

出國報告(出國類別：進修)

美國伊利諾大學芝加哥分校心血管研
究中心進階復甦醫學研究

服務機關：國防醫學院三軍總醫院

姓名職稱：陳思州主治醫師

派赴國家：美國

報告日期：103 年 8 月 2 日

出國時間：102 年 7 月 26 日至 103 年 7 月 23 日

摘要

伊利諾州大學芝加哥分校心血管研究中心之急救復甦醫學研究，旨在探討心臟驟停復甦後，其伴隨之休克現象之心臟功能損傷之機制。根據對於時間長短極其敏感之氧化物壓力與發炎反應，找出有效改善治療策略。過去經由已確立之成鼠氯化鉀心臟驟停模型，於心臟驟停 8 分鐘後施行心肺復甦，於缺血期間降溫至攝氏 32 度已證實對血液動力學與存活改善有顯著差異，且此保護作用隨著降溫延遲而消失。降溫之保護作用機制已知可透過增加 AKT 磷酸化程度增加細胞存活。經由 AKT1 基因剔除之成鼠亦證實降溫之保護作用消失。然而及時地降溫，在實務上有困難性。故找尋藥物，藉由替代或透過類似降溫之保護機制達到改善心肌細胞功能之作用。PTEN 阻斷劑為一阻斷 PIP3 還原為 PIP2，從而增強下游 AKT 磷酸化之藥物。除增加細胞存活外，藉由培養之心肌細胞缺血 stunning 模型研究，亦顯示其能改善缺血後心肌細胞之收縮功能，增加 phospholamban 磷酸化，降低 ATP 產生，故 PTEN 阻斷劑未來可能做為一種心臟驟停改善缺血再灌流損傷之藥物。Intralipid 為臨床靜脈營養劑，病例報告指出其對於局部麻醉藥過量引起心臟毒性有保護作用，對於缺血再灌流損傷亦可能有保護作用。

目次

一、目的	4
二、進修過程	5
1. 伊利諾大學芝加哥分校	5
2. 心血管研究中心	5
3. 心臟驟停動物模型	7
4. 新生鼠心臟細胞培養	8
5. 缺氧箱模型	10
6. 灌流系統模型	11
7. 倒式螢光顯微鏡測定	12
8. 降溫對於心肌保護作用	13
9. Baicalein 於延遲降溫時 對心肌保護作用	14
10. PTEN 阻斷劑心肌保護作用機制	15
三、心得建議	16

一、目的

到院前心肺停止病人的預後一向偏低，不論是國內外皆然。近十年來，由於台灣緊急醫療體系的建立及日趨完善，到院前心肺停止病患之急救後自發循環恢復比率已有明顯改善。根據台大醫院研究，台北地區於八十八年至九十年間到院前心肺停止病患的已可達 28.9%，然而出院存活率仍未盡理想，僅約 3.1%。其原因，有為數不少的病患於恢復循環後在醫院內再次惡化而死亡，其中約三分之一乃早期死於心臟及循環衰竭，三分之一因神經學功能衰竭而死於晚期，而另三分之一則是死於感染及其他的併發症。

因此，欲有效急救此類病患，除了開始急救時的生存之鏈須緊密配合之外，對於初步急救成功病患的復甦後照顧，亦為病患能否存活出院的關鍵。此一環節目前已日益獲得重視，且被視為生存之鏈的延伸，因此急救復甦後種種病、生理學變化的研究現正蓬勃進行。

於心血管研究中心學習缺血暨再灌流傷害之心臟驟停細胞與動物模型之建立，了解造成細胞與組織於過氧化傷害之機轉。藉由介入性策略如低溫療法，抗氧化物治療或其他替代性藥物與方法，研究探討心臟驟停心肌細胞再灌流損傷時之保護機轉，期能作為改善復甦後病患之存活與功能保存之參考。

二、進修過程

1. 伊利諾大學芝加哥分校 University of Illinois at Chicago (UIC)
伊利諾大學芝加哥分校創立於 1982 年，由伊利諾大學醫學中心與位於芝加哥的校區合併而成。為芝加哥地區最大之大學系統。包含 27,580 個學生，15 個學院。醫學院每年研究支出超過\$335000000 為美國研究經費排名前 50 的機構之一。學校堪稱為名副其實的國際研究機構，因為超過 1/3 的學生是以英語為其第二語言。
2. 心血管研究中心 Center for Cardiovascular Research
這個中心整合超過 15 個研究室與設施，致力於找尋治癒心血管疾病的方法。整合不同領域提供伊利諾大學芝加哥分校醫學院於基礎研究、轉譯研究和臨床研究的資源。這樣研究中心提供了絕佳互動的研究環境，給博士生，博士後研究員，醫學生，住院醫師和臨床研究員更好的培訓機會，其目標即在培養心血管科學未來的領導人。

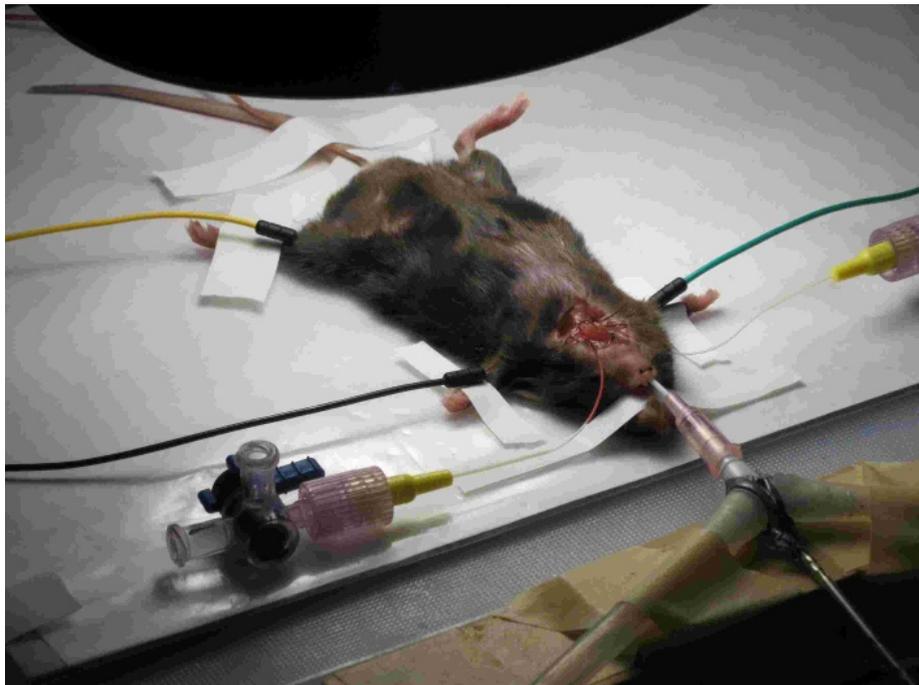
而我所在的實驗室專注於心血管復甦的計劃，由 Terry Vanden Hoek 教授主持。專門研究解決臨床上突然休克，心臟驟停，與嚴重創傷失血性休克等條件後可見心臟功能受損的現象。這些原因是老年人和年輕人導致死亡的主要原因。其研究具體的重點即在是致力於識別影響對時間敏感的的氧化壓力變化和炎症的治療策略，以期改善心臟功能，增加復甦的成功與存活。已運用的策略包括一氧化氮的使用或其它氣體，以抑制線粒體氧化生成；阻斷引起免疫反應之早期引發劑。使用藥物和遺傳途徑方法，結合體內和體外復甦模型解決問題。



3. 心臟驟停動物模型

選用成年雌性 C57BL/6 小鼠（重量 25 至 30 克）。麻醉動物用混合 80 $\mu\text{g/g}$ ketamine HCl 和 12 $\mu\text{g/g}$ xylazine HCl 腹腔注射。手術準備期間，體溫保持在 36.5°至 37.5°C，透過白熾加熱燈和由直腸熱電偶探頭監測體溫。20 號的導管安裝在 145°角尖鈍針做氣管插管。了確認氣管導管放置後，啟動機械通氣。呼吸機設置潮氣量為 12.5 μL /克，呼吸頻率 110/分鐘，FIO₂ 1.0，呼氣末正壓為 2cm H₂O。通過右頸動脈插入微導管作為血壓測量。充滿生理鹽水的微導管插入左側頸靜脈作為輸液通路。血壓和針狀探頭心電圖數據使用電腦的數據採集系統記錄。

手術準備後，觀察動物於呼吸機上 50 分鐘。如果平均動脈壓小於 80 毫米汞柱或證實手術出血或手術時間超過 40 分鐘則此動物被排除於實驗。心臟驟停則藉由頸靜脈導管推注 0.08 克/克的氯化鉀，經由動脈壓消失和心搏停止來確認效果出現。心臟驟停 8 分鐘後，用手指按壓胸部維持速度約每分鐘 400 下。以維持主動脈舒張壓為 20 毫米汞柱為目標。恢復自發性循環定義為竇性心律的恢復與平均動脈壓 40 毫米汞柱，持續至少 1 分鐘

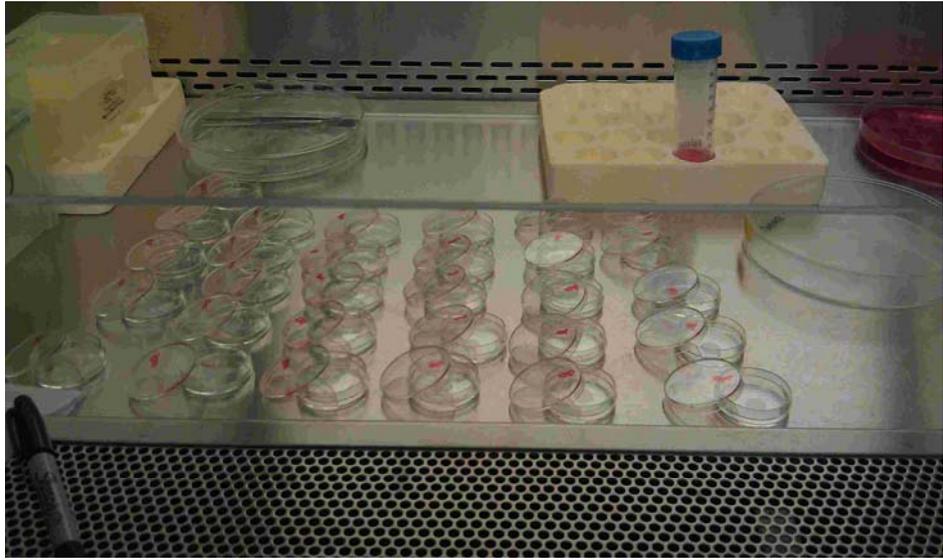


4. 新生鼠心臟細胞培養

1 - 2 日齡的新生 C57BL6 小鼠，取出心室置於冰 Hanks'平衡鹽溶液 (HBSS)，集中後適度減碎。以 pH 7.4 不含 Ca 與 Mg 的 HBSS 配製之 0.1%胰蛋白酶，在 37°C 溫浴萃取分離細胞 8 分鐘。丟棄第一回的細胞懸浮液，之後萃取懸浮液則留下並加入冷的含 Ca 與 Mg 的 HBSS 配製之胰蛋白酶抑制劑溶液 (pH7.4) 並離心，連續進行 5~6 個週期直到所有的心肌細胞分離出並做過濾以去除雜質。

分離的細胞以 MEM、FBS、B12、penicillin 配製之細胞培養液再懸浮，在 37°C 下靜置 90 分鐘 (preplating) 以去除減少纖維母細胞。其後取出上清液離心。再以細胞培養液調配成密度為 0.6×10^6 細胞濃度。最後取 1ml 植載在事先以 laminin 沾黏的蓋玻片上，放入 37°C，5% CO₂ 溫箱培養 6-8 天。





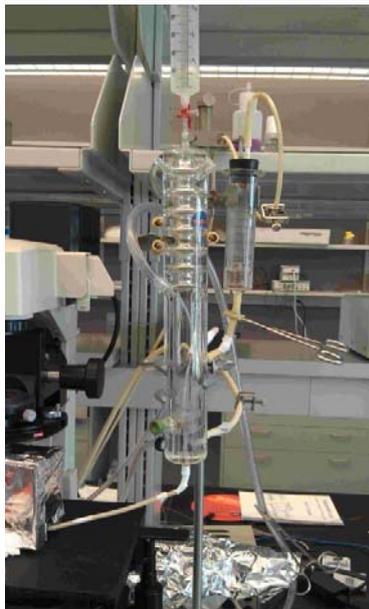
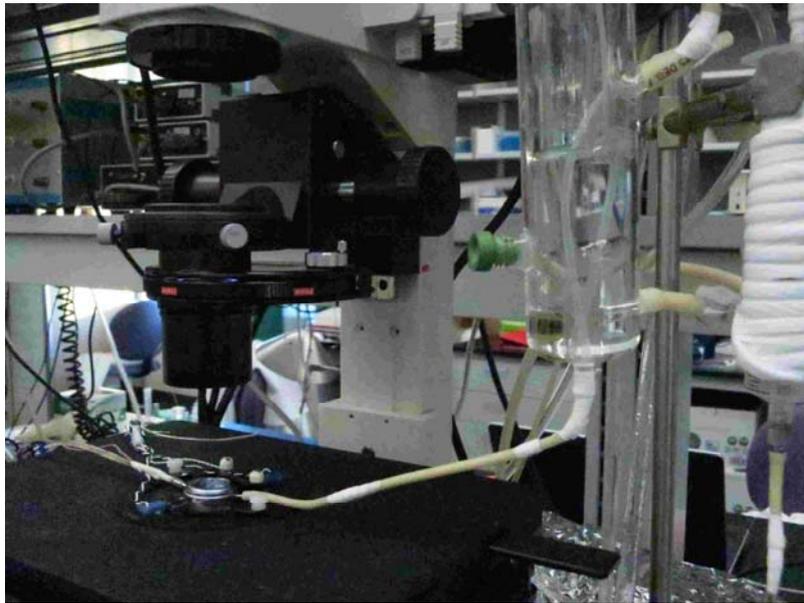
5. 缺氧箱模型 Hypoxic Box

依照實驗設定流程，心肌細胞的培養基置換為平衡鹽溶液讓心肌細胞在 37°C 下培養 30 分鐘。然後將細胞置於缺氧箱（37°C，1%O₂，20% CO₂ 和 79%N₂）並立即將平衡鹽溶液置換為事先已於缺氧箱平衡之缺血平衡鹽溶液 (PO₂ 3–5 Torr，PCO₂ 144 Torr，pH6.8)。於 37°C 缺氧箱中模擬細胞缺氧生理狀態。於設定之時間 (30，60 或 90 分鐘) 後取出置換為標準平衡鹽溶液。在 37°C 下，21%O₂ 和 5% CO₂ 培養 30 分鐘。其後將細胞溶解做分子蛋白分析。

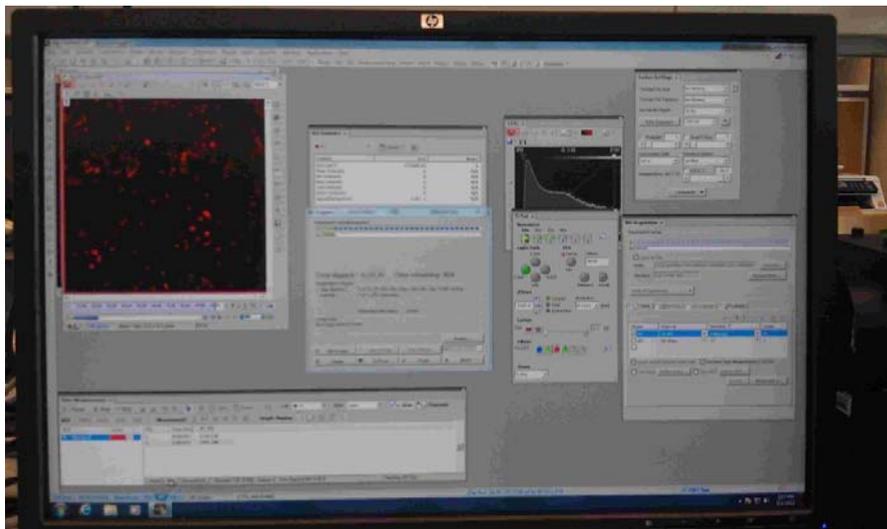
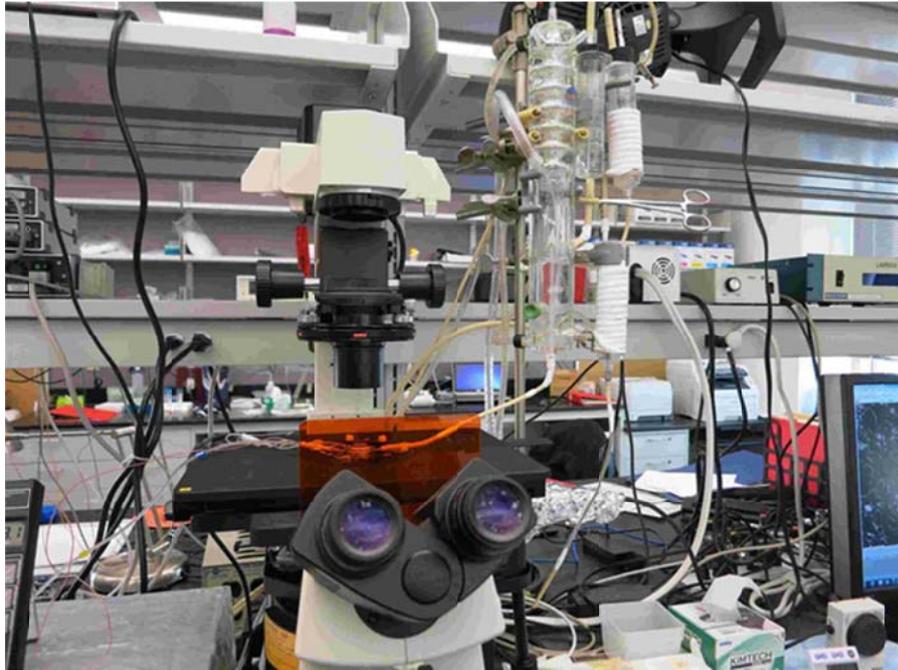


6. 灌流系統模型 Perfusion system

蓋玻片上同步收縮之心肌細胞放置於 1.2 毫升的灌流腔(Sykes-Moore perfusion chamber)。腔室部位接管以不銹鋼製，腔室用 Kynar 墊片密封，以減少氧氣洩漏。使用 Langendorff 將常氧壓溶液以 0.25 毫升/分鐘灌注率泵送 (HBSS with 149 Torr PO_2 , 40 Torr PCO_2 , pH 7.4, 4.0 mM [K], and 5.6 mM glucose)。模擬缺血 HBSS 中則含 20mM 2-脫氧葡萄糖和 8.0 mM 的[K]。吹以 80% N_2 和 20% CO_2 的混合氣體，產生一個 3-5 Torr PO_2 , 144 Torr PCO_2 ，最終 pH 為 6.8 的缺氧液。依照流程設計先後給予缺氧液與復氧液灌流。



7. 倒相式螢光顯微鏡 Inverted phase/epifluorescent microscopy
倒相式螢光顯微鏡用做為細胞攝影。以帶電耦合攝像機來監測隨著時間，在同一視野下細胞收縮和細胞膜變化。螢光影像以冷卻的 Cool - SNAP-E 相機擷取影像。螢光強度隨著時間的變化以 MetaMorph 軟件進行定量。細胞存活可以螢光 exclusion dye 來測定。配合灌流系統可記錄缺血灌流後之心肌收縮變化。



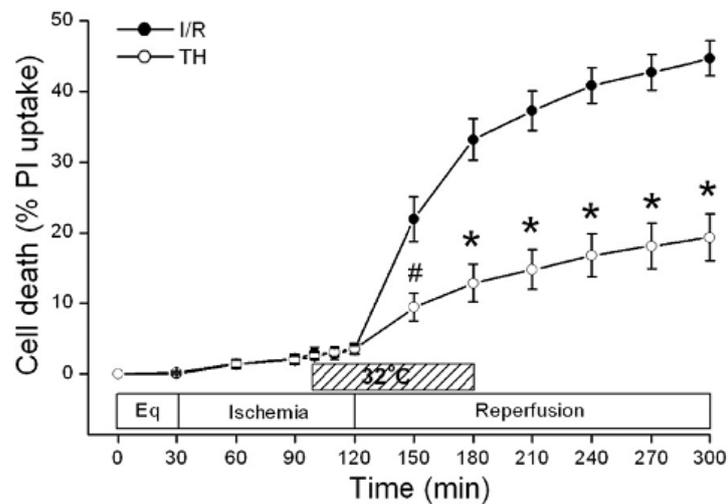
8. 降溫對於心肌保護作用

動物模型在心臟停止 5 分鐘，胸部按壓前 3 分鐘開始先行降溫至目標溫度 32°C，並持續維持 32°C 1 小時。降溫方法在小鼠上容易達成。以冰水充填之手術套置於胸腹上，監測中心體溫至預設溫度隨時移除或加上。

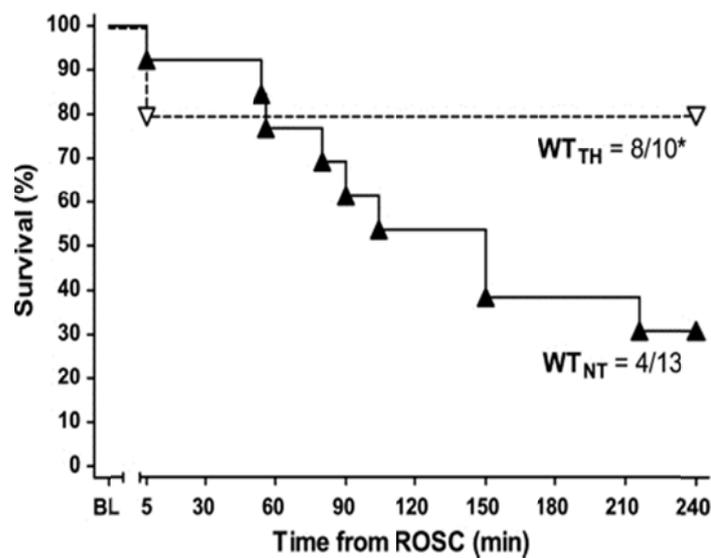
細胞模型則在缺血期後 20 分鐘將細胞盤移入 32°C 的缺氧培養箱，而再灌流期時則移至 32°C 的復氧培養箱持續 1 小時。

動物與細胞模型均證實於缺血期降溫對心肌細胞有保護作用。

Shao and Sharp et al., AJP 2010; H2164-H2173

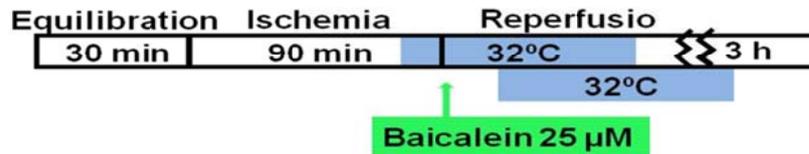


Beiser and Wojcik et al., AJP 2010; H1761-H1768

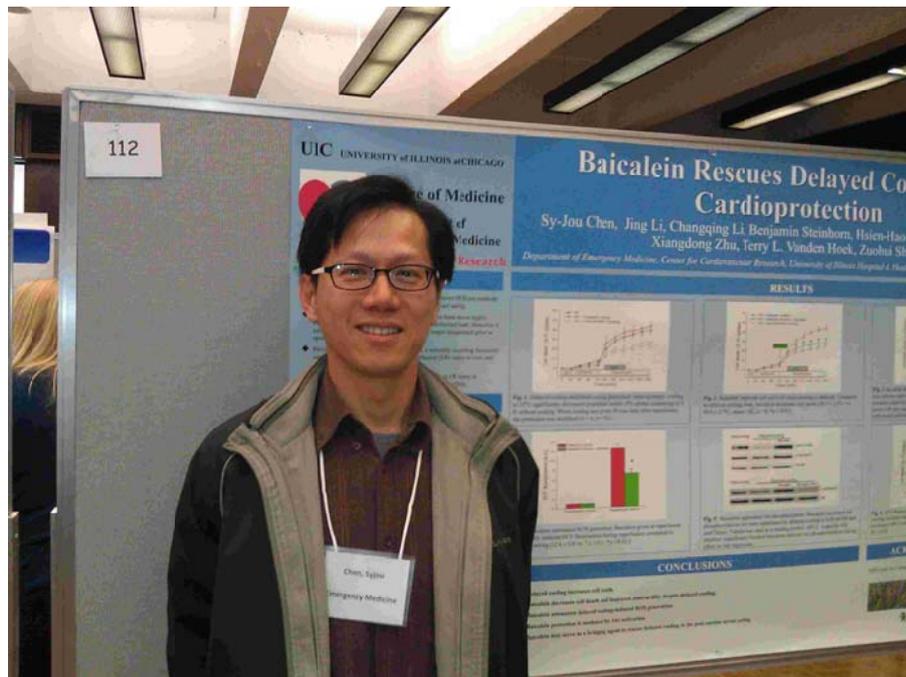


9. Baicalein 於延遲降溫時之心肌保護作用
運用已建立之細胞缺血再灌流模型，於再灌流階段加入 Baicalein，評估其對於心肌細胞之影響。

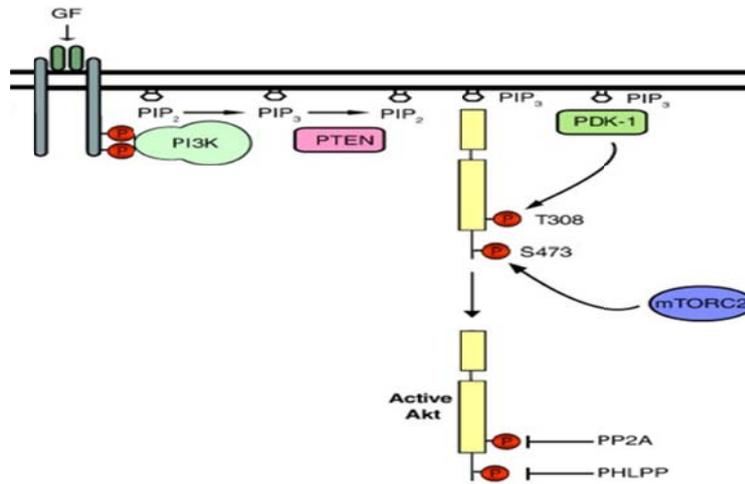
Mouse neonatal cardiomyocytes



初步結果顯示 Baicalein 在延遲降溫時於在灌流階段給予，可減少細胞死亡與增加心肌細胞的收縮力；減緩因延遲降溫導致之 ROS 產生。另對於 Akt 有增強磷酸化現象。



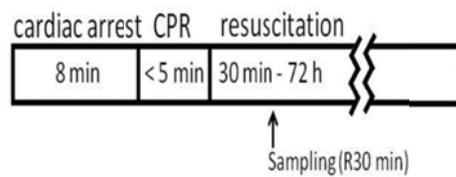
10. PTEN 阻斷劑心肌保護作用機制



Adapted from Hers I, et Al., Cellular Signaling, 2011

PTEN 抑制劑抑制 PTEN 還原 PIP₃ 為 PIP₂。PIP₃ 可透過 PDK1 磷酸化 AKT T308。因此活化 AKT 路徑，此為細胞存活路徑之一。於動物實驗，30 分鐘前腹膜腔注射 10ug/g 的 VO-OHpic 進行心臟驟停模式實驗。實驗結果顯示 VO 組 72 小時存活率較生理食鹽水組有統計差異地升高。相關生理參數在 VO 組亦較佳。西方墨點法顯現 AKT 有顯著增強磷酸化現象。對於 ATP 亦有顯著降低。

運用細胞 Stunning 模式，亦顯示 VO 改善心肌細胞收縮，增加 P-MLC，P-PLB 等訊號。



三、心得建議

1. 在伊利諾大學芝加哥分校心臟血管研究中心接受心臟驟停轉譯醫學研究訓練一年，學習心臟驟停模型研究。實驗室成員均為資深研究員或學者，在急診室主任 Dr Vanden Hoek 的領導下，成員均展現充分合作與團隊默契，因此常能以高效率完成多項實驗。專職研究員，能夠確保對於系統穩定性，實驗一致性地掌握，故能得到較可靠地數據，藉以決定實驗方向與推判可行性。
2. 美國近年面臨經濟消弱，政府稅收減少，研究預算大幅刪減，造成科研經費縮減，許多實驗室因申請不到經費而結束運作。而現有實驗室欲申請到經費，多為整合型，跨部門並且以有臨床價值為優先。故現在實驗室單打獨鬥的時代已逐漸過去，取而代之是跨單位分工與合作。藉由資源共享與分擔，產生的結果實則更有廣度與深度。我們的研究亦須朝此趨勢，創造最大價值。
3. 美國對於研究型醫師給予減少調整臨床業務量，此類醫師可以在研究上多下功夫，因為有研究經費的支持，故薪水仍能維持一定水平。此措施在鼓勵研究，對醫師個人或醫院都有好處。但誠如前述，研究經費取得日趨困難，競爭相當激烈。
4. 美國高中生，醫學生暑期會申請到實驗室見習或學習，此資歷對於將來申請醫學院或醫學生未來申請醫院至為重要。因此許多學生甚早即接觸實驗室，了解如何進行某項實驗或學習基本技術，這些的學習對於未來選擇攻讀博士或對於個人研究能力均有相當的幫助。我們的學生沒有此壓力，也較慢接觸基礎研究訓練，明顯較國際缺乏競爭力。學校應有計畫措施讓我們的學生早期進入實驗室，學習基本技能，以增加未來競爭力，並培養下一代優秀研究人員。
5. 急診臨床醫師在美國從事基礎研究亦相當罕見。在 UIC 的急診部門亦只有急診主任，其過去為芝加哥大學的急診主任，帶領他的研究團隊從事轉譯醫學心臟驟停的研究。可想見其忙碌臨床業務之下仍須固定維持每週實驗室的進度會議實屬不易。其基礎之建立在於個人興趣、天賦、努力與早期加入優秀的研究團隊。個人認為後者更是決定性因素。有好的研究領導與團隊，可作為學習仿效的標竿。
6. 在 UIC 的學習當中，亦有機會參加該醫學院年度研究壁報的展出比賽。這競賽區分醫學生，研究生，教職員，研究員不同等級。評審委員為自願且至少為助理教授以上。所有參賽人員須於時限內對評審委員說明你的研究內容並回答三個委員提問。對於不曾有基礎訓練背景的我，是一大挑戰。不過在實驗室老師的指導下總算順利完成。雖然未獲獎，但是能在美國有此經歷亦是一大收穫。

7. 參訪 UIC 急診室了解其運作。急診規模不大，急救室僅一床，觀察床 15 床。以護理站為中心如同加護病房之設計結構。家屬或待診病人均隔離在外，故診間顯得格外清靜。除主治醫師外有住院醫師，實習醫師，醫師助理，護士，護佐。急診室感覺醫療人員多於病患。病患看診前會於檢傷處評估，輕症病患由醫師助理評估後會在待診區等待檢查報告或結果。最後由醫師評估解釋病情。發燒病患多半先在外頭等待，也不給藥，不進診間。我們的急診室病人多半要求打點滴，快速退燒。此習慣在健保環境，醫療可近性及人民的錯誤觀念下一時亦難更動。換做另一角度看，台灣民眾是幸福的。享有便利與高可近性的醫療資源。而我們醫療人員在執行醫療業務時，其實該減少資源浪費與不必要耗用。畢竟健保架構下，餅是固定的，不必要的浪費只是稀釋了醫療的單位價值。急診室的診間系統有許多的符號暗示各項檢查完成與否，可提供醫療人員快速參考。病例利用許多的勾選系統，減少書寫耗時。主治醫師有屬於自己的書寫系統，所以每份病歷均須檢視書寫動向與處置。另外急診室備有輕巧的超音波，方便推送轉運。看片區利用兩個約 37 寸高解析螢幕可同時呈現兩張 X 光作為相互比對，非常清晰方便，值得學習。
8. 台灣在國際上之能見度越來越低。許多美國人根本不知道台灣。我們也缺少屬於自己特色或強勢的產品見於美國市場。倒是南韓的商品與汽車工業在美國赤剎風雲。台灣需拓展國際觀，加強觀光與國際交流，在大中國環扣下亦須發展特色產品，避免被邊緣化。我們的下一代亦須積極培養具國際競爭力，英語能力與世界觀與世界接軌。