

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	： 以粒線體移植保護順鉑(cisplatin)誘導產生腎損傷的 可行性分析
------------	--

執行計畫學生：駱佳慧

學生計畫編號：MOST 107-2813-C-040-104-B

研究期間：107年07月01日至108年02月28日止，計8個月

指導教授：王淑紅

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 108年03月28日

目錄

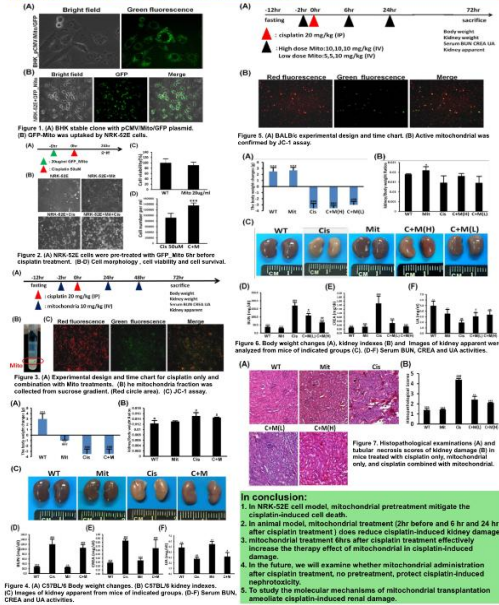
壹、生醫年會論文	1
貳、大專生計畫研究成果	
一、摘要	2
二、研究背景及目的	3
三、文獻回顧	3
四、材料與方法	4
五、結果	6
六、總結	13
七、討論	13
八、參考文獻	13

壹、生醫年會論文

Mitochondrial transplantation ameliate cisplatin-induced nephrotoxicity in NRK-52E cell and mice

Chia-Hsiu Liu¹, Shang-Kai Ng¹, Chen-Yu Hu¹, Ming-Shun Tsai¹, Sun-Hong Hong^{1*}
¹Department of Biomedical Sciences, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan.
²Department of Biotechnology, Da-Yeh University, Changhua, Taiwan.

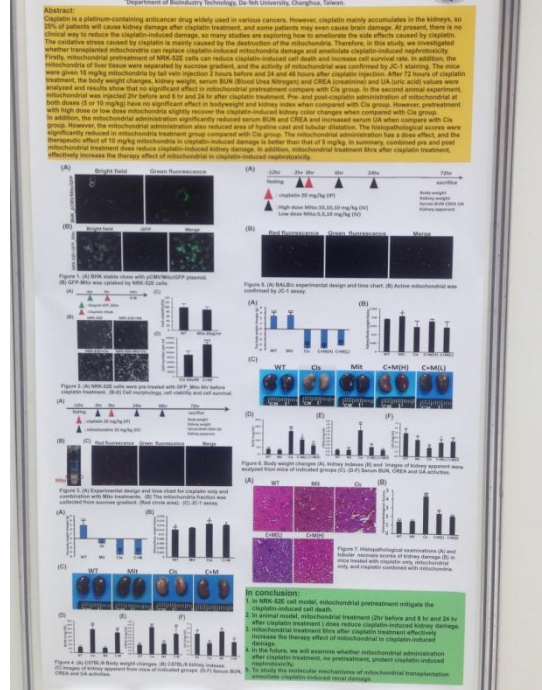
Abstract: Cisplatin is a platinum-containing anticancer drug widely used in various cancers. However, cisplatin mainly accumulates in the kidneys, so 25% of patients will cause kidney damage after cisplatin treatment, and some patients may even cause brain damage. At present, there is no clinical way to reduce the cisplatin-induced damage, so many studies are exploring how to ameliorate the side effects caused by cisplatin. The oxidative stress caused by cisplatin is mainly caused by the destruction of the mitochondria. Therefore, in this study, we investigated whether transplanted mitochondria can repair cisplatin-induced mitochondrial damage and ameliorate cisplatin-induced nephrotoxicity. Firstly, mitochondrial pretreatment of NRK-52E cells can reduce cisplatin-induced cell death and increase cell survival rate. In addition, the mitochondria of liver tissue were separated by sucrose gradient, and the activity of mitochondria was confirmed by JC-1 staining. The mice were given 10 mg/kg mitochondria by tail vein injection 2 hours before and 24 and 48 hours after cisplatin injection. After 72 hours of cisplatin treatment, the body weight changes, kidney weight, serum BUN (Blood Urea Nitrogen) and CREA (creatinine) and UA (uric acid) values were analyzed and results show that no significant effect in mitochondrial pretreatment compared with Cis group. In the second animal experiment, mitochondrial was injected 2hr before and 6 hr and 24 hr after cisplatin treatment. Pre- and post-cisplatin administration of mitochondrial at both doses (6 or 10 mg/kg) have no significant effect in bodyweight and kidney index when compared with Cis group. However, pretreatment with high dose or low dose mitochondria slightly recover the cisplatin-induced kidney color changes when compared with Cis group. In addition, the mitochondrial administration significantly reduced serum BUN and CREA and increased serum UA when compared with Cis group. However, the mitochondrial administration also reduced area of hyaline cast and tubular dilatation. The histopathological scores were significantly reduced in mitochondrial treatment group compared with Cis group. The mitochondrial administration has a dose effect, and the therapeutic effect of 10 mg/kg mitochondria in cisplatin-induced damage is better than that of 6 mg/kg. In summary, combined pre and post mitochondrial treatment does reduce cisplatin-induced kidney damage. In addition, mitochondrial treatment three after cisplatin treatment effectively increase the therapy effect of mitochondrial in cisplatin-induced nephrotoxicity.



Mitochondrial transplantation ameliate cisplatin-induced nephrotoxicity in NRK-52E cell and mice

Chia-Hsiu Liu¹, Shang-Kai Ng¹, Chen-Yu Hu¹, Ming-Shun Tsai¹, Sun-Hong Hong^{1*}
¹Department of Biomedical Sciences, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan.
²Department of Biotechnology, Da-Yeh University, Changhua, Taiwan.

Abstract: Cisplatin is a platinum-containing anticancer drug widely used in various cancers. However, cisplatin mainly accumulates in the kidneys, so 25% of patients will cause kidney damage after cisplatin treatment, and some patients may even cause brain damage. At present, there is no clinical way to reduce the cisplatin-induced damage, so more studies are exploring how to ameliorate the side effects caused by cisplatin. The oxidative stress caused by cisplatin is mainly caused by the destruction of the mitochondria. Therefore, in this study, we investigated whether transplanted mitochondria can repair cisplatin-induced mitochondrial damage and ameliorate cisplatin-induced nephrotoxicity. Firstly, mitochondrial pretreatment of NRK-52E cells can reduce cisplatin-induced cell death and increase cell survival rate. In addition, the mitochondria of liver tissue were separated by sucrose gradient, and the activity of mitochondria was confirmed by JC-1 staining. The mice were given 10 mg/kg mitochondria by tail vein injection 2 hours before and 24 and 48 hours after cisplatin injection. After 72 hours of cisplatin treatment, the body weight changes, kidney weight, serum BUN (Blood Urea Nitrogen) and CREA (creatinine) and UA (uric acid) values were analyzed and results show that no significant effect in mitochondrial pretreatment compared with Cis group. In the second animal experiment, mitochondrial was injected 2hr before and 6 hr and 24 hr after cisplatin treatment. Pre- and post-cisplatin administration of mitochondrial at both doses (6 or 10 mg/kg) have no significant effect in bodyweight and kidney index when compared with Cis group. However, pretreatment with high dose or low dose mitochondria slightly recover the cisplatin-induced kidney color changes when compared with Cis group. In addition, the mitochondrial administration significantly reduced serum BUN and CREA and increased serum UA when compared with Cis group. However, the mitochondrial administration also reduced area of hyaline cast and tubular dilatation. The histopathological scores were significantly reduced in mitochondrial treatment group compared with Cis group. The mitochondrial administration has a dose effect, and the therapeutic effect of 10 mg/kg mitochondria in cisplatin-induced damage is better than that of 6 mg/kg. In summary, combined pre and post mitochondrial treatment does reduce cisplatin-induced kidney damage. In addition, mitochondrial treatment three after cisplatin treatment effectively increase the therapy effect of mitochondrial in cisplatin-induced nephrotoxicity.



第34屆生物醫學聯合學術年會

2019 The 34th Joint Annual Conference of Biomedical Science

Translating Science into Health Care.

會議地點：國防醫學院

中華民國臨床生物化學學會
台灣毒物學學會
中國生理學會

台灣藥理學會
中華民族基因學會
中華民國免疫學會

台灣分子生物物理學會
台灣生物化學及分子生物學學會
中華民國細胞及分子生物學學會

參加證明

茲證明 駱佳慧 君於2019年3月23-24日參加第34屆生物醫學聯合學術年會。

此證

第34屆生物醫學聯合年會 籌備委員會 主席
中華民國臨床生物化學會 理事長 甯孝勇

貳、大專生計畫研究成果報告

計畫名稱:

以粒線體移植保護順鉑(cisplatin)誘導產生腎損傷的可行性分析

(一)摘要

順鉑(Cisplatin)是一種含鉑的抗癌藥物，廣泛的應用在各種癌症上，但是有 30%病人在使用順鉑後會造成腎臟損傷。目前臨床上減緩順鉑所造成的損傷，主要在使用順鉑時大量以點滴注射方式給病人生理食鹽水或給病人甘露純(mannitol)來減緩順鉑所造成的損傷。雖然有以上方法來減緩順鉑所造成的副作用，仍然有病人在使用順鉑後產生腎臟或腦神經損傷，因此順鉑所造成的副作用依然是臨床治療上很大的挑戰。所以許多研究都在探討如何減緩順鉑所造成的副作用，如我們過去所發表的高良薑素(Galangin)已經被證實可以透過抗氧化、抗發炎和抗細胞凋亡的機制減少順鉑所造成的小鼠腎臟損傷，由於順鉑造成的氧化壓力主要來自於粒線體的破壞所造成的，粒線體移植已被證實可以修復缺血再灌注所造成的心臟損傷，及修復非酒精性脂肪性肝病，因此本研究計畫將探討移植的線粒體是否可以取代順鉑誘導的線粒體損傷並改善順鉑誘導的腎毒性。

首先，在細胞實驗的部分發現粒線體預處理 NRK-52E 細胞可以減少順鉑誘導的細胞死亡，提高細胞存活率。接著在小鼠 C57BL/6 實驗上我們利用蔗糖梯度分離肝組織粒線體後，透過 JC-1 染色確認粒線體具有活性。在順鉑腹腔注射前 2 小時和順鉑注射後 24 和 48 小時透過尾靜脈注射給予小鼠 10 mg/kg 粒線體。並於順鉑治療 72 小時後，分析體重變化、腎臟體重比、血清腎功能 BUN (血尿素氮) 和 CREA (肌酐) 和 UA (尿酸) 值，結果顯示線粒體預處理與 Cis 組無顯著差異。在小鼠 C57BL/6 實驗上我們認為粒線體給予的時間點太晚，導致粒線體無法及時減緩 cisplatin 在 10hr 之內所造成的氧化壓力。因此在第二次動物 BALB/c 實驗中，我們在順鉑處理前 2 小時和順鉑處理後 6 小時和 24 小時注射粒線體，實驗結果發現在高劑量 (10 mg/kg) 或低劑量 (5 mg/kg) 粒線體治療組皆無顯著影響小鼠體重變化與腎臟體重比。然而，與 Cis 組相比，高劑量或低劑量粒線體處理稍微恢復了順鉑誘導的腎臟顏色變化。並且在血清腎功能指數上，粒線體顯著降低 BUN 和 CREA，並增加 UA 濃度。接著我們進一步分析腎臟組織病理分析與損傷判分，發現粒線體處理組與 Cis 組相比下，減少了玻璃圓柱體(hyaline cast)與腎小管管壁擴張(tubular dilatation)的面積。總結以上細胞與動物實驗得知，粒線體的前處理與後處理確實可以減少順鉑誘導細胞與動物的腎毒性，而粒線體具有劑量效應，10 mg/kg 線粒體的治療效果優於 5 mg/Kg。此外，在動物實驗上發現在順鉑誘導損傷 6 小時後給予粒線體，可以有效增加粒線體的治療作用。

(二)研究背景及目的

近年來因為飲食習慣以及環境的改變，罹患癌症的人口越來越多，而現今主要用於治療固態腫瘤，如膀胱癌、肺癌、乳癌、睪丸癌、大腸癌等，都是使用順鉑(cisplatin)這個化療藥劑，但是有 30%病人在使用 cisplatin 後會造成腎臟損傷，而且也有許多腦神經細胞的傷害發生，造成學習或記憶方面的障礙。Cisplatin 可能透過提升氧化壓力，引起發炎反應與導致細胞凋亡等機制，造成腎臟損傷(dos Santos et al., 2012)。這些嚴重的副作用會造成 cisplatin 在臨床上限制使用的原因，而目前臨床上減緩 cisplatin 所造成的損傷，主要在使用 cisplatin 時大量以點滴注射方式給病人生理食鹽水，以減低 cisplatin 的濃度(Bajorin et al., 1986)；或在使用 cisplatin 時以點滴方式給病人甘露純(mannitol)來減緩 cisplatin 所造成的損傷(Cornelison et al., 1993)。雖然有以上方法來減緩 cisplatin 所造成的副作用，仍然有病人在使用 cisplatin 後產生腎臟或腦神經損傷，因此 cisplatin 所造成的副作用依然是臨床治療上很大的挑戰。

所以許多研究都在探討如何減緩 cisplatin 所造成的副作用，如我們過去所發表的高良薑素(Galangin)已經被證實可以透過抗氧化、抗發炎和抗細胞凋亡的機制減少 cisplatin 所造成的小鼠腎臟損傷(Huang et al., 2017)。由於 cisplatin 造成的氧化壓力主要來自於粒線體的破壞所造成的，因此若以健康的粒線體取代破壞的粒線體將可以提高細胞對抗 ROS 的抗氧化的能力及提供新的 mtDNA，最後使受傷的細胞增加產生 ATP 的能力，因此本研究計畫將直接給與 cisplatin 處理的小鼠，分析粒線體移植是否具有減緩 cisplatin 造成的腎損傷的能力。目前已有研究指出粒線體可以進入體外培養的動物細胞並治療粒線體缺失的細胞(Katrangi et al., 2007; Islam et al., 2012)，另外在早期缺血再灌注期間，將心肌粒線體注入心肌組織缺血區，可顯著恢復因為區域和全身性缺血所造成的功能缺失(McCully et al., 2009)。另外以靜脈注射的方式將人類粒線體打入非酒精性脂肪性肝病的小鼠，減少脂肪的累積及氧化傷害恢復肝臟功能(Fu et al., 2017) 在帕金森氏症疾病大鼠與小鼠模式中也證明直接將粒線體以靜脈注射粒線體的方式，都能降低氧化壓力避免神經細胞的死亡(Michael et al., 2006)。以靜脈注射的方式將 GFP 標記的粒線體打入小鼠後，可以在肝臟、肺臟、腦、腎、及肌肉組織發現 GFP 螢光，顯示外源性粒線體會進入不同的組織。因此本研究以 cisplatin 誘導的小鼠測試注射粒線體是否減緩 cisplatin 造成的腎損傷，同時也將比較組織中分離粒線體與細胞分離粒線體的治療效果是否不同。

(三)文獻回顧

許多研究已證實由 cisplatin 所誘導的腎毒性與粒線體所產生的活性氧化物質有密切關聯(Santos et al., 2008)。活性氧化物質直接損壞細胞組成並活化且促使腫瘤壞死因子(TNF- α)表現，腫瘤壞死因子(TNF- α)誘導細胞凋亡並活

化促發炎細胞激素，接著聚集發炎細胞，導致產生氧化壓力並增加腎損傷(Ramesh et al., 2003)。Cisplatin也會活化絲裂原活化蛋白激酶途徑(MAPK pathways)，抑制 p38、ERK1/2 或 JNK 藉由特定的藥理機制或透過遺傳抑制因子阻礙細胞凋亡激酶活性(apoptotic caspase)、發炎因子與腎損傷(Jo et al., 2005; Ramesh et al., 2005)。此外，cisplatin 藉由刺激 RIP1 及 RIP3 或 MLKL 表現，導致腎小管細胞壞死。許多研究已證實 cisplatin 誘導 NF- κ B 活化，並且抑制 NF- κ B 轉錄活性進而降低促發炎因子與 RIP1/RIP3 的表現，來改善 cisplatin 所誘導的急性腎損傷(AKI) (Ozkok et al., 2016)，其他研究也證實 Nrf2 在 cisplatin 所誘導的腎毒性中扮演一個保護者角色(Shelton et al., 2013)。先前許多研究已專注於 cisplatin 所誘導的腎毒性機制，然而目前臨床上尚未有關於預防 cisplatin 誘導急性腎損傷(AKI)之有效治療方法，因此，開發新的降低 cisplatin 造成腎損傷的方法極為重要。cisplatin 所誘導的急性腎損傷機制主要有四種，分別為氧化壓力、發炎作用、腎臟近曲小管損傷以及腎管損傷(Oh et al., 2016)，Cisplatin 所誘導的活性氧化物(ROS)與活性氮化物(RNS)與 cisplatin 誘導的急性腎損傷有密切關聯(Yao et al., 2007)。MDA 與 3-NT 為脂質過氧化與蛋白質硝化的重要指標，同時也是腎臟中氧化壓力與亞硝化壓力的重要指數。

粒線體療法在近 10~20 年來皆有許多學者開始研究其效果，在分離的粒線體能在不同的兩個細胞系間做交換的論文出現後(Tomoya et al., 2014)已有許多的學者開始利用粒線體原位移植注射來治療心臟衰竭等缺氧性壞死疾病(Sanchis et al., 2016)及神經性的退化疾病，如：阿茲海默症(AD)、帕金森氏症(PD)等(Shi et al., 2017)。此外，在粒線體靜脈注射移植的技術被應用在非酒精性脂肪肝病(Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) (Fu et al., 2017)出現後，研究證明粒線體能經由靜脈注射(0.5 mg/kg)至小鼠而分布到肝、肺、腦、肌肉、腎臟，並且以每三天一次持續 9~18 天的方式來治療可發現脂肪肝的狀況有明顯的下降，因此我們認為 Cisplatin 經由一些發炎因子(Nrf2, HO-1, GCLC)、凋亡因子(P53, Bax, caspase-3)及氧化壓力所造成的腎毒性可能可以經由外源性的粒線體做組織功能性修復及治療。

(四)材料與方法

1. 細胞中粒線體的分離與製備

BHK_pCMV/Mito/GFP(來自於中興蘇老師)細胞與 BHK 細胞培養在 10 cm dish 至滿盤(2×10^8)以 PBS 清洗兩次後，加入 trypsin 將細胞打下，以 15ml 離心管 1000rpm 離心三分鐘後，去除上清液後再加入冰的 1ml S. E. H. buffer(0.25M sucrose, 0.5 mM EGTA, 3 mM HEPE, pH7.2, 4°C)，將細胞打散後再將細胞移至預冷的均質器，研磨 40 次(避免泡泡)，取 5ul 以 trypan blue 確認是否有八成以上細胞都破了(以未磨以前的細胞作為對照)，若破的比例太低，可以繼續研磨。確定八成以上細胞都破了後，將溶液移至 eppendorf 靜至於冰上 5 分鐘，接著離

心 400g, 5 分鐘。離心後去除沉澱物, 將上清液移至新的 eppendorf 離心 400g, 5 分鐘。離心後去除沉澱物, 將上清液移至新的 eppendorf 離心 5800g, 5 分鐘。離心後沉澱物即為粒線體, 用 100ul S. E. H. buffer 回溶 pellet, 以 Bio-Rad protein assay kit 測量蛋白濃度。

2. 組織中粒線體的分離與製備

小鼠禁食 12hr 後(消耗肝醣), 以 Isoflurane 氣麻, 接著以 1X PBS 灌流。以下步驟均在冰上操作, 取全部肝臟秤重後切半至兩個 15ml 離心管, 並用剪刀碎組織(約 10 刀)後, 各加入 6ml SHE buffer。將 PR0200 固定於架上, 強度 "1", 震 20 秒, 停 20 秒, 8 次(過程需上下移動離心管), 離心 1000g, 10min, 4°C 後, 用 dropper 取上清液兩管合併至 38ml 養菌離心管, 接著離心 9000g, 10min, 4°C。離心後留 pellet, 加 5ml SEH buffer 用 dropper 打散。接著製備蔗糖濃度梯 55%-40%-30% (用 13.2ml 軟管, 每個濃度各 2.5ml, 動作慢, 用滴的) total 7.5ml, 最後加入均質液 4.5-5 ml, 連同離心管子與蓋平衡, 連同離心管子與蓋平衡到小數點後三位。離心 27500rpm, 35min, 4°C 後粒線體會 40%-55% 交界處, 為乳白色液體(紅色圈起處), 先將上層液體吸除至粒線體上方約 0.5cm 高度, 再用 dropper 插入至粒線體那層吸取, 以十倍體積打散粒線於 15ml 離心管 (mito:SEH buffer=1:10, 用 dropper 輕輕吸放)。接著離心 6300g, 10min, 4°C, 離心後留 pellet, 加 10 ml SEH buffer 用 dropper 打散), 再離心 6300 g, 10min, 4°C。離心後留 pellet, 加 500-1000ul SEH buffer 回溶粒線體, 測濃度。取 20ul 粒線體加入 di10X JC1 2ul 至玻片上, 蓋至玻片上, 正立螢光顯微鏡觀察。



3. JC-1 staining

JC1 染劑是一種粒線體染劑, 可測量粒線體膜電位, 染出粒線體電位失衡現象。其原理為當帶正電的 JC1 染劑進入細胞中, 會被粒線體膜上負性電位所吸引並聚集成二聚體, 在螢光顯微鏡下呈現橘紅色螢光。若是粒線體膜電位消失, JC1 就無法被吸引, 而形成單聚體, 散佈在細胞中, 在螢光顯微鏡下呈現綠色螢光。依細胞粒線體萃取方法學或組織粒線體萃取方法學將粒線體分離出來後, 經蛋白質定量, 給予每 mg 蛋白 1.5ug 的 JC1 染劑, 透過正立螢光顯微鏡觀察。

4. H. E staining

將玻片依序置於 Xylene A-B-C, 10~15min 脫臘, 接著將玻片由濃度高到低泡入酒精 100% 95% 75% 50% 30% 各 10min (覆水)。泡入二次水 10min 後染核 (hematoxylin, 鹼性), 需避光, 3 min。再泡入二次水 10min 清洗 hematoxylin, 接著染質 (Eosin, 酸性) 10 min。再依序泡入 95%、100% 酒精, 各 2min, 泡入 Xylene C 10min (在去臘), 將玻片於操作台烘乾烘乾後, 在玻片上滴封片膠, 並用蓋玻片封片。

(五)結果

1. NRK-52E 以 BHK_pCMV/Mito/GFP 分離的 GFP_粒線體處理 24 小時，GFP_粒線體會進入細胞。

在螢光顯微鏡下觀察 BHK_GFP 細胞(圖 1A)，明顯的細胞質中有 GFP 綠色螢光訊號，根據粒線體的分離方法分離出的粒線體，也有明顯的 GFP 訊號，將此純化出的粒線體經蛋白定量後，以 20ug/ml 處理 NRK-52E 細胞 24 小時後觀察到細胞質中帶有綠螢光之粒線體胞器(圖 1B)。

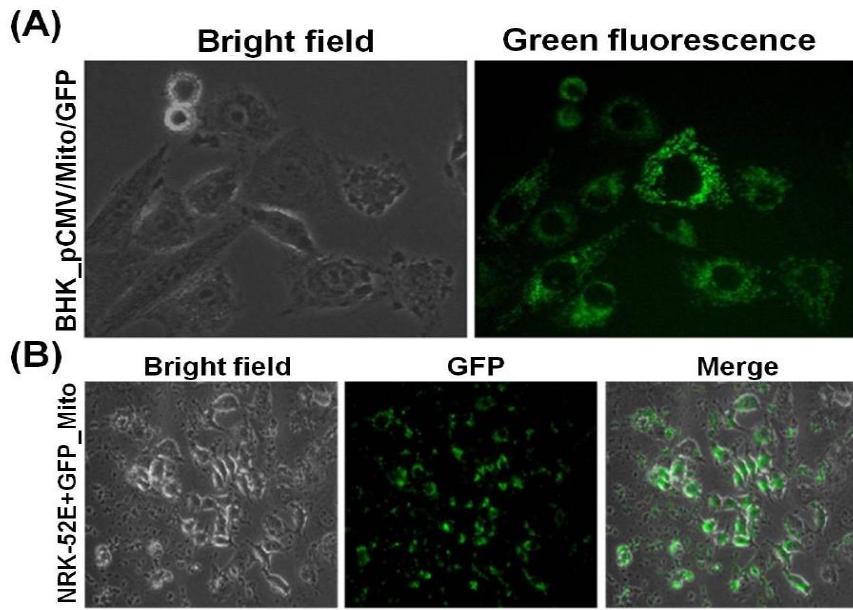


Figure 1. (A) BHK stable clone with pCMV/Mito/GFP plasmid. (B) NRK-52E 以 BHK stable 細胞分離之 GFP_Mito 處理 24 小時的螢光圖。

2. BHK_GFP 細胞分離之粒線體前處理 NRK-52E 細胞可以降低 cisplatin 造成的細胞死亡現象。

確認外來的粒線體會進入細胞後，接著我們探討粒線體是否減緩 cisplatin 對於細胞造成的傷害。以 1.5×10^6 NRK-52E 細胞數量培養於 6cm dish 後，分別以 BHK 細胞分離之粒線體處理，或 cisplatin 0ug/ml 處理 6 小時後再以 cisplatin 50uM 處理 24 小時圖(2A)。單獨粒線體 20ug/ml 處理不會影響細胞存活率圖(2B-C)。粒線體前處理 6 小時後可以降低 cisplatin 造成的細胞死亡現象圖(2D)。

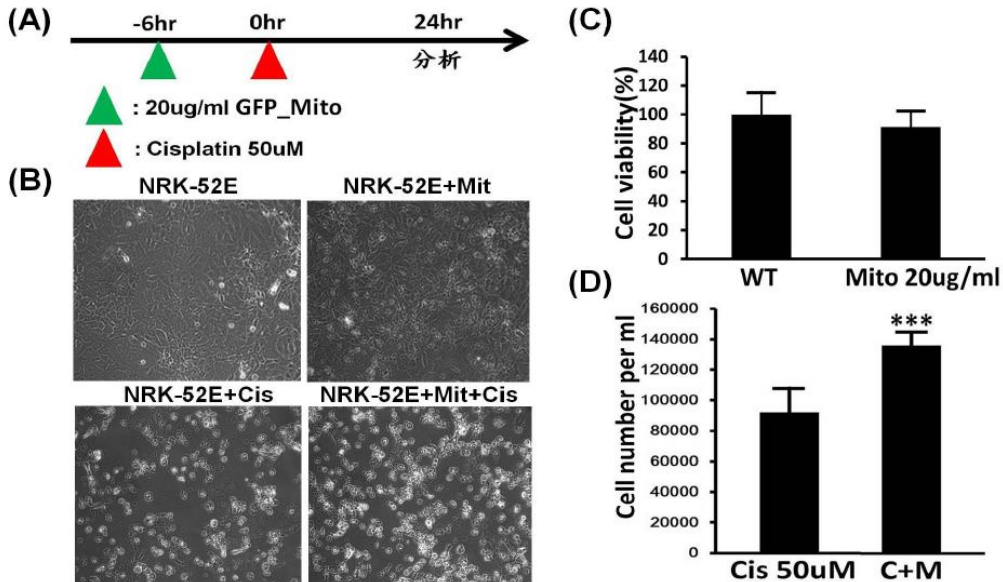


Figure 2. (A)細胞實驗設計與明視野圖 (B)細胞存活率統計圖 (C)細胞總數統計圖。(平均±SD, n≥3, *表示與 Cis 組相比 p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), and p < 0.001(***))

3. 以 Sucrose gradient 方式分離出 C57BL/6 小鼠肝臟中的粒線體，並藉由 JC-1 確認粒線體具有活性。

在細胞實驗上我們確認粒線體預處理 NRK-52E 細胞可以減少順鉑誘導的細胞死亡與提高細胞存活率後，接著我們進行 C57BL/6 動物實驗，探討移植外源性的粒線體是否降低 cisplatin 造成的腎毒性。圖(3A) 自國家動物中心購買 5 周大 C57BL/6 小公鼠後，飼養於中山醫學大學動物中心，適應一周後進行實驗，將老鼠依體重平均分組。實驗組別分成 WT 組、cisplatin only (cis)組、Mitochondria only (mit)組、cisplatin + mitochondria (C+M)組，總共 4 組。在 cisplatin 20mg/kg 誘導小鼠急性腎衰竭的前 2 小時與後第 24、48 小時以尾靜脈注射方式給予 10mg/kg 粒線體。並於 cisplatin 誘導小鼠腎衰竭後第 72 個小時過後將存活下來的小鼠犧牲，進行生化分析。依序加入 55%, 40%, 30% 不同蔗糖濃度建立濃度梯度後，加入肝臟組織均值液，超高速離心後粒線體會聚集於 40%-55% 交界處(紅色圈圈處)圖(3B)。利用 JC-1 staining 確認粒線體膜電位，紅色螢光代表正常健康粒線體；綠色螢光代表粒線體功能失衡圖(3C)。

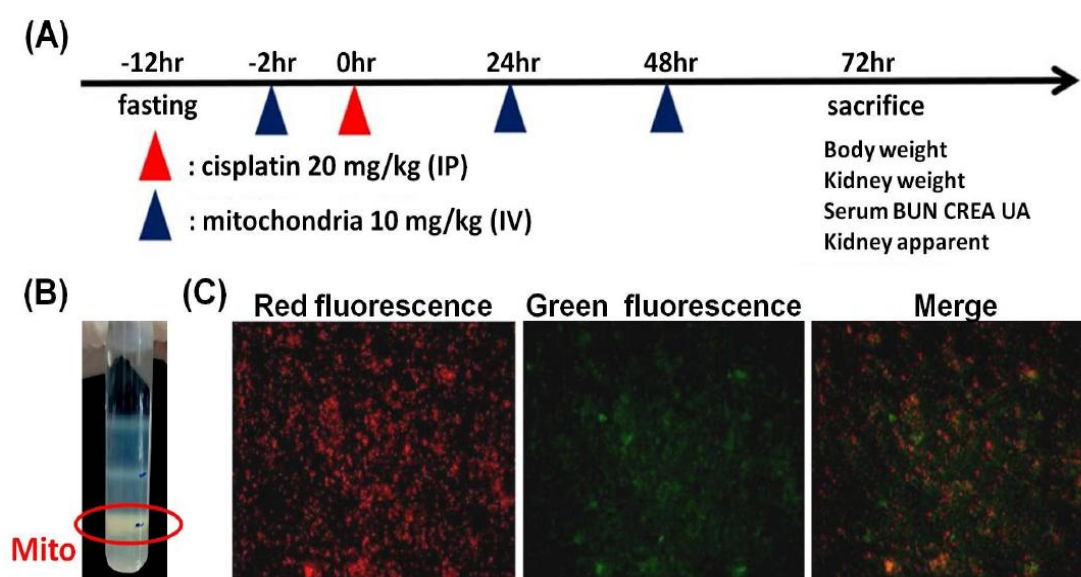


Figure 3. (A)C57BL/6 實驗設計 (B)以 Sucrose gradient 方式分離組織中的粒線體 (C)JC-1 螢光圖。

4. 粒線體前 (-2hr)與後處理(24, 48hr)對於 cisplatin 誘導小鼠的體重變化、腎指數與腎臟外觀的影響。

以 JC-1 確認組織分離出的粒線體功能良好後，在 cisplatin 20mg/kg 誘導小鼠急性腎衰竭的前 2 小時與後第 24、48 小時以尾靜脈注射方式給予 10 mg/kg 至小鼠體內，並於 cisplatin 誘導小鼠腎損傷後第 72 個小時過後將存活下來的小鼠犧牲。透過小鼠體重變化統計(圖 4A)，腎臟體重比統計(圖 4B)以及腎臟外

觀圖(圖 4C)，得知 cisplatin 會造成小鼠體重下降，提高腎臟體重比，腎臟外觀顏色變淺，表示有腎水腫情形。藉由粒線體理後，在體重變化、腎臟體重比與腎臟外觀並無有效降低 cisplatin 造成的腎毒性。

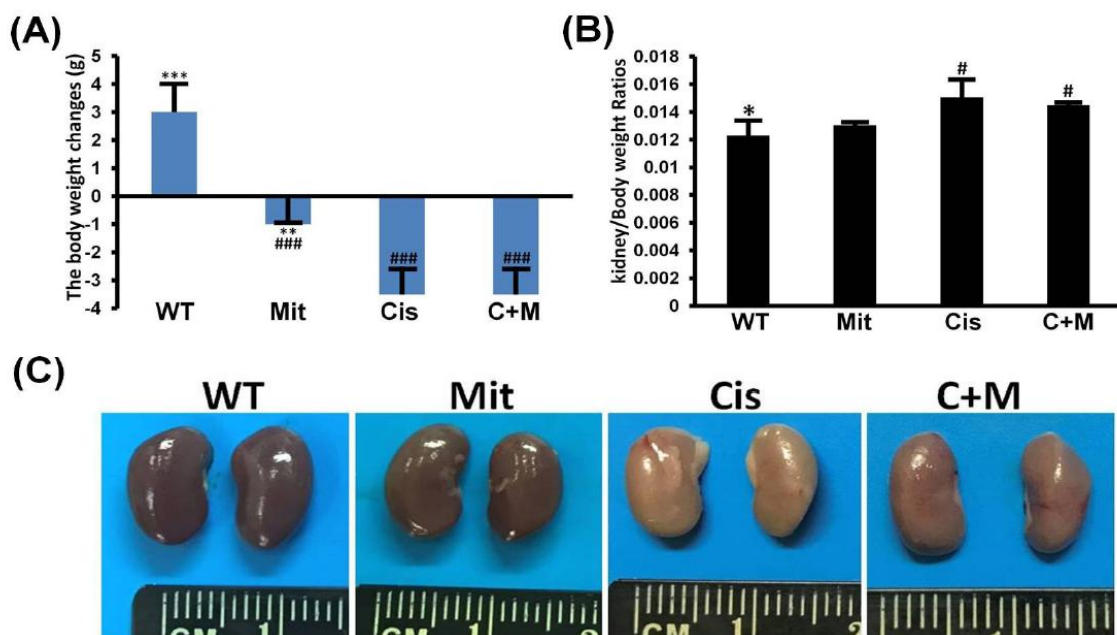


Figure 4. (A)C57BL/6 體重變化 (B)腎臟體重比 (C)各組腎臟外觀

在 cisplatin 誘導 C57BL/6 腎損傷後第 72 小時將小鼠犧牲，取出腎臟後秤重與拍照。圖(4A) 犧牲前(72hr)小鼠體重減去實驗前體重(-2hr)。圖(4B) 腎臟重量除以犧牲前(72hr)小鼠體重。圖(4C) 腎臟取出後以 1X PBS 將表面血漬潤洗乾淨後，移至塑膠背板拍照。(平均±SD, n≥3, *表示與 Cis 組相比 p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), and p < 0.001(***) ; #表示與 WT 組相比 p < 0.05 (#), p < 0.01 (##), and p < 0.001(###))。

5. 粒線體前(-2hr)與後處理(24, 48hr)對於腎功能指數 BUN, CREA, UA 的影響。

根據血清中 BUN 與 CREA 統計圖得知圖(5A-B)，cisplatin 處理組別，BUN 與 CREA 指數明顯較 WT 組增加，而在圖(5C) 血清中 UA 統計圖中，cisplatin 處理可以使血清中 UA 表現降低，以上血清統計圖表示透過 cisplatin 可以誘導小鼠腎損傷。經由粒線體治療後，腎臟功能指標(BUN, CREA, UA)皆與 Cis 組別無顯著上差異，仍有腎功能異常現象。

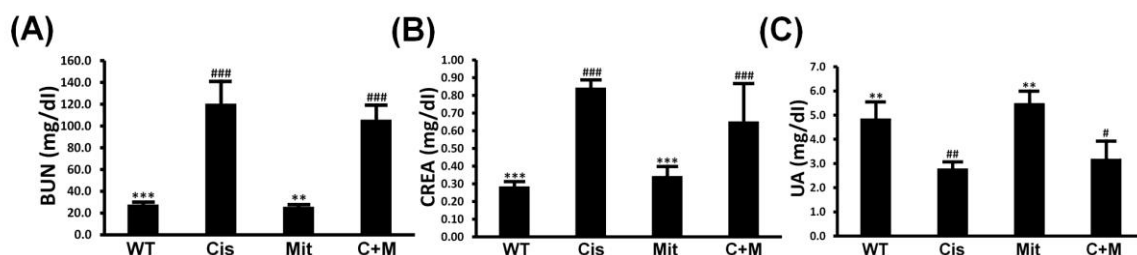


Figure 5. C57BL/6 血清中腎功能指數 (A)BUN (B)CREA (C)UA

在 cisplatin 20mg/kg 誘導小鼠腎衰竭後第 72 小時，將小鼠犧牲，進行心臟採血將液靜置 30 分鐘後，離心 3000g，4°C，10 分鐘後，取上清液即為小鼠血。血清送至國家實驗動物中檢測 BUN, CREA, UA，將數值作成小鼠腎功能統計圖圖 (5A-C)。(平均±SD, n≥3, *表示與 Cis 組相比 p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), and p < 0.001(***) ; #表示與 WT 組相比 p < 0.05 (#), p < 0.01 (##), and p < 0.001(###))。

6. 在組織並理分析上，粒線體的前(-2hr)與後處理(24, 48hr)可以減緩 cisplatin 造成的腎損傷。

透過組織切片與損傷判分得知單獨粒線體處理不會造成腎臟損傷，而 cisplatin 處理組別則有明顯管壁擴張(tubular dilatation)與玻璃圓柱體(hyaline cast)形成。在 C+M 組發現藉由粒線體的處理可以降低 cisplatin 造成的腎損傷，有效減少管壁擴張與玻璃圓柱體的形成。

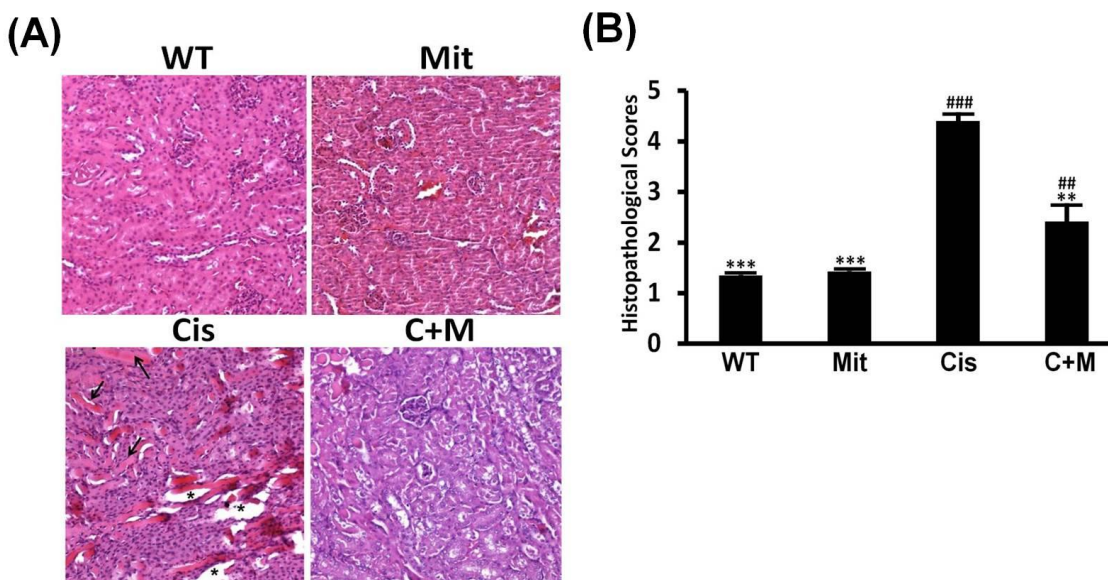


Figure 6. (A)C57BL/6 腎臟組織病理分析 (B)判分

在連續觀察 72hr 後，將小鼠犧牲並取下腎臟，用 10%中性福馬林將其固定後，送至中山醫病理室脫水，接著將脫水好的組織包埋並進行組織切片與 H. E 染色。透過正立螢光顯微鏡觀察各組腎臟切片。透過正立螢光顯微鏡觀察各組腎臟切片 (*表示管壁擴張，箭號表示玻璃圓柱體)圖(6A)。透過類流式組織細胞定量分析儀(TissueFAXS™ Cytometry)將各組腎臟組織切片中的損傷面積進行判分與統計圖(6B)。(平均±SD, n≥3, *表示與 Cis 組相比 p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), and p < 0.001(***) ; #表示與 WT 組相比 p < 0.05 (#), p < 0.01 (##), and p < 0.001(###))。

7. 從 BHK 細胞分離出的粒線體，藉由 JC-1 確認粒線體具有活性。

根據先前 C57BL/6 動物實驗我們認為粒線體給予的時間點太晚，導致粒線體無法及時減緩 cisplatin 在 10hr 之內所造成的氧化壓力。因此在第二次動物 BALB/c 實驗中，我們在順鉑處理前 2 小時和順鉑處理後 6 小時和 24 小時注射粒線體。圖(7A) 自國家動物中心購買 5 周大 BALB/c 小公鼠後，飼養於中山醫學大學動物中心，適應一周後進行實驗，將老鼠依體重平均分組。實驗組別分成 WT 組、Cisplatin only (cis)組、Mitochondria only (mit)組、cisplatin +高劑量 mitochondria (C+M(H))組、cisplatin +低劑量 mitochondria (C+M(L))總共 5 組。BHK 細胞分離粒線體後，利用 JC-1 染色觀察粒線體具有活性後，在高劑量粒線體治療組別透過蛋白定量將 10 mg/kg 粒線體經尾靜脈注射方式給予至小鼠體內；低劑量組別給予 5 mg/kg 粒線體。接著在 2 個小時過後以腹腔注射給予 cisplatin 20mg/kg 誘導小鼠急性腎衰竭。在 cisplatin 20mg/kg 誘導小鼠急性腎衰竭後第 6 與第 24 小時，都以尾靜脈注射方式給予高劑量組別 10 mg/kg 粒線體；低劑量組別則分別給予 5 mg/kg 與 10 mg/kg 粒線體。接著在 cisplatin 誘導小鼠急性腎衰竭後 72 小時將存活下來的小鼠犧牲，進行生化分析。利用 JC-1 staining 確認粒線體膜電位，紅色螢光代表正常健康粒線體；綠色螢光代表粒線體功能失衡圖(7B)。

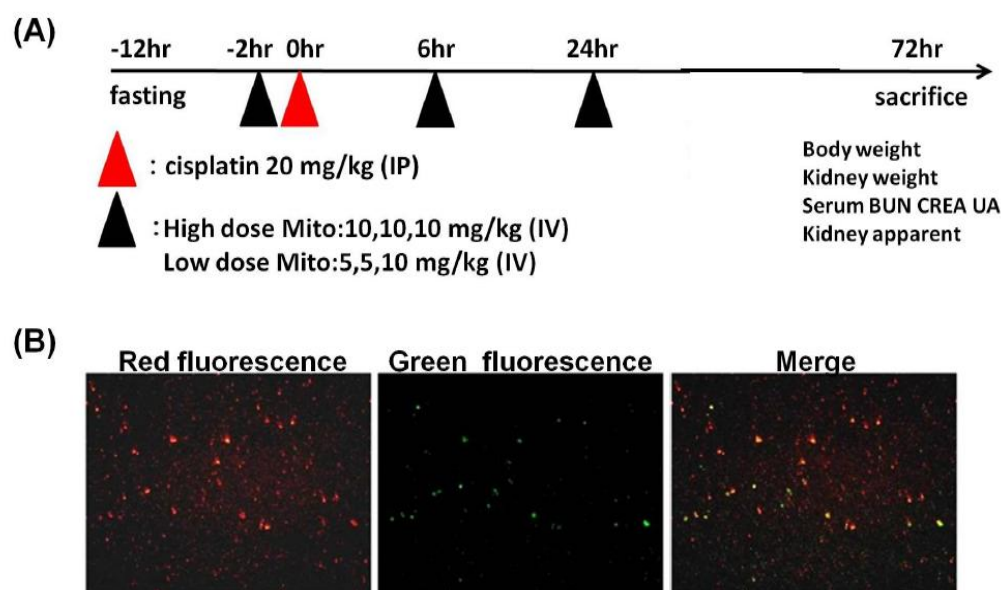


Figure 7. (A)BALB/c 實驗設計 (B)JC-1 螢光圖。

8. 粒線體前(-2hr)與後處理(6, 24hr)可以改善 cisplatin 造成的腎臟外觀顏色變化。

透過小鼠體重變化統計(圖 8A)，腎臟體重比統計(圖 8B)以及腎臟外觀(圖 8C)，得知 cisplatin 會造成小鼠體重下降，提高腎臟體重比，腎臟外觀顏色變淺，表示有腎水腫情形。雖然藉由粒線體理後，在體重變化、腎臟體重比並無有效降低 cisplatin 造成的腎毒性，但是在外觀圖粒線體處理有減少腎臟顏色變白的現象。

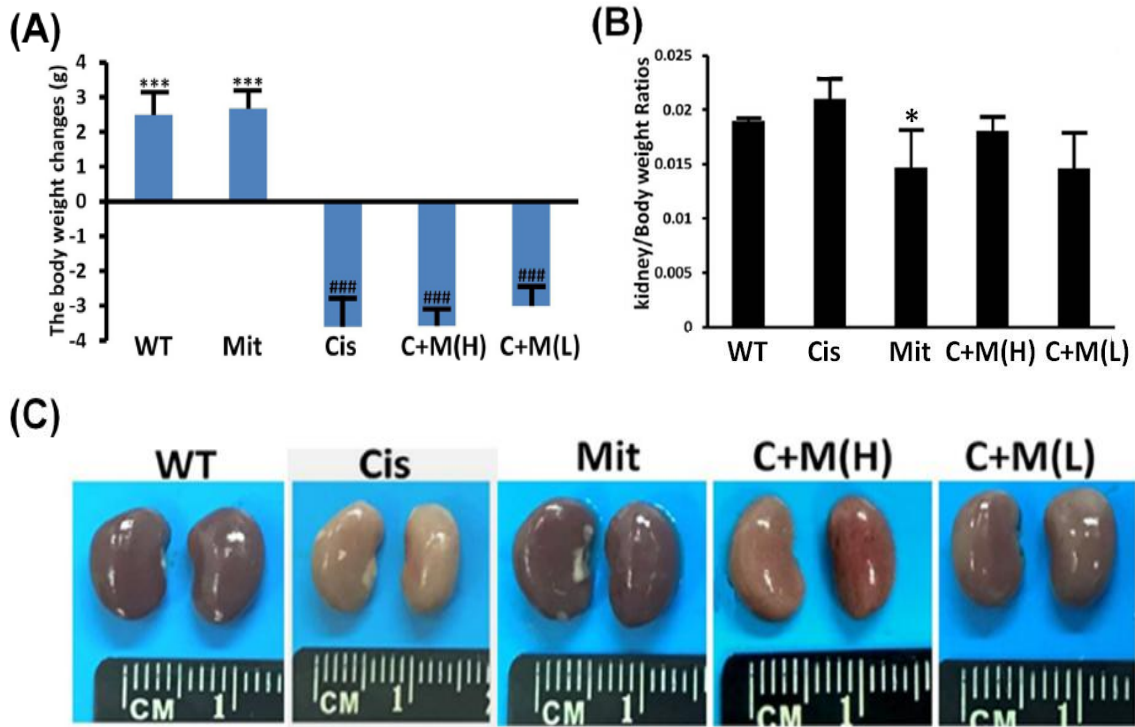
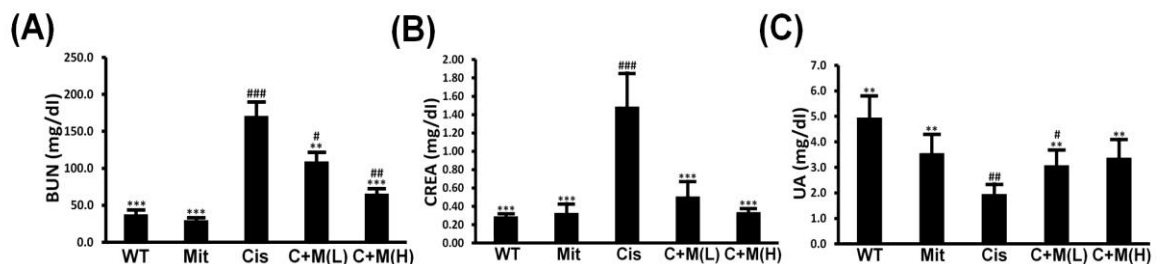


Figure 8. (A) BALB/c 體重變化 (B) 腎臟體重比 (C) 各組腎臟外觀

在 cisplatin 誘導 BALB/c 腎損傷後第 72 小時將小鼠犧牲，取出腎臟後秤重與拍照。圖(8A) 犧牲前(72hr)小鼠體重減去實驗前體重(-2hr)。圖(8B) 腎臟重量除以犧牲前(72hr)小鼠體重。圖(8C) 腎臟取出後以 1X PBS 將表面血漬潤洗乾淨後，移至塑膠背板拍照。(平均±SD, n≥3, *表示與 Cis 組相比 p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), and p < 0.001(***) ; #表示與 WT 組相比 p < 0.05 (#), p < 0.01 (##), and p < 0.001(###))。

9. 粒線體前(-2hr)與後處理(6, 24hr)改善 cisplatin 誘導小鼠的腎功能指數。

根據血清中 BUN 與 CREA 統計圖得知圖(9A-B)，cisplatin 處理組別，BUN 與 CREA 指數明顯較 WT 組增加，而在圖(9C) 血清中 UA 統計圖中，cisplatin 處理可以使血清中 UA 表現降低，以上血清統計圖表示透過 cisplatin 可以誘導小鼠腎損傷。經由高劑量或低劑量的粒線體處理後，都有顯著下降 BUN 與 CREA 的表現，並且提升 UA 的濃度，表示透過粒線體治療可以降低 cisplatin 造成的腎毒性。



在 cisplatin 20mg/kg 誘導小鼠腎衰竭後第 72 小時，將小鼠犧牲，進行心臟採血將液靜置 30 分鐘後，離心 3000g，4°C，10 分鐘後，取上清液即為小鼠血。血清送至國家實驗動物中檢測 BUN, CREA, UA，將數值作成小鼠腎功能統計圖圖 (9A-C)。(平均±SD, n≥3, *表示與 Cis 組相比 p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), and p < 0.001(***);#表示與 WT 組相比 p < 0.05 (#), p < 0.01 (##), and p < 0.001(###))。

10. 在組織並理分析上，粒線體的前(-2hr)與後處理(24, 48hr)可以降低 cisplatin 造成的腎損傷。

透過組織切片與損傷判分得知單獨粒線體處理不會造成腎臟損傷，而 cisplatin 處理組別則有明顯管壁擴張(tubular dilatation)與玻璃圓柱體(hyaline cast)形成。在 C+M 組發現藉由粒線體的處理可以降低 cisplatin 造成的腎損傷，有效減少管壁擴張與玻璃圓柱體的形成，而其中高劑量的效果比低劑量好。

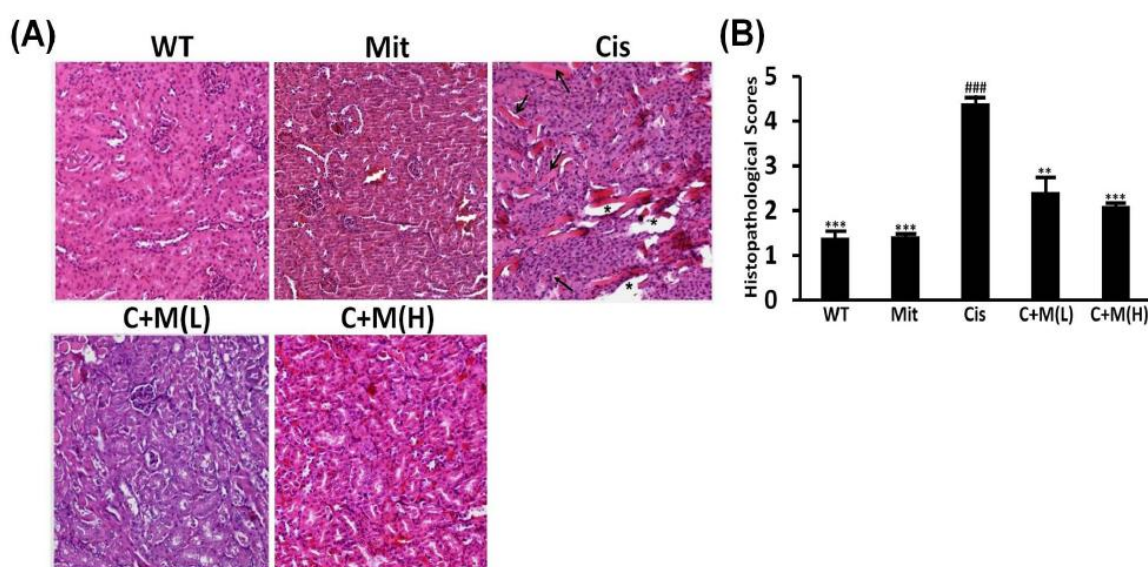


Figure 10. (A)BALB/c 腎臟組織病理分析 (B)判分

在連續觀察 72hr 後，將小鼠犧牲並取下腎臟，用 10%中性福馬林將其固定後，送至中山醫病理室脫水，接著將脫水好的組織包埋並進行組織切片與 H. E 染色。透過正立螢光顯微鏡觀察各組腎臟切片。透過正立螢光顯微鏡觀察各組腎臟切片 (*表示管壁擴張，箭號表示玻璃圓柱體)圖(10A)。透過類流式組織細胞定量分析儀(TissueFAXS™ Cytometry)將各組腎臟組織切片中的損傷面積進行判分與統計圖(10B)。(平均±SD, n≥3, *表示與 Cis 組相比 p < 0.05 (*), p < 0.01 (**), and p < 0.001(***);#表示與 WT 組相比 p < 0.05 (#), p < 0.01 (##), and p < 0.001(###))。

(六)總結

根據以上細胞與動物實驗得知，粒線體的前處理與後處理確實可以減少順鉑誘導細胞與動物的腎毒性，而單獨的粒線體處理並不會影響細胞的存活率或造成動物腎毒性。此外，粒線體具有劑量效應，10 mg/kg 線粒體的治療效果優於 5 mg/Kg，我們在 BALB/c 動物實驗上發現粒線體給予的時間會影響治療效果，在順鉑誘導損傷 6 小時後給予粒線體，可以有效增加粒線體的治療作用。

(七)討論

本次研究中我們發現，直接給與順鉑處理的 NRK-52E 細胞外源性粒線體，可以提高細胞的存活率，而在活體實驗上，在 cisplatin 注射前 2 小時及後 6 與 24 小時，以尾靜脈注射方式給與小鼠 5 或 10mg/kg 粒線體確實可以降低 cisplatin 造成的腎損傷，包括血清 BUN 與 CREA 數值降低；血清 UA 數值提高，腎臟組織 hyaline cast 與管壁擴張及細胞死亡也減少。此外，粒線體的治療具有劑量效應，10 mg/Kg 的粒線體的治療效果比 5 mg/Kg 的效果好。因此未來我們將延續之前的粒線體治療，首先找出粒線體治療 cisplatin 誘導小鼠腎臟損傷的最佳劑量與治療時間，另外也將以 GFP_粒線體追蹤粒線體是否累積在腎臟組織取代壞死的粒線體，因而增加細胞的存活增進腎臟生理功能，另外也將以細胞模式分析粒線體治療是否增加細胞 ATP 合成的能力，分析腎臟組織抗氧化能力是否增加，測量腎臟組織之脂質過氧化物 MDA、GSH 量、SOD、catalase，另外也分析腎臟組織粒線體的膜電位及細胞凋亡分子的表現如 P53, Bax, Bcl2 及 caspase-3 的表現，最後分析發炎因子如(TNF α , IL-1 β , IL-6)的表現，以了解粒線體移植治療 cisplatin 造成的腎損傷的分子機制。

(八)參考文獻

- Bajorin, D. F., Bosl, G. J., Alcock, N. W., Niedzwiecki, D., Gallina, E., & Shurgot, B. Pharmacokinetics of cis-diamminedichloroplatinum (II) after administration in hypertonic saline. *Cancer Res.* 1986 Nov;46(11):5969-72.
- Cornelison ,TL.,Reed, E., Nephrotoxicity and hydration management for cisplatin, carboplatin, and ormaplatin. *Gynecol Oncol.* 1993 Aug;50(2):147-58.
- Chang, L., Karin ,M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 2001 Mar 1;410(6824):37-40
- dos Santos, NA., Carvalho Rodrigues ,MA., Martins ,NM., dos Santos ,AC. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. *Arch Toxicol.* 2012 Aug;86(8):1233-50
- Fu, A., Shi, X., Zhang, H., Fu,B. Mitotherapy for Fatty Liver by Intravenous Administration of Exogenous Mitochondria in Male Mice. *Front Pharmacol.* 2017 May 9;8:241
- Huang, J.,Iglesias, N., Moazed, D., Evaluation of the Nucleolar Localization of the

- RENT Complex to Ribosomal DNA by Chromatin Immunoprecipitation Assays. *Methods Mol Biol.* 2017;1505:195-213.
- Huang ,Y.C., Tsai , M.S., Hsieh, P.C., Shih, J.H., Wang ,T.S., Wang , Y.C, Lin , T.H., Wang, S.H. Galangin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by attenuating oxidative stress, inflammation and cell death in mice through inhibition of ERK and NF-kappaB signaling. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017 Aug 15;329:128-139.
- Islam, MN1., Das, SR., Emin ,MT., Wei, M., Sun, L., Westphalen, K., Rowlands, DJ., Quadri ,SK., Bhattacharya, S., Bhattacharya, J. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat Med.* 2012 Apr 15;18(5):759-65
- Jiang, M., Yi ,X., Hsu, S., Wang, CY., Dong, Z. Role of p53 in cisplatin-induced tubular cell apoptosis: dependence on p53 transcriptional activity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004 Dec;287(6):F1140-7.
- Jo ,SK1., Cho, WY., Sung, SA., Kim, HK., Won, NH. MEK inhibitor, U0126, attenuates cisplatin-induced renal injury by decreasing inflammation and apoptosis. *Kidney Int.* 2005 Feb;67(2):458-66.
- Katrangi, E., D'Souza ,G., Boddapati, SV., Kulawiec, M., Singh, KK., Bigger ,B., Weissig ,V., Xenogenic transfer of isolated murine mitochondria into human rho0 cells can improve respiratory function. *Rejuvenation Res.* 2007 Dec;10(4):561-70.
- Kitani, T., Kami, D., Matoba, S., Gojo, S. Internalization of isolated functional mitochondria: involvement of macropinocytosis. *J Cell Mol Med.* 2014 Aug;18(8):1694-703.
- Lin, MT., Beal, MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 2006 Oct 19;443(7113):787-95
- Lee, DW., Faubel, S., Edelstein, CL. A pan caspase inhibitor decreases caspase-1, IL-1 α and IL-1 β , and protects against necrosis of cisplatin-treated freshly isolated proximal tubules. *Ren Fail.* 2015 Feb;37(1):144-50.
- McCully ,JD., Cowan, DB., Pacak, CA., Toumpoulis ,JK., Dayalan, H., Levitsky, S. Injection of isolated mitochondria during early reperfusion for cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 Jan;296(1):H94-H105.
- Oh ,GS., Kim, HJ., Shen, A., Lee, SB., Yang, SH., Shim, H., Cho, EY., Kwon, KB., Kwak ,TH., So, HS. New therapeutic concept of NAD redox balance for cisplatin nephrotoxicity. *Biomed Res Int.* 2016;2016:4048390
- Ozkok, A., Ravichandran, K., Wang, Q., Ljubanovic, D., Edelstein, CL. NF-kB transcriptional inhibition ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury (AKI). *Toxicol Lett.* 2016 Jan 5;240(1):105-13
- Ozkok, A., Edelstein, CL. Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury.

- Biomed Res Int. 2014;2014:967826.
- Ramesh, G., Reeves, WB. TNFR2-mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003 Oct;285(4):F610-8
- Sanchis-Gomar, F., Lippi, G., Lucia, A. 'Mitotherapy' for Heart Failure. *Trends Mol Med*. 2016 Apr;22(4):267-9
- Shi, X., Zhao, M., Fu, C., Fu, A. Intravenous administration of mitochondria for treating experimental Parkinson's disease. *Mitochondrion*. 2017 May;34:91-100
- Shelton, LM., Park, BK., Copple, IM. Role of Nrf2 in protection against acute kidney injury. *Kidney Int*. 2013 Dec;84(6):1090-5
- Santos, NA., Bezerra, CS., Martins, NM., Curti, C., Bianchi, ML., Santos, AC. Hydroxyl radical scavenger ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by preventing oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008 Jan;61(1):145-55
- Ueki, M., Ueno, M., Morishita, J., Maekawa, N., Curcumin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by inhibiting renal inflammation in mice. *J Biosci Bioeng*. 2013 May;115(5):547-51
- Yao, J., Ardehali, MB., Fecko, CJ., Webb, WW., Lis, JT. Intranuclear distribution and local dynamics of RNA polymerase II during transcription activation. *Mol Cell*. 2007 Dec 28;28(6):978-90.