

行政院及所屬各機關出國報告

(出國類別：研究)

分子生物學

The second intronic CArG box of cysteine-rich protein 2 gene is
activated by myocardin-related transcription factor A

服務機關：臺北榮民總醫院

職 稱：住院醫師

姓 名：李宜中

出國地區：美國

出國期間：92/9/30 至 93/3/18 日

報告日期：93/4/27

J3/
C09203292

公務出國報告提要

頁數: 20 含附件: 否

報告名稱: 分子生物學

主辦機關: 行政院輔導會臺北榮民總醫院

聯絡人/電話: /28757115

出國人員: 李宜中 行政院輔導會臺北榮民總醫院 神經醫學中心 住院醫師

出國類別: 進修

出國地區: 美國

出國期間: 民國 92 年 09 月 30 日 -民國 93 年 03 月 18 日

報告日期: 民國 93 年 05 月 03 日

分類號/目: J3/醫療 J3/醫療

關鍵詞: 分子生物學

內容摘要: CRP2 是近年來才新發現的基因，它主要表現在血管壁的平滑肌細胞上。由於血管壁平滑肌細胞在心血管疾病及腦血管疾病的致病機轉上扮演重要的角色，探索 CRP2 的作用及其基因表現的調控機制也非常重要。我們將 CRP2 promoter 及第一內子內的相關調控序列 cloning 入一擁有 luciferase reporter 基因的 pGL2B 質體內，同時製備數種具有平滑肌細胞內常見的轉錄因子基因的表現質體(expression plasmid)，藉由對 CV1 細胞進行 co-transfection，使 CRP2 的相關調控序列及特定轉錄因子同時表現在 CV1 細胞內。利用 luciferase 活性的測定及校正代表 CRP2 的相關調控序列的活性，進而一步探討其與特定轉錄因子的相互關係。實驗結果顯示，MRTFA 對 CRP2 (+40~-1693)序列有明顯的活化作用，但對 CRP2(+40~-1590)的活化作用較不明確；而 MRTFB 對各種長度 CRP2 promoter deletion - luciferase construct 並無活化作用，這代表 CRP2 (+40~-4855)序列間沒有 MRTFB 的作用點。DNMRTFA630 或 723 都可對 CRP2 (+40~-795)序列產生一 dose responsive 的抑制作用，而暗示 MRTFA 對此一區間也有作用。最後，實驗證實 MRTFA 可藉由與 CRP2 第一內子內第二個 CArG Box 的相互作用來活化基因的表現。

中文摘要

CRP2 是近年來才新發現的基因，它主要表現在血管壁的平滑肌細胞上。由於血管壁平滑肌細胞在心血管疾病及腦血管疾病的致病機轉上扮演重要的角色，探索 CRP2 的作用及其基因表現的調控機制也非常重要。我們將 CRP2 promoter 及第一內子內的相關調控序列 cloning 入一擁有 luciferase reporter 基因的 pGL2B 質體內，同時製備數種具有平滑肌細胞內常見的轉錄因子基因的表現質體(expression plasmid)，藉由對 CV1 細胞進行 co-transfection，使 CRP2 的相關調控序列及特定轉錄因子同時表現在 CV1 細胞內。利用 luciferase 活性的測定及校正代表 CRP2 的相關調控序列的活性，進而一步探討其與特定轉錄因子的相互關係。

實驗結果顯示，MRTFA 對 CRP2 (+40~-1693) 序列有明顯的活化作用，但對 CRP2(+40~-1590) 的活化作用較不明確；而 MRTFB 對各種長度 CRP2 promoter deletion – luciferase construct 並無活化作用，這代表 CRP2 (+40~-4855) 序列間沒有 MRTFB 的作用點。DNMRTFA630 或 723 都可對 CRP2 (+40~-795) 序列產生一 dose responsive 的抑制作用，而暗示 MRTFA 對此一區間也有作用。最後，實驗證實 MRTFA 可藉由與 CRP2 第一內子內第二個 CArG Box 的相互作用來活化基因的表現。

關鍵詞： CRP2, MRTFA, MRTFB, Myocardin

英文摘要

CRP2, a newly discovered gene, expresses mainly in the vascular smooth muscle cells. Because smooth muscle cells are vital in the pathogenesis of cardiovascular and cerebrovascular diseases, it is very important to make clear the effect and regulatory mechanism of CRP2 expression. In this study, we cloned CRP2 promoter, intron 1, and related regulatory sequences into pGL2B that contains a luciferase reporter gene. We also made several kinds of expression plasmids with different transcription factors as MRTFA, MRTFB, and myocardin. The co-transfection study on CV1 cells with different reporter and expression plasmids was performed. We measured and corrected the luciferase activities in each condition to evaluate the relationship between different CRP2 regulatory sequences and specific transcription factor.

Our results revealed that MRTFA activated the sequence of CRP2(+40~-1693) significantly but not CRP2(+40~-1590). There is no effect of MRTFB on CRP2 promoter sequence between +40~-4855. DNMRMRTFA630 or 732 can produce a suppressive effect with dose-responsive manner on CRP2(+40~-795). We also proved that MRTFA activates CRP2 through the interaction with the second CArG box in CRP2 intron 1.

關鍵詞： CRP2, MRTFA, MRTFB, Myocardin

目錄

前言	1
研習目標	3
研習方法	4
行程紀要	8
研習成果	9
研習心得	13
建議	14
計畫成果至自評	15

報告內容

前言

二十一世紀是後基因體時代，分子生物學的快速進步不僅深切的影響基礎醫學研究的發展，也帶給臨床醫學診斷治療在執行與創新等各方面新的思維及契機。身為以服務、研究、及教學並重為職志的醫學中心醫師，對於基因及遺傳醫學應有相當程度的素養與認識，以符合並期超越現代醫學的發展潮流。此次承蒙行政院衛生署遴選特殊科醫師出國進修實施計畫補助，讓我有機會至哈佛大學醫學院附屬 Brigham and Women's hospital 進行近六個月的研習。在這六個月裏，我在 Dr Mark Perrella 的實驗室裏跟隨 Dr Shaw-Fang Yet 進行純粹的基礎醫學研究，雖然研究的成果有限，未能達到足以發表的規模，但在此研究過程中學習了許多先進的分子生物學研究方法、實驗技巧、與實驗設計理念。

我所參與的研究計畫是探索 Cystein-rich protein 2 (CRP2) 基因的調控機制。CRP2 是近年來才新發現的基因，它主要表現在血管壁的平滑肌細胞。由於血管壁平滑肌細胞在心血管疾病及腦血管疾病的致病機轉上扮演重要的角色，探索 CRP2 在生理上的作用及基因表現的調控機制也相對的重要。我們將 CRP2 promoter 或相關調控序列 cloning 入一擁有 luciferase reporter 基因的質體，同時製備數種具有

平滑肌細胞內常見的轉錄因子基因的表現質體(expression plasmid)，藉由對 CV1 細胞進行 co-transfection，使 CRP2 promoter 或相關調控序列及特定轉錄因子同時表現在 CV1 細胞內。此時 luciferase 的活性可代表 CRP2 promoter 或相關調控序列的表現強度，而進一步提供探討 CRP2 promoter 或相關調控序列與特定轉錄因子相互關係的依據。

在這近六個月的時間裡，我嘗試探索 CRP2 promoter 序列（從 +40~-795 到 +40~-4855）及內含兩個 CArG Box 的第一內子（-810 bp ~ 12kb）序列，與各種在平滑肌細胞內常見的轉錄因子間的相互關係；這些相關轉錄因子包括 myocardium, myocardium related factor A (MRTFA)，以及 myocardium related factor B (MRTFB)。其中發現 MRTFA 可藉由與 CRP2 第一內子內第二個 CArG Box 的相互作用來活化基因的表現。

研習目標

藉由參與先進醫學研究機構之基礎醫學研究,學習分子生物學研究方法、實驗技巧、與實驗設計理念,以期日後應用於臨床基因遺傳醫學的診斷、治療、以及研究。

所學習的實驗技巧細項如下:

研習方法

利用在 CV1 細胞株上進行 co-transfection 研究,來探索 Cystein-rich protein 2 (CRP2)基因的調控機制。方法大綱如下:

- (1) 製備各種長度 CRP2 promoter deletion – luciferase construct 的報告質體 (reporter plasmid)。

以實驗室裏原本即製備的 pGL2B-CRP2(-2663)質體

[CRP2(-2663~+40) 之片段殖入帶有 luciferase reporter gene 的

pGL2-B] 為模板,設計 PCR primers 來生產 CRP2(-2281~+40)、

CRP2(-2063~+40)、CRP2(-1857~+40)、CRP2(-1693~+40)、
CRP2(-1590~+40)、CRP2(-1398~+40)、及 CRP2(-1169~+40) 片段；
並將這些片段分別殖入 pGL2-B 而得到 pGL2B-CRP2(-2281)、
pGL2B-CRP2(-2063)、pGL2B-CRP2(-1857)、
pGL2B-CRP2(-1693)、pGL2B-CRP2(-1590)、
pGL2B-CRP2(-1398)、pGL2B-CRP2(-1169)。另方面實驗室內
原本即製備了 pGL2B-CRP2(-4855) 及 pGL2B-CRP2(-795)。

- (2) 製備數種具有平滑肌細胞內常見的轉錄因子基因的表現質體。
設計適當的 PCR primers 來生產 MRTFA，以及 MRTFB 的片段；
並將這些片段分別殖入 pFLAG-CMV5a 質體而得到
pFLAG-MRTFA 及 pFLAG-MRTFB。另方面實驗室內原本即製
備了 pCDNA3-Myocardin。

- (3) 培養 CV-1 細胞。

CV-1 細胞是源自猴子腎臟的纖維母細胞，常作為 transfection 研
究的平台。

- (4) 用 CRP2 promoter deletion – luciferase construct 的報告質體
(reporter plasmid)，及包含轉錄因子基因的表現質體，在 CV1 細
胞上進行 co-transfection 研究。
同時以報告質體(各種 pGL2B-CRP2 promoter deletion construct 及

pGL2C), 表現質體(pFLAG-MRTFA or pFLAG-MRTFB), 及 pFLAG-CMV5a- β -gal(帶有 β -galactosidase reporter gene) transfect CV1 細胞。其中 β -galactosidase 可用來校正 luciferase 的活性, 以校正後 luciferase 的活性可用來評估 MRTFA 或 MRTFB 與某一 CRP2 promoter 片段的相互作用。

(5) 製備 dominant negative MRTFA。

利用 site-specific mutagenesis 的方法, 使 pFLAG-MRTFA 中 MRTFA 的序列, 在第 631 或 733 codon 處產生突變而生成一適當的限制酶切割處; 再利用適當的限制酶處理並選殖出僅可產生 630 及 732 個氨基酸序列 MRTFA 片段的 pFLAG-DNMRTFA630 及 pFLAG-DNMRTFA732。根據先前的文獻, DNMRTFA630 及 DNMRTFA732 具有 dominant negative 的 effect。

(6) 用 CRP2 promoter deletion – luciferase construct 的報告質體

(reporter plasmid), 及 dominant negative MRTFA, 在 CV1 細胞株上進行 co-transfection 研究。

同時以報告質體[pGL2B-CRP2(-2663), or (-795)], 表現質體(pFLAG-DNMRTFA630 or 723), 及 pFLAG-CMV5a- β -gal(帶有 β -galactosidase reporter gene) transfect CV1 細胞。其中 β -galactosidase 可用來校正 luciferase 的活性, 以校正後 luciferase

的活性可用來評估 DNMRFTA630 或 DNMRFTA723，與
CRP2(-2663~+40) or CRP2(-795~+40)片段的相互作用。

- (7) 製備內含兩個 CArG Box 的第一內子 (-810 bp ~ 12kb) 序列及內
含 luciferase 的報告質體。

先將 splicing acceptor 的序列(約 50nt)先嵌入 pGL2B 內的適當位
置；再將內含兩個 CArG Box 的第一內子 (-810 bp ~ 12kb) 序列
嵌入 splicing acceptor 的序列之前，而得到 pGL2B-CRP2(Int1)。
並利用 site-specific mutagenesis 的方法備製分別及同時具有第一
及第二 CArG Box 突變的 pGL2B-CRP2(Int1)，分別命名為
pGL2B-CRP2(C1M-Int1)，pGL2B-CRP2(C2M-Int1)，及
pGL2B-CRP2(C1/2M-Int1)。

- (8) 用內含 CRP2 第一內子 (-810 bp ~ 12kb) 序列及 luciferase 的報告
質體 (reporter plasmid)，及包含轉錄因子基因的表現質體，在
CV1 細胞株上進行 co-transfection 研究。

同時以報告質體 pGL2B-CRP2(Int1)，pGL2B-CRP2(C1M-Int1)，
pGL2B-CRP2(C2M-Int1)，及 pGL2B-CRP2(C1/2M-Int1)，表現質
體(pFLAG-MRTFA，pCGN-SRF 及 pCDNA3-Myocardin)，及
pFLAG-CMV5a- β -gal(帶有 β -galactosidase reporter gene) transfect
CV1 細胞。其中 β -galactosidase 可用來校正 luciferase 的活性，以

校正後 luciferase 的活性可用來評估 MRTFA 或 Myocardin 與 CRP2 (Int1)的相互作用。

行程紀要

92/9/30: 到達 Boston

92/10/1: 到 Brigham and women's hospital 報到，並於當日開始進行實驗。

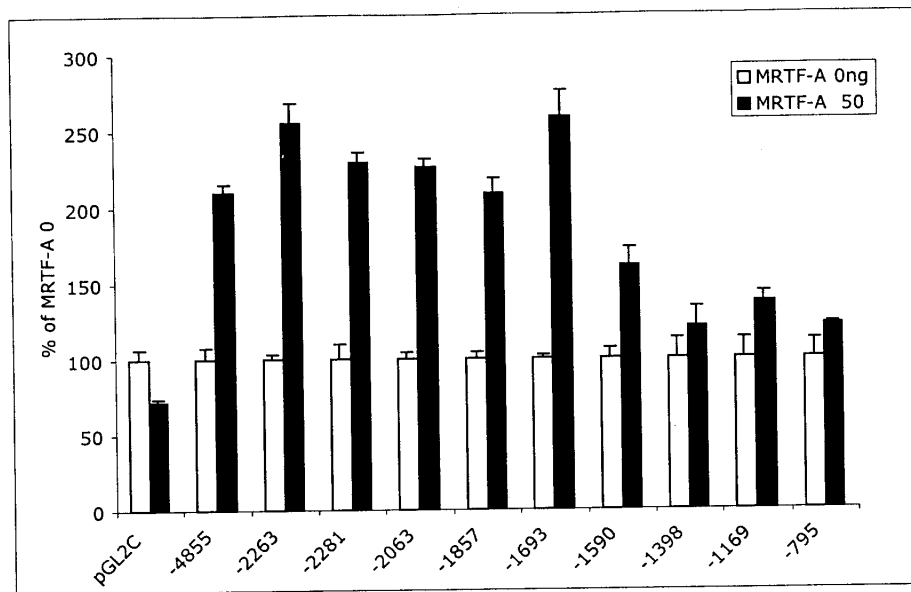
92/10~11: 熟悉基本實驗技巧，將目標序列 cloning 入帶有 reporter gene 的質體內，並大量製備成功選殖的質體。

92/12-93/2: 進行 CV1 細胞培養，co-transfection study，探索 CRP2 基因的調控與平滑肌細胞內常見的一些轉錄因子，如 SRF、myocardin、MRTFA、MRTFB 間的相互關係。

93/3/1~16: 整理實驗資料，繕寫研究報告。

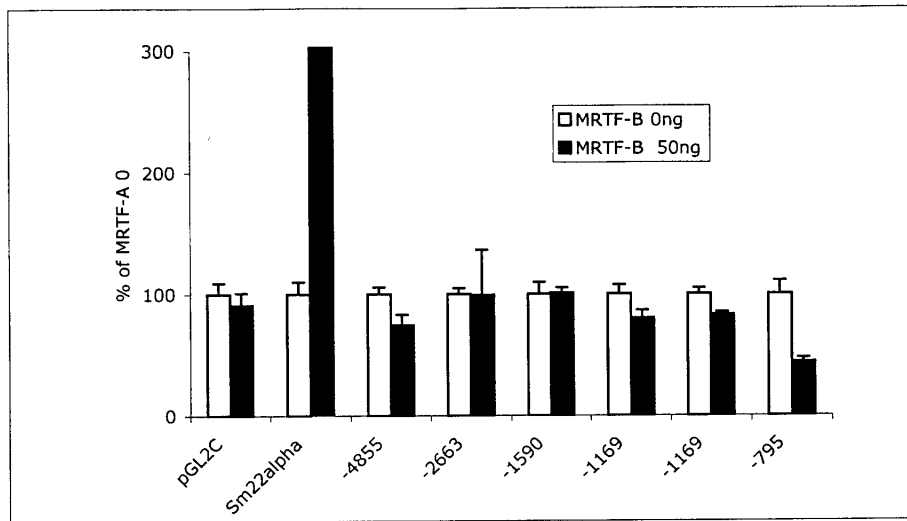
研習成果

(1) 各種長度 CRP2 promoter deletion – luciferase construct 與 MRTFA 的相互關係。



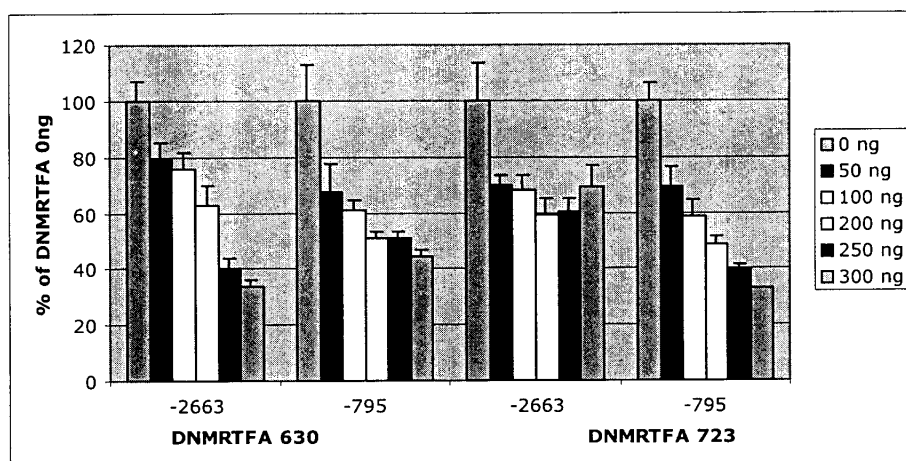
上圖中，PGL2C 為 negative control，縱軸代表校正後的 luciferase 的活性在 MRTFA 0, 50ng 時與 MRTFA 0ng 的相對比例。由上可見 MRTFA 對 CRP2(-1693)至 CRP2(-4855)的序列可增強一倍以上的表現，這代表在 CRP2 (+40~-1693)序列間可能有 MRTFA 的作用點。但 MRTFA 對 CRP2(-795)至 CRP(-1590)的活化作用較不明確，無法達成進一步結論。

(2) 各種長度 CRP2 promoter deletion – luciferase construct 與 MRTFB 的相互關係。



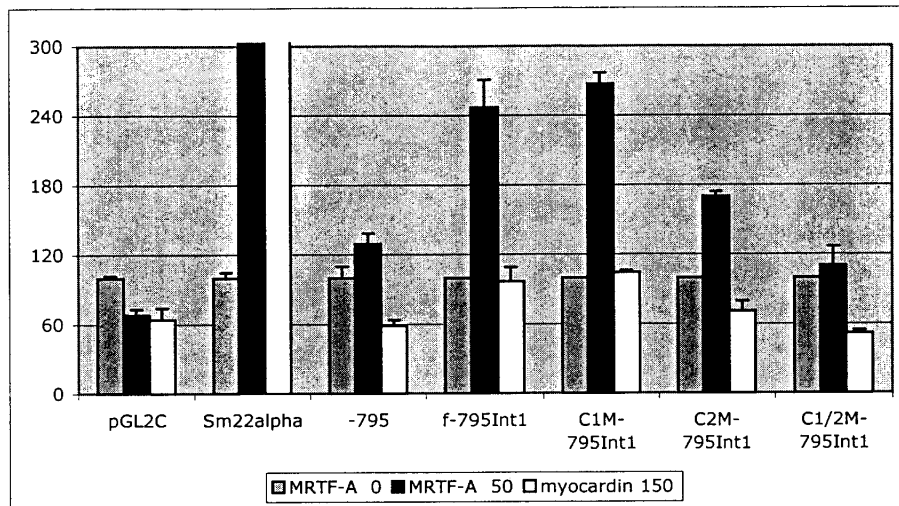
上圖中，PGL2C 為 negative control，SM22alpha 為 positive control，縱軸代表校正後的 luciferase 的活性在 MRTFB 0, 50ng 時與 MRTFB 0ng 的相對比例。由上可見 MRTFB 對各種長度 CRP2 promoter deletion – luciferase construct 並無活化作用，這代表 CRP2 (+40~-4855) 序列間沒有 MRTFB 的作用點。

(3) CRP2(-2663)或 CRP2(-795~+40)的片段，與 DNMRFTA630 或 DNMRFTA723 的相互關係



上圖中，縱軸代表校正後的 luciferase 的活性在不同量的 DNMTFA630 或 723 時與 DNMTFA 0ng 的相對比例，橫軸代表 pGL2B-CRP2(-2633)或 CRP2(-795)分別與 DNMTFA630 或 723 的實驗。由上可見，不論是在 pGL2B-CRP2(-2633)或 CRP2(-795)的實驗中，DNMTFA630 或 723 都可對其 luciferase 的表現產生一 dose responsive 的抑制作用。這代表 DNMTFA630 或 723 可能作用在 CRP2 (+40~-795)序列間，同時暗示 MRTFA 也作用在此一區間。

(4)MRTFA 或 Myocardin 與 CRP2 (Int1)的相互作用。



上圖中，PGL2C 為 negative control，SM22alpha 為 positive control，縱軸代表校正後的 luciferase 的活性在 MRTFA 0, 50ng, 及 myocardin 150ng 時與 MRTFA 0ng 的相對比例。f-795Int1 代表 pGL2B-CRP2(Int1)；C1M-795Int1 代表 pGL2B-CRP2(Int1) with 1st CarG box mutation；C2M-795Int1 代表 pGL2B-CRP2(Int1) with 2nd CarG box mutation；C1/2M-795Int1 代表 pGL2B-CRP2(Int1) with 1st and 2nd CarG box mutation。由上可見，MRTFA 可活化 CRP2(Int1)；但是這活化作用會因 CRP2(Int1) 的 2nd CarG box mutation 而消滅，這同時暗示 MRTFA 的作用與此 2nd CarG box 相關。

研習心得

此次承蒙行政院衛生署遴選特殊科醫師出國進修實施計畫補助，讓我有機會至哈佛大學醫學院附屬 Brigham and Women's hospital 進行近六個月的研習。在這六個月裡，除了專門知識的擷取，也經歷了許多從人生未有的經驗，同時開拓了個人的視野，對日後學術生涯有很大的裨益。

美國國力的強盛在哈佛大學這頂尖學府內表露無遺，不僅實驗室空間儀器的配合，實驗耗材的補給都非常理想外，更是各類人才濟濟。美國的強盛及利己的移民政策使得世界各國大量人才得為己用。我問了許多從中國大陸、印度、及其他亞洲國家來到哈佛大學擔任博士後研究員的同事，發現大部份的人都準備移民至美國。這個現象勢必會增強美國國力。

另外，在進修期間讓我了解，一個好的研究是對一個主題深入而全面的探索，因而要完成一個好的研究往往需要一個團隊來努力。而台灣的醫師常常是單打獨鬥，故很難能得到一個世界級的研究結果。台灣的相關單位應鼓勵從事研究醫師的整合，以其能有更有更好的研究風氣與結果。

建議

衛生署「遴選特殊科醫師出國進修計畫」是一個用意與效用都非常好的計畫，對於有心進修的特殊科醫師提供一個很好的管道。幾點建議如下：

1. 延長進修期限為三個月至一年：不同特殊科及不同領域的研究進修達到最好的 cost-benefit 效果所需要的時間可能不盡相同，不同醫師所面臨的進修需求及醫院允許的進修時間也可能不同，若能將進修期限的上限延長並保持一彈性空間，必更將能提供進修醫師更好的發揮空間。

就我此次從事較基礎的醫學研究經驗，六個月不過是剛熟悉了完整的實驗技巧，正要大步邁向前的時候。雖然在計畫中有可以自費延長進修的條款，但對一位年輕的醫學中心醫師而言，尤其是在收入因為進修期間沒有服務病人而打相當的折扣的情況下，自費進修仍是可觀的經濟負擔。

2. 適當調整補助的金額標準：既然本計畫是鼓勵進修，補助基本生活的金額就應該要足夠，讓進修人員能安心進修。補助金額的標準應每年並針對不同的地域性而修訂，同樣是美國，德州和波士頓或紐約的生活費用可能相差到一倍以上。每個月一千美元的補助在波士頓可能連租屋都有困難，更遑論其他生活費。

計畫成果自評

經由本進修計畫，於哈佛大學醫學院附屬 Brigham and Women's hospital 內參與基礎醫學研究，學習了分子生物學研究方法、實驗技巧、與實驗設計理念

學習的實驗技巧細項如下:

- 一， 基本的分子生物學實驗技巧，如電泳分析，限制酶運用，聚合酶連鎖反應.....等。
- 二， 利用質體的操作對特定 DNA 片段的進行選殖 (cloning)。
- 三， 對於 DNA 序列上特定的核苷酸進行突變 (Site-Directed Mutagenesis)。
- 四， Southern and Northern blotting。
- 五， 哺乳動物細胞的培養。
- 六， Transfection。
- 七， 利用 Luciferase 及 β -Galactosidase reporter gene 及測量 luciferase 及 β -Galactosidase 活性的方式，評估目標序列對基因調控的影響或與其他因子的相互關係。

美中不足是實驗結果資料不夠豐富，無法進行學術發表。