

國立臺灣大學醫學院生理學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Physiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

內皮唾酸蛋白基因剔除後對缺血再灌流的

急性腎損傷之影響

The effect of endosialin knockout on the
ischemia-reperfusion acute kidney injury

劉家豪

Chia-Hao Liu

指導教授：林水龍 博士

Advisor: Shuei-Liong Lin, M.D. Ph.D.

中華民國 105 年 6 月

June, 2016

國立臺灣大學（碩）博士學位論文
口試委員會審定書

內皮唾酸蛋白基因剔除後對缺血再灌流的
急性腎損傷之影響

The effect of endosialin knockout on the
ischemia-reperfusion acute kidney injury

本論文係 劉冠豪 君（學號 R02441017）在國立臺灣大學
生理學研究所完成之碩士學位論文，於民國 105 年 6 月 28 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：

林水輝

（簽名）

（指導教授）

吳明修

姜文智

系主任、所長

湯志水

（簽名）

謝辭



感謝水龍老師這三年來的指導，不論是在課堂上或者是 lab meeting 時，您總是仔細的講解背景知識並引導我們進行問題的討論。而在實驗上，您也常常給予我許多建議與鼓勵，讓我的實驗能夠順利地進行下去。同時也要感謝 Eileen 幫忙處理實驗室的大小雜事，讓我們能夠專心的做實驗，也謝謝您常常提醒我們做實驗時該注意的事情，所以有時候不是我不理你，是因為我在抽 RNA。

在苦悶的實驗中有大家的陪伴，實在是很快樂。由於老師與學長姐的努力，常常有論文的發表，因此也常常在慶祝聚餐，謝謝大家讓我變得越來越“穩重”。謝謝芳翎跟千慧在我剛進來實驗室的時候帶我認識環境，並教我做手術，在許多實驗上也不吝嗇地告訴我實驗技巧，最重要的是本實驗室人人必須學會的“辯論技巧”，你們也都直接讓我親身參與。謝謝靜欽學長在忙碌的實驗中，還是不厭其煩地替我解答實驗上遇到的問題，在我忙不過來的時候給予我幫助，也時常跟我分享您家哥哥與妹妹的趣事，我會向您看齊當個好丈夫好爸爸的。感謝紀均和佩綦在我忙碌的時候，幫我把老鼠拿回來，在我嘴巴癢的時候又扮演箭靶的角色，為實驗室的大家製造笑果，許多的話純屬效果不要當真阿。謝謝實驗室裡的每一個人，在我苦惱論文要怎麼寫的時候，都一直鼓勵我。

感謝我的爸媽一直支持著我，讓我無後顧之憂的完成碩士學業，謝謝你們的栽培與陪伴；謝謝我的哥哥，一直支持著我，教我面對挑戰。此外也要特別感謝我的女友怡安，一直以來都在身邊督促我、鞭策我、鼓勵著我，雖然距離你的期望還是有點距離，但沒有你就不會有現在的我。未來希望能發揮所長，貢獻自己的力量回饋社會。



摘要


即便在現今醫療水準大幅提升的環境下，急性腎損傷 (acute kidney injury；AKI) 的發病率、盛行率及死亡率仍高居不下。而至今仍然沒有發展出有效的藥物或治療方式來改善急性腎損傷，因此尋找出有效的藥物或者治療方式是十分迫切的。

根據過去的研究中發現到 Endosialin (中文稱內皮唾酸蛋白；又稱 Tumor endothelial marker 1；CD248) 在健康的成體中，只有腎臟及子宮有大量的表現；在腫瘤生長或者發炎反應時，Endosialin 也會被大量的表現出來。先前實驗室在單側輸尿管阻塞的慢性腎臟病模型研究中，發現到將 Endosialin 剔除後，可以有效地降低腎臟的纖維化，而腎臟內的巨噬細胞數量也會減少；但巨噬細胞在急性發炎所扮演的角色跟慢性發炎又不相同，普遍認為巨噬細胞在急性發炎時對於組織的支持、修復是有正面的幫助，因此我們想看看在急性腎損傷的情況下，Endosialin 剔除後會有什麼樣的影響。

本論文是將 7 週大的公鼠先施予右側腎臟摘除，兩週後再將左側腎臟做缺血再灌流手術，做為本實驗的急性腎損傷模型，藉此來比較 Endosialin 基因剔除鼠與 C57BL/6 小鼠是否有差異性。

實驗的結果顯示，老鼠在受到缺血再灌流的損傷之後，不論是在第二天或第十天，其血液尿素氮和肌酸酐的數值，基因剔除鼠都比一般的小鼠低。而在第二天的 PAS stain 中，組織的損傷程度也有一樣的趨勢。不過在檢測巨噬細胞相關的 RNA 表現上，卻沒有看到明顯的變化。所以再利用免疫組織化學染色的方式去看巨噬細胞及嗜中性球浸潤之情形，結果可以看到這兩種免疫細胞的浸潤都沒有差異。接著我們想看看在腎臟細胞的凋亡與增生的情況，於是利用 TUNEL assay 及 Ki67 進行免疫螢光染色，結果發現將 endosialin 剔除後，可以減少細胞的凋亡，並增加細胞的增生。

根據實驗的結果可以知道把 endosialin 剔除後可以減少 IRI 造成的腎損傷，並



且會促進腎臟細胞的增生。但 endosialin 的剔除並不會影響到免疫細胞的浸潤，且相關的基因表現並無明顯差異。由於過去的研究指出，endosialin 會去影響到血管的新生或者是組織的血液灌流量，我們推測或許是這些原因造成上述的結果，而這部分仍需更多實驗來驗證。

過去臨床報告中指出，發生急性腎損傷的病人即使在治療後恢復到了正常，但在日後轉為慢性腎臟病的機會還是比一般正常人來的高，且 AKI 的嚴重程度與未來轉變成 CKD 又有高度的相關性；而本實驗中可以發現到基因剔除鼠在於預防急性腎損傷有良好的效果，未來我們可以利用這個老鼠去觀察其轉為慢性腎病變的機率是否也比正常老鼠來的低，以期許未來可以利用 Endosialin 的抗體做為一個治療的方式。

關鍵詞：急性腎損傷、缺血再灌流、內皮唾酸蛋白、巨噬細胞、嗜中性球

Abstract




Although medical care advances significantly, the incidence, morbidity and mortality of acute kidney injury (AKI) are still high. But there is no promising drug or therapy for AKI treatment, so it is an unmet medical issue to discover effective therapeutics for AKI.

According to a previous study, endosialin (also known as tumor endothelial marker-1 or CD248) is only highly expressed in kidney and uterus of a healthy adult; in the tumor growth or inflammation, endosialin will be overexpressed. Previous laboratory studies of chronic kidney disease model of unilateral ureteral obstruction found that the endosialin knockout mice could effectively reduce fibrosis and the number of macrophages within the kidney. Because macrophages play different roles in acute and chronic inflammation, we are intrigued by the effect of endosialin knockout on the AKI.

To compare the difference between endosialin knockout mice and wild type mice, we performed right nephrectomy to 7-week-old male mice and induced ischemia-reperfusion injury in the left kidney 2 weeks later, as an AKI model.

Our data showed that mice subjected to ischemia- reperfusion injury, the plasma levels of blood urea nitrogen and creatinine were lower in knockout mice at either day 2 or 10 after injury. Periodic-acid Schiff stain showed that extent of tissue damage was

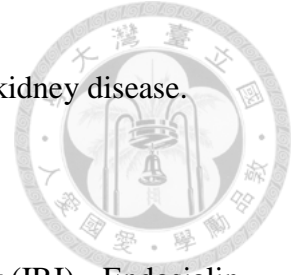


less severe in knockout mice, too. In the injured kidneys of knockout mice, moreover, cell apoptosis detected by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling was decreased. In contrast, cell proliferation detected by Ki67 staining was increased. However, we did not detect significant difference in the expression of function-related genes in macrophages using quantitative polymerase chain reaction. The numbers of macrophages and neutrophils infiltration in the injured kidneys detected by immunohistochemistry were not different, either.

According to the results, endosialin knockout can attenuate renal injury caused by ischemia-reperfusion and enhance kidney cell proliferation. But the infiltration of macrophages and neutrophils as well as the function-related gene expression of macrophages in injured kidneys are not changed by endosialin knockout. Because endosialin has been shown to affect angiogenesis and blood perfusion in previous studies, we will explore whether endosialin regulates renal blood flow and microvasculature in healthy and injured kidneys in the future.

Evidence has shown that AKI patients, even with functional recovery after supportive care, will experience increased risk for progression to chronic kidney disease. Based on our data showing the potential of endosialin disruption in protection of mice from AKI, we will advance our knowledge for the mechanisms responsible for such a renoprotective effect. Furthermore, we will use this mouse to study whether

endosialin knockout can block the progression from AKI to chronic kidney disease.



Keywords : Acute kidney injury (AKI) 、 ischemia-reperfusion injury (IRI) 、 Endosialin
(TEM-1;CD248) 、 macrophage 、 neutrophil

目錄



口試委員會審定書.....	i
謝辭.....	ii
摘要.....	iii
Abstract.....	v
目錄.....	viii
圖目錄.....	xi
表目錄.....	xii
第一章 緒論.....	1
1.1 腎臟與急性腎損傷.....	1
1.1.1 腎臟簡介.....	1
1.1.2 急性腎損傷(Acute Kidney Injury, AKI).....	2
1.1.3 急性發炎、修復及再生的機制.....	3
1.1.4 缺血再灌流損傷(Ischemia-Reperfusion Injury, IRI).....	6
1.2 內皮唾酸蛋白(Endosialin).....	8
1.2.1 Endosialin 的發現與蛋白質結構.....	8
1.2.2 Endosialin 的表現.....	9
1.2.3 Endosialin 的功能.....	10
1.3 巨噬細胞.....	11
1.3.1 組織的損傷及修復.....	11
1.3.2 剔除巨噬細胞之影響.....	13
1.4 實驗目的.....	15
第二章 材料與方法.....	16
2.1 材料.....	16
2.1.1 實驗動物.....	16



2.1.2	藥品與試劑.....	16
2.1.3	溶液.....	20
2.1.4	抗體.....	22
2.2	方法.....	23
2.2.1	小鼠基因型鑑定.....	23
2.2.1.1	DNA 萃取.....	23
2.2.1.2	聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction ; PCR)	23
2.2.2	缺血再灌流模式.....	23
2.2.3	檢體採集.....	24
2.2.3.1	血漿的採集.....	24
2.2.3.2	腎臟組織的採集.....	24
2.2.3.3	腎臟巨噬細胞的分離.....	25
2.2.4	RNA 萃取.....	25
2.2.5	反轉錄(reverse transcription)及即時聚合酶連鎖反應 (real-time polymerase chain reaction ; real-time PCR)	26
2.2.6	X-gal 染色.....	26
2.2.7	PAS 染色.....	27
2.2.8	免疫組織化學染色.....	27
2.2.9	免疫螢光染色.....	28
2.2.10	TUNEL 分析 (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay ; TUNEL assays)	28
2.2.11	統計分析.....	29
第三章	實驗結果.....	30
3.1	腎臟受到 IRI 後,LacZ 於腎間質的表現量增加.....	30



3.2 Endosialin 的剔除可降低 IRI 在第二天的損傷.....	30
3.3 IRI 後第二天巨噬細胞相關基因表現之情形.....	32
3.4 IRI 後第二天免疫細胞浸潤之情形.....	33
3.5 IRI 後第二天腎臟細胞的凋亡與增生之情形.....	33
第四章 討論.....	35
4.1 Endosialin 剔除後，於 IRI 第二、十天腎臟損傷之情形.....	35
4.2 Endosialin 剔除後，減少了免疫細胞的浸潤.....	36
4.3 Endosialin 剔除後，減少 IRI 後腎小管上皮細胞的凋亡並增加細胞的 增生.....	37
4.4 未來可進行的相關實驗.....	37
第五章 結論與未來展望.....	39
圖表.....	40
附錄.....	56
第六章 參考文獻.....	66



圖目錄

圖一、腎臟 X-gal 染色之情形.....	40
圖二、IRI 後第二天之 BUN 及 Creatinine.....	42
圖三、IRI 後腎臟生理功能恢復之情形.....	43
圖四、比較 WT 與 KO 在 IRI 後兩天腎臟組織損傷之情形.....	44
圖五、IRI 後第二天腎臟組織與巨噬細胞相關基因之表現.....	45
圖六、IRI 後第二天分離的巨噬細胞基因之表現.....	47
圖七、比較 WT 與 KO 在 IRI 後兩天之巨噬細胞浸潤情形.....	48
圖八、比較 WT 與 KO 在 IRI 後兩天之嗜中性球浸潤情形.....	49
圖九、比較 WT 與 KO 在 IRI 後兩天之凋亡細胞數量.....	50
圖十、比較 WT 與 KO 在 IRI 後兩天之增生細胞數量.....	51

表目錄

表一、PCR 之引子序列.....	52
表二、Real-time PCR 之引子序列.....	53





第一章 緒論

1.1 腎臟與急性腎損傷

1.1.1 腎臟簡介

腎臟是位於腰部兩側後方的成對器官，其高度約在第十二胸椎與第三腰椎之間，因右腎上方有肝臟佔據著空間，故右腎的位置會比左腎來的低。人的腎臟長約 10 至 12 公分，寬約 5 至 7 公分，厚度約 2 至 3 公分，每個腎臟重量約 125 至 150 公克。腎臟的基本功能單位為腎元，每個腎臟約有一百萬個腎元，腎元則由腎絲球、鮑氏囊及腎小管所組成，而腎小管又分為近曲小管、亨利氏環(下降支與上升支)及遠曲小管(附錄一)。腎元所製造的過濾液會流入集尿管，然後匯入腎盂。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中，過濾液再經由腎小管的分泌與再吸收過程進入到集尿管中，最後流經輸尿管而至膀胱形成尿液。尿液是過濾液經由一連串非常複雜的分泌與再吸收作用的過程而產生的，目的是要維持身體上化學物質的平衡，例如：酸和鹼、鉀跟鈉以及其他電解質的平衡，同時腎臟也藉由控制再吸收水分的多寡，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 的合成(1)。如近腎絲球細胞(Juxtaglomerular cells)分泌腎素(Renin)，並透過 Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS)控制腎絲球內血壓與全身血壓；腎微血管周細胞(pericytes)會製造促紅血球生成素(erythropoietin, EPO)促進紅血球生成(2)；腎臟也負責維生素 D 的代謝物 calcidiol 轉化成具生物活性的 calcitriol (3-5)。因此當腎臟疾病發生時，除了代謝廢物或尿毒素累積體內，水分恆定異常外，往往會伴隨著高血壓、貧血以及維生素 D 缺乏性併發症。



1.1.2 急性腎損傷(Acute Kidney Injury ; AKI)

急性腎損傷(acute kidney injury, AKI)在醫院的重症病患中是最常發生的問題，並且與死亡率有高度的相關性。在 2004 年，急性透析品質創始小組(Acute Dialysis Quality Initiative Group, ADQI)提出 RIFLE criteria 作為 AKI 的診斷標準(6);之後急性腎損傷照護網(Acute Kidney Injury Network)再對此定義做出進一步的修正後指出：腎功能在 48 小時以內快速的下降，如血清肌酸酐(serum creatinine, Scr)上升值 ≥ 0.3 mg/dL，Scr ≥ 1.5 倍的基礎值或是排尿量 < 0.5 ml/kg/hr 並持續 6 個小時以上，就會被診斷為 AKI(附錄二)(7)。

從過去的數據得知，當 AKI 在不完全修復的情況下，病患會有較低的存活率並且有較高的風險發展成慢性腎臟病(chronic kidney disease, CKD)及末期腎病(end-stage renal disease, ESRD)。由於 AKI 的嚴重程度與死亡率有高度的相關性，因此腎臟病學者除了不斷地改善現有的治療方式，也致力於尋找更為靈敏的生物標記物(biomarkers)，以便能夠在早期就發現到 AKI 的發生進而進行治療(8)。根據 2015 年美國腎臟數據系統(United States Renal Data System, USRDS)的年度報告中指出，在 2013 年 ESRD 的發病率(incidence)前三名分別為台灣、墨西哥的哈利斯科州及美國(各別為 458、421 和 363/百萬人)；而盛行率(prevalence)前三名分別為台灣、日本及美國(各別為 3138、2411 和 2043/百萬人)(附錄三)(9)。由於腎臟病的治療需要花費大量的醫療資源，而台灣的發病率與盛行率都高居全球第一，因此腎臟病的預防與治療的改善是非常迫切需要的。

缺血再灌流損傷(ischemia-reperfusion injury, IRI)是引發 AKI 最主要的原因，最常發生在失血，多重器官衰竭或敗血症的情況下。由於血液的供給量突發性的降低而造成缺血，使得氧氣與養分的供給不足，以及代謝廢棄物無法有效的排除，因而造成腎小管上皮細胞的凋亡與壞死，最終導致腎臟失去功能(10)。此外，在 S3 segment 近曲小管與髓質粗上升支有耗氧量極高的離子運輸蛋白，所以在血流不足的情況下，它們很快就會將氧氣消耗殆盡，也就是說當腎臟的血液灌流量不



足時，對於外側髓質所造成的影響會比皮質來的顯著；即使皮質的血流之後恢復到了正常的水平，仍可發現到皮質-髓質交界處(cortico-medullary junction)有明顯的損傷情形 (8, 10, 11)。

1.1.3 急性發炎、修復及再生的機制

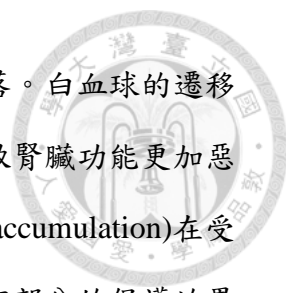
缺血性腎損傷的病理機轉主要來自於三個部分：(1)腎小管上皮細胞的損傷，(2)血管內皮細胞的功能失調，(3)免疫細胞的異常活化。

當腎臟血液灌流量降低，細胞因沒有足夠的養分而將 ATP 耗盡，使得細胞沒有辦法維持必要的生理機能，進而導致細胞死亡。在受損後，腎小管上皮細胞失去了細胞骨架的完整性與極性，因此我們可以觀察到 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPases 的錯位 (mislocalization)與黏附分子(adhesion molecules)的產生，在更嚴重的損傷，則會引發細胞的凋亡與壞死。在 IRI 的病理切片中除了可以很容易地觀察到近曲小管刷狀緣(brush border)的損失，也可以看到損傷的上皮細胞脫落並在腎小管的管腔中形成圓柱體(casts)，進而阻塞了管線，最後導致腎絲球過濾率(glomerular filtration rate；GFR)的下降。存活下來的腎小管細胞會開始進行去分化(dedifferentiation)並沿著基底膜遷移，而基底膜是腎絲球過濾液與腎小管間質的唯一屏障，在損傷的期間，過濾液可能因此回流而傷害到組織。之後這些再分化(re-differentiated)的腎小管上皮細胞會開始透過增生(proliferation)及再生(regeneration)的過程而重新建立起上皮層(epithelium)(10, 12)。事實上，在損傷期間受到傷害的腎小管上皮細胞不僅僅是個受害者而已，它也會釋出許多促發炎性細胞因子來吸引免疫細胞，像是 tumor necrosis factor- α (TNF- α), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin-8 (IL-8), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), transforming growth factor- β (TGF- β);此外他們也會表現 Toll-like receptors (TLRs)或者透過第二型主要組織相容性複合體(major histocompatibility complex, MHC)分子呈現抗原而吸引 T 淋巴球(12)。而過去的研究報告指出，當抑制了促發炎性細胞因子或趨化因子的

傳遞途徑，如 chemokine (C-C motif) ligand 2 (Ccl2), chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (Cxcl1), chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (Cxcl2), chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 (Cx3cl1)等，則對於組織會產生出保護的效果(11, 13-20)。

在齧齒類動物中，受到 IRI 損傷的第 24 個小時後可以觀察到腎臟皮質的內皮細胞屏障功能之喪失現象(21)。由缺血引起的內皮細胞損傷會導致腎小管旁微血管的扭曲而減少了腎血流量，進而增加了上皮細胞的損傷。此外，在外側髓質的直血管(vasa recta)有逆流交換(countercurrent exchange)的功能，因為此處的氧濃度會比皮質來的低，因此當血流不足的時候，此區域的損傷也會比皮質來的明顯(附錄四)(12, 22)。遭受 AKI 的內皮細胞其細胞骨架及糖萼(glycocalyx)會被破壞掉，而內皮細胞則會從血管中脫落，進而改變了內皮屏障的功能、血管的反應性與滲透性的增加(11, 23)。白血球被活化後浸潤到組織間質而產生發炎反應，會使白血球與內皮細胞的交互作用增加，導致細胞間黏附分子的表現量增加，如 P-selectin 和 E-selectin(召集白血球的重要分子)、B7-1(促進 T 細胞的活化)、intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)和 vascular cell adhesion protein-1 (VCAM-1)(白血球與內皮細胞的黏附及細胞訊息的傳遞)；除此之外，微血栓的生成、微血管的阻塞以及促發炎性細胞因子的產生也都會跟著增加(附錄五)(8, 12)。即使病患從 AKI 中完全恢復回來，IRI 對於內皮細胞造成的長期影響仍會增加病患進展成 CKD 的風險：這是因為缺血性損傷後的腎臟，其血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)的分泌量減少，導致內皮細胞可能失去了再生的潛力(10, 24, 25)；以及微血管的數量減少，進而導致組織慢性缺氧及腎小管間質纖維化(10, 12)。

目前公認發炎反應與白血球的召集(recruitment)是造成內皮細胞與腎小管上皮細胞損傷的主要調節者(mediators)(10)。發炎反應會使外側腎髓質的血流量減少並影響腎小管的功能及存活(22)，以及血管的阻塞會造成缺氧環境並降低清除有害的自由基的能力(8)。此外，前面也提過發炎反應會增加白血球與內皮細胞的交




互作用，進而導致黏附分子的表現增加以及內皮細胞糖萼的脫落。白血球的遷移增加則會進一步的傷害到腎小管上皮細胞並且降低了 GFR，導致腎臟功能更加惡化(8)。有研究顯示在 IRI 後，嗜中性球(neutrophils)是最先累積(accumulation)在受損組織中的細胞，而將此現象給抑制掉的話，對於抵抗 IRI 僅有部分的保護效果(26)，也就是說還有其他種類的白血球參與了調節損傷的過程：比方說巨噬細胞會產生促發炎性細胞因子，進而刺激其他種類的白血球活化(10)。部分研究指出去除巨噬細胞對於 AKI 能產生保護的效果，這部分後續會再討論。

相較於其他器官，腎臟在遭受 IRI 之後是有自我修復的能力，而修復過程非常的複雜。近期的研究藉由細胞血統追蹤(cell lineage tracing)的方式證明取代受損的上皮細胞其來源是存活下來的上皮細胞而不是由骨髓來的幹細胞或腎臟內的祖細胞(progenitor cell)(27, 28)，這些存活下來的細胞會開始沿著基底膜(basement membrane)作遷移而擴展開來，並且會開始增生而恢復細胞的數量以及腎元功能的完整性，而受損較嚴重的細胞會去分化而變成刷狀緣不明顯的扁平細胞。這代表著倖存的腎小管細胞之再生是受損腎臟的主要修復機制(8, 10, 22)。

但是當腎小管的修復不完全時，則會產生持續性的腎小管間質炎症(tubulointerstitial inflammation)、不正常的纖維母細胞增生及胞外基質過度的分解(12)。許多的損傷因素會造成缺血後的纖維化，當中最為相關的是腎小管旁微血管持續損失所引起的長期缺氧(29)和巨噬細胞的慢性活化(30, 31)。在大鼠 IRI 模型的研究中發現，腎小管旁微血管的減少會導致 AKI 進展成 CKD 或 ESRD (32)。

綜合以上所述，腎臟的損傷與修復過程牽涉到很多種類的細胞以及其複雜的交互作用：腎小管上皮細胞的損傷直接導致了離子運輸的失常，進而間接降低 GFR；而上皮細胞可藉由釋出細胞因子、趨化因子及其他可溶性分子而影響到內皮細胞和免疫細胞的功能；此外，內皮細胞與白血球間的交互作用會引起持續性的缺氧、發炎反應以及上皮細胞進一步的損傷。

AKI 的病患在臨床上有很差的預後，這一直是個非常重要的議題。雖然近十



幾年來有相當大的進展，包括：(1)建立標準化的診斷/分類方式，(2)鑑定出許多與腎臟損傷專一性的生物標記物，(3)能夠預防或者減緩損傷的治療靶點(therapeutic targets)。為了減少病患 CKD 的發展及 AKI 轉變成 ESRD，我們仍需其他的方式去改善組織的修復、盡可能減少纖維化以及血管的損失。

1.1.4 缺血再灌流損傷(Ischemia-Reperfusion Injury ; IRI)

在過去有許多的動物模型被拿來作為 AKI 的研究，但是直到 1990 年，小鼠的缺血再灌流損傷(ischemia-reperfusion injury; IRI)所引發的 AKI 才被提出來(33)。由於 AKI 可以經由各種不同的條件引發，所以有許多的動物模型被陸續的發展出來：包括了敗血症型 AKI (septic AKI)，缺血再灌流損傷型 AKI(IRI-induced AKI)，以及由馬兜鈴酸(aristolochic acid)、順鉑(cisplatin)、葉酸(folic acid)或其他具有腎毒性的化學物質所引發的 AKI (nephrotoxic AKI) (34, 35)。其中經由手術將腎蒂(renal pedicle)夾緊而引發的 IRI，在嚙齒類動物中是最常用的動物模型且最能模擬人類的病理過程。也因為小鼠有許多的基因轉殖工具以及藥物測試用量比較少的好處，所以小鼠腎臟的 IRI 模型是非常受到歡迎的；然而這個動物模型的穩定性較為不足，跟其他動物模型相比之下，它的實驗結果存在著比較大的誤差值。到了 2012 年，Wei and Dong 分享了他們的手術方式以及相關的技巧要點，詳細的說明該如何進行雙側腎臟 IRI (bilateral renal IRI)(36)。雖然這個動物模型更能模擬人類在疾病情況下血液的不正常供應，但也常常導致受到較為嚴重傷害的腎臟會萎縮掉，腎臟功能無法完全恢復。本實驗室為了避免雙側腎臟 IRI 因不均等損傷造成實驗誤差；我們將手術改成在小鼠 7 週大時，先將右側腎臟摘除(Nephrectomy ; Nx)，經過 14 天後，再對左側的腎臟進行 IRI。以此 Nx + IRI 的手術作為本論文的動物模型，以便於我們觀察 IRI 對於腎臟的損傷與修復的過程(37)。由於小鼠的體溫對於 IRI 的損傷有很大的影響(38)，因此在 IRI 的期間，我們利用恆溫監控系統維持小鼠的體溫在 37°C。腎臟的缺血是利用微動脈瘤夾(micro-aneurysm clip)



將腎蒂夾緊而阻止血液流動，我們將可以看到腎臟由紅色轉變成為暗紫色，當夾子鬆開之後，腎臟會因為血液的流入再變回紅色，如此一來才是成功的手術(附錄六)。

做為一個 AKI 的動物模型，成功的 IRI 手術除了藉由觀察腎臟顏色的變化(由紅色轉變為暗紫色)，還可以藉由檢測血液尿素氮(blood urea nitrogen ; BUN)或肌酸酐(creatinine)來判定腎臟功能是否受到影響。在正常的 C57BL/6 小鼠的 BUN 正常值大約在 20-40 mg/dL ; IRI 之後，其 BUN 會在 24 到 48 小時之內顯著的上升，而 22 分鐘和 25 分鐘的缺血會引發輕度及中度的傷害，然後在一週內恢復；但缺血 30 分鐘則會引發嚴重的傷害，導致小鼠在 72 小時以內死亡(36)。另外，腎臟的損傷程度也可以直接透過組織學的檢測來進行評估，例如利用蘇木精-伊紅染色(Hematoxylin and eosin stain ; H&E stain)或過碘酸雪夫染色(periodic acid-Schiff stain ; PAS stain)來觀察刷狀緣(brush border)的損失、腎小管上皮細胞的壞死(tubular epithelial cell necrosis)及管腔的阻塞(luminal obstruction with casts) 。也可以利用 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)檢測測量出凋亡細胞的數量(36)。而血液中與發炎相關的嗜中性球(neutrophil)及單核球(monocytes)的浸潤程度也可以拿來做為損傷評估(26)。

動物的腎臟 IRI 模型與臨床的情況有高度的相似性，所以被廣泛的應用在各種研究上;但實驗的結果與臨床的應用上仍有很大差距。許多的動物研究讓我們能夠更清楚的了解 AKI 的病理生理機制以及實驗性療法的可行性，例如 p53 RNAi (可抑制腎小管上皮細胞因 AKI 後導致 G2/M arrest 而產生的纖維化)或骨髓來源的間質幹細胞目前都正在進行人類 AKI 的臨床試驗(39, 40)。AKI 是一個非常嚴重的疾病，它會增加病患發展成 CKD 或死亡的風險，最終可能導致病患必需做腎臟替代療法(renal replacement therapy ; RRT)。然而目前在治療 AKI 上，仍舊沒有發展出一套常規性的治療方式，目前給予的都是支持性的治療，而非治癒性的治療；也沒有良好的生物標記物能夠及早的偵測到 AKI 的發生。因此，我們仍需更多的

研究以便發展出能夠預防腎臟損傷或者是促進腎臟修復的治療方式，並且要降低實驗與臨床的差距(35)。




1.2 內皮唾酸蛋白(Endosialin)

1.2.1 Endosialin 的發現與蛋白質結構

Endosialin 又被稱作第一型腫瘤內皮標記蛋白 (Tumor endothelial marker 1, TEM1) 或 CD248。由 Rettig 等人以人類的胚胎纖維母細胞萃取物對小鼠進行免疫刺激，製造出能專一性辨認基質纖維母細胞的單株抗體-FB5，並以此單株抗體對人類 128 種腫瘤樣本進行免疫組織化學染色，結果發現有 67% 腫瘤樣本呈現陽性反應，並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 (41)。人類 *ENDOSIALIN* 之 cDNA 序列在 2001 年由 Christian 等人首度發表(42)，他們從神經纖維母細胞瘤細胞株中純化出 endosialin，並以埃德曼降解法(Edman degradation)取得胺基酸序列，比對人類 EST 資料庫而取得 cDNA 序列，總共有 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* 基因位在第 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，其多肽鏈分子量為 95 kDa，經後轉譯修飾後形成分子量 165 kDa 富含唾液酸之醣蛋白，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，其胺基酸組成與人類 endosialin 比較下，發現具有 77.5% 的相似度 (43)。

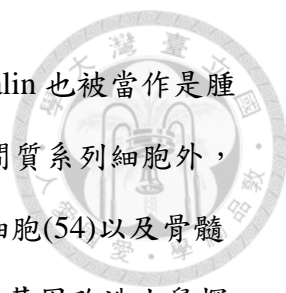
Endosialin 蛋白結構上具有六個功能性區域，依序分別為： C-type lectin-like domain (CTLD)、Sushi/ccp/scr pattern 的區域、三個重複的 EGF-like domain、一



個 sialomucin-like domain，以及穿膜區域和位於細胞質的短片段 cytoplasmic domain (附錄七)(44)。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 (45)。在 TM 上的 CTLD 與調控白血球貼附以及抗發炎反應相關 (46)，而在 endosialin 則是未知；CD93 上的 Sushi domain 則被認為是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 (47)，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 個胺基酸且被預估有 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(45)，但目前仍沒有發現會與 endosialin PDZ motif 結合的蛋白。

1.2.2 Endosialin 的表現


先前許多研究認為 endosialin 是大量的表現在腫瘤血管的內皮細胞上，包括大腸直腸癌、乳癌、黑色素瘤以及神經膠質母細胞瘤等(48-50)。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)，而不是先前大家認為的內皮細胞(51)，且正常基質組織的纖維母細胞和血管周圍的周細胞也會表現 endosialin。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現，當中有淋巴管內皮細胞、臍動脈內皮細胞、臍靜脈內皮細胞、纖維母細胞、平滑肌細胞、周細胞以及間質幹細胞，結果顯示只有在間質系列的細胞 (纖維母細胞、平滑肌細胞、周細胞及間質幹細胞) 具有表現 endosialin 的能力(52)。同時他們也發現 endosialin 在腫瘤相關之肌纖維母細胞 (tumor-associated myofibroblasts) 和腫瘤血管相關之壁



細胞(tumor vessel-associated mural cells)有大量表現；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 除了會表現在間質系列細胞外，也被發現在人類周邊血裡的 naive CD8⁺ T 細胞(53)和內皮前驅細胞(54)以及骨髓的造骨細胞(55)皆有表現。近期 Huang 等人利用 *Endosialin-lacZ* 基因改造小鼠探討 *Endosialin* 在胚胎發育期間及成熟小鼠體內的表現，發現到 *Endosialin* 在 9.5 天大的胚胎會開始大量表現，並隨著胚胎的發育而逐漸增加，但是在出生後大部分組織會失去 *Endosialin* 的表現，只有腎臟和子宮會持續啟動 *Endosialin*，甚至在成體組織中仍呈現高量的 *Endosialin* 基因轉錄(附錄八)(56)。除了上述組織及細胞外，另有其他研究指出在疾病中周邊基質細胞會過度表達 endosialin，例如在關節炎患者的關節滑膜上(57)，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會大量表現 endosialin (58)。

1.2.3 Endosialin 的功能

在 2006 年 *Endosialin* 基因剔除鼠首度發表，此小鼠的生長及生育能力都正常，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，基因剔除小鼠的腫瘤生成率、侵入率及轉移發生率皆比野生型小鼠低，因此存活率也較高(59)。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(60)，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。另有其他研究指出 endosialin 會透過與 platelet-derived growth factor (PDGF) 訊息相互作用抑制造骨細胞的成熟(55)，或者在骨骼肌細胞中促進血管側支新生 (sprouting angiogenesis)(61)；Maia 等人也利用小鼠關節炎模式，證明 endosialin 會透過胞內傳遞訊息，使 HIF-1 α 表現增加而促進發炎反應(57)。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(58)；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(62)。此外 *endosialin* 也被報導會調控細胞的增生與遷移，Christian 在人類纖維母細胞中用小片段干擾核糖核酸(siRNA)抑制 *endosialin* 的表現，結果發現細胞的增生及遷移能力就隨之下降(52)，另外體外培養人類腦部血管的周細胞，使用 siRNA 抑制 *ENDOSAILIN* 的表現，其結果也發現會影響細胞的生長。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(63)。相反的，在人類的 naive CD8⁺ T 細胞，使用 siRNA 抑制 *ENDOSAILIN* 的表現則會促進細胞的增生(53)。

Tomkowicz 等人經由細胞實驗證實纖維結合素(fibronectin)、第一型及第四型膠原蛋白會與 *Endosialin* 的胞外區域有交互作用，且在腫瘤侵入的過程中，藉由釋放出 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)而去影響細胞的貼附及遷移能力(64)。另外在人類腫瘤細胞會大量表現的 Galectin-3 binding protein (Mac2-BP/90K)，也被發現會和腫瘤基質細胞的 *endosialin* 結合並且促進腫瘤的轉移(65)。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，進而影響細胞的成長、增生、遷移以及發炎反應(44)，但是其作用機制仍待進一步釐清。

1.3 巨噬細胞(Macrophage)

1.3.1 組織的損傷及修復


巨噬細胞會藉由調控免疫反應以及清除損傷以維持組織的恆定性(66)，在受傷的組織中，發炎性的單核球(monocyte)會被吸引浸潤至組織中，並且受到不同的環境因子影響，而分化成不同亞型的巨噬細胞，如 M1、M2/Mreg 以及 M2/M2a 三種型態(67, 68)。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，造成組織的損傷以及微血管的稀疏，並且導致不可逆的纖維化產生(69-71)。一般來說，巨噬細胞除了吞噬細胞碎片和外來的病原體以外，也會透過刺激淋巴細胞



或其他免疫細胞放大發炎反應(67, 71)；此外巨噬細胞會藉由分泌許多細胞激素刺激周邊的肌纖維母細胞，使得肌纖維母細胞活化而大量增生，並且產生許多的細胞膜外基質蛋白，因此巨噬細胞被認為主要是調控組織損傷及修復的免疫細胞(66, 67, 69, 72)。

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變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)型態的巨噬細胞。M1 巨噬細胞主要分泌促炎因子，如 interleukin-1 (IL-1)、IL-6、MCP-1、inducible nitric oxide synthase (iNOS) 等，促使組織進行發炎反應並造成已損傷的細胞進行凋亡。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，而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 、connective tissue growth factor (CTGF)、PDGF、Galectin-3、chemokine C-C motif ligand 17 (CCL17)、chemokine C-C motif ligand 22 (CCL22)等因子，刺激肌纖維母細胞的活化並且使傷口癒合(附錄九)(68)。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 表現量可分為 Ly6C high, intermediate and low 三種巨噬細胞，其中 Ly6C 表現量高(Ly6C^{hi})的亞群被證實是促進發炎反應，而表達量低(Ly6C^{low})的亞群則是促纖維化的巨噬細胞(69, 71)。

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而造成型態轉變(68)。根據先前研究指出，在不同損傷刺激下，巨噬細胞的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，組織回復到正常狀態；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 巨噬細胞也會逐漸增加，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，最後導致組織發生不可逆的損傷(附錄九)。目前已知在胞外實驗外加特定因子可以促進巨噬細胞的轉型，例如：內毒素(LPS)或者 INF- γ 等因子會促進轉型為 M1 巨噬細胞(68)，而 IL-4 和 IL-13 則是被報導會促使轉型為 M2 巨噬細胞(73)；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(70)，顯示周邊細胞與巨噬細胞具有相互調控的功能，影響彼此的活化與轉型，但是在活體內的轉型機制尚待證明。

1.3.2 剔除巨噬細胞之影響

巨噬細胞會大量的出現在急性和慢性發炎的腎病當中，其分布的位置除了腎絲球以外，還包括了皮質和髓質的間質。而研究指出巨噬細胞的存在和其激活狀態會與疾病的進展、嚴重程度以及未來腎臟纖維化或腎小管萎縮有相關聯(30)。

許多去除巨噬細胞(macrophage depletion)的研究已經證明了巨噬細胞與腎臟損傷相關。而在腎臟疾病去除巨噬細胞或阻斷巨噬細胞的召集，可以減少巨噬細胞的堆積與腎臟的損傷(74)。在許多去除巨噬細胞的方式中，以下兩種最普遍使用的方式：(1) 氯膦酸二鈉脂質體(liposomal clodronate)，(2) 對 *CD11b-DTR* 的基因轉殖鼠注射白喉毒素(diphtheria toxin；DT)。

在 1990 年左右，利用單核球和巨噬細胞會選擇性的攝取脂質體的特性，而將氯膦酸二鈉包入到脂質體內，讓單核球和巨噬細胞攝取過多的氯膦酸二鈉，進而導致細胞的凋亡以達到去除的效果(30, 75)。在單側輸尿管阻塞(unilateral ureteral obstruction，UUO)的模型中使用氯膦酸二鈉脂質體被證實有保護效果，其原因是



降低了 F4/80⁺ 巨噬細胞的堆積及減少腎臟纖維化(74, 76)。另一方面，在 IRI 之前給予氣磷酸二鈉脂質體可以減少腎臟在形態學上的損傷，並且能夠減緩 BUN 及 Scr 的增加；然而在 IRI 之後才給予藥物的話，則會導致腎小管細胞的增生減少以及延遲了組織的再生過程(70, 75, 77, 78)。就上述的結果來看，巨噬細胞的浸潤會增強發炎反應並促進腎小管的損傷。此外，從分析巨噬細胞兩種不同的 M1 和 M2 表型的實驗中發現，當巨噬細胞的表型從 M1 轉變成 M2 時，可看到巨噬細胞的功能從原本造成腎小管細胞的損失轉變成幫助腎臟組織的修復與再生(70)。

另一種去除巨噬細胞的方式是將白喉毒素使用在齧齒類動物的細胞上。由於在人類的細胞上有表現肝素結合表皮生長因子受器(heparin-binding epithelial growth factor receptor; HBEGFR)，它同時是一個白喉毒素受器(diphtheria toxin receptor)，而人類的 DTR 對於 DT 的敏感度又是齧齒動物的 1000 倍。因此科學家們就利用基因轉殖技術，產生一隻由 *CD11b*(為巨噬細胞的標的物)的啟動子去啟動而表現人類 DTR 的基因轉殖鼠。以這個方式產生的 *CD11b-DTR* 小鼠，在注射 DT 之後，就能夠專一性的去除 *CD11b*⁺ 巨噬細胞(或單核球)(30)。

利用 *CD11b-DTR* 小鼠在 UUO 模型下，當給予 DT 而去除了巨噬細胞之後，腎臟的纖維化就會減少(75, 76, 79)。此外，在 IRI 之後的修復階段給予 DT 時，會阻礙到組織的修復，這顯示了巨噬細胞具有修復腎臟的能力(30)；但若是在 IRI 之前先給予 DT，則對於傷害沒有任何影響，這個結果與利用氣磷酸二鈉脂質體去除巨噬細胞的不一樣，這代表著有一特定群組的巨噬細胞會造成急性腎損傷(80)。



1.4 實驗目的

重症病患中 AKI 有很高的發生率及死亡率，而病人的治癒程度與未來是否會進展成 CKD 或 ESRD 有高度的相關性，因腎臟病的治療需要花費大量的醫療資源，又台灣 ESRD 的發病率與盛行率都高居全球第一，數量眾多的病人造成健保醫療莫大的壓力，因此尋找預防或改善 AKI 的方式是必須的。

許多研究都指出 endosialin 的表現量與疾病的發展呈正相關，當抑制了 endosialin 的表現，可減緩腫瘤的生長或降低腫瘤的生成率抑或是降低發炎反應。已知正常人的腎臟中，endosialin 微量的表現在血管周圍的纖維母細胞以及腎絲球的系膜細胞(mesangial cells)，當腎臟受到損傷的時候 endosialin 就會跟著大量表現，所以我們想知道當 endosialin 被抑制後，是否能夠降低或者預防 AKI。



第二章 材料與方法

2.1 材料

2.1.1 實驗動物

本論文使用的*Endosialin-LacZ* knock-in(KI)小鼠，是來自國立台大醫學院醫學檢驗暨生物技術學研究所林淑華老師，*Endosialin-LacZ* KI小鼠以*LacZ*作為報導基因，將其置入*Endosialin*基因而製備出*Endosialin*剔除小鼠(56)。而對照組小鼠則是用littermate Wild type小鼠。小鼠皆飼養於台大醫學院大動物代養中心，環境條件設定為12/12小時光照週期(早上8點開燈，晚上8點熄燈)，室溫維持在 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，濕度 $55\pm 5\%$ ，並給予充足的飲水與飼料。

2.1.2 藥品與試劑

名稱	資訊
100 bp DNA ladder	Cat. ADM100.500, Arrowtec Limited, Berkshire, RG46XJ, UK
Agarose	Cat. A9539, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
X-gal	Cat. 15520-018, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Bovine serum albumin (BSA)	Cat. ALB001, BioShop Canada Inc., Burlington, Ontario, Canada
Chloroform: Isoamylalcohol 24:1	Cat. C0549, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
4',6'-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)	1:1000, Cat. D1306, Molecular Probes, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.,

	USA
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Cat. D-5758, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Dullbecco's modified eagle medium, a nutrient mixture F-12 powder (DMEM/F12)	Cat. 12400-024, Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Ethelenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Cat. E-5134, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Ethanol absolute	Cat. 32221, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Fetal bovine serum (FBS)	Cat. 26140-079, Gibco, Life Technology, Green Island, NY, USA
Formalin solution, neutral buttered, 10%	Cat. HT501128, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Heparin LEO 5000 i.u./ml	LEO, Pharma A/S, Ballerup, Denmark
iQ TM SYBR [®] green supermix	Cat. 170-8882AP, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
iScript TM cDNA synthesis kit	Cat. 170-8891, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Isoflurane	Panion & BF Biotech Inc., Taoyuan, Taiwan
Isopropanol	Cat. A10335-0500, Bionovas Biotechnology Co. Ltd., Toronto, Ontario, Canada
Ketalar [®] injection 50 mg/mL	Pfizer Inc., New York, NY, USA
Liberase TM research grade	Cat. 05-401-119-001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany



L-Lysine monohydrochloride (Lysine: HCl)	Cat. L-5626, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Normal goat serum (NGS)	Cat. 005-000-121, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
Normal mouse serum	Cat. 015-000-120, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
Paraformaldehyde (PFA)	Cat. 441244, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Phosphate buffer solution (PBS) pH7.4 (10X)	Cat. 70011-044, Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Potassium chloride (KCl), crystal	Cat. 3040-01, J.T. Baker [®] , Avantor Performance Materials Inc., Phillipsburg, NJ, USA
Potassium phosphate (KH ₂ PO ₄)	Cat. CK-CP1580153, One-Star Biotechnology Co. Ltd., Taipei, Taiwan
Proteinase K	Cat. V3021, Promega Corporation, Madison, WI, USA
RNeasy [®] mini kit	Cat. 74106, Qiagen GmbH, Hilden, Germany
Sodium dodecyl sulfates (SDS)	Cat. 75746, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Sodium azide (NaN ₃)	Cat. S-8032, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Sodium chloride (NaCl), crystal	Cat. 3624-05, J.T. Baker [®] , Avantor Performance Materials Inc., Center Valley, PA

Sodium (meta) periodate	Cat. S1878, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Sodium phosphate dibasic (Na ₂ HPO ₄)	Cat. S3264, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Sodium phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄)	Cat. S3139, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Sucrose	Cat. AS1560-1000, Bionovas Biotechnology Co. Ltd., Toronto, Ontario, Canada
SyBR [®] safe DNA gel stain	Cat. S33102, Invitrogen [™] , Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Taq DNA polymerase 2x master mix RED	Cat. A180306, Ampliqon A/S, Odense M, Denmark
Tissue-Tek [®] O.C.T Compound	Cat. 4583, Sakura Finetek USA., Inc., Torrance, CA, USA
Tris (base)	Cat. 4109-02, J. T. Baker, Avantor Performance Materials, Inc., Center Valley, PA, USA
Tris hydrochloride (Tris-HCl)	Cat. 4103-02, J. T. Baker, Avantor Performance Materials, Inc., Center Valley, PA, USA
TRIzol [®] reagent	Cat. 15596018, Ambion, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., USA
VECTASHIELD [®]	Cat. H-1000, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA

Xylazine hydrochloride

Cat. X1251, Sigma-Aldrich Co. LLC., St.

Louis, MO, USA



2.1.3 溶液

Tail Lysis Buffer 200mL

Chemicals and reagent	Quantity	Final concentration
10 % SDS	4 mL	0.2 %
1 M Tris pH 8.5	20 mL	0.1 M
0.5 M EDTA pH 8.0	2 mL	5 mM
NaCl	2.36 g	200 mM

Phosphate buffer (PB) 0.1M 200mL

Chemicals and reagent	Quantity	Final concentration
0.2 M NaH ₂ PO ₄	19 mL	19 mM
0.2 M Na ₂ HPO ₄	81 mL	81 mM
ddH ₂ O	Add to 200 mL	

Periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) solution 200mL

Chemicals and reagent	Quantity	Final concentration
0.1 M PB	75 mL	37.5 mM
8 % PFA	50 mL	2 %
L-Lysine monohydrochloride	2.192 g	60 mM
Sodium (meta) periodate	0.428 g	10 mM
Sucrose	10 g	145.8 mM



ddH ₂ O	75 mL
--------------------	-------

Phosphate buffered saline (PBS) (10x) 1L

Chemicals and reagent	Quantity	Final concentration
NaCl	80 g	1.37 M
Na ₂ HPO ₄	14.2 g	0.1 M
KCl	2 g	26.8 mM
KH ₂ PO ₄	2.4 g	17.6 mM
HCl	Adjust to pH 7.4	
ddH ₂ O	Add to 1 L	

TE Buffer 50mL

Chemicals and reagent	Quantity	Final concentration
0.5 M EDTA pH 8	0.1 mL	1 mM
1 M Tris-HCl pH 7.5	0.5 mL	10 mM
ddH ₂ O	Add to 50 mL	

X-gal staining solution 50 mL pH 7.4

Chemicals and reagent	Quantity	Final concentration
0.5 M K ₃ Fe(CN) ₆	0.5 mL	5 mM
0.5 M K ₄ Fe(CN) ₆	0.5 mL	5 mM
1M MgCl	0.1 mL	2 mM
10% Na deoxycholate	50 µL	0.01%
10% IGEPAL	0.1 mL	0.02%

X-gal	50 mg	1 mg/ml
1X PBS pH7.4	Add to 50 mL	



2.1.4 抗體

Primary antibodies

Name	Host	Information
Anti-mouse F4/80 0.2 mg/mL	Rat	1:100, Cat. MF48000, Invitrogen™, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Anti-mouse Ly6G	Rat	1:100, Cat. 127601, Biolegend, San Diego, CA
Anti-mouse Ki67	Rabbit	1:100, Cat. ab15580, Abcam, USA

Secondary antibodies

Name	Information
N -Histofine® Simple Stain™ Mouse MAX PO (Rat)	414311F, NICHIREI BIOSCIENCES INC., Japan
Alexa Fluor® 488 conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	1:400, Cat. 111-545-144, ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA



2.2 方法

2.2.1 小鼠基因型鑑定

2.2.1.1 DNA 萃取

小鼠出生後 10 天，採集小鼠腳趾檢體，每個檢體加入 600 μ l tail lysis buffer 及 5 μ l 蛋白酶 K (10 mg/ml) 置於 55°C 乾浴槽作用至少 4 小時，待檢體完全溶解後，以 16000 rcf 常溫離心 10 分鐘。取上清液到新的微量離心管並加入等量的異丙醇，手動混勻，常溫靜置 1 小時讓 DNA 沉澱，然後以 16000 rcf 常溫離心 15 分鐘。倒掉上清液，再加入 200 μ l 70% 酒精，以 16000 rcf 常溫離心 5 分鐘。倒掉上清液，利用真空濃縮裝置將酒精抽乾，然後加入 100 μ l TE buffer 並置於 55°C 乾浴槽 1 小時使 DNA 溶解，即完成 DNA 萃取。

2.2.1.2 聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction ; PCR)

聚合酶連鎖反應是在總體積為 20 μ l 的混合物中進行，含有 2 μ l DNA 萃取液、10 μ l Taq DNA Polymerase 2x Master Mix Red (Ampliqon A/S, Denmark)、6 μ l 2dH₂O、1 μ l Forward primer (10 μ M)、1 μ l Reverse Primer (10 μ M)。使用的引子序列清單列於表一。使用 T100 thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, USA) 執行 PCR，反應條件的設定是 94°C 30 秒，60°C 30 秒，72°C 30 秒，反覆進行 35 次循環，最後 72°C 再作用 1 分鐘後即終止反應。PCR 產物經 1% 洋菜膠進行電泳後，使用 Gel Doc EZ imager (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) 觀察並照相。並依此結果判斷小鼠基因型。

2.2.2 缺血再灌流模型

利用 ketamine/xylazine 混合型麻醉劑(100/10 mg/kgBW, 腹腔注射)對小鼠進行麻醉。小鼠在 7 週大時先進行右側腎臟摘除手術；兩週後，再利用微動脈瘤夾將左側腎臟腎蒂夾緊 24 分鐘再鬆開完成 IRI 手術。手術期間利用恆溫電毯監控系



統(Stoelting Co., IL, USA)維持小鼠的體溫在 37°C。並且在手術當天及隔天利用腹腔注射的方式替小鼠補充 1 ml 生理食鹽水。

2.2.3 檢體採集

2.2.3.1 血漿的採集與檢測

以肝素鈉(sodium heparin)潤濕微量離心管或空針，然後利用臉頰採血或犧牲老鼠時由下腔靜脈抽取全血，再以 4°C，3000 rcf 離心 10 分鐘，抽取上清液到新的微量離心管，即完成血漿的採集。檢體送至台大醫學院實驗動物中心做生化檢測，利用自動生化分析儀(Cobas c111, Roche, Switzerland)檢測血液尿素氮(blood urea nitrogen；BUN)及肌酸酐(creatinine)的數值。

2.2.3.2 腎臟組織的採集

將小鼠以愛爾能(Aerrane, Baxter, Puerto Rico)氣體麻醉後，剪開腹腔，從下腔靜脈抽取血液，再用刀片劃破下腔靜脈，接著把胸腔剪開，以 10~20 ml 冷的 PBS 做心臟灌流，待血液灌流乾淨後，將腎臟取下並除去腎囊(renal capsule)，把腎臟對半縱切，然後再橫切成四個四分之一顆的腎臟。兩個四分之一顆的腎臟放入冷凍小管後馬上丟入液態氮做急速冷凍，之後放到 -80°C 冰箱作保存，以利後續核糖核酸(ribonucleic acid，RNA)和蛋白質相關檢測；一個四分之一顆的腎臟泡入過碘酸鹽-賴氨酸-多聚甲醛固定液(Periodate-Lysine-Paraformaldehyde，PLP)，放冰上固定 2 小時後，再換成 18% 蔗糖溶液於 4°C 環境下進行脫水，隔天再將組織用冷凍包埋劑(OCT compound,)包埋，放入 -80°C 冰箱保存，日後可進行冷凍切片；最後四分之一顆的腎臟泡入 10% 福馬林中(Sigma-Aldrich, MO, USA)，於 4°C 固定隔夜，再換成 70% 酒精進行脫水，然後送到台大醫學院實驗動物中心做石蠟包埋，日後可進行石蠟切片。



2.2.3.3 腎臟巨噬細胞的分離

小鼠犧牲後，取下腎臟並除去腎囊，然後將腎臟放到含有 200 μ l DMEM/F12 的微量離心管裡，為了方便後續的酵素作用，使用組織研磨棒將組織壓碎。然後每顆加入 800 μ l DMEM/F12 + 20 units DNase + 75 μ g Liberase TM 於 37°C 作用 30 分鐘。然後以 4°C，800 rcf 離心 5 分鐘。除去上清液後用 1 ml 45% Percoll 把細胞打散，再移到 15 ml 離心管裡並加入 6 ml 45% Percoll 混勻細胞液，然後用滴管吸取 45% Percoll 細胞液，沿著管壁緩緩加入到有 3 ml 80% Percoll 的 15 ml 離心管裡。然後以 4°C，1400 rcf，no brake 離心 20 分鐘。可以在刻度 2.5~4 ml 左右看到一層白白的介面，此層為白血球細胞(Leucocytes)，將其吸出放到新的 15 ml 離心管，並加入 8 ml DPBS，然後以 4°C，800 rcf 離心 5 分鐘。除去上清液，然後加入 90 μ l 的 autoMACS Running Buffer(130-091-221, Miltenyi Biotec, Germany)將細胞打散，然後再加入 10 μ l 的 CD11b MicroBeads(130-049-601, Miltenyi Biotec, Germany)於冰上作用 15 分鐘。接著加入 1 ml running buffer，然後以 300 rcf 離心 10 分鐘。除去上清液，加入 500 μ l 將細胞打散。然後利用 autoMACS® Pro Separator(Miltenyi Biotec, Germany)把 CD11b+ cell 分離出來。然後利用 TRIzol® Reagent 萃取 RNA。

2.2.4 RNA 萃取

巨噬細胞或磨碎的腎臟組織會加入適當體積的 TRIzol® Reagent (Ambion, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)於室溫作用 5 分鐘，然後以 4°C，16000 rcf 離心 10 分鐘。取上清液至新的微量離心管，再加入氯仿異戊醇混合液 (chloroform : isoamyl alcohol 24:1, Sigma-Aldrich, USA)，利用震盪器將溶液混合均勻呈粉紅色後靜置 5 分鐘，再以 4°C，16000 rcf 離心 10 分鐘。取上清液至新的微量離心管，然後加入異丙醇並靜置 30 分鐘使 RNA 沉澱，然後以 4°C，16000 rcf 離心 10 分鐘。倒掉上清液並以 70% 酒精清洗，室溫晾乾後，加入適當體積的 RNase-free water



回溶RNA，然後保存在-80°C冰箱。

2.2.5 反轉錄(reverse transcription)及即時聚合酶連鎖反應(real-time polymerase chain reaction ; real-time PCR)

RNA 以 NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)進行定量。取 500~1000 ng 之 RNA 進行反轉錄，使用 T100 thermal cycler 及 iScript™ cDNA synthesis kit(Bio-Rad Laboratories, USA)製造出 20 µl 之互補 DNA(Complementary DNA , cDNA)。

即時聚合酶連鎖反應可將cDNA放大並定量。加入cDNA和0.1 µM之正反引子(primer)與1X iQ™ SYBR®Green Supermix，總體積20 µl進行PCR放大特定基因之序列。使用的引子序列清單列於表二。每樣檢體皆進行二重複試驗。使用 CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, USA)執行 Real-time PCR的放大作用和螢光偵測。個別數據和併盤作業以Bio-rad CFX Manager™ Manager 3.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) 計算分析所有檢體皆以其甘油醛-3-磷酸脫氫酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ,*Gapdh*)表現量進行標準化(normalize)。

2.2.6 X-gal 染色

利用 30 分鐘單側腎臟 IRI(unilateral IRI , uIRI)誘發小鼠產生 AKI，然後在第 14 天犧牲小鼠。犧牲時，先用冷的 PBS pH7.4 做心臟灌流，待血液灌流乾淨後，再用冷的 4% PFA solution 10 ml 灌流，然後把腎臟取下並除去腎囊，接著再把腎臟等分的橫切成四段，泡入冷的 4% PFA solution 固定 30 分鐘。之後用冷的 PBS 清洗三次各 15 分鐘，然後加入 X-gal staining solution pH7.4，放到 37°C 的培養箱作用整晚(約 16 個小時)，用冷的 PBS 清洗三次各 15 分鐘，再用冷的 4% PFA solution 固定 15 分鐘，接著再用冷的 PBS 清洗三次各 15 分鐘，最後泡入 70% 酒

精進行脫水，並送到台大醫學院實驗動物中心做石蠟包埋。之後檢體使用石蠟切片機將檢體切成厚度 8 μm 的切片。脫蠟復水流程如下：以 xylene 脫蠟，共浸泡兩次，每次 5 分鐘；再以 100% 酒精浸泡兩次、90% 酒精浸泡一次、75% 酒精浸泡一次、純水浸泡兩次，以上流程每次 5 分鐘。然後以 nuclear fast red solution 染細胞核(淡粉紅色)，以自來水清洗乾淨後，再進行脫水的流程，最後以 permount medium 進行封片。

2.2.7 PAS 染色(periodic acid-Schiff stain ; PAS stain)

檢體使用石蠟切片機將檢體切成厚度 4 μm 的切片，然後送至台大醫學院實驗動物中心進行 PAS 染色。用 Nikon eclipse E400 顯微鏡以 200 倍率進行閱片，使用顯微鏡照相系統(Nikon DS-Fi1 鏡頭與 Digital sight DS-L2 顯示器)進行拍攝，曝光時間 1/60s，解析度 1280x960。拍攝區域為皮質-髓質交界處，每個檢體約拍攝 5-9 張影像，每張再均分成 252 格的方格，計算損傷的格數，最後算出平均的損傷百分比，在進行統計分析。

2.2.8 免疫組織化學染色(immunohistochemistry ; IHC)

檢體使用冷凍切片機將檢體切成厚度 4 μm 的切片。用 PBS 洗去多餘的冷凍包埋劑，接著以 0.5% H_2O_2 作用 30 分鐘，去除內源性的過氧化酶活性。以 PBS 清洗後，用 10% 的牛血清白蛋白(bovine serum albumin ; BSA)進行 blocking，作用 30 分鐘。然後加入一級抗體 F4/80 (1 : 100, MF48000, Invitrogen, USA)、Ly6G (1 : 100, 127601, BioLegend, USA)，於 4°C 作用至少 16 小時。隔日用 PBS 清洗後，再依據一抗的來源使用對應的試劑，大鼠使用 N-Histofine Simple Stain Mouse Max PO Rat (Nichirei Biosciences inc., Japan)作用 30 分鐘。以 PBS 清洗後，用 Novolink DAB (RE7230-K, Leica, UK)呈色，之後進行脫水封片。用 Nikon eclipse E400 顯微鏡以 200 倍率進行閱片，使用顯微鏡照相系統(Nikon DS-Fi1 鏡頭與 Digital sight

DS-L2 顯示器)進行拍攝，曝光時間 1/350s，解析度 1280x960。拍攝區域為皮質-髓質交界處，以 ImageJ 軟體計算陽性(褐色)面積占整張照片之比例，並算出平均值。



2.2.9 免疫螢光染色(immunofluorescence ; IF)

檢體使用石蠟切片機將檢體切成厚度 4 μm 的切片，再經過前述的脫蠟復水流程後，以 PBS 清洗，再用 10% 的 Normal goat serum (NGS) 進行 blocking，作用 30 分鐘。然後加入一級抗體 Ki67 (1 : 100, ab15580, Abcam, USA) 於 4°C 作用至少 16 小時。隔日用 PBS 清洗後，再加入帶有螢光的二級抗體 Alexa488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (1:400, 111-545-144, ImmunoResearch Laboratories Inc., USA) 作用 30 分鐘。用 PBS 清洗後，以 DAPI (1:1000, D1306, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) 染細胞核，作用 2 分鐘。再用 PBS 清洗 5 分鐘，共三次。然後利用 VECTASHIELD® (Vector Laboratories, USA) 進行封片。使用台大醫院醫學研究部第七共研的螢光顯微鏡照相系統(OLYMPUS BX51 研究型正立螢光顯微鏡與 OLYMPUS DP72 冷卻式數位影像系統)以 400 倍率進行閱片拍攝，解析度 1360x1024。拍攝區域為皮質-髓質交界處。

2.2.10 TUNEL 分析 (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated

dUTP-biotin nick end labeling assay ; TUNEL assays)

檢體使用冷凍切片機將檢體切成厚度 4 μm 的切片。用 PBS 洗去多餘的冷凍包埋劑後，使用 DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (G3250, Promega Corporation, USA) 進行染色，所有步驟流程依照試劑組提供之步驟進行，完成染色後再進行封片。使用前述的螢光顯微鏡照相系統，以 400 倍率進行閱片拍攝，解析度 1360x1024。拍攝區域為皮質-髓質交界處。

2.2.11 統計分析

統計分析皆以 GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) 軟體進行。各數值皆以平均值±SEM 表示，數值間的比較以 Student's t 檢定進行分析。 $P < 0.05$ 則達顯著差異。





第三章 實驗結果

3.1 腎臟受到 IRI 後，LacZ 於腎間質的表現量增加

Smith 等人發現 endosialin 於正常腎臟組織中，表現在腎絲球的系膜細胞及微量表現在血管周圍的纖維母細胞；但是在慢性腎臟病患的檢體切片中，則發現會大量表現於腎間質纖維化的組織(58)。而在 Huang 等人利用 *Endosialin-lacZ* 基因改造小鼠觀察 endosialin 的表現位置的實驗上也有一樣的發現(56)；已知此基因改造小鼠是利用 lacZ 這個報導基因去替換掉 endosialin 的 exon，進而達到剔除 endosialin 的目的，而此基因改造小鼠與野生型小鼠有一樣的正常腎功能(81)，因此本論文利用此 *Endosialin-lacZ* 改造小鼠來研究 endosialin 剔除後對 IRI 之影響。

過去實驗室的研究中發現隨著 IRI 後的疾病進程天數增加，endosialin 的表現量會越來越高，大約在第 14 天達到高峰，然後再降低(附錄十)。為了知道 endosialin 在 IRI 之後於腎臟表現位置之情形，我們利用單側腎臟 IRI(unilateral IRI, uIRI) 誘發損傷，而對側腎臟(contralateral kidney, CLK)就作為對照組，在 IRI 後 14 天犧牲小鼠並進行 X-gal 染色(圖一)。CLK 因為沒有受到 IRI，所以就像正常的腎臟一樣，X-gal 的染色都位於腎絲球及小血管旁，此外，在腎乳突也有些許的表現；而受到 IRI 的腎臟除了上述的位置外，在腎髓質的間質區也會有表現，此現象跟慢性腎病有類似的情形。

3.2 Endosialin 的剔除可降低 IRI 在第二天的損傷

在過去的研究中指出在急性發炎期，M2/Mreg 巨噬細胞具有抗發炎、支持組織與修復及再生組織的功能，多數情況下對於組織是有正面的效果，能夠預防損傷或者重建組織的動態平衡(homeostasis)；而慢性發炎期的 M2/M2a 巨噬細胞則會導致組織過度的重組，最後導致纖維化的發生(68)。實驗室先前在單側輸尿管阻塞的模型中發現，將 endosialin 剔除後，可以降低腎臟的纖維化、減少巨噬細

胞的浸潤並且影響到 M1 及 M2 巨噬細胞的轉型。由於看到剔除 endosialin 對於慢性腎病有這麼良好的效果，又知道巨噬細胞在急性發炎與慢性發炎是扮演著不同的角色，所以我們好奇當 endosialin 剔除後，對於 AKI 會有什麼樣的影響。

我們利用 Nephrectomy + uIRI 的模型來模擬急性腎損傷，並在第二天的急性發炎期犧牲小鼠(圖二 A)，取得的血漿檢體送去檢測血液尿素氮(BUN)及肌酸酐(creatinine)。endosialin 剔除小鼠(以下簡稱 KO)的 BUN 及 creatinine 都比野生型小鼠(以下簡稱 WT)來的低(圖二 B, C)，並達到統計上的差異($p < 0.01$)。由於剔除 endosialin 能夠降低 IRI 的損傷，所以我們想知道這個差異到了組織修復期(IRI 後第十天)的時候還會不會持續存在。為了增加實驗的準確性我們設計了下一個實驗。

一樣利用 Nephrectomy + uIRI 的模型，但是我們在第二天進行臉頰採血，取得適量的血液檢體並檢測其 BUN 及 creatinine，確認小鼠是真的有受到損傷後，才在第十天犧牲小鼠(圖三 A)。結果可以看到 KO 在第二天急性損傷期的 BUN 及 creatinine 都比 WT 來的低，到了第十天進入已修復的期間，KO 的 BUN 及 creatinine 也比 WT 的低(圖三 B)，兩者的差距都有達到統計上的差異($p < 0.01$)。由於剔除 endosialin 後能夠降低 IRI 帶來的損傷，我們認為在第二天能夠降低損傷的影響是比較重要的，因此都先取第二天的檢體做後續的實驗分析。

在血液生化檢測上能夠看到剔除 endosialin 的好處，所以我們想看看在組織結構上是不是也有一樣的結果，所以我們將檢體進行切片，然後藉由 PAS stain 來觀察腎臟組織的結構，經由觀察圓柱體(cast)及腎小管壞死的情形，利用這兩個指標來評估組織損傷的程度(圖四 A)。由於 IRI 引起的損傷區域主要是皮質-髓質交界區，所以在組織損傷的評估也是以這個區域為主。可以發現到 WT 生成的圓柱體及腎小管壞死的情形都比 KO 來的多，而量化後的結果在統計上也達到了差異($p < 0.01$)(圖四 B)，這個結果也呼應了前面的血液生化檢測。



3.3 IRI 後第二天巨噬細胞相關基因表現之情形

根據前面的實驗結果得知 endosialin 剔除後對於 IRI 的損傷有減緩的效果，且在組織型態上也有顯著的差異。因為之前在慢性腎臟纖維化的研究顯示 endosialin 可能與巨噬細胞的功能有關，因而影響腎臟纖維化(81)。因此我們想知道在 AKI 後，endosialin 的剔除是否也如慢性腎病模型一樣會去影響到巨噬細胞的功能與 AKI。所以我們萃取了整個腎臟的 mRNA，然後去檢測與巨噬細胞相關的基因表現之情形(所有基因都與 *Gapdh* 做標準化)。首先可以看到在 IRI 後，與正常腎臟相比下，不論是 WT 或 KO 其 *Acta2*(即 α SMA，纖維化指標)及 *Adgre1*(即 F4/80，巨噬細胞的 marker)的表現量都會增加(圖五 A)。KO 的 *Acta2* 會比 WT 來的低，代表其肌纖維母細胞活化的情況比較輕微，也就是受到的傷害也比較低，與先前的結果相符；而在 *Adgre1* 則是 WT 比較低，但上述兩個基因在統計學上都沒有達到顯著差異。*Nos2* 及 *Ccr2* 是與 M1 巨噬細胞相關的基因(圖五 B)，由於 *Nos2* 的 C_T 值大約落在 34~37 之間，與 *Gapdh* 差了至少 12~17 個 cycle，所以表現量其實很低；*Ccr2* 則是在 IRI 後表現量增加，而 KO 的表現量又比 WT 來的多，並且達到了統計上的差異($p < 0.05$)。接著是與 M2 巨噬細胞相關的基因(圖五 C)，IRI 後這些基因的表現量其實都相當的接近，其中 *Arg1*、*Ccl17* 和 *Ccl22* 則是因為 C_T 值都在 35 以上，所以表現量也是很低，但因為這是 IRI 後第二天的檢體，所以 M2 巨噬細胞的量本來就不多，又因為是整個腎臟下去萃取 mRNA，所以這樣的結果是可以預期的。

因為在整個腎臟的 RNA 分析上並沒有太多的發現，考慮到或許是因為有太多非巨噬細胞的細胞存在，因而稀釋掉了其相關基因的表現，所以我們再利用 CD11b 的磁珠，將巨噬細胞給分離出來，再抽取其 mRNA 去進行分析。一樣檢測了 M1 巨噬細胞相關的基因(圖六 A)及 M2 巨噬細胞相關的基因(圖六 B)，但不論是 M1 或 M2 巨噬細胞，其相關基因的表現在 WT 與 KO 上都無明顯的差異。

從上述實驗結果來看，endosialin 剔除後，似乎是不影響急性損傷期的 M1 或

M2 巨噬細胞基因之表現，而這個結果與 UUO 模型相當的不一樣。



3.4 IRI 後第二天免疫細胞浸潤之情形

過去的研究已知腎臟在受到損傷的時候會有許多的免疫細胞浸潤到組織間，進而加重了組織的損傷；而實驗室過去在 UUO 模型下將 endosialin 剔除後，能夠降低巨噬細胞的浸潤，因此我們想看看在 IRI 模型下是否也有類似的情況。利用巨噬細胞的生物標記物 F4/80 來進行免疫組織化學染色(圖七)，其結果可以看到巨噬細胞的浸潤情形在 KO 的組織中是有比較少的趨勢，但是並沒有達到統計上的差異。

而先前也有提到在 IRI 後，嗜中性球是最先抵達組織的免疫細胞，其浸潤之情形對於組織的損傷也扮演了重要的角色，因此我們利用了嗜中性球的生物標記物 Ly6G 來進行免疫組織化學染色(圖八)，其結果可以看到嗜中性球的浸潤情形在兩者之間沒有差異性。

根據這兩個結果來看，endosialin 剔除後對於免疫細胞的浸潤並無明顯的影響。因此 endosialin 剔除後能夠減少 IRI 的損傷似乎與免疫細胞沒有直接的關聯性。

3.5 IRI 後第二天腎臟細胞的凋亡與增生之情形

在探討 IRI 造成組織的損傷上，除了觀察免疫細胞的浸潤情形及相關基因的表現差異，我們也看腎小管細胞在 IRI 後的凋亡或增生之情形，尤其是腎小管的修復本身就是由存活下來的細胞來進行修復的(27, 28)。利用 DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System 來標記出正在進行凋亡(apoptosis)的細胞，在 400 倍的視野下，我們聚焦在 IRI 損傷最嚴重的皮質-髓質交界處(圖九)，可以看到 KO 正在凋亡的細胞比 WT 少的非常的多，統計上達到了差異($p < 0.01$)。

除了看細胞的凋亡，我們也看了細胞增生的情形，利用 Ki67 來標記出正在進

行增生(proliferation)的細胞(圖十)，一樣在 400 倍的視野下，聚焦在皮質-髓質交界處，其結果發現到 KO 正在進行增生的細胞數量比 WT 來的多，並且達到了統計上的差異($p < 0.01$)。

上述的結果代表著 endosialin 剔除後，在遭受 IRI 損傷的腎臟內有較多存活下來的腎小管上皮細胞，且這些細胞具有增生的能力，也就是說能夠進行腎小管修復的細胞在 KO 是比 WT 來的多。這個結果再次的呼應了前面的事情，也就是說 endosialin 剔除後，在經過 IRI 的損傷，其腎臟內的細胞死掉的比較少，而存活下來的細胞又有比較多具有增生的能力，因此我們才可以觀察到 *Endosialin-lacZ* 改造小鼠在受到 IRI 後，其血液生化檢測及組織型態上都有較好的結果。



第四章 討論


4.1 Endosialin 剔除後，於 IRI 後第二、十天之腎臟損傷情形

根據實驗的血液生化檢測結果來看，將 endosialin 剔除後，能夠降低 IRI 後第二天的腎臟損傷，而到了第十天時這個差異仍然存在。根據上述的情況，剔除 endosialin 在 IRI 後造成的影響，似乎是有三個階段：(1)在急性損傷前的差異(IRI 前)，(2)在急性損傷期間(IRI 到第五天)，(3)急性損傷後的組織修復期(IRI 後第五到十天)。

過去關於 endosialin 的研究大多與腫瘤相關，不論是利用基因改造小鼠或是用抗體和 siRNA 來抑制 endosialin 的表現，都可以發現到腫瘤組織的血管密度都會減少，進而影響腫瘤的生長與轉移(59, 60, 82)。但在一些實驗中利用到的 *Endosialin* 基因缺陷小鼠在正常的狀況下，其血管的密度和傷口的癒合都是正常的(59, 83)。因此，正常的腎臟在受到 IRI 之前，其血管的密度應該是一樣的。但在我們的動物模型當中，小鼠還有先進行單側腎臟摘除的手術，而這會造成剩下來的顆腎臟進行適應性超濾作用(adaptive hyperfiltration)，進而導致腎臟肥大(hypertrophy)(84, 85)，在這個情況下，WT 與 KO 的腎臟是否仍然沒有差異還需要進行實驗來驗證。

在小鼠關節炎模式的實驗中，endosialin 會經由下游的 HIF-1 傳遞訊息，並抑制 Notch-3 訊息傳遞而促進發炎反應(57)，因此在 endosialin 剔除後，此路徑就被阻斷掉，是否因此而減少急性損傷期的發炎反應。

Smith 等人利用 *Endosialin* 剔除小鼠，透過 UUO 引發腎臟纖維化的實驗裡(83)，可以看到 endosialin 剔除鼠其腎臟血管於術前一直到 UUO 第 14 天都維持在差不多的數量，而正常小鼠則是在第三天先增加，之後隨著疾病的病程進展而逐漸減少。此外根據 Tomkowicz 等人的實驗，可以知道當利用 siRNA 抑制掉 endosialin 後，PDGF-BB 經由活化 PDGFR β 造成 pericyte 的增生就會受到抑制(63)。



綜合上述的實驗，我們假設在正常的情況下將 endosialin 剔除後，腎臟的組織並沒有差異，但在遭受到 IRI 的損傷之後，endosialin 剔除鼠因為沒有辦法活化 HIF-1 及抑制 Notch-3 的訊息傳遞而減少了發炎反應，所以急性損傷期受到的損傷就比較少；然後因為損傷較嚴重的正常老鼠，其分泌出的 PDGF-BB 能透過 PDGFR β 的途徑促進 pericyte (或 myofibroblast) 增生，到了比較後面的組織修復期，由於 pericyte (或 myofibroblast) 的過度增生，以及正常老鼠的血管密度降低，最後導致了腎臟組織處於慢性缺氧的情況，因此到了第十天，組織損傷的差異性仍然存在。這個部分仍需更多的實驗來進行驗證，且應該增加更多的時間點來觀測。

4.2 Endosialin 剔除後，不影響免疫細胞的浸潤

先前提到有研究顯示在 IRI 後，嗜中性球是最先受到吸引而浸潤到組織中的細胞，而將此現象給抑制掉的話，對於抵抗 IRI 有部分的保護效果(26)。另外，受損的組織也會吸引發炎性的單核球浸潤到裡面，然後在經由環境因子影響，進而分化成不同亞型的巨噬細胞(67, 68)。

根據我的實驗發現將 endosialin 剔除後，只有巨噬細胞的浸潤情形有減少的趨勢，但沒有達到統計上的差異。這代表剔除 endosialin 造成損傷比較輕微的結果，主因並不是藉由減少免疫細胞的浸潤而產生的。

而過去在去除巨噬細胞的實驗中，可以確定的是在組織受到 IRI 損傷之後才將巨噬細胞給去除的話，會去影響到組織的修復及再生過程，不論是利用氫磷酸二鈉脂質體(86)或是注射 DT 到 CD11b-DTR 老鼠(66)。但是在腎臟受到 IRI 之前將巨噬細胞給去除掉的話，兩種去除方式得到的結果卻是不同的(80, 87)。因此，巨噬細胞的減少或去除，對於 IRI 損傷的影響仍沒有定論。



4.3 Endosialin 剔除後，減少 IRI 後腎小管上皮細胞的凋亡並增加細胞增生

從實驗的結果可以得知，將 endosialin 剔除後可以減少 IRI 對於腎小管細胞造成的凋亡，並且有更多的腎小管上皮細胞正在進行增生。由於在免疫細胞的浸潤與巨噬細胞相關基因的檢測上，並沒有觀察到顯著的差異，因此造成此現象的原因應該不是由免疫細胞導致的。前面的討論中有提到，在 UUO 的慢性腎病模型下，將 endosialin 剔除掉後，可以減少腎臟的纖維化以及維持血管的密度(83)。而先前有研究提到，在腎臟受到損傷的時候會活化 a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs-1 (ADAMTS1)，它會使得血管變得不穩定；並且將它的抑制劑向下調節(downregulated)，tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP3)(88)，而 TIMP3 本身的作用是穩定血管；而這兩個基因只在 pericyte 上有表現，由 pericyte 轉變而來的 myofibroblast 則不會表現這兩個基因，因此可以知道在腎臟損傷的時候，血管的穩定性是由 pericyte 來負責的。而 endosialin 也是表現在 pericyte 上的蛋白質，有沒有可能因為 endosialin 的剔除，而去影響了這個調控機制，進而導致 Endosialin-lacZ 改造小鼠比較能抵抗 IRI 的傷害，然後觀察到腎小管細胞的凋亡減少及增生增加的結果。未來我們可以檢測 *Timp3* 及 *Adamts1* 在 IRI 後的變化，以及腎臟血液灌流量是不是有差異。

4.4 未來可進行的相關實驗

由於目前對於 endosialin 的研究還不是很透徹，尤其是在腎臟疾病的這個區塊。因此想要就單一的途徑去探討它的效果似乎是有點大海撈針。因此，未來可能利用 microarray 的方式，先去看看整個腎臟有哪一類別的基因出現了差異，在針對裡面相關的基因去做進一步的分析。另外也可以利用 *Collα1-GFP mice* 與 *Endosialin-lacZ mice* 配種，然後去分離出 GFP+ 的 pericyte / fibroblast，看看他們



在正常的情況下以及 IRI 損傷後的基因有什麼變化。

目前不論是基礎研究或是臨床都發現到 AKI 的病人在預後會有一部份的人轉變成 CKD，而當初 AKI 的嚴重程度又與未來發展成 CKD 的機率呈現高度的相關(89-91)。既然剔除 endosialin 在 IRI 能夠降低傷害的程度，然後在 UUO 的模型下又能減少腎臟的纖維化，似乎能利用這個老鼠來驗證當 AKI 的損傷減少時，CKD 的發生率是不是也會比較低。

此外前面 X-gal 的染色可以發現到 endosialin 大多數都表現在腎絲球上，而剔除 endosialin 後也不會影響到腎臟的功能，但若是在一些腎絲球的疾病情況下，endosialin 的缺乏會不會也造成了一些影響，這些都是未來可以進行的研究。

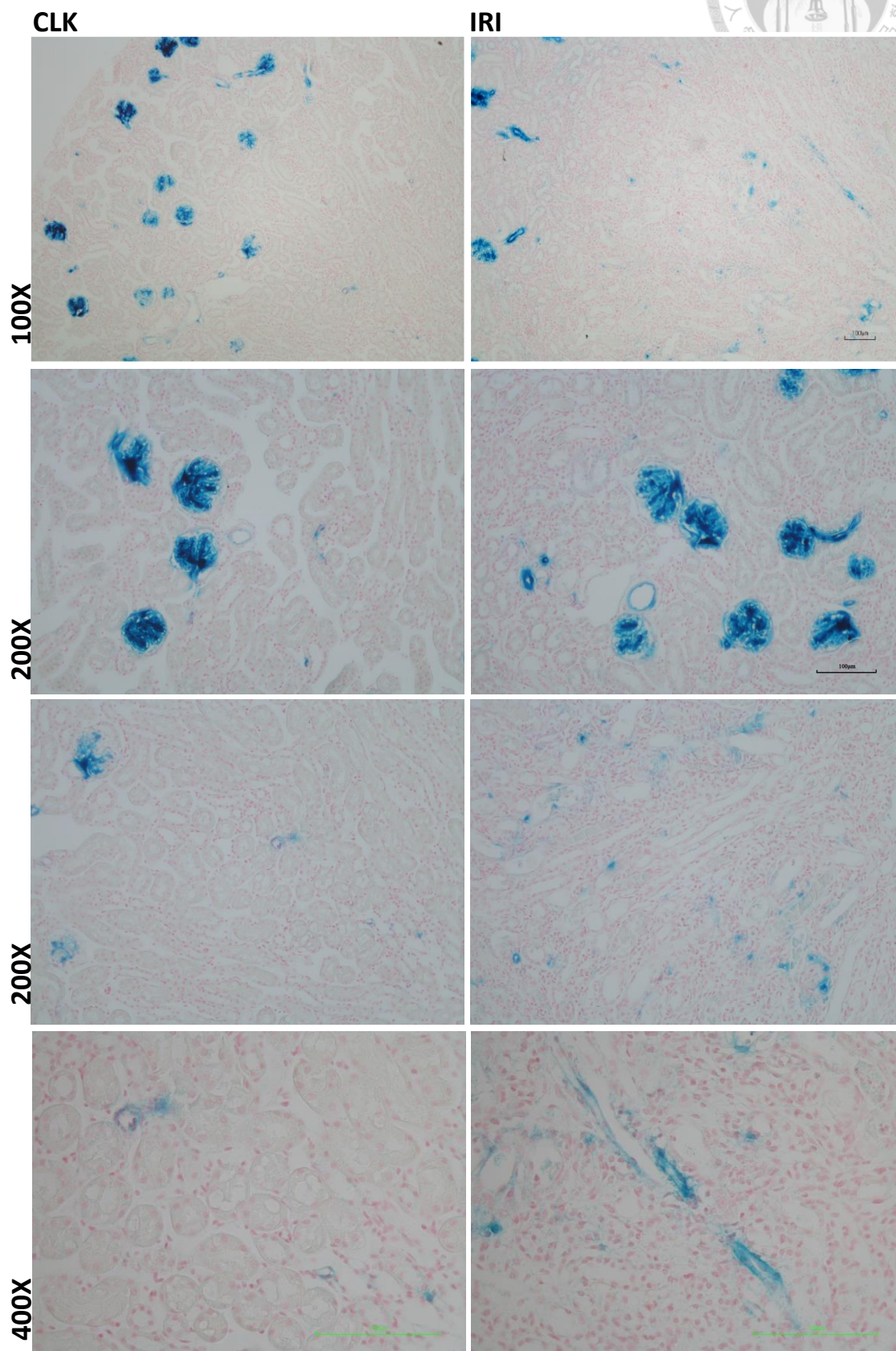


第五章 結論與未來展望

在本篇研究中，透過 *Endosialin-LacZ* 基因改造小鼠來探討 endosialin 剔除後對於 IRI 造成的急性腎損傷之影響。其結果可以得知 endosialin 剔除後能夠減少 IRI 所帶來的傷害，在血液尿素氮、肌酸酐及腎臟組織結構上都看的到好處；也觀察到免疫細胞的浸潤及腎臟細胞的凋亡會比較少，而正在進行增生的細胞比較多，但這之間的關係及作用機制仍需更多的實驗來完成。

至今為止，endosialin 的研究都著重於腫瘤的治療，而目前在人類已設計出針對 endosialin 的 humanized 單株抗體 MORAb-004，並且進入第一期臨床試驗，也完成最高安全劑量測試 (12mg/kg)，初步觀察結果也顯示此抗體能夠抑制腫瘤的活性(92)，在 2016 年有部分的腫瘤治療也已經進入到第二期臨床試驗，如 melanoma、sarcoma 及 colorectal cancer。根據之前 Smith 的研究發現，endosialin 的表現量與腎臟病的嚴重程度呈正相關(58)；最近白博士也證明了剔除 *Endosialin* 並不會影響到胚胎的發育和生殖能力，且腎臟的結構與功能都與正常的小鼠一樣；而在 UUO 這個慢性腎病的模型下，又能顯著的降低腎臟的纖維化，證實 endosialin 是有潛力做為腎臟病的治療標的(81)。而在本研究中則是發現剔除 endosialin 能夠減少 IRI 在第二天的傷害，並且不會影響到腎臟後續的修復能力，且在 IRI 後第十天，腎臟的損傷程度仍比正常小鼠低，又目前對於 AKI 的治療並沒有太多有效的藥物或治療方式(12, 93)，這無疑是增加了”抑制 endosialin 作為治療方式”的應用性，也突顯其臨床應用的價值性。

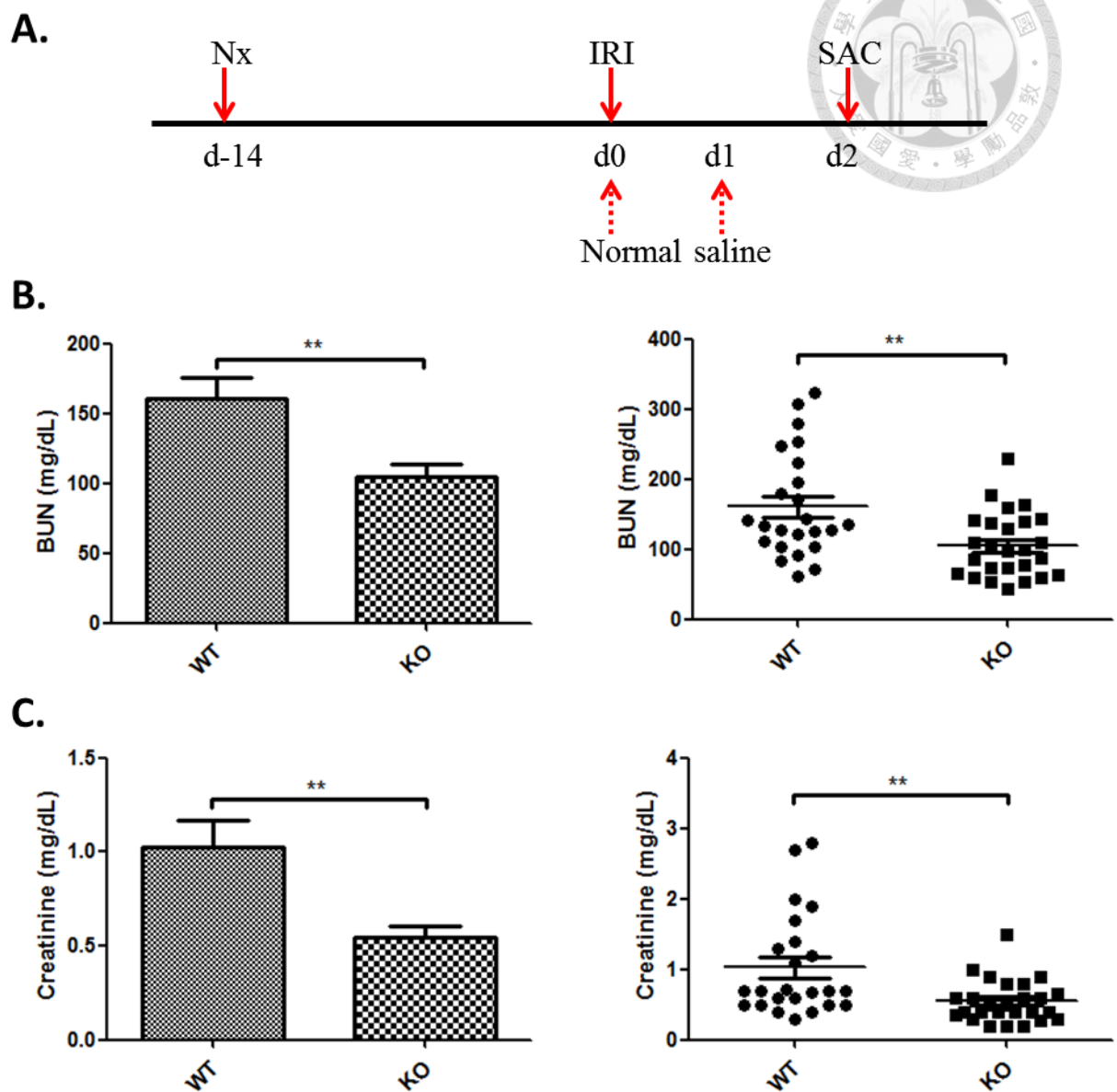
圖表





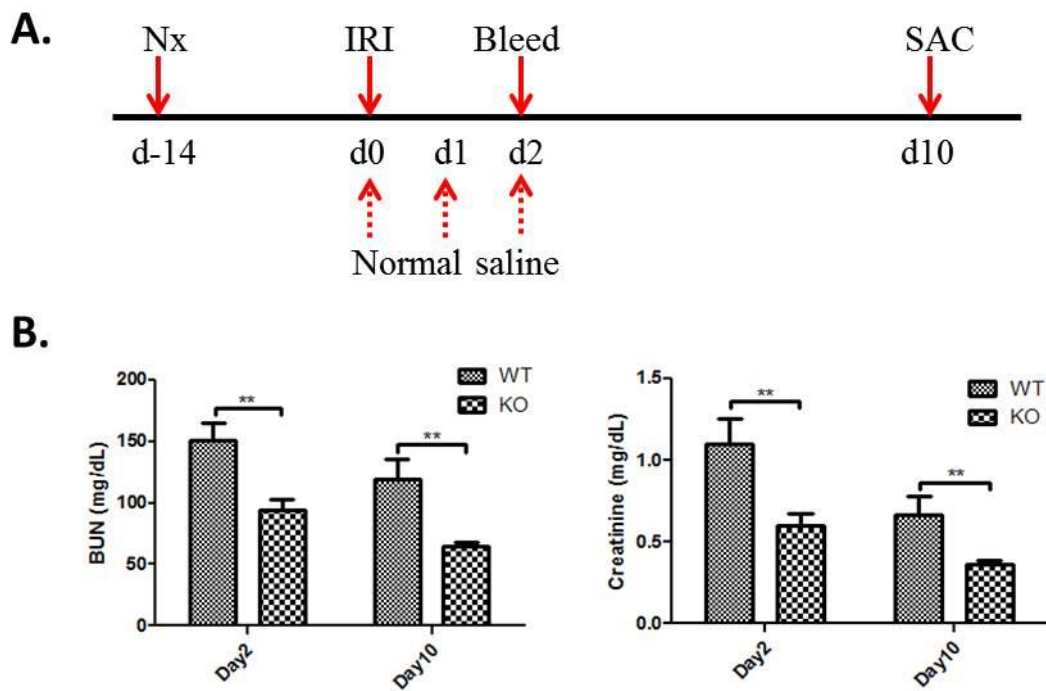
圖一、腎臟 X-gal 染色之情形

以 30 分鐘 uIRI 誘發損傷，第 14 天犧牲小鼠後做 X-gal 染色。藍色代表有 LacZ 的表現。在 CLK 可以看到腎絲球及小血管有 LacZ 的表現；在 IRI 的腎臟中，除了上述的位置外，在腎髓質的間質區也會有 LacZ 的表現。比例尺長度代表 100 μm 。(左半圖為 CLK：對側腎臟、右半圖為 IRI：受缺血再灌流損傷的腎臟；400X 為腎臟皮質髓質交界處)。



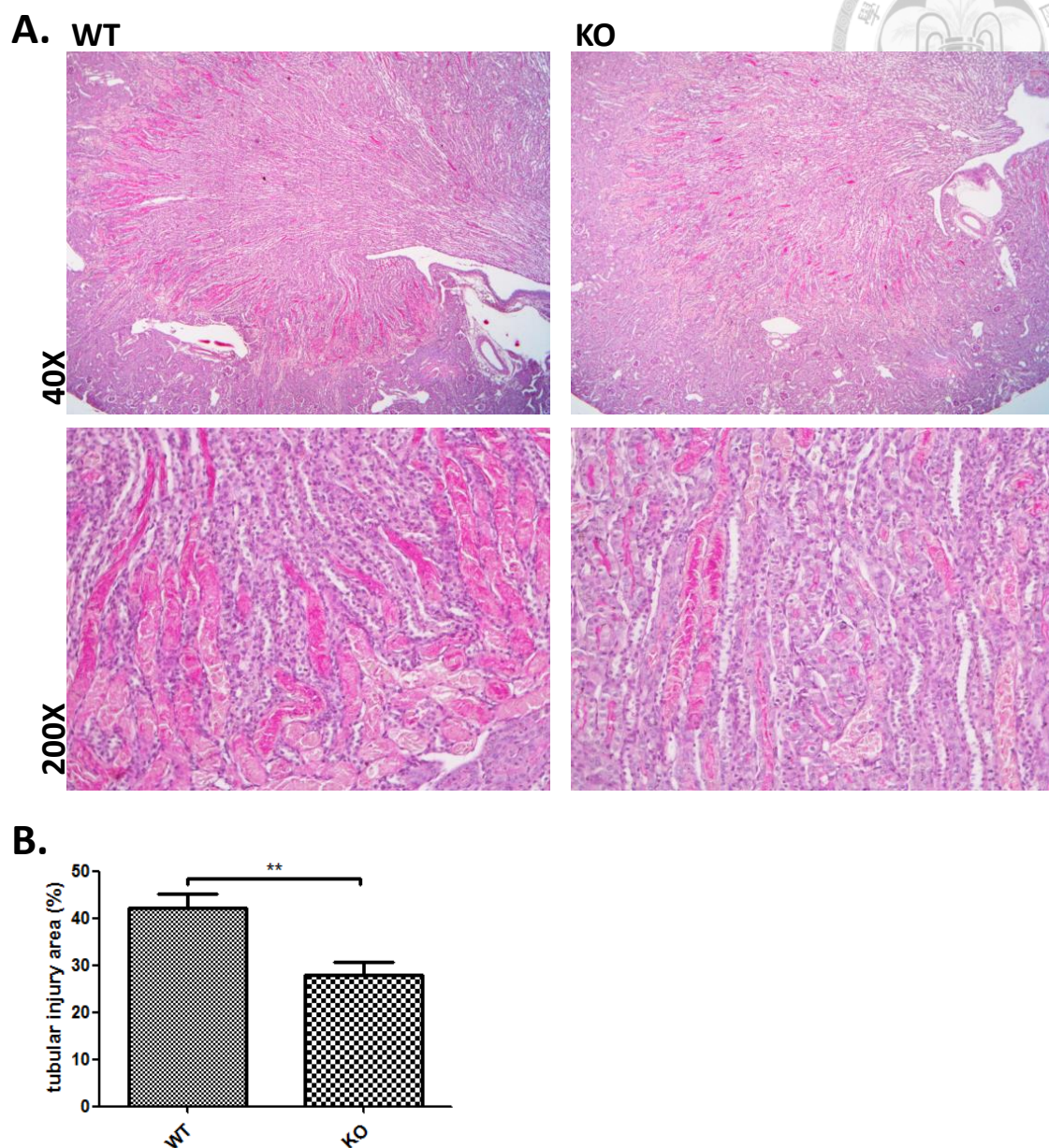
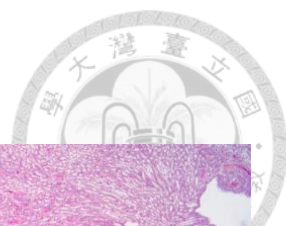
圖二、IRI 後第二天之 BUN 及 Creatinine

(A)在 IRI 前 14 天先進行單側腎臟摘除，手術當天進行 24 分鐘的 uIRI，並於術後和隔天用腹腔注射 1 mL 的 normal saline 補充體液，小鼠於的三天進行犧牲。在 IRI 術後第二天，不論是血液尿素氮(B)或肌酸酐(C)的數值，KO 的數值都比 WT 來的低，並達到統計上的差異。(統計以 Student's t 檢定進行分析，** P < 0.01。長條圖為平均值±SEM。WT：n=24，KO：n=26)。



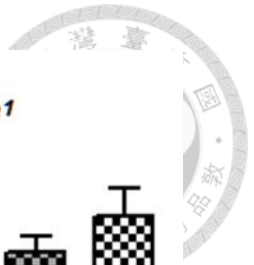
圖三、IRI 後腎臟生理功能恢復之情形

(A)在 IRI 後的第二天，利用臉頰採血取得血液檢體，並檢測其 BUN 及 Creatinine，以確保老鼠真的有受到傷害，採完血會補充 0.5 ml 生理食鹽水補充小鼠體液，然後於第 10 天犧牲。(B)於第二天的時候可以看到 KO 的損傷確實是比較低，而這個差異到了第十天仍然存在。(統計以 Student's t 檢定進行分析，** P < 0.01。長條圖為平均值±SEM。WT：n=13，KO：n=15)。

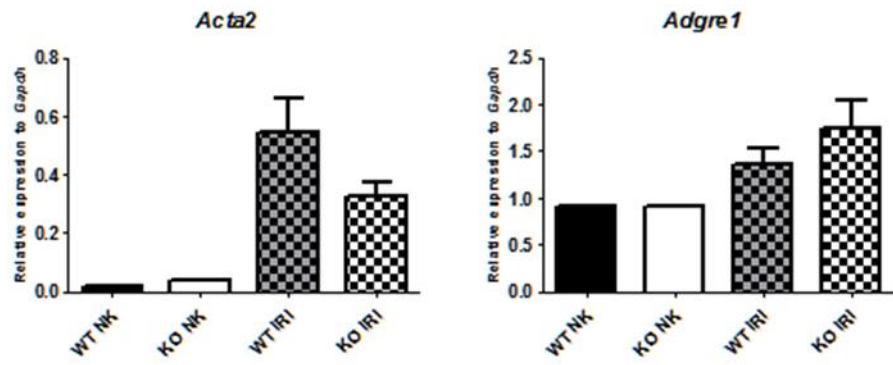


圖四、比較 WT 與 KO 在 IRI 後兩天腎臟組織損傷之情形

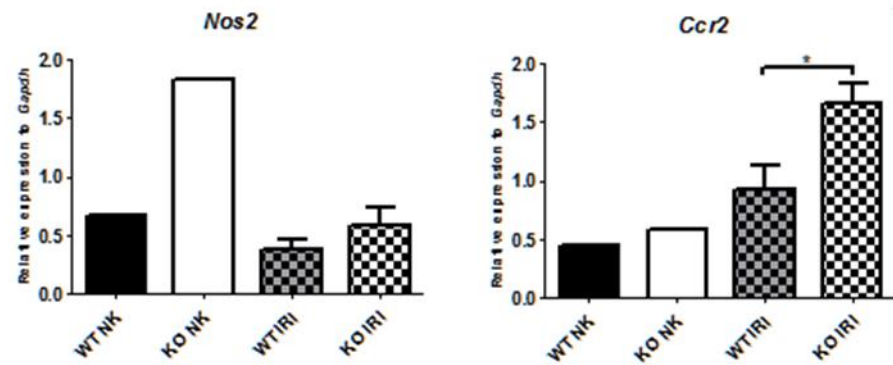
(A)利用 PAS stain 來觀察腎臟組織圓柱體(cast)的生成及腎小管的壞死。進一步分析其組織學上的差異。(B)以 200 倍視野拍攝照片，聚焦在損傷最嚴重的皮質-髓質交界處。每個檢體由 5-9 個視野取平均作為代表值。(統計以 Student's t 檢定進行分析，** P < 0.01。長條圖為平均值±SEM。WT 及 KO n=5)。



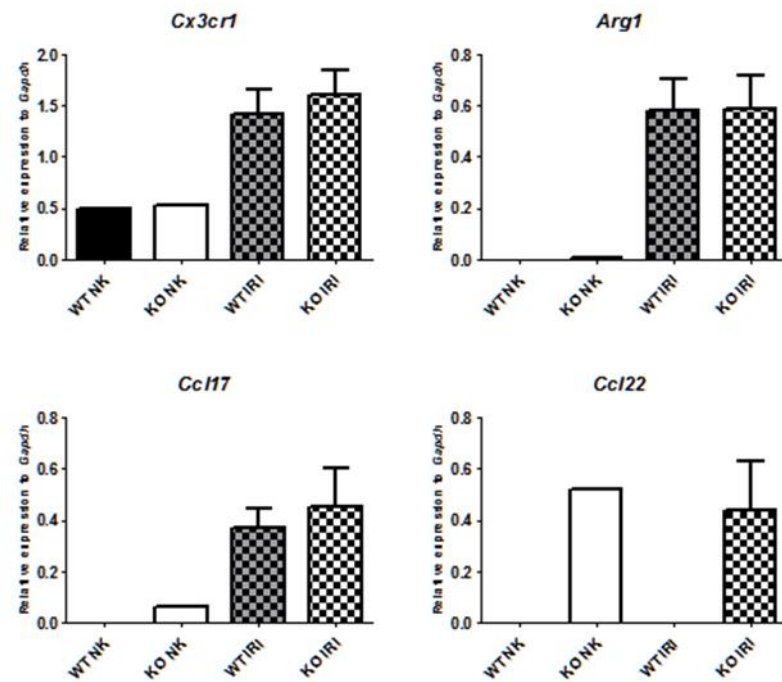
A.



B.



C.

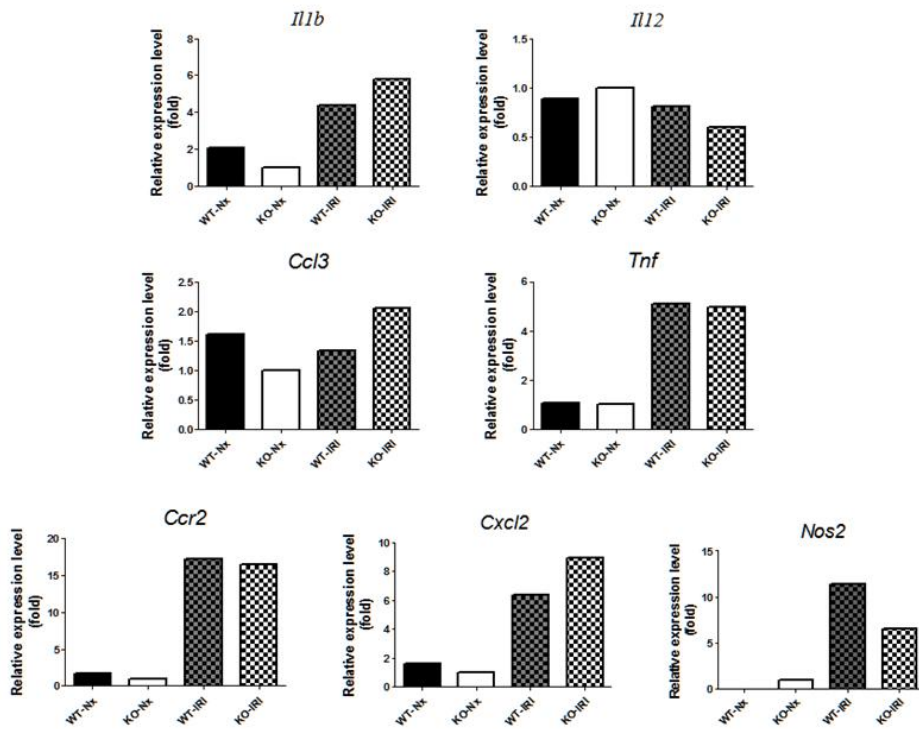


圖五、IRI 後第二天腎臟組織與巨噬細胞相關基因之表現

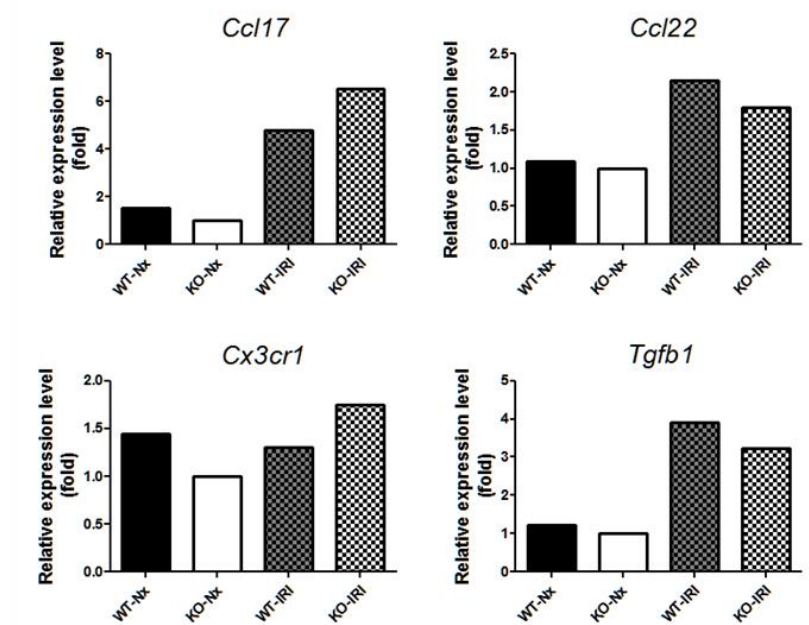
(A)*Acta2*(纖維化的指標)及 *Adgre1*(巨噬細胞的指標)的表現量。(B)*Nos2* 及 *Ccr2*(M1 巨噬細胞的指標)的表現量。(C)與 Mreg 或 M2a 巨噬細胞相關基因的表現。(所有基因都與 *Gapdh* 做標準化。統計以 Student's t 檢定進行分析,* P < 0.05。長條圖為平均值±SEM。normal kidney, NK。WT 與 KO 的 NK n=1；WT 與 KO 的 IRI n=5。)



A.

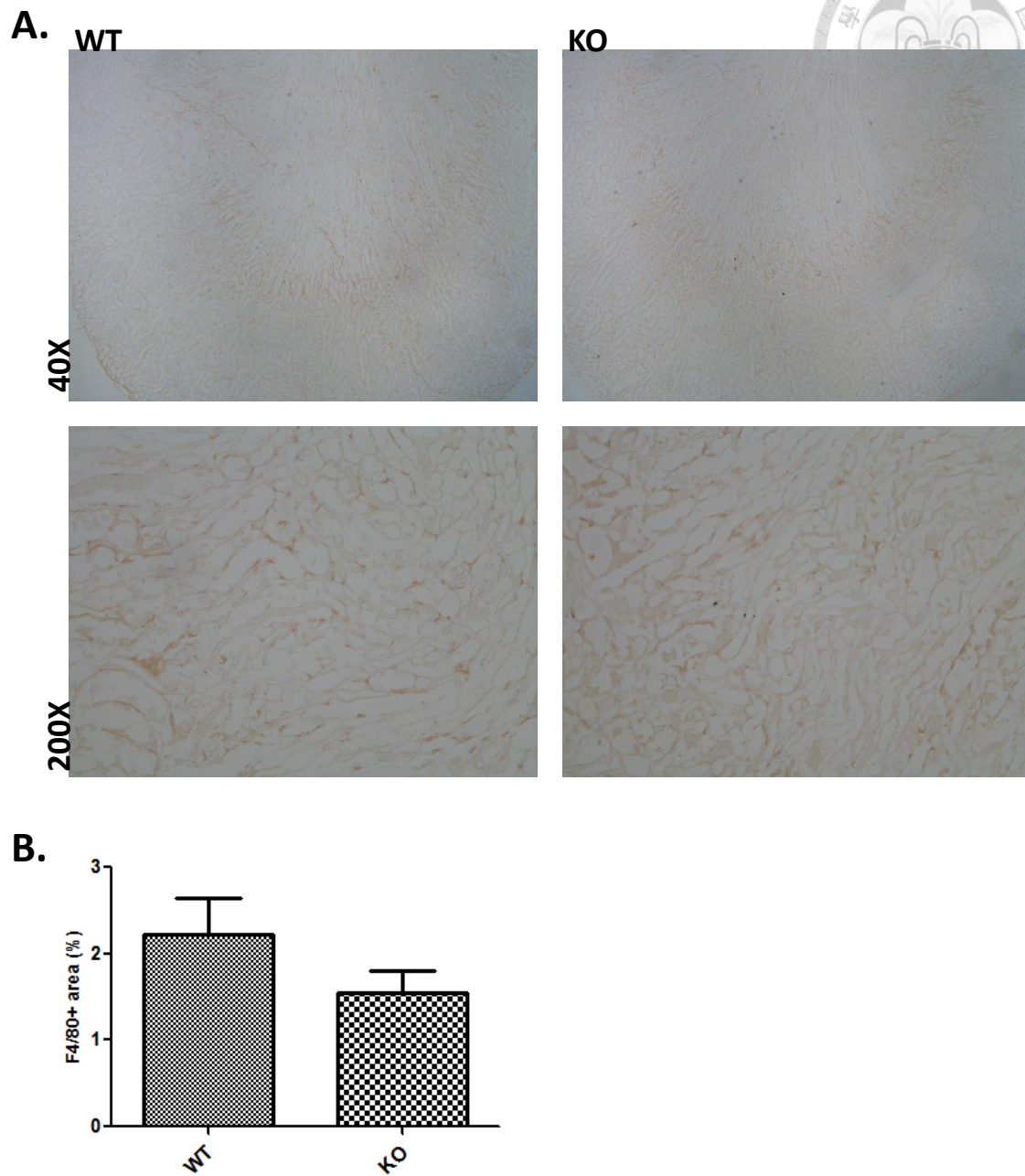


B.



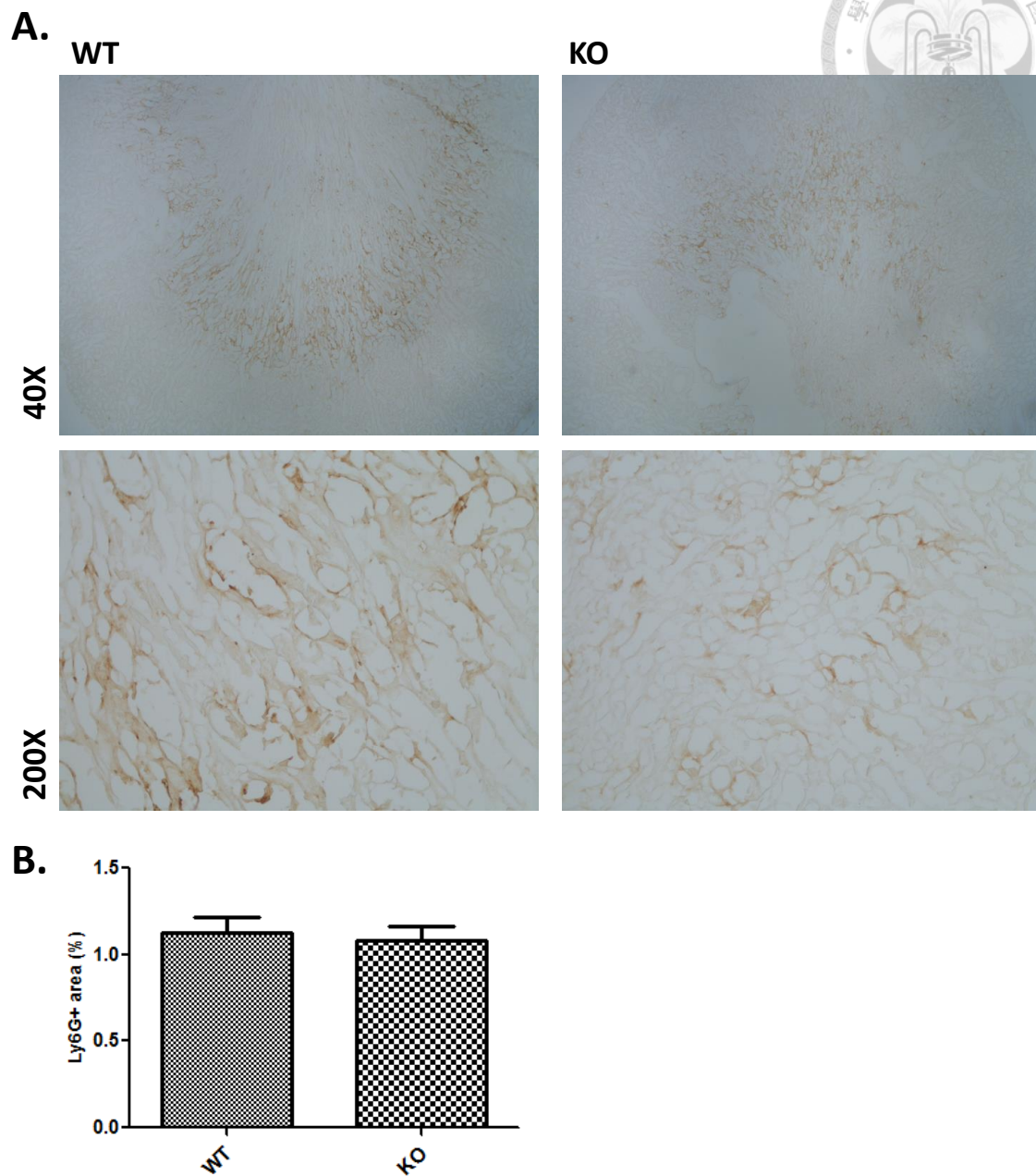
圖六、IRI 後第二天分離的巨噬細胞基因之表現

(A)為 M1 巨噬細胞相關基因的表現。(B)為 M2 巨噬細胞相關基因的表現。(所有基因都與 *Gapdh* 做標準化，再以 KO-NK 做為比較的基準。)



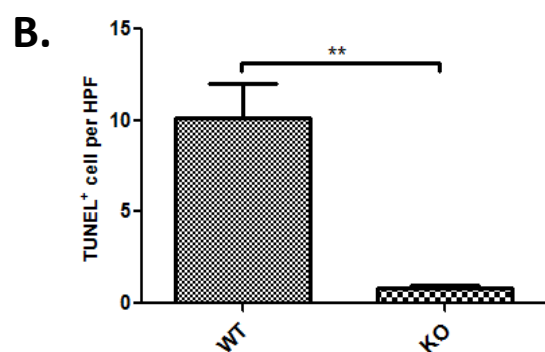
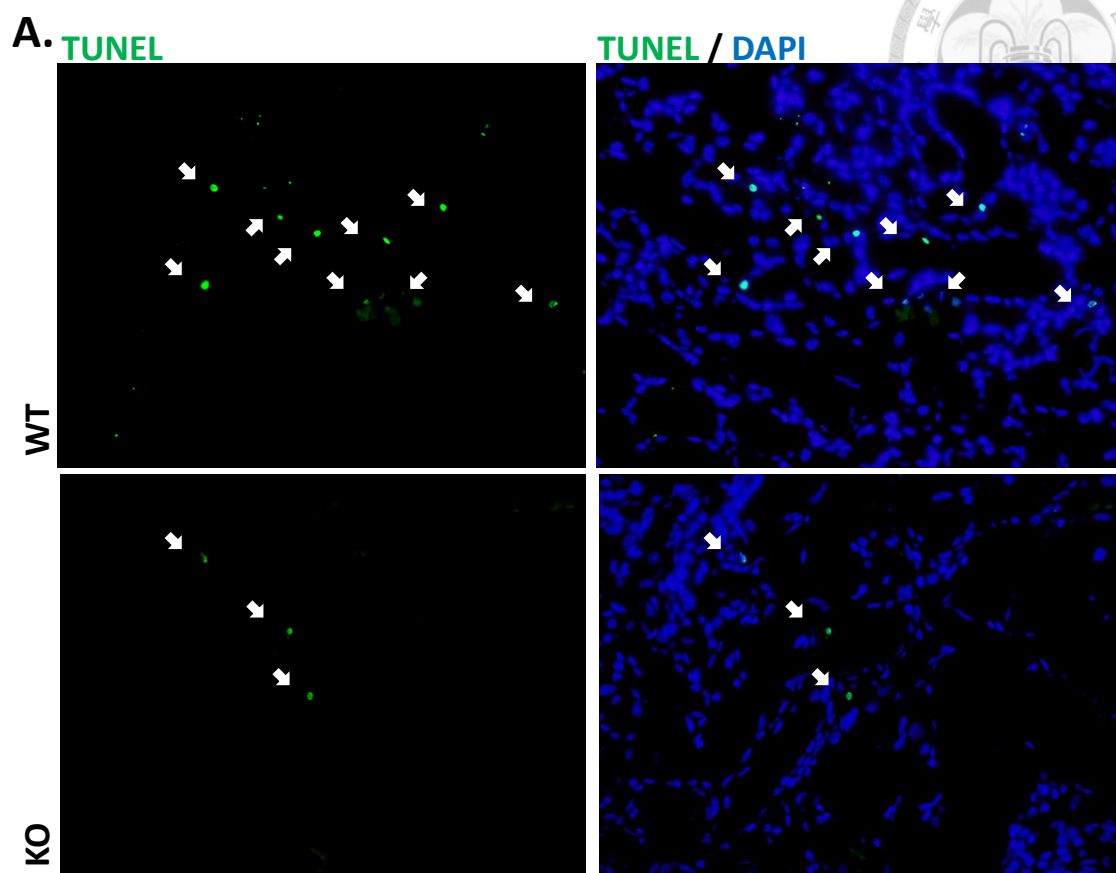
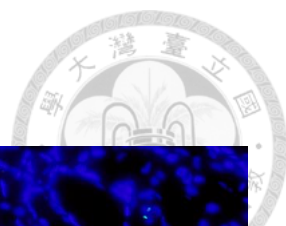
圖七、比較 WT 與 KO 在 IRI 後兩天之巨噬細胞浸潤情形

(A)利用 F4/80 免疫組織染色偵測巨噬細胞浸潤情形。(B)以 200 倍視野拍攝照片，聚焦在皮質-髓質交界處。每個檢體由 7-10 個視野取平均作為代表值。(統計以 Student's t 檢定進行分析。長條圖為平均值±SEM。WT 及 KO n=5)。



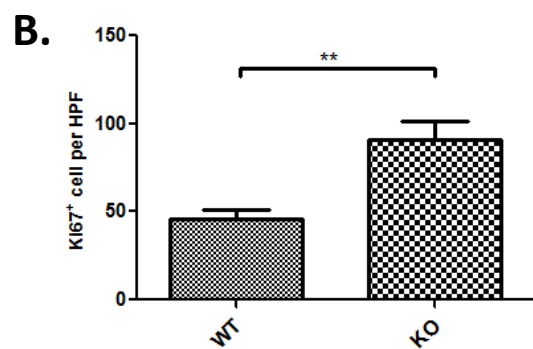
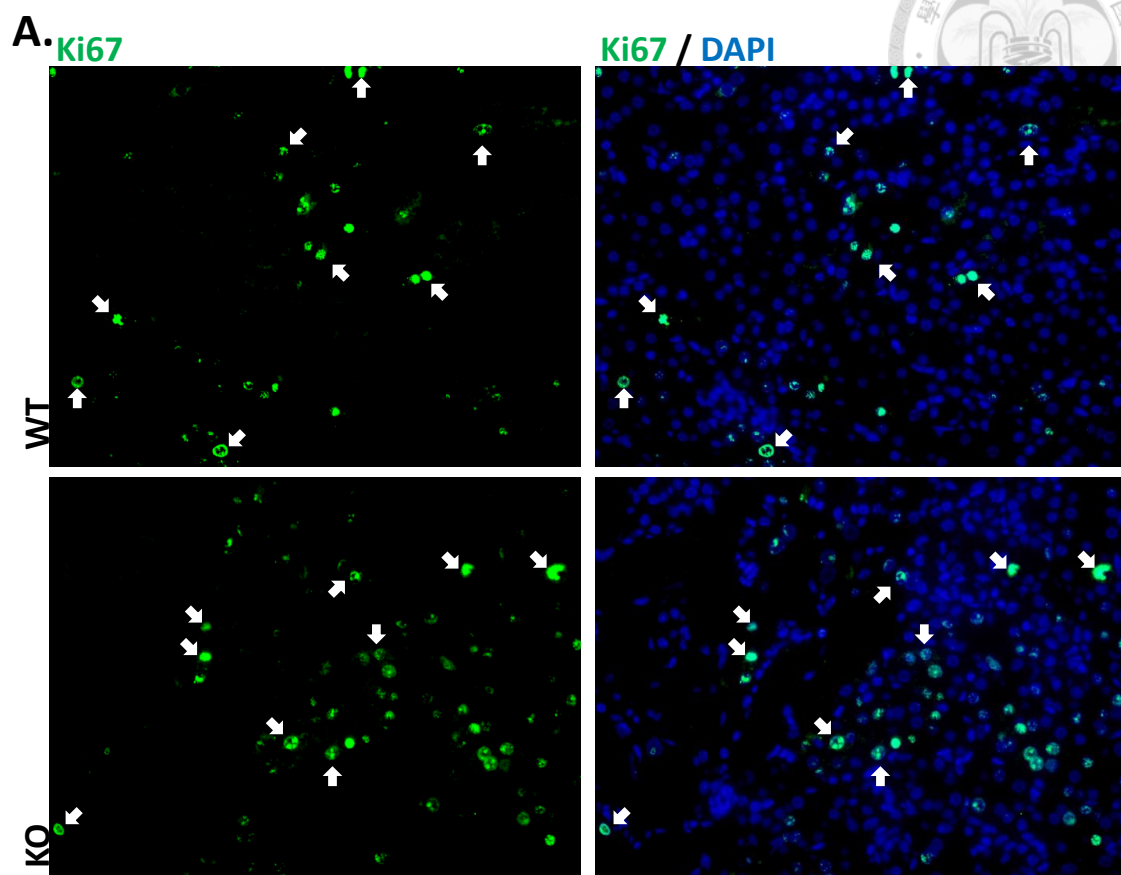
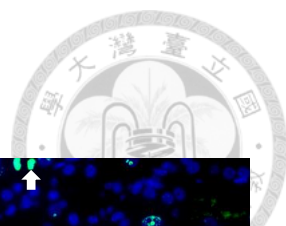
圖八、比較 WT 與 KO 在 IRI 後兩天嗜中性球浸潤情形

(A)利用 Ly6G 免疫組織染色偵測嗜中性球浸潤情形。(B)以 200 倍視野拍攝照片，聚焦在皮質-髓質交界處。每個檢體由 7-10 個視野取平均作為代表值。(統計以 Student's t 檢定進行分析。長條圖為平均值±SEM。WT 及 KO n=5)。



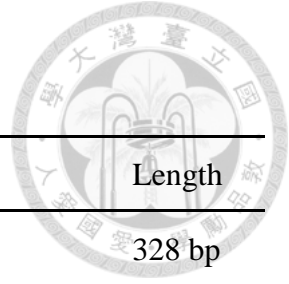
圖九、比較 WT 與 KO 在 IRI 後兩天之凋亡細胞數量

(A)利用 TUNEL assay kit 進行螢光染色來偵測細胞凋亡之數量。綠色代表正在凋亡的細胞，藍色為細胞核。(B)以 400 倍視野拍攝照片，聚焦在皮質-髓質交界處。每個檢體由 6-11 個視野取平均作為代表值。(統計以 Student's t 檢定進行分析，** P < 0.01。長條圖為平均值±SEM。WT 及 KO n=5)。



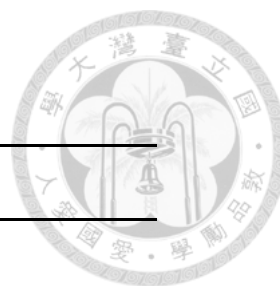
圖十、比較 WT 與 KO 在 IRI 後兩天之細胞增生數量

(A)利用 Ki67 免疫螢光染色偵測正在進行增生(proliferation)的細胞。綠色代表正在進行增生的細胞，藍色代表細胞核。(B)以 400 倍視野拍攝照片，聚焦在皮質-髓質交界處。每個檢體由 9-12 個視野取平均作為代表值。(統計以 Student's t 檢定進行分析，** $P < 0.01$ 。長條圖為平均值 \pm SEM。WT：n=5，KO：n=4)。



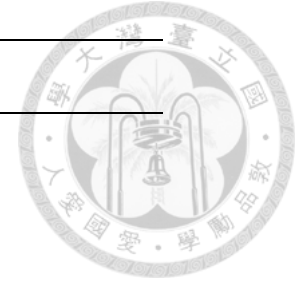
表一、PCR 之引子序列

Gene	Sequences (5' to 3')	Length
Endosialin		328 bp
Forward	TGT GCG TGA AAC AGC CTT CAG GTG GCG	
Reverse	ACA CAC CAG CAA TCT GGC ACT CAT CCG	
LacZ		440 bp
Forward	GCT ACC ATT ACC AGT TGG TC	
Reverse	GGT CTG GAT AAT TGG CCT TG	



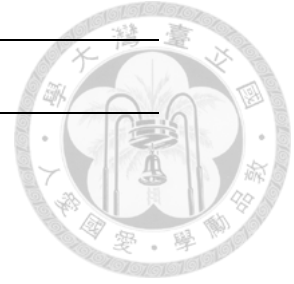
表二、Real-time PCR 之引子序列

Gene	Sequences (5' to 3')
Arg1	
Forward	AGC ACT GAG GAA AGC TGG TC
Reverse	CAG ACC GTG GGT TCT TCA CA
Ccl17	
Forward	AGT GGA GTG TTC CAG GGA TG
Reverse	CTG GTC ACA GGC CGT TTT AT
Ccl22	
Forward	TGG CTA CCC TGC GTG TCC CA
Reverse	GCC AGG CTT GCG GCA GGA TT
Ccr2	
Forward	ATT CTC CAC ACC CTG TTT CG
Reverse	GAT TCC TGG AAG GTG GTC AA
Cx3cr1	
Forward	GGA GAC TGG AGC CAA CAG AG
Reverse	CCT GAT CCA GGG AAT GCT AA
Gapdh	
Forward	ACG GCC GCA TCT TCT TGT GCA
Reverse	AAT GGC AGC CCT GGT GAC CA
Pdgfrb	
Forward	CAC CTT CTC CAG TGT GCT GA
Reverse	GGA GTC CAT AGG GAG GAA GC

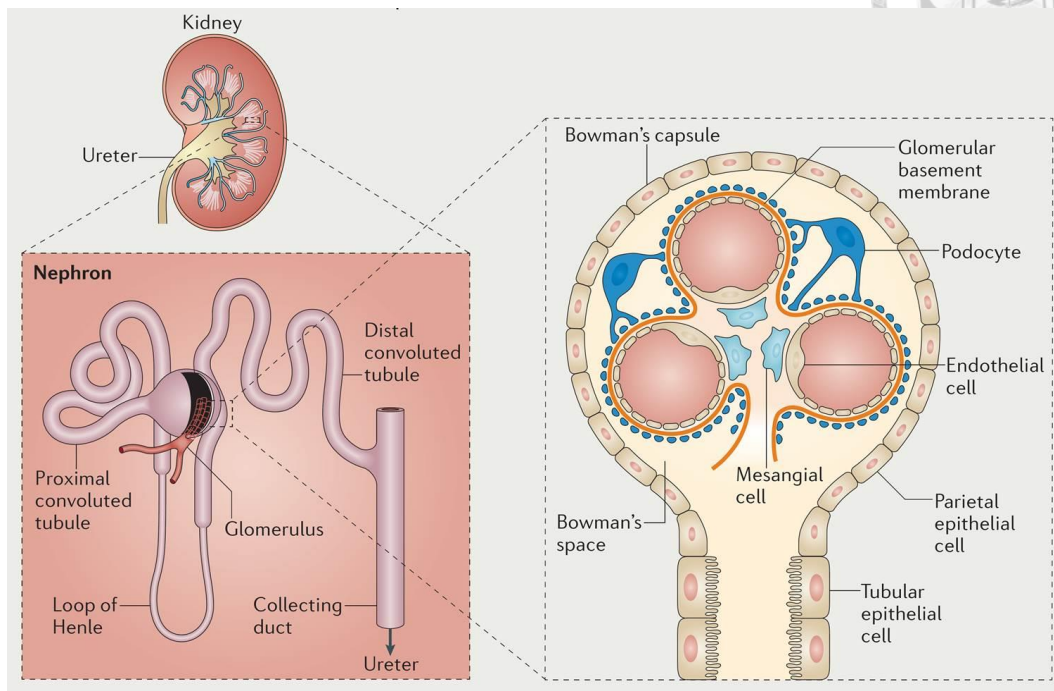


Gene	Sequences (5' to 3')
Acta2(aSMA)	
Forward	CTG ACA GAG GCA CCA CTG AA
Reverse	CAT CTC CAG AGT CCA GCA CA
Adgre1(F480)	
Forward	GCC ACG GGG CTA TGG GAT GC
Reverse	ACC CAC AGT GTC CAG GCA AGG
Il12	
Forward	CCC TTG CAT CTG GCG TCT ACA C
Reverse	ACC CTG GCC AAA CTG AGG TGG T
Il1b	
Forward	CCC AAG CAA TAC CCA AAG AA
Reverse	GCT TGT GCT CTG CTT GTG AG
Nos2	
Forward	CAC CTT GGA GTT CAC CCA GT
Reverse	ACC ACT CGT ACT TGG GAT GC
Ccl3 (MIP-1a)	
Forward	ATG AAG GTC TCC ACC ACT GC
Reverse	GAT GAA TTG GCG TGG AAT CT
Cxcl2 (MIP-2)	
Forward	CAG ACT CCA GCC ACA CTT CA
Reverse	CAG TTC ACT GGC CAC AAC AG
Tgfb1	
Forward	GGA CTC TCC ACC TGC AAG AC
Reverse	GAC TGG CGA GCC TTA GTT TG

Gene	Sequences (5' to 3')
Tnf	
Forward	TAG CCA GGA GGG AGA ACA GA
Reverse	TTT TCT GGA GGG AGA TGT GG



附錄



附錄一、腎臟結構圖

左圖為腎臟基本功能單位，腎元：經由腎絲球、鮑氏囊、近曲小管、亨利氏環、遠曲小管和集尿管所組成。右圖為腎絲球，由內皮細胞、系膜細胞、足細胞和上皮細胞所組成。

資料來源：Kurts, C., et al., *The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(10): p. 738-53.

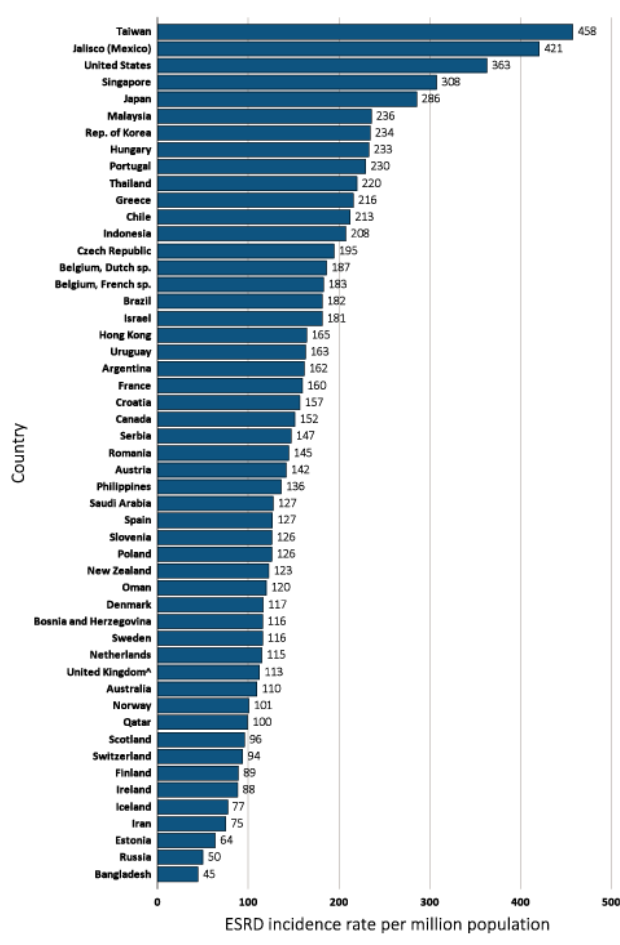
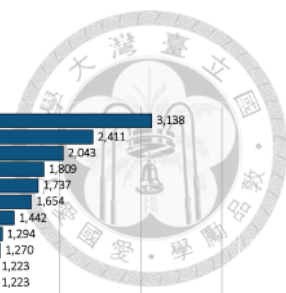
RIFLE Criteria			AKIN Criteria		
Stage	GFR Criteria	Urine Output Criteria	Scr Criteria	Urine Output Criteria	Stage
Risk	↑Scr x 1.5 or ↓GFR > 25%	UO < 0.5 ml/kg/hr x 6 hrs	↑Scr ≥ 0.3 mg/dL or ↑ to ≥ 1.5- to 2-fold from baseline	UO < 0.5 ml/kg/hr ≥ 6 hrs	1
Injury	↑Scr x 2 or ↓GFR > 50%	UO < 0.5 ml/kg/hr x 12 hrs	↑Scr > 2- to 3-fold from baseline	UO < 0.5 ml/kg/hr ≥ 12 hrs	2
Failure	↑Scr x 3 or ↓GFR > 75% or Scr ≥ 4 mg/dl (acute ↑ ≥ 0.5 mg/dL)	UO < 0.3 ml/kg/hr x 24 hrs or anuria x 12 hrs	↑Scr > 2- to 3-fold from baseline, with an acute increase of at least 0.5 mg/dL or individual who received RRT	UO < 0.3 ml/kg/hr ≥ 24 hrs	3
Loss	Persistent AFR = complete loss of renal function > 4wks		Diagnostic criteria : within 48 hrs		
ESRD	End stage renal disease (complete loss of renal function > 3 months)		-absolute increase in serum creatinine ≥ 0.3 mg/dL, or a percentage increase in serum creatinine ≥ 50%, or a reduction in urine output (< 0.5 ml/kg/hr > 6 hrs)		

GFR : glomerular filtration rate ; Scr : serum creatinine ; UO : urine output ; RRT : renal replacement therapy

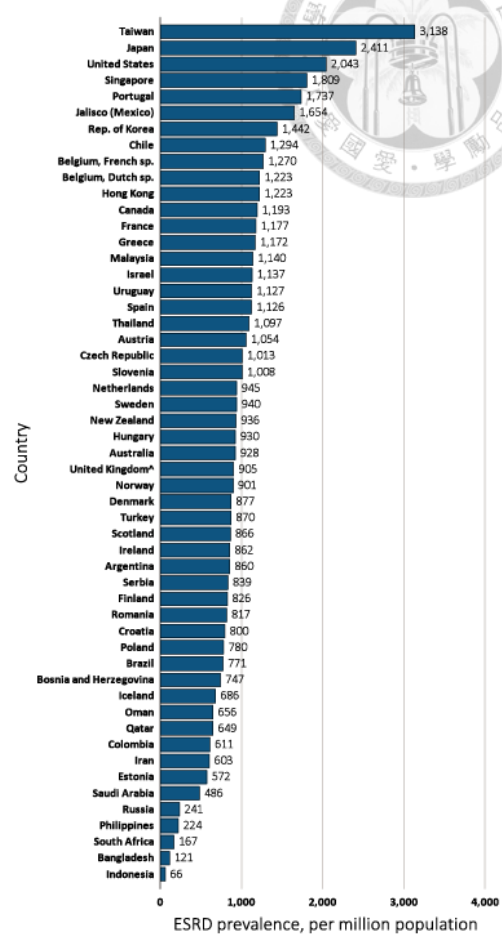
附錄二、急性腎損傷之診斷標準

左半表為急性透析品質創始小組(Acute Dialysis Quality Initiative Group, ADQI)所提出 RIFLE 診斷標準，將疾病依嚴重程度分成 5 個階段：Risk、Injury、Failure、Loss、End stage renal disease；右半表為急性腎損傷照護網(Acute Kidney Injury Network, AKIN)依據 RIFLE criteria 進一步修訂而提出的 AKIN criteria，把診斷急性腎損傷的時間明確定義為在 48 小時以內其血清肌酸酐上升值 ≥ 0.3mg/dL。

資料來源：郭錦輯等人，急性腎損傷與重症透析之最新進展，內科學誌，2009；20：320-334。



Incidence of treated ESRD, 2013

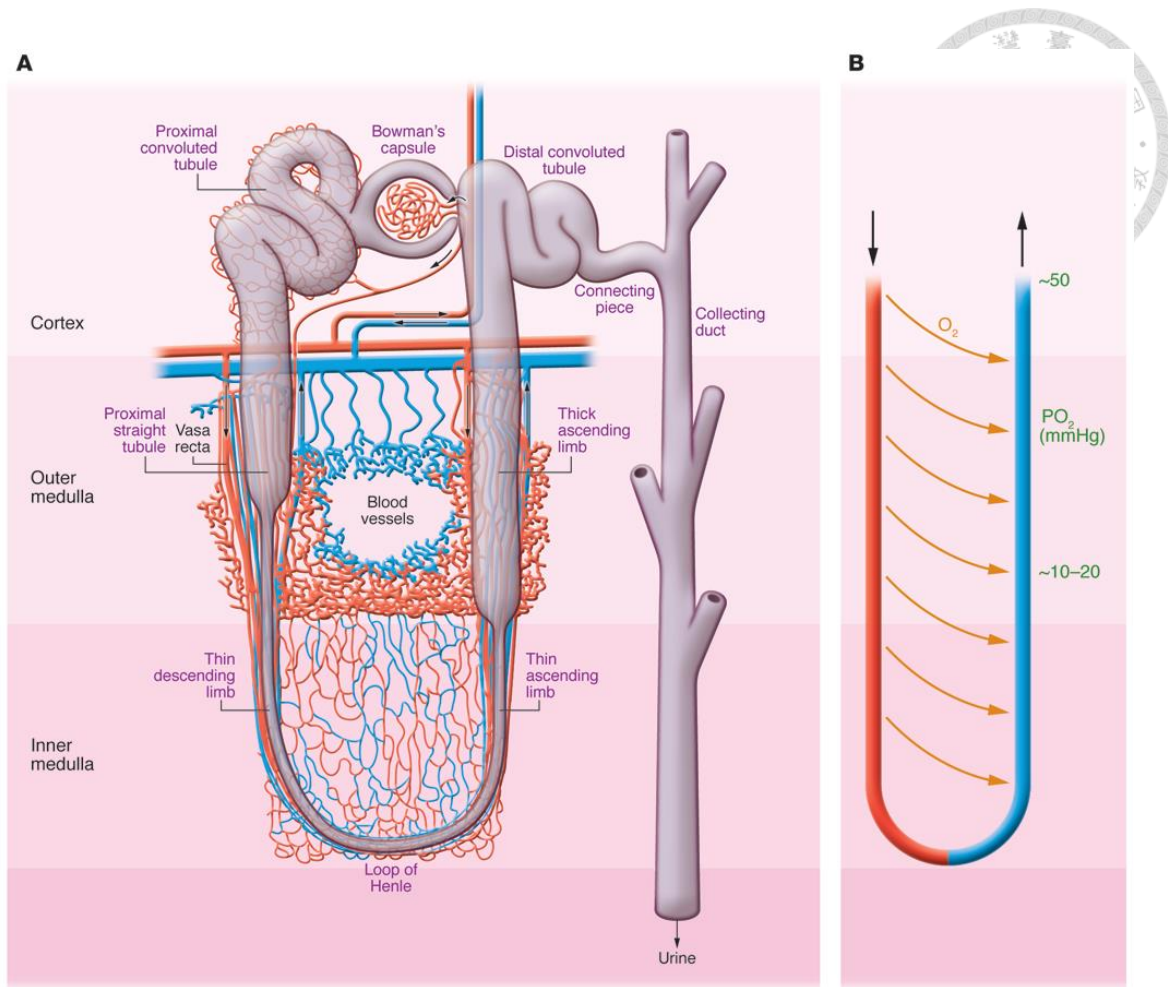


Prevalence of treated ESRD, 2013

附錄三、2013 年全球 ESRD 之發病率與盛行率

左圖為 2013 年全球 ESRD 發病率之國家排名：依序為台灣、墨西哥的哈利斯科州及美國；右圖為 2013 年全球 ESRD 盛行率之國家排名：依序為台灣、日本及美國。台灣 ESRD 之發病率與盛行率都高居全球第一，對於國內醫療資源造成嚴重的負擔。

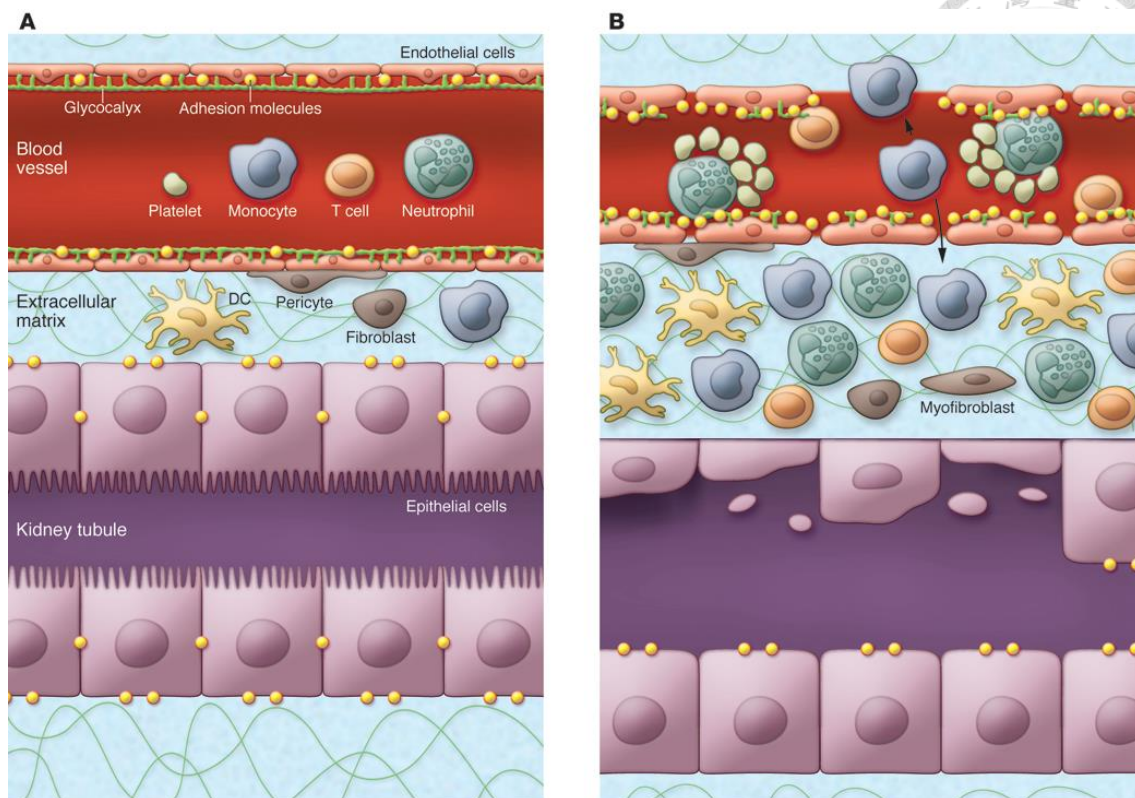
資料來源：Saran, R., et al., *US Renal Data System 2015 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States*. Am J Kidney Dis, 2016. 67(3)(Suppl 1): S1-S434.



附錄四、正常腎元的微血管網及氧氣梯度(oxygen gradient)

左圖為正常腎元之解剖圖，由上到下分為皮質、外側髓質及內側髓質，而直血管(vasa recta)位於外側髓質層。右圖為氧分壓濃度圖，因直血管有逆流交換器，有較大的耗氧量，導致外側髓質層的氧分壓比皮質低。

資料來源：Yang, J.V.B.a.L., *Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury*.
The Journal of Clinical Investigation, 2011. **121**(11): p. 4210-4221.



附錄五、內皮細胞在 IRI 的損傷情形

(A)圖為正常的上皮層及內皮層，兩者由一小區域的間質分隔開來。內皮層有一層糖萼(glycocalyx)外衣。(B)圖為組織受到 IRI 後，引起內皮細胞的腫脹(swelling)並破壞了糖萼外衣與內皮層，之後產生出許多的黏附分子，如 ICAM-1, VCAM-1, selectins 等，導致白血球與內皮細胞交互作用增加而形成了微血栓(microthrombi)；接著部分的白血球穿透過內皮層而遷移到了間質，最後會充斥著許多炎性細胞(inflammatory cells)而造成間質水腫。

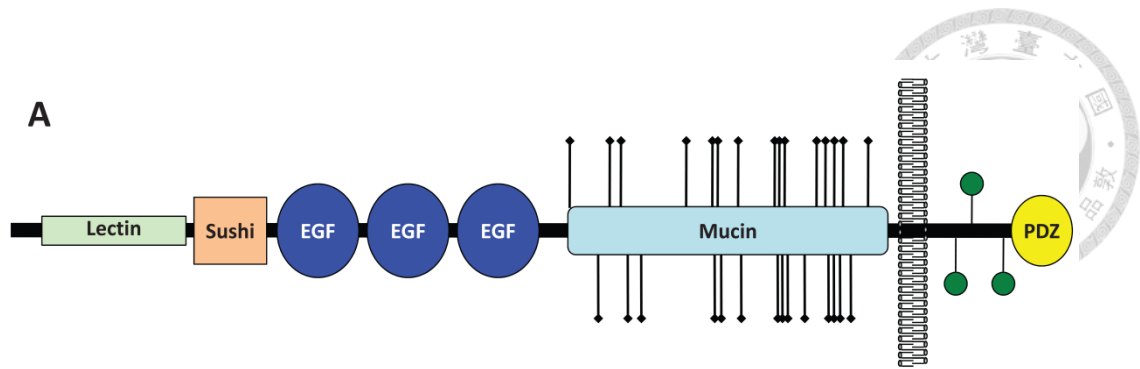
資料來源：Yang, J.V.B.a.L., *Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury*.

The Journal of Clinical Investigation, 2011. **121**(11): p. 4210-4221.



附錄六、IRI 術前術後圖

上圖為老鼠正常腎臟的顏色(紅色、粉紅色)；下圖為老鼠腎蒂被微動脈瘤夾住後的顏色(紫紅色、暗紫色)。



B

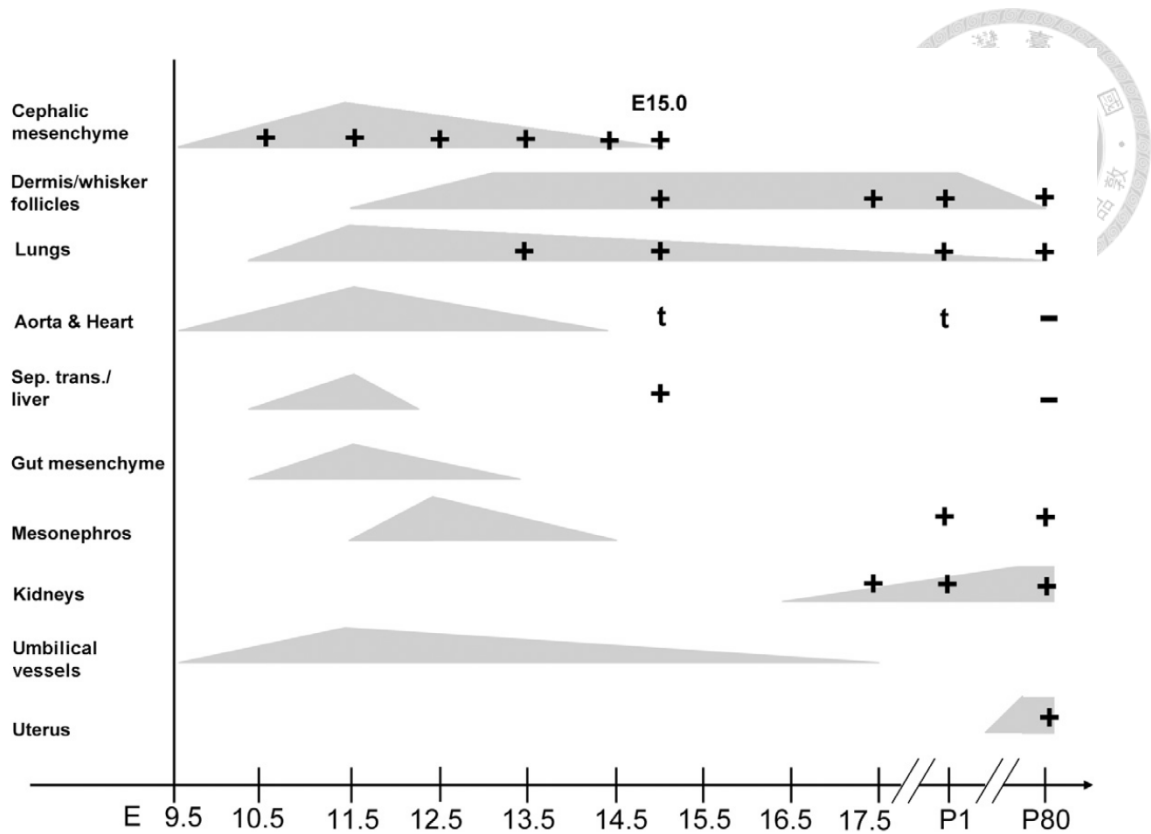
Human: IVYCTRCGPHAPNKRI**T**DCYRWVIHAGSK**S**PTEPMPPRGS�TGVQ**T**CR**T**SV 757
 Bovine: IVYCTRCGPHAPNKRI**T**DCYRWVTHAGSK**S**PTEPMPPRGS�TGVQ**T**CR**T**SV 757
 Canine: IVYCTRCGPHAPNKRV**T**DCYRWVTHAGSK**G**PTEPAPPRGS�TGVQ**T**CR**T**SV 631
 Murine: IVYCTRCGSHAPNKRI**T**DCYRWVTHAGNK**S**STEPMPPRGS�TGVQ**T**CR**T**SV 765
 Rat: IVYCTRCGSHTPNKRI**T**DCYRWVTHAGNK**S**STEPMPPRGS�TGVQ**T**CR**T**SV 764

附錄七、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，而綠色的 TSV 則是 PDZ motif。

資料來源：Valdez, Y., M. Maia, and E.M. Conway, *CD248: reviewing its role in health and disease*. *Curr Drug Targets*, 2012. **13**(3): p. 432-9.

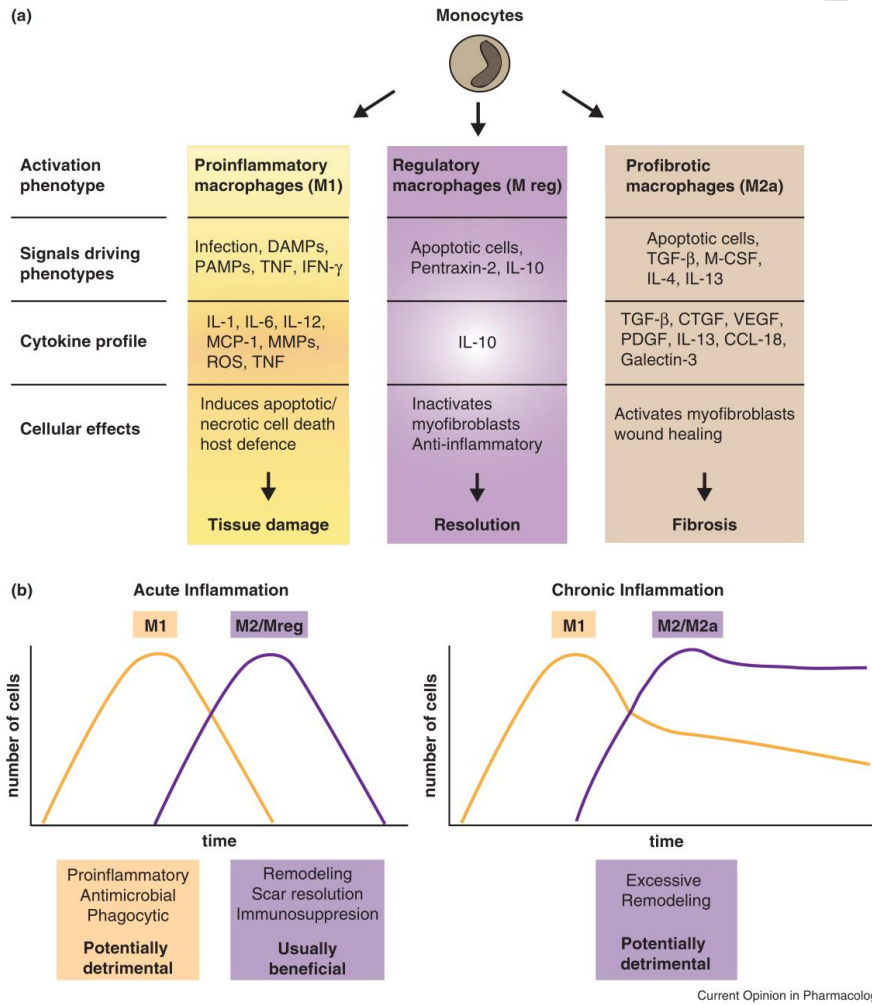


附錄八、Endosialin 表現的時間與位置

圖為利用 *Endosialin-LacZ* KI 小鼠進行 Blu-Gal 染色以偵測 endosialin 表現的時間與位置。X 軸為偵測的時間點，Y 軸則是表現的組織。灰色區域代表 endosialin 表現的變化量，越高代表量愈多。(+)表示存在 endosialin，(-)則是無，(t)代表先前其他研究利用 mRNA or 蛋白質有偵測到表現的時間點，(E)表示胚胎期，(P)表示出生後。

資料來源：Huang, H.P., et al., *Gene targeting and expression analysis of mouse*

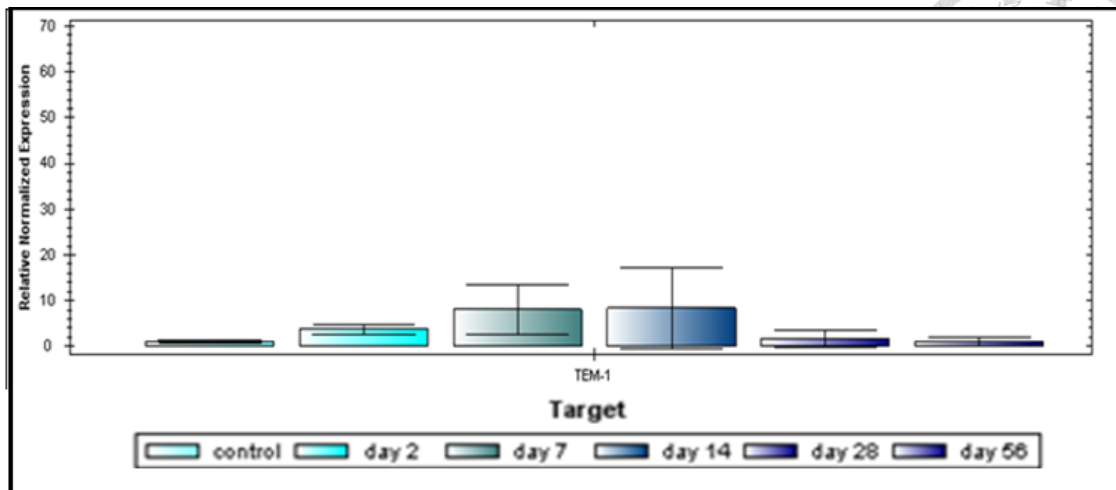
Tem1/endosialin using a lacZ reporter. *Gene Expr Patterns*, 2011. **11**(5-6): p. 316-26.



附錄九、巨噬細胞的亞型與功能

圖(a)敘述單核球受到不同刺激而分化成各種亞型，每個亞型有各自分泌的細胞激素，進而造成組織發炎、抑制發炎或者纖維化的產生。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 型態也會增加，以抑制發炎進而使組織重組。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 型態增加，最終使得組織過度重組而產生纖維化。

資料來源：Lichtnekert, J., et al., *Changes in macrophage phenotype as the immune response evolves*. *Curr Opin Pharmacol*, 2013. **13**(4): p. 555-64.




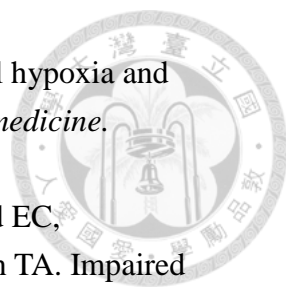
附錄十、22 分鐘 IRI 後，腎臟 Endosialin 在各個時間點的表現情況

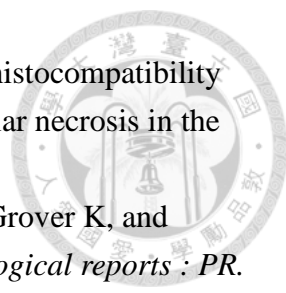
此為老鼠受到 22 分鐘 IRI 後，第 2、7、14、28 及 56 天時 *Endosialin* 的 mRNA 表現量。腎臟在受到傷害後，其 *Endosialin* 的表現量會逐漸上升，於第 14 天達到高峰，然後再降下來。

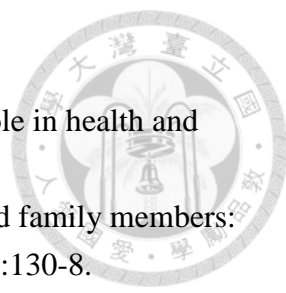
第六章 參考文獻

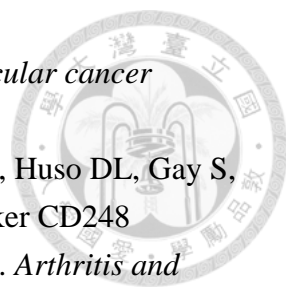
1. Kurts C, Panzer U, Anders HJ, and Rees AJ. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(10):738-53.
2. Pan SY, Chang YT, and Lin SL. Microvascular pericytes in healthy and diseased kidneys. *International journal of nephrology and renovascular disease*. 2014;7(39-48).
3. Carey RM, Wang ZQ, and Siragy HM. Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension*. 2000;35(1 Pt 2):155-63.
4. Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, Casadevall N, Camilleri JP, Bariety J, Tambourin P, and Varet B. Erythropoietin: sites of synthesis and regulation of secretion. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1991;18(4 Suppl 1):14-9.
5. Kumar R, Tebben PJ, and Thompson JR. Vitamin D and the kidney. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2012;523(1):77-86.
6. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P, and Acute Dialysis Quality Initiative w. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Critical care*. 2004;8(4):R204-12.
7. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, Levin A, and Acute Kidney Injury N. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Critical care*. 2007;11(2):R31.
8. Raj Munshi CH, Jonathan Himmelfarb. Advances in understanding ischemic acute kidney injury. *BMC Medicine*. 2011.
9. Saran R, Li Y, Robinson B, Abbott KC, Agodoa LY, Ayanian J, Bragg-Gresham J, Balkrishnan R, Chen JL, Cope E, et al. US Renal Data System 2015 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 2016;67(3 Suppl 1):S1-S434.
10. Sharfuddin AA, and Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nature reviews Nephrology*. 2011;7(4):189-200.
11. Sutton TA. Alteration of microvascular permeability in acute kidney injury. *Microvascular research*. 2009;77(1):4-7.
12. Yang JVBaL. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *The*


- 
- Journal of clinical investigation*. 2011;121(11):4210-21.
13. Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Kitagawa K, Kobayashi K, Hashimoto H, Ishiwata Y, Asano M, Wang H, Matsushima K, et al. CCR2 signaling contributes to ischemia-reperfusion injury in kidney. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2003;14(10):2503-15.
 14. Costa DL, Lima-Junior DS, Nascimento MS, Sacramento LA, Almeida RP, Carregaro V, and Silva JS. CCR2 signaling contributes to the differentiation of protective inflammatory dendritic cells in *Leishmania braziliensis* infection. *Journal of leukocyte biology*. 2016.
 15. Miura M, Fu X, Zhang QW, Remick DG, and Fairchild RL. Neutralization of Gro alpha and macrophage inflammatory protein-2 attenuates renal ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol*. 2001;159(6):2137-45.
 16. Oh DJ, Dursun B, He Z, Lu L, Hoke TS, Ljubanovic D, Faubel S, and Edelstein CL. Fractalkine receptor (CX3CR1) inhibition is protective against ischemic acute renal failure in mice. *American journal of physiology Renal physiology*. 2008;294(1):F264-71.
 17. Stroo I, Stokman G, Teske GJ, Raven A, Butter LM, Florquin S, and Leemans JC. Chemokine expression in renal ischemia/reperfusion injury is most profound during the reparative phase. *International immunology*. 2010;22(6):433-42.
 18. Yang Z, Luo W, Fu R, Tan Y, Yuan L, and Fang B. [CCL2/CCR2 signaling activation contributes to tooth movement pain]. *Zhonghua kou qiang yi xue za zhi = Zhonghua kouqiang yixue zazhi = Chinese journal of stomatology*. 2014;49(8):500-5.
 19. Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Kitagawa K, Kobayashi K, Hashimoto H, Ishiwata Y, Tomosugi N, Mukaida N, Matsushima K, et al. Gene therapy expressing amino-terminal truncated monocyte chemoattractant protein-1 prevents renal ischemia-reperfusion injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2003;14(4):1066-71.
 20. Fiorina P, Ansari MJ, Jurewicz M, Barry M, Ricchiuti V, Smith RN, Shea S, Means TK, Auchincloss H, Jr., Luster AD, et al. Role of CXC chemokine receptor 3 pathway in renal ischemic injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2006;17(3):716-23.
 21. Sutton TA, Mang HE, Campos SB, Sandoval RM, Yoder MC, and Molitoris BA. Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia. *American journal of physiology Renal physiology*. 2003;285(2):F191-8.
 22. Bonventre JV. Mechanisms of Acute Kidney Injury and Repair. 2010.


- 
23. Legrand M, Mik EG, Johannes T, Payen D, and Ince C. Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney. *Molecular medicine*. 2008;14(7-8):502-16.
24. Basile DP, Friedrich JL, Spahic J, Knipe N, Mang H, Leonard EC, Changizi-Ashtiyani S, Bacallao RL, Molitoris BA, and Sutton TA. Impaired endothelial proliferation and mesenchymal transition contribute to vascular rarefaction following acute kidney injury. *American journal of physiology Renal physiology*. 2011;300(3):F721-33.
25. Basile DP, Fredrich K, Chelladurai B, Leonard EC, and Parrish AR. Renal ischemia reperfusion inhibits VEGF expression and induces ADAMTS-1, a novel VEGF inhibitor. *American journal of physiology Renal physiology*. 2008;294(4):F928-36.
26. Karasawa K, Asano K, Moriyama S, Ushiki M, Monya M, Iida M, Kuboki E, Yagita H, Uchida K, Nitta K, et al. Vascular-Resident CD169-Positive Monocytes and Macrophages Control Neutrophil Accumulation in the Kidney with Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2015;26(4):896-906.
27. Kusaba T, Lalli M, Kramann R, Kobayashi A, and Humphreys BD. Differentiated kidney epithelial cells repair injured proximal tubule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(4):1527-32.
28. Berger K, Bangen JM, Hammerich L, Liedtke C, Floege J, Smeets B, and Moeller MJ. Origin of regenerating tubular cells after acute kidney injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(4):1533-8.
29. Basile DP. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney international*. 2007;72(2):151-6.
30. Duffield JS. Macrophages and immunologic inflammation of the kidney. *Seminars in nephrology*. 2010;30(3):234-54.
31. Ko GJ, Boo CS, Jo SK, Cho WY, and Kim HK. Macrophages contribute to the development of renal fibrosis following ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2008;23(3):842-52.
32. Basile DP, Donohoe D, Roethe K, and Osborn JL. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *American journal of physiology Renal physiology*. 2001;281(5):F887-99.

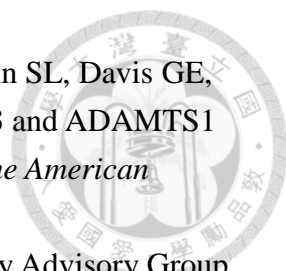
- 
33. Shoskes DA, Parfrey NA, and Halloran PF. Increased major histocompatibility complex antigen expression in unilateral ischemic acute tubular necrosis in the mouse. *Transplantation*. 1990;49(1):201-7.
34. Singh AP, Junemann A, Muthuraman A, Jaggi AS, Singh N, Grover K, and Dhawan R. Animal models of acute renal failure. *Pharmacological reports : PR*. 2012;64(1):31-44.
35. Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Martin-Cleary C, Ortiz A, and Ramos AM. Progress in the development of animal models of acute kidney injury and its impact on drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*. 2013;8(7):879-95.
36. Wei Q, and Dong Z. Mouse model of ischemic acute kidney injury: technical notes and tricks. *American journal of physiology Renal physiology*. 2012;303(11):F1487-94.
37. Hesketh EE, Czopek A, Clay M, Borthwick G, Ferenbach D, Kluth D, and Hughes J. Renal ischaemia reperfusion injury: a mouse model of injury and regeneration. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2014(88).
38. Delbridge MS, Shrestha BM, Raftery AT, El Nahas AM, and Haylor JL. The effect of body temperature in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation proceedings*. 2007;39(10):2983-5.
39. Molitoris BA, Dagher PC, Sandoval RM, Campos SB, Ashush H, Fridman E, Brafman A, Faerman A, Atkinson SJ, Thompson JD, et al. siRNA targeted to p53 attenuates ischemic and cisplatin-induced acute kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2009;20(8):1754-64.
40. Swaminathan M. ACT-AKI: A Phase 2 Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of AC607 for the Treatment of Acute Kidney Injury in Cardiac Surgery Subjects. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2014;25(B3).
41. Rettig WJ, Garin-Chesa P, Healey JH, Su SL, Jaffe EA, and Old LJ. Identification of endosialin, a cell surface glycoprotein of vascular endothelial cells in human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(22):10832-6.
42. Christian S, Ahorn H, Koehler A, Eisenhaber F, Rodi HP, Garin-Chesa P, Park JE, Rettig WJ, and Lenter MC. Molecular cloning and characterization of endosialin, a C-type lectin-like cell surface receptor of tumor endothelium. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(10):7408-14.
43. Opavsky R, Haviernik P, Jurkovicova D, Garin MT, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Bies J, Garfield S, Pastorekova S, et al. Molecular characterization of the mouse Tem1/endosialin gene regulated by cell density in vitro and expressed in normal tissues in vivo. *The Journal of biological chemistry*.

- 
- 2001;276(42):38795-807.
44. Valdez Y, Maia M, and Conway EM. CD248: reviewing its role in health and disease. *Current drug targets*. 2012;13(3):432-9.
 45. Greenlee MC, Sullivan SA, and Bohlsos SS. CD93 and related family members: their role in innate immunity. *Current drug targets*. 2008;9(2):130-8.
 46. Conway EM, Van de Wouwer M, Pollefeyt S, Jurk K, Van Aken H, De Vriese A, Weitz JI, Weiler H, Hellings PW, Schaeffer P, et al. 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. *The Journal of experimental medicine*. 2002;196(5):565-77.
 47. Van de Wouwer M, Collen D, and Conway EM. Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24(8):1374-83.
 48. St Croix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans KE, Montgomery E, Lal A, Riggins GJ, Lengauer C, Vogelstein B, et al. Genes expressed in human tumor endothelium. *Science*. 2000;289(5482):1197-202.
 49. Carson-Walter EB, Watkins DN, Nanda A, Vogelstein B, Kinzler KW, and St Croix B. Cell surface tumor endothelial markers are conserved in mice and humans. *Cancer research*. 2001;61(18):6649-55.
 50. Brady J, Neal J, Sadakar N, and Gasque P. Human endosialin (tumor endothelial marker 1) is abundantly expressed in highly malignant and invasive brain tumors. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2004;63(12):1274-83.
 51. MacFadyen JR, Haworth O, Roberston D, Hardie D, Webster MT, Morris HR, Panico M, Sutton-Smith M, Dell A, van der Geer P, et al. Endosialin (TEM1, CD248) is a marker of stromal fibroblasts and is not selectively expressed on tumour endothelium. *FEBS letters*. 2005;579(12):2569-75.
 52. Christian S, Winkler R, Helfrich I, Boos AM, Besemfelder E, Schadendorf D, and Augustin HG. Endosialin (Tem1) is a marker of tumor-associated myofibroblasts and tumor vessel-associated mural cells. *Am J Pathol*. 2008;172(2):486-94.
 53. Hardie DL, Baldwin MJ, Naylor A, Haworth OJ, Hou TZ, Lax S, Curnow SJ, Willcox N, MacFadyen J, Isacke CM, et al. The stromal cell antigen CD248 (endosialin) is expressed on naive CD8+ human T cells and regulates proliferation. *Immunology*. 2011;133(3):288-95.
 54. Bagley RG, Rouleau C, St Martin T, Boutin P, Weber W, Ruzek M, Honma N, Nacht M, Shankara S, Kataoka S, et al. Human endothelial precursor cells

- 
- express tumor endothelial marker 1/endosialin/CD248. *Molecular cancer therapeutics*. 2008;7(8):2536-46.
55. Naylor AJ, Azzam E, Smith S, Croft A, Poyser C, Duffield JS, Huso DL, Gay S, Ospelt C, Cooper MS, et al. The mesenchymal stem cell marker CD248 (endosialin) is a negative regulator of bone formation in mice. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(10):3334-43.
 56. Huang HP, Hong CL, Kao CY, Lin SW, Lin SR, Wu HL, Shi GY, You LR, Wu CL, and Yu IS. Gene targeting and expression analysis of mouse Tem1/endosialin using a lacZ reporter. *Gene expression patterns : GEP*. 2011;11(5-6):316-26.
 57. Maia M, de Vriese A, Janssens T, Moons M, van Landuyt K, Tavernier J, Lories RJ, and Conway EM. CD248 and its cytoplasmic domain: a therapeutic target for arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(12):3595-606.
 58. Smith SW, Eardley KS, Croft AP, Nwosu J, Howie AJ, Cockwell P, Isacke CM, Buckley CD, and Savage CO. CD248+ stromal cells are associated with progressive chronic kidney disease. *Kidney international*. 2011;80(2):199-207.
 59. Nanda A, Karim B, Peng Z, Liu G, Qiu W, Gan C, Vogelstein B, St Croix B, Kinzler KW, and Huso DL. Tumor endothelial marker 1 (Tem1) functions in the growth and progression of abdominal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(9):3351-6.
 60. Maia M, DeVriese A, Janssens T, Moons M, Lories RJ, Tavernier J, and Conway EM. CD248 facilitates tumor growth via its cytoplasmic domain. *BMC cancer*. 2011;11(162).
 61. Naylor AJ, McGettrick HM, Maynard WD, May P, Barone F, Croft AP, Egginton S, and Buckley CD. A differential role for CD248 (Endosialin) in PDGF-mediated skeletal muscle angiogenesis. *PLoS one*. 2014;9(9):e107146.
 62. Mogler C, Wieland M, Konig C, Hu J, Runge A, Korn C, Besemfelder E, Breitkopf-Heinlein K, Komljenovic D, Dooley S, et al. Hepatic stellate cell-expressed endosialin balances fibrogenesis and hepatocyte proliferation during liver damage. *EMBO molecular medicine*. 2015;7(3):332-8.
 63. Tomkowicz B, Rybinski K, Sebeck D, Sass P, Nicolaidis NC, Grasso L, and Zhou Y. Endosialin/TEM-1/CD248 regulates pericyte proliferation through PDGF receptor signaling. *Cancer biology & therapy*. 2010;9(11):908-15.
 64. Tomkowicz B, Rybinski K, Foley B, Ebel W, Kline B, Routhier E, Sass P, Nicolaidis NC, Grasso L, and Zhou Y. Interaction of endosialin/TEM1 with extracellular matrix proteins mediates cell adhesion and migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(46):17965-70.

- 
65. Becker R, Lenter MC, Vollkommer T, Boos AM, Pfaff D, Augustin HG, and Christian S. Tumor stroma marker endosialin (Tem1) is a binding partner of metastasis-related protein Mac-2 BP/90K. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2008;22(8):3059-67.
66. Lin SL, Li B, Rao S, Yeo EJ, Hudson TE, Nowlin BT, Pei H, Chen L, Zheng JJ, Carroll TJ, et al. Macrophage Wnt7b is critical for kidney repair and regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(9):4194-9.
67. Ricardo SD, van Goor H, and Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(11):3522-30.
68. Lichtnekert J, Kawakami T, Parks WC, and Duffield JS. Changes in macrophage phenotype as the immune response evolves. *Current opinion in pharmacology*. 2013;13(4):555-64.
69. Lin SL, Castano AP, Nowlin BT, Lupher ML, Jr., and Duffield JS. Bone marrow Ly6Chigh monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations. *Journal of immunology*. 2009;183(10):6733-43.
70. Lee S, Huen S, Nishio H, Nishio S, Lee HK, Choi BS, Ruhrberg C, and Cantley LG. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011;22(2):317-26.
71. Lin SLD, J.S. Macrophages in Kidney Injury and Repair. *Acta Nephrologica*. 2012;26(2):45-57.
72. Castano AP, Lin SL, Surowy T, Nowlin BT, Turlapati SA, Patel T, Singh A, Li S, Lupher ML, Jr., and Duffield JS. Serum amyloid P inhibits fibrosis through Fc gamma R-dependent monocyte-macrophage regulation in vivo. *Science translational medicine*. 2009;1(5):5ra13.
73. Van Dyken SJ, and Locksley RM. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annual review of immunology*. 2013;31(317-43).
74. Wang Y, and Harris DC. Macrophages in renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2011;22(1):21-7.
75. Rogers NM, Ferenbach DA, Isenberg JS, Thomson AW, and Hughes J. Dendritic cells and macrophages in the kidney: a spectrum of good and evil. *Nature reviews Nephrology*. 2014;10(11):625-43.
76. Kitamoto K, Machida Y, Uchida J, Izumi Y, Shiota M, Nakao T, Iwao H, Yukimura T, Nakatani T, and Miura K. Effects of liposome clodronate on renal leukocyte populations and renal fibrosis in murine obstructive nephropathy.

- 
- Journal of pharmacological sciences*. 2009;111(3):285-92.
77. Day YJ, Huang L, Ye H, Linden J, and Okusa MD. Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: role of macrophages. *American journal of physiology Renal physiology*. 2005;288(4):F722-31.
 78. Jo SK, Sung SA, Cho WY, Go KJ, and Kim HK. Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2006;21(5):1231-9.
 79. Sung SA, Jo SK, Cho WY, Won NH, and Kim HK. Reduction of renal fibrosis as a result of liposome encapsulated clodronate induced macrophage depletion after unilateral ureteral obstruction in rats. *Nephron Experimental nephrology*. 2007;105(1):e1-9.
 80. Ferenbach DA, Sheldrake TA, Dhaliwal K, Kipari TM, Marson LP, Kluth DC, and Hughes J. Macrophage/monocyte depletion by clodronate, but not diphtheria toxin, improves renal ischemia/reperfusion injury in mice. *Kidney international*. 2012;82(8):928-33.
 81. 白振學，博士論文：內皮唾酸蛋白質在慢性腎病之角色。2015。
 82. Rybinski K, Imtiyaz HZ, Mittica B, Drozdowski B, Fulmer J, Furuuchi K, Fernando S, Henry M, Chao QM, Kline B, et al. Targeting endosialin/CD248 through antibody-mediated internalization results in impaired pericyte maturation and dysfunctional tumor microvasculature. *Oncotarget*. 2015;6(28):25429-40.
 83. Smith SW, Croft AP, Morris HL, Naylor AJ, Huso DL, Isacke CM, Savage CO, and Buckley CD. Genetic Deletion of the Stromal Cell Marker CD248 (Endosialin) Protects against the Development of Renal Fibrosis. *Nephron*. 2015;131(4):265-77.
 84. Krohn AG, Ogden DA, and Holmes JH. Renal function in 29 healthy adults before and after nephrectomy. *Jama*. 1966;196(4):322-4.
 85. Saxena AB, Myers BD, Derby G, Blouch KL, Yan J, Ho B, and Tan JC. Adaptive hyperfiltration in the aging kidney after contralateral nephrectomy. *American journal of physiology Renal physiology*. 2006;291(3):F629-34.
 86. Vinuesa E, Hotter G, Jung M, Herrero-Fresneda I, Torras J, and Sola A. Macrophage involvement in the kidney repair phase after ischaemia/reperfusion injury. *The Journal of pathology*. 2008;214(1):104-13.
 87. Lu L, Faubel S, He Z, Andres Hernando A, Jani A, Kedl R, and Edelstein CL. Depletion of macrophages and dendritic cells in ischemic acute kidney injury. *American journal of nephrology*. 2012;35(2):181-90.

- 
88. Schrimpf C, Xin CY, Campanholle G, Gill SE, Stallcup W, Lin SL, Davis GE, Gharib SA, Humphreys BD, and Duffield JS. Pericyte TIMP3 and ADAMTS1 Modulate Vascular Stability after Kidney Injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2012;23(5):868-83.
89. Okusa MD, Chertow GM, Portilla D, and Acute Kidney Injury Advisory Group of the American Society of N. The nexus of acute kidney injury, chronic kidney disease, and World Kidney Day 2009. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2009;4(3):520-2.
90. Chawla LS, and Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome. *Kidney international*. 2012;82(5):516-24.
91. Cerda J, Lameire N, Eggers P, Pannu N, Uchino S, Wang H, Bagga A, and Levin A. Epidemiology of acute kidney injury. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2008;3(3):881-6.
92. Diaz LA, Jr., Coughlin CM, Weil SC, Fishel J, Gounder MM, Lawrence S, Azad N, O'Shannessy DJ, Grasso L, Wustner J, et al. A first-in-human phase I study of MORAb-004, a monoclonal antibody to endosialin in patients with advanced solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21(6):1281-8.
93. Faubel S, Chawla LS, Chertow GM, Goldstein SL, Jaber BL, Liu KD, and Acute Kidney Injury Advisory Group of the American Society of N. Ongoing clinical trials in AKI. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2012;7(5):861-73.