

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

香煙萃物誘發 ICAM-1 基因增加表現之分子機制及防治研究 (第 3 年) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 98-2320-B-040-019-MY3
執行期間：100 年 08 月 01 日至 101 年 07 月 31 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：碩士級-專任助理人員：陳韻方
碩士級-專任助理人員：黃千維

公開資訊：本計畫可公開查詢

中華民國 101 年 11 月 01 日

中文摘要：抽菸與心血管疾病形成之間有著密切的關係。抽菸所引起的發炎反應和其他危險的因子例如高血脂等的交叉作用，將增加血管內皮細胞的氧化壓力，進而引起血管內皮細胞損傷，最終造成嚴重的血管病變，例如動脈粥狀硬化症。本研究室先前的研究結果顯示，香菸煙霧水提取物 (cigarette smoke extract, CSE) 在人臍靜脈內皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 有誘導蛋白質氧化羰基化、細胞微絲骨架蛋白重組，以及增加 ICAM-1 蛋白質的表現程度。本研究計畫目的是進一步了解人類臍靜脈內皮細胞 (EA.hy926) 處理香菸煙霧水提取物的時，細胞微絲骨架是如何發生重組變化，進而增加 ICAM-1 蛋白質的表現。藉由細胞螢光骨架染色分析，證明 CSE 誘導 EA.hy926 細胞微絲骨架的重組和所造成細胞的皺縮，有隨劑量增加和時間增長而提高的現象。此外，蛋白質羰基化的程度也隨著 CSE 處理濃度的增加而明顯上升，預處理抗氧化劑 (硫辛酸、穀胱甘肽、N-乙酰半胱氨酸、氨基胍、tocopherol、維生素 C)、鈣離子螯合劑及鈣離子通道抑制劑 (乙二醇四乙酸、BAPTA-AM、MRS 1845) 及細胞自噬作用抑制劑 (3-MA)，均有不同程度減緩 CSE 所誘導的細胞微絲骨架蛋白重組、細胞皺縮和蛋白質羰基化的程度，抑制活性由高至低依序為：LA、GSH、EGTA、MRS、NAC > AG、TCP、BAPTA-AM > 3-MA、VitC。此外藉由免疫螢光觀察 light chain 3 (LC3)，也發現 CSE 處理會提高細胞內自噬作用標籤 LC3 的表現，預處理抗氧化劑 CSE 造成之 LC3 螢光量也隨之下降。這些結果顯誓，CSE 所誘導的微絲骨架重組的機制中，至少包含細胞內 ROS 產生增加，以及細胞鈣離子濃度上升兩種訊息。相似的狀況，CSE 所造成內皮細胞蛋白質羰基化及發炎前驅基因 ICAM-1 增加表現，也可被抗氧化劑及鈣離子螯合劑或鈣離子通道抑制劑的添加而明顯抑制。另外，以免疫螢光顯微鏡技術觀察，更發現 CSE 處理會明顯增加 AP-1 輔助活化劑 Jab1 蛋白質的細胞核轉移 (nuclear translocation)，綜合上述所有的數據，我們成功證實 CSE 誘發血管內皮細胞 ICAM-1 增加表現的分子機制，包含下列數個階段。階段一：促進細胞內 ROS 上升；階段二：形成 ER stress 並釋放鈣離子；階段三：細胞外大量鈣離子流入；階段四：促進蛋白質大量的氧化羰基化並釋放轉錄因子 Jab1 蛋白質；階段五：藉微絲骨架重組，促成 Jab1 蛋白質的細胞核轉移；階段六：Jab1 蛋白質輔助 c-Jun 或 AP-1 並增加其轉錄活性，最終增加 ICAM-1 基因的表現。本研究成果對抽菸如何導致動脈硬化疾病可提供解釋之基礎，對利用抗氧化劑或鈣離子抑制劑來防治菸害也提供重要的參考依據。

中文關鍵詞：香菸煙霧水提取物，人臍靜脈內皮細胞人類內皮細胞，微絲骨架重組，自噬作用，暫態鈣離子通道，Jab1 蛋白質

英文摘要：Cigarette smoking is a major cause of cardiovascular disorders. Smoking-induced inflammation and other risk factors like dyslipidemia cause vascular endothelial damage via oxidative stress. The role of the actin cytoskeleton as a possible key player in the response to inflammatory stimuli and it is an early target of cellular oxidative stress. Our previous results also show that cigarette smoke extract (CSE) induces rapid actin cytoskeleton remodeling and up-regulate ICAM-1 expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVE. The purpose of this research project is to understand how CSE induced pro-inflammation gene ICAM-1 upregulation in human endothelial EA.hy926 cells. Fluorescence staining of EAhy926 cells incubated with CSE showed that organization of the actin cytoskeleton was disrupted and caused cell to shrink in a dose- and time-dependent manner. By means of immunofluorescence analysis technique, CSE-induced EA.hy926 cells actin reorganization, cell shrinkage was increased with a dose and time course manner. In addition, actin cytoskeleton reorganization, protein carbonylation and cell shrinkage extent was significantly induced by CSE exposure. Pretreatment of antioxidants (lipoic acid, glutathione peptide, N-acetyl cysteine, aminoguanidine, α -tocopherol, vitamins C), calcium ion chelates and calcium channel inhibitors (EGTA, BAPTA AM, MRS 1845) and autophagy inhibitor (3-MA) could obviously block CSE-induced protein carbonylation, actin reorganization and cell shrinkage. The inhibitory activity from high to low order is: LA, GSH, EGTA, MRS, NAC > AG, TCP, BAPTA-AM > 3-MA, VitC. These results showed that CSE-induced actin reorganization mechanism, at least contains intracellular ROS production and a rise in intracellular calcium ions concentration. Similar situation, CSE-induced protein carbonylation of endothelial cells and the up-regulation of pro-inflammation gene, ICAM-1 could also be significantly

attenuate by antioxidants and calcium ion chelators or calcium channel inhibitor. In addition, using immunofluorescence microscope technique also found that CSE can significantly increase AP-1 co-activator Jab1 protein nuclear translocation. Results from this study not only provide a basic explanation of the mechanism of how CSE-induced cardiovascular disorders but also offer practical suggestions to antioxidant/calcium regulators therapy for CSE-mediated diseases prevention.

英文關鍵詞： Cigarette smoke extract, Human umbilical vein endothelial cells, Actin cytoskeleton reorganization, Autophagy, Transient receptor potential canonical (TRPC) channels TRPC, Jab1

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

期中進度報告

期末報告

香煙萃取物誘發 ICAM-1 基因增加表現分子機制及防治研究

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 98-2320-B-040-019-MY3

執行期間：98年08月01日至101年07月31日

執行機構及系所：中山醫學大學-生物醫學科學學系

計畫主持人：王祖興

共同主持人：

計畫參與人員：陳韻芳、黃千維、陳曉含、許泐溱

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國報告：

赴國外移地研究心得報告

赴大陸地區移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告及發表之論文

國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

中 華 民 國 101 年 10 月 31 日

摘要

抽菸與心血管疾病形成之間有著密切的關係。抽菸所引起的發炎反應和其他危險的因子例如高血脂等的交叉作用，將增加血管內皮細胞的氧化壓力，進而引起血管內皮細胞損傷，最終造成嚴重的血管病變，例如動脈粥狀硬化症。本研究室先前的研究結果顯示，香菸煙霧水提取物 (cigarette smoke extract, CSE) 在人臍靜脈內皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 有誘導蛋白質氧化羰基化、細胞微絲骨架蛋白重組，以及增加 ICAM-1 蛋白質的表現程度。本研究計畫目的是進一步了解人類臍靜脈內皮細胞(EA.hy926)處理香菸煙霧水提取物的時，細胞微絲骨架是如何發生重組變化，進而增加 ICAM-1 蛋白質的表現。藉由細胞螢光骨架染色分析，證明 CSE 誘導 EA.hy926 細胞微絲骨架的重組和所造成細胞的皺縮，有隨劑量增加和時間增長而提高的現象。此外，蛋白質羰基化的程度也隨著 CSE 處理濃度的增加而明顯上升，預處理抗氧化劑 (硫辛酸、穀胱甘肽、N-乙酰半胱氨酸、氨基胍、tocopherol、維生素 C)、鈣離子螯合劑及鈣離子通道抑制劑(乙二醇四乙酸、BAPTA AM、MRS 1845)及細胞自噬作用抑制劑(3-MA)，均有不同程度減緩 CSE 所誘導的細胞微絲骨架蛋白重組、細胞皺縮和蛋白質羰基化的程度，抑制活性由高至低依序為：LA、GSH、EGTA、MRS、NAC > AG、TCP、BAPTA-AM > 3-MA、VitC。此外藉由免疫螢光觀察 light chain 3 (LC3)，也發現 CSE 處理會提高細胞內自噬作用標籤 LC3 的表現，預處理抗氧化劑 CSE 造成之 LC3 螢光量也隨之下降。這些結果顯誓，CSE 所誘導的微絲骨架重組的機制中，至少包含細胞內 ROS 產生增加，以及細胞鈣離子濃度上升兩種訊息。相似的狀況，CSE 所造成內皮細胞蛋白質羰基化及發炎前驅基因 ICAM-1 增加表現，也可被抗氧化劑及鈣離子螯合劑或鈣離子通道抑制劑的添加而明顯抑制。另外，以免疫螢光顯微鏡技術觀察，更發現 CSE 處理會明顯增加 AP-1 輔助活化劑 Jab1 蛋白質的細胞核轉移(nuclear translocation)，綜合上述所有的數據，我們成功證實 CSE 誘發血管內皮細胞 ICAM-1 增加表現的分子機制，包含下列數個階段。階段一：促進細胞內 ROS 上升；階段二：形成 ER stress 並釋放鈣離子；階段三：細胞外大量鈣離子流入；階段四：促進蛋白質大量的氧化羰基化並釋放轉錄因子 Jab1 蛋白質；階段五：藉微絲骨架重組，促成 Jab1 蛋白質的細胞核轉移；階段六：Jab1 蛋白質輔助 c-Jun 或 AP-1 並增加其轉錄活性，最終增加 ICAM-1 基因的表現。本研究結果對抽菸如何導致動脈疾病可提供解釋之基礎，對利用抗氧化劑或鈣離子抑制劑來防治菸害也提供重要的參考依據。

關鍵詞：香菸煙霧水提取物，人臍靜脈內皮細胞人類內皮細胞，微絲骨架重組，自噬作用，暫態鈣離子通道，Jab1 蛋白質

Abstract

Cigarette smoking is a major cause of cardiovascular disorders. Smoking-induced inflammation and other risk factors like dyslipidemia cause vascular endothelial damage via oxidative stress. The role of the actin cytoskeleton as a possible key player in the response to inflammatory stimuli and it is an early target of cellular oxidative stress. Our previous results also show that cigarette smoke extract (CSE) induces rapid actin cytoskeleton remodeling and up-regulate ICAM-1 expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVE). The purpose of this research project is to understand how CSE induced pro-inflammation gene ICAM-1 upregulation in human endothelial EA.hy926 cells. Fluorescence staining of EAhy926 cells incubated with CSE showed that organization of the actin cytoskeleton was disrupted and caused cell to shrink in a dose- and time-dependent manner. By means of immunofluorescence analysis technique, CSE-induced EA.hy926 cells actin reorganization, cell shrinkage was increased with a dose and time course manner. In addition, actin cytoskeleton reorganization, protein carbonylation and cell shrinkage extent was significantly induced by CSE exposure. Pretreatment of antioxidants (lipoic acid, glutathione peptide, *N*-acetyl cysteine, aminoguanidine, α -tocopherol, vitamins C), calcium ion chelates and calcium channel inhibitors (EGTA, BAPTA AM, MRS 1845) and autophagy inhibitor (3-MA) could obviously block CSE-induced protein carbonylation, actin reorganization and cell shrinkage. The inhibitory activity from high to low order is: LA, GSH, EGTA, MRS, NAC > AG, TCP, BAPTA-AM > 3-MA, VitC. These results showed that CSE -induced actin reorganization mechanism, at least contains intracellular ROS production and a rise in intracellular calcium ions concentration. Similar situation, CSE-induced protein carbonylation of endothelial cells and the up-regulation of pro-inflammation gene, ICAM-1 could also be significantly attenuate by antioxidants and calcium ion chelators or calcium channel inhibitor. In addition, using immunofluorescence microscope technique also found that CSE can significantly increase AP-1 co-activator Jab1 protein nuclear translocation. Collectively, all the above findings, we successfully confirmed that CSE-induced ICAM-1 gene up-regulation in human endothelial cells contain following several stages. Stage one: increase intracellular ROS production; stage II: initiate ER stress and release calcium ions; stage III: cause high amount calcium ions influx; stage IV: induce high amount protein oxidative carbonylation and release the Jab1 proteins; stage V: actin reorganization and Jab1 protein nuclear translocation; stage VI: Jab1 proteins activate c-Jun or AP-1 and ultimately increase the ICAM-1 gene expression. Results from this study not only provide a basic explanation of the mechanism of how CSE-induced cardiovascular disorders but also offer practical suggestions to antioxidant/calcium regulators therapy for CSE-mediated diseases prevention.

Keywords: Cigarette smoke extract, Human umbilical vein endothelial cells, Actin cytoskeleton reorganization, Autophagy, Transient receptor potential canonical (TRPC) channels TRPC, Jab1

目錄

中文摘要	II
英文摘要	III
目錄	IV
前言	01
文獻探討	02
材料與方法	04
結果	08
討論	12
參考文獻	14
圖表	16
附件二 (成果自評)	44
附件三 (心得報告)	45

前言及研究目的

流病學的研究證實香煙是造成動脈硬化症(atherosclerosis)主要的原因。細胞黏著分子(cell adhesion molecule)與動脈硬化症關係密切，尤其是細胞間黏著分子-1(ICAM-1)、血管細胞黏著分子-1(VCAM-1)與E-選擇素(E-selectin)等參與動脈硬化症形成的病理過程，且其基因多態性是動脈硬化症發生的危險因子。因此，針對細胞黏著分子的抗黏著調節，將可能成為動脈硬化症有效的防治手段。本實驗室先前的研究發現，香煙萃物(cigarette smoke extract/CSE)明顯造成人類臍靜脈內皮細胞(HUVEC) ICAM-1及E-selectin 蛋白質表現的增加，而誘發這個現象的訊號傳遞與細胞微絲骨架(actin cytoskeleton)的重組(reorganization)及AP-1 轉錄因子的活化有關，而與CSE在HUVEC造成的ERK及JNK活化磷酸化途徑則較不相關。為進一步了解CSE如何透過細胞骨架重組，引發MAPK-非依賴途徑，活化AP-1轉錄活性，造成ICAM-1基因表現增加的詳細控制途徑，並且研發其防治之道。本研究計畫將探討下列三大問題：(1)香菸煙霧萃物如何造成細胞骨架重編並調高ICAM-1基因表現，(2)探討Jab1(a co-activator of AP-1)在香煙萃物誘發ICAM-1表現增加所扮演的角色，(3) 探討天然植物多酚、茶萃物對香煙萃物誘發ICAM-1表現增加的防治效果及作用機制。整體成果對香煙造成心血管疾病之基本學理及其防治，可提供新穎且有應用價值之資訊。

文獻探討

香菸被世界衛生組織(World Health Organization, WHO)列為主要死亡原因之一。近年來有許多相關的研究發現了香菸對於人體會造成諸多危害，例如慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、肺氣腫、新生兒死亡率的上升或是導致癌症的發生。常見吸菸者罹患的癌症有肺癌、口腔及喉癌、食道癌、膀胱癌及胃癌等等，雖然部分的致病機轉尚未完全清除，但許多許多報告指出吸菸者罹患癌症的機率比一般人高。

香菸經過燃燒後會產生數種化合物，其分子種類至少超過6000種已知的化合物(Holzer *et al.*, 2012)，其中包含了數十種刺激物質及六十種以上被國際癌症研究中心 (IARC) 認定的致癌物，因此當人在享受吞雲吐霧的時候，這些物質也隨之進入肺部或人體內，部分則會散播於空氣中。目前已知這些化合物可分為四大類：顆粒相 (particular phase)、氣相 (gas phase)、刺激物 (excitant)及致癌物 (carcinogens)。

顆粒相包括多種混合物、焦油 (tar) 及尼古丁 (nicotine)，又被稱之為焦油相。尼古丁具有中樞神經興奮、提神作用的雙重藥理，也是主要造成菸癮的原因，長期吸入將造成心跳速率加快、血壓上升，進而導致心臟血管疾病的發生。焦油則是一種黃黑色的黏性混合物，含有許多致癌物及大量的自由基，本身會刺激氣管並且造成肺組織失去彈性，進而造成慢性阻塞性肺病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)及多種癌症的主要原因。

氣相中除了氮、氧、氫、二氧化碳、一氧化碳等碳氫化合物之外，也包括了會刺激呼吸道的物質，例如：甲醛、乙醛、硫化氫、氮氧化物(nitrogen oxide, NOx)及大量的自由基(如·OH、H₂O₂等)。由於一氧化碳與血紅素結合力比氧與血紅素結合力強，所以抽菸者在抽菸時體內的氧氣的運送會受到影響，進而導致體內缺氧。香菸中含有數十種刺激物質，吸入這些刺激物會刺激呼吸道的黏膜進行分泌，長久下來則會使呼吸道對異物或是細菌的排除能力下降，進而導致支氣管炎或是細菌感染的機會增加。

在許多研究的文獻中都發現，香菸的煙霧粒子，是自由基的主要來源之一，所含有的物質都和慢性阻塞性肺病的發病原因有相關性(Cheng *et al.*, 2010)。流行病學的研究強烈支持吸菸增加myocardial infarction 及fatal coronary artery disease的主張，相較於非抽煙，即使是吸低焦油(tar)香煙和無煙香煙都曾被証實會增加罹患心血管方面疾病的風險。二手煙約可增加30%罹患心血管疾病的風險，而抽煙者則增加80%罹患心血管疾病的風險，因此，連結香煙曝露與心血管疾病的證據是極為確定的。然而，對於香菸中何種組成或機制負責此連結關係，則仍不清處。抽煙直接或間接造成自由基(reactive oxygen species, ROS & reactive nitrogen species, RNS)的產生及發炎反應(inflammation)，都是目前普遍被接受抽煙造成動脈硬化症極為重要的創始及發展原因。白血球在血管內皮細胞局部的招募(recruitment)是動脈硬化症的早期事件，多種前發炎細胞激素(pro-inflammation cytokine)的釋放，增加白血球與血管內皮細胞間的交互作用，導致白血球的招募。在抽煙者，可溶性(soluble)細胞黏著分子(ICAM-1、VCAM-1、E-selectin)的數目也確實有增高表現的情形，在香煙萃物(cigarette smoke extract, CSE)的曝露下，將增加上述黏著分子在白血球及血管內皮細胞膜上的表現，進而造成約70%~90%促進人類白血球與人類臍靜脈血管內皮細胞(HUVEC)的黏著(Kalra *et al.*, 1994)；曝露香煙萃物也會增加單核球類似細胞越過單層HUVEC 細胞的速度達200% (Shen *et al.*, 1996)；處理來自抽煙者的血清，明顯增加人類單核球與

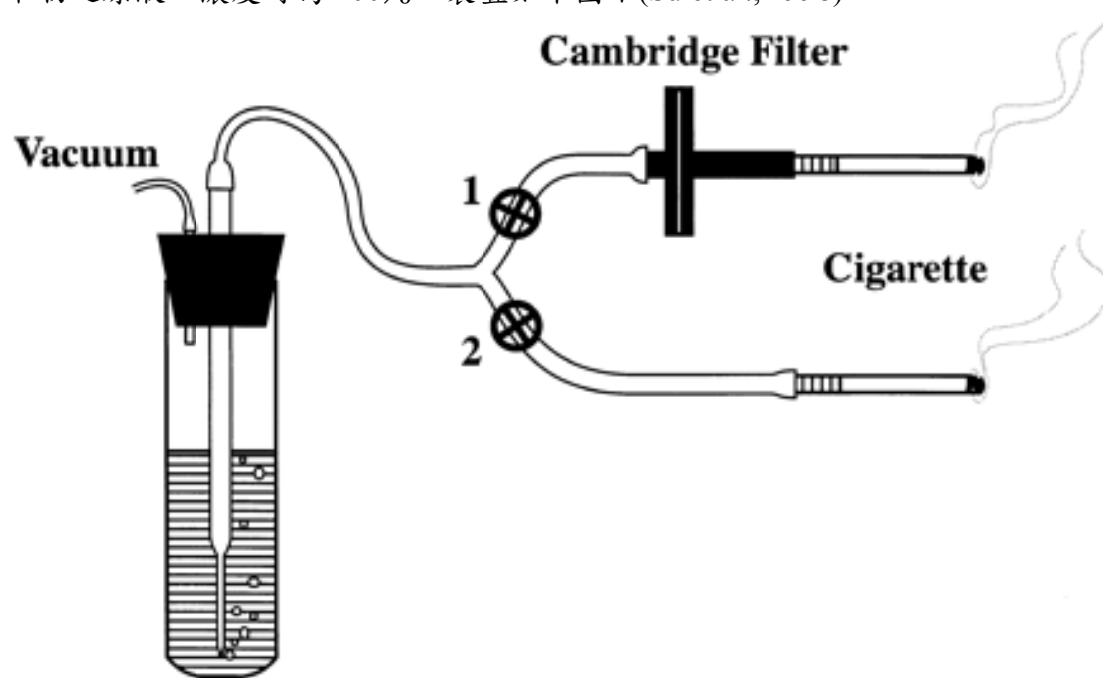
HUVEC 細胞間的黏著，這些現象與HUVEC 細胞膜上黏著分子ICAM-1 表達增加有密切關係(Adam et al., 1997)，這些證據都說明抽煙對血管內皮細胞膜上黏著分子的表達程度的增加，對誘發心血管疾病是有關鍵性的影響，若能解答香煙如何造成血管內皮細胞黏著分子表達增加的詳細作用機制，並研發其防治之道，對動脈硬化症形成機制的了解，以及預防抽煙造成心血管病變將會有很大的幫助。

本試驗室先前的研究發現香煙萃物可明顯增加HUVEC 細胞膜上黏著分子 ICAM-1 及E-selectin的表現，也明顯增加細胞核DNA 傷害的程度，而抗氧化劑 alpha-tocopherol、Vitamin C 的添加雖可有效降低香煙萃物造成的DNA 傷害，但對香煙萃物造成ICAM-1 及E-selectin 在HUVEC細胞的的表達增加則無抑制效果(Chen et al., 2004)，此結果說明ROS 的產生，可能不是香煙萃物造成HUVEC 膜上黏著分子(ICAM-1)表達增加的主要原因，最近我們的研究發現細胞內銅離子而非ROS，在香煙萃物造成THP-1 細胞蛋白質羰基化(carbonylation)上扮演重要促進角色，也支持上述ROS 的產生，可能不是香煙萃物造成HUVEC 膜上黏著分子(ICAM-1)表達增加主因的假設。本研究室最近的研究更進一步證實香煙萃物處理HUVECs 會明顯增加ERK1/2 及JNK1 的磷酸化程度，並進而增加轉錄因子AP-1 與DNA 的結合能力，然而有趣的是添加JNK 及ERK1/2 的抑制劑，可明顯壓制香煙萃物在HUVEC 細胞所造成的JNK 及ERK1/2 磷酸化作用，但卻無法降低香煙萃物在HUVEC細胞造成細胞膜上ICAM-1 及E-selectin 表達的增加，而短暫前處理破壞微絲骨架藥劑(50 nM cytochalasin D) 30 min，卻可部份顯著地降低香煙萃物在HUVEC 細胞造成細胞膜上ICAM-1 及 E-selectin 表達的增加(Chen et al., 2009)，這些發現顯示香煙萃物造成HUVEC 細胞增加ICAM-1 基因的表現，可能是透過一種ROS-非依賴/MAPKs(ERK1/2-JNK)-非依賴的途徑，利用細胞內微絲骨架再組織(reorganization)，進而活化AP-1 轉錄活性造成的，香菸煙霧提取物何種(類)成分造成細胞中微絲骨架再組織，進而引發專一的訊息傳遞路線，最後造成ICAM-1表現增加等不同階段間關係，仍需進一步試驗加以證明串接。

材料與方法

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°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 μm filter 過濾，所得之溶液為香菸煙霧萃取物之原液，濃度訂為 100%。裝置如下圖示 (Su *et al.*, 1998)：



細胞培養

細胞解凍：先將培養液回溫至 37°C 後，取出 4 mL 於 15 ml 離心管中，之後再從液態氮桶中將冷凍的細胞取出，迅速的置於 37°C 水浴槽中解凍，將細胞懸浮於 4 ml 培養液中，以 rpm 離心五分鐘丟棄上清液，加入 5 ml 培養液將細胞沖散混勻，移至 25-T 培養瓶中，置於 37°C、5%CO₂ 的細胞培養箱 (CO₂-incubator) 中培養。**細胞繼代：**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°C、5%CO₂ 的細胞培養箱。滿盤時，先使用 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。**細胞冷凍保存：**先將培養液移去，以 PBS 移除死亡細胞，吸走 PBS 後加入 0.05% 胰蛋白酶 0.53 mM EDTA 溶液將細胞和培養皿分離，細胞懸浮液移至 15 ml 離心管中，以 rpm 離心五分鐘丟棄上清液，加入含有 10% DMSO 的培養液中混合，將其置於冷凍小管中，先放於 -80°C 冰箱，隔日在移至液態氮桶中保存。

細胞處理

將細胞種於 4-well Chamber Glass Slide、24 孔盤或 6 公分之培養皿中，培養二十四小時，之後將香菸萃取液以 1%、5%、10% 處理一小時，再添加抗氧化

劑或抑制劑實驗時，則先處理不同的抗氧化劑或抑制劑半小時，在加入香菸萃取液 10% 處理一小時。

蛋白質定量法及圓點轉漬法

利用 coomassie plus protein assay reagent kit 測定蛋白質濃度，以 BSA 配置標準濃度，其標準濃度為 2、1.5、1、0.75、0.5、0.25、0.125、0.025 mg/ml。每管標準濃度中取 μl 置於 96 孔盤中，在加入 μl coomassie reagent(樣品量 coomassie reagent 與體積比為 1:30)，以五合一多功能光譜儀(Molecular Devices, Flexstation 3)測量波長為 595 nm，其吸光值對照標準曲線，即可計算樣品中蛋白質濃度。圓點轉漬法是一種將轉漬台孔洞中的蛋白質樣品，藉由抽氣的方法吸附上到 PVDF 膜上。將 PVDF 膜及濾紙裁成長 10.2 公分、寬 7.2 公分，並且修成符合轉漬台的凹槽，將 PVDF 膜以 100% 甲醇浸濕活化，再移到含有 20% 甲醇的 TBS 中浸泡五分鐘，並將濾紙浸濕，以 PVDF 膜在上濾紙在下的方式與轉漬台組合，以每一孔洞的蛋白質總量為 5 μg 加入，並靜置二十分鐘，剩餘孔洞以 100 μl PBS 填滿，以確保抽氣力道平均。用抽氣方式將液體吸乾後，用針在沒有加入樣品的孔洞中戳洞做記號，拆開轉漬台，剪除未加入樣品的膜，之後可進行 coomassie blue 染色或進行西方墨點法。

蛋白質羰基化西方墨點法

在測定蛋白直羰基化的方法中，最常見且有高敏感度的方法為利用 DNPH 和蛋白質上的羰基結合成 dinitrophenyl hydrazone (DNP)，可用抗體進行辨認(Lin et al.,2009)。接續上述方式，將 PVDF 膜浸泡在 2 N HCl 中五分鐘，再浸泡 0.1 mg/ml DNPH 溶於 2 N HCl 中五分鐘，以 2 N HCl 清洗掉殘餘的 DNPH，清洗三次，每次五分鐘。以 100% 甲醇清洗三次，每次五分鐘。以 PBST(含有 0.05% Tween 20 的 PBS)清洗五分鐘，再用 5% 的脫脂牛奶溶於 PBST 中，在室溫下 blocking 一小時。加入一抗 anti-DNP(1:5000，溶於 5% 脫脂牛奶)，放入 4°C 冰箱中 overnight，隔天再以 PBST 清洗三次，每次五分鐘。加入二抗 Goat anti-rabbit IgG-AP(1:5000，溶於 5% 脫脂牛奶)，於室溫下作用一小時，再以 PBST 清洗三次，每次五分鐘。之後加入 BCIP/NBT 進行呈色反應，用掃描機()拍攝影像，並用 ImageJ 進行影像之分析和針對蛋白質點做定量。

細胞骨架螢光染色

將 EA hy.926 以 4×10^4 cells/well 種於 4-well Chamber Glass Slide，培養 24 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 處理 10 分鐘，再來加入 1% BSA 並且放於 Shake 上二十分鐘，加入 1U rhodamine-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，蓋上玻片即可於螢光顯微鏡下進行觀察。

細胞骨架螢光量測定

參考自 (Thurston et al,1995) 和 (Cable et al,1995) 兩篇文獻所記載的方法，將細胞種於 6 孔盤中，24 hr 後加藥處理，使用 PBS 進行清洗，使用 3.75% Formaldehyde 進行固定十五分鐘。用 0.2% Triton X-100 進行穿孔十分鐘。用 rhodamine phalloidin 進行 F-actin 染色五分鐘，用 PBS 進行清洗三次，每次五分

鐘。最後使用 0.1 M 的 NaOH 進行溶解十分鐘，吸液體 1 ml 到石英管中使用螢光光譜儀進行分析，測定條件為 Ex 540、Em 560。

免疫螢光顯微鏡分析

一種利用抗原和抗體特異性結合的特點進行檢測，可對細胞內的某種蛋白質或是特定的大分子等的存在或是分佈進行探測。將細胞以 4×10^4 種於 4 well 中，24 hr 後加藥處理，使用 PBS 先進行清洗，在利用 3.75% Formaldehyde 進行固定三十分鐘。用 0.5% Triton X-100 進行穿孔十分鐘。用 1% BSA 並放在 Shake 上進行 blocking 一小時使用，使用 PBS 進行清洗三次，每次五分鐘。將 anti-LC3 以 1:100 的和 1% BSA 混合加入，並放在 Shake 上一小時，用 PBS 清洗三次，每次五分鐘。使用 IgG-FITC 做為二抗，以 1:100 的和 1% BSA 混合加入，並放在 Shake 上一小時，用 PBS 清洗三次，每次五分鐘。之後使用 rhodamine phalloidinb 進行細胞骨架染色四十分鐘。拆掉架子，將 DAPI 和封片膠以 1:1 比例混合滴在 well 上，最後蓋上玻片使用正立螢光顯微鏡 (ZEISS, AXioskop2) 進行觀察，使用 ImageJ 和 PhotoImpact X3 進行比對和合成分析。

西方墨點法

將 EA.hy926 細胞以 3×10^5 cells 種於直徑 6 公分培養皿中，分別以 5% CSE 處理不同時間點 (4、6、8、16 和 24 小時)、Quercetin 與 5% CSE 共同處理 24 小時或是先預處理 30 分鐘的抑制劑，再加入 5% CSE 處理 24 小時。移除上清液，以 PBS 清洗兩次後，加入 60 μ 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°C 以 14,000g 離心 10 分鐘，收集上清液，進行蛋白定量。

實驗全程戴手套，以 70% 酒精擦淨玻璃片，將玻璃片固定在鑄膠台上，注入含 10% 聚丙烯醯胺的 separating gel 溶液 (含 4.96 ml 40% 37.5: 1 Acrylamide/ Bis、5 ml 1.5 M Tris, pH 8.8、9.72 ml Milli-Q 水、200 μ l 10% SDS、100 μ l 10% ammonium persulfate 及 20 μ l TEMED)，以 95% 酒精壓平，待下膠凝固以後移除 95% 酒精。上膠放入含 4% 聚丙烯醯胺的 stacking gel 溶液 (含 1 ml 40% 37.5: 1 Acrylamide/ Bis、2.5 ml 0.5 M Tris, pH 6.8、6.32 ml Milli-Q 水、100 μ l 10% SDS、50 μ l 10% ammonium persulfate 及 35 μ l TEMED)，接著將齒槽模板 (comb) 平行插入，凝膠之後，將齒槽模板抽出，即可形成凹型槽狀，將其架在電泳架上，放入電泳槽中，倒入由 5X SDS electrophoresis buffer (含 0.12 M Tris、0.96 M glycine 及 0.02 M SDS) 稀釋成 1X 電泳液，再依序加入蛋白質樣品，先以 70 伏特電壓下進行電泳，待樣品由上膠移至下膠，再以 110 伏特電壓下進行電泳，80 分鐘。

電泳完成後，裁剪比膠片大的 NC 膜，再將海綿、濾紙、NC 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、NC 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，60 分鐘。完成轉漬後，將 NC 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，接著加入 anti-ICAM1 抗體 (1:1000，於 5% 脫脂牛奶)、anti-Jab1 ru61 及 anti-actin 抗體 (1:5000，於 5% 脫脂牛奶)，放在 4°C 冰箱中，隔天再以 TBST 清洗 3 次，每次 5 分鐘。加入二抗 goat anti-rabbit IgG - HRP 抗體 (1:1000，於 5% 脫脂牛奶) 或 goat anti-mouse IgG - HRP (1:10000，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 ImageQuant TL 軟體進行影像定量。

統計分析

各組試驗所得數據以平均值加減標準誤差 (Means \pm SD) 方式表示；試驗統計分析採用 Microsoft Office Excel 2007 電腦統計套裝軟體中的 Student's *t*-test 進行統計分析，並以 $P < 0.05$ 作為試驗數據間是否達到顯著性差異之標準檢測。

結果

一、 CSE 對 EA. hy926 細胞之形態影響

人類臍靜脈內皮細胞 (EA. hy926) 分別以不同濃度 (1、5、10%) 的香菸煙霧水提取物 (Cigarette smoke extract, CSE) 處理 4 小時，以螢光染色的方法來觀察微絲細胞骨架受到 CSE 處理的影響情形，並且觀察細胞的型態變化，來確認 CSE 對細胞造成的影響(圖一)。將未處理 CSE 的正常細胞數設定為 100%，當 CSE 的濃度增加至 5 及 10% 時，正常細胞數則分別下降為 $68.2 \pm 5.94\%$ 及 $52.28 \pm 0.75\%$ 。隨著 CSE 劑量的提升，細胞型態的皺縮情形增加，呈現劑量依賴關係之影響，且最佳的處理濃度為 10%。

以 10% CSE 處理 EA. hy926 不同的時間 (1、2、4 小時)，以螢光染色的方法來觀察微絲細胞骨架受到 CSE 影響的情形，從細胞螢光染色中可以發現，CSE 處理 1 小時的時候細胞已經有明顯的皺縮情形發生，隨著處理時間的增加，細胞皺縮情形和 1 小時的情形相似(圖二)。將未處理 CSE 的正常細胞數設定為 1，當 CSE 處理時間為 1、2 及 4 小時，正常細胞數則分別下降為 $53.11 \pm 5.3\%$ 、 $50.15 \pm 4.43\%$ 及 $43.35 \pm 8.73\%$ 。隨著處理的時間增加，細胞皺縮的情形卻沒有增加，且在 1 小時所觀察到的細胞型態和在 2 和 4 小時所觀察到的變化情形是相似的，所以 CSE 適合的處理時間為 1 小時。之後的實驗會採取處理 CSE 10%、處理 1 小時。

二、 蛋白質之羰基化

CSE 對微絲細胞骨架有影響外，也分別用不同的 CSE 濃度 (1、5、10%) 處理 EA. hy926 細胞 4 小時，以蛋白質圓點轉漬法和蛋白質羰基化西方墨點法來分析蛋白質羰基化 (Carbonylation) 的情形。當 CSE 處理濃度大於 1% 時，誘發蛋白質羰基化的程度明顯增加，將未處理組的羰基化程度設為 1 時，1、5 和 10% CSE 處理的 EA. hy926 細胞，細胞羰基化增加的程度分別為 1.61 ± 0.92 、 1.94 ± 1.36 和 2.23 ± 1.63 倍(圖三)。由此結果顯示，CSE 所造成蛋白質羰基化會隨著濃度升高而增加。細胞預處理 LA、GSH、EGTA 和 Vit C 時，也能明顯降低 CSE 所造成的蛋白質羰基化(圖四)，降低的強度依序為 $\text{GSH} > \text{NAC} \gg \text{EGTA} > \text{LA}$ 。

三、 不同藥品對 CSE 造成細胞骨架傷害之影響

藉由多種的藥品與 CSE 的共同處理，來觀察抗氧化劑是否能降低 CSE 所造成細胞骨架傷害。細胞分別以不同濃度 Lipoic acid (LA, 10、25、50 mM)、Glutathione (GSH, 1、5、10 mM)、Ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA, 5、25、500 μM)、MRS 1845 (1、2、4 μM)、N-acetyl cysteine (NAC, 1、5、10 mM)、Aminoguanidine (AG, 5、10、15 mM)、Tocopherol (TCP, 5、10、25 μM)、BAPTA AM (1、2、5 μM)、3-methyladenine (3-MA, 0.1、0.5、1 mM)、Vitamin C (Vit C, 0.1、0.2、0.5 mM)，預處理細胞 0.5 小時，共同處理 10% CSE 1 小時，藉由觀察細胞骨架螢光染色結果顯示，使用不同抗氧化劑，對 CSE 造成的微絲細胞骨架傷害也有明顯的作用差異。

預處理 LA (10、25、50 mM) 後，再與 10% CSE 共同處理時，EA. hy926 細胞的形態如圖五。以未處理組的正常細胞數當成 100% 時，單獨處理 CSE 的正常細胞數下降約 $59.6 \pm 1.79\%$ ，有預處理 10、25 和 50 mM LA 再與 10% CSE 共處理的細胞，則形態正常細胞的比例為 $75.87 \pm 3.38\%$ 、 $96.69 \pm 1.47\%$ 和 $87.42 \pm$

0.65%，此一現象顯示 LA 可以預防 CSE 所造成的細胞皺縮和傷害。

相似的結果也在預處理 GSH、EGTA、MRS 1845 和 NAC 後與 10% CSE 共同處理時發現。當預處理 GSH (1、5、10 mM) 後與 10% CSE 共同處理時，EA. hy926 細胞形態變化的情形如圖六。以未處理組的正常細胞數當成 100% 時，單獨處理 CSE 的形態正常細胞數下降為 $45.63 \pm 11.49\%$ ，預處理 1、5 和 10 mM GSH 與 10% CSE 共處理的細胞，形態正常細胞比例回復為 77.5%、86.25% 和 $95 \pm 5.3\%$ ，此一現象顯示 GSH 可以預防 CSE 所造成的細胞皺縮和傷害。

預處理 EGTA (5、25、50 μM) 後與 10% CSE 共同處理時，EA. hy926 細胞的形態變化情形如圖七。以未處理組的正常細胞數當成 100% 時，單獨處理 CSE 形態正常的細胞數下降為 $32.01 \pm 3.22\%$ ，有 5、25 和 50 μM EGTA 預處理與 10% CSE 共處理的細胞，形態正常細胞比例回復為 $79.73 \pm 10.18\%$ 、 $80.58 \pm 1.2\%$ 和 $95.08 \pm 3.14\%$ ，此一現象顯示 EGTA 可以預防 CSE 所造成的細胞皺縮和傷害，同時也指出 CSE 所造成的細胞型態改變與細胞外鈣離子的流入(Influx)有關。

預處理 MRS 1845 (1、2、4 μM) 後與 10% CSE 共同處理時，EA. hy926 細胞的形態變化情形如圖八。以未處理組的正常細胞數當成 100% 時，單獨處理 CSE 形態正常的細胞數下降約 $40.21 \pm 9.68\%$ ，有 1、2 和 4 μM MRS 1845 預處理與 10% CSE 共處理的細胞，形態正常的細胞比例回復為 $88.57 \pm 2.87\%$ 、 $80.82 \pm 5.81\%$ 和 78.08%，此一現象顯示出 MRS 1845 可以預防 CSE 所造成的細胞皺縮和傷害，同時也指出 CSE 所造成的細胞型態改變與細胞膜上的鈣離子通道有關。

預處理 NAC (1、5、10 mM) 後與 10% CSE 共同處理時，EA. hy926 細胞的形態變化情形如圖九。以未處理組的正常細胞數當成 100% 時，單獨處理 CSE 形態正常的細胞數下降為 $35.37 \pm 2.29\%$ ，有 1、5 和 10 mM NAC 預處理與 10% CSE 共處理的細胞，形態正常的細胞比例回復為 $52.14 \pm 5.68\%$ 、 $68.56 \pm 2.03\%$ 和 $84.79 \pm 5.61\%$ ，此一現象顯示出 NAC 可以預防對於 CSE 所造成的細胞皺縮和傷害。

預處理 AG (5、10、15 mM) 後與 10% CSE 共同處理時，EA. hy926 細胞形態變化的情形如圖十。以未處理組形態正常的細胞數當成 100% 時，單獨處理 CSE 形態正常的細胞數下降約 $56.32 \pm 6.37\%$ ，有 5、10 和 15 mM AG 預處理與 10% CSE 共處理的細胞，形態正常的細胞比例回復為 $70.09 \pm 4.51\%$ 、 $73.39 \pm 5.39\%$ 和 $87.23 \pm 0.69\%$ ，此一現象顯示 AG 可以預防 CSE 所造成的細胞皺縮和傷害，同時也指 CSE 造成細胞形態改變與活性碳物種的形成有關。

相似的結果也在預處理 TCP 和 BAPTA AM 後與 10% CSE 共同處理時發現。當預處理 TCP (5、10、25 μM) 後與 10% CSE 共同處理時，EA. hy926 細胞形態改變的情形如圖十一。以未處理組的形態正常的細胞數當成 100% 時，單獨處理 CSE 形態正常的細胞數下降為 $51.96 \pm 1.74\%$ ，有 5、10 和 25 μM TCP 預處理與 10% CSE 共處理的細胞，形態正常細胞比例回復為 56.74%、72.34% 和 84.23 ± 0.24 ，此一現象顯示出 TCP 可以預防對於 CSE 所造成的細胞皺縮和傷害。

預處理 BAPTA AM (1、2、5 μM) 後與 10% CSE 共同處理時，EA. hy926 細胞形態的情形如圖十二。以未處理組形態正常細胞的數當成 100% 時，單獨處理 CSE 形態正常的細胞數下降約 $44.35 \pm 14.42\%$ ，有 1、2 和 5 μM BAPTA AM 預處理與 10% CSE 共處理的細胞，形態正常的細胞比例回復為 70.13%、77.92% 和 $81.23 \pm 4.5\%$ ，此一現象顯示出 BAPTA AM 可以預防對於 CSE 所造成的細胞皺縮和傷害，同時也指出 CSE 所造成的細胞形態改變與受到細胞內的鈣離子的影響不大。

預處理 3-MA (0.1、0.5、1 mM) 後與 10% CSE 共同處理時，EA. hy926 細

胞形態的情形如圖十三。以未處理組形態正常的細胞數當成 100%時，單獨處理 CSE 形態正常的細胞數下降約 $32.57 \pm 2.55\%$ ，有 0.1、0.5 和 1 mM 3-MA 預處理與 10% CSE 共處理的細胞，形態正常細胞比例回復為 71.79%、 $74.1 \pm 12.32\%$ 和 $79.99 \pm 26.09\%$ ，此一現象顯示出 3-MA 可以預防對於 CSE 所造成的細胞皺縮和傷害。

預處理 Vit C (0.1、0.2、0.5 mM) 後與 10% CSE 共同處理時，EA.hy926 細胞形態改變的情形如圖十四。以未處理組形態正常的細胞數當成 100%時，單獨處理 CSE 形態正常的細胞數下降約 $48.63 \pm 6.4\%$ ，有 0.1、0.2 和 0.5 mM Vit C 預處理與 10% CSE 共處理的細胞，則正常細胞比例回復為 $78.6 \pm 2.55\%$ 、 $73.89 \pm 8.92\%$ 和 $72.45 \pm 7.47\%$ ，此一現象顯示出 3-MA 可以預防對於 CSE 所造成的細胞皺縮和傷害。

四、 CSE 對 LC3 免疫螢光的影響

有部分研究文獻指出，CSE 會造成的細胞的自噬作用的發生進而造成細胞死亡，所以將藉由免疫螢光的方式來檢測是否和細胞的自噬作用有相關。分別處理 CSE 濃度 5 和 10% 以及 H_2O_2 100 μM 先進行試驗(圖十五)。由 Merge 的結果圖中，可以看到黃螢光(綠+紅螢光)的亮度隨著 CSE 的濃度增加而加深。之後使用抗氧化劑 LA、GSH、EGTA 和 Vit C 先進行預處理再和 CSE 10% 共同處理來觀察螢光亮度的變化如圖十六。有先預處理 LA、GSH 和 EGTA 的組別中，發現 Merge 圖中的黃螢光的亮度降低到和未處理組的 Merge 圖相似，反之 Vit C 的 Merge 圖則沒有此現象。

五、 CSE 誘導 ICAM-1 蛋白質表現

先將 EA.hy926 細胞以不同時間點 (4、6、8、16 與 24 小時) 各別加入 5% CSE，再進行破細胞，取得全細胞溶解物，以西方墨點法分析。結果顯示：EA.hy926 細胞以 5% CSE 處理 24 小時對 ICAM-1 蛋白質表現量有大幅度誘發，將對照組數據設為 1，處理組相對於對照組得到比值為 3.17 ± 1 ($P < 0.01$) (圖十七)。將 EA.hy926 細胞預先處理 SR11302 (0.5 與 1 μM) 抑制劑，再處理 5% CSE，經過 24 小時後再進行破細胞，取得全細胞溶解物，以西方墨點法分析。結果顯示：SR11302 (0.5 與 1 μM) 不能有效壓制由 5% CSE 誘發 ICAM-1 的表現量，將對照組數據設為 1，處理組相對於對照組得到比值各別為 1.96 ± 0.07 及 1.85 ± 0.52 (圖十八)。

將 EA.hy926 細胞預先處理 Exo1 (10 與 20 μM) 抑制劑，再處理 5% CSE，經過 24 小時後再進行破細胞，取得全細胞溶解物，以西方墨點法分析。結果顯示：Exo1 (10 與 20 μM) 能有效壓制由 5% CSE 誘發 ICAM-1 的表現量，將對照組數據設為 1，處理組相對於對照組得到比值各別為 0.81 ± 0.17 ($P < 0.05$) 及 0.6 ± 0.15 ($P < 0.01$) (圖十九)。

將 EA.hy926 細胞預先處理 BATPA/AM (5 與 10 μM) 螯合劑，再處理 5% CSE，經過 24 小時後再進行破細胞，取得全細胞溶解物，以西方墨點法分析。結果顯示：BATPA/AM (5 與 10 μM) 能有效壓制由 5% CSE 誘發 ICAM-1 的表現量，將對照組數據設為 1，處理組相對於對照組得到比值各別為 0.87 ± 0.06 ($P < 0.001$) 及 0.51 ± 0.08 ($P < 0.001$) (圖二十)。將 EA.hy926 細胞預先處理鈣離子通道抑制劑，MRS 1845 (5 與 10 μM) 抑制劑，再處理 5% CSE，經過 24 小時後再進行破細胞，取得全細胞溶解物，以西方墨點法分析。結果顯示：MRS 1845 (5 與 10 μM) 能有效壓制由 5% CSE 誘發 ICAM-1 的表現量，將對照組數據設為 1，

處理組相對於對照組得到比值各別為 1.27 ± 0.2 ($P < 0.001$) 及 1.15 ± 0.05 ($P < 0.001$) (圖二十一)。將 EA.hy926 細胞共同處理 Quercetin (10 與 50 μM) 與 5% CSE, 經過 24 小時後, 再進行破細胞, 取得全細胞溶解物, 以西方墨點法分析。結果顯示: EA.hy926 細胞以 5% CSE 處理 24 小時對 ICAM-1 蛋白質表現量有明顯誘發, 將對照組數據設為 1, 正對照組相對於對照組得到比值為 1.52 ± 0.43 ($P < 0.001$); 當 Quercetin (10 與 50 μM) 與 5% CSE 共同處理 24 小時之後, ICAM-1 的表現有明顯下降, 處理組相對於對照組得到比值為 0.66 ± 0.22 ($P < 0.01$) 及 0.93 ± 0.47 ($P < 0.05$) (圖二十二)。

六、 CSE 誘導細胞內轉錄因子活化之圖譜

使用 TF Activation Profiling Plate Array I (FA-1001, 購自 Signosis) 進行 CSE 誘導細胞內轉錄因子活化之圖譜試驗。此分析套件可同時偵測 48 種轉錄因子的活化情形。CSE 處理除可有效提高 AP-1 的 DNA 鍵結活性外, 更能強烈增加其他轉錄因子的活化, 包括 CAR、CDP、E2F-1、GAS/ISRER、GATA、MEF2、Myb、NF-1、NF-AT、NF-E2、p53、Pax-5、Pbx1、PPAR、Sp1、SATB1、Stat3、Stat4 及 TR, 其活性增加均達到 AP-1 增加的二倍量以上(圖二十三)。

七、 CSE 對細胞內 Jab1 蛋白質核分佈之影響

CSE 對細胞內 Jab1 蛋白質核分佈影響的結果如圖二十四。Jab1 蛋白質在平時是平均分佈於細胞內, 螢光訊號呈均勻性散發整個細胞範圍, 當細胞處 CSE 24 小時後, Jab1 會隨濃度的提高而愈往細胞核區域集中, 這項結果說明 CSE 可能藉由誘導 Jab1 蛋白質的核轉移, 再進一步活化 AP-1 增加 ICAM-1 基因表現。

討論

CSE 處理 EA.hy926 細胞明顯造成細胞間黏附分子-1(ICAM-1)的增加表，這個誘導現象有很好的劑量效應及時間效應關係(圖五 A & B)。CSE 24 小時處理，ICAM-1 的表現隨濃度增加而增加，大約在 5% 呈現誘導增加的飽和點，增加表現的倍數約 1.6 倍，濃度增加至 10%，ICAM-1 表現出現些微下降。CSE 誘導 ICAM-1 表現增加，在時間上可從 4 小時延續至 24 小時。本研究後續試驗以 5% CSE 處理 24 小時為一標準的處理條件，進一步了解 CSE 誘導 ICAM-1 表現增加之可能機制。在 CSE 處理前 30 分鐘加入細胞外釋作用(exocytosis)抑制劑(Exo 1)，可以完全地壓制 CSE 誘發 ICAM-1 的表現增加，然而 Exo 1 這項壓制效果，在點型發炎因子 TNF- α 所誘導的 ICAM-1 表現增加卻是完全沒有作用。這一發現指出：CSE 及 TNF- α 誘發內皮細胞 ICAM-1 表現增加的途徑並不相同，另外也指出：細胞外釋作用在 CSE 誘導 ICAM-1 增加表現的過程中扮演重要的角色，而且此現象是本研究首次發現。先前的報導茶多酚(ECGC)透過抑制內皮的之外釋作用，可以有效抑制白血球與血管內皮細胞粘著的發炎現象(Yamakuchi et al., 2008); SLC17A9-依賴的囊泡外釋作用參與 T 細胞免疫基因的表現(Tokunaga et al., 2010); 細胞外釋作用搏動(pulsatile)與促性腺激素釋放素(GnRH)基因表達間的密切關係(Vazquez-Martinez et al., 2001)，都支持本研究發現細胞外釋作用參與 CSE 誘發 ICAM-1 增加表現的可能，進一步證實此一可能的研究仍須進行。

在 CSE 處理前 30 分鐘加入轉錄因子 AP-1 抑制劑(SR11302)，對 ICAM-1 增加表現的抑制作用並不明顯。雖然本研究室先前的報導指出：CSE 可以增加人類臍靜脈血管內皮細胞(HUVEC)AP-1 與 DNA 間的結合能力。綜合分析顯示 CSE 誘發 ICAM-1 增加表現，單獨靠 AP-1 的是不足的，它的活化可能需要搭配其他轉錄因子的活化。利用陣列分析法(array analysis)，篩選 CSE 在 EA.hy926 可能活化之轉錄因子，結果發現 CSE 的處理下，除 AP-1 的活性被明顯活化之外，有多種轉錄因子活性被更強烈的增加，這些轉錄因子依活化強度，區分為三級，第一級(為 AP-1 的 2-4 倍)：CAR、CDP、MEF2、NF-1、Pax-5、Pbx1、PPAR、Sp1、Sat1、Stat3、Stat4、TR；第二級(為 AP-1 的 4-5 倍)：E2F-1、p53S、ATB1；第三級(為 AP-1 的 6 倍以上)：GAS/ISRE、GATA、NFAT、NF-E2。另外，先前的研究報導也指出 AP-1 與 NTA 間是關係緊密的轉錄因子夥伴，在肥大細胞(mast cell)的細胞激素(cytokine)誘發即是透過 AP-1 及 NFAT 協力作用的例子(Andrade et al., 2011)，其實多種轉錄因子聯合在基因表現控制是複雜且重要的(Yeang & Jaakkola,)。這些數據支持 CSE 造成的 ICAM-1 表現增加，透過 AP-1 及其他轉錄因子活化的聯合調空是極有可能的，然而確定的參與份子及調整方式仍須進一步研究證實。總結本研究結果，我們提出 CSE 在人類血管內皮細胞增加 ICAM-1 表現的機制如圖二十五及二十六所示。CSE 造成細胞內 ROS 增加並造成內質網逆境(ER stress)，此現象將進一步造成細胞內鈣離子濃度增加，並促發細胞膜上鈣離子通道開起，讓細胞外鈣離子大量流入細胞內，造成明顯細胞骨架重組，

DNA 受傷、蛋白質氧化羰基化，蛋白質氧化羰基化的發生將破壞蛋白質交互作用，飾放出自由的 Jab1 蛋白質，並且藉微絲骨架重組，協助 Jab1 或其他轉錄因子進行細胞核轉移，最終造成 ICAM-1 表現的增加表現的工作假說。

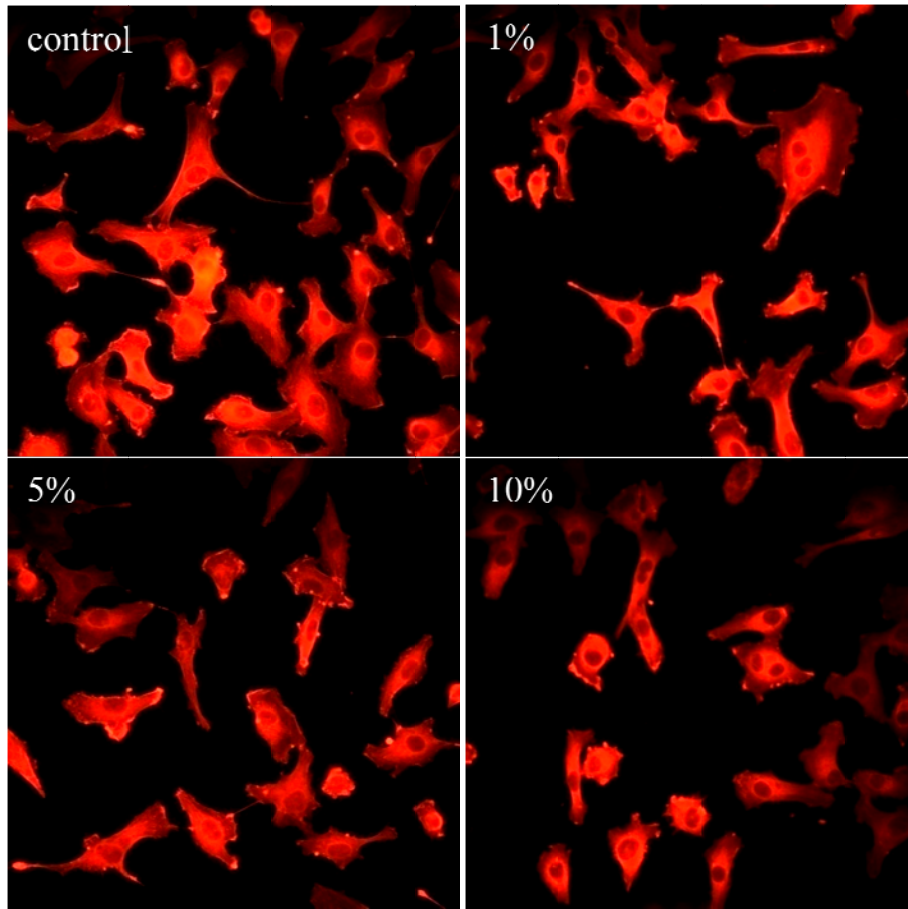
參考文獻

- Adams MR, Jessup W, Celermajer DS. Cigarette smoking is associated with increased human monocyte adhesion to endothelial cells: reversibility with oral L-arginine but not vitamin C. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29(3):491-7.
- Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(10):1731-7.
- Andrade MV, Iwaki S, Ropert C, Gazzinelli RT, Cunha-Melo JR, Beaven MA. Amplification of cytokine production through synergistic activation of NFAT and AP-1 following stimulation of mast cells with antigen and IL-33. *Eur J Immunol.* 2011;41(3):760-72.
- Barreiro E, Peinado VI, Galdiz JB, Ferrer E, Marin-Corral J, Sanchez F, Gea J, Barbera JA; on behalf of the ENIGMA in COPD Project. Cigarette Smoke-induced Oxidative Stress: A Role in COPD Skeletal Muscle Dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010. [Epub ahead of print]
- Benowitz NL. Cigarette smoking and cardiovascular disease: pathophysiology and implications for treatment. *Prog Cardiovasc Dis.* 2003;46(1):91-111.
- Chen HW, Chien ML, Chaung YH, Lii CK, Wang TS. Extracts from cigarette smoke induce DNA damage and cell adhesion molecule expression through different pathways. *Chem Biol Interact.* 2004 Dec 7;150(3):233-41.
- Chen HW, Chien ML, Chaung YH, Lii CK, Wang TS. Extracts from cigarette smoke induce DNA damage and cell adhesion molecule expression through different pathways. *Chem Biol Interact.* 2004;150(3):233-41.
- Chen HW, Chien ML, Chaung YH, Lii CK, Wang TS. Extracts from cigarette smoke induce DNA damage and cell adhesion molecule expression through different pathways. *Chem Biol Interact.* 2004;150(3):233-41.
- 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.
- 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;50(2):96-104.
- 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;50(2):96-104.
- Cheng SE, Lee IT, Lin CC, Kou YR, Yang CM. Cigarette smoke particle-phase extract induces HO-1 expression in human tracheal smooth muscle cells: role of the c-Src/NADPH oxidase/MAPK/Nrf2 signaling pathway. *Free Radic Biol Med.* 2010 May 15;48(10):1410-22.
- Damico R, Simms T, Kim BS, Tekeste Z, Amankwan H, Damarla M, Hassoun PM. p53 mediates cigarette smoke-induced apoptosis of pulmonary endothelial cells: inhibitory effects of macrophage migration inhibitor factor. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010. [Epub ahead of print]
- Doreian BW, Fulop TG, Smith CB. Myosin II activation and actin reorganization regulate the mode of quantal exocytosis in mouse adrenal chromaffin cells. *J Neurosci.* 2008;28(17):4470-8.
- Fazal F, Minhajuddin M, Bijli KM, McGrath JL, Rahman A. Evidence for actin cytoskeleton-dependent and -independent pathways for RelA/p65 nuclear translocation in endothelial cells. *J Biol Chem.* 2007;282(6):3940-50.
- Gourlay SG, Benowitz NL, Forbes A, McNeil JJ. Determinants of plasma concentrations of nicotine and cotinine during cigarette smoking and transdermal

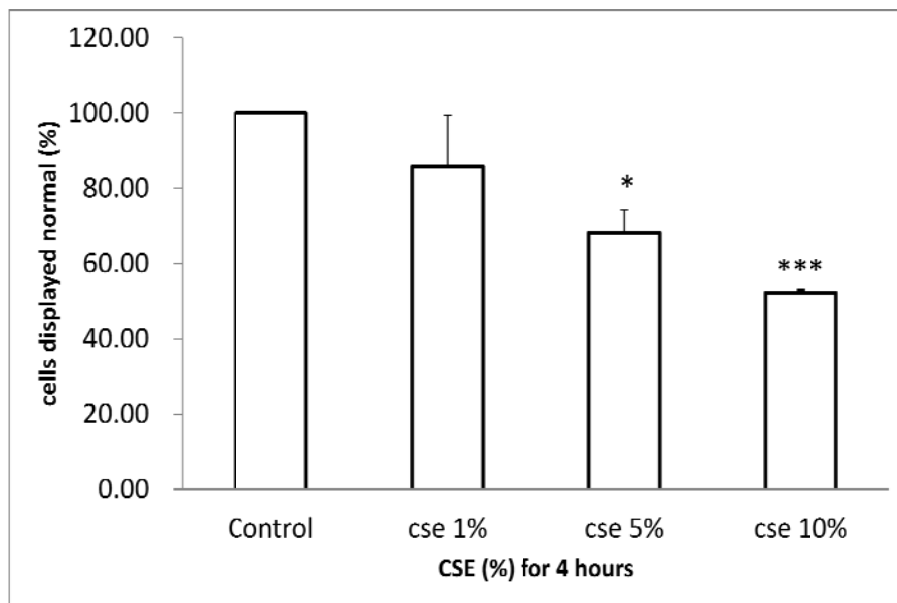
- nicotine treatment. *Eur J Clin Pharmacol.* 1997;51(5):407-14.
- Hattori Y, Kasai K. Disruption of the actin cytoskeleton up-regulates iNOS expression in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;43(2):209-13.
- Holzer N, Braun KF, Ehnert S, Egaña JT, Schenck TL, Buchholz A, Schyschka L, Neumaier M, Benzing S, Stöckle U, Freude T, Nussler AK. Green tea protects human osteoblasts from cigarette smoke-induced injury: possible clinical implication. *Langenbecks Arch Surg.* 2012 Mar;397(3):467-74.
- McConnell RE, Tyska MJ. Leveraging the membrane-cytoskeleton interface with myosin-1. *Trends Cell Biol.* 2010. [Epub ahead of print]
- Muallem S, Kwiatkowska K, Xu X, Yin HL. Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. *J Cell Biol.* 1995;128(4):589-98.
- Orosz Z, Csiszar A, Labinskyy N, Smith K, Kaminski PM, Ferdinandy P, Wolin MS, Rivera A, Ungvari Z. Cigarette smoke-induced proinflammatory alterations in the endothelial phenotype: role of NAD(P)H oxidase activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(1):H130-9.
- Rao SP, Sikora L, Hosseinkhani MR, Pinkerton KE, Sriramarao P. Exposure to environmental tobacco smoke induces angiogenesis and leukocyte trafficking in lung microvessels. *Exp Lung Res.* 2009;35(2):119-35.
- Shen Y, Rattan V, Sultana C, Kalra VK. Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transendothelial migration of monocytes. *Am J Physiol.* 1996 May;270(5 Pt 2):H1624-33.
- Shen Y, Rattan V, Sultana C, Kalra VK. Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transendothelial migration of monocytes. *Am J Physiol.* 1996;270(5 Pt 2):H1624-33.
- Su Y, Han W, Giraldo C, De Li Y, Block ER. Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;19(5):819-25.
- Su Y, Han W, Giraldo C, De Li Y, Block ER. Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;19(5):819-25.
- Tokunaga A, Tsukimoto M, Harada H, Moriyama Y, Kojima S. Involvement of SLC17A9-dependent vesicular exocytosis in the mechanism of ATP release during T cell activation. *J Biol Chem.* 2010;285(23):17406-16.
- Tsai MC, Chen WJ, Ching CH, Chuang JI. Resuscitation with hydroxyethyl starch solution prevents nuclear factor kappaB activation and oxidative stress after hemorrhagic shock and resuscitation in rats. *Shock.* 2007;27(5):527-33.
- Unverdorben M, von Holt K, Winkelmann BR. Smoking and atherosclerotic cardiovascular disease: Part II: Role of cigarette smoking in cardiovascular disease development. *Biomark Med.* 2009;3(5):617-53.
- Vazquez-Martinez R, Shorte SL, Faught WJ, Leaumont DC, Frawley LS, Boockfor FR. Pulsatile exocytosis is functionally associated with GnRH gene expression in immortalized GnRH-expressing cells. *Endocrinology.* 2001;142(12):5364-70.
- Xu Y, Li S. Blockade of ICAM-1: a novel way of vasculitis treatment. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;381(4):459-61.
- Yamakuchi M, Bao C, Ferlito M, Lowenstein CJ. Epigallocatechin gallate inhibits endothelial exocytosis. *Biol Chem.* 2008;389(7):935-41.
- Yeang CH, Jaakkola T. Modeling the combinatorial functions of multiple transcription factors. *J Comput Biol.* 2006;13(2):463-80.

圖表

(A)



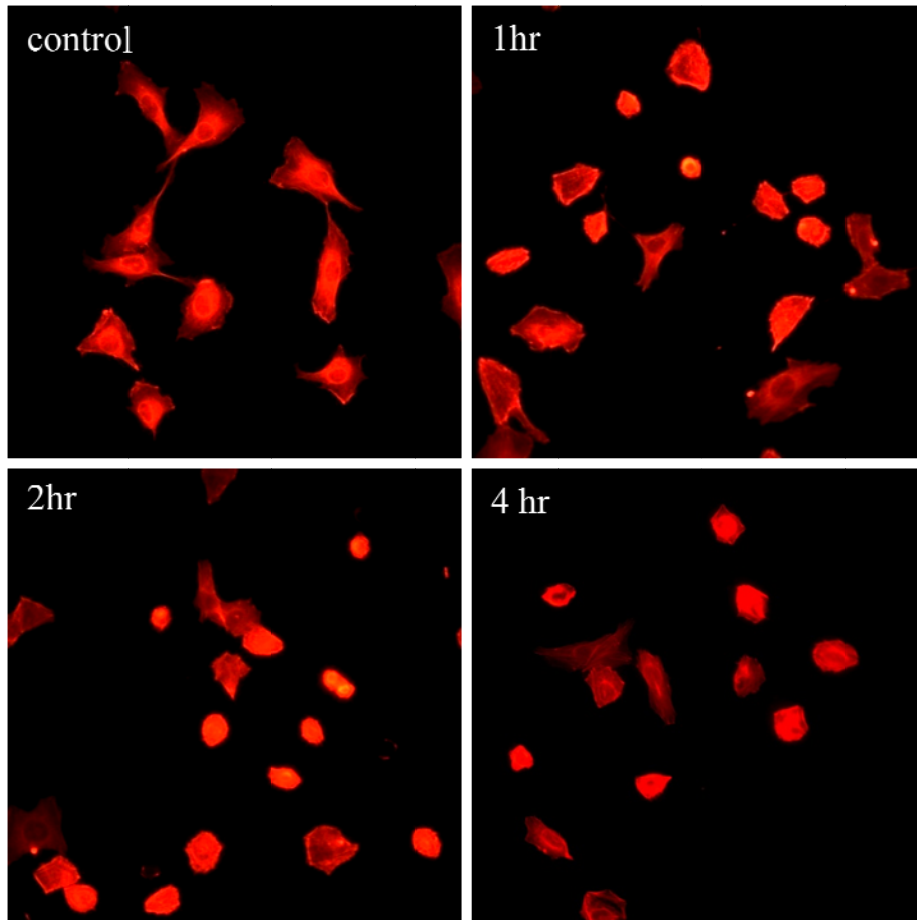
(B)



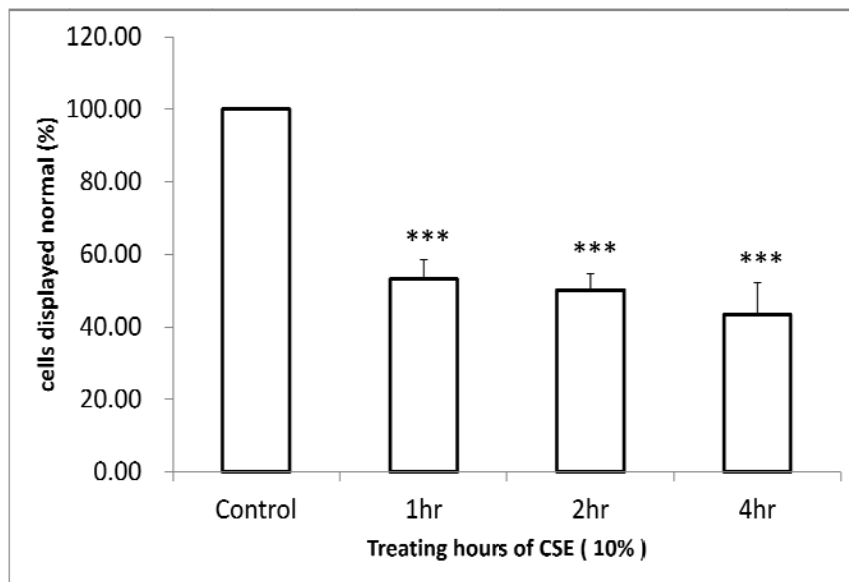
圖一、 CSE 對 EA. hy926 細胞形態變化的劑量效應。
CSE 以不同濃度(1、5、10%) 處理 4 小時後，將細胞骨架染色，以正立螢光顯微鏡觀察細胞外形並拍照記錄。(A)細胞外形照片。(B)以未處理 CSE 的細胞正常數

目當成 100%，計算各處理組的百分比。*號表示相對 Control 與處理組有統計顯著差異(* P <0.05；** P <0.01；*** P <0.001)，數據為三次試驗平均值±SD。

(A)

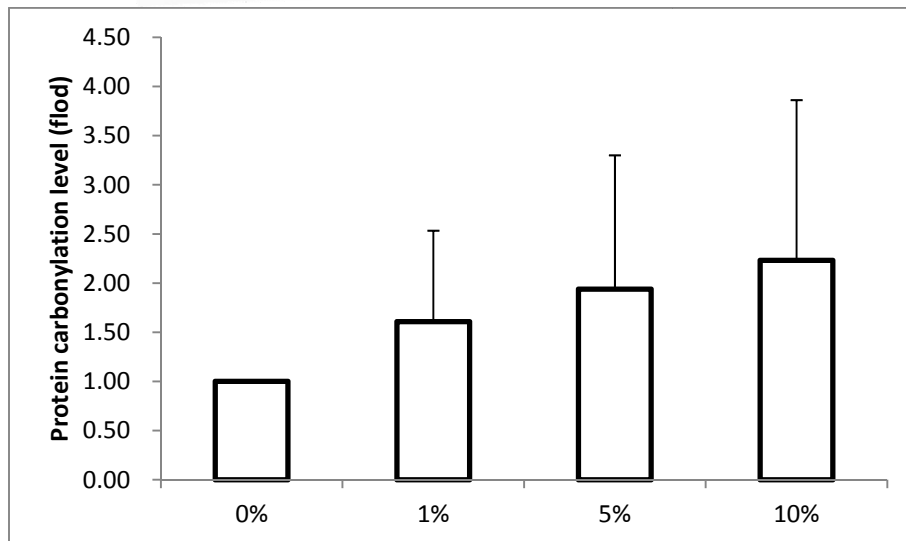
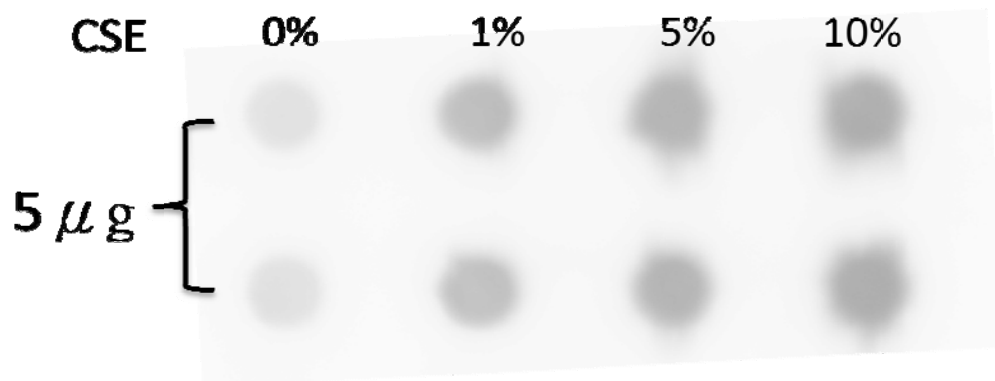


(B)

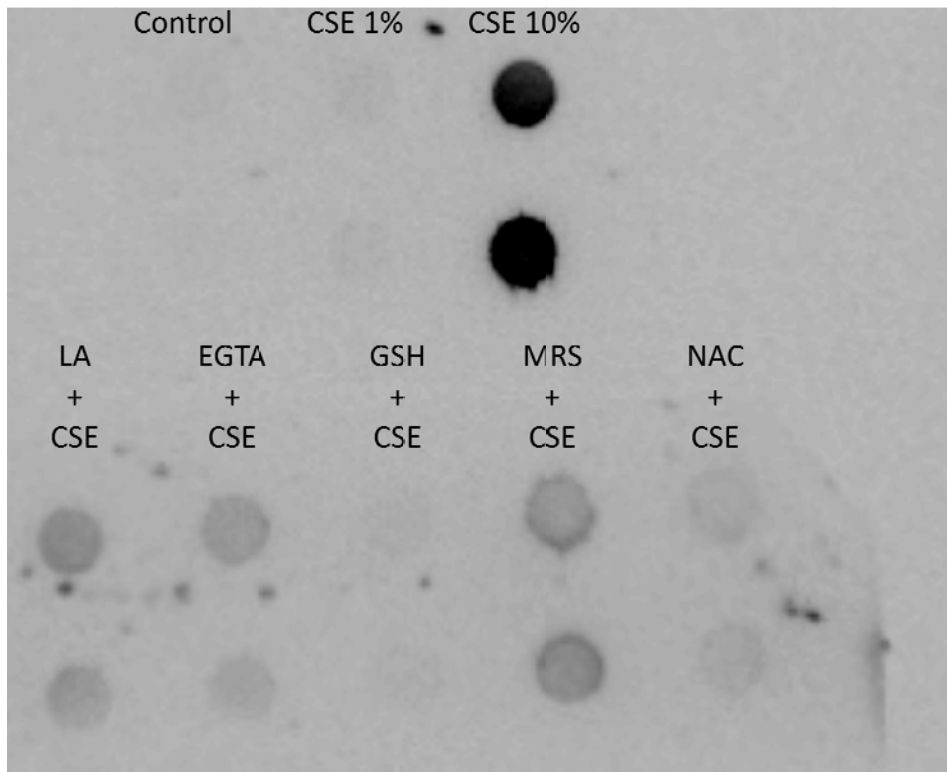


圖二、CSE 對 EA. hy926 細胞型態變化的時間效應。

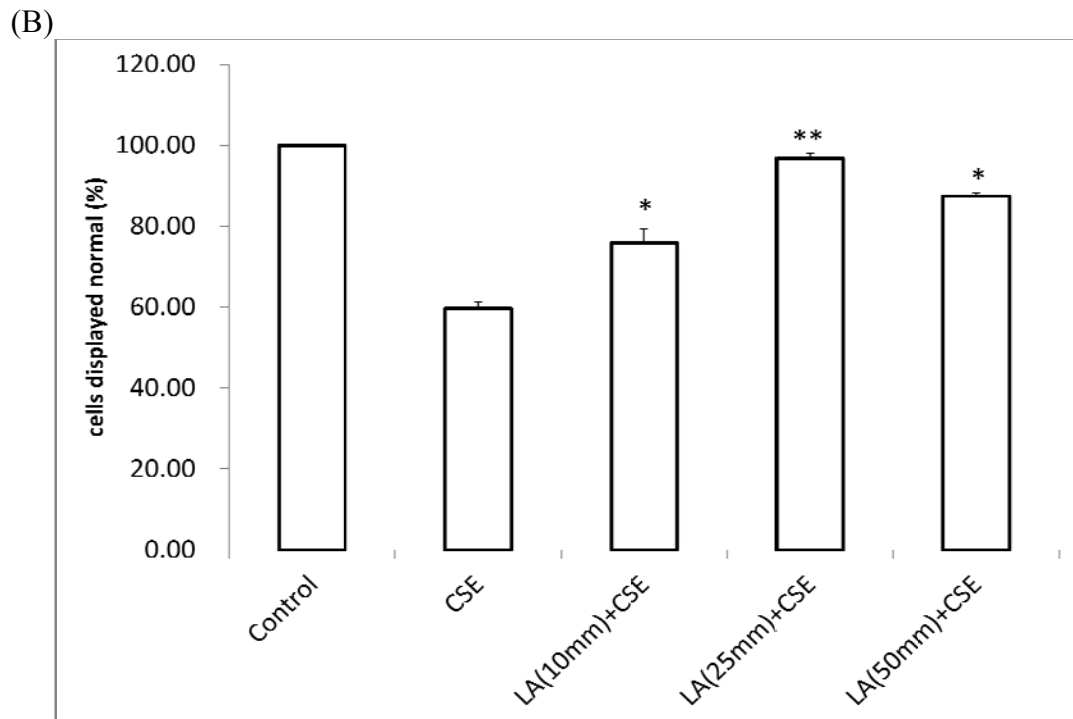
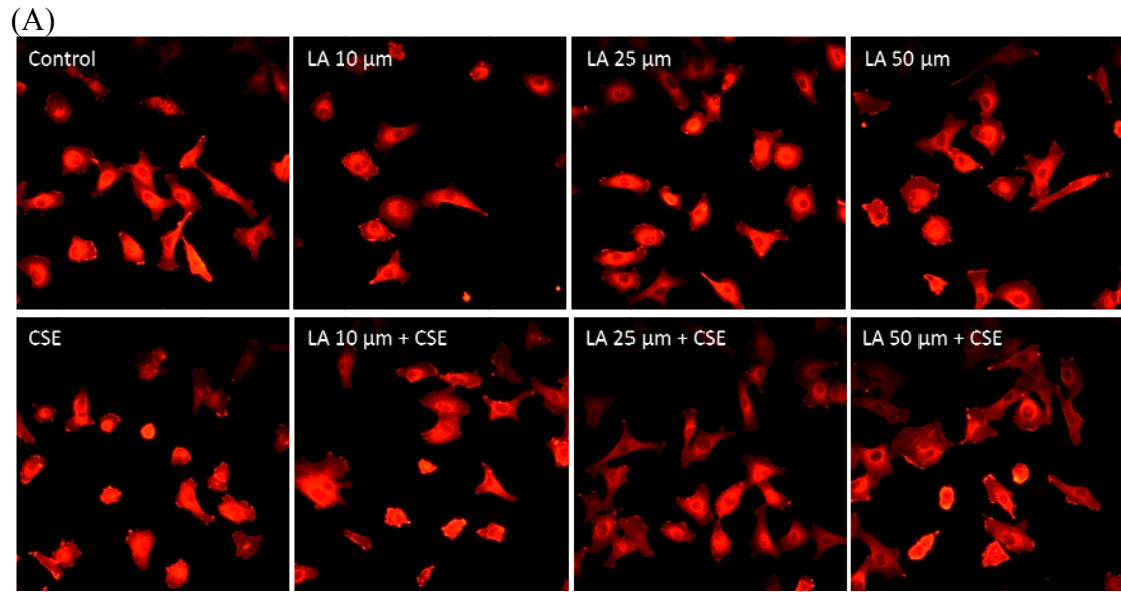
10% CSE 以不同時間(1、2、4 小時)處理 EA. hy926 細胞後，將細胞骨架染色，以正立螢光顯微鏡觀察細胞外形並拍照記錄。(A)細胞外形照片。(B)以未處理 CSE 的細胞正常數目當成 100%，計算各處理組的百分比。*號表示相對 Control 與處理組有統計顯著差異(* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ ；*** $P < 0.001$)，數據為三次試驗平均值 \pm SD。



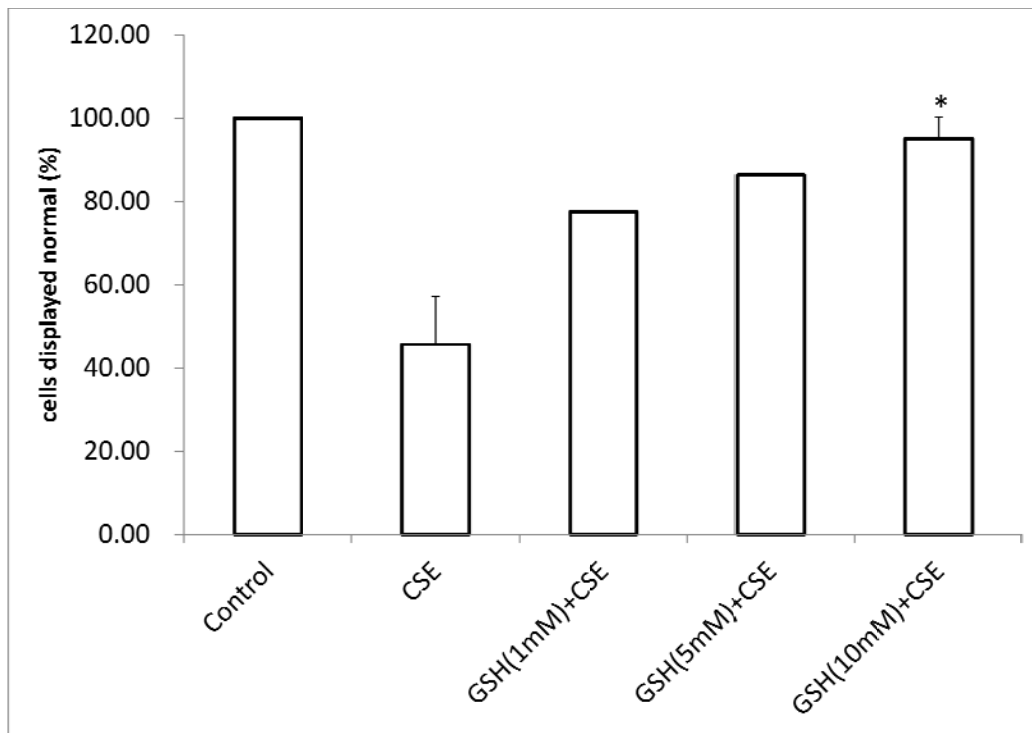
圖三、處理 CSE 4 小時對 EA. hy926 細胞蛋白質羰基化程度之影響。CSE 給予不同濃度(1、5、10%) 處理 4 小時後，收集細胞並且製備成蛋白質樣品，以蛋白質圓點轉漬法和蛋白質羰基化西方墨點法來分析蛋白質羰基化的程度。數據為三次試驗平均值±SD。



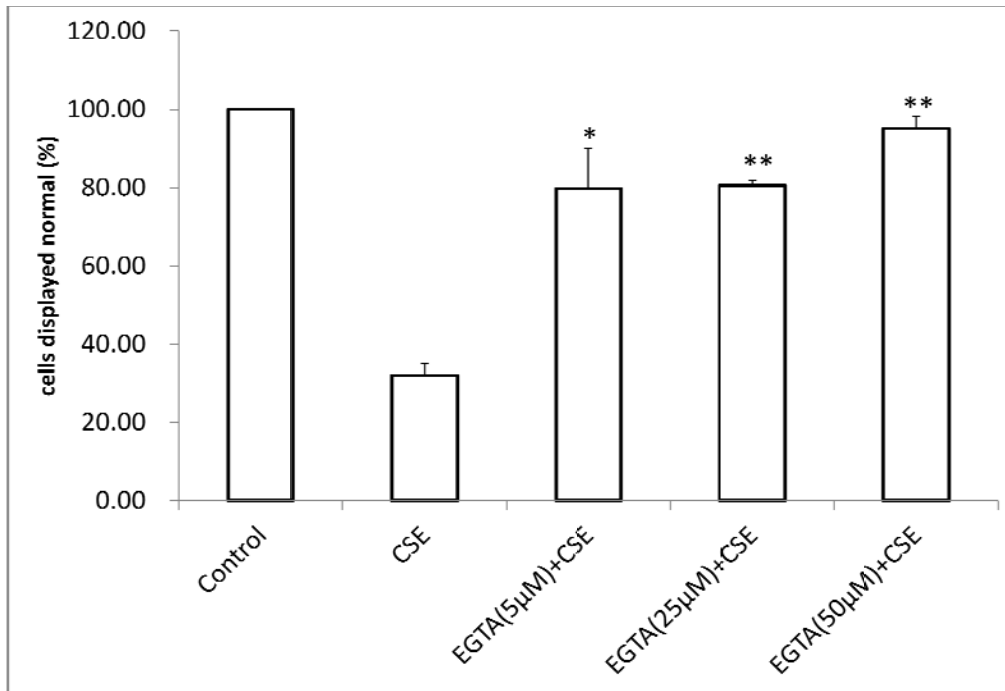
圖四、先預處理 LA、GSH、EGTA、MRS 和 NAC 對於 CSE 誘導 EA. hy926 細胞蛋白羰基化之影響。給予不同抗氧化劑 LA 25 mM、GSH 10 mM、EGTA 50 μ M、MRS 1 μ M 和 NAC 10 mM 進行預處理 0.5 小時，再和 10% CSE 共同處理 1 小時，收集細胞並且製備成蛋白質樣品，以蛋白質圓點轉漬法和蛋白質羰基化西方墨點法來分析蛋白質羰基化的程度。



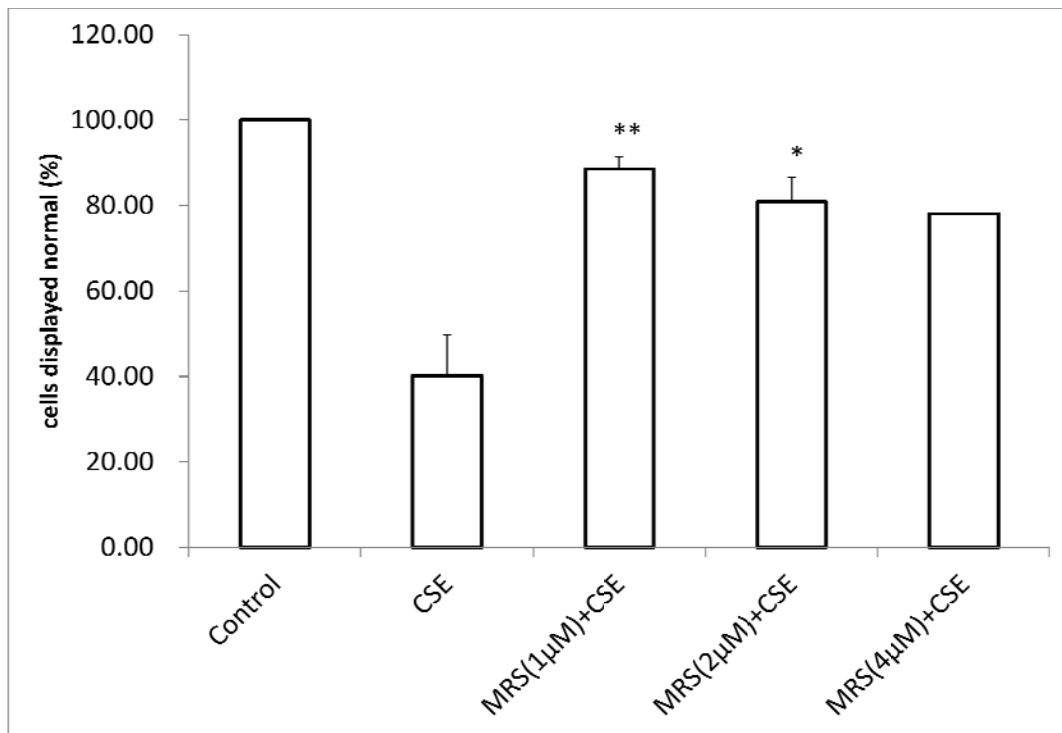
圖五、先預處理 LA 對於 CSE 誘導 EA. hy926 細胞微絲骨架變化之影響。LA 給予不同濃度(10、25、50 mM)進行預處理 0.5 小時，再和 10% CSE 共同處理 1 小時，將細胞骨架染色，以正立螢光顯微鏡觀察細胞外形並拍照記錄。(A)細胞外形照片。(B)以未處理 CSE 的細胞正常數目當成 100%，計算各處理組的百分比。
號表示 CSE 處理組與預處理組有統計顯著差異($P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)，數據為二次試驗平均值 \pm SD。



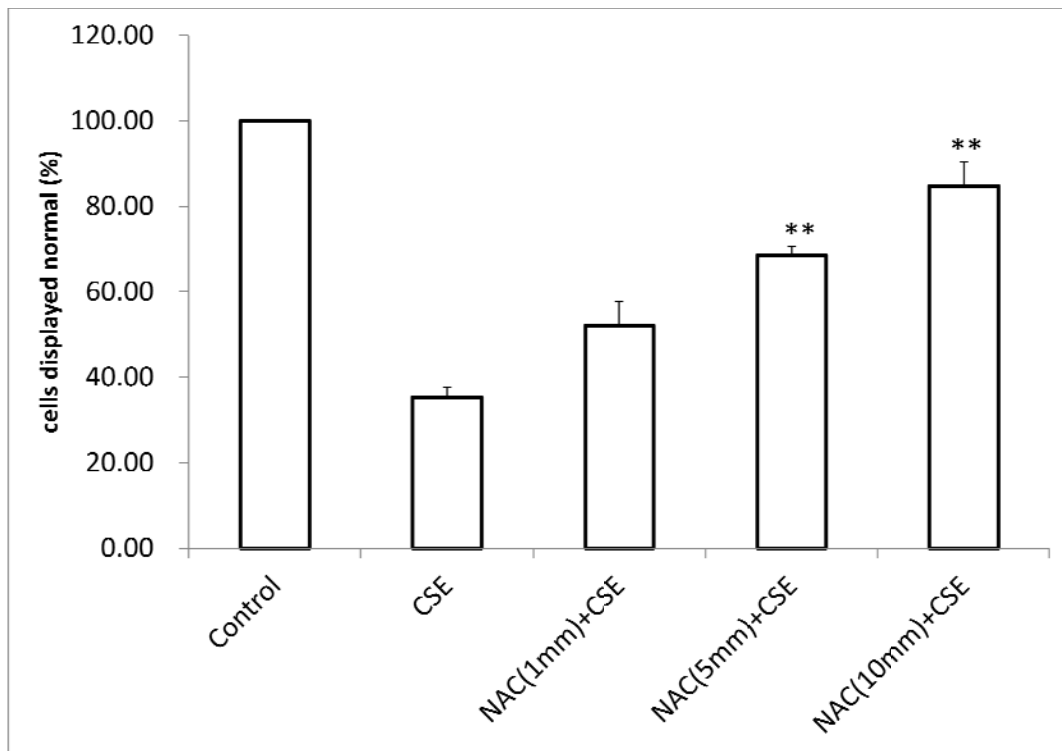
圖六、先預處理 GSH 對於 CSE 誘導 EA. hy926 細胞微絲骨架變化之影響。GSH 給予不同濃度(1、5、10 mM)進行預處理 0.5 小時，再和 10% CSE 共同處理 1 小時，將細胞骨架染色，以正立螢光顯微鏡觀察細胞外形並拍照記錄。(A)細胞外形照片。(B)以未處理 CSE 的細胞正常數目當成 100%，計算各處理組的百分比。
號表示 CSE 處理組與預處理組有統計顯著差異($P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)，數據為三次試驗平均值 \pm SD。



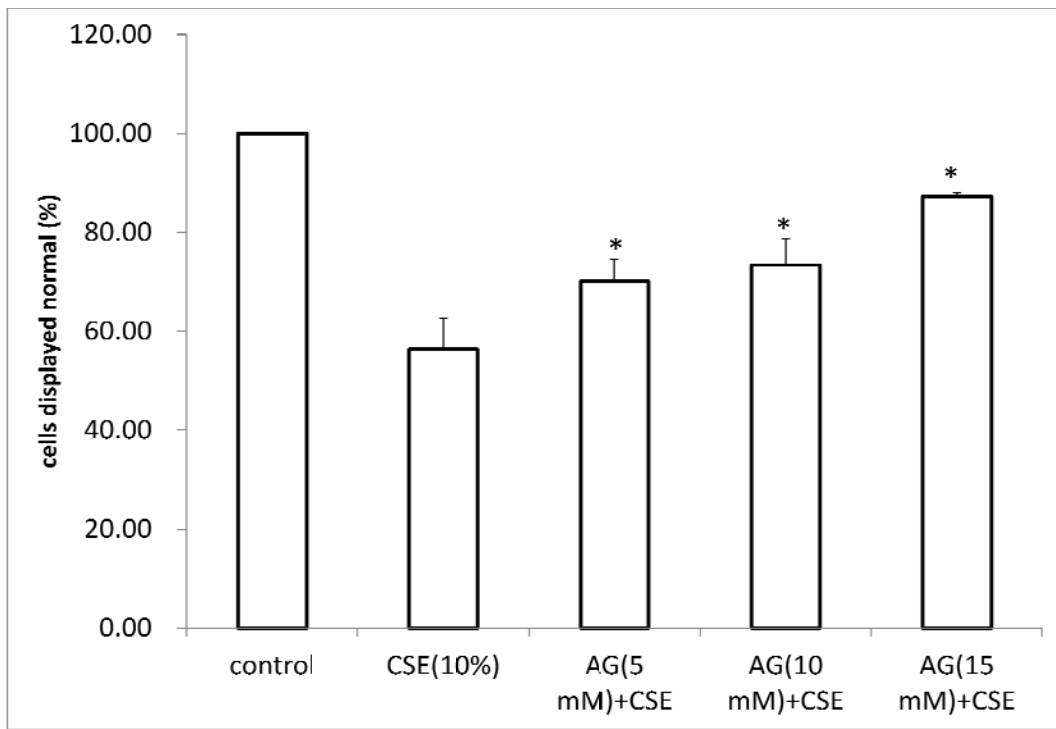
圖七、先預處理 EGTA 對於 CSE 誘導 EA. hy926 細胞微絲骨架變化之影響。EGTA 給予不同濃度(5、25、50 μM)進行預處理 0.5 小時，再和 10% CSE 共同處理 1 小時，將細胞骨架染色，以正立螢光顯微鏡觀察細胞外形並拍照記錄。(A)細胞外形照片。(B)以未處理 CSE 的細胞正常數目當成 100%，計算各處理組的百分比。
號表示 CSE 處理組與預處理組有統計顯著差異($P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)，數據為三次試驗平均值 \pm SD。



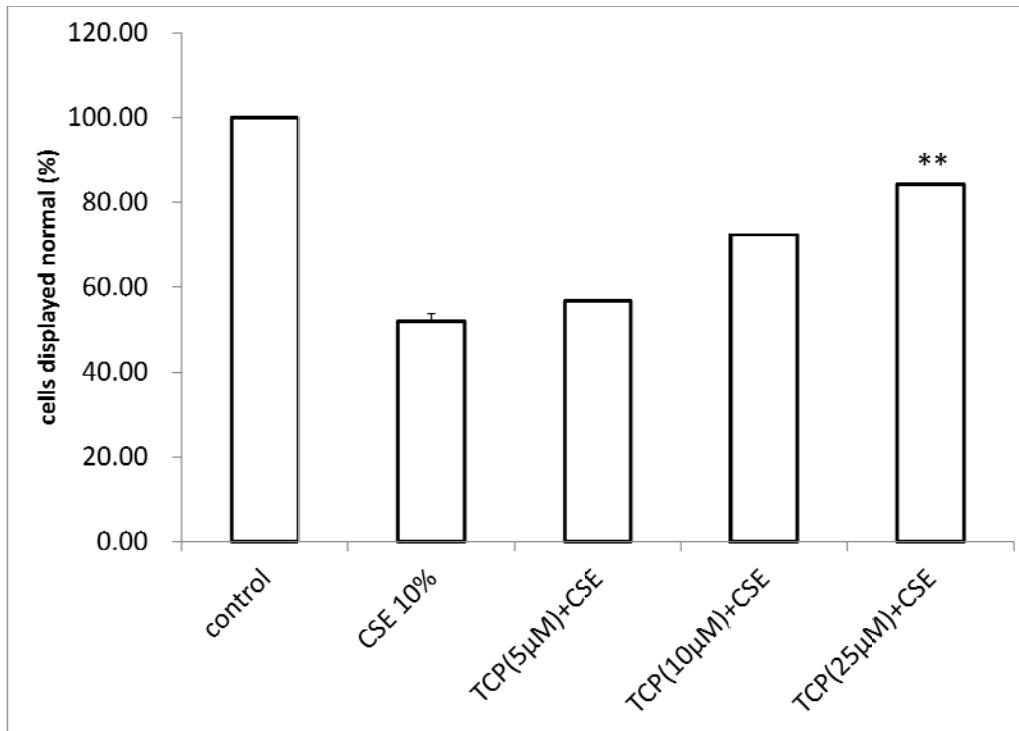
圖八、先預處理 MRS 1845 對於 CSE 誘導 EA. hy926 細胞微絲骨架變化之影響。MRS 1845 給予不同濃度(1、2、4 μM)進行預處理 0.5 小時，再和 10% CSE 共同處理 1 小時，將細胞骨架染色，以正立螢光顯微鏡觀察細胞外形並拍照記錄。(A) 細胞外形照片。(B)以未處理 CSE 的細胞正常數目當成 100%，計算各處理組的百分比。數據為三次試驗平均值 \pm SD。



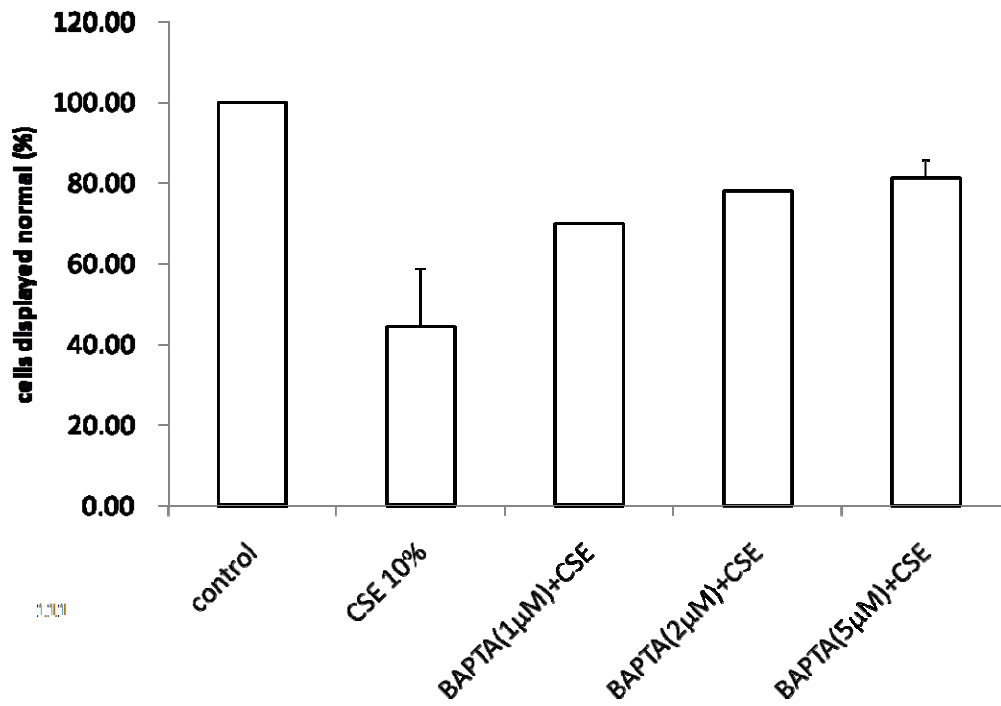
圖九、先預處理 NAC 對於 CSE 誘導 EA. hy926 細胞微絲骨架變化之影響。 NAC 給予不同濃度(1、5、10 mM)進行預處理 0.5 小時，再和 10% CSE 共同處理 1 小時，將細胞骨架染色，以正立螢光顯微鏡觀察細胞外形並拍照記錄。(A)細胞外形照片。(B)以未處理 CSE 的細胞正常數目當成 100%，計算各處理組的百分比。
號表示 CSE 處理組與預處理組有統計顯著差異($P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)，數據為三次試驗平均值 \pm SD。



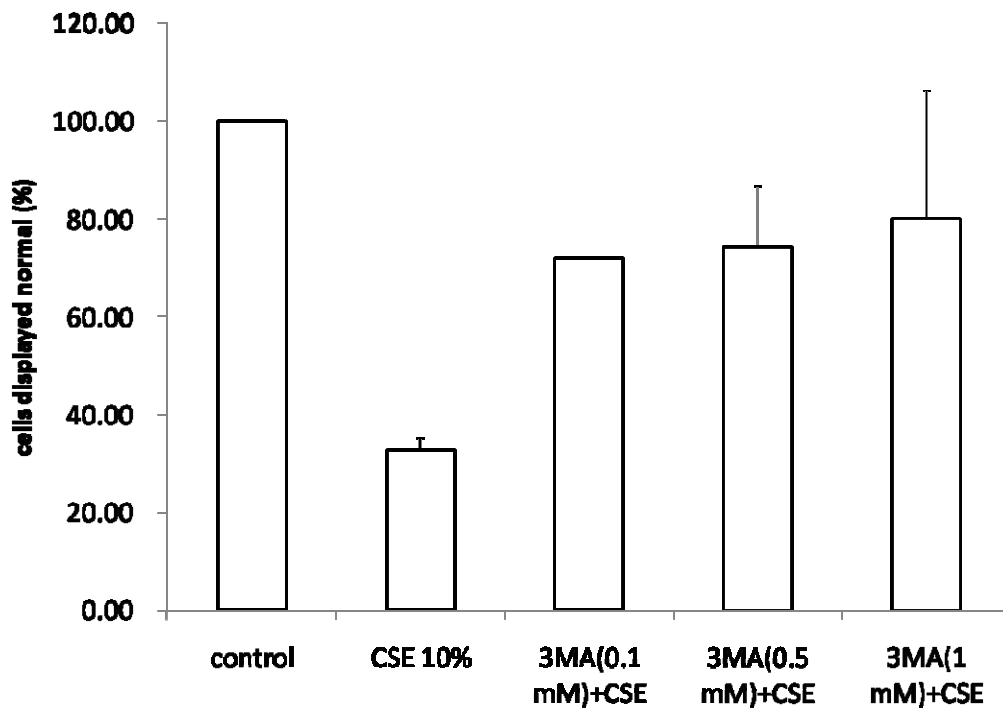
圖十、先預處理 AG 對於 CSE 誘導 EA. hy926 細胞微絲骨架變化之影響。AG 給予不同濃度(5、10、15 mM)進行預處理 0.5 小時，再和 10% CSE 共同處理 1 小時，將細胞骨架染色，以正立螢光顯微鏡觀察細胞外形並拍照記錄。(A)細胞外形照片。(B)以未處理 CSE 的細胞正常數目當成 100%，計算各處理組的百分比。*號表示 CSE 處理組與預處理組有統計顯著差異(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)，數據為二次試驗平均值 \pm SD。



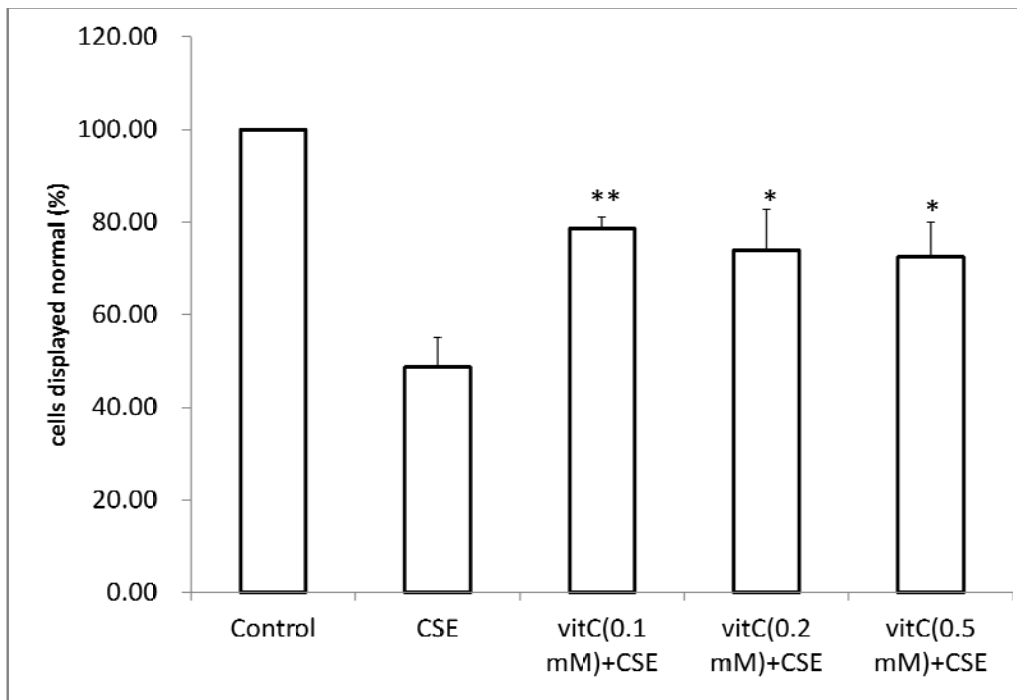
圖十一、先預處理 TCP 對於 CSE 誘導 EA. hy926 細胞微絲骨架變化之影響。TCP 給予不同濃度(5、10、25 µM)和 DMSO 進行預處理 0.5 小時，再和 10% CSE 共同處理 1 小時，將細胞骨架染色，以正立螢光顯微鏡觀察細胞外形並拍照記錄。(A)細胞外形照片。(B)以未處理 CSE 的細胞正常數目當成 100%，計算各處理組的百分比。*號表示 CSE 處理組與預處理組有統計顯著差異(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)，數據為二次試驗平均值 \pm SD。



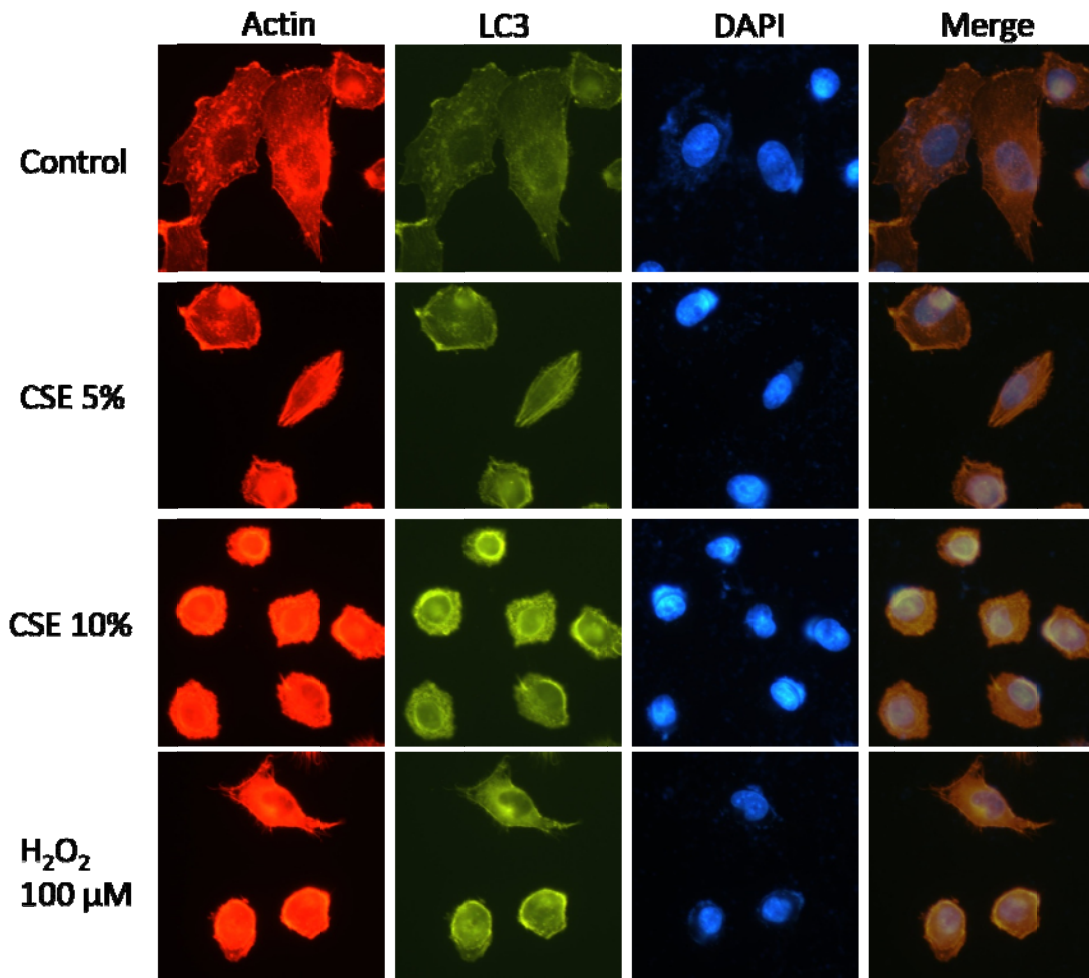
圖十二、先預處理 BAPTA 對於 CSE 誘導 EA. hy926 細胞微絲骨架變化之影響。BAPTA 給予不同濃度(1、2、5 μ M)進行預處理 0.5 小時，再和 10% CSE 共同處理 1 小時，將細胞骨架染色，以正立螢光顯微鏡觀察細胞外形並拍照記錄。(A) 細胞外形照片。(B)以未處理 CSE 的細胞正常數目當成 100%，計算各處理組的百分比。數據為二次試驗平均值 \pm SD。



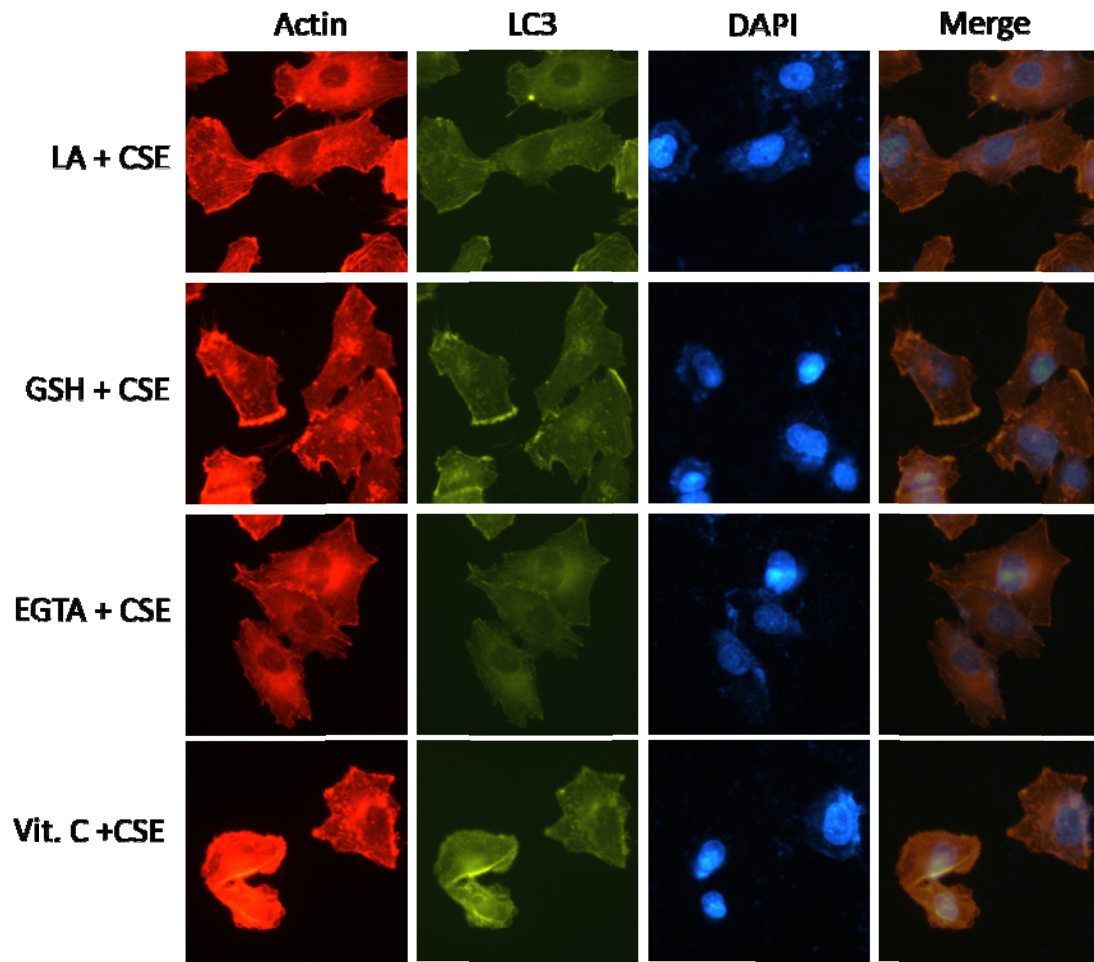
圖十三、先預處理 3MA 對於 CSE 誘導 EA. hy926 細胞微絲骨架變化之影響。3MA 給予不同濃度(0.1、0.5、1 mM)進行預處理 0.5 小時，再和 10% CSE 共同處理 1 小時，將細胞骨架染色，以正立螢光顯微鏡觀察細胞外形並拍照記錄。(A)細胞外形照片。(B)以未處理 CSE 的細胞正常數目當成 100%，計算各處理組的百分比。數據為三次試驗平均值±SD。



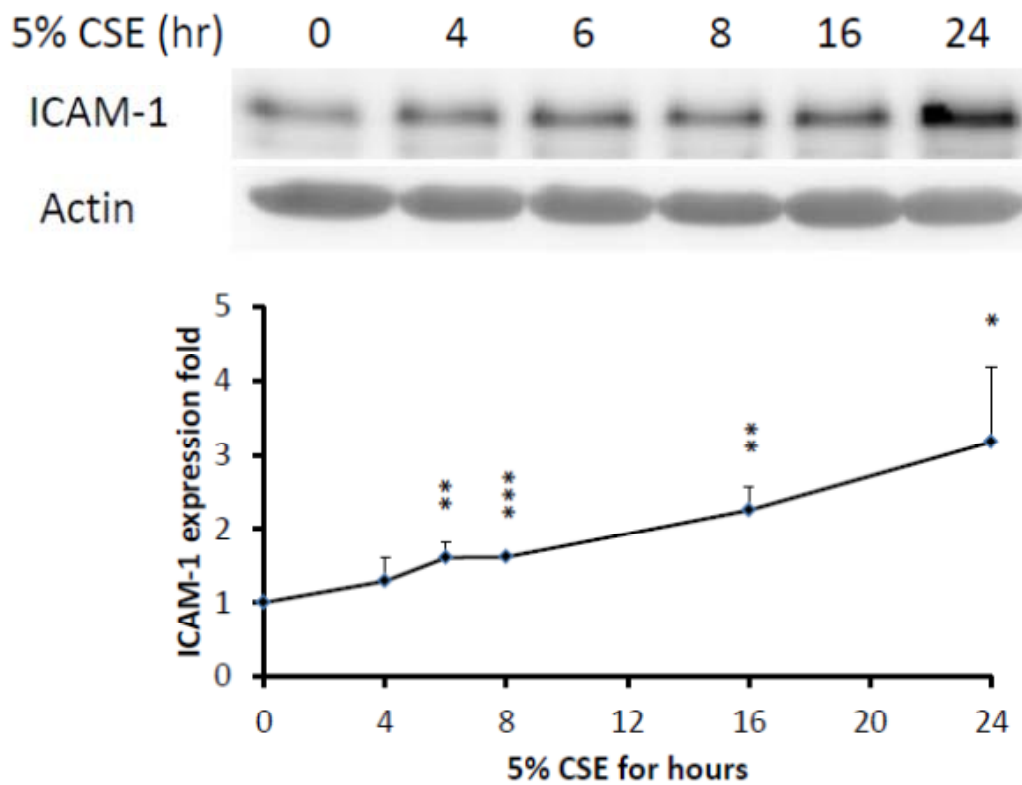
圖十四、先預處理 Vit C 對於 CSE 誘導 EA. hy926 細胞微絲骨架變化之影響。Vit C 給予不同濃度(0.1、0.2、0.5 mM)進行預處理 0.5 小時，再和 10% CSE 共同處理 1 小時，將細胞骨架染色，以正立螢光顯微鏡觀察細胞外形並拍照記錄。(A) 細胞外形照片。(B)以未處理 CSE 的細胞正常數目當成 100%，計算各處理組的百分比。*號表示 CSE 處理組與預處理組有統計顯著差異(* $P < 0.05$ ；** $P < 0.01$ ；*** $P < 0.001$)，數據為三次試驗平均值 \pm SD。



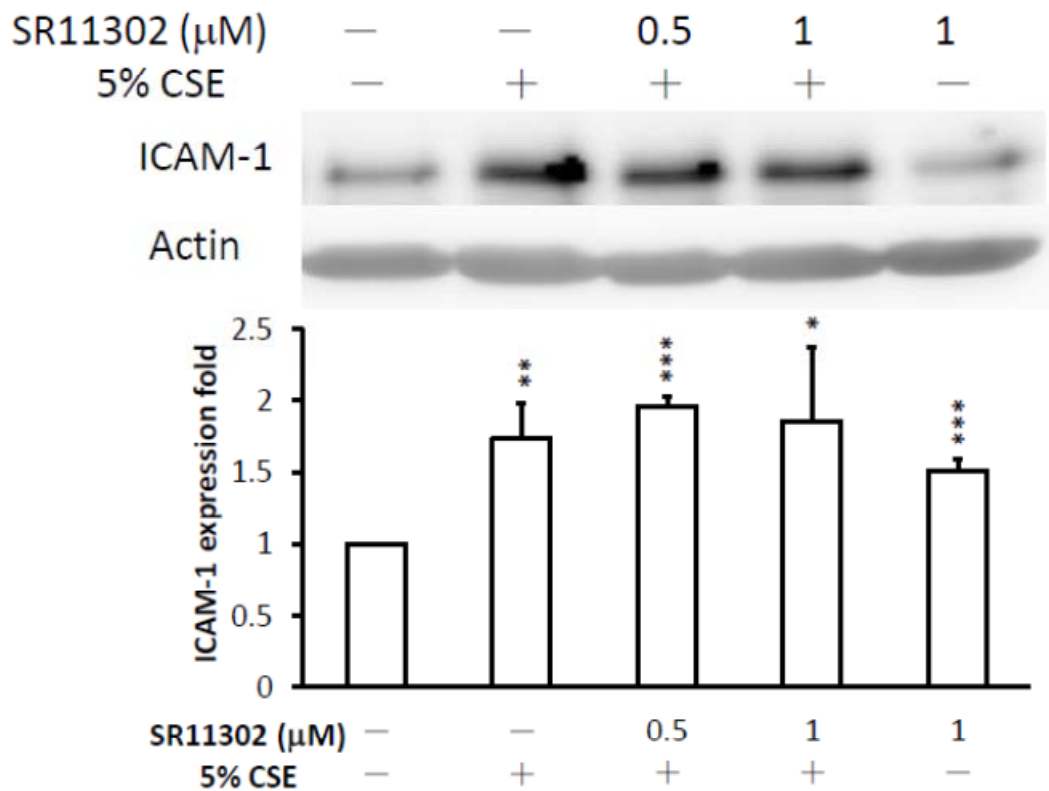
圖十五、處理 CSE 和 H₂O₂ 誘導 EA. hy926 細胞 LC3 免疫螢光變化之影響。處理 5、10% CSE 和 H₂O₂ 分別處理 1 小時，使用免疫螢光染色和 DAPI 染色，以正立螢光顯微鏡觀察細胞螢光發色和外形並拍照記錄，之後使用 PhotoImpact X3 進行 Merge。



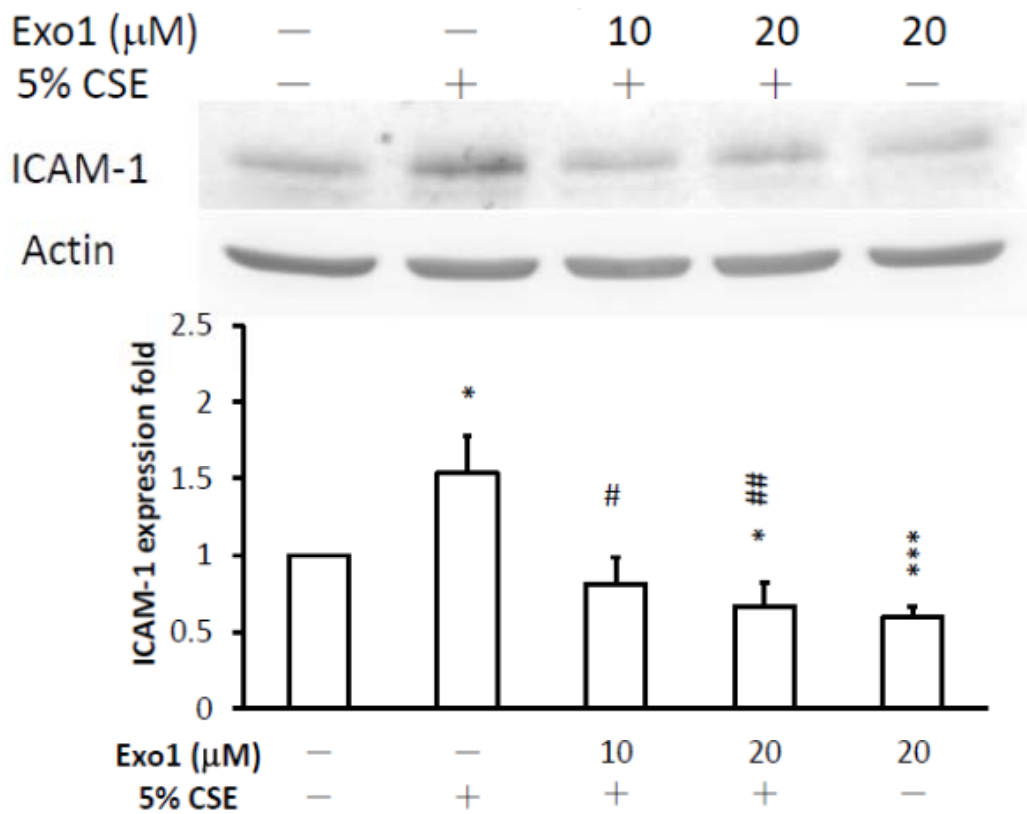
圖十六、先預處理 LA、GSH、EGTA 和 Vit C 對於 CSE 誘導 EA. hy926 細胞 LC3 免疫螢光變化之影響。給予不同抗氧化劑 LA 25 mM、GSH 10 mM、EGTA 50 μ M 和 Vit C 0.5 mM 進行預處理 0.5 小時，再和 10% CSE 共同處理 1 小時，使用免疫螢光染色和 DAPI 染色，以正立螢光顯微鏡觀察細胞螢光發色和外形並拍照記錄，之後使用 PhotoImpact X3 進行 Merge。



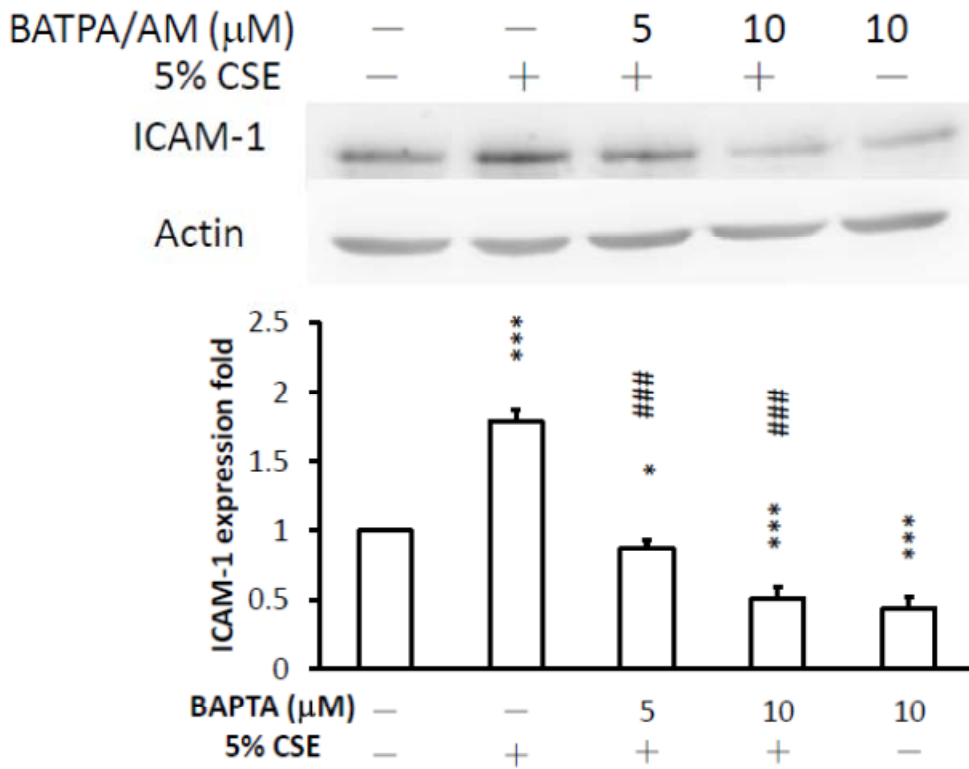
圖十七、以 5% CSE 處理不同時間點對 EA.hy926 細胞內誘發 ICAM-1 蛋白質表現影響。EA.hy926 細胞以不同時間點 (4、6、8、16 與 24 小時) 各別加入 5% CSE，觀察細胞內誘導 ICAM-1 蛋白質表現量的情形，以西方墨點法分析。對照組數據設為 1，計算處理組相對於對照組比值。*號表示相對處理組與對照組間有統計顯著差異 ($*P<0.05$ ； $**P<0.01$ ； $***P<0.001$)，數據為三次試驗平均值 \pm SD。



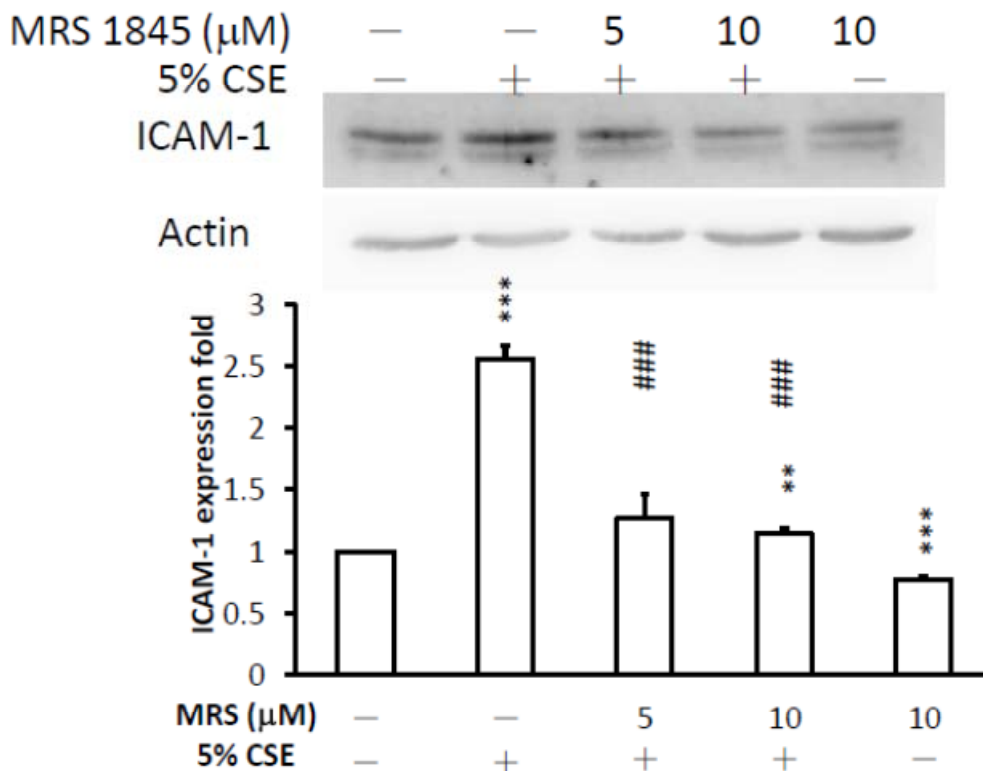
圖十八、SR11302 抑制劑對人類血管內皮細胞內誘導 ICAM-1 蛋白質表現量。EA.hy926 細胞預先處理 SR11302 (0.5 與 1 μM) 抑制劑，再處理 5% CSE 24 小時，觀察細胞內誘導 ICAM-1 蛋白質表現量的情形，以西方墨點法分析。對照組數據設為 1，計算處理組相對於對照組比值。*號表示相對處理組與對照組間有統計顯著差異 (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)，數據為三次試驗平均值 \pm SD。



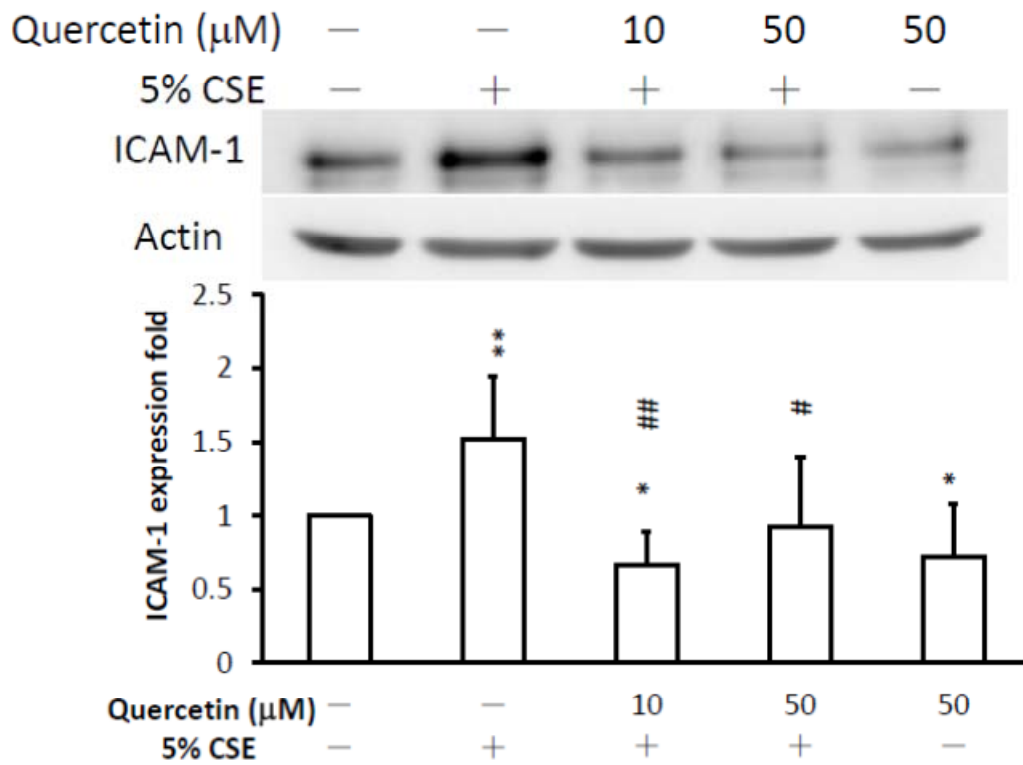
圖十九、Exo1 對人類血管內皮細胞內誘導 ICAM-1 蛋白質表現量。EA.hy926 細胞預先處理 Exo1 (10 與 20 μM) 抑制劑，再處理 5% CSE 24 小時，觀察細胞內誘導 ICAM-1 蛋白質表現量的情形，以西方墨點法分析。對照組數據設為 1，計算處理組相對於對照組比值。*號表示相對處理組與對照組間有統計顯著差異 ($*P<0.05$ ； $***P<0.001$)，#號表示相對處理組與正對照組間有統計顯著差異 ($\#P<0.05$ ； $\#\#P<0.01$)，數據為三次試驗平均值 \pm SD。



圖二十、BATPA/AM 鈣離子螯合劑對人類血管內皮細胞內誘導 ICAM-1 蛋白質表現量。EA.hy926 細胞預先處理 BATPA/AM (5 與 10 μM) 螯合劑，再處理 5% CSE 24 小時，觀察細胞內誘導 ICAM-1 蛋白質表現量的情形，以西方墨點法分析。對照組數據設為 1，計算處理組相對於對照組比值。*號表示相對處理組與對照組間有統計顯著差異 ($*P<0.05$ ； $***P<0.001$)，#號表示相對處理組與正對照組間有統計顯著差異 ($####P<0.001$)，數據為三次試驗平均值 \pm SD。

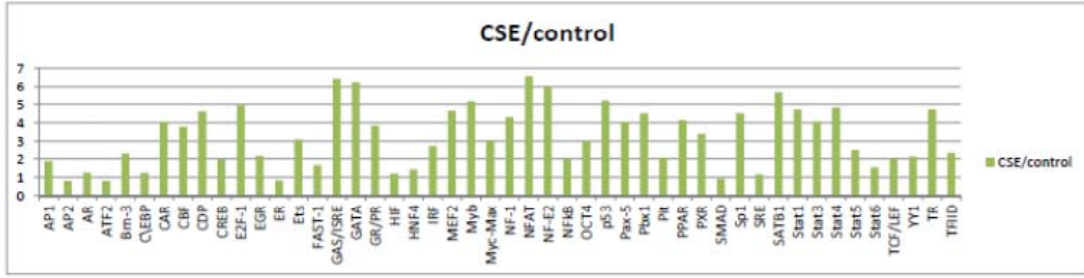


圖二十一、鈣離子通道抑制劑對人類血管內皮細胞內誘導 ICAM-1 蛋白質表現量。EA.hy926 細胞預先處理 MRS 1845 (5 與 10 μM) 抑制劑，再處理 5% CSE 24 小時，觀察細胞內誘導 ICAM-1 蛋白質表現量的情形，以西方墨點法分析。對照組數據設為 1，計算處理組相對於對照組比值。*號表示相對處理組與對照組間有統計顯著差異 (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)，#號表示相對處理組與正對照組間有統計顯著差異 (#### $P < 0.001$)，數據為三次試驗平均值 \pm SD。

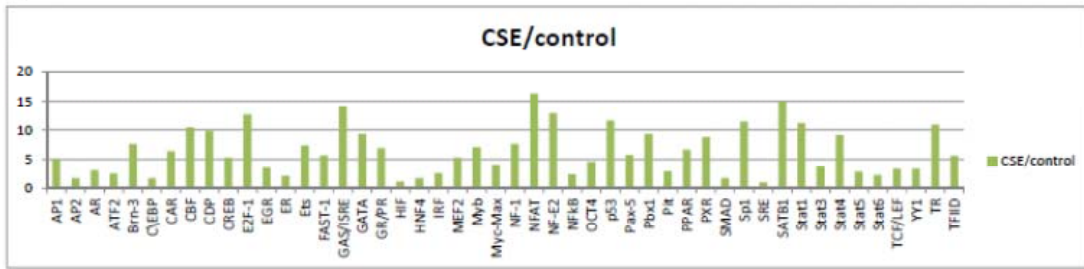


圖二十二、 Quercetin 抗氧化劑對人類血管內皮類似細胞內誘導 ICAM-1 蛋白質表現量。將 EA.hy926 細胞共同處理 Quercetin (10 與 50 μM) 與 5% CSE，經過 24 小時後，觀察細胞內誘導 ICAM-1 蛋白質表現量的情形，以西方墨點法分析。對照組數據設為 1，計算處理組相對於對照組比值。*號表示相對處理組與對照組間有統計顯著差異 ($*P<0.05$ ； $**P<0.01$)，#號表示相對處理組與正對照組間有統計顯著差異 ($\#P<0.05$ ； $\#\#P<0.01$)，數據為三次試驗平均值 \pm SD。

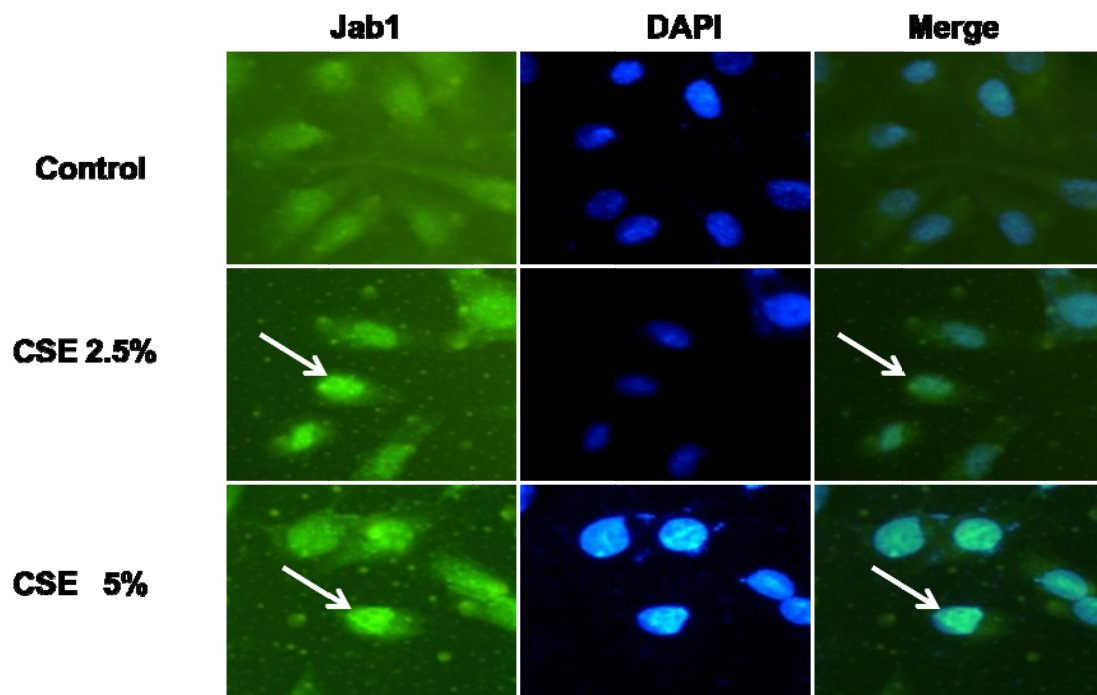
(A) Reaction time: 5 mins



(B) Reaction time: 15 mins



圖二十三、CSE 對人類靜脈內皮細胞 48 種轉錄因子活化之影響。細胞經 CSE (5%)處理 24 小時，細胞核蛋白質萃取物(9 μ g)中 48 種轉錄因子活性變化以 TF Activation Profiling Plate Array I (Signosis)套件進行分析，螢光反應之訊號於 5 分鐘 (A)、15 分鐘 (B)各測量一次。



圖二十四、CSE 對人類靜脈內皮細胞內 Jab1 蛋白質分轉移之影響。細胞經 CSE (2.5% 或 5%) 處理 24 小時，細胞內 Jab1 蛋白質的分佈情形，利用免疫螢光顯微鏡進行觀察並照像。細胞核位置則利用 DNA 螢光染劑(DAPI)進行染色定位。

圖二十五、CSE 誘導人類血管內皮細胞微絲骨架重整及細胞死亡可能之分子機制。LA: lipoic acid, GSH: glutathione, NAC: N-acetylcysteine, AG: aminoguanidine; TCP: alpha-tocopherol; VitC: ascorbic acid; ER: endoplasmic reticulum。

圖二十六、CSE 造成細胞內 DNA 傷害、蛋白質羰基化、微絲骨架重整及增加 ICAM-1 基因表現，比彼此間可能的作用機轉。

國科會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：本研究內容包含確認香菸煙霧水提取物誘發 ICAM-1 基因增加表現之分子機轉，以及可能之防治之道與原計畫內相符一致。

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

總結本研究結果，我們證實 CSE 造成細胞內 ROS 增加並造成內質網逆境(ER stress)，此現象將進一步造成細胞內鈣離子濃度增加，並促發細胞膜上鈣離子通道開起，讓細胞外鈣離子大量流入細胞內，造成明顯細胞骨架重組，DNA 受傷、蛋白質氧化羰基化，蛋白質氧化羰基化的發生將破壞蛋白質交互作用，飾放出自由的 Jab1 蛋白質，並且藉微絲骨架重組，協助 Jab1 或其他轉錄因子進行細胞核轉移，最終造成 ICAM-1 表現的增加表現的工作假說，這項假說包含下列六個階段。階段一：促進細胞內 ROS 上升；階段二：形成 ER stress 並釋放鈣離子；階段三：細胞外大量鈣離子流入；階段四：促進蛋白質大量的氧化羰基化並釋放轉錄因子 Jab1 蛋白質；階段五：藉微絲骨架重組，促成 Jab1 蛋白質的細胞核轉移；階段六：Jab1 蛋白質輔助 c-Jun 或 AP-1 並增加其轉錄活性，最終增加 ICAM-1 基因的表現。本研究對抽菸如何導致動心血管疾病可提供解釋之基礎，對利用抗氧化劑或鈣離子抑制劑來防治菸害也提供重要的參考依據。

會議心得報告

日期：99年7月31日

計畫編號	NSC 98-2320-B-040-MY3		
計畫名稱	香煙萃物誘發 ICAM-1 基因增加表現之分子機制及防治研究		
出國人員姓名	王祖興	服務機構及職稱	中山醫學大學-生物醫學科學系
會議時間	99年7月19日至 99年7月23日	會議地點	西班牙-巴塞隆納
會議名稱	(中文)第12屆國際毒理學研討會 (英文) XII International Congress of Toxicology		
發表論文題目	(中文)甲基乙二醛經活性氧非依賴蛋白質羰基化方式在人類血管內皮細胞造成 DNA-蛋白質連結 (英文) Mehtylglyoxal-induced DPC in ECV304 cells via a ROS-independent protein carbonylation pathway		

一、參加會議經過

國際毒理學會每三年舉辦一次，今年第12屆於99年7月19日到99年7月23日，在西班牙-巴塞隆納的會議中心 (Palau de Congressos de Barcelona) 舉行，本研討論想達成在科學的環境下讓毒理學不同相關領域間有互動的公開論壇。7月18日本人由台中搭車至桃園機場出發，經香港 - 慕尼黑 - 巴塞隆納。7月19日至會場完成報到並領取名牌、大會手冊及餐卷等資料，晚間18:00參加研討會開幕。7月20-23日聆聽專家學者的演講並觀看壁報論文，並於7月22日13:00-15:00在大廳發表壁報論文一篇並與參觀的專家學交流討論。

二、與會心得

本次是第二次參與國際毒理學研討會，國際毒理學會與各國毒理學會合作，每三年於不同國家之國際城市舉行，每年參與的人數均非常踴躍，在大會所舉辦的演講及壁報展中，有相當多學習毒理學新知的機會，每日的會議還提供餐飲，服務比起上一屆周到且貼心。在壁報會議中也有機會跟當地的博士生聊畢業後出路的問題，普遍也表示教研市場在歐洲也相當的飽和，就業不易。最後也很感謝本校幫助，補助差旅費，讓我得已有此機會參與此大型的國際會議，透過當面解說自己的研究成果，除了有機會拜訪國際知名城市外，還可與世界各地的研究者交換彼此的研究心得，進一步提升自己的研究視野，也對他人的研究成果有進一步的認識。

三、考察參觀活動(無是項活動者略)

四、建議

希望本國毒理學會也能在國科會的指導與補助下，在本國承接舉辦國際毒理學研討會。

五、攜回資料名稱及內容

大會詳細議程、演講及壁報論文合輯一冊及摘要補遺一冊。

六、其他

無研發成果推廣資料

98 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：98-2320-B-040-019-MY3				計畫名稱：香煙萃物誘發 ICAM-1 基因增加表現之分子機制及防治研究	
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	0	0	0%		
		研討會論文	0	0	0%		
		專書	0	0	0%		
	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	2	2	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
博士後研究員		0	0	100%			
專任助理		0	0	100%			
國外	論文著作	期刊論文	0	1	100%	篇	revise manuscript-1 篇 preparation-1 篇
		研究報告/技術報告	0	0	0%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%		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	2	2	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	0%		
		專任助理	1	1	100%		
						99 年陳韻芳 100 年黃千維	

<p>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，請以文字敘述填列。)</p>	<p>無</p>
--	----------

	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	

國科會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）

總結本研究結果，我們證實 CSE 造成細胞內 ROS 增加並造成內質網逆境(ER stress)，此現象將進一步造成細胞內鈣離子濃度增加，並促發細胞膜上鈣離子通道開起，讓細胞外鈣離子大量流入細胞內，造成明顯細胞骨架重組，DNA 受傷、蛋白質氧化羧基化，蛋白質氧化羧基化的發生將破壞蛋白質交互作用，飾放出自由的 Jab1 蛋白質，並且藉微絲骨架重組，協助 Jab1 或其他轉錄因子進行細胞核轉移，最終造成 ICAM-1 表現的增加表現的工作假說，這項假說包含下列六個階段。階段一：促進細胞內 ROS 上升；階段二：形成 ER stress 並釋放鈣離子；階段三：細胞外大量鈣離子流入；階段四：促進蛋白質大量的氧化羧基化並釋放轉錄因子 Jab1 蛋白質；階段五：藉微絲骨架重組，促成 Jab1 蛋白質的細胞核轉移；階段六：Jab1 蛋白質輔助 c-Jun 或 AP-1 並增加其轉錄活性，最終增加 ICAM-1 基因的表現。本研究成果對抽菸如何導致動心血管疾病可提供解釋之基礎，對利用抗氧化劑或鈣離子抑制劑來防治菸害也提供重要的參考依據。