

出國報告(出國類別：進修)

赴美國國家衛生研究院進行腎臟學研究返 國心得報告

服務機關：國防醫學院三軍總醫院

姓名職稱：宋志建、主治醫師

派赴國家：美國

出國期間：105 年 8 月 1 日至 106 年 7 月 29 日

報告日期：106 年 8 月 10 日

摘要

職為臨床腎臟科醫師，除了臨床服務外，在研究上主要在於腎臟學領域包含水分、酸鹼與電解質不平衡等相關研究，由其是在於腎臟腎小管功能研究。對於腎臟生理學的腎小管功能早期研究，主要是電生理實驗到腎小管微分離與微灌注實驗，但是自從人類基因定序出來後與人類「基因圖譜」的完成，目前學術研究已走向定序與生物資訊分析時代。而 RNA 定序(RNA-Seq)可全面性獲得細胞或組織的轉錄體及基因序列，甚至於是很微量或單一細胞的 RNA，也可以做定序。職獲得補助後到美國國家衛生研究院心肺及血液研究所進行一年短期進修，進修期間在指導教授 Dr. Knepper 教導下，建立鋰鹽引起尿崩症的動物模式，利用腎小管微分離作 RNA 測序(RNA-Seq)，並學習資料分析，期待能對於鋰鹽引起尿崩症的致病機轉了解更深入。

目次

封面.....	第 1 頁
摘要.....	第 2 頁
目次.....	第 3 頁
本文.....	第 4-10 頁
目的.....	第 4 頁
過程.....	第 5-8 頁
心得與建議.....	第 9-10 頁

本文

目的

職為三軍總醫院內科部腎臟內科擔任臨床主治醫師，本科在林石化院長帶領下與後續楊松昇、許育瑞、鄭智仁等國外博士回來後，在遺傳性腎小管疾病的動物模式以及腎臟電生理、腎小管微分離與微灌注實驗等基礎研究已具有相當深厚的研究基礎。而職的研究興趣主要在低血鉀癱瘓之臨床研究與基因分析，以及尿液外吐小體蛋白質體分析。在臨床研究上，希望能在腎小管疾病學習更進一步的研究。

在人類「基因圖譜」定序出來後，尖端研究已走向定序與生物資訊分析，職在獲得國防部補助下，到美國國家衛生研究院心肺及血液研究所進行短期進修，主要目的希望能學習到利用腎小管微分離作 RNA 定序(RNA-Seq)與資料分析，以期能提升本身在臨床研究的質與量與三軍總醫院基因體中心的研究能力。

過程

職在美國國家衛生研究院 (National Institutes of Health, 縮寫為 NIH), 進修的一年期間, 學習指導教授為 Dr. Mark A. Knepper。美國國家衛生研究院屬於美國衛生及人類服務部 (Health and Human Services), 是美國聯邦政府中首要的生物醫學研究機構也是全世界最大的醫學研究重鎮, 有許多研究學者和工程師聚集於此, 為人類的健康與醫學做出極大的貢獻, 當然也有許多台灣研究學者。美國國家衛生研究院主要可分兩大部分, 一部分負責支援研究院之外的生物醫學研究, 另一部分則負責直接由研究院指導的內部研究, 大多是在位於馬里蘭州貝塞斯達 (Bethesda) 的部門進行。而職這次進修的地方就是位於貝塞斯達的總部。

美國國家衛生研究院早期代表性建築



貝塞斯達位於美國馬里蘭州(Maryland)蒙哥馬利縣(Montgomery County)的一個未成建制的自然聚居區, 就在華盛頓特區(Washington DC)北邊, 人口以白人與亞裔美國人為主, 在這裡除了美國國家衛生研究院, 還有美國國家海軍醫療中心(Walter Reed National Military Medical Center), 就位於美國國家衛生研究院的對面, 類似我們的國防醫學中心。而華盛頓地鐵紅線在此設有貝塞斯達站與醫療中心站, 交通相當方便。貝塞斯達更被列為美國教育程度最高的城鎮, 並於把貝塞斯達列為美國第二適居地, 因而此地消費也是很高, 當初美國教授還擔心職的補助經費是否可以讓我們能舒適地在貝塞斯達生活。職所居住的地方, 位於我們美國國家衛生研究院的附近公寓, 平日走路即可到達職的實驗室。

美國國家衛生研究院, 主要有 27 個研究所(Institutes)與研究中心(Centers), 包含許多有名的 National Cancer Institute (國立癌症研究所, NCI), National Heart, Lung, and Blood Institute (國立心肺及血液研究所, NHLBI), National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (國立糖尿病與消化和腎臟疾病研究所, NIDDK), National Library of Medicine (國立醫學圖書館, NLM)等, 還有著名美國國家衛生研究院臨床中心(NIH Clinical Center), 也叫做美國研究醫院(America's research hospital), 提供對於罕見疾病或者是對於公眾衛生有巨大影響的疾病進行研究與臨床試驗。而我們實驗室是位於國立

心肺及血液研究所(National Heart, Lung, and Blood Institute, NHLBI), 是創立於西元 1948 年, 當時早期美國國家衛生研究院只有四個研究機構, 而國立心肺及血液研究所是其中之一。

美國國家衛生研究院四季



職所在的實驗室早期名稱為腎臟與電解質代謝實驗室 (Laboratory of Kidney and Electrolyte Metabolism, LKEM), 後來名字才改成上皮細胞系統生物實驗室 (Epithelial Systems Biology Laboratory, ESBL), 而職的指導教授 Dr. Mark A. Knepper 為我們實驗室最主要的計畫主持人。Dr. Mark A. Knepper 在國際腎臟生理學 (Renal Physiology) 是知名的學者, 得到許多國際重大的研究獎項, 如 1996 年美國腎臟生理學會的 Carl W. Gottschalk Lectureship, 2012 年美國腎臟生理學會的 Hugh Davison Distinguished Lectureship, 2001 年美國腎臟醫學會 Homer W. Smith Award, 2014 年美國腎臟生理學會的 Robert W. Berliner Award 等研究獎項。

實驗室



Dr. Knepper 在密西根大學(University of Michigan)以化學工程師(Chemical Engineer)獲得學位(西元 1970 年), 之後在 CaseWestern Reserve University 以生物醫學工程師 (Biomedical Engineering)獲得博士學位(西元 1975 年)也順利拿到醫師學位(西元 1976 年)。因此以他專長是生物醫學工程師, 主要利用系統生物學方法(Systems-Biology, 結合電

腦與數據數據的分析)，在腎臟排水的功能發現許多重要的調控機轉。更在早期西元 1980 年代 Dr. Knepper 在腎臟集尿管發現尿素轉運蛋白(urea transporter)，在 1990 年代主要研究

實驗室同仁合影



在”水通道(aquaporin)”(他發明這個名詞)，發現在抗利尿激素(vasopressin)下，水通道的跑到上皮細胞表面(trafficking)功能，另外也致力於研究長期在抗利尿激素下對於水通道的調控。近幾年 Dr. Knepper 更利用蛋白質質譜儀鑑定(protein mass spectrometry)加上電腦程式發現許多主要的訊息傳導路徑。

因此職到了美國後，花了一些時間把住宿與生活起居安排，其中申請美國國家衛生研究院的識別證，還要調查背景後才能核發給你，主要是因為是聯邦政府的機構的關係。我們實驗室位於 10 號樓(Building 10)，是美國國家衛生研究院最主要的主體建築之一，裡面還有很多的研究機構包含臨床中心。與指導教授討論完主題後，職的研究主要在於探討鋰鹽導致腎因性尿崩症(Lithium-induced Nephrogenic Diabetes Insipidus)原因。因此首先須建立鋰鹽導致腎因性尿崩症的動物模式，去研究轉錄體(transcriptome)與試著找出可能的轉錄因子(transcriptional factors)。然而在美國國家衛生研究院要做動物實驗一定要經過動物使用訓練課程與職業醫學的體檢通過後，才可以進行操作動物實驗，因此前面一個月主要練習腎小管微分離術。除了做動物實驗，還有做細胞實驗，探討抗利尿激素受體的不同亞型(vasopressin receptor isoform)，因此學習做細胞實驗包含細胞轉染(transfection)，免疫墨點法(immunoblot)，免疫螢光法(immunofluorescence)等技術。而以下幾點是職學習到的主要內容。

一、 學習主要過程

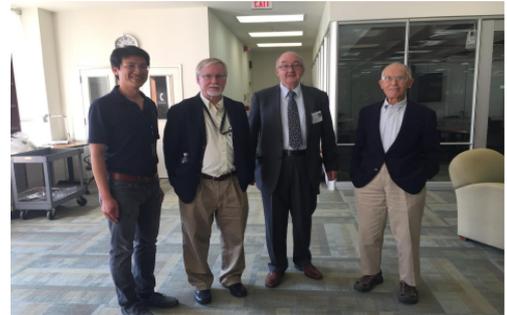
在 2016 年 9-10 月，主要先建立鋰鹽導致腎因性尿崩症的動物模式，也熟悉實驗所需用到的技巧及儀器操作。在確認鋰鹽治療天數後，我們在 2016 年 12 月做第一次腎小管微分離術，我們再把大鼠腎臟皮質集尿管取下後，轉成核糖核酸(RNA)與互補 DNA(cDNA)然後做成 library 後，送 HiSeq3000 作定序。在 2017 年 1 月，主要作後續分析資料，在結果上也確認職的實驗方法是可行的。並在 2017 年 2、3 月份，主要完成第二批大鼠的腎小管微分離術，轉 cDNA，建立 cDNA library，也完成 HiSeq3000 定序，到 4 月做分析定序資料。2017 年 5 月再做不同的時間過程(time course)的大鼠實驗。此外，也學習使用分析軟體，在 2017 年 6 月完成定序後分析，並著手整理結果與寫論文。而在 2017 年 7 月，做鋰鹽導致腎因性尿崩症的單一腎小管蛋白質體分析(single tubule proteomic)。除此外還學習細胞技術與使用共焦顯微鏡(confocal microscopy)、酵素連結免疫吸附分析法(ELISA)等實驗技術的操作。

二、 腎小管微分離術

一般哺乳類的腎元大約有 20 段腎臟小管片段。每一段腎小管都有其獨特的生理功能，也

有其特殊代謝特質，因此假設可以分離很微小腎小管，就可以去了解腎臟每一段腎小管生理功能。而腎小管微分離術已經發展 50 年了，早期由職的指導教授 Dr. Knepper 與其老師 Dr. Burg 發展，早期是分離後作灌流去了解其生理功能。近幾年由於定序的進步，目前發展已經到了次世代定序，因此職指導教授已於 2015 年 J Am Soc Nephrol. 已成功利用為分離下來的腎小管作 RNA 定序，因此職此次主要目的之一也是學習作腎小管微分離術與 RNA 定序。

指導教授與 Dr. Maurice B. Burg (右一)



三、 RNA 定序操作

RNA 定序，是基於第二代測序技術的轉錄組學研究方法，藉由次世代的定序(HiSeq3000)可以知道 RNA 的存在(表現)和數量(定量)。首先在進行定序之前，須從生物樣品(Tissue Sample)提取全部轉錄的 RNA，之後再反轉錄為 c-DNA 後，經由建立片段的重疊組裝(Library)，在進行高通量測序。早期比較兩種或多種條件下作 transcriptome 研究，多是使用 microarray 來分析基因體表現量的變化與樣本條件之間的關聯性，然而在 RNA 定序發現後，因為 RNA 定序的深度夠深，能夠覆蓋的深度較一般常用的 microarray 為多廣，且 RNA 定序的解析度也比 microarray 大許多，能夠找出更多具有差異性表現基因，由於如此，利用 RNA 定序來找尋 differential expression(差異性表現基因)已經是學術界的主流。而值此次作腎小管分離術下來後的腎小管作 RNA 定序，主要的挑戰在於樣品細胞數目約 1000 到 2000 細胞，所以處理上需要使用特殊 kit 去處理。

四、 生物資料分析

當做完 RNA 定序，會得到樣品的定序結果，主要是 FASTQ 檔案，之後須對 RNA 定序產出的數據(FASTQ)進行變異分析，這個時候會使用到參考基因組(reference genome)，例如職作的實驗參考基因組為大鼠，在進行變異檢測的重點就在於比對跨剪切位點的精確序列，職學習到使用 STAR 去做 Mapping RNA-seq Reads to Reference genome。此時通常檔案非常大，需要在 Linux 指令下進行操作，在比對後(mapping)，即可以得到每個樣品的 Reads 與 TPM (Transcripts Per Kilobase Million)，之後可以再 R program 作分析。職在實驗室，也學習使用這些軟體與程式，還有後續分析(DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis)。

五、 單一腎小管蛋白質體學(Proteomics)

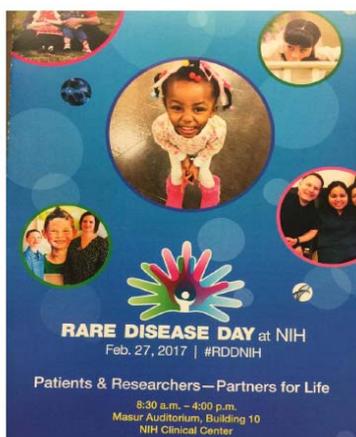
最後在整個研究後期，職也學習做單一腎小管蛋白質體分析(single tubule proteomic)，雖然做完實驗，但是因為後續時間不夠，還來不及分析就回台灣了，這是唯一可惜的地方，希望將來有機會能在回去完成後續分析。

心得與建議

職此次赴美國短修，雖然只有短短一年，但是期間除了進行實驗操作與分析外，也參與許多課程，同時也接觸國外研究環境與不同人文文化的衝擊，均帶來許多不同感受與心得，以下幾項為主要的心得與建議事項：

一、 持續自我教育

在美國的教育，強調自我學習，除了提供良好研究環境外，美國國家衛生研究院提供許多自我進修課程，在有許多課程都有提供線上課程，且是全世界都可線上觀看的，包含許多免費的演講或臨床講座或蛋白質體學課程等不同分類，都是免費的。例如，在國際罕病日(2月29日)與辦了一系列演講(Validating and modeling rare diseases in zebrafish using CRISPR/Cas9)，在今年5月12日也請馬友友(A Morning with Yo-Yo Ma)來演講，也舉辦許多人文藝術課程包含許多演奏會，相當豐富。在圖書館(NIH library)也有提供許多免費的訓練課程，如R program, UCSC genome Browser, RNA-Seq processing, Chip-Seq progressing等課程，都蠻踴躍參加的。建議我們圖書館可以結合醫院與研究基礎需求，也可以舉辦許多研究講座課程，並且線上錄影，讓許多無法參加臨床醫師在線上自我學習能增加新知。



二、 充分自我準備

短期進修，通常只有一年，來到美國前，建議一定要增強自己的外語能力考驗，尤其是聽力，可以減少適應時間。在生活上，最好來美國前，須了解準備哪些東西，尤其是申請 VISA, Social Security Number、銀行、駕照等，因為在美國申請這些就需要花掉你

一個半月時間，所以最好先準備好才不至於浪費時間。另外，若是選擇以基礎實驗為主的進修，最好先跟老師了解要進行的題目，了解學會基本實驗原理，如此才能在一年內能完成你的題目。

三、 培養研究風氣

在台灣，醫生開始做研究通常是當住院醫師或主治醫師才開始，換句話說是要學術升等需求才開始做研究，反觀美國，作研究是從做大學生就開始，甚至小學生就開始讓他們了解實驗過程。我們在美國國家衛生研究院每年都有暑期大學學生(Summer Students)來我們實驗室，大約三個月，他們都是來自頂尖大學學校，訓練他們獨立實驗與獨立思考的能力。訓練學生表達自己的想法，這是我們台灣大部分學生所缺乏的。建議我們台灣應該培養研究風氣，應該向下扎根，讓台灣學生能多了解研究過程。美國亦有 M.D. PhD. 課程，約 7 到 8 年，讓美國學生除了念 M.D. 外，亦可以提供另一個路可以選擇。

四、 能與世界接軌

在美國進修，可以接觸到來自世界各地研究人員，除了可以學術交流外，也可以接觸與了解不同的文化背景。職發現全世界都在求進步，覺得台灣更應該有世界觀與前瞻性，應多培養國外人才與建立人才回國接軌計畫，能提供國外學者合適的研究環境讓許多優秀人才回國內貢獻所學。

五、 未來研究方向

職此次進修主題主要在腎小管微分離、RNA 定序、資料分析，期待職回國後，能夠持續進行實驗，並能與遺傳性腎小管疾病作結合，並與科內其他老師合作，最後也希望能建立三軍總醫院總與國防醫學院能做 RNA 定序與資料處理。

最後要特別感謝國防部軍醫局、三軍總醫院及國防醫學院各位長官及師長的支持與幫忙下，才能夠讓職赴國外短修的梦想實現。希望能將自己在美國國家衛生研究院所學貢獻於未來教學、研究及臨床服務上，更期能對腎臟內科的臨床及基礎研究有所助益。