

出國報告(出國類別：進修)

腎臟移植與缺血再灌流損傷
-華盛頓特區國家兒童醫學中心

服務機關：國立成功大學醫學院附設醫院

姓名職稱：張勝勛 主治醫師

派赴國家：美國

出國期間：104 年 12 月 3 日至 106 年 1 月 21 日

報告日期：106 年 3 月 20 日

摘要

腎臟移植是目前對末期腎衰竭最根本的治療方式，成功的腎移植卻可以使受腎者的腎功能恢復到似乎正常人一般。但是腎臟移植過程中存在一無法避免的缺血期(cold and warm ischemic time) ，缺血再灌流損傷(Ischemia-reperfusion injury)是影響移植腎早期功能的主要因素，不僅和移植腎功能延遲恢復(delayed graft function, DGF)有關，還能通過影響免疫機制促進急性排斥(acute rejection)發生。其對移植腎長期功能存活也存在影響，因此如何減輕對移植腎的缺血再灌流損傷，以改善移植腎功能，是許多人努力的方向。腎缺血再灌流損傷的病理機制相當複雜，造成腎臟缺血再灌流損傷相關因素很多，其中氧自由基過氧化損傷、凋亡、炎症介質的產生和免疫學反應皆有貢獻。

此次 2015 年 12 月至 2017 年 1 月期間，職於美國華盛頓特區(Washington D.C.)的國家兒童醫學中心 (Children's National Medical Center,CNMC) 在 Michael Hsieh 教授與其主持的 Biomedical Research Institute 團隊指導下，學習一些有關免疫與發炎實驗，發展腎缺血再灌流損傷的小鼠動物模型。

除了個人學習到有關免疫與發炎實驗技術外，獲得許多移植領域醫療新知與照護經驗，更重要的是建立一腎缺血再灌流損傷的小鼠動物模型。經過此次進修參訪後，期待回國後能將所學與成大醫院相關領域專家分享，有效整合院內資源，提升術後移植照護品質，與基礎老師們合作並進一步進行移植免疫相關研究。

目次

(一)目的	1
(二)過程	2
(三)心得	4
(四)建議事項.....	13

(一)目的

成功大學附設醫院自 79 年 9 月完成首例活體腎臟移植，80 年 3 月完成首例屍腎移植以來，迄今共完成超過數百例的腎臟移植手術，門診追蹤之移植患者 400 餘人。在 95 年 2 月也順利完成南部首例血型不相容腎移植，目前也是財團法人器官捐贈移植登錄中心 (OPO) 規劃的專責醫院。

職為成大醫院腎臟移植醫師，奉准於 2015 年 12 月 9 日至 2017 年 1 月 20 日赴美於華盛頓特區(Washington D.C.)的國家兒童醫學中心 (Children's National Medical Center, CNMC)進修，在 Michael Hsieh 教授與其主持的 Biomedical Research Institute 團隊指導下，學習移植免疫相關發炎及感染實驗，隨著分子生物技術日新月異，希望藉由動物實驗更加的了解有關如何減輕缺血再灌流損傷(IRI)對移植腎功能的影響，降低延遲腎功能恢復(delayed graft function)機會，改善移植腎長期存活率。除了在實驗室學習，也撥空在華盛頓特區(Washington D.C.)內其他移植醫學中心如喬治華盛頓大學醫院(The George Washington University Hospital)和喬治城大學醫學中心 (Georgetown University Medical Center)，參加臨床討論會及外賓演講，學習移植醫師應具備的醫療照護及新知，期望回台後能將所學應用，提升本院整體移植照護品質，加強醫學研究，進而嘉惠更多病人。

(二)過程

國家兒童醫學中心（Children's National Medical Center, CNMC）是美國華盛頓特區是華盛頓特區唯一一所兒童醫院，並一直被列為美國的頂級兒科醫院。包含兒童研究所和兒科外科創新研究所，是美國國家衛生研究院(NIH)資助的最大的兒科機構之一，也是喬治華盛頓大學醫學院(The George Washington University, GWU)的教學醫院。

Michael Hsieh 教授主持的實驗室成員眾多，主要在 Biomedical Research Institute 進行研究。我參與其中一個重要的課題是有關 IPSE (Interleukin-4-inducing principle from schistosoma eggs)的應用。IPSE 是一種分泌糖蛋白，可通過 IgE 依賴性但非抗原特異性機制激活嗜鹼性粒細胞。缺血再灌注損傷(I-R injury)是影響移植腎早期功能的主要因素，不僅引起單純的移植腎功能延遲恢復(delayed graft function)，還通過影響免疫機制促進急性排斥發生。建立一小鼠腎缺血再灌流損傷模型，得知一些基因表現變化，希望進一步檢視 recombinant IPSE / alpha-1 (Interleukin-4-inducing principle from schistosoma eggs) 對腎臟缺血再灌流損傷(I-R injury)的影響。

另一個實驗是以一個小鼠模型証實有關 Granulin 對傷口癒合的影響。(Elucidating the influence of Granulin during wound healing—in a novel mouse model)。

Granulin 蛋白可以作為細胞生長刺激劑作用，在傷口癒合和腫瘤發生有些影響。首先設計將 Granulin coating 在 4-0 的 Vicryl 縫線上，用 ELISA 方式證實其含

量，再將縫線縫合小鼠皮膚傷口，再取下傷口皮膚做基因表現分析。

THE
BLADDER IMMUNOLOGY
GROUP (BIG)
THINK BIG!

You are here: [Home](#) / [People](#)

HOME
RESEARCH
PUBLICATIONS
PEOPLE
OPPORTUNITIES
LINKS

People

Lab Members

Michael Hsieh, M.D., Ph.D.
Principal Investigator

Medicine + Health
a biannual magazine of

圖：指導教授 Michael Hsieh 及其主持的實驗室

Lab Members

圖：左排第四位是我，實驗室團隊成員包括 Research scientist、Postdoc、

Bioinformatician、Fellow、PH D. student、Master student、Medical student、Student

Intern。



圖：執行小鼠動物實驗所用設備及器械

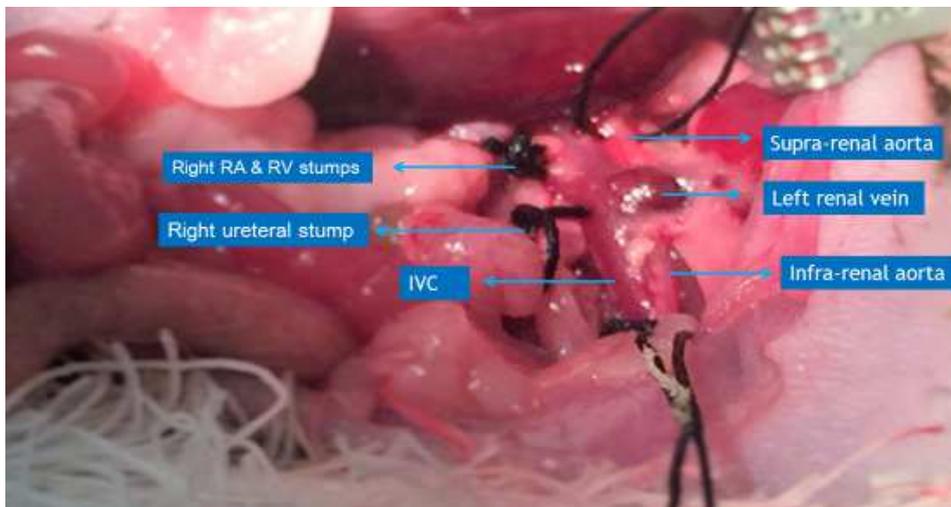
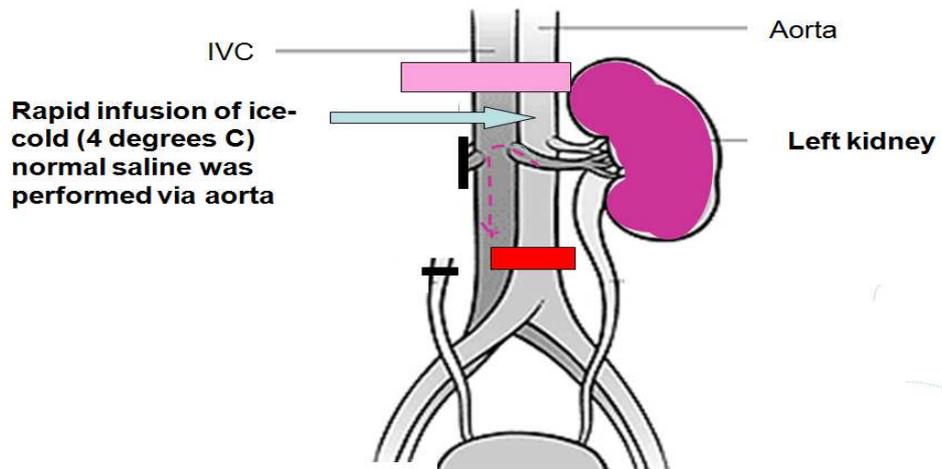
(三)心得

以下就這次進修所學與心得感想分類作詳細敘述

1. Renal ischemia/reperfusion injury model

模擬腎臟移植缺血再灌流損傷小鼠動物模型的建立:

摘除右腎後，分離出腎上主動脈及腎下主動脈，用 4-O silk 暫時阻斷血流。接著經由主動脈注射生理食鹽水將左腎內的血趕出至下腔靜脈後，將腎動靜脈暫時阻斷，進入缺血期。先鬆開主動脈上 silk，25 分鐘再後鬆開腎動靜脈 silk，進入再灌流期。(如下圖示)



圖：用顯微外科技術右腎切除後，游離腎臟上、下主動脈、下腔靜脈。



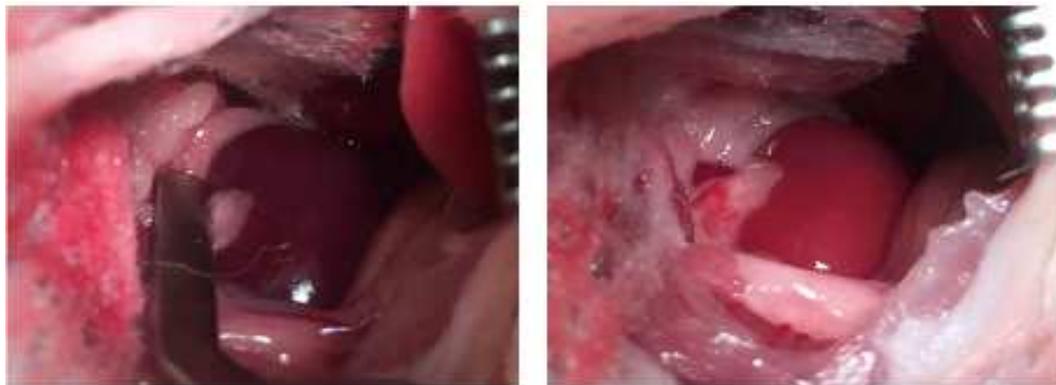
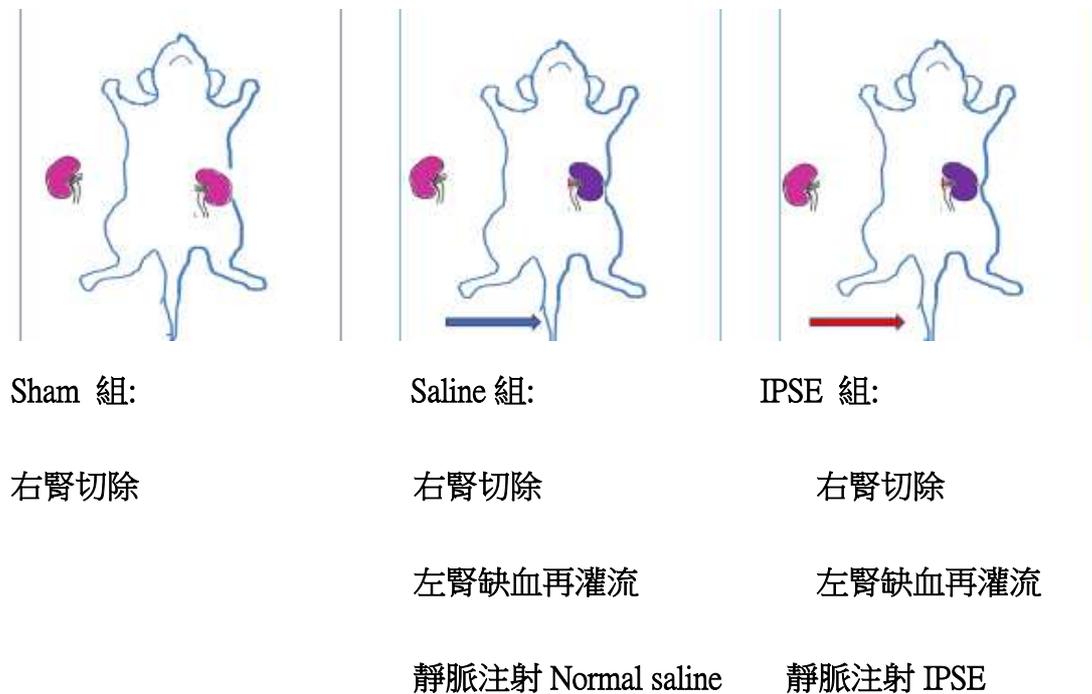
圖：腎臟缺血期，右為再灌流期

2. 簡化後動物模型及實驗設計:

選用 BALB/c mice (male, 8 週大), 正中剖腹後用微血管夾阻斷左腎血流, 在缺血期(25 分鐘)摘除右腎。恢復左腎血流後, 縫合傷口。實驗小鼠分三組實驗:

Sham組、 Saline組、 IPSE組。Sham組: 動物進行相同的外科手術(右腎切除術+左腎門探查), 無血管阻塞步驟。Saline組: 在缺血期之前一天, 從尾靜脈注射生理鹽水200uL。IPSE組: 在缺血期之前一天, 從尾靜脈注射H-IPSE (25ug, 1.65nM溶於生理鹽水200uL中)。在再灌流24小時後抽血並取出腎臟作分析。

圖：模擬腎臟移植缺血再灌流損傷



圖：用無創血管夾阻斷左腎血流，再鬆開恢復血流。

3.Rationale(理論基礎):

缺血再灌流是腎移植的必經歷程。促發炎細胞因子增加腎缺血再灌流損傷後炎症反應。腎缺血再灌流損傷是在腎血流量恢復過程中引起的，這種損傷導致大量線粒體活性氧的釋放，鈣超載和炎性細胞因子的釋放導致細胞凋亡和壞死，隨後造成腎臟損害。因此，抑制發炎可能具有治療潛力。

缺血再灌注損傷的臨床意義：

屍體腎移植後的延遲移植功能恢復是繼發於慢性排斥的隨後移植物衰竭的獨立危險因素，通過減弱缺血再灌流損傷，可能增加marginal donor的使用，耐受較長的冷缺血時間。曼氏血吸蟲分泌具有抗炎活性的趨化因子結合蛋白，純化的重組IPSE結合蛋白在幾種疾病模型可抑制發炎。IL-4，一種抗炎細胞因子，可減少小鼠中的TNF- α ，IL-1 β ，iNOS和COX-2的表達。然而，IL-4不能被動物所耐受。重組IPSE / α -1已經證明在靜脈注射的數小時內誘導肝嗜鹼性細胞產生IL-4。

4.Hypothesis (假設)

IPSE ameliorates renal ischemic-reperfusion injury via anti-inflammatory effects (重組IPSE 的治療可藉由減弱炎症介質的增加，進而改善腎缺血再灌流損傷)

5. Assessment (評鑑)

(1)Renal function(腎功能，尿素氮 肌酸酐 BUN Creatinine)

(2)Renal histology, acute tubular injury score(腎臟組織切片，急性腎小管損傷評分)

(3)Gene expression of chemokine/cytokine in IR injury kidneys(腎組織前發炎性/發炎反應細胞激素/趨化激素的基因表現):

RNA purification, cDNA synthesis, and Real-time reverse transcription – polymerase chain reaction (RNA 純化，cDNA 合成和即時逆轉錄聚合酶鏈反應):

利用缺血再灌流後腎臟(mRNA in the post ischemic-reperfusion kidney)

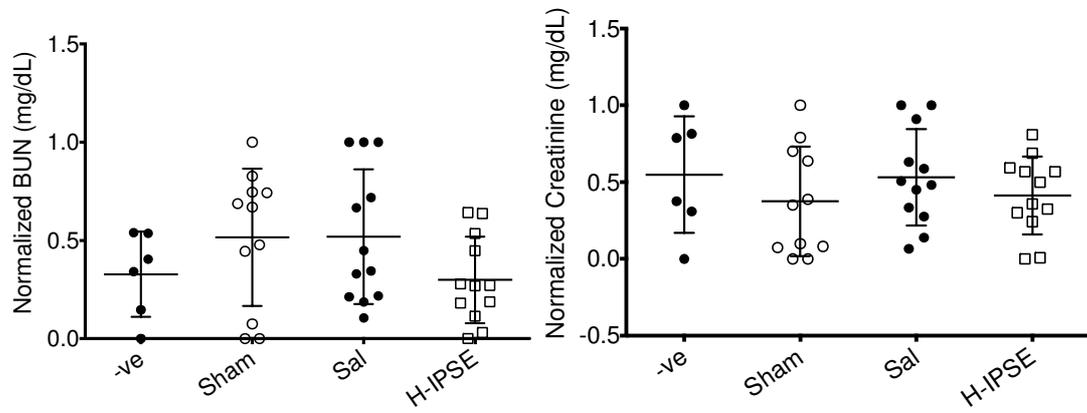
Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed to assess the expression of chemokine/cytokine. (即時逆轉錄聚合酶鏈反應評估前發炎性/發炎反應細胞激素/趨化激素的基因表現):

The PCR primer(聚合酶鏈鎖反應引子) sets used for COX-2,CXCL8, IL-1 β , TNF- α , CXCL1,CCL2,CCL3,CCR1,CCR2,CCL5,NF κ B,iNOS

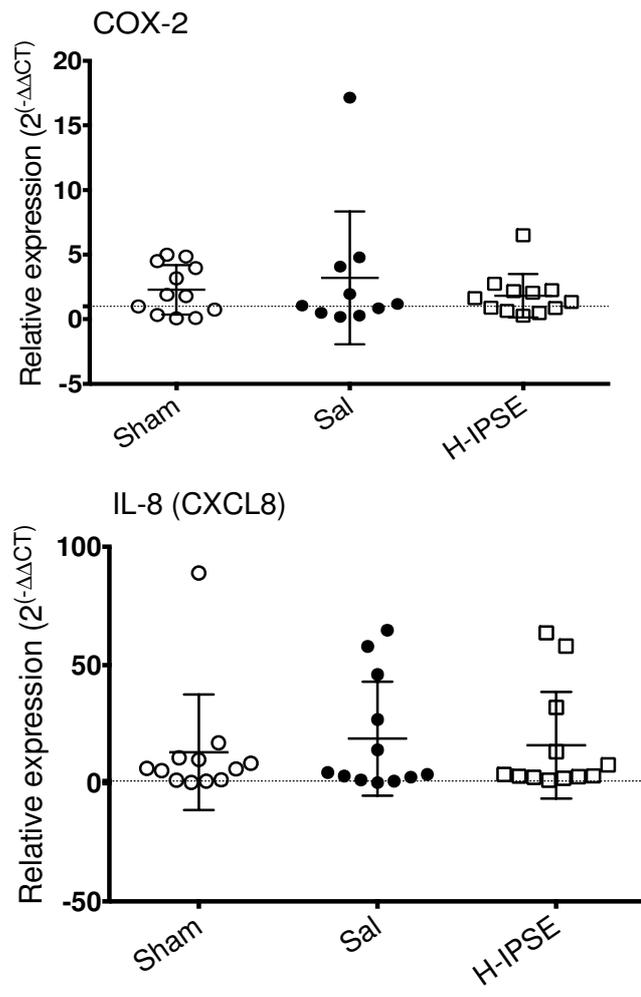
(4)Effect on renal neutrophil accumulation, renal myeloperoxidase (MPO) content(骨髓過氧化酶的含量)

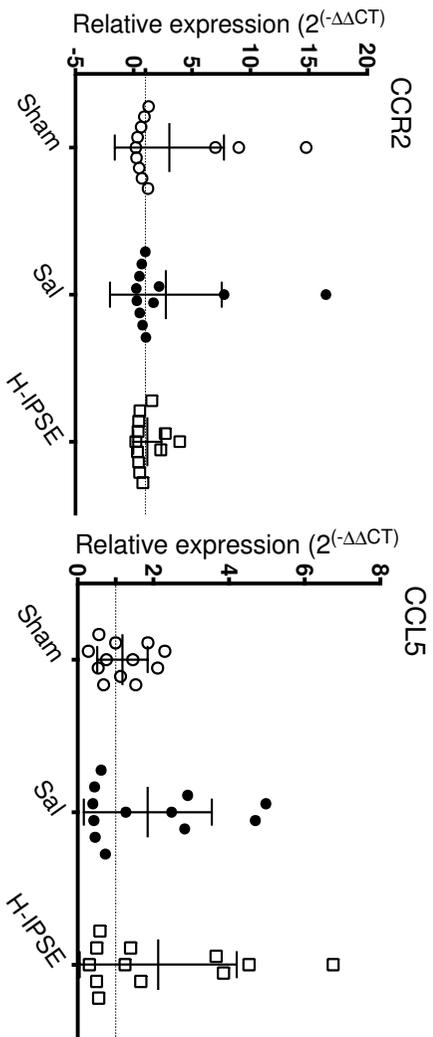
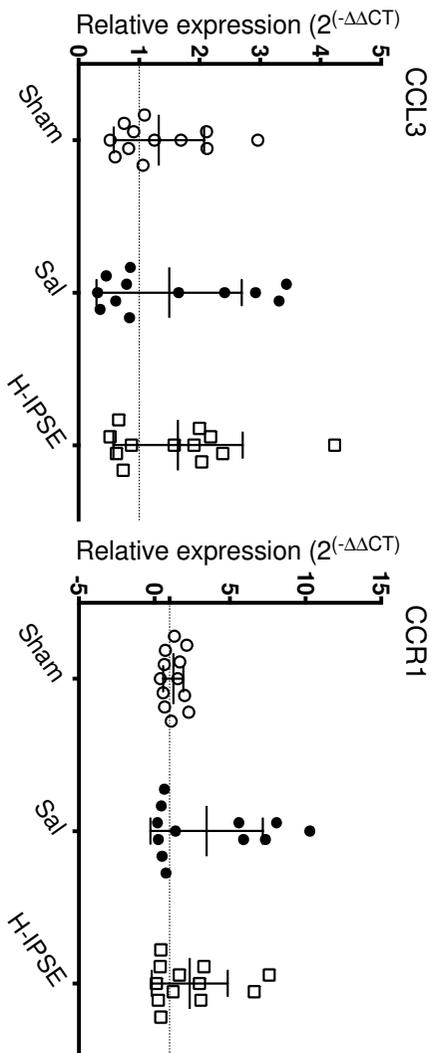
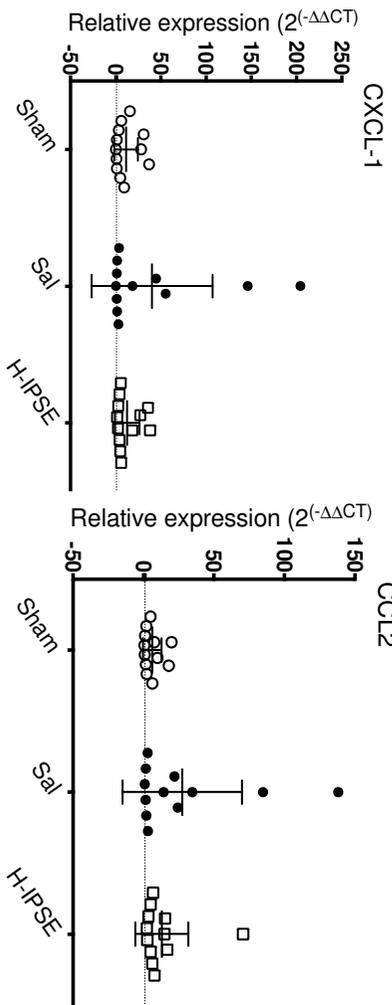
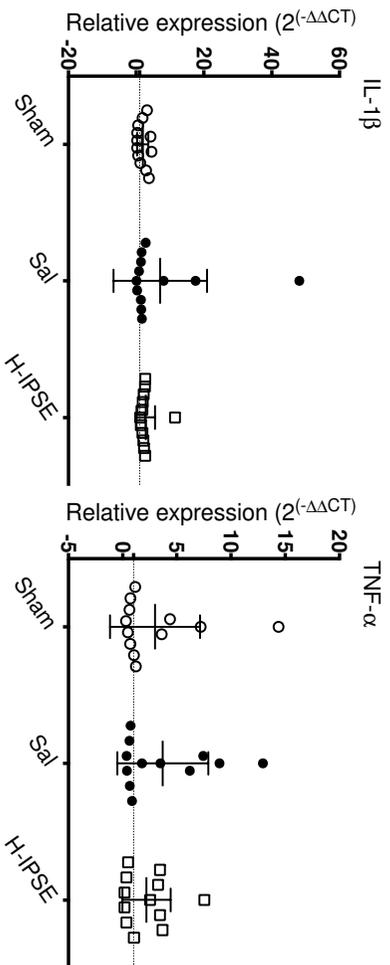
(5)Apoptosis of tubular cells(腎小管細胞凋亡)

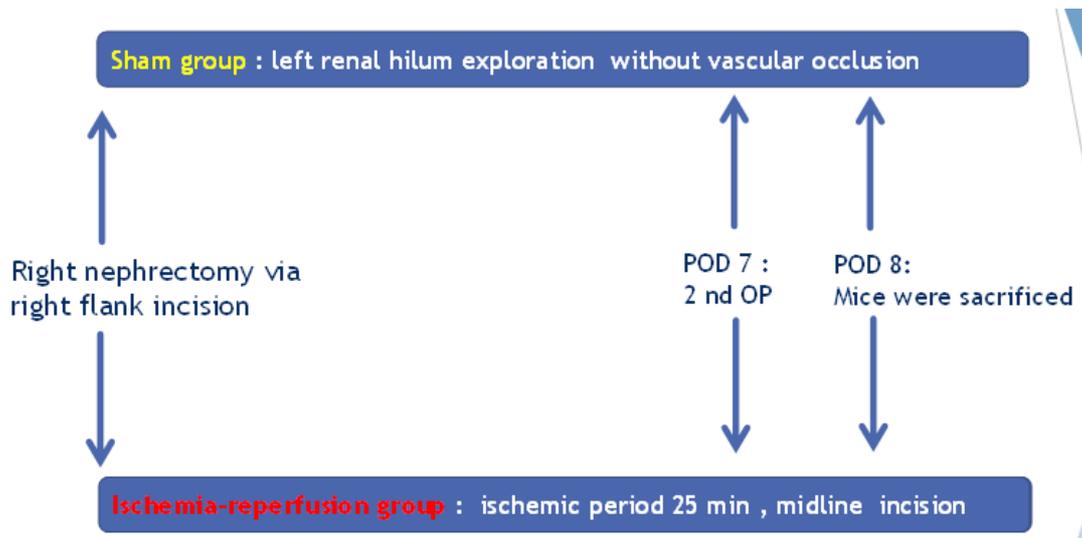
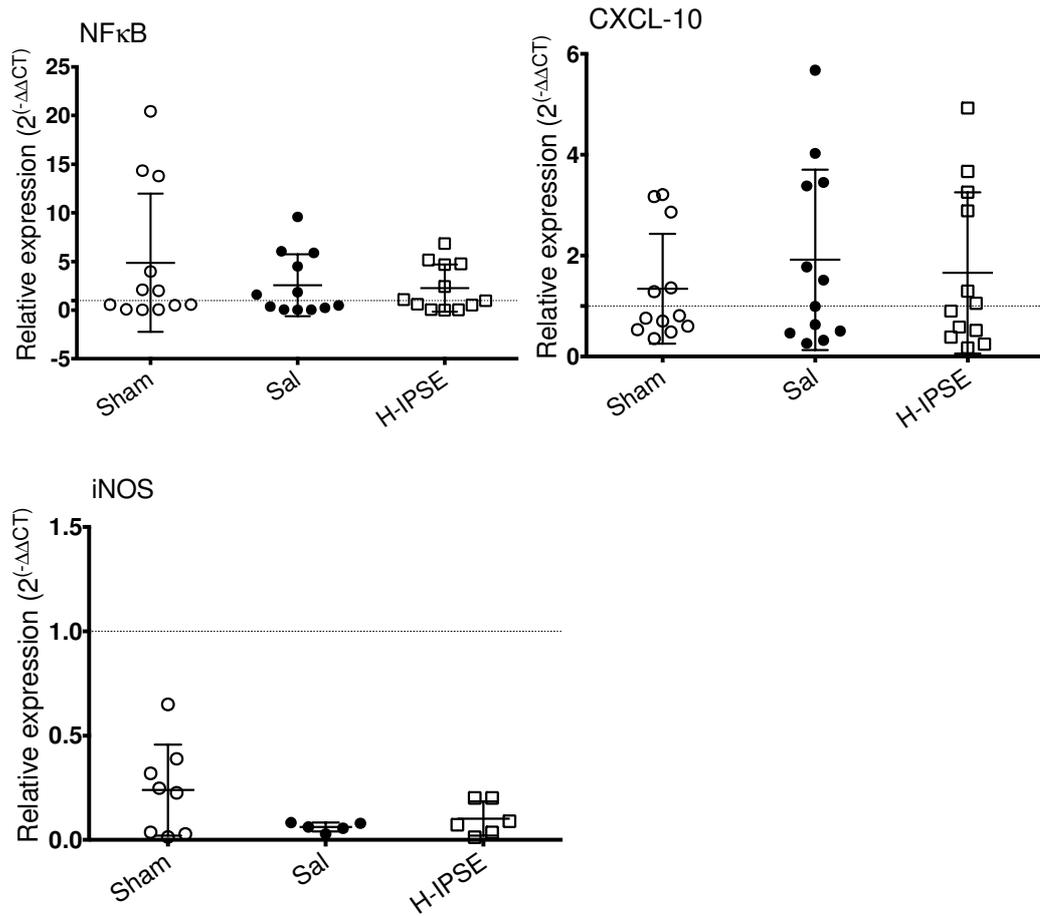
下圖：不同組別的腎功能



下圖：缺血再灌流後不同組別的腎臟細胞激素/趨化激素的基因表現



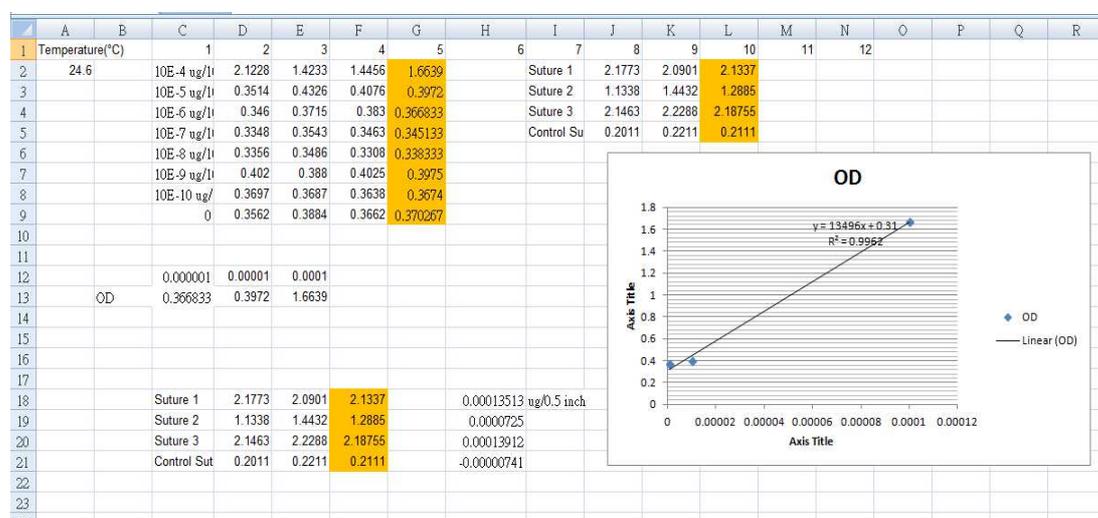




排除右腎切除對發炎反應影響，可改為兩階段手術。先經由右腰部傷口切除右腎，7天後再執行左腎的缺血再灌流手術。

Elucidating the influence of Granulin during wound healing—in a novel mouse model(闡明 Granulin 在傷口癒合過程中的影響 - 在一個新的小鼠模型)

選用 BALB/c mice (male, 8 週大)，實驗小鼠分四組實驗。腹部切開傷口(如下圖)，用 coating 上 Granulin 的縫線，以連續縫合方法縫合傷口。術後兩天後切下傷口皮膚，分析基因表現。



Confirmation of Granulin on coated Vicryl suture (ELISA)

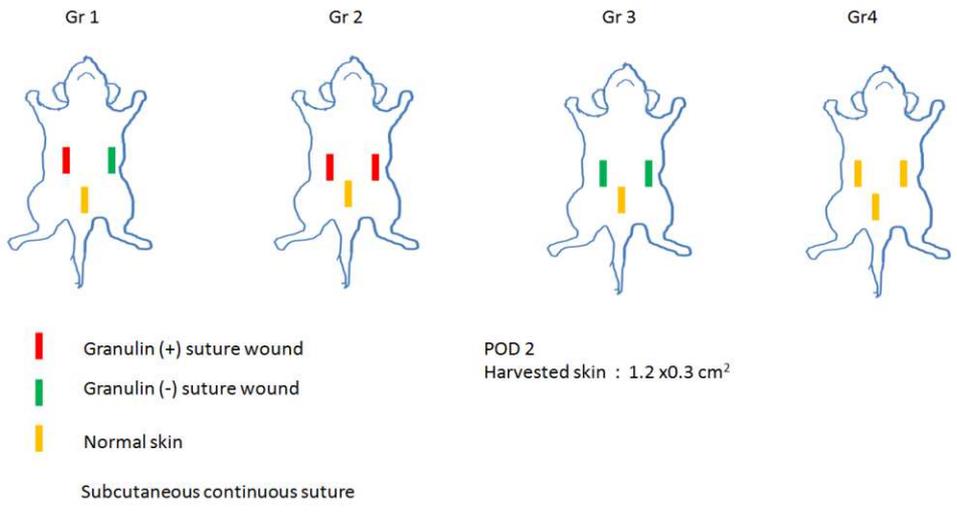
150 ul Granulin in 3 ml coupling buffer

- OD ug granulin/ 0.5 inch
- Suture 1 0.29345 6.75x10E-6
- Suture 2 0.37295 1.55x10E-5
- Control 0.16595

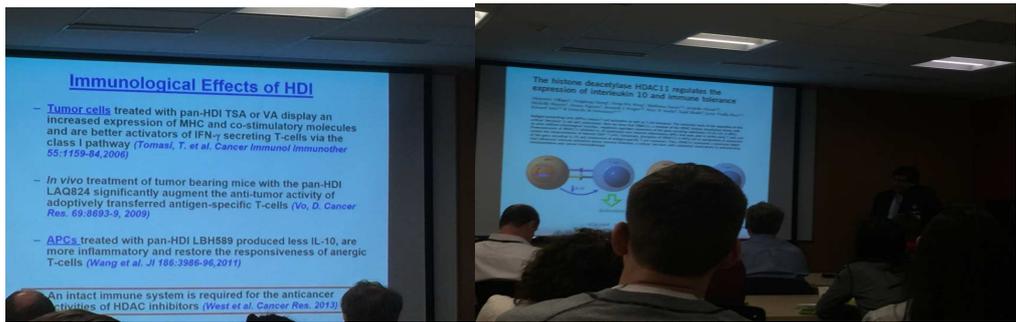
300 ul Granulin in 3 ml coupling buffer

- OD ug granulin/ 0.5 inch
- Suture 1 2.1337 1.35x10E-4
- Suture 2 1.2885 7.25x10E-5
- Suture 3 2.1876 1.39x10E-4
- Control 0.2111

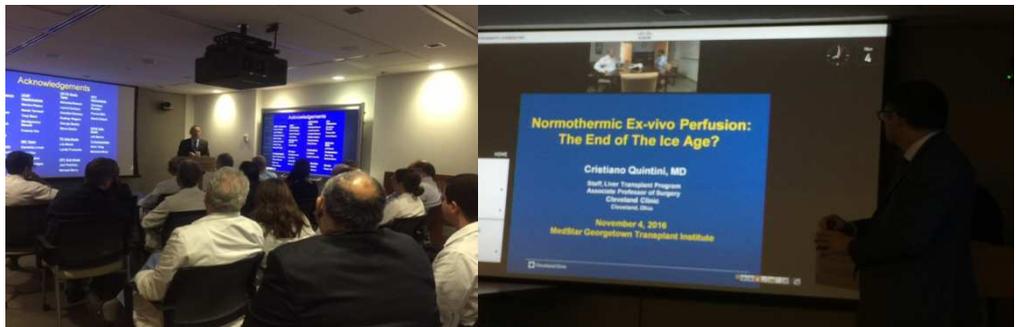
用酵素連結免疫吸附分析法(ELISA)證實不同濃度 Granulin 附在縫線上



用 coating 上 Granulin 的縫線，以連續縫合方法縫合傷口。



圖：學術演講(喬治華盛頓大學醫學院 GWU)



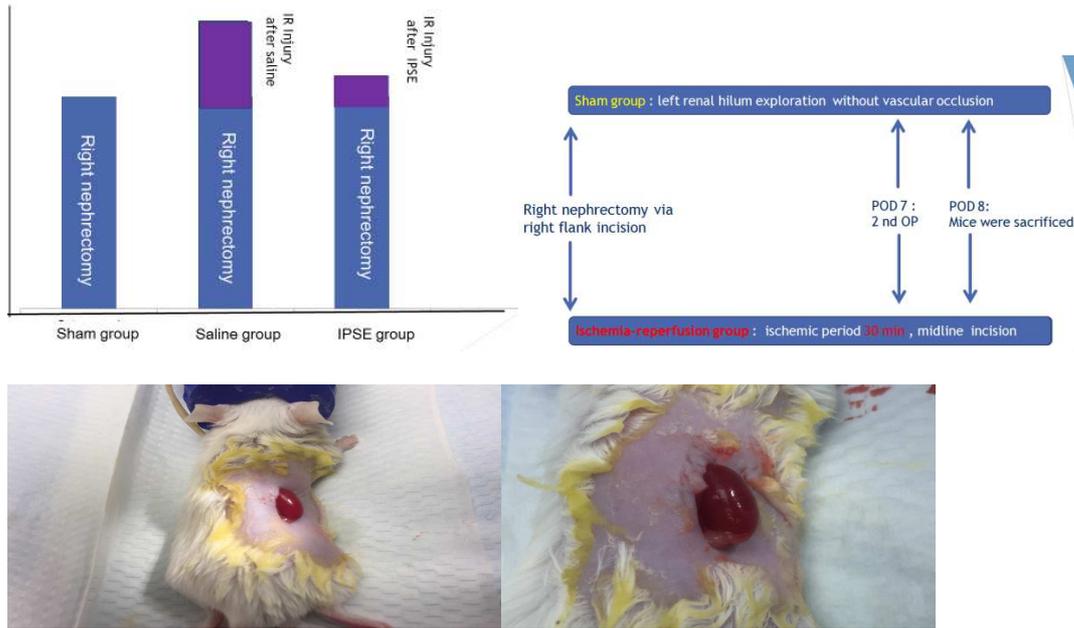
圖：定期移植學術外賓演講 Transplant Academic Conference in Georgetown Hospital



圖：喬治城大學醫學中心 (Georgetown University Medical Center) 死亡與併發症討論 M&M 會議

(四)建議

- 1.腎臟病理切片可見典型腎臟缺血再灌流損傷改變。此小鼠模缺血再灌流損傷模型簡化後手術操作簡便，手術成功率高，可用於研究腎臟移植缺血再灌流損傷。靜脈注射 Recombinant IPSE / alpha-1 (Interleukin-4-inducing principle from schistosoma eggs)後，一些腎組織前發炎性/發炎反應細胞激素/趨化激素的基因表現有降低的調節趨勢(Down-regulation)。
- 2.但是若欲排除 Right nephrectomy(右腎切除)對前發炎性/發炎反應細胞激素/趨化激素的基因表現的影響，可以再稍改變一些作法。把手術分成兩階段(two stages)，先施行右腎切除，一周後待發炎反應緩解，再執行左腎之缺血再灌流損傷手術。右腎切除建議改由右腰部切口執行，避免兩次腹部正中切口及腹內沾黏。



圖：Right nephrectomy via flank wound(右腎切除改由右腰部切口執行)

3. 另一個方式是分析 contribution of nephrectomy to inflammatory mechanisms，一組僅做 right nephrectomy，另一組做 right nephrectomy + I-R injury(不給 saline 或 IPSE)，比較兩組細胞激素/趨化激素的基因表現及腎功能變化。
4. 最後可以嘗試將 ischemic period 延長為 30 分鐘，造成更嚴重的缺血再灌注損傷後，再分析比較各組結果。
5. 定期邀請移植、免疫、感染專家舉辦各項討論會議及教育訓練，整合臨床醫師及基礎研究學者，實際參與、加強合作醫學研究。單打獨鬥做研究易淪為瞎子摸象、事倍功半，熱情易被澆滅，不易長久投入。
6. 雖然已申請延長一個月回國時間，有些實驗計畫著實無法在一年完成，個人建議往後若臨床醫師想在實驗室學習，或許可考慮為期兩年的進修期。