

出國報告（出國類別：進修）

肝臟基礎研究：

細胞凋亡訊息傳遞與粒線體功能
於肝臟疾病中的影響

服務機關：台北榮民總醫院

姓名職稱：主治醫師 辛怡芳

派赴國家：美國

出國期間：104/6/1~105/8/31

報告日期：105/9/28

摘要

本次前往的實驗室以探討肝臟細胞各種訊息傳遞因子及細胞訊息傳遞分子在疾病中扮演的角色為主要專長，因此本次進修內容包括 1.藉由不同基因缺失小鼠設計交配育種，探討肝臟疾病（肝炎、肝纖維化、肝癌）的發生內在原因。2.經由外來刺激（膽管結紮、酒精灌食、高脂肪飲食、營養素欠缺飲食、癌細胞注射等）誘發不同肝臟疾病動物模式，探討疾病機轉及測試藥物反應。3.取得高品質原代肝臟細胞並用藥物或細胞素(cytokine)刺激以觀察細胞反應。4.探討肝細胞受損時粒線體於其中所扮演的角色。

關鍵字: 細胞凋亡、原代肝細胞 Primary Hepatocyte、粒線體 Mitochondria

一、目的

過去台灣肝臟疾病以病毒性肝炎為主，台灣在此方面的公衛成績與治療結果的成功亦是世界有目共睹，隨著各種新穎的肝炎藥物出現，消除病毒性肝炎的一日應是指日可待。而肝臟專家皆預測下一個世紀是代謝性肝病的世紀，歐美國家病毒性肝炎比例一向比亞洲少，過去即以代謝性肝臟疾病（酒精性肝炎、脂肪肝）為引發慢性肝炎、肝硬化、肝癌的主要因素，亦投注相當多精力在此領域。筆者這一年度所在 Cedars Sinai Medical Center 中 Prof. Ekihiro Seki 的研究室，即是以肝細胞受損之分生機轉、訊息傳遞、各種肝損傷模式（包括基因缺失、長短期酒精影響、高脂食物誘導肝炎、癌症肝臟轉移）動物聞名的研究室。本次很榮幸獲得台北榮總支持及科技部千里馬經費補助前來學習肝臟基礎研究。過去筆者的研究方向主要為肝臟衰竭動物（大鼠）的生理病理表現與藥物治療效果，由於此進修實驗室特別專精於細胞層次的分生研究，未來可結合過去的研究基礎，對肝損傷的動物模式與疾病機轉有更深入的探討。

二、過程

於此實驗室的學習首先以肝細胞受損模式與分生基礎為主，並學習分離原代肝細胞，自行育種特殊基因缺失小鼠以進行實驗。之後由於此實驗室開始參與粒線體於代謝性肝臟疾病中的角色研究，因此也參與了肝細胞粒線體功能測定的流程設計與藥物測試。

Ekihiro Seki' lab 其主要研究為細胞凋亡 (apoptosis/necroptosis/necrosis) 與疾病生成機轉的相關性，雖實驗室以肝臟疾病為主要討論目標，但其理論技術亦可運用於其他疾病(目前已開始發展胰臟及大腸癌轉移細胞)。本實驗室並自行育種，保持不同基因缺失小鼠品系，包含 TAK1 KO, IKK-beta KO, P38 mutant, Lrat-Cre mutant, Ubiquitin13 KO 等，這一年中我亦參與維持品系與育種項目。另

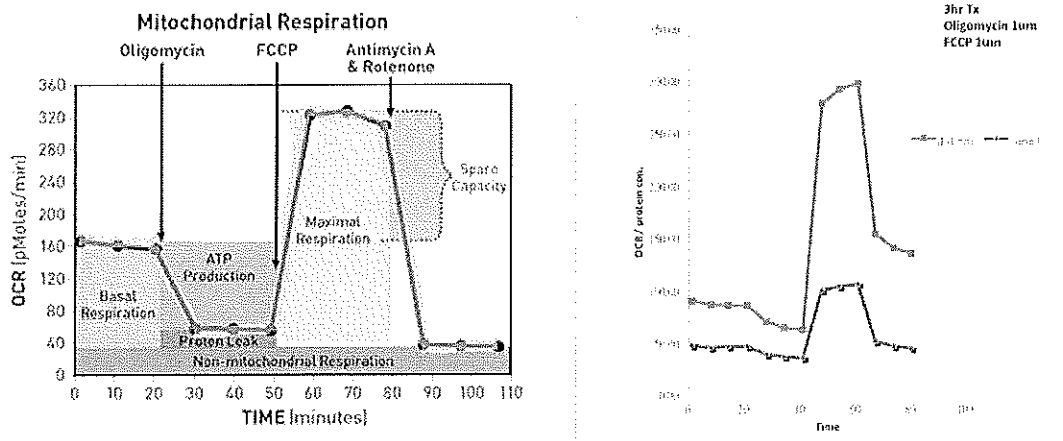
過去一年於 Prof. Ekihiro Seki 指導下，完成與肝細胞凋亡相關的短文評論，目前已刊登於 Hepatology 2016 July. (見附錄) 另參與撰寫 Cell death and liver inflammation, fibrosis, tumorigenesis 文章 (待刊登中)。

此實驗室基本專長技術為高品質的肝細胞 (primary hepatocyte) 分離，多數的研究皆奠基於上。肝臟實質細胞為肝細胞 (hepatocyte) 約佔整體肝臟細胞 70% 以上，而肝臟其他非實質細胞包括：血管內皮細胞 (endothelial cell)，肝臟特殊免疫細胞 (Kupffer cell)，及肝臟星狀細胞 (Stellate cell)，非實質細胞對於調節肝臟代謝及免疫的相關功能，至關重要，而實質細胞則是主導基本肝臟功能，也是肝臟受損時損失的細胞。分離不同細胞第一步皆是採用灌流法將血液排出，並使用酵素將肝臟溶解，而後才使用不同梯度，將所需要細胞分離出來，且過程需謹慎以免污染。由於肝細胞質量較重，使用不同的離心梯度，即能將肝細胞沈澱分離出來，亦可運用不同設計分離星狀細胞或免疫細胞，實驗中可微觀完全瞭解各種細胞不同的反應，取代過去動物實驗中較為宏觀的結果。原代肝細胞需於底層有膠原蛋白的培養皿中培養，且因細胞分離出後不會再生，因此實驗須於數天內完成，而後細胞將自行老化凋亡。對於原代肝細胞，小鼠年齡影響不大，僅年紀超過 6 個月的小鼠由於肝臟含有較多脂肪油滴，於脂肪肝實驗或其他與脂質代謝相關的研究須謹慎選擇鼠齡。

粒線體是細胞中最重要的胞器之一，其不僅為製造能量的場所，也是脂肪酸氧化(beta-oxidation)發生的位置，更參與了氧化還原反應，與細胞受損的氧化壓力習習相關。過去粒線體功能變化在肌肉細胞中較常被探討 (心肌細胞，神經肌肉疾病等) 而近年來在肝臟疾病中的角色也漸漸受到重視。本部分計畫第一階段為分離小鼠原代肝臟細胞 (primary hepatocyte)，由於粒線體功能測試相當敏感，原代肝臟細胞於體外培養其環境，數量，培養基等，皆須經過特殊設計，才能確保不會影響粒線體呼吸功能。於成功培養活肝臟細胞並取得良好狀態後，本研究第二部分使用發炎細胞素刺激肝臟細胞發炎反應，並確認是否能增加細胞內脂肪油滴的堆積，再以油滴染色及半定量確認。本計畫第三階段為使用 Seahorse 系統來測定粒線體呼吸功能以及脂肪酸氧化功能是否受到影響。目前初步得知，在細胞素刺激 24 小時，的確會造成原代肝細胞油滴堆積，且油滴堆積量與刺激劑量成正比。另外，藉由 Seahorse 系統測定，我們亦發現肝細胞經過類發炎物質刺激後，其粒線體功能呼吸會升高，但脂肪酸代謝反而是下降的。目前此初步的結果還需更進一步確認，而未來計畫能採用不同肝臟受損動物模式，做粒線體功能測試，以釐清粒線體在肝臟受損中扮演的角色。

Seahorse bioscience analyzer：此系統中文全名為海馬生物能量分析儀，藉由獨特的探針設計，在不接觸不傷害細胞的前提下可立即偵測細胞代謝過程中消耗氧氣及產酸

的速率。此種藉由微透析原理來偵測細胞周圍環境氧氣和氫離子的濃度變化，可以連續的偵測細胞能量的變化，是全球目前唯一可以同步偵測細胞有氧呼吸與無氧呼吸涵蓋整體能量代謝的儀器。此系統需要的檢體量很少，但應用範圍很廣，可用來探討不同細胞及粒線體如何運用不同受質作為能量來源，評估疾病與代謝狀態的交互作用，對於代謝性疾病極有幫助，另外也可以分析藥物對生理病理的效應，由於此系統為偵測活細胞呼吸效能，比之過去細胞數量管控，更能用在建立細胞品管系統。也可用來快速篩選出具開發潛力的新藥物或評估藥物毒性等。由於各種細胞的粒線體含量代謝能力不一，因此在每一種細胞測定之前，需就其培養細胞數量，藥物刺激濃度等進行最佳化。未來計畫能採用不同肝臟受損動物模式（酒精性肝炎、脂肪肝、癌症轉移導致肝功能受損模式、自我修復基因缺陷動物等），做粒線體功能測試，以釐清粒線體在肝臟受損中扮演的角色。



此左圖為基本粒線體功能測定示意圖，其利用不同藥物對粒線體有氧呼吸及電子傳遞鏈影響，在 FCCP 加入之後，可測得粒線體最大呼吸速率。右圖為藉由 Seahorse 系統測定，發現肝細胞經過類發炎物質刺激後，其粒線體功能耗氧量大幅增加，代表在肝細胞受刺激後，有氧呼吸能力上升。此發現可能與肝臟堆積脂肪有關，然確切機轉尚待進一步確認。（由於研究數據目前尚未公開 僅呈現部分結果）

三、心得

本次進修原本申請的地點是在加州聖地牙哥分校，而因為指導教授的搬遷，因此落腳於 Cedars Sinai Medical Center。雖然沒有了學校較為悠閒的氛圍，但在醫院附設的研究單位工作，反而瞭解到這裡在學術研究與醫療應用上的合作無間。我所在的部門是屬於 Medicine 之下的 Gastroenterology department。每週三會有一次全部門的研究結果報告，而每週五則是本實驗室的研究成果報告。週三的全部研究報告由不同的

PI 團隊輪流上陣，並彼此交流意見，也會有其他合作的臨床醫師，外科醫師、病理醫師的參與。研究人員每年也可以參加醫院主辦的肝臟疾病新知研討會，了解臨床需求。本院與 UCLA、USC 的消化系研究團隊也有不錯的合作，在這一年中我也多次與實驗室同仁一起去參與各種消化系臨床研究或基礎研究的會議，獲益良多。另外由於本身亦為醫院單位，因此於患者隱私、實驗倫理等皆特別重視，有許多關於人體檢體的必修教育課程，雖然在這一年中我的實驗室以動物實驗為主，但這些必修課程都精心設計成有效率、有趣的模式，可以看出醫院對患者權益的重視。動物實驗方面，亦是要通過許多相關訓練才能得到操作動物的機會，不定期也會有動物中心人員與我們聯繫。在這個醫院裡雖然有許多規範，但總是再三強調的一點是所有人員不是來“限制”你的研究，而是來“協助”你的研究。各部門人員合作很愉快，是非常值得學習之處。而本身 Cedars Sinai medical center 也不時有員工日、院慶、犒賞日等等節慶活動，讓在這裡工作變成一件愉快的事。

本次也很幸運能參與此實驗室開發粒線體研究的過程，了解要穩定一個新的技術需要的準備，也知道一個新的假說成立，並非只是為了出現一個短期的成果，然後盡快寫成文獻發表，真正的研究是要能夠舉一反三可長可久，唯有將研究細節都準備完全，才能在一個設定下反覆的推敲，最後拼出完整的機制。一個好的研究室是能在一個主題下深且廣的發展，這次的粒線體計畫是與醫院中心臟細胞研究部門合作，跨領域的合作十分有趣，不僅可以討論同一動物模式之下，不同器官的表現，共同研究更可以在動物使用方面做更有效率的利用。在這個醫院中由於各研究部門之間聯繫非常頻繁，往往許多子計畫是與其他研究室合作，也是非常值得學習的模式。

過去一年在洛杉磯進修，受到許多幫助，亦與台灣科技部加州辦事處的人員保持聯繫，得以與其他由科技部經費資助的台灣學者認識交流。幾位在去年一年中前往洛杉磯或加州進修的台北榮總同仁，皆彼此見面鼓勵支持。而去年於舊金山舉辦的 AASLD 美國肝臟醫學會及今年於聖地牙哥舉辦的 DDW 美國消化系醫學會，亦與本單位內視鏡中心侯明志主任及其他與會同事們見面交流，分享學習新知。筆者就讀的研究所所長李新城老師（陽明大學藥理研究所）於去年到 USC 訪問，也與我見面給予我鼓勵。隻身在外進修，生活上大小事處理難免較為吃力，能夠感受到醫院，學校與同鄉的溫暖關心讓我非常感激。目前就比例而言，台灣在洛杉磯進修學者的人數遠不及日韓中國的多，未來亦希望有更多同仁能順利進行國際交流，並將新技術與視野帶回台灣。

四、 建議事項

在於指導教授 Prof. Seki 討論此年的進修計畫時，他一開始即明確指出，一年時

間對於基礎研究實在太短，學習新實驗技術層面大約就需要 3-6 個月，之後完整的研究計畫或是要開發出新的技術，穩定育種動物，則多半又需要一年，初步成果更可能需要一年以上時間才能完成。而如果使用在台灣的實驗模式雙方合作，雖然也許可以在一年中幸運得到成果，但也可惜了到國外來進修。目前榮陽體系其實在研究設備，研究能量上並不輸給國外研究機構，多數研究也可在台灣完成，因此如果只是應用台灣已知的技巧，在國外研究機構未有新的突破，反而相當可惜。由於當初科技部的補助計畫最長僅一年，因此礙於經費及醫院工作累積，這次無法再延長研究時間，研究計畫未完成的部分，也只能留待研究室其他同仁接手。建議未來能有更靈活的進修計畫搭配，讓其他同仁進修時間上更有彈性。

→ (事實上可申請尹基金
會才不一年延計使用)

附錄

Hsin IF, Montano E, Seki E. Finding a new role for NEMO: A key player in preventing hepatocyte apoptosis and liver tumorigenesis by inhibiting RIPK1. Hepatology. 2016 Jul;64 (1):295-7.

Very good!