

行政院及所屬各機關出國報告

( 出國類別： 研究 )

冠狀動脈疾病血栓形成機轉之研究

服務機關：臺大醫院內科部

出國人職 稱：主治醫師

姓 名：黃瑞仁

出國地區： 美國

出國日期：89.8.1-90.12.26

報告日期：91.3.25

J2/  
c08904429

系統識別號:C08904429

公 務 出 國 報 告 提 要

頁數: 14 含附件:

否

報告名稱:

冠狀動脈疾病血栓形成機轉之研究

主辦機關:

國立臺灣大學醫學院附設醫院

聯絡人/電話:

李美美/23123456-1582

出國人員:

黃瑞仁 國立臺灣大學醫學院附設醫院 內科部 主治醫師

出國類別: 研究

出國地區: 美國

出國期間: 民國 89 年 08 月 01 日 -民國 90 年 12 月 31 日

報告日期: 民國 91 年 03 月 25 日

分類號/目: J2/西醫 J2/西醫

關鍵詞: 冠狀動脈疾病(coronary artery disease), 血栓形成(thrombosis) 基因微陣列(microarray), 生物資訊學(bioinformatics), 心臟血管研究(cardiovascular research)

內容摘要: 本人於民國89年8月1日至 90年12月26日奉派至美國波士頓哈佛醫學院附設布里格翰醫院內科部心臟血管基因體中心研究。隨著國人飲食逐漸西化的影響,冠狀動脈心臟病之發生率逐漸升高,而引起突發性心臟病變的原因,主要為動脈粥狀硬化加上突發性斑塊破裂 (plaque rupture) 及血栓形成。至於血栓形成之致病機轉尚不清楚。本人進修即針對血栓形成機轉之原因以心導管檢查血管攝影資料分析來探討。另外對新發展之基因晶片 (或基因微陣列)技術在心臟血管系統研究之應用也深入學習。主要內容包括基本分子生物學相關技術學習,由人體基因圖譜之完成來推測心臟血管系統基因數目, cDNA 微陣列晶片之製備,心臟衰竭基因研究,生物資訊學研習以及實時間反轉錄PCR技術等。這些研究方法及技術之進修研習,對心臟血管疾病研究有重大突破,回國之後期望在相關領域之研究及應用有所貢獻。

摘要：

本人於民國 89 年 8 月 1 日至 90 年 12 月 26 日奉派至美國波士頓哈佛醫學院附設布里格翰醫院內科部心臟血管基因體中心研究。隨著國人飲食逐漸西化的影響，冠狀動脈心臟病之發生率逐漸升高，而引起突發性心臟病變的原因，主要為動脈粥狀硬化加上突發性斑塊破裂 (plaque rupture) 及血栓形成。至於血栓形成之致病機轉尚不清楚。本人進修即針對血栓形成機轉之原因以心導管檢查血管攝影資料分析來探討。另外對新發展之基因晶片 (或基因微陣列) 技術在心臟血管系統研究之應用也深入學習。主要內容包括基本分子生物學相關技術學習，由人體基因圖譜之完成來推測心臟血管系統基因數目，cDNA 微陣列晶片之製備，心臟衰竭基因研究，生物資訊學研

習以及實時間反轉錄 PCR 技術等。這些研究方法及技術之進修研習，對心臟血管疾病研究有重大突破，回國之後期望在相關領域之研究及應用有所貢獻。

## 目 次

|         |        |
|---------|--------|
| 摘要      | P2-3   |
| 目的      | P5     |
| 進修過程及內容 | P6-P11 |
| 進修心得    | P12-13 |
| 建議      | P14    |

- 目的： 1.研習冠狀動脈疾病病血栓形成之致病機轉，藉以進修心導管血管攝影資料分析及臨床應用。
- 2.研習基因微陣列技術在心藏血管疾病之研究及應用，由微陣列技術之原理，製備及實際操作達到學習成效。
- 3.研究方法及解決醫學問題的研究設計，資料搜集及分析技巧等研習。

進修過程及內容：冠狀動脈心臟病在國人的發生率,隨著飲食習慣逐漸西化的影響而逐年增加。冠狀動脈心臟病的突然發病如心肌梗塞,不穩定型心絞痛及心臟猝死症等,與病患原先動脈粥狀硬化斑塊的破裂而形成血栓有密切相關,近年來,各種研究証據顯示:血栓形成是急性冠動脈病變(acute coronary syndrome)的主要致病因,但其機轉尚不清楚。本人出國進修即以心導管血管攝影資料分析,至布里格翰醫院心臟科之血管攝影資料分析及臨床研究中心(core laboratory)研習電腦分析,統計及研究課題等。

另外,本人研習重點為基因微陣列技術,此一技術為近年來分子生物學的一大突破。有關基因微陣列技術研究,分下列幾點報告:

1. 基本分子生物學技術學習:由基本之 DNA, RNA 提取, northern 及 western blotting, 免疫組

織化學染色技術(immunohistochemical staining),

細胞培養, PCR 及 agarose gel 電泳技術等。

2. 由人類基因圖譜完成推測心臟血管系統基因數

目: 本研究假設為人體各組織系統有其特定之基因

(organ-specific genes), 也有各組織器官共同之基

因。本研究利用指導教授 Dr. CC Liew 原在加拿大多

倫多大學建立之人類心臟血管基因庫 (Circulation

1997;96: 4146-4203)加以叢集分析, 得到 26,648 個

non-redundant expressed sequence tags(ESTs), 估計心

臟血管系統之基因約為此數目。其次以人體基因數目

最少之第 21 及 22 對染色體來分析心臟血管基因所佔

之比率, 推測人類基因體約有 20,930 個基因, 為心臟

血管系統之基因。第三種方法為以基因微陣列方法

推測, 本人即參與此部份工作。以正常心臟組織及肥

厚性心肌病變組織分別螢光染色, 雜交至基因晶片上



(晶片基因為人類基因，但無器官之特異性)，分析其陽性可判讀之 SPOT 比率，推算心臟血管基因數目約為 27,160 個基因。已公佈之人類基因圖譜估計人類基因數目為 35,000 至 40,000 以此三種方法推測人類心臟血管系統基因數目介於 20,930 與 27,160 之間 ( J Mol Cell Cardiol 2001;33:1879-86 )。

3. cDNA 微陣列晶片之製備：先篩選 non-redundant EST, 分別以 BLAST algorithm 來 match 人體基因庫之基因及 EST database 可知 known genes, EST matched clones 及 novel ESTs 之數目。分別以 96-well 之 plate PCR ,電泳, PCR 產物沉澱, 離心, 溶於 SSC, 以 robotic arrayer (本實驗室為 4 pins), spot 至 slides 上 (最多 42 片), 再以 succinic anhydride blocking, UV cross-linking, 即可用於研究課題。

4. 心臟衰竭基因研究：本人為臨床心臟科醫師，至此

實驗室分配到之題目為 “那些基因與心臟衰竭有關？”。過去分子生物學研究，大多探討一個或數個基因在某種生理或病理狀態下之變化，基因微陣列技術提供一個重大突破，即可同時分析成千上萬個基因的變化進而提供基因相互作用(cross-talk) 或共同調節(co-regulation) 之資訊，在致病機轉上能有更深入之理解。心臟衰竭之致病原因相當複雜，包括缺血性心臟病，瓣膜性心臟病，高血壓性心臟病，先天性心臟病，心肌病變，心肌炎及心律不整等。由於致病因之差異性，心臟之代償機轉(remodeling process) 也互異，包括傳遞訊息給路徑之改變，鈣離子及其它離子通道之改變，氧化壓力基因之調節，能量代謝，細胞存活及凋亡基因之改變，GAP junctions 之改變等 (Curr Cardiol Rep 2001; 3 (3): 198-207)。本研究乃以心臟移植手術時受贈者之心臟衰竭心臟為研究對象，並以未使用於心臟移植之捐贈者心臟作為正常對照

組。實驗組之心臟衰竭病因，有三位為擴張型心肌病變，二位為肥厚型心肌病變，另正常心臟對照組有三位，以此樣本自左心室壁組織提取 RNA，製備 cDNA 探針，雜交，並加以雷射掃描及數據分析。

5. 生物資訊學之研習：微陣列技術同時需處理成千上萬的數據，且由於各次實驗 Slide 間會有螢光標記效率(labeling efficiency)之差異，樣本 RNA 量之不同等因素，需要做一個校正的過程(normalization)。本研究以 M-A plot 分析，先選出 non-differentially expressed genes 作為 normalization curve，再以此為基礎計算各 gene 之 expression level (Nucleic Acids Res 2001; 29(12): 2549-57)。Filtering 過程不同也會影響 gene expression 之結果，如某一 channel 強度甚低，容易有 ratio 上極大誤差。因而我們以嚴格的條件，包括 background 及 bacterial controls 等作為篩選之依據，且只分析重複 slides 中均有基因表達(即未被 filter

掉之 spots)之數值，作為進一步分析之參考，如此大部分選出有差異表達之基因，均可以 RT-PCR 證實 (Submission to *Physiological Genomics*)。

6. 實時間反轉錄 PCR 技術：篩選出之 gene，以 software 設計 forward 及 reverse primers。Primer 約 20 鹼基，合成之 PCR 片段約 150-200 鹼基對， $T_m$  為 59 至 61°C 之間，以 Perkin Elmer AB1 Prism 7700 Sequence Detection System 來操作實時間 RT-PCR，而以  $C_T$  來表示樣本中特定 gene 之相對 RNA 濃度，計算出不同樣本某一 gene 之表達差異倍數。

進修心得：本實驗室位於哈佛醫學院旁邊，臨哈佛公衛學院及醫學圖書館 (Countway library)，在分析數據時，與公衛學院生物統計系之王永雄 (Wing Hong Wong) 教授及學生曾建成互動頻繁，受益良多。尋找相關之文獻，多可即時獲得資料，研究相關之 ultrastructure 支援便利，為其最大優勢。對一個臨床醫師而言，有機會至一流醫學院之研究單位研習，是個難得及研究生涯轉捩點的經驗，不僅對實驗室工作有深入了解，在基礎與臨床整合上會有更務實的理解。指導教授 Victor Dzau 之領導風格及一個 clinician-scientist 對解決科學問題的敏銳度，在每週兩次的實驗室討論會展露無遺。CC Liew 教授的科學家精神在及

研究課題領域的領先氣魄促使整個研究  
團隊士氣高昂。Dr. Richard Pratt 雄厚的分  
子生物背景，在問題討論及解決上指導頗  
多。另外本人亦抽空參加布里格翰醫院心  
臟科討論會，心導管室 core laboratory 之  
臨床研究中心，選修哈佛公衛學會生物資  
訊學，流行病學，臨床試驗及實証醫學等  
課程，藉以充實自己的知識及能力。總之，  
出國進修提供一個全新的學習機會，回國  
之後期望在相關領域之研究及應用有所  
貢獻。

- 建議：
1. 持續派遣研究人員至同一實驗室在研究工作上可連貫，不致中斷。
  2. 出國研習，尤其是新研究方法或技術學習，時間以一年半至兩年為宜。
  3. 醫院可訂出發展重點及方向，派遣人員出國，如此可有一宏觀之願景。