



國立臺灣大學生物資源暨農學院動物科學技術學系

碩士論文

Department or Graduate Institute of Animal Science and Technology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

低氧處理羊水幹細胞治療大鼠腎間質纖維化之療效

Therapeutic effect of hypoxia-treated amniotic fluid stem
cell on rat renal interstitial fibrosis

吳書瑋

Shu-Wei Wu

指導教授：吳信志 博士

Advisor: Shinn-Chih Wu, Ph.D.

中華民國 108 年 2 月

Feb 2019



國立臺灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書

低氧處理羊水幹細胞治療大鼠腎間質纖維化之療效
Therapeutic effect of hypoxia-treated amniotic fluid
stem cell on rat renal interstitial fibrosis

本論文係吳書瑋君(R05626008)在國立臺灣大學動物科學技術學系、所完成之碩士學位論文，於民國 108 年 1 月 28 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

吳信志

(簽名)

陳銘正 (指導教授)

李麗英

林佐靜

系主任、所長

丁詩同

(簽名)

誌謝



本論文承蒙指導教授 吳信志 老師之指導，感謝老師於研究所期間給予我諸多生活與研究上之關心與引導，亦感謝口試委員臺灣大學生物科技研究所 宋麗英 老師、宜蘭大學生物技術與動物科學系 陳銘正 老師與 林佳靜 老師對於論文撰寫之指正與試驗上之建議。同時，感謝臺灣大學動物科學技術學系 丁詩同 老師之分生生物研究室、邱智賢 老師、吳兩新 老師及 鍾德憲 老師之動物生理研究室大方出借儀器，讓我得以完成實驗數據之分析；另感謝系上所有老師在碩士班專討期間給予的建議；以及感謝系辦 游位育 學長、廖奕雯 學姐與 小紅 阿姨等所有工作人員處理系上行政事務，讓我能專心於研究；感謝生技中心 曾亭育 學姊在流式細胞儀實驗數據分析上之協助。

此外，感謝動物生殖科技研究室 吳信志 老師實驗室夥伴 張廉本 學長、陳奕臣 學長、謝明凱 學長、葉衍廷 學長、林廷寬 學長、王佳蓉 學姊平時在實驗上的協助與指導，並由衷地感謝大鼠手術團隊 陳維安、蘇嘉賢、李哲豪、宋家維、黃昱嘉、蘇暄淳 等學弟妹在我動物試驗期間給予及時地手術支援，亦感謝 吳家寬、張瑋哲、余晟嘉、石秀曼 與 潘岳彤 等學弟妹平時在實驗與生活上的幫助，同時也感謝 劉逸軒 老師實驗室夥伴 曾彥慈 學姊、李妍樺 學姊、鍾佩軒 學姊、簡銓良 學長、柯均霖 學長、姜喆云 學姊、馨儀 學姊、蔡佳惠、楊迪旭、張家騰 與 陶佩妍 學妹，平時在實驗上的協助與指導。再者，亦感謝為我的研究貢獻一生的大鼠們，你們的犧牲讓我的碩士研究得以完成。

最後，感謝我的家人及朋友，在研究所期間給予我強力的支持與鼓勵！


僅此獻給幫助我的所有人

中文摘要



腎間質纖維化 (renal interstitial fibrosis, RIF) 為慢性腎臟病 (chronic kidney disease, CKD) 進展之主要途徑，而 CKD 為臺灣常見之慢性疾病，其盛行率於 2016 年達 9.8%，同年因腎炎、腎病症候群及腎病變造成之死亡率更列為十大死因之一。CKD 若嚴重會導致末期腎衰竭，治療方式以血液或腹膜透析或腎臟移植為主。先前之研究證實幹細胞具有組織再生之臨床應用潛能，期望能藉此找到更有效用之替代療法。羊水幹細胞 (amniotic fluid stem cells, AFSCs) 因應用上較無倫理道德爭議及形成畸胎瘤之風險，另具有低免疫原性、來源取得容易且低侵入性之優點，且胎兒發育期間之環境氧濃度僅約為 4 至 5%，故本試驗擬藉由分離自大鼠胎兒羊水之 AFSCs 進行低氧 (5% O₂) 處理後再移植於單側輸尿管梗阻 (unilateral ureteral obstruction, UUO) 引發 RIF 之大鼠模式，探討低氧處理是否能維持體外培養 AFSCs 之幹性，進而增加移植後之 RIF 治療之可行性。

試驗分二部分進行，試驗一探討低氧培養之大鼠羊水幹細胞 (rat amniotic fluid stem cells, rAFSCs) 對其幹性、增殖及分化潛能之影響，自懷孕大鼠胎兒羊水分離之細胞培養於常氧 (normoxia, Nor) 19.9% O₂ 及低氧 (hypoxia, Hyp) 5% O₂ 環境。結果顯示，Nor-rAFSCs 與 Hyp-rAFSCs 隨著繼代培養，皆呈現類纖維母細胞之紡錘狀形態，生長方向為螺旋狀排列。將二種處理之 rAFSCs (P11) 以流式細胞儀進行分析結果顯示，Hyp-rAFSCs 之細胞形態顯著較 Nor-rAFSCs 小 ($P < 0.05$)，且於 CD29 及 CD90 之表現量皆有高於 Nor-rAFSCs 之趨勢，而其 octamer-binding transcription factor 4 (Oct-4) 之基因表現量倍率亦顯著較後者增加 ($P < 0.05$)；同時，Hyp 處理亦有顯著提高 rAFSCs 之增值倍率 ($P < 0.05$)。此外，rAFSCs 脂肪誘導分化試驗中，Hyp 處理無顯著提高其分化為脂肪細胞之能力；而 rAFSCs 之硬骨誘導分化試驗中，Hyp 之誘導處理組其硬骨分化能力顯著低於 Nor 處理組 ($P < 0.05$)，且於軟骨誘導分化之培養中無法形成細胞球，因此推測 Hyp 處理可能降低 rAFSCs 分化為軟骨及硬骨細胞之潛能。試驗二探討

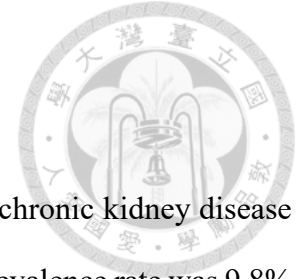


Hyp-rAFSCs 及其條件培養液 (condition medium, CM) 對其移植於經 UUU 大鼠尾靜脈後緩解其 RIF 之影響，其移植一週及二週後將大鼠犧牲，取其腎臟進行檢測分析，外觀型態上，無論 Nor 或 Hyp 處理之 CM 或 rAFSCs 經移植一週與二週後之左腎皆因尿液積累而有較右腎膨大之現象；另將其組織切片以 H&E 與 Masson's Trichome 染色進行組織分析，發現經移植一週與二週後之左腎皆有發炎細胞之浸潤，顯示腎臟組織受到損傷，經由 Nor 或 Hyp 處理之 CM 或 rAFSCs 移植後一週之 RIF 均較 vehicle 組有緩解之趨勢，移植二週後則除 Nor-CM 組外，其餘組別皆有緩解纖維化之趨勢，再者，RIF 大鼠腎臟之纖維化相關因子 TGF- β 1、collagen I 及 α -SMA 之表現量倍率分析，除 Nor-rAFSCs 組，其他組別經移植一週後之纖維化因子之表現量倍率皆有低於 vehicle 組之趨勢；移植二週後，少數組別與 vehicle 組之基因表現量倍率趨近相同，然多數組別則有高於 vehicle 之趨勢，由此推測，rAFSCs 或其 CM 於體內無法改善 RIF 至二週，其原因可能與同種異體移植之幹細胞及其分泌因子於宿主體內存活及降解時間有關。

綜上所述，Hyp 處理具有提高 rAFSCs 之增殖倍率，即有利於其體外增殖，同時亦能增加 rAFSCs 表現典型幹細胞表面抗原 CD90、MSCs 表面抗原 CD29 之比例，與幹性及多能性相關之分子標誌 Oct-4 之基因表現量倍率，並具降低其分化為硬骨之潛能，而 Hyp-rAFSCs 與其 CM 之移植對 RIF 大鼠之療效僅於移植一週與二週後有緩解纖維化之趨勢。

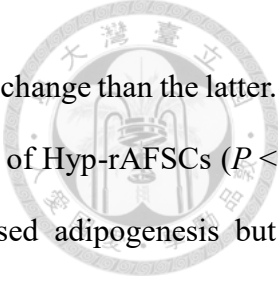
關鍵字：腎間質纖維化、羊水幹細胞、低氧、常氧

ABSTRACT



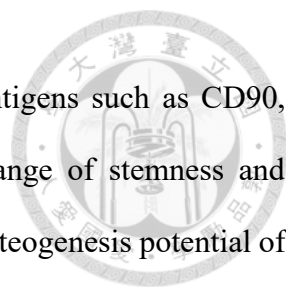
Renal interstitial fibrosis (RIF) is a main progression pathway of chronic kidney disease (CKD). Besides, CKD is a common chronic disease in Taiwan and its prevalence rate was 9.8% in 2016. Moreover, mortality caused by nephritis, nephrotic syndrome and nephropathy were ranked as one of the top ten causes of death in the same year. If CKD is severe, it will lead to end-stage of renal failure, and therefore the treatment now is mainly based on hemodialysis or peritoneal dialysis or kidney transplantation. Previous researches confirmed that stem cells have the clinical potential of tissue regeneration and are expected to find more effective alternative therapies. Application of amniotic fluid stem cells (AFSCs) do not have ethical dispute and the risk of teratoma formation, besides, ASFCs have advantage such as low immunogenicity, easy and non-invasive accessibility. In addition, environmental oxygen concentration of fetal development process is only about 4 to 5%. For this reason, the aim of my research intended to isolate AFSCs from amniotic fluid of fetus during pregnant rats, treat it by hypoxia and then transplant it to RIF models induced by unilateral ureteral obstruction (UUO) in order to discuss whether hypoxia-treated AFSCs can maintain their stemness, proliferation and differentiation potentials, even increase feasibility of RIF treatment after AFSCs transplantation.

There were two parts of experiment. In part one, I investigated the effect of hypoxia on stemness, proliferation and differentiation potentials of rAFSCs. After isolated rAFSCs from amniotic fluid of fetus during pregnant rats, cultured them under normoxia (Nor) 19.9% O₂ and hypoxia (Hyp) 5% O₂ respectively. The result demonstrated that both Nor-rAFSCs and Hyp-rAFSCs showed spindle-like morphology of fibroblasts and their growth direction exhibit spiral order in subculture. Moreover, Hyp-rAFSCs presented significantly smaller morphology than Nor-rAFSCs ($P < 0.05$), had higher expression of surface markers such as CD29 and CD90



by flow cytometry, and even exhibited higher Oct-4 gene expression fold change than the latter. Simultaneously, Hyp-treatment significantly increased proliferation rate of Hyp-rAFSCs ($P < 0.05$). Furthermore, it showed that Hyp did not significantly increased adipogenesis but significantly decreased osteogenesis of Hyp-rAFSCs ($P < 0.05$), and even caused Hyp-rAFSCs did not form chondrogenic sphere. As a result, I speculated Hyp-treatment might lowered the potentials of Hyp-rAFSCs to differentiate into cartilage and osteoblasts. In part two of experiment, I further investigated whether the rAFSCs and rAFSCs-conditioned medium under hypoxia can alleviate the renal interstitial fibrosis of rat by tail vein injection. After 1 and 2 weeks of transplantation, rats were sacrificed and isolated kidneys for analysis. First, no matter Nor or Hyp-treated rAFSCs or CM groups, their left kidneys showed ectatic morphology due to urine accumulation after 1 and 2 weeks of transplantation. Next, stained renal tissues with H&E and Masson's Trichrome stain for histological examination. The results demonstrated that infiltration of inflammatory cell in H&E stain, showing renal tissues were damaged. Besides, transplanted Nor or Hyp-treated rAFSCs or CM had alleviated trend on rat RIF after 1 week, and except Nor-CM group, other transplant groups had alleviated trend on fibrosis after 2 weeks. Moreover, analysis of fibrosis related gene such as TGF- β 1, collagen I and α -SMA mentioned that except the Nor-rAFSCs group, others had lower trend of fibrosis related gene expression after 1 week-transplantation. However, fibrosis related gene expression fold change in minority of groups were similar to vehicle groups, majority of groups were higher than vehicle group instead after 2 weeks. Therefore, it was speculated that rAFSCs or their CM could not improve RIF in vivo for two weeks, which may be related to the survival time of allogeneic stem cells and decay of their secreted factors in the host.

In summary, Hyp-treatment has the advantage of increasing the proliferation rate of rAFSCs, which means Hyp is beneficial to rAFSCs proliferation in *vitro*. Simultaneously, Hyp-



treatment could also increase the ratio of typical stem cell surface antigens such as CD90, MSCs surface antigens such as CD29, the gene expression fold change of stemness and pluripotency related molecular markers such as Oct-4, and reduce the osteogenesis potential of Hyp-rAFSCs. Besides, the therapeutic effect of Hyp-rAFSCs and Hyp-CM on RIF rat only had alleviated trend after one and two-week-transplantation.

Key words: renal interstitial fibrosis, amniotic fluid stem cells, hypoxia, normoxia

目錄



口試委員審定書	i
誌謝.....	ii
中文摘要.....	iii
ABSTRACT.....	v
目錄.....	viii
圖目錄.....	x
表目錄.....	xii
第一章 緒論.....	1
第二章 文獻檢討.....	3
2.1 腎臟構造與功能	3
2.1.1 腎臟之解剖構造	3
2.1.2 腎臟之生理功能	5
2.2 慢性腎臟病	7
2.2.1 慢性腎臟病	7
2.2.2 慢性腎臟病之動物疾病模式	8
2.3 腎間質纖維化	10
2.3.1 腎間質纖維化	10
2.3.2 腎間質纖維化之動物疾病模式	13
2.4 幹細胞.....	16
2.4.1 何謂幹細胞?	16
2.4.2 羊水幹細胞	17
2.5 低氧培養於再生醫學領域之研究	19
2.6 羊水幹細胞於腎間質纖維化之研究	22

第三章	試驗研究.....	24
3.1	低氧處理對大鼠羊水幹細胞之幹性、增殖及分化潛能之影響	24
3.1.1	前言.....	24
3.1.2	試驗設計.....	25
3.1.3	材料與方法	27
3.1.4	結果與討論	37
3.2	低氧處理羊水幹細胞及其條件培養液對腎間質纖維化之療效	50
3.2.1	前言.....	50
3.2.2	試驗設計.....	51
3.2.3	材料與方法	53
3.2.4	結果與討論	61
第四章	綜合討論.....	78
第五章	結論.....	81
第六章	未來展望.....	83
第七章	參考文獻.....	84



圖目錄



圖 1 腎間質纖維化之形成。	11
圖 2 輔助 T 細胞於腎間質纖維化中之作用機制路徑。	12
圖 3 單側輸尿管梗阻動物疾病模式之腎臟細胞間之交互作用。	15
圖 4 羊水幹細胞可分化為三胚層之細胞系。	18
圖 5 羊水來源之細胞於腎臟再生醫學領域之應用與挑戰	23
圖 6 大鼠羊水幹細胞分離與培養之流程圖。	26
圖 7 懷孕 12 天之大鼠子宮角。	28
圖 8 大鼠羊水幹細胞於常氧及低氧環境下之細胞型態。	38
圖 9 大鼠羊水幹細胞經流式細胞儀分析，Nor 和 Hyp 二組之相對細胞大小。	39
圖 10 以流式細胞儀進行常氧與低氧大鼠羊水幹細胞之表面抗原分析。	42
圖 11 以 RT-PCR 進行常氧與低氧培養大鼠羊水幹細胞之 Oct-4 基因表現分析。	43
圖 12 以 qRT-PCR 進行常氧與低氧培養大鼠羊水幹細胞之 Oct-4 基因表現量倍率分析。	43
圖 13 常氧與低氧培養大鼠羊水幹細胞之生長曲線比較。	45
圖 14 經 Oil red o 染色之常氧與低氧環境下大鼠羊水幹細胞 14 天後之脂肪形成。	47
圖 15 經 Alizarin Red 染色之大鼠羊水幹細胞 21 天後之硬骨形成。	48
圖 16 經 Safranin O 染色之大鼠羊水幹細胞 21 天後之軟骨形成。	49
圖 17 單側輸尿管梗阻模式。	51
圖 18 低氧處理羊水幹細胞及其條件培養液對大鼠腎間質纖維化療效之流程圖。	52
圖 19 大鼠輸尿管之確認示意圖。	54
圖 20 大鼠單側輸尿管梗阻模式之手術流程示意圖。	55
圖 21 大鼠尾靜脈注射示意圖。	56
圖 22 大鼠右腎與左腎之取樣位置。	57



圖 23 大鼠體重之變化。62

圖 24 移植後大鼠腎臟外觀型態。64

圖 25 移植一週後之左腎以 H&E stain 進行組織學檢查。66

圖 26 移植一週後之右腎以 H&E stain 進行組織學檢查。67

圖 27 移植二週後之左腎以 H&E stain 進行組織學檢查。68

圖 28 移植二週後之右腎以 H&E stain 進行組織學檢查。69

圖 29 移植一週後之左腎以 Masson's Trichrome 染色進行組織學檢查。70

圖 30 移植一週後之右腎以 Masson's Trichrome 染色進行組織學檢查。71

圖 31 移植二週後之左臟以 Masson's Trichrome 染色進行組織學檢查。72

圖 32 移植二週後之右腎以 Masson's Trichrome 染色進行組織學檢查。73

圖 33 以 qPCR 進行左腎纖維化相關基因之表現量倍率分析。76

圖 34 移植一週與二週之左腎纖維化相關基因表現量倍率之比較。77



表目錄

表 1 慢性腎臟病動物疾病模式之誘導方式。	9
表 2 腎間質纖維化動物疾病模式之誘導方式。	14
表 3 不同種類之幹細胞微環境氧濃度。	21
表 4 羊水幹細胞之低氧培養相關文獻。	21
表 5 大鼠羊水幹細胞之引子序列。	32
表 6 大鼠羊水幹細胞之 Oct-4 基因表現量倍率計算公式。	33
表 7 腎間質纖維化之引子序列。	59
表 8 腎臟纖維化分子標誌基因表現量之計算公式。	60



第一章 緒論

至 2013 年，全球 CKD 之盛行率達 8 至 16% (Jha *et al.*, 2013)，導致盛行率居高不下之原因包含肥胖、人口老化、糖尿病 (diabetes Mellitus, DM) 與高血壓 (hypertension, HTN) 之盛行率持續增加、心肌梗塞 (myocardial infarction, MI) 與腦中風之治療方法進步，減少病患死亡，進而導致這些病患產生器官衰竭之機會增加等。此外，CKD 亦為臺灣常見之慢性疾病之一，根據衛生福利部國民健康署資料統計，其盛行率於 2016 年達 9.8%，同年因腎炎、腎病症候群及腎病變造成之死亡率更列為該年十大死因之一。

腎間質纖維化 (renal interstitial fibrosis, RIF) 為 CKD 進展之主要途徑，當病人腎臟受到損傷，腎絲球過濾率 (glomerular filtration rate, GFR) 連續三個月以上低於 60 mL/min/1.73 m²，會導致其結構或功能無法恢復正常，若受損嚴重則會導致末期腎衰竭，而目前之治療方式仍以腎臟透析或移植為主。過去已有許多文獻證實幹細胞具有組織再生之臨床應用潛力，因而研究人員欲藉由幹細胞之特性，尋找幹細胞於臨床疾病應用上之可行性，期望能替代現有之治療方式，改善現況。再者，羊水幹細胞為近年來於幹細胞與再生醫學領域之熱門題材，其特性介於多能性幹細胞與複能性幹細胞之間，應用上較無倫理道德之爭議性，且移植安全性上較無形成畸胎瘤之風險，並具有低免疫原性、來源取得容易且低侵入性等優點，因此已有研究顯示 AFSCs 之移植能延緩 RIF 之進程 (da Silva *et al.*, 2015; Sedrakyan *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013)。然而，一般常規體外培養幹細胞之環境，其氧濃度約為幹細胞於體內生存微環境氧濃度之 4 至 10 倍，可能對體外培養之幹細胞產生氧化壓力，進而導致移植後治療功效降低 (Ma *et al.*, 2009)。

綜上所述，AFSCs 對改善 RIF 具有一定之治療潛力，惟其培養環境之氧濃度是否影響其潛在效用尚未可知，因而將 AFSCs 進行低氧處理後再將其移植至臨床疾病模

式動物體內，觀察經低氧處理後之 AFSCs 是否較常規培養程序之 AFSCs 有較佳之療效，將可作為未來 AFSCs 於臨床應用上之參考。





第二章 文獻檢討

2.1 腎臟構造與功能

2.1.1 腎臟之解剖構造

人體腎臟形似蠶豆，長約 10 至 12 公分，重約 150 公克，位於脊椎二側之腹腔後壁，即第 12 根胸椎與第 13 根腰椎之間，且右腎因肝臟位於其上方故右腎之位置較左腎低。腎臟由外而內依序藉由腎筋膜 (renal fascia)、脂肪被膜 (adipose capsule) 與腎被膜 (renal capsul) 固定於人體內，腎筋膜為緻密性結締組織，用於固定腎臟並包覆腎上腺 (adrenal gland)；脂肪被膜厚度最厚，用於保護腎臟以防止產生外傷；而腎臟外側所包覆之腎被膜為光滑透明之纖維性膜，其內側凹陷處形成之空腔稱為腎竇 (renal sinus)，腎竇之入口處則為腎門 (renal pelvis)，腎竇中包含腎小盞 (minor calyx)、腎大盞 (major calyx)、集尿管 (collecting tube) 與腎盂 (renal hilum)，為血管、淋巴管、神經與輸尿管進入腎臟之管道。

此外，腎臟內部解剖構造分為腎皮質 (renal cortex) 與腎髓質 (renal medulla) 區，前者位於腎臟外層，包含腎元 (nephron)，其組織於相鄰之腎椎體 (pyramid) 間向腎髓質區呈輻射狀延伸形成腎柱 (renal columns)，將腎髓質與腎皮質分開；後者位於腎臟內層，由腎椎體 (pyramid) 構成，且其頂端形成腎乳頭 (papillæ renales)，包含來自腎皮質區之腎小管 (renal tubules)。每個腎臟由約 100 萬個腎元組成，腎元為腎臟之基本功能單位，每個腎元由腎小體 (renal corpuscle) 與腎小管組成，而腎小體包含了腎絲球 (glomerulus) 與鮑氏囊 (bowman's capsule)，腎絲球由入球小動脈 (afferent arteriole) 與出球小動脈 (efferent arteriole) 間之微血管網所組成，且管壁具有通透性高之孔洞以過濾血漿，而鮑氏囊為腎小管封閉端之延伸，並由二層鱗狀表皮細胞組成；腎小管則依序包含了近曲小管 (proximal convoluted tubule)、亨耳氏套 (loop of Henle) 及遠曲小管



(distal convoluted tubule) 三部分，近曲小管位於腎皮質區，表皮由立方上皮細胞組成，其上方具有微絨毛所形成之刷狀緣 (brush border)，可增加水分再吸收與分泌作用之表面積，而亨耳氏套位於腎髓質區，其下降支 (descending limb of the loop of Henle) 由鱗狀上皮組成，上降支 (ascending limb of the loop of Henle) 由立方或低之柱狀上皮細胞組成，且對水具不通透性，此外，遠曲小管位於腎皮質區，其組成之立方上皮細胞形成緻密斑 (macula densa)，不具有微絨毛，且醛固酮 (aldosterone) 於此作用將鈉離子 (Na^+) 與水分進行再吸收，並排出鉀離子 (K^+)；接著，集尿管則連結所有遠曲小管開口，將尿液收集到輸尿管而進入膀胱。



2.1.2 腎臟之生理功能

腎元為腎臟之基本功能單位，當血液經由入球小動脈進入腎絲球後，會經過四個步驟，分別為過濾 (filtration)、再吸收 (reabsorption)、分泌 (secretion)、排出 (excretion)。因此，腎臟之基本生理功能分為以下五點：

(1) 製造尿液 (urine) 並排泄廢物

腎臟微血管攜帶水分、電解質、養分與代謝後之廢物至腎絲球處進行過濾，而多餘水分、電解質、代謝廢物及少許養分排至腎小管內，此時葡萄糖、維生素、胺基酸、多肽類物質與少量蛋白質於近曲小管處進行再吸收，而尿素、尿酸、肌酸酐、藥物等代謝廢物則經由尿液排出體外。

(2) 調整水分、體液與血壓

調節水分與滲透壓平衡之部位主要位於腎小管，其中，近曲小管為吸收 Na^+ 及分泌 H^+ 之重要場所，而葡萄糖、維生素、胺基酸、多肽類物質、少量蛋白質、 HCO_3^- 、水分及鈉於近曲小管處進行再吸收，以調節人體內之水分、體液、與血壓。

(3) 維持電解質之平衡

腎絲球濾液中含有多種電解質，當濾液進入腎小管後，鈉、鉀、氯、鈣、磷、鎂等重要電解質被再吸收，以維持其於人體血液中濃度之穩定。



(4) 維持酸鹼之平衡

當人體血液 pH 值降低時，促使腎小管分泌 H^+ 、 NH_3 並再吸收 HCO_3^- ，以調節血液（提高）與尿液（降低）之 pH 值。

(5) 製造與分泌賀爾蒙

腎臟可分泌腎素 (renin) 來控制血壓，或分泌紅血球生成素 (erythropoietin, EPO) 來刺激骨髓製造紅血球，亦可產生活性維生素 D (vitamin D) 來控制鈣離子之平衡以維持骨質密度與健康。



2.2 慢性腎臟病

2.2.1 慢性腎臟病

當病人腎臟受損，其腎絲球過濾率 (glomerular filtration rate, GFR) 連續三個月以上低於 $60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ ，導致其結構或功能無法恢復正常、蛋白尿排泄量增加或二者兼具時，即定義為慢性腎臟病 (chronic kidney disease, CKD)。CKD 依 GFR 分為五個階段：第一期為腎功能正常，但具有蛋白尿 (proteinuria) 與血尿 (haematuria) 等病癥，GFR 為 $90 \sim 100 \text{ ml/min/1.73m}^2$ ；第二期為輕度慢性腎衰竭，且併有蛋白尿與血尿等，GFR 為 $60 \sim 89 \text{ ml/min/1.73m}^2$ ；第三期為中度慢性腎衰竭，GFR 為 $35 \sim 59 \text{ ml/min/1.73m}^2$ ；第四期為重度慢性腎衰竭，GFR 為 $15 \sim 29 \text{ ml/min/1.73m}^2$ ；第五期為末期腎臟病變，GFR 為 $< 15 \text{ ml/min/1.73m}^2$ ，達第五期時，腎功能因只剩下正常人之 15%，若腎臟逐漸無法排除體內之代謝廢物與水分，治療方式則多以透析及腎臟移植為主。此外，臺灣常見之 CKD 主要分為五大類，分別為先天性腎臟病 (如最常見之遺傳傾向之多囊性腎臟病)、腎炎 (如原發性腎絲球腎炎)、繼發性腎臟病 (由其他病引起之腎臟病症候群，如糖尿病引起之腎病變及尿毒症)、腎小管間質腎病 (如腎腫瘤、痛風、腎結石、尿道或輸尿管狹窄等) 與血管性腎病變 (如高血壓腎動脈硬化症)，而罹患 CKD 之高危險群則有糖尿病、高血壓或痛風患者、65 歲以上老人、藥物濫用者與有家族腎臟病史者。



2.2.2 慢性腎臟病之動物疾病模式

因 CKD 由腎絲球、腎小管、腎間質或脈管系統之複發或進行性損傷引起，為探討其病理機制，目前已發展出多種 CKD 之模式動物，包含自發模式、遺傳模式及後天誘導模式（表 1）(Yang *et al.*, 2010)，其中，主要用來模擬腎絲球腎炎 (glomerulonephritis) 之模式為 Lupus nephritis、Thy-1 nephritis、Anti-GBM model 與 Alport syndrome；模擬腎絲球硬化 (glomerulosclerosis) 之模式為 Aging、Buffalo/mna rat、Munich Wistar Frömter (MWF) rat、Primary podocyte-specific genetic FSGS models、Puromycin aminonucleoside nephrosis (PAN) and adriamycin nephropathy、Radiation nephropathy、5/6 nephrectomy 與 HIVAN；模擬間質纖維化 (interstitial fibrosis) 之模式為 Unilateral ureteral obstruction (UUO)、Folic acid nephropathy 與 CyA nephropathy；模擬腎臟血管損傷之模式為 Spontaneously hypertensive rats (SHR) 與 DOCA-salt nephropathy，由於上述已建立之模式動物，所針對並模擬之人類 CKD 病理特徵與形成機制不盡相同，因此選擇適合之疾病模式動物將有助於了解並研究具有潛力之 CKD 療法。



表 1 慢性腎臟病動物疾病模式之誘導方式。

Table 1 Induction methods of animal disease model in CKD.

Animal Disease Models of CKD				
Spontaneous		Genetically Engineered	Acquired	
Glomerular and interstitial injury models	Vascular injury models		Immune-induced models	Non-immune induced models
Lupus nephritis	Spontaneously hypertensive rats (SHR)	Primary podocyte-specific genetic FSGS models	Thy-1 nephritis	5/6 nephrectomy
Aging	Buffalo/mna rat	HIVAN	Anti-GBM model	Radiation nephropathy
	Munich Wistar Frömter (MWF) rat	Alport syndrome		Unilateral ureteral obstruction (UUO)
				Puromycin aminonucleoside nephrosis (PAN) and adriamycin nephropathy
				Folic acid nephropathy
				CyA nephropathy
				DOCA-salt nephropathy

慢性腎臟病動物疾病模式之誘導方式分為自發模式、遺傳模式及後天誘導模式三種。

Induction methods of animal disease models of CKD are divided into three types: spontaneous mode, genetically engineered mode and acquired mode.



2.3 腎間質纖維化

2.3.1 腎間質纖維化

腎間質纖維化 (renal interstitial fibrosis, RIF) 為一種病理與生理上之改變，其病理特徵包括細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 之異常沉積、腎絲球硬化與間質纖維化，為所有慢性腎臟病進展之主要途徑。腎臟由於受到創傷、感染、發炎、血液循環障礙及免疫反應等各種致病因素刺激，導致細胞受損，引起腎實質 (皮質與髓質) 受巨噬細胞浸潤，巨噬細胞釋放細胞因子 (cytokine) 與化學激活素 (chemokine) 促使腎小管細胞凋亡，造成腎小管細胞增殖與凋亡之間產生不平衡，接著導致大量肌纖維母細胞 (myofibroblast) 活化與增殖，造成大量細胞外基質 (主成分為膠原蛋白) 異常沉積而形成間質纖維化，使腎實質逐漸硬化並生成疤痕 (tissue scarring)，腎小管萎縮，直至腎臟功能完全喪失 (圖 1) (Pradère *et al.*, 2008)。再者，RIF 形成之分子機制為當腎臟組織受到損傷後，受損組織受到發炎細胞之浸潤，輔助 T 細胞藉由三種路徑，依序為：第一種路徑，輔助 T 細胞透過 Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) 直接作用於成纖維細胞 (fibroblast) 與外被細胞 (pericyte)；第二種路徑，輔助 T 細胞誘導巨噬細胞分泌促增殖及促纖維化之細胞因子與生長因子，如 platelet-derived growth factor (PDGF)、TGF- β 1 及 connective tissue growth factor (CTGF)；第三種路徑，輔助 T 細胞作用於腎小管上皮細胞以誘導其分泌細胞因子與生長因子，促使纖維細胞與外被細胞之遷移、增殖與分化，進而使肌纖維母細胞活化與增殖，以及細胞外基質之異常合成與累積 (圖 2) (Nikolic-Paterson, 2010)。

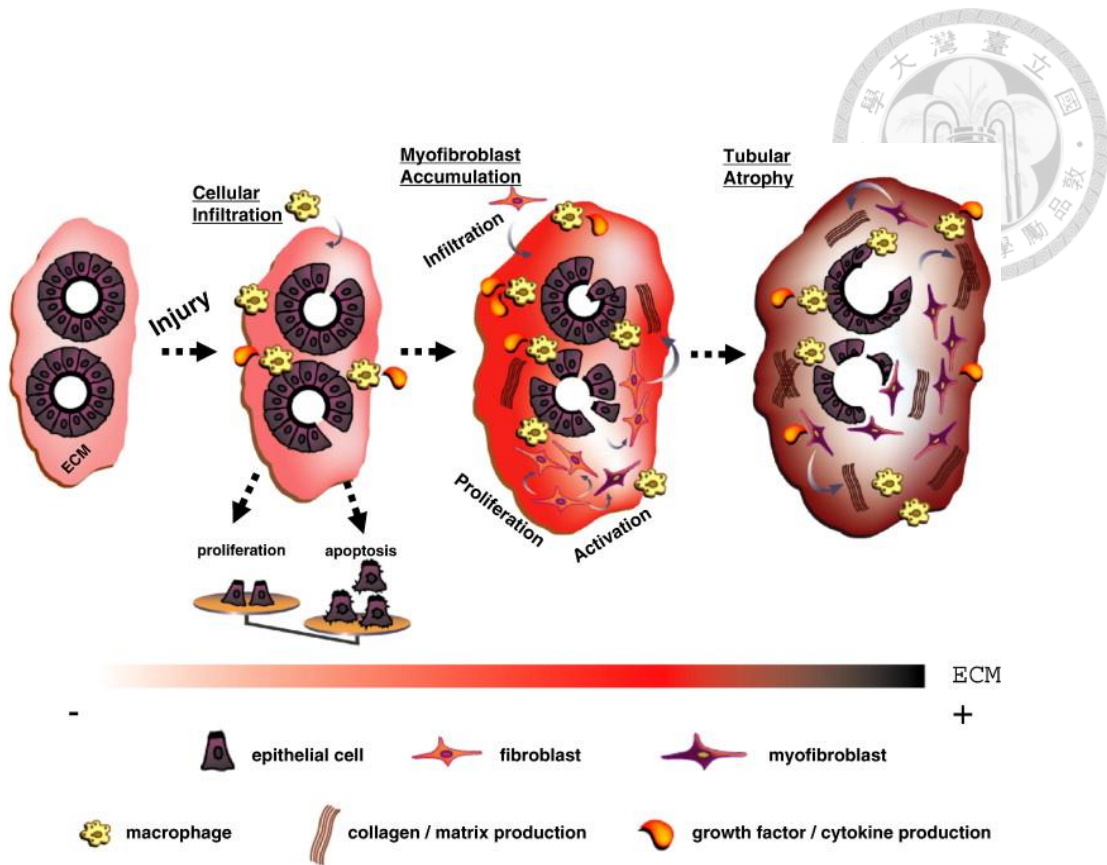


圖 1 腎間質纖維化之形成。

Figure 1 Renal interstitial fibrogenesis (Pradère *et al.*, 2008).

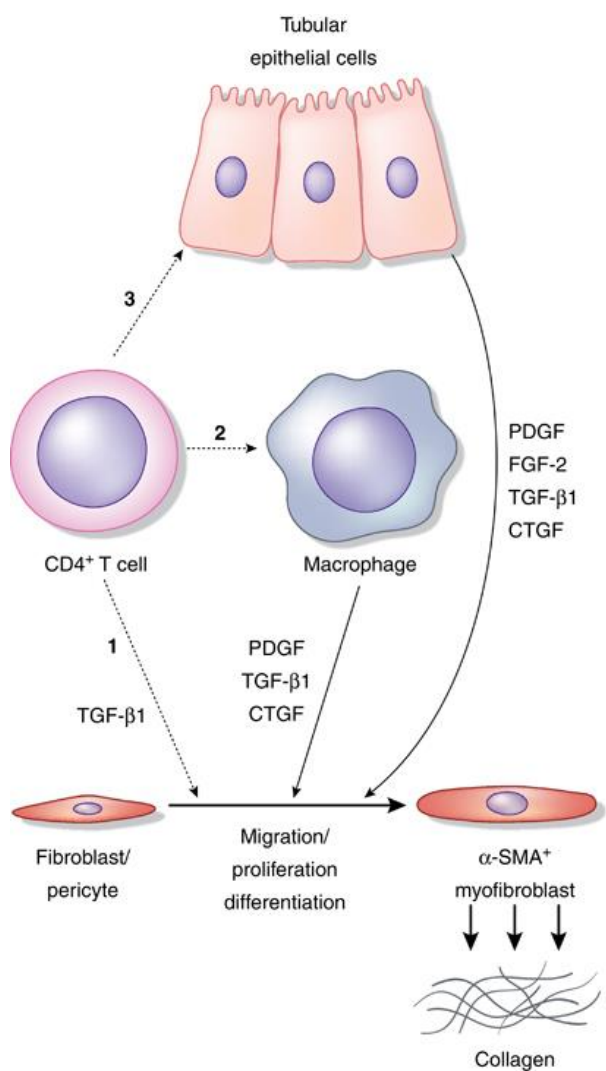


圖 2 輔助 T 細胞於腎間質纖維化中之作用機制路徑。

Figure 2 Mechanism pathways of helper T cells in RIF (Nikolic-Paterson, 2010).



2.3.2 腎間質纖維化之動物疾病模式

至今用於誘導 RIF 動物疾病之模式分為五種類別，依序為化學模式、物理模式、手術模式、自發性模式以及基因修飾模式 (Nogueira *et al.*, 2017)，如表 2 所示。化學模式之誘導方法為每日餵食 HgCl₂ 或注射 Vanadate、Adriamycin、Uranyl nitrate、Folic acid、Streptozotocin 或 Cyclosporine A 並持續一段時間；物理模式透過注射局部劑量 (10 Gy) 之放射性物質；手術模式經由切除 2/3 左腎 (5/6 Renal mass reduction)、結紮左側輸尿管 (unilateral ureteral obstruction, UUO) 或缺血再灌注損傷 (Ischaemia-reperfusion) 來誘使 RIF 形成；自發性模式則因遺傳缺陷而自發產生 RIF 之病徵，如 Buffalo/Mna rats 或 Munich Wistar Frömter rats；基因修飾模式為利用轉基因 (Nep25、Tg26、Coll-green fluorescent protein 或 AT1a receptor) 之方式導致模式動物之腎臟產生 RIF。

此外，上述所提及之 RIF 之動物疾病模式中，單側輸尿管梗阻 (unilateral ureteral obstruction, UUO) 為目前較廣泛用來模擬 RIF 之動物模式 (Zhao *et al.*, 2015)，藉由將動物左側輸尿管下方 1/3 處進行結紮，經一段時間誘導該動物之左腎產生 RIF，此模式於腎臟組織細胞間之交互作用與腎臟形成間質纖維化之機制相同 (圖 3) (Chevalier, 2006)，且具有容易執行、能快速取得實驗數據及對側腎臟 (右腎) 可作為對照之優點 (Yang *et al.*, 2010)；一般經輸尿管結紮後 1 週可誘導小鼠之 RIF，2 至 3 週則可誘導大鼠之 RIF (Nogueira *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2015)。



表 2 腎間質纖維化動物疾病模式之誘導方式。

Table 2 Induction methods of animal disease model in RIF.

Animal Disease Models of RIF				
Chemical	Physical	Surgical	Spontaneous	Genetically Modified
Mercuric chloride (HgCl ₂)	Radiation Nephropathy	5/6 Renal mass reduction	Buffalo/Mna rats	Transgenic mouse strain (Nep25)
Vanadate		Unilateral ureteral obstruction	Munich	HIV-associated nephropathy (HIVAN) transgenic mouse model
Adriamycin		Ischaemia-reperfusion		Coll-green fluorescent protein transgenic mice
Uranyl nitrate				AT1 receptor-deficient mice
Folic acid				
Streptozotocin-diabetic rats				
Cyclosporine A				

腎間質纖維化動物疾病模式之誘導方式分為化學、物理、手術、自發性以及基因修飾模式五種。

Induction methods of animal disease models of RIF are divided into five types: chemical, physical, surgical, spontaneous and genetically modified mode.

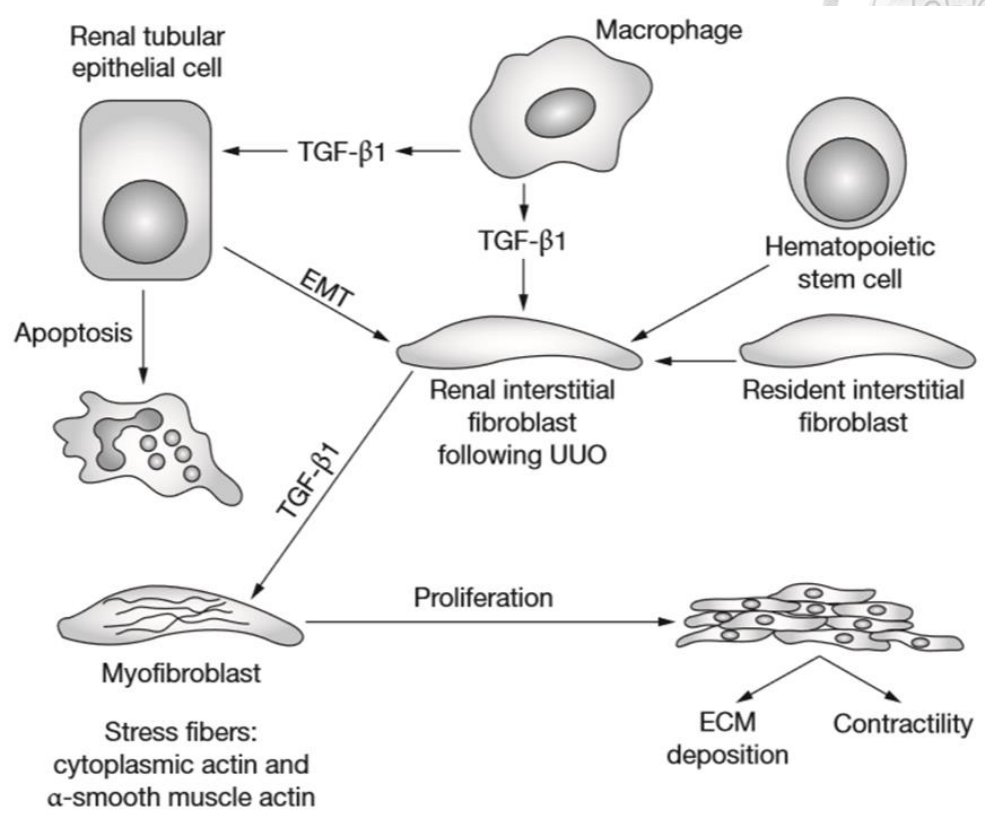


圖 3 單側輸尿管梗阻動物疾病模式之腎臟細胞間之交互作用。

Figure 3 Renal cellular interactions in UUO animal disease model (Chevalier, 2006).



2.4 幹細胞

2.4.1 何謂幹細胞？

幹細胞 (stem cell) 為一種具有克隆性 (clonality)、增殖能力 (proliferative capacity) 及可塑性 (plasticity) 之細胞類型，並藉由非對稱性分裂 (asymmetric cell division) 產生一個保有原來特性之幹細胞以維持自我更新 (self-renew) 之能力，與一個分化 (differentiate) 為特定細胞系 (specialized cell lineage) 之細胞。

因此，幹細胞依其可塑性分為全能性幹細胞 (totipotent stem cell)、多能性幹細胞 (pluripotent stem cell)、複能性幹細胞 (multipotent stem cell) 與單能性幹細胞 (unipotent stem cell) (Najem *et al.*, 2016)。全能性幹細胞具有分化為所有三胚層 (外胚層、中胚層及內胚層)、滋養層胚外組織及胎盤之分化能力，可形成完整之個體，例如：受精卵；多能性幹細胞具有分化為所有三胚層 (外胚層、中胚層及內胚層) 之分化能力，但無法分化為滋養層胚外組織及胎盤，例如：胚幹細胞；複能性幹細胞具有分化為單一胚層內，三種或以上細胞系 (lineage) 之分化能力，例如：骨髓間葉幹細胞、羊水幹細胞及牙髓幹細胞等；單能性幹細胞僅具有分化為單一特定細胞系之能力，例如體內之上皮先驅細胞 (epithelial progenitor cells)、皮膚幹細胞 (skin stem cells) 及 B 或 T 細胞等。

此外，幹細胞又依其來源可分為胚幹細胞 (embryonic stem cells, ESCs)、成體幹細胞 (adult stem cells, ASCs) 與誘導性多潛能幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs)。其中，成體幹細胞為自人體多種組織或器官中發現之幹細胞，例如：皮膚、骨髓、血液、脂肪及肝臟等，其可塑性與增殖能力較 ESCs 差 (Di Bernardo *et al.*, 2016)，卻較 ESCs 無倫理道德上之爭議性，以及移植後形成畸胎瘤之風險較小，因此有許多研究團隊進行提高成體幹細胞幹性之相關研究，或將其移植至疾病模式動物體內以探討其於臨床研究上之應用潛能。



2.4.2 羊水幹細胞

2.4.2.1 羊水

羊水 (amniotic fluid, AF) 為胎兒發育過程中充滿於羊膜腔 (amniotic cavity) 中之液體，其液體組成包含胎兒之尿液、電解質、蛋白質、碳水化合物、磷脂質，以及自三胚層 (胎兒皮膚、尿液、腸胃道、呼吸道及胚胎外膜細胞等) 脫落之異質性 (heterogeneous) 細胞群，除了提供胎兒發育期間之環境保護及溫度調節，亦可作為診斷胎兒之發育情況 (如胎兒肺部之成熟度) 及遺傳疾病等 (Da Sacco *et al.*, 2017; Di Bernardo *et al.*, 2016; Underwood *et al.*, 2005)。

2.4.2.2 羊水幹細胞 (amniotic fluid stem cells, AFSCs)

羊水之相關研究始於二十世紀，起因於羊膜穿刺術 (amniocentesis) (Di Bernardo *et al.*, 2016)，此術為目前診斷產前胎兒之染色體異常等遺傳疾病之工具。Torricelli *et al.* (1993) 首次於羊水中先驅細胞 (progenitor cells) 之研究結果表示羊水中可能具有幹細胞之存在，因而開啟了後續羊水來源細胞之相關研究。自羊水中分離出之羊水幹細胞外觀型態可分為三種類型：羊水特異型 (amniotic fluid-specific, AF-type)、類上皮型 (epithelioid type, E-type) 與纖維母細胞型 (fibroblastic type, F-type) (Hoehn *et al.*, 1975; Ramasamy *et al.*, 2018)。此外，羊水幹細胞 (amniotic fluid stem cells, AFSCs) 可表現典型幹細胞皆表現之 CD90 表面抗原、類似間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 之表面抗原如 CD29 等，及幹性 (stemness) 與多能性 (pluripotency) 相關之分子標誌如 octamer-binding transcription factor 4, (Oct-4) 等，且其特性介於多能性與複能性幹細胞之間，應用上較 ESCs 無倫理道德之爭議及形成畸胎瘤之風險，具有低免疫原性、來源取得容易且低侵入性 (Gholizadeh-Ghaleh Aziz *et al.*, 2017; Joo *et al.*, 2012)，以及相較於 BMSCs 具有可分化為三胚層細胞系 (Joo *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2012; Ramasamy



et al., 2018) (圖 4) 之優點等。再者，Kaviani *et al.* 於 2001 年首次提出羊水來源之先驅細胞可用於細胞治療，且其團隊於三年後第一次將羊水間葉幹細胞 (AF mesenchymal stem cells, AF-MSCs) 應用於體內，並表示 AF-MSCs 有助於自體肌腱之重建 (Fuchs *et al.*, 2004)，此外，隨後陸續有研究將 AFSCs 應用於神經組織 (Cipriani *et al.*, 2007)、心臟 (Yeh *et al.*, 2010)、肺臟 (Petersen *et al.*, 2010)、腎臟 (Perin *et al.*, 2010) 或骨頭 (Maraldi *et al.*, 2011) 等，綜上所述，AFSCs 因此被認為於再生醫學領域上具有一定之臨床應用潛力。

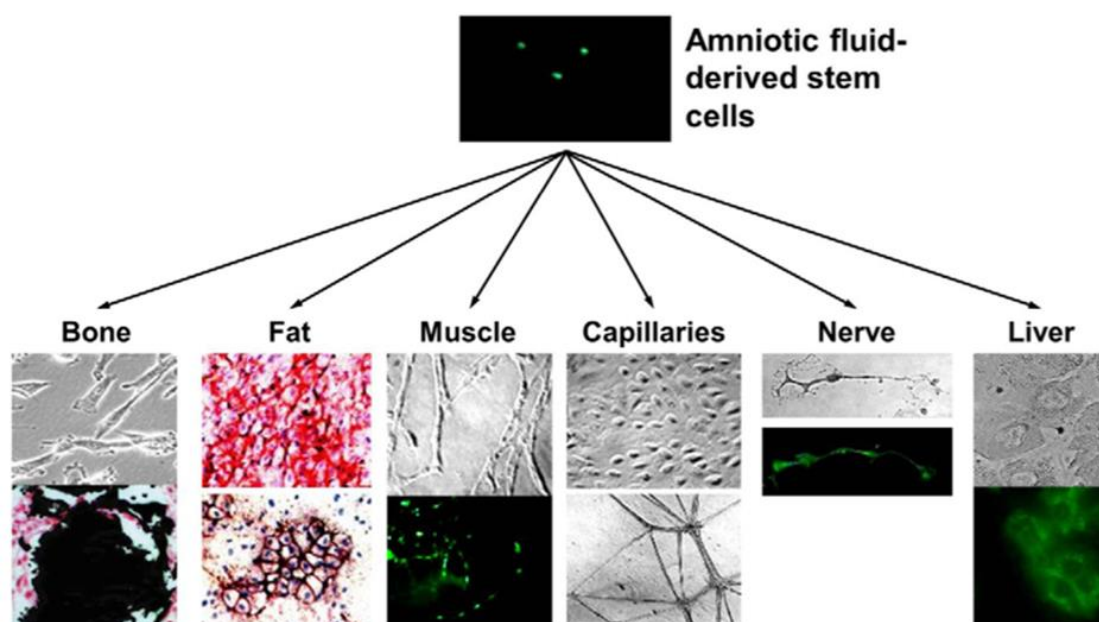


圖 4 羊水幹細胞可分化為三胚層之細胞系。

羊水幹細胞可分化為三胚層之細胞系，例如：肝細胞 (內胚層)、神經元細胞 (外胚層) 及骨頭細胞、脂肪細胞、肌肉細胞及血管 (中胚層)。

Figure 4 Amniotic fluid stem cells can differentiate into lineages representative of three germ layers (Joo *et al.*, 2012).

Amniotic fluid stem cells can differentiate into lineages representative of three germ layers such as liver cells (endoderm), nerve cells (ectoderm) and bone cells, adipose cells, muscle cells and capillaries (mesoderm).



2.5 低氧培養於再生醫學領域之研究

迄今已有許多間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 應用於疾病治療之相關研究，而 MSCs 之體外例行擴增培養程序一般於 21% O₂ 濃度 (normoxia, Nor) 下進行，此環境氧濃度約為體內 MSCs 生存環境之 4 至 10 倍，可能對體外培養之 MSCs 產生氧化壓力，進而導致移植後治療功效降低 (Kim *et al.*, 2016)。

綜觀前人文獻，許多研究曾將 ESCs、脂肪來源間葉幹細胞 (Adipose-derived mesenchymal stem cells, ADSCs)、骨髓間葉幹細胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 及神經幹細胞 (neural stem cells, NSCs) 等置於低氧環境 (hypoxia, Hyp) 下培養以模擬這些幹細胞於體內生存微環境 (microenvironment) 之氧濃度 (Liu *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2009) (表 3)，觀察這些幹細胞於低氧培養下增殖及分化能力之影響 (Ma *et al.*, 2009)，或是探討 Hyp 培養對幹細胞應用於動物疾病模式如：大鼠中大腦動脈閉塞 (middle cerebral artery occlusion, MACO) 模式產生之缺血性中風 (Wei *et al.*, 2012)、大鼠心肌梗塞 (rodent myocardial infarction) 模式 (Hu *et al.*, 2008) 及大鼠缺血再灌注引起之腎功能衰竭模式 (Zhang *et al.*, 2014) 等之影響。然而，相較於前述較常提及之幹細胞種類，羊水幹細胞經 Hyp 培養處理之研究較少，2010 年，Phermthai *et al.* 建立以 5% 氧濃度培養人類羊水幹細胞 (human AFSCs, hAFSCs) 用於治療目的，其結果顯示此 Hyp 培養較以往之培養方式，可提高 hAFSCs 之增殖能力約 2 至 5 倍，並於第 18 代 hAFSCs 仍維持其正常染色體核型 (karyotype)。此外，Jun *et al.* (2014) 將人類羊水間葉幹細胞 (human amniotic fluid mesenchymal stem cell, hAF-MSCs) 於 1% 及 5% 氧濃度下培養，其結果發現 hAF-MSCs 之條件培養液 (conditioned medium, CM) 透過 TGF- β / SMAD2 及 PI3K/AKT 路徑，具有促進皮膚纖維母細胞之增值與遷移之能力。Dionigi *et al.* (2014) 比較不同來源之 MSCs 於 1% 氧濃度與 Nor 培養間之影響，其結果顯示於 Hyp 培養中，僅產前來源之 MSCs，即 AF-MSCs 與臍帶血間葉幹細胞



(umbilical cord blood, CB-MSCs) 於體外培養之增殖率顯著較 Nor 培養高。再者，Schiavo *et al.* (2015) 則比較妊娠晚期與妊娠中期取得之 AFSCs 誘導分化為內皮細胞之潛力，並觀察到 Hyp (5% O₂) 皆可增加於不同妊娠期取得之 AFSCs 之體外增殖率。2018 年，另有研究團隊表示 hAFSCs 經 Hyp (1% O₂) 處理，其 hAFSCs-CM (conditioned medium, CM) 移植注射於心肌梗塞 (myocardial infarction, MI) 模式動物之心肌後，具有顯著之心臟保護作用 (Balbi *et al.*, 2018)。

綜上所述，雖然前人研究鮮少探討 Hyp 培養對 AFSCs 之影響及經 Hyp 培養後之 AFSCs 於動物疾病模式之效用，將前述與 AFSCs 之低氧培養相關研究彙整後 (表 4)，可知低氧培養處理之 hAFSCs 或 hAF-MSCs 相較於常規培養條件 (21% O₂) 具有維持 hAFSCs 或 hAF-MSCs 之幹性，且提高其體外培養之細胞增殖率，其 CM 甚至對受損組織具有保護之作用，因而，經低氧培養後之 AFSCs 或其 CM 具有一定之治療潛力，可能有助於未來幹細胞療法於臨床再生醫學領域中之應用。

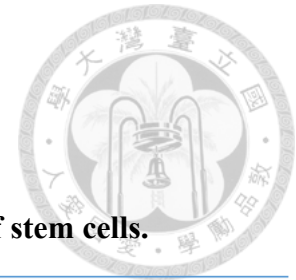


表 3 不同種類之幹細胞微環境氧濃度。

Table 3 O₂ concentration in microenvironment of different types of stem cells.

Stem cell	ESCs	MSCs	ADSCs	NSCs	Fetal development process (AFSCs)
<i>In vivo</i> O ₂ concentration	1~5%	1~2%	3%	0.55~8%	4~5%
References	(Ma <i>et al.</i> , 2009)	(Ma <i>et al.</i> , 2009; Liu <i>et al.</i> , 2017)	(Ma <i>et al.</i> , 2009)	(Liu <i>et al.</i> , 2017)	(Ma <i>et al.</i> , 2009)

ESCs、MSCs、ADSCs、NSCs、胎兒發育期間之微環境氧濃度分別約 1~5%、1~2%、3%、0.55~8% 及 4~5%，此外，因 AFSCs 取自胎兒發育期間，故 AFSCs 微環境氧濃度約為 4~5%。

ESCs, MSCs, ADSCs, NSCs and fetal development process of O₂ concentration in microenvironment is separately about 1 ~ 5%, 1 ~ 2%, 3%, 0.55 ~ 8% and 4 ~ 5%, and because AFSCs are derived during fetal development process, O₂ concentration in microenvironment of AFSCs is 4 ~ 5%.

表 4 羊水幹細胞之低氧培養相關文獻。

Table 4 References of amniotic fluid stem cells with hypoxic culture.

Source	O ₂ concentration (<i>in vitro</i> culture)	Major findings (Hyp-)	References
hAFSCs	5%	↑ Proliferation rate 2~5 fold Maintain normal karyotype	(Phermthai <i>et al.</i> , 2010)
hAF-MSCs	1% and 5%	Proliferation ↑ Maintain stemness	(Jun <i>et al.</i> , 2014)
CM		Wound healing ↑	
hAFSCs	1%	Proliferation ↑	(Dionigi <i>et al.</i> , 2014)
hAFSCs	5%	Proliferation ↑	(Schiavo <i>et al.</i> , 2015)
hAFSCs-CM	1%	cardioprotection	(Balbi <i>et al.</i> , 2018)



2.6 羊水幹細胞於腎間質纖維化之研究

幹細胞因其所具備之特性於臨床再生醫學領域具有應用之潛力，而 AFSCs 相較於 ESCs 較無倫理道德之爭議及形成畸胎瘤之風險，亦具有分化為三胚層細胞系之能力、低免疫原性、來源取得容易且低侵入性等優點，因而許多研究開始以 AFSCs 取代其他來源之幹細胞進行臨床疾病模式之研究。

2012 年，Sedrakyan *et al.* 將 mouse amniotic fluid stem cells (mAFSCs) 經左心室注射移植至 1.5 月齡且尚未產生蛋白尿之 Alport syndrome (Col4a5^{-/-}) 小鼠體內，其結果顯示 mAFSCs 能增加 Alport syndrome (Col4a5^{-/-}) 小鼠之存活，並顯著降低其體內之血清肌酸酐 (creatinine, CR)、蛋白尿與血液中之尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 之含量。此外，Sun *et al.* (2013) 將 human AFSCs (hAFSCs) 藉由尾靜脈注射移植至經 UUO 模式之小鼠體內，發現經 hAFSCs 移植後之組別，其腎臟組織之周邊微血管 (peritubular capillary, PTC) 密度較高，且腎臟組織間 TGF- β 1 表現量較低。再者，Monteiro Carvalho Mori da Cunha *et al.* (2015) 則進一步將含有腎臟先驅細胞表型 (renal progenitor phenotype) 之 hAFSCs 透過腎動脈注射移植至經缺血再灌注損傷 (ischemia-reperfusion injury) 之大鼠體內，研究顯示 hAFSCs 移植之組別，其大鼠體內之 CR 於 24 小時內降低，於 48 小時內減少腎小管壞死、降低發炎細胞浸潤及肌纖維母細胞 (myofibroblasts) 之增生，並且於 2 個月後，hAFSCs 移植組別之腎臟具有較低之纖維化程度及蛋白尿之形成。

綜上所述，AFSCs 之移植對改善受損之腎臟組織及腎間質纖維化之病徵具有一定之潛能，可作為未來於臨床治療改善腎間質纖維化之潛在幹細胞來源。然而，近年來僅少數研究團隊將 AFSCs 移植至疾病模式動物體內以探討其對腎間質纖維化之療效與作用機制，儘管 AFSCs 已有許多研究將其應用於腎臟細胞體外分化、藥物毒理學、腎臟組織工程，以及急性與慢性腎臟損傷治療等領域，AFSCs 之應用仍有許多問題有待



進一步去釐清，例如：缺乏體外標準分離與擴增方法、表面抗原特性之維持、旁分泌之作用機制、免疫調節之能力，以及異種移植之問題等 (圖 5) (Da Sacco *et al.*, 2017)。

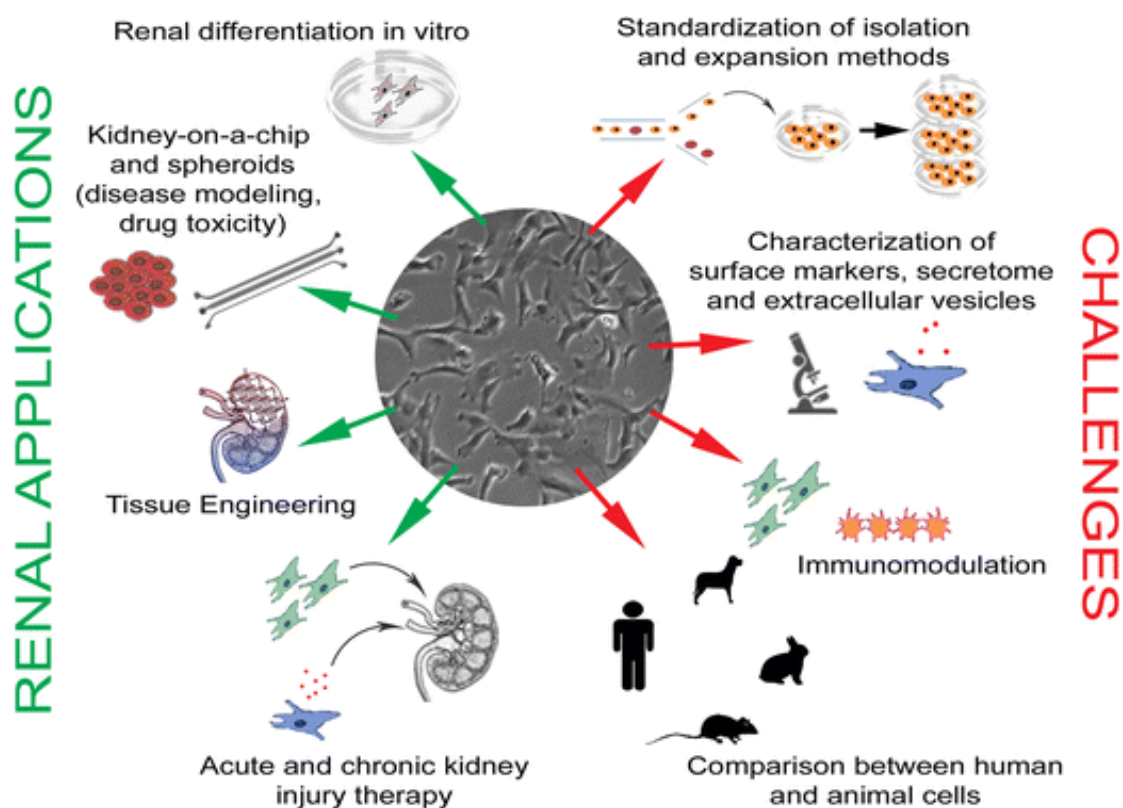


圖 5 羊水來源之細胞於腎臟再生醫學領域之應用與挑戰

Figure 5 Application and challenges of amniotic fluid-derived cells for renal regenerative medicine (Da Sacco *et al.*, 2017).



第三章 試驗研究

3.1 低氧處理對大鼠羊水幹細胞之幹性、增殖及分化潛能之影響

3.1.1 前言

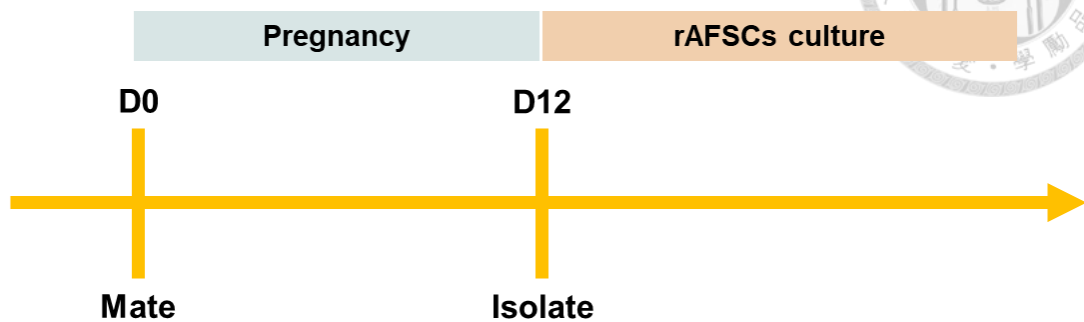
間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 為常見用於疾病治療研究之幹細胞，其體外擴增培養程序一般於常氧下進行，然而此環境氧濃度約為體內 MSCs 生存環境之 4 至 10 倍，可能對體外培養之 MSCs 產生氧化壓力，進而導致移植後治療功效降低 (Kim *et al.*, 2016)。然而，相較於前人文獻多探討 MSCs 於 Hyp 培養之相關議題，AFSCs 於 Hyp 之培養相關研究較少。前述提及 AFSCs 分離自羊水，而羊水中含有胚胎發育過程中脫落之三胚層細胞群，其特性介於多能性與複能性幹細胞之間，於應用上較 ESCs 無倫理道德之爭議及產生畸胎瘤，具有低免疫原性、來源取得容易且低侵入性，以及可分化為三胚層細胞系之優點等，且 AFSCs 取自胎兒發育期間，故 AFSCs 之微環境氧濃度約為 4~5% (Ma *et al.*, 2009)，因此本試驗欲建立低氧 (Hypoxia, Hyp, 5%) 培養之大鼠羊水幹細胞 (rat amniotic fluid stem cells, rAFSCs)，探討 Hyp 是否能維持 rAFSCs 之幹性，並提高 rAFSCs 體外培養擴增程序之效率，以利後續試驗之進行。



3.1.2 試驗設計

自樂斯科生物科技股份有限公司取得 7 週齡 SD rats (♂) 與 SD rats (♀)，待其適應一週後，觀察母鼠是否發情，於動情週期間之傍晚將公鼠與母鼠合籠，採一對一配種，隔天早上約 9:30 前觀察母鼠陰道是否有白色之陰道栓，如有陰道栓便確認該母鼠成功配上，待懷孕 12 天後，將其犧牲以分離羊水 (圖 6-A)，同時將羊水與培養液混合後分為 常氧 (Normoxia, Nor: 37 °C, 5% CO₂, 19.9% O₂, 74.1 N₂) 與低氧 (Hypoxia, Hyp: 37 °C, 5% CO₂, 5% O₂, 89.1% N₂) 二組進行培養 (圖 6-B)，持續培養至足夠細胞量後，挑選一相同胎兒羊水來源且於 Nor 及 Hyp 二種培養環境皆具有較佳生長情況之 rAFSCs 細胞系，以避免個體差異造成試驗中之變因，始將部分細胞進行大鼠羊水幹細胞 (Rat amniotic fluid stem cells, rAFSCs) 之外觀型態、細胞大小、表面抗原、體外增殖與分化潛能 (脂肪、硬骨及軟骨細胞) 之檢測分析，另一部分細胞則進行冷凍保存以利後續移植試驗之進行。

(A)



(B)

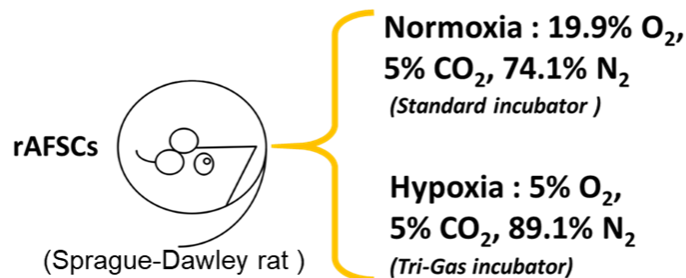


圖 6 大鼠羊水幹細胞分離與培養之流程圖。

(A)大鼠於傍晚配種 (D0)，隔天早上觀察是否有陰道栓，若有陰道栓則於懷孕 12 天 (D12) 後分離大鼠羊水進行羊水幹細胞之培養；(B)大鼠羊水幹細胞分別於 Normoxia (37 °C, 5% CO₂, 19.9% O₂, 74.1 N₂) 及 Hypoxia (37 °C, 5% CO₂, 5% O₂, 89.1% N₂) 二種氧濃度環境下培養；D: 天。大鼠卡通圖取自 Noun Project (N. K. Narasimhan)。

Figure 6 Process chart of isolation and culture of rAFSCs.

(A) Rat was mated in the evening (D0) and was observed whether had the vaginal plug. If the rat have vaginal plug , then isolate rAFSCs in 12-day pregnancy (D12) and start to culture rAFSCs; (B) rAFSCs were cultured under two oxygen concentrations: Normoxia (37 °C, 5% CO₂, 19.9% O₂, 74.1 N₂) and Hypoxia (37 °C, 5% CO₂, 5% O₂, 89.1% N₂); D: day. Rat cartoon picture was created by N. K. Narasimhan from Noun Project.



3.1.3 材料與方法

3.1.3.1 實驗動物

本試驗所使用之 Sprague Dawley rats (SD rats) 購自於樂斯科股份有限公司並飼養於本系之動物舍，溫度維持於 23~25 °C，相對濕度保持在 40%~60%，使用自動控制光照循環 (12L:12D)，於每日早上 7 點亮燈，晚上 7 點熄燈。SD rats 採用任食飼養，提供充足之飲水及大鼠專用飼糧 (ALTRONIN, 1324)，並定期更換墊料 (TAPVEI aspen bedding) 與消毒以維持環境整潔。

3.1.3.2 大鼠羊水幹細胞之分離與培養

本試驗使用懷孕 12 天之 SD rat (配種時週齡：♀ 10~11w, ♂ 27~28w；分離羊水時週齡：♀ 12w)，以舒泰 (Zoletil 50, 0.1ml/100g of rat) 進行麻醉後，取出子宮角 (圖 7)，快速浸泡 70% 酒精予以消毒後，再以磷酸緩衝溶液 (Dulbecco's Phosphate-Buffered Salines, D-PBS) (gibco, 21600-051) 潤洗 2 次，放入含有 D-PBS 之培養皿上去除表面結締組織、絨毛膜和胎盤，分離出含有完整羊膜之胚胎，再將其分別以 27 G 針頭刺破羊膜，使羊水分別流入 1.5 ml tube 後，加入 1ml 含 100 U/mL penicillin 及 100 µg/mL streptomycin (gibco, 15140)，3.7 mg/mL 碳酸氫鈉 (sodium bicarbonate, NaHCO₃) (Sigma, s5761)，1% GlutaMax, 100X (gibco, 35050061)/1% GlutaGO, 100X (Simply, CC516.0100) 及 20% 胎牛血清 (bovine fetal serum, FBS) (Hyclone, SH30084.03) 之 α-MEM (minimum essential medium alpha-modification) (Sigma, M0894) 培養液混合均勻，再分別將 1ml 之混合液以 500 µl 分為常氧與低氧二組 (normoxia, Nor 與 hypoxia, Hyp)，置於 48 well 中，隨後分別放置於 Nor (37 °C, 5% CO₂, 19.9% O₂, 74.1 N₂) 與 Hyp (37 °C, 5% CO₂, 5% O₂, 89.1% N₂) 之培養箱進行培養，每 3 天更換一次培養液，約



8 至 9 天後細胞會達到滿盤 (confluence)。

待 rAFSCs 增生至滿盤後，移除培養液，經 D-PBS 潤洗 1 次後加入 0.25% 之 trypsin-EDTA (gibco, 2500056/ Hyclone, SH30042.01) 將細胞懸浮，以 1200 rpm 離心 5 分鐘後吸除上清液，加入新的培養液混合均勻並進行繼代，待細胞持續繼代至第 6~7 代時，挑選一相同胎兒羊水來源且於 Nor 及 Hyp 二種培養環境皆具有較佳生長情況之 rAFSCs 細胞系，以避免個體差異造成試驗中之變因，始進行後續之試驗。



圖 7 懷孕 12 天之大鼠子宮角。

Figure 7 Uterine horn of 12-day pregnant rat.



3.1.3.3 細胞計數

以 0.25% 之 trypsin-EDTA 將細胞懸浮後，取 20 μ l 細胞液加入等量之錐蟲藍 (trypan blue) (gibco, 15250) 染色，取 10 μ l 染色後之細胞液滴入血球計數器 (hemocytometer)，計算未被染色之細胞數目，重複計算二次，加以計算後可得總細胞數。

3.1.3.4 細胞之培養與保存

待 rAFSCs 滿盤後，吸除培養液，經 D-PBS 潤洗 1 次後以 0.25% 之 trypsin-EDTA 於 37 °C 反應 2~3 分鐘，細胞懸浮後加入等量之培養液終止反應，以 1200 rpm 離心 5 分鐘後，依細胞種類及生長速度以 1 : 2~3 之比例分盤。當細胞進行冷凍保存時，將細胞顆粒懸浮於含有 10 % 之二甲亞石風 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) (Sigma, D2650) 之胎牛血清中，以大約每分鐘降低 1 °C 之速率降溫，緩慢冷凍細胞至 -85 °C 後置於液態氮中保存。

3.1.3.5 細胞表面抗原分析

將 rAFSCs 分別以 Nor 與 Hyp 二種培養環境進行培養至第 11 代後，吸除培養液，經 D-PBS 潤洗 1 次後以 0.25% 之 trypsin-EDTA 於 37 °C 反應 2~3 分鐘使細胞懸浮，以 1200 rpm 離心 5 分鐘後吸除上清液。利用免疫細胞化學法 (Immunocytochemistry, ICC) : D-PBS 潤洗後，以 1200 rpm 離心 5 分鐘，吸除上清液 (重複二次)，加入 4% PFA (4g Paraformaldehyde, PFA in D-PBS) (Merck, 1. 04005. 1000)，於冰上靜置 5 分鐘；重複二次 D-PBS 潤洗，加入 PBST (0.1% Tween-20 in D-PBS)，於冰上靜置 5 分鐘；再重複二次 D-PBS 潤洗，將欲檢測之抗體 (antibody, Ab) CD11b-FITC (BD Pharmingen™, 1:500)、CD29-FITC (BD Pharmingen™, 1:500)、CD45-FITC (BD



Pharmingen™, 1:500)、CD90-FITC (BD Pharmingen™, 1:500) 及非特異性對照組 IgA-FITC (BD Pharmingen™, 1:1000)、IgM-FITC (1:1000)、IgG-FITC (BD Pharmingen™, 1:1000) 與 Blocking buffer (1% BFA in D-PBS) 預先混合均勻後，以 500 μ l 混合液將細胞混合均勻，避光，置於 4°C 冰箱 24 hrs；隔天重複二次 D-PBS 潤洗，加入 1 ml Flow buffer (1 ml FBS + 50 ml D-PBS + 200 μ l) 將細胞混合均勻，樣品末濃度 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells / ml，以流式細胞儀進行分析 (Cytomic FC 500)。

3.1.2.6 幹性與多能性相關基因之分析

將 rAFSCs 分別以 Nor 與 Hyp 二種培養環境進行培養至第 11 代後，以定量反轉錄聚合酶連鎖反應 (quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR) 檢測 Nor 與 Hyp-rAFSCs 之 Oct-4 基因表現量倍率之差異。

3.1.2.7 大鼠羊水幹細胞 RNA 之萃取

收集細胞團塊後，加入 500 μ l 之 GENEzol™ Reagent (Geneaid, MC32701/ EBL, MRE-3200K) 將細胞團塊或組織塊均質化，接著將樣品與 GENEzol™ Reagent 震盪混合均勻，500 μ l 混合液加入 50 μ l 1-bromo-3-chloropropane (BCP) (MRC, BP151)，震盪混合均勻後置於室溫反應 15 分鐘後，離心 (12,000 xg, 15 分鐘, 4°C)，取最上層之溶液 (RNA) 並置於新的 1.5 ml tube，加入與上層溶液等量之 isopropanol (Merck, 1.09634.1000)，震盪混合均勻後置於室溫反應 10 分鐘，離心 (12,000 xg, 8 分鐘, 4°C)，去除上清液，以 75% 酒精清洗 RNA 團塊後，將 RNA 團塊曬乾後以分生純水 (Corning, 46-000-CM) 進行回溶 (分生水多寡視團塊大小以 15 ~ 20 μ l 回溶)，最後以 Nano drop 測定 RNA 之 OD 值後，置於 -80 °C 保存。



3.1.2.8 反轉錄反應

將 rAFSCs 之 RNA 加入分生純水配置成 $1\mu\text{g} / \text{tube}$ ($6.4\mu\text{l}$)，接著採用 DNase I, Amplification Grade 套組 (Invitrogen™, 18068015)，依序先加入 DNase I 及 10X DNase I reaction buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 20 mM MgCl_2 , 500 mM KCl] 之混合液 ($0.8\mu\text{l}: 1\mu\text{l}$)，於 22°C 反應 15 分鐘，接著加入 $0.8\mu\text{l}$ 25 mM EDTA (pH 8.0)，於 65°C 反應 10 分鐘，再加入 High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (2X RT Buffer Mix 與 20X Enzyme mix 之混合液，比例為 $10\mu\text{l}: 1\mu\text{l}$) (Applied Biosystems™, 4387406)，於 37°C 反應 60 分鐘， 95°C 反應 5 分鐘，最後將互補 DNA (complementary DNA, cDNA) 置於 -20°C 保存。

3.1.2.10 聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

將 $10\mu\text{l}$ Power Amp 2X PCRmix Green (Biomax, RT008G)、 $2\mu\text{l}$ primer mix ($10\mu\text{M}$)、 $7\mu\text{l}$ 分生純水與 $1\mu\text{l}$ cDNA 混合均勻，總反應體積為 $20\mu\text{l}$ ，並以 2720 Thermol Cycler (Applied Biosystems) 94°C 反應 5 分鐘將雙股 DNA 打開，隨後以 94°C 20s, 58°C 30s, 72°C 20s 分別進行 30 循環 (cycles) (GAPDH) 與 94°C 20s, 55°C 30s, 72°C 20s 進行 35 cycles (Oct-4)，最後再以 72°C 反應 7 分鐘。

3.1.2.11 瓊脂糖凝膠電泳分析

採用水平式電泳槽，以 1X TAE buffer (Cis-Bio, D436-1L) 配置 2% 瓊脂糖凝膠 (agarose gel) (LONZA SeaKem® LE Agarose, 5004)，隨後以微波爐加熱使其溶解，待 agarose gel 冷卻至 55°C 後加入 Ethidium bromide (EtBr) $2\text{ g} / 100\text{ ml}$ ，混合均勻並倒入製膠模型，待冷卻凝固。注入 $5\mu\text{l}$ 100bp DNA Ladder (Biomax, DM100) 與 $20\mu\text{l}$ / 樣品，以 100 V 電壓於 1X TAE buffer 中進行電泳 25 分鐘，取出 agarose gel 於紫外



光下觀察並拍照存檔。

3.1.2.12 即時聚合酶鏈鎖反應 (Real-time polymerase chain reaction, qPCR)

將 cDNA 進行二倍稀釋，取 2 μ l 稀釋後 cDNA 加入 10 μ l Fast SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems™, 4385612)、2 μ l primer mix (10 μ M) (Genomics) (序列如表 5 所示) 與 6 μ l 分生純水 (總體積為 20 μ l / well) 混合均勻，採用 StepOnePlus Real time PCR system (Applied Biosystems)，並以 95°C 20s (holding stage)、95°C 3s，60°C 30s 40 cycles (cycling stage)、60°C 1min，65°C 10s，95°C 10s (melt curve stage) 為條件進行 qPCR。此外，因 qPCR 靈敏度高，故每個樣品做 3 個平行孔，以避免後續數據分析中，由於 Ct 值或 SD 值相差太大而導致無法進行統計分析，而基因表現量之計算公式如表 6 所示。

表 5 大鼠羊水幹細胞之引子序列。

Table 5 rAFSCs primer sequence.

rAFSCs primer sequence			
Primer ID	Sequence (5' → 3')	Product	Product length (bp)
Oct-4 F	TGTTCCCTGTCAGTCTCTGG	NM_001009178.2	164
Oct-4 R	CCCCTGTTTGTGCTTTCAAT		
GAPDH F	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	NM_017008.4	158
GAPDH R	TCAATGAAGGGGTCGTTGAT		



表 6 大鼠羊水幹細胞之 Oct-4 基因表現量倍率計算公式。

Table 6 Calculation formula of rAFSCs Oct-4 gene expression fold change.

	Nor-rAFSCs Ct mean (N)	Hyp-rAFSCs Ct mean (H)	ΔCt_N (Nor-rAFSCs)	ΔCt_H (Hyp-rAFSCs)	$\Delta\Delta Ct$	Gene Expression Fold Change
Housekeeping Gene (H)	HN	HH	TN-HN	TH-HH	$\Delta Ct_N - \Delta Ct_H$	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$
Tested gene (T)	TN	TH				

Nor-rAFSCs Ct mean (N) 之 Housekeeping gene (H) 與 Tested gene (T) 分別簡稱為 HN 與 TN；Hyp-rAFSCs Ct mean (H) 之 Housekeeping gene (H) 與 Tested gene (T) 分別簡稱為 HH 與 TH；試驗結果以 $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ 表示基因表現量倍率。

Housekeeping gene (H) and Tested gene (T) of Nor-rAFSCs Ct mean (N) were respectively referred to as HN and TN; Housekeeping gene (H) and Tested gene (T) of Hyp-rAFSCs Ct mean (H) were respectively referred to as HH and TH; gene expression fold changes of the tested results were represented as $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$.

3.1.3.13 細胞活性與增殖率

將 rAFSCs 分別以 Nor 與 Hyp 二種培養環境進行培養至第 11 代後，分別於繼代後第 0、2、4、6、8 及 10 天，以 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Dojindo, CK04) 比色法測量存活細胞之數量，並每三天更換一次培養液。測量時將 10 μ L 之 CCK-8 加入含有 100 μ L 培養液之 96 孔盤，於 Nor 與 Hyp 培養箱培養 2 小時後，將含有 CCK-8 之培養液移植另一個 96 孔盤，以 ELISA reader 於波長 450 nm 進行分析。計算方式為利用標準曲線換算出第 0、2、4、6、8 及 10 天之細胞數量，再分別將第 2、4、6、



8 及 10 天 450 nm 讀值扣除第 0 天 450 nm 之平均讀值後，除以第 0 天測得之平均讀值；所得之比例即為存活細胞增殖之倍數。

3.1.3.14 體外硬骨誘導分化及分析

將 rAFSCs 分別以 Nor 與 Hyp 二種培養環境進行培養至第 10 代後，以 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 繼代至 12 well-plate (rAFSCs, P11) 培養一天，待 rAFSCs 生長至 8~9 分滿後，去除培養液，加入含 10% FBS、 $0.1 \mu\text{M}$ dexamethasone (Sigma, d4902)， 10 mM glycerol-2-phosphate (Sigma, g9891) 及 $50 \mu\text{M}$ ascorbate-2-phosphate (Sigma, a8960) 之 αMEM 硬骨細胞誘導培養液，每 3 天更換一次培養液，培養 21 天後進行分析。骨細胞之鈣化可以茜素紅染色 (Alizarin Red S, ARS) (Sigma, a5533) 進行分析。首先移除硬骨誘導培養液，使用 PBS 進行 1 次清洗，以將細胞表面之培養液清洗乾淨，接著以 4% PFA (Merck, 1.04005.1000) 於室溫下處理 10 分鐘完成細胞固定，再去除 4% PFA，用 PBS 清洗 1 次，加入 2% Alizarin Red S (以 0.5% ammonium hydroxide (Riedel-de Haën, 05002) 將 pH 值調整至 4.1~4.3) 反應 15 分鐘，以 PBS 充分清洗後，再藉由顯微鏡進行觀察細胞鈣離子堆積情形。接著，加入 10% cetylpyridinium chloride, C.C. (Sigma, C0732-100G) 將 ARS 回溶後，取樣本之 $100 \mu\text{l}$ 置於 96 well，另將 $250 \mu\text{l}$ ARS 加入 $125 \mu\text{l}$ C.C. 並 vortex 20 秒後，再自其中取 $250 \mu\text{l}$ 與 $125 \mu\text{l}$ C.C. 混勻，以此做出 15 管以做出標準曲線，再取 $100 \mu\text{l}$ 置於 96 well，以 O.D.550 測吸光值以進行硬骨誘導之定量分析。



3.1.3.15 體外脂肪誘導分化及分析

將 rAFSCs 分別以 Nor 與 Hyp 二種培養環境進行培養至第 10 代後，以 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 繼代至 12 well-plate (rAFSCs, P11) 培養一天，待 rAFSCs 生長至 8~9 分滿後，去除培養液，加入含 10% FBS, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin (Sigma, i6634), 1 μM dexamethasone、0.5 mM isobutyl-methylxanthine (Sigma, i5879) 及 100 μM indomethacin (Sigma, i7378) 之 α -MEM 脂肪細胞誘導培養液，每 3 天更換培養液一次，培養經 14~15 日後進行分析。脂肪細胞之油滴堆積係以油紅染色 (Oil Red O) (Sigma, o9755) 進行分析。首先移除脂肪誘導培養液，以 PBS 清洗 3 次，將細胞表面之培養液吸乾，接著以 4% PFA 在室溫下處理 10 分鐘完成細胞固定，再用 PBS 進行 2 次清洗，去除 4% PFA，加入 1 ml 之 100% propylene glycol (J. T. Baker, 9402-01) 反應 2 min 後去除，再加入 200 μl 0.5% Oil Red O 置於搖晃機反應 15 分鐘，接著吸除 Oil red O 並於加入 1 ml 60% propylene glycol 後立刻吸除，以 H_2O 充分清洗後，再加入 1 ml H_2O 並藉由顯微鏡觀察細胞油滴堆積情形。接著，加入 200 μl DMSO (Sigma, D5879) 將 Oil Red O 回溶，取樣本之 100 μl 置於 96 well，另將 250 μl Oil Red O 加入 125 μl DMSO 並 vortex 20 秒後，再自其中取 250 μl 與 125 μl DMSO 混勻，以此做出 15 管以做出標準曲線，再取 100 μl 置於 96 well，以 O.D.550 測吸光值以進行脂肪誘導之定量分析。

3.1.3.16 體外軟骨誘導分化及分析

將 rAFSCs 分別以 Nor 與 Hyp 二種培養環境進行培養至第 10 代後，以 0.25% 之 trypsin-EDTA 將細胞懸浮，並以 1200 rpm 離心 5 分鐘後吸去上清液，隨後每 2.5×10^5 細胞以 1 mL 含有 1% FBS、50 nM ascorbate-2-phosphate, 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Insulin, 10 ng/mL TGF- β 1 (R&D system, 240-B-010) 之 α MEM 軟骨細胞誘導培養液混合均勻，先置於 15 mL 離心管 (rAFSCs, P11) 進行培養，每 3 天更換一次培養液，培養 21 日



分析。收取分化之軟骨組織，放入 4% PFA，先置於 4°C 培養三小時後，再進行石蠟包埋並切片（厚度為 5 μm ）。隨後將切片置於非二甲苯（non-xylene）(Muto Pure Chemicals, 43292) 中進行 10 分鐘浸泡脫臘 2 次後，再依序浸泡於 100, 95, 90, 80% 之酒精各 5 分鐘進行復水，爾後置於 ddH₂O 浸泡 5 分鐘，接著依序以 0.02% Fast Green 染色 1 分鐘，1% Acetic acid 染色 20 秒，1% Safranin O 染色 10 分鐘後，經 95% 酒精潤洗，並以 95% 酒精脫水三次後以不含二甲苯之封片膠進行封片，再利用顯微鏡觀察軟骨組織染色情形。

3.1.3.17 統計分析

本實驗之數據使用 GraphPad Prism 6 軟體中之 Sidak's multiple comparisons test 或 Unpaired t test 將處理均值兩兩比較，並以平均值 \pm 標準誤差 (mean \pm SEM) 表示之， $P < 0.05$ 時定義兩者間具有顯著差異。



3.1.4 結果與討論

3.1.4.1 大鼠羊水幹細胞之分離與外觀型態

本試驗之大鼠羊水幹細胞取自懷孕 12 天之 SD rat (配種：♀ 10~11w，♂ 27~28w，w: week)。因 MSCs 一般於體外擴增培養採用 Nor：37°C，5% CO₂，19.9% O₂，74.1% N₂ 之培養環境，此環境氧濃度約為體內 MSCs 生存環境之 4 至 10 倍，且文獻指出骨髓來源之 MSCs 經 1% O₂ 之 Hyp 培養發現可促使 MSCs 之增值能力及存活率增加 (Kim et al., 2016)，故本試驗將大鼠羊水幹細胞進行 Nor 與 Hyp 二種氧濃度環境之培養。此外，根據文獻指出哺乳動物胚胎發育過程中之氧濃度約為 4 至 5% (Ma et al., 2009)，且少數羊水幹細胞之低氧培養文獻採用 5% 氧濃度進行研究，因而本試驗 Hyp 之氧濃度採用 5% O₂ 進行培養及後續試驗。

試驗中之大鼠羊水幹細胞經分離培養後，可自顯微鏡下觀察到多種細胞型態之異質性細胞群體，且隨著繼代次數增加，可觀察到羊水幹細胞呈現類纖維母細胞之紡錘狀細胞型態，且生長方向為螺旋狀排列 (圖 8)。此外，自初代培養開始，隨著繼代次數增加，可逐漸地觀察到於 Nor 與 Hyp 下培養之羊水幹細胞於型態上之差異，例如：第 11 代 rAFSCs 之細胞可於顯微鏡下觀察到尚未貼盤之 Nor-rAFSCs 其細胞型態較 Hyp-rAFSCs 之細胞型態大，因而進一步藉由流式細胞儀進行分析，亦可看出於散射光譜圖中之相同圈選範圍內，Hyp 組之散射點相較於 Nor 組多集中在左下角，經量化後之直方圖中，由前向散射光 (FS Lin，代表細胞大小) 可獲得每一萬顆細胞之平均相對細胞大小 (X-maen)，並經由統計結果顯示 Hyp 組之細胞相對大小顯著小於 Nor 組 (215.0 ± 3.3 v.s. 256.6 ± 2.5，n=8，*P* < 0.001) (圖 9)。

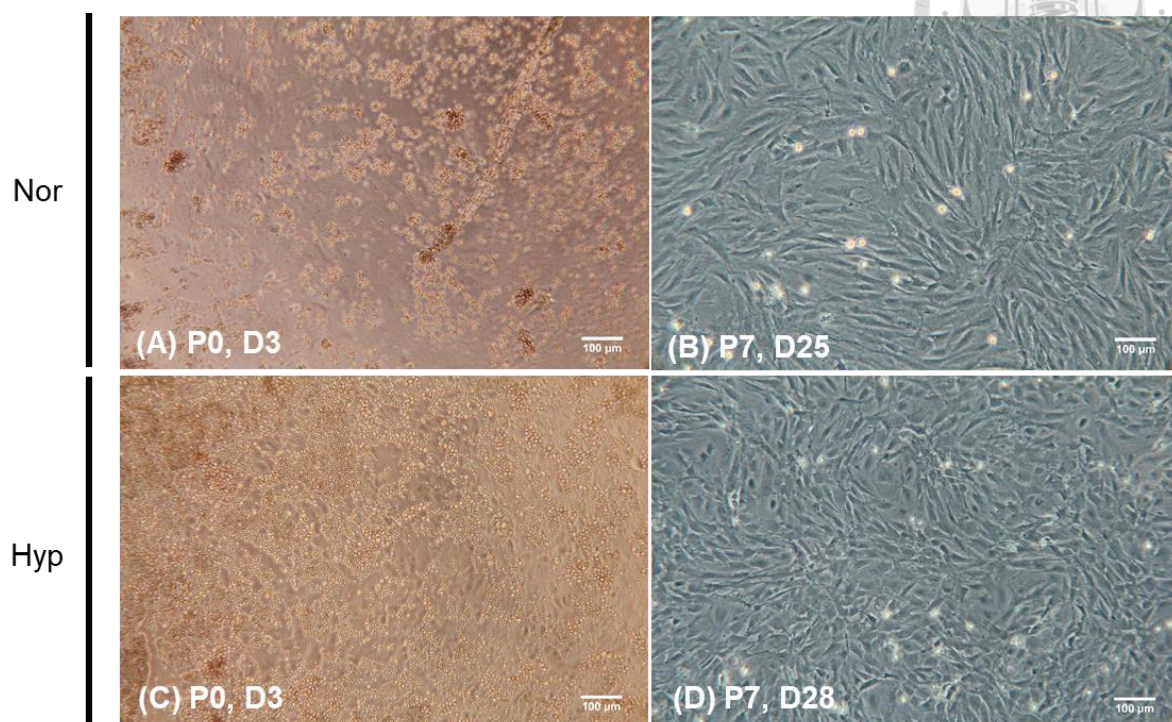


圖 8 大鼠羊水幹細胞於常氧及低氧環境下之細胞型態。

(A)(C) 常氧與低氧環境下培養第三天之初代大鼠羊水幹細胞；(B)(D) 常氧與低氧環境下第 7 代大鼠羊水幹細胞，二者之羊水幹細胞呈現類纖維母細胞之紡錘狀細胞型態，且生長方向為螺旋狀排列。Nor：nomoxia；Hyp：hypoxia；P：細胞代數；D：天數；放大倍率為 100X；比例尺為 100 μ m。

Figure 8 Morphology of rAFSCs under normoxic and hypoxic environment.

(A)(C) P0 of Nor-rAFSCs and Hyp-rAFSCs cultured for 3 days; (B)(D) P7 of Nor-rAFSCs and Hyp-rAFSCs showed spindle-like morphology of fibroblasts and their growth direction exhibit spiral order. Nor: nomoxia; Hyp: hypoxia; P: cell passage; D: day; magnification: X100; scale bar: 100 μ m.

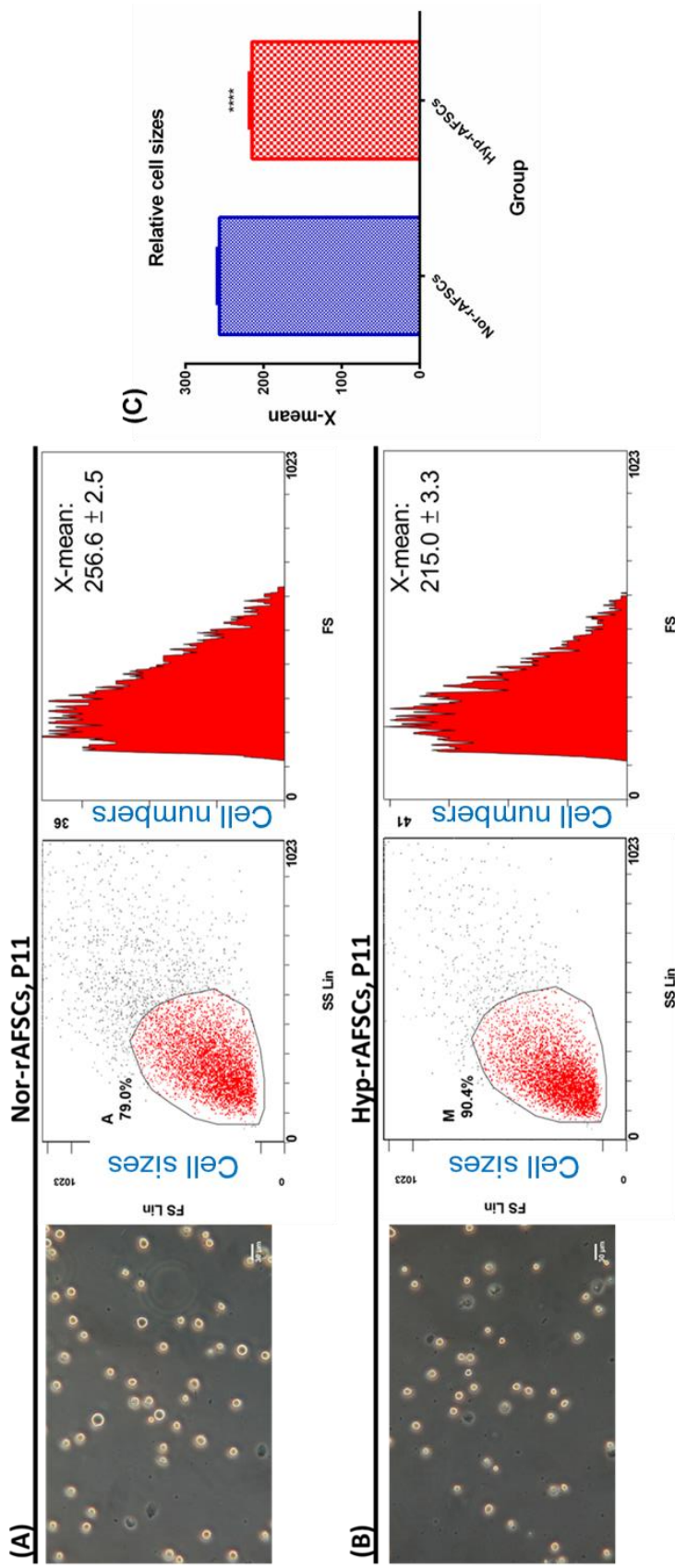


圖 9 大鼠羊水幹細胞經流式細胞儀分析，Nor 和 Hyp 二組之相對細胞大小。
 (A-i 與 B-i) 為 Nor 與 Hyp-rAFSCs 之細胞型態；(A-ii, iii) 與 (B-ii, iii) 為 Nor 與 Hyp-rAFSCs 之散射光譜圖及直方圖；(C) Nor 與 Hyp-rAFSCs 之 X-mean 比較，顯示 Hyp-rAFSCs 之相對細胞大小顯著小於 Nor-rAFSCs；實驗數據以 8 重複之平均值 ± 平均值標準誤差表示 (***) $P < 0.001$ ，放大倍率為 200 倍；比例尺為 30 μm；X-mean 代表每一萬顆細胞之平均相對細胞大小，無單位。



Figure 9 Relative cell sizes of Nor and Hyp-rAFSCs by flow cytometry analysis.

Relative cell sizes of Nor and Hyp-rAFSCs by flow cytometry analysis. (A-i and B-i) were morphology of Nor and Hyp-rAFSCs; (A-ii, iii) and (B-ii, iii) were scatter plots and histograms of Nor and Hyp-rAFSCs; (C) Comparison of the X-mean of Nor and Hyp-rAFSCs, showing relative cell size of Hyp-rAFSCs were significantly smaller than Nor-rAFSCs. Values were presented as the mean \pm SEM, n=8, Hyp versus Nor, *** $P < 0.001$; magnification: 200X; scale bar: 30 μm ; X-mean: mean of cell sizes per 10,000 cells and it has no unit.





3.1.4.2 大鼠羊水幹細胞之定性分析

細胞表面抗原分析結果顯示本試驗所建立之第 11 代大鼠羊水幹細胞無論於 Nor 或 Hyp 培養條件下皆會表現與 MSCs 相關之細胞表面分子標誌 CD29 及幹細胞皆會表現之表面分子標誌 CD90，而不表現與造血幹細胞 (Hematopoietic stem cells, HSCs) 相關之細胞表面分子標誌 CD11b 與 CD45。其中，Nor-rAFSCs 與 Hyp-rAFSCs 之 CD29 表現量分別為 29.6% 與 72.9%，後者之 CD29 表現量百分比有高於前者之趨勢；此外，Hyp-rAFSCs 除了於 CD29 之表現量具有較高百分比之趨勢外，其 CD90 之表現量亦有高於 Nor-rAFSCs 之趨勢 (84.3% v.s. 80.7) (圖 10)。此外，前述曾提及羊水幹細胞會表現幹性及多能性相關之分子標誌 Oct-4，因而本試驗先以 RT-PCR 確認所建立之第 11 代 Nor 與 Hyp-rAFSCs 是否會表現 Oct-4，並由圖 11 中可觀察到二種培養處理之 rAFSCs 皆表現 Oct-4，結果證實本試驗之 Nor 與 Hyp-rAFSCs 培養至第 11 代時仍維持其幹性；再者，為探討 Hyp 培養處理是否會影響其 Oct-4 之表現量，故進一步以 qRT-PCR 分析 Nor 與 Hyp-rAFSCs 之 Oct-4 表現量之差異，結果顯示 Hyp-rAFSCs 之 Oct-4 基因表現量 (4.31 ± 0.29) 顯著較 Nor-rAFSCs (1.00 ± 0.0) 高 ($n=3$, $P < 0.005$) (圖 12)。由此可知，Hyp 處理有益於提高 rAFSCs 表現與 MSCs 相關之表面抗原 CD29 及維持幹細胞皆會表現之表面抗原 CD90 之比例；同時，Hyp 促使其 Oct-4 表現量增加，亦有利於提高其幹性。

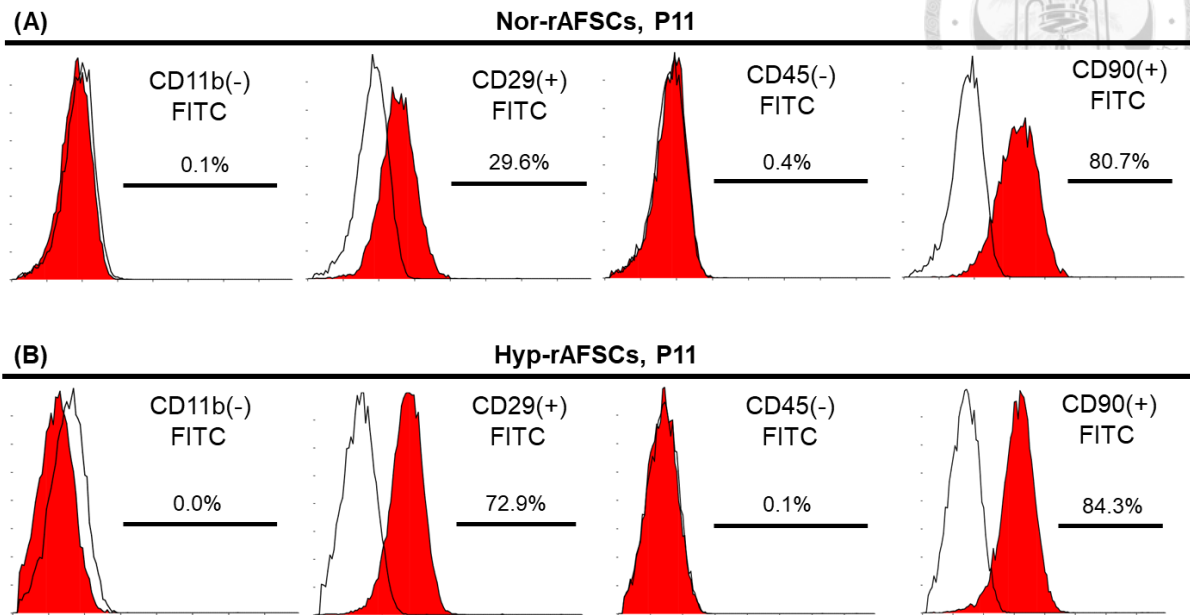


圖 10 以流式細胞儀進行常氧與低氧大鼠羊水幹細胞之表面抗原分析。

結果顯示 (A) Nor 組和 (B) Hyp 組大鼠羊水幹細胞皆表現 CD29 和 CD90，而不表現 CD11b 和 CD45。此外，Hyp 組之大鼠羊水幹細胞較 Nor 組表現較高的 CD29 和 CD90。

Figure 10 Analysis of Nor and Hyp-rAFSCs surface markers by flow cytometry.

The results shown that (A) Nor-rAFSCs and (B) Hyp-rAFSCs both expressed CD29 and CD90, but do not express CD11b and CD45. Besides, Hyp-rAFSCs expressed CD29 and CD90 higher than Nor-rAFSCs.

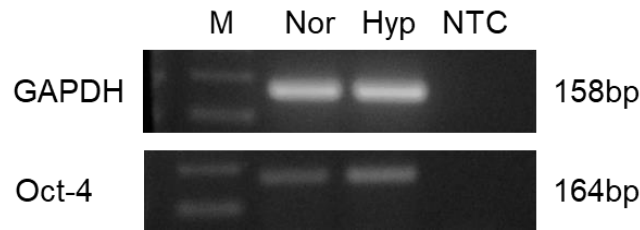


圖 11 以 RT-PCR 進行常氧與低氧培養大鼠羊水幹細胞之 Oct-4 基因表現分析。

M : 100bp DNA ladder , Nor : Nor-rAFSCs , Hyp : Hyp- rAFSCs , NTC : 負對照組 (不含 cDNA)。

Figure 11 Analysis of Nor and Hyp-rAFSCs Oct-4 gene expression by RT-PCR.

M: 100bp DNA ladder, Nor: Nor-rAFSCs, Hyp: Hyp-rAFSCs, NTC: negative control (without cDNA).

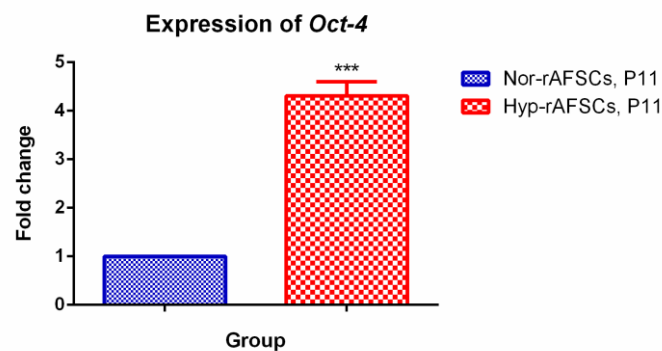


圖 12 以 qRT-PCR 進行常氧與低氧培養大鼠羊水幹細胞之 Oct-4 基因表現量倍率分析。

Nor-rAFSCs 之 Oct-4 基因表現量為 1.00 ± 0.0 ; Hyp-rAFSCs 之 Oct-4 基因表現量為 4.31 ± 0.29 。實驗數據以三重複之平均值 \pm 標準誤差表示，低氧與常氧相比， $***P < 0.005$ 。

Figure 12 Analysis of Nor and Hyp-rAFSCs Oct-4 gene expression fold change by qPCR.

Oct-4 gene expression fold change of Nor-rAFSCs was 1.00 ± 0.0 ; Oct-4 gene expression fold change of Hyp-rAFSCs was 4.31 ± 0.29 . Values were presented as the mean \pm SEM, $n=3$, Hyp versus Nor, $***P < 0.005$.



3.1.4.3 大鼠羊水幹細胞之活性與增殖率分析

CCK-8 為一款利用比色法進行細胞存活率、細胞增生及毒性測試之高靈敏度分析套組。其靈敏度高於其他 tetrazolium salt，如 MTT、XTT、MTS 或 WST-1 等。套組內之水溶性 tetrazolium salt- WST-8，可因活細胞內之脫氫酶 (dehydrogenase) 活性而被還原成可溶於培養液中之水溶性橘黃色產物 (WST-8 formazan)。因 WST-8 formazan 之產量取決於細胞內脫氫酶之活性，因而可直接反映存活細胞之數量。試驗中將培養至第 11 代之 Nor-rAFSCs 與 Hyp-rAFSCs 分別於第 0、2、4、6、8 及 10 天，以 CCK-8 比色法測量 Nor-rAFSCs 與 Hyp-rAFSCs 之存活細胞數量及體外增殖倍率。

試驗結果如圖 13 所示，圖中分別顯示 Nor-rAFSCs 與 Hyp-rAFSCs 之細胞增殖倍率與細胞數，發現 Hyp-rAFSCs 之細胞增殖倍率與細胞數之生長曲線斜率皆較 Nor-rAFSCs 高。其中，Nor-rAFSCs 於第 2 天之增殖倍率 (8.79 ± 0.54) 有高於 Hyp-rAFSCs (1.27 ± 0.83) 之趨勢，且其細胞數量 (10.90 ± 0.68) 極顯著高於 Hyp-rAFSCs (2.24 ± 0.79) ($n=3$, $P < 0.005$)，第 4 天時二者間之增殖倍率 (Nor-rAFSCs: 17.54 ± 1.22 v.s. Hyp-rAFSCs: 16.56 ± 3.32) 與細胞數量 (Nor-rAFSCs: 20.61 ± 0.77 v.s. Hyp-rAFSCs: 18.65 ± 1.82) 趨近相同，然而於第 6 天開始 Hyp-rAFSCs 之增殖倍率 (27.47 ± 4.17) 與細胞數量 (30.42 ± 3.17) 則開始極顯著高於 Nor-rAFSCs 之增殖倍率 (21.26 ± 1.92) 與 (24.72 ± 0.29) ($n=3$, $P < 0.001$)。

綜上所述，常規之 rAFSCs 體外擴增培養環境可藉由降低氧濃度來模擬 rAFSCs 於體內微環境之低氧濃度，藉此提升 rAFSCs 之體外細胞增殖倍率，此結果與 (Phermthai *et al.*, 2010) 等人藉由 5% O₂ 以提升 hAFSCs 之研究結果相同，皆具有提高 AFSCs 之體外擴增，表示 Hyp 處理有利於 rAFSCs 之體外增殖，有助於改善 rAFSCs 之體外擴增程序以產生足夠用於移植試驗之細胞量，因而將 rAFSCs 進行低氧培養之條件將使其於臨床再生醫學領域上更加具有應用之潛力，同時也可作為其他可能應用於臨床研究上之細胞 (不限於幹細胞) 於體外擴增之培養環境條件之參考。

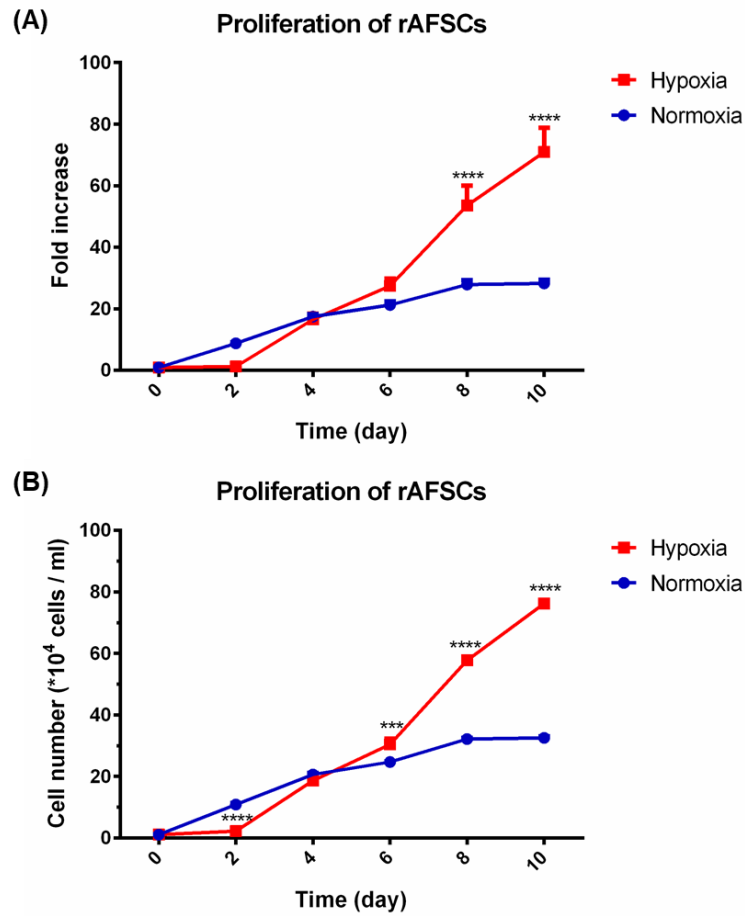


圖 13 常氧與低氧培養大鼠羊水幹細胞之生長曲線比較。

(A) 細胞增殖倍率；(B) 細胞數。實驗數據以三重複之平均值 \pm 標準誤差表示，低氧與常氧相比，*** $P < 0.005$ ，**** $P < 0.001$ 。

Figure 13 Comparison of Nor and Hyp-rAFSCs growth curve.

(A) Cell numbers; (B) Fold increase versus of day 0. Values were presented as the mean \pm SEM, $n=3$, Hyp versus Nor, *** $P < 0.005$, **** $P < 0.001$.



3.1.4.4 大鼠羊水幹細胞之三系分化與分析

因 rAFSCs 具有與 MSCs 相似之特性，而 MSCs 具有分化為中胚層三種細胞系（硬骨、脂肪與軟骨）之潛能，故將第 11 代 Nor-rAFSCs 與 Hyp-rAFSCs 進行脂肪、硬骨與軟骨之誘導分化，並分別培養至第 14 天、第 21 天及第 21 天後進行染色及定量。

Nor-rAFSCs 與 Hyp-rAFSCs 於脂肪誘導分化之染色結果，藉由 Oil red O 將脂肪滴染為紅色（圖 14-A 至 D），並進一步將染色結果進行定量分析，結果顯示 Nor-rAFSCs (249.4 ± 11.71) 與 Hyp-rAFSCs (240.6 ± 7.837) 之脂肪誘導分化之染色定量於統計上無顯著差異（圖 14-E），表示 Hyp 處理對 rAFSCs 於誘導 14 天後之脂肪形成無提升或降低之影響；再者，硬骨誘導分化試驗則藉由 Alizarin Red stain (ARS) 將鈣化之骨細胞進行染色（圖 15-A 至 D），其染色定量結果顯示 Nor-rAFSCs 分化為硬骨細胞之定量結果顯著高於 Hyp-rAFSCs 組 (1189 ± 24.55 v.s. 597.6 ± 60.28 , $n=3$, $P < 0.005$)，即 Hyp 處理會降低 rAFSCs 於誘導 14 天後分化為硬骨細胞之能力（圖 15-E）；然而於軟骨分化試驗中，Hyp 處理下 Hyp-rAFSCs 並不會形成軟骨細胞球（圖 16），因此推測 Hyp 處理並不適合進行硬骨與軟骨之分化潛能檢測。

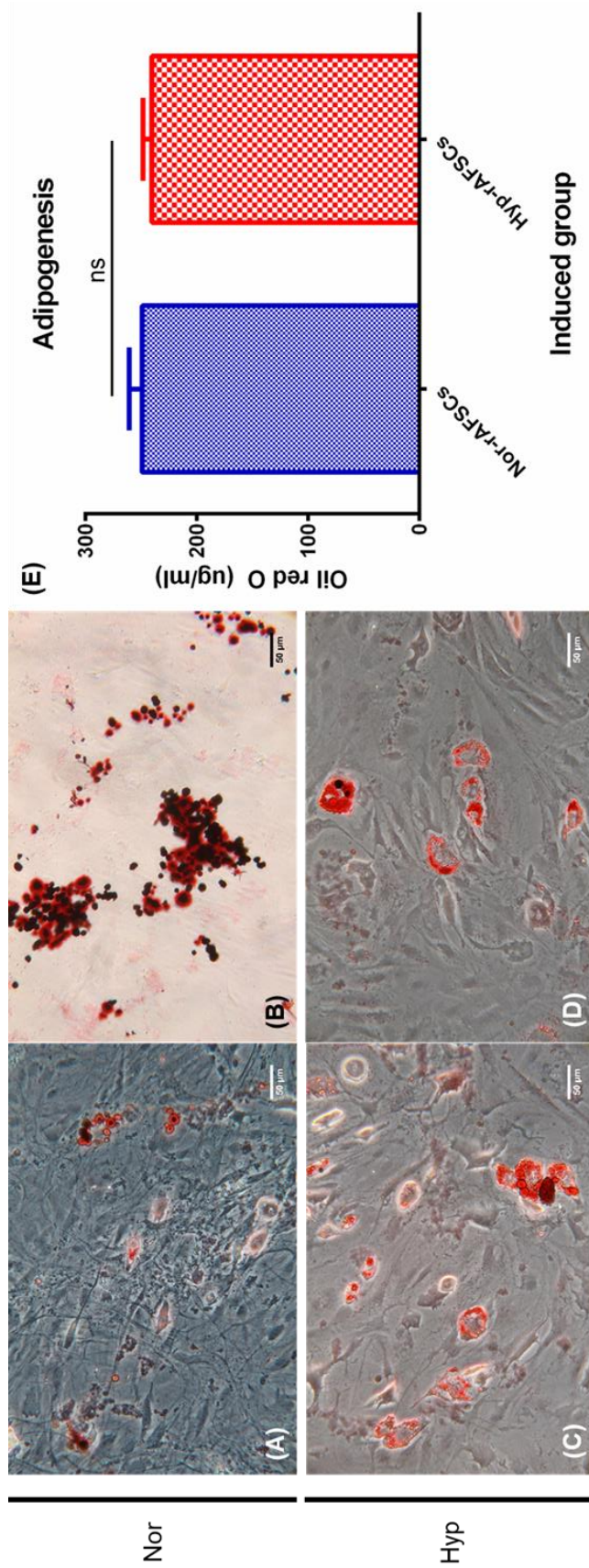


圖 14 經 Oil red o 染色之常氧與低氧環境下大鼠羊水幹細胞 14 天後之脂肪形成。

(A)(B) 為常氧環境下 Nor-rAFSCs 之脂肪分化；(C)(D) 為低氧環境下 Hyp-rAFSCs 之脂肪分化，放大倍率：200X；比例尺：50 μm ；(E) 為脂肪形成之定量，實驗數據以三重複之平均值 \pm 標準誤差表示， $P < 0.05$ 。

Figure 14 Figure. Adipogenesis of Nor/ Hyp-rAFSCs (P11) after 14 days by Oil red o stain.

(A)(B) Nor-rAFSCs; (C)(D) were Hyp-rAFSCs, magnification, 200X; scale bar: 50 μm ; (E) Quantitative analysis of adipogenesis. Values were presented as the mean \pm SEM, $n=3$, Hyp versus Nor, $P > 0.05$; ns: no significant.



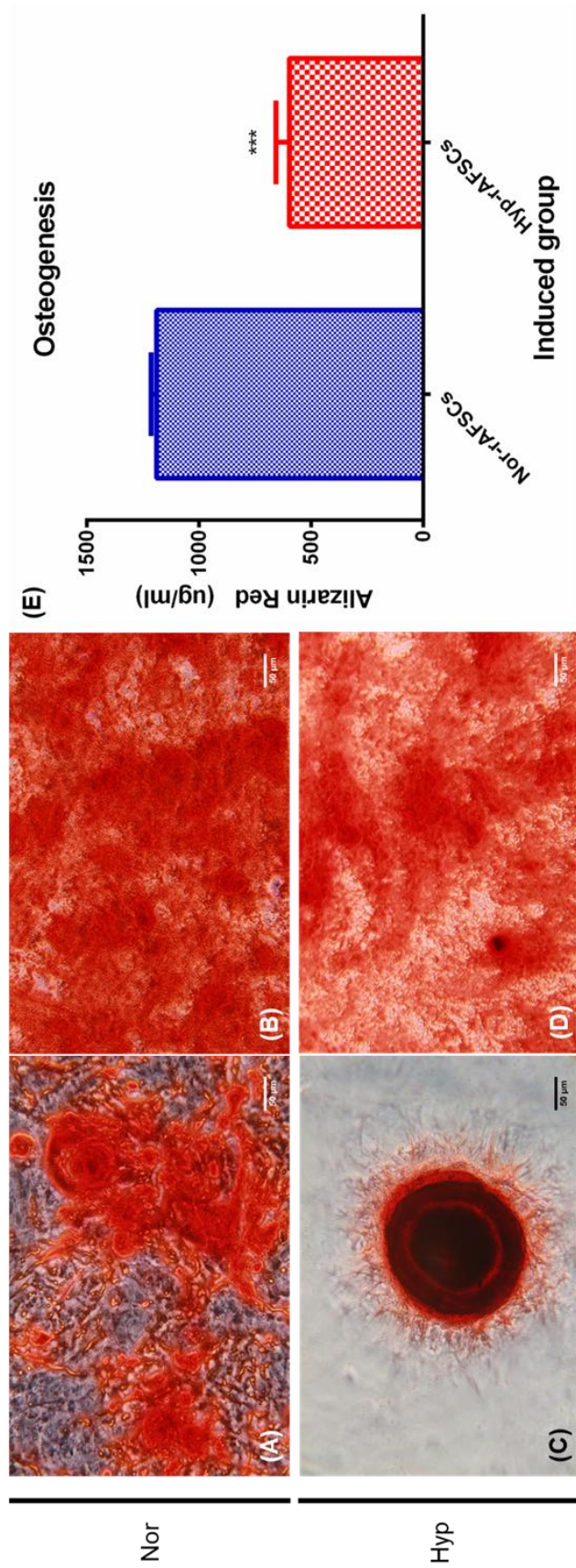


圖 15 經 Alizarin Red 染色之大鼠羊水幹細胞 21 天後之硬骨形成。

(A)(B) 為常氧環境下 Nor-rAFSCs 之硬骨分化；(C)(D) 為低氧環境下 Hyp-rAFSCs 之硬骨分化，放大倍率：200X；比例尺：50 μm ；(E) 為硬骨形成之定量，實驗數據以三重複之平均值 \pm 標準誤差表示， $P < 0.05$ 。

Figure 15 Osteogenesis of Nor/ Hyp-rAFSCs (P11) after 21 days by Alizarin Red stain (ARS).

(A)(B) Nor-rAFSCs; (C)(D) were Hyp-rAFSCs, magnification, 200X; scale bar: 50 μm ; (E) Quantitative analysis of adipogenesis. Values were presented as the mean \pm SEM, $n=3$, Hyp versus Nor, $P < 0.05$.



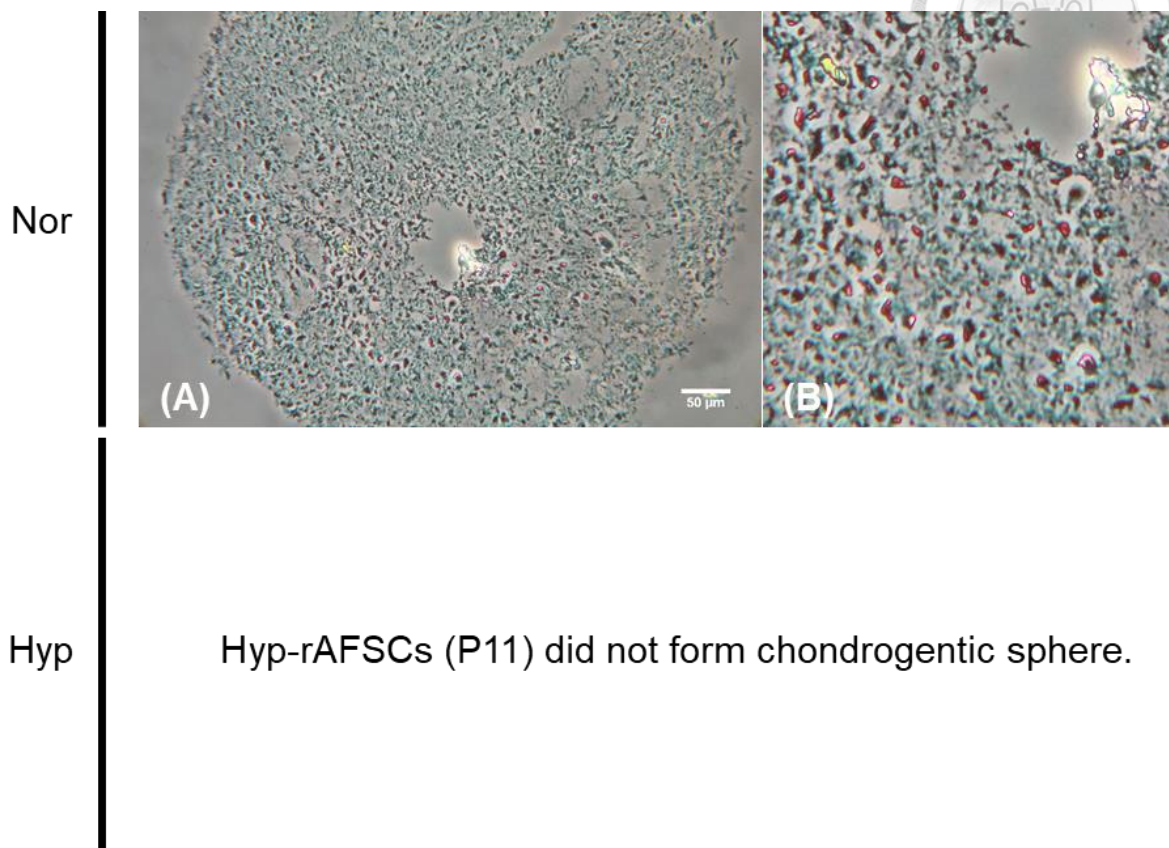


圖 16 經 Safranin O 染色之大鼠羊水幹細胞 21 天後之軟骨形成。

(A) 常氧環境下 Nor-rAFSCs 之軟骨細胞球切片，放大倍率為 200 X，比例尺為 50 μm ；
(B) 局部放大 Nor-rAFSCs 之軟骨細胞球切片；低氧環境下之 Hyp-rAFSCs 並不會形成軟骨細胞球；細胞核呈黑色；細胞質呈藍綠色；軟骨、黏蛋白及肥大細胞顆粒呈橘至紅色。

Figure 16 Chondrogenesis of Nor/ Hyp-rAFSCs (P11) after 21 days by Safranin O stain.

(A) Slice of chondrogenic sphere of Nor-rAFSCs, magnification, 200X; scale bar: 50 μm ; (B) Magnified partial of the slice of chondrogenic sphere of Nor-rAFSCs; Hyp-rAFSCs did not form chondrogenic sphere. Nuclei: black; Cytoplasm: bluish green; Cartilage, mucin, mast cell granules: orange to red.



3.2 低氧處理羊水幹細胞及其條件培養液對腎間質纖維化之療效

3.2.1 前言

UUO 為較廣泛用來模擬 RIF 之動物模式，採取此模式之原因除了阻塞性尿路病變 (obstructive uropathy) 為 CKD 成因之一，UUO 具有容易執行、能快速取得實驗數據及對側腎臟可作為對照之優點 (Yang *et al.*, 2010)。Sun *et al.* (2013) 研究顯示小鼠經 UUO 手術後，隨即移植 hAFSCs，經治療 1 週與 2 週後，小鼠腎臟組織之微血管數量顯著較未移植組高，其組織中 TGF- β 1 及 collagen I 之表現量亦顯著較未移植組低，顯示 hAFSCs 具有延緩經 UUO 誘導小鼠 RIF 進程之功效。此外，另有研究指出 BMSCs 或其 CM 於大鼠 UUO 動物模式之研究中，大鼠經 UUO 手術後隨即進行 BMSCs 或其 CM 之移植，七天後予以犧牲進行試驗分析，相較於未移植組，BMSCs 及其 CM 具有降低大鼠腎臟組織之 collagen I、III 及 α -SMA 表現量之效用，此結果亦顯示 BMSCs 或其 CM 具有延緩大鼠腎間質纖維化之療效 (da Silva *et al.*, 2015)。

綜上所述，RIF 之模式動物藉由單側輸尿管結紮後隨即注射幹細胞或其 CM 至動物體內，經一段時間後皆具有延緩模式動物罹患 RIF 之進程。然而，過去文獻卻鮮少探討低氧處理後之 AFSCs 或其 CM 是否較未處理之 AFSCs 或其 CM 對受損腎臟組織之纖維化具有較佳之治療效果，而本研究於試驗一之結果顯示低氧可維持 rAFSCs 之幹性且有利於其體外增殖，因此，進一步於試驗二中探討低氧處理之 rAFSCs 及其 CM 是否能增加移植後之 RIF 治療之可行性，以供未來 RIF 治療之臨床及相關研究之參考。



3.2.2 試驗設計

自樂斯科生物科技股份有限公司取得 7 週齡 SD rats (♂) 共 28 隻，待其適應一週後，約 8~9 週齡，體重約 250~350 g，隨機分為七組，每組 4 隻大鼠，進行三重複試驗，以 UUO 模式 (圖 17) 建立 RIF 之大鼠疾病動物模式，經二週時間誘導大鼠腎間質纖維化之形成，再予以移植經 Normoxia 與 Hypoxia 二種氧濃度培養之 rAFSCs 及其條件培養液 (conditioned medium, CM)，並於移植一週及二週後犧牲每組一半數量之大鼠 (圖 18)，進行腎臟組織病理與纖維化相關分子標誌 TGF- β 、 α -SMA 與 Collagen I 之基因表現量分析。

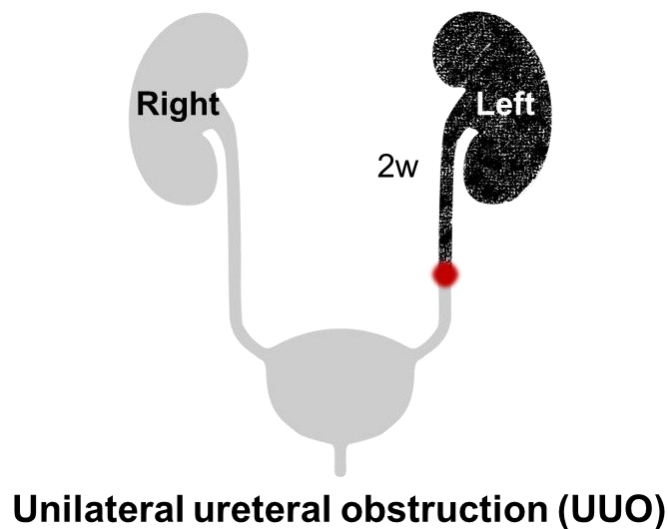
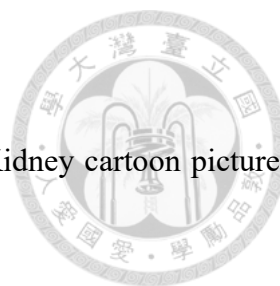


圖 17 單側輸尿管梗阻模式。

大鼠腹部朝上：左側輸尿管下方 1/3 處以縫線 (4/0) 進行結紮二次，並在二個結紮點之間剪斷輸尿管，經二週後誘導 RIF；W：週；腎臟卡通圖取自 Noun Project (Philip Hogeboom)。

Figure 17 Unilateral ureteral obstruction (UUO) model.

Rat abdomen was upward: ligated the lower third of the left ureter twice with sutures (4/0),



cut between the ligatures and induced RIF after 2 weeks. W: week; Kidney cartoon picture was created by Philip Hogeboom from Noun Project.

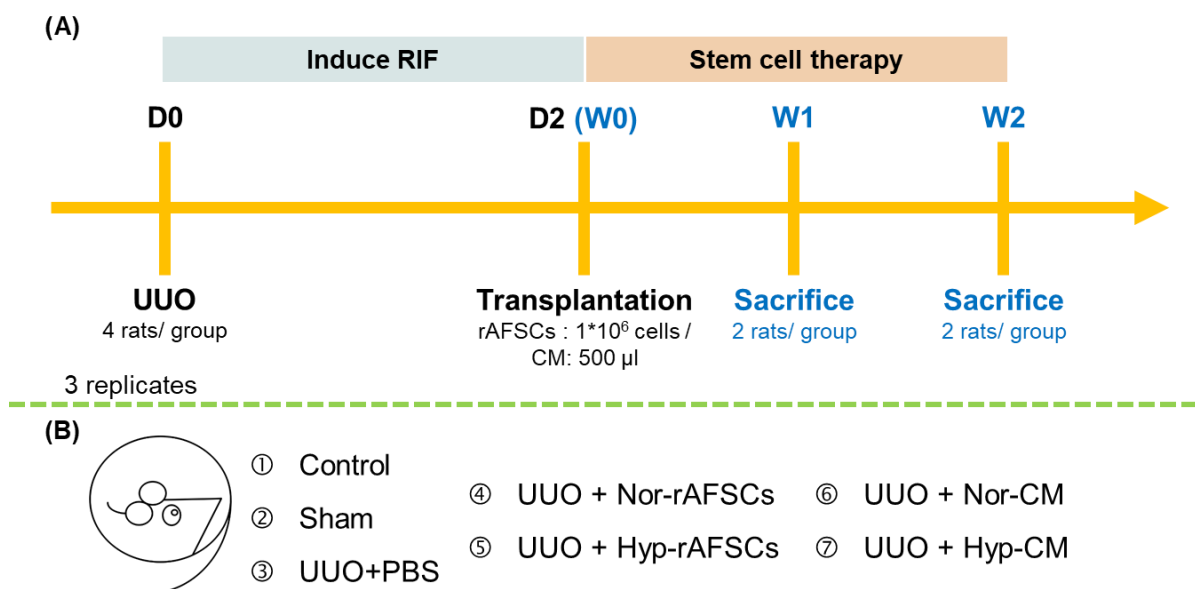


圖 18 低氧處理羊水幹細胞及其條件培養液對大鼠腎間質纖維化療效之流程圖。

(A) 大鼠腎間質纖維化手術誘導及幹細胞治療流程；(B) 試驗組別。RIF：Renal interstitial fibrosis；CM：Conditioned medium；D：天；W：週。

Figure 18 Process chart of therapeutic effect of hypoxia-preconditioned amniotic fluid stem cell on rat renal interstitial fibrosis.

(A) Process of RIF surgery of rats and stem cell therapy; (B) Experiment groups. RIF: Renal interstitial fibrosis; CM: Conditioned medium; D: day; W: week.



3.2.3 材料與方法

3.2.3.1 實驗動物

本試驗所使用之 SD rats 係購自於樂斯科生物科技股份有限公司，8~9 週齡，體重約 250~350 g。飼養管理條件如 3.1.3.1 所述。

3.2.3.2 大鼠輸尿管之確認

大鼠 (♀) 以舒泰 (0.2~0.3ml/rat) 進行麻醉後予以腹部剃毛，將其四肢以膠帶固定於厚紙板上，自腹部中線處剪開皮層約 4 至 5 公分，並使皮層與肌肉層分離；剪開肌肉層，並利用開創器撐開傷口；找到左腎後，夾取腎臟周邊脂肪結締組織以利帶出腎臟，接著自腎門處 (包含腎動脈、腎靜脈與腎盂) 找到腎盂後，以腎盂為起始點，往下自脂肪結締組織中找到可能為輸尿管之半透明管狀物，將此物以鑷子稍作固定後，以含有 trypan blue 之 31G 胰島針於解剖顯微鏡下注射至半透明管狀物 (圖 19-A)，待一段時間後，觀察膀胱是否因尿液被 trypan blue 染色而呈現藍色 (圖 19-B 至 D)，以及大鼠是否因處於麻醉狀態而導致肌肉鬆弛，進而有藍色尿液排出之情形發生 (圖 19-E)，即代表此半透明管狀物為輸尿管，並於確認輸尿管結紮位置後將大鼠以頸椎脫臼予以犧牲。

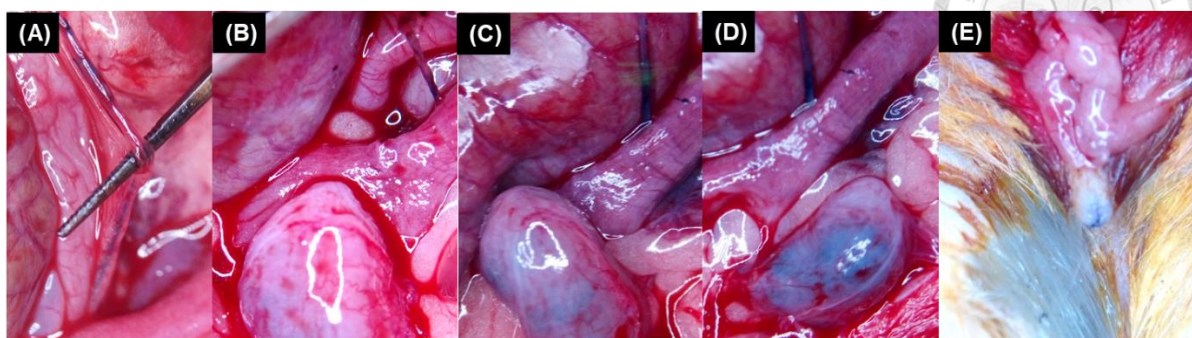


圖 19 大鼠輸尿管之確認示意圖。

(A) 將 trypan blue 注射自半透明管狀物；(B) 膀胱呈現正常顏色；(C) 膀胱開始呈現藍色；(D) 膀胱呈現深藍色；(E) 膀胱肌肉鬆弛，導致被染成藍色之尿液排出。

Figure 19 Schematic diagram of rat ureter confirmation.

(A) Inject trypan blue into translucent tube; (B) bladder exhibited normal color; (C) bladder exhibited blue; (D) bladder exhibited dark blue; (E) Relaxation of the bladder muscles, causing the urine which was stained blue urinated.

3.2.3.3 單側輸尿管梗阻之大鼠模式手術流程

大鼠 (♂) 以舒泰 (0.2~0.3ml/rat) 進行麻醉後予以秤重及腹部剃毛，將其四肢以膠帶固定於厚紙板上，並於腹部剃毛區塊以碘酒充分消毒後再以 70%酒精消毒一次，鋪上剪開一洞口之滅菌紗布 (洞巾)，接著自腹部中線處剪開皮層約 4 至 5 公分，並使皮層與肌肉層分離；剪開肌肉層，並利用開創器撐開傷口 (圖 20-A 至圖 20-C)；將部分腸子先撥至洞巾上，找到左側腎臟後，夾取腎臟周邊脂肪結締組織以利帶出腎臟及輸尿管；再從左側輸尿管下方 1/3 處以縫線 (4/0) 進行結紮二次，並於二個結紮點之間剪斷輸尿管 (圖 20-D 至圖 20-F)；將暫時移出之腸子移回腹腔後縫合肌肉層與皮層 (圖 20-G)，剪完耳號並於縫合處及耳朵塗上碘酒以防傷口感染，而後將大鼠以側躺姿勢放回鼠籠，待其轉醒。

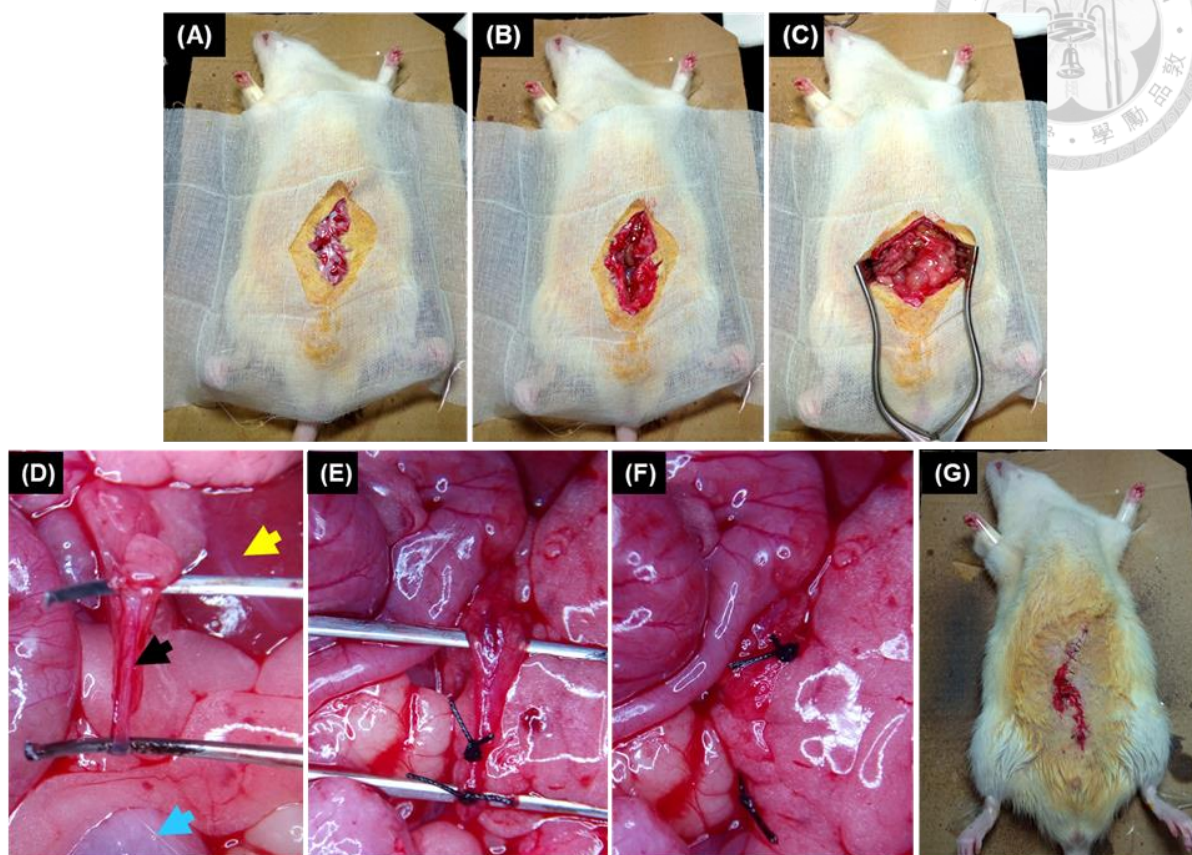


圖 20 大鼠單側輸尿管梗阻模式之手術流程示意圖。

(A) 自腹中線剪開皮層；(B) 剪開肌肉層；(C) 利用開創器撐開傷口；(D) 找到輸尿管；
(E) 左側輸尿管下方 1/3 處以縫線 (4 / 0) 進行結紮二次；(F) 於二個結紮點之間剪斷
輸尿管；(G) 縫合傷口。黑色箭頭為輸尿管；黃色箭頭為左腎；藍色箭頭為膀胱。

Figure 20 Schematic diagram of surgery process of UUO model of rat.

(A) Cut the skin layer from ventral line; (B) cut the muscle layer; (C) used the retractor to shove off the wound; (E) ligated the lower third of the left ureter with a silk (4/0); (F) Cut between the two ligatures; (G) sutured the wound. Black arrow: ureter; yellow arrow: left kidney; blue arrow: bladder.



3.2.3.4 大鼠羊水幹細胞及其條件培養液移植流程

將大鼠以舒泰 (0.1ml/rat) 進行麻醉後，置於壓克力固定器內，僅露出大鼠尾部。以浸泡 70% 酒精之棉球擦拭大鼠尾巴下方 1/3~1/4 處使其尾側靜脈擴張，再以靜脈留置針 (Terumo, SR+OX2419C9) 刺入靜脈，待自靜脈留置針內觀察到回血後，抽出針頭，留塑膠軟管於靜脈內 (圖 21)，並接上裝有 rAFSCs (1×10^6 cells/ 500 μ l in D-PBS) 或 rAFSCs-CM (500 μ l) 之 1ml 針筒，緩慢地以 500 μ l / 30s 速度注射 AFSCs 或 rAFSCs-CM 至靜脈內，移植完畢後再以酒精棉球按壓移植點，止血後將大鼠以側躺方式移回鼠籠，待其轉醒。

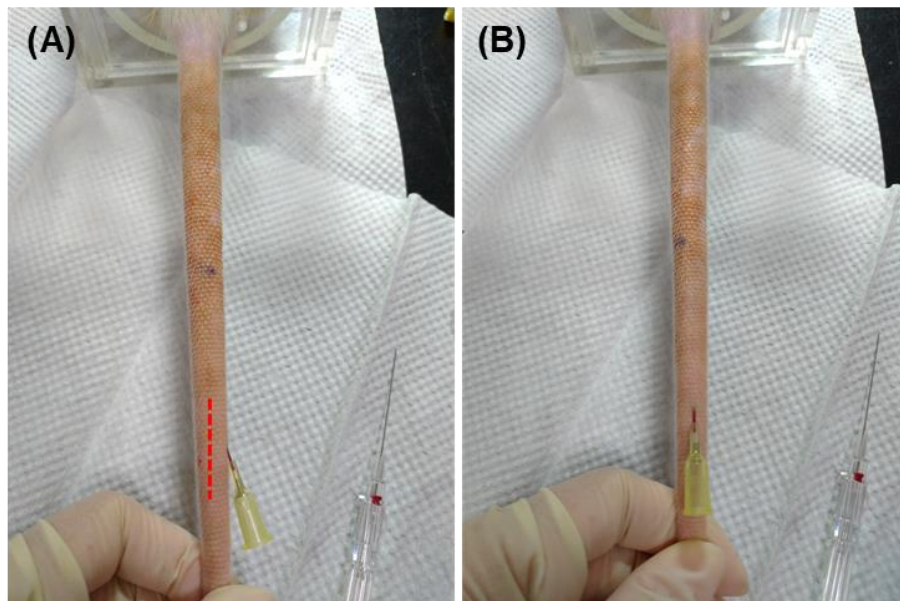


圖 21 大鼠尾靜脈注射示意圖。

(A) 紅色虛線為大鼠尾部正上方靜脈；(B) 大鼠尾側靜脈之回血。

Figure 21 Schematic diagram of tail vein injection of rat.

(A) The red dashed line means the dorsal tail vein of rat; (B) The blood was returned from the lateral vein of rat.



3.2.3.5 大鼠體重監控

於每次手術前、移植前與犧牲前測量大鼠之體重，除可評估試驗進行時追加之麻醉劑量外，可由體重變化之趨勢了解大鼠於健康因素上之變化，是否因進行 RIF 誘導手術而對其體重造成影響。

3.2.3.6 腎臟組織病理分析

大鼠以舒泰 (0.2 ~ 0.3ml / rat) 進行麻醉後予以秤重及腹部剃毛，再將其以頸椎脫臼方式進行犧牲，其四肢以膠帶固定於厚紙板上。剪開皮層約 4 至 5 公分，並利用開創器撐開傷口，找出二側腎臟，先後摘除右腎及左腎，以 D-PBS 潤洗後，剝除腎被膜 (renal capsule) 並剪取一部分腎臟組織用於後續纖維化分子標誌之分析，剩餘腎臟以 4% PFA 浸泡 2 天後委託璽達生物科技公司進行石蠟包埋、切片 (厚度為 3 μ m)，且分別以 H&E staining 與 Masson's Trichrome stain 進行染色。

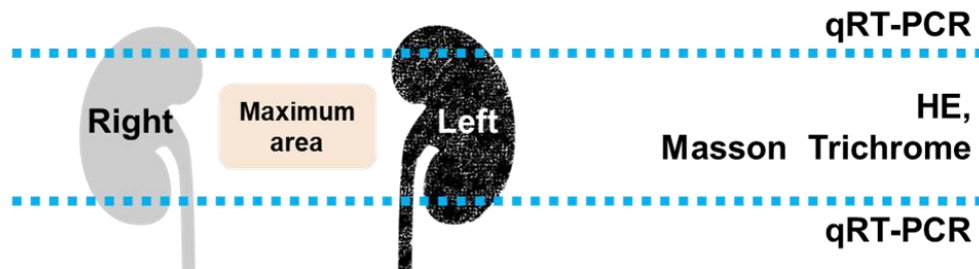


圖 22 大鼠右腎與左腎之取樣位置。

藍色虛線間之腎臟最大面積用於 HE 與 Masson's Trichrome stain，其餘用於 qRT-PCR 分析。腎臟卡通圖取自 Noun Project (Philip Hogeboom)。

Figure 22 Sampling location of the right and left kidneys of rats.

The maximum areas of the kidneys between the blue dashed lines were used for HE and Masson's Trichrome stain, and the rest was used for qRT-PCR analysis. Kidney cartoon picture was created by Philip Hogeboom from Noun Project.



3.3.3.7 腎臟之纖維化分子標誌分析

以定量反轉錄聚合酶連鎖反應 (quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR) 檢測各組腎臟之纖維化分子標誌 TGF- β 、 α -SMA、Collagen I 之基因表現量倍率差異。

3.3.3.8 大鼠腎臟 RNA 之萃取

收集腎臟組織塊後，加入 1 ml 之 GENEzolTM Reagent (Geneaid, MC32701) 將組織塊均質化，接著將樣品與 GENEzolTM Reagent 震盪混合均勻，加入 1 ml 混合液加入 100 μ l 1-bromo-3-chloropropane (BCP)，震盪混合均勻後置於室溫反應 15 分鐘後，離心 (12,000 xg, 15 分鐘, 4°C)，取最上層之溶液 (RNA) 並置於新之 1.5 ml tube，加入與上層溶液等量之 isopropanol，震盪混合均勻後置於室溫反應 10 分鐘，離心 (12,000 xg, 8 分鐘, 4°C)，去除上清液，以 75% 酒精清洗 RNA 團塊三次後，將 RNA 團塊曬乾並以分生純水進行回溶 (分生水多寡視團塊大小以 20 ~ 30 μ l 或更多進行回溶)，最後以 Nano drop 測定 RNA 之 OD 值，並置於 -80°C 保存。

3.3.3.9 反轉錄反應

將腎臟組織之 RNA 加入分生純水配置成 1 μ g / tube (6.4 μ l)，接著採用 DNase I, Amplification Grade 套組 (InvitrogenTM, 18068015)，依序先加入 DNase I 及 10X DNase I reaction buffer [200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 20 mM MgCl₂, 500 mM KCl] 之混合液 (0.8 μ l: 1 μ l)，於 22 °C 反應 15 分鐘，接著加入 0.8 μ l 25 mM EDTA (pH 8.0)，於 65 °C 反應 10 分鐘，再加入 High-Capacity RNA-to-cDNATM Kit (2X RT Buffer Mix 與 20X Enzyme mix 之混合液，比例為 10 μ l: 1 μ l) (Applied BiosystemsTM, 4387406)，於 37 °C 反應 60 分鐘，95 °C 反應 5 分鐘，最後將互補 DNA (complementary DNA, cDNA)



置於 -20 °C 保存。

3.3.3.10 即時聚合酶鏈鎖反應 (Real-time polymerase chain reaction, qPCR)

將 cDNA 進行二倍稀釋，取 2 μ l 稀釋後 cDNA 加入 10 μ l Fast SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems™, 4385612)、2 μ l primer mix (10 μ M) (Genomics) (序列如表 7 所示) 與 6 μ l 分生純水 (總體積為 20 μ l / well) 混合均勻，採用 StepOnePlus Real time PCR system (Applied Biosystems)，並以 95°C 20s (holding stage)、95°C 3s，60°C 30s 40 cycles (cycling stage)、60°C 1min，65°C 10s，95°C 10s (melt curve stage) 為條件進行 qPCR。此外，因 qPCR 靈敏度高，故每個樣品做 3 個平行孔，以避免後續數據分析中，由於 Ct 值或 SD 值相差太大而導致無法進行統計分析。

表 7 腎間質纖維化之引子序列。

Table 7 RIF primer sequence.

RIF primer sequence			
Primer ID	Sequence (5' → 3')	Product	Product length (bp)
TGF- β 1 F	CCTGCAAGACCATCGACATG	NM_021578.2	153
TGF- β 1 R	TGTTGTACAAAGCGAGCACC		
α -SMA F	CCCTCTATGCTTCTGGACGT	NM_031004.2	144
α -SMA R	GGTAGTCGGTGAGATCTCGG		
Col-I F	AACAAGGGGAGGAGAGAGTGTC	NM_053304.1	143
Col-I R	AGAGAAGCTGAGGGTAGGGA		
GAPDH F	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	NM_017008.4	158
GAPDH R	TCAATGAAGGGGTCGTTGAT		



表 8 腎臟纖維化分子標誌基因表現量之計算公式。

Table 8 Calculation formula of RIF molecular markers gene expression.

	Left-kidney Ct mean (L)	Right-kidney Ct mean (R)	ΔCt_L (left- kidney)	ΔCt_R (right- kidney)	$\Delta\Delta Ct$	Gene Expression Fold Change
Housekeeping Gene (H)	HL	HR	TL-HL	TR-HR	$\Delta Ct_L - \Delta Ct_R$	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$
Tested Gene (T)	TL	TR				

Left-kidney Ct mean (L) 之 Housekeeping gene (H) 與 Tested gene (T) 分別簡稱為 HL 與 TL；Right-kidney Ct mean (R) 之 Housekeeping gene (H) 與 Tested gene (T) 分別簡稱為 HR 與 TR；試驗結果以 $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ 表示基因表現量倍率。

Housekeeping gene (H) and Tested gene (T) of Left-kidney Ct mean (L) were respectively referred to as HL and TL; Housekeeping gene (H) and Tested gene (T) of Right-kidney Ct mean (R) were respectively referred to as HR and TR; gene expression fold changes of the tested results were represented as $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$.

3.3.3.12 統計結果分析

本實驗之數據使用 GraphPad Prism 6 軟體中之 Tukey's multiple comparisons test 或 Sidak's multiple comparisons test 將處理均值兩兩比較，並以平均值 \pm 標準誤差 (mean \pm SEM) 表示之， $P < 0.05$ 時定義兩者間具有顯著差異。



3.2.4 結果與討論

3.2.4.1 大鼠體重之變化

本試驗使用 8~9 週齡 SD rats 共 28 隻，體重約 250~350 g，隨機分為七組，分別為對照組 (control)、假手術組 (sham)、vehicle 移植組 (UUO+vehicle)、Nor-rAFSCs 移植組 (UUO+Nor-rAFSCs)、Hyp-rAFSCs 移植組 (UUO+Hyp-rAFSCs)、Nor-CM 移植組 (UUO+Nor-CM) 與 Hyp-CM 移植組 (UUO+Hyp-CM)，並於 UUO 手術前與移植一週與二週後犧牲前測量大鼠體重，其結果顯示大鼠體重並未因 UUO 手術而導致體重下降之情形，而大鼠體重增加之原因，除了因大鼠隨著週齡增加，其體重亦隨之增長外，也可能包含左腎積累之尿液重。

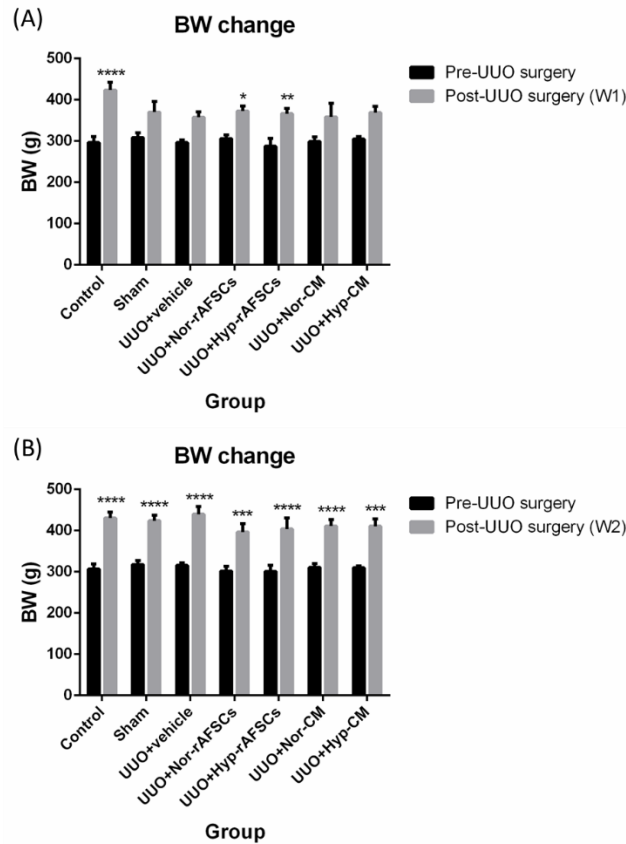


圖 23 大鼠體重之變化。

(A) UUO 手術前與 UUO 手術後 (移植一週後) 之比較; (B) UUO 手術前與 UUO 手術後 (移植二週後) 之比較; 實驗數據以四至六重複之平均值 \pm 標準誤差表示, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.005$, $****P < 0.001$; BW: 個體重量, pre-UUO surgery: UUO 手術前, post-UUO surgery (W1): UUO 手術後一週, post-UUO surgery (W2): UUO 手術後二週。

Figure 23 Body weight change of rats.

(A) Pre-UUO surgery versus post-UUO surgery (W1); (B) Pre-UUO surgery versus post-UUO surgery (W2); values were presented as the mean \pm SEM, $n=4-6$, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.005$, $****P < 0.001$; BW: body weight, pre-UUO surgery: before transplantation; post-UUO surgery (W1): after transplantation 1 week; post-UUO surgery (W2): after transplantation 2 weeks.



3.2.4.2 大鼠腎臟之外觀型態

將移植 Nor 或 Hyp 處理之 rAFSCs 或 CM 一週與二週後大鼠腎臟進行外觀型態之觀察，可看出無論移植一週或二週後，經 UUO 手術誘導 RIF 之組別，其左腎摘除前皆因輸尿管阻塞而有尿液積累之膨大現象 (腎積水) (圖 24 之綠標)，且經摘除後因積累之尿液排出而呈現坍塌狀態；右腎則皆呈現正常腎臟之形態 (圖 24 之藍標)。

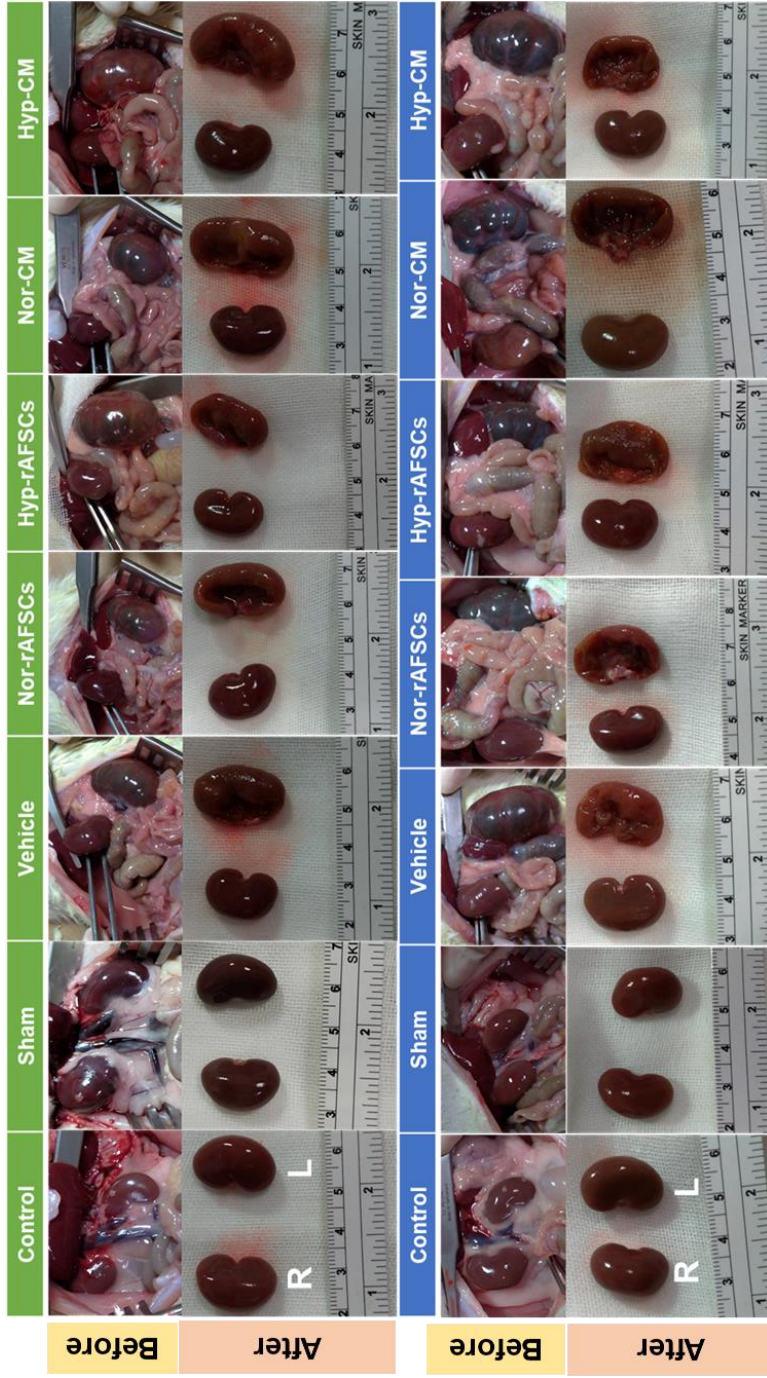


圖 24 移植後大鼠腎臟外觀型態。

綠標代表移植一週後之腎臟；藍標代表移植二週後之腎臟；黃標代表摘除前之腎臟；橘標代表摘除後之腎臟；R 為右腎；L 為左腎。

Figure 24 Morphology of post-transplantation kidney.

Green label represented as W1-post-transplantation kidneys; blue label represented as W2-post-transplantation kidneys; yellow label represented as kidneys before isolation; orange label represented as kidneys after isolation; R: right kidney; L: left kidney





3.2.4.3 大鼠腎臟之纖維化組織染色分析

將摘除後之左、右腎臟進行組織切片染色，分別以 H&E 染色與 Masson's Trichrome 染色觀察各組腎臟發炎細胞浸潤與 ECM (膠原蛋白為主要組成成分) 異常沉積之程度。首先觀察移植一週後左右二邊腎臟之 H&E 染色結果 (圖 25 與圖 26)，相較於 control 與 sham 組，vehicle、Nor 或 Hyp 處理之 rAFSCs 或其 CM 組之左腎於移植一週後之藍紫色區域較多，而圖中之藍紫色代表嗜鹼性結構，藍紫色區域增加即意味著受損腎臟組織受到發炎細胞 (嗜鹼性球) 之浸潤，因此顯示這些組別之左腎皆有發炎細胞浸潤之病徵；同樣地，移植二週後之 HE 染色切片結果 (圖 27 與圖 28)，除 control 與 sham 組之左腎，其餘組別之左腎亦有大量藍紫色區域，表示這些組別之大鼠左腎於移植二週後依然受到發炎細胞之浸潤，代表其腎臟組織仍舊持續受到損傷。

接著，進一步將腎臟組織切片以 Masson's Trichrome 染色，圖中藍色代表膠原蛋白 (collagen)，即 ECM 之組成成分，為 RIF 之病徵。觀察移植一週後左右二邊腎臟之染色結果 (圖 29 與圖 30)，可以看到於左腎之組織染色切片中，經 UUO 手術誘導 RIF 之組別，除膠原蛋白沉積量較 control 與 sham 組有明顯增加外，其組織切片中亦能觀察到部分腎絲球或腎小管之萎縮或凋亡而形成之空洞；而由 Nor 或 Hyp 處理之 rAFSCs 或其 CM 之組別，其藍色區域較 vehicle 組少，表示大鼠之 RIF 均較 vehicle 組緩解；接著觀察移植二週後左右二邊腎臟之染色結果 (圖 31 與圖 32)，圖中經 UUO 手術誘導 RIF 組別之左腎，皆未發現其藍色區域有減少之趨勢，表示這些組別之左側腎臟組織中，ECM 之沉積仍為異常，顯示各組大鼠之 RIF 並未較移植一週後緩解。

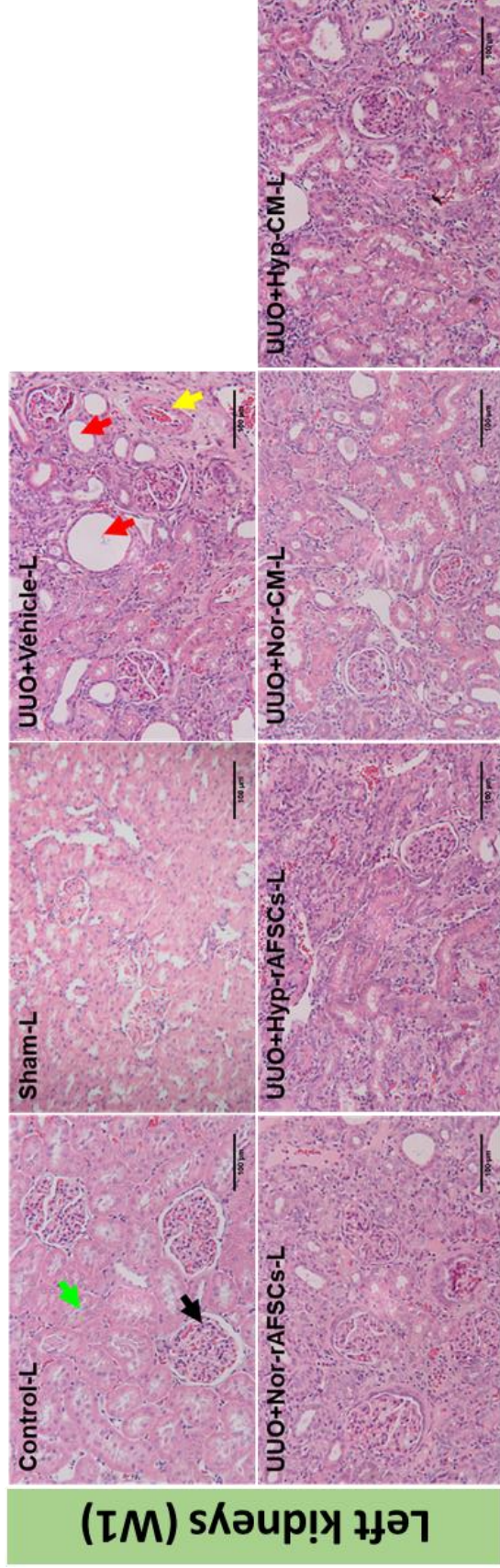


圖 25 移植一週後之左腎以 H&E stain 進行組織學檢查。

黑色箭頭代表腎絲球；綠色箭頭代表腎小管；黃色箭頭代表血管；紅色箭頭代表萎縮或凋亡之腎絲球與腎小管形成之空洞；藍紫色點狀區域代表嗜鹼性結構，藍紫色點狀區域增加代表腎臟組織受到參與發炎反應之嗜鹼性球浸潤；放大倍率為 200X；比例尺為 100 μm ；L 為左腎。

Figure 25 Histological examination of left kidneys of W1-post-transplantation by H&E stain.

Black arrow means glomerulus; green arrow means renal tubules; yellow arrow means blood vessel; red arrows mean hollows which are formed by atrophy or apoptosis of glomerulus or renal tubules; blue-violet punctate area means basophilic structure and the increase of blue-violet punctate area indicates that the kidney tissue is infiltrated by the basophil involved in the inflammatory response; Magnification, 200x; scale bar: 100 μm ; L: left kidney.



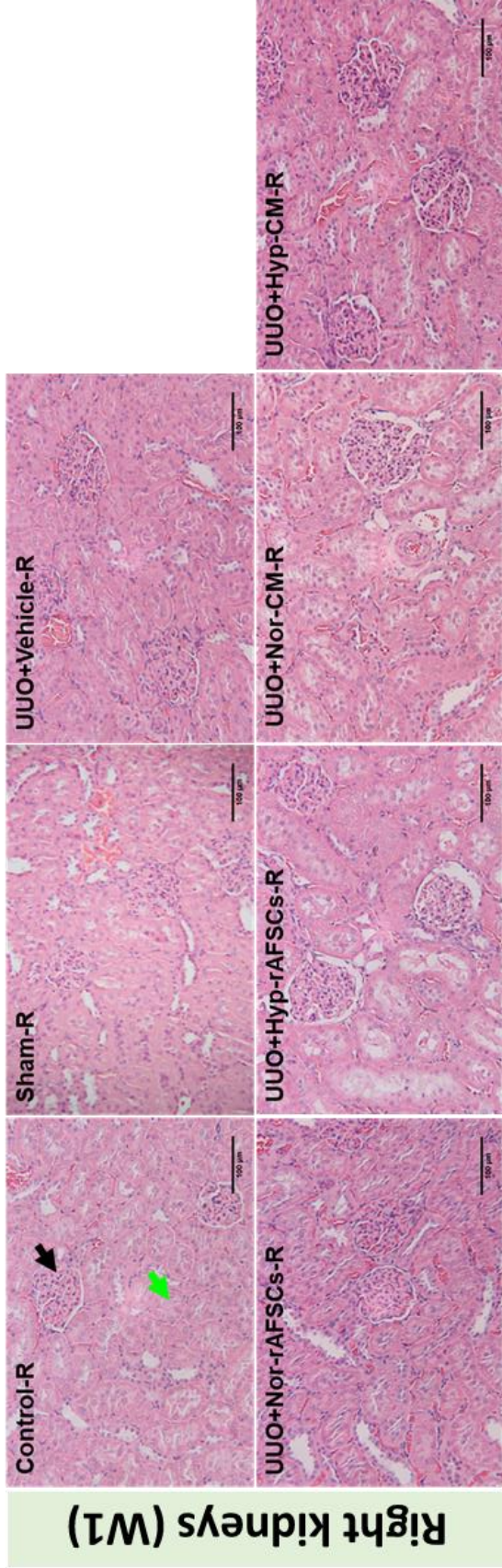


圖 26 移植一週後之右腎以 H&E stain 進行組織學檢查。

黑色箭頭代表腎絲球；綠色箭頭代表腎小管；放大倍率為 200X；比例尺為 100 μm；R 為右腎。

Figure 26 Histological examination of right kidneys of W1-post-transplantation by H&E stain.

Black arrow means glomerulus; green arrow means renal tubules; yellow arrow means blood vessel;; Magnification, 200x; scale bar: 100μm; R: right kidney.



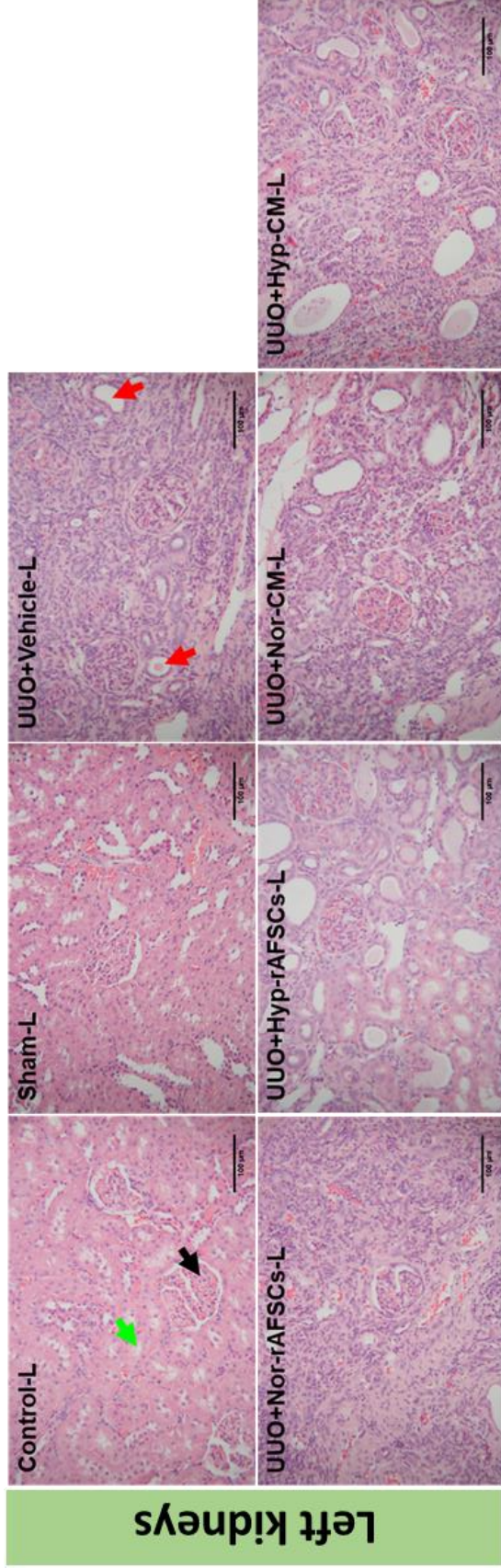


圖 27 移植二週後之左腎以 H&E stain 進行組織學檢查。

黑色箭頭代表腎絲球；綠色箭頭代表腎小管；黃色箭頭代表萎縮或凋亡之腎絲球與腎小管形成之空洞；藍紫色點狀區域代表嗜鹼性結構，藍紫色點狀區域增加代表腎臟組織受到參與發炎反應之嗜鹼性球浸潤；放大倍率為 200X；比例尺為 100 μm ；L 為左腎。

Figure 27 Histological examination of left kidneys of W2-post-transplantation by H&E stain.

Black arrow means glomerulus; green arrow means renal tubules; yellow arrow means blood vessel; red arrows mean hollows which are formed by atrophy or apoptosis of glomerulus or renal tubules; blue-violet punctate area means basophilic structure and the increase of blue-violet punctate area indicates that the kidney tissue is infiltrated by the basophil involved in the inflammatory response; Magnification, 200X; scale bar: 100 μm ; L: left kidney.



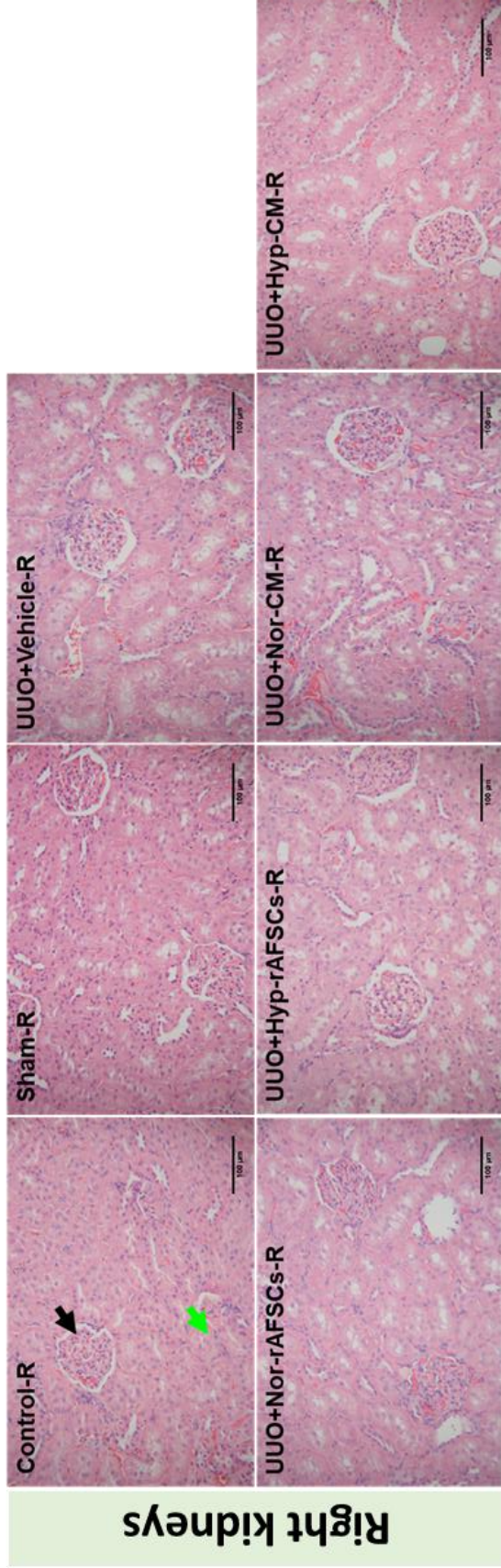


圖 28 移植二週後之右腎以 H&E stain 進行組織學檢查。

黑色箭頭代表腎絲球；綠色箭頭代表腎小管；放大倍率為 200X；比例尺為 100 μm；R 為右腎。

Figure 28 Histological examination of right kidneys of W2-post-transplantation by H&E stain.

Black arrow means glomerulus; green arrow means renal tubules; yellow arrow means blood vessel;; Magnification, 200X; scale bar: 100 μm; R: right kidney.



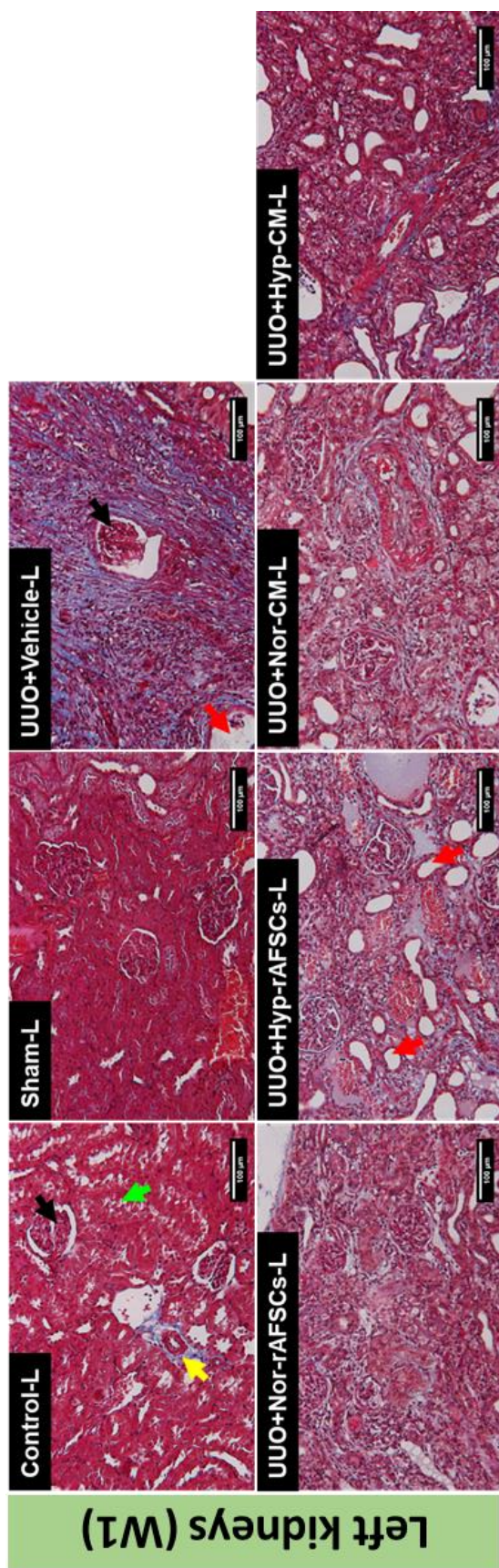


圖 29 移植一週後之左腎以 Masson's Trichrome 染色進行組織學檢查。

黑色箭頭代表腎絲球；綠色箭頭代表腎小管；黃色箭頭代表血管；紅色箭頭代表萎縮或凋亡之腎絲球與腎小管形成之空洞；黑點代表細胞核；藍色區域代表間質中膠原蛋白之沉積；紅色區域代表肌肉、細胞質與角蛋白；放大倍率為 200X；比例尺為 100 µm；L 為左腎。

Figure 29 Histological examination of left kidneys of W1-post-transplantation by Masson's Trichrome staining.

Black arrow means glomerulus; green arrow means renal tubules; yellow arrow means blood vessel; red arrows mean hollows which are formed by atrophy or apoptosis of glomerulus or renal tubules; black spots mean nuclei; blue area means collagen deposition in interstitium; red area means muscle, cytoplasm and keratin; Magnification, 200X; scale bar: 100 µm; L: left kidney.



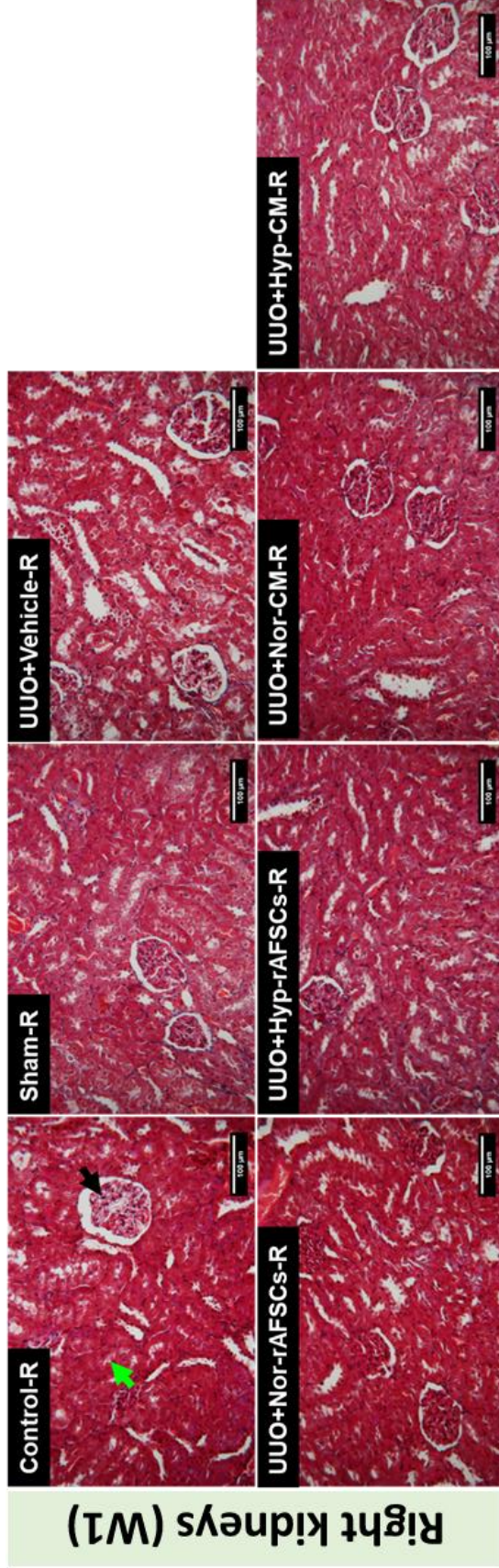


圖 30 移植一週後之右腎以 Masson's Trichrome 染色進行組織學檢查。

黑色箭頭代表腎絲球；綠色箭頭代表腎小管；黑點代表細胞核；藍色區域代表間質中膠原蛋白之沉積；紅色區域代表肌肉、細胞質與角蛋白；放大倍率為 200X；比例尺為 100 µm；R 為右腎。

Figure 30 Histological examination of right kidneys of W1-post-transplantation by Masson's Trichrome staining.

Black arrow means glomerulus; green arrow means renal tubules; black spots mean nuclei; blue area means collagen deposition in interstitium; red area means muscle, cytoplasm and keratin; Magnification, 200X; scale bar: 100 µm; L: right kidney.



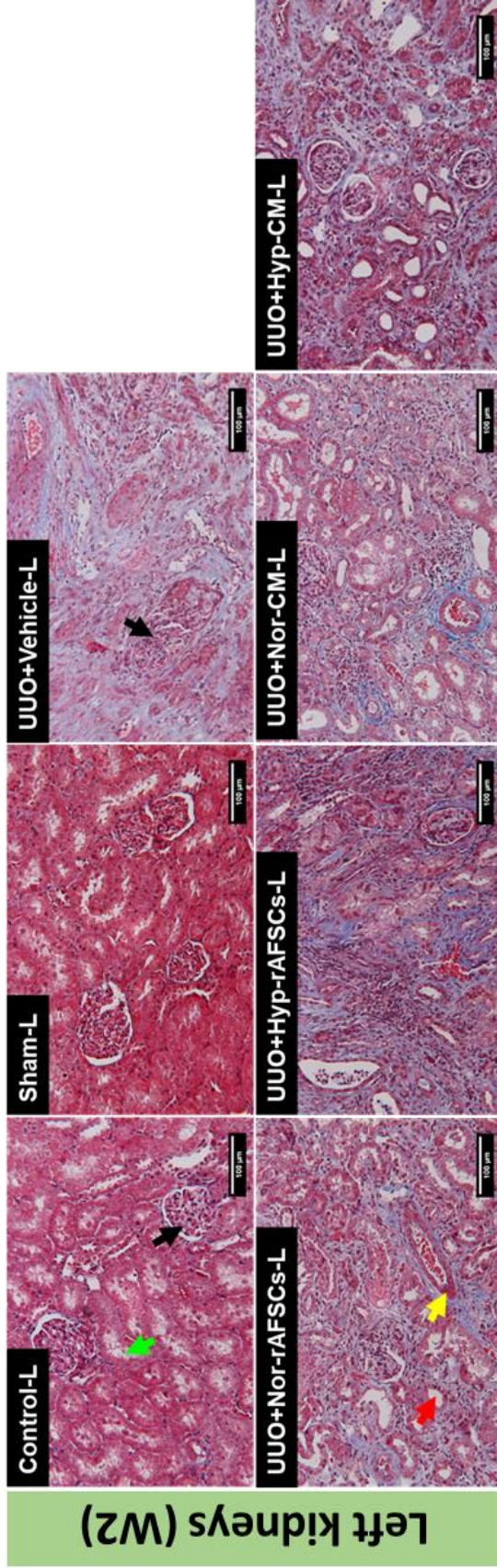


圖 31 移植二週後之左臟以 Masson's Trichrome 染色進行組織學檢查。

黑色箭頭代表腎絲球；綠色箭頭代表腎小管；黃色箭頭代表萎縮或凋亡之腎絲球與腎小管形成之空洞；黑點代表細胞核；藍色區域代表間質中膠原蛋白之沉積；紅色區域代表肌肉、細胞質與角蛋白；放大倍率為 200X；比例尺為 100 µm；L 為左腎。

Figure 31 Histological examination of left kidneys of W2-post-transplantation by Masson's Trichrome staining.

Black arrow means glomerulus; green arrow means renal tubules; yellow arrow means blood vessel; red arrows mean hollows which are formed by atrophy or apoptosis of glomerulus or renal tubules; black spots mean nuclei; blue area means collagen deposition in interstitium; red area means muscle, cytoplasm and keratin; Magnification, 200X; scale bar: 100 µm; L: left kidney.



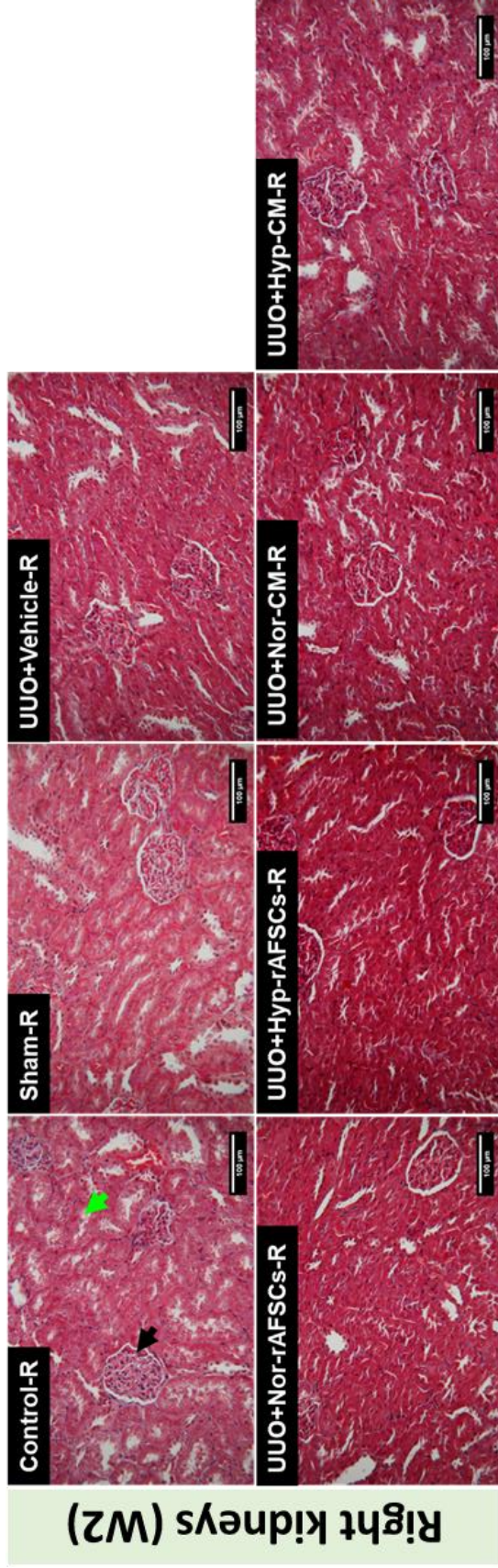


圖 32 移植二週後之右腎以 Masson's Trichrome 染色進行組織學檢查。

黑色箭頭代表腎絲球；綠色箭頭代表腎小管；黑點代表細胞核；藍色區域代表間質中膠原蛋白之沉積；紅色區域代表肌肉、細胞質與角蛋白；放大倍率為 200X；比例尺為 100 µm；R 為右腎。

Figure 32 Histological examination of right kidneys of W2-post-transplantation by Masson's Trichrome staining.

Black arrow means glomerulus; green arrow means renal tubules; yellow arrow means blood vessel; red arrows mean hollows which are formed by atrophy or apoptosis of glomerulus or renal tubules; black spots mean nuclei; blue area means collagen deposition in interstitium; red area means muscle, cytoplasm and keratin; Magnification, 200X; scale bar: 100 µm; L: left kidney.





3.2.4.4 大鼠腎臟纖維化相關分子標誌之分析

因第一章 2.3.1 提及之腎間質纖維化形成機制，故進一步以 TGF- β 、 α -SMA 與 Collagen I 作為檢測纖維化之分子標誌，並以 qRT-PCR 分析各組分子標誌之基因表現量倍率之差異。從圖 33 中，control、sham 與 UUO+vehicle 三組，無論於移植一週或二週後，control 與 sham 組之纖維化分子標誌皆有低於 UUO+vehicle 組之趨勢，表示大鼠之左腎經 UUO 模式手術誘導後，確實會形成左腎之纖維化，同時其組織中之 TGF- β 、 α -SMA 與 Collagen I 會有增加之趨勢；再者，移植一週後 Nor 或 Hyp 處理之 CM 或 rAFSCs 之組別，其 TGF- β 與 Collagen I 之表現量倍率皆有低於 vehicle 組之趨勢，且 Hyp 處理之 rAFSCs 及 CM 之纖維化分子表現量倍率相較於 Nor 處理之 rAFSCs 及 CM 有較低之趨勢，惟 Nor-rAFSCs 之 α -SMA 表現量有較 vehicle 組高之情形 (圖 33-A、C、E)；此外，移植二週後，試驗結果顯示 Nor 或 Hyp 處理之 CM 或 rAFSCs 之組別，其 TGF- β 、 α -SMA 與 Collagen I 之表現量，少數組別與 vehicle 組之表現量倍率趨近相同，然多數組別則有高於 vehicle 之趨勢 (圖 33-B、D、F)；再者，將移植一週與二週後之纖維化分子標誌進行比較，圖 34 顯示移植二週後，除 control 與 sham 組，其餘組別纖維化分子標誌之基因表現量皆有高於移植一週組別之趨勢，其中又以 Hyp-rAFSCs、Nor-CM 與 Hyp-CM 之 α -SMA 表現量顯著較移植一週之組別高，而 Hyp-rAFSCs 之 Collagen I 則顯著較移植一週之組別高。

綜上所述，經 Nor 或 Hyp 處理之 CM 或 rAFSCs 移植一週後，除 Nor-rAFSCs 組未有降低 α -SMA 表現量倍率之趨勢外，皆有降低大鼠 RIF 中之纖維化分子標誌之趨勢，此外，其中又以 Hyp 處理之 rAFSCs 及 CM 之移植可能較 Nor 處理更有緩解 RIF 之潛能；然而，經 Nor 或 Hyp 處理之 CM 或 rAFSCs 移植二週後則觀察到此四組之纖維化分子標誌反而有高於 vehicle 組之趨勢，其原因可能與同種異體移植之幹細胞及其分泌因子於宿主體內存活及降解時間有關，或因大鼠之左側輸尿管為完全阻塞而導致持續性損傷，因而使 Nor 或 Hyp 處理之 rAFSCs 或 CM 不足以提供受損

組織保護作用至二週。



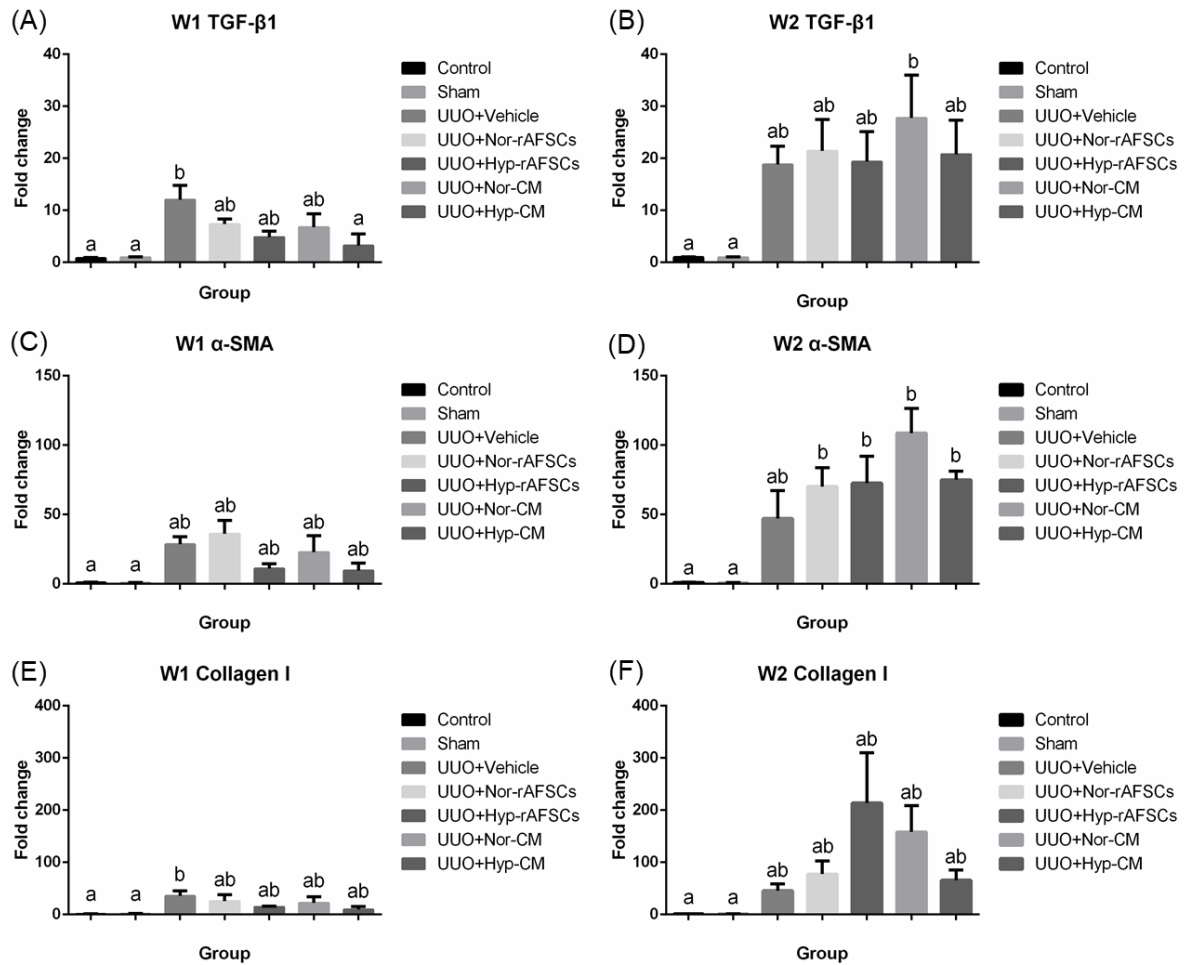


圖 33 以 qPCR 進行左腎纖維化相關基因之表現量倍率分析。

(A)(C)(E) 移植一週後之左腎纖維化相關基因表現量倍率，實驗數據以三至四重複之平均值±標準誤差表示， $P < 0.05$ ；(B)(D)(F) 移植二週後之左腎纖維化相關基因表現量倍率，實驗數據以四至六重複之平均值 ± 標準誤差表示， $P < 0.05$ ；W1：移植後一週，W2：移植後二週。

Figure 33 Analysis of fibrosis related gene expression fold change of left kidneys by qPCR.

(A)(C)(E) Fibrosis related gene expression fold change of W1-post transplantation, values were presented as the mean ± SEM, $n=3-4$, $P < 0.05$; (B)(D)(F) Fibrosis related gene expression fold change of W2-post transplantation, values were presented as the mean ± SEM, $n=4-6$, $P < 0.05$; W1: .after transplantation 1 week; W2: .after transplantation 2 weeks.

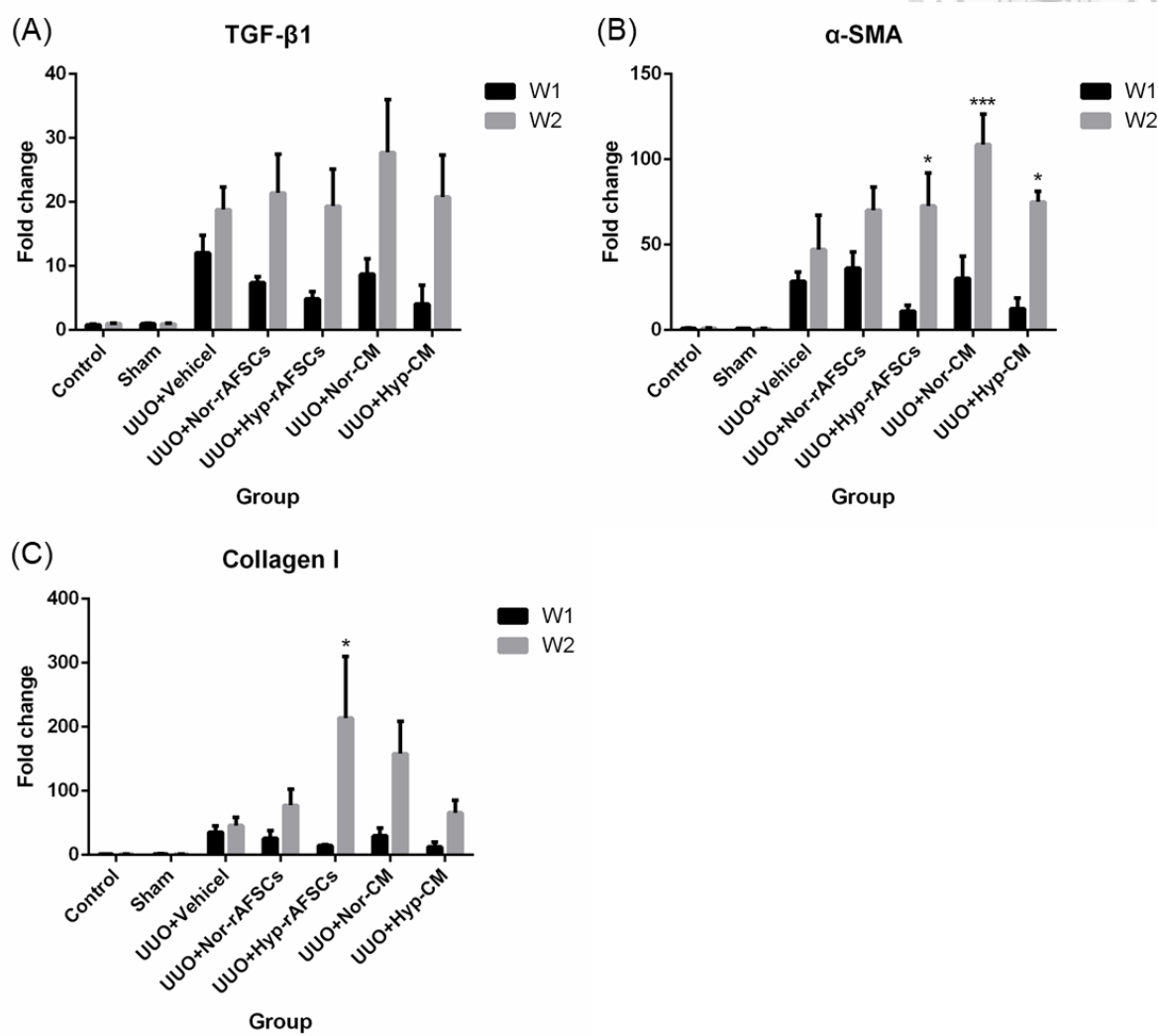


圖 34 移植一週與二週之左腎纖維化相關基因表現量倍率之比較。

(A) TGF-β1 分析；(B) α-SMA 分析；(C) collagen I 分析。實驗數據以三至六重複之平均值 ± 標準誤差表示，*P < 0.05，***P < 0.005；W1：移植後一週，W2：移植後二週。

Figure 34 Comparison of fibrosis related gene expression fold change of left kidneys between W1 and W2-post transplantation.

(A) TGF-β1 assay; (B) α-SMA assay; (C) collagen I assay. Values were presented as the mean ± SEM, n=3-6, * P < 0.05, ***P < 0.005; W1: .after transplantation 1 week; W2: .after transplantation 2 weeks.



第四章 綜合討論

近年來已有許多研究團隊針對 Hyp 培養對 MSCs 之作用與功能進行探討 (Jun *et al.*, 2014), 且多以 ESCs、BM-MSCs 或 AD-MSCs 為主, 而 AFSCs 經 Hyp 培養處理之相關研究則較少。

于 2010 年, Phermthai *et al.* 以 5% 氧濃度培養 hAFSCs 發現經由 Hyp 培養證實較以往之培養方式可維持其表現典型之表面抗原分子標誌, 亦可提高 hAFSCs 之增殖能力約 2 至 5 倍, 而本研究 rAFSCs 經 Hyp 處理後, 其表現 CD29 與 CD90 之比例有較高之趨勢, 並顯著提高其 Oct-4 之基因表現量, 且其增殖試驗結果顯示 Hyp-rAFSCs 於體外培養第 8 天開始, 細胞數及其增殖倍率顯著高於 Nor-rAFSCs ($P < 0.05$), 此結果意味著 Hyp 處理於體外培養第 8 天開始可提高 rAFSCs 之細胞數約 1.8 至 2.3 倍, 增殖倍率約 1.9 至 2.5 倍, 即有利於 rAFSCs 之體外增殖。此外, 本研究因 rAFSCs 可表現與 MSCs 相關之表面抗原, 且 MSCs 一般可分化為脂肪、硬骨與軟骨細胞, 故另將 Nor 與 Hyp 處理之 rAFSCs 進行分化試驗, 從試驗中發現 Hyp 處理對 rAFSCs 於誘導 14 天後之脂肪形成無提高或降低之影響, 此結果與 Jun *et al.* (2014) 相同, 其原因可能為 Hyp 對 rAFSCs 分化為脂肪細胞並無影響。若要進一步探討確切之原因, 可嘗試將 Nor 或 Hyp 處理之 rAFSCs 分別誘導 1、3、5、7 與 14 天以探討於不同誘導天數下, Hyp 處理是否會影響其脂肪分化; 而本研究之硬骨誘導分化試驗顯示 Hyp 處理會降低 rAFSCs 分化為硬骨細胞之能力, 其原因可能為 Hyp 之環境並不適合 rAFSCs 分化為硬骨細胞, 反而有抑制之作用, 然而 Jun *et al.* (2014) 將 hAF-MSCs 進行硬骨分化潛力試驗, 其結果則顯示 Hyp 對 hAF-MSCs 之硬骨分化並無提高或降低 hAF-MSCs 之硬骨分化潛能, 因而推測這二種不同之研究結果可能與不同物種來源之幹細胞有關。

再者, Da Sacco *et al.* (2017) 指出近年來僅少數研究團隊將 AFSCs 移植至疾病模



式動物體內，藉以探討其對 RIF 之療效與作用機制。綜觀過去以 UUO 動物疾病模式作為模擬 RIF 之相關研究中，Sun *et al.* (2013) 於建立 UUO 小鼠後，隨即移植 hAFSCs，並於移植後 1、3、7(1 週) 及 14(2 週) 天將小鼠犧牲與分析，結果顯示 RIF 經 hAFSCs 治療 1 週與 2 週後，其組織中 TGF- β 1 及 collagen I 之表現量顯著較未經 hAFSCs 處理組低 ($P < 0.05$)，顯示 hAFSCs 具有延緩經 UUO 誘導小鼠形成 RIF 之功效。此外，另有研究指出當大鼠經 UUO 手術後，隨即移植 BMSCs 與 BMSCs-CM 至大鼠體內，移植後 7 及 14 天 (1 及 2 週) 將大鼠予以犧牲進行試驗分析，相較於未移植組，BMSCs 與 BMSCs-CM 具有降低大鼠腎臟組織之 collagen I、III 及 α -SMA 表現量之效用，此結果亦顯示 BMSCs 與 BMSCs-CM 具有減緩大鼠 RIF 之療效 (da Silva *et al.*, 2015)。上述二篇文獻中，其團隊皆於建立 UUO 動物疾病模式後，立即注射幹細胞至動物體內，經一段時間後發現 hAFSCs、BMSCs 或 BMSCs-CM 皆具有延緩模式動物 RIF 之進程。本研究則探討已產生 RIF 症狀再經 Nor 或 Hyp 處理之 rAFSCs 或 CM 治療是否具有療效，因此於大鼠經 UUO 手術誘導 2 週已產生 RIF 後，再將 Nor 或 Hyp 處理之 rAFSCs 或 CM 移植至大鼠體內，由腎臟組織切片染色之結果，發現經由 Nor 或 Hyp 處理之 CM 或 rAFSCs 移植後一週之 RIF 均較 vehicle 組有緩解之趨勢，移植二週後則無緩解纖維化之趨勢；此外，於 RIF 大鼠腎臟之纖維化相關因子之表現量分析結果中，除 Nor-rAFSCs 組之 α -SMA 之表現量倍率有高於 vehicle 組，其他組別經移植一週後之纖維化相關因子 TGF- β 1、 α -SMA 與 collagen I 之表現量倍率皆有低於 vehicle 組之趨勢；而移植二週後，少數組別與 vehicle 組之基因表現量倍率趨近相同，然多數組別則有高於 vehicle 之趨勢，顯示經移植 Nor 或 Hyp 處理之 rAFSCs 或 CM 一週後較具有緩解大鼠 RIF 之可能，且其中又以 Hyp 處理之 rAFSCs 及 CM 之移植可能較 Nor 處理更有緩解 RIF 之潛能；然而，經移植二週後之療效於組織染色切片及纖維化相關因子之結果則皆無緩解大鼠 RIF 進程之現象，且 Nor 或 Hyp 處理之 rAFSCs 或 CM 之移植組別，其 TGF-



$\beta 1$ 、 α -SMA 與 collagen I 之表現量倍率相較於 vehicle 組，多數皆有高於 vehicle 組之趨勢，然而此原因尚不明確，可能與同種異體移植之幹細胞及其分泌因子於宿主體內存活及降解時間有關，或因本研究採用之 RIF 動物疾病模式為不可逆之 UUO，而此模式已被許多研究團隊用來探討 RIF，其手術中將大鼠左側輸尿管結紮後於二個結紮點間將輸尿管剪斷，會使大鼠之輸尿管永久阻塞進而產生 RIF，而 Nor 或 Hyp 處理 rAFSCs 或 CM 可能因輸尿管永久阻塞造成持續性之腎臟損傷，進而影響其移植後之治療潛力，因而嘗試採用可逆之 UUO (Hesketh *et al.*, 2014) 或其他方式誘導之 RIF 動物疾病模式進行相關試驗，或許為可行之方法，惟可逆之 UUO 尚未有一致性之標準建立程序，採用前需先釐清之。

綜上所述，Hyp 培養有利於 rAFSCs 之體外增殖，可供未來建立 rAFSCs 於體外擴增之標準分離方法之參考，但於硬骨或軟骨誘導分化試驗則可能因 Hyp 之培養環境不適合硬骨或軟骨分化或取得細胞之物種來源不同而有相異之結果。此外，Hyp 處理之 rAFSCs 及 CM 移植至已產生 RIF 之大鼠體內較 Nor 處理之 rAFSCs 及 CM 無明顯提高之改善效用，若進一步追蹤同種異體移植後 rAFSCs 於體內存在之時間點，或結合其他誘導 RIF 之動物疾病模式之試驗結果，將有助於未來 RIF 治療之臨床及相關研究之進行。



第五章 結論

本研究中首先探討 Hyp 處理對 rAFSCs 之幹性、增殖與分化潛能之影響，試驗結果證實 Hyp-*AFSCs* 表現 CD 29 與 CD 90 之表面抗原比例有較高之趨勢，並顯著提高其 Oct-4 之基因表現量，且 Hyp 處理有利於 rAFSCs 之體外增殖。此外，Hyp 對 rAFSCs 分化為脂肪細胞之能力並無明顯增加或降低之趨勢，卻會顯著降低其分化為硬骨細胞之潛能，且 Hyp 培養可能具有抑制其分化為軟骨細胞之作用，顯示 Hyp 之培養環境不影響 rAFSCs 之脂肪分化，但可能不利於 rAFSCs 之硬骨與軟骨分化。另進一步探討 Hyp-rAFSCs 之同種異體移植對 RIF 大鼠之療效，在組織切片染色之結果中，經 Nor 或 Hyp 處理之 CM 或 rAFSCs 移植後一週之 RIF 均較 vehicle 組有緩解之趨勢，移植二週後則除 Nor-CM 組外，其餘組別皆有緩解纖維化之趨勢；再者，RIF 大鼠腎臟之纖維化相關因子 TGF- β 1、collagen I 及 α -SMA 之表現量分析確認，除 Nor-rAFSCs 組之 α -SMA 之表現量有高於 vehicle 組，其他組別經移植一週後之纖維化相關因子 TGF- β 1、 α -SMA 與 collagen I 之表現量皆有低於 vehicle 組之趨勢，而移植二週後，少數組別與 vehicle 組之基因表現量倍率趨近相同，然多數組別則有高於 vehicle 之趨勢，顯示經移植 Nor 或 Hyp 處理之 rAFSCs 或 CM 一週後較具有緩解大鼠 RIF 之可能，經移植二週後之療效於組織染色切片及纖維化相關因子之結果則皆無緩解大鼠 RIF 進程之情形。

綜言之，Hyp 處理可維持幹細胞之幹性、提高 rAFSCs 之體外增殖倍率，並具降低其分化為硬骨或軟骨之潛能，而 Hyp-rAFSCs 或 Hyp-CM 於移植一週及二週後對 RIF 大鼠之影響則與 Nor-rAFSCs 或 Nor-CM 無明顯差異，顯示 Hyp 處理之 rAFSCs 或 CM 對已產生 RIF 病徵之大鼠於移植一週及二週後無較佳之改善效果。因此，雖然於本研究中 Hyp 處理之 rAFSCs 與其 CM 對 RIF 無較佳之療效，但 Hyp 處理將可供未來建立適當化之 AFSCs 體外培養之擴增程序，期能利用 Hyp 處理之

AFSCs 或其 CM，並藉由其他 CKD 或 RIF 之模式動物，探討 Hyp-AFSCs 或 Hyp-CM 之移植對 CKD 或 RIF 之可行細胞療法。





第六章 未來展望

RIF 為各種 CKD 進展之主要途徑，而目前許多嚴重之腎臟疾病之治療方式多以腎臟透析或移植為主，但長期透析會造成腎功能逐漸喪失，而腎臟移植則因臺灣法律對捐贈者與受贈者之親屬關係及年齡原因而有所限制，因此許多臨床試驗研究欲利用幹細胞之特性來發展可能之替代療法。

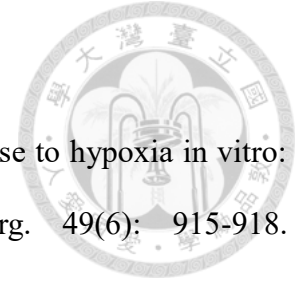
AFSCs 已被認為於再生醫學領域上具有一定之臨床應用潛力，其特性介於多能性與複能性幹細胞之間，較 ESCs 無應用上之倫理道德爭議及形成畸胎瘤之風險，具有低免疫原性、來源取得容易且低侵入性之優點，可表現與 MSCs 相關之表面抗原 CD29 等，及幹性與多能性相關之分子標誌 Oct-4，同時亦具有分化為三胚層細胞系之潛能。從本研究之結果顯現，Hyp 處理有益於維持或增加 rAFSCs 自我更新之潛力，但於分化能力之部分則尚有待評估；在移植上，Hyp 處理之 rAFSCs 或 CM 則未較 Nor 處理之 rAFSCs 或 CM 有較佳之 RIF 治療效果。

有鑑於此，Hyp 處理之 rAFSCs 或其 CM 應仍具有臨床應用之潛力，可供未來建立 rAFSCs 於體外擴增之標準分離方法的參考，以便產生足夠進行移植之細胞數，並同時維持其自我更新與分化之潛能。此外，未來進行相關臨床研究時，可能需要考慮同種異體移植之幹細胞於宿主體內之存活時間或採用不同誘導方法之 RIF 疾病模式動物，結合各方觀點來發展具有確切療效之替代療法，如此可避免因長期進行透析造成腎功能喪失，或等待合適腎臟之煎熬，為飽受病魔困擾之患者帶來重獲新生之希望。

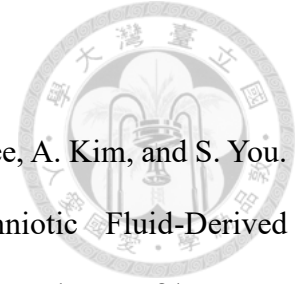


第七章 參考文獻

- Balbi, C., L. Barile, S. Moimas, F. Moccia, A. Smits, F. Santini, A. Smits, F. Santini, D. Coviello, M. J. Goumans, M. Giacca, and S. Bollini. 2018. The human amniotic fluid stem cell secretome as new paracrine source to unlock endogenous cardiac regeneration. *Vasc. Pharmacol.* 103-105: 47-48. doi:<https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.12.004>
- Chevalier, R. L. 2006. Obstructive nephropathy: towards biomarker discovery and gene therapy. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* 2, 157. doi:10.1038/ncpneph0098
- Cipriani, S., D. Bonini, E. Marchina, I. Balgkouranidou, L. Caimi, G. G. Zucconi, and S. Barlati. 2007. Mesenchymal cells from human amniotic fluid survive and migrate after transplantation into adult rat brain. *Cell Biolo. Int.* 31(8): 845-850. doi:doi:10.1016/j.cellbi.2007.01.037
- Da Sacco, S., L. Perin, and S. Sedrakyan. 2017. Amniotic fluid cells: current progress and emerging challenges in renal regeneration. *Pediatr. Nephrol.* doi:10.1007/s00467-017-3711-7
- da Silva, A. F., K. Silva, L. A. Reis, V. P. C. Teixeira, and N. Schor. 2015. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Their Conditioned Medium Attenuate Fibrosis in an Irreversible Model of Unilateral Ureteral Obstruction. *Cell Transplant.* 24(12): 2657-2666. doi:10.3727/096368915X687534
- Di Bernardo, J., and S. M. Kunisaki. 2016. Amniotic Fluid Stem Cell Populations. In D. O. Fauza & M. Bani (Eds.), *Fetal Stem Cells in Regenerative Medicine: Principles and Translational Strategies* (pp. 167-179). New York, NY: Springer New York.
- Dionigi, B., A. Ahmed, E. C. Pennington, D. Zurakowski, and D. O. Fauza. 2014. A



- comparative analysis of human mesenchymal stem cell response to hypoxia in vitro: Implications to translational strategies. *J. Pediatr. Surg.* 49(6): 915-918. doi:10.1016/j.jpedsurg.2014.01.023
- Fuchs, J. R., A. Kaviani, J.-T. Oh, D. LaVan, T. Udagawa, R. W. Jennings, J. M. Wilson, and D. O. Fauza. 2004. Diaphragmatic reconstruction with autologous tendon engineered from mesenchymal amniocytes. *J. Pediatr. Surg.* 39(6): 834-838. doi:https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2004.02.014
- Gholizadeh-Ghaleh Aziz, S., E. Fathi, M. Rahmati-Yamchi, A. Akbarzadeh, Z. Fardiyazar, and M. Pashaiasl. 2017. An update clinical application of amniotic fluid-derived stem cells (AFSCs) in cancer cell therapy and tissue engineering. *Artif. Cell. Nanomed. B.* 45(4): 765-774. doi:10.1080/21691401.2016.1216857
- Hesketh, E. E., M. A. Vernon, P. Ding, S. Clay, G. Borthwick, B. Conway, and J. Hughes. 2014. A Murine Model of Irreversible and Reversible Unilateral Ureteric Obstruction. *J. Vis. Exp.* (94): e52559. doi:doi:10.3791/52559
- Hu, X., S. P. Yu, J. L. Fraser, Z. Lu, M. E. Ogle, J.-A. Wang, and L. Wei. 2008. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 135(4): 799-808. doi:https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2007.07.071
- Jha, V., G. Garcia-Garcia, K. Iseki, Z. Li, S. Naicker, B. Plattner, R. Saran, A. Y.-M. Wang, and C.-W. Yang. 2013. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *The Lancet* 382(9888): 260-272. doi:https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60687-X
- Joo, S., I. K. Ko, A. Atala, J. J. Yoo, and S. J. Lee. 2012. Amniotic fluid-derived stem cells in regenerative medicine research. *Arch. Pharm. Res.* 35(2): 271-280. doi:10.1007/s12272-012-0207-7

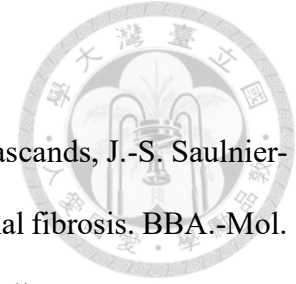


- Jun, E., Q. Zhang, B. Yoon, J.-H. Moon, G. Lee, G. Park, P. Kang, J. Lee, A. Kim, and S. You. 2014. Hypoxic Conditioned Medium from Human Amniotic Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells Accelerates Skin Wound Healing through TGF- β /SMAD2 and PI3K/Akt Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* 15(1): 605.
- Kang, N. H., K. A. Hwang, S. U. Kim, Y. B. Kim, S. H. Hyun, E. B. Jeung, and K. C. Choi. 2012. Potential antitumor therapeutic strategies of human amniotic membrane and amniotic fluid-derived stem cells. *Cancer Gene Ther.* 19: 517. doi:10.1038/cgt.2012.30
- Kaviani, A., T. E. Perry, A. Dzakovic, R. W. Jennings, M. M. Ziegler, and D. O. Fauza. 2001. The amniotic fluid as a source of cells for fetal tissue engineering. *J. Pediatr. Surg.* 36(11): 1662-1665. doi:https://doi.org/10.1053/jpsu.2001.27945
- Kim, D. S., Y. J. Ko, M. W. Lee, H. J. Park, Y. J. Park, D.-I. Kim, K. W. Sung, H. H. Koo, and K. H. Yoo. 2016. Effect of low oxygen tension on the biological characteristics of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Stress and Chaperon.* 21(6): 1089-1099. doi:10.1007/s12192-016-0733-1
- Liu, Y., A.-C. Tsai, X. Yuan, Y. Li, and T. Ma. 2017. Chapter 18 - Hypoxia Regulation of Stem Cell: Mechanisms, Biological Properties, and Applications A2 - Vishwakarma, Ajaykumar. In J. M. Karp (Ed.), *Biology and Engineering of Stem Cell Niches* (pp. 273-291). Boston: Academic Press.
- Ma, T., W. L. Grayson, M. Fröhlich, and G. Vunjak-Novakovic. 2009. Hypoxia and stem cell-based engineering of mesenchymal tissues. *Biotechnol. Progress.* 25(1): 32-42. doi:10.1002/btpr.128
- Maraldi, T., M. Riccio, E. Resca, A. Pisciotta, G. B. La Sala, A. Ferrari, G. Bruzzesi, A. Motta, C. Migliaresi, L. Marzona, and A. D. Pol. 2011. Human Amniotic Fluid Stem Cells Seeded in Fibroin Scaffold Produce In Vivo Mineralized Matrix. *Tissue Eng. Pt. A*

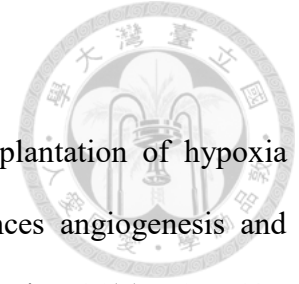


17(21-22): 2833-2843. doi:10.1089/ten.tea.2011.0062

- Monteiro Carvalho Mori da Cunha, M. G., S. Zia, F. Oliveira Arcolino, M. S. Carlon, D. V. Beckmann, N. L. Pippi, D. Luhers Graça, E. Levtchenko, J. Deprest, and J. Toelen. 2015. Amniotic Fluid Derived Stem Cells with a Renal Progenitor Phenotype Inhibit Interstitial Fibrosis in Renal Ischemia and Reperfusion Injury in Rats. *Plos One*. 10(8): e0136145. doi:10.1371/journal.pone.0136145
- Najem, D., M. Ribocco-Lutkiewicz, C. Sodja, F. M. Moretti, D. Stanimirovic, and M. Bani-Yaghoub. 2016. Amniotic Fluid Stem Cell Culture Methods. In D. O. Fauza & M. Bani (Eds.), *Fetal Stem Cells in Regenerative Medicine: Principles and Translational Strategies* (pp. 181-214). New York, NY: Springer New York.
- Nikolic-Paterson, D. 2010. CD4+ T cells: A potential player in renal fibrosis (Vol. 78).
- Nogueira, A., M. JoÃO Pires, and P. Alexandra Oliveira. 2017. Pathophysiological Mechanisms of Renal Fibrosis: A Review of Animal Models and Therapeutic Strategies. *In Vivo*. 31(1): 1-22. doi:10.21873/invivo.11019
- Perin, L., S. Sedrakyan, S. Giuliani, S. Da Sacco, G. Carraro, L. Shiri, K. V. Lemley, M. Rosol, S. Wu, A. Atala, D. Warburton, and R. E. De Filippo. 2010. Protective Effect of Human Amniotic Fluid Stem Cells in an Immunodeficient Mouse Model of Acute Tubular Necrosis. *Plos One* 5(2): e9357. doi:10.1371/journal.pone.0009357
- Petersen, T. H., E. A. Calle, L. Zhao, E. J. Lee, L. Gui, M. B. Raredon, K. Gavrilov, T. Yi, Z. W. Zhuang, C. Breuer, E. Herzog, L. E. Niklason. 2010. Tissue-Engineered Lungs for in Vivo Implantation. *Science* 329(5991): 538-541. doi:10.1126/science.1189345
- Phermthai, T., Y. Odglun, S. Julavijitphong, V. Titapant, P. Chuenwattana, C. Vantanasiri, and K. Pattanapanyasat. 2010. A novel method to derive amniotic fluid stem cells for therapeutic purposes. *BMC Cell Biol*. 11(1): 79. doi:10.1186/1471-2121-11-79



- Pradère, J.-P., J. Gonzalez, J. Klein, P. Valet, S. Grès, D. Salant, J.-L. Bascands, J.-S. Saulnier-Blache, and J. P. Schanstra. 2008. Lysophosphatidic acid and renal fibrosis. *BBA.-Mol. Cell Biol. L.* 1781(9): 582-587. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2008.04.001>
- Ramasamy, T. S., V. Velaithan, Y. Yeow, and F. H. Sarkar. 2018. Stem Cells Derived from Amniotic Fluid: A Potential Pluripotent-Like Cell Source for Cellular Therapy? *Curr. Stem Cell Res. T.* 13(4): 252-264. doi:[10.2174/1574888x13666180115093800](https://doi.org/10.2174/1574888x13666180115093800)
- Schiavo, A. A., C. Franzin, M. Albiero, M. Piccoli, G. Spiro, E. Bertin, L. Urbani, S. Visentin, E. Cosmi, G. P. Fadini, P. De Coppi, and M. Pozzobon. 2015. Endothelial properties of third-trimester amniotic fluid stem cells cultured in hypoxia. *Stem Cell Res. Ther.* 6(1): 209. doi:[10.1186/s13287-015-0204-0](https://doi.org/10.1186/s13287-015-0204-0)
- Sedrakyan, S., S. Da Sacco, A. Milanesi, L. Shiri, A. Petrosyan, R. Varimezova, D. Warburton, K. V. Lemley, R. E. De Filippo, and L. Perin. 2012. Injection of amniotic fluid stem cells delays progression of renal fibrosis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 23(4): 661-673. doi:[10.1681/asn.2011030243](https://doi.org/10.1681/asn.2011030243)
- Sun, D., L. Bu, C. Liu, Z. Yin, X. Zhou, X. Li, and A. Xiao. 2013. Therapeutic Effects of Human Amniotic Fluid-Derived Stem Cells on Renal Interstitial Fibrosis in a Murine Model of Unilateral Ureteral Obstruction. *Plos One* 8(5): e65042. doi:[10.1371/journal.pone.0065042](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065042)
- Toricelli, F., L. Brizzi, P. A. Bernabei, G. Gheri, S. Di Lollo, L. Nutini, E. Lisi, M. Di Tommaso, and E. Cariati. 1993. Identification of hematopoietic progenitor cells in human amniotic fluid before the 12th week of gestation. *Italian journal of anatomy and embryology = Archivio italiano di anatomia ed embriologia*, 98(2): 119-126.
- Underwood, M. A., W. M. Gilbert, and M. P. Sherman. 2005. Amniotic Fluid: Not Just Fetal Urine Anymore. *J. Perinatol.* 25: 341. doi:[10.1038/sj.jp.7211290](https://doi.org/10.1038/sj.jp.7211290)



- Wei, L., J. L. Fraser, Z.-Y. Lu, X. Hu, and S. P. Yu. 2012. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Neurobiolo. Dis.* 46(3): 635-645. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.03.002>
- Yang, H.-C., Y. Zuo, and A. B. Foggo. 2010. Models of chronic kidney disease. *Drug discov. today. Dis. Models.* 7(1-2): 13-19. doi:[10.1016/j.ddmod.2010.08.002](https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2010.08.002)
- Yeh, Y.-C., W.-Y. Lee, C.-L. Yu, S.-M. Hwang, M.-F. Chung, L.-W. Hsu, Y. Chang, W.-W. Lin, M.-S. Tsai, H.-J. Wei, and H.-W. Sung. 2010. Cardiac repair with injectable cell sheet fragments of human amniotic fluid stem cells in an immune-suppressed rat model. *Biomaterials* 31(25): 6444-6453. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.04.069>
- Zhang, W., L. Liu, Y. Huo, Y. Yang, and Y. Wang. 2014. Hypoxia-Pretreated Human MSCs Attenuate Acute Kidney Injury through Enhanced Angiogenic and Antioxidative Capacities. *BioMed Res. Int.* 2014: 10. doi:[10.1155/2014/462472](https://doi.org/10.1155/2014/462472)
- Zhao, J., L. Wang, A. Cao, M. Jiang, X. Chen, and W. Peng. 2015. Renal Tubulointerstitial Fibrosis: A Review in Animal Models. *J. Integr. Nephrol. Androl.* 2(3): 75-80. doi:[10.4103/2225-1243.161428](https://doi.org/10.4103/2225-1243.161428)