

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

Rapamycin 在慢性移植腎病變的角色：一個活體外研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2314-B-039-016-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：中國醫藥大學醫學系

計畫主持人：黃秋錦

共同主持人：田亞中，方基存

計畫參與人員：田亞中，方基存

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 11 月 29 日

一、緣起

慢性移植腎病變是一個長期腎移植後移植腎中常見的表徵。其特徵為在腎絲球及腎小管間質中有大量細胞外基質沉積，造成慢性移植病變其中的一個原因為長期暴露於腎毒性藥物。Rapamycin在腎移植病人中已被大量使用於預防移植腎的排斥，Rapamycin不像cyclosporine般會經calcineucin途徑傳導訊息，因此可能不會引起腎毒性。然而計劃性移植腎切片的資料顯示rapamycin引發第三型膠原蛋白產生增加及在動物實驗中，rapamycin亦引起腎移植纖維化程度增加，這些研究意謂著rapamycin可能會促進腎臟纖維化。乙型變形生長因子(transforming growth factor β ，TGF β)為一種促進纖維化因子，是造成腎纖維化主要因子。在此研究中，我們用一種人類近端腎小管上皮細胞株(HK2細胞)來研究(1) rapamycin對於腎小管細胞的間質纖維化中細胞外基質(extracellular matrix, ECM)合成的影響。我們的假設是Rapamycin會促進腎小管細胞的ECM合成，且這個作用是經由增加TGF β 的產生。(2) rapamycin造成的腎小管間質纖維化是否經由增加TGF β 的產生或是活化TGF β 1的訊息傳導途徑。這研究將使我們對於了解rapamycin在慢性移植腎病變的角色有所助益。

關鍵詞：慢性移植腎病變，rapamycin，腎小管間質纖維化

二、研究方法

1. HK-2 細胞培養

將 HK-2 細胞置於 10-cm dish 中，以含有 10 % FBS、1%Penicillin-Streptomycin 抗生素之 DMEM 培養液進行培養，並置於 37°C、5 % CO₂ 培養箱中。每 2-3 天已 fresh growth medium containing 10% FBS until confluent。

2. RT-PCR

經藥物處理過的 HK-2 細胞，用 TRIzol reagent 抽取 total RNAs，進行 RT-PCR 複製 β -Actin、Fibronectin、Type IV collagen 與 TIMP 1，所用的條件如下：

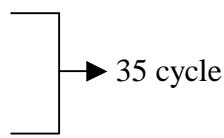
95°C、5 分鐘 -- 1 cycle

95°C、30 秒

60°C、30 秒

72°C、30 秒

4 °C、∞



3. Rapamycin 與 TGF- β 1 處理

HK-2 細胞經過 16 小時 starvation 處理後，加入 Rapamycin 與 TGF- β 1 處理。本實驗所用之 Rapamycin 濃度分為 250 ng/ml 與 1000 ng/ml，TGF- β 1 濃度為 5 ng/ml。

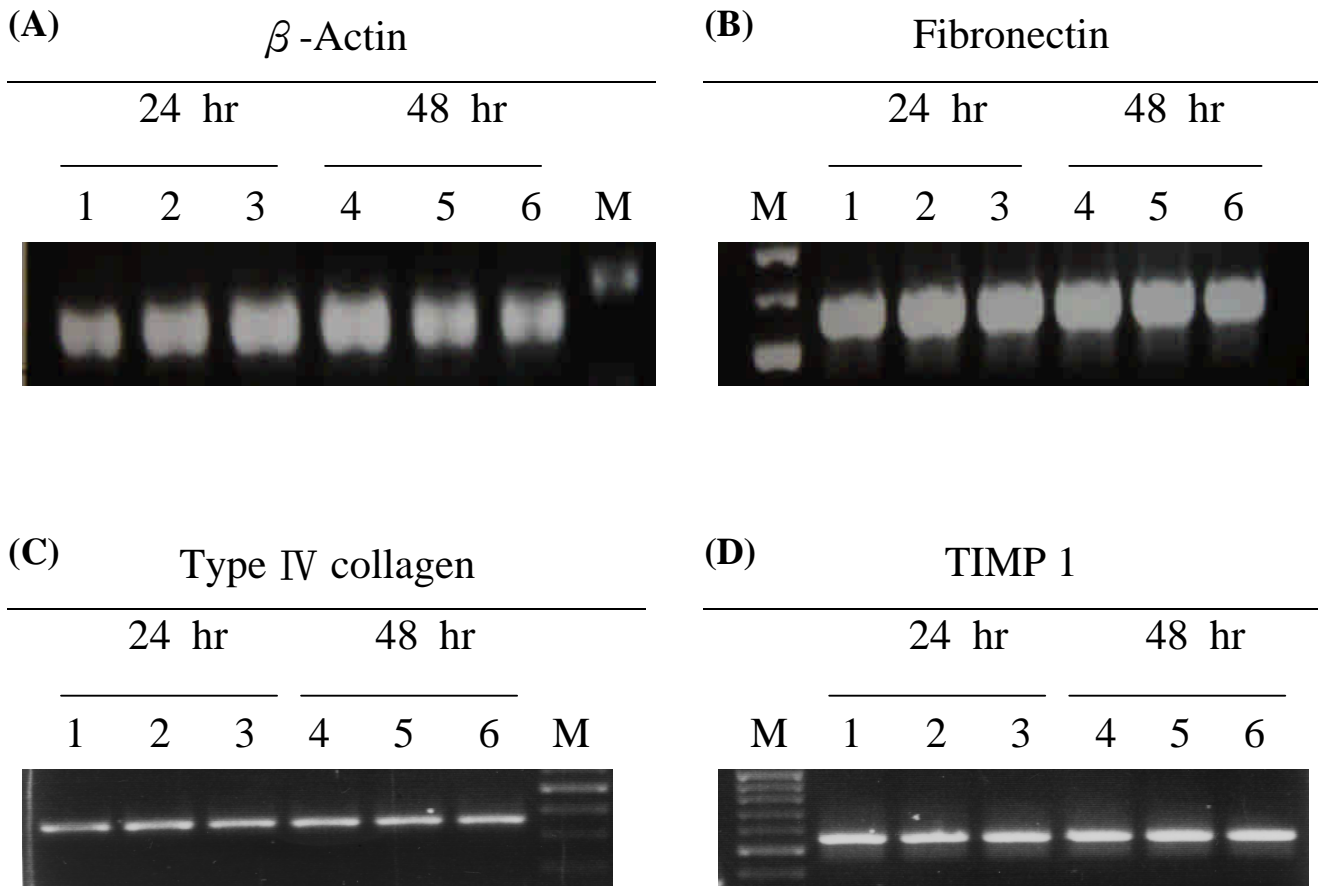
4. Microarray 分析

HK-2 細胞分二組來進行，第一組為控制組，第二組則加入 Rapamycin 1000 ng/ml 經過 48 小時處理後，直接用 TRIzol reagent 將 HK-2 細胞 lysis，將 cell lysate 置於 -80°C 保存，委託威健公司進行 Microarray 分析。

三、結果

1. Rapamycin 對 extracellular matrix (ECM) synthesis 的影響

由圖一可知，和控制組相比，加入不同濃度的 Rapamycin 和不同暴露時間都不影響 β -Actin、Fibronectin、Type IV collagen 及 TIMP 1 等 ECM 基因的表現。

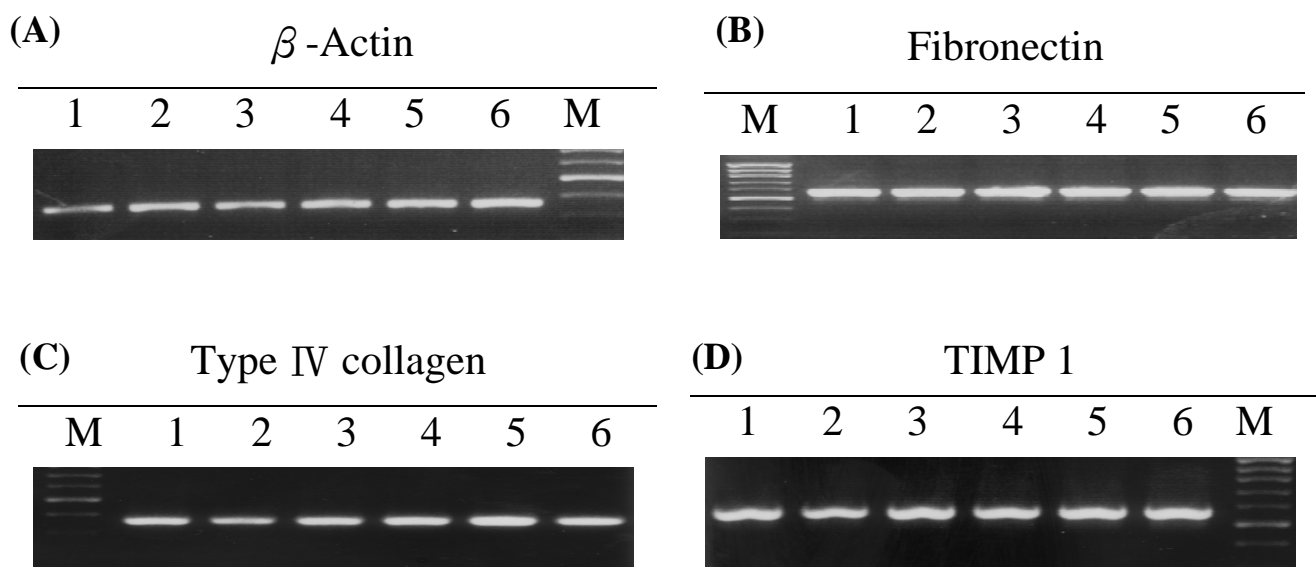


- Lane M 100-bp DNA ladder
- Lanes 1,4 控制組
- Lane 2 Rapamycin 250 ng/ml 處理 24 小時
- Lane 3 Rapamycin 1000 ng/ml 處理 24 小時
- Lane 5 Rapamycin 250 ng/ml 處理 48 小時
- Lane 6 Rapamycin 1000 ng/ml 處理 48 小時

圖一、HK-2 細胞經過 16 小時 starvation 處理後，加入 Rapamycin 250 ng/ml 與 1000 ng/ml 分別處理 24 小時及 48 小時，對於基因表現之影響。(A) β -Actin (B) Fibronectin (C) Type IV collagen (D)TIMP 1。

2. Rapamycin 在 TGF- β 1 存在下對 H₂K cell 合成 ECM matrix 的影響

由圖二可知，在 TGF- β 1 存在下，不論是高濃度(1000 ng/ml)或低濃度(250 ng/ml)的 Rapamycin 處理對於上述四個 ECM 基因的表現量均無明顯影響。



- Lane M 100-bp DNA ladder
- Lane 1 控制組
- Lane 2 Rapamycin 250 ng/ml 處理 48 小時
- Lane 3 Rapamycin 1000 ng/ml 處理 48 小時
- Lane 4 5 ng/ml TGF- β 1 處理 48 小時
- Lane 5 Rapamycin 250 ng/ml 與 5 ng/ml TGF- β 1 處理 48 小時
- Lane 6 Rapamycin 1000 ng/ml 與 5 ng/ml TGF- β 1 處理 48 小時

圖二、HK-2 細胞在 TGF- β 1 存在下，以 Rapamycin 250 ng/ml 與 1000 ng/ml 處理 48 小時，對於基因表現之影響。(A) β -Actin (B) Fibronectin (C) Type IV collagen (D)TIMP 1。

3. Rapamycin 對於其它基因表現之影響

根據圖一及圖二之結果，Rapamycin 與 TGF- β 1 對於 ECM (Extracellular matrix) 之表現無顯著影響，因此，我們進行 Microarray 分析以探討 Rapamycin 對於其它基因表現之影響，如表一所示。

Table 1. Genes differentially expressed in HK-2 cell treated with rapamycin

Up-regulated expression (Ratio>2.5)				
Gene	Product	Accession no.	Locus	Function/Process
EYA4	Eyes absent homolog 4	NM_004100	6q23	Protein tyrosine phosphatase activity
JAG1	Jagged 1	NM_000214	20p12.1	Transmembrane receptor
Down-regulated expression (Ratio<0.37)				
Gene	Product	Accession no.	Locus	Function/Process
LOC51333	Mesenchymal stem cell protein DSC43	NM_016643	16p11.2	Zinc finger protein
BPY2	Variably charge protein Y2	NM_004678	Yq11	Fertilization
PPARGC1B	PPARG coactivator 1, beta	NM_133263	5q32	Transcription regulator
CXCL6	Granulocyte chemotactic protein 2	NM_002993	4q21	Chemokine activity
HOXC4	Homeo box C4	NM_014620	12q13.3	Transcription factor

四、討論與結論

本研究結果顯示 Rapamycin 不論是單獨存在或與 TGF- β 並存下對 H₂K 細胞之 ECM synthesis 都沒有明顯影響。這個結果和原先的假設背道而馳。因此我們進行 microarray 的分析。Microarray 分析的結果顯示高濃度的 Rapamycin 對欲探討的 ECM 基因 (β -actin, fibronectin, type IV Collagen, TIMP 1) 都沒有 up-regulate 或 down-regulate 的跡象，因此很可能兩者之間並無關聯。事實上，Rapamycin 處理 HK-2 細胞所影響的基因非常單純，在表一中，上升 2.5 倍以上者只有兩個基因，下降 3 倍以上者只有五個基因，將來我們會進一步根據 Microarray 分析的結果探討這些基因變化之機轉。