

出國報告(出國類別：博士班進修)

利用液相層析質譜儀分析人體組織
蛋白在缺氧環境下之轉錄後修飾變
化，及經由酵母菌模型的建立探討人
體組蛋白去甲基化酶之作用

服務機關：國防醫學院三軍總醫院

姓名職稱：徐國峯 醫師

派赴國家：英國

出國時間：101年7月9號 至 101年7月8號

報告日期：105年11月3號

摘要

表觀遺傳學是近十年來蓬勃發展的學科，有別於過去以去氧核糖核酸(DNA)，基因主導的遺傳學，在不改變 DNA 序列下，經由修飾作用調控基因組的功能變化。在遺傳工程中，組織蛋白修飾與基因的轉譯、蛋白質的轉錄有密切相關。組織蛋白修飾參與了一般普遍的細胞反應，例如：發炎免疫反應、細胞生長分化、細胞老化...等，在疾病及腫瘤的形成上有重要的影響。組織蛋白修飾酶主要功能為藉由調控組織蛋白修飾之動態性變化，進而影響染色質結構的改變，以因應細胞各生長階段的發展變化。在缺氧環境下，正常細胞與腫瘤細胞其組織蛋白修飾的表現差異，乃此次研究的主題與方向。利用優化液相質譜方法分析組織蛋白修飾在細胞中的表現形態，並偵測在不同程度的缺氧環境下，觀察並研究組織蛋白修飾所產生的變化，以期了解兩者的之關係。另，藉由酵母菌模型探討組織蛋白修飾酶中的去甲基化酶作用，在癌症病程發展與治療藥物研發的相關影響。

關鍵詞：人體組織蛋白、缺氧、基因

目次

封面	1
摘要	2
目次	3
本文	4-9
目的	4
過程	6
心得與建議	8

本文

目的

由於腫瘤的多重發生原因、多樣性面貌與複雜的病理機轉，長期以來一直是臨床醫師與基礎研究學者急欲了解與探究的疾病之一。然目前尚未有單一有效的治療方式，因而引發嘗試從不同的方法切入並研究，以盼對腫瘤細胞的面貌有進一步的了解和認識。

在基因調控上，組織蛋白的重要性已廣為人知，而腫瘤的發生實與基因異常變化，息息相關。人體基因組已陸續解開，其研究的深度也從較單純的基因序列分析，到今日整個染色體調控機轉的探索；而其中，轉錄後的修飾過程更是近年廣受研究與了解的議題及領域。從分子生物化學的角度探討表觀遺傳學，乃是此領域的主軸，而透過蛋白質結構的分析、修飾酶的動力學影響，以及觀察不同化學修飾型態發生的變化差異，進一步了解表觀遺傳因素與人體正常細胞之生長、疾病發展與腫瘤形成之間的交互關係。

組織蛋白上的修飾作用，已被大量研究證實和細胞發炎免疫、胚胎生長發育，以及癌症疾病發生有密切的關聯。而“缺氧狀態”一直是腫瘤形成與治療的重要影響關鍵，其涉及複雜的生理機制，並與不同細胞所呈現的型態特性差異有關。

“缺氧”與“組織蛋白上的修飾”有著交互的影響，若能進一步了解此一調控機轉，將有助於癌症疾病的診斷與治療。

“液相層析質譜儀”是近年來研究蛋白質組學非常重要的工具，其具有高解析、敏

感性和專一性...等特質，使蛋白質/酶的作用得以被進一步地分析與了解。學習分子生物化學之相關知識與技術，有助於研究組織蛋白修飾在“缺氧”狀態下，對基因調控的影響及其後續的反應變化。

“酶”是體內生物化學反應一切的基礎，而 DNA 和組織蛋白受到相關酶的調控以適應細胞周圍的環境。了解並研究組織蛋白修飾酶，在修飾過程中的機轉原理，有助於癌症疾病的診斷與抗癌藥物的研發。

酵母菌模式是使近代基因學與表觀遺傳學研究突飛猛進的利器，藉由酵母菌模擬人體細胞內酶的調控，以了解及探討組織蛋白變化與癌症疾病發生的相關性，進而尋找阻斷異常變化之方式或藥物介入。建立一擬真穩定的生物細胞體內組織蛋白修飾酶模式，並藉此了解其與調控細胞生長的蛋白酶間之相互作用，用以癌症疾病治療之機轉研究，將有助於“組織蛋白修飾酶抑制劑”之研發，在未來應用於癌症治療上之可能性。

過程

第一年學習項目與實驗：

基本生物化學實驗技術，修習分子生物化學相關課程，專研液相層析質譜儀分析於分子生物領域的應用。廣讀文獻以增強相關研究之知識，並釐清個人欲鑽研探討的方向及內容。學習質譜儀儀器操作方式，培養精準實驗技術與正確數據判讀之能力，以達從事研究時所必備的精確性與可重複性。

規劃欲研究的範圍與訂定研究相關的時程表。

第二年學習項目與實驗：

第二年初通過博士生資格考後，開始挹注更多時間於實驗上。同時，利用研究空檔，參與校際間與國際性的研討會，藉以學習並更新相關的研究知識和技術。

培養人體正常細胞株與癌細胞株，並採用不同方式萃取與純化組織蛋白，積極尋求一最適宜可行的方法，施行於後續的實驗之中。

實驗與分析液相層析質譜儀對於人體組織蛋白的分離與其上修飾作用監測，經過多次反覆的實驗，始得較理想且快速的液相層析流動相梯度，並經實驗證實，液相層析質譜儀確實可應用於偵測及分析人體組織蛋白之修飾作用。利用已建立之液相層析質譜分析人體組織蛋白修飾的方法，以偵測在缺氧或擬缺氧狀況下（利用鐵螯合劑與其他化合物）所產生的變化。

第三年學習項目與實驗：

延續前液相層析質譜分析於人體組織蛋白修飾方法之應用，並配合西方墨點法求得更完整在缺氧或擬缺氧狀況下，組織蛋白修飾變化的深入資訊，進而了解在細胞內所引發的變化。

嘗試利用酵母菌為模型來探討人體雙氧酶催化組織蛋白去甲基化作用，與細胞週期有關之蛋白酶在細胞內相互作用之機轉。利用此模型研究人體雙氧酶之結構單位的角色與作用，並研究建立一個細胞體內測試人體雙氧酶抑制劑之模型，以尋得較理想藥物研發測試之方法。

於第三年結束時取得博士候選人資格。

第四年學習項目：

嘗試純化酵母菌的組織蛋白去甲基酶，並測定其活性功能；彙整與整理實驗結果，和指導教授討論此研究的優缺點，並做一全面性的回顧以利論文之撰寫。實驗數據的整理判讀與學習論文架構建立和撰寫，為第四年的重心。

心得與建議

此次英國進修博士的經歷做作以下心得報告和建議：

1. 出國進修前英語能力的加強—

英語的重要性自不在話下，然而在求學或行醫過程中，該語言的使用多侷限於書寫上，故缺乏良好聽與說的能力，常是國內學子普遍存在的問題。除須努力增進英語能力以達到申請學校之語言成績要求外，學習流利地使用於日常溝通與意見表達，並多了解所去國家以及地區之民情風俗，亦是相當重要。

2. 參與國際會議—

國內相關醫學或研究會議眾多，各學會亦會定期舉辦學術研討會，然礙於時間與地域上的侷限與困難，國際會議的參與度相對是偏少的。如何妥善安排時間以增加參與國際會議之機會與經驗，並藉此汲取新知及拓展視野，是預備出國進修前應正視的議題。

3. 基礎研究的認知—

醫學博士的進修，主要在於基礎的研究上，與臨床實務是相去甚遠的。如何培養並習得關於相關基礎科目的背景知識，與從事基礎研究時所需具備的基本能力和技術，是有意出國進修博士者應認真看待，敝人認為此可大幅降低對於基礎研究的陌生感。

4. 研究時程的安排—

由於修業年限的規定，使得派遣出國進修的人員，大多承受著較大的時間壓力。

有鑒於此，與指導教授間良好、正確且有效率的溝通與互動，相形之下顯得格外重要。但因民情風俗的差異、語言的隔閡，再加上研究期間種種不確定的實驗因素，皆是造成無法於規定年限內完成學業的主因。因此，如何與指導教授商討可能後續的應對措施，亦是進修人員所需考量和解決的。

5. 研究的嚴謹度一

經由此次的英國進修經驗，深刻體會到國外研究學者對於實驗態度之嚴謹認真、剖析問題之精闢準確，及切入角度之廣泛開放。其訓練博士生不以發表成果為目的，而是重視於實驗過程中，正確的態度培養、扎實的技術訓練，以及發現問題與尋求解決的能力。

6. 不同實驗室間的合作一

研究中涵蓋不同類型之實驗，與其他相關實驗室建立良好的合作關係亦是研究過程中的重要部分。實驗室同仁間的默契和關係，是需要相當時間與心力去培養建立的，而彼此之間良善的溝通協調和討論，對於研究的進行甚為重要。且此一合作經驗，亦可開闊研究的視野和激盪出不同的觀點火花。

致謝

感謝醫院長官及科內師長的協助與支持，使本人有機會赴英國進修博士，並對於國防部軍醫局的經費補助，表達深深的謝意。