

# 科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

香菸煙霧水提取物誘導細胞內鈣離子濃度增加和微絲骨架重組  
的分子調控：蛋白激酶C、磷脂酶C及微絲動態調節蛋白質的角  
色

計畫類別：個別型計畫  
計畫編號：MOST 103-2320-B-040-006-  
執行期間：103年08月01日至104年09月30日  
執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

計畫主持人：王祖興

計畫參與人員：博士班研究生-兼任助理人員：陳姵吟

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：

1. 公開資訊：本計畫可公開查詢
2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否
3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考：否

中華民國 105 年 01 月 11 日

中文摘要：抽菸除造成肺癌、慢性肺阻塞及其他肺部疾病外，對心血管系統也造成相當大的危害，抽菸造成癌症及心血管系統疾病的研究雖然很多，但到目前仍沒有清楚明確的解答，最主要的因素與香菸組成分複雜有很大關係，香菸煙霧中含近7000種不同的化學成分。本研究發現香菸煙霧水提取物(cigarette smoke extract/CSE)在人類血管內皮EA.hy926細胞，明顯造成細胞內ROS增加、鈣離子濃度增加及微絲骨架改造的細胞外形皺縮變圓，此一連串現象可被蛋白激酶C (protein kinase C/PKC)抑制劑、磷脂酰肌醇磷脂酶C (phosphatidylinositol phospholipase C/PLC)抑制劑及鈣離子通道(transient receptor potential cation channel/TRPC)抑制劑等有效的遏阻，這些結果顯示PLC-PKC-TRPC訊息途徑，在CSE造成人類血管內皮細胞鈣離子濃度增加及微絲骨架改造扮演重要調節角色。此外，我們分析了微絲骨架改造(remodeling)調節蛋白質，cofilin及filamin A蛋白質在CSE處理下的表現量及磷酸化分子的比例。從西方轉漬分析結果發現，CSE 1小時處理明顯增加EA.hy926細胞中cofilin及磷酸化cofilin的表現量，CSE處理8小時，磷酸化態cofilin的表現量，仍然依處理濃度增加而明顯增加，但cofilin並無增加表現的情形，在高濃度10% CSE處理組下，cofilin的表現量甚至有下降的現象；除cofilin之外，CSE處理也提高磷酸化-filamin A蛋白在EA.hy926細胞的表現量，然而，filamin A蛋白質的表現量則不受CSE處理而影響。以抗氧化劑quercetin及glutathione與CSE進行共同處理發現，這兩種強力抗氧化劑明顯降低CSE在EA.hy926細胞所造成鈣離子濃度增加、ROS增加及黏附因子ICAM-1的表現增加，這些結果暗示ROS增加可能是CSE造成內皮細胞多種生理改變重要且早期的因子，另外，PI3K在CSE處理的作用角色也值得留意，因為quercetin也扮演PI3K抑制劑的角色。總結本計畫結果說明CSE可能透過ROS增加，活化phospholipase C與PKC，讓細胞內Ca<sup>2+</sup>濃度增加，並改變細胞微絲骨架調節蛋白質cofilin及filamin A的表現量及磷酸化狀態，造成微絲骨架改造的總體反應，此一現象與抽菸造成血管屏障完整性喪失(barrier integrity loss)及之後的心血管疾病形成有密切關係，因此，以多重抗氧化劑和/或鈣離子螯合劑的補充方式，降低抽菸對心血管的危害風險值得再進一步證實。

中文關鍵詞：蛋白激酶C，磷脂酰肌醇磷脂酶C，鈣離子通道(TRPC1)，微絲骨架改造，絲切蛋白(cofilin)，絲蛋白A (filamin A)

英文摘要：Cigarette smoking not only induces lung cancer, chronic obstructive pulmonary disease and other lung diseases, but also causes cardiovascular diseases. Although there have been lots of studies on the negative effects of cigarette smoking, the exact molecular mechanism of cigarette smoking-induced cardiovascular diseases is still unclear. One of the major reasons is its complex composition of cigarette smoke. More than 7,000 different compounds have been found in cigarettes smoke. Our results showed that cigarette smoke extract (CSE) induced significant elevation of intracellular calcium ion concentration as well as the

reorganization of actin cytoskeleton in human endothelial EA.hy926 cells. These phenomena could be potentially suppressed by a variety of inhibitors involving signaling pathways, such as protein kinase C, phospholipase C and transient receptor potential cation channel. These results clearly indicate that PLC/PKC/TRPC signaling pathway plays an extremely important role in the CSE-induced intracellular calcium concentration increase and actin cytoskeleton remodeling in EA.hy926 cells. Furthermore, we analyzed expression levels of actin-remodeling proteins, such as cofilin and filamin A in EA.hy926 cells during CSE exposure by Western blot analysis. The results showed that CSE leads to a significant increase in the levels of both cofilin and phosphorylated cofilin in CSE-treated EA.hy926 cells. Besides cofilin, CSE also increased the level of phosphorylated filamin A but not filamin A in EA.hy926 cells. These findings further indicated that CSE-induced protein kinase C activation and/or intracellular Ca<sup>2+</sup> elevation may act together or separately to modulate actin cytoskeleton remodeling by controlling the expression and phosphorylation of cofilin and filamin A. Moreover, CSE-induced adverse effects in endothelial cells including elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> and ROS and ICAM-1 up-regulation were abolished by antioxidants quercetin and glutathione co-treatment. Collectively, the present study indicates that CSE-induced abnormally disrupted actin cytoskeleton remodeling contribute to endothelial barrier disruption and the pathology of cardiovascular diseases. And it is possible that supplementation of multiple antioxidants and/or calcium ion chelator may be beneficial to prevent disease with cigarette smoke.

英文關鍵詞： Protein kinase C, Phospholipase C, Ca<sup>2+</sup>, TRPC1, Actin remodeling, Cofilin, Filamin A

# 科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

香菸煙霧水提取物誘導細胞內鈣離子濃度增加和微絲骨架重組的分子調控：蛋白激酶C、磷脂酶C 及微絲動態調節蛋白質的角色

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 103— 2320— B— 040— 006—

執行期間：103年08月01日至104年09月30日

執行機構及系所：中山醫學大學-生物醫學學系

計畫主持人：王祖興

共同主持人：

計畫參與人員：陳姵吟

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 \_\_\_\_ 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

期末報告處理方式：

1. 公開方式：

非列管計畫亦不具下列情形，立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否 是

3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考 否 是，\_\_\_\_（請列舉提供之單位；本部不經審議，依勾選逕予轉送）

中 華 民 國 104 年 12 月 31 日

## 目錄

---

項目	頁數
目錄	I
中、英文摘要及關鍵詞	III
前言	1
研究目的	2
文獻探討	2
研究方法	3
結果與討論	4
參考文獻	8
附圖	11

---

## (二) 中、英文摘要及關鍵詞

### 中文摘要&關鍵詞

抽菸除造成肺癌、慢性肺阻塞及其他肺部疾病外，對心血管系統也造成相當大的危害，抽菸造成癌症及心血管系統疾病的研究雖然很多，但到目前仍沒有清楚明確的解答，最主要的因素與香菸組成分複雜有很大關係，香菸煙霧中含近7000種不同的化學成分。本研究發現香菸煙霧水提取物(cigarette smoke extract/CSE)在人類血管內皮EA.hy926細胞，明顯造成細胞內ROS增加、鈣離子濃度增加及微絲骨架改造的細胞外形皺縮變圓，此一連串現象可被蛋白激酶C (protein kinase C/PKC)抑制劑、磷脂酰肌醇磷脂酶C (phosphatidylinositol phospholipase C/PLC)抑制劑及鈣離子通道(transient receptor potential cation channel/TRPC)抑制劑等有效的遏阻，這些結果顯示PLC-PKC-TRPC訊息途徑，在CSE造成人類血管內皮細胞鈣離子濃度增加及微絲骨架改造扮演重要調節角色。此外，我們分析了微絲骨架改造(remodeling)調節蛋白質，cofilin及filamin A蛋白質在CSE處理下的表現量及磷酸化分子的比例。從西方轉漬分析結果發現，CSE 1小時處理明顯增加EA.hy926細胞中cofilin及磷酸化cofilin的表現量，CSE處理8小時，磷酸化態cofilin的表現量，仍然依處理濃度增加而明顯增加，但cofilin並無增加表現的情形，在高濃度10% CSE處理組下，cofilin的表現量甚至有下降的現象；除cofilin之外，CSE處理也提高磷酸化-filamin A蛋白在EA.hy926細胞的表現量，然而，filamin A蛋白質的表現量則不受CSE處理而影響。以抗氧化劑quercetin及glutathione與CSE進行共同處理發現，這兩種強力抗氧化劑明顯降低CSE在EA.hy926細胞所造成鈣離子濃度增加、ROS增加及黏附因子ICAM-1的表現增加，這些結果暗示ROS增加可能是CSE造成內皮細胞多種生理改變重要且早期的因子，另外，PI3K在CSE處理的作用角色也值得留意，因為quercetin也扮演PI3K抑制劑的角色。總結本計畫結果說明CSE可能透過ROS增加，活化phospholipase C與PKC，讓細胞內Ca<sup>2+</sup>濃度增加，並改變細胞微絲骨架調節蛋白質cofilin及filamin A的表現量及磷酸化狀態，造成微絲骨架改造的總體反應，此一現象與抽菸造成血管屏障完整性喪失(barrier integrity loss)及之後的心血管疾病形成有密切關係，因此，以多重抗氧化劑和/或鈣離子螯合劑的補充方式，降低抽菸對心血管的危害風險值得再進一步證實。

**關鍵詞：**蛋白激酶C，磷脂酰肌醇磷脂酶C，鈣離子通道(TRPC1)，微絲骨架改造，絲切蛋白(cofilin)，絲蛋白A (filamin A)

## 英文摘要&關鍵詞

Cigarette smoking not only induces lung cancer, chronic obstructive pulmonary disease and other lung diseases, but also causes cardiovascular diseases. Although there have been lots of studies on the negative effects of cigarette smoking, the exact molecular mechanism of cigarette smoking-induced cardiovascular diseases is still unclear. One of the major reasons is its complex composition of cigarette smoke. More than 7,000 different compounds have been found in cigarettes smoke. Our results showed that cigarette smoke extract (CSE) induced significant elevation of intracellular calcium ion concentration as well as the reorganization of actin cytoskeleton in human endothelial EA.hy926 cells. These phenomena could be potentially suppressed by a variety of inhibitors involving signaling pathways, such as protein kinase C, phospholipase C and transient receptor potential cation channel. These results clearly indicate that PLC/PKC/TRPC signaling pathway plays an extremely important role in the CSE-induced intracellular calcium concentration increase and actin cytoskeleton remodeling in EA.hy926 cells. Furthermore, we analyzed expression levels of actin-remodeling proteins, such as cofilin and filamin A in EA.hy926 cells during CSE exposure by Western blot analysis. The results showed that CSE leads to a significant increase in the levels of both cofilin and phosphorylated cofilin in CSE-treated Ea.hy926 cells. Besides cofilin, CSE also increased the level of phosphorylated filamin A but not filamin A in EA.hy926 cells. These findings further indicated that CSE-induced protein kinase C activation and/or intracellular  $Ca^{2+}$  elevation may act together or separately to modulate actin cytoskeleton remodeling by controlling the expression and phosphorylation of cofilin and filamin A. Moreover, CSE-induced adverse effects in endothelial cells including elevation of intracellular  $Ca^{2+}$  and ROS and ICAM-1 up-regulation were abolished by antioxidants quercetin and glutathione co-treatment. Collectively, the present study indicates that CSE-induced abnormally disrupted actin cytoskeleton remodeling contribute to endothelial barrier disruption and the pathology of cardiovascular diseases. And it is possible that supplementation of multiple antioxidants and/or calcium ion chelator may be beneficial to prevent disease with cigarette smoke.

**Keywords:** Protein kinase C, Phospholipase C,  $Ca^{2+}$ , TRPC1, Actin remodeling, Cofilin, Filamin A

### (三)報告內容：

#### 前言

抽菸對人體所造成健康危害非常大，普遍性影響所有的組織及器官，最終也造成多元性疾病的形成包含癌症及心血管疾病。香菸煙霧中含近7000種不同的化合物或元素，其中許多已被證實為毒物及致癌劑。其實，香菸煙霧本身是多種致癌劑毒藥的混合物，與其高風險性及多元毒性特色相符一致。現今對於香菸致毒及致癌性的研究很多，但在機制上因其組成的複雜性，常無法給予明確且一致性的解答。綜合而言，造成細胞內氧化壓力升高是一明顯的共通現象，然而這個效應並非由源於香菸煙霧本身組成直接造成的，因為本研究室之前試驗發現：在無細胞系統(cell-free system)，香菸煙霧水提取並不會明顯造成在蛋白質及DNA的傷害，但在細胞系統則明顯且快速的造成蛋白質的氧化羰基化(carbonylation)及DNA鏈斷傷害(Chen et al., 2004; Lin et al., 2009)。這些發現間接說明，香菸煙霧在細胞所造成的氧化壓力增加，可能是經由 (1)降低細胞內總體抗氧化能力，如抑制抗氧化酵素活性及清除抗氧化劑，先前研究已指出香菸煙霧水提取物具有強烈耗盡細胞內抗氧化分子-穀胱甘肽(glutathione)的作用(Müller & Gebel, 1998)。(2)刺激活性氧物種(reactive oxygen species/ROS)釋放，如刺激細胞膜NADPH oxidase 產生超氧陰離子(superoxide anion/O<sub>2</sub><sup>-</sup>)或藉攻擊粒線體(mitochondria)使活性氧物種洩漏(Hara et al., 2013; Asano et al., 2012; Jaimes et al., 2004)。除細胞內重要物質DNA及蛋白質的傷害之外，香菸煙霧水提取物也明顯造成多種哺乳動物細胞中基因表現圖譜的改變，增加發炎相關基因之表現，如ICAM-1, E-selectin 及IL-8 (Chen et al., 2009; Wang et al., 2000)。本研究室更進一步的結果發現：香菸煙霧水提取物明顯且快速的造成人類血管內皮細胞微絲骨架的重組，並且導致細胞皺縮變圓，而且此細胞內微絲骨架(filamentous actin)重組(reorganization)在香菸煙霧水提取物誘導ICAM-1表現上，似乎扮演重要的訊息角色(Chen et al., 2009)。最近本研究室結果進一步發現：香菸煙霧水提取可明顯造成人類血管內皮細胞內鈣離子濃度升高，而且這個現象，可分別被細胞內及細胞外鈣離子螯合劑(EGTA及BTPA-AM)、細胞膜鈣離子通道抑制劑(MRS1845)、蛋白激酶C(protein kinase C/PKC)抑制劑(GF109203X)、磷脂酶C(phospholipase C/PLC)抑制劑U73122及IP3R (inositol-1,4,5-trisphosphate receptor)拮抗劑Xestospongin C所抑制(Lin et al., 2015)。綜合這些數據我們提出下列的工作假說(圖七)，解釋香菸煙霧



水提取物如何在人類血管內皮細胞造成細胞內鈣離子濃度增加，以及微絲骨架重組為基礎的細胞外形皺縮：(1)香菸煙霧水提取物活化磷脂酶C，使PIP2 轉變成IP3 及DAG，(2)IP3 活化內質網(endoplasmic reticulum membrane)上之IP3R 造成Ca<sup>2+</sup>釋放至細胞質，(3)胞內釋放Ca<sup>2+</sup>離子活化鈣調素(calmodulin)及PKC，(4)細胞膜上TRPC通道活化開啟，造成大量細胞外Ca<sup>2+</sup>流入，細胞內微絲骨架重組。進一步證實此一假說，找出上述各個重要步驟的銜接分子，並且對菸害防治能提出實際的建議策略及相關產品為本研究之目標。

## 研究目的

建立香菸煙霧水提取物如何造成人類血管內皮細胞微絲骨架重組及細胞內鈣離子濃度增加的分子控制機轉，並尋求菸害防治可能之策略並研發其相關保健產品。

## 文獻探討

抽菸對多種慢性病的形成具有高風險性，這些疾病包含脂肪在動脈的建立、癌症及慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease)，動脈粥狀硬化症(Atherosclerosis)是抽菸死亡人口中最主要的貢獻者。抽菸如何造成的動脈粥狀硬化症的機制複雜，比較受到注意的因素包括：(1)血管氧化傷害及發炎 Barua et al., 2015; Messner & Bernhard, 2014)，嚴重的血管發炎及氧化傷害將造成細胞與細胞間的接合點(junction)產生鬆脫(Gagat et al., 2014)，使得血管內皮的壁壘完整性(barrier integrity)喪失，造成血管通透性增加，讓體液、溶質及細胞往血管系統外移動，進入周圍的組織形成中風及肺水腫等致命性疾病(Chistiakov et al., 2015; Gulino-Debrac, 2013)。因此，抑制血管內皮細胞的自由基過量產生，預防血管內皮壁壘完整性喪失是維持血管系統健康的重要策略。香菸煙霧的暴露對細胞骨架及細胞-細胞間接合點的恆定維持有一定程度的負面影響性，包括破壞微管(microtubule) (Das et al., 2009)、微絲(microfilament) (Lin et al., 2015; Chen et al., 2009) 及緊密接合點(tight junction) (Schamberger et al., 2014; Olivera et al., 2009)。香菸煙霧如何造成細胞骨架重改組及接合點表現降低?依據研究發現，至少包含(1)蛋白質氧化修飾作用如羰基化(carbonylation)，以及(2)增加作用於細胞骨架之切割酵素活性，例如微絲切割蛋白 cofilin 及 gelsolin 的活性增加兩種原因。基本上，微絲切割蛋白 cofilin 及 gelsolin 的活性增加，必須透過細胞內鈣離子濃度的增加，

因為 cofilin 及 gelsolin 均是  $\text{Ca}^{2+}$ -依賴型酵素。過去研究發現香菸煙霧暴露，造成人類支氣管初代上皮細胞中磷酸化態 cofilin 大量減少(Zhang et al., 2013); 在人類血管內皮細胞則發現，香菸煙霧暴露明顯增加細胞內鈣離子濃度(Lin et al., 2015; Cordazzo et al., 2014)。綜合上述研究發現，歸納出下列幾點結論：香菸煙霧在人類血管內皮細胞極可能透過細胞內  $\text{Ca}^{2+}$  濃度增加、細胞骨架代動態恆定調節蛋白質，干擾內皮細胞之障壁完整性，最終造成血管系統的發炎及相關病變，然而，這些相關效應彼此間的作用細節與銜接仍需進一步釐清。

## 研究方法

### 香菸煙霧水提取物的製備

本實驗所用的香菸來源為市售的紅色 Marlboro 香菸，香菸所含的焦油含量為 12 mg，尼古丁的含量為 0.9 mg，抽取方式參考(Su et al., 1998) 和 (Chen et al., 2004)。抽取的方式是先將 PBS 於水浴槽中加熱至  $37^{\circ}\text{C}$  後，在特製的玻璃管中加入 15 ml PBS，並且使用抽氣幫浦將香菸的煙霧抽進 PBS 中，每次抽取三隻菸，每隻香菸在抽取前會在菸身上每一公分劃一記，共畫五公分，以一公分抽一分鐘為抽取速度，所得溶液在用  $0.22\ \mu\text{m}$  filter 過濾，所得之溶液為香菸煙霧水提取物之原液，濃度訂為 100%。

### 細胞培養

EA.hy926 細胞是人類內皮細胞與纖維母細胞融合的細胞株，培養於含有 10% FBS、1% Penicillin-Streptomycin 的 DMEM 培養液中，培養於  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的細胞培養箱。滿盤時，先用 PBS 將死亡細胞移除，以 0.05% 胰蛋白酶/0.53 mM EDTA 溶液將細胞和培養皿分離，加入新的培養液混合後取出 1~2 ml 回種於 25-T 或 75-T 的培養瓶中，每隔 2~3 天進行一次繼代培養。

### 全細胞溶解物製備

EA.hy926 細胞以  $7 \times 10^5$  cells 種於直徑 10 公分培養皿中，隔天加入不同的 CSE 濃度 (2.5%、5%) 處理 24 小時。移除上清液，以 PBS 清洗兩次後，加入 80  $\mu\text{l}$  cell lysis buffer 將細胞刮下，所得細胞液裝入 1.5 ml 離心管中，以微量吸管打散細胞液，再用最高振動數度 vortex 10 秒，置於冰上 10 分鐘，之後在  $4^{\circ}\text{C}$  以 14,000 rpm 離心 20 分鐘，收集上清液，利用 coomassie plus protein assay reagent kit 測定蛋白質濃度，以 BSA 配置標準濃度。

### 西方轉漬分析

蛋白質 SDS-PAGE 電泳完成後，裁剪比膠片大的 PVDF 膜，將其置於 100% 甲醇搖晃幾秒，再將海綿、濾紙、PVDF 膜及膠片浸泡於轉漬緩衝液 (80% 25 mM

Tris / 192 mM glycine 及 20% methanol 溶液), 依序將海綿、濾紙、PVDF 膜及膠片由負極至正極依序放在轉漬板上, 並將氣泡趕出, 置入裝有轉漬緩衝液的電泳槽中, 於 4°C 下進行轉漬, 100 伏特, 65 分鐘。完成轉漬後, 將 PVDF 膜取出, 置於 5% 脫脂牛奶 (溶於含有 0.05% Tween 20 的 TBST), 於室溫下進行 blocking 1 小時, 之後以一級 anti-cofilin、anti-p-cofilin、anti-filamin A、anti-p-filamin A、anti-ICAM-1 或 anti-actin 抗體在 4°C 冰箱中反應隔夜, 進行特定蛋白質之表現測量, 以 TBST 清洗 3 次, 每次 5 分鐘, 加入二抗 HRP 耦合的二級抗體 (1:3000, 於 5% 脫脂牛奶), 在室溫作用 1 小時, 再以 TBST 清洗 3 次, 每次 5 分鐘, 再以 TBS 清洗 2 次, 每次 5 分鐘, 之後以冷光數位分析系統 (GE, LAS-4000 mini) 擷取影像。以 AlphaEaseFC 軟體進行影像定量。

### **細胞骨架螢光染色**

將 EA.hy926 以  $4 \times 10^4$  cells/well 種於 4-well Chamber Glass Slide, 培養二十四小時, 可依造不同條件進行處理, 等處理程序完成後, 先以 PBS 進行清洗兩次, 再以 3.75% Formaldehyde 固定細胞十分鐘後, 接著使用 0.5% Triton X-100 進行穿孔十分鐘, 再來加入 1% BSA 並放在 Shake 上進行 blocking 一小時, 加入 1U Rhodamun-labeled Phalloidin 避光處理, 同樣也是放在 Shake 上四十分鐘, 以 PBS 清洗兩次, 最後拆除架子並且滴上 Fluorescent Mounting Medium, 蓋上玻片於螢光顯微鏡下進行觀察, 使用 ImageJ 和 PhotoImpact X3 進行定量分析。

### **細胞內鈣離子濃度測定**

將人類臍靜脈內皮細胞以  $5 \times 10^4$  cells /well 種於 4 wells chamber slide 中, 置於培養箱中培養, 隔天加入 5% CSE 處理 8 小時, 以 PBS 清洗一次後, 加入 2 M Fluo-3 AM (溶於培養基) 置於培養箱中培養 30 分鐘, 以 PBS 清洗一次後, 給予培養基置於培養箱 30 分鐘恢復, 以 PBS 清洗一次後封片, 蓋上蓋玻片, 以正立螢光顯微鏡 (ZEISS, AXioskop2) 觀察。以 ImageJ 進行影像分析。

### **結果與討論 (含結論與建議)**

香菸煙霧水提取物(CSE)處理人類血管內皮細(EA.hy926)胞造成細胞內鈣離子濃度明顯上升, 增加的趨勢有很好的劑量依賴性(圖一), 其實 CSE 處理 EA.hy926 細胞, 大約在 10 分鐘就能造成細胞內  $\text{Ca}^{2+}$  濃度的明顯增加(數據未呈現), 此一效果算是 CSE 處理早期的反應。除  $\text{Ca}^{2+}$  濃度增加之外, CSE 處理也造成 EA.hy926 細胞中 ROS 產生量, 隨處理濃度增加而明顯上升(圖二)。1% CSE 處理 30 分鐘, 細胞內 ROS 增加約為控制組的 3.8 倍, 2.5% CSE 約為 6.2 倍, 5% CSE 約為 14.2 倍。另外, CSE 處理也導致細胞黏附因子 ICAM-1 蛋白的表現量增加, 反應時間上, 4 小時處理即出現明顯增加表現的情形, 表現量隨處理時間延長而更形增

加，表現量在 24 小時處理達到最大，平均增加量約為控制組的 3 倍(圖三)。CSE 處理對 EA.hy926 細胞外部型態也造成明顯的改變，隨處理劑量的增加，細胞外形由伸展不規則轉變成為皺縮圓化的外形(圖四)，在時間上，若以高濃度 10% CSE 處理細胞，大約在 1 小時即引發細胞外形明顯的皺縮圓化現象(數據未呈現)，綜合上述研究結果，小結論 CSE 處理血管內皮細胞，依時間序發生：細胞  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上升及 ROS 增加之早期反應，細胞微絲骨架重組及外形皺縮圓化之中期反應，以及細胞黏附因子 ICAM-1 蛋白表現增加的晚期反應。

進一步探討 CSE 如何造成 EA.hy926 細胞中鈣離子濃度的增加，利用細胞內鈣離子螯合劑 BAPTA-AM 與 CSE 共同處理，發現螯合細胞內鈣離子明顯降低 CSE 處理所造成的鈣離子濃度上升，此數據說明胞器鈣離子釋放作用，在 CSE 所造成的細胞內鈣離子濃度增加上扮演關鍵性角色，除細胞鈣離子外，利用選擇性抗體去活性細胞膜上 TRPC1 鈣離子通道，也可以完全有效降低 CSE 在 EA.hy926 細胞造成的鈣離子濃度增加(圖五)，這個結果進一步說明，源自細胞外及胞器內鈣離子庫存均參與 CSE 在 EA.hy926 細胞所造成的鈣離子濃度增加事件。測量 CSE 處理對細胞 TRPC1 蛋白質表現量及分佈之影響，發現 CSE 處理，明顯造成細胞 TRPC1 蛋白質小幅度的表現增加，5% CSE 處理約增加 50% 的 TRPC1，在分佈上 TRPC1 在高濃度 5% CSE 處理下，有明顯集中於細胞膜的現象(圖六)。PLC 抑制劑(U73122)、PKC 抑制劑(GF109203X)或 IP3R 抑制劑(Xestopongin C)與 CSE 的共同處理也都明顯降低細胞內鈣離子上升的幅度，在抑制能力上，由高至低為 PLC 抑制劑>PKC 抑制劑>>IP3R 抑制劑(數據未呈現)。根據上述結果，CSE 造成 EA.hy926 細胞中鈣離子濃度增加的可能路徑為：(1) CSE 活化 PLC 代謝 PIP2 (phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate)產生 IP3 及 DAG (diacylglycerol)，(2) IP3 刺激 IP3R 致使內質網釋放出鈣離子，(3) 鈣離子 and/or DAG 活化 PKC，進而開啟細胞膜上 TRPC1 鈣離子通道。

細胞內鈣離子濃度增加，極可能活化鈣離子依賴之細胞微絲骨架切割蛋白質及轉錄因子，這些分子包括 cofilin、gelsolin 及 NFATc1 等。首先了解 CSE 處理是否影響 actin 的總量，而造成細胞外部形態的皺縮圓化現象，利用免疫西方轉漬法測量，發現 1% - 4% CSE 處理 4 小時或 8 小時，對 EA.hy926 細胞 actin 總量並無明顯影響(圖七)。分析細胞 cofilin 蛋白質的表現量及磷酸化狀態與 CSE 處理間關係，發現 5% CSE 處理 1 小時，cofilin 的蛋白質表現量及磷酸化態程度，均隨處理濃度增加而增加；8 小時處理，磷酸化態 cofilin 仍呈現隨 CSE 處

理增加而增加趨勢，但 cofilin 蛋白質的表現無明顯增加的情形(圖八)，此結果目前雖無法直接解釋 CSE 造成之細胞外形皺縮圓化，但說明 CSE 的確造成 cofilin(活性態)與 P-cofilin (磷酸化態/非活性態)間的平衡改變，與細胞外部形態的皺縮圓化改變是符合一致的，利用 LIMK 抑制封鎖 cofilin 磷酸化的形成，將有助於了解 cofilin 磷酸化與非磷酸在 CSE 造成細胞皺縮圓化的角色。外一個與微絲骨架調節關係密切的蛋白質 Filamin A，CSE 處理對此蛋白質的表現量無明顯影響(圖九)，但對磷酸化態-Filamin A 的表現量則有明顯影響，在 5% CSE 處理 24 小時下，磷酸化態-Filamin A 的表現量約為控制組的 2.5 倍(圖十)。利用免疫螢光顯微鏡觀察 Filamin A 在細胞中的分佈，發現 Filamin 的分佈發生因 CSE 處理濃度增加而差異性集中於細胞質某處的情形(圖十一)。最近的研究論文指出 Filamin A 透過連結整合微絲骨架與胞飲小泡(caveolae)穩定此微小環境，當 Filamin A 發生磷酸化時，將降低該蛋白質與微絲骨架的連接，進而降低維持胞飲小泡的穩定與排列特性，因此，Filamin 蛋白質的磷酸化-去磷酸化作用對維持胞飲小泡正常功能是非常重要的(Muriel et al., 2011)。非常值得注意的一點：本研究中與 CSE 處理誘發 EA.hy926 細胞鈣離子濃度增加及微絲骨架重組重要的參與蛋白質，幾乎都可以和 PIP2 形成連接，例如 TRPC1、Filamin 及 Cofilin 等蛋白質，這個現象凸顯 CSE 處理透過活化 PLC (phospholipase C)降解代謝 PIP2 分子，極有可能是後續導致細胞內鈣離子濃度增加，以及微絲骨架重組的基本因素，然而 CSE 處理如何活化 PLC 仍不清處，透過 CSE 組成中具許多具有高反應活性的醛類分子(van der Toorn et al., 2013)，共價結合 RTK 造成 PLC 活性是一可能途徑(Pizzimenti et al., 2013)。

最後，利用抗氧化劑與 CSE 合併處理，驗證 ROS 在 CSE 誘發 EA.hy926 細胞鈣離子濃度增加與微絲骨架重組之外形改變，結果發現在製備香菸煙霧水提取物時，將煙霧通過內含不同濃度 glutathione (GSH)膠體的水提取物製備，其誘發 EA.hy926 細胞 ROS 增加的程度大幅減低(圖十二)，GSH 在細胞中的濃度高，也是細胞中重要的一線抗氧化劑，香菸煙霧的暴露明顯造成細胞內 GSH 的耗盡(Gould et al., 2015)，這也是香菸煙霧暴露造成細胞內 ROS 增加主要的原因。由 GSH 降低 CSE 增加 ROS 活性衡量，CSE 組成中具誘發 ROS 增加的分子是可以與 GSH 發生鍵結而失去活性，這些成分猜測有可能是活性高的醛類，因為 GSH 本身是一極佳的醛類吸收劑。另外，以 quercetin 與 CSE 共同處理，也發現 CSE 在 EA.hy926 細胞造成的 ICAM-1 蛋白質表現量明顯降低(圖十三)，因

quercetin 可扮演 PI3K 及 NADPH oxidase 的抑制。這些結果顯示 ROS 增加在 CSE 毒性上扮演重要角色，利用適當的抗氧化劑防治香菸毒害，也是一極具潛能的策略與建議。綜合以上所有發現及其他研究結果，CSE 造成 ROS 及鈣離子濃度增加，以及後續誘發微絲骨架重組的細胞外形皺縮圓化、ICAM-1 黏附因子增加表現，可能運作的分子路徑如圖十四。

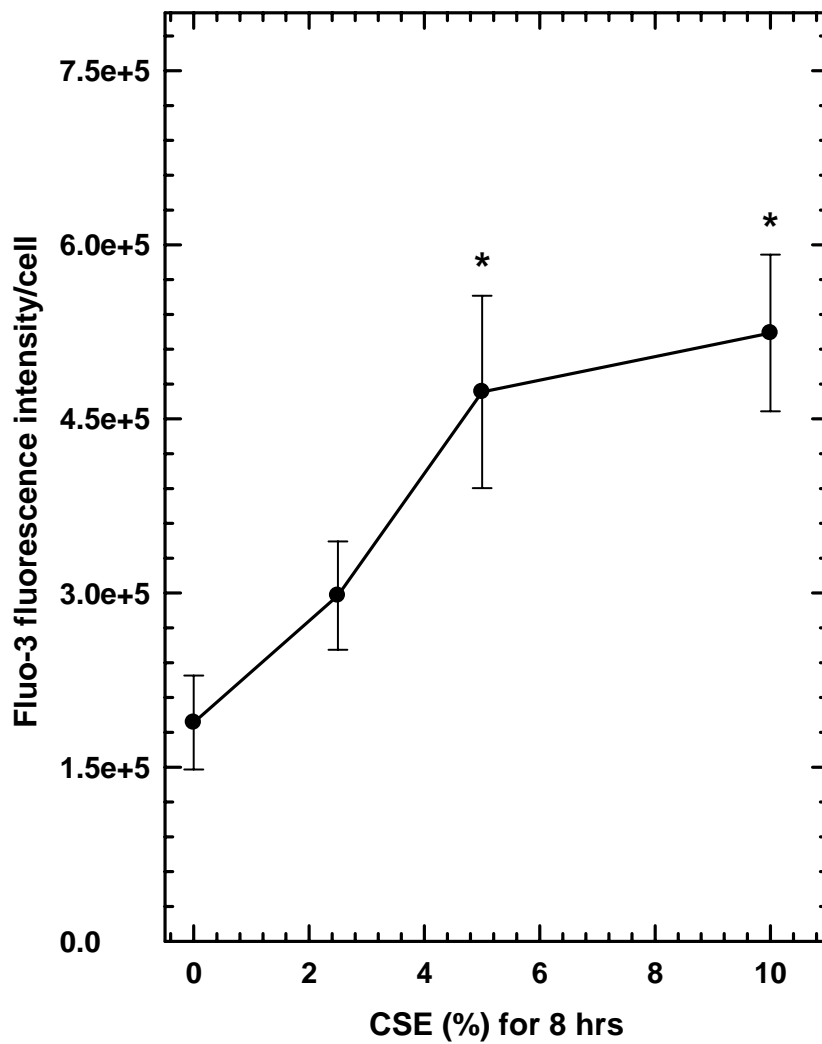
## 參考文獻

1. André E, Campi B, Materazzi S, Trevisani M, Amadesi S, Massi D, Creminon C, Vaksman N, Nassini R, Civelli M, Baraldi PG, Poole DP, Bunnett NW, Geppetti P, Patacchini R. Cigarette smoke-induced neurogenic inflammation is mediated by alpha,beta-unsaturated aldehydes and the TRPA1 receptor in rodents. *J Clin Invest.* 2008 Jul;118(7):2574-82.
2. Barua RS, Sharma M, Dileepan KN. Cigarette Smoke Amplifies Inflammatory Response and Atherosclerosis Progression Through Activation of the H1R-TLR2/4-COX2 Axis. *Front Immunol.* 2015 Nov 9;6:572.
3. Bernhard D, Csordas A, Henderson B, Rossmann A, Kind M, Wick G. Cigarette smoke metal-catalyzed protein oxidation leads to vascular endothelial cell contraction by depolymerization of microtubules. *FASEB J.* 2005 Jul;19(9):1096-107.
4. Chen HW, Lii CK, Ku HJ, Wang TS. Cigarette smoke extract induces expression of cell adhesion molecules in HUVEC via actin filament reorganization. *Environ Mol Mutagen.* 2009 Mar;50(2):96-104.
5. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Endothelial Barrier and Its Abnormalities in Cardiovascular Disease. *Front Physiol.* 2015 Dec 9;6:365.
6. Cordazzo C, Petrini S, Neri T, Lombardi S, Carmazzi Y, Pedrinelli R, Paggiaro P, Celi A. Rapid shedding of proinflammatory microparticles by human mononuclear cells exposed to cigarette smoke is dependent on Ca<sup>2+</sup> mobilization. *Inflamm Res.* 2014 Jul;63(7):539-47.
7. Das A, Bhattacharya A, Chakrabarti G. Cigarette smoke extract induces disruption of structure and function of tubulin-microtubule in lung epithelium cells and in vitro. *Chem Res Toxicol.* 2009 Mar 16;22(3):446-59.
8. Gagat M, Grzanka D, Izdebska M, Sroka WD, Marszał MP, Grzanka A. Tropomyosin-1 protects endothelial cell-cell junctions against cigarette smoke extract through F-actin stabilization in EA.hy926 cell line. *Acta Histochem.* 2014 May;116(4):606-18.
9. Gould NS, Min E, Huang J, Chu HW, Good J, Martin RJ, Day BJ. Glutathione Depletion Accelerates Cigarette Smoke-Induced Inflammation and Airspace

- Enlargement. *Toxicol Sci.* 2015 Oct;147(2):466-74.
10. Gulino-Debrac D. Mechanotransduction at the basis of endothelial barrier function. *Tissue Barriers.* 2013 Apr 1;1(2):e24180.
  11. Huang C, Wang JJ, Jing G, Li J, Jin C, Yu Q, Falkowski MW, Zhang SX. Erp29 Attenuates Cigarette Smoke Extract-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Mitigates Tight Junction Damage in Retinal Pigment Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015 Oct;56(11):6196-207.
  12. Jennings PC, Merriman JA, Beckett EL, Hansbro PM, Jones KT. Increased zona pellucida thickness and meiotic spindle disruption in oocytes from cigarette smoking mice. *Hum Reprod.* 2011 Apr;26(4):878-84.
  13. Jha A, Sharma P, Anaparti V, Ryu MH, Halayko AJ. A role for transient receptor potential ankyrin 1 cation channel (TRPA1) in airway hyper-responsiveness? *Can J Physiol Pharmacol.* 2015 Mar;93(3):171-6.
  14. Lin BH, Tsai MH, Lii CK, Wang TS. IP3 and calcium signaling involved in the reorganization of the actin cytoskeleton and cell rounding induced by cigarette smoke extract in human endothelial cells. *Environ Toxicol.* 2015 Mar 10. doi: 10.1002/tox.22133. [Epub ahead of print]
  15. Lin BH, Tsai MH, Lii CK, Wang TS. IP3 and calcium signaling involved in the reorganization of the actin cytoskeleton and cell rounding induced by cigarette smoke extract in human endothelial cells. *Environ Toxicol.* 2015 Mar 10. doi:10.1002/tox.22133.
  16. Messner B, Bernhard D. Smoking and cardiovascular disease: mechanisms of endothelial dysfunction and early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Mar;34(3):509-15.
  17. Muriel O, Echarri A, Hellriegel C, Pavón DM, Beccari L, Del Pozo MA. Phosphorylated filamin A regulates actin-linked caveolae dynamics. *J Cell Sci.* 2011 Aug 15;124(Pt 16):2763-76.
  18. Olivera D, Knall C, Boggs S, Seagrave J. Cytoskeletal modulation and tyrosine phosphorylation of tight junction proteins are associated with mainstream cigarette smoke-induced permeability of airway epithelium. *Exp Toxicol Pathol.* 2010 Mar;62(2):133-43.

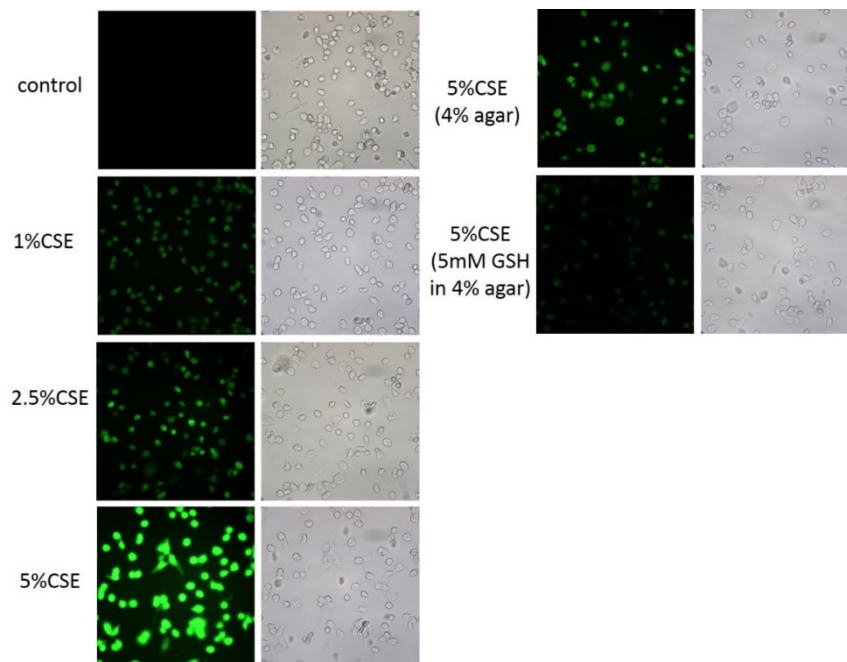


19. Pizzimenti S, Ciamporcero E, Daga M, Pettazzoni P, Arcaro A, Cetrangolo G, Minelli R, Dianzani C, Lepore A, Gentile F, Barrera G. Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. *Front Physiol.* 2013 Sep 4;4:242.
20. Poggi P, Rota MT, Boratto R. The volatile fraction of cigarette smoke induces alterations in the human gingival fibroblast cytoskeleton. *J Periodontal Res.* 2002 Jun;37(3):230-5.
21. Schamberger AC, Mise N, Jia J, Genoyer E, Yildirim AÖ, Meiners S, Eickelberg O. Cigarette smoke-induced disruption of bronchial epithelial tight junctions is prevented by transforming growth factor- $\beta$ . *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014 Jun;50(6):1040-52.
22. Schweitzer KS, Hatoum H, Brown MB, Gupta M, Justice MJ, Beteck B, Van Demark M, Gu Y, Presson RG Jr, Hubbard WC, Petrache I. Mechanisms of lung endothelial barrier disruption induced by cigarette smoke: role of oxidative stress and ceramides. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011 Dec;301(6):L836-46.
23. Tsunoda K, Tsujino I, Koshi R, Sugano N, Sato S, Asano M. Nicotine-Mediated  $\text{Ca}^{2+}$  -Influx Induces IL-8 Secretion in Oral Squamous Cell Carcinoma Cell. *J Cell Biochem.* 2015 Sep 29. doi: 10.1002/jcb.25387. [Epub ahead of print]
24. van der Toorn M, Slebos DJ, de Bruin HG, Gras R, Rezayat D, Jorge L, Sandra K, van Oosterhout AJ. Critical role of aldehydes in cigarette smoke-induced acute airway inflammation. *Respir Res.* 2013 Apr 17;14:45.
25. Zhang L, Gallup M, Zlock L, Finkbeiner WE, McNamara NA. Rac1 and Cdc42 differentially modulate cigarette smoke-induced airway cell migration through p120-catenin-dependent and -independent pathways. *Am J Pathol.* 2013 Jun;182(6):1986-95. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.02.008.

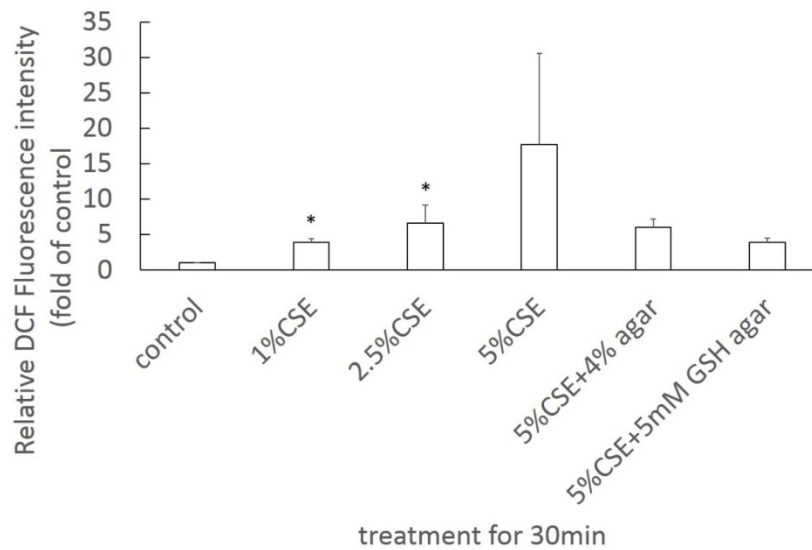


圖一、香菸煙霧水提取物對人類血管內皮細胞(EA.hy926) 鈣離子濃度的影響。細胞處理不同濃度香菸煙霧水提取物(2.5%、5%、及 10%) 8 小時，細胞內  $\text{Ca}^{2+}$  濃度以 4  $\mu\text{M}$  of Fluo-3 AM 進行染色後，利用螢光顯微鏡進行觀察並照相分析。數據為三次試驗之平均值  $\pm$  SD。

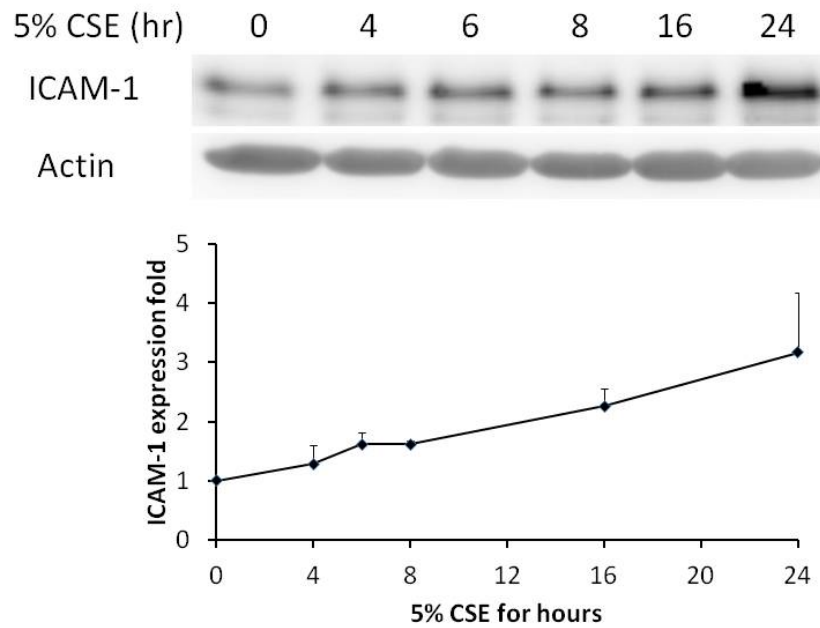
(A)



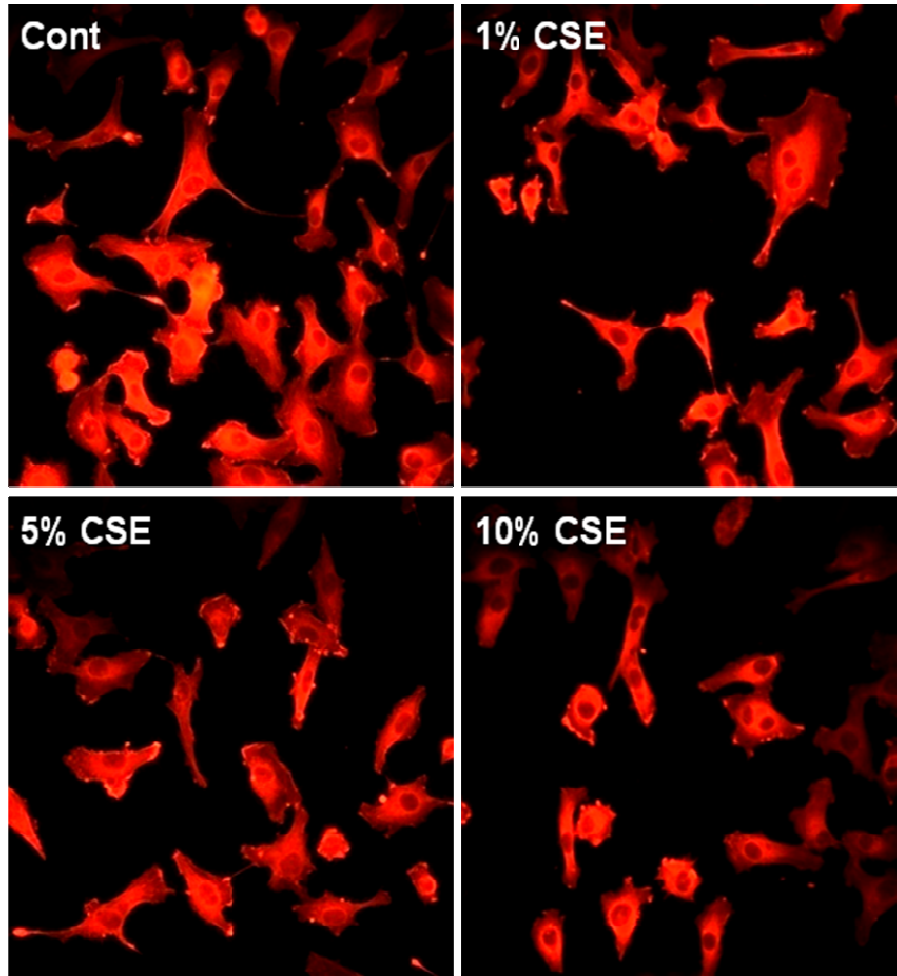
(B)



圖二、CSE 及通過不同的 agar 管柱粹取之 CSE 對人類臍靜脈類似細胞內 ROS 螢光訊號之影響。將  $5 \times 10^4$  的 EA.hy926 細胞種於 chamber slide 中至少超過 24 小時，以 1-5% CSE 及通過含有 4% agar 與含有 5mM GSH 的 4% agar 管柱粹取的 CSE 處理細胞 30 分鐘，使用 DCHF-DA 染色 30 分鐘後，再使用 PBS wash 三次後，以 Dako Fluorescent Mounting Medium 進行封片，利用正立螢光顯微鏡 (ZEISS, AXioskop2) 觀察螢光訊號。以 Image J 定量，對照組數據設為 1，計算處理組相對於對照組比值。數據為 2 次試驗平均值  $\pm$  SD。

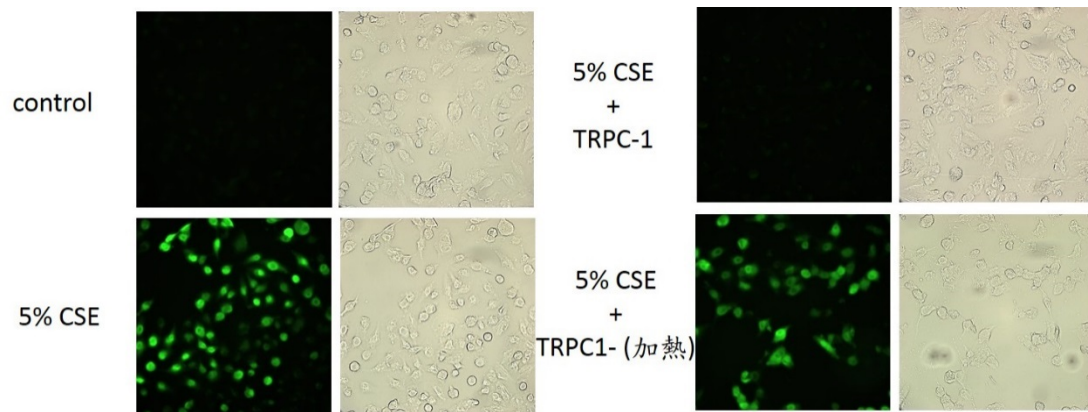


圖三、香菸煙霧水提取物對人類血管內皮細胞(EA.hy926) ICAM-1 蛋白質表現的影響。細胞處理 5%香菸煙霧水提取物不同小時數(4-24 小時)，細胞 ICAM-1 蛋白質表現量，以免疫西方轉漬法進行分析。數據為三次試驗之平均值  $\pm$  SD。

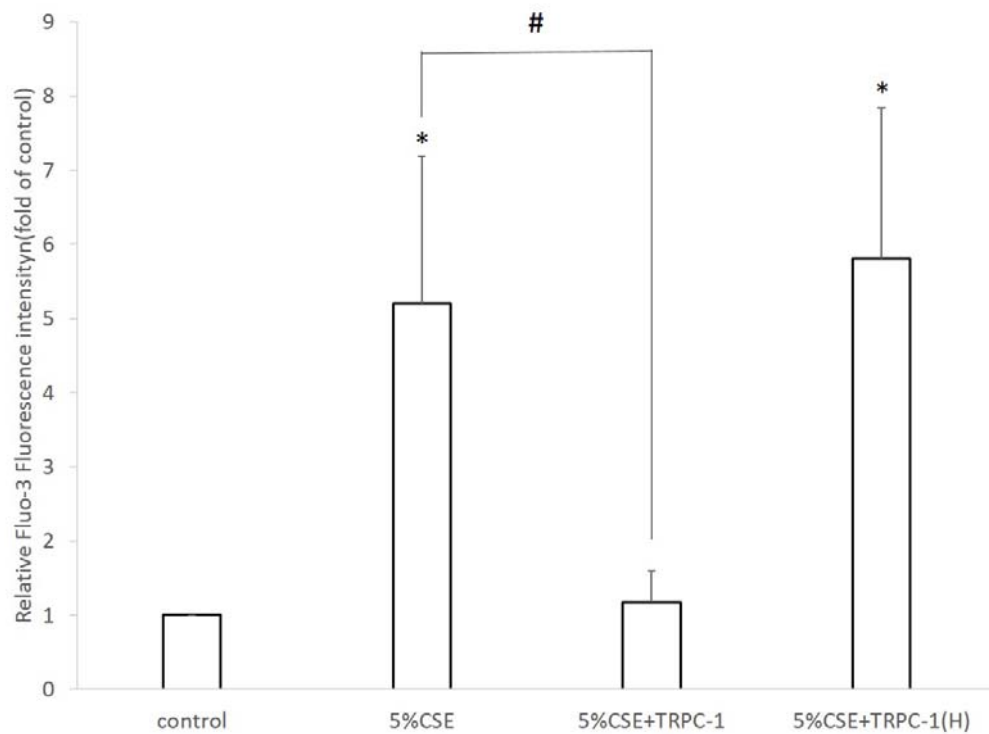


圖四、香菸煙霧水提取物對人類血管內皮細胞(EA.hy926)微絲骨架的影響。細胞處理不同濃度香菸煙霧水提取物(0%、5%及 10%) 4 小時，細胞微絲骨架的分佈以 Rhodamine-Phalloidin 進行染色後，利用螢光顯微鏡進行觀察並照相分析。

(A)

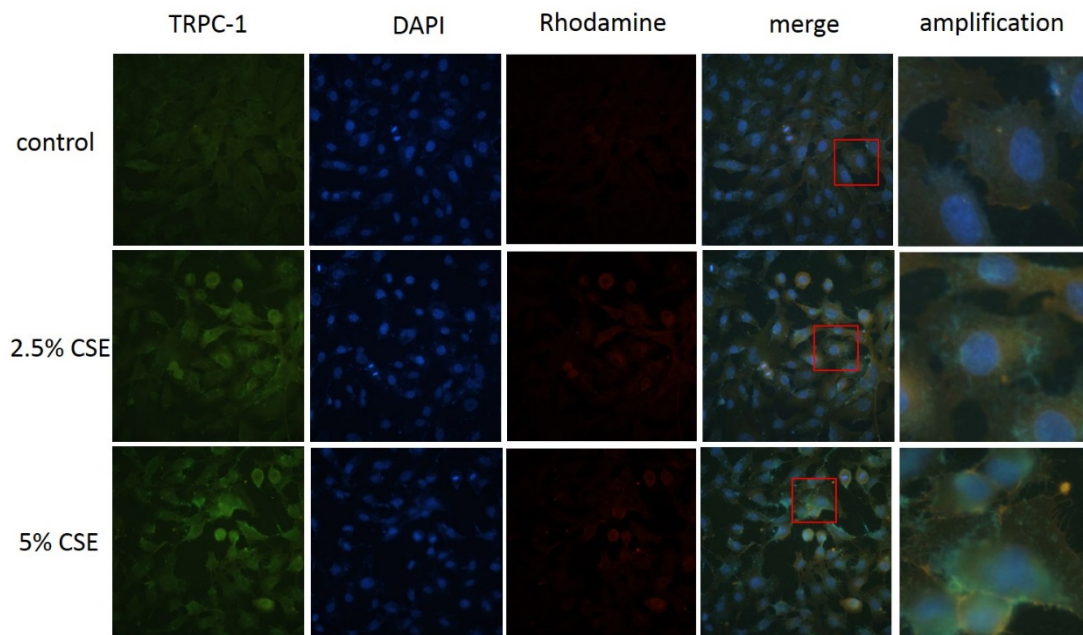


(B)

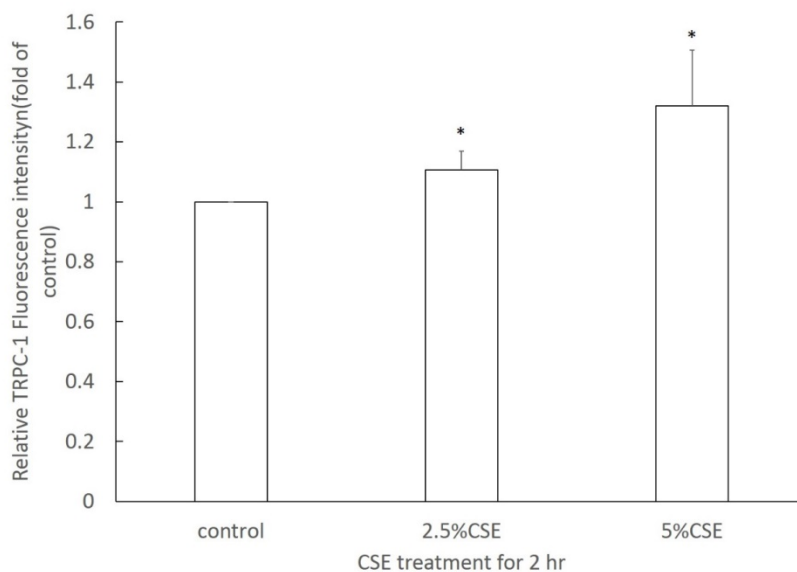


**圖五、TRPC-1 對 CSE 誘導人類臍靜脈類似細胞內 Fluo-3 表現量上升之影響。**將  $5 \times 10^4$  的 EA.hy926 細胞種於 chamber slide 中至少超過 24 小時，使用 TRPC-1 抗體及以  $100^\circ\text{C}$  加熱 10 分鐘的 TRPC-1 抗體以比例 1:100 預處理細胞 1 小時後共處理 5% CSE 2 小時，以 PBS wash 一次後加入  $2 \mu\text{M}$  Fluo-3 染色 30 分鐘後，再使用 PBS wash 一次後，以 Dako Fluorescent Mounting Medium 進行封片，利用正立螢光顯微鏡 (ZEISS, AXioskop2) 觀察螢光訊號。以 Image J 定量，對照組數據設為 1，計算處理組相對於對照組比值。數據為 2 次試驗平均值  $\pm$  SD。\*為與對照組有顯著差異，#為與 5% CSE 組有顯著差異。

(A)

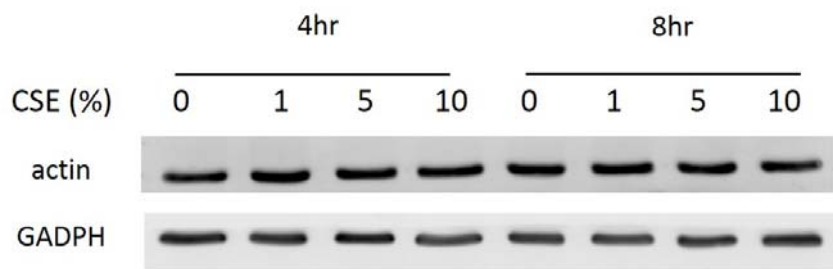


(B)

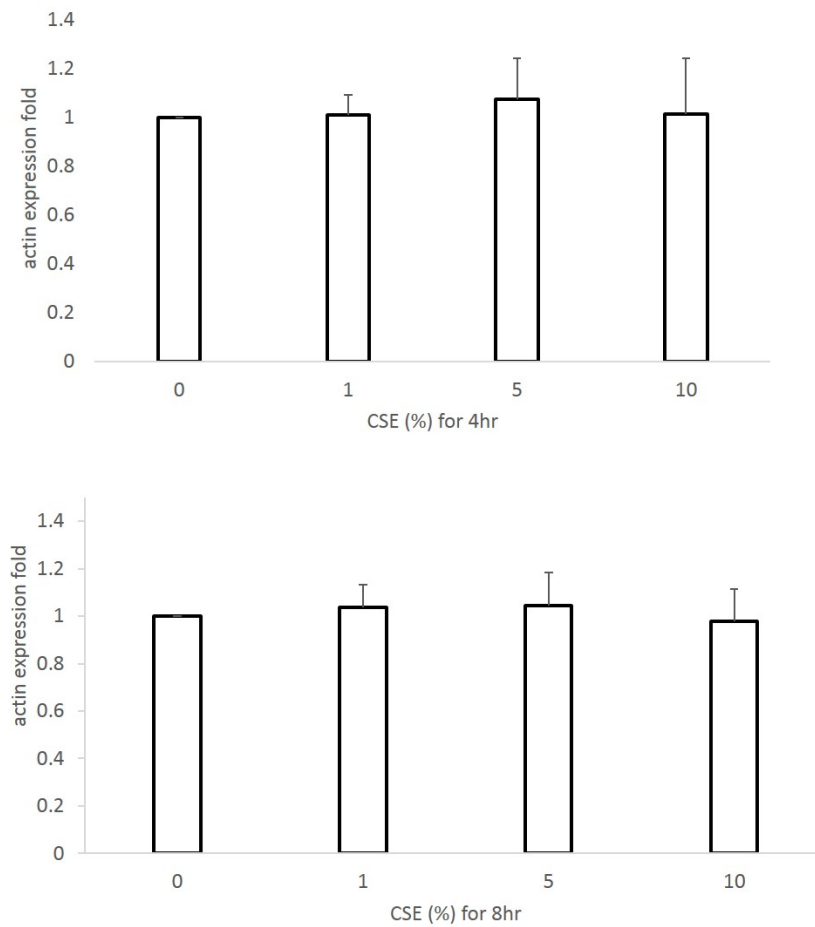


圖六、CSE 對人類臍靜脈類似細胞內 TRPC-1 蛋白質表現量及分布之影響。將  $5 \times 10^4$  的 EA.hy926 細胞種於 chamber slide 中至少超過 24 小時，2.5%及 5%處理細胞 2 小時，使用 anti-TRPC-1 比例 1:500 overnight 後，再以 anti-rabbit-FITC 比例 1:200 1 小時後，以 Dako Fluorescent Mounting Medium 進行封片，利用正立螢光顯微鏡 (ZEISS, AXioskop2) 觀察螢光訊號。以 Image J 定量，對照組數據設為 1，計算處理組相對於對照組比值。數據為 3 次試驗平均值  $\pm$  SD。

(A)

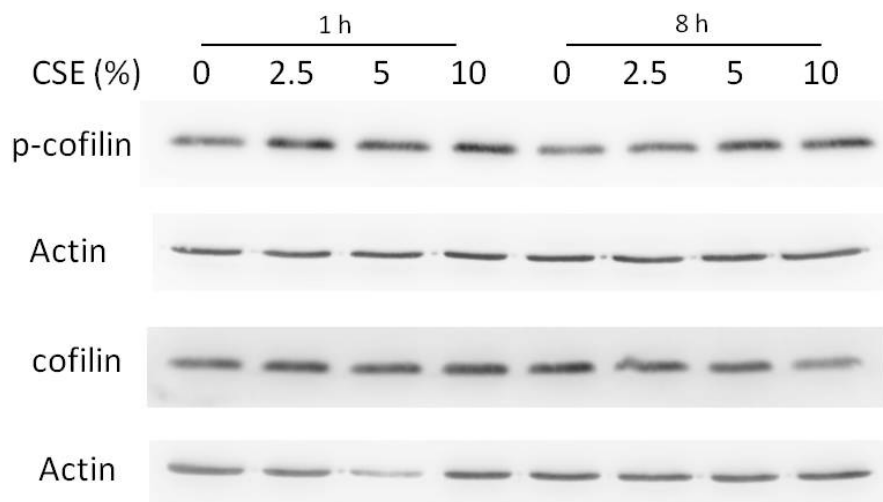


(B)



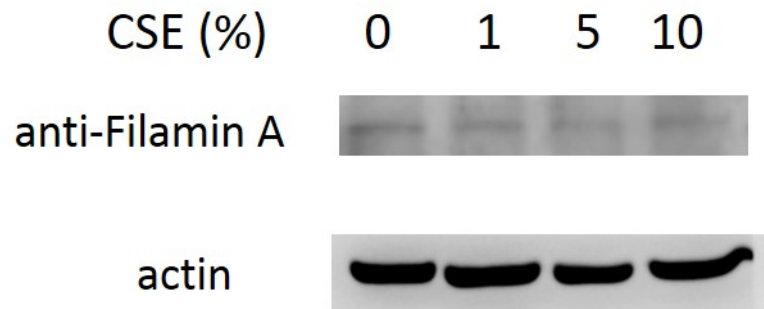
圖七、CSE 對人類臍靜脈類似細胞內 beta-actin 蛋白質表現量之影響。將 EA.hy926 細胞種於 6cm 盤中達八分滿，以 1-5% CSE 處理細胞 4 與 8 小時，收集細胞並製備總細胞溶解物，利用西方墨點法測量  $\beta$ -actin 表現量。以 AlphaEaseFC 4.0 定量，對照組數據設為 1，計算處理組相對於對照組比值。數據為 3 次試驗平均值  $\pm$  SD。



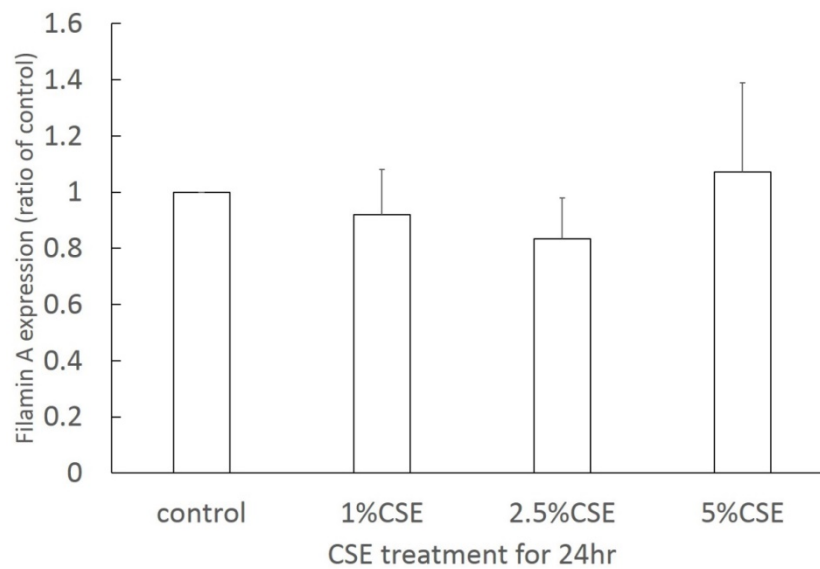


圖八、香菸煙霧水提取液對人類血管內細胞 cofilin 及 p-cofilin 表現的影響。細胞處理不同濃度 CSE (5%及 10%)1 小時或 8 小時，細胞 cofilin 及磷酸化態 cofilin (p-cofilin)蛋白質表現量以免疫西方轉漬法進行分析。

(A)

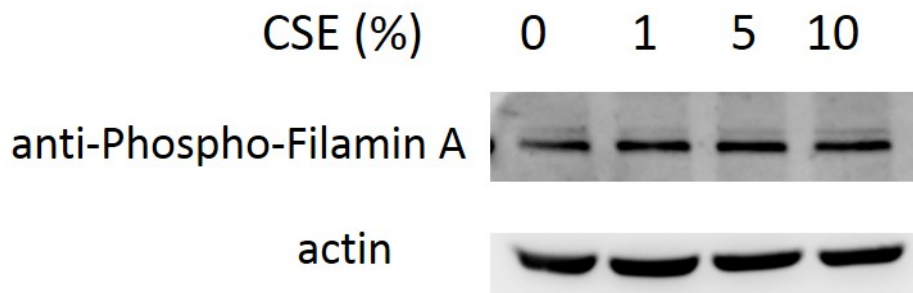


(B)

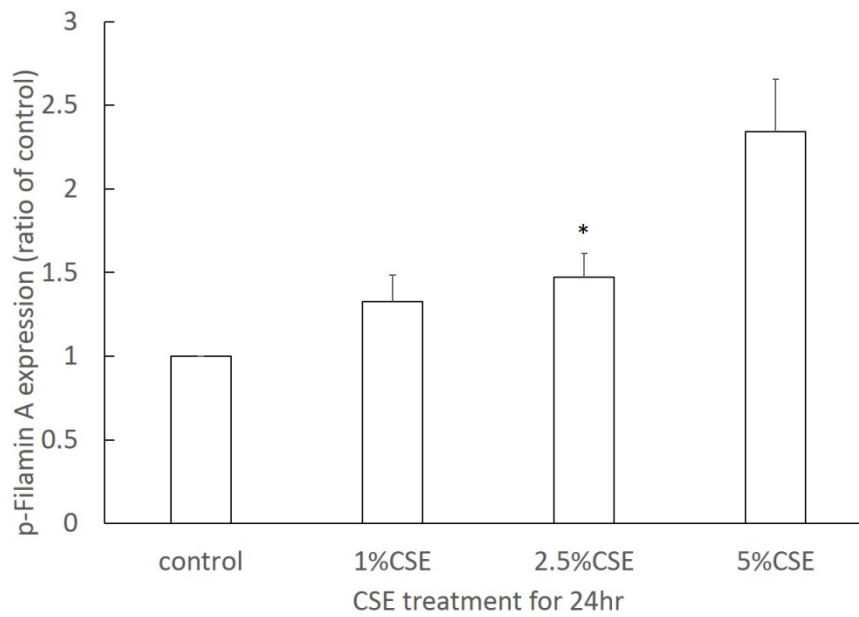


圖九、CSE 對人類臍靜脈類似細胞內 Filamin A 蛋白質表現量之影響。將 EA.hy926 細胞種於 10cm 盤中達八分滿，以 1-5% CSE 處理細胞 24 小時，收集細胞並製備總細胞溶解物，利用西方墨點法測量 Filamin A 表現量。以 AlphaEaseFC 4.0 定量，對照組數據設為 1，計算處理組相對於對照組比值。數據為 3 次試驗平均值  $\pm$  SD。

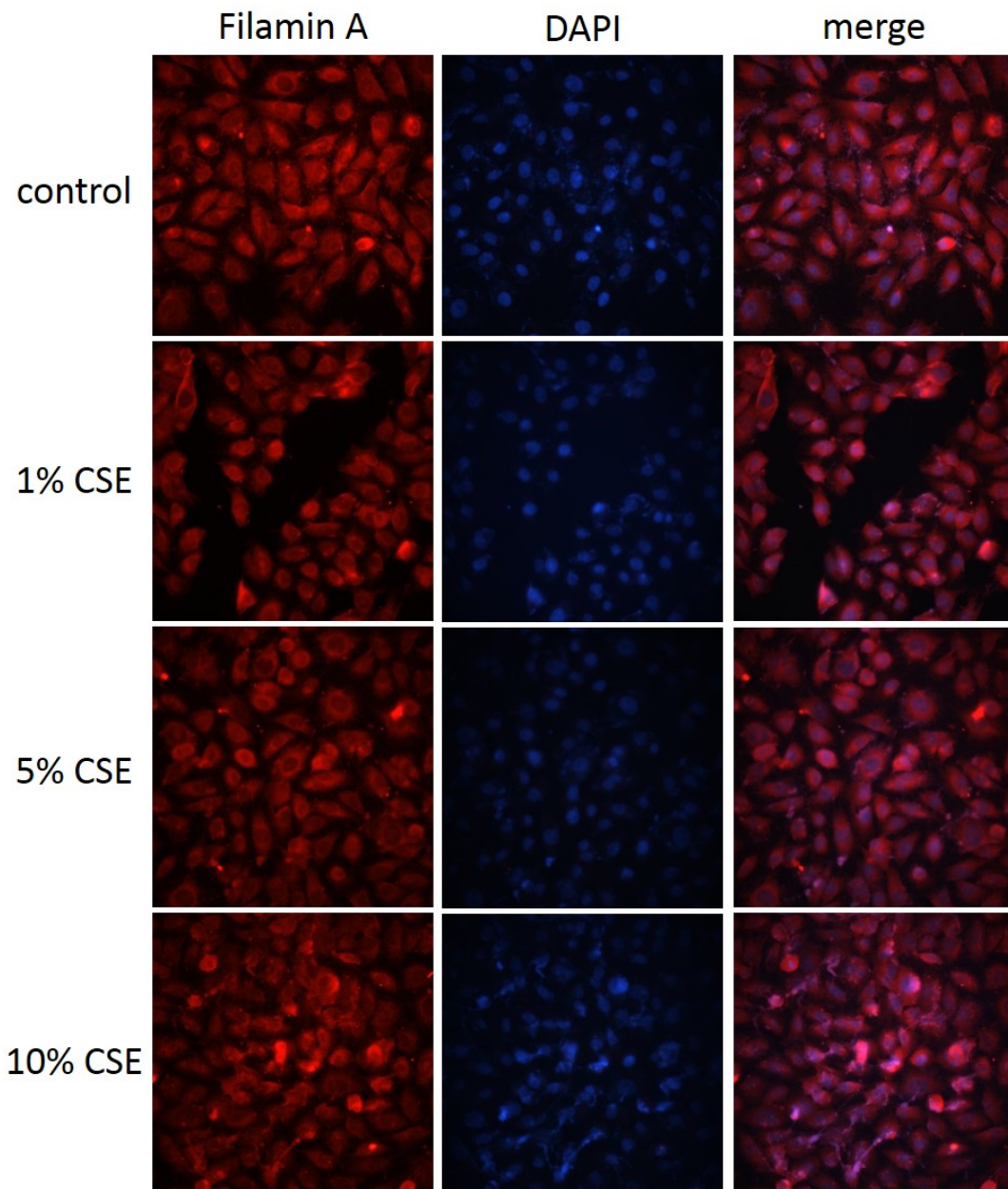
(A)



(B)

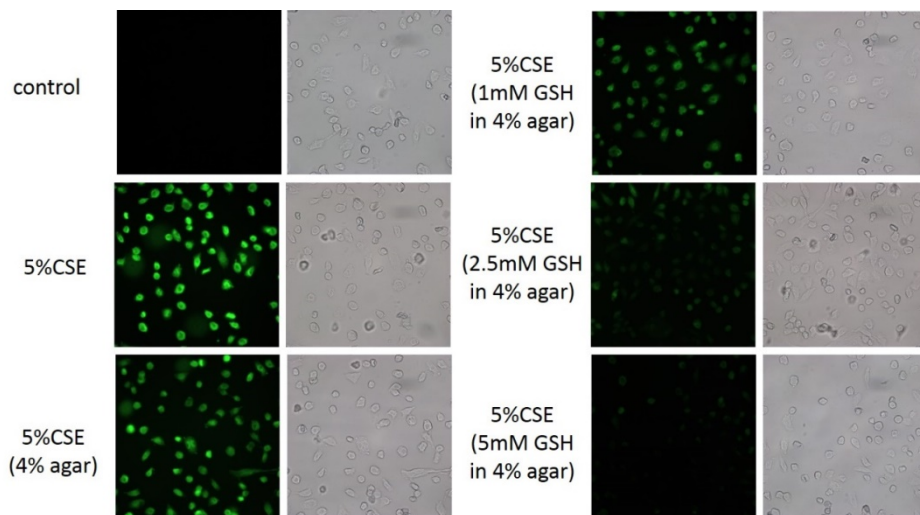


圖十、CSE 對人類臍靜脈類似細胞內 Phospho-Filamin A (Ser2151)蛋白質表現量之影響。將 EA.hy926 細胞種於 10cm 盤中達八分滿，以 1-5% CSE 處理細胞 24 小時，收集細胞並製備總細胞溶解物，利用西方墨點法測量 Phospho-Filamin A (Ser2151)表現量。以 AlphaEaseFC 4.0 定量，對照組數據設為 1，計算處理組相對於對照組比值。數據為 2 次試驗平均值  $\pm$  SD。

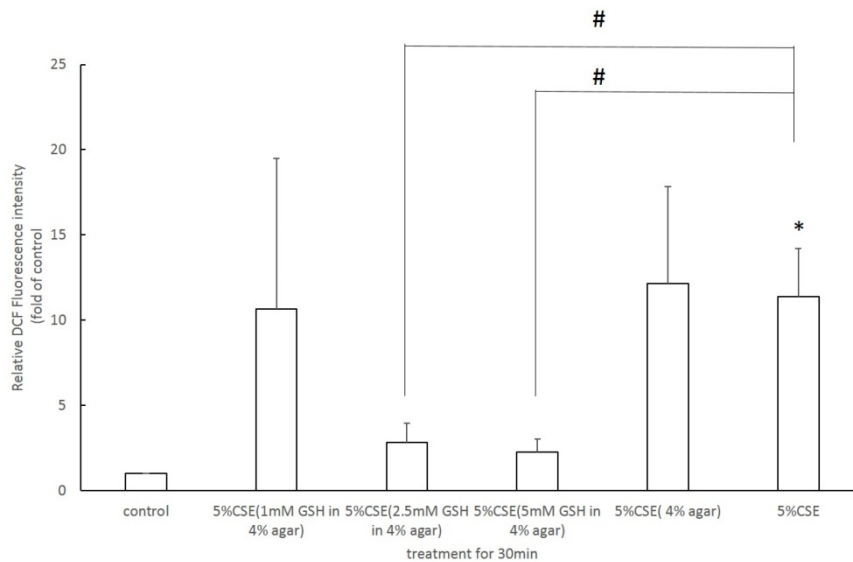


圖十一、CSE 對人類臍靜脈類似細胞內 Filamin A 蛋白質分布之影響。將  $5 \times 10^4$  的 EA.hy926 細胞種於 chamber slide 中至少超過 24 小時，1-10% CSE 處理細胞 2 小時，使用 anti-Filamin A 比例 1:300 overnight 後，再以 anti-Goat (H+L) 比例 1:500 2 小時後，以 Dako Fluorescent Mounting Medium 進行封片，利用正立螢光顯微鏡 (ZEISS, AXioskop2) 觀察螢光訊號。

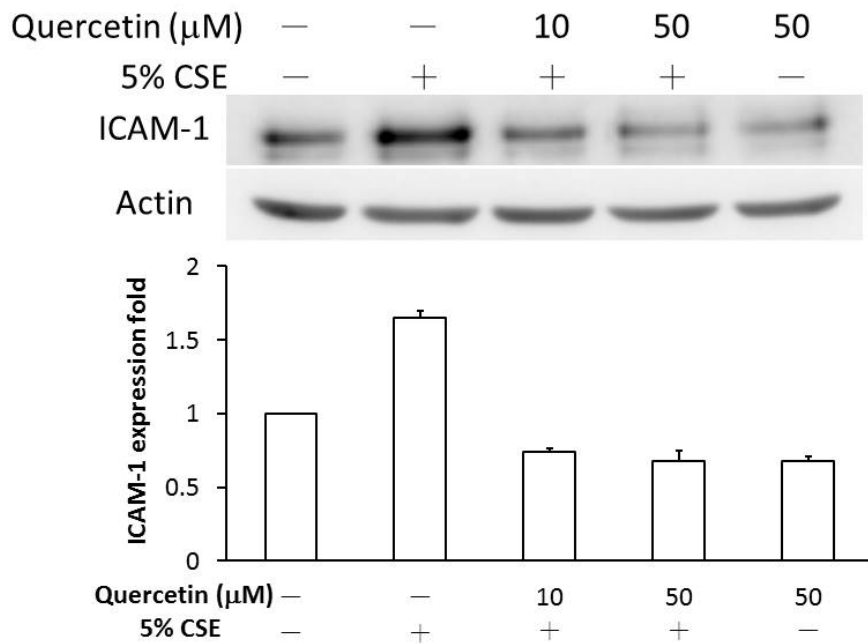
(A)



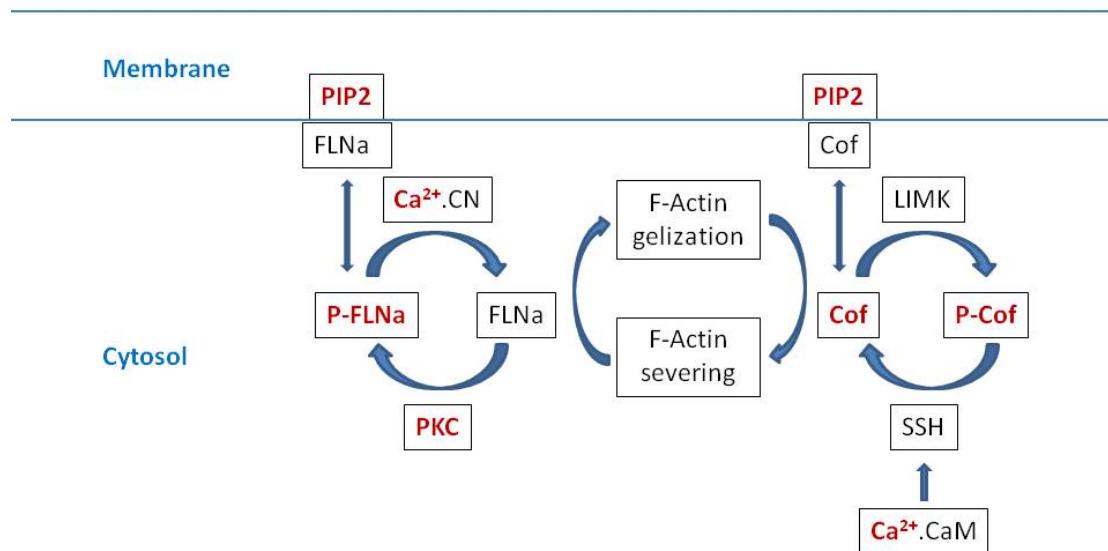
(B)



圖十二、經由含有不同 GSH 濃度的 agar 管柱粹取之 CSE 對人類臍靜脈類似細胞內 ROS 螢光訊號之影響。將  $5 \times 10^4$  的 EA.hy926 細胞種於 chamber slide 中至少超過 24 小時，以 1-5mM GSH 濃度的 agar 管柱粹取之 CSE 處理細胞 30 分鐘，使用 DCHF-DA 染色 30 分鐘後，再使用 PBS wash 三次後，以 Dako Fluorescent Mounting Medium 進行封片，利用正立螢光顯微鏡 (ZEISS, AXioskop2) 觀察螢光訊號。以 Image J 定量，對照組數據設為 1，計算處理組相對於對照組比值。數據為 2 次試驗平均值  $\pm$  SD。\* 為與對照組有顯著差異，# 為與 5% CSE 組有顯著差異。



**圖十三、Quercetin 對香菸煙霧水提取物對人類血管內皮細胞(EA.hy926) ICAM-1 蛋白質表現的影響。**細胞同時處理 5%香菸煙霧水提取物與 quercetin (10  $\mu\text{M}$  或 50  $\mu\text{M}$ ) 24 小時，細胞 ICAM-1 蛋白質表現量，以免疫西方轉漬法進行分析。數據為三次試驗之平均值  $\pm$  SD。



圖十四、香菸煙霧水提取物對人類血管內皮細胞(EA.hy926) 微絲骨架調節蛋白質作用機制。FLNa: filamin A; P-FLNa: phosphorylated filamin A; PKC: protein kinase C; Cof: cofilin; P-Cof: phosphorylated cofilin; LIMK: LIM kinase-1; SSH: Slingshot phosphatases; CN: calcineurin; CaM: calmodulin; 紅色標示為本計畫發現香菸煙霧水提取物的作用點。

# 科技部補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報告

日期：104 年 12 月 31 日

計畫編號	MOST103-2320-B-040-006-		
計畫名稱	香菸煙霧水提取物誘導細胞內鈣離子濃度增加和微絲骨架重組的分子調控：蛋白激酶 C、磷脂酶 C 及微絲動態調節蛋白質的角色		
出國人員姓名	王祖興	服務機構及職稱	中山醫學大學
會議時間	104 年 6 月 23 日 至 104 年 6 月 26 日	會議地點	韓國-濟洲島
會議名稱	(中文)第 7 屆亞洲毒理學會國際研討會 (英文) The 7 <sup>th</sup> International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX2015)		
發表題目	(中文) (英文) The effects of chronic exposure to cigarette smoke extract on zebrafish adults		

## 一、參加會議經過

**\*因六月韓國 MERS 疫情嚴重，預定航班被迫取消致未能出席該次會議，事後已簽呈貴部同意並流用經費至事務費使用。**

## 二、與會心得

## 三、發表論文全文或摘要

## 四、建議

## 五、攜回資料名稱及內容

## 六、其他



# 科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2016/01/11

科技部補助計畫	計畫名稱: 香菸煙霧水提取物誘導細胞內鈣離子濃度增加和微絲骨架重組的分子調控: 蛋白激酶C、磷脂酶C及微絲動態調節蛋白質的角色
	計畫主持人: 王祖興
	計畫編號: 103-2320-B-040-006- 學門領域: 保健營養
無研發成果推廣資料	

103年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：王祖興		計畫編號：103-2320-B-040-006-					
計畫名稱：香菸煙霧水提取物誘導細胞內鈣離子濃度增加和微絲骨架重組的分子調控：蛋白激酶C、磷脂酶C及微絲動態調節蛋白質的角色							
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	0%	篇	
		研究報告/技術報告	1	1	100%		
		研討會論文	0	0	0%		
		專書	0	0	0%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	0%	件	
		已獲得件數	0	0	0%		
	技術移轉	件數	0	0	0%	件	
		權利金	0	0	0%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	0%	人次	
		博士生	1	0	25%		
		博士後研究員	0	0	0%		
		專任助理	0	0	0%		
國外	論文著作	期刊論文	0	0	0%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	0%		
		研討會論文	0	0	0%		
		專書	0	0	0%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	0%	件	
		已獲得件數	0	0	0%		
	技術移轉	件數	0	0	0%	件	
		權利金	0	0	0%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	0%	人次	
		博士生	0	0	0%		
		博士後研究員	0	0	0%		
		專任助理	0	0	0%		
其他成果 （無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文		無					

字敘述填列。)			
	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

# 科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以100字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以500字為限）

本研究以香菸煙霧水提取物在人類血管內皮細胞的傷害為模式，了解香菸造成心血管病之可能分子機制，並找尋防治菸害安全有效的方法，對空污的健康危害或也可提供可能之應用建議。本研究首次發現香菸煙霧透過增加血管內皮細胞ROS、鈣離子濃度，連結微絲骨架效應蛋白cofilin及filamin A的表現量增加，以及磷酸化程度增加，加速細胞微絲骨架的改造，長遠可能造成內皮細胞的整合性喪失，進一步形成比較嚴重的心血管疾病，另外，也可能促進癌細胞的轉移，升高癌症的惡性度與治療困難，因此，本研究結果提出抽菸導致心血管病可能的建議一種：透過抗氧化劑-鈣離子螯合劑輔助療法，控制內皮細胞因香菸煙霧增加的ROS及鈣離子濃度，對預防抽菸所引起的心血管疾病有相當大的潛能，但臨床可行性仍須進一步驗證。