

出國報告（出國類別：進修）

美國希望之城醫學中心(City of Hope)貝  
克曼研究機構(Beckman Research  
Institute)進修報告

服務機關：臺北榮民總醫院重症醫學部

姓名職稱：主治醫師 吳承學

派赴國家：美國/加州

出國期間：107 年 9 月 01 日至 108 年 8 月 27 日

報告日期：108 年 11 月 15 日

## 摘要

美國希望之城醫學中心為美國相當有名的癌症治療中心，在 2019 年美國醫院癌症領域的排名中名列第 11 名。但這個醫學中心除了癌症領域的研究外，附屬於醫院的貝克曼研究機構的糖尿病研究中心也是在基礎研究領域非常有名的研究機構，更是人造胰島素的起源地。此次出國進修的目的在於貝克曼研究機構學習當前非常熱門的研究議題-表觀遺傳學(epigenetics)。我的指導教授 Zhen Chen 為內皮細胞功能與表觀遺傳學領域傑出的學者。一開始我們計畫研究的主題: 敗血症與內皮細胞功能的計畫，因為預期將會耗時太久，因此改為研究探討新的糖尿病用藥 SGLT2 抑制劑(dapagliflozin)對周邊血管缺血及內皮細胞功能是否有影響，然而經過幾個月後的研究後發現其中並無關聯性。其後同時進行兩個計畫: (一)內皮細胞老化的表觀遺傳學、(二)抑制 micro-RNA 92 對心臟纖維化的影響。這兩個研究經過約 8 個月的實驗，第一個研究發現 RAMP2-AS1 是影響內皮細胞老化的重要非編碼 RNA，另外第二個研究也初步證明抑制 micro-RNA 92 可能可以減少心臟纖維化的 RNA 表現，但因為受限於進修時間的限制，這兩個主題其中機轉部分的探討仍尚需實驗室的同仁完成後續的研究。雖然一年的時間並無法完成一個完整的研究，但已學習到表觀遺傳學的原理，可以應用在往後與基礎研究專家的研究合作。

**關鍵字:** 表觀遺傳學(epigenetics)、內皮細胞

## 目次

1. 摘要	.p1
2. 目的	.p2
3. 過程	.p2
4. 心得	.p6
5. 建議	.p7
6. 附錄	.p8

## 一、 目的

美國希望之城醫學中心為美國相當有名的癌症治療中心，在 2019 年美國醫院癌症領域的排名中名列第 11 名。但這個醫學中心除了癌症領域的研究外，附屬於醫院的貝克曼研究機構的糖尿病研究中心也是在基礎研究領域非常有名的研究機構，更是人造胰島素的起源地。此次出國進修的目的在於貝克曼研究機構學習當前非常熱門的研究議題-表觀遺傳學(epigenetics)。

## 二、 過程

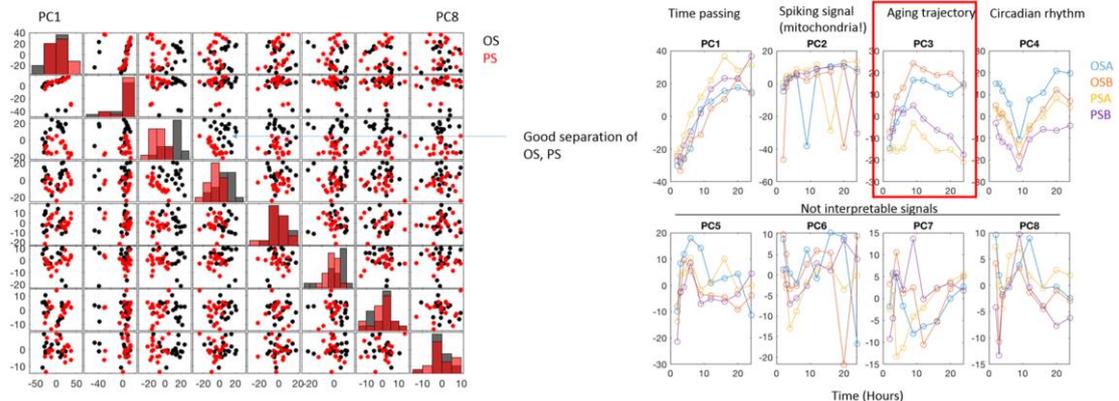
我前往進修的實驗室主要從事非編碼 RNA(non-coding RNA)與內皮細胞功能(endothelial function)為主軸的研究。Zhen Chen 教授是這個實驗室的主持人(<https://www.cityofhope.org/faculty/zhen-chen>)。Zhen 為基礎研究出身，於加洲大學聖地亞哥分校(UCSD)的研究室為博士後研究員，當時主要研究內皮細胞功能並接觸一些表觀遺傳學，發表過許多優秀的文章後便受邀至貝克曼研究機構擔任實驗室的主持人。此時才開始將研究重心放在表觀遺傳學，並在 2018 年於 Nature communication 發表 lncRNA(Long Non-Coding RNA)在內皮細胞功能的重要角色。而身處貝克曼研究機構的研究主持人也多必須進行糖尿病(diabetes)的相關研究，因此我的實驗室也進行內皮細胞功能與脂肪代謝機轉的研究。所以簡單的說，我的實驗室兩大主軸分別為內皮細胞功能與表觀遺傳學研究。

由於表觀遺傳學是屬於基礎科學的研究，對多數醫生都是很陌生的東西，因此我的進修過程必須按部就班不停的試誤學習,前後分為三個計畫:

**第一個計畫:**一到實驗室花了約兩個月的時間學習表觀遺傳學的實驗技術，包含 RNA DNA 的萃取以及定量(qPCR)等，以及基因剔除鼠(knockout mice)是否有成功的檢定。一開始原先預定進行探討敗血症與內皮細胞功能關係的題目，也因準備時間可能曠日廢時而改為其他題目。直到二個月後才先初步選定選與糖尿病跟內皮功能可能都有關聯的題目--我去探討新的糖尿病用藥 SGLT2 抑制劑(dapagliflozin)對周邊血管缺血是否有影響。為了這個實驗，我一方面必須練習如何幫小鼠製造出周邊血管缺血的動物模式，一方面我要培養內皮細胞,檢測是否添加 SGLT2 抑制劑於內皮細胞後會改善內皮細胞的功能。這實驗就花了我好幾個月的時間，結果發現不論在何種時期給予 SGLT2 抑制劑，對於內皮細胞功能都不會影響，所以這計劃就告結束。而這個研究也開始也讓我了解到基礎研究需要投入許多的時間，但卻不一定會有完美的結果。

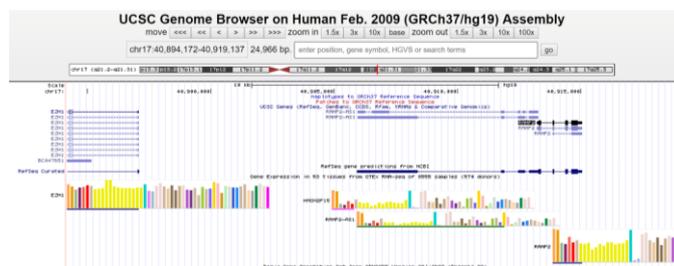
**第二個計畫:**由於第一個計劃的失敗，讓我們思考如何在剩下有限的進修時間可以有效繼續進行，我們選擇以細胞培養為主的研究可以減短研究時程。主題為找到內皮細胞老化的重要 RNA 基因。我們利用水流沖刷內皮細胞的方式，製造對比的老化及年輕化的內皮細胞，將這些細胞送去作 RNA 測序(RNA-seq)。接者與統計方法學教授 Dr. Russel 合作,以時間為橫軸，基因表現為縱軸，找出前 50 個可能是影響內皮細胞老化

最重要的 lncRNA 基因，我們從這 50 個 lncRNA，挑出一個可能最有前途的 RNA: **RAMP2-AS1**。從這個實驗我學到了如何去發現一個重要 RNA 的邏輯過程。接者為了驗證 RAMP2-AS1 是重要的老化基因，我們用藥物去刺激內皮細胞，製造老化的狀態。果然發現 RAMP2-AS1 會隨著細胞的老化而改變其表現強度。接者我們必須了解 RAMP2-AS1 與老化之間是否有因果關係。驗證方式便是阻斷或加強 RAMP2-AS1 的表現，來看內皮細胞的功能或老化(染色的方式)是否有改變。於是我們設計了不同的 RAMP2-AS1 阻斷劑(LNA)做來阻斷 RAMP2-AS1 的基因表現。然而一開始去驗證我們做出來的 RAMP2-AS1 阻斷劑是否能夠成功阻斷 RAMP2-AS1 表現的這個過程是不容易的，我們不停的修正實驗技巧，找出可能的誤差，每一次的修正就需要重新再培養細胞，相當的耗時。這樣經過了八個月，經由不斷的修正，我們才證明我們設計的 RAMP2-AS1 阻斷劑(LNA)可以發揮功效，而且的確可以影響在細胞老化的下游表現。然而這樣的驗證完成後已經接近我即將要完成進修返院的時間。後續的步驟將是要找出 RAMP2-AS1 與細胞老化的機轉，方法是先要做 RAMP2-AS1 阻斷後的細胞 RNA 測序，決定可能的相關 coding RNA 再進行機轉驗證的實驗，而這樣的過程可能還需要一年或更久的時間，所以後續的部分將由實驗室的同仁繼續幫忙完成。

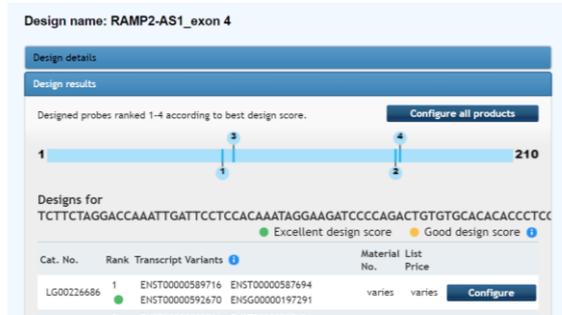


1. 利用統計方式分析出內皮細胞老化的趨勢

- |                   |                    |
|-------------------|--------------------|
| 1. MIR509HG       | 21. RP11-356G12    |
| 2. C1orf132       | 22. RP11-119G21.4  |
| 3. LINC01358      | 23. RP11-039E1.3   |
| 4. RP11-117P02.3  | 24. RP11-433G2.3   |
| 5. RP11-260J.1    | 25. W01-039798.2   |
| 6. RP11-201A1.1   | 26. RP11-66824.2   |
| 7. LINC01629      | 27. RP11-66824.2   |
| 8. AC122136.2     | 28. RP11-12G12.7   |
| 9. RP11-493N16.2  | 29. RP11-254P7.2   |
| 10. RP11-286C.2   | 30. CP041146-401   |
| 11. RAMP2-AS1     | 31. CTC-668916.20  |
| 12. MIR137HG      | 32. RP11-5468.1    |
| 13. CTC-939F2.2   | 33. RP11-779C24.5  |
| 14. RP11-534C12.1 | 34. RP5-108813.1   |
| 15. RP11-496D21.2 | 35. LINC01295      |
| 16. RP11-473A2.4  | 36. PVT1           |
| 17. RP11-1100L3.8 | 37. RP11-479F14.1  |
| 18. RP11-231J23.2 | 38. RP11-479F14.2  |
| 19. NEAT1         | 39. RP11-079F14.8  |
| 20. LINC00520     | 40. RP11-429J1.3   |
|                   | 41. RP11-610R.5    |
|                   | 42. CTD-2134A5.5   |
|                   | 43. LINC01013      |
|                   | 44. LINC00687      |
|                   | 45. LINC00682      |
|                   | 46. RP11-147L13.11 |
|                   | 47. RP11-147L13.12 |
|                   | 48. RP11-147L13.13 |
|                   | 49. RP11-908R23.1  |
|                   | 50. RP11-534C17.6  |
|                   | 51. PSMB8-AS1      |

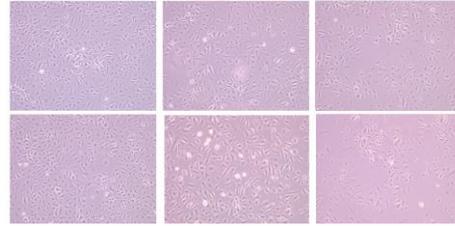


2. 從 50 個 lncRNA，挑出一個可能最有前途的 RNA: RAMP2-AS1



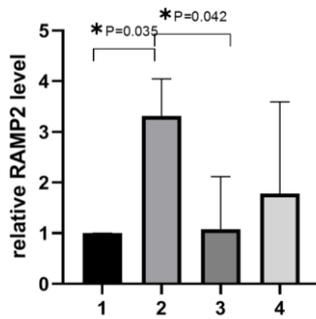
After transfection 5 hours, changing to media culture. LNA1-Day 2

Control (transfect with Scr 50 nM)	Transfection with LNA_1 12.5 nM	Transfection with LNA_1 50nM
Control (transfect with Scr 50 nM)	Transfection with LNA_1 25 nM	Transfection with LNA_1 100 nM

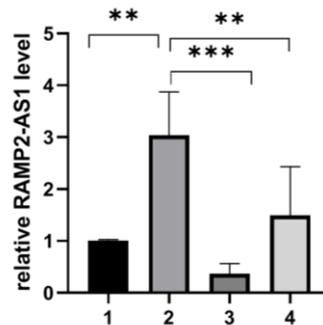


### 3. 製作 RAMP2-AS1 阻斷劑，進行細胞實驗

RAMP2 level



RAMP2-AS1 level

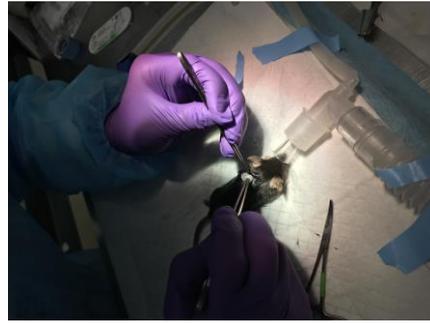


1:untreated-scramble  
 2:ATV-scramble  
 3:ATV-RAMP2-AS1 LNA1  
 4:ATV-RAMP2-AS1 LNA2  
 N=3-8

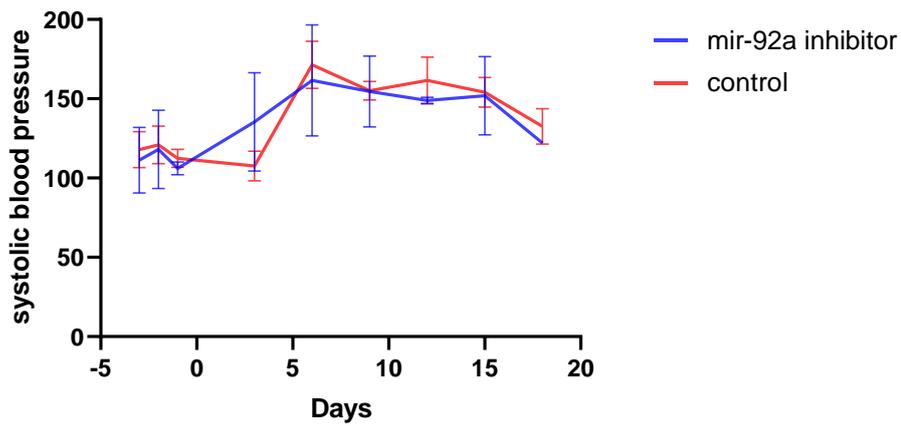
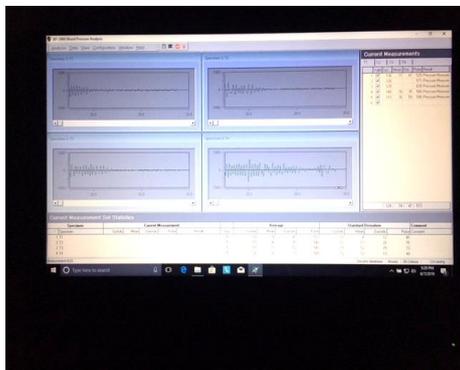
\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

### 4.RAMP2-AS1 阻斷劑成功阻斷 RAMP2-AS1

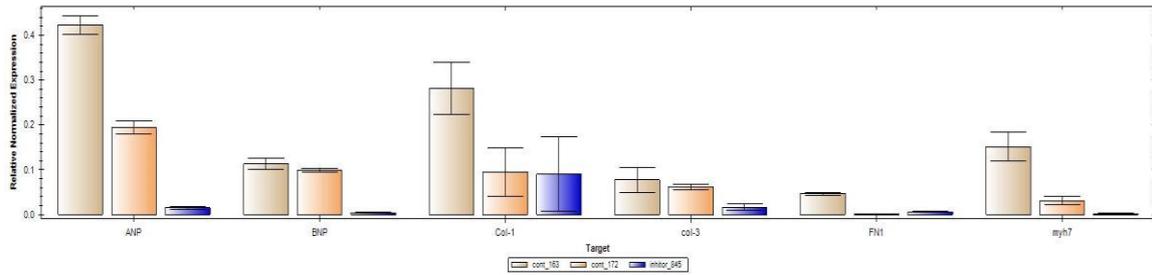
**第三個計劃:** 是由動物實驗下手,我們實驗室做出新型 microRNA-92 的抑制劑。我的指導教授在 2015 年曾經發表抑制 microRNA-92 可以減少動脈硬化。而那時用的動物模型方法為替小鼠皮下置入血管張力素 II(Angiotensin II)的幫浦,讓血管張力素 II 慢慢於體內釋放 28 天後創造出動脈硬化狀態。我們在閱讀大量文獻後,發現同樣的動物模型也可以製造出心肌纖維化的狀態。於是我們花了 2 個月練習將藥物可以順利從鼠尾的靜脈打入,這個過程從一開始都打不到血管,到後來成功率可以到 8 成以上。同時等待老鼠長大到 8-12 週後,才開始真正的實驗。實驗內容包含置放皮下血管張力素 II 的幫浦、每 3 天定期測量老鼠的血壓、以及每周由鼠尾施打 microRNA-92 的抑制劑。不幸的有部分老鼠在施打藥物過程中暴斃,因此需要立即解剖取下器官冷凍以待日後分析。這樣的一輪實驗也需要花費幾個月的時間,幸運的是最後犧牲老鼠後取下心臟檢體作的分析,的確發現 microRNA-92 的抑制劑可以減少心肌纖維化的表現。而下一階段針對機轉的研究,則需要做打完 microRNA-92 抑制劑後老鼠心臟肌肉的 RNA 測序,根據測序的結果,才有辦法決定其後決定機轉的方向。而這樣後續的部分將也因為我已進修結束而交由實驗室的同仁繼續幫忙完成。



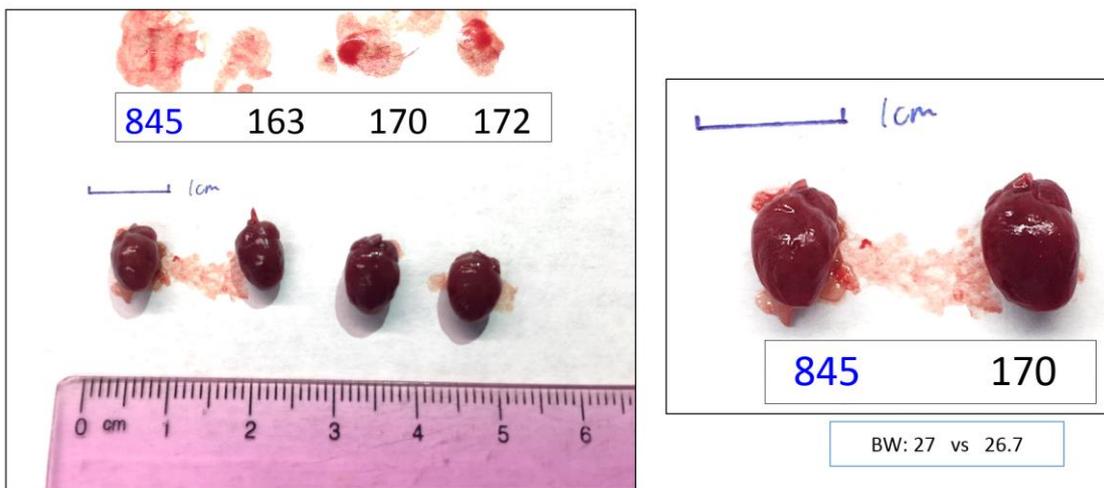
1. 替小鼠皮下置入血管張力素 II(Angiotensin II)的幫浦



2. 光學測量小鼠的血壓



3. qPCR 定量: microRNA-92 的抑制劑可以減少心肌纖維化的表現



4.施打 microRNA-92 抑制劑後小鼠的心臟不會擴大

### 三、心得

美國的希望之城醫學中心占地遼闊，病人端年收入約 38 億美金。但真正的臨床醫療大樓只有一棟，共有 217 可用床位。而其他的建築物都是研究大樓，可見其對試驗研究的重視。醫院大部分的員工也是隸屬於研究部門。而這些部門各有所長，可以互相合作但也需收費，譬如生物資訊部門可以幫忙基因測序結果的分析，檢驗部門可以幫忙做組織處理，切片染色等，也有幫忙製作特殊基因鼠的部門，所以是一個很完善的研究中心。而這些研究計畫的主持人，也多不是醫療人員，這樣的醫院結構跟台灣醫院是有很大的不同，它在臨床發展之餘，投入更多的人力跟財力來做基礎研究。一但有研究成果很快就會申請專利以及產學合作。我所學習的是很基礎的研究，目前跟臨床要作聯結仍有一段距離，但基礎研究跟臨床研究不一樣的地方是基礎研究必須追根

究底把詳細機轉研究出來，所以完成一個主題的研究總需要個三年五載，並非一蹴可機。我這一年的時間最後並無法完成一個完整的實驗，但已經學習到基礎研究的方法及精神，也了解一個人是很難同時兼顧臨床跟基礎研究，因此回國後我們仍會與希望之城醫學中心保持合作關係，我們完成臨床檢體的收集及檢驗研究，她們負責基礎細胞跟動物的試驗，共同完成一個實驗。也期許可以幫助基礎研究的學者可以與臨床醫師合作，完成不同層次的研究主題。

#### 四、 建議事項

醫院的醫師工作繁忙，難有品質良好的基礎研究，多需與陽明大學的基礎研究老師合作。醫院其實可以考慮成立自己的專科研究中心，其中的試驗主持人可以不用是醫師，而是以基礎實驗為主要工作內容及發展重點，並著重專利申請與產學合作，如此醫院才有機會發表文章於 Cell、Nature、Science 的雜誌上，進而應用於臨床，醫院的形態也會更趨近於歐美的一流醫院，基礎、臨床、轉譯醫學並重。另外基礎研究與臨床研究的性質截然不同，進修往往需要個三年五載，國外的消費高出國內許多，而出國的主治醫師多已成家立業，需要負擔全家開銷。第一年的公費補助及底薪尚能勉強支撐，但若需展延第二年的進修，則對多數醫師都是沉重的負擔，因為第二年已沒有底薪支援。建議醫院對於多留第二年以上進修的醫師，可以協助申請較多的基金會補助。

## 附錄

Zhen Chen 實驗室成員合照，中間為 Zhen Chen 教授，今年被選為 City of Hope 的 rising star

