

出國報告(出國類別：博士進修)

利用人類與老鼠基因模式了解鉀離子恆定

服務機關：國防醫學院三軍總醫院

姓名職稱：鄭智仁、主治醫師

派赴國家：美國

報告日期：101年7月31日

出國時間：97年7月26日至101年7月24日

摘 要

鉀離子為細胞內主要的陽離子，百分之 98 的鉀儲存於細胞內，細胞外的鉀離子只佔全身總量的百分之 2，微量改變細胞外鉀離子濃度即可造成致命性的危險，因此鉀離子必須維持在恆定狀態，身體對任何影響鉀離子恆定的因素都必須很快的做出適當的反應，其中以腎臟和骨骼肌扮演最重要的角色，腎臟是主要排泄鉀離子的管道，在正常情形下每日的尿液鉀排泄量幾乎等於飲食鉀離子的攝取量，以維持全身鉀離子總量的恆定，但是對腎臟鉀離子排泄的調節是一個相對較慢的反應，細胞外鉀離子的恆定主要是靠骨骼肌快速地儲存或分泌鉀離子來維持。此次進修的研究重點在利用新的研究方式與各種老鼠模式來研究在生理與病理狀態下腎臟鉀離子排泄與肌肉鉀離子通道的調節。

目 次

	頁 碼
壹、進修緣起.....	4
貳、進修目的.....	4
參、進修過程.....	5
肆、進修心得.....	7
伍、回單位後報告情形.....	7
陸、建議事項.....	8
柒、此進修對單位之貢獻.....	8

壹、進修緣起

出國進修一直是職從小的夢想，進入國防醫學院以後接觸到許多進修回國的學長，發現他們都有許多過人的長處，而這些長處很多都是經由出國進修所培養而成的，因此也在心中埋下出國進修的種子，進入腎臟科後，在林石化教授與幾位老師的指導下開始嘗試病例報告的寫作，文章也順利發表在許多知名的國際期刊(如: Lancet 等)，之後更進行一些臨床人體試驗的研究，所得的研究結果發表於美國腎臟病雜誌(American Journal of Kidney Disease)，並於 96 年通過講師資審，終於出國進修的機會在 96 年年中到來，經由評比與當時內科部林裕峯部長的大力支持下，獲得於 97 年出國進修博士學位的機會。之後的一年，在國軍岡山醫院服務的期間，除了努力加強英文能力外，也開始尋找心中理想的學校和實驗室，因為職在三軍總醫院腎臟科訓練期間對於鉀離子的疾病與生理調節特別的感興趣，林石化教授向來專注於研究各項電解質在腎臟內的調控，在臨床上對於各種先天性與後天性鉀離子疾病也有豐富的經驗與論文發表，經由林石化教授的推薦，最後決定前往位於美國達拉斯德州大學西南醫學中心的黃朝榮教授實驗室，黃教授為國際知名的電生理研究學者，尤其以研究鉀離子通道調節聞名，到達德州與黃教授討論後，決定將實驗重點放在了解鉀離子通道在生理與病理狀態下的調節，鉀離子是人體細胞中最主要的電解質，細胞內外的鉀離子濃度必須恆定地維持在很微小的正常範圍內，鉀離子恆定關乎人體許多器官的正常功能，如神經傳導、肌肉收縮、心臟功能與胰島素分泌等等。人體內有兩大器官對維持鉀離子

恆定扮演著最重要的角色，一是腎臟，二為骨骼肌。藉由此次的進修機會，讓職
深入學習到研究電解質通道的方法，並對於鉀離子恆定的生理及病理機轉有更進
一步的了解。

貳、進修目的

基於先前於三軍總醫院腎臟科訓練的研究經驗，職對於臨床鉀離子異常的疾病機轉有深刻的了解與興趣，在林石化教授的實驗室，職接觸到各種臨床電解質疾病，尤其是吉特曼氏症候群以及低血鉀癱瘓，雖然我們累積了全世界最多的吉特曼氏症候群及甲狀腺亢進低血鉀癱瘓的病人群，但是許多病理機轉仍須要以基礎研究方式來證實，自從楊松昇醫師與許育瑞醫師相繼由日本及荷蘭進修歸國後，許多以小鼠為模式的基礎研究已有相當好的成果，為使本院的電解質研究能更上一層樓，此次的進修機會著重於學習最新的觀念與功能性研究，包括電生理膜片鉗技術（patch clamp）與腎小管微分離與微灌注(microdissection & microperfusion)，藉此希望能對鉀離子及其他電解質代謝平衡相關疾病之生理病理機轉進行更深入的研究。

參、進修過程

1. 美國德州大學西南醫學中心概況

美國德州大學西南醫學中心為美國首屈一指的醫學院與生物醫學研究中心，更是德州州立大學系統中最佳的醫學中心，校址在美國第四大都會區達拉斯市福和市(Dallas-Fort Worth)，醫學中心由醫學院，生物醫學科學研究所(Graduate School of Biomedical Science)，健康專業學校(School of Health Professions)，與五家附設醫院所組成。成立於 1939 年，如同國防醫學院，西南醫學中心在創見初期是以幾棟老舊的軍營開始，到目前已成為全美醫學院排名第 16 名，臨床服務量在 15 年內由每年的五萬人到目前的 50 萬人，除了臨床服務外，自從 1986 年霍華休斯醫學機構(Howard Hughes Medical Institute)在院區設立研究職位，大量優秀科學家進駐西南醫學中心，它們除了擔任醫學院和研究所的指導老師外，更將西南醫學中心轉型為研究型生物醫學中心，將醫學中心的層次與知名度大幅提升，根據 Thomson ScienceWatch 的調查，自 2005-2009 年期間，西南醫學中心所發表的論文期刊引用量(Citation-per-paper)在臨床醫學(Clinical Medicine)、生物生化(Biology & Biochemistry)領域均為全世界第一，神經生物與行為(Neurobiology & Behavior)為全世界第二、分子生物與基因(Molecular Biology & Genetics)為全世界第三，即使哈佛等名校也沒有同時

在這麼多領域名列前茅，由此可見西南醫學中心在歷任主持人的領導下快速的轉型和茁壯，終於培養出雄厚的臨床與生醫研究實力。

中心內目前有五位諾貝爾獎得主(Nobel Price Laureate)、14 位美國藝術與科學院院士(American Academy of Arts and Science)、19 位美國國家科學院院士(National Academy of Sciences)與 12 位霍華休斯醫學機構(HHMI)研究員，包括 2012 年的諾貝爾醫學獎得主 Bruce A. Beutler 博士。該醫學中心內的實驗室在許多醫學相關上的研究領域上均執牛耳，內科系腎臟科亦為全美知名的腎臟研究中心，主任為 Peter Igarashi 教授以多囊腎與腎小管發育而聞名，黃朝榮教授實驗室在離子通道與電解質代謝平衡及高血壓的研究也在世界中佔有一席之地，Michel Baum 教授為知名的小兒腎臟專家並專精於腎小管微分離與微灌注實驗，另外尚有 20 餘位主治醫師各專精於不同領域。

2. 腎臟內科黃朝榮實驗室成員簡介

實驗室由黃朝榮教授主持，黃朝榮教授於台北醫學院醫學系畢業後即前往美國加州大學舊金山分校進修博士學位，之後受聘於美國德州大學西南醫學中心，主要的研究課題為離子通道的生理調節、離子通道異常造成的人體疾病以及 WNK、Klotho 兩個蛋白媒的訊息機轉與調控，目前實驗室人員包括博士後研究員 5 名、腎臟科臨床研究員 2 名、技術員

1 名、博士班學生 2 名。黃教授雖然長期旅居美國，但他仍與台灣的許多單位保持密切的聯絡，本科林石化教授多年前於美國腎臟醫學會年會結識黃教授，之後便邀請黃教授多次蒞臨三軍總醫院與台灣腎臟醫學會年會演講，並與本院共同發表了多篇的研究論文，職此次進修也是拜此緣分，相信將來必能繼續加強雙方的合作。

3. 進修課程

美國德州大學西南醫學中心生物醫學研究所包含 10 多項哲學博士學程，第一年上學期為必修共同科目，內容包含基因、蛋白與細胞等三大部分的基礎知識，第一年下學期至第二年為選修科目，可以根據自己的興趣選修課程，修滿畢修與選修學分達 30 學分後，於第二年結束前接受博士資格考試，第三年至第六年為論文研究及實驗，畢業論文委員會在第二年開始時，由學生自行挑選校內老師 3-4 名，包含指導教授在內為 4-5 名教授組成的委員會，負責為學生提供研究及生活上的諮詢，並監督學生畢業論文的進展，在西南醫學中心博士班學生畢業的條件為：必須完成必修及選修相關課程 96 學分以上、通過博士資格考試、並於研究領域完成數項研究計畫，成果經國際相關專業雜誌認可並發表，最後畢業論文(Dissertation)與論文答辯(Defense Seminar)須經口試委員會(3-4 位教授)審查通過方能取得博士學位。根據最近的統計，美國德州

大學西南醫學中心生物醫學博士班研究所畢業生取得學位之平均時間為 5.5 年。

4. 實際過程

剛到美國的前半年，除了生活環境、語言及人際關係的陌生之外，最大的壓力還是來自課業，未出國前就聽聞美國研究所的課業壓力要比其他國家來的沉重許多，實際接觸之後，才發現比自己預估的還要困難，雖然美國的教育並不以難倒學生為目的，很多的課程也以互動式與問題解決的方式進行，但是近年來基礎科學的進展已遠超過職先前在國防醫學院上課所學的內容，雖然職於出國前也先行購買了最新版本的教科書先行研讀，但相對照於其他剛從碩士班本科畢業的年輕同學，程度上是差了許多，因此每天下課後都必須花比別人更多的時間來研讀與搜尋資料，將當日上課的內容做徹底的了解，若遇討論課的前一日，更必須徹夜研讀，以免在討論時回答不出問題。另外每個月都會有一次筆試，以 Open book 的形式進行，考試題目都是申論題，基本上沒有正確答案，而是在考驗你如何以你所學的知識來解決實際實驗上的問題，這樣的考試方式只能完全靠實力，對職而言也是一種新的體驗和壓力，每次考試結束，老師們會將每位同學所答的試卷發還，上面會有老師對你的評語與修正，必且會提供答得好的試卷給大家參考，許多同學的答案

甚至連老師都大為讚賞，認為比他們原來的想法還要傑出，也讓我
知道同學們的程度都非常的好，也更激發自己見賢思齊努力向上，最
終仍以 A(約全班前 1/4 的學生能得到 A)的成績通過第一學期的課
程。雖然美國的這種教育方式讓我一度很不能適應，但是相對的也
從中學習到很多新的學習觀念與方法，整體而言個人覺得這樣的教
育方式比較能激發學生的創造力，並且讓學生將所學應用在實際實
驗上，要實踐這種教育制度，好的老師的引導、優秀同儕的討論與
競爭還有自己的努力缺一不可。在通過了第一學期的魔鬼考驗後，
之後的課程便都能得心應手，順利地通過了。

至於實驗室工作部分，我的實驗計畫大致分為三大部分，第一部分
主要利用電生理膜片鉗技術 (patch clamp)進行胰島素對鉀離子通道
(ROMK)的影響，將表達在人類胚胎腎細胞(HEK)的 ROMK 通道置於無
血清狀態至少 16 小時後，測試胰島素或類胰島素生長因子對 ROMK
通道的影響，實驗結果發現胰島素與類胰島素生長因子可以抑制 ROMK
通道之電流，經由更進一步的生化實驗證實此抑制作用是經由
Phosphoinositol-3-kinase (PI3-Kinase)-serum & glucocorticoid induced protein
kinase (SGK)/Akt1-with-no-lysine kinase 1(WNK1)之訊息傳導路徑來促進
細胞膜上 ROMK 通道的內吞(endocytosis)(此部分研究發表於 J Am Soc
Nephrol 2011; 22: 460-471)，這項研究提供了影響 ROMK 通道上游的訊息

傳遞路徑以及胰島素影響集尿管鉀離子排泄的可能調控方式。

第二部分實驗主題是與本院合作低血鉀癱瘓鉀離子通道(Kir2.6)基因突變之功能性研究，如前所述，本院林石化教授收集了上百名甲狀腺亢進低血鉀癱瘓與其他原因引起低血鉀癱瘓的病患 DNA 資料庫，利用基因定序我們發現不管是甲狀腺亢進引起或自發性的低血鉀癱瘓病人都可能帶有突變的 Kir2.6 鉀離子通道，將突變的 Kir2.6 通道表達在 HEK 細胞後以電生理膜片鉗技術紀錄突變通道的電流，發現這些突變都會導致 Kir2.6 通道的功能下降，進而引起肌肉對鉀離子調控的異常及骨骼肌的癱瘓(此部分研究發表於 J Biol Chem 2011; 286: 27425-27435)。這個發現更受到國際知名低血鉀癱瘓學者 Stephen C. Cannon 的重視，與 Dr. Cannon 教授討論後，我們首先提出了非家族性低血鉀癱瘓疾病(non-familial hypokalemic periodic paralysis)的病理機轉，因此我們受邀於 2011 年美國腎臟醫學會年會做 20 分鐘的演講，獲得在場學者的廣泛回響，之後並獲腎臟學排名第一名的期刊:美國腎臟醫學會雜誌(Journal of American Society of Nephrology)邀稿，將此疾病機轉撰文發表(J Am Soc Nephrol. 2012 Jun;23(6):985-8.)。

第三部分主要利用顯微鏡分離小鼠之腎小管(microdissection)，進行微灌注(microperfusion)，研究特定腎小管對鈉鉀離子之調控。此項技術目前全世界僅有 10 多個實驗室有能力進行，因本科多專注於腎小管生

理與病理調節，為使本科的實驗能力更加提升與獨立，黃教授特別透過私人關係情商國際知名腎小管微灌注專家 Dr. Michel Baum 親自指導職學習此技術，經過半年多的學習，終能獨立進行腎小管微分離與微灌注實驗，並開始著手研究 Kidney-specific WNK1 這個蛋白對於亨利氏環與集尿管鈉離子與鉀離子通道的調節，研究結果發現基因剔除 Kidney-specific WNK1(KS-WNK1)會導致亨利氏環上升支鈉離子的吸收增加，在高鉀飲食情況下會增加 KS-WNK1 的表達以抑制亨利氏環的鈉離子吸收，藉此幫助遠端集尿管鉀離子的排泄(此部分研究發表於 *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012 Jul 11. [Epub ahead of print])，此項研究提供了在高鉀飲食下，亨利氏環上升枝如何調節以提升腎臟鉀離子的排泄能力。

肆、進修心得

美國德州大學西南醫學中心腎臟內科在離子通道及電解質代謝平衡方面的研究領域及臨床治療在世界中佔有一席之地。經由此次的進修機會得以學習最新的研究方式與觀念，並對遺傳或非遺傳性電解質代謝平衡相關疾病之生理病理機轉作更深入的研究與貢獻，雖然初期困難重重，修業之路備極艱辛，但在師長與家人的鼓勵下，最終仍如期取得學位並有豐富的收穫與成果。

伍、回單位後報告及研究合作情形

回國後先初步了解目前實驗室的狀況並在科內進行口頭報告，同時將進行計畫與實驗室空間的申請，並與國防醫學院內實驗室進行討論與計畫合作，目前的目標為建立電生理膜片鉗技術 (patch clamp) 實驗平台以及腎小管為灌注系統。此外與黃朝榮教授實驗室亦有數項研究計畫正在進行中，將來也會繼續保持合作關係，互相交流老鼠模式與及相關實驗所需材料。

陸、建議事項

以下為建議及未來工作的目標

1. 提供歸國進修人員研究場所及經費補助。
2. 保持與國外實驗室的聯繫並拓展合作觸角。
3. 隨時攝取最新的知識及參加學術研討。

柒、此進修對單位之貢獻

本科對於水分及電解質代謝平衡方面的研究已有相當的基礎，此次進修所

學相信能與現有之基礎互補，期能在本科未來的研究上有所貢獻，提供更多的實驗方法與深入了解疾病之機轉，並對電解質異常疾病治療方式的開發提供新的資訊，相信可使本院在水分及電解質代謝平衡方面的研究及治療領域在國際上佔有一席之地。