

出國報告(出國類別：進修)

第二型胰島素受體受質過度表現對 胰島素訊息傳遞的影響

服務機關：國立成功大學附設醫院

姓名職稱：詹世鴻 主治醫師

派赴國家：日本

出國期間：950217~960216

報告日期：960510

摘要

冠狀動脈心臟病影響人類健康甚巨，病態生理學乃是血管壁上形成粥狀硬化癥塊，其乃由於血管壁上細胞不當地過度增生。糖尿病是冠狀動脈心臟病的一個主要危險因子。約百分之九十的糖尿病患者具有胰島素抵抗性的現象，據研究指出，胰島素抵抗性多由於胰島素訊息傳遞路徑出現異常所致。

胰島素訊息傳遞路徑相當複雜，負責血糖調控、細胞生長、細胞增生及蛋白質合成等。當胰島素訊息傳遞路徑出現異常，人類胰臟會分泌更多之胰島素以克服胰島素抵抗性。但血中過高之胰島素可能會過度活細胞生長、細胞增生及蛋白質合成；而血管壁上細胞過度的細胞生長、細胞增生及蛋白質合成有可能是造成冠狀動脈心臟病的一個重要原因。因此，研究胰島素訊息傳遞路徑和冠狀動脈心臟病的發病原理便是一個重要的課題。

基於上述原因，本人至日本神戶大學理學院生物訊息研究中心進修，從一位臨床醫師的角色出發，學習基礎醫學的原理及技術，來探討冠狀動脈心臟病的發病原理和胰島素訊息傳遞路徑之間的相關性。

目次

本文.....	P1
目的.....	P1
過程.....	P2
心得.....	P3
建議事項.....	P3
附圖一.....	P5
附圖二.....	P6
附圖三.....	P7
附圖四.....	P8
附圖五.....	P9
附圖六.....	P10

本文

目的

冠狀動脈心臟病影響人類健康甚巨。它可以引起狹心症，影響病人工作能力；它可以引發急性心肌梗塞及嚴重性心律不整，造成病人猝死；它可以造成鬱血性心臟衰竭，造成病人生活品質變差，勞動耐受力下降。

冠狀動脈心臟病的病態生理學乃是血管壁上形成粥狀硬化癥塊，而粥狀硬化癥塊乃由於血管壁上細胞不當地過度增生及膽固醇的過度堆積而成。冠狀動脈心臟病的為危險因子眾多，包括高血壓、糖尿病、男性、抽煙及高血脂等。

糖尿病是冠狀動脈心臟病的一個主要危險因子。患有糖尿病的人得到冠狀動脈心臟病的機率是普通人的數倍之高；而患有冠狀動脈心臟病且有糖尿病的病人的臨床預後較沒有糖尿病的病人差上許多。

約百分之九十的糖尿病患者具有胰島素抵抗性的現象。所謂胰島素抵抗性乃是指身體對於胰島素控制血糖的反應不佳，因此迫使胰臟分泌更多之胰島素來降低血糖。因此，具胰島素抵抗性的病人血中常有胰島素及血糖偏高的現象。據研究指出，胰島素抵抗性多由於胰島素訊息傳遞路徑出現異常所致。

胰島素訊息傳遞路徑相當複雜，而胰島素的生理作用很多，包括血糖調控、細胞生長、細胞增生及蛋白質合成等。當胰島素訊息傳遞路徑之一出現異常而導致血糖過高時，人類胰臟會分泌更多之胰島素以克服胰島素抵抗性，進而控制血糖。但血中過高之胰島素可能會過度活化胰島素的其他作用，例如細胞生長、細胞增生及蛋白質合成；而血管壁上細胞過度的細胞生長、細胞增生及蛋白質合成有可能是造成冠狀動脈心臟病的一個重要原因。因此，研究胰島素訊息傳遞路徑和冠狀動脈心臟病的發病原理便是一個重要的課題。

在 2003 年，一篇發表於心臟醫學領域的重要期刊 *Circulation* 的論文指出，缺乏第二型胰島素受體受質 (Insulin receptor substrate 2) 之小鼠在其血管壁受傷後，其血管壁內膜新生 (neointima formation) 的現象較野生型小鼠來得嚴重。在缺乏第二型胰島素受體受質的小鼠 20 週大時，會有糖尿病的現象。此時，其血中胰島素及血糖上升，意即出現胰島素抵抗性的現象。雖然原作者將缺乏第二型胰島素受體受質的小鼠身上其血管壁內膜新生的現象較嚴重的表現歸因於血中胰島素及血糖上升，但是由於升高之血中胰島素過度活化胰島素之其他訊息傳遞路徑，例如細胞生長、細胞增生及蛋白質合成，而造成血管壁內膜新生的現象較嚴重也是一個不能排除的可能。

基於上述原因，本人至日本神戶大學理學院生物訊息研究中心進修，從一位臨床醫師的角色出發，學習基礎醫學的原理及技術，來探討冠狀動脈心臟病的發病原理和胰島素訊息傳遞路徑之間的相關性。

過程

1.見習

由於本身為臨床醫師，雖對基礎醫學研究所需的知識已早有涉獵，但對於實際操作則欠缺經驗。因此，在剛到日本神戶大學理學院生物訊息研究中心之前一個月中，主要是以見習為主，該中心指派一位助理教授協助我慢慢接觸實際的基礎醫學實驗。

2.實際操作：

一個月過後，我開始親自操作實驗。

1).表現人類第二型胰島素受體受質 cDNA 之鼠類反轉錄病毒表現載體之建立

由於計劃探討第二型胰島素受體受質的改變對胰島素訊息傳遞路徑及冠狀動脈心臟病的發病原理的影響，我必須建立表現人類第二型胰島素受體受質 cDNA 之鼠類反轉錄病毒之表現載體，以作為後續研究所需。總共製作了一個表現野生型人類第二型胰島素受體受質 cDNA 之鼠類反轉錄病毒表現載體及三個表現突變型人類第二型胰島素受體受質 cDNA 之鼠類反轉錄病毒表現載體。(附圖一)

2).穩定表現人類第二型胰島素受體受質之細胞株之建立

在製造了表現人類第二型胰島素受體受質 cDNA 之鼠類反轉錄病毒表現載體後，利用這些載體去轉染(transfection)毒組合細胞株，以便製造含有表現人類第二型胰島素受體受質 cDNA 之鼠類反轉錄病毒表現載體之反轉病毒。蒐集這些鼠類反轉病毒之後，用它們來轉導(transduction)小鼠類纖維母細胞 NIH/3T3 細胞。之後，再利用抗生素來篩選，歷經兩個星期後，得以找出穩定表現人類第二型胰島素受體受質之細胞株。

3).穩定表現人類第二型胰島素受體受質之細胞株之確立

經歷兩個星期抗生素篩選後存活下來的細胞株不一定代表可以表現人類第二型胰島素受體受質，因為可能本身對抗生素有抗藥性；再者，人類第二型胰島素受體受質的表現量也尚未確定。因此，在此階段，利用細胞溶解液將細胞溶解後，進行電泳分析(SDS-PAGE)，再用抗體來檢驗我們獲得之細胞株中人類第二型胰島素受體受質之表現量。(附圖二)

4).穩定細胞株上所表現之人類第二型胰島素受體受質特性之檢查

所表現出來之人類第二型胰島素受體受質不一定具有生理活性。因此，必須檢查其特性。首先，先檢查其是否可以在胰島素的刺激下進行 tyrosine 之磷酸化，結果顯示所表現出來之人類第二型胰島素受體受質

可以進行此項生理功能；其次，檢查在胰島素刺激下，所表現出來之人類第二型胰島素受體受質上進行 tyrosine 磷酸化之時程(time course)，比較野生型及突變型人類第二型胰島素受體受質進行 tyrosine 磷酸化之時程有無不同。此外，也作為下一步驟實驗之依據。(附圖三、四及五)

5).過度表現(overexpression) 人類第二型胰島素受體受質對胰島素訊息傳遞影響之評估

在建立實驗之系統之後，開始進行實驗的目的，那即是過度表現人類第二型胰島素受體受質對胰島素訊息傳遞影響之評估。先將細胞進行一段時間之 serum starvation 後，讓所有之細胞內之生理活動幾近停止後，再給予不同劑量胰島素之刺激。然後，對胰島素之訊息傳遞路徑之標的蛋白質進行評估。(附圖六)

心得

1.實驗室研究之認識

身為臨床醫師，除了運用大學所學及在醫院的訓練好好照顧病人之外，對於行醫過程中所發現的問題，除了從文獻中找尋答案外，就必須從實驗室來解決從未被知的現象了。但是，基礎醫學的研究對臨床醫師而言是遙遠且陌生的。很慶幸自己有這個機會到基礎醫學研究的環境中，接受不同以往的訓練。對於基礎醫學研究的態度及技術，有了進一步深入的認知及訓練。

2.基礎醫學研究技術之學習

基礎醫學研究技術對臨床醫師而言，是相關難以掌握的部份，這是由於我國的醫學生訓練過程中並無此方面的安排。但國際趨勢的潮流顯示，醫師研究家(physician scientist)的角色愈來愈重要。臨床醫師對基礎醫學研究技術的認識及學習也愈形重要，因為臨床醫師若能親自執行基礎醫學研究技術，則可獨立執行自己的想法，可收事半功倍之效；再者，對於研究助理或學生的實驗結果，也能擁有足夠的知識來判讀實驗的結果。在這一年的進修過程中，自己從實際操作實驗中學習到必備的實驗技術，也在和其他研究者的討論過程中學習到解讀實驗結果的觀念及技巧。

建議事項

- 1.一年的時間對基礎醫學研究而言，是非常短暫的，尤其對剛接觸這個領域的臨床醫師而言。就自己的經驗來說，經過一年的接觸後，對於基礎醫學研究的觀念較為熟悉，對必需的實驗技術也較能掌握。但也在此時，出國

進修的時間已到，因而無法繼續進行實驗，這是相當可惜的事，因此建議延長為兩年是較的適當的安排。現階段的規定只有在第一年是留職留薪，第二年則為留職停薪，這對大部分有家庭的醫師而言是相當沉重的負擔。因此，若能提供兩年皆留職留薪的出國進修機會，相信可以鼓勵更多醫師出國進修。

2.此次進修的地點為日本神戶大學理學院生物訊息研中心，乃是大學中一個獨立研究單位，該中心進年內曾經執行日本政府推行之 21 世紀 COE (center of excellence)計劃。在該中心進修一年的觀察得知，要有好的研究結果至少需要下列幾個條件：

1)自由的思考環境

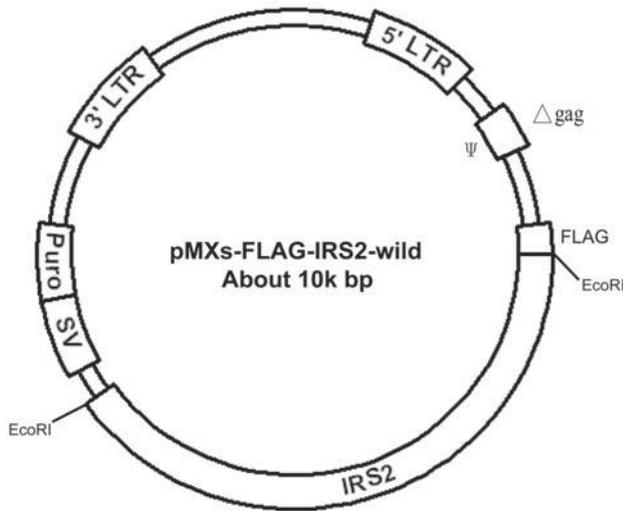
該中心的研究員擁有自由思考的環境，可以隨時進行實驗來驗證自己的想法，不一定任何實驗都必須獲得監督者同意才能進行。若遇到困難時，隨時可以和其他研究者討論。

2)充足完善的研究設備及經費

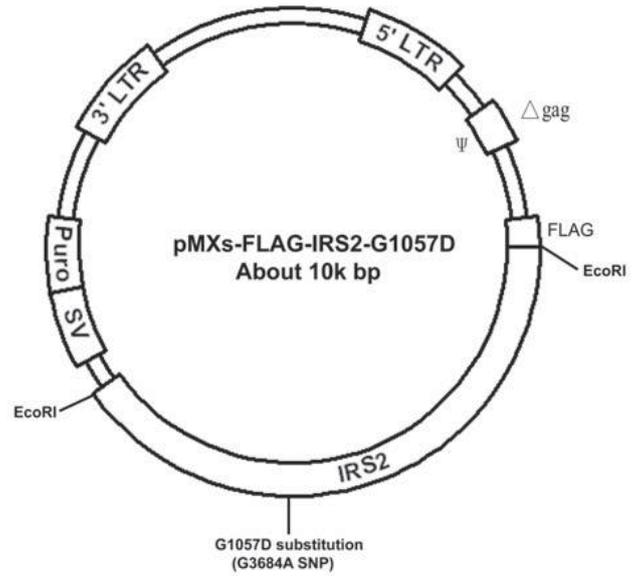
該中心的空間充足，可以提供研究者充沛的實驗空間，不會感覺空間狹隘，有所拘束。此外，研究設備完備及充分，可以提供不同實驗所需，且同時提供多位研究者進行實驗，不致耽誤研究進度。更為人稱羨的是充裕的經費，隨時提供所需的試劑。而這些研究所需要的空間及經費，皆由教授來負責籌措；研究者只須專注於實驗，不須為這些事項分心。

因此，我認為本院研究相關部門及負責教授若能為新進研究人員創造這些環境，必定能對本院研究風氣及水準有所提升。

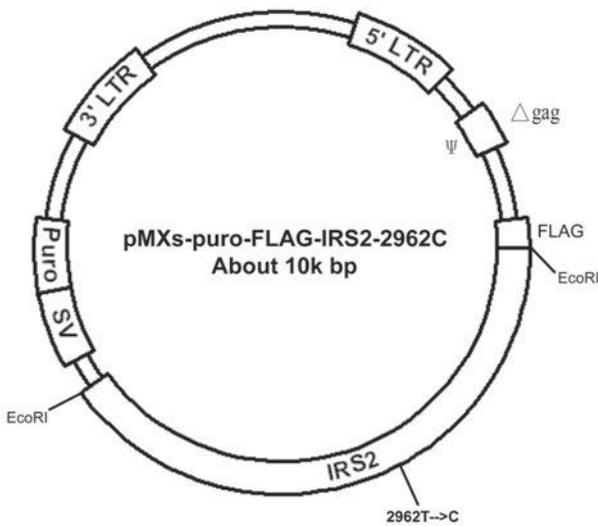
附圖一：各種表現人類第二型胰島素受體受質cDNA之鼠類反轉錄病毒表現載體



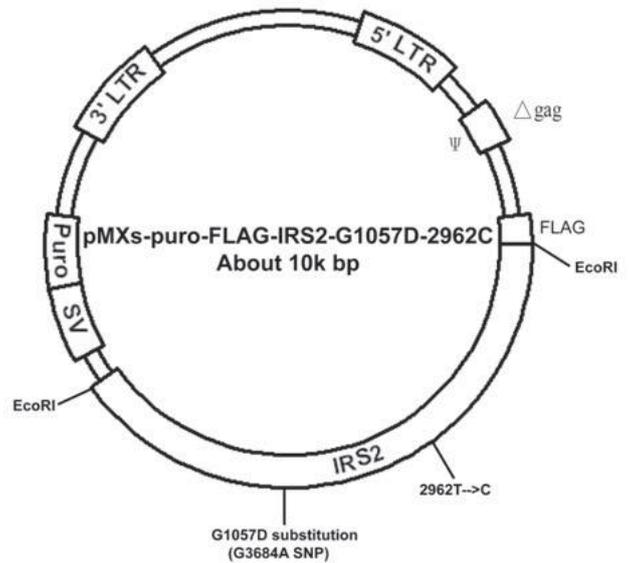
此載體乃是將人類野生型第二型胰島素受體受質cDNA利用制限酵素切割後及DNA接合酶作用後插入鼠類反轉錄病毒表現載體



此載體乃是表現人類野生型第二型胰島素受體受質cDNA之鼠類反轉錄病毒表現載體利用primers來產生point mutation，形成一個single nucleotide polymorphism，造成人類第二型胰島素受體受質第1057個胺基酸位置出現Gly/Asp的多型性變化。

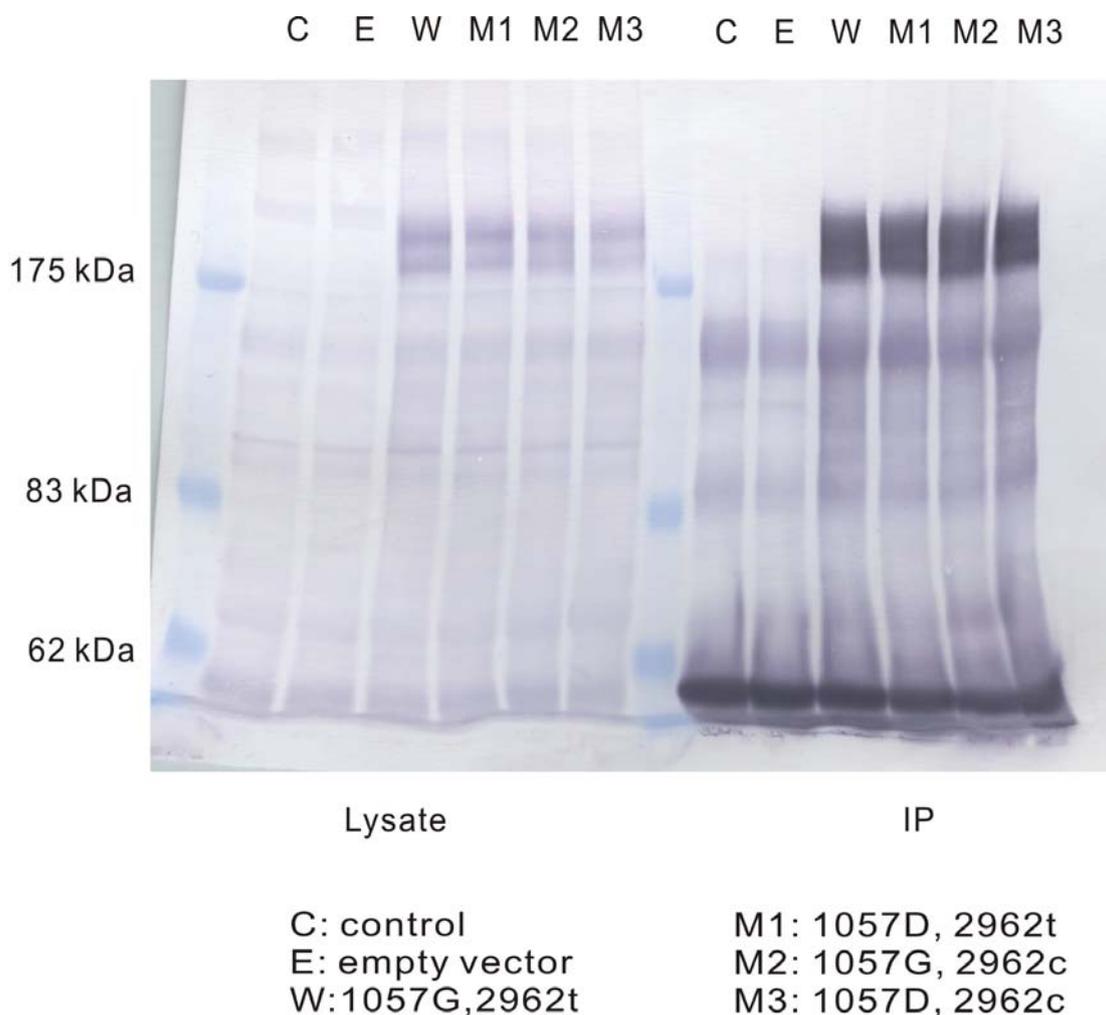


此載體乃是表現人類野生型第二型胰島素受體受質cDNA之鼠類反轉錄病毒表現載體利用primers來產生point mutation，形成一個single nucleotide polymorphism，但不造成人類第二型胰島素受體受質任何胺基酸的改變，是為一個synonymous single nucleotide polymorphism。



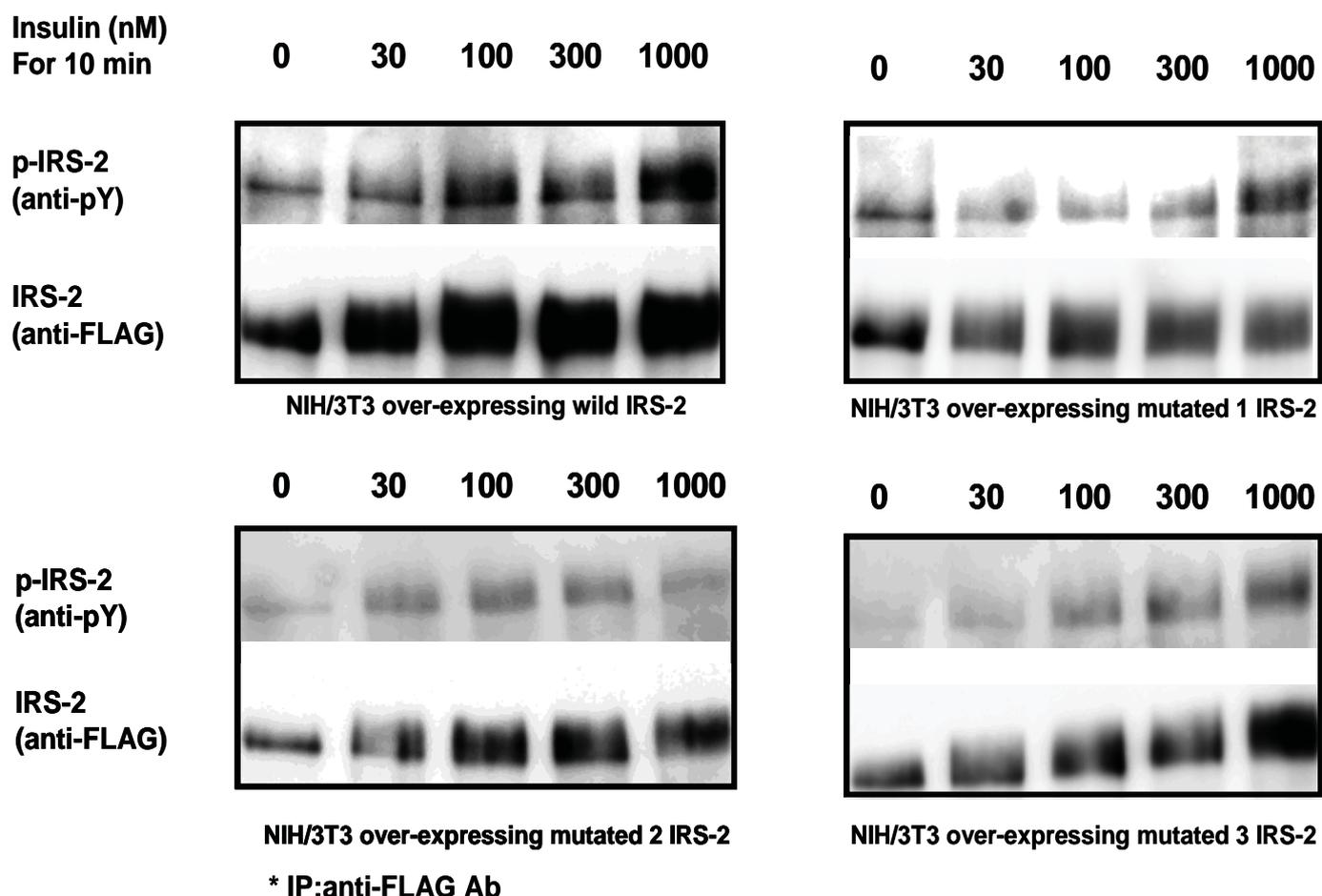
此載體乃是表現人類野生型第二型胰島素受體受質cDNA之鼠類反轉錄病毒表現載體利用primers來產生point mutation，形成兩個single nucleotide polymorphism，其中一個會造成人類第二型胰島素受體受質第1057個胺基酸位置出現Gly/Asp的多型性變化，另一個則為synonymous single nucleotide polymorphism。

附圖二:人類第二型胰島素受體受質在不同細胞株中之表現量



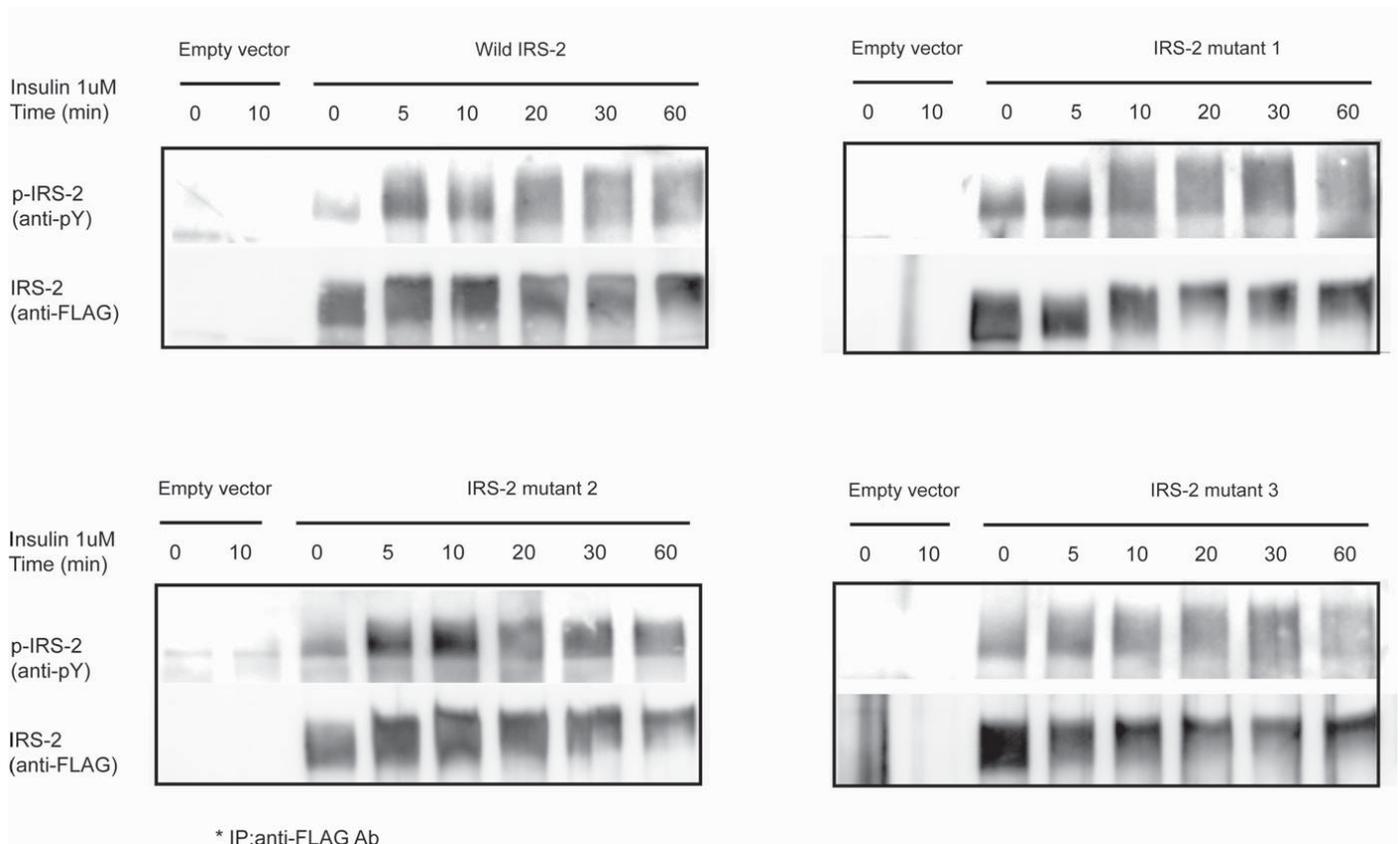
經歷兩個星期抗生素篩選後存活下來的細胞株不一定代表可以表現人類第二型胰島素受體受質，因為可能本身對抗生素有抗藥性；再者，人類第二型胰島素受體受質的表現量也尚未確定。因此，在此階段，利用細胞溶解液將細胞溶解後，進行電泳分析(SDS-PAGE)，再用抗體來檢驗我們獲得之細胞株中人類第二型胰島素受體受質之表現量。左半邊是細胞溶解物，右半邊則是免疫沉澱物。由這結果可知，我們所建立的穩定細胞株可以成功地表現各種人類第二型胰島素受體受質，包括野生型及不同突變型。

附圖三:人類第二型胰島素受體受質在不同劑量胰島素刺激下進行 tyrosine 磷酸化的現象



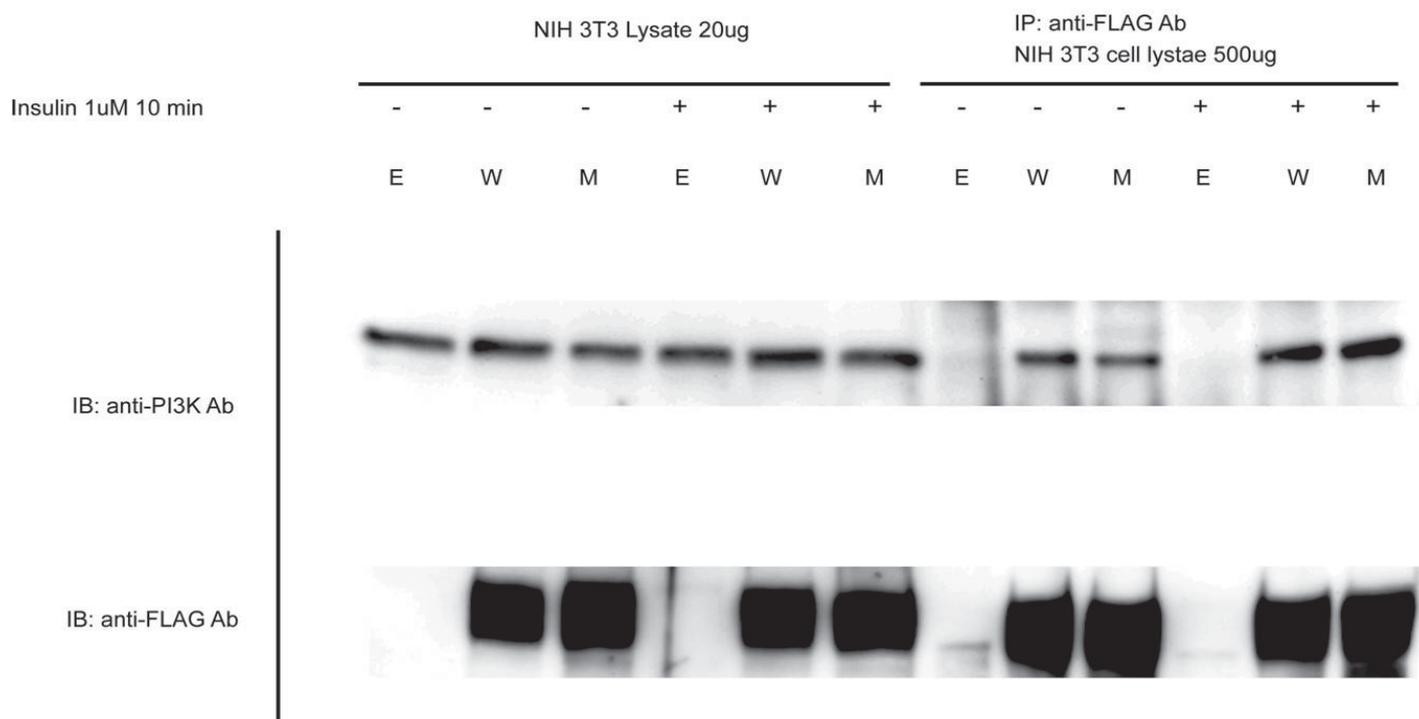
在成功表現人類第二型胰島素受體受質後，必須檢查其是否具生理特性。首先，先檢查其是否可以在胰島素的刺激下進行 tyrosine 之磷酸化，結果顯示所表現出來的人類第二型胰島素受體受質可以進行 tyrosine 之磷酸化，其程度隨胰島素的濃度上升而增強，符合正常生理功能。

附圖四：人類第二型胰島素受體受質在胰島素刺激下進行 tyrosine 磷酸化的時間變化



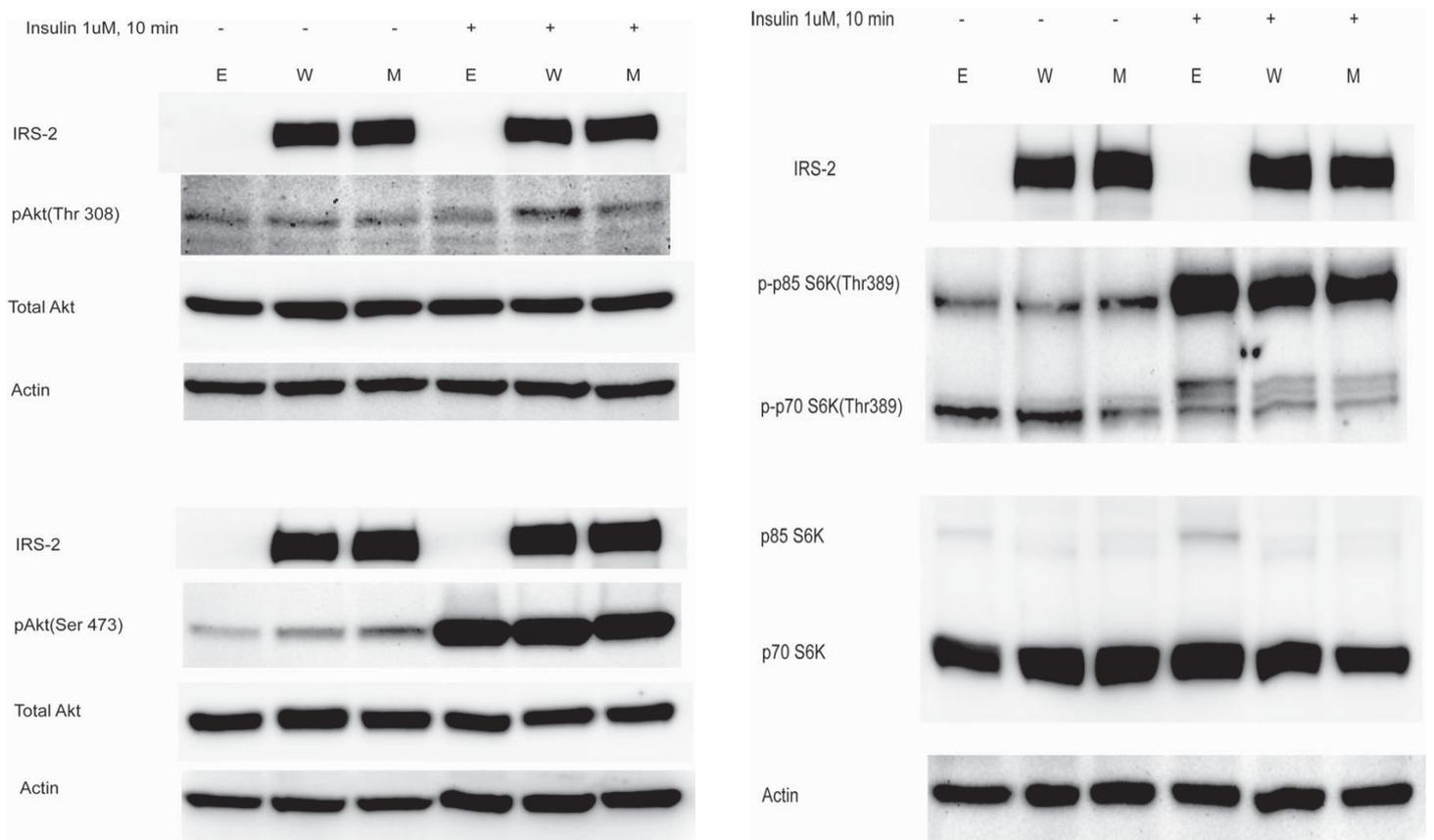
在已知所表現之人類第二型胰島素受體受質，在胰島素刺激下，可以進行tyrosine磷酸化。進一步檢驗其進行tyrosine磷酸化之時程(time course)，可見野生型及突變型人類第二型胰島素受體受質進行tyrosine磷酸化約在胰島素刺激後五分鐘達到高原期(plateau)。據此特性，作為下一步驟實驗之依據。

附圖五:所表現之人類第二型胰島素受體受質和PI3K結合之評估



第二型胰島素受體受質必須要能和其下游蛋白質PI3K有效結合，才能把胰島素訊息繼續傳遞下去。在這個實驗中，我們可知在我們的細胞株中，所表現出來的人類第二型胰島素受體受質，無論是野生型或突變型，在serum starvation的狀態下，已可和PI3K有效結合；而在胰島素刺激後，結合的量更增許多。此現象符合正常生理功能，也暗示我們所表現出來的人類第二型胰島素受體受質可以發揮正常生理功能，將胰島素訊息傳遞下去。

附圖六:過度表現第二型胰島素受體受質對胰島素訊息的影響



檢驗過度表現之第二型胰島素受體受質對胰島素訊息傳遞的影響。左邊的標的蛋白質為Akt，右邊為S6K1，此二蛋白質為胰島素訊息傳遞路徑之重要蛋白質。此項實驗似乎顯示，檢驗過度表現之第二型胰島素受體受質對胰島素訊息傳遞稍微有影響，但仍需更多實驗來驗正。