

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

大鼠腎小球支持細胞表現 fractalkine 之訊息傳遞機轉及其
病態生理角色之探討(2/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2314-B-002-335-

執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 年 12 月 31 日

執行單位：國立臺灣大學醫學院內科

計畫主持人：陳永銘

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 4 月 27 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

大鼠膈細胞表現 fractalkine 的訊息傳遞機轉和病態生理角色(2/2)

Signal transduction mechanisms and pathophysiologic roles of fractalkine expression by rat mesangial cells (2/2)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 91-2314-B-002-335

執行期間：91/08/01 ~ 92/12/31

計畫主持人：陳永銘

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：國 立 台 灣 大 學 醫 學 院 內 科

中 華 民 國 92 年 4 月 26 日

中文題目：大鼠膈細胞表現 fractalkine 的訊息傳遞機轉和病態生理角色 (2/2)

英文題目：Signal transduction mechanisms and pathophysiologic roles of fractalkine expression by rat mesangial cells (2/2)

計劃編號：NSC 91-2314-B-002-335

執行期限：91/08/01 ~ 92/12/31

主持人：陳永銘 主治醫師 (*e mail*: ymchen@ha.mc.ntu.edu.tw; *fax*: 2322-2955)

執行機關：國立台灣大學醫學院內科

中文摘要

背景：Fractalkine 可以促進腎小球疾病中單核球的侵潤和聚集。本研究探 fractalkine 在實驗型 anti-Thy1 腎小球腎炎的時序性表現，以及阻斷 fractalkine 系統對 anti-Thy1 腎小球腎炎的療效。

方法：大鼠 anti-Thy1 腎小球腎炎的誘發方式同吾人先前報告。實驗動物分成三大組，A 組接受每日 PBS 靜注治療 (days 1-5)，B 組接受每日 PBS 靜注治療 (days 1-2) 和商業用 polyclonal rabbit anti-rat fractalkine 抗體 (days 3-5)，C 組接受每日 polyclonal rabbit anti-rat fractalkine 抗體 (days 1-5)。動物在第五日殺死，分別觀察蛋白尿 (BioRad 方法)，腎小球硬化 (H&E 染色)，發炎細胞浸潤 (免疫組化染色)，以及腎小球基質蛋白的基因表現程度 (北方和西方墨點染色)。腎小球內 fractalkine mRNA 以北方墨點染色檢查，尿液和腎小球內的 fractalkine 蛋白則以西方墨點染色偵測。

結果：A 組大鼠在第五天呈顯著蛋白尿排泄，同時可見明顯的腎小球硬化，發炎細胞浸潤，以及腎小球基質蛋白 (type 1 and 3 collagen 和 fibronectin) 的基因表現。此外，A 組大鼠在第三至五天可觀察到腎小球內有 fractalkine 的基因和蛋白表現增加，且尿液中亦有游離型 fractalkine 的排泄。然而，無論是 B 或 C 組動物，施打商業用 anti-fractalkine 抗體後並不能減輕腎炎大鼠之蛋白尿排泄、腎小球硬化、發炎細胞浸潤、或基質蛋白的基因表現。

結論：使用商業用 polyclonal rabbit anti-rat fractalkine 抗體並不能減緩大鼠 anti-Thy1 腎小球腎炎的嚴重度。

英文摘要

Background. Fractalkine is a CX₃C chemokine for mononuclear cells that has been implicated in the recruitment and accumulation of monocytes seen in glomerular diseases. This study investigated the sequential expression of fractalkine in rat anti-Thy1 nephritis, and the effect of fractalkine blockade on the severity of anti-Thy1 nephritis.

Methods. Rat anti-Thy1 glomerulonephritis was induced as described previously. Group A rats received monoclonal anti-Thy1 antibodies and daily 1X PBS injection; group B rats received monoclonal anti-Thy1 antibodies and daily 1X PBS injection (days 1-2) and rabbit anti-rat fractalkine injection (days 3-5); group C rats received monoclonal anti-Thy1 antibodies and daily rabbit anti-rat fractalkine injection (days 1-5). Fractalkine mRNA and protein were analyzed by Northern and Western blotting. Renal histomorphology was examined by H&E staining, glomerular macrophage and T cell infiltration were studied by immunohistochemical staining.

Results. Group A rats showed an appreciable increase in urinary protein excretion, glomerulosclerosis, and matrix gene expression at days 5 of the nephritis, when compared with normal control rats. In addition, the nephritic rats showed an increase in glomerular fractalkine gene expression during days 1 to 5 of the disease. A parallel increase in glomerular fractalkine protein expression was also seen during days 3 to 5. Urinary fractalkine excretion could be seen during days 3 to 5 of the nephritis. The administration of rabbit anti-rat fractalkine antibodies, whether between days 3 and 5 (group B), or during days 1 and 5 (group C), did not affect the severity of the nephritis. **Conclusion.** The present data shows that fractalkine is upregulated during the course of anti-Thy1 nephritis. However, blocking fractalkine activity with a commercially-available polyclonal antibody did not ameliorate the severity of the disease.

計劃緣由

近來在血管內皮細胞上所發現的 CX₃C 趨化激素— fractalkine，兼具黏附和趨化作用，其標的細胞是具有 fractalkine 受體的單核球和 T 淋巴球 [1]。Feng 等人發現腎小球內皮細胞在實驗型新月狀腎炎模式誘發後可表現 fractalkine，給與 anti-fractalkine 受體 antibody 可顯著減少新月體形成，降低蛋白尿，並改善腎功能 [2]。我們發現除了內皮細胞之外，腎小球支持細胞 (mesangial cell, 簡稱 MC) 在發炎激素或生長因子刺激下，也會產生 fractalkine [3]，然而腎小球支持細胞衍生的 fractalkine 是否與內皮細胞製造的 fractalkine 具有同樣的功能，目前並不清楚。因此我們擬於體外和體內分別檢視腎小球支持細胞衍生的 fractalkine 是否也具有趨化作用。體外實驗主要以腎小球支持細胞的 cultured conditioned media，利用 TransWell 培養皿進行 chemotaxis assay，J774.A1 單核球細胞株將被檢視是否具有 fractalkine 受體 (CX₃CR1)，若有，將被用來當做標的細胞，而 neutralizing anti-fractalkine 多株抗體 (購自 R&D Systems) 將用來證明本 assay 中 fractalkine 的生物特定性。除此之外，我們也將探討 fractalkine 是否具有刺激單核球產生 CC 趨化激素 (如 MCP-1, RANTES) 的能力；體內實驗則在大鼠 anti-Thy1 疾病進行，這是一種急性腎小球支持細胞增生型腎炎模式，大約從誘發後第三天起，腎小球內逐漸出現腎小球支持細胞增生和細胞外基質沈積的現象 [4]。為了檢驗腎小球支持細胞所衍生的 fractalkine 在體內吸引單核白血球的能力，我們擬在 anti-Thy1 腎炎誘發之後不同時間投與 neutralizing anti-rat fractalkine 多株抗體 (因需要量大，除了使用 R&D Systems 公司的商業用抗體外，也將嘗試自行製造)，為了能夠區分是阻斷內皮細胞，或是腎小球支持細胞所產生的 fractalkine，實驗動物將分成五組，第一組是正常對照組；第二組是未施打抗體之腎炎組；第三組是於腎炎誘發同時開始給與 neutralizing anti-fractalkine 抗體 (每日一次共兩天)，主要阻斷內皮細胞所產生的 fractalkine；第四組是於腎炎誘發後第三至第五天給與 neutralizing anti-fractalkine 抗體 (每日一次共三天)，主要阻斷腎小球支持細胞所產生的 fractalkine；第五組則是於腎炎誘發後連給五天 neutralizing anti-fractalkine 抗體 (每日一次共五天)，阻斷包括內皮細胞和腎小球支持細胞產生的 fractalkine。這些實驗動物在腎炎誘發後滿五天被殺死，然後比較各組之間腎小球內單核白血球數目和蛋白尿嚴重度，以判斷腎小球支持細胞所產生的 fractalkine 所可能扮演的病態生理角色。

目的

探討 fractalkine 在實驗型 anti-Thy1 腎小球腎炎的時序性表現以及其所扮演的病態生理角色。

結果

A 組腎炎大鼠 (僅接受每日 PBS 靜注治療) 在第五天呈顯著蛋白尿排泄 (102.4 ± 20.1 (mean \pm standard error of mean) mg/day; 正常鼠每日尿蛋白排泄量為 5.7 ± 0.9 mg/day, $P < 0.01$), 同時可見明顯的腎小球硬化, 發炎細胞浸潤, 以及腎小球 type 1 and 3 collagen ($\alpha 1$) 和 fibronectin 的 mRNA 表現。除此此外, A 組大鼠在第三至五天可觀察到腎小球內有 fractalkine 的 mRNA 和固定型蛋白表現增加, 且尿液中亦有游離型 fractalkine 的排泄。然而, 無論是 B (days 1-2, 每日靜注 PBS, days 3-5 每日靜注 anti-fractalkine 抗體) 或 C (days 1-5, 每日靜注 anti-fractalkine 抗體) 組動物, 施打商業用 anti-fractalkine 抗體 (up to 100 μ g/day) 後並不能減輕腎炎大鼠之蛋白尿排泄 (第五天, B 組大鼠 (107.2 ± 40.1 mg/day; C 組大鼠 103.5 ± 9.9 mg/day)、腎小球硬化比例、發炎細胞浸潤程度、或基質蛋白的基因表現。

計劃成果自評

1. 我們發現 fractalkine 在 anti-Thy1 腎小球腎炎模式中表現增加, 可能與腎小球內單核球浸潤有關 (這部份結果發表在 Chen Y-M, Hu-Tsai M-I, Lin S-L, Tsai T-J, Hsieh B-S: Expression of CX3CL1/fractalkine by mesangial cells *in vitro* and in acute anti-Thy1 glomerulonephritis in rats. *Nephrol Dial Transplant* 18:2505-2514, 2003).
2. 本研究顯示商業用 rabbit anti-rat fractalkine 抗體無法改善 anti-Thy1 腎小球腎炎嚴重度。吾人認為這主要與所使用的抗體效價或濃度太低有關, 做 *in vitro* study 可能還好 [3], *in vivo* 就沒辦法 (太貴, 無法用高量)。我們雖也曾嘗試以 *E. coli*-based expression system 去合成 recombinant fractalkine, 希望能夠當成足以產生抗體的抗原, 但做了很久都無法成功, 或許應該嘗試其它 expression system。
3. 我們認為這些結果並不能完全否定 fractalkine 在腎小球腎炎致病過程中可能扮演的致病角色。Feng 等人曾報告 fractalkine system 在 crescentic GN 確有致病角色 [2], 而在動物蛋白質負荷過度模式中使用阻斷 fractalkine 抗體也可以降低腎間質單核球浸潤程度 [5]。此外, fractalkine 或其受器在若干人類腎臟疾病, 包括血管炎、急性移植腎排斥、以及各種腎小球腎炎, 也被報告有表現增加的現象 [6, 7]。因此, 我們未來可能朝自行合成抗體, 或是改用其他動物 (如 mouse) 或疾病 (如糖尿病) 模式, 來進一步檢視 fractalkine system 在腎臟疾病所扮演的病態生理角色。

參考文獻

1. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Ross D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ: A new class of membrane-bound chemokine with a CX₃C motif. *Nature* 385:640-644, 1997.

2. Feng L, Chen S, Garcia GE, Xia Y, Siani MA, Botti P, Wilson CB, Harrison JK, Bacon KB: Prevention of crescentic glomerulonephritis by immunoneutralization of the fractalkine receptor CX₃R1. *Kidney Int* 56:612-620, 1999.
3. Chen Y-M, Lin S-L, Chen C-W, Chiang W-C, Tsai T-J, Hsieh B-S: Tumor necrosis factor- α stimulates fractalkine production by mesangial cells and regulates monocyte transmigration: Down-regulation by cAMP. *Kidney Int* 63:474-486, 2003.
4. Chen Y-M, Chien C-T, Hu-Tsai M-I, Wu K-D, Tsai C-C, Wu M-S, Tsai T-J : Pentoxifylline attenuates experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 56: 932-943, 1999.
5. Donadelli R, Zanchi C, Morigi M, et al: Protein overload induces fractalkine upregulation in proximal tubular cells through nuclear factor kB- and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathways. *J Am Soc Nephrol* 14:2426-2446, 2003.
6. Cockwell P, Chakravorty SJ, Girdlestone J, Savage CO: Fractalkine expression in human renal inflammation. *J Pathol* 196:85-90, 2002.
7. Segerer S, Hughes E, Hudkins KL, et al: Expression of the fractalkine receptor (CX₃CR1) in human kidney diseases. *Kidney Int* 62:488-495, 2002.