

出國報告(出國類別：短修)

膽固醇調節元件結合蛋白第二型與主動脈 瘤相關性之研究

服務機關：國防醫學院 醫學系 急診醫學科

姓名職稱：蔡適鴻、少校教師

派赴國家：美國

報告日期：103 年 8 月 31 日

出國時間：102 年 9 月 1 日至 103 年 8 月 21 日

摘要

本次赴加州大學聖地牙哥分校醫學院心臟內科擔任訪問學者主要學習相關轉譯醫學所需分子機轉式研究的方法與實驗操作，並與國外實驗室建立實質交流與合作的機會。此次合作研究的主題為膽固醇調節元件結合蛋白第二型(steroid response element binding protein 2, SREBP2)，此一調節脂質代謝的關鍵轉錄因子與主動脈瘤生成與進展相關性之研究。主動脈瘤破裂是一種具有生命危險的急症，其急性破裂的死亡率為80%，而破裂的獨立危險因子為直徑大於5.5公分，因此若直徑大於5公分或每年擴張的速度超過1公分即應採取預防性手術治療避免破裂；但許多主動脈瘤是意外被發現的，因此除了手術治療之適應症外，運用內科藥物治療延緩其進展具有臨床上重要的意義；然而陸續相關於使用doxycycline 的臨床試驗與使用免疫抑制劑於器官移植同時合併主動脈瘤病患會加速主動脈瘤進展的臨床觀察等皆顯示抑制基質金屬蛋白酶與抗發炎藥物機無法有效抑制腹主動脈瘤的進展，因此開發新的及可有藥物介入的治療途徑仍是臨床上重要的課題。延續此實驗室過去於物理應力對於內皮細胞的影響、轉錄因子與轉錄後修飾等相關研究的經驗與基礎下，我們合作進行關於SREBP2於調控基質金屬蛋白酶與親環素於內皮細胞與平滑肌細胞的機轉性研究，另運用血管張力素誘發主動脈瘤之動物模式進行相關可用於穩定小型動脈瘤之輔佐藥物治療，同時並重分子機轉式與轉譯醫學的研究，以期相關的研究成果可用於避免急性主動脈瘤破裂造成的高死亡率與高風險性的手術等，而伴隨抗脂質代謝相關研究所發展出的抑制劑則有效提供以干擾此路徑為藥物輔助治療的契機。藉由此次出國短修，結合基礎研究與本院暨有的動物模式與豐富的臨床資料等，有助於深入未來在相關領域的研究，加深雙邊實質合作的契機與默契。

目次

摘 要	2
目 次	3
壹、目的	4
貳、過程	
一、研究單位與指導教授背景.....	6
二、研究重點	
a. 研究主題	8
b. 研究方法與初步研究結果.....	9
c. 後續研究方向.....	12
參、心得及建議	13

壹、目的

主動脈瘤破裂是一種具有生命危險的急症，其急性破裂的死亡率為 80%，而破裂的獨立危險因子為直徑大於 5.5 公分，因此若直徑大於 5 公分或每年擴張的速度超過 1 公分即應採取預防性手術治療避免破裂；但許多主動脈瘤是意外被發現的，因此除了手術治療之適應症外，運用內科藥物治療延緩其進展具有臨床上重要的意義。然而過去使用免疫抑制劑於器官移植同時合併主動脈瘤病患曾觀察到主動脈瘤進展加速的臨床經驗與陸續使用 doxycycline 做為抑制基質金屬蛋白酶與相關抗發炎藥物的臨床試驗等皆無法有效抑制腹主動脈瘤的進展，因此開發新的且具有藥物介入潛力的治療途徑仍是臨床上重要的課題。

主動脈瘤的致病機轉與其病理特徵為血管發炎細胞浸潤、平滑肌細胞凋亡與彈力蛋白 (elastin) 的退化與斷裂，最終導致血管中層失去張力而擴張。在主動脈瘤生成的相關研究中，基質金屬蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)，特別是 MMP-2 MMP-9 與親環素 (cyclophilin, CypA) 等被視為造成彈力蛋白退化與斷裂與血管平滑肌細胞凋亡等的重要因子。其中 MMPs 可被發炎細胞、內皮細胞與平滑肌細胞等釋放與活化後分泌，可分解包括彈力蛋白與膠原蛋白等細胞間質；而 CypA 則可惡性循環地增加氧化壓力、促進彈力蛋白退化與發炎反應等進而會促進血管中層彈性蛋白的降解而誘發主動脈瘤，綜觀上述三種分子皆為關鍵致腹主動脈瘤發生與進展的因子。

膽固醇調節元件結合蛋白第二型(sterol regulatory element binding protein 2, SREBP2) 為調節脂質代謝重要的轉錄因子，於加州大學聖地牙哥分校醫學院內科學系 (Department of Medicine, School of Medicine, University of California, San Diego, 簡稱 UCSD) 史允中教授所領導的實驗室已於過去相關的研究證實 SREBP2 可活化 NOX2 等氧化壓力基因等與

NLRP3 發炎小體並為與內皮細胞的活化與發炎反應具有相關性與過氧化物的生成、進而促進高血脂小鼠動脈粥狀硬化等，後續亦發現 SREBP2 可調控特定的微核糖核酸進而促進發炎反應與致動脈粥狀硬化。

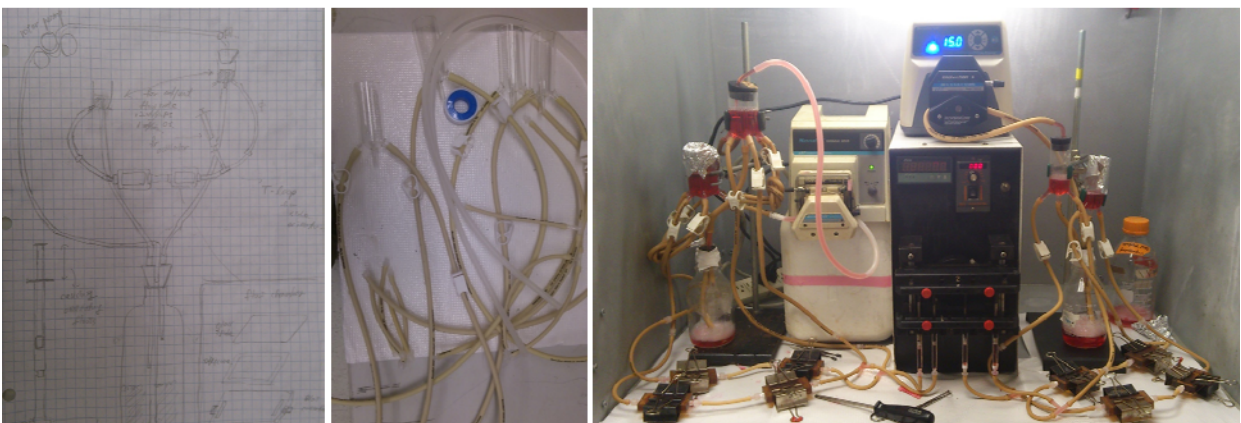
延續此實驗室關於 SREBP2 的活化與轉錄後修飾的調控於致動脈粥狀硬化之基礎下，並結合於國內實驗室相關熟悉的動物模式與臨床對於腹主動脈瘤與血管中層退化等內科治療的實際需求，我們合作進行關於 SREBP2 於調控 MMP-2 MMP-9 與 CypA 等於內皮細胞與平滑肌細胞的分子機轉性研究，另運用血管張力素二型慢性注射誘發主動脈瘤之動物模式進行相關可用於穩定小型動脈瘤之輔佐藥物治療，以期未來能有效運用於臨床上，避免高風險性的手術與急性主動脈瘤破裂所造成的高死亡率。因此本研究的目的為探討 SREBP2 此轉錄因子除了對於脂質代謝的調控外，所具促進發炎反應與內皮細胞活化的特性是否會促進主動脈瘤的進展，而此途徑的證實亦有助於後續使用 SREBP2 活化抑制劑於治療動脈粥狀硬化與主動脈瘤之合理性。就轉譯醫學研究的層面，SREBP2 活化的抑制劑如 betulin 與 fatostatin 等若能延緩腹主動脈瘤的生成與進展，則將可提供新的治療契機。

貳、過程

一、研究單位與指導教授背景

此次短修地點為加州大學聖地牙哥分校醫學院內科學系 (Department of Medicine, School of Medicine, University of California, San Diego, 簡稱 UCSD), 是一所屬於加州大學系統的公立大學, 而心臟內科為分子心臟學的发源地之一, 具有優良的研究傳統與風氣。史允中教授 (Professor John Shyy) 對於生物醫學工程、腺苷單磷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK), 血流動力學的物理應力對於內皮細胞的影響等與相關研究成就卓越, 研究成果發表於 Circulation 與 Journal of Clinical Investigation 的高影響力的期刊。近年對於 SREBP2 此轉錄因子於內皮細胞免疫發炎小體、氧化壓力與相關微核糖核酸的調控等, 實驗室目前飼養多種品系的小鼠可用於相關研究, 其中包括於內皮細胞特異性過表達 SREBP2 之黑鼠, 極具進行創新研究的潛力。

相關於內皮細胞對於血流物理應力實驗的設備、操作與實驗設計之簡介。



所需設備與器材:

1. 溫度控制與二氧化碳濃度控制的封閉式大型培養箱。
2. 旋轉式的幫浦用於循環細胞培養液
3. 震盪儀用於與循環的系統內模擬生理性的正常脈動與擾流等
4. 訂製的玻璃管路等與flow chamber

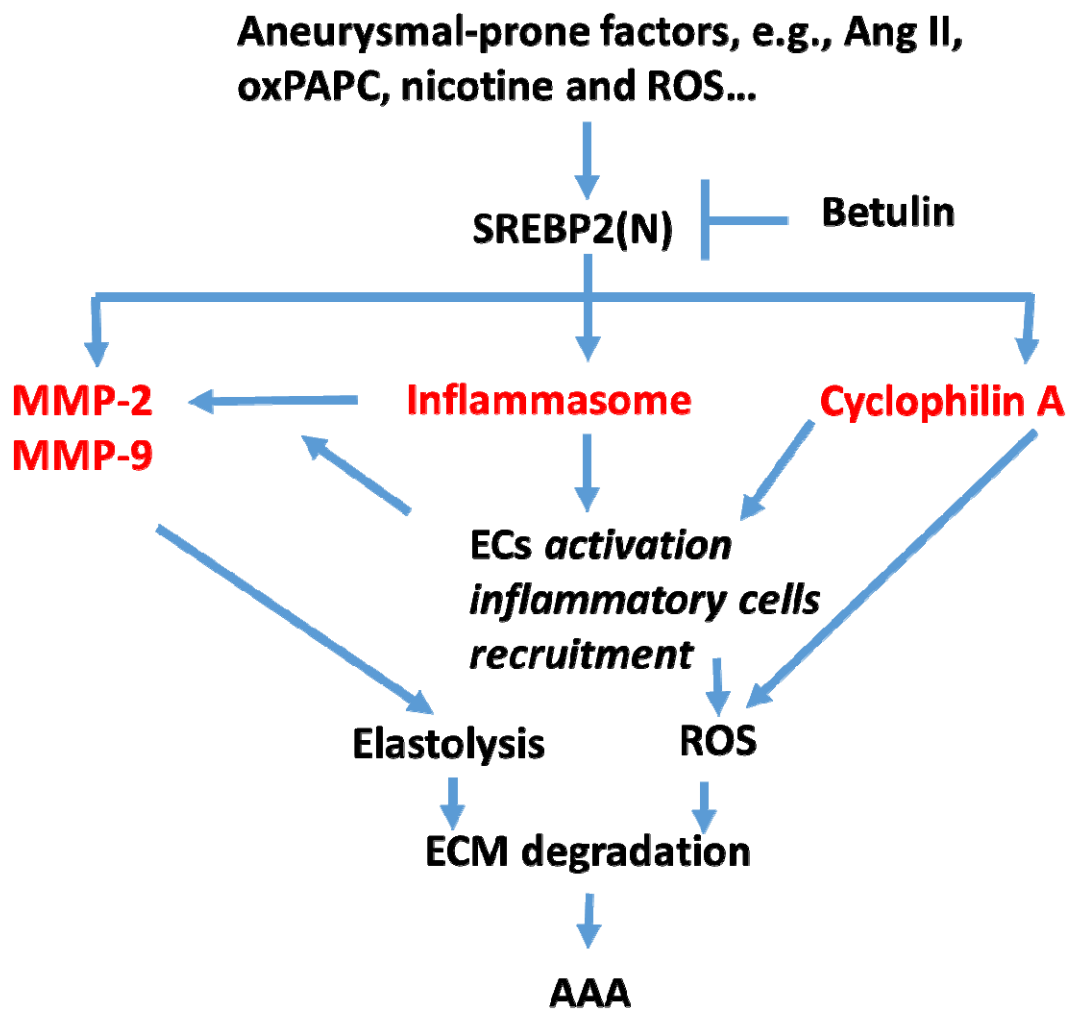
內皮細胞培養於膠原蛋白處理的載玻片串聯於循環系統中。利用震盪器可於循環系統內產生1 Hz的弦波型分別於生理性的脈動式的應力(pulsatile shear stress, PS)與病理性的擾流 (oscillatory stress stress, OS) ，分別為 12 ± 4 or 1 ± 4 dynes/cm² 的應力，以此培養條件18小時候，可見接受生理性PS的細胞排列整齊，但於承受病理性OS的細胞則無法呈現排列的現象，另於信息傳導途徑的角度觀察，亦可發現PS會造成有益於內皮細胞維持恆定的AMPK磷酸化與其下游ACC，SIRT1的活化等；而OS則會促進內皮細胞的活化、發炎訊息途徑的活化、沾黏因子的表達等發炎反應；因此，使用此系統可以有效地做為研究內皮細胞與致動脈粥狀硬化的因子與相關途徑。過去的文獻指出，動脈瘤好犯於血管之雙分岔處至三分岔處，顯示OS或有機會藉由增加SREBP2進而正調控血管中層MMPs的活性與過氧化物等，恰提供研究內皮細胞於主動脈瘤之制病機轉適當的體外實驗模式。

二、修習重點

a. 研究主題:

SREBP2 於腹主動脈瘤致病機轉的相關性與 SREBP2 活化抑制劑做為腹主動脈瘤內科輔佐治療的新契機

我們的假說如下圖:

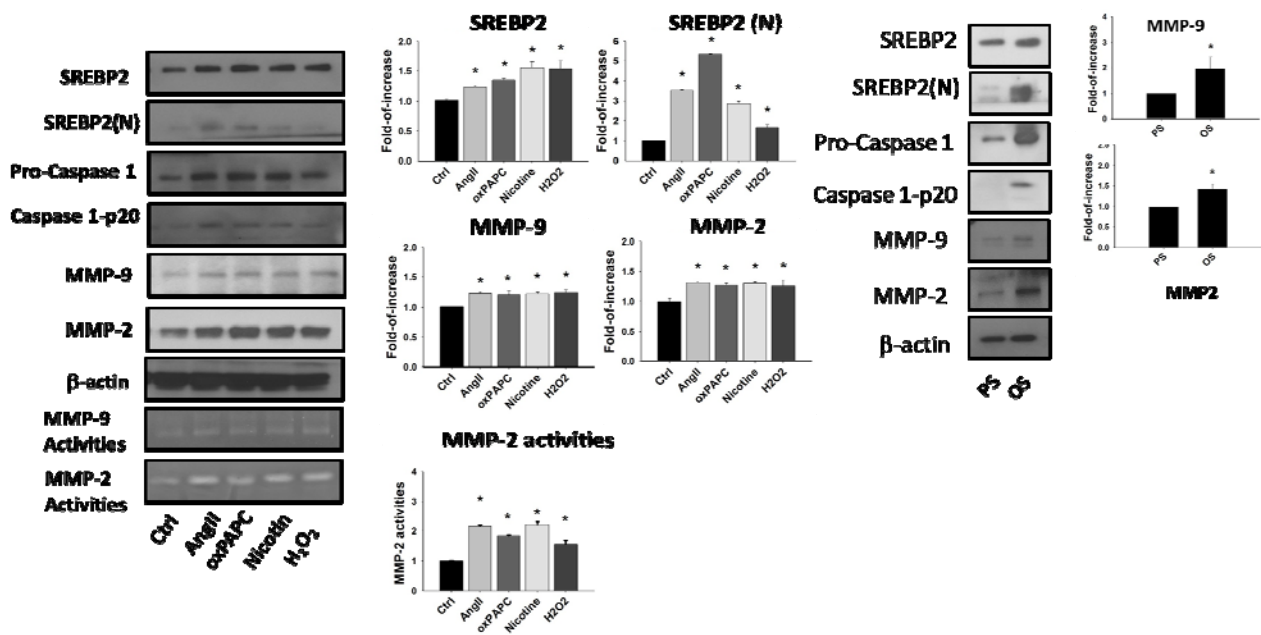


為驗證我們的假說，我們預計以下述的步驟進行研究

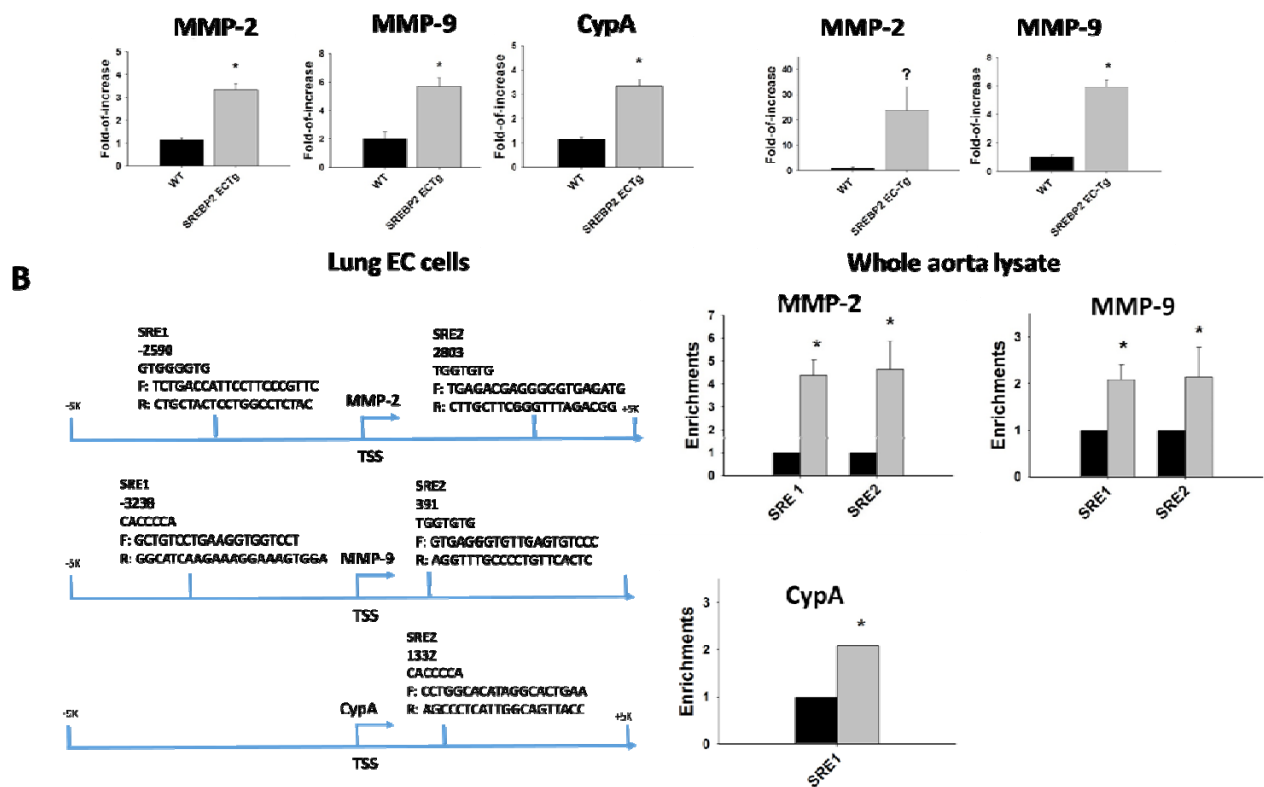
1. **SREBP2 ECTg mice were susceptible to AngII induced AAA *in vivo*?**
2. **Several aneurysm-prone factors induce activations of SREBP2 and MMP-2, MMP-9 and CypA concurrently in ECs**
3. **SREBP2 transactivates the expression of MMP-2 and MMP-9**
4. **Overexpression of SREBP2 up-regulates the expression of MMP-2 and MMP-9**
5. **Silencing SREBP2 down-regulates the expression of MMP-2 and MMP-9; Betulin, an inhibitor of SREBP cleavage, decreases AngII-induced MMP-2 and MMP-9 expressions and activities**
6. **SREBP2 transactivates another AAA player, CypA; the effects of gain and loss of SREBP2 on CypA**
7. **Pharmacological SREBP2 activation inhibitor can attenuate AngII induced AAA *in vivo*?**
8. **The protective effects of betulin are through decreased SREBP2 mediated ECs and MMPs activations and CypA associated ROS production-> hypothesis**

b. 研究方法與初步實驗成果：

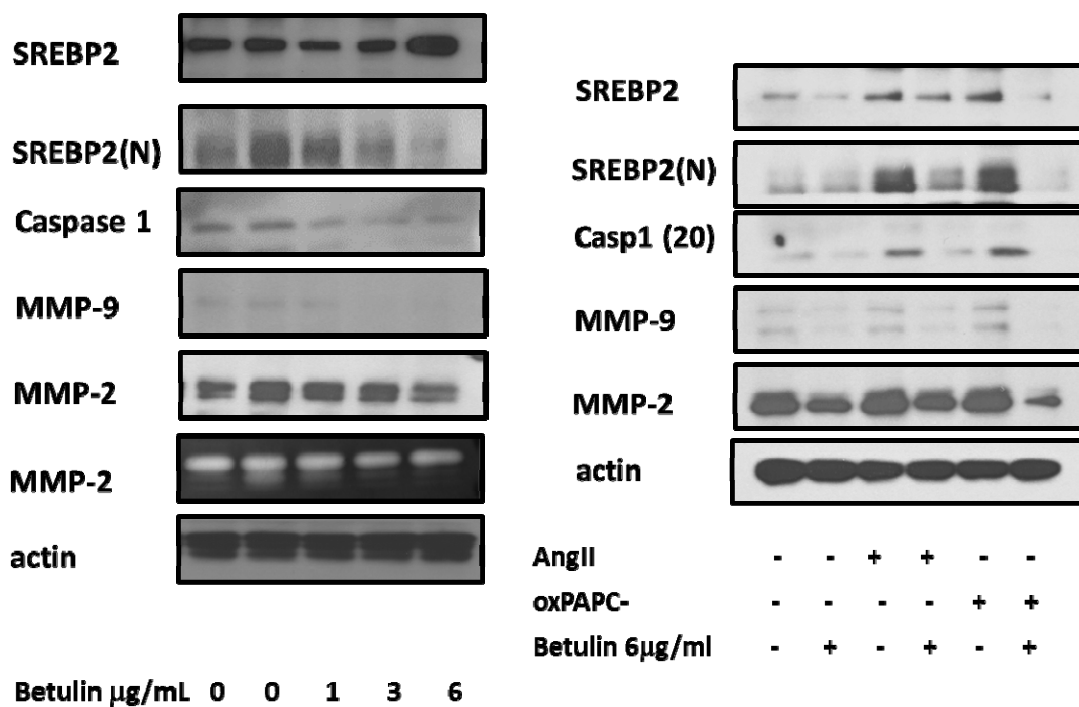
為研究相關 MMPs、SREBP2 與臨床危險因子包括高血壓、高血脂、抽菸與過氧化物生成等，我們利用包括血管張力素、氧化低密度脂膽固醇、尼古丁與雙氧水等分別模擬相關的危險因子刺激內皮細胞對於與 SREBP2 與基質金屬蛋白酶存在共伴正調控得現象；過去研究已知腹主動脈瘤好發於血管之分岔具有擾流處，利用本實驗室所熟捻的血管物理應力體外實驗亦證實於低剪力與擾流的環境下，內皮細胞會分泌較多的 MMP-2 MMP-9 與 CypA 等。



進而我們亦利用 SREBP2N 基因轉殖小鼠所分離的肺微循環內皮細胞與主動脈驗證其是否表現較多的 MMP -2 ，MMP-9 與 CypA 等；我們假設 SREBP2 為一轉錄因子可能可正調控上述的基因表現；利用生物資訊軟體 TRASNFEFC ver.15 確實可預測於 MMP-2, MMP-9 與 CypA 等三個主要促進彈力蛋白降解與氧化壓力致主動脈瘤生成的基因啟動區域上皆存在數個 SRE ，後續我們利用免疫沉澱法 (chromatin immunoprecipitation, CHIP) 的方法進行相關研究，證實 SREBP2 可正調控 MMP-2, MMP-9 與 CypA ；而過表達 SREBP2N 的內皮細胞亦會增加此三個基因的表現量 (enrichment)。



於增強與失去功能的研究部分，藉由過表達活化的 SREBP2-N 與 利用 silencing RNA 則可分別正調控此與負調控 MMP-2, MMP-9 與 CypA；Betulin 是一種由白樺樹皮萃取的天然化合物，過去相關的研究已知此化合物的衍生物具有抗發炎與抗生素的特性。目前已知的 SREBF 活化的抑制劑，betuline，則可抑制血管張力素、尼古丁與等的 MMP-2 MMP-9 的活化，此體外實驗提供我們進行以 betulin 抑制腹主動脈生成與進展的合理性。



後續研究方向

我們將利用 SREBP2 內皮細胞特異性過表達的黑鼠給予血管張力素慢性注射後是否會較其對照組有較高的主動脈瘤的發生率等，另將利用細胞存活率 MTT 試驗驗證 betulin 於血管細胞並不存在明顯的細胞毒性後，依據過去相關 betulin 抑制動脈粥狀硬化相關研究所使用的劑量 15-30mg/kg/day 於抑制血管張力素所誘發的腹主動脈瘤與高血脂背景的黑鼠驗證其延緩主動脈瘤進展的治療效果，另期間將持續監視實驗動物的體重變化、血壓、心跳、血脂變化等參數。

叁、心得及建議

赴UCSD進修一年收穫良多，期間於心臟血管內科基礎醫學研究的實驗室學習，並致力於賦予轉譯醫學的意義。實驗室普遍重視研究方向的規畫與”戰術”運用，申請研究計畫所需的關鍵研究成果，腦力激盪等需要整個實驗室總動員集思廣益；研究計畫申請的過程強調呈現出研究主持人對於執行該項研究的執行力是否足夠、計劃本身的可行性與最後轉譯醫學價值的詮釋等，確實值得國內研究單位主持人與經營者借鏡參考。

對於實驗室的經營，著重一系列與深入的研究，針對研究計畫申請的嚴謹性、寫作的技巧、步驟與alternative approach等皆會著墨；多數的實驗室以博士後研究員為主要的組成份子，對於實驗設計與執行皆較具有經驗，另博士後研究員也自己申請計畫，籌措相關子計畫實驗的經費，累積經驗與升任正式教職的籌碼。實驗室的整合以研究相同系統或器官的研究主持人們為導向，因此更加縮短技術與創意的交流；研究主持人們與其團隊輪流定期跨研究領域的研究進度報告確實也可促進有效的溝通、激盪研究的創意與互相合作的平台。

在制度面與創造研究有善的環境方面，於UCSD及其周遭生物科技業界已形成生物醫學研究的聚落，具有相當研究的優勢；因此對於相關試劑、抗體、耗材的取得皆相當迅速，而貴重儀器的管理也相當使用者有善具有可親近性。在UCSD校內也有chemical stock, CoreBio 等相關附屬機構，因此購買化學藥品、生物試劑與細胞培養液等皆非常方便，在網路上也可透過校方利用研究計畫的代碼直接進行購買，節省文書行政的時間，另單位內也有負責研究計畫預算編列與消耗的行政人員支援，可使研究人員專心致力於計劃的撰寫與實驗。

此次一年於UCSD短修期間，確實建立與國外頂尖生物醫學研究機構的互信與交流，期望未來能帶動急診醫學部基礎研究的風氣並深化基礎研究的能量，並期許能有效建立基礎生物醫學研究、急診醫學與心臟內外科部等間臨床研究與實際需求撮合溝通的橋梁。