

行政院及所屬各機關出國報告

(出國類別：進修)

肝細胞傳送蛋白之表現在嬰兒膽汁滯留之研究

服務機關：台大醫院小兒部

出國人職稱：主治醫師

姓名：陳慧玲

出國地區：加拿大

出國期間：91.4.1~92.6.30

報告日期：92.9.29

J2/c09101088

系統識別號:C09101088

公務出國報告提要

頁數: 19 含附件: 否

報告名稱:

九十一年度計畫/肝細胞傳送蛋白之表現在嬰兒膽汁滯留之研究

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:

陳慧玲 國立臺灣大學醫學院附設醫院 小兒部 主治醫師

出國類別: 研究

出國地區: 加拿大

出國期間: 民國 91 年 04 月 01 日 -民國 92 年 06 月 30 日

報告日期: 民國 92 年 09 月 29 日

分類號/目: J2/西醫 J2/西醫

關鍵詞: 肝臟疾病、膽汁滯留、兒科、肝細胞移植

內容摘要: 膽汁滯留是最常見的原發或次發性肝臟疾病之表現，尤其以新生兒及嬰兒最爲好發，近年來之分子生物學發展，發現在肝臟的膽小管有一些傳送蛋白，負責膽汁的排出，是控制膽汁分泌的決定因素，其中Sister of P-glycoprotein (在人類爲Bile salt export pump-BSEP)，控制膽酸(Bile acids or bile salts)的分泌，是膽汁流的速率決定因子，此基因的突變在人類會造成第二型progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC type 2)。本人赴加拿大溫哥華卑詩癌症研究中心Dr.Victor Ling之研究室進修，此實驗室培育出sPgp 基因惕除老鼠，爲研究膽汁滯留的動物模式，本人研究主題在於利用肝細胞及骨髓細胞移植至sPgp基因惕除老鼠，並追蹤移植後之肝細胞再生狀況。另外本人亦利用real-time RT-PCR研究在未成年之幼鼠，其肝細胞傳送蛋白的表現量在正常與sPgp 基因惕除老鼠，以及幼鼠與成鼠的差異。sPgp 基因惕除老鼠是研究膽汁滯留肝臟病變及細胞治療之一種動物模式，本人已引進此種基因惕除老鼠，繼續進行相關之實驗研究，將來計畫可增加其他肝臟損傷之因子，在移植前及移植後加強對宿主本身的肝臟損傷，以及sPgp 基因惕除後之肝臟病變等方向繼續研究。

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

行政院及所屬各機關出國報告

(出國類別：進修)

肝細胞傳送蛋白之表現在嬰兒膽汁滯留之研究

服務機關：台大醫院小兒部

出國人職稱：主治醫師

姓名：陳慧玲

出國地區：加拿大

出國期間：91.4.1~92.6.30

報告日期：92.9.29

行政院及所屬各機關出國報告提要 系統識別號 C09101088  
出國報告名稱：肝細胞傳送蛋白之表現在嬰兒膽汁滯留之研究  
頁數 19 含附件：否

出國計畫主辦機關/聯絡人/電話  
台大醫院/李美美/02-2312345 ext 1582  
出國人員姓名/服務機關/單位/職稱/電話  
陳慧玲/台大醫院/小兒部/主治醫師/02-23123456 ext 5148

出國類別：1 考察 2 進修 3 研究 4 實習 5 其他

出國期間：91.4.1~ 92.6.30 出國地區： 加拿大

報告日期： 92.9.29

分類號/目

關鍵詞：肝臟疾病、膽汁滯留、兒科、肝細胞移植

#### 內容摘要

膽汁滯留是最常見的原發或次發性肝臟疾病之表現，尤其以新生兒及嬰兒最為好發，近年來之分子生物學發展，發現在肝臟的膽小管有一些傳送蛋白，負責膽汁的排出，是控制膽汁分泌的決定因素，其中 Sister of P-glycoprotein (在人類為 Bile salt export pump-BSEP)，控制膽酸(Bile acids or bile salts)的分泌，是膽汁流的速率決定因子，此基因的突變在人類會造成第二型 progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC type 2).

本人赴加拿大溫哥華卑詩癌症研究中心 Dr. Victor Ling 之研究室進修，此實驗室培育出 spgp 基因剔除老鼠，為研究膽汁滯留的動物模式，本人研究主題在於利用肝細胞及骨髓細胞移植至 spgp 基因剔除老鼠，並追蹤移植後之肝細胞再生狀況。另外本人亦利用 real-time RT-PCR 研究在未成年之幼鼠，其肝細胞

傳送蛋白的表現量在正常與 sPgp 基因老鼠，以及幼鼠與成鼠的差異. sPgp 基因剔除老鼠是研究膽汁滯留肝臟病變及細胞治療之一種動物模式，本人已引進此種基因剔除老鼠，繼續進行相關之實驗研究，將來計畫可增加其他肝臟損傷之因子，在移植前及移植後加強對宿主本身的肝臟損傷，以及 sPgp 基因剔除後之肝臟病變等方向繼續研究。

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

## 目 次

目的:	-5
過程	
1. BSEP/sPgp 基因剔除老鼠	-6
2. 肝細胞移植	-7
3. 骨髓細胞移植	-8
4. BSEP/sPgp 基因剔除老鼠發育與基因表現之變化	-9
5. 動物實驗中心介紹	-10
6. 加拿大卑詩兒童醫院參訪	-11
心得	-13
建議	-14
附錄	-16

## 目的

膽汁滯留是最常見的原發或次發性肝臟疾病之表現，尤其以新生兒及嬰兒最為好發，近年來之分子生物學發展，發現在肝臟的膽小管有一些傳送蛋白，負責膽汁的排出，是控制膽汁分泌的決定因素，其中 Sister of P-glycoprotein (sPgp 在人類為 Bile salt export pump-BSEP)，控制膽酸(Bile acids or bile salts)的分泌，是膽汁流的速率決定因子，此基因的突變在人類會造成第二型 progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC type 2). 此疾病初期類似新生兒肝炎之症狀，但會快速進展至肝硬化及肝衰竭，目前唯有換肝是最佳的治療方式。

BSEP/sPgp 基因的發現，以及其他膽小管傳送蛋白的發現，是膽汁排出的分子機制一個很大的進展，由此我們知道膽汁分泌的速率決定步驟，在於膽小管的這些 ATP-dependent 蛋白的傳送包括膽酸、磷脂、organic anions, 以及 bilirubin 等等的分子，因此很多因藥物、靜脈營養、敗血症等造成的膽汁滯留之機轉，也漸漸被釐清。

由於新生兒及嬰兒是膽汁滯留症的好發年齡，許多原發或次發性的原因，會造成嬰兒的膽汁滯留；此次出國進修，藉由研究 sPgp knockout mice 的生理、病理、及細胞治療，除了可以更了解膽汁的生理機轉外，對於 PFIC 疾病的治療，以及一般的膽汁滯留症的治療，有更進一步的了解及進展。

以肝細胞或幹細胞進行移植，是治療遺傳性肝臟疾病的新治療方式，本人赴加拿大溫哥華卑詩癌症研究中心 Dr. Victor Ling 之研究室進修，此實驗室培育出 sPgp 基因剔除老鼠，為研究膽汁滯留的動物模式，本人研究主題在於利用肝細胞及骨髓細胞移植至 spgp 基因剔除老鼠，並追蹤移植後之肝細胞再生狀況。

## 過程

1. BSEP/sPgp 基因剔除老鼠: 為了研究 PFIC 的致病機轉及治療, 因此在 BC Cancer Research Centre 的 Victor Ling lab 在 2001 年發表了 PFIC-2 的動物模式: *Targeted inactivation of sister of P-glycoprotein gene (spgp) in mice*, 這個模式造成了比人類疾病稍微輕的肝臟內膽汁滯留: nonprogressive but persistent intrahepatic cholestasis. 此老鼠的肝臟比一般老鼠大兩倍 (Fig. 1), 幼鼠死亡率約百分之五十, 其死因為生長不良 (failure to thrive), 肝臟病理切片可看到肝細胞壞死、脂肪堆積、膽管病變等, 膽汁流速 (bile flow rate) 是正常老鼠的一半以下, 膽汁中的膽酸濃度極低, 而肝臟中的膽酸濃度增加 (Fig 3), 成鼠的體重與壽命大約與正常老鼠相當。但當給予大量膽酸 Cholic acid 0.5% feeding 時, 公鼠便在一星期內死亡, 給予 0.1% cholic acid feeding, 老鼠在一星期內會體重下降, 但隨後漸上升回正常 (Fig. 4), 因此我的實驗重點便在於 (1) 以 Cholic acid feeding 的 sPgp knockout mice 的動物模式作細胞治療 (2) 研究新生之 sPgp knockout 幼鼠與成鼠的病理及基因表現的差別. 實驗之方法分為 1. 以正常成鼠之肝細胞移植到 sPgp 基因剔除老鼠, 2. 以正常骨髓細胞移植至經過低劑量 X 光照射之 sPgp 基因剔除老鼠, 3. 以正常骨髓細胞移植至經過致死劑量 X 光照射之 sPgp 基因剔除老鼠, 亦即進行骨髓移植。上述實驗均以帶有綠色螢光 (GFP transgenic mice) 之成鼠為正常細胞之來源, 以作為移植後之追蹤標記。



## 2. 肝細胞移植

以 Green Fluorescent Protein (GFP) transgenic mice 為 donor, 以 2-step collagenase perfusion 方法分離成鼠肝臟細胞, 並將約  $1 \times 10^6$  個細胞以脾臟注射之方式注入 recipient mice, 待移植之後一到五個月不等之時間切片檢查. 此實驗之 recipient 共有 16 之老鼠, 包括 7 males (+/+ : 1, +/- : 2, -/- : 4) and 9 females (+/+ : 5, +/- : 1, -/- : 3).

移植之結果(1)以冷凍切片直接觀察 GFP positive cells, (2)PCR for Spgp genes 測試; 其中 PCR for Spgp mice 之結果, 在五隻 knockout mice 中有兩隻出現陽性反應, 這兩隻各有 1/4 個 liver samples 出現陽性反應; 而在冷凍切片的 GFP cell 部份, 有 4/15 隻老鼠出現散在性的陽性細胞反應, 這些細胞約以 1-8 個細胞形成群聚, 多在 portal vein 的周圍, 細胞(約 0.06~0.2%)為帶有綠色螢光之捐贈者(donor), 但並未形成 regeneration nodules

病理切片變化顯示 knockout mice 有細胞增生的現象, 細胞大小不一, mitotic figures, 並且有 cell necrosis 的現象. 而 wild type 老鼠則偶有 fatty change, 在 Cholic acid feeding 的老鼠則 knockout mice necrosis 更明顯; wild type fatty change 更明顯.

### 3. 骨髓細胞移植

我們以 sPgp knockout mice 進行骨髓細胞的移植，分為低劑量及致死劑量兩種；在低劑量我們以 100 Rad 照射老鼠後以脾臟注射方式注入  $1 \times 10^6$  個 GFP transgenic mice 的骨髓細胞，致死劑量則以 900 Rad (wild type) 及 700 Rad (knockout mice) 照射老鼠後，以 tail vein injection 之方式，注入  $1 \times 10^6$  個 GFP transgenic mice 的骨髓細胞，以作為 total bone marrow replacement. 移植後之老鼠則以 cholic acid feeding 來增加 liver damage.

移植後之骨髓細胞，在 recipient 之接受程度，以直接觀察冷凍切片的 GFP fluorescent 方法，發現低劑量 irradiation 之老鼠其進入 host liver 的比例，平均約一個 high power field 有一個 GFP positive cells，以 PCR method detection，有 11/12 隻 knockout mice 為 positive；而平均每隻老鼠取四個 samples，共有 41/51 個 samples 為 positive。

高劑量 irradiation 老鼠(即 bone marrow transplantation)老鼠共有 14 隻其中四隻 knockout mice；高劑量 irradiation 老鼠其 GFP cells 進入比例則高得多，不論是 knockout 或是 wild type 在冷凍切片均可觀察到約 5-10 percent of cells positive (Fig 5)；而以 flow cytometry 方式將 isolated hepatocytes test 綠色螢光約有 20% positive, 這可能是在分離肝細胞過程中 knockout liver cells 因為較易死亡，因此留下來之活細胞中移植進去的 wild type cells 比例較多。以細胞所占比例來看，低劑量放射線照射後接受骨髓細胞移植的老鼠，其捐贈者細胞比例僅  $< 0.001\%$ ，而經過致死劑量 X 光照射之老鼠，其捐贈者細胞可達 0.1~20%。

在此骨髓移植中比較需要探討的是在肝臟中觀察到的 donor cells 是否已

轉變為肝細胞，在我們觀察到的 morphology 裡面有許多細胞可能為 kupffer cells, 另一些細胞則 morphology 像 liver cells, 我們以 immunofluorescent staining 染 sPgp (BSEP) proteins, 發現在骨髓細胞移植之切片之 sPgp stain is negative, 而肝細胞移植之切片偶爾可以看到 positive cells. 顯示骨髓細胞可能還在 hematopoietic cells 的階段或者是在 transition from progenitor cells to hepatocyte 的 development 階段.

#### 4. BSEP/sPgp 基因老鼠發育與基因表現之變化

由於 PFIC-2 是嬰兒之疾病，為了解 sPgp knockout mice 在嬰兒期間的基因表現，我們採取 13 days old 的 sPgp knockout mice 之 liver, 分析其病理變化、膽汁及抽取 total liver RNA, 做 Real-time RT-PCR 以分析其相關的基因表現，分析的基因包括:mdr1a, mdr2, mrp2, mrp3, ntcp, oatp1, oatp2, oatp4, ficl, hmgc, fxr, abcg5, abcg8, lxr-a, lxr-b, ppar, pxxr 等基因。發現 mdr2, mrp3, ntcp, ficl, hmgc, lxr-b, and pxxr 有 up-regulation 的現象，顯示其他 transporter 在 sPgp 缺乏時，可能扮演 compensation 的角色，以及 cholesterol-bile acid metabolism 的途徑也受到影響。另外，oatp1 之表現量下降，可能是在肝內膽酸之濃度上升時，肝細胞會減少膽酸的吸收(uptake) 的自動調節功能。另外，我們也比較幼鼠和成鼠的傳送蛋白表現量，在 wild type, mrp2, mrp3, ntcp, ficl, hmgc, pxxr 之表現量，在成鼠比幼鼠有顯著升高的表現量，而 oatp4 在成鼠之表現量低，其餘之基因表現量相似。發現多數傳送蛋白在幼鼠的表現均較成鼠為低，顯示傳送蛋白在幼年之表現未成熟，可能是造成嬰兒及兒童容易膽汁滯留的原因。

## 5. 動物實驗中心介紹

動物實驗是 BC Cancer Research Centre 內許多實驗室的重點，因此動物實驗中心的規模及管理可供借鏡。BC Cancer Research Centre 的動物中心是屬於 UBC joint animal facility (JAF) 的一員，與 UBC 的各動物中心共同管理並可互通。在 BC Cancer Research 內許多實驗是需要用到老鼠，由其在血液學方便世界知名的 Terry Fox Laboratory，以及專做腫瘤治療實驗的 Department of Advanced Therapeutics. BC Cancer Research Centre 的 JAF 主要以養 mice 為主，佔的空間不算大，但養的數量很多，約有 16 間動物室，鼠籠以層架分隔，幾乎從地板到天花板。許多實驗室養有 transgenic mice 及 knockout mice，也與世界各地的實驗室互相交流動物品種。由於許多研究人員需要自行照顧老鼠以及做治療，因此除了 JAF 專雇的人員外，有許多研究人員也常在飼養室中照顧老鼠。為了飼養動物的安全及感染管控，各房間有分級之規定，人員在 24 小時之內，只可以從最高級的房間，進入到次級房間。動物中心人員除了飼養動物外，亦熱心協助處理各研究人員的需求，例如只要是實驗計畫已通過動物實驗委員會審核，隨時需要多少實驗用老鼠，只需一封 e-mail 給動物中心人員，他便會依照目前飼養的狀況盡快提供，計價也就自動處理好，不須繁複的文書審核作業。也有另外收費服務項目例如協助採血等等。另外他的治療室使用率非常高，有四個 laminar flow hood，可供四組實驗同時進行，幾乎每天都 full-booked，另有氣體麻醉機，對於 mice 的手術進行十分方便。各實驗室的人員都是有經驗的研究人員或博士後研究員，舉凡 tail vein injection, drug administration, 到器官移植等繁複的手術，大家經驗互相交流，都是實驗高手。在與世界其他各地合作的簽約方面，值得借鏡的是 Research Centre 有專責與其他單位簽約的

office，由專門人員及法律顧問負責簽約事宜，並不需要PI自行簽約，除了管理方便，節省人力外，也避免PI在法律上不懂的困擾。總之，BC Cancer的動物中心雖然面積不大、建築老舊，設備也不是最新穎，但是充分利用空間及人力，以及有效率的管理，使得動物實驗之水準很高，是支持及提昇研究水準的重要因素。

#### 6. 加拿大卑詩兒童醫院參訪

加拿大卑詩省兒童醫院(BC Children's Hospital)位於溫哥華市區，和BC Woman's Hospital共同位於同一院區，兒童醫院分為門診大樓、以及急診及病房大樓兩部分，另外有一座Chan's Centre是教育及會議中心。我因小兒部張美惠主任之介紹，拜訪小兒消化次專科之Dr. Eric Hassall，參觀小兒消化學專科之門診、住院、及討論會，共有四位主治醫師、兩位研究醫師(fellow)負責。門診部份，兒童醫院的門診大樓空間充足，每個次專科各有專用的診間，大約只有一或兩個次專科共用同一診間，另外並有討論室，以及護士專用的衛教間，Dr. Hassall的特別門診，以腸胃疾病特別是inflammatory bowel disease為主，病人大多由全省各地轉介而來，平時由當地的兒科醫師診治，因此每個病人看完除了簡單的手寫病歷外，Dr. Hassall均以診間的電話做口述錄音，將病人的病情處置詳細記錄，有專門的人員打字回信，除了病歷記錄詳細外，也確實做到了雙向轉診的功能，因此病人通常回診時間比較長，大約半年才回來一次。診間有兒童用的矮桌椅及書籍，但是並沒有電腦。在看診前當天病歷會集中到討論室，也有列印的病人名單，醫師會先在討論室大致了解病人的病情。另外如inflammatory bowel disease, 或是 constipation 等，都是慢性病需要家屬了

解居家照顧及用藥知識的疾病，在 GI section 有兩位專科護士專門做衛教，在醫生看診完畢後繼續進入護士的診間衛教，除了節省看診時間外，也給病人較充裕的時間解答心中的疑問。

討論會方面消化學次專科每週有一次的討論(星期三上午九點)，由 Fellow 報告病例並且分析，此次報告的是一個 acute pancreatitis 的病例。另外病房的回診由 Dr. Baker 主持，所看的病人為一個 prolonged jaundice 的 premature infant. 大致上與我們的形式類似。兒童醫院的四位消化學專科醫師以月份為單位輪值查房及內視鏡檢查，因此一年有三個月輪病房，三個月輪內視鏡，另外便是研究時間。而腹部超音波檢查則是由影像科醫師執行。

## 心得

1. 本實驗之結果發現 sPgp 基因剔除老鼠之肝臟損傷並未到達致死之程度，且受贈者之肝細胞本身之再生力很強，可能是移植後捐贈者細胞不易再生之原因，將來計畫可增加其他肝臟損傷之因子，例如 Retrosine 等，在移植前及移植後加強對宿主本身的肝臟損傷。

2. 將來研究方向：

(1) 本人回國後引進 C57B6/J 以及 FVB/NJ 兩個 strain 之 sPgp knockout，將可繼續進行細胞治療或是基因治療之研究，並可提供作為 chronic liver injury 的 mice model，供相關之研究人員共同合作研究。

(2) 細胞治療以及肝細胞分離技術，以門脈灌注術進行鼠肝細胞分離，是技術上較為困難的步驟，此技術的引進，將來除可用在細胞移植外，也可作為細胞培養，功能性肝細胞研究，流式細胞儀分析等應用。

(3) 對於 human progressive intrahepatic cholestasis (PFIC) 的研究，將來可進行的方向有：

- A. 飲食影響：包括 lipid-containing diet 以及 calorie intake 的對於病情的影響。
- B. Apoptosis and necrosis in liver of PFIC
- C. Peroxidation injury in liver of PFIC
- D. Cell therapy, including hepatocyte, liver progenitor cells, and bone marrow cells
- E. Pruritus: the abnormal bile acids participating the mechanisms of pruritus in PFIC and cholestatic liver diseases and its therapy

## 建議

1. 研究人員應多參與國內及國際實驗室間的交流，除了可以獲得最新的資訊及研究方向，也可交換實驗技術及材料，例如 anitbody, clone, 及 mice 等等，大大的節省研究時間。
2. 建議成立專責校外合作簽約的單位，統一窗口對外合作，包含法律顧問，並提供制式的簽約文件供研究人員使用。
3. 擴大動物中心的編制，鼓勵小鼠(mice)之實驗，除了空間人力財力節省外，mice genome, mice atlas 的完成, trangenic 以及 knockout mice 的進展迅速，以及醫學院 mice microarray 的發展，都有利於 mice research 的發展以及研究人員之間互相交流合作的效率，另外對於動物實驗目前多在各研究室自行進行，建議動物中心增加治療室 laminar flow hood 空間，可避免感染，也可促進技術之交流。
4. 醫師研究員在基礎研究方面所占的角色越來越重，因此這個方向是正確的；但是臨床研究及臨床的材料仍然非常重要，這是臨床醫師進行研究很大的利基；建議對於臨床研究人才的培養仍需重視，最好是鼓勵個人有不同的專精，不須每個人都同時專精於臨床及基礎(這是院內很多同仁壓力及挫折的來源)，醫院對於基礎研究近年來有很大的鼓勵及支持，例如貴重儀器及共同研究室等，個人非常的感謝；將來建議加強臨床研究的支持人力及編制，例如臨床研究方法、臨床試驗、病例分析、流行病學及統計學的支持系統。另外臨床醫學研究所學生研究主題可以有偏重臨床以及偏重基礎的分別。
5. 貴重儀器的購買設置固然重要，然而日後維持，如有專門技術人員操作及指導之人力編制，對於支持基礎研究人員將會有大的幫助。



最後非常感謝台大醫院及教育部提供這個出國進修的機會，到國外進修學習到很多寶貴的經驗，除了技術及材料之外，包括嚴謹的科學研究精神，研究者之間開放胸襟的互相討論及交流，團隊合作的運作，開拓國際視野及國際關，同時也對國內的研究環境有了一定的信心，相信對於未來的研究生涯會有很大的鼓勵及影響。





Fig. 3 Secretion of taurocholate into the bile is impaired in *spgp*<sup>-/-</sup> mice

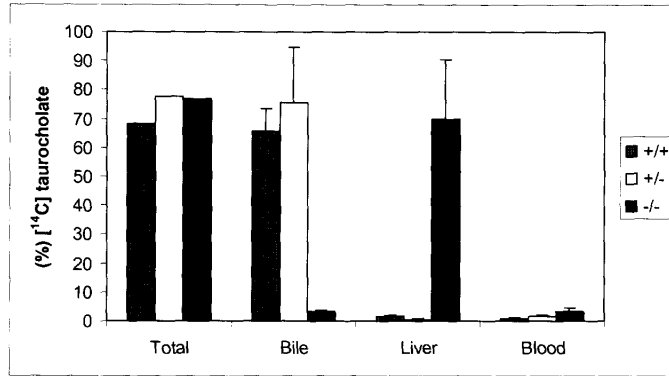


Fig.4 Body weight decreased after Cholic acid feeding in the first week in male knockout mice

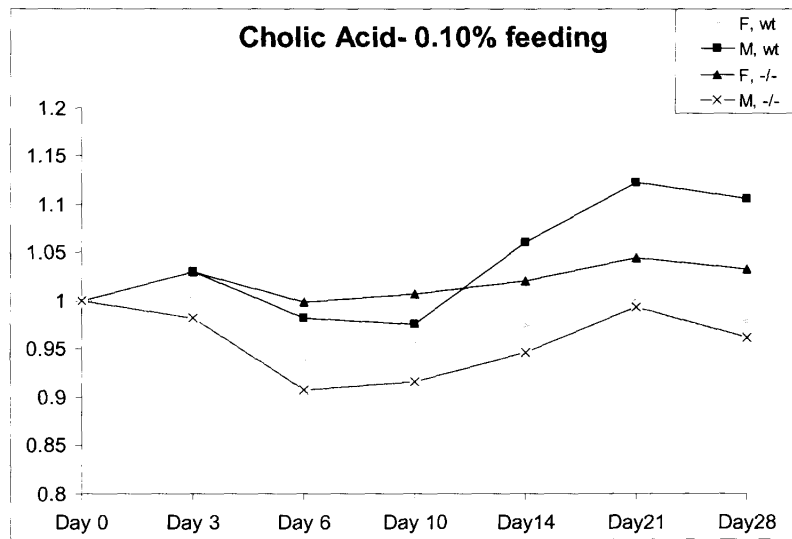


Fig. 5 sPgp (-/-) Male mice, 10 months old, 6 wks after BMT

Green fluorescent cells presented at periportal area

