

出國報告（出國類別：研究）

## 美國霍普金斯醫學院眼科中心研究報告

服務機關：國立成功大學醫學院附設醫院

姓名職稱：陳婉如醫師

派赴國家：美國

出國期間：104/1/1~105/12/9

報告日期：106/1/1

## 摘要

地點：美國霍普金斯大學醫學中心眼科實驗室

內容：

1. 病人手術切除的眼翳組織，石蠟包埋切片後，做免疫染色，比較正常結膜和眼翳組織的一些分子蛋白表現差異，包括 HMGB1, Nrf2 及 NLRP3 等。
2. 學習如何建立小鼠及大鼠的缺氧再灌流損傷模型(ischemic-reperfusion injury model)，並觀察在缺氧再灌流損傷後，動物視網膜的結構細胞變化。測量小鼠及大鼠的 ERG 可知視網膜的功能變化。將視網膜固定並剝離後，可經由特殊免疫染色 (NeuN staining) 將視網膜神經節細胞染色，再經由雙焦顯微鏡攝影後，可計數失去多少比例的細胞。藉此利用在評估很多藥物的治療效果。
3. 建立藍光對視網膜光受器細胞造成光氧化壓力增加之模型，探討過程中影響及活化因子，是否影響細胞存活及細胞活性。

## 目次

一、 目的 .....	1
二、 過程 .....	1
三、 心得 .....	13
四、 建議事項 .....	13

## 一、目的

美國霍普金斯醫學大學眼科中心(Wilmer eye institute)是世界著名的眼科殿堂,擁有尖端的技術及研究,藉由至實驗室實地加入團隊學習,參與研究,學習眼科先進的觀念,期許回國後進一步能夠建立嶄新的模式,在研究上繼續進步,與世界趨勢接軌。

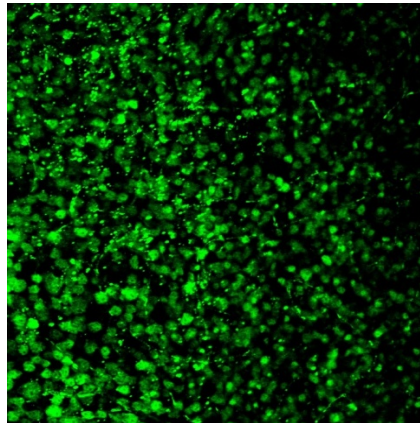
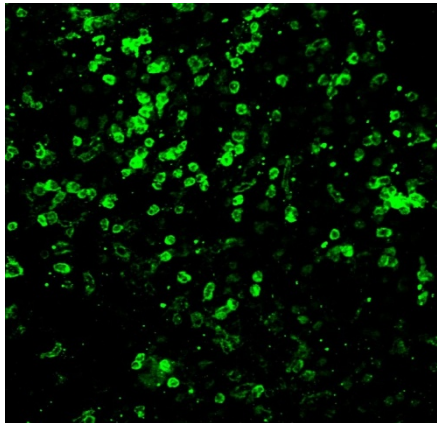
## 二、過程

### (一)缺氧再灌流損傷小鼠模型

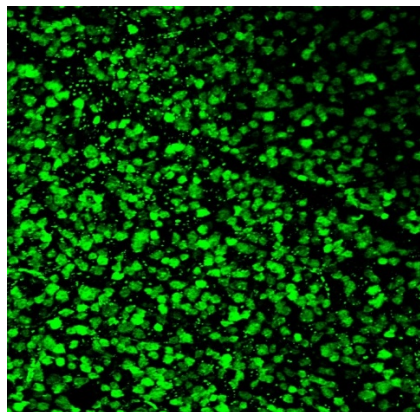
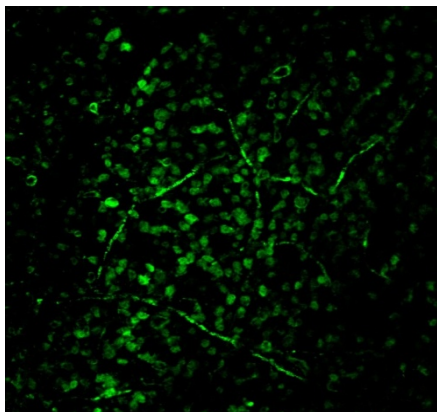
將小鼠麻醉後,將細針穿刺從角膜輪部進入前房,利用升降支架的高度調整液體的壓力,藉此升高小鼠的眼壓至九十毫米汞柱或一百二十毫米汞柱,維持壓力持續六十分鐘至九十分鐘,端視要模擬造成如何程度的視神經傷害。一周後藉由將小鼠的視網膜以福馬林固定,即可人工剝離視網膜,再以特殊免疫染色(Neu N)可將視網膜節細胞定數,來定量模型造成的傷害大小程度,也可用以評估介入藥物的功效。

1. 一百二十毫米汞柱,六十分鐘; 特殊免疫染色  
(圖示: 實驗組; 對照組)

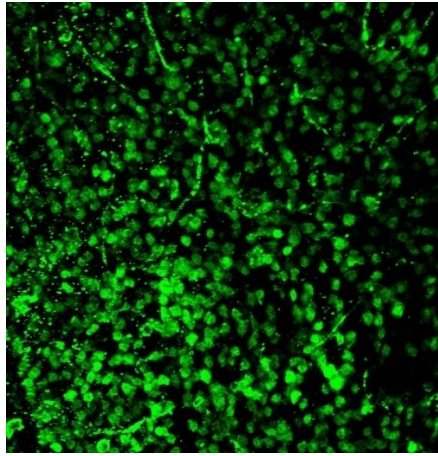
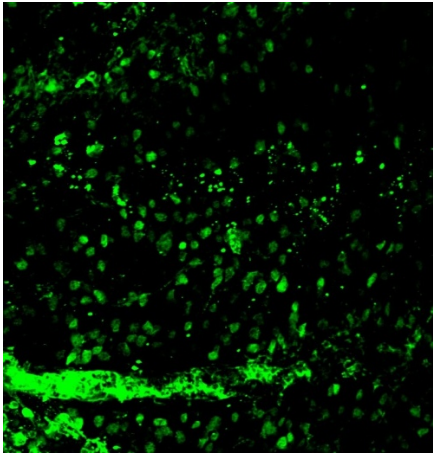
小鼠 A



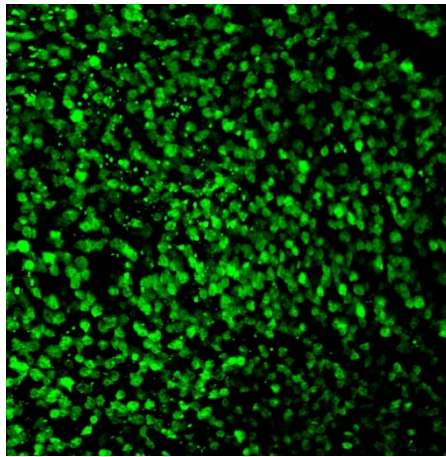
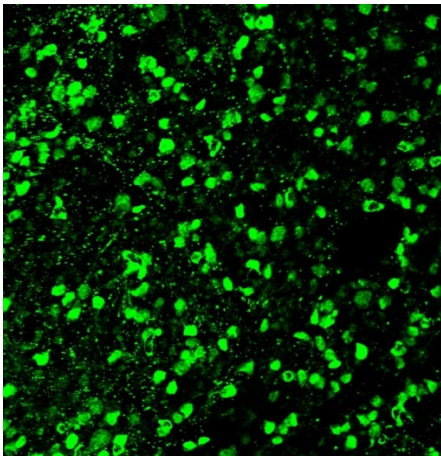
小鼠 B



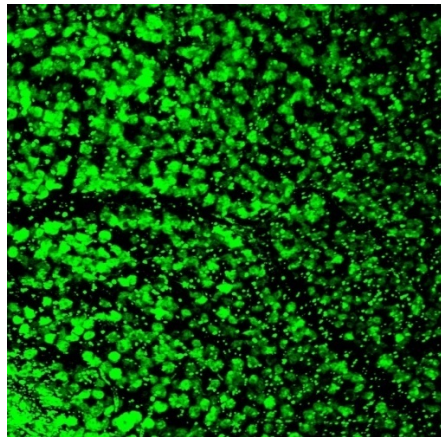
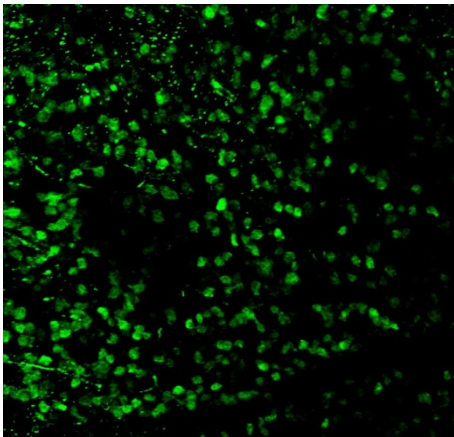
小鼠 C



小鼠 D

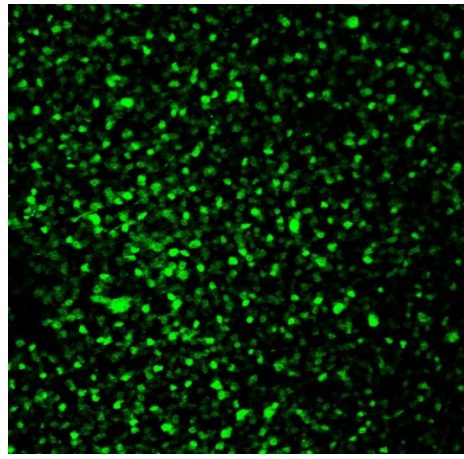
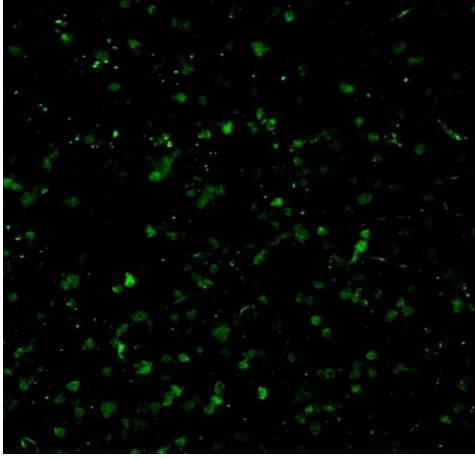


小鼠 E

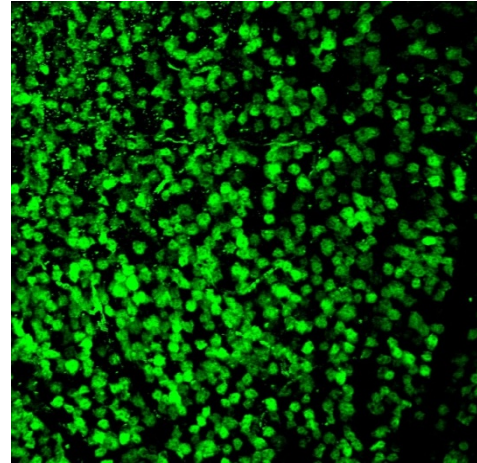
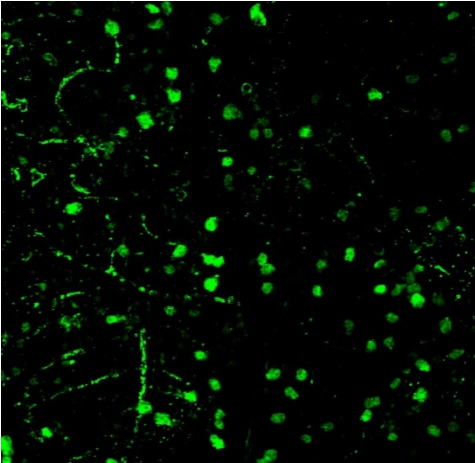


2. 一百二十毫米汞柱，九十分鐘; 特殊免疫染色  
小鼠 F

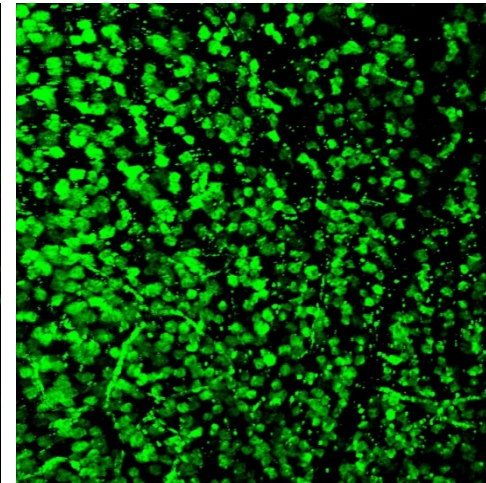
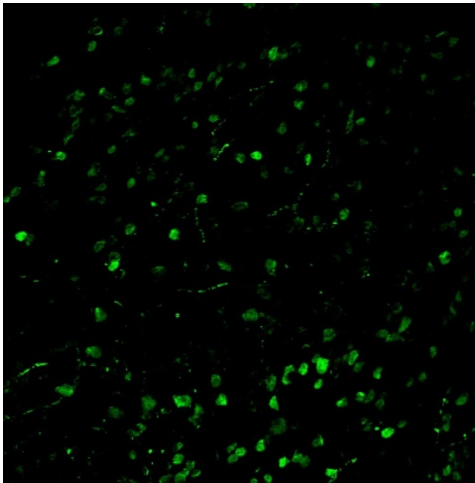




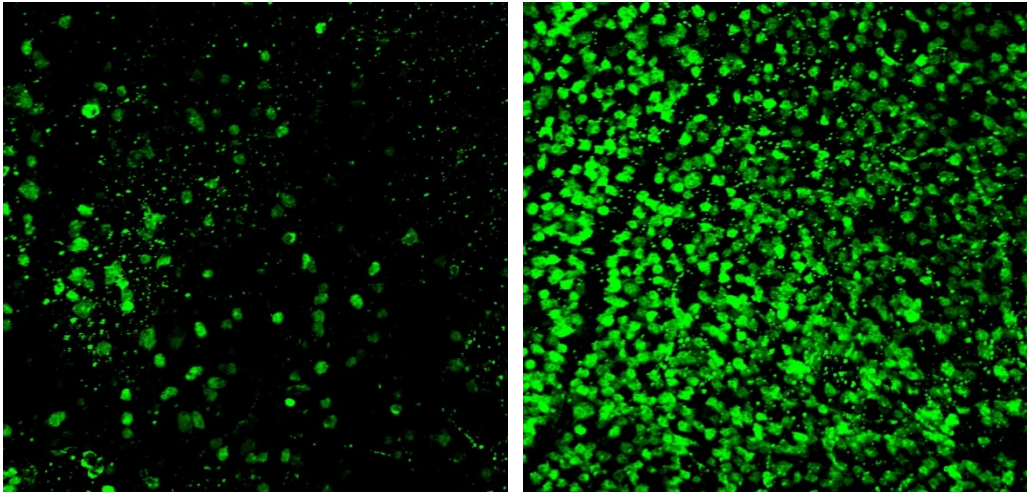
小鼠 G



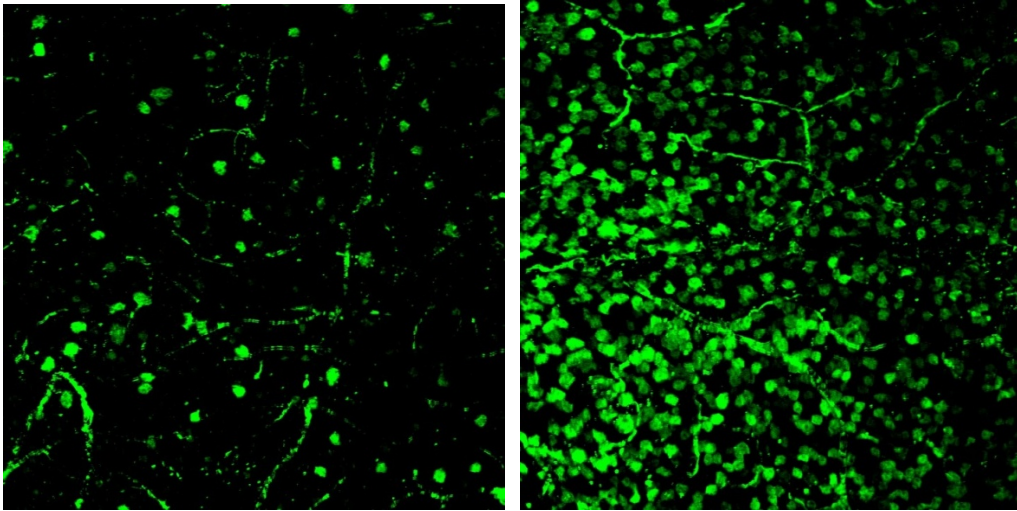
小鼠 H



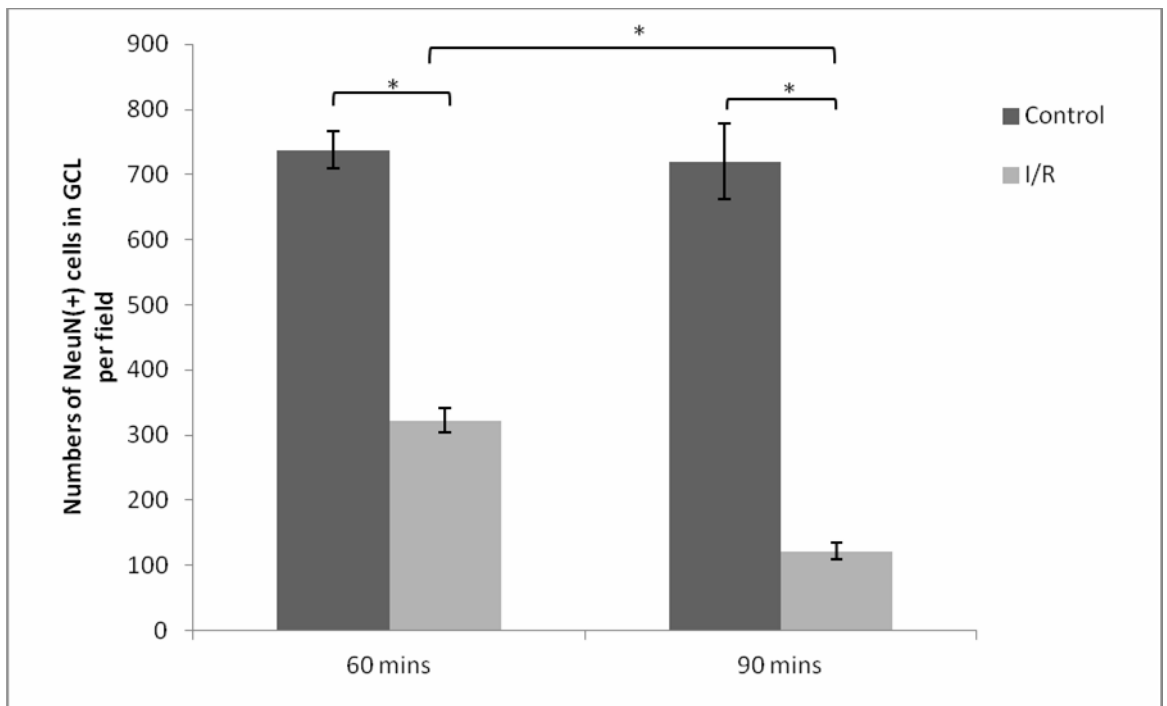
小鼠 I



小鼠 J

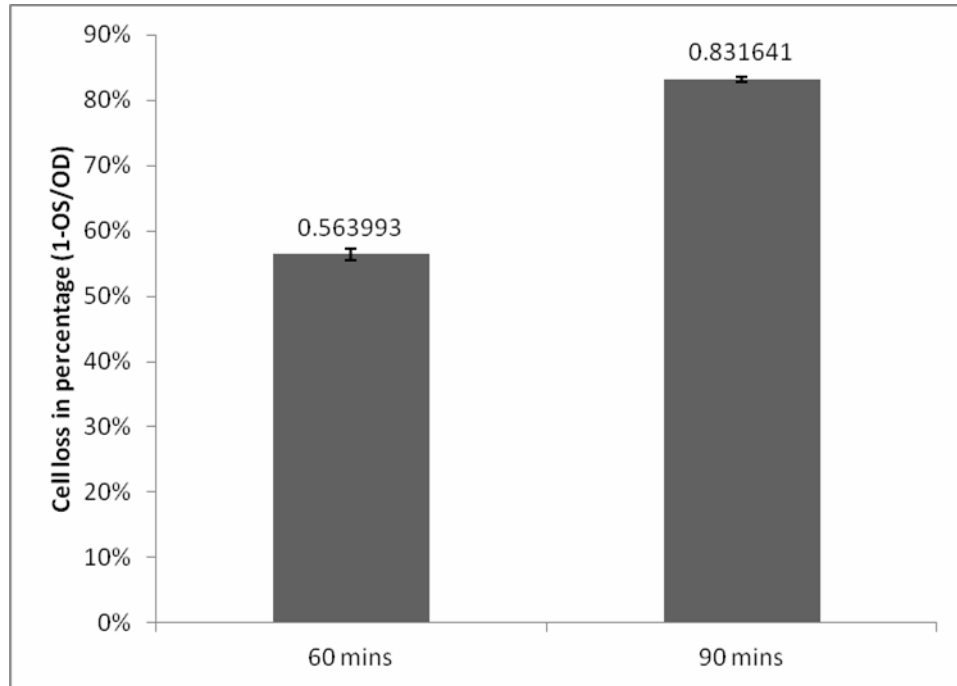


3. 經過缺氧再灌流損傷模型，六十分鐘及九十分鐘的差異比較





明顯可看出九十分鐘明顯比六十分鐘的傷害大小差異。

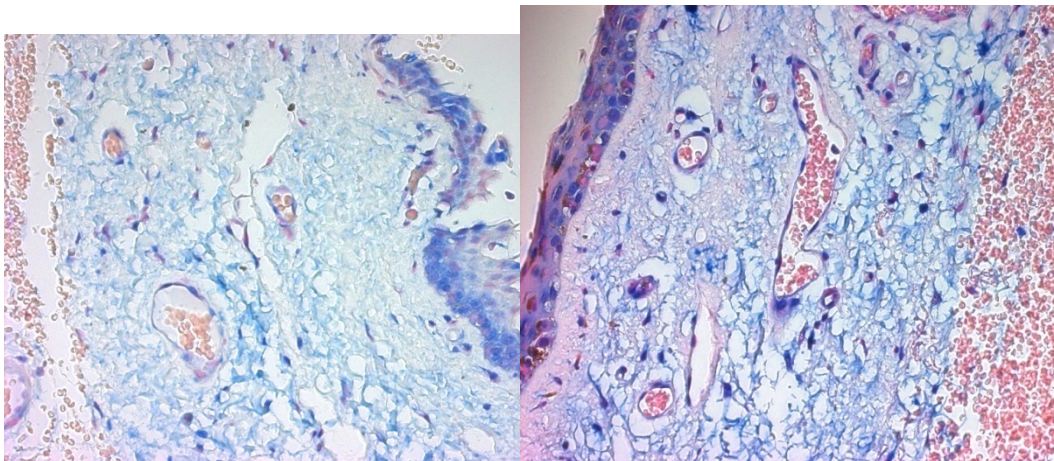


經過練習後，可以維持每次模型傷害程度的穩定，上圖可見一百二十毫米汞柱維持六十分鐘的傷害約為百分之五十六的視網膜節細胞喪失，而九十分鐘會造成更高至百分之八十三的視網膜節細胞喪失。

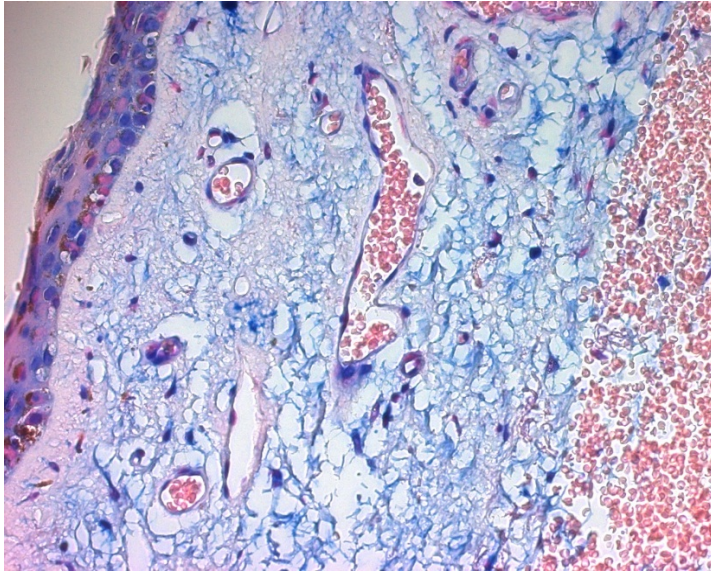
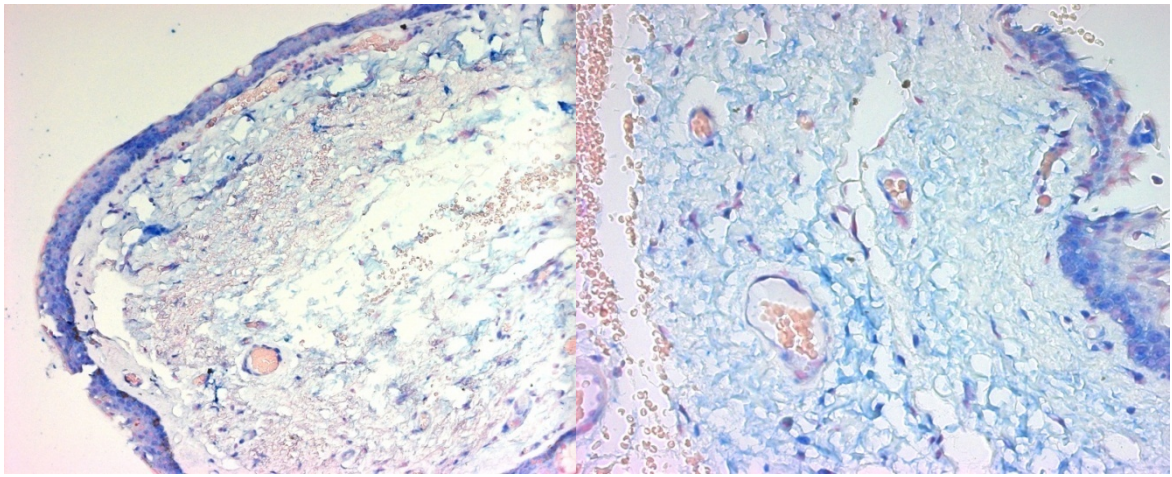
## (二)人體眼翳組織免疫染色

將組織切片以 Nrf2 (NF-E2 相關因子 2) 抗體做免疫染色，以下呈現為抗體以 1:25 稀釋之染色後顯微鏡照像圖。

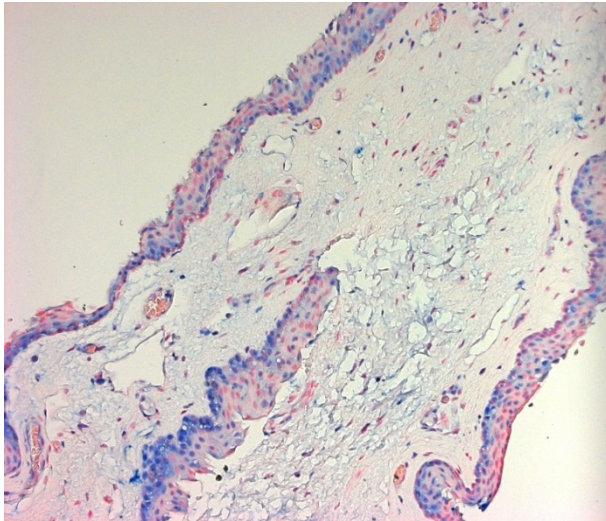
### 1. 眼翳組織



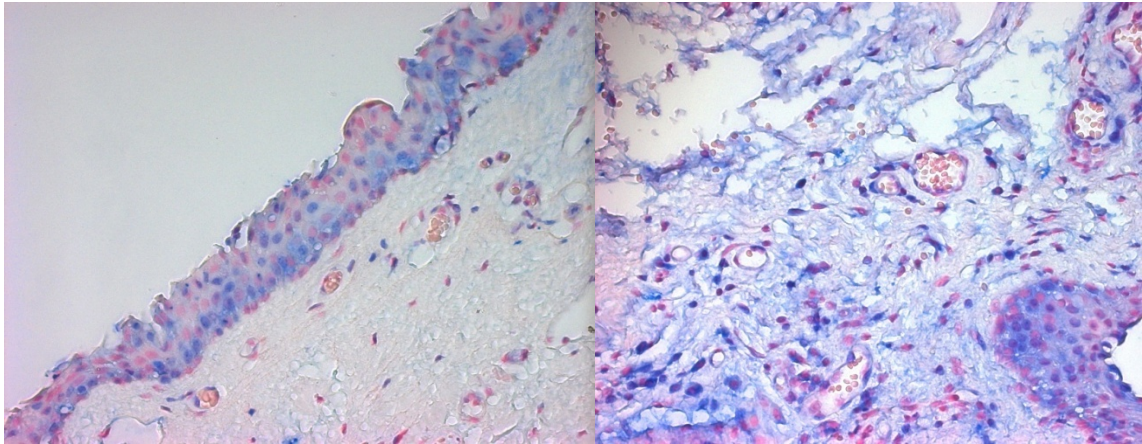
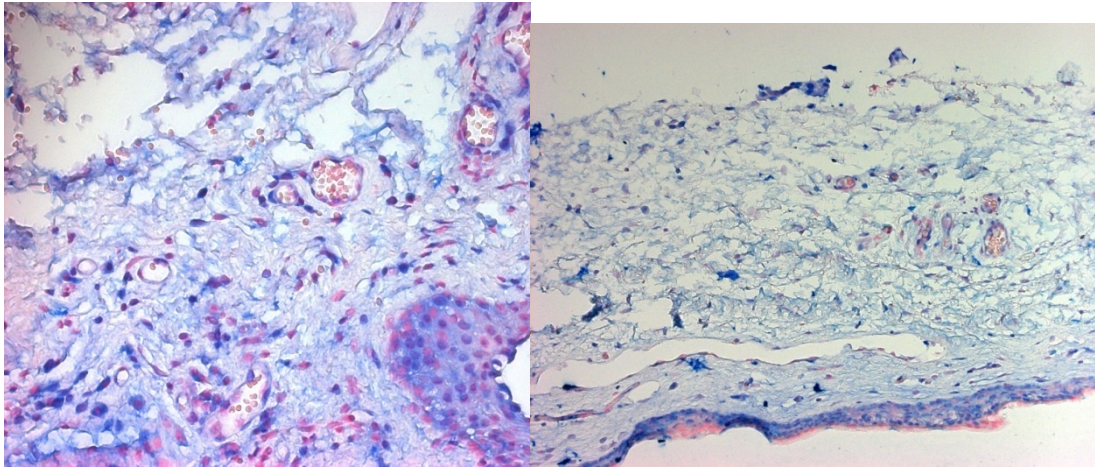




2. 對側眼結膜(對照組)







可見眼翳組織及正常結膜組織皆呈 Nrf2 陽性反應，但在上皮組織的分布有些微差異，眼翳的上皮主要分布在底部，而正常結膜的上皮呈散布狀；另外基質的血管內皮細胞於眼翳組織內 Nrf2 的染色強度大於正常結膜組織。

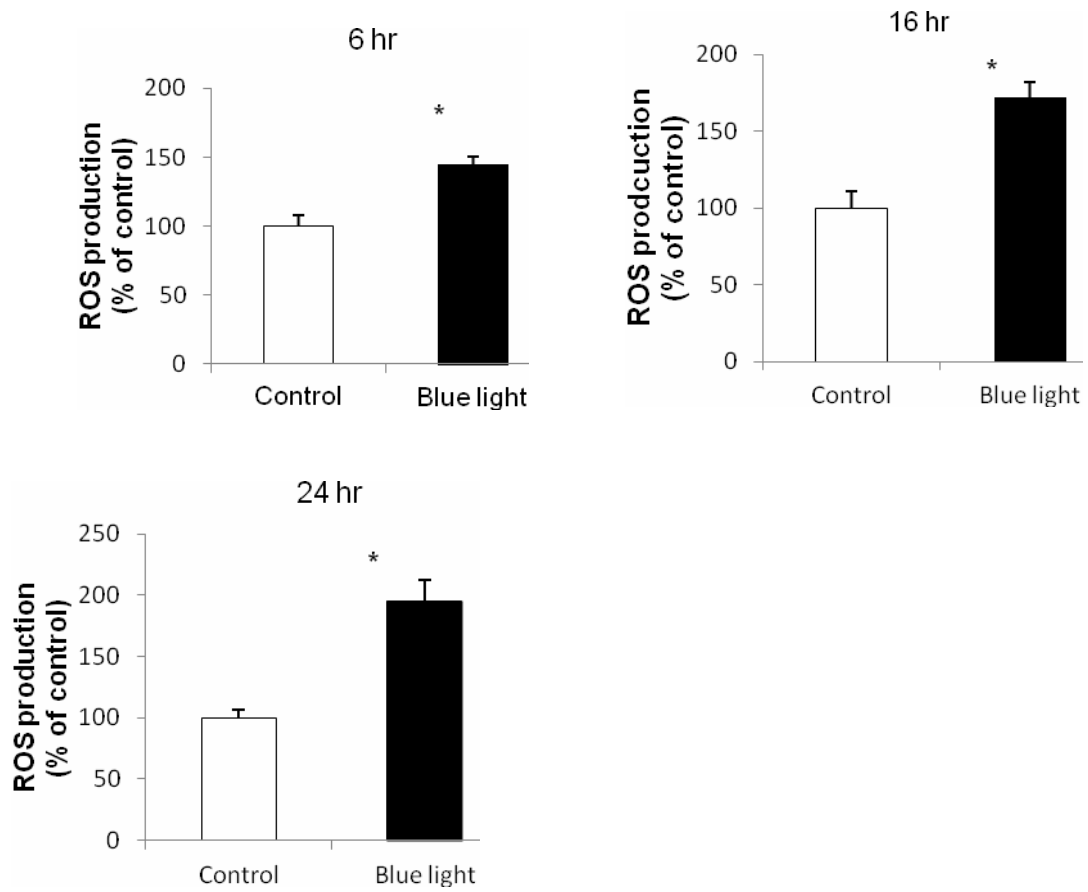
### (三) 藍光致光氧化壓力及光受器細胞傷害

1. 實驗室以可符合細胞培養箱大小的 LED 藍光光源，可用於細胞株實驗模型需長時間藍光照射之實驗，利用薄紙調整光強度，達到實驗條件要求。

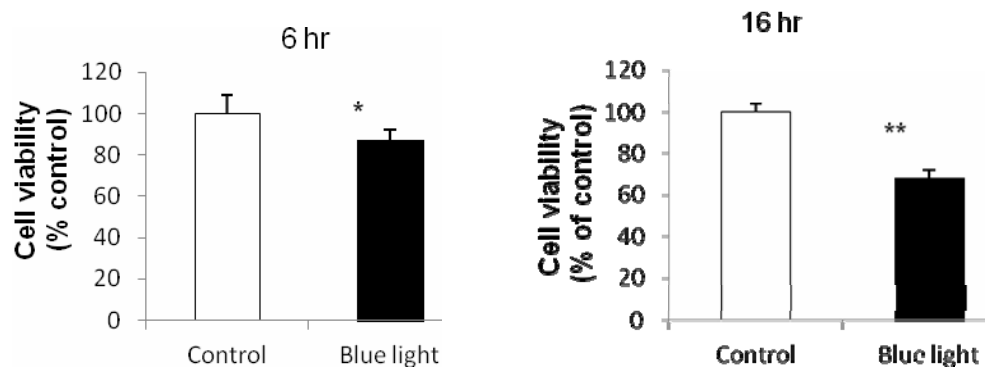


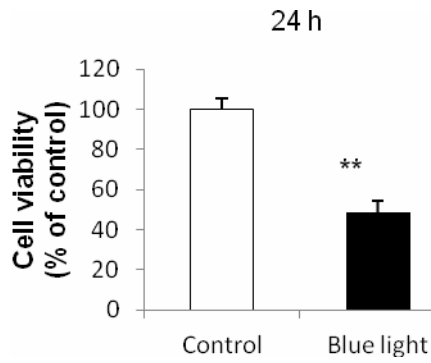
2. 先確立此藍光模型造成的感光受器細胞株，是否可達一定程度的氧化壓力升高，下圖可見藍光導致的自由基產生相較於對照組有明顯提高之情形，且隨著暴露時

間拉長而有愈趨嚴重的狀況。

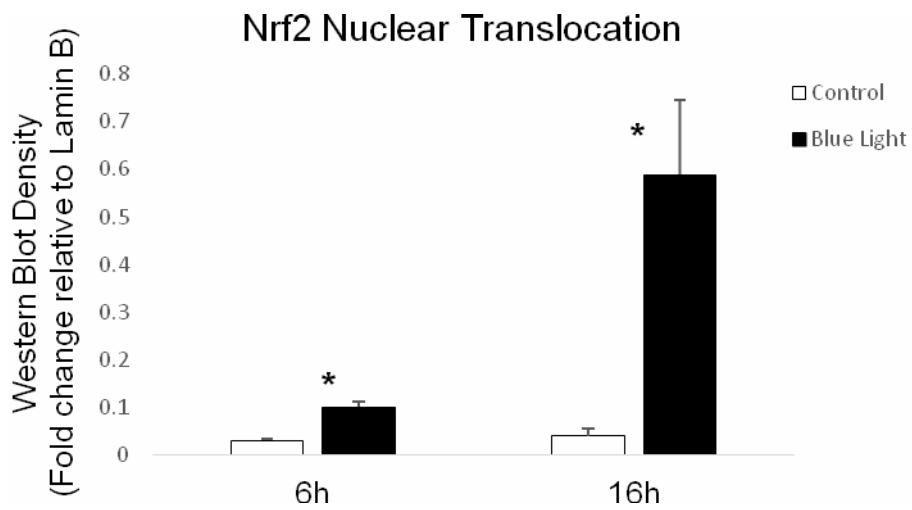
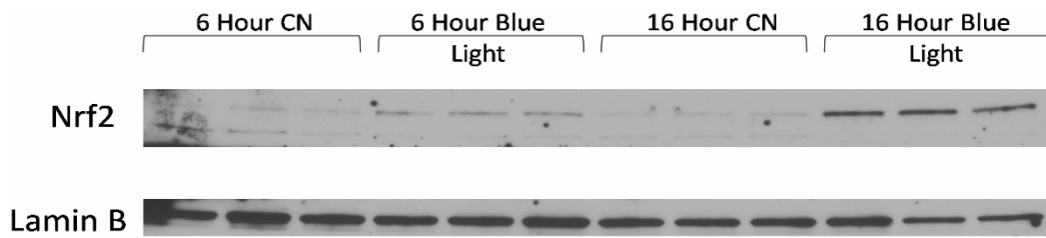


3. 此藍光模型造成之光受器細胞損傷，以細胞活性檢測亦可顯示暴露藍光時間愈長，光受器細胞活性愈低。



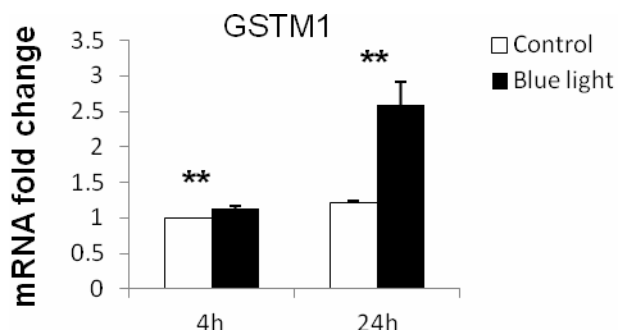
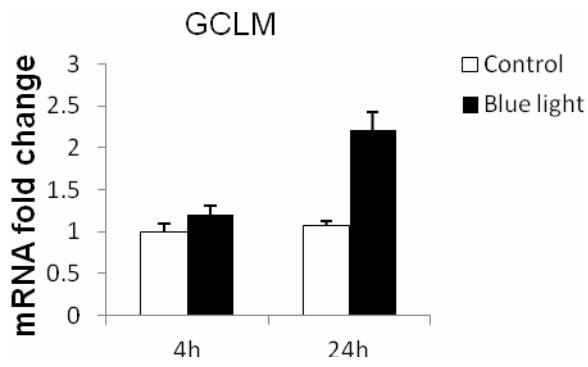
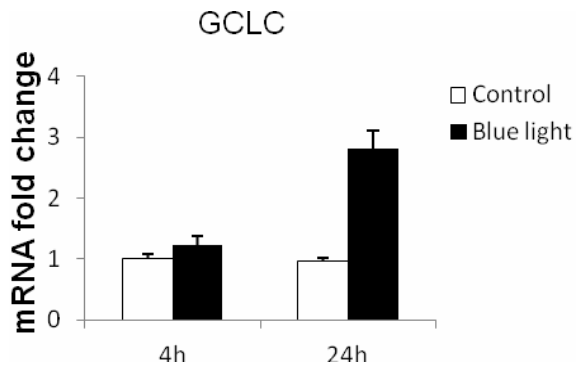
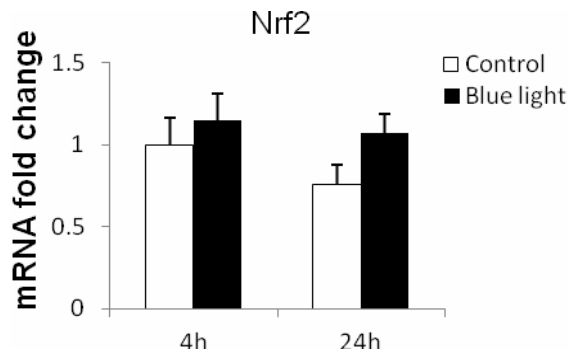


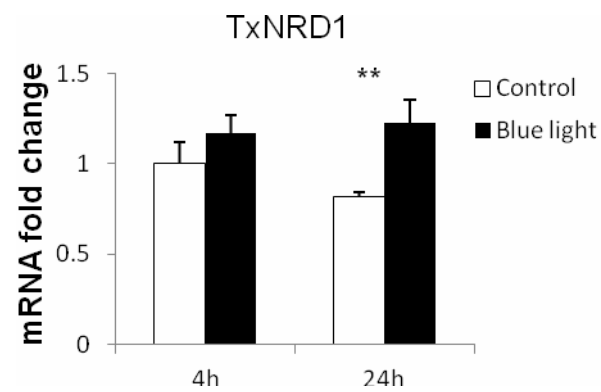
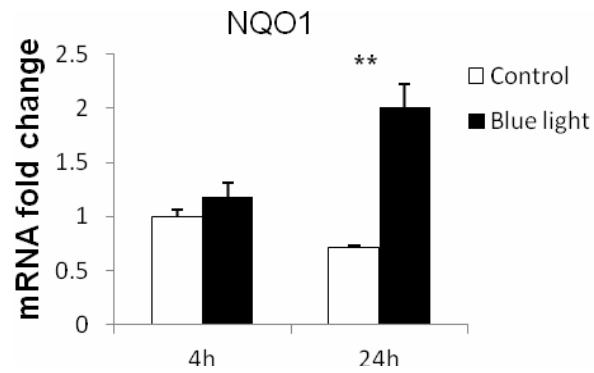
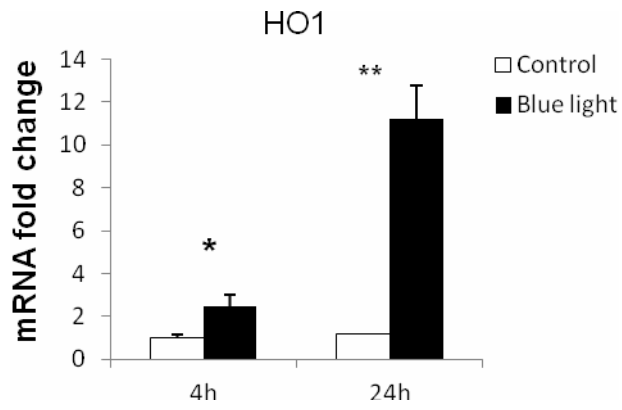
4. 西方墨點檢測蛋白質表現，發現藍光會刺激 Nrf2 活化，而由細胞質往細胞核移動，因此在細胞核分離出的蛋白質，可發現 Nrf2 蛋白質量顯著增加之情形。



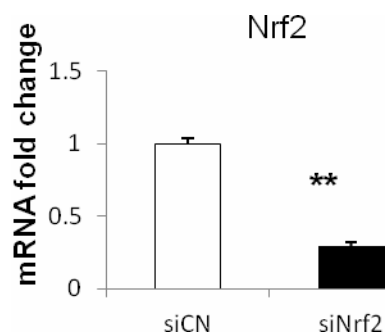
5. 以定量聚合酶連鎖反應檢測(real-time PCR)，確認 Nrf2 活化往細胞核遷移後，進一步刺激下游抗氧化基因的表現。



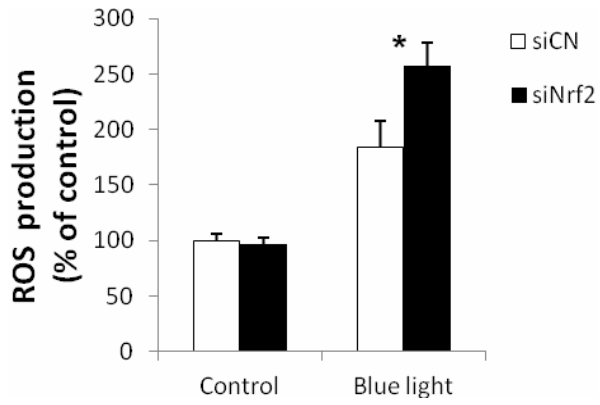




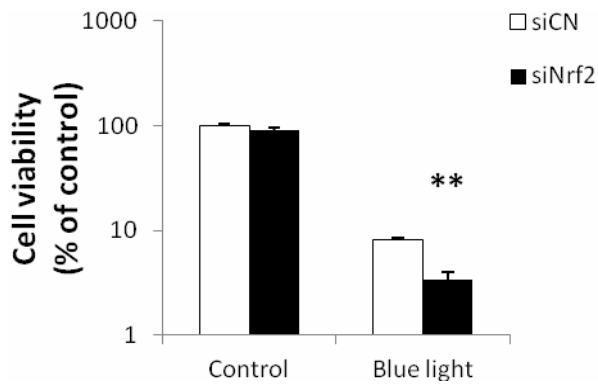
6. 爲了確認 *Nrf2* 對光受器細胞於藍光傷害扮演之保護角色，以小分子干擾核糖核酸對 *Nrf2* 做專一性基因剔除，發現 *Nrf2* 基因缺乏會加重藍光致氧化自由基之增加，及細胞活力下降。



*Nrf2* 基因剔除效率 70%



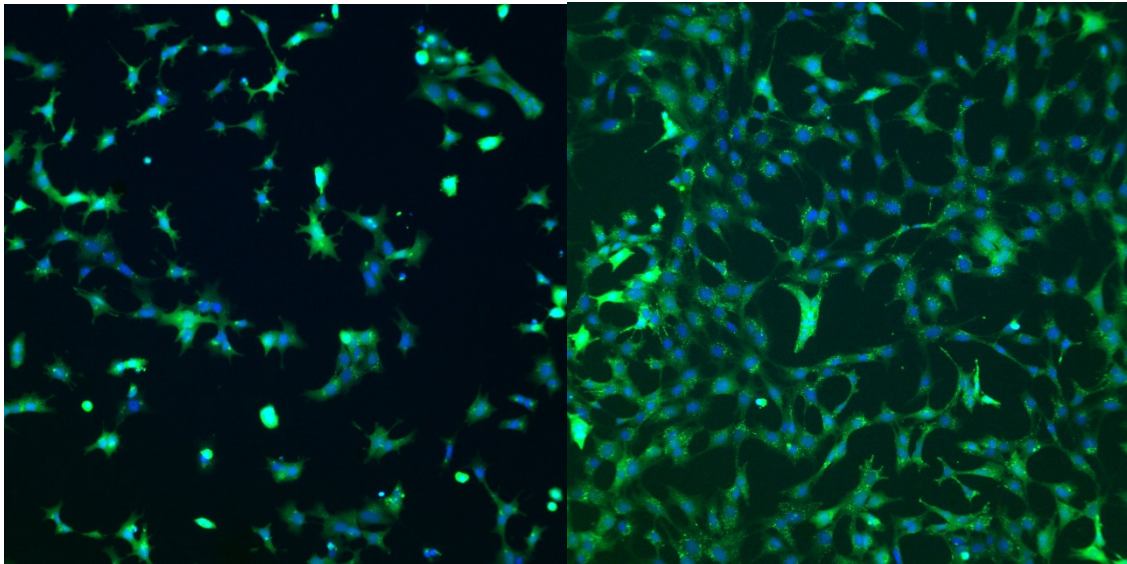
Nrf2 缺乏會造成藍光致自由基產生更逾劇增加



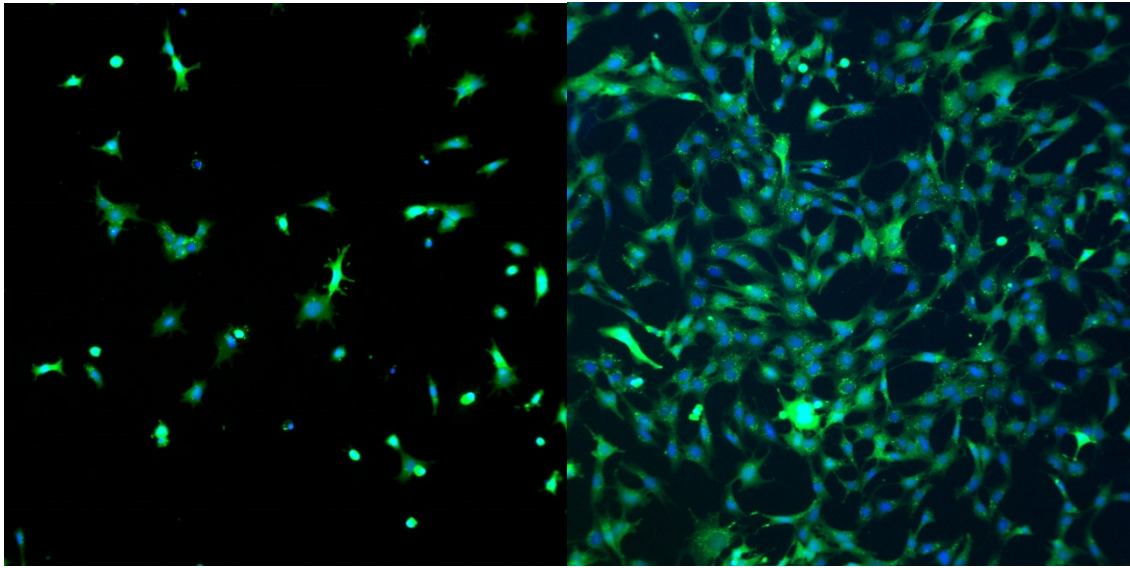
Nrf2 缺乏會使因藍光降低之細胞活性，更加減低

藍光照射

對照組



(無 Nrf2 缺失)



(Nrf2 缺失)

上圖為特殊細胞染色，綠色部分染色為活細胞，藍色為所有細胞(包含活細胞及死細胞)之細胞核。

以上之實驗成果已於 105 年 12 月被國際期刊 *Experimental eye research* 接受。

### 三、心得

雖然之前沒有很豐富的實驗室經驗，但是能夠到美國霍普金斯醫學院眼科中心，參與研究，著實收穫良多，除了系統性的學習到實驗的方法技巧，還有實驗設計及施行等等。另外中心內常定期舉辦學術討論會議，可聽到一些最新最前端的眼科研究。對於一些想法觀念的建立，更能激起不同的火花。

### 四、建議事項

回國後若能繼續與美國的實驗室保持合作關係，或一定程度的聯繫，對於將來研究的進行會更加裨益。