

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

Tamoxifen 對缺血再灌流的

急性腎損傷之影響

The effect of tamoxifen on the ischemia-reperfusion acute
kidney injury

蘇彥昌

Yen-Chang Su

指導教授：林水龍 博士

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

中華民國 107 年 10 月

October, 2018



國立臺灣大學（碩）博士學位論文
口試委員會審定書

Tamoxifen 對缺血再灌流的急性腎損傷之影響
The effect of tamoxifen on the ischemia-reperfusion acute
kidney injury

本論文係蘇彥昌君（R05441011）在國立臺灣大學生理學系、所
完成之碩（博）士學位論文，於民國 107 年 10 月 08 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：

	<u>林水祥</u>	(簽名)
	(指導教授)	
<u>賴俊夫</u>	<u>周毅翔</u>	
_____	_____	
_____	_____	
_____	_____	
系主任、所長	<u>李卓宏</u>	(簽名)

謝辭



感謝林水龍老師這兩年多來的指導，從老師身上真的學到了許多，在討論實驗時老師也給了我許多實驗上的方向，讓我在探索未知領域時不至於茫然失措，而能順利完成這份論文，也要謝謝 Eileen 幫我們處理實驗室的行政事務以及幫忙管理實驗用品的採買，讓我們能專注在實驗上，並且能順利的完成各項實驗。

覺得能進到林水龍老師實驗室是一件很幸運的事，實驗生活中總是充斥著大家歡樂的聊天聲以及音樂聲，當實驗遇到瓶頸時也有許多學長姊可以詢問，給予我寶貴的意見，謝謝鈺翔醫師在我剛進來實驗室時帶著我做各項手術，並且在寫論文的過程中也總是不厭其煩地幫我修改，謝謝靜欽學長、家豪學長、潘醫師、鈺涵學姊、佩蓁學姊、雅純學姊、怡婷醫師、wanda 學姊，在實驗過程中給予我各項指導，讓我能順利的完成實驗，謝謝學妹諳潔幫忙泡了許多 buffer，還有從我手上接下訂便當股長的位子，也要謝謝好戰友徐顥在這兩年多來給予的幫助，謝謝老同學順喻慷慨出借抗體，讓我能及時完成實驗。

最後，要謝謝我的爸爸、媽媽，在兩年多來的碩士生活中給予我強大的後盾，讓我能無後顧之憂地完成學業。



摘要

急性腎損傷(Acute kidney injury, AKI)被定義為在數小時或數天內的急性腎臟功能下降，在醫療日益發達的現代，AKI 的發生率以及致死率依舊居高不下，且伴隨著醫療的高支出，目前對於 AKI 還沒有有效的藥物能進行治療或預防，因此極需找出針對 AKI 有效的治療以及預防方法。

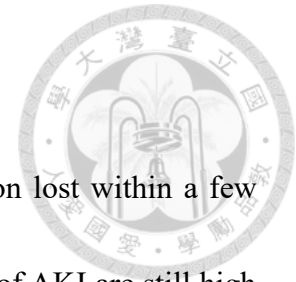
Tamoxifen (TAM)是常見的乳癌用藥，除了用於乳癌治療上，TAM 也被用來活化基因轉殖鼠 Cre 重組酶的活性，我們發現給予 C57BL/6J 小鼠 TAM 後可以降低缺血再灌流所造成急性腎損傷的損傷程度，我們在小鼠 8 週大時將左側腎臟切除，並於兩週後進行腎臟缺血再灌流手術(IRI)，發現以管餵的方式在缺血再灌流前連續給予三天 TAM 後可以降低老鼠的腎損傷程度，給予 TAM 的組別血液中 BUN 及 creatinine 較低，並且在 Periodic Acid-Schiff (PAS)染色的結果中腎臟損傷程度也較低，在 Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay (TUNEL)染色的結果上，我們也發現 TAM 可以降低缺血再灌流後細胞凋亡的數量，透過酵素結合免疫分析法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay;ELISA)，我們發現在 IRI 後 24 小時，Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)的表現在給予 olive oil 與 TAM 的組別間沒有差異，但在 48 小時則是給予 TAM 的組別顯著低於給予 olive oil 的組別，Kidney injury molecule (KIM-1) 的表現不論在 IRI 後 24 小時或是 48 小時，皆是給予 TAM 的組別表現較低。此外，單純連續管餵 TAM 三天後且未進行 IRI 的小鼠血液中 NGAL 蛋白以及腎臟組織中的 NGAL 基因表現皆顯著上升，腎臟組織中的 KIM-1 基因表現也有增加，查詢相關文獻發現目前有部分研究顯示 NGAL 對於急性腎損傷有保護的作用，也有研究探討過 KIM-1 有助於急性腎損傷後的修復。我們進一步發現單純連續給予 TAM 且未進行 IRI 的小鼠在肝臟以及腎小管細胞中 NGAL 基因表現會增加，而嗜中性白血球 NGAL 的基因表現則沒有改變，此外 buffy coat 以及腎小管細胞的 KIM-1 基因表現也是增加的。另外我們也發現給予 TAM 可使 IRI 後腎臟中促發炎相關激素 *Tnfa*、*Il1b* 基因表現

下降，而 *Egf* 基因以及粒線體功能相關基因 *Ppargcla* 表現增加。除此之外，給予 TAM 後也在 IRI 前增加了腎臟中 *ki67* 基因的表現。

總結來說，小鼠術前三天連續給予 TAM 後降低了缺血再灌流的急性腎損傷，且單純給予 TAM 且尚未進行缺血再灌流手術就會使小鼠血液、腎臟及肝臟中的 NGAL 增加，未來須進一步透過 NGAL 基因剔除的小鼠進行實驗來證實 TAM 是否藉由 NGAL 的增加來減低急性腎損傷的嚴重程度，另外關於給予 TAM 後會使缺血再灌流手術小鼠腎臟粒線體功能相關基因 *Ppargcla* 顯著增加的部分，也將進一步研究 TAM 是否也會藉由影響粒線體的功能來改善急性腎損傷。

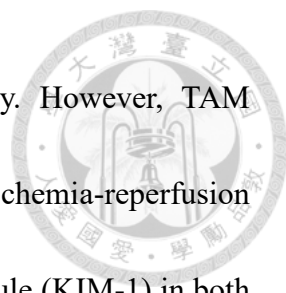
關鍵詞：急性腎損傷、缺血再灌流、他莫昔芬、嗜中性白血球明膠酶相關性脂質運載蛋白、腎損傷分子、粒線體

Abstract



Acute kidney injury (AKI) is defined as a sudden renal function lost within a few hours or a few days. In recent days, the mortality and the incidence of AKI are still high and contribute to a lot of burden of medical costs. There is no promising drug for AKI treatment or prevention currently. Thus, it is imperative to find effective therapeutics for AKI.

Tamoxifen (TAM) is a medication used to treat breast cancer. Besides the anticancer effect, tamoxifen used to induce Cre recombinases for gene activation in mice. Here we demonstrated that TAM attenuated renal ischemia reperfusion injury in C57BL/6J mice. We performed right nephrectomy on 8-week-old C57BL/6J male mice and induced the ischemia-reperfusion injury in the left kidney 2 weeks later. These mice treated with TAM by oral gavage daily for three consecutive days before ischemia-reperfusion injury had lower injury severity. TAM treatment lowered plasma BUN and creatinine. Periodic Acid-Schiff (PAS) stain also showed that TAM treated mice had lower renal injury level. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay (TUNEL) staining showed that TAM treated mice had lower apoptotic cells expression in renal tissues after ischemia-reperfusion injury. According to the results of Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), we found that plasma Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) expression had no difference between TAM treatment and



olive oil treatment in 24 hours after ischemia-reperfusion injury. However, TAM treatment had lower plasma NGAL expression in 48 hours after ischemia-reperfusion injury. TAM treatment had lower expression of Kidney injury molecule (KIM-1) in both 24 and 48 hours after ischemia-reperfusion injury. In addition, our data showed that the plasma level of NGAL and gene expression of NGAL and KIM-1 in whole kidney of TAM treated mice were both elevated before ischemia-reperfusion injury, which were the plausible protective effect of TAM. Because several researchers have discussed the effect of NGAL on ischemia-reperfusion injury protection, and the role of KIM-1 signaling in renal tubule cells repair has been studied as well. According to the results, liver and renal tubule cells but not neutrophil increased NGAL secretion after TAM treatment. Moreover, buffy coat and renal tubule cells increased KIM-1 secretion. On the other hand, TAM treatment reduced inflammatory cytokines *Tnfa*、*Il1b* gene expression while induced *Egf* and mitochondria function related gene *Ppargc1a* expression in whole kidney after ischemia-reperfusion injury. TAM treatment also increased *ki67* gene expression in whole kidney before ischemia-reperfusion injury.

In conclusion, TAM treatment lowered acute renal ischemia reperfusion injury. On the other hand, administration of TAM without renal injury increased the NGAL plasma level and its expression in kidney and liver. In the future study, we will use NGAL gene knockout mice to confirm whether the renoprotective effect of TAM is contributed from

the increase of NGAL for acute kidney injury. Regarding increased expression of mitochondria function related gene *Ppargc1a* after TAM treatment, we will also arrange further study to clarify if TAM has effect on mitochondria to reduce AKI.

Keywords : Acute kidney injury (AKI) 、 ischemia-reperfusion injury (IRI) 、 Tamoxifen(TAM) 、 Neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL) 、 Kidney injury molecule(KIM-1) 、 mitochondria

目錄



謝辭.....	i
摘要.....	ii
Abstract.....	iv
目錄.....	vii
圖目錄.....	x
表目錄.....	xi
第一章	緒論..... 1
1.1	腎臟與急性腎損傷..... 1
1.1.1	腎臟簡介..... 1
1.1.2	急性腎損傷(Acute Kidney Injury, AKI)..... 1
1.1.3	急性腎損傷病理機制..... 3
1.1.4	缺血再灌流損傷(Ischemia Reperfusion Injury)..... 3
1.1.5	粒線體於急性腎損傷的角色..... 5
1.1.6	急性腎損傷的自我修復..... 5
1.1.7	急性腎損傷動物模式..... 6
1.2	Tamoxifen..... 6
1.2.1	Tamoxifen 簡介..... 6
1.2.2	TAM 與腎臟疾病..... 7
1.3	嗜中性白血球明膠酶相關性脂質運載蛋白(neutrophil-gelatinase-associated lipocalin, NGAL)..... 8
1.3.1	NGAL 結構與功能..... 8
1.3.2	NGAL 與腎臟疾病..... 9
1.3.3	NGAL 對急性腎損傷的保護作用..... 9
1.4	腎損傷分子 Kidney injury molecule-1 (KIM-1)..... 10
1.5	實驗目的..... 11
第二章	材料與方法..... 12
2.1	材料..... 12
2.1.1	實驗動物..... 12
2.1.2	藥品與試劑..... 12
2.1.3	溶液..... 16
2.1.4	抗體..... 18
2.1.5	試劑盒..... 19
2.2	方法..... 20

2.2.1	小鼠基因型鑑定	20
2.2.1.1	DNA 萃取	20
2.2.1.2	聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction ; PCR)	20
2.2.2	缺血再灌流模型	20
2.2.3	檢體採集	21
2.2.3.1	血漿的採集與檢測	21
2.2.3.2	腎臟組織的採集	21
2.2.3.3	血液中嗜中性白血球的分離	22
2.2.3.4	血液中 buffy coat 的分離	22
2.2.3.5	腎臟腎小管細胞的分離	22
2.2.4	Periodic Acid-Schiff (PAS) 染色	22
2.2.5	免疫螢光染色(immunofluorescence ; IF)	23
2.2.6	TUNEL 分析(Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay, TUNEL assays)	23
2.2.7	RNA 萃取	23
2.2.8	反轉錄(reverse transcription)及即時聚合酶連鎖反應(real-time polymerase chain reaction ; real-time PCR)	24
2.2.9	蛋白質萃取及分裝	24
2.2.10	西方墨點法(Western blot)	25
2.2.11	酵素結合免疫分析法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay;ELISA)	26
2.2.12	統計分析	26
第三章	實驗結果	27
3.1	連續給予 TAM 三天後可以降低 IRI 在第二天及第七天的腎損傷	27
3.2	TAM 劑量對於急性腎損傷的保護效果	27
3.3	連續管餵三天 TAM 以及 IRI 後 NGAL 以及 KIM-1 的表現	28
3.4	給予 TAM 後可以降低 bilateral IRI 後第二天的腎損傷	28
3.5	給予 TAM 後 NGAL 以及 KIM-1 來源	29
3.6	給予 TAM 及 IRI 後第二天腎小管細胞的凋亡與增生情形	29
3.7	給予 TAM 及 IRI 後第二天對粒線體功能相關基因表現的影響	30
3.8	給予 TAM 及 IRI 後促發炎細胞激素及生長因子的表現	31
第四章	討論	32
4.1	管餵 TAM 可以降低 IRI 的損傷	32
4.2	TAM 劑量對於急性腎損傷的保護效果	33
4.3	管餵 TAM 後增加 NGAL 及 KIM-1 之表現及來源	34
4.4	Nephrectomy 後增加 NGAL 的表現	35
4.5	管餵 TAM 後可以減少 IRI 後細胞凋亡	35
4.6	給予 TAM 後對於粒線體功能的影響	37

4.7	給予 TAM 可以抑制 IRI 後促發炎激素並增加生長因子表現.....	38
4.8	未來可進行的相關實驗.....	38
第五章	結論與未來展望.....	39
圖表		40
圖一、uIRI 前給予 TAM 可減低急性腎損傷的嚴重程度.....		40
圖二、uIRI 前給予 TAM 可減少腎小管的損傷程度.....		42
圖三、不同 TAM 劑量對於急性腎損傷保護效果的差異.....		43
圖四、給予 TAM 及 IRI 後 NGAL 及 KIM-1 的表現.....		44
圖五、bIRI 前給予 TAM 可減低急性腎損傷的嚴重程度.....		46
圖六、給予 TAM 後 NGAL 及 KIM-1 的來源.....		48
圖七、uIRI 前給予 TAM 可減少腎小管細胞的凋亡.....		50
圖八、給予 TAM 於 uIRI 後第二天細胞凋亡相關蛋白的影響.....		51
圖九、給予 TAM 對 uIRI 後第二天腎小管細胞增生的影響.....		52
圖十、給予 TAM 對 uIRI 後第二天 Ki67 的蛋白以及基因表現的影響.....		53
圖十一、給予 TAM 對 uIRI 後促發炎細胞激素及生長因子基因表現的影響.....		55
圖十二、給予 TAM 對 IRI 後對粒線體功能相關基因表現的影響.....		57
附錄		63
第六章	參考文獻.....	66



圖目錄

圖一、uIRI 前給予 TAM 可減低急性腎損傷的嚴重程度.....	40
圖二、uIRI 前給予 TAM 可減少腎小管的損傷程度.....	42
圖三、不同 TAM 劑量對於急性腎損傷保護效果的差異	43
圖四、給予 TAM 及 IRI 後 NGAL 及 KIM-1 的表現.....	44
圖五、bIRI 前給予 TAM 可減低急性腎損傷的嚴重程度.....	46
圖六、給予 TAM 後 NGAL 及 KIM-1 的來源.....	48
圖七、uIRI 前給予 TAM 可減少腎小管細胞的凋亡.....	50
圖八、給予 TAM 於 uIRI 後第二天細胞凋亡相關蛋白的影響.....	51
圖九、給予 TAM 對 uIRI 後第二天腎小管細胞增生的影響.....	52
圖十、給予 TAM 對 uIRI 後第二天 Ki67 的蛋白以及基因表現的影響.....	53
圖十一、給予 TAM 對 uIRI 後促發炎細胞激素及生長因子基因表現的影響.....	55
圖十二、給予 TAM 對 IRI 後對粒線體功能相關基因表現的影響	57

表目錄

表 一、PCR 之引子序列.....	59
表 二、Real-time PCR 之引子序列	60





第一章 緒論

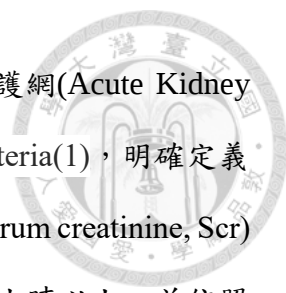
1.1 腎臟與急性腎損傷

1.1.1 腎臟簡介

腎臟位於人體後腰部脊椎兩側，形狀與蠶豆類似，由於右側腎臟上方是肝臟，因此右腎比起左腎的位置較低。每個腎臟的重量約為 120 公克至 150 公克，腎臟的基本組成單位為腎元，每顆腎臟約有一百萬個腎元，每個腎元由腎絲球和腎小管所組成，腎小管又包括近曲小管、亨利氏環以及遠曲小管。當體內的血液流經腎臟時，腎絲球會過濾其中的代謝廢物、水分及電解質，再透過腎小管進行再吸收以及分泌作用，最終經由集尿管匯入腎盂，形成尿液，並經由輸尿管進入膀胱儲存。腎臟的功能主要是透過過濾、分泌、再吸收的過程來調節體內水分以及化學物質的平衡，並且可以透過水分以及電解質的調節，來穩定體內的滲透壓及血壓，此外腎臟也可以生成賀爾蒙，如：腎素(Renin)，經由 Renin-Angiotensin- Aldosterone System (RAAS) 來調節人體血壓。除了代謝以及血壓調節的功能之外，腎臟也可以分泌 1 α -hydroxylase 將未活化型態的 25-hydroxyvitamin D 轉化成具有活性的 1, 25-dihydroxyvitamin D，進而調控體內的鈣磷平衡，而腎臟的腎微血管周細胞(pericytes)也能分泌紅血球生成素(erythropoietin, EPO)促進紅血球的生成。

1.1.2 急性腎損傷(Acute Kidney Injury, AKI)

急性腎損傷(Acute Kidney Injury, AKI)係指腎臟功能的急速惡化，在醫療日益發達的現代，醫院內發生急性腎損傷而死亡的比例依舊居高不下，此外 AKI 的高發生率也伴隨著醫療成本的高支出，因此也成為現今亟需解決的醫療問題之一。早期將嚴重的腎功能衰竭稱為急性腎衰竭(Acute renal failure)，此時對於急性腎衰竭的定義有許多種，還沒有一致的共識，在 2002 年，急性透析品質創始小組(Acute Dialysis Quality Initiative Group, ADQI)成立，將急性腎衰竭一詞修改成急性腎損傷，並提出 RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss of kidney function, and End-stage kidney



disease) 作為 AKI 的定義標準，而後在 2005 年急性腎損傷照護網(Acute Kidney Injury Networ, AKIN)將 RIFLE criteria 進一步的修改成 AKIN criteria(1)，明確定義 AKI 的標準為在 48 小時內腎功能急速下降，血清肌酸酐上升(serum creatinine, Scr) ≥ 0.3 mg/dl，Scr ≥ 1.5 倍基礎值，排尿量 < 0.5 mg/kg/hr 且持續六小時以上，並依照不同嚴重程度將 AKI 分成 3 個級別(附錄 1)。AKI 的嚴重程度與死亡率有高度相關性，且隨著嚴重程度以及罹病時間的增加，進展成慢性腎臟病(Chronic Kidney Disease, CKD)以及末期腎臟病(End stage renal disease, ESRD)的機會也隨之增加(2)，因此目前相關研究的方向除了找出能有效治療或預防 AKI 的方法之外，也需要有更早期且更靈敏的生物標記(biomarkers)來進行早期的診斷，以便能夠盡早介入治療而減緩疾病的進展。臨床上最普遍使用的是依據血清肌酸酐作為 AKI 的判斷標準，血清肌酸酐是肌肉細胞中肌酸的代謝物，可以血清肌酸酐來反應腎絲球過濾率的狀態，然而血清肌酸酐並非最敏感的生物標記，血清肌酸酐除了會受到營養狀態、肌肉含量以及體重的影響外，也會隨著體液容積分佈以及疾病時體內代謝的影響，在敗血症感染的情況下血清肌酸酐的數值可能會降低(3)，且腎絲球過濾率的下降並非與血清肌酸酐的上升同步，在觀察到血清肌酸酐數值上升時往往已經到了急性腎損傷的後期，因而錯失治療的黃金時期。除了血清肌酸酐外，目前已知的生物標記有嗜中性白血球明膠酶相關性脂質運載蛋白(neutrophil-gelatinase-associated lipocalin, NGAL)、腎臟損傷因子(kidney injury molecule, KIM-1)、第十八型細胞間素(interleukin-18, IL-18)、血清半胱氨酸蛋白酶抑制劑(cystatin C)、基質金屬蛋白酶組織抑制劑(tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMP-2)，類胰島素生長因子結合蛋白(insulin-like growth-factor binding protein-7, IGFBP-7)、肝型脂肪酸結合蛋白(Liver-type fatty acid-binding protein, L-FABP)等，可以使用於臨床上 AKI 的診斷(4)。在美國腎臟數據系統(United States Renal Data Sysem, USRDS)2017 年的年度報告中顯示，在 2015 年 ESRD 的發生率(incidence)以及盛行率(prevalence)台灣分別為 476/百萬人以及 3317/百萬人(附錄 2)，皆高居世界第一，因此對於腎臟疾病的預防、治

療以及長期照護，都是目前極需關注並且解決的問題。

1.1.3 急性腎損傷病理機制

傳統上將急性腎損傷的病因分為腎前型(pre-renal)、腎因型(intrinsic)、腎後型(post-renal): (1)腎前型是在腎臟沒有受到實質損傷的情況下，由於腎臟灌流壓下降導致腎絲球過濾率(glomerular filtration rate, GFR)下降，(2)腎後型是在腎臟後端的尿液通路阻塞，導致腎小管內壓力增加進而使得 GFR 下降，(3)腎因型是由於腎臟本身受到實質損傷而導致 GFR 下降，依照病因分類可再細分為 4 個亞群: (1)急性腎小管壞死型(Acute tubular necrosis, ATN)，由於缺血或者是受到具腎毒性物質的傷害，(2)急性腎絲球腎炎型(acute glomerulonephritis, GN)，(3)急性腎間質腎炎型(acute interstitial nephritis)，(4)血管損傷型(vascular damage)(5)。

1.1.4 缺血再灌流損傷(Ischemia Reperfusion Injury)

腎臟缺血再灌流損傷(renal ischemia-reperfusion injury, IRI)是造成 AKI 最常見的原因，由於腎臟因為各種原因產生缺血的情形，血流無法及時供應氧氣以及營養物質，導致細胞的傷害以及代謝廢物的累積，而引起腎臟細胞的損傷，最終造成腎功能異常，造成腎臟缺血的原因有許多種，包括敗血症、腎臟大小血管的病變、心血管功能異常、藥物的使用，如顯影劑等(6)。

IRI 發生後的病理生理機制十分複雜，主要可以分為三個面向來探討，分別為腎小管上皮細胞損傷、血管內皮細胞功能受損以及發炎反應。當腎臟持續缺血，細胞內的腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)會逐漸消耗殆盡，此時腎小管上皮細胞以及血管內皮細胞就會逐漸受到傷害，並引發一連串的發炎反應，當內皮細胞受到 IRI 的損傷後，其糖萼(glycocalyx)以及細胞骨架的完整性會受到破壞，使內皮細胞間的連結受到影響，導致內皮細胞脫落，並使微血管通透性增加，使免疫細胞較易進入腎臟間質中，當活化後的白血球浸潤到細胞間質內，受到增加的細胞黏附分子(intracellular adhesion molecule-1, ICAM-1)影響，白血球及內皮細胞間



的交互作用會增加，並促進促發炎細胞激素的分泌，造成微血管栓塞，使 GFR 持續降低。在 IRI 時，皮質髓質交界處是最主要受到傷害的區域，這是由於受到近髓質的直管(vasa recta)逆流交換(countercurrent exchange)所形成的滲透梯度影響，該處的氧濃度本來就較低，且該處也是高度耗能的區域，因此在血流供應不足時就容易受到嚴重的傷害(6, 7)。先天以及後天的免疫反應對於 IRI 的致病機制扮演著十分重要的角色，除了上述血管內皮細胞與白血球的交互作用外，受傷的腎小管上皮細胞會釋放許多促發炎細胞激素如：tumor necrosis factor α (TNF- α)、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)、interleukin-8 (IL-8)、interleukin-6 (IL-6)、interleukin-1 β (IL-1 β)、transforming growth factor- β (TGF- β)、RANTES 以及 epithelial neutrophil-activating protein-78 (ENA-78)等來活化免疫細胞，另外腎小管細胞也會透過 Toll-like receptors (TLRs)、補體(complement)、補體受體(complement receptors)來吸引免疫細胞以加強免疫反應(6)。除了發炎反應外，活性氧化物質(Reactive oxygen species, ROS)也是造成 IRI 後細胞損傷的物質之一，在缺血時，細胞內的 ATP 以及氧氣逐漸耗盡，此時體內的代謝廢物無法排除，其中次黃嘌呤(hypoxanthine)會大量累積，而再灌流時期時次黃嘌呤會被酵素分解成黃嘌呤(xanthine)，此過程會產生過氧化氫(hydrogen peroxide)以及超氧化物(superoxide)，過氧化氫會再經二價鐵離子還原成氫氧自由基(hydroxyl radical)，這些 ROS 便會造成蛋白質氧化、脂質過氧化、DNA 被破壞並刺激細胞凋亡(apoptosis)，使得腎小管細胞受到傷害(8, 9)。

在 IRI 的動物模式中，最容易觀察到損傷的位置是在近曲小管(proximal tubule)的 S3 段(10)，在病理切片中可以看到腎小管上皮細胞在受到 IRI 的損傷後，刷狀緣(brush border)會變得不完整，且細胞骨架完整性以及細胞間的極性喪失，導致黏附分子(adhesion molecule)以及細胞膜上鈉鉀幫浦(Na⁺K⁺-ATPase)錯位，細胞間的連結以及緊密接合(tight junction)喪失，此時壞死的腎小管上皮細胞便會脫落，掉入管腔內形成圓柱體(casts)，大量的圓柱體阻塞管腔後導致 GFR 下降(5, 9)。



1.1.5 粒線體於急性腎損傷的角色

粒線體是具有雙層膜結構的胞器，其最主要的功能是經由 tricarboxylic acid (TCA) cycle 或是脂肪酸的 β -oxidation 提供身體所需要的 ATP，粒線體可以透過 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) coactivator-1alpha (PGC-1 α)、Nuclear respiratory factors 1 and 2 (NRF1 and NRF2) 等基因來調控粒腺體生合成以及能量生成，其中在腎臟的近端腎小管細胞中，有大量的 PGC-1 α 表現(11)，暗示 PGC-1 α 對於近端腎小管功能的調控扮演著重要的角色，有研究將老鼠全身性以及近端腎小管 PGC-1 α 的表現抑制，在內毒素誘發 AKI 的動物模型下，這些 PGC-1 α 缺失的老鼠比起 littermate control 腎臟損傷的時間會更持久(12)。粒線體的動態平衡，也就是分裂(fission)及融合(fusion)作用由 dynamin-related protein 1(Drp1)、mitofusin 1(Mfn1)、mitofusin 2(Mfn2)、optic atrophy 1(OPA1)等蛋白來調控(11, 13)，在 AKI 時近端腎小管的 Drp1 會被大量活化，導致粒線體破裂(mitochondrial fragmentation)，釋出 cytochrome c 並活化下游的 caspase 9 以及 caspase 3 以促進細胞凋亡(13, 14)，此外，粒線體也是 ROS 的來源之一，在經由電子傳遞鏈產生 ATP 的過程中，也會產生 ROS，導致粒線體 mtDNA 以及蛋白質的損傷，此時損傷的粒線體會經由自噬作用(mitophagy)清除(15)，正常狀況下，粒線體的生合成與自噬作用會達到平衡，維持粒線體功能正常運作，而在 AKI 時粒線體的分裂(fission)及融合(fusion)作用不平衡，導致粒線體破裂，增加 ROS 的釋放，促使細胞凋亡(16)。

1.1.6 急性腎損傷的自我修復

腎臟上皮細胞受到缺血或毒性物質損傷後，可以進行自我修復，存活下來的腎小管上皮細胞會表現波型蛋白(vimentin)以及增殖細胞核抗原 proliferating cell nuclear antigen (PCNA)，並進行去分化(de-differentiation)、增生(poliferation)以及分化(differentiation)作用，重新建立完整的腎小管上皮，使腎功能慢慢回復(17-19)。骨髓來源的間質幹細胞(mesenchymal stem cells)進入損傷的腎臟後，可以透過旁泌



作用，分泌 hepatocyte growth factor (HGF)、epidermal growth factor (EGF)、insulin-like growth factor (IGF)等因子來調節增生以及分化等作用(20)，EGF 可以與 EGF 受體結合活化下游細胞路徑，以促進腎小管上皮細胞的增生，腎臟損傷後，存活下來的腎小管細胞會增加 IGF 的分泌，並且促進 EGF 受體的表現(21)，藉由與 EGF 結合活化下游的細胞路徑，維持腎小管增生的作用，此外 HGF 於腎臟中的表現也會增加，HGF 可以與 c-met 受體結合，活化下游與細胞增生以及分化相關的路徑(22-24)。當細胞修復不完全時，會導致腎小管間質慢性發炎，纖維母細胞(fibroblasts)增生，造成腎臟纖維化以及腎小球硬化(glomerulosclerosis)等與腎臟老化過程類似的症狀，此時病症就會由 AKI 慢慢往 CKD 的方向發展(6, 17, 25, 26)。

1.1.7 急性腎損傷動物模式

造成 AKI 的原因有許多種，為了研究 AKI 相關的議題，有許多的動物模式因而發展出來，大致上可分為三種：(1)腎毒性藥物：給予 gentamicin, cisplatin, amphotericin 等藥物，導致這些物質堆積在近曲小管上皮細胞內，造成腎毒性。(2)：控溫缺血再灌流(warm ischemia-reperfusion)模式：此模式是現今最為常見的 AKI 動物模式，也最接近人體致病的機制，依照做法的不同，可以再細分為雙側缺血再灌流模式或者是單側缺血再灌流模式，雙側缺血再灌流模式是將兩側腎臟的腎蒂(renal pedicle)夾緊再放開，造成腎臟損傷；單側缺血再灌流模式則是將一側腎臟保留或者進行切除，並將對側腎臟的腎蒂夾緊再放開。(3)感染敗血型(infectious/septic)AKI：以盲腸結扎穿刺 cecal ligation and puncture (CLP)引起腹膜炎敗血症，或者是給予內毒素如 lipopolysaccharide (LPS)來誘發 AKI(27-29)。

1.2 Tamoxifen

1.2.1 Tamoxifen 簡介

Tamoxifen(TAM)是由英國帝國化學工業(Imperial Chemical Industries PLC, ICI)的製藥部門合成的藥物，當時稱為 ICI 46,474，在 1960 年代早期 TAM 是作為避孕



藥物使用的，而後 Dr. Arthur Walpole 以及 Dr. Michael Harper 發現了 TAM 具有抗雌激素(antiestrogen)的能力(30)，在 1977 年，TAM 正式通過食品藥品監督管理局(Food and Drug Administration, FDA)的核准作為乳癌用藥使用，TAM 可藉由與雌性激素(estrogen)競爭雌激素受體(estrogen receptors)的結合，在乳房抑制癌細胞的增生，因而可以做為雌激素受體陽性乳癌的用藥(31, 32)，TAM 在進入體內後，可經由不同酵素代謝成其他活化態的形式，如：經由 CYP2D6 進行氫氧化，代謝成 4-hydroxy TAM，或經由 CYP3A4/5 進行去甲基化，代謝成 N-desmethyl TAM，其中 4-hydroxy TAM 是最主要作為抗雌激素活性(antiestrogenic activity)的代謝物(30, 33, 34)。TAM 及其代謝物可以藉由與雌激素受體結合，並與 Nuclear receptor corepressor (NCoR) and silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors (SMRT)等蛋白共同作用，來調節雌激素受體下游基因的表現(35-37)，此外 TAM 可以與 PAX2 蛋白共同抑制促增生相關蛋白 ERBB2 的表現，而達到抗癌的效果(38)，TAM 除了可以透過雌激素受體來調節細胞的功能外，還有許多雌激素受體作用以外的調控能力，例如：研究發現 TAM 能增強嗜中性白血球(neutrophil)的細菌清除能力(39)，TAM 也具有調控神經鞘脂質(sphingolipid)生合成的功能(40)，因此除了癌症使用上，TAM 或許還有更多未知的生理調控功能可以應用於疾病治療上。

1.2.2 TAM 與腎臟疾病

近期有越來越多的研究證實 TAM 具有抗纖維化(antifibrosis)的能力，因此有潛力應用於相關腎臟疾病的治療上，有研究發現 TAM 可以透過雌激素受體 α (estrogen receptor α , ER α) 來調節轉化生長因子(transforming growth factor- β 1/Smad, TGF- β 1/Smad)這條路徑以減緩單側輸尿管阻塞 unilateral ureteral obstruction (UUO)所誘導的腎小管間質纖維化(renal tubulointerstitial fibrosis)(41)，另一篇研究使用 L-arginine methyl ester (L-NAME)誘導高血壓性腎硬化(hypertensive nephrosclerosis)的動物模式來研究 TAM 對於纖維化的影響，也發現 TAM 可以減緩白蛋白尿(albuminuria)、腎小球硬化(glomerulosclerosis)、間質纖維

化(interstitial fibrosis)的症狀，並且 TAM 可能是透過直接調控 TGF- β 1 的表現來減緩腎臟纖維化的發生(42)。除了動物以及細胞實驗外，也有臨床試驗研究 TAM 應用於特發性腹膜後纖維化(idiopathic retroperitoneal fibrosis, RPF)(43)以及包囊性腹膜硬化症(encapsulating peritoneal sclerosis, EPS)(44)，兩者都得到正向的結果，因此 TAM 在腎臟相關疾病的使用上也有許多潛力以及可能性。

1.3 嗜中性白血球明膠酶相關性脂質運載蛋白(neutrophil-gelatinase-associated lipocalin, NGAL)

1.3.1 NGAL 結構與功能

NGAL 又稱 lipocalin2 (Lcn2)、siderocalin、24p3，是脂質運載蛋白家族中的成員之一(45)，NGAL 最早被發現是由嗜中性白血球所分泌(46-48)，其核心結構是由 8 個 β 折疊(β -strands)所構成的 β 摺疊桶 (β -barrel)結構(49)，目前已知 NGAL 有三種不同的形態，分別為由嗜中性球以及上皮細胞所分泌的單體醣蛋白形式 monomeric NGAL，大小為 25kDa，其中腎小管上皮細胞被認為是尿液中 monomeric NGAL 最主要的來源(47, 50)；由嗜中性球所分泌的雙體形式 homodimeric NGAL，大小為 45kDa；以及由腎小管上皮細胞分泌的 heterodimeric NGAL，此形式 NGAL 與 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)形成共價鍵結，大小為 135 kDa (50-52)。NGAL 對於嗜鐵載體(siderophore)具有很強的親和力，細菌所分泌的嗜鐵載體會與宿主的運鐵蛋白以及儲鐵蛋白競爭三價鐵的吸收，因此可以透過 NGAL 與嗜鐵載體有高親和力的特性，阻止細菌對鐵的吸收，進而達到殺菌的功效(53)。在細胞內 NGAL 能透過嗜鐵載體調控細胞對於鐵的吸收或轉運，進而調控與鐵相關的細胞生長路徑(growth pathway)以及細胞凋亡路徑(54)，當 NGAL 與攜帶有鐵的嗜鐵載體形成複合體的型態(holo-NGAL)後，可以透過與細胞上的 NGAL 受體(24p3R 或者 megalin)結合而進入細胞內，並釋放出鐵來活化下游相關的基因表現；相反的，當 NGAL 呈現未與鐵結合的型態(apo-NGAL)，與細胞上的受體結合並進入細胞內後，



則可以與細胞內含鐵的嗜鐵載體結合形成複合體，進而將鐵運送出細胞外，造成細胞內鐵濃度的下降，此時促進細胞凋亡的蛋白質 Bim 表達上升，使得細胞開始進入細胞凋亡(55, 56)。

1.3.2 NGAL 與腎臟疾病

在腎臟發育的過程中，NGAL 能促進上皮細胞分化成間質前驅細胞 (mesenchymal progenitor cells)，後續形成腎絲球、腎小管、亨利氏環等構造(57)，除了腎臟發育時期 NGAL 表現會增加之外，損傷的上皮細胞也會分泌 NGAL，人體的體液在正常情況下 NGAL 的濃度並不高，在發炎、氧化壓力、缺血、惡性腫瘤等情況下則會增加 NGAL 的表現(58-62)。血液中 NGAL 來源為嗜中性白血球、肝臟、腎臟、脾臟、肺臟等器官，當上述器官的上皮細胞受到損傷時，會活化 nuclear factor-kappaB (NF-kB) 路徑，NF-kB 以及輔因子 inhibitor of kappaB-zeta (IkappaB-zeta) 複合體會結合到 NGAL 的啟動子(promotor)上，促進 NGAL 的表現(54, 63, 64)。腎臟對於維持 NGAL 在體內的穩定表現扮演著很重要的角色，由於 NGAL 具有低分子量以及帶正電的特性，因此可以通過腎絲球過濾，接著在近端小管(proximal tubule) NGAL 被捕捉後，經由溶酶體(lysosomes)分解成 14kDa 大小的片段，並透過頂端膜(apical membrane)進行胞吞作用再吸收(65)。近年來有越來越多實驗證實 NGAL 可以做為早期診斷 AKI 的生物標記，研究發現腎臟受到缺血或者腎毒性損傷後 NGAL 的蛋白質表現在早期就會顯著上升，並且在尿液中也可以偵測到 NGAL 的表現(63, 66, 67)，透過缺血再灌流的動物模型發現，灌流後 3 小時腎臟 NGAL 的基因表現就會開始上升，在 12 小時達到高峰，12~24 小時後則逐漸降低(68)，另一篇以高劑量順鉑(cisplatin)引發腎毒性導致腎損傷的動物模型發現，在給予順鉑三小時後腎臟以及尿液中的 NGAL 蛋白質表現量顯著上升，並且透過免疫螢光染色發現 NGAL 表現在近端小管上皮細胞上(69)。

1.3.3 NGAL 對急性腎損傷的保護作用



NGAL 除了可以作為 AKI 早期的生物標記外，近期有學者認為 NGAL 的上升，對於 AKI 整個疾病過程中扮演著重要的角色，有越來越多的實驗發現在缺血再灌流的動物模型下，若額外以靜脈注射給予 NGAL 的補充，可以降低 AKI 的嚴重程度，不論是在病理組織切片上，血清中 BUN、creatinine 的檢測，或者是細胞凋亡相關蛋白質或者基因水平的分析，都可以發現給予 NGAL 後，損傷程度有所降低(70-72)，另外也有實驗在缺血再灌流手術前 1 小時、手術中、手術後 1 小時從尾靜脈給予 NGAL，發現有給予 NGAL 的組別損傷程度降低，且越早給予預防的效果越好，而分析增生相關的標記如 PCNA 則可以發現，給予 NGAL 的組別 PCNA 的表現量顯著增加(73)。在細胞實驗則發現，給予腎臟上皮細胞株(NRK-52E)缺氧再灌流後，給予 NGAL 的組別，促細胞凋亡相關的基因以及蛋白質表現皆顯著降低，而抑制細胞凋亡的基因以及蛋白質表現則顯著增加，顯示 NGAL 可以透過調控腎臟上皮細胞的細胞凋亡來減少腎臟上皮細胞損傷(74)。

1.4 腎損傷分子 Kidney injury molecule-1 (KIM-1)

腎損傷分子 Kidney injury molecule-1 (KIM-1)又被稱為 hepatitis A virus cellular receptor 1(Havcr1)或者是 T-cell immunoglobulin mucin 1(Tim-1)，KIM-1 是第一型糖膜蛋白(type 1 membrane glycoprotein)，其胞外結構含有 6 個 cysteine 組成的類免疫球蛋白區(six-cysteine immunoglobulin-like domain)、兩個 N-糖基化位點(N-glycosylation sites)、黏蛋白結構區(mucin domain)(75)。正常情況下，KIM-1 在腎臟中的表現並不高，而 KIM-1 在腎臟損傷時，近端腎小管會大量表現 KIM-1(76-78)，KIM-1 約 90kD 的胞外結構會被 matrix metalloproteinases (MMPs)切下，在尿液及血液中則可以檢測到 KIM-1 的大量表現(79)，有許多研究證實 KIM-1 可以當作人類或者是老鼠實驗模型中腎臟損傷的指標(80-83)，此外也有研究以不同腎毒性物質引發腎臟損傷，結果發現在不同腎毒性物質的模型下皆可以觀察到 KIM-1 增加表現(76)。KIM-1 除了表現在腎小管細胞外，也有少部分會表現在淋巴球(75, 84)，也因此才又被稱為 TIM-1。近期有部分研究發現 KIM-1 之 phosphatidylserine

receptor 具有吞噬能力，可以在腎小管細胞將進入細胞凋亡的細胞吞噬，以降低先天性發炎以及免疫反應，由此來達成急性腎損傷的保護效果(85, 86)。



1.5 實驗目的

在醫療日益進步的現在，醫院內急性腎損傷的發生率以及死亡率依舊居高不下，本實驗室在以 TAM 來誘導 Cre recombinase 基因轉殖鼠 cre 重組酶的活性時，發現這些老鼠接受 IRI 手術損傷的嚴重程度會降低，我們以 C57BL/6J 小鼠來進行實驗也得到一致的結果，本篇論文旨在找出 TAM 究竟是透過何種途徑，以及如何影響急性腎損傷，若能找出相關機轉，或許能應用於臨床急性腎損傷的藥物開發以及預防治療上。



第二章 材料與方法

2.1 材料

2.1.1 實驗動物

本論文使用 C57BL/6J 以及 Pax8-rtTA^{Tg}; LC1^{Tg}; RS26^{fstdtomato} 小鼠進行實驗，C57BL/6J 來源為台大醫學院大動物代養中心 10 樓，Pax8-rtTA^{Tg}; LC1^{Tg} 來源為德國海德堡大學 Dr. Robert Koesters 所提供。

上述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 藥品與試劑

Name	Information
100 bp DNA ladder	Cat. ADM100.500, Arrowtec Limited, Berkshire, RG46XJ, UK
Agarose	Cat. A9539, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
30% Acrylamide/Bis solution 29:1	Cat. 1610156, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Ammonium persulfate (APS)	Cat. A3678, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Bovine serum albumin (BSA)	Cat. ALB001, BioShop Canada Inc., Burlington, Ontario, Canada
BD Pharm Lyse™	Cat.555899, BD Biosciences, USA
Chloroform: Isoamylalcohol 24:1	Cat. C0549, Sigma-Aldrich Co. LLC., St.

	Louis, MO, USA
4',6'-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)	1:1000, Cat. D1306, Molecular Probes, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc., 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 buttered, 10%	Cat. HT501128, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
Ficoll-Paque PREMIUM 1.084 Sterile solution	Cat. 17546602, GE Healthcare.
Heparin LEO 5000 i.u./ml	LEO, Pharma A/S, Ballerup, Denmark
iQ TM SYBR [®] green supermix	Cat. 170-8882AP, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
iScript TM 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
Luminata [™] Classico western HRP substrate	Cat.WBLUC0500, Millipore Corporation, Billerica, 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
Protein assay dye	Cat. 5000006 Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Paraformaldehyde (PFA)	Cat. 441244, Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA
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
Proteinase inhibitor cocktail	Cat. FC0070-0001, BIONOVAS Biotechnology Co., Ltd. Toronto. Ontario.
5X Protein Loading Buffer	Cat. GM47-b, GMbiolab Co., Ltd.
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
RIPA lysis buffer	Cat. N653, AMRESCO, LLC, Solon, Ohio USA
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



TEMED	Cat. TEM001.25, Bioshop Canada Inc., Burlington
Tissue-Tek [®] O.C.T Compound	Cat. 4583, Sakura Finetek USA., Inc., Torrance, CA, 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

2.1.3 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	

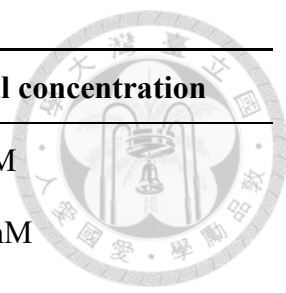
Periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) solution 200mL

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	

Transfer Buffer 1L

Chemicals and reagent	Quantity	Final concentration
Tris Base	60.5g	0.5M
Glycine	38.3g	0.51M
SDS	1g	0.1%

TBS(10x) 1L

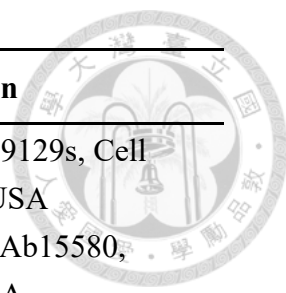
Chemicals and reagent	Quantity	Final concentration
Tris Base	30.3g	0.25M
Nacl	80g	1.37M
Kcl	2g	0.027M

TBST(1x) 500mL

Chemicals and reagent	Quantity	Final concentration
TBS(10X)	50ml	10%
50%Tween20	500μl	0.1%
ddH ₂ O	Add to 500ml	

2.1.4 抗體

Primary antibodies



Name	Host	Information
Anti-mouse Ki67	Rabbit	1:500, Cat. 9129s, Cell signaling, USA
Anti-mouse Ki67	Rabbit	1:400, Cat. Ab15580, Abcam, USA
Anti-laminin	Rabbit	
Anti-nidogen	Rat	
Cleaved Caspase-3 (Asp175) (5A1E)	Rabbit	1:500, Cat. 9664, Cell signaling, USA
Cleaved Caspase-7 (Asp198)	Rabbit	1:500, Cat. 9491, Cell signaling, USA

Secondary antibodies

Name	Information
Cy TM 3-conjugated	1:400, Cat. 111-165-144, ImmunoResearch
AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)	Laboratories Inc., USA
Cy TM 3-conjugated	1:400, Cat. 112-165-167, ImmunoResearch
AffiniPure Goat Anti-Rat IgG(H+L)	Laboratories Inc., USA
FITC-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)	1:400, Cat. 111-095-144, ImmunoResearch
Rabbit IgG antibody(HRP)	1:1000, Cat. GTX213110-01, GeneTex, USA

2.1.5 試劑盒

Name	Information
DeadEnd TM Fluorometric TUNEL System	Cat. G3250, Promega Corporation, USA
Mouse TIM-1/KIM-1/HAVCR Quantikine ELISA Kit	Cat. MKM100, R&D Systems, Inc. USA

Mouse Lipocalin-2/NGAL	Cat. MLCN20, R&D Systems, Inc. USA
Quantikine ELISA Kit	
Neutrophil isolation kit, mouse	Cat. 130-097-658, Miltenyi Biotec Inc.
	USA
RNeasy Mini Kit	Cat. 47106, QIAGEN.

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 6 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一。使用 T100 thermal cycler (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 缺血再灌流模型



利用 ketamine/xylazine 混合型麻醉劑(100/10 mg/kgBW, 腹腔注射)對小鼠進行麻醉。小鼠在 8 週大時先進行右側腎臟摘除手術；兩週後，再利用微動脈瘤夾將左側腎臟腎蒂夾緊 24 分鐘再鬆開完成 IRI 手術。手術期間利用恆溫電毯監控系統 (Stoelting Co., IL, USA)維持小鼠的體溫在 37°C。並且在手術當天及隔天利用腹腔注射的方式替小鼠補充 1 ml 生理食鹽水，雙側 IRI 則是等小鼠 9~10 週大時，利用微動脈瘤夾將左右側腎臟腎蒂夾緊 24 分鐘再鬆開完成 IRI 手術。

2.2.3 檢體採集

2.2.3.1 血漿的採集與檢測

以肝素鈉(sodium heparin)潤濕微量離心管或空針，然後利用臉頰採血或犧牲老鼠時由下腔靜脈抽取全血，再以 4°C，3000 rcf 離心 10 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)及肌酸酐(creatinine)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)，腎臟對半縱切成兩個二分之一顆的腎臟，再橫切成四個四分之一顆的腎臟。一個四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；另一個四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。兩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 血液中嗜中性白血球的分離

將小鼠犧牲後，採取適量血液，加入 BD Pharm Lyse™於 37°C 進行作用 15 分鐘，使紅血球裂解，接著加入適量 1 倍 PBS，以 4°C，200 rcf 離心 5 分鐘，吸除上清液，接著依照 Neutrophil isolation kit (Cat. 130-097-658, Miltenyi Biotec Inc) 的步驟進行血液嗜中性白血球的分離。

2.2.3.4 血液中 buffy coat 的分離

將小鼠犧牲後採血，加入適量 sodium citrate 混勻，以 1 倍 PBS 稀釋至 3ml，用滴管緩慢將稀釋後血液加入 3ml Ficoll-paque premium 1.084 (Cat. 17546602)，於室溫以 1000 rcf 離心 5 分鐘，此時可以看到中間有一層白色狀的薄層，此層就是 buffy coat，用滴管將此層小心地吸起來，並以 1 倍 PBS 將總體積補至 10 ml，然後於 4°C 以 1000 rcf 離心 5 分鐘，去除上清液，後以 RNeasy mini kit 抽取細胞的 RNA。

2.2.3.5 腎臟腎小管細胞的分離

Tg(Pax8-rtTA);Tg(LC1);tdtomato 小鼠於右側腎臟摘除手術前一周將飲水換成含有 doxycycline hyclate 之蔗糖水，doxycycline hyclate 濃度為 0.2 毫克溶於一毫升 2% 蔗糖水中，右側腎臟摘除後將飲水換回正常飲水，並於右側腎臟摘除手術 11 天後連續管餵三天 Tamoxifen 或者 olive oil，管餵後隔天將 Tg(Pax8-rtTA);Tg(LC1);tdtomato 小鼠犧牲，取出腎臟以 PBS 清洗乾淨，用鑷子將腎囊剝除，以手術刀片將腎臟剝碎後，每顆腎臟加入 5ml DMEM/F12 + 15μl collagenase + 21μl Dispase 於 37°C 作用 45 分鐘，後以 70μm 的濾網將細胞過濾到 DMEM/F12 + 10% FBS 中，接著於 4°C 以 1500rpm 離心 5 分鐘，去除上清液後加入 3ml sorting buffer，從 40μm 濾網過濾細胞至上樣管中，完成前處理後將上樣管送至台大醫學院第一共研流式細胞分析暨分選核心收取 tdtomato positive 的腎小管細胞，後將細胞於 4°C 以 1500rpm 離心 5 分鐘，去除上清液後以 RNeasy mini kit 抽取細胞的 RNA。

2.2.4 Periodic Acid-Schiff (PAS) 染色

檢體使用石蠟切片機將檢體切成厚度 4 μm 的切片，然後送至台大醫學院實驗動物中心進行 PAS 染色。用 Nikon eclipse E400 顯微鏡以 400 倍率進行閱片，使用顯微鏡照相系統(Nikon DS-Fi1 鏡頭與 Digital sight DS-L2 顯示器)進行拍攝，曝光時間 1/40s，解析度 1280x960。拍攝區域為皮質-髓質交界處，每個檢體約拍攝 9-12 張影像，每張再均分成 252 格的方格，計算損傷的格數，最後算出平均的損傷百分比，再進行統計分析。

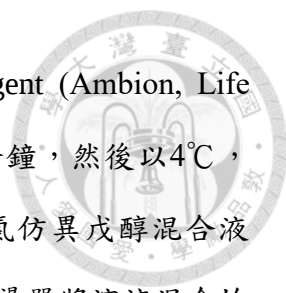
2.2.5 免疫螢光染色(immunofluorescence ; IF)

檢體使用冷凍切片機將檢體切成厚度 4 μm 的切片，以 PBS 洗去多餘的冷凍包埋劑，再用 10%的 Normal goat serum (NGS)進行 blocking，作用 30 分鐘。然後加入一級抗體 Ki67 (1 : 400, 9129s, Cell signaling, USA)於 4°C作用至少 16 小時。隔日用 PBS 清洗後，再加入帶有螢光的二級抗體 FITC-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(1:400, 111-095-144, ImmunoResearch Laboratories Inc., USA)作用 30 分鐘。用 PBS 清洗後，以 DAPI(1:1000, D1306, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)染細胞核，作用 4 分鐘。再用 PBS 清洗 5 分鐘，共三次。然後利用 VECTASHIELD® (Vector Laboratories, USA)進行封片。使用台大醫學院第一共研顯微影像核心實驗室的螢光顯微鏡照相系統(正立共軛焦顯微鏡 1 Leica SP5)以 400 倍率進行閱片拍攝，解析度 1024x1024。拍攝區域為皮質-髓質交界處。

2.2.6 TUNEL 分析(Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay, TUNEL assays)

檢體使用冷凍切片機將檢體切成厚度 4~5 μm 的切片。用 PBS 洗去多餘的冷凍包埋劑後，使用 DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Cat.G3250, Promega Corporation, USA)進行染色，所有步驟流程依照試劑組提供之步驟進行，完成染色後再進行封片。使用前述的螢光顯微鏡照相系統，以 400 倍率進行閱片拍攝，解析度 1024x1024。拍攝區域為皮質-髓質交界處。

2.2.7 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℃，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℃，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℃，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℃冰箱。

2.2.8 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 µl 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 µM之正反引子(primer)與1X iQ™ SYBR®Green Supermix，總體積20 µl進行PCR放大特定基因之序列。使用的引子序列清單列於表二。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)。

2.2.9 蛋白質萃取及分裝

磨碎的腎臟組織加入適當體積的 RIPA lysis buffer(Cat. N653, AMRESCO, LLC) 以及 proteinase inhibitor cocktail(Cat. FC0070-0001, BIONOVAS Biotechnology)，置



於冰上 15 分鐘，接著於 13200rpm，4°C 離心 30 分鐘，吸取上清液，以 BSA 序列稀釋做為參考濃度曲線，萃取好的蛋白質加入 1x protein assay dye(Cat. 5000006 Bio-Rad Laboratories Inc.)，反應五分鐘後，以 595nm 測吸光值，接著換算成濃度，再將蛋白質分裝成每管 50μg，加入 5x protein loading buffer (Cat. GM47-b, GMbiolab Co., Ltd.) 以及二次水使總體積為 16μl，並於 95°C 乾浴 5 分鐘，保存於-80°C 冰箱。

2.2.10 西方墨點法(Western blot)

以 30% acrylamide/bis solution 29:1(Cat. 1610156, Bio-Rad)、二次水、1.5M Tris(ph8.8)、10%SDS(Cat. 75746, Sigma)、TEMED(Cat. TEM001.25, Bioshop)、10%Ammonium persulfate(Cat. A3678, Sigma)配置好分離膠體溶液(separating gel)，加入鑄膠台中，以二次水於上方壓膠，等待膠體凝固，以 30% acrylamide/bis solution 29:1(Cat. 1610156, Bio-Rad)、二次水、1.0M Tris(ph6.8)、10%SDS(Cat. 75746, Sigma)、TEMED(Cat. TEM001.25, Bioshop)、10%Ammonium persulfate(Cat. A3678, Sigma)配置好上層 Stacking gel，加入已凝膠之 separating gel 上方，壓入齒梳等待凝膠，加入已分裝蛋白於 50V、200mA 進行電泳，待樣品超過 Stacking gel 後將電壓調整為 100V、200mA，電泳結束後進行轉漬(transfer)，條件為 90V、300mA、90 分鐘，transfer 完成後進行以 5%脫脂奶粉溶於 TBST 進行 blocking，而後以 1X TBST 清洗 3 次 5 分鐘，接著使用一抗 Anti-mouse Ki67(1:500, Cat. Ab15580, Abcam)、Cleaved Caspase-3(1:500, Cat. 9664, Cell signaling)、Cleaved Caspase-7(1:500, Cat. 9491, Cell signaling,)於 4°C 冷房中進行作用至少 16 小時，隔天以 1X TBST 清洗 3 次 5 分鐘後，使用二抗 Rabbit IgG antibody(HRP)(1:1000, Cat. GTX213110-01, GeneTex)於室溫作用 90 分鐘，再以 1X TBST 清洗 3 次 5 分鐘後，淋上 LuminataTM Classico western HRP substrate(Cat.WBLUC0500, Millipore Corporation)，於台大醫學院第一共研 Chemiluminescence Imager biostep Calvin[®] S 420 系統進行顯影，實驗結果使用 Image pro plus 軟體進行分析定量。

2.2.11 酵素結合免疫分析法(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay;ELISA)

以 Mouse Lipocalin-2/NGAL Quantikine ELISA Kit(Cat. MLCN20, R&D Systems, Inc.)以及 Mouse TIM-1/KIM-1/HAVCR Quantikine ELISA Kit(Cat. MKM100, R&D Systems, Inc.)進行血清中 NGAL 和 KIM-1 表現量的分析，所有步驟流程依照試劑組提供之步驟進行。

2.2.12 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 $\pm$ 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 連續給予 TAM 三天後可以降低 IRI 在第二天及第七天的腎損傷

過去實驗室發現給予 TAM 來誘導 Cre recombinase 的基因轉殖鼠 Cre 重組酶的活性後，這些老鼠接受 IRI 手術損傷的嚴重程度會降低，為了探討是否 TAM 確實可以降低急性腎損傷的嚴重程度，以及探討相關的機轉，我們以雄性 C57BL/6 小鼠進行 nephrectomy + IRI 的模型誘導急性腎損傷，發現在 nephrectomy 之後以管餵的方式連續給予三天 TAM，IRI 後第二天以及第七天血漿的 BUN 以及 creatinine 的數值皆較單獨給予 olive oil 的組別低(圖一 A)，且達到統計上的差異。為了瞭解是否 TAM 在靠近急性腎損傷的時間點給予能有一樣的效果，我們在 IRI 前三天連續管餵 TAM，仍然發現第二天以及第七天的 BUN 以及 creatinine 的數值皆較管餵 olive oil 的組別低(圖一 B)。為了能符合臨床使用上的需求，模擬在急性腎損傷前給予 TAM 的治療，我們進一步累積 IRI 前三天給予 TAM 小鼠的數目，並在 IRI 後第二天犧牲，收取腎臟以及血液的檢體進行後續機轉的分析，我們再次發現在 IRI 前三天給予 TAM 的小鼠，IRI 後第二天的 BUN 以及 creatinine 的數值皆較給予 olive oil 的組別低，且達到統計上的差異(圖一 C)。我們觀察腎臟皮質髓質交界處在 IRI 後的變化，利用圓柱體(cast)的形成、腎小管的壞死、刷狀緣(brush border)的完整性來判斷腎臟損傷的程度，也發現給予 TAM 的組別，在 IRI 後第二天腎臟組織損傷的程度較低，並且達到統計上的差異(圖二)，與血清生化學上的結果一致。

3.2 TAM 劑量對於急性腎損傷的保護效果

我們使用 TAM 管餵的劑量為誘導 Cre recombinase 基因轉殖鼠 Cre 重組酶活性的劑量，每隻老鼠給予 0.4 毫克/克體重/天，連續管餵三天，然而此劑量若換算成應用於人體的劑量是很高的，因此我們試著降低給予 TAM 的劑量，想找出有效的最低劑量，發現若分別在 IRI 三天前或是一天前給予一次 0.4 毫克/克體重劑量管餵，其保護效果就消失了(圖三 A)。接著我們將管餵的劑量降低，測試 0.2、0.1

毫克/克體重/天，在 uIRI 前連續管餵三天，發現在低劑量的效果並不顯著(圖三 B)。

3.3 連續管餵三天 TAM 以及 IRI 後 NGAL 以及 KIM-1 的表現

由於在第二天的血漿 BUN 及 creatinine 的表現上，皆可看到給予 TAM 後，數值顯著降低，顯示出 TAM 在急性期就能影響急性腎損傷的嚴重程度，為了瞭解 TAM 究竟在什麼階段就產生影響，我們找了其他在急性腎損傷早期就能偵測到有大量表現的生化指標來進行研究，我們利用臉頰採血來觀察不同時間點 NGAL 以及 KIM-1 的表現(圖四 A)，發現在 IRI 之前，給予 TAM 三天之後，老鼠血液中的 NGAL 表現就已經上升，並且達到統計上的意義，而在 IRI 後 24 小時，不論是否給予 TAM，血液中的 NGAL 比起 IRI 前皆顯著增加，在 IRI 後 48 小時，則可以發現給予 TAM 的組別 NGAL 的表現比起 IRI 後 24 小時要低，且顯著低於給予 olive oil 的組別(圖四 B)，我們在連續給予三天 TAM 後隔天將老鼠犧牲，萃取小鼠腎臟的 RNA 來進行分析，發現給予 TAM 後可以增加 NGAL 在腎臟組織的基因表現(圖四 C)，達到統計上的意義(圖四 F)。血液中 KIM-1 於 IRI 後 24 及 48 小時的表現則是在給予 TAM 的組別顯著低於管餵 olive oil 的組別(圖四 D)，在 IRI 之前血液中 KIM-1 的數值則在可偵測濃度之外。在連續給予三天 TAM 後隔天將老鼠犧牲，萃取小鼠腎臟的 RNA 來進行分析，也發現給予 TAM 之後可以增加 KIM-1 在腎臟組織的基因表現(圖四 E、圖四 G)。過去我們的經驗發現在 nephrectomy 之後，血液中 NGAL 的表現會上升，因此我們也在不同時間點進行臉頰採血，觀察 nephrectomy 之後 NGAL 的表現(圖四 H)，發現 nephrectomy 之後三天血液中 NGAL 的表現增加，且顯著高於沒有手術的控制組，但在 nephrectomy 後兩個禮拜血液中 NGAL 的表現下降，對比控制組則沒有統計上的差異(圖四 I)。在 nephrectomy 三天後將老鼠犧牲，萃取腎臟 RNA 進行分析，發現 Ngal 基因表現顯著增加，但是在 nephrectomy 兩個禮拜後犧牲的組別則發現與沒有手術的控制組間腎臟中 NGAL 基因表現沒有差異(圖四 J)。

3.4 給予 TAM 後可以降低 bilateral IRI 後第二天的腎損傷

因為觀察到 nephrectomy 會影響到 NGAL 的表現，因此我們使用 bilateral IRI 的動物模型來模擬急性腎損傷，減少 nephrectomy 造成的影響，結果發現不論是在 bilateral IRI 前兩個禮拜給予 TAM 或者是 bilateral IRI 前三天給予 TAM，皆可以降低 IRI 後第二天的損傷程度(圖五)，顯示 nephrectomy 與否並不會影響 TAM 減輕 AKI 嚴重度的效果。

3.5 給予 TAM 後 NGAL 以及 KIM-1 來源

由於觀察到連續給予 TAM 三天後，血液以及腎臟中 NGAL 以及 KIM-1 的表現增加，於是我們想找出增加 NGAL 以及 KIM-1 的來源，buffy coat 中含有白血球細胞以及血小板，而 buffy coat 中的嗜中性白血球細胞是分泌 NGAL 的來源之一，從實驗結果來看 IRI 後 buffy coat 中 NGAL 的基因表現相比 IRI 前上升許多，然而不論是否給予 TAM，buffy coat 中的 NGAL 基因表現在兩組間並無統計上的差異(圖六 A)，由於 buffy coat 中除了嗜中性白血球外，還有許多其他細胞，例如：淋巴球、血小板等等，因此我們利用 neutrophil isolation kit 進一步將嗜中性白血球收下來，以觀察 NGAL 的基因表現，減少其他細胞造成的干擾，實驗結果依舊發現在連續給予 TAM 三天後，血液中嗜中性白血球的 NGAL 基因表現與給予 olive oil 的組別相比沒有差異(圖六 B)。除了嗜中性白血球之外，肝臟也是 NGAL 的來源之一，從實驗結果發現連續給予 TAM 三天後，肝臟 NGAL 基因表現對比給予 olive oil 的組別顯著上升(圖六 C)。我們也觀察 buffy coat 中 KIM-1 的基因表現，從實驗結果看來在 IRI 後，不論是否給予 TAM，兩組間 buffy coat 的 KIM-1 基因表現沒有顯著差異，但是在連續給予 TAM 三天後 buffy coat 的 KIM-1 表現顯著高於給予 olive oil 的組別(圖六 D)。接著我們使用 Pax8-rtTA^{Tg}; LC1^{Tg}; RS26^{fstdtomato} 老鼠，於連續給予 TAM 三天後將具有 tdtomato 紅色螢光的腎小管細胞收下來，抽取 RNA，發現給予 TAM 的組別 NGAL 及 KIM-1 之表現相較於給予 olive oil 的組別皆有增加的趨勢(圖六 E、F)。

3.6 給予 TAM 及 IRI 後第二天腎小管細胞的凋亡與增生情形



除了透過 Periodic acid–Schiff (PAS) 染色以及血清生化數值來判斷細胞損傷的程度外，我們也以 TUNEL 以及 Ki67 的染色來觀察細胞的凋亡以及增生情形，本論文使用 DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Cat.G3250, Promega) 來標定處於細胞凋亡階段嚴重損傷的細胞，以 400 倍的倍率在螢光顯微鏡下觀察皮質及髓質交界處的區域凋亡細胞的多寡，從結果可以發現給予 TAM 的組別在 IRI 後第二天凋亡的腎小管細胞顯著低於給予 olive oil 的組別(圖七)，我們也以西方墨點法來觀察細胞凋亡相關的蛋白表現量，從結果發現 cleaved caspase-7 以及 cleaved caspase-3 在給予 TAM 的組別表現也較低，與 TUNEL 染色的結果一致(圖八)。Ki67 在細胞分裂時的整個週期中都能有所表現，我們透過 Ki67 染色以 400 倍的倍率於皮質及髓質交界處觀察正在增生的細胞，結果發現在 IRI 後第二天，不論是否給予 TAM，Ki67 的表現並無顯著差異(圖九)，接著我們發現在 IRI 之前，連續管餵三天 TAM 後，Ki67 的基因表現對比給予 olive oil 的組別已經顯著增加，而在 IRI 後第二天則是有給予 TAM 的組別表現略低於沒有餵藥的組別，但是兩組間並無統計上的差異(圖十 A)，此外，我們透過西方墨點法來觀察 Ki67 蛋白水平的表現量，則發現有給予 TAM 的組別在連續給予三天 TAM 後，不論是否有經過 IRI 手術，其 Ki67 的表現量皆略高於給予 olive oil 的組別，但是統計過後的結果皆無顯著差異(圖十 B)。

3.7 給予 TAM 及 IRI 後第二天對粒線體功能相關基因表現的影響

為了探討 TAM 降低 IRI 後損傷的機制，我們收集連續給予 TAM 三天後以及 IRI 後的腎臟檢體，抽取 RNA 來進行粒線體功能相關基因表現的分析，PGC1 α 是調控粒線體功能最主要且重要的基因，從實驗結果發現在 IRI 後 PGC1 α 基因表現 在給予 TAM 的組別顯著高於給予 olive oil 的組別(圖十二 A)，其他與粒線體功能相關的基因在 IRI 前後不論是否給予 TAM，皆沒有顯著的差異，但是可以發現在 IRI 前給予 TAM 的組別，粒線體功能相關基因皆有高於給予 olive oil 組別的趨勢(圖十二 B~F)。

3.8 給予 TAM 及 IRI 後促發炎細胞激素及生長因子的表現

為了探討 TAM 降低 IRI 後損傷的機制，我們收集連續給予 TAM 三天後以及 IRI 後的腎臟檢體，抽取 RNA 來進行促發炎細胞激素以及生長因子基因表現的分析，實驗結果發現在連續給予 TAM 三天後，腎臟的促發炎細胞激素基因表現與管餵 olive oil 的組別相比並無顯著差異，但是在 IRI 前給予 TAM 的組別 *Tnfa* 以及 *Il1b* 基因表現皆顯著低於給予 olive oil 的組別(圖十一 A)。同樣的，在連續給予 TAM 三天後，腎臟的生長因子基因表現與管餵 olive oil 的組別相比並無顯著差異，但是在 IRI 前給予 TAM 的組別 *Egf* 基因表現顯著高於給予 olive oil 的組別(圖十一 B)。

第四章 討論



4.1 管餵 TAM 可以降低 IRI 的損傷

根據血液中 BUN、Creatinine 的結果，可以發現不論是在 IRI 前兩周或者前三天給予 TAM 都能降低 IRI 後第二天的損傷程度，並且我們透過 PAS 染色，於皮質髓質交界處觀察腎小管損傷的程度進行統計後，也確實發現在 IRI 前三天給予 TAM 的組別損傷程度較輕微，在 TUNEL 染色的結果上發現 IRI 前給予 TAM 的組別，細胞凋亡的數目顯著低於給予 olive oil 的組別，細胞凋亡相關的蛋白表現 cleavage caspase3 及 cleavage caspase7 的表現在給予 TAM 組別較低，促發炎基因 TNF- α 、IL-1 β 的表現在給予 TAM 的組別表現較低，而生長因子 EGF 基因表現在給予 TAM 的組別表現較高，而粒線體功能調控基因 PGC1 α 在給予 TAM 的組別表現較高，上述結果皆顯示給予 TAM 後 IRI 損傷降低。

為了瞭解 TAM 是在哪一階段影響腎臟損傷，我們選了其他在急性腎損傷早期就能觀測到的生物指標 NGAL 以及 KIM-1 進行實驗，在 IRI 後第一天不論是否給予 TAM，血液中 NGAL 的表現對比 IRI 前皆顯著上升，且兩組之間並無顯著差異，然而在 IRI 後第二天則可以發現給予 TAM 的組別血液中 NGAL 表現對比第一天較低，且顯著低於給予 olive oil 的組別，血液中 KIM-1 的表現在 IRI 後第一天及第二天皆是給予 TAM 的組別顯著低於給予 olive oil 的組別，研究顯示 KIM-1 在 AKI 時增加的速度較 NGAL 緩慢(87)，在 Palin 等人的研究中發現，大鼠在進行 IRI 後，血液中 NGAL 的表現在 IRI 後 24 小時前已經達到高峰，而血液中 KIM-1 表現則在 IRI 後 24~72 小時間持續上升(88)，在我們的實驗結果中發現 IRI 後第一天在 KIM-1 以及 NGAL 的表現上趨勢不一致，這可能是由於這兩者之間在 IRI 後增加的速度不一樣所致，在 IRI 後第一天 NGAL 的表現便已經到達高峰，在 IRI 後第二天已經下降，KIM-1 的表現在 IRI 後第一天及第二天則還未達到最高峰，但是我們在 IRI 後第一天以及第二天可以觀察到給予 TAM 的組別 KIM-1 表現較給予 olive

oil 的組別低，這也可能暗示著給予 TAM 的組別在 IRI 後損傷程度本就比較輕微。

綜合以上所述，給予 TAM 的組別在 IRI 後依舊會受到損傷，然後損傷程度比起給予 olive oil 的組別輕微，且損傷的回復速度快於單純給予 olive oil 的組別。

4.2 TAM 劑量對於急性腎損傷的保護效果

我們試著減低 TAM 的劑量，想知道是否在低劑量下對於急性腎損傷也能達到同樣的保護效果，然而卻發現在 IRI 前三天或前一天只給予 1 次 0.4 毫克每克體重劑量的組別，或者是在 IRI 前連續給予三天 0.2 及 0.1 毫克每克體重劑量的組別，在 IRI 後 BUN 及 Creatinine 的表現與給予 olive oil 的組別並沒有差異。一般於臨床治療給予的 TAM 劑量為每天 20 毫克(89)，而我們給予的劑量則為 400 毫克每公斤體重，是臨床使用的 20 倍以上，TAM 以及其代謝物在進入體內後絕大多數會與白蛋白(albumin)結合，並分布在肝臟、腎臟等周邊組織中，只有極少數(0.1%)會在血液中，周邊組織給予 TAM 後的穩定濃度約為血液中的 70~80 倍(90)。在 Robinson 等人的研究中發現給予小鼠一次低劑量(50 微克)的 TAM 後，血液中 TAM 以及其代謝物的濃度僅會些微上升(<10 奈克/毫升)，在其他組織所測得的濃度更少(<1 奈克/毫升)，若將濃度提高到 200 毫克每公斤體重，血液以及組織中所測得的 TAM 及代謝物濃度才有顯著的增加，在給予一次 200 毫克每公斤體重劑量的 TAM 後 10 小時血液中 TAM 及代謝物濃度約在 600~800 奈克/毫升間，之後濃度開始下降，到 70 小時左右下降至接近基準值，在肝臟以及肌肉等組織中則在 10 小時內可以測得 TAM 及代謝物濃度顯著增加，約 50 小時內降到接近基準值(91)。因此若 TAM 是經由吸收至腎臟組織後才能影響後續急性腎損傷機制，僅在 IRI 前三天或前一天給予一次 400 毫克每公斤體重劑量的 TAM，或許還不足以讓組織中有足夠濃度的 TAM 進行作用，而在 IRI 前三天連續給予 200 及 100 毫克每公斤體重劑量的組別，對於腎臟損傷的保護效果不如 400 毫克每公斤體重的組別來的顯著，推測可能的原因為體內血液或組織中需要有足夠的 TAM 及其代謝物的濃度來進行作用，才能對於急性腎損傷有保護的作用，若要證實此理論，或許未來可以在給予不同濃度的

TAM 後，測量血液及腎臟中 TAM 及其代謝物的濃度，觀察是否有差異。

4.3 管餵 TAM 後增加 NGAL 及 KIM-1 之表現及來源

從實驗結果中可以觀察到在連續給予三天 TAM 後，無論是血液中 NGAL 或者是腎臟中 NGAL 基因表現比起給予 olive oil 的組別皆顯著增加，腎臟中 KIM-1 基因表現在連續給予三天 TAM 後同樣顯著增加，研究發現 TAM 可以藉由活化 nitric oxide synthase(NOS)相關路徑誘導細胞凋亡(92)，Rafal 等人分離肝臟的粒線體進行研究，發現 TAM 可以增加粒線體內鈣離子濃度，並活化粒線體 NOS，誘導 NO 分泌增加(93)，NO 則可以透過可逆的調節 cytochrome oxidase 活性以及 peroxinitrite 的製造來誘導氧化壓力和細胞凋亡的發生(94, 95)。NGAL 以及 KIM-1 在腎小管上皮細胞損傷時表現皆會增加(96)，此外也有研究顯示氧化壓力的傷害會導致 NGAL 表現增加(62, 97)，因此我們推測在如此高的 TAM 劑量下，會誘導肝臟以及腎臟上皮細胞受到氧化壓力傷害，導致肝臟增加 NGAL 的分泌，而腎臟也同樣增加 NGAL 以及 KIM-1 的表現，未來或許可以進行實驗觀察腎臟以及肝臟給予 TAM 後粒線體氧化壓力的測試、NOS 活性、NO 的表現證實此理論。血液中 NGAL 的來源除了肝臟、腎臟等組織外，嗜中性白血球也是來源之一，我們在管餵 TAM 三天後將老鼠犧牲，分離出血液中的 buffy coat 以及嗜中性白血球，發現 buffy coat 以及嗜中性白血球中 NGAL 的基因表現與給予 olive oil 的控制組並無差異，顯示給予 TAM 後並不會增加嗜中性白血球中 NGAL 的表現，但是我們發現給予 TAM 後可以增加在 buffy coat 中 KIM-1 基因表現。接著我們更進一步探討腎臟內 NGAL 及 KIM-1 基因表現增加的來源，除了從循環而來的 NGAL 和 KIM-1，是否腎小管細胞也是來源之一，因此我們使用 Pax8-rtTA^{Tg}; LC1^{Tg}; RS26^{fstdtomato} 於管餵 TAM 三天後犧牲，將腎臟內帶有紅色螢光的腎小管細胞收下來，觀察 NGAL 基因表現，發現對比給予 olive oil 的控制組其 NGAL 基因表現有增加的趨勢，而在 KIM-1 的基因表現上，給予 TAM 的組別則略高於給予 olive oil 的組別。目前 Pax8-rtTA^{Tg}; LC1^{Tg}; RS26^{fstdtomato} 在兩組間的數目還很少，未來累積更多隻數之後或許能達到統



計上的差異。

綜合以上所述，給予 TAM 後血液以及腎臟中 NGAL 的來源可能為肝臟以及腎小管細胞，而 KIM-1 來源則腎小管以及 buffy coat 內的細胞。

4.4 Nephrectomy 後增加 NGAL 的表現

從實驗結果中可以發現，Nephrectomy 三天後不論是血液中 NGAL 以及腎臟 NGAL 基因表現皆顯著增加，為了確保給予 TAM 後 NGAL 增加的效應不是來自於 nephrectomy 而影響實驗結果，我們使用 bilateral IRI 進行實驗，結果同樣發現不論在 bilateral IRI 兩周前或三天前給予 TAM，IRI 後 BUN 和 creatinine 的表現皆是給予 TAM 的組別顯著低於給予 olive oil 的組別，與 Nephrectomy + unilateral IRI 的結果一致。

4.5 管餵 TAM 後可以減少 IRI 後細胞凋亡

我們透過 TUNEL assay 於 IRI 後觀察皮質髓質交界處進入細胞凋亡的細胞，為了區分出細胞間質與腎小管細胞，我們利用 laminin 染基底膜(basement membrane)，並記數被圈在基底膜內的凋亡細胞，結果發現在 IRI 後給予 TAM 的組別細胞凋亡的數量顯著低於給予 olive oil 的組別，此外我們也以西方墨點法，觀察細胞凋亡相關路徑蛋白質 cleavage caspase-3 以及 cleavage caspase-7 的表現，發現給予 TAM 的組別在 IRI 後 cleavage caspase-3 以及 cleavage caspase-7 表現低於給予 olive oil 的組別，細胞凋亡路徑可以分為內在路徑以及外在路徑，外在路徑是經由死亡受體(death receptors)進行調控，經由活化 caspase-8，進而活化 caspase-3 以及 caspase-7，以調控後續細胞凋亡的作用，內在路徑則是經由粒線體膜上以及細胞質的蛋白例如:Bax、Bcl-2 等進行調控，促使粒線體釋放 cytochrome C，活化 caspase-9，進而活化下游 caspase-3 以及 caspase-7，調控後續細胞凋亡的作用(98)。有研究發現 KIM-1 之 phosphatidylserine receptor 具有吞噬能力，可以在腎小管細胞將進入細胞凋亡的細胞吞噬，以降低先天性發炎以及免疫反應，由此來達成急性腎



損傷的保護效果(85, 86)，同樣的，也有研究將腎臟上皮細胞株(NRK-52E)進行缺氧再灌流實驗後，發現給予 NGAL 的組別促細胞凋亡相關的基因以及蛋白質表現皆顯著降低，而抑制細胞凋亡的基因以及蛋白質表現則顯著增加，顯示 NGAL 可以透過調控腎臟上皮細胞的細胞凋亡來減少腎臟上皮細胞損傷(74)，未來我們可以透過實驗比較 caspase-9 或者是 caspase-8 的表現，觀察 TAM 的作用是透過外在路徑或者是內在路徑來影響細胞凋亡，也可以透過 NGAL、KIM-1 基因剔除小鼠或者是抑制劑來進行實驗，觀察是否確實是因為 NGAL 以及 KIM-1 的表現而導致後續凋亡細胞減少。

除了利用 TUNEL assay 觀察細胞凋亡的狀態外，我們也利用 Ki67 染正在進行增生的細胞，同樣的，觀察皮質髓質交界處，並利用 Nidogen 染出基底膜，以區分出細胞間質以及腎小管細胞，但是結果卻發現不論是否給予 TAM，兩組之間正在進行增生的細胞並沒有顯著差異，我們也觀察 Ki67 蛋白質以及基因表現，同樣發現給予 TAM 在 IRI 後 Ki67 的表現與給予 olive oil 的組別並無顯著差異，但是我們卻發現連續給予 TAM 三天後，在 IRI 前 Ki67 在腎臟的基因表現顯著高於給予 olive oil 的組別，研究發現在腎臟細胞株以及癌細胞株上增加 NGAL 的表現能促進增生的作用(74, 99)，我們推測腎臟及肝臟給予 TAM 後促進 NGAL 的表現，NGAL 則透過嗜鐵載體調控細胞對於鐵的吸收或轉運，進而調控與鐵相關的細胞生長路徑(growth pathway)使細胞增生(54)。雖然目前我們的實驗發現給予 TAM 與否對 IRI 後 Ki67 的表現無影響，但因為 Ki67 在細胞週期的 G1、S、G2、M 都能表現(100)，加上前人在細胞實驗中發現，給予 NGAL 可以促進腎小管細胞增生的作用來自於處於 S phase 的細胞對比控制組增加了 15% (74)，所以未來可以使用表現在 S phase 的 Bromodeoxyuridine(BrdU)染色進行實驗，或許可以觀察到 IRI 後的 BrdU 的表現在給予 TAM 及控制組之間有所差異。除此之外，因為過去研究發現 IRI 後處於 G2M arrest 的細胞較易凋亡(101)，之後我們也可以觀察在給予 TAM 後會不會改變處於 G2M arrest 細胞的比例來達到保護的效果。



綜合以上所述，給予 TAM 後可以降低 IRI 後細胞損傷的程度，因此細胞凋亡的數目較少，並且給予 TAM 後可以在 IRI 前增加 Ki67 基因表現。

4.6 給予 TAM 後對於粒線體功能的影響

依據上述的實驗結果可以發現，給予 TAM 後可以使細胞凋亡減少，我們想知道其中可能的機制是否跟粒線體功能相關，因此我們選了部分跟粒線體功能相關的基因進行實驗，從實驗結果可以發現，調控粒線體功能最主要的基因 PGC1 α 在 IRI 後給予 TAM 的組別顯著高於給予 olive oil 的組別，顯示在 IRI 後給予 TAM 的組別粒線體功能較佳，但是這可能是由於給予 TAM 的組別損傷程度本來就較給予 olive oil 的組別輕微。研究發現 TGF- β 1/Smad3 路徑活化後會抑制粒線體 PGC1 α 的表現，導致後續脂肪酸氧化下降，使得粒線體能量製造下降，最終導致腎小管萎縮 (atrophy) 以及纖維化(102)，另一篇研究則發現 TAM 可以透過抑制 TGF- β 1/Smad 路徑減緩腎臟纖維化(41)，未來或許可以探討 TAM 是否可以透過調控 TGF- β 1/Smad 路徑影響 IRI 後粒線體中 PGC1 α 的表現。而在給予 TAM 和給予 olive oil 的組別間在其他基因的表現上則沒有顯著差異，若要研究粒線體的功能，或許直接測 tissue lysate 的 ROS 表現、ATP level 等是比較恰當的，單看基因表現無法得知確切的粒線體功能為何，需要進一步做相關功能的測試才能得知粒線體對於 TAM 減少 IRI 損傷的機制為何，除此之外，可以透過 Pax8-rtTA^{Tg}; LC1^{Tg}; RS26^{fstdtomato} 收下腎小管細胞，或者也可以使用 Lotus tetragonolobus Lectin-FITC 抗體，將老鼠腎臟中帶有螢光的近端腎小管收下來，觀察腎小管細胞中 PGC1 α 的表現是否在給予 TAM 後會增加。研究發現 Estrogen-related receptor- α (ERR α) 可以作為 PGC1 α 的共同活化因子(coactivator)，進入細胞核中調控後續氧化磷酸化以及粒線體生合成的作用(102)，以 cisplatin 誘導 AKI 的動物模型中發現給予 cisplatin 後雖然不會影響 ERR α 在腎臟中的基因表現，卻會影響 ERR α 進入細胞核作用的表現量，而 ERR α 的缺失則會使粒線體產生病變以及 PGC1 α 的表現下降，加重 AKI 的損傷程度(103)，未來可以觀察腎小管細胞細胞質以及細胞核中 ERR α 的表現量，探討是否 TAM 可以維

持 $ERR\alpha$ 入核的作用，以維持粒線體功能並減少急性腎損傷。

4.7 給予 TAM 可以抑制 IRI 後促發炎激素並增加生長因子表現

為了瞭解 TAM 影響 IRI 後損傷的機制，我們觀察了促發炎激素以及生長因子的基因表現，結果顯示 IRI 後促發炎相關激素 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 在給予 TAM 組別表現顯著低於給予 olive oil 的組別。

生長因子 EGF 表現在給予 TAM 的組別顯著高於給予 olive oil 的組別。EGF 可以經由 MAPK/ERK 路徑活化下游細胞增生的路徑(103, 104)，研究發現 KIM-1 可以增強 EGF 所誘導的 MAPK/ERK 活化程度，促進腎小管細胞的修復(105)，未來可以研究給予 TAM 後此路徑的表現證實其相關性。

綜合以上所述，顯示 IRI 後給予 TAM 的組別發炎反應較輕微，且可以增加 EGF 的表現維持細胞增生的調控。

4.8 未來可進行的相關實驗

如果想要驗證 TAM 是否確實是透過 NGAL 或者是 KIM-1 的表現來達到急性腎損傷的保護作用，未來可以使用 NGAL 以及 KIM-1 基因剔除轉殖鼠來進行實驗，直接驗證兩者的影響為何。TAM 可以經由抑制雌激素受體來達成抗癌的效果，除此之外 TAM 還有很多對細胞的調控功能是經由雌激素受體外的機制，因此若要探討 TAM 是如何減少急性腎損傷，這其中的機制除了透過 NGAL 及 KIM-1 外尚有非常多可能性，因此或許也可以透過腎臟以及血液檢體去進行 microarray 的實驗，後續再來分析單純給予 TAM、IRI 前給予 TAM 及 olive oil 這幾組之間，哪些基因有較大的變化，再來歸納出可能影響的路徑。另外關於給予 TAM 後會使缺血再灌注手術小鼠腎臟粒線體功能相關基因 *Ppargcla* 顯著增加的部分，也將進一步研究 TAM 是否也會藉由影響粒線體的功能來改善急性腎損傷。

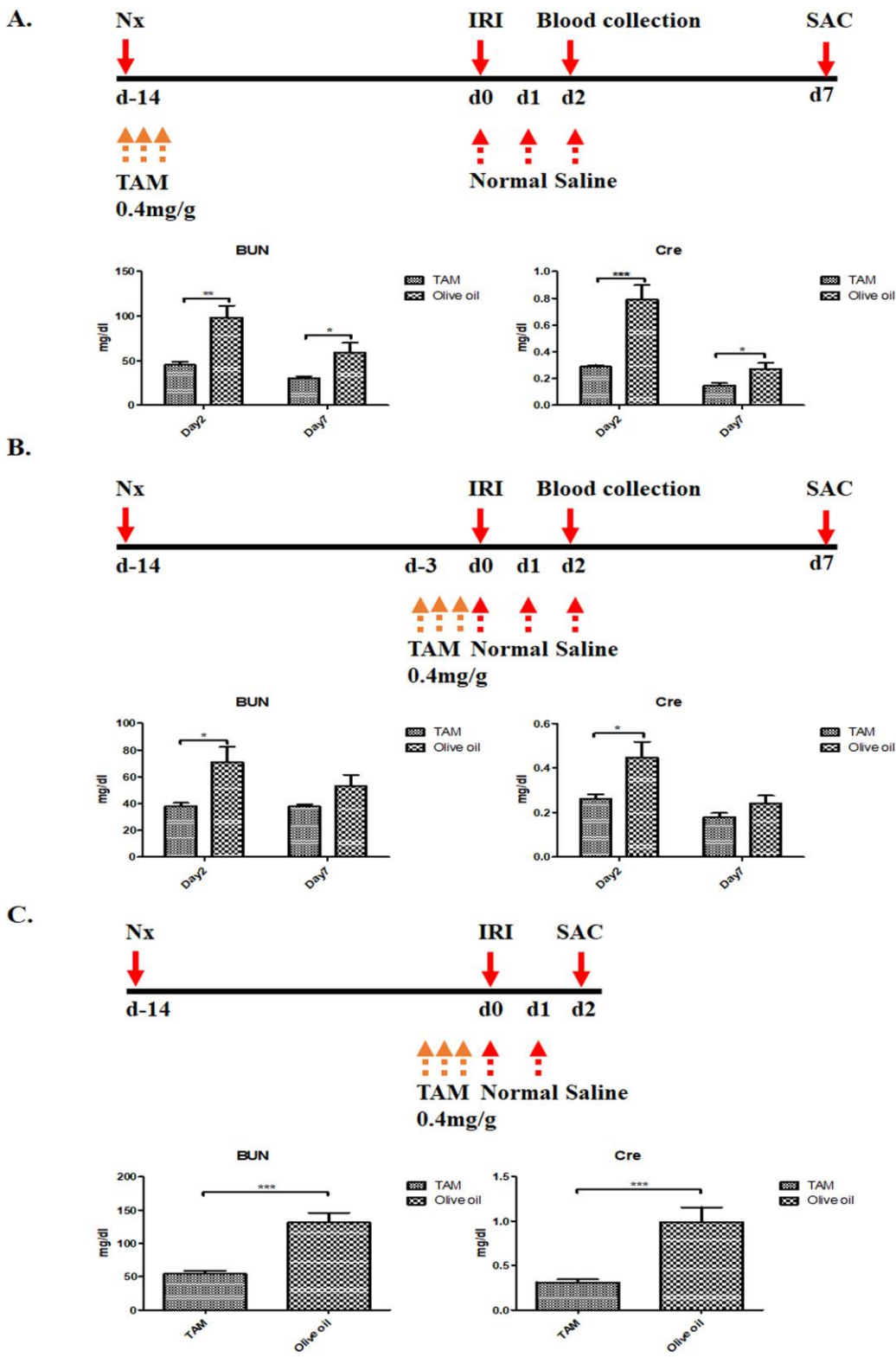
第五章 結論與未來展望



本篇研究發現小鼠術前三天連續給予 TAM 後降低了缺血再灌流的急性腎損傷，且單純給予 TAM 且尚未進行缺血再灌流手術就會使小鼠血液、腎臟及肝臟中的 NGAL 增加，未來須進一步透過 NGAL 基因剔除的小鼠進行實驗來證實 TAM 是否藉由 NGAL 的增加來減低急性腎損傷的嚴重程度，另外關於給予 TAM 後會使缺血再灌流手術小鼠腎臟粒線體功能相關基因 *Ppargcla* 顯著增加的部分，也將進一步研究 TAM 是否也會藉由影響粒線體的功能來改善急性腎損傷。。

TAM 降低急性腎損傷的機制十分複雜，未來還有許多實驗可以進行，若能找出確切的機制，應用於急性腎損傷藥物開發上，將有益於臨床上急性腎損傷的預防以及治療，降低醫院內急性腎損傷的死亡率，並減少醫療資源的支出。

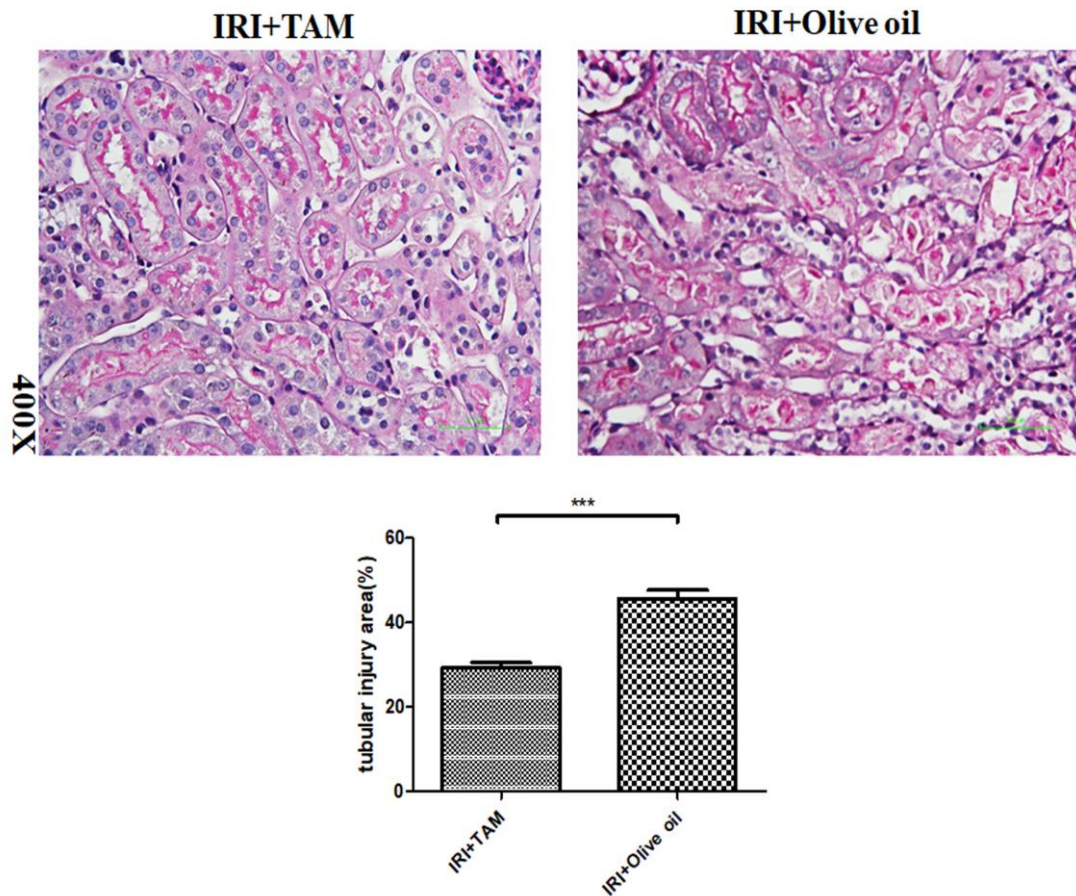
圖表



圖一、uIRI 前給予 TAM 可減低急性腎損傷的嚴重程度

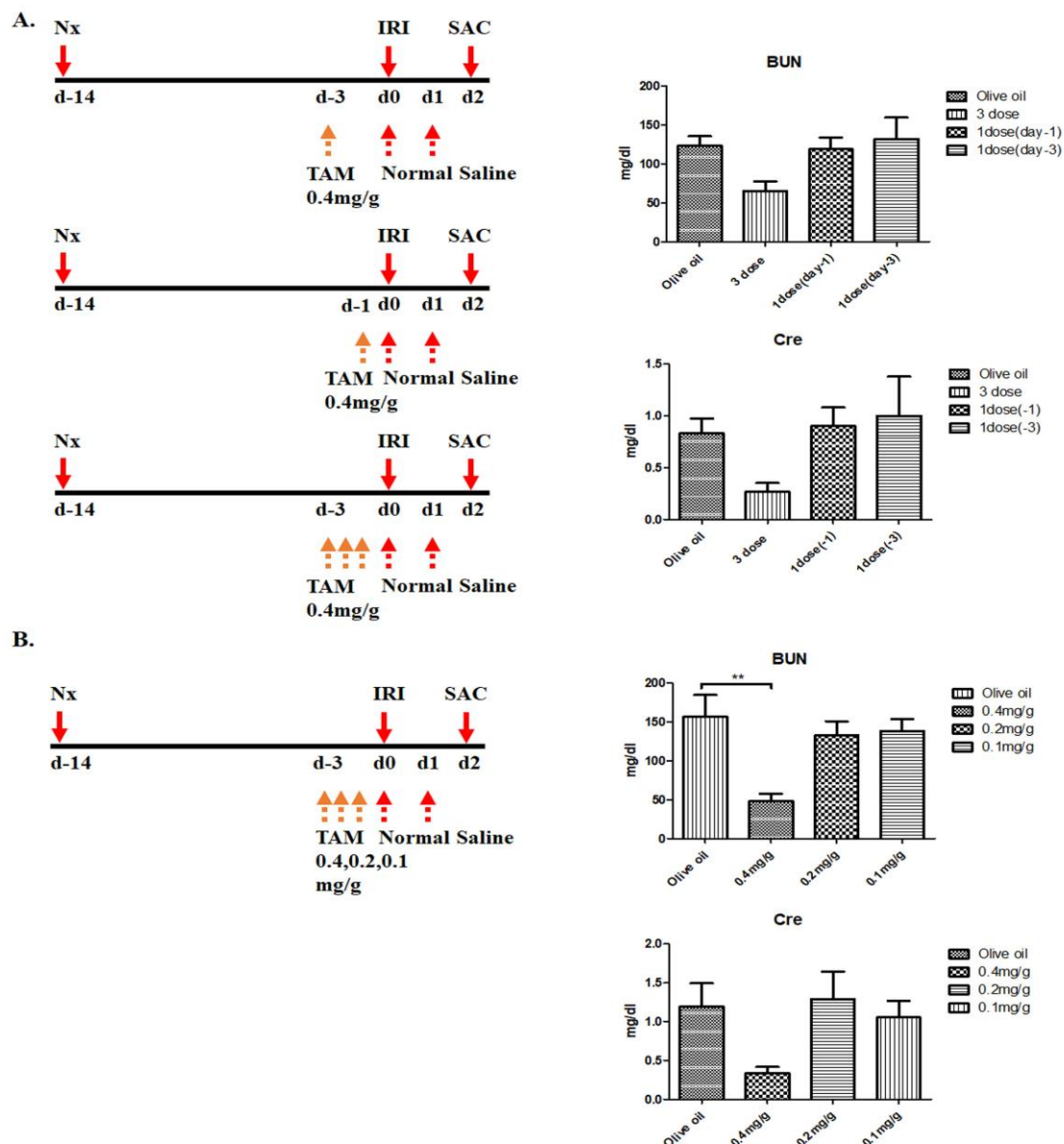


小鼠於 IRI 後第二天以及第七天進行採血，檢測血液生化數值的變化，(A)在 nephrectomy 之後連續管餵三天 TAM，在 IRI 後第二天和第七天的 BUN 及 creatinine 表現皆低於管餵 olive oil 的組別。(B)在 IRI 前連續管餵三天 TAM，IRI 後第二天和第七天的 BUN 及 creatinine 表現皆低於管餵 olive oil 的組別。(C)增加在 IRI 前連續管餵三天 TAM 的小鼠數目，並於 IRI 後第二天犧牲，採取血液檢體，其 BUN 及 creatinine 表現皆低於管餵 olive oil 的組別。(統計以 Student's t 檢定進行分析，*** $P < 0.001$ ，** $P < 0.01$ ，* $P < 0.05$ 。TAM vs. olive oil。長條圖為平均值 $\pm$ SEM。A: $n=7$ ，B: $n=4$ ，C: $n=15$ 。)



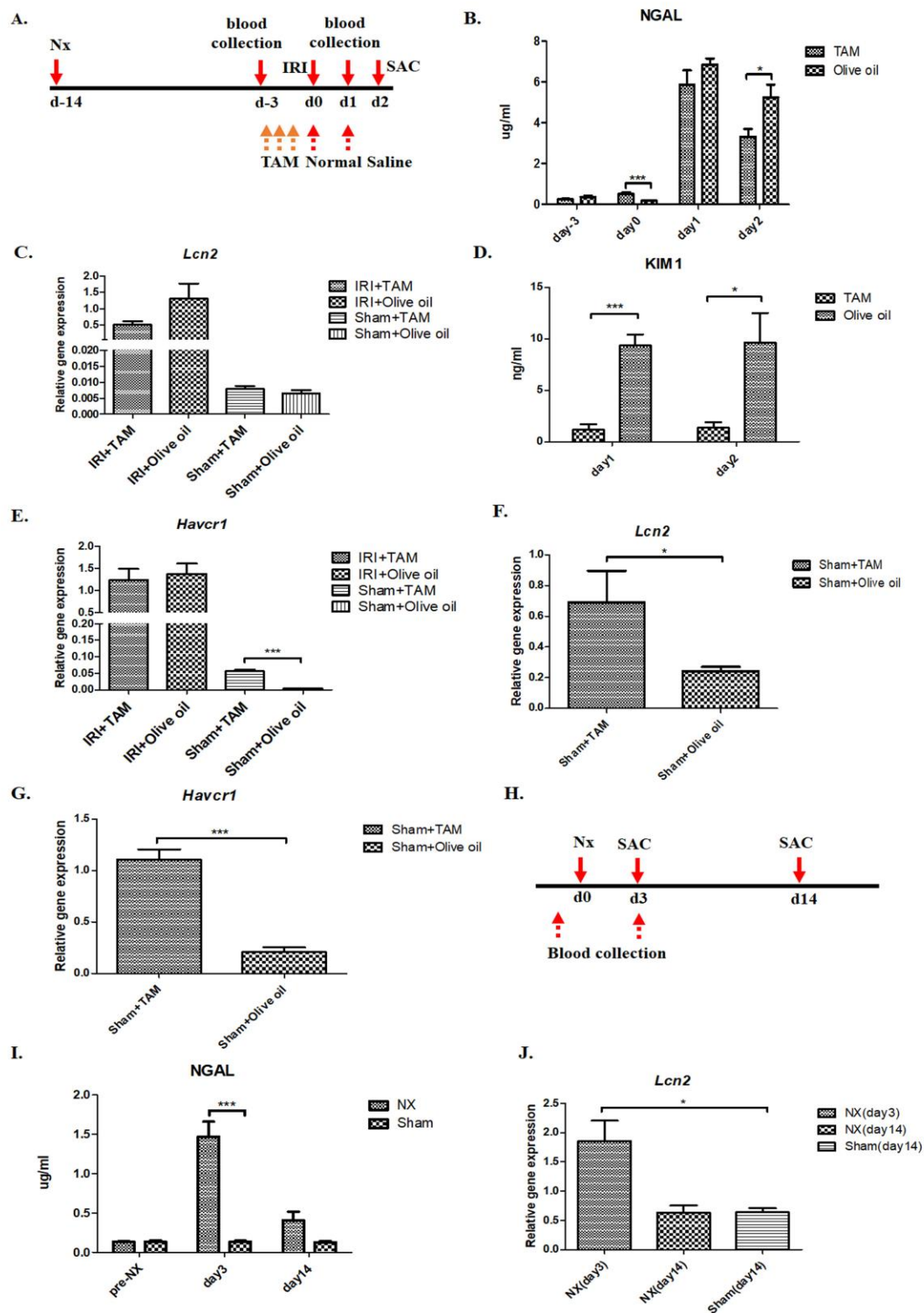
圖二、uIRI 前給予 TAM 可減少腎小管的損傷程度

透過 PAS stain，觀察腎臟組織在 IRI 後的結構，利用圓柱體(cast)的形成、腎小管的壞死、刷狀緣(brush border)的完整性來判斷腎臟損傷的程度，以 400 倍視野進行拍照，觀察區域為腎臟皮質髓質交界處，每個檢體取 9~12 個視野進行拍攝以及統計 (統計以 Student's t 檢定進行分析，*** $P < 0.001$ ，TAM vs. olive oil。長條圖為平均值 $\pm$ SEM。n=5。比例尺: 100 μ m。)



圖三、不同 TAM 劑量對於急性腎損傷保護效果的差異

(A)分別在 IRI 前三天以及前一天管餵一次劑量 0.4mg/g 的 TAM，於 IRI 後第二天犧牲採取血液檢體，觀察血液生化數值 BUN 及 creatinine 的差異(olive oil n=6; TAM n=3)(B)在 IRI 前連續管餵三天 0.4 毫克/克體重、0.2 毫克/克體重、0.1 毫克/克體重的 TAM，於 IRI 後第二天犧牲採取血液檢體，觀察血液生化數值 BUN 及 creatinine 的差異(olive oil n=7; 0.4mg/g n=5; 0.2mg/g n=6; 0.1mg/g n=5)(統計以 Student's t 檢定進行分析，** P < 0.01。TAM vs. olive oil。長條圖為平均值±SEM。)



圖四、給予 TAM 及 IRI 後 NGAL 及 KIM-1 的表現

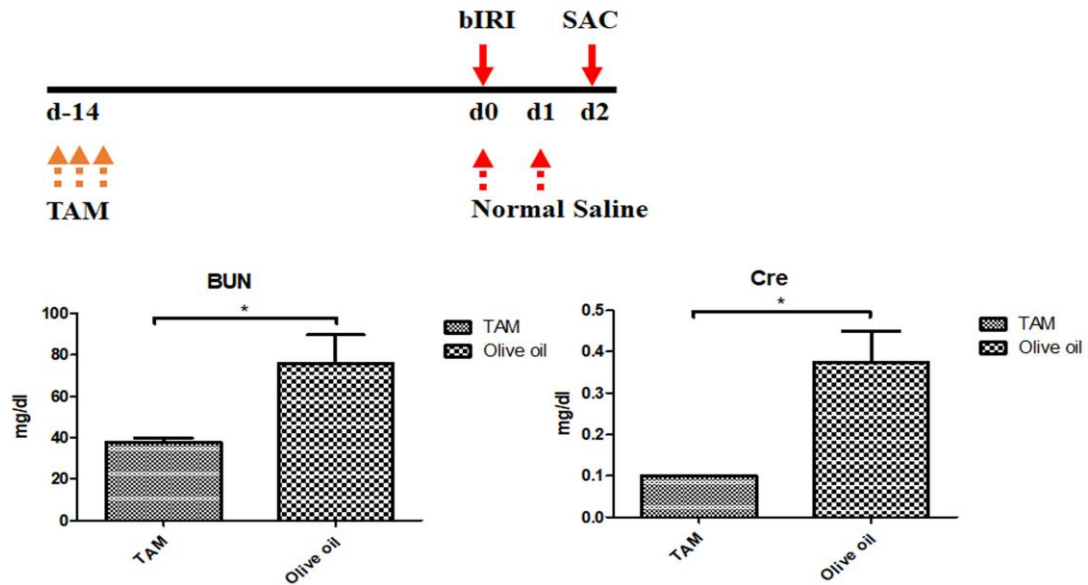
(A)透過臉頰採血在餵 TAM 前、餵 TAM 三天後、IRI 後 24 小時、IRI 後 48 小時取



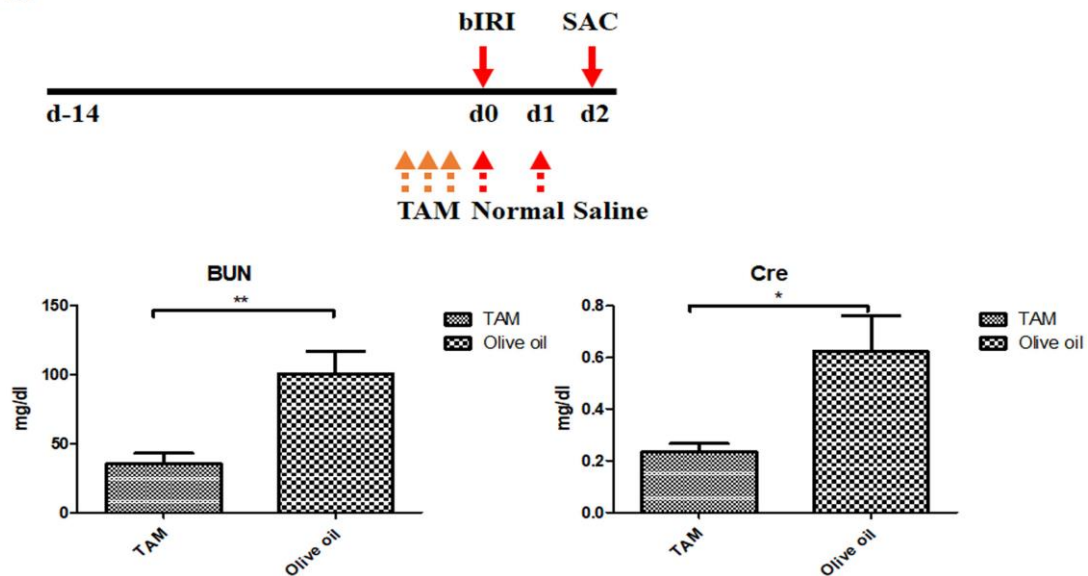
得血液檢體 (B)測不同時間點血液中 NGAL 表現情形(TAM n=5;Olive oil n=6) (C) 分別在連續管餵 TAM 三天後以及 IRI 兩天後將小鼠犧牲，以觀察腎臟中 NGAL 基因表現(Sham+TAM: n=4; Sham+olive oil: n=6; IRI+olive oil n=6 ;IRI+TAM n=5) (D) 測不同時間點血液中 KIM-1 表現情形(TAM n=4 ; olive oil n=5) (E)分別在連續管餵 TAM 三天後以及 IRI 兩天後將小鼠犧牲，觀察腎臟中 KIM-1 基因表現(IRI+TAM n=7 ; IRI+ olive oil n=9 ; Sham+TAM n=4; Sham+ olive oil n=4) (F)增加連續管餵 TAM 三天後犧牲小鼠的數目，觀察腎臟中 NGAL 基因表現(TAM n=7 ; olive oil n=8)(G) 增加連續管餵 TAM 三天後犧牲小鼠的數目，觀察腎臟中 KIM-1 基因表現(n=7) (H) 透過臉頰採血在 nephrectomy 前、nephrectomy 三天後、nephrectomy 兩週後取得血液檢體 (I)測 nephrectomy 前後不同時間點血液中 NGAL 表現情形(Nx n=5 ; Sham n=4) (J)於 nephrectomy 三天及兩週後將小鼠犧牲，觀察腎臟中 NGAL 基因表現 (n=5)(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，* $P < 0.05$ ，*** $P < 0.001$ ，TAM vs. olive oil ; Nx vs. Sham。長條圖為平均值 $\pm$ SEM。)



A.



B.

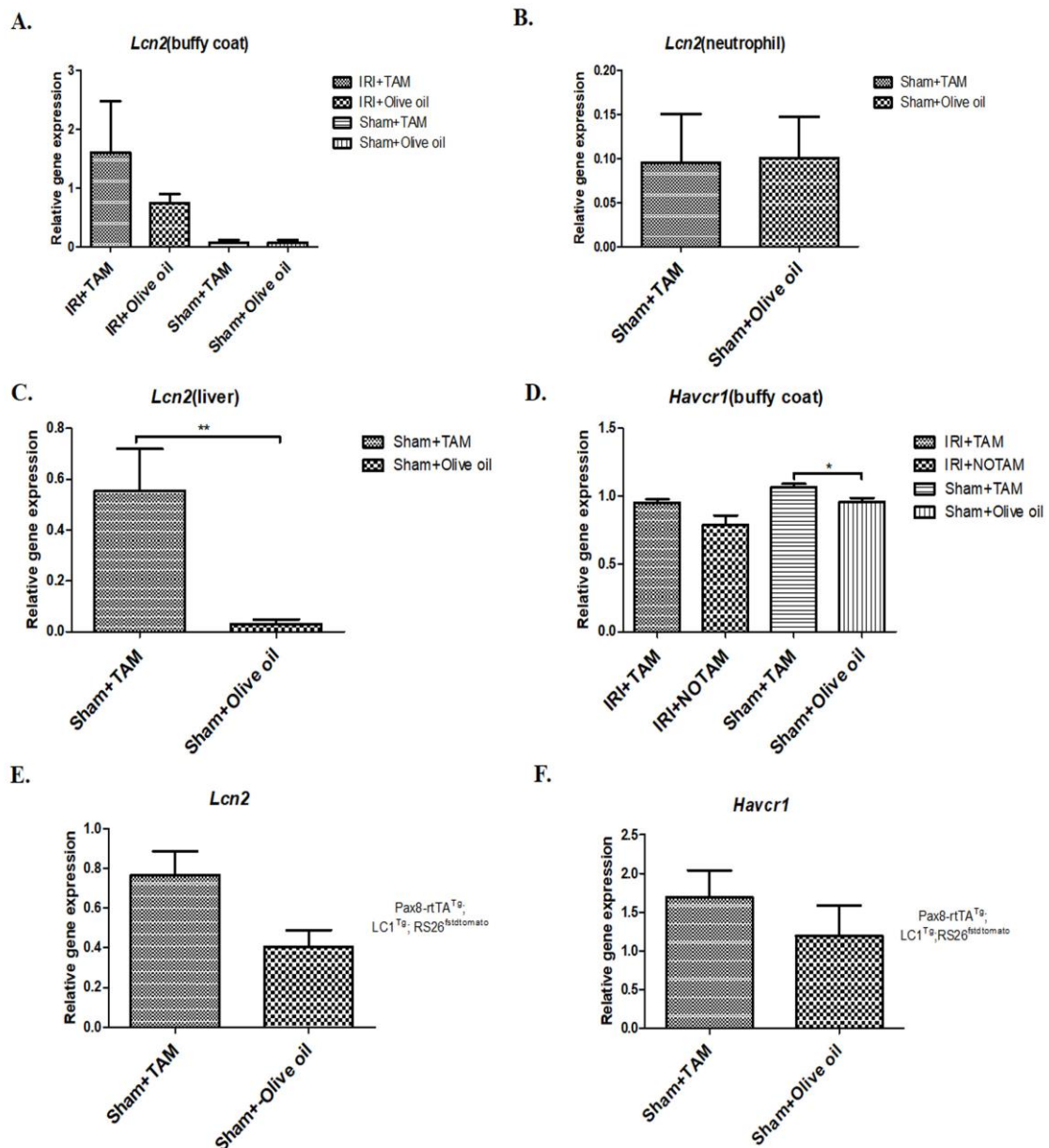


圖五、bIRI 前給予 TAM 可減低急性腎損傷的嚴重程度

(A)於 bilateral IRI 前兩週連續管餵三天 TAM，IRI 後第二天犧牲並採取血液檢體，觀察血液生化數值 BUN 及 creatinine 的差異(n=4) (B)於 bilateral IRI 前三天連續管餵三天 TAM，IRI 後第二天犧牲並採取血液檢體，觀察血液生化數值 BUN 及

creatinine 的差異(TAM n=6 ; olive oil n=9)(統計以 Student's t 檢定進行分析，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，TAM vs. olive oil。長條圖為平均值 $\pm$ SEM。)

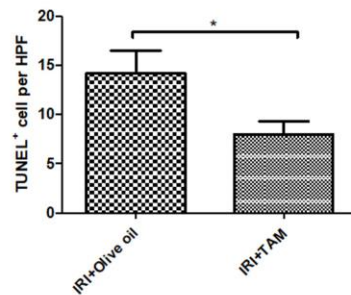
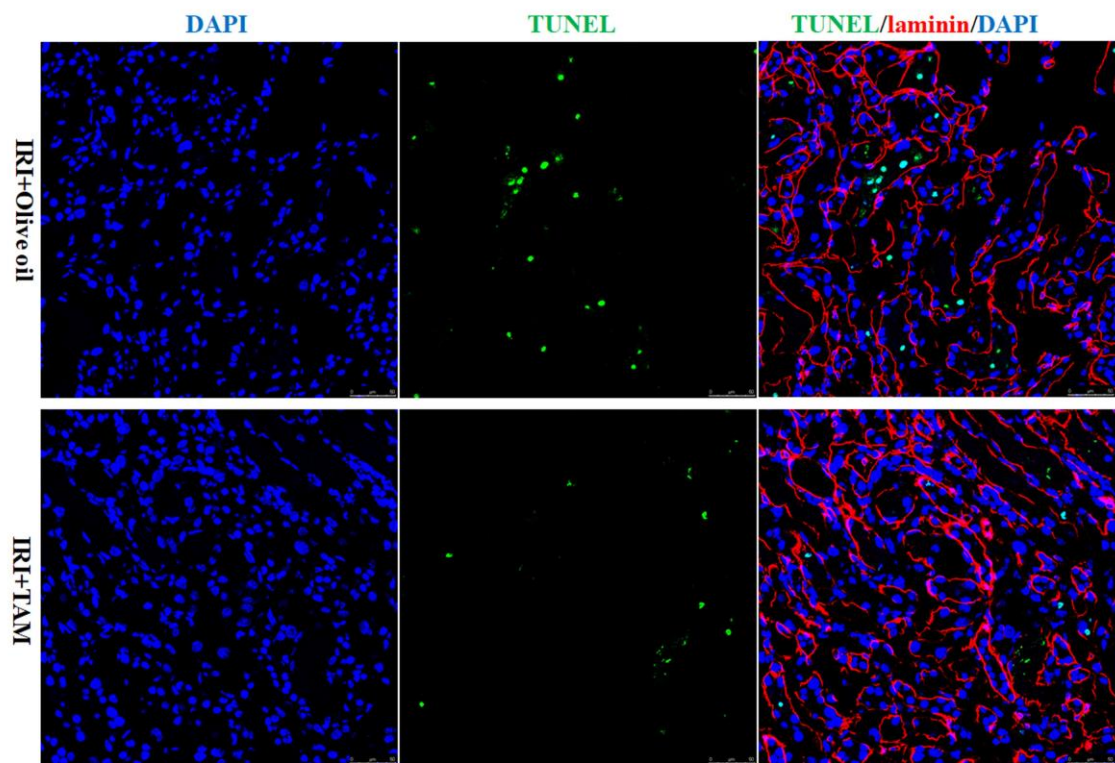




圖六、給予 TAM 後 NGAL 及 KIM-1 的來源

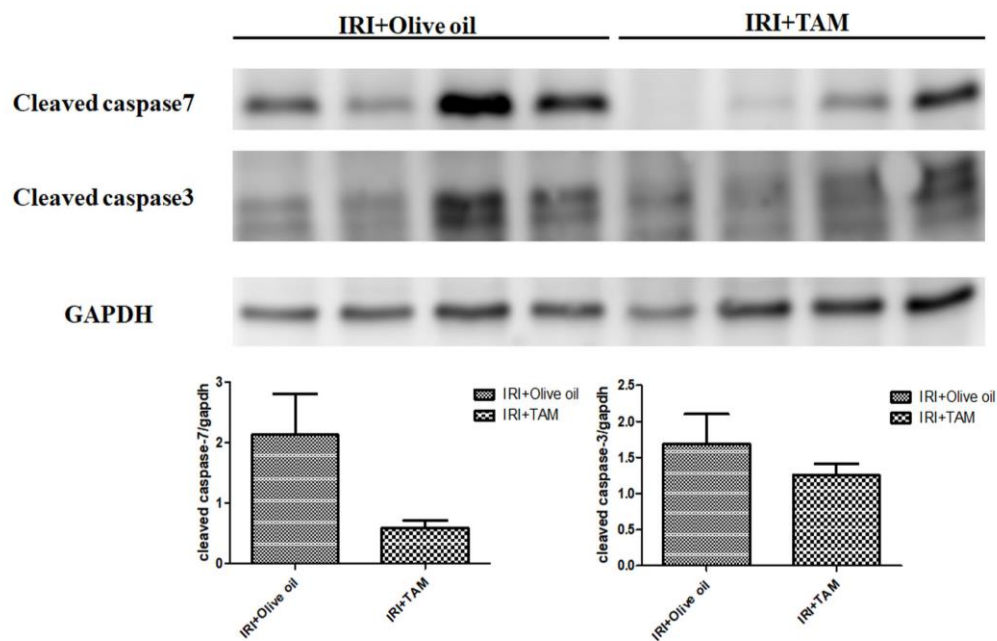
(A)於管餵 TAM 以及 IRI 後進行採血，收取血液中的 buffy coat，進行 NGAL 基因表現的分析(Sham n=5; IRI+TAM n=3; IRI+olive oil n=4) (B)於管餵 TAM 後進行採血，收取血液中的 neutrophil，進行 NGAL 基因表現的分析(Sham+TAM n=5; Sham+olive oil n=6) (C)於管餵 TAM 將老鼠犧牲，取肝臟抽取 RNA，進行 NGAL 基因表現的分析 (D)於管餵 TAM 以及 IRI 後進行採血，收取血液中的 buffy coat，進行 KIM-1 基因表現的分析(Sham n=5; IRI+TAM n=3; IRI+olive oil n=4) (E)於管

餵 TAM 三天後將 Pax8-rtTA^{Tg}; LC1^{Tg}; RS26^{fstdtomato} 老鼠具 tdtomato 紅色螢光之腎小管細胞收下來抽取 RNA，進行 NGAL 基因表現的分析(n=3) (F)於管餵 TAM 三天後將 Pax8-rtTA^{Tg}; LC1^{Tg}; RS26^{fstdtomato} 老鼠具 tdtomato 紅色螢光之腎小管細胞收下來抽取 RNA，進行 KIM-1 基因表現的分析(n=3) (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，TAM vs. olive oil。長條圖為平均值±SEM。)



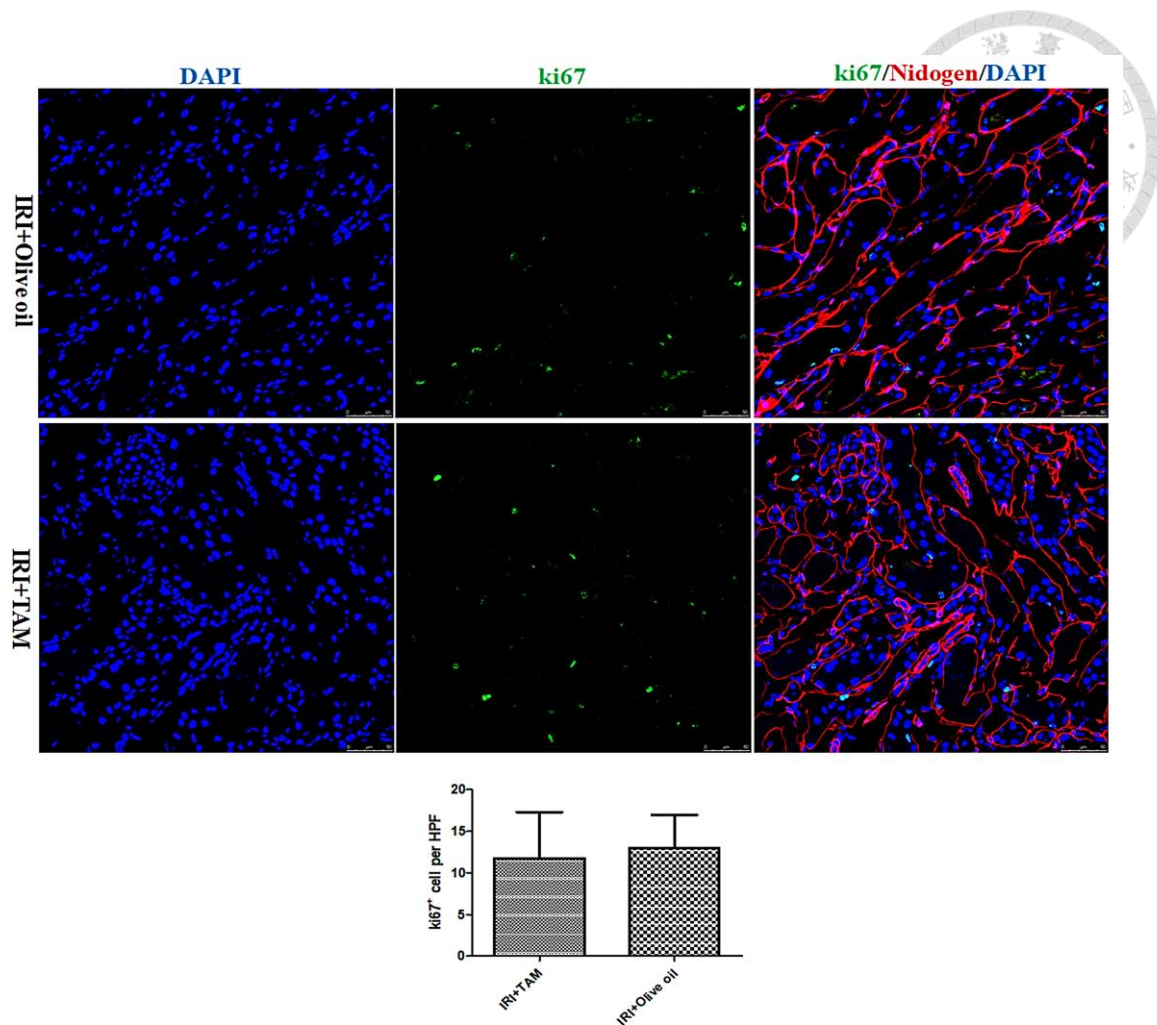
圖七、uIRI 前給予 TAM 可減少腎小管細胞的凋亡

利用 DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System(Cat. G3250)進行螢光染色，計算細胞凋亡之數量，以 400 倍率觀察皮質髓質交界處，每個檢體取 10~12 個視野進行計數(n=5)(統計以 Student's t 檢定進行分析，* P < 0.05，TAM vs. olive oil。比例尺: 50μm。)



圖八、給予 TAM 於 uIRI 後第二天細胞凋亡相關蛋白的影響

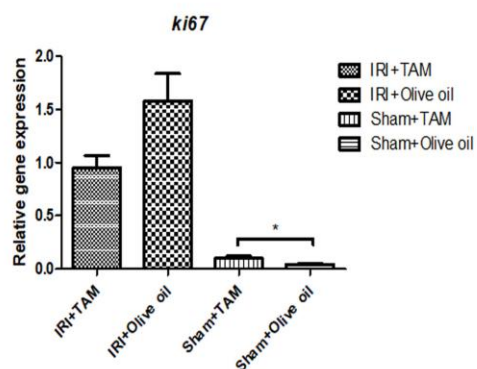
利用 western blot 分析細胞凋亡蛋白相關的表現量。(n=4)(蛋白表現量以 *Gapdh* 表現量做標準化。統計以 Student's t 檢定進行分析，TAM vs. olive oil。)



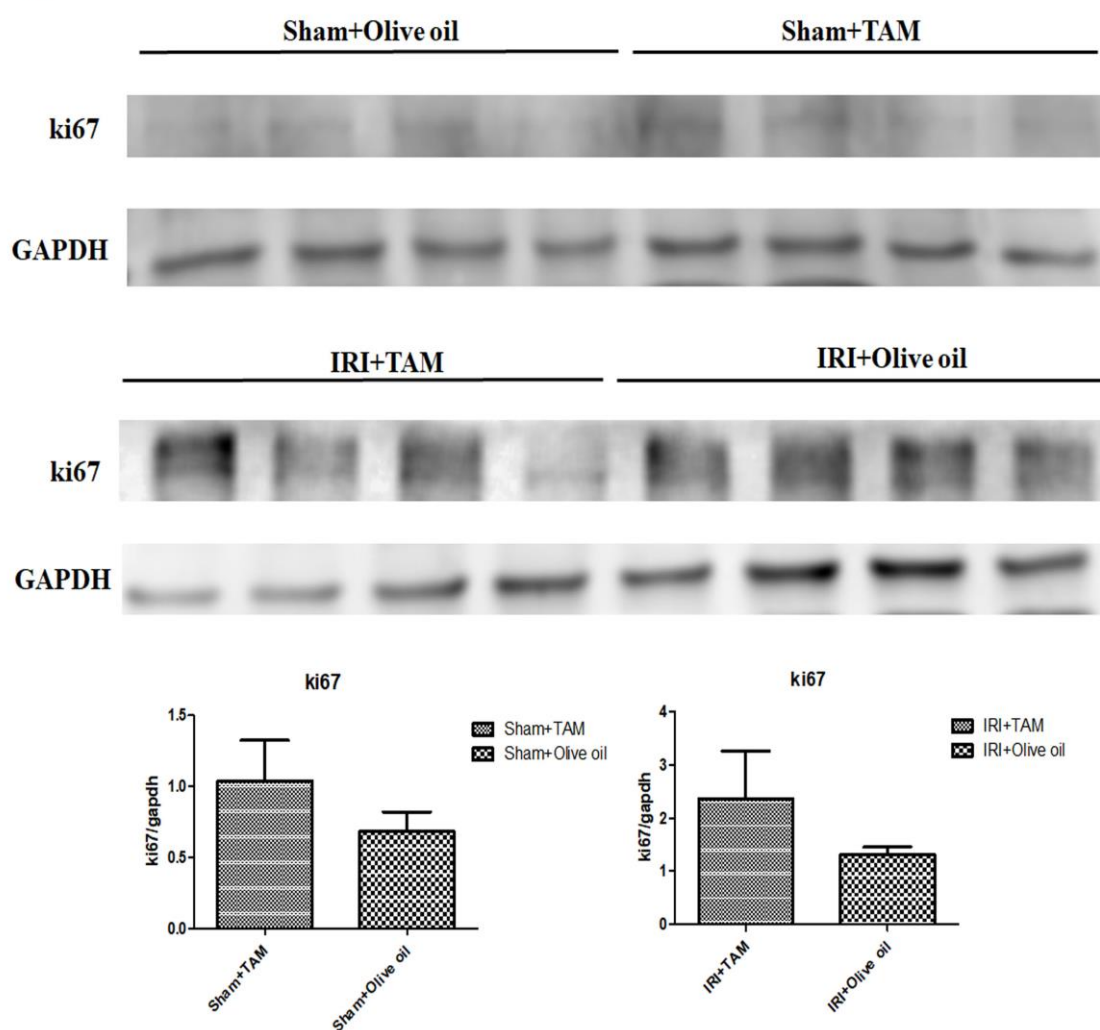
圖九、給予 TAM 對 uIRI 後第二天腎小管細胞增生的影響

利用 ki67 進行螢光染色統計，計算細胞增生之數量，以 400 倍率觀察皮質髓質交界處，每個檢體取 10~12 個視野進行計數(以 Student's t 檢定進行分析，TAM vs. olive oil。長條圖為平均值 $\pm$ SEM。TAM: n=4，olive oil: n=4。比例尺: 50 μ m。)

A.



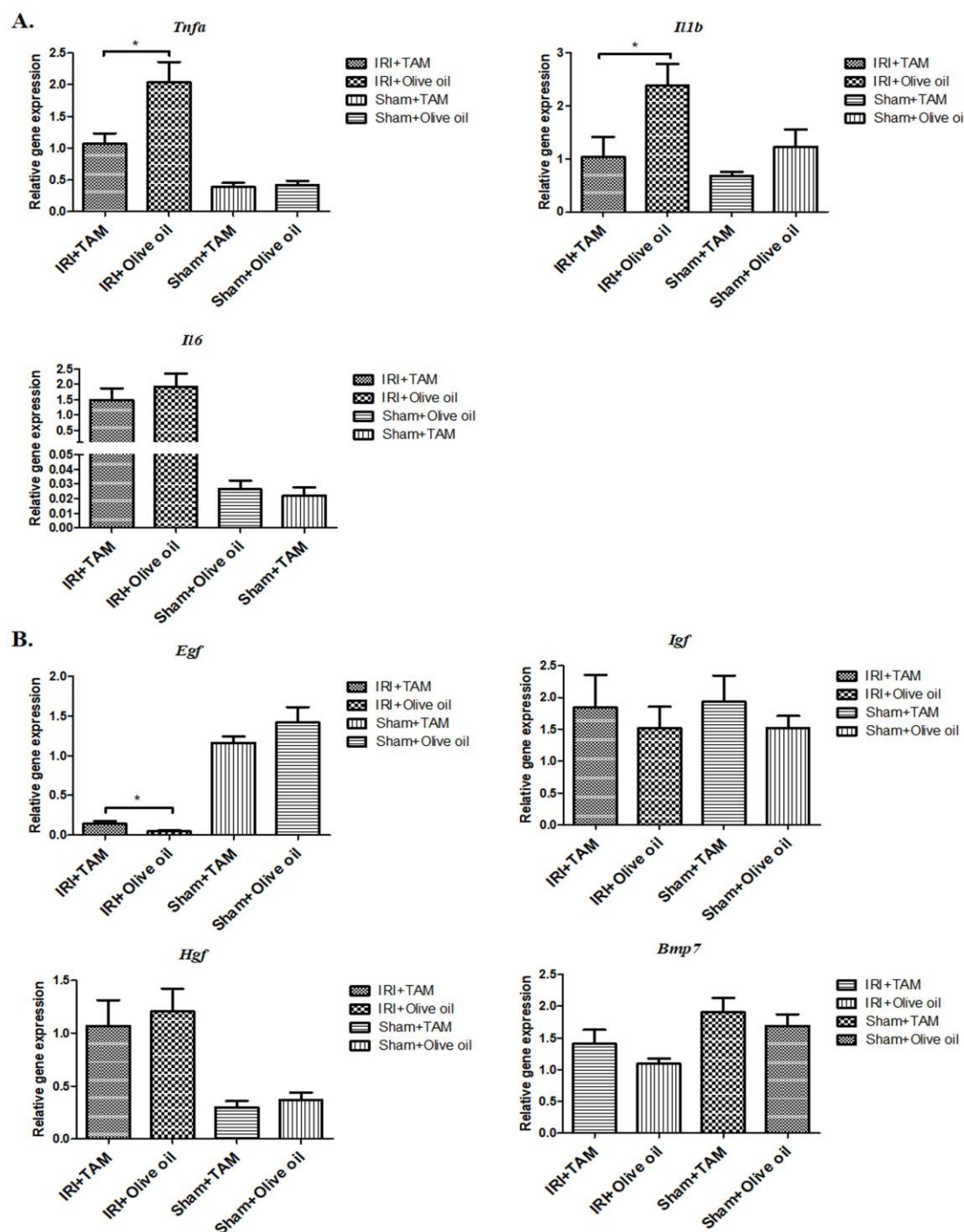
B.



圖十、給予 TAM 對 uIRI 後第二天 Ki67 的蛋白以及基因表現的影響

(A)Ki67 基因表現量。(n=6)(B)以 western blot 觀察 Ki67 蛋白表現量。(n=4)(所有基因以及蛋白都以 *Gapdh* 表現量做標準化。統計以 Student's t 檢定進行分析，* P < 0.05TAM vs. olive oil。長條圖為平均值±SEM。)

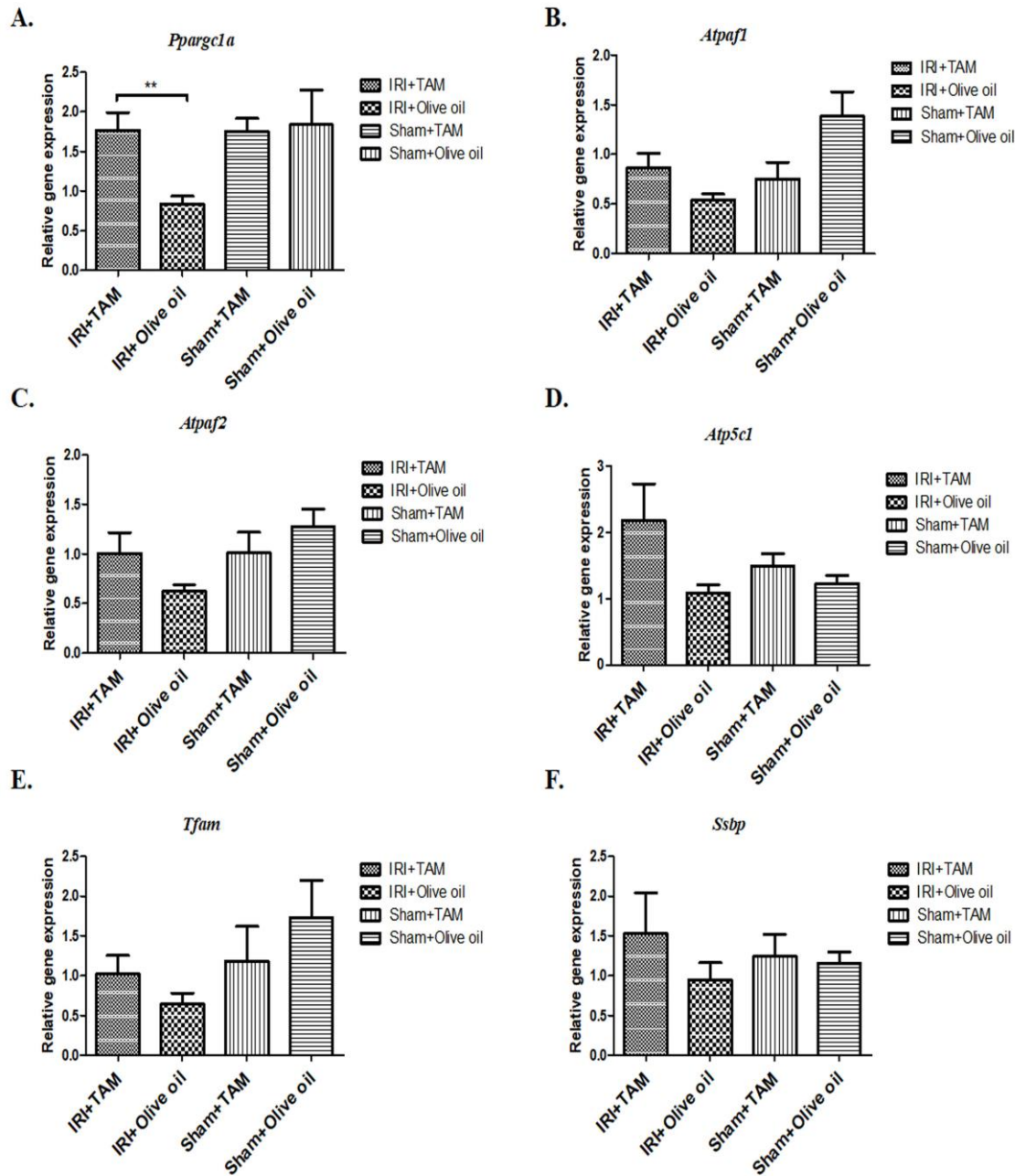




圖十一、給予 TAM 對 uIRI 後促發炎細胞激素及生長因子基因表現的影響

(A)促發炎細胞激素基因表現量。(B) 生長因子基因表現量。(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，* $P < 0.05$ ，TAM vs. olive oil。長條圖為平均值 $\pm$ SEM。IRI n=6；Sham n=7。)





圖十二、給予 TAM 對 IRI 後對粒線體功能相關基因表現的影響

於管餵 TAM 以及 IRI 後將老鼠犧牲，取腎臟抽取 RNA，觀察粒線體功能相關基因表現。(A)*Ppargc1a* (IRI+TAM n=7; IRI+Olive oil n=6; Sham+TAM n=7; Sham+Olive oil n=6) (B)*Atpaf1* (IRI+TAM n=5; IRI+Olive oil n=5; Sham+TAM n=4; Sham+Olive oil n=4) (C) *Atpaf2* (IRI+TAM n=5; IRI+Olive oil n=6; Sham+TAM n=4; Sham+Olive oil n=5) (D) *Atp5c1* (IRI+TAM n=6; IRI+Olive oil n=6; Sham+TAM n=6; Sham+Olive oil

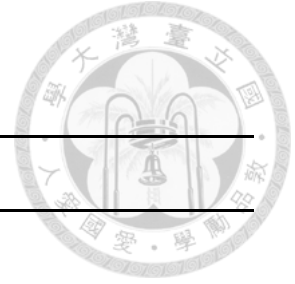
n=6) (E) *Tfam* (IRI+TAM n=5; IRI+Olive oil n=5; Sham+TAM n=4; Sham+Olive oil n=4)

(F) *Ssbp* (IRI+TAM n=5; IRI+Olive oil n=6; Sham+TAM n=4; Sham+Olive oil n=5) (統

計以 Student's t 檢定進行分析，** $P < 0.01$ ，TAM vs. olive oil。長條圖為平均值
 $\pm$ SEM。)

表 一、PCR 之引子序列

Gene	Sequences (5' to 3')
<i>Cre</i>	
Forward	ATCCGAAAAGAAAACGTTGA
Reverse	ATCCAGGTAACGGATATAGT
<i>Pax8</i>	
Forward	CCATGTCTAGACTGGACAAGA
Reverse	CTCCAGGCCACATATGATTAG



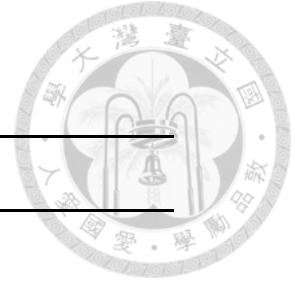
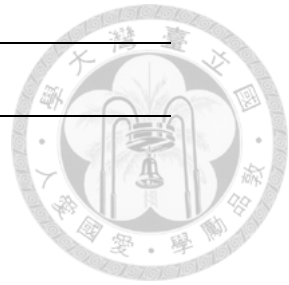


表 二、Real-time PCR 之引子序列

Gene	Sequences (5' to 3')
<i>Atpaf1</i>	
Forward	CACATTTCTGAATGTTGTGG
Reverse	GGTCTGAAGTTAAAGGTCTC
<i>Atpaf2</i>	
Forward	GAAGAGTACCAGATCCAGAAG
Reverse	TGACTGTAGAGCTTTCTGAG
<i>Atp5c1</i>	
Forward	GCAAGAACGCTTCTGATATG
Reverse	TTCTGACAAAGACAGCAATC
<i>Bmp7</i>	
Forward	GTACGTCAGCTTCCGAGACC
Reverse	GGTGGCGTTCATGTAGGAGT
<i>Egf</i>	
Forward	GCCTTCCTGCTGGTGTTTT
Reverse	CACCAATTGCTGGTGATTG
<i>Gapdh</i>	
Forward	ACGGCCGCATCTTCTTGTGCA
Reverse	AATGGCAGCCCTGGTGACCA
<i>Havcr1</i>	
Forward	AAACCAGAGATTCCCACACG
Reverse	GTCGTGGGTCTTCCTGTAGC

Gene	Sequences (5' to 3')
<i>Hgf</i>	
Forward	AGGAACAGGGGCTTTACGTT
Reverse	GCTGCCTCCTTTACCAATGA
<i>IGF</i>	
Forward	GGCATTGTGGATGAGTGTTG
Reverse	TCTCCTTTGCAGCTTCGTTT
<i>Ki67</i>	
Forward	CTGCCTGCGAAGAGAGCATC
Reverse	AGCTCCACTTCGCCTTTTGG
<i>Il1b</i>	
Forward	CCCAAGCAATACCCAAAGAA
Reverse	GCTTGTGCTCTGCTTGTGAG
<i>Il6</i>	
Forward	AGACAAAGCCAGAGTCCTTCA
Reverse	GGTCCTTAGCCACTCCTTCTG
<i>Lcn2</i>	
Forward	ATGCACAGGTATCCTCAGGT
Reverse	TGGCGAACTGGTTGTAGTCC
<i>Pparg1a</i>	
Forward	AGAGAGGCAGAAGCAGAAAGC
Reverse	TCCATCATCCCGCAGATTACG
<i>Ssbp</i>	
Forward	CGTCAGTTTGTAAGACATGAG
Reverse	CCCCTGATCGCCACATCTC



Tfam

Forward GCTTGGAAAACCAAAAAGAC

Reverse CCCAAGACTTCATTTCATTGT

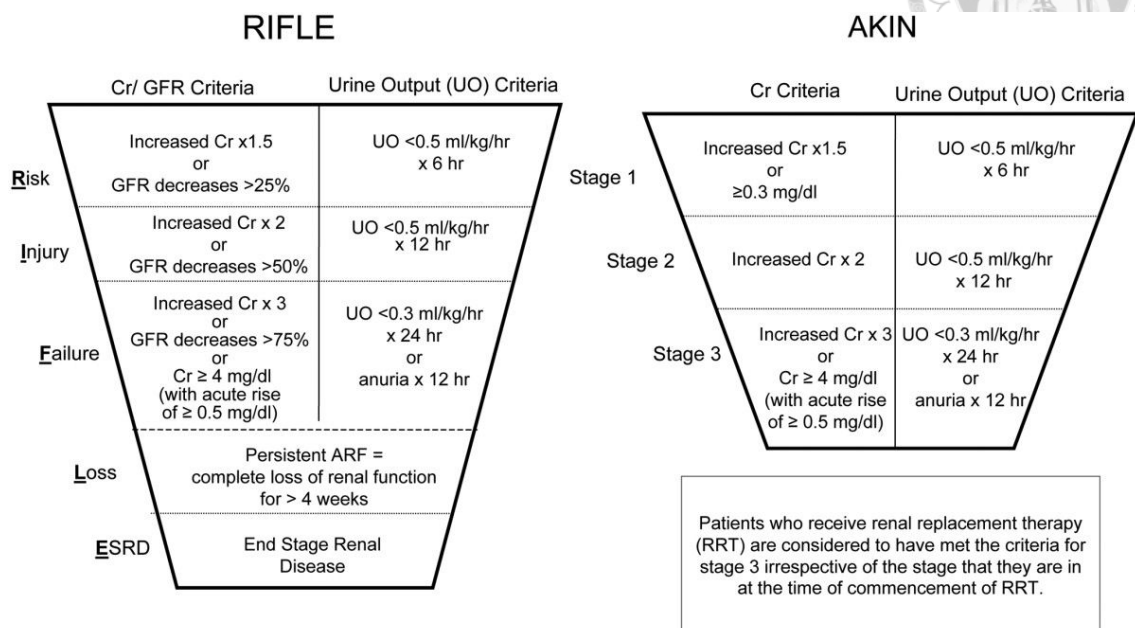
Tnfa

Forward TAGCCAGGAGGGAGAACAGA

Reverse TTTTCTGGAGGGAGATGTGG



附錄

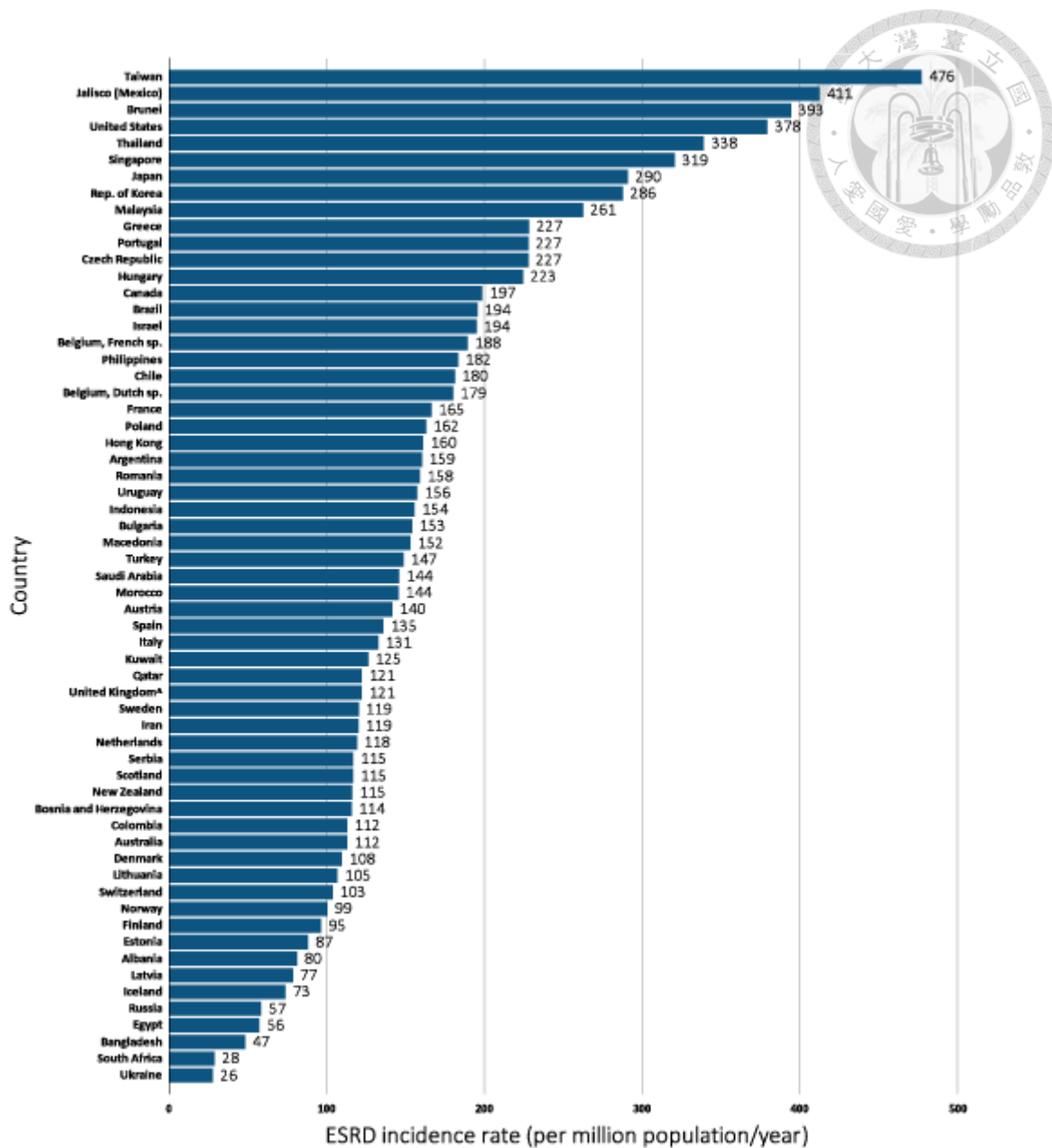


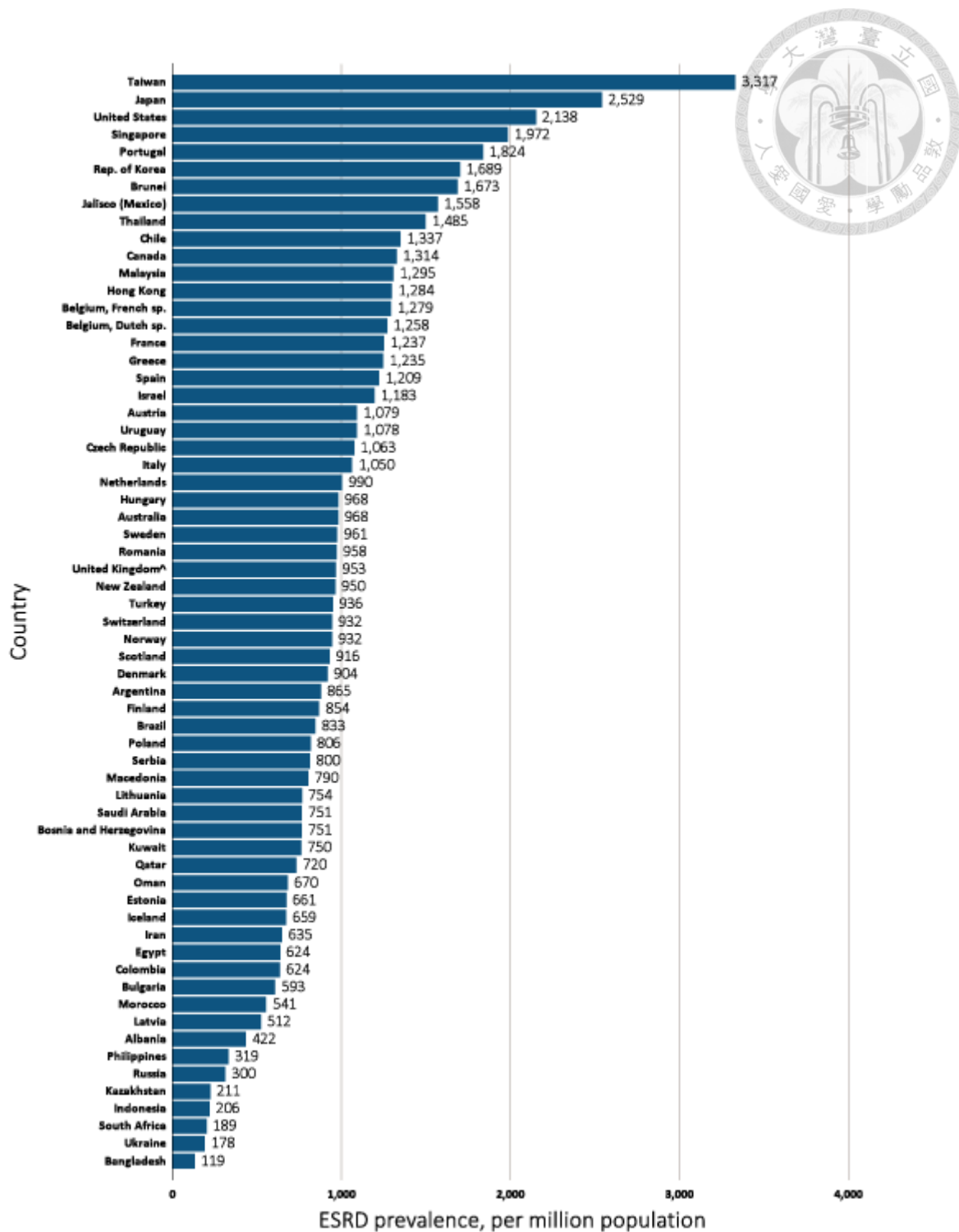
附錄一 急性腎損傷診斷標準

左圖為 RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss of kidney function, and End-stage kidney disease) 的定義標準，右圖則是急性腎損傷照護網(Acute Kidney Injury Network, AKIN)的定義標準。

資料來源：

Cruz, D. N., et al. (2009). "Clinical review: RIFLE and AKIN--time for reappraisal." Crit Care 13(3): 211





附錄二 2015 年世界 ESRD 發生率以及盛行率

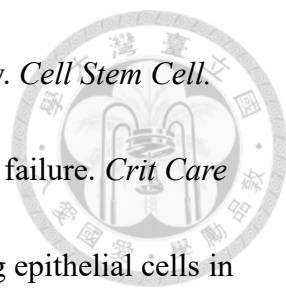
上圖為世界各國 ESRD 的發生率(incidence)，下圖為各國 ESRD 的盛行率(prevalence)，台灣皆高居世界第一。

參考資料：

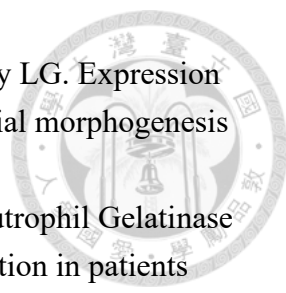
United States Renal Data Sysem, USRDS 2017 Annual Report

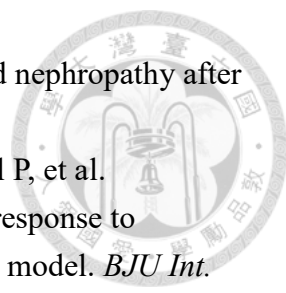
第六章 參考文獻

1. Lopes JA, and Jorge S. The RIFLE and AKIN classifications for acute kidney injury: a critical and comprehensive review. *Clin Kidney J.* 2013;6(1):8-14.
2. Lewington AJ, Cerda J, and Mehta RL. Raising awareness of acute kidney injury: a global perspective of a silent killer. *Kidney Int.* 2013;84(3):457-67.
3. de Geus HR, Betjes MG, and Bakker J. Biomarkers for the prediction of acute kidney injury: a narrative review on current status and future challenges. *Clin Kidney J.* 2012;5(2):102-8.
4. Liu X, Guan Y, Xu S, Li Q, Sun Y, Han R, et al. Early Predictors of Acute Kidney Injury: A Narrative Review. *Kidney Blood Press Res.* 2016;41(5):680-700.
5. Basile DP, Anderson MD, and Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr Physiol.* 2012;2(2):1303-53.
6. Bonventre JV, and Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest.* 2011;121(11):4210-21.
7. Malek M, and Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment. *J Renal Inj Prev.* 2015;4(2):20-7.
8. Banaei S. Novel role of microRNAs in renal ischemia reperfusion injury. *Ren Fail.* 2015;37(7):1073-9.
9. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(6):1503-20.
10. Lieberthal W, and Nigam SK. Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs. distal tubular injury. *Am J Physiol.* 1998;275(5 Pt 2):F623-31.
11. Ishimoto Y, and Inagi R. Mitochondria: a therapeutic target in acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(7):1062-9.
12. Tran M, Tam D, Bardia A, Bhasin M, Rowe GC, Kher A, et al. PGC-1 α promotes recovery after acute kidney injury during systemic inflammation in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(10):4003-14.
13. Hall AM. Maintaining mitochondrial morphology in AKI: looks matter. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(8):1185-7.
14. Jiang X, and Wang X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:87-106.
15. Ding WX, and Yin XM. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem.* 2012;393(7):547-64.
16. Agarwal A, Dong Z, Harris R, Murray P, Parikh SM, Rosner MH, et al. Cellular and Molecular Mechanisms of AKI. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(5):1288-99.
17. Humphreys BD, Valerius MT, Kobayashi A, Mugford JW, Soeung S, Duffield

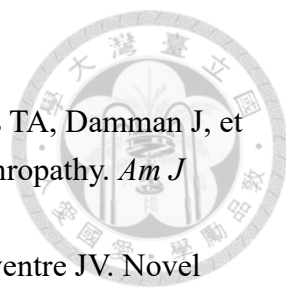
- 
- JS, et al. Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. *Cell Stem Cell*. 2008;2(3):284-91.
18. Liu KD. Molecular mechanisms of recovery from acute renal failure. *Crit Care Med*. 2003;31(8 Suppl):S572-81.
19. Bonventre JV. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14 Suppl 1:S55-61.
20. Humphreys BD, Cantaluppi V, Portilla D, Singbartl K, Yang L, Rosner MH, et al. Targeting Endogenous Repair Pathways after AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(4):990-8.
21. Lin JJ, Cybulsky AV, Goodyer PR, Fine RN, and Kaskel FJ. Insulin-like growth factor-1 enhances epidermal growth factor receptor activation and renal tubular cell regeneration in postischemic acute renal failure. *J Lab Clin Med*. 1995;125(6):724-33.
22. Liu KD, and Brakeman PR. Renal repair and recovery. *Crit Care Med*. 2008;36(4 Suppl):S187-92.
23. Liu Y. Hepatocyte growth factor and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2002;11(1):23-30.
24. Flaquer M, Romagnani P, and Cruzado JM. [Growth factors and renal regeneration]. *Nefrologia*. 2010;30(4):385-93.
25. Chang-Panesso M, and Humphreys BD. Cellular plasticity in kidney injury and repair. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13(1):39-46.
26. Hsu RK, and Hsu CY. The Role of Acute Kidney Injury in Chronic Kidney Disease. *Semin Nephrol*. 2016;36(4):283-92.
27. Ramesh G, and Ranganathan P. Mouse models and methods for studying human disease, acute kidney injury (AKI). *Methods Mol Biol*. 2014;1194:421-36.
28. Singh AP, Junemann A, Muthuraman A, Jaggi AS, Singh N, Grover K, et al. Animal models of acute renal failure. *Pharmacol Rep*. 2012;64(1):31-44.
29. Wei Q, and Dong Z. Mouse model of ischemic acute kidney injury: technical notes and tricks. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303(11):F1487-94.
30. Yang G, Newshean S, Aziz K, and Georgakilas AG. Toxicity and adverse effects of Tamoxifen and other anti-estrogen drugs. *Pharmacol Ther*. 2013;139(3):392-404.
31. Love RR, and Koroltchouk V. Tamoxifen therapy in breast cancer control worldwide. *Bull World Health Organ*. 1993;71(6):795-803.
32. Love RR. Tamoxifen therapy in primary breast cancer: biology, efficacy, and side effects. *J Clin Oncol*. 1989;7(6):803-15.
33. Rangel LB, Taraba JL, Frei CR, Smith L, Rodriguez G, and Kuhn JG. Pharmacogenomic diversity of tamoxifen metabolites and estrogen receptor

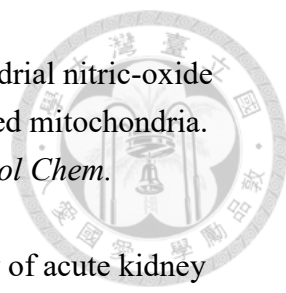
- 
- genes in Hispanics and non-Hispanic whites with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;148(3):571-80.
34. Moreira PI, Custodio JB, Oliveira CR, and Santos MS. Hydroxytamoxifen protects against oxidative stress in brain mitochondria. *Biochem Pharmacol.* 2004;68(1):195-204.
 35. Wong MM, Guo C, and Zhang J. Nuclear receptor corepressor complexes in cancer: mechanism, function and regulation. *Am J Clin Exp Urol.* 2014;2(3):169-87.
 36. Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, and Brown M. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell.* 2000;103(6):843-52.
 37. Ali S, Rasool M, Chaoudhry H, P NP, Jha P, Hafiz A, et al. Molecular mechanisms and mode of tamoxifen resistance in breast cancer. *Bioinformation.* 2016;12(3):135-9.
 38. Hurtado A, Holmes KA, Geistlinger TR, Hutcheson IR, Nicholson RI, Brown M, et al. Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen. *Nature.* 2008;456(7222):663-6.
 39. Corriden R, Hollands A, Olson J, Derieux J, Lopez J, Chang JT, et al. Tamoxifen augments the innate immune function of neutrophils through modulation of intracellular ceramide. *Nat Commun.* 2015;6:8369.
 40. Paul R, Silve S, De Nys N, Dupuy PH, Bouteiller CL, Rosenfeld J, et al. Both the immunosuppressant SR31747 and the antiestrogen tamoxifen bind to an emopamil-insensitive site of mammalian Delta8-Delta7 sterol isomerase. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;285(3):1296-302.
 41. Kim D, Lee AS, Jung YJ, Yang KH, Lee S, Park SK, et al. Tamoxifen ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis by modulation of estrogen receptor alpha-mediated transforming growth factor-beta1/Smad signaling pathway. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29(11):2043-53.
 42. Delle H, Rocha JR, Cavaglieri RC, Vieira JM, Jr., Malheiros DM, and Noronha IL. Antifibrotic effect of tamoxifen in a model of progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(1):37-48.
 43. van der Bilt FE, Hendriksz TR, van der Meijden WA, Brilman LG, and van Bommel EF. Outcome in patients with idiopathic retroperitoneal fibrosis treated with corticosteroid or tamoxifen monotherapy. *Clin Kidney J.* 2016;9(2):184-91.
 44. Korte MR, Fieren MW, Sampimon DE, Lingsma HF, Weimar W, Betjes MG, et al. Tamoxifen is associated with lower mortality of encapsulating peritoneal sclerosis: results of the Dutch Multicentre EPS Study. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(2):691-7.

- 
45. Gwira JA, Wei F, Ishibe S, Ueland JM, Barasch J, and Cantley LG. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin regulates epithelial morphogenesis in vitro. *J Biol Chem*. 2005;280(9):7875-82.
 46. Firu SG, Streba CT, Firu D, Tache DE, and Rogoveanu I. Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) - a biomarker of renal dysfunction in patients with liver cirrhosis: Do we have enough proof? *J Med Life*. 2015;8 Spec Issue:15-20.
 47. Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, and Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem*. 1993;268(14):10425-32.
 48. Kjeldsen L, Bainton DF, Sengelov H, and Borregaard N. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Blood*. 1994;83(3):799-807.
 49. Chakraborty S, Kaur S, Guha S, and Batra SK. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1826(1):129-69.
 50. Cai L, Rubin J, Han W, Venge P, and Xu S. The origin of multiple molecular forms in urine of HNL/NGAL. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(12):2229-35.
 51. Martensson J, and Bellomo R. The rise and fall of NGAL in acute kidney injury. *Blood Purif*. 2014;37(4):304-10.
 52. Glassford NJ, Schneider AG, Xu S, Eastwood GM, Young H, Peck L, et al. The nature and discriminatory value of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in critically ill patients at risk of acute kidney injury. *Intensive Care Med*. 2013;39(10):1714-24.
 53. Mori K, Lee HT, Rapoport D, Drexler IR, Foster K, Yang J, et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *Journal of Clinical Investigation*. 2005;115(3):610-21.
 54. Candido S, Abrams SL, Steelman LS, Lertpiriyapong K, Fitzgerald TL, Martelli AM, et al. Roles of NGAL and MMP-9 in the tumor microenvironment and sensitivity to targeted therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(3):438-48.
 55. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, Kalandadze A, Cohen DJ, Devarajan P, et al. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(2):407-13.
 56. Devireddy LR, Gazin C, Zhu X, and Green MR. A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell*. 2005;123(7):1293-305.
 57. Filiopoulos V, Biblaki D, and Vlassopoulos D. Neutrophil gelatinase-associated

- 
- lipocalin (NGAL): a promising biomarker of contrast-induced nephropathy after computed tomography. *Ren Fail.* 2014;36(6):979-86.
58. Silberstein JL, Sprenkle PC, Su D, Power NE, Tarin TV, Ezell P, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) levels in response to unilateral renal ischaemia in a novel pilot two-kidney porcine model. *BJU Int.* 2013;112(4):517-25.
 59. Carlson M, Raab Y, Seveus L, Xu S, Hallgren R, and Venge P. Human neutrophil lipocalin is a unique marker of neutrophil inflammation in ulcerative colitis and proctitis. *Gut.* 2002;50(4):501-6.
 60. Bauer M, Eickhoff JC, Gould MN, Mundhenke C, Maass N, and Friedl A. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a predictor of poor prognosis in human primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;108(3):389-97.
 61. Nielsen BS, Borregaard N, Bundgaard JR, Timshel S, Sehested M, and Kjeldsen L. Induction of NGAL synthesis in epithelial cells of human colorectal neoplasia and inflammatory bowel diseases. *Gut.* 1996;38(3):414-20.
 62. Roudkenar MH, Kuwahara Y, Baba T, Roushandeh AM, Ebishima S, Abe S, et al. Oxidative stress induced lipocalin 2 gene expression: addressing its expression under the harmful conditions. *J Radiat Res.* 2007;48(1):39-44.
 63. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a promising biomarker for human acute kidney injury. *Biomark Med.* 2010;4(2):265-80.
 64. Candido S, Maestro R, Polesel J, Catania A, Maira F, Signorelli SS, et al. Roles of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human cancer. *Oncotarget.* 2014;5(6):1576-94.
 65. Paragas N, Qiu A, Hollmen M, Nickolas TL, Devarajan P, and Barasch J. NGAL-Siderocalin in kidney disease. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823(9):1451-8.
 66. Supavekin S, Zhang W, Kucherlapati R, Kaskel FJ, Moore LC, and Devarajan P. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int.* 2003;63(5):1714-24.
 67. Devarajan P, Mishra J, Supavekin S, Patterson LT, and Steven Potter S. Gene expression in early ischemic renal injury: clues towards pathogenesis, biomarker discovery, and novel therapeutics. *Molecular Genetics and Metabolism.* 2003;80(4):365-76.
 68. Mishra J. Identification of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Novel Early Urinary Biomarker for Ischemic Renal Injury. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2003;14(10):2534-43.
 69. Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Barasch J, and Devarajan P. Neutrophil

- 
- gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *Am J Nephrol*. 2004;24(3):307-15.
70. An S, Zang X, Yuan W, Zhuge Y, and Yu Q. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) may play a protective role against rats ischemia/reperfusion renal injury via inhibiting tubular epithelial cell apoptosis. *Ren Fail*. 2013;35(1):143-9.
 71. Gong L, Yu H, ZhuGe Y, and Yu Q. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin protects renal tubular epithelial cell in ischemic/reperfusion injury rats via apoptosis-regulating proteins. *Ren Fail*. 2012;34(6):777-83.
 72. Zang XJ, An SX, Feng Z, Xia YP, Song Y, and Yu Q. In vivo mechanism study of NGAL in rat renal ischemia-reperfusion injury. *Genet Mol Res*. 2014;13(4):8740-8.
 73. Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Yang J, Mitsnefes M, et al. Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(12):3073-82.
 74. Zang X, Zheng F, Hong HJ, Jiang Y, Song Y, and Xia Y. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin protects renal tubular epithelial cells in hypoxia-reperfusion by reducing apoptosis. *Int Urol Nephrol*. 2014;46(8):1673-9.
 75. Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(11):3265-8.
 76. Ichimura T, Hung CC, Yang SA, Stevens JL, and Bonventre JV. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004;286(3):F552-63.
 77. Vaidya VS, Ramirez V, Ichimura T, Bobadilla NA, and Bonventre JV. Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;290(2):F517-29.
 78. Zhou Y, Vaidya VS, Brown RP, Zhang J, Rosenzweig BA, Thompson KL, et al. Comparison of kidney injury molecule-1 and other nephrotoxicity biomarkers in urine and kidney following acute exposure to gentamicin, mercury, and chromium. *Toxicol Sci*. 2008;101(1):159-70.
 79. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, and Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int*. 2002;62(1):237-44.
 80. Vaidya VS, Ozer JS, Dieterle F, Collings FB, Ramirez V, Troth S, et al. Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. *Nat Biotechnol*. 2010;28(5):478-85.
 81. Vaidya VS, Waikar SS, Ferguson MA, Collings FB, Sunderland K, Gioules C, et al. Urinary biomarkers for sensitive and specific detection of acute kidney injury

- 
- in humans. *Clin Transl Sci*. 2008;1(3):200-8.
82. van Timmeren MM, Bakker SJ, Vaidya VS, Bailly V, Schuur TA, Damman J, et al. Tubular kidney injury molecule-1 in protein-overload nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;291(2):F456-64.
 83. Sabbisetti VS, Ito K, Wang C, Yang L, Mefferd SC, and Bonventre JV. Novel assays for detection of urinary KIM-1 in mouse models of kidney injury. *Toxicol Sci*. 2013;131(1):13-25.
 84. Ichimura T, Brooks CR, and Bonventre JV. Kim-1/Tim-1 and immune cells: shifting sands. *Kidney Int*. 2012;81(9):809-11.
 85. Yang L, Brooks CR, Xiao S, Sabbisetti V, Yeung MY, Hsiao LL, et al. KIM-1-mediated phagocytosis reduces acute injury to the kidney. *J Clin Invest*. 2015;125(4):1620-36.
 86. Ichimura T, Asseldonk EJ, Humphreys BD, Gunaratnam L, Duffield JS, and Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest*. 2008;118(5):1657-68.
 87. McIlroy DR, Wagener G, and Lee HT. Biomarkers of acute kidney injury: an evolving domain. *Anesthesiology*. 2010;112(4):998-1004.
 88. Palin NK, Savikko J, Pasternack A, Rintala JM, Kalra B, Mistry S, et al. Activin inhibition limits early innate immune response in rat kidney allografts-a pilot study. *Transpl Int*. 2017;30(1):96-107.
 89. Cardoso CM, Custodio JB, Almeida LM, and Moreno AJ. Mechanisms of the deleterious effects of tamoxifen on mitochondrial respiration rate and phosphorylation efficiency. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2001;176(3):145-52.
 90. Lien EA, Solheim E, and Ueland PM. Distribution of tamoxifen and its metabolites in rat and human tissues during steady-state treatment. *Cancer Res*. 1991;51(18):4837-44.
 91. Robinson SP, Langan-Fahey SM, Johnson DA, and Jordan VC. Metabolites, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of tamoxifen in rats and mice compared to the breast cancer patient. *Drug Metab Dispos*. 1991;19(1):36-43.
 92. Maccarrone M, Fantini C, Ranalli M, Melino G, and Agro AF. Activation of nitric oxide synthase is involved in tamoxifen-induced apoptosis of human erythroleukemia K562 cells. *FEBS Lett*. 1998;434(3):421-4.
 93. Nazarewicz RR, Zenebe WJ, Parihar A, Larson SK, Alidema E, Choi J, et al. Tamoxifen induces oxidative stress and mitochondrial apoptosis via stimulating mitochondrial nitric oxide synthase. *Cancer Res*. 2007;67(3):1282-90.
 94. Ghafourifar P, and Richter C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett*. 1997;418(3):291-6.

- 
95. Ghafourifar P, Schenk U, Klein SD, and Richter C. Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome c release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation. *J Biol Chem.* 1999;274(44):31185-8.
 96. Charlton JR, Portilla D, and Okusa MD. A basic science view of acute kidney injury biomarkers. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29(7):1301-11.
 97. Meyer K, Lee JS, Dyck PA, Cao WQ, Rao MS, Thorgeirsson SS, et al. Molecular profiling of hepatocellular carcinomas developing spontaneously in acyl-CoA oxidase deficient mice: comparison with liver tumors induced in wild-type mice by a peroxisome proliferator and a genotoxic carcinogen. *Carcinogenesis.* 2003;24(5):975-84.
 98. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* 2012;45(6):487-98.
 99. Lv Z, Xu LY, Shen ZY, Zhang FR, Xu XE, and Li EM. Overexpression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin and its receptor in colorectal carcinoma: Significant correlation with cell differentiation and tumour invasion. *Oncol Lett.* 2010;1(1):103-8.
 100. Sobecki M, Mrouj K, Colinge J, Gerbe F, Jay P, Krasinska L, et al. Cell-Cycle Regulation Accounts for Variability in Ki-67 Expression Levels. *Cancer Res.* 2017;77(10):2722-34.
 101. Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR, Shah JV, and Bonventre JV. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat Med.* 2010;16(5):535-43, 1p following 143.
 102. Kang HM, Ahn SH, Choi P, Ko YA, Han SH, Chinga F, et al. Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. *Nat Med.* 2015;21(1):37-46.
 103. Wee P, and Wang Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel).* 2017;9(5).
 104. Karihaloo A, O'Rourke DA, Nickel C, Spokes K, and Cantley LG. Differential MAPK pathways utilized for HGF- and EGF-dependent renal epithelial morphogenesis. *J Biol Chem.* 2001;276(12):9166-73.
 105. Zhang Z, and Cai CX. Kidney injury molecule-1 (KIM-1) mediates renal epithelial cell repair via ERK MAPK signaling pathway. *Mol Cell Biochem.* 2016;416(1-2):109-16.