

國立臺灣大學生命科學院生化科學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Biochemical Sciences

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

分泌性 Lcn2 蛋白在斑馬魚與小鼠腦部組織基因
表現的研究

Identification of Lcn2 gene expression in zebrafish
and mouse brain



指導教授：朱善德 博士

Advisor: Sin-Tak Chu, Ph.D.

中華民國 99 年 7 月

July, 2010

謝辭

兩年，可以讓人成長多少？又失去些什麼？多了幾根白髮？認識多少人？去了多少地方？兩年過去，將欠下多少人情債？

緣份讓人相遇，然後對人們造成不同的影響。我向來是個好運的人，但一路上相遇的貴人可能就沒那麼好的運氣了，在這兩年中幫助過我的人一定有不少人因我而感到困擾吧！謝謝你們的幫助與包容，讓我能夠順利的走過這兩年碩士班的人生階段，使我獲益良多。

我要先謝謝我的指導老師朱善德博士，老師總是很有耐心的回答我的疑問，提出精闢的見解，無論是課業或是生活上都給我很大的幫助，並且明確的點出我的缺點，使我一輩子受用不盡，老師的教誨將來我一定不會忘記。實驗室的成員們：璦祝學姊、倍慈學姊、啟志學長總是不厭其煩的指導我實驗上的問題，並糾正我的壞習慣，奕傑學長、哲宇學長在我碩一剛入學時，不嫌棄門外漢如我，從最基本的地方教導我如何做實驗，並且在我感到沮喪時安慰我為我打氣，我的同學彥孜跟我在這裡一起奮鬥了兩年也幫助我解決了不少難題，慕儀學妹跟傑昂學弟在我左右不僅常要忍受我超亂的桌面，且身為學長的我還無法像其他學長姐一樣給予指導。因為老師與每一位實驗室成員的幫助與指導，讓不才如我度過了可以說是人生到目前為止最充實的兩年，謝謝你們！

接著要謝謝我的口試委員張瀨仁老師、余榮熾老師、曾婉芳老師，針對我的論文需補強之處提供了許多寶貴的意見，使本論文能變得比初稿更好。

我要特別感謝隔壁實驗室的同學林子揚常常教我許多關於實驗或是課業的問題。Jerry 跟 Rica 常會找我聊天幫我解悶，還有其他的同學們，能在這兩年認識各位同學真好。還有陽明的 Tina 同學也在實驗技術上給予我很大的幫助，多謝你拔刀相助。

我一定要好好謝謝我的女友台眉，在交往的過程中總是細心的照顧我，從不抱怨我常因為實驗或考試沒辦法陪他出去玩，尤其是接近口試的最後兩個月，面對我任性的要求總是有求必應，從不計較我因壓力太大而無理的發脾氣，在我感到徬徨無助毫無自信時給予我最大的安慰，沒有他我肯定無法撐到現在。

最後當然要感謝我的媽媽，沒有他按時繳學費這本碩士論文必定是生不出來的，而且因為碩二繁忙的實驗，使我無法在他生病時隨時陪在他的身邊。您的投資沒有白費，現在我終於能夠帶著碩士學位的畢業證書與論文回來孝敬您了。

需要感謝的人太多可說是族繁不及備載，沒有各位的幫助，我潘暉現在真是不知道會在何處。引述陳之藩先生的話：「無論什麼事，得之於人者太多，出之於己者太少。因為需要感謝的人太多了，就感謝天罷。」這些話對我來說真是再貼切不過了，感謝上天的安排，讓我來台大生化科學所走一遭，對我是很好的人生經驗，感謝老天讓我一路走到今日身旁總有貴人相扶持。紙短情長，希望每一個我的朋友與幫助過我的人都能感受到我的謝意，希望將來在下也能有能力有機會為各位盡棉薄之力，謝謝各位！

摘要

Lcn2 是疏水性結合蛋白家族的一員，初期研究被認為是一急性期蛋白，許多的研究指出其參與了多種生理功能，包括免疫功能、細胞凋亡、細胞分化與增生與各種疾病的發生等。近期的研究則多集中於該蛋白與癌症之間的關係。由於先前有研究指出 Lcn2 參與了胚胎期的腎臟發育，本實驗著重於探討 Lcn2 在斑馬魚與小鼠的胚胎發育時的表現，利用 RT-PCR 技術與即時定量 PCR 分析了 Lcn2 基因在斑馬魚及小鼠各組織及不同胚胎期 Lcn2 的表現，發現在斑馬魚的胚胎受精後 10 小時開始表現，並持續表現到 72 小時。此外以小鼠為動物模式將研究重點集中於胚胎期腦部的發育過程 Lcn2 基因的表現時，利用 RT-PCR 與 qPCR 的技術，觀察了在不同胚胎期的腦部 Lcn2 的表現量，結果發現 E10.5 即有 Lcn2 基因的表現，但 E16.5 的胚胎腦部 Lcn2 基因表現量下降，到 E18.5 後表現量又恢復，在成鼠亦能持續表現。利用免疫沉澱法與西方墨點術觀察 Lcn2 蛋白的表現也有類似的結果，但在不同時期的胚胎腦組織中，Lcn2 蛋白表現量不多且不具顯著的差異。利用免疫染色法則無法觀察到小鼠胚胎期的腦部組織切片有 Lcn2 蛋白的表現，推測 Lcn2 基因在小鼠胚胎期的腦部表現量很低。Lcn2 是否在發育過程中有重要功能則仍有待進一步的研究。

Abstract

Lcn2 is a member of the lipocalin family and has been well known as an acute phase protein. Several evidences showed that Lcn2 is a multi-function protein, participating in such as immunity, apoptosis, ion transport, cell differentiation and proliferation. It may also be related to the occurrence of diseases. Subsequently, it has been found that the expression of Lcn2 gene triggered embryonic kidney development. The finding encourages us to characterize the Lcn2 expression in zebrafish and mice, and look for an animal model to elucidate the biological function of Lcn2. The mRNA level of Lcn2 in tissue distribution and stage profile of embryos in zebrafish and mice were analyzed by RT-PCR and Real-time PCR. Western blotting and immunohistochemical staining have performed for protein assay. The data showed that Lcn2 gene expression initiated in 10 hpf embryo and sustained till 72 hpf. Furthermore, with a mouse brain model, Lcn2 expressed in E10.5, decreased significantly in E16.5 but regained in E18.5, and expressed persistently in the mature mice. The results of immunoprecipitation and Western blotting technique coincided with the mRNA levels in these periods. Unfortunately, we did not find a significant protein expression in between the each stage of embryonic development, and neither in immunohistochemistry analysis. The data revealed that Lcn2 gene expressed in low level during the mouse brain development.

縮寫表

24p3R: 24p3 receptor

APR: acute phase response

APS: ammonium peroxodisulfate

BCP: bromochlopropane

BSA: bovine serum albumin

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

Ct: threshold cycle

DAB: 3,3,-diaminobenzidine

DTT: 1,4-DL-Dithiothreitol

EF1- α : elongation factor 1- α

EMT: epithelial to mesenchymal transition

ErbB2: Human Epidermal growth factor Receptor 2

EtBr: Ethidium Bromide

GAPDH: glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase

hpf: hours post fertilization

IHC: immunohistochemistry

IL-3: interleukin 3

IL-8: interleukin 8



IP: immunoprecipitation

I/R: ischemia-reperfusion

Lcn2: lipocalin 2

LPS: lipopolysaccharide

MCP-1: monocyte chemoattractant protein 1

MLLV: moloney murine leukemia virus

MMP9: matrix metalloproteinase 9

MMTV: mouse mammary tumor virus

mRNA: messenger ribonucleic acid

NGAL: neutrophil gelatinase-associated lipocalin

NF- κ B: nuclear factor κ B

PBS: Phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PDK-1: phosphoinositide-dependent kinase 1

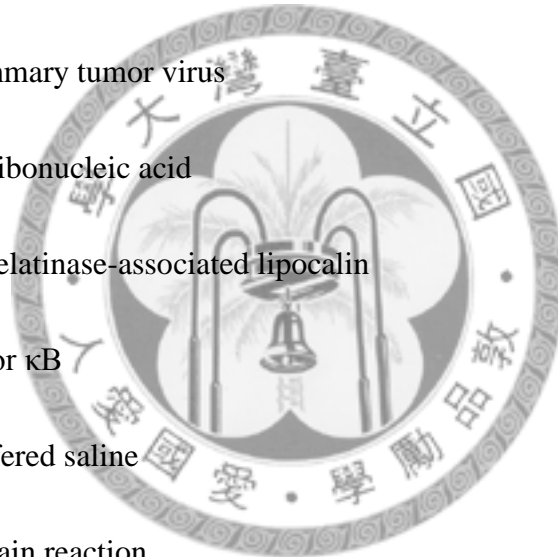
qPCR: quantitative polymerase chain reaction

RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction

SDS: sodium dodecyl sulfate

SV-40: simian virus 40

TBE: Tris/Borate/EDTA



TNF- α : tumor necrosis factor α

TSSK: testis specific serine/threonine kinase



目錄

謝辭	i
摘要	ii
Abstract.....	iii
縮寫表	iv
目錄	vii
第一章 緒論	1
關於 Lcn2.....	1
Lcn2 與急性期反應 (Acute phase response, APR).....	1
NGAL 為人類的 Lcn2.....	1
Lcn2 與細胞凋亡.....	2
Lcn2 與細胞存活.....	3
Lcn2 與癌症的關聯.....	4
Lcn2 廣泛的表現與多功能.....	5
實驗目標.....	6
第二章 材料與方法	7
材料.....	7
實驗方法.....	7
一、樣本組織的擷取與收集.....	7
二、RNA 萃取.....	8
三、洋菜膠電泳 (Agarose gel electrophoresis).....	9
四、反轉錄 (Reverse transcription)	10
五、聚合酶連鎖反應 PCR (polymerase chain reaction)	11
六、即時定量聚合酶連鎖反應 (Quantitative Real-time PCR)	12
七、組織蛋白質萃取.....	13
八、Pierce 660 nm 蛋白質定量法.....	13
九、十二酯硫酸鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis)	14
十、西方墨點 (western blotting).....	15
十一、免疫沉澱法 (immunoprecipitation)	17
十二、石蠟包埋.....	17
十三、免疫組織化學染色法 (immunohistochemistry)	19
第三章 結果	21

Lcn2 基因在斑馬魚各組織中的表現.....	21
Lcn2 基因在斑馬魚胚胎不同時期的表現.....	21
Lcn2 基因在小鼠各組織中的表現.....	22
Lcn2 基因在小鼠胚胎不同時期腦部的表現.....	22
Lcn2 蛋白在小鼠胚胎不同時期腦部的表現.....	23
Lcn2 蛋白在不同時期胚胎腦部表現的位置.....	24
第四章 討論	25
第五章 實驗圖表	28
圖一、Lcn2 基因在成熟斑馬魚組織中的分佈.....	28
圖二、斑馬魚胚胎發育過程中不同時期之 Lcn2 的表現.....	29
圖三、Lcn2 在成熟小鼠組織中的分佈.....	30
圖四、小鼠胚胎發育過程中不同時期之胚胎腦部的 Lcn2 基因表現.....	31
圖五、小鼠不同胚胎期腦部 Lcn2 基因的表現，以即時定量 PCR 觀察.....	32
圖六、小鼠在不同胚胎期腦部之 Lcn2 蛋白質的表現量.....	33
圖七、小鼠在不同胚胎期腦部之 Lcn2 蛋白表現位置.....	34
附圖	35
附錄	37
參考文獻	39



第一章 緒論

關於 Lcn2

Lipocalin 2 (Lcn2) 是疏水性分子結合蛋白家族 (lipocalin family) 中的一員，且大多為分泌蛋白。在此家族中的蛋白一級結構變異很大，但擁有相似的三級結構。它們都具有 8 個反平行的 β -sheet 結構組成杯狀立體結構 (8-stranded antiparallel β barrel)，此杯狀結構中可能具有疏水性受質 (ligand) 結合部位。推測這類胞外蛋白 (extracellular protein) 可運輸或是與細胞表面之受器 (receptor) 結合，在細胞的生理功能調節、增生與分化的過程中扮演重要的角色 [1-4]。

Lcn2 與急性期反應 (Acute phase response, APR)

在小鼠研究中首次發現被 SV40 病毒感染的初級培養腎臟細胞有 Lcn2 基因之 mRNA 大量表現，該基因被稱為 24p3，被認為是一致癌基因 [5, 6]。亦有研究認為 24p3 是一種急性期蛋白 (acute phase protein)，在 LPS (lipopolysaccharide) 或 TNF α 等已知的急性發炎反應因子刺激之下，可觀測到 24p3 的表現量上升。生物在發炎或是受到壓力刺激如手術、創傷、病毒感染，或是帶來壓力的因子 (stressful agent) 大量增加時，急性期反應所產生的蛋白可促進生物快速反應以進行修補並減少傷害產生 [7, 8]，Lcn2 則可能扮演此一角色。

NGAL 為人類的 Lcn2

Lcn2 在人類命名為嗜中性球膠原蛋白酶結合蛋白 (neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)，因為其與嗜中性球膠原蛋白酶以雙

硫鍵結合而命名之〔9〕。NGAL 是一個 25kd 大小的醣蛋白(glycosylated protein)，可藉由一個半胱氨酸(cystein)與膠原蛋白酶形成異質二聚體(heterodimer)。NGAL 平常以單體(monomer)、同型二聚體(homodimer)的型式，或是與膠原蛋白酶形成異質二聚體(heterodimer)，儲存於中性粒球的專一性顆粒(specific granules of neutrophils)中〔10〕。

然而在 Lcn2 表現的調節上，人類與老鼠間似乎存在著很大的差異。老鼠的 24p3 是一種由肝臟或脂肪組織合成的急性期蛋白(acute phase protein)，但 NGAL 在人類的表現則沒有急性期蛋白的特性〔11〕。

Lcn2 的表現與先天免疫(innate immunity)功能有關，能抑制生物體受細菌感染。Lcn2 的結合位與鐵離子螯合物(siderophore)有強的結合能力，siderophore 是微生物合成之鐵離子載體，微生物藉由 siderophore 與鐵離子的螯合(chelate)能力從環境中獲得鐵離子使細菌順利生長。Lcn2 與含鐵的 siderophore 結合後，使得細菌無法從環境中獲得鐵離子而無法生存，詳細的分子機制則仍有待研究〔12-15〕。

Lcn2 與細胞凋亡

小鼠 FL5.12 pro-B 血球細胞在不含白細胞介素 3(interleukin 3, IL-3)的培養液中培養時，可發現 Lcn2 的轉錄表現量達到最大，此時細胞會進行細胞凋亡(apoptosis)。利用含 Lcn2 蛋白的培養液培養 Pro-B 細胞，即使加入了白細胞介素 3，仍然會有細胞凋亡的發生，表示 Lcn2 蛋白可能會引發細胞凋亡〔16〕。此一現象和本實驗室先前在 RL-95-2 子宮內膜細胞所觀察的結果是類似的〔17〕。因此可知 Lcn2 和細胞凋亡的相關性。

Bong 等人在乳腺細胞的研究則發現在乳腺細胞退化(involution)時，可觀測到 Lcn2 基因的大量表現。HC11 乳房表皮細胞在缺乏血清的培養條件下，會進行細胞凋亡，此時也可發現 Lcn2 的產生，且將 Lcn2 基因轉殖到 HC11 乳房表皮

細胞株，可發現細胞凋亡數量會上升 3 至 4 倍 [18]。表示 Lcn2 可誘發不同種類的細胞進行細胞凋亡，至少不只限於血液細胞。

本實驗室先前研究發現，人類子宮內膜 RL95-2 細胞株在無血清 (serum free) 或是加入氟美松 (dexamethasone) 等模擬環境壓力的情況下，Lcn2 量會隨著時間提高，顯示環境壓力會造成 Lcn2 的表現。若在 RL-95 的培養基中加入 Lcn2，細胞的存活率會下降。加入 Lcn2 使得細胞內活性氧 (reactive oxygen species) 濃度增加，造成粒線體膜電位下降與細胞色素 c 的釋放，半胱天冬酶 (caspase) 8, 9 與 3 濃度增加造成細胞凋亡 [17]。

Lcn2 可能藉由自泌 (autocrine) 作用或是旁泌 (paracrine) 作用促使細胞進行凋亡 (apoptosis)。當 Lcn2 與帶有鐵離子的 siderophore 結合 (holo-Lcn2) 後，與受器 24p3R (24p3 receptor) 結合，經由內吞作用 (endocytosis) 進入細胞時，Lcn2 將會釋放攜帶的鐵離子，提高細胞內的鐵離子濃度，使 Bim 的表現量下降，以抑制細胞凋亡的發生。反之，當沒有與任何分子結合的 Lcn2 (apo-Lcn2) 藉由內吞作用進入細胞時，將會與細胞內的 siderophore 結合，並將 siderophore 與鐵離子一起帶出細胞外，造成細胞內的鐵離子濃度下降，使細胞中 Bim 等促使細胞凋亡的蛋白質濃度上升，促使細胞進行凋亡 [19]。

Lcn2 與細胞存活

亦有研究認為 Lcn2 也可能是細胞存活因子 (survival factor)。人類角化細胞 (keratinocyte) 中的 Lcn2 被 IGF 與 TGF- α 等生長因子強烈誘導其濃度上升，此過程被認為與傷口癒合有關 [20]。使用 PDK-1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) 抑制劑處理人類肺癌細胞株 A549 會造成細胞凋亡且可觀察到 Lcn2 的 mRNA 表現量上升。若將 Lcn2 轉殖到 A549 細胞株，使之大量表現 Lcn2 蛋白，則可有效減少 PDK-1 抑制劑所造成的細胞凋亡發生 [21]。

本實驗室以人類子宮內膜細胞株 RL-95 進行研究也發現 Lcn2 可能是存活因子。以純化自小鼠子宮液的 Lcn2 處理 RL-95 細胞株，24 小時可發現 DNA 片段化(DNA fragmentation)，該現象將造成細胞凋亡。然而在 Lcn2 處理 48 小時至 72 小時後，可發現細胞減少的速度趨緩，且細胞中 caspase 3 的活性在 24 小時到 72 小時間逐漸下降，這使得細胞凋亡的現象減緩。表示 Lcn2 可能誘導了某些生長因子以阻止細胞凋亡繼續發生。後續的結果顯示 Lcn2 可能藉由誘導 IL-8 與 MCP-1 的產生來阻止細胞凋亡的發生（未發表的數據）。

從上所述可推測，Lcn2 可能在不同的環境中對不同的細胞造成不同的影響，此一複雜的生理反應是本實驗室致力於此分子研究之原因。

Lcn2 與癌症的關聯

當細胞中存活因子過度表現，便可能造成細胞過度增生形成癌症。目前許多關於 Lcn2 的研究都著重於該蛋白與各種癌症的發生，或是入侵 (invasion)、轉移 (metastasis) 能力之間的關聯。Lcn2 廣泛在各種人類癌症中表現，包括乳癌、結腸癌、胰臟癌與卵巢癌等都可發現 Lcn2 較高的表現量 [21-24]。Lcn2 也被發現在甲狀腺癌細胞中大量表現。在甲狀腺癌細胞中，NF- κ B 是持續表現的存活因子。若使用藥物抑制 NF- κ B，則細胞將進行凋亡。研究指出該存活因子的下游之一便是 Lcn2，當 NF- κ B 被抑制時，Lcn2 表現量也大量下降。降低 (knock down) Lcn2 表現可阻止細胞株在培養基上的生長，也抑制腫瘤在老鼠身上的形成。推測 NF- κ B 可能誘導 Lcn2 的表現，並藉由 Lcn2 攜帶鐵離子的能力使得癌細胞得以存活 [25]。

在人類的乳癌病症中，Lcn2 的表現量上升會使病患的存活率下降 [26]。使用 MMTV (小鼠乳腺腫瘤病毒)-ErbB2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2，人類表皮生長因子受器 2，在入侵性乳癌細胞中大量表現的蛋白) 基因轉殖小鼠做為實驗素材，若將 Lcn2 基因剔除 (knock out)，相較於正常表現沒有剔

除 Lcn2 基因的基因轉殖小鼠，可觀測到乳癌細胞的生成與轉移都明顯的延遲。實驗發現 Lcn2 為 ErbB2 的下游，ErbB2 藉由調控 Lcn2 的表現，影響癌細胞入侵與轉移的能力〔27〕。

Lcn2 蛋白大量表現會誘導 EMT (epithelial to mesenchymal transition, 上皮細胞轉換成間質細胞) 發生。EMT 是癌細胞發展與轉移前期的重要過程。研究指出 Lcn2 會與 MMP9 (matrix metalloproteinase 9) 結合，可使本來甚不穩定的 MMP9 自我降解 (auto-degradation) 減少發生，而 MMP9 具有促進 EMT 發生的能力，為癌細胞血管新生、入侵與轉移的重要因子。因此推測 Lcn2 可能藉由穩定 MMP9 並使之活化，增進了癌細胞入侵與轉移的能力。然而也有研究持相反意見，認為 Lcn2 可抑制癌細胞的入侵與血管新生〔28〕。Lcn2 與癌症之間的關聯與其詳細分子機制仍然有待研究〔27, 29-32〕。

Lcn2 廣泛的表現與多功能

除了上文提到的 Lcn2 的廣泛表現與功能外，Lcn2 還在許多疾病中表現量上升〔33-35〕。腎臟受到損害時，Lcn2 濃度會升高，目前已被當作腎臟受損的生物標誌 (biomarker)〔36〕。Lcn2 可能在腎臟 I/R (ischemia-reperfusion, 缺血後的血液回流，將造成腎臟細胞的損害) 的恢復期 (recovery phase) 幫助腎臟細胞的新生，Lcn2 可能藉由調節細胞因子 (cytokine)，使細胞繼續存活並分裂新生〔37〕。

Lcn2 的表現甚至與胚胎發育有關，在胚胎期腎臟的發育過程中可發現 Lcn2 的表現。更有學者認為 Lcn2 運送鐵離子的能力可能對於腎前驅細胞 (renal progenitor cell) 進行上皮化 (epithelialization) 與分化成腎元 (nephron) 有所幫助〔38, 39〕。

另有研究認為 Lcn2 在星狀細胞增生 (astrocytosis) 時會表現〔40〕。星狀細胞 (astrocytes) 是腦部神經膠質 (glial) 細胞中數量最多的一種。星狀細

胞提供神經元代謝所需之養分並調節突觸的活動，同時也對中樞神經出現的緊急情況例如缺血、受傷、感染與神經變性 (neurodegeneration) 作出反應 [41]。Lcn2 已被廣泛研究但關於其表現與功能至今仍莫衷一是，其廣泛的表現與眾多功能仍需要更多的研究去發掘與證實。

實驗目標

已有研究指出 Lcn2 跟腎臟發育的關聯 [38, 39]，且 Lcn2 誘發細胞凋亡的能力也可能在發育、分化的過程中扮演重要角色，因此本實驗試圖了解 Lcn2 與發育之間的關聯性。目前還沒有針對 Lcn2 在斑馬魚的表現或是對發育影響的研究。斑馬魚的胚胎發育快速，且透明易於觀察，適合作為研究發育的模式生物 (animal model)。因此先了解 Lcn2 在成魚各種不同組織或是器官，以及在不同時期胚胎的表現狀況，再進一步的觀察 Lcn2 在小鼠發育中的表現作為對照。且由於已有研究認為 Lcn2 會在小鼠腦部表現 [40]，因此以小鼠為模式動物的研究將集中於胚胎期的腦部。希望能藉由觀察 Lcn2 在斑馬魚與老鼠兩不同物種的表現 (不同物種間的 Lcn2 胺基酸序列請見附錄一)，對 Lcn2 在發育過程中扮演的角色及功能有更詳細的了解。

第二章 材料與方法

材料

AB strain 斑馬魚：

AB strain 斑馬魚 (zebrafish) 購自邵港生技公司後自產，飼養於光照 14 小時黑暗 10 小時，攝氏 28 度恆溫之水槽中。3 月大的斑馬魚可用於交配用途，交配前一晚分別取公魚與母魚各 3 隻放入有隔板隔開的交配缸中，隔天早上將隔板取出使公魚與母魚得以交配產卵，卵會透過缸中的孔洞掉落底部以免被吞食，收集產後胚胎供實驗或繁殖用。

ICR 小鼠：

ICR 小鼠購自台大動物中心後自產，飼養於光照 14 小時黑暗 10 小時之定溫動物房。提供充足的飲水與飼料，固定每星期清理排泄物一次。使用 8~12 週大之公鼠與母鼠交配，欲交配當晚將公鼠 1 隻與母鼠 2 隻放入飼養箱內，小鼠將於半夜進行交配，隔天早上觀察交配栓的形成確認交配已進行。

實驗方法

一、樣本組織的擷取與收集

【試劑】

10X PBS (UniRegion Bio-Tech, Lot. # PBS001-5A)

37% formaldehyde (Merck, cat. # 1.04003.1000)

【儀器】

立體顯微鏡 (1X, OLYMPUS SZX7 Stereomicroscopy)

【方法】

1. 擷取成熟斑馬魚的組織：

將成熟斑馬魚置於 4℃ 中將之犧牲，分別取公魚與母魚各 6 隻，在顯微鏡下操作取出眼、腮、皮膚、肌肉、心臟、腦、肝臟、腎臟、脾臟、小腸、卵巢與睪丸，以 1X PBS 清洗後保存於-70℃。

2. 收集斑馬魚不同時期胚胎：

於產卵後記時，分別收集 2h、5h、10h、18h、24h、48h、72h 的胚胎一次約 30~50 個，以 PBS 清洗後保存於-70℃。

3. 擷取成熟小鼠的組織：

將成熟小鼠斷頸犧牲後，分別取下公小鼠與母小鼠的各組織，以液態氮冷凍後保存於-70℃。

4. 擷取小鼠不同時期之胚胎、出生後小鼠與成鼠腦部：

小鼠於半夜交配，隔天早上以交配栓的形成確認交配已進行，認定為 E0.5 (懷孕後 0.5 天之胚胎)。分別於 E6.5、E10.5、E14.5、E15.5、E16.5、E17.5、E18.5 以斷頸法犧牲懷孕母鼠取出胚胎後擷取腦部 (E6.5 擷取整個胚胎，E10.5 胚胎太小僅取頭部)。母鼠懷孕後約 20 天會產下小鼠，認定為 D0 (出生當天)，分別取下 D0、D2 與成熟小鼠的腦部。取下的組織以液態氮冷凍後存於-70℃，或是在取下組織後將之置於 4% 中性甲醛固定液中。

二、RNA 萃取

【試劑】

TRI-reagent (Pan Asia Biomedical Technology Inc, Cat.# TB 126)

bromochloropropane (Pan Asia Biomedical Technology Inc, Cat.# BP 151)

Ethanol (J.T Baker, Cat.# 8006-05)

Isopropanol (Sigma I9516)

RNase-free water (Bioman WAT0500)

【儀器】

分光光度計 (General Electric Company, GeneQuant 1300)

離心機 (KUBOTA 1720)

【方法】

1. 將組織至於 500 μ l 的 TRI-reagent 中，使用 tissue-lyser (QIAGEN) 將之磨碎，磨碎後靜置 5 分鐘，加入 50 μ l 的 BCP (bromochloropropane)，充分混合後至於室溫 15 分鐘。
2. 以 13000 rpm 在攝氏 4 度離心 15 分鐘，取出上層透明溶液，組織中之 RNA 溶解於此，將之轉移到新的 RNase-free 之 1.5ml 離心管中。
3. 加入 250 μ l 之異丙醇(isopropanol)，充分混合後靜置於攝氏 4 度 10 分鐘。
4. 以 14000rpm 在攝氏 4 度離心 10 分鐘，移除上清液，加入 75%酒精以 14000rpm 在攝氏 4 度離心 10 分鐘。
5. 移除上清液後，待試管內的酒精風乾，加入適量 RNase-free water (約 30~40 μ l) 在 60°C 回溶約 10 分鐘。
6. 以分光光度計測量 RNA 濃度。

三、洋菜膠電泳 (Agarose gel electrophoresis)

【試劑】

5X TBE (One-Star Biotech., Cat.# BF 100-013-1L)

Agarose (Lamda Biotech., Cat.# A113-3)

Ethidium Bromide (EtBr)(Sigma-Aldrich, Cat.,# E-8751)

【方法】

1. 使用 1XTBE 緩衝液配置 1~1.8%的洋菜溶液，加熱溶解後，倒入鑄膠模中，插入齒模後待其凝固成膠體。
2. 膠體凝固後放置於電泳槽內，倒入 1X TBE 緩衝液至蓋住膠體為止
3. 將分子量 marker 與樣本置入膠體凹槽。
4. 將電源開至 100V 電壓，20 分鐘。
5. 將膠體置於 EtBr 染劑中搖晃約 10 分鐘。
6. 使用紫外光觀察結果並記錄，視情況決定是否褪染。

四、反轉錄 (Reverse transcription)

【試劑】

MMLV Reverse transcriptase (EPIGENTRE, Cat. # M6125H)

MMLV Reverse transcriptase 10X buffer (EPIGENTRE, Lot. # M62-60733)

DTT (EPIGENTRE, Lot. # M62-50627)

Random primer (Invitrogen, Lot. # 464358)

dNTP

【儀器】

PCR machine (Applied Biosystem, 2720 Thermal Cycler)

【方法】

將 1 μ g RNA 與以下藥劑按照比例混合

10X buffer	2.5 μ l
100mM DTT	2.5 μ l

20mM dNTP	2.5μl
10X random primer	2μl
RTase	1μl
RNA + RNase-free water	14.5μl
Total volume	25μl

37°C 反應 1 小時，將 cDNA 保存於-20°C

五、聚合酶連鎖反應 PCR (polymerase chain reaction)

【試劑】

2X Taq DNA polymerase Mastermix RED (Bioman, cat. # RT803)

【儀器】

聚合酶連鎖反應機器 (Applied Biosystems. 2720 Thermal Cycler)

【方法】

將 75~100ng 之 cDNA 與以下藥劑按照比例混合

2X Taq Polymerase Master Mix Red	10μl
Primer forward 2μM	1μl
Primer reverse 2μM	1μl
cDNA + water	8μl
Total volume	20μl

反應條件如下：

Steps	Temperature	Time	Cycles
Initiation	94°C	10 min	1 cycle
Denaturation	94°C	30 sec	28~35 cycles
Annealing	58~60°C	30 sec	28~35 cycles
Extension	72°C	1 min	28~35 cycles
Final extension	72°C	10 min	1 cycle

使用之 primer 參見附錄二。

六、即時定量聚合酶連鎖反應 (Quantitative Real-time PCR)

【試劑】

Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Cat.# 4367659)

【儀器】

Applied Biosystems 7300

【方法】

1. 加入 SYBR Green PCR Master 10 μ l，5ng cDNA 與 100nM 的 primer，最後反應體積為 20 μ l。
2. 95°C 10 分鐘，之後三步驟：95°C 15 秒，60°C 30 秒，72°C 分鐘，重複 40 個循環。
3. 相對定量：

$$\Delta Ct = Ct(\text{基因}) - Ct(\text{actin})$$

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct(\text{實驗組}) - \Delta Ct(\text{控制組})$$

$$\text{相對表現量 (relative expression)} = 2^{- (\Delta \Delta Ct)}$$

使用之 primer 參見附錄二。

七、組織蛋白質萃取

【試劑】

RIPA lysis buffer (50mM Tris-HCL, 1% DOC, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 150 mM NaCl pH 7.4, 4°C)

Protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Cat.# 11 679 498 001)

【儀器】

TissueLyser II (Qiagen)

【方法】

1. 將組織浸泡於適量 RIPA lysis buffer 中，並加入 1X protease inhibitor cocktail tablets，後將組織使用機器打碎。
2. 離心 12000 g，4°C，10 分鐘。收集上清液保存於-20°C。
3. 做蛋白質定量 (Pierce 660nm 蛋白質定量法)。

八、Pierce 660 nm 蛋白質定量法

試劑：

Pierce 660 nm protein assay reagent (thermo scientific Lot # JK127961)

Bovine serum albumin (BSA) (Sigma, Cat.#A7888)

儀器：

ELX 808 ultra microplate reader

方法：

1. 以 0 μ g、2 μ g、4 μ g、8 μ g、10 μ g BSA 溶於 10 μ l 做為定量標準。
2. 所有受測實驗樣本各取出 1 μ l 加上 9 μ l 的水。
3. 不同濃度的 BSA 與受測實驗樣本各加入 150 μ l 的 Pierce 660 nm protein assay reagent，反應 5 分鐘。
4. 使用 microplate reader 測吸光值 660 nm。
5. 使用不同濃度的 BSA 的數值做出標準曲線(standard curve)，將實驗樣本之數據內插該標準曲線得到正確濃度。

九、十二酯硫酸鈉-聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis)

【試劑】

40% Acrylamide/Bis-acrylamide solution (29:1) (LAMDA Biotech., Cat.# A107-1)

Ammonium Persulfate (APS) (Merck, Cat.#1.01201)

Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (Sigma, Cat.#4390)

4X Resolving Gel Buffer Solution (BIONOVAS., Lot.#9A0508)

4X Stacking Gel Buffer Solution (BIONOVAS., Lot.#9A0212)

10X TG-SDS Buffer (AMRESCO®, Cat.# 0783)

【方法】

1. 將玻片、鋁板與間隔器清理乾淨後架好鑄膠器，並測漏。

2. 按照配方配置下層膠，混合均勻後加入鑄膠器內置適當高度，以水將膠面壓平。
3. 膠體凝固後將水倒出。
4. 按照配方配置上層膠，混合均勻後加入鑄膠器中的空間，置入齒模。
5. 待膠體凝固後，將膠體連同玻片、鋁片與間隔器置於電泳槽中，加入 1X SDS 電泳緩衝液置電泳槽中。
6. 將實驗樣本與樣本緩衝液混合，95℃加熱 5 分鐘。
7. 以電壓 120 伏特進行電泳。

5ml，15% 下層膠體

試劑	體積
二次水	1.875ml
40% acrylamide solution	1.875ml
4X 下膠緩衝液	1.25ml
10% APS	50μl

2ml，5%上層膠體

試劑	體積
二次水	1.48ml
40% acrylamide solution	0.25ml
4X 上膠緩衝液	0.25ml
10% APS	20μl

十、西方墨點 (western blotting)

【試劑】

PBST (3.2 mM Na_2HPO_4 , 0.5 mM KH_2PO_4 , 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4)

Transfer buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM glycine, 20% methanol)

Blocking buffer : 3% BSA in PBST

Hybond-C extra (Amersham Bioscience, Cat.# RPN303E)

Rabbit anti-mouse Lcn2 antibody 1:5000

Rabbit anti-mouse GAPDH antibody 1:5000 (Abcam, lot.# 808033)

Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody 1:10000 (Cell signaling, #7074)

【儀器】

Kodak X-OMAT 2000

LV FX7 image system



【方法】

1. 電泳結束後，將上膠切除。
2. 將適當大小之轉印紙與下膠夾於有海棉墊之轉印夾中，轉印紙在正極方向，膠體在負極方向。
3. 將轉印夾置於裝滿轉印緩衝液之轉印槽中，以17伏特電壓在4°C轉印16小時。
4. 轉印結束後，將轉印紙置於阻隔緩衝液 (blocking buffer) 中，反應一小時。
5. 倒去溶液，加入溶於阻隔緩衝液之一級抗體，在4°C反應16小時。
6. 以PBST清洗轉印紙，室溫下清洗三次，每次10分鐘。
7. 加入溶於阻隔緩衝液之二級抗體，室溫下反應1小時。
8. 以PBST清洗轉印紙，室溫下清洗三次，每次10分鐘。

9. 以ECL呈色。

十一、免疫沉澱法 (immunoprecipitation)

【試劑】

Protein A-agarose macrobeads (Sigma, Cat. #1925)

10X PBS (UniRegion Bio-Tech, Lot. # PBS001-5)

Protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Cat. # 11 679 498 001)

【方法】

1. 取各組織萃取出蛋白質 150 μ g，加入蛋白酶抑制劑後，加入 1X PBS 至體積為 300 μ l。
2. 取 10 μ l protein A beads 加入準備好的蛋白質樣本中，反應一小時。
3. 以 3000rpm 離心 1 分鐘，保留上清液。
4. 取 20 μ l 的 protein A beads，以 PBS 清洗後加入樣本蛋白質中。
5. 取 3 μ g 的一級抗體加入混合了 protein A beads 的樣本蛋白質中，於 4 $^{\circ}$ C 反應 16 小時。
6. 以 3000rpm 離心 1 分鐘，移除上清液。
7. 將留下的 beads 加入樣本緩衝液，以 95 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘，準備進行電泳。

十二、石蠟包埋

【試劑】

Ethanol absolute (SIGMA-ALDRICH®, Lot. # SZE93060)

Xylene (J.T.baker, Cat. # 9490-03)

Paraplast Plus* Tissue Embedding Medium (Kendall, Tyco Healthcare, Cat. #

8899-502004)

Silane-Prep Slides (Sigma, Cat. # S4651-72EA)

【儀器】

標準切片機 (Microm, HM 360)

切片漂浮水槽 (Medax, 31479)

【方法】

1. 將固定好的組織從甲醛固定液中取出，進行脫水步驟：

80% 酒精	1 小時
更新 80%酒精	1 小時
90%酒精	1 小時
更新 90%酒精	2 小時
100%酒精	1 小時
100%酒精	2 小時

脫水完成後，進行透明步驟

2. 透明：

Xylene	1 小時
更新 xylene	2 小時

3. 然後進行滲蠟與包埋：

65°C 中滲蠟	2 小時
換新蠟 65°C 中滲蠟	2 小時
將樣品換至新蠟後冷卻形成蠟塊	

4. 將蠟塊修成適當形狀，使用切片機切成厚度約 5-7 μ m 的切片，置於 40~44°C 之溫水槽中，使之攤平。
5. 使用玻片將切片撈起並貼平在玻片上的適當位置，將貼好切片的玻片以 42°C 加熱至水分完全去除。

十三、免疫組織化學染色法 (immunohistochemistry)

【試劑】

Ethanol absolute (SIGMA-ALDRICH®, Lot. # SZE93060)

Xylene (J.T.baker, Cat. # 9490-03)

Harris hematoxylin solution, modified (SIGMA-ALDEICH, Lot. # 116K4353)

10X PBS (UniRegion Bio-Tech, Lot. # PBS001-5A)

PBST (3.2 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.4)

Blocking buffer : 3% BSA in PBST

30% H₂O₂ (Merck, Cat. # 1.07210.1000)

3,3'-DIAMINOBENZIDINE (DAB) (SIGMA, Lot. # 91H3682)

Acetone (J.T. Baker, Lot. # H10B06)

Rabbit anti-mouse Lcn2 antibody 1:50

Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody 1:200 (Cell signaling, #7074)

Silane-Prep Slides (SIGMA-ALDEICH, Lot. #116k4370)

【儀器】

玻片加熱器 (Boeckel, 24000)

冷卻式彩色攝影機 (Olympus, DP71)

【方法】

1. 將貼附好切片的玻片加熱烘乾。
2. 將組織切片置於二甲苯中脫蠟 30 分鐘。
3. 復水 (rehydration) 步驟：分別依順序以 100%、90%、80%、70%、50%、30% 與 10% 的酒精各處理 10 分鐘，再以二次水處理兩次，每次 10 分鐘。
4. 以 -20°C 丙酮處理 5 分鐘。
5. 二次水處理 5 分鐘。
6. 以含 1% 雙氧水的 PBS 處理 20 分鐘，並以 PBS 清洗三次，每次 5 分鐘。
7. 以阻隔緩衝液處理約 1 小時。
8. 以 PBST 清洗 3 次，每次 15 分鐘。
9. 加入以 1:50 的稀釋比例溶於阻隔溶液之一級抗體，4°C 反應 16 小時。
10. 以 PBST 清洗 3 次，每次 15 分鐘。
11. 加入以 1:200 的稀釋比例溶於阻隔緩衝液之二級抗體，於室溫反應 2 小時。
12. 以 PBST 清洗 3 次，每次 15 分鐘。
13. 將玻片置於溶於 PBS 之 DAB 溶液 (1mg/ml) 中進行呈色約 20 分鐘。
14. 水洗約 90 秒。
15. 使用蘇木紫 (hematoxylin) 染色約 5 秒，再水洗 15 分鐘。
16. 依序以 80%、90%、100% 的酒精脫水後與二甲苯反應，每一步驟約 10 秒。
17. 以等體積的 PBS 與甘油充分混合之液體進行封片，後以顯微鏡觀察並照相。

第三章 結果

Lcn2 基因在斑馬魚各組織中的表現

為了瞭解 Lcn2 在斑馬魚的成魚的表現部位，我們觀察 Lcn2 的 mRNA 在魚體各組織的表現情形。分別將 6 隻成熟的公、母的斑馬魚的眼、鰓、皮膚、肌肉、心臟、腦、肝臟、腎臟、脾臟、小腸、卵巢與睪丸取下，後萃取各組織與器官的 RNA，進行 RT-PCR（反轉錄-聚合酶連鎖反應）觀察 Lcn2 之 mRNA 表現量，以各組織 GAPDH 的 mRNA 表現量做為內部對照（internal control）。結果發現在公魚與母魚中，Lcn2 的 mRNA 在肝臟均具有最高的表現量，腦、脾臟、小腸與生殖器官 Lcn2 的 mRNA 也都有次於肝臟的多重表現，腎臟、眼、鰓、皮膚、肌肉與心臟等器官與組織則表現量較低（圖一）。此結果顯示 Lcn2 基因在斑馬魚的成魚組織中可廣泛的表現。

Lcn2 基因在斑馬魚胚胎不同時期的表現

斑馬魚的胚胎發育大約在受精的 72 小時後會發育完成〔42〕，因此我們分別收集受精後 2 小時、5 小時、10 小時、18 小時、24 小時、48 小時與 72 小時(hpf) 等不同時期之胚胎約 50 個，萃取其 RNA，進行 RT-PCR 觀察 Lcn2 之 mRNA 表現量。由於 GAPDH 在胚胎發育的各時期表現量不一，因此以各時期胚胎之 EF1- α 作為內部對照。結果發現 Lcn2 基因在受精後 10 小時的胚胎表現最多，18 hpf（受精後小時數）表現量相較於 10 hpf 是相對較低的，24 hpf 表現量更低，從 48 hpf 至 72 hpf 的 Lcn2 表現量則是隨著時間升高，2 hpf 及 5 hpf 則未發現 Lcn2 基因的表現（圖二）。10hpf 的胚胎剛結束原腸胚形成（gastrulation），開始體節（somite）的形成、尾出現、器官形成與中樞神經發育，其中腦是上述器官中最早開始發育的〔42〕，推測 Lcn2 的表現可能跟包括腦部的上述器官或部位的生長發育有關。Lcn2 在 24 hpf 到 72 hpf 的表現量逐漸上升，顯示在器官逐漸發育

完成後，Lcn2 可能持續的表現。

既已得知 Lcn2 的基因在成熟的斑馬魚各組織以及不同時期胚胎的表現狀況，若要進一步了解該基因表現的功能與其造成的影響，就必須了解蛋白質的表現情形。然而現在並沒有可用的斑馬魚 Lcn2 蛋白的抗體，因此改使用本實驗室較為熟悉且身為哺乳類的小鼠(mouse)作為模式動物，以進行進一步的實驗與研究。

Lcn2 基因在小鼠各組織中的表現

為了瞭解 Lcn2 在成熟小鼠的表現位置，我們觀察 Lcn2 的 mRNA 在小鼠各組織的表現情形。將成熟的公小鼠與母小鼠的腦、心臟、肺、肝臟、脾臟、腎臟、小腸、結腸、膀胱、睪丸、副睪、儲精囊、卵巢、輸卵管、子宮、子宮頸與陰道取下，後萃取各組織的 RNA，進行 RT-PCR（反轉錄-聚合酶連鎖反應）觀察 Lcn2 之 mRNA 表現量，以各組織 β -actin 的 mRNA 表現量做為內部對照（internal control）。結果發現在母小鼠的各組織中，輸卵管具有最高的 Lcn2 表現量，公小鼠中則是副睪的表現量最高，在母小鼠中卵巢、肝臟、子宮、心臟具有低於輸卵管的次高 Lcn2 表現量，公小鼠中則是睪丸、肺、儲精囊的表現量次高，腦、肺、脾臟、膀胱與子宮頸在母小鼠中也都觀察的到 Lcn2 的表現，公小鼠可在肝臟、結腸、膀胱觀察到較低的 Lcn2 表現量，其餘的組織則是沒有 Lcn2 基因表現或是表現量很低。（圖三）此結果顯示 Lcn2 基因在小鼠的各組織中亦有廣泛的表現。

Lcn2 基因在小鼠胚胎不同時期腦部的表現

研究指出 Lcn2 在星狀細胞增生（astrocytosis）時會表現〔40〕。且由於在先前實驗中發現 Lcn2 基因在 10 hpf 的斑馬魚胚胎中會表現，此時腦部正開始發育。而在上述的實驗中我們也發現 Lcn2 在成熟小鼠中有表現，因此我們希望了解 Lcn2 的表現是否也對小鼠的胚胎腦部發育有影響。

為了了解 Lcn2 基因在不同時期小鼠胚胎腦部的表現情形，我們將胚胎的腦部取下，萃取其 RNA，進行 RT-PCR 來觀測 Lcn2 在小鼠胚胎腦部 mRNA 表現量的差異。小鼠的懷孕週期為 20 天，小鼠的中樞神經發育是從 E9~10（懷孕後第 9 天）開始 [43]。然而 E9.5 或是 E10.5 的頭部非常的小，無法取發育中的腦部，所以之後的實驗截取胚胎的頭部作為取樣的對象，在此實驗則分別收取 E14.5、E16.5、E18.5、D0（出生當天）與 D2（出生後兩天）的腦組織，萃取 RNA 後進行 RT-PCR。結果發現 Lcn2 基因在 E14.5 時開始有表現，E18.5、D0 與 D2 的腦部都可以觀測到 Lcn2 基因的表現，但在 E16.5 天的時候表現量卻驟減（圖四）。

接著我們使用 E14.5、E16.5、E18.5、D0、D2 與成熟小鼠的腦部的 cDNA 進行相較於 PCR 更為靈敏的即時定量 PCR 來觀測 Lcn2 在不同時期的 mRNA 表現量，發現 E16.5 腦組織中 Lcn2 基因表現量確實低於 E14.5、E18.5、D0 與 D2，其中以 E14.5 天的表現量最多，顯著高於 E16.5 表現量，E18.5、D0、D2 與 E14.5 沒有顯著差距。此外在成熟小鼠的腦部 Lcn2 基因表現量遠高於胚胎期（圖五）。此結果與圖四 RT-PCR 的結果吻合，顯示 Lcn2 的基因在 E16.5 的腦部相較於其他時期的胚胎，具有較低的表現量，且相較於胚胎期，Lcn2 基因在成熟小鼠的腦部表現量較多。

Lcn2 蛋白在小鼠胚胎不同時期腦部的表現

我們已藉由 RT-PCR 與即時定量 PCR 分析了解 Lcn2 基因的 mRNA 表現量，但轉錄的發生並不代表其產物 mRNA 一定會轉譯成蛋白質，而基因必須表現出蛋白質才可能具有生理功能。因此希望觀察 Lcn2 基因在不同時期的胚胎腦部實際的蛋白質表現量。收集 E10.5 的頭部，E14.5、E15.5、E16.5、E17.5、E18.5、D0 與 D2 的腦部，以及 E6.5 的整個胚胎與成熟小鼠的腦部，分別萃取腦組織的蛋白質，定量後進行電泳與西方墨點 (western blotting) 來觀察 Lcn2 蛋白質的表現量。經由西方墨點我們沒有辦法觀測到 Lcn2 在不同胚胎期腦部的表現，推測是因為

Lcn2 蛋白可能集中表現於特定區位，對整個腦部來說表現量可能太低無法以前述方法有效偵測。因此進一步利用 Lcn2 抗體以免疫沉澱技術 (immunoprecipitation, IP) 將組織全蛋白質中的 Lcn2 蛋白聚集析出進行電泳與西方墨點以分析 Lcn2 蛋白表現量的差異，並以各組織的 GAPDH 表現量為基準計算 Lcn2 的表現量。結果發現 E6.5 的胚胎 Lcn2 蛋白的表現量最高，在 E10.5 的頭部，E14.5、E15.4、E16.5、E17.5、E18.5、D0 與 D2 的腦部都可以觀測到 Lcn2 蛋白的表現，E10.5 天的頭部、E14.5 與 E15.5 的腦部 Lcn2 蛋白表現量較為接近，E16.5 的腦部表現量只有 E14.5 的 50% 左右，E17.5 的 Lcn2 表現量達到最低約 42%，E18.5 的表現量又再度回升到與 E14.5 差不多的表現量，出生當天的表現量與 E18.5 相近，出生後兩天的 Lcn2 表現量略為下降，與成熟小鼠的腦部表現量差不多但可見其能持續表現。由於數次實驗結果數據差異相當大，此為動物實驗難以避免的差異，但 E16.5 的腦部 Lcn2 表現量最少的趨勢是存在的，且與 mRNA 的表現量吻合 (圖六，此圖為代表性結果)。若要更進一步的了解 Lcn2 蛋白在不同時期胚胎腦部發育中所扮演的角色，就必須了解在這些時期中 Lcn2 蛋白質在腦部所表現的位置為何。

Lcn2 蛋白在不同時期胚胎腦部表現的位置

為了解 Lcn2 蛋白在不同時期胚胎腦部表現的位置，利用 Lcn2 抗體進行免疫組織染色實驗 (immunohistochemistry, IHC)。先將取下 E14.5、E16.5、E18.5 與 D0 等不同時期胚胎腦部儲存在中性甲醛固定液中，經由脫水、滲蠟、封蠟後進行切片 (7 μ m)，然後針對目標蛋白 Lcn2 進行染色。結果我們無法觀察到 Lcn2 蛋白在不同胚胎期腦部的任一特定部位有表現 (圖六)。推測 Lcn2 蛋白的表現量在胚胎時期的腦部可能相當低，且沒有集中表現在特定部位。

第四章 討論

在 Yang et al. 的研究中發現 Lcn2 參與了胚胎期的腎臟發育 [38, 39]，且 Lcn2 促進細胞凋亡 (apoptosis) 的能力 [16-19] 有可能會跟發育與分化過程中的族群數量控制 (population control) 有關，然而目前的研究對於 Lcn2 與胚胎發育之間的關係著墨甚少，本次實驗便是針對 Lcn2 與發育間的關係作研究與探討。

本次實驗初期使用斑馬魚作為模式動物 (animal model)，斑馬魚具有透明的胚胎利於觀察，且胚胎發育快速 (僅需 72 小時)，上述優點接使得該物種成為研究發育過程的優秀模式動物。為了解 Lcn2 在斑馬魚中可能參與的生理功能，實驗首先觀察了 Lcn2 基因在成熟斑馬魚的各組織的 mRNA 表現量，結果發現 Lcn2 的基因在成熟斑馬魚的身上有廣泛的表現，且 Lcn2 的基因在雄性與雌性表現情形不盡相同，我們也在成熟小鼠的身上觀察到 Lcn2 基因與斑馬魚同樣的廣泛表現與性別差異，這可能是生物的生理狀態在不同性別間的差異所致。由於 Lcn2 已知可造成細胞凋亡 [16-19]，而發育過程中亦包含了細胞凋亡的過程，Lcn2 是否在發育中和細胞凋亡有關則待進一步確認。目前並沒有其他以斑馬魚作為模式動物的 Lcn2 的研究，關於 Lcn2 在斑馬魚各器官組織的表現所具備的功能與機制仍為未知。

斑馬魚胚胎期主要有幾個重要階段：囊胚期 (blastula, 2 hpf)、原腸期 (gastrula, 5 hpf)、分節期 (segmentation, 10 hpf)、咽部期 (pharyngula, 24 hpf)、孵化期 (hatching, 48 hpf) 與初期幼體期 (early larva, 72 hpf)，72 小時後胚胎便發育完成 [42] (請見附圖二)。本次實驗在 10 hpf 的胚胎發現 Lcn2 基因開始表現，且持續表現到 72 hpf。10 hpf 的胚胎處於分節期，此時原腸胚的形成剛結束，開始體節 (somite) 的形成、尾、器官與中樞神經開始發育，因此推測 Lcn2 的表現可能與上述部位或器官的發育有關。此一推測與小鼠所得

之結果是符合的，因小鼠的中樞神經於 E9.5~10.5 開始發育 [43]，實驗中亦可觀察到小鼠 E10.5 時期的胚胎腦部有 Lcn2 蛋白的表現。至於 E16.5、E17.5 時蛋白質的下降是否顯示此時腦部發育對 Lcn2 蛋白的需求降低則待了解。

小鼠腦部發育在 E16.5 時，伏隔核 (nucleus accumbens)、叢狀細胞 (tufted cells) 與卡耶哈氏島 (isles of Calleja) 正處於神經增生 (neurogenesis) 的高峰期 [43]，在 E17.5 時，第四層皮質層 (cortical layer IV) 處於神經增生高峰期，胼胝體 (Corpus callosum) 也出現在此時 [44, 45]。推測 Lcn2 表現量的相對減少可能與此時期的腦部發育處於神經增生高峰期有關，為了阻止細胞進行凋亡而減少 Lcn2 的表現量。但由於在免疫組織化學染色的實驗中並沒有觀察到 Lcn2 表現的位置，關於 Lcn2 在此時期減少的原因還有待證實。

在 Vinuesa E, et al. 的研究中，在腎臟缺血後造成主要損害的早期回血 (early reperfusion) 時期，發現 Lcn2 大量表現但 Lcn2 的受器 24p3R 與 megalin 表現卻較低，此時細胞大量死亡。Lcn2 在恢復期時的表現量則下降，但 24p3R 與 megalin 卻大量表現，此時細胞快速增生 [37]。顯示 Lcn2 會因其受器的表現不同而有不同的功能，Lcn2 與受器間的作用的詳細機制與造成的影響仍有待繼續研究。未來或許可藉由觀察 24p3R 與 megalin 的基因與蛋白質在小鼠不同胚胎期腦部的表現量差異來幫助探討 Lcn2 在小鼠胚胎腦部表現所具備的功能為何。

在免疫組織化學染色 (immunohistochemistry, IHC) 的實驗部分，無法觀察到 Lcn2 蛋白在任何部位的表現。推測 Lcn2 在不同胚胎期的腦部表現量是偏低的，無法以免疫化學染色法觀測，這可以解釋為何在進行西方墨點術 (western blotting) 時，必須經由免疫沉澱法 (immunoprecipitation) 聚集 Lcn2 蛋白，才可觀測到 Lcn2 蛋白在各胚胎期腦部的表現。

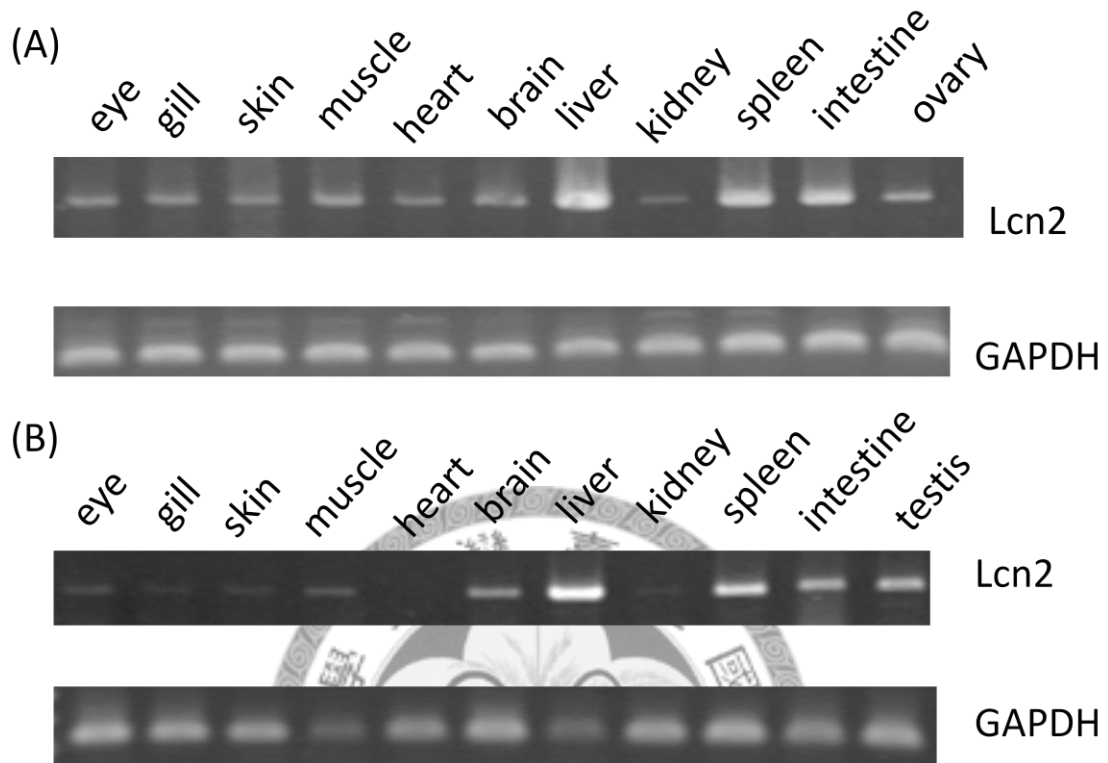
在斑馬魚的實驗中，我們僅能藉由觀察 mRNA 在不同胚胎期的表現來推測 Lcn2 可能參與的發育過程，但無法觀測到 Lcn2 基因或是蛋白的表現位置。本實驗室先前的研究曾利用原位雜合技術 (in situ hybridization) 來偵測 zTSSK

(斑馬魚的睪丸專一性絲胺酸磷酸酶)的基因在斑馬魚不同胚胎期的表現位置，同樣的方式或許也可應用在偵測 Lcn2 的基因在斑馬魚不同胚胎期的表現的研究，或是待製備出可用的斑馬魚 Lcn2 蛋白抗體，便可進行免疫組織化學染色，來觀察 Lcn2 蛋白的表現位置，這些可能是將來進一步研究 Lcn2 與斑馬魚胚胎發育間的關聯的可行方法。

星狀細胞 (astrocytes) 在中樞神經系統受損或是面臨環境壓力時扮演著修復腦部受損部位的主要回應者，在中樞神經受到傷害或是有發炎反應時，星狀細胞會活化增生行使他們的修補作用 [41]。而 Lcn2 在腦部的表現則會促使星狀細胞增生 (astrocytosis) 的進行 [40]，這符合先前研究認為 Lcn2 是一種急性期蛋白的結果 [7, 8]。表示 Lcn2 在腦部的表現可能主要跟中樞神經面對環境壓力時的反應有關，這也解釋了本次實驗在健康的成熟小鼠腦部僅能觀察到少量的 Lcn2 蛋白表現的結果，儘管 Lcn2 基因的表 mRNA 現在成熟小鼠腦部相較於胚胎期的腦部明顯增加，卻無法測得蛋白質表現量，推測健康的成熟小鼠 Lcn2 基因的 mRNA 可能不會轉譯成蛋白質，其中調節轉譯的詳細機制則須進一步的實驗去發現。

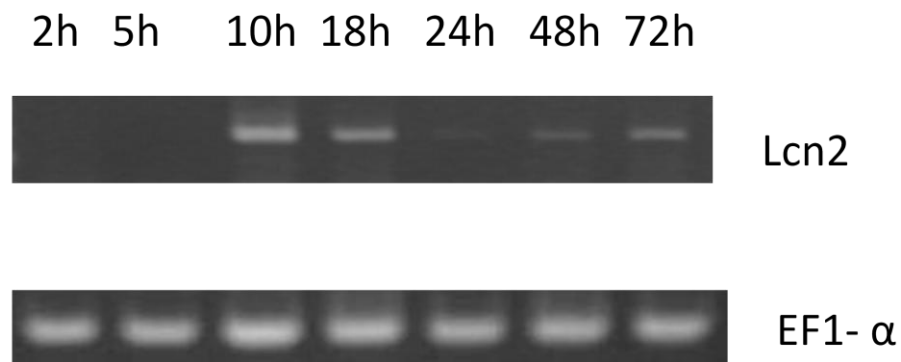
在 Yang et al. 的研究中認為 Lcn2 參與了腎前驅細胞 (renal progenitor cell) 的上皮化 (epithelialization) [39]；Lee et al. 則在星狀細胞的研究中發現了 Lcn2 有促進細胞凋亡的能力且會促使星狀細胞進行型態改變 (morphological change) [40]。細胞凋亡與細胞型態改變在發育與分化中都具有重要地位，引起了本實驗室對於 Lcn2 與發育之間關聯的興趣。本次實驗無法觀測出 Lcn2 表現與小鼠胚胎期腦部發育的關聯，但 Lcn2 的表現在不同物種間的胚胎發育期所扮演的角色仍然值得未來的研究者繼續關注。

第五章 實驗圖表



圖一、Lcn2 基因在成熟斑馬魚組織中的分佈

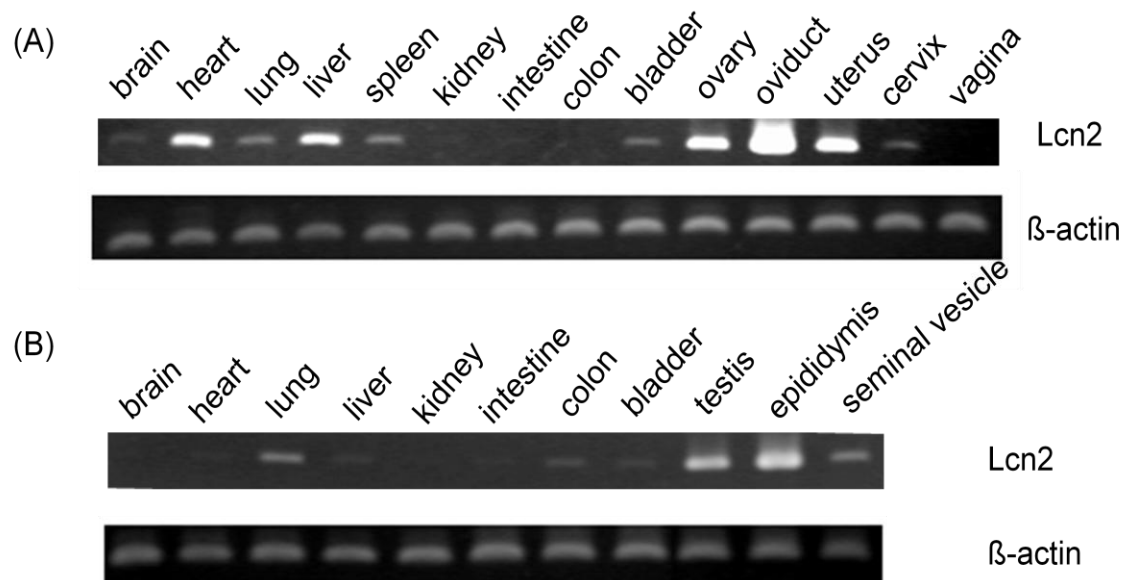
(A)為成熟母斑馬魚的各組織 Lcn2 的 mRNA 表現量，(B) 為成熟公斑馬魚的各組織 Lcn2 的 mRNA 表現量。將成熟的公魚與母魚各 6 隻的組織分別取下後萃取其 RNA，取 1 μ g RNA 反轉錄為 cDNA，再進行 PCR 觀察 Lcn2 基因的表現量。結果為 6 個個體的平均值。以 PCR 產物進行 1.5% 洋菜膠體電泳後使用 EtBr 染色並觀測各組織 Lcn2 表現的情形，其中 Lcn2 的 PCR 產物為 573 bps。GAPDH 為內部對照組 (internal control)。



圖二、斑馬魚胚胎發育過程中不同時期之 Lcn2 的表現

斑馬魚卵受精後，於不同時間點收集胚胎每次約 50 個後萃取 RNA，取 1 μ g 進行反轉錄成 cDNA，再進行 PCR 觀測 Lcn2 基因的表現量。以 PCR 產物進行 1.5% 洋菜膠體電泳後使用 EtBr 染色並觀測，Lcn2 的 PCR 產物為 573 bps。EF1- α 為內部對照組。

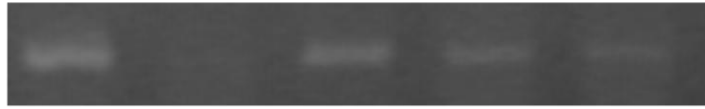




圖三、Lcn2 在成熟小鼠組織中的分佈

(A)為成熟母小鼠的各組織 Lcn2 的 mRNA 表現量，(B)為成熟公小鼠的各組織 Lcn2 的 mRNA 表現量。將成熟的公與母的小鼠的組織分別取下後萃取其 RNA，取 1μg RNA 反轉錄為 cDNA，再進行 PCR 觀察 Lcn2 基因的表現量。以 PCR 產物進行 1.5% 洋菜膠體電泳後使用 EtBr 染色並觀測各組織 Lcn2 表現的情形，其中 Lcn2 的 PCR 產物為 543 bps。β-actin 為內部對照組 (internal control)。

E14.5 E16.5 E18.5 D0 D2



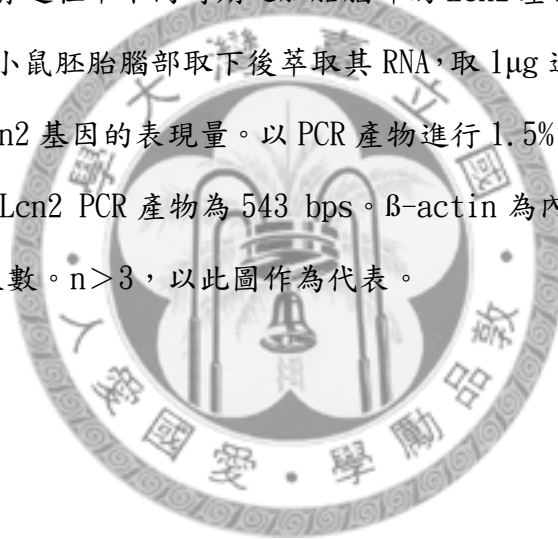
Lcn2

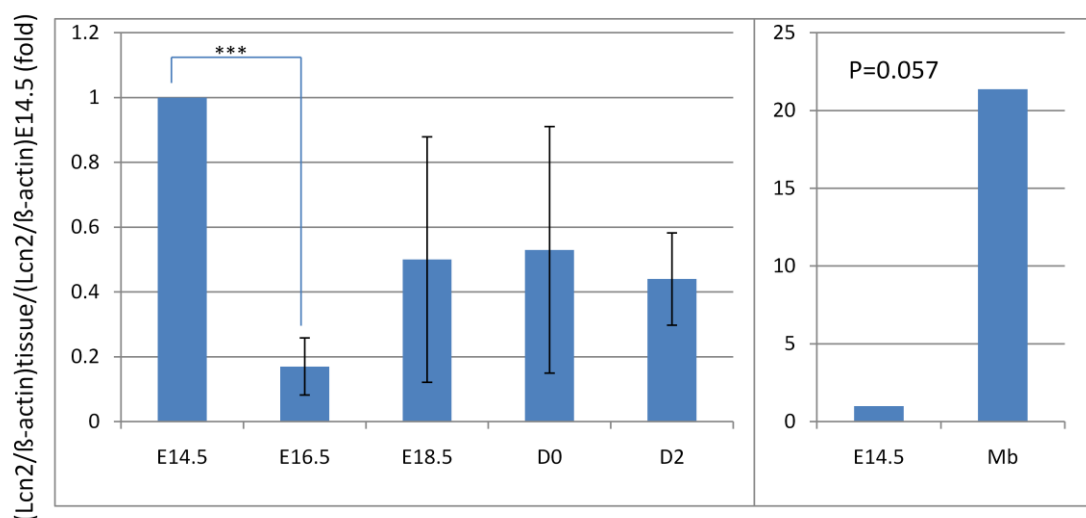


β -actin

圖四、小鼠胚胎發育過程中不同時期之胚胎腦部的 Lcn2 基因表現

將不同時期之小鼠胚胎腦部取下後萃取其 RNA，取 1 μ g 進行反轉錄成 cDNA，再進行 PCR 觀測 Lcn2 基因的表現量。以 PCR 產物進行 1.5% 洋菜膠體電泳後使用 EtBr 染色並觀測，Lcn2 PCR 產物為 543 bps。 β -actin 為內部對照組。E：胚胎天數，D：出生後天數。n>3，以此圖作為代表。

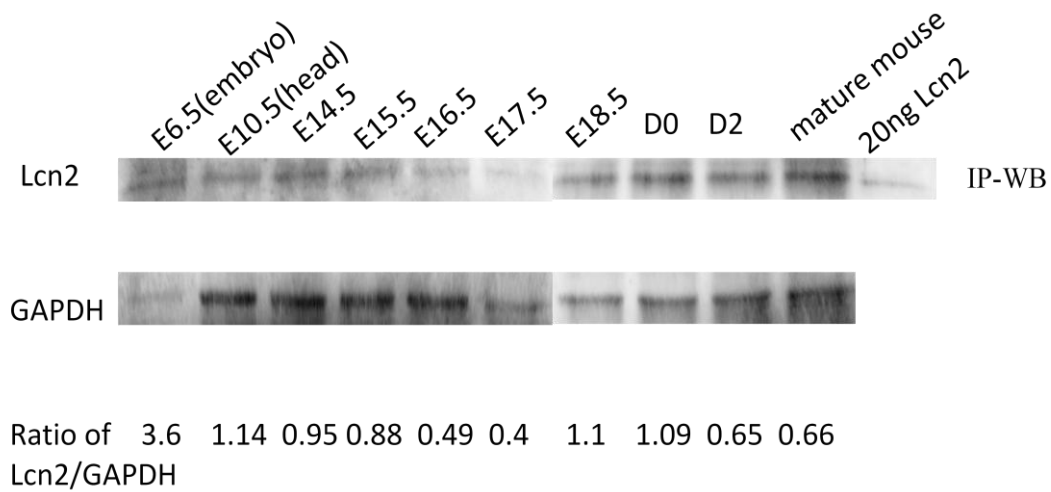




圖五、小鼠不同胚胎期腦部 Lcn2 基因的表現，以即時定量 PCR 觀察

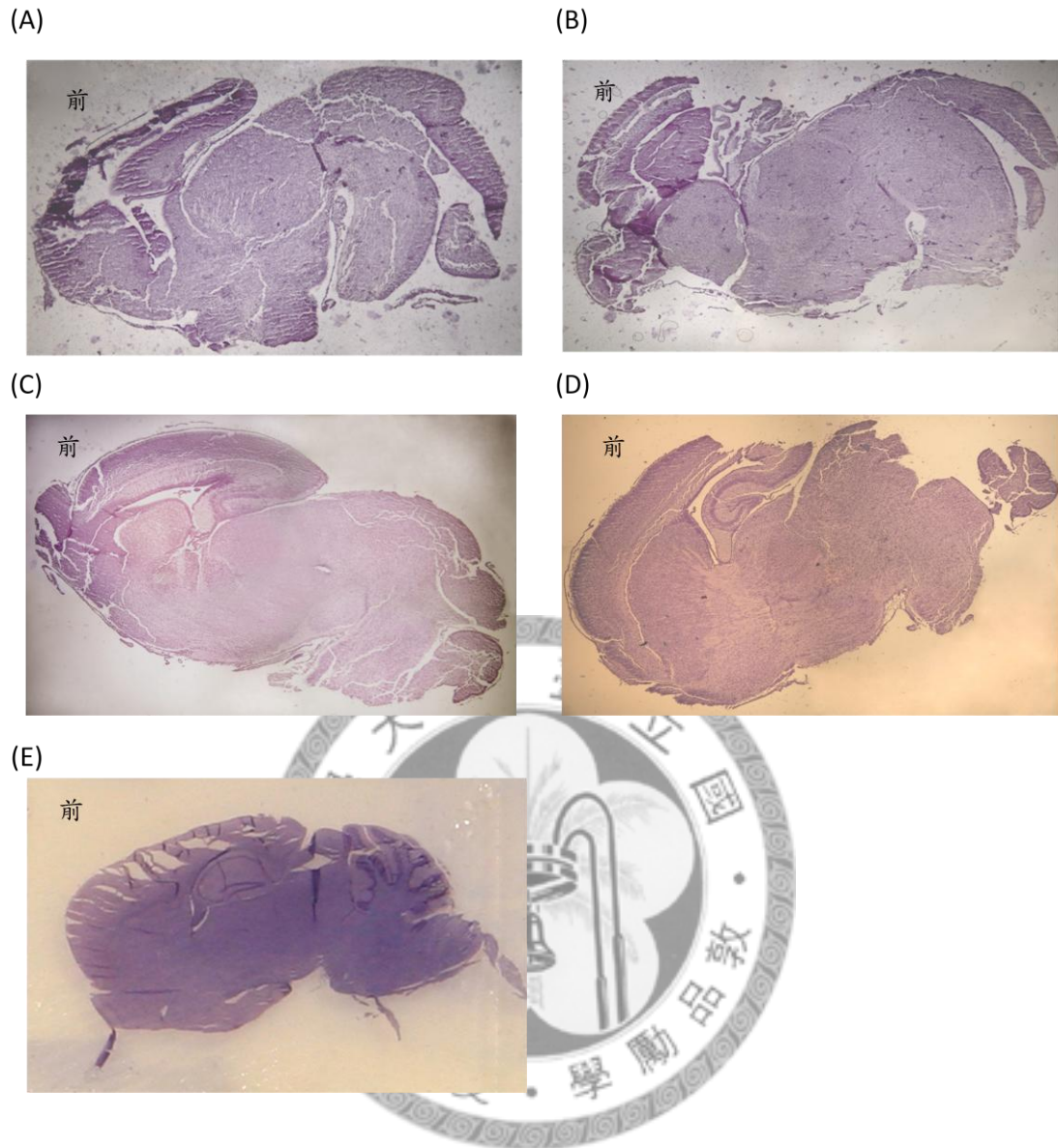
將不同時期之小鼠胚胎腦部取下後萃取其 RNA，取 1 μ g 進行反轉錄成 cDNA，分別取 25ng 的 cDNA，進行即時定量聚合酶連鎖反應來分析 Lcn2 之 mRNA 的表現量，得到 Lcn2 與 β -actin 的 Ct 值後，利用公式計算出 Δ Ct 值，以 E14.5 的 Δ Ct 值作為控制組計算 $\Delta\Delta$ Ct 值，將計算結果作平均後以統計圖表示。右圖表示成熟小鼠的腦組織 Lcn2 表現量之 $\Delta\Delta$ Ct 值，因成熟小鼠之數值過大所以獨立顯示。***代表 $P < 0.001$ ，E：胚胎天數，D：出生後天數，Mb：成熟小鼠腦部。

n=4



圖六、小鼠在不同胚胎期腦部之 Lcn2 蛋白質的表現量

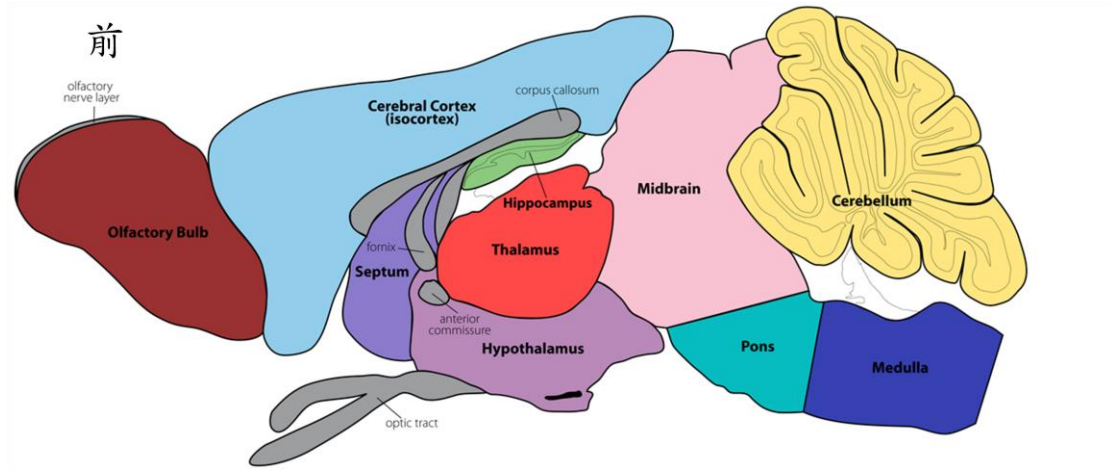
分別取下整個 E6.5 的胚胎、E10.5 的胚胎頭部，以及 E14.5、E15.5、E16.5、E17.5、E18.5、D0 與 D2 還有成熟小鼠的腦部，萃取其蛋白質，取 150 μ g 的蛋白進行免疫沉澱 (immunoprecipitation, IP) 將 Lcn2 蛋白聚集後，將全部蛋白加入膠體進行 15% SDS 電泳後進行西方墨點分析 (Western blotting)，以 20ng 的純化 Lcn2 蛋白作為正控制 (positive control)，GAPDH 作為內部控制 (internal control)，利用 Image J 軟體分析所得之數據。E：胚胎天數，D：出生後天數。圖中所示數字為 Lcn2 蛋白質質量與 GAPDH 蛋白質質量的比例，藉以表示已正常化之數據，數字愈大表示蛋白質質量較多。



圖七、小鼠在不同胚胎期腦部之 Lcn2 蛋白表現位置

分別取下 E14.5(A)、E16.5(B)、E18.5(C)、D0(D)與成鼠 (E) 的腦組織，固定於 4%甲醛固定液中，待脫水、透明、滲蠟與包埋完成後，將組織切成 $7\mu\text{m}$ 的切片進行免疫組織化學染色 (immunohistochemistry) 偵測 Lcn2 蛋白表現位置。(A~D)放大倍率 40X。(E)在沒有使用顯微鏡的情況下使用照相機拍攝。詳細腦部各部位對應位置請參照附圖一，圖片由左而右為頭部的前到後。

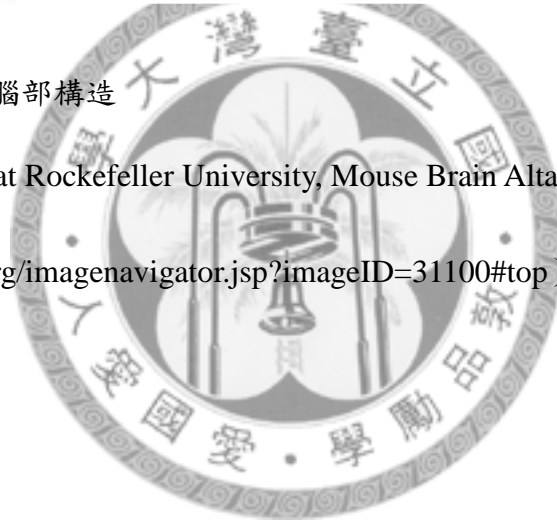
附圖

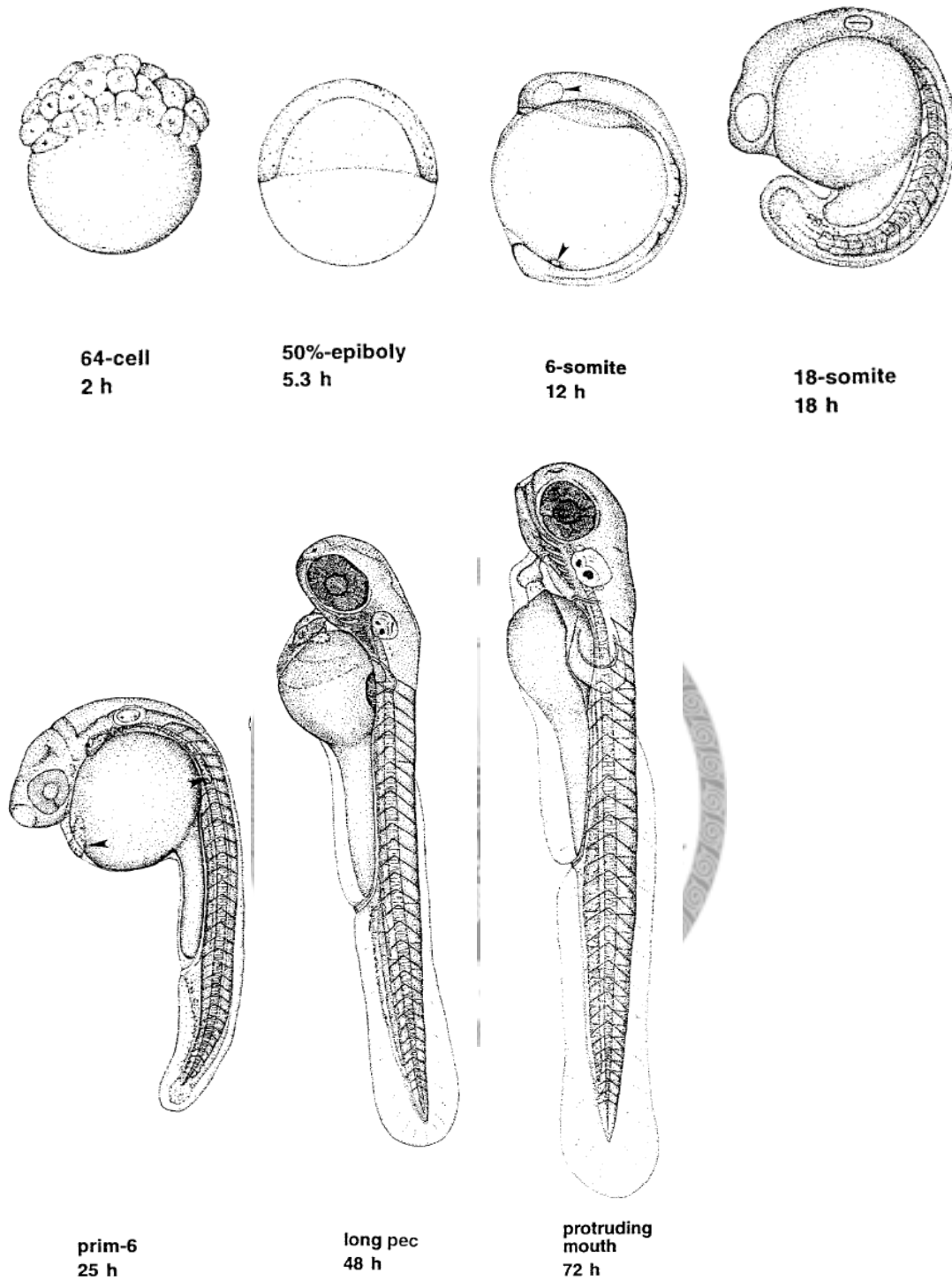


附圖一、成熟小鼠腦部構造

(GENSAT Project at Rockefeller University, Mouse Brain Atlas, Image Navigator.

<http://www.gensat.org/imagenavigator.jsp?imageID=31100#top>)





附圖二、本次實驗使用之不同時期斑馬魚胚胎

(Kimmel, C.B., et al., Stages of Embryonic Development of the Zebrafish.

DEVELOPMENTAL DYNAMICS, 1995. 203:255-310)

附錄

附錄一、不同物種間之 Lcn2 胺基酸序列比對：

(<http://www.tcoffee.org>)

Mouse	MALSVMCLGLALLGVLSQAQD-STQNLIPAPSLLTVPPLQPDFRSDQFRGRWYVVGLAGN
Rat	MGLGVLCALVLLGVLRQAQD-STQNLIPAPPLISVPLQPGFWTERFQGRWFVVGLAAN
Human	MPLGLLWGLALLGALHAQAQD-STSDLIPAPPLSKVPLQQNFQDNQFQGWYVVGLAGN
Zebrafish	MT-----LALALLFGLFLGTHSFNTPD-----PIGPQPNFDLEKFAGEWYRLGLADE
	* . * . * * * : : . * : : * . * : : * * . : : * * : : * * : :
Mouse	A-VQKKTEGSFTMYSTIYELQENNSYNVTSILVRDQDQGCYRWIRTFVPSSRAGQFTLGN
Rat	A-VQKERQSRFTMYSTIYELQEDNSYNVTSILVRGQ--GCRYWIRTFVPSSRPGQFTLGN
Human	A-ILREDKDPQKMYATIYELKEDKSYNVTSVLFRKK--KCDYWIRTFVPGCQPGFTLGN
Zebrafish	SQFFAMFKSHLKVSKGLLVDPDTSIGNVNLTMWTMRPY--GCSISVYSYEKTDVPGFTYFS
	: . : . : : : . . . * * . * * : : : . * * * .
Mouse	MHRYPQVQSYNVQVATTDYNQFAMVFFRKTSSENKQYFKITLYGRTKELSPELKERFTRFA
Rat	IHSYPQIQSYDVQVADTDYDQFAMVFFQKTSSENKQYFKVTLYGRTKGLSDELKERFVSFA
Human	IKSYPGLTSYLVRVSTNYNQHAMVFFKKVSQNREYFKITLYGRTKELTSELKENFIRFS
Zebrafish	KRNQ---ITKDVTIVETNYTDYSLVLKYKTM-NKEYTQVALYGRSSTLRPDLDKFRSFA
	: : * : . * : * : : : * : * * : : * * : : * * : : * * : :
Mouse	KSLGLKDDNIIFSVPDQCIDN-----
Rat	KSLGLKDDNIVFSVPDQCIDN-----
Human	KSLGLPENHIVFPVPIDQCIDG-----
Zebrafish	LSLGFSEEAVITPTDIDPCPNLEPSLLWSETLGYIYSLLRVWGTVFVFTQTQVIGEMQQY
	* * : : : . . * * :
Mouse	-----
Rat	-----
Human	-----
Zebrafish	YIFNVTQAVLH



附錄二、primer 序列

RT-PCR primer 序列：

gene		sequence	length
Lcn2 (zebrafish)	Forward	atgaaggtcaccatctttttgc	573bps
	Reverse	ataaccggcttttacttgaatg	
GAPDH(zebrafish)	Forward	cacgaattcgctgtgggcaaagtcattcc	120bps
	Reverse	cacctcgaggtagctggcgggccttgta	
EF-1 α (zebrafish)	Forward	aactgaaggccgagcgtgagcgtggtat	~1kb
	Reverse	tccgatttgagagccttggggttgtc	
Lcn2(mouse)	Forward	caggactcaactcagaacttg	543bps
	Reverse	tcagttgtcaatgcattggtc	
β -actin(mouse)	Forward	tgcgtgacatcaaagagaag	197bps
	Reverse	gatgccacaggattccata	

Real-time PCR 序列：

mLcn2	Left	ccatctatgagctacaagagaacaat	89bps
	Right	tctgatccagtagcgacagc	
β -actin	Left	ggcccagagcaagagaggta	245bps
	Right	cagcctggatggctacgtaca	

參考文獻

1. Bratt T (2000) Lipocalins and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1482:318–326
2. Flower, D. R. (1996) The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* 318,1–14
3. Flower, D. R., North, A. C. and Sansom, C. E. (2000) The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 9–24
4. Flower, D. R. (2000) Beyond the superfamily: the lipocalin receptors. *Biochim. Biophys. Acta.* 1482, 327–336
5. Harba-Renevey, S., et al., SV40-induced expression of mouse gene 24p3 involves a post-transcriptional mechanism. *Oncogene*, 1989. 4(5): p. 601-8
6. Flower, D.R., A.C. North, and T.K. Attwood, Mouse oncogene protein 24p3 is a member of the lipocalin family. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. 180(1): p. 69-74
7. Quansheng Liu and Marit Nilson-Hamilton, Identification of a New Acute Phase Protein. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 1995. Pp. 22565-22570
8. Meheus LA, Fransen LM, Raymackers JG, Blockx HA, Van Beeumen JJ, Van Bun SM & Van de Voorde A 1993, Identification by microsequencing of lipopolysaccharide-induced proteins secreted by mouse macrophages. *J immunol*

151 1535-1547.

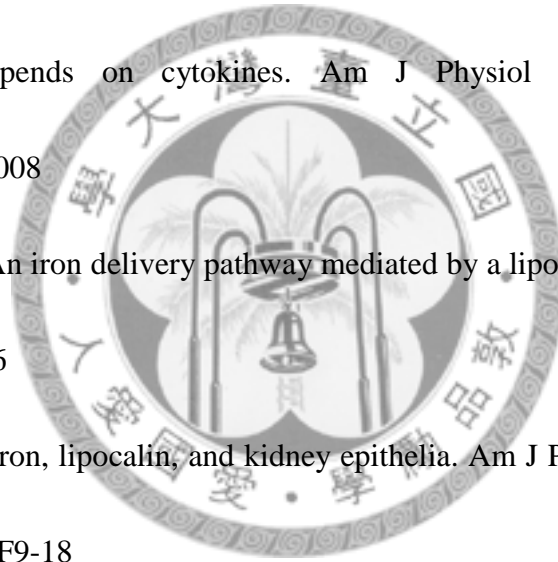
9. Kjeldsen, L., et al., Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem*, 1993. 268(14): p.10425-32
10. Kjeldsen L, Bainton DF, Sengelov H, Borregaard N. 1994 Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Blood* 83, 799–807.
11. Klausen et al. On mouse and man: neutrophil gelatinase associated lipocalin is not involved in apoptosis or acute response. *Eur J Haematol* 2005; 75: 332–340.
12. Nilands JB. 1995 Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* 270, 26723–26726.
13. Strong RK, Bratt T, Cowland JB, Borregaard N, Wiberg FC, Ewald AJ. 1998 Expression, purification, crystallization and crystallographic characterization of dimeric and monomeric human neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54(Pt 1), 93–95.
14. Flo TH, Smith KD, Sato S, et al. 2004 Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432, 917–921.
15. Holmes MA, Paulsene W, Jide X, Ratledge C, Strong RK. 2005 Siderocalin (Lcn 2) also binds carboxymycobactins, potentially defending against mycobacterial

- infections through iron sequestration. *Structure (Camb)* 13, 29–41.
16. Devireddy LR, Teodoro JG, Richard FA & Green MR 2001, Induction of apoptosis by a secreted lipocalin that is transcriptionally regulated by IL-3 deprivation. *Science* 293 829-834.
17. Lin HH, Li WW, Lee YC & Chu ST 2007, Apoptosis induced by uterine 24p3 protein in endometrial carcinoma cell line. *Toxicology* 234 203-215.
18. Bong JJ, Seol MB, Kim HH, Han O, Back K & Baik M 2004, The 24p3 gene is induced during involution of the mammary gland and induces apoptosis of mammary epithelial cells.
19. Devireddy, L.R., et al., A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell*, 2005. 123(7): p. 1293-305
20. Sorensen, O. E., Cowland, J. B., Theilgaard-Monch, K., Liu, L., Ganz, T. and Borregaard, N. (2003) Wound healing and expression of antimicrobial peptides/polypeptides in human keratinocytes, a consequence of common growth factors. *J. Immunol.* 170, 5583–5589
21. Nielsen, B. S., Borregaard, N., Bundgaard, J. R., Timshel, S., Sehested, M. and Kjeldsen, L. (1996) Induction of NGAL synthesis in epithelial cells of human colorectal neoplasia and inflammatory bowel diseases. *Gut* 38, 414–420
22. Stoesz, S. P., Friedl, A., Haag, J. D., Lindstrom, M. J., Clark, G. M. and Gould, M.

- N. (1998) Heterogeneous expression of the lipocalin NGAL in primary breast cancers. *Int. J. Cancer* 79, 565–572
23. Furutani, M., Arii, S., Mizumoto, M., Kato, M. and Imamura, M. (1998) Identification of a neutrophil gelatinase-associated lipocalin mRNA in human pancreatic cancers using a modified signal sequence trap method. *Cancer Lett.* 122, 209–214
24. Bartsch, S. and Tschesche, H. (1995) Cloning and expression of human neutrophil lipocalin cDNA derived from bone marrow and ovarian cancer cells. *FEBS Lett.* 357, 255–259
25. Iannetti A, Pacifico F, Acquaviva R, Lavorghna A, Crescenzi E, Vascotto C, Tell G, Salzano AM, Scaloni A, Vuttariello E, Chiappetta G, Formisano S, Leonardi A.(2008), The neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), a NF-kappaB-regulated gene, is a survival factor for thyroid neoplastic cells. *PNAS.* 105, 14058–14063
26. Bauer M, Eickhoff JC, Gould MN, Mundhenke C, Maass N, Friedl A. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a predictor of poor prognosis in human primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008;108:389–97.
27. Xiaohong Leng, et al, Inhibition of Lipocalin 2 Impairs Breast Tumorigenesis and Metastasis. *Cancer Res* 2009;69(22):8579–84

28. Z. Tong et al., Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin: A Novel Suppressor of Invasion and Angiogenesis in Pancreatic Cancer. *Cancer Res* 2008;68(15):6100–8.
29. Hu L, Hittelman W, Lu T, et al. NGAL decreases Ecadherin- mediated cell-cell adhesion and increases cell motility and invasion through Rac1 in colon carcinoma cells. *Lab Invest* 2009;89:531–48.
30. Yang J, Bielenberg DR, Rodig SJ, et al. Lipocalin 2 promotes breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:3913–8.
31. Kubben FJ, Sier CF, Hawinkels LJ, et al. Clinical evidence for a protective role of lipocalin-2 against MMP-9 autodegradation and the impact for gastric cancer. *Eur J Cancer* 2007;43:1869–76
32. Fernandez, C.A., et al., The matrix metalloproteinase-9/neutrophil gelatinase-associated lipocalin complex plays a role in breast tumor growth and is present in the urine of breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(15):p. 5390-5.
33. Hemdahl, A.L., et al., Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. 26(1): p. 136-42
34. Biezeveld, M.H., et al., Sustained activation of neutrophils in the course of

- Kawazaki disease: an association with matrix metalloproteinases. *Clin Exp Immunol*, 2005. 141(1): p. 183-8.
35. Xu, S. and P. Venge, Lipocalins as biochemical markers of disease. *Biochim Biophys Acta*, 2000. 1482(1-2): p. 298-307.
36. Mishra, J., et al., Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol*, 2004. 15(12): p. 3073-82.
37. Vinuesa E, Sola A, Jung M, Alfaro V, Hotter G. Lipocalin-2-induced renal regeneration depends on cytokines. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F1554–F1562, 2008
38. Yang, J., et al., An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell*, 2002. 10(5): p. 1045-56
39. Yang, J., et al., Iron, lipocalin, and kidney epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003. 285(1): p. F9-18
40. Lee, S., et al., Lipocalin-2 Is an Autocrine Mediator of Reactive Astrocytosis. *The Journal of Neuroscience*, 2009 • 29(1):234 –249
41. Farina C, Aloisi F, Meinl E., Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* , 2007. 28:138 –145.
42. Kimmel, C.B., et al., Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS*, 1995. 203:255-310



43. Finlay, B.L. and Darlington, R.B., 1995. Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science* 268, pp. 1578–1584.
44. Ashwell, K.W., Waite, P.M. and Marotte, L., 1996. Ontogeny of the projection tracts and commissural fibres in the forebrain of the tammar wallaby (*Macropus eugenii*): timing in comparison with other mammals. *Brain Behav. Evol.* 47, pp. 8–22.
45. Caviness VS (1982) Neocortical histogenesis in the normal and reeler mice: a developmental study based upon $[^3\text{H}]$ -thymidine autoradiography. *Dev Brain Res* 4:293–302.

