

出國報告（出國類別：實習）

赴德國 Justus-Liebig 大學研習高階質譜  
分析技術及赴荷蘭參加 2012 歐洲消化  
系醫學年會

服務機關：核能研究所

姓名職稱：程俊嘉 助理工程師

派赴國家：德國、荷蘭

出國期間：101 年 9 月 27 日~101 年 10 月 26 日

報告日期：101 年 11 月 20 日



## 摘要

本次公差有 2 個目的，第一為赴德國 Justus-Liebig 大學無機與分析化學研究所學習高階質譜分析技術，第二為赴荷蘭參加 2012 歐洲消化系醫學年會並發表 2 篇壁報論文。本人於德國 Justus-Liebig 大學總共進行 3 週之訓練課程 (2012/9/28~2012/10/18)，學習內容主要為質譜影像分析技術及其分子鑑定技術，包括組織樣品製備、質譜基質之噴灑、質譜儀器之操作、及質譜影像之分析。其中與 Spengler 教授討論奈米金當作質譜基質之可行性與應用，認為其具有腫瘤聚集之特性，或許可用以進行體內(in vivo)質譜造影之基質，Spengler 教授也建議雙方可進行學術交流，共同合作開發質譜相關技術並搜尋癌症相關生物標記。另本人隨後參加 2012 於荷蘭阿姆斯特丹 RAI 會議中心舉行之歐洲消化系醫學年會，此會議為期 5 天(自 2012/10/20~10/24)，期間本人與台北振興醫院胃腸科何愛生醫師共同發表 2 篇壁報論文，並參與大會關於胃癌及大腸癌蛋白生物標記之演講課程，獲益良多，有助於未來相關研究之進展。本次所發表之論文，其一為利用蛋白質體技術探討藥毒性肝纖維化之形成機制，其二為搜尋並利用胃癌生物標記 GRP78 以增進胃癌之診斷及治療，其中胃癌之研究獲得大會最佳論文殊榮，甚感榮譽。本次所學習或吸收之最新知識，相信可增進臨床或基礎學術研究，以朝轉譯醫學或個人化診療來增進診斷或治療技術，嘉惠病患福祉。

# 目 次

## 摘 要

(頁碼)

一、目 的 . . . . .	1
二、過 程 . . . . .	2
三、心 得 . . . . .	4
四、建 議 事 項 . . . . .	19

# 一、目的

配合中央計畫「分子標的核醫藥物之研製與應用」計畫，赴德國吉森 Justus-Liebig 大學無機與分析化學研究所學習高階質譜分析，學習高階質譜影像分析技術以搜尋國人好發癌症之組織蛋白生物標記，及利用此技術追蹤藥物於生物體內之代謝分佈。搜尋可靠性癌症蛋白生物標記一直是發展臨床診斷試劑或開發治療藥劑之重要環節，而追蹤藥物注射後之生物分佈亦可了解藥物專一性與有效性，隨者質譜技術之精進發展，可用以鑑定化合物之準確分子量及判斷藥物合成之結構是否正確，另亦可用以搜尋疾病蛋白生物標記，並鑑定具差異性之蛋白質或小分子化合物，以影像方式呈現，分析藥物或生物標記於疾病組織中之分佈，以利後續設計成專一性診斷試劑或發展治療藥物。另此次赴德國 Spengler 教授實驗室實習外，也順道參加歐洲消化系醫學會，透過在歐洲消化醫學會議中發表 2 篇研究論文，目的為透過參加歐洲消化醫學會議吸收國外最新臨床與基礎醫學進展，並發表論文與國外學者進行學術討論與進行知識交流，期望能吸取目前最新之研究技術與知識，同時展現本所於消化醫學研究領域之成果與進展。

## 二、過程

本次實習行程如下：

月	日	星期	地點	工作紀要
9	27	四	德國吉森	去程：桃園機場直飛德國法蘭克福，再轉火車、公車至吉森 Justus-Liebig 大學。
	28	五	德國吉森	1. 與 Justus-Liebig 大學 Spengler 教授見面，辦理相關報到手續。 2. 熟悉實驗室位置、工作人員及設備。 3. 安置行李及辦理住宿。
10	1	一	德國吉森	1. 進行質譜儀 Q-Exactive 之基本功能及應用了解，並以標準品 Substance P 進行偵測分析，隨後挑選欲鑑定之質譜訊號進行二次碎裂，以利後續軟體鑑定分析。 2. 完成質譜分析後，以軟體 METLIN 進行分析物鑑定，可精確鑑定胺基酸序列。
	2	二	德國吉森	1. 進行 HPLC/Q-Exactive 之花青素 Proanthocyanidins 之成份分析，欲了解當地花朵植物中花青素含量，以便釐清其萃取物之抗氧化效果。 2. 分析過程中先以標準品校正，再分析待測物，所使用之 HPLC 管柱為 C18 管柱。
	3	三	德國吉森	1. 進行實驗室安全訓練，因質譜實驗室具有高能雷射，分成 1~4 等級，配合不同雷射操作，應選用適合之防護眼鏡，並正確遵循操作步驟，以防止危險意外產生。
	4	四	德國吉森	1. 進行質譜影像之基礎認識與應用，介紹並了解相關質譜儀器功能與操作。 2. 進行基質 DHB 之配製，及進行基質噴灑器 Sprayer 之組裝，並以 30mg/ml 進行噴灑器之流速測試。
	5	五	德國吉森	1. 進行小鼠腦切片，先將小鼠犧牲後，取其完整腦部，並進行組織切片，組織需新鮮取得，切片後可放置-80 度冰箱保存。 2. 之後從冰箱拿取之組織切片，需先放置於乾燥箱中自然乾燥，約 10~15 分鐘後可進行基質噴灑，組織不可置於 heater 上方快速乾燥，將破壞組織蛋白之完整性。
	8	一	德國吉森	1. 參加實驗室研討會，講員為 Dr. Mario Kompouer，題目為 Ion morbidity in AP MALDI，會後並與 Spengler 教授討論相關質譜應用問題，Spengler 教授建議我們雙方可以進行合作，利用

			質譜影像技術進行小分子藥物之追蹤。
9	二	德國吉森	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 進行小鼠腦切片之基質噴灑，流速為 10 <math>\mu</math>l/ml，噴灑 100 <math>\mu</math>l，共 10 分鐘，實驗前先進行組織完整影像掃描，完成噴灑後以顯微鏡觀測其基質結晶狀態，需無大顆粒物，結晶約 10~20 <math>\mu</math>m。</li> <li>2. 進行質譜影像儀器 Source 之組裝，並以標準品進行測試。</li> </ol>
10	三	德國吉森	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 進行質譜 Q-Exactive 分析，分析分子量為 200~1000Da，解析度設定為 50 <math>\mu</math>m，圈選分析樣品大小。</li> <li>2. 完成質譜分析後，進行儀器 Source 清理及保養。</li> </ol>
11	四	德國吉森	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 進行質譜影像軟體 Mirion 之操作，以 50 Da 為之範圍先進行質譜訊號之分析，完成影像之建構，並根據質譜影像圈選有差異之分子，再將差異分子質譜訊號與光學組織影像進行重疊，辦可清楚了解差異分子於組織中之表現位置及強度。</li> </ol>
12	五	德國吉森	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 閱讀質譜噴灑技術、Q-Exactive 質譜儀、及質譜影像之相關文獻介紹與應用。</li> </ol>
15	一	德國吉森	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 學習組織胰蛋白碎解，以同樣組織塊進行蛋白萃取及胰蛋白碎解。</li> <li>2. 組織完成胰蛋白碎解後進行基質噴灑，並以顯微鏡觀看基質結晶情況。</li> </ol>
16	二	德國吉森	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 以 Q-exactive 質譜進行組織分析，調整儀器參數，分析 100~1000Da 之胜肽。</li> <li>2. 與 Spengler 教授討論組織蛋白鑑定實驗，以他的經驗，目前從組織直接鑑定之胜肽有限，主要因組織蛋白太複雜，難以二次碎裂，故目前還是以 HPLC 分離後，再利用準確分子量，或質譜二次碎裂以達到鑑定效果。</li> </ol>
17	三	德國吉森	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 以標準品進行胰蛋白碎解後，再利用質譜二次碎裂進行蛋白質身份鑑定。</li> </ol>
18	四	德國吉森	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 進行生物資訊比對軟體練習。</li> <li>2. 閱讀 Spengler 教授發表 MALDI-imaging 之論文，獲益良多。</li> <li>3. 收拾行李。</li> </ol>
19	五	荷蘭阿姆斯特丹	旅程：從德國吉森搭車至法蘭克福機場再轉機至荷蘭阿姆斯特丹。
20~24	六~三	荷蘭阿姆斯特丹	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 參與歐洲消化系醫學年會並發表 2 篇壁報論文。</li> <li>2. 與國內外胃腸科專家進行學術討論，吸收國外最新研究知識，分別於會場與台北振興醫院何愛生醫師及三軍總醫院黃天佑醫師共同討論癌症生物標記之最新發展。</li> </ol>
25、26	四、五	台北	返程：荷蘭阿姆斯特丹直飛台灣桃園機場

### 三、心得

Bernhard Spengler 教授現專職於分析化學，專長於質譜分析技術，目前為德國 Justus-Liebig 大學無機化學與分析化學所教授(圖一及圖二)，並擔任德國質譜協會副理事長與歐洲質譜雜誌 (European Journal of Mass Spectrometry)編輯。本人前往其實驗室實習，主要學習質譜影像分析與蛋白質鑑定技術以增進基礎研究能力，厚植本所於蛋白質或藥物分析之能力，有助本所未來藥物設計之研究發展。

此次的實習重點為質譜影像技術搜尋疾病蛋白生物標記，及分子或蛋白質身份鑑定技術，學習內容包括組織樣品製備、質譜基質之噴灑、質譜儀器之操作、質譜影像之分析、及小分子之身份鑑定。學習期間主要由 Dhaka 帶我進行相關質譜影像實驗；Arton 簡介質譜儀 LTQ/FTICR 並以標準品 Substance P 進行二次碎裂及小分子鑑定實驗，Dr. Hinz 介紹質譜雷射之安全操作方式及注意事項。

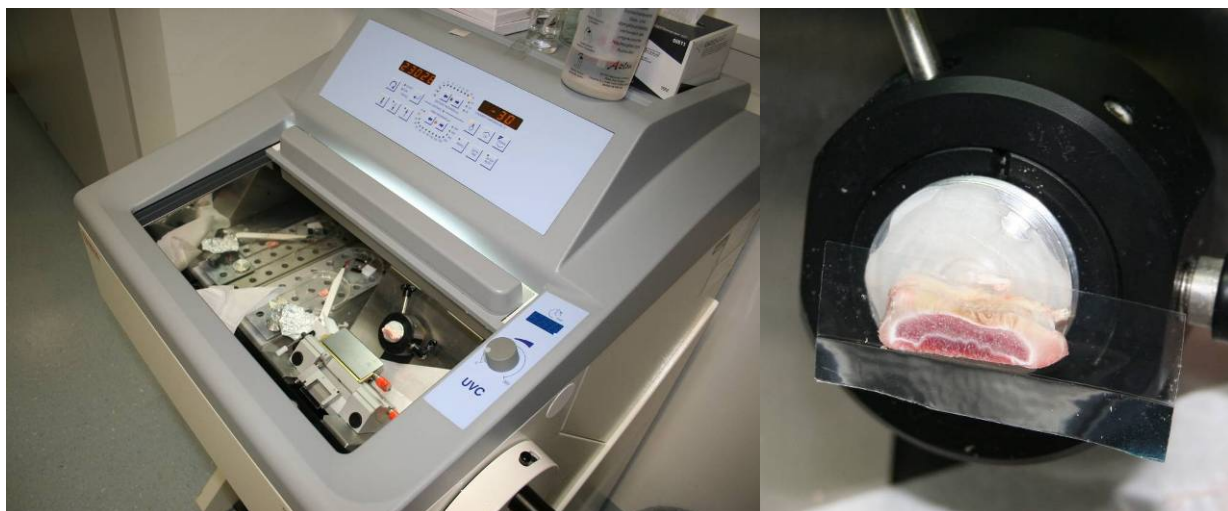


圖一：Spengler 教授實驗室，為 2 層樓建築物。





圖二：與 Spengler 教授合影留念。

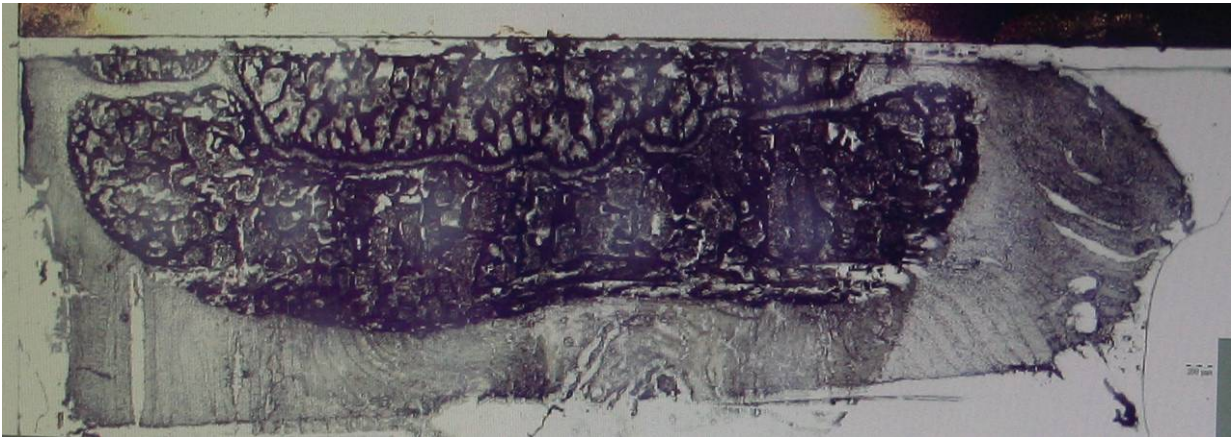


圖三：(左)冷凍組織切片機，其型號規格與核研所一致；(右)進行組織切片，厚度為  $20\mu\text{m}$ ，因組織包括骨頭及肌肉，故需以膠帶黏貼帶出完整組織切片，以利進行質譜影像分析。

(一)、實習過程如下：

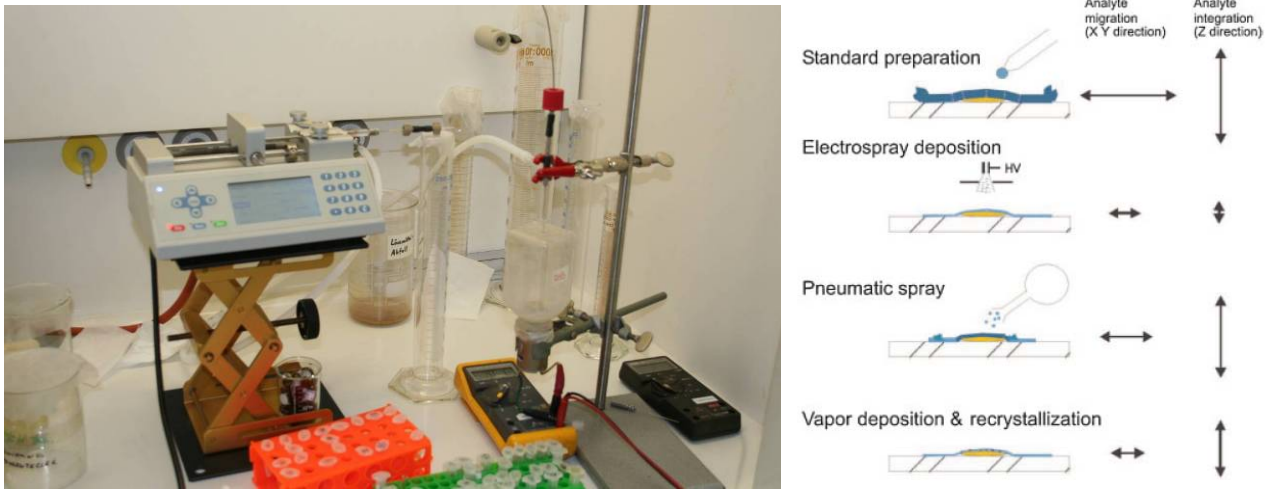
1. 組織樣品製備：首先，如果是直接從冰箱拿取之組織切片，需先放置於乾燥

箱中自然乾燥，約 10~15 分鐘後可進行基質噴灑，組織不可置於 heater 上方快速乾燥，保持組織蛋白之完整性。而如圖三所示，本次使用之樣品為豬脊髓切塊，其中包括骨頭及肌肉甚至脊髓液，故需以膠帶黏貼帶出完整組織切片，切片後以雙面膠黏貼於一般玻片上，再進行顯微鏡觀察，確認組織完整性，並於顯微鏡 100 倍狀態下擷取完整組織光學影像(圖四)。

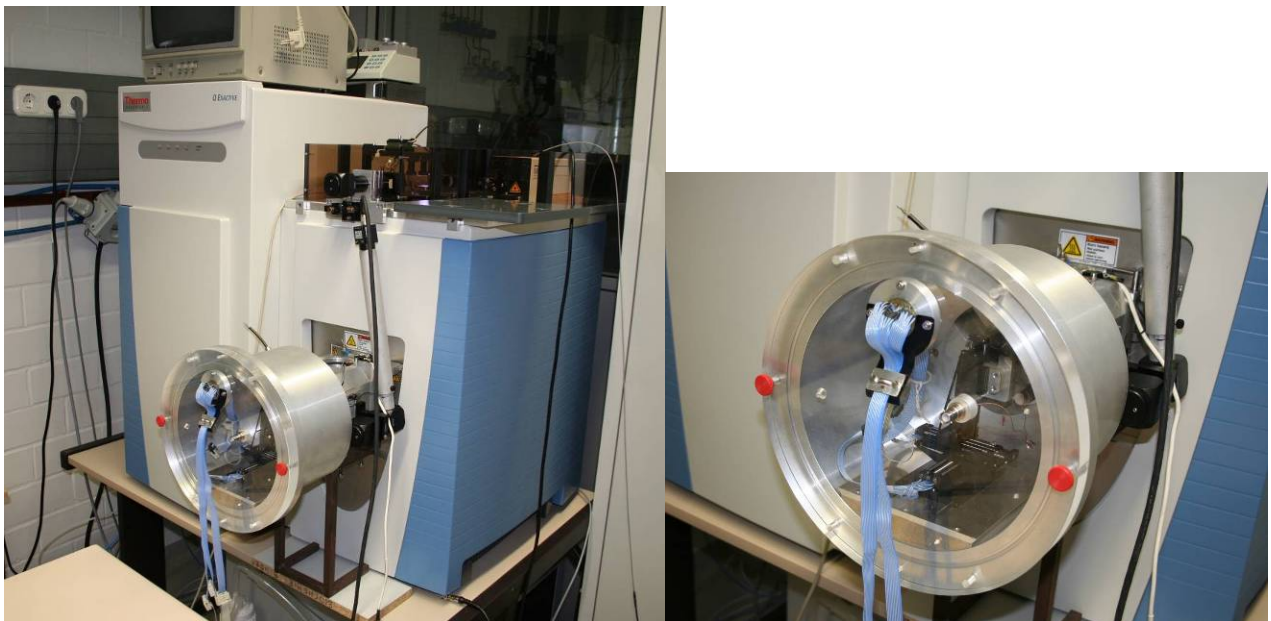


圖四：顯微鏡擷取完整組織光學影像。

2. 質譜基質之噴灑：先配製 DHB 溶液，濃度為 30mg/ml，溶於 50%ACN+0.1%TFA 之中，超音波震盪去除氣泡，以噴灑器(圖五)先進行流速測試，並確定實驗流程順暢。完成後將組織玻片裁剪成約 2x2cm 的圓狀型，黏貼於 Adaptor 上，通上電流進行電噴灑，以將 DHB 液體氣化並均勻覆蓋於組織上，共噴灑 150 $\mu$ l，流速 10 $\mu$ l/min，外面容器則可防止有毒基質散佈於空氣中。



圖五：基質噴灑器及與其他基質噴灑作用之比較，電噴灑具有較小之分析物(指組織蛋白或小分子)移動狀況及較小之基質覆蓋體積，將有利於質譜分析。(參考文獻：Rapid Commun. Mass Spectrom. 2010; 24: 355–364)



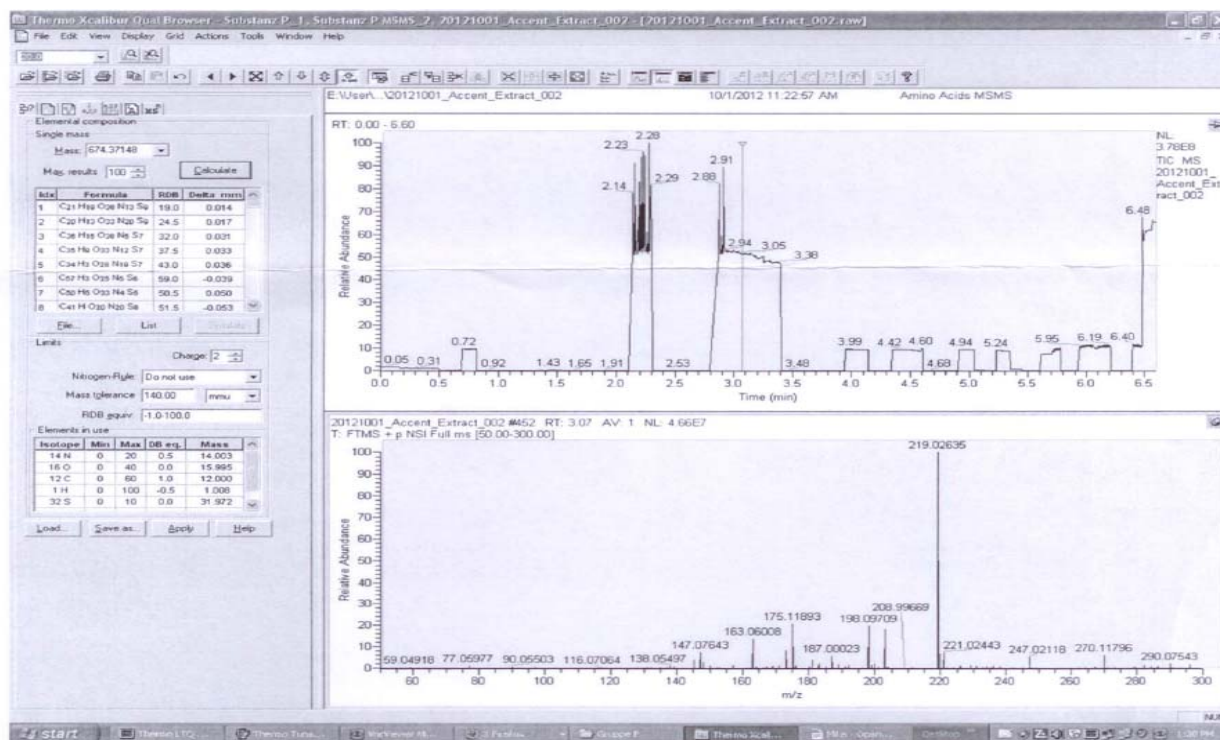
圖六：Q-Exactive 質譜儀及樣品 Source 裝置。

3. 質譜儀器之操作(圖六)：於質譜儀器操作以前，需先進行雷射安全操作課程，因質譜具有高能量雷射，操作不當則會傷及眼睛器官，故操作質譜(1)需於獨立空間操作；(2)雷射警示燈需開啓；(3)配戴雷射護目鏡(圖七)；(4)並避免直接觀看雷射光源。完成以上課程，便將 DHB 基質噴灑之組織樣

品置於 Source 裝置中(圖六右)，調整儀器參數，分析分子量為 200~1000Da，解析度設定為 10 $\mu$ m(軟體介面如圖八所示)，完成雷射轟擊及質譜訊號收集後，便利用質譜影像軟體 Mirion 進行差異性小分子或胜肽之分析。



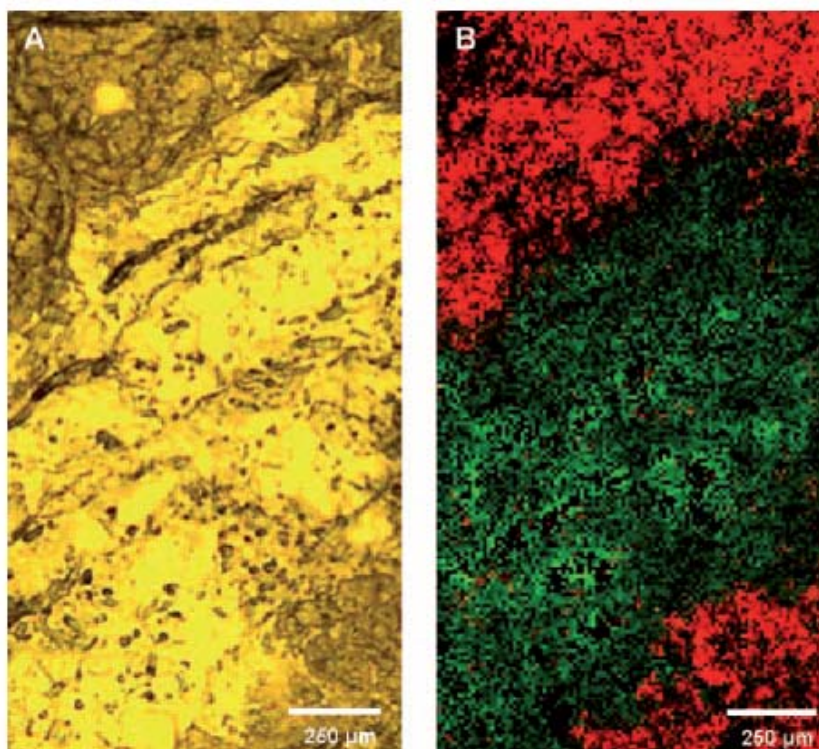
圖七：雷射護目鏡



圖八：質譜儀器分析介面

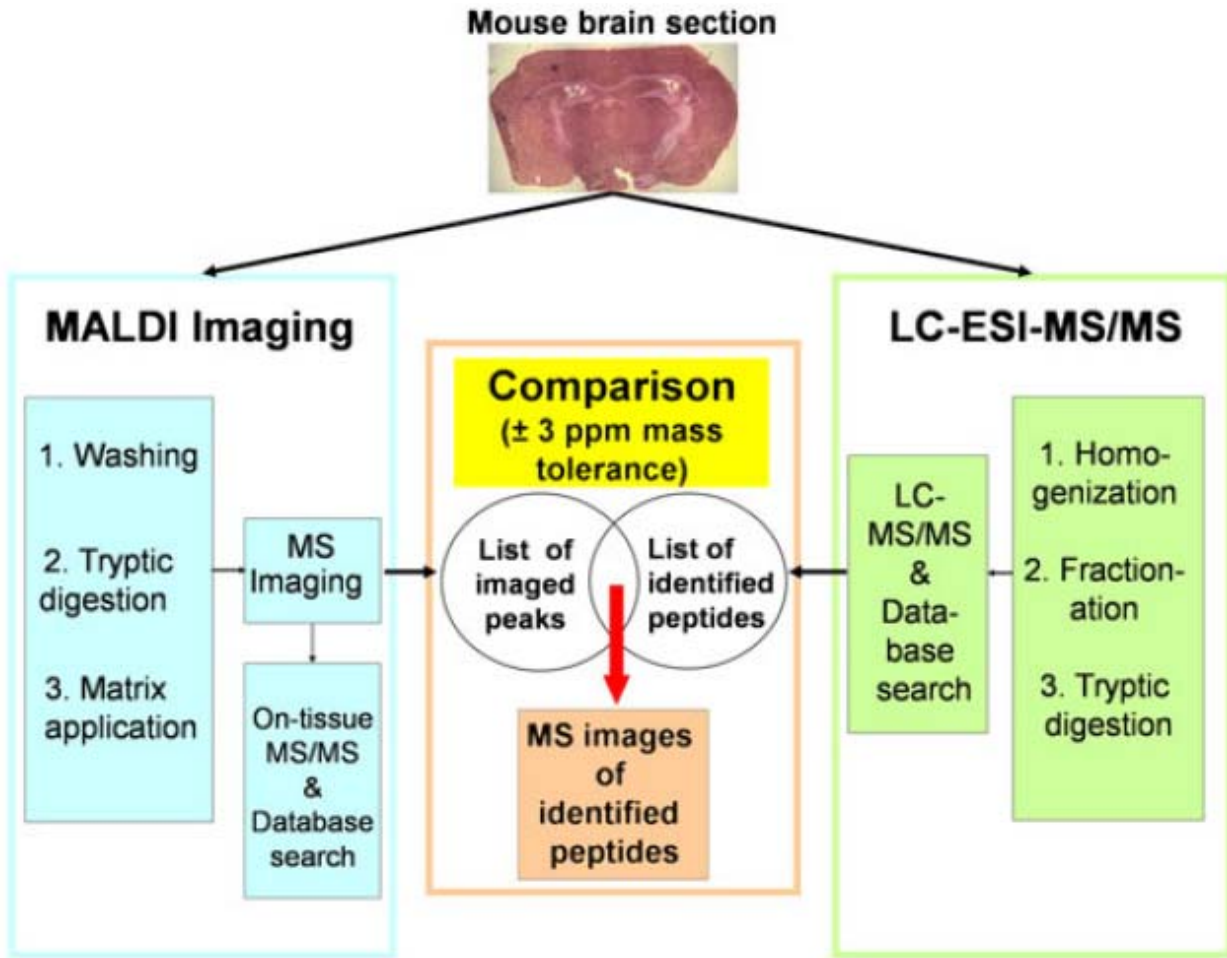
4. 質譜影像之分析(圖九)：利用質譜影像軟體 Mirion 進行分析，以 50 Da 為之範圍先進行質譜訊號之分析，完成影像之建構，並根據質譜影像圈選有差異之分子，再將差異分子質譜訊號與光學組織影像進行重疊，辦可清楚了解差異分子於組織中之表現位置

及強度。



圖九：質譜影像之分析，人類癌症組織(ductal carcinoma)之光學(左)及質譜影像，由質譜影像中可清楚了解癌細胞之分佈。正常組織(綠色， $m/z$  525.3998)及癌組織(紅色， $m/z$  896.6006，PC(34:1))(參考文獻：Angew. Chem. Int. Ed. 2010, 49, 3834–3838)

5. 小分子之身份鑑定：由質譜影像所獲得之具差異性小分子或胜肽則以圖十所示程序進行身份鑑定，因直接從組織上進行身份鑑定困難度較高，故需搭配 LC-ESI-MS/MS 進行組織蛋白分離及鑑定，再由分子量比對以了解鑑定出的物質與質譜影像上的生物標記是一樣的，故只能鑑定比對出局部的生物標記，但對於目前蛋白質體學上生物標記之搜尋，此技術可解決大部份高表現之生物標記之蛋白鑑定，也是目前公認之標準程序。此次以標準品 Substance P 進行練習，結果如圖十一所示，完成整個質譜 profiling 分析，可挑選其中質譜訊號如  $m/z$ 147.07643 進行二次質譜碎裂，在以軟體 METLIN 進行分析物鑑定(圖十二)，可精確鑑定胺基酸序列，如分子量 147.07643 經鑑定後為 Glutamine 胺基酸，如此完成圖十一整個質譜訊號之鑑定，便可解出蛋白質完成序列。

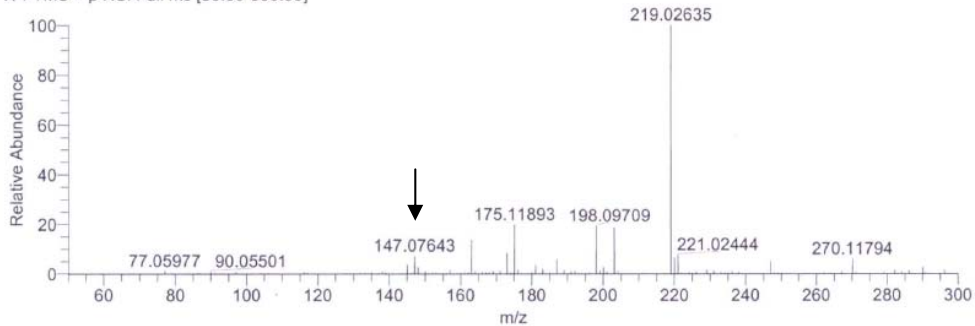


圖十：小分子或胜肽之身份鑑定流程，搭配LC-ESI-MS/MS進行組織蛋白分離及鑑定，再比對質譜影像獲得之生物標記分子量，完成胜肽鑑定研究。(參考文獻：Rapid Commun. Mass Spectrom. 2011, 25, 2475–2483)

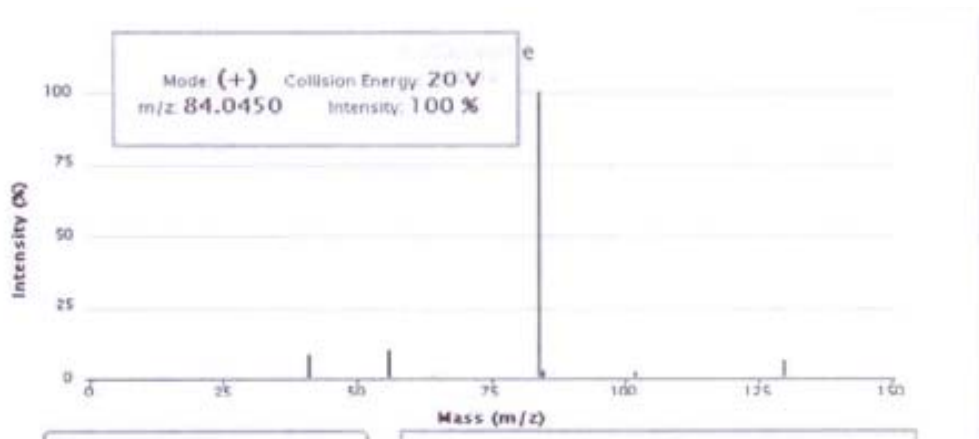
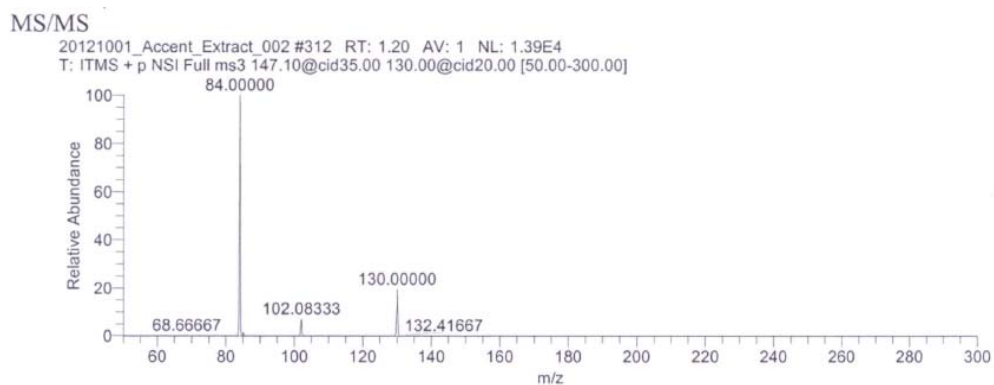
Sample grape extract

Full MS

20121001\_Accent\_Extract\_002 #472 RT: 3.17 AV: 1 NL: 4.67E7  
T: FTMS + p NSI Full ms [50.00-300.00]



圖十一：標準品 Substance P 之質譜 profiling 分析



18	[M+H] <sup>+</sup> m/z 147.0764 M 146.0691	0	L-Glutamine Formula: C5H10N2O3 CAS: 56-65-9	<a href="#">View</a>	<chem>NC(=O)CC[C@@H](N)C(=O)O</chem>
----	--	---	---	----------------------	--------------------------------------

圖十二：質譜訊號  $m/z$ 147.07643 進行二次質譜碎裂，得到分子量 130, 102, 84,及 68 之訊號，以軟體 METLIN 進行分析物鑑定，與 Glutamine 的二次碎裂訊號一致，故推測  $m/z$ 147.07643 為 Glutamine 胺基酸。

完成德國之實習，Spengler 教授頒給本人訓練認證書(圖十三)，在此也謝謝 Spengler 教授無私地教導質譜方面之相關知識，本人獲益良多，期望未來有助於核研所搜尋癌症相關生物標記。

21.10.2012

**Certificate**

Mr. Chun-Chia Cheng from Taiwan has participated in a training program

**"MALDI Mass Spectrometry Imaging of biological tissue"**

between September 27, 2012 and October 19, 2012 at the Institute of Inorganic and Analytical Chemistry. During that time he was trained in

- MS Imaging instrumentation,
- sample acquisition,
- preparation and sectioning of fresh frozen tissue,
- matrix application for high resolution MALDI imaging,
- tissue imaging with high spatial resolution on a high resolution orbital trapping mass spectrometer,
- data evaluation and
- image formation.

Chun-Chia Cheng has performed all steps successfully.



(Prof. Dr. Bernhard Spengler)

圖十三：完成整個質譜影像訓練課程，Dr. Spengler 頒給之結業證書。

另這次為期 6 天的研討會(圖十四及圖十五)，其主要學術演講發表集中於 10/22~10/24，分成相當多的研究主題，本人主要參加的講座包括肝臟疾病研究、最新 TNM 癌症組織分級法、大腸癌生物標記研究、癌症之標靶治療、及胃幽門螺旋桿菌引起之胃發炎或胃癌研究等課程，並於與會期間參研國外學者之壁報論文成果。





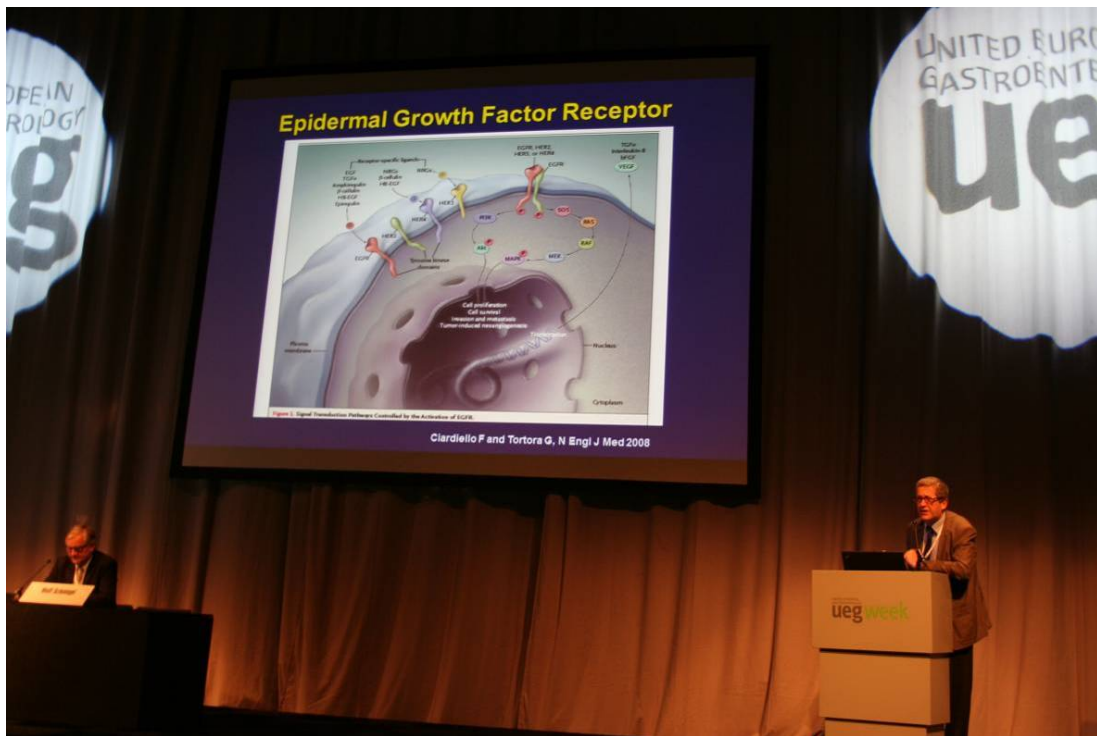
圖十四：阿姆斯特丹 RAI 會議中心舉行 2012 歐洲消化系醫學週



圖十五：2012 歐洲消化系醫學週會場壁報與廠商展示區

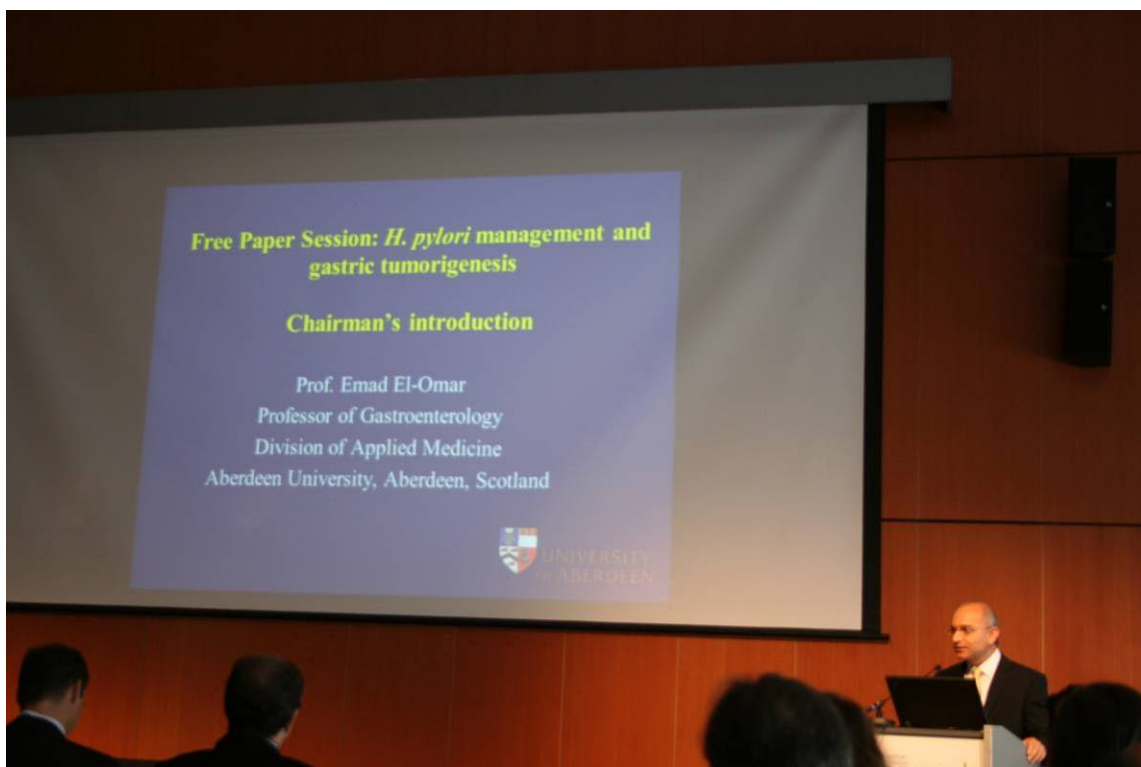
(二)、 2012 歐洲消化系醫學會最新相關研究成果摘要如下：

1. 內質網氧化壓力參與肝纖維化、脂肪肝、甚至肝癌之產生，其中 Bip (GRP78) 扮演內質網氧化壓力調控者角色，Bip 於內質網中與 IRE、ATF6、及 PERK 等蛋白結合，於體內自由基過多時 Bip 離開 IRE、ATF6、及 PERK 接收器，而啓動下游訊息傳遞，大量產生 Bip，故 Bip 可當作內質網氧化壓力生物標記，而大量表現之 Bip 最後參與癌症生成，故學術上調控內質網氧化壓力，例如利用抗氧化劑將有助於肝臟疾病之產生與治療。
2. 大腸癌之生物標靶研究(圖十六)：K-ras 蛋白為大腸癌之生物標靶蛋白，研究指出大腸癌病人檢體發現 K-ras 突變，主要集中於 G13D 得位置，而使 ras-GTP 無法回復成 ras-GDP 而持續活化下游基因，以致癌細胞生長不受控制，另外 K-ras 突變之病人容易產生 anti-EGFR 抗體(Cetuximab)之藥物抗藥性，故臨床上，部份學者使用 FOLFIRI (FOL = Leucovorin – Calcium(Folinic Acid), F=Fluorouracil(5-FU), IRI=Irinotecan Hydrochloride)配合 Cetuximab 進行治療，療效顯著，可提升大腸癌病人存活率。另外也有學者提到 anti-angiogenesis 藥物之比較，包括 Bevacizumab, Panitumumab, Cetuximab 間之療效評估，建議之大腸癌治療順序例如為(1)化學治療，如 5-FU；(2)標靶治療，如 anti-EGFR 抗體 Bevacizumab 或 Cetuximab；(3)結合治療(如果產生抗藥性)，當然隨著藥物時間之使用，藥物效果會逐漸降低，而毒性副作用會逐漸升高，如何於降低副作用並產生最大療效成為目前癌症藥物之最新研究主題。

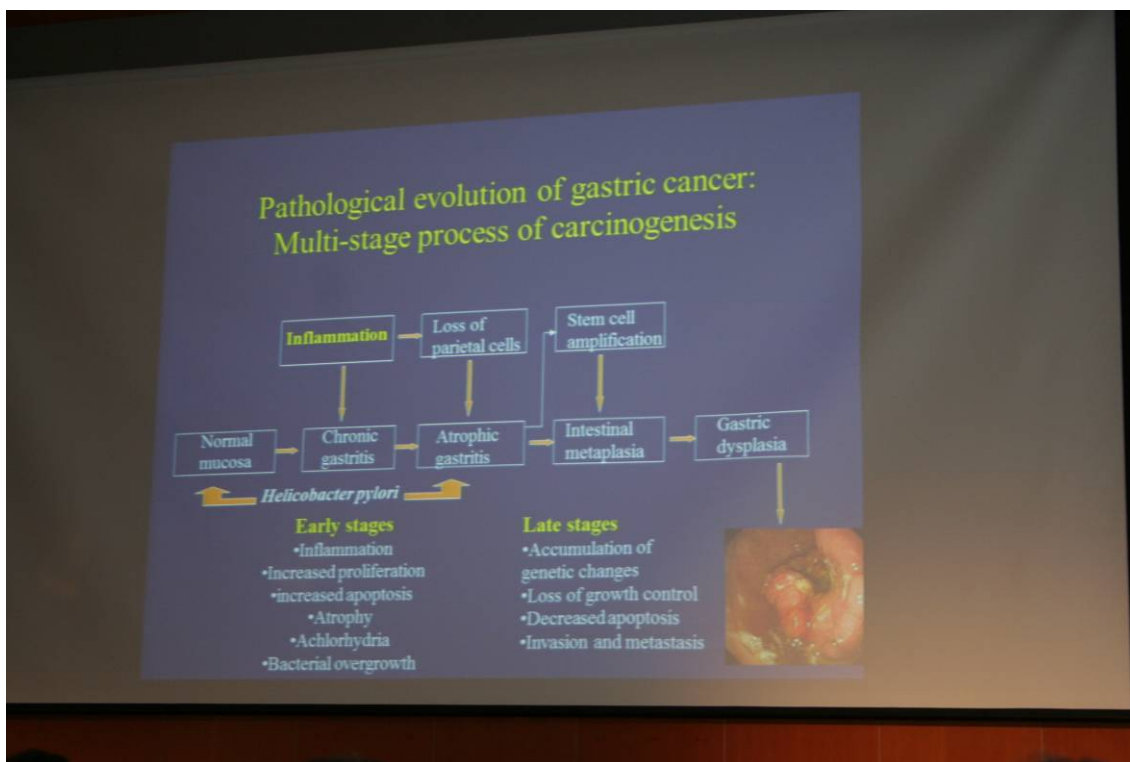


圖十六：大腸癌之生物標靶研究之演講現況

3. 胃幽門螺旋桿菌與胃癌生物標記(圖十七及圖十八): 胃幽門螺旋桿菌與胃潰瘍甚至胃癌有直接之關聯，利用胃幽門螺旋桿菌 CagA 參與其之致病機轉，誘發胃部產生發炎，故臨床上學者使用抗生素 PPI 治療因幽門螺旋桿菌引起之胃潰瘍及胃酸分泌，另外同時配合 Clarithromycin 的使用，將更有效去除胃幽門螺旋桿菌。另胃癌生物標記則有學者提到大約 22% 的病人胃癌組織有大量表現 Her-2 接收器，故針對 Her-2 大量表現之病人，可利用其專一性標靶抗體藥物 Herceptin 進行治療，將有助於改善病人之存活率。



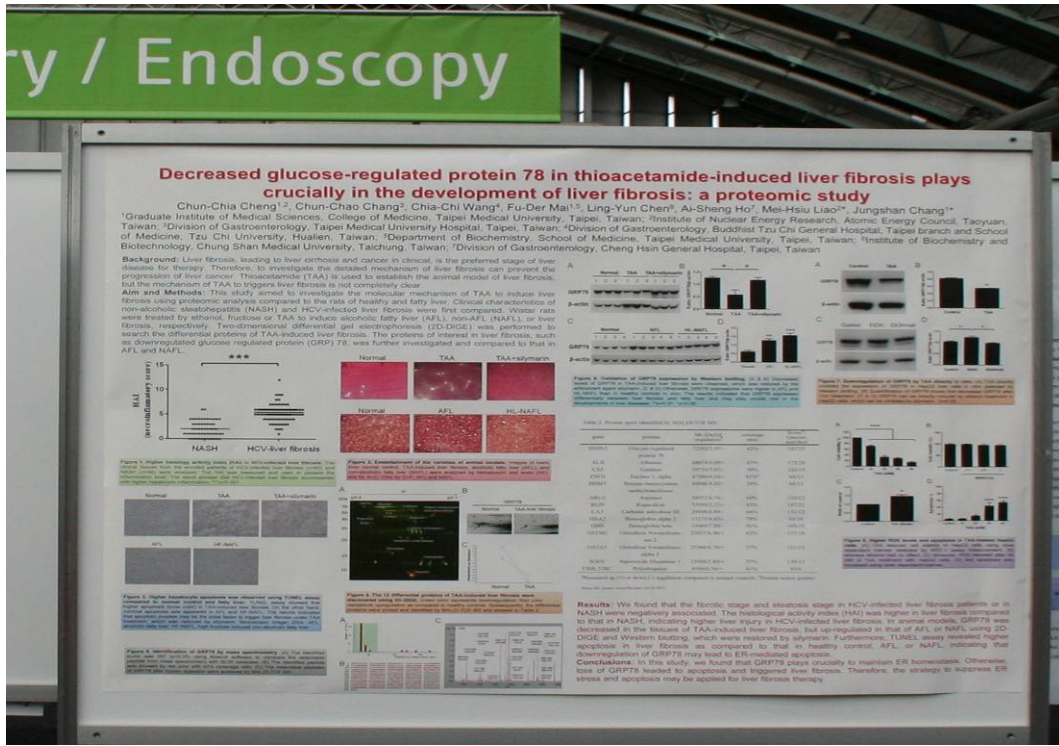
圖十七：胃幽門螺旋桿菌與胃癌生物標記之演講現況



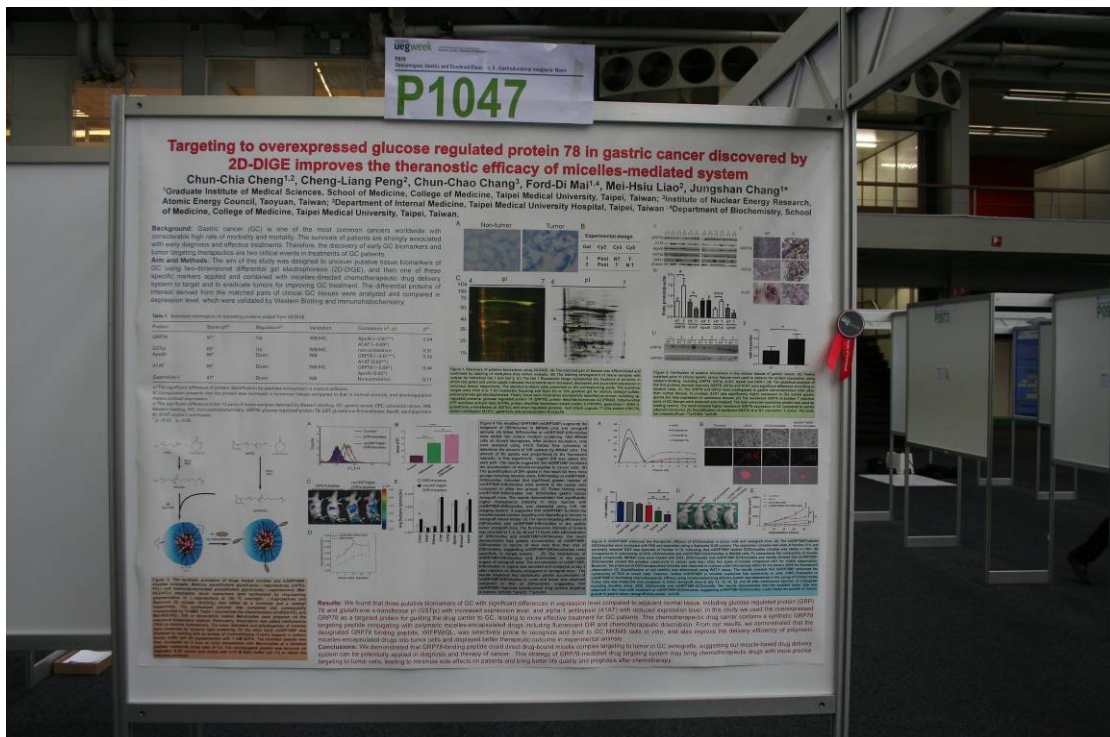
圖十八：胃癌之診療流程

4. 壁報論文發表狀況：此次共發表 2 篇壁報論文，其一為利用蛋白質體技術探討病毒

性肝纖維化之形成機制(圖十九),其二為搜尋並利用胃癌生物標記 GRP78 以增進胃癌之診斷及治療(圖二十),其中胃癌之研究獲得大會最佳論文殊榮,顯示目前研究方向正確,將繼續朝此方向繼續深入探討。



圖十九：論文發表一，利用蛋白質體技術探討病毒性肝纖維化之形成機制



圖二十：論文發表二，搜尋並利用胃癌生物標記 GRP78 以增進胃癌之診斷及治療

此次歐洲消化系醫學年會於阿姆斯特丹 RAI 會議中心舉行，會場相當開闊，佈置完善，而演講及壁報區也相當清楚，但由於演講內容太過豐富，只能選擇個人感興趣的研究進行聆聽與了解。另外就此次吸收之研究知識，包括癌症與生物標記相關研究，似乎大部份學者都朝向專一性之標靶治療，例如針對 Her-2、EGFR 等大量表現於癌組織之蛋白接收器進行研究探討，顯示我們目前針對胃癌與大腸癌專一性生物標記之搜尋似乎是前瞻研究。另外奈米物質例如微脂體或金奈米並沒有學者進行研究，但根據目前的科學文獻，奈米粒子在癌症卻已有相當程度之進展，甚至已進行到臨床試驗，故這方面的研究未來可進行，以期與國外學術領域並駕齊驅。

## 四、建議事項

質譜影像分析技術搜尋癌症之組織蛋白生物標記，及利用此技術追蹤藥物於生物體內之代謝分佈，一直是癌症診斷試劑或開發治療藥劑發展之重要研究，並且質譜影像分析技術可用以鑑定化合物之準確分子量及判斷藥物合成之結構是否正確，鑑定具差異性之蛋白質或小分子化合物，透過影像方式呈現，分析藥物或生物標記於疾病組織中之分佈，以利後續設計成專一性診斷試劑或發展治療藥物。另本次歐洲消化系醫學週之參加與發表論文相當順利成功，透過發表自己的研究成果與國外學者進行討論，有助於研究設計與問題釐清。依此次公差經驗，對本所未來核醫發展有如下之建議：

- (一)、繼續發展高解析度質譜技術，用以鑑定小分子核醫藥物之合成及體內分佈，有助於藥物之開發。
- (二)、多支持年輕研究者多參加類似臨床學術研討會，吸收國外最新醫學發展，也藉此鼓勵發表研究成果。
- (三)、癌症治療目前朝向標靶治療，可利用治療性放射性同位素鍵結專一性標靶藥物，增進癌症治療效果。
- (四)、胃癌生物標記 Her-2 似乎可用以當作專一性標靶蛋白用於治療，因為 22%的胃癌病人大量表現 Her-2，但如何診斷大量表現 Her-2 卻是可開發之新技術，未來可利用專一抗體 Herceptin 標幟放射性同位素進行核醫造影，除了組織切片鑑定胃癌病灶外，更可了解是否為 Her-2 大量表現，以利後續治療方式或藥物之選擇。