28 AUG 2001

THE ROLES OF CYCLOOXYGENASE AND NITRIC OXIDE SYNTHASE ON ACUTE EFFECTS OF LIPID COMPONENT ACTIVATED ENDOTHELIAL CELLS

DUANGPORN PLASEN

อภิสันทยาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
(PHARMACOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2001

ISBN 974-04-0335-2
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
D818r
2001
C.2

Copyright by Mahidol University

3936381 SIPM/D : MAJOR : PHARMACOLOGY ; Ph.D. (PHARMACOLOGY)
KEY WORDS : COX-2 / PRIMARY LIPID EXPOSURE / ENDOTHELIAL CELL

DAUNGPORN PLASEN : THE ROLES OF CYCLOOXYGENASE AND NITRIC OXIDE SYNTHASE ON ACUTE EFFECTS OF LIPID COMPONENT ACTIVATED ENDOTHELIAL CELLS. THESIS ADVISORS : PRAVIT AKARASEREENONT, M.D., Ph.D., KITIRAT TECHATRISAK, M.D., Ph.D., ADISAK WONGKAJORNSILP, M.D., Ph.D. 186 P. ISBN 974-04-0335-2

Endothelial cells line all vessels of the body and are the most important structure for communication between the bloodstream and the vessel wall. Normal endothelial cells constitutively secrete vasoactive substances such as prostacyclin (PGI_2) and nitric oxide (NO), which maintain normal physiological function of vessel walls by vasodilating and by exhibiting antithrombogenic properties. Both PGI_2 and NO are produced by cyclooxygenase (COX) and nitric oxide synthase (NOS) enzyme, respectively. It has been well established that oxidised LDL (oLDL), produced from oxidative modification of LDL in serum is one of the major causes of atherosclerosis. The oxidative modification of LDL results in an extensive conversion of phosphatidylcholine to lysophosphatidylcholine (LC) as well as to the production of oxysterols from the cholesterol esters, such as 25-hydroxycholesterol (25OH). Both LC and 25OH induce atherosclerosis by impairing the barrier function of endothelial cells and promoting the attraction of circulating monocyte to endothelial cells. Atherosclerosis is initiated by sustained vascular endothelial injury and propagated by a series of chain reactions involving vascular cellular constituents and lipid accumulation. The disease progresses insidiously for many years before symptoms develop. This thesis explored the involvement of COX and NOS in endothelial cells (human umbilical vein endothelial cells; HUVEC) primarily activated with lipid component such as 25OH and LC. The cellular mechanisms by which COX and NOS isoform expression were also elucidated. HUVEC was obtained from babies born to normal pregnancy and cultured by standard technique. The effects of 25OH and LC on COX and NOS activity including isoform expressions were investigated. The third passage of HUVEC culture was treated with 25OH (0.1, 1 and 10 μM) or LC (12.5 and 25 μM) at times 6, 12, and 24 h or, 3, and 24 h, respectively. COX activities were evaluated by measuring 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ (a stable metabolite of PGI_2) after incubating with 10 μM arachidonic acid for 10 min. NOS activities were determined from measuring nitrate/nitrite production in the treatment medium. COX and NOS protein were identified by Western blot technique using specific antibodies. The major finding of this thesis is that HUVEC exposed initially to 25OH or LC, the principle atherosclerotic lipid components, will defend themselves by upregulating PGI_2 synthesis in a manner that depends on concentration and time. The increase in PGI_2 production results from induction of COX-2 through activating protein tyrosine kinase. NOS was not involved in this observation.

Copyright by Mahidol University

3936381 SIPM/D : สาขาวิชา : เภสัชวิทยา ; ปร.ด. (เภสัชวิทยา)

ดวงพร พลเสน: บทบาทของเอนไซม์ cyclooxygenase และ nitric oxide synthase ในเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดที่ถูกกระตุ้นด้วยองค์ประกอบของไขมันในระยะสั้น (THE ROLES OF CYCLOOXYGENASE AND NITRIC OXIDE SYNTHASE ON ACUTE EFFECTS OF LIPID COMPONENT ACTIVATED ENDOTHELIAL CELLS) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ประวิทย์ อัครเสรีนนท์, M.D.,Ph.D., กิติรัตน์ เตชะไตรศักดิ์, M.D., Ph.D., อดิศักดิ์ วงศ์ขจรศิลป์, M.D., Ph.D.

186 P. ISBN 974-04-0335-2

เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด เป็นเซลล์ซึ่งเรียงตัวเป็นชั้นเดียวอยู่ด้านในสุดของผนังหลอดเลือด ในภาวะปกติเซลล์นี้จะหลั่งสารสำคัญที่ควบคุม สรีรวิทยาของหลอดเลือด ได้แก่ PGI_2 และ NO สาร PGI_2 และ NO นี้ถูกสร้างโดยเอ็นไซม์ Cyclooxygenase (COX) และ Nitric oxide synthase (NOS) ตามลำดับ Oxidized LDL (oLDL) ที่เกิดจากขบวนการ oxidation LDL ในน้ำเลือดเป็นปัจจัยที่สำคัญอันหนึ่งของการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว การเปลี่ยนแปลงนี้มีผลให้เกิดสารสำคัญ 2 ชนิดคือ Lysophosphatidylcholine (LC) และ 25 hydroxycholesterol (25OH) ทั้ง 2 ตัวนี้ ดึงดูดเม็ดเลือดขาวให้มาชุมนุมที่ผนังหลอดเลือดและทำให้เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดสูญเสียคุณสมบัติ ในการกั้นผ่านสารเข้าไปในผนังหลอดเลือด ภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว เริ่มต้นจากมีการบาดเจ็บที่เซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดและดำเนินต่อเป็นลูกโซ่โดยมีองค์ประกอบของเซลล์ในหลอดเลือดและการสะสมของไขมันเข้ามาเกี่ยวข้องซึ่งใช้เวลานานหลายปีกว่าอาการจะปรากฏ งานวิจัยนี้เป็นการศึกษากลไกระดับเซลล์ของเอ็นไซม์ COX และ NOS ในเซ็ลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดสายสะดือเด็กทารก (Human umbilical vein endothelial cell; HUVEC) ที่ถูกกระตุ้นด้วยองค์ประกอบของไขมันในระยะสั้น HUVEC ซึ่งได้จากสายสะดือเด็กทารกที่คลอดจากมารดาซึ่งตั้งครรภ์ปกติ ถูกนำมาทดสอบด้วย 25OH (0.1, 1 และ 10 μM) หรือ LC (12.5 และ 25 μM) ที่เวลา 6, 12 และ 24 ชม.หรือ 3 และ 24 ชม ตามลำดับ ฤทธิ์ของ COX วัดจากการสร้าง 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ (ผลิตผลที่คงตัวของ PGI_2) หลังจากให้ arachidonic acid ฤทธิ์ของNOS วัดจากการสร้าง nitrate / nitrite ในน้ำเลี้ยงเซลล์ โปรตีน COX และ NOS ตรวจหาโดยวิธี Western blot พบว่า HUVEC ที่ได้รับ 25OH หรือ LC ในระยะเริ่มแรกจะป้องกันตนเอง โดยเพิ่มการหลั่ง PGI_2 ด้วยการสร้าง COX-2 ผ่านทางเอนไซม์ tyrosine kinase โดยขึ้นกับความเข้มข้นของ 25OH, LC และเวลาที่ใช้ทดสอบด้วย ส่วนเอนไซม์ NOS ไม่พบว่ามีความเกี่ยวข้อง

Copyright by Mahidol University