

# 東海大學生命科學系碩士論文

血清 endocan 可做為腎臟移植後慢性腎臟病分期之指標

**Serum endocan may be used as a new biomarker for chronic  
kidney disease staging after renal transplantation**

研究生：蘇祐萱

**Yu-Hsuan Su**

指導教授：范聖興 博士

**Dr. Seng-Sheen Fan**

陳呈旭 博士

**Dr. Cheng-Hsu Chen**

中華民國一百零二年七月二十五日

## 目錄

中文摘要	1
英文摘要	3
緒論	4
材料與方法	10
結果	23
討論	30
參考文獻	36
表目及圖目	42
附表	43
附圖	47
個人資料	58

## 摘要

腎臟移植後，受贈者的腎功能逐步下降仍是不可避免的現象。造成移植腎功能下降的原因可能是慢性的發炎反應和動脈粥樣硬化。內皮細胞特異性分子-1 (endothelial cell-specific molecule-1) 是一種蛋白醣 (proteoglycan)，也稱為 endocan，表達於腎臟的內皮細胞中，在炎症反應時會顯著增加，因此，它可以作為內皮細胞活化的標誌物。本實驗的目的是探討腎臟移植受贈者的慢性腎病可否以血清中 endocan 的含量作為早期預測指標。我們的實驗分為體外實驗和體內實驗兩部份進行。體外實驗部份：我們建立了內皮細胞初代 (primary) 細胞培養的系統，將人類臍靜脈內皮細胞 (human umbilical vein endothelium cell, HUVEC) 培養於不同濃度的  $\alpha$  腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 中模擬發炎模式，我們證實 TNF- $\alpha$  誘導的發炎內皮細胞會隨時間而增加 endocan 的分泌。體內實驗部份：為了在病患體中證實此現象，我們招募了 97 位腎臟移植的受贈者，他們的平均年齡為  $43.6 \pm 13.2$  歲，平均追蹤時間為  $7.0 \pm 5.7$  年。發現腎臟移植病患血清中的 endocan 與 TNF- $\alpha$  濃度呈顯著的正相關 ( $r = 0.286$ ,  $p = 0.002$ )，且越後期之慢性腎臟病患有較高的血清 endocan 含量 ( $p = 0.077$ )。經由「接收者操作特徵曲線」(receiver operating characteristic curve, 簡稱 ROC 曲線) 的統計運算，設定以 endocan  $> 643.19$  pg/ml

及 endocan  $\leq 643.19$  pg/ml 來區分移植腎功能惡化的可能性 (AUC : 0.732; 95%, 置信區間為 0.632 - 0.818)。我們發現, 在 endocan  $> 643.19$  pg/ml 的患者中有較高的血清肌酸酐 (creatinine) 值 ( $1.6 \pm 1.1$  mg/dL vs  $1.2 \pm 0.4$  mg/dL,  $p = 0.029$ ) 和較差的腎絲球過濾率。我們的結果證實, 移植腎的功能惡化常伴隨著 TNF- $\alpha$  及 endocan 的增加; 因此, endocan 可能作為移植病患內皮損傷及腎功能惡化的一個新的標誌。未來將藉此發現, 進一步探索其應用性, 以利未來移植醫學或慢性腎臟病之臨床應用。

## Abstract

The gradual decline in renal graft function is inevitable in renal transplant recipients. The causes are thought to be chronic inflammation and atherosclerosis. Endocan, also called endothelial cell-specific molecule-1 (ESM-1), is mainly expressed in the endothelial cells in human lung and kidney tissues, is increased in acute and severe inflammation. Thus, it can be considered as a marker for the activation of endothelial cells. We established a primary endothelial cell culture system from human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) for the study of the effect with different concentrations of TNF- $\alpha$  on endothelial cells. Endocan was induced in TNF- $\alpha$ -induced inflamed HUVECs. To verify this finding in patients, we recruited 97 renal transplantation recipients and followed for  $7.0 \pm 5.7$  years. The mean age of patients was  $43.6 \pm 13.2$  years and 55.7% (54/97) were male patients. We found that the serum endocan level was correlated with the concentration of TNF- $\alpha$  ( $r = 0.286$ ,  $p = 0.002$ ). We also found that the staging of the chronic kidney disease in these patients is positively correlated with the serum endocan level ( $p = 0.077$ ). After analysis by a receiver operating characteristic (ROC) curve, a concentration of endocan  $> 643.19$  pg/ml was used to differentiate disease progression (AUC: 0.732, 95% confidence interval 0.632 - 0.818). The patients with endocan  $> 643.19$  pg/ml had a higher follow-up creatinine level ( $1.6 \pm 1.1$  mg/dL) but lower glomerular filtration rate than those with endocan  $\leq 643.19$  pg/ml ( $1.2 \pm 0.4$  mg/dL,  $p = 0.029$ ). Our findings suggested that the function of the grafted kidney deteriorated along with the increase of TNF- $\alpha$  and endocan in patient serum. Thus, endocan, an indicator of endothelial injury, may be used as a new biomarker for the deterioration of kidney function in renal transplantation or chronic kidney disease patients.

## 緒論

慢性腎臟病（Chronic Kidney Disease, CKD）患病率在全球呈持續增加的趨勢，無論是在已開發國家或發展中國家，都是危害民眾健康的主要問題之一。慢性腎臟病進展結果最終導致末期腎臟病（End-Stage Renal Disease, ESRD）及相關併發症的發生，根據美國腎臟病資料登錄系統 2012 年報（United States Renal Data System, USRDS），統計至 2010 年止，台灣的末期腎臟病盛行率，是全球第一，顯示慢性腎臟病在台灣的嚴重性(圖一)，而其造成的各項醫療費用負擔如門診透析治療與因其併發症造成住院醫療，是健保財務和患者家庭龐大的經濟負擔和生活壓力。進入末期腎病變後，腎臟失去功能，必需進行腎臟替代療法治療，目前的方式有腹膜透析、血液透析、腎臟移植。其中，腎臟移植是較符合生理的治療方式。

美國在 1954 年完成全世界第一例雙胞胎之間的腎臟移植，迄今已過了半個多世紀（Murray, 2005）。隨著外科手術技術日漸成熟，以及免疫抑制劑的進步與使用經驗的累積，已大大提升腎移植的存活率。而腹膜透析及血液透析對患者來說，都有其不方便性，成功的腎移植，可以改善患者的生活品質及較佳的存活率。毫無疑問，腎移植手術已成為治療末期腎臟病患者的最佳選擇。然而，長期的臨床追蹤顯示，即使免疫抑制劑的進步和移植手術的成熟，改善移植病患早期

的存活率，但移植腎功能仍會隨時間逐漸惡化是不可避免的現象。研究統計發現，無論是標準腦死判定條件下或是心臟死亡後捐贈的腎臟，5年後移植腎的存活率即顯著下降至約70%（圖二），造成移植腎失敗的原因有很多，例如免疫抑制劑所造成的腎毒性、長期免疫抑制狀態導致的反覆感染、患者原發疾病如：高血壓或糖尿病造成的慢性病變、原發之腎小球腎炎或再復發、血管病變等。若能早期診斷造成慢性移植腎病變原因，並選擇合適的治療方式，或許可使移植腎能得到長期存活的關鍵。鑑別慢性移植腎病變，復發性疾病或者新生的疾病，一般是要靠移植腎臟穿刺切片檢查。腎臟穿刺組織切片，雖然是目前最能明確診斷腎臟病變的方法，但是屬於侵入性檢查，檢查後可能會產生出血、血尿或腎功能損傷等併發症，且臨床上有時因診斷之需要而必需重複移植腎切片檢查的情況，在台灣大多數患者常無法接受。因此尋求高敏感度及高特異性的非侵入性檢查方法和客觀指標測量，以評估腎移植後的情況，應有臨床實用上的意義。

血管內皮細胞（endothelial cell, EC）位於血管內側之薄層細胞，與血液直接接觸，形成血液與周圍組織之間的重要屏障。在腎臟移植後，是捐贈的移植腎與受贈者血液細胞最早接觸的地方，因此是受贈者免疫系統最先能辨識捐贈者抗原的位置，在腎臟移植後的免疫排斥反應中扮演重要角色。

Endocan，最初是由 Lassalle 等人於 1996 年從人類內皮細胞 cDNA library 中克隆出來 (Lassalle et al., 1996)，又稱為內皮細胞特异性分子-1 (endothelial cell specific molecule-1, ESM-1)，是一個大小為 50 kDa 的蛋白多糖 (Proteoglycans, PG)，包含一條含有 165 個氨基酸的成熟多肽以及一條與 137 位點的絲氨酸殘基共價結合的硫酸皮膚素 (Dermatan sulphate, DS) 單鏈，該硫酸皮膚素單鏈主要在血管內皮組織表達，也存在於血液循環中。文獻指出，endocan 分子高度限制在內皮細胞，是微血管、動脈、靜脈等血管組織的共同特徵，在許多正常組織的血管內皮細胞可發現其表達 (Li et al., 2012; Sarrazin et al., 2006)。蛋白多糖是一個主要存在於細胞表面的複雜的大分子結構，從結構上看，蛋白多糖包含一個大小和結構可改變的核心蛋白以及一個或多個伴隨的氨基葡聚糖鏈 (Glycosaminoglycan, GAG)，這些氨基葡聚糖鏈有 5 種類型：硫酸軟骨素 (Chondroitin sulphate, CS)、硫酸皮膚素 (Dermatan sulphate, DS)、硫酸乙醯肝素 (Heparan sulphate, HS)、透明質酸 (Hyaluronic acid, HA) 和硫酸角質素 (Keratan sulphate, KS) (Sarrazin et al., 2006)。從基因組成來看，endocan 分子是一個單基因產物，位於人類第 5 號染色體的 5q11.2 位點，由 2 個內含子 (Intron) 分割為三個外顯子 (Exon) (Lassalle et al., 1996)，exon 1 有 362 個鹼基對，exon 2 有 150 個鹼基對，exon 3 有 1560 個



鹼基對，endocan 的全部氨基酸序列是從殘基端-19 到 165，包括 N 末端富含半胱氨酸區域、絲氨酸 137、富含苯丙氨酸(Phenylalanine, F) 的區域【圖三】。

Endocan 是以一種可溶性的硫酸皮膚素蛋白多糖之形式分泌至血液中，其屬於蛋白多糖卻與其他的蛋白多糖不同，它既不與細胞膜相聯繫，也不與細胞外基質相聯繫，而是以可溶的形式分泌釋放進入血液循環 (Tsai et al., 2002)。發炎性的細胞激素如 TNF- $\alpha$  和 IL-1 對內皮細胞的刺激會促使 endocan 產生，有很強的正調節作用。而其他細胞因子如 IFN- $\gamma$  和 IL-4 刺激，則無顯著變化。然而，IFN- $\gamma$  可以抑制內皮細胞經 TNF- $\alpha$  刺激後的 endocan mRNA 表達，此外，血管生長因子 VEGF、FGF-2 均能增加內皮細胞中 endocan 的表達，顯示 endocan 可以作為內皮細胞是否活化的指標 (Sarrazin et al., 2006; Lassalle et al., 1996)。

過去研究發現，endocan 在發炎及腫瘤發展過程中可能扮演重要的角色。例如，白血球細胞的粘附、癌細胞的擴散等，與侵入血管內皮細胞的過程有關。直接將循環的 endocan 與 integrin 結合可以降低白血球細胞的相互作用。在體外實驗中其核心蛋白還能與人類血液白血球細胞(包括單核細胞和淋巴細胞)相結合，在劑量依賴性抑制的體外實驗中，endocan 能夠隨劑量的變化而產生不同程度的抑制

ICAM-1 與淋巴細胞的特異性結合，從而證實 endocan 的核心蛋白可以與 integrin CD11a / CD18(又稱淋巴細胞功能相關抗原，lymphocyte function associated antigen-1, LFA-1)結合，經由 LFA-1 途徑來抑制淋巴細胞的粘附和/或啟動作用 (Bechard et al., 2001)。另外，在大鼠炎症動物模型實驗中，血液循環中 endocan 濃度的增加也可以抑制淋巴細胞與內皮組織的粘附 (Tissier et al., 2004)。Endocan 參與了許多反應調控，但有關 endocan 在移植腎內皮組織中的功能及作用目前還沒有很詳盡的研究和認識。

因此，Li 等人研究探討了在腎臟移植後，發生急性排斥反應時 endocan 的表達，通過對周邊血液中循環內皮細胞之 endocan mRNA 及移植腎組織中 endocan 蛋白表現的分析，發現在腎移植後急性排斥反應過程中 endocan 表達明顯升高，經有效抗排斥治療後 endocan 表達下降，表示其具有高度的靈敏性和特異性。而在移植腎功能正常的病人和其他原因所致移植腎功能不全病人中，endocan 則有輕度升高，但差異不明顯，Li 等人認為 endocan 的這種輕度升高可能與腎移植手術有關。由於手術所致的開放性創傷和微血管受損不可避免的引起內皮細胞損傷，導致內皮細胞剝落到血液循環中，從而使 endocan 分析結果出現短暫升高，但隨著術後恢復和傷口的癒合，很快便回到正常，這現象顯示 endocan 濃度變化分析具有臨床實用上的靈敏性和

特異性。此外，合併使用流式細胞儀分析尿液細胞中 HLA-DR、CD54 等指標相比，周邊血液中 endocan mRNA 的測量分析在臨床上實際操作性佳，因其取材方便、操作簡單、準確性高、重複性好的優點，且具有高度敏感性及特異性。而周邊血液採集容易，樣本品質高，能及時反映移植腎內皮細胞的變化。先前的研究發現，endocan 主要表達在內皮細胞及肺臟、腎臟組織 (Bechard et al., 2001)，而 Li 等人的研究結果，從基因及蛋白兩個層面證實了 endocan 能夠敏感的反映移植腎內皮細胞的受損程度，顯示 endocan 由於具有內皮細胞高度特異性的特徵，有可能作為一種新的急性免疫排斥反應標誌物而應用於臨床，具有較高的應用價值 (Li et al., 2012)。

本實驗的目的是探討腎臟移植受贈者的腎功能情況可否以血清中 endocan 的含量作為指標，來評估腎移植病患內皮細胞發炎損傷程度以及腎功能，以期作為未來移植醫學或慢性腎臟病的一種高敏感性高特異性的非侵入性方式分析指標，為臨床所應用。

## 材料與方法

### 臍帶

臍帶取得自台中市林聖凱婦產科和美村婦產科診所。在產婦妊娠期約 36 週時，向產婦本人說明此實驗目的與方式，充分了解後，經過其同意捐贈。生產後，由產科醫師剪下並保留供實驗使用。台中榮民總醫院人體試驗委員會試驗編號：CE12061。

### 一、體外實驗

#### 人類臍帶靜脈內皮細胞(HUVEC)之製備

##### (A) 預先準備

紗布、三向轉接頭 1 個、50ml 針筒 1 個、10ml 針筒 2 個、臍帶夾 2 個、塑膠繫繩 2 條、鑷子、解剖剪刀、燒杯 2 個，高溫高壓滅菌。為使人類臍帶靜脈內皮細胞能在體外培養生長，需製備明膠覆蓋之細胞培養皿（預先準備放置隔夜或至少 3-4 小時，置於 37°C 含 5% 二氧化碳之細胞培養箱保存）：以無菌水配製 2% 明膠（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA），配製完成後需經過高溫高壓滅菌（冷卻後可放在 4°C 冰箱保存，要使用前，37°C 水浴槽加熱即可），準備 10 cm 細胞培養皿，用無菌血清刻度吸管（serological pipette）吸取 10ml 明膠加入，輕輕搖晃使得明膠液體能覆蓋整個培養皿（盡量避免有泡泡產生），接著吸取出所有液體繼續以同樣方式覆蓋下一盤（最後剩下的

可回收再使用)。使用磷酸緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS) 配置 0.1% 膠原蛋白酶 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 並經過 0.22 $\mu$ m 無菌過濾器 (Steritop bottle top filter) (Millipore, Billerica, MA, USA) 過濾後, 分裝於 50ml 離心管置於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 使用前以 37 $^{\circ}$ C 水浴槽加熱。配製三種培養液, 1. A 培養液: 不含胎牛血清之培養液 199 (Gibco, Grand Island, N.Y., USA) 1 公升, 內含 2.2g sodium bicarbonate, 4.9g HEPES (20 mM)。2. B 培養液: 含 20% 胎牛血清之培養液 199 (390ml 培養液 A, 100ml fetal bovine serum (FBS), 5ml L-glutamin solution, 5ml penicillin/streptomycin solution, 15mg endothelial cell growth supplement (Millipore, Billerica, MA, USA))。3. C 培養液: 含 2% 胎牛血清但不含內皮細胞生長補充劑 (endothelial cell growth supplement, ECGS) 之培養液 199 (480ml 培養液 A, 10ml fetal bovine serum (FBS), 5ml L-glutamin solution, 5ml penicillin/streptomycin solution)。

### **(B) 進行臍帶靜脈內皮細胞(HUVEC)灌流及純化**

準備 37 $^{\circ}$ C 加熱之 PBS、37 $^{\circ}$ C 含 20% 胎牛血清之培養液 B、37 $^{\circ}$ C 0.1% 膠原蛋白酶。無菌操作台先鋪好一層乾淨紗布, 以燒杯盛裝 PBS。將臍帶血管內部血液輕輕的擠出, 用紗布擦拭臍帶表面血液, 以免沾黏。臍帶具有 2 條動脈、1 條靜脈, 將三向轉接頭下方孔徑套

入臍靜脈（可先用鑷子撐開靜脈孔較易插入），以塑膠繫繩固定、夾緊。關住其他開口，以 50ml 針筒吸取 PBS，從上方孔徑灌注 PBS，重複多次，將血管內部殘留的血液清洗乾淨。臍帶另一端用臍帶夾夾緊封住，以 10ml 針筒吸取 0.1% 膠原蛋白酶從三向轉接頭上方孔注入，直到整條臍帶都充滿再關閉開口。將臍帶放到燒杯中，放置到 37°C 細胞培養箱 6-8 分鐘。將臍帶拿出，以指腹輕輕搓揉臍帶，由上方孔徑倒出含有細胞的 0.1% 膠原蛋白酶到 50ml 離心管。由 4°C 冰箱拿出不含胎牛血清之培養液 A，用 10ml 針筒吸取不含胎牛血清的培養液 A，注入臍帶直到充滿，再次以指腹不斷搓揉臍帶，倒出液體到離心管，重複此動作沖洗約 2~3 次直到臍帶靜脈血管呈現半透明狀態。以 1200 rpm 轉速離心 10 分鐘，去除上清液，將細胞輕輕拍散，加入 37°C 含 20% 胎牛血清之培養液 B 約 7ml 再懸浮細胞，吸取至 10 cm 已覆蓋好 2% 明膠之細胞培養皿中，靜置於 37°C 含 5% 二氧化碳之細胞培養箱內。隔天將培養皿內的培養液吸出丟棄，以 PBS 溫和的清洗三次，去除多餘的血球細胞，更換新鮮的含 20% 胎牛血清之培養液 B。等待內皮細胞長滿後再進行繼代培養，先將細胞培養皿中的培養液吸取丟棄，以 PBS 溫和的清洗一次，加入 2ml 的 TrypLE（Gibco, Grand Island, N.Y., USA）溶液，靜置於 37°C 細胞培養箱約 1-2 分鐘，加入 2ml 含 20% 胎牛血清之培養液 B，中和

TrypLE 的作用。以 1200 rpm 轉速離心 10 分鐘，去除上清液，將細胞輕輕拍散，加入 8ml 含 20% 胎牛血清之培養液 B 再懸浮細胞，在新的已覆蓋明膠之培養皿中放入 3ml 含 20% 胎牛血清之培養液 B，各加入 4ml 細胞懸浮液後搖晃均勻，靜置於 37°C 細胞培養箱培養，細胞長滿後再次進行上述繼代培養。

### 臍帶靜脈內皮細胞的冷凍保存

由於臍帶取得不易且每次實驗需使用大量的內皮細胞，故需將每次純化之臍帶靜脈內皮細胞先進行保存以提供實驗使用。準備細胞冷凍小管，標示日期、細胞名稱、繼代數、使用者。配製 90% FBS 加 10% DMSO 混合液，置於 37°C 水浴槽加熱。先將細胞培養皿中的培養液吸取丟棄，以 PBS 溫和的清洗一次，加入 2ml 的 TrypLE 溶液，此為非動物源性的細胞分離酶，使附著之細胞自培養皿脫落。靜置於 37°C 細胞培養箱約 1 - 2 分鐘，加入 2ml 含 20% 胎牛血清之培養液 B，中和 TrypLE 的作用。以 1200 rpm 轉速離心 10 分鐘，去除上清液，用 PBS 再懸浮細胞，計數所有的細胞量。再次以 1200 rpm 轉速離心 10 分鐘，去除上清液，用 90% 胎牛血清加 10% DMSO 混合液再懸浮細胞並均勻混合，每 1ml 混合液含有  $1 \times 10^6$  個細胞，移至標示好的細胞冷凍小管。將細胞先冰存於 -80°C 冰箱，24 小時後移到液態氮桶中作為長時間之 HUVECs 保存。

### 解凍臍帶靜脈內皮細胞進行培養

將含 20% 胎牛血清之培養液 B 置於水浴槽回溫至 37°C。由液態氮桶中取出細胞冷凍小管，在 37°C 水浴槽解凍約 30 秒，將冷凍小管內的細胞懸浮液取出，緩緩的加到 1ml 含 20% 胎牛血清之培養液 B 均勻混合，以 1200 rpm 轉速離心 10 分鐘，去除上清液，用 PBS 再懸浮細胞，再次以 1200 rpm 轉速離心 10 分鐘，去除上清液，加入 7ml 含 20% 胎牛血清之培養液 B 均勻混合後，放到已覆蓋 2% 明膠之細胞培養皿中，移至細胞培養箱。等待細胞長滿後再進行繼代培養或後續實驗。

### 免疫螢光染色法 (Immunocytochemical Fluorescence)

為了確認從臍帶取得的細胞是否為內皮細胞，將以內皮細胞特異性抗體做細胞免疫螢光染色分析。CD31，也稱為血小板內皮細胞黏附分子 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1)，被發現能表達在血小板，大多數白血球細胞亞群如單核球、嗜中性球，以及很高的比例集中表達於血管內皮細胞相鄰細胞間の間隙交界處，它參與調節白血球細胞的遷移，當白血球細胞準備穿過血管內皮細胞之間隙進入組織時，CD31 是必需的分子。而因為其高度表達於內皮細胞，CD31 可被用來作為標記內皮細胞的特異性分子。溫韋伯氏因子 (von Willebrand factor, vWF) 的主要功能是與其他蛋白質結合，尤其



是第八凝血因子 (factor VIII)，對於血小板黏附至內皮細胞損傷位置也很重要，它不是酵素，不具有催化活性。第八凝血因子與 vWF 結合成複合體並於血液中循環時，是不具有活性的，通過凝血酶 (thrombin) 的催化分解作用，第八凝血因子與 vWF 分離並釋出後快速降解，參與凝血作用。血管發生損傷時，vWF 被凝血酶活化並與血小板結合，再結合至血管內皮膠原蛋白 (collagen)，功用為幫助血小板黏著至血管壁。由於 vWF 是血中一種糖蛋白聚合物分子，由內皮細胞製造產生，參與止血的生理機制，也可被用來作為內皮細胞的特異性標記。碘化丙啶(propidium iodide, PI)是一種螢光核酸染劑，此染劑只會與雙股核酸結合，因此被用來標記細胞核內的 DNA，辨識細胞核的位置。小的圓形蓋玻片 (12 mm round glass cover slip) 以 75% 酒精清洗擦拭，並以酒精燈快速燒烤正反面後，放入 24 孔培養盤中。將內皮細胞以含 2% 胎牛血清但不含內皮細胞生長補充劑之培養液 C 稀釋至  $2 \times 10^5$ /ml 之濃度，取 1ml 細胞種於一玻片上培養，待細胞密度約達到 8 成即可進行實驗。去除培養液，以 PBS 清洗一次後，加入 3.7% 甲醛置於室溫下 20 分鐘以固定細胞。移除甲醛，以 PBS 清洗 3 次，加入 0.1% Triton X-100 作用 1 分鐘於細胞膜上穿洞，使一級抗體 (first antibody) 能通過細胞膜。移除 0.1% Triton X - 100，以 PBS 清洗 3 次，每孔加入一級抗體 200 $\mu$ l 置於室溫下作用 1 小時

使抗體能與其相對應的抗原結合，一級抗體分別為 Polyclonal Rabbit Anti-Human Von Willebrand Factor (1:200, Dako, Denmark, A/S) 與 Monoclonal Mouse Anti-Human CD31 (1:20, Dako, Denmark, A/S)。移除一級抗體，以 PBS 清洗 3 次洗去未反應的抗體後，加入有螢光標示的二級抗體 (second antibody) 及 RNase A (1:500, stock 10mg/ml) 每孔共 500 $\mu$ l 置於室溫下避光作用 1 小時，二級抗體分別為 488-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (1:200, Jackson ImmunoResearch, Europe Ltd) 與 647-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (1:200, Jackson ImmunoResearch, Europe Ltd)。移除二級抗體，以 PBS 清洗 3 次，加入 Propidium iodide 溶液 (1:1000, stock 1mg/ml) 每孔 300 $\mu$ l 置於室溫下作用 10 分鐘。移除 Propidium iodide 溶液，以 PBS 清洗 3 次。先將封片膠 (mounting medium) 滴於載玻片上，風乾玻片後，小心的將玻片倒蓋於載玻片上，避免產生氣泡，膠體凝固後即可以雷射掃描式共軛焦顯微鏡觀察。

### **TNF- $\alpha$ 刺激 HUVECs 之反應**

將 10cm 細胞培養皿中的內皮細胞以 TrypLE 溶液作用後取出，離心後以含 2% 胎牛血清但不含內皮細胞生長補充劑之培養液 C 再懸浮細胞，並稀釋至  $2 \times 10^5$ /ml 之濃度，取 1ml 細胞種於 CellBIND® 24 孔盤 (Corning, San Nicolás, NL, México)，待細胞密度約達到 8 成即

可進行實驗。分別以含有不同濃度腫瘤壞死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$  100、10、1、0.1、0 ng/ml) (PEPROTECH, Rocky Hill, USA) 之新鮮培養液處理細胞，靜置於細胞培養箱培養，並以不同時間點 (2、6、12、24、48、72 小時) 分別收取細胞培養液，之後以酵素免疫分析法偵測 Endocan 表現。

## 二、體內實驗

### 腎移植病患之試驗

2012 年 7 月 12 日到 2012 年 8 月 16 日，在這段期間內，我們招募了 97 位腎移植受贈者收案人。首先，將 97 位收案人進行慢性腎臟病之分組，一般臨床上訂定分期範圍，可分一到五期，第一期屬於腎功能正常，第二期表示輕度慢性腎衰竭，第三期屬於中度慢性腎衰竭，第四期重度慢性腎衰竭，第五期為最嚴重且是末期慢性腎衰竭狀態 (表一)。

97 位收案人於第一次回診抽血時，預留 3ml 分離血清後，將其冷凍於-80°C，作為以酵素免疫分析套組測量 Endocan 和 TNF- $\alpha$  的濃度時分析使用。

### 酵素免疫分析

Endocan 酵素免疫分析套組 (Lunginnov, Lille, France) , 依照其所附之操作手冊進行實驗, 操作步驟簡述如下: 將擷取抗體 (capture antibody) 溶於緩衝液 A (carbonate/bicarbonate buffer 0.1M, pH9.6) 至作用濃度 2  $\mu\text{g/ml}$  後, 加入 96 孔盤, 每孔加入 100 $\mu\text{l}$ , 封膜於 4 $^{\circ}\text{C}$  放置隔夜; 次日以緩衝液 B (1L PBS 含有 0.1% BSA, 0.1% Tween 20, 5mM EDTA) 清洗 96 孔盤, 每孔加入 300 $\mu\text{l}$  清洗三次後, 每孔加入 300 $\mu\text{l}$  的緩衝液 B, 封膜置於室溫作用 1 小時。再以緩衝液 B 清洗三次後, 加入序列稀釋好的標準溶液 (standard) 以及待測之樣品分別各 100 $\mu\text{l}$ , 置於室溫作用 1 小時。再以緩衝液 B 清洗三次後, 加入以緩衝液 B 稀釋之偵測抗體 (detection antibody) 每孔各 100 $\mu\text{l}$ , 封膜於室溫作用 1 小時。以緩衝液 B 清洗三次, 每孔加入 100 $\mu\text{l}$  以緩衝液 B 稀釋之有鍵結酵素辣根過氧化酶 (horseradish peroxidase, HRP) 的 Streptavidin, 於室溫避光作用 30 分鐘。以緩衝液 B 清洗三次後加入 100 $\mu\text{l}$  四甲基聯苯胺 (tetramethylbenzidine, TMB) 受質, 室溫避光作用 10 至 15 分鐘。待呈色後每孔加入 50 $\mu\text{l}$  終止溶液 (1M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), 並盡快在 30 分鐘內以微量盤式分析儀 (microplate reader), 吸光值 (optical density, OD) 450 讀取數值, 最後將讀值換算為濃度即完成。

TNF- $\alpha$  酵素免疫分析套組 (eBioscience, San Diego, CA, USA) , 依照其操作手冊步驟簡述如下: 將擷取抗體 (capture antibody) 以套

組所附的 1 倍之覆蓋緩衝液 (coating buffer) 稀釋 250 倍後，加入 96 孔盤，每孔各 100 $\mu$ l，封膜於 4 $^{\circ}$ C 放置隔夜；次日以清洗緩衝液 (PBS 含有 0.05% Tween 20) 清洗緩衝液沖洗 96 孔盤，每孔加入 250 $\mu$ l 清洗五次後，每孔加入 200 $\mu$ l 套組所附的 1 倍分析稀釋液 (assay diluent)，封膜置於室溫作用 1 小時。以清洗緩衝液清洗五次，加入序列稀釋好的標準溶液和待測樣品分別各 100 $\mu$ l，置於室溫作用 2 小時。再以清洗緩衝液清洗五次後，加入以 1 倍之分析稀釋液稀釋之偵測抗體，每孔各 100 $\mu$ l，封膜於室溫作用 1 小時。再以清洗緩衝液清洗五次，每孔加入 100 $\mu$ l 以 1 倍分析稀釋液稀釋之有鍵結酵素辣根過氧化酶的 Streptavidin，置於室溫作用 30 分鐘，須避光。以清洗緩衝液清洗七次後，每孔加入 100 $\mu$ l 四甲基聯苯胺受質溶液，室溫避光作用約 15 分鐘呈色後，每孔中加入 50 $\mu$ l 終止溶液 (1M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)，在 30 分鐘內以微量盤式分析儀，吸光值 450nm 讀取數值，並將讀值換算為濃度。

### 三、統計分析

#### 相關性分析

##### (A) Pearson 相關性檢定

將酵素免疫分析套組測量得到的腎移植病患血清中 Endocan 與 TNF- $\alpha$  濃度，利用 Pearson 相關性檢定，求得兩個連續變數之間的相

關性強弱並得到其相關係數 (correlation coefficient)。相關係數是反映這兩連續變數之間的關係密切程度之指標。相關係數值會介於-1 到+1 之間，具有以下特點：當相關係數大於 0 時，表示此兩變數間為正相關，小於 0 時表示兩變數間為負相關；當相關係數等於 1 或-1 時，表示兩變數間具有完全線性相關；若相關係數等於 0，表示兩變數間無線性相關。因此，若相關係數在 0 到 1 之間或是落於-1 到 0 之間，表示檢測的兩連續變數具有一定程度的線性相關性，越接近 1 或-1，兩變數間的線性關係越強，而若是越接近 0，表示其線性相關性越弱。將相關係數絕對值，訂定相關性強弱範圍 (表二)。統計上以  $p < 0.05$  表示具有顯著意義。

### **(B)接收者操作特徵曲線(receiver operating characteristic curve)**

在臨床，醫師診斷疾病常需要根據各類檢查結果之數值來判定，而這些數值，大於多少或者小於多少該判定區分為陽性或者陰性，需訂定一個分界點 (cut-point)，以此分界點來做診斷或推論的依據，此分界點的訂定會影響到醫師診斷疾病時的敏感性 (sensitivity) 與特异性 (specificity)，在本研究中，敏感性表示腎功能開始惡化並判定為陽性的機率，特异性表示腎功能正常並被判定為陰性的機率，藉由「接收者操作特徵曲線」(receiver operating characteristic curve, 簡稱 ROC 曲線) 的統計運算，來找出 endocan 作為標誌物是否有最佳切

點。ROC 曲線即是用來呈現此檢驗標誌物 (endocan) 之敏感性及特異性，其中 X 軸為 100-特異性，表示偽陽性率 (false positive)，Y 軸為敏感性，若是此標誌物之 ROC 曲線呈現對角線的狀態，表示此標誌物對於腎功能診斷並不具有其相關特殊性和鑑別性，若 ROC 曲線越靠近圖形的左上方表示此標誌物與腎功能間的敏感性越佳且偽陽性率越低，代表此標誌物對於腎功能好壞的診斷具有其鑑別力。除了曲線坐落的位置以外，同時曲線下的面積 (Area Under Curve, AUC) 也是用來判定此標誌物是否具有鑑別力的方式，一般將 AUC 數值分為幾個區分界線：AUC = 0.5 表示幾乎不具有判別力 (no discrimination)， $0.7 \leq \text{AUC} < 0.8$  表示可以接受的判別力 (acceptable discrimination)， $0.8 \leq \text{AUC} < 0.9$  表示為好的判別力 (excellent discrimination)， $\text{AUC} \geq 0.9$  表示此為非常好的判別方式 (outstanding discrimination)。

### 一般數據統計分析

將上述得到的數據進行統計分析。第一次回診與間隔一個月後的第二次回診，規則抽血檢查由醫院檢驗部生化科測量其肌酸酐血清濃度，依照 MDRD (Modification of Diet in Renal Disease) 公式計算出兩次測量的腎絲球過濾率 (estimated glomerular filtration rate, eGFR)，再根據腎絲球過濾率數值作慢性腎臟病嚴重程度之分期。以

Kruskal-Wallis H test 統計分析 endocan 濃度與慢性腎臟病分期之相關性與趨勢。藉由接收者操作特徵(ROC)曲線，設定 endocan 濃度一基準點，作為區分移植腎功能惡化可能性之標準。根據此 endocan 基準點分組，以 Independent samples t test(獨立樣本 T 檢定)統計分析與兩次肌酸酐血中濃度之相關性，以及 Pearson chi-square 統計分析與估計腎絲球過濾率差之間的相關性。統計上以  $p < 0.05$  表示具有顯著意義。



## 結果

### 人類臍帶靜脈內皮細胞(HUVECs)之辨識及純度

進行臍帶灌流，目的是利用膠原蛋白酶將臍帶靜脈血管內皮細胞取出，操作取得方式如前所述。初步取得的細胞，則需經過各項染色來辨識，確認我們得到的確為臍帶靜脈內皮細胞，純度達 95% 以上才能進行下一步實驗。將細胞種於小的圓形蓋玻片上培養，待細胞密度約達到 8 成即可進行染色實驗。首先以倒立顯微鏡 (Inverted microscope) 觀察細胞型態，細胞扁平呈梭狀，並貼附於底層，為典型內皮細胞形態。(圖四、a 及 b)。為了更加肯定及確認為臍帶靜脈內皮細胞，以內皮細胞特異性抗體 CD31、vWF 做細胞免疫螢光染色分析，並利用雷射掃描式共軛焦顯微鏡觀察，由掃描得到的圖片可看出，被碘化丙啶所標識的部位為細胞核，在其周圍皆可明顯看到 CD31 和 vWF 的表達，因此我們確認藉此灌流方式所得到的細胞，皆為臍帶靜脈血管內皮細胞 (圖五)。

### TNF- $\alpha$ 誘導的發炎內皮細胞會隨時間而增加 endocan 的分泌

以含 2% 胎牛血清但不含內皮細胞生長補充劑之培養液 C 懸浮細胞，並稀釋細胞濃度至  $2 \times 10^5$ /ml，取 1ml 細胞種於 24 孔盤，細胞生長到密度約 8 成即可進行實驗。分別以含有不同濃度腫瘤壞死因子 - $\alpha$  (TNF- $\alpha$  0、0.1、1、10、100 ng/ml) 之新鮮培養液處理細胞，靜

置於細胞培養箱培養，並分別於下列不同時間點（2、6、12、24、48、72 小時）分別收取細胞培養液，再以酵素免疫分析法偵測 Endocan 表現。第一次實驗使用 TNF- $\alpha$  濃度為 0、0.1、1、10、100 ng/ml，並偵測 6、24、48、72 小時之 endocan 濃度：TNF- $\alpha$  濃度為 100 ng/ml 時，endocan 濃度由 6 小時的 3.90 ng/ml 隨時間增加至 72 小時的 12.01 ng/ml；TNF- $\alpha$  濃度為 10 ng/ml 時，endocan 濃度由 6 小時的 2.95 ng/ml 隨時間增加至 72 小時的 13.34 ng/ml；TNF- $\alpha$  濃度為 1 ng/ml 時，endocan 濃度由 6 小時的 2.17 ng/ml 隨時間增加至 72 小時的 12.02 ng/ml；TNF- $\alpha$  濃度為 0.1 ng/ml 時，前 24h 與不加 TNF- $\alpha$  的速率相似，24 小時後，endocan 的上升速度加快，濃度由 6 小時的 1.64 ng/ml 亦隨時間增加至 72 小時的 9.65 ng/ml；沒有經過 TNF- $\alpha$  處理的內皮細胞其 endocan 濃度也有增加，上升比較平緩，由 6 小時的 1.01 ng/ml 增加至 72 小時的 6.21 ng/ml，這次實驗由於每個組別只測試了一孔，無法求得平均值（Mean）與標準差（Standard Deviation, S.D.）（圖六、a）。第二次實驗使用 TNF- $\alpha$  濃度為 0、10 ng/ml，並偵測 24、48、72 小時之 endocan 濃度：TNF- $\alpha$  濃度為 10 ng/ml 時，每個時間點測試 4 個孔，endocan 平均濃度由 24 小時的  $9.40 \pm 1.39$  ng/ml 增加至 72 小時的  $13.09 \pm 0.25$  ng/ml；另外 TNF- $\alpha$  濃度為 0 ng/ml 時，每個時間點各測試了 3 個孔，endocan 平均濃度由 24 小時的  $7.35 \pm 0.25$  ng/ml 增

加至 72 小時的  $9.01 \pm 1.27$  ng/ml (圖六、b)。第三次實驗一樣使用 0 和 10 ng/ml 的 TNF- $\alpha$  濃度，偵測時間點為 6、24、48、72 小時，每個時間點各 3 個孔：當 TNF- $\alpha$  濃度使用 10 ng/ml，endocan 平均濃度由 6 小時的  $1.15 \pm 0.09$  ng/ml 增加至 72 小時的  $9.46 \pm 1.21$  ng/ml；而 TNF- $\alpha$  濃度降為 0 ng/ml 時，endocan 平均濃度由 6 小時的  $0.43 \pm 0.04$  ng/ml 增加至 72 小時的  $2.42 \pm 0.28$  ng/ml (圖六、c)。最後一次實驗，改為測試較低濃度的 TNF- $\alpha$ ，使用 0 和 1 ng/ml，並收取 2、6、12 小時這 3 個時間點，由於每個時間點只檢測 2 個孔，無法求得標準差：可看到 TNF- $\alpha$  為 1 ng/ml 時，endocan 平均濃度由 2 小時的 0.80 ng/ml 增加至 12 小時的 3.59 ng/ml；沒加入 TNF- $\alpha$  的組別，endocan 平均濃度由 2 小時的 0.53 ng/ml 增加至 12 小時的 1.95 ng/ml (圖六、d)。由以上四次實驗結果可看出，當我們以 TNF- $\alpha$  誘導內皮細胞產生發炎反應時，使用不同濃度的 TNF- $\alpha$ ，皆會隨時間增長而使內皮細胞逐漸增加 endocan 的分泌至細胞培養液中，而 TNF- $\alpha$  濃度 10 ng/ml 以上時，約 48 小時之時間點，endocan 濃度會達到頂點。

### **腎臟移植病患血清中的 endocan 與 TNF $\alpha$ 濃度呈顯著的正相關**

由上述內皮細胞的體外試驗結果得到，以 TNF- $\alpha$  誘導內皮細胞發炎的方式，使內皮細胞隨時間增加 endocan 分泌量，為了在腎移植病患體中證實是否此現象也存在，我們招募了 97 位接受過腎移植手

術的受贈者，他們平均年齡為  $43.6 \pm 13.2$  歲，腎移植手術後平均追蹤時間為  $7.0 \pm 5.7$  年，其中男性比例為 55.7%，將收集的血清以酵素免疫分析套組測量 endocan 和 TNF- $\alpha$  的濃度，將測得的兩個濃度經過統計檢定分析，求得兩者間相關係數和相關性。經過統計檢定分析，求得其相關係數絕對值為 0.286，落在 0.1 ~ 0.39 中間，表示具有低度相關性。根據上述的範圍訂定，我們發現腎移植病患血清中 endocan 和 TNF- $\alpha$  兩濃度間是具有正相關的關係，且具有統計上的顯著意義 ( $p = 0.002$ ) (圖七)。

#### **慢性腎臟病之分期越後期者有較高的血清 endocan 含量**

這 97 位接受過腎移植手術的受贈者，在第一次回診取得血清後以酵素免疫分析套組測量 endocan 濃度。而每一位腎移植患者，第一次回診同時也抽血由醫院測量其肌酸酐血中濃度，依照公式計算出其腎絲球過濾率 (glomerular filtration rate, GFR)，再根據腎絲球過濾率數值作慢性腎臟病 (CKD) 嚴重程度之分期。97 位腎移植患者，分別得到各自的血清 endocan 濃度及慢性腎臟病嚴重程度之分期後，以 Kruskal-Wallis H test 統計分析 endocan 濃度與慢性腎臟病分期之相關性與趨勢，由於收案人大部份落於第三期，第一期和第二期以及第四期和第五期人數過少，採取合併方式，將第一、二期合併 (共 48 人)，第四、五期合併 (共 5 人)，加上第三期 (44 人) 共三組進行

分析。由直條圖圖形來看，越後期的慢性腎臟病患，血清中具有較高的 endocan 含量，趨勢線向上 ( $p = 0.077$ ) (圖八)。

### **以接收者操作特徵(ROC)曲線設定 endocan 之基準點**

經過 ROC 曲線的統計運算結果，設定以 endocan  $> 643.19$  pg/ml 及 endocan  $\leq 643.19$  pg/ml 來區分移植腎功能惡化的可能性，且其 AUC = 0.732，95% 置信區間為 0.632 - 0.818 (圖九)，顯示其判斷力在可接受範圍內並具有可信度。因此根據 ROC 曲線得到的結果，我們將病患依血清之 endocan 濃度值大於 643.19 pg/ml 及 endocan 小於和等於 643.19 pg/ml 兩組來分析，臨床診斷上是否需要注意患者腎功能之變化。

### **Endocan $> 643.19$ pg/ml 的患者具有較高的血清肌酸酐值及較差的腎絲球過濾率 (glomerular filtration rate)**

根據 ROC 曲線，我們設定以血清中 endocan 濃度  $> 643.19$  pg/ml 及  $\leq 643.19$  pg/ml 作為分界基準點，接著我們想依據此 endocan 濃度分界點將腎移植患者分組，並與其血清肌酸酐濃度和腎絲球過濾率做比較分析，確認 endocan 濃度和代表腎功能好壞的肌酸酐濃度及腎絲球過濾率，是否具有相關性。首先將 97 位腎臟移植受贈者兩次門診取得之血液中肌酸酐濃度，分別依據 endocan  $> 643.19$  pg/ml 及  $\leq$

643.19 pg/ml 分組，並以 Independent samples t test(獨立樣本 T 檢定) 統計分析方式檢定兩次肌酸酐值分組比較。第一次門診分組結果  $\text{endocan} \leq 643.19 \text{ pg/ml}$  的患者有 58 人，肌酸酐平均值為  $1.2 \pm 0.4 \text{ mg/dL}$ ，而  $\text{endocan} > 643.19 \text{ pg/ml}$  的患者有 39 人，肌酸酐平均值為  $1.5 \pm 1.0 \text{ mg/dL}$ ，這一次取得之肌酸酐濃度分組比較結果沒有顯著差異 ( $p = 0.113$ )；進行第二次門診取得肌酸酐濃度分組結果  $\text{endocan} \leq 643.19 \text{ pg/ml}$  的患者有 58 人，肌酸酐平均值為  $1.2 \pm 0.4 \text{ mg/dL}$ ，而  $\text{endocan} > 643.19 \text{ pg/ml}$  的患者有 39 人，肌酸酐平均值為  $1.6 \pm 1.1 \text{ mg/dL}$ ，結果顯示在  $\text{endocan} > 643.19 \text{ pg/ml}$  的患者中亦有較高的血清肌酸酐值 ( $p = 0.029$ ) (表三)。

另一方面，利用兩次門診取得血液中肌酸酐濃度，藉由估計腎絲球過濾率的換算公式，求得每位患者兩次之估計腎絲球過濾率後，計算腎絲球過濾率變動差 (difference of estimated glomerular filtration rate, deGFR)，方式是「(第二次腎絲球過濾率 - 第一次腎絲球過濾率) / 第一次腎絲球過濾率」，臨床上以  $\text{deGFR} \leq -5\%$  為準則，當  $\text{deGFR} \leq -5\%$  時判定為腎功能走下坡或有腎功能障礙，表示腎絲球過濾率變差，也代表移植後腎臟功能再度惡化，而  $\text{deGFR} > -5\%$  表示腎臟功能維持良好。首先將 97 位腎臟移植受贈者依照  $\text{endocan}$  濃度  $> 643.19 \text{ pg/ml}$  及  $\leq 643.19 \text{ pg/ml}$  分組，計算出 deGFR 後， $\text{endocan}$

兩組依據  $\text{deGFR} > -5\%$  和  $\leq -5\%$  分別再次分組，並以 Pearson chi-square 統計分析 endocan 與估計腎絲球過濾率差之間的相關性。Endocan 濃度  $\leq 643.19 \text{ pg/ml}$  的患者裡， $\text{deGFR} > -5\%$  的患者有 46 人 (79.3%)， $\text{deGFR} \leq -5\%$  的患者有 12 人 (20.7%)；Endocan 濃度  $> 643.19 \text{ pg/ml}$  的患者裡， $\text{deGFR} > -5\%$  的患者有 16 人 (41.0%)， $\text{deGFR} \leq -5\%$  的患者有 23 人 (59.0%) (表四)。結果顯示 endocan 與估計腎絲球過濾率變動差之間具有顯著相關性 ( $p < 0.0001$ )，血清中 endocan 水平高的患者，其腎絲球過濾率變差，表示 endocan 濃度值大於 643.19 時便需要注意患者的腎功能之變化。

## 討論

正常的腎臟功能大致分為幾類，排泄身體代謝所產生之廢物或是排出藥物及其代謝產物，水分的維持平衡，人體電解質和酸鹼度恆定之維持，製造並分泌腎素、紅血球生成素等賀爾蒙，及活化維生素 D 功能，因此腎功能對人體維持身體的恆定及各項生理功能正常運作是很重要的，若是失去腎功能，就會出現尿毒症狀，病患就必需進行腹膜透析、血液透析、腎臟移植等腎臟替代治療，其中腎臟移植對尿毒症患者來說是最便利且術後生活品質最好的方式。但長期的觀察研究發現，腎移植術後因各種因素，腎功能依然會逐漸下降甚至最後失去功能，必須等待第二次腎移植或進入透析，因此移植後持續追蹤及注意腎功能變化是很重要的。臨床上診斷腎功能的方式，初步可以肌酸酐來判斷，肌酸酐主要是身體肌肉運動代謝所產生的廢物，須由腎臟排出，當腎臟產生損傷破壞時，肌酸酐排出功能下降，使得血液中測得肌酸酐濃度增加，作為病患腎功能之評估。但肌酸酐的產生因人而異，會受到不同的飲食、體重、身高、年齡及性別等因素影響，使得檢驗結果指數在正常範圍時，可能腎功能已有不同程度的傷害。因此臨床上還會利用另一種方式，較能準確的評估腎功能，即為估計腎絲球過濾率，表示腎絲球過濾血液形成尿液並排出肌酸酐的效能。目前估算腎絲球過濾率有幾種換算公式：收集 24 小時尿液計算肌酸酐清



除率 (Creatinine Clearance Rate, Ccr), 24 小時 CCr (ml/min) = 【尿中肌酸酐(mg/dL)x 24 小時尿量 (ml)】 / 【血清肌酸酐(mg/dL)x 1440 分鐘】，此方式需收集 24 小時的尿液，以收集與保存來說並不方便；Cockcroft-Gault 公式計算 (C-G 公式) 的肌酸酐清除率，【((140-年齡) x 體重 (公斤))】 / 【血清肌酸酐(mg/dL)x 72】，若是女性須再乘以 0.85，但肌酸酐若處於變動不穩定的狀態時，會影響計算結果；腎臟病飲食修正研究推演之公式，MDRD-Simplify-GFR ( mL/min/1.73 m<sup>2</sup>) = 186 x 血清肌酸酐 Scr<sup>-1.154</sup> x 年齡<sup>-0.203</sup> x 0.742 (若為女性)，此公式是 1999 年為美國 MDRD 研究以一千多位慢性腎臟病患者的腎功能狀態研究推演出來的公式，在第一期和第二期患者容易被低估腎絲球過濾率，而第四期和第五期卻容易被高估 (Rule et al., 2004; Stevens et al., 2007)。以上幾個公式，大致可以估算腎絲球過濾率，用以評估腎功能的好壞，但具有它們的不方便性與誤差，且以不同的公式計算也會得到不盡相同的結果，各有其優缺點。

除了以腎絲球過濾率來評估移植腎功能的好壞以外，評估腎臟結構性的變化，腎臟穿刺組織切片檢查也是重要的方式。腎移植病患常會造成排斥現象，使得腎功能之惡化，而排斥又分為細胞性排斥及體液性排斥，其過去細胞性排斥有較多的認識及治療，而漸漸之體液性排斥歷年來有增多趨勢，且常常慢性排斥的主因是慢性抗體相關的體

液性排斥所造成。而診斷體液性排斥，目前以 C4d 染色，觀察 C4d 的沉積作為免疫組織化學的指標，代表抗體性排斥的發生。根據班夫準則 (Banff criteria)，診斷體液性排斥需包含幾項檢查結果：存在捐贈者特異性抗體 (donor specific antibodies, DSA)，C4d 染色為陽性，和至少一種組織形態特徵例如腎小管萎縮或腎間質纖維化。但近來的研究發現，過去有些研究顯示 C4d 和體液性排斥具有很強的相關性，但卻有些研究顯示兩者間相關性很差：例如有些腎移植病患檢查捐贈者特異性抗體是陽性反應且組織特徵也顯示出排斥反應，且移植腎功能喪失，但其 C4d 染色卻是陰性反應；而有些腎移植病患，C4d 染色出現陽性反應且移植腎功能異常，但捐贈者特異性抗體並不存在或其組織特徵沒有出現排斥現象 (Puttarajappa et al., 2012)。顯示以 C4d 診斷時，仍可能出現偽陽性或偽陰性的情況，而進行此項腎臟穿刺組織切片檢查，屬侵入性檢查方式，具有其不方便性和可能產生的併發症，有時對於病情的持續追蹤或診斷需要，必須重複穿刺檢查，對患者而言不方便且不太能接受。

過去的研究指出，endocan 高度表達於腎臟和肺臟內皮細胞 (Bechard et al., 2001)，其他研究探討腎臟移植後，發生急性排斥反應時 endocan 的表達，期望能找出 endocan 在移植腎內皮組織中的功能及作用，發現在腎移植後若患者產生急性排斥反應，其 endocan 表

達明顯升高，包括周邊血液及移植腎的組織切片皆如此 (Li et al., 2012)。因此我們的目的是研究 endocan 是否能成為一個新的指標，能反映移植腎內皮組織之發炎與受損程度，用以評估腎移植病患長期之移植腎存活率，是否能更準確代表腎功能變化程度，且必須是具有高敏感性、高特異性、非侵入性及能快速檢測等特點的指標。

此外，在過去的研究中，Scherpereel 等人利用臍帶靜脈內皮細胞進行體外實驗，分別以 1  $\mu\text{g/ml}$  的 LPS 和 500 IU/ml 的 TNF- $\alpha$  處理，發現內皮細胞經過刺激而誘導其增加 endocan 分泌，且隨時間持續釋放高達 96 小時 (Scherpereel et al., 2006)。而我們的實驗結果顯示：利用臍帶靜脈內皮細胞進行體外實驗，TNF- $\alpha$  誘導內皮細胞產生發炎反應，同樣會隨時間而增加 endocan 的分泌 (圖六)。此外，體外實驗部份，我們測得在不同濃度的 TNF- $\alpha$  刺激下，內皮細胞會隨著發炎反應程度而分泌 endocan 至培養液中，而內皮細胞上是否直接表達不同程度的 endocan，以及表達的位置是否主要分佈於細胞核、細胞質或是細胞間隙，尚需進一步的研究來證實，可能可以利用細胞免疫螢光染色法與共軛焦顯微鏡，觀察 endocan 在內皮細胞上的表達情況。

根據上述的體外實驗結果，我們想探討是否在腎移植患者中，endocan 和 TNF- $\alpha$  兩者間是否具有相關性，以酵素免疫分析套組測量腎臟移植病患血清中的 endocan 與 TNF- $\alpha$  濃度結果，兩者呈顯著的

正相關 (圖七), 且 endocan > 643.19 pg/ml 的患者, 其腎絲球過濾率較差 (表三)。此外, Scherpereel 的研究發現, 在敗血症病人裡, 代表內皮細胞活化及損傷的標誌物 vWF, 與 endocan 之間也具有顯著的相關性 (Scherpereel et al., 2006), 這部份也許我們將來可以同樣利用腎移植患者血清進行探討, vWF 與 endocan 與腎絲球過濾率之間是否有相關性, 使得 endocan 對於評估腎移植病患內皮細胞發炎損傷程度及腎功能, 可能可以有更佳的準確性。

Li 等人的研究, 利用 endocan 抗體進行標定, 並以共軛焦顯微鏡觀察 endocan 在腎臟組織切片的表達, 發現 endocan 蛋白在正常的腎臟組織中表達不明顯, 但在具有急性排斥反應的腎組織卻可看到大量表達於腎小球, 其研究結果表示 endocan 可能反映腎移植內皮細胞損傷的程度, 而且它可以作為一個腎移植後急性排斥反應的高度敏感性和特異性標記 (Li et al., 2012)。目前我們在體內實驗部份所做的主要是以血清中 endocan 含量及 TNF- $\alpha$  濃度來做分析, 若能如同 Li 等人研究, 加上移植腎組織中 endocan 表現的分析, 這部份同時再加上與 TNF- $\alpha$  雙染, 兩者對照應能使得研究更完整。此外, 目前收案的 97 位腎移植手術受贈者, 移植後平均追蹤時間為  $7.0 \pm 5.7$  年, 其中 CKD 第四與第五期合併只有 5 人, 若能增加收案人數, 提高平均追蹤時間至十年以上, 以及若能多招募到 CKD 後期的患者, 整體研究結果應

更具有意義。

由本篇論文的結果看來，腎臟移植受贈者的腎功能情況，可能可藉由血清中 endocan 的含量，用來評估腎移植病患甚至是一般慢性腎臟病患者，其內皮細胞發炎損傷程度以及腎功能早期預測或診斷的非侵入性指標，為臨床所應用。血清中 endocan 含量檢測方式快速，約 5 個小時內即可得知檢測結果，只是 endocan 目前研究量少，檢測試劑仍屬昂貴，將來如何普及應用，也是另一項值得研究的課題。

## 參考文獻

1. Al-Lamki, R.S., Wang, J., Skepper, J.N., Thiru, S., Pober, J.S., and Bradley, J.R. (2001). Expression of tumor necrosis factor receptors in normal kidney and rejecting renal transplants. *Lab Invest* 81(11), 1503.
2. Bechard, D., Gentina, T., Delehedde, M., Scherpereel, A., Lyon, M., Aumercier, M., Vazeux, R., Richet, C., Degand, P., Jude, B., Janin, A., Fernig, D.G., Tonnel, A.B., and Lassalle, P. (2001). Endocan is a novel chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan that promotes hepatocyte growth factor/scatter factor mitogenic activity. *J Biol Chem* 276, 48341-48349.
3. Bechard, D., Meignin, V., Scherpereel, A., Oudin, S., Kervoaze, G., Bertheau, P., Janin, A., Tonnel, A.B., and Lassalle, P. (2000). Characterization of the secreted form of endothelial-cell-specific molecule 1 by specific monoclonal antibodies. *J Vasc Res* 37, 417-425.
4. Bechard, D., Scherpereel, A., Hammad, H., Gentina, T., Tsicopoulos, A., Aumercier, M., Pestel, J., Dessaint, J.P., Tonnel, A.B., and Lassalle, P. (2001). Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 167, 3099-3106.
5. Carrillo, L.M., Arciniegas, E., Rojas, H., Ramírez, R. (2011). Immunolocalization of endocan during the endothelial-mesenchymal transition process. *Eur J Histochem* 55(2), e13.
6. Cornelius, A., Cortet-Rudelli, C., Assaker, R., Kerdraon, O., Gevaert, M.H., Prévot, V., Lassalle, P., Trouillas, J., Delehedde, M., and Maurage, C.A. (2012). Endothelial expression of endocan is strongly associated with tumor progression in pituitary adenoma. *Brain Pathol* 22(6), 757-764.
7. Coskun, C., Kural, A., Doventas, Y., Koldas, M., Ozturk, H., Inal,

- B.B., and Gumus, A. (2007). Hemodialysis and protein oxidation products. *Ann N Y Acad Sci* 1100, 404-408.
8. Depontieu, F., de Freitas Caires, N., Gourcerol, D., Giordano, J., Grigoriu, B., Delehedde, M., and Lassalle, P. (2012). Development of monoclonal antibodies and ELISA specific for the mouse vascular endocan. *J Immunol Methods* 378(1-2), 88-94.
  9. Feldman, H.I., Kobrin, S., and Wasserstein, A. (1996). Hemodialysis vascular access morbidity. *J Am Soc Nephrol* 7, 523-535.
  10. Florian, M., Magder, S. (2008). Estrogen decreases TNF- and oxidized LDL induced apoptosis in endothelial cells. *Steroids* 73, 47-58.
  11. Guo, S.J., Meng, S., Chen, B., Liu, J., Gao, L., and Wu, Y.F. (2011). C-reactive protein can influence the proliferation, apoptosis, and monocyte chemotactic protein-1 production of human umbilical vein endothelial cells. *DNA Cell Biol* 30, 157-162.
  12. Hatfield, K.J., Lassalle, P., Leiva, R.A., Lindås, R., Wendelboe, Ø., and Bruserud, Ø. (2011). Serum levels of endothelium-derived endocan are increased in patients with untreated acute myeloid leukemia. *Hematology* 16(6), 351-356.
  13. Kang, Y.H., Ji, N.Y., Lee, C.I., Lee, H.G., Kim, J.W., Yeom, Y.I., Kim, D.G., Yoon, S.K., Kim, J.W., Park, P.J., and Song, E.Y. (2011). ESM-1 silencing decreased cell survival, migration, and invasion and modulated cell cycle progression in hepatocellular carcinoma. *Amino Acids* 40(3), 1003-1013.
  14. Karasek, M.A. (2007). Does transformation of microvascular endothelial cells into myofibroblasts play a key role in the etiology and pathology of fibrotic disease? *Medical Hypotheses* 68, 650-655.
  15. Lassalle, P., Molet, S., Janin, A., Heyden, J.V., Tavernier, J., Fiers, W., Devos, R., and Tonnel, A.B. (1996). ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines. *J Biol Chem* 271, 20458-20464.

- 16.Leroy, X., Aubert, S., Zini, L., Franquet, H., Kervoaze, G., Villers, A., Delehedde, M., Copin, M.C., and Lassalle, P. (2010). Vascular endocan (ESM-1) is markedly overexpressed in clear cell renal cell carcinoma. *Histopathology* 56(2), 180-187.
- 17.Li, S., Wang, L., Wang, C., Wang, Q., Yang, H., Liang, P., and Jin, F. (2012). Detection on dynamic changes of endothelial cell specific molecule-1 in acute rejection after renal transplantation. *Urology* 80, 738.e1–738.e8.
- 18.Lin, C.C., Chang, C.F., Lai, M.Y., Chen, T.W., Lee, P.C., and Yang, W.C. (2007). Far -infrared therapy: a novel treatment improving access blood flow and unassisted patency of arteriovenous fistula in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 18, 985-992.
- 19.Liu, N., Zhang, L.H., Du, H., Hu, Y., Zhang, G.G., Wang, X.H., Li, J.Y., and Ji, J.F. (2010). Overexpression of endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1) in gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 17(10), 2628-2639.
- 20.Lv, Y.Y., Jin, Y., Han, G.Z., Liu, Y.X., Wu, T., Liu, P., Zhou, Q., and Liu, K.X. (2012). Ursolic acid suppresses IL-6 induced C-reactive protein expression in HepG2 and protects HUVECs from injury induced by CRP. *Eur J Pharm Sci* 45, 190-194.
- 21.Marks, R., and Finke, J. (2006). Biologics in the prevention and treatment of graft rejection. *Springer Semin Immun* 27, 457-476.
- 22.Min, C., Kang, E., Yu, S.H., Shinn, S.H., and Kim, Y.S. (1999). Advanced glycation end products induce apoptosis and procoagulant activity in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes Res Clin Pract* 46, 197-202.
- 23.Murray, J.E. (2005). The 50th anniversary of the first successful human organ transplant. *Rev Invest Clin* 57(2), 118-119.
- 24.Organ Procurement and Transplantation Network and the Scientific Registry of Transplant Recipients (OPTN/SRTR) 2011 Annual Data



Report.

25. Palermo, A., Mule, G., Vadala, A., Vaccaro, F., Guarneri, A., Arsena, R., Briolotta, C., Cerasola, G., and Cottone, S. (2008). Relationship of transforming growth factor-beta1 with tumor necrosis factor-alpha and endothelial activation in patients with stable renal transplantation. *Nephrology* 13, 164-170.
26. Parmentier, E., de Freitas Caires, N., Grigoriu, B., Pastré, J., Palud, A., Delehedde, M., Mathieu, D., Scherpere, A., and Lassalle, P. (2010). Endocan (endothelial cell-specific molecule-1) as a pertinent biomarker of endothelial dysfunction in sepsis. *Critical Care* 14(Suppl 2), 55.
27. Pasceri, V., Willerson, J.T., and Yeh, T.H. (2000). Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 102, 2165-2168.
28. Paulus, P., Jennewein, C., and Zacharowski, K. (2011). Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? *Biomarkers* 16(S1), S11-S21.
29. Puttarajappa, C., Shapiro, R., and Tan, H.P. (2012). Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review. *J Transplant* ID193724.
30. Reinders, M.E.J., Rabelink, T.J., and Briscoe, D.M. (2006). Angiogenesis and endothelial cell repair in renal disease and allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 17, 932-942.
31. Roy-Chaudhury, P., Sukhatme, V.P., and Cheung, A.K. (2006). Hemodialysis vascular access dysfunction: a cellular and molecular viewpoint. *J Am Soc Nephrol* 17, 1112-1127.
32. Rule, A.D., Larson, T.S., and Bergstralh, E.J. (2004). Using serum creatinine to estimate glomerular filtration rate: accuracy in good health and in chronic kidney disease. *Ann Intern Med* 141, 929-937.

- 33.Sankaran, D., Asderakis, A., Ashraf, S., Roberts, I.S.D., Short, C.D., Dyer, P.A., Sinnott, P.J., and Hutchinson, I.V. (1999). Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. *Kidney Int* 56, 281-288.
- 34.Sarrazin, S., Adam, E., Lyon, M., Depontieu, F., Motte, V., Landolfi, C., Lortat-Jacob, H., Bechard, D., Lassalle, P., and Delehedde, M. (2006). Endocan or endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1): A potential novel endothelial cell marker and a new target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 1765, 25-37.
- 35.Sarrazin, S., Lyon, M., Deakin, J.A., Guerrini, M., Lassalle, P., Delehedde, M., Lortat-Jacob, H. (2010). Characterization and binding activity of the chondroitin/dermatan sulfate chain from endocan, a soluble endothelial proteoglycan. *Glycobiology* 20(11), 1380-1388.
- 36.Scherpereel, A., Depontieu, F., Grigoriu, B., Cavestri, B., Tsiopoulos, A., Gentina, T., Jourdain, M., Pugin, J., Tonnel, A.B., Lassalle, P. (2006). Endocan, a new endothelial marker in human sepsis. *Crit Care Med* 34(2), 532-7.
- 37.Speeckaert, M.M., Speeckaert, R., Laute, M., Vanholder, R., and Delanghe, J.R. (2012). Tumor necrosis factor receptors: biology and therapeutic potential in kidney diseases. *Am J Nephrol* 36, 261-270.
- 38.Stevens, L.A., Coresh, J., and Feldman, H.I. (2007). Evaluation of the modification of diet in renal disease study equation in a large diverse population. *J Am Soc Nephrol* 18, 2749-2757.
- 39.The Taiwan Society of Nephrology. 台灣腎臟醫學會 .  
( <http://kidney.tsn.org.tw/index.php> )
- 40.Tissier, S., Lancel, S., Marechal, X., Mordon, S., Depontieu, F., Scherpereel, A., Chopin, C., and Neviere, R. (2004). Calpain inhibitors improve myocardial dysfunction and inflammation induced by endotoxin in rats. *Shock* 21, 352-357.

41. Tsai, J.C., Zhang, J., Minami, T., Volland, C., Zhao, S., Yi, X., Lassalle, P., Oettgen, P., and Aird, W.C. (2002). Cloning and characterization of the human lung endothelial-cell-specific molecule-1 promoter. *J Vasc Res* 39, 148– 159.
42. United States Renal Data System. (2012). 美國腎臟病資料登錄系統，2012 年年報 (<http://www.usrds.org/>)
43. van den Oever, I.M., Raterman, H.G., Nurmohamed, M.T., and Simsek, S. (2010). Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. *Mediators Inflammation* ID 792393.
44. van Ree, R.M., Oterdoom, L.H., de Vries, A.P., Gansevoort, R.T., van der Heide, J.J., van Son, W.J., Ploeg, R.J., de Jong, P.E., Gans, R.O., and Bakker, S.J. (2007). Elevated levels of C-reactive protein independently predict accelerated deterioration of graft function in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 22(1), 246-53.
45. Yu, S.Y., Chiu, J.H., Yang, S.D., Hsu, Y.C., Lui, W.Y., and Wu, C.W. (2006). Biological effect of far-infrared therapy on increasing skin microcirculation in rats. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 22, 78-86.

## 表目及圖目

表一、臨床上依腎絲球過濾率數值作慢性腎臟病 (CKD) 嚴重程度分期範圍.....	43
表二、將相關係數絕對值訂定相關程度範圍.....	44
表三、Endocan > 643.19 pg/ml 的患者血清肌酸酐值較高.....	45
表四、Endocan > 643.19 pg/ml 的患者腎絲球過濾率較差.....	46
圖一、全世界末期腎臟病之盛行率比較.....	47
圖二、腎移植受贈者，移植後腎功能的逐漸下降是不可避免的.....	48
圖三、Endocan 的全部氨基酸序列.....	49
圖四、以倒立顯微鏡觀察細胞型態.....	50
圖五、以內皮細胞特異性抗體做細胞免疫螢光染色.....	51
圖六、TNF- $\alpha$ 誘導的發炎內皮細胞會隨時間而增加 endocan 的分泌.....	52
圖七、腎臟移植病患血清中 endocan 與 TNF $\alpha$ 濃度之相關性.....	55
圖八、慢性腎臟病之分期越後期者血清 endocan 含量較高.....	56
圖九、利用接收者操作特徵(ROC)曲線設定 endocan 分界基準點....	57

**表一、臨床上依腎絲球過濾率數值作慢性腎臟病（CKD）嚴重程度分期範圍**

一般臨床上訂定分期範圍如下：第一期，腎絲球過濾率為 $\geq 90$  ml/min/1.73m<sup>2</sup>；輕度慢性腎衰竭的第二期，腎絲球過濾率介於 60 ~ 89 ml/min/1.73m<sup>2</sup> 之間；屬於中度慢性腎衰竭的第三期，腎絲球過濾率介於 30 ~ 59 ml/min/1.73m<sup>2</sup> 之間；重度慢性腎衰竭之第四期，腎絲球過濾率為 15 ~ 29 ml/min/1.73m<sup>2</sup> 之間；最嚴重且屬於末期慢性腎衰竭的第五期，腎絲球過濾率已經 $< 15$  ml/min/1.73m<sup>2</sup>。

<b>Stage</b>	<b>GFR(ml/min/1.73m<sup>2</sup>)</b>
第一期	$\geq 90$
第二期	60 – 89
第三期	30 – 59
第四期	15 – 29
第五期	$< 15$

## 表二、將相關係數絕對值訂定相關程度範圍

利用 Pearson 相關性檢定，求得兩個連續變數之間的相關係數，是反映這兩連續變數之間的關係密切程度之指標。將相關係數絕對值，訂定相關性強弱範圍。

相關係數絕對值	相關程度
等於 1	完全相關
0.7 ~ 0.99	高度相關
0.4 ~ 0.69	中度相關
0.1 ~ 0.39	低度相關
0.01 ~ 0.09	微弱甚至接近無相關
等於 0	完全無相關

### 表三、Endocan > 643.19 pg/ml 的患者血清肌酸酐值較高

根據 ROC 曲線，設定以血清 endocan 濃度 > 643.19 pg/ml 及  $\leq$  643.19 pg/ml 作為基準點，依據此基準點將 97 位腎移植患者分組，並與其血清中肌酸酐 (Cr) 濃度做比較分析。第一次回診分組結果 endocan  $\leq$  643.19 pg/ml 的患者有 58 人，肌酸酐平均值為  $1.2 \pm 0.4$  mg/dL，而 endocan > 643.19 pg/ml 的患者有 39 人，肌酸酐平均值為  $1.5 \pm 1.0$  mg/dL，分組比較結果沒有顯著差異 ( $p = 0.113$ )。一個月後第二次回診分組結果 endocan  $\leq$  643.19 pg/ml 的患者有 58 人，肌酸酐平均值為  $1.2 \pm 0.4$  mg/dL，而 endocan > 643.19 pg/ml 的患者有 39 人，肌酸酐平均值為  $1.6 \pm 1.1$  mg/dL，顯示在 endocan > 643.19 pg/ml 的患者中亦有較高的血清肌酸酐值 ( $p = 0.029$ )。

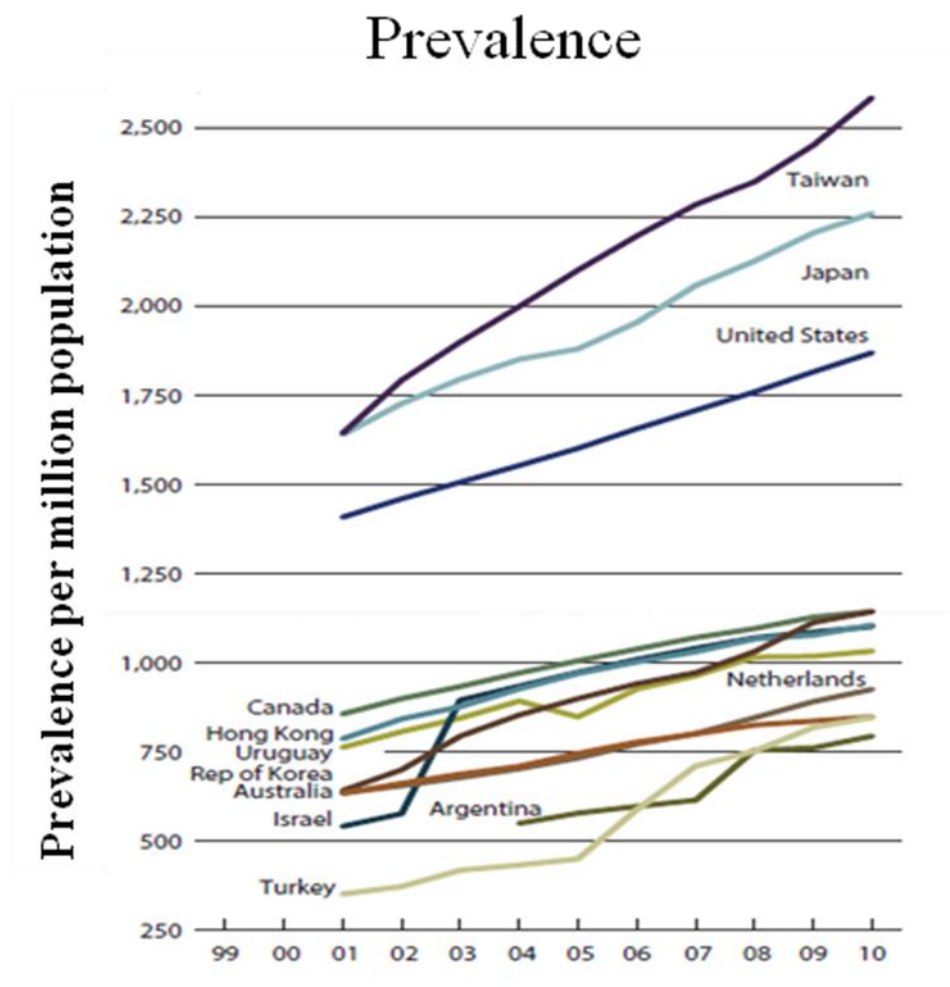
	<b>Endocan <math>\leq</math> 643.19</b>		<b>Endocan &gt; 643.19</b>		<b>p-value</b>
Cr 1	58 人	$1.2 \pm 0.4$ mg/dL	39 人	$1.5 \pm 1.0$ mg/dL	0.113
Cr 2	58 人	$1.2 \pm 0.4$ mg/dL	39 人	$1.6 \pm 1.1$ mg/dL	0.029

#### 表四、Endocan > 643.19 pg/ml 的患者腎絲球過濾率較差

兩次回診取得血液中肌酸酐濃度，換算求得每位患者兩次之估計腎絲球過濾率，並計算腎絲球過濾率變動差 (deGFR)，deGFR ≤ -5% 時表示腎絲球過濾率變差，而 deGFR > -5% 表示腎臟功能維持良好。97 位收案人先依照 endocan 濃度 > 643.19 pg/ml 及 ≤ 643.19 pg/ml 分組，兩組各依據 deGFR > -5% 和 ≤ -5% 分別再次分組。Endocan 濃度 ≤ 643.19 pg/ml 的患者裡，deGFR > -5% 的患者為 79.3%，deGFR ≤ -5% 的患者則為 20.7%；Endocan 濃度 > 643.19 pg/ml 的患者裡，deGFR > -5% 的患者為 41.0%，deGFR ≤ -5% 的患者則是 59.0%。統計結果顯示 endocan 與腎絲球過濾率之間具有顯著相關性 (p < 0.0001)。

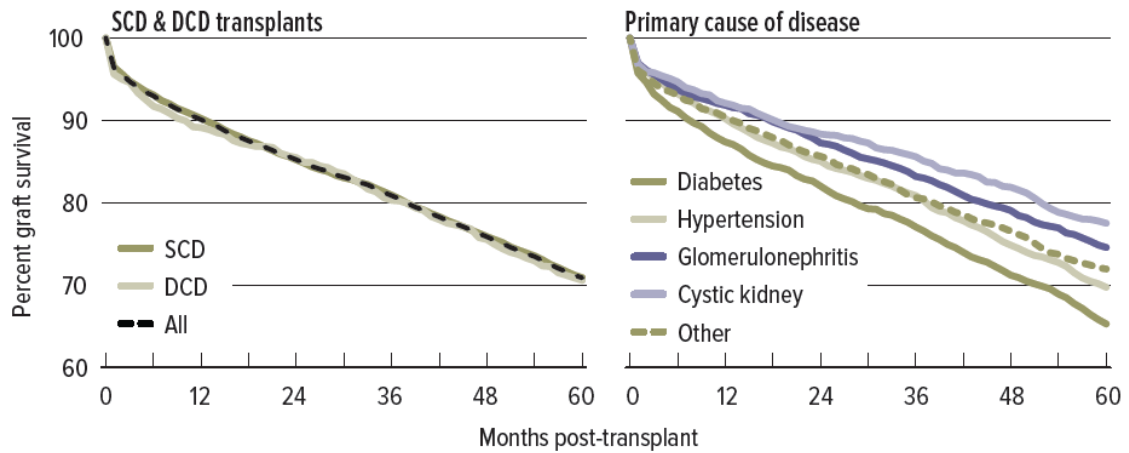
	<b>Endocan ≤ 643.19</b>	<b>Endocan &gt; 643.19</b>	<b>Total</b>	<b>p-value</b>
<b>deGFR &gt; -5%</b>	46 人(79.3%)	16 人(41.0%)	62 人(63.9%)	< 0.0001
<b>deGFR ≤ -5%</b>	12 人(20.7%)	23 人(59.0%)	35 人(36.1%)	





圖一、全世界末期腎臟病之盛行率比較

根據美國腎臟病資料登錄系統之統計比較，在台灣末期腎臟病盛行率已是全世界排行第一，第二名為日本，第三名為美國，遠勝於其他國家。(United States Renal Data System, 2012)



## 圖二、腎移植受贈者，移植後腎功能的逐漸下降是不可避免的

末期腎臟病的患者，腎臟失去原有的功能，進行了腎臟移植手術，但接受腎移植後，依然漸漸的有慢性腎臟病，無論移植腎來源是標準腦死判定條件下（SCD: standard criteria donor kidneys）或是心臟死亡後捐贈的腎臟（DCD: donations after cardiac death）。造成移植腎存活率逐年下降的因素，例如糖尿病、高血壓、腎小球腎炎、腎囊泡疾病或其他原因。（OPTN/SRTR 2011 Annual Data Report）

-19 MKSVLLLTL L<sup>V</sup>PAHLVA<sup>A</sup>W SNNYAVDCPQ HCD<sup>S</sup>SECKSS PRCKRTVLDD CGCCRYCAAG

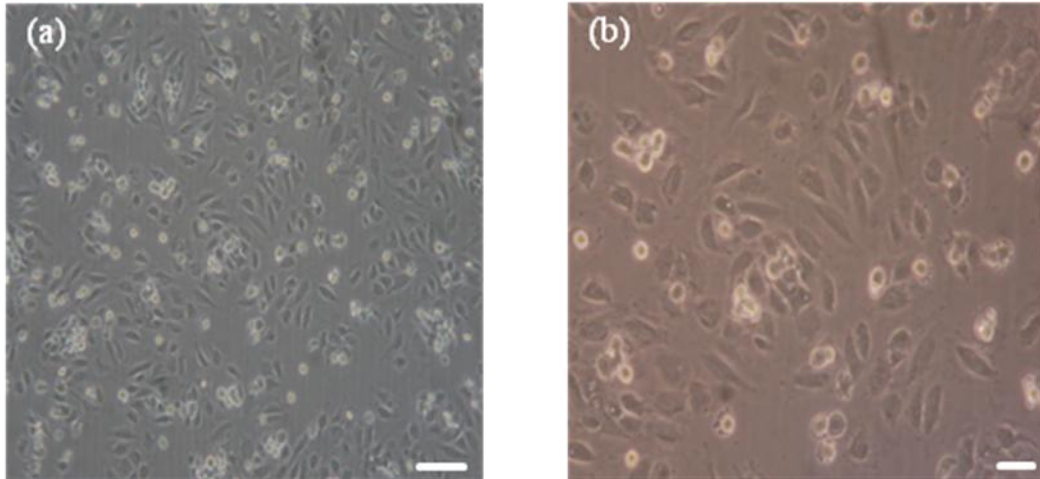
42 RGETCYRTVS GMDGMKCGPG LRCQPSNGED PFGE<sup>E</sup>FGICK DCPYGTFGMD CRETCNCQSG

102 ICDRGTGKCL KFPFFQYSVT KSSNR<sup>F</sup>VSLT EHDMA<sup>S</sup>GDGN IVREEVVKEN AAGSPVMRKW

162 LNPR

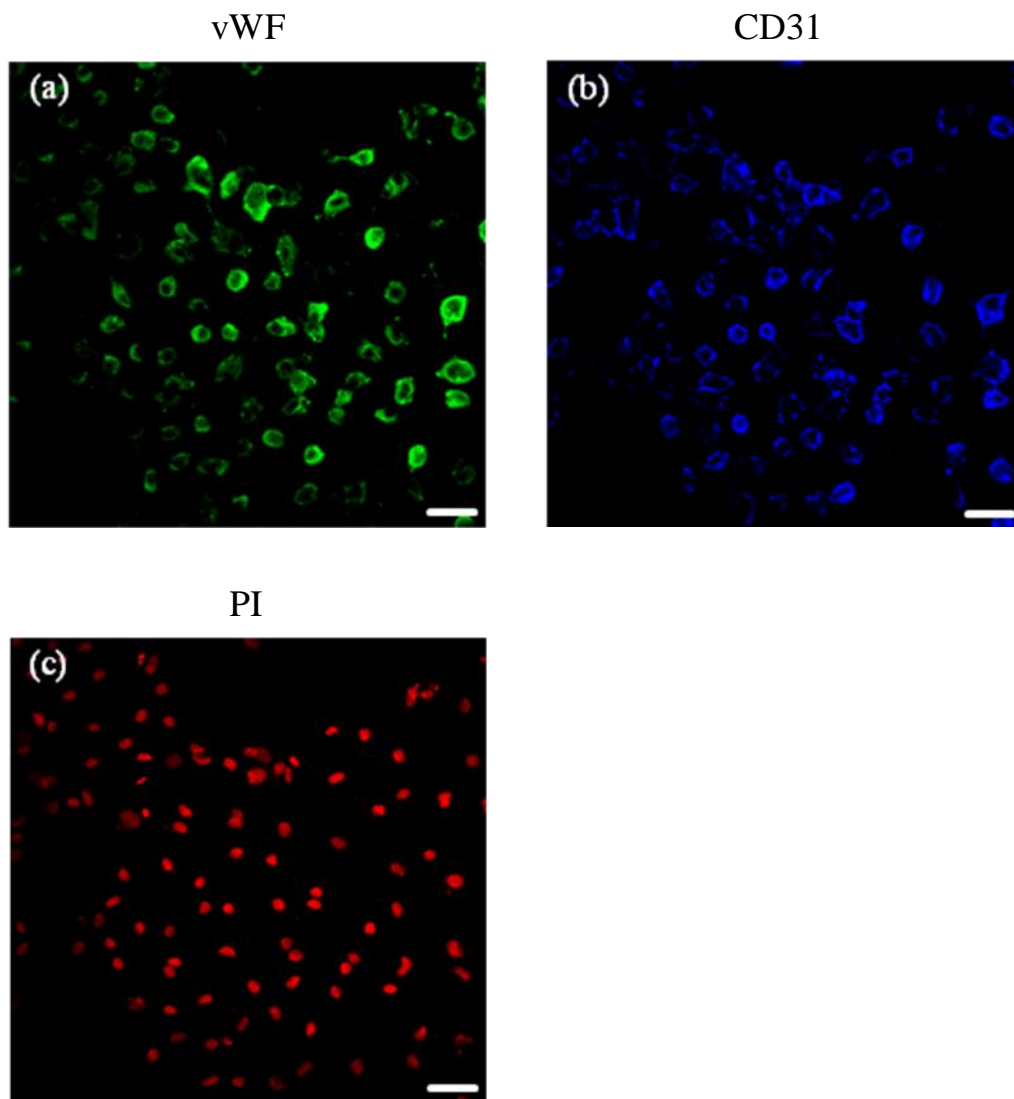
### 圖三、Endocan 的全部氨基酸序列

Endocan 的全部氨基酸序列是從殘基端-19 到 165，其中-19 到 0 的氨基酸位於疏水的 N 末端訊號肽。與半胱氨酸有關的類 EGF (epidermal growth factor) 基序用灰體字表示；絲氨酸 137，即硫酸皮膚素單鏈附著區，以下劃線表示；斜體字表示富含苯丙氨酸 (Phenylalanine, F) 區域。(Sarrazin et al., 2006)



#### 圖四、以倒立顯微鏡觀察細胞型態

將細胞種於小的圓形蓋玻片（12 mm round glass cover slip）上培養，在第二天時，以倒立顯微鏡觀察細胞型態。(a)在 200X 的倍率下觀察。游標尺為 50 $\mu$ m。(b)在 400X 的倍率下觀察。細胞扁平呈梭狀，並貼附於底層，為典型內皮細胞形態。游標尺為 20 $\mu$ m。



圖五、以內皮細胞特異性抗體做細胞免疫螢光染色

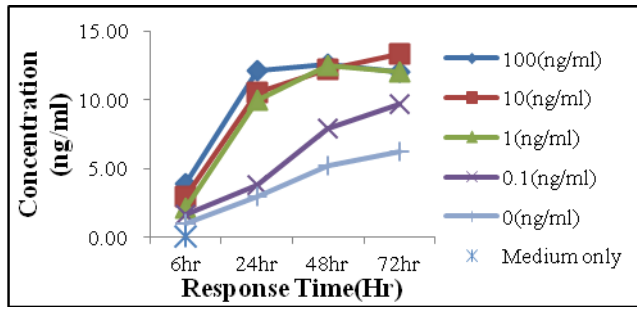
將細胞種於小的圓形蓋玻片（12 mm round glass cover slip）上培養，待細胞密度約達到 8 成即可進行實驗。(a)以 vWF 染色標記，大部分位於細胞質處。(b)以 CD31 染色標記，大部分位於細胞與相鄰細胞間隙交界處。(c) 以 PI 標記細胞核的位置。由此可看出，被 PI 所標識的部位為細胞核，在其周圍皆可明顯看到 CD31 和 vWF 的表達。游標尺為 50 $\mu$ m。

## 圖六、TNF- $\alpha$ 誘導的發炎內皮細胞會隨時間而增加 endocan 的分泌

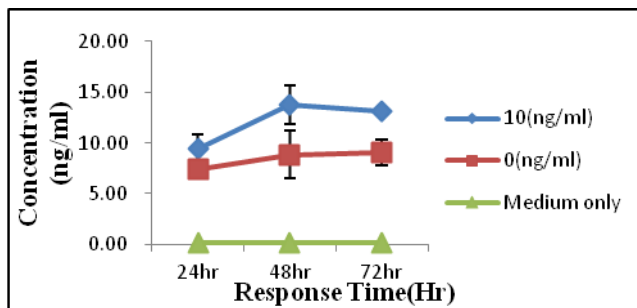
以含 2% 胎牛血清但不含內皮細胞生長補充劑之培養液 C 懸浮細胞，並稀釋細胞濃度至  $2 \times 10^5$ /ml，取 1ml 細胞種於 24 孔盤，細胞生長到密度約 8 成即可進行實驗。分別以含有不同濃度腫瘤壞死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$  0、0.1、1、10、100 ng/ml) 之新鮮培養液處理細胞，靜置於細胞培養箱培養，並分別於下列不同時間點 (2、6、12、24、48、72 小時) 分別收取細胞培養液，再以酵素免疫分析法偵測 endocan 表現。(a) 使用 TNF- $\alpha$  濃度為 0、0.1、1、10、100 ng/ml，並偵測 6、24、48、72 小時之 endocan 濃度：TNF- $\alpha$  濃度為 100 ng/ml 時，endocan 濃度由 6 小時的 3.90 ng/ml 隨時間增加至 72 小時的 12.01 ng/ml；TNF- $\alpha$  濃度為 10 ng/ml 時，endocan 濃度由 6 小時的 2.95 ng/ml 隨時間增加至 72 小時的 13.34 ng/ml；TNF- $\alpha$  濃度為 1 ng/ml 時，endocan 濃度由 6 小時的 2.17 ng/ml 隨時間增加至 72 小時的 12.02 ng/ml；TNF- $\alpha$  濃度為 0.1 ng/ml 時，前 24h 與不加 TNF- $\alpha$  的速率相似，24 小時後，endocan 的上升速度加快，濃度由 6 小時的 1.64 ng/ml 亦隨時間增加至 72 小時的 9.65 ng/ml；沒有經過 TNF- $\alpha$  處理的內皮細胞其 endocan 濃度也有增加，上升比較平緩，由 6 小時的 1.01 ng/ml 增加至 72 小時的 6.21 ng/ml，這次實驗由於每個組別只測試了一孔，無法求得平均值與標準差。(b) TNF- $\alpha$  濃度為 0、10 ng/ml，並偵測 24、48、

72 小時之 endocan 濃度：TNF- $\alpha$  濃度為 10 ng/ml 時，每個時間點測試 4 個孔，endocan 平均濃度由 24 小時的  $9.40 \pm 1.39$  ng/ml 增加至 72 小時的  $13.09 \pm 0.25$  ng/ml；另外 TNF- $\alpha$  濃度為 0 ng/ml 時，每個時間點各測試了 3 個孔，endocan 平均濃度由 24 小時的  $7.35 \pm 0.25$  ng/ml 增加至 72 小時的  $9.01 \pm 1.27$  ng/ml。(c) TNF- $\alpha$  濃度為 0 和 10 ng/ml，偵測時間點為 6、24、48、72 小時，每個時間點各 3 個 well：TNF- $\alpha$  濃度 10 ng/ml，endocan 平均濃度由 6 小時的  $1.15 \pm 0.09$  ng/ml 增加至 72 小時的  $9.46 \pm 1.21$  ng/ml；而 TNF- $\alpha$  濃度降為 0 ng/ml 時，endocan 平均濃度由 6 小時的  $0.43 \pm 0.04$  ng/ml 增加至 72 小時的  $2.42 \pm 0.28$  ng/ml。(d) TNF- $\alpha$  使用 0 和 1 ng/ml，收取 2、6、12 小時共 3 個時間點：TNF- $\alpha$  為 1 ng/ml 時，endocan 平均濃度由 2 小時的 0.80 ng/ml 增加至 12 小時的 3.59 ng/ml；無 TNF- $\alpha$  的組別，endocan 平均濃度由 2 小時的 0.53 ng/ml 增加至 12 小時的 1.95 ng/ml，由於每個時間點只檢測 2 個孔，無法求得標準差。

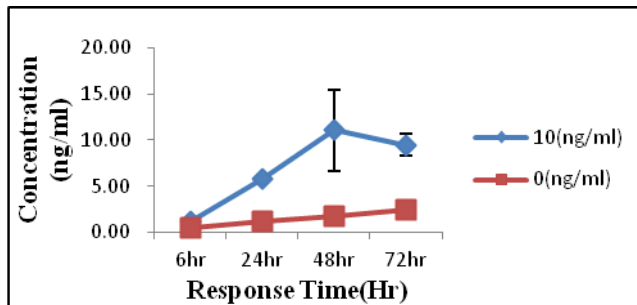
(a) Endocan 表現量實驗一



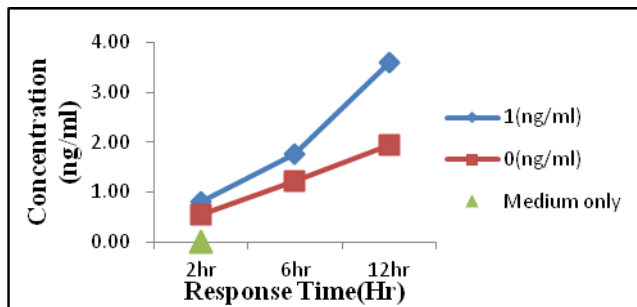
(b) Endocan 表現量實驗二



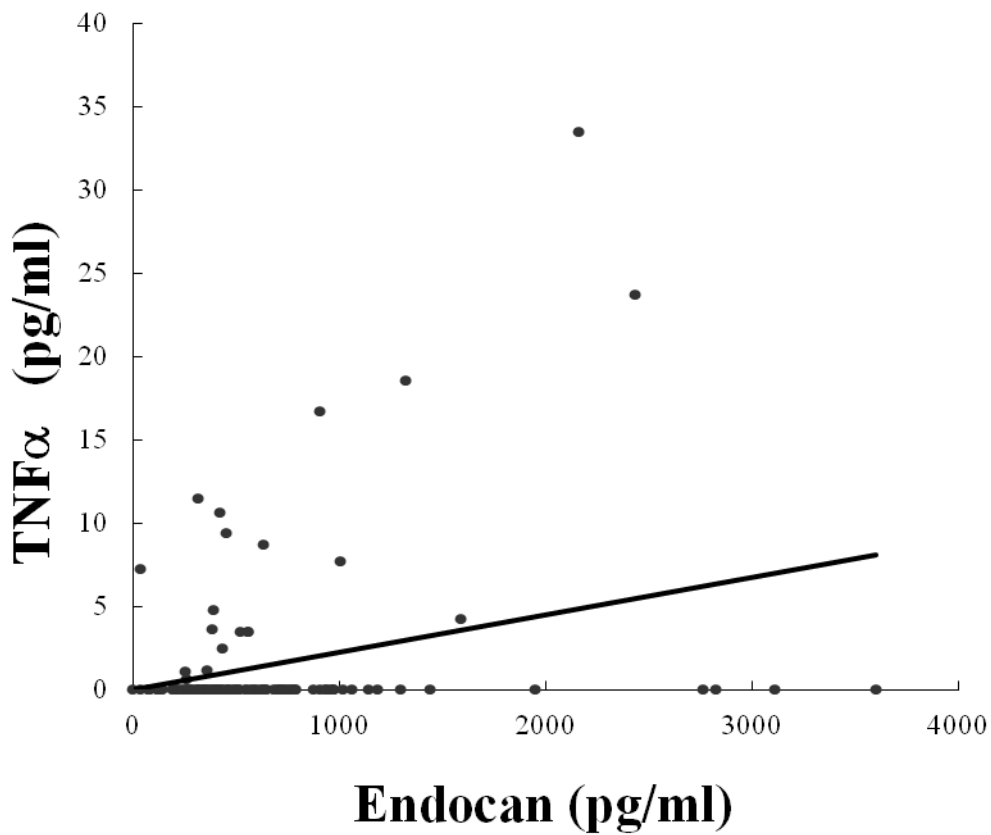
(c) Endocan 表現量實驗三



(d) Endocan 表現量實驗四

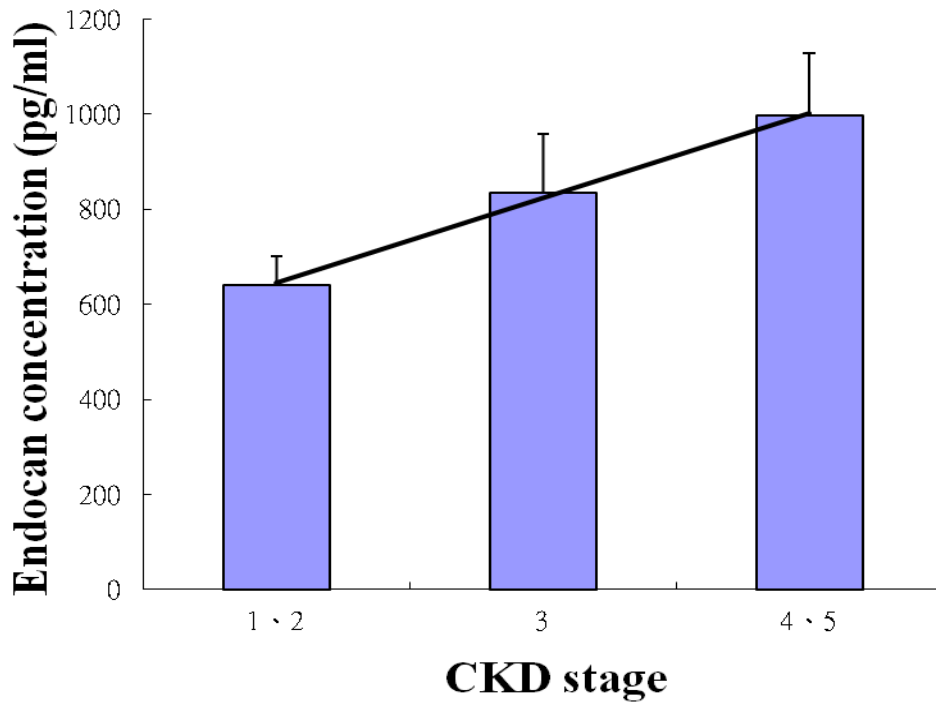






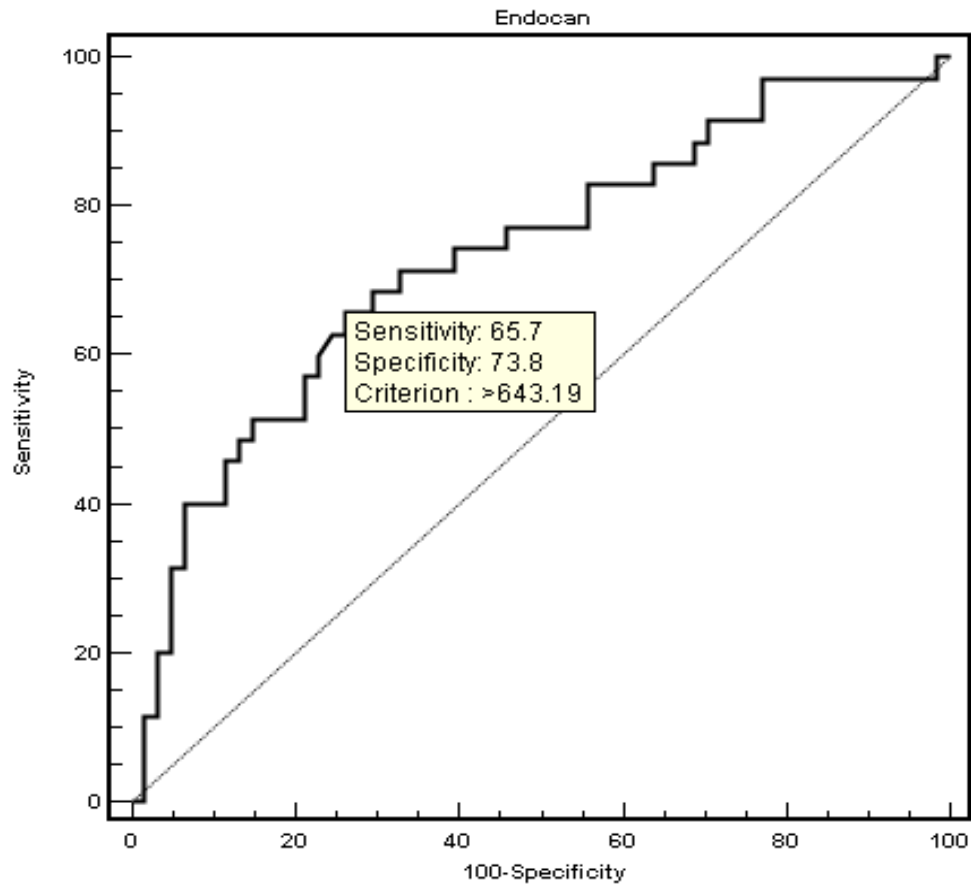
圖七、腎臟移植病患血清中 endocan 與 TNF $\alpha$  濃度之相關性

收案共 97 位接受過腎移植手術的受贈者，他們平均年齡為  $43.6 \pm 13.2$  歲，腎移植手術後平均追蹤時間為  $7.0 \pm 5.7$  年，當中男性比例為 55.7%，取得血清後以酵素免疫分析套組測量 endocan 和 TNF- $\alpha$  的濃度。經過 Pearson 相關性檢定，求得其相關係數絕對值為 0.286，顯示腎移植病患血清中 endocan 和 TNF- $\alpha$  兩濃度間具有正相關的關係，且具有統計上的顯著意義 ( $p = 0.002$ )。



**圖八、慢性腎臟病之分期越後期者血清 endocan 含量較高**

此 97 位接受過腎移植手術的收案人，在一次回診取得血清後以酵素免疫分析套組測量 endocan 濃度。同次回診也抽血由醫院測量其肌酸酐濃度，依照公式計算出其腎絲球過濾率，再根據腎絲球過濾率數值作慢性腎臟病（CKD）嚴重程度之分期。由於收案人大部份落於第三期，其他分期人數過少，採取合併方式，將第一、二期合併（共 48 人），第四、五期合併（共 5 人），加上第三期（44 人）共三組進行統計分析。由直條圖圖形結果來看，越後期的慢性腎臟病患，血清中具有較高的 endocan 含量，趨勢線向上（ $p = 0.077$ ）。



**圖九、利用接收者操作特徵(ROC)曲線設定 endocan 分界基準點**

藉由「接收者操作特徵曲線」的統計運算，訂定一個分界點，以此分界點來做區分陽性或者陰性的診斷依據。運算結果，設定以 endocan > 643.19 pg/ml 及 endocan ≤ 643.19 pg/ml 來區分移植腎功能惡化的可能性，其 AUC = 0.732，95% 置信區間為 0.632 - 0.818。