

出國報告(出國類別：短期進修)

美國國家衛生研究院 環境健康科學研究所短期進修心得報告

服務機關：國防醫學院三軍總醫院

姓名職稱：胡智綦、主治醫師

派赴國家：美國

出國期間：104 年 12 月 12 日至 105 年 6 月 11 日

報告日期：105 年 6 月 21 日

摘要

巴金森氏症(Parkinson's disease)是僅次於阿滋海默氏症(Alzheimer's disease)第二常見的神經退化性疾病，研究發現巴金森氏症造因於中腦黑質的多巴胺神經元退化凋亡所致，而病理機轉至今仍不是很清楚。目前最新的觀念是病患在發病前十到二十年已先有非動作障礙的症狀出現，如情緒、睡眠、嗅覺異常、大小便功能障礙等，且最先受影響的腦區是嗅球、縫核跟藍斑核區的神經元。

目前造成巴金森氏症的原因包括： α -synuclein 蛋白異常、自由基及氧化壓力增加、多巴胺傳送體(DAT)異常、粒腺體異常、環境毒素、內生性毒素(多巴胺代謝過程中產生的醛類物質，如DOPAL、DOPEGAL)等等。本人赴美進修的實驗室是美國國家衛生研究院環境健康科學研究所神經藥理組(NIH/NIEHS, Neuropharmacology Group)洪昭雄老師的實驗室。洪老師專注於探討慢性發炎在巴金森氏症扮演的角色，目前已有很多研究證實慢性炎症與神經退化性疾病的有關，在巴金森氏症動物模式下發現抑制發炎可以有效減少多巴胺神經元的退化與凋亡及改善運動功能。此次赴美研究主題包括探討免疫細胞如何調控發炎反應、以及各種chemicals、factors的所經過的訊號通路與傳遞，來探討致病機轉，進而從機轉著手來發展是否有可介入治療的用藥。

目 次

壹、 進修目的.....	4
貳、 進修過程.....	6
參、 進修心得及建議.....	9

本 文

目 的

巴金森氏症為第二常見的神經退化性疾病，估計約有100 萬名美國人罹患此病，國內目前推估至少有5 萬名巴病患者。目前巴金森氏症的治療方式僅止於症狀治療，對於延緩疾病的進展無任何幫助，若能找到遏止多巴胺神經元退化的方法將是病患的一大福音。

近年來發炎參與神經疾病，甚至癌症的角色已逐漸獲得重視。神經疾病包括阿滋海默氏症、巴金森氏症、運動神經元疾病、多發性硬化症、神經痛、偏頭痛等都認為與慢性發炎有很密切的關係。大腦裡面參與發炎反應主要透過二種神經膠質細胞：微小膠質細胞(microglia)及星狀膠質細胞(astroglia)。當大腦的微小膠質細胞活化時，會產生各式各樣的促發炎因子(pro-inflammatory factors)。目前的觀念是，微小膠質細胞在不同的狀況下功能歧異，在正常或者輕微發炎的狀態下，微小膠質細胞具有免疫監督的功能，然而，在進入慢性發炎狀態後，微小膠質細胞反而具有細胞毒性，會造成神經元細胞受損。

在動物實驗中發現，慢性發炎導致的微小膠質細胞活化，會引起中腦黑質的多巴胺神經元漸進性喪失，而造成類似人類巴金森氏症的表現。雖然星狀膠質細胞引起的促發炎反應沒有微小膠質細胞這麼顯著，但活化的星狀膠質細胞會產生許多神經滋養因子(neurotrophic factors)，這些因子與神經元的存活有密切的關係。

本實驗室過去已成功發展出LPS(lipopolysaccharide, 脂多醣，一種細菌內毒素)誘發之巴金森氏症動物模型，及使用各種初代神經細胞培養(primary neuron cell cultures)研究來探討神經發炎在巴金森氏症扮演的角色。本次進修研究目的在於探討這些膠質細胞在LPS 刺激下的反應及嘗試找出具有保護多巴胺神經元的分子、化合物等，最終希望能將研究成果運用在臨床治療

上，以造福病人。本人雖然醫學背景為小兒神經科的臨床醫師，隨著越來越多的神經退化疾病發現跟發炎有關，在兒童自閉症或是其他罕見退化疾病也可能為相同的病理機轉，藉由實驗室進修學習相關概念，除了可以應用在兒童身上，也希望將紮實的實驗室觀念帶回台灣，以利後續博士班學習。

進修過程

歷經了21 小時的飛行、轉機時間，終於在104年12 月14 日抵達美國北卡羅來納州(North Carolina)羅利德罕國際機場(RDU)。北卡有豐富的自然環境，道路兩旁都是高聳的松樹，不時可以看到松鼠在樹間穿梭，早、晚也見得到許多種類的野生動物的蹤跡。本人進修的單位是美國國家衛生研究院環境健康科學研究所(NIH/NIEHS)，是美國國家衛生研究院(NIH)及美國衛生和公眾服務部(U.S. Department of Health and Human Services, DHHS) 27個研究中心及機構中其中一個單位，位於北卡的研究三角區(Research TrianglePark)，這個三角區是全美最大的科學園區，許多的科技公司、藥廠總部均設在這裏，如IBM、Cisco、GSK、Eisai 等等。

由於NIEHS 是美國政府單位，對於新進研究人員有嚴格的規範，前二週主要辦理識別證、完成線上電腦資訊安全課程、研究倫理課程，動物使用及人道照顧課程、及三天的輻射安全講習課程等等，有些課程只需要線上作答，不列入成績，但輻射安全講習課程課後要考試，通過後發予證書，才能執行相關輻射線工作。

由於實驗室已經營數十年，大部份的實驗流程都已製訂一套完整的操作程序，動物使用操作也有完整的作業手冊。資淺的人員會先由資深的研究人員(大部份是博士後研究人員，也有生物學家)帶領，有任何問題隨時跟同事或指導老師討論。每週一早上八點半到十一點固定是實驗室報告，每個人要報告前一週完成的實驗結果及下週預計執行的實驗，聽取同事及老師的意見。另外，實驗室還有不定期的文獻回顧討論，及邀請專家學者演講。

實驗室主要的研究方向在探討發炎如何誘發巴金森氏症，神經膠質細胞培養(neuron-glia culture)、混合膠質細胞培養(mixed glia culture)成為必備的實驗工具，還需視實驗條件做純神經細胞培養(neuron-enriched culture)、純微小膠質細胞培養(enriched microglia culture)等等。實驗方

法為取懷孕14、15 天大鼠的胚胎，取其中腦做神經膠質細胞培養，一週後進行實驗，神經細胞約占有所有細胞的41%，多巴胺神經元只占其中的1%而已。混合膠質細胞培養為取出生一到兩天的小鼠大腦及中腦，培養二週後視實驗需要做純微小膠質細胞培養或純星狀膠質細胞培養。不僅是細胞實驗，實驗室也做很多大鼠、小鼠的活體實驗，並且有很多類型的基因剔除小鼠，如： Cybb KO、MAC1 KO、TLR4 KO、MyD88 KO等來進一步探討發炎機轉。洪老師實驗室目前研究的重心主要是探討微小膠質細胞、星狀膠質細胞跟神經元之間的關係，而巴金森氏症的發病主要是圍繞微小膠質細胞上NADPH oxidase (NOX2)的活化，而產生過氧化物，而促進微小膠質細胞產生促發炎因子(pro-inflammatory factors)，如：reactive oxygen species、NO、TNF-alpha、IL-1及PGs等，而這些因子會導致神經細胞的傷害，甚至是死亡。死亡的神經細胞會釋放出DAMPs (damaged-associated molecular patterns)，如：細胞外基質蛋白(extracellular matrix protein)、 α -synuclein, β -amyloid, HMGB1等，而這些分子又會回頭刺激微小膠質細胞，導致反應性微小膠質細胞增殖 (reactive microgliosis)，讓微小膠質細胞又繼續釋放更多的促發炎因子，此惡性循環也就是讓疾病繼續惡化的主要可能原因。過去我們實驗室已陸續發現許多新的抗發炎化合物，如：NOX2 Inhibitor (Diphenylene iodonium, DPI)、Morphinans (Dextromethorphan, Naloxone, Naltrexone)、Nor-epinephrine, β 2-agonists, PGE2 等均可以直接抑制GP91 (NOX2 complex上transmembrane protein component) 產生的超氧自由基，達到保護多巴胺神經元的效果，希望這些以膠質細胞為標的的治療方式可以發展出延緩巴病進展的新的治療方向。

洪老師除了對巴金森氏症研究很專精之外，也對其他神經退化或是神經發炎疾病很有興趣，有一些來短期進修的訪問學者，本身已經在某些領域有一些成果，希望借用NIEHS的資

源來讓研究更提升，像漸凍人、多發性硬化症、阿茲海默症甚至是惡性腦瘤，也都是實驗室有興趣的研究主題。老師實驗室目前有十一位成員，組成有博士後研究員、博士班學生、教授、副教授等老師級研究員以及跟我一樣是短期訪問學者的醫師，大家都能在實驗室盡心盡力工作，不分彼此，生活上或是工作上都能互相幫忙，氣氛非常好，實屬難能可貴。

進修心得及建議

一、研究資源及設備：

因應美國政府財政赤字，NIEHS 也面臨研究經費逐年縮減，甚至於關閉實驗室的困境。但整體來說研究經費仍相對充沛，以我們實驗室來說，每年花在動物費就高達三十萬美金，以每週都需要實驗的大鼠來說，一隻要價200美金，若是基因轉殖小鼠費用更高，甚至高達1000美金，而神經細胞培養所需要的培養液及設備也是非常昂貴，台灣大概沒有一間實驗室能負擔得起如此高的經費。在NIEHS，實驗室彼此間的合作相當密切，每天都會看到有人在網上詢問可不可以借用試劑、研究設備等等留言，馬上就會有人回覆。另外，你也可以把檢體送往所內的核心實驗室，有專人協助分析，省卻不少時間及精力。離NIEHS 不到半小時車程即是全美著名的杜克大學(DukeUniversity)及北卡州立大學教堂山分校(UNC)，這兩所大學在研究方面均有傑出的表現，與NIEHS也有密切的合作。

二、演講及會議：

除了每週定期的小組討論外，我們實驗室所屬的神經藥理組每週也有一次的演講，邀請外賓、專家學者蒞臨演講。每年八、九月，各實驗室的研究人員得輪流上台報告過去一年相關的研究成果，會中各領域專家會提出各式各樣的問題，相當有挑戰性。另外，NIEHS 每週幾乎都會舉辦大型會議或演講，我參加過幾次探討巴金森氏症相關議題的會議，會中演講者都是全美最傑出的研究學者，與會人員討論非常熱烈，令我印象十分深刻。

三、教學與訓練：

NIEHS 對於新進人員要求很嚴格，得受相關訓練才能執行相關研究工作，在我出國前，就必須登入系統完成相關訓練課程，才能繼續後面簽證申請。有些教學課程在電腦線上學習就

可以了，類似於本院的e-learning 系統，但NIEHS 的線上課程相對較為活潑，較多圖片、影音等互動課程，比較不會乏味。參與訓練課程的講師教學非常熱情，即使學員只有二、三位，仍賣力教學，而且善於使用道具，很值得我們學習。

另外，NIEHS 對於電腦、網路的教學也不遺餘力，每個月圖書館都有Windows、Google、Pubmed、Graphpad Prism、Endnote 等程式、軟體免費教學，幫助甚大，甚至你想要借的書並無館藏，可經由ILL (interlibrary loan)幫你借到。

三、電腦使用規範：

由於NIEHS 是政府單位，對於電腦、網路使用規定相當嚴格。當我進實驗室最先了解的三件事之一，就是資訊安全。不能任意下載軟體或程式到個人電腦，有需要得聯絡IT人員，馬上會有人處理。而且不能連接私人隨身碟到辦公室電腦，得使用公發的隨身碟(ironkey，號稱最安全的隨身碟，要價二、三百美金)，筆記型電腦也不能連接到公用網路上，只能在特定區域使用。若是偵測到某個人的IP中毒，算是很嚴重的違規，甚至個人上網、收信的功能都會被取消。另外，會定期進行電腦軟硬體更新，增進電腦使用效率。而IT人員是非常有效率跟非常有幫忙的單位，不管是電話諮詢或是實體操作，都讓我們非常便利使用跟非常快速獲得解決，有強大的IT資源，的確讓研究人員省事不少。

四、進修時間：

對於實驗室短期進修，半年的時間不是很足夠，以我們實驗室來說，光是要達到細胞培養穩定平均就要花上三個月以上的時間，若要做活體實驗，以我們實驗室的動物模型，至少也要一年以上的時間 (因為慢性發炎疾病模型需要觀察到一年時間實驗才可收成)。受限於進修時間，我僅協助資深研究員陳博士完成他的實驗與論文發表等，並未有自己的實驗，非常可

惜。建議日後若申請實驗室進修，可否延長時間至一年半至二年，對於研究應該會很有幫助。

目前因為返國後要接續念在職博班，有保持跟洪老師跟陳博士的聯繫，希望用合作的方式延續資源利用，對個人或是醫院、醫學院都是很大的加分與幫忙。

五、國際觀：

感謝小兒科部及軍醫局給我機會赴美進修，感謝神經科部彭家勛醫師以及宋岳峰醫師幫忙牽線，讓我到洪老師實驗室見習，大大地開闊了我的視野及眼界。NIEHS人才濟濟，所見都是知名的學者，更不乏諾貝爾獎提名者或是得主。我發現大陸的研究人員相當多，我們實驗室目前就有九位，均是頂尖的人才，其中三位是博班學生，學校先送她們到美國完成實驗及論文發表後，在回國補修學分，可見他們培養人才的用心跟積極程度。不僅是大陸人員，印度、日本跟韓國也非常積極送人才到NIEHS進修或是工作，台灣人在所裡已經是少數中的少數，可想而知這些國家的人才在美國的影響力也越來越大，值得我們正視跟關注。

六、回國後應用：

目前已發現慢性神經發炎與神經退化性疾病的關聯性，不僅在成人的神經退化性疾病扮演重要角色，在兒科部分也有越來越多文獻支持這個理論與機轉。本人為小兒神經科背景，希望能延續實驗室的經驗，推展到臨床實驗，所以今年在職博班進修的主軸，除了會繼續之前的動物實驗之外，也希望能往臨床端延伸，藉由兩方面的結合，更進一步詳細探討特別是兒科神經退化性疾病的致病機轉。因為很多資源必須重新建立，不管是軟硬體都需要，本人將與指導老師陳錫洲醫師密切合作，也希望能藉由實驗的進行，連結醫院、醫學院，甚至國內外相關資源，讓實驗能順利完成。特別是美國國衛院的資源非常豐富，本人也計畫寒暑假各一個月時間，前往執行實驗步驟較昂貴或是關鍵部分，對個人或是學校都能大大加分。