

出國報告(出國類別：出國短期進修)

探討相關於動脈硬化之激酶活性

服務機關：國防醫學院三軍總醫院

姓名職稱：鄭書孟、主治醫師

派赴國家：美國

報告日期：98年7月16日

出國時間：98年1月16日至7月15日

摘要(200-300 字)

動脈硬化是一種慢性疾病，全身之器官均可能受到影響，尤其是跟心臟血管疾病有密切的關係。而且動脈硬化已知為一種發炎性疾病，其中某種激酶，如 Rho Kinase 的增加，與發炎反應息息相關。目前已知肥胖是一種代謝症候群，與心臟血管疾病有關，且易產生血管病變，而導致急性心臟血管疾病發作。因此瞭解動脈硬化相關 Rho Kinase 反應的強弱與肥胖，高血脂症的相關性及可能免疫細胞的影響，就很重要，因此取得肥胖者減重前後的血液標本及膽固醇治療前後的血液標本，測量 Rho Kinase 的變化，是本次在美國波士頓 Brigham and Women's Hospital 實驗室進修主要的課題。同時藉由瞭解 Rho Kinase 的變化，以提供肥胖及高血脂症不良影響的其中機轉。

目次

	頁碼
<u>本文</u>	
「目的」	4
「過程」	5-7
「心得」	7
「建議事項」	7-8
<u>附錄</u>	8-9

本文

「目的」

1. 於 98 年 1 月 16 日至 98 年 7 月 15 日到美國波士頓 Brigham & Women' s Hospital 進修，在廖教授(Prof. James K. Liao)主持的血管研究實驗室 (Vascular Research Laboratory)進行動脈硬化相關激酶，如 Rho Kinase 等的研究。
2. 爲了進一步瞭解免疫細胞，如白血球對血中發炎物質的影響以及可能對心臟血管疾病之影響，因此學習測定白血球中 Rho Kinase 的活性，同時學習相關文章的探討，以瞭解相關基礎研究的方法。
3. 同時學習相關於 Rho Kinase 基因有無表現之老鼠的基因型偵測。
4. 利用免疫細胞，如巨噬細胞，進行研究，瞭解 Arginine 對活化巨噬細胞後所產生的 Rho Kinase 的活性有無影響。
5. 爲了驗證白血球中 Rho Kinase 的活性強弱，因此取得肥胖者及高血脂症血液，進行分析，以瞭解減重前後及膽固醇治療前後有無 Rho Kinase 的活性

差異。

6. 參與實驗室文章探討及實驗結果呈現。
7. 進修期間，學習指導教授所進行的臨床研究及基礎研究的範圍及相關實驗室的先進技術，同時建立往後良好之合作關係。

「過程」

於美國進修六個月期間，首先瞭解實驗室發展方向。目前實驗室以動物及細胞實驗並行，及與其他醫院進行合作相關臨床研究為主，因此就朝此方向進行實驗；同時參加實驗室討論會及本地醫院研討會，以學習新知。

一. 老鼠基因型之檢測:

1. 目前實驗室爲了探討 Rho Kinase 的活性，瞭解跟動脈硬化的相關性，因此以基因剔除鼠爲主來研究，我主要幫忙分其基因型。
2. 因爲時間因素，無法參加動物實驗講習，未能進動物實驗室進行動物飼養，只能在實驗室學習其基因型檢測。

二. 巨噬細胞之實驗:

1. 因爲實驗室有巨噬細胞株及可以學習從老鼠骨髓培養巨噬細胞，因此利用 Arginine(一種生成人體一氧化氮的前驅物)來培養巨噬細胞(細胞株及骨髓細胞)，看氧化劑(H₂O₂)對巨噬細胞的影響。
2. 因爲氧化劑(H₂O₂)會造成 Rho Kinase 的活性增加，因此瞭解到是否 Arginine

可以抑制氧化劑(H₂O₂)所產生 Rho Kinase 的活性，以證明 Arginine 對相關於動脈硬化的免疫細胞有調解作用。

三. 肥胖者減重及膽固醇治療前後之實驗:

1. 實驗的血液標本來自臺灣某家醫院，經評估為肥胖者為實驗組，經過肥胖者同意及醫師詳加解釋後，獲得肥胖者基本資料，如體重，身高，年齡，性別，血壓及服用藥物等基本狀況，同時徵求數十位正常者為對照組。
2. 膽固醇治療前後的病人血液標本來自本地 (Boston) Children' s Hospital.
3. 然後抽取實驗組及對照組的血液作為分析，以比較其 Rho Kinase 活性，瞭解其高低有何不同，抽取血液後，經由離心及化學藥品的反應作用，以取得白血球沉澱物，然後將白血球沉澱物加入反應試劑，以抽取蛋白質，接著利用電泳方式，以分離不同質量的蛋白質，然後轉印蛋白質至一種薄膜上，加入一級及二級抗體而成像，最後得到 Rho Kinase 的反應圖形，然後分析其強弱以比較其不同。
4. 減重實驗組同時經由運動及飲食的控制來減輕體重，同時減重後再抽取血液，利用上述方法再來比較減重前後 Rho Kinase 活性的高低有何不同。膽固醇治療前後的病人，利用治療膽固醇藥物，來分析降膽固醇藥物，對 Rho Kinase 活性的高低有何不同。
5. 利用此種實驗方式，來比較實驗組及對照組的差異性，或治療前後的結果，以提供可能致病機制及治療效果。

四. 實驗室活動:

1. 按照排定日期，每個人輪流於每隔一次周五早上，選擇一篇文章，於進行報告後，開放大家討論。
2. 同時，每隔一次周五早上，進行個人實驗結果呈現，然後由指導教授分析及提示進行方向。

五. 醫院演講活動:

1. 每周三下午，由內科部主持，由各個實驗室輪流安排演講題目，大部份是由研究 Fellows 來演講，以其實驗的成果呈現為主；亦有邀請來賓來作專題演講。
2. 每周四下午，參加由 Children' s Hospital 舉辦的一系列血管研究研討會，演講者大部份是院外人士，且實驗成果有目共睹者。

「心得」

經過六個月的進修，期間雖然不長，且主要以實驗為主，而非臨床學習；但可以瞭解不同環境的實驗狀況，耳濡目染實驗室的氣氛及聽到傑出的研究者演講，於知識的增進獲益良多。

1. 可以瞭解先進研究的方向，啟發自己的思考。
2. 可以親自操作實驗，瞭解相同實驗方式，卻不同處理流程的訣竅，以啟發自我小心處理細節的能力。
3. 可以瞭解臨床研究的進行，病人的溝通方式，以及如何處理運送標本，同時自我學習相關統計的計巧。

4. 目前經濟不景氣，美國的實驗環境亦受經費影響，進而學習如何整合實驗，避免浪費資源。

「建議事項」

1. 多安排人員與國外的學術交流，尤其參加研討會，以得知最新訊息。
2. 多安排人員進修，尤其是長期進修及博士後研究，更可以瞭解最新的進展。
3. 鼓勵國內博士班學生及研究所老師，尋求國外相關研究課題的實驗室進行合作，甚至到國外進行研究，畢竟國外的儀器及經費似乎較充沛。
4. 能夠預先提供欲前往進修地點的訊息，尤其是聯絡管道，或者誰曾經去過，以減少行前的不安及可以作充分的準備工作。

附錄

1. 實驗室已發表 Rho Kinase 實驗操作的文章摘要

Abstract

The Rho-associated kinases (ROCKs) can regulate cell shape and function by modulating the actin cytoskeleton. ROCKs are serine-threonine protein kinases that can phosphorylate adducin, ezrin-radixin-moesin proteins, LIM kinase, and myosin light chain phosphatase. In the cardiovascular system, the RhoA/ROCK pathway has been implicated in angiogenesis, atherosclerosis, cerebral and coronary vasospasm, cerebral ischemia, hypertension, myocardial hypertrophy, and neointima formation after vascular injury. ROCKs consist of two isoforms: ROCK1 and ROCK2. They share overall 65% homology in their amino acid sequence and 92% homology in their amino kinase domains. However, these two isoforms have different subcellular localizations and exert biologically different functions. In particular, ROCK1 appears to be more important for immunological functions, whereas ROCK2 is more important for endothelial and vascular smooth muscle function. Thus, the ability to measure ROCK activity in tissues and cells would be important for understanding mechanisms underlying cardiovascular disease. This chapter describes a method for measuring ROCK activity in peripheral blood, tissues, and cells.

Vascular Medicine Research Unit, Brigham and Women's Hospital and Harvard, Medical School,
Boston, Massachusetts

Methods in Enzymology, Volume 439

© 2008 Elsevier Inc.

2. 實驗室已發表代謝性症候群跟 Rho Kinase 相關的文章摘要

Objectives	We sought to determine whether Rho kinase (ROCK) activity is increased in a Taiwanese population with metabolic syndrome (MetS).
Background	Recent studies suggest that ROCK may be involved in the pathogenesis of MetS, but clinical studies linking ROCK with MetS are lacking.
Methods	We studied 40 Taiwanese subjects (60% men, mean age 55.5 ± 5.6 years) who were diagnosed with MetS with National Cholesterol Educational Program Adult Treatment Panel III criteria and 40 age- and gender-matched control subjects. Subject demographics were recorded, and blood samples were obtained.
Results	Compared with control subjects, ROCK activity, as determined by phosphorylation of myosin binding subunit (MBS) in leukocytes, was greater in MetS subjects (mean phospho-MBS/MBS ratio 0.46 vs. 0.35, $p = 0.002$). A cutoff value for ROCK activity of 0.39 predicted the presence of MetS with specificity and sensitivity rates of 70%. Plasma high-sensitivity C-reactive protein was greater (5.5 mg/l, 95% confidence interval [CI] 3.1 to 7.2 mg/l vs. 2.8 mg/l, 95% CI 1.1 to 3.9 mg/l, $p = 0.01$) and adiponectin was lower (4.9 $\mu\text{g/ml}$, 95% CI 3.2 to 6.1 $\mu\text{g/ml}$ vs. 5.9 $\mu\text{g/ml}$, 95% CI 4.2 to 7.5 $\mu\text{g/ml}$, $p = 0.01$) in MetS subjects compared with control subjects, but plasma levels of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha were not different ($p > 0.05$ for both). Body mass index, waist circumference, fasting glucose, high-sensitivity C-reactive protein, and triglyceride levels were associated with increased levels of ROCK activity. The risk of increased ROCK activity increased with the number of MetS components (p for trend < 0.001).
Conclusions	Rho kinase activity is increased in Taiwanese subjects with MetS and is associated with each component of MetS and markers of inflammation. These findings suggest that ROCK activity may be a novel serological marker of MetS. (J Am Coll Cardiol 2007;49:1619-24) © 2007 by the American College of Cardiology Foundation

3. 於實驗室研究的初步結果整理概要

- (1) Arginine 可以抑制氧化劑(H₂O₂)所產生 Rho Kinase 的活性。
- (2) 肥胖者 Rho Kinase 的活性比正常者增加；如果經由減重，可能使 Rho Kinase 的活性有下降趨勢，但統計學上無明顯意義。
- (3) 降膽固醇治療後，Rho Kinase 的活性有降低趨勢，但樣本數少，故統計學上的意義不明顯。

全文完