

行政院所屬各機關出國報告書

小鼠活體微循環研究

服務機關:成大醫學院醫學系內科學科

出國人職稱:主治醫師

姓名:陳昌文

出國地區:加拿大

出國期間:91年10月1日至92年12月9日

報告日期:93年3月5日

J2 / 09205207

系統識別號:C09205207

公務出國報告提要

頁數:22 含附件:否

報告名稱:

小鼠活體微循環的研究

主辦機關:

國立成功大學醫學院附設醫院

聯絡人/電話:

陳秀梅/06-2353535-2049

出國人員:陳昌文 國立成功大學醫學院附設醫院 主治醫師

出國類別:研究

出國地區:加拿大

出國日期:91年10月1日至92年12月9日

報告日期:93年3月5日

分類號/目:J2/西醫 J2/西醫

關鍵詞:微循環 小腸 CD14 TLR4

摘要

2002 年到 2003 年我有幸得到教育部補助出國到加拿大卡加利大學進修一年。卡加利大學-一個不太為人熟悉的學校，它的軟硬體設備仍讓我有些驚奇。進入純基礎醫學生活應是我此次出國進修的預期。有時雖有些遺憾但也實實學了一些東西。可能在基礎醫學問題溝通上，較少障礙。而且也對一個標準實驗室的運作有較深的認識。我學到了活體微循環的技術也學了一些分子生物學的技巧。出國一年似乎滿長，但從實驗角度看又短了些。我要感謝學校、醫院給我一年公假出國，讓我有機會靜下來，做做一些有臨床負荷時無法做的事，並拉近和分子生物學的距離。出國這一年，剛好台灣碰上 SARS，最後，僅對當時抗 SARS 的同仁表示最高敬意。

目次

1. 書名	P2
2. 摘要	P3
3. 目次	P4
4. 正文	P5
5. 附錄	P12

對於多數人而言，卡加利較為人熟悉的是一個洛磯山脈的城市，而卡加利大學(University of Calgary UC)對大部分人應是陌生的，雖然卡加利大學仍屬加拿大的研究型大學，但排名總在十名上下，我在 2002 年初的一封給 Professor Paul Kubes 的 e-mail，促使了我到卡加利一年。從事十幾年的臨床工作，雖然也做了些實驗，但因知識背景和有限的非臨床時間，只能做做急性生理性實驗，如今有機會出國一年，希望改變一下，進入純基礎醫學生活。由於自己先前作了些微循環的實驗，總希望找找多少有些相關的實驗室，Paul 的實驗室看來還有點適合且他也算有些名氣(雖然我和他素昧平生)，再加上他同意，就因此來卡加利了。

卡加利屬加拿大亞伯達省的南部大城，人口約 90-100 萬，它比較有名的歷史是 1988 年的冬季奧運會址。從台灣的角度而言，它是面積很大但人口稍少的城市。卡加利大學和亞伯達省的另一所大學亞伯達大學，是亞伯達省兩所主要的大學，彼此近些年較勁的意味很強，不過各有特色。卡加利大學的醫院主要是一間 Footfill hospital，約一千床。由於加拿大屬公醫制度，卡加利市的醫院照護系統自成一格，整個市內的醫療資源是可以互通的。因此，當某家醫院沒有病房時，是很容易在另一家醫院找到。不過，由於是公醫系統，預約久候的情形是常態。這方面，加拿大民眾的抱怨也不少。我到的部門是卡加利大

學的生理和生物物理部，這個部門主要由幾個研究群組成。這些研究群包括 Cardiovascular, Smooth muscle, Gastrointestinal, Respiratory, Immunology 等 research group。一般而言，各個研究群有自己的核心實驗室，一些較貴重的研究儀器大多放在核心實驗室。無論是使用自己或核心實驗室，一般都要填寫時間表。此外，由於我是去基礎實驗室，使用實驗動物前，須受 Biohazard 和動物中心的職前訓練。再者，由於實驗室有時會接觸放射性物質，我也去參加兩天的放射性物質講習。這些訓練或講習大多有講習後考試。從個人角度看，這些實驗室的訓練滿實際的，對於初入實驗室的人或並未專心接受正規實驗室訓練的人而言，是很重要的。舉個例子，不同的實驗廢棄物該如何分類，使用放射性物質該如何避免污染，萬一發生污染的標準因應步驟該如何？這些基本原則或許對一個長期於實驗室工作的人是理所當然，但對不常於實驗室工作的人，則有正本效果。

Paul 的實驗室是屬於他們生理和生物物理學科的免疫群。Paul 在加拿大應是個名人吧！他是加拿大 Leukocyte biology 的頭。年齡比我還小 1-2 歲。他的實驗室有三間，其中有四套活體顯微鏡系統(分別是 Dage-MTI, Hamamatsu, Pieper 的螢光顯微鏡。及 Sony 的 color videomicroscope)。倘若做 Cremaster microcirculation 需先確定 postcapillary venule 的 blood flow 是否適當，則用 Doppler velocimeter

(是連接在 color videomicroscope 和 tape recorder 上), 血管大小可以從螢幕手算或以 videocaliper 來計算。這些工具基本上是應用在活體動物的微循環用以定量白血球的動態紀錄。倘若是使用 bright field microscope (一般是 transillumination, color videomicroscope), 白血球的 rolling, adhesion, transmigration 都可以記錄到, 標準的 preparation 是 cremaster。Liver microcirculation 則無量化 transmigration。由於白血球的分類無法從影像中分別若是要觀察特定白血球(如 lymphocyte subpopulation), 一般做離體培養(usually from spleen), 再 labelling 螢光物質打入靜脈中, 後以螢光顯微鏡觀察記錄, GFP mice 則視 GFP 於何細胞可直接於螢光顯微鏡觀察, 不過我聽他們說 GFP 螢光信號並不強。倘若是使用螢光顯微鏡, 我們需先給予動物 rhodamine-6G, FITC-labelled dextran 或 albumin(不同的螢光物質視實驗目的而給)等, 再用一定範圍波長的光源(常為藍、青光)激活。經濾鏡, 將顯微鏡影像呈相於目鏡或以 recorder 將影像記錄於錄影帶。實驗完成後再倒帶分析 leukocyte kinetics。活體動物觀察的器官有 brain, liver, skin, cremaster, intestine, colon。Lung 的 microcirculation 由於技術難目前則暫緩。由於 Paul 的重點在 adhesion molecules, 他也應用放射性同位素技術(dual-labelled radionuclide method) 來測量 adhesion molecules 在組織的量。另外, Paul 有一個分子生物學實驗室來做 cell

culture, flow chamber, isolation of leukocyte from tissue(mainly magnetic beads technique)等技術。Paul 的全職技術員有三位，Master 或 PhD 學生有五位，PostDoc 有五位，另外有一些合作對象。由於身兼美國生理學雜誌副主論及 JCI 的編輯群，所以平時很忙。由於在他下面工作的研究人員蠻多的。所以，所需的經費很高，據他的 laboratory manager 告訴我，他們的實驗室一個月單單小動物飼養費約八千至一萬元加幣。實驗動物以 gene knock-out mice 為主(約 10-20 種)。消耗品費用約一個月五萬元加幣。再加上一些可能的儀器設備費，一年可能需一百萬加幣以上 (還不包括工資)。由這些研究所需資金可預期 Paul 應是很會找錢的。

我到的第二天 Paul 介紹一個新 faculty Donna-Marie (DM) McCafferty 給我，她在 Paul 的實驗室做了六年 post-doc。因她新成立一個實驗室需要人手，而 Paul 於 2003 年上半年為 Sabbatical year 到 University of British Columbia。所以事實上我主要便在 DM 的實驗室做實驗有時到 Paul 那兒(其實就在同一條走廊)和他的 post-doctors 寒暄也學些技術。不過 DM 也大腹便便，2003 年上半年也休產假半年。

我前半年主要以活體顯微鏡為主，主要是看看 CD14^{-/-}, TLR4^{-/-} mice 的小腸在接受 intraperitoneal lipopolysaccharide (LPS) 後的 leukocyte kinetics。另外我也替另一位 faculty Dr.Paul Beck 做 Fas/

Fas-ligand mutant mice 及 iNOS^{-/-} mice 的 colon microcirculation。我上半年裏,活顯的結果發現,接受LPS 的CD14^{-/-} mice小腸仍有部分發炎反應 但於TLR4^{-/-} mice則否。換言之, mice 小腸微循環對LPS有獨立於CD14 的訊息傳遞通道。七月初,DM產假回來後經簡單討論,我預備作cDNA microarray (Stratagene, 7k)。八月到九月,我花了不少時間涉獵microarray文獻及準備比較用的mice intestine RNA, 第一片microarray slide在九月底於 UC microarray facilities完成。以後我在自己實驗室做了24片,只有在slide washing, scanning及analysis於microarray facilities做。Microarray結果經一個可註冊的internet-based software **GeneTraffic**分析,我發現LPS induced gene expression於CD14^{-/-} mice 小腸有些有趣的upregulated genes,其中有HSP70,HSP90。這和二年前的一篇in vitro探討CD14 independent pathway的文章所提的四種蛋白中之二種吻合,接著就是確定動作。確認那些genes是否真的upregulated。最後可能仍要看HSP70,90 和CD14 double knock-out mice是否對 LPS induced inflammation有抗性或以anti HSP70,90 Ab (只是未見活體使用的Ab)來看看是否影響leukocyte kinetics。我把我做好的部份寫好交給DM就該回來了,Abstract可能在明年AGA年會發表。倘若後續者可完成未做的部分,這個計劃就可完成。

在卡加利這一年,我是有一些遺憾,因為我未料到實驗室負責人都休

假半年，且有時年輕 faculty 處理問題技巧不甚純熟。不過整體而言仍有正面的幫助，可能在基礎醫學問題溝通上，較少障礙。卡加利大學較令我注目的是一個相當龐大的動物中心，約有五十個人員負責，裡面有許多 gene knock-out mice 及大動物。這對基礎研究應很重要，主要資助來自 Alberta 政府及一些企業。不過，我聽他們說，某些大學的動物中心更大，可能這只是北美研究型大學的特色吧！另外，實驗用品的取得可能較我們取得方便一些，因為一些生技公司如：

Qiagen, In Vitrogen 等，在醫學院都有小分部。有些常用的實驗用品，由於有庫存，可隨時取得。另一方面，醫學院另設有器材製造室，及電子儀器維修室，對於實驗室硬體的提供和維修，提供便利場所，不過，這些場所均按時收費，收費也不便宜。這些附設機構，對於實驗室的正常運作是很重要的。

出國一年似乎滿長，但從實驗角度看又短了些，然除臨床的訓練外，實驗室工作的訓練可能需要幾年專心工作才有較紮實的底盤，未來或許可讓出國者有二至三年，甚至唸學位的機會，應是較理想的方式。我仍要感謝學校、醫院給我一年公假出國，讓我有機會靜下來，做做一些有臨床負荷時無法做的事，並拉近和分子生物學的距離。出國這一年，剛好台灣碰上 SARS，最後，僅對當時抗 SARS 的同仁表示最高敬意。

附錄:

筆者將於 2004 年於世界腸胃學會年會發表之論文摘要

Lipopolysaccharide (LPS) Induced Leukocyte Recruitment in the Intestine: Role of CD14 Independent Pathway

Chang-Wen Chen, Donna-Marie McCafferty, Department of Physiology and Biophysics, University of Calgary, Calgary, T2N 4N1.

It is well documented that LPS acts through CD14 and TLR4 receptors to induce inflammatory responses. However, recent evidence suggests that there is a CD14-independent role in some tissues. Chemokine receptor CXCR4, growth differentiation factor 5 (GDF5), heat shock protein 70 (HSP70) and heat shock protein 90 (HSP90) were shown in vitro to associate with LPS without CD14 (Triantafilou et al, *Nat Immunol* 2:338, 2001). The aim of this study is to assess the role of CD14 independent pathway in LPS-induced leukocyte recruitment in the intestine of mice.

Materials and Methods: Intestinal leukocyte trafficking was observed using fluorescence intravital microscopy. Leukocyte kinetics were quantified in CD14- deficient (CD14^{-/-}), TLR4-deficient (TLR4^{-/-}) or appropriate wild type (WT) control mice (n=5). Mice were challenged intraperitoneally with highly purified LPS (*E. coli* 0111:B4, 5-500 µg/kg) and submucosal vessels of the intestine were studied 4 h later. LPS-induced gene expression in the intestine was determined by cDNA microarray (mouse 7K, Stratagene) in WT and CD14^{-/-} mice.

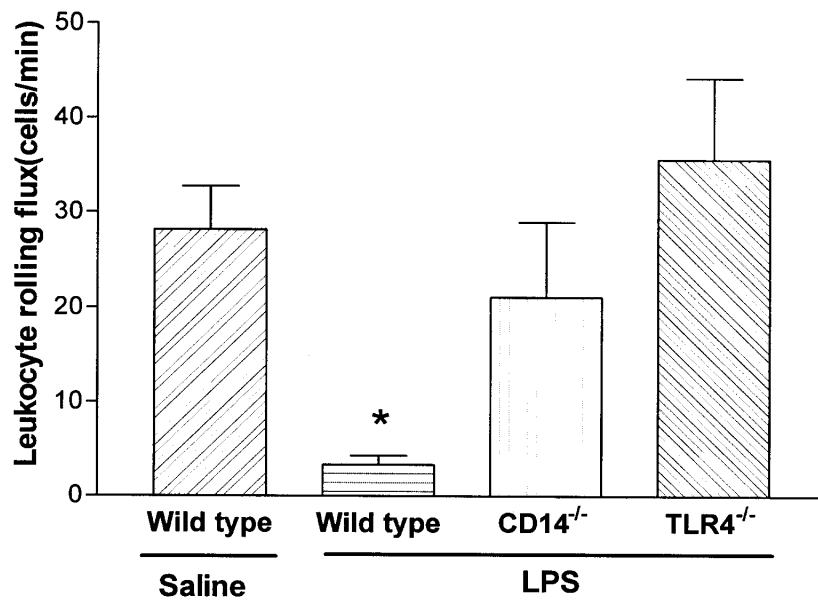
Results: In WT mice, LPS (500 µg/Kg, i.p.), induced a significant increase in leukocyte adhesion (16.8 ± 2.8 vs. 0.1 ± 0.1 cells/100µm), a significant decrease in leukocyte rolling velocity (10.3 ± 3.0 vs. 110.9 ± 11.9 µm/s) and flux (3.3 ± 1.0 vs. 28.1 ± 4.6 cells/min) over saline treated controls. No significant changes in leukocyte kinetics were observed in LPS-treated TLR4^{-/-} mice over WT saline treated controls. However, LPS treatment in CD14^{-/-} mice induced a significant increase in leukocyte adhesion (6.3 ± 0.6 cells/100µm) and a decrease in leukocyte velocity (16.8 ± 3.5 µm/s) compared to WT controls. This CD14-independent increase in leukocyte adhesion was shown to be dose dependent. Microarray analysis of intestinal genes showed 113 genes in WT mice and 111 genes in CD14^{-/-} mice were upregulated at least 2-fold after LPS treatment. Interestingly, HSP70 and HSP90 were upregulated 2.8 fold and 4.2 fold respectively in CD14^{-/-} mice only, while CXCR4 and GDF5 were not significantly altered.

Conclusion: These data show in vivo, that leukocyte recruitment to the intestine can occur in part via a CD14-independent pathway. In addition, HSP70 and HSP90 may participate in the inflammation in the absence of CD14.

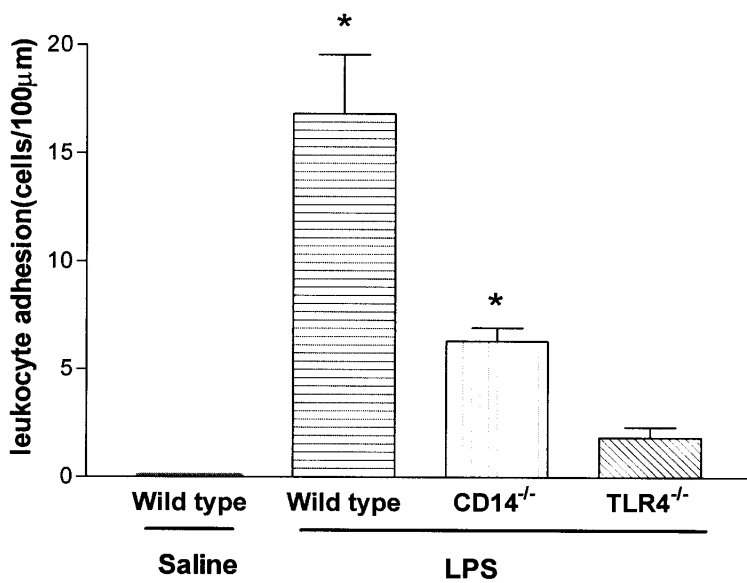
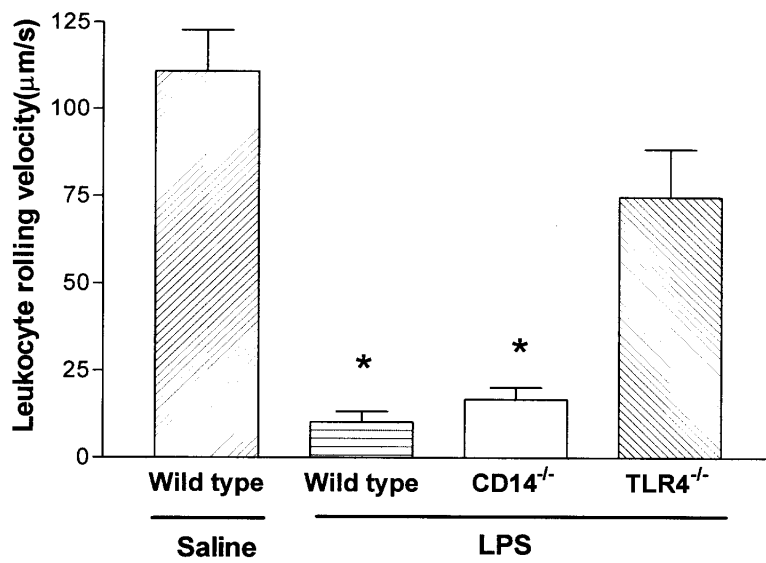
Summary of the work in the role of CD14 in mice intestine in response to LPS

Experiment 1

Intestinal microcirculatory leukocyte kinetics to LPS (0.5 mg/Kg)



* $p < 0.05$ compared to wild type saline control

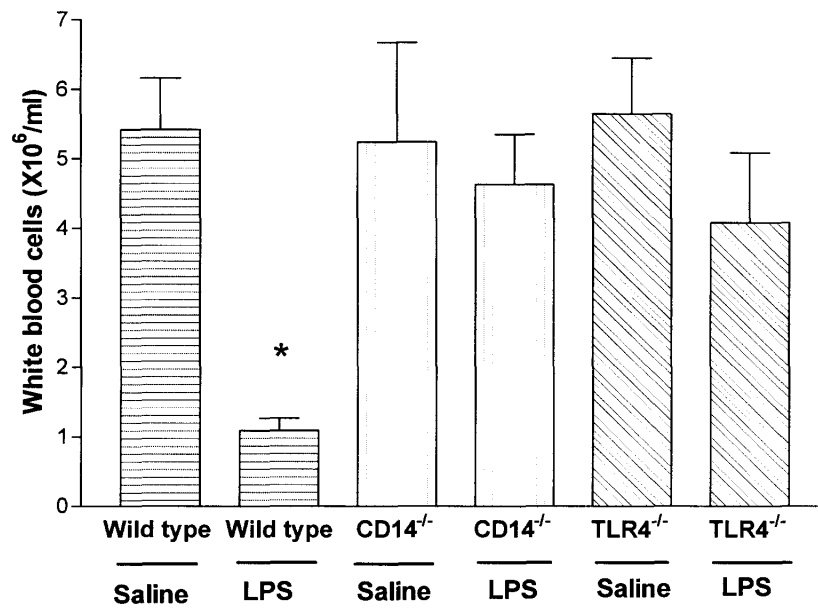


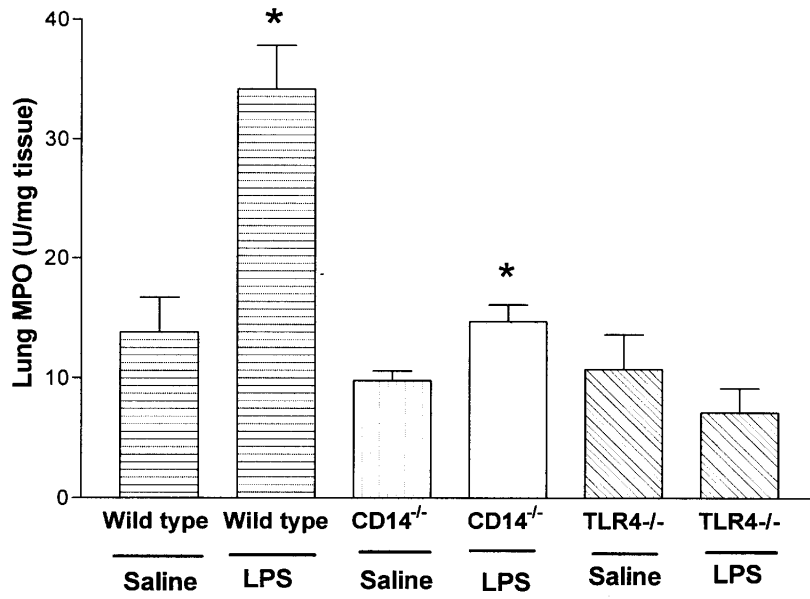
* $p < 0.05$ compared to wild type saline control

Systemic parameters to LPS (0.5 mg/Kg)

(1) Lung myeloperoxidase (MPO) level

(2) Systemic white blood cell count

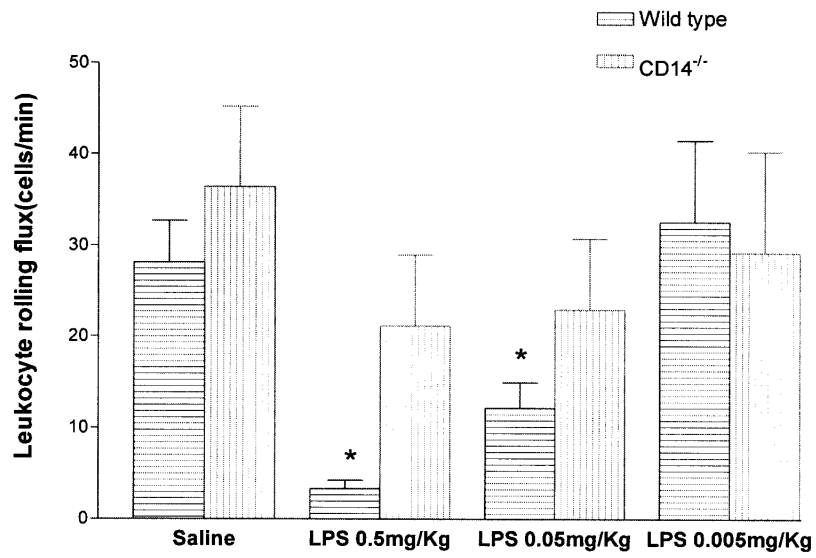


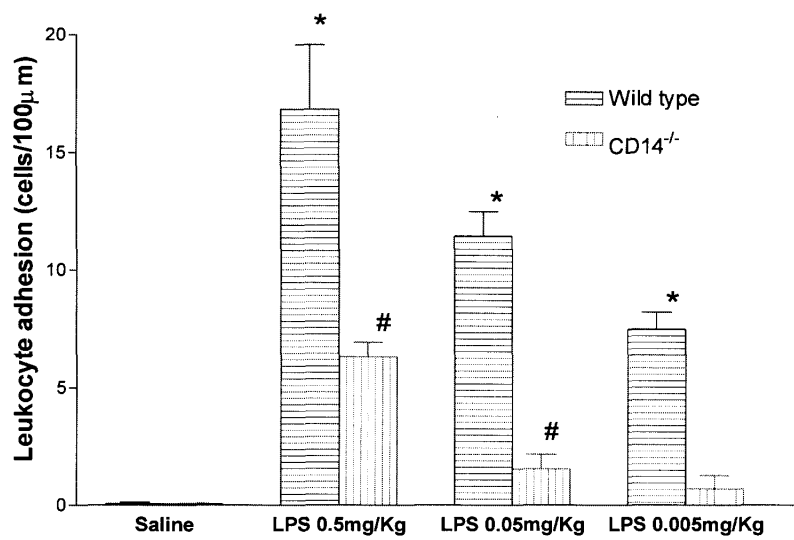
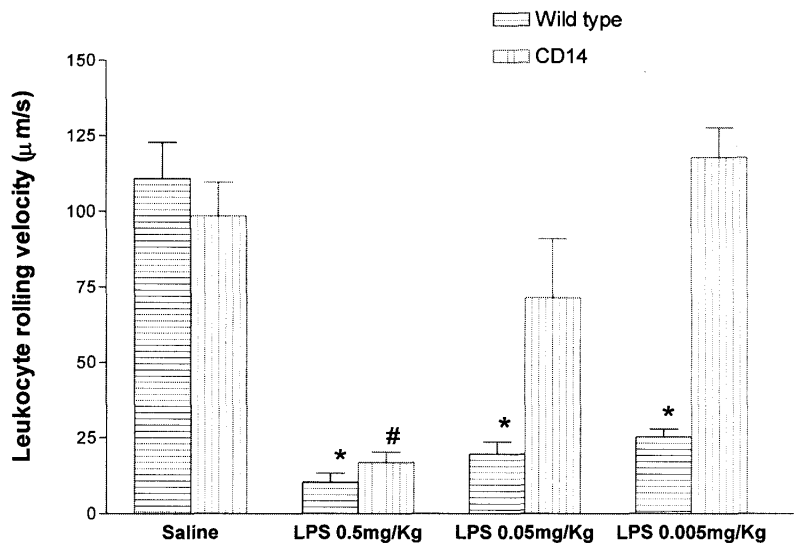


** p < 0.05 compared to wild type saline control*

Experiment 2

Intestinal microcirculatory leukocyte kinetics to decreasing dose of LPS in wild type and CD14^{-/-} mice





*, # $p < 0.05$ compared to respective saline control.

Results of cDNA microarray

Genes upregulated 2 fold in LPS treated wild type

- 114 genes
- Characteristics:
 - CXCL10, 9,5,1. One RANTES gene.
 - Interferon related genes:13.
 - Three Serum amyloid A(2,3,4) genes.
 - Schlafen genes: a new family of growth regulatory genes that affect thymocyte development.
 - HIF-1a gene.
 - NIK-I-kappaB/NF-kappaB cascade : one gene.
 - Some transcription genes: STAT1,2 etc.
 - Some enzymes: caspase 8, MMP.
 - IL1 R antagonist.
 - HSP 105.
 - LPS-induced TN factor

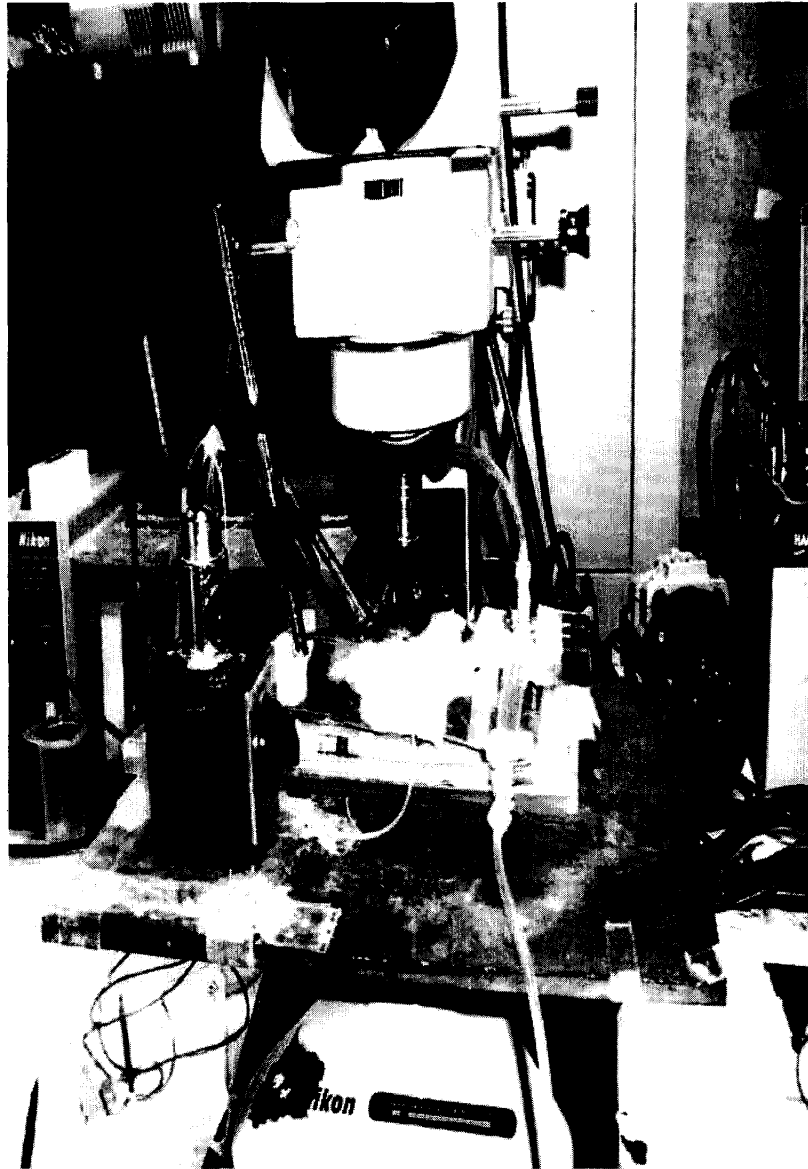
Genes upregulated in CD14^{-/-}-mice with LPS

- 111 genes upregulated.
- No chemokines seen.
- HSP 70 and 90 upregulated.
- Apolipoprotein upregulated.
- One interferon gamma receptor.

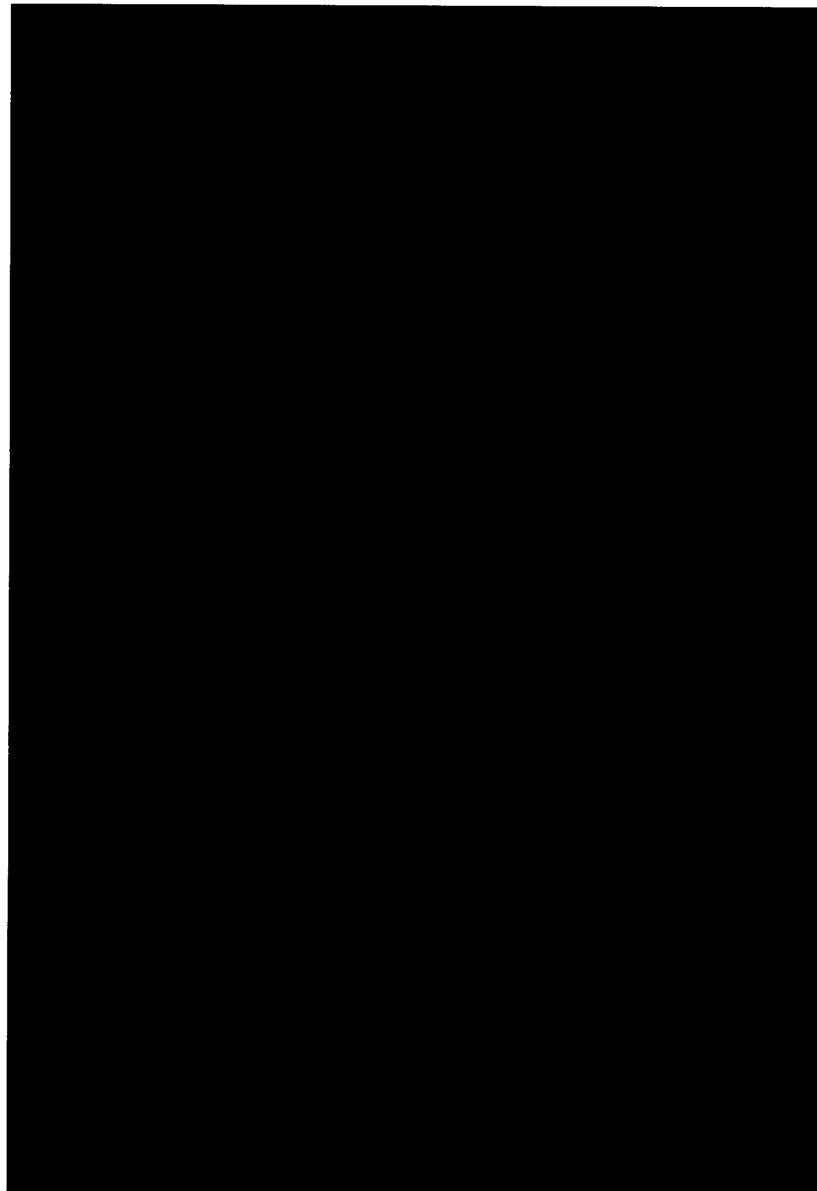
Immunoglobulin related genes shared

upregulated genes:4

- 1. Acute phase protein: Serum amyloid A3 (SAA3).
- 2. Scavenger receptor activities, deleted in malignant brain tumors 1 (dmbt1).
- 3. Carbonic anhydrase IV gene.
- 4. S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B): calcium binding protein.



一個標準腸微循環的活體實驗, photographed under permission in Professor Paul Kubes's laboratory in University of Calgary.



cDNA microarray simulation picture using dual-dye (Cy3, Cy5) labeling. There are 7000 genes with duplicated spots on the slides. The treatment group is lipopolysaccharide. The cDNA is reverse transcribed from mice intestines RNA. Red color implicates possibly upregulated genes. The picture is produced using GeneTraffic software.