

出國報告（出國類別：進修）

P38 Mitogen-activated Protein
Kinase Pathway 研究
美國加州聖地牙哥緊急救護系統觀摩

服務單位：臺北榮民總醫院急診部

姓名職稱：侯重光主治醫師

派赴國家：美國

出國期間：96年1月20日至96年12月22日

報告日期：97年1月7日

摘要

敗血症是全球化的問題，需要更進一步重視。敗血症及敗血性休克的產生，除了感染之外，宿主的免疫系統亦扮演一個重要的角色，了解敗血症致病機轉，或許可提供一個早期診斷及新的治療方向。利用基因剔除 (gene knockout) 或基因表現干擾 (gene silencing) 等技術，是研究敗血症致病機轉不可或缺的重要利器。P38 α Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase 是第一個被發現的 38-kDa 蛋白質，對於 LPS 的刺激，能快速產生 tyrosine phosphorylation 反應。Phosphorylated P38 α 會經由活化下游的受質，如：一些 protein kinases 和 transcription factors，進而對於多樣的細胞外刺激產生特定的生物反應。從利用 LysM Cre (cyclization recombination) /LoxP (locus of X-over of P1) 技術製造出的 macrophage-specific P38 α knockout mouse 實驗中，發現其 peritoneal macrophage，利用 bacterial LPS in vitro challenge 後，一些 inflammatory gene 表現減少及 cytokines 的產生亦明顯減少。因此，P38 α 在敗血症致病機轉上，扮演一個相當重要的角色。

關鍵詞：敗血症、致病機轉、基因剔除、基因表現干擾、分子生物學。

目次

摘要	2
目的	4
過程	5
心得	14
建議事項	15
參考文獻	16
附錄	17

目的

敗血症病患有高達 23%至 46%的死亡率。在美國，嚴重敗血症患者每年估計有 75 萬人，造成一百六十億美元的損失。據歐洲及澳洲的估計，每十萬人口約有 51 至 206 人為敗血症患者。由此得知，敗血症是全球化的問題，需要更進一步重視。敗血症及敗血性休克的產生，除了感染之外，宿主的免疫系統亦扮演一個重要的角色，了解敗血症致病機轉，或許可提供一個早期診斷及新的治療方向。目前利用基因剔除 (gene knockout) 或基因表現干擾 (gene silencing) 等技術，是研究敗血症致病機轉不可或缺的重要利器。P38 α Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase 是第一個被發現的 38-kDa 蛋白質，對於 LPS 的刺激，能快速產生 tyrosine phosphorylation 反應。Phosphorylated P38 α 會經由活化下游的受質，如：一些 protein kinases 和 transcription factors，進而對於多樣的細胞外刺激產生特定的生物反應。目前已知 P38 α 訊息傳導與 inflammation、cell cycle、cell death、development、cell differentiation、senescence 和 tumorigenesis 等息息相關。在老鼠的動物模式中，使用 P38 α 的抑制劑 SB203580，可有效的抑制關節炎的產生，及減緩因內毒素休克實驗老鼠的死亡率。因此，這次出國進修的主要目的，即是學習利用先端基因剔除或基因表現干擾等技術，來探討 P38 α 在敗血症致病機轉的角色。

過程

美國 Scripps 研究中心

美國 Scripps 研究中心 (The Scripps Research Institute, TSRI) 是一個優秀學術性質的生化醫學研究機構，它位於美國加州聖地牙哥附近高級的 La Jolla 地區，由慈善家 Ellen Browning Scripps 於西元 1955 年捐助成立。由十個主要研究部門組成，包括：Biochemistry、Cancer Biology、Cellular Biology、Chemistry、Immunology、Molecular Biology、Neurobiology、Molecular and Experimental Medicine、Infectology、Molecular and Integrative Neurosciences Department。佔地超過 1,000,000 square feet，面對美麗的太平洋海邊，緊臨 UCSD 校園和 Salk 研究中心，三者構成美國西岸最尖端重要的生化學區。近年來美國 Scripps 研究中心編制及佔地面積不斷地擴大，故其於西元 2003 年開始在美國 Palm Beach County, Florida 另新成立一個分院。目前美國 Scripps 研究中心共有 270 位教授級研究員，其中有三位是諾貝爾獎得主，800 位來自各國尖端的博士後研究生，研究中心本身亦設有博士班課程，共有 126 位博士班學生。此次進修單位在 Immunology 部門，指導教授為 Jiahuai Han，主要從事研究 P38 Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase pathway。

Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway 是細胞對於反應不同細胞外刺激所表現細胞內訊息傳導的重要機制。目前有四種 MAP kinase 家族被發現：

1. extracellular signal-regulated kinases (ERKs)
2. c-jun N-terminal or stress-activated protein kinases (JNK/SAPK)
3. ERK/big MAP kinase 1 (BMK1)
4. P38 protein kinase

P38 α 是第一個被發現的 38-kDa 蛋白質，對於 LPS 的刺激，能快速產生 tyrosine phosphorylation 反應。到目前為止，已有四種 P38 家族被發現：P38 α 、

P38 β 、P38 γ (ERK6, SAPK3)、P38 δ (SAPK4)。其中 P38 α 和 P38 β 是表現在所有細胞中，P38 γ 和 P38 δ 則僅存在於特定細胞中。

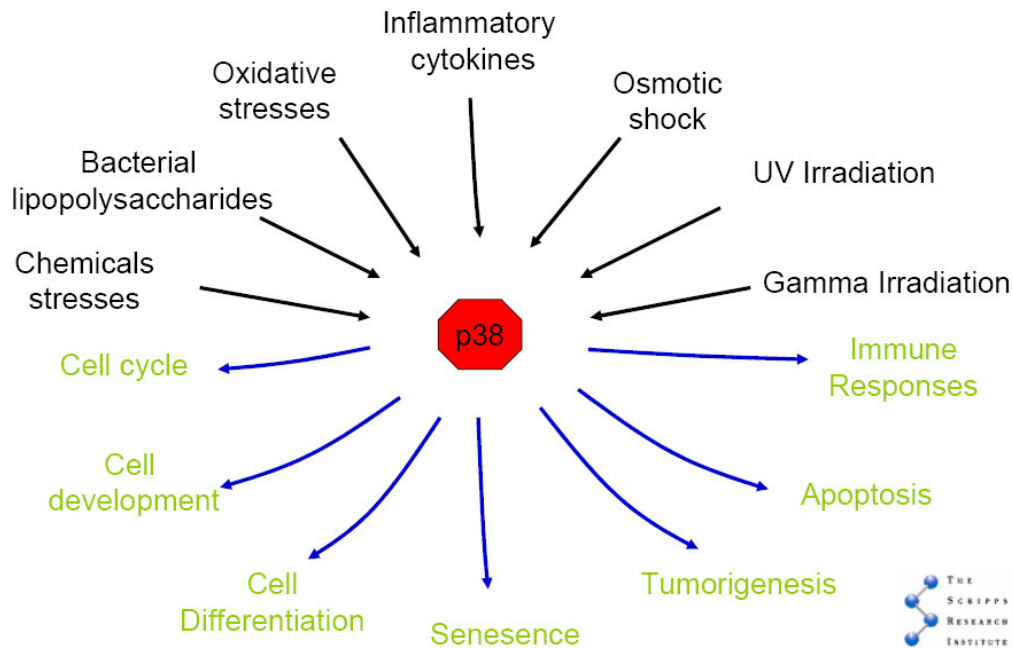
P38 訊息傳導路徑的調節

多樣的細胞外刺激，如：紫外線照射、熱、stress、osmotic shock、bacterial component、inflammatory cytokines 和一些生長因子，均會造成 P38 α 活化。P38 α 的活化主要是經由 MKK (MAPK kinase) 3 和 MKK6 是兩個上游 kinase 的調節，另一個獨立路徑 TAB1 (transforming growth factor- β -activated protein kinase(TAK1)-binding protein)亦可調控 P38 α 的活化，產生 phosphorylation。Phosphorylated P38 α 會經由活化下游的受質，如：一些 protein kinases 和 transcription factors (表 1)，進而對於多樣的細胞外刺激產生特定的生物反應。目前已知 P38 α 訊息傳導與 inflammation、cell cycle、cell death、development、cell differentiation、senescence 和 tumorigenesis 等息息相關，如圖 1。

表 1. Substrates and potential substrates of p38 MAPK

	Substrates
Protein kinases	MK2, MK3, MNK1, PRAK, MSK
Transcription factors	ATF2, ATF1, Sap1, GADD153, p53 C/EBP β , MEF2C, MEF2A, STAT1, CHOP, ETS1, Pax6, ELK-1, MITF
Other protein substrates	cPLA2, Na ⁺ /H ⁺ exchanger isoform-1, EE1A, Rab5:GDI complex, EGFR, Bcl-2, Bcl-xL

圖 1. P38 α MAP kinases 的生理功能



P38 α 和 inflammation 的相關性

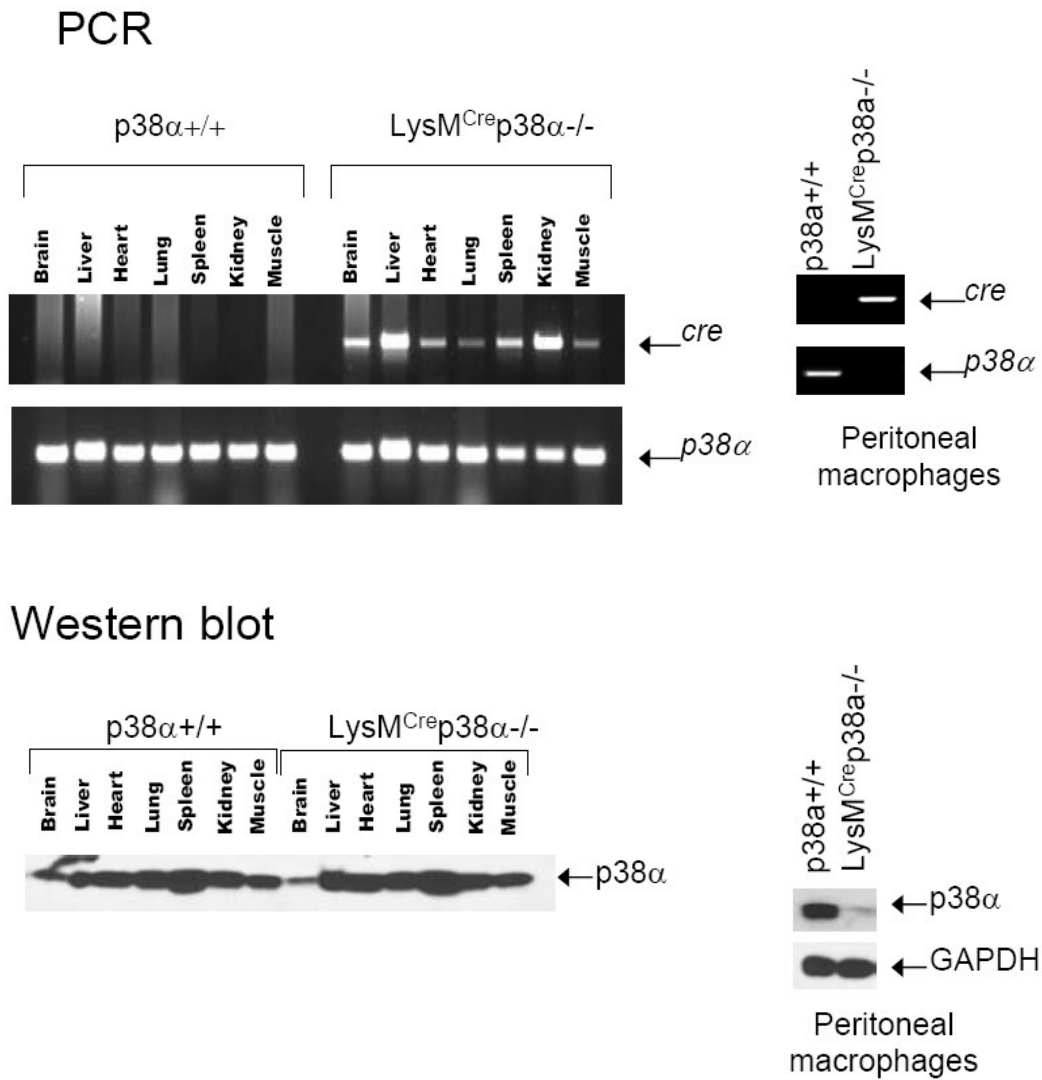
目前已知 P38 α 訊息傳導與 inflammation 存在強烈的相關性。Rheumatoid arthritis、Alzheimer' s disease 和 inflammatory bowel disease 等疾病，均被提出與 P38 α 訊息傳導路徑有關。活化的 P38 α 在 proinflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α and IL-6) 的產生、一些免疫相關酵素的誘導 (COX-2、VCAM-1 和一些 adherent protein)、iNOS 等細胞內酵素的表現、免疫細胞增生分化的調節等，伴演極重要的角色。在老鼠的動物模式中，使用 P38 α 的抑制劑 SB203580，可有效的抑制關節炎的產生，及減緩因內毒素休克實驗老鼠的死亡率。

P38 α 基因剔除小鼠 (gene knockout mouse)

傳統的 P38 α gene knockout 會因導致老鼠胚胎器官形成的嚴重缺陷，造成老鼠胚胎死亡，而無法利用此方式產生 P38 α 基因剔除小鼠。該實驗室則成功利用 LysM Cre (cyclization recombination) / LoxP (locus of X-over of P1) 技術，成功製造 macrophage-specific P38 α knockout mouse。LysM Cre 為

tissue-specific，只在 myeloid cell 上表現，故所產生的基因剔除小鼠只在單核球、成熟吞噬細胞及顆粒性白血球上產生 P38 α gene knockout（圖 2）。同時此老鼠可存活亦可受孕繁殖。

圖 2 顯示 macrophage-specific P38 α 基因剔除小鼠各器官 PCR 的結果。



該實驗室將此 macrophage-specific P38 α 基因剔除小鼠，抽取 peritoneal macrophage，再用 bacterial LPS in vitro challenge，發現其 inflammatory cytokines 的產生明顯減少（圖 3），利用 PCR 半定量分析亦可發現其一些 inflammatory genes 表現減少（圖 4）。

圖 3. Production of cytokines (in vitro)

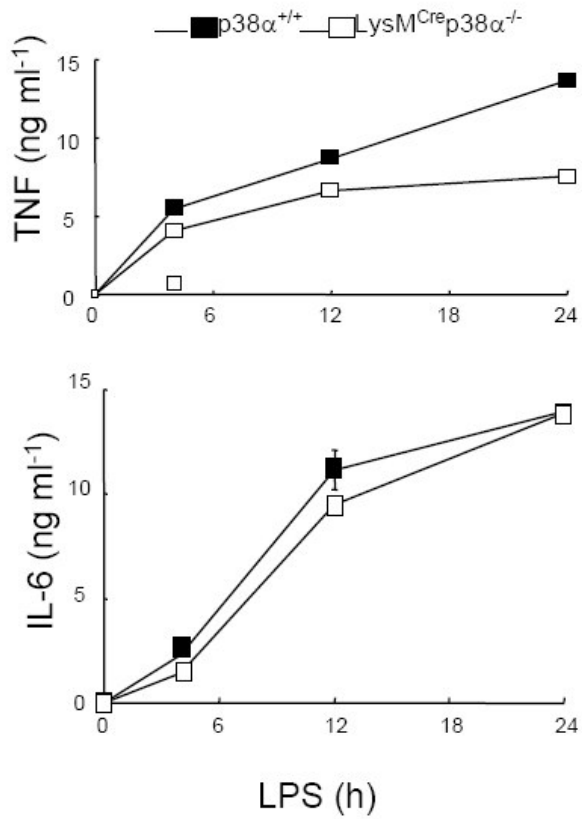
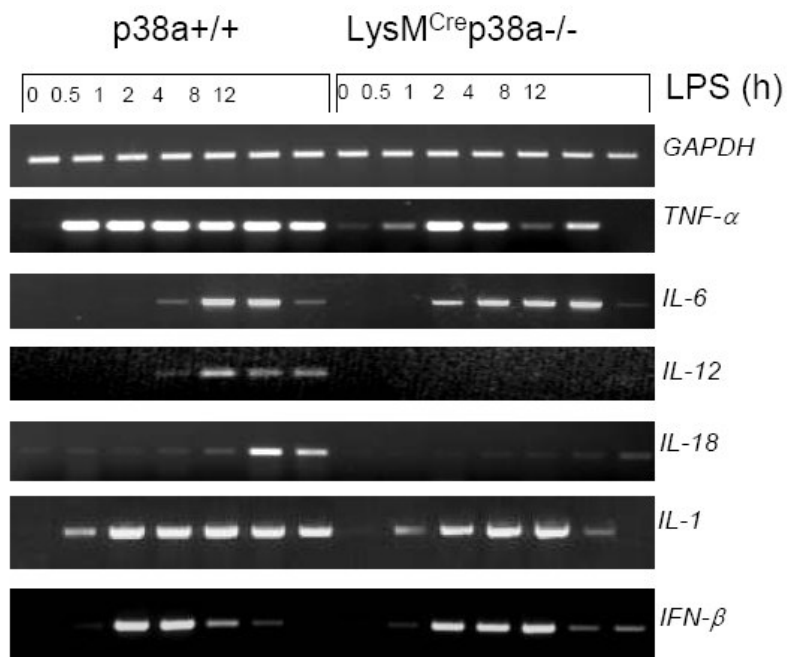


圖 4. Inflammatory gene expression (semi-quantitative PCR)



Posttranscriptional RNA silencing

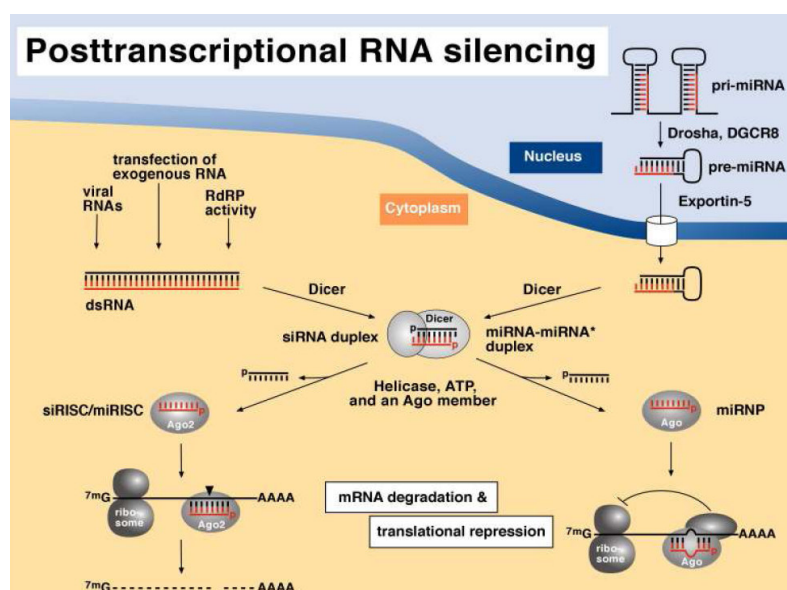
除了學習基因剔除技術外，當然該實驗室亦有從事目前最新熱門 RNA interference (RNAi) gene knockdown 的研究主題。

1998 年兩位美國科學家 Andrew Z. Fire 和 Craig C. Mello 在線蟲上發現 RNA interference-gene silencing by double-strand RNA 的現象，隨後引發 RNAi 紅到發紫的研究熱潮。2006 年諾貝爾生醫獎桂冠因此由這兩位學者共同掄元，以表彰他們重要的貢獻。

RNAi 的干擾現象可能是普遍存在於各種生物體裡的防禦機制。RNAi 的干擾機制主要是藉由雙股 RNA 忠實地干擾其標地的訊息 RNA (mRNA) 之基因表達。

對於外生性 (exogenous) 雙股 small interfering RNA (siRNA), micro RNA (miRNA) 是生物體內自行合成的 (endogenous) 一段長髮夾型單股 RNA, miRNA 並不會被轉譯成蛋白質，相反地，miRNA 會經由類似 RNAi 的抑制基因表達機制來調控生物體本身的生理功能。

之前的一些研究顯示，一些植物、線蟲及果蠅會利用 Dicer 從病毒 genomes 產生 siRNA，以達到抗病毒作用。該實驗室發現 Dicer 1-deficient 老鼠比野生型老鼠更容易受 vesicular stomatitis virus 感染影響。推究其機制可能是 Dicer 1-deficiency，導致 miRNA24 及 miRNA93 表現缺陷所引起。



動物中心

美國 Scripps 研究中心動物房的設計新穎，對於實驗動物的照顧及其權利的保護相當重視，此次進修學到不少動物照料的技巧及知識，對於未來從事基礎醫學研究獲益頗多。

Animal Center



美國加州大學聖地牙哥分校附設醫學中心

此次出國進修亦利用最後幾個月順便觀摹美國加州聖地牙哥緊急救護系統及 UCSD Hillcrest Medical Center 急診部門的運作。UCSD Hillcrest Medical Center 是一個 466 床急性照護醫院，是第一級創傷中心及急救責任醫院，也是全美 50 大最好醫院 (Best Hospitals) 之一。其急診部門共有 21 位專任和 17 位兼任主治醫師組成，分六部份包括：clinical service、division of prehospital care、hyperbaric medical center、division of medical toxicology、division of training and division of emergency preparedness。

該醫院對於病人安全相當重視，全面引用 bar-coded patient wristband 及雙向 computerized physician order entry (CPOE) 系統，急診部門全面電子病歷，非常熱衷於住院醫師臨床教學和研究，本身亦是著名醫學雜誌 Journal of Emergency Medicine 的本營。

美國加州聖地牙哥面積 4,300 square miles，共有兩百八十萬人口，是全美第六大城，擁有先進的緊急救護系統。其緊急救護系統由 46 個消防救護站與周圍七所大型醫院所組成，彼此相互合作，教學相長。透過多項會議討論、演練及各種教學課程，改善其外傷、緊急救護及小兒急症的到院前救護能力。以下為所參與的緊急救護系統會議：

1. Medical Audit Committee (MAC) : county' s confidential trauma oversight committee.
2. BSPC/PAC : base hospital physicians issues (public) ; prehospital audit case review.
3. Children' s trauma committee : trauma morbidity/mortality conference of children.
4. EMS Oversight Committee : discuss EMS issues affecting all hospitals.
5. SD Health Care Disaster Council : coordinate hospital disaster plans.
6. Metropolitan Medical Strike Team : federally sponsored first response for mass casualty.
7. Medical Dispatch Review : city' s emergency medical dispatch issue.

美國加州聖地牙哥本身也是災難救護隊 DMAT CA-4 的所在地，此次亦利用進修機會數次參與其定期會議，學習其對重大災害發生時之醫療救護能力，統合救災救護資源，迅速動員投入災區從事災區醫療工作，以爭取搶救時效。亦對於其指揮系統 (Incident Command System, IS-100, IS-200, IS-700, IS-800a NRP) 的運作，有深刻的體會及認識。

進修期間亦參與其 Healthcare Facility Evacuation Planning 訓練課程。

美國在 2005 年經歷了 Hurricanes Katrina，當時共有 30 間醫療院所需要緊急疏散，之後特別重視此問題。2006 年的春天 HEICS IV 問世，也將名稱改爲 HICS (Hospital Incident Command System)。

HICS 能有效改善醫療院所緊急應變時的效率，主要是因爲有下列幾項優點：

1. 確定的管理架構與指揮鏈。
2. 每個角色的職責與任務很明確。
3. 院內各機構間，或是與院外的機構，如消防、警察等單位，有共同的『語言』。
4. 彈性的作業編組，可以適應各種不同的場景與事件。
5. 應變事項有清楚的優先順序清單。
6. 改善資料記錄的完整性與正確性。

當醫療院所面臨的災難夠大，必定會牽涉到院外的許多機構，例如其他的醫院、消防、警察機構，民間的救難組織等，在這情形下，使用本系統的優勢將更明顯。該研討會亦介紹醫療院所需要緊急疏散時，各類特殊病患 (children or sensory-impaired patients) 疏散方法及需注意事項，亦透過桌上模擬 (table top) 及情境演練方式加強學習者的體會，獲益頗多。

心得

在本段的進修期間，見識到國外對研究的投入和嚴謹、深深體會到現今醫學與科技的進展真是一日千里，一些重大學術發現都是整個研究團隊共同努力的結果。敗血症是全球化的問題，需要更進一步重視，分子生物學的研究是瞭解敗血症致病機轉的重要利器。此次進修學習利用基因剔除或基因表現干擾等基礎先端技術，來探討臨床敗血症複雜問題。基礎研究是臨床治療的基礎，只有基礎研究和臨床治療能充分的溝通和合作，才能真正造福敗血症患者。

此外，經過一年的訓練和學習，除了在學術研究上得到許多寶貴的經驗外，對美國的生活環境、社會文化、人文活動等都有更深一層的認識。總括而言，進修期間生活有甜有甘，十分感謝我在台灣服務的科部能讓我有此機會前往美國進修研究，相信我在美國進修的這段時光將會成爲一生之中難得的經驗與美好的回憶。

建議事項

1. 結合 RNAi 干擾的技術與 miRNA 的生理作用機制，可以提供未來以 RNAi 干擾的技術來治療人類敗血症、癌症或退化性疾病的基石。RNAi 干擾的臨床應用已初步在長尾獼猴上被證明有效，未來實質應用在人類疾病的治療上應是指日可待。
2. 關於研究敗血症致病機轉方面，Animal Models 的建立乃是不可或缺的工具，而我國在這方面的支持亦顯不足。將來建議應有更完備動物中心的設置，以期對生物科學的研究能有更完備的協助。
3. 各醫療院所應多透過參與多項緊急救護系統會議，加強連繫溝通，放棄本位主義，共同為提升病患到院前救護盡一份心力。
4. 臺灣多地震及颱風，各醫療院所可能會因各項內在及外在因素需要疏散，應訂有各自緊急疏散計畫，熟悉 HICS 的運作及平時加強情境演練。

參考文獻

1. Zarubin T, Han J. Activation of signaling of the P38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 2005;15 (1) : 11-8.
2. Kang YJ, Seit-Nebi A, Davis RJ, et al. Multiple activation mechanisms of P38 α mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2006;281 (36) :26225-34.
3. Fire A, Xu S, Montgomery MK, et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-11.
4. Otsuka M, Jing Q, Georgel P, et al. Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in *Dicer1*-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. *Immunity* 2007 Jul;27 (1) :123-34.
5. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 2006;441:111-4.
6. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *PNAS* 2006;103 (3) :1281-6.

附錄 1

The Scripps Research Institute



附錄 2

UCSD Hillcrest Medical Center

