

出國報告(出國類別：短期進修)

美國國家衛生研究院
環境健康科學研究所短期進修心得報告

服務機關：國防醫學院三軍總醫院

姓名職稱：宋岳峰、主治醫師

派赴國家：美國

報告日期：101 年 9 月 8 日

出國時間：100 年 9 月 1 日至 101 年 8 月 30 日

摘 要

巴金森氏病(Parkinson' s disease)是僅次於阿滋海默氏症(Alzheimer' s disease)第二常見的神經退化性疾病，研究發現巴病主要是中腦黑質的多巴胺神經元退化所致，但病理機轉至今仍不是很清楚。目前造成巴病的原因包括： α -synuclein 蛋白異常、自由基及氧化壓力增加、多巴胺傳送體(DAT)異常、粒腺體異常、環境毒素、內生性毒素(多巴胺代謝過程中產生的醃類物質，如 DOPAL、DOPEGAL)等等。本人赴美進修的實驗室是美國國家衛生研究院環境健康科學研究所神經藥理組(NIH/NIEHS，Neuropharmacology Group)，本實驗室專注於探討慢性發炎在巴病扮演的角色，目前已有許多研究證實發炎與神經退化性疾病的有關，在巴病動物模式下發現抑制發炎可以有效減少多巴胺神經元的退化及改善運動功能。此次赴美研究主題包括探討免疫細胞如何調控發炎反應、Prostaglandin D2 如何參與多巴胺神經元保護、及增加 ALDH2 酶活性是否具有保護多巴胺神經元的功效。

目 次

壹、進修目的.....	4
貳、進修過程.....	6
參、進修心得及建議.....	10

本 文

目 的

巴金森氏病為第二常見的神經退化性疾病，估計約有 100 萬名美國人罹患此病，國內沒有正式的統計數字，但推估至少有 5 萬名巴病患者。目前巴病的治療方式僅止於症狀治療，對於延緩疾病的進展無任何幫助，若能找到遏止多巴胺神經元退化的方法將是病人的一大福音。

近年來發炎參與神經疾病，甚至癌症的角色已逐漸獲得重視。神經疾病包括阿滋海默氏症、巴金森氏病、運動神經元疾病、多發性硬化症、神經痛、偏頭痛等都認為與慢性發炎有很密切的關係。大腦裏面參與發炎反應主要透過二種神經膠質細胞：微小膠質細胞(microglia)及星狀膠質細胞(astroglia)。當大腦的微小膠質細胞活化時，會產生各式各樣的促發炎因子(pro-inflammatory factors)。目前的觀念是，微小膠質細胞在不同的狀況下功能歧異，在正常或者輕微發炎的狀態下，微小膠質細胞具有免疫監督的功能，然而，在慢性發炎狀態下，微小膠質細胞反而具有細胞毒性，會造成神經元受損。在一些動物實驗中發現，慢性發炎導致的微小膠質細胞活化，會引起中腦黑質的多巴胺神經元延遲性及進展性的喪失，而造成類似巴金森氏症的表現。雖然星狀膠質細胞引起的促發炎反應沒有微小膠質細胞這麼顯著，但活化的星狀膠質細胞會產生許多神經滋養因子(neurotrophic factors)，這些因子與神經元的存活有密切的關係。

本實驗室過去已成功發展出 LPS(lipopolysaccharide, 脂多糖，一種細菌內毒素)誘發之巴病動物模式，及使用各種初代細胞培養(primary cultures)研究來探討神經發

炎在巴病扮演的角色。本次進修研究目的在於探討這些膠質細胞在 LPS 刺激下的反應及嘗試找出具有保護多巴胺神經元的分子、化合物等，最終希望能將研究成果運用在臨床治療上，以造福病人。

進修過程

歷經了 21 小時的飛行、轉機時間，終於在 100 年 9 月 1 日抵達美國北卡羅來納州 (North Carolina) 羅利德罕國際機場 (RDU)。北卡有豐富的自然環境，道路兩旁都是高聳的松樹，不時可以看到松鼠在樹間穿梭，早、晚也見得到鹿的蹤跡。本人進修的單位是美國國家衛生研究院環境健康科學研究所 (NIH/NIEHS)，是美國國家衛生研究院 (NIH) 及美國衛生和公眾服務部 (U.S. Department of Health and Human Services, DHHS) 27 個研究中心及機構中其中一個單位，位於北卡的研究三角區 (Research Triangle Park)，這個三角區是全美最大的科學園區，許多的科技公司、藥廠總部均設在這裏，如 IBM、Cisco、GSK、Eisai 等等。

由於 NIEHS 是美國政府單位，對於新進研究人員有嚴格的規範，前二週主要辦理識別證、完成線上電腦資訊安全課程、研究倫理課程，動物使用及人道照顧課程、及三天的輻射安全講習課程等等，有些課程只需要線上作答，不列入成績，但輻射安全講習課程課後要考試，通過後發予證書，才能執行相關輻射線工作。

由於實驗室已經營多年，大部份的實驗流程都已製訂一套完整的操作程序，動物使用也有完整的作業手冊。資淺的人員會先由資深的研究人員 (大部份是博士後研究人員，也有生物學家) 帶領，有任何問題隨時跟同事或教授討論。每週有二個半天的實驗室小組討論，每個人要報告前一週完成的實驗結果及下週預計執行的實驗，聽取同事及教授的意見。另外，實驗室還有不定期的文獻回顧討論，及邀請專家學者演講。

由於實驗室主要的研究方向在探討發炎如何誘發巴金森氏病，神經膠質細胞培養

(neuron-glia culture)、混合膠質細胞培養(mixed glia culture)成爲必備的實驗工具，還需視實驗條件做純神經細胞培養(neuron-enriched culture)、純微小膠質細胞培養(enriched microglia culture)等等。實驗方法爲取懷孕 14、15 天大鼠的胚胎，取其中腦做神經膠質細胞培養，一週後進行實驗，神經細胞約占所有細胞的 41%，多巴胺神經元只占其中的 1%而已。混合膠質細胞培養爲取出生一天的大鼠大腦，培養二週後視實驗需要做純微小膠質細胞培養或純星狀膠質細胞培養。

過去對於星狀膠質細胞是否會產生促發炎因子，如腫瘤壞死因子(TNF- α)、一氧化氮(NO)一直存有爭議。爲了釐清這點，我們修改了過去研究人員常用的純星狀膠質細胞培養方法，在細胞培養裏加入了 1mM 的 LME 共 5 天，結果證實可以有效地毒殺微小膠質細胞(僅占所有細胞的 0.01%)。使用高達 1000ng/ml 的 LPS 刺激下，在我們修改方法後的高度純化星狀膠質細胞培養及 C6 細胞株(星狀細胞瘤細胞株)，仍無法產生促發炎因子。免疫螢光染色結果顯示，誘導型 NOS(iNOS, inducible NO synthase)僅在 LPS 刺激的混合膠質細胞培養中的微小膠質細胞表現，並不會在高度純化星狀膠質細胞培養中表現。另外，在高度純化星狀膠質細胞培養中加入 0.5 或 1%的微小膠質細胞，即可產生明顯的腫瘤壞死因子及一氧化氮。實驗結果告訴我們，LPS 刺激無法誘導星狀膠質細胞產生促發炎因子，使用傳統純星狀膠質細胞培養方法並無法完全根除微小膠質細胞，即使含量低到 0.5%的微小膠質細胞在 LPS 刺激下仍可產生明顯的促發炎因子，讓人們誤以爲星狀膠質細胞在 LPS 刺激下能產生促發炎因子。

PGD2 是哺乳類動物大腦最主要的前列腺素，過去曾有研究發現 PGD2 及其代謝物 J2

能誘導小鼠星狀膠質細胞分泌神經生長因子(NGF)及腦源性神經滋養因子(BDNF, brain-derived neurotrophic factor)，扮演神經保護的角色。但 PGD2 在微小膠質細胞的角色仍不是很明確。我們發現 PGD2 在 picomolar 濃度下，在 ³H-dopamine uptake assay 及免疫化學染色的結果均顯示具有多巴胺神經元保護的效果，PGD2 保護多巴胺神經元似乎不是透過抑制微小膠質細胞產生腫瘤壞死因子及一氧化氮等促發炎因子，而是抑制微小膠質細胞上的 GP91 產生之超氧自由基(superoxide radical)。過去我們實驗室已陸續發現許多化合物如 DPI、morphinan、Dynorphin、PGE2 等均可以直接抑制 GP91 產生的超氧自由基，達到保護多巴胺神經元的效果，希望這些以膠質細胞為標的的治療方式可以發展出延緩巴病進展的新的治療方向。

醛類廣泛存在於環境中，諸如汽車廢氣、香煙、煙霧、工業產品、食物等等，有些醛類是人體必需的，但大部份的醛類具有毒性甚至是致癌的。喝酒後酒精會代謝成乙醛，乙醛再利用乙型乙醛去氫酶(ALDH2)代謝成乙酸，亞洲人因為存有 ALDH2 基因變異，因此許多人喝酒後會有臉部潮紅，甚至於頭暈、噁心、嘔吐的現象，此為乙醛在體內聚積的結果。多巴胺在代謝過程中也會產生醛類物質 DOPAL，得靠 ALDH 進一步代謝成 DOPAC。過去研究顯示 DOPAL 會促進 α -synuclein 蛋白聚合(oligomerization)，另外在死於巴病的病人尾狀核及紋狀體也發現 DOPAL 的含量增加，由此推測 DOPAL 在巴病可能扮演相當重要的角色。我們藉由增加 ALDH2 活性以減少多巴胺神經元內的 DOPAL 的累積，以期減低 DOPAL 對多巴胺神經元的毒性。實驗結果證實抑制 ALDH2 會增加多巴胺神經元的受損，而活化 ALDH2 在 ³H-dopamine uptake assay 及免疫化學染色的結果均看到多

巴胺神經元保護的效果。對於 30-50%ALDH2 基因變異的亞洲人來說，活化 ALDH2 是否有神經保護的效果值得更深入的研究。

進修心得及建議

一、研究資源及設備：

因美國政府財政赤字，NIEHS 也面臨研究經費逐年縮減，甚至於關閉實驗室的窘境。但整體來說研究經費仍相當充沛，以我們實驗室來說，每年花在動物費就高達上千萬台幣，以每週都需要實驗的大鼠來說，一隻要價 200 美金，若是基因轉殖小鼠費用更高，甚至高達 1000 美金，台灣大概沒有一間實驗室能負擔得起如此高的經費。在 NIEHS，實驗室彼此間的合作相當密切，每天都會看到有人在網上詢問可不可以借用試劑、研究設備等等留言，馬上就會有人回覆。另外，你也可以把檢體送往所內的核心實驗室，有專人分析，省卻不少時間及精力。離 NIEHS 不到半小時車程即是全美著名的杜克大學(Duke University)及北卡州立大學(UNC)，這兩所大學在研究方面均有傑出的表現，與 NIEHS 也有密切的合作。

二、演講及會議：

除了每週的小組討論、文獻回顧會議外，我們實驗室所屬的神經藥理組每週也有一次的演講，邀請外賓、專家學者蒞臨演講。每年八、九月，各實驗室的研究人員得輪流上台報告過去一年相關的研究成果，會中各領域專家會提出各式各樣的問題，相當有挑戰性。另外，NIEHS 每週幾乎都會舉辦大型會議或演講，我參加過幾次探討巴金森疾病相關議題的會議，會中演講者都是全美最傑出的研究學者，與會人員討論非常熱烈，令我印象十分深刻。

三、教學與訓練：

NIEHS 對於新進人員要求很嚴格，得受相關訓練才能執行相關研究工作。有些教學課程在電腦線上學習就可以了，類似於本院的 e-learning 系統，但 NIEHS 的線上課程相對較為活潑，較多圖片、影音等互動課程，比較不會乏味。參與訓練課程的講師教學非常熱情，即使學員只有二、三位，仍邁力教學，而且善於使用道具，很值得我們學習。另外，NIEHS 對於電腦、網路的教學也不遺餘力，每個月都有 Windows、Google、Pubmed、Graphpad Prism、Endnote 等程式、軟體免費教學，幫助甚大。

三、電腦使用規範：

由於 NIEHS 是政府單位，對於電腦、網路使用規定相當嚴格。不能任意下載軟體或程式到個人電腦，有需要得聯絡 IT 人員，馬上會有人處理。不能連接私人的隨身碟到電腦上，得使用公發的隨身碟(ironkey，號稱最安全的隨身碟，要價二、三百美金)，筆記型電腦也不能連接到公用網路上。若是偵測到某個人的 IP 中毒，算是很嚴重的違規，甚至個人上網、收信的功能都會被取消。另外，會定期進行電腦軟硬體更新，增進電腦使用效率。

四、進修時間：

對於實驗室短期進修，一年的時間不是很足夠，以我們實驗室來說，光是要達到細胞培養穩定平均就要花上六個月的時間，若要做活體實驗，以我們實驗室的動物模式，至少也要一年以上的時間。受限於進修時間，我無法參與活體實驗、切片、行為測試等實驗，非常可惜。建議日後若申請實驗室進修，可否延長時間至一年半至二年，對於研究應該會很有幫助。

五、國際觀：

感謝所屬單位及軍醫局給我機會赴美進修，大大地開闊了我的視野及眼見。NIEHS 人才濟濟，所見都是知名的學者。我發現大陸的研究人員相當多，我們實驗室目前就有四位，均是頂尖的人才，其中一位碩士班畢業，學校就送她到美國進修，可見他們培養人才的用心。另外，我參加附近的華人教會，看到的幾乎都是攻讀杜克大學、北卡州立大學博士學位的大陸留學生，及在當地進修的大陸研究人員、醫生，沒有一位台灣留學生。這些大陸學生畢業後大部份會留在美國工作，人數越來越多，在美國的影響力也越來越大，值得我們重視。