

出國報告 (出國類別：進修)

缺血性腦中風後神經保護機轉 之探索

服務機關：國立臺灣大學醫學院附設醫院

姓名：葉馨喬

派赴國家：美國

出國期間：108年10月1日至109年4月6日

報告日期：109年5月1日

摘要

此次出國進修地點為美國紐約康乃爾大學醫學院的 Feil Family Brain and Mind Research Institute (BMRI)，指導教授為該中心的 Costantino Iadecola 主任與 Josef Anrather 教授，因指導教授考量一年的進修時間可能無法完成一個研究計畫，故安排我執行已進行中的腦出血與腸內菌關係的計畫。於執行該計畫的過程中，我學習的項目如下: (1) 以立體定位儀進行小鼠基底核注射膠原蛋白酶 (Collagenase VII-S)，引發腦出血；(2) 小鼠腦中風行為測試，包括 Bederson's test、modified Garcia test、corner test、wire-hanging test；(3) 以檢測血紅素的方

式評估腦出血大小；(4) 以 wet-dry weight method 評估腦水腫；(5) 以流式細胞技術(flow cytometry) 量化分析腦部發炎細胞種類。原定進修期間為 2019 年 10 月 1 日至 2020 年 9 月 30 日止，然而因紐約自 2020 年 3 月起爆發嚴峻的 COVID-19 感染，以致實驗中斷，故提早於 2020 年 4 月 6 日結束進修返國。

目次

壹：目的.....	1
貳：過程.....	3
參：心得.....	7
肆：建議事項.....	10

本文

壹：目的

此次出國進修的主題為缺血性腦中風後神經保護機轉，進修地點為美國紐約康乃爾大學醫學院的 Feil Family Brain and Mind Research Institute (BMRI)，該中心主任 Costantino Iadecola 教授與 Josef Anrather 教授的神經科學實驗室長期致力於研究缺血性腦中風相關的發炎反應與神經退化，故選擇此實驗室為研究進修地點。兩位指導教授考量到一年的時間對於一個基礎研究計畫而言可能無法及時完成，故建議我進行一個探討腦出血與腸內菌關係的研究計畫，此計畫之前已進行一部分，預估將較有機會於一年內接續完成此研究。

腦出血是第二常見的腦中風種類，在臺灣約佔所有腦中風的三成左右，腦出血是由於腦部血管破裂導致血液流至腦內蓄積成血塊，對局部腦組織造成壓迫、腫脹，進而傷害局部腦組織造成神經學症狀。腦出血的原因最常見為長期高血壓控制不良，其次為類澱粉性血管病變(amyloid angiopathy)，其他如藥物(如抗凝血劑)、凝血功能異常或肝腎功能異常也可能引起腦出血。高血壓性腦出血常見的位置為基底核(basal ganglion)、殼核(putamen)、腦幹、小腦等位置，依血塊位置及血塊大小會有不同的神經學表現，大型血塊除了造成局部症狀之外，也會造成腦壓升高甚至腦疝脫，導致生命危險。腦出血 30 日的死亡率高達 28%-46%，存活的患者也常存留相當程度的失能。然而，腦出血一旦發生，目前尚無有效的治療方法，非侵入性的治療包括血壓控制、tranexamic acid、以及

recombinant activated factor VII 等皆無法證實對長期預後有療效；而數種手術治療的研究，目前也無法證實何種術式於腦出血早期執行可以改善患者的長期預後。腦出血引發的發炎反應是造成腦部腫脹很重要的因素，腦部腫脹會進一步惡化腦組織的傷害，理論上若能控制腦部腫脹將能減少一部分腦損傷，因此探討腦出血引發的發炎反應機轉與研究如何降低此發炎反應將是具有潛力的研究方向。

貳：過程

我們一家三口於 108 年 9 月 25 日半夜抵達紐約後，第一週忙著辦理住宿、銀行、電話、網路、保險、社會安全卡及小孩上學的事務上。108 年 10 月 1 日報到後，Anrather 教授向我解釋我即將進行的計畫的背景想法，以及即將進行的順序。

康乃爾大學醫學院規定，新進人員不論之前是否有動物實驗之經驗，於正式進行或練習任何動物實驗之前，首先計畫主持人需將此新進人員納入該研究計畫之名單內，接著該新進人員需通過一系列動物中心的訓練課程與認證測驗。這些訓練課程是由實驗室主持人依照研究計畫的內容決定該新進人員需接受之訓練項目，主要以線上的方式進行，即觀看動物中心製作的教學檔案，課程內容淺顯易懂、重點明確、設計活潑，讓我對動物手術的背景知識有更深的了解。因為社會上動物保護的意識高漲，此訓練課程非常強調對實驗動物的尊重，以及進行動物實驗的研究人員有義務遵守這些規定，否則可能會導致非常嚴重的懲罰，輕者研究計畫經費被收回，重者研究室被勒令關閉等。於線上課程完成之後，我被安排參加動物中心舉辦的討論會，內容是關於實驗室中可能會遭遇的動物倫理議題及處理方式，強調實驗動物的快樂與健康是達到準確的實驗結果不可忽視的要素。接著，我參加動物中心的導覽活動，此活動除了介紹動物中心的環境之外，更強調研究人員在動物中心內活動需注意之安全事項。最後的一項訓練是實際操作課程(hand-on training)，由獸醫師指導 3-4 位學

員實際練習操作小鼠手術前的準備工作以及麻醉的技巧，相當實用。這些訓練的安排是層次漸進的，對於剛入門或已有經驗的研究者皆相當有助益。

於硬體設備上，我所在的研究大樓是 **Feil Family Brain and Mind Institute**，是一棟獨立於康乃爾醫學院之外的研究大樓，大樓內的 3 樓與 4 樓設有專屬的動物中心，4 樓動物中心飼養小鼠，即位於腦中風手術室的隔壁，也與教職員工的辦公室在同一樓層，因此提取實驗動物與觀察動物術後狀況非常方便，節省搬運動物的時間，且減少動物在搬運過程中所產生的焦慮與壓力，是非常好的設計。此外，手術實驗需要用到氣體麻醉，氧氣是由牆壁上的氣體供應系統所提供，而非鋼瓶，所以不用擔心手術進行中氧氣壓力突然不夠的問題，有利於實驗的順利進行，且較為安全。此中心每位操作動物手術的研究人員皆有一個專屬的手術臺，基本配備包括解剖顯微鏡、氣麻機等，若是操作缺血性腦中風手術之手術臺則另外配有雷射都普勒超音波以偵測腦部大血管血流，我的手術臺則配有立體定位儀，以便進行立體定位注射。因為研究人員各自有手術臺且可熟悉其配備，對操作手術而言相當方便，不會發生等不到手術臺而必須將實驗延後的狀況。此外，對於腦中風術後的小鼠，有一個保溫箱(**incubator**)可以讓小鼠暫留，溫度約 28-30°C，其內有通氣及燈光設備，因為中風後的小鼠常有體溫調節的障礙，例如腦出血小鼠常有低體溫的現象，保溫箱可以幫助小鼠維持體溫，度過急性中風的危險期。

完成動物中心的訓練課程之後，我正式開始動物實驗的練習階段。首先練

習將染料(Evans blue)以立體定位注射的方式(stereotactic injection)注射於小鼠大腦的基底核處，注射後立即犧牲小鼠取出腦部，再沿著注射處切開腦部，以確認注射位置是否正確以及是否需要調整。待注射位置正確且穩定後，進而練習注射膠原蛋白酶(Collagenase VII-S)於基底核處，藉由膠原蛋白酶將血管壁逐漸分解的效果，誘發小鼠發生腦出血。此腦出血症狀出現得很快，當小鼠由氣麻中甦醒時，幾乎都會出現向注射側轉圈的行為，表示左右兩側肢體的張力或肌力不同或是存在感覺系統的障礙。此腦出血模式比起直接於小鼠腦部注射定量血液，更接近人類的自發性腦出血，因膠原蛋白酶引發之腦出血的血塊於注射後的數小時內有逐漸增大之現象，類似人類腦出血後數小時內的血塊變大(hematoma enlargement)的現象。將小鼠大腦自注射處切下，其腦出血之位置與大小相當穩定，且對照組小鼠（於腦部同部位注射與實驗組相同的溶劑）的腦部不會有出血現象。

在評估腦出血的方面，首先我學習了幾種小鼠的腦中風行為測試，包括 Bederson's test、modified Garcia test、corner test、wire-hanging test，這幾種測試皆能明顯區分腦出血小鼠與對照組小鼠的行為差異。其次，我學習以檢測血紅素(hemoglobin)的方式評估腦出血的大小，初步的結果證實腦出血小鼠的出血側腦部的血紅素值遠高於對側腦部以及對照組小鼠。接著，我學習評估腦出血所引發之腦水腫，以 wet-dry weight method 進行評估，因需要將鼠腦置於 100°C 加熱 24 小時，Anrather 教授為此特地購買了一個實驗用烤箱以利實驗進行。這

實驗證實了出血側基底核的含水量高於對側基底核及對照組小鼠的同側基底核，表示腦出血處的有較厲害的發炎反應。此外我也開始學習流式細胞技術 (flow cytometry)，此為研究發炎反應很重要的一項工具，此方法為藉由細胞表面的抗體，量化分析腦部及腦膜的發炎細胞種類。

為了研究腸內菌對腦出血的影響，首先學習如何讓小鼠的腸內菌叢改變為抗藥性菌株，這是利用小鼠有食糞的特性，將小鼠與腸內帶有抗藥菌叢的播種小鼠(seeder)同籠，並將其飲用水改為抗生素水，持續飼養 2 週後，小鼠的腸內菌叢即與播種小鼠相同，接著進行小鼠腦出血手術，術後以行為測試及腦部血紅素定量評估腦出血嚴重程度，並以其腦水腫之程度來做為評估發炎的指標。目前此計畫已完成一部分，主要發現帶有抗藥菌株的小鼠之腦水腫程度顯著高於無抗藥菌株之小鼠；但此兩組於腦出血後三日的行為測試無明顯差異，故欲延長測試時間至第 14 日以觀察較長期的變化。然而因新冠肺炎流行，康乃爾醫學院規定所有非必要之實驗須於 109 年 3 月 20 日前結束，故最後一批術後小鼠只追蹤 10 日即提早結束實驗。自 109 年 3 月 23 日起，紐約州政府規定所有非必要之工作之員工必須在家工作，因紐約新冠肺炎疫情的嚴重性與不確定性，故與兩位指導教授討論之後，我們決定提早歸國，兩位指導教授均表示隨時歡迎我回去繼續完成研究計畫。

叁：心得

我很感謝臺大醫院的院方及神經部，讓我有這樣的機會能夠一圓出國進修的夢想，也很感謝康乃爾大學醫學院的 Iadecola 主任與 Anrather 教授接受我的進修申請以及對我的指導。當我暫時脫離臨床與教學的工作，在這一段時間專心進行一項研究計畫，讓我能有更多的時間於實驗前徹底的了解這個實驗以及仔細思考實驗的設計，也可以從容的完成實驗，於實驗後也可以有時間立刻整理實驗數據，以據此決定下個實驗的設計是否需要修改。

每週一上午，Iadecola 主任會分兩梯次分別與神經血管生理與腦中風團隊 (Neurovascular Biology and Stroke Team) 所有研究人員討論前一週的進度與實驗成果，每梯次的成員包括副教授、助理教授、博士後研究員及研究生，每位研究人員輪流報告上週實驗成果、實驗困境以及未來這週的實驗計畫，會中 Iadecola 主任與各研究人員討論實驗結果的問題所在，以及建議實驗該如何調整或建議進行其他實驗來驗證，或者討論論文的圖該如何安排以陳述一個完整的故事，抑或是討論撰寫論文的要點是否有邏輯上的缺口或不一致處，於討論時其他成員也一起旁聽。為了準備每週一的報告，我學會了運用製圖軟體以及製圖的技巧。每次報告完畢，Iadecola 主任都會給我一些實驗上及製圖上的建議。對我而言，聆聽 Iadecola 主任與其他研究者的討論也常讓我有新的體悟與收穫，尤其是實事求是、精益求精的精神，更讓我印象深刻。緊接著進行的是 Anrather 教授的團隊討論會議，其團隊成員包括助理教授、博士後研究員、研

究生及研究助理。Anrather 教授會與每一位成員討論本週即將進行的研究工作，著重於一些重要的細節及做法，例如觀察小鼠術後的時間點及其原因、小鼠術後照顧的重點、以及抗藥菌小鼠術後如何繼續維持及如何確定其抗藥菌株等問題。至於 Anrather 教授不清楚的問題，他會建議該成員查閱文獻，他尤其強調研究人員於使用一種新實驗藥品或新的實驗檢測套件(kit)之前需徹底了解選這項藥品的理由以及其特性，否則可能會成為隱形的錯誤，而造成實驗結果錯誤及實驗時間的浪費。

在這訓練的過程中，經由與 Anrather 教授的討論，我學習到如何照顧腦出血術後的小鼠以有效改善其三日存活率（存活率由 25%改善為 100%），這些照顧技巧包括術後每日給予皮下注射生理食鹽水 1mL、術後飲食改為以飲用水將飼料泡軟之軟質飲食、以及術後將小鼠置於保溫箱中保暖。我也學習到如何運用小鼠本身的習性以有效完成行為的測試，在 modified Garcia test 中有一項測試是攀爬能力，觀察小鼠是否能爬上一個 45°斜坡，一開始練習測試術後小鼠時，小鼠常拒絕向上攀爬，包括對照組也是如此；我查了行為測試方式的資料，發現另一種行為測試(bean test)可利用小鼠歸巢的傾向，將其鼠籠置於小鼠應前進的方向，即可引誘小鼠朝終點方向前進。故我將小鼠及鼠籠在測試攀爬之前先置於斜坡頂端 5 分鐘，讓小鼠熟悉其巢的位置，之後進行測試時緩慢地將小鼠由鼠籠內移至斜坡底端，讓小鼠認得其巢的方向，這樣即可成功的吸引小鼠向上攀爬；Anrather 教授則建議我也可以利用小鼠喜歡黑暗角落的特性，

考慮將斜坡頂端遮蔽，製造黑暗的角落以吸引小鼠前進。在學習流式細胞技術的過程中，Anrather 教授很有耐心的教我使用分析軟體，他也提醒我，儀器算出的血球數需與已知的正常血球數據相比較以思考其是否合理，不能直接相信數據；若數據不合理則需找原因，如人為定義染色陽性的範圍有誤、compensation model 之問題、或離心的問題等。

肆：建議事項

此次的進修讓我有機會進一步學習腦中風動物實驗的技巧與概念，也觀摩了該中心的實驗室的設計，有以下建議：

- (1) 在 BMRI，每位操作手術的研究者皆有其專屬的手術臺，設備完整，操作方便，不會有為了等候手術臺而必須將手術延後的狀況，一方面節省實驗的時間，二方面也不會因為手術臺的使用有時間限制而造成操作手術的急迫性。相較於之前在臺大醫院共同研究室登記使用手術臺時，常面臨數週內皆已排滿的狀況，而必須將手術延後或另找手術臺；然而，臺大醫院的研究空間著實有限，若未來有新的研究空間，建議可以考慮增加實驗動物手術臺的設置。
- (2) BMRI 雖然隸屬於康乃爾大學醫學院，但為一棟獨立的建築，內有專屬的動物中心，即位於動物手術室之隔壁，且與教職員生的辦公室在同一樓層，因此領取動物及觀察術後動物的狀況非常方便快速，也減少長途動物搬運所造成的緊張與壓力，該層樓也設置動物保溫箱供術後的動物維持體溫，以及動物行為室供研究人員評估動物的行為表現，且手術室設有中央氣體供應以及提供乾冰，這些設計非常方便研究人員進行研究，且也有益於維持實驗動物的健康。建議未來若有建置新的研究大樓，可以考慮納入此設計。
- (3) 康乃爾大學醫學院動物中心提供的訓練課程主要是線上的課程，此線上課程是由三所鄰近的學校及醫院(康乃爾大學醫學院、Memorial Sloan Kettering

Cancer Center、The Rockefeller University)共同設計與使用，訓練課程由實驗室主持人依照研究計畫所需而選定，線上課程的優點是不受時間、空間及人數的限制，不論新進人員何時需要開始訓練，皆可隨時開始，其課程的內容重點明確，非常有利於新進人員快速熟悉重點項目，且課程最後皆附有測驗，通過後即可得到該課程的認證。完成所有指定的線上課程之後，接下來可依照研究計畫中實驗動物的種類，安排由獸醫師負責的動物手術實際操作教學(hand-on training)，藉由實際操作可以得知自己在操作上有哪些細節不了解，當場可與獸醫師討論請教，這樣的教學活動對初學者而言尤其有很大的助益。此線上教學以及實際操作教學的模式，未來在醫學院或醫院也可考慮應用，有利於協助新進人員迅速進入狀況，對醫院或醫學院而言也可以有高效率的執行新進人員教育訓練，且對該訓練的成果有適當的評核機制。