

國立臺灣大學醫學院醫學檢驗暨生物技術學系

博士論文

Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology

College of Medicine

National Taiwan University

Doctoral Dissertation



內皮唾酸蛋白質在慢性腎病之角色

The role of Endosialin in chronic kidney disease

白振學

Chen-Hsueh Pai

指導教授：林淑華 博士

Advisor: Shu-Wha Lin, Ph.D.

中華民國一百零四年七月

July 2015



國立臺灣大學博士學位論文
口試委員會審定書

內皮唾酸蛋白質在慢性腎病的角色

The role of Endosialin in chronic kidney disease

本論文係白振學君 D97424004 於國立臺灣大學醫學院醫學檢驗暨生物技術學系研究所完成之博士學位論文，於民國 104 年 7 月 27 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

林依華

(指導教授)

林水龍

林永宏

楊雅倩

胡忠怡

林東燁

吳榮林

系主任、所長

鄧麗珍



誌謝



感謝研究路上許多人的幫助與提攜，使我成長並且完成人生重要的里程碑，藉此文表達由衷的謝意。

首先感謝指導老師林淑華老師，老師的指導及觀念的養成使我受益匪淺，提升我撰寫研究計畫的能力及研究的思考邏輯，並且指引我論文的方向，也謝謝老師鼓勵我參加國際研討會，開闊我的視野。感謝啟蒙老師林淑容老師，老師細心栽培使我對研究產生興趣，並耐心訓練我的思考能力及實驗技巧，奠定了我的研究基礎，也謝謝老師提供我學習管理動物房的經驗，增強我的管理及應變能力，並且提供許多人生經驗指引我方向。另外感謝林水龍老師一路上的鼓勵與指導，帶領我進入腎臟科學的研究領域，教導我許多知識及指引研究方向，並且幫助我申請獎學金，使我順利畢業。我還要感謝論文指導委員吳華林老師、林東燦老師、楊雅倩老師及胡忠怡老師，謝謝老師們這些年的指導，在實驗的建議、器材提供、成果鑑定及論文的修正等獲益良多。

我也要感謝實驗室的夥伴們，謝謝游益興學長、蘇英卉學姊、徐玉真學姊、陳軍宇學長、洪嘉倫學長、高仲揚學長等學長姐的指導與建議，使我的實驗順利進行。也感謝明憲、建宇、勝凱、文志的鼓勵與支持，使我有更多的勇氣走下去，另外謝謝登舜、冠瑛、瑤絮、士峰及嘉君等學弟妹以及核心實驗室助理們在實驗及行政上的幫忙，同時也要感謝林水龍老師實驗室的沛縈、于庭及家豪的鼎力相助。特別感謝中原大學生物科技系提供動物飼養空間及儀器，也感謝小鼠們的犧牲奉獻，讓我們可以探討疾病病理機制。

最後，誠摯感謝我的父母親、岳父母及家人，他們的全力支持與鼓勵，讓我可以安心做研究，特別感謝我的太太靜慈，在這辛苦的過程中，陪我一起努力、互相體諒與鼓勵，完成這重要的階段，也謝謝即將出生的白吐司，促使我們走向人生下一個里程碑。謹以此研究獻上誠摯的祝福，謝謝大家！

振學 2015.8



中文摘要



不同成因的腎臟疾病最終都會導致腎纖維化，它是器官衰竭的預兆，並且反映出過度的發炎以及不當的器官重組。許多的研究利用動物模型證實抑制纖維產生的訊息路徑能有效減緩腎臟纖維化，而這些研究只有少部分能應用到臨床上。儘管器官纖維化有很高的盛行率，目前仍然沒有很好的治療可以抑制纖維化的進程，因此，研究纖維化的機制可以幫助發展新的治療。

Endosialin 中文為內皮唾酸蛋白質，也被稱作腫瘤內皮標記蛋白 1 (TEM1) 或者 CD248，它是第一型的穿膜醣蛋白，主要表現在正常及腫瘤的基質細胞。利用實驗室所建立的 LacZ-KI 小鼠，我們發現在出生後大多數器官都會減少 *Endosialin* 的表現，只有腎臟仍持續大量表現。主要細胞型包括腎絲球、周細胞及血管周圍的纖維母細胞。最近文獻指出人類慢性腎病患者的腎臟切片中可測得 *endosialin* 會高量表達在肌纖維母細胞，且表現量與腎功能呈反比。文獻已證實腎臟周細胞及血管周圍的纖維母細胞即為造成腎臟纖維化的肌纖維母細胞，截至目前為止，*endosialin* 在肌纖維母細胞的角色與影響仍然未知。

本論文主要要探討 *endosialin* 與腎臟纖維化以及巨噬細胞轉型作用的關係，實驗主軸是利用 UUO 模式誘導小鼠產生慢性腎病模擬人類疾病。首先在 UUO 處理後，可見 *Endosialin* 大量表現在腎臟的膠原蛋白製造細胞，失去 *Endosialin* 會減緩纖維化。此外組織的巨噬細胞數目減少，且 M2 巨噬細胞比例也較低。進一步分析發現 LacZ-KI 小鼠的巨噬細胞分泌較少的 CCL17 和 CCL22。而在體外共同培養系統誘導 M1/M2 轉型模式下，發現相似結果。顯示 *endosialin* 可能藉由調控巨噬細胞的 M1 及 M2 轉型而促進纖維化。

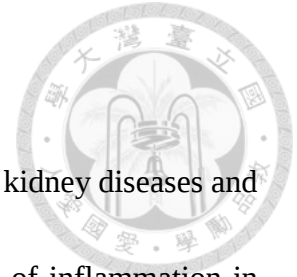
進一步欲證明周細胞與巨噬細胞可能藉由 *endosialin* 及 galectin-3 交互作用而造成周細胞的活化及巨噬細胞的型態改變，本論文使用免疫共沉澱方式證實兩者可相互作用。

本論文結論可知當腎臟受損時，損傷的組織會吸引單核細胞浸潤並活化成 M1

巨噬細胞。巨噬細胞也會分泌促纖維化因子造成周細胞活化並大量表現 endosialin，巨噬細胞也會分泌 galectin-3 與 endosialin 結合並促進膜外基質產生。同時 endosialin 也會透過未知的機制促使 M1 巨噬細胞轉型成 M2 細胞，並且製造更多膜外基質，導致不可逆的纖維化。

關鍵詞：纖維化、肌纖維母細胞、endosialin、巨噬細胞、galectin-3

英文摘要



Fibrosis is the final common manifestation of a wide variety of kidney diseases and it is a harbinger of organ failure and reflects inadequate resolution of inflammation in response to injury or inappropriate organ remodelling. Many studies targeting key fibrogenic pathways have demonstrated efficacy in mitigating renal fibrosis in experimental models. Only a small fraction of these approaches, however, have been studied in human and even fewer have been successfully translated to clinical use. Despite the prevalence of organ fibrosis, no good therapies directly target the fibrotic process. Thus, understanding the mechanisms of fibrosis in response to injury is pivotal to our development of new therapies to counteract fibrosis.

Endosialin, also known as tumor endothelial marker 1 (TEM1) or CD248, is a type I transmembrane glycoprotein that is expressed in stromal cells in normal tissues and cancers. Using lacZ knock-in (+/KI) mice we have shown that *Endosialin* expression decreases in most organs but increases and persists in postnatal kidneys, specifically in glomerular mesangial cells and perivascular cells. CD248 has also been identified in normal kidney pericytes and perivascular fibroblasts of mice by specific antibody staining. In human chronic kidney disease (CKD), upregulated expression of Endosialin is shown in myofibroblasts, which is linked to renal survival. Many studies including ours have identified pericytes and perivascular fibroblasts as the major source of

precursors of scar-producing myofibroblasts during renal fibrosis. The mechanisms underlying the impact of increased endosialin expression in myofibroblasts, namely activated pericytes, on kidney disease progression is not clear now.



In this study, we investigated the role of endosialin in fibrosis and macrophage phenotype switch by using UUO model to induce CKD in mice. We found that *Endosialin* is up-regulated in the collagen producing cells in the kidney of mice, and loss of *Endosialin* attenuated collagen-induced fibrosis. Furthermore, without *Endosialin* also decreases the numbers of macrophage. Analysed the gene expression pattern in macrophage, the M2 marker, CCL17 and CCL22 were expressed lower in KI/KI mice. In vitro co-culture of M1/M2 macrophage phenotype-switch assay, similar results were detected in macrophage's CCL17 and CCL22 when culture with KI/KI cells. These results suggest that endosialin promotes the fibrosis though macrophage phenotype regulation.

To further investigate whether the interaction between endosialin and galectin-3 exists and leads to activation of pericytes and pro-fibrotic phenotype switch of recruited macrophages during progressive renal fibrosis. We confirm the interaction between endosialin and galectin-3 by immunoprecipitation.

In summary, monocytes would be recruited and activated to become M1 type macrophages by injury signals. Macrophages will secret cytokines to activate preicytes

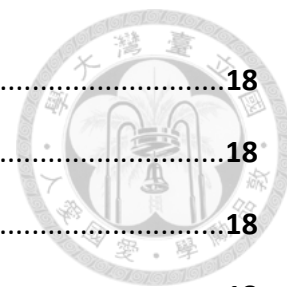
becoming myofibroblasts. Myofibroblast will highly express endosialin and interact with galectin-3 which is secreted by macrophages and consequently enhance collagen production. In addition, endosialin will promote these M1 type macrophages switch to M2 type through unknown mechanism. These changes will activate more myofibroblast and tissue will become more fibrogenic.

Keywords: fibrosis, myofibroblast, endosialin, macrophage, galectin-3



總目錄

誌謝.....	I
中文摘要.....	III
英文摘要.....	V
圖目錄.....	XI
表目錄.....	XIII
第一章 緒論.....	1
1.1 本章概要.....	1
1.2 腎臟與慢性腎病.....	1
1.3 腎臟纖維化.....	3
1.4 巨噬細胞與組織修復.....	4
1.5 Galectin-3 與慢性腎病.....	6
1.6 Endosialin 之介紹.....	8
1.6.1 Endosialin 的基因與蛋白質結構.....	8
1.6.2 Endosialin 之表達.....	9
1.6.3 Endosialin 之功能.....	10
1.7 慢性腎病的治療.....	12
1.8 研究動機.....	14
第二章 材料與方法.....	16
2.1 實驗動物.....	16
2.2 小鼠基因型鑑定.....	16
2.2.1 小鼠尾巴 DNA 萃取.....	16
2.2.2 聚合酶鏈鎖反應.....	17
2.3 小鼠血清及尿液分離以及指標偵測.....	17
2.4 小鼠慢性病模式.....	17



2.5 組織檢體處理與石蠟包埋切片.....	18
2.5.1 腎臟採集固定.....	18
2.5.2 石蠟包埋切片.....	18
2.6 組織病理染色分析.....	18
2.6.1 石蠟切片脫蠟復水.....	18
2.6.2 蘇木紫和伊紅染色.....	18
2.6.3 Picosirius red 染色.....	19
2.6.4 免疫組織化學染色.....	19
2.6.5 免疫螢光染色.....	19
2.7 細胞分離.....	20
2.7.1 單顆細胞製備.....	20
2.7.2 磁珠分離細胞技術分離巨噬細胞.....	20
2.7.3 流式細胞儀及分選細胞.....	20
2.8 細胞培養與誘導實驗.....	21
2.8.1 肌纖維母細胞培養.....	21
2.8.2 HEK293FT、L929 以及 RAW264.7 細胞培養.....	21
2.8.3 骨髓源性巨噬細胞(BMDMs)培養.....	21
2.8.4 M1 巨噬細胞誘導轉型試驗.....	21
2.8.5 HEK293FT 轉染.....	22
2.9 細胞或組織 mRNA 及蛋白質分析.....	22
2.9.1 萃取 RNA.....	22
2.9.2 反轉錄 RNA 及定量 PCR 分析.....	22
2.9.3 蛋白質萃取及電泳分析.....	23
2.10 免疫沉澱 (Immunoprecipitation, IP).....	23

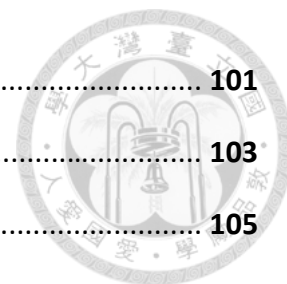
第三章 實驗結果.....	24
3.1 Endosialin-LacZ KI 小鼠.....	25
3.2 小鼠慢性腎病模式.....	25
3.3 Endosialin 高量表現於膠原蛋白質製造細胞且影響膠原蛋白製造.....	25
3.4 Endosialin 剔除並不影響肌纖維母細胞在腎病組織的擴增.....	27
3.5 Endosialin 影響巨噬細胞浸潤以及功能.....	28
3.6 Endosialin 影響巨噬細胞的轉型.....	29
3.7 Endosialin 影響巨噬細胞與肌纖維母細胞的交互作用.....	30
第四章 結果討論.....	34
4.1 調控 Endosialin 之表達.....	34
4.2 Endosialin 下游訊息傳遞與細胞增生.....	35
4.3 Endosialin 剔除造成組織內的巨噬細胞減少.....	36
4.4 Endosialin 與巨噬細胞的轉型.....	37
4.5 Endosialin 與 Galectin-3 的結合與功能影響.....	38
第五章 未來展望.....	39
參考文獻.....	40
圖.....	52
表.....	111
附錄.....	115
擬發表之論文.....	127



圖目錄

圖一、野生型小鼠及 KI/KI 小鼠腎臟組織切片結構.....	53
圖二、野生型小鼠及 KI/KI 小鼠之腎絲球及細胞組成數目統計.....	55
圖三、野生型小鼠及 KI/KI 小鼠之腎功能評估.....	57
圖四、單側輸尿管結紮 (UUO) 腎臟以及對照組腎臟之外觀.....	59
圖五、以 LacZ 染色以及免疫螢光染色偵測 endosialin 表達之細胞.....	61
圖六、Endosialin mRNA 在慢性腎病模式中的表達量.....	63
圖七、以 Picosirius Red 染色偵測膠原蛋白在腎臟累積之情形.....	65
圖八、膠原蛋白 mRNA 在慢性腎病模式中的表達量.....	67
圖九、膠原蛋白 mRNA 在膠原蛋白製造細胞的表達量.....	69
圖十、比較野生型及 KI/KI 小鼠在 uIRI 模式中 Endosialin mRNA 的表現.....	71
圖十一、比較野生型及 KI/KI 小鼠在 uIRI 模式中膠原蛋白累積之情形.....	73
圖十二、比較野生型小鼠及 KI/KI 小鼠在慢性腎病模式之肌纖維母細胞.....	75
圖十三、比較野生型及 KI/KI 小鼠在 UUO 模式中 Acta2 mRNA 的表現.....	77
圖十四、比較野生型小鼠及 KI/KI 小鼠肌纖維母細胞之增生能力.....	79
圖十五、體外培養野生型小鼠及 KI/KI 小鼠肌纖維母細胞.....	81
圖十六、比較野生型小鼠及 KI/KI 小鼠在慢性腎病模式之巨噬細胞數目.....	83
圖十七、比較野生型小鼠及 KI/KI 巨噬細胞在 M1 基因的表現情形.....	85
圖十八、比較野生型小鼠及 KI/KI 巨噬細胞在 M2 基因的表現情形.....	87
圖十九、流式細胞儀分析野生型小鼠腎臟巨噬細胞之分群.....	89
圖二十、流式細胞儀分析 KI/KI 小鼠腎臟巨噬細胞之分群.....	91
圖二十一、流式細胞儀分析野生型及 KI/KI 小鼠腎臟巨噬細胞之分群.....	93
圖二十二、胞外巨噬細胞型態轉型試驗.....	95
圖二十三、施打 anti-CCL17 抗體減少膠原蛋白累積之情形.....	97
圖二十四、分析野生型及 KI/KI 肌纖維母細胞釋放激素之差異.....	99

圖二十五、Galectin-3 mRNA 的表現情形.....	101
圖二十六、 <i>Lgals3</i> 剔除小鼠之巨噬細胞基因表達情形.....	103
圖二十七、Endosialin 與 Galectin-3 結合.....	105
圖二十八、Galectin-3 透過 endosialin 促進膠原蛋白表現.....	107
圖二十九、Endosialin 在纖維化演進過程中的角色.....	109



表目錄

表一、引子序列.....	112
表二、血清腎功能指標.....	113
表三、Cytokine array 結果.....	114







第一章 導論

1.1 本章概要

本章將針對研究背景做論述，介紹腎臟與慢性腎病，腎臟損傷纖維化及修復，其中包括分子機制之探討，並以細胞間相互調控的角度探討巨噬細胞與周邊細胞的作用，並且介紹巨噬細胞所分泌之 Galectin-3 與慢性腎病的相關性。接著介紹 Endosialin 之結構和功能，並且描述 Endosialin 與慢性腎病之相關性。最後介紹慢性腎病的臨床治療以及闡明本論文之主旨與目的。

1.2 腎臟與慢性腎病

腎臟是位於後腰部成對的器官，高度約介於第十二胸椎與第三腰椎之間。人的腎臟長約是 10 至 12 公分，寬則是 5 至 7.5 公分，厚度約 2.5 至 3 公分，每個腎臟重量約 150 公克。腎臟的基本組成單位為腎元，每個腎臟約由一百萬個腎元所組成，每個腎元則包括了腎絲球、鮑氏囊及腎小管，而腎小管又分為近端腎小管、亨利氏彎管、遠端腎小管及集尿管（附錄一）(Kurts, Panzer et al. 2013)。腎臟的主要功能是代謝體內的廢物以及多餘的水份，體內的廢物以及水份經血液輸送至腎臟的腎絲球，並藉由腎絲球的過濾流至鮑氏囊，再經由腎小管排到集尿管中，最後集中至膀胱形成尿液。尿液的產生是經由一個非常複雜的排泄與再回收過程，目的是要維持身體上化學物質的平衡，例如：酸和鹼、鉀和鈉以及電解質的平衡，同時腎臟也藉由控制回收水分的多寡，調節體液滲透性並穩定血壓。此外腎臟除了代謝作用外，也會分泌賀爾蒙參與血壓的調控、紅血球的生成及維生素 D 合成。如近腎絲球細胞 (Juxtaglomerular cells) 分泌腎素 (Renin)，並透過 Renin-Angiotension-Aldosterone System (RAAS) 使血壓上升；腎間質纖維母細胞會製造促紅血球生成素 (erythropoietin, EPO) 促進紅血球生成；腎臟也負責維生素 D 的代謝物 calcidiol 轉化成具生物活性的 calcitriol (Lacombe, Da Silva et al.

1991; Carey, Wang et al. 2000; Kumar, Tebben et al. 2012)。因此當腎臟疾病發生時，通常會伴隨著高血壓、貧血以及維生素 D 缺乏性併發症。

慢性腎病是全球性的健康問題，其發生率和盛行率日益漸增，而台灣近年來發生率及盛行率攀升至世界第一（附錄二）（Stenvinkel 2010）。慢性腎病發現不易，除了患者本身逐漸腎臟失去功能，同時腎功能下降也會併發產生心血管疾病（Levey, Coresh et al. 2003），因此造成高醫療成本。對於嚴重的慢性腎病只能透過腎臟移植，或者經由血液透析或腹膜透析取代腎臟功能，這也是台灣健保最大的負擔，因此了解慢性腎病的機制，找出可能治療的標的，是刻不容緩。造成慢性腎病的原因非常複雜，包含：糖尿病、高血壓、先天性自體免疫疾病、持續性的感染、腎絲球炎、服用腎毒性藥劑等，都會造成腎臟的發炎及損傷，其中以代謝型疾病患者最常併發慢性腎病，而最大的族群為糖尿病患者（Himmelfarb and Tuttle 2013）。這些不同成因所造成的持續性損傷，最終都將造成不可逆的腎纖維化，進而導致腎功能缺失。臨床上是依照腎絲球過濾值（estimated glomerular filtration rate, eGFR）評估腎臟功能，並且以此界定慢性腎病的分期。正常人的 eGFR 值為 100-120 ml/min/1.73 m²，第一期則是 eGFR 值 > 90 ml/min/1.73 m² 但是腎臟有損傷出現輕微蛋白尿或血尿；第二期則是 eGFR 值介於 60-89 ml/min/1.73 m² 之間，此時腎臟已剩下約 60% 的功能，並進入輕微的腎功能衰竭時期；第三期又可分為前期和後期，前期指標為 45-59 ml/min/1.73 m² 之間，為輕度至中度腎功能衰竭時期，若更惡化則為後期，eGFR 值介於 30-44 ml/min/1.73 m² 為中度腎功能衰竭；第四期則是嚴重腎功能衰竭時期，eGFR 值介於 15-30 ml/min/1.73 m²；而最後第五期是腎功能完全衰竭，eGFR 值 < 15 ml/min/1.73 m²，又稱為 End-stage renal disease (ESRD)（Tomino 2014）。在前兩個時期臨床表徵並不明顯，因此常被忽略，可以藉由尿液及血液檢測，發現後可以透過改變飲食，控制血糖、血壓以及發炎等而減緩疾病的進程，並且回復腎功能。若未受控制進入中期（三到四期），腎功能只剩下正常的 15~60%，臨床上可能出現泡沫尿、水腫且伴隨著貧血、高血壓

及疲倦等症狀，除了飲食控制外還需要搭配其他藥物治療，如抗血壓藥和紅血球生成素等；當進入末期，腎臟完全失去功能，只能透過腎臟移植或透析治療排除病人體內的代謝廢物和水分，並且搭配藥物預防心血管疾病及骨質疏鬆等併發症 (Wouters, O'Donoghue et al. 2015)。

1.3 腎臟纖維化

腎臟纖維化被認為是漸進式腎臟疾病的指標，也是組織進行修復的必經過程。纖維化演進的病理表現為腎絲球硬化，腎小管間質纖維化，發炎細胞浸潤，並且造成腎小管萎縮，血管損失及硬化和足細胞耗竭 (Liu 2006)，其中腎小管間質因為佔腎臟 ~90% 體積，因此腎小管間質纖維化也被認為是疾病的指標且最為明顯 (Hewitson 2009)。根據病理上的表現，腎臟纖維化可分為四個時期：啟動 (Priming)、活化 (Activation)、執行 (Execution) 以及完成進程 (Progression) (Liu 2011)。

啟動期為組織受損初期，此時受損的組織會進行發炎反應，大量活化 Nuclear factor (NF) κ B 訊息，並分泌促炎因子，如 IL-1、IL-6、MCP-1 以及 TNF- α 等激素，吸引免疫細胞如巨噬細胞以及T細胞浸潤，引起進一步的發炎反應，同時這些免疫細胞也被活化，並且分泌促纖維化激素以及生長因子，如 TGF- β 等，刺激周遭細胞進行轉型作用以利組織修復；接著是活化期，由於受到組織及免疫細胞釋放的促纖維化因子及生長因子刺激，血管周邊的纖維母細胞會增生並且大量表現 α -smooth muscle actin (α -SMA)，然而先前研究指出微血管結構損壞造成組織缺血是慢性腎病出現病灶的主因，缺血的組織也會誘導血管周邊細胞的轉型成肌纖維母細胞 (myofibroblast) (Venkatachalam, Griffin et al. 2010)，而活化型態的肌纖維母細胞也會增生並且佔據腎臟的間隙。此外，肌纖維母細胞會製造且分泌大量的膜外基質，目前已知腎臟的周細胞 (Pericyte) 和血管周邊的纖維母細胞 (Perivascular fibroblast) 會活化成肌纖維母細胞 (附錄三) (Lin, Kisseleva et al. 2008; Ren and Duffield 2013; Duffield 2014)，且後續研究也證實這群細胞是由胚胎時期的



FOXD1⁺ 的基質前驅細胞演化而成；因此當腎臟受到刺激後，這群常駐血管周邊的周細胞則成為製造膜外基質的主要來源 (Duffield 2014)。再來是執行時期，活化的肌纖維母細胞此時會分泌出大量膜外基質，例如：第一型、第三型膠原蛋白 (Collagen I and III) 及纖維結合素 (fibronectin)。過多的膜外基質沉積在腎臟間隙，使得組織纖維化，此時纖維化為可逆的，膜外基質易被基質金屬蛋白酶 (MMPs) 水解，並促進傷口癒合；目前已知許多分子訊息參與調控膜外基質的製造，如 Transforming growth factor β (TGF- β)、Platelet derived growth factor (PDGF)、Fibroblast growth factor 2 (FGF2)、Connective tissue growth factor (CTGF) 以及 angiotensin II 等，其中 TGF- β 被視為治療的重要標的 (Fassett, Venuthurupalli et al. 2011)。除了 TGF- β ，周細胞上 PDGF receptor β (PDGFR- β) 訊息、內皮細胞上的 Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) 以及巨噬細胞分泌的 Wnt7b 也被報導促進腎纖維化演進 (Lin, Li et al. 2010; Lin, Chang et al. 2011)，抑制這些因子也被證實能有效減緩纖維化的進行。一旦損傷持續進行，最後終將完成纖維化的進程。受損的組織會除了分泌促纖維化因子外，也會提高 transglutaminase 及 lysyl oxidase 的表現，這些酵素會將膜外基質鏈結再一起，避免被降解 (Eddy 2005)，無法被清除的纖維組織則形成不可逆的瘢痕組織 (scar tissue)。過多的瘢痕破壞正常的腎元，並且造成腎小管萎縮、血管結構缺損，最終導致腎臟整體萎縮並且失去功能 (Liu 2006; Hewitson 2009)。

1.4 巨噬細胞與組織修復

巨噬細胞會透過調控免疫反應以及清除損傷達到維持組織的恆定性 (Lin, Li et al. 2010)，在受傷的組織中，發炎性的單核細胞 (monocyte) 會被吸引浸潤至組織中，並且受到不同的環境因子影響，分化成不同亞型的巨噬細胞，如 M1、M2/Mreg 以及 M2/M2a 三種型態 (Ricardo, van Goor et al. 2008; Lichtnekert, Kawakami et al. 2013)。愈來愈多的證據顯示這些巨噬細胞會透過持續分泌修復因

子，造成組織破壞以及微血管的稀疏，並且導致不可逆的纖維化產生 (Lin, Castano et al. 2009; Lee, Huen et al. 2011; Lin 2012)。一般來說，巨噬細胞除了吞噬細胞碎片和外來病原，也會透過刺激淋巴細胞或其他免疫細胞放大發炎反應 (Ricardo, van Goor et al. 2008; Lin 2012)；此外巨噬細胞會藉由分泌許多細胞激素刺激周邊的纖維母細胞，使得纖維母細胞活化、大量增生且產生細胞膜外基質蛋白，因此巨噬細胞也被認為是主要調控組織破壞及重組的免疫細胞 (Ricardo, van Goor et al. 2008; Castano, Lin et al. 2009; Lin, Castano et al. 2009; Lin, Li et al. 2010)。

巨噬細胞的極化現象 (Macrophage polarization) 對於調控組織纖維化相當重要，目前已知單核細胞受到不同刺激會轉型成不同型態的巨噬細胞，並且依照其分泌的細胞激素或活化的形式可分為，M1 (classical activation type) 型態的巨噬細胞，以及 M2 (alternative activation type) 巨噬細胞。M1 巨噬細胞主要分泌促炎因子，如 IL-1、IL-6、MCP-1、iNOS 等，促使組織進行發炎作用並造成已損傷的細胞凋亡。M2 巨噬細胞則表現出廣泛的多樣性，它們可執行抑制免疫反應、保護細胞並且促進組織修復再生等，依功能分成兩種亞型為 Mreg 及 M2a；Mreg 巨噬細胞會藉由分泌 IL-10 抑制發炎反應及肌纖維母細胞的活化，避免組織損傷並且穩定組織的平衡。另一型態是 M2a，此型為促纖維化的巨噬細胞。藉由分泌 TGF- β 、CTGF、PDGF、Galectin-3、CCL17、CCL22 等因子，刺激肌纖維母細胞的活化並且使傷口癒合 (Lichtnekert, Kawakami et al. 2013) (附錄四)。此外先前研究在小鼠腎臟纖維化的模式中發現，當腎臟受損時，來自骨髓的單核細胞 (Ly6C⁺) 首先會浸潤至損傷的部位進行發炎反應，並且分化成三種亞群，依照 Ly6C 表達量可分為 Ly6C high, intermedium, and low 三種巨噬細胞，其中 Ly6C 表達量高 (Ly6C^{hi}) 的亞群被證實是促進發炎而表達量低 (Ly6C^{low}) 的亞群則是促纖維化的巨噬細胞 (Lin, Castano et al. 2009; Lin 2012)。

體內調控巨噬細胞的轉型機制目前仍未釐清，一般認為可能是組織中的環境因子影響，或者是透過細胞彼此間的相互調控造成型態轉變 (Lichtnekert,



Kawakami et al. 2013)。根據先前研究指出，在不同損傷刺激下巨噬細胞會出現極化現象也有所不同。當組織發生急性損傷發炎時，剛開始組織內的 M1 巨噬細胞逐漸增加，而隨著時間增加 M2/Mreg 巨噬細胞也跟著出現。M2/Mreg 巨噬細胞的增加會伴隨著 M1 巨噬細胞減少並且抑制組織發炎，而當急性期過後兩種細胞皆會消失，組織會回復正常；而在慢性發炎的組織，剛開始 M1 巨噬細胞逐漸增加，由於持續性的發炎，M1 巨噬細胞始終存在於組織中；而組織為了進行修復，另一型態的 M2/M2a 巨噬細胞也逐漸增加，並且促進組織纖維化。由於持續的慢性發炎反應，使得組織過度的重組，並且導致組織不可逆的損傷（附錄四）。目前已知在胞外實驗外加特定因子可以促進巨噬細胞轉型，例如：內毒素 (LPS) 或者 INF- γ 等因子會促進轉型為 M1 巨噬細胞 (Lichtnekert, Kawakami et al. 2013)，而 IL-4 和 IL-13 則是被報導會促使轉型為 M2 巨噬細胞 (Van Dyken and Locksley 2013)；另外也有研究證實將腎臟上皮細胞與巨噬細胞共同培養 (Co-culture) 也會促使巨噬細胞的轉型 (Lee, Huen et al. 2011)，顯示周邊細胞與巨噬細胞具有相互調控的功能，影響彼此活化與轉型，但是在活體內的轉型機制尚待證明。

1.5 Galectin-3 與慢性腎病

Galectin-3 是 galectin 系列成員之一，此系列蛋白透過 carbohydrate recognition domain (CRD) 與許多膜外糖基或者糖蛋白結合，並且影響先天性和適應性的免疫反應 (Liu, Yang et al. 2012)。Galectin-3 在許多免疫相關細胞皆會表現，如巨噬細胞、嗜酸性及嗜中性顆粒細胞 (eosinophils and neutrophils) 以及巨大細胞 (mast cells) (Liu, Hsu et al. 1995; Lee, Moon et al. 2009)，另外 galectin-3 也被發現會表現在腎臟的巨噬細胞以及腎小管上皮細胞 (Bichara, Attmane-Elakeb et al. 2006)。目前已知 Galectin-3 蛋白會形成五聚體的 Chimera-type，並且與細胞膜外的受體結合影響細胞的功能 (Rabinovich and Toscano 2009)，已知 galectin-3 透過與 Toll-like receptor 4 (TLR4) 結合誘發免疫細胞產生免疫反應 (Burguillos, Svensson

et al. 2015)。除了影響免疫反應，Galectin-3 也會透過與膜上的受器結合調控細胞的存活，先前研究指出 T 細胞表面的 CD45 會與 galectin-3 結合，並且導致 T 細胞死亡 (Stillman, Hsu et al. 2006)。而在 Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) 的腫瘤細胞會分泌大量的 galectin-3，並且會與腫瘤細胞表面的 CD45 結合，活化下游路徑，抑制腫瘤細胞的凋亡 (Clark, Pang et al. 2012)。另外，galectin-3 也被證實會與內皮細胞上的 VEGFR2 結合，促進血管的新生作用 (Markowska, Jefferies et al. 2011)。

Galectin-3 也被認為與纖維化相關，研究指出 galectin-3 促進肝臟衛星細胞 (hepatic stellate cells, HSC) 及腎絲球的繫膜細胞 (Mesangial cells) 的增生 (Sasaki, Bao et al. 1999; Maeda, Kawada et al. 2003)。此外在肝纖維化的動物模式中也證實 galectin-3 會誘導肌纖維母細胞的活化 (Henderson, Mackinnon et al. 2006)，因此 galectin-3 也被認為是促進纖維化的重要因子。隨後即被 Henderson 等人利用 *LGALS3* (galectin-3 gene) 剔除小鼠證實 galectin-3 與腎纖維化之相關性。他們誘導小鼠產生慢性腎病，結果發現破壞 galectin-3 表達可以抑制腎肌纖維母細胞活化，進而避免腎組織纖維化。更進一步在誘導小鼠慢性腎病後，利用授受性轉移 (adoptive transfer) 的方式將野生型小鼠的巨噬細胞注入基因剔除小鼠體內，結果也產生嚴重的纖維化，此證據說明了巨噬細胞上所分泌的 galectin-3 是造成纖維化的主因 (Henderson, Mackinnon et al. 2008)；另外其他研究也利用此小鼠證明 galectin-3 會促進巨噬細胞轉型為 M2 形式 (MacKinnon, Farnworth et al. 2008)。因此，巨噬細胞所分泌的 galectin-3 除了會活化周邊的纖維母細胞，也可以影響本身的型態改變，進而促進纖維化的演進。但是纖維母細胞與 galectin-3 結合作用的分子目前仍未被報導。



1.6 Endosilain 之介紹

1.6.1 Endosialin 的基因與蛋白質結構

Endosilain 也被稱作第一型腫瘤內皮標誌蛋白 (Tumor endothelial marker 1, TEM1) 或 CD248，其發現是在 1992 年 Rettig 以人類的胚胎纖維母細胞萃取物對小鼠進行免疫激發，產製出能專一性辨認基質纖維母細胞的單株抗體，FB5，並以 FB5 單株抗體針對 128 種人類腫瘤樣本進行免疫組織化學染色，結果發 67% 腫瘤樣本呈現陽性反應，並只侷限在腫瘤組織的血管內皮細胞，以純化的 FB5 抗原進行醣化程度分析，發現 FB5 抗原是一富含唾液酸 (sialic acid) 的醣化蛋白質，所以又稱此 FB5 抗原為 endosialin (Rettig, Garin-Chesa et al. 1992)。人類 *Endosialin* 之 cDNA 序列在 2001 年由 Christian 等人首度發表 (Christian, Ahorn et al. 2001)，他們從神經纖維母細胞瘤細胞株中純化出 endosialin，並以 Edman degradation 取得胺基酸序列，比對人類 EST 資料庫而取得 cDNA 序列，共有 2274 個核苷酸，可轉譯成 757 個胺基酸。後續經由生物資訊分析發現 *ENDOSIALIN* 基因座落在 11 號染色體上，並根據其蛋白質構型被鑑定為類 C 型凝集素膜外受器 (C-type lectin-like receptor)。人類 endosialin 是第一型穿膜蛋白質，其多肽鏈為 95kD，經後轉譯修飾後形成分子量 165 kDa 富含唾酸之醣蛋白，而小鼠的 *Endosialin* 基因也在同年被鑑定出來，其基因組位於第 19 號染色體的短臂上，open reading frame (ORF) 是由 2298 個去氧核糖核苷酸組成，並轉譯為具有 765 個胺基酸，分子量 92 kDa 之多肽鏈，胺基酸組成與人類 endosialin 比較，具有 77.5% 的相似度 (Opavsky, Haviernik et al. 2001)。

Endosialin 蛋白結構上具有六個功能性區域，依序分別為：C-type lectin-like domain (CTLD)、Sushi/ccp/scr pattern 的區域、三個重複的 EGF-like domain、一個 sialomucin-like domain，以及穿膜區域和位於細胞質的短片段 cytoplasmic domain (附錄五)。根據蛋白結構發現 endosialin 與 thrombomodulin (TM) 具有 39% 的同源性，同時也與補體受器 CD93 具有 33% 的同源性，且這三個蛋白皆含有上述 CTLD



蛋白質功能區，因此也被歸類為 Group XIV family (Greenlee, Sullivan et al. 2008)。依序細究 endosialin 蛋白上的結構與功能，已知在 TM 的 CTLD 與調控白血球貼附以及抗發炎反應有關 (Conway, Van de Wouwer et al. 2002)，而在 endosialin 則是未知；CD93 上的 Sushi domain 則是被認為與補體蛋白結合之區域；另外在 TM 的 EGF-like domain 是與血液凝集有關 (Van de Wouwer, Collen et al. 2004)，但目前沒有證據顯示 endosialin 具有類似的功能；Sialomucin-like structure domain 則是許多醣基結合的位置，大約有 27 個 O-glycosylation 位點在此區域；而最後是 C 端的 cytoplasmic domain，大約有 51 個胺基酸且被預測有 3 個磷酸化的位點，另外尾端為 PDZ binding motif，可做為支架蛋白 (scaffold protein)，與其他蛋白結合，例如已知 CD93 的 PDZ motif 會與 G protein 結合進而傳遞下游訊息 (Greenlee, Sullivan et al. 2008)，但目前尚無證據發現 endosialin PDZ motif 的結合蛋白。

1.6.2 Endosialin 之表達

先前許多研究認為 endosialin 高量表達於腫瘤血管之內皮細胞，包含：大腸直腸癌、乳癌、黑色素瘤以及神經膠質母細胞瘤等 (St Croix, Rago et al. 2000; Carson-Walter, Watkins et al. 2001; Brady, Neal et al. 2004)，但在 2005 年 MacFadyen 等人利用免疫組織染色證實了 endosialin 是表現於腫瘤血管基質之纖維母細胞和周細胞 (Pericyte)，並非內皮細胞 (MacFadyen, Haworth et al. 2005)。Endosialin 也被證實表達在正常基質組織的纖維母細胞以及血管周圍的周細胞。此外，Christian 等人分析了 endosialin 在人類不同類型的初代培養細胞之表達，包含：淋巴管內皮細胞、臍動脈內皮細胞、臍靜脈內皮細胞、纖維母細胞、平滑肌細胞、周細胞以及間葉幹細胞，結果顯示只有在間葉系列的細胞 (纖維母細胞、平滑肌細胞、周細胞及間葉幹細胞) 具有表達 endosialin 之能力 (Christian, Winkler et al. 2008)。同時他們也發現 endosialin 在腫瘤相關之肌纖維母細胞 (tumor-associated



myofibroblasts) 和腫瘤相關之壁細胞：周細胞及平滑肌細胞 (tumor-associated mural cells) 大量表達；因此，endosialin 也被當作是腫瘤相關之肌纖維母細胞之標記。此外，endosialin 除了會表現在間葉系列細胞外，也被發現在人類周邊血裡的 naïve CD8⁺ T 細胞 (Hardie, Baldwin et al. 2011) 和內皮前驅細胞 (Bagley, Rouleau et al. 2008) 以及骨髓的造骨細胞 (Naylor, Azzam et al. 2012) 皆有表現。另外，本實驗室先前已利用 *Endosialin-lacZ* 轉殖小鼠探討 *Endosialin* 在胚胎發育過程以及成熟小鼠體內表現的位置，我們發現 *Endosialin* 在胚胎時期從 9.5 天開始會大量表現，隨著胚胎發育逐漸增加，但是在出生後大部分組織會失去 *Endosialin* 的表現，只有腎臟以及子宮會持續啟動 *Endosialin*，甚至在成體組織中仍呈現高量的 *Endosialin* 基因轉錄 (附錄六) (Huang, Hong et al. 2011)。除了上述組織及細胞外，另有其他研究也指出在疾病周邊基質細胞過度表達 endosialin，例如在關節炎患者的關節滑膜上 (Maia, de Vriese et al. 2010)，以及 IgA 腎炎引起的慢性腎病患者，其腎間質的纖維母細胞也大量表現 endosialin (Smith, Eardley et al. 2011)。

1.6.3 Endosialin 之功能

Endosialin 基因剔除鼠在 2006 年首度被發表，此小鼠可以正常的發育及生育，且血管的數目及傷口癒合情形都與野生型小鼠相似。但是在原位注射大腸癌模式下，基因剔除小鼠腫瘤生成率以及轉移發生率皆比野生型小鼠低，且存活率也較高 (Nanda, Karim et al. 2006)。另外，也有研究指出 endosialin 胞內區域剔除 (cytoplasmic domain deletion) 小鼠在腫瘤模式誘導下，也呈現腫瘤較小且存活率高的結果 (Maia, DeVriese et al. 2011)，這些結果顯示 endosialin 會透過胞內區域進行訊息傳遞，進而促進腫瘤的生成及轉移。除了影響腫瘤生成外，endosialin 也被多研究報導會調控細胞的增生與爬行，Christian 在人類纖維母細胞中用小片段干擾核糖核酸 (siRNA) 抑制 endosialin 之表達，結果發現當細胞之 endosialin 下降則細胞的增生及爬行能力也隨之下降 (Christian, Winkler et al. 2008)，另外體外培



養人類腦部血管的周細胞，使用 siRNA 抑制 *ENDOSIALIN* 的表達量，結果發現也會降低細胞之生長能力。經進一步證實，endosialin 是透過影響血小板衍生性生長因子受器 (PDGFR- β) 下游訊息傳遞，而造成細胞增生能力下降 (Tomkowicz, Rybinski et al. 2010)。相反的，在人類的 naive CD8⁺ T 細胞，使用 siRNA 抑制 *ENDOSIALIN* 的表達量會促進細胞增生，因此 endosialin 則是扮演抑制細胞增生的角色 (Hardie, Baldwin et al. 2011)。另有其他研究指出 endosialin 會透過與 PDGF 訊息相互作用抑制造骨細胞的成熟 (Naylor, Azzam et al. 2012)，或者在血管新生中促進骨骼肌細胞分岔 (Naylor, McGettrick et al. 2014)；Conway 等人也利用小鼠關節炎模式，證明 endosialin 透過下游 HIF-1 傳遞訊息，並抑制 Notch-3 訊息傳遞而促進發炎反應 (Maia, de Vriese et al. 2010)。Endosialin 也被指出與組織纖維化相關，在慢性腎病病患的組織中，也發現 endosialin 大量表現在纖維化的細胞 (Smith, Eardley et al. 2011)；另外在肝臟纖維化的病人組織中也看到類似的結果，更進一步用 *Endosialin* 剔除小鼠證明肝臟衛星細胞 (hepatic stellate cells) 表達的 endosialin 會促進肝纖維化形成並且抑制 Hepatocyte growth factor (HGF) 誘導的肝細胞再生 (Mogler, Wieland et al. 2015)。

Endosialin 的胞外配合基細胞實驗已證實為纖維結合素 (fibronectin)、第一型及第四型膠原蛋白，並且這些配合基會透過 endosialin 影響細胞的貼附及爬行能力，並且釋放出 MMP-9 (Tomkowicz, Rybinski et al. 2007)。另外在人類腫瘤細胞會高量表達的 Galectin-3 binding protein (Mac2-BP/90K)，也被發現會和腫瘤基質細胞的 endosialin 結合並且促進腫瘤轉移 (Becker, Lenter et al. 2008)。統整來看，endosialin 會透過本身的訊息傳遞以及與其他受器相互作用，進而影響細胞的增生、爬行、成熟以及發炎反應 (附錄七) (Valdez, Maia et al. 2012)，但是其相互作用機制仍待進一步釐清。



1.7 慢性腎病的治療

由於慢性腎病成因複雜，截至目前為止，臨床上的治療仍是一大難題，如果未經規範治療，或錯過治療時機，腎臟內部病理損傷會逐漸加重，病情就會迅速發展到纖維化形成期和瘢痕形成期，給治療會帶來很大難度 (Eddy 2005)。初期慢性腎病治療大多採取排除病因及飲食控制，例如：糖尿病引起的慢性腎病患者，會以藥物控制血糖以及降低飲食的蛋白質含量，但隨著疾病演進需搭配不同藥物治療。慢性腎病常會併發或惡化高血壓，控制血壓是目前阻止或減緩腎病惡化最有效的方法。目前臨床使用的高血壓藥物中，血管張力素轉化抑制劑 (angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEI) 或血管張力素受體阻斷劑 (Angiotensin receptor blocker, ARB) 在部分病患特別有效，但仍有副作用 (Baltatzi, Savopoulos et al. 2011)。先前也有臨床試驗證實膽固醇合成抑制劑 statins，有效降低早期慢性腎病患者的死亡率及併發心血管發生率，但對於腎臟沒有保護的作用 (Palmer, Craig et al. 2012)。另外使用抗血小板藥劑的治療也被報導能降低慢性腎病患者的死亡率，但是有出血的疑慮 (Floege and Schlieper 2013; Palmer, Di Micco et al. 2013)。這些治療方法大多只能降低患者的心血管併發症，但對於減緩腎臟功能流失無明顯幫助。

腎臟纖維化是所有慢性腎病的必經過程，隨著病理調控機制越來越清楚，許多分子及訊息傳遞路徑都被證明可有效抑制纖維化演進，其中 TGF- β 訊息路徑被認為是最重要的因子 (Bottinger 2007; Lan 2011; Loeffler and Wolf 2014)。TGF- β 被認為會促進纖維母細胞活化以及膜外基質的製造，但同時也會抑制免疫反應 (Lan 2011)，早期設計針對抑制 TGF- β 訊息路徑所設計出的藥物或小分子，可能會造成免疫系統嚴重的失調 (Chuang, Menon et al. 2013)。目前已知 Lilly 藥廠針對慢性腎病所開發新一代 anti-TGF- β 人源化抗體 (humanized antibody)，LY2382770 已進入臨床試驗第二期 (Friedman, Sheppard et al. 2013)。另有其他藥物被發現有附加抑制 TGF- β 訊息路徑的效果，並且可有效抑制纖維化，如 tranilast 和 pirfenidone。



Tranliast 是一種治療支氣管哮喘的抗過敏臨床用藥，後來研究發現也能有抑制 TGF- β 活性且具有減緩纖維形成的能力 (Soma, Sugawara et al. 2002; Soma, Sato et al. 2006)，因此被用在糖尿病誘導型慢性腎病的病人，目前是臨床試驗第一期。Pirfenidone (Esbriet) 是一種抗發炎藥，後續研究也發現會具有抗纖維形成的能力，已被核可在治療 idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) 病人，而針對慢性腎病是鎖定在糖尿病引起的慢性腎病，目前停留在臨床試驗第一期，結果顯示雖然有效減緩病患腎功能缺失，但是無法改善蛋白尿的徵兆 (Sharma, Ix et al. 2011)。另外研究指出 CTGF 也會活化 TGF- β 訊息路徑而促進纖維形成 (Abreu, Ketpura et al. 2002)，因此 Anti-CTGF monoclonal antibody (FG-3019) 也被發展作為抗纖維化的藥物，目前是以糖尿病誘導的慢性腎病患者進行臨床第二期試驗 (Adler, Schwartz et al. 2010)。

其他訊息路徑及分子標的如 Bone morphogenetic protein (BMP)、HGF、PDGFR- β 、VEGF-R 及 microRNA-21 等，都被報導具有發展成抗纖維化標的之潛力，但目前仍停留在臨床前動物試驗 (Zeisberg, Hanai et al. 2003; Gong, Rifai et al. 2004; Liu and Yang 2006; Lin, Chang et al. 2011; Chau, Xin et al. 2012)，因此釐清致病機制並找出新的治療標的仍是目前最重要的任務。



1.8 研究動機

隨著盛行率不斷增加，慢性腎病可能成為我國的新國病。根據健保署統計，洗腎費用一直是我國健保最高且沉重的負擔，為了降低國人洗腎率，釐清致病機轉顯得格外重要。慢性腎病成因相當多元且不易發現，當病情疏於控制就會迅速發展到不可逆的結果。其中關鍵就是阻止組織纖維化，而目前臨床減緩腎臟纖維化的藥物仍在發展中，因此仍需開發新的治療標的。纖維母細胞活化及巨噬細胞的極化現象被認為是纖維化演進最重要的因子，因此許多研究也針對此尋找治療標的。目前已知正常人的腎組織中，endosialin 微量表現在血管周圍的纖維母細胞以及腎絲球的繫膜細胞。而在 IgA 腎炎誘導的慢性腎病患者的組織切片中，發現大量的肌纖維母細胞累積在腎間質中，並且大量表達 endosialin，進一步分析發現 endosialin 的表現量與腎功能呈現負相關趨勢，顯示 endosialin 可能會促進慢性腎病的演進 (Smith, Eardley et al. 2011)，但是詳細機制尚未釐清。另有研究指出 endosialin 促進纖維母細胞的增生 (Christian, Winkler et al. 2008)，且 endosialin 也被指出會增加白血球的貼附以及促進發炎反應 (Maia, de Vriese et al. 2010)，綜觀以上研究推測 endosialin 在慢性腎病演進過程，可能參與促進巨噬細胞的浸潤與發炎，以及纖維母細胞的增生與活化。

此外，巨噬細胞的轉型對於調控組織纖維化相當重要。目前已知慢性腎病組織中，巨噬細胞會促進損傷及發炎的 M1 型態，轉變成為促進組織修復的 M2 型態。先前有研究指出巨噬細胞與上皮細胞培養會影響其轉型，顯示周邊細胞與巨噬細胞具有相互調控的功能 (Lee, Huen et al. 2011)。另外有研究證實巨噬細胞所分泌之 galectin-3 會活化周邊的纖維母細胞，且可以影響本身的型態改變，進而促進纖維化的演進。但是纖維母細胞上與 galectin-3 結合作用的分子目前仍未被報導 (Henderson, Mackinnon et al. 2008)。而 galectin-3 已被證實會與 endosialin 的受質 Mac2-BP/90K 結合，因此，我們假設纖維母細胞與巨噬細胞的交互作用，可能是透過 endosialin 和 Mac2-BP/90K 及 galectin-3 結合作用，進一步影響彼此的型態

與功能。

為應證上述假設，本論文將採用實驗室已建立之 *Endosialin-LacZ* knock in 小鼠作為模型，並且誘導小鼠產生慢性腎病。我將在腎病組織中評估 endosialin 的表現，以及比較野生型小鼠與基因剔除小鼠纖維化程度，評估 endosialin 作為臨床治療標的之可能性。接著詳細探究致病機轉，包括：肌纖維母細胞的增生、巨噬細胞的浸潤、巨噬細胞的轉型作用以及 endosialin 與 galectin-3 之相關性，以釐清 endosialin 在慢性腎病所扮演之角色。



第二章 材料與方法

2.1 實驗動物

本論文使用實驗室先前建立之 *Endosialin-LacZ* KI 小鼠，以 *LacZ* 作為報導基因，將其置入 *Endosialin* 基因製備出 *Endosialin* 剔除小鼠 (Huang, Hong et al. 2011)，再與 C57BL/6JNarl 野生型小鼠回交 (backcross) 至第十代 (N10)，C57BL/6JNarl 來自國家實驗動物中心，本論文主要實驗小鼠為 N8~N10。*Coll-GFP* 轉殖小鼠來自台大醫學院生理學研究所林水龍老師，*Coll-GFP* 轉殖小鼠為 C57BL/6 背景，以 Collagen-1 的啟動子表現 EGFP 作為報導基因，用來追蹤膠原蛋白製造細胞 (Yata, Scanga et al. 2003)。*Lgals3* 基因剔除小鼠來自中央研究院劉扶東院士，小鼠為 C57BL/6 背景，基因剔除小鼠製備是利用 Neo cassette 嵌入 *Lgals3* 基因的 exon5 破壞基因表現 (Hsu, Yang et al. 2000)。所有實驗小鼠飼養於中原大學生物科技系齒動物中心，並且依據中原大學生物科技系實驗動物規範照護。動物房每日規律光照週期為 12 小時 (8:00AM~8:00PM)，並給予充分飼料與飲水。本研究所有動物實驗設計以及實驗流程均通過中原大學實驗動物照護及使用委員會 (IACUC) 審核，且遵照其規範執行。

2.2 小鼠基因型鑑定

2.2.1 小鼠尾巴 DNA 萃取

小鼠出生後 10 天，採集小鼠尾巴檢體約 0.5 公分，並用試劑套組 (Direct PCR Lysis Reagent; Viagen, USA) 萃取 DNA。流程如下：將尾巴放入微量離心管，加入 200 μ l 試劑以及 2ul 蛋白酶 K (Proteinase K, 10mg/ml; Invitrogen, USA)，於 55 $^{\circ}$ C 培養箱旋轉作用，反應至少 8 小時。待檢體溶解，以 15,000xg 於 4 $^{\circ}$ C 離心 10 分鐘。取上清液即可獲得 DNA。

2.2.2 聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction , PCR)

聚合酶鏈鎖反應之進行是在總體積為 25 μ L 的聚合酶鏈鎖反應混合物中，含有 0.3-1 μ g DNA、0.8 μ M dNTPs、0.2 μ M primer (each)、0.15 mM $MgCl_2$ 、和 2.5 unit Taq DNA polymerase (Prime Taq, GENET BIO, Taiwan)。引子序列於表一呈現。反應條件的設定是 94°C, 1 分鐘，60°C, 2 分鐘，72°C, 2 分鐘，如此反覆進行 35 次循環，最後 72°C 再作用 7 分鐘後即終止反應。PCR 產物經 2% 洋菜膠進行電泳後，使用 UV 偵測儀觀察並照相。並依此結果判斷小鼠基因型。

2.3 小鼠血清及尿液分離以及指標偵測

自眼窩採集小鼠全血，置於室溫 30 分鐘，以 2,000xg 於 4°C 離心 10 分鐘，血清液為上層液體，收取上清液至新的離心管，保存至 -80°C 冰箱。腎功能指標是委託台灣小鼠診所以血清進行偵測。尿液是使用生物代謝籠，收集 24hr 尿液，並且用 Protein Assay Kits (Bio-Rad, USA) 來測量尿中蛋白質含量，尿中 Creatinine 則是用 Creatinine Assay Kit (BioAssay Systems, USA) 偵測。

2.4 小鼠慢性腎病模式

在單側輸尿管結紮手術中 (Unilateral Ureteral Obstruction, UUO)，實驗小鼠先以腹腔注射 avertin 進行麻醉，麻醉劑量為 250 mg/kg，之後從背部剪開小鼠外皮，小心將左腎輸尿管撈出，並以 4/0 nylon 手術縫合線將輸尿管結紮，結紮位置為腎臟下方，之後將腎臟塞回體內並縫合傷口 (Chang, Chiang et al. 2014)。而在單側缺血再灌流模式 (unilateral Ischemia and Reperfusion Injury, uIRI)，實驗小鼠先以腹腔注射 avertin 進行麻醉，麻醉劑量為 250 mg/kg，之後從背部剪開小鼠外皮，小心將左腎撈出，使用蛙心夾將腎臟血管夾住 30 分鐘，注意小鼠體溫須維持在 36.8°C 至 37.3°C 之間 (Lin, Chang et al. 2011)。



2.5 組織檢體處理與石蠟包埋切片與染色分析

2.5.1 腎臟採集與固定

先將小鼠以 avertin 麻醉，打開胸腔並以 1XPBS 溶液自心臟灌流，注意肝臟血色明顯退去即可停止。小心採集腎臟，將腎臟外膜剝乾淨後，放入 10% 中性福馬林固定液，置於 4°C 冰箱固定 24 小時。注意不可固定過久。

2.5.2 石蠟包埋切片

固定完的組織以脫水機進行脫水，流程如下：50% 酒精、75% 酒精 x2、95% 酒精 x2、100% 酒精 x2、Xylene x3，如此循環。脫水完的組織會浸泡至液態蠟中，再用組織包埋機將組織包埋。石蠟檢體使用切片機，將檢體切成厚度 5 μ m 的切片，貼附至載玻片上，置於加熱器上 1 小時讓切片貼附更完全。

2.6 組織病理染色分析

2.6.1 石蠟切片脫蠟復水

將切片置於 65°C 烘箱 15 分鐘熔蠟，再以 Xylene 脫蠟，共浸泡三次，每次 10 分鐘。後續脫蠟流程如下：100% 酒精浸泡 2 次、95% 酒精浸泡 2 次、75% 酒精浸泡 1 次、50% 酒精浸泡 1 次、1XPBS 或用純水代替浸泡 2 次，以上流程每次 10 分鐘。

2.6.2 蘇木紫和伊紅染色

蘇木紫染劑是染細胞核，呈現藍色，將切片泡 10 分鐘，再經流水浸潤 5 分鐘，接著以伊紅染細胞質，呈現粉紅色，浸泡 1 分鐘，經流水浸潤 5 分鐘，將切片進行脫水流程，最後以封片膠封片。



2.6.3 Picosirius red 染色

以 Picosirius Red Stain Kit (Polysciences, Inc, USA) 進行，先將切片脫蠟復水，流程如 2.6.1，將切片放入 Solution A (磷鉬酸) 2 分鐘，再將切片泡置水中，放入 Solution B (Picosirius Red) 60 分鐘，再將切片放入 Solution C (0.1 N Hydrochloride Acid)，最後 75% 酒精 2 分鐘，然後走脫水流程並封片。

2.6.4 免疫組織化學染色

將切片脫蠟復水，以含有 0.05% Tween 20 的 10mM 檸檬酸鈉溶液進行抗原修復 (antigen retrieval)，加熱沸騰 20 分鐘後完成。接著以 3% H₂O₂ 作用 10 分鐘，去除內源性的過氧化酵素，以 1X PBS 清洗後，加入 Rodent Block M 溶液 (Biocare, USA) 室溫作用 1 小時，進行 Blocking。接著加入一級抗體，本論文使用 (F4/80, 1:200, MF48000, Invitrogen, USA)、(α -SMA, 1:200, ab5694, Abcam, USA)、(Ki-67, 1:400, ab15580, Abcam, USA) 和 (α -SMA, 1:400, C6198, sigma, USA)，4°C 至少反應 16 小時。隔日以含 0.5% Tween 20/1X PBS (PBST) 清洗三次，每次 10 分鐘。接著一抗的來源使用不同試劑組。小鼠和兔子則使用 Super Sensitive PolymerHRP IHC detection kit (BioGenex, USA)，大鼠或山羊則分別用 Histofine Simple Stain Max PO (Rat or Goat) 試劑組 (Histofine, Japan)。最後以 DAB 呈色，並於光學顯微鏡下觀察，並用蘇木紫進行對比染色。之後脫水封片。

2.6.5 免疫螢光染色

步驟與免疫組織化學染色類似，加完一級抗體後，4°C 至少反應 16 小時。以 PBST 清洗三次，每次 10 分鐘。加入帶有螢光分子的二抗，若一抗帶有螢光則不須加二抗。以 PBST 清洗三次，每次 10 分鐘。以 DAPI 染色 10 分鐘，以 PBS，每次 5 分鐘。最後以螢光專用封片膠封片，並於螢光顯微鏡下拍照。



2.7 組織細胞分離

2.7.1 單顆細胞製備

將小鼠麻醉後解剖並灌流，小心且快速將手術及對照組腎臟取出剝膜，放入含有培養液 (DMEM+10 %FBS) 之 24 孔盤裡。將腎臟用刀片在培養皿上剝碎，並將組織放入含有 5ml DMEM 之 15 ml 離心管，**注意全程應放在冰上**。加入以下酵素，DNaseI (100 U/ml)、Type I collagenase (1 mg/ml) 和 Hyaluronidase (1 mg/ml) 37 °C 旋轉培養 45 分鐘，每 10 分鐘 vortex，一次 15 秒，加入 5 ml 培養液 (DMEM+10%FBS)，並以 40 µm strainer 過濾，以 1,000xg 於 4°C 離心 5 分鐘，得到細胞。

2.7.2 磁珠細胞分離技術分離巨噬細胞，MACS

UUO 術後第七天之腎臟組織經由上述製備流程後，將細胞回溶於 500 µl 1X BD IMag™ buffer (置於冰上)，加入 10 µl Anti-Mouse CD11b Magnetic Particles (BD bioscience, 558013, USA) 置於 ROCKER 於冷房 (6~12°C) 作用 30 分鐘。以 1X BD IMag™ buffer 體積補至 1ml，並將液體移置玻璃管，放入磁座 8 分鐘，小心吸取上清液 (可做為 negative control)，加入 1ml 1X BD IMag™ buffer 於磁座上作用 4 分鐘，重複清洗一次，去除上清液即可獲得細胞。

2.7.3 流式細胞儀分析以及分選細胞

依上述流程製備單顆細胞，將細胞回溶於染色緩衝液 (2% FBS/1XPBS)，將細胞進行用抗體進行染色分析，詳細使用抗體如下： Ly6C-FITC (1:200; BioLegend, 128005, USA)、CD11b-APC (1:400; eBioscience, 17-0118, USA) 和 F4/80-APC (1:400; eBioscience, 17-4801, USA)。流式細胞分選儀機型為 BD FACSAria IIIu，位於台大醫學院第一公共研究室。



2.8 細胞培養與誘導實驗

2.8.1 肌纖維母細胞培養

單顆細胞製備如上述 2.7.1 流程，離心後細胞回溶於 RF medium (DMEM+20% FBS+1%P/S)，加入已用 0.5% gelatin coating 之 10 cm 培養盤，隔天更換 medium，約 5 天會長滿，此為 P0 細胞。細胞使用 0.1% Trypsin/EDTA 做繼代培養，且須培養至第 2 代才可做實驗。所有細胞培養

2.8.2 HEK293FT、L929 以及 RAW264.7 細胞培養

這三種細胞都培養於含 DMEM+10%FBS+1%P/S 之 medium。L929 細胞須外加 1% HEPES。而 RAW264.7 是懸浮性細胞，必須使用 Non-Coating 的培養皿培養。

2.8.3 骨髓源性巨噬細胞 (BMDMs) 培養

拆解小鼠股骨，將頭尾小心去除，以 25G 針筒吸取 1XPBS 沖出骨髓，以 1,500 rpm 離心 5 分鐘，將細胞回溶在 BMDM medium (80% fibroblast medium+20% L929 C.M)，隔天小心更換一半 medium，於第四天更換新的 medium，並在第 7 天可獲得分化成熟的巨噬細胞。使用 0.1% Trypsin/EDTA 將細胞。

2.8.4 M1 巨噬細胞誘導轉型試驗

巨噬細胞打散並計數後種入 24 孔盤中，每個 well 種 5×10^5 個細胞，並加入 LPS (10ng/ml, Sigma, USA) 以及 INF- γ (100U/ml, R&D, USA) 誘導培養 36 小時，以 1XPBS 清洗三次。加入 1ml fibroblast medium 至 well 後，並且種入 1×10^5 個肌纖維母細胞，於 37 °C CO₂ 培養箱共同培養，48 小時後萃取巨噬細胞 RNA 分析。

2.8.5 HEK293FT 轉染

將 HEK293 FT 培養至 8 分滿，將細胞打落並且在 10 公分培養皿種下 5×10^6 個細胞，並換上無添加抗生素的 medium，隔天利用 Lipofectamine 2000 將載體送入細胞，並且於兩天後收取細胞蛋白質。

2.9 細胞或組織 mRNA 及蛋白質分析

2.9.1 萃取 RNA

巨噬細胞、肌纖維母細胞或者腎臟組織的 RNA 都是用 TRIzol 試劑 (Invitrogen, 10296028, USA)。將細胞或組織磨碎後，補上適當體積之 TRIzol 將碎片溶解，室溫作用 5 分鐘，加入 chloroform (J.T Baker, 9182, USA) 用力混勻後室溫作用 3 分鐘，可觀察出分層。以 $15,000 \times g$ 於 4°C 離心 15 分鐘，小心吸取上清液至離心管，加入 isopropanol 沉澱 RNA，並以 75% 酒精清洗，室溫晾乾 10 分鐘，加入適當體積的 0.1% DEPC ddH₂O 回溶 RNA。

2.9.2 反轉錄 RNA 及定量 PCR 分析

每一個互補 DNA 製備的反應體積共 20 μl ，在冰上先混合 9 μl total RNA (5 μg) 和 1% DEPC ddH₂O、1 μl 10 μM random hexamers、及 1 μl 10 μM oligo dT，在 65°C 作用 5 分鐘，移到冰上再加入已經預先混合的 1 μl 40 mM dNTPs、2 μl 0.1M DTT、4 μl 5X First Strand RT buffer、1 μl RNase 抑制劑 (RNase Out, Invitrogen, USA) 及 1 μl 反轉錄酵素 (Super Script III, Invitrogen, USA)，混合均勻後快速離心，置於 42°C 進行反轉錄反應 1 小時又 30 分鐘，作用完畢後快速離心，保存在 -20°C 。定量 PCR 則是將經反轉錄作用的各管樣品 cDNA 加入至反應管，依照不同基因調製 SYBR 系統反應試劑，之後上機分析，本研究使用機型為 ABI7300。所有引子序列整理於 (表一)。

2.9.3 蛋白質萃取及電泳分析

細胞或組織加入 RIPA lysis buffer，磨碎後置於冰上 20 分鐘後，以 15,000xg 於 4°C 離心 5 分鐘，取上清液以 Protein Assay Kits 測定蛋白質濃度。將 5x loading dye 及 1x PBS 加入 sample 蛋白質以水煮加熱 10 分鐘離心後，每格 well 注入 10µl sample 蛋白質到已配置好的 SDS-PAGE，以 150 伏特電壓進行電泳 5 分鐘後調至 100 伏特電壓。電泳後，將已分離蛋白質轉漬於 PVDF 膜上 (轉漬時，電壓 300V；電流 300MA；時間 1 小時 45 分鐘)，並以 5%脫脂奶粉/0.1%PBS-T 進行 blocking，室溫反應 60 分鐘。加入 anti-ddk 抗體 (mouse monoclonal, 1:1000; OriGene, USA) 或者 anti-galectin-3 抗體(Rat polyclonal, 1:1000; BioLegend, USA)，於 4°C 冰箱 shaker 隔夜作用。以 0.1%PBST 清洗三次，再加入相對應之二級抗體 (1 : 5000 , anti-Rat IgG 或 1 : 10000 , anti-mouse IgG) 室溫反應一小時，最後以 ECL (enhanced chemiluminescence reagent) 感應試劑於冷光影像分析儀中分析結果。

2.10 免疫沉澱 (Immunoprecipitation, IP)

Lysis buffer 配方為：20mM Tris-HCl (pH=8.0), 137mM NaCl, 10% glycerol, 1% NP-40, 2mM EDTA。此配方較溫和，適合作用於鍵結較弱之蛋白質。先將細胞刮下，並加入 200 µl lysis buffer，冰上作用 30 分鐘，每 10 分鐘混勻一次，之後以 15,000xg 於 4°C 離心 30 分鐘，收取上清液，並以 Protein Assay Kits (Bio-Rad, USA) 測量蛋白質濃度。加入 500 到 1000 µg 蛋白質 至新的離心管，並且以 lysis buffer 補體積到 200µl。加入 20 µl protein G beads 與蛋白質作用，於 4°C 旋轉輪作用 1 小時，收取上清液至新的離心管，加入 IP 抗體，於 4°C 旋轉輪作用 1 小時後，再加入 40 µl beads 作用隔夜。隔天以 3,000 rpm 於 4°C 離心 4 分鐘，小心去除上清液，加入 500µl lysis buffer 清洗，再以 3,000 rpm 於 4°C 離心 4 分鐘。重複清洗三次，最後用 western blot buffer 回溶 sample。



第三章 實驗結果

3.1 *Endosialin*-LacZ KI 小鼠

為探討 *Endosialin* 在表現的時間點以及位置，本實驗室先前已建立 *Endosialin*-LacZ KI 小鼠。由於 *Endosialin* 基因只有一個 exon，我們便以 LacZ 做為報導基因，將其置入 *Endosialin* 基因 ATG 之後原本的序列，藉此策略得到 *Endosialin* 啟動子驅動的 LacZ 報導基因，同時也是 *Endosialin* 剔除的胚胎幹細胞，接著將胚胎幹細胞注入囊胚後植入代孕母鼠，獲得嵌合鼠 (chimera) (附錄八) (Huang, Hong et al. 2011)。挑選嵌合率 > 90% 之公鼠再與 C57BL/6 母鼠交配將 *Endosialin*-LacZ 對偶基因向子代遺傳，得到 N1 (B6, 129) 小鼠，之後便與 C57BL/6 野生型小鼠回交 (backcross) 至第十代 (N10)，本論文主要實驗小鼠為 N8~N10。

Endosialin-LacZ KI 小鼠具有有正常的生殖能力，並且其胚胎發育情形與野生型小鼠並無明顯差異。利用 LacZ stain 偵測 *Endosialin* 在胚胎發育時期表現的時間及位置，發現在胚胎時期第 9.5 天 (E9.5) 時在背部主動脈壁 (dorsal aortic wall)、心臟、臍帶血管、第一腮弓 (first branchial arch) 以及頭部的間葉組織 (cephalic mesenchyme) 開始表現。之後在生殖結節 (genital tubercle)、中腎 (mesonephros) 以及眼部、肺部的間葉組織皆有表現，另外在胚胎時期第 16.5 天腎臟開始表現 *Endosialin*。在出生後其他組織的表現量減低，只有在腎臟的腎絲球和周邊血管，還有子宮具有高量表現 (附錄五)。

為了釐清 *endosialin* 在腎臟的功能，我們分析了野生型、+/KI (heterozygous KI) 和 KI/KI (homozygous KI) 小鼠血清中的腎功能指標 (表二)，結果顯示不同基因型小鼠間並無差異。進一步以組織切片染色釐清腎臟組織結構以及細胞組成，在 H&E 染色結果中，觀察野生型小鼠與 KI/KI 小鼠腎小管和腎絲球的排列與組成並無差異 (圖一)，詳細計數腎臟腎絲球數目發現兩者亦無差異，而在腎絲球細胞組成結構及細胞數目，KI/KI 與野生型小鼠相似；另外，為了評估腎過濾功能，我

們也偵測血液中血液尿素氮 (Blood urea nitrogen, BUN) 以及 肌酐酸 (Creatinine, CRE)，兩者間並無差異；此外，我們也利用生物代謝籠收取小鼠尿液，偵測尿液蛋白含量以及 Creatinine (肌酐酸)，並且以肌酐酸為基準算出比值，評估腎臟的過濾功能，結果顯示野生型小鼠及 KI/KI 小鼠皆有正常的腎功能 (圖二)。因此，*Endosialin* 剔除並不會影響腎臟發育以及腎臟的結構與功能。

3.2 小鼠慢性腎病模式

根據先前研究發現疾病組織會大量表現 *endosialin*；此外，Smith 等人也發現 *endosialin* 在正常腎臟表現在腎絲球的 mesangial cells 以及微量表現在血管周圍之纖維母細胞，但是在慢性病患則會大量表現在腎間質纖維化的組織 (Smith, Eardley et al. 2011)。為了釐清 *endosialin* 在慢性腎病的作用機制，我們選用單側輸尿管結紮模式 (UUO) 誘導小鼠產生慢性腎病，並且比較野生型及 KI/KI 小鼠的差異性。依據先前研究指出，UUO 誘導後 7 天為腎病演進中期而 14 天為末期；從外觀來看，在第 7 天手術後，左腎因為輸尿管結紮導致尿液累積在腎臟造成腎臟膨大，相較於右側對照組腎臟，左腎組織外表變得粗糙；在手術後 14 天，左腎膨脹更為巨大，而腎臟因為細胞凋亡造成內部組織萎縮變薄，外表粗糙變得更明顯 (圖四)。另外，本論文也使用單側腎臟缺血再灌流 (uIRI) 模式，急性缺血再灌流也會造成急性腎損傷，並且會演變成腎臟纖維化，在術後 14 天觀察也可發現腎臟萎縮硬化。

3.3 *Endosialin* 高量表現於膠原蛋白質製造細胞且影響膠原蛋白質製造

已知 *endosialin* 在人類慢性腎病會大量表達在肌纖維母細胞，因此我們利用 LacZ 染色分析在 UUO 誘導後之腎臟的表現情形，並搭配 α -SMA 之免疫螢光染色偵測肌纖維母細胞，結果顯示經 UUO 誘導之腎臟組織，皆有大量肌纖維母細胞

(紅色螢光)堆積在腎間質；此外，*Endosialin-LacZ* KI 正常組織在腎絲球的 mesangial cells 偵測到大量 LacZ 染色 (綠色)，而經 UUO 誘導後，除了腎絲球的 mesangial cells，間質的肌纖維母細胞也大量表現 LacZ (圖五)。另外，比較整個腎臟組織 *Endosialin* mRNA 的表現量，發現在 UUO 誘導的腎臟較對照組腎臟表達高出 15 至 30 倍 ($p<0.001$)，而在 KI/KI 小鼠則是偵測不到 (圖六 A)。雖然先前研究已指出造成腎臟纖維化的細胞主因就是肌纖維母細胞，但為了更加確認 *endosialin* 的是否表達在這些細胞，我們利用了 *Coll-GFP* 轉殖小鼠來回答。*Coll-GFP* 轉殖小鼠在製造膠原蛋白的細胞 (collagen-producing cells) 會發出綠色螢光，利用將此小鼠進行 UUO 手術後，以流式細胞分選儀自腎臟分離出製造膠原蛋白的細胞，並且與對照組比較 *Endosialin* mRNA 的表現量，結果顯示經由 UUO 誘導之細胞具有較高的表現量 (圖六 B)。這些結果顯示在 *endosialin* 會被誘導大量表現在腎病組織的肌纖維母細胞，這與在人類慢性腎病的結果相類似。

根據上述結果發現 *endosialin* 會表現在膠原蛋白製造細胞，接著我們分析 *endosialin* 是否會影響這些細胞促進纖維化的功能。利用 Picosirius red 染色偵測膠原蛋白在組織中堆積的程度 (圖七 A)，結果顯示在第 14 天 UUO 誘導的組織中，KI/KI 小鼠腎臟的膠原蛋白堆積程度明顯較野生型小鼠少，下降約 50% ($p<0.05$) (圖七 B)。進一步分析膠原蛋白 mRNA 在腎臟的表現情形，結果與上述相似，在第 14 天 UUO 誘導的組織中，KI/KI 小鼠腎臟的膠原蛋白表現明顯低於野生型小鼠 ($p<0.05$) (圖八)。為了進一步釐清是否剔除 *Endosialin* 會造成細胞製造膠原蛋白質的能力下降，我們將 *Endosialin-LacZ* KI 小鼠與 *Coll-GFP* 交配取得 *Endosialin-LacZ- Coll-GFP* 小鼠，並且以流式細胞分選儀分離來自野生型-GFP 和 KI/KI-GFP 小鼠之細胞，並且分析膠原蛋白之表現量，結果顯示 KI/KI 小鼠細胞表現量略低於野生型小鼠，但無統計差異 ($p=0.08$, $n=3$)，仍待放大實驗數 (圖九)。

此外，為了確認 *endosialin* 在腎臟纖維化演進的角色，我們另外使用單側腎

臟缺血再灌流 (uIRI) 的慢性腎模式進行分析。在 uIRI 手術後 14 天之腎臟，*Endosialin* 表達明顯高於對照組腎臟，約增加 13 倍 (圖十)，接著利用 Picosirius red 染色分析膠原蛋白堆積的情形，我們發現 KI/KI 小鼠之腎臟明顯少於野生型小鼠，而量化結果也與 UUO 模式相類似，減少約 50% (圖十一)。統整上述結果，我們推測 *endosialin* 可能扮演促進慢性腎病的角色，而剔除 *Endosialin* 能透過降低細胞製造膠原蛋白，減少膠原蛋白堆積以減緩腎臟纖維化的進程。

3.4 *Endosialin* 剔除並不影響肌纖維母細胞在腎病組織的擴增

肌纖維母細胞的擴增是腎臟纖維化的必經過程，而先前有研究指出 *endosialin* 也會參與調控細胞增生 (Tomkowicz, Rybinski et al. 2010)，為了釐清 *endosialin* 是否透過影響肌纖維母細胞的增生，進而促進纖維化的進程，我們利用免疫組織染色定量野生型以及 KI/KI 小鼠肌纖維母細胞，並且體外培養兩種基因型的肌纖維母細胞，觀察增生情形。首先，利用免疫組織化學染色以 α -SMA 抗體辨認肌纖維母細胞 (圖十二)，可以觀察到在 UUO 腎臟肌纖維母細胞明顯多於對照組，顯示肌纖維母細胞的擴增，但是在野生型小鼠與 KI/KI 小鼠並無明顯差異 (圖十二 A)；以分析軟體定量 SMA positive 的區域，結果顯示隨著疾病天數的演變，肌纖維母細胞數量隨之增加，而野生型與 KI/KI 小鼠不論在增加趨勢，或者增加量皆無明顯差異 (圖十二 B)。偵測 α -SMA RNA 表現量亦無明顯差異 (圖十三)。

接著進一步分析肌纖維母細胞的增生情形，我們利用 α -SMA 以及 Ki-67 抗體在 UUO 腎臟組織切片做免疫螢光染色，偵測肌纖維母細胞以及增生的細胞 (圖十四 A)，之後計數都被染上之細胞並且量化比較，結果顯示野生型與 KI/KI 小鼠間並無差異 (圖十四 B)。另外，我們分別自野生型小鼠及 KI/KI 小鼠的 UUO 腎臟，分離出肌纖維母細胞作體外培養，並且比較兩種基因型細胞的增生能力。從形態觀察，野生型與 KI/KI 細胞並無明顯差異，以 α -SMA 抗體進行免疫螢光染色發現幾乎所有的細胞皆有表現，此證明細胞為肌纖維母細胞，且野生型及

KI/KI 細胞的 SMA 表現量亦無明顯差異 (圖十五 A 和 B)。進一步利用 MTT 試劑組分析兩種基因型細胞的增生，結果顯示兩者間並無差異 (圖十五 C)。統整以上結果顯示，endosialin 對於體內或體外之腎臟肌纖維母細胞擴增並無影響，KI/KI 小鼠與野生型小鼠之肌纖維母細胞數量相似，顯示剔除 *Endosialin* 是透過影響肌纖維母細胞之功能而非細胞數目，進而減緩腎臟纖維化。

3.5 Endosialin 影響巨噬細胞浸潤以及功能

由於組織受損後會吸引免疫細胞浸潤並造成發炎反應，並且促進組織修復，其中巨噬細胞被認為扮演重要的角色，先前報導也指出巨噬細胞會藉由分泌細胞激素影響肌纖維母細胞的活化 (Lin, Li et al. 2010; Lin 2012)，進而影響組織修復。為了探討 endosialin 是否透過巨噬細胞而影響纖維化，首先我們偵測巨噬細胞浸潤至組織的數目，利用 F4/80 抗體進行免疫組織化學染色，結果顯示在 KI/KI 小鼠明顯少於野生型小鼠 (圖十六 A 和 B)。分析軟體定量 F4/80 positive 的區域顯示 KI/KI 小鼠不論是在手術後第 7 天或 14 天，都發現巨噬細胞浸潤數目明顯低於野生型小鼠 (圖十六 C) ($p < 0.001$)。根據上結果推測 endosialin 可能扮演促進巨噬細胞浸潤的角色。

為探討巨噬細胞之功能，我們採用磁珠細胞分離技術 (MACS) 將巨噬細胞自 UUO 術後第七天的組織中分離，並且萃取巨噬細胞之 RNA，進一步比較野生型以及 KI/KI 小鼠間基因表達的差異性。根據先前研究指出巨噬細胞可依據分泌激素的不同，分為促進發炎的 M1 型態，以及促進纖維化的 M2 型態，且當組織開始修復時，M1 型態的巨噬細胞則會轉型成 M2 型態 (Lin, Castano et al. 2009)。圖十七呈現巨噬細胞促進發炎的基因表現，也就是 M1 的指標，包括 iNOS、IL-1 β 、Mip-1 α 以及 Mip-2 α 。結果顯示這四個基因在野生型與 KI/KI 小鼠的表現並無統計差異，但是整體趨勢 KI/KI 小鼠的基因表現皆略高於野生型小鼠。圖十八則是 M2 指標基因的分析，包括 Arg1、TGF- β 、PDGF-C、CCL17 以及 CCL22。在 Arg1、

TGF- β 、PDGF-C 的表現並無明顯的差異性 (圖十八 A-C)，但是在 CCL17 以及 CCL22 的基因表現，發現 KI/KI 小鼠明顯低於野生型小鼠且具統計意義 ($p<0.05$) (圖十八 D 和 E)。綜合以上結果顯示，*Endosialin* 剔除減少巨噬細胞浸潤至腎病組織，並且透過未知機制降低 M2 型巨噬細胞所分泌之 CCL17 和 CCL22，因此，推測 *endosialin* 可能扮演促進巨噬細胞浸潤，並且可能參與調控 M1 及 M2 巨噬細胞的功能。

3.6 *Endosialin* 影響巨噬細胞的轉型

為探討 *endosialin* 是否影響會影響細胞的轉型作用，我們選用報導過可用來區分巨噬細胞的分型的標記蛋白 Ly6C 進行分析。根據先前研究指出在小鼠 UUO 模式中，當腎臟剛開始損傷，會有一群 $CD11b^+Ly6C^{high}$ 的細胞會從骨髓浸潤至腎臟，而此群細胞表達許多促進發炎的基因，因此也被歸類為 M1 型態的巨噬細胞，隨著時間增加， $CD11b^+Ly6C^{high}$ 會轉型成為 $CD11b^+Ly6C^{low}$ 的細胞，而此群細胞則是表現促纖維化的基因，也被歸類為 M2 型態的巨噬細胞 (Lin, Castano et al. 2009)。因此，我們以流式細胞儀分析 UUO 術後第七天的腎臟，並比較野生型及 KI/KI 小鼠巨噬細胞的分群。首先圖十九和圖二十的 A 圖分別顯示野生型小鼠及 KI/KI 小鼠以 CD11b 及 Ly6C 染色將細胞分群的情形，接著圈選 $CD11b^+$ 的細胞並且以 Ly6C 的表達量高低，計算 $Ly6C^{high}$ 以及 $Ly6C^{low}$ 佔所有 $CD11b^+$ 細胞的百分比 (圖十九和圖二十的 B-C)。結果顯示 KI/KI 小鼠腎病組織內的 $CD11b^+Ly6C^{hi}$ 巨噬細胞較野生型多，而 $CD11b^+Ly6C^{low}$ 巨噬細胞則是較野生型小鼠少，且皆有統計差異 ($p<0.05$) (圖二十一)。

另外，為了探討肌纖維母細胞表達的 *endosialin* 與巨噬細胞的作用機制，我們參考先前的研究，在體外培養模式下建立巨噬細胞的轉型試驗 (Lee, Huen et al. 2011)，試驗流程如附錄九。先將巨噬細胞誘導分化為 M1 型態，之後分別與野生型或 KI/KI 小鼠的腎臟肌纖維母細胞一起培養，最後分析巨噬細胞的基因表現評



估巨噬細胞之轉型。首先我們採用小鼠巨噬細胞的細胞株 RAW264.7 作為模型，經誘導後的 RAW264.7 會表現 M1 型態的基因如 iNOS，且不會表現 M2 型態的基因 (圖二十二 A)。將此細胞分別與對照組 (vehicle)、野生型以及 KI/KI 細胞一起培養後分析，結果顯示與 KI/KI 細胞培養造成巨噬細胞的 CCL17 表達量較野生型細胞組低 ($p<0.05$) (圖二十二 B)。另外，以骨髓源性巨噬細胞 (BMDMs) 為模式，也看到相類似的結果。當巨噬細胞與 KI/KI 細胞一起培養，也使得 CCL17 表達量較野生型細胞組低 ($p<0.05$) (圖二十二 C)。綜合以上結果顯示，*Endosialin* 剔除會減少腎病組織內 M1 巨噬細胞轉型至 M2 型態，而從體外培養試驗也得到類似的結果，特別是會表現 CCL17 和 CCL22 的巨噬細胞明顯減少，因此，推測 *endosialin* 可能藉由未知機制調控 M1 及 M2 巨噬細胞的型態轉型。

根據研究指出，CCL17 及 CCL22 會參與促進肺臟的纖維化 (Inoue, Fujishima et al. 2004)。但其他研究指出注射 anti-CCL17 抗體能有效抑制小鼠肺臟的纖維化，而 anti-CCL22 抗體則無效果，顯示 CCL17 對於肺纖維化演進的重要性 (Belperio, Dy et al. 2004)。為了釐清 CCL17 對於腎臟纖維化的影響，我們以野生型小鼠進行 UUO 手術，並且同時注射 anti-CCL17 抗體或者對照組抗體至小鼠中，術後 10 天分析腎纖維化程度。利用 Picosirius red 染色偵測膠原蛋白在組織中堆積的程度，結果顯示注射 Anti-CCL17 抗體明顯低於對照組 (圖二十三 A 和 B)，經分析軟體量化後也呈現相同結果 ($p<0.05$)。

3.7 Endosialin 影響巨噬細胞與肌纖維母細胞的交互作用

為探討 *endosialin* 如何調控巨噬細胞轉型，我們利用 cytokine array 分析野生型及 KI/KI 小鼠肌纖維母細胞所分泌的分子 (圖二十四)，結果顯示 KI/KI 小鼠肌纖維母細胞所分泌的分子皆高於野生型細胞，表現之比值整理至表三，但結果仍需後續分析。另一方面，根據先前報導指出 Mac2BP/90K 會與 *endosialin* 結合 (Becker, Lenter et al. 2008)，而巨噬細胞曾被報導會表達 Mac2 (galectin-3) 並且促

進腎臟纖維化 (Henderson, Mackinnon et al. 2008)，另外，galectin-3 也被報導與會許多膜外蛋白結合，因此我們假設 endosialin 可能透過 Mac2BP/90K 間接影響肌纖維母細胞及巨噬細胞，或者 endosialin 直接與 galectin-3 結合影響肌纖維母細胞及巨噬細胞的功能 (附錄十)。為了證明 galectin-3 與 endosialin 的作用，我們首先分析 galectin-3 基因在 *Endosialin* 剔除小鼠的表現情形，結果顯示不論是在組織或者巨噬細胞，*Endosialin* 剔除不會影響 galectin-3 基因的表達 (圖二十五)。之後分析 *Lgals3* (galectin-3) 基因剔除鼠的基因表達，利用磁珠細胞分離技術將巨噬細胞自 UUO 組織中分離，並且萃取巨噬細胞之 RNA，分析 M1 和 M2 基因的表達，結果顯示在 galectin-3 缺乏的巨噬細胞，CCL17 以及 CCL22 的表達皆比野生型細胞低，減少約 80% (圖二十六 E-F)，其他基因則無明顯差異。此結果與 *Endosialin* 剔除小鼠相類似，但降低幅度更大。根據此結果證明 endosialin 不會影響 galectin-3 的表現，由於兩種基因剔除後產生相似的表現型，因此推測兩者間可能具有相同的調控機制。

為了探討 endosialin 與 galectin-3 間的作用，我們將 endosialin-ddk 與 galectin-3 表現載體一同轉染於 HEK293FT 細胞株中，並且利用免疫共沉澱 (co-IP) 的方式，證明 endosialin 會與 galectin-3 結合 (附錄十一)。Endosialin 的表現載體帶有標記蛋白 ddk，因此可用 anti-ddk 抗體辨識 endosialin 蛋白質，其大小介於 100 kDa~130kDa 之間，而 galectin-3 蛋白質大小約 30kDa。圖二十七 A 呈現為以 anti-galectin-3 抗體沉澱蛋白質後，再用 anti-ddk 抗體偵測 endosialin 的結果；左側 Cell lysate 為轉染對照組，右側則是實驗組，轉染兩個表現載體並且加入 anti-galectin-3 抗體明顯偵測到 endosialin 的訊號，而在 IgG 或轉染 endosialin-ddk 對照組則沒有訊號。相反的，圖二十七 B 是利用 anti-ddk 抗體沉澱蛋白質，再用 anti-galectin-3 抗體偵測 galectin-3 的訊號，左側是轉染對照圖，右側則是實驗組，結果顯示轉染兩個表現載體並且加入 anti-ddk 抗體偵測到微弱的 galectin-3 的訊號。統整結果顯示，endosialin 可以與 galectin-3 結合，但是否影響彼此細胞功能

仍待進一步證實。此外，我們將 galectin-3 重組蛋白加入野生型及 KI/KI 腎肌纖維母細胞，結果顯示 galectin-3 重組蛋白會促進野生型細胞表現膠原蛋白基因，但 KI/KI 細胞則不會 (圖二十八)。

統整所有實驗結果，我們構築了一個作用機制圖解釋 endosialin 在慢性腎病的功能 (圖二十九)。當腎臟損傷時，血液中的單核細胞會被吸引浸潤至損傷組織，並活化成 M1 型態巨噬細胞，M1 巨噬細胞除了分泌促進發炎之細胞激素，同時也刺激 pericyte 轉變為肌纖維母細胞；肌纖維母細胞大量表現出 endosialin 以及大量擴增，而 M1 巨噬細胞也會透過 galectin-3 與肌纖維母細胞的 endosialin 作用，促使型態轉變成 M2 巨噬細胞；M2 巨噬細胞會分泌 CCL17 促進肌纖維母細胞，造成更多的膠原蛋白堆積，最終造成不可逆之纖維化。



第四章 結論及討論

在本篇研究，我們利用 *Endosialin-LacZ* KI 小鼠探討 *endosialin* 在慢性腎病所扮演的角色。在小鼠疾病模式中也觀察到如同慢性腎病患者，腎病組織都會大量表現 *endosialin*，接著我們接著證實了 *endosialin* 作為治療的標的可能性。首先剔除 *Endosialin* 基因並不影響胚胎發育以及生殖，且腎臟結構與功能皆與正常小鼠無異；而在慢性腎病模式中，又能有效降低纖維化程度。此外，我們也發現 *endosialin* 會與 galectin-3 作用進而調控肌纖維母細胞以及巨噬細胞的功能與轉型，這是先前並未報導過的作用機制，但仍有部分機轉仍未釐清，我將在此討論。

4.1 調控 *Endosialin* 之表達

目前很少文獻對於 *Endosialin* 基因調控進行探討，先前 Ohradanova 等人指出 *Endosialin* 啟動子上游具有 hypoxia-responsive element (HRE) 藉此受到 hypoxia inducible transcription factors 2 (HIF-2) 調控，促進 *endosialin* 表現 (Ohradanova, Gradin et al. 2008)，而在腎臟 HIF-2 被發現表達在內皮細胞以及腎臟的間質纖維母細胞 (Gunaratnam and Bonventre 2009)，此外 HIF-2 也被發現會促進細胞的增生 (Gordan, Bertout et al. 2007)。另外，也有研究指出 TGF- β 會抑制正常細胞 *Endosialin* 表現，但當細胞被活化時 TGF- β 則失去抑制的能力 (Suresh Babu, Valdez et al. 2014)。正常人的腎組織中，*endosialin* 微量表現在血管周圍的纖維母細胞以及腎絲球的繫膜細胞，但是在慢性腎病組織會大量表現 (Smith, Eardley et al. 2011)，而 TGF- β 被證實會大量表現腎病組織中，並且促進纖維化。綜合上述結果推測 *endosialin* 的表達調控機制如下：在正常腎組織中，TGF- β 會抑制腎間質纖維母細胞表達 *Endosailin*，使得 *Endosailin* 錶表現量很低，當腎臟受損呈現缺氧狀態時，腎臟間質的纖維母細胞藉由高量表達 HIF-2 促進 *Endosailin* 表現，同時 HIF-2 刺激細胞增生與活化，而此時 TGF- β 雖然失去抑制 *Endosailin* 表現的能力，

但是會使纖維母細胞走向促纖維化的訊息傳遞路徑。



4.2 Endosialin 下游訊息傳遞與細胞增生

Endosialin 本身的 cytoplasmic domain 片段十分短，約 51 個胺基酸，其細胞內的結合分子尚未找到，而 endosialin 的同源蛋白 CD93 則被報導會與 G protein 結合傳遞下游訊息 (Greenlee, Sullivan et al. 2008)。另外，有研究利用 *Endosialin* cytoplasmic domain 剔除小鼠證明 cytoplasmic domain 會影響組織發炎以及腫瘤的增生 (Maia, de Vriese et al. 2010; Maia, DeVriese et al. 2011)，此結果間接證明 endosialin 具有下游訊息傳遞功能；他們也同時證明 endosialin 會藉由下游 HIF-1 以及透過未知機制抑制 Notch-3 訊息傳遞，進而刺激細胞發炎以及促進腫瘤生長 (附錄七)。另外 Tomkowicz 等人也提出 endosialin 藉由輔助 PDGF Receptor β 下游訊息傳遞，促進人類周細胞增生 (Tomkowicz, Rybinski et al. 2010)，此證據也說明 endosialin 可能作為其他受器的輔助因子進而傳遞下游訊息，但是作用機制仍釐清。在我的實驗結果中發現，剔除 *Endosialin* 會減少膠原蛋白生成 (圖七和八)；而根據先前研究指出，PDGF 也會促進細胞製造膠原蛋白 (Throckmorton, Brogden et al. 1995)，推測或許 endosialin 也是透影響 PDGFR 訊息傳遞影響下游膠原蛋白的生合成，因此我將進一步分析野生型小鼠及剔除小鼠纖維母細胞的 PDGFR 下游的訊息路徑。

Tomkowicz 也指出 endosialin 藉由影響 PDGFR 下游的訊息路徑，參與調控細胞增生，他們利用 siRNA 抑制 *ENDOSIALIN* 的表達，發現 PDGFR 下游的訊息傳遞減少並抑制細胞生長。但是根據其他的研究指出抑制 PDGFR β 訊息會造成周細胞嚴重異常，在 PDGFR β 剔除小鼠觀察到其血管缺乏周細胞，導致小鼠在胚胎發育時期即死於嚴重的出血 (Betsholtz, Karlsson et al. 2001)；然而 *Endosialin* 剔除小鼠卻具有正常的血管分布及發育 (Nanda, Karim et al. 2006)，從我的實驗也觀察到 endosialin 並不會影響到肌纖維母細胞之增生 (圖十二至十四)。Maia 等人也

發現類似的結果，他們體外培養 *Endosialin* 剔除小鼠的胚胎纖維母細胞，與野生型小鼠比較其增生能力，並無明顯差異 (Maia, de Vriese et al. 2010)。因此推論在人類與小鼠 *endosialin* 與 PDGFR β 相互作用，可能因物種或細胞種類不同，導致結果不同。進一步分析野生型小鼠及剔除小鼠纖維母細胞的 PDGFR 下游的訊息路徑，仍待進行。

4.3 *Endosialin* 剔除造成組織內的巨噬細胞數目減少

本研究發現剔除 *Endosialin* 會減少組織內巨噬細胞的數目 (圖十五)，先前也有研究在小鼠關節炎模式也觀察到相似的結果 (Maia, de Vriese et al. 2010)。他們誘導 *Endosialin* 剔除小鼠產生關節炎，並且與野生型小鼠比較發現白血球浸潤至損傷區域的數目明顯減少，進一步分別用野生型及 *Endosialin* 剔除小鼠之胚胎纖維母細胞與單核細胞進行貼附試驗，結果 *Endosialin* 剔除造成單核細胞貼附減少。此外他們證實 *Endosialin* 剔除的胚胎纖維母細胞表現較低的 PlGF (Placental growth factor) 和 VEGFR 1，而在 TGF- β 刺激下 VEGF 表現量也較野生型細胞低。而這三個因子在本研究並未討論，之後我將分析這些基因在野生型及 KI/KI 小鼠腎臟肌纖維母細胞的表現情形。本研究使用 cytokine array 比較體外培養之野生型及 KI/KI 小鼠腎臟肌纖維母細胞所分泌之細胞激素，結果顯示 KI/KI 表現較高的促發炎因子，如：TNF- α 、CXCL1、MIP-1 α 等 (圖二十四及表三)。此結果無法解釋 *Endosialin* 剔除造成巨噬細胞浸潤減少的結果，推測可能是因為這些細胞經過體外培養，與原本在腎病組織的微環境不同。因此，我將利用 *Endosialin*-LacZ-Coll-GFP 小鼠，利用流式細胞分選儀分離出 WT-GFP 以及 KI/KI-GFP 細胞，並萃取 RNA 進行 mRNA microarray 分析，藉此找出差異性的因子。

此外，越來越多證據顯示巨噬細胞在損傷部位具有增生的能力 (Jenkins, Ruckerl et al. 2011; Robbins, Hilgendorf et al. 2013; Van Gassen, Van Overmeire et al. 2015)。Robbins 等利用 adoptively transfer 將綠螢光小鼠的 Ly-6C^{high} 單核細胞植

入動脈粥狀硬化小鼠內，他們發現這些帶有綠螢光的巨噬細胞會在粥狀硬化的斑塊裡增生，而且是斑塊巨噬細胞的主要來源，非自血液浸潤 (Robbins, Hilgendorf et al. 2013)。為了釐清 *Endosialin* 剔除小鼠腎病組織內巨噬細胞的數目減少，是因為從血管浸潤至病灶較少，或者是 *endosialin* 會影響巨噬細胞在腎病組織的增生，我將利用實驗室已建立之螢光小鼠 (Chen, Tsai et al. 2012) 作為報導標的，利用 adoptively transfer 將綠螢光小鼠的 Ly-6C^{high} 單核細胞植入野生型及 KI/KI 小鼠，藉此方式也可以觀察巨噬細胞浸潤之情形，以及確認巨噬細胞的增生。

4.4 *Endosialin* 與巨噬細胞的轉型

利用流式細胞儀以 Ly6C 分析腎病組織巨噬細胞的分群，我們發現剔除 *Endosialin* 會減少組織內 M2 型態巨噬細胞的比例 (圖二十一)，並且影響巨噬細胞的功能，其中以 CCL17 和 CCL22 最為明顯。不論是從腎病組織分離出巨噬細胞分析或者用體外誘導轉型模式，都可以發現 *Endosialin* 剔除會造成巨噬細胞 CCL17 和 CCL22 表現量下降 (圖十八和圖二十二)。已知 CCL17 和 CCL22 同屬一個基因群落，且共享一個接受器，CCR4。根據先前研究結果證明 CCL17 會促進肺臟纖維化 (Belperio, Dy et al. 2004)，且抑制 CCR4 也會減緩肺纖維化，但是機制仍未被證實。本研究首度提出 CCL17 也會促進腎臟纖維化，而使用 anti-CCL17 抗體能有效減緩腎臟纖維化 (圖二十三)。本研究也試圖利用 cytokine array 找尋可能作用分子，但並無發現，後續將以 mRNA microarray 分析，藉此找出差異性的因子。此外，也有研究指出 CCL17 也會吸引 Th2 細胞，並且促進 Th2 及 Treg 活化 (Fujimura, Kambayashi et al. 2014)，或許可以進一步分析腎病組織中的 T 細胞變化情形。

4.5 Endosialin 與 Galectin-3 的結合與功能影響

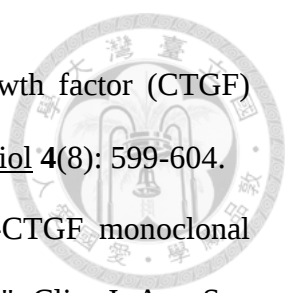
先前研究指出 Galectin-3 會與 CD45 結合並且活化下游訊息傳遞增加癌細胞的生存 (Clark, Pang et al. 2012)，本研究利用免疫共沉澱的方式應證 endosialin 能與 galectin-3 結合，但其下游訊息仍未證實，而許多研究已經證明 galectin-3 會促進纖維母細胞膠原蛋白的表達 (Sasaki, Bao et al. 1999; Henderson, Mackinnon et al. 2008)，而本研究也發現相同的結果，我們發現外加 galectin-3 蛋白無法誘導 *Endosialin* 剔除細胞表現膠原蛋白，證明 galectin-3 會促進纖維母細胞需要透過 endosialin，但是 endosialin 下游訊息路徑仍然未知；此外，endosialin 與 galectin-3 結合後如何影響巨噬細胞的功能與轉型仍待證實。因此我將利用骨髓移植的方式將綠螢光小鼠的 Ly-6C^{high} 單核細胞植入 KI/KI 小鼠，藉此方式也可以觀察巨噬細胞浸潤之情形，並且分析後續纖維化程度、巨噬細胞的轉型及功能，評估是否與 KI/KI 小鼠腎病組織觀察的結果相似。

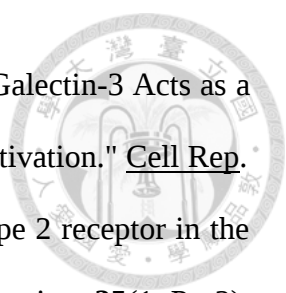
第五章 未來展望

目前臨床針對腎纖維化治療的藥物開發大多鎖定在 TGF- β 訊息傳遞路徑，先前有報導指出 (Yanagita 2012; Chuang, Menon et al. 2013) 抑制 TGF- β 訊息傳遞可能會造成免疫系統嚴重的缺失，另外，也有研究指出 BMP-7 可有效減緩纖維化 (Zhong, Wang et al. 2013)，但也有其他研究指出 BMP-7 並無效果 (Li, Yiu et al. 2015)；而 HGF 也被認為有促進腫瘤轉移的副作用 (Straussman, Morikawa et al. 2012)，因此尋找其他治療標的更顯得重要。根據先前 Smith 的研究顯示，endosialin 的表現量與腎病嚴重程度成正比 (Smith, Eardley et al. 2011)，我們建立的基因剔除小鼠正是模擬作為治療標的平台，剔除 *Endosialin* 基因並不影響小鼠之生理功能，而且在 UUO 模式中，有效減緩腎纖維的進程。此外，在急性損傷腎損傷的病患，也有機會演變成慢性腎病，而 UUO 模式無法評估 endosialin 對於腎臟修復以及功能之影響，因此需要其他誘導模式，例如：雙側腎臟缺血再灌流模式，目前林水龍老師實驗室進行分析中，初步結果顯示 endosialin 對於腎臟修復並無影響。根據這些結果顯示，抑制 endosialin 表達有效減低纖維化，且不會影響腎臟回復的能力，因此更加突顯在臨床應用之價值。而在人類已設計出針對 endosialin 的 humanized 單株抗體 MORAb-004，且目前在 36 為患有末期固態腫瘤的病人進行第一期臨床試驗 (Diaz, Coughlin et al. 2015)，目前已完成最高安全劑量測試 (12mg/kg)，初步觀察結果也顯示抑制腫瘤的活性，但仍需長期觀察。

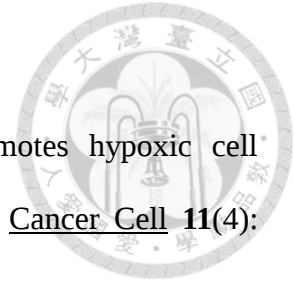


參考文獻

- 
- Abreu, J. G., N. I. Ketpura, et al. (2002). "Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta." Nat Cell Biol **4**(8): 599-604.
- Adler, S. G., S. Schwartz, et al. (2010). "Phase 1 study of anti-CTGF monoclonal antibody in patients with diabetes and microalbuminuria." Clin J Am Soc Nephrol **5**(8): 1420-1428.
- Bagley, R. G., C. Rouleau, et al. (2008). "Human endothelial precursor cells express tumor endothelial marker 1/endosialin/CD248." Mol Cancer Ther **7**(8): 2536-2546.
- Baltatzi, M., C. Savopoulos, et al. (2011). "Role of angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers in hypertension of chronic kidney disease and renoprotection. Study results." Hippokratia **15**(Suppl 1): 27-32.
- Becker, R., M. C. Lenter, et al. (2008). "Tumor stroma marker endosialin (Tem1) is a binding partner of metastasis-related protein Mac-2 BP/90K." FASEB J **22**(8): 3059-3067.
- Belperio, J. A., M. Dy, et al. (2004). "The role of the Th2 CC chemokine ligand CCL17 in pulmonary fibrosis." J Immunol **173**(7): 4692-4698.
- Betsholtz, C., L. Karlsson, et al. (2001). "Developmental roles of platelet-derived growth factors." Bioessays **23**(6): 494-507.
- Bichara, M., A. Attmane-Elakeb, et al. (2006). "Exploring the role of galectin 3 in kidney function: a genetic approach." Glycobiology **16**(1): 36-45.
- Bottinger, E. P. (2007). "TGF-beta in renal injury and disease." Semin Nephrol **27**(3): 309-320.
- Brady, J., J. Neal, et al. (2004). "Human endosialin (tumor endothelial marker 1) is abundantly expressed in highly malignant and invasive brain tumors." J Neuropathol Exp Neurol **63**(12): 1274-1283.

- 
- Burguillos, M. A., M. Svensson, et al. (2015). "Microglia-Secreted Galectin-3 Acts as a Toll-like Receptor 4 Ligand and Contributes to Microglial Activation." Cell Rep.
- Carey, R. M., Z. Q. Wang, et al. (2000). "Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function." Hypertension **35**(1 Pt 2): 155-163.
- Carson-Walter, E. B., D. N. Watkins, et al. (2001). "Cell surface tumor endothelial markers are conserved in mice and humans." Cancer Res **61**(18): 6649-6655.
- Castano, A. P., S. L. Lin, et al. (2009). "Serum amyloid P inhibits fibrosis through Fc gamma R-dependent monocyte-macrophage regulation in vivo." Sci Transl Med **1**(5): 5ra13.
- Chang, F. C., W. C. Chiang, et al. (2014). "Angiopietin-2-induced arterial stiffness in CKD." J Am Soc Nephrol **25**(6): 1198-1209.
- Chau, B. N., C. Xin, et al. (2012). "MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways." Sci Transl Med **4**(121): 121ra118.
- Chen, Y. T., M. S. Tsai, et al. (2012). "R26R-GR: a Cre-activable dual fluorescent protein reporter mouse." PLoS One **7**(9): e46171.
- Christian, S., H. Ahorn, et al. (2001). "Molecular cloning and characterization of endosialin, a C-type lectin-like cell surface receptor of tumor endothelium." J Biol Chem **276**(10): 7408-7414.
- Christian, S., R. Winkler, et al. (2008). "Endosialin (Tem1) is a marker of tumor-associated myofibroblasts and tumor vessel-associated mural cells." Am J Pathol **172**(2): 486-494.
- Chuang, P. Y., M. C. Menon, et al. (2013). "Molecular targets for treatment of kidney fibrosis." J Mol Med (Berl) **91**(5): 549-559.
- Clark, M. C., M. Pang, et al. (2012). "Galectin-3 binds to CD45 on diffuse large B-cell

- lymphoma cells to regulate susceptibility to cell death." Blood **120**(23): 4635-4644.
- Conway, E. M., M. Van de Wouwer, et al. (2002). "The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways." J Exp Med **196**(5): 565-577.
- Diaz, L. A., Jr., C. M. Coughlin, et al. (2015). "A First-in-Human Phase I Study of MORAb-004, a Monoclonal Antibody to Endosialin in Patients with Advanced Solid Tumors." Clin Cancer Res **21**(6): 1281-1288.
- Duffield, J. S. (2014). "Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis." J Clin Invest **124**(6): 2299-2306.
- Eddy, A. A. (2005). "Progression in chronic kidney disease." Adv Chronic Kidney Dis **12**(4): 353-365.
- Fassett, R. G., S. K. Venuthurupalli, et al. (2011). "Biomarkers in chronic kidney disease: a review." Kidney Int **80**(8): 806-821.
- Floege, J. and G. Schlieper (2013). "Chronic kidney disease: How effective and safe are antiplatelet agents in CKD?" Nat Rev Nephrol **9**(6): 314-316.
- Friedman, S. L., D. Sheppard, et al. (2013). "Therapy for fibrotic diseases: nearing the starting line." Sci Transl Med **5**(167): 167sr161.
- Fujimura, T., Y. Kambayashi, et al. (2014). "A possible mechanism in the recruitment of eosinophils and Th2 cells through CD163(+) M2 macrophages in the lesional skin of eosinophilic cellulitis." Eur J Dermatol **24**(2): 180-185.
- Gong, R., A. Rifai, et al. (2004). "Hepatocyte growth factor ameliorates renal interstitial inflammation in rat remnant kidney by modulating tubular expression of macrophage chemoattractant protein-1 and RANTES." J Am Soc Nephrol **15**(11):



2868-2881.

Gordan, J. D., J. A. Bertout, et al. (2007). "HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity." Cancer Cell **11**(4): 335-347.

Greenlee, M. C., S. A. Sullivan, et al. (2008). "CD93 and related family members: their role in innate immunity." Curr Drug Targets **9**(2): 130-138.

Gunaratnam, L. and J. V. Bonventre (2009). "HIF in kidney disease and development." J Am Soc Nephrol **20**(9): 1877-1887.

Hardie, D. L., M. J. Baldwin, et al. (2011). "The stromal cell antigen CD248 (endosialin) is expressed on naive CD8+ human T cells and regulates proliferation." Immunology **133**(3): 288-295.

Henderson, N. C., A. C. Mackinnon, et al. (2008). "Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis." Am J Pathol **172**(2): 288-298.

Henderson, N. C., A. C. Mackinnon, et al. (2006). "Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(13): 5060-5065.

Hewitson, T. D. (2009). "Renal tubulointerstitial fibrosis: common but never simple." Am J Physiol Renal Physiol **296**(6): F1239-1244.

Himmelfarb, J. and K. R. Tuttle (2013). "New therapies for diabetic kidney disease." N Engl J Med **369**(26): 2549-2550.

Hsu, D. K., R. Y. Yang, et al. (2000). "Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses." Am J Pathol **156**(3): 1073-1083.

Huang, H. P., C. L. Hong, et al. (2011). "Gene targeting and expression analysis of mouse Tem1/endosialin using a lacZ reporter." Gene Expr Patterns **11**(5-6):

316-326.

Inoue, T., S. Fujishima, et al. (2004). "CCL22 and CCL17 in rat radiation pneumonitis and in human idiopathic pulmonary fibrosis." Eur Respir J **24**(1): 49-56.

Jenkins, S. J., D. Ruckerl, et al. (2011). "Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation." Science **332**(6035): 1284-1288.

Kumar, R., P. J. Tebben, et al. (2012). "Vitamin D and the kidney." Arch Biochem Biophys **523**(1): 77-86.

Kurts, C., U. Panzer, et al. (2013). "The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications." Nat Rev Immunol **13**(10): 738-753.

Lacombe, C., J. L. Da Silva, et al. (1991). "Erythropoietin: sites of synthesis and regulation of secretion." Am J Kidney Dis **18**(4 Suppl 1): 14-19.

Lan, H. Y. (2011). "Diverse roles of TGF-beta/Smads in renal fibrosis and inflammation." Int J Biol Sci **7**(7): 1056-1067.

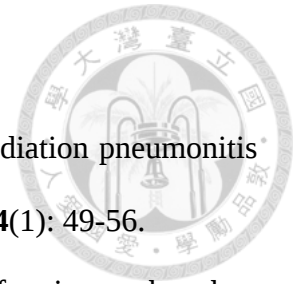
Lee, J., C. Moon, et al. (2009). "Immunohistochemical localization of galectin-3 in the granulomatous lesions of paratuberculosis-infected bovine intestine." J Vet Sci **10**(3): 177-180.

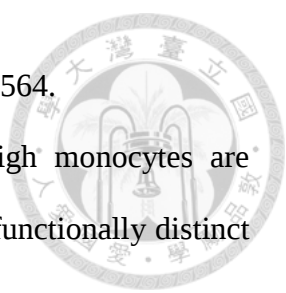
Lee, S., S. Huen, et al. (2011). "Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair." J Am Soc Nephrol **22**(2): 317-326.

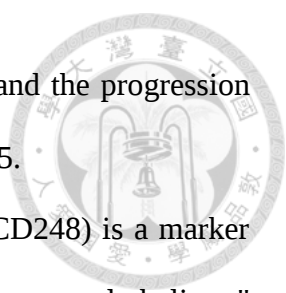
Levey, A. S., J. Coresh, et al. (2003). "National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification." Ann Intern Med **139**(2): 137-147.

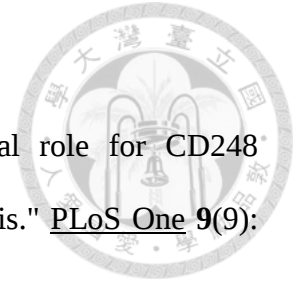
Li, R. X., W. H. Yiu, et al. (2015). "Role of bone morphogenetic protein-7 in renal fibrosis." Front Physiol **6**: 114.

Lichtnekert, J., T. Kawakami, et al. (2013). "Changes in macrophage phenotype as the



- 
- immune response evolves." Curr Opin Pharmacol **13**(4): 555-564.
- Lin, S. L., A. P. Castano, et al. (2009). "Bone marrow Ly6Chigh monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations." J Immunol **183**(10): 6733-6743.
- Lin, S. L., F. C. Chang, et al. (2011). "Targeting endothelium-pericyte cross talk by inhibiting VEGF receptor signaling attenuates kidney microvascular rarefaction and fibrosis." Am J Pathol **178**(2): 911-923.
- Lin, S. L., T. Kisseleva, et al. (2008). "Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney." Am J Pathol **173**(6): 1617-1627.
- Lin, S. L., B. Li, et al. (2010). "Macrophage Wnt7b is critical for kidney repair and regeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(9): 4194-4199.
- Lin, S. L. D., J.S. (2012). "Macrophages in Kidney Injury and Repair." Acta Nephrologica **26**(2): 45-57.
- Liu, F. T., D. K. Hsu, et al. (1995). "Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages." Am J Pathol **147**(4): 1016-1028.
- Liu, F. T., R. Y. Yang, et al. (2012). "Galectins in acute and chronic inflammation." Ann N Y Acad Sci **1253**: 80-91.
- Liu, Y. (2006). "Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics." Kidney Int **69**(2): 213-217.
- Liu, Y. (2011). "Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis." Nat Rev Nephrol **7**(12): 684-696.
- Liu, Y. and J. Yang (2006). "Hepatocyte growth factor: new arsenal in the fights against renal fibrosis?" Kidney Int **70**(2): 238-240.

- 
- Loeffler, I. and G. Wolf (2014). "Transforming growth factor-beta and the progression of renal disease." Nephrol Dial Transplant **29 Suppl 1**: i37-i45.
- MacFadyen, J. R., O. Haworth, et al. (2005). "Endosialin (TEM1, CD248) is a marker of stromal fibroblasts and is not selectively expressed on tumour endothelium." FEBS Lett **579**(12): 2569-2575.
- MacKinnon, A. C., S. L. Farnworth, et al. (2008). "Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3." J Immunol **180**(4): 2650-2658.
- Maeda, N., N. Kawada, et al. (2003). "Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways." J Biol Chem **278**(21): 18938-18944.
- Maia, M., A. de Vriese, et al. (2010). "CD248 and its cytoplasmic domain: a therapeutic target for arthritis." Arthritis Rheum **62**(12): 3595-3606.
- Maia, M., A. DeVriese, et al. (2011). "CD248 facilitates tumor growth via its cytoplasmic domain." BMC Cancer **11**: 162.
- Markowska, A. I., K. C. Jefferies, et al. (2011). "Galectin-3 protein modulates cell surface expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 in human endothelial cells." J Biol Chem **286**(34): 29913-29921.
- Mogler, C., M. Wieland, et al. (2015). "Hepatic stellate cell-expressed endosialin balances fibrogenesis and hepatocyte proliferation during liver damage." EMBO Mol Med **7**(3): 332-338.
- Nanda, A., B. Karim, et al. (2006). "Tumor endothelial marker 1 (Tem1) functions in the growth and progression of abdominal tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(9): 3351-3356.
- Naylor, A. J., E. Azzam, et al. (2012). "The mesenchymal stem cell marker CD248 (endosialin) is a negative regulator of bone formation in mice." Arthritis Rheum



64(10): 3334-3343.

Naylor, A. J., H. M. McGettrick, et al. (2014). "A differential role for CD248 (Endosialin) in PDGF-mediated skeletal muscle angiogenesis." PLoS One **9**(9): e107146.

Ohradanova, A., K. Gradin, et al. (2008). "Hypoxia upregulates expression of human endosialin gene via hypoxia-inducible factor 2." Br J Cancer **99**(8): 1348-1356.

Opavsky, R., P. Haviernik, et al. (2001). "Molecular characterization of the mouse Tem1/endosialin gene regulated by cell density in vitro and expressed in normal tissues in vivo." J Biol Chem **276**(42): 38795-38807.

Palmer, S. C., J. C. Craig, et al. (2012). "Benefits and harms of statin therapy for persons with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis." Ann Intern Med **157**(4): 263-275.

Palmer, S. C., L. Di Micco, et al. (2013). "Antiplatelet agents for chronic kidney disease." Cochrane Database Syst Rev **2**: CD008834.

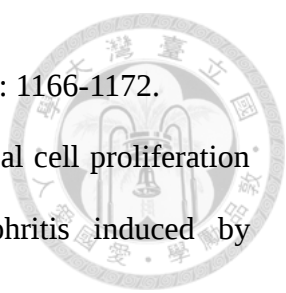
Rabinovich, G. A. and M. A. Toscano (2009). "Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation." Nat Rev Immunol **9**(5): 338-352.

Ren, S. and J. S. Duffield (2013). "Pericytes in kidney fibrosis." Curr Opin Nephrol Hypertens **22**(4): 471-480.

Rettig, W. J., P. Garin-Chesa, et al. (1992). "Identification of endosialin, a cell surface glycoprotein of vascular endothelial cells in human cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(22): 10832-10836.

Ricardo, S. D., H. van Goor, et al. (2008). "Macrophage diversity in renal injury and repair." J Clin Invest **118**(11): 3522-3530.

Robbins, C. S., I. Hilgendorf, et al. (2013). "Local proliferation dominates lesional

- 
- macrophage accumulation in atherosclerosis." Nat Med **19**(9): 1166-1172.
- Sasaki, S., Q. Bao, et al. (1999). "Galectin-3 modulates rat mesangial cell proliferation and matrix synthesis during experimental glomerulonephritis induced by anti-Thy1.1 antibodies." J Pathol **187**(4): 481-489.
- Sharma, K., J. H. Ix, et al. (2011). "Pirfenidone for diabetic nephropathy." J Am Soc Nephrol **22**(6): 1144-1151.
- Smith, S. W., K. S. Eardley, et al. (2011). "CD248+ stromal cells are associated with progressive chronic kidney disease." Kidney Int **80**(2): 199-207.
- Soma, J., K. Sato, et al. (2006). "Effect of tranilast in early-stage diabetic nephropathy." Nephrol Dial Transplant **21**(10): 2795-2799.
- Soma, J., T. Sugawara, et al. (2002). "Tranilast slows the progression of advanced diabetic nephropathy." Nephron **92**(3): 693-698.
- St Croix, B., C. Rago, et al. (2000). "Genes expressed in human tumor endothelium." Science **289**(5482): 1197-1202.
- Stenvinkel, P. (2010). "Chronic kidney disease: a public health priority and harbinger of premature cardiovascular disease." J Intern Med **268**(5): 456-467.
- Stillman, B. N., D. K. Hsu, et al. (2006). "Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death." J Immunol **176**(2): 778-789.
- Straussman, R., T. Morikawa, et al. (2012). "Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion." Nature **487**(7408): 500-504.
- Suresh Babu, S., Y. Valdez, et al. (2014). "TGFbeta-mediated suppression of CD248 in non-cancer cells via canonical Smad-dependent signaling pathways is uncoupled in cancer cells." BMC Cancer **14**: 113.

Throckmorton, D. C., A. P. Brogden, et al. (1995). "PDGF and TGF-beta mediate collagen production by mesangial cells exposed to advanced glycosylation end products." Kidney Int **48**(1): 111-117.

Tomino, Y. (2014). "Pathogenesis and treatment of chronic kidney disease: a review of our recent basic and clinical data." Kidney Blood Press Res **39**(5): 450-489.

Tomkowicz, B., K. Rybinski, et al. (2007). "Interaction of endosialin/TEM1 with extracellular matrix proteins mediates cell adhesion and migration." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(46): 17965-17970.

Tomkowicz, B., K. Rybinski, et al. (2010). "Endosialin/TEM-1/CD248 regulates pericyte proliferation through PDGF receptor signaling." Cancer Biol Ther **9**(11): 908-915.

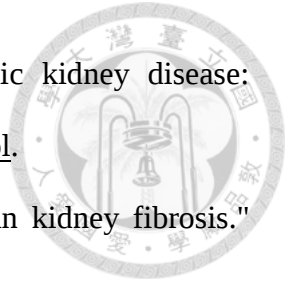
Valdez, Y., M. Maia, et al. (2012). "CD248: reviewing its role in health and disease." Curr Drug Targets **13**(3): 432-439.

Van de Wouwer, M., D. Collen, et al. (2004). "Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(8): 1374-1383.

Van Dyken, S. J. and R. M. Locksley (2013). "Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease." Annu Rev Immunol **31**: 317-343.

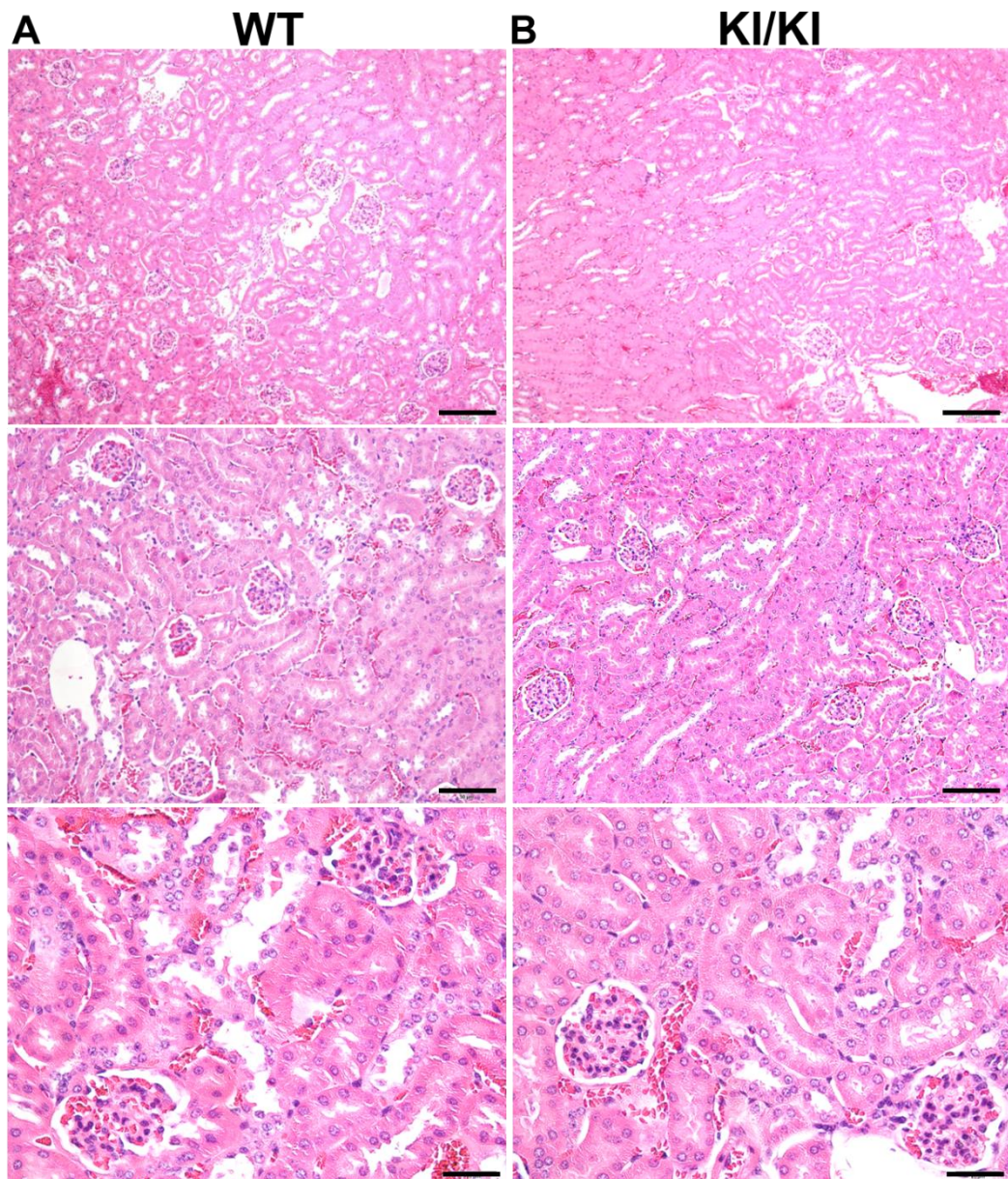
Van Gassen, N., E. Van Overmeire, et al. (2015). "Macrophage dynamics are regulated by local macrophage proliferation and monocyte recruitment in injured pancreas." Eur J Immunol **45**(5): 1482-1493.

Venkatachalam, M. A., K. A. Griffin, et al. (2010). "Acute kidney injury: a springboard for progression in chronic kidney disease." Am J Physiol Renal Physiol **298**(5): F1078-1094.

- 
- Wouters, O. J., D. J. O'Donoghue, et al. (2015). "Early chronic kidney disease: diagnosis, management and models of care." Nat Rev Nephrol.
- Yanagita, M. (2012). "Inhibitors/antagonists of TGF-beta system in kidney fibrosis." Nephrol Dial Transplant **27**(10): 3686-3691.
- Yata, Y., A. Scanga, et al. (2003). "DNase I-hypersensitive sites enhance alpha1(I) collagen gene expression in hepatic stellate cells." Hepatology **37**(2): 267-276.
- Zeisberg, M., J. Hanai, et al. (2003). "BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury." Nat Med **9**(7): 964-968.
- Zhong, L., X. Wang, et al. (2013). "The anti-fibrotic effect of bone morphogenic protein-7(BMP-7) on liver fibrosis." Int J Med Sci **10**(4): 441-450.



圖



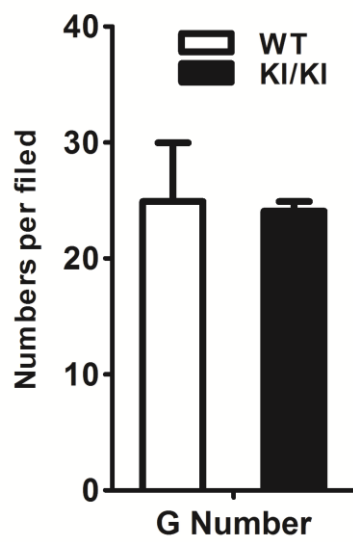


圖一、野生型小鼠及 KI/KI 小鼠腎臟組織切片結構

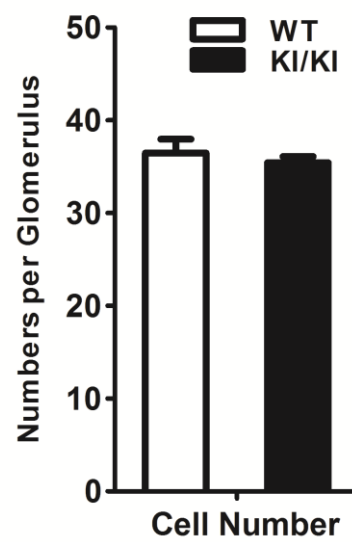
圖 A 和 B 分別為野生型小鼠以及 KI/KI 小鼠出生後 80 天之腎臟切片染色圖，利用 H&E 染色觀察野生型小鼠及基因剔除鼠組織結構上是否有差異。依放大倍率排序，上圖為 X 100 放大圖，scale bar 為 100 μm ；中圖為 X 200 放大圖，scale bar 為 50 μm ；下圖為 X400 放大圖，scale bar 為 25 μm 。觀察腎小管及腎絲球的組成，野生型及 KI/KI 小鼠並無明顯差異。WT：野生型小鼠，KI/KI：*Endosialin-LacZ* homozygous KI 小鼠，同時代表 *Endosialin* 基因剔除小鼠。



A



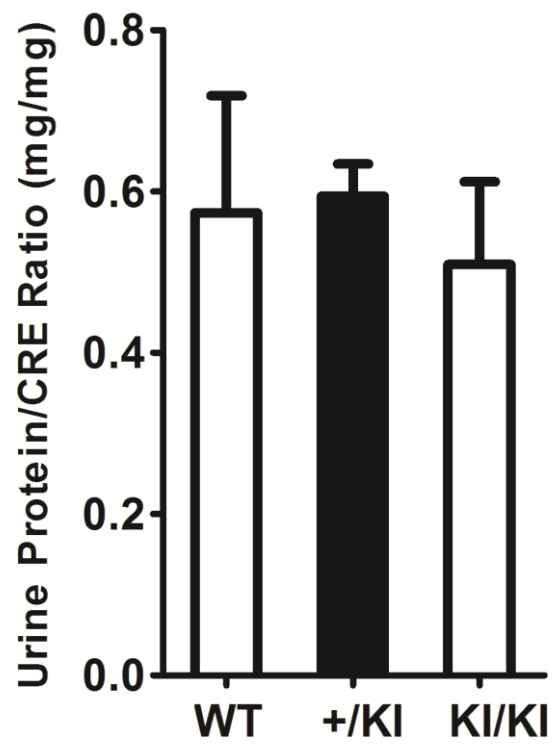
B





圖二、野生型小鼠及 KI/KI 小鼠之腎絲球及細胞組成數目統計

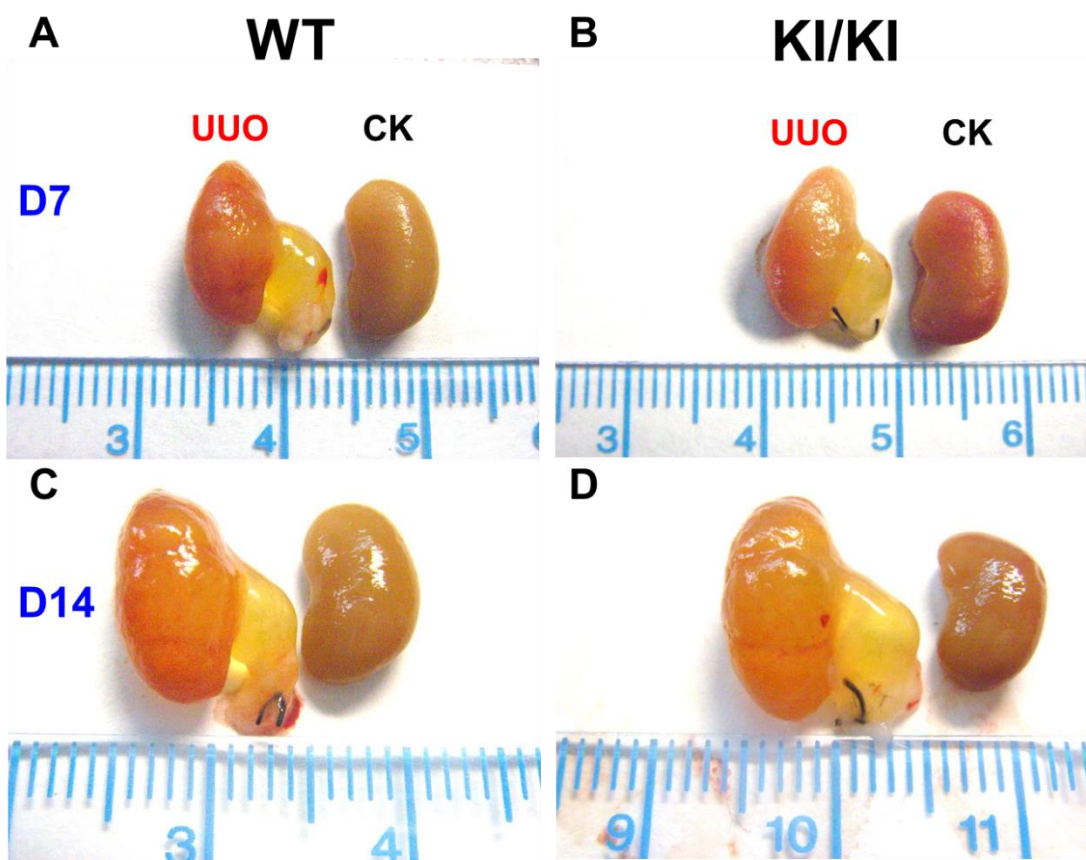
圖 A：以 40 倍放大視野為基準，分別計數野生型小鼠以及 KI/KI 小鼠出生後 80 天之腎臟，每個腎臟約有 5-8 個視野，估算平均視野裡腎絲球的數目。圖 B：以 200 倍放大視野為基準，分別計數野生型小鼠以及 KI/KI 小鼠出生後 80 天之腎臟，每個腎臟約計數 10-15 個視野，估算平均視野腎絲球裡的細胞數目。每種基因型為 6 隻小鼠，實驗結果為平均值 $\pm$ 標準誤 (Mean $\pm$ S.E.M)。





圖三、野生型小鼠及 KI/KI 小鼠之腎功能評估

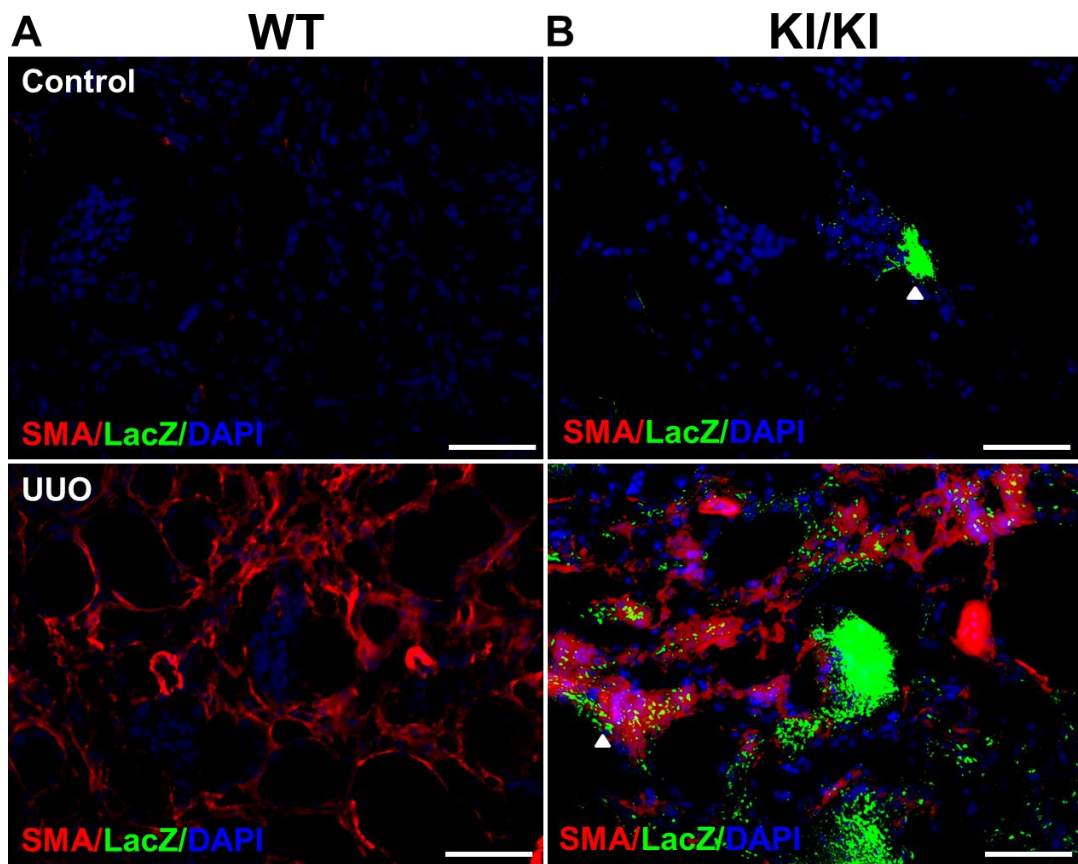
圖為小鼠尿液中蛋白質濃度與 Creatinine (CRE) 濃度之比值，單位為 mg/mg。利用代謝籠收集小鼠 24 小時的尿液後，以試劑組偵測尿液中蛋白質濃度以及 CRE 濃度，並且以 CRE 作為基準估算出蛋白質與 CRE 的比值。每種基因型為 6 隻小鼠，實驗結果為平均值 $\pm$ 標準差。 $+/KI$: *Endosialin-LacZ* Heterozygous KI 小鼠。





圖四、單側輸尿管結紮 (UUO) 腎臟以及對照組腎臟之外觀

圖 A 和 C 分別為野生型小鼠手術後 7 天及 14 天之腎臟，左側為 UUO 腎臟，右側為對照組腎臟 (Control kidney, CK)。圖 B 和 D 則是 KI/KI 小鼠腎臟。利用手術縫合線將左側腎臟輸尿管進行結紮，右側腎臟為對照組腎臟，術後 7 天可觀察到腎臟的膨脹，外表較對照組腎臟粗糙。術後 14 天腎臟明顯膨脹且充滿尿液，組織內部明顯萎縮造成外表變薄。野生型小鼠及 KI/KI 小鼠手術方式及術後觀察外觀並無差異。



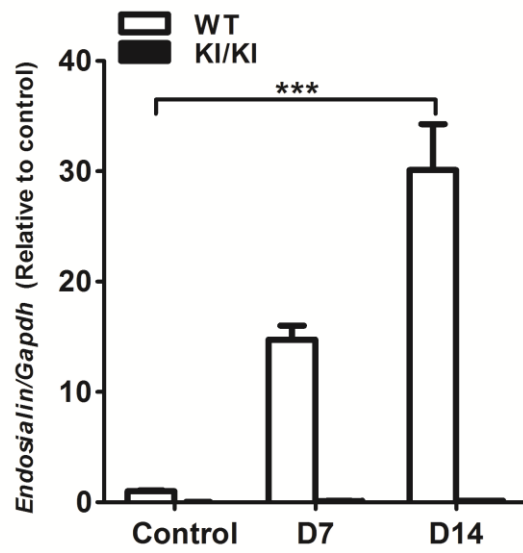


圖五、以 LacZ 染色以及免疫螢光染色偵測 endosialin 表達之細胞

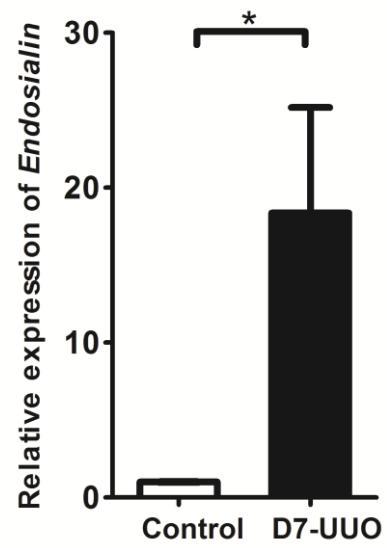
圖 A 和 B 分別為野生型小鼠及 KI/KI 小鼠手術後 14 天之腎臟，上圖為對照組腎臟，下圖為 UUO 腎臟。利用免疫螢光染色表示不同的蛋白質抗原，紅色螢光偵測 α -SMA 表示肌纖維母細胞；藍色螢光則是 DAPI，表示細胞核。同時使用 LacZ 染色偵測 *Endosialin* 的表達，利用綠色套色代表 LacZ 染色 positive 區域，為 *Endosialin* 的表達細胞；白色箭號表示 *endosialin* 表達的區域細胞。野生型小鼠不俱 LacZ，因此無法偵測 *endosialin*，但手術後會大量激活間質中的肌纖維母細胞，及紅色 α -SMA 的區域。在 KI/KI 小鼠對照組腎臟中發現，*endosialin* 表達在腎絲球裡，而手術後也可偵測 LacZ 在間質肌纖維母細胞大量表現。圖中 Scale bar 為 50 μ m。LacZ : β -galactosidase, α -SMA : α -smooth muscle actin。



A



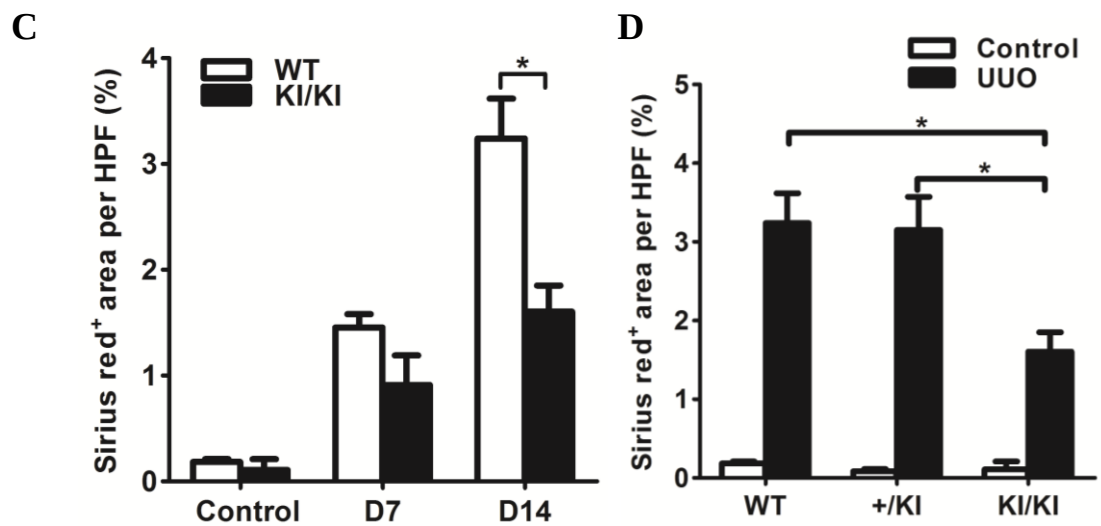
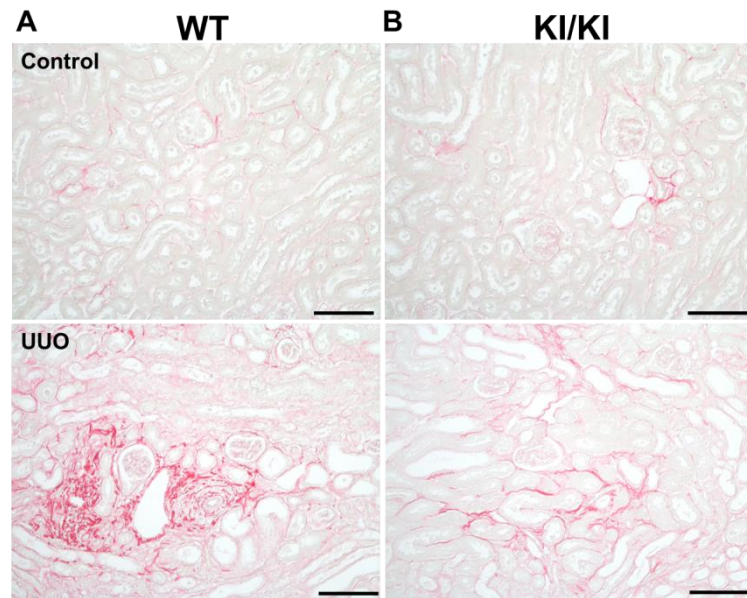
B





圖六、*Endosialin* mRNA 在慢性腎病模式中的表達量

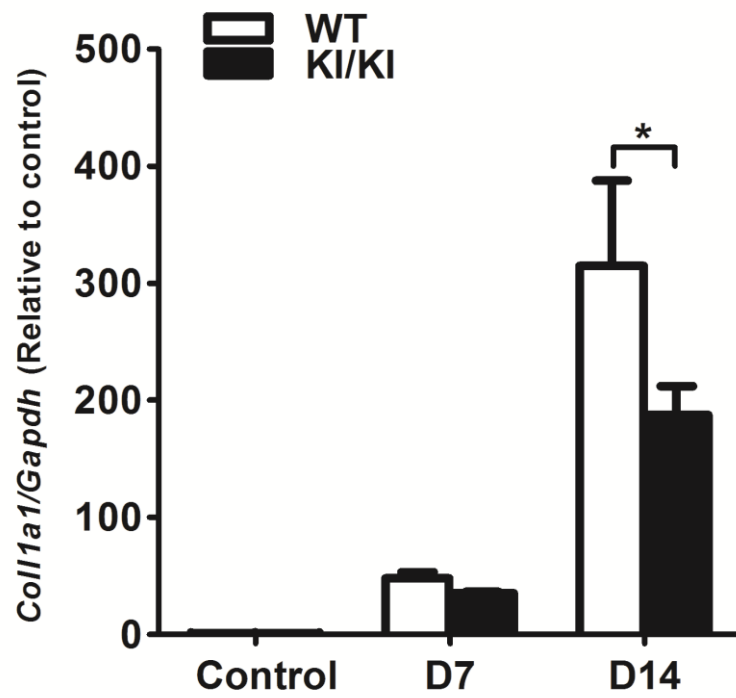
圖 A 比較 *Endosialin* 在野生型小鼠和 KI/KI 小鼠在不同天數 UUO 誘導後的表現量，並以野生型小鼠對照組腎臟表現為基準，計算出相對表現倍數，每個組別為 10 隻小鼠。圖 B 呈現 *COLA1-GFP* 轉殖小鼠經 UUO 誘導慢性腎病 7 天後，膠原蛋白製造細胞 (Collogen-producing cells) 的 *Endosialin* 表現量，每個組別為 6 隻小鼠。利用流式細胞儀分選出 GFP positive 細胞表示為膠原蛋白製造細胞，並且偵測 *Endosialin* 的表現。所有實驗之內源性對照基因為 *Gapdh*，實驗結果呈現為平均值 $\pm$ 標準誤。 $*P<0.05$ ， $***P<0.001$ 。





圖七、以 Picosirius Red 染色偵測膠原蛋白在腎臟累積之情形

圖 A 和 B 分別為野生型小鼠以及 KI/KI 小鼠在第 14 天數 UUO 誘導後 Picosirius Red 的染色結果，深紅色表示膠原蛋白堆積處。上圖為對照組腎臟，下圖則是 UUO 誘導之腎臟，scale bar 為 100 μ m。圖 C 則是以 100 倍視野為基準，並以分析軟體定量膠原蛋白質所佔視野之比例結果，每個腎臟約有 15-20 個視野取平均為代表值，圖為各組間的平均值。圖 D 則是三種基因型在第 14 天數 UUO 誘導後 Picosirius Red 的染色定量結果，每種基因型為 10 隻小鼠，實驗結果為平均值 $\pm$ 標準誤。 $*P<0.05$ 。

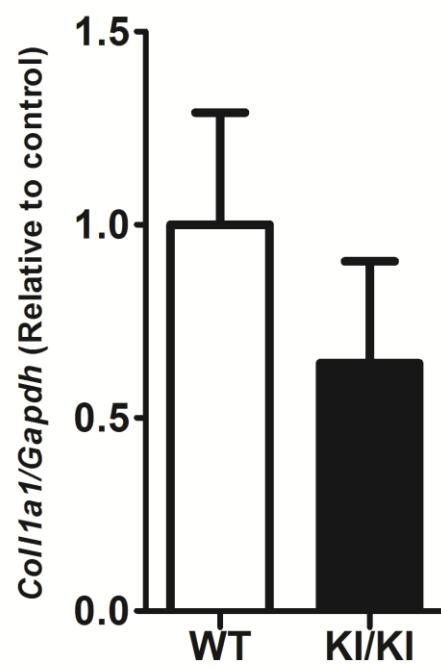




圖八、膠原蛋白 mRNA 在慢性腎病模式中的表達量

比較膠原蛋白在野生型小鼠和 KI/KI 小鼠在不同天數 UUO 誘導後的表現量，並以野生型小鼠對照組腎臟表現為基準，計算出相對表現倍數，每個組別為 10 隻小鼠。所有實驗之內源性對照基因為 *Gapdh*，實驗結果呈現為平均值 $\pm$ 標準誤。

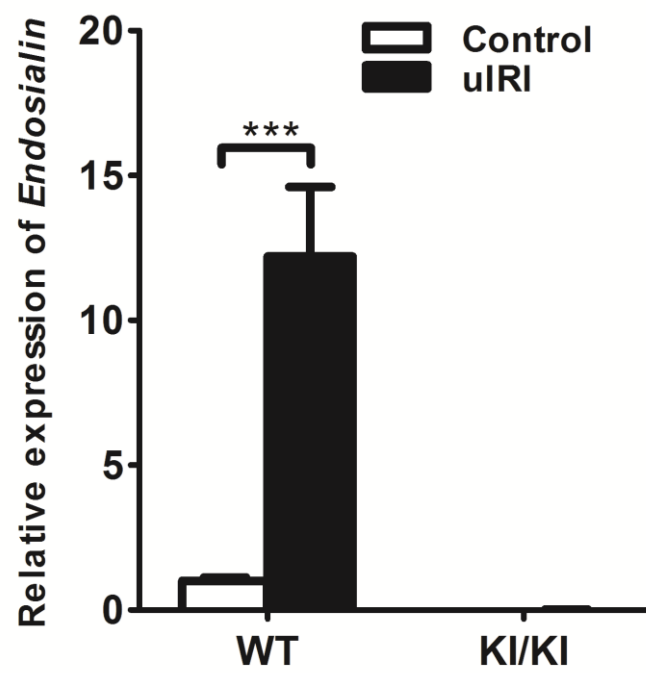
* $P < 0.05$ ，*** $P < 0.001$ 。





圖九、膠原蛋白 mRNA 在兩種小鼠之膠原蛋白製造細胞的表達量

比較膠原蛋白在野生型小鼠和 KI/KI 小鼠之膠原蛋白製造細胞的表現量。將 *Endosialin-LacZ* KI 小鼠與 *Coll-GFP* 轉殖小鼠互相交配得到 *Endosialin-LacZ-COLA1-GFP* 小鼠，將 UUO 誘導後 7 天之 WT-GFP 和 KI/KI-GFP 小鼠，以流式細胞儀分選出為膠原蛋白製造細胞，並且比較 WT-GFP 和 KI/KI-GFP 細胞之膠原蛋白表現量，每種基因型為 3 隻小鼠。*Coll1a1*：第一型膠原蛋白，所有實驗之內源性對照基因為 *Gapdh*，實驗結果呈現為平均值 $\pm$ 標準誤。

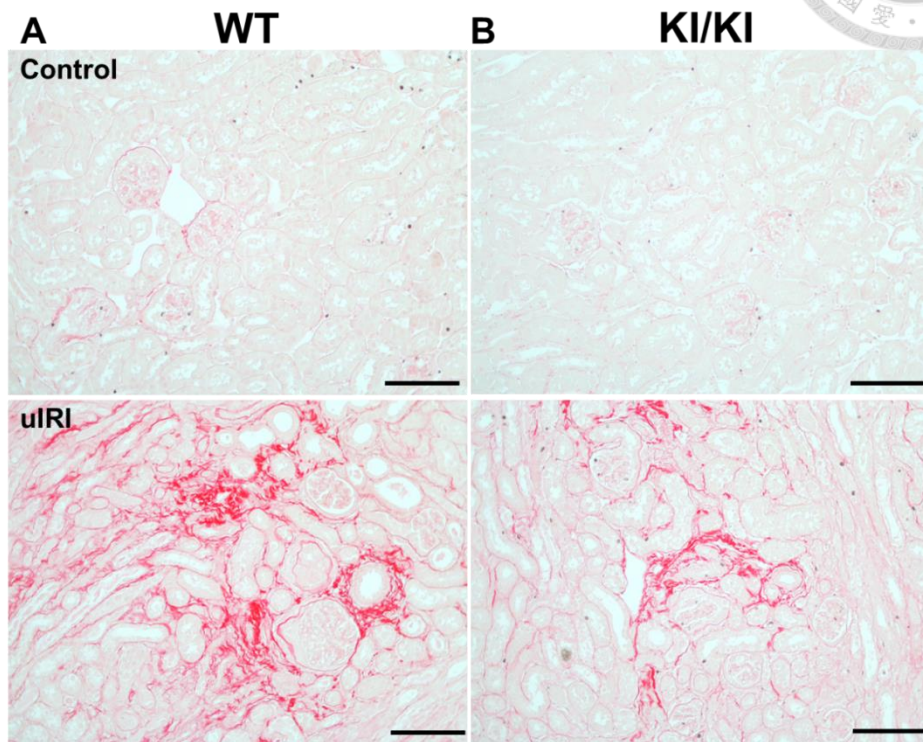




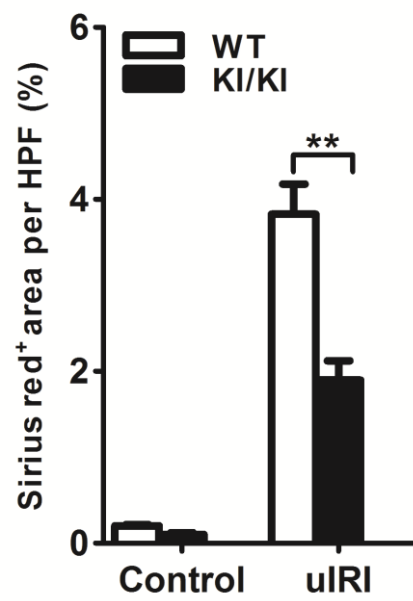
圖十、比較野生型及 KI/KI 小鼠在 uIRI 模式中 *Endosialin* 的表現

比較 *Endosialin* 在野生型小鼠和 KI/KI 小鼠在 uIRI 誘導後 14 天的表現量，並以野生型小鼠對照組腎臟表現為基準，計算出相對表現倍數，每個組別為 5 隻小鼠。所有實驗之內源性對照基因為 *Gapdh*，實驗結果呈現為平均值 $\pm$ 標準誤。

*** $P < 0.001$ 。



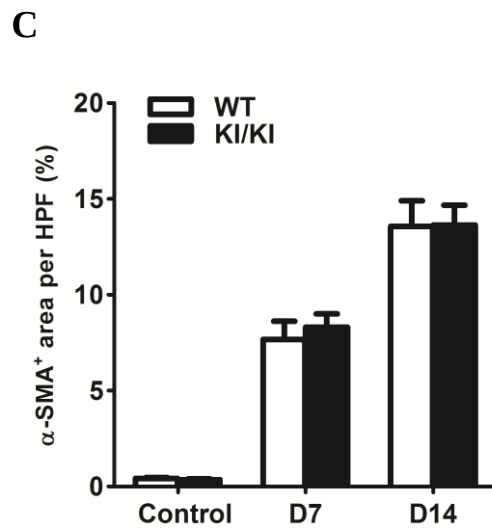
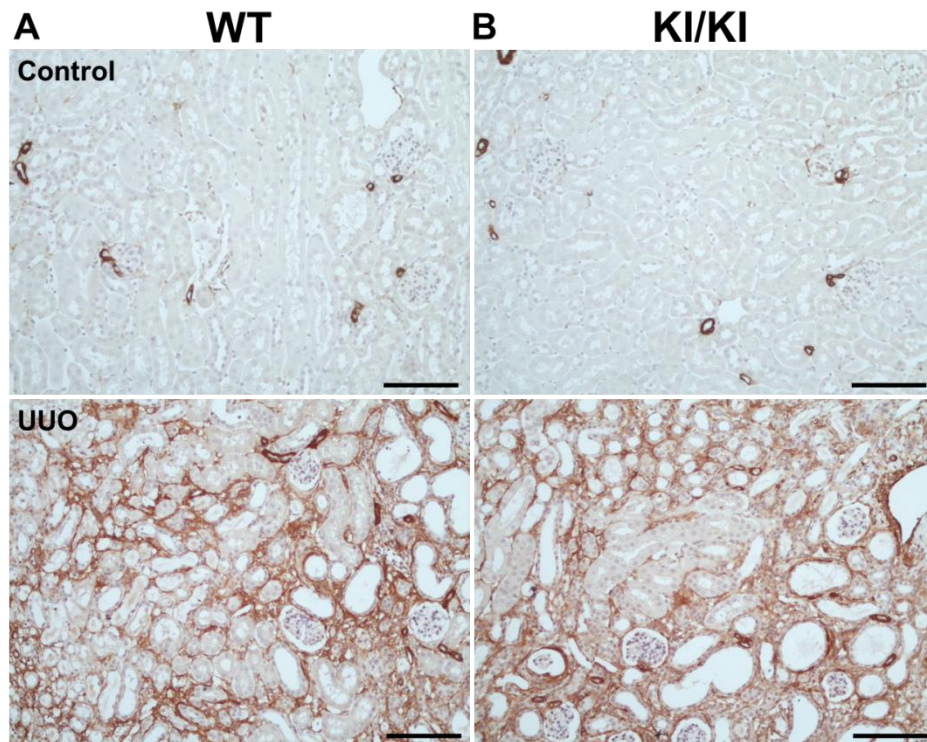
C





圖十一、比較野生型及 KI/KI 小鼠在 uIRI 模式中膠原蛋白累積之情形

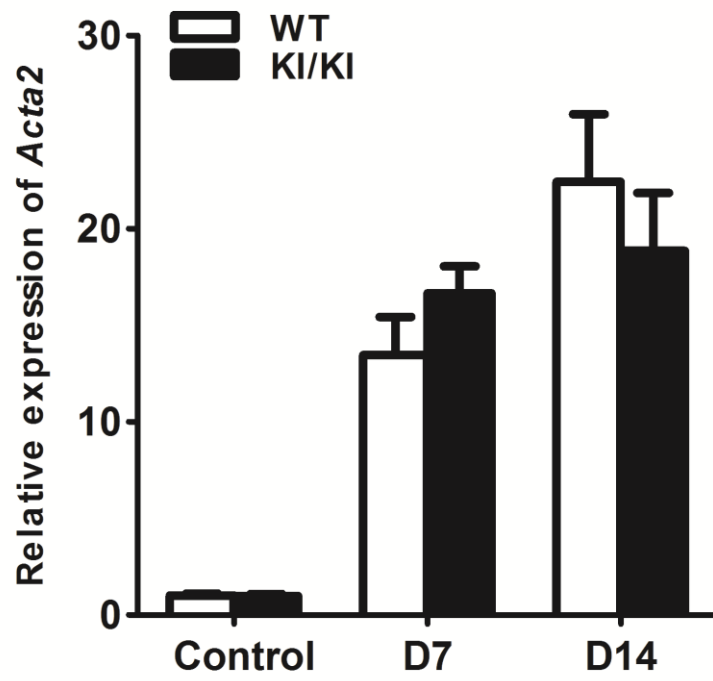
圖 A 和 B 分別為野生型小鼠以及 KI/KI 小鼠在第 14 天數 uIRI 誘導後 Picosirius Red 的染色結果，深紅色表示膠原蛋白堆積處。上圖為對照組腎臟，下圖則是 UUO 誘導之腎臟，scale bar 為 100 μ m。圖 C 則是以 100 倍視野為基準，並以分析軟體定量膠原蛋白質所佔視野之比例結果，每個腎臟約有 15-20 個視野取平均為代表值，圖為各組間的平均值。每種基因型為 5 隻小鼠，實驗結果為平均值 $\pm$ 標準誤。 $**P<0.01$ 。





圖十二、比較野生型小鼠及 KI/KI 小鼠在慢性腎病模式之肌纖維母細胞

利用 α -SMA 免疫組織染色偵測肌纖維母細胞含量，圖 A 和 B 分別為野生型小鼠和 KI/KI 小鼠不同組別之染色結果，上圖為對照組腎臟，下圖為 UUO 腎臟。圖 C 則是以 100 倍視野為基準，並以分析軟體定量 α -SMA 所佔視野之比例結果，每個腎臟約有 15-20 個視野取平均為代表值，圖為各組間的平均值。每種基因型為 10 隻小鼠，實驗結果為平均值 $\pm$ 標準誤，scale bar 為 100 μ m。

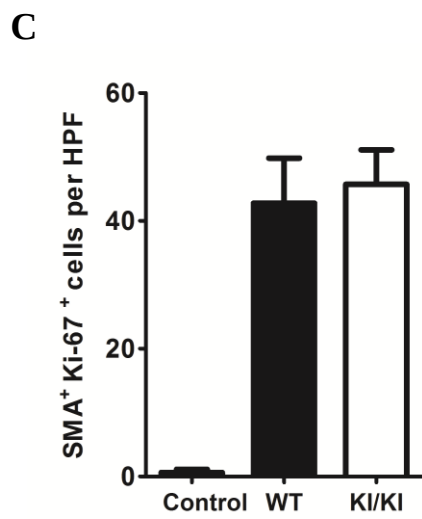
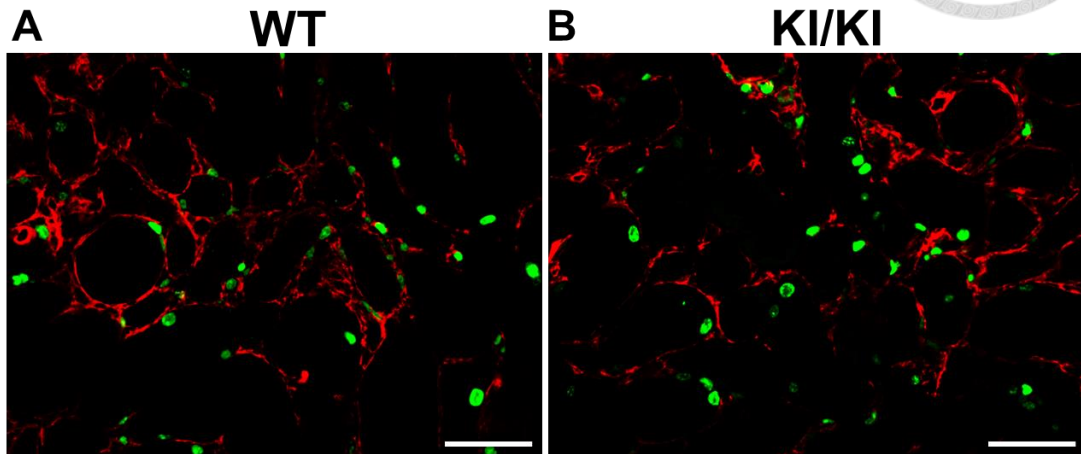




圖十三、比較野生型及 KI/KI 小鼠在 UUO 模式中 *Acta2* mRNA 的表現

比較 *Acta2* 在野生型小鼠和 KI/KI 小鼠在不同天數 UUO 誘導後的表現量，並以野生型小鼠對照組腎臟表現為基準，計算出相對表現倍數，每個組別為 10 隻小鼠。所有實驗之內源性對照基因為 *Gapdh*，實驗結果呈現為平均值 $\pm$ 標準誤。

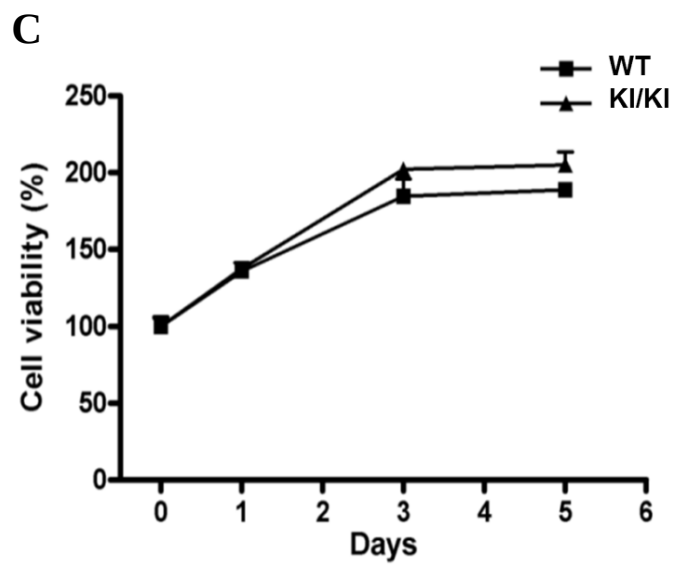
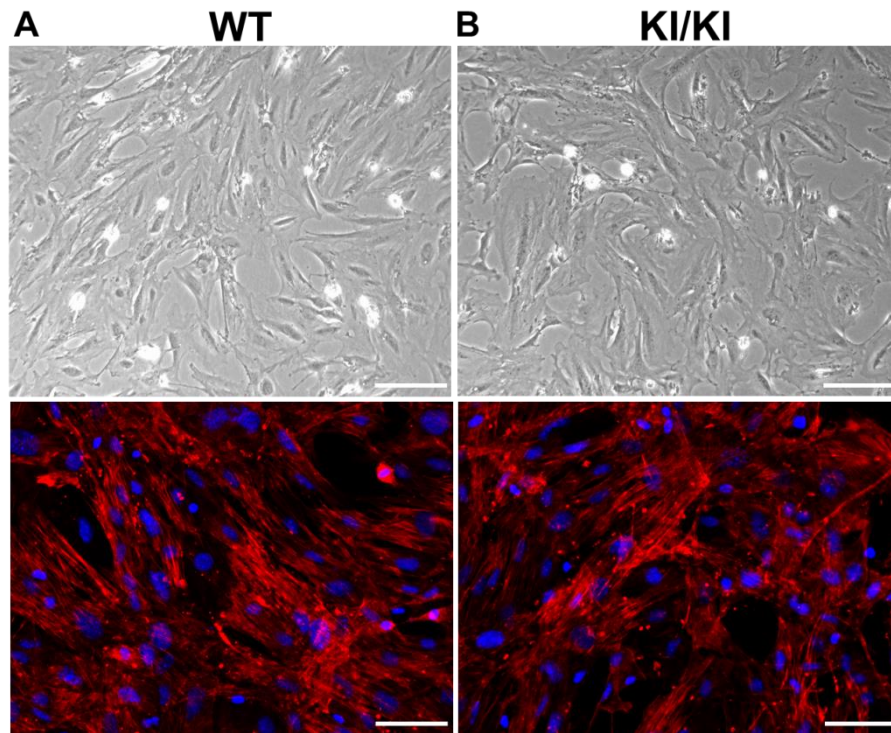
*** $P < 0.001$ 。Acta2: α -SMA 基因名。





圖十四、比較野生型小鼠及 KI/KI 小鼠肌纖維母細胞之增生能力

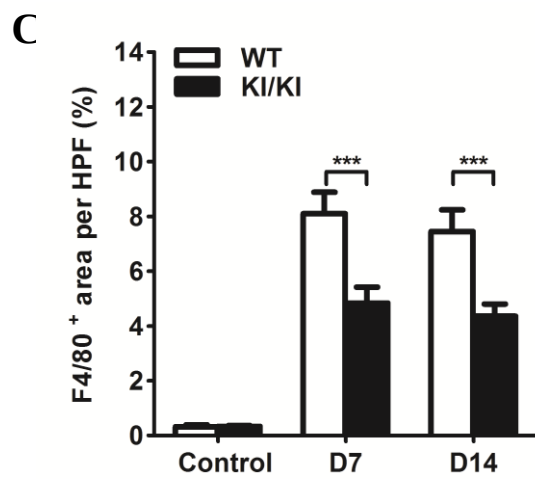
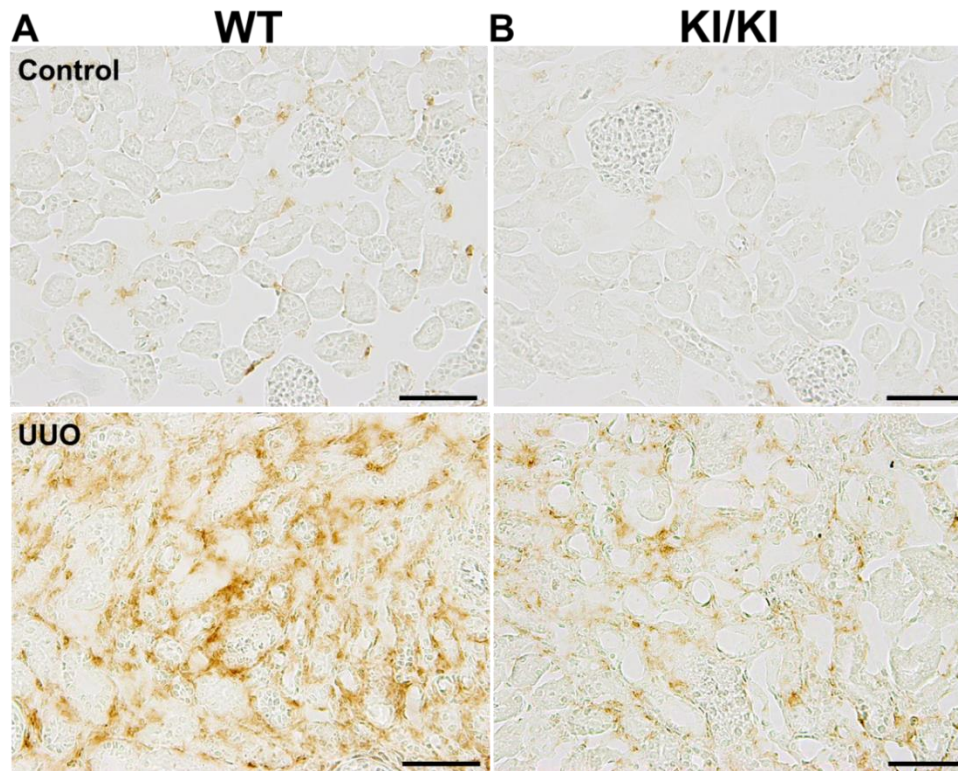
利用 α -SMA 和 Ki-67 免疫螢光染色偵測肌纖維母細胞的增生。圖 A 和 B 分別為野生型小鼠和 KI/KI 小鼠之染色結果，紅色螢光偵測 α -SMA 表示肌纖維母細胞；綠色則是 Ki-67 positive 細胞核，代表正在增生的細胞。圖 C 則是以 100 倍視野為基準，並以計數每個視野 SMA 和 Ki67 double positive 的細胞數目，每個腎臟約有 15-20 個視野取平均為代表值，圖為不同組別各自的平均結果。每種基因型為 6 隻小鼠，實驗結果為平均值 $\pm$ 標準誤。





圖十五、體外培養野生型小鼠及 KI/KI 小鼠肌纖維母細胞

體外培養肌纖維母細胞並比較增生能力。圖 A 和 B 上圖分別為野生型小鼠和 KI/KI 之肌纖維母細胞一般視野，下圖則是免疫螢光圖，紅色螢光偵測 α -SMA 表示肌纖維母細胞；DAPI，藍色代表細胞核。圖 C 則是以 MTT assay 比較兩種細胞的增生情形。每種基因型 n 值為 3，實驗結果為平均值 $\pm$ 標準誤。



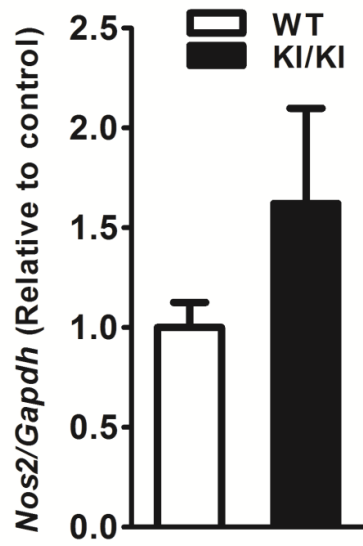


圖十六、比較野生型小鼠及 KI/KI 小鼠在慢性腎病模式之巨噬細胞數目

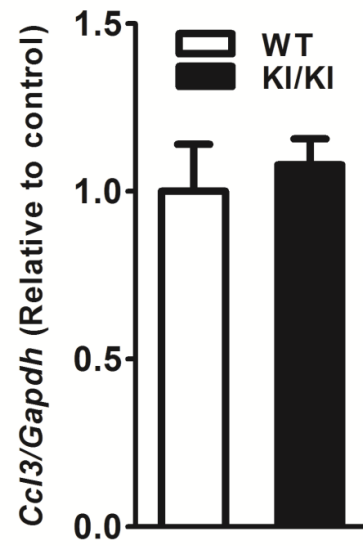
利用 F4/80 免疫組織染色偵測巨噬細胞含量，圖 A 和 B 分別為野生型小鼠和 KI/KI 小鼠不同組別之染色結果，上圖為對照組腎臟，下圖為 UUO 腎臟。圖 C 則是以 100 倍視野為基準，並以分析軟體定量 F4/80 所佔視野之比例結果，每個腎臟約有 15-20 個視野取平均為代表值，圖為各組間的平均值。每種基因型為 10 隻小鼠，實驗結果為平均值 $\pm$ 標準誤，scale bar 為 100 μ m。*** $P < 0.001$ 。



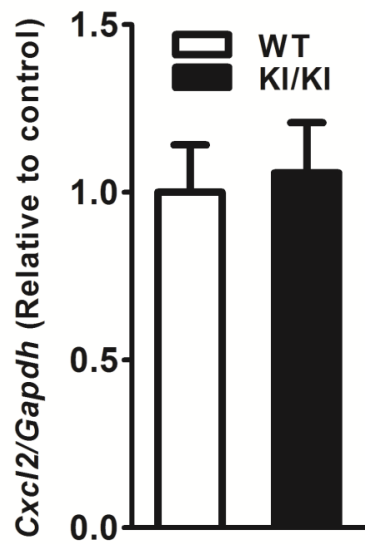
A



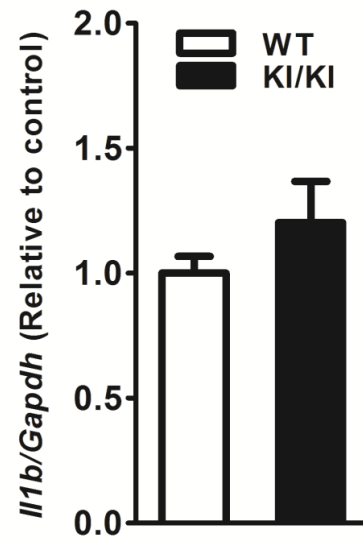
B



C



D



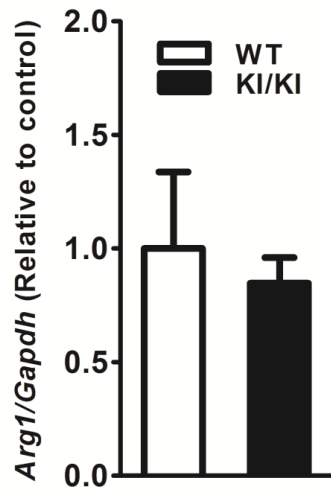


圖十七、比較野生型小鼠及 KI/KI 巨噬細胞在 M1 基因的表現情形

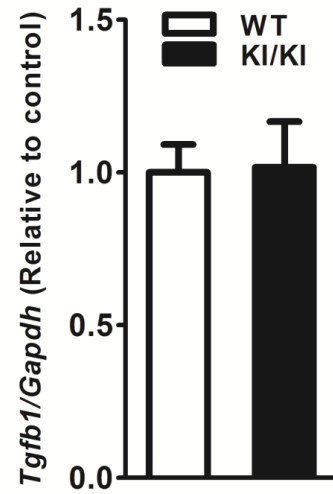
利用磁珠分離細胞技術 (MACS) 將手術後 7 天 UUO 腎臟的 CD11b⁺ 巨噬細胞分離出來，萃取 RNA 並偵測巨噬細胞 M1 相關基因，並以野生型小鼠作為基準，計算出相對表現倍數。每種基因型為 5 隻小鼠，實驗結果為平均值 ± 標準誤。所有實驗之內源性對照基因為 *Gapdh*。Nos2 : iNOS 基因名, *Ccl3* : Mip1- α 基因名, *Cxcl2* : Mip-2 α 基因名, *Il1b* : IL-1 β 基因名。



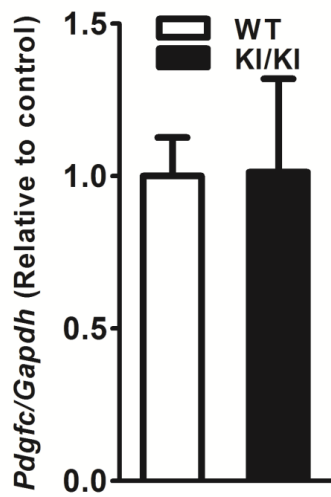
A



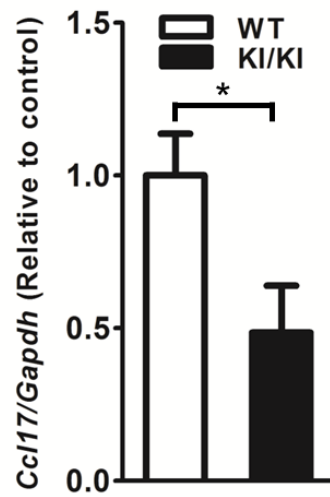
B



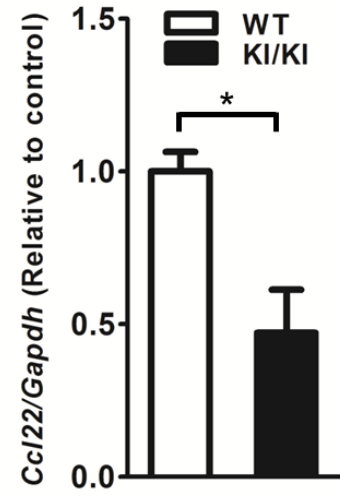
C



D



E



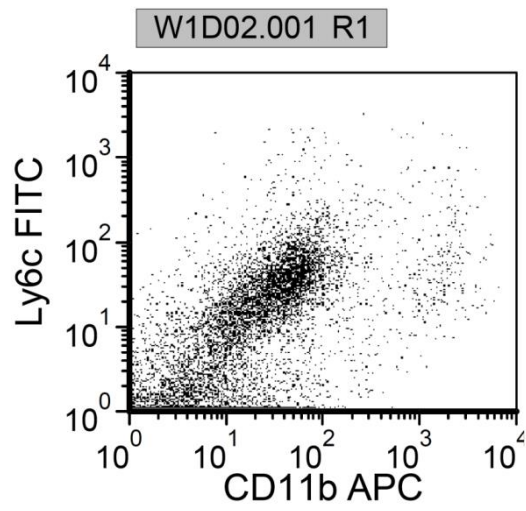


圖十八、比較野生型小鼠及 KI/KI 巨噬細胞在 M2 基因的表現情形

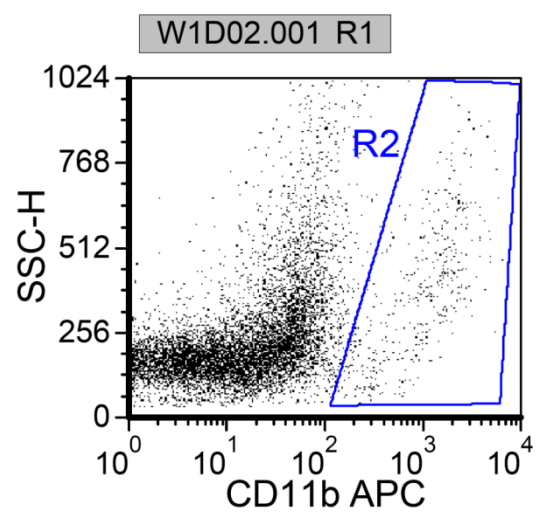
利用磁珠分離細胞技術 (MACS) 將手術後 7 天 UUO 腎臟的 CD11b⁺ 巨噬細胞分離出來，萃取 RNA 並偵測巨噬細胞 M2 相關基因，並以野生型小鼠作為基準，計算出相對表現倍數，所有實驗之內源性對照基因為 *Gapdh*。每種基因型為 5 隻小鼠，實驗結果為平均值 $\pm$ 標準誤，* $P < 0.05$ 。 *Arg1* : Arginase 1 基因名， *Tgfb1* : TGF- β 1 基因名， *Pdgfc* : PDGF-C 基因名， *Ccl17* : CCL-17 基因名， *Ccl22* : CCL-22 基因名。



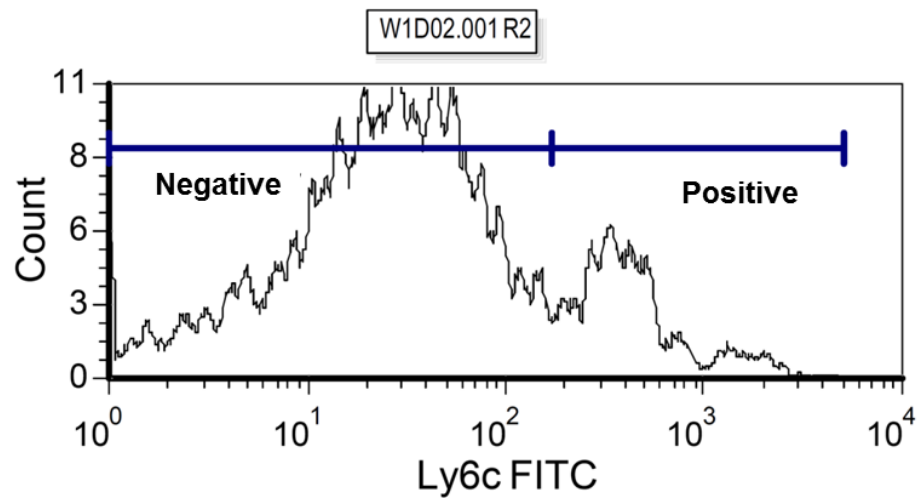
A



B



C



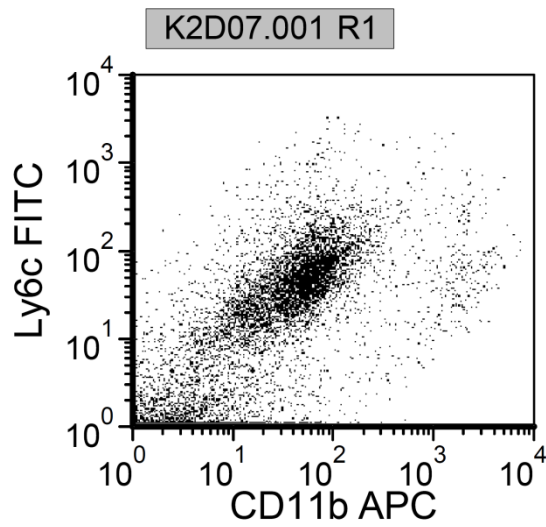


圖十九、流式細胞儀分析野生型小鼠腎臟巨噬細胞之分群

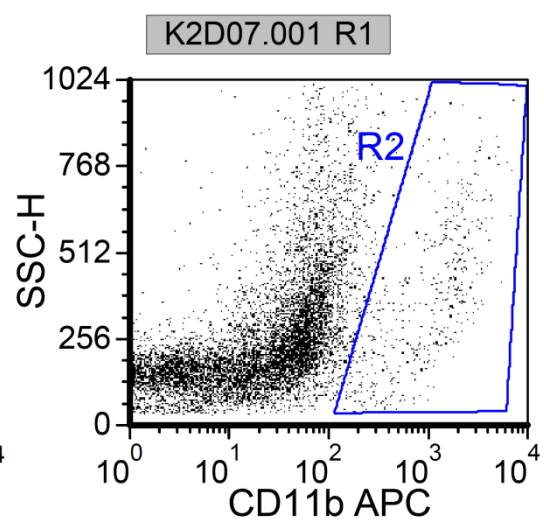
利用流式細胞儀分析巨噬細胞的分群，圖 A 以 Ly6C-FITC 和 CD11b-APC 染色作為依據，分析野生型小鼠 UUO 手術後 7 天之腎臟巨噬細胞分群。圖 B 為圈選 CD11b positive cells 進一步分析 Ly6C 的表現，圖 C 顯示依 Ly6C-FITC 螢光強度區分出 Positive 及 Negative 兩個分群。Ly6C positive 表示屬於 M1 巨噬細胞，Ly6C negative 則表示 M2 巨噬細胞。



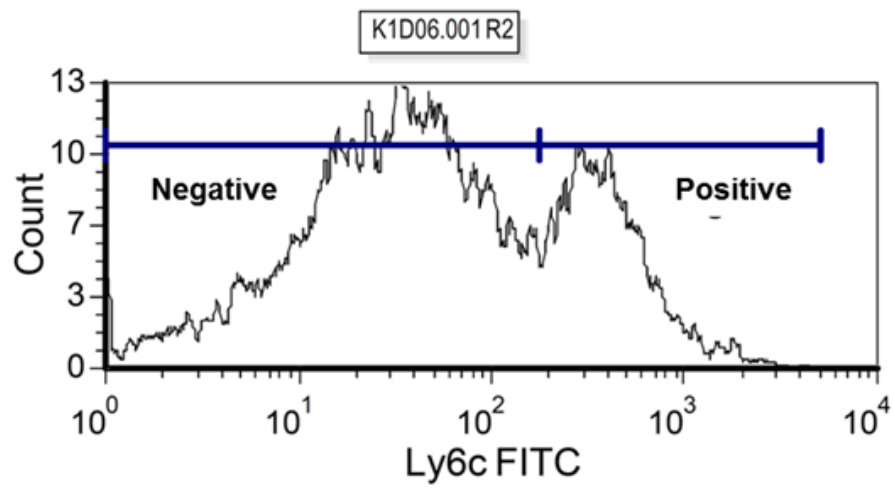
A



B



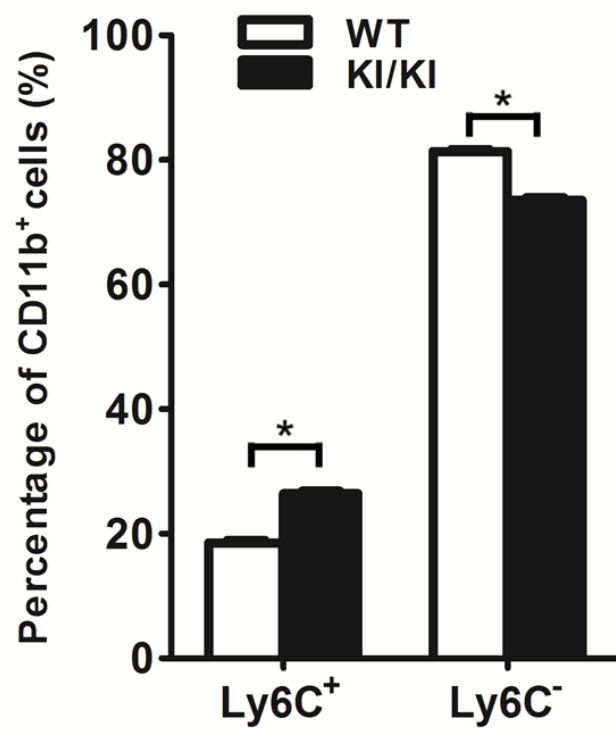
C





圖二十、流式細胞儀分析 KI/KI 小鼠腎臟巨噬細胞之分群

利用流式細胞儀分析巨噬細胞的分群，圖 A 以 Ly6C-FITC 和 CD11b-APC 染色作為依據，分析 KI/KI 小鼠 UUO 手術後 7 天之腎臟巨噬細胞分群。圖 B 為圈選 CD11b positive cells 進一步分析 Ly6C 的表現，圖 C 顯示依 Ly6C-FITC 螢光強度區分出 Positive 及 Negative 兩個分群。Ly6C positive 表示屬於 M1 巨噬細胞，Ly6C negative 則表示 M2 巨噬細胞。



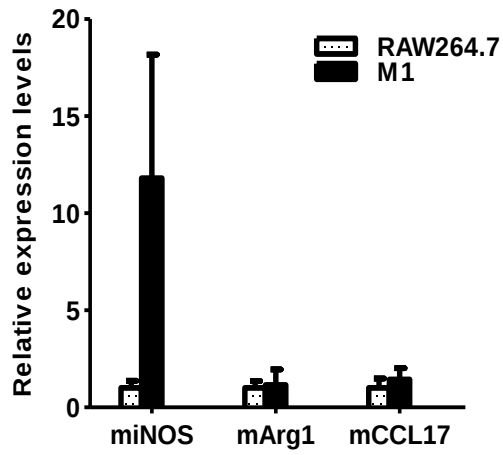


圖二十一、流式細胞儀分析野生型及 KI/KI 小鼠腎臟巨噬細胞之分群

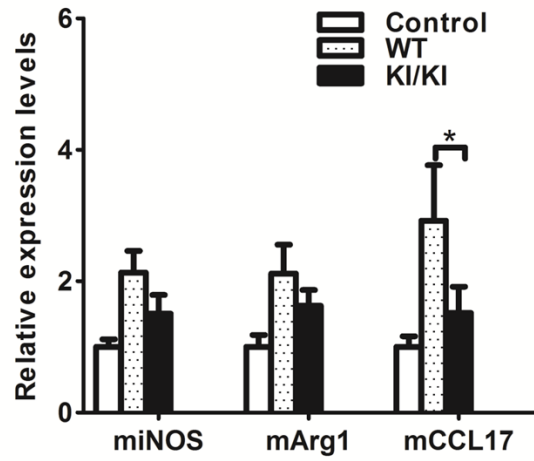
量化圖為框選 CD11b positive 細胞後，計算 Ly6C^+ 與 Ly6C^- 所佔之比例，總比例為 100%。每種基因型為 3 隻小鼠。 Ly6C^+ 代表 M1 型態巨噬細胞， Ly6C^- 代表 M2 型態巨噬細胞。 $*P < 0.05$ 。



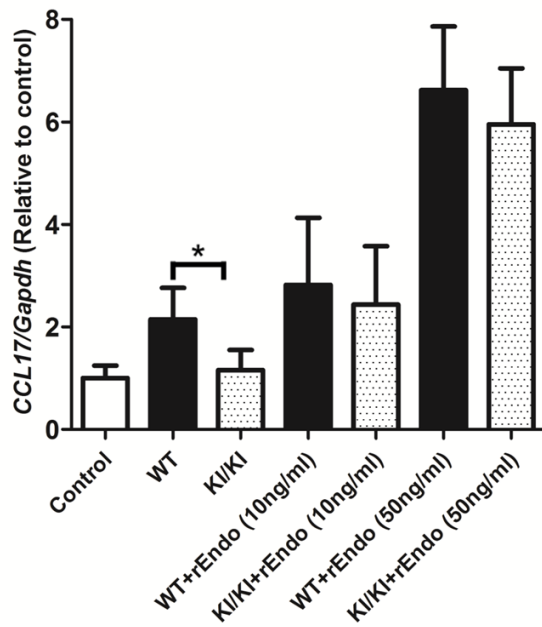
A



B



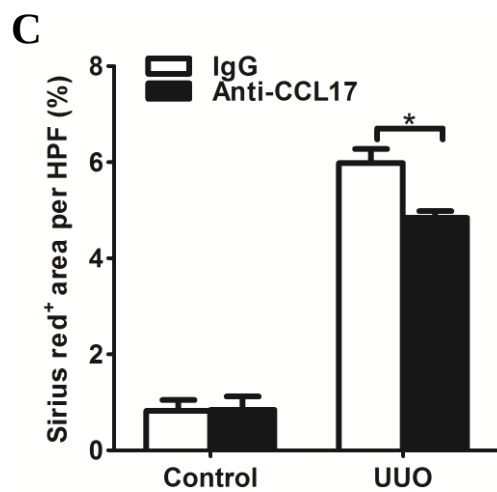
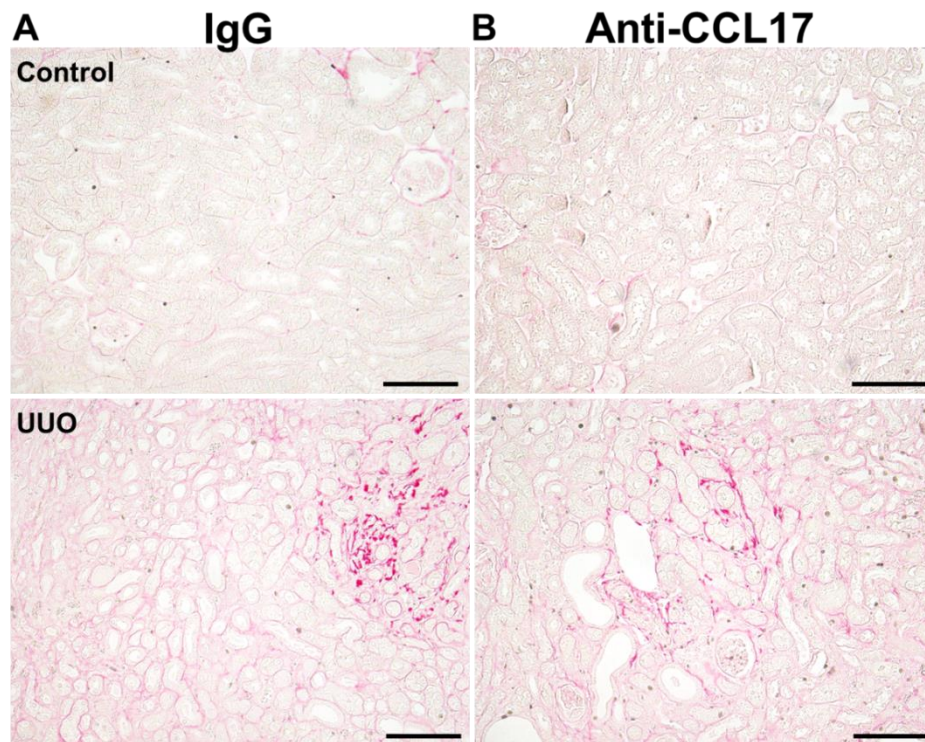
C





圖二十二、胞外巨噬細胞型態轉型試驗

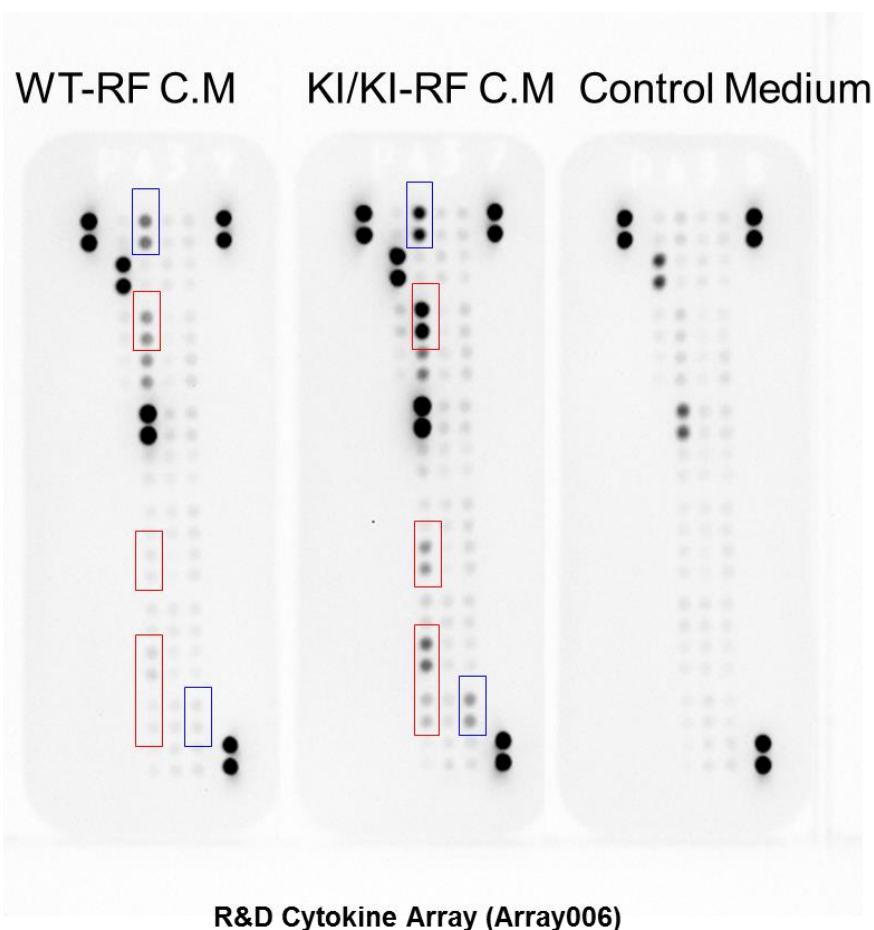
利用與肌纖維母細胞共培養 48 小時，以並以 Q-RT-PCR 偵測基因變化評估巨噬細胞之轉型作用，以對照組表現為基準，計算出相對表現倍數，所有實驗之內源性對照基因為 *Gapdh*。圖 A 顯示 RAW264.7 細胞株經刺激誘導成為 M1 巨噬細胞之基因表現情形。M1 表示實驗組，高量表達 iNOS (M1) 基因。圖 B 呈現將野生型小鼠和 KI/KI 肌纖維母細胞與 M1 巨噬細胞共培養後的基因變化。圖 C 呈現以骨髓源性巨噬細胞 (Bone marrow derived macrophages, BMDMs) 與不同組別共同培養之 CCL17 基因變化結果。Control: 對照組，表示只有巨噬細胞。WT: 表示與野生型肌纖維母胞培養，KI/KI: 表示與 KI/KI 肌纖維母胞培養，rEndo: 老鼠 endosialin 重組蛋白。每組試驗 $n = 3$ ，實驗結果為平均值 $\pm$ 標準誤。* $P < 0.05$ 。





圖二十三、施打 anti-CCL17 抗體減少膠原蛋白累積之情形

圖 A 和 B 分別為施打 IgG 以及 Anti-CCL17 抗體小鼠在第 10 天數 UUO 誘導後 Picosirius Red 的染色結果，深紅色表示膠原蛋白堆積處。上圖為對照組腎臟，下圖則是 UUO 誘導之腎臟。圖 C 則是以 100 倍視野為基準，並以分析軟體定量膠原蛋白質所佔視野之比例結果，每個腎臟約有 15-20 個視野取平均為代表值，圖為各組間的平均值。scale bar 為 100 μ m。* $P < 0.05$ 。



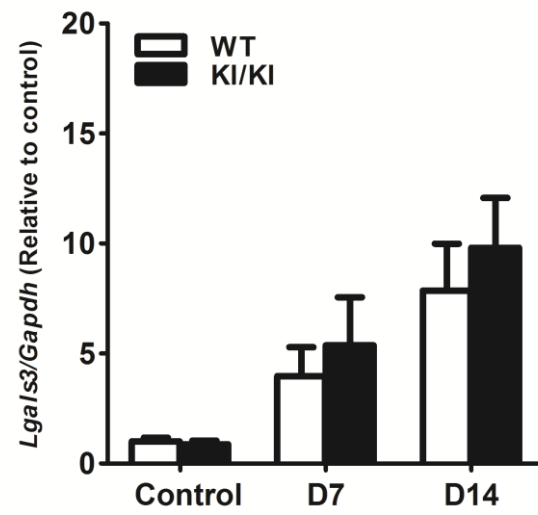


圖二十四、分析野生型及 KI/KI 肌纖維母細胞釋放激素之差異

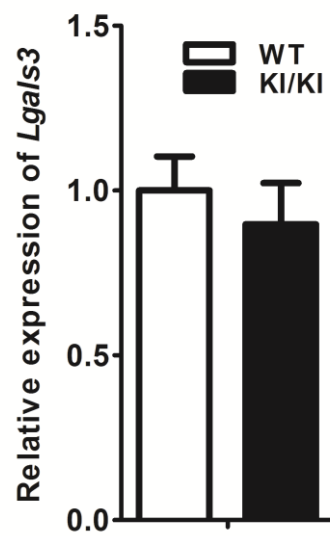
體外培養野生型及 KI/KI 肌纖維母細胞，培養 48 小時收集 conditional medium，並利用 cytokine array 分析兩種細胞所分泌之因子。總共偵測 40 個不同因子，每個因子呈現二重複位點，例如 A1 和 A2 屬於同個因子，根據呈色結果並以定量軟體分析，結果呈現於表三。紅色框表示明顯差異的位點，且屬於促進發炎的因子，而藍色框則屬於促進纖維化因子。WT-RF C.M：表示野生型細胞之 conditional medium，KI/KI-RF C.M：表示 KI/KI 肌纖維母細胞之 conditional medium，Control 為 medium，作為背景值。



A



B





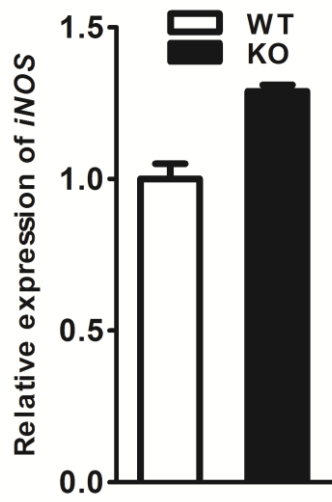
圖二十五、Galectin-3 mRNA 的表現情形

比較 *Lgals3* 在野生型小鼠和 KI/KI 小鼠在不同天數 UUO 誘導後的表現量，並以野生型小鼠對照組腎臟表現為基準，計算出相對表現倍數，每個組別為 5 隻小鼠。

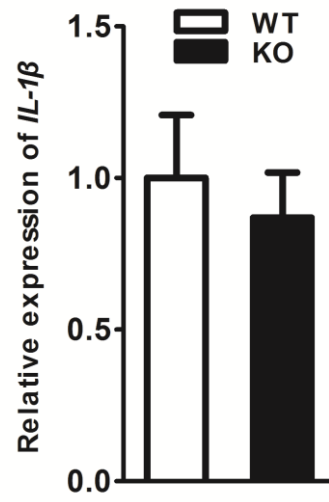
圖 B 則是磁珠分離細胞技術 (MACS) 將手術後 7 天 UUO 腎臟的 CD11b⁺ 巨噬細胞分離出來，萃取 RNA 並偵測巨噬細胞 *Lgals3* 的表現量，並以野生型小鼠作為基準，計算出相對表現倍數，所有實驗之內源性對照基因為 *Gapdh*。每種基因型為 5 隻小鼠，實驗結果為平均值 $\pm$ 標準誤。 *Lgals3*: galectin-3 基因名。



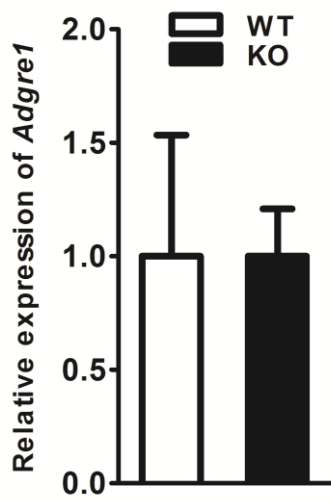
A



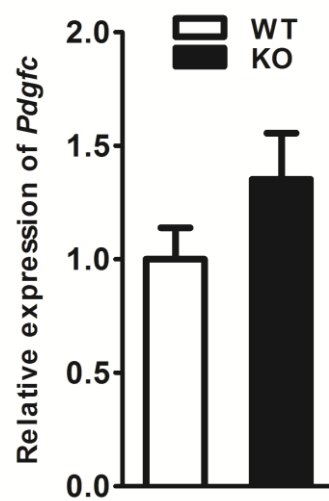
B



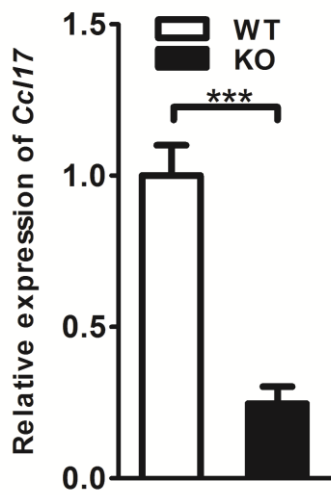
C



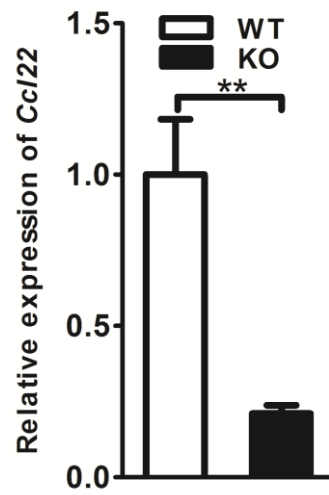
D



E



F



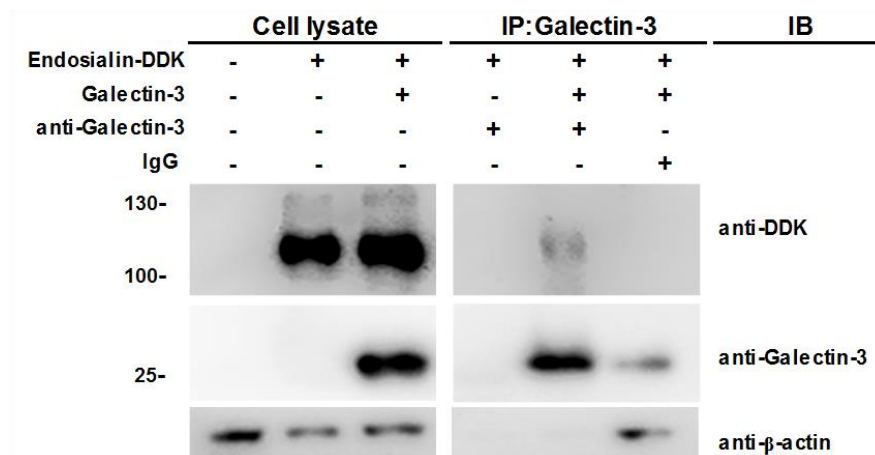


圖二十六、*Lgals3* 剔除小鼠 UUO 腎臟巨噬細胞之基因表達情形

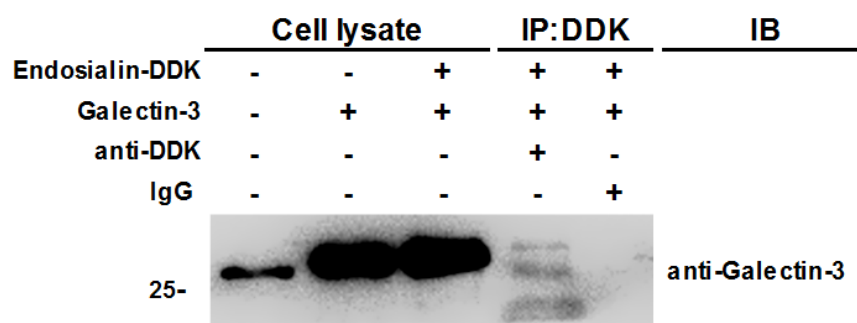
利用磁珠分離細胞技術 (MACS) 將手術後 7 天 UUO 腎臟的 CD11b⁺ 巨噬細胞分離出來，萃取 RNA 並偵測巨噬細胞 M1 和 M2 相關基因的表達量，並以野生型小鼠表現為基準，計算出相對表現倍數，所有實驗之內源性對照基因為 *Gapdh* 。每種基因型為 6 隻小鼠，實驗結果為平均值 $\pm$ 標準誤。 $**P<0.01$ ， $***P<0.001$ 。



A



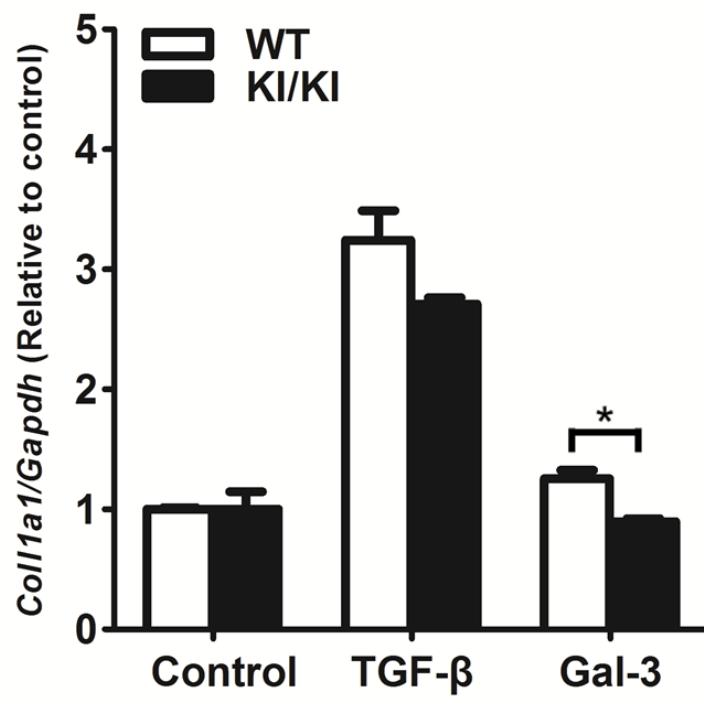
B





圖二十七、Endosailin 與 Galectin-3 結合

在 HEK293FT 細胞中過量表現 Endosailin-DDK 以及 Galectin-3 之表現載體，並利用免疫共沉澱方式分析 Endosailin 與 Galectin-3 的結合。圖 A 是用 anti-galectin-3 抗體沉澱蛋白，再用 anti-DDK 抗體進行 immunoblot，辨識 endosialin 是否隨著 galectin-3 一起沉澱。左圖為對照組。圖 B 則是 anti-DDK 抗體沉澱蛋白，再用 anti-galectin-3 抗體進行 immunoblot，辨識 galectin-3。Endosialin 表現載體在蛋白尾端有標記蛋白 (DDK)。+：代表有加入，-：則無；IgG 為 isotype control

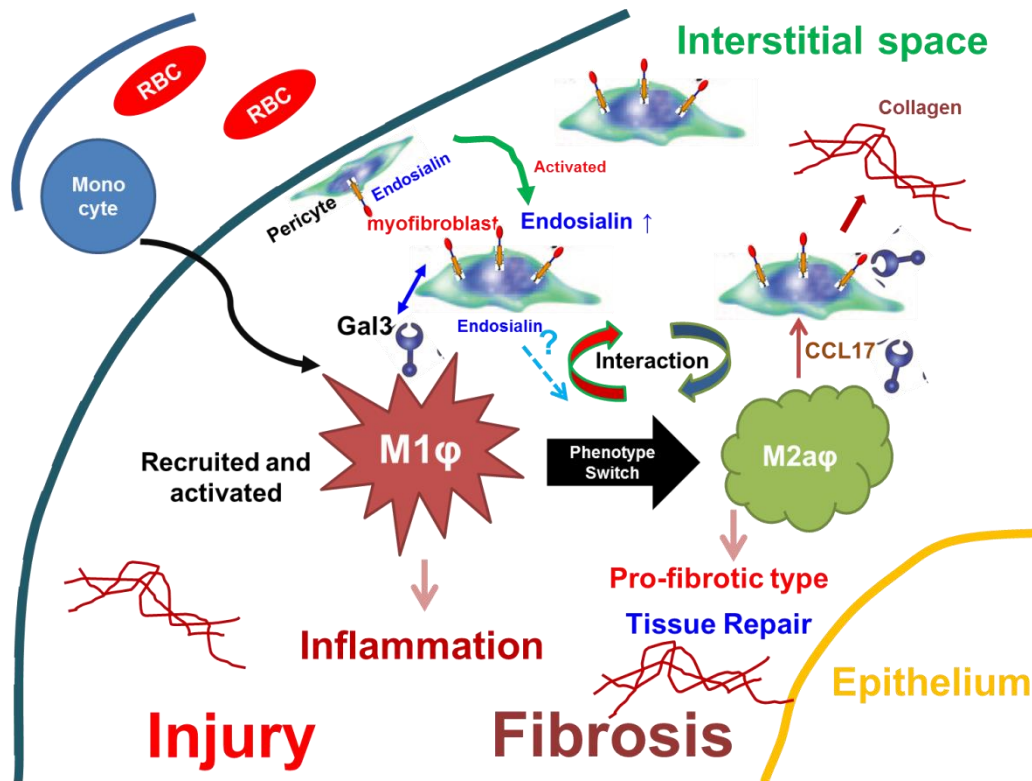




圖二十八、Galectin-3 透過 endosialin 促進膠原蛋白表現

野生型或 KI/KI 肌纖維母細胞經不同因子刺激後，以 Q-RT-PCR 偵測膠原蛋白基因的表現量，以對照組表現為基準，計算出相對表現倍數，所有實驗之內源性對照基因為 *Gapdh*。TGF- β 當作 positive control。Control 則是 medium。Gal3: galectin-3 重組蛋白 (20ng/ml)。每組實驗 $n = 3$ ，實驗結果為平均值 $\pm$ 標準誤。

* $P < 0.05$ 。





圖二十九、Endosialin 在纖維化演進過程中的角色

當腎臟受所損時，血管內的 monocyte 會被吸引並浸潤至損傷部位，並且受到刺激並活化成為 M1 促炎型態的巨噬細胞。同時血管周邊的周細胞 (pericyte) 會脫離血管並且於間質空隙 (interstitial space) 中活化成為肌纖維母細胞，同時大量增生，而肌纖維母細胞也會高量表現 endosialin。持續性的損傷促使組織走向纖維化的進程，此時巨噬細胞與肌纖維母細胞可能會透過相互的作用促進纖維化的演進，機制如下：肌纖維母細胞的 endosialin 透過未知路徑，促進巨噬細胞從 M1 轉變成 M2 促纖維化型態，並且分泌更多的 CCL17。CCL17 促進肌纖維母細胞製造更多的膠原蛋白，而過多的膠原蛋白堆積造成纖維形成不可逆之瘢痕組織 (scar tissue)，最終導致血管稀疏、腎臟萎縮且失去功能。

Gal3 : galectin-3



表



表一 Q-RT-PCR 之引子序列

Table1. Primer Sequences Used in Quantitative RT-PCR	
Gene	Sequences
<i>GAPDH</i>	
Forward	5'-CTGGAGAAACCTGCCAAGTA-3'
Reverse	5'-AAGAGTGGGAGTTGCTGTTG-3'
<i>TGF-β1</i>	
Forward	5'-GGACTCTCCACCTGCAAGAC-3'
Reverse	5'-GACTGGCGAGCCTTAGTTTG-3'
<i>Arginase1</i>	
Forward	5'-GCTGTCTTCCCAAGAGTTGGG-3'
Reverse	5'-ATGGAAGAGACCTTCAGCTAC-3'
<i>CCL17</i>	
Forward	5'-AGTGGAGTGTTCCAGGGATG-3'
Reverse	5'-CTGGTCACAGGCCGTTTTAT-3'
<i>CCL22</i>	
Forward	5'-GTGGAAGACAGTATCTGCTGCC-3'
Reverse	5'-AGGCTTGCGGCAGGATTTTGAG-3'
<i>PDGFC</i>	
Forward	5'-GAGTCCAACCTGAGCAGCAAGT-3'
Reverse	5'-GAAACTTCGGGCTGTGGATGCT-3'
<i>iNOS</i>	
Forward	5'-CAGCTGGGCTGTACAAACCTT-3'
Reverse	5'-CATTGGAAGTGAAGCGGTTCG-3'
<i>CCL3/Mip1α</i>	
Forward	5'-CGGAAGATTCCACGCCAATTC-3'
Reverse	5'-GGTGAGGAACGTGTCCTGAAG-3'
<i>CXCL2/Mip2 α</i>	
Forward	5'-CTCTCAAGGGCGGTCAAAAAGTT-3'
Reverse	5'-TCAGACAGCGAGGCACATCAGGTA-3'
<i>CXCL2/Mip2 α</i>	
Forward	5'-CTCTCAAGGGCGGTCAAAAAGTT-3'
Reverse	5'-TCAGACAGCGAGGCACATCAGGTA-3'
<i>Endosialin</i>	
Forward	5'-CTGCCACTCGACCCACACTA-3'
Reverse	5'-GGTGGGCGTGTAGCTGAAAT-3'
<i>Collagen I</i>	
Forward	5'-GGCTATGACTTTGGTTTTGAAGGA-3'
Reverse	5'-CGTTGTCGTAGCAGGGTTCTTT-3'



表二 血清中腎功能相關指標

TEM1-LacZ KI mice, 10 wks, n = 6/group				
Item	Unit	+/+	+/KI	KI/KI
BUN	mg/dL	28.87 ± 0.57	29.57 ± 1.33	29.43 ± 2.19
CRE	mg/dL	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00	0.10 ± 0.00
UA	mg/dL	2.32 ± 0.16	2.33 ± 0.11	2.68 ± 0.12
Na	mEq/L	140.67 ± 0.67	144.00 ± 1.03	144.67 ± 1.23
K	mEq/L	5.87 ± 0.08	5.60 ± 0.27	6.13 ± 0.17
Cl	mEq/L	129.33 ± 0.84	126.67 ± 0.84	125.33 ± 0.84
P	mg/dL	6.80 ± 0.39	7.60 ± 0.47	7.00 ± 0.49
Ca	mg/dL	9.25 ± 0.04	9.28 ± 0.28	9.37 ± 0.08
Mg	mg/dL	2.65 ± 0.08	2.72 ± 0.13	2.77 ± 0.08



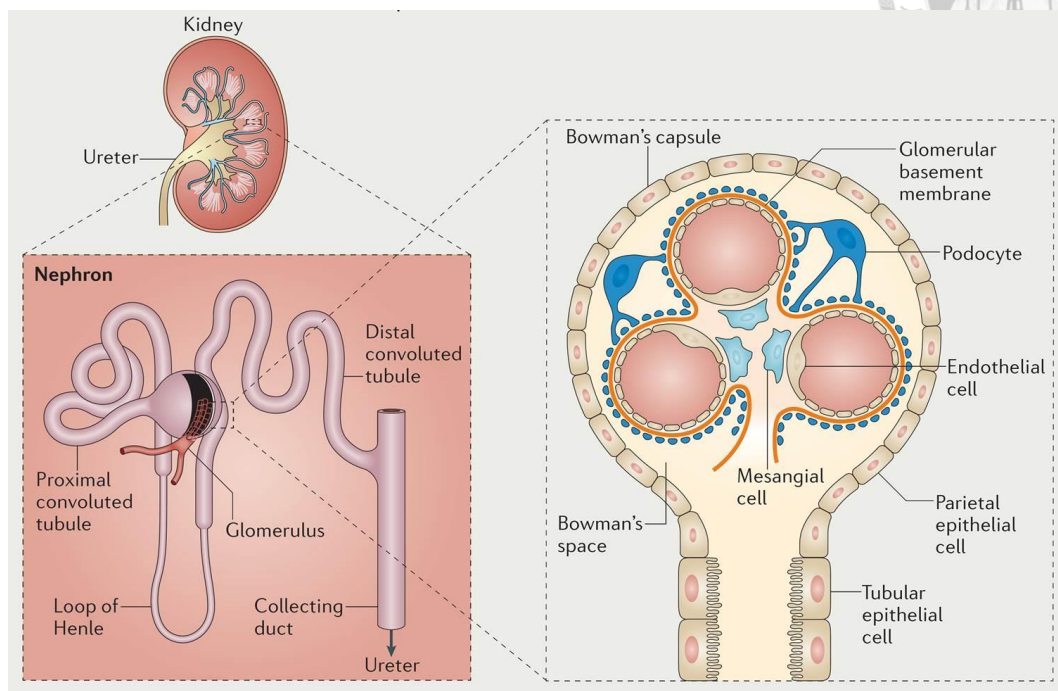
表三 Cytokine array 因子表現結果

Table 3. Chemokine profile in WT and KI/KI RF

	Protein	Relative expression level (folds of KO RF/WT RF)
E7 8	TREM-1	2.083
D5 6	CXCL1/KC	1.878
D21 22	RANTES/CCL5	1.801
D15 16	MIP-1 α	1.778
D19 20	MIP-2	1.718
E5 6	TNF- α	1.601
D13 14	MIG/CXCL9	1.489
D1 2	IP-10	1.468
D17 18	MIP-1 β	1.456
C7 8	IL-6	1.452



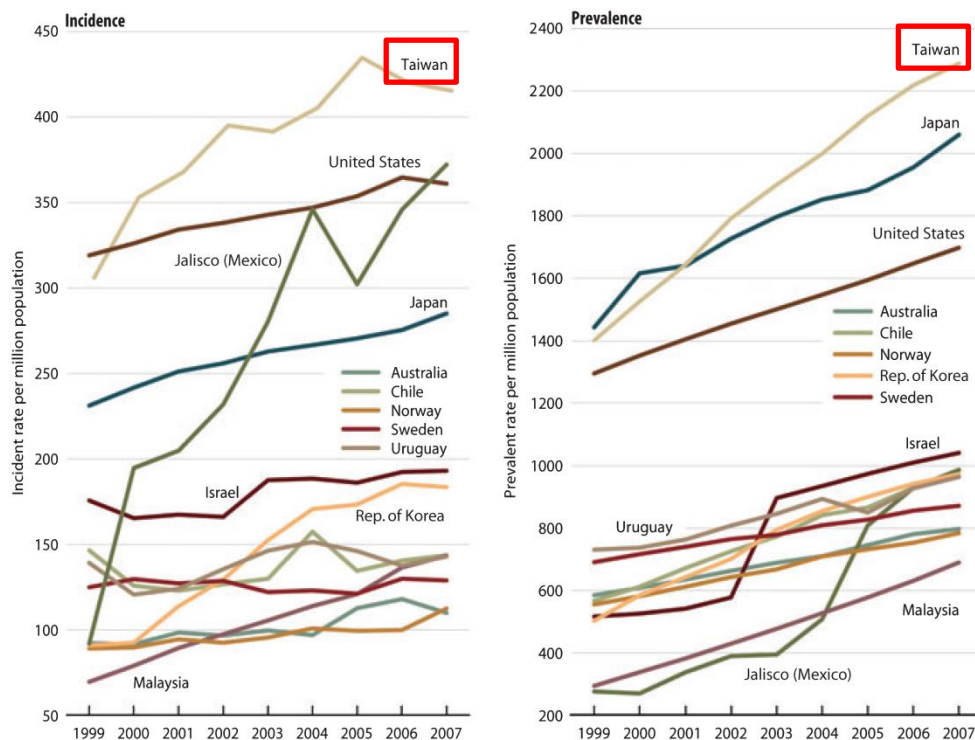
附錄



附錄一、腎臟結構圖

圖腎臟結構，左圖為腎臟基本單位，腎元。包括：腎絲球、鮑式囊、近曲小管、亨爾式小管、遠曲小管及急尿管。右圖為腎絲球組成，包括：內皮細胞、足細胞、腎繫膜細胞以及上皮細胞。

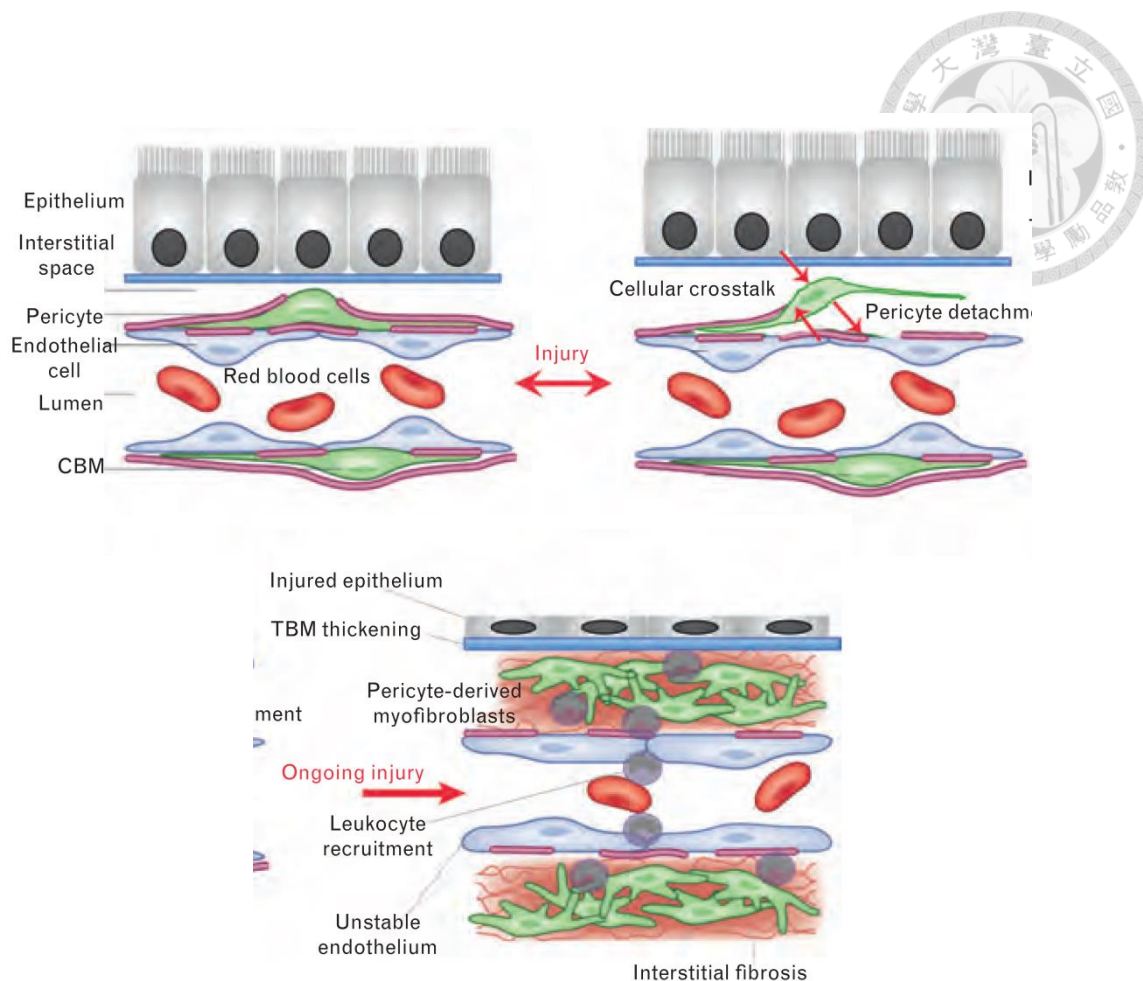
資料來源：Kurts, C., U. Panzer, et al. (2013). "The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications." *Nat Rev Immunol* 13(10): 738-753.



附錄二、世界各國慢性腎病之發生率以及盛行率

圖為統計各國自 1999 年到 2007 慢性腎病之發生率及盛行率。左圖為發生率，右圖為盛行率，縱軸單位為每百萬人口的腎病人數。台灣自 2001 年開始為世界第一，且呈現持續上升的趨勢。

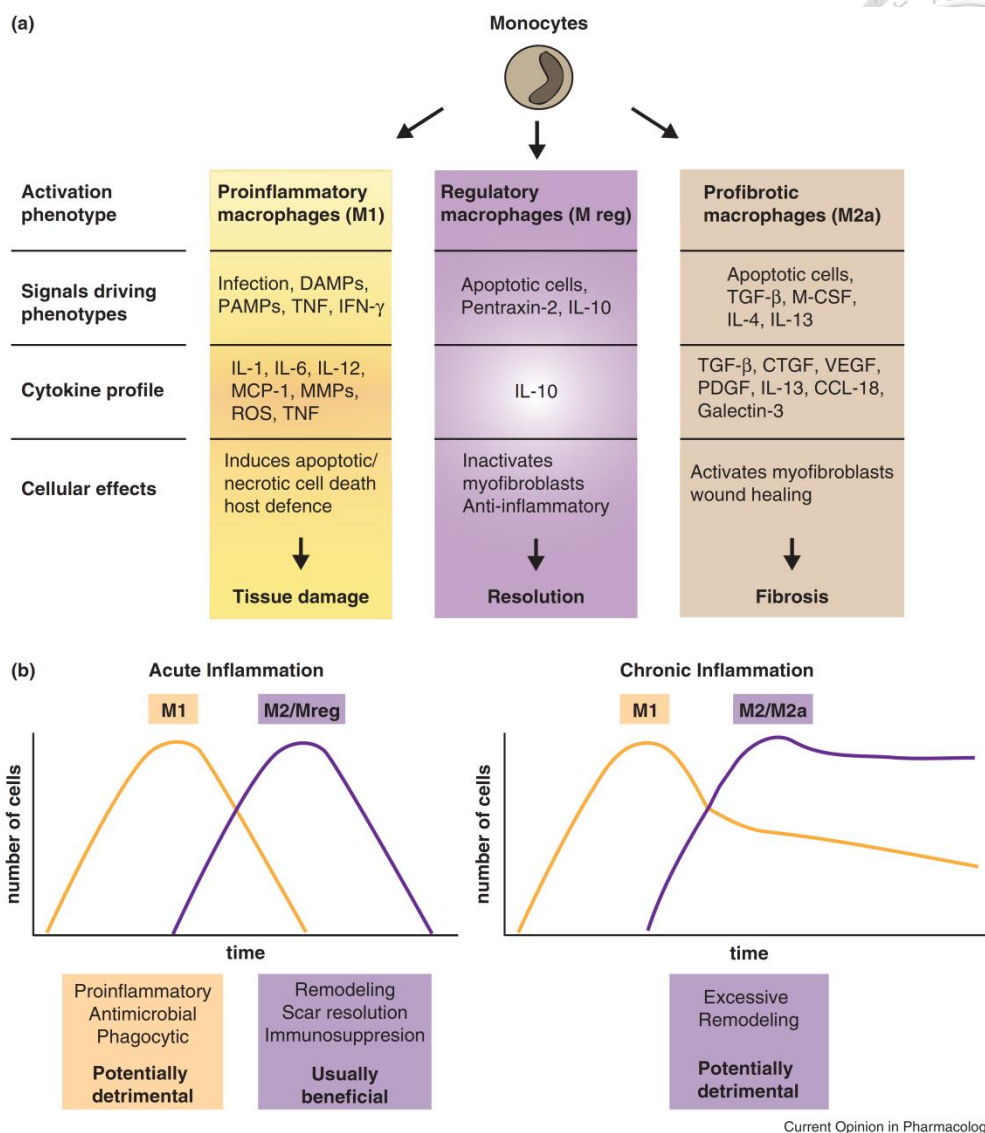
資料來源：Stenvinkel, P. (2010). "Chronic kidney disease: a public health priority and harbinger of premature cardiovascular disease." *J Intern Med* **268**(5): 456-467.



附錄三、腎損傷誘導 Pericyte 活化之機制

在正常腎臟血管旁，Pericyte 緊貼內皮細胞維持血管構造。右上圖當損傷時，組織間會分泌激素刺激 pericyte 脫離血管。下圖持續性損傷，pericyte 活化並增生成為 myofibroblast (肌纖維母細胞)，分泌大量膜外基質堆積於間質中，同時由於血管的結構不穩定使通透性增加，造成更多白血球浸潤，而損傷的上皮組織也會萎縮。

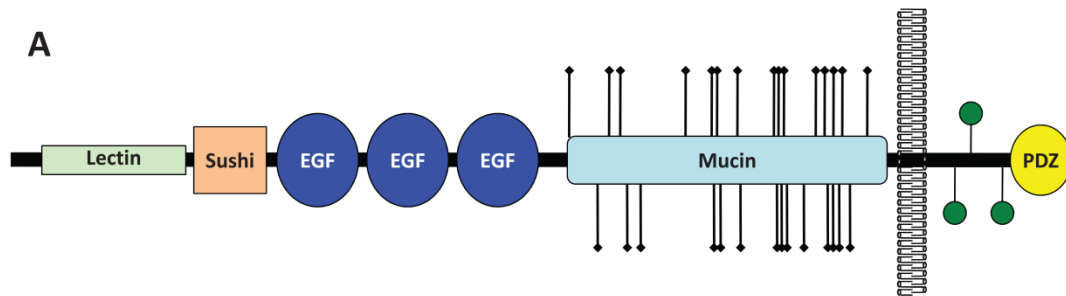
資料來源：Ren, S. and J. S. Duffield (2013). "Pericytes in kidney fibrosis." *Curr Opin Nephrol Hypertens* 22(4): 471-480.



附錄四、巨噬細胞的亞型與功能

圖(a) 描述單核球受到不同刺激影響而分化成不同亞群，每個亞群所分泌不同細胞激素造成組織發炎、抑制發炎或者纖維化。圖(b) 左圖為組織處於急性損傷造成急性發炎時，巨噬細胞大多屬於炎性 M1 型態，隨著時間增加，抗發炎的 M2/Mreg 型態巨噬細胞也會增加，抑制發炎以利組織重組。右圖為組織處於持續性的發炎狀態，剛開始屬於炎性 M1 型態，持續性的刺激造成促纖維化的 M2/M2a 巨噬細胞增加，並使得組織過度重組造成纖維化。

資料來源：Lichtnekert, J., T. Kawakami, et al. (2013). "Changes in macrophage phenotype as the immune response evolves." *Curr Opin Pharmacol* 13(4): 555-564.



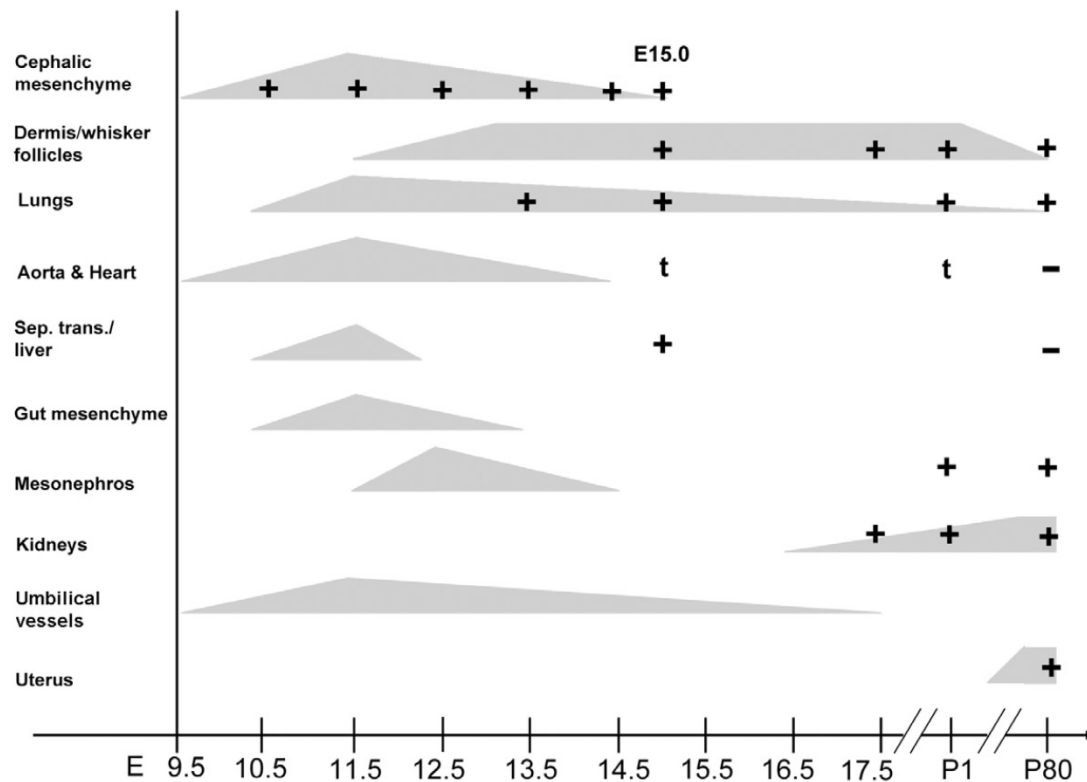
B

Human:	IVYCTRCGPHAPNKRI	T	DCYRWVIHAGSK	S	PTEPMPPRGS	LTGVQ	T	CRTSV	757
Bovine:	IVYCTRCGPHAPNKRI	T	DCYRWVTHAGSK	S	PTEPMPPRGS	LTGVQ	T	CRTSV	757
Canine:	IVYCTRCGPHAPNKRV	T	DCYRWVTHAGSK	G	PTEPAPPRGS	LTGVQ	T	CRTSV	631
Murine:	IVYCTRCGSHAPNKRI	T	DCYRWVTHAGNK	S	STEPMPPRGS	LTGVQ	T	CRTSV	765
Rat:	IVYCTRCGSHTPNKRI	T	DCYRWVTHAGNK	S	STEPMPPRGS	LTGVQ	T	CRTSV	764

附錄五、Endosialin 的蛋白質結構

圖(A) 為 Endosialin 的蛋白質結構依序為 C-type lectin domain、Shushi domain、三個 EGF-like domain、Mucin domain、Transmembrane domain 以及 PDZ domain。圖(B) 則是 endosialin 的 cytoplasmic tail 在不同物種的胺基酸序列，顯示物種間的同源性非常高。紅色為預測會被磷酸化的位點，TSV 則是 PDZ motif。

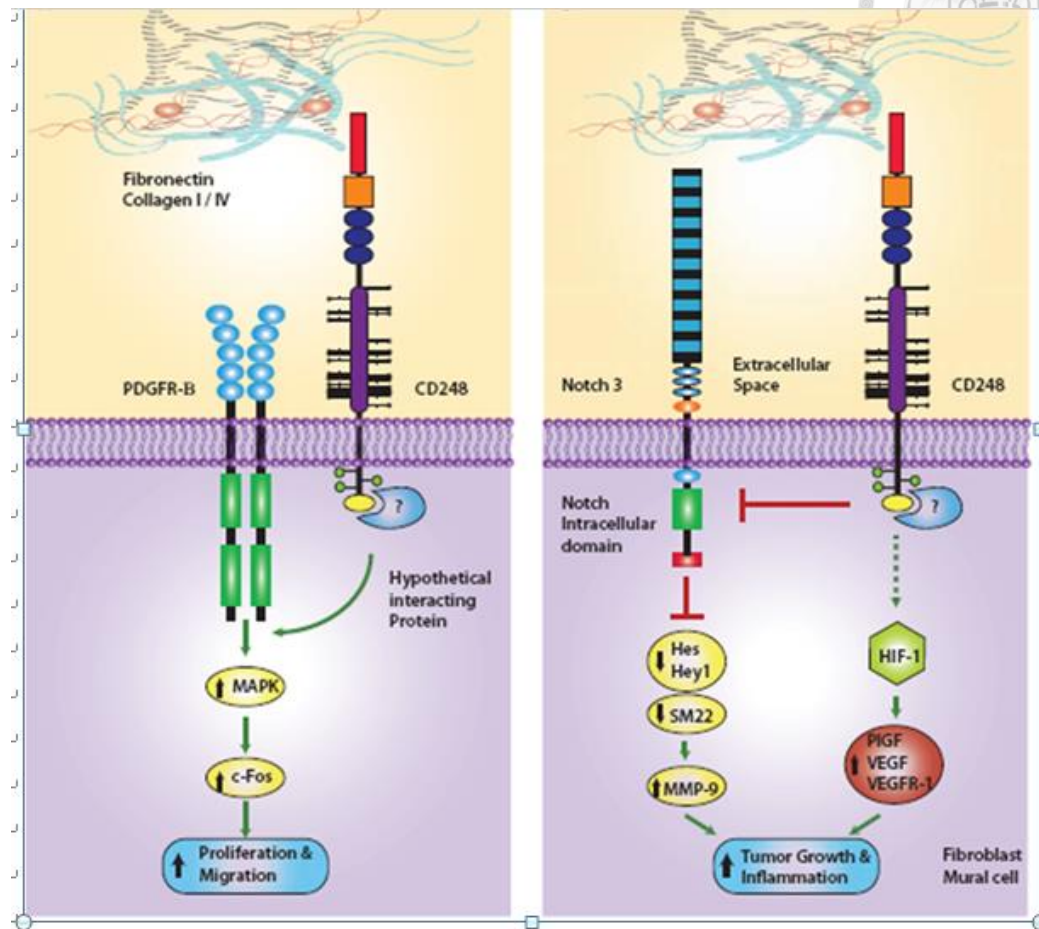
資料來源：Valdez, Y., M. Maia, et al. (2012). "CD248: reviewing its role in health and disease." *Curr Drug Targets* 13(3): 432-439.



附錄六、Endosialin 表現的時間及位置

圖為利用 *Endosialin-LacZ* KI 小鼠進行 LacZ 染色以偵測 endosialin 表現的時間及組織。X 軸為偵測時間點，Y 軸則是表達的組織位置。灰色區域代表 endosialin 表達的變化量，越高代表量愈多。(+) 表示存在 endosialin，(-) 則是無，(t) 代表先前其他研究已用 mRNA or 蛋白質偵測有表達的時間點。

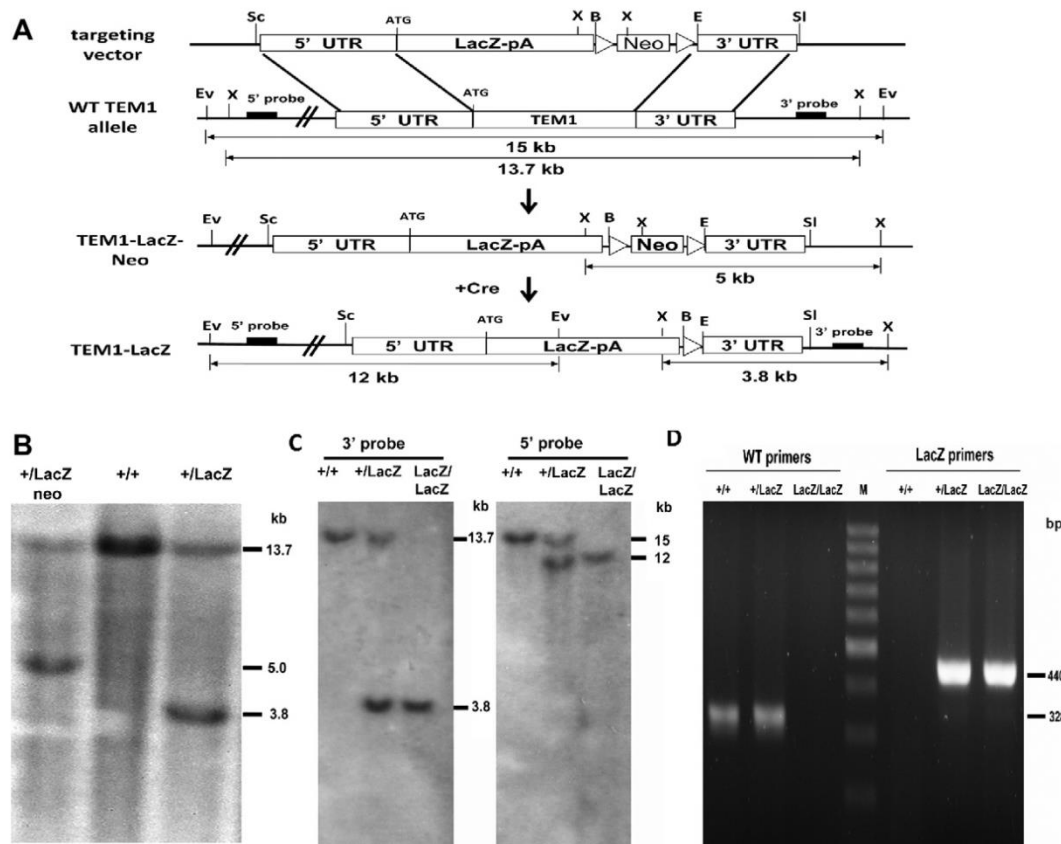
資料來源：Huang, H. P., C. L. Hong, et al. (2011). "Gene targeting and expression analysis of mouse Tem1/endosialin using a lacZ reporter." *Gene Expr Patterns* 11(5-6): 316-326.



附錄七、Endosialin (CD248) 作用機制

圖 (A) Endosialin 與 PDGFR-β 間的作用。當 Fibronectin 或者 collagen 結合至 endosialin，促使 PDGFR-β 下游訊息傳遞增強，進而促進細胞增生及爬行。圖 (B) 在纖維母細胞中 Endosialin 與 Notch-3 間的作用。Endosialin 本身會抑制 Notch-3 訊息傳遞使得 MMP-9 表達上升，同時 endosialin 下游 HIF-1 會一些生長因子表現量上升，促進腫瘤生長以及發炎反應。

資料來源：Valdez, Y., M. Maia, et al. (2012). "CD248: reviewing its role in health and disease." *Curr Drug Targets* 13(3): 432-439.



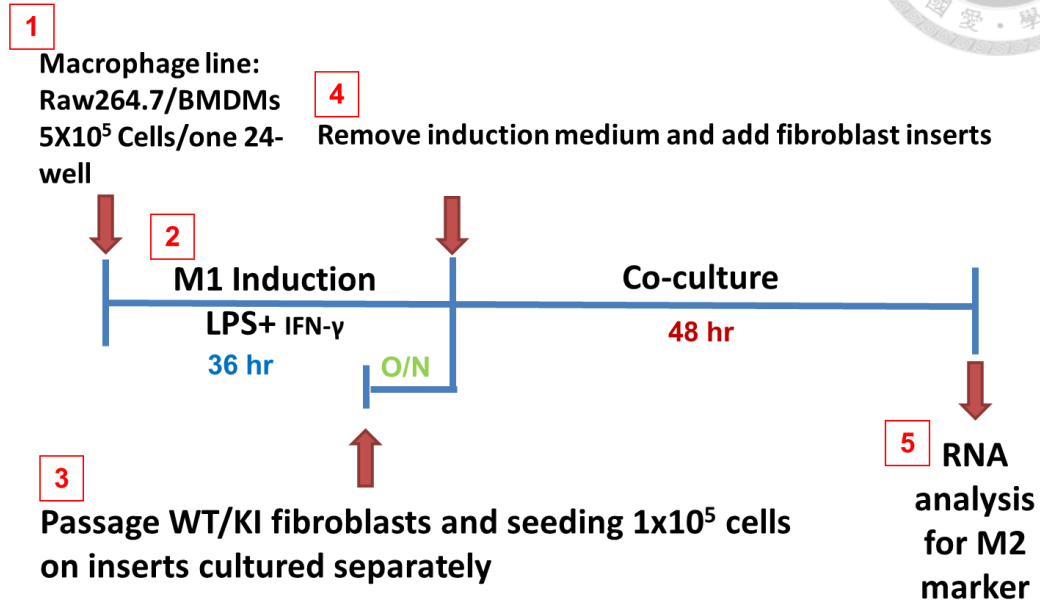
附錄八、*Endosialin-LacZ* KI 小鼠之載體構築及基因型鑑定

圖 A 為基因標的策略來建立以 *LacZ* 基因置換入 *Endosialin* 基因 ATG 之後，同時剔除 *Endosialin* 基因的胚胎幹細胞，經抗生素篩選出細胞株，並以 Cre 重組酶移除細胞株內的 *Neo* 基因片段。圖 B 和 C 是用南方墨點法確認正確的基因標的細胞株，再以此胚胎幹細胞經由囊胚注射後植入代理孕鼠。圖 D 為 PCR 基因型鑑定，萃取三種基因型小鼠尾巴 DNA，並已不同引子放大。WT 放大片段為 328b.p，*LacZ* 放大片段為 440 b.p。Neo : Neomycin resistance gene ; TEM1: endosialin。

資料來源：Huang, H. P., C. L. Hong, et al. (2011). "Gene targeting and expression analysis of mouse *Tem1*/endosialin using a *lacZ* reporter." *Gene Expr Patterns* 11(5-6): 316-326.



In-vitro assay for M1/M2 switch

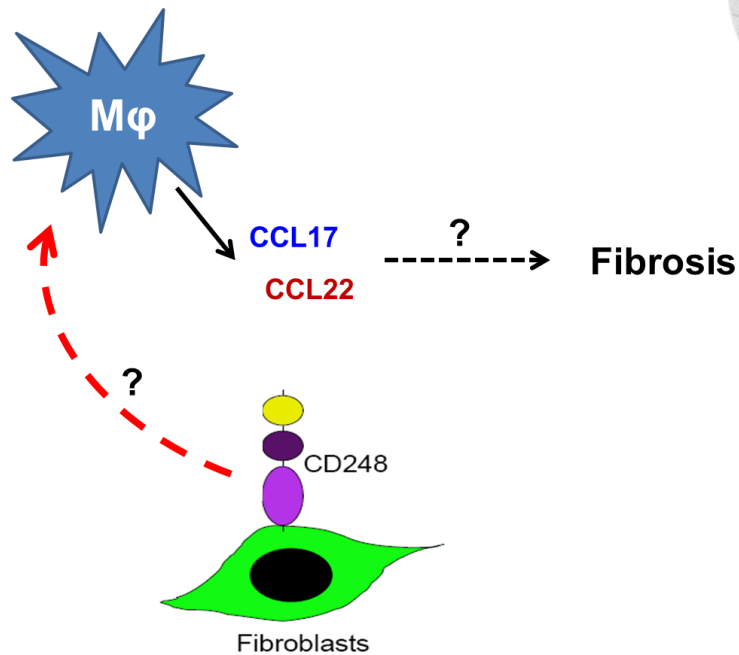


附錄九、巨噬細胞的轉型試驗流程圖

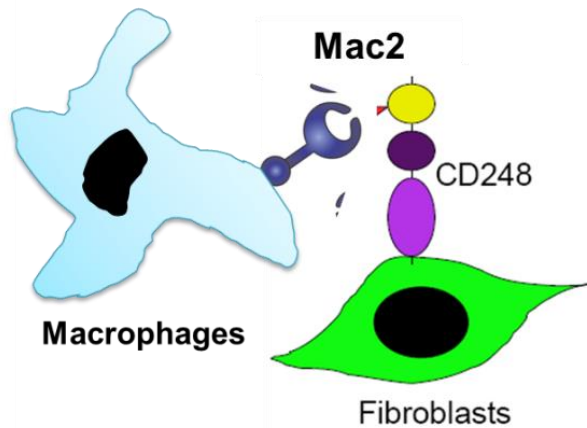
先將 5×10^5 的巨噬細胞種入 24 well 培養盤中，加入 LPS 以及 $\text{INF-}\gamma$ 誘導 36 小時使巨噬細胞成為 M1 型態，之後與野生型或 KI/KI 肌纖維母細胞共同培養 48 小時，萃取巨噬細胞的 RNA 並分析其基因變化



A

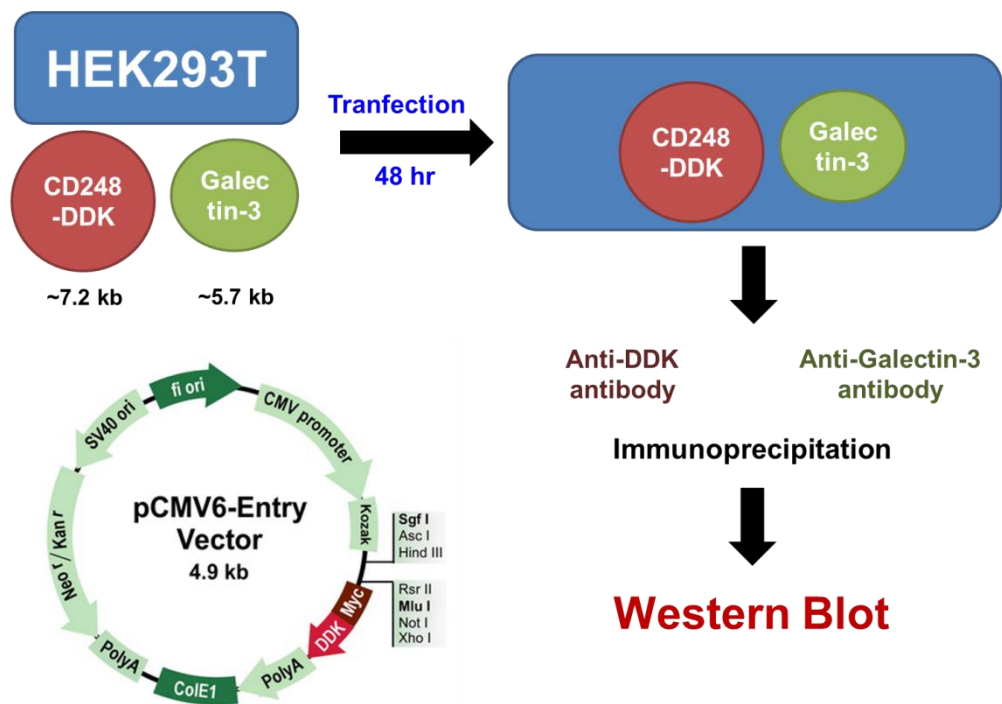


B



附錄十、Endosialin 與 Galectin-3 作用機制圖

圖 A 表示肌纖維母細胞的 endosialin 透過未知機制促進巨噬細胞表現 CCL17 以及 CCL22，進而促進纖維化的進程。圖 B 表示肌纖維母細胞可能透過 endosialin 與巨噬細胞之 Galectin-3 (Mac2) 進行相互作用。



附錄十一、Endosialin 與 Galectin-3 載體，以及轉染之策略

在 HEK293FT 細胞中過量表現 Endosailin-DDK 以及 Galectin-3 之表現載體，48 小時之後收取蛋白質，並利用免疫共沉澱方式分析 Endosailin 與 Galectin-3 的結合。Endosialin 表現載體在蛋白尾端有標記蛋白 (DDK)。



RESEARCH ARTICLE

TXAS-deleted mice prevent hypertension and growth restriction in fetus after high salt treatment during pregnancy

Chen-Hsueh Pai¹, Ching-Tzu Yen¹, I-Shin Yu², Chie-Pein Chen³, Shu-Wha Lin¹, and Shu-Rung Lin^{4*}

(in submission)

¹Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology, National Taiwan University Hospital, College of Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

²Laboratory animal center, National Taiwan University Hospital, College of Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

³Division of High Risk Pregnancy, Department of Obstetrics and Gynecology, Mackay Memorial Hospital, Taipei, Taiwan

⁴Department of Bioscience Technology, College of Science, Chung-Yuan Christian University, Taoyuan, Taiwan

* Corresponding author

E-mail: shurung@cycu.edu.tw

Introduction

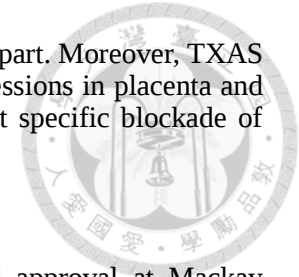
Preeclampsia (PE) is a serious complication occurring in pregnant women, and both the affected mother and child may encounter high morbidity and mortality. Women with PE may suffer from all or some of the symptoms as hypertension, proteinuria, renal insufficiency, hemolysis, decreased platelet counts, and increased platelet activation. The present management of PE patients depends on severity of symptoms, and selective drugs targeting from mild to severe PE's have been available, i.e., methyldopa, hydralazine, and magnesium sulfate, etc. [1]. Nevertheless, the best treatment currently available for PE, particularly for those diagnosed beyond the gestation period of 38 weeks or with maternal compromise or eclampsia at gestation greater than 20 weeks, is delivery of the infant and the placenta. Consequently, this contributes to the incidences of intrauterine fetal growth retardation (IUGR) and preterm birth.

Nearly 5~10% of women develop hypertension during pregnancy, and pregnancy-induced hypertension (PIH) is one of the most prevalent risk factors for PE [2]. Hypertensive conditions are multifactorial, and one such factor closely associated with PIH or PE is inadequate implantation and defective cytotrophoblastic invasion of the maternal spiral arteries that results in poor placentation and placental dysfunction [3,4]. Defective placentation may lead to focal regions of hypoxia which, in turn, is thought to alter the production of growth factors, cytokines [5], lipid peroxides [6], and prostaglandins by placental trophoblast cells [7]. For example, the production of inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF α), interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , and IL-6 were elevated in placenta and are generally proposed to be unfavorable to pregnancy [8]. Moreover, clinical studies have shown changes in the levels of cytokines, prostaglandins etc. in women with PE [9,10]. These observations have raised interest in understanding the effect of these cytokines on placentation and disease progression in relation to hypertension and PE [11].

In women with PE, the balance between TXA2 and PGI2 has been altered and high levels of thromboxane A2 (TXA2) metabolite have been detected in circulation [12,13]. Both TXA2 and PGI2 are derivative of the arachidonic acid and functional antagonized to each other. While TXA2 stimulates platelet activation and aggregation, vessel constriction, and proliferation and mitogenesis of vascular smooth muscle cell (VSM), PGI2 acts to be an inhibitor of platelet aggregation and a vasodilator [2]. Studies have shown that during placenta ischemia/hypoxia as caused by aberrant implantation, PGI2 synthesis may be downregulated and TXA2 synthesis upregulated. Moreover, it seems that the release of TXA2 from basal trophoblast cells had been increased in PE placenta [14]. Elevated levels of TXA2 might explain major clinical symptoms of PIH and PE, such as hypertension, platelet aggregation and reduced utero-placental blood flow [15,16]. Low dose aspirin has been used for many years for prevention of PE. A 10% reduction in the prevalence of both PE and delivery before 34 weeks' gestation has been observed with low-dose aspirin [17]. Aspirin at low dosages selectively blocks the synthesis of TXA2 and consequently tips the balance between thromboxane A2 and PGI2 in favor of PGI2. This may improve the uteroplacental circulation [18]. However, aspirin usage during pregnancy demonstrated the controversial outcomes in clinical patients and animal models [11]. Low dose aspirin has been shown to reducing risk of developing PE and damage mediated by TXA2 [19], whereas it is useless in women at high risk of PE and side effects such as post-partum bleeding and epigastric pain were observed in pregnant women [20]. Moreover, in RUPP (reduction in utero-placental perfusion pressure) rats TXA2 did not contribute to hypertension or renal vasoconstriction [21], or did not show decreased effects on the uterine artery of pregnant guinea pigs [22]. In contrast, other studies showed that TXA2 analogs caused hypertension in pregnant animals [23,24] and ozagrel, a TXA2 modulator, could reduce pregnancy-induced hypertension and proteinuria in PE [25]. Thus, the role of TXA2 in PE remains unclear.

Studies in rats have shown that high salt treatment in late pregnancy induce maternal hypertension and renal dysfunction [26,27], and this treatment also develop to IUGR. We have generated TXA2 synthase (TXAS)-deleted mice and reported that TXAS is not essential for embryogenesis, reproduction, growth, thrombopoiesis and lymphocyte differentiation. However, TXAS deletion causes a mild hemostatic defect but protects mice against arachidonate-induced shock and death due to systemic platelet thrombi [28]. To investigate whether blockade of TXAS may provide an alternative strategy for PIH or PE prevention, we have used TXAS-deleted mice treated with high salt as a model. Our results demonstrated that TXAS KO

female mice were more resistant to high salt-induced PE than WT counterpart. Moreover, TXAS KO female mice had reduced apoptosis and inflammatory cytokine expressions in placenta and decreased level of growth factors in circulation. Our study suggests that specific blockade of TXA2 production may have beneficial to women at high risk of PE.



Materials and Methods

Tissues

Placental tissues were obtained under Institutional Review Board approval at Mackay Memorial Hospital, Taipei, Taiwan, from spontaneous preterm birth, normal term delivery or pre-eclamptic patients (33 to 38 weeks of gestation) following Cesarean delivery in the absence of signs and symptoms of chorioamnionitis. Preeclampsia was defined as gestational blood pressure elevation with proteinuria, usually occurring after 20 weeks of gestation according to the ACOG guidelines [29].

Animals

Male and female mice (8-16 weeks) were used in this study. C57BL/6J mice from the Animal Center of the College of Medicine, National Taiwan University were used in early treatment experiment. We have generated TXAS-deficient mice and were bred to ten generation on BALB/c background [28]. All mice were maintained in the institutional laboratory animal center of department of Bioscience Technology of Chung Yuan Christian University. All animal experiments were approved by the board of Animal Welfare of CYCU and performed according to its guidelines. The protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of Chung Yuan Christian University.

Treatment Protocol

High salt solution in drinking water induced preeclampsia symptoms in rats had been established [26,27]. Here we treated 2.7% NaCl solution in mice and protocol were shown in Figs. 1. In briefly, pregnant mice were fed with dH₂O (control group) or 2.7 % NaCl solution (treatment group) in drinking water and starting at Day 12 of gestation and end at Day 18 (S1 Fig.). After parturition, the given birth mice were immediately sacrificed and collected the plasma. Kidney and placenta tissue were collected rapidly and stored at formalin or snap frozen at -80 oC.

Physiological Measurements and Analysis

For pregnant mice, blood pressure was measured by the indirect tail-cuff method (Softron BP-98A tail Blood pressure system; Japan). Body weight and feet size of the mice were recorded every day from Day 10. Urine samples were collected at Day 11, Day 14, and D 18. Urinary protein and creatinine were determined by Protein assay kits (Bio-Rad, USA) and Creatinine Assay Kit (BioAssay Systems, USA), respectively. Placental weight, fetal weight, as well as fetal length (nose-rump length) were measured after birth immediately.

Plasma collection and Molecular detection

Blood was collected by cardiac puncture into heparin tube and then centrifuged 15 min at 1,500 x g, 4 oC to collect plasma. TXA₂, PGI₂ were measured by detection of their metabolite using ACE competitive enzyme immunoassays (Catalog # 501020 and 515211, Cayman, USA). Blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (CRE) were determined by assay kit (Catalog # DIUR-500 and DICT-500, BioAssay Systems, USA). Mouse soluble Flt-1 (sFlt-1) was measured by ELISA kit (Catalog # DY471 and DY1320, R&D systems, USA). Electrolytes were detected by TBA-120FR Automated Clinical Analyzer (TOSHIBA, Japan). All assays procedures were followed the manufacturer's instructions.

RNA preparation and mRNA expression

Total RNA was extracted from placenta tissue using the TRIzol kit (Invitrogen, USA) and used for complementary DNA synthesis as described previously. [28,30] Human TXAS, human GAPDH (internal control for human gene), mouse Tbxas1, and mouse Gapdh transcripts (internal control for mouse gene) were detected by quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR) using TaqMan gene expression assays (Hs01022706_m1, Hs02758991_g1, Mm00495553_m1 and Mm99999915_g1; Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's instructions. Real-time qPCR was performed using a standard protocol on ABI-7300 (Applied Biosystems, USA). Quantification of mouse Il1b, Il6, and reference gene gapdh were conducted by SYBR Green qRT-PCR using previous reported primers [31,32]. The

primers sequence were as follows: IL-1 β Forward: 5'-CAGGCAGGCAGTATCACTCA-3', Reverse: 5'-ATGAGTCACAGAGGATGGGC-3'; IL-6 Forward: 5'-CAGGAGAGGAGACTTCAAG-3', Reverse: 5'-CAGAATTGCCATTGCACAAC-3'; GAPDH Forward: 5'-CTGGAGAAACCTGCCAAGTA-3', Reverse: 5'-AAGAGTGGGAGTTGCTGTTG-3'. All samples were run in triplicate. The threshold cycle is defined as the fractional cycle number at which the fluorescence passes the fixed threshold. Relative quantification of target gene expression was calculated by the comparative CT method.

Western blot

Total tissue protein (25 mg) was separated by SDS-PAGE (10% gel) and transferred onto an Immobilon polyvinylidene difluoride membrane (Pall, USA) [33]. Immunoblot analysis was conducted using antibodies against TXAS (Catalog # 160715, Cayman, USA), GAPDH (Catalog # GT239, GeneTex, Taiwan). The proteins were visualized by DuPont Western Blot Chemiluminescence Reagent (NEN Research, USA).

Histologic analysis, Immunohistochemistry, and TUNEL assay

Placenta and kidney were collected and weighed. The tissues was fixed in 10% buffered formalin for 24 hours, embedded in paraffin, cut at 5-7 μ m and stored at 4°C in dark. For histologic analysis, the sections were de-waxed before staining with hematoxylin and eosin (H&E) [28]. For immunohistochemistry analysis, the de-waxed tissue sections were incubated with a rabbit polyclonal anti-IL1 β antibody (1 : 500 dilution, Catalog # ab9722, Abcam, USA) or a rabbit monoclonal anti-phospho-p38-MAPK antibody (1 : 500 dilution, Catalog # 4511, Cell signaling, USA) at 4°C overnight. After washing with PBS containing 0.5% Tween 20, the detection of primary antibody was conducted by using Super Sensitive™ IHC detection systems (Biogenex, USA) based on the manufacturer's instructions. Hematoxylin counterstaining was used. For detection of apoptotic cells, the sections were stained by TUNEL assay kits (Millipore, S7110). All control tissues stained appropriately.

Statistical analysis

Statistical analysis Data were expressed as means $\pm$ S.E.M. Statistical analyses were performed between different groups using ANOVA test. Asterisks are used in the figures to indicate statistically significant differences (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001).

Results

Increased TXA2 synthase levels in the placenta of pregnant women with PE

Because abnormal placentation and elevated levels of thromboxane A2 (TXA2) are found in pregnant women with PE [12], we investigated whether the TXA2 synthesis in the placenta of women with PE were increased. The results showed that both the RNA and the protein levels of the thromboxane A2 synthase (TXAS), the enzyme responsible for TXA2 production, in the placenta of women with PE were higher than those of women without PE (Fig. 1). This is in agreement with the knowledge that pregnant women with PE had elevated TXA2 metabolite in circulation [34] and suggests that the placental TXA2 levels are in correlation with the pathogenesis of PE.

High salt treatment induces severe growth restriction in mice during pregnancy

Abnormally elevated TXA2 levels were known to induce thrombosis and hypertension [35]. To investigate the role of TXA2 in the pathophysiology of PE, we used wild-type (WT) mice and TXAS-deficient (KO) mice that are defective in synthesizing TXA2 [28] as models, and induced PE in the pregnant female mice by high salt treatment with 2.7% NaCl in drinking water started on day 12 of pregnancy till delivery (fig. S1). Under this experimental condition we found that the pregnant wild-type (WT) control mice exhibited significantly increased TXB2 levels (metabolite of TXA2) as found in women with PE (fig. 2A). They also developed specific PE phenotypes, including high blood pressure and growth restriction in fetus. In contrast, high salt-treated TXAS-deficient pregnant mice had undetectable TXB2 due to loss the TXAS gene, and had less severe phenotypes. We found that while WT pregnant female mice gradually developed high blood pressure (Δ MAP=15 mmHg) upon high salt treatment, the KO group did not (fig. 2B). Moreover, the weights and sizes of the fetuses born to the high salt-treated WT mice were reduced by nearly 50% and 24%, respectively. In contrast, those of the fetuses born to the high salt-treated KO mice were mildly affected (fig. 2C and 2D). In addition, we found

that the 6-keto-PGF1 α (metabolite of prostacyclin) levels remained unchanged in and comparable between WT and KO groups during high salt induction (fig. 2E). This suggests that prostacyclin does not play a role in this experimental model.

Detailed physical examination of the pregnant mice showed that both high salt drinking water-treated WT and KO groups had higher sodium and chloride levels in plasma compared with regular water-treated control groups. This further indicates that the experimental treatment was successful (Table 1). Other parameters such as potassium, total calcium, magnesium, serum creatinine and BUN remained unchanged before and after high salt supplement on WT and KO mice. Moreover, both WT and KO groups also did not develop proteinuria, or edema in the lower extremity as measured by the size of the feet, or sFlt-1, which are also unchanged in all experimental groups (fig. S2).

While the fetus sizes and weights were affected by high salt treatment (fig. 2C-2D), we found the WT group was more severely affected than the KO group. We also found that while the maternal weights of WT and KO groups on regular drinking water increased gradually during the gestational period, the maternal body weights of both WT and KO groups were both significantly lower than the regular water control groups (Fig. 3A). Moreover, the KO group on high salt water had more body weight than the WT counterpart (31.5 g v.s 24.8 g) (Fig. 3A). The placental weight as well as the litter size was not different among all experimental groups (Fig. 3B-3C). By calculation we found that the maternal net body weight of KO (29.3 $\pm$ 2.7 g) on regular water was similar with WT counterpart (27.9 $\pm$ 2.7 g). On the other hand, in the high salt treatment condition, the KO group (23.4 $\pm$ 3.1 g) had higher body weight than that of the WT counterpart (18.8 $\pm$ 2.1 g) (Fig. 3D). However, how the TXA2 affected the maternal body weight is unclear.

High-salt drinking water-treated TXAS KO pregnant mice show increased blood infusion and resistant to apoptosis in the placenta

High salt drinking water may cause deleterious effects on the maternal kidney and placenta. Moreover, placenta defects may affect fetal development due to insufficient nutrient supply [36]. To explore how high salt treatment resulted in severe fetal growth restriction, we performed detailed examination on histopathology of kidney and placenta. While tissue sections showed no significant alterations in the kidney and placenta in the WT or KO pregnant mice either fed with high salt or normal drinking water, increased blood flow with numerous red blood cells were found in the vascular sinuses of the placenta labyrinth of the KO mice, indicating there were hemostatic defects in the KO pregnant mice (Fig. S3). Our data suggest that depletion of TXA2 as in the KO mice may increase blood infusion into the placenta and provide more nutrients supply to fetus, and consequently render these mice sustainable to high-salt drinking water-induced severe growth restriction.

High levels of TXA2 have been suggested to play a role in placental cell apoptosis, and that may consequently contribute to hypertension [37]. We next assessed the extent of apoptosis in the placenta. The number of apoptotic cells that were identified as DAPI/TUNEL double-positive was remarkably increased in the WT placenta labyrinth as compared to the KO fed with high-salt water (Fig. 4)

High salt treatment of pregnant mice induced IL-1 β signaling pathway in the placenta of WT mice but not the KO counterpart

Studies have indicated that elevated TXA2 and IL-1 β may contribute to placental dysfunction by restricting differentiation, induction of cell cycle arrest, and enhancing apoptosis in human trophoblasts [37,38]. In addition, IL-1 β could induce cellular apoptosis via p38-Mitogen Activated Protein Kinase (p38-MAPK) activation [39]. Thus, we examined the mRNA and protein expression of IL-1 β and the downstream signaling molecules, including IL-6 and the activated form of p38-MAPK. We found that the IL-1 β mRNA and protein levels and IL-6 mRNA were all upregulated in high-salt treated WT placentas (Fig. 5A-5C). Moreover, the number of cells expressing phosphorylated p38-MAPK in placenta labyrinth was increased in high-salt treated WT group, but not in KO counterpart (Fig 5D-E). Our data demonstrated high salt drinking water induced IL-1 β signaling pathway in the WT placenta, which may be related to the role of TXA2 in the regulation of IL-1 β and its downstream molecules, and the effect was

minimal in the TXA2 KO mice.

Discussion

Poorly development of placenta is accepted as the key factor for the etiology of PIH and PE [3,4]. In this study, we demonstrated that TXAS mRNA and protein was highly expressed in the placental tissue from PE patients in the comparison of gestational age-matched controls, in agreement with previous reports shown that both TXAS mRNA and protein were abundant in trophoblast layer, decidua, and blood vessels of placenta from PE pregnancies [40,41]. Low dose aspirin which selectively inhibits TXA2 production has been shown beneficial effects in a wide range of clinical trials for prevention of placenta-associated pregnancy complications including reducing the risk by 17–21% of PE [42–47]. Recently, the US Preventive Services Task Force (USPSTF) has recommended to use of low does aspirin (81mg daily) in women who are at high risk of developing PE [48,49]. However, the detail mechanism of protective effects of aspirin is not well defined, to address the role of TXA2 blockade in aspirin-mediated prevention of PE, we established an inducible PE mouse model in which mice were treated with salted-water in drinking and applied *Tbxas1* KO mice on this model. Salted-water treatment resulted in significant elevation in plasma sodium and chloride concentration in both WT and KO pregnant mice without defective in renal function (data not shown) and structure and decrease in litter size. We showed that WT pregnant mice with salted-water intake demonstrated hypertension, imbalances of plasma prostanoid levels which TXA2 level was elevated without change in PGI2 level, and lower fetal weight and size. The aforementioned phenotypes observed in WT mice were mostly consistent with the rat administrated with salted-water [27]. While WT female mice were suffered from adverse effects induced by salted-water, the KO mice did not revealed high blood pressure and fetal weight and size only showed mild decrease. Besides, we also found that although the body weight of KO pregnant mice with salted-water intake were less increased as those with normal drinking along with the progression of gestation, WT counterparts showed a more severe phenotype that almost unchanged in their body weight. Salted-water treatment not only restricted fetal growth, it also affected pregnant mice themselves as their maternal net body weight was obviously reduced, but this reduction was mollified in KO mice.

It has been reported that overexpressing TP or infusing synthetic TXA2 in pregnant rodents would induce IUGR [50–52]. In addition, specific inhibition of TXA2 production has been demonstrated to reduce pregnancy-induced hypertension and proteinuria in a small scale clinical trial of PE women. We have shown normal growth and thrombopoiesis, and only mild hemostatic defect in *Tbxas1* KO mice previously [28], in this study we further demonstrated deficient in TXA2 did not result in severe bleeding at delivery and reduction in litter size, and plasma sFlt-1 levels from KO were lower than WT mice in normal pregnancy ($p = 0.08$). Together our results confirmed the protective effect of blocking TXA2 production on prevention of PIH, PE, and IUGR and the safety of specific inhibition of TXA2 as we did not observe any obvious side effects such as abnormal hemorrhage. Moreover, we provided additional evidence that this protective effect was beneficial to both mother and fetus.

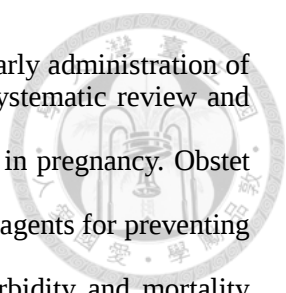
Infusion with TXA2 analog in the last week of C57BL/6J mouse gestation was shown to induce IUGR. The increased production of TXA2 may be deleterious to placenta. Culturing the trophoblasts from clinical PE samples under hypoxia condition could induce TXAS expression [53], which may consequently inhibit the trophoblast differentiation and enhance apoptosis of trophoblasts [37]. TXA2 was also considered to enhance oxidative stress via mediating the superoxide production by neutrophils obtained from pregnant women [54]. All of the results indicate TXA2 may damage placental tissues and cause placental insufficiency which may consequently restrict fetal growth [55]. In the present study, although we did not observed morphological and structural alterations induced by salted-water, we found that blood flow was increased in placenta after salted-water treatment, and placenta from KO mice with normal or salted-water drinking showed more significant blood infusion in the comparison with their WT counterparts. Increased production of pro-inflammatory cytokines such as interleukin IL-1 β and IL-6 has been detected in women with PE [56]. IL-1 β has been shown to modulate human trophoblast proliferation through triggering apoptotic cell death and induction of cell cycle arrest [38]. Besides induction of apoptosis by IL-1 β was shown to rely on p38MAPK activity

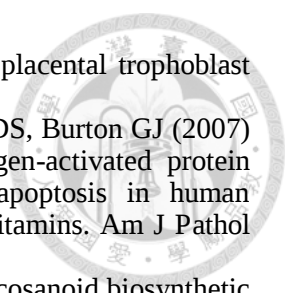
[57,58]. We measured gene expressions in placental tissue and identified *Il1b* and *Il6* mRNA levels were upregulated in WT but not in KO mice with salted-water treatment. Further examination of *IL-1 β* and the phosphorylated-p38MAPK showed that *IL-1 β* signaling pathway was significantly induced by salted-water treatment concordant with increased number of apoptotic cells in placenta from WT but not in KO mice. Taken together, inhibition of TXA2 production may help to increase blood infusion and thus provides more nutrient supply to placental tissue, and could inhibit *IL-1 β* signaling pathway upregulation and thus protect placental cells from apoptosis.

In summary, using salted-water treatment we successfully induced PE phenotypes in WT pregnant mice. We further use this model to investigate how TXA2 blockade prevents PE and found that *Tbxas1* KO mice were more resistant to adverse effects induced by salted-water. Our results provide evidence supporting the safety of TXAS inhibitors which may offer anti-PE effects owing to prevention of hypertension and placental damage.

Reference

1. McCoy S, Baldwin K (2009) Pharmacotherapeutic options for the treatment of preeclampsia. *Am J Health Syst Pharm* 66: 337-344.
2. Reslan OM, Khalil RA (2010) Molecular and vascular targets in the pathogenesis and management of the hypertension associated with preeclampsia. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 8: 204-226.
3. Redman CW, Sargent IL (2000) Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta* 21: 597-602.
4. Furuya M, Ishida J, Aoki I, Fukamizu A (2008) Pathophysiology of placentation abnormalities in pregnancy-induced hypertension. *Vasc Health Risk Manag* 4: 1301-1313.
5. Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA (2002) Pathophysiology of preeclampsia: linking placental ischemia/hypoxia with microvascular dysfunction. *Microcirculation* 9: 147-160.
6. Lyall F, Myatt L (2002) The role of the placenta in pre-eclampsia--a workshop report. *Placenta* 23 Suppl A: S142-145.
7. Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA (2001) Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Hypertension* 38: 718-722.
8. Lockwood CJ, Yen CF, Basar M, Kayisli UA, Martel M, et al. (2008) Preeclampsia-related inflammatory cytokines regulate interleukin-6 expression in human decidual cells. *Am J Pathol* 172: 1571-1579.
9. Benyo DF, Smarason A, Redman CW, Sims C, Conrad KP (2001) Expression of inflammatory cytokines in placentas from women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 2505-2512.
10. Raghupathy R (2013) Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. *Med Princ Pract* 22 Suppl 1: 8-19.
11. Shah DA, Khalil RA (2015) Bioactive factors in uteroplacental and systemic circulation link placental ischemia to generalized vascular dysfunction in hypertensive pregnancy and preeclampsia. *Biochem Pharmacol* 95: 211-226.
12. Walsh SW (2004) Eicosanoids in preeclampsia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70: 223-232.
13. Walsh SW (1985) Preeclampsia: an imbalance in placental prostacyclin and thromboxane production. *Am J Obstet Gynecol* 152: 335-340.
14. Zhao S, Gu Y, Lewis DF, Wang Y (2008) Predominant basal directional release of thromboxane, but not prostacyclin, by placental trophoblasts from normal and preeclamptic pregnancies. *Placenta* 29: 81-88.
15. Sellers MM, Stallone JN (2008) Sympathy for the devil: the role of thromboxane in the regulation of vascular tone and blood pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H1978-1986.
16. Gilbert JS, Ryan MJ, LaMarca BB, Sedeek M, Murphy SR, et al. (2008) Pathophysiology of hypertension during preeclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H541-550.

- 
17. Roberge S, Giguere Y, Villa P, Nicolaides K, Vainio M, et al. (2012) Early administration of low-dose aspirin for the prevention of severe and mild preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Perinatol* 29: 551-556.
 18. Sibai BM, Mirro R, Chesney CM, Leffler C (1989) Low-dose aspirin in pregnancy. *Obstet Gynecol* 74: 551-557.
 19. Knight M, Duley L, Henderson-Smart DJ, King JF (2000) Antiplatelet agents for preventing and treating pre-eclampsia. *Cochrane Database Syst Rev*: CD000492.
 20. LeFevre ML (2014) Low-dose aspirin use for the prevention of morbidity and mortality from preeclampsia: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med* 161: 819-826.
 21. Llinas MT, Alexander BT, Seedek M, Abram SR, Crell A, et al. (2002) Enhanced thromboxane synthesis during chronic reductions in uterine perfusion pressure in pregnant rats. *Am J Hypertens* 15: 793-797.
 22. Weiner CP, Thompson LP, Liu KZ, Herrig JE (1992) Endothelium-derived relaxing factor and indomethacin-sensitive contracting factor alter arterial contractile responses to thromboxane during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 166: 1171-1178; discussion 1179-1181.
 23. Kriston T, Venuto RC, Baylis C, Losonczy G (1999) Hemodynamic and renal effects of U-46619, a TXA₂/PGH₂ analog, in late-pregnant rats. *Am J Physiol* 276: R831-837.
 24. Losonczy G, Singh JP, Schoenl M, Mucha I, Venuto RC (1995) Pregnancy enhances the pressor response to thromboxane analogues in rabbits. *Am J Physiol* 269: R720-725.
 25. Seki H, Kuromaki K, Takeda S, Kinoshita K, Satoh K (1999) Trial of prophylactic administration of TXA₂ synthetase inhibitor, ozagrel hydrochloride, for preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 18: 157-164.
 26. Beausejour A, Auger K, St-Louis J, Brochu M (2003) High-sodium intake prevents pregnancy-induced decrease of blood pressure in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H375-383.
 27. Beausejour A, Bibeau K, Lavoie JC, St-Louis J, Brochu M (2007) Placental oxidative stress in a rat model of preeclampsia. *Placenta* 28: 52-58.
 28. Yu IS, Lin SR, Huang CC, Tseng HY, Huang PH, et al. (2004) TXAS-deleted mice exhibit normal thrombopoiesis, defective hemostasis, and resistance to arachidonate-induced death. *Blood* 104: 135-142.
 29. (2002) ACOG practice bulletin. Diagnosis and management of preeclampsia and eclampsia. Number 33, January 2002. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Int J Gynaecol Obstet* 77: 67-75.
 30. Yang YL, Lin SR, Chen JS, Lin SW, Yu SL, et al. (2010) Expression and prognostic significance of the apoptotic genes BCL2L13, Livin, and CASP8AP2 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 34: 18-23.
 31. Schurigt U, Stopfel N, Huckel M, Pfirschke C, Wiederanders B, et al. (2005) Local expression of matrix metalloproteinases, cathepsins, and their inhibitors during the development of murine antigen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 7: R174-188.
 32. Lin SL, Chang FC, Schrimpf C, Chen YT, Wu CF, et al. (2011) Targeting endothelium-pericyte cross talk by inhibiting VEGF receptor signaling attenuates kidney microvascular rarefaction and fibrosis. *Am J Pathol* 178: 911-923.
 33. Chen CP, Huang JP, Chu TY, Aplin JD, Chen CY, et al. (2013) Human placental multipotent mesenchymal stromal cells modulate trophoblast migration via Rap1 activation. *Placenta* 34: 913-923.
 34. Goeschen K, Henkel E, Behrens O (1993) Plasma prostacyclin and thromboxane concentrations in 160 normotensive, hypotensive, and preeclamptic patients during pregnancy, delivery, and the post partum period. *J Perinat Med* 21: 481-489.
 35. Ally AI, Horrobin DF (1980) Thromboxane A₂ in blood vessel walls and its physiological significance: relevance to thrombosis and hypertension. *Prostaglandins Med* 4: 431-438.
 36. Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA (2011) Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation* 123: 2856-2869.
 37. Yusuf K, Smith SD, Levy R, Schaiff WT, Wyatt SM, et al. (2001) Thromboxane A₂ limits differentiation and enhances apoptosis of cultured human trophoblasts. *Pediatr Res* 50: 203-209.

- 
38. Nilkaeo A, Bhuvanath S (2006) Interleukin-1 modulation of human placental trophoblast proliferation. *Mediators Inflamm* 2006: 79359.
 39. Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Jauniaux E, Charnock-Jones DS, Burton GJ (2007) Nuclear factor-kappa B, p38, and stress-activated protein kinase mitogen-activated protein kinase signaling pathways regulate proinflammatory cytokines and apoptosis in human placental explants in response to oxidative stress: effects of antioxidant vitamins. *Am J Pathol* 170: 1511-1520.
 40. Woodworth SH, Li X, Lei ZM, Rao CV, Yussman MA, et al. (1994) Eicosanoid biosynthetic enzymes in placental and decidual tissues from preeclamptic pregnancies: increased expression of thromboxane-A2 synthase gene. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 1225-1231.
 41. Mousa AA, Strauss JF, 3rd, Walsh SW (2012) Reduced methylation of the thromboxane synthase gene is correlated with its increased vascular expression in preeclampsia. *Hypertension* 59: 1249-1255.
 42. Duley L, Henderson-Smart DJ, Meher S, King JF (2007) Antiplatelet agents for preventing pre-eclampsia and its complications. *Cochrane Database Syst Rev*: CD004659.
 43. Briceno-Perez C, Briceno-Sanabria L, Vigil-De Gracia P (2009) Prediction and prevention of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 28: 138-155.
 44. Elmahashi MO, Elbareg AM, Essadi FM, Ashur BM, Adam I (2014) Low dose aspirin and low-molecular-weight heparin in the treatment of pregnant Libyan women with recurrent miscarriage. *BMC Res Notes* 7: 23.
 45. Schramm AM, Clowse ME (2014) Aspirin for prevention of preeclampsia in lupus pregnancy. *Autoimmune Dis* 2014: 920467.
 46. Xu TT, Zhou F, Deng CY, Huang GQ, Li JK, et al. (2015) Low-Dose Aspirin for Preventing Preeclampsia and Its Complications: A Meta-Analysis. *J Clin Hypertens (Greenwich)*.
 47. Trivedi NA (2011) A meta-analysis of low-dose aspirin for prevention of preeclampsia. *J Postgrad Med* 57: 91-95.
 48. Sidaway P (2014) Pre-eclampsia: low-dose aspirin for pre-eclampsia. *Nat Rev Nephrol* 10: 613.
 49. Sibai BM (2015) Therapy: Low-dose aspirin to reduce the risk of pre-eclampsia? *Nat Rev Endocrinol* 11: 6-8.
 50. Rocca B, Loeb AL, Strauss JF, 3rd, Vezza R, Habib A, et al. (2000) Directed vascular expression of the thromboxane A2 receptor results in intrauterine growth retardation. *Nat Med* 6: 219-221.
 51. Hayakawa M, Takemoto K, Nakayama A, Saito A, Sato Y, et al. (2006) An animal model of intrauterine growth retardation induced by synthetic thromboxane a(2). *J Soc Gynecol Investig* 13: 566-572.
 52. Fung C, Brown A, Cox J, Callaway C, McKnight R, et al. (2011) Novel thromboxane A2 analog-induced IUGR mouse model. *J Dev Orig Health Dis* 2: 291-301.
 53. Bowen RS, Zhang Y, Gu Y, Lewis DF, Wang Y (2005) Increased phospholipase A2 and thromboxane but not prostacyclin production by placental trophoblast cells from normal and preeclamptic pregnancies cultured under hypoxia condition. *Placenta* 26: 402-409.
 54. Vaughan JE, Walsh SW, Ford GD (2006) Thromboxane mediates neutrophil superoxide production in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 195: 1415-1420.
 55. Krishna U, Bhalerao S (2011) Placental insufficiency and fetal growth restriction. *J Obstet Gynaecol India* 61: 505-511.
 56. Kalinderis M, Papanikolaou A, Kalinderi K, Ioannidou E, Giannoulis C, et al. (2011) Elevated serum levels of interleukin-6, interleukin-1beta and human chorionic gonadotropin in pre-eclampsia. *Am J Reprod Immunol* 66: 468-475.
 57. Wang XJ, Kong KM, Qi WL, Ye WL, Song PS (2005) Interleukin-1 beta induction of neuron apoptosis depends on p38 mitogen-activated protein kinase activity after spinal cord injury. *Acta Pharmacol Sin* 26: 934-942.
 58. Vetere A, Choudhary A, Burns SM, Wagner BK (2014) Targeting the pancreatic beta-cell to treat diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 13: 278-289.

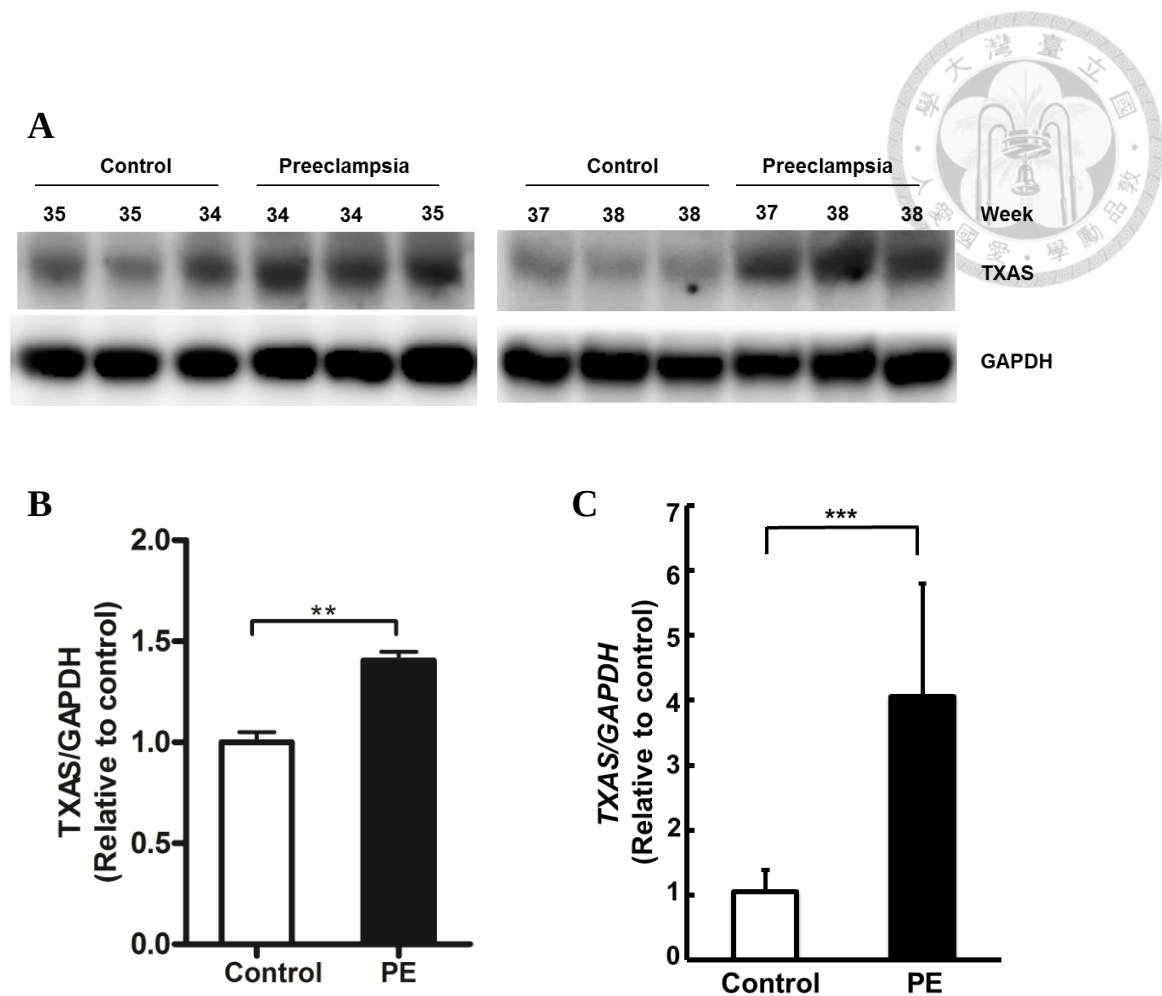


Fig. 1 TXAS was upregulated in the human preeclamptic placentas. (A) Western blotting of TXAS protein levels in the placentas of preeclampsia women compared with gestational age-matched controls. (B) Quantification of TXAS protein was conducted by densitometric analysis. (n = 6 for each group). (C) TXAS mRNA level was determined by qRT-PCR (n = 15 for each group). Protein and mRNA expression level of reference gene *GAPDH* were used as an internal control for Western blotting and qRT-PCR, respectively. Relative expression to control patients were shown by the bars representing the mean $\pm$ S.E.M. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (ANOVA).

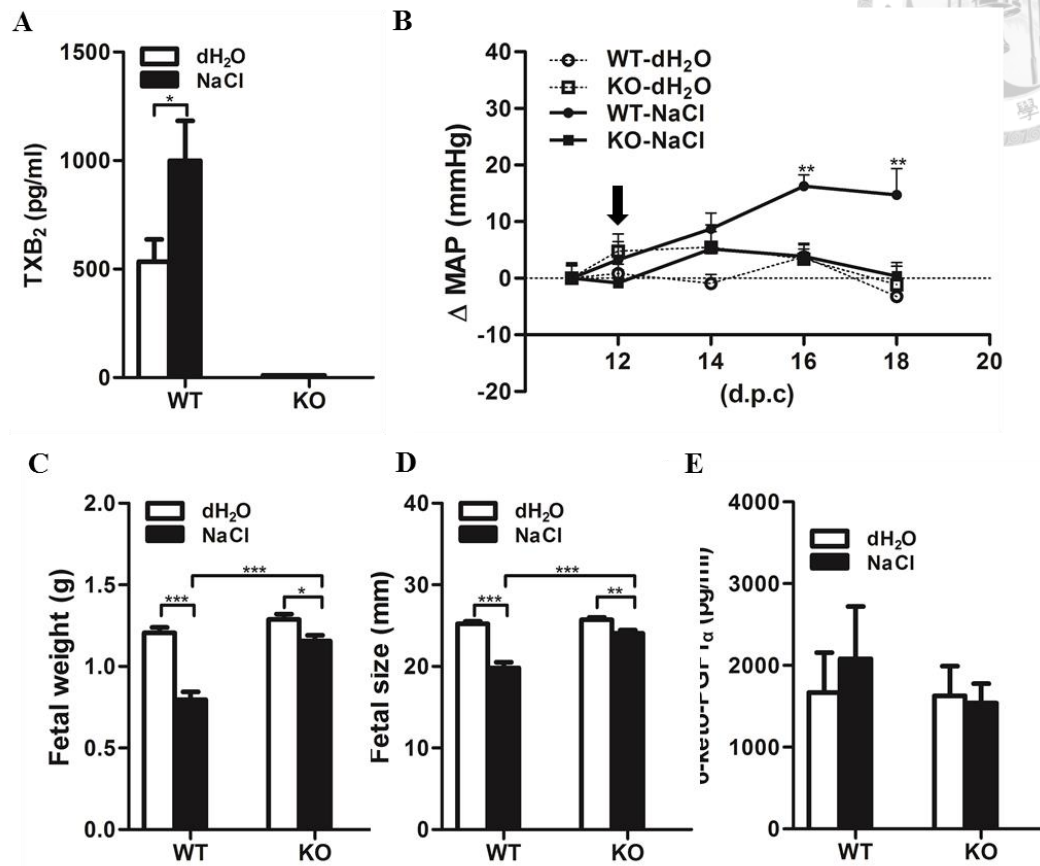


Fig. 2 The high salt treatment induced higher plasma TXA₂ level and blood pressure, and affected fetal growth in WT pregnant mice. The plasma (A) TXB₂, the metabolite of TXA₂, and (E) 6-keto-PGF₁α level were detected by EIA (n = 7 for each group). (B) The Mean arterial pressure (ΔMAP) was measured from D11 to D18 and was normalized to the corresponding D11 baseline pressure (n = 10 for each group). Arrow means the beginning of high salt treatment. Fetal weight (C) and size (D) were measured immediately after delivery. Bars represented the means ± S.E.M. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 (ANOVA).



Table 1. Effects of 2.7% NaCl supplement on Plasma Electrolytes, Creatinine, and BUN

	WT		KO	
	dH ₂ O	NaCl	dH ₂ O	NaCl
Sodium, mmol/l	158.5±5.54	169.5±7.7 *	160.17±7.65	172.85±7.9 *
Potassium, mmol/L	5.83±0.51	5.83±0.55	6.75±1.01	5.91±0.56
Chloride, mmol/L	130.67±7.89	142.75±9.74 *	129.83±6.94	141.43±10.41 *
Total calcium, mmol/L	1.34±0.39	1.23±0.18	1.55±0.18	1.54±0.39
Magnesium, mmol/L	0.59±0.18	0.54±0.04	0.62±0.12	0.61±0.13
Creatinine, mg/dL	0.21±0.12	0.16±0.1	0.32±0.16	0.28±0.14
Blood urea nitrogen, mg/dL	27.77±9.92	33.56±30.15	32.12±6.23	46.21±18.4

Values are means±SD. Each group number were 5. * $P<0.05$ compared with control groups

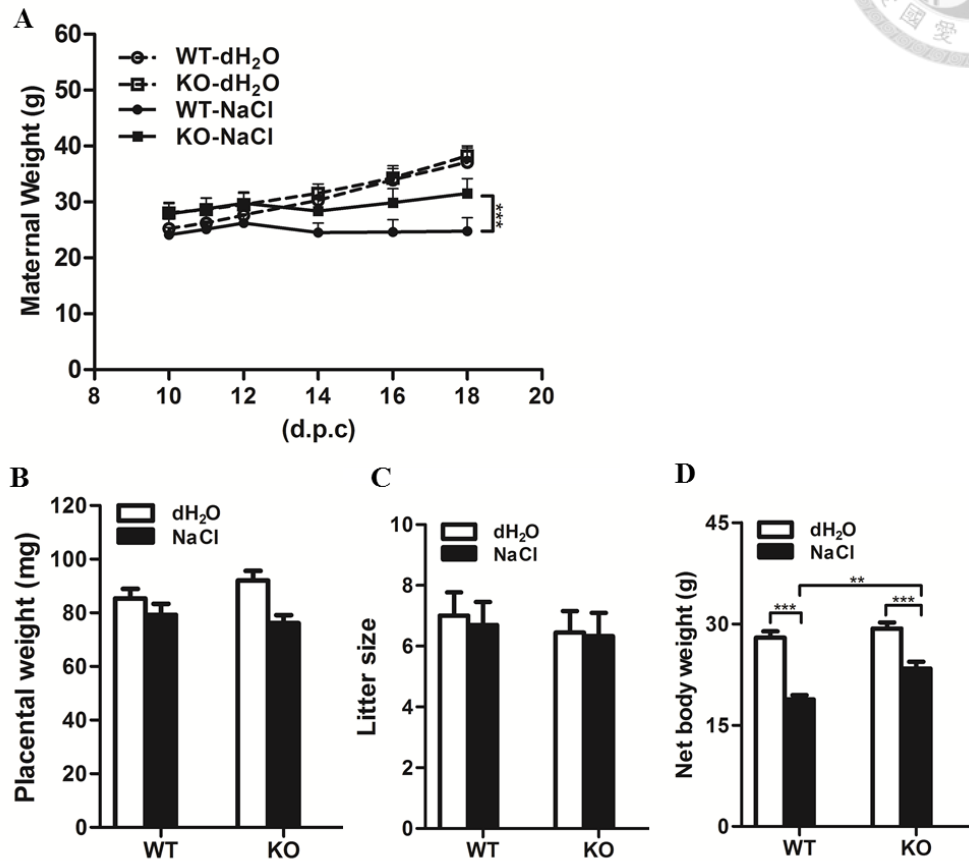


Fig. 3 The Effects of high salt treatment on maternal weight and placenta. (A) Maternal body weight was recorded during mid-late pregnancy. Placental weight (B), litter size (C) and maternal net bod weight (D) were also recorded after delivery immediately. Data were shown as means $\pm$ S.E.M. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (ANOVA).

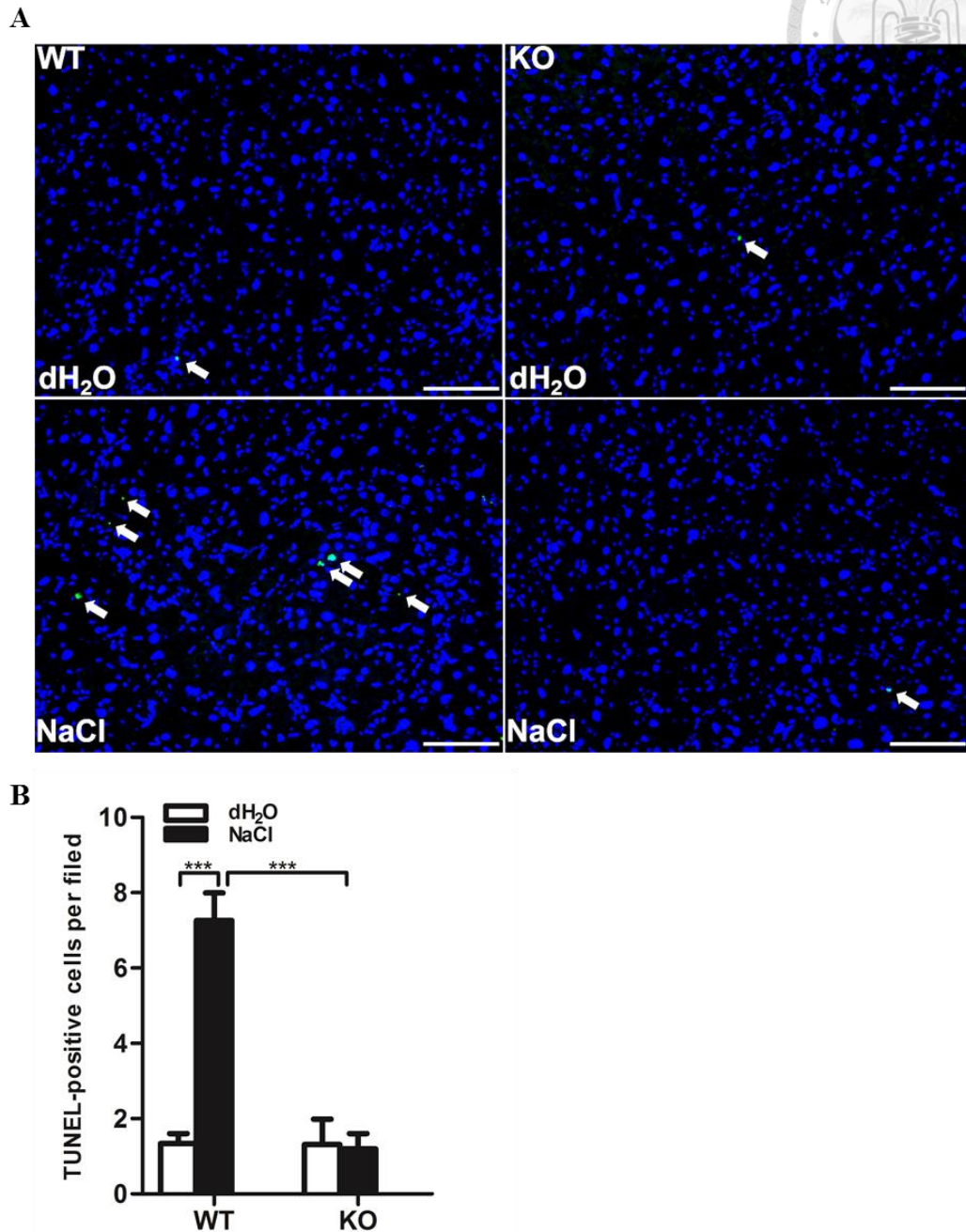


Fig. 4 Increase of apoptotic cells in placenta labyrinth of high-salt treated mice. (A) TUNEL positive cells (green, arrow) observed in placenta. DAPI (blue) was used as for nuclear staining. Scale bar was 100 μ m. (B) The number DAPI/TUNEL double-positive cells in placenta labyrinth was quantified and averaged from ten to fifteen fields per placenta (n = 4 for each group). Data were shown as means $\pm$ S.E.M. * $P < 0.05$ (ANOVA).

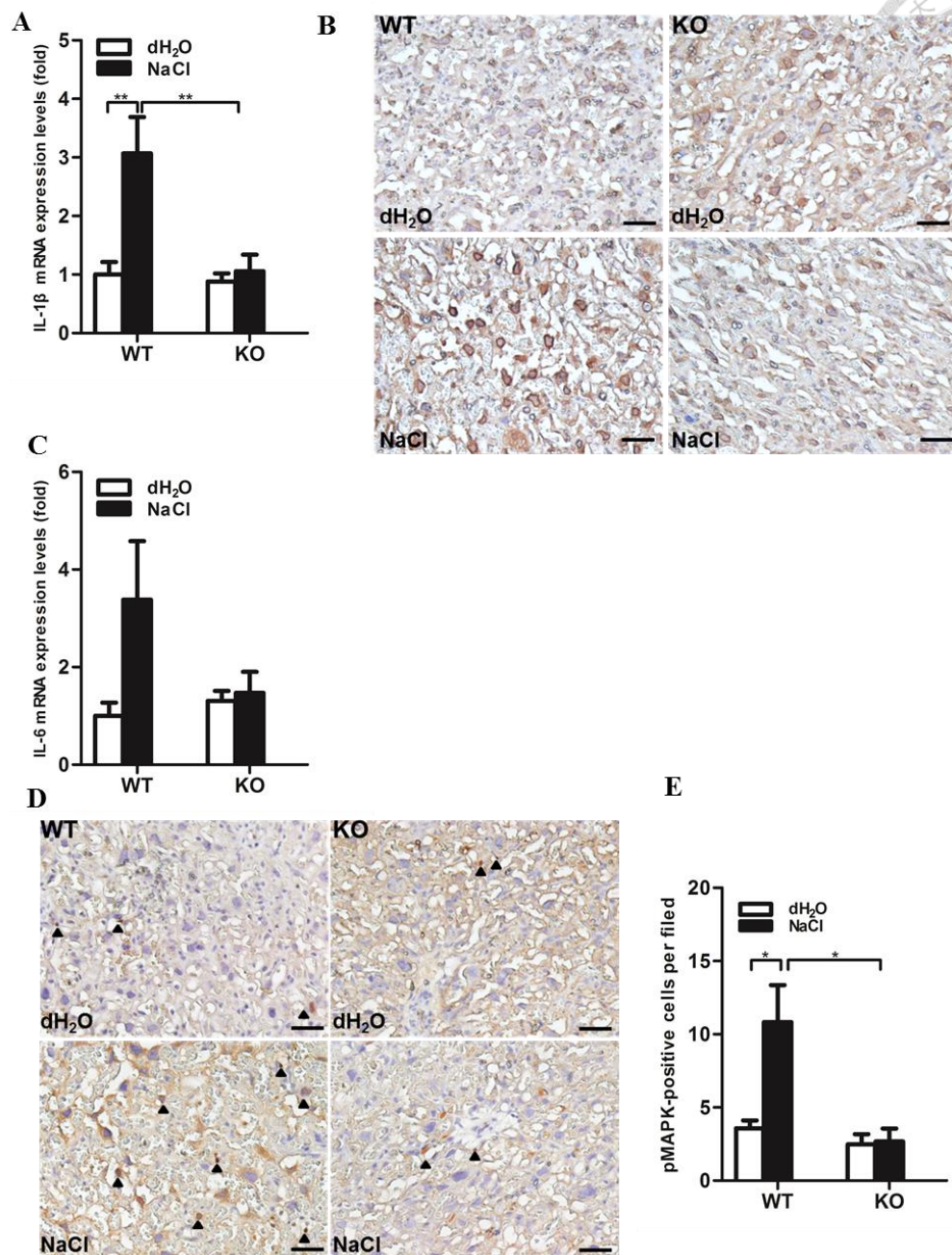


Fig. 5 The high salt treatment induced IL-1 β signaling pathway in WT placentas.

(A) Immunohistochemistry for IL-1 β and (B) *Il1b* and *Il6* mRNA expression were detected by real-time qPCR ($n = 5$ for each group). Reference gene *Gapdh* was used as an internal control for qRT-PCR. (D) Immunohistochemistry for phosphorylated p38-MAPK (Arrow head show positive signal and co-localized with nucleus (hematoxylin)). (E) The number positive cells was quantified and averaged from ten to fifteen fields per placenta ($n = 4$ for each group). Data were shown as means $\pm$ S.E.M. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). Scale bars were 100 μ m in (A) and 50 μ m in (D).

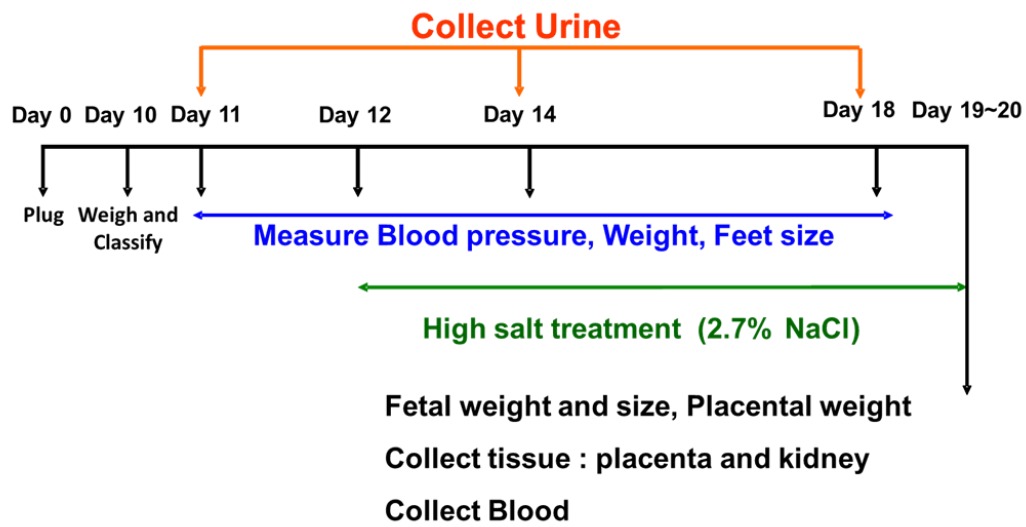


Fig. S1 The experimental design. Female mice were mated, checked plug at D0.5. , measured body weight and random assigned to each group at D10. WT and KO pregnant mice were fed with dH₂O or 2.7% NaCl in drinking water at D12 until delivery. Maternal weight, blood pressure and feet size were recorded every two days from D11 to D18. Blood Pressure was measured and record by tail-cuff system and performed between 9:00 – 12:00 am. Urine was also collected at D11, D14 and D18. Blood and tissues were collected immediately after delivery.

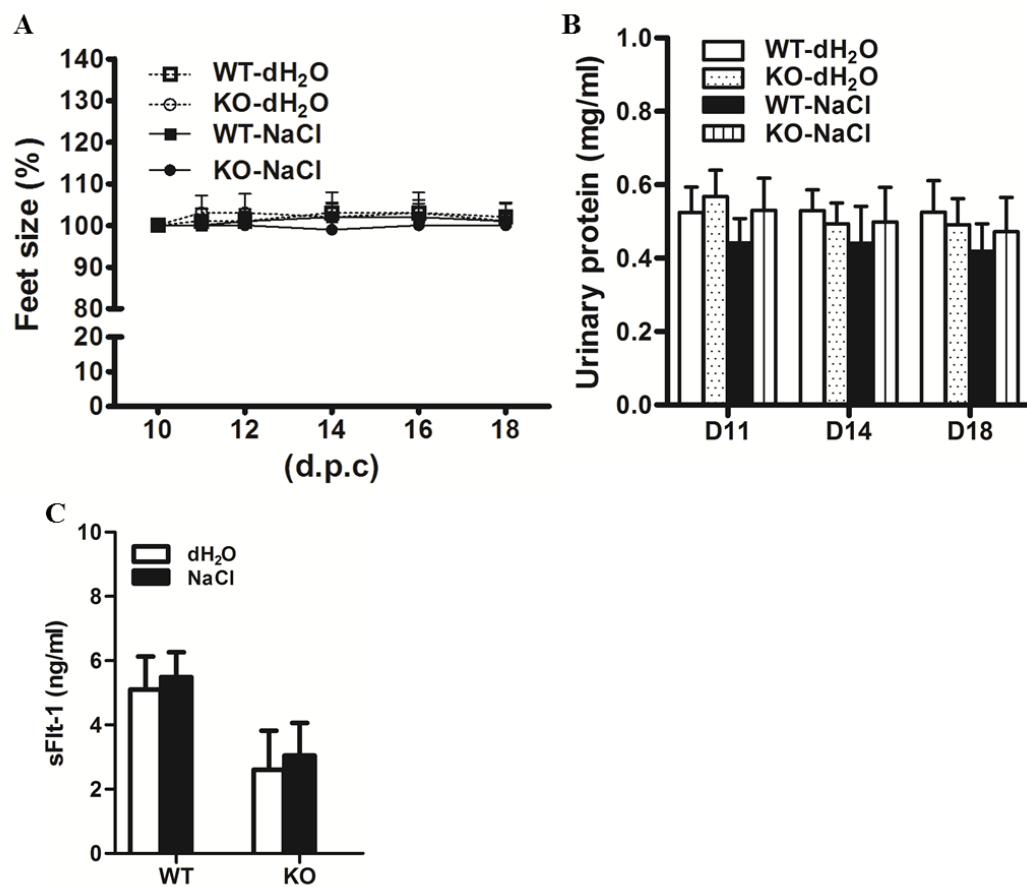


Fig. S2 The feet size and urine protein of pregnant mice were measured during mid-late pregnancy and the plasma sFlt-1 was detected after delivery. (A) Maternal feet size was measured by electronic calipers. (B) Urine protein level was determined by protein assay. (C) Plasma sFlt-1 level was determined by EIA assay. Data were shown as means $\pm$ S.E.M.

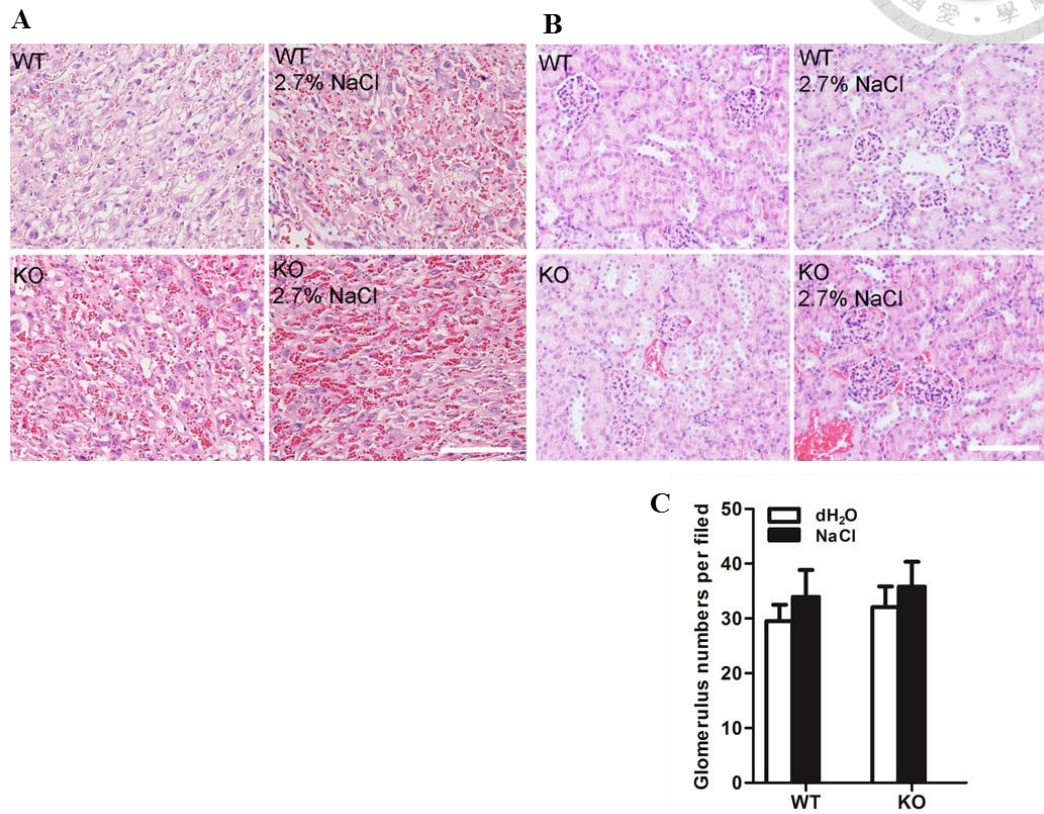


Fig. S3 Histological analysis of mouse placenta and kidney. H&E stain was conducted on (A) placenta and (B) kidney. (C) The number of glomerulus in kidney was quantified and averaged from ten to fifteen fields per placenta (n = 5 for each group). Data were shown as means $\pm$ S.E.M. ****P**<0.01 (ANOVA). Scale bar was 50 μ m.