

國立臺灣大學醫學院生理學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Physiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

高鹽飲食對腎臟免疫的影響

The impact of high-salt intake in kidney immunity

蔡佩蓁

Pei-Zhen Tsai

指導教授：林水龍 博士

Advisor: Shuei-Liong Lin, M.D. Ph.D.

中華民國 106 年 1 月

January, 2017

國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文

口試委員會審定書

高鹽飲食對腎臟免疫的影響

The impact of high-salt intake in kidney immunity

本論文係蔡佩蓁君 (R03441002) 在國立臺灣大學生理所完成之碩
(博) 士學位論文，於民國 106 年 01 月 16 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：

林水龍

(簽名)

(指導教授)


陳永銘

邱新

系主任、所長

湯志永 (簽名)

謝辭



感謝林水龍老師這兩年半的教導，老師總是很仔細地講解問題及實驗，即使實驗結果不如預期，老師還是不斷地激勵我，稱讚我做得很好，讓我有信心實驗能夠順利繼續，從老師身上學到很多，不論是對實驗的嚴謹態度，還是為人處事的技巧，都讓我受益良多。同時也要感謝 Eileen 幫忙處理實驗室的大小事情，讓我們能無後顧之憂地做實驗，也謝謝您像媽媽一樣關心我們的生活，讓實驗室就像個大家庭。

感謝靜欽學長在我剛進實驗室時帶我做實驗，熟悉實驗室的環境。感謝明軒常說些有趣的話，讓實驗室充滿歡樂。感謝芳翎學姐給予我實驗及生活上的幫助，讓我能盡快適應實驗室生活。感謝舜陽及家豪學長在實驗上的幫助，也常給我建議，讓我能實驗室生存下去。謝謝我的好同學紀均，常和我聊天鬥嘴，讓實驗室生活更加有趣，也不離不棄地陪我一起做實驗，當我的小小幫手，能遇到如此體貼又有趣的好夥伴真的很幸運。謝謝鈺涵和皓仔在我忙碌時幫忙處理實驗室的雜務，陪我聊天抒發心情。感謝實驗室的每一個人，在這兩年半的陪伴與關心，讓我能堅持下去。

最後要感謝的是我的家人，謝謝父母一路的支持與栽培，讓我能無後顧之憂完成學業。謝謝妹妹弟弟陪我聊天，讓我能抒發心情開心地過每一天。感謝我身邊的所有人，期望未來能成為幫助他人，使別人感受到溫暖的人。



摘要

鹽對地球多數生物來說是不可或缺的，適當濃度的鹽能維持細胞與器官正常的生理功能。但最近越來越多研究顯示高鹽飲食有可能是高血壓、慢性發炎以及自體免疫疾病發展的重要因子，而現代人鹽攝取量也逐年增加，因此，研究高鹽飲食與免疫疾病之間的關係是十分重要的。

過去的研究指出未分化的 CD4⁺ T 細胞會受到外加 10-40 mM 的鹽往輔助型 T 細胞 17(T helper 17 cells;Th17 cells)分化，而高鹽所誘導的分化在體外及體內的實驗都證實受到血清糖皮質激酶 1(serum glucocorticoid kinase 1;SGK1)及介白素-23 受體(IL-23R)的表現所調控，高鹽也會影響巨噬細胞的功能及極化。然而一般生理狀況下，在身體內具有如此高的鹽濃度只可能在腎臟發現，因此我們想知道腎臟是否為發生 Th17 cells 活化的重要場所，以及如果 Th17 cells 的活化真的發生在腎臟，半乳糖凝集素 3(galectin-3;Gal3)是否會抑制 Th17 cells 的活化。

我們給予 8~12 週大的 C57BL/6 小鼠餵食高鹽飼料(8% NaCl)當作實驗組，控制組則給予一般飼料(0.4% NaCl)，兩組皆可自由飲水，藉此來觀察餵食高鹽飼料組別與控制組是否有差異性。

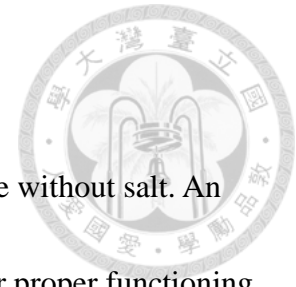
實驗結果顯示餵食高鹽飼料的組別尿液裡的鈉離子、氯離子濃度明顯高於控制組，但血壓及血漿內鈉離子、氯離子濃度並無明顯差別。腎臟萃取的 RNA 在檢測 Th17 cells 相關基因表現上兩組並沒有差別，但 galectin-3 的表現則在高鹽組升高。因此，我們從腎臟分離出 CD45⁺細胞看高鹽是否會影響 Th17 cells 的活化，結果顯示餵食高鹽組別相對於控制組在和 Th17 cells 活化相關基因表現量有明顯上升的趨勢，代表餵食高鹽飼料後 Th17 cells 的活化可能會發生在腎臟。但進一步從腎臟分離出的 CD11b⁺巨噬細胞及 CD4⁺ Th cells 並沒有 Th17 cells 活化的情形。另外，培養的巨噬細胞在高鹽環境下似乎也有促進 Th17 cells 活化的情形，但 galectin-3 的表現反而下降。巨噬細胞實驗與我們發現餵食高鹽飼料後整個腎臟與 CD45⁺細胞的 galectin-3 表現量會上升剛好相反，這之間的關係及作用

機制仍需更多的實驗來完成。

總結來說，餵食高鹽飼料可能會導致在腎臟有 Th17 cells 活化的情形，細胞實驗也能互相驗證，但我們目前還未找出 Th17 cells 活化的情形發生在腎臟哪些細胞上，以及腎臟中的變化是否會影響身體其他部分的免疫反應仍需更多實驗來釐清。

關鍵詞：高鹽飲食、巨噬細胞、輔助型 T 細胞 17、半乳糖凝集素 3、介白素-17

Abstract



Like the majority of other lives on earth, humans cannot survive without salt. An ideal concentration of salt, or sodium chloride (NaCl), is required for proper functioning of cells and organ systems. A high intake of dietary salt has been implicated in the development of hypertension, chronic inflammation, and autoimmune diseases. And modern people increase salt intake year by year. Therefore, it is important to study the relationship between high-salt diet and immune diseases.

Recent evidence has shown that Th17 cells can be preferentially induced by treating CD4⁺ T cells in cell culture medium with an additional 10-40 mM NaCl. High-salt treatment enhances the differentiation of Th17 cells by upregulation of serum glucocorticoid kinase 1 (SGK1) and IL-23 receptor (IL-23R) both *in vitro* and *in vivo*. High-salt treatment also affects the function and polarization of macrophages. However, a high level of sodium or hyperosmolality can only be found in the kidneys in normal physiology. We would like to know whether the hypertonic renal medulla is the exact niche for Th17 cells activation. If the hypertonic renal medulla is the exact niche for Th17 cells activation, we would like to know whether galectin-3 inhibit the activation of Th17 cells in renal medulla.

We fed 8% NaCl diets to 8~12-week-old C57BL/6 male mice as a high salt diet (HSD) group, and control mice were fed with 0.4% NaCl diets. Both groups had free



access to tap water.

Experimental results show that urine Na^+ , Cl^- concentrations were higher in HSD group, but blood pressure and plasma Na^+ , Cl^- concentration did not have the significant changes. RNA extracted from kidney did not differ in the detection of Th17 cells-associated gene expression, except for increased galectin-3 expression in HSD group. We then isolated CD45^+ cell from control and HSD kidneys to analyze gene expression associated with Th17 cells, and the data showed higher expression levels of *Il23/Il23r/Il17* in HSD group than control group. Then we isolated CD11b^+ macrophages and CD4^+ Th cells from control and HSD kidneys to repeat the same analyses, but there's no difference between groups. In addition, cultured macrophages seemed to promote Th17 cells activation in high salt environment. Although we found that galectin-3 expression increased in the kidneys and CD45^+ cells after high-salt diet, the galectin-3 expression in high salt-treated macrophages *in vitro* was in contrast. The role of galectin-3 in regulating high salt-induced Th17 activation still needs more experiments to verify.

In conclusion, mice fed high-salt diets may result in the activation of Th17 cells in the kidney, and cell culture experiments can be used to verify each other. But we have not yet identified which cells in the kidney are responsible for activation of Th17 cells and whether the activation of Th17 cells in kidney will affect the other body parts after

high salt intake. We need more experiments to clarify.



Keywords : high salt diet 、 macrophage 、 Th17 cells 、 Galectin-3 、 IL17

目錄



口試委員會審定書.....	i
謝辭.....	ii
摘要.....	iii
Abstract.....	v
目錄.....	viii
圖目錄.....	xi
表目錄.....	xii
第一章 緒論.....	1
1.1 鹽(Salt).....	1
1.2 鹽與免疫反應.....	2
1.2.1 腎臟免疫反應.....	2
1.2.2 巨噬細胞(macrophage).....	3
1.2.3 輔助型 T 細胞 17(T helper 17 cells;Th17 cells).....	4
1.2.4 鹽和巨噬細胞.....	5
1.2.5 鹽和 Th17 cells.....	7
1.2.6 半乳糖凝集素-3(galectin-3)和 Th17 cells.....	8
1.3 實驗目的.....	10
第二章 材料與方法.....	11
2.1 材料.....	11
2.1.1 實驗動物.....	11
2.1.2 實驗動物飼料.....	11
2.1.3 藥品與試劑.....	11
2.1.4 溶液.....	15
2.1.5 抗體.....	17



2.2	方法	19
2.2.1	小鼠基因型鑑定	19
2.2.1.1	DNA 萃取	19
2.2.1.2	聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction ; PCR).....	19
2.2.2	骨髓巨噬細胞培養	19
2.2.3	檢體採集	20
2.2.3.1	血漿的採集與檢測	20
2.2.3.2	腎臟組織的採集	20
2.2.3.3	尿液的採集與檢測	21
2.2.3.4	腎臟 CD45 ⁺ 、CD4 ⁺ 、CD11b ⁺ 細胞的分離	21
2.2.3.5	淋巴結(lymph node)的採集	21
2.2.4	血壓測量	22
2.2.5	RNA 萃取.....	22
2.2.6	反轉錄(reverse transcription)及即時聚合酶連鎖反應(real-time polymerase chain reaction ; real-time PCR).....	23
2.2.7	流式細胞技術(Flow cytometry)	23
2.2.8	統計分析	24
第三章	實驗結果	25
3.1	餵食高鹽飼料對生理數值的影響	25
3.2	餵食高鹽飼料後腎臟 Th17 cells 相關基因表現之情形	26
3.3	餵食高鹽飼料後淋巴結 Th cells 變化之情形	29
3.4	高鹽對巨噬細胞 Th17 cells 相關基因表現的影響	29
第四章	討論	31
4.1	餵食高鹽飼料對生理數值的影響	31
4.2	餵食高鹽飼料後腎臟 Th17 cells 相關基因表現之情形	32

4.3	餵食高鹽飼料後淋巴結 Th cells 變化之情形	32
4.4	高鹽對巨噬細胞 Th17 cells 相關基因表現的影響	33
4.5	未來可進行的相關實驗	34
第五章	結論與未來展望	35
圖表		36
第六章	參考文獻	64





圖目錄

圖一、小鼠餵食高鹽飼料一個月後血液電解質變化	36
圖二、小鼠餵食高鹽飼料一個月後尿液電解質變化	37
圖三、小鼠餵食高鹽飼料一個月後血壓變化	38
圖四、餵食高鹽飼料兩週腎臟組織與 Th17 cells 相關基因之表現	39
圖五、餵食高鹽飼料兩週分離的 CD45 ⁺ cell 基因之表現	41
圖六、餵食高鹽飼料一週分離的 CD45 ⁺ cell 基因之表現	43
圖七、餵食高鹽飼料一個月分離的 CD45 ⁺ cell 基因之表現	45
圖八、餵食高鹽飼料兩週分離的巨噬細胞基因之表現	46
圖九、餵食高鹽飼料兩週分離的 Th cells 基因之表現	47
圖十、餵食高鹽飼料一個月分離的巨噬細胞基因之表現	48
圖十一、餵食高鹽飼料一個月分離的 Th cells 基因之表現	49
圖十二、餵食高鹽飼料兩週分離的 CD45 ⁺ cells 細胞組成	50
圖十三、餵食高鹽飼料一週 renal lymph node Th cells 細胞組成變化	51
圖十四、餵食高鹽飼料一週 popliteal lymph node Th cells 細胞組成變化	52
圖十五、餵食高鹽飼料一週分離的 Th cells 基因之表現	53
圖十六、餵食高鹽飼料兩週 lymph node Th cells 分泌細胞激素變化	54
圖十七、高鹽環境下 wild type 巨噬細胞基因之表現及細胞毒性之情形	55
圖十八、高鹽或高滲透壓環境下 wild type 巨噬細胞基因之表現	56
圖十九、高鹽環境下 wild type 及 Gal3 ^{-/-} 巨噬細胞基因之表現	57



表目錄

表一、控制組飼料與高鹽組飼料之營養成分表	58
表二、PCR 之引子序列.....	61
表三、Real-time PCR 之引子序列.....	62



第一章 緒論

1.1 鹽(Salt)

鹽對地球多數生物來說是不可或缺的，適當濃度的鹽能維持細胞與器官正常的生理功能。即使每天攝取鹽的量不同，腎臟會調節鹽的排泄速率來讓身體鹽的總量維持一定[1]。腎臟會在腎小球過濾大量的鹽，但最後排泄在尿液中的卻只有很小一部分。近曲小管(proximal tubule)和亨利氏環的粗上升支(thick ascending limb of the loop of Henle)會再吸收大部分的鈉離子，而遠曲小管(distal convoluted tubule)和集尿管(collecting duct)依據攝取的鹽來調節鈉離子的再吸收。

在多數的情況下，腎臟會將大於 95% 由飲食攝取的鈉離子排泄出去，在穩定的情況下無論是健康或有疾病的腎臟都是如此，也可由排泄出的鈉離子來推算鈉離子的攝取量。最近的研究指出皮膚是可堆積鈉離子的地方，但並不會伴隨水的累積，而堆積的鈉離子是和糖胺聚糖(glycosaminoglycan)結合形成無滲透活性的鈉離子(osmotically inactive Na^+)，大鼠餵食高鹽飲食後軟骨及皮膚的膠原蛋白(collagen)及蛋白聚糖(proteoglycan)含量也會增加[2, 3]。長期觀察顯示由皮膚週期釋放的鈉離子會使鈉離子的排泄率偏離攝取的鈉離子，利用鈉-核磁共振攝影技術(Na-MRI)也發現鈉離子會累積在肌肉、皮膚、腦[4]。當鈉離子的攝取量突然改變時，要重新達到攝取和排泄的平衡需要一段時間，當鈉離子的攝取量增加時身體的鈉離子含量也會增加，體重、血壓、細胞外水含量也會增加，但長期攝取高鹽血壓會持續上升，但身體鈉離子含量、體重、細胞外水含量反而會下降[5, 6]。這種身體鈉離子含量和血量的改變被認為是鈉離子攝取量和血壓之間關係的可能原因。在血壓正常的個體，鈉離子的攝取量改變對血壓的影響很小，減少一半的鈉離子攝取量血壓只會降低大約 2 毫米汞柱(mmHg)[7]。然而這樣的血壓降低對於鹽敏感的人，例如有高血壓、糖尿病、慢性腎病變及老人有健康的益處[7-10]。因此，限制鹽的攝取量被廣泛認為是健康生活方式的一部分，也是被剛診斷出有



高血壓的人的一線治療[11]。最新的世界衛生組織指導方針建議成人每日攝取的鹽不超過 5 公克[12]。

除了高血壓，鹽攝取量也會影響蛋白尿和腎小球濾過分數(glomerular filtration fraction)，鹽攝取量的上升和蛋白尿的惡化有關[9, 10, 13-15]。雖然現在的證據對於鹽攝取量對腎臟功能的影響結論還是衝突的，但對於長時間暴露在高鹽和腎臟組織損傷的關係實驗結果是一致的[16-18]。許多實驗證實增加鹽的攝取會直接讓促使纖維化的介質增加，主要是轉化生長因子- β (transforming growth factor- β ;TGF- β)和氧化壓力源(oxidative stressors)[18-22]。因此目前普遍接受於有蛋白尿或體液狀態增加的慢性腎病(chronic kidney disease;CKD)病人可以建議適度限制鹽的攝取量[19, 23]。

1.2 鹽與免疫反應

1.2.1 腎臟免疫反應

雖然許多腎臟疾病的病因都不同，但大多數的腎臟疾病都會有失去實質細胞(parenchymal cells)、腎小球及週圍微血管(peritubular capillaries)減少、免疫細胞的浸潤及纖維化等病理表現[24]。受損的表皮及內皮細胞會進行傷口癒合快速恢復體內平衡，第一步為了阻止血液流失，先天免疫細胞例如駐留巨噬細胞(resident macrophages)、樹突細胞(dendritic cells)、嗜中性球(neutrophils)會被活化引起急性發炎，上皮細胞及免疫細胞分泌的細胞激素會隨後影響後天免疫反應的活化，而受傷的組織也會直接活化後天免疫反應，先天免疫及後天免疫會參與肌纖維母細胞(myofibroblasts)的分化及活化，而肌纖維母細胞在受傷害的器官產生疤痕或促進受傷組織癒合[25, 26]。急性發炎反應在引起纖維化扮演重要的角色，低程度但持續的發炎被認為是造成纖維化和高血壓進展的原因之一。實際上，在許多纖維化病症中，持續的發炎是活化受傷組織癒合進而導致纖維化的主

要因素。



1.2.2 巨噬細胞(Macrophage)

巨噬細胞是會參與慢性發炎及纖維化的免疫細胞，且會調控免疫反應以及清除損傷以維持組織的恆定性[27]。在受傷的組織中，單核球(monocyte)會被吸引進入組織中，並且受到不同的環境因子影響而分化為不同亞型的巨噬細胞。愈來愈多的證據顯示這些巨噬細胞會透過持續分泌修復因子，造成組織的損傷以及微血管的稀疏，並且導致不可逆的疤痕(Scar)產生[25, 28]。巨噬細胞除了吞噬細胞碎片和外來的病原體，也會透過刺激淋巴細胞或其他免疫細胞放大發炎反應[25, 29]；此外巨噬細胞會藉由分泌許多細胞激素刺激周邊的肌纖維母細胞，使得肌纖維母細胞活化而大量增生，並且產生許多的細胞外基質蛋白(extracellular matrix)，因此巨噬細胞被認為是調控組織損傷及修復的重要免疫細胞之一[27-29]。

巨噬細胞的極化現象(macrophage polarization)對於調控組織纖維化相當重要，目前已知單核球受到不同刺激會轉變成不同型態的巨噬細胞，並且依照其分泌的細胞激素或活化的形式可分為，M1(classical activation type)型態的巨噬細胞，以及M2(alternative activation type)型態的巨噬細胞。M1 巨噬細胞主要分泌促發炎因子，如介白素-1(interleukin-1;IL-1)、介白素-6(IL-6)、單核球趨化蛋白-1(MCP-1)、誘導型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase;iNOS)等，促使組織進行發炎反應並造成已損傷的細胞進行凋亡。M2 巨噬細胞則表現出廣泛的多樣性，它們可抑制免疫反應、保護細胞並且促進組織修復再生，而依功能分成兩種亞型為 Mreg 及 M2a；Mreg 巨噬細胞會藉由分泌介白素-10(IL-10)抑制發炎反應及肌纖維母細胞的活化，避免組織損傷並且穩定組織的平衡。另一型態是 M2a，此型為促纖維化的巨噬細胞。藉由分泌 TGF- β 、結締組織生長因子(connective tissue growth factor;CTGF)、血小板衍生生長因子(platelet-derived growth factor;PDGF)、半乳糖凝集素-3(galectin-3)、chemokine C-C motif ligand 17 (CCL17)、chemokine C-C motif ligand




22 (CCL22)等因子，刺激肌纖維母細胞的活化並促使傷口癒合[30]。

體內調控巨噬細胞的轉型機制目前仍未釐清，一般認為可能是組織中的環境因子影響，或者是透過細胞彼此間的相互調控而造成型態轉變[30]。目前已知在細胞實驗外加特定因子可以促進巨噬細胞的轉型，例如：脂多醣 (lipopolysaccharide;LPS, 或稱內毒素)或者干擾素- γ (interferon- γ ;IFN- γ)等因子會促進轉型為 M1 巨噬細胞[30]，而介白素-4(IL-4)和介白素 13(IL-13)則是被認為會促進轉型為 M2 巨噬細胞[31]；另外也有研究證實將腎臟上皮細胞與巨噬細胞共同培養(co-culture)也會促使巨噬細胞的轉型[32]，顯示周邊細胞與巨噬細胞具有相互調控的功能，影響彼此的活化與轉型，但是在活體內的轉型機制尚待證明。

1.2.3 輔助型 T 細胞 17(T helper 17 cells;Th17 cells)

在後天免疫反應中輔助型 T 細胞(T helper cells;Th cells)在保護身體免受病原體侵害扮演很重要的角色，但過度活化 Th cells 也會導致疾病。在這方面，Th2 cells 調節過敏，而 Th1 cells 和 Th17 cells 則是自體免疫疾病發展的中心[33, 34]。為了發揮其功效，未分化的 T 細胞會經由表現不同的轉錄因子以及被不同的細胞激素刺激分化為具有功效的 Th cells；Th1 cells 會表現 T-bet、Stat1、Stat4[35]，Th2 cells 會表現 Gata3 和 Stat6[36, 37]，而 Th17 cells 則是會表現 Stat3 和 ROR γ t[38, 39]。Th cells 也被報導會參與各種腎臟疾病損傷及進展[40-43]。最近的研究廣泛地探索 Th17 cells 及其分泌的發炎性細胞激素介白素-17(IL-17)在紅斑性狼瘡腎炎(lupus nephritis)、腎毒性腎炎(nephrotoxic nephritis)及腎臟纖維化(renal fibrosis)發病所扮演的角色[44-51]。也有研究指出 Th17 cells 可藉由抑制 miR-155 進而減緩實驗性腎小球腎炎(experimental glomerulonephritis)而做為潛在的治療標靶[52]。此外，有另一種 T 細胞稱為調節 T 細胞(regulatory T cells, Treg)，會表現 Foxp3 和 Stat5，具有抑制其他 Th cells 的功能[53]。


在過去這半世紀以來自體免疫疾病的發生率有明顯地增加，環境因素可能在



啟動自體免疫扮演重要的角色。因此，上述的研究喚起科學家對於鹽的攝取量和 Th17 cells 在自體免疫疾病發展所扮演的角色的興趣。除了上述提到 Th17 cells 在腎臟疾病所扮演的角色[44-51]，Th17 cells 在最近確實被認定和許多人類自體免疫疾病相關，全基因組關聯研究(genome-wide association studies)顯示 Th17 cells 相關基因和克隆氏症(Crohn's disease)、類風溼性關節炎(rheumatoid arthritis)及牛皮癬(psoriasis)有關[54-57]。在小鼠研究 IL17 路徑的機制研究中指出介白素-1 β (IL-1 β)及介白素-23(IL23)等促發炎細胞激素是啟動 Th17 反應的重要因子，TGF- β 、IL6、介白素-21(IL21)也參與其中，被活化的 Th17 cells 會分泌 IL17、IL21、介白素-22(IL22)、chemokine C-C motif ligand 20(CCL20)等細胞激素以執行功能，且 Th17 cells 似乎具有多效功能能促進全身及局部的自體免疫反應[38, 39]。IL17 藉由作用在其他免疫細胞和表皮細胞上的 IL-17 receptor (IL-17R)來增強發炎，Th17 反應抑制由 Treg cell 所調控的耐受性使氣喘的表皮細胞通透性增加[58]，且 IL17 會調控金屬蛋白酶(metalloproteinase)直接導致組織損傷[59]。另外，IL17 也會促進 B 淋巴球的增殖、生存及免疫球蛋白的製造[38]。

1.2.4 鹽和巨噬細胞

如同上述所提到的，在大多數的情況下腎臟會將大於 95% 由飲食攝取的鈉離子排泄出去來調節鈉離子攝入量。然而最近的研究顯示皮膚是可堆積鈉離子的地方，但並不會伴隨水的累積，堆積的鈉離子和糖胺聚糖(glycosaminoglycan)結合形成無滲透活性的鈉離子(osmotically inactive Na⁺)[2, 3, 60]。因此，皮膚被認為是過度攝取鹽造成鈉離子堆積時儲存鈉離子的地方[2, 60]。研究顯示 Sprague-Dawley (SD)大鼠皮膚的 osmotically inactive Na⁺含量是 salt-sensitive Dahl 大鼠及 salt-resistant Dahl 大鼠的三倍，而 osmotically inactive Na⁺在 salt-sensitive Dahl 大鼠及 salt-resistant Dahl 大鼠的減少被認為是這些大鼠容易體液堆積和高血壓的潛在機制之一，其他的因素例如腎臟鹽排泄減少也可能是造成 salt-sensitive Dahl 大鼠高



血壓的原因之一[60]。除了基因背景的不同外，切除 SD 大鼠的卵巢也會造成皮膚 osmotically inactive Na^+ 的減少，使其容易體液過剩和高血壓，這個研究可能解釋了為什麼女性相比於同年紀的男性較不易因攝取過多的鹽而有高血壓，以及鹽敏感高血壓(salt-sensitive hypertension)的發生率在更年期的女性和男性是差不多的[2]。


在皮膚儲存 osmotically inactive Na^+ 而沒有同量的水累積在攝取過多鹽的情況下可能具有避免體液過多及高血壓的保護效果。為了要了解其中的機制，先前的研究指出在 SD 大鼠餵食高鹽飲食會導致皮膚的淋巴微血管密度增加，鹽及水的含量也會增加[61, 62]；之後證實大鼠餵食高鹽飲食後進入皮膚間質的巨噬細胞會活化 tonicity-responsive enhancer binding protein/ nuclear factor of activated T-cells 5 (TonEBP/NFAT5) 這個轉錄因子來提高血管內皮生長因子(vascular endothelial growth factor-C; VEGF-C)的基因表現量並分泌 VEGF-C 造成皮膚淋巴微血管密度增加，而利用氯膦酸脂質體(clodronate liposomes)和抑制 VEGF-C 訊息傳遞會增加間質中水的累積，減少內皮一氧化氮合成酶(endothelial nitric oxide synthase)的表現和血壓升高。因此巨噬細胞被認為可以調節間質的鈉離子以及血壓的平衡，在皮膚間質堆積鈉離子時透過 NFAT5/VEGF-C 調節機制維持電解質平衡及正常的血壓，如果調節機制失敗會導致對鹽敏感的血壓反應。但這篇研究並沒有解釋為什麼累積 osmotically inactive Na^+ 同時也伴隨水的累積[61, 62]，這和之前定義的 osmotically inactive Na^+ 是堆積鈉離子但並不伴隨水的累積互相矛盾[2, 3, 60]。儲存在皮膚的鈉離子會和 glycosaminoglycan 結合[3, 63]，因此和 glycosaminoglycan 結合的鹽很少甚至不會對滲透壓造成影響。如果在培養巨噬細胞的培養液裡外加 40 mM 的鹽也不能完全模擬餵食高鹽飼料的大鼠皮膚的環境，因為外加的 40 mM 的鹽是可溶且 osmotically active。

另一篇研究顯示在人及小鼠鈉離子會堆積在被細菌感染的皮膚，且會促進宿主抗菌的防衛機制[64]。在高鹽的情況下會促進 M1 巨噬細胞活化 p38/MAPK 訊息傳遞，且 NFAT5 也參與其中，提高一氧化氮(NO)的製造而加強皮膚抗菌防

禦，因此作者認為高滲透環境可做為感染的屏障。另外，高鹽也會影響 M2 巨噬細胞的轉型，降低 M2 巨噬細胞抑制 T cell 增生的能力，且延緩傷口癒合[65]。上述研究顯示高鹽可能會促進發炎反應，抑制非發炎的免疫細胞活化導致免疫系統整體地失衡。

1.2.5 鹽和 Th17 cells

鹽除了會影響巨噬細胞外，研究也顯示在培養未分化 CD4⁺ T cells 的培養液中外加 10-40 mM 的鹽會誘導其往 Th17 cells 分化[66, 67]。高鹽刺激會藉由增加 serum glucocorticoid kinase 1(SGK1)及 IL-23R 的表現量來誘導未分化 CD4⁺ T cells 往 Th17 cells 分化，在細胞實驗及動物實驗皆得到證實[66]。相比於在正常情況下的 Th17 cells，由高鹽所誘導的 Th17 cells 會表現較高的促發炎細胞因子，例如介白素-2(IL-2)、腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor- α ;TNF- α)及 granulocyte macrophage colony-stimulating factor(GM-CSF)[67]。高鹽飲食和 Th17 cells 的誘導在野生型小鼠(wild-type mice)會惡化實驗性自體免疫性腦脊髓炎(experimental autoimmune encephalitis;EAE)的嚴重程度，但在 SGK1 基因剔除小鼠高鹽誘導 Th17 cells 及自體免疫現象會消失[66]。由鹽引發的高滲透會活化 p38/MAPK 訊息傳遞而誘導 Th17 cells 的分化，NFAT5 和 SGK1 也參與其中[67]。另一篇研究利用大鼠接受單側腎臟摘除手術並給予 deoxycorticosterone acetate(DOCA)及在飲水加入 0.9%的鹽建立 salt-sensitive hypertension 動物模型，發現在 peripheral blood mononuclear cell(PBMC)及脾臟會誘導 Th17 cells 的活化及降低 Treg cells 的數量，在心臟及腎臟也會有同樣情形，給予抑制 IL17 的抗體則會改善由 DOCA-salt 所引起的高血壓及組織纖維化[68]。在給予小鼠缺血再灌流損傷(ischemia-reperfusion injury;IRI)做為急性腎損傷(acute kidney injury;AKI)的動物模型中，在 5 週恢復期後再給予 4 週的高鹽飲食發現會加速由 AKI 往 CKD 的病程，且此過程與 Th17 cells 的活化有關[69]。然而鹽誘導 Th17 cells 的活化和鹽活化巨噬細胞一




樣都有一個問題，哪個地方是巨噬細胞及 Th17 cells 真正會接觸到高於生理情況下的 140 mM 的鹽的環境?刺激巨噬細胞和誘導 Th17 cells 是在培養液中外加 10-40 mM 的鹽[61, 66, 67]，如此濃度的鹽通常不會在腎功能正常且可自由飲水的人的血液及組織發現，然而只有在腎臟才可發現如此或更高濃度的鹽。具有正常飲食的個體腎臟髓質中滲透壓(osmolality)可高達 600-1200 mOsm/kg of H₂O，在高鹽飲食或脫水的情況下可能更高[70-72]。間質中的鈉離子通常佔間質滲透壓的 30% 以上，因此由高鹽所誘導的巨噬細胞反應及 Th17 cells 的分化在腎臟間質中可能是最顯著的。

1.2.6 半乳糖凝集素-3(Galectin-3)和 Th17 cells

Galectin-3 是一種 β -galactoside-binding lectin，經由細胞內與細胞外機制參與多種細胞生化過程[73]。細胞外的 galectin-3 會調節細胞黏附、細胞活化及細胞遷移，而細胞內的 galectin-3 則會調控細胞生存、pre-mRNA 剪接及吞噬作用。過去研究顯示 galectin-3 可能藉由影響 dendritic cells 分泌介白素-12(interleukin 12;IL-12)的能力及影響 M2 巨噬細胞的活化在 Th1/Th2 分化調控中扮演角色[74-76]。最新的研究證明 Galectin-3 通過調節 dendritic cells 分泌 IL23 的能力在 Th17 反應中扮演抑制的角色[73, 77]。在活化 dectin-1 的情況下，相比於 wild-type *Gal3*^{+/+} dendritic cells，*Gal3*^{-/-} dendritic cells 會分泌較多的 IL23，也有較多活化態的 c-Rel。c-Rel 是 nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) 的次單元(subunit)，會促進 IL-23 的表現。在 *Gal3*^{-/-} dendritic cells 中抑制 c-Rel 結合到 IL23 啟動子(promoter)的激酶(kinase) Raf-1 也較少，導致 *Gal3*^{-/-} dendritic cells 分泌較多的 IL-23。

Galectin-3 會表現在腎臟 thick ascending limb of Henle loop 和 collecting duct 的上皮細胞上，巨噬細胞或 dendritic cells 也會表現[78]。在 *Gal3*^{-/-} 小鼠尿液中排泄氣離子量較 *Gal3*^{+/+} 小鼠高，但尿液中碳酸氫鹽(bicarbonate)排泄、腎小球濾過



(glomerular filtration)及尿流率(urinary flow rates)兩者並無差異。在長期低鹽飲食攝取下，*Gal3*^{-/-}小鼠的細胞外液體積較 *Gal3*^{+/+}小鼠低，血漿中醛固酮(aldosterone)濃度在 *Gal3*^{-/-}小鼠較高，可能導致 α -epithelial sodium channel(α -ENaC)蛋白質含量增加。長期高鹽飲食攝取導致 *Gal3*^{+/+}小鼠血壓較 *Gal3*^{-/-}小鼠高，顯示 galectin-3 在腎臟保留鈉離子中有一定角色[78]。除了調節鈉離子的再吸收，galectin-3 也和由單側輸尿管阻塞(unilateral ureteral obstruction; UUO)引起的腎臟纖維化有關[79]。UUO 所引起的腎臟纖維化在 *Gal3*^{-/-}小鼠嚴重程度較低，如果將 *Gal3*^{+/+}巨噬細胞轉移至 *Gal3*^{-/-}小鼠腎臟纖維化嚴重程度恢復，顯示 galectin-3 在巨噬細胞中的促纖維化作用[79]。使用 *Gal3*^{+/+}及 *Gal3*^{-/-}巨噬細胞上清液和腎臟纖維母細胞的 cross-over experiments 證明巨噬細胞分泌的 galectin-3 對於腎臟纖維母細胞活化為促纖維化表型非常重要[79]。此外，血漿中 galectin-3 濃度升高被報導具有快速腎功能下降及發生 CKD 的風險[80]。綜合上述研究，galectin-3 分別在生理上調控鈉離子的再吸收及在病理上促進纖維化。

雖然 galectin-3 會調控鹽的再吸收及高血壓，但目前還不清楚高鹽飲食會不會影響腎臟 galectin-3 的表現，特別是腎小管上皮細胞或間質中的巨噬細胞。因為 galectin-3 的表現會透過抑制 dendritic cells IL-23 的製造以負調控 Th17 cells 反應，而高鹽則會活化 Th17 cells。如果這是真的，我們可以期望相比於 *Gal3*^{+/+}小鼠，高鹽飲食在 *Gal3*^{-/-}小鼠會誘導更多 IL-17 的製造，證明 galectin-3 於高鹽飲食下在腎臟間質中扮演負向的免疫調節劑(negative immunomodulator)。



1.3 實驗目的

雖然之前的研究顯示皮膚可以以 osmotically inactive Na^+ 的形式儲存由飲食中過度攝取的鹽，從而誘導促發炎的 Th17 cells 活化以及加重自體免疫疾病。但我們想知道在高鹽飲食下具有高滲透的腎臟髓質是否才是活化 Th17 cells 的確切位置，如果高鹽飲食下在腎臟的確能活化 Th17 cells，那 galectin-3 在其中是否扮演抑制 IL-23/IL-17 細胞激素製造的角色，避免免疫反應被過度活化。



第二章 材料與方法

2.1 材料

2.1.1 實驗動物

本論文使用的*Galectin-3* knock-out(KO)小鼠，是來自國立台灣大學醫學院免疫學研究所劉扶東與伍安怡老師實驗室，*Galectin-3* KO小鼠是將neomycin selection cassette置換掉*Galectin-3*基因的exon 2至exon 4而製備出*Galectin-3* KO小鼠。而對照組小鼠則是用C57BL/6 Wild type小鼠。小鼠皆飼養於台大醫學院大動物代養中心，環境條件設定為12/12小時光照週期(早上8點開燈，晚上8點熄燈)，室溫維持在 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，濕度 $55\pm 5\%$ ，並給予充足的飲水與飼料。

2.1.2 實驗動物飼料

本論文使用的特殊飼料是TestDiet製作，營養成分如表一所示。控制組飼料為Laboratory Rodent Diet 5001(LabDiet 5001)，為台大醫學院動物中心正常配給的飼料，內含0.4% NaCl；高鹽飼料是以LabDiet 5001為基底，內含8% total NaCl製成。

2.1.3 藥品與試劑

名稱	資訊
100 bp DNA ladder	Cat. ADM100.500, Arrowtec Limited, Berkshire, RG46XJ, UK
Agarose	Cat. A9539, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Bovine serum albumin (BSA)	Cat. ALB001, BioShop Canada Inc., Burlington, Ontario, Canada
Chloroform: Isoamylalcohol 24:1	Cat. C0549, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA

Deoxyribonuclease I from bovine pancreas	Cat. D-5025, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Cat. D-5758, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Dullbecco's modified eagle medium, a nutrient mixture F-12 powder (DMEM/F12)	Cat. 12400-024, Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Ethelenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Cat. E-5134, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Ethanol absolute	Cat. 32221, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Fetal bovine serum (FBS)	Cat. 26140-079, Gibco, Life Technology, Green Island, NY, USA
Formalin solution, neutral buffered, 10%	Cat. HT501128, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Heparin LEO 5000 i.u./ml	LEO, Pharma A/S, Ballerup, Denmark
iQ™ SYBR® green supermix	Cat. 170-8882AP, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
iScript™ cDNA synthesis kit	Cat. 170-8891, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Isoflurane	Panion & BF Biotech Inc., Taoyuan, Taiwan
Isopropanol	Cat. A10335-0500, Bionovas Biotechnology Co. Ltd., Toronto, Ontario, Canada
Ketalar® injection 50 mg/mL	Pfizer Inc., New York, NY, USA
Leukocyte Activation Cocktail,	Cat. 550583, BD (Becton, Dickinson and

with BD GolgiPlug™	Company), USA
Liberase TM research grade	Cat. 05-401-119-001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
L-Lysine monohydrochloride (Lysine: HCl)	Cat. L-5626, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Normal goat serum (NGS)	Cat. 005-000-121, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
Normal mouse serum	Cat. 015-000-120, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA
Paraformaldehyde (PFA)	Cat. 441244, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Percoll	Cat. 17-0891-01, GE Healthcare Life Sciences
Phosphate buffer solution (PBS) pH7.4 (10X)	Cat. 70011-044, Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Potassium chloride (KCl), crystal	Cat. 3040-01, J.T. Baker®, Avantor Performance Materials Inc., Phillipsburg, NJ, USA
Potassium phosphate (KH ₂ PO ₄)	Cat. CK-CP1580153, One-Star Biotechnology Co. Ltd., Taipei, Taiwan
Proteinase K	Cat. V3021, Promega Corporation, Madison, WI, USA
RNeasy® mini kit	Cat. 74106, Qiagen GmbH, Hilden, Germany
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Cat. 75746, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Sodium azide (NaN ₃)	Cat. S-8032, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA



Sodium chloride (NaCl), crystal	Cat. 3624-05, J.T. Baker [®] , Avantor Performance Materials Inc., Center Valley, PA
Sodium (meta) periodate	Cat. S1878, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Sodium phosphate dibasic (Na ₂ HPO ₄)	Cat. S3264, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Sodium phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄)	Cat. S3139, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Sucrose	Cat. AS1560-1000, Bionovas Biotechnology Co. Ltd., Toronto, Ontario, Canada
SyBR [®] safe DNA gel stain	Cat. S33102, Invitrogen [™] , Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., USA
Taq DNA polymerase 2x master mix RED	Cat. A180306, Ampliqon A/S, Odense M, Denmark
Tissue-Tek [®] O.C.T Compound	Cat. 4583, Sakura Finetek USA., Inc., Torrance, CA, USA
Transcription Factor Buffer Set	Cat. 562574, BD (Becton, Dickinson and Company), USA
Tris (base)	Cat. 4109-02, J. T. Baker, Avantor Performance Materials, Inc., Center Valley, PA, USA
Tris hydrochloride (Tris-HCl)	Cat. 4103-02, J. T. Baker, Avantor Performance Materials, Inc., Center Valley, PA, USA
TRIzol [®] reagent	Cat. 15596018, Ambion, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., USA
VECTASHIELD [®]	Cat. H-1000, Vector Laboratories, Inc.,

	Burlingame, CA, USA
Xylazine hydrochloride	Cat. X1251, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA



2.1.4 溶液

Tail Lysis Buffer 200mL


Chemicals and reagent	Quantity	Final concentration
10 % SDS	4 mL	0.2 %
1 M Tris pH 8.5	20 mL	0.1 M
0.5 M EDTA pH 8.0	2 mL	5 mM
NaCl	2.36 g	200 mM

Phosphate buffer (PB) 0.1M 200mL

Chemicals and reagent	Quantity	Final concentration
0.2 M NaH ₂ PO ₄	19 mL	19 mM
0.2 M Na ₂ HPO ₄	81 mL	81 mM
ddH ₂ O	Add to 200 mL	

Periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) solution 200mL

Chemicals and reagent	Quantity	Final concentration
0.1 M PB	75 mL	37.5 mM
8 % PFA	50 mL	2 %
L-Lysine monohydrochloride	2.192 g	60 mM



Sodium (meta) periodate	0.428 g	10 mM
Sucrose	10 g	145.8 mM
ddH ₂ O	75 mL	

Phosphate buffered saline (PBS) (10x) 1L

Chemicals and reagent	Quantity	Final concentration
NaCl	80 g	1.37 M
Na ₂ HPO ₄	14.2 g	0.1 M
KCl	2 g	26.8 mM
KH ₂ PO ₄	2.4 g	17.6 mM
HCl	Adjust to pH 7.4	
ddH ₂ O	Add to 1 L	

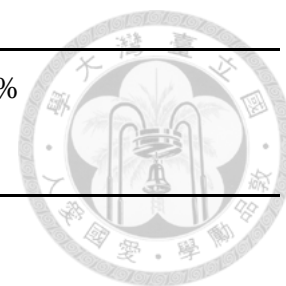
TE Buffer 50mL

Chemicals and reagent	Quantity	Final concentration
0.5 M EDTA pH 8	0.1 mL	1 mM
1 M Tris-HCl pH 7.5	0.5 mL	10 mM
ddH ₂ O	Add to 50 mL	

FACS Buffer 500 mL pH 7.4

Chemicals and reagent	Quantity	Final concentration
10X PBS	50 ml	1X
FBS	25 ml	5 %

NaN ₃	0.5 g	0.1 %
ddH ₂ O	Add to 500 mL	



2.1.5 抗體

Name	Clone	Information
Purified Rat Anti-Mouse CD16/CD32(Mouse BD Fc Blocker)	2.4G2	Cat. 553142, BD (Becton, Dickinson and Company), USA
FITC anti-mouse CD45 Antibody	30-F11	Cat. 103107, BioLegend, San Diego, CA
Brilliant Violet 510 TM anti-mouse CD4 Antibody	GK1.5	Cat. 100449, BioLegend, San Diego, CA
FITC Rat Anti-Mouse CD4	GK1.5	Cat. 557307, BD (Becton, Dickinson and Company), USA
PE Rat Anti-Mouse CD8a	53-6.7	Cat. 561095, BD (Becton, Dickinson and Company), USA
APC anti-mouse CD11b Antibody	M1/70	Cat. 101212, BioLegend, San Diego, CA
APC anti-mouse $\gamma\delta$ TCR Antibody	GL3	Cat. 118115, BioLegend, San Diego, CA
Alexa Fluor® 488 anti-mouse CD11c Antibody	N418	Cat. 117313, BioLegend, San Diego, CA
APC anti-mouse CD19 Antibody	6D5	Cat. 115511, BioLegend,

		San Diego, CA
Brilliant Violet 421™ anti-mouse	PK136	Cat. 108741, BioLegend,
NK-1.1 Antibody		San Diego, CA
PE Rat Anti-Mouse IFN γ	XMG1.2	Cat. 554412, BD (Becton,
		Dickinson and Company),
		USA
PE Rat Anti-Mouse IL17A	TC11-	Cat. 506903, BD (Becton,
	18H10.1	Dickinson and Company),
		USA





2.2 方法

2.2.1 小鼠基因型鑑定

2.2.1.1 DNA 萃取

小鼠出生後 10~14 天，採集小鼠腳趾檢體，每個檢體加入 600 μ l tail lysis buffer 及 5 μ l 蛋白酶 K (10 mg/ml) 置於 55°C 乾浴槽作用至少 4 小時，待檢體完全溶解後，以 13200rpm 常溫離心 10 分鐘。取上清液到新的微量離心管並加入等量的異丙醇，手動混勻，常溫靜置 1 小時讓 DNA 沉澱，再以 13200rpm 常溫離心 15 分鐘。去除上清液，再加入 200 μ l 70% 酒精，以 13200rpm 常溫離心 5 分鐘。去除上清液，利用真空濃縮裝置將酒精抽乾，加入 100 μ l TE buffer 並置於 55°C 乾浴槽 1 小時使 DNA 溶解，即完成 DNA 萃取。

2.2.1.2 聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction ; PCR)

聚合酶連鎖反應是在總體積為 20 μ l 的混合物中進行，含有 5 μ l DNA 萃取液、10 μ l Taq DNA Polymerase 2x Master Mix Red (Ampliqon A/S, Denmark)、3.8 μ l 2dH₂O、0.4 μ l Forward primer (10 μ M)、0.4 μ l Reverse Primer1 (10 μ M)、0.4 μ l Reverse Primer2 (10 μ M)。使用的引子序列清單列於表二。使用 T100 thermal cyclers (Bio-Rad Laboratories, USA) 執行 PCR，反應條件的設定是 94°C 30 秒，65°C 30 秒，72°C 30 秒，反覆進行 35 次循環，最後 72°C 作用 1 分鐘後即終止反應。PCR 產物經 2% 洋菜膠進行電泳後，使用 Gel Doc EZ imager (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) 觀察並照相。依此結果判斷小鼠基因型。

2.2.2 骨髓巨噬細胞培養

將小鼠過度麻醉犧牲後在其皮膚噴上 70% 酒精消毒，去除下腹部至雙腳的皮膚，取出股骨並用紗布將黏附於骨上的肌肉去除，用骨剪將股骨的兩端剪出開口，利用 3ml 的針筒吸取培養液(80% DMEM/F12, 10% FBS+20% L929 medium)將



股骨中的細胞沖出，再將細胞以 1200rpm 離心後種於細菌培養盤，放置於 37°C 培養箱中培養，48 小時後去除一半的培養液再加入一半新鮮的培養液，再經過 96 小時培養後骨髓巨噬細胞便可使用。

2.2.3 檢體採集

2.2.3.1 血漿的採集與檢測

以空針於犧牲小鼠時由下腔靜脈抽取全血，再以 4°C，3000 rcf 離心 15 分鐘，抽取上清液到新的微量離心管，即完成血漿的採集。檢體送至台大醫學院實驗動物中心做生化檢測，利用自動生化分析儀(Cobas c111, Roche, Switzerland)檢測血液尿素氮(blood urea nitrogen；BUN)、肌酸酐(creatinine)及鈉離子(Na⁺)、鉀離子(K⁺)、氯離子(Cl⁻)的數值。

2.2.3.2 腎臟組織的採集

將小鼠以愛爾能(Aerrane, Baxter, Puerto Rico)氣體麻醉後，剪開腹腔，從下腔靜脈抽取血液，再用刀片劃破下腔靜脈，接著把胸腔剪開，以 20 ml 冷的 PBS 做心臟灌流，待血液灌流乾淨後，將腎臟取下並除去腎囊(renal capsule)，其中一顆腎臟對半縱切切成兩個二分之一顆的腎臟，另一顆切成四個四分之一顆的腎臟。一個二分之一顆的腎臟泡入過碘酸鹽-賴氨酸-多聚甲醛固定液(Periodate-Lysine-Paraformaldehyde, PLP)，放冰上固定 2 小時後，再換成 18% 蔗糖溶液於 4°C 環境下進行脫水，隔天再將組織用冷凍包埋劑(OCT compound,)包埋，放入 -80°C 冰箱保存，日後可進行冷凍切片；另一個二分之一顆的腎臟泡入 10% 福馬林中(Sigma-Aldrich, MO, USA)，於 4°C 固定隔夜，再換成 70% 酒精進行脫水，送到台大醫學院實驗動物中心做石蠟包埋，日後可進行石蠟切片。四個四分之一顆的腎臟放入冷凍小管後馬上丟入液態氮做急速冷凍，之後放到 -80°C 冰箱保存，以利後續核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)和蛋白質相關檢測。



2.2.3.3 尿液的採集與檢測


將小鼠放入代謝籠中以尿瓶收集 24 小時或 6 小時的尿液，並測量小鼠的尿量，委託南昌醫事檢驗所進行生化檢測，檢測尿液尿素氮(blood urea nitrogen；BUN)、肌酸酐(creatinine)及鈉離子(Na^+)、鉀離子(k^+)、氯離子(Cl^-)的數值。

2.2.3.4 腎臟 CD45^+ 、 CD4^+ 、 CD11b^+ 細胞的分離

小鼠犧牲後，取下腎臟並除去腎囊，然後將腎臟放到含有 200 μl DMEM/F12 的微量離心管裡，使用組織研磨棒將組織壓碎。每顆腎臟加入 800 μl DMEM/F12 + 20 units DNase + 75 μg Liberase TM 於 37°C 作用 30 分鐘。然後以 4°C，800 rcf 離心 5 分鐘。除去上清液後用 1 ml 45% Percoll 將細胞打散，再移到 15 ml 離心管裡並加入 6 ml 45% Percoll 混勻細胞液，之後用滴管吸取 45% Percoll 細胞液，沿著管壁緩緩加入到有 3 ml 80% Percoll 的 15 ml 離心管裡。以 4°C，1400 rcf，no brake 離心 20 分鐘。可以在刻度 3ml 左右看到一層白霧狀的介面，此層為白血球細胞(Leucocytes)，將其吸出放到新的 15 ml 離心管，並加入 8 ml DPBS，然後以 4°C，800 rcf 離心 5 分鐘。除去上清液，之後加入 90 μl 的 autoMACS Running Buffer(130-091-221, Miltenyi Biotec, Germany)將細胞打散，再加入 10 μl 的 CD45^+ (130-052-301, Miltenyi Biotec, Germany)、 CD4^+ (130-049-201, Miltenyi Biotec, Germany)或 CD11b^+ MicroBeads(130-049-601, Miltenyi Biotec, Germany)於 4°C 作用 15 分鐘。接著加入 1 ml running buffer，以 300 rcf 離心 10 分鐘。去除上清液，加入 500 μl 將細胞打散。利用 autoMACS® Pro Separator(Miltenyi Biotec, Germany)把 CD45^+ 、 CD4^+ 或 CD11b^+ cell 分離出來。

2.2.3.5 淋巴結(lymph node)的採集

將小鼠利用 ketamine/xylazine 混合型麻醉劑(100/10 mg/kgBW，腹腔注射)進行麻醉，在雙腳腳底皮下打入 25 μl 5% Evans Blue dye，5% Evans Blue dye 會經由



淋巴管擴散至全身，等待 30 分鐘後犧牲小鼠，剪開腹腔於腎臟背面取出 renal lymph node，剪開小鼠後腳膝蓋後方取出 popliteal lymph node[81]。將取出的 lymph node 放在玻片上磨破，再用 1X PBS 將細胞沖下，以 4°C，800 rcf 離心 5 分鐘將細胞離心下來，再用 1X PBS 清洗兩次，以 1 ml DMEM/F12, 10% FBS 懸浮細胞，加入 2 µl Leukocyte Activation Cocktail, with BD GolgiPlug™ 於 37°C 培養箱刺激 4 小時，即可進行流式細胞技術實驗。

2.2.4 血壓測量

血壓測量以非侵入式血壓偵測儀(Cat No. BP-2000-M-2, Visitech Systems, Inc. Apex, NC, USA)進行小鼠尾壓測量。可獲得收縮壓(SDP)、舒張壓(DBP)、平均動脈壓(MAP)、心跳速率(HR)等參數。使用儀器前須先確定管線是否有漏氣，確定儀器正常後再以水銀血壓計做壓力校正。測量設定條件為初測量 5 次，使小鼠適應後再進行 10 次的正式測量，加熱器溫度維持 37°C 以穩定小鼠體溫，平均動脈壓未達 6 次以上之數據將不予統計，完成設定後將小鼠放置量測平台，以固定器將小鼠固定於平台上，尾巴根部套上加壓環後以膠帶固定，即可進行測量。

2.2.5 RNA 萃取

磨碎的腎臟組織或細胞會加入適當體積的 TRIzol® Reagent (Ambion, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)於室溫作用 5 分鐘，然後以 4°C，16000 rcf 離心 10 分鐘。取上清液至新的微量離心管，再加入氯仿異戊醇混合液 (chloroform : isoamyl alcohol 24:1, Sigma-Aldrich, USA)，利用震盪器將溶液混合均勻呈粉紅色後靜置 5 分鐘，再以 4°C，16000 rcf 離心 10 分鐘。取上清液至新的微量離心管，然後加入異丙醇並靜置 30 分鐘使 RNA 沉澱，然後以 4°C，16000 rcf 離心 10 分鐘。倒掉上清液並以 70% 酒精清洗，室溫晾乾後，加入適當體積的 RNase-free water 回溶 RNA，然後保存在 -80°C 冰箱。



2.2.6 反轉錄(reverse transcription)及即時聚合酶連鎖反應(real-time polymerase chain reaction ; real-time PCR)

RNA 以 NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)進行定量。取 500~1000 ng 之 RNA 進行反轉錄，使用 T100 thermal cycler 及 iScript™ cDNA synthesis kit(Bio-Rad Laboratories, USA)製造出 20 μ l 之互補 DNA(Complementary DNA, cDNA)。

即時聚合酶連鎖反應可將cDNA放大並定量。加入cDNA和0.1 μ M之正反引子(primer)與1X iQ™ SYBR®Green Supermix，總體積20 μ l進行PCR放大特定基因之序列。使用的引子序列清單列於表三。每樣檢體皆進行二重複試驗。使用CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, USA)執行Real-time PCR的放大作用和螢光偵測。個別數據和併盤作業以Bio-rad CFX Manager™ Manager 3.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) 計算分析所有檢體皆以其甘油醛-3-磷酸脫氫酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, *Gapdh*)表現量進行標準化(normalize)。

2.2.7 流式細胞技術(Flow cytometry)

將細胞懸浮於 100 μ l FACS Buffer 中再加入 1 μ l Mouse BD Fc Blocker 於 4°C 培養 5 分鐘，加入 100 μ l FACS Buffer 含表面抗原螢光抗體，混合均勻後於 4°C 避光培養 30 分鐘，加入 1 ml FACS Buffer 以 4°C，400rcf 離心 6 分鐘，去除上清液，以 750 μ l 1X Fix/Perm Buffer 懸浮細胞，利用震盪器震盪 3 秒後於 4°C 避光培養 45 分鐘，加入 750 μ l 1X Perm/Wash Buffer 混合均勻後，以 4°C，400rcf 離心 6 分鐘，去除上清液，再加入 1.5 ml 1X Perm/Wash Buffer 混合均勻後，以 4°C，400rcf 離心 6 分鐘，去除上清液，加入 100 μ l 1X Perm/Wash Buffer 懸浮細胞，再加入 100 μ l 1X Perm/Wash Buffer 含細胞內蛋白螢光抗體，利用震盪器震盪 10 秒後於 4°C 避光培養 45 分鐘，加入 1 ml 1X Perm/Wash Buffer 混合均勻後，以 4°C，400rcf 離心

6 分鐘，去除上清液，再加入 1.5 ml 1X Perm/Wash Buffer 混合均勻後，以 4°C，400rcf 離心 6 分鐘，去除上清液，以 500 µl FACS Buffer 懸浮細胞，利用 BD[®] LSRFortessa™ 流式細胞分析儀分析實驗結果。



2.2.8 統計分析

統計分析皆以 GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) 軟體進行。各數值皆以平均值±SEM 表示，數值間的比較以 Student's t 檢定進行分析。 $P < 0.05$ 則達顯著差異。



第三章 實驗結果

3.1 餵食高鹽飼料對生理數值的影響

為了要觀察餵食高鹽飼料會對腎臟產生什麼影響，首先我們先檢測餵食高鹽飼料對生理數值的影響。我們將 8~12 週大之 C57BL/6(簡稱 B6)小鼠及 *Galectin-3* KO(*Gal3*^{-/-})小鼠分為控制組(ND)及高鹽組(HSD)，由於性別差異對餵食高鹽飼料的反應可能有所不同，因此公、母小鼠皆餵食高鹽飼料來觀察血液和尿液中離子的濃度及血壓變化。控制組小鼠餵食一般正常飼料，而高鹽組小鼠則餵食含有 8% total NaCl 之飼料，兩組都可自由飲水，餵食時間達一個月。於餵食高鹽飼料一個月犧牲前一天量尾壓、留 6 小時尿液，犧牲時採血分析，並留下腎臟組織做後續分析。

拿犧牲後的血漿送驗，測量血漿中的鈉離子、鉀離子及氯離子濃度會不會受到餵食高鹽飼料的影響，由結果可知 B6 小鼠和 *Gal3*^{-/-}小鼠的鈉離子(圖一 A)在血中的濃度平穩，各組間皆無顯著差異。因鉀離子的數值易受到溶血影響，故鉀離子(圖一 B)的濃度較為起伏，但各組間一樣無顯著差異。氯離子(圖一 C)則是在 *Gal3*^{-/-}小鼠高鹽組較控制組低，達顯著差異。

再看尿液中各電解質排出的狀況，鈉離子濃度(圖二 A)在高鹽組明顯提高，各組皆達顯著差異。尿液中的氯離子濃度(圖二 C)與鈉離子情況相似，尿液排出的氯離子在高鹽組有明顯的上升。鉀離子濃度(圖二 B)在各組間皆無顯著差異。因尿液中的離子濃度會受到尿量的影響，而小鼠每天排出的肌酸酐(Creatinine)量都差不多，因此我們用 Creatinine 簡單校正尿液中的離子濃度。校正後的結果(圖二 D-F)和原始濃度結果一致，鈉離子及氯離子在高鹽組的比值皆高於控制組，鉀離子則無顯著差異。

另外，我們量測餵食高鹽飼料一個月後小鼠的血壓變化，從小鼠尾壓的結果來看(圖三 A-D)，B6 小鼠和 *Gal3*^{-/-}小鼠在餵食高鹽飼料一個月後血壓並沒有上




升，且 *Gal3*^{-/-} 小鼠在餵食高鹽飼料後血壓反而下降，達顯著差異。

3.2 餵食高鹽飼料後腎臟 Th17 cells 相關基因表現之情形

過去的研究指出在培養未分化 CD4⁺ T cells 的培養液中外加 10-40 mM 的鈉鹽會誘導其往 Th17 cells 分化[67]。而動物實驗利用大鼠接受單側腎臟摘除手術並給予 deoxycorticosterone acetate(DOCA)及在飲水中加入 0.9%的鹽，發現在 PBMC 及脾臟會誘導 Th17 cells 的活化及降低 Treg cells 的數量，在心臟及腎臟也會有同樣情形[68]。於是我們想知道如果單純給予小鼠高鹽飼料而能自由地飲水，在不給予疾病模式的情況下，這樣是否也能在腎臟觀察到 Th17 cells 的活化，因為這是最符合人體生理活動的狀態。

由前面的結果可知小鼠及母鼠在餵食高鹽飼料後血壓並不會升高，血液中的離子濃度也無差異，尿液中的離子濃度變化也一致，公母鼠之間並無明顯差異，於是我們先使用 B6 Wild type 小鼠進行實驗。將 8~12 週大之 B6 小鼠分為控制組及高鹽組，控制組小鼠餵食一般正常飼料，而高鹽組小鼠則餵食含有 8% total NaCl 之飼料，兩組都可自由飲水，餵食時間則為兩週，犧牲後取下腎臟萃取 mRNA，然後檢測與 Th17 cells 相關的基因表現之情形(所有基因都以 *Gapdh* 表現量做標準化)。首先可以看到餵食高鹽飼料兩週後，與餵食一般飼料相比，與 Th17 cells 活化相關基因只有 *Il1b* 表現量上升，並達到顯著差異，其它基因並無差異(圖四 A)。而參與 Th17 cells 活化訊息傳遞的 *Nfat5*、*Sgk1* 表現量兩組並無差異(圖四 B)。至於我們感興趣的 *Gal3* 在餵食高鹽飼料兩週後基因表現量上升，並達顯著差異(圖四 C)。

就基因表現量來看 Th17 cells 在餵食高鹽飼料兩週後並無明顯的活化情形，考慮到或許是因為有太多非免疫細胞的細胞存在，因而稀釋掉了其相關基因的表現，所以我們再利用 CD45 的磁珠，從腎臟組織分離出所有白血球，再抽取其 mRNA 進行分析，一樣檢測與 Th17 cells 相關的基因表現之情形。結果顯示餵食



高鹽飼料兩週後從腎臟分離出的 CD45⁺ cell 的 *Tgfb1*、*Tgfb3*、*Il1b*、*Il23r* 等與 Th17 cells 活化相關基因表現量皆上升，且達顯著差異(圖五 A)。而參與 Th17 cells 活化訊息傳遞的 *Nfat5*、*Sgk1* 表現量雖然高鹽組有上升的趨勢，但兩組間並無顯著差異(圖五 B)。另外，我們也檢測和 Th17 cells 分泌的細胞激素相關基因，其中 *Il17* 在餵食高鹽飼料兩週後基因表現量明顯上升，且達顯著差異，*Ccl20* 表現量在兩組間並無差異(圖五 C)。而 *Gal3* 在餵食高鹽飼料兩週後基因表現量明顯上升，並達顯著差異(圖五 D)。除了檢測與 Th17 cells 相關的基因外，我們也看和 Th1 cells 分泌的細胞激素相關的基因 *Ifny*，結果顯示 *Ifny* 在餵食高鹽飼料兩週後基因表現量上升，且達顯著差異(圖五 E)。綜上所述，就基因表現量來看 Th17 cells 在餵食高鹽飼料兩週後有活化之情形，誘導 Th17 cells 分化的相關基因表現量上升，Th17 cells 分泌的細胞激素基因表現量也上升，雖然和 Th1 cells 有關的 *Ifny* 基因表現量也上升，但 *Il17* 表現量增加的倍率明顯較 *Ifny* 高，推測由鹽誘導的 Th cells 分化還是往 Th17 cells 分化佔主導地位。

上述的結果顯示就基因表現量來看 Th17 cells 在餵食高鹽飼料兩週後有活化之情形，於是我們想知道餵食高鹽飼料多久會開始誘導 Th17 cells 活化，以及會持續多久。我們使用 B6 Wild type 小鼠餵食高鹽飼料一週及一個月，犧牲後取出腎臟組織分離出 CD45⁺ cell 萃取其 mRNA 進行分析，檢測與 Th17 cells 相關的基因表現之情形。餵食高鹽飼料一週與 Th17 cells 相關的基因只有 *Il23* 表現量增加且達統計上的差異，其它基因均無顯著變化(圖六)。而餵食高鹽飼料一個月 CD45⁺ cell 的 *Il23*、*Roryt* 基因表現量上升且達顯著差異，*Il23r* 表現量雖然增加但無顯著差異。*Il17* 和 *Ccl20* 這兩個 Th17 cells 分泌的細胞激素基因表現量也增加且達顯著差異(圖七)。綜合以上結果，餵食高鹽飼料一週 *Il23* 表現量增加，啟動 Th17 cells 的活化，到了第二週 *Tgfb1*、*Tgfb3*、*Il1b*、*Il23r* 等與 Th17 cells 活化相關基因表現量皆上升，促使 Th17 cells 活化，*Il17* 表現量也明顯上升，到了一個月促使 Th17 cells 活化的基因持續高表現，使 *Il17*、*Ccl20* 表現量相比於控制組



高，推測高鹽誘導的 Th17 cells 活化從餵食高鹽飼料一週就開始，且至少持續到一個月。

上述的結果是利用 CD45 的磁珠，將所有白血球給分離出來，然而我們想知道與 Th17 cells 相關的基因到底表現在哪種免疫細胞上，我們使用 B6 Wild type 公鼠餵食高鹽飼料兩週及一個月，利用 CD11b、CD4 的磁珠分別從腎臟分離出巨噬細胞及 Th cells，萃取其 mRNA 進行分析，檢測與 Th17 cells 相關的基因表現之情形。在餵食高鹽飼料兩週的結果顯示從腎臟分離出的巨噬細胞與 Th17 cells 相關基因表現在高鹽組與控制組這兩組間皆無顯著差異，*Gal3* 的表現量在兩組間也無顯著差異(圖八)。而 Th cells 的結果也與巨噬細胞相似，與 Th17 cells 相關基因表現量在兩組間並無顯著差異(圖九)。在餵食高鹽飼料一個月的結果也和兩週相似，無論是巨噬細胞或 Th cells，在與 Th17 cells 相關基因表現量在高鹽組與控制組這兩組間皆無顯著差異(圖十、圖十一)。這和我們所預期的結果非常不一樣，本來預期 *Tgfb1*、*Tgfb3*、*IL6*、*IL23*、*IL1b* 可能表現在巨噬細胞上，餵食高鹽飼料後表現量上升影響 Th cells 促使 Th cells 往 Th17 cells 分化，而 *IL21*、*Roryt*、*IL23r*、*IL17* 則表現在 Th17 cells，使 Th cells 往 Th17 cells 分化並分泌 *IL17*。為了研究為什麼結果會和我們預期的不同，我們將餵食高鹽飼料兩週的小鼠腎臟分離出的 CD45⁺ cell 利用流式細胞技術分析其免疫細胞的組成，並比較高鹽組和控制組的 CD45⁺ cell 的免疫細胞組成是否有不同(圖十二)。從結果來看我們從腎臟分離出的 CD45⁺ cell 純度很高，有 80% 的細胞表現 CD45，而其中大部分的細胞是巨噬細胞(CD11b⁺)，約佔 65%，其次是 B 淋巴球(CD19⁺)，佔 10~20%，第三是細胞毒性 T 細胞(CD8⁺)，約佔 10~15%，Th cells(CD4⁺)則佔 5~10%， $\gamma\delta$ T cells($\gamma\delta$ TCR⁺)約 3~6%，樹突細胞(CD11c⁺)則佔 5~10%，而高鹽組和控制組的細胞組成並無顯著差異。綜合上述的結果，餵食高鹽飼料後從腎臟分離出的 CD45⁺ cell 會有 Th17 cells 活化的情形，但分離出巨噬細胞或 Th cells 卻無 Th17 cells 活化的現象，是因為分離出的巨噬細胞或 Th cells 數量太少以至於無法



看出基因的變化，還是與 Th17 cells 相關的基因表現增加並不是發生在巨噬細胞和 Th cells，而是在其它的免疫細胞上，這個問題還需更多的實驗來釐清。


3.3 餵食高鹽飼料後淋巴結 Th cells 變化之情形

根據前面的實驗結果得知在餵食高鹽飼料後腎臟可能會有 Th17 cells 活化的情形，於是我們想知道位於腎臟附近的腎臟淋巴結(renal lymph node)會不會也受到餵食高鹽飼料的影響而改變免疫細胞的狀態。我們將 8~12 週大之 B6 公鼠分為控制組及高鹽組，控制組小鼠餵食一般正常飼料，而高鹽組小鼠則餵食含有 8% total NaCl 之飼料，兩組都可自由飲水，餵食時間則為一週和兩週。於犧牲時取出 renal lymph node，我們也取出位於小鼠後腳膝蓋後方的 popliteal lymph node，因為 popliteal lymph node 較大，利於實驗進行，並且 popliteal lymph node 和腎臟離的較遠，可知道餵食高鹽飼料的影響是局部性的還是全身性的。我們利用流式細胞技術分析 renal lymph node 及 popliteal lymph node 在餵食高鹽飼料一週後 Th cells 的組成變化，結果顯示在 renal lymph node 及 popliteal lymph node 都是 Th2 cells 佔多數，而無論是在 renal lymph node 還是 popliteal lymph node，Th17 cells 在餵食高鹽飼料後比例並沒有增加(圖十三、圖十四)。

另外，我們也利用 CD4 的磁珠從 renal lymph node 和 popliteal lymph node 分離出 CD4⁺Th cells，萃取其 mRNA 進行分析，檢測與 Th17 cells 相關的基因表現之情形。結果顯示雖然和 Th17 cells 相關的基因表現量在 renal lymph node 的 Th cells 有上升的趨勢，但都沒有顯著差異(圖十五)。而餵食高鹽飼料兩週的結果也與餵食一週的結果相似，renal lymph node 及 popliteal lymph node 的 Th cells 在餵食高鹽飼料後分泌 IL17 的比例並沒有增加(圖十六)。

從上述結果來看，餵食高鹽飼料似乎不會促使 renal lymph node 及 popliteal lymph node 的 Th cells 往 Th17 cells 分化。

3.4 高鹽對巨噬細胞 Th17 cells 相關基因表現的影響



前面的結果都是利用小鼠進行實驗，我們想知道在細胞實驗是否也能得到相似的結果互相驗證。我們利用 B6 小鼠股骨的骨髓培養巨噬細胞，由於培養的巨噬細胞較偏向 M2 巨噬細胞，我們在培養液給予 100ng/ml LPS 刺激三小時讓巨噬細胞偏向 M1 且較為活化，對刺激比較有反應。之後在培養液外加 0-80mM 的鈉鹽培養 24 小時，萃取其 mRNA 檢測與活化 Th17 cells 相關的基因表現。結果顯示 *Tgfb1* 的表現量隨著外加的鈉鹽濃度越高表現越低，*Tgfb3*、*Il23* 在外加 20mM 的鈉鹽表現量降低，但其他濃度則無顯著差異，*Il1b*、*Il6* 隨著外加的鈉鹽濃度越高表現量越高(圖十七 A)。*Nfat5* 的表現量在不同濃度沒有差異(圖十七 B)，*Gal3* 則是隨著外加的鈉鹽濃度越高表現量越低(圖十七 C)。由於外加太高濃度的鈉鹽可能會使巨噬細胞死亡，我們測量培養液的 LDH 濃度來評估外加的鈉鹽濃度會不會使細胞死亡，結果顯示外加 60mM 以上的鈉鹽 LDH 的濃度與 0mM 相比達顯著差異(圖十七 D)，因此我們接下來的實驗都外加 40mM 的鈉鹽。為了證明上述的結果是真的由鈉鹽所引起而不是由於滲透壓提高所致，我們外加和 40 mM 的鈉鹽造成的滲透壓相同的 mannitol 當作滲透壓的控制組，結果顯示巨噬細胞基因表現量改變確實是外加的鈉鹽的效果而不是滲透壓改變所造成(圖十八)。

除了使用 B6 小鼠的骨髓培養巨噬細胞外，我們也使用 *Gal3*^{-/-} 小鼠的骨髓培養巨噬細胞來比較和 B6 Wild type 小鼠的差別。結果顯示 *Tgfb1* 在 B6 巨噬細胞外加 40 mM 的鈉鹽表現量下降，而 *Gal3*^{-/-} 巨噬細胞則無差異；*Tgfb3* 在 *Gal3*^{-/-} 巨噬細胞外加 40 mM 的鈉鹽表現量上升，*Il1b* 則是在 B6 及 *Gal3*^{-/-} 巨噬細胞外加 40 mM 的鈉鹽表現量上升(圖十九 A)。*Nfat5* 的表現量在 *Gal3*^{-/-} 巨噬細胞外加 40 mM 的鈉鹽表現量上升(圖十九 B)，*Gal3* 則是在 B6 巨噬細胞外加 40 mM 的鈉鹽表現量有降低的趨勢(圖十九 C)。

上述的結果代表巨噬細胞在高鈉鹽的環境下 *Gal3* 下降，某些與 Th17 cells 相關的基因表現量會上升，而缺少 *Gal3* 似乎會加強活化某些 Th17 cells 相關的基因(*Tgfb3*、*Nfat5*)的表現量。



第四章 討論

4.1 餵食高鹽飼料對生理數值的影響

根據實驗的血液生化檢測結果來看，餵食高鹽飼料一個月後血漿中的鈉離子、鉀離子及氯離子濃度並不會上升，這符合我們的預期，因為無論外在環境如何變化，身體會讓血漿內的離子濃度維持恆定，但比較意外的是氯離子濃度在 $Gal3^{-/-}$ 小鼠高鹽組較控制組低，達顯著差異。因先前的研究指出 $Gal3^{-/-}$ 小鼠較 Wild type 小鼠會排泄出較多的氯離子[78]，推測有可能是此原因讓血漿內氯離子濃度下降，但根據我們的實驗結果卻顯示 $Gal3^{-/-}$ 小鼠相比於 Wild type 小鼠並不會排泄較多的氯離子，和先前的研究結果不同，因此也無法確定 $Gal3^{-/-}$ 小鼠在餵食高鹽飼料後血漿中的氯離子濃度降低的原因。

在血壓方面，我們餵食高鹽飼料一個月後 B6 小鼠和 $Gal3^{-/-}$ 小鼠血壓並沒有上升，且 $Gal3^{-/-}$ 小鼠在餵食高鹽飼料後血壓反而下降，達顯著差異。先前的研究顯示餵食大鼠 8% 高鹽飼料及 1% 鹽水兩個禮拜會造成大鼠產生高血壓[61]，但在我們的實驗餵食高鹽飼料長達一個月並沒有高血壓的產生，有可能因為使用的動物不同導致不同的結果，我們也有嘗試餵食 B6 和 $Gal3^{-/-}$ 小鼠 8% 高鹽飼料及 1% 鹽水，但小鼠很快就會死亡。另一篇研究餵食 $Gal3^{-/-}$ 小鼠 3% 高鹽飼料五個月，發現相比於 Wild type 小鼠， $Gal3^{-/-}$ 小鼠血壓較低，此篇作者推測與 $Gal3^{-/-}$ 小鼠具有輕度的慢性氯化鈉尿流失(mild chronic NaCl urinary losses)有關，但並沒有提到餵食高鹽飼料是否會有高血壓的產生[78]。此篇研究提供了為什麼 $Gal3^{-/-}$ 小鼠在餵食高鹽飼料後血壓反而下降的可能原因。

為更進一步釐清 galectin-3 對於鈉與氯離子在腎小管上皮細胞的再吸收是否有影響，未來可以利用 $Hoxb7-Cre^{Tg}$ x $Gal3^{flox/flox}$ mice 以剔除 Gal3 在集尿管上皮細胞，再來研究是否發生慢性氯化鈉尿流失。如果研究結果類似，可以進一步研究 galectin-3 與集尿管上皮再吸收鈉離子的 epithelial sodium channel (ENaC) 有何交

集作用。

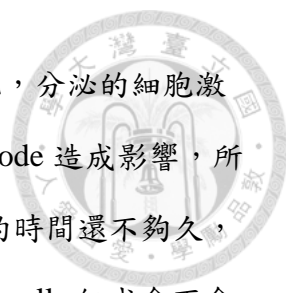


4.2 餵食高鹽飼料後腎臟 Th17 cells 相關基因表現之情形

根據實驗結果顯示餵食高鹽飼料後從腎臟分離出的 CD45⁺ cell 會有 Th17 cells 活化的情形，但分離出 CD11b⁺巨噬細胞或 CD4⁺ Th cells 卻無 Th17 cells 活化的現象，這和我們預期的結果非常不一樣，原本預期 Tgfb1、Tgfb3、IL6、IL23、IL1b 可能表現在巨噬細胞上，餵食高鹽飼料後表現量上升影響 Th cells 促使 Th cells 往 Th17 cells 分化，而 IL21、Roryt、IL23r、IL17 則表現在 Th17 cells，使 Th cells 往 Th17 cells 分化並分泌 IL17。利用流式細胞技術分析從腎臟分離出的 CD45⁺ cell 細胞組成發現佔大多數是 CD11b⁺巨噬細胞，CD4⁺ Th cells 則佔小部分，是因為分離出的巨噬細胞或 Th cells 數量太少以至於無法看出基因的變化，還是與 Th17 cells 相關的基因表現增加並不是發生在巨噬細胞和 Th cells，而是在其它的免疫細胞上，這個問題目前還無法證實。我們曾利用流式細胞技術將腎臟分離出的 CD45⁺ cell 染 IL17，想知道 IL17 表現在哪種免疫細胞上，但由於從腎臟分離出的 CD45⁺ cell 細胞數目已經很少，再經由染表面抗原再打洞固定染細胞內的 IL17 等步驟造成細胞數目減少，增加分析的困難度，導致無法看出 IL17 表現在何種免疫細胞上。未來我們會利用 in situ hybridization 來看 IL23、IL17 等我們感興趣的基因表現在何種細胞上，且檢測餵食高鹽飼料後表現量是否會上升，看是否能和 real-time PCR 的結果互相驗證。

4.3 餵食高鹽飼料後淋巴結 Th cells 變化之情形


從實驗的結果可以得知，餵食高鹽飼料似乎不會促使 renal lymph node 及 popliteal lymph node 的 Th cells 往 Th17 cells 分化。但由於實驗次數並不多所以要再重複實驗才能確定。就目前的實驗結果來看，餵食高鹽飼料一週及兩週 renal



lymph node 及 popliteal lymph node 的 Th cells 組成沒有顯著變化，分泌的細胞激素也沒有明顯變化。由於不知道餵食高鹽飼料何時會對 lymph node 造成影響，所以才先測試一週及兩週這兩個時間點，可能因為餵食高鹽飼料的時間還不夠久，之後可以再測試更久的時間點，例如四週，看 lymph node 的 Th cells 組成會不會有變化。也有可能餵食高鹽飼料所誘導的 Th17 cells 活化情形可能是局部性的，只在腎臟發生，並不會影響到 lymph node。另外，利用 CD4 的磁珠從 lymph node 分離出 CD4⁺ Th cells，結果顯示雖然和 Th17 cells 相關的基因表現量在 renal lymph node 的 Th cells 有上升的趨勢，但都沒有顯著差異。這需要進一步確認 CD4 磁珠獲取的細胞是否具有足夠的專一性。另外我們之後可以利用 CD45 的磁珠從 lymph node 分離出的 CD45⁺ cell，說不定會有不一樣的結果，此部分還需要更多的實驗來證實。我們也希望從之前其他實驗室高鹽實驗的報告中，看看有哪個地方的細胞可以作為 positive control，驗證我們的實驗設計是否與其他實驗室的設計都可以獲得相同的結果。

4.4 高鹽對巨噬細胞 Th17 cells 相關基因表現的影響

根據實驗結果顯示培養的巨噬細胞在高鈉鹽的環境下 Gal3 下降，IL6、IL1b 等與 Th17 cells 相關的基因表現量會上升，而缺少 Gal3 似乎會加強活化 Th17 cells 相關的基因表現量上升的情形，這和動物實驗結果有互相驗證也有不一樣的地方。Gal3、Tgfb1、Tgfb3 在小鼠餵食高鹽飼料後表現量是增加的，但培養的巨噬細胞在高鈉鹽的環境下 Gal3、Tgfb1、Tgfb3 表現量下降；而 IL6、IL1b 在動物實驗和細胞實驗結果是相似的，在高鹽的刺激下表現量都是增加的。會有這樣的差別可能是因為給予高鹽刺激的條件不一樣，在細胞實驗中，是在培養液外加 40 mM 的鈉鹽培養 24 小時，而動物實驗則是餵食高鹽飼料，在動物實驗中腎臟的鈉濃度是慢慢增加的，不像細胞實驗是突然間增加 40 mM，造成的效果可能不一樣，雖然我們也想要在細胞實驗中慢慢增加鈉鹽的濃度，但由於不知道腎臟中鈉濃



度增加的速度，所以並無法進行實驗。也有可能是在身體中，各種細胞在高鹽飲食後綜合的結果是造成 Gal3 在整個腎臟與巨噬細胞中增加表現。如果 galectin-3 對於 Th17 cells 的活化具有負調節的作用，也許這意味著 galectin-3 在對抗免疫反應增強的刺激是很重要的。未來我們可以利用在巨噬細胞專一性剔除 galectin-3，以觀察高鹽飲食後，腎臟中 Th17 cells 活化的變化。另外因為細胞實驗的環境較單純，不像動物體內可能有較複雜的機制來應對高鹽的刺激。我們想利用細胞實驗來看是否能和動物實驗互相驗證，但細胞實驗不可能百分之百模擬體內的環境，造成結果可能會和動物實驗有些不一樣，但總體而言，在細胞實驗中給予高鈉鹽刺激還是能和動物實驗互相驗證和比較。

4.5 未來可進行的相關實驗

根據上述的討論，其實還有很多的實驗需要進行。首先最重要的還是找到 IL17 表現的細胞，並比較高鹽組和控制組表現量是否不同。另外，NFAT5 在現有的結果中高鹽組和控制組沒有明顯差異，可以利用免疫螢光染色或西方墨點法來確定兩組間是否有差異。我們也想知道腎臟在餵食高鹽飼料後鈉濃度的改變，以及 IL23、IL17 等細胞激素在餵食高鹽飼料後，經由腎臟 Th17 cells 活化後在血液中的濃度是否會上升。

雖然利用 CD11b 與 CD4 磁珠抓取的細胞，未能重複驗證我們利用 CD45 磁珠進行的實驗，我們首先可以利用 in situ hybridization 來找到表現 IL23, IL17 等的細胞，也可以利用基因工程標記細胞的方法，讓 CSF1R⁺巨噬細胞與 CD4⁺ Th cells 標記上螢光，以方便利用流式細胞技術抓取細胞或在組織中辨識細胞。

雖然我們發現餵食高鹽飼料後腎臟的 galectin-3 表現量會上升，但我們並未再多加研究 galectin-3 在這其中扮演的角色，未來可利用 tissue-specific *Galectin-3* knockout mice 在例如巨噬細胞，CD4⁺ Th cells，集尿管細胞等細胞剔除 galectin-3 來研究其在由高鹽所誘導的 Th17 cells 活化扮演什麼樣的角色。



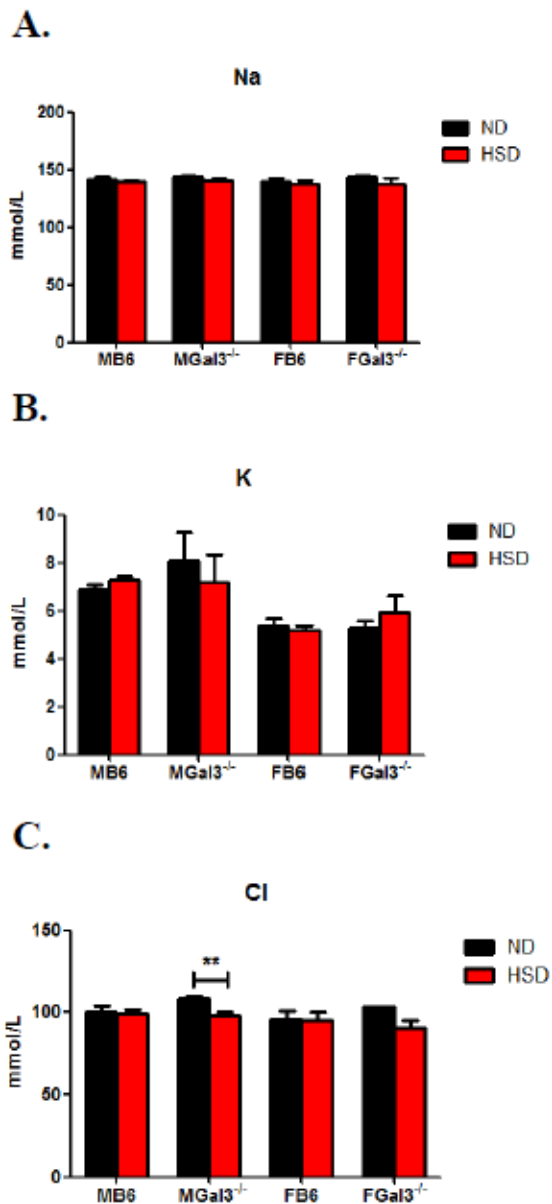
第五章 結論與未來展望

在本篇研究中，利用 C57BL/6 Wild type 小鼠及 *Galectin-3* knock-out 小鼠來研究高鹽對腎臟免疫的影響。其結果得知餵食高鹽飼料血漿中鈉、鉀、氯離子濃度並不會變化，也不會產生高血壓，但尿液中排泄的鈉、氯離子增加;從腎臟分離出的 CD45⁺ cell 有 Th17 cells 活化的情形，但分離出的 CD11b⁺巨噬細胞及 CD4⁺ Th cells 並沒有 Th17 cells 活化的情形;培養的巨噬細胞在高鹽環境下也有部分促進 Th17 cells 活化的情形，但這之間的關係及作用機制仍需更多的實驗來完成。

在過去這半世紀以來自體免疫疾病的發生率有明顯地增加，高鹽飲食被認為是高血壓、慢性發炎以及自體免疫疾病發展的重要因子，而現代人鹽攝取量也逐年增加，代表暴露在誘導自體免疫疾病發展的環境風險因子機率也提高，因此，研究高鹽與免疫疾病關係是具有潛力的研究方向，也可為自體免疫疾病提供一個新的治療目標。

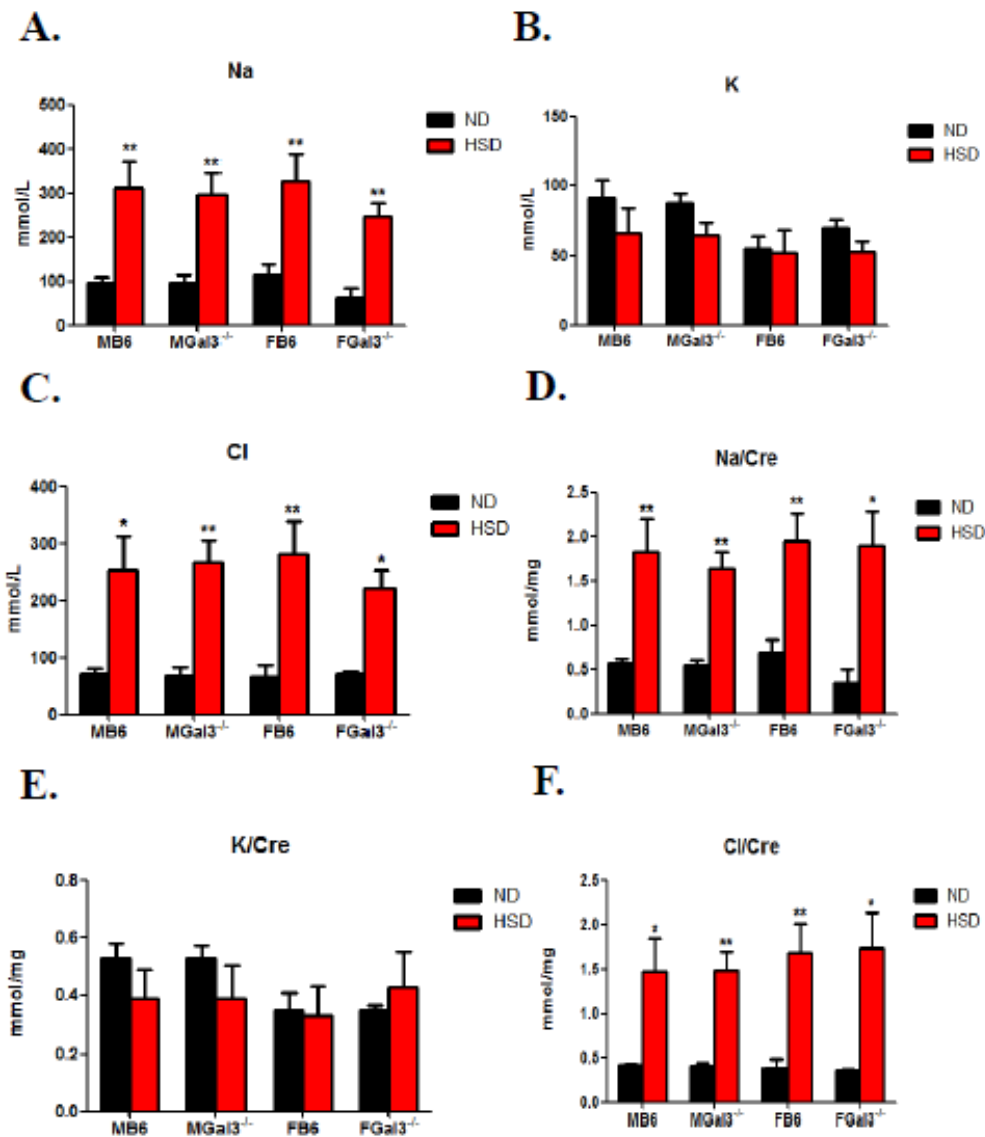
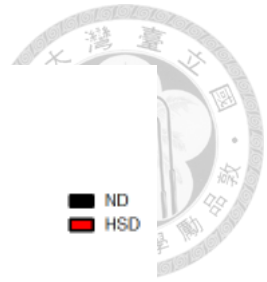


圖表



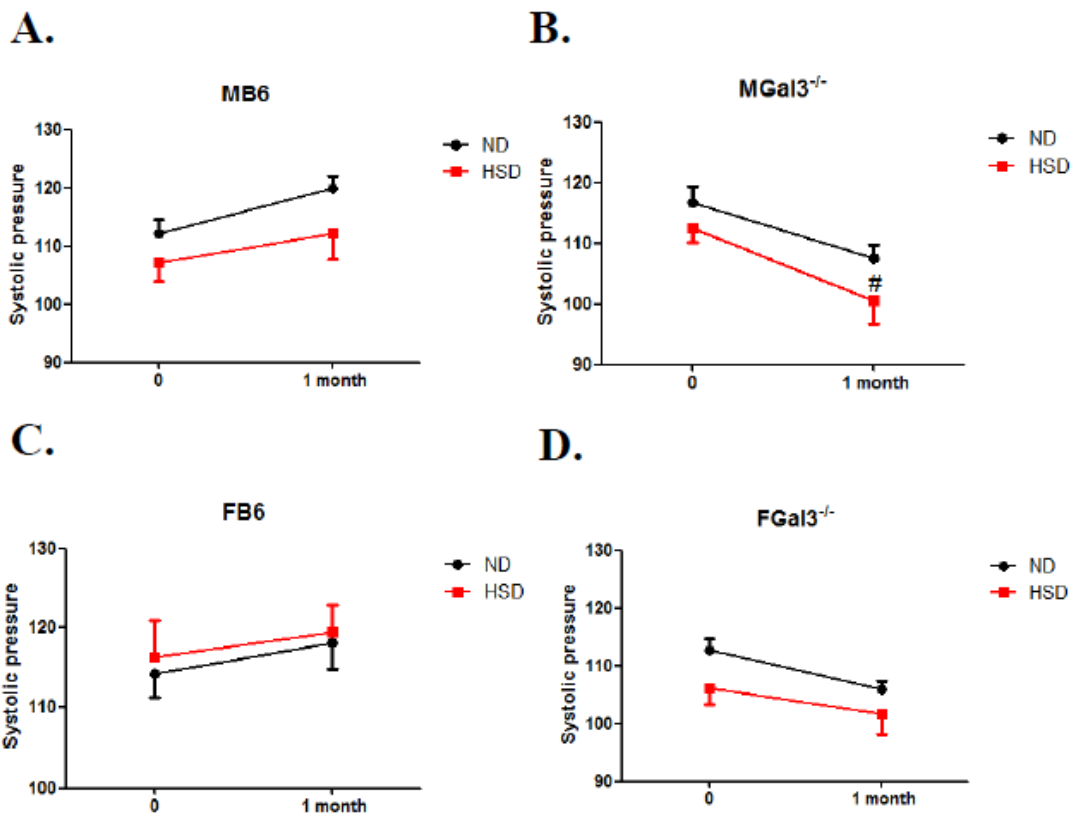
圖一、小鼠餵食高鹽飼料一個月後血液電解質變化

小鼠血漿中的(A)鈉、(B)鉀離子濃度在餵食高鹽飼料一個月後控制組及高鹽組皆無差異。(C)血漿中氯離子濃度在 *Gal3*^{-/-} 小鼠高鹽組別較控制組低，達顯著差異。(統計以 Student's t 檢定進行分析，** P < 0.01。長條圖為平均值±SEM。Male B6(MB6): n=6，Male *Gal3*^{-/-}(MGal3^{-/-}): n=4，Female B6(FB6): n=4，Female *Gal3*^{-/-}(FGal3^{-/-}): n=4)。



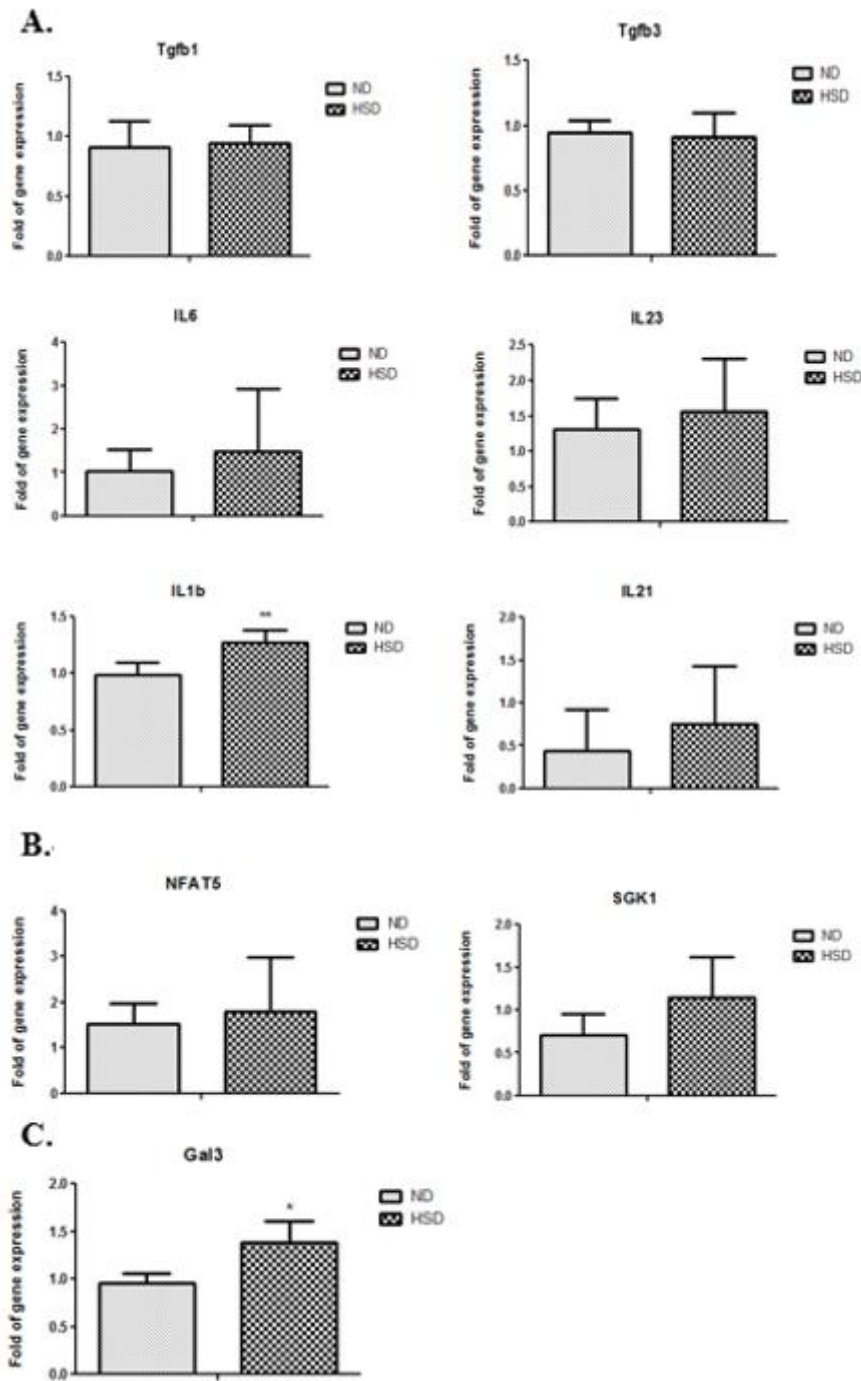
圖二、小鼠餵食高鹽飼料一個月後尿液電解質變化

(A-C)分別為尿液中鈉、鉀、氯離子的濃度，鈉及氯離子在各組中高鹽組較控制組濃度高，皆達顯著差異，鉀離子則皆無差異。(D-F)分別為尿液中鈉、鉀、氯離子的濃度以 Creatinine 校正，鈉及氯離子在各組中高鹽組較控制組比值高，皆達顯著差異，鉀離子則皆無差異。(統計以 Student's t 檢定進行分析，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，ND vs. HSD。長條圖為平均值 \pm SEM。MB6: $n=6$ ，MGal3^{-/-}: $n=6$ ，FB6: $n=6$ ，FGal3^{-/-}: $n=4$)。



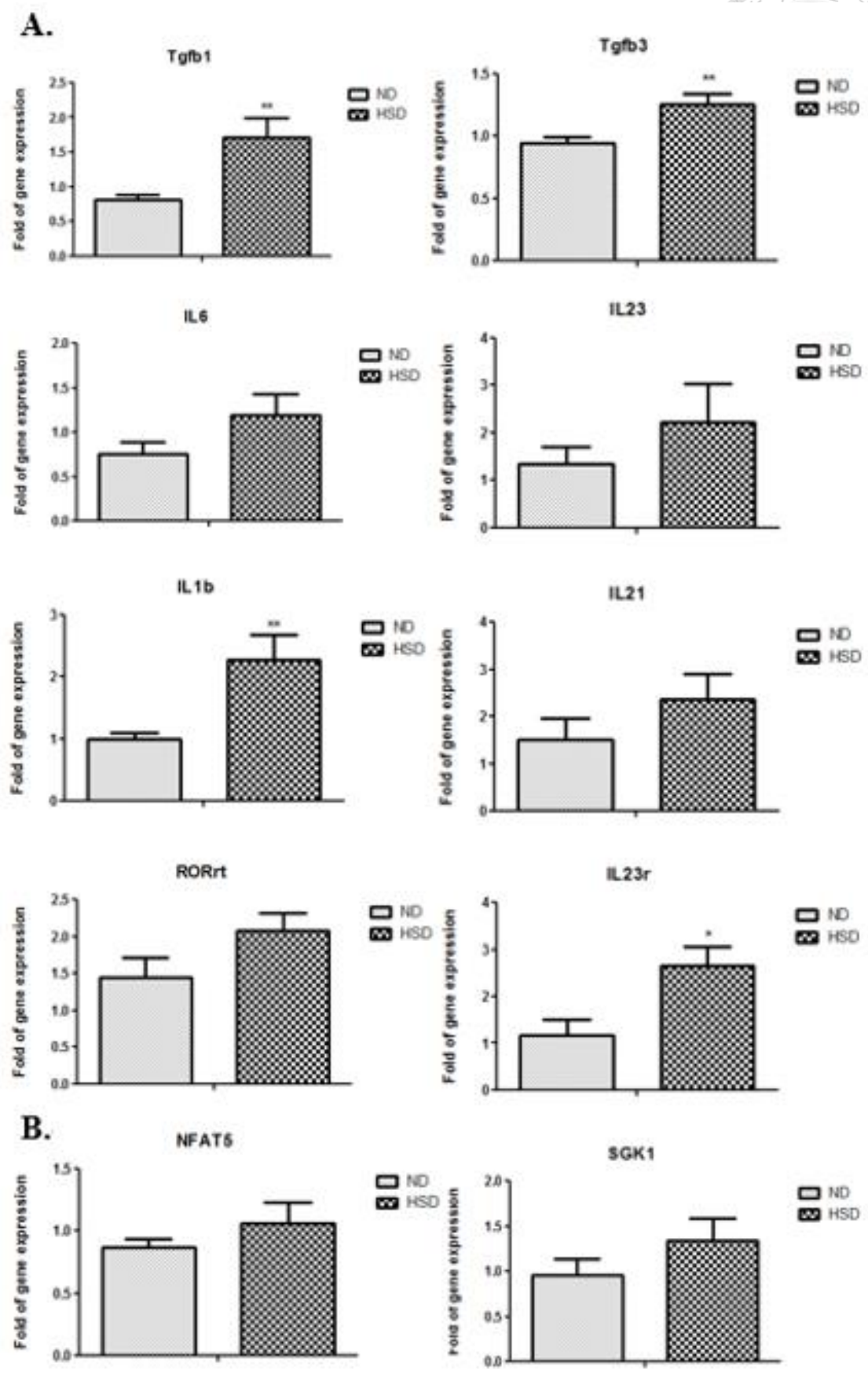
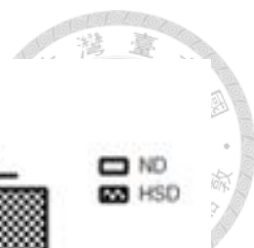
圖三、小鼠餵食高鹽飼料一個月後血壓變化

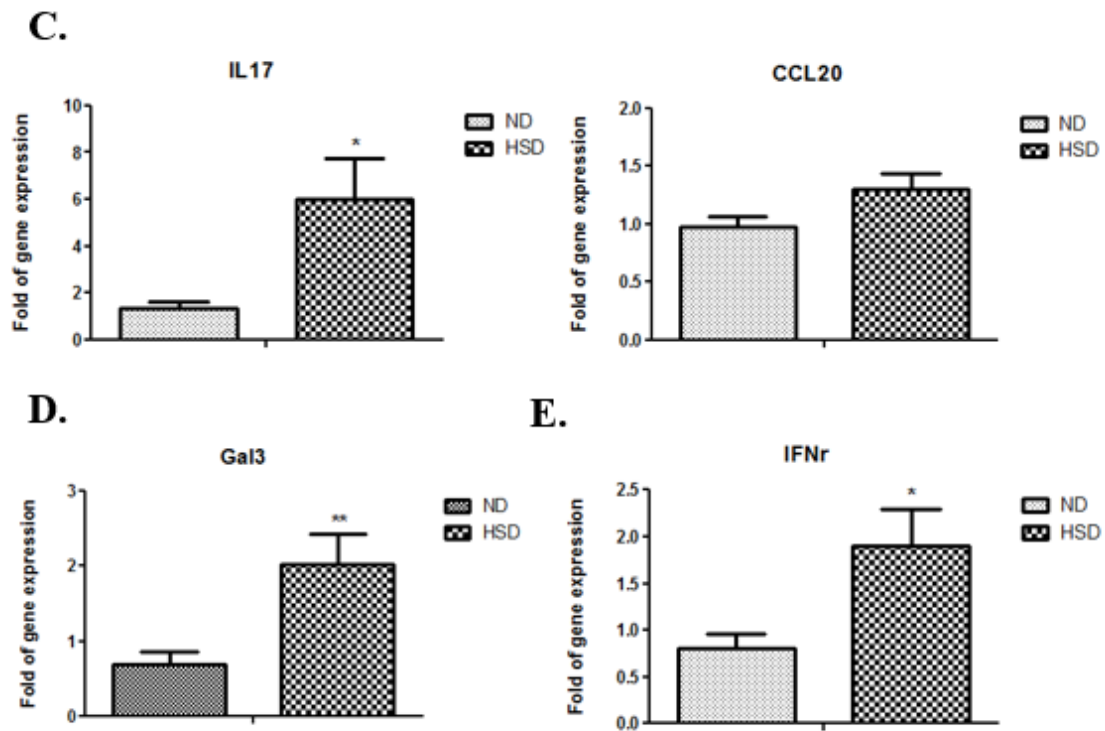
(A)MB6、(B)*MGal3^{-/-}*、(C)FB6 及(D)*FGal3^{-/-}*收縮壓在餵食高鹽飼料一個月後的變化。除了 *MGal3^{-/-}*組別在餵食高鹽飼料後收縮壓較餵食前低，其他組別均無顯著差異。(統計以 Student's t 檢定進行分析，# $P < 0.05$ ，0 vs. 1 month。折線圖為平均值 \pm SEM。MB6: n=12，*MGal3^{-/-}*: n=10，FB6: n=12，*FGal3^{-/-}*: n=9)。



圖四、餵食高鹽飼料兩週腎臟組織與 Th17 cells 相關基因之表現

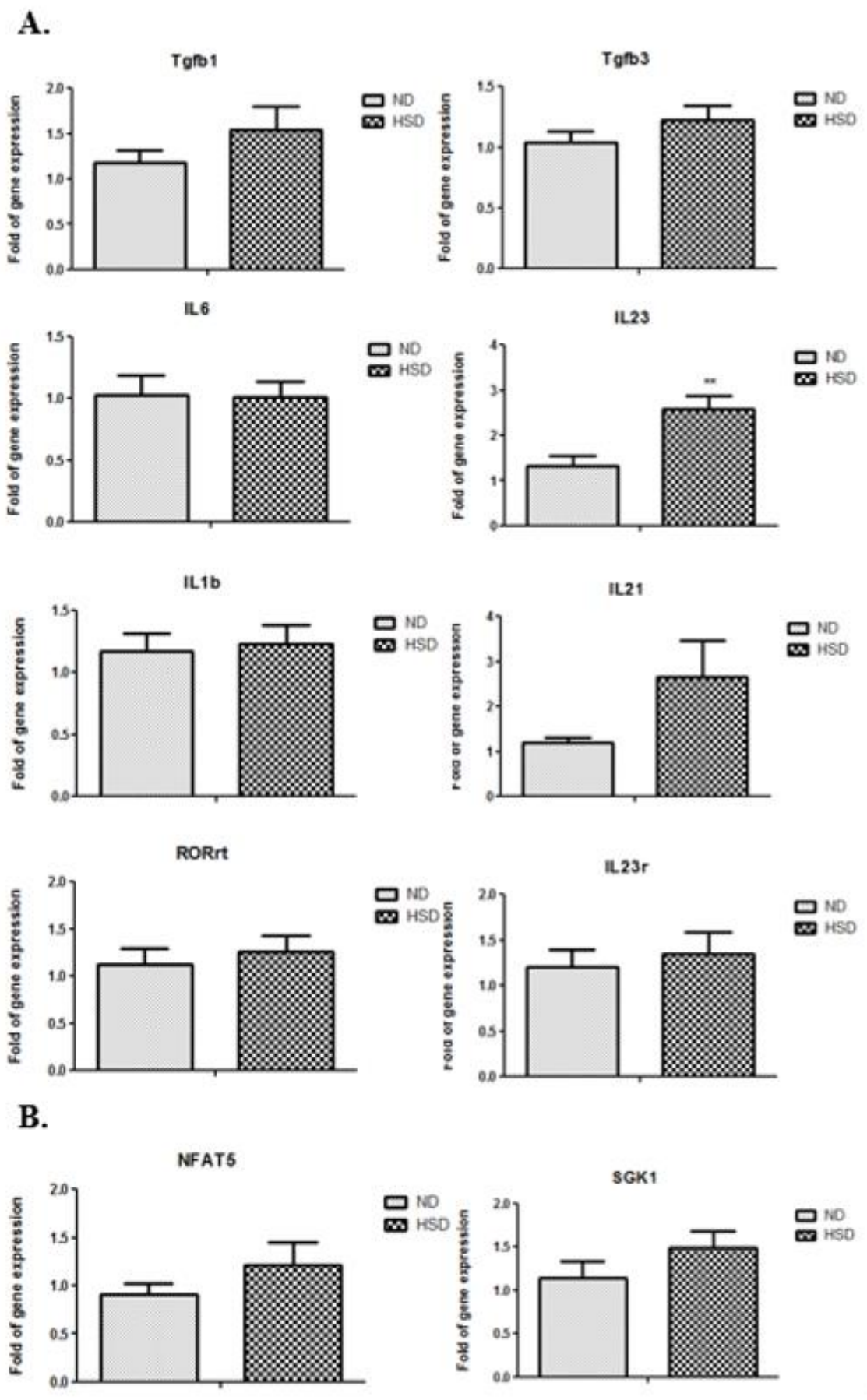
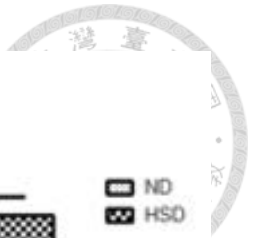
(A)誘導 Th17 cells 活化相關基因的表現量。(B)參與 Th17 cells 活化訊息傳遞的基因表現量。(C)Gal3 的基因表現量。(所有基因都以 *Gapdh* 表現量做標準化。統計以 Student's t 檢定進行分析，* P < 0.05，** P < 0.01，ND vs. HSD。長條圖為平均值±SEM。ND: n=4，HSD: n=4。)

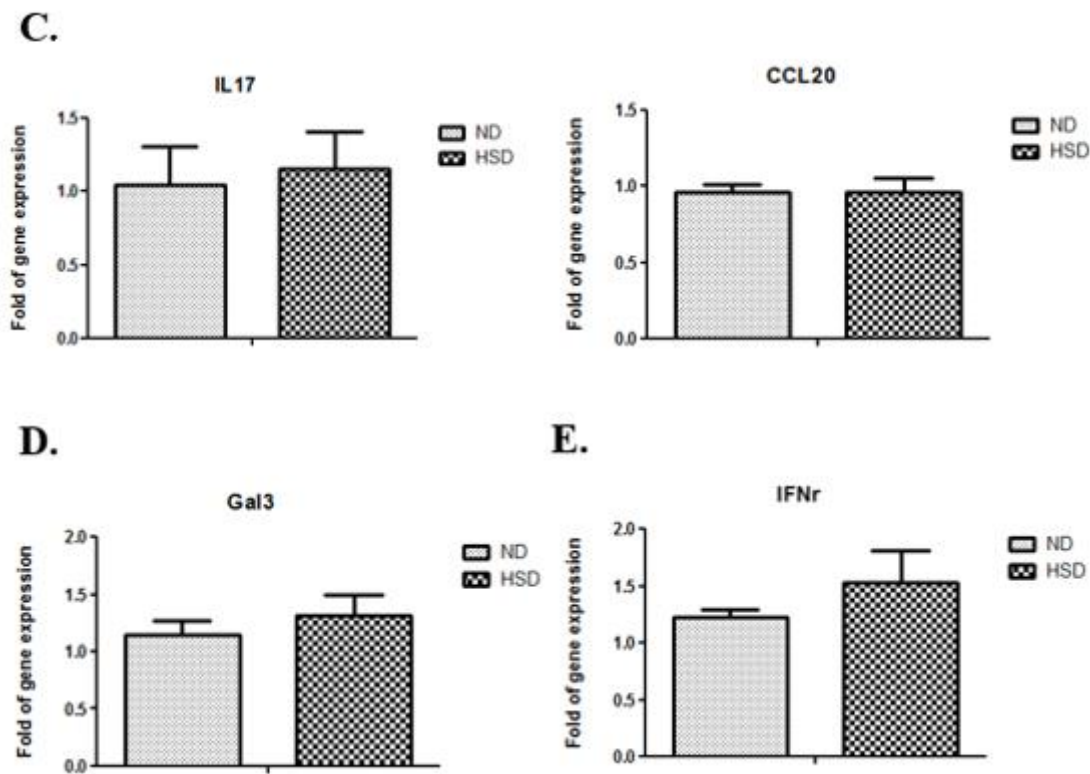




圖五、餵食高鹽飼料兩週分離的 CD45⁺ cell 基因之表現

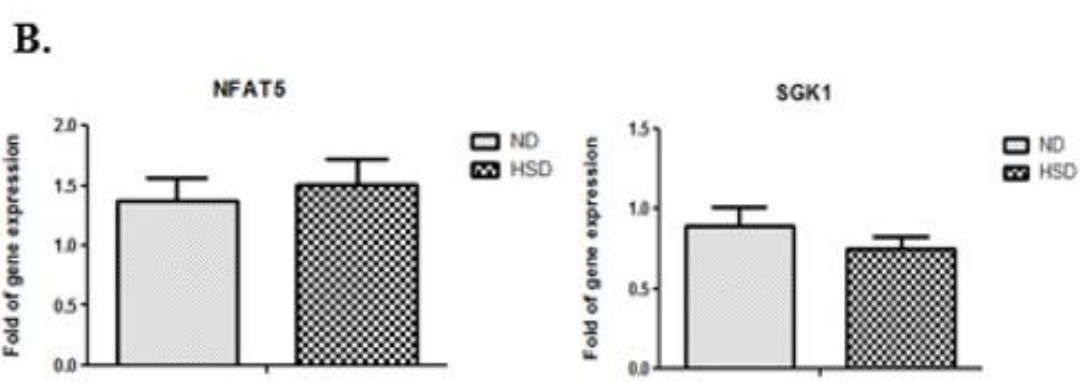
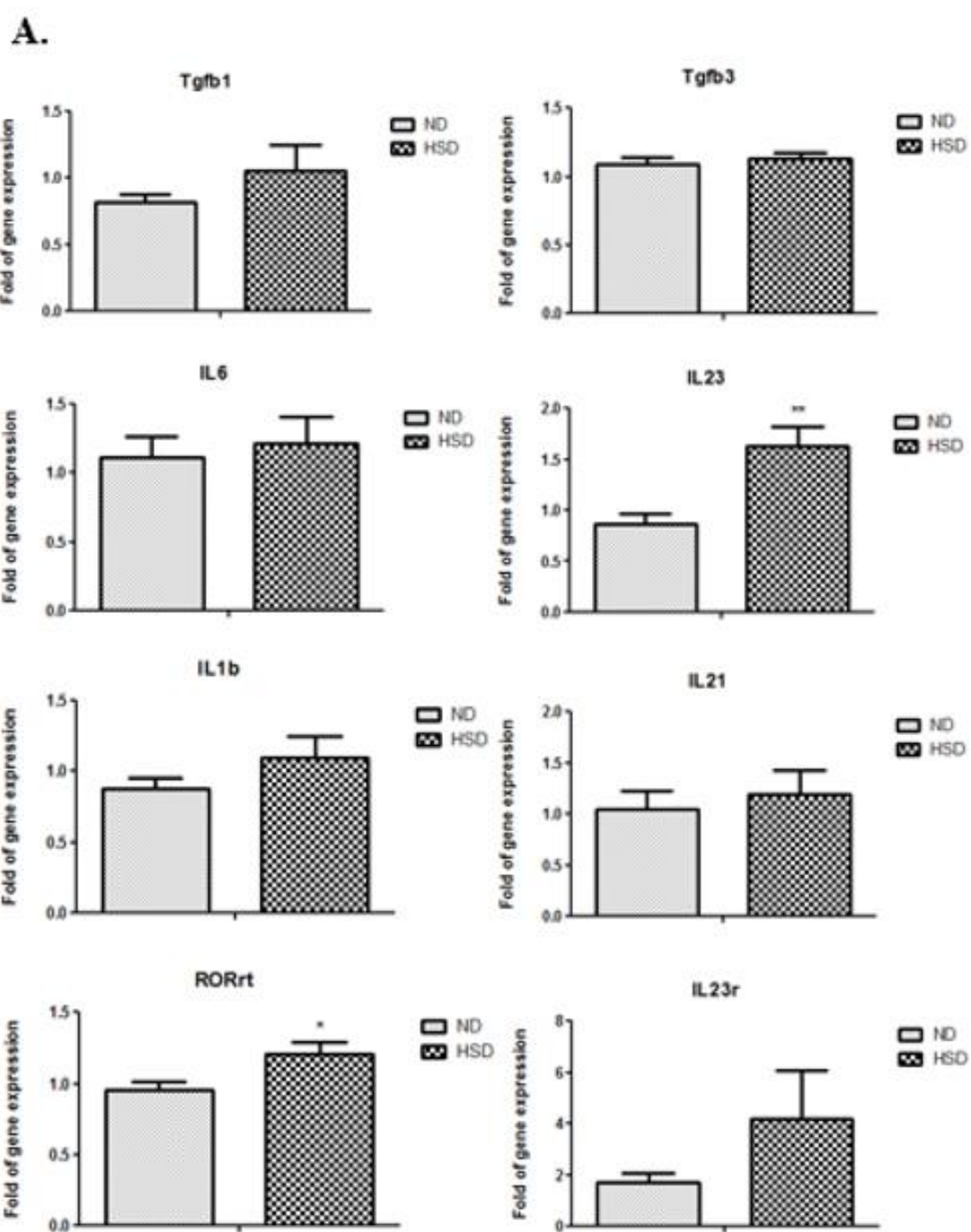
(A)誘導 Th17 cells 活化相關基因的表現量。(B)參與 Th17 cells 活化訊息傳遞的基因表現量。(C)與 Th17 cells 分泌的細胞激素相關的基因表現量。(D) *Gal3* 的基因表現量。(E) *Ifn γ* 的基因表現量。(所有基因都以 *Gapdh* 表現量做標準化。統計以 Student's t 檢定進行分析，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，ND vs. HSD。長條圖為平均值 \pm SEM。ND: n=14，HSD: n=14。)

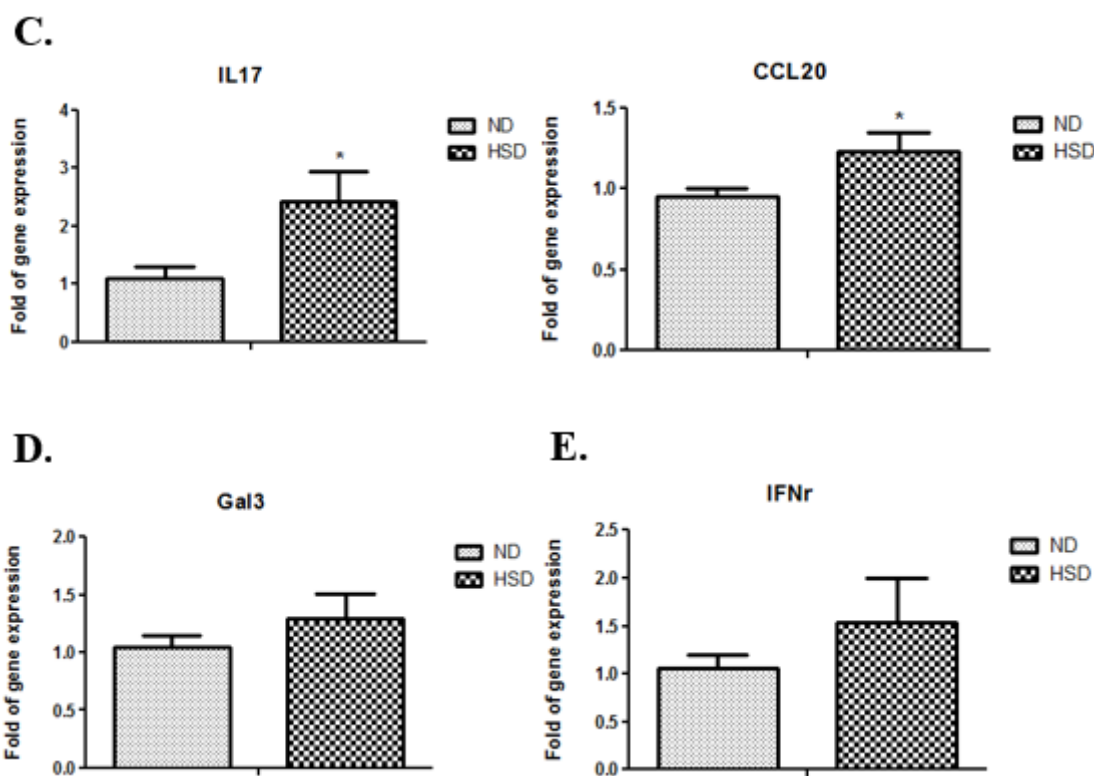




圖六、餵食高鹽飼料一週分離的 CD45⁺ cell 基因之表現

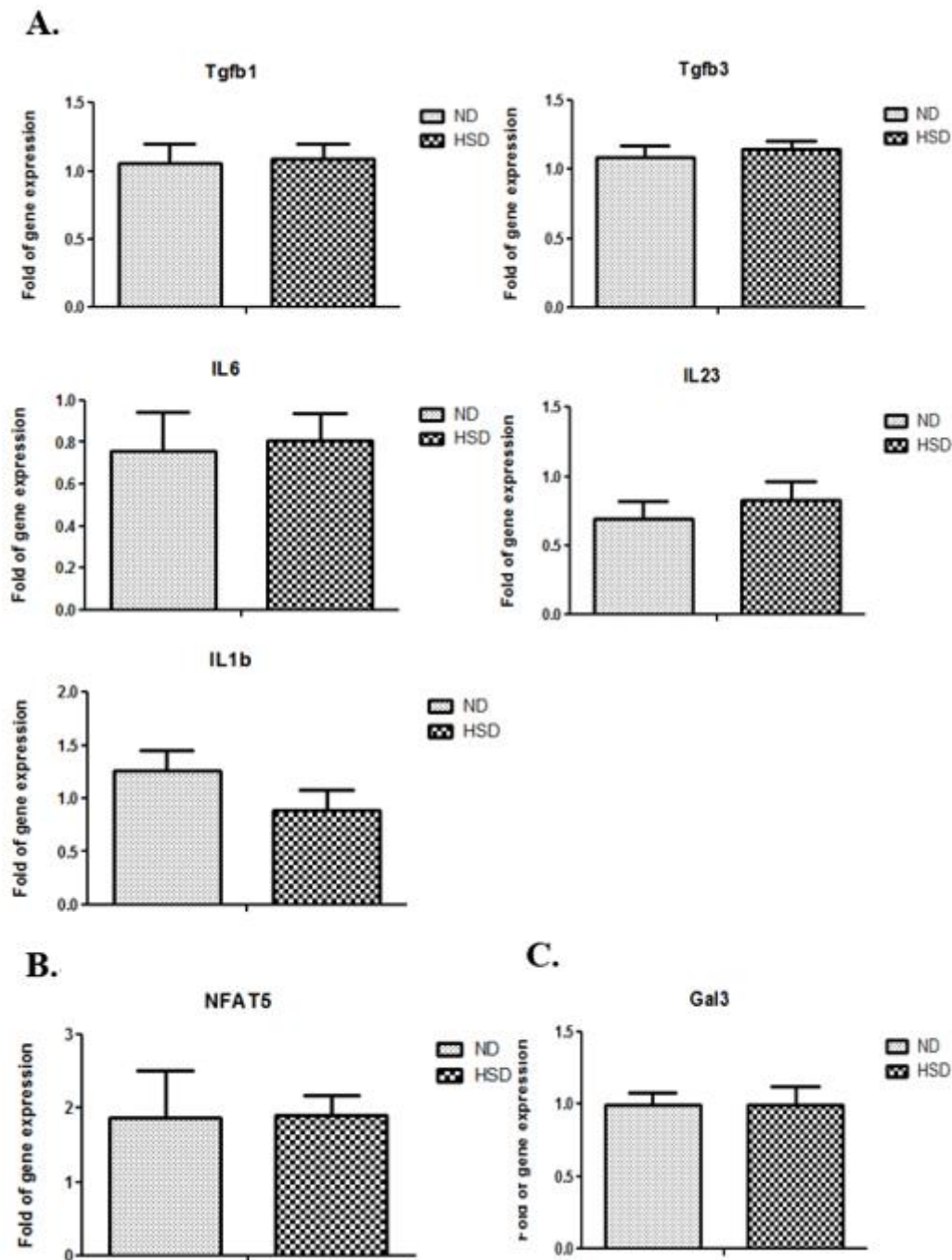
(A)誘導 Th17 cells 活化相關基因的表現量。(B)參與 Th17 cells 活化訊息傳遞的基因表現量。(C)與 Th17 cells 分泌的細胞激素相關的基因表現量。(D) *Gal3* 的基因表現量。(E) *Ifn γ* 的基因表現量。(所有基因都以 *Gapdh* 表現量做標準化。統計以 Student's t 檢定進行分析， ** P < 0.01, ND vs. HSD。長條圖為平均值 \pm SEM。ND: n=9, HSD: n=9。)





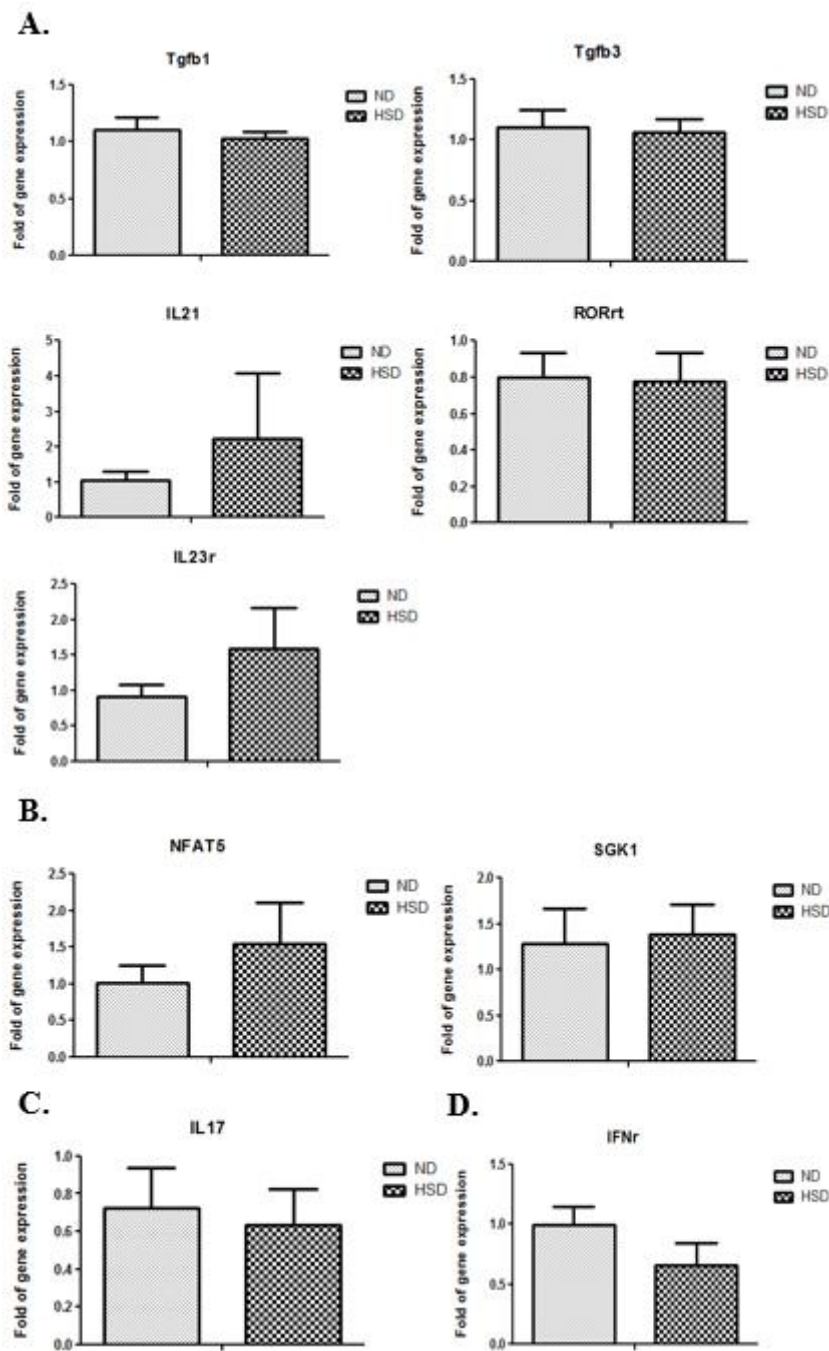
圖七、餵食高鹽飼料一個月分離的 CD45⁺ cell 基因之表現

(A)誘導 Th17 cells 活化相關基因的表現量。(B)參與 Th17 cells 活化訊息傳遞的基因表現量。(C)與 Th17 cells 分泌的細胞激素相關的基因表現量。(D) *Gal3* 的基因表現量。(E) *Ifn γ* 的基因表現量。(所有基因都以 *Gapdh* 表現量做標準化。統計以 Student's t 檢定進行分析，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，ND vs. HSD。長條圖為平均值 \pm SEM。ND: n=10，HSD: n=10。)



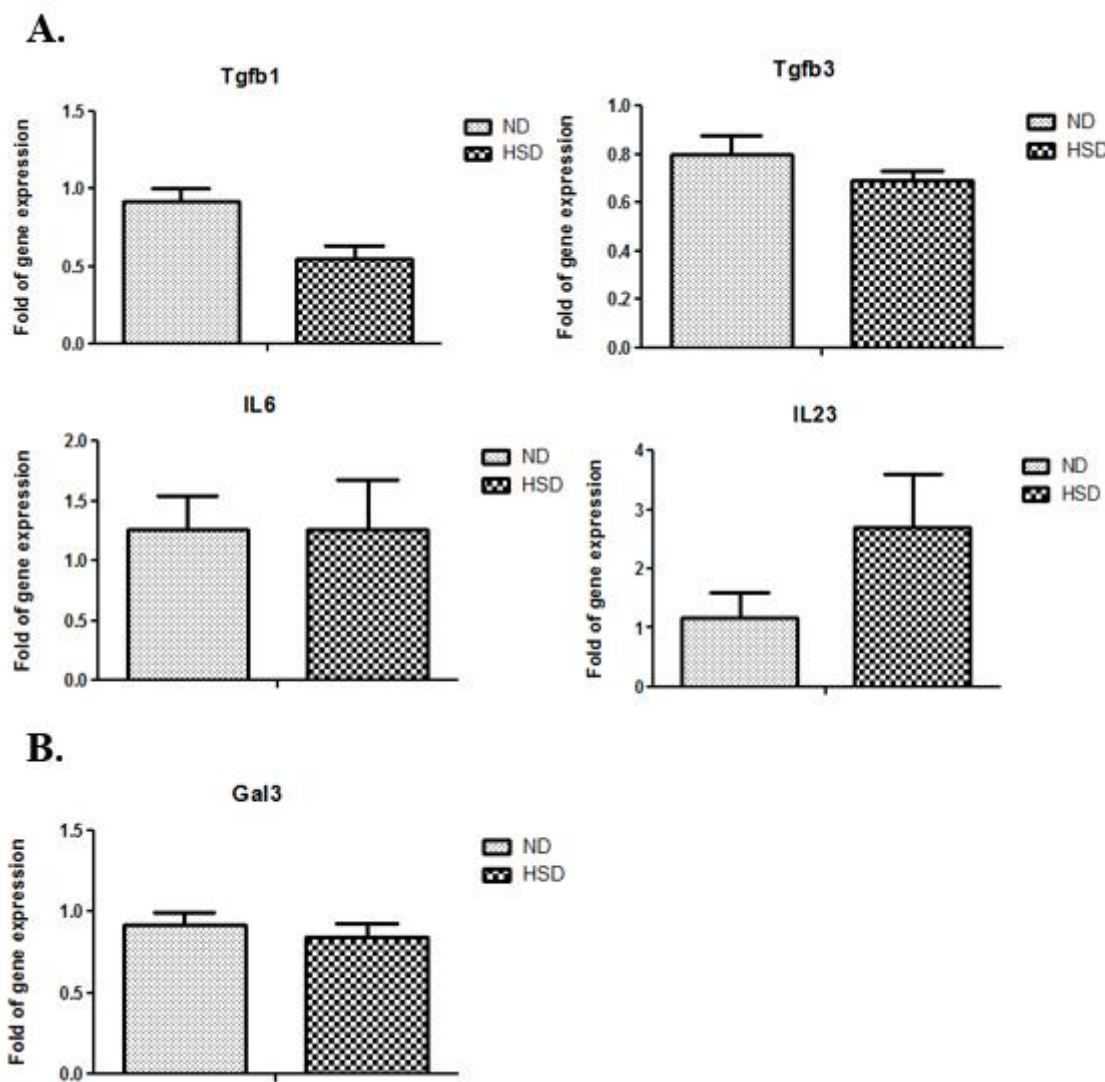
圖八、餵食高鹽飼料兩週分離的巨噬細胞基因之表現

(A)誘導 Th17 cells 活化相關基因的表現量。(B)參與 Th17 cells 活化訊息傳遞的基因表現量。(C)Gal3 的基因表現量。(所有基因都以 *Gapdh* 表現量做標準化。統計以 Student's t 檢定進行分析, * $P < 0.05$, ND vs. HSD。長條圖為平均值 \pm SEM。ND: n=8, HSD: n=8。)



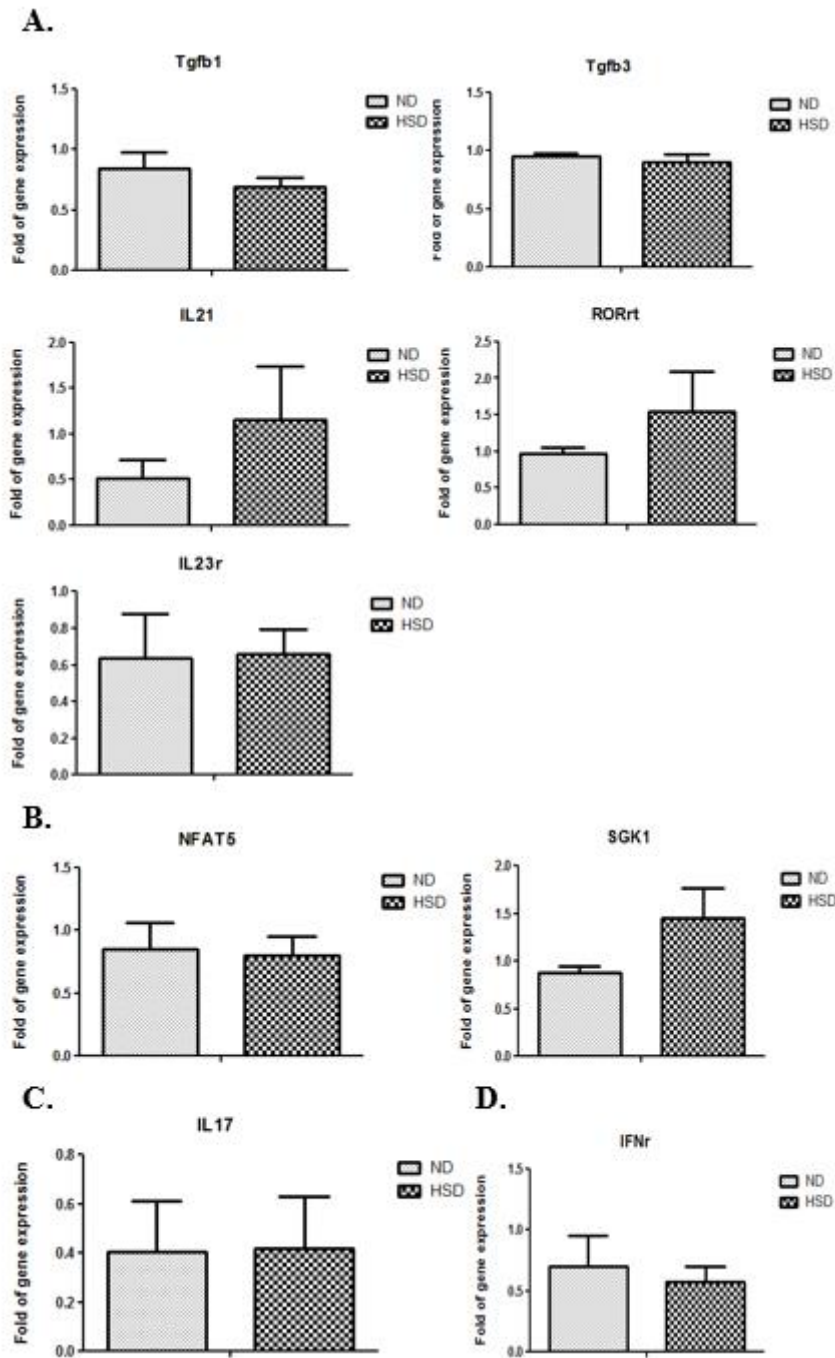
圖九、餵食高鹽飼料兩週分離的 Th cells 基因之表現

(A)誘導 Th17 cells 活化相關基因的表現量。(B)參與 Th17 cells 活化訊息傳遞的基因表現量。(C) *Il17* 的基因表現量。(D) *Ifny* 的基因表現量。(所有基因都以 *Gapdh* 表現量做標準化。統計以 Student's t 檢定進行分析，* $P < 0.05$ ，ND vs. HSD。長條圖為平均值 \pm SEM。ND: n=9，HSD: n=9。)



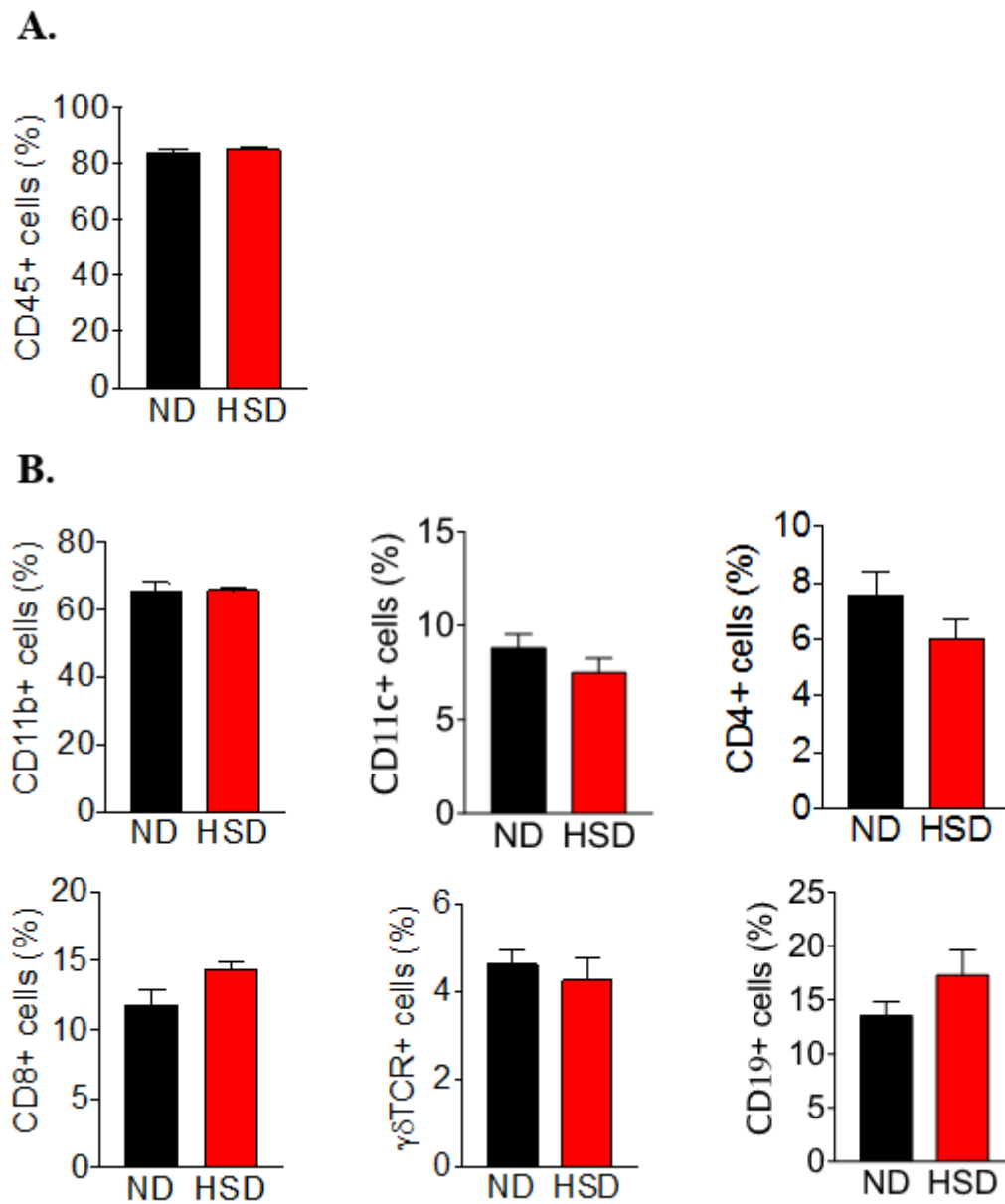
圖十、餵食高鹽飼料一個月分離的巨噬細胞基因之表現

(A)誘導 Th17 cells 活化相關基因的表現量。(B) *Gal3* 的基因表現量。(所有基因都以 *Gapdh* 表現量做標準化。統計以 Student's t 檢定進行分析，* P < 0.05，ND vs. HSD。長條圖為平均值±SEM。ND: n=4，HSD: n=4。)



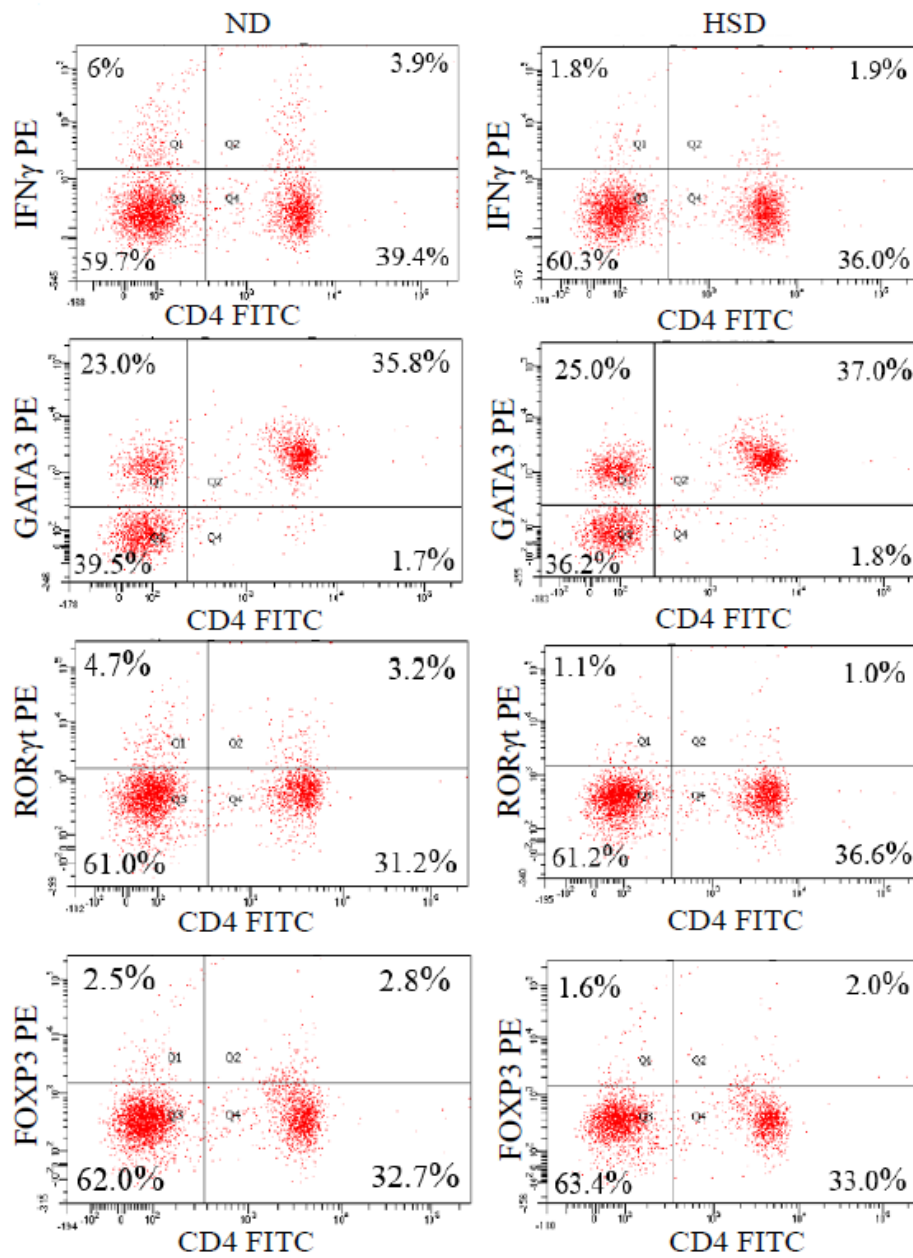
圖十一、餵食高鹽飼料一個月分離的 Th cells 基因之表現

(A)誘導 Th17 cells 活化相關基因的表現量。(B)參與 Th17 cells 活化訊息傳遞的基因表現量。(C) *Il17* 的基因表現量。(D) *Ifn̳* 的基因表現量。(所有基因都以 *Gapdh* 表現量做標準化。統計以 Student's t 檢定進行分析，*P < 0.05，ND vs. HSD。長條圖為平均值±SEM。ND: n=4，HSD: n=4。)



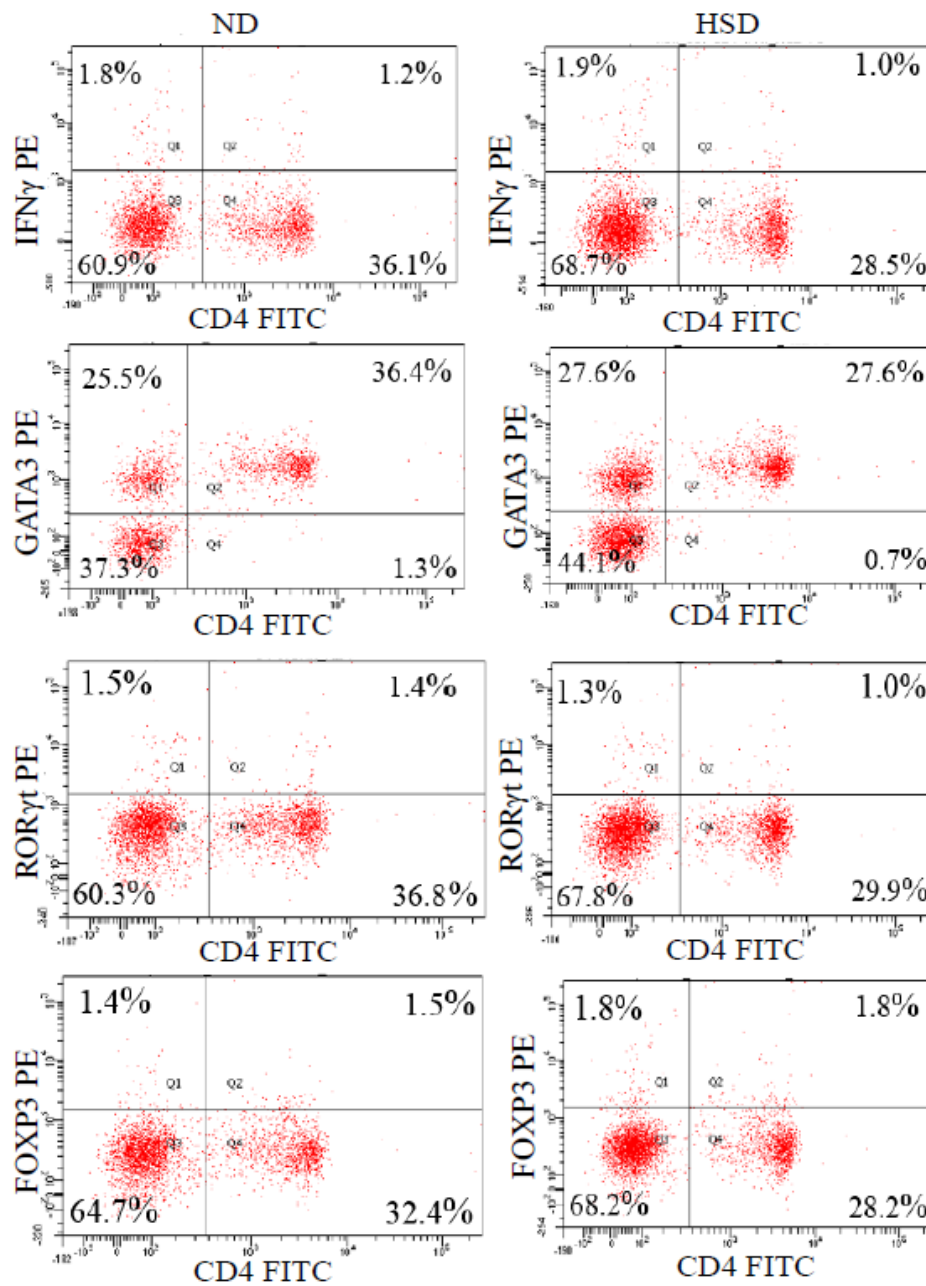
圖十二、餵食高鹽飼料兩週分離的 CD45⁺ cells 細胞組成

(A) CD45⁺ cells 佔分離出的所有細胞比例。(B) CD45⁺ cells 各免疫細胞所佔的比例。(統計以 Student's t 檢定進行分析，*P < 0.05，ND vs. HSD。長條圖為平均值±SEM。ND: n=5，HSD: n=5。)



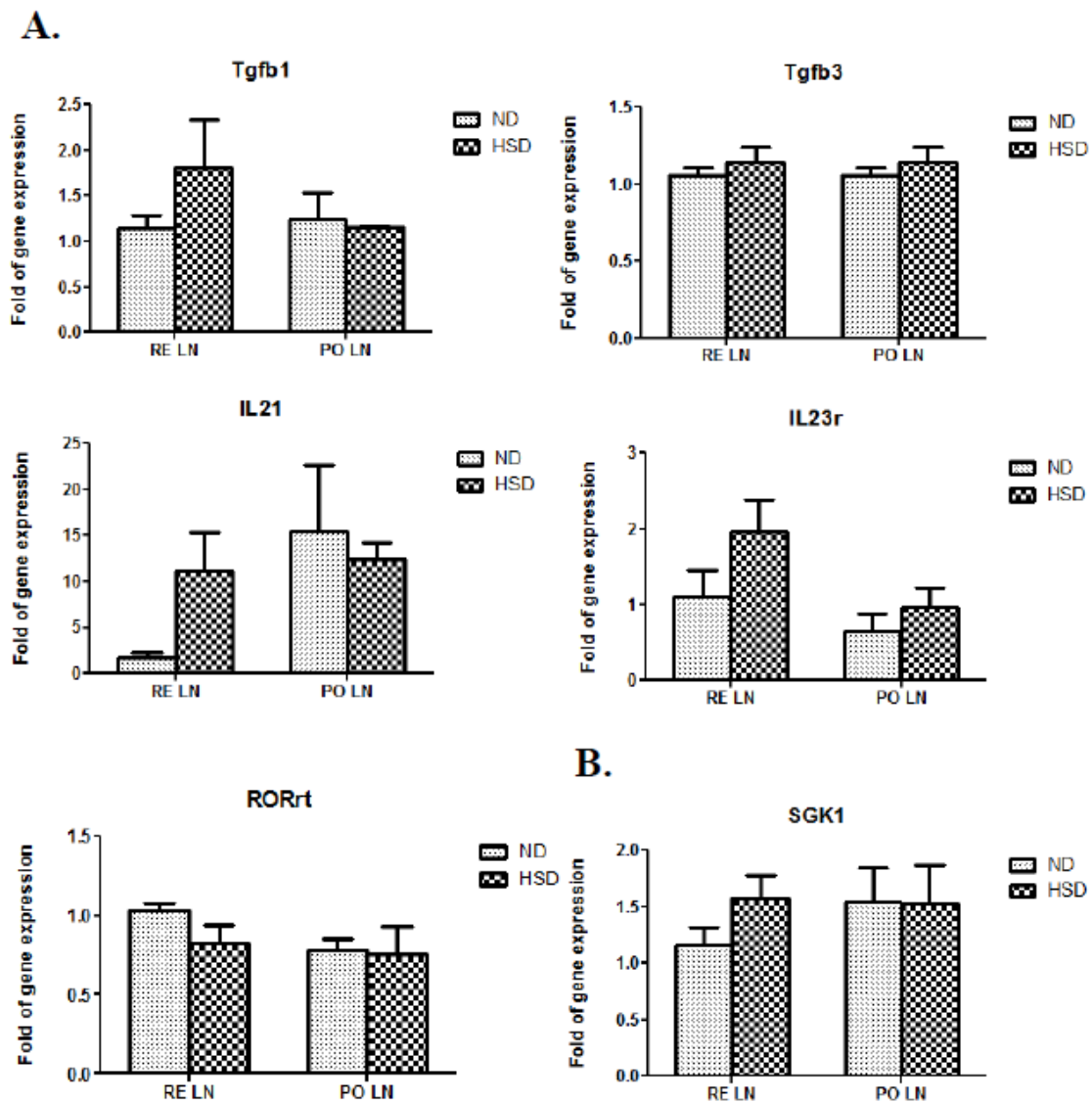
圖十三、餵食高鹽飼料一週 renal lymph node Th cells 細胞組成變化

餵食高鹽飼料一週 renal lymph node 內 Th1 cells(CD4⁺IFN γ ⁺)、Th2 cells(CD4⁺GATA3⁺)、Th17 cells(CD4⁺ROR γ t⁺)及 Treg cells(CD4⁺FOXP3⁺)組成變化 (左半圖為 ND，右半圖為 HSD)



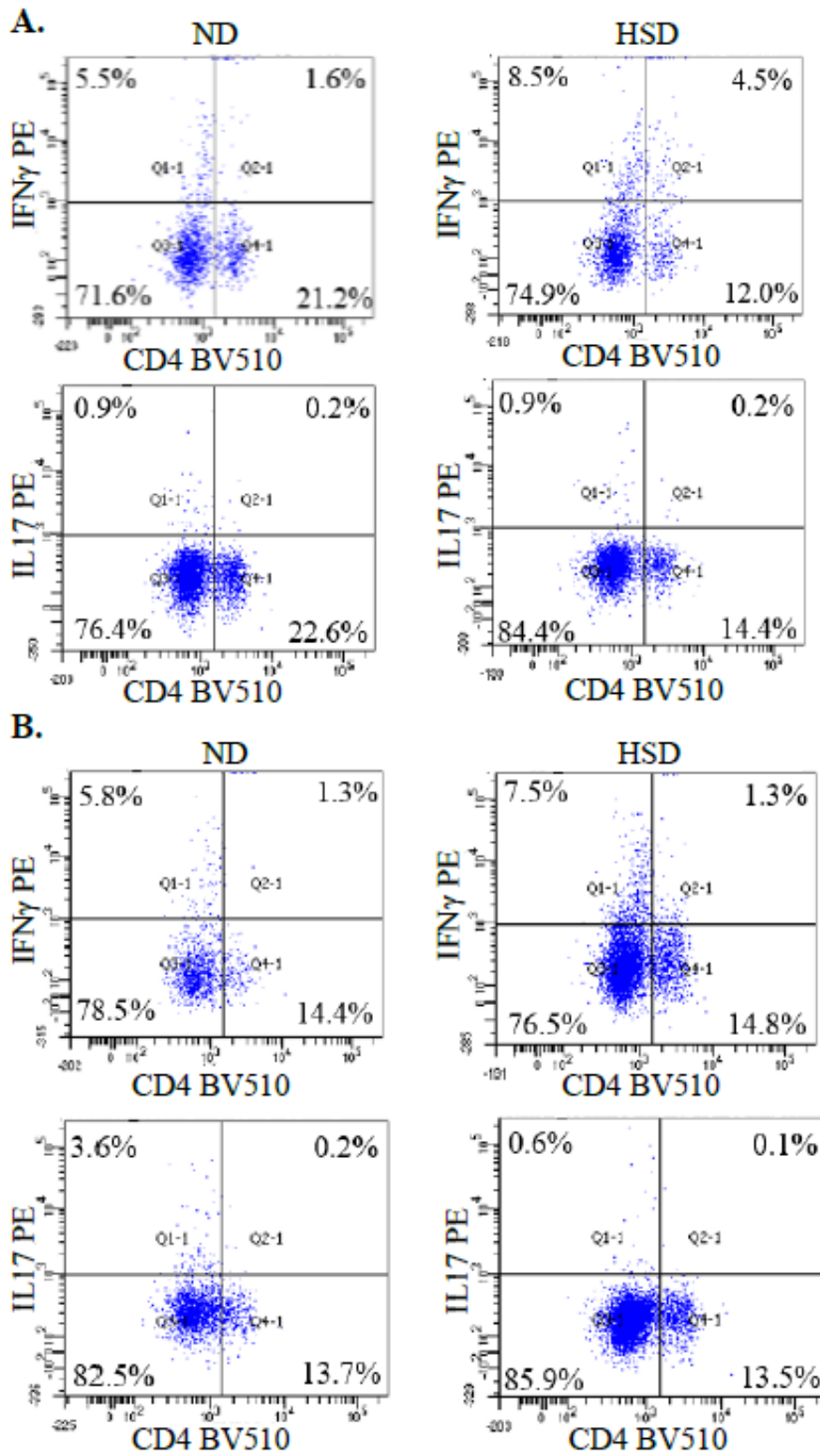
圖十四、餵食高鹽飼料一週 popliteal lymph node Th cells 細胞組成變化

餵食高鹽飼料一週 popliteal lymph node 內 Th1 cells(CD4⁺IFN γ ⁺)、Th2 cells(CD4⁺GATA3⁺)、Th17 cells(CD4⁺ROR γ t⁺)及 Treg cells(CD4⁺FOXP3⁺)組成變化 (左半圖為 ND，右半圖為 HSD)



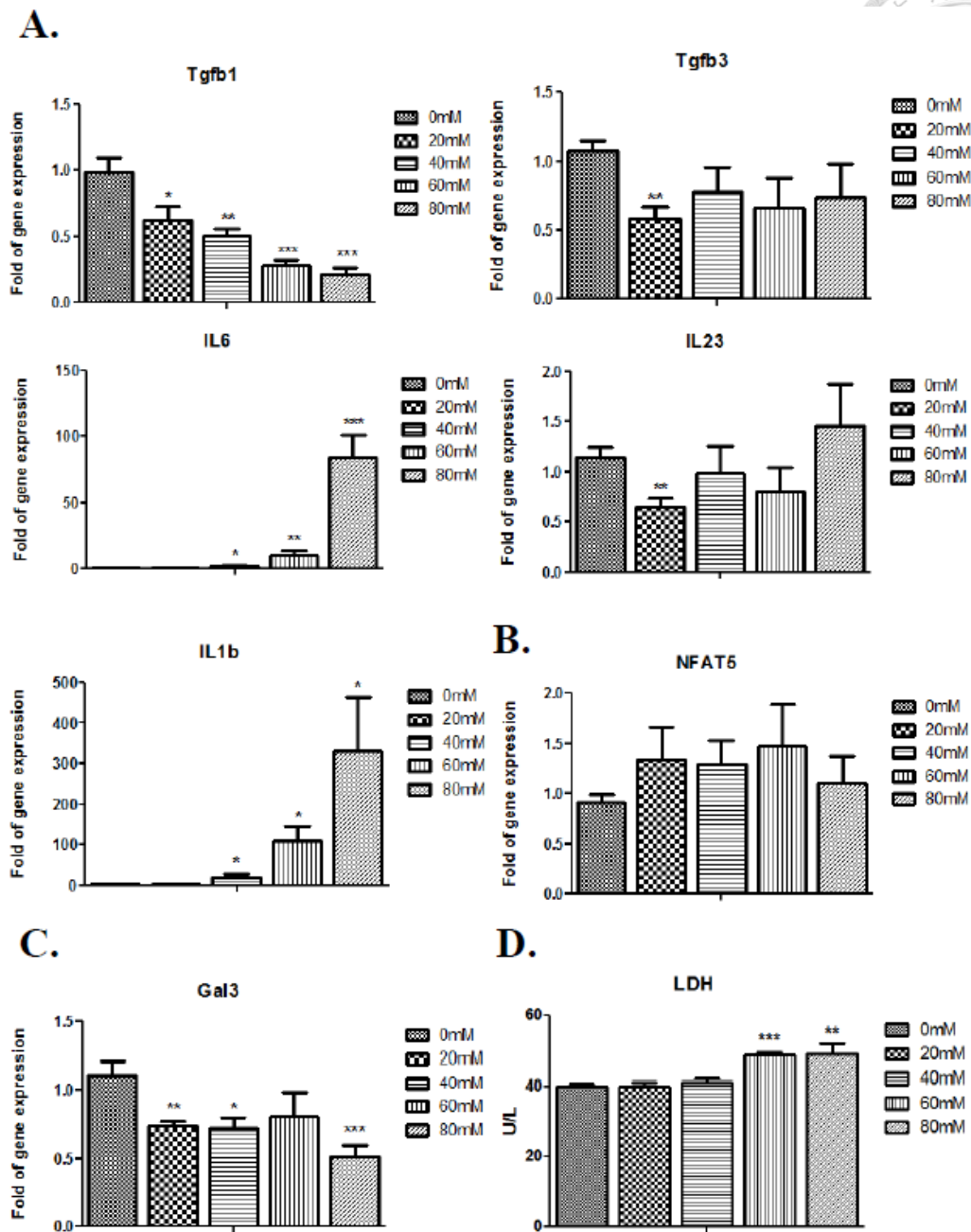
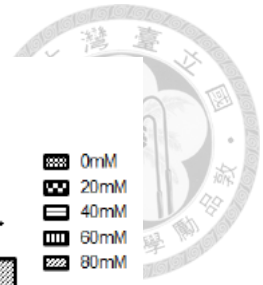
圖十五、餵食高鹽飼料一週分離的 Th cells 基因之表現

(A)誘導 Th17 cells 活化相關基因的表現量。(B)參與 Th17 cells 活化訊息傳遞的基因表現量。(所有基因都以 *Gapdh* 表現量做標準化。RE LN: renal lymph node, PO LN: popliteal lymph node, 統計以 Student's t 檢定進行分析, * $P < 0.05$, ND vs. HSD。長條圖為平均值 \pm SEM。ND: n=4, HSD: n=4。)



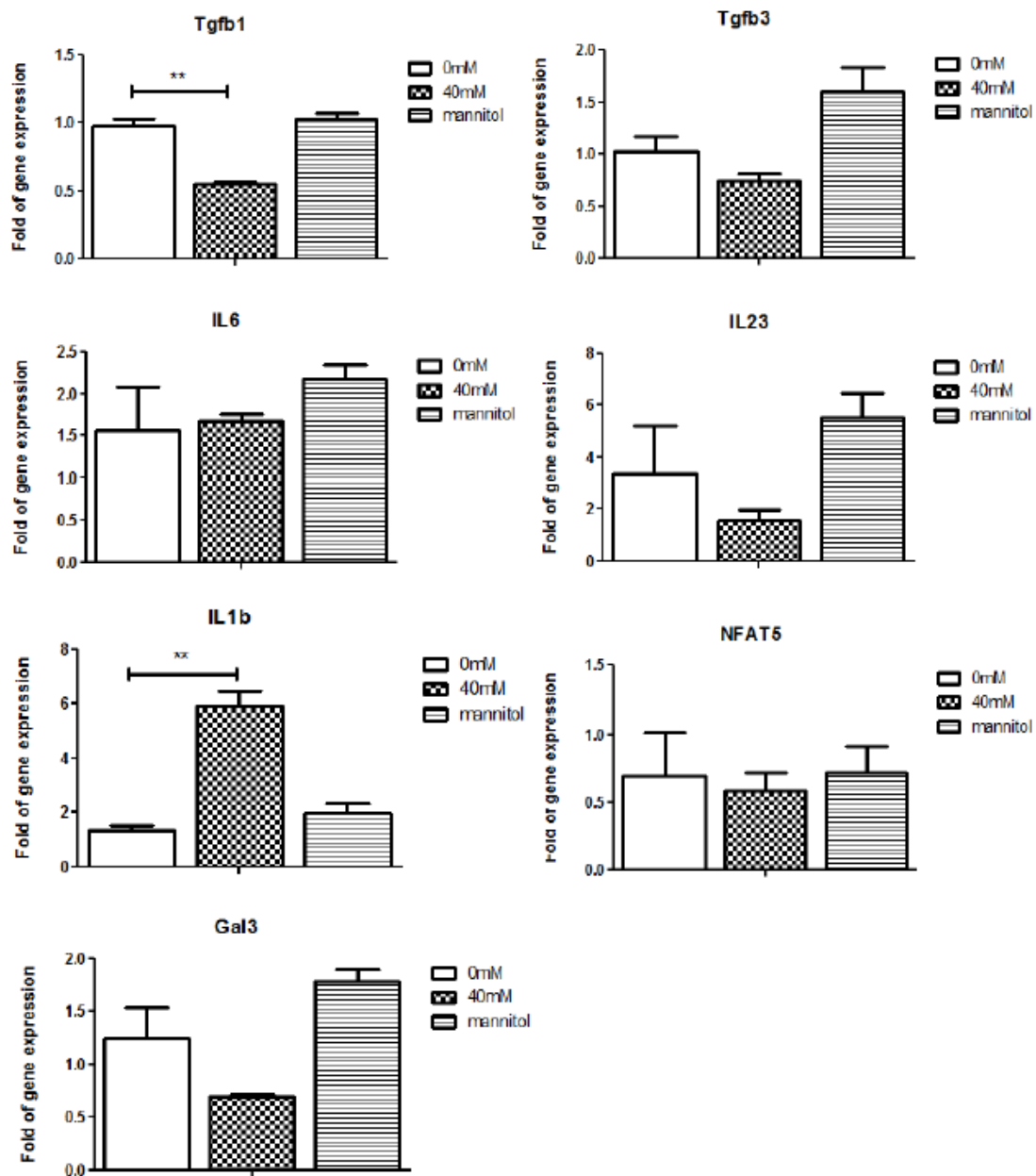
圖十六、餵食高鹽飼料兩週 lymph node Th cells 分泌細胞激素變化

餵食高鹽飼料兩週(A) renal lymph node 及(B)popliteal lymph node Th cells 分泌 IFN γ 和 IL17 的比例。(左半圖為 ND，右半圖為 HSD)



圖十七、高鹽環境下 wild type 巨噬細胞基因之表現及細胞毒性之情形

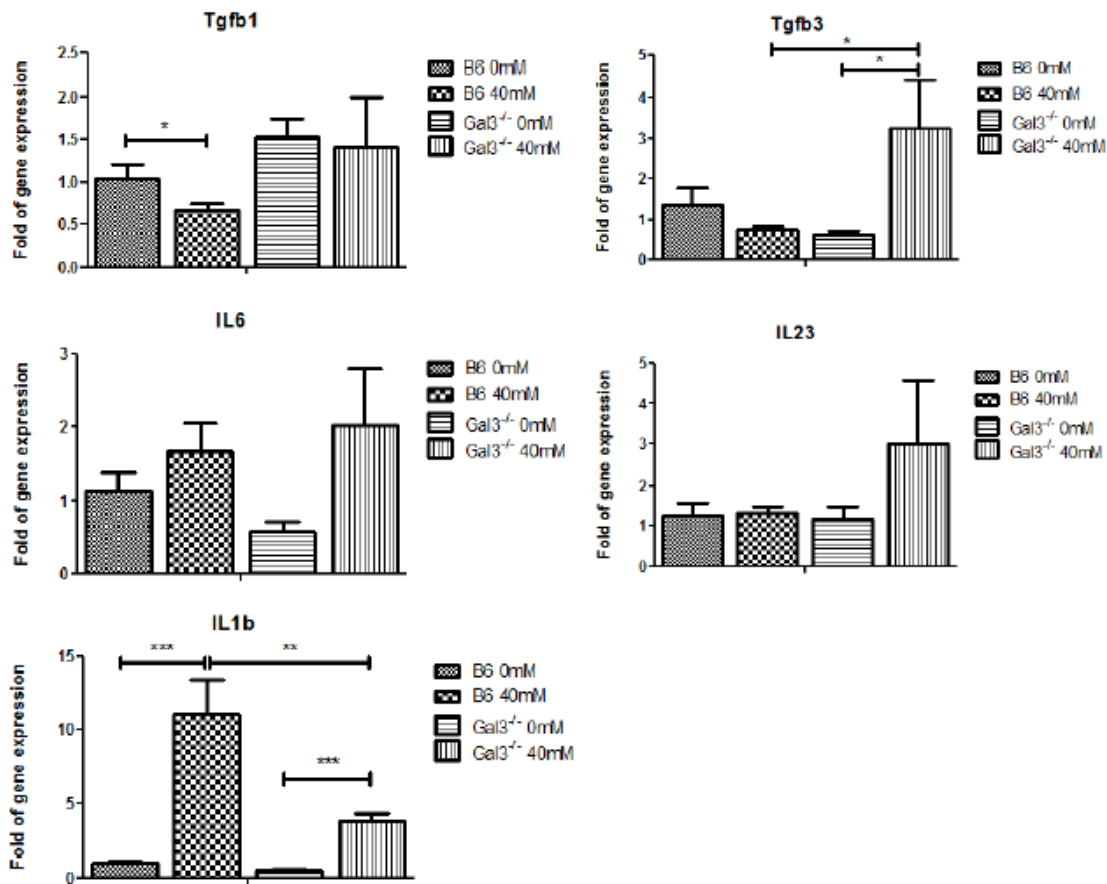
(A)誘導 Th17 cells 活化相關基因的表現量。(B)參與 Th17 cells 活化訊息傳遞的基因表現量。(C)Gal3 的基因表現量。(D)LDH 濃度。(所有基因都以 *Gapdh* 表現量做標準化。統計以 Student's t 檢定進行分析，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ，vs. 0mM。長條圖為平均值 \pm SEM。n=6。)



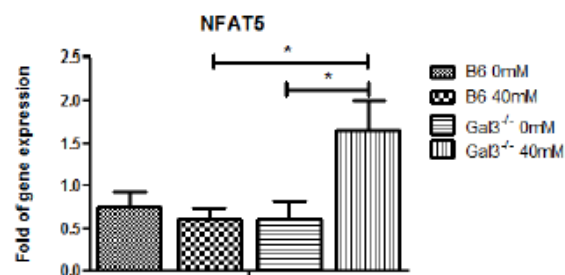
圖十八、高鹽或高滲透壓環境下 wild type 巨噬細胞基因之表現

巨噬細胞在外加 40mM 的鹽和相同滲透壓的 mannitol 的基因表現量(所有基因都以 *Gapdh* 表現量做標準化。統計以 Student's t 檢定進行分析，** P < 0.01。長條圖為平均值±SEM。n=3。)

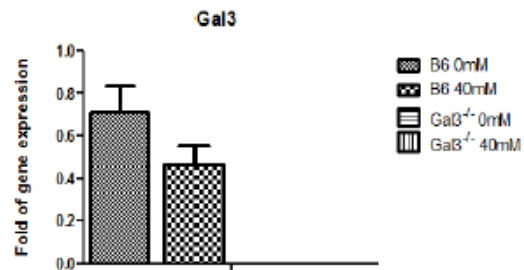
A.



B.

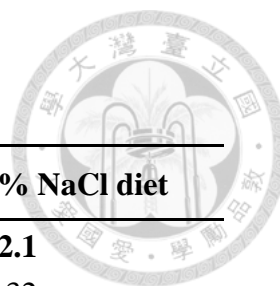


C.



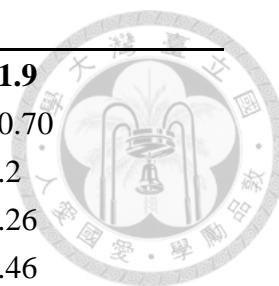
圖十九、高鹽環境下 wild type 及 *Gal3*^{-/-} 巨噬細胞基因之表現

(A)誘導 Th17 cells 活化相關基因的表現量。(B)參與 Th17 cells 活化訊息傳遞的基因表現量。(C)*Gal3* 的基因表現量。(所有基因都以 *Gapdh* 表現量做標準化。統計以 Student's t 檢定進行分析，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。長條圖為平均值 \pm SEM。n=8。)



表一、控制組飼料與高鹽組飼料之營養成分表

Composition	Control diet	8% NaCl diet
Protein, %	25.0	22.1
Arginine, %	1.57	1.32
Histidine, %	0.62	0.52
Isoleucine, %	1.06	1.07
Leucine, %	1.89	1.67
Lysine, %	1.48	1.31
Methionine, %	0.59	0.62
Cystine, %	0.39	0.28
Phenylalanine, %	1.11	0.96
Tyrosine, %	0.77	0.66
Threonine, %	0.97	0.84
Tryptophan, %	0.28	0.27
Valine, %	1.16	1.08
Alanine, %	1.44	1.35
Aspartic Acid, %	2.81	2.70
Glutamic Acid, %	4.74	4.18
Glycine, %	1.28	1.12
Proline, %	1.47	1.41
Serine, %	1.18	1.14
Taurine, %	0.03	0.04
Fat(ether extract), %	5.0	4.6
Fat(acid hydrolysis), %	6.4	5.5
Cholesterol, ppm	209	227
Linoleic Acid, %	1.05	1.02
Linolenic Acid,%	0.09	0.08
Arachidonic Acid,%	0.02	0.02
Omega-3 Fatty Acid,%	0.30	0.17
Total Saturated Fatty Acid, %	1.48	1.29
Total Monounsaturated Fatty Acid, %	1.62	1.48
Polyunsaturated Fatty Acid, %	---	0.81
Fiber(max), %	5.0	5.3
Neutral Detergent Fiber, %	13.9	16.7
Acid Detergent Fiber, %	6.2	6.9



Nitrogen-Free Extract(by difference), %	47.5	51.9
Starch, %	21.0	20.70
Glucose, %	0.19	0.2
Fructose, %	0.27	0.26
Sucrose, %	3.83	3.46
Lactose, %	2.01	1.86
Total Digestible Nutrients, %	73.8	70.2
Mineral		
Ash, %	7.0	6.4
Calcium, %	0.95	0.88
Phosphorus, %	0.70	0.64
Phosphorus (available), %	0.42	0.38
Potassium, %	1.28	1.12
Magnesium, %	0.23	0.21
Sulfur, %	0.36	0.34
Sodium, %	0.39	3.32
Chloride, %	0.64	5.16
Fluorine, ppm	15	14.2
Iron, ppm	240	220
Zinc, ppm	85	77
Manganese, ppm	75	68
Copper, ppm	15	13
Cobalt, ppm	0.91	0.84
Iodine, ppm	0.99	0.92
Chromium, ppm	0.01	1.15
Selenium, ppm	0.41	0.34
Vitamins		
Carotene, ppm	2.3	2.1
Vitamin A, IU/g	15	14
Vitamin D-3 (added), IU/g	4.6	4.2
Vitamin E, IU/g	42	39
Vitamin K (as menadione), ppm	1.3	1.2
Thiamin Hydrochloride, ppm	16	15
Riboflavin, ppm	4.7	4.2
Niacin, ppm	120	112
Pantothenic Acid, ppm	24	22
Folic Acid, ppm	7.1	6.6

Pyridoxine, ppm	6.0	5.55
Biotin, ppm	0.30	0.30
Vitamin B-12, mcg/kg	51	47
Choline Chloride, ppm	2250	2081
Ascorbic Acid, ppm	0	0
Calories provided by:		
Protein, %	29.829	26.2
Fat (ether extract), %	13.427	12.3
Carbohydrates, %	56.744	61.5



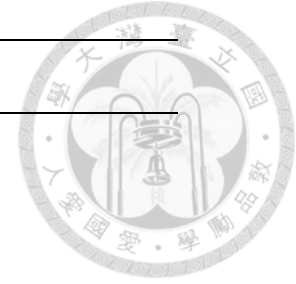
表二、PCR 之引子序列

Gene	Sequences (5' to 3')	Length
Galectin3 WT		490 bp
Forward	GTA GGT GAG AGT CAC AAG CTG GAG GCC	
Reverse	CAC TCT CAA AGG GGA AGG CTG ACT GTC	
Galectin3 KO		300 bp
Forward	GGC TGA CCG CTT CCT CGT GCT TTA CGG	
Reverse	CAC TCT CAA AGG GGA AGG CTG ACT GTC	



表三、Real-time PCR 之引子序列

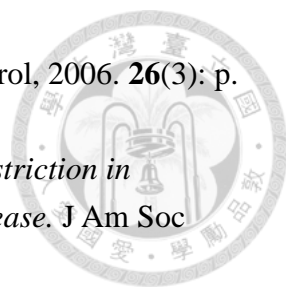
Gene	Sequences (5' to 3')
Tgfb1	
Forward	GGA CTC TCC ACC TGC AAG AC
Reverse	GAC TGG CGA GCC TTA GTT TG
Tgfb3	
Forward	ATG TCA CAC CTT TCA GCC CA
Reverse	AGG ATC AGG TGT GGG TTG TG
IL23	
Forward	CCC GTA TCC AGT GTG AAG ATG
Reverse	CCC TTT GAA GAT GTC AGA GTC A
IL6	
Forward	AGA CAA AGC CAG AGT CCT TCA
Reverse	GGT CCT TAG CCA CTC CTT CTG
IL1b	
Forward	CCC AAG CAA TAC CCA AAG AA
Reverse	GCT TGT GCT CTG CTT GTG AG
Gapdh	
Forward	ACG GCC GCA TCT TCT TGT GCA
Reverse	AAT GGC AGC CCT GGT GAC CA
Gal3	
Forward	GCC CTA TGA CCT GCC CTT G
Reverse	TCC CTC TCC TGA AAT CTA GAA CA

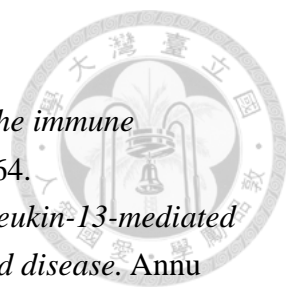


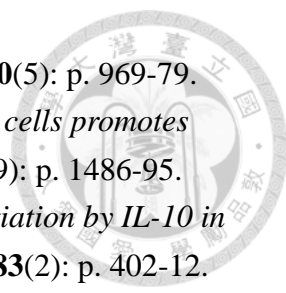
Gene	Sequences (5' to 3')
NFAT5	
Forward	TTT CCA ACA GCA GCC TCC AA
Reverse	GCG TCT GGG GTT ATG TGT GA
ROR γ t	
Forward	GTG CAG GAG TAG GCC ACA TT
Reverse	GTG CAG GAG TAG GCC ACA TT
IL17	
Forward	TTT AAC TCC CTT GGC GCA AAA
Reverse	CTT TCC CTC CGC ATT GAC AC
IL21	
Forward	TCA AGC CAT CAA ACC CTG GAA
Reverse	TGA ATC ATC TTT TGA AGG AGC CA
CCL20	
Forward	TGC TCT TCC TTG CTT TGG CAT GGG TA
Reverse	TCT GTG CAG TGA TGT GCA GGT GAA GC
IFN γ	
Forward	CGC TAC ACA CTG CAT CTT GG
Reverse	CCA TCC TTT TGC CAG TTC CTC
IL23r	
	GCC AAG AGA ACC ATT CCC GA
	TCA GTG CTA CAA TCT TCA GAG GAC A
SGK1	
Forward	CGT CAA AGC CGA GGC TGC TC
Reverse	GGT TTG GCG TGA GGG TTG GA

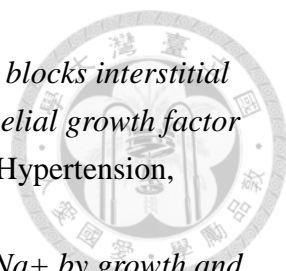
第六章 參考文獻

1. Palmer, L.G. and J. Schnermann, *Integrated control of Na transport along the nephron*. Clin J Am Soc Nephrol, 2015. **10**(4): p. 676-87.
2. Titze, J., et al., *Osmotically inactive skin Na⁺ storage in rats*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **285**(6): p. F1108-17.
3. Titze, J., et al., *Glycosaminoglycan polymerization may enable osmotically inactive Na⁺ storage in the skin*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(1): p. H203-8.
4. Titze, J., *Sodium balance is not just a renal affair*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2014. **23**(2): p. 101-5.
5. Reinhardt, H.W. and D.W. Behrenbeck, [*Studies in awake dogs on the regulation of the sodium balance. I. The significance of the extracellular space for the regulation of the daily sodium balance*]. Pflugers Arch Gesamte Physiol Menschen Tiere, 1967. **295**(3): p. 266-79.
6. Titze, J., et al., *Spooky sodium balance*. Kidney Int, 2014. **85**(4): p. 759-67.
7. He, F.J. and G.A. MacGregor, *Effect of longer-term modest salt reduction on blood pressure*. Cochrane Database Syst Rev, 2004(3): p. Cd004937.
8. Tseng, L.N., et al., *Prevalence of hypertension and dyslipidemia and their associations with micro- and macrovascular diseases in patients with diabetes in Taiwan: an analysis of nationwide data for 2000-2009*. J Formos Med Assoc, 2012. **111**(11): p. 625-36.
9. Slagman, M.C., et al., *Moderate dietary sodium restriction added to angiotensin converting enzyme inhibition compared with dual blockade in lowering proteinuria and blood pressure: randomised controlled trial*. Bmj, 2011. **343**: p. d4366.
10. McMahon, E.J., et al., *A randomized trial of dietary sodium restriction in CKD*. J Am Soc Nephrol, 2013. **24**(12): p. 2096-103.
11. Frisoli, T.M., et al., *Salt and hypertension: is salt dietary reduction worth the effort?* Am J Med, 2012. **125**(5): p. 433-9.
12. WHO, *Sodium intake for adults and children: Guideline*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2012.
13. Bakris, G.L. and A. Smith, *Effects of sodium intake on albumin excretion in patients with diabetic nephropathy treated with long-acting calcium antagonists*. Ann Intern Med, 1996. **125**(3): p. 201-4.
14. Imanishi, M., et al., *Sodium sensitivity related to albuminuria appearing before hypertension in type 2 diabetic patients*. Diabetes Care, 2001. **24**(1): p. 111-6.
15. Jones-Burton, C., et al., *An in-depth review of the evidence linking dietary salt*

- 
- intake and progression of chronic kidney disease. Am J Nephrol*, 2006. **26**(3): p. 268-75.
16. Cianciaruso, B., et al., *Renal adaptation to dietary sodium restriction in moderate renal failure resulting from chronic glomerular disease. J Am Soc Nephrol*, 1996. **7**(2): p. 306-13.
 17. Mazouz, H., et al., *Risk factors of renal failure progression two years prior to dialysis. Clin Nephrol*, 1999. **51**(6): p. 355-66.
 18. Habibi, J., et al., *Salt Loading Promotes Kidney Injury via Fibrosis in Young Female Ren2 Rats. Cardiorenal Med*, 2014. **4**(1): p. 43-52.
 19. Weir, M.R. and J.C. Fink, *Salt intake and progression of chronic kidney disease: an overlooked modifiable exposure? A commentary. Am J Kidney Dis*, 2005. **45**(1): p. 176-88.
 20. Barton, M., et al., *Dysfunctional renal nitric oxide synthase as a determinant of salt-sensitive hypertension: mechanisms of renal artery endothelial dysfunction and role of endothelin for vascular hypertrophy and Glomerulosclerosis. J Am Soc Nephrol*, 2000. **11**(5): p. 835-45.
 21. Frisbee, J.C. and J.H. Lombard, *Chronic elevations in salt intake and reduced renal mass hypertension compromise mechanisms of arteriolar dilation. Microvasc Res*, 1998. **56**(3): p. 218-27.
 22. Kitiyakara, C., et al., *Salt intake, oxidative stress, and renal expression of NADPH oxidase and superoxide dismutase. J Am Soc Nephrol*, 2003. **14**(11): p. 2775-82.
 23. Humalda, J.K. and G. Navis, *Dietary sodium restriction: a neglected therapeutic opportunity in chronic kidney disease. Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2014. **23**(6): p. 533-40.
 24. Wynn, T.A. and T.R. Ramalingam, *Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. Nat Med*, 2012. **18**(7): p. 1028-40.
 25. Lin SL, D.J., *Macrophages in kidney injury and repair. Acta Nephrol.*, 2012. **26**(2): p. 45-57.
 26. Chang, F.C., et al., *Novel insights into pericyte-myofibroblast transition and therapeutic targets in renal fibrosis. J Formos Med Assoc*, 2012. **111**(11): p. 589-98.
 27. Lin, S.L., et al., *Macrophage Wnt7b is critical for kidney repair and regeneration. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(9): p. 4194-9.
 28. Lin, S.L., et al., *Bone marrow Ly6Chigh monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations. J Immunol*, 2009. **183**(10): p. 6733-43.
 29. Ricardo, S.D., H. van Goor, and A.A. Eddy, *Macrophage diversity in renal*

- 
- injury and repair*. J Clin Invest, 2008. **118**(11): p. 3522-30.
30. Lichtnekert, J., et al., *Changes in macrophage phenotype as the immune response evolves*. Curr Opin Pharmacol, 2013. **13**(4): p. 555-64.
 31. Van Dyken, S.J. and R.M. Locksley, *Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 317-43.
 32. Lee, S., et al., *Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(2): p. 317-26.
 33. Hemdan, N.Y., et al., *Interleukin-17-producing T helper cells in autoimmunity*. Autoimmun Rev, 2010. **9**(11): p. 785-92.
 34. Jager, A. and V.K. Kuchroo, *Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation*. Scand J Immunol, 2010. **72**(3): p. 173-84.
 35. Oestreich, K.J. and A.S. Weinmann, *Transcriptional mechanisms that regulate T helper 1 cell differentiation*. Curr Opin Immunol, 2012. **24**(2): p. 191-5.
 36. Zheng, W. and R.A. Flavell, *The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells*. Cell, 1997. **89**(4): p. 587-96.
 37. Kaplan, M.H., et al., *Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells*. Immunity, 1996. **4**(3): p. 313-9.
 38. Maddur, M.S., et al., *Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies*. Am J Pathol, 2012. **181**(1): p. 8-18.
 39. Gaffen, S.L., et al., *The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(9): p. 585-600.
 40. Ysebaert, D.K., et al., *T cells as mediators in renal ischemia/reperfusion injury*. Kidney Int, 2004. **66**(2): p. 491-6.
 41. Tipping, P.G. and S.R. Holdsworth, *T cells in crescentic glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(5): p. 1253-63.
 42. Summers, S.A., et al., *Th1 and Th17 cells induce proliferative glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(12): p. 2518-24.
 43. Tapmeier, T.T., et al., *Pivotal role of CD4+ T cells in renal fibrosis following ureteric obstruction*. Kidney Int, 2010. **78**(4): p. 351-62.
 44. Chen, D.Y., et al., *The potential role of Th17 cells and Th17-related cytokines in the pathogenesis of lupus nephritis*. Lupus, 2012. **21**(13): p. 1385-96.
 45. Amarilyo, G., et al., *IL-17 promotes murine lupus*. J Immunol, 2014. **193**(2): p. 540-3.
 46. Paust, H.J., et al., *The IL-23/Th17 axis contributes to renal injury in*

- 
- experimental glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(5): p. 969-79.
47. Turner, J.E., et al., *IL-17A production by renal gammadelta T cells promotes kidney injury in crescentic GN*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(9): p. 1486-95.
48. Zhang, R., et al., *Regulation of pathogenic Th17 cell differentiation by IL-10 in the development of glomerulonephritis*. Am J Pathol, 2013. **183**(2): p. 402-12.
49. Ramani, K., et al., *An essential role of interleukin-17 receptor signaling in the development of autoimmune glomerulonephritis*. J Leukoc Biol, 2014. **96**(3): p. 463-72.
50. Pindjakova, J., et al., *Interleukin-1 accounts for intrarenal Th17 cell activation during ureteral obstruction*. Kidney Int, 2012. **81**(4): p. 379-90.
51. Bige, N., et al., *Thrombospondin-1 plays a profibrotic and pro-inflammatory role during ureteric obstruction*. Kidney Int, 2012. **81**(12): p. 1226-38.
52. Krebs, C.F., et al., *MicroRNA-155 drives TH17 immune response and tissue injury in experimental crescentic GN*. J Am Soc Nephrol, 2013. **24**(12): p. 1955-65.
53. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.
54. Noble, C.L., et al., *Characterization of intestinal gene expression profiles in Crohn's disease by genome-wide microarray analysis*. Inflamm Bowel Dis, 2010. **16**(10): p. 1717-28.
55. Kochi, Y., et al., *A regulatory variant in CCR6 is associated with rheumatoid arthritis susceptibility*. Nat Genet, 2010. **42**(6): p. 515-9.
56. Nair, R.P., et al., *Genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappaB pathways*. Nat Genet, 2009. **41**(2): p. 199-204.
57. Ye, C.J., et al., *Intersection of population variation and autoimmunity genetics in human T cell activation*. Science, 2014. **345**(6202): p. 1254665.
58. Zhao, J., C.M. Lloyd, and A. Noble, *Th17 responses in chronic allergic airway inflammation abrogate regulatory T-cell-mediated tolerance and contribute to airway remodeling*. Mucosal Immunol, 2013. **6**(2): p. 335-46.
59. Prause, O., et al., *Increased matrix metalloproteinase-9 concentration and activity after stimulation with interleukin-17 in mouse airways*. Thorax, 2004. **59**(4): p. 313-7.
60. Titze, J., et al., *Reduced osmotically inactive Na storage capacity and hypertension in the Dahl model*. Am J Physiol Renal Physiol, 2002. **283**(1): p. F134-41.
61. Machnik, A., et al., *Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism*. Nat Med, 2009. **15**(5): p. 545-52.

- 
62. Machnik, A., et al., *Mononuclear phagocyte system depletion blocks interstitial tonicity-responsive enhancer binding protein/vascular endothelial growth factor C expression and induces salt-sensitive hypertension in rats*. *Hypertension*, 2010. **55**(3): p. 755-61.
63. Schafflhuber, M., et al., *Mobilization of osmotically inactive Na⁺ by growth and by dietary salt restriction in rats*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007. **292**(5): p. F1490-500.
64. Jantsch, J., et al., *Cutaneous Na⁺ storage strengthens the antimicrobial barrier function of the skin and boosts macrophage-driven host defense*. *Cell Metab*, 2015. **21**(3): p. 493-501.
65. Binger, K.J., et al., *High salt reduces the activation of IL-4- and IL-13-stimulated macrophages*. *J Clin Invest*, 2015. **125**(11): p. 4223-38.
66. Wu, C., et al., *Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1*. *Nature*, 2013. **496**(7446): p. 513-17.
67. Kleinewietfeld, M., et al., *Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells*. *Nature*, 2013. **496**(7446): p. 518-22.
68. Amador, C.A., et al., *Spironolactone decreases DOCA-salt-induced organ damage by blocking the activation of T helper 17 and the downregulation of regulatory T lymphocytes*. *Hypertension*, 2014. **63**(4): p. 797-803.
69. Mehrotra, P., et al., *Th-17 cell activation in response to high salt following acute kidney injury is associated with progressive fibrosis and attenuated by AT-1R antagonism*. *Kidney Int*, 2015. **88**(4): p. 776-84.
70. Nakanishi, T., et al., *Determinants of relative amounts of medullary organic osmolytes: effects of NaCl and urea differ*. *Am J Physiol*, 1993. **264**(3 Pt 2): p. F472-9.
71. Hao, S., L. Bellner, and N.R. Ferreri, *NKCC2A and NFAT5 regulate renal TNF production induced by hypertonic NaCl intake*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013. **304**(5): p. F533-42.
72. Sheen, M.R., et al., *Interstitial tonicity controls TonEBP expression in the renal medulla*. *Kidney Int*, 2009. **75**(5): p. 518-25.
73. Wu, S.Y., et al., *Galectin-3 negatively regulates dendritic cell production of IL-23/IL-17-axis cytokines in infection by Histoplasma capsulatum*. *J Immunol*, 2013. **190**(7): p. 3427-37.
74. Zuberi, R.I., et al., *Critical role for galectin-3 in airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness in a murine model of asthma*. *Am J Pathol*, 2004. **165**(6): p. 2045-53.
75. Saegusa, J., et al., *Galectin-3 is critical for the development of the allergic inflammatory response in a mouse model of atopic dermatitis*. *Am J Pathol*,

2009. **174**(3): p. 922-31.
76. MacKinnon, A.C., et al., *Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3*. J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2650-8.
77. Fermin Lee, A., et al., *Galectin-3 modulates Th17 responses by regulating dendritic cell cytokines*. Am J Pathol, 2013. **183**(4): p. 1209-22.
78. Bichara, M., et al., *Exploring the role of galectin 3 in kidney function: a genetic approach*. Glycobiology, 2006. **16**(1): p. 36-45.
79. Henderson, N.C., et al., *Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis*. Am J Pathol, 2008. **172**(2): p. 288-98.
80. O'Seaghdha, C.M., et al., *Elevated galectin-3 precedes the development of CKD*. J Am Soc Nephrol, 2013. **24**(9): p. 1470-7.
81. Harrell, M.I., B.M. Iritani, and A. Ruddell, *Lymph node mapping in the mouse*. J Immunol Methods, 2008. **332**(1-2): p. 170-4.

