

行政院及所屬各機關出國報告

(出國類別：研究)

幽門螺旋桿菌所引起的胃癌侵襲性分子生物學機轉

服務機關：台中榮民總醫院

出國人職稱：主治醫師

出國人姓名：吳俊穎

出國地區：美國

出國期間：民國九十一年八月一日至

民國九十二年七月三十一日

報告日期：民國九十一年八月三十日

J2/  
CO9202872

系統識別號:C09202872

公務出國報告提要

頁數: 12 含附件: 否

報告名稱:

幽門螺旋桿菌所引起的胃癌基因之分子生物學

主辦機關:

行政院輔導會臺中榮民總醫院

聯絡人/電話:

/

出國人員:

吳俊穎 行政院輔導會臺中榮民總醫院 內科部胃腸科 主治醫師

出國類別: 進修

出國地區: 美國

出國期間: 民國 91 年 08 月 01 日 -民國 92 年 07 月 31 日

報告日期: 民國 92 年 09 月 05 日

分類號/目: J2/西醫 J2/西醫

關鍵詞: 幽門螺旋桿菌,胃癌,侵襲性, COX-2

內容摘要: 美國波士頓醫學中心，為美國新英格蘭區三大醫學研究重鎮之一，在國際胃腸醫學研究的領域上，為相當重要的領導者，聲譽頗佳。職有幸承蒙該中心Professor Chi-Chuan Tseng之指導，從事幽門螺旋桿菌與胃癌侵犯的研究。本研究分為三個部分，分別為：一、將幽門螺旋桿菌與胃癌細胞株MKN-45一起培養,研究其影響.二、分別分析共同培養後，與癌症侵襲性相關的一些蛋白質表現；三、分析這些與癌症侵襲性相關的蛋白質之上游訊息傳遞分子，包括：NF-kB與COX-2。我們的研究結果發現幽門螺旋桿菌的感染可以增加胃癌細胞株的侵襲，而其機轉係經由NF-kB 及 COX-2 及 MMP-2、MMP-9、VEGF的作用

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

## 幽門螺旋桿菌所引起的胃癌侵襲性隻分子生物學機轉

壹、目的 .....	3
貳、過程 .....	3
(一) 研究背景 .....	4
(二) 材料與方法 .....	6
(三) 研究結果 .....	9
參、心得 .....	10
肆、建議 .....	11

## 壹、目的：

研究幽門螺旋桿菌如何對於胃癌的侵襲性產生影響，以及其分子生物學機轉。

幽門螺旋桿菌為一種普遍存在於台灣居民胃部的一種細菌，超過一半的台灣居民感染幽門螺旋桿菌。感染之後可以造成腸胃不適的症狀，也會增加慢性胃炎、消化性潰瘍以及胃癌的發生機會。在最近的臨床醫學研究中，幽門螺旋桿菌也被發現會增加胃癌的侵犯性，然而其分子生物學機轉並不清楚。

藉由瞭解幽門螺旋桿菌如何影響胃癌的侵襲性，將有助於將來胃癌的防治。雖然台灣為胃癌盛行率相當高的地方，國內對於胃癌侵襲性的研究，目前仍大多數限於臨床醫學的報告，對於其基礎醫學上的研究仍與美國有相當距離，為提升國內在這個領域的研究能力，仍有必要向先進國家學習，以促進醫學之進步，並造福病患。

## 貳、過程：

美國波士頓醫學中心，為美國新英格蘭區三大醫學研究重鎮之一，在國際胃腸醫學研究的領域上，為相當重要的領導者，聲譽頗佳。其在胃腸醫學的基礎研究上，有相當傑出的表現，每年有數量繁多的研究成果刊登於國際著名科學期刊，也為胃腸醫學全世界最好的醫學雜誌 Gastroenterology 主要編輯者之一。

職有幸承蒙該中心 Professor Chi-Chuan Tseng 之指導，從事幽門螺旋桿菌與胃癌侵犯的研究。本研究分為三個部分，分別為：

- 一、將幽門螺旋桿菌與胃癌細胞株 MKN-45 一起培養，研究其對於胃癌細胞株侵襲性的整體影響；
- 二、分別分析共同培養後，與癌症侵襲性相關的一些蛋白質表現，諸如：MMP-2、MMP-9、VEGF 與 COX-2，會產生怎樣的變化；
- 三、分析這些與癌症侵襲性相關的蛋白質之上游訊息傳遞分子，包括：NF-kB 與 COX-2。

我們的研究結果發現幽門螺旋桿菌的感染可以增加胃癌細胞株的侵襲。

MMP-2、MMP-9、VEGF 與 COX-2 均會因為幽門螺旋桿菌感染而被誘發表現。而其上游的 NF-kB 與 COX-2 表現也被證實增加。

本研究為目前為止，對於幽門螺旋桿菌感染所誘發的胃癌侵襲性提供直接證據之第一篇研究報告。目前已整理成研究論文，準備投稿中，以下就職所從事的研究結果，加以介紹。

研究背景：

#### 幽門螺旋桿菌 (*H. pylori*)

在感染幽門螺旋桿菌的胃部，會引起一連串宿主的發炎反應與免疫變化。在這些幽門螺旋桿菌所引起的宿主反應中，目前關於 Cyclooxygenase-2 (COX-2) 的研究相當熱門，因為 COX-2 的誘發已經在許多癌症的致癌過程中被證實。

Cyclooxygenase 為一個會催化 arachidonic acid 氧化反應的酶，它有兩種 isoforms，一個為 COX-1，另一個為 COX-2。COX-1 在許多組織裡頭是持續活化的，對於維持細胞的平衡非常重要；相反的，COX-2 在正常的組織裡頭是偵測不到的，但是一旦胃腸道的上皮細胞受到 inflammatory cytokines、lipopolysaccharide、mitogens 以及 oxygen radicals 的刺激，很快的 COX-2 就會表現出來。

#### Cyclooxygenase-2 (COX-2)

COX-2 在胃腸道的表現作用目前還不確定，然而，經由 COX-2 產生的 prostaglandins，包括有 prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)、prostaglandin A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, and D<sub>2</sub>、prostaglandin J<sub>2</sub> 以及 15-deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J<sub>2</sub>、這些 enzymes 目前相信與細胞的增生及發炎反應的進行有關，它們能夠引起突變以及腫瘤的形成。因此，在胃炎形成胃癌的過程中，COX-2 的表現扮演著重要的角色；Zimmermann 指出在人類食道癌的細胞中有很高 PGE<sub>2</sub> 的合成量，他們說明 COX-2 高度的表現直接關係到細胞的 proliferation。在大腸直腸的組織裡頭發現 COX-2 過度表現決定腫瘤的形成，而 COX-2 的表現與 angiogenic factors 的表現以及新的血管形成有關；抑制 COX-2 的表現會造成 apoptosis 和抑制腫瘤的生長以及腫瘤的轉移。在原發性的子宮頸癌與轉移性的淋巴腺癌發現 COX-1 與 COX-2 的表現和 VEGF 的表現有關。在胃癌裡，COX-2 的表現與腫瘤的血管生成有關，在 COX-2 形成腫瘤血管的訊息傳導中 VEGF 可能是主要的作用。COX-2 誘導腫瘤血管生成作用是促進胃癌細胞 invasion 與 metastasis 的一種作用機轉。

#### NF- $\kappa$ B

最近幾年有研究證實，在癌症細胞裡 NF- $\kappa$ B 會去調控 COX-2 的表現以及細胞的 proliferation 和 apoptosis。然而這些研究都沒有直接探討 transcription factors 調節 COX-2 表現，進而影響 tumor invasion 與 tumor metastasis 之間的相關性。在很多不同的細胞裡 NF- $\kappa$ B 是一種誘導性的 transcription factor，主要是在調控 cytoplasm 與 nucleus 之間的訊息傳遞。NF- $\kappa$ B 是 Rel 家族的成員之一，包括有 p50 (NF- $\kappa$ B1)、p52 (NF- $\kappa$ B2)、Rel A (p65)、c-Rel、rel B。在 resting cells 裡，NF- $\kappa$ B 與 cytoplasmic inhibitory proteins I $\kappa$ B 以 heterodimer 或是 homodimer 的方

式存在 cytoplasm，位於上方與病理有關的刺激因素有 viruses、mitogens、bacteria、agents providing oxygen radicals 與 inflammatory cytokines，一旦 NF- $\kappa$ B complex 受到這些刺激因素活化後，NF- $\kappa$ B 就會移到細胞核裡與其辨識的 DNA 結合進而調控轉錄作用。在大多數 resting-state mammalian cells 裡，NF- $\kappa$ B 是不活化的但是在人類乳癌和老鼠的乳腺腫瘤細胞裡，NF- $\kappa$ B 異常的活化，而低濃度的 NF- $\kappa$ B 被發現存在於還未轉型 untransformed 的人類乳房上皮細胞與正常的老鼠乳腺裡面。

NF- $\kappa$ B dimmers ( p50/p65 heterodimer 和 p50 homodimer ) 存在這些細胞裡頭，大部分 NF- $\kappa$ B 是以 p50 homodimer 存在，甚至於在 resting- state cells 也是如此。在 AGS cells (胃癌上皮細胞)，用 *Helicobacter pylori* 感染刺激 NF- $\kappa$ B，發現 p50/p65 heterodimer 的表現會明顯升高而 p50 homodimer 只是輕微的增加。NF- $\kappa$ B 在 cytoplasm 與 I $\kappa$ B 型成一個 complexes，在大部分研究中提到的 I $\kappa$ B 是 I $\kappa$ B  $\alpha$ ，對於降解 I $\kappa$ B  $\alpha$  蛋白的作用機轉目前並不是很清楚，不過一般認為是去磷酸化 I $\kappa$ B。有二個 serine 位於 I $\kappa$ B  $\alpha$  的 N-terminal domain (位於第 32 和 36)，一般認為與 I $\kappa$ B  $\alpha$  穩定性有關，將 serine 換成 alanine，cellular activator 便無法降解 I $\kappa$ B。有不少蛋白具有像 I $\kappa$ B 的作用，但是唯有 I $\kappa$ B  $\alpha$  才是真正與 NF- $\kappa$ B 被刺激活化 translocate 到 nucleus 的作用有關。因此這些結果支持活化 NF- $\kappa$ B 是需要 NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B  $\alpha$  這個 complex 進行分離做用。突變的 I $\kappa$ B  $\alpha$  是一種 NF- $\kappa$ B 的 super-repressor。

#### Matrix Metalloproteinases ( MMPs )

發炎細胞的免疫浸潤以及抗體的活性，這兩者都包括 metalloproteinase 的活化。Matrix Metalloproteinases ( MMPs ) 是一種 zinc-containing endopeptidases，當傷口組織進行發育修補的時候，Matrix Metalloproteinases ( MMPs ) 會去分解 extracellular matrix 的蛋白而且和腫瘤的血管形成、腫瘤的侵入及腫瘤的轉移、關節炎以及動脈硬化症有關係。生長因子、荷爾蒙、細胞組織介素和 cell-cell matrix interactions 都會調控 MMPs 的轉錄表現。從上皮細胞與結締組織細胞中分泌的細胞表面型 ( membrane-type ) 及細胞外型 ( extracellular ) 的 MMPs，它們的活化通常都需要經過 proteolytic 去切割它的 NH<sub>2</sub> terminal domain；而抑制 MMPs 的活性，是借由 tissue inhibitors of metalloproteinases ( TIMPs ) 的非共價作用來形成，這些 TIMP-1, -2, -3 與 -4 的蛋白家族約是 20-到 30-kDa 的大小，含有 125-amino acid 的 NH<sub>2</sub> terminal domain 及 65-amino acid 的 COOH terminal domain，而它們本身的 disulfide bonds 是用來穩定其結構。

MMP2 和 MMP9 在一起可以切割 gelatins ( type I and V )、collagens ( types IV, V, VII, and X )、elastin 以及 fibronectin。構成胃黏膜的 extracellular matrix 的大分子包括有 collagen, laminin, proteoglycan, elastin, fibronectin, and hyaluronic acid。一般認為 MMPs 活化在一些結締組織重塑的生理過程中，包括 bone resorption 和子宮或是乳房的萎縮以及病理的情況像是癌症與發炎疾病的進行。這些支持著：

在胃組織的 extracellular matrix 裏，MMP 也許參與 physiologic turnover；然而在早期胃潰瘍形成的階段，MMP-9 也許扮演重要角色；在促進淋巴腺的侵犯以及早期胃癌的轉移，MMP9 被視為一個重要因子。也就是因為這樣，讓許多的研究想去探討、解釋幽門螺旋桿菌和 MMP 表現之間的相關性。

材料與方法：

#### 細胞培養

人類胃癌上皮細胞 MKN-45 細胞株培養在含有 10 % fetal bovine serum、100U/mL penicillin 以及 100 $\mu$ g/mL streptomycin 的 DMEM 培養液，在實驗的時候，MKN-45 細胞會重新培養在沒有血清、抗生素的培養液裏和 *H. pylori* 一起培養。

#### 幽門螺旋桿菌菌株

本篇所有研究都是使用 *H. pylori* ATCC 43504 這支菌株，此菌株擁有 *cag* pathogenicity island。冷凍儲藏於-70 度含有 brucella broth、30% glycerol 的營養液。幽門螺旋桿菌養在含有 5% horse blood 的培養皿於 37 $^{\circ}$ C、微適氧的環境中生長；在培養的過程中，常規使用 urease activity 的方法來篩檢細菌。在與 MKN-45 胃癌上皮細胞感染，我們是取用已培養 48 到 72 小時的細菌，用棉棒在培養皿上沾取細菌，之後使其懸浮於 PBS，使用可見光 600nm 來測定菌落數（optical density (OD)600nm =  $2.4 \times 10^8$  colony-forming units/ml），MKN-45 胃癌上皮細胞以  $2 \times 10^6$  養在 65mm 的 dish，與細菌的比例為 MOI 80 來做實驗。

#### Western blot analysis

##### 1. 樣本處理

取已定量完成的蛋白質萃取液 50  $\mu$ g (換算成相對體積)，以二次水將各樣本之體積補成一致，再加入五倍體積 protein loading buffer (內含有染料)，於 100 $^{\circ}$ C Dry-Bath 機器加熱 5 分鐘 (目的使蛋白質變性)，迅速置回冰上 5 分鐘，再經 microcentrifuge 低速離心，置冰上等待 loading。

\*\* protein loading buffer :

1 ml	Tris-HCL, PH 6.8 ( 0.5 M )
1.6 ml	10% SDS
1.6 ml	Glycerol ( 10(w/v)% )

0.4 ml	$\beta$ -mercaptoethanol (50 mM)
0.4 ml	0.5% bromophenol blue (in water)
3.0 ml	Distilled water

## 2. 鑄膠

將電泳玻璃片洗淨，擦拭乾淨後以厚度約 0.75 mm 或 1.25 mm 之 spacer 為間隔裝好電泳片，並架到電泳座上固定，依所觀察不同的蛋白分子量，需配置不同比例的下層 separating gel，將配膠所需物質混合均勻後，直到液面離 well 約 1.5 cm 處為止，加入二次水覆蓋液面，待膠體凝固後，吸乾上層的二次水，再配置上層 stacking gel 倒入，將電泳齒梳插入電泳片之 stacking gel 中，若有氣泡則上下移動齒梳，使氣泡脫離，待上層膠凝固後，抽出齒梳，用二次水清洗 well 數次，再將配好之整組電泳玻璃膠體，置入電泳槽中，準備將 sample 加入 well 中。

## 3. SDS-PAGE

將處理好之蛋白質樣本小心注入 well 中，勿使樣本溢出，將 protein standard maker 注入其中一個 well，再取 SDS-running buffer 小心地將各 well 補滿，持續加入 SDS-running buffer 至內槽，直到蓋過最內側之玻璃上緣；外槽也以此 buffer 補至蓋過電導線為止。

連接電泳槽與電源供應器，打開電源，先以 70V 的電流跑過 stacking gel，直至色帶跑至 stacking gel 與 separating gel 之交界處，再調整電流為 200V，當色帶跑至底限時才停止電泳。

## 4. 蛋白質樣本之轉漬 (Electrotransfer)

電泳完畢後將膠體取出，截去多餘之部分，將膠體置於兩張 transfer buffer 浸濕過的濾紙上，膠體上再放上與膠體大小相同之硝化纖維紙 (必須已經以 transfer buffer 浸濕)，再放上兩張經 transfer buffer 浸濕過的濾紙，並用玻璃棒趕氣泡，最後以夾板 (內含海棉襯墊) 夾緊，放入冷房的轉漬槽中，以固定電流 0.1 安培轉漬 16-18 個小時。

※transfer 完成的 NC paper 可用紅色染劑，染看看是否有轉漬成功？確認後再以 TBS-T 清洗至紅色消失。

## 5. 免疫墨點法 (Immunoblot)

轉漬完後將硝化纖維紙取出，用 TBS-Tween buffer 漂洗 5 分鐘，再以 5% blocking buffer 於 4°C 下作用 1 小時。倒掉 blocking buffer，再以 TBS-T 漂洗三次，每次時間為 10 分鐘。換上一級抗體，於 4°C 下作用 overnight，再以 TBS-T buffer 快速漂洗三次，時間也是 10 分鐘。再換上二級抗體，於 4°C 下作用 1 小時，再以



TBS-T buffer 快速漂洗三次，時間也是 10 分鐘。最後將硝化纖維紙放入透明塑膠套中，以濾紙吸掉紙上殘留的 TBS-T buffer，再將 ECL substrate 覆蓋整個硝化纖維紙，再擦掉多餘的 ECL，將塑膠封套放到感光夾中，以 X 光片感光 (感光時間依經驗調整)，後再以顯影液顯影 1-3 分鐘，換清水漂洗數次，再以定影液處理 1-3 分鐘，再換清水漂洗乾淨即可。

#### 6. Luciferase and $\beta$ -galactosidase measurements

MKN-45 胃癌上皮細胞和 pMT2 LacZ、COX-2-Luc、以及 NF $\kappa$ B p65, p50 DNA 或是與 control pMT2 plasmid 轉染。在 luciferase assays，將細胞用 PBS 清洗兩次，之後加入 500 $\mu$ l 的細胞溶解液 (Analytical Luminescence, San Diego, CA)，於 4 $^{\circ}$ C 搖晃 15-30 分鐘，然後以 14000g 離心 15 分鐘，取 100  $\mu$ l sample 加入 100 $\mu$ l 的 luciferase substrate solution A (Analytical Luminescence) 和 100 $\mu$ l 的 luciferase solution B (Analytical Luminescence)，然後使用 measured luciferase activity 的儀器來偵測。

LacZ activity 取 40 $\mu$ l 的 sample 和 2mM chlorophenol red  $\beta$ -galactopyranoside (Boehringer Mannheim)、2 nM MgCl<sub>2</sub>、0.1 mM MnCl<sub>2</sub>、45 mM 2-mer-captoethanol、100mM NaHPO<sub>4</sub> 在 37 $^{\circ}$ C 的溫度下做用 5- 30min，加入 500 $\mu$ l 的 0.5 M EDTA 來終止作用，接著使用可見光 570nm 測其吸光值，With each experiment, luciferase activity was determined in duplicate and normalize to LacZ activity for each dish.

#### 7. Electrophoretic Mobility Shift Assay

先將細胞全部的 nuclear extract protein 準備好，NF- $\kappa$ B gel shift oligonucleotide 用 T4 polynucleotide kinase 和 ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P) ATP (3,000Ci/mmol at 10mCi/ml) 標記起來，使用 1 $\mu$ g Nuclear extracts protein 和含有 20% glycerol, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5mM EDTA, 2.5mM DTT, 250mM NaCl, 50mM Tris-HCl (PH 7.5), 0.25mg/ml poly (dl-dC)  $\cdot$  poly (dl-dC) 的溶液以及 NF- $\kappa$ B antibiotic (anti-p65, anti-p50) 在室溫下一起作用 10 分鐘之後加入 <sup>32</sup>P-labeled consensus oligo 在室溫下作用 20 分鐘，將 Sample 放到 4% acrylamide gel 使用 0.5 X TBE buffer 用 25mA 跑 1 小時 30 分，之後在 80  $^{\circ}$ C 的環境下乾膠 2 小時，曝光約 24-48 小時。

#### 8. Cell invasion assays

將  $1 \times 10^5$  cells 和 *H. pylori*、NS398 加到 invasion chamber 的上層，然後在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 細胞培養箱培養過夜，之後將沾濕的棉棒在 invasion chamber 的上層來回擦拭數次，以移除 non-invading 的細胞，將染劑 hematoxylin 加在 invasion chamber 下面，作用約 10 分鐘，之後在 200X 的顯微鏡下計算細胞。Invasion%= Mean number of cells invading through Matrigel under the treatment/ Mean number of cells invading through Matrigel under the control.

研究結果:

#### *H. pylori* 的感染會促進胃癌上皮細胞的 invasion

想去證實 MKN-45 胃癌上皮細胞和 *H. pylori* 感染會去增加胃癌上皮細胞的 invasion，將細胞與 *H. pylori* 以及加或不加 COX-2 inhibitor NS398 一起培養過夜，然後利用 hematoxylin 來染細胞，約作用 10 min，在顯微鏡下計算細胞量。結果，有和 *H. pylori* co-culture 的 MKN-45 細胞有明顯增加其 invasion 的作用，相對的，NS398 會去減少 MKN-45 細胞的 invasion，這些結果支持著 *H. pylori* 的感染會增加胃癌上皮細胞 invasion 的作用，而這個作用可能是受到 COX-2 的調節。

#### 胃癌細胞與 *H. pylori* 感染會增加 MMP2、MMP9、VEGF 的表現

我們想研究 MKN-45 胃癌上皮細胞和 *H. pylori* 一起培養會不會影響 MMP2、MMP9、VEGF 的表現；有和 *H. pylori* 感染的胃癌上皮細胞其 MMP2、MMP9、VEGF 的蛋白量，有明顯的增加，MMP2、MMP9、VEGF 表現量的增加，都是發生在和 *H. pylori* 作用的第 24 小時；這些結果指出，在 MKN-45 胃癌上皮細胞裏 *H. pylori* 有能力去增加 MMP2、MMP9、VEGF 的表現。

#### 在 *H. pylori* 感染胃癌上皮細胞中，COX-2 inhibitor NS398 會去減少 MMP2、MMP9、VEGF 蛋白量的表現。

最近有研究指出 COX-2 inhibitor 可以減少 matrix metalloproteinase 的釋放以及 COX-2 會促進 matrix metalloproteinase-2 和-9 的分泌。因此，我們想探討在胃癌上皮細胞裏，*H. pylori* 誘導 MMP2、MMP9、VEGF 的表現是需要 COX-2 的表現。有和 *H. pylori* 作用的 MKN-45 胃癌上皮細胞中，COX-2 有明顯被誘導出來，而且 COX-2 inhibitor NS398 會降底 COX-2、MMP2、MMP9 以及 VEGF 的表現；這些結果表示，在胃癌上皮細胞裏，*H. pylori* 誘導 MMP2、MMP9 以及 VEGF 的表現是透過 COX-2 的活化。

#### *H. pylori* 感染胃癌上皮細胞，誘導 MMP2、MMP9、VEGF 的表現是經由活化 NF-kB 調控 COX-2 的表現 *H. pylori* infection of gastric epithelial cells induces MMP2, MMP9, VEGG4F through activation of mediated COX-2 expression.

在之前的研究指出在胃癌細胞裏 NF-kB 的活化是經由 *H. pylori* 的刺激。另外也有研究表示 NF-kB 會去調控 cyclooxygenase-2 的表現以及細胞的 proliferation，也有人證實 *H. pylori* 誘導 metalloproteinase-9 的表現是透過 NF-kB 的活化，我們假設經由 *H. pylori* 誘導 COX-2、MMP2、MMP9 以及 VEGF 的表現是透過 NF-kB 的調控，為了證實這個假設，我們用 EMSA 和 western blot 來析 *H. pylori* 是否會影響 NF-kB 的表現。*H. pylori* 感染胃上皮細胞會誘導 NF-kB 的 p65 以及 p50 的

蛋白表現，*H. pylori* 去影響 NF-kB 的表現這個現象在加入 *H. pylori* 的第 1 個小時的時候就可看出來，這個表現持續作用到加入 *H. pylori* 的第 6 小時，這個誘導的作用更進一步在 EMSA 裏證實出來，在 *H. pylori* 感染胃癌上皮細胞的第 3 小時 protein-DNA complex 有明顯增加而且使用 p65 或是 p50 antibody 有 super-shift 的表現。

接著，我們想證實 NF-kB 在 COX-2 gene expression 中所扮演的角色。MKN-45 胃癌上皮細胞和 COX-2 promoter DNA (COX-Luc)、NF-kB P65、P50 或是 control pMT2 一起 transfection，而 promoter activity 利用 luciferase activity 來分析；transfection NF-kB p65 或是 p50 明顯增加 COX-2 promoter activity，這些結果支持著，經由 *H. pylori* 誘導 COX-2 的表現也許是受到 NF-KB activation 的調控。

### 參、心得：

在一年的研究中，最大的心得是對於基礎醫學的研究設計。學習了如何在研究一開始的設計階段，選擇一個在臨床上有其重要性而仍然未知的問題。其次，要設計一個實際可行，又可以回答我們問題的研究。這一部分必須與指導教授經過多次的溝通與討論，事先就將實驗進行過程中所可能得到的結果以及可能面對的困難加以考慮，以便於在實驗一開始，便可以選擇正確而有效率的實驗模式、細胞株以及細菌株。

對於臨床醫師而言，從事細胞分子生物學研究，有其優點與限制。其優點之一：所有的實驗室研究結果，均須以臨床上的應用與重要性為依歸，臨床醫師照顧病人的豐富經驗，知道哪些研究主題有其臨床上的重要性，所以在選擇基礎醫學研究的主題時，有比基礎醫學研究人員更為敏銳而精確的能力。其次，臨床醫師可以充分應用臨床上資訊，包括：病人的病情、檢體、血液與藥物治療等訊息，配合基礎醫學研究的發現，可以讓基礎醫學的研究成果，在臨床上充分發揮，造福病患。

然而，臨床醫師從事基礎醫學研究也有其限制。首先是基礎醫學研究能力訓練上的不足，即使出國前，在台大博士班已經有實驗室的工作經驗，然而比起在實驗室動輒十幾年經驗的美國研究者，基礎醫學的研究訓練仍嫌不足。有幸能到世界一流醫學中心的研究室，從事一年基礎醫學研究，對於將來的研究非常有助益。其次，台灣臨床醫師的臨床工作負擔較為繁重，很難向美國的研究者可以選擇以研究為主、臨床服務為輔，專心從事研究工作。這個缺點可以藉由增加研究助理的方式加以改善。

#### 肆、建議

本院在許多前輩與全體同仁多年的努力下，在台灣的醫學界已享有相當的聲譽，且在中台灣居領導地位。對於一個只有二十年的年輕醫院而言，誠屬不易。以職服務於本院十年的經驗，認為本院有以下優點：

- 一、 本院為一個重視教學與研究的醫學中心：比起許多台灣的醫學中心，本院相當重視教學與研究，並不以臨床工作的績效為唯一考量。而且相當願意將經費使用於購買研究設備與研究計劃，可以讓有心從事研究的研究人員，有個良好的環境。
- 二、 本院的醫師與研究人員，素質優良：除了優良的設備與充分的經費之外，良好的醫師與研究人力，是一個優秀的醫學中心所不能或缺的條件。本院一向為許多優秀醫學畢業生所選擇的醫學中心，有了這些優秀的醫學畢業生為背景，本院有相當充分的實力可以與其他醫學中心競爭。
- 三、 本院相當重視與國內外醫學界的交流：與國內外一流醫院、醫學院的交流，同時積極參加國內外的醫學界活動，是一個醫學中心是否能夠維持其學術地位與研究水準很重要的一環。本院每年均提撥相當的金額以補助、獎勵論文發表，同時也提供經費供醫師出國進修、開會，這些投資，雖然不能在短時間內看到成果，但卻是一個醫學中心能夠持續成長茁壯的重要政策。

除了上述的這些優點之外，職也針對本院的研究環境，提供一些個人淺見，希望本院能夠不斷地進步、好上加好：

- 一、 增加研究者的研究誘因：對於有心從事研究的醫師或研究者而言，一個良好的環境與充分的經費，是一個很重要的前提條件。與此同時，若能也增加其從事研究的動機，讓其對於研究的興趣與努力能夠保持不墜，是一個相當重要的考量。要提供研究誘因，除了獎勵金制度之外，也應該讓從事研究者有榮譽感。美國許多醫學中心都有研究成果發表的佈告欄，隨時張貼院內同仁最近發表的研究成果，不僅讓研究者可以隨時分享其研究成果，也讓研究者有充分的榮譽感。
- 二、 統合研究資源：在美國從事研究的一個深深感觸，就是美國對於研究資源的統合做的相當成功。包括：研究場地、研究設備、研究人力與研究檢體，均能做最佳的統合。本院在教研部主任的努力下，已經開始收集全院性的檢體，這是一個相當有遠見的做法。希望與此同時，在其他研究場地、研究設備與研究人力上，也能做相同的整合。此外，也希望作為所有臨床研究核心的病理部，能將其累積二十年的寶貴組織庫，廣泛地與本院研究者合作，而不需要每位研究者辛苦地收集其自己的組織檢體。

三、醫師收入雙軌制：既然本院為醫學中心，可以考慮引進國外醫學中心或者長庚醫院的做法，分別保護以臨床工作為主的醫師，或者以研究為主的醫師。雖然臨床工作與研究兩者相輔相成，豐富的臨床經驗將有助於從事研究，而研究的成果本身可以回饋回來增加臨床對於病人照顧的品質。然而兩者在時間的分配上，是相互衝突的。很難同時兼顧在臨床上有很高的業績，在研究上又有傑出的表現。在這種情況下，應該允許醫師依其興趣與表現，選擇以臨床工作為主，或者以研究工作為主。以提高臨床工作的品質，同時也有助於提升研究水準。在目前的研究環境下，若醫師收入雙軌制不容易實行，另一個變通方法，應該增加研究助理的編制，讓臨床工作繁忙的醫師，有研究助理的幫助以從事研究工作。