

出國報告(出國類別：進修)

英國博士學位進修心得報告  
探討人體血液中的非編碼核糖核酸之載體  
組成及心血管疾病下的其影響

服務機關：國防醫學院三軍總醫院

姓名職稱：鄧以柔

派赴國家/地區：英國倫敦

出國期間：108年7月1日至112年12月8日

報告日期：112年12月15日

## 摘要：

血液循環中的小分子核糖核酸被認為是有前瞻性的生物標的，可利用於微侵入式抽血檢查。目前有更多研究開始專注在胞外顆粒攜帶的小分子核糖核酸及其對於細胞間信息交通的角色。在其他研究上顯示脂蛋白和 Argonaute 複合物也可以為攜帶血液循環中小分子核糖核酸之載體，而可信賴之分離方法的缺乏及只專注在分離物的不完整研究導致不同研究設計下的不一致結論，並且誤導了小分子核糖核酸在不同載體複合物的含量。

超速離心是從各種體液中分離胞外顆粒的最常用的方法，而我們利用免疫墨點和質譜儀蛋白體學的初步數據顯示超速離心只能低產率地分離含有脂蛋白的胞外顆粒。當我們只分析分離出的胞外顆粒樣品就會高估胞外顆粒真正的小分子核糖核酸含量。為了改善此議題，我們使用高校液相色譜系統來執行分子排阻層析法，而按照顆粒和複合體在照流體液相下直徑來分離體液。此技術具有減少物質流失和避免顆粒/複合物之聚集的好處。此技術可從人體血清分離出富含胞外顆粒的樣品、富含白蛋白及低密度脂蛋白的樣品及高密度脂蛋白的樣品。在此過程中我們也使用胞外顆粒相關抗體 (syntenin-1 及 CD9)和載脂蛋白相關抗體 (apoA1 及 apoB)來分析這些分離的樣品來證明。我們建立的平台可以從人體血清來提取不同富含小分子核糖核酸載體的分離樣品，並使用反轉錄聚合酶連鎖反應來分析小分子核糖核酸在其中的分布。這樣相對含量的分布也能用來跟蛋白質標的來比較出哪種載體與特定的小分子核糖核酸為共同溶析出來的複合體。我們也將會使用成分相對較單純的含細胞分泌物之培養基來減少非特異性的蛋白質之摻雜可能性，並做出針對細胞特異之小分子核糖核酸的分析研究。

這項研究建立起一個能夠更具體分析小分子核糖核酸的載體之特性，且了解血液中的小分子核糖核酸如何被胞外顆粒、脂蛋白和核糖核酸鑲嵌蛋白攜帶著。因此我們可以不只檢測血液中小分子核糖核酸的總體含量，也能去分析在不同載體的小分子核糖核酸分布。這樣的技術不僅能研討出小分子核糖核酸在細胞間信息傳遞的特定作用，並且能開啟另一個疾病檢測生物標的之新領域。

目錄

一、	目的：	4
二、	過程：	4
三、	心得及建議：	6
四、	致謝：	7
五、	附錄：	8

## 目的：

台灣的十大死因中，心血管相關疾病就佔了四名左右，其中的心肌梗塞和中風都與血管粥狀硬化的形成有關，可想而知有眾多台灣人的健康都是受此威脅。雖然台灣醫療已針對這些疾病從病理機轉、臨床醫學統計研究及專業經驗中，發展健全的治療指引和照護網，但在現今的醫療下，對於血管粥狀硬化的病理機轉和相關的脂質代謝還是充滿未知，也導致無法根治這類疾病。

從學習心血管疾病知識到照護病患中，我開始冒出對於動脈粥狀硬化形成的好奇心，也進而決定未來醫學研究的方向。在大學期間進行上皮細胞研究所學習到的細胞實驗基礎下，開始接受心臟內科醫師的指導，參與探討心血管疾病相關之轉譯醫學研究；同時在生理老師的教學下，學習血管生理機制和動物實驗模型。血液循環中的小分子核糖核酸被認為是有前瞻性的生物標的，可利用於微侵入式抽血檢查。目前有更多研究開始專注在胞外顆粒攜帶的小分子核糖核酸及其對於細胞間信息交通的角色。在其他研究上顯示脂蛋白和Argonaute複合物也可以為攜帶血液循環中小分子核糖核酸之載體，而可信賴之分離方法的缺乏及只專注在分離物的不完整研究導致不同研究設計下的不一致結論，並且誤導了小分子核糖核酸在不同載體複合物的含量。

## 一、 過程：

博士學程一開始與指導老師討論學程內容及認識實驗室的組成和資源，學程的管理員也介紹實驗室安全指示和學校各種學習資源。經過將近三個月的基本實驗訓練、文獻研讀及研討會參與，進行博士第一階段的研究題目審核，向指導老師和學程其他三位老師解說自己的研究計畫，並得到不同的反饋和建議。

關於研究的深度進行，首先我先進行不同分離技術來分離胞外顆粒，包含超速離心及密度梯度離心。免疫墨點法和質譜儀蛋白體學來評估方法學上是否有效地分離胞外顆粒相關的蛋白質標記，以及評估這些分離檢體上殘餘的白蛋白、脂蛋白相關蛋白質標記及血清常見的游離蛋白質。而這些數據顯示超速離心只能低產率地分離含有脂蛋白的胞外顆粒，且會有高污染率之其他游離白蛋白及脂蛋白。此發現顯示當只分析分離出的胞外顆粒樣品就會高估胞外顆粒真正的小分子核糖核酸含量，因為這些小分子核糖核酸可能來自一起分離的脂蛋白或其他游離蛋白質複合體。

完成以上的實驗後，剛好遇到新冠肺炎的疫情，疫情導致實驗室暫時關閉，所以開始整理數據、撰寫博士資格考的報告及準備資格考口試所需要的口頭報告，經過將近兩個月的準備後，完成線上的口試和答辯，成功取得博士候選人的資格。而在大約半個月後，實驗室經過政府和學校的審慎評估後，開始進行有階段性的開放，並在開放前針對降低疫情散布的風險，進行所有相關實驗技術的步驟之細節評估。由於疫情的管控下，許多研究和學習的干擾斷斷續續地維持了兩年以上，包含實驗空間的管控、實驗材料的短缺、線上討論的拘限、研討會的延期調整及染病下的修養。這些都影響了研究的進度且干擾了許多學習的計畫和機

會，間接決定一些後續實驗的延伸和方向。

為了改善低產率和高污染率的分離方法，實驗室團隊開始使用高校液相色譜系統來執行分子排阻層析法，其原理利用在照流體液相下直徑來分離體液，並收集顆粒和複合體，此項系統能利用不同材質和孔洞大小的管線來調整，以達到在目標檢體的注入後，有明顯的目標複合體群間的分離。此技術具有減少物質流失和避免顆粒/複合物之聚集的好處。而在使用人體血清檢體下，此技術能分離出富含胞外顆粒的樣品、富含白蛋白及低密度脂蛋白的樣品及高密度脂蛋白的樣品。在此過程中我們是使用不同蛋白質標記來分析目標複合體的分離：胞外顆粒相關抗體 (syntenin-1及CD9)、載脂蛋白相關抗體(apoA1及apoB)及血清最大宗的游離白蛋白分布於不同時間收集下的樣品。

此建立的平台可以從人體血清來提取不同富含小分子核糖核酸載體的分離樣品，並使用反轉錄聚合酶連鎖反應來分析小分子核糖核酸在其中的分布。這樣相對含量的分布也能用來跟蛋白質標的來比較出哪種載體與特定的小分子核糖核酸為共同溶析出來的複合體。在進行此分析前，我也進行一連串的步驟和參考控制標的的測試，以避免在分子排阻層析法及後續提取小分子核糖核酸的流程中，造成不必要的流失或其他數據雜訊。令人驚訝的是，大部分的小分子核糖核酸並不在富含胞外嗜體的分離檢品。另外，利用高特異性的脂蛋白分離實驗也顯示無法有效地分離多數的小分子核糖核酸，這顯示了胞外嗜體和脂蛋白在人體血液循環系統中，並不是主要的小分子核糖核酸載體。

接下來我們也使用成分相對較單純的含細胞分泌物之培養基來減少非特異性的蛋白質之摻雜可能性，並做出針對細胞特異之小分子核糖核酸的分析研究，並使用不同種類的細胞株來分析不同細胞對於分泌小分子核糖核酸至血液循環的可能差異。因為細胞分泌物具有成分相對較單純的特性，質譜儀之蛋白質體學分析也應用在分離的所有檢品中，去分析多數蛋白質標記及低含量的核糖核酸相關蛋白質的分布，更能有效地分析流體間的主要小分子核糖核酸載體。

這項研究計畫建立起一個能夠更具體分析小分子核糖核酸的載體之特性，且了解血液中的小分子核糖核酸如何被胞外顆粒、脂蛋白和核糖核酸鑲嵌蛋白攜帶著。因此可以不只檢測血液中小分子核糖核酸的總體含量，也能去分析在不同載體的小分子核糖核酸分布，甚至應用到其他生物液體之檢測分析。這樣的技術不僅能研討出小分子核糖核酸在細胞間信息傳遞的特定作用，並且能開啟另一個疾病檢測生物標的之新領域。

完成這系列的研究及分析，在最後一年也開始著手整理數據，開始著手論文的準備及撰寫。期間也有進行其他小型實驗去提供不同面向的分析，並也有參與學程的相關研究成果發表和研討會。在今年也完成論文的繳交，及後續的博士學位答辯，當中針對方法學、數據呈現及後續發表的考量都有很多討論和收穫。

## 二、心得及建議：

### 1. 語言與溝通:

雖然在醫學系和臨床醫院的教學都會使用英文的專有名詞來學習，也確實在適應閱讀上有一定程度的幫助，但生活用語以及英文表達上確實是一個初始的障礙和課題。這體現在與老師和實驗室其他成員的討論和相關研究學習，無法達到有效的溝通，甚至會影響後續實驗的進度安排，和可能參與其他偏臨床的計劃機會。故出國前及在進修期間中，如有任何能有更多用英語與人互動的機會，甚至能做學術的討論是最能有幫助的。如醫學院能囊括相關人才來建立純英文的環境，建立相關的課程或工作坊能增進這方面的準備，或是增加更多與蒞臨本校演講參訪之國外學者的交流時間，或許能縮短博士進修的英文溝通陣痛期，來達到更有效率的學習。

### 2. 學習模式:

由於本學程無修課要求，和指導教授討論後可能需要學習及加強的項目。在了解學校所提供的自主學習課程、無學分的通識課、預約制的專業老師討論及實驗室相關博士後研究員的專業後，能在前兩年建立基本的研究和寫作能力後，不斷地自主學習是非常重要的。在與實驗室的其他歐洲及英國人了解關於學習和研究模式，體認到以前醫學系在研究文獻研讀、邏輯思辯和科學寫作及口頭報告的訓練是缺乏的，雖然以前自主的課外實驗室實習經驗，能有一定程度上的訓練，但對於國外基礎醫學研究之博士學程缺乏系統系的基本訓練，會因此需要額外時間上去彌補缺乏的經驗和適應新的學習及實作部分。如醫學院能就這些主題去做加強性的選修課、暑期課程或工作坊，或許能讓更多有興趣的醫師能提早具備基礎的研究能力，不僅有利於日後博士學程的進修，也能增進臨床醫師在臨床或轉譯醫學研究上的基礎能力。

### 3. 研究模式:

首先關於實驗計畫及操作方面，英國的實驗室要求邏輯思考及文獻吸收的能力，每個步驟都需要知道原理和可能的變化，並不會有既定的流程步驟，而是經由與資深研究員或指導老師討論，來完成針對每個研究問題及樣品特性的實驗流程。而在寫作上西方愛用破題法而東方講究起承轉合，這是需要適應的。如何用簡潔精確的英文字句來表達研究的所有邏輯思辯是一開始準備資格考還有研討會摘要時，非常艱深且耗時的課題。另外在口頭報告上，實驗是在投影片的製作和圖表設計上，提供了我許多思考上的突破，如何針對不同聽眾的需求和能力，來表達研究本身的重要性、趣味性及突破型，都是很多不同層面的思考及學習。還有，

與實驗室不同專業和分組的人員去做討論會有更多的收穫。

#### 4. 文化差異:

英國及歐洲國家十分重視上下班的時間安排，對於時間的安排有一定的規則，且十分重視工作的效率及尊重每個人的上下班和休息的權益。而在倫敦進修及進修的實驗室，最有趣的收穫就是能跟不同文化的人交流，光是實驗室的人員組成就沒有單一多數族群，甚至曾多達十個不同國家，甚至倫敦絕大數都是來自世界各地，讓我更學習到尊重和了解各個不同文化，這不僅加深實驗室的情誼，也更了解國際觀和開拓視野。這些都會更幫助建立以後與各國的科學家合作和交流的能力。

### 三、 致謝:

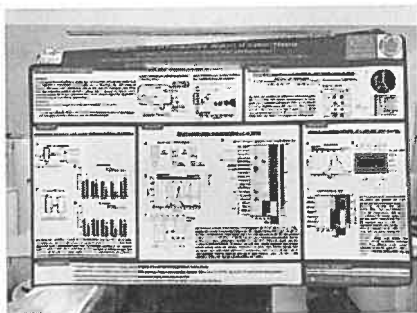
上尉軍醫官鄧以柔本著對於基礎醫學研究的熱情，持續參與心血管疾病相關的研究，也發現對此還是有許多學識和技術的不足。因此為培育優良基礎研究及教育人才，具備完整醫學知識和精良之研究才能，且強化與國際接軌及鏈結醫學相關發展。如今在期限內完成國外進修及取得博士學位後，將返回國防醫學院取得教職，持續開拓個人之學術研究專長，期望能以學制用，運用到臨床醫學的層面，與此之外也積極從事醫學教育工作。

## 附錄:

與實驗室至牛津參加研討會



與實驗室參與研討會及海報報告



招待短期進修的烏克蘭醫師交流及與實驗室至鼎泰豐用餐



在研討會進行口頭報告

