

出國報告(出國類別：進修)

英國博士學位進修心得報告  
研究主題：鉀離子通道在血管平滑肌上之鈣  
離子調控機轉

服務機關：國防醫學院三軍總醫院

姓名職稱：蔡遠明、主治醫師

派赴國家/地區：英國里茲

出國期間：105年9月28日至109年11月29日

報告日期：110年1月7日

## 摘要

根據 2016 年 WHO 統計，因呼吸系統疾病死亡人數約占百分之二十四，死亡率僅次於心血管疾病，而此 2 大類系統疾病均和細胞內鈣離子濃度有密切關連，因為心肌及血管平滑肌的收縮程序乃藉由特定離子通道加以調控鈣離子。第 7 型鉀離子通道已證實在癲癇及疼痛控制上扮演重要的角色，但在血管平滑肌上及缺氧環境下的鈣離子調控機轉仍然不是很清楚。不平衡的鈣離子濃度亦會造成氣喘、慢性阻塞性疾病、肺高壓、癌症及心血管疾病產生。職雖在第 1 年進修結束後，原指導教授(Prof. Chris Peers)因健康因素辦理退休而需更換實驗室，但在新任指導教授(Prof. Nikita Gamper)幫忙下仍讓我保留原研究主題，並順利在歐州鈣離子會議獲得優秀年輕學者獎，研究成果也發表在國際期刊(Cell Calcium)。期許自己未來能將兩位教授帶給我的理論及精神，結合臨床實務加以提升研究能量。

摘要.....	2
目的.....	4
過程.....	4
心得與建議.....	6

## 目的

第 7 型鉀離子通道(Kv7)是細胞膜上控制膜電位的重要離子通道，其在神經系統上扮演著煞車的角色，可讓細胞電位過極化。最新發表的關於第 7 型鉀離子通道在血管平滑肌上亦扮演著關鍵地位，其可使已收縮的血管舒張。鈣離子濃度調控多樣生理功能，如：基因傳遞、肌肉及血管收縮等。藉由證實第 7 型鉀離子通道在鈣離子濃度調控機制中存在緊密的相互作用，可有助於理解第 7 型鉀離子通道在生理功能上的調控機制，進而揭示其相關疾病的病理生理學基礎。職前往享負盛名的英國里茲大學從事基礎醫學研究，當地有知名約克郡心臟醫學中心，進修期間專注於鈣離子調控機制，希望透過深入的訊息傳導路徑研究，能為未來的新藥開發進一步找到方向，同時也為病患找到有效的治療方法來減緩肺高壓的進展，爭取移植等待機會。

## 過程

### 第一年

1. 舉家剛到英國，面臨全新的生活與語言環境。於剛開始的第 1 個月因指導教授住院而無法迅速進入實驗室生活，但也因此利用這段時間辦理學校註冊，銀行開戶及找好住宿，同時逐漸適應環境並加強語言的溝通能力。
2. 在實驗室學習上，從最基礎的細胞培養開始，接著在教授的安排下學習操作即時聚合酶鏈式反應(RT-PCR)、細胞計數、鈣訊號偵測。
3. 於第 6 個月時通過學院第一次進程報告，同時利用時間學習研究之後會用到的會議表達技

巧、論文寫作技巧及統計學分析等。

4. 於第 12 個月時順利通過 Transfer Viva(報告及口試)，取得博士候選人資格。

## 第二年

1. 指導教授於完成我的 Transfer Viva 並遞交相關報告至學院後，因健康因素住院接受檢查，這也是我最後一次見指導教授。最後在 106 年 11 月指導教授寄信給大家說明因健康因素，他需辦理退休而在 107 年 1 月由校方召集實驗室全體成員宣佈實驗室解散並討論每一位成員的未來動向。
2. 107 年 2 月，經校方及第一年的口試委員 Prof. Nikita Gamper 同意接替成為新任指導教授，而原指導教授 Prof. Chris Peers 為共同指導教授。同月搬至新的辦公室，重新適應環境。
3. 107 年 4 月開始進行實驗，設法趕上進度。
4. 107 年 5 月 20 日原指導教授過世，7 月時另一共同指導教授無預警去職，8 月 Prof. Derek Steele 同意加入指導團隊。
5. 107 年 9 月投稿歐州鈣離子大會獲得年經優秀學者獎。

## 第三年

1. 原先在動物的細胞株的實驗獲得初步結果，接著運用人體的血管平滑肌來印證期基因表現型及鈣訊號反應。
2. 實驗室技巧方面，學習西方墨點法、免疫螢光染色及 DNA 電泳表現，同時嘗試新的膜電位指示劑，設法獲得突破並運用在平滑肌實驗。同年，通過年度考核，惟口試官考量到新

穎膜電位指示劑可能無法短期內獲得實驗結果，而經費補助僅有 4 年，建議延長進修的可能性。

3. 文章發表方面，開始進行資料收集整理及更一步的結果分析比較。
4. 108 年 6 月將基礎研究及臨床實務結合，投稿至第 27 屆歐州胸腔外科醫學會獲得前 3 名，進入決賽評比。

#### 第四年

1. 在新的膜電位指示劑實驗上獲得成功，我們發現在血管平滑肌上，鈣訊號及膜電位變化的共振盪效應。
2. 新型冠狀病毒全球爆發，英國及學校於 109 年 3 月底時進入封閉階段，所有實驗停止，人員僅能居家工作，會議及討論均採線上方式。
3. 封城期間，繼續整理實驗結果並進行文章寫作及修改。經指導教授及團隊成員協助下，於 109 年 8 月獲國期期刊 Cell Calcium 接受刊出。
4. 有於全球疫情的不確定、英國封城及學校遲未開放達半年之久，遂將目標放在博士論文寫作。

#### 心得與建議

1. 於英國進修博士沒有強制修課及學分的規定，好處是自主性很大但也有可能會因目標不明確而讓時間稍縱即逝。英國大學的資源多，定期及不定期的課程及會議講座及也多，對於目標的設定要明確外，時間的分配也一定要確時，除了實驗室工作的時間可以靠自己彈性

安排外，許多有趣而可激發實驗靈感的會議講座切莫錯過。

2. 在進修的過程中，沒有人願意遭遇更換研究方向甚至是整個實驗室(含指導教授)，而我都剛好遇到了，將近一年內心的不安、等待、茫然及煎熬和後續要再重新融入一個新的團隊實在艱辛。針對研究上瓶頸，可以建議的是除了同團隊成員外，也可以找不同實驗室但同辦公室的可靠同伴討論，通常同一年的博士生都很願意互相幫忙，因為同樣的問題大家都會遭遇，另外每一個博士生都會有分配一位導師，有任何問題，不管是在生活或學業上也都是可以請益的對象。
3. 前後 2 位指導教授鼓勵實驗室成員參加大型會議外，交通住宿等費用也都由學校或實驗室經費支付。藉由海報或口頭報告，可以訓練講述自己的研究設計和目前結果外，同時也可聆聽來賓講者的前瞻想法及實驗設計。每一次會議，除了大開眼界外也會讓自己了解到更多的不足。
4. 在博士學位的進修過程中，收穫有第 1 任指導教授帶給我離子通道的基本概念，研究的重點在於想法和創意。另外，第 2 任指導教授，除了讓我了解到跨國及團隊合作的重要性，也讓我了解到邏輯性、一致性及創新元素在發表文章上的重要性。
5. 返國後繼續研究所需，實驗室方面需求為可以進行鈣離子訊號偵測的螢光顯微鏡(Fura2)，未來需用到技術及設備為細胞自動計數器、免疫螢光染色、西方墨點法、即時聚合酶鏈式反應及 DNA 電泳，更進一步期盼可以和施行電位測定的實驗團隊合作。
6. 預定於 110 年 1 月 16 日於三軍總醫院胸腔外科舉辦之國軍胸腔外科研討會及 3 月 4 日 0730 時於外科部部務會議中分享進修心得。



Figure1. 2018 歐州鈣離子大會獲得年輕優秀學者獎



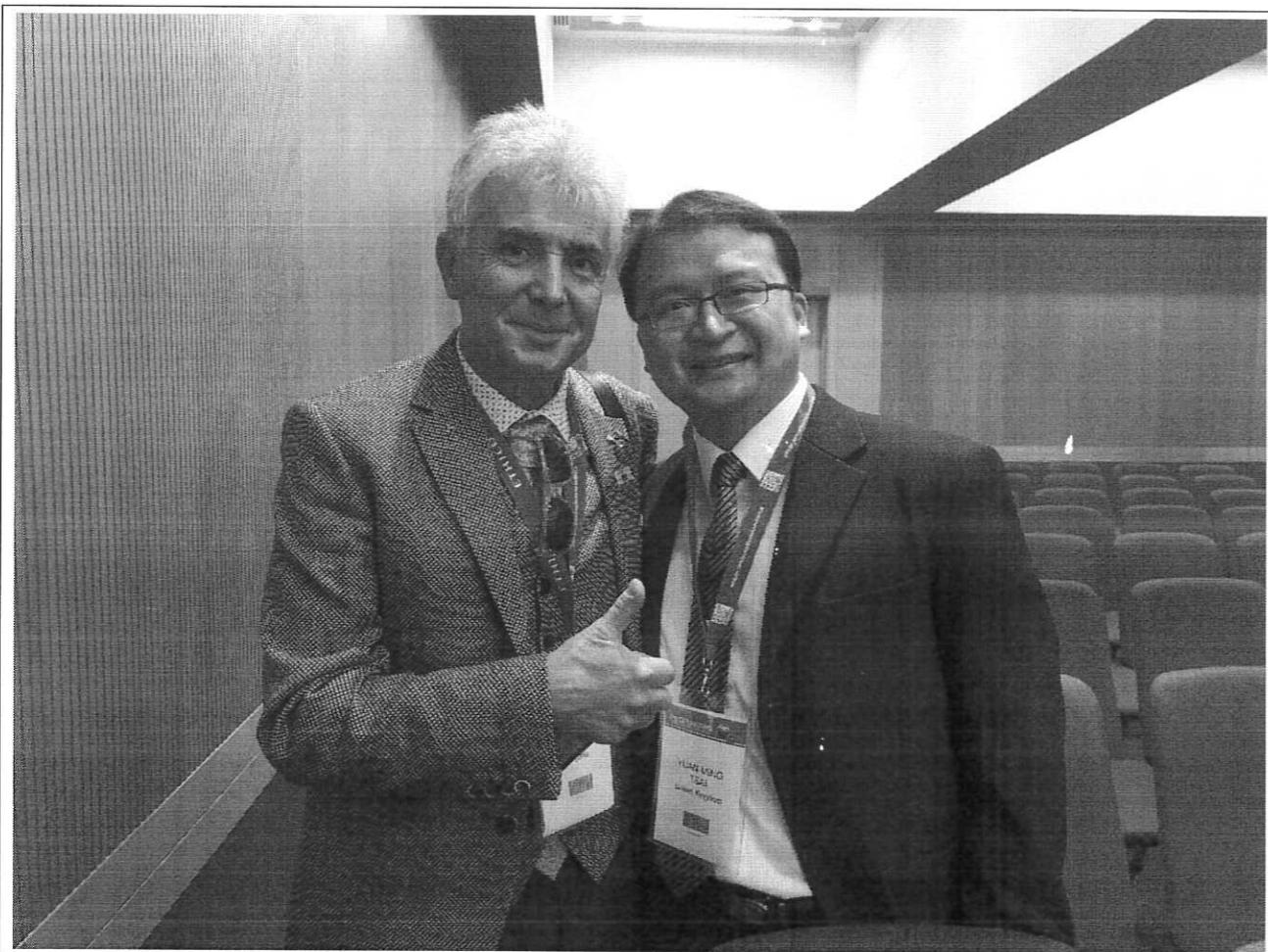


Figure 2. 在第 27 屆歐州胸腔外科醫學會獲得前 3 名，進入決賽評比。



## Vascular Kv7 channels control intracellular $\text{Ca}^{2+}$ dynamics in smooth muscle

Yuan-Ming Tsai<sup>a, b, \*</sup>, Frederick Jones<sup>a</sup>, Pierce Mullen<sup>a</sup>, Karen E. Porter<sup>c</sup>, Derek Steele<sup>a</sup>,  
Chris Peers<sup>a, †</sup>, Nikita Gamper<sup>a, \*</sup>

<sup>a</sup> School of Biomedical Sciences, Faculty of Biological Sciences, University of Leeds, Leeds, LS2 9JT, United Kingdom

<sup>b</sup> Division of Thoracic Surgery, Department of Surgery, Tri-Service General Hospital, National Defence Medical Centre, Taipei 11490, Taiwan

<sup>c</sup> Leeds Institute of Cardiovascular and Metabolic Medicine, Faculty of Medicine and Health, University of Leeds, Leeds, LS2 9JT, United Kingdom

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Kv7  
Retigabine  
Vasopressin  
Calcium  
Vascular smooth muscle cell  
T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels  
Phospholipase C

### ABSTRACT

Voltage-gated Kv7 (or KCNQ) channels control activity of excitable cells, including vascular smooth muscle cells (VSMCs), by setting their resting membrane potential and controlling other excitability parameters. Excitation-contraction coupling in muscle cells is mediated by  $\text{Ca}^{2+}$  but until now, the exact role of Kv7 channels in cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics in VSMCs has not been fully elucidated. We utilised microfluorimetry to investigate the impact of Kv7 channel activity on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels and electrical activity of rat A7r5 VSMCs and primary human internal mammary artery (IMA) SMCs. Both, direct (XE991) and G protein coupled receptor mediated (vasopressin, AVP) Kv7 channel inhibition induced robust  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations, which were significantly reduced in the presence of Kv7 channel activator, retigabine, L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel inhibitor, nifedipine, or T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel inhibitor, NNC 55-0396, in A7r5 cells. Membrane potential measured using FluoVolt exhibited a slow depolarisation followed by a burst of sharp spikes in response to XE991; spikes were temporally correlated with  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. Phospholipase C inhibitor (edelfosine) reduced AVP-induced, but not XE991-induced  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. AVP and XE991 induced a large increase of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in human IMA, which was also attenuated with retigabine, nifedipine and NNC 55-0396. RT-PCR, immunohistochemistry and electrophysiology suggested that Kv7.5 was the predominant Kv7 subunit in both rat and human arterial SMCs; *CACNA1C* (Cav1.2; L-type) and *CACNA1G* (Cav3.1; T-type) were the most abundant voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel gene transcripts in both types of VSMCs. This study establishes Kv7 channels as key regulators of  $\text{Ca}^{2+}$  signalling in VSMCs with Kv7.5 playing a dominant role.

### 1. Introduction

Vascular tone is actively regulated by vasoactive stimuli which control the contractility of vascular smooth muscle cells (VSMCs). The main mechanisms of such control operate via the intracellular calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) signals orchestrating the contraction. Thus, depolarisation of VSMCs membrane potential ( $E_m$ ) results in the opening of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (VGCCs), predominantly L-type [1], while activation of G protein coupled receptors (GPCRs) can induce release of  $\text{Ca}^{2+}$  from the sarco/endoplasmic reticulum (SR/ER) [2]. Voltage-gated potassium

channels (Kv) represent a primary effector system for adjusting the resting  $E_m$  in VSMCs and other cell types [3,4]. Some of these Kv channels are partially open in resting VSMCs and stabilise the resting  $E_m$  at negative voltages to prevent the opening of VGCCs. Inhibition of these Kv channels in VSMCs results in depolarisation which, in turn, may lead to VGCCs activation and, hence, vasoconstriction [5]. To date, the functional roles of some Kv channels in smooth muscle have been examined, especially the Kv1, Kv2 and Kv7 families [6–9]. Furthermore, several vascular diseases such as hypertension, diabetes and atherosclerosis were shown to be associated with the abnormal function or

**Abbreviations:** AVP, Arginine vasopressin;  $\text{Ca}^{2+}$ , Calcium; ER, Endoplasmic reticulum; GPCRs, G protein coupled receptors;  $\text{IP}_3$ , Inositol trisphosphate; IMA, Internal mammary artery;  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , Intracellular calcium concentration;  $E_m$ , Membrane potential;  $\text{PIP}_2$ , Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PLC, Phospholipase C; RT-PCR, Real-Time Polymerase Chain Reaction; RyR, Ryanodine receptor; VSMCs, Vascular smooth muscle cells; VGCCs, Voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels.

\* Corresponding authors at: School of Biomedical Sciences, Faculty of Biological Sciences, University of Leeds, Leeds, LS2 9JT, United Kingdom

E-mail addresses: [ymt@leeds.ac.uk](mailto:ymt@leeds.ac.uk) (Y.-M. Tsai), [n.gamper@leeds.ac.uk](mailto:n.gamper@leeds.ac.uk) (N. Gamper).

† Deceased

<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102283>

Received 15 July 2020; Received in revised form 21 August 2020; Accepted 26 August 2020

Available online 29 August 2020

0143-4160/© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Figure 3. 研究成果投稿國際期刊(Cell Calcium)獲接受刊登。