出國報告（出國類別：進修研究）

美國希望之城醫學中心進修心得

服務機關：臺中榮民總醫院 心臟血管中心
姓名職稱：賴志泓 主治醫師
派赴國家/地區：美國加州
出國期間：**2018/8/31-2020/8/5**
報告日期：**2020/8/31**

目　次

摘要..... 2

目的..... 3

過程..... 3

心得..... 10

建議..... 10

附錄.....11

摘要:

在美從事基礎分子生物學研究，對 non-coding RNA 與內皮細胞功能關研究。Non-coding RNA 為 RNA 但不具有轉譯成蛋白質能力的 RNA，近期發現這樣的 RNA 在基因的表現與調控扮演許多腳色，且有需多未知有待開發其功能的 non-coding RNA. 在此研究項目為 non-coding RNA 與內皮細胞調控。藉由研究人體覆蓋血管與交換調控功能的內皮組織與 non-coding RNA 的關聯，來尋找可能調控的因子，作為預後或是治療的標的。學習實驗方法與設計，與發表國際論文。

關鍵字: non-coding RNA, endothelial function, molecular biology.

一、 目的

經由陽明大學臨床醫學研究所博士班指導老師黃柏勳教授的推薦，讓我在美國 City of Hope National Medical Center, Duarte, California, USA (美國希望之城醫學中心) 的 Beckman Research Institute， Zhen Chen's lab 進修基礎醫學研究。

City of Hope 做兩大方向的研究， 癌症(美國 CART 免疫治療的濫觴, 美國#11 nationally ranked cancer hospital)與糖尿病相關研究(人造胰島素的起源地)。是以研究為主的機構。目前我所在實驗室 (Zhen Chen lab) 主要從事 non-coding RNA (epigenetic) 與內皮功能 (endothelial function)的兩大研究主軸。

Non-coding RNA 為 RNA 但不具有轉譯成蛋白質能力的 RNA，近期發現這樣的 RNA 在基因的表現與調控扮演許多腳色，且有需多未知有待開發其功能的 non-coding RNA. 在此研究項目為 non-coding RNA 與內皮細胞調控。藉由研究人體覆蓋血管與交換調控功能的內皮組織與 non-coding RNA 的關聯，來尋找可能調控的因子，作為預後或是治療的標的。

二、 過程

Zhen Chen lab 主要從事 non-coding RNA 與內皮功能(endothelial function)的兩大研究。 Zhen Chen 是我實驗室 PI。Zhen 出身 UCSD (美國加州大學聖地牙哥分校)的以研究內皮細胞功能與流體剪應力(flow shear stress)的實驗室。她過去文章像 Oxidative stress activates endothelial innate immunity through SREBP2 transactivation of miR-92a:Circulation 20151。結合目前熱門的 epigenetic 的研究，主要研究 micro or long non-coding RNA， 如像 2018 發表的 Long Non-Coding RNA LEENE Promotes Chromatin Remodeling to Enhance Endothelial Nitric Oxide Synthase -Nat Comm 20182。就是結合 endothelial function 與 epigenetic 的研究。 此外也從事結合 diabetes 的相關

研究。所以實驗室兩大主軸內皮功能與 epigenetic 研究。

Non-coding RNA 為 RNA 但不具有轉譯成蛋白質能力的 RNA，近期發現這樣的 RNA，超過兩萬個，在很多疾病與基因的表現與調控扮演許多重要腳色，特別是癌症與心血管疾病。3, 4 目前相關在臨床上應用的研究正蓬勃發展 5，但是仍對許多 non-coding RNA 的確實功用都不是很了解，這領域的開發與應用可以成為未來診斷與治療疾病的目標。4 目前許多先進的治療都開始以 RNA 為治療標的物，如以抑制 RNA 製劑(RNAi)來治療遺傳性轉甲狀腺素蛋白樣沉積症(Hereditary Transthyretin Amyloidosis)，可以看出未來以 RNA 治療方向的強烈發展性。6

本研究室另個研究重點是內皮細胞功能。內皮細胞是覆蓋我們血管內層的第一層，與血液作接觸與交換其他器官訊息與得到養分的地方，所有人體內訊息的傳遞幾乎都要透過內皮細胞開始。在心血管疾病扮演更重要腳色，比如調控血管收縮與舒放 (vasomotor)，調控凝血與抗凝血(hemostasis)，調控血管粥狀動脈硬化(atherosclerosis)等，進一步，影響高血壓，心肌梗塞，冠狀動脈疾病等疾病。故內皮細胞功能失調 (endothelial dysfunction) 是很多心血管疾病的開始，也是在老化等扮演重要的調控腳色，也是重要治療的目標。7

因此，我的研究方向探討 non-coding RNA 與內皮細胞調控的關係。我們針對內皮細胞失調可能調控的疾病，如老化，心臟血管疾病，藉由研究人體覆蓋血管與交換訊息的內皮組織與 non-coding RNA 的關聯，來尋找可能的因子，作為預後預測因子和治療的目標。

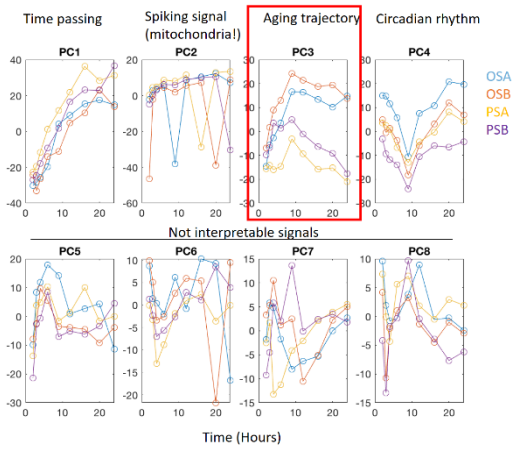
從事相關的研究主題有如下:

老化 long non-coding RNA 的找尋與機轉

老化(aging)是造成許多心血管疾病的主要因子之一。老化所引起的內皮細胞功能失調(如 NO 的生成與利用不足，血管舒張能力失調，增加 oxidative stress，促進發炎等)進一步是引起心血管疾病，也可以是治療的目標機轉。8 我們利用

內皮細胞在 shear stress stimulation 的資料庫，在不同 shear stress: pulsatile (beneficial to endothelial cells) vs oscillary flow，以時間為 trajectory，以 HUVECs (人類臍帶血管內皮細胞)為對象，分析出可能有助於防止內皮細胞老化 (aging)，對於內皮功能有保護作用的 RNA (from our RNA-seq database)。

以 principal component analysis 方法，篩出 PC3 的分組最能區分 PS vs OS。



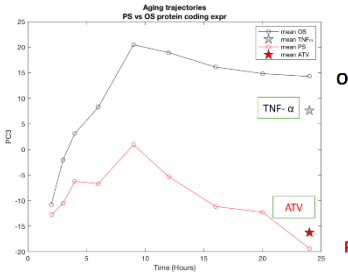
再從 PC3 中尋找 100 個候選基因，對照我們的 statin(保護內皮細胞)或是 TNF-alpha(對內皮細胞有害)的刺激反應資料庫。

Correlation with PS/OS ratio, ATV, TNF-α

• Selected with PS/OS ratio >0 (positive), ATV>0 (positive), TNF-α<0 (negative)

	gene	HUVEC Ctrl	HUVEC ATV 1uM 24hr	ATV fold change	TNF fold change	HUVEC TNFα 10ng/ml 24hr	HAOEC Ctrl	HAOEC ATV 1uM 24
2	A1BG	1.008	1.827	0.821	0.721	1.729	2.589	3.019
3	A1CF	0	0	0	0	0	0	0
4	A2M	1.019	0.782	-0.237	-0.519	0.5	1.175	1.005
5	A2ML1	0.108	0.014	-0.094	0.088	0.196	0.165	0.116
6	A3GALT2	0	0	0	0	0	0.011	0
7	A4GALT	1.509	1.368	-0.141	0.859	2.348	3.06	3.453
8	A4GNT	0	0	0	0	0	0.012	0.02
9	AAAS	5.558	5.069	-0.489	-0.814	4.744	5.643	5.336
10	AACS	3.059	3.711	0.652	0.537	3.596	3.529	3.569
11	AADAC	0.259	0.418	0.159	0.254	0.513	0.237	0.052
12	AADACL3	0	0.003	0.003	0	0	0	0
13	AADAT	0.952	0.328	-0.624	-0.157	0.795	0.392	0.31
14	AAED1	3.172	3.538	0.366	-0.095	3.087	3.955	3.606
15	AAGAB	5.099	5.107	0.008	-0.082	5.017	4.801	4.798
16	AAK1	5.128	5.555	0.427	-0.199	4.929	5.234	5.555
17	AAMDC	5.237	5.457	0.22	-0.524	4.713	5.2	5.453
18	AAMP	5.781	5.793	0.012	-0.034	5.747	5.759	5.619
19	AANAT	0.068	0	-0.068	0.057	0.135	0	0.036
20	AAR2	3.799	3.759	-0.04	-0.113	3.686	3.731	3.586
21	AARD	0.094	0.081	-0.013	0.044	0.138	0.175	0.164

Correlation with HUVECS treated with ATV or TNF-α

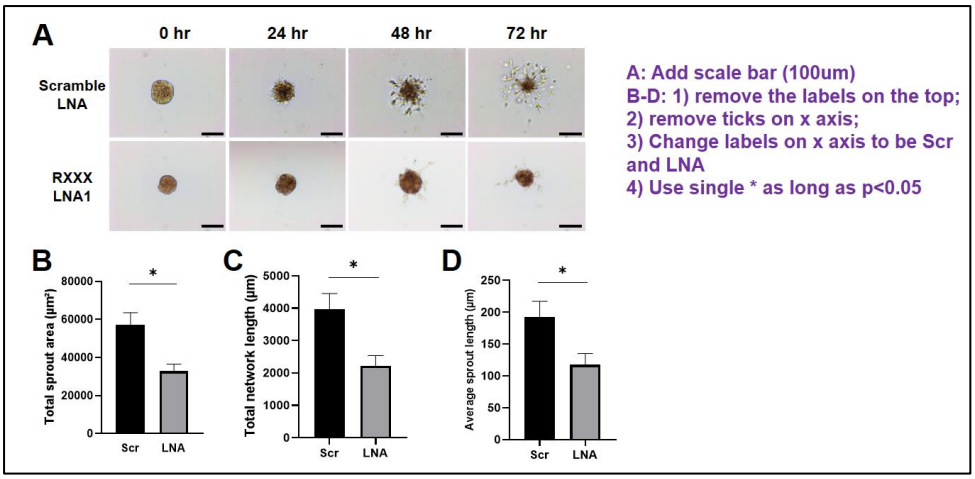


OS

PS

再加上回顧已有的文獻，以此挑出最可能與未知的幾個候選基因，已有目標 non-coding RNA，目標 non-coding RNA 有調控重要 receptor gene 的可能。

接著做目標 non-coding RNA 的 locked nucleotide acid (LNA)，看在抑制目標下的細胞表現(knock down)，在老化上的表現(以監測老化染色表現，內皮細胞功能改變，血管新生 tube formation/ sprouting assay 等)。



另外考慮做增加其表現(over-expression)正反證實其調控狀況。並在以 RNA-seq(全 RNA 量鑑定) 分析 knock down 的細胞其下游可能調控的相關基因與機轉。

同時看是否可以建立動物模型，在老鼠上找到同基因的 homology，以建立老鼠模型，進步擴展研究能力。

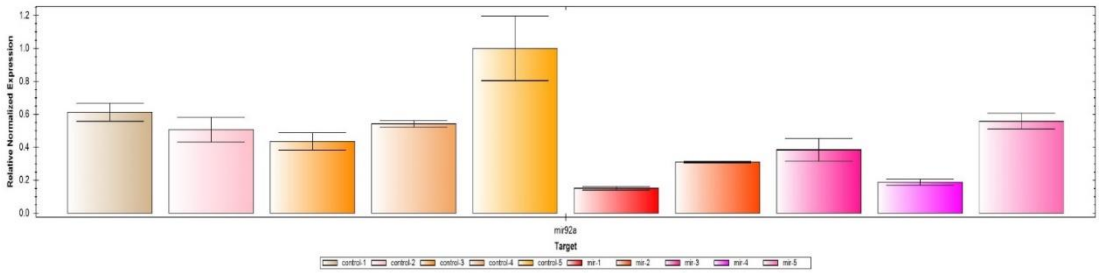
目前這研究已大致完成，在撰寫論文當中。

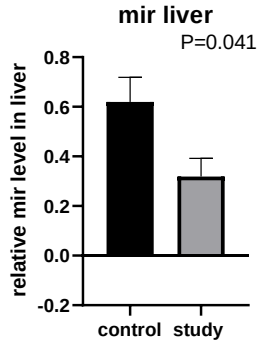
新型 micro-RNA LNA 抑制劑是否可以改善心臟纖維化

我們以 city of hope 研發出新型 micro-RNA(mir) 的 locked nucleotide acid (LNA)，對於內皮細胞有很高的吸收性，目前這新劑型已應用在初步人體試驗。9 我們們利用這研發，針對目標 micro-RNA 製作新型 LNA。

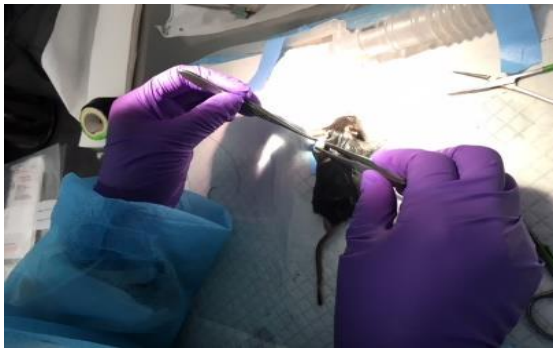
目前研究以可以確定新型 LNA 療效可以任，可以有效減少動物模型上肝臟目標 mir-RNA 濃度。

(左五為對照組,右五為實驗組)

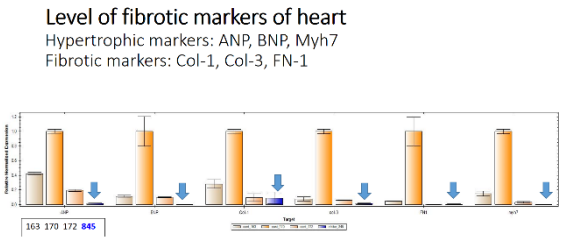


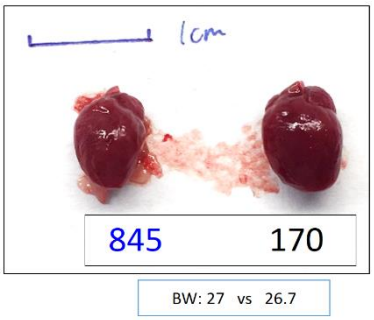


Angiotensin II 是造成多心血管疾病的成因，如高血壓，心臟衰竭等。針對人類心血管致死原因與心臟衰竭的成因-心肌纖維化(cardiac fibrosis)，Angiotensin II 是引起 cardiac fibrosis 主要原因。10 我們建立植入 Angiotensin II-osmotic pump mice model(Angiotensin 植入型幫浦老鼠模型)，以緩慢釋放 angiotensin II 造成老鼠心肌纖維化，在給予新型 mir LNA，與以抑制，看是否抑制目標 micro-RNA 可以改善纖維化的狀況。



在初步老鼠上的研究，看出可以顯著減少心臟肥厚狀況，與減少心肌纖維化指標。(#845 為實驗組，#170 為相同體重的對照組)





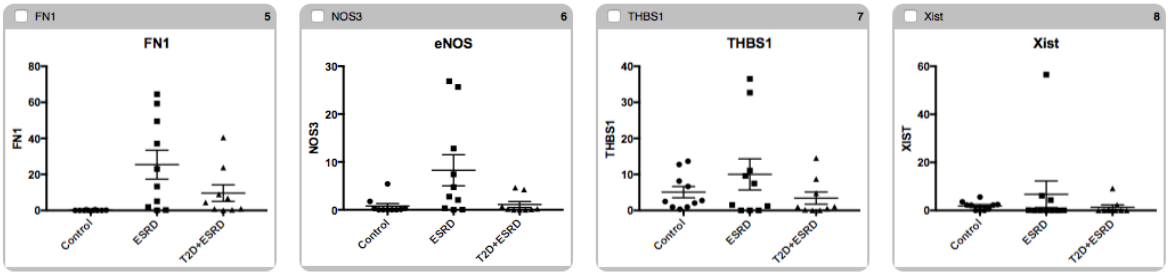
接下來需做更大多的動物試驗，證實其效果，與機轉的探討。甚至進一步，人體檢體的檢驗與分析對照。

血液循環的 RNA 作為腎功能變化指標

我們試著對血液的循環 RNA (circulating RNA) 尋找在臨床上可以作為疾病程度的指標。我們與 Arizona 大學合作，對 40 位腎臟衰竭接受洗腎治療的病患，做 RNA-seq 分析，找出可能，與 20 位正常腎功能為對照。

尋找預測腎臟病程預後因子的 circulating RNA。

(以下是分析的一例)



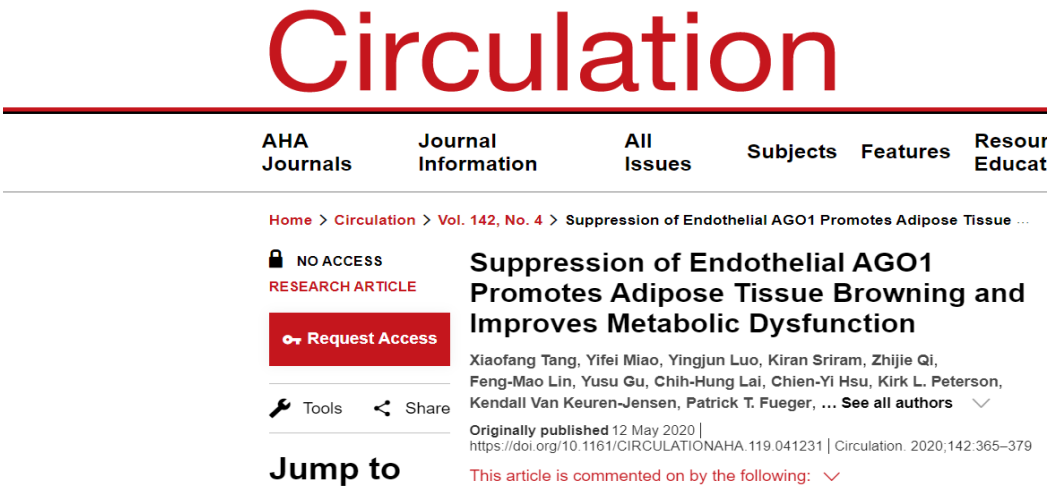
從 97,981 個 RNA (coding or non-coding)挑選出兩者差異最大的目標 RNA。由於 circulating RNA 的分泌多是來是內皮細胞，所以我們會以內皮細胞(HUVECs)給予尿毒素(uremic toxicity)，在細胞層面上證實分析所見。接下來，需要再多分析更多病人血液樣本，對不同慢性腎功能缺損(chronic kidney disease) 病人抽血，依據腎功能的受損程度對照指標 RNA 的關聯性。以這樣來證實腎功能指標的建立。和追蹤接下來探討未來可能的腎功能的變化，是否有預測性。

Suppression of endothelial AGO-1 promotes adipose tissue browning and improves metabolic dysfunction

我們實驗室之前已經發現在 AGO-1 (Argonaute 1；a key component of microRNA-induced silencing complex) hypoxia induced angiogenesis 扮演重要腳色。我們生成了具有 EC-AGO1 缺失的小鼠，並使其接受了模仿快餐，高脂高蔗糖的飲食，並對代謝表型進行了分析。我們使用交聯免疫沉澱和 RNA 測序來確定 AGO1 介導的機制觀察到的 EC-AGO1-KO 的代謝表型。我們進一步利用細胞培養和小鼠模型來驗證已鑑定分子途徑的功能重要性，為此使用從健康供體

和肥胖或是第 2 型糖尿病患者中分離的人內皮探索了人體的相關性。我們的研究提出了一種新的機制，該機制 EC 可以通過 AGO1-TSP1 途徑控制脂肪組織的血管化和功能，調節胰島素敏感性和全身代謝狀態。

我們的研究發現，已刊登在 2020 年 7 月 28 號的心臟學科最好期刊 Circulation 上(Circulation. 2020;142:365–379)


Circulation

AHA Journals | Journal Information | All Issues | Subjects | Features | Resour Educat

Home > Circulation > Vol. 142, No. 4 > Suppression of Endothelial AGO1 Promotes Adipose Tissue ...

NO ACCESS
RESEARCH ARTICLE
Request Access
Tools Share
Jump to

Suppression of Endothelial AGO1 Promotes Adipose Tissue Browning and Improves Metabolic Dysfunction

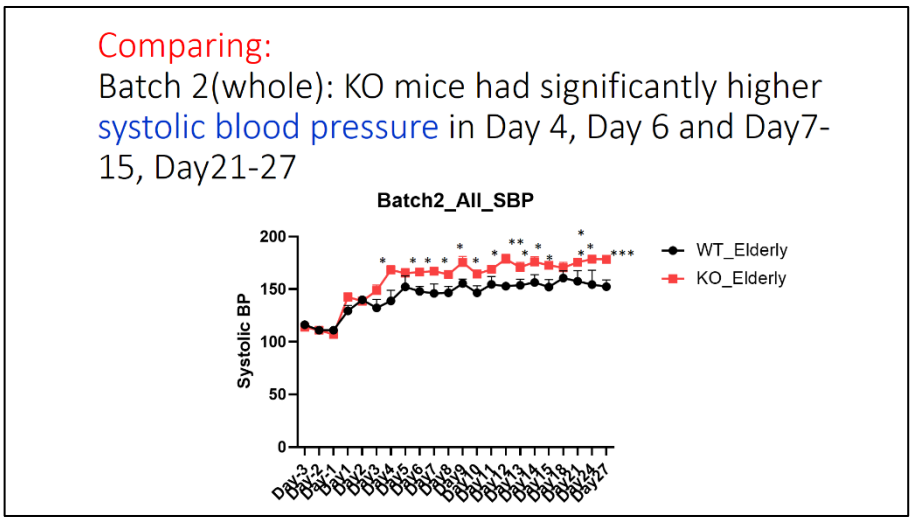
Xiaofang Tang, Yifei Miao, Yingjun Luo, Kiran Sriram, Zhijie Qi, Feng-Mao Lin, Yusu Gu, Chih-Hung Lai, Chien-Yi Hsu, Kirk L. Peterson, Kendall Van Keuren-Jensen, Patrick T. Fueger, ... See all authors

Originally published 12 May 2020 | https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041231 | Circulation. 2020;142:365–379

This article is commented on by the following:

Non-coding RNA related to Blood pressure control

實驗室根據以前相關研究，我們做出新的 KO mice. 並透過 Aniotensin II hypertension model. 初步我們發現 KO mice 可以有效降低 systolic blood pressure under AII model。更進一步的 pathway 分析正在進行中。



三、心得

一、對於學術研究上的訓練

在進修時間完成實驗技巧與設計學習與訓練，包括 RNA-sequence 分析技術，與實驗流程。相關實驗技術，RNA extraction and qPCR, HUVECS cell culture skill, NO assay, tube formation, animal model set-up and new LNA design and tail vein injection 等。

除了研究論文發表外，主要學習完整 epigenetic 的研究方法，包含尋找新目標方式，knock don/over-expression，動物模型的建立，與臨床轉錄醫學發展的方式。

二、對臺中榮總未來發展與醫學教育

未來回醫院效力，可以就所學， 院內協助建立相關分子生物學的研究與實驗室，也可以與別的學術單位結合研究，延續自我研究的能力，同時增加院內研究的多樣性與可能性。此外，就算回國，除了保持與陽明大學實驗室的合作外，會增加與 City of Hope 和 UCSD 等實驗室持續合作。City of hope 癌症與糖尿病研究，都是美國前區有名的機構，雙方建立良好關係，對醫院這兩方面發展充滿助力。UCSD 的錢許教授 (同時也是中研院院士)與史教授指導下實驗室，在 shear stress 研究為開端研究者。相信能與這兩個研究機構合作，對於醫院以後發展都會有很大幫助。

轉錄醫學而言，基礎研究也需與臨床研究結合， 相當多的疾病，仍有發展分子生物研究的機會，如 RNA-seq，去探討 RNA 等，於疾病誘發的關係，這需要基礎研究能力與臨床標本等配合，經由完整的訓練，這方面相信能幫助醫院與心血管中心的發展，在探討心血管疾病的新診斷方式與治療方式更上一層樓。

四、建議（包括改進作法）

很感謝醫院願意支持醫師出國進修基礎研究。基礎研究的訓練通常都要花上好幾

年打基本功。此外，從事基礎研究，對臨床的醫師，不論在時間與精力上，都是相當辛苦的。希望有更多的實驗室與醫院或是學校的研究部門能與臨床醫師合作來進行基礎或是轉錄醫學的研究，以達到學以致用，精益求精的可能。

五、 附錄

參考文獻

1. Chen Z, Wen L, Martin M, Hsu CY, Fang L, Lin FM, Lin TY, Geary MJ, Geary GG, Zhao Y, Johnson DA, Chen JW, Lin SJ, Chien S, Huang HD, Miller YI, Huang PH and Shyy JY. Oxidative stress activates endothelial innate immunity via sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) transactivation of microRNA-92a. Circulation. 2015;131:805-14.
2. Miao Y, Ajami NE, Huang TS, Lin FM, Lou CH, Wang YT, Li S, Kang J, Munkacsi H, Maurya MR, Gupta S, Chien S, Subramaniam S and Chen Z. Enhancer-associated long non-coding RNA LEENE regulates endothelial nitric oxide synthase and endothelial function. Nat Commun. 2018;9:292.
3. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. Nat Rev Genet. 2011;12:861-74.
4. Mercer TR, Dinger ME and Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. Nat Rev Genet. 2009;10:155-9.
5. Fernandez-Mercado M, Manterola L, Larrea E, Goicoechea I, Arestin M, Armesto M, Otaegui D and Lawrie CH. The circulating transcriptome as a source of non-invasive cancer biomarkers: concepts and controversies of non-coding and coding RNA in body fluids. J Cell Mol Med. 2015;19:2307-23.
6. Adams D, Gonzalez-Duarte A, O'Riordan WD, Yang CC, Ueda M, Kristen AV, Tournev I, Schmidt HH, Coelho T, Berk JL, Lin KP, Vita G, Attarian S, Plante-Bordeneuve V, Mezei MM, Campistol JM, Buades J, Brannagan TH, 3rd, Kim BJ, Oh J, Parman Y, Sekijima Y, Hawkins PN, Solomon SD, Polydefkis M, Dyck PJ, Gandhi PJ, Goyal S, Chen J, Strahs AL, Nochur SV, Sweetser MT, Garg PP, Vaishnaw AK, Gollob JA and Suhr OB. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. N Engl J Med. 2018;379:11-21.
7. Deanfield JE, Halcox JP and Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. Circulation. 2007;115:1285-95.
8. Herrera MD, Mingorance C, Rodriguez-Rodriguez R and Alvarez de Sotomayor M. Endothelial dysfunction and aging: an update. Ageing Res Rev. 2010;9:142-52.
9. Zhang B, Nguyen LXT, Li L, Zhao D, Kumar B, Wu H, Lin A, Pellicano F, Hopcroft L, Su YL, Copland M, Holyoake TL, Kuo CJ, Bhatia R, Snyder DS, Ali H, Stein AS, Brewer C, Wang H, McDonald T, Swiderski P, Troadec E, Chen CC, Dorrance A, Pullarkat V, Yuan YC, Perrotti D, Carlesso N,

Forman SJ, Kortylewski M, Kuo YH and Marcucci G. Bone marrow niche trafficking of miR-126 controls the self-renewal of leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia. Nat Med. 2018;24:450-462.

10. Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP and Schmidt BM. Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. Lancet. 2007;369:1208-19.