

出國報告(出國類別:研究)

研究腸道微生物群在肝纖維化及 門脈高壓的病理轉機及發展趨勢

服務機關：臺北榮民總醫院內科部

姓名職稱：李癸洵 師三級醫師

派赴國家：美國

出國期間：2015.7.14-2016.9.13

報告日期：105.10.24

摘要（含關鍵字）

慢性肝傷害為國人重要死亡疾病，仍缺乏肝硬化及肝纖維化的有效治療。職奉派到加州大學聖地牙哥分校研習腸道菌落群相關研究。進行數個動物實驗，除了觀摩學習分析腸道菌落群的軟體，也學習到了許多基礎實驗技術包括腸道細胞、肝細胞、庫佛細胞、星狀細胞、單核球細胞的分離。目前有三個題目有初步成果，分別為探討酒精肝傷害的腸道菌落改變的機轉，探討腸道上皮過氧化物酶體增殖物活化受體 γ 剔除後對肝傷害的影響和探討腸道淋巴結在肝傷害的移行現象。後續將和美國方面持續合作，期能發表好的論文，也希望把技術應用到臨床研究上，找尋到新的治療機轉或標的。

關鍵字

腸道微生物群、慢性肝傷害、腸道免疫、細菌移行

目次

一、 目的.....	4
二、 過程.....	5
三、 心得.....	8
四、 建議事項（包括改進作法）	10

一、目的

肝病為國人重要死亡疾病，雖然這些年的治療有大幅進步，仍缺乏肝硬化及肝纖維化的有效治療。腸道微生物群(Gut microbiota)近幾年開始被各國科學家投入研究，肝臟和胃腸道有著雙向的關聯。腸道微生物群在肝纖維化及門脈高壓的病理機轉中都扮演了致病因子的角色，同時也導致了肝硬化併發症的產生。調整腸道微生物群的組成及數量可能可影響疾病的病程。而本國病患的腸道微生物群勢必和國外不同，因此，我們必須建立自己的研究平台，並有本土的研究，才能發展出有效的治療。

由於肝臟和胃腸道有著雙向的關聯(gut liver axis)，尤其是腸道有缺損(Gut barrier dysfunction)時，腸道的細菌就會大量進入到門脈和肝臟(bacterial translocation)，如此將造成肝內的免疫細胞活化，造成肝臟損傷，這在酒精性及非酒精性肝炎都扮演重要治病角色，在肝硬化病人則引起自發性腹膜炎和敗血症，造秤許多肝硬化病人的死亡。台灣目前在腸道微生物群及腸道損傷的研究仍在起步階段，職本次有幸獲得院方及內科部的支持下前往美國加州大學聖地牙哥分校著名的肝臟研究團隊學習，目的在於學取腸道微生物群及腸道損傷的基礎研究，以期將來能應用在我們實驗室現有的動物模式，並結合臨床病人的研究來尋找慢性肝損傷及肝硬化新的治療標的。

二、過程

到聖地牙哥的第二天早上就和 Dr. Bernd Schnabl 面談討論並拜訪 Dr. David Brenner. David Brenner 是目前加州大學聖地牙哥分校副校長及醫學院院長，乃研究肝纖維化的大師級人物，也是 Dr. Schnabl 的老師。早期 Dr. Schnabl 也是專攻肝纖維化的研究，近幾年則致力於腸道微生物群及肝臟和胃腸道連結相關研究，是第一位發表各種慢性肝傷害小鼠其腸道微生物群的表現，且發表多篇藉由調控腸道功能包括腸道微生物群進而影響慢性肝傷害的論文，目前是這領域的領先者。Schnabl 實驗室包含我有七個人，每個人都有自己的研究主題，雖然我只有進修一年，我和 Schnabl 討論後還是決定同時做幾個題目，這樣才能滿足我想學的技術。

肝硬化動物模式一般是使用大鼠，這我已有多年經驗，但很難有基因改造的大鼠，因此對基因和免疫的功能研究和機轉的探討沒有小鼠那麼好。Dr. Schnabl 有許多基因改造的小鼠，但卻無基因改造的大鼠，因此他要求我在小鼠作實驗。小鼠目前只有使用四氯化碳才能產生肝硬化，而是否產生腸道通透改變及腸道菌群與細菌移位則未知，而腸道通透的改變則是產生肝硬化併發症最重要的因素，因此若建立此模式，則可做許多新穎的實驗。我使用經口灌食和皮下注射四氯化碳 16 週，很不幸的，並無產生細菌移位。因此我們決定放棄小鼠肝硬化模式。實驗之初，Dr. Schnabl 則鼓勵我同時利用酒精肝傷害小鼠模式做實驗，此模式雖然沒有到肝硬化，但此模式有明顯的腸道通透改變及腸道菌群與細菌移位，藉由此模式，學習相關技術，將來回台直接應用在臨床病人的研究。

因此，在等待四氯化碳小鼠的過程，同時繁殖多種基因改造鼠，並進行另外四個實驗。已知腸道 interleukin 6-STAT3 途徑對腸道的上皮生長和發炎有關，因此我們假設把腸道上皮的 IL6 或 STAT3 給剔除掉應會影響腸道通透性並進而影響肝傷害。我繁殖了只在腸道上皮 IL6 或 STAT3 給剔除的小鼠，餵食不含蛋白

質原料的胆鹼缺乏飼料，來觀察對肝發炎和肝纖維化是否有影響，很可惜，經過 12 週的餵食，基因剔除鼠和野生型鼠並無肝傷害的分別。

由於酒精肝傷害小鼠有很明顯的腸道菌落改變、細菌移位及肝纖維化，我也同時以此模式來做實驗來學習技術。雖然我們知道酒精可以造成腸道的腸道菌落改變和細菌移位，但機轉仍不清楚。首先，把餵食酒精和一般飲食的小鼠的盲腸的內容物做酒精厭氧培養，發現細菌長得很好，但醋酸鹽(Acetate)增加，而酒精的量卻沒變，代表細菌生產醋酸鹽。之後把糞便 DNA 萃取出來，定序後，利用許多生物資訊軟體分析 metagenomic data, 最後發現擬桿菌屬細菌增加 (Bacteroides), 乳桿菌(Lactobacillus)和梭狀芽孢桿菌(Clostridium)減少，之後再利用 metatranscriptomic data, Metatranscriptomics 可讓我們對未培養的微生物群落的集體轉錄組進行分析。發現 Bacteroides Bin 1 高度表現的基因和醋酸鹽利用有關，所以 Dr Schnabl 和另一位生物資訊專家就用這資料去申請計畫，繼續做實驗，包括 metabolomics。雖然我不但進行動物實驗，也參與分析，但這麼多軟體對我這門外漢一時之間很難消化，這真是非常專業的一門學問，所幸他們說我之後若回台有問題都可問他們。

另一個實驗則是利用腸道上皮 PPARgamma 剔除的小鼠餵食酒精飲食八週，評估其對肝臟的影響。由於之前已有實驗發現腸道上皮 PPARgamma 剔除的小鼠其大腸發炎會惡化，因此我們假設在酒精肝傷害的模式，會增加腸道通透及細菌移行。經過數月的繁殖小鼠和酒精餵食，發現基因剔除小鼠的肝傷害增加，而肝臟的脂肪化、酒精代謝酵素濃度、腸道白蛋白濃度、重要腸道菌相對於野生型鼠卻無明顯改變。之後分析大腸和小腸的發炎反應都不明顯改變，之後轉而查肝臟的免疫細胞表現，T 細胞，B 細胞，庫佛細胞也無明顯改變，之後想到 PPARgamma 影響脂肪代謝，可能會造成 NKT 細胞的活化，而 NKT 細胞的表現並無法從組織獲得，於是又經過數月的繁殖小鼠和酒精餵食，之後同時分離肝臟的單核細胞，腸道上皮細胞，腸道免疫細胞。分析腸道和肝臟的 NKT 細胞表現發現，NKT 表現量也無明顯差異，但 NKT 細胞的細胞凋亡上升且 Fas 配體上升，暗示 NKT 細胞

和肝細胞作用而產生細胞凋亡。基因剔除小鼠肝臟切片也呈現肝細胞凋亡上升。後續還須做實驗探討肝中的 NKT 細胞可以促進肝細胞的凋亡，肝門脈中的 NKT 細胞量在基因剔除小鼠肝門脈是否上升，及觀察抑制 NKT 細胞的作用後肝傷害的情形。目前正申請將小鼠運回台灣繼續實驗，來完成此課題。

另外，我還進行另一個很有趣的實驗，就是探討腸道的免疫細胞在肝傷害時，是否會從腸道淋巴結跑到肝臟。我利用兩個動物模式，一個是用膽管結紮鼠，一個是用酒精肝傷害，這兩個模式可以產生明顯的腸道通透改變和細菌移行。有一種楓葉鼠，利用雷射可以活體標記其淋巴結的免疫細胞，就可以知道到底是那些免疫細胞從腸道跑到肝臟來參與肝傷害的過程。我先使用膽管結紮鼠，因為快速有肝傷害及腸道細菌移行，膽管結紮後利用雷射標記其腸系膜淋巴結，之後在不同時間點觀察其肝臟的冷凍切片，發現標記 48 小時後有明顯的標記細胞跑到肝臟。之後在分離肝臟的單核細胞跑流式細胞儀，發現相對於未結紮鼠，膽管結紮後許多免疫細胞都跑到肝細胞參與肝傷害的過程。其後續實驗我一直沒時間再做，因為剛好 PPAR γ 的題目有比較多進展，因此之後就往酒精肝傷害題目來做，而膽管結紮的題目，和 Dr. Schnabl 討論後，則希望我完成 PPAR γ 的課題後，我可以在台灣繼續做。在酒精肝傷害模式，在餵食 8 週的酒精飲食或正常飲食後，利用雷射標記其腸系膜淋巴結，48 小時後分離肝臟的單核細胞，跑流式細胞儀分析各種免疫細胞，發現相對於正常鼠，有比較多的 B 細胞和 NKT 細胞跑到肝臟去，這結果令我很振奮，因為剛好可以解釋 PPAR γ 課題的 NKT 細胞到底有沒有經由腸道跑到肝臟。之後我雜交楓葉鼠和腸道上皮 PPAR γ 剔除的小鼠，目前已經有純合子的小鼠，希望可以運回台灣來餵食酒精後再做一個實驗來看是否有較多的 NKT 細胞從基因剔除鼠跑到肝臟。而 B 細胞的後續實驗，Dr. Schnabl 則會在美國繼續完成。

心得

1. 美國做了一年多的實驗，感觸很多。本來在台灣白天看病，晚上做實驗，希望可以好好全心做實驗，到美國真的整天做實驗，才覺得還是看病人比較有趣和成就感。雖然 Dr. Schnabl 認為我超適合做實驗，一直希望我留久一點，說可以有多少論文云云，但我還是比較喜歡在台灣當醫生的日子。
2. 新技術學得不少，包括腸道細胞、肝細胞、庫佛細胞、星狀細胞、單核球細胞的分離。對將來自己的基礎實驗有很大的幫忙。而腸道菌落群的部分，除了 DNA 的萃取，也學習觀摩了 Velvet, GroopM, RAST, DESeq, Model Seed, MetaNet X tool 等操作，有初步了解，但這些軟體必須使用程式語言，要專精的話必須花大量的心力。
3. UCSD 的實驗室也採共同實驗室的做法，每位研究員有數條實驗桌，基本上和榮總大致相同，但是所有實驗桌上都可以做動物實驗，北榮則要到另一區做動物實驗，比較不方便。另外，所有的實驗設備在同一層樓都可以找到，非常方便。北榮則要跑到不同樓層，甚至不同建築物。這些都是小差異，可以克服，其實我們北榮的研究硬體環境還不算差很多。不過我們的軟體方面是望塵莫及的。首先，研究經費真的差很多，Dr. Schnabl 和 Dr. Brenner 加起來有將近 10 個美國國立衛生研究院的計畫，工作的人有一半是像我一樣的國外訪問學者，因此經費充足，可以嘗試許多大膽的假設。動物房的空間大，光一個研究員就有 500 籠老鼠的空間，我一個人就要照顧約 100 籠的老鼠，所有的老鼠都是基因改造鼠。當實驗需要某種基因改造鼠，總是可以拿到。在台灣要拿到基因改造鼠要花的時間和金錢實在很高，但高品質的論文，這些幾乎是基本配備了。因此當 Dr. Schnabl 要把老鼠送我時，我非常高興地就答應了，只是我們的動物房很小，規定嚴格又繁瑣，實在很希望可以順利把老鼠運回台灣，運回後也有空間繁殖和做實驗。

4. 中國真的崛起了。UCSD 是生醫排名在美國很好的學校，但走在路上不時可見到東方面孔，打招呼後發現大部分都是對岸同胞，坐在校車上，我常覺得這是上海還是北京？實驗室幾乎每個團隊都有對岸同胞，這些人回國後將來都手擁大筆研究經費。許多博士後研究員回去對岸都被起聘為教授，實驗室啟動經費上千萬人民幣，每年研究經費都是一兩百萬人民幣起跳。我在聖地牙哥也認識一些台灣的博士後研究員，沒有人想回台灣，他們說看不到未來，令我心中非常感慨。
5. 在一次聚餐中，我和 UCSD 幾位胃腸科醫師聊天，他們真的覺得北榮的醫師太厲害也太辛苦了。他們認為從前也許醫師可以兼顧臨床教學和研究，但是現在他們都分開來，有些醫師專攻臨床新技術，有些人專攻研究，有些人則負責教學。像 Dr. Schnabl 為研究型醫師，一年只有一個月幫忙病房，一星期一節門診和一節內視鏡檢，而教學更是神聖領域，要大教授才能去教學生，鐘點費也很高，值得我們參考。
6. 美國實驗室的討論和資源共享做得比我們好，許多實驗都是兩三個實驗室一起合作，這樣實驗的品質會更好，資源也不會浪費，很像我們的整合型計畫，但是他們很多題目都是私底下合作，並非等計畫過才做，也很值得我們學習。
7. 美國人對於實驗安全是很重視的，剛進實驗室時就有許多課程，包括毒藥物、火災、動物房的注意事項等要上課，很像闖關遊戲，還要通過考試，才能拿到門禁卡和做動物實驗。動物房的門禁還要掌紋掃描，做骨髓移植實驗還要視網膜掃描才能進去輻射房。管制藥品則只要經過正常程序申請都買的到，只要使用時，開鎖，簽完名，註明使用多少就能拿到管制藥品。相較北榮要買管制藥品，比較有難度，尤其是 K 他命，美國的管理方式也值得我們跟進。
8. 關於動物實驗的申請，每位研究員都有他們做動物實驗的編號，只要把你可能用到的情況都線上登錄，經過動委會通過，就可以做了，並不需要寫太多實驗設計等。

三、 建議事項（包括改進作法）

1. 細胞分離需要一個好的離心機，免疫研究需要好的流式細胞儀。
2. 生物資訊真是一個專業領域，比生物統計更難，一個臨床醫師自學基本的生物統計還有辦法，但生物資訊真的要花很多時間或念個學位才有辦法，希望醫院方能聘請這方面的人才或是謀成這方面的人才來合作，我們醫院才能建立良好的腸道微生物平台。
3. 榮總的動物房入室規定比 UCSD 高，現在 UCSD 這批基因改造鼠只能先送國家實驗動物中心，但國動中心飼養後的老鼠，卻不一定可以進榮總。我們要拿到基因改造鼠已是千辛萬苦，還要為運送老鼠，空間飼養大傷腦筋，還要花很多錢，不知我們動物房的規定是否可以平易近人一些或是至少和國家實驗動物中心同步。另外建議動物實驗線上申請系統。
4. 雖然目前醫院仍然希望主治醫師兼顧臨床研究和教學，但美國的臨床工作比我們輕鬆那麼多，仍然設法做分工，希望將來教學型和研究型主治醫師不是只在教研部，而是各科都可有。
5. 我們醫院有許多研究做得很好，但我真的不太了解其他人在做什麼，像之前內科部就安排各科醫師在科內報告自己的研究，我真的覺得很好，如果有平台可以知道其他科的人在做甚麼，大家就可以互相了解，互相合作，才能做出跨領域的好研究。甚至部科主任可以謀成一些跨領域的研究或實驗，用全科或全部或全院的力量來整合，這樣會更有競爭力。
6. 關於管制藥品，我們的實驗需要四氯化碳、苯巴比妥，氯胺酮等，但相對於美國，我覺得本醫院的申請真的比較難，但猜想是怕管理不易，尤其許多實驗室人不多，怕有監守自盜的情形，因此我建議應該集中管理，設計良好的標準作業程序，就可以安心的使用管制藥品。