

中文摘要

單側阻塞性尿路疾病是指尿液無法經由腎臟或輸尿管流入膀胱，尿液迴流造成腎水腫。其發生原因如單側輸尿管結石、狹窄、腫瘤、受傷等，但仍以腎結石最常見，而單側輸尿管阻塞則是一種適合模擬阻塞性尿路腎臟漸進式纖維化發展過程的病理模型。本研究主要在探討單側輸尿管阻塞造成腎臟損傷過程中，活性氧、細胞凋亡與細胞自噬的角色以及細胞凋亡與細胞自噬的關係。本實驗利用大白屬於其右側輸尿管靠近腎臟三分之一處用兩條繩子分別打結，接著縫合腹腔。之後將老鼠隨機分成八組，第一組無進行結紮手術，其餘分別於術後 4hr、8hr、12hr、1 天、3 天、5 天、7 天進行生理實驗並抽取 500 μ l 腎靜脈血進行自由基測定，另外動物犧牲後取阻塞腎臟，利用西方墨點法測定蛋白表現量；使用免疫組織染色觀察腎臟組織型態。結果發現腎靜脈血液 H_2O_2/OH^- 類的自由基於阻塞後四至十二小時期間有上升趨勢，而 Catalase 和 MnSOD 的蛋白表現從阻塞四小時開始就隨時間下降；腎臟組織 Bax/Bcl-2 比值及 Caspase 3 蛋白表現表現則增加；自噬作用的起始蛋白 Beclin1 及中期蛋白 Atg5-Atg12 和後期蛋白 LC3 表現則在阻塞 3 天後開始逐漸增加，從切片染色結果也發現自噬作用發生在腎臟近端與遠端腎小管處。我們的結果發現自噬作用蛋白和凋亡作用蛋白表現時間一致，表示自噬作用在單側輸尿管阻塞動物模式中有助細胞死亡的功能。

關鍵字：單側輸尿管阻塞、自由基、細胞凋亡、自噬作用、腎臟

Abstract

Unilateral obstructive uropathy refers to the structural changes, like ureteral cot, stenosis, tumor and damage, that impede the normal flow of urine and the most common cause is renal calculus. Unilateral ureteral obstruction (UUO) is an animal model of mimic progressive fibrosis renal disease that can reproducibly demonstrate this pathological progress. The aim of the present study was to investigate the role of reactive oxygen species , apoptosis, autophagy and the relation between apoptosis and autophagy in UUO model. In this research, female wistar rats were performed ligation of the right ureter at the ureteropelvic junction using double silk suture. Rats were divided into 8 groups and the first group had no UUO operation and others were sacrificed after operating UUO for 4hrs, 8hrs, 12hrs, 1 day, 3 days, 5 days, 7 days. After then, rats were proceeded with physiological observation, 500µl volume of renal venous blood for free radical detection, harvested obstruction kidney for protein expression with western blot assay and immunohistochemistry stain for morphology changes. Our results found that, renal venous blood had increased hydrogen peroxide/hydroxyl radical production after UUO 4hrs to 12hrs. Catalase and MnSOD protein expression was decreased with a time-dependent manner from obstruction 4hrs. Bax and Bcl-2 ratio and Caspase 3 protein expression of UUO kidney was increased. UUO enhanced autophagy step I protein, Beclin-1 ; step II protein, Atg5-Atg12 complex ; step III protein, LC3 II in a time-dependent after 3 days of UUO. We observed an incremental autophagy and apoptosis protein expression in renal proximal and distal tubules by immunohistochemistry. These results suggest that autophagy and apoptosis have identical tendency and represents that autophagy may play a role with apoptotic cell death in UUO animal models.

Key words : unilateral ureteral obstruction, free radical, apoptosis, autophagy, kidney

誌謝

匆匆兩年沒想到這麼快就過了，剛進研究所時的懵懂和緊張也隨著時間越發成熟及穩重，而師大求學期間濃濃的師生情感以及作學問的嚴謹態度，都扎實的烙印在眼底，直接影響我在研究路上的執著和信心。

研究所期間是以共同指導方式在台大醫院鄭劍廷教授的實驗室進行研究工作，雖然在修課上有些許不便，但是我卻認為是一連串幸運的開始。老師是如此的忙碌，卻總是能適時給予我實驗與課業上的幫助，讓我順利度過每一個關卡，完成這一階段的學業。此外老師也始終給我極大的信賴以及自發性的研究環境，讓我的碩士生活比其他同學要來的更充實及豐富，不僅習得許多專業知識及實驗技巧，更讓我學會自我管理及時間規劃應用。十二萬分地感謝老師對我的栽培及呵護，也要感謝另一位指導教授黃基礎老師，嚴謹的教學和指導讓我在研究上能夠思考的更縝密扎實同時也要感謝余宏政醫師以及吳明修醫師對於本論文研究所提出的問題與建議，在老師們的指導之下才能使本論文更完整的呈現。

實驗室的學姊：歐陽學姊、靜儀學姐，對於我實驗技術上的指導以及疑難雜症的解惑，都是幫助我完成這份論文的大功臣；實驗室夥伴：乃玉、儷嫻、小蔡、靜怡，以及所上學長及同學：怡帆、作豪、世郁、廷翰及伊文在實驗、課業上的互相切磋及加油打氣，讓我即使實驗室分隔很遠卻仍然深刻感受同儕之間的溫暖；大學時期的好友：彥婷、亭好、筱瑋、筱婷在我求學期間給我最多的關心和支持，感謝你們的幫助，讓我得以順利的完成學業，由衷感謝；還有我各個求學階段分散於國內外的同學朋友們不時捎來藉由 msn 的問候；最重要的是老爸、老媽、哥哥柏超和妹妹妤甄以及眾多阿姨親戚們給予我的照顧和鼓勵，沒有這些強大的後援部隊，我獨自一人絕對無法完成。

碩士學位的取得只是一個階段結束的象徵，上課考試也許煩悶，實驗失敗也許多於成功，成績好壞也只是當下表現的一個標準，然而與大家一同喜怒哀樂的過程才是日後真正值得珍藏與回味的部份。

時光如此短暫，在即將完成論文的這一刻，回顧這兩年來的生活，經歷的事情很多然而也獲得許多，更發現要感謝的人竟是何其多，研究期間讓我了解到生活週遭的每一個人在生命中皆扮演了無可取代的角色，沒有你們就不會有現在成長的我，僅將此成果獻給無時無刻陪伴我的你們，並願將完成的喜悅分享給認識我的每一個人。

賴亭諭 謹誌於 國立台灣師範大學生命科學研究所

中華民國九十七年八月

<目錄>

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
誌謝.....	III
目錄.....	V
壹、緒論.....	1
一、單側輸尿管梗塞(Unilateral ureteral obstruction).....	1
二、單側輸尿管阻塞與氧化傷害.....	2
三、細胞程序性死亡(Programmed cell death).....	4
四、細胞自噬(Autophagy).....	7
五、細胞自噬和細胞凋亡間的影響因子.....	13
六、研究目的.....	14
貳、研究材料與方法.....	15
一、動物實驗.....	15
二、自由基測定.....	15
三、腎動脈血流及組織氧測定.....	17
四、西方墨點法(Western blot).....	19
五、免疫沉澱法(Immunoprecipitation).....	26
六、TUNEL assay (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labeling).....	27
七、免疫組織染色(Immunohistochemistry).....	30
八、統計方法.....	33
參、結果.....	34
一、觀察阻塞側4小時內腎動脈血流變化及腎皮質組織氧分壓變化.....	34
二、單側輸尿管結紮(UUO)後靜脈血自由基表現量.....	35
三、腎組織蛋白質變化.....	35

四、組織切片表現.....	36
肆、討論.....	38
伍、結論.....	41
陸、參考文獻.....	60

論文結果列表

圖一、阻塞側 4 小時內腎動脈血流變化.....	42
圖二、單側輸尿管結紮(UUO)後腎靜脈血自由基表現量.....	43
圖三、細胞凋亡相關蛋白表現-Bcl-2.....	44
圖四、細胞凋亡相關蛋白表-Bax.....	45
圖五、腎臟組織細胞凋亡率.....	46
圖六、細胞凋亡相關蛋白表現-Bcl-X _L	47
圖七、細胞凋亡相關蛋白表現-Caspase 3.....	48
圖八、自由基清除酵素相關蛋白表現比較圖-MnSOD.....	49
圖九、自由基清除酵素相關蛋白表現比較圖-Catalase.....	50
圖十、細胞自噬相關蛋白表現比較圖-Beclin-1.....	51
圖十一、細胞自噬相關蛋白表現比較圖-Atg5-Atg12.....	52
圖十二、細胞自噬相關蛋白表現比較圖-LC3 type II	53
圖十三、腎臟組織切片染色圖 H&E 染色.....	54
圖十四、腎臟組織切片染色圖 TUNEL.....	55
圖十五、TUNEL 染色後凋亡細胞統計圖現.....	56
圖十六、腎臟組織切片染色圖 4HNE.....	57
圖十七、腎臟組織切片染色圖 Beclin-1.....	58
圖十八、腎臟組織切片染色圖 ED-1.....	59