

出國報告（出國類別：進修）

赴美國辛辛那提大學腎臟及高血壓
學系研習尿毒症病人透析慶管阻塞
病生理及動物模型建立
心得報告

服務機關：國軍桃園總醫院

姓名職稱：腎臟內科主任醫師詹正雄

派赴國家：美國

出國期間：98年07月27日至99年1月27日

報告日期：99年2月28日

目次

摘要

一、目的

二、過程

三、心得

四、建議事項

五、附圖

赴美國辛辛那提大學腎臟及高血壓學系研習尿毒症病人透析瘻管阻

塞病生理及動物模型建立

心得報告

摘要

臨床上尿毒症病人常因透析瘻管通路慢性功能不良而導致狹窄或急性阻塞，輕則透析不足、重則必需住院耗時重建而有生命危險。初期研究透析血管通路狹窄，包括從瘻管實驗模型建立：如將動物(豬)下腔靜脈或大隱靜脈移植於內頸動脈後的靜脈血管成長顯微結構類似得知狹窄變化，另一方面則由人體接受冠狀動脈繞道手術、經皮血管氣球擴張術後等的血管內膜增生病理變化比較推測歸納其中與狹窄或阻塞的可能病理的機轉包括血管壁的再塑型、血管平滑肌細胞增生與血管內膜慢性增厚三者有關。而研究更進一步證實增厚的內膜主要來自於中層平滑肌細胞的位移增生，血液中則可偵測到血管平滑肌細胞增生時所釋放出的許多蛋白質酵素及生長素等介值，這些物質對內膜增生的厚度有許多影響。血管內皮細胞研究若成熟的話，未來將可被廣泛地應用到目前醫藥治療尚無法定論的慢性內膜增生。職於國軍桃園總醫院腎臟科工作近十年，近年並於國立陽明大學臨床醫學研究所進修中，很幸運爭取到出國進修機會，在台灣腎臟醫學會理事長林裕峰教授及陽明大學指導老師陳肇文教授推薦下，至美國俄亥俄州辛辛那提大學腎臟及高血壓學系透析瘻管研究中心，研習尿毒症病人透析瘻管阻塞病生理，透析瘻管動物模型建立，並嘗試雙重(多重)免疫螢光染色來瞭解不同時間點的增生細胞彼此所扮演的角色；目前以動物-豬為研究對象 將來也將進行小鼠上靜脈血管內皮細胞研究，以便觀察轉殖基因後各種細胞激素和基因的彼此關聯性及對於透析瘻管阻塞的內膜增生所產生影響，希望有助於未來預防及治療瘻管阻塞之研究。

一、目的：

尿毒症病人的慢性透析血管通路(Dialysis Vascular Access)可分為自體動靜脈瘻管(Native Arterio-Venous Fistula)和植入性人工動靜瘻管 (Implanted Artificial Arterio-Venous Graft)。兩者均有一定使用壽命，且常因為多種因素而發生阻塞，導致病人必需接受手術或忍受暫時性洗腎導管放置的不便。血管通路發生阻塞的原因在近十年內因為內外科醫師的積極研究有了相當多的成果。隨後，各國科學家利用技術陸續建立了豬、兔、綿羊、大鼠和小鼠等的血管通路阻塞的模型，對這些模型進行系統性的組織比較鑒定研究，以釐清各種細胞及細胞激素在急性阻塞和慢性狹窄的內膜增厚上扮演何種角色。不論是由組織學上所累積系統性的觀察或是藉由分子生物學的分離技術瞭解各種狹窄因子，到 knockout 基因的應用逐漸建構出血管通路阻塞的生理、病理機轉，主要是要用於研究人體的生理病理機制，當然也期待在不久的將來能在臨床上應用在血管通路治療和疾病預防。

二、過程：

職 91 年於台北榮民總醫院完成腎臟科專科醫師訓練後，隨即在臨床上開始照顧尿毒症病人，並對於病人的第二生命線-透析時所使用的血管通路感到興趣，很幸運地得到有機會出國進修，遂針對個題目展開了一連串的準備工作。在獲得我的老師：美國辛辛那提大學腎臟及高血壓學系大學教授 Prabir Roy-Chaudhury 同意後確定成行，將臨床事務作一妥善交接給同仁，於 98 年 07 月 27 日抵美，隨即便與老師訂定進修計畫，敲定在未來的半年中，我的研究主題。美國辛辛那提大學(University of Cincinnati)位於南北戰爭歷史中著名的俄亥俄州與肯塔基州交界地區，有著俄亥俄河(Ohio River)

流經過，是一間多樣性及多國文化學生聚集的教育機構，提供傑出的大學和研究所文、理科課程，尤以表演、音樂藝術著稱，也為繁瑣沉悶的自然科學研究提供調和的作用。主校區位於辛辛那提市的 UpperTown，距離俄亥俄州的首府哥倫布市 (Columbus) 需要 2 小時的路程，到肯塔基州的 Covington 僅要 10 分的車程，往北到芝加哥市需要 4.5 小時的車程，出境或國內航空則賴不需一個小時可抵達的 CVG (Cincinnati-Northern Kentucky) International Airport。辛大腎臟及高血壓學系以研究血液透析病人所使用的動靜脈瘻管聞名，是以多種動物的動靜脈瘻管模型型態學(Animal Model、Phenotype)研究為主，型態學是指當建立動靜脈瘻管前及之後不同時間點的組織細胞改變(Histologic Cell)，它的觀察可拼湊出動靜脈瘻管阻塞的病理機轉、相關細胞激素的不同角色和多向分化的特性。使用的方法以免疫組織化學染色(Immunohistochemical stain, IHC)為主要，藉由組織抗原開啓(Antigen Retrieval)後可連結生物素(Biotin)再與親和素(Avidin)鍵接在抗生素蛋白體與放大作用的化學染色，於呈色時可定量出各種免疫分子在不同血管層(如 Intima, Media, Advential)的細胞類型。另外可使用雙重或參重免疫螢光染色(Double or Triple immunofluorescence stain)比較不同細胞在不同時間點的消長表現。組織學研究更可藉由免疫組織化學染色的確認，利用雷射顯微截取組織(Laser Microdissection)取得有表現組織加以分析 RNA 和基因型態(Genotype)。瘻管研究模型可建立在動物常見的腹主動脈下腔靜脈吻合(Abdominal aorta-Inferior Vena Cava Anastomosis)、股動靜吻合(Femoral artery-Vein Anastomosis)、內頸動靜吻合(Internal jugular vein-carotid art anastomosis)，若於小鼠(mice)上並可執行轉殖基因(Transgenic Method)的研究，獲取不同基因對瘻管阻塞的影響。辛大實驗室的領域主要有以下幾點：不同材質的人工血管銜接所產生阻塞變化，自體動靜脈瘻管阻塞的病理機轉，腎臟缺血後及血流再灌注後模型和病生理，尿毒症病人瘻管阻塞的組織染色分析，嘗試藥物在動物上對動靜脈瘻管的影響。

- 1.不同材質的人工血管銜接所產生阻塞變化：鐵氟龍【(polytetrafluoroethylene (PTFE)】、活性碳塗抹(Carbon-Coating) 等人工血管移植於動物模型後產生阻塞的病理變化，而嘗試不同角度及手術方式亦有不同阻塞比例的觀察，因此可能還有其他因數(如流速、切力等)對血管內膜產生一定的增生效果。
- 2.自體動靜脈瘻管阻塞的病理機轉：這個是當前洗腎瘻管研究熱門課題，辛大實驗室以其長久穩固扎實的模型基礎，訂有一套完整穩定的免疫組織化學染色流程，有效率地分析並定量出各各增生細胞在瘻管阻塞過程中順序，目前發表於諸多知名期刊且為其它實驗室所仿效運用。
3. 腎臟缺血後及血流再灌注後模型和病生理：急性腎衰竭最常見原因就是腎臟缺血後引起腎小管細胞壞死 (Acute Tubular Necrosis, ATN) 進而導至寡尿期產生身體一連串尿毒滯留反應，目前使用的血管鉗夾住腎動脈常無法完全截止血流而仍有部份通行的缺點，導致所產生病理變化不一，較難作長久分析，而辛大教授 Roy-Chaudhury 實驗室與辛大腎臟科主任 Soleimani 實驗室共同建立一套穩定且成功率近百分之百的腎臟缺血模型，因此近年來辛大相關研究文章進展很快。
4. 尿毒症病人瘻管阻塞的組織染色分析：臨床上尿毒症病人瘻管的觀察、阻塞後的血管組織染色分析也同時在辛大腎臟科實驗室進行中，主要包括細胞激素 (Cytokine)、氧化壓力 (Oxidative Stress) 結合病理學表現以建立相關血管阻塞的病理機轉和研究平台。
5. 藥物在動物上對動靜脈瘻管的影響：有了病生理的瞭解和組織學表現的佐証，接著當然是選取藥物在預防和治療瘻管阻塞上的應用，初步在成熟的動靜脈瘻管動物模型上有正面的效果，尚待累集更多具統計意義的實驗結果出現。

基因、幹細胞治療一直是本世紀以來，許多難解疾病所抱以的重大期望和研究學者所投入的最大心血，為達到治癒或控制疾病目的。然而疾病的動物模型建立和組織學的相互對應仍能穩定地在研究上有著一定的角色

和關鍵性的說明，更是任何治療應用在人體前所必備的一道關卡。職在短短六個月中的學習，選擇以最基礎的工具作為研究的計劃，期中也為克服一些困難而有了兩項為辛大實驗室所獲得的成果，更期待回國後於臨床工作之餘的研究能接續此次進修，並能搭起國際間合作的未來，共同提升照護病人的品質。

2009年10月，美國腎臟醫學會舉辦的年會中，因指導教授 Roy-Chaudhury 的贊助得以學習到當今各國所發表的透析瘻管研究新知，辛大實驗室在教授 Roy-Chaudhury 的帶領下共同發表六篇壁報摘要、一篇口頭摘要報告和教授 Roy-Chaudhury 本身的專題演講，會中寄語相關有興趣的科學家，對尿毒症病人瘻管阻塞現象，應導入各專家包括如腎臟科、外科、病理科和生物機械工程學系等，制訂分工的相關研究計畫。

三. 心得

1.瞭解透析瘻管阻塞的組織病理、病因學對慢性血液透析病人的長期存活率有極大改善作用，其主因在於可進一步應用在修復甚至治療成熟不全的自體瘻管或是反復狹窄致阻塞(stenosis) 的人工血管。應用在分子生物學的層級則探討動靜脈血管的平滑肌細胞過度增生和具有發育分化、修復的內皮祖細胞(Endothelial ProgenitorCells, EPCs)失衡，將可能應用幹細胞替代治療等。

2.傳統理論有關的自體瘻管成熟不佳或狹窄，人工植入透析血管的慢性內膜增厚導致阻塞均認定血管中層肌細胞移入內膜產生主要堆積的角色，

藉由實驗室反復研究又加入不同的觀點導入新的病因機轉，將有助於區別以往由僅心血管模型得知的冠狀動脈阻塞的理論，也得知藥物預防經皮冠狀動脈整形術後再狹窄並不一定能達到同樣治療透析瘻管經皮整形術後的預防再阻塞效果。

3.實驗室的小鼠頸區透析動靜脈瘻管模型成功，為未來基因層次的研究注入另一股活力，更是提供不同角度研究題材，對由基因治療下手解決易有透析瘻管阻塞的病人族群也是一盞明燈。

四. 建議事項

1. 國際上關於透析動靜脈瘻管的研究可謂日新月異，許多臨床或基礎醫學重鎮均將其一併列入心血管細胞研究的領域之一，台灣也可列入參考，以使資源共享避免重復投資動物模型造成浪費。

2. 藉由動物模式的研究進階至基因模式乃至各種治療的切入，是 21 世紀具發展潛力的領域，所以需要各個不同領域學科的研究人員，進行大量的研究與探索，辛大各系所的合作成果已經受到美國國家衛生研究院 (National Health Institute, NIH) 的高度重視，並積極投入更多經費期待更具改善病人結果，為臨床應用提供更堅實的基礎，政府投入的國衛院也期待能有這方面前瞻性的作為。

3. 台灣擁有傲人的健保制度，所以在廉價醫療照護之下，積極鼓勵正向照護品值和給付同時，若能投入一定的心血作為研究照護，對於品質提升相信定可相輔相成，引導民眾有更好的生活品質。

五. 附圖



(辛辛那提大學實驗室)



(共厄焦顯微鏡: Zeiss LSM 510 META)



(辛辛那提大學附屬醫院)