白酶的作用，收集培養皿中所有的培養基後，以 1000 rpm 之轉速離心 10 分鐘，吸除上清液，留下沉澱於管底的細胞，加入新鮮培養基重新均勻懸浮細胞，再將細胞懸浮液以每片 1.5 mL 均勻滴在經過 fibronectin 覆蓋的玻片上。

2.3.5. 流動實驗

2.3.5.1. 流動室之設計

設計流動室 (flow chamber) 的主要目的，是使生長在玻片上的細胞能接受特定的流場型態與剪力作用，本實驗的流動室為一平行板層流流動室 (parallel plate laminar flow chamber)，如 Fig. 2.1 所示；流動室主要是由鋁製本體 (chamber)、透明塑膠板 (polycarbonate plate)、墊片 (gasket)、玻片 (glass slide) 和橡膠墊 (rubber) 所構成。裝設步驟依次如下：

- I. 在鋁製本體內放入透明塑膠板，並在板上放置墊片。
- II. 以培養基注滿板面兩端縫隙 (slit) 及其表面。
- III. 迅速將有內皮細胞生長的玻片以細胞面向下方式置入，並且避免產生氣泡。
- IV. 在玻片上放置橡膠墊，以螺絲固定上層蓋子，即可完成流動室之裝設。

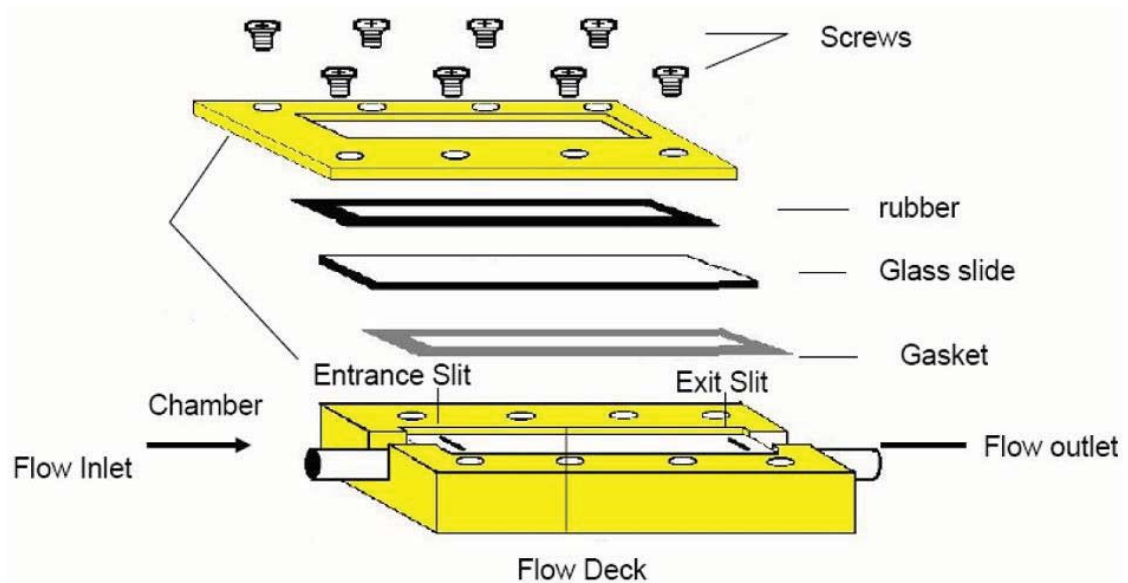


Fig. 2.1 Parallel plate laminar flow chamber. The rubber, glass slide, gasket, and polycarbonate plate are held together in a metal chamber by screws on the periphery. A channel of uniform height is formed by the gasket. Culture medium flows in the chamber through entrance slit at the inlet, distributes through a slit into the channel, and then flows out through exit slit at the outlet.

由動量平衡 (momentum balance)，可以估計細胞所受之剪力大小。考慮如 Fig. 2.2 的流體通道 (fluid channel)，以 y 方向的 Navier-Stokes 公式可以推導出作用於玻片 (slide) 上的壁面剪力為：

$$\tau_w = \frac{6 \mu Q}{wh^2}$$

其中 τ_w = 壁面剪力 (dyne / cm²)

μ = 黏度 (dyne.sec / cm²)

Q = 流量 (cm³ / sec)

w = 流體通道寬度 (cm)

h = 流體通道長度 (cm)

而流經通道的流體雷諾數 (Reynolds number, Re) 為：

$$Re = \frac{2\rho hU}{\mu} = \frac{2\rho Q}{w\mu}$$

其中 ρ = 培養基之密度

U = 平均流速

推導方式如下頁所示。經由壁面剪力 (τ_w) 與流率 (Q) 的關係式 $\tau_w = \frac{6 \mu Q}{wh^2}$ ，可以調整流動系統的流量來達成所預期的流動室內之壁面剪力。以本實驗中採用剪力 12 dyne/cm² 為例， w 、 h 及 μ 分別代表由墊片 (gasket) 所形成的通道寬 (2.6 cm)、高 (0.025 cm) 及培養基 (M199+20 % (v/v) FBS) 的黏度 (0.0084 g.sec / cm)，依關係式計算發現，要達平均剪力為 12 dyne/cm² 的要求，系統流率必須為 0.39 mL/sec。將流率除以通道的截面積所得之流動速度代入，計算出雷諾數為 35.7，說明流體的流動型態應為層流。

層流流動室中壁面剪力 (wall shear stress) 及 Re 之計算過程如下所示：

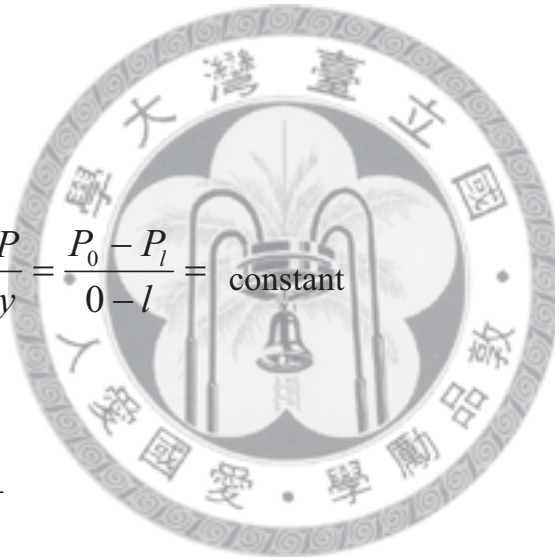
Assume $V_x = 0$ 、 $V_z = 0$ 、 $V_y = V_y(z)$ ，steady state、constant ρ and μ ，Newtonian fluid, g_y negligible. Equation of motion in rectangular coordinates (x, y, z) becomes：

$$\rho \left(\frac{\partial V_y}{\partial t} + V_x \frac{\partial V_y}{\partial x} + V_y \frac{\partial V_y}{\partial y} + V_z \frac{\partial V_y}{\partial z} \right) = -\frac{\partial P}{\partial y} + \mu \left(\frac{\partial^2 V_y}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 V_y}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 V_y}{\partial z^2} \right) + \rho g_y$$

$$\Rightarrow \mu \frac{\partial^2 V_y}{\partial z^2} = \frac{\partial P}{\partial y}$$

$$\text{assume : } \frac{\partial P}{\partial y} = \frac{\Delta P}{\Delta y} = \frac{P_0 - P_l}{0 - l} = \text{constant}$$

$$\Rightarrow \frac{\partial^2 V_y}{\partial z^2} = \frac{P_l - P_0}{\mu \cdot l}$$



with boundary conditions：

$$\text{I. } V_y = 0 \quad \text{at} \quad z = \frac{h}{2}$$

$$\text{II. } \frac{\partial V_y}{\partial z} = 0 \quad \text{at} \quad z = 0$$

$$\text{So, } V_y = \frac{P_0 - P_l}{8\mu \cdot l} (h^2 - 4z^2) \quad \text{and} \quad Q = 2 \int_0^{h/2} V_y w dz = \frac{w(P_0 - P_l)h^3}{12\mu \cdot l}$$

$$\Rightarrow \tau_{yz} = -\mu \frac{dV_y}{dz} = \frac{P_0 - P_l}{l} z$$

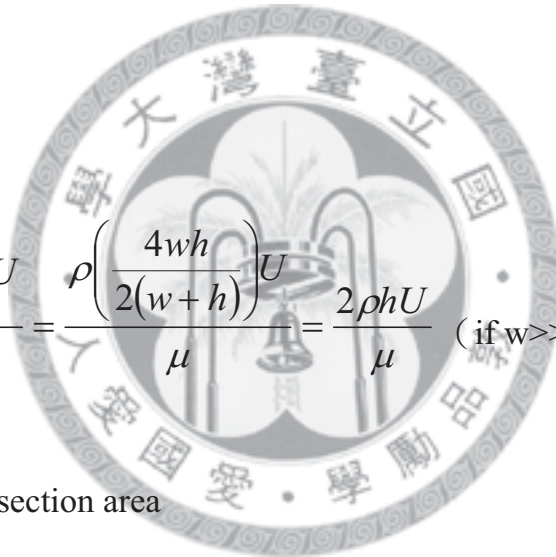
$$\Rightarrow \tau_{wall} = \tau_{yz} \quad \text{at} \quad z = h/2 = \frac{(P_0 - P_l)h}{2l}$$

$$\Rightarrow \tau_{wall} = \frac{6\mu \cdot Q}{wh^2}$$

$$\text{and } \text{Re} = \frac{\rho \left(\frac{4A}{P} \right) U}{\mu} = \frac{\rho \left(\frac{4wh}{2(w+h)} \right) U}{\mu} = \frac{2\rho h U}{\mu} \quad (\text{if } w \gg h)$$

其中 A : cross section area

P : perimeter



2.3.5.2. 流動實驗之設計與流程

流動實驗裝置如 Fig. 2.3 所示。將培養細胞的培養基裝入玻璃瓶內層，並且通入無菌過濾後含 5% CO₂ 外加飽和水蒸氣的空氣，以保持培養基之 pH 值為 7.4；將玻璃瓶置入恆溫水槽中，外層以恆溫水流通，保持系統溫度維持在 37°C。開啟轉動式幫浦 (roller pump)，並將波動調節器 (pulse dampener; Masterflex, U.S.A.) 稍微傾斜，直到輸入的培養基達到液面達適當

高度，再將其放平，以消除流體的脈動，並藉由敲打管路以且阻止氣泡進入流動室；此時培養基便經由塑膠管流回瓶中，而成為一循環狀態。調節幫浦轉速至所需流量後，使系統循環 30 分鐘到達穩定狀態後，先將蠕動幫浦關閉，將流動室裝入流動系統後開始進行實驗。在裝上流動室開始實驗及結束實驗拆下流動室時，均應盡量避免氣泡的產生，以免傷害細胞，並將處理裝卸時間縮到最短，以減少此一過程對於細胞狀態之影響。



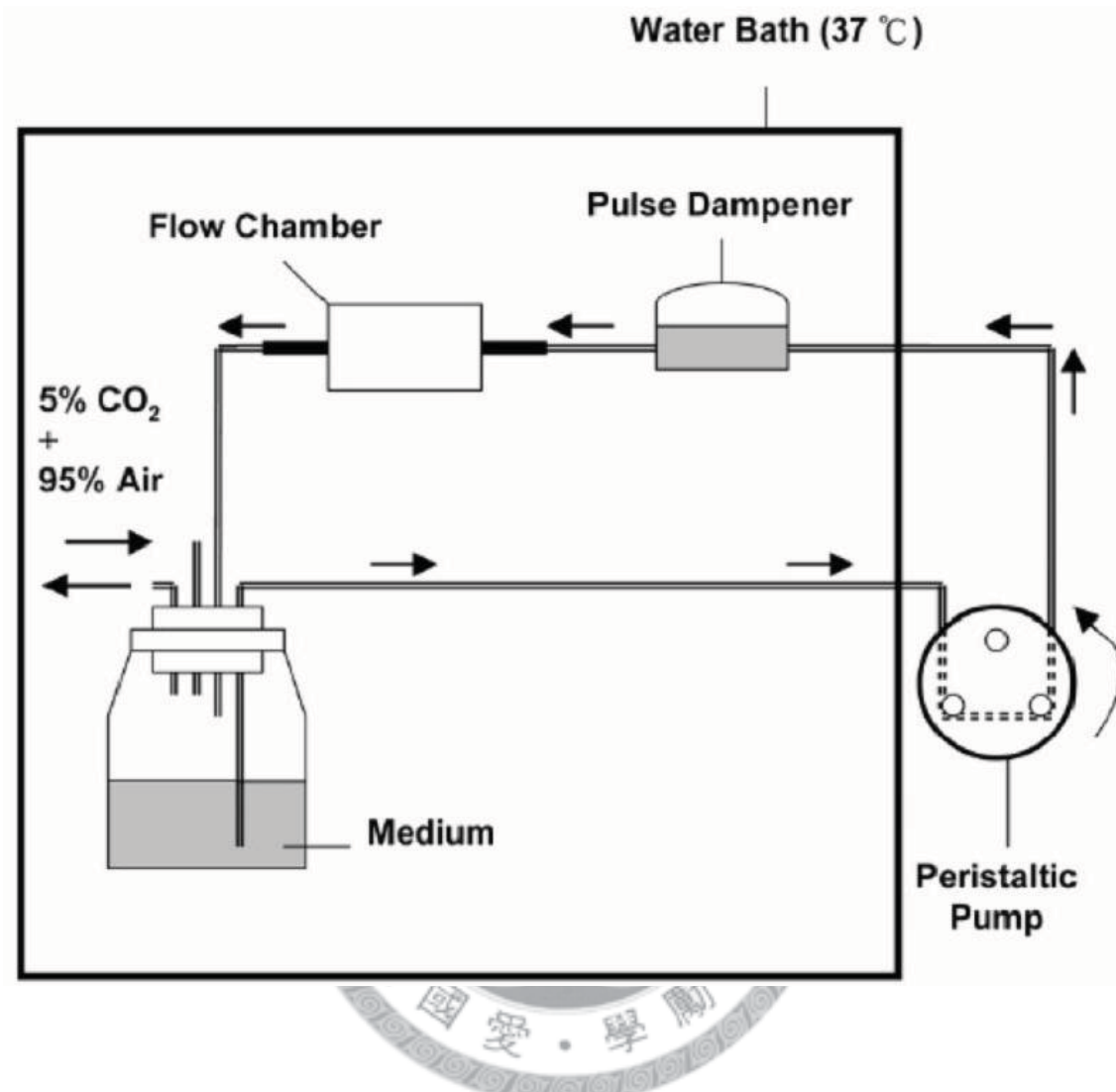


Fig. 2.3 Flow chamber system. Continuous flow of culture medium through the flow chamber is driven by a roller pump. A pulse dampener eliminates pulsation in the output flow.

2.3.6. 細胞內蛋白質抽取

經實驗處理過的細胞以 PBS 緩衝液潤洗後，吸乾培養皿及玻片上殘留之液體，加入含有蛋白酶抑制劑 (Protease inhibitor: NaF、PMSF、Aprotinin、Na₃VO₄) 的溶胞緩衝溶液 (Lysis buffer: RIPA buffer with protease inhibitors and 0.1% SDS) 後，將細胞刮下移至 1.5 mL 的離心管中，接著用超音波震盪器將細胞破碎 (需注意避免產生高溫)，皆下來在 4°C 下使用微量離心機、以 12000 rpm 的轉速離心 30 分鐘，此時之上清液即為 total cell lysate，接下來可測定破碎下來的細胞之總蛋白質含量、進行 Western Blot 或其他實驗。

2.3.7. 蛋白質含量測定

在本實驗中，主要是使用 Bradford method 進行蛋白質含量之測定 (Bradford, 1976)。2 μ L 樣品加入 8 μ L 純水，並且加入 200 μ L 的蛋白質濃度定量液 (BCA protein detection kit, reagent A: reagent B=50:1)，混合均勻後將樣品放入 60°C 的恆溫水槽浸煮 30 分鐘，再以分光光度計 (kinetic microplate reader) 測量樣品在波長為 530 nm 的吸光值。另外，用相同方法測定濃度分別為：0、0.05、0.1、0.3、0.5、0.7 μ g/ml 的 BSA 之吸光值，10 μ L 的標準液加入 200 μ L 的蛋白質濃度定量液 (BCA reagent, A:B=50:1)，以此做出蛋白質濃度對吸光值的標準曲線 (standard curve)，由此標準曲線決定每個樣品的蛋白質濃度。

2.3.8. 西方墨點法

經實驗處理後的細胞以前述之方法收集蛋白質樣品並測定細胞之總蛋白質含量後，將不同試樣之蛋白質加純水調成相同濃度，加入還原劑 (5X

Laennli sample buffer，以 1：4 的體積比作稀釋)，於 95°C 加熱十分鐘，然後進行 SDS-PAGE 電泳 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)，以約 90 伏特進行 2-3 小時，取出凝膠，將之置於轉印 (transfer) 卡夾再放入轉漬槽中，倒入 transfer buffer，以 280mA 轉印兩到三個小時，即可將蛋白質轉移到 PVDF 膜片上；接著以含 5% 牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)及 0.1% Tween-20 的 TBS 溶液 (TBS-T) 進行 blocking，約浸泡膜片一小時，然後再加入一級抗體 (1：1000~1：5000 稀釋倍率) 浸泡，於室溫 2 小時以上或 4°C 下搖晃過夜，再以 TBS-T 溶液洗三次，每次十分鐘，以洗去多餘抗體。倒掉 TBS-T 後，加入 HRP 標記的二級抗體 (1：30000~1：10000 稀釋) 之含 5% BSA 的 TBS-T 浸泡，於室溫下搖晃 1~2 小時，然後以 TBS-T 洗三次，每次十分鐘，最後在膜上加 chemiluminescence substrate，以富士冷光影像分析系統來測量 HRP 催化後產物的冷光強度。

2.3.9. 細胞內 total RNA 之抽取

經實驗處理過後的細胞以 PBS 緩衝液潤洗後，完全吸乾殘留之液體，加入 TRI reagent，於室溫下作用 5 分鐘後，將溶液吸到 1.5 mL 離心管中，再加入 0.1 mL bromochloropropane，劇烈搖盪均勻，於室溫下作用 2~15 分鐘使其分層，於 4°C 下使用微量離心機、12000 rpm 離心 15~25 分鐘；將上清液 (水層) 移至乾淨的另一離心管中，加入 0.5 mL isopropanol，搖晃均勻，於室溫下作用 5~10 分鐘後，於 4°C 下 12000rpm 離心 8 分鐘，移除上清液，加入 1 mL 70% ethanol 與 RNA pellet 混合均勻後，於 4°C 下 7500 rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液，在抽氣櫥中使 RNA pellet 乾燥約 5~10 分鐘，待 RNA pellet 乾燥變成透明無色後，加入適當體積的 DEPC 水回溶，放置 -80°C 保存。

2.3.10. 反轉錄

以 Nano Drop[®]測量 total RNA 樣品濃度，將同組實驗中各樣品濃度以 DEPC 水稀釋至相同以利後續實驗比較。每個反轉錄反應以 20 μL 為單位，將 1~5 μg 的 total RNA 於 PCR 離心管中稀釋到 11 μL ，並加入 1 μL 隨機引子(random primer; 200 ng/ μL)與 1 μL 10 mM dNTP。以 Biometra Thermocycler T3000 加熱至 65 $^{\circ}\text{C}$ 五分鐘，結束後將樣品取出冰浴五分鐘。加入 4 μL First-Strand Buffer，1 μL 0.1M 二硫蘇糖醇(Dithiothreitol, DTT)，1 μL RNase OUT[™]，1 μL SuperScript[™] III Reverse Transcriptase。混合均勻後，加熱 25 $^{\circ}\text{C}$ 五分鐘，接著加熱至 50 $^{\circ}\text{C}$ 六十分鐘，最後加熱至 70 $^{\circ}\text{C}$ 十五分鐘。完成後樣品即為 cDNA，可保存於-20 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3.11. 即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time quantitative PCR)

2.3.11.1. DyNAmo[™] Flash SYBR[®] Green qPCR

本實驗使用 Finnzymes(Espoo, Finland) F-415 分析套組，用來測量實驗組與對照組之間 cystathionine beta synthase (CBS) mRNA 的相對表現量，所使用的引子序列如下：

Bovine CBS: sense-5' ATCTT GTCGT TTCCT CGTCT3'

antisense-5' TCTCC CTACC CTGGT CATT3'

Bovine GAPDH: sense-5' ATGAC CACTG TCCAC GCCAT3'

antisense-5' GCCTG CTTCA CCACC TTCTT3'

將先前反轉錄完成的樣品取適量(CBS:20 ng;GAPDH:5 ng)依 Finnzymes

建議之分析步驟加入反應試劑(2x Master Mix, 50x ROX reference dye, DEPC water)，混合完成後共 20 μ L 加入專用 96-well plate 中，封上封膜，離心使溶液完全置於 well 底部，打開 Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR System 機器，將樣品盤放入指定位置，設定專用之電腦程式，反應條件為：(1) 95 $^{\circ}$ C 7 分鐘；(2) 95 $^{\circ}$ C 10 秒；(3) 58 $^{\circ}$ C 15 秒；(4) 72 $^{\circ}$ C 15 秒。其中步驟(2)到(4)進行 50 個循環，並同時由機器偵測 PCR 產物隨著反應增加的情況，待反應結束後，對量測結果進行分析，選取適當的 threshold，即可得到每一個產物的 C_T 值，並經由計算得到 mRNA 的變化情況。

2.3.11.2. TaqMan[®] Gene Expression Assay

本實驗使用 TaqMan[®] (Applied Biosystems) 分析套組，用來測量實驗組與對照組之間 cystathionine gamma lyase (CSE) mRNA 的相對表現量。將先前反轉錄完成的樣品取適量(CSE:100ng； GAPDH:40ng)依分析套組使用說明建議之分析步驟加入反應試劑(20x TaqMan[®] Gene Expression Assay, 2x TaqMan[®] Gene Expression Master Mix, DEPC water)，混合完成後共 20 μ L 加入專用 96-well plate 中，封上封膜，離心使溶液完全置於 well 底部，打開 Applied Biosystem 7500 Real-Time PCR System 機器，將樣品盤放入指定位置，設定專用之電腦程式，反應條件為：(1) 95 $^{\circ}$ C 10 分鐘；(2) 95 $^{\circ}$ C 15 秒；(3) 60 $^{\circ}$ C 1 分鐘。其中步驟(2)跟(3)進行 40 個循環，並同時由機器偵測 PCR 產物隨著反應增加的情況，待反應結束後，對量測結果進行分析，選取適當的 threshold，即可得到每一個產物的 C_T 值，並經由計算得到 mRNA 的變化情況。

2.3.12. siRNA 轉染

在實驗開始前一到兩個小時，先將欲處理之細胞換新鮮培養基。將欲轉染之 siRNA 加入不含血清之培養基中，此培養基體積為細胞培養盤中培養基體積的十分之一。接著加入 TurboFect™細胞轉染試劑(Fermentas)，比例為 1 μ g siRNA : 2 μ L 轉染試劑。靜候 20 分鐘，將混合溶液滴入欲轉染的細胞盤中。

2.3.13. 免疫沉澱

經實驗處理後的細胞以前述之方法收集蛋白質樣品後，利用 Bradford method 進行蛋白質含量測定。取同量之蛋白質並用純水調成相同濃度，隨後依比例加入欲沉澱之蛋白質的抗體，於 4°C 下搖晃過夜，然後再加入預先以 PBS buffer 潤洗過以及用含 5% BSA 之 PBS 溶液進行 blocking 後的 protein G beads (Thermo Scientific)，於 4°C 下搖晃 1 小時，結束後將 beads 離心至離心管底。之後再用 IP washing buffer 潤洗，洗完離心並抽去上清液，重複 2~3 次，加入 2X Laemmli sample buffer，於 95°C 加熱十分鐘。所得特定蛋白質沉澱的樣品可用於進行 Western Blot 或其他實驗。

2.3.14. 硫化氫測定

本實驗主要參考 Yang et al. (2006) 以及 Zhao et al. (2001) 的方法並加以修正。經過實驗處理的細胞加入胰蛋白酶溶液 (Trypsin)，放入 37°C 恆溫培養箱中作用 2 分鐘並略微敲打，使細胞懸浮，加入含 FBS 的培養基，以中和胰蛋白酶的作用，收集所有培養基，以 2000 rpm 之轉速離心 3 分鐘，吸除上清液，留下沉澱於管底的細胞，實驗過程盡可能將細胞至於冰上保持低溫。

將收集下來的細胞加入 1 mL reaction mixture (100 mM potassium phosphate buffer, pH7.4; 10 mM L-cysteine; 2 mM pyridoxal 5'-phosphate), 以超音波震盪器打碎細胞。將含有細胞碎屑的 reaction mixture 以微量吸管吸至 25 mL 錐形瓶中, 置於冰上。準備一只 cryogenic vial (Corning), 放入約 1.5 cm 見方的濾紙(Whatman)以及 0.5 mL 1% zinc acetate 以吸收製造出來的硫化氫。將 cryogenic vial 放入先前置於冰上的錐形瓶, 充入氮氣約 30 秒, 以雙層 Parafilm[®] 封口, 37°C 反應。1.5 小時以後加入 0.5 mL 50% trichloroacetic acid 中止反應, 封上雙層 Parafilm[®] 並置於 37°C 一小時以利硫化氫吸收。取出 cryogenic vial 中的溶液與濾紙, 加入 3.5 mL 純水。加入 0.5 mL 20 mM N,N-dimethyl-p-phenylenediamine sulfate (溶於 7.2 M HCl), 接著快速加入 0.5 mL FeCl₃ (溶於 1.2 M HCl), 反應 20 分鐘。將反應後的溶液離心去除濾紙所產生的紙屑, 利用分光光度計(VERSA max tunable microplate reader)測量其於 670 nm 的吸收值。將所得的吸收值對照校正曲線即可算出硫化氫濃度。

硫化氫校正曲線：準備 0、0.2、0.4、0.8、1、1.2、1.4、1.8、2、4、6、8、10 μ M 的 NaHS 水溶液 4 mL。各濃度點作三重複, 分別加入 0.5 mL 20 mM N,N-dimethyl-p-phenylenediamine sulfate (溶於 7.2 M HCl), 接著快速加入 0.5 mL FeCl₃ (溶於 1.2 M HCl), 反應 20 分鐘。將反應後的溶液以分光光度計(VERSA max tunable microplate reader)測量其於 670 nm 的吸收值。將所得的吸收值對照 NaHS 濃度繪出校正曲線如 Fig. 2.4。

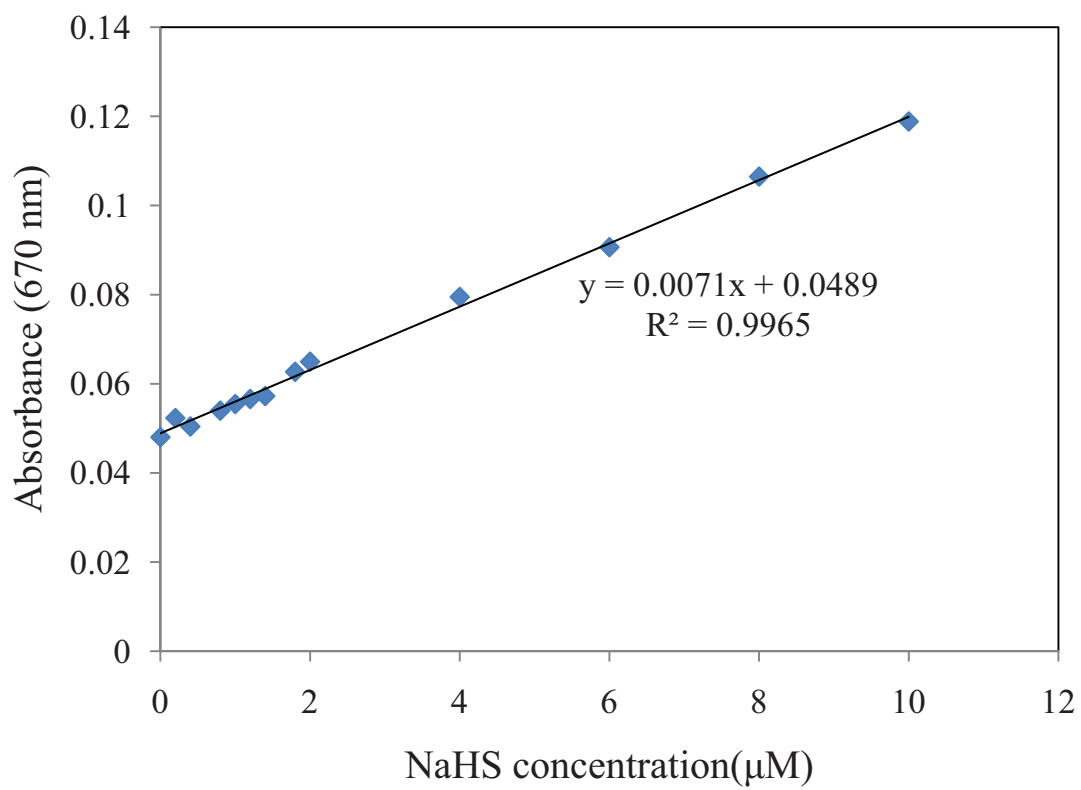


Fig. 2.4 Hydrogen sulfide assay calibration curve.

2.3.15. 量化與統計方法

本論文中西方墨點法所得之圖像皆以美國 National Institute of Health (NIH)所開發之 Image J 軟體進行量化，取三次重複實驗之數據，將量化後的結果繪成統計圖。統計圖形式皆為 $\text{mean} \pm \text{S.E.}$ ，並進行 Student's t-test，以所得之 P value 判定實驗組與對照組是否有統計上之差異，或以 ANOVA 分析方法，以所得的 F_0 值判定統計上是否有差異。



第3章 實驗結果與討論

3.1. 剪力對硫化氫生成速率之調控

剪力對內皮細胞會產生許多保護作用，硫化氫亦然。然而目前關於剪力與硫化氫生成的關聯的研究非常有限，因此，本實驗旨在探討剪力對內皮細胞中硫化氫生成之影響。在牛主動脈內皮細胞(BAECs)經過 12 dyne/cm² 的剪力刺激30分鐘之後，收集細胞並測定細胞內硫化氫在一定時間內的生成量，結果如 Fig. 3.1。

Fig. 3.1 顯示，在剪力刺激30分鐘後，細胞內硫化氫生成速率上升了約五倍，可見剪力會大幅增加硫化氫的生成。其中的機制可能是透過增加細胞內硫化氫生成酵素的量或者是增加其活性，在後續的章節中，將分別探討這兩種可能機制。



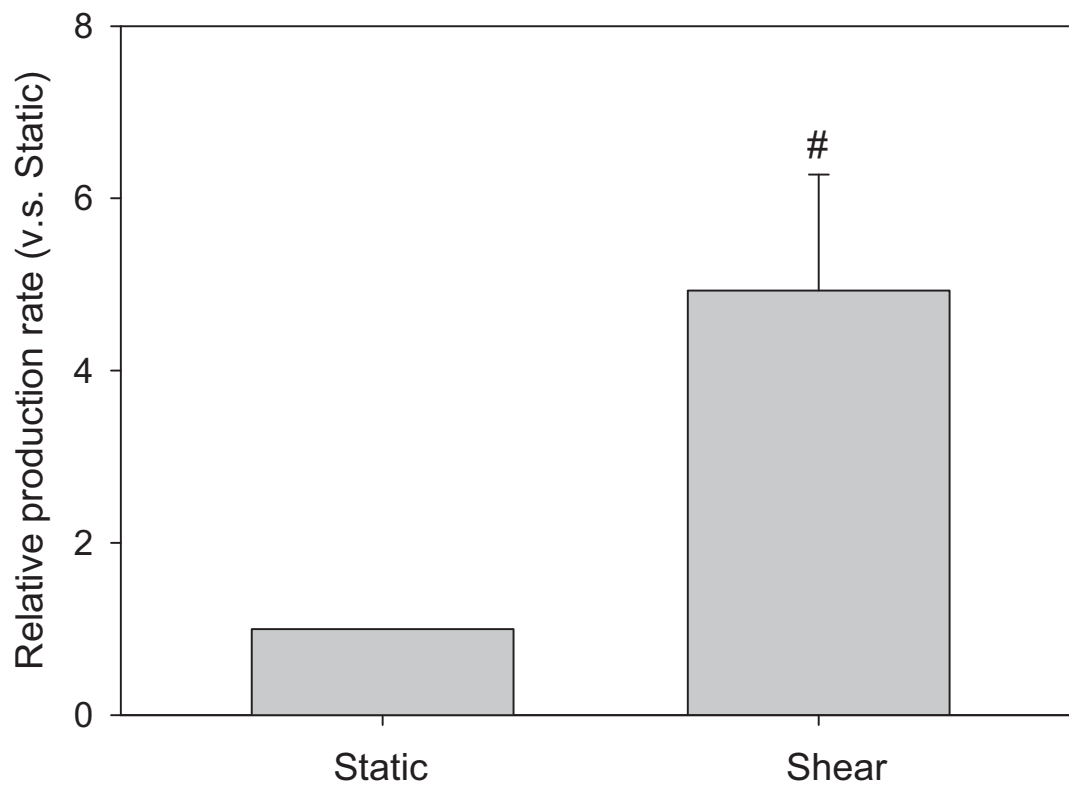


Fig. 3.1 Shear stress stimulates hydrogen sulfide production in endothelial cells. Bovine aortic endothelial cells (BAECs) were stimulated with shear stress (30 minutes, 12 dyne/cm²) and hydrogen sulfide production rate was measured. (n=3, mean±S.E., # P value < 0.05 v.s. Static)

3.2. 剪力對硫化氫合成酵素之影響

3.2.1. 剪力對硫化氫合成酵素 mRNA 之調控

由 3.1 節的結果，可知剪力會增加內皮細胞的硫化氫生成速率，其中可能的機制之一是透過增加硫化氫生成酵素的量，而欲增加特定蛋白質的量，細胞可能透過增加 mRNA 的合成，因此，在本節中將探討剪力刺激後 CSE 與 CBS mRNA 的量。

Fig. 3.2 與 Fig. 3.3 分別為 BAECs 經過 30 分鐘以及 2 小時剪力刺激之後 CBS 以及 CSE mRNA 的相對表現量。本組實驗時間點取 30 分鐘與 2 小時，理由在於兩者可分別代表短時間與長時間的蛋白質表現調控。Fig. 3.2 顯示，CBS mRNA 表現量不受剪力所影響，無論剪力刺激 30 分鐘或 2 小時，mRNA 量皆與控制組(static)無異；另一方面，Fig. 3.3 顯示 CSE mRNA 在剪力刺激 2 小時後無明顯變化，剪力作用 30 分鐘的實驗組雖然平均值下降約 20%，然而透過 ANOVA 檢定可以發現，其 F_0 值為 1.958，小於信賴水準 0.05 之下的 F 值 19.33，表示剪力刺激 30 分鐘後之平均值與靜態下的結果並無統計上差異。綜合本組實驗結果，可以發現剪力作用後硫化氫生成速率的上升並不是透過增加硫化氫生成酵素的 mRNA 表現。

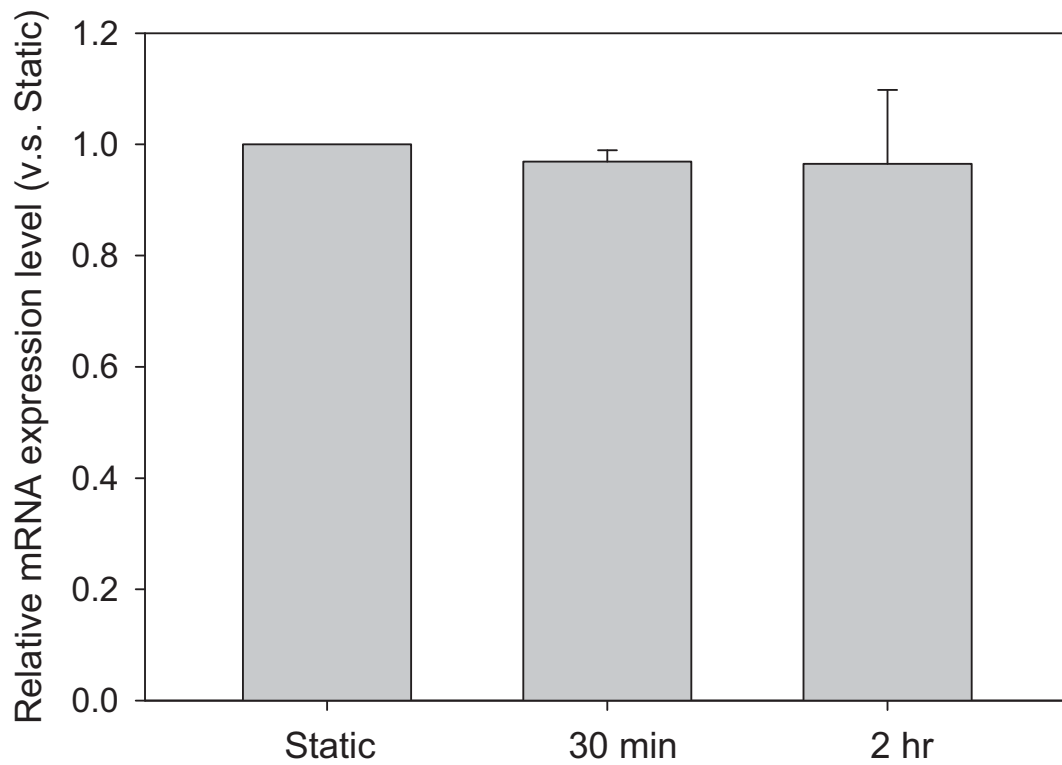


Fig. 3.2 Shear stress does not affect CBS mRNA expression levels in endothelial cells. Bovine aortic endothelial cells (BAECs) were stimulated with shear stress (12 dyne/cm²) for 30 minutes or 2 hours, CBS mRNA expression levels were measured by quantitative real-time PCR. (n=3, mean±S.E.)

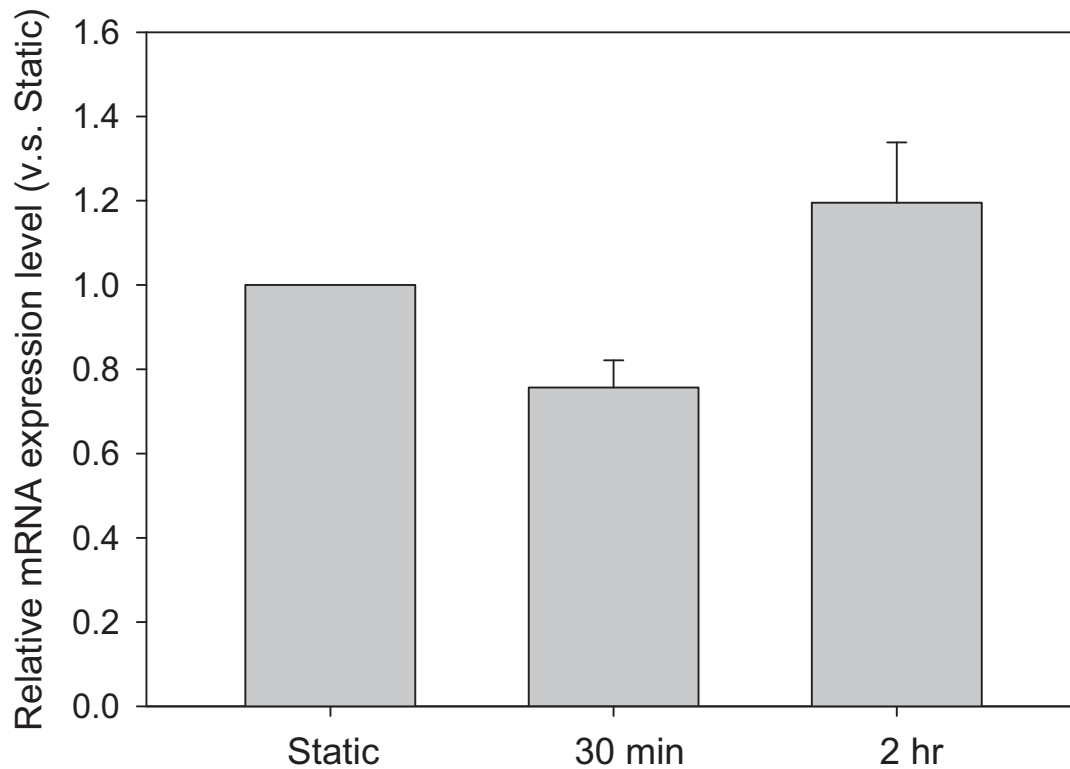


Fig. 3.3 Shear stress does not affect CSE mRNA expression levels in endothelial cells. Bovine aortic endothelial cells (BAECs) were stimulated with shear stress (12 dyne/cm²) for 30 minutes or 2 hours, CSE mRNA expression levels were measured by quantitative real-time PCR. (n=3, mean±S.E.)

3.2.2. 剪力對硫化氫合成酵素蛋白質表現之調控

根據 3.2.1 節的結果，可知剪力並非透過增加硫化氫生成酵素的 mRNA 表現量來調控硫化氫生成。然而除了增加硫化氫生成酵素的 mRNA 表現量，細胞亦可透過增加硫化氫生成酵素的穩定性等方式來增加細胞內酵素的量，因此，直接測定剪力作用後細胞內硫化氫生成酵素的表現量，可以釐清是否其在剪力作用後有所變化以及其他調控方式的可能性。

BAECs 在以剪力刺激 30 分鐘之後，收集細胞內蛋白質並以西方墨點法分析蛋白質含量，結果如 Fig. 3.4。結果顯示，無論 CBS 或者 CSE 在 30 分鐘剪力刺激之後，蛋白質的量皆無變化，而 3-MST 則上升約 10%。雖然 3-MST 在本實驗中觀察到上升的情形，但其上升的幅度僅 10%，與 3.1 節中硫化氫生成速率上升約五倍的幅度比例相差懸殊，僅以 10% 的蛋白質增加量來解釋五倍的硫化氫生成速率上升並不合理，因此，有其它調控機制的可能性極高，將在後續章節繼續探討。

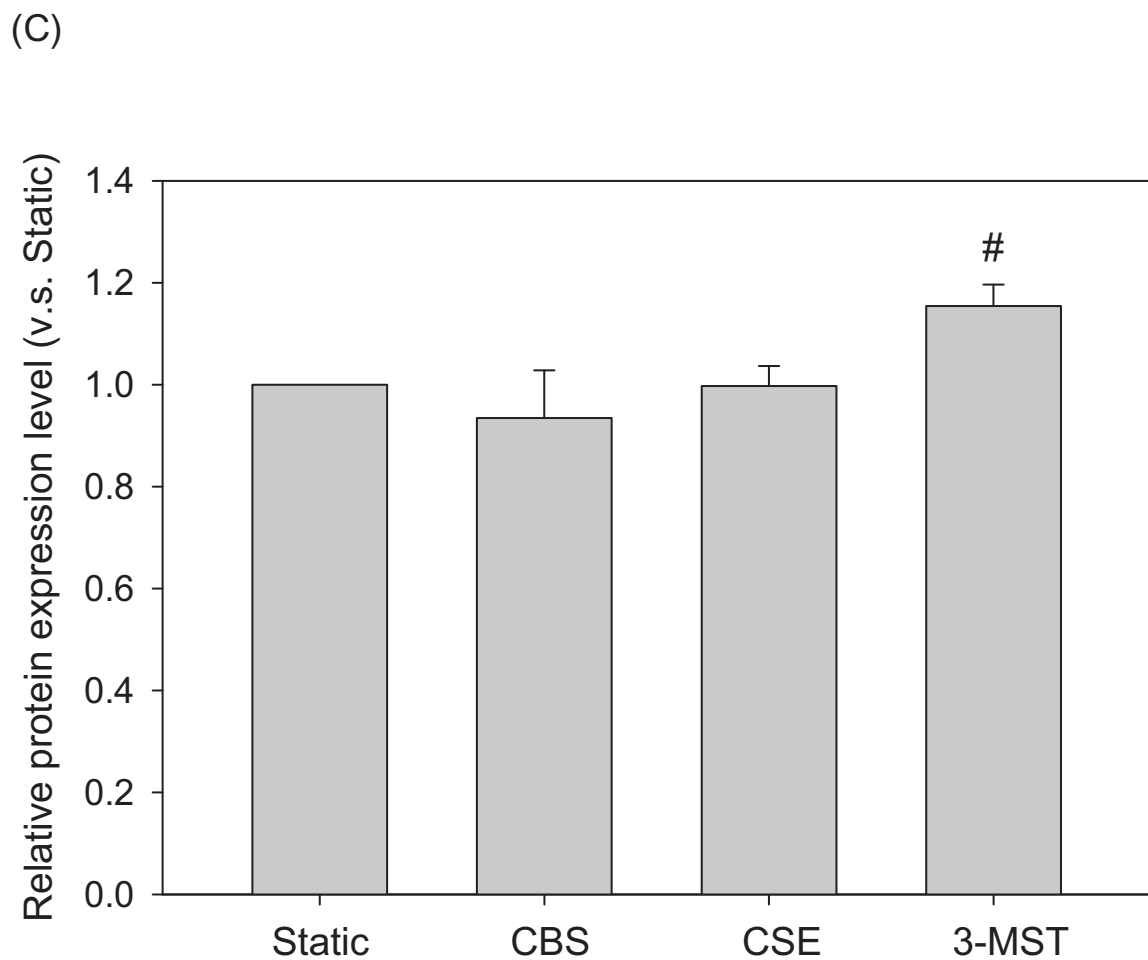
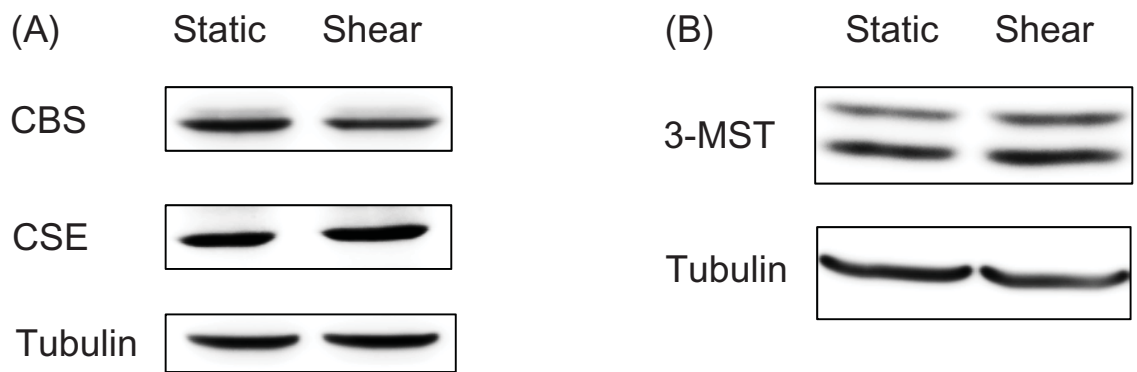


Fig. 3.4 Effect of shear stress on expression levels of hydrogen sulfide producing proteins in endothelial cells. Bovine aortic endothelial cells (BAECs) were stimulated with shear stress (12 dyne/cm²) for 30 minutes. Whole cell lysate was collected for western blot to analyze protein expression levels of (A) CBS, CSE and (B) 3-MST. (C) Results are plotted in bar graph (n=3, mean±S.E., # P value < 0.05 v.s. Static).

3.3. Calmodulin 對硫化氫生成酵素之調控

根據 3.2 節的結果，我們可以得知剪力增加硫化氫生成量的機制，並非透過增加硫化氫生成酵素的蛋白質量，先前研究指出，CBS 以及 CSE 活性會受到攜鈣素(calmodulin)的調控(Kimura, 2002；Yang et al., 2008)，因此，本節實驗主要探討剪力是否透過攜鈣素來調控硫化氫生成酵素。攜鈣素主要受到細胞內鈣離子濃度調控，當細胞內鈣離子濃度升高時，鈣離子會與攜鈣素結合，進而誘使攜鈣素與其他酵素結合，因而改變所結合酵素的活性(Means et al., 1980)。根據文獻，剪力會增加細胞內鈣離子濃度，然而，此一機制尚未完全被了解，鈣離子濃度上升的程度、上升時間的長短、持續時間、鈣離子的來源等問題都尚未有定論(Yamamoto et al., 2000；Yamamoto et al., 2003；Mo et al., 1991；Ando et al., 1988；Shen et al., 1992)，因此，本實驗的設計上為避免剪力對鈣離子濃度影響的不確定性，先以鈣離子離子載體(calcium ionophore)A23187 來造成細胞內鈣離子濃度上升，接著使用免疫沉澱的實驗方法，觀察與攜鈣素有結合的蛋白質。

參考 Yang et al.(2008)的實驗，將 BAECs 以 1 μ M 的 A23187 處理 10 分鐘之後(對照組以 A23187 的溶劑 DMSO 處理)，收集細胞全蛋白質，並以攜鈣素抗體進行免疫沉澱，或以小鼠免疫球蛋白 G (mouse IgG)進行實驗作為陰性對照(negative control)，最後以西方墨點法觀察實驗結果。除了免疫沉澱(IP)的結果以外，於西方墨點法中亦觀察細胞全蛋白質(WCL)中攜鈣素、CSE 以及 CBS 的量，以確定實驗組與對照組細胞中此三種蛋白質的表現量無明顯差異，以利結果比較。結果如 Fig. 3.5，WCL 的結果可以首先確認細胞處理 DMSO 或者 A23187 並不會對目標蛋白質產生影響，IP 的結果顯示並無 CBS 與攜鈣素結合的情形，CSE 方面，在可能出現 CSE 訊號的區域附近，有觀察到兩條細微的條帶，然而，由於小鼠免疫球蛋白 G 的對照組也出現

相同的訊號，可以判定此訊號應該為非專一性(non-specific)的結果。綜合以上實驗結果，我們可以發現在本實驗中 CBS 與 CSE 在 BAECs 中並不會受到細胞內鈣離子濃度增加而與攜鈣素結合，而促使硫化氫生成速率在剪力作用下上升的機制，仍待更多的實驗去證明。



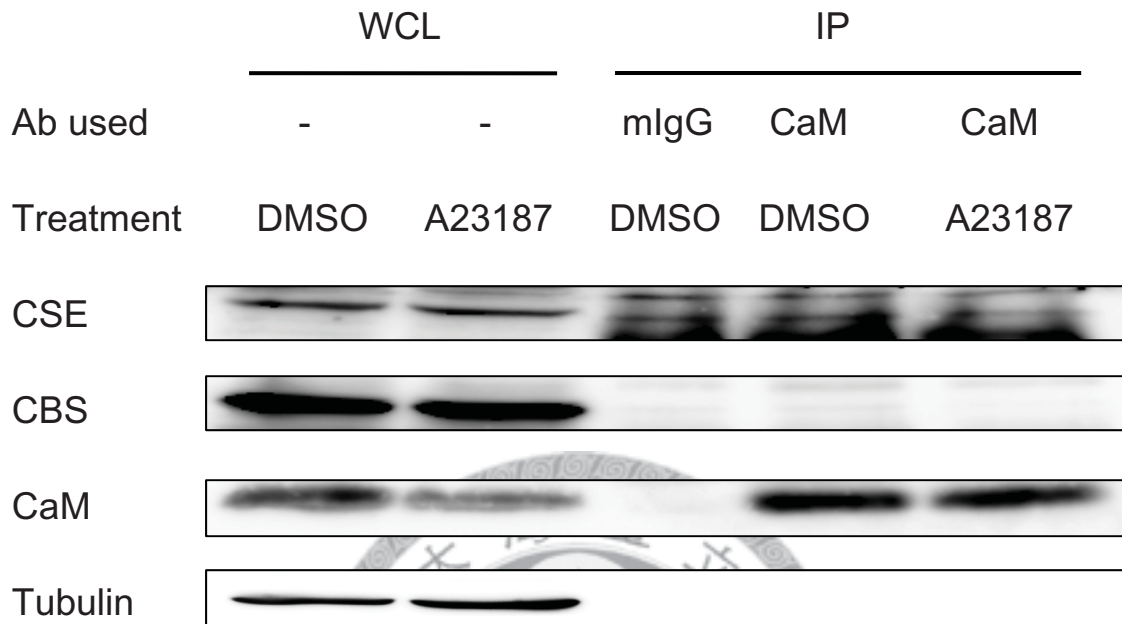


Fig. 3.5 CSE and CBS are not associated with calmodulin after BAECs were treated with calcium ionophore, A23187. WCL, whole cell lysate ; IP, immunoprecipitation ; Ab used, antibody used in immunoprecipitation ; CaM, calmodulin. BAECs were treated with 1 μ M A23187 (or DMSO as control) for 10 minutes before whole cell lysate was collected for immunoprecipitation. Immunoprecipitation were carried out with calmodulin antibody or mouse IgG (control).

3.4. 硫化氫對內皮細胞之影響

在 3.4 以及 3.5 兩小節中，主要探討剪力作用對硫化氫所產生的訊息傳導的影響。根據前人的研究指出，內皮細胞在 60 μM 的硫化氫(硫化氫 donor)作用之下，Akt 與 ERK 磷酸化的程度在 30 分鐘內皆有上升 (Papapetropoulos et al., 2009)，且 Akt 與 ERK 在硫化氫所產生的心血管保護作用的機制中扮演了相當重要的角色，兩者在剪力作用之下與硫化氫的關係值得討論。除了 Akt 與 ERK 以外，eNOS 亦是討論的重點，理由在於 NO 是剪力作用下內皮細胞一個相當重要的氣體傳導分子，而文獻指出硫化氫對負責產生 NO 的 eNOS 有所調控，因此硫化氫有可能影響剪力對 eNOS 的作用，值得深入探討，此外，因為 Akt 可能影響 eNOS 在 serine 1177 此一殘基的磷酸化 (Dimmeler et al., 1999)，eNOS 磷酸化方面以 peNOS s1177 為主要討論的磷酸化態。因此，在以下的實驗中，主要選定 Akt、ERK 以及 eNOS 為討論的目標。

在討論剪力所扮演的角色之前，應先釐清硫化氫本身對於細胞訊息傳導的作用。本節目的在於確認文獻上所觀察到的現象，並測試不同濃度與作用時間下訊息傳導的變化。為了與剪力實驗條件一致，BAECs 在含 2% fetal bovine serum 的 DMEM 中 starvation 隔夜，再以硫化氫進行實驗。Fig. 3.6 為 BAECs 以 60 μM 硫化氫作用 0 至 120 分鐘所得到的結果，由圖可看出 peNOS s1177 在硫化氫作用 30 分鐘內呈現下降的情形，45 分鐘開始回升，然而又在 60 分鐘下降，直到 120 分鐘才又回升至未作用前的基準。此結果並無呈現一個明顯隨時間上升或者下降的趨勢，只能觀察出在作用的前 30 分鐘 eNOS 磷酸化下降相當明顯。Akt 磷酸化對時間的關係呈現暫態(transient) 上升的趨勢，pAkt 在硫化氫作用後隨時間上升，於 45 分鐘達到高峰，並在此後漸漸下降。ERK 的磷酸化也是呈現類似的情形，唯其高峰在 30 分鐘

即達到，維持至 45 分鐘之後才逐漸下降。因此，若配合 3.1 節的結果來看，剪力作用 30 分鐘後誘導硫化氫的生成，很可能造成 peNOS s1177 下降、pAkt 與 pERK 上升之結果。

除了用 BAECs 作為研究模型之外，本實驗亦利用了 HUVECs 研究硫化氫的作用，主要是因為在下面 3.5 節中使用 siRNA 技術以人類細胞作為研究對象較佳。實驗依然是在含 2% fetal bovine serum 的 M199 中 starvation 隔夜之後，再以硫氫化鈉進行處理。此部分的實驗時間點取 30 分鐘以及 60 分鐘，30 分鐘為 3.1 節中觀察到剪力誘導硫化氫生成的時間點，60 分鐘則用來觀察 30 分鐘所顯現的作用是否持續。此外，由於硫化氫在體內的濃度可能為 10-100 μM (Olson, 2009 ; Hyspler et al., 2002 ; Hongfang et al., 2006)，取 20、60、100 μM 作為實驗濃度。實驗結果如 Fig. 3.7 所示，peNOS s1177 在硫氫化鈉作用 30 分鐘時，無論是在何種濃度之下，皆呈現些微下降的情形，然而，作用 60 分鐘以後，20 μM 的硫氫化鈉則造成 peNOS s1177 上升，60 μM 與作用前水準無太大差異，100 μM 則維持下降的情況。Akt 的磷酸化在 20 μM 之下並無明顯變化，60 μM 呈現持續的上升，100 μM 則為先上升後下降的情形。pERK 方面，20 μM 呈現些微上升，60 μM 以及 100 μM 則呈現相當明顯而且穩定的上升。

對照 Fig. 3.7 與 Fig. 3.6 的結果可以發現，二者在 60 μM 硫氫化鈉的作用下表現相當類似。30 分鐘與 60 分鐘兩個時間點的 pAkt 與 pERK 皆呈現明顯上升的狀況，且兩個時間的上升的程度相差不大，peNOS s1177 在作用 30 分鐘時於 BAECs 與 HUVECs 內也都呈現下降的情形，唯 60 分鐘時 HUVECs 的 peNOS s1177 觀察到回升的情形而 BAECs 的 peNOS s1177 仍處於下降的狀況。

綜合以上結果，我們可以發現硫化氫無論是對 BAECs 或者 HUVECs，相同濃度之下產生的作用是非常相似的，此結論對於本研究有承上啟下之作用，第一，根據此結果可以預期剪力作用 30 分鐘誘導硫化氫生成後，可能造成 peNOS s1177 下降、pAkt 與 pERK 上升之結果，第二，藉此可以確定於 HUVECs 與 BAECs 中所得的實驗結果有一定的相似性，有助於比較兩個模型中所得的實驗結果。



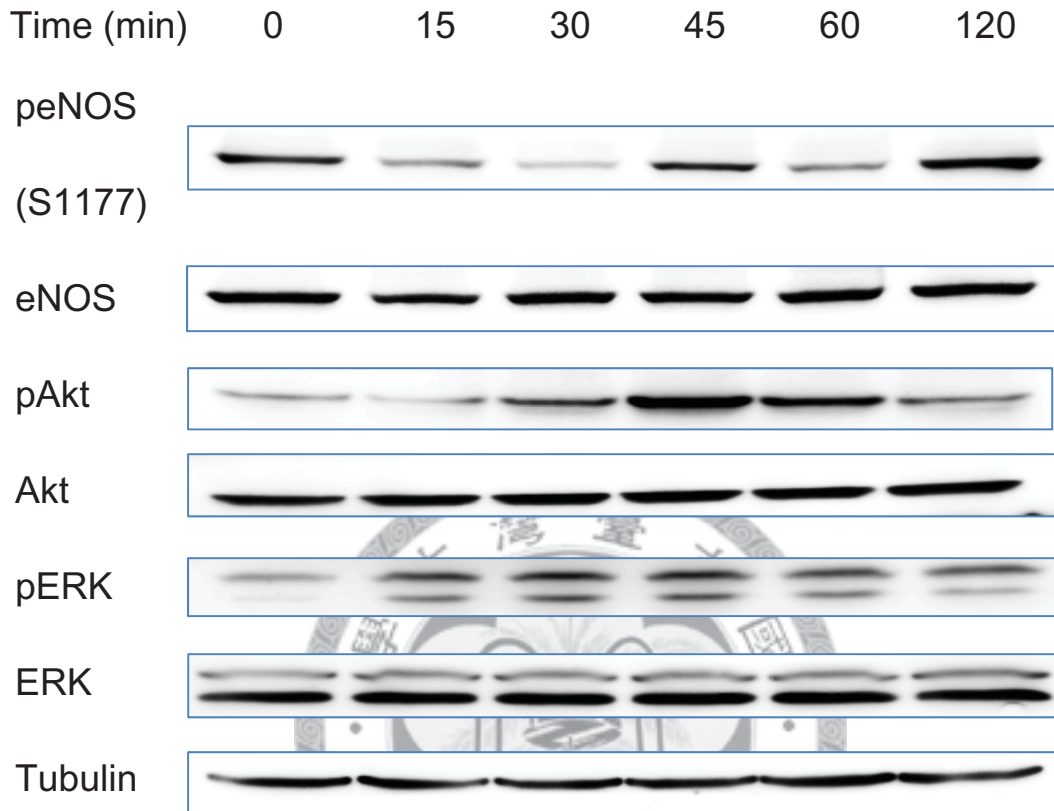


Fig. 3.6 Effect of hydrogen sulfide donor on Akt, ERK, and eNOS phosphorylation in BAECs. BAECs were serum starved in DMEM, 2% fetal bovine serum overnight before 60 μ M NaHS treatment for various times as indicated. After NaHS treatment, whole cell lysate was collected for western blot.

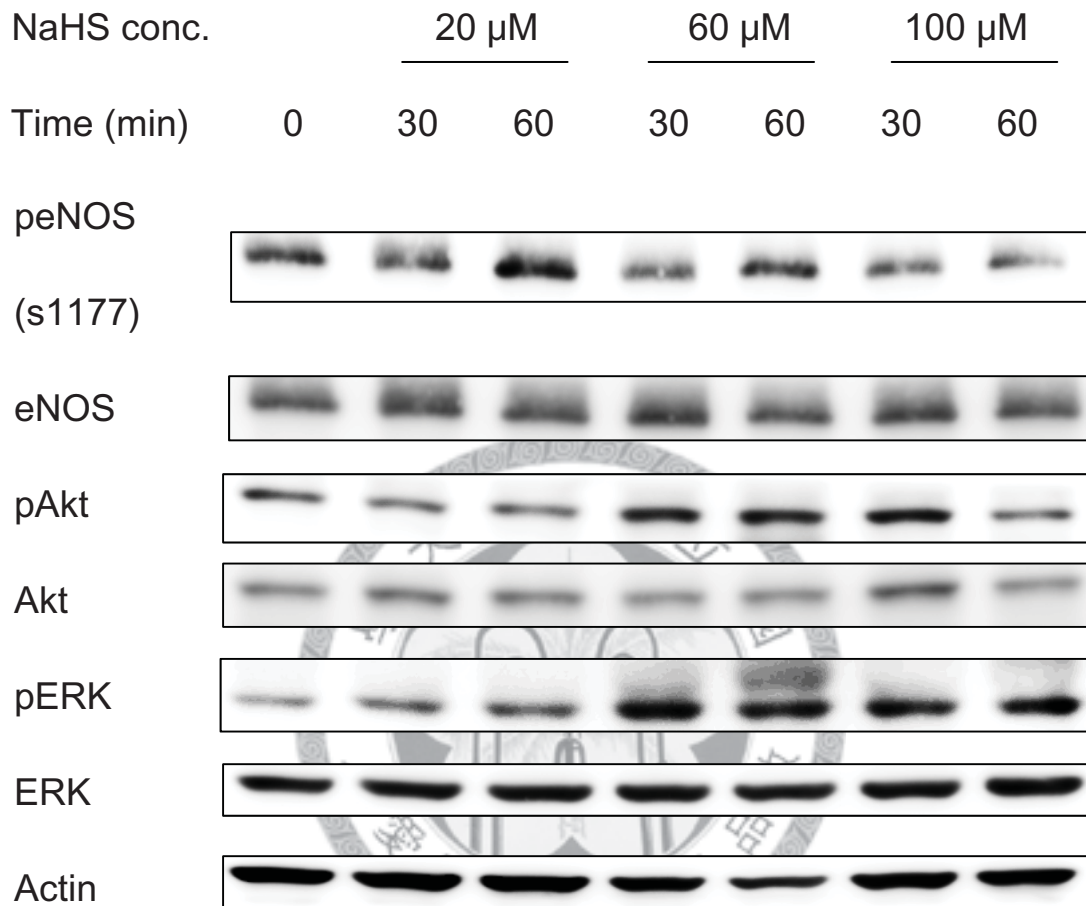


Fig. 3.7 Effect of hydrogen sulfide donor on Akt, ERK, and eNOS phosphorylation in HUVECs. HUVECs were serum starved in M199, 2% fetal bovine serum overnight before exposure to various concentrations of NaHS for times indicated. After NaHS treatment, whole cell lysate was collected for western blot.

3.5. 剪力誘導之訊息傳導與硫化氫之關係

3.5.1. 硫化氫清除劑對剪力誘導之訊息傳導之影響

在 3.4 節中，透過直接加入硫化氫的方式，得到關於硫化氫對細胞所誘導的反應的初步資訊，在 3.5 節當中，將加入剪力此一變因，探討剪力作用下硫化氫對細胞所產生的作用。

本節利用硫化氫清除劑(scavenger)高鐵血紅蛋白(methemoglobin)，探討剪力作用之下硫化氫的訊息傳導。本實驗根據 Yang et al. (2004)的實驗條件設計，BAECs 在以 10 μM 高鐵血紅蛋白處理一小時後，以剪力刺激 30 分鐘 (12 dyne/cm^2)並收集細胞蛋白質作西方墨點法分析。實驗結果如 Fig. 3.8 所示，可以發現硫化氫清除劑抑制 Akt、eNOS 以及 ERK 在剪力作用之下的磷酸化，對照 3.4 節的結果，Akt 與 ERK 的反應皆是符合預期的下降情形，然而 eNOS 在外加硫化氫的實驗中呈現下降趨勢，在本實驗去除硫化氫的狀況之下，磷酸化的程度卻比同樣是剪力作用但不加硫化氫清除劑的對照組要低，與硫化氫降低 eNOS 磷酸化反應的假設不符，探究其原因，可能是因為外加硫化氫與清除細胞內硫化氫所造成的效應可能不同，前者為外源性(exogenous)的效應，而後者為內源性(endogenous)，也可能有其他原因。

儘管 Akt 與 ERK 的反應如同預期，仔細觀察 Fig. 3.8，會發現本實驗有極大缺陷，在沒有剪力作用的情況下，清除劑本身對細胞就造成了 Akt、eNOS 以及 ERK 的磷酸化上升。因此，在清除劑本身就會干擾訊息傳導的前提下，難以保證剪力與對照組的比較沒有其它變因，再者，清除劑的效果以及

專一性難以確定，因此本實驗結果僅能提供參考，在下一節中，將使用專一性更高的 siRNA 技術，以期獲得更精準的數據。



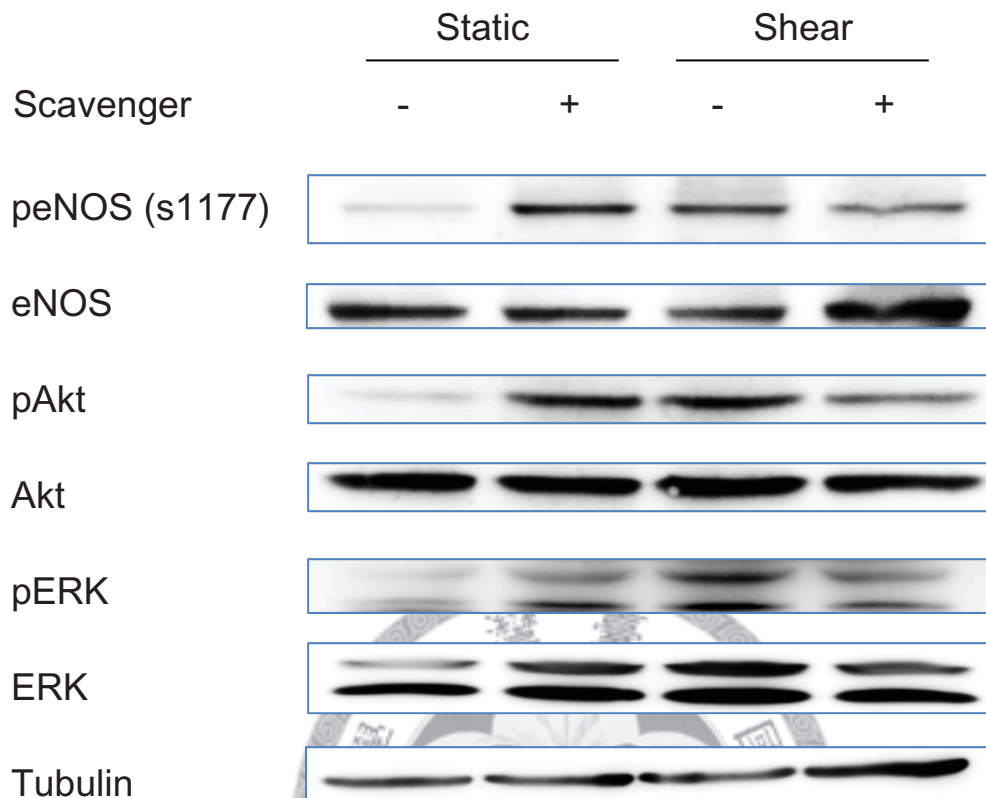


Fig. 3.8 Effect of hydrogen sulfide scavenger on shear-induced cell signaling. BAECs were treated with 10 μ M methemoglobin (H_2S scavenger) for 1 hour before shear stimulation. After 30 minutes shear stimulation (12 $dyne/cm^2$), whole cell lysate was collected for western blot.

3.5.2. 硫化氫生成酶 siRNA 對剪力誘導之訊息傳導之影響

在 3.5.1 節的結果中，可以得知剪力作用後生成的硫化氫，可能造成 eNOS、Akt 以及 ERK 磷酸化程度上升，然而，硫化氫清除劑本身對細胞產生的影響令此結果的可信度大打折扣，因此，在本節當中使用專一度相當高的 siRNA 技術來探討硫化氫生成被抑制的情況下對剪力誘導之訊息傳導有何影響。

HUVECs 在轉染硫化氫生成酶(CBS、CSE 以及 3-MST)siRNA 72 小時之後進行剪力刺激，並以西方墨點法觀察其訊息傳導蛋白質結果如 Fig. 3.9 至 Fig. 3.14。西方墨點法所呈現的結果如 Fig. 3.9、Fig. 3.11、Fig. 3.13，將多次實驗結果進行量化及統計之後，可以得到 Fig. 3.10、Fig. 3.12、Fig. 3.14。本節的數據可以分為幾個層面進行探討：首先，是直觀上目標蛋白質的變化，非磷酸化狀態的蛋白質主要以此一觀點討論，因此非磷酸化的蛋白質以 Actin 或者 Tubulin 標準化(normalize)，如 Fig. 3.10、Fig. 3.12、Fig. 3.14 中的 (A)、(B)與(C)；在同樣的圖中，亦會討論蛋白質磷酸化程度的變化，在探討磷酸化蛋白質時，以原態蛋白質標準化(normalize)，則所得的數據為蛋白質磷酸化的比例；再者，由於本節重點為討論 siRNA 的作用，勢必比較 siRNA 作用後剪力誘導磷酸化上升的程度，因此 Fig. 3.10、Fig. 3.12、Fig. 3.14 中的(D)圖，是將標準化後的磷酸化蛋白質在剪力作用下的量除以靜態(static)下的量，以得知剪力作用下誘導磷酸化的相對幅度。

在蛋白質量方面，CBS 以及 CSE siRNA 作用後在剪力誘導的訊息傳導方面並沒有產生明顯的效果。唯一有明顯差異的，是 3-MST siRNA 作用後，

eNOS 的量無論剪力作用與否都有增加的情形(Fig. 3.14 (A))，由於 siRNA 作用時間長達 72 小時，因此在這段時間內細胞有相當充裕的時間對 3-MST 的下降產生反應，影響其他蛋白質的表現，然而因為文獻上硫化氫對 eNOS 的調控尚未有清楚的脈絡，此部分觀察到的結果仍待進一步研究結果去探討其意義。除了 eNOS 之外，3-MST siRNA 作用後 ERK 磷酸化的程度也大幅提高，靜態與剪力下皆升高約 2.5 倍(Fig. 3.14 (C))，此觀察與 3.4 節得到的結果背道而馳，在 3.4 節中，外加硫化氫明顯增高 pERK 的表現，在本實驗以 siRNA 抑制 3-MST 間接降低硫化氫生成的情況下，卻觀察到相同的結果。其中可能是外加硫化氫與抑制硫化氫生成酵素的結果並不相同，雖然目的皆為改變細胞中硫化氫的濃度，前者為直接增高硫化氫的濃度，後者則先以降低 3-MST 表現量為手段，而降低 3-MST 表現量會對細胞造成何種影響，在本論文的實驗中並無法找到佐證，因此，siRNA 實驗的假設在於其對細胞的主要作用是造成硫化氫生成能力下降，然而，此一假設並無法被證明，故此部分矛盾的結果，尚待更多實驗釐清。

在磷酸化程度上，三種 siRNA 對 eNOS 磷酸化皆無明顯影響的趨勢；而 ERK 的磷酸化則受到 3-MST siRNA 的影響，無論在靜態或者剪力下皆升高為對照組的 2.5 倍；在 pAkt 方面，皆為 siRNA 靜態下無差異，而 siRNA 連同剪力作用下磷酸化的程度較對照組剪力下磷酸化的程度要低，因此，觀察 Fig. 3.10、Fig. 3.12、Fig. 3.14 中的(D)圖，可以發現剪力所誘導的 Akt 磷酸化升高被此三種 siRNA 所抑制，其中 CBS 抑制約 50%的剪力誘導，3-MST 抑制約 60%，以 CSE 最多，達到 70%。綜合上面章節所得之結果，可以推論部分剪力所誘導的 Akt 磷酸化是透過硫化氫生成所致。而 peNOS s1177 與 pERK 受到剪力所誘導的程度並未被 siRNA 所影響。

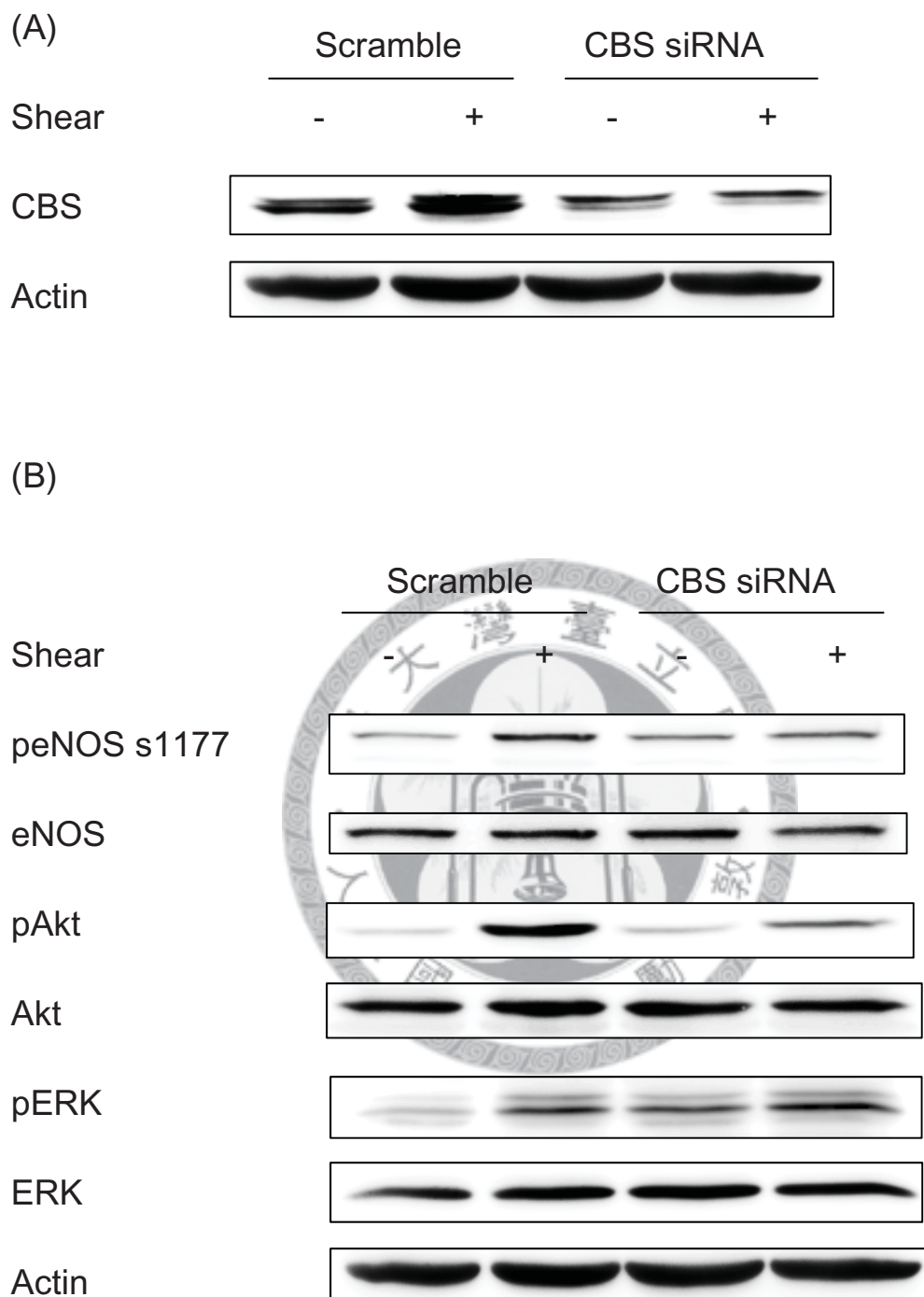
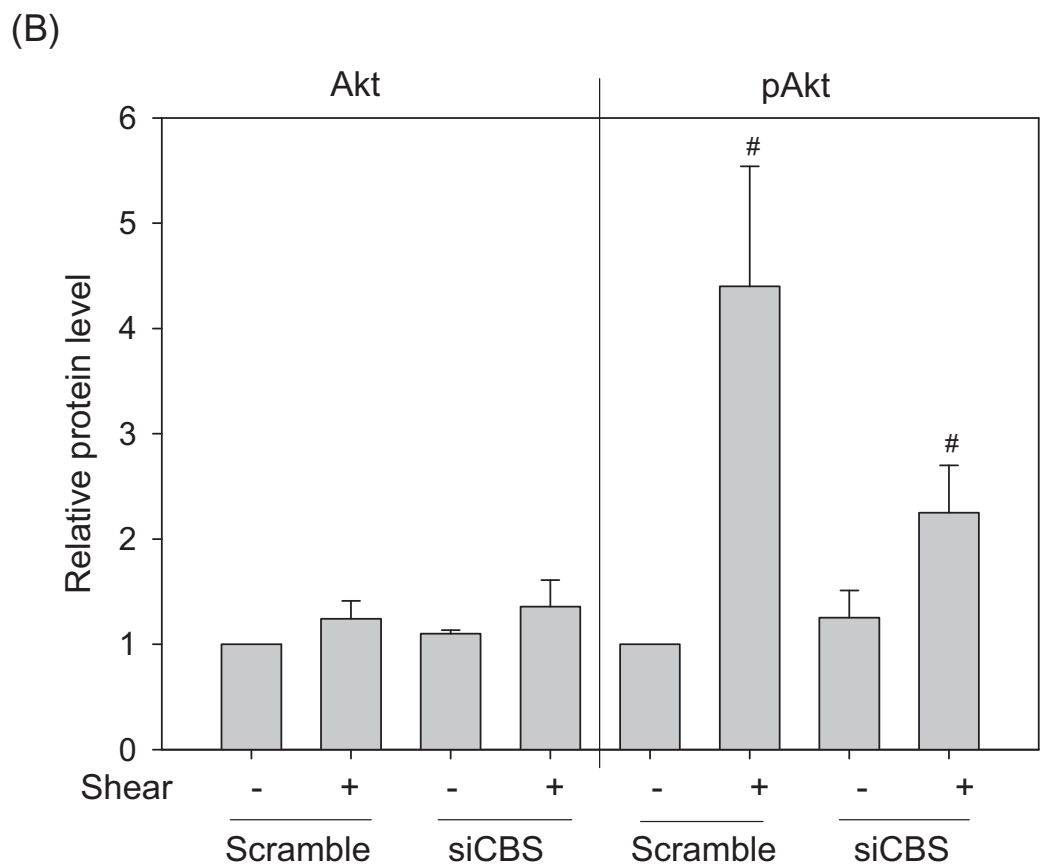
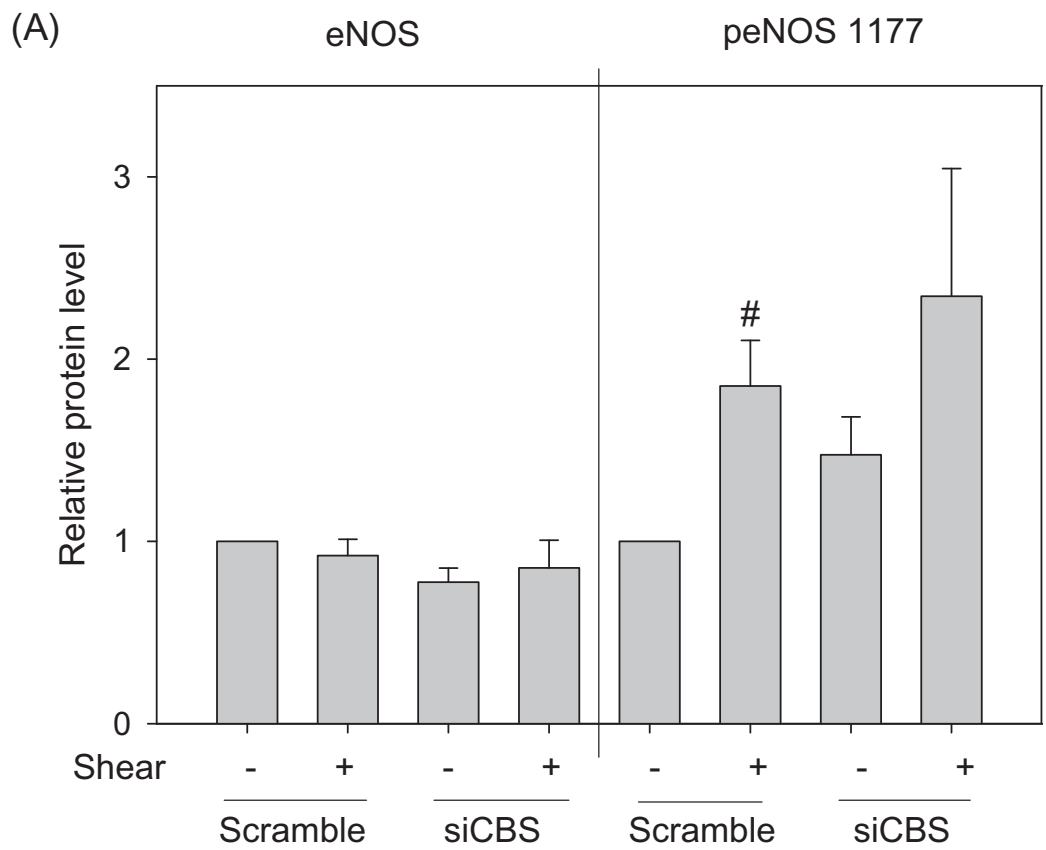


Fig. 3.9 Effect of CBS siRNA on cell signaling after shear stress stimulation (western blot). HUVECs were transfected with CBS siRNA as indicated in material and method for 72 hours before the cells were subjected to shear stress stimulation (30 minutes, 12 dyne/cm²). Western blot were employed to determine the relative level of (A) CBS after transfection and (B) signaling proteins.



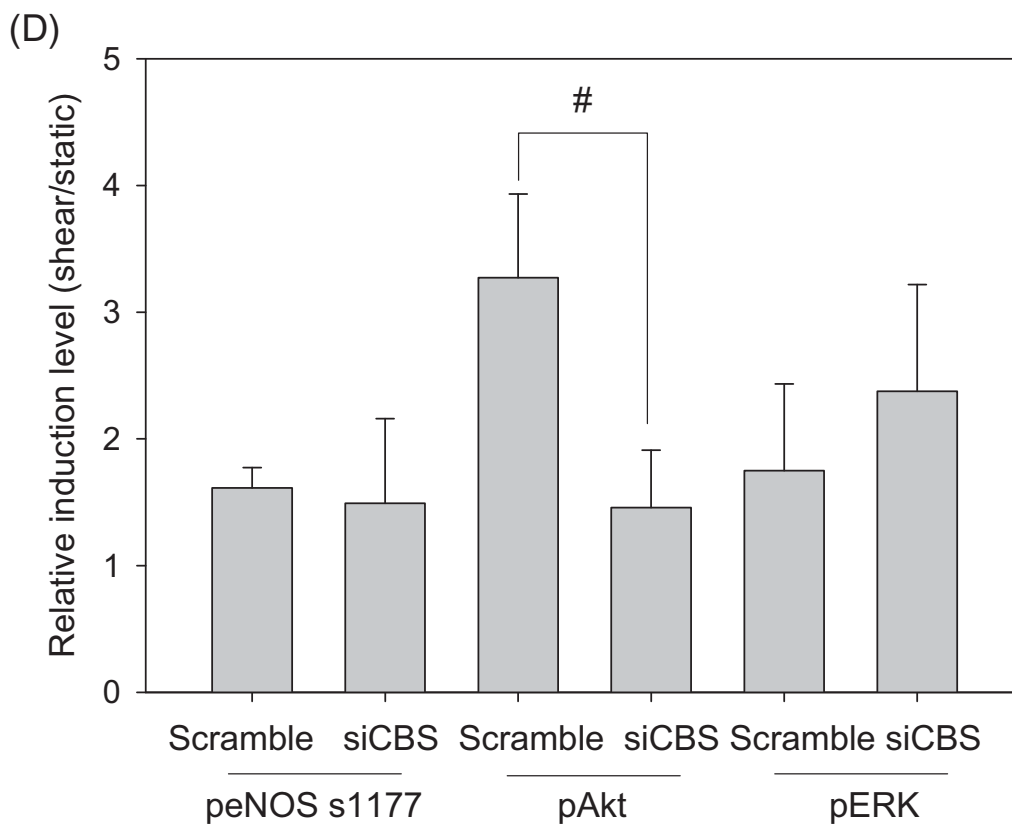
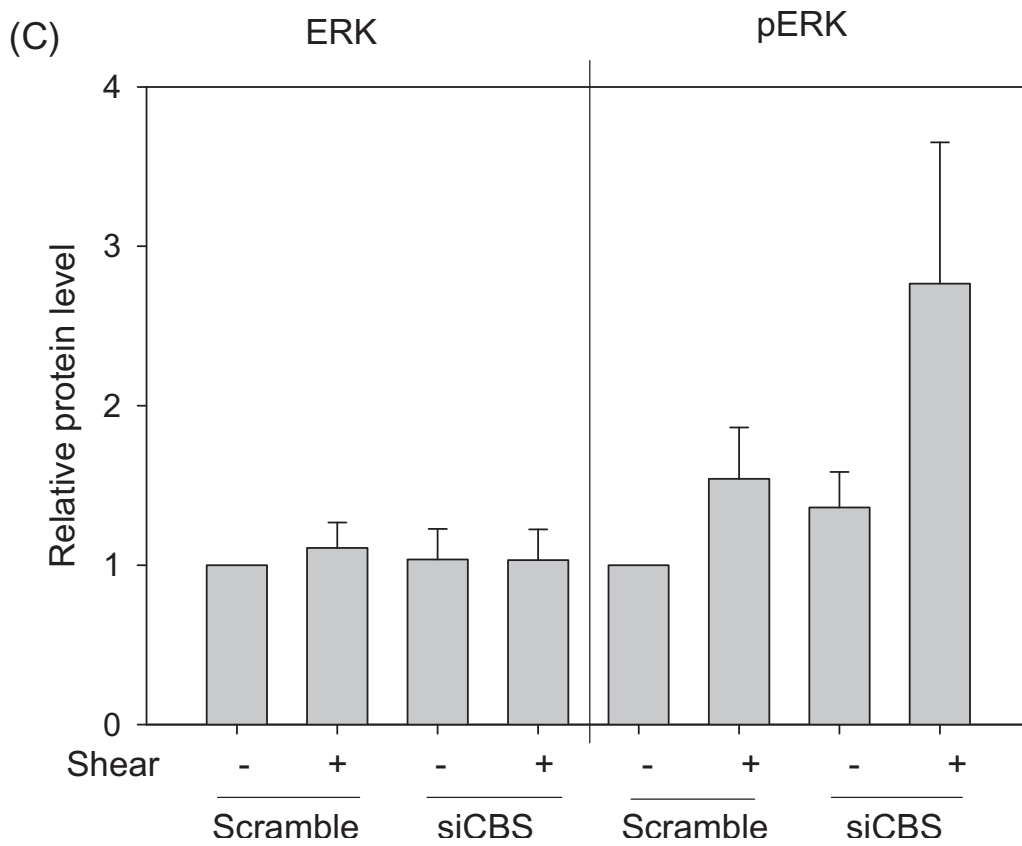


Fig. 3.10 Effect of CBS siRNA on cell signaling after shear stress stimulation (statistic figure). HUVECs were transfected with CBS siRNA as indicated in

material and method for 72 hours before the cells were subjected to shear stress stimulation (30 minutes, 12 dyne/cm²). Western blot signals of (A) eNOS and peNOS s1177, (B)Akt and pAkt, (C) ERK and pERK were quantified and plotted in bar graph. (D) Induction levels were obtained by dividing phospho state under shear stress condition over phospho state at static. (n≥3, mean±S.E., # P value < 0.05 v.s. Scramble or Static).



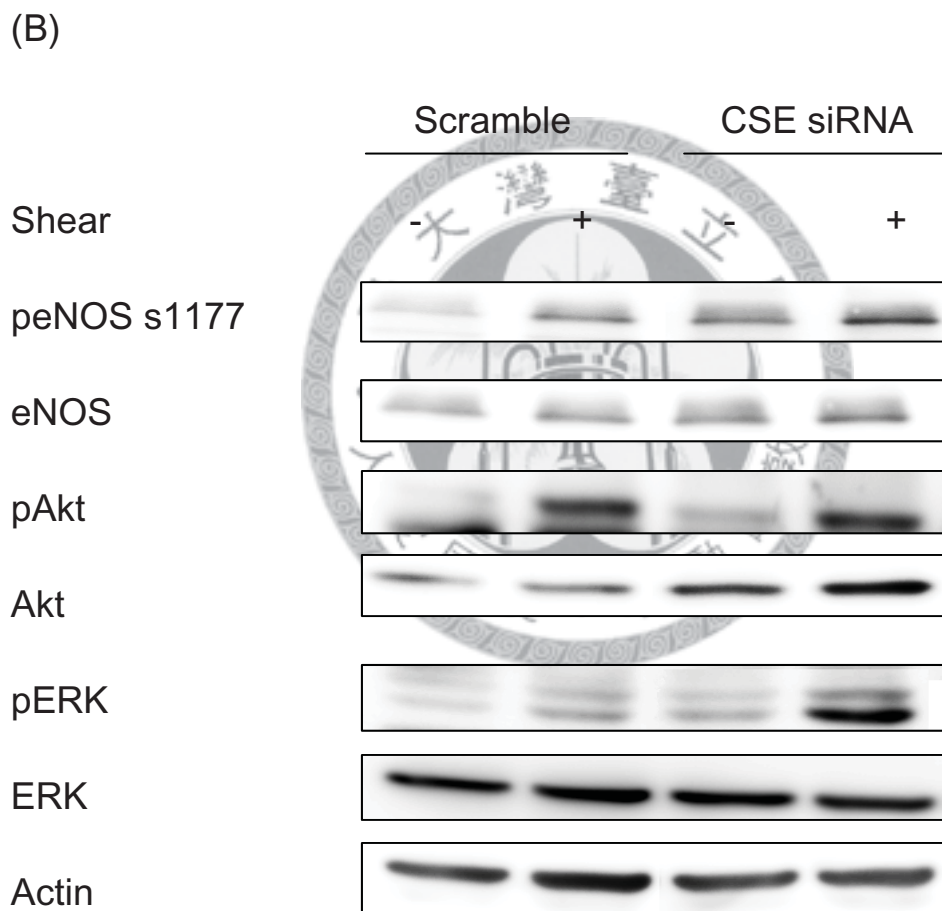
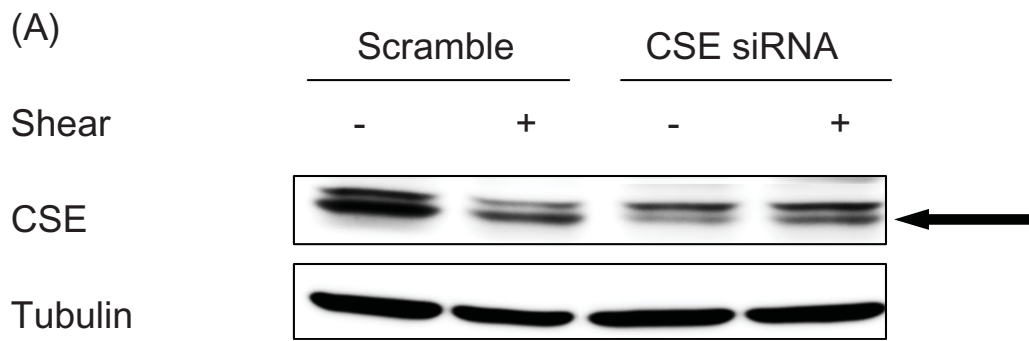
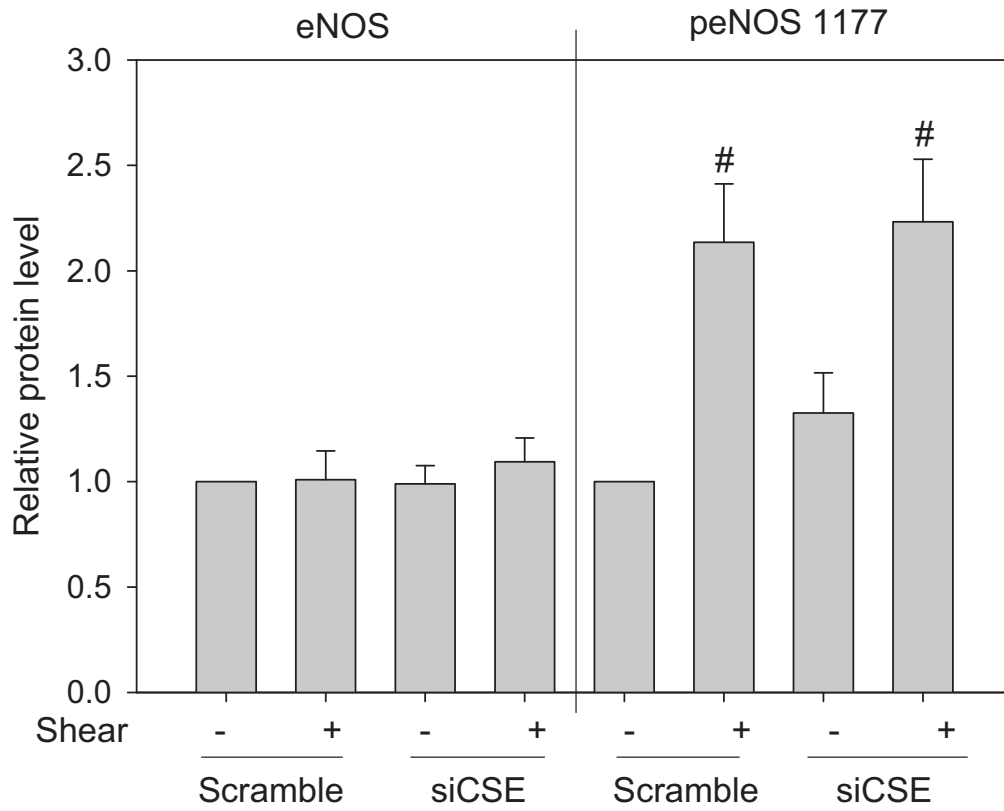
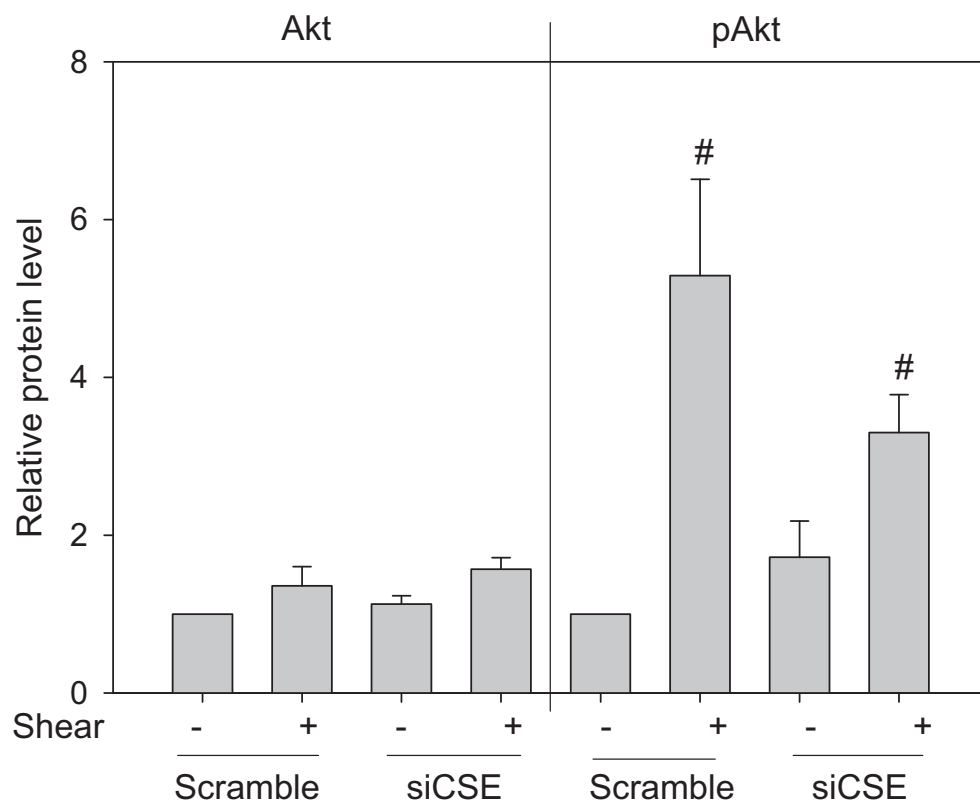


Fig. 3.11 Effect of CSE siRNA on cell signaling after shear stress stimulation (western blot). HUVECs were transfected with CSE siRNA as indicated in material and method for 72 hours before the cells were subjected to shear stress stimulation (30 minutes, 12 dyne/cm²). Western blot were employed to determine the relative level of (A) CSE (indicated by arrow) after transfection and (B) signaling proteins.

(A)



(B)



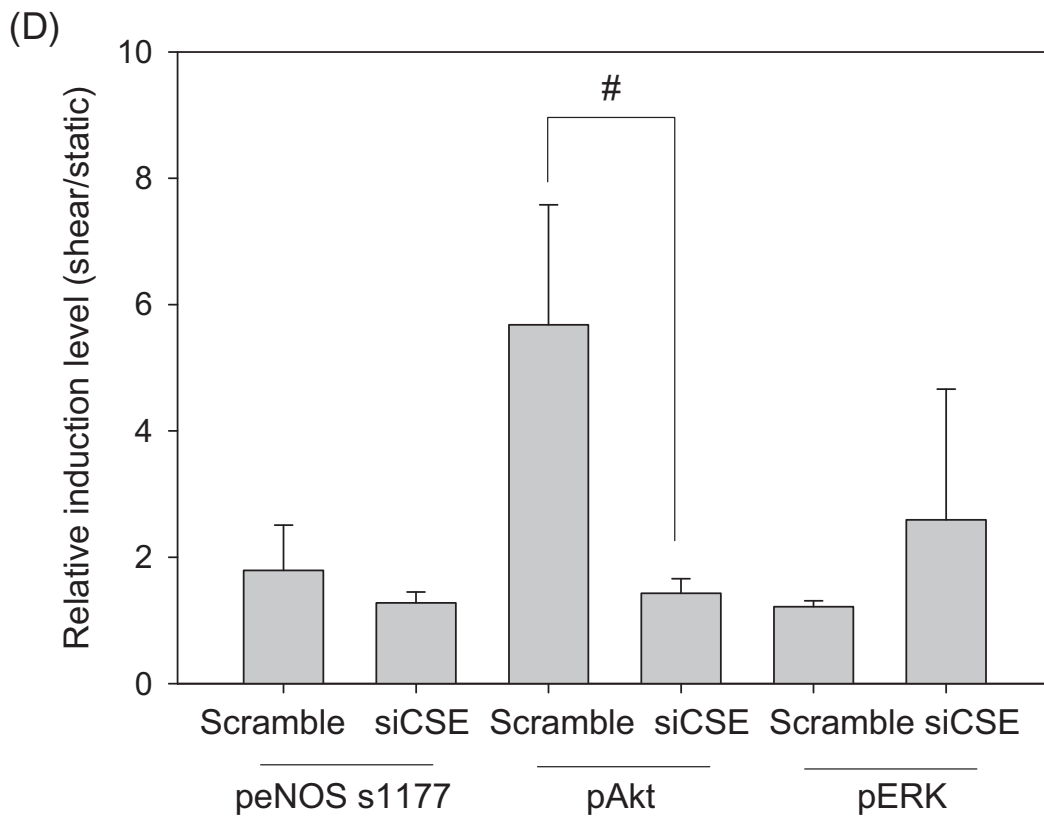
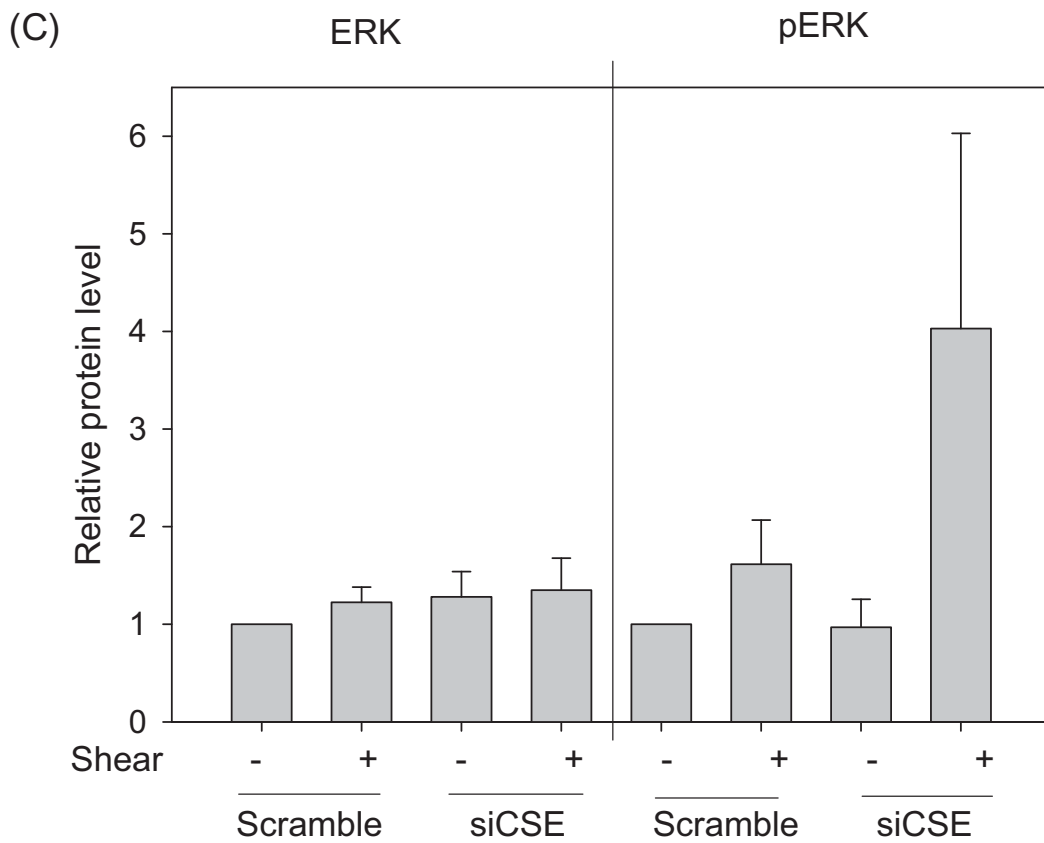


Fig. 3.12 Effect of CSE siRNA on cell signaling after shear stress stimulation (statistic figure). HUVECs were transfected with CSE siRNA as indicated in

material and method for 72 hours before the cells were subjected to shear stress stimulation (30 minutes, 12 dyne/cm²). Western blot signals of (A) eNOS and peNOS s1177, (B)Akt and pAkt, (C) ERK and pERK were quantified and plotted in bar graph. (D) Induction levels were obtained by dividing phospho state under shear stress condition over phospho state at static. (n≥3, mean±S.E., # P value < 0.05 v.s. Scramble or Static).



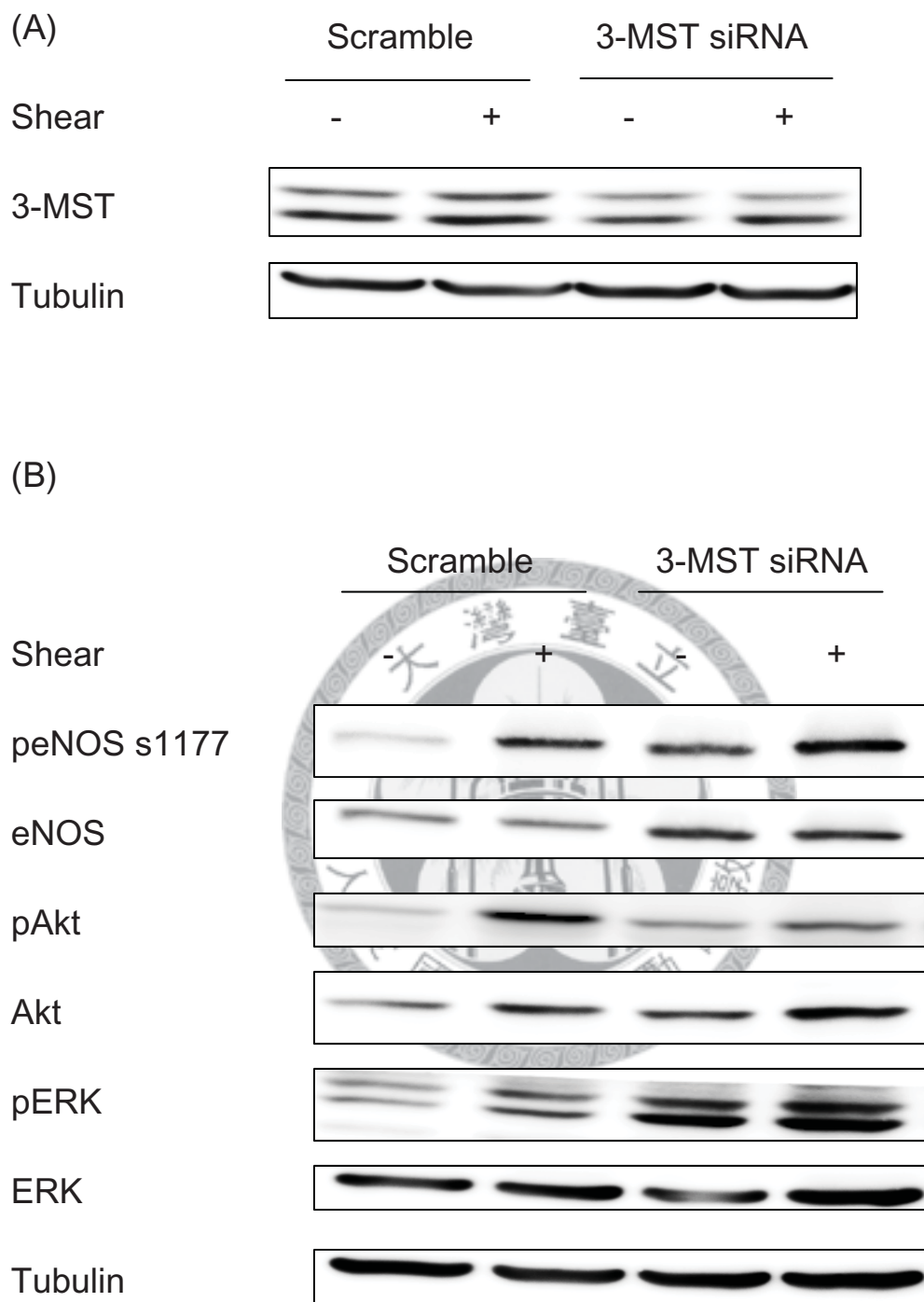
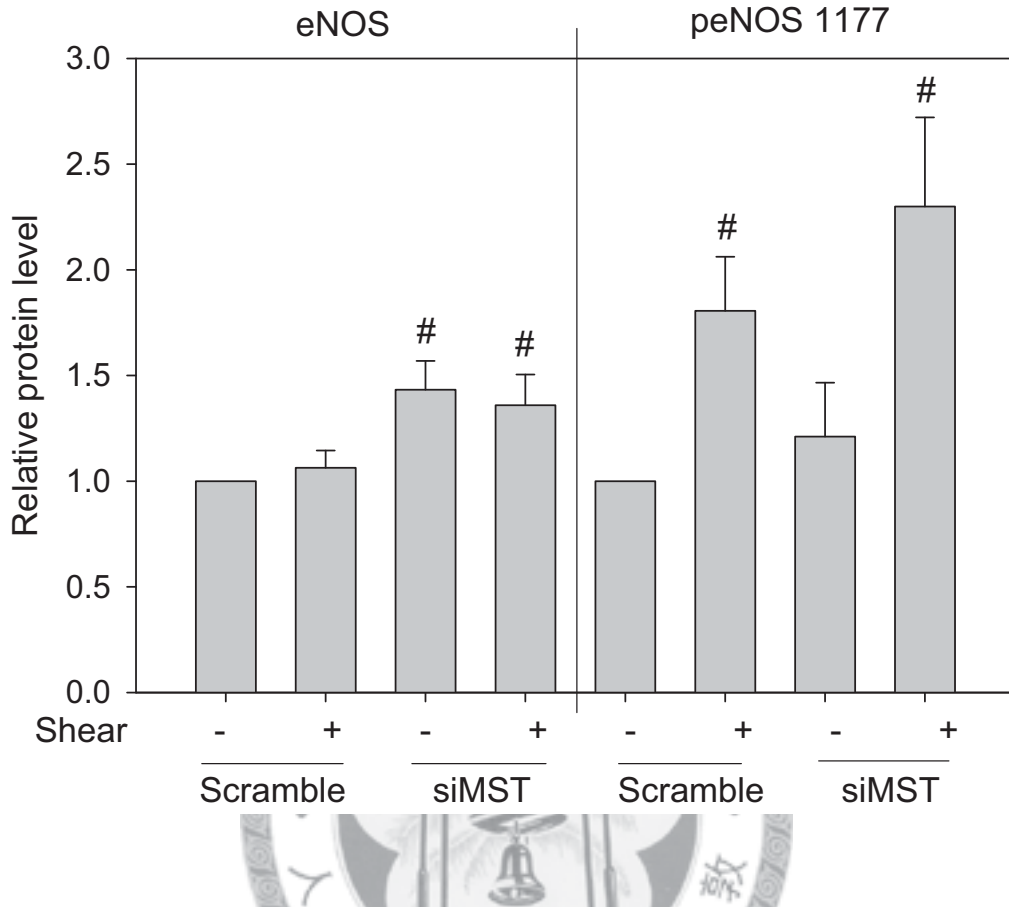
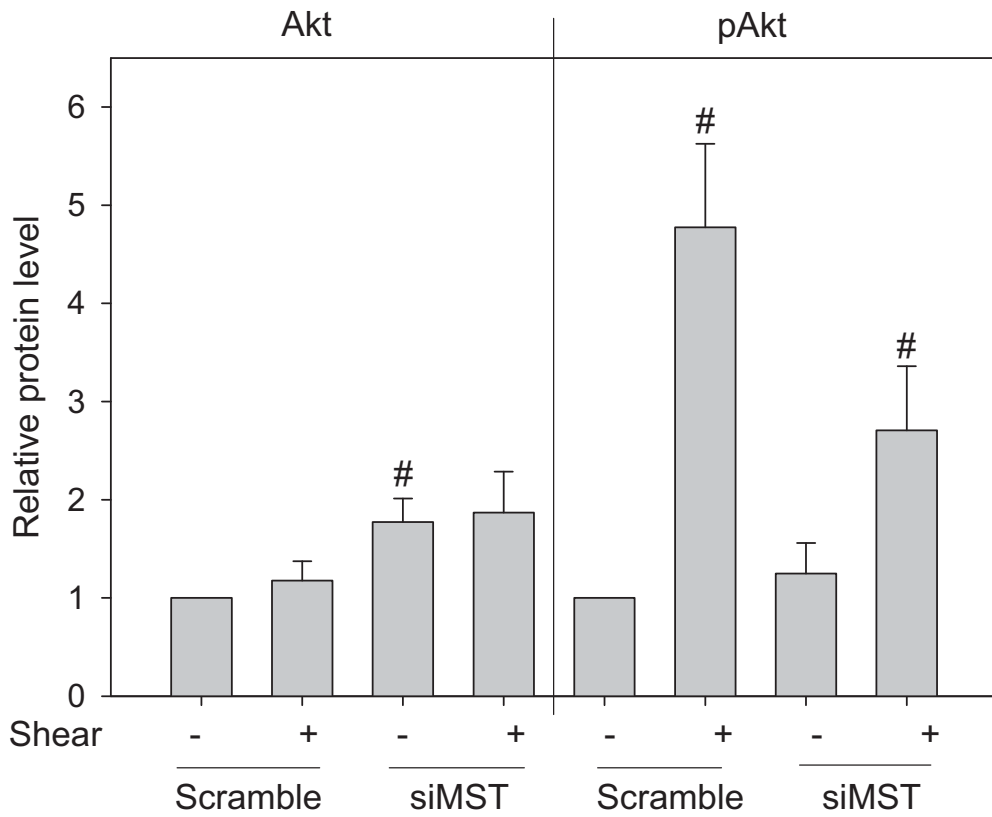


Fig. 3.13 Effect of 3-MST siRNA on cell signaling after shear stress stimulation (western blot). HUVECs were transfected with 3-MST siRNA as indicated in material and method for 72 hours before the cells were subjected to shear stress stimulation (30 minutes, 12 dyne/cm²). Western blot were employed to determine the relative level of (A) 3-MST after transfection and (B) signaling proteins.

(A)



(B)



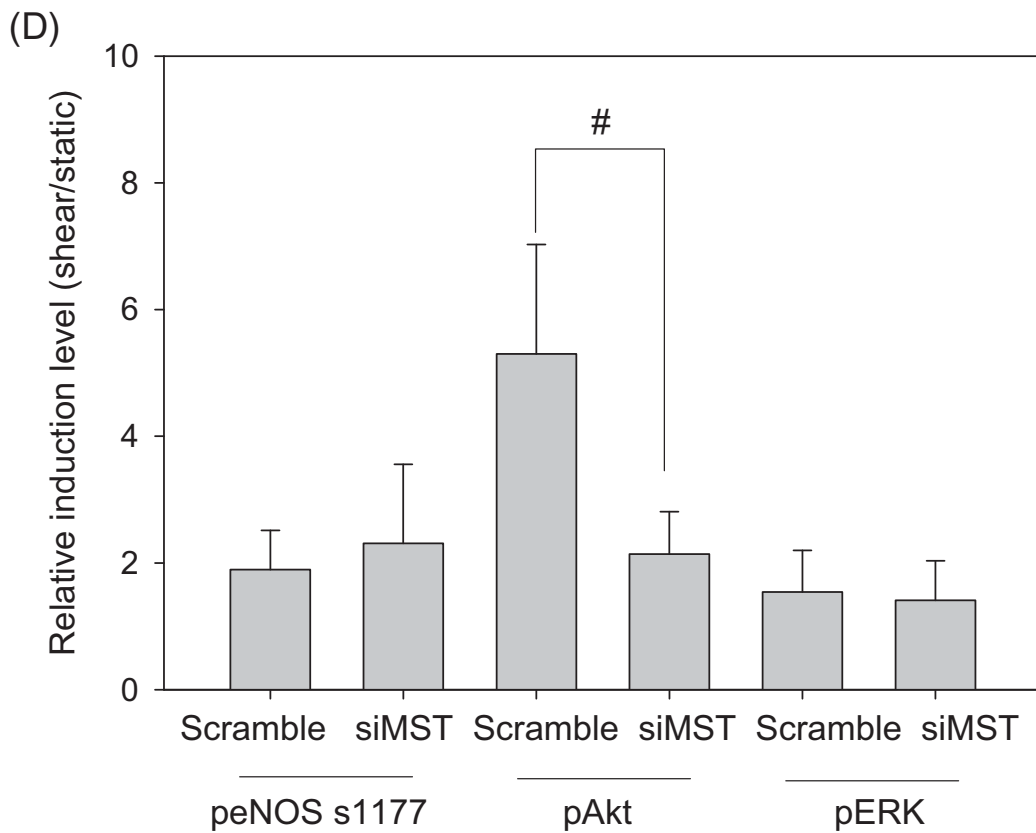
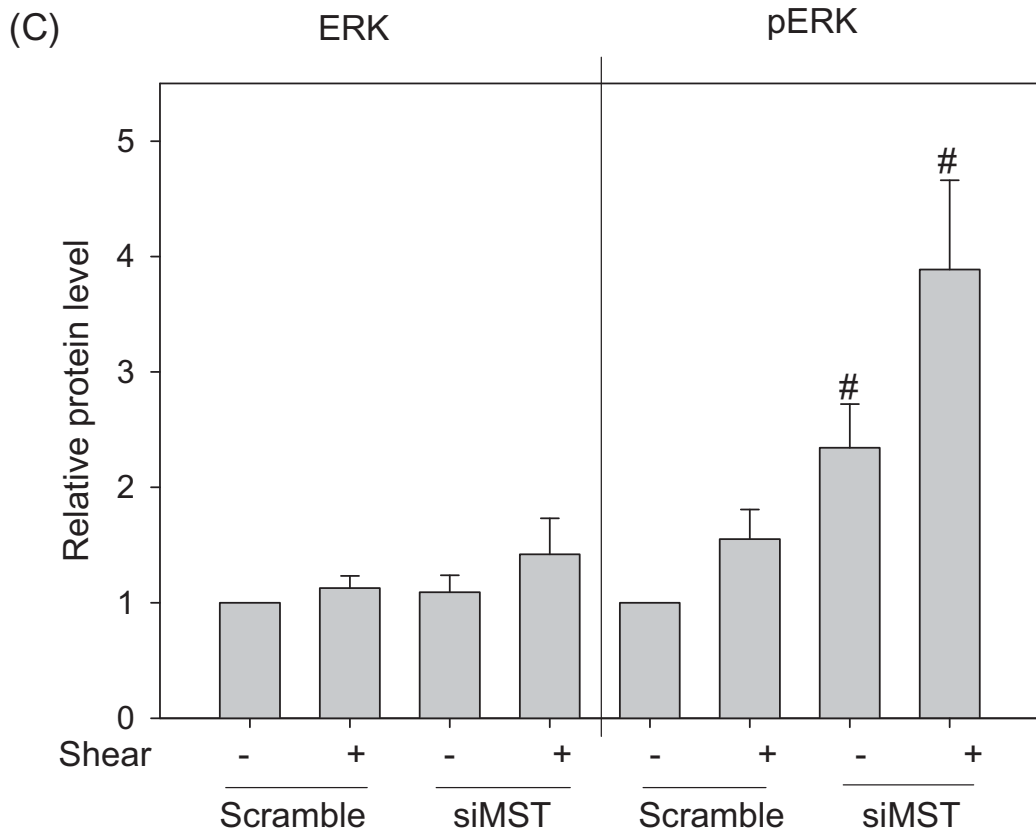


Fig. 3.14 Effect of 3-MST siRNA on cell signaling after shear stress stimulation (statistic figure). HUVECs were transfected with 3-MST siRNA as

indicated in material and method for 72 hours before the cells were subjected to shear stress stimulation (30 minutes, 12 dyne/cm²). Western blot signals of (A) eNOS and peNOS s1177, (B)Akt and pAkt, (C) ERK and pERK were quantified and plotted in bar graph. (D) Induction levels were obtained by dividing phospho state under shear stress condition over phospho state at static. (n≥3, mean±S.E., # P value < 0.05 v.s. Scramble/Static).



3.6. 綜合討論

如同文獻回顧所提，硫化氫對心血管系統產生相當多的保護作用，然而，卻鮮少有文獻提及剪力在硫化氫所產生的心血管保護作用中的角色，在生理環境之下，動物體內的血管皆持續的受到剪力作用，若要清楚了解硫化氫在生理上產生保護作用的詳細機制，則不能不探討剪力在其中扮演的角色。因此，本論文主要探討三個問題，第一個問題是剪力作用對硫化氫生成速率的影響，第二個問題是剪力如何調控硫化氫生成速率，第三為硫化氫對剪力作用所誘導的訊息傳導有何種影響。

硫化氫是近年來被發現新的細胞內氣體傳導分子(gasotransmitter)之一，並且擁有和 NO 類似的生理特性，兩者皆會使血管產生放鬆作用，且都會產生心血管保護作用(Wang, 2009)。因此，本論文推測很可能剪力對硫化氫也有類似的調控，也就是在剪力作用之下硫化氫的生成量很可能跟 NO 一樣上升。根據 3.1 節的結果顯示，剪力作用 30 分鐘後的硫化氫生成速率的確高於靜態下的生成速率，確認此一推測初步上是對的。然而，動物的血管無時無刻受到血流作用，30 分鐘在生理意義上屬於相當短的時間，若能測得剪力作用 2 小時、4 小時甚至 24 小時等長時間之後硫化氫生成速率的變化，可以提供更多寶貴的資訊，進而了解剪力誘導硫化氫生成速率上升是暫態(transient)或者持續(sustained)的現象。值得一提的是，目前對硫化氫方面研究的瓶頸，部分來自測定方法的準確度(Li et al., 2008)，大多數研究測定硫化氫的方法是先利用醋酸鋅將硫化氫沉澱，再以化學變色方法測定吸光值並定量(Stipanuk et al., 1982; Siegel, 1965)，然而，此一方法會產生許多誤差，例如醋酸鋅所沉澱的實際上是硫化物(sulfide)，並非專一的針對硫化氫；再者，硫化氫是高反應的物質，在細胞內可能與超氧自由基(superoxide radical)或過氧化氫(hydrogen peroxide)等物質反應(Mitsuhashi et al., 2005; Geng et al.,

2004)，甚至本身自行氧化，因此然難以捕捉特定時間下硫化氫精確的量。

3.1 節的實驗結果由於是相對生成速率的比較，因此較不受測定方法本身的誤差造成誤判，然而，硫化氫在細胞內相當微量，在一般動物體內約只有 10-100 μM (Olson, 2009；Hyspler et al., 2002；Hongfang et al., 2006)，在測定方面需要大量細胞，因此在作剪力實驗時需要重複多次，增加實驗困難度與實驗所需的時間。

在 3.1 節中得知剪力作用 30 分鐘會誘導硫化氫生成速率增高後，接下來的 3.2 以及 3.3 節皆是探討可能的調控機制。由 3.2 節的結果可以看出，剪力對 CBS 以及 CSE 的 mRNA 並沒有明顯的影響，而 3-MST 的 mRNA 則因為當時並未發現其在內皮細胞中有表現，因而未測其 mRNA 的變化，留待後人完成；在蛋白質表現量方面，CBS 以及 CSE 在剪力下也皆未顯示任何變化，只有 3-MST 表現量上升約一成，然而，硫化氫生成速率在 30 分鐘剪力作用後上升約 5 倍，明顯難以以一成的蛋白質量上升造成如此劇烈的改變，因此，很可能有其它作用機制在調控剪力後的硫化氫生成。綜合 3.1 節結果，可以發現剪力作用 30 分鐘下，應該不是透過增加硫化氫生成酵素的量，較可能是透過增加硫化氫生成酵素活性的方式，因此在 3.3 節中探討此一可能。

由於 CBS 以及 CSE 皆被報導會被攜鈣素(calmodulin)調控其活性(Kimura, 2002；Yang et al., 2008)，在攜鈣素與其結合以後活性增高，而剪力又會誘發細胞內鈣離子濃度增高(Yamamoto et al., 2000；Yamamoto et al., 2003；Mo et al., 1991；Ando et al., 1988；Shen et al., 1992)，因此剪力可能是透過此一機制來增加 CBS 或 CSE 的活性。由於剪力對於細胞內鈣離子濃度增加的反應時間以及濃度尚未有定論，在 3.3 節中先利用鈣離子離子載體(calcium ionophore)A23187 作初步的討論，避開爭議。3.3 節的結果顯示

A23187 並沒有造成 CBS 與 CSE 與攜鈣素結合，然而，Wang (2009)卻指出在 A23187 的作用下內皮細胞的硫化氫生成量明顯上升，且 CBS (Eto et al., 2002)與 CSE (Yang et al., 2008)在含有 1-2 mM Ca^{2+} 與攜鈣素的實驗環境中皆被觀察到與攜鈣素有結合，與本論文 3.3 節所得的實驗結果矛盾。細究其原因，可能是因為實驗中收集細胞蛋白質的步驟中，需要打破細胞，此時細胞內的所有物質包含鈣離子在內，皆會被胞外大量的緩衝液所稀釋，因此，原本受到 A23187 影響而升高的鈣離子濃度此時又被降低，可能造成原本與攜鈣素結合的 CBS 以及 CSE 脫附，在文獻中也有提到類似的情形，以細胞萃取物的 CBS 與攜鈣素反應測定其是否結合時，若無外加 1 mM Ca^{2+} 則無法觀察到攜鈣素與 CBS 結合，反之則可以觀察到兩者結合(Eto et al., 2002)，為此一推論提供佐證。若此推論為真，則 CBS 或 CSE 在剪力作用後與攜鈣素的結合就不能用一般免疫沉澱的方法來驗證，因為在收取蛋白質時打破細胞是必要步驟，須要另覓其他方式來驗證攜鈣素調控的理論，例如使用 FRET (fluorescence resonance energy transfer)的技術觀察剪力作用後攜鈣素是否與 CSE 或者 CBS 有結合的現象。

根據 3.2 節以及 3.3 節中的實驗結果，可以發現剪力作用後升高硫化氫的作用比較可能是硫化氫生成酶活性的增高，然而，受限於目前對硫化氫生成酶調控機制的知識以及實驗設計，尚未能得出完整的結論。

在 3.4 以及 3.5 節中，主要討論硫化氫對剪力誘導的訊息傳導的影響。從文獻回顧可以得知，硫化氫會透過活化 eNOS、Akt 以及 ERK 達到心血管保護效果，已知剪力作用下，此三種蛋白質亦會被活化且此現象與剪力產生的心血管保護作用息息相關(Dimmeler et al., 1998; Dimmeler et al., 1999; Bao et al., 2001)，因此，選定 eNOS、Akt 以及 ERK 作為討論的重點。在 3.4 節的結果中，可以發現無論在 BAECs 或者 HUVECs 的系統中，60 μM 的硫氫

化鈉作用 30 分鐘皆會造成 peNOS s1177 下降, pAkt 以及 pERK 上升的情形; 而依照 Fig. 3.6 來看, pAkt 以及 pERK 的上升可能是屬於暫態(transient)的情形, 在 120 分鐘之後就漸漸降低, peNOS s1177 則無法觀察到有規律的趨勢。在不同濃度的硫化鈉作用下(Fig. 3.7), pAkt 在 60 μ M 以及 100 μ M 下呈現持續(sustained)至少 60 分鐘的上升, 而 20 μ M 不具明顯效果; pERK 方面, 20 μ M 亦不具明顯效果, 60 μ M 維持上升的水平, 100 μ M 則在 60 分鐘開始降回對照組的水準; peNOS s1177 方面, 不同濃度在 30 分鐘皆造成下降, 而 60 分鐘時 20 μ M 呈現上升, 60 μ M 升回對照組水平, 而 100 μ M 則仍呈現下降的情形。綜合以上觀察, 可以發現硫化氫在 BAECs 或者 HUVECs 中所造成的反應可能是類似的, 因此於兩個系統中所得的數據有其比較的依據。Fig. 3.6 所觀察到 pAkt 以及 pERK 暫態上升的情形與文獻觀察類似 (Papapetropoulos et al., 2009), 然而, 因為生理上硫化氫的濃度尚未有精確的測量結果, 以上觀察只能描述不同濃度或者作用時間之下細胞的反應, 其生理上的意義尚未明朗。

在 3.5 節中, 使用硫化氫清除劑(scavenger)或者硫化氫生成酵素的 siRNA, 以抑制硫化氫生成的方式觀察硫化氫可能在剪力作用的訊息傳導中扮演的角色。3.5.1 所得的結論與 3.4 節類似, 即硫化氫可以促進 pAkt 以及 pERK 的上升, 且 3.5.1 節得到更進一步的資訊, 及剪力可能透過加硫化氫來增加 pAkt 以及 pERK。然而 3.5.1 節的實驗僅供參考, 原因在於硫化氫清除劑本身就造成了細胞訊息傳導上的反應, 因此, 在多了此一不確定變因之後, 所得的結果有其可議之處。

由於 3.5.1 節中硫化氫清除劑所產生的問題, 在 3.5.2 節中使用專一性高的 siRNA 來抑制硫化氫生成酶的表現, 以其觀察細胞硫化氫生成量降低後在剪力下的反應。在此部分實驗中針對 CSE、CBS 以及 3-MST 皆有作 siRNA

的實驗，即使文獻指出 CSE 可能是心血管系統中主要的硫化氫生成酵素 (Wang, 2002)，仍不能排除 CBS 可能的貢獻，理由在於 3.2 節中的結果顯示，內皮細胞的 CBS 無論 mRNA 或者蛋白質皆在可以測得的水準內，而 3-MST 更有文獻指出可能是除了 CSE 以外內皮細胞主要的硫化氫來源 (Shibuya et al., 2009a)。在決定 CSE、CBS 以及 3-MST 三者對於硫化氫生成的貢獻方面，若能以 siRNA 抑制後直接測定其硫化氫生成速率的下降，或許是最快最直接的方式，但需使用大量細胞，其實驗難度較高。

3.5.2 節中主要的發現在於三種 siRNA 皆會抑制剪力所誘導的 Akt 磷酸化程度上升，進一步印證了 3.4 節中所觀察到硫化氫會增加 pAkt 的結果。Akt 在細胞中扮演著重要的角色，調控了許多細胞存活 (survival) 方面的傳導機制，因此，根據此一觀察，可以推論剪力對細胞所產生的保護作用，部分來自於剪力作用後誘導硫化氫生成，而後硫化氫誘導 Akt 磷酸化所致。

另一方面，ERK 與 eNOS 在剪力後誘導磷酸化程度上升的情形並未受到 siRNA 的影響。值得一提的是，3-MST siRNA 本身會造成 pERK 上升，與 3.4 節所觀察到外加硫化氫的效果相反；此外，eNOS 蛋白質的量亦受到 3-MST siRNA 的影響而上升，此部分結果與文獻一致，文獻指出外加硫化氫會造成 eNOS mRNA 以及蛋白質表現量下降 (Kubo et al., 2007; Geng et al., 2007)。細論其原因，有可能是細胞為了補償 3-MST 下降所作的反應，若硫化氫的產生對細胞有保護作用，其生成酵素下降將對細胞產生不利的影響，因此透過增高 pERK 以及 eNOS 來產生額外的保護作用，而外加硫化氫所造成的 eNOS 下降，則可能是細胞控制氣體傳導分子 (gasotransmitter) 的負向回饋 (negative feedback) 所致。

在 30 分鐘剪力作用之下，siRNA 對 pERK 以及 peNOS s1177 誘導上升

的程度皆無明顯的影響。觀察 pERK 在剪力刺激後的變化(蔡宇致, 2002), 可以發現 pERK 受剪力誘導的情形隨時間點變化, 在 30 分鐘時達到高峰, 之後漸漸下降。因此, 不同時間點所觀察到剪力誘導 pERK 上升的情形可能不同, 甚至可能與靜態下 pERK 的水準無異, 本論文中雖沒有觀察到剪力作用後 siRNA 對 pERK 以及 peNOS s1177 誘導上升程度的影響, 但對此一現象的了解僅止於 30 分鐘一個時間點, 若能得到不同時間點下的數據, 或許有助於釐清抑制硫化氫生成在剪力作用下完整的影響。



第4章 結論

4.1. 結論

本論文主要討論兩個問題：(1)剪力作用下內皮細胞硫化氫生成速率是否改變，(2)若剪力作用下內皮細胞硫化氫生成量上升，其對剪力造成的訊息傳導有何影響。

在 3.1 節的實驗中，我們發現剪力在作用 30 分鐘之後的確會造成硫化氫生成速率上升約 5 倍。3.2 以及 3.3 節對可能的調控機制作探討，發現剪力並不會影響 CBS 以及 CSE 的 mRNA 量，亦不會顯著改變 CBS、CSE 或者 3-MST 的量，因此有可能剪力是以增加硫化氫生成酵素活性的方式增加硫化氫的生成。然而，驗證 CBS 或 CSE 與攜鈣素結合的免疫沉澱實驗並不成功，回顧文獻，可能是因為收取細胞的實驗過程中鈣離子濃度下降導致無法觀察到結合的現象。因此關於調控機制的部分尚無結論，需更多實驗數據釐清。

在 3.4 節外加硫化氫的實驗中，可以觀察到在 60 μM 的硫化氫作用下，BAECs 以及 HUVECs 所表現出的反應類似，提供兩種模型比較的基础；此外，60 μM 以及 100 μM 的硫化氫皆使細胞 pAkt 以及 pERK 在作用 30 分鐘時上升，其他部分尚無定論。

以 siRNA 抑制 CBS、CSE 以及 3-MST 表現並外加剪力刺激的實驗方面，則觀察到了三種 siRNA 皆有效抑制 pAkt 於剪力作用下誘導增高的程度，其中以 CSE siRNA 最為明顯，抑制了約 70% 的剪力誘導增高，CBS 以及 3-MST

siRNA 則各抑制約 50%及 60%。此結果顯示剪力對內皮細胞所產生的保護作用，可能部分來自於剪力增加硫化氫濃度，而後誘導 pAkt 上升，進而啟動相關的訊息傳導，產生心腎保護作用。Fig. 4.1 為本論文主要結論示意圖。

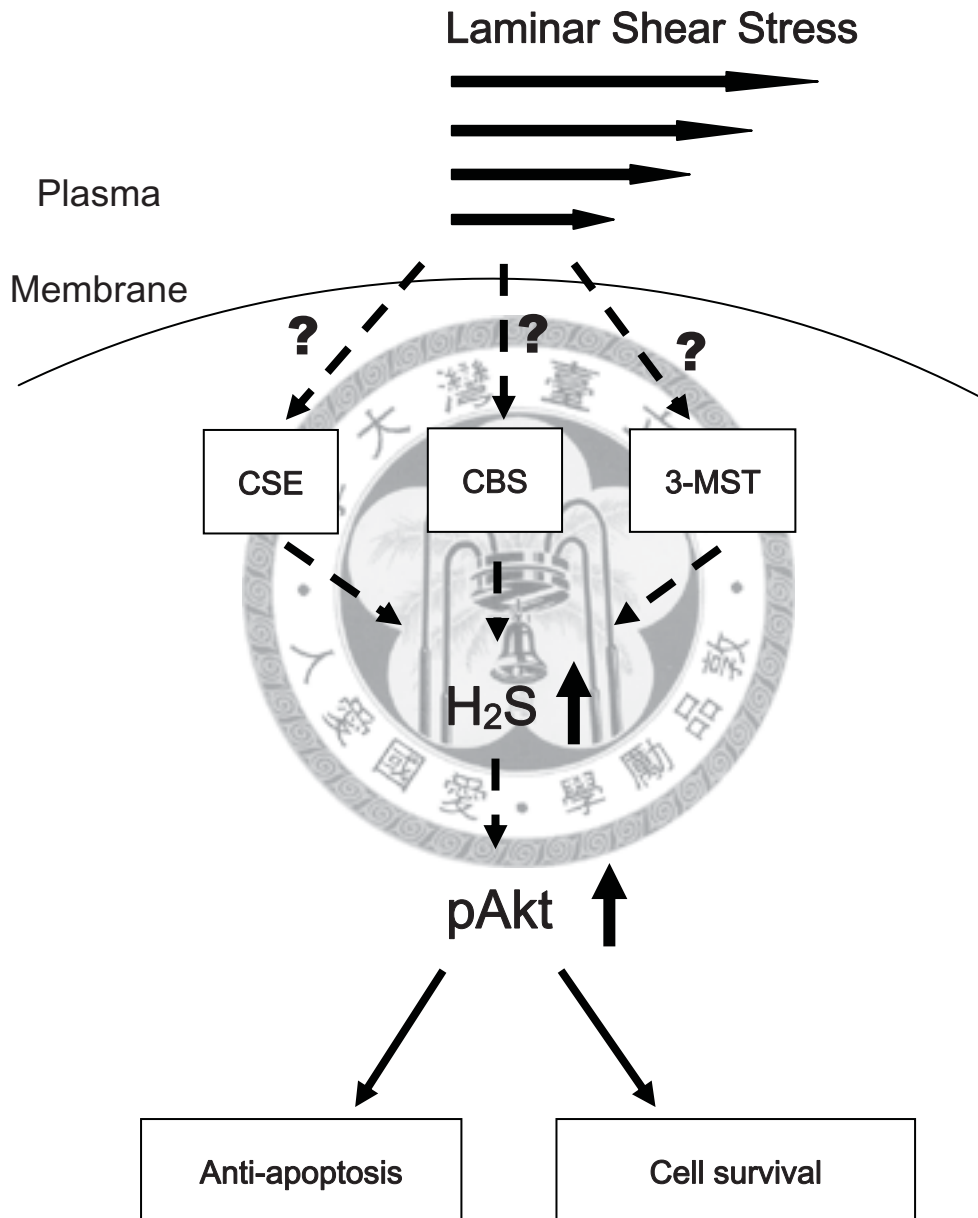


Fig. 4.1 Laminar shear stress enhances H₂S production in endothelial cells and results in Akt phosphorylation in a H₂S-dependent way. In endothelial cells, laminar shear stress enhances H₂S production possibly by promoting activities of H₂S producing enzymes. As a result, the level of Akt phosphorylation is increased and this event renders various cardioprotective effects such as anti-apoptosis and pro-cell survival.

4.2. 未來研究方向

本論文對剪力作用之下硫化氫對內皮細胞的影響作了初步的探討，雖然發現許多有趣的現象，但卻有更多尚待釐清的問題，值得未來更深入的研究：

1. 由本論文實驗結果可知，CSE、CBS 與 3-MST 的 siRNA 皆會抑制剪力誘導的 pAkt 上升，對 peNOS s1177 或者 pERK 卻沒有明顯的作用。然而，本論文只探討了剪力作用 30 分鐘所產生的影響，生理上血管內皮細胞是處於長期剪力作用的狀態，若能得知長時間剪力作用下 siRNA 的效應，或許能幫助釐清硫化氫在生理上的功能。
2. 在本論文的實驗當中，可以發現 CBS、CSE 與 3-MST 的 siRNA 對內皮細胞皆有影響，表示三者皆在內皮細胞硫化氫生成上面有所貢獻。然而，目前對於不同細胞中硫化氫的來源尚無清楚的定論，若能以 siRNA 抑制蛋白質表現的方式，觀察 CBS、CSE 與 3-MST 被抑制後何者對內皮細胞硫化氫生成影響最大，則可推論內皮細胞主要的硫化氫生成酵素為何者。
3. 由文獻可知，CBS 與 CSE 在剪力下的活性很可能受到鈣離子與攜鈣素的調控(Kimura, 2002；Yang et al., 2008)，然而在本論文 3.3 節的實驗中，卻無法證明此一假設，推論其原因可能為免疫沉澱的實驗步驟中，打破細胞的步驟造成鈣離子濃度下降所致。因此，若改用 FRET (fluorescence resonance energy transfer) 的技術，直接觀察剪力作用後細胞內攜鈣素與 CBS 或 CSE 結合的情形，避免打破細胞此一步驟對前述結合造成影響，

或許可以證明 CBS 與 CSE 在剪力下受到鈣離子與攜鈣素調控的假設。

4. 文獻指出硫化氫具有幫助細胞對抗氧化逆境(oxidative stress)的作用，不僅本身會清除 ROS，更會刺激細胞產生抗氧化的機制(Geng et al., 2004；Kimura et al., 2004)。而 ROS 對於本實驗所觀察的訊息傳導蛋白質 pERK、peNOS、pAkt 皆有可能造成影響，因此，若能以實驗觀察 ROS 與硫化氫的交互作用，甚至是 ROS 對硫化氫所誘導的訊息傳導的影響，對了解硫化氫在生理上扮演的角色或許會有幫助。



參考文獻

- Abe K, Kimura H (1996) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci* 16: 1066-1071.
- Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, et al. (1997) Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J Clin Invest* 100: 1813-1821.
- Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, et al. (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15: 6541-6551.
- Alessi DR, Deak M, Casamayor A, Caudwell FB, Morrice N, et al. (1997) 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. *Curr Biol* 7: 776-789.
- Ali MY, Ping CY, Mok YY, Ling L, Whiteman M, et al. (2006) Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? *Br J Pharmacol* 149: 625-634.
- Ando J, Komatsuda T, Kamiya A (1988) Cytoplasmic calcium response to fluid shear stress in cultured vascular endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 24: 871-877.
- Aon MA, Cortassa S, Akar FG, O'Rourke B (2006) Mitochondrial criticality: a new concept at the turning point of life or death. *Biochim Biophys Acta* 1762: 232-240.
- Banerjee SK, Maulik SK (2002) Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. *Nutr J* 1: 4.
- Bao X, Lu C, Frangos JA (2001) Mechanism of temporal gradients in shear-induced ERK1/2 activation and proliferation in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H22-29.
- Bearden SE, Beard RS, Jr., Pfau JC (2010) Extracellular transsulfuration generates hydrogen sulfide from homocysteine and protects endothelium from redox stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299: H1568-1576.
- Beauchamp RO, Jr., Bus JS, Popp JA, Boreiko CJ, Andjelkovich DA (1984) A

- critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Crit Rev Toxicol* 13: 25-97.
- Behrendt D, Ganz P (2002) Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol* 90: 40L-48L.
- Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN (1991) A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254: 274-277.
- Benavides GA, Squadrito GL, Mills RW, Patel HD, Isbell TS, et al. (2007) Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17977-17982.
- Benson SD, Bamford JK, Bamford DH, Burnett RM (1999) Viral evolution revealed by bacteriophage PRD1 and human adenovirus coat protein structures. *Cell* 98: 825-833.
- Berliner JA, Heinecke JW (1996) The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 20: 707-727.
- Bian JS, Yong QC, Pan TT, Feng ZN, Ali MY, et al. (2006) Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 316: 670-678.
- Billaut-Laden I, Rat E, Allorge D, Crunelle-Thibaut A, Cauffiez C, et al. (2006) Evidence for a functional genetic polymorphism of the human mercaptopyruvate sulfurtransferase (MPST), a cyanide detoxification enzyme. *Toxicol Lett* 165: 101-111.
- Bliksoen M, Kaljusto ML, Vaage J, Stenslokken KO (2008) Effects of hydrogen sulphide on ischaemia-reperfusion injury and ischaemic preconditioning in the isolated, perfused rat heart. *Eur J Cardiothorac Surg* 34: 344-349.
- Boo YC, Jo H (2003) Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C499-508.
- Boo YC, Sorescu G, Boyd N, Shiojima I, Walsh K, et al. (2002) Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. *J Biol Chem* 277: 3388-3396.
- Brach MA, Gruss HJ, Riedel D, Asano Y, De Vos S, et al. (1992) Effect of antiinflammatory agents on synthesis of MCP-1/JE transcripts by human blood

- monocytes. *Mol Pharmacol* 42: 63-68.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brooks AR, Lelkes PI, Rubanyi GM (2002) Gene expression profiling of human aortic endothelial cells exposed to disturbed flow and steady laminar flow. *Physiol Genomics* 9: 27-41.
- Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, Balligand JL, Feron O (2001) Hsp90 ensures the transition from the early Ca²⁺-dependent to the late phosphorylation-dependent activation of the endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial growth factor-exposed endothelial cells. *J Biol Chem* 276: 32663-32669.
- Bruemmer D, Collins AR, Noh G, Wang W, Territo M, et al. (2003) Angiotensin II-accelerated atherosclerosis and aneurysm formation is attenuated in osteopontin-deficient mice. *J Clin Invest* 112: 1318-1331.
- Busse R, Fleming I (2003) Regulation of endothelium-derived vasoactive autacoid production by hemodynamic forces. *Trends Pharmacol Sci* 24: 24-29.
- Calvert JW, Coetzee WA, Lefer DJ (2010) Novel insights into hydrogen sulfide--mediated cytoprotection. *Antioxid Redox Signal* 12: 1203-1217.
- Calvert JW, Jha S, Gundewar S, Elrod JW, Ramachandran A, et al. (2009) Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. *Circ Res* 105: 365-374.
- Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, et al. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282: 1318-1321.
- Carretero OA, Oparil S (2000) Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation* 101: 329-335.
- Chen Q, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ (2006) Reversible blockade of electron transport during ischemia protects mitochondria and decreases myocardial injury following reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 1405-1412.
- Chen Z, Peng IC, Sun W, Su MI, Hsu PH, et al. (2009) AMP-activated protein kinase functionally phosphorylates endothelial nitric oxide synthase Ser633.

- Circ Res 104: 496-505.
- Cheng Y, Ndisang JF, Tang G, Cao K, Wang R (2004) Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2316-2323.
- Chien S, Li S, Shyy YJ (1998) Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells. *Hypertension* 31: 162-169.
- Chiku T, Padovani D, Zhu W, Singh S, Vitvitsky V, et al. (2009) H₂S biogenesis by human cystathionine gamma-lyase leads to the novel sulfur metabolites lanthionine and homolanthionine and is responsive to the grade of hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem* 284: 11601-11612.
- Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ (2001) Akt1/PKB α is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem* 276: 38349-38352.
- Churchill EN, Mochly-Rosen D (2007) The roles of PKC δ and epsilon isoenzymes in the regulation of myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Biochem Soc Trans* 35: 1040-1042.
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, et al. (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91: 3527-3561.
- Cohen P, Alessi DR, Cross DA (1997) PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction? *FEBS Lett* 410: 3-10.
- Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, et al. (2000) P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med* 191: 189-194.
- Cross TG, Scheel-Toellner D, Henriquez NV, Deacon E, Salmon M, et al. (2000) Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp Cell Res* 256: 34-41.
- Davies PF, Shi C, Depaola N, Helmke BP, Polacek DC (2001) Hemodynamics and the focal origin of atherosclerosis: a spatial approach to endothelial structure, gene expression, and function. *Ann N Y Acad Sci* 947: 7-16; discussion 16-17.
- Diamond SL, Eskin SG, McIntire LV (1989) Fluid flow stimulates tissue

- plasminogen activator secretion by cultured human endothelial cells. *Science* 243: 1483-1485.
- Dickson ME, Sigmund CD (2006) Genetic basis of hypertension: revisiting angiotensinogen. *Hypertension* 48: 14-20.
- Dimmeler S, Assmus B, Hermann C, Haendeler J, Zeiher AM (1998) Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells: involvement in suppression of apoptosis. *Circ Res* 83: 334-341.
- Dimmeler S, Dernbach E, Zeiher AM (2000) Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Lett* 477: 258-262.
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, et al. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-605.
- Diwakar L, Ravindranath V (2007) Inhibition of cystathionine-gamma-lyase leads to loss of glutathione and aggravation of mitochondrial dysfunction mediated by excitatory amino acid in the CNS. *Neurochem Int* 50: 418-426.
- Djousse L, Mukamal KJ (2009) Alcohol consumption and risk of hypertension: does the type of beverage or drinking pattern matter? *Rev Esp Cardiol* 62: 603-605.
- Downward J (1998) Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 10: 262-267.
- Drake PM, Gunn MD, Charo IF, Tsou CL, Zhou Y, et al. (2001) Human placental cytotrophoblasts attract monocytes and CD56(bright) natural killer cells via the actions of monocyte inflammatory protein 1alpha. *J Exp Med* 193: 1199-1212.
- Eikelboom JW, Lonn E, Genest J, Jr., Hankey G, Yusuf S (1999) Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med* 131: 363-375.
- Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, Doeller JE, Kraus DW, et al. (2007) Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15560-15565.
- Enokido Y, Suzuki E, Iwasawa K, Namekata K, Okazawa H, et al. (2005)

- Cystathionine beta-synthase, a key enzyme for homocysteine metabolism, is preferentially expressed in the radial glia/astrocyte lineage of developing mouse CNS. *FASEB J* 19: 1854-1856.
- Eto K, Ogasawara M, Umemura K, Nagai Y, Kimura H (2002) Hydrogen sulfide is produced in response to neuronal excitation. *J Neurosci* 22: 3386-3391.
- Faxon DP, Creager MA, Smith SC, Jr., Pasternak RC, Olin JW, et al. (2004) Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Executive summary: Atherosclerotic Vascular Disease Conference proceeding for healthcare professionals from a special writing group of the American Heart Association. *Circulation* 109: 2595-2604.
- Fiorucci S, Antonelli E, Mencarelli A, Orlandi S, Renga B, et al. (2005) The third gas: H₂S regulates perfusion pressure in both the isolated and perfused normal rat liver and in cirrhosis. *Hepatology* 42: 539-548.
- Frangos JA, Eskin SG, McIntire LV, Ives CL (1985) Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science* 227: 1477-1479.
- Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, et al. (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399: 597-601.
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376.
- Furne J, Saeed A, Levitt MD (2008) Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1479-1485.
- Gabriels JE, Paul DL (1998) Connexin43 is highly localized to sites of disturbed flow in rat aortic endothelium but connexin37 and connexin40 are more uniformly distributed. *Circ Res* 83: 636-643.
- Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, et al. (1998) Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392: 821-824.
- Geng B, Chang L, Pan C, Qi Y, Zhao J, et al. (2004) Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. *Biochem Biophys Res Commun* 318: 756-763.
- Geng B, Cui Y, Zhao J, Yu F, Zhu Y, et al. (2007) Hydrogen sulfide downregulates the aortic L-arginine/nitric oxide pathway in rats. *Am J Physiol*

- Regul Integr Comp Physiol 293: R1608-1618.
- Gimbrone MA, Jr., Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G (2000) Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 902: 230-239; discussion 239-240.
- Gow AJ (2005) Nitric oxide, hemoglobin, and hypoxic vasodilation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32: 479-482.
- Hafezi-Moghadam A, Simoncini T, Yang Z, Limbourg FP, Plumier JC, et al. (2002) Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 8: 473-479.
- Hansson GK (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352: 1685-1695.
- Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H (2003) Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 91: 7A-11A.
- Haslam DW, James WP (2005) Obesity. *Lancet* 366: 1197-1209.
- He H, Wang X, Gorospe M, Holbrook NJ, Trush MA (1999) Phorbol ester-induced mononuclear cell differentiation is blocked by the mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) inhibitor PD98059. *Cell Growth Differ* 10: 307-315.
- Hennig B, Boissonneault GA (1987) Cholestan-3 beta,5 alpha,6 beta-triol decreases barrier function of cultured endothelial cell monolayers. *Atherosclerosis* 68: 255-261.
- Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 150-166.
- Hobson B, Denekamp J (1984) Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br J Cancer* 49: 405-413.
- Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, Gleason MR, Wolf BM, et al. (2001) Hyperhomocysteinemia enhances vascular inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J Clin Invest* 107: 675-683.
- Hongfang J, Cong B, Zhao B, Zhang C, Liu X, et al. (2006) Effects of hydrogen sulfide on hypoxic pulmonary vascular structural remodeling. *Life Sci* 78: 1299-1309.

- Hosoki R, Matsuki N, Kimura H (1997) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 527-531.
- Hu Y, Chen X, Pan TT, Neo KL, Lee SW, et al. (2008) Cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning involves activation of ERK and PI3K/Akt pathways. *Pflugers Arch* 455: 607-616.
- Hu Y, Dietrich H, Metzler B, Wick G, Xu Q (2000) Hyperexpression and activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) in atherosclerotic lesions of cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 18-26.
- Hughes MN, Centelles MN, Moore KP (2009) Making and working with hydrogen sulfide: The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review. *Free Radic Biol Med* 47: 1346-1353.
- Hyspler R, Ticha A, Indrova M, Zadak Z, Hysplerova L, et al. (2002) A simple, optimized method for the determination of sulphide in whole blood by GC-mS as a marker of bowel fermentation processes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 770: 255-259.
- Ichinohe A, Kanaumi T, Takashima S, Enokido Y, Nagai Y, et al. (2005) Cystathionine beta-synthase is enriched in the brains of Down's patients. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 1547-1550.
- Ishida T, Takahashi M, Corson MA, Berk BC (1997) Fluid shear stress-mediated signal transduction: how do endothelial cells transduce mechanical force into biological responses? *Ann N Y Acad Sci* 811: 12-23; discussion 23-14.
- Jaarsma D, Veenma-van der Duin L, Korf J (1994) N-acetylaspartate and N-acetylaspartylglutamate levels in Alzheimer's disease post-mortem brain tissue. *J Neurol Sci* 127: 230-233.
- Ji Y, Neverova I, Van Eyk JE, Bennett BM (2006) Nitration of tyrosine 92 mediates the activation of rat microsomal glutathione s-transferase by peroxynitrite. *J Biol Chem* 281: 1986-1991.
- Jo H, Sipos K, Go YM, Law R, Rong J, et al. (1997) Differential effect of shear stress on extracellular signal-regulated kinase and N-terminal Jun kinase in endothelial cells. Gi2- and Gbeta/gamma-dependent signaling pathways. *J Biol Chem* 272: 1395-1401.
- Johnson GL, Lapadat R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways

- mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911-1912.
- Johnson GL, Vaillancourt RR (1994) Sequential protein kinase reactions controlling cell growth and differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 6: 230-238.
- Kaneko Y, Kimura Y, Kimura H, Niki I (2006) L-cysteine inhibits insulin release from the pancreatic beta-cell: possible involvement of metabolic production of hydrogen sulfide, a novel gasotransmitter. *Diabetes* 55: 1391-1397.
- Kimura H (2002) Hydrogen sulfide as a neuromodulator. *Mol Neurobiol* 26: 13-19.
- Kimura Y, Kimura H (2004) Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J* 18: 1165-1167.
- Kinlay S, Libby P, Ganz P (2001) Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol* 12: 383-389.
- Knowles JW, Reddick RL, Jennette JC, Shesely EG, Smithies O, et al. (2000) Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)ApoE(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J Clin Invest* 105: 451-458.
- Kosonen O, Kankaanranta H, Uotila J, Moilanen E (2000) Inhibition by nitric oxide-releasing compounds of E-selectin expression in and neutrophil adhesion to human endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 394: 149-156.
- Kosugi T, Nakagawa T, Kamath D, Johnson RJ (2009) Uric acid and hypertension: an age-related relationship? *J Hum Hypertens* 23: 75-76.
- Kraus JP (1998) Biochemistry and molecular genetics of cystathionine beta-synthase deficiency. *Eur J Pediatr* 157 Suppl 2: S50-53.
- Kubo S, Doe I, Kurokawa Y, Nishikawa H, Kawabata A (2007) Direct inhibition of endothelial nitric oxide synthase by hydrogen sulfide: contribution to dual modulation of vascular tension. *Toxicology* 232: 138-146.
- Kuchan MJ, Jo H, Frangos JA (1994) Role of G proteins in shear stress-mediated nitric oxide production by endothelial cells. *Am J Physiol* 267: C753-758.
- Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, et al. (2000) The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 6: 1004-1010.
- Kyriakis JM, Avruch J (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol*

Rev 81: 807-869.

- Kyrou I, Chrousos GP, Tsigos C (2006) Stress, visceral obesity, and metabolic complications. *Ann N Y Acad Sci* 1083: 77-110.
- Lackland DT, Egan BM (2007) Dietary salt restriction and blood pressure in clinical trials. *Curr Hypertens Rep* 9: 314-319.
- Lahera V, Goicoechea M, de Vinuesa SG, Miana M, de las Heras N, et al. (2007) Endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation in atherosclerosis: beneficial effects of statins. *Curr Med Chem* 14: 243-248.
- Langille BL (1996) Arterial remodeling: relation to hemodynamics. *Can J Physiol Pharmacol* 74: 834-841.
- Langille BL, O'Donnell F (1986) Reductions in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium-dependent. *Science* 231: 405-407.
- Lee JH, O'Keefe JH, Bell D, Hensrud DD, Holick MF (2008) Vitamin D deficiency an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor? *J Am Coll Cardiol* 52: 1949-1956.
- Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, et al. (1999) Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 99: 301-312.
- Li L, Moore PK (2008) Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: a breath of not so fresh air? *Trends Pharmacol Sci* 29: 84-90.
- Li YS, Haga JH, Chien S (2005) Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *J Biomech* 38: 1949-1971.
- Libby P (2001) Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 104: 365-372.
- Libby P (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868-874.
- Liu J, Sessa WC (1994) Identification of covalently bound amino-terminal myristic acid in endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269: 11691-11694.
- Lloyd-Jones DM, Larson MG, Beiser A, Levy D (1999) Lifetime risk of developing coronary heart disease. *Lancet* 353: 89-92.

- Lowicka E, Beltowski J (2007) Hydrogen sulfide (H₂S) - the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacol Rep* 59: 4-24.
- Lusis AJ (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407: 233-241.
- Malek AM, Alper SL, Izumo S (1999) Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA* 282: 2035-2042.
- Manning BD, Cantley LC (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129: 1261-1274.
- Marathe S, Kuriakose G, Williams KJ, Tabas I (1999) Sphingomyelinase, an enzyme implicated in atherogenesis, is present in atherosclerotic lesions and binds to specific components of the subendothelial extracellular matrix. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2648-2658.
- Marshall HE, Merchant K, Stamler JS (2000) Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *FASEB J* 14: 1889-1900.
- Mazzone T, Jensen M, Chait A (1983) Human arterial wall cells secrete factors that are chemotactic for monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 5094-5097.
- McCaffrey TA, Fu C, Du B, Eksinar S, Kent KC, et al. (2000) High-level expression of Egr-1 and Egr-1-inducible genes in mouse and human atherosclerosis. *J Clin Invest* 105: 653-662.
- McCormick SM, Eskin SG, McIntire LV, Teng CL, Lu CM, et al. (2001) DNA microarray reveals changes in gene expression of shear stressed human umbilical vein endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8955-8960.
- Means AR, Dedman JR (1980) Calmodulin--an intracellular calcium receptor. *Nature* 285: 73-77.
- Michel T, Feron O (1997) Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 100: 2146-2152.
- Michell BJ, Harris MB, Chen ZP, Ju H, Venema VJ, et al. (2002) Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635. *J Biol Chem* 277: 42344-42351.
- Minamishima S, Bougaki M, Sips PY, Yu JD, Minamishima YA, et al. (2009) Hydrogen sulfide improves survival after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation via a nitric oxide synthase 3-dependent mechanism in mice. *Circulation* 120: 888-896.

- Mitsuhashi H, Yamashita S, Ikeuchi H, Kuroiwa T, Kaneko Y, et al. (2005) Oxidative stress-dependent conversion of hydrogen sulfide to sulfite by activated neutrophils. *Shock* 24: 529-534.
- Mo M, Eskin SG, Schilling WP (1991) Flow-induced changes in Ca²⁺ signaling of vascular endothelial cells: effect of shear stress and ATP. *Am J Physiol* 260: H1698-1707.
- Mocellin S, Bronte V, Nitti D (2007) Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: searching for therapeutic opportunities. *Med Res Rev* 27: 317-352.
- Morales-Ruiz M, Fulton D, Sowa G, Languino LR, Fujio Y, et al. (2000) Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt. *Circ Res* 86: 892-896.
- Morawietz H, Talanow R, Szibor M, Rueckschloss U, Schubert A, et al. (2000) Regulation of the endothelin system by shear stress in human endothelial cells. *J Physiol* 525 Pt 3: 761-770.
- Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN (1991) Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* 88: 1121-1127.
- Olson KR (2009) Is hydrogen sulfide a circulating "gasotransmitter" in vertebrate blood? *Biochim Biophys Acta* 1787: 856-863.
- Pan TT, Neo KL, Hu LF, Yong QC, Bian JS (2008) H₂S preconditioning-induced PKC activation regulates intracellular calcium handling in rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 294: C169-177.
- Panetti TS, Nowlen J, Mosher DF (2000) Sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid stimulate endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 1013-1019.
- Papapetropoulos A, Pyriochou A, Altaany Z, Yang G, Marazioti A, et al. (2009) Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21972-21977.
- Park HJ, Zhang Y, Georgescu SP, Johnson KL, Kong D, et al. (2006) Human umbilical vein endothelial cells and human dermal microvascular endothelial cells offer new insights into the relationship between lipid metabolism and

- angiogenesis. *Stem Cell Rev* 2: 93-102.
- Patel P, Vatish M, Heptinstall J, Wang R, Carson RJ (2009) The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. *Reprod Biol Endocrinol* 7: 10.
- Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, et al. (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J* 10: 885-892.
- Prabhakar P, Thatte HS, Goetz RM, Cho MR, Golan DE, et al. (1998) Receptor-regulated translocation of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 273: 27383-27388.
- Pritchard KA, Jr., Ackerman AW, Gross ER, Stepp DW, Shi Y, et al. (2001) Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 276: 17621-17624.
- Qiao JH, Tripathi J, Mishra NK, Cai Y, Tripathi S, et al. (1997) Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol* 150: 1687-1699.
- Qu K, Lee SW, Bian JS, Low CM, Wong PT (2008) Hydrogen sulfide: neurochemistry and neurobiology. *Neurochem Int* 52: 155-165.
- Resnick N, Yahav H, Shay-Salit A, Shushy M, Schubert S, et al. (2003) Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Prog Biophys Mol Biol* 81: 177-199.
- Rosenfeld CS (1992) Effects of L-leucyl-L-leucine methyl ester on human marrow and protection of progenitor cells by IL-1. *Int J Cell Cloning* 10: 249-253.
- Ross R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809.
- Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: 115-126.
- Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM (1986) Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 250: H1145-1149.
- Sharma AK, Rohrer B (2004) Calcium-induced calpain mediates apoptosis via caspase-3 in a mouse photoreceptor cell line. *J Biol Chem* 279: 35564-35572.

- Shen J, Luscinckas FW, Connolly A, Dewey CF, Jr., Gimbrone MA, Jr. (1992) Fluid shear stress modulates cytosolic free calcium in vascular endothelial cells. *Am J Physiol* 262: C384-390.
- Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N, Kimura H (2009a) Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *J Biochem* 146: 623-626.
- Shibuya N, Tanaka M, Yoshida M, Ogasawara Y, Togawa T, et al. (2009b) 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxid Redox Signal* 11: 703-714.
- Shiojima I, Walsh K (2002) Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res* 90: 1243-1250.
- Siegel LM (1965) A Direct Microdetermination for Sulfide. *Anal Biochem* 11: 126-132.
- Singh S, Padovani D, Leslie RA, Chiku T, Banerjee R (2009) Relative contributions of cystathionine beta-synthase and gamma-cystathionase to H₂S biogenesis via alternative trans-sulfuration reactions. *J Biol Chem* 284: 22457-22466.
- Sivarajah A, McDonald MC, Thiemermann C (2006) The production of hydrogen sulfide limits myocardial ischemia and reperfusion injury and contributes to the cardioprotective effects of preconditioning with endotoxin, but not ischemia in the rat. *Shock* 26: 154-161.
- Smithies O, Maeda N (1995) Gene targeting approaches to complex genetic diseases: atherosclerosis and essential hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5266-5272.
- Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, et al. (1996) Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 347: 781-786.
- Stipanuk MH, Beck PW (1982) Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J* 206: 267-277.
- Stone PH, Coskun AU, Yeghiazarians Y, Kinlay S, Popma JJ, et al. (2003) Prediction of sites of coronary atherosclerosis progression: In vivo profiling of endothelial shear stress, lumen, and outer vessel wall characteristics to predict

- vascular behavior. *Curr Opin Cardiol* 18: 458-470.
- Takeya M, Yoshimura T, Leonard EJ, Takahashi K (1993) Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody. *Hum Pathol* 24: 534-539.
- Tang G, Wu L, Liang W, Wang R (2005) Direct stimulation of K(ATP) channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 68: 1757-1764.
- Tuohimaa P (2009) Vitamin D and aging. *J Steroid Biochem Mol Biol* 114: 78-84.
- Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, et al. (2005) A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* 437: 426-431.
- Usachev YM, Marsh AJ, Johanns TM, Lemke MM, Thayer SA (2006) Activation of protein kinase C in sensory neurons accelerates Ca²⁺ uptake into the endoplasmic reticulum. *J Neurosci* 26: 311-318.
- Venema VJ, Marrero MB, Venema RC (1996) Bradykinin-stimulated protein tyrosine phosphorylation promotes endothelial nitric oxide synthase translocation to the cytoskeleton. *Biochem Biophys Res Commun* 226: 703-710.
- Vitvitsky V, Thomas M, Ghorpade A, Gendelman HE, Banerjee R (2006) A functional transsulfuration pathway in the brain links to glutathione homeostasis. *J Biol Chem* 281: 35785-35793.
- Wagner EF, Nebreda AR (2009) Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* 9: 537-549.
- Wang R (2002) Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 16: 1792-1798.
- Wang R (2003) The gasotransmitter role of hydrogen sulfide. *Antioxid Redox Signal* 5: 493-501.
- Wang R (2009) Hydrogen sulfide: a new EDRF. *Kidney Int* 76: 700-704.
- Whiteman M, Li L, Kostetski I, Chu SH, Siau JL, et al. (2006) Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and

- hydrogen sulphide. *Biochem Biophys Res Commun* 343: 303-310.
- Whitfield NL, Kreimier EL, Verdial FC, Skovgaard N, Olson KR (2008) Reappraisal of H₂S/sulfide concentration in vertebrate blood and its potential significance in ischemic preconditioning and vascular signaling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1930-1937.
- Wofford MR, Hall JE (2004) Pathophysiology and treatment of obesity hypertension. *Curr Pharm Des* 10: 3621-3637.
- Wu R, Huang YH, Elinder LS, Frostegard J (1998) Lysophosphatidylcholine is involved in the antigenicity of oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18: 626-630.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270: 1326-1331.
- Yamamoto K, Korenaga R, Kamiya A, Ando J (2000) Fluid shear stress activates Ca²⁺ influx into human endothelial cells via P2X₄ purinoceptors. *Circ Res* 87: 385-391.
- Yamamoto K, Sokabe T, Ohura N, Nakatsuka H, Kamiya A, et al. (2003) Endogenously released ATP mediates shear stress-induced Ca²⁺ influx into pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H793-803.
- Yan SK, Chang T, Wang H, Wu L, Wang R, et al. (2006) Effects of hydrogen sulfide on homocysteine-induced oxidative stress in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 351: 485-491.
- Yang G, Cao K, Wu L, Wang R (2004) Cystathionine gamma-lyase overexpression inhibits cell proliferation via a H₂S-dependent modulation of ERK1/2 phosphorylation and p21Cip/WAK-1. *J Biol Chem* 279: 49199-49205.
- Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, et al. (2008) H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science* 322: 587-590.
- Yang G, Wu L, Wang R (2006) Pro-apoptotic effect of endogenous H₂S on human aorta smooth muscle cells. *FASEB J* 20: 553-555.
- Yang W, Yang G, Jia X, Wu L, Wang R (2005) Activation of KATP channels by

- H₂S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *J Physiol* 569: 519-531.
- Yellon DM, Baxter GF (1999) Reperfusion injury revisited: is there a role for growth factor signaling in limiting lethal reperfusion injury? *Trends Cardiovasc Med* 9: 245-249.
- Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, et al. (1991) Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 5252-5256.
- Yong QC, Lee SW, Foo CS, Neo KL, Chen X, et al. (2008) Endogenous hydrogen sulphide mediates the cardioprotection induced by ischemic postconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H1330-H1340.
- Yue TL, Wang C, Gu JL, Ma XL, Kumar S, et al. (2000) Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circ Res* 86: 692-699.
- Yusuf M, Kwong Huat BT, Hsu A, Whiteman M, Bhatia M, et al. (2005) Streptozotocin-induced diabetes in the rat is associated with enhanced tissue hydrogen sulfide biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 1146-1152.
- Zhao W, Ndisang JF, Wang R (2003) Modulation of endogenous production of H₂S in rat tissues. *Can J Physiol Pharmacol* 81: 848-853.
- Zhao W, Wang R (2002) H₂S-induced vasorelaxation and underlying cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H474-480.
- Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R (2001) The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J* 20: 6008-6016.
- 蔡宇致 (2002) 不同型態之流動對內皮細胞中訊息傳導分子之影響(國立台灣大學化學工程學研究所碩士學位論文).
- 謝宗佑 (2007) 剪力調控內皮細胞中凝血酶調節素之訊息傳遞路徑及其蛋白質穩定性之調節 (國立台灣大學化學工程學研究所碩士學位論文).
- 郭任淵 (2010) 穩定流及脈動流對內皮細胞中訊息傳導分子之調控 (國立台灣大學化學工程學研究所碩士學位論文).