

出國報告(出國類別: 進修)

# 蛋白質體學及川崎病基因研究心得 報告

服務機關：高雄榮民總醫院 兒童醫學部

姓名職稱：簡光仁 主治醫師

派赴國家：美國 西雅圖兒童醫院

出國期間：99/12/31～101/10/16

報告日期：101/12/10

## 摘要

進入新世紀後，生物學上的第一件大事，將是人體基因的核酸序列將完全被解出，這是號稱 Human Genome Project 的浩大工程；得到人體所有基因的序列後，第一件可以做的事，就是把這些基因所表現的蛋白質翻譯出來，可得知一個生物的整個蛋白質體，稱為 proteome。Proteome 也是一個龐大資料庫，而研究 Proteome 的學問就稱為蛋白質體學。

川崎病 (Kawasaki disease) 乃日本小兒科教授川崎富作於 1961 年首度發現並提出報告。自此，世界各國陸續都有病例提出，至今病例數已不下數萬，而以日本最多。六、七零年代，川崎教授及其他學者剛提出此病時因其病變多出現在皮膚及結膜、口腔等部位，且常有頸部淋巴腺腫大情形，故稱之為黏膜皮膚淋巴腺症候群 (Mucocutaneous Lymph Node Syndrome)，之後漸漸有人稱為川崎症候群 (Kawasaki Syndrome)，近幾年的文獻大多數醫師都直呼此病為川崎病。

病因至今仍未明。全世界有許多學者專家致力於各種病因的研究，但未有明確答案。目前僅知其為免疫反應造成的全身性血管炎。另外，在治療方面：除給予高劑量之阿斯匹靈和靜脈注射免疫球蛋白外，許多方法都曾被提出，如：Ibuprofen，Steroid 等。

西雅圖兒童醫院心臟醫學研究室主任 Dr. Porltman 是專門從事蛋白質體研究的專家，此外他對川崎病基因學也頗有研究，經過他的同意，我加入他的研究團隊，開始從事蛋白質體學的學習、研究及川崎病病因及治療方法的學習及研究。此次研究分為兩部分；第一部分為川崎病病患血液的基因及蛋白質體研究。第二部分為川崎病動物模型實驗。在基因研究方面，主要以 PCR 及 RT-PCR 的技術為主，探討川崎病的病因。在動物模型實驗方面，主要以 2D PAGE、Mass Spectrometry 及 Western blotting 為主，探討 Bosentan 對冠狀動脈瘤的治療效果。動物模型實驗

顯示，使用 Bosentan(一種血管上皮細胞接受體阻斷劑)，可以使實驗動物受損的冠狀動脈上皮細胞恢復正常。且此藥物經 RT-PCR 及 Western blotting test 均顯示可改善動物受損的冠狀動脈上皮細胞。

## 目次

|             |     |
|-------------|-----|
| 一. 目的-----  | p5  |
| 二. 過程-----  | p7  |
| 三. 心得 ----- | p9  |
| 四. 結論-----  | p10 |

## 一、 研究目的：

蛋白質體 (proteome) 和蛋白質體學 (proteomics) 是在 90 年代初期，由 Marc Wikins 和學者們首先提出、相對於基因體 (genome) 和基因體學 (genomics) 的新名詞，字尾-omics 本身的意義，代表與生物、生命系統相關的想法及學問。到了 90 年代中期，生物化學、分子生物學、細胞生物學方面的學者們，在基因與蛋白質方面的研究成果豐碩，北方墨點法 (Northern blots, 藉由偵測 RNA 得知基因表現) 和西方墨點法 (Western blots, 偵測蛋白質的表現) 等實驗方法，也在這個時期有重大進展。究竟蛋白質體學和傳統生化中的蛋白質學有何不同？簡單地說蛋白質化學著重蛋白質結構、功能的研究，例如某一蛋白質的完整序列、三度空間立體結構、這樣的結構如何執行功能、在生理上扮演角色，以及代謝的生化機制。蛋白質體學是研究多種蛋白質組成的系統，往往是分析一段序列、再藉由 database 的比對，推測出它的特性，換句話說，蛋白質體學的焦點，放在「系統」的行為，而不是「單一組成」的行為。

川崎症 (Kawasaki Disease) 是 1961 年，日本小兒科醫師川崎富作 (Tomisaku Kawasaki) 教授首先發現並於 1967 年提出報告。因其病變多出現在皮膚及結膜、口腔等部位，且常有頸部淋巴腺腫大情形，故稱之為黏膜皮膚淋巴腺症候群 (Mucocutaneous Lymph Node Syndrome)，此後漸漸有人稱為川崎症候群 (Kawasaki Syndrome)，近年的文獻大都稱此病為川崎病。

川崎症 (Kawasaki Disease) 是一種多系統血管發炎症候群，好發於五歲以下的幼童。到目前為止，此病的診斷仍完全依靠臨床症狀，尚未有任何一個具體的實驗室檢驗數據可用於確認及診斷此病。川崎氏症在急性期的所有臨床症狀，包括發燒、黏膜、皮膚及淋巴腺病變等，都會隨著時間而逐漸消失，唯有其所引起的急性心臟冠狀動脈症候群 (Acute coronary artery syndrome)，包括冠狀動脈瘤 (coronary artery aneurysm)、心臟衰竭會造成死亡。

雖然目前川崎病的原因仍不清楚。但在川崎病的治療方面目前仍是以發燒十天內給予靜脈注射單次高劑量免疫球蛋白（2 g/Kg）及合併使用阿斯匹靈為標準的治療方式。靜脈免疫球蛋白的給予方法依據 Newburger JW 等人分析發現單次給予高劑量 2 g/Kg 的效果較好。依據川崎氏症標準診斷的條件，必須發燒大於或等於五天才可確定診斷並給予免疫球蛋白治療，但若是發燒未滿五天但其他的臨床症狀已經符合川崎氏症的表現時，應該於發燒滿五天後才給予，對預後有較有幫助。至於對第一次免疫球蛋白治療效果不好目前尚無治療準則，其發生率依地區不同約 7.8%~23%，這些病童會持續發燒且發炎現象並未減退，更使冠狀動脈產生病變的機率大增，目前傾向使用第二次的免疫球蛋白(1~2g/kg)，但還是有 3-4%的病童會對第二次的高劑量免疫球蛋白反應仍然不佳，這時就必須輔助以其他的治療方法，如 corticosteroid、methylprednisolone pulse therapy、cyclophosphamide、cyclosporin、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) antagonist、methotrexate、血漿置換術..等。

川崎病病因至今仍未明。全世界有許多學者專家致力於各種病因的研究，但未有明確答案。川崎症好發於亞洲地區，尤其在日本族群，即使他們移居至美洲或是歐洲，亞洲裔的兒童比起當地的居民仍然有較高風險會得到川崎症，這現象也暗示川崎症可能與遺傳基因有關。過去二十多年來，世界各國的川崎症研究者們企圖找出造成川崎症發病的相關基因，尤其針對人類白血球抗原基因（*Human Leukocyte Antigen*）及腫瘤壞死因子基因（*Tumor Necrosis Factor*）進行探討。因此對於川崎病的病因的探查，透過基因及蛋白質體的研究或許可以知道其病因。

西雅圖兒童醫院心臟研究室主任 Dr. Portman 已經沉浸在川崎病的基因及蛋白質體研究多年，且成績斐然。因此我申請前往他的實驗室進修，學習川崎病的基因及蛋白質研究。

## 二、研究過程：

我選擇的實驗室是西雅圖兒童醫院(Seattle Children's Hospital)心臟實驗室，它位於美國西岸，華盛頓州第二大城市、西雅圖市。它也是目前美國西岸最大的兒童醫院。本身擁有兩座實驗大樓及周邊醫些小型實驗室。期內部所有研究室主持人均是美國華盛頓大學(UW, University of Washington)教授。

華盛頓大學醫學系目前為全美前十大醫學院科系，系內擁有許多世界知名的學者、專家，及豐富的醫療研究資源。而西雅圖兒童醫院不僅包含華大的研究人員，且還有蒙大拿州、愛德華州、奧勒岡州、內華達州等美國中西部各州的俊傑均匯聚於此。西雅圖兒童醫院研究中心非常重視新進研究人員的訓練；包括：研究室環境安全、新進人員安全、人員的身體健康及心理問題的處置等，此外對於動物實驗的各項注意事務也包含在訓練課程內。研究中心成立一個安全暨訓練委員會，負責所有人員的安全及訓練。所有新進人員均須接受書面講解及上網完成環境、健康評估、安全訓練，並且接受測試，測試通過後才能開始從事研究工作。且每年須通過一次實驗室安全測試，才能繼續從事實驗工作。

Dr. Porltman 是研究中心心血管研究室主持人，也是兒童醫院心臟科心臟生理研究室主任及華盛頓大學教授。他專門從事心臟生理及心臟疾病基因、蛋白質體的研究。近年來特別專注於川崎病的基因及蛋白質體研究，且成績斐然。

逆轉錄 PCR，或者稱反轉錄 PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR)，是聚合酶鏈式反應(PCR)的一種廣泛應用的變形。在 RT-PCR 中，一條 RNA 鏈被逆轉錄成爲互補 DNA，再以此爲模板透過 PCR 進行 DNA 複製。由一條 RNA 單鏈轉錄爲互補 DNA(cDNA)稱作「逆轉錄」，由依賴 RNA 的 DNA 聚合酶（逆轉錄酶）來完成。隨後，DNA 的另一條鏈通過去氧核苷酸引子和依賴 DNA 的 DNA 聚合酶完成，隨每個循環倍增，即通常的 PCR。原先的 RNA 模板被 RNA 酶 H 降解，

留下互補 DNA。RT-PCR 的指數擴增是一種很靈敏的技術，可以檢測很低拷貝數的 RNA。RT-PCR 廣泛應用於遺傳病的診斷，並且可以用於定量監測某種 RNA 的含量。

至於蛋白質體的研究方面，主要以 2D PAGE 及西方墨點為主，其原理與電泳的技術有關。當把一個帶淨電荷的粒子放入電場時，便有一個來自與它所帶電荷性質相反電及的吸引力作用於其上。吸引力的大小取決於粒子電荷及其所處的電場強度。由此可知再一定條件下，任何帶電粒子都具有自己特定的移動率，其大小決定於粒子本身的性質，既所帶電荷的數量、形狀和大小，亦既取決於粒子的帶電密度。兩種不同的帶電粒子(例如兩種蛋白質分子)一般具有不同的移動速率。蛋白質分子具有許多可解離的酸性基(如 RCOOH-)和鹼性基(如 NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)是一個典型的兩性電解質。蛋白質分子所帶電荷的性質和數量取決於蛋白質本身的性質、溶液的 PH 值以及溶液的離子強度。不同蛋白質分子的可解離基團各不相同，因此具有不同的等電(pI)。當溶液的 PH 值等於 pI 時，蛋白質分子所帶的淨電荷等於零，在電場中不移動；當溶液 PH 值小於 pI 時，蛋白質分子帶正電荷，在電場中向負極移動；當溶液 PH 值大於 pI 時，蛋白質分子帶負電荷，在電場中向正極移動。蛋白質的 pI 與溶液 PH 值相差愈大，其所帶的淨電荷就愈多。因此，不同蛋白質由於 pI 不同，在同一溶液中所帶的淨電荷也會不同，加上不同蛋白質的粒子大小和形狀也不相同，使得混合於同一溶液中的不同蛋白質在電場中具有不同的移動速度，因此可通過電泳加以分離。蛋白質經過電泳分離後，還要經由質譜儀(MASS SPECTROMETRY)的分析及電腦軟體蛋白質資料庫的比對後，才能確認蛋白質及分析其特性。



### 三、心得

此次很榮幸能夠出國進修，特別要感謝退輔會、院部長官、兒童醫學部謝主任及全體同仁的玉成，此外也要感謝人事室、會計室及補給室的幫助。

此次很榮幸能在美麗的風景、良好的氣候、一流的實驗室裡接受大師的指導，同時學得心臟相關的知識及實驗技術。醫學科技的發展日新月異，其實國內、國外在基因方面的研究成果是不分軒致。相反的在蛋白質體學研究方面，雖然國外在這方面的研究正如火如荼的展開，但因為它是一種新的生物醫學技術，因此國內在此一方面的研究就顯的稀少。希望我們能在此一研究下工夫，才能迎頭趕上國外。

#### 四、建議

一般出國從事基礎醫學研究的人員，首先須先熟悉實驗環境，其次是學習各類實驗技術，接著要面對的是實驗初期的一連串嚐試錯誤及修正，這大概要花費四至六個月。所以想要有好的研究成果，一年的研究時間確實不夠，一般大概需要兩年半的時間才好。因此我申請額外展延一年來繼續研究，但仍然覺得時間不夠，雖然實驗完成，但實驗數據的統計、資料的整理、研究成果的撰寫及發表，只好等回國後再來完成這些工作。在此建議院方對於想要出國從事基礎醫學研究的醫師，可以提供兩年及兩年以上的進修方案。如此才不致於造成研究中斷，或因阮囊羞澀而不得不草草結束研究工作的狀況發生。

蛋白質體研究可應用的範圍很廣，在國外，此一研究不只用於基礎醫學的研究，且進一步的用於各種臨床疾病的診斷、疾病抗藥性的檢測及開發新藥物的研究。建議院方能購置這方面的機器，用於發展本院的蛋白質體研究。