

出國報告（出國類別：研究）

血管生物學研究

服務機關：台北榮民總醫院神經內科

姓名職稱：鍾芷萍主治醫師

派赴國家：美國波士頓

出國期間：2011-6-1 ~ 2013-5-31

報告日期：2013-6-3

摘要

台北榮總的腦血管臨床研究在胡漢華教授的帶領下是國內數一數二。如果要再讓醫院的腦血管研究更上一層樓，必須要在基礎或是轉譯研究上多下功夫。我的專長與興趣在腦血管，因此興起了要出國進修血管生物基礎研究的念頭。

本次出國進修研究的目的是:

- (1) 學習頂尖生物研究環境(哈佛醫學院實驗室)的研究思維與方法
- (2) 獨立從事血管生物學的研究課題

從事研究過程中，除了觀摩了世界頂尖研究環境的制度之外，在從事的血管生物學課題上也得到了成果:

- (1) 首次發現 Klotho 蛋白在人類血管內皮細胞的表現情形
- (2) 首度發現 FGF-23 在人類主動脈內皮細胞中的作用
- (3) FGF-23 在血管內皮細胞的作用需要內生性 Klotho 的存在

這些成果除了已經在國際學會年會上口頭發表，並將在近期內以台北榮民總醫院與哈佛醫學院共同代表下發表論文投稿國際期刊。

並期許往後利用這些學習到的知識，建立發展本院的腦血管生物研究室。

關鍵字: 血管生物學、 血管內皮細胞、 腦血管。

目次

一、目的	-----	4
二、過程	-----	4
三、心得	-----	8
四、建議事項	-----	8

本文

一、目的

目前是台北榮總神經醫學中心腦血管科的主治醫師，臨床上照顧的大多是腦中風、血管性失智症、與其他腦血管疾病的病人。我的研究興趣是：(1) 腦部小血管疾病的病理機轉，以及(2) 腦靜脈回流異常的生理影響與臨床相關性。我在臨床研究的路上很順遂，發表了多篇 SCI 的文章，這些研究成果讓我可以 2011 年受聘為陽明大學的助理教授，並且接受了國際學術年會(2012 International Society of Neurovascular Diseases)與研究機構 (Buffalo Neuroimaging Analysis Center) 的演講邀請。

台北榮總的腦血管臨床研究在胡漢華教授的帶領下是國內數一數二。我以為如果要再讓我們醫院的腦血管研究更上一層樓，必須要在基礎或是轉譯研究上多下功夫。我的專長與興趣在腦血管，因此興起了要出國進修血管生物基礎研究的念頭。本次出國進修研究的目的是：

- (3) 學習頂尖生物研究環境(哈佛醫學院實驗室)的研究思維與方法
- (4) 獨立從事血管生物學的研究課題

並期望將這些成果帶回國內，開始建立發展本院的腦血管基礎研究環境。

二、過程

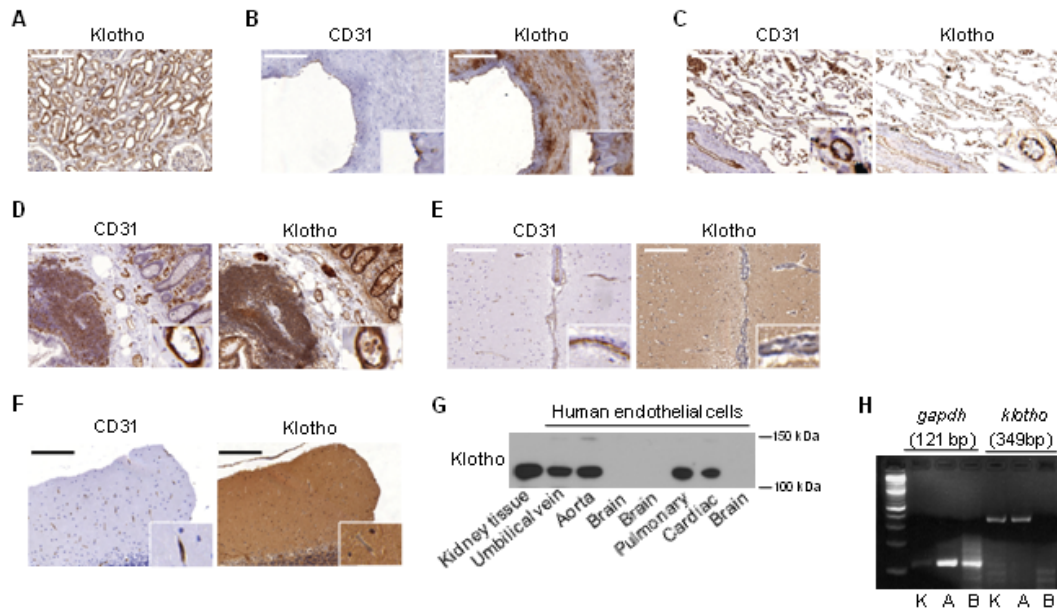
在波士頓，我分別待了兩個實驗室，第一個實驗室是心臟血管科的血管生物研究室，另一個是腎臟科的血管生物實驗室。獨立從事的課題有：

1. ER stress in human endothelium
2. The role of ROCK1/2 in Th1/2 differentiation and its effects on autoimmune encephalitis
3. The effects of FGF-23/Klotho on human endothelial cell
4. The effects of chronic kidney disease (CKD) on human brain microvascular endothelial cells

在研究環境上，我觀察了研究實驗室管理的情形，與其他相關領域實驗室學術研究的方式以及研究經費的獲得。

在研究方法上，哈佛研究環境提供了任何可以想到的實驗方法與器材，也學習到了如何撰寫基礎的研究計畫書，與如何籌措與管理研究經費。

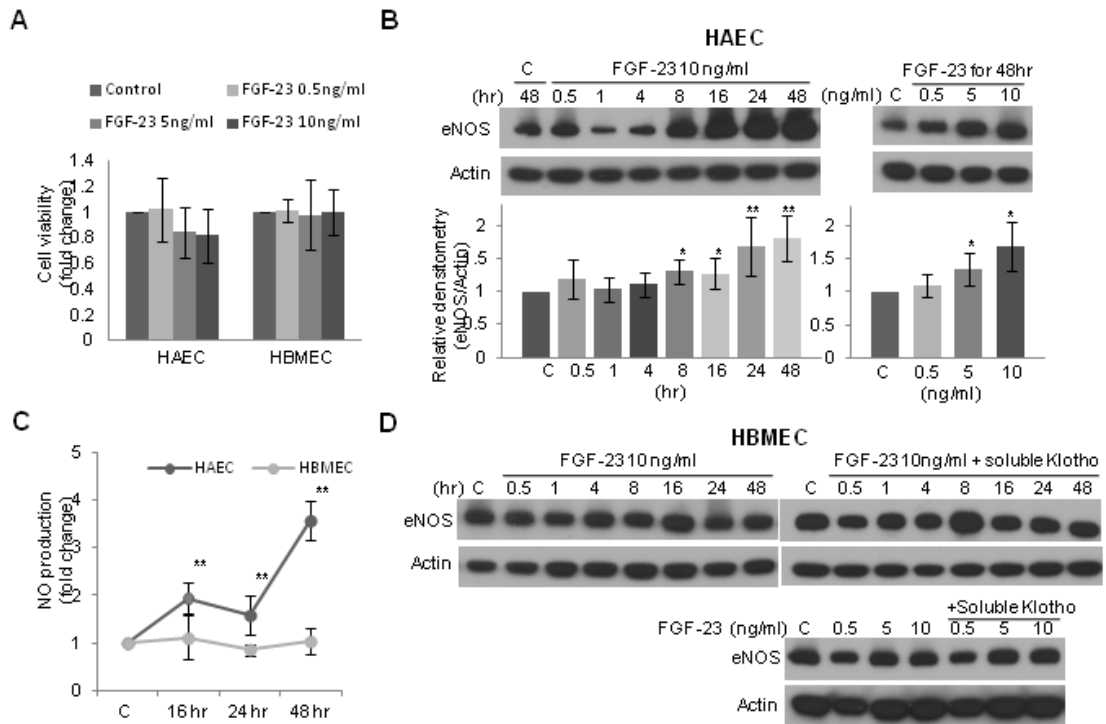
在獨立從事的課題中，分別有兩個課題得到 2012 美國腎臟學會年會的口頭報告與壁報報告機會。並有一篇論文已經撰寫完畢，經修改後將以台北榮民總醫院與哈佛醫學院共同代表之下投稿國際期刊。以下將簡述這篇論文的發現：



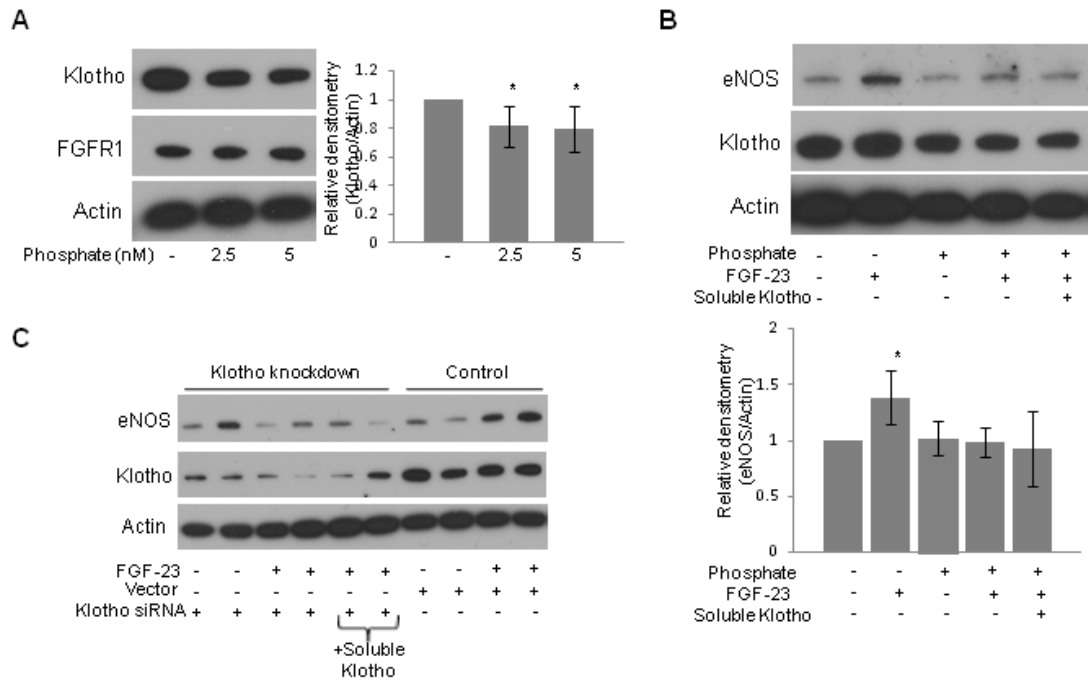
1. 首次發現 Klotho 蛋白在人類血管內皮細胞的表現情形:

Klotho 蛋白質在許多人類血管的內皮細胞中表現，唯獨在腦部小血管內皮細胞並沒有發現。

(A) 人類腎臟組織當作控制組 (B-F) Klotho 蛋白在人類腎臟動脈內皮細胞，肺臟小血管內皮細胞，結腸黏膜下組織小血管內皮細胞皆有發現 (E & F) Klotho 蛋白在小腦與海馬迴腦組織中的小血管內皮細胞中沒有發現. CD31 用來作內皮細胞標誌. CD31 和 Klotho 蛋白皆染色於相鄰的組織切. Scale bar: 200 μ m. $n = 3$ in tissues of each site. (G & H) 細胞實驗利用 western blotting 和 PCR 證明內皮細胞中的 Klotho 蛋白表現於人類主動脈內皮細胞，靜脈內皮細胞，肺部小血管內皮細胞，心臟組織中小血管內皮細胞. 但不表現於人類腦部小血管內皮細胞. For western blots, 20 μ g of proteins were used for kidney tissues, HAEC, and HUVEC cell lysates; 50 μ g of proteins were used for human brain, pulmonary and cardiac microvascular ECs cell lysates. $n = 3$ for each origin of tissues, cells or cell lysates.



2. 首度發現FGF-23在人類主動脈內皮細胞中的作用: FGF-23蛋白會增加人類主動脈內皮細胞中eNOS蛋白的表現, NO製造量,以及細胞增生,但是在人類腦部小血管內皮細胞中並沒有這些作用. (A) FGF-23蛋白會增加人類主動脈內皮細胞中細胞增生的情形,但是在人類腦部小血管內皮細胞中沒有這些作用. (B) FGF-23蛋白會增加人類主動脈內皮細胞中eNOS蛋白的表現 (C) FGF-23蛋白會增加人類主動脈內皮細胞中NO製造量,但是在人類腦部小血管內皮細胞中沒有這些作用.(D) FGF-23蛋白不會增加人類腦部組織小血管內皮細胞中eNOS蛋白的表現 Data represent mean \pm SD of 3 independent treatments. ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ versus control.



3. FGF-23 在血管內皮細胞的作用需要內生性 Klotho 的存在: 高磷與 Klotho 蛋白對於 FGF-23 在人類血管內皮細胞作用的影響. **(A)** 人類主動脈內皮細胞的內生性 Klotho 蛋白在高磷影響下(2.5 and 5 nM)會減少其表現量, 而 FGF 受器的表現並不沒有受到影響 **(B)** 高磷 (5 mM) 會讓 FGF-23 升高 eNOS 表現量的情形消失,而同時加入循環型 Klotho 並沒有讓這情形回復. High phosphate was treated for 24 hrs followed by FGF-23 \pm soluble Klotho for another 24 hrs. **(C)** 將內生性 Klotho 敲掉(knock down)會讓 FGF-23 升高 eNOS 表現量的情形消失,而同時加入循環型 Klotho 並沒有讓這情形回復. Klotho was knockdown with 1 μ M siRNA in HAEC ($n = 3$). Vector: control siRNA with lipofectamine of the same concentration used in Klotho siRNA knockdown. FGF-23 10 ng/ml \pm soluble Klotho 0.2 nM were treated for 24 hrs following Klotho siRNA or vector (Lipofetamine) transfection. $n = 3$ in each treatment condition.

三、心得

台北榮民總醫院臨床硬體軟體資源豐富，由於有大量的病患就診，臨床研究可以有許多先於國際的發現。爲了可以將這些臨床研究觀察進而形成一個理論，相關的基礎探討機轉的研究不能少。故若有更多臨床醫師，尤其是已經有臨床研究基礎的醫師去進修基礎生物醫學研究，將能讓本院的醫學研究的深度與廣度提高。另外對於如何將研究成果應用在醫藥或是醫學技術等等的產業合作也有相當的助益。

在世界頂尖的研究環境工作下，發現最重要的還是制度。雖然競爭很激烈，但是由於他們有很清楚公開的遊戲規則(升等，經費運用與申請)，資源擁有者尊重專業人士，由專業領導研究方向，這樣一來才会有源源不絕的創意與研究成果。健全的制度才能創造人才濟濟的環境。

四、建議事項

基礎研究要有成果通常需要數年的時間，出國常常要先花數個月在適應新環境，又花最後幾個月準備返台事宜，如果只有一兩年的時間，真正可以待在實驗室專心從事研究的時間非常不夠用，建議若是出國作基礎研究的醫師可以放寬留職停薪年限。