

系統識別號 C09003247

## 行政院及所屬各機關出國報告

出國類別：研究

### 赴美國佛羅里達大學從事尿路結石研究心得報告

服務機關：行政院輔導會高雄榮民總醫院  
出國人職稱：外科部主治醫師  
姓名：蔡政諭  
出國地區：美國  
出國期間：89-12-20 至 90-12-19  
報告日期：91-04-25

> / c09003247

分類號/目

關鍵詞：

尿路結石 蛋白質

## 目次

正文	PAGE 4
過程	PAGE 5
內容摘要	PAGE 6
介紹	PAGE 7
實驗的目的	PAGE 9
材料及方法	PAGE 10
結果	PAGE 14
討論	PAGE 17
心得	PAGE 18

正文：

目的：

希望到美國從事以分子生物學的方法從事尿路結石的研究。一方面學習分子生物學的技術。一方面了解結石研究的新方向及最新的觀念。

過程

於十二月底到達美國後，在生活安定後，開始了研究的工作。以下就是所研究的摘要。

內容摘要：

本次出國到美國佛羅里達州大學主要從事尿路結石的研究。主要是利用腎細胞經過草酸分子的刺激，再用分子生物的技術。萃取細胞中的核醣核酸，再利用聚合酶反應的方法比較其核醣核酸的生成有無增加。其中利用的方法包括了西方墨點法，北方墨點法，原位雜交等方法研究基因的表現。

## 介紹

根據以前的研究顯示：在 MDCK 細胞模式中，有一種蛋白質稱為 bikunin 會在細胞經過草酸分子及草酸鈣刺激之後增加核醣核酸及蛋白質。而其中的一種蛋白和 bikunin 一同由同一核醣核酸製造出來的是所謂的甲一型微球蛋白，由於其功能及在對結石的形成的角色仍不明顯，所以在佛羅里達州的一年從事這甲一型球蛋白及草酸的研究。

甲一型微球蛋白可在結石的間質中發現，在西方墨點法中呈現的是一 26Kda 大小的蛋白質<sup>1</sup> 在體外的結石研究發現，它可以視為一草酸結石形成過程中做為一結石形成的抑制物質。<sup>2</sup>

## 細胞對草酸鹽刺激的反應

在豬腎的近曲上皮細胞 LLC-PK1 及狗的遠曲上皮細胞 MDCK，草酸鹽暴露對細胞膜有影響，導致 phosphatidylserine 的重新分配以及活化兩個的脂質信號的反應其一牽涉 phospholipase A(2)而另一牽涉到。更長的暴露在草酸中導致了細胞膜的破壞及細胞的死亡。但仍舊有調節的方法可以被觀察到，包含了細胞的增多以便補充受傷的細胞以及誘發不同的基因以便取代死亡的細胞以及修復細胞。<sup>3</sup>

從佛羅里達州大學的實驗室發現了草酸鈣結晶及超過生理劑量的草酸濃度會對腎細胞會造成傷害。可能是細胞為了對抗這腎毒性，腎細胞可以刺激製造許多的大分子例如 bikunin 以及 osteopontin,這些可能是結石結晶過程中的調節者而且可

以在晶體附著於細胞上扮演一定的功能。<sup>4</sup>

草酸在濃度大於 175  $\mu\text{M}$  會在四小時內對細胞膜產生破壞。<sup>5</sup> 在 NRK-52E 細胞若遇到草酸鹽濃度超過 500  $\mu\text{M}$  在 LLC-PK1 細胞超過 400  $\mu\text{M}$ , 細胞的完整性會受到破壞在高濃度且時間更久會產生細胞壞死的特性例如細胞水腫及細胞核水腫。<sup>6</sup>

草酸鈣結晶 (150  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) 及草酸鉀 (0.5 mmol/L) 加到細胞培養皿中 這種濃度是根據以前的經驗, 所得到的最適當的濃度, 而且也是正常人及不明原因草酸結石患者草酸排出的上限值。而且在我們的實驗室先前的實驗結果發現當草酸濃度大於 0.5 mmol 會明顯地對腎的上皮細胞造成傷害。<sup>7</sup>



實驗的目的:

我們實驗的目的在於觀察甲一型微球蛋白在經過草酸鈣及草酸的刺激後在腎上皮細胞中細胞對這種物質的反應看是否甲一型微球蛋白的基因是否會向上調節，以及向上調節後的產物甲一型微球蛋白是否增加。

## 材料及方法

### 細胞的培養

首先是利用 LLK-PK1 細胞先將這些細胞用 0.25% trypsin/EDTA 分離，再值入 56 cm<sup>2</sup> 培養皿中，在培養液中培養 90-95% Dulbecco's MEM 以及 5-10% 小牛血在 5% 二氧化碳中培養直到八成的培養皿表面積長滿了細胞。

取細胞之後再更換細胞於無血清的環境培養液中。取代成 defined DMEM/F-12 (GibcoBRL Inc) 併補充 penicillin, transferrin, insulin, selenium, hydrocortisone, prostaglandin E1, and 3,3',5-triiodo-L-thyronine (T3)。細胞之後轉換成調節培養液 這 是和 defined DMEM/F-12 media 一樣只是除去鈉 pyruvate pH 7.4.

細胞在更換為調節培養液後，加入草酸鉀成爲濃度 0.5 mmol/L 及草酸鈣結晶成 150µg/cm<sup>2</sup> 暴露出 1, 2 及 4 小時。另無暴露的於草酸溶液的爲對照組。所有的反應均在 37°C 下溫度下培養。

經過草酸的暴露後，吸出培養液，再用 Trizol 溶液溶解細胞 (GibcoBRL, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)。之後使用氯仿分離。再以乙醇沈澱核醣核酸。經過沈澱後，再以去除核醣核酸分解酵素的純水溶解核醣核酸。之後在紫外線光譜儀之下測其濃度。經過濃度的測量之後取定量的核醣核酸在含有甲醛的核醣核酸膠上行電泳以分離核醣核酸。經在紫外線燈下檢視核醣核酸的品質後看其呈現出 28S 及 18S 以 2:1 的比較呈現，且核醣核酸沒有明顯的退化。

再取 100 毫克的全部核醣核酸萃取信息核醣核酸，使用的方法是利用 Oligotex

mRNA Kit (Qiagen Inc, Santa Clarita, CA)根據標準的程序來萃取其信息核醣核酸，最後所有的信息核醣核酸再用70毫升的純水在70°C下溶解。取八毫升的信詆核醣核酸溶液行互補段去氧核醣核酸的製造使用的是SuperScript first strand synthesis system(Invitrogen)，根據標準程序製造。最後再以核醣核酸分解酵素分解所有的信息核醣核酸。

### 聚合酵素鏈反應

利用所合成的互補性去氧核醣核酸，在一標準25微升的反應中加入1微升的互補去氧核醣核酸，使用的聚合酵素是Qiagen的合成Taq 去氧核醣核酸聚合酵素。所用的引體是根據豬的甲一微型球蛋白的基因庫所選出的：向前的引體5' GCG ACG GAG AGG GAG ATC A 3'，而向後的引體是5' TGA ACTCCTCCAGCAGGCTTT 3'。聚合酵素鏈反應共有38次循環。首先在94C加熱一分鐘，在55C下韌化一分鐘，在72C下延長去氧核醣核酸長度。最後在72C延長七分鐘。所有的反應均在溫度循環機下進行(PTC100, MJ research lab)。聚合酵素鏈反應的產物取10微升在1%TAE膠在紫外燈下照光。

### 即時聚合酵素鏈反應

經過了聚合酵素鏈反應，証實了在以上的溫度及條件下，在紫外線燈下呈現的是一特定的帶狀。顯示出由這二種引體所產生的產物是專一的。即時聚合酵素鏈反應使用的是Qiagen 所研發出的QuantiTech SybrGreen Kit. 所用的引體是和聚合

酵素鏈反應一樣的引體。所使用的儀器是Applied Biosystem的GeneAmp® 5700.

反應的條件是設定在起始的活化熱起動聚合酵素使用95°C加熱15分鐘，之後每次循環包含了94°C加熱三十秒，在55°C下韌化三十秒，在72°C下延長去氧核醣核酸長度四十五秒。最後在72°C延長七分鐘。共四十次循環。在最後的產物在TAE1%膠上行電泳，所得到的是一273bp大小的去氧核醣核酸產物。

### 細胞蛋白的分離及電泳

經由 Trizol 的分離，加入乙醇於中間及有機層中，再經過離心後收集上清液。利用 isopropyl alcohol 沈澱上清液的蛋白質。再次離心以沈澱蛋白質，去除上清液後再用 0.3 M guanidine hydrochloride in 95% ethanol 清洗蛋白質的沈澱物三次，最後再以乙醇洗清一次，在真空乾燥後，以0.5 毫升的 1% SDS 溶液溶解蛋白質。Sedi 再次離心以去除雜質，取出上清液，之後再以 BioRad Detergent Compatible protein assay (Lowry method) 測其蛋白質的濃度。而對培養液的上清液收集的方法是取定量的培養液再用附透析膜的離心管濃縮培養液。其優點在於放入定量的培養液以便觀察到特定蛋白質的濃度變化。

### 蛋白質電泳分析

加入兩倍量的樣本緩衝液後，在 95°C 下煮沸五分鐘後快速於冰中冷卻，使用 Bio Rad Laboratories 的 10% 10 well Redigel disc,放入 10 µl 的濃縮培養液及二微克的

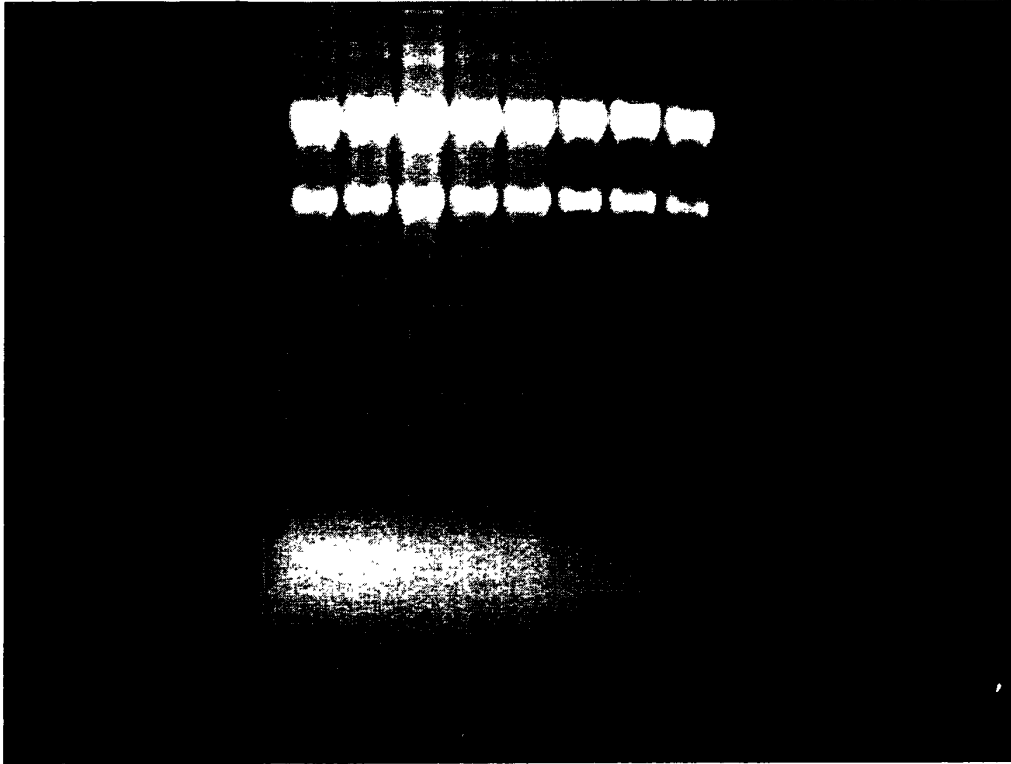
細胞蛋白質於每一樣本槽中。整個反應是在 Bio-Rad 的 Mini-Protean III 裝置在 200V 下行電泳 35 分鐘。電泳之後先在固定液固定一小時,之後用 Coomassie Brilliant Blue stain 染色 30 分鐘,再脫色直到背景清澈為止。

#### 西方墨點法

相同內容的兩片膠體。一作為蛋白質的染色一作為西方墨點法。方法是將這蛋白質以電泳方法轉到 0.45  $\mu$ M nitrocellulose 膜。首先用 gelatin 阻塞非特異性的蛋白質結合,再用 1:2000 Rabbit anti-rat  $\alpha$ -1-microglobulin antibody (Angri-Sera AB, Umeå, Sweden) 在低溫下反應隔夜,洗淨之後再放入二次抗體反應二小時,再次洗淨後用 1:1000 CDP-star (1:100) 在底片下曝光。

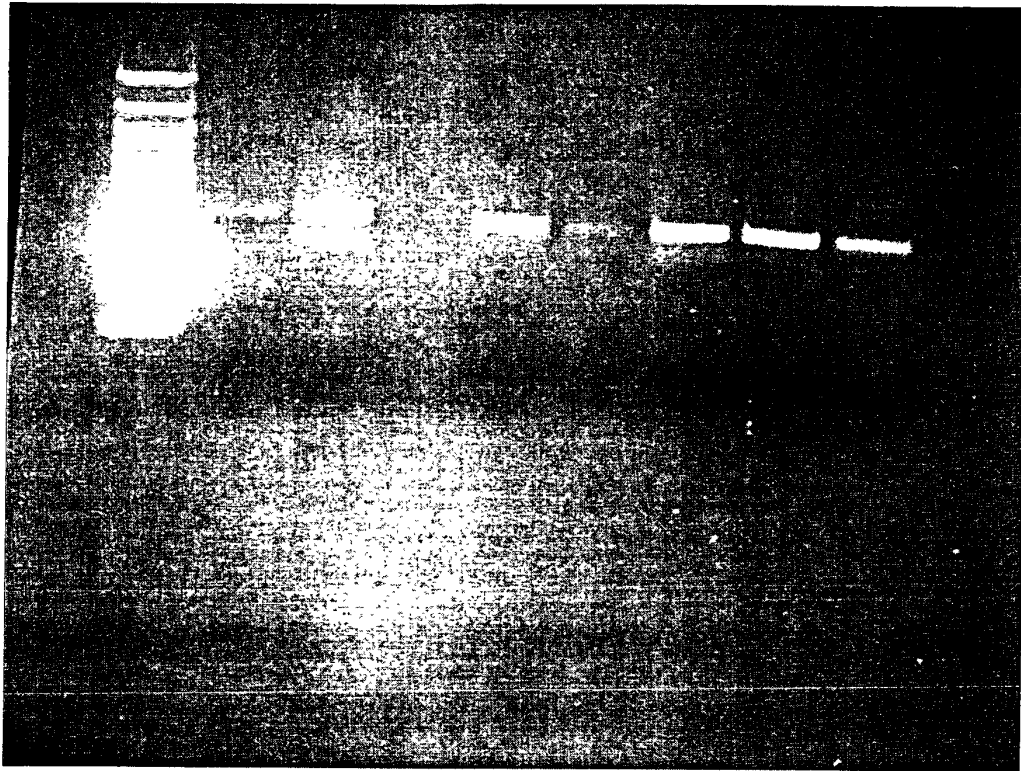
## 結果

共計進行了七次細胞的實驗。在核醣核酸電泳分析看來是：無明顯的核醣核酸退化，在 28S 以及 18S 呈現的是 2:1 的比例。



且各槽中的核醣核酸的質量呈現了一定的量，顯示核醣核酸的測量準確。以及其品質。

聚合酵素鏈反應



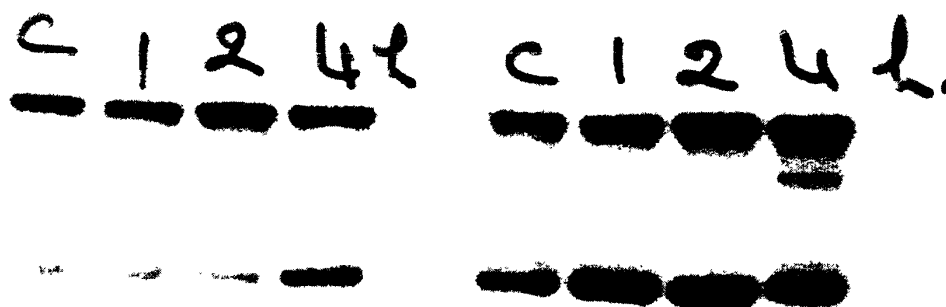
在單純的聚合酵素鏈反應中可以看出在對照組(第一行及第五行)，所得到的產物較少。意謂這對照組中原始的核醣核酸的量較少。

#### 即時聚合酵素鏈反應的結果

即時聚合酵素鏈反應顯示出1. 所有的看守基因GAPDH表現的都在同一範圍內，顯示出所有細胞組的互補去氧核醣核酸的品質相當，可以的是細胞之間的核醣核酸是可以互相比較的。而即時聚合酵素鏈反應的結果顯示出在相對於對照組的實驗組經由區間檢定以界限值設定為二，做統計分析發現在草酸及草酸鈣組一、二、四小時均有顯著的增加。

培養液的西方墨點法.

在細胞內蛋白無明顯的增加但在培養中。而培養液中的蛋白有明顯的增加。





## 討論

從之前的聚合酶鏈反應顯示從人體的組織 AMBP mRNA 大多存在於肝臟組織之中，但在有少許的存在。<sup>8</sup> 肝細胞，巨噬細胞，胰腺細胞以及腎近曲上皮細胞有甲一型微球蛋白的免疫活性。<sup>9 10</sup> 這些蛋白主要在肝細胞中生成，這些先驅體首先在高基氏體分裂<sup>11</sup>，分成兩個蛋白再離開細胞。<sup>12</sup> 這兩個蛋白在腎絲球過濾<sup>13</sup>，懷孕時會降低腎曲小管的重吸收。<sup>14</sup> 游離甲一型微球蛋白過濾後經過近曲小管吸收。所以這個蛋白被當做腎小管功能的指標<sup>15</sup> 腎功能不全會影響血中的濃度及尿中的濃度。但在身體的體液不會因其他的病理狀況而有所變化<sup>16</sup>

在本次的實驗可以發現經由草酸及草酸鈣的刺激。可見得其基因的活性被提昇了，其信息核糖核酸會昇高可能是細胞本身接受刺激而產生蛋白。這可能的意義在於細胞經由刺激會產生這種蛋白。<sup>17</sup>

## 心得

利用分子生物學的方法研究，對一位臨床醫師而言是一個不同的領域，以往想的是要如何手術，什麼疾病要如何治療，而新的生活是天天和 DNA 及 RNA 一同生活，開始花了一些時間在了解如何處理這些東西，以及從中凡衍生的技巧。如南方墨點法及北方墨點法、DNA 及 RNA 探針的製作，原位雜交的技巧、各種聚合酵素鏈反應的操作，蛋白質的分離，測量及尋找。種種的技術均是不容易累積的經驗。希望臨床醫師而言要兼顧照顧病患的工作，還要做出有國際水準的研究。是相當不容易的，希望慢慢的建立本科的實驗室及結合本部有意從事基礎研究的醫師，結合大家的力量及知識。希望可以提高本院的研究水準。

## Reference

---

- <sup>1</sup> Dussol, B., Geider, S., Lilova, A., et al: Analysis of soluble organic matrix of five morphologically different kidney stones. *Urol Res*(1995)23:45-51
- <sup>2</sup> S. Tardivel, S., Medetognon, J., Randoux, C., Kebede, M., et al. Alpha-1-microglobulin: inhibitory effect on calcium oxalate crystallization in vitro and decreased urinary concentration in calcium oxalate stone formers. *Urol Res* 27:243-249 1999.
- <sup>3</sup> Scheid, C., Honeyman, T., Kohjimoto, Y., Cao, LC., Jonassen, J.: Oxalate-induced changes in renal epithelial cell function: role in stone disease. *Mol Urol* 4(4):371-382 2000.
- <sup>4</sup> Khan, SR., Thamilselvan, S.,: Nephrolithiasis: a consequence of renal epithelial cell exposure to oxalate and calcium oxalate crystals. *Mol Urol* 4(4):371-382 2000.
- <sup>5</sup> Jonassen, JA., Cooney, R., Kennington, L., Gravel, K., Honeyman, T., Scheid, CR.: Oxalate-induced changes in the viability and growth of human renal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 10:S446-S451, 1999.
- <sup>6</sup> Miller C, Kennington L, Cooney R, Kohjimoto Y et al. Oxalate Toxicity in Renal Epithelial Cells: Characteristics of Apoptosis and Necrosis *Toxicology and Applied Pharmacology* **162**:132–141 (2000).
- <sup>7</sup> Khan, S. R.: Calcium oxalate crystal interaction with renal tubular epithelium, mechanism of crystal adhesion and its impact on stone development. *Urol. Res.*, **23**: 71, 1995.
- <sup>8</sup> Berggård T, Oury TD, Thogersen IB, Åkerström B, Enghild JJ: Alpha-1-microglobulin is found in blood and in most tissues. *J Histochem Cytochem*

---

46:887–893 1998.

<sup>9</sup> Takagi K, Kin K, Itoh Y, Kawai T, et al: Tissue distribution of human alpha-1-microglobulin. *J Clin Invest* 63:318-25 1979.

<sup>10</sup> Bouic P, Vincent C, Revillard JP. Immunohistochemical localization of alpha-1-microglobulin in normal rat tissue. *J Histochem Cytochem* 21:717-23 1984.

<sup>11</sup> Bratt, T., Olsson, H., Sjöberg, E. M., Jergil, B., and Åkerström, B. *Biochim. Biophys. Acta* 1157,147–154 1993.

<sup>12</sup> Sjöberg, E. M., and Fries, E. Biosynthesis of bikunin (urinary trypsin inhibitor) in rat hepatocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **295(2)**, 217–222 1992.

<sup>13</sup> Lindstrom KE, Blom A, Johnsson E, et al. High molecular permeability of bikunin despite similarity in charge and hydrodynamic size to serum albumin. *Kidney International* 51:1053-8 1997.

<sup>14</sup> Lindstrom KE, Blom A, Johnsson E, et al. High molecular permeability of bikunin despite similarity in charge and hydrodynamic size to serum albumin. *Kidney International* 51:1053-8 1997.

<sup>15</sup> Yu H, Yanagisawa Y, Forbes MA: Alpha-1-microglobulin: an indicator protein for renal tubular function. *J Clin Pathol* 36:253-9 1983.

<sup>16</sup> Itoh Y, Kawai T. Human alpha 1-microglobulin: its measurement and clinical significance. *J Clin Lab Anal* 4(5):376-384 1990.

<sup>17</sup> Xu Y, Carr PD, Guss JM, Ollis DL. The crystal structure of bikunin from the inter-alpha-inhibitor complex: a serine protease inhibitor with two Kunitz domains. *J Mol Biol* 276(5):955-966 1998.

