

**科技部補助**  
**大專學生研究計畫研究成果報告**

計 畫 名 稱	： 研究內皮細胞特異分子-1(ESM-1)參與慢性腎臟疾病的 進程及生物功能分析
------------	---

執行計畫學生：初朝陽

學生計畫編號：MOST 107-2813-C-040-090-B

研究期間：107年07月01日至108年02月28日止，計8個月

指導教授：謝逸憲

處理方式：本計畫可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學系生化學科

中華民國 108年03月30日

## 中文摘要

腎臟纖維化是由於正常的腎臟組織被不正常堆積的細胞外基質蛋白所取代，它不僅是所有慢性腎臟疾病導致腎功能下降的共同途徑，其嚴重程度也是預測腎臟病預後的重要指標。根據衛生署的統計，腎炎、腎病症候群及腎病變在國人十大死因之中排名第九，而從民國 96 年起，台灣腎透析人口有逐年上升的趨勢。因此尋找新穎慢性腎臟病的生物指標蛋白是刻不容緩的議題。內皮間質轉換系統(Endothelial-Mesenchymal Transition, EndoMT)是一個複雜的生物學過程，其中內皮細胞失去其特異性標記物並獲得間充質或肌成纖維細胞表型，並表達間充質細胞產物如  $\alpha$  平滑肌肌動蛋白( $\alpha$ -SMA)和膠原蛋白。最近使用細胞系分析的研究已經證明 EndoMT 可能是肺臟、心臟和腎纖維化發病機制中的重要機制，並且可能代表纖維化疾病的新型治療靶標。內皮細胞特異分子 1(ESM-1)為一分泌型的可溶性多醣蛋白，在過去的研究中顯示，此蛋白與發炎反應息息相關。然而目前的研究之中，ESM-1 對於腎臟纖維化的相關機轉仍未釐清。單側輸尿管阻塞手術(Unilateral Ureteral Obstruction, UUO)，可以造成腎臟的受損以及纖維化，是目前眾人公認的慢性腎臟疾病(Chronic kidney disease, CKD)動物模型。本計畫將探討 ESM-1 在慢性腎臟疾病所扮演的角色，並且進一步探討其相關作用機轉。首先，我們初步以實驗證實利用單側輸尿管阻塞手術(Unilateral Ureteral Obstruction; UUO)會引發小鼠的單側腎臟纖維化，以免疫組織化學染色法發現隨著實驗天數(7 和 14 天)的增加，ESM-1 的蛋白表現量逐漸增加。另外，以 RT-qPCR 的方式分析經過 UUO 處理後的老鼠腎臟，發現 ESM-1 的表現量也有上升的趨勢。為了探討 ESM-1 的生物功能，我們利用基因轉染技術(Transfection)和免疫螢光法證實過度表現 ESM-1(GFP-ESM-1) 會大量表現在人類腎小管 HK2 細胞，以 MTT 和 colony formation 方式證實不影響 HK2 細胞的生長，但利用傷口癒合過度表現 ESM-1 會增加細胞移動能力。內皮間質轉換系統(EndoMT)是腎臟纖維化的調控機制之一，我們利用西方點墨法證實過度表現 ESM-1 造成間質相關蛋白(Vimentin, N-cadherin, Fibronectin, MMP9) 有明顯增加，我們初步推測 ESM-1 可能參與腎臟纖維化的機轉是透過內皮間質轉換機制。未來我們將進一步透過基因剔除 ESM-1 的小鼠來分析 ESM-1 在腎臟纖維化中的分子機制。

## **Abstract**

### **Background**

Renal fibrosis is characterized by the accumulation of fibroblasts and excess deposition of extracellular matrix (ECM). It is also a common pathway which results in a progressive loss of renal function. Endothelial-Mesenchymal Transition (EndoMT), a newly recognized type of cellular transdifferentiation, in which endothelial cells lose their specific markers and acquire a mesenchymal or myofibroblastic phenotype. Recently, the studies have demonstrated that EndoMT may be a critical mechanism in the pathogenesis of cardiac and kidney fibrosis. Endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1) is a soluble proteoglycan, which is shown to be related to the inflammation reaction. However, the contribution of ESM-1 in the pathogenesis of chronic kidney disease (CKD) has not been fully elucidated. Unilateral Ureteric Obstruction (UUO), which will result in kidney injury and scarring, has become one of the most popular models of CKD due to its capability of generating a progressive renal fibrosis. In this study, we analyze the role of ESM-1 in CKD.

### **Materials & Methods**

Unilateral Ureteric Obstruction (UUO) in C57BL/6 mouse was used as a CKD model. Under inhalation of anesthesia with isoflurane, we operated unilateral ureteral obstruction(UUO) surgery on their left ureters. The expression of ESM-1 in tissue was investigated by Immunohistochemistry stain (IHC stain). The expression of mRNA was measured by QPCR. The overexpression of protein after transient transfected with GFP-ESM-1 plasmid in HK2 cells was investigated by western blot and immunofluorescence assay. The expression of EndoMT marker was measured by western blot. Wound healing assay was used to investigate cell migration. Cell growth rate was detected via MTT assay and colony formation.

### **Results**

The results showed that ESM-1 increased in the kidney of UUO mouse, and the expression of mRNA increased in the UUO mouse's kidney at 7 and 14 days after ureter obstruction. On the other hand, transfection with GFP-ESM-1 plasmid in HK2 enhanced the expression of ESM-1 and EndoMT marker, like Vimemtin and MMP9. The data of wound healing also demonstrated that HK2 cell transient transfected with GFP-ESM-1 plasmid enhanced the ability to migrate. However, the result of MTT assay demonstrated that transfection has no influence in cell growth rate.

### **Conclusions**

These results obviously demonstrate that the expression of ESM-1 increase after ureter obstruction. And the overexpression of ESM-1 also increase EndoMT relative proteins in vitro. In conclusion, we demonstrated the association between ESM-1 expression and renal fibrosis. Thus, ESM-1 might involve in fibrotic disorders via EndoMT pathway. In future, we'll set up ESM-1 knockout mice to investigate the molecular mechanism in renal fibrosis progression.

## (一) 研究動機與研究問題

慢性腎臟疾病(Chronic kidney disease, CKD)對人類健康構成嚴重危害，具有高患病率。在已開發國家中，估計有超過 10% 的成人出現一定程度的慢性腎臟病。儘管造成腎臟病的病因很多(例如：遺傳學、自身免疫相關感染、環境因素、飲食和藥物等)但這些都指向相同的結果，導致腎纖維化，最終腎衰竭。有關腎纖維化的機制尚不清楚，現有的治療方法無效或是拖延病情的情況發生，因此了解 CKD 常見發病的病理生理機制，發現並更好地理解治療這種疾病的新策略至關重要[1]。另外，根據美國腎臟資料系統在西元 2014 年(The United States Renal Data System, USRDS)公佈之資料顯示，台灣地區中末期腎臟病(End-stage renal disease, ESRD)發生率在 2001 年為每百萬人口 368 人[2]。而在 2012 年，為每百萬人口 449.7 人，皆高於日本及美國，且 2012 年 ESRD 的盛行率為每百萬人口 2,902 人。事實上，台灣地區 ESRD 的盛行率自 2001 年起，都高居世界上有 ESRD 資料統計的國家中的前茅。因此本計畫將探討 ESM-1 於人類腎臟纖維化中的生物功能、訊息傳遞和相關基因調控為何，更進一步探討其詳細分子機制，以期 ESM-1 能做為未來標靶治療的目標。

## (二) 文獻回顧與探討

### 一、腎臟纖維化

#### 1. 簡介

腎臟纖維化是所有進展性慢性腎臟疾病導致腎功能下降的共同途徑，為細胞外基質過度合成或減少細胞外基質分解的結果，一般來說，組織損傷後會產生發炎反應，隨後發生纖維化，以定向的方式試圖解決問題。然而，在進展性腎臟疾病中，這個修復反應不會關閉。並且，此過程是不可逆的，進行性纖維化隨後導致組織疤痕與器官的破壞[3]。其特徵為肌成纖維細胞的增殖和細胞外基質作為膠原蛋白在間質間隙中的過量累積。由於腎小管和腎間質佔據了腎臟體積中龐大的比例，腎小管間質空間在腎臟病惡化的過程中著實扮演了很重要的角色[4]。

此外，腎臟纖維化與一般的傷口癒合並不相同，因為它很少能自行緩解。事實上，細胞外基質蛋白會持續地在不知不覺中破壞正常的腎臟構造，形成結疤，最後導致腎臟功能的喪失。因此腎臟結疤非常重要，它代表著許多慢性腎臟病最後的共同路徑。

#### 2. 分期

腎臟纖維化可分為三期，第一期是誘發和發炎反應前期，主要特徵為單核細胞湧入腎臟。最初的腎臟損傷可以活化腎小管上皮細胞和腎小管旁的微血管內皮細胞，進而分泌促進發炎的細胞趨化激素及細胞激素來促進單核細胞移入間質。雖然有一小部分的間質巨噬細胞可能源自本來就存在腎小管間質的巨噬細胞增生而來，絕大部分的巨噬細胞都是從循環經由腎小管旁之微血管移入腎小管間質。此外，肥大細胞(mast cells)也會聚集到腎臟，而且肥大細胞增生愈多，腎臟纖維化程度就愈嚴重。

第二期是發炎反應和纖維化生成期。當發炎的單核細胞在腎小管間質增生以後，纖維母細胞開始被活化和增生。增生的巨噬細胞也會分泌生長因子，進而誘發腎小管上皮細胞之增生與細胞自殘的不平衡現象，甚至會促進纖維母細胞的增生及活化。增生的纖維母細胞可能來自血液循環、上皮間質轉分化，或者少數原來就存在間質的纖維母細胞增生而來。

第三期則是發炎反應後的破壞期。當腎臟纖維化進展到在這一期，原來在腎絲球、腎小

管間質、或腎臟血管的發炎反應，都會減少到很小的範圍，但是細胞外基質的生成和堆積卻會繼續進行。當細胞外基質大量堆積在間質，以及腎小管上皮細胞無法自制地進行細胞自殘時，就會導致腎小管萎縮。腎小管旁的微血管會被阻塞，完好的腎元數目逐漸減少，腎絲球過濾率也會持續下降。續發性的腎間質損傷又可以形成一個惡性循環。最後，間質的纖維母細胞也逐漸凋零，只留下一些無細胞的末期纖維化反應[5]。

### 3. 治療方法

目前臨床使用中尚未出現針對慢性腎臟病和纖維化的藥物。現今使用的治療多為延緩其進程而非真的能夠使腎臟纖維化回復，但這些治療卻又無法有效地阻止大多數慢性腎臟疾病(CKD)的進展[6]。腎纖維化是所有慢性腎病共同的病理過程，因此代表了治療目標。目前在研究中發現大量與腎纖維化相關的分子通路，也發現許多有潛力的藥物，但由於腎臟纖維化的調控機制十分複雜，想讓腎臟纖維化真的被控制住，可能需要許多藥物併用。然而，在CKD患者中只有少數臨床試驗正在使用抗纖維化藥物。

### 4. 調控機轉

根據先前研究，與腎小球硬化、腎間質纖維化和組織發炎反應進展有關的ECM蛋白積累似乎與血管張力素II(Angiotensin II, Ang II)和轉化生長因子 $\beta$ (Transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )的活性有關[1]。TGF- $\beta$ 以無活性也就是潛伏的形式分泌，需要加工才能發揮其作用。潛伏的TGF- $\beta$ 儲存在細胞表面和細胞外基質(Extracellular matrix, ECM)上，並轉化為活性TGF- $\beta$ [7]。沿著這些路線，有研究表明Ang II誘導ECM合成，並且這些作用直接由Ang II誘導TGF- $\beta$ 的活性形式引導[8]，表明TGF- $\beta$ 有助於腎纖維化。在哺乳動物中存在三種TGF- $\beta$ ，與腎纖維化最相關的形式是TGF- $\beta$ 1[9]。TGF- $\beta$ 1在腎臟的所有細胞中廣泛表達，特別是在腎小球中，是整個腎臟的數倍，或由侵入腎臟的巨噬細胞表達[7]。TGF- $\beta$ 1在腎纖維形成中起著關鍵作用，事實上，腎臟對TGF- $\beta$ 1的過度表達特別敏感[10]。

另一方面，TGF- $\beta$ 可同時調節細胞的增殖、分化和遷移、調節免疫應答、纖維母細胞增殖、ECM合成、抑制降解基質的蛋白酶，並增加與基質成分相互作用的細胞表面整合素的表達，導致ECM極高的沉積[10]。從這個意義上說，TGF- $\beta$ 通過刺激基質蛋白的產生，減少ECM降解蛋白酶的產生和上調蛋白酶抑制劑的產生來誘導ECM，並誘導腎小球系膜細胞和上皮細胞產生膠原蛋白、纖維蛋白、內皮素[7]。另一個重要因素是TGF- $\beta$ 可以刺激其自身合成與激活的能力，維持自分泌循環。除此之外，TGF- $\beta$ 也通過上調Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI1)和增加分離腎小球中的腎素釋放[10]來促進ECM，降低基質降解金屬蛋白酶的活性。基質降解的這種改變也與結締組織生長因子(CTGF)[11]的升高表達有關。

## 二、內皮間質轉換系統(Endothelial-Mesenchymal Transition, EndoMT)

### 1. 介紹

EndoMT是一個複雜的生物學過程，其中內皮細胞失去其特異性標記物並獲得間充質或肌成纖維細胞表型，並表達間充質細胞產物如 $\alpha$ 平滑肌肌動蛋白( $\alpha$ -SMA)和I型膠原蛋白。與上皮間質轉換系統(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)類似，EndoMT可通過轉化生長因子(TGF- $\beta$ )誘導。最近使用細胞譜系分析的研究已經證明EndoMT可能是肺，心臟和腎纖維化發病機制中的重要機制，並且可能代表纖維化疾病的新型治療靶標[12]。

### 2. 調控

最近的研究表明，TGF- $\beta$ 不僅有效刺激參與纖維化過程中眾多基因的表達之外，還通過

EndoMT 參與肌成纖維細胞的生成。實驗性心肌肥厚的研究提供了 TGF- $\beta$  在這一過程中的作用的精確證明[13]。這些研究表明，TGF- $\beta$  是一種重要的介質，導致內皮細胞接受 EndoMT，因為在 Smad3+的 Smad3 缺乏時 TGF- $\beta$  應答減弱。這些結果已被使用抑制活化的 TGF- $\beta$  的 TGF- $\beta$  受體激酶抑制劑所證實[14]。

除了 TGF- $\beta$  之外，已經顯示內皮素-1(endothelin, ET-1)也可以參與 EndoMT。在一項研究中表明內皮細胞衍生 ET-1 通過刺激 EndoMT 促進糖尿病心臟的心臟纖維化和心力衰竭。這些特徵在內皮細胞特異性 ET-1 缺失的轉基因小鼠的心臟中被消除[15]。在另一項研究中顯示，用 ET-1 體外處理小鼠肺內皮細胞雖然不能單獨啟動 EndoMT，但能夠與 TGF- $\beta$  發揮強大的協同作用。

雖然有許多研究已經確定地顯示 TGF- $\beta$  家族成員的重要參與啟動 EndoMT，詳細的分子事件和 TGF- $\beta$  激活的細胞內級聯導致內皮顯著的表型改變細胞至間充質細胞尚未完全闡明。最近在小鼠肺內皮細胞和培養的人皮膚微血管細胞的原代培養物中的研究證明，EndoMT 涉及 Smad 依賴性和 Smad 獨立途徑。由 TGF- $\beta$  啟動的下游信號傳導途徑導致轉錄抑制子 Snail1 的強烈上調。Snail1 導致對培養細胞中 E-鈣粘蛋白基因轉錄的有效抑制，並且在上皮間質轉化系統中起重要作用，表明 EndoMT 過程與 EMT 具有相似的分子機制。

### 三、內皮細胞特異分子 1(ESM-1)

#### 1. 介紹

內皮細胞特異分子 1(ESM-1)也稱作 IGFBP-RP6 或 Endocan，為一分子量約 50 kDa 的可溶性蛋白多醣，由核心蛋白與一條 chondroitin/ dermatan sulfate 醣基鏈組成，主要表現於人體肺、腎組織及內皮細胞中。近年研究逐漸顯示，ESM-1 參與體內發炎反應、血管生成及腫瘤細胞的生存、細胞週期進程、遷移和侵襲等，可作為腫瘤的生物標記物。

#### 2. 結構

ESM-1 的基因位第五號染色體 5q11.2 上，含 3 個外顯子和 2 個內含子，由單一基因編碼。外顯子 1,2 和 3 分別是 362,150 和 1,560 個鹼基對(bp)。第一和第二外顯子的一部分可以編碼特定的氨基酸末端，其含有 110 個氨基酸且富含半胱氨酸。ESM-1 的功能區域位於外顯子 2 編碼，是一個富含 F(113FPFFQY I 18)特殊區域。此外，最大的外顯子 3 編碼為 ESM-1 蛋白 C 端 33 個氨基酸區域，這區域含有提前終止密碼子和 137 位 Ser O 醣基化位點，以共價鍵的形式連接一條黏多醣單鏈(dermatan sulfate)。這黏多醣單鏈與 ESM-1 的多種生物學功能緊密相關[16]。

ESM-1 的蛋白結構編碼為 184 個氨基酸序列，成熟的 ESM-1 蛋白由 165 個氨基酸組成。ESM-1 是一種富含半胱氨酸的分子。這些半胱氨酸殘基都集中在 NH<sub>2</sub> 的 ESM-1 分子(110 個氨基酸)的末端部分。因為有 ESM-1 的單體之間沒有二硫鍵的鏈接，這些半胱氨酸必須參與鏈內二硫鍵，這將賦予 ESM-1 的結構。繼 ESM-1 的富含半胱氨酸的區域，有一個 55 個氨基酸的 COOH 末端多肽性的尾巴，這是自由的半胱氨酸殘基，由此表明兩個不同的結構域的存在：第一個區域是 110 個氨基酸和第二區域的 55 個氨基酸，其特徵差別在於，存在或不存在的半胱氨酸殘基[17]。

#### 3. 與發炎反應的關係

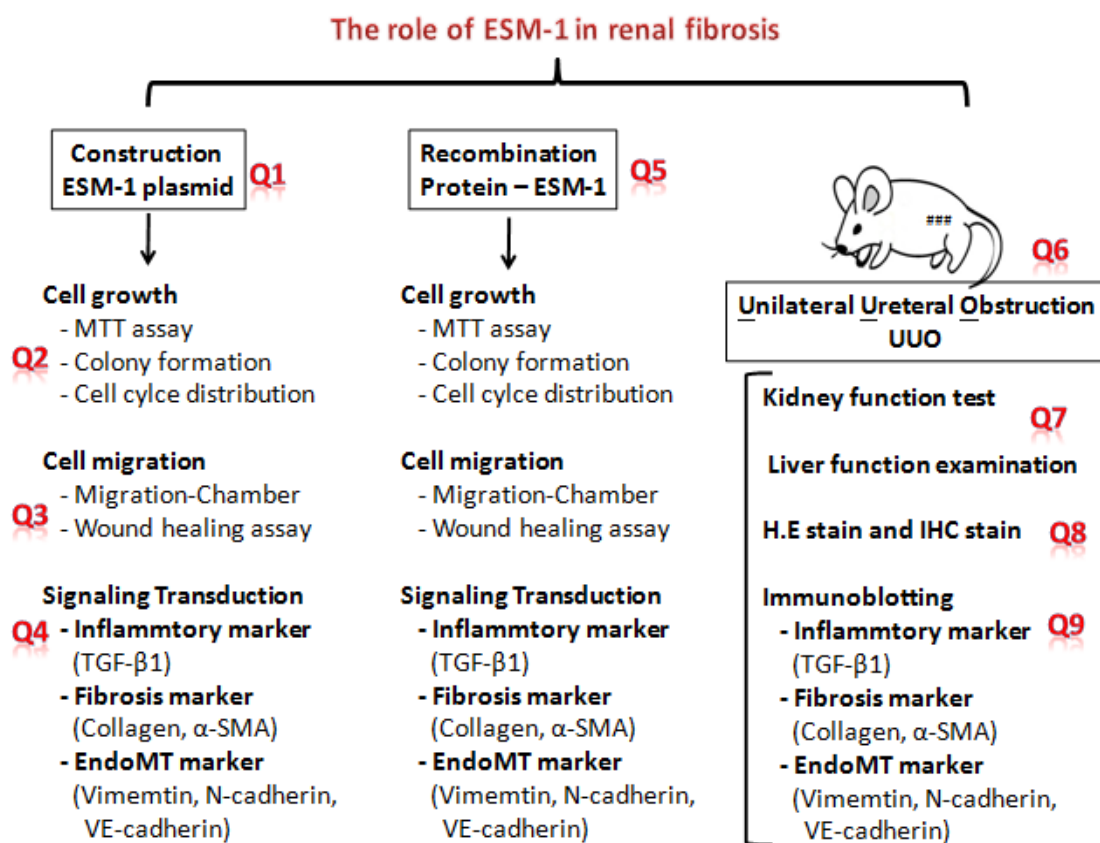
ESM-1 受發炎反應細胞因子的調控，ESM-1 的合成與分泌也受到腫瘤壞死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )的調節，通常在內皮細胞聯合加入 TNF- $\alpha$  及干擾素 IFN- $\gamma$  會對

多種促炎因子誘導表現具有協同作用。但單獨使用 IFN- $\gamma$ ，ESM-1 並無任何作用，當加入 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$ ，IFN- $\gamma$  抑制了 TNF- $\alpha$  誘導 ESM-1 的基因表達[17, 18]。

另一方面，血管內皮生長因子(VEGF)通過誘導血管通透性和維持內皮細胞分裂和存活的能力在血管生成中起關鍵作用。ESM-1 通過促進血管內皮生長因子-A (VEGF-A)對其受體(VEGFR-2)的作用影響內皮細胞[19]，伴隨著兩種強大的嗜中性粒細胞和單核細胞趨化因子，白介素-8(IL-8)和單核細胞趨化蛋白-1(MCP-1)的釋放，從而引發內皮細胞通透性[20]。以這種方式，ESM-1 作用於幫助白血球跨過血管內皮以聚集、粘附和遷移。

ESM-1 的唯一已知功能是其與白血球細胞整合素 LFA-1(CD11a / CD18)結合，隨後以劑量依賴性方式阻止可溶性的細胞間黏附分子(ICAM-1)與 LFA-1 的特異性結合。ICAM-1 是 LFA-1 的內皮結合配偶體，並且這種細胞與細胞接觸的抑制可能影響循環的單核細胞，使其聚集到發炎部位或影響 LFA-1 依賴性的細胞進行粘附和遷移。這些分子調節白血球細胞對內皮的粘附，隨後轉移到發炎的區域[21]。

### (三) 實驗架構圖



#### (四) 研究方法與步驟

##### 細胞培養

人類腎小管上皮細胞株 HK2，利用 F12/DMEM 外加 10 % fetal bovine serum(Biological Industries)、2.2 g/L sodium bicarbonate、100 units/mL penicillin 和 100 µg/mL streptomycin 培養液培養細胞於 10 cm dish 中，培養條件為 37°C、5% CO<sub>2</sub>，每日將細胞置於顯微鏡下觀察，並定期更換培養液。

##### 暫時性轉染(Transfection)

將 GFP-ESM-1 質體及 GFP-C1 質體送入 HK2 內，以 GFP-ESM-1 作為實驗組，GFP-C1 作為對照組，方法為：將  $3 \times 10^5$  個細胞接種於 6 cm dish，待其貼盤後分別加入 GFP-ESM-1 質體與 GFP 質體及轉染試劑與 serum-free 培養液，靜待 6 小時後，將培養液換回一般含有 FBS 之 F12/DMEM 培養液，待 24 及 48 小時後收取細胞。

##### 細胞培養中蛋白萃取及定量

從全細胞中抽取蛋白液以分析細胞內的各種蛋白，方法如下：首先觀察細胞型態是否有改變。用 PBS 清洗細胞後，加入胰蛋白酶(trypsin)使細胞脫離盤底後以 1000rpm 離心 5 分鐘使細胞沉澱，去除上清液後加入含有蛋白酶抑制劑的 Lysis Buffer(NETN)以防止蛋白水解，再將細胞收入 1.5ml 微量離心管。用超音波震碎細胞後，以 13000rpm，4°C 離心 30 分鐘，取上清液，即為蛋白萃取液。接著使用 Bradford 法測定蛋白質含量：使用 Coomassie Brilliant Blue G-250(CBG)測定蛋白，其在過氯酸溶液中呈紅棕色，但與蛋白質結合後則變成藍色，呈色時用分光光度計 OD 595 nm 波長的測量吸光值。先用胎牛血清白蛋白(BSA)作為一種標準蛋白質定量分析試劑，用以做出標準曲線，然後測量蛋白液，再以內插法算出其中蛋白質的含量。

##### 西方墨點法

要確定質體是否有成功送入細胞內可使用西方墨點法，方法如下：樣品以每種 15µl 置入上膠，下膠為 10%的 SDS-PAGE 凝膠，用 80V，150 分鐘的速度跑電泳。將 PVDF 膜上放入甲醇中活化，用轉印模組以 100V 將蛋白質轉印到膜上。接著利用 Block buffer(30ml 的 TBST (TBS+0.1%Tween-20) + 1.5mg 的脫脂牛奶)反應 1 小時，再用 TBST 清洗 3 次，每次 10 分鐘，然後用適當稀釋的一級抗體在 4°C 反應 overnight。用 TBST 清洗 10 分鐘/3 次，洗掉未結合的一級抗體，再與適當稀釋的二級抗體反應 1 小時。用 TBST 清洗 10 分鐘/3 次，洗掉未結合的二級抗體，之後加入呈色劑，以化學冷光法呈色，呈色出的帶的粗細深淺代表蛋白量的多寡。

##### MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay

為了評估含 GFP-ESM-1 質體的 HK<sub>2</sub> 與含 GFP-C1 質體的 HK<sub>2</sub> 細胞存活率是否有差異，及一般 HK2 及加了重組蛋白的 HK2 細胞存活率差異，可以利用 MTT 試劑來測定。其方法為：將經過不同種處理的細胞以每  $3 \times 10^4$  個細胞/well，接種在 24 well 中培養。各在 24、48 與 72 小時後，去除上清液，並在每個 well 加入 1ml 10%MTT 試劑(5 mg/ml)，放置 4 小時後去除上清液。用異丙醇溶解藍紫色結晶(Formazan)，再分別取出 200 µl 至 96 ELISA 孔盤中，利用 ELISA reader 以波長 573 nm 進行讀取吸光值。最後，將經不同處理與放置時間的細胞和相對的吸光值畫成統計圖表。

##### 群落生長實驗(colony formation)

分別把細胞以每盤  $2 \times 10^3$  個細胞種植至 6 well 的培養盤中，37 °C 培養 14 天後，以 PBS 緩衝溶液清洗細胞二次，再加入 1ml 之 95% 酒精於每盤細胞中，靜置室溫 30 分鐘，倒掉酒精



後再加入每盤 2 ml 之 10% Geimsa stain，室溫中靜置 30 分鐘，並以 PBS 輕輕沖去殘留染劑，等晾乾後觀察細胞形成群落的形態。

### 細胞遷移試驗

Boyden chamber 是被設計用來研究細胞受到化學趨向物(chemotaxis)的影響而移動的裝置，可用來檢測細胞侵襲和遷移的能力。此裝置有 48 個孔洞，分成上下兩層，中間夾一片塑膠墊，其實驗方法為：先在下層 chamber 中加入每孔 35  $\mu$ l 含有胎牛血清的細胞培養液，接著放置一片孔徑大小為 8  $\mu$ m 的半透膜，再加上塑膠墊、上層 chamber。在上層 chamber 中加入每孔 50  $\mu$ l 不含胎牛血清的細胞。18 小時後收集並分析受到化學趨向物而遷移到下層 chamber 的細胞數：將半透膜的下層面用甲醇固定 30min，用 5% Giemsa 染劑過夜染色，而後擦掉半透膜上層面的細胞，用光學顯微鏡拍照並用軟體計數。

### 單側輸尿管阻塞手術(Unilateral Ureteral Obstruction,UUO)

以 UUO 手術引發小鼠單邊腎臟纖維化。方法如下：以小鼠作為實驗體，首先以愛爾能吸入式麻醉劑完成麻醉，將小鼠剃毛後，在背部中線左側劃開皮膚組織及皮下肌肉層。然後將左側腎臟暴露出來，隨即分離出輸尿管。在輸尿管距離腎臟近處以手術縫線上端結紮，接下來在往下約一公分處，再以手術縫線進行下端結紮。在確認無出血之後，逐步將腹部皮下肌肉層傷口與皮膚組織傷口縫合。至於假性手術組的對照鼠，也是同樣接受腹部皮膚組織及皮下肌肉層剖開術，但是並未真正實施結紮的動作，隨後也是在確認無出血情形下，將腹部皮下肌肉層傷口與皮膚組織傷口逐步縫合，並實施光照，維持體溫，待小鼠甦醒。待手術後 7 天以及 14 天後分別犧牲小鼠，並取出左腎及右腎對照腎臟纖維化情形。

### 組織切片

取老鼠犧牲後的腎臟以 10% 福馬林固定處理，再以低至高濃度之酒精及以二甲苯脫水，然後以石蠟固定包埋，以 4 mm 的厚度作切片，固定於玻片上，接著放入烘箱中以 37°C overnight 將石蠟熔解，然後再以二甲苯進行脫臘，利用高至低濃度酒精進行復水，並以 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去除內生性過氧化酶再以 PBS buffer 處理，使其具有滲透性。接著以胎牛血清處理而阻止一些非特異性抗原的結合，20 分鐘後將水吸乾，然後在室溫下加入一級抗體(ESM-1 抗體)一小時後，接著再加入二級抗體作用一小時後，再加入 ABC solution，再以 hematoxylin 染色(細胞核)，以顯微鏡下觀察褐色分布的結果。

### 即時定量聚合酶連鎖反應(Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, real-time PCR or Q-PCR)

將下列物品加入 8 連排 PCR tube 中：ddH<sub>2</sub>O、10  $\mu$ l 的 2X SYBR Green polymerase buffer、0.6  $\mu$ l 10  $\mu$ M 的 forward primer 和 10  $\mu$ M 的 reverse primer、1  $\mu$ l 的 cDNA，使總體積 20  $\mu$ l 均勻混合；置入 OneStep real-time PCR 機器中，並依照 SYBR Green 內建系統進行設定。循環溫度如下：Stage1 50°C 反應 2 分鐘；Stage2 95°C 反應 10 分鐘；Stage3 95°C 反應 15 秒、60°C 反應 1 分鐘，共 40 個 Cycle。最後結果輸出以進行分析。

### 統計分析

數據以 means $\pm$ SD 表示。以 SPSS10.0 來評估統計差異。\*為 p < 0.05 表示顯著差異，\*\*為 p < 0.01 表示極顯著差異。

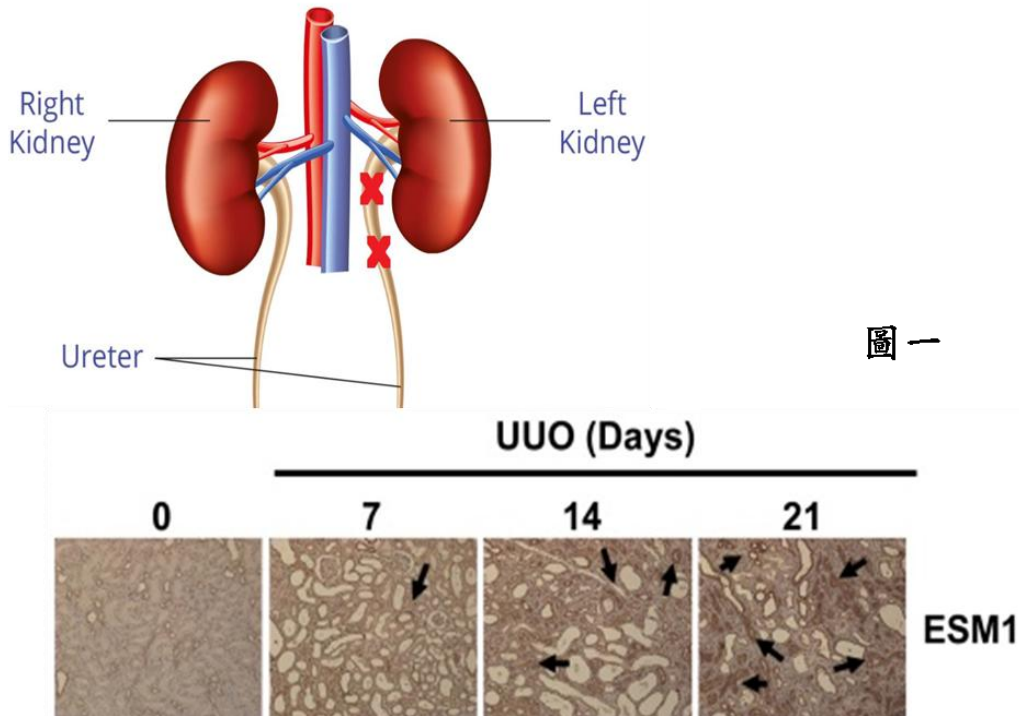
## 傷口癒合試驗(wound healing assay)

為了觀察 ESM-1 是否影響細胞遷移能力，而使用傷口癒合試驗。其方法為：分別把細胞以每盤  $2 \times 10^5$  個細胞種植至 6well 的培養盤中。以暫時性轉染的方法送 GFP-C1 及 GFP-ESM-1 質體進入細胞，待細胞長到幾乎全滿時先處理含 0.5% FBS 之培養液 24 hr 以抑制細胞生長，接下來用吸管尖(blue tip)在每一個孔中劃線，其距離約為  $80 \mu\text{m}$ ，再用 1xPBS 洗細胞，最後在加入 0.5% FBS 之培養液培養，觀察 24 小時以乙醇固定 Giemsa 染色並照相，以觀察細胞移動情形。

## (五) 實驗結果

### 探討 ESM-1 在 UUO 老鼠腎臟切片中的表現量

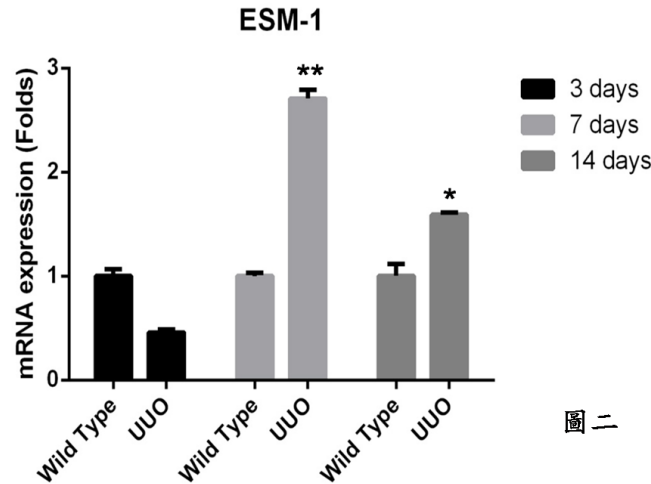
在先前的研究之中，指出 ESM-1 可能參與於腎臟纖維化的進程之中[21]。首先，我們將 C57BL/6 的老鼠，以單側輸尿管阻塞手術(Unilateral Ureteral Obstruction, UUO)的方式處理左腎，建立腎臟纖維化的動物模型，而後分別在 0 天、7 天、14 天及 21 天犧牲小鼠，取左腎組織進行切片，再利用 IHC stain 的方式染出 ESM-1。從實驗結果圖中可以發現，隨著天數的增加，老鼠左腎(經 UUO 手術處理之後)的 ESM-1 表現量逐漸增加(圖一)。實驗結果與先前論文相符，因此我們推測 ESM-1 可能以某種形式參與腎臟纖維化的進程。



圖一

### 探討 ESM-1 mRNA 在 UUO 老鼠腎臟的表現量

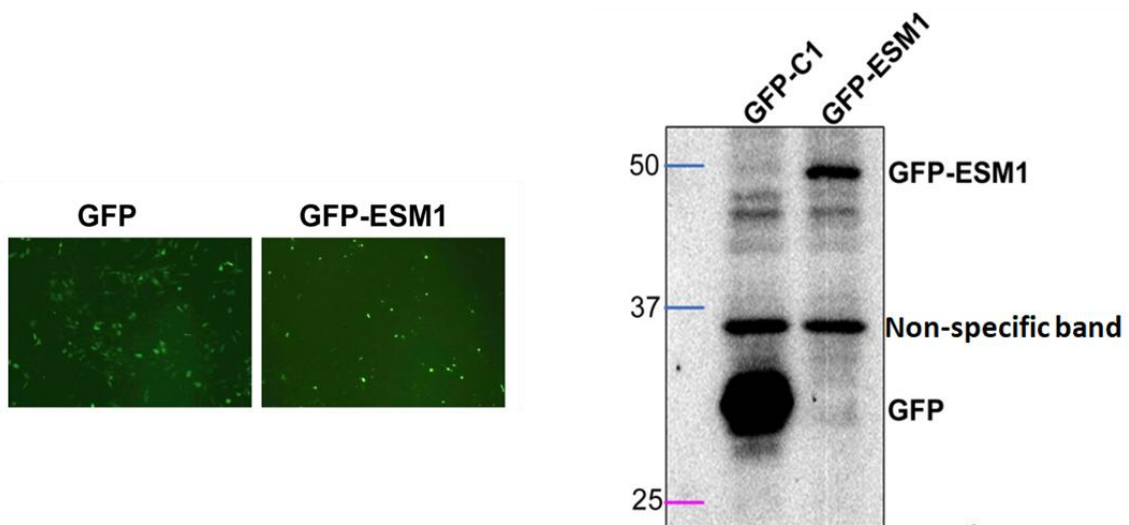
本實驗進一步證明，老鼠腎臟經過 UUO 處理後，ESM-1 表現量確實會增加。將老鼠以 UUO 的方式處理左腎之後，分別於 3 天、7 天及 14 天後犧牲老鼠，取下兩邊腎臟，左腎當實驗組，而右腎當對照組，分別抽取其 mRNA 並以 Real Time Q-PCR 的方式進行分析，由結果圖我們可以得知，在 7 天與 14 天的組別之中，ESM-1 表現量與對照組相比，有顯著增加的情形(圖二)。



圖二

### 建立過度表現 ESM-1 在人類腎小管細胞模式

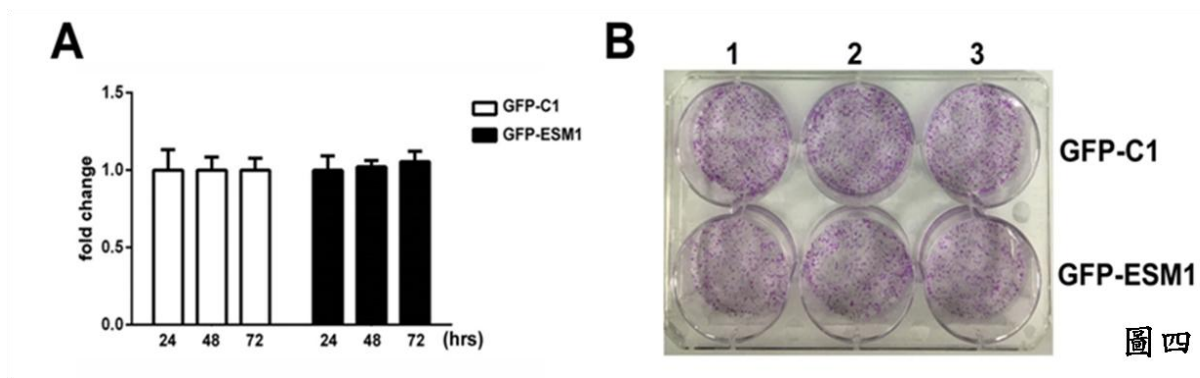
接著我們將在細胞實驗中，以過度表現 ESM-1 的方式，繼續探討 ESM-1 在腎臟纖維化當中扮演的角色。首先，我們將 GFP-ESM-1(3 $\mu$ g)與 GFP-C1(3 $\mu$ g)質體利用短暫性基因轉染技術(Transfection)送入人類腎小管細胞 HK2 細胞中，並於 48 小時後收取細胞，而後利用螢光顯微鏡以及西方點墨法觀察，GFP-C1(對照組)以及 GFP-ESM-1(實驗組)表現情況。結果可以發現，在螢光顯微鏡之中，實驗組與對照組都可以明顯的以肉眼看出 GFP 蛋白的表現(圖三)，證明我們確實有將 GFP-C1 及 GFP-ESM-1 質體送入細胞當中。另一方面，以西方墨點法的方式，我們也可以發現，在實驗組當中 GFP-ESM-1 有明顯表現(圖三)，證明利用短暫性基因轉染技術可以成功將 GFP-ESM-1 送入細胞內，並使其表現量上升。



圖三

### 探討 ESM-1 對於人類腎小管細胞生長的影响

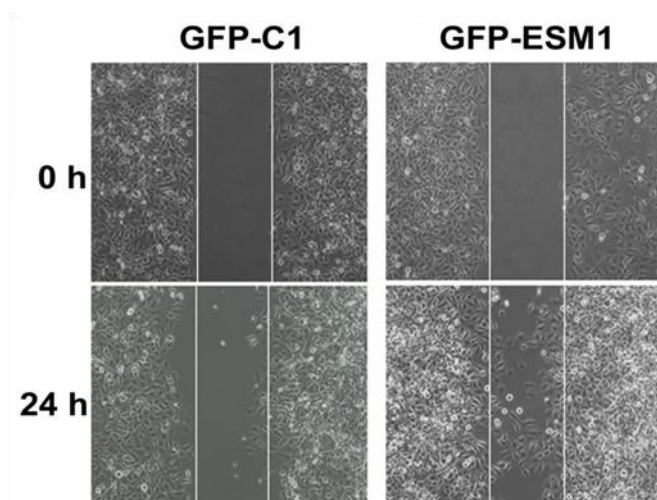
先前實驗證實 ESM-1 有成功過度表現於人類腎小管細胞之中，隨後本實驗欲了解 ESM-1 是否會影響人類腎小管細胞(HK2)的生長。首先將 HK2 細胞以每  $3 \times 10^4$  個細胞/well，接種在 24 well 中培養。待細胞貼盤後，以暫時性轉染的方式，將 GFP-C1 及 GFP-ESM-1 的質體送入細胞中，各在 24、48 與 72 小時後，以 MTT 的方式分析細胞的存活率。另外，我們也用群落生長實驗(colony formation)再次確認實驗結果。實驗結果顯示，在 24、48 與 72 小時的實驗當中，過度表現 ESM-1 的實驗組與對照組相比，並沒有顯著的細胞存活率差異(圖四)。另一方面，在群落生長試驗之中，由結果顯示，實驗組與對照組的細胞生長狀況，並沒有出現顯著的差異(圖四)。因此，以上述結果可以得知，過度表現 ESM-1 並不會影響 HK2 細胞的生長。



圖四

### 探討 ESM-1 對於人類腎小管細胞遷移的影响

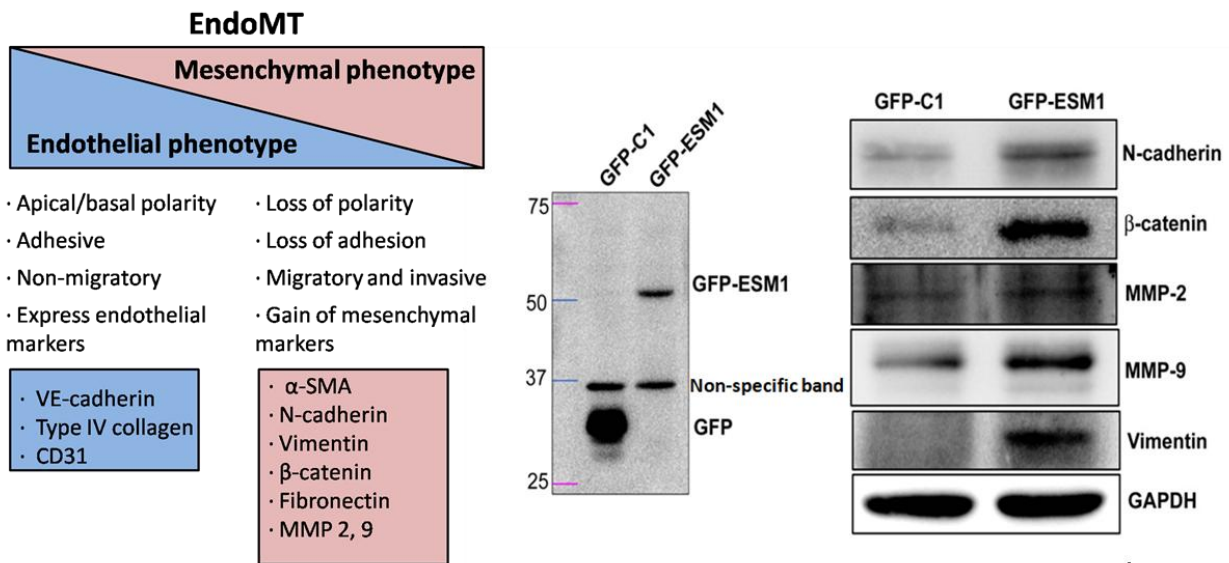
在先前實驗顯示過度表現 ESM-1 並不會影響人類腎小管細胞的生長，接下來本實驗想要了解 ESM-1 是否會影響人類腎小管細胞的遷移能力。我們將 GFP-C1 及 GFP-ESM-1 質體轉染進入人類腎小管細胞，之後以傷口癒合試驗的方式，分析細胞的爬行能力。由結果圖可以看出，經過 24 小時，與對照組(轉染 GFP-C1 質體者)相比，過度表現 ESM-1 的細胞(轉染 GFP-ESM-1 質體者) 爬行能力有明顯的上升(圖五)。由上述結果我們可以得知，ESM-1 的過度表現，會增進細胞爬行的能力。



圖五

### 探討過度表現 ESM-1 的細胞對於 EndoMT 相關蛋白表現量的影響

過去研究指出 EndoMT 在腎臟纖維化中扮演重要角色[21]，本實驗意在探討 ESM-1 是否會透過 EndoMT 的方式參與腎臟纖維化的進程。我們利用暫時性轉染與西方點墨法，觀察大量表現 ESM-1 後，是否影響 EndoMT 相關蛋白(Vimentin, N-cadherin, MMP-9, MMP-2,  $\beta$ -catenin 等)的表現量。從結果圖可以發現，當我們成功在 HK2 細胞中大量表現 ESM-1 蛋白後，EndoMT 偏向 Mesenchymal phenotype 相關蛋白如：N-cadherin、 $\beta$ -catenin、MMP-9 和 vimentin 的表現量皆有增加的趨勢(圖六)。因此，我們推測，ESM-1 可能是透過 EndoMT 的途徑，參與於腎臟纖維化的進程之中。



圖六

## (六) 討論

近年來，慢性腎臟疾病逐漸引起社會的重視，根據國際指引 Kidney Disease Improving Global Outcomes(KDIGO)將慢性腎臟病定義為腎功能受損超過3個月，導致其結構或功能無法恢復正常[22]，一般慢性腎臟病分為五期，分期的依據主要依照腎絲球過濾率。在2007年國民健康署的報告中，慢性腎臟疾病在台灣的盛行率為11.3%，顯示其重要性。另一方面，腎臟纖維化是所有進展性慢性腎臟疾病導致腎功能下降的共同途徑，其進程大致為受損、發炎、纖維化、及破壞[23]，目前已經有許多研究顯示出內皮間質轉換系統(EndoMT)參與於心臟、腎臟纖維化的進程[24]。內皮間質轉換系統(EndoMT)是指內皮細胞失去其特異性標記物並獲得間充質或肌成纖維細胞表型，並表達間充質細胞產物如 $\alpha$ 平滑肌肌動蛋白( $\alpha$ -SMA)和I型膠原蛋白的過程，在2008年Zeisberg, Elisabeth M[25]、2013年He, Jianhua[26]的研究皆指出EndoMT參與於腎臟纖維化之中。內皮細胞特異分子1(endothelial cell specific molecular 1, ESM-1)也稱作IGFBP-RP6或Endocan，為一分子量約50 kDa的可溶性蛋白多醣，在先前的研究之中，發現ESM-1參與體內發炎反應、血管生成及腫瘤細胞的生存，另外，在2014年Lee, H.G等人的研究也顯示ESM-1參與於腎臟纖維化的進程當中[19]。

綜合先前文獻回顧以及上述實驗的結果，可以發現在腎臟纖維化的動物模型之中，以IHC stain 與 Real time Q-PCR 的方式分析，ESM-1的表現量有顯著的增加，於是我們推測ESM-1可能透過某種機制參與於腎臟纖維化之中。另一方面，在細胞實驗之中，我們以人類腎小管細胞株(HK2 cells)為主要的研究對象。接著利用暫時性轉染的方式，欲在細胞之中過度表現ESM-1，建立模型並加以分析。以MTT與群落生長試驗分析，發現過度表現ESM-1基因並不會對細胞生長造成影響；另一方面，以傷口癒合試驗分析，發現ESM-1會增進細胞遷移的能力。接著，我們以西方墨點法的方式，發現在細胞中過度表現ESM-1基因會導致一些EndoMT相關蛋白的表現量有上升的趨勢。綜觀以上，我們可以得知ESM-1基因確實會在腎臟纖維化中表現，並推測ESM-1可能是透過EndoMT轉化的機制，而參與於腎臟纖維化的進程之中。

未來，期許我們能進一步以下列幾個不同面向來更深入地了解ESM-1如何參與於腎臟纖維化之中，並觀察其相關調控的分子機制。

1. 以臨床的慢性腎臟病病人血液為研究目標。由於慢性腎臟疾病可以大致分為五期[22]，我們希望未來能夠分析不同階段慢性腎臟疾病病患的血液，以測量ESM-1及相關蛋白在之中的表現量。
2. 在細胞實驗方面，我們希望可以透過測量不同蛋白的表現量，以尋找ESM-1的分子機制如何參與並調控腎臟纖維化的進程。
3. 在動物實驗方面，希望透過基因剔除ESM-1的小鼠，再次以單側輸尿管阻塞術建立腎臟纖維化的動物模型，並分析ESM-1相關蛋白，以更加了解ESM-1在腎臟纖維化中的分子機制以及其所扮演的角色。

## (七) 參考文獻

1. Nogueira, A., M.J. Pires, and P.A. Oliveira, *Pathophysiological mechanisms of renal fibrosis: a review of animal models and therapeutic strategies*. *in vivo*, 2017. **31**(1): p. 1-22.
2. Saran, R., et al., *US Renal Data System 2014 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States*. *American Journal of Kidney Diseases*, 2015. **66**(1): p. Svii.
3. Noronha, I.L., C.K. Fujihara, and R. Zatz, *The inflammatory component in progressive renal disease—are interventions possible?* *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2002. **17**(3): p. 363-368.
4. Morishita, Y., et al., *siRNAs targeted to Smad4 prevent renal fibrosis in vivo*. *Sci Rep*, 2014. **4**: p. 6424.
5. 吳明儒, 斥消靈減少單側輸尿管阻塞誘發之腎臟纖維化, in *臨床醫學研究所*. 2006, 國立陽明大學: 台北市. p. 96.
6. Klinkhammer, B.M., et al., *Treatment of renal fibrosis—turning challenges into opportunities*. *Advances in chronic kidney disease*, 2017. **24**(2): p. 117-129.
7. Klahr, S. and J.J. Morrissey, *The role of vasoactive compounds, growth factors and cytokines in the progression of renal disease*. *Kidney International*, 2000. **57**: p. S7-S14.
8. Kagami, S., et al., *Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells*. *The Journal of clinical investigation*, 1994. **93**(6): p. 2431-2437.
9. Meran, S. and R. Steadman, *Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis*. *International journal of experimental pathology*, 2011. **92**(3): p. 158-167.
10. Border, W.A. and N.A. Noble, *Interactions of transforming growth factor- $\beta$  and angiotensin II in renal fibrosis*. *Hypertension*, 1998. **31**(1): p. 181-188.
11. McCarty, M.F., *Adjuvant strategies for prevention of glomerulosclerosis*. *Medical hypotheses*, 2006. **67**(6): p. 1277-1296.
12. Piera-Velazquez, S., Z. Li, and S.A. Jimenez, *Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders*. *The American journal of pathology*, 2011. **179**(3): p. 1074-1080.
13. Zeisberg, E.M., et al., *Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis*. *Nature medicine*, 2007. **13**(8): p. 952.
14. Li, J., et al., *Blockade of endothelial-mesenchymal transition by a Smad3 inhibitor delays the early development of streptozotocin-induced diabetic nephropathy*. *Diabetes*, 2010. **59**(10): p. 2612-2624.
15. Widyantoro, B., et al., *Endothelial cell-derived endothelin-1 promotes cardiac fibrosis in diabetic hearts through stimulation of endothelial-to-mesenchymal transition*. *Circulation*, 2010. **121**(22): p. 2407-2418.
16. Yang, J., et al., *Endocan: A new marker for cancer and a target for cancer therapy*. *Biomedical reports*, 2015. **3**(3): p. 279-283.
17. Lassalle, P., et al., *ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in*

- lung and regulated by cytokines*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(34): p. 20458-20464.
18. Becharard, D., et al., *Characterization of the secreted form of endothelial-cell-specific molecule 1 by specific monoclonal antibodies*. Journal of vascular research, 2000. **37**(5): p. 417-425.
  19. Lee, H.G., H.Y. Choi, and J.-S. Bae, *Endocan as a potential diagnostic or prognostic biomarker for chronic kidney disease*. Kidney international, 2014. **86**(6): p. 1079-1081.
  20. Gerszten, R.E., et al., *MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions*. Nature, 1999. **398**(6729): p. 718.
  21. Balta, S., et al., *Association between coronary artery ectasia and neutrophil–lymphocyte ratio*. Angiology, 2013. **64**(8): p. 627-632.
  22. Levey, A.S., et al., *Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)*. 2005. **67**(6): p. 2089-2100.
  23. Liu, Y.J.K.i., *Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics*. 2006. **69**(2): p. 213-217.
  24. Piera-Velazquez, S., F. Mendoza, and S.J.J.o.c.m. Jimenez, *Endothelial to mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of human fibrotic diseases*. 2016. **5**(4): p. 45.
  25. Zeisberg, E.M., et al., *Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition*. 2008. **19**(12): p. 2282-2287.
  26. He, J., et al., *Role of the endothelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis of chronic kidney disease*. 2013. **17**(4): p. 488-497.