

國立臺灣大學生命科學院生化科技學系

碩士論文

Department of Biochemical Science and Technology

College of Life Science

National Taiwan University

Master's Thesis



果糖與葉酸對腺嘌呤誘發腎損傷小鼠腎功能的影響

Effects of fructose and folate on renal function in adenine-induced kidney injury murine model

陳亭語

Ting-Yu Chen

指導教授：林璧鳳 博士

Advisor: Bi-Fong Lin, Ph.D.

中華民國 113 年 7 月

July, 2024



國立臺灣大學碩士學位論文

口試委員會審定書

MASTER'S THESIS ACCEPTANCE CERTIFICATE

NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY



果糖與葉酸對腺嘌呤誘發腎損傷小鼠腎功能的影響

Effects of fructose and folate on renal function in
adenine-induced kidney injury murine model

本論文係 陳亭語 (姓名) R11B22026 (學號) 在國立臺灣大學
生化科技學系完成之碩士學位論文，於民國 113 年 7 月 23 日承下列
考試委員審查通過及口試及格，特此證明。

The undersigned, appointed by the Department of Biochemical Science and Technology on 23 (date) July (month) 2024 (year) have examined a Master's Thesis entitled above presented by Chen, Ting-Yu (name) R11B22026 (student ID) candidate and hereby certify that it is worthy of acceptance.

口試委員 Oral examination committee:

林麗鳳

(指導教授 Advisor)

許瑞剛

江孟燦

邵任傑

洪永淵

李昌達

系（所、學位學程）主管 Director:





謝辭

時光荏苒，碩士生涯如同白駒過隙。這兩年充滿挑戰與成長，每一步都彌足珍貴。在此，我懷著最真摯的心情，向所有給予我幫助的人表達深深的感激。

首先，我要向我的指導教授林璧鳳教授致以最崇高的敬意。在實驗遇到難題時，您總是耐心地指導我，給予我自由探索的空間。您不僅在學術上給予我悉心的教導，更以身作則，教會了我許多為人處世的智慧。您的言傳身教，將成為我今後人生的寶貴財富。

衷心感謝我的口試委員江孟燦教授、許瑞芬教授、謝佳倩教授以及洪永瀚教授。感謝您們在百忙之中審閱我的論文，並提出寶貴的建議，使我的論文得以完善。

接下來，感謝研究室的駿威學長傳授實驗技巧和研究設計建議，謝謝聖如學姐無私分享獨到見解。謝謝維茵、意雲、立芬學姐幫助我快速適應碩士生活，謝謝采靜、佩儒和Alana學姐在實驗技巧上的指導以及對我的鼓勵和建議，還有德益和佩倪在困難時的腦力激盪，讓我的實驗進展更加順利。特別感謝我的夥伴雅靖，感謝你陪伴我度過了碩士生涯中的每一個起起落落，一起面對小鼠實驗中的挑戰，並解決無數意外的問題。此外，還要感謝沛榮學姐在大小事上的傾力支持。你們的帮助和支持，是我成長的重要力量。同時，我也要向為研究獻身的小鼠們表示敬意，願你們在來世能夠擁有幸福的生活。

最後，感謝我的家人，你們的支持讓我能全心投入學業。感謝朋友們的陪伴與關心，讓我在忙碌中倍感溫暖。這段短暫卻寶貴的碩士生涯，凝聚了眾人的幫助與鼓勵。我將帶著這份感恩之心，繼續在人生的道路上砥礪前行。

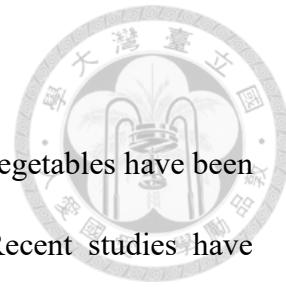




摘要

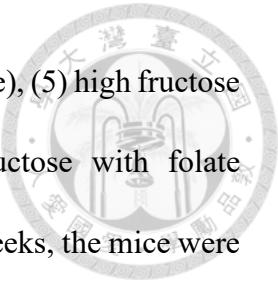
已知高含糖飲料低蔬果攝取的飲食型態，可能導致慢性腎病盛行率上升。近年來，研究指出腺嘌呤可作為誘發小鼠腎損傷的媒介。故本研究以腺嘌呤誘發腎損傷小鼠探討果糖與葉酸對腎功能的影響。首先建立腺嘌呤誘發腎損傷小鼠模式，將 28 週齡的 C57BL/6 雄鼠分為 (1)正常飲食組 (Ctrl)、低劑量組 (0.1% ade) 以及高劑量組 (0.15% ade)，餵飼六週後結果顯示，ade 兩組都能顯著增加腎功損傷指標，而 0.1% ade 組體重下降幅度較低，故選擇 0.1% 腺嘌呤進行後續實驗。首先探討果糖與葉酸不足對腎功能的影響，將 7 週齡的 C57BL/6 雄鼠分為 (1)正常飲食組 (Ctrl)、(2)高果糖組 (Hfru_(ade))、(3)高果糖腺嘌呤組 (Hfru + ade)、和 (4)高果糖缺葉酸腺嘌呤組 (Hfru-f + ade)。小鼠 22 週齡開始添加 0.1% (w/w) 腺嘌呤誘發腎損傷，44 週齡犧牲分析腎功能指標。結果顯示，不論高果糖組或腺嘌呤 (+ade) 組的飲水量與血清尿素氮、血清肌酸酐、尿蛋白、腎纖維化區域和免疫細胞浸潤顯著增加，Hfru-f + ade 組的尿腎損傷分子-1 (KIM-1) 較高。顯示葉酸不足加劇腎損傷。接著，為探討純果糖與葉酸補充對腎功能的影響，8 週齡的 C57BL/6 雄鼠分為 (1)正常飲食組 (Ctrl)、(2)高果糖組 (Hfru)、(3)正常飲食腺嘌呤組 (Ctrl + ade)、(4)高果糖腺嘌呤組 (Hfru + ade)、(5)高果糖低葉酸腺嘌呤組 (Hfru-f + ade) 以及 (6)高果糖葉酸補充腺嘌呤組 (Hfru+f10+ade)。小鼠 18 週齡添加 0.1%~0.2% (w/w) 腺嘌呤誘發腎損傷，25 週齡時犧牲。結果顯示，高果糖組 (Hfru) 體重與肝脂肪比控制組顯著較高，Hfru-f + ade 組腎功能顯著降低，而補充葉酸顯著降低血清肌酸酐。綜上所述，高果糖會增加肝脂肪堆積造成肥胖，葉酸不足加劇腎損傷，葉酸補充能減緩腎臟損傷。

關鍵字：果糖、葉酸、腺嘌呤、腎功能、纖維化



Abstract

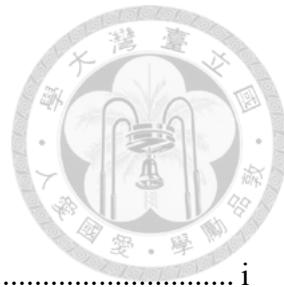
Dietary patterns high in sugary beverages and low in fruits and vegetables have been linked to the increasing prevalence of chronic kidney disease. Recent studies have identified adenine as a mediator that induces kidney injury in mice. This study investigates the effects of fructose and folate on renal function in adenine-induced kidney injury murine model. First, we established a mouse model of adenine-induced kidney injury. 28-week-old male C57BL/6 mice were divided into three groups: (1) normal diet (Ctrl), (2) low-dose adenine (0.1% ade), and (3) high-dose adenine (0.15% ade). After 6 weeks, both adenine groups showed significant increases in kidney injury markers, with less weight loss in the 0.1% ade group. Therefore, 0.1% adenine was chosen for subsequent experiments. To explore the effects of fructose and folate deficiency on renal function, 7 week-old male C57BL/6 mice were divided into four groups: (1) normal diet (Ctrl), (2) high fructose (Hfru_(ade)), (3) high fructose with adenine (Hfru +ade), and (4) high fructose with folate insufficiency and adenine (Hfru-f +ade). From the age of 22 weeks, the mice were treated with 0.1% (w/w) adenine to induce kidney injury, and were sacrificed at 44 weeks of age for analysis. The results showed that both Hfru and ade groups showed significantly increased water intake, serum urea nitrogen, serum creatinine, urinary protein, renal fibrosis areas, and immune cell infiltration. The Hfru-f +ade group had higher levels of urinary kidney injury molecule-1 (KIM-1), indicating that folate deficiency exacerbates kidney damage. To further investigate the impact of fructose and folate supplementation on renal function, 8 week-old male C57BL/6 mice were divided into six groups: (1) normal diet (Ctrl), (2) high fructose (Hfru), (3) normal



diet with adenine (Ctrl +ade), (4) high fructose with adenine (Hfru +ade), (5) high fructose with low folate with adenine (Hfru-**f** +ade), and (6) high fructose with folate supplementation with adenine (Hfru+**f10**+ade). From the age of 18 weeks, the mice were treated with 0.1~0.2% (w/w) adenine to induce kidney injury, and were sacrificed at 25 weeks of age for analysis. The results showed that the Hfru group had significantly higher body weight and liver fat compared to the control group. The Hfru-**f**+ade group exhibited significantly reduced renal function, while Hfru+**f10**+ade significantly lowered serum creatinine levels. These results demonstrated that high fructose increases liver fat accumulation. Low folate exacerbates kidney damage by increasing fibrosis, while folate supplementation can mitigate kidney injury.

Keywords: fructose, folic acid, adenine, renal function, fibrosis

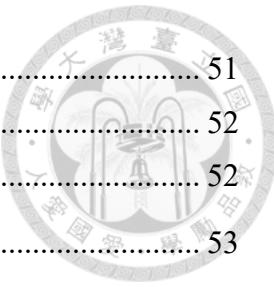
目次



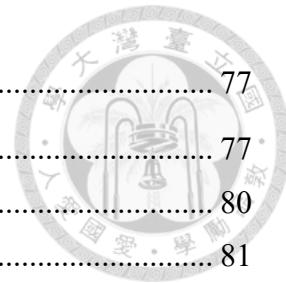
口試委員審定書	i
謝辭	ii
摘要	iii
Abstract.....	iv
目次	vi
圖次	x
表次	xii
第一章 文獻回顧.....	1
第一節 葉酸	1
一、 化學結構	1
二、 生理生化功能	2
三、 食物來源與建議攝取量	3
四、 消化吸收與儲存	3
六、 缺乏症	5
七、 葉酸營養狀況	7
第二節 果糖	8
一、 化學結構與來源	8
二、 生化代謝	8
三、 消化吸收	10
四、 果糖與疾病	10
第三節 腺嘌呤	13
一、 化學結構與來源	13
二、 生理功能與代謝機轉	13
三、 腺嘌呤對全身代謝的影響	15



四、	腺嘌呤對腎臟的影響	16
五、	腺嘌呤誘發腎病模式	16
第四節	腎臟疾病	21
一、	腎結石 (kidney stone)	21
二、	急性腎損傷 (Acute kidney injury, AKI)	23
三、	慢性腎病變 (chronic kidney disease, CKD)	24
第五節	研究動機與目的	30
第二章 腺嘌呤誘發腎損傷的劑量實驗.....		32
第一節	前言	32
第二節	材料方法	33
一、	動物飼養	33
二、	血液採集與處理	33
三、	尿液採集與處理	33
四、	腎功能測定	35
五、	腎臟組織切片染色	36
六、	統計分析	37
第三節	實驗結果	38
一、	腺嘌呤誘發腎損傷小鼠生長情形	38
二、	小鼠組織器官重量	40
二、	腺嘌呤對小鼠腎功能的影響	41
三、	腺嘌呤對小鼠腎纖維化的影響	42
第四節	討論	43
第三章 果糖與葉酸不足對腺嘌呤誘發腎損傷小鼠腎功能的影響		46
第一節	前言	46
第二節	材料方法	47
一、	動物飼養	47
二、	血液採集與處理	47
三、	尿液採集與處理	47
四、	血清葉酸濃度測定	49



五、	腎功能測定	51
六、	腎臟組織切片染色	52
七、	統計分析	52
第三節	實驗結果	53
一、	小鼠生長情形	53
二、	小鼠組織器官重量	58
三、	腎功能指標	59
四、	腎損傷小鼠腎臟組織病理變化和纖維化的影響	60
第四節	討論	62
一、	高油高果糖與葉酸對小鼠體重的影響	62
二、	腺嘌呤對小鼠體重與腎功能的影響	62
三、	腺嘌呤誘發之腎損傷無法回復	63
四、	果糖與腺嘌呤對小鼠熱量攝取與血糖的影響	63
五、	葉酸缺乏使小鼠攝食量與體重減輕	64
六、	腺嘌呤餵飼增加飲水量與尿量	64
七、	果糖與葉酸不足對腎臟外觀的影響	64
八、	果糖與葉酸不足對腎功能指標的影響	65
九、	果糖與葉酸不足加劇組織病理變化和纖維化	66
第四章	果糖與葉酸補充對腺嘌呤誘發腎損傷小鼠的影響	68
第一節	前言	68
第二節	材料方法	69
一、	動物飼養	69
二、	血液採集與處理	69
三、	尿液採集與處理	69
四、	血清葉酸濃度測定	71
五、	肝功能測定	71
六、	肝臟脂肪測定	71
七、	腎功能測定	72
八、	腎臟組織切片染色	73
九、	腎臟 mRNA 表現量分析	73
十、	統計分析	76



第三節	實驗結果	77
一、	小鼠生長情形	77
二、	小鼠組織器官重量	80
三、	小鼠體內葉酸濃度	81
四、	果糖、葉酸與腺嘌呤對小鼠血糖的影響	82
五、	果糖、葉酸與腺嘌呤對小鼠消化道的影響	83
六、	果糖、葉酸與腺嘌呤對小鼠肝功能的影響	84
七、	果糖、葉酸與腺嘌呤對小鼠脂肪堆積的影響	85
八、	果糖、葉酸與腺嘌呤對小鼠腎臟的影響	87
第四節	討論	92
一、	果糖與葉酸對小鼠生長情形的影響	92
二、	葉酸與腺嘌呤對小鼠器官重量的影響	92
三、	飲食葉酸對小鼠體內葉酸濃度的影響	93
四、	果糖對小鼠禁食血糖與尿糖的影響	93
五、	果糖、葉酸與腺嘌呤對肝功能的影響	94
六、	果糖增加小鼠肝臟脂肪堆積	94
七、	果糖與葉酸對腎功能與腎纖維化的影響	95
第五章 綜合討論與結論	96
第一節	綜合討論	96
一、	葉酸與腺嘌呤代謝相互作用	96
二、	飲食葉酸對體內葉酸含量的影響	97
三、	飲食因子影響腺嘌呤誘發腎損傷可能的原因	97
第二節	結論	99
參考文獻	101

圖次

圖 1-1 葉酸代謝	5
圖 1-2 果糖代謝	9
圖 1-3 嘌呤代謝途徑及相關酵素	14
圖 1-4 腺嘌呤誘發腎病模式	17
圖 1-5 腎臟形態以及結石的位置	23
圖 1-6 依 GFR 和蛋白尿嚴重程度劃分的 CKD	25
圖 2-1 實驗設計	32
圖 2-2 腺嘌呤小鼠腎功能損傷。	41
圖 2-3 腺嘌呤增加小鼠腎免疫細胞浸潤與纖維化程度。	42
圖 3-1 實驗設計	46
圖 3-2 小鼠 BUN 濃度	54
圖 3-3 葉酸不足造成熱量攝取降低與禁食血糖升高	56
圖 3-4 腺嘌呤餵飼增加飲水量與尿蛋白	57
圖 3-5 腺嘌呤誘發腎損傷指標增加	59
圖 3-6 小鼠腎臟纖維化程度	61
圖 4-1 實驗設計	68
圖 4-2 小鼠血清與肝臟葉酸濃度	81
圖 4-3 果糖與葉酸升高小鼠禁食血糖與尿糖	82
圖 4-4 小鼠(A)胃殘餘量與(B)小腸長度	83
圖 4-5 果糖與低葉酸降低小鼠肝功能	84
圖 4-6 果糖與葉酸對腺嘌呤誘發腎損傷小鼠體脂肪與肝臟脂肪的影響	86

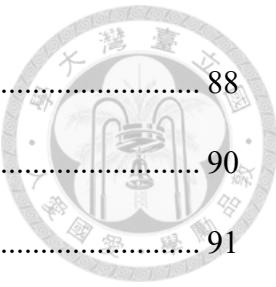


圖 4-7 果糖與葉酸對腺嘌呤誘發腎損傷小鼠腎功能指標的影響	88
圖 4-8 小鼠腎纖維化面積與組織病理變化	90
圖 4-9 缺氧與發炎相關基因表現	91
圖 5-1 果糖與葉酸對腺嘌呤誘發腎損傷小鼠腎功能的影響	99



表次

表 1-1 AKI、AKD、CKD 和 NKD 的定義標準	24
表 1-2 慢性腎病變診斷準則	25
表 2-1 飼料成分表(劑量實驗).....	34
表 2-2 腺嘌呤誘發腎損傷小鼠之體重變化	38
表 2-3 腺嘌呤誘發腎損傷小鼠之攝食量變化	39
表 2-4 腺嘌呤誘發腎損傷小鼠之飲水量變化	39
表 2-5 腺嘌呤誘發腎損傷小鼠之絕對與相對器官重量的影響	40
表 3-1 飼料成分表(葉酸不足實驗).....	48
表 3-2 不同飲食配方對腺嘌呤誘發腎損傷小鼠體重的影響	54
表 3-3 不同飲食配方對腺嘌呤誘發腎損傷小鼠熱量攝取的影響	54
表 3-4 不同葉酸攝取量對小鼠體重的影響	55
表 3-5 不同葉酸攝取量對小鼠攝食量的影響	55
表 3-6 臟器絕對與相對器官重量	58
表 4-1 飼料成分表(葉酸補充實驗).....	70
表 4-2 本研究使用的引子對	75
表 4-3 腎臟 RT-PCR 反應條件	76
表 4-4 不同飲食配方下小鼠體重變化	78
表 4-5 不同飲食配方下小鼠攝食量變化	78
表 4-6 不同飲食配方下小鼠熱量攝取變化	78
表 4-7 不同腺嘌呤劑量下小鼠飲水量變化	79
表 4-8 臟器絕對與相對器官重量	80



表 4-9 果糖與葉酸對腺嘌呤誘發腎損傷小鼠白色脂肪組織重量的影響 86

縮寫對照表



縮寫	全名
AA	Aristolochic acid
AKD	Acute kidney disease
AKI	Acute kidney injury
APRT	Adenine phosphoribosyltransferase
BUN	Blood urea nitrogen
CCR	Creatinine Clearance Rate
CKD	Chronic kidney disease
KIM-1	Kidney Injury Molecule-1
MTHFR	Methylene tetrahydrofolate reductase
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
NKD	No known kidney disease
SAM	S-adenosylmethionine
sCr	Serum creatinine
UUO	Unilateral Ureteral Obstruction
2,8-DHA	2,8-Dihydroxyadenine



第一章 文獻回顧

第一節 葉酸

一、化學結構

葉酸是水溶性必須維生素之一，化學式為 $C_{19}H_{19}N_7O_6$ 。核心是雜環喋啶(pteridine ring)結構，第六個碳上有一個甲基與對氨基苯甲酸(γ -aminobenzoic acid)和麩胺酸(glutamate)結合，「folate」是涵蓋葉酸及接受單碳代謝後的衍生物—具有代謝活性的二氳、四氳、甲基、甲醯基化合物的統稱(Shulpeкова et al. 2021)。因人體沒有連結 pteridine 和 γ -aminobenzoic acid 的能力，而不能自行合成葉酸(Fernández-Villa et al. 2019)。葉酸在鹼性環境溶解度較高，在酸性環境中結構較穩定。葉酸對氧氣、光、溫度高度敏感，容易氧化釋放 pteridine 以及 γ -aminobenzoic acid。抗壞血酸可抑制葉酸氧化，保存葉酸活性(Shulpeкова et al. 2021)。細胞內的葉酸多為具有由 3 到 8 個麩胺酸所形成的多麩胺酸鏈，多麩胺酸結構會將葉酸留存在細胞內提高細胞使用葉酸的效率，葉酸吸收需要 γ -glutamyl hydrolyase 將含多麩胺酸的葉酸分解成單麩胺酸型式才能吸收，所以多麩胺酸的葉酸型式會降低生物利用率，人工製造的補充劑多為單麩胺酸型式，以提高生物利用率(Suh et al. 2001)。



二、生理生化功能

葉酸是輔因子，容易與 O-、S-、N-、C-鍵反應，最重要的功能是參與單碳代謝，單碳代謝在核酸、組蛋白、神經傳導物質、磷脂質、蛋白質的甲基化、同半胱氨酸再甲基化、穀胱甘肽還原中扮演重要角色，其中最重要的是參與嘌呤和嘧啶的合成。單碳基團最重要的來源是胺基酸 serine, glycine, histidine, tryptophane 和 嘌呤鹼基、胸腺嘧啶和 S-adenosylmethionine (SAM)。嘧啶合成過程中，serine 提供一個碳被轉移到 THF，經由 serine hydroxymethyltransferase 產生 glycine 和 5,10-methylene THF，Thymidylate synthase 催化 dUMP 形成 dTMP 的過程中，需要 5,10-methylene THF，同時此反應會形成 dihydrofolate (DHF)。另外，嘌呤環直接 C-2 和 C-8 直接由 10-formyl-THF 提供 (Stover, 2009)，甲基則會提供給 DNA 合成、methionine 合成、半胱氨酸和同半胱氨酸代謝等。methionine 合成由 methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) 還原 5,10-methylene-THF 形成 5-methyl-THF 開始，此過程需要 cobalamin (維生素 B12) 作為輔因子，將同半胱氨酸轉換為 methionine，形成 S-adenosyl methionine (SAM)，提供甲基給 DNA、RNA、磷脂質、神經傳導物質合成。SAM 透過抑制 MTHFR 的活性來調節 MTHFR。當 SAM 增加時，葉酸會刺激核苷酸合成。在葉酸缺乏的情況下，減少 SAM 的產生減少對 MTHFR 的抑制，導致核苷酸合成下降 (Ebara, 2017)。另外，葉酸在血液中會與二價陽離子銅、鐵等形成穩定的不溶性化合物，葉酸結構中的還原態蝶啶環能做為電子提供者以穩定自由基，參與消除血中二價陽離子，具有抗氧化的功能 (Buglak et al., 2022)。



三、食物來源與建議攝取量

台灣人葉酸主要食物來源有肝臟、葉綠蔬菜、酵母、柑橘類、水果、豆類 (Chen et al., 2011)，食物中的葉酸利用率大約為 50%，而單獨攝取合成的葉酸利用率大約為 85% 至 90% (Bailey, 2009)。由於天然葉酸利用率是合成葉酸利用率的 50%，所以使用葉酸當量 (dietary folate equivalents, DFEs) 作為參考攝取量表示方式，以表示不同葉酸型式或攝取狀態上，所達到不同的利用率。根據國人膳食營養素參考攝取量 (Dietary Reference Intakes, DRIs) 第八版，13 歲以上建議每日攝取 400 μg，孕婦與哺乳婦需各增加 200 μg 與 100 μg，為避免遮蔽維生素 B12 缺乏引起的惡性貧血和神經症狀，成人每日上限攝取量 (Tolerable Upper Intake Levels, UL) 為 1000 μg。

四、消化吸收與儲存

葉酸以多麩胺酸型式儲存於自然界，小腸會將多麩胺酸葉酸轉成單麩胺酸型式吸收，之後經由肝門靜脈送入肝臟以多麩胺酸型式儲存，體內葉酸濃度約有 22 毫克，一半會在肝臟儲存。葉酸在進入小腸後，會由空腸刷狀緣上的 glutamate carboxypeptidase II (GCPII) 將葉酸上的水解成單麩胺酸型式後，以 proton-coupled folate transporter (PCFT) 穿過 apical membrane 吸收 (Ebara, 2017)，然後在腸道被代謝為 5-methyl-THF 進入血液循環，在血液中的 5-methyl-THF 會由細胞上的 reduced folate carrier (RFC) 或 receptor-mediated endocytosis of the folate receptors (FRs) 兩種 receptors 內吞進入細胞，然後被 folylpoly-gamma-glutamate synthetase (FPGS) 轉成多麩胺酸型式，以利保存與利用 (Bailey, 2009)。RFC 主要將血液中的 5-methyl-THF 運送至腎臟、白血球、肺臟和骨髓，FRs 則主要存在於腸道、肝



臟、腎臟、大腦等高代謝速率的器官 (Shulpeкова et al., 2021)。RFC 也可以將葉酸由細胞內轉運至細胞外，容易受血液中葉酸濃度調控。動物研究指出葉酸缺乏時小腸和腎臟的 RFC 會有顯著的代償增加 (Zhao et al., 2011)，另外 multidrug resistance-associated proteins (MRP) 也將葉酸由細胞內往外運輸，主要在具有細胞頂膜與基底膜的組織 (例如腎臟、肝臟和小腸) 表現，MRP 蛋白的基因富含 G 與 C 鹼基，表示 MRP 的活性可能受甲基化影響 (Gu et al., 2010)。

五、生化代謝與排出

在腸細胞和肝細胞中，吸收的單麴胺酸葉酸 dihydrofolate reductase 還原成 dihydrofolate (DHF) 和 tetrahydrofolate (THF)。THF 會被 serine hydroxymethyltransferase 轉化成 5,10-methylene-THF，最後再經 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 還原形成 5-methyl-THF。THF 和 5-methyl-THF 是最具生物活性的葉酸，在細胞單碳代謝中扮演重要角色 (圖 1-1) (Shulpeкова et al., 2021)。

有一部分的葉酸經由糞便排泄、一部分經由尿液排泄，部分肝臟葉酸經由膽汁排泄，並由腸肝循環再吸收。酒精會干擾再吸收過程，造成酗酒者葉酸缺乏。葉酸是水溶性維生素，因此它們可以自由進出腎絲球。在正常生理濃度下，只有很少量會被腎臟排泄，幾乎所有葉酸都會被近曲小管再吸收 (Samodelov et al., 2019)。

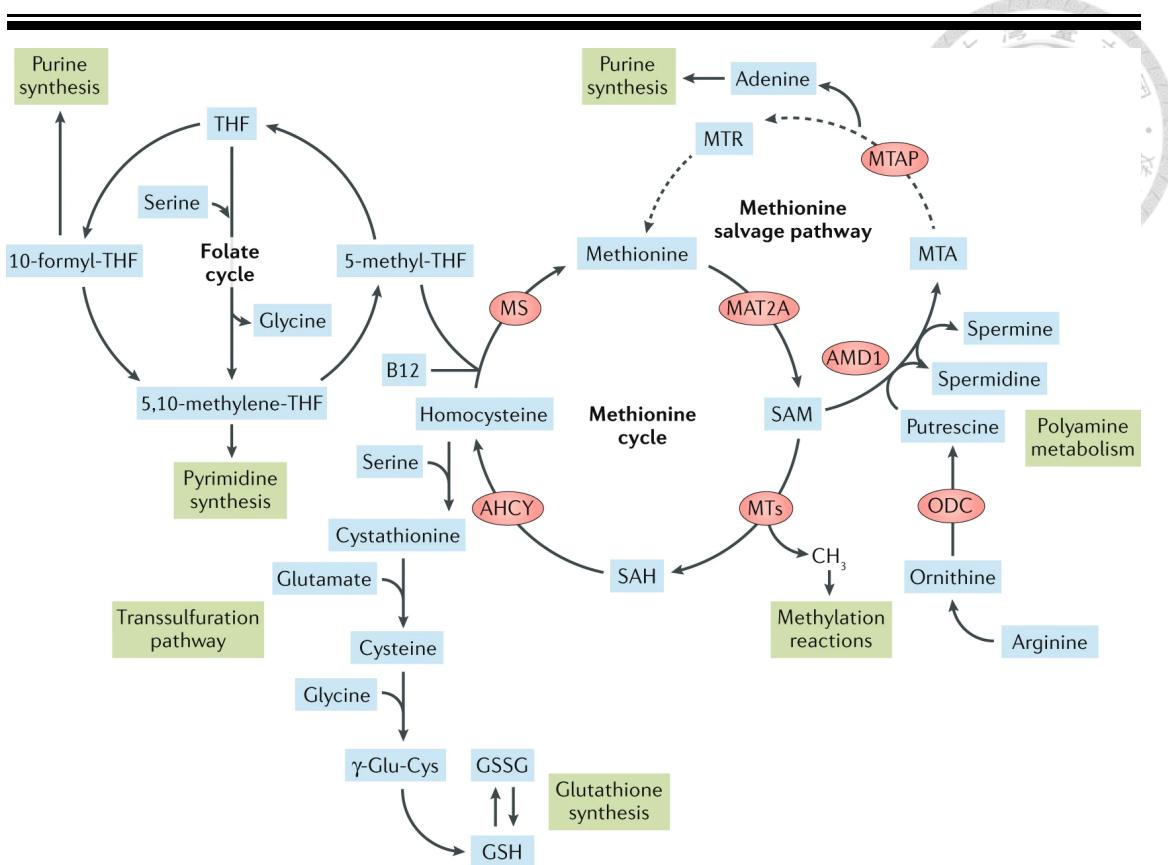


圖 1-1 葉酸代謝

Fig. 1-1 Folate metabolism (Sanderson et al., 2019)

六、 缺乏症

紅血球葉酸濃度小於 305 nmol/L (140 ng/mL)，訂為葉酸缺乏，近期葉酸攝取狀況由以血清濃度低於 7 nmol/L (3 ng/mL) 作為缺乏切點，14 nmol/L (6ng/mL) 為邊緣缺乏。葉酸缺乏可能由飲食不足、吸收不良（酗酒）、葉酸需求增加（懷孕期間）或服用藥物（抗葉酸藥物）導致。（國建署，2011）

(一) 心血管疾病

眾多研究顯示同半胱氨酸與心血管疾病正相關，5-methyl-THF 作為代謝同半胱氨酸的重要反應物，同時可增加一氧化氮的產生，並且可以直接清除超氧自由基，臨床研究證明，血清葉酸濃度與血清同半胱氨酸濃度為負相關 (Moat et al.,



2004)，補充葉酸劑量在 0.5 至 5 mg/d 範圍內可將血清同半胱氨酸濃度降低約 20-25% (Keya et al., 2020)。

(二) 腦神經病變

孕婦受孕後 28 天內缺乏葉酸會導致胎兒神經管缺陷，導致胎兒無腦畸形或脊柱裂，導致死胎或早夭等問題 (Zheng & Cantley, 2019)，成人缺乏葉酸也會造成神經系統損害，如果中樞神經系統缺乏 SAM，可能會導致正腎上腺素和血清素甲基化減少，造成腎上腺素和褪黑激素形成減少。高同型半胱氨酸血症也可能導致中樞神經系統損傷，可能是由於細胞內質網壓力和 Glutamate receptor 過度活化而導致突觸功能障礙，導致興奮性毒性 (excitotoxicity)，造成神經細胞傷害 (Shulpeková et al., 2021)。

(三) 癌症

低葉酸營養狀況與大腸直腸癌 (Moazzen et al., 2018) 和肝癌 (Malaguarnera et al., 2020) 有關。葉酸參與 dUMP 生成 dTMP，在 DNA 合成扮演重要角色。因此，血清葉酸濃度低可能會因 uracil misincorporation 進入 DNA 而導致 DNA 斷裂進而導致癌症。此外，血清葉酸濃度低可能會降低 DNA 甲基化，改變抑癌基因表現 (Pieroth et al., 2018)。

(四) 發炎性腸道疾病

葉酸不足可能導致腸道黏膜細胞功能受損，進而引起食慾降低。腸道上皮細胞更新週期為三天，在長期葉酸缺乏的營養狀態下，DNA 的合成與修復受阻，使細胞無法正常分裂、增殖和成熟。腸道上皮細胞需要大量葉酸幫助細胞生長，葉酸



缺乏可能導致腸細胞分泌消化酶和吸收能力下降，嚴重時甚至出現持續性腹瀉。此外，葉酸缺乏還可能影響腸道屏障的完整性和免疫防禦功能 (Ponziani et al., 2012)。

(五) 葉酸與腎臟疾病

研究顯示，葉酸缺乏可能造成同半胱氨酸血症而導致腎絲球纖維化 (Wu et al., 2023)。且血清葉酸濃度與腎絲球過濾率正相關 (Park et al., 2021)。本研究室先前研究指出，葉酸缺乏會增加高油高果糖餵飼小鼠尿蛋白、尿 NGAL、腎臟發炎反應與腎臟纖維化，進而加劇腎臟損傷 (Chan & Lin, 2023)。另外，研究顯示，每天補充 2.5 毫克葉酸，顯著降低糖尿病腎病變的進展(Wu et al., 2023)，本研究室先前研究也指出，小鼠補充 10 倍劑量葉酸可以顯著降低血清肌酸酐 (辜，2016)，顯示葉酸補充可能對減輕腎損傷。

七、葉酸營養狀況

根據國民營養健康狀況變遷調查，國人葉酸缺乏盛行率為 0%，故探討葉酸邊緣缺乏盛行率，葉酸邊緣缺乏定義為血清葉酸濃度在 3 ng/mL 與 6 ng/mL 之間，葉酸邊緣缺乏盛行率男性於各年齡層均高於女性，男性於 13 至 44 歲之邊緣缺乏盛行高達 24.7—36.2%，45 歲以上為 9.6—11.6%；女性以 13 至 44 歲高達 10.5—18.3%，45 歲以上則降為 1.6—4.2%，與 102—105 年國民營養健康狀況變遷調查相較，國人葉酸邊緣缺乏盛行率有升高的趨勢，19—64 歲男性與女性葉酸邊緣缺乏盛行率分別增加 9.2% 與 6.4%，64 歲以上才有些微下降 (國健署，2022)。



第二節 果糖

一、化學結構與來源

果糖的化學式為 $C_6H_{12}O_6$ 是葡萄糖的同分異構物，二號碳上是酮基，D-fructose 與 D-glucose 是自然界中存在最多的六碳單糖，D-果糖的五號或六號碳羥基很容易與二號碳的酮基反應形成含有半縮酮鍵的呋喃糖環 (pyranose)，參與光合作用、產生能量和核苷酸合成 (Nelson et al., 2021)。動物體內血液循環主要為葡萄糖，蔗糖則是植物體內主要儲存的型式，蔗糖由一分子葡萄糖與一分子果糖鍵結而成，食品工業中蔗糖與高果糖糖漿被廣泛作為添加劑使用，高果糖糖漿以 microbial xylose isomerase 將蔗糖內的部分葡萄糖轉化為果糖，形成最常見的 55% 果糖和 45% 葡萄糖組成配方，提供更高的甜度，以降低食品生產成本 (Bray et al., 2004; Herman & Birnbaum, 2021)。

二、生化代謝

大部分低劑量 (約為每日熱量攝取量的 0.5%) 的果糖會直接先由小腸代謝，高濃度的果糖才會通過肝門靜脈送到肝臟代謝 (Jang et al., 2018)。果糖的代謝第一步由肝臟、腸和腎臟近端腎小管中的 ketohexokinase (KHK) 將果糖磷酸化為 fructose-1-phosphate (F1P) 開始，且沒有負回饋調節。葡萄糖糖解作用由 Phosphofructokinase (PFK) 將 fructose-6-phosphate 催化為 fructose-1, 6-biphosphate 是速率限制步驟，受到細胞代謝狀態和能量狀態的密切調節。然而，F1P 可以被 aldolase B 直接裂解成 dihydroxyacetone phosphate (DHAP) 和 glyceraldehyde (GA)，繞過糖解作用的速率限制步驟，最後 GA 可經由 triokinase 活化成 glyceraldehyde 3 phosphate，進入糖解作用或脂肪合成 (Cheng et al., 2022) ()。

與葡萄糖相比，果糖更容易引起肝臟 de novo lipogenesis，可將多餘的糖轉化為脂質。果糖會進入 TCA cycle 生成 citrate，由粒線體進入細胞質，然後經由 ATP citrate lyase 作用，生成 acetyl-CoA，最後經由 acetyl-CoA carboxylase 2 進入脂肪生成。另外，果糖還會經由另一條路徑進行 de novo lipogenesis，當大量果糖進入腸道，未吸收的果糖到達結腸並被腸道微生物群轉化為短鏈脂肪酸（主要是 acetate）(Skenderian et al., 2020)，會透過肝門靜脈運送至肝臟，經由 acetyl-CoA synthetase 2 (ACSS2) 將 acetate 代謝為 acetyl-CoA，促進脂肪合成。果糖還會增加脂肪合成轉錄基因 *ChREBP-β* 和 *SREBP-1c* 的轉錄，促進脂肪合成作用 (Jung et al., 2022)。

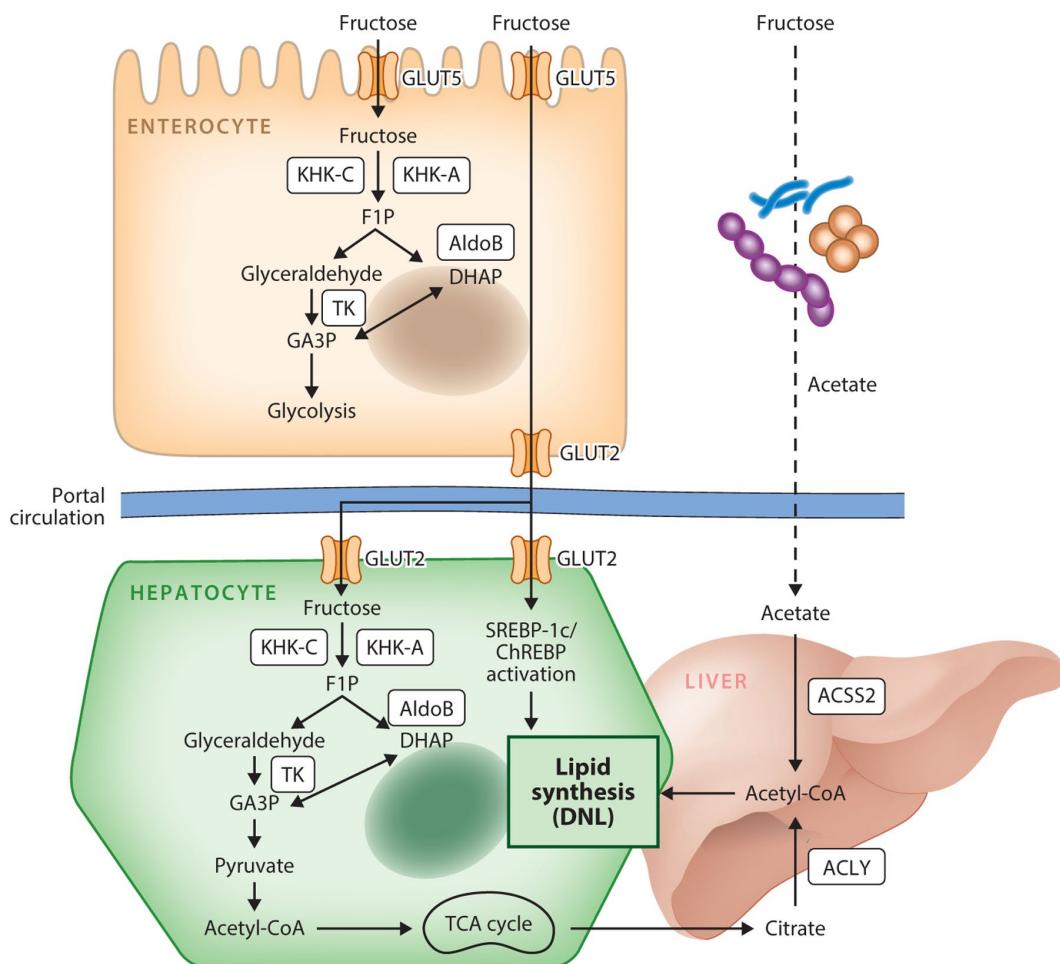


圖 1-2 果糖代謝

Fig. 1- 2 Fructose metabolism. (Jung et al. 2022)



三、消化吸收

果糖經由小腸刷狀緣上的 GLUT5 促進性擴散穿越小腸頂膜，然後經由腸道細胞上的 GLUT2 進入肝門靜脈，最後運送至肝臟。GLUT2 對果糖的親和力較低，除了轉運果糖，還轉運葡萄糖和半乳糖。GLUT5 主要在小腸和腎臟中，肝臟幾乎沒有 GLUT5，而 GLUT2 的主要位於肝臟、胰臟、腸道、腎臟和大腦 (Ferraris et al., 2018)。

四、果糖與疾病

近年來，含糖飲料攝取量居高不下，據國民營養健康狀況變遷調查，19-64 歲成人平均每週喝將近 7 次含糖飲料 (國建署, 2016)，且根據經濟部統計，10 年內飲料店營業額從 597 億上升至 1286 億元，(經濟部，2024)，含糖飲料大多使用高果糖糖漿作為甜味來源，含 55% 果糖與 45% 葡萄糖，顯示台灣人果糖攝取日漸增高，以下為果糖對全身代謝造成影響。

(一) 非酒精性脂肪肝

非酒精性脂肪肝特徵是肝細胞脂肪浸潤，後續會進展為脂肪變性和肝小葉發炎，NAFLD 可能會造成肝硬化、肝纖維化，甚至造成肝細胞癌 (Yki-Järvinen et al., 2021)。果糖能透過影響大腦增加攝取後愉悅的感覺，導致總熱量攝取增加 (Myers et al., 2020)，果糖在肝臟不需要透過胰島素調控，可以直接活化脂肪合成轉錄因子 *SREBP1c*，另外也可以活化肝臟 FGF21 合成 (Tillman & Rolph, 2020)，進一步活化肝臟碳水化合物代謝和脂肪合成轉錄因子 *ChREBP* 促進肝臟脂肪合成和 VLDL 製造 (Taskinen et al., 2019)。同時 *ChREBP* 會抑制 *PPARα* 和脂肪分解速率限制酵



素 Carnitine palmitoyltransferase I(CPT1A) 進而抑制脂肪分解，以上機制均造成肝臟脂肪堆積，造成脂肪肝 (Inci et al., 2023)。

(二) 第二型糖尿病

第二型糖尿病最顯著的症狀是血糖升高與胰島素阻抗 (Galicia-Garcia et al., 2020)，果糖會增加尿酸的代謝量，增加粒線體氧化壓力，進而抑制脂肪酸氧化，肝臟脂肪堆積會增加肝臟胰島素阻抗，干擾體內血糖調控，最後造成第二型糖尿病 (Jung et al., 2022)。

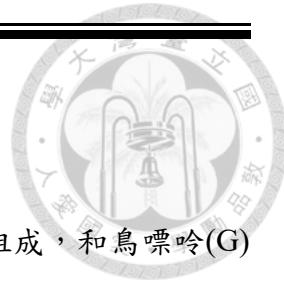
(三) 高尿酸血症

果糖主要由 KHK 代謝成 fructose-1-phosphate 此過程不會被胰島素調控，並且會大量消耗 ATP，細胞內 phosphate 減少會活化 AMP deaminase 導致 AMP 轉化為 IMP 並刺激尿酸的產生 (C. Zhang et al., 2020)。另外，尿酸在產生過程中會增加氧化壓力、活化 p38、NF- κ B、inflamasome、MCP-1，導致發炎反應 (Johnson et al., 2023)。

(四) 慢性腎病變

腎臟的 GLUT5 與果糖代謝酵素 KHK 和 aldolase B 都存在於近端腎小管，顯示近端腎小管是腎臟代謝果糖主要部位 (Nakagawa & Kang, 2021)。果糖增加腎絲球高血壓、刺激近端腎小管的 Na^+/H^+ pump 離子交換，以及亨利氏環粗升枝的 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$ 交換，進而增加鈉和水分再吸收，增加血壓。血漿腎素活性、尿 angiotensin II 和腎臟腎素及 angiotensin II 接受器的表現會受果糖刺激，使血壓上

升 (Xu et al., 2021)。果糖代謝刺激導致粒線體氧化磷酸化減少，會活化轉錄因子 *Hif1α*，進而導致發炎和纖維化 (Kanbay et al., 2023)。大量果糖代謝會引起胰島素阻抗導致高血糖，在高血糖情況下，葡萄糖會經由 aldose reductase 代謝為 sorbitol，然後再經由 sorbitol dehydrogenase 代謝為果糖，內生性果糖會增加整個腎臟血管內皮細胞 ICAM-1，增加巨噬細胞黏附，導致腎小管產生發炎反應而損傷，腎小管損傷會引起小動脈血管舒張導致腎絲球高血壓 (Nakagawa & Kang, 2021)。另外，重複近端腎小管損傷已被認為是糖尿病腎病變的致病機轉 (Chang et al., 2021)。綜上所述，大量攝取果糖會導致慢性腎病的發生。



第三節 腺嘌呤

一、化學結構與來源

腺嘌呤的化學式為 $C_5H_5N_5$ ，由一個呪啶環與一個呡唑環組成，和鳥嘌呤(G)同屬於嘌呤家族的核苷酸成員之一，在DNA雙螺旋結構中，腺嘌呤與胸腺嘧啶(T)通過兩個氫鍵配對。而在RNA中，腺嘌呤與尿嘧啶(U)配對。這樣的鹼基配對是遺傳資訊儲存和傳遞的基礎 (Mathews et al., 2013)。腺嘌呤是一種重要的嘌呤鹼基，在生物體內的來源可分為外源性和內源性。外源性分為動物性食物和植物性食物來源，動物性食物如海鮮和奶類、植物性食物如豆類和酵母等也富含腺嘌呤。(Wildman et al., 2022)。內源性腺嘌呤則經 de novo synthesis 和核酸降解而來。人體肝臟可以通過 de novo de novo synthesis 由 PRPP (5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate) 合成嘌呤，另外在細胞內核酸降解過程中，嘌呤核苷酸 (AMP) 被分解為嘌呤鹼基(如腺嘌呤)和核苷(如腺苷) (Mathews et al., 2013)。

二、生理功能與代謝機轉

腺嘌呤及其衍生物參與多種生物化學路徑如 ATP 參與能量產生， NAD^+ 、FAD 等酵素輔助因子，參與營養素代謝，或是形成 cAMP 等 second messenger 參與細胞訊號傳遞 (Nelson et al., 2021)。腺嘌呤在小腸被吸收，會經由腸道上皮細胞的鈉離子轉運蛋白 Concentrative nucleoside transporters 1 (CNT1) 吸收，再經促進性擴散蛋白 equilibrative nucleoside transporters 1 (ENT1) 進入血液循環 (Pastor-Anglada et al., 2022)。腺嘌呤可以由較耗能的新合成途徑 (de novo synthesis) 在肝臟合成，或是在其他器官使用較節省能量的嘌呤回收途徑 (salvage pathway) 回收而來 (圖 1-3)。在新合成路徑中，PRPP 提供碳骨架，經多個步驟形成第一個含嘌

吟環的產物，inosine monophosphate (IMP)。第一步會由 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) 經 amido-phosphoribosyltransferase (ATase) 催化形成 5-phosphoribosylamine，形成 IMP 後，由天門冬氨酸提供氨基，轉變為 AMP。AMP 經水解生成 adenosine，最後形成 adenine。新合成途徑會被產物回饋調控，ATase 會被產物 IMP、AMP、GMP 抑制，AMP 和 GMP 也抑制 R-5-P 生成 PRPP 進而抑制整個新合成途徑 (Nelson et al., 2021)。

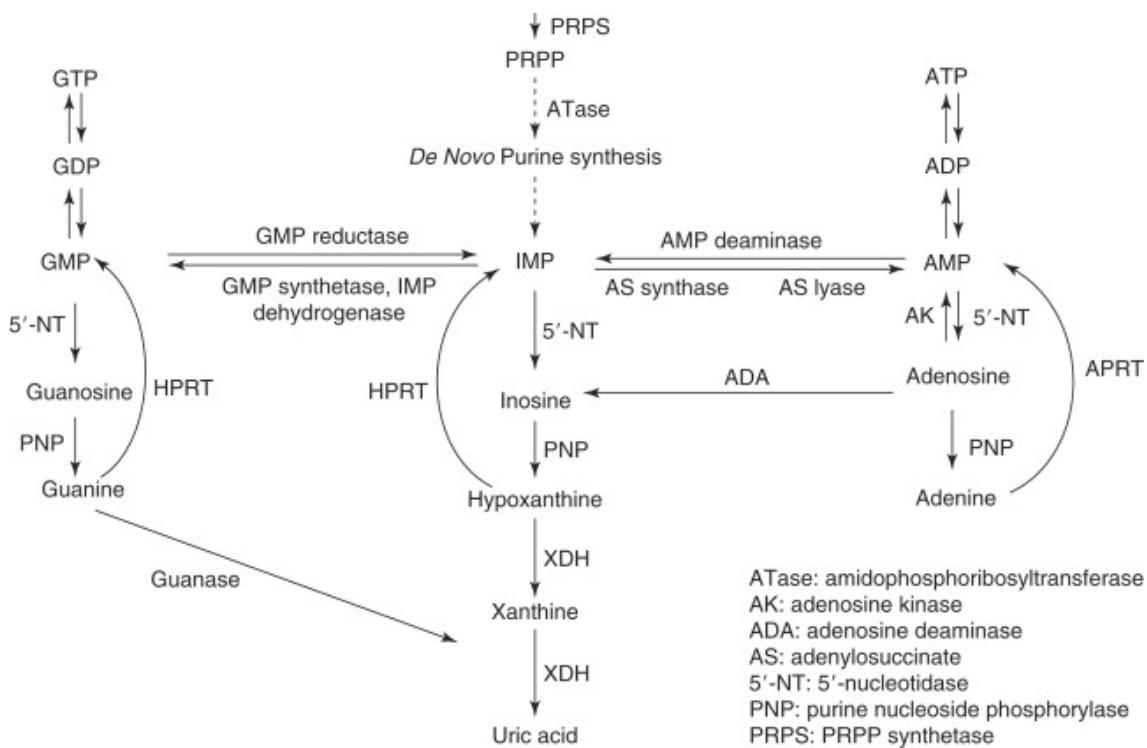


圖 1-3 嘌呤代謝途徑及相關酵素

Fig. 1-3 Purine metabolic pathways and the related enzymes (Lifton et al., 2009)

然而，在哺乳動物身上，purine nucleoside phosphorylase (PNP) 的活性較低，adenosine 幾乎不會代謝為 adenine，而是傾向去胺形成 IMP 或是經 kinase 轉換為 AMP。人體 adenine 是 methionine cycle 酵素 methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) 將 methylthioadenosine (MTA) 代謝為 methylthioribose (MTR) 時作為副產



物產生 (Sanderson et al., 2019; Thimm et al., 2015)。腺嘌呤在回收路徑中，可經由 adenine phosphoribosyltransferase (APRT) 磷酸核糖化作用形成 AMP，鳥嘌呤和次黃嘌呤可經 Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) 磷酸核糖化作用分別回收形成 GMP 和 IMP。腺嘌呤代謝為 adenosine 後，會經 xanthine oxidase 代謝為黃嘌呤，最後代謝為尿酸，由腎臟排出 (Nelson et al., 2021)。

三、腺嘌呤對全身代謝的影響

腎臟病使全身代謝走向分解代謝狀態，研究指出，腺嘌呤誘發腎損傷會改變蛋白質代謝，肝臟胺基酸含量雖沒有顯著變化，但是心臟和腎臟的支鏈胺基酸顯著減少，表示身體走向分解代謝 (Khattri et al., 2021)。此外，adenine 會增加尿毒素硫酸吲哚酚 (Chen et al., 2016)。另外，adenine 會改變心臟、肝臟和腎臟的脂質代謝，腺嘌呤可以活化 AMPK，增加葡萄糖代謝，並且降低血脂和肝臟脂肪變性 (Padalkar et al., 2023)。研究指出，小鼠餵食腺嘌呤 6 個月後，心臟、肝臟和腎臟中三酸甘油酯和膽固醇顯著降低，肝臟和腎臟中的飽和與不飽和脂肪酸均顯著降低，此外，幾乎所有種類的脂肪酸在腎臟中均顯著降低 (Khattri et al., 2021)。血漿中亞麻油酸、次亞麻油酸、花生四烯酸均顯著降低，並且隨著腎臟病進程而降低 (Zhao et al., 2013)。腺嘌呤會顯著增加血清中膽固醇前驅物，降低膽汁合成 (Chen et al., 2016)，也會增加糞便中膽酸，降低小腸中膽汁的再吸收，進而降低膳食脂肪吸收與代謝 (Zhao et al., 2012)。



四、腺嘌呤對腎臟的影響

高濃度腺嘌呤會由 adenine receptor (AdeR) 接收後啟動一系列的訊息傳遞反應，小鼠全身 AdeR 表現量最高的地方在背根神經節 (Knospe et al., 2013)，所以腺嘌呤的過量攝取可能會導致痛覺神經興奮，增加疼痛的感覺。腎臟的 AdeR 主要分布於皮質與髓質交界處，皮質的腎絲球小動脈有較多的 AdeR 表現，髓質部分則在集尿管表現量較高，同時 AdeR 與第二型水通道蛋白 AVP-regulated aquaporin-2 (AQP2) Colocalization (Kwon et al., 2013)。AVP 透過集尿管基底膜上的 G protein couple receptor 活化腺苷酸環化酶，增加主細胞內 cAMP 濃度，使 AQP2 表現於細胞膜，增加集尿管水分吸收 (Sparapani et al., 2021)。

AdeR 接收腺嘌呤後，會抑制 cAMP 生成，降低 AQP2 移位至細胞膜，進而抑制水分再吸收 (Santos et al., 2019)。除了集尿管的 AQP 蛋白會調控水分吸收，髓質內亨利氏環上升枝粗段上的 sodium–potassium–chloride cotransporter 2 (Slc12a1, NKCC2) 也是調控水分的重要蛋白，AQP2 只吸收水，而 NKCC2 同時吸收鈉、鉀、氯與水，是平衡體內離子濃度的重要蛋白。腺嘌呤會導致 NKCC2 表現降低，增加尿鈉排泄，NKCC2 和 AQP2 表現同時降低導致尿量增加，使體內水分與電解質平衡受到破壞，血量降低，造成缺血與氧化壓力增加，促進細胞凋亡，進而發生腎臟損傷 (Atay et al., 2024; M. Zhang et al., 2024)。

五、腺嘌呤誘發腎病模式

腺嘌呤經一系列代謝後會形成尿酸，由腎臟排出，但若腺嘌呤劑量過高，或是體內 APRT 缺陷，腺嘌呤會轉為由 xanthine oxidase 在肝臟代謝為水溶性較低的 2,8-dihydroxyadenine (2,8-DHA) (Singh et al., 2023) (圖 1-4)，沉積於近端腎小管，

引起腎小管發炎與纖維化、間質損傷、以及細胞死亡，最後導致腎功能損傷 (Klinkhammer et al., 2020)。文獻指出小鼠持續餵食 0.2% (w/w) 腺嘌呤可以使腎臟萎縮且表面粗糙、腎臟表面變黃、病理切片顯示腎小管肥大與阻塞以及基底膜萎縮，免疫組織化學染色顯示腎臟出現 2,8 DHA 堆積，表示腎臟受 2,8 DHA 堆積發炎而導致纖維化 (Choi et al., 2023)。另有文獻指出，飲食中添加 0.2% (w/w) 腺嘌呤會顯著降低小鼠體重、顯著增加飲水量、尿量、血清尿素氮與肌酸酐、以及尿蛋白與濃度 (Zaaba et al., 2023)，將腺嘌呤添加於大鼠飲食中，還會降低腎臟相對重量以及肌酸酐清除率 (Samaha et al., 2023)，表示腺嘌呤誘發的腎病變與人類慢性腎病變表現出相似的症狀。

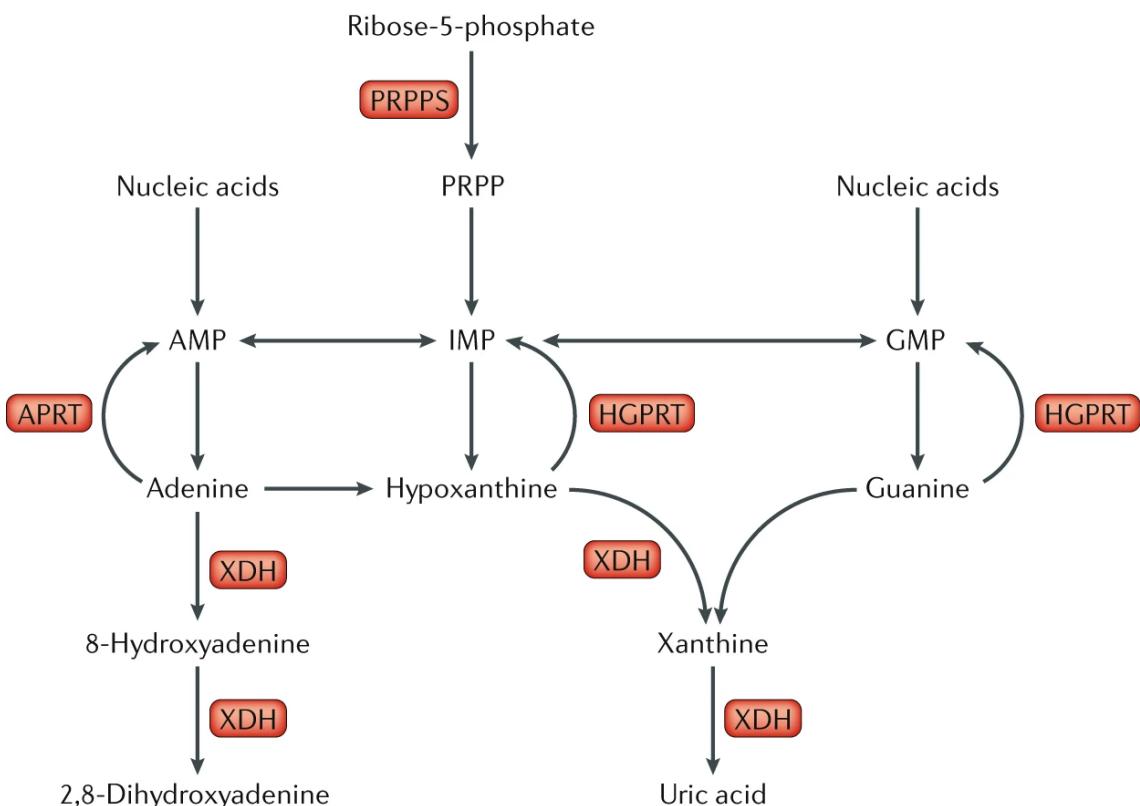


圖 1-4 腺嘌呤誘發腎病模式

Fig. 1-4 Schematic representation of purine metabolism. (Howles and Thakker, 2020)



六、腺嘌呤誘發腎病機制

高濃度的腺嘌呤會形成 2,8-DHA 結晶，某些體積小的晶體會被排出，某些被腎小管吸收進入間質，大體積的晶體就會阻塞腎小管，此時大量不溶於水的 2,8-DHA 結晶沉積於近端腎小管，造成近端腎小管損傷 (Klinkhammer et al., 2020)。

接下來整理 2,8-DHA 引起腎損傷的詳細機轉，2,8-DHA 會引起細胞表型轉變、發炎、細胞凋亡、氧化壓力，最後引起纖維化。

(一) 細胞表型轉變

研究指出，在健康的腎臟中，腎小管上皮細胞具有晶體排斥表面，並且包覆晶體表面的尿液陰離子可防止晶體黏附在腎臟細胞，結石型腎臟疾病起始是腎小管上皮細胞向「晶體結合」表型轉變，包括 CD44⁺ 或 TNF receptor (TNFR⁺)。健康腎臟中，TNFR1 在皮質和髓質集尿管的主細胞中表現，2,8-DHA 沉積使 TNFR1⁺ 腎小管細胞的數量在疾病過程中逐漸增加，在擴張的腎小管內特別顯著，2,8-DHA 晶體大部分在沉積在 TNFR1⁺ 的腎小管細胞或其管腔，TNFR2⁺ 腎小管細胞的數量在疾病進展過程中增加，2,8-DHA 晶體沉積後促使 TNFR2⁺ 細胞過度生長，CD44⁺ 細胞會分布於基底膜外側，並出現在大多數有黏附晶體的小管中 (Klinkhammer et al., 2020)。

(二) 細胞凋亡

研究顯示，腎小管為了清除結晶，會將結晶內吞，噬溶小體 (phagolysosome) 釋放組織蛋白酶 B (cathepsin-B)，降解胞壞死 (necroptosis) 抑制蛋白 RIPK1，使 RIPK3–MLKL necrosome complex 形成，造成腎小管細胞壞死並釋放 DAMP (Klinkhammer et al., 2020)。另外也有研究發現腎小管內鐵的堆積、脂質過氧化指標



4-hydroxynonenal (4-HNE) 顯著增加、粒線體過氧化物增加，造成近端腎小管鐵依賴性細胞死亡 (ferroptosis) (Khan et al., 2022)。

缺氧、缺血再灌注損傷都會活化 NLRP3 路徑。F4/80⁺巨噬細胞受 CCL5 趨化，同時，ErHr3⁺單核球與腎臟樹突細胞與也會浸潤於腎臟，ErHr3⁺單核球和 F4/80⁺巨噬細胞會分化為 CD11c⁺巨噬細胞，形成肉芽腫和多核組織球，腎臟樹突細胞將腎間質細胞內的結晶內吞，啟動溶酶體降解機制和釋放 ROS，經由 TLR4 促進 MY88、TRAF6、使 NF-κB 進入細胞核，使 NLRP3 路徑活化，釋放 TNF- α , IL-1 β 等促發炎細胞激素 (Klinkhammer et al., 2020a; Perazella & Herlitz, 2021; Samaha et al., 2023b)。

(三) 氧化壓力

2,8-DHA 晶體阻塞腎小管後，不但影響腎小管，也會造成腎小管周邊微血管缺氧 (Ullah et al., 2019)，缺氧會加速細胞內 ATP 的降解，並增加次黃嘌呤的產生，活化腎臟中的黃嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase)，進而導致氧化壓力的產生 (Wang et al., 2022)。研究指出，小鼠飲食中添加腺嘌呤會增加 *Hifα* mRNA 表現量增加、Xanthine oxidoreductase (xanthine dehydrogenase 和 xanthine oxidase) 活性增加，catalase mRNA 表現量降低(Ohata et al., 2017)，另外還會增加 malondialdehyde (MDA) 含量、降低 glutathione (GSH) 濃度(Samaha et al., 2023a)，降低 glutathione peroxidase 4 (GPX4) 表現(Khan et al., 2022)，顯示小鼠飲食中添加腺嘌呤會增加小鼠腎臟的氧化壓力。



(四) 纖維化

當腎小管持續損傷，細胞會持續產生 TGF- β , PDGF, hedgehog, 和 Wnt ligands 等生長因子和細胞激素，他們可以刺激細胞再生和纖維母細胞分化為肌纖維母細胞，此時會表現特異性指標 α -SMA，活化的肌纖維母細胞快速增殖後，會產生大量細胞外基質，如 fibronectin 和 collagen，使腎小管細胞纖維化持續發生 (Huang et al., 2023)。研究顯示，腺嘌呤可以透過 TGF- β /Smad 途徑活化 TGF- β 1 刺激 ERK、p38 MAPK 和 JNK 途徑，增加第四型膠原蛋白、纖連蛋白和整體細胞外基質表現，影響腎小管上皮幹細胞轉化，增加纖維化 (Yi et al., 2021)。



第四節 腎臟疾病

每個腎臟包含多達一百萬腎單位。腎單位由附著在腎小管上的微小血管過濾結構——腎絲球組成。當血液進入腎絲球時會被過濾，經過鮑氏囊收集後，過濾的液體會送入腎小管。腎小管分為近曲小管、亨利氏環和遠曲小管三個部分，近曲小管從鮑氏囊延伸出來，主要負責再吸收水分、葡萄糖、氨基酸和各種離子，亨利氏環由降支和升支組成，在此進行水和鹽分的再吸收，可濃縮尿液，遠曲小管可以繼續調節鈉、鉀和酸鹼平衡，並與集尿管相連。腎小管三個部分會將身體不需要的代謝物排出至過濾液，並將需要的物質再吸收。最終產生的就是排出的尿液。

腎臟每天過濾大約 150 公升的液體並將其送回血液中，是腎臟維持體內物質穩定平衡且維持生命的重要工作之一。過濾液中大約 1 公升以尿液的形式排出體外，而大約 149 公升被回收利用。排出的尿液會在膀胱中儲存 1 到 8 小時。腎臟的主要功能包含清除體內廢物、調節體內酸鹼平衡、釋放調節血壓的荷爾蒙、產生活性維生素 D，促進骨骼健康還有控制紅血球的產生 (Raymond and Morrow 2020)。腎臟疾病可依嚴重程度排序為腎結石、急性腎損傷 (AKI) 、慢性腎病變 (CKD) 和末期腎病 (ESRD)。

一、 腎結石 (kidney stone)

腎結石的全球發病率約為 15%，顧名思義其特徵是在腎臟中形成結石，如果不 timely 治療，可能導致劇烈的疼痛、出血，甚至對腎功能造成損害(圖 1-5)。大約 80% 的腎結石由草酸鈣 ($\text{Ca}(\text{COO})_2$) 與磷酸鈣 (CaP) 混合而成，由尿酸、鳥糞石和胱胺酸組成的結石也很常見，分別約佔結石的 9%、10% 和 1% (Khan et al. 2016)。腎結石的疾病進展有多種因素參與，飲食習慣的改變，尤其是高蛋白質、高鈉和



高糖攝取，被認為是腎結石發病率增加的主要原因。男性比女性更容易患上腎結石。此外，與代謝症候群相關的因素，如高血壓、血脂異常、糖尿病和肥胖，也與腎結石的風險增加有關。腎結石的發病機制是一個複雜的過程，涉及多種相互作用。發炎、氧化還原失衡、血管新生、嘌呤代謝和尿素循環異常等因素都被認為與腎結石的形成有關。與正常對照組相比，患有泌尿結石的患者表現出較高的活性氧物種 (ROS)、脂質過氧化產物 (MDA)、誘導型一氧化氮合酶 (iNOS)、促發炎細胞激素和促血管新生因子的濃度。參與嘌呤代謝和尿素循環的酵素缺乏和異常也可能導致腎結石的形成 (Wigner et al. 2021)。草酸鈣和磷酸鈣結石是主要的腎結石，約佔所有泌尿道結石的 80%。結石可能由純草酸鈣 ($\text{Ca}(\text{COO})_2$) (50%)、磷酸鈣 (CaP，磷灰石) (5%) 以及兩者的混合物 (45%) 組成。最後形成結石的主要成分是磷酸氫鈣或羟基磷酸鈣。許多因素導致草酸鈣結石形成，例如高鈣尿症 (吸收性、腎漏、吸收性和代謝性疾病)、高尿酸尿症、高草酸尿症、低檸檬酸尿症、低鎂尿症和高胱氨酸尿症。大多數情況下，尿液 pH 值為 5.0 至 6.5 會促進氧化鈣結石，而當 pH 值大於 7.5 時，則會發生磷酸鈣結石。鈣結石的復發率高於其他類型的腎結石 (Khan et al. 2016)。尿酸結石與肥胖和胰島素抗性有關。與鈣結石不同，尿液過酸 ($\text{pH} < 5.5$) 被認為是導致尿酸性腎結石的主要異常。尿酸結石形成還與尿酸排泄過多有關 (即高尿酸尿症)，除了尿酸在低尿液 pH 值和脫水時不溶之外，高濃度尿酸可能是由於攝取過多富含嘌呤的食物或內源性尿酸過量產生，如痛風等情況。嘌呤分解代謝增加和使用抑制腎臟再吸收尿酸的藥物也是促成因素 (Wigner et al. 2021)。

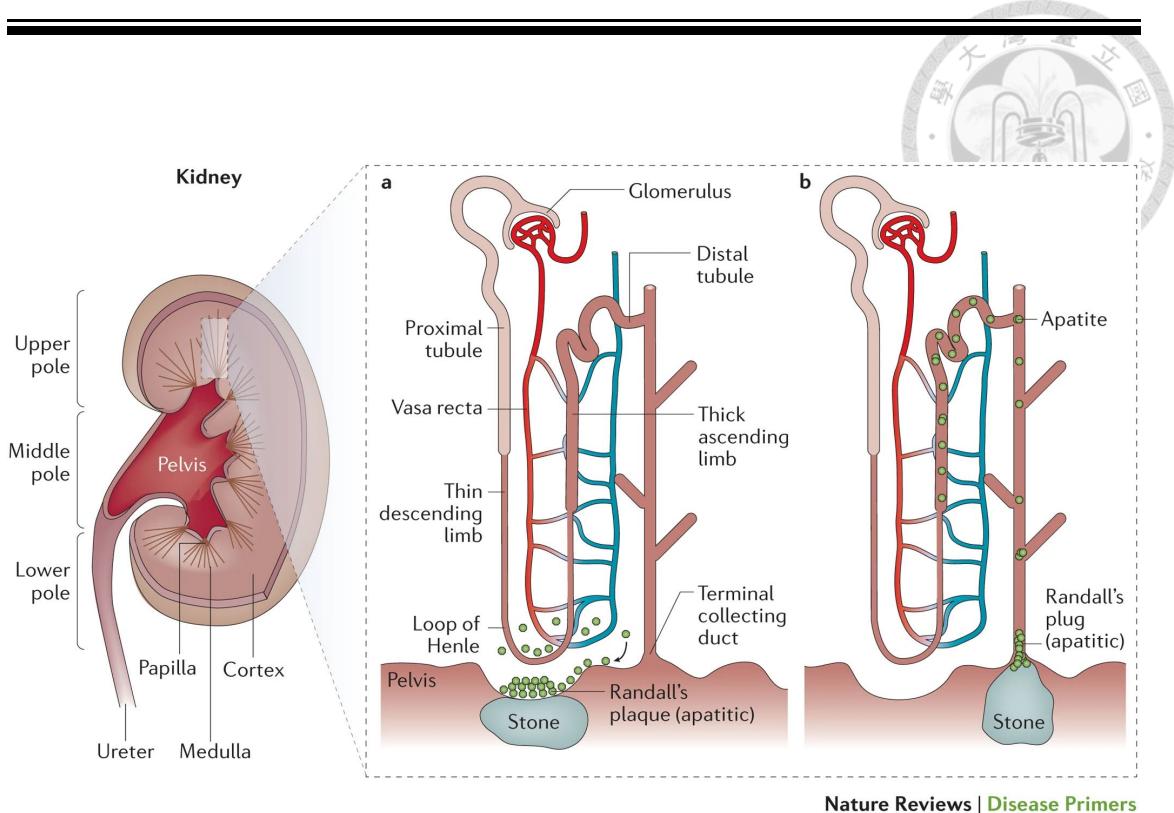


圖 1-5 腎臟形態以及結石的位置

Fig. 1-5 Morphology of human kidneys and location of stones (Khan.,2016)

二、急性腎損傷 (Acute kidney injury, AKI)

根據 KDIGO 急性腎損傷的定義，肌酸酐在 24 小時內增加 0.3 mg/dL、過去 7 天內肌酸酐增加 1.5 倍或連續 6 小時尿量低於每公斤體重 0.5 毫升，符合以上任一條件就可以被定義為 AKI。AKI 的病因和分類可以分為脫水、敗血症、腎血管病變、腎絲球疾病等。由於過度脫水，血容量減少，導致腎臟血流灌注不足，引發 AKI。腎動脈或腎靜脈阻塞、血栓栓塞影響腎臟血流供應。腎絲球疾病如腎絲球腎炎微血管疾病等影響腎絲球功能的疾病可能引起 AKI。腎臟間質疾病如腎臟間質腎炎、感染等，損害腎間質和降低腎功能。

若按照病因分類可分為腎前、腎中、腎後 AKI，腎前性 AKI 是由腎臟以外的因素導致的腎功能損害，例如低血容量或低血壓；腎性 AKI 是由於腎臟本身的



病變如腎絲球腎病導致的，而腎後性 AKI 指的是由尿路阻塞或泌尿系統疾病引起的 AKI。AKI 症狀通常是可逆的，只要將 AKI 病因移除即可復原（圖 1-5）。AKI 持續時間小於 7 天，當 AKI 持續時間大於 7 天，並且小於三個月即定義為 AKD，一旦腎臟損傷指標持續出現超過三個月，即定義為 CKD，三種腎臟疾病的定義如（表 1-1）(Kellum et al. 2021; Raymond and Morrow 2020)。

表 1-1 AKI、AKD、CKD 和 NKD 的定義標準

Table 1-1 Criteria for defining AKI, AKD, CKD and NKD (KDIGO.,2021)

	持續時間	功能指標	和/或	結構性標準
AKI	≤ 7 天	7 天內血清肌酸酐 $\geq 50\%$ 、 兩天內血清肌酸酐濃度 $\geq 0.3 \text{ mg/dL}$ 、 寡尿 ≥ 6 小時	或	未定義
AKD	≤ 3 個月	AKI 或 GFR $< 60 \text{ ml/min}/1.73 \text{ m}^2$ 、 GFR 下降 $\geq 35\%$ 、 血清肌酸酐增加 $> 50\%$	或	蛋白尿、血尿 或 腫尿升高
CKD	≥ 3 個月	GFR $< 60 \text{ ml/min}/1.73 \text{ m}^2$	或	蛋白尿升高
NKD	NA	GFR $\geq 60 \text{ ml/min}/1.73 \text{ m}^2$ ，GFR 穩定、 (3 個月內不下降 35%)、 血清肌酸酐穩定 (3 個月內增加小於 50% 或 2 天內增加小於 0.3 mg/d)、 26 小時無寡尿	和	不表現腎臟損傷指標

三、慢性腎病變 (chronic kidney disease, CKD)

慢性腎病變 (CKD) 由多種原因引起，造成腎臟長時間不可逆的損傷，KDIGO 指南定義慢性腎病變為腎功能下降，表現為腎絲球濾過率 (GFR) 每 1.73 m^2 小於 60 mL/min ，或腎臟損傷指標（表 1-2）出現持續 3 個月，或兩者皆有，即為慢性腎病變。CKD 依腎絲球過濾率分為五期（圖 1-6），當腎絲球濾過率 (GFR) 每 1.73



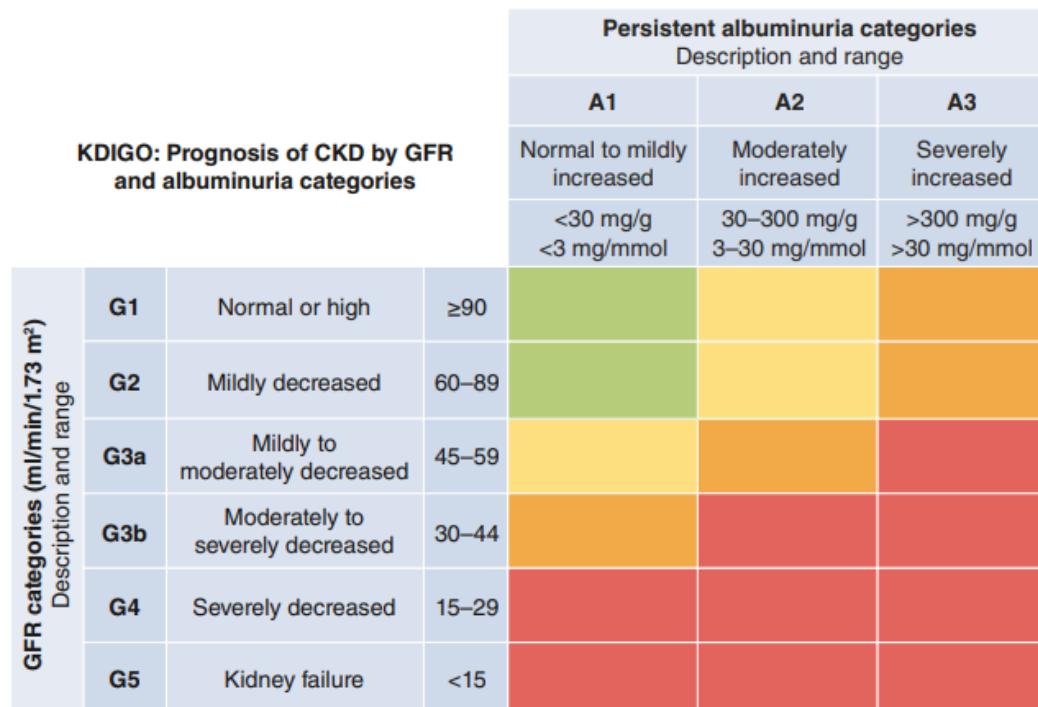
m^2 小於 15 mL/min，就會進展為末期腎病變，此時腎功能幾乎完全喪失，需要透析治療或腎臟移植。

表 1-2 慢性腎病變診斷準則

Table 1-2 Criteria for chronic kidney disease (KDIGO,2024)

Markers of kidney damage (1 or more)	Albuminuria (ACR $\geq 30 \text{ mg/g}$ [$\geq 3 \text{ mg/mmol}$])
	Urine sediment abnormalities
	Persistent hematuria
	Electrolyte and other abnormalities due to tubular disorders
	Abnormalities detected by histology
	Structural abnormalities detected by imaging
Decreased GFR	History of kidney transplantation
	GFR $< 60 \text{ ml/min per } 1.73 \text{ m}^2$ (GFR categories G3a-G5)

ACR, albumin-to-creatinine ratio; GFR, glomerular filtration rate



Green: low risk (if no other markers of kidney disease, no CKD); Yellow: moderately increased risk; Orange: high risk; Red: very high risk. GFR, glomerular filtration rate.

圖 1-6 依 GFR 和蛋白尿嚴重程度劃分的 CKD

Fig. 1-6 Prognosis of CKD by GFR and albuminuria categories (KDIGO,2024)



(一) 盛行率

根據美國腎臟資料系統 (United States Renal Data System, USRDS) 2023 年年度報告中，台灣的透析發生率和盛行率排名全球最高。台灣 CKD 1-5 期的總體盛行率為 15.46%，發病率為 27.21/1,000 千人年。此外，CKD 3-5 期的盛行率為 9.06%，發生率為 16.89/1,000 千人年。顯示台灣人口中 CKD 的高盛行率和發生率 (Tsai et al., 2018)。

(二) 危險因子與病生理

由於飲食西化，代謝症候群盛行率日益增加，其中糖尿病、高血壓和高血脂更是 CKD 的主要原因。糖尿病佔所有 CKD 的 30-70%，許多慢性腎臟病最終共同的病理表現是腎臟纖維化。腎纖維化代表腎組織在慢性持續損傷後傷口癒合不成功，其特徵為腎絲球硬化、腎小管萎縮及間質纖維化。腎絲球硬化症是由內皮損傷和功能障礙、平滑肌細胞和繫膜細胞增殖以及通常排列在腎絲球基底膜上的足細胞破壞引起的。腎絲球硬化的危險因子包括高血壓和血脂異常。腎絲球發炎是在內皮微血管高血壓後活化後引發的，促發炎細胞 (包括巨噬細胞和泡沫細胞) 會活化繫膜細胞增生。TFG- β 1 和其他生長因子 (包括 platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor, tumour necrosis factor 和 IFN- γ) 刺激繫膜細胞退化為系膜母細胞。這些繫膜細胞產生過多的細胞外基質，導致繫膜擴張，也就是腎絲球硬化症的早期症狀。足細胞的拉伸使腎絲球基底膜區域暴露於鮑氏囊，並與其形成粘連，導致腎絲球硬化。腎小管萎縮、間質纖維化和疤痕與 GFR 和蛋白尿有密切關係。各種異常濾出的尿蛋白 (包括補體、細胞激素和白蛋白) 會刺激腎小管上皮細胞合成促發炎因子，包括活性氧物種和趨化因子。這些物質將促發炎細胞吸引到腎間質。



並引發與間質纖維母細胞的相互作用。隨著纖維化的發展，受損的腎小管上皮失去再生能力並發生細胞凋亡，導致腎小管萎縮並使腎絲球失去功能。在組織學上，腎小管細胞面積的測量與 GFR 密切相關。

腎臟代謝高度活躍，需氧量高。在 CKD 損傷早期，間質微血管的滲透性變得越來越強，許多通常不會到達腎間質的血漿蛋白能夠到達腎間質並引起發炎反應。間質微血管表面積的逐漸減少導致腎臟內缺氧，並影響參與膠原蛋白降解細胞的功能，使膠原蛋白（特別是膠原蛋白 I 和 II）、基底膜蛋白、蛋白聚糖和糖蛋白沉積在慢性受損的腎臟中(Webster., 2017)。

(三) 腎臟疾病檢測指標

腎臟功能依照腎絲球過濾率進行分級，血液或尿液中能被腎絲球自由過濾的分子如血清尿素氮和血清肌酸酐能被作為腎功能判定的指標，尿素可被腎臟自由過濾，並經由腎小管再吸收，血清尿素濃度會被 (1)肝臟尿素生成率 (2)蛋白質攝取量 (3)腎小管再吸收的速率影響，肌酸酐則是肌肉代謝物，不會被腎臟再吸收，可用於測量腎絲球過濾率。此外，一旦腎絲球發生損傷，足細胞受損，會增加大分子（如：白蛋白）滲漏至尿液，引起蛋白尿，尿蛋白出現超過三個月，即可判定為慢性腎病變。

除了腎絲球，腎小管損傷也會對腎功能造成巨大影響，急性腎損傷分子(Acute kidney injury molecule-1, Kim-1) 是一種在近端腎小管細胞中表現的 38.7 kDa 跨膜糖蛋白，參與損傷上皮細胞的吞噬作用，是腎小管損傷的前期生物標記物(Ibrahim et al., 2022)。另外，尿液嗜中性白血球明膠酶相關運載蛋白 (Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL) 也可以做為腎小管損傷的指標，NGAL 是一



種 25 kDa 的蛋白質，在上皮損傷後在各種組織中合成，例如腎臟、肺部和消化道。

血漿 NGAL 被腎絲球過濾並在近端腎小管再吸收，近端腎小管損傷時，尿液 NGAL 濃度會升高 (Romejko et al., 2023)。

(四) 常見誘發腎損傷的動物模式

許多動物模式被用來研究腎損傷的病理機制，以下為常見動物模式。

1. 5/6 腎切除手術 (5/6 nephrectomy) :

CKD 模式的黃金標準，模擬進行性腎衰竭及人類腎功能喪失，缺點是高度侵入性，可能發生手術併發症 (Sárközy et al., 2023)。

2. 單側輸尿管阻塞 (Unilateral ureteral obstruction,UUO):

可用於研究腎小管間質纖維化，模擬阻塞性 CKD，缺點是需要手術干預，可能發生腎功能代償(Nørregaard et al., 2023)。

3. 馬兜鈴酸 (Aristolochic acid,AA):

先前研究指出，4 mg/kg BW/day 可用於研究 AKI-CKD 轉變，具有臨床相關性，缺點是具高毒性，潛在致癌風險，可能有其他 CKD 外的危害，對於誘發 CKD 來說複雜、耗時、昂貴 (Furusho et al., 2020)。

4. 葉酸:

小鼠腹腔注射 250 mg/kg 高劑量葉酸，可誘發 CKD，優點為簡單、可重複，有助於研究 AKI-CKD 轉變，缺點是存在一定的變異性，缺乏臨床相關性 (Aparicio et al., 2020)。



5. 糖尿病腎病變:

小鼠注射 Streptozotocin，30–40 mg/kg 持續 5 次，可模擬第 1 型糖尿病併發的 CKD，缺點是只誘導 1 型糖尿病模式，誘發的腎臟病可能與患者的病理過程不完全匹配，CKD 誘發耗時長，小鼠可能死亡。

6. 高油高果糖飲食導致代謝症候群引發慢性腎病變:

代謝症候群是慢性腎病變的危險因子之一，會增加肥胖、發炎和胰島素阻抗，造成腎臟脂肪堆積，使腎絲球和腎小管肥大、腎絲球高血壓進而誘發慢性腎臟病。(Chan & Lin, 2023)

7. 腺嘌呤誘發腎病變:

模擬腎臟結晶和腎小管間質纖維化，可用於研究 CKD 進展機制。本研究欲利用腺嘌呤誘發腎病變小鼠模式，探討果糖與葉酸對腎損傷的影響。



第五節 研究動機與目的

國人飲食習慣西化，國民營養狀況變遷調查資料顯示，台灣 60% 葉酸來源為蔬菜，而 44 歲以下男女人口的蔬菜攝取量均低於建議攝取量的 4-5 份，只攝取不到 2 份，與此同時，含糖飲料攝取反而每週攝取高達 7 杯，低葉酸與高果糖攝取將導致慢性疾病的發生。國民營養狀況變遷調查資料指出，十年來代謝症候群盛行率有增加的趨勢（國建署，2022），其中，高血壓與糖尿病是引發慢性腎臟疾病的主要元兇，根據美國腎臟資料系統 (United States Renal Data System, USRDS) 2023 年年度報告中，台灣末期腎臟病盛行率世界之冠，為醫療系統帶來極大的負擔。高果糖攝取是代謝症候群的危險因子之一，可能直接導致慢性腎臟疾病的發生。研究指出，血清葉酸濃度與腎絲球過濾率正相關，顯示葉酸營養狀況會對腎功能顯著影響 (Wang et al., 2022)。

本研究室先前研究指出，以高油高果糖與葉酸缺乏飼料餵飼小鼠 12 個月後，會造成體內脂肪增大與腎臟的發炎與纖維化，增加尿蛋白與尿 NGAL 濃度，進而降低腎功能 (Chan & Lin, 2023)。此外，本研究室先前研究顯示，葉酸補充可以降低高油飲食與馬兜鈴酸餵飼小鼠血清肌酸酐濃度，然而，馬兜鈴酸會降低小鼠體重和存活率 (辜，2016)。故重新建立誘發腎損傷的動物模式，有研究指出，腺嘌呤可以誘發腎損傷，便於追蹤腎損傷的進程，故本研究探討以腺嘌呤誘發腎損傷小鼠模式，果糖與葉酸對腎功能的影響。



第二章 腺嘌呤誘發腎損傷的劑量實驗



第一節 前言

文獻指出，腺嘌呤通過誘發 2,8-DHA 沉積於腎小管導致腎損傷，小鼠品系通常使用 C57BL/6 雄鼠，給予腺嘌呤的方式有混入飼料、管餵或腹腔注射，由於管餵和腹腔注射可能給小鼠帶來更多壓力與刺激，故本實驗在飼料中混入腺嘌呤純物質，誘發小鼠腎損傷。此外，小鼠常用腺嘌呤給予劑量有 0.15%、0.2%、0.25% (w/w) (Yang et al., 2024)，然而，預實驗餵飼 0.2% 腺嘌呤一週後，小鼠體重降低 20%，出現駝背、活動力不佳等情形，故本實驗使用降低腺嘌呤劑量為 0.15 和 0.1% (w/w)，探討不同劑量腺嘌呤對小鼠腎功能的影響。

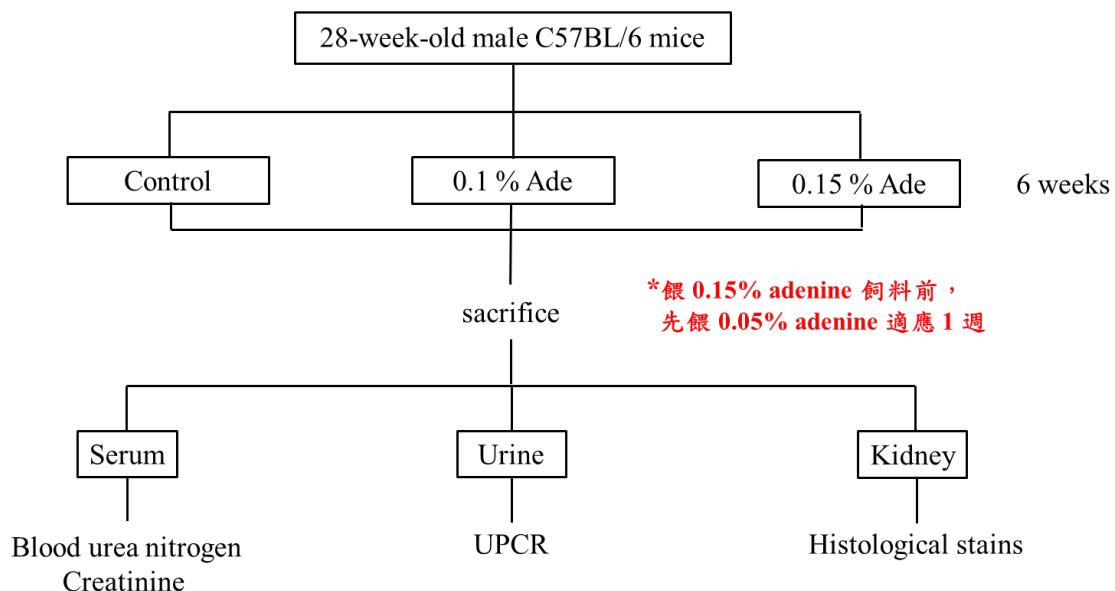


圖 2-1 實驗設計

Fig. 2- 1 Experimental design



第二節 材料方法

一、動物飼養

自行繁殖 27 週齡大的 C57BL/6 雄鼠，分別飼養在飼養籠中，自由攝取飲水及飼料，動物房溫度控制在 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ，相對濕度 $55 \pm 10\%$ ，光、暗循環各 12 小時。本研究的動物實驗設計與操作，獲得國立台灣大學實驗動物照護及使用委員會 (IACUC) 審查通過，IACUC 許可編號：NTU-110-EL-00190 小鼠適應環境與 AIN-93 飼料一週後，於 28 週齡隨機分為三組，控制組 (Ctrl, n=3)、0.1% 腺嘌呤低劑量組(0.1% ade, n=3) 及 0.15% 腺嘌呤高劑量組(0.15% ade, n=3)。Ade 組在 AIN-93 飼料裡加入 Adenine 純物質 (1 或 1.5g/kg)，持續餵食 6 週，飼料組成如表 2-1。實驗進行期間每週紀錄一次體重及飲水量，每三天記錄一次食物攝取量。

二、血液採集與處理

餵飼腺嘌呤前與實驗開始後每隔兩週將小鼠保定以 5mm 採血進行針臉頰採血。犧牲時以二氧化碳犧牲小鼠，立即以 1m 針筒心臟採血，以 12000rpm 離心 20 分鐘，抽取上清液，重複步驟一次，收集血清，保存於 -80°C 冰箱，待日後分析。

三、尿液採集與處理

餵飼腺嘌呤前與實驗開始後每隔兩週將小鼠保定，輕壓腹部收集尿液，直至小鼠犧牲。尿液樣本保存於 -80°C 冰箱，待日後分析。

**表 2-1 飼料成分表**Table 2-1 AIN-93G purified diet composition¹

Ingredient (g/kg)	Ctrl ¹
Soybean oil	70
Corn starch	529.5
Sucrose	100
Casein	200
Cellulose	50
AIN-93G Mineral mix	35
AIN-93G Vitamin mix	10
L-Cystine	3
Choline	2.5
Total energy (kcal)	3960
CHO (% kcal)	63.6
Protein (% kcal)	20.5
Fat (% kcal)	15.9

¹Reeves et al., 1993²於 ade 組添加 0.1 或 0.15% (1 或 1.5g/kg diet) 腺嘌呤純物質(Sigma, A5565)³Soybean oil, Sucrose (Taisugar) ; Corn starch (Samyang) ; AIN-93G Mineral mix, AIN-93G Vitamin mix (MP Biomedicals) ; Cellulose (JRS PHARMA) ; L-Cystine (Wako, Japan). Casein, Choline (Sigma, C7078, C1879)



四、腎功能測定

(一) 血液尿素氮測定

【材料與試劑】

QuantiChrom™ Urea Assay Kit (BioAssay System, DIUR-100)

【方法】

取 5 μL 血清樣本、標準品與 Blank，加入 96-well 盤，以 1 比 1 配製 A 與 B 反應試劑，每個 well 加入 200 μL 反應試劑，置於室溫反應 20 分鐘，以 OD 520nm 讀取吸光值，帶入公式計算尿素氮含量，計算公式如下：

$$[\text{Urea}] = \frac{\text{OD Sample} - \text{OD Blank}}{\text{OD Standard} - \text{OD Blank}} \times n \times [\text{Standard}] (\text{mg/dL})$$

尿素與尿素氮轉換: BUN=[Urea]/2.14

(二) 血清與尿液肌酸酐測定

【材料與試劑】

QuantiChrom™ Creatinine Assay Kit (BioAssay System, DICT-500)

【方法】

血清肌酸酐測定 (Serum creatinine) :

血清肌酸酐測定取 30 μL 血清樣本、2 mg/dL (以 ddH₂O 25 倍稀釋) 標準品，96-well 盤，以 1 比 1 配製 A 與 B 反應試劑，每個 well 加入 200 μL 反應試劑，立即讀取 OD 520mn (OD 0 min) 置於室溫反應 5 分鐘後再次讀取吸光值(OD 5 min)，帶入公式計算肌酸酐含量，計算公式如下：

$$[\text{Creatinine}] = \frac{\text{OD Sample 5min} - \text{OD Sample 0min}}{\text{OD Standard 5min} - \text{OD Standard 0min}} \times n \times [\text{Standard}] (\text{mg/dL})$$

尿液肌酸酐測定 (Urine creatinine) :

取 5 μL 尿液樣本、50 mg/dL 標準品加入 200 μL 反應試劑，立即讀取 OD 520nm (OD 0 min) 置於室溫反應 5 分鐘後再次讀取吸光值 (OD 5 min)，帶入公式計算肌酸酐含量，計算公式如下：

$$[\text{Creatinine}] = \frac{\text{OD Sample 5min} - \text{OD Sample 0min}}{\text{OD Standard 5min} - \text{OD Standard 0min}} \times n \times [\text{Standard}] (\text{mg/dL})$$

(三) 尿蛋白與尿液肌酸酐比值測定

【材料與試劑】

PierceTM Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Thremo, #23200)

Coomassie (Bradford) Protein Assay Reagent

BSA Standard Ampules, 500 μg/mL

【方法】

取 5 μL 尿液樣本、標準品 (標準曲線濃度 500、250、125、25、12.5、6.25、3.125、15.625 μg/mL)，加入 250 μL/well Coomassie Reagent，搖晃混勻 30 秒，置於室溫反應 10 分鐘，讀取 OD 595 nm 吸光值，帶入標準曲線計算尿蛋白濃度再除以尿液肌酸酐濃度校正，即可得尿蛋白濃度與尿液肌酸酐濃度比值，單位為 mg/mg creatinine。

五、腎臟組織切片染色

【材料與試劑】

1. 包埋盒 (Bioman Scientific)
2. 10% formaldehyde solution (BioGnost, F10-1L)
3. 拭鏡紙 (Kimtech Science)



【方法】

取半顆腎臟去膜後浸入 10% 甲醛，委託台大獸醫專業學院進行石蠟包埋切片，並以 hematoxylin & eosin (H&E) 染色，觀察免疫細胞浸潤與腎臟受損情形。腎臟組織纖維化程度以 Masson's Trichrome 染色法，判定藍色部分膠原蛋白沉積面積，利用 image J 定量，計算膠原纖維沉積量，以定量腎臟纖維化程度。

六、統計分析

使用 GraphPad Prism 軟體進行繪圖。實驗結果以 Mean \pm SD 表示。以 Student's t test 分析兩組之間顯著差異。



第三節 實驗結果

一、腺嘌呤誘發腎損傷小鼠生長情形

(一) 體重變化

28 週齡 C57BL/6 小鼠餵飼 Ctrl、低劑量或高劑量腺嘌呤六週後犧牲，每週紀錄一次體重，(表 2- 2) 顯示，餵飼腺嘌呤前，三組小鼠體重沒有顯著差異，低劑量組餵飼腺嘌呤三週後，31 週齡開始體重顯著低於 Ctrl 組，高劑量組由於第一週先餵飼 0.05% (w/w) 腺嘌呤適應，故體重直到 33 週齡才顯著降低，餵飼腺嘌呤六週後，不論是低劑量或高劑量組體重均顯著低於 Ctrl 組。

表 2- 2 腺嘌呤誘發腎損傷小鼠之體重變化

Table 2- 2 Effects of body weight on adenine induce kidney injury mice.

Group	n	28 week-old	31 week-old	33 week-old	34 week-old
		Body weight (g)			
Ctrl	3	33.64 ± 1.65	32.27 ± 2.33	32.22 ± 0.28	33.86 ± 1.09
0.1% ade	3	33.17 ± 0.97	27.89 ± 0.73*	26.16 ± 1.03*	25.53 ± 1.13*
0.15% ade	3	32.55 ± 0.99	31.91 ± 3.27	26.73 ± 2.86*	23.68 ± 2.48*

Data were mean ± SD. n=3. *p<0.05 compare to the Ctrl group.



(二) 攝食量變化

餵飼腺嘌呤持續六週，攝食量三組之間沒有顯著差異（表 2-3）。

表 2-3 腺嘌呤誘發腎損傷小鼠之攝食量變化

Table 2-3 Effects of food intake on adenine induce kidney injury mice.

Group	n	28 week-old	31 week-old	33 week-old	34 week-old
		Food intake (g/day)			
Ctrl	3	2.81 ± 0.26	3.02 ± 0.02	3.29 ± 0.07	3.29 ± 0.07
0.1% ade	3	2.03 ± 0.88	3.28 ± 0.36	2.96 ± 0.45	2.51 ± 0.58
0.15% ade	3	3.15 ± 1.04	2.51 ± 0.58	2.32 ± 0.14	2.32 ± 0.14

Values were mean ± SD. n=3. *p<0.05 compare to the Ctrl group.

(三) 飲水量變化

(表 2-4) 腺嘌呤誘發腎損傷小鼠之飲水量變化顯示，低劑量組餵食腺嘌呤兩週後飲水量顯著上升，高劑量組由於第一週先餵飼 0.05% (w/w) 腺嘌呤適應，故飲水量直到 31 週齡才顯著升高。

表 2-4 腺嘌呤誘發腎損傷小鼠之飲水量變化

Table 2-4 Effects of food intake on adenine induce kidney injury mice.

Group	n	Initial	31 week-old	33 week-old	Final water
		Water intake (mL/day)			
Ctrl	3	3.10 ± 0.08	3.33 ± 0.08	3.52 ± 0.36	3.57 ± 1.13
0.1% ade	3	3.38 ± 0.54	4.81 ± 0.86*	5.52 ± 0.72*	7.38 ± 1.01*
0.15% ade	3	3.05 ± 0.16	3.14 ± 0.29	5.90 ± 0.33*	5.86 ± 0.14*

Values were mean ± SD. n=3. *p<0.05 compare to the Ctrl group.



二、小鼠組織器官重量

小鼠餵飼腺嘌呤(0 或 1g/kg 或 1.5g/kg) 6 週後犧牲，取各器官測量絕對重量並計算相對重量，結果顯示於 (表 2-5)。餵飼腺嘌呤後，高劑量和低劑量組肝臟和心臟絕對重量均顯著較 Ctrl 組低，其他臟器絕對重量各組之間沒有顯著差異。脾臟和肺臟相對重量不論在低劑量或高劑量組均顯著高於 Ctrl 組，腎臟、肝臟和心臟相對重量各組之間則沒有顯著差異。

表 2-5 腺嘌呤誘發腎損傷小鼠之絕對與相對器官重量的影響

Table 2- 5 Effects of absolute and relative organ weight among adenine induce kidney

Group	n	Kidney	Spleen	Liver
		Absolute weight (g)		
Ctrl	3	0.20 ± 0.01	0.07 ± 0.01	1.36 ± 0.10
0.1% ade	3	0.16 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.98 ± 0.13*
0.15% ade	3	0.18 ± 0.00	0.08 ± 0.01	0.90 ± 0.10*
	n	Relative weight (%)		
Ctrl	3	0.60 ± 0.05	0.21 ± 0.02	4.01 ± 0.17
0.1% ade	3	0.10 ± 0.55	0.33 ± 0.02*	3.83 ± 0.40
0.15% ade	3	0.77 ± 0.07	0.33 ± 0.03*	3.81 ± 0.14

injury mice.

¹Values were mean ± SD. n=3. *p<0.05 compare to the Ctrl group.

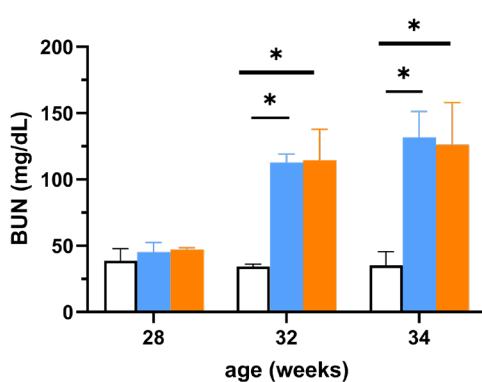
²Relative organ weight(%)=absolute organ weight/body weight ×100%



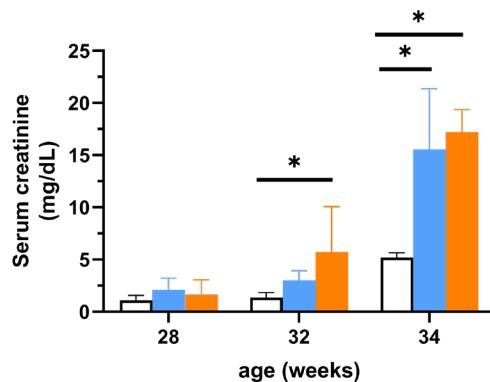
二、腺嘌呤對小鼠腎功能的影響

小鼠餵飼腺嘌呤四週後的 32 週齡和 34 週齡，血清 BUN 顯著升高（圖 2-2A），低劑量組血清肌酸酐在小鼠 32 週齡有趨勢性的上升，高劑量組顯著上升，34 週齡犧牲時不論高劑量或低劑量組血清肌酸酐均顯著增加（圖 2-2B），顯示尿蛋白與肌酸酐比值在低劑量組小鼠 34 週齡犧牲時有趨勢性的增加（圖 2-2C），表示腺嘌呤餵飼會造成腎功能損傷。

(A)



(B)



(C)

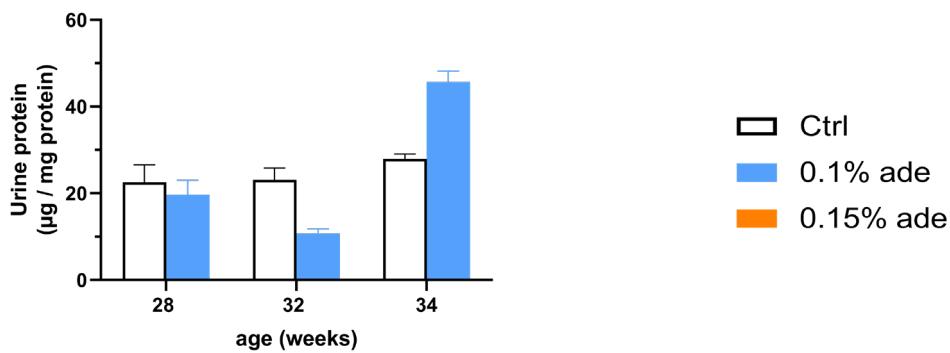


圖 2-2 腺嘌呤小鼠腎功能損傷。

Fig. 2- 2 Effects of adenine on renal function in mice. (A) BUN (B) serum creatinine (C) urine protein/urine creatinine ratio. Data were mean \pm SD, n=3. * $p < 0.05$ compared with the Ctrl group by Student's t-test.



三、腺嘌呤對小鼠腎纖維化的影響

腎臟組織以 H&E 染色，觀察免疫細胞浸潤程度，餵飼腺嘌呤六週後於小鼠 34 週齡犧牲，低劑量組小鼠腎臟藍色免疫細胞浸潤程度顯著較 Ctrl 組高，並且出現腎小管擴張和萎縮、腎小管刷狀緣脫落、上皮細胞損傷等現象(圖 2-3A)。腎臟組織以 Masson's Trichrome (Trichrome) 染色顯示低劑量組小腎小管間質和腎絲球均有大量深藍色膠原蛋白沉積 (圖 2-3B)。腎小管纖維化面積百分比定量也顯示 0.1% ade 組纖維化面積顯著較 Ctrl 組高 (圖 2-3C)。綜上所述，腺嘌呤餵飼會造成腎臟纖維化導致腎損傷。

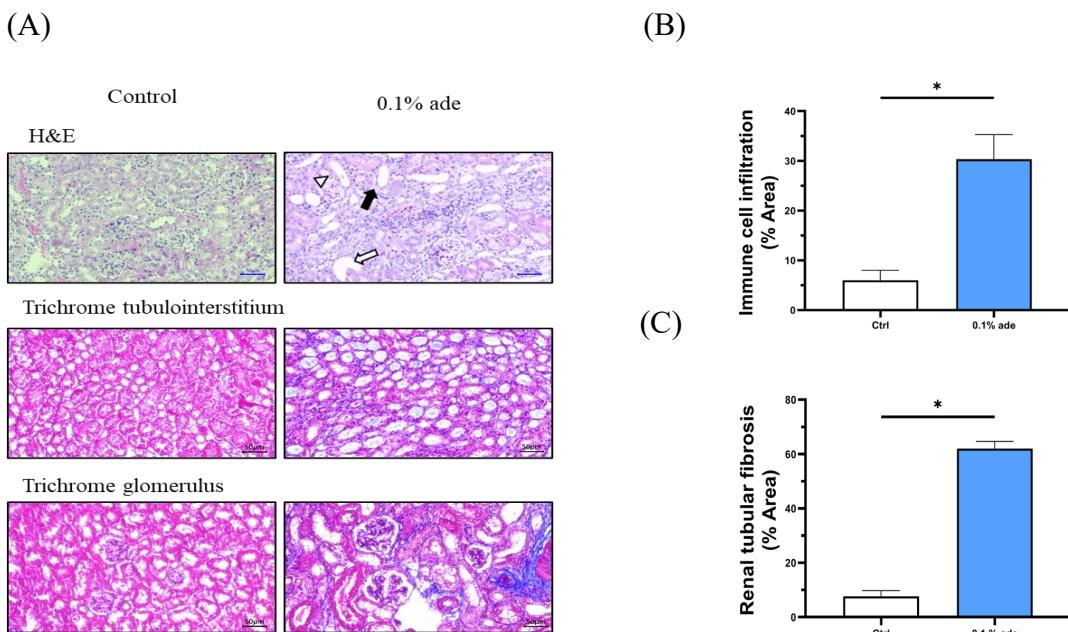


圖 2-3 腺嘌呤增加小鼠腎免疫細胞浸潤與纖維化程度。

Fig. 2- 3 Adenine increases immune cell infiltration and fibrosis in mouse kidneys. (A) The representative images of hematoxylin and eosin (H&E)-stain kidney (cortex, 200X, upper panel; scale bar, 50 μ M). Renal histology showed deposition of dilated tubules (white arrow), tubular epithelial loss (black arrow) and dilated Bowman's space (black triangle). Trichrome-stained kidney (tubulointerstitium, 200X, middle panel) from the Ctrl or ade group. Then, trichrome-stained kidney (cortex, lower panel), and the quantification of (B) immune cell infiltration area from the Ctrl or 0.1% ade group. (C) renal fibrosis area from the Ctrl or 0.1% ade group.



第四節 討論

一、腺嘌呤降低小鼠體重與攝食量的可能原因

研究指出，給予小鼠藥理劑量的腺嘌呤會在較短時間內經由損害腎小管功能誘發腎臟損傷與纖維化，常用給予方式有(1)口服、(2)管餵及(3)腹腔注射，其中，口服給予方式最多文獻使用，常用給予小鼠的劑量分別為(1)0.15% (2)0.2% (3)0.25% (Yang et al., 2024)。然而，預實驗發現給予 0.2% 腺嘌呤會造成小鼠嚴重厭食，體重下降超過 20%，並出現駝背、皮毛粗糙虛弱等情況，不符合實驗動物福祉。綜上所述，本實驗使用口服餵飼 0.1% 或 0.15% (1 或 1.5 g/kg) 腺嘌呤持續 6 週誘發小鼠腎損傷，為延緩餵飼 0.15% 腺嘌呤小鼠體重快速降低，第一週先以 0.05% 腺嘌呤讓小鼠適應，發現體重下降幅度變得平緩，也沒有出現駝背、虛弱等問題。另外使用更低劑量 0.1% 誘發小鼠腎損傷，在 0.1% 腺嘌呤餵飼三週後，小鼠體重顯著下降，攝食量有下降的趨勢，飲水量則顯著上升，與眾多研究一致 (Lair et al., 2024; Zaaba et al., 2023)。文獻指出，由於腺嘌呤本身有難聞的氣味，口服 0.2% 腺嘌呤會造成小鼠厭食，造成體重和攝食量顯著降低，飼料中含 20% 酪蛋白可以降低腺嘌呤純物質的氣味，減緩小鼠厭食 (Jia et al., 2013)。然而，本實驗 AIN-93 飼料本身含有 20% 酪蛋白，小鼠攝食量還是有趨勢性的下降，與其他較新發表的研究結果一致 (Lair et al., 2024)。推測腺嘌呤可能會活化下視丘的腺嘌呤接受器，導致食慾下降 (Santos et al., 2019)。同時，含氮廢物的累積會導致腸胃蠕動減慢與胃排空降低，進一步抑制小鼠食慾 (Ali et al., 2014)。另外，腺嘌呤會影響腎小管水通道蛋白的表現，進而降低水分再吸收導致體液平衡失調，造成小鼠飲水量與尿量增加 (Atay et al., 2024)。



本實驗以 0.1% (1g/kg) 腺嘌呤餵飼小鼠六週後犧牲，發現脾臟相對重量顯著增加，顯示腺嘌呤可能影響全身免疫反應進而影響腎功能。文獻指出，0.2% 腺嘌呤餵飼兩週後會增加腎臟重量，但本實驗未觀察到此現象，推測因劑量較低，使腎臟重量不受影響 (Thome et al., 2021)。

二、腺嘌呤可建立腎損傷小鼠模式

研究指出，血清尿素氮達 80-100 mg/dL，可以獲得較穩定的腎損傷模式 (Jia et al., 2013)。本實驗發現，低劑量 0.1% (1g/kg) 腺嘌呤餵飼小鼠六週後小鼠活動力仍佳、體重降低幅度平緩，血清尿素氮達 80 mg/dL 並且顯著增加和肌酸酐，尿蛋白與肌酸酐比值也顯著增加，腎臟切片染色結果也顯示腎小管擴張和上皮細胞萎縮、腎小管刷狀緣脫落、上皮細胞損傷以及膠原蛋白堆積等現象，與眾多研究結果相符(Yang et al., 2024)，顯示成功建立腺嘌呤誘發腎損傷模式，將應用於後續實驗。



第三章 果糖與葉酸不足對腺嘌呤誘發腎損傷小鼠腎功能的影響

第一節 前言

本研究室先前研究指出，葉酸缺乏會加劇高油高果糖餵飼小鼠腎功能損傷 (Chan & Lin, 2023)，又本研究預實驗結果顯示腺嘌呤能在較短時間內誘發小鼠腎纖維化與功能喪失，故本實驗欲探討腺嘌呤餵飼模式下葉酸缺乏與高油高果糖餵飼對小鼠腎臟造成的影响。

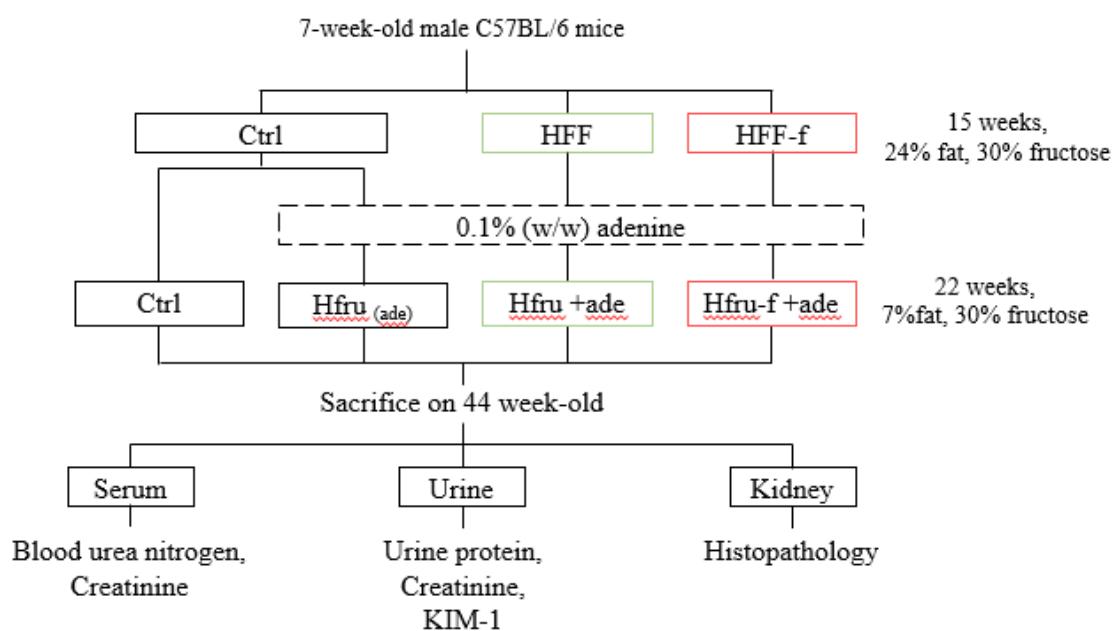


圖 3-1 實驗設計

Fig. 3-1 Experimental design



第二節 材料方法

一、動物飼養

自國家動物中心購入 6 週大的 C57BL/6 雄鼠，分別飼養在塑膠籠中，自由攝取飲水及飼料，動物房溫度控制在 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ，相對濕度 $55 \pm 10\%$ ，光、暗循環各 12 小時。本研究的動物實驗設計與操作，獲得國立台灣大學實驗動物照護及使用委員會 (IACUC) 審查通過，IACUC 許可編號：NTU-110-EL-00190。

小鼠適應環境與 AIN-93 飼料一週後，於 7 週齡隨機分為 4 組，控制組 (Ctrl, n=9)、腺嘌呤組 (Ctrl+ade, n=8)、正常葉酸 2 mg/kg 之高油高果糖腺嘌呤組 (HFF+ade, n=12) 及含 1/10 倍葉酸 0.2 mg/kg 之高油高果糖葉酸不足腺嘌呤組 (HFF-f+ade, n=7)。Ctrl 組和 Ctrl+ade 組餵飼 AIN-93、HFF+ade 組和 HFF-f+ade 組餵飼高油高果糖飼料持續 15 週，Ctrl+ade 組、HFF+ade 組和 HFF-f+ade 於 22 週齡在飼料裡加入腺嘌呤純物質 (1g/kg)，並改為高果糖組 (Hfru(ade), n=8)、高果糖腺嘌呤組 (Hfru+ade, n=12)、高果糖葉酸不足腺嘌呤組 (Hfru-f+ade, n=7)，持續餵食 22 週，小鼠於 44 週齡犧牲。飼料組成如表 3-1。實驗進行期間每週紀錄一次體重及飲水量，每三天記錄一次食物攝取量。

二、血液採集與處理

如同第二章材料方法第二部分「血液採集與處理」(p.31)

三、尿液採集與處理

如同第二章材料方法第三部分「尿液採集與處理」(p.30)

表 3-1 飼料成分表

Table 3-1 AIN-93G purified diet composition¹

Ingredient (g/kg)	Ctrl	HFF	HFF-f	Hfru	Hfru-f
Folic acid (mg)	2	2	0.2	2	0.2
Lard		226	226		
Soybean oil	70	10	10	70	70
Fructose		316	316	296	296
Sucrose	100	100	100	100	100
Corn starch	529.5			233.4	233.4
Casein	200	230	230	200	200
Cellulose	50	57	57	50	50
AIN-93G mineral mix	35	42	42	35	35
AIN-93G vitamin mix (W/O folic acid)	10	12	12	10	10
L-Cystine	3	4	4	3	3
Choline	2.5	3	3	2.5	2.5
Total energy (kcal)	3960	4724	4724	3960	3960
Fat (% kcal)	15.9	45.0	45.0	15.9	15.9
CHO (% kcal)	63.6	35.2	35.2	63.6	63.6
Protein (% kcal)	20.5	19.8	19.8	20.5	20.5

¹ Reeves et al., 1993² 小鼠 22 週齡於 ade 組添加 0.1 (1 g/kg diet) 腺嘌呤純物質 (Sigma, A5565)³ Folic acid, Casein, Choline (Sigma, F7876, C7078, C1879) ; Lard, AIN-93G Mineral mix, AIN-93G Vitamin mix (MP Biomedicals) ; Soybean oil, Sucrose (Taisugar) ; Fructose (ADM[®]) ; Corn starch (Samyang) ; Cellulose (JRS PHARMA) ; L-Cystine (Wako, Japan).



四、 血清葉酸濃度測定

以微生物法測定葉酸含量，*Lacticaseibacillus rhamnosus* 為葉酸需求菌，生長與繁殖與葉酸濃度相關，可以透過菌生長速率推算樣品葉酸含量。

(一) 葉酸需求菌繼代

【材料與試劑】

1. 葉酸需求菌: *Lacticaseibacillus rhamnosus* (ATCC No.7469)
2. MRS Broth (Biolife,4017292): 取 11.04 g MRS 粉末溶於 200 mL 一次水，調 pH 值至 6.4，以 121°C 滅菌 15 分鐘，冷卻後於 4°C 保存。

【方法】

取 5 mL MRS broth，加入 10 μL 冷凍菌液，以 37°C 搖晃培養 18 小時，重複繼代兩代後即可進行葉酸濃度測定。

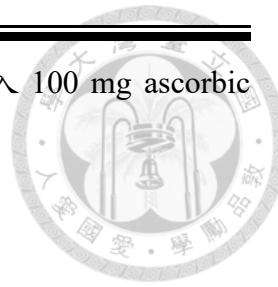
(二) 葉酸含量測定

【材料與試劑】

1. 第三代菌液
2. 0.1M phosphate buffer saline(PBS) :
10×PBS 配製: 將 80.0 g NaCl (Sigma, S7653)、11.6 g Anhydrous Na₂HPO₄ (Sigma, S8282)、2.0 g KH₂P04 (Sigma, P0662) 以及 2.0 g KC1 (Sigma, P9333) 溶於滅菌一次並水定量至 1000 mL，調 pH 至 7.4，以 121°C 滅菌 30 分鐘即為 10×PBS。

取 50mL 10×PBS 加入 450 mL 一次水，配製成 1×PBS，調 pH 值至 6.2，以 121°C 滅菌 30 分鐘，冷卻後加入 250 mg ascorbic acid (Sigma, A7506)，以 121°C 滅菌 5 分鐘，冷卻後於 4°C 保存。

3. Folic acid casei medium (Himedia,m543) :



取 18.8g 粉末以一次水定容至 200 mL，調 pH 值至 6.7，再加入 100 mg ascorbic acid，以 121°C 滅菌 5 分鐘，冷卻後於 4°C 保存。

4. 0.9% NaCl (Sigma,S7653) :

取 450 mg NaCl 粉末以一次水定容至體積為 50 mL，以 121°C 滅菌 30 分鐘，冷卻後於 4°C 保存。

5. 12.5 mM NaOH (Sigma, S5881) :

取 50 mg NaOH 粉末，以一次水定容至 100mL，即為 12.5 mM NaOH 溶液。

6. 葉酸(Sigma, S8758)標準溶液：

取 20 mg 葉酸粉末，溶於 10 mL 12.5 mM NaOH 溶液，經 0.22 μm 濾膜 (Sartorius, 16532K) 過濾，即得 2 mg/mL 葉酸標準溶液。

【方法】

樣品配製：

2 mg/mL 葉酸標準溶液以 1×PBS 配製為濃度 (1、0.8、0.6、0.4、0.2、0.1ng/mL) 的標準品，血清樣品同樣以 1×PBS 稀釋 100~500 倍，取 120 $\mu\text{L}/\text{well}$ 標準品和血清樣品加入 96 well 盤。

菌液配製：

取 1mL 第三代菌液以 4°C 12,000 rpm 離心 30 秒，倒除上清液，加入 1 mL 0.9% NaCl 震盪混勻，再以 4°C 12,000 rpm 離心 30 秒，重複清洗步驟 3 次，取 25 μL 懸浮菌液，以 50 mL casei medium 稀釋 2000 倍，取 120 $\mu\text{L}/\text{well}$ 菌液加入 96 well 盤，以 37°C 培養 18~24 小時，讀取 620 nm 吸光值，代入標準曲線計算葉酸濃度。



五、 腎功能測定

(一) 血液尿素氮測定

如同第二章材料方法第四部分「腎功能測定」(p.33)

(二) 血清與尿液肌酸酐測定

如同第二章材料方法第四部分「腎功能測定」(p.33)

(三) 尿蛋白與尿液肌酸酐比值測定

如同第二章材料方法第四部分「腎功能測定」(p.33)

(四) 尿液中 kidney injury molecular (KIM-1) 檢測

【材料與試劑】

1. Mouse KIM-1 ELISA kit (IGL, E-90KIM)

(1) Enzyme Conjugated Detection Antibody：將 100× Diluent Concentrate 以 ddH₂O 稀釋 100 倍

(2) Diluent Concentrate：將 5× Diluent Concentrate 以 ddH₂O 稀釋 5 倍

(3) Wash Solution Concentrate：將 20× Diluent Concentrate 以 ddH₂O 稀釋 20 倍

【方法】

將 100 μL/well 標準曲線 (5、2.5、1.25、0.63、0.31、0.16、0.08、0 ng/mL) 和 3× 稀釋的尿液樣品加入 96well 盤室溫培養 2 小時，吸除樣品後，加入 300μL/well 1× wash buffer 倒除 buffer 後敲乾，重複清洗 4 次，將 100μL/well 1× Enzyme Conjugated Detection Antibody 加入 96well 盤室溫避光培養 30 分鐘，清洗 4 次，將 100μL/well Chromogen Substrate Solution 加入 96well 盤室溫培養 10 分鐘，再將 100μL/well stop solution 加入 96well 盤，讀取 O.D.450，將結果代入標準曲線計算 KIM-1 濃度。



六、 腎臟組織切片染色

如同第二章材料方法第五部分「腎臟組織切片染色」(p.33)

七、 統計分析

使用 SPSS 進行統計分析，使用 GraphPad Prism 軟體進行繪圖。實驗結果以 Mean \pm SD 表示。以 Student's t test 分析兩組之間顯著差異。與 Ctrl 比較，若 $*p<0.05$ 表示有顯著差異，與 Hfru(ade)比較， $\dagger p<0.05$ 表示有顯著差異。以 One-way ANOVA 事後以 Duncan's test 進行分析，不同字母表示組間具有顯著差異，a 表示最高值，b 表示次高值，依此類推。



第三節 實驗結果

一、 小鼠生長情形

(一) 體重與攝食量

7 週齡小鼠分別餵飼 AIN-93、HFF、HFF-f 持續 15 週，22 週齡時，根據劑量實驗結果 Hfru_(ade)、Hfru +ade、Hfru-f+ade 三組給予 0.1% 腺嘌呤 (1g/kg) 誘發腎損傷。餵飼 AIN-93 的 Hfru_(ade)組小鼠給予腺嘌呤後體重、攝食量顯著降低 (表 3-2、表 3-3)，26 週齡時 BUN 濃度顯著增加，並達到穩定的 80 mg/dL (圖 3-2)，顯示小鼠腎功能受到損傷。然而小鼠出現駝背、活動力不佳等現象，故於 27 週齡時停止給予腺嘌呤，改為餵飼高果糖飼料 (果糖含 30 %)，小鼠體重明顯增加，駝背、活動力明顯改善。

然而，餵飼腺嘌呤四週之後 Hfru+ade、Hfru-f+ade 兩組小鼠於 26 週齡體重、攝食量和 BUN 濃度未受腺嘌呤影響，故將腺嘌呤劑量調整至 1.5 g/kg，一週之後體重仍未出現顯著變化，根據 Hfru_(ade)組體重降低的結果，推測高油可能影響腺嘌呤代謝，進而降低其誘發腎損傷的效果，故降低高油高果糖飼料 (油含 23.6%、果糖含 29.6%)，降低油含量為正常油高果糖飼料 (油含 7%、果糖含 29.6%)，發現體重、攝食量明顯降低 (表 3-2、表 3-3)，腎功能指標 BUN 顯著增加 (圖 3-2)，顯示小鼠腎功能顯著降低。

表 3-2 不同飲食配方對腺嘌呤誘發腎損傷小鼠體重的影響

Table 3- 2 Effects of different diet on body weight of adenine-induced kidney injury murine model.

Group	n	22 week-old	26 week-old	34 week-old	Final
		BW(g)	BW(g)	BW(g)	BW(g)
Ctrl	9	35.11 ± 5.72	38.19 ± 6.27	40.33 ± 6.81	43.69 ± 7.38
Hfru _(ade)	8	35.85 ± 4.12	28.48 ± 4.41#	29.35 ± 3.97*	34.05 ± 4.83*
Hfru+ade	12	40.63 ± 2.00	45.19 ± 1.50#	37.97 ± 3.66†	34.25 ± 5.57*†
Hfru-f+ade	7	38.05 ± 4.95	41.27 ± 6.23	30.11 ± 2.75*	25.96 ± 1.57*†

Values were mean ± SD. n=7~12. *p<0.05 compare to the Ctrl group. †p<0.05

compare to Hfru_(ade). #p<0.05 compare to 22 week-old.

表 3-3 不同飲食配方對腺嘌呤誘發腎損傷小鼠熱量攝取的影響

Table 3- 3 Effects of different diet on energy intake of adenine-induced kidney injury murine model.

Group	n	22 week-old	26 week-old	26 week-old	Final
		Energy intake (kcal)	Energy intake (kcal)	Energy intake (kcal)	Energy intake (kcal)
Ctrl	10	14.24 ± 2.28	13.51 ± 1.51	12.38 ± 0.79	15.27 ± 1.31
Hfru _(ade)	8	13.21 ± 2.27	10.40 ± 1.13*	11.93 ± 2.04	13.19 ± 1.87*
HFF+ade	12	12.65 ± 1.48	12.55 ± 1.17	11.68 ± 4.73	13.80 ± 3.17*
HFF-f+ade	7	12.65 ± 0.96	11.64 ± 2.07	10.79 ± 6.34	11.80 ± 2.94*

Values were mean ± SD. n=7~12. *p<0.05 compare to the Ctrl group.

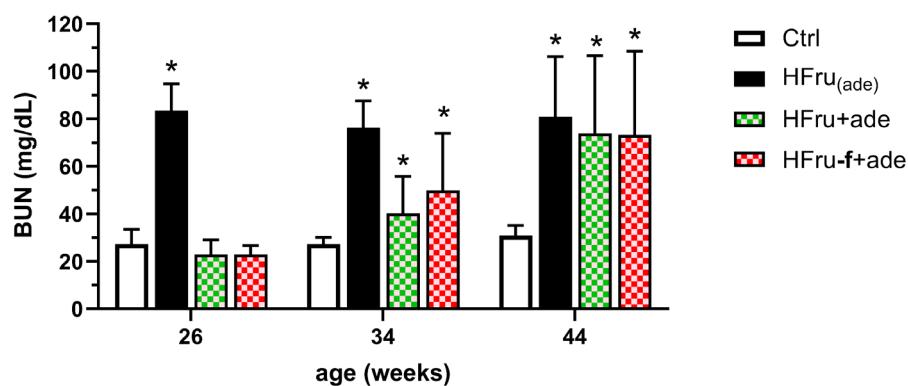


圖 3-2 小鼠 BUN 濃度

Fig. 3- 2 Mouse BUN concentration. Values were mean ± SD, n=7~12. *p<0.05 compare to the Ctrl group.

Hfru-f+ade 組小鼠 8 週齡餵飼完全缺乏葉酸 (0 mg/kg) 之飼料，由於小鼠體重增長情形不佳、攝食量降低，於 12 週齡將小鼠飼料中葉酸劑量回補至 1/10 葉酸 (0.2 mg/kg)，小鼠攝食量明顯回升。為了比較葉酸對腎臟功能的影響，Hfru-f+ade 組小鼠 27 週齡時將 1/10 葉酸降低為餵飼 1/20 葉酸 (0.1 mg/kg)，然而，小鼠體重與攝食量大幅降低，研判體內葉酸存量耗盡，於 39 週齡飼料回補至 1/10 葉酸，小鼠攝食量明顯增加 (表 3-4、表 3-5)。

表 3-4 不同葉酸攝取量對小鼠體重的影響

Table 3-4 Effects of different folate intake on the body weight of mice

Group	n	8 week-old	12 week-old	27 week-old	39 week-old
		BW(g)	BW(g)	BW(g)	BW(g)
Hfru+aade	12	24.33 ± 0.67	32.51 ± 1.34	43.64 ± 1.33	35.62 ± 5.18
Hfru-f+aade	7	24.49 ± 0.87	28.26 ± 2.24*	40.36 ± 6.16	21.46 ± 3.04*

Values were mean ± SD. n=7~12. *p<0.05 compare to Hfru+aade.

表 3-5 不同葉酸攝取量對小鼠攝食量的影響

Table 3-5 Effects of different folate intake on the energy intake of mice

Group	n	8 week-old	12 week-old	27 week-old	39 week-old
		Energy intake (kcal)	Energy intake (kcal)	Energy intake (kcal)	Energy intake (kcal)
Hfru+aade	12	10.57 ± 0.92	13.45 ± 0.93	8.08 ± 0.97	11.34 ± 2.91
Hfru-f+aade	7	10.82 ± 0.90	10.71 ± 1.38*	8.53 ± 1.55	8.71 ± 4.25*

Values were mean ± SD. n=7~12. *p<0.05 compare to Hfru+aade.



(二) 葉酸營養狀況對熱量攝取與禁食血糖的影響

小鼠犧牲後測定血清葉酸濃度，Hfru-f+ade 組顯著低於其他三組（圖 3-3A）。

將小鼠 7 至 44 週齡整個飼養週期內的攝食量乘以每克所含熱量，計算平均每天熱量攝取，Hfru-f+ade 組顯著低於其他組（圖 3-3B）。Hfru-f+ade 組禁食血糖顯著高於 Ctrl 組，Hfru(ade) 組和 Hfru+ade 組則有增加的趨勢（圖 3-4C），顯示果糖與葉酸不足影響攝食量與糖代謝。

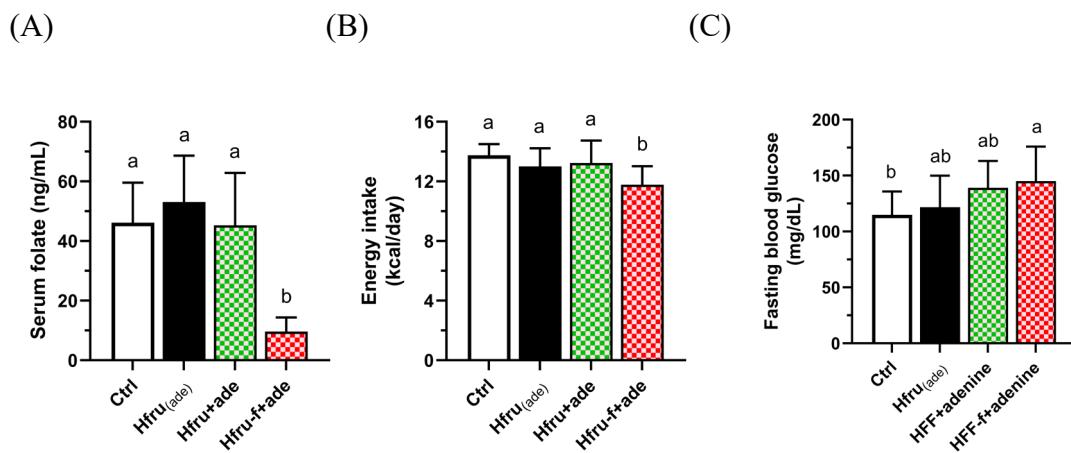


圖 3-3 葉酸不足造成熱量攝取降低與禁食血糖升高

Fig. 3- 3 Folate insufficiency reduced energy intake and elevated fasting blood glucose levels. (A) serum folate, (B) energy intake, (C) fasting blood glucose. Values were mean \pm SD, n=7~12. Bars with different letters indicate the significant difference ($P < 0.05$) analyzed using One-way ANOVA, followed by Duncan's post-hoc test.



(三) 腺嘌呤餵飼對飲水量與尿蛋白的影響

餵飼腺嘌呤 37 週後，Hfru(ade) 、Hfru+ade 、Hfru-f+ade 三組飲水量均顯著高於餵飼前，表示腺嘌呤會增加飲水量並可能增加尿量（圖 3- 4A）。與 Ctrl 組相比 Hfru(ade) 組、Hfru+ade 組與 Hfru-f+ade 組尿蛋白顯著高於 Ctrl 組（圖 3- 4B），顯示小鼠腎臟足細胞損傷。

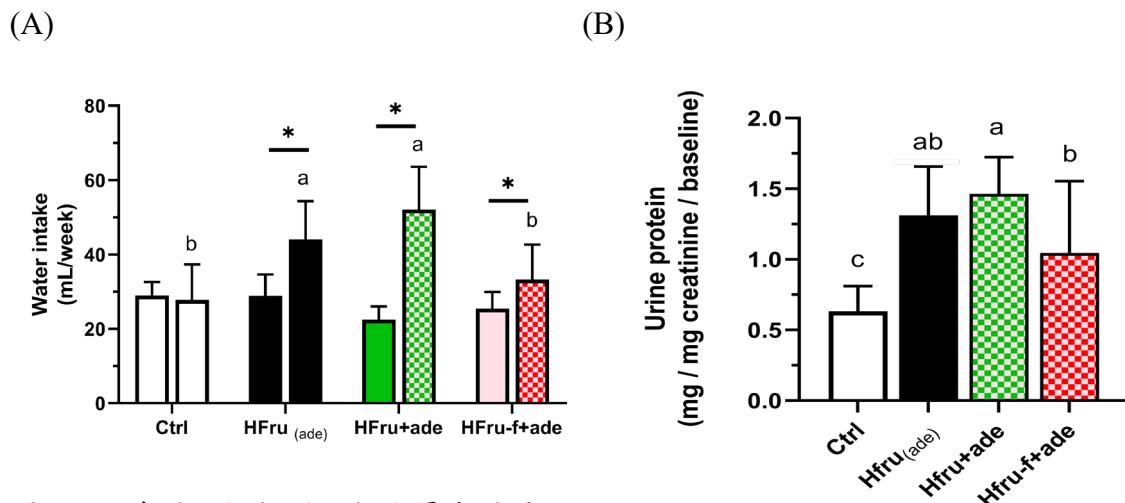


圖 3- 4 腺嘌呤餵飼增加飲水量與尿蛋白

Fig. 3- 4 Adenine increases water intake and urinary protein levels. (A) Comparison of water intake before and after adenine feeding. (B) urine protein among adenine-induced kidney injury murine model. Values were mean \pm SD, n=7~12. Bars with different letters indicate the significant difference ($P < 0.05$) analyzed using One-way ANOVA, followed by Duncan's post-hoc test.



二、小鼠組織器官重量

顯示絕對重量方面，與 Ctrl 組相比，Hfru_(ade) 、Hfru+ade 、Hfru-f+ade 三組腎臟、肝臟、副睪脂肪、腎周脂肪絕對重量均顯著較低。相對重量方面，與 Ctrl 組相比，Hfru+ade 組脾臟重量顯著較高，Hfru-f+ade 組副睪脂肪相對重量顯著降低，Hfru_(ade) 、Hfru+ade 、Hfru-f+ade 三組腎周脂肪均相對重量均顯著降低，顯示腺嘌呤餵飼改變腎功能的同時改變腎臟脂肪代謝 (表 3- 6)。

表 3- 6 腸器絕對與相對器官重量

Table 3- 6 Absolute and relative organ weights

		Kidney	Liver	eWAT	rWAT
Group	n	Absolute weight (g)			
Ctrl	9	0.26 ± 0.03	1.80 ± 0.40	1.63 ± 0.55	1.12 ± 0.42
Hfru _(ade)	8	0.15 ± 0.08*	1.44 ± 0.13*	0.99 ± 0.59*	0.51 ± 0.33*
HFF +ade	12	0.21 ± 0.04*	1.48 ± 0.25*	1.09 ± 0.58*	0.62 ± 0.36*
HFF-f +ade	7	0.17 ± 0.03*	1.17 ± 0.10*	0.28 ± 0.04*	0.15 ± 0.04*
		Relative weight (%)			
Ctrl	9	0.59 ± 0.12	4.06 ± 0.48	3.65 ± 0.94	2.27 ± 1.01
Hfru _(ade)	8	0.56 ± 0.10	4.22 ± 0.30	2.72 ± 1.35	1.39 ± 0.79*
HFF +ade	12	0.61 ± 0.09	4.20 ± 0.60	2.95 ± 1.32	1.68 ± 0.84*
HFF-f +ade	7	0.61 ± 0.23	4.24 ± 0.28	1.03 ± 0.13*	0.54 ± 0.14*

¹Values were mean ± SD, n=7~12. *p<0.05 compare to the Ctrl group.

²Relative organ weight(%)=absolute organ weight/body weight ×100%

三、腎功能指標

腺嘌呤餵飼會改變腎臟顏色，表示腎臟纖維化（圖 3- 5A），餵飼腺嘌呤使血清肌酸酐顯著增加（圖 3- 5B），Hfru_(ade)組餵飼腺嘌呤 5 週停止給予腺嘌呤，改為餵飼單純高果糖，持續 17 週直到小鼠 44 週齡犧牲，仍無法逆轉腺嘌呤飲食造成血清肌酸酐升高，顯示腎功能持續喪失，無法恢復。Hfru+ade 、Hfru-f+ade 兩組之間血清肌酸酐無顯著差異，顯示飼料中葉酸劑量對腎功能的影響小於腺嘌呤對腎功能的影響（圖 3- 5B）。Hfru_(ade) 和 Hfru+ade 組尿蛋白顯著增加，Hfru-f+ade 組尿液 Kim-1 濃度顯著高於 Ctrl 組，而 Hfru_(ade) 組和 Hfru+ade 組則顯示趨勢性增加，顯示果糖與葉酸缺乏加劇腎功能損傷（圖 3- 5C）。

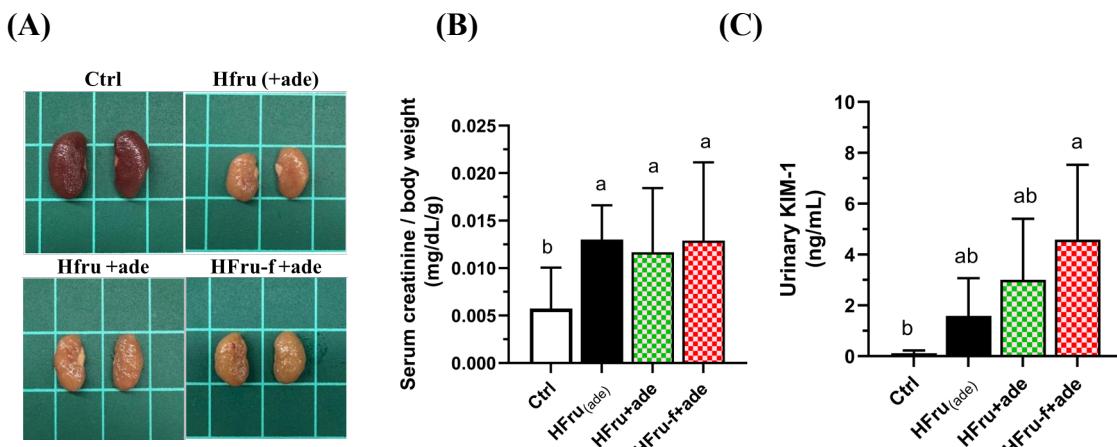


圖 3- 5 腺嘌呤誘發腎損傷指標增加

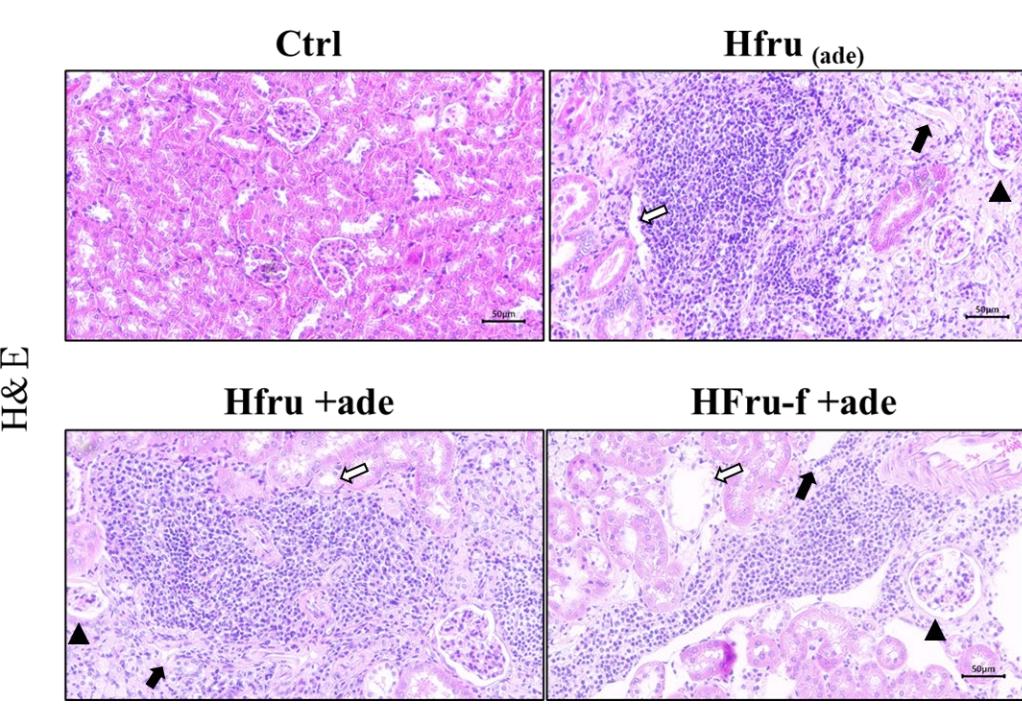
Fig. 3- 5 Adenine administration elevates markers of renal injury (A) The representative image of kidney (B) serum creatinine/body weight ratio (C) urinary kim-1. Data were mean \pm SD, n=7~12. Bars with different letters indicate the significant difference ($P < 0.05$) analyzed using One-way ANOVA, followed by Duncan's post-hoc test.



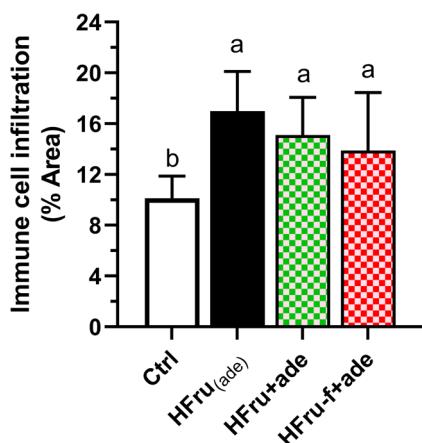
四、腎損傷小鼠腎臟組織病理變化和纖維化的影響

H&E 染色顯示腎小管管腔擴張、鮑氏囊間隙擴張、腎小管細胞脫落與萎縮 (圖 3- 6A)，定量圖顯示 +ade 三組免疫細胞浸潤顯著較 Ctrl 組高(圖 3- 6B)，Masson's trichrome 染色顯示腎小管藍色部分膠原蛋白沉積明顯增加 (圖 3- 6C)，Hfru_(ade)組腎纖維化面積顯著較 Ctrl 組高，Hfru-f+ade 組腎臟纖維化面積顯著較 Hfru+ade 組高 (圖 3- 6)，顯示葉酸不足可能會加劇腎臟纖維化。

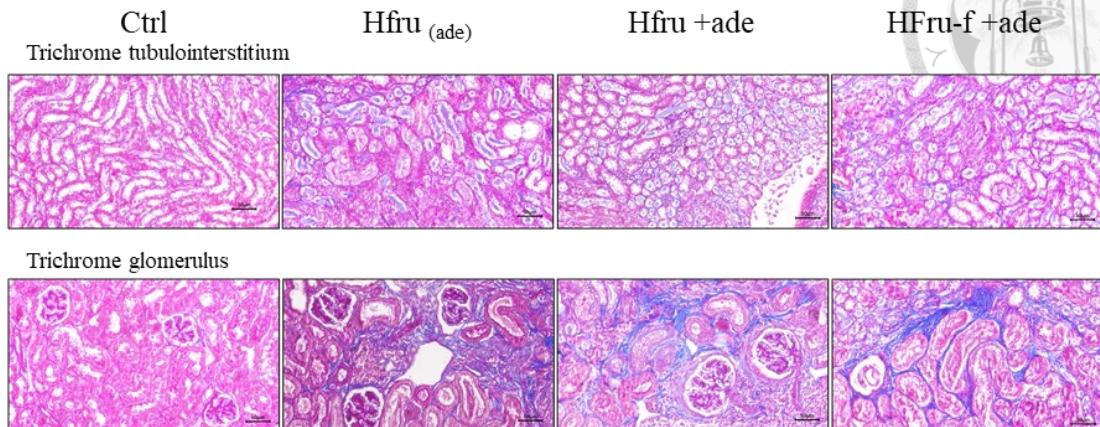
(A)



(B)



(C)



(D)

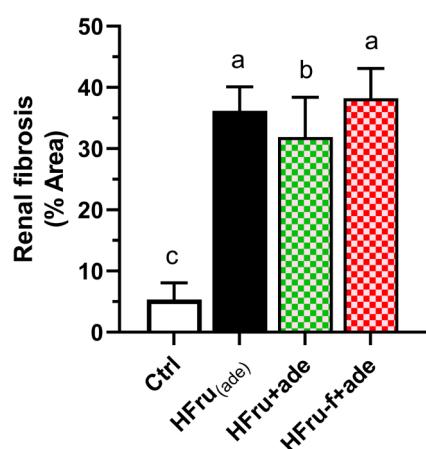


圖 3-6 小鼠腎臟纖維化程度

Fig. 3-6 Renal fibrosis in mice. The representative images of (A) H&E-stained kidney (cortex, 200X). Renal histology showed deposition of dilated tubules (white arrow), tubular epithelial loss (black arrow) and dilated Bowman's space (black triangle). (B) Trichrome-stained kidney (tubulointerstitium, 200X; upper panel) and trichrome-stained kidney (cortex, 200X; lower panel), scale bar, 50 μ m. The quantification of (C) immune cell infiltration and (D) renal fibrosis area from AIN-93 or Hfru fed mice. Bars with different letters indicate the significant difference ($P < 0.05$) analyzed using One-way ANOVA, followed by Duncan's post-hoc test.

第四節 討論

一、高油高果糖與葉酸對小鼠體重的影響

高血糖、高血壓是慢性腎病變的主要危險因子，本研究室先前研究指出，葉酸缺乏與高油高果糖飲食致肥胖會加劇慢性腎病變的發生 (Chan & Lin, 2023)，本實驗使用同樣配方之高油高果糖飼料餵飼 Hfru+ade 組和 Hfru-f+ade 組小鼠，Ctrl 組和 Hfru(ade)組小鼠則餵飼 AIN-93 標準飼料，與先前研究結果相比，Hfru+ade 組和 Hfru-f+ade 組小鼠體重增加幅度平緩許多，推測為前期飼料更換頻率較低，飼料變質導致小鼠攝食量與熱量攝取偏低，使體重上升速率較平緩。小鼠 12 週齡以高油高果糖餵飼一個月後，相較於 Hfru+ade 組，Hfru-f+ade 組小鼠體重增長緩慢的情況更加明顯，推測可能因葉酸缺乏使腸道細胞無法更新，影響小鼠食慾，故依照本研究室先前研究之經驗，回補 1/10 葉酸 (0.2 mg/kg) (Chan & Lin, 2023)，回補葉酸後小鼠攝食量明顯增加，體重也逐漸增加。然而，至 21 週齡，Hfru-f+ade 組體重仍略低於 Hfru+ade 組。

二、腺嘌呤對小鼠體重與腎功能的影響

Hfru(ade)組、Hfru+ade 組和 Hfru-f+ade 組小鼠於 22 週齡於飼料中添加 0.1% 腺嘌呤，餵飼四週後 Hfru(ade)組，體重顯著降低，可能由於腺嘌呤會活化 AMPK，改變脂肪與醣類代謝，降低肝臟與腎臟三酸甘油脂與膽固醇 (Padalkar et al., 2023)。Hfru+ade 組體重反而顯著增加，Hfru-f+ade 組體重則沒有顯著差異。26 週齡 BUN 結果顯示，同樣餵飼腺嘌呤四週，只有 Hfru(ade)組 BUN 顯著增加，並且達 80 mg/dL，Hfru+ade 組和 Hfru-f+ade 組沒有顯著變化。研究指出，餵飼腺嘌呤可以使 APRT 飽和，造成 2,8DHA 堆積於腎小管，進而在較短時間內誘發腎損傷 (Yang et al., 2024)，故本實驗使用含腺嘌呤的高油高果糖飼料探討飲食因子對腎損傷的影響，然而，本

研究結果顯示，餵飼腺嘌呤後，高油飼料會妨礙腺嘌呤對腎臟的作用，推測由於高脂飲食會增加黃嘌呤，使 xanthine oxidase 增加黃嘌呤代謝，腺嘌呤代謝減少，造成 2,8-DHA 無法堆積，腎損傷無法誘發。故於小鼠 27 週齡，Hfru⁺ade 組和 Hfru⁻f⁺ade 組將高油高果糖飼料改為高果糖正常油 (果糖:葡萄糖=55:45)，同時，為了探討葉酸在其中扮演的角色，將 Hfru-f⁺ade 組飼料中 1/10 葉酸改為 1/20 (0.1 mg/kg)，繼續觀察果糖、葉酸與腺嘌呤對小鼠體重與腎功能的影響。

三、腺嘌呤誘發之腎損傷無法回復

Hfru^(ade)組持續餵飼 0.1% 腺嘌呤長達 5 週，為避免小鼠體重繼續降低，停止給予腺嘌呤，持續追蹤 BUN，探討腺嘌呤誘發之腎損傷是否可以回復，同時為了與 Hfru⁺ade 組和 Hfru-f⁺ade 組比較，探討高果糖飲食是否加劇腎損傷，Hfru^(ade)組小鼠於 28 週齡餵飼高果糖飼料，持續追蹤體重與腎功能，由 44 週齡犧牲腎功能各項指標與腎組織學與纖維化面積判斷，停止餵飼腺嘌呤後，腎損傷仍然維持，顯示腎功能維持損傷狀態，腎臟再生能力受到抑制，與其他研究結果相符 (Klinkhammer et al., 2022)。

四、果糖與腺嘌呤對小鼠熱量攝取與血糖的影響

由於 AIN-93、高油高果糖與高果糖飼料中，每公克飼料所含熱量不同，以小鼠每天平均熱量攝取量作圖，四組小鼠熱量攝取沒有顯差異，根據本研究室先前研究結果，高油高果糖餵飼並不會影響熱量攝取量 (Chan & Lin, 2023)，本實驗於小鼠 27 週齡後改為餵飼高果糖飼料，也得到相同的結果。

根據本研究室先前研究結果，高油高果糖餵飼 12 個月後，小鼠禁食血糖顯著高於 Ctrl 組，而葉酸不會影響禁食血糖濃度 (Chan & Lin, 2023)，本研究得到的結



果不盡相同，Hfru-f+ade 組小鼠禁食血糖顯著高於 Ctrl 組，Hfru+ade 組和 Hfru(ade) 組進食血糖有趨勢性的增加，可能是高果糖飲食增加小鼠禁食血糖 (Dornas et al., 2015)。

五、葉酸缺乏使小鼠攝食量與體重減輕

Hfru-f+ade 組小鼠 28 至 39 週齡體重顯著下降並持續減輕，伴隨攝食量降低，並且攝食量與飼料中葉酸濃度有關。推測為葉酸缺乏導致腸胃道功能降低使食慾下降 (Ponziani et al., 2012)。將葉酸回補至正常葉酸的 1/10 (0.2mg/kg) 後，體重與攝食量顯著回升，顯示飲食中葉酸濃度對體重與攝食量有重大影響。

六、腺嘌呤餵飼增加飲水量與尿量

文獻指出，腺嘌呤會藉由影響腎小管 AQP2 影響水分再吸收，進而增加尿量 (Atay et al., 2024; M. Zhang et al., 2024)，由小鼠飲水量顯著增加推測小鼠尿量可能增加，造成尿蛋白濃度受到影響。尿蛋白與尿肌酸酐比值可以預測腎絲球過濾率，由於餵飼腺嘌呤會增加小鼠飲水量同時降低體重，造成數據被干擾，故而以飲水量和 baseline 校正，結果顯示 Hfru(ade) 組、Hfru+ade 組 UPCR 顯著高於 Ctrl 組，Hfru-f+ade 組則有趨勢性增加，可能由於小鼠較瘦弱，肌肉組織減少使尿蛋白在 Hfru-f+ade 和 Ctr 組之間無顯著差異，也有可能為單次收取尿液，小鼠每次排尿時間可能不同，尿蛋白或尿肌酸酐濃度不同導致較大的標準差。

七、果糖與葉酸不足對腎臟外觀的影響

，正常飲食下腎臟顏色為鮮紅色，然而，小鼠餵飼腺嘌呤 5 週後停止，給予高果糖飼料，持續 17 週，腎臟外觀呈黃色 (圖 3-5A)，顯示腎臟細胞凋亡與纖維

化 (Diwan et al., 2018)。Hfru+ade 組和 Hfru-f+ade 組餵飼腺嘌呤 22 週後犧牲，發現除了腎臟外觀成黃色，還合併外皮皺縮與空洞的產生，在 Hfru-f+ade 組更加明顯，腎臟纖維化的情況更為嚴重，顯示果糖與葉酸不足會加劇腎臟損傷，可能由於果糖會增加尿酸生成，活化轉錄因子 *Hif1α*，導致細胞缺氧引發纖維化 (Moat et al., 2004)，葉酸代謝物 5-methyl-THF 可直接清除超氧自由基，具抗氧化功能(Kanbay et al., 2023)，可能是導致 Hfru-f+ade 組腎臟外觀劇烈改變的原因。

八、果糖與葉酸不足對腎功能指標的影響

Hfru(ade) 組即使停止餵飼腺嘌呤，改為餵飼高果糖飼料，血清尿素氮仍然顯著高於 Ctrl 組，並維持在 80 mg/dL 左右，腎功能無法回復 (圖 3-5B)，顯示腎臟再生能力受到抑制。BUN 於 Hfru(ade) 組、Hfru+ade 組和 Hfru-f+ade 組三組之間沒有顯著差異，可能由於血清尿素氮與蛋白質攝取量有關，小鼠體重與攝食量差異較大，標準差較大，導致三組之間無顯著差異。考慮到體內肌肉量多寡會影響血清肌酸酐濃度，血清肌酸酐以體重校正，結果顯示，Hfru(ade) 組血清肌酸酐顯著高於 Ctrl 組，Hfru(ade) 組、Hfru+ade 組和 Hfru-f+ade 組血清肌酸酐有依序升高的趨勢，顯示果糖可能加劇體內代謝廢物的累積，而葉酸不足使腎損傷惡化，然而組內標準差較大，導致三組之間沒有顯著差異，可能是因為每隻小鼠對腺嘌呤或對飲食中葉酸耐受性不同導致。與尿蛋白不同，Hfru-f+ade 組尿液 KIM-1 濃度顯著高於 Ctrl 組，而 Hfru(ade) 組和 Hfru+ade 組則顯示趨勢性增加，KIM-1 濃度會因為腎小管缺氧壞死而大量出現 (Chen et al., 2023)，可能是果糖代謝和腺嘌呤代謝物 2,8-DHA 堆積都會造成腎小管缺氧與 ROS 增加，而葉酸不足減少抗氧化能力，造成 Hfru-f+ade 組尿液 Kim-1 濃度顯著升高。



九、果糖與葉酸不足加劇組織病理變化和纖維化

腺嘌呤會造成腎小管管腔擴張、腎小管基底膜增厚、腎小管細胞脫落與萎縮、膠原蛋白沉積顯著增加，鮑氏囊間隙擴張等組織病理變化，與許多研究結果相似 (Klinkhammer et al., 2022)，研究也指出切片結果出現 2,8-DHA 晶體沉積 (Jia et al., 2013)，但本實驗切片結果未觀察到此現象，推測由於放大倍率較低，導致晶體沉積不足以分辨。綜上所述，果糖與葉酸不足可能會降低腺嘌呤餵飼小鼠的腎功能，增加腎臟纖維化，進而加劇腎損傷。





第四章 果糖與葉酸補充對腺嘌呤誘發腎損傷小鼠的影響

第一節 前言

根據葉酸不足實驗研究結果，果糖和葉酸不足會加劇腺嘌呤餵飼小鼠的腎損傷。然而，尚未探討單純餵飼高果糖對小鼠腎功能的影響。前章實驗中，小鼠在前半部分餵飼高油高果糖，後半部分餵飼高果糖，可能導致實驗結果受到不同飲食模式的干擾。另外本研究室先前研究結果顯示 10 倍葉酸補充可以降低高油飲食小鼠血清肌酸酐濃度 (辜，2016)，故本實驗欲探討餵飼高果糖與低葉酸或葉酸補充對小鼠腎功能的影響。

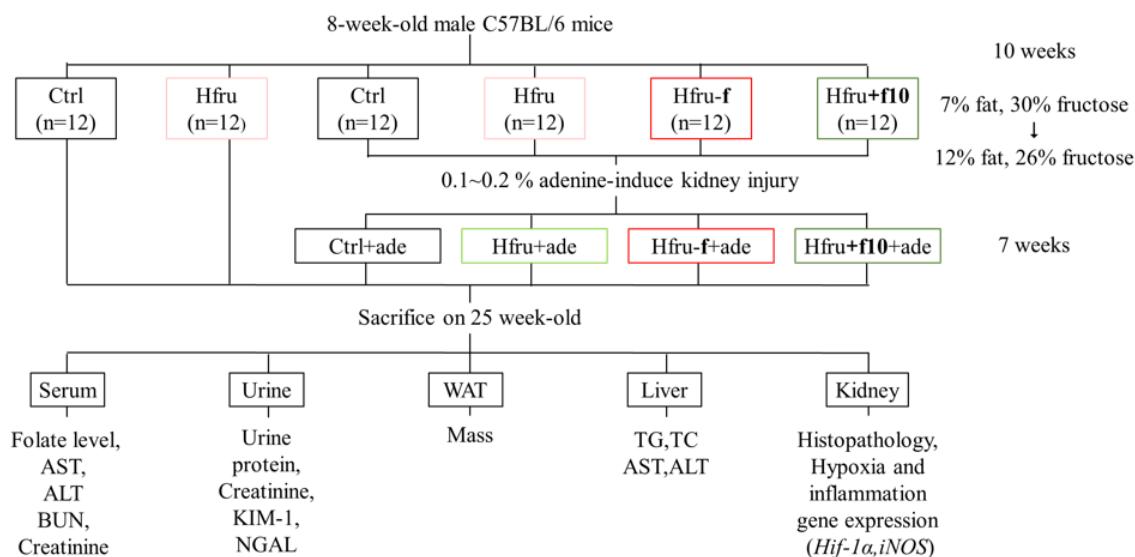


圖 4-1 實驗設計

Fig. 4-1 Experimental design



第二節 材料方法

一、動物飼養

自國家動物中心購入 6 週大的 C57BL/6 雄鼠，分別飼養在塑膠籠中，自由攝取飲水及飼料，動物房溫度控制在 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相對濕度 $55 \pm 10\%$ ，光、暗循環各 12 小時。本研究的動物實驗設計與操作，獲得國立台灣大學實驗動物照護及使用委員會 (IACUC) 審查通過，IACUC 許可編號：NTU-110-EL-00190。小鼠適應環境與 AIN-93 飼料一週後，於 8 週齡隨機分為 6 組，Ctrl 控制組 (Ctrl)、高果糖組 (Hfru)、Ctrl 腺嘌呤組 (Ctrl+ade)、正常葉酸 2mg/kg 之高果糖腺嘌呤組 (Hfru+ade)、含 1/10 倍葉酸 (0.2mg/kg) 之高果糖低葉酸腺嘌呤組 (Hfru-f+ade) 含 10 倍 (20 mg/kg) 高果糖葉酸葉酸補充腺嘌呤組 (Hfru+f10+ade)。每組 12 隻小鼠。Ctrl 組和 Ctrl+ade 組餵飼 AIN-93、其餘四組餵飼高果糖飼料持續 10 週，Ctrl+ade、Hfru+ade、Hfru-f+ade 及 Hfru+f10+ade 於 18 週齡飼料裡加入 Adenine 純物質 (1.5 g/kg) 持續餵飼 7 週，尿蛋白指標升高後，小鼠於 25 週齡犧牲。飼料組成如表 4-1。實驗期間每週紀錄一次體重及飲水量，每三天記錄一次食物攝取量。

二、血液採集與處理

如同第二章材料方法第二部分「血液採集與處理」(p.31)

三、尿液採集與處理

如同第二章材料方法第三部分「尿液採集與處理」(p.30)



表 4-1 飼料成分表

Table 4-1 AIN-93G purified diet composition¹

Ingredient (g/kg)	Ctrl	Hfru	Hfru-f	Hfru+f10
Folic acid (mg)		2	0.2	20
Lard		110	110	110
Soybean oil	70	10	10	10
Fructose		264	264	264
Sucrose	100	100	100	100
Corn starch	529.5	206	206	206
Casein	200	206	206	206
Cellulose	50	51	51	51
AIN-93G Mineral mix	35	37	37	37
AIN-93G Vitamin mix (W/O folic acid)	10	10.5	10.5	10.5
L-Cystine	3	3	3	3
Choline	2.5	2.5	2.5	2.5
Total energy (kcal)	3960	4196	4196	4196
Fat (% kcal)	15.9	25.7	25.7	25.7
CHO (% kcal)	63.6	54.3	54.3	54.3
Protein (% kcal)	20.5	19.9	19.9	19.9

¹ Reeves et al., 1993² 於 ade 組添加 0.1~0.2 % (1~2 g/kg diet) 腺嘌呤純物質(Sigma, A5565)³Folic acid, Casein, Choline (Sigma, F7876, C7078, C1879) ; Lard, AIN-93G Mineral mix, AIN-93G Vitamin mix (MP Biomedicals) ; Soybean oil, Sucrose (Taisugar) ; Fructose (ADM[®]) ; Corn starch (Samyang) ; Cellulose (JRS PHARMA) ; L-Cystine (Wako, Japan).



四、 血清葉酸濃度測定

如同第三章材料方法第四部分「尿液採集與處理」(p.30)

五、 肝功能測定

【材料與試劑】

1. 丙胺酸轉胺酶 (alanine transaminase, ALT) 市售試劑組 (Randox, AL1268)
2. 天門冬胺酸轉胺酶 (aspartate transaminase, AST) 市售試劑組 (Randox, AS1204)

【方法】

將 $20\text{ }\mu\text{L/well}$ 稀釋 10 倍之血清加入至 96well 盤中，再加入 $200\text{ }\mu\text{L/well}$ 的 ALT 或 AST 反應試劑，靜置於室溫反應 1 分鐘後讀取 OD 340，每隔一分鐘重複讀取吸光值。取前兩分鐘之數值帶入公式計算 ALT 與 AST 活性。

換算公式： $1746 \times \text{樣本吸光值 (AOD340/min)} = \text{活性 (U/L)}$

六、 肝臟脂肪測定

【材料與試劑】

1. 組織均質管 (QSP, 520-GRD-Q)：以 121°C 高壓滅菌 30 分鐘備用
2. 均質珠 (BioSpec, 11079125Z)：以 121°C 高壓滅菌 30 分鐘備用
3. NP-40 IGEPAL®CA-630 (Sigma, 56741)：以二次水配成 50 NP-40 Lysis buffer
4. 三酸甘油酯 (triglyceride, TG) 市售試劑組 (Randox, TR213)
5. 總膽固醇 (total cholesterol, TC) 市售試劑組 (Randox, CH201)

【方法】

小鼠犧牲後取 100mg 肝臟組織，加入 1mL NP-40 Lysis buffer 震盪均質，以 100°C 乾浴 10 分鐘使脂肪溶解，肝臟均質液以二次水稀釋 5 倍或 10 倍，以二次水序



列稀釋 TG 或 CHOL 標準品 (濃度 200、100、50、25、12.5、0mg/dL) 樣品與標準品各加 10 μL/well 至 96well 盤中，再加入 250 μL/well 的 TG 或 CHOL 反應試劑，於 37°C 反應 10 分鐘後讀取 OD 520 吸光值代入標準曲線，依所得公式推算樣本中 TG 和 CHOL 的含量。

七、腎功能測定

(一) 血液尿素氮測定

如同第二章材料方法第四部分「腎功能測定」(p.33)

(二) 血清與尿液肌酸酐測定

如同第二章材料方法第四部分「腎功能測定」(p.33)

(三) 尿蛋白與尿液肌酸酐比值測定

如同第二章材料方法第四部分「腎功能測定」(p.33)

(四) 肌酸酐清除率

$Ccr \text{ (ml/min)} = [\text{urinary Cr (mg/dl)} \times \text{urine volume (ml)} \times 1440 / \text{serum Cr (mg/dl)}]$

1440: total number of minutes per day

(五) 尿液中 kidney injury molecular (KIM-1) 檢測

如同第三章材料方法第五部分「腎功能測定」(p.47)

(六) 尿液中 neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) 檢測

【材料與試劑】

1. Mouse Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) ELISA Kit (R&D, MLCN20)
2. Reagent A 與 B: 以 1:1 等比例混和配製
3. RD5-24 Diluent: 將 5× Diluent Concentrate 以 ddH₂O 稀釋 5 倍



4. Wash Solution Concentrate：將 25× Diluent Concentrate 以 ddH₂O 稀釋 25 倍

【方法】

將 50μL RD1-34 反應試劑加入 96well 盤，再將以 RD5-24 Diluent 稀釋後的 50μL/well 標準曲線 (5000、2500、1250、625、312.5、156.3、75.1、0 pg/mL) 和 20× 稀釋的尿液樣品加入 96well 盤室溫培養 2 小時，倒除樣品後，加入 300μL/well 1× wash buffer 倒除 buffer 後敲乾，重複清洗 4 次，將 100μL/well 的 Enzyme Conjugated Detection Antibody 加入 96well 盤室溫培養 2 分小時，清洗 4 次，將 100μL/well reagent A+B solution 加入 96well 盤室溫避光培養 30 分鐘，再加入 100μL/well stop solution 至 96well 盤，讀取 O.D.450，將結果代入標準曲線計算 NGAL 濃度。

八、 腎臟組織切片染色

如同第二章材料方法第五部分「腎臟組織切片染色」(p.34)

九、 腎臟 mRNA 表現量分析

(一) Total RNA 抽取

【材料與試劑】

1. 組織均質管 (QSP, 520-GRD-Q)：以 121°C 高壓滅菌 30 分鐘備用
2. 均質珠 (Next advance, SSUFO35)：以 121°C 高壓滅菌 30 分鐘備用
3. TRIzol™ Reagent (Invitrogen, 15596026)
4. Chloroform (Sigma, C2432)
5. 2-Propanol (Sigma, 19516)
6. 99.9% Alcohol (Bioman Scientific, E23-4L) :



以無菌二次水配製 75% 酒精保存於 -20 度 C

【方法】

取一小塊腎臟放入組織含均質珠的均質管，各管加入 1 mL TRIzol 試劑，靜置於室溫反應 2 分鐘後，各管加入 200 μ L chloroform，振盪均勻後以均質機均質 45 秒後置於冰上冷卻 30 秒，重複步驟兩次使液體呈現粉色乳白狀，靜置於室溫反應 3 分鐘。以 4 度 C、12,000xg 離心 15 分鐘後分為三層，吸取上清液至 RNase free 離心管，加入 400 μ L 2-propanol，反轉搖晃後靜置於冰浴 10 分鐘使 RNA 沉澱。以 4°C，12,000xg 離心 15 分鐘後，移除上清液，各管加入 750 μ L 75% 酒精沖洗，以 4°C，7,500xg 離心 5 分鐘後，移除上清液，重複清洗 1 次，再離心 5 分鐘，移除殘餘液體，將沉澱物置於抽氣櫃風乾，以 55°C 無菌二次水回溶 RNA。

(二) Total RNA 反轉錄成 cDNA

【材料與試劑】

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, 4368813)

- (1) 10x RT buffer : 2 μ L/sample
- (2) 10x Random primer : 2 μ L/sample
- (3) 25x dNTP mix (100 mM) : 0.8 μ L/sample
- (4) MultiScribeTM reverse transcriptase (50 U/ μ L) : 1 μ L/sample

【方法】

以 Thermo, Nano Drop 2000 測量核酸樣本的 OD260 推算 RNA 濃度，OD260/OD230 \geq 1.8 代表 RNA 純度良好。將 10 μ L 濃度為 200 ng/mL 的核酸樣本及反應試劑加入超微量離心管，最後以滅菌二次水將體積定量為 20 μ L，放入 PCR 儀 (Applied Biosystems, 2720 Thermal Cycler) 進行反轉錄反應。25°C 10 分鐘，37°C



120 分鐘，85°C 5 分鐘終止反應，最後維持於 4°C。所得 DNA 儲存於 -80 度 C 冰箱備用。

(三) 即時定量聚合酶連鎖反應 (Q-PCR)

【材料與試劑】

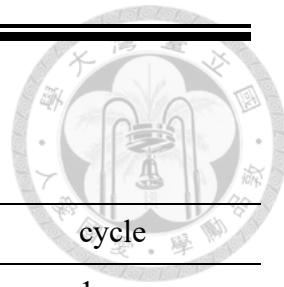
1. Multiplate PCR 96-well Plate (Bio-Rad, MLL9601)
2. Microseal® 'B' Seal (Bio-Rad, MSB1001)
3. Individual PCR Tubes (8-tube strips) (Bio-Rad, ILS0801)
4. iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, 170-8882)

各取 1 μL 完成反轉錄之 CDNA 加入 96 well PCR 反應盤，再加入各 0.5 μL 濃度為 10 μM 的 forward primer 和 reverse primer，另加入 12.5 μL iQ™SYBR Green Supermix 反應試劑，以無菌二次水調整體積至 25 μL。最後將孔盤封膜，放入定量即時聚合酶連鎖反應儀（Bio-Rad, CFX Connecf™ Optics Module）進行基因表現量分析，Q-PCR 反應步驟，並以 GAPDH 作為基因表現量的 internal control。計算公式： $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ 。

表 4-2 本研究使用的引子對

Table 4-2 Primer sets used in this Research

	Forward Primer	Reverse Primer
Gene	5' to 3'	3' to 5'
<i>Hif1α</i>	CTA TGG AGG CCA GAA GAG GGT AT	CCC ACA TCA GGT GGC TCA TAA
<i>iNOS</i>	CCC ACA TCA GGT GGC TCA TAA	CAG GGA CGG GAA CTC CTC TA
<i>Gapdh</i>	GTG AAG GTC GGA GTC AAC GG	CTC CTG GAA GAT GGT GAT GGG

**表 4-3 腎臟 RT-PCR 反應條件****Table 4-3 RT-PCR reaction program**

步驟	反應條件	cycle
Denaturation	95°C , 3 分鐘	1
Annealing	95°C , 10 秒 55°C , 30 秒	39
Extension	95°C , 10 秒	1
Melt curve	從 65°C 開始，每 cycle 上升 0.5°C 直到 95°C	-

十、 統計分析

使用 SPSS 進行統計分析，使用 GraphPad Prism 軟體進行繪圖。實驗結果以 Mean ± SD 表示。以 Student's t test 分析兩組之間顯著差異。與 Ctrl 比較，若^{*}p<0.05 表示有顯著差異。

以 One-way ANOVA 事後以 Duncan's test 進行分析，不同字母表示組間具有顯著差異，a 表示最高值，b 表示次高值，依此類推。



第三節 實驗結果

一、小鼠生長情形

(一) 體重、攝食量與熱量攝取

餵飼期間紀錄小鼠體重變化如（表 4-4），為了加速小鼠體重增長，於小鼠 12 週齡將飼料內油脂含量由 7% 添加豬油至 12%，至小鼠 18 週齡開始餵飼 0.1% 腺嘌呤，然而小鼠體重與攝食量並無變化，根據葉酸不足實驗結果得知體重下降與 BUN 有關，推測為飼料內油脂含量影響腺嘌呤作用，0.1% 腺嘌呤無法在短期內誘發腎損傷，故於小鼠 19 週齡將腺嘌呤劑量調整至 0.2%，由於小鼠體重與攝食量下降過快，於 21 週齡將腺嘌呤劑量調整至 0.15%，小鼠體重下降幅度趨於平緩，攝食量明顯回升。

根據葉酸不足實驗結果，飼料內完全不含葉酸會影響小鼠腸胃道完整性，導致小鼠體重與攝食量下降，故於小鼠 8 週齡實驗開始之初，回補 1/10 劑量的葉酸於 Hfru-f+ade 組小鼠飼料內，然而，四週之後 Hfru-f+ade 組小鼠體重增長幅度仍低於其他組小鼠（表 4-5），研判這批小鼠對葉酸需求量較大，將飼料中葉酸劑量回補為 1/5，小鼠體重上升，攝食量微幅增加，然而於小鼠 23 週齡採血測定血清葉酸，發現小鼠血清葉酸濃度高達 30 ng/mL，遠高於葉酸不足實驗缺葉酸組小鼠葉酸濃度小於 10 ng/mL 的結果，故小鼠 23 週齡之後 Hfru-f+ade 組餵飼完全不含葉酸之高果糖飼料，小鼠體重與攝食量明顯下降。所有小鼠於 25 週齡犧牲。

Ctrl+ade 組熱量攝取顯著較低，Hfru+ade 組顯著最高，低葉酸使 Hfru-f+ade 組熱量攝取顯著降低，而回補 10 倍葉酸能回復小鼠熱量攝取（表 4-6）。



表 4-4 不同飲食配方下小鼠體重變化

Table 4-4 Effects of different diet patterns on body weight among mice.

Group	18 week-old BW (g)	19 week-old BW (g)	20 week-old BW (g)	22 week-old BW (g)
Ctrl	32.6 ± 3.9	33.5 ± 3.2	34.3 ± 3.8	35.5 ± 3.7
Hfru	37.1 ± 4.2*	37.6 ± 4.9*	38.6 ± 5.4*	39.6 ± 6.1*
Ctrl+ade	32.4 ± 2.5 ^c	32.8 ± 3.4 ^b	28.4 ± 3.0 ^b	22.3 ± 1.9 ^b
Hfru+ade	37.3 ± 2.8 ^a	38.5 ± 2.7 ^a	35.0 ± 3.1 ^a	28.8 ± 2.6 ^a
Hfru-f+ade	33.6 ± 4.1 ^{bc}	33.7 ± 4.8 ^b	29.9 ± 4.8 ^b	25.7 ± 3.2 ^c
Hfru+f10+ade	35.4 ± 3.2 ^{ab}	36.9 ± 3.2 ^a	33.9 ± 3.4 ^a	29.3 ± 3.5 ^a

Values were mean ± SD. n=12. *p<0.05 compare to the Ctrl group. Different letters indicate the significant difference (P < 0.05) analyzed using One-way ANOVA, followed by Duncan's post-hoc test.

表 4-5 不同飲食配方下小鼠攝食量變化

Table 4-5 Effects of different diet patterns on food intake among mice.

Group	9 week-old Food intake (g/day)	12 week-old Food intake (g/day)	23week-old Food intake (g/day)	25 week-old Food intake (g/day)
Ctrl	3.1 ± 0.3	3.1 ± 0.3	3.6 ± 0.9	3.1 ± 0.3
Hfru	3.8 ± 0.3*	3.5 ± 0.3*	3.2 ± 0.9	2.8 ± 0.6
Ctrl+ade	2.8 ± 0.1 ^c	3.1 ± 0.1 ^b	2.4 ± 0.6	2.0 ± 0.2 ^a
Hfru+ade	3.6 ± 0.4 ^a	3.8 ± 0.6 ^a	2.1 ± 0.4 ^c	1.9 ± 0.4 ^a
Hfru-f+ade	3.2 ± 0.4 ^b	2.6 ± 0.5 ^c	2.1 ± 0.5 ^c	1.1 ± 0.7
Hfru+f10+ade	3.4 ± 0.4 ^{ab}	3.1 ± 0.3	2.8 ± 1.1 ^a	2.1 ± 0.4 ^a

Values were mean ± SD. n=12. *p<0.05 compare to the Ctrl group. Different letters indicate the significant difference (P < 0.05) analyzed using One-way ANOVA, followed by Duncan's post-hoc test.

表 4-6 不同飲食配方下小鼠熱量攝取變化

Table 4-6 Effects of different diet patterns on energy intake among mice.

Group	Before adenine	After adenine	Total
	Energy intake (g/day)		
Ctrl	12.94 ± 1.70	13.06 ± 2.43	12.95 ± 2.03
Hfru	14.38 ± 0.77*	13.49 ± 1.60	13.99 ± 1.32
Ctrl+ade	11.79 ± 0.29 ^b	9.71 ± 0.60 ^b	10.37 ± 0.41 ^c
Hfru+ade	14.58 ± 1.23 ^a	11.18 ± 1.36 ^a	12.36 ± 1.17 ^a
Hfru-f+ade	13.28 ± 2.00 ^a	10.04 ± 2.15 ^b	10.77 ± 1.74 ^c
Hfru+f10+ade	13.49 ± 2.19 ^a	10.55 ± 1.43 ^{ab}	11.61 ± 1.46 ^{ab}

Values were mean ± SD. n=12. *p<0.05 compare to the Ctrl group. Different letters indicate the significant difference (P < 0.05) analyzed using One-way ANOVA, followed by Duncan's post-hoc test.



(二) 飲水量

葉酸不足實驗相同，餵飼腺嘌呤後，飲水量顯著增加。(表 4-7) 顯示，小鼠 18 週齡餵飼 0.1% 腺嘌呤後，只有 Ctrl+ade 組飲水量顯著增加，其他組沒有顯著變化，給予 0.2% 腺嘌呤後，飲水量顯著上升。

表 4-7 不同腺嘌呤劑量下小鼠飲水量變化

Table 4-7 Effects of different adenine doses on water intake among mice.

Group	9 week-old	19 week-old	20 week-old	22 week-old
	Water intake (ml/week)			
Ctrl	23.12 ± 4.98	26.49 ± 6.90	26.86 ± 7.42	25.91 ± 5.55
Hfru	26.14 ± 8.09	33.25 ± 7.08*	33.25 ± 7.08*	40.88 ± 5.97*
Ctrl+ade	18.26 ± 3.08 ^b	28.85 ± 4.67 [†]	36.34 ± 4.62 [†]	36.27 ± 3.88 ^{b†}
Hfru+ade	26.33 ± 9.20 ^a	30.52 ± 10.84	43.88 ± 6.00 [†]	44.36 ± 3.14 ^{ab†}
Hfru- f +ade	20.66 ± 4.12 ^{ab}	31.00 ± 14.90	38.86 ± 14.99 [†]	41.57 ± 14.00 ^{b†}
Hfru+ f10 +ade	26.22 ± 7.19 ^a	32.89 ± 9.06	44.28 ± 6.79 [†]	50.57 ± 11.85 ^{a†}

Values were mean ± SD. n=12. *p<0.05 compare to the Ctrl group. †p<0.05 compare to 19 week-old. Different letters indicate the significant difference (P < 0.05) analyzed using One-way ANOVA, followed by Duncan's post-hoc test.



二、小鼠組織器官重量

(表 4-8) 絶對重量方面，與 Ctrl+ade、Hfru+ade 及 Hfru+f10+ade 組相比 Hfru-f+ade 組小鼠脾臟及肝臟重量顯著較低。相對重量方面，Hfru-f+ade 組小鼠左腎、心、肺重量顯著較高，脾臟、肝臟重量顯著較低，Hfru+f10+ade 組心臟與肺臟重量顯著低於其他三組，右腎重量在四組之間無顯著差異。

表 4-8 臟器絕對與相對器官重量

Table 4-8 Absolute and relative organ weights.

Group	Kidney	Spleen	Liver
	Absolute weight (g)		
Ctrl	0.19 ± 0.04	0.09 ± 0.01	1.24 ± 0.27
Hfru	0.25 ± 0.12	0.10 ± 0.03	1.36 ± 0.46
Ctrl+ade	0.14 ± 0.04	0.08 ± 0.01 ^a	0.90 ± 0.10 ^a
Hfru+ade	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01 ^a	0.99 ± 0.12 ^a
Hfru-f+ade	0.21 ± 0.25	0.05 ± 0.02 ^b	0.54 ± 0.13 ^b
Hfru+f10+ade	0.12 ± 0.02	0.10 ± 0.02 ^a	1.01 ± 0.15 ^a
Relative weight (%)			
Ctrl	0.53 ± 0.10	0.26 ± 0.07	3.48 ± 0.62
Hfru	0.69 ± 0.40	0.28 ± 0.15	3.84 ± 0.84
Ctrl+ade	0.63 ± 0.19 ^{ab}	0.36 ± 0.05 ^a	4.10 ± 0.37 ^a
Hfru+ade	0.44 ± 0.06 ^b	0.37 ± 0.05 ^a	3.49 ± 1.15 ^{ab}
Hfru-f+ade	1.15 ± 1.43 ^a	0.25 ± 0.10 ^b	2.96 ± 0.66 ^b
Hfru+f10+ade	0.44 ± 0.09 ^b	0.36 ± 0.07 ^a	3.66 ± 0.50 ^a

¹Values were mean ± SD, n=12. *p<0.05 compare to the Ctrl group. Different letters indicate the significant difference (P < 0.05) analyzed using One-way ANOVA, followed by Duncan's post-hoc test.

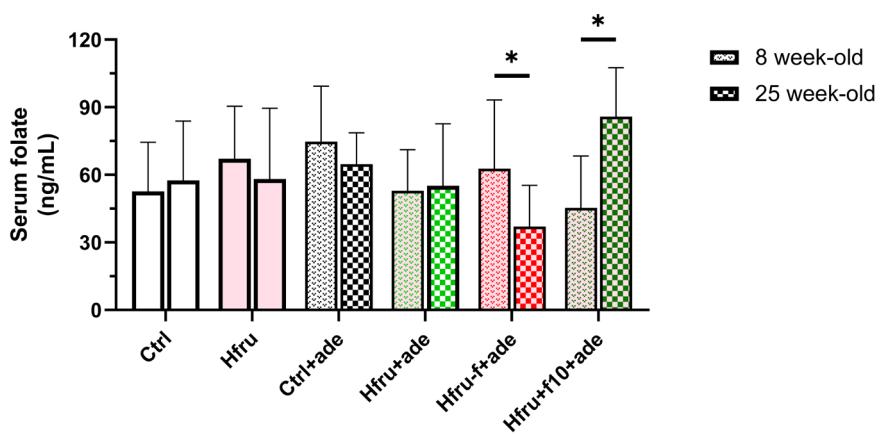
²Relative organ weight(%)=absolute organ weight/body weight ×100%



三、小鼠體內葉酸濃度

Hfru-f+ade 組於 25 週齡犧牲血清葉酸濃度顯著低於 8 週齡，然而並未低於 10 ng/mL (圖 4-4A)。Hfru+f10+ade 組 25 週齡犧牲血清葉酸濃度則顯著高於 8 週齡。血清葉酸濃度反應短期葉酸攝取量，以肝臟葉酸濃度測定長期葉酸攝取量，Hfru-f+ade 組肝臟葉酸含量顯著較低，Hfru+f10+ade 組肝臟葉酸含量趨勢性升高，Ctrl 組與 Hfru 組兩組之間沒有顯著差異 (圖 4-4B)。

(A)



(B)

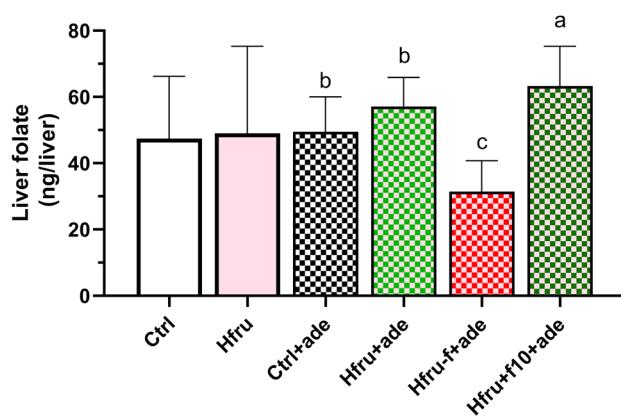


圖 4-2 小鼠血清與肝臟葉酸濃度

Fig. 4-2 Mice (A) serum (B) liver folate concentration.

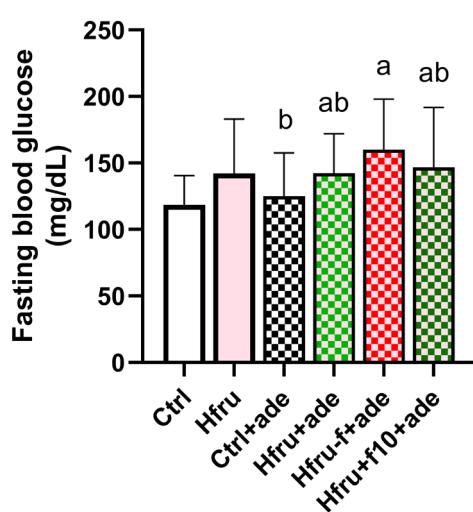
Values were mean \pm SD. * $p < 0.05$ Different letters indicate the significant difference ($P < 0.05$) analyzed using One-way ANOVA, followed by Duncan's post-hoc test.



四、果糖、葉酸與腺嘌呤對小鼠血糖的影響

果糖增加胰島素阻抗，故測定小鼠禁食血糖。小鼠餵飼 AIN-93 或 Hfru、Hfruf、Hfru+f10 持續 10 週，於 18 週齡測定禁食血糖。8 週齡時六組小鼠禁食血糖無顯著差異，與 Ctrl 組相比，18 週齡 Hfru 組禁食血糖有上升的趨勢，與 Ctrl+ade 組相比 Hfru+ade 禁食血糖趨勢性上升，Hfru-f+ade 組禁食血糖顯著升高，Hfru+10+ade 組減緩 Hfru-f+ade 組低葉酸造成的血糖上升（圖 4-5A）。（圖 4-5B）為 25 週齡犧牲尿糖，與 Ctrl 組相比，Hfru 組尿糖顯著升高。與 Hfru+ade 相比，Hfru-f+ade 組尿糖顯著升高，補充 10 倍葉酸的 Hfru+10+ade 組減緩尿糖升高，而 Ctrl+ade 組尿糖濃度顯著低於 Hfru-f+ade 組，Hfru-f+ade 組顯著高於 Hfru+ade 組。表示高果糖與低葉酸使血糖升高。

(A)



(B)

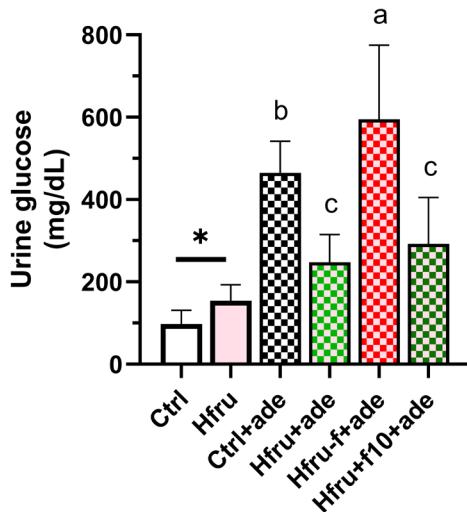


圖 4-3 果糖與葉酸升高小鼠禁食血糖與尿糖

Fig. 4-3 Fructose and folate increase (A) fasting blood glucose and (B) urine glucose in mice. Values were mean \pm SD. n=12. *p<0.05 compare to the Ctrl group. Different letters indicate the significant difference ($P < 0.05$) analyzed using One-way ANOVA, followed by Duncan's post-hoc test.



五、果糖、葉酸與腺嘌呤對小鼠消化道的影響

根據劑量實驗與葉酸不足實驗研究結果顯示腺嘌呤可能會影響胃腸道蠕動進而影響攝食量與體重，根據葉酸不足實驗研究結果顯示低葉酸可能會影響小腸細胞更新而影響小鼠攝食量，故探討果糖與葉酸對腺嘌呤誘發腎損傷小鼠腸胃道的影響，結果顯示，Hfru 組胃殘餘量明顯較 Ctrl 組高，Ctrl+ade 組胃殘餘量明顯最高，而 Hfru+ade 組胃排空情況較 Ctrl+ade 組佳，而 Hfru-f+ade 組胃殘餘量明顯較低，顯示腺嘌呤與低葉酸可能影響食慾與胃排空（圖 4-6 A）。Hfru-f+ade 組小腸長度顯著低於 Ctrl 組，顯示低葉酸降低腸道完整性（圖 4-6 B、C）。

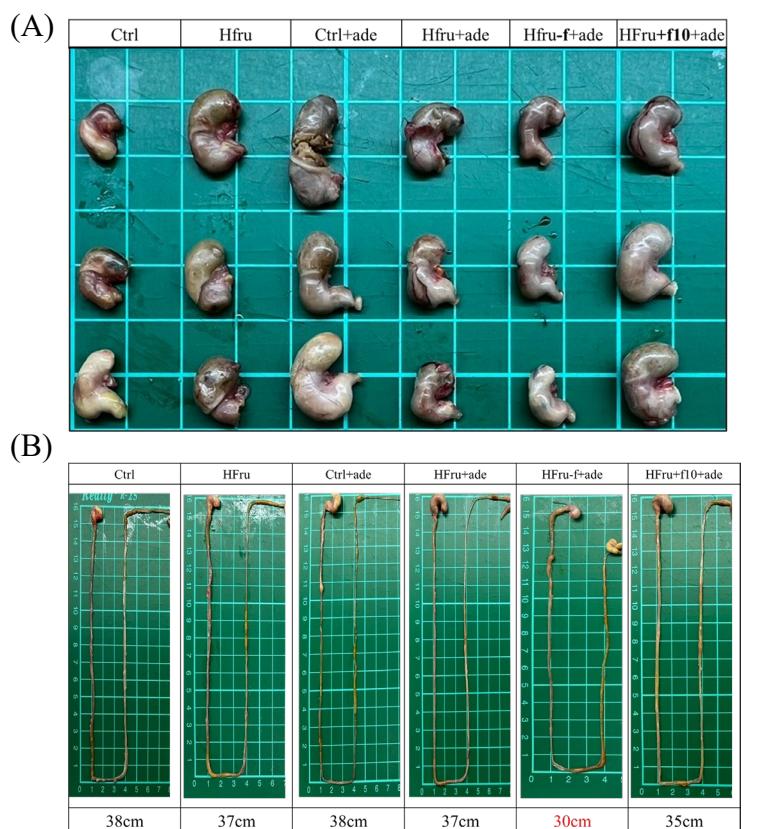


圖 4-4 小鼠(A)胃殘餘量與(B)小腸長度

Fig. 4-4 The representative images of mouse (A)stomach and (B)small intestine length. Values were mean \pm SD. * $p<0.05$ Different letters indicate the significant difference ($P < 0.05$) analyzed using One-way ANOVA, followed by Duncan's post-hoc test.



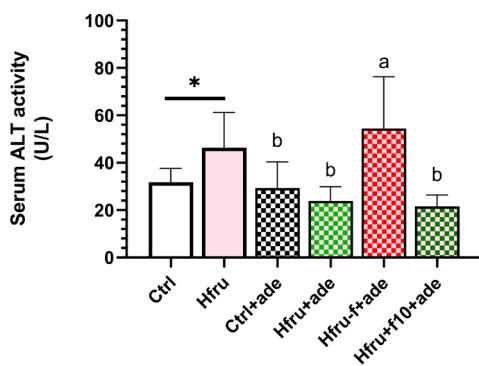
六、果糖、葉酸與腺嘌呤對小鼠肝功能的影響

(圖 4-7A) 為小鼠肝臟照片，由左到右依肝臟重量排序，與 Ctrl 組相比，Hfru 組肝臟體積明顯較大，顏色較黃，而 Hfru-f+ade 組肝臟體積明顯較小，顏色較黑。測定小鼠肝功能，與 Ctrl 組相比，Hfru 組血清 ALT 濃度顯著增加，血清 AST 則沒有顯著差異，顯示果糖可能損害肝功能。Hfru-f+ade 組血清 ALT 和 AST 濃度均顯著高於其他組，顯示低葉酸加劇肝功能損傷 (圖 4-7B、C)。

(A)



(B)



(C)

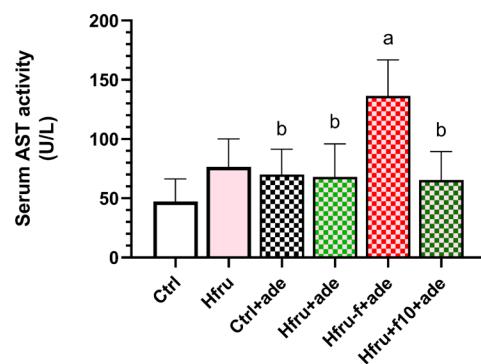


圖 4-5 果糖與低葉酸降低小鼠肝功能

Fig. 4-5 Effects of fructose and folate on liver function among adenine-induced kidney injury murine model. (A)The representative images of liver (B) serum ALT activity (C) serum AST activity. Values were mean \pm SD. n=12.* $p<0.05$ compare to the Ctrl group. Different letters indicate the significant difference ($P < 0.05$) analyzed using One-way ANOVA, followed by Duncan's post-hoc test.



七、果糖、葉酸與腺嘌呤對小鼠脂肪堆積的影響

果糖由肝臟代謝，由於不受胰島素抑制，容易引起脂肪堆積，小鼠犧牲後取主要白色脂肪組織副臍脂肪(eWAT) 與腎周脂肪(rWAT)，副臍脂肪相對重量於 Hfru 組與 Ctrl 組兩組之間無顯著差異，Hfru+**f10+ade** 組相對重量顯著高於 Ctrl+ade 組，Hfru-**f+ade** 組小鼠幾乎沒有副臍脂肪，導致數據無法比較 (表 4- 5)。腎周脂肪相對重量於 Hfru 組與 Ctrl 組兩組之間無顯著差異，Hfru+**f10+ade** 組腎周脂肪顯著高於 Ctrl+ade 組。小鼠副臍脂肪照片顯示，Hfru 組與 Ctrl 組脂肪組織大小幾乎相同，Hfru+ade 組與 Hfru+**f10+ade** 組肪組織大小幾乎相同，Ctrl+ade 組明顯小於其他組，Hfru-**f+ade** 組脂肪組織幾乎不可見 (圖 4- 8A)。Hfru 組肝臟總膽固醇與三酸甘油脂均顯著高於 Ctrl 組，顯示果糖增加肝臟脂肪堆積。Ctrl+ade 組、Hfru+ade 組、Hfru-**f+ade** 和 Hfru+**f10+ade** 組四組相比，Ctrl+ade 組肝臟重與三酸甘油脂顯著較高，總膽固醇顯著較低，Hfru-**f+ade** 組肝臟重量、肝臟總膽固醇與三酸甘油脂均顯著低於 Hfru+ade 組， Hfru+**f10+ade** 組肝臟重量與脂肪含量回升 (圖 4- 8B、C、D)。顯示腺嘌呤會干擾脂肪代謝，低葉酸加劇脂肪代謝異常，補充葉酸能減緩脂肪異常代謝的情況。

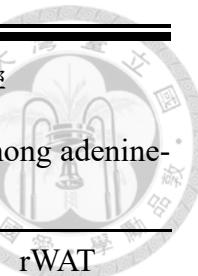


表 4-9 果糖與葉酸對腺嘌呤誘發腎損傷小鼠白色脂肪組織重量的影響

Table 4-9 Effects of fructose and folate on white adipose tissue weight among adenine-induced kidney injury murine model.

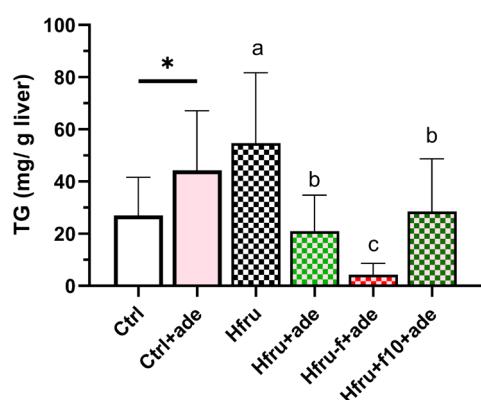
Group	eWAT	eWAT	rWAT	rWAT
	Absolute weight (g)	Relative weight (%)	Absolute weight (g)	Relative weight (%)
Ctrl	1.55 ± 0.57	4.24 ± 1.29	0.70 ± 0.27	1.90 ± 0.62
Hfru	2.02 ± 0.29*	4.20 ± 2.07	0.81 ± 0.37	2.02 ± 0.85
Ctrl+ade	0.47 ± 0.56	2.11 ± 2.48	0.07 ± 0.04 ^b	0.33 ± 0.16 ^b
Hfru+ade	0.37 ± 0.16	1.26 ± 0.63	0.09 ± 0.04 ^b	0.32 ± 0.13 ^b
Hfru-f+ade			0.01 ± 0.01 ^b	0.04 ± 0.05 ^b
Hfru+f10+ade	0.55 ± 0.44	1.88 ± 1.29	0.21 ± 0.17 ^a	0.63 ± 0.52 ^a

Values were mean ± SD. n=12. *p<0.05 compare to the Ctrl group. Different letters indicate the significant difference (P < 0.05) analyzed using One-way ANOVA, followed by Duncan's post-hoc test.

(A)



(B)



(C)

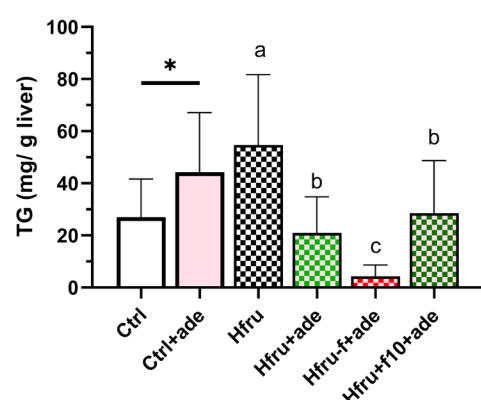


圖 4-6 果糖與葉酸對腺嘌呤誘發腎損傷小鼠體脂肪與肝臟脂肪的影響

Fig. 4-6 Effects of fructose and folate on (A) eWAT fat pad (B)liver total cholesterol (C) liver total triglyceride among adenine-induced kidney injury murine model. Values were mean ± SD. n=12. *p<0.05 compare to the Ctrl group. Different letters indicate the significant difference (P < 0.05) analyzed using One-way ANOVA, followed by Duncan's post-hoc test.



八、果糖、葉酸與腺嘌呤對小鼠腎臟的影響

(一) 腎功能

小鼠犧牲後測定腎功能，血清尿素氮濃度顯示，Ctrl 組與 Hfru 組兩組之間沒有顯著差異，Ctrl+ade 組濃度顯著高於 Hfru+ade 組，低葉酸使血清尿素氮顯著升高，補充 10 倍葉酸顯著降低血清尿素氮（圖 4-9A）。血清肌酸酐濃度顯示，Hfru 組顯著高於 Ctrl 組，Ctrl+ade 組、Hfru+ade 組、Hfru+f+ade 組三組之間沒有顯著差異，Hfru+f10+ade 血清肌酸酐濃度顯著降低（圖 4-9B）。由於血清肌酸酐與尿素氮會被蛋白質攝取量與肌肉量影響，故以肌酸酐清除率計算以判斷腎功能，Hfru 組肌酸酐清除率顯著低於 Ctrl 組，與 Hfru+ade 組相比，Ctrl+ade 組肌酸酐清除率顯著降低，低葉酸有趨勢性的降低，補充 10 倍葉酸則有回升的趨勢（圖 4-9C）。24 小時尿蛋白濃度，果糖顯著增加尿蛋白濃度，Ctrl+ade 組和 Hfru+ade 組兩組之間沒有顯著差異，低葉酸使尿蛋白濃度顯著升高，補充 10 倍葉酸顯著降低尿蛋白濃度（圖 4-9D）。Kim-1 可作為腎小管損傷的指標，然而，Hfru 與 Ctrl 兩組之間沒有顯著差異，Ctrl+ade 組尿液 Kim-1 有高於 Hfru+ade 組的趨勢，低葉酸尿液 Kim-1 趨勢性增加，補充 10 倍葉酸有降低的趨勢（圖 4-9E）。尿液 NGAL 於腎臟細胞凋亡會增加，與 Ctrl 組相比，Hfru 組尿 NGAL 有升高的趨勢，與 Hfru+ade 組相比，Ctrl+ade 組尿 NGAL 趨勢性增加，低葉酸顯著升高尿 NGAL 濃度，補充 10 倍葉酸能趨勢性降低尿 NGAL 濃度（圖 4-9F）。

以上結果顯示，果糖會損害腎臟功能，腺嘌呤誘發腎損傷模式下，低油飲食誘發更嚴重的腎損傷，低葉酸會加劇腎損傷，補充 10 倍葉酸可以降低果糖和腺嘌呤對腎的危害。

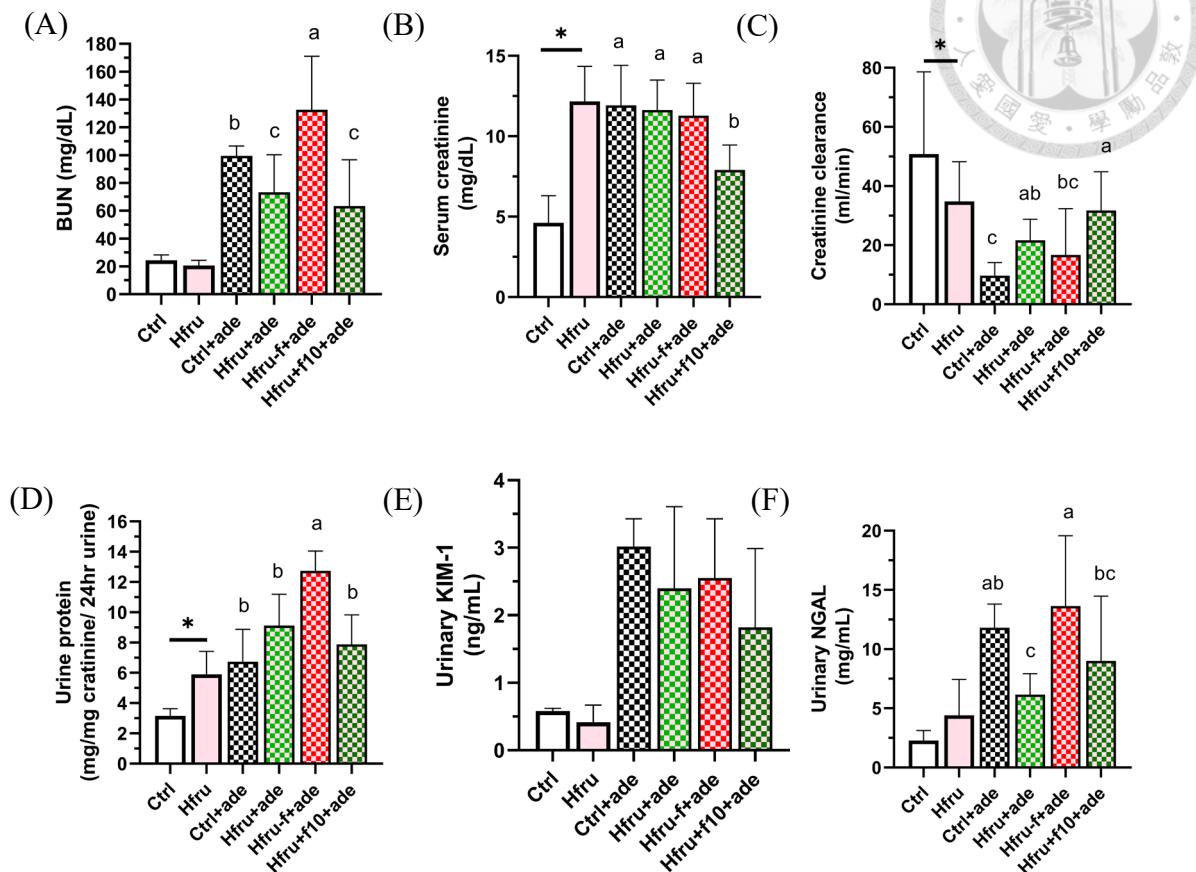


圖 4-7 果糖與葉酸對腺嘌呤誘發腎損傷小鼠腎功能指標的影響

Fig. 4-7 Effects of fructose and folate on kidney function among adenine-induced kidney injury murine model. (A)BUN, (B) serum creatinine, (C) creatinine clearance, (D) 24hr urine protein, (E) urinary Kim-1, (F) urinary NGAL. Values were mean ± SD. n=12. *p<0.05 compare to the Ctrl group. Different letters indicate the significant difference (P < 0.05) analyzed using One-way ANOVA, followed by Duncan's post-hoc test.

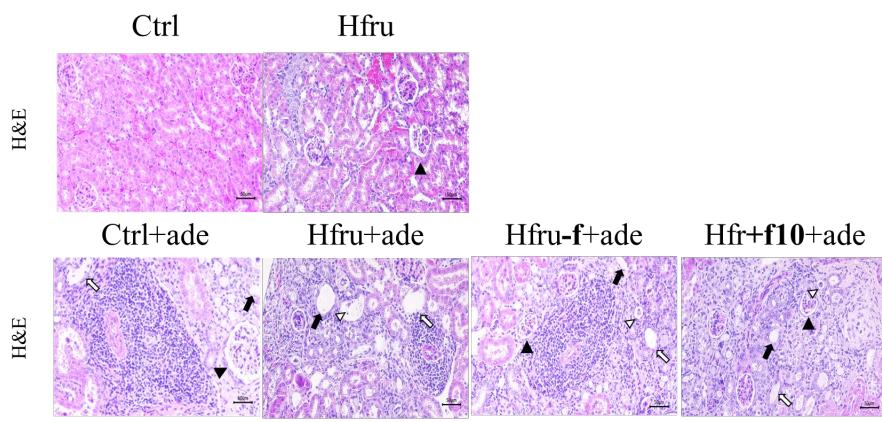


(二) 腎纖維化程度

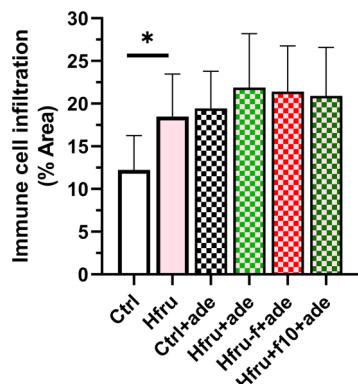
2,8-DHA 引起小鼠腎臟纖維化進而造成腎功能損傷，以 H&E 染色判定免疫細胞浸潤與組織病理變化，餵飼腺嘌呤四組小鼠腎臟切片藍色免疫細胞浸潤明顯較高，組織病理變化部分 Hfru 組僅出現鮑氏囊增厚情形，餵飼腺嘌呤四組小鼠除鮑氏囊增厚還出現腎小管擴張、腎小管上皮損失等病理變化（圖 4-10A），腎臟免疫細胞浸潤面積定量圖顯示 Hfru 組細胞浸潤面積顯著高於 Ctrl 組（圖 4-10B）。

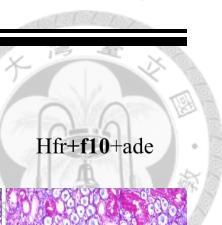
以 Masson's trichrome 染色測定小鼠腎臟纖維化程度，藍色部分代表膠原蛋白面積顯示餵飼腺嘌呤四組腎小管與腎絲球藍色纖維化面積明顯較高。（圖 4-10C）。腎小管纖維化面積定量圖顯示與 Hfru+ade 組相比，Ctrl+ade 組腎纖維化面積有增加的趨勢，低葉酸顯著增加腎纖維化，補充 10 倍葉酸腎纖維化面積則顯著下降（圖 4-10D）。

(A)

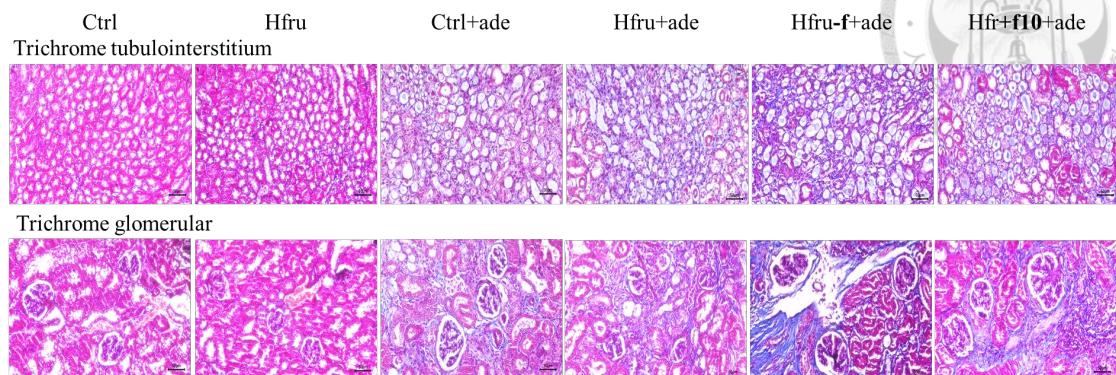


(B)





(C)



(D)

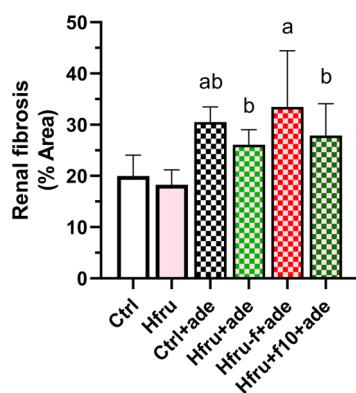


圖 4-8 小鼠腎纖維化面積與組織病理變化

Fig. 4-8 Effects of fructose and folate on fibrosis area and histopathological changes among adenine-induced kidney injury murine model. The representative images of (A) H&E-stained kidney (cortex, 200x). Renal histology showed deposition of dilated tubules (white arrow), tubular epithelial loss (black arrow) and dilated Bowman's space (black triangle). (B) Trichrome-stained kidney (tubulointerstitium, 200x; upper panel) and trichrome-stained kidney (cortex, 200x; lower panel), scale bar, 50 μ m. (C) The quantification of immune cell renal fibrosis area from adenine induced kidney injury murine model.



(三) 腎臟缺氧與發炎相關基因表現

果糖與腺嘌呤都會造成缺氧與發炎，故測定 *Hif1α* 和 *iNOS* 基因表現，與 Hfru+ade 組相比，Ctrl+ade 組 *Hif1α* 和 *iNOS* 基因表現均趨勢性較低，低葉酸 Hfru 和 *iNOS* 基因表現有較高的趨勢，補充 10 倍葉酸趨勢性降低 *Hif1α* 和 *iNOS* 基因表現（圖 4-11），顯示低葉酸增加腎臟缺氧，補充 10 倍葉酸可以減緩腎臟缺氧情況。

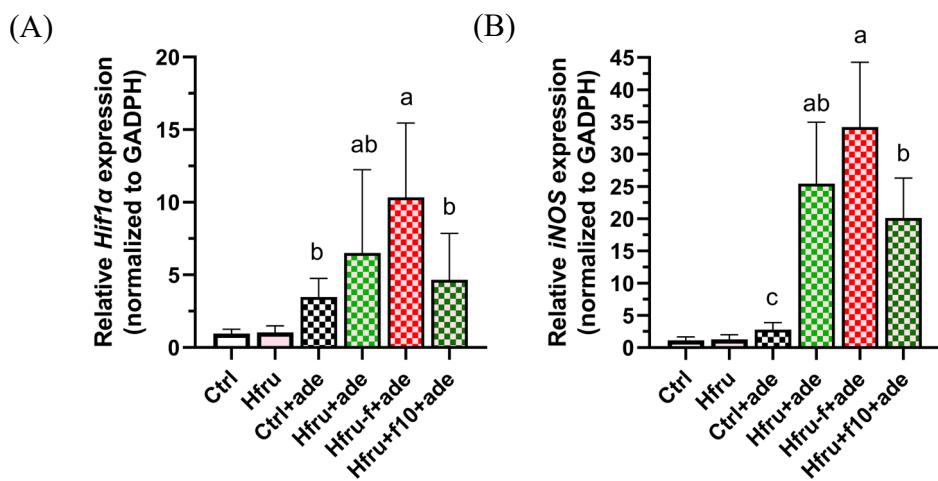


圖 4-9 缺氧與發炎相關基因表現

Fig. 4-9 Effects of fructose and folate on hypoxia and inflammation gene expression among adenine-induced kidney injury murine model. Values were mean \pm SD. n=12.
 *p<0.05 compare to the Ctrl group. Different letters indicate the significant difference (P < 0.05) analyzed using One-way ANOVA, followed by Duncan's post-hoc test.



第四節 討論

一、果糖與葉酸對小鼠生長情形的影響

本研究為探討果糖對小鼠腎功能的影響，餵飼高果糖飼料，為模彷台灣民眾飲食型態，高果糖飼料依高果糖糖漿比例 55%果糖與 45%葡萄糖配製，每公斤飼料含 26% 的果糖，另額外添加 11% 的豬油，實驗結果顯示儘管熱量攝取沒有顯著差異，Hfru 組體重仍顯著高於 Ctrl 組。小鼠於 18 週齡餵飼 0.1% (1g/kg) 腺嘌呤，根據前章研究結果，體重與 BUN 濃度有關，一週後小鼠體重沒有顯著變化，推測為每批小鼠適應腺嘌呤程度不同，故加重劑量至 0.2%，小鼠體重與攝食量明顯降低，為避免小鼠體重下降太快，於 21 週齡將劑量改為 0.15%。與葉酸不足實驗結果相同，小鼠於 25 週齡犧牲後體重與攝食量顯著降低，Ctrl+ade 組下降幅度最大，推測高果糖飼料適口性較佳，掩蓋腺嘌呤的氣味，減緩小鼠體重與攝食量降低。高果糖三組相比，低葉酸會增加小鼠體重下降幅度，補充 10 倍葉酸則可以使體重下降幅度減緩。前章研究結果顯示低葉酸會使小鼠體重增加速率減慢、攝食量降低，故於實驗開始時回補 1/10 濃度的葉酸至 Hfru-f+ade 組小鼠飼料中，然而四週後小鼠體重增漲幅度與攝食量仍然降低，推測為每批小鼠體內葉酸儲存量不同，回補葉酸至 1/5 濃度後小鼠體重上升速率與攝食量明顯回復。Hfru 組飲水量顯著高於 Ctrl 組，研究顯示，果糖可能增加抗利尿激素分泌而增加飲水量 (Student et al., 2022)。與前章研究結果相同，餵飼腺嘌呤後飲水量顯著升高，可能由於影響腎臟 AQP2 而降低腎臟水分再吸收(Atay et al., 2024; M. Zhang et al., 2024)。

二、葉酸與腺嘌呤對小鼠器官重量的影響

腺嘌呤使腎臟肥大可能是透過刺激 mTOR activity 增加腎臟細胞纖維化 (Sharma et al., 2023)，造成腎臟重量增加，另外有研究指出，腺嘌呤可能透過腸道代謝物 trimethylamine N-oxide (TMAO)使心臟重量增加引起心臟肥大 (Zhang et



al., 2021)，而低葉酸會增加血清同半胱胺酸的濃度，高同半胱胺酸血症會顯著增加心臟肥大，補充葉酸可以減緩症狀 (Deng et al., 2022)，顯示葉酸與腺嘌呤在心血管疾病進程中也扮演重要角色。

三、飲食葉酸對小鼠體內葉酸濃度的影響

由於前章研究結果顯示飼料中完全缺乏葉酸使小鼠體重與攝食量降低，故本次實驗之初於小鼠 8 週齡回補至 1/10 葉酸，然而四週後小鼠攝食量仍然降低，故回補至 1/5 葉酸，然而 Hfru-f+ade 組小鼠血清葉酸顯著高於前章研究結果，故 Hfru-f+ade 組改為餵飼完全不含葉酸飼料，由於體內 50% 葉酸儲存於肝臟，代表長期葉酸營養狀況，故測定肝臟葉酸含量，Hfru-f+ad 組肝臟葉酸顯著較低，Hfru+f10+ade 組肝臟葉酸趨勢性上升，測定犧牲血清葉酸濃度顯示，Hfru-f+ade 小鼠體重、攝食量、腎功能均低於其他組別，顯示葉酸確實不足加劇小鼠腎損傷。

四、果糖對小鼠禁食血糖與尿糖的影響

研究指出，果糖會增加胰島素阻抗 (Jung et al., 2022)，故測定禁食血糖，然而，Hfru 組與 Ctrl 組兩組禁食血糖無顯著差異，由腺嘌呤餵飼四組小鼠判斷，餵飼高果糖可以使血糖升高。推測為標準差過大造成誤差，故測定尿糖，然而，由於腎損傷會影響腎小管葡萄糖再吸收 (Ormonde et al., 2021)，腎損傷情況下尿糖會增加，由絕對值判斷，Ctrl 組禁食血糖與尿糖均約為 150 mg/dL，Hfru 組禁食血糖約為 160 mg/dL，尿糖卻約為 180 mg/dL，可判斷尿糖濃度受腎功能影響。另外，尿糖濃度與尿 NGAL 呈正相關，故推測 Hfru 組尿糖升高的原因為腎小管無法再吸收葡萄糖導致。研究指出，果糖透過肝臟脂肪堆積，引起胰島素阻抗，最後引發第二型糖尿病 (Jung et al., 2022)，果糖本身並不會增加空腹血糖 (Song et al., 2021)，推測由於高果糖餵飼時間不夠長，小鼠未發展至胰島素阻抗，造成 Hfru 與 Ctrl 兩組禁食血糖無顯著差異。給予腺嘌呤誘發腎損傷的四組小鼠血糖顯著上升，可能與腺



嘌呤代謝物 5'-AMP 有關。研究指出，注射 5'-AMP 會使小鼠出現高血糖，5'-AMP 會活化 G-6-Pase 增加肝醣分解，導致高血糖 (Yang et al., 2019)。此外，高果糖低葉酸合併給予腺嘌呤會使小鼠空腹血糖顯著上升，可能由於低葉酸增加胰島細胞氧化壓力，降低胰島素分泌，使肝醣合成降低，低葉酸與腺嘌呤加乘作用使血糖升高。

五、果糖、葉酸與腺嘌呤對肝功能的影響

ALT 與 AST 在肝受損時會釋出至血液中，Hfru 組僅 ALT 顯著高於 Ctrl，研究指出，ALT 是肝細胞損傷更專一性的指標 (Kalas et al., 2021)，顯示 Hfru 組肝功能受高果糖餵飼損害，Hfru-f+ade 組 AST 和 ALT 均顯著高於其他組，推測果糖可能增加肝臟氧化壓力，低葉酸加劇肝臟氧化壓力使肝功能受損 (Muriel et al., 2021)。

六、果糖增加小鼠肝臟脂肪堆積

Hfru 組小鼠白色脂肪與 Ctrl 組無顯著差異，肝臟總膽固醇與三酸甘油脂含量均顯著高於 Ctrl 組，研究顯示，果糖吸收後會直接被送至肝臟代謝，並且肝臟會代謝 70% 的果糖，多餘的果糖才會被運送至其他組織(Hernández-Díazcouder et al., 2019)，推測本實驗果糖濃度較低 (通常使用果糖 60% w/w，本研究使用 26% w/w) (Flisiński et al., 2022) 不足以增加小鼠白色脂肪堆積。與 Hfru+ade 組相比，Ctrl+ade 組肝臟總膽固醇顯著較低，而三酸甘油脂顯著較高，可能是腎損傷造成蛋白質營養不良，導致肝臟無法製造脂蛋白運送脂肪，導致三酸甘油脂在肝臟累積，Hfru-f+ade 組不論是肝臟總膽固醇或是三酸甘油脂均顯著較低，推測由於攝食量降低，導致脂肪儲存降低，而補充 10 被葉酸能回復攝食量，使肝臟脂肪堆積增加。



七、果糖與葉酸對腎功能與腎纖維化的影響

Hfru 組腎臟 H&E 染色 Hfru 組出現鮑氏囊擴張，血清肌酸酐和尿蛋白顯著高於 Ctrl 組，肌酸酐清除率顯著低於 Ctrl 組，血清尿素氮與 Kim-1 則沒有顯著差異，顯示果糖損害腎臟腎絲球足細胞完整性與過濾功能，不造成腎小管缺氧損傷。腎臟 NGAL 與尿糖濃度顯著正相關，代表果糖對腎小管的危害可能是影響葡萄糖再吸收與 ferroptosis. Ctrl+ade 組腎損傷所有指標都較 Hfru+ade 嚴重，顯示高果糖飼料內 12% (w/w)的油脂含量仍然干擾腺嘌呤誘發腎損傷的作用，推測需使用更高劑量並依照小鼠體重變化調整餵飼時間與濃度，方能建立更完整的腺嘌呤誘發腎損傷模式 (Wollenhaupt et al., 2022)。與 Hfru+ade 組相比，所有腎功能指標均顯示 Hfru-f+ade 組顯著增加，肌酸酐清除率顯著降低，而 Hfru+f10+ade 組顯著降低血清肌酸酐，並顯著增加肌酸酐清除率。文獻指出，2,8 -DHA 晶體會阻塞腎小管，造成腎臟缺氧 (Yang et al., 2024)。與腎功能指標結果相似，低葉酸導致缺氧基因 *Hif1α* 基因表現趨勢性較高，補充 10 倍葉酸降低 *Hif1α* 基因表現，然而，與 Hfru+ade 組相比，Ctrl+ade 組 *Hif1α* 基因表現有較低的趨勢，推測果糖代謝產生尿酸，增加腎臟氧化壓力，加劇腎臟缺氧 (Johnson et al., 2023)。顯示低葉酸會加劇腎損傷，補充 10 倍葉酸對腎有保護作用。



第五章 綜合討論與結論

第一節 綜合討論

首先預實驗建立腺嘌呤誘發小鼠腎損傷模式，使用 28 週齡 C57BL/6 小鼠餵飼 Ctrl 飼料並分別給予 0.1% 或 0.15% 腺嘌呤，體重、攝食量、腎功能顯著下降，實驗使用 7 週齡小鼠分別餵飼 AIN-93 或高油高果糖飼料 15 週後給予 0.1% 腺嘌呤，與預實驗小鼠相同，AIN-93 飼飼組體重、攝食量、腎功能顯著下降，然而，高油高果糖組體重、攝食量與腎功能均沒有顯著變化，改為餵飼高果糖合併 0.1% 腺嘌呤飼料後，小鼠體重、攝食量、腎功能顯著下降，顯示飲食脂肪可能影響腺嘌呤誘發小鼠腎損傷。第四章實驗使用 8 週齡小鼠分別餵飼 AIN-93 或高果糖飼料 10 週後給予 0.1% 腺嘌呤，然而，不論是餵飼 AIN-93 或是高果糖，體重、攝食量與腎功能均沒有顯著變化，直到給予 0.2% 腺嘌呤小鼠體重顯著下降。

一、葉酸與腺嘌呤代謝相互作用

葉酸的生理功能為參與單碳代謝，在嘌呤及嘧啶合成、甲基化、同半胱胺酸代謝、穀胱甘肽還原中扮演重要角色。葉酸缺乏會降低體內 tetrahydrofolate 濃度，降低嘌呤與嘧啶合成，導致細胞核苷酸濃度下降 (Ebara, 2017)。本研究使用高劑量腺嘌呤誘發小鼠腎損傷，不過，腺嘌呤的補充可能有助於緩解因葉酸缺乏而受到抑制的嘌呤合成，細胞更新得以繼續，遮蔽葉酸缺乏的影響 (Sanderson et al., 2019)。

然而，本研究實驗結果顯示，葉酸缺乏會加劇腺嘌呤誘發腎損傷小鼠腎功能指標、腎臟纖維化面積以及腎臟缺氧與發炎相關基因表現增加，表示即使腺嘌呤補充對嘌呤合成有幫助，仍然無法回復葉酸缺乏導致的嘧啶合成、甲基化、同半胱胺酸代謝、穀胱甘肽還原損傷，不足以防止腎臟損傷的進一步進展。



二、飲食葉酸對體內葉酸含量的影響

本研究室先前研究指出，於缺葉酸飼料補充 1/10 葉酸 (0.2 mg/kg)可以維持小鼠體重與攝食量 (Chan and Lin, 2023)。葉酸不足實驗 Hfru-f+ade 組飼料內完全缺乏葉酸四週後，小鼠體重、攝食量下降，補充 1/10 葉酸後，小鼠體重與攝食量回復正常，犧牲後測定小鼠血清葉酸濃度約為 10 ng/mL。然而，為避免小鼠體重、攝食量減輕，葉酸補充實驗開始之初給予 Hfru-f+ade 組小鼠 1/10 葉酸，四週後小鼠體重、攝食量仍然下降，補充至 1/5 葉酸小鼠體重與攝食量回復正常，11 週後測定小鼠血清葉酸為 30ng/mL，給予完全葉酸缺乏飼料 3 週，犧牲後測定小鼠血清、肝臟葉酸濃度均約為 30 ng/mL，仍顯著高於葉酸不足實驗小鼠血清葉酸濃度，推測為葉酸給予劑量太高，導致血清葉酸較高，由葉酸不足實驗小鼠四週後體重降低與本章研究結果判斷飲食中葉酸濃度至少需一個月才能影響血清葉酸，然而，兩實驗小鼠體內葉酸濃度雖不同，但腎功能均顯著低於其他組小鼠，顯示血清葉酸顯著低於其他組別就會顯著影響腎功能。

三、飲食因子影響腺嘌呤誘發腎損傷可能的原因

(一) 脂肪

葉酸不足實驗餵飼高油高果糖合併 0.1% 腺嘌呤飼料兩組小鼠體重、攝食量與腎功能均沒有顯著變化，改為餵飼高果糖合併 0.1% 腺嘌呤飼料後，小鼠體重、攝食量、腎功能顯著下降，推測高脂飲食會改變腸道菌叢，使體內黃嘌呤濃度增加 (Wei et al., 2021)，競爭抑制黃嘌呤去氫酶，抑制腺嘌呤往下代謝為 8-hydroxyadenine，抑制 2,8-DHA 形成，導致無法誘發腎損傷。葉酸補充實驗 Ctrl+ade 組腎功能較 Hfru+ade 組低，推測為高果糖飼料內比 AIN-93 飼料多了 5% (w/w)的豬油，也可能造成小鼠代謝改變，使腎功能受到影響。



(二) 果糖

葉酸補充實驗 Hfru 組小鼠出現飲水量、尿蛋白增加、肌酸酐清除率下降等情形，研究指出，果糖會活化 RAAS 系統，增加飲水量與腎小管的離子交換，進而增加血管內鈉和水分，造成腎臟高血壓 (Xu et al., 2021)。果糖代謝也會造成粒線體氧化磷酸化減少，造成腎臟缺氧與纖維化 (Kanbay et al., 2023)。果糖引起的胰島素阻抗會增加血糖升高，內源性果糖產生增加，腎內巨噬細胞黏附，導致腎小管產生發炎反應而損傷 (Nakagawa & Kang, 2021)，綜上所述，果糖透過多種原因造成腎損傷。

(三) 葉酸

腎臟作為高血流灌注的器官，血管疾病與氧化壓力均會對腎臟健康造成重大影響，葉酸參與體內單碳代謝與 DNA 合成，葉酸代謝物 5-methyl-THF 可直接清除超氧自由基，具抗氧化功能(Kanbay et al., 2023)，低葉酸會增加血清同半胱胺酸濃度、增加腎臟發炎與纖維化。葉酸不足實驗與葉酸補充實驗 Hfru-**f+ade** 組腎功能均顯著低於 Hfru+ade 組，然而，葉酸不足實驗 Hfru-**f+ade** 組小鼠腎臟切片顯示出更加明顯的腎小管管腔擴張、腎小管基底膜增厚以及腎小管細胞脫落與萎縮，推測為葉酸不足實驗 Hfru-**f+ade** 組小鼠葉酸攝取不足的時間較長，血清葉酸濃度更低，造成更加嚴重的腎小管損傷。葉酸補充實驗實驗 Hfru+**f10+ade** 組腎功能顯著優於 Hfru-**f+ade** 組，顯示補充葉酸能回復腺嘌呤誘發的腎損傷。



第二節 結論

本研究結果發現，Hfru 組體重與肝臟脂肪比控制組顯著較高，餵飼腺嘌呤組的體重皆比控制組顯著較低，飲水量與胃殘餘量顯著較高，Hfru-f+ade 組腎臟外觀變化、血清尿素氮、血清肌酸酐、尿蛋白、尿腎損傷分子-1 (KIM-1)、NGAL、腎纖維化區域、免疫細胞浸潤以及缺氧與發炎相關基因 *Hif1α*、*iNOS* 表現顯著增加，肌酸酐清除顯示顯著降低，而補充葉酸能顯著降低血清肌酸酐及顯著增加肌酸酐清除率，顯示高果糖會增加肝脂肪堆積造成肥胖，低葉酸會透過增加纖維化加劇腎損傷，葉酸補充能有效減緩腎臟損傷。

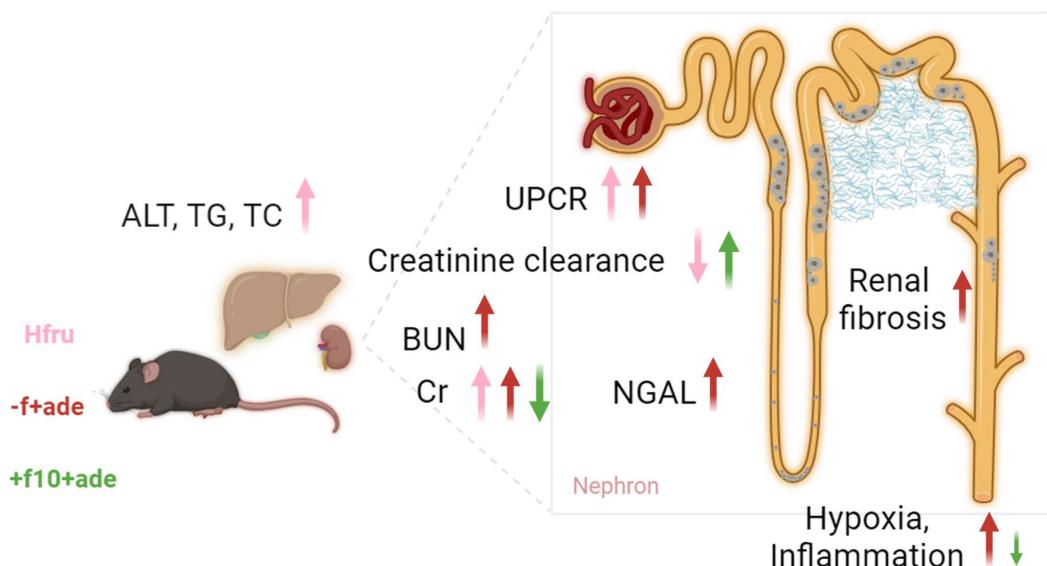


圖 5-1 果糖與葉酸對腺嘌呤誘發腎損傷小鼠腎功能的影響

Fig. 5-1 Effects of fructose and folate on renal function in adenine-induced kidney injury murine model.



參考文獻

辜祥霖 (2016)。不同葉酸含量對高油飲食小鼠腎臟的影響。國立臺灣大學生化科
技學系暨研究所碩士論文

陳駿威 (2023)。葉酸營養狀況對脂質代謝和慢性腎病變的影響之研究。國立臺灣
大學生化科技學系暨研究所博士論文

國健署 (2018)，臺灣國民營養健康狀況變遷調查成果報告（民國 102-105 年）

國健署 (2022)，臺灣國民營養健康狀況變遷調查成果報告（民國 106-109 年）

經濟部統計處 (2024)，批發、零售及餐飲業營業額統計，餐飲業營業額部分。

Atay JCL, Elsborg SH, Palmfeldt J, Nejsum LN, Nørregaard R. Recovery of Water
Homeostasis in Adenine-Induced Kidney Disease Is Mediated by Increased AQP2
Membrane Targeting. *IJMS*. 2024;25(6):3447. doi:10.3390/ijms25063447

Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages
may play a role in the epidemic of obesity *Am J Clin Nutr*. 2004;79(4):537-543.
doi:10.1093/ajcn/79.4.537

Brouns F. Saccharide Characteristics and Their Potential Health Effects in Perspective.
Front Nutr. 2020;7:75. doi:10.3389/fnut.2020.00075

Buglak AA, Kapitonova MA, Vechtomova YL, Telegina TA. Insights into Molecular
Structure of Pterins Suitable for Biomedical Applications. *IJMS*. 2022;23(23):15222.
doi:10.3390/ijms232315222

Chan CW, Lin BF. Folate Deficiency Enhanced Inflammation and Exacerbated Renal
Fibrosis in High-Fat High-Fructose Diet-Fed Mice. *Nutrients*. 2023 Aug
17;15(16):3616. doi: 10.3390/nu15163616.

Chang J, Yan J, Li X, Liu N, Zheng R, Zhong Y. Update on the Mechanisms of Tubular
Cell Injury in Diabetic Kidney Disease. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:661076.
doi:10.3389/fmed.2021.661076

Chen KJ, Pan WH, Lin YC, Lin BF. Trends in folate status in the Taiwanese population aged 19 years and older from the Nutrition and Health Survey in Taiwan 1993-1996 to 2005-2008. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2011;20(2):275-82. PMID: 21669596.

Cheng H, Zhou J, Sun Y, Zhan Q, Zhang D. High fructose diet: A risk factor for immune system dysregulation. *Hum Immunol.* 2022;83(6):538-546. doi:10.1016/j.humimm.2022.03.007

Choi J, Choi MS, Jeon J, et al. In vivo longitudinal 920 nm two-photon intravital kidney imaging of a dynamic 2,8-DHA crystal formation and tubular deterioration in the adenine-induced chronic kidney disease mouse model. *Biomed Opt Express.* 2023;14(4):1647. doi:10.1364/boe.485187

Dos Santos IF, Sheriff S, Amlal S, Ahmed RPH, Thakar CV, Amlal H. Adenine acts in the kidney as a signaling factor and causes salt- and water-losing nephropathy: early mechanism of adenine-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2019;316(4). doi:10.1152/ajprenal.00142.2018

Ebara S. Nutritional role of folate. *Congenital Anomalies.* 2017;57(5):138-141. doi:10.1111/cga.12233

Fernández-Villa D, Aguilar MR, Rojo L. Folic Acid Antagonists: Antimicrobial and Immunomodulating Mechanisms and Applications. *Int J Mol Sci.* 2019;20(20):4996. doi:10.3390/ijms20204996

Ferraris RP, Choe JY, Patel CR. Intestinal Absorption of Fructose. *Annu Rev Nutr.* 2018;38:41-67. doi:10.1146/annurev-nutr-082117-051707

Flisiński M, Brymora A, Skoczylas-Makowska N, Stefańska A, Manitius J. Fructose-Rich Diet Is a Risk Factor for Metabolic Syndrome, Proximal Tubule Injury and Urolithiasis in Rats. *Int J Mol Sci.* 2021;23(1):203. doi:10.3390/ijms23010203

Furusho T, Sohara E, Mandai S, et al. Renal TNF α activates the WNK phosphorylation cascade and contributes to salt-sensitive hypertension in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2020;97(4):713-727. doi:10.1016/j.kint.2019.11.021

Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, et al. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17):6275. doi:10.3390/ijms21176275

Green R, Datta Mitra A. Megaloblastic Anemias: Nutritional and Other Causes. *Med Clin North Am.* 2017;101(2):297-317. doi:10.1016/j.mcna.2016.09.013

Gu X, Manautou JE. Regulation of hepatic ABCC transporters by xenobiotics and in disease states. *Drug Metab Rev.* 2010;42(3):482-538. doi:10.3109/03602531003654915

Herman MA, Birnbaum MJ. Molecular aspects of fructose metabolism and metabolic disease. *Cell Metab.* 2021;33(12):2329-2354. doi:10.1016/j.cmet.2021.09.010

Howles SA, Thakker RV. Genetics of kidney stone disease. *Nat Rev Urol.* 2020;17(7):407-421. doi:10.1038/s41585-020-0332-x

Huang R, Fu P, Ma L. Kidney fibrosis: from mechanisms to therapeutic medicines. *Sig Transduct Target Ther.* 2023;8(1). doi:10.1038/s41392-023-01379-7

Inci MK, Park SH, Helsley RN, Attia SL, Softic S. Fructose impairs fat oxidation: Implications for the mechanism of western diet-induced NAFLD. *J Nutr Biochem.* 2023;114:109224. doi:10.1016/j.jnutbio.2022.109224

Jang C, Hui S, Lu W, et al. The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids. *Cell Metabolism.* 2018;27(2):351-361.e3. doi:10.1016/j.cmet.2017.12.016

Johnson RJ, Lanasa MA, Sanchez-Lozada LG, et al. The fructose survival hypothesis for obesity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2023;378(1885):20220230. doi:10.1098/rstb.2022.0230

Jung S, Bae H, Song WS, Jang C. Dietary fructose and fructose-induced pathologies. *Annual review of nutrition.* 2022;42:45-66. doi: 10.1146/annurev-nutr-062220-025831.

Kanbay M, Altintas A, Yavuz F, et al. Responses to Hypoxia: How Fructose Metabolism and Hypoxia-Inducible Factor-1a Pathways Converge in Health and Disease. *Curr Nutr Rep.* 2023;12(1):181-190. doi:10.1007/s13668-023-00452-5

Kaye AD, Jeha GM, Pham AD, et al. Folic Acid Supplementation in Patients with Elevated Homocysteine Levels. *Adv Ther.* 2020;37(10):4149-4164. doi:10.1007/s12325-020-01474-z

Kellum JA, Romagnani P, Ashuntantang G, Ronco C, Zarbock A, Anders HJ. Acute kidney injury. *Nat Rev Dis Primers.* 2021;7(1):52. doi:10.1038/s41572-021-00284-z

Khan SR, Pearle MS, Robertson WG, et al. Kidney stones. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16008. doi:10.1038/nrdp.2016.8

Klinkhamer BM, Djudjaj S, Kunter U, et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Kidney Injury in 2,8-Dihydroxyadenine Nephropathy. *JASN.* 2020;31(4):799-816. doi:10.1681/asn.2019080827

Klinkhamer BM, Djudjaj S, Kunter U, et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Kidney Injury in 2,8-Dihydroxyadenine Nephropathy. *JASN.* 2020;31(4):799-816. doi:10.1681/asn.2019080827

Knospe M, Müller CE, Rosa P, et al. The rat adenine receptor: pharmacological characterization and mutagenesis studies to investigate its putative ligand binding site. *Purinergic Signalling.* 2013;9(3):367-381. doi:10.1007/s11302-013-9358-1

Kodama N, Shimizu A, Wakamatsu K, et al. Epithelial-mesenchymal transition-related gene expression as a new marker for detecting glomerular injury and interstitial fibrosis in renal biopsy specimens from patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(12):2067-2075. doi:10.1093/ndt/gfw219

Kousios A, Fletcher RS, Johnson AW, et al. The link between dietary fructose and kidney health: Mechanisms and implications. *Nutrients.* 2022;14(5):1013. doi:10.3390/nu14051013

Krishnamurthy VM, Ross JR, Dressler R, et al. Glomerular basement membrane damage induced by 2,8-dihydroxyadenine crystals. *Kidney Int.* 2011;79(2):227-234. doi:10.1038/ki.2010.351

Kuro-o M. A potential role of Klotho in metabolic pathways. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1782(7-8):410-413. doi:10.1016/j.bbadi.2008.02.008

Lanaspa MA, Kuwabara M, Andres-Hernando A, Li N, Cicerchi C, Jensen T. High salt intake causes leptin resistance and obesity in mice by stimulating endogenous fructose production and metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(12):3138-3143. doi:10.1073/pnas.1713837115

Lee YS, Dang TN, Li X, et al. Renal insulin signaling and dysfunction: Insights into molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *J Clin Invest.* 2021;131(15). doi:10.1172/jci142721

Li Y, Luo H, Liu T, et al. The protective effect of autophagy on fructose-induced metabolic dysfunction in mice. *Cell Metab.* 2016;24(4):659-671. doi:10.1016/j.cmet.2016.09.001

Liao D, Wang T, Wang X, et al. Dietary intake of folate and colorectal cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Nutrients.* 2019;11(8):1823. doi:10.3390/nu11081823

Liu D, Zuo X, Yang H, et al. Fructose induces de novo lipogenesis and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) via a miR-200a-3p/PPAR γ signaling axis. *Mol Nutr Food Res.* 2020;64(20). doi:10.1002/mnfr.202000321

Liu J, Ren W, Yan X, et al. The impact of high fructose intake on cognitive function and its mechanisms. *Front Neurosci.* 2022;16:864321. doi:10.3389/fnins.2022.864321

Liu Q, Li Y, Niu X, et al. The role of mitochondrial dysfunction in fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *J Hepatol.* 2020;73(4):787-792. doi:10.1016/j.jhep.2020.04.017

- Liu Y, Wang X, Pang T, et al. Fructose induces renal inflammation and fibrosis via the TLR4/MyD88/NF-κB pathway in rats. *Mol Med Rep.* 2021;24(3):698. doi:10.3892/mmr.2021.12318
- Lombardi VC, Hekmatyar SK, Tarrago MG, et al. Homocysteine in vitamin B12 and folate deficiency. *Mol Genet Metab.* 2021;134(4):339-349. doi:10.1016/j.ymgme.2021.08.004
- MacKinnon SD, Choi YS, McGill BJ, et al. The role of fructose and uric acid in the pathogenesis of kidney disease. *Kidney Int.* 2011;79(11):1234-1241. doi:10.1038/ki.2011.27
- Mathews, Christopher K., K. E. Van Holde, Dean R. Appling, and Spencer J. Anthony-Cahill. 2013. *Biochemistry*. 4. ed. Toronto: Pearson.
- Matsuzawa Y, Tanimoto K, Hayashi T, et al. Efficacy of a self-monitored diet and exercise program for weight loss in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2020;43(9):2133-2139. doi:10.2337/dc20-0034
- Medeiros, D. M., & Wildman, R. E. C. (2019). Advanced human nutrition. Jones & Barlett Learning.
- McGough AM, Mayfield JA, Brody R, et al. A high-fructose diet causes hyperuricemia, kidney inflammation, and oxidative stress, and alters gut microbiota in rats. *Front Physiol.* 2020;11:271. doi:10.3389/fphys.2020.00271
- Mohamed SM, Shalaby MA, El-Shiekh RA, El-Banna HA, Emam SR, Bakr AF.Nelson, D. L., Lehninger, A. L., & Cox, M. M. (2017). Lehninger Principles of biochemistry (8th ed.). Basingstoke.
- Mokhtari Z, Baluchnejadmojarad T, Roghani M. Co-administration of rutin and naringenin ameliorates memory deficits in a rat model of Alzheimer's disease: Behavioral, biochemical, and histopathological aspects. *J Alzheimers Dis.* 2022;86(2):857-868. doi:10.3233/JAD-215263

- Nakagawa T, Kang DH, Feig D, et al. Unearthing uric acid: An ancient factor with recently found significance in renal and cardiovascular disease. *Kidney Int.* 2006;69(10):1722-1725. doi:10.1038/sj.ki.5000433
- Niazi F, Albalushi NM, Laxman N, Al-Adawi S. The role of folic acid in the prevention of congenital anomalies: A systematic review. *J Pediatr Neurol.* 2020;18(1):1-10. doi:10.1055/s-0039-1695031
- Nørregaard R, Mutsaers HAM, Frøkiær J, Kwon TH. Obstructive nephropathy and molecular pathophysiology of renal interstitial fibrosis. *Physiol Rev.* 2023;103(4):2827-2872. doi:10.1152/physrev.00027.2022
- Oosthuyse T, Bosch AN. Fructose-induced hypertension: An old tale with new twists. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;302(5). doi:10.1152/ajpheart.00732.2011
- Patel R, Malik M, Daga S, et al. Dietary fructose and metabolic syndrome: A review of the evidence and implications for public health. *Nutrients.* 2021;13(7):2293. doi:10.3390/nu13072293
- Heudobler D, Rechenmacher M, Lüke F, et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR) γ Agonists as Master Modulators of Tumor Tissue. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3540. doi:10.3390/ijms19113540 Romero JR, Mazza M. Angiotensin II receptor blockers and nephroprotection: An updated review. *Hypertension.* 2009;53(2):207-15. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.121699
- Raymond, J. L., & Morrow, K. (2020). Krause and Mahan's food & the nutrition care process. Saunders.
- Ruan Q, Niu M, Zhang X, et al. The effects of fructose and glucose on renal fibrosis: A comparative study. *J Ren Nutr.* 2016;26(5):352-359. doi:10.1053/j.jrn.2016.04.002
- Ruggiero C, Cherubini A, Ble A, et al. The effect of folate deficiency on DNA methylation and DNA damage in human lymphocytes. *J Nutr Biochem.* 2003;14(8):461-466. doi:10.1016/S0955-2863(03)00076-0
- Sabate J, Wien M. A perspective on vegetarian dietary patterns and risk of metabolic syndrome. *Br J Nutr.* 2015;113 Suppl 2. doi:10.1017/S0007114514004139

- Sasaki S, Joh K, Hata J, et al. Glomerular hyperfiltration in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney Int.* 1997;51(1):75-82. doi:10.1038/ki.1997.10
- Sato K, Inoue S, Matsuda H, et al. Epigenetic memory and metabolic syndrome: The role of early-life environmental exposures in shaping future health. *Biosci Rep.* 2020;40(5). doi:10.1042/BSR20194396
- Savini I, Catani MV, Evangelista D, Gasperi V, Avigliano L. Obesity-associated oxidative stress: Strategies finalized to improve redox state. *Int J Mol Sci.* 2013;14(5):10497-10538. doi:10.3390/ijms140510497
- Sharma K, Ziyadeh FN. Hyperglycemia and diabetic kidney disease: The case for transforming growth factor- β as a key mediator. *Diabetes.* 1995;44(10):1139-1146. doi:10.2337/diab.44.10.1139
- Sárközy M, Watzinger S, Kovács ZZA, et al. Neuregulin-1 β Improves Uremic Cardiomyopathy and Renal Dysfunction in Rats. *JACC Basic Transl Sci.* 2023;8(9):1160-1176.. doi:10.1016/j.jacbts.2023.03.003
- Singhal AK, Shah DK, Nathan S, et al. Fructose and the kidney: What role does it play in health and disease? *Am J Nephrol.* 2021;52(3):255-264. doi:10.1159/000515867
- Smith R, Wood R, Talmage J, et al. The link between fructose consumption and chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(12):2036-2045. doi:10.1681/ASN.2009101044
- Soleimani M. The impact of dietary and endogenous fructose on kidney function. *Nat Rev Nephrol.* 2021;17(1):47-58. doi:10.1038/s41581-020-00329-y
- Song X, Wang C, Zhao Y, et al. Protective effect of resveratrol on fructose-induced renal injury through regulation of oxidative stress and inflammatory response in rats. *BMC Nephrol.* 2019;20(1):9. doi:10.1186/s12882-019-1211-1
- Sundstrom J, Vessby B, Andrén B, et al. Fatty acid composition of skeletal muscle reflects dietary intake. *Am J Clin Nutr.* 1995;61(5):1140-1145. doi:10.1093/ajcn/61.5.1140

Susztak K. Understanding the epigenetic regulation of kidney fibrosis: Toward novel treatment approaches. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10(1):17-21. doi:10.1038/nrneph.2013.243

Takahashi H, Mizoue T, Kitamura A, et al. Dietary intake of sugar-sweetened beverages and risk of type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. *J Diabetes Investig.* 2015;6(4):360-366. doi:10.1111/jdi.12309

Tarrago MG, Rasola A, Kristensen KK, et al. Fructose consumption and its impact on metabolic health: A focus on mitochondrial dysfunction. *Biochem J.* 2022;479(7):971-984. doi:10.1042/BCJ20210670

Thomas MC, Burns WC, Cooper ME. Tubular changes in early diabetic nephropathy. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2005;12(2):177-186. doi:10.1053/j.ackd.2005.01.009

Toledo-Corral CM, Alderete TL, Richey JM, et al. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia: Insights from the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos (HCHS/SOL). *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(3). doi:10.1210/clinem/dgz265

Trepicchio WL, Bozza M, Pedneault G, et al. Fructose-induced renal hypertrophy in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294(1). doi:10.1152/ajprenal.00210.2007

Treviño-BecerraA., & Iseki, K. (2018). Uric acid in chronic kidney disease. Karger.

Tsao TH, Chang CH, Lai SJ, et al. Long-term fructose consumption causes metabolic syndrome and altered renal lipid metabolism in mice. *J Nutr Biochem.* 2017;48:126-137. doi:10.1016/j.jnutbio.2017.07.007

Tuttle KR, Bakris GL, Bilous RW, et al. Diabetic kidney disease: A report from an ADA Consensus Conference. *Diabetes Care.* 2014;37(10):2864-2883. doi:10.2337/dc14-1296

Tuttle KR, Brosius FC, Adler SG, et al. Strategies for improving outcomes in diabetic kidney disease: A call to action from the Nephropathy Committee of the Council on the Kidney in Cardiovascular Disease of the American Heart Association. *Circulation.* 2014;130(17):1411-1420. doi:10.1161/CIR.0000000000000045



Ueno T, Takabatake Y, Suematsu M, et al. Fructose causes tubulointerstitial injury in the kidney of rats. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(10):2049-2060. doi:10.1681/ASN.2010111182

USRDS. Annual Data Report of End-Stage Renal Disease (International Comparisons). United States Renal Data System. (2023)

van Greevenbroek MM, Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Obesity-associated low-grade inflammation in type 2 diabetes mellitus: Causes and consequences. *Neth J Med.* 2013;71(4):174-187. PMID: 23723111.

Viberti G, Wheeldon NM. Microalbuminuria reduction with valsartan in patients with type 2 diabetes mellitus: A blood pressure-independent effect. *Circulation.* 2002;106(6):672-678. doi:10.1161/01.CIR.0000024411.70290.50

Villegas R, Xiang YB, Elasy TA, et al. Fructose, glycemic load, and risk of type 2 diabetes: The Shanghai Women's Health Study. *Am J Clin Nutr.* 2007;86(5):1390-1397. doi:10.1093/ajcn/86.5.1390

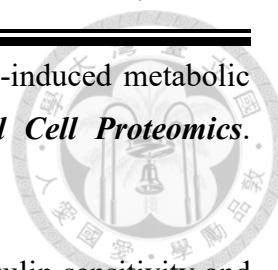
Wada J, Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clin Sci (Lond).* 2013;124(3):139-152. doi:10.1042/CS20120198

Wang H, Li D, Han C, et al. High fructose-induced metabolic syndrome: Implications for the development of chronic kidney disease. *Front Pharmacol.* 2019;10:1282. doi:10.3389/fphar.2019.01282

Wang W, Zhao Y, Zhang J, et al. The role of oxidative stress in the development of diabetic nephropathy: A focus on the connection between mitochondrial oxidative stress and NADPH oxidase-derived ROS. *Clin Sci (Lond).* 2019;133(13):1321-1340. doi:10.1042/CS20190055

Weiss R, Bremer AA, Lustig RH. What is metabolic syndrome, and why are children getting it? *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1281(1):123-140. doi:10.1111/nyas.12030

Wu Y, Zhang D, Kang S. The relationship between uric acid and diabetic nephropathy: A systematic review and meta-analysis. *J Diabetes Res.* 2020;2020:8713694. doi:10.1155/2020/8713694



- Xu C, Chang A, Jiang H, et al. Molecular mechanisms in fructose-induced metabolic diseases: Insights from proteomics and transcriptomics. *Mol Cell Proteomics*. 2017;16(4):698-710. doi:10.1074/mcp.M116.065185
- Yang Q, Vijayakumar A, Kahn BB. Metabolites as regulators of insulin sensitivity and metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(10):654-672. doi:10.1038/s41580-018-0034-9
- Yilmaz MI, Saglam M, Carrero JJ, et al. Stress, nutrition and cardiovascular risk in renal disease. *Kidney Int Suppl*. 2013;3(2):150-156. doi:10.1038/kisup.2013.9
- Zhang C, Zhang Z, Xu Y, et al. Mitochondrial dysfunction and metabolic disturbances in the kidney of fructose-fed rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018;45(7):675-683. doi:10.1111/1440-1681.12935
- Zhang Y, Liu J, Yao J, et al. Obesity: Pathophysiology and intervention. *Nutrients*. 2014;6(11):5153-5183. doi:10.3390/nu6115153
- Zhou G, Myers R, Li Y, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001;108(8):1167-1174. doi:10.1172/JCI13505
- Zhu Y, Zhang Y, Zhou J, et al. Mechanisms of fructose-induced kidney damage and the protective role of naringenin. *Front Physiol*. 2021;12:702063. doi:10.3389/fphys.2021.702063