

中華民國第 63 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 動物與醫學科

佳作

052009

探討 miR-17-92 透過調控 T 細胞分化影響腎
纖維化

學校名稱：桃園市立武陵高級中等學校

| | |
|---|------------------|
| 作者： 高二 廖采穎 高二 楊恆睿 高二 賴奕安 | 指導老師： 林碧晶 |
|---|------------------|

關鍵詞：miR-17-92、T 細胞、腎纖維化

摘要

我國慢性腎病人口約 14%，大多患者會因藥物或免疫疾病而走向腎纖維化。根據文獻，miR-17-92 會影響 T 細胞分化，分化的差異則會造成不同程度的腎纖維化。

本研究取不同基因型小鼠的 CD4⁺T 細胞做體外分化。結果顯示含 miR-17-92 基因較多的 T 細胞分化成 Th1 比例較高、Treg 比例較少，但對 Th17 無顯著影響。將小鼠腎纖維化模式處理的細胞進行 RT-qPCR 和染色實驗，觀察剔除 miR-17-92 基因的小鼠（簡稱 KO）腎纖維化的情形，發現造成腎纖維化的纖維蛋白、膠原蛋白和其 mRNA 的表現量均減少。將 WT 和 KO 小鼠腎臟進行染色後，發現 WT 小鼠腎中 Th1 的數量較多，Treg 則較少。綜合實驗結果推論，miR-17-92 可以增加腎中 Th1、降低 Treg 的數量，而 Th1 則會加重腎纖維化的情形。期盼本研究能對腎纖維化疾病有所貢獻。

壹、前言

一、研究背景

纖維化是正常組織因受到超出自身修復能力的損傷後，受損處轉化為由纖維母細胞與其細胞間質（纖維蛋白和膠原蛋白）構成的纖維化組織[1]。此過程為：損傷（上皮、內皮、發炎細胞）、活化（纖維母細胞、肌纖維母細胞）、胞外基質產生及堆積。而損傷時聚集於傷處的細胞除了嗜中性球、巨噬細胞等發炎細胞外，在免疫介導的疾病中，T 細胞也大量存在於細胞間質中，而這些免疫細胞分泌的細胞激素也被證明會影響纖維化的程度[2]。

根據研究顯示 T 細胞經由不同細胞激素的誘導，可以分別分化成 Th1、Th2、Th17 和 Treg 細胞。而 Th1 產生的 IFN- γ 可以影響急性腎損傷[3]。Th2 會改變 Th1 的 IFN- γ 的表現，且其產生的 IL-13 是纖維化不可少的因子，因此 Th2 增加會促進纖維化[4]。Th17 產生的 IL-17 會促進第一型膠原蛋白的產生[4]。Treg 在身體各處不同致病原因的纖維化中可能扮演促進或抑制的角色，但研究顯示其產生的 TGF- β 會促進腎纖維化[4][5]。由此可知，若我們可

以改變這些 Th 細胞的分化，應該可以影響腎纖維化的進行。

閱讀文獻後發現，近年來被廣泛研究的 miR-17-92 會影響 Th 細胞的分化。miR-17-92 是一種 miRNA；miRNA 是一段微小的 RNA，它會靶向特定的 mRNA 然後進行降解或抑制轉譯的發生[6]。miR-17-92 於 2004 年被提出和淋巴瘤的形成有關，後來也被證明它是致癌的基因。還有研究顯示 miR-17-92 過度表達的小鼠會表現出 B 細胞和 T 細胞的異常增生[7]。

二、研究動機

腎臟纖維化為多數慢性腎病最終的走向，影響 50%的 70 歲以上成年人和 10%的世界人口[1]，不僅導致經濟重點的負擔，更是我國十大死因之一，每十萬人中就有 22.8 人因此喪命。衛服部資料顯示，台灣慢性腎臟病盛行率高達 14%，僅次日本和美國，洗腎人口密度更是世界第一。這些都顯示腎臟疾病在臺灣乃至於全世界，是相當重要且極需解決的問題。

目前慢性腎臟疾病的治療藥物中，針對腎臟纖維化治療的選擇相當有限，許多病患即使接受治療，腎臟功能仍然持續惡化，因此尋找針對腎臟纖維化的新型治療方法成為相當重要的課題。

透過文獻得知，CD4⁺ T 細胞因其分化成各種 T 細胞亞型可造成不同的腎纖維化結果（促進或抑制纖維化）。淋巴細胞在健康腎臟中並不常見，但在纖維化時中，它們的數量卻大大增加，因此可藉由觀察其數量來探討其對纖維化的影響。而近年來被廣泛研究的 miR-17-92 也被發現會影響 T 細胞的分化。因此我們想以小鼠腎纖維化模型研究 miR-17-92 透過調控 T 細胞分化影響腎纖維化。

三、研究目的

- (一) 探討 miR-17-92 對於 Th1、Th17 和 Treg 表現的影響
- (二) 探討 miR-17-92 透過調控 T 細胞對於腎纖維化的影響

貳、研究設備與材料

一、實驗動物

(一) 老鼠品系

此次實驗我們使用 B6(Wildtype; WT)小鼠為控制組，B6-MIR17 KO、B6-MIR17 Tg 為實驗組進行實驗。

(二) Tissue-Specific Knockout Mouse

KO 老鼠(Knockout mouse)是指經過基因剔除技術，使得某一特定基因在老鼠體內無法表達的老鼠模型，而我們此次使用的 KO 老鼠是只有將 CD4⁺細胞中產生 miR-17-92 的基因剔除的老鼠(B6-MIR17 KO)。

(三) Transgenic Mouse

Tg 老鼠(Transgenic mouse)是一種基因轉殖老鼠，其基因組中被插入了人工合成的外源基因，而我們此次使用的 Tg 老鼠為於 CD4⁺細胞中插入產生 miR-17-92 的基因，使 miR-17-92 過度表現的老鼠(B6-MIR17 Tg)。

(四) 缺血再灌注傷害 (Ischaemia Reperfusion Injury, IRI)

缺血再灌注損傷 (IRI) 模型常用於生物醫學研究，以研究 IRI 的機制和潛在治療方法。這個方法涉及誘導組織或器官局部缺血（血流減少或消失），然後再灌注血液（血流恢復）時對器官所造成的損傷。此次實驗我們使用 IRI 模式對小鼠腎臟造成傷害，在放置十四天後對小鼠進行後續實驗。

二、實驗器材與藥品

(一) 細胞培養與分化

1. 器材

| 名稱 | 用途 | 型號 | 廠牌 |
|---------|--------|--|-----------------|
| MACS | 分選細胞 | CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit | Miltenyi Biotec |
| 培養箱 | 培養細胞 | Forma Direct Heat CO ₂ Incubator | Thermo |
| 無菌操作台 | 進行無菌操作 | Forma Class II, Type A2 Biological Safety Cabinet | Thermo |
| 自動細胞計數儀 | 計算細胞數量 | Dual Fluorescence Cell Counter | LUNA-FL™ |
| 流式細胞儀 | 分析細胞特性 | FACSVerse™ | BD |

2. 細胞培養、再刺激與染色

| 名稱 | 名稱 | 名稱 |
|-------------------------|---|-------------------------------|
| RPMI 1640 | IMDM | 丙二醇甲醚醋酸酯(PMA) |
| L-谷氨酰胺 (L-Glutamine) | 羥乙基哌嗪乙硫磺酸 (HEPES) | 非必需胺基酸 (NEAA) |
| 杜氏磷酸緩衝液 (DPBS) | P/S 抗生素溶液 (Penicillin Streptomycin; P/S) | 2 硫醇乙醇 (2-Mercaptoethanol) |
| Lonomycin | Fix/Perm | 染劑 |
| 紅血球裂解液 RBC lysis | 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum; FBS) | 丙酮酸鈉 GogiSTOP(mouse) |

3. 抗體及細胞激素

| 名稱 | 廠牌 | 名稱 | 廠牌 | 名稱 | 廠牌 |
|----------------------|-----------|-----------------------|-----------|---------------|-----------|
| Anti-CD3 Antibody | BioLegend | Anti-CD28 Antibody | BioLegend | IL-6 IL-12 | BioLegend |

| | | | | | |
|-----------|--|--------------------|--|--------------|-----|
| IL-2 | | Anti-CD28 | | IL-23 | |
| Anti-IL-4 | | Anti-IFN- γ | | TGF- β | R&D |

(二) 馬森三色染色法(Masson's trichrome stain)

| 名稱 | 用途 | 廠牌型號 |
|---------------------------|------------|--------------|
| 二甲苯 | 溶蠟 | Sigma |
| 酒精 | 使組織從脫水狀態恢復 | Sigma |
| Bouin's solution | 染色 | Leica |
| Weigert's HemaToxylin A+B | | Leica |
| Gomri's Trichrome Blue | | Leica |
| 醋酸 | 潤洗 | Merck |
| 顯微鏡 | 觀察樣本 | Olympus BX60 |

(三) RT-qPCR

| 名稱 | 廠牌型號 |
|---------------------------------|---------------------------|
| TaqMan Universal PCR Master Mix | Applied Biosystems |
| Forward primer | |
| Reverse primer | |
| TaqMan probe | |
| 即時聚合酶鏈鎖反應儀 | Applied Biosystems ViiA 7 |

(四) 細胞螢光染色

| 名稱 | 廠牌型號 |
|----------------|--------------------|
| 二甲苯、酒精、Tween20 | Sigma |
| 磷酸鹽緩衝生理鹽水(PBS) | UniRegion Bio-Tech |

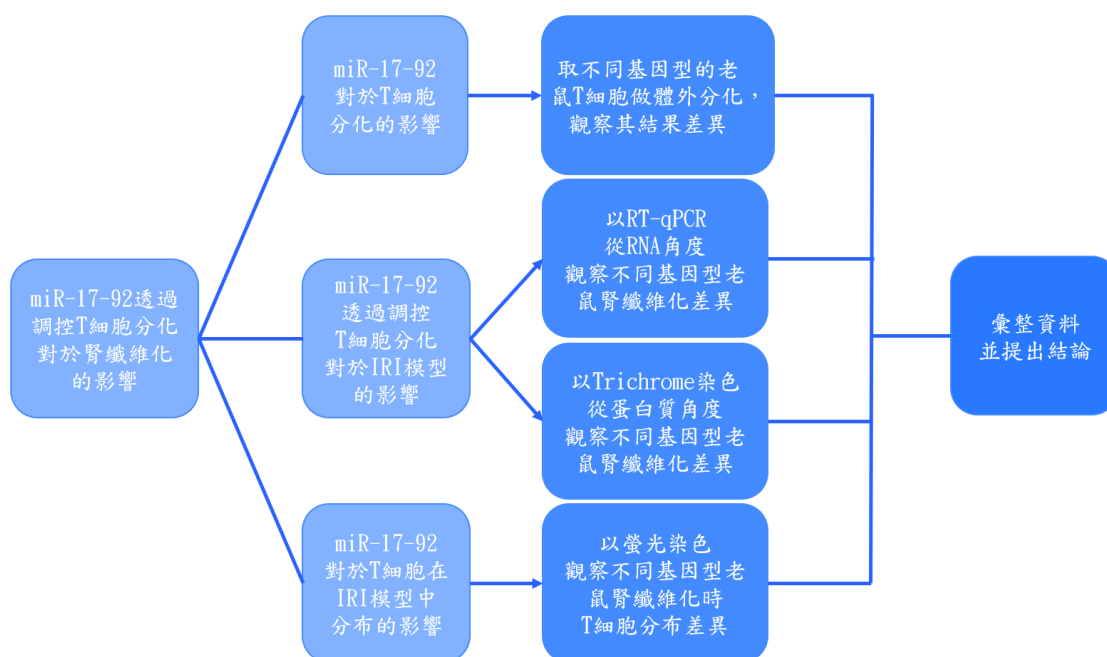
| | |
|---|---------------------|
| Target Retrieval Solution, Citrate pH=6.1 (10X) | Dako s1699 |
| CD4 antibody | Abcam #133616 |
| IFN- γ antibody | Biolegend #505834 |
| donkey anti-rabbit-IgG-Alexa488 antibody | Invitrogen #A-21206 |
| donkey anti-rat-IgG-Alexa594 antibody | Invitrogen #A-21209 |
| IL-17 | BD#559502 |
| Foxp3 | Invitrogen#1950163 |
| 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) | ThermoFisher D1306 |
| 共軛焦顯微鏡 | LEICA TCS SP8X |

三、通用器材

微量吸管分注器、電動吸管、離心管、離心機、拭鏡紙、手套、烘箱、培養皿、水浴槽

參、研究過程與方法

一、實驗架構圖



圖一：研究架構圖

二、細胞培養與分化

(一) 取檢體並分離細胞

1. 將老鼠麻醉，取其脾臟及淋巴結，置入 RPMI 1640 中、4°C 以保持細胞存活。
2. 將檢體磨碎，過 70 μ m 篩管後加入 6mL RPMI 1640 清洗，離心（500g, 五分鐘）後去上清液。
3. 加入紅血球裂解液(Red Blood Cell Lysis Buffer; RBC Lysis)，小力搖晃 3-5 分鐘，加入 RPMI 1640 清洗，離心（500g, 五分鐘）去上清液。
4. 加入 1mL RPMI 1640 後數細胞（以決定分選管柱的數量）。
5. 離心（500g, 五分鐘）後去上清液。

(二) 細胞磁珠分選 (Magnetic-activated cell sorting; MACS)

1. 原理

MACS 是一種利用細胞表面抗原差異進行細胞分選的技術。整項技術包含了奈米順磁性顆粒(MicroBeads)、分選管柱(column)和分離器(separator)。其原理為 microbeads 會和特定細胞表面抗原作專一性結合（圖二 step1），經結合後，將樣品置入分選管柱中，其分選管柱包含一個由鐵磁球體組成的基質，並覆蓋有保護細胞的塗層。當分選管柱放在分離器上後，球體會將磁場放大，而帶有磁珠的細胞便會留在分選管柱中，其餘細胞流下來（圖二 step2），最終再將留在管柱中的細胞取出，得到分離效果（圖二 step3）。



圖二：MACS 的原理 Step1 奈米磁性顆粒和表面抗原專一性結合

Step2 帶有磁球的細胞留在分選管柱中 Step3 將分選管柱中的細胞取出

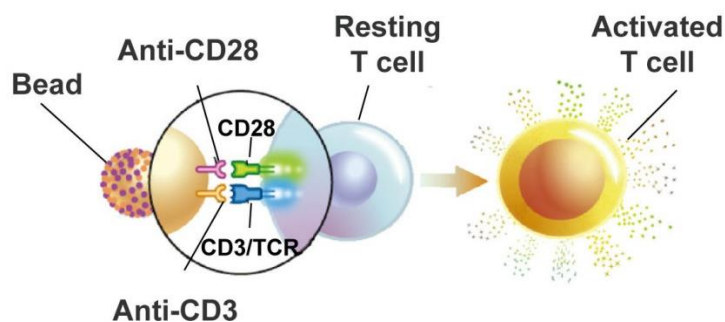
2. 步驟

- (1) 分配數好的細胞，每隻分選管柱至多可以過 2×10^8 個細胞。
- (2) 每管加入 400 μ L MACS buffer
(MACS buffer : DPBS+0.5%BSA+2mM EDTA)
100 μ L Biotin-Antibody Cocktail 混合後置於 4°C 十分鐘
- (3) 每管加入 300 μ L MACS buffer
200 μ L Anti-Biotin Microbeads
混合後置於 4°C 十分鐘，加入 MACS buffer 清洗，離心 (500g, 五分鐘)
後去上清液。
- (4) 每管各加入 500 μ L MACS buffer 後過磁座。
- (5) 取圖二 step2 中流過磁座的溶液。
- (6) 離心 (500g, 五分鐘) 後去上清液，數細胞後將各細胞數量
調整一致 (2×10^6 cell/well)。

(三) 預塗蛋白

1. 原理

將誘發專一性防禦的蛋白先塗抹在培養皿中以模擬人體環境中的抗原呈現細胞，誘發 T 細胞分化。由於此實驗要使 T 細胞分化，因此塗抹了 CD3 和 CD28 的抗體。



圖三：抗原呈現細胞活化 T 細胞的途徑 抗原呈現細胞上的蛋白和 T 細胞上的 CD4 跟 CD28 結合，誘發專一性防禦

2. 步驟

(1) 配製溶液

於杜氏磷酸緩衝溶液(DPBS)中加入以下成分

| Th1 Treg | Th17 |
|----------------------------------|---------------------------------|
| Mouse α CD3 3 μ g/mL | Mouse α CD3 3 μ g/mL |
| Mouse α CD28 2 μ g/mL | |

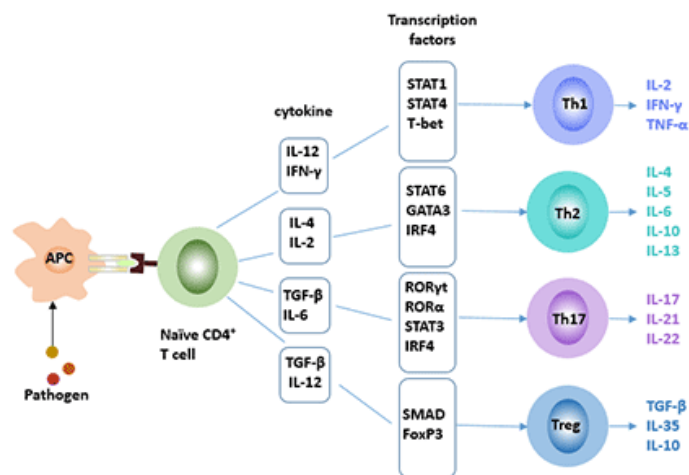
(2) 於每一格培養皿中加入一毫升上述溶液，置於 37°C 一小時以上。

(3) 輕輕吸掉培養皿中的溶液，以供之後培養細胞使用。

(四) 細胞培養與極化

1. 原理

在培養液中加入一些細胞激素，誘導 Naïve CD4⁺ T 細胞分化成 Th1、Th17 和 Treg 細胞。



圖四：Th1、Th17、Treg 的分化方法

2. 步驟

(1) 配製培養液

Th1、Treg：於 RPMI 1640 中加入以下溶液

| 名稱 | 劑量 |
|--|------|
| L-谷氨酰胺(L-Glutamine) | 2mM |
| 丙酮酸鈉(Sodium pyruvate) | 1mM |
| 非必需胺基酸 (Non-Essential Amino Acids; NEAA) | 1X |
| 羥乙基哌嗪乙硫磺酸(HEPES) | 10mM |
| P/S 抗生素溶液(Penicillin/Streptomycin Solution) | 1X |
| β-巰基乙醇(β -Mercaptoethanol; β-Me) | 50μM |
| 胎牛血清(Fetal Bovine Serum; FBS) | 10% |

Th17：於 IMDM 中加入以下溶液

| 名稱 | 劑量 |
|---|------|
| 丙酮酸鈉(Sodium pyruvate) | 1mM |
| 非必需胺基酸 (Non-Essential Amino Acids; NEAA) | 1X |
| 羥乙基哌嗪乙硫磺酸(HEPES) | 10mM |
| P/S 抗生素溶液(Penicillin/Streptomycin Solution) | 1X |
| 2 硫醇乙醇(2-Mercaptoethanol ; 2-ME) | 50μM |
| 胎牛血清(Fetal Bovine Serum; FBS) | 5% |

(2) 加入抗體及細胞激素

Th1：於第一點配製的 RPMI 1640 培養液中加入以下成分

| 名稱 | 劑量 |
|-----------|----------|
| IL-12 | 1 ng/mL |
| Anti-IL-4 | 10 μg/mL |

Treg：於第一點配製的 RPMI 1640 培養液中加入以下成分

| 名稱 | 劑量 |
|-------|-----------|
| TGF-β | 3 ng/mL |
| IL-2 | 100 ng/mL |

Th17：於第一點配製的 IMDM 培養液中加入以下成分

| 名稱 | 劑量 |
|------------|------------|
| TGF-β | 1.25 ng/mL |
| IL-6 | 20 ng/mL |
| IL-23 | 20 ng/mL |
| Anti-IL-4 | 10 μg/mL |
| Anti-IFN-γ | 10 μg/mL |
| Anti-CD28 | 2 μg/mL |

(五) 再刺激與染色

1. 配製溶液

於(四)中的步驟(1)各自的培養液中加入下列溶液

| 名稱 | 劑量 |
|-----------------|-----------|
| 丙二醇甲醚醋酸酯(PMA) | 50 ng/mL |
| lonomycin | 500 ng/mL |
| GogiSTOP(mouse) | 1 μg/μL |

- 於每一格培養皿加入一毫升上述溶液，於 37°C 放置四小時。
- 取出細胞後離心 (2000g，五分鐘)，去上清液。
- 每管加入 200μL FACS buffer(DPBS+10%FBS)後，自三組(WT、KO、Tg)各取 50μL 的液體混合，並分裝給不染色、染 CD4 和胞內染色。

| | 不染 | CD4 | 胞內染色 | WT | KO | Tg |
|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| Th1 | 130 | 20 | 20 | 150 | 150 | 150 |
| Th17 | 130 | 20 | 20 | 150 | 150 | 150 |
| Treg | 130 | 20 | 20 | 150 | 150 | 150 |

(單位：μL)

5. 將染劑配至 FACS buffer 中，CD4：FACS buffer = 1：300，於 CD4、WT、KO 和 Tg 中每管各加入 100μL，於室溫避光時五分鐘。

| | 不染 | CD4 | 胞內染色 | WT | KO | Tg |
|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| Th1 | 130 | 20 | 20 | 150 | 150 | 150 |
| Th17 | 130 | 20 | 20 | 150 | 150 | 150 |
| Treg | 130 | 20 | 20 | 150 | 150 | 150 |

(單位：μL)

6. 每管以 200μL FACS buffer 清洗後離心 (2000g，五分鐘)，去上清液，此動作重複兩次。
7. 將 fix/perm 以 1：3 配製，並於每管加入 100μL，於室溫避光一小時。
8. 離心後去上清液 (2000g，五分鐘)。以 200μL Permeabilization buffer 清洗後離心 (2000g，五分鐘) 去上清液，此動作重複兩次。
9. 將胞內染劑配至 FACS buffer 中

IFN-γ：FACS buffer = 1：50 (Th1)

IL-17：FACS buffer = 1：50 (Th17)

FoxP3：FACS buffer = 1：25 (Treg)

將各自的染劑加至胞內染色室溫避光四十五分鐘，WT、KO、Tg 中 50μL，其餘加入 FACS buffer。

| | 不染 | CD4 | 胞內染色 | WT | KO | Tg |
|------|----|-----|------|----|----|----|
| Th1 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Th17 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Treg | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |

(單位：μL)

10. 離心後去上清液（2000g，五分鐘）。以 200 μ L Permeabilization buffer 清洗後離心（2000g，五分鐘）去上清液，此動作重複兩次。
11. 換成 FACS buffer（不染的 50 μ L，其於 100 μ L）後上機。

（六）結果收集和讀取

1. 原理

流式細胞儀主要由流體學系統(fluidics)、光學與電子系統(optics and electronics)組成。樣本細胞經由流體系統傳送，依序經過雷射光，細胞接收刺激而發出訊號，機器接收訊號並進而得知其細胞大小、複雜度、型態等資訊。

2. 步驟

- (1) 將沒有染色和單一染色的細胞上機後圈出我們要的細胞和畫出是否有 CD4 和胞內產物的分割線。
- (2) 將每個樣品上機得到數據。
- (3) 將雙陽性的比例繪成圖表，計算其標準差和可信度。

三、及時定量聚合酶連鎖反應 Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction

（一）原理

qPCR 技術利用專一的 Primer probe(引子探針)會在 PCR(聚合酶連鎖反應)過程中產生螢光，再利用螢光偵測系統來偵測每個循環所釋放出的螢光量，進而推算出每個循環所產生的產物含量，達到即時定量的目的。

（二）步驟

1. 配製以下溶液（DNA 先不加入）

| 名稱 | 劑量 | 名稱 | 劑量 |
|------------------------------------|--------|--------------------|--------|
| TaqMan Universal PCR Master Mix | 1X | TaqMan probe | 250 nM |
| Forward primer | 900 nM | DNA sample | 25 ng |
| Reverse primer | 900 nM | ddH ₂ O | |

2. 將 DNA 樣本先置入盤內，再將上述溶液滴入盤中，完成後封膜。
3. 離心（1000rpm，五分鐘）。
4. 設定機器 50°C (2 min)→95°C (10min)→95°C (15sec)→60°C (1min)，最後兩步驟重複四十回。
5. 整理並分析數據。

四、馬森三色染色法 Masson's trichrome stain

(一) 原理

馬森三色染色法是由皮埃爾·馬森創始的一種組織染色法，目的為區分結締組織和細胞。染色時細胞會被染成紅色，細胞核為黑色，而膠原蛋白則被染為藍色。

(二) 步驟

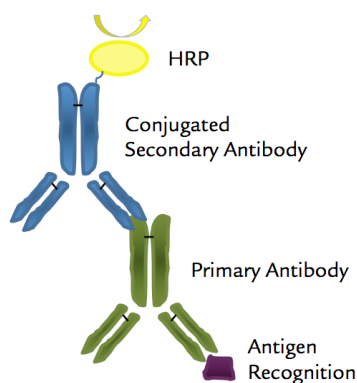
1. 烘切片和二甲苯（60°C，四十五分鐘）。
2. 將切片放入二甲苯中，繼續烘四十五分鐘。
3. 將切片依序放入 100%、95%、70%、50%酒精和水（三次）中各五分鐘。
4. 將 Bouin's solution 放入 56°C 水浴中。
5. 將切片放入 Bouin's solution 中置於 56°C 水浴中一小時，換缸沖水直至切片變透明，拍乾切片。
6. 加 Weigert's HemaToxylin A+B（每一片 A、B 各 100μL），十分鐘後沖水七分鐘，拍乾。

7. 加 Gomri's Trichrome Blue （一片一滴）二十分鐘。
8. 用 1%醋酸潤洗後，再覆蓋 1%醋酸一分鐘，以蒸餾水清洗乾淨。
9. 將切片依序泡在 95%、100%酒精中（各兩分鐘）後烤片、封片。
10. 於顯微鏡下觀察並拍照紀錄。

五、細胞螢光染色

（一）原理

利用一級抗體和玻片上的特定蛋白產生專一性結合，再利用帶有螢光蛋白的二級抗體接到一級抗體上，使標的物帶有螢光蛋白（Th1），Th17 和 Treg 則使用流式細胞儀的染劑染一次即可，最後於黑暗中進行拍攝。



圖五：一級抗體及二級抗體原理

（二）步驟

1. 烘切片和二甲苯（60°C，三十分鐘）。
2. 將切片放入二甲苯中，繼續烘三十分鐘。
3. 回水：將切片依序放入 100%、95%、70%、50%酒精中各三分鐘，最後泡入 washing buffer。
4. 抗原修復：將玻片泡入 pH=6 的 citrate buffer，放入微波爐中沸騰十分鐘，再冷卻三十分鐘（重複兩次）後以 washing buffer 清洗五分鐘，洗三次。
5. blocking：以 antibody diluent 浸泡玻片三十分鐘。

6. 將抗體配在 washing buffer 中，滴在玻片上，室溫避光一小時(Th1)或五分鐘(Th17、Treg)後，以 washing buffer 清洗五分鐘，洗三次。

| | 抗體或染劑 | 稀釋濃度 | 抗體 | 抗體稀釋濃度 |
|------|-------------|---------|---------------------|---------|
| Th1 | CD4(rabbit) | 1 : 100 | IFN- γ (rat) | 1 : 100 |
| Th17 | CD4 | 1 : 300 | | |
| Treg | CD4 | 1 : 300 | | |

7. 將抗體配在 washing buffer 中，滴在玻片上，室溫避光十五分鐘(Th1)和四十五分鐘(Th17、Treg)。

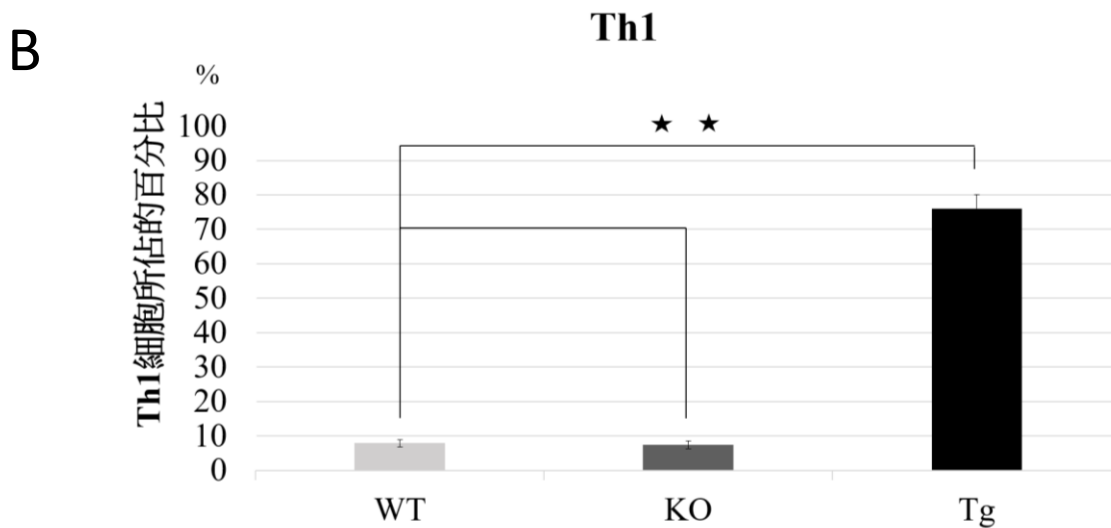
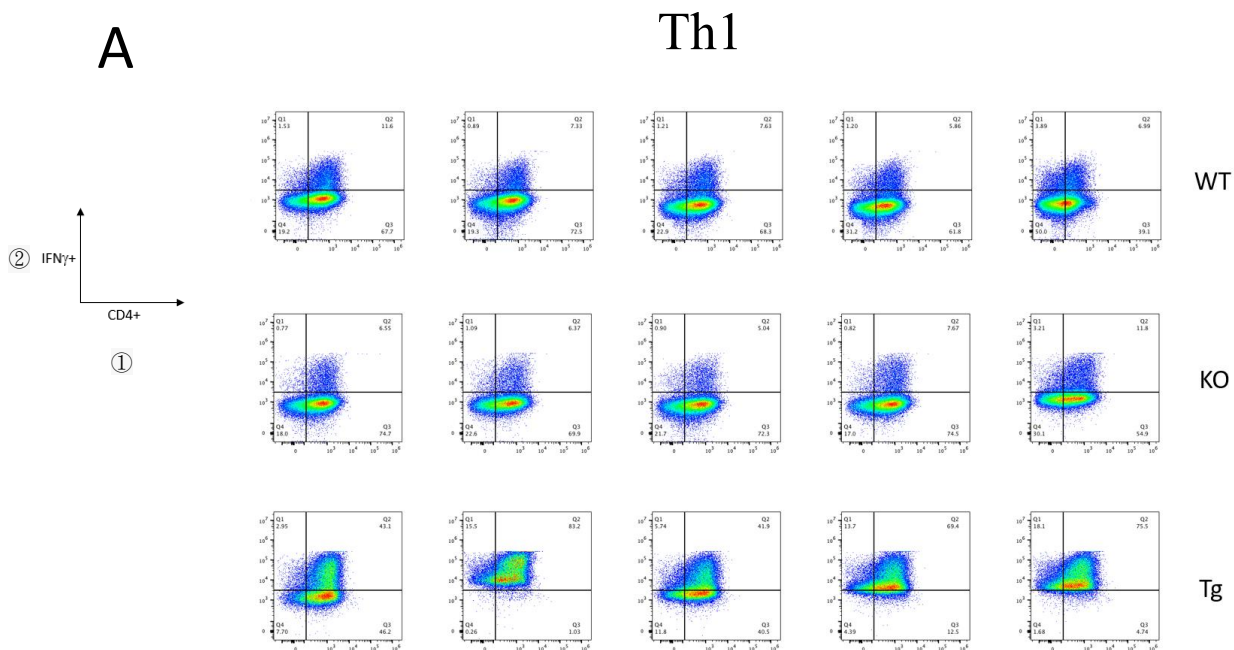
| | 抗體或染劑 | 抗體 | 抗體稀釋濃度 |
|------|-----------------|--------------|---------|
| Th1 | Rabbit-Alexa488 | Rat-Alexa594 | 1 : 300 |
| Th17 | IL-17 | | 1 : 50 |
| Treg | FoxP3 | | 1 : 25 |

8. 以 washing buffer 清洗五分鐘，重複三次。
9. 染細胞核：將染劑滴在玻片上室溫避光三分鐘。
10. 以 washing buffer 清洗五分鐘後，於螢光顯微鏡下觀察並紀錄結果。

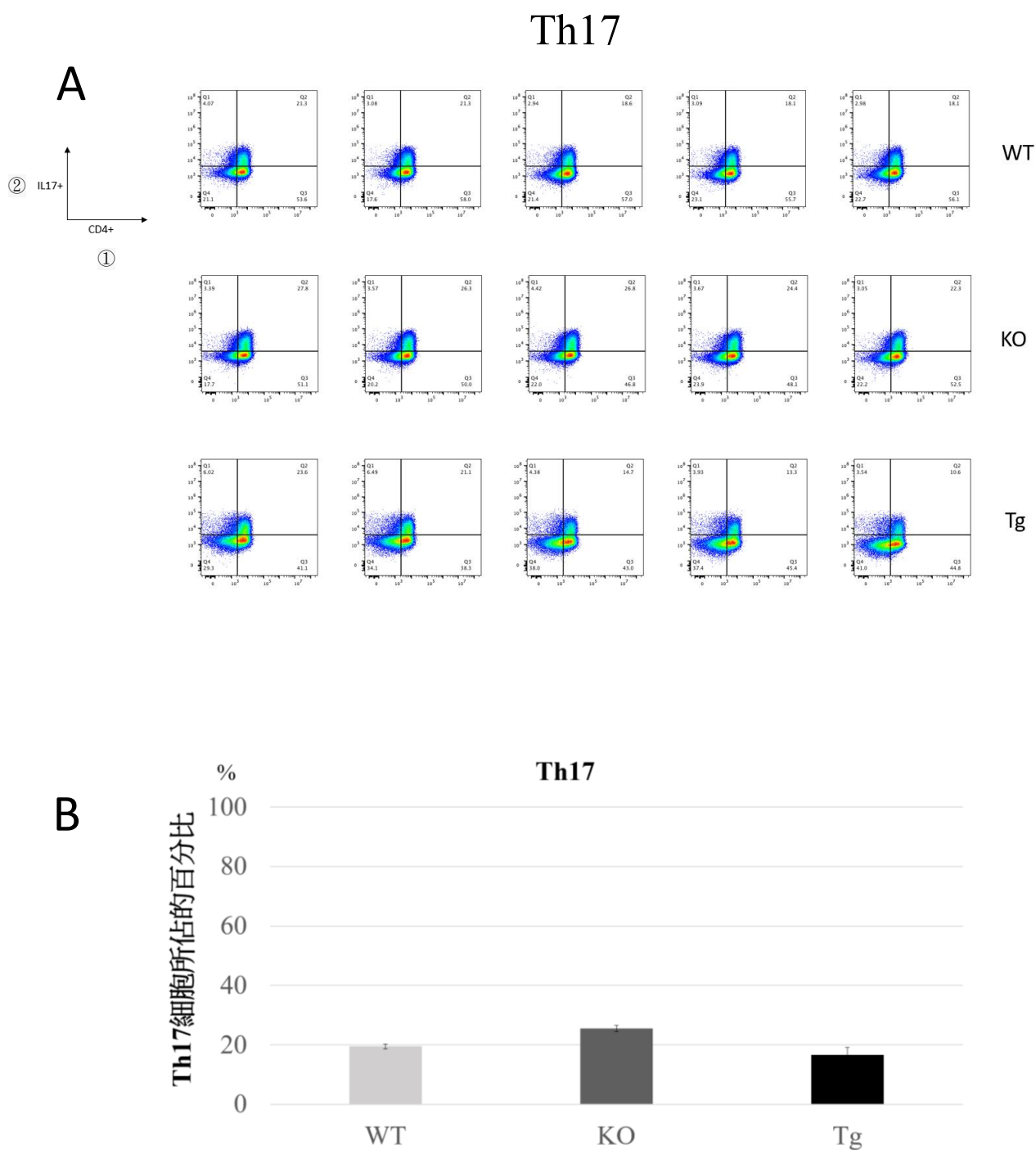
肆、研究結果

一、以細胞培養探討 miR-17-92 對 T 細胞分化的影響

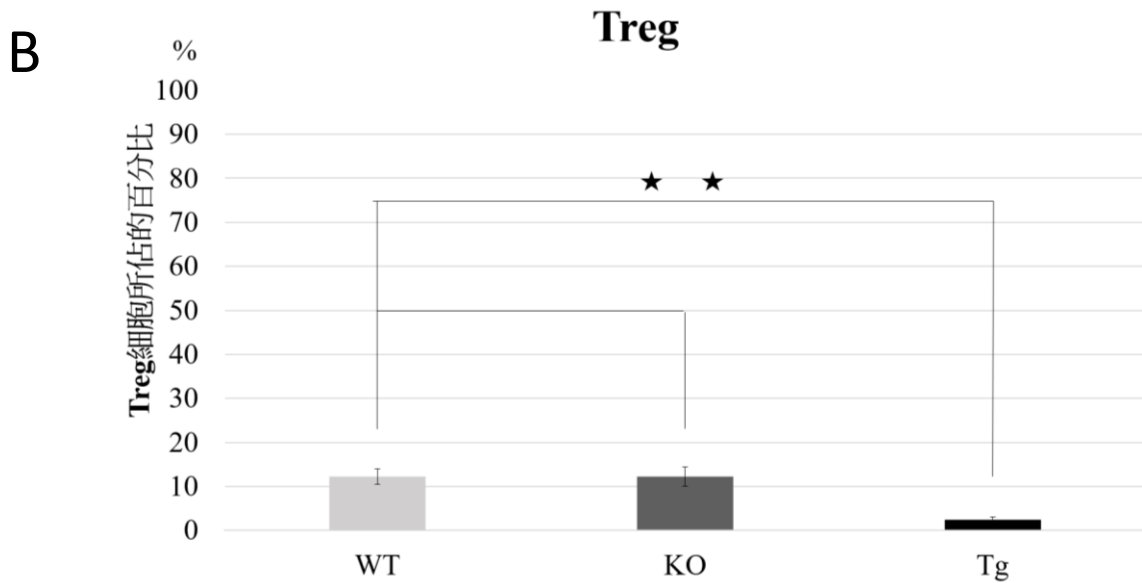
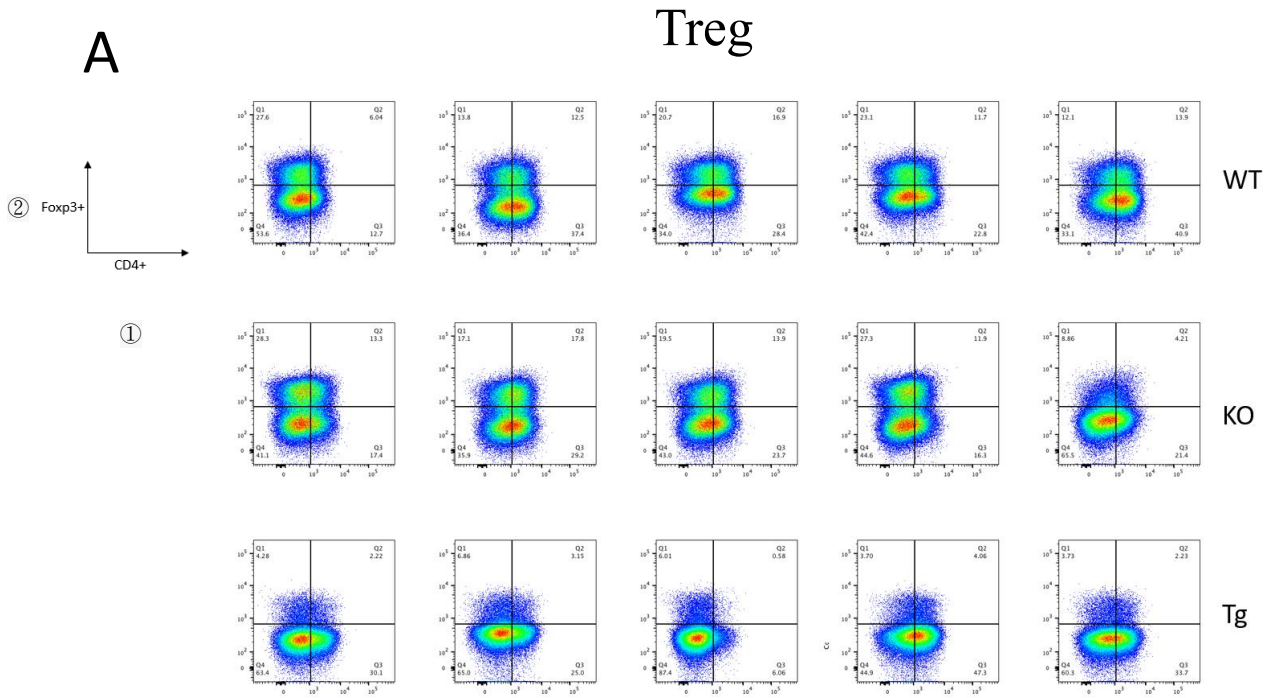
這次研究，為了能夠更透徹地了解 miR-17-92 對腎纖維化的影響與其作用的原理，先以細胞激素與營養物質將 Naïve CD4⁺ T 細胞在保溫箱裡培養三天，並染色表面抗原(CD4)①與各自的細胞激素或轉錄因子②，再送入流式細胞儀檢測。我們觀察了參與生理作用且可能與纖維化有潛在關係的 T 細胞，並測量 T 細胞在 WT、KO 和 Tg 三種 miR-17-92 基因數量不同的情形下，分化為 Th1、Th17 與 Treg 的差異。



圖六：(A)圖 WT、KO、Tg 小鼠 CD4⁺T 細胞做體外分化成 Th1 之結果：第一象限為成功分化為 Th1 細胞的數量，X 軸為接收到 CD4⁺的螢光強度；Y 軸為接收到 IFN- γ 的螢光強度；(B)圖 比較 WT、KO、Tg 小鼠 CD4⁺T 細胞分化成 Th1 的成效：將(A)圖中第一象限的比例做數據統計，繪製成長條圖（無★：P \geq 0.05；★：0.01<P<0.05；★★：0.001<P \leq 0.01；★★★★：P \leq 0.001）



圖七：(A)圖 WT、KO、Tg 小鼠 CD4⁺T 細胞做體外分化成 Th17 之結果：第一象限為成功分化為 Th17 細胞的數量，X 軸為接收到 CD4⁺的螢光強度；Y 軸為接收到 IL-17 的螢光強度；(B)圖 比較 WT、KO、Tg 小鼠 CD4⁺T 細胞分化成 Th17 的成效：將(A)圖中第一象限的比例做數據統計，繪製成長條圖（無★：P ≥ 0.05; ★：0.01 < P < 0.05; ★★：0.001 < P ≤ 0.01; ★★★：P ≤ 0.001）



圖八：(A)圖 WT、KO、Tg 小鼠 CD4⁺T 細胞做體外分化成 Treg 之結果：第一象限為成功分化為 Treg 細胞的數量，X 軸為接收到 CD4⁺的螢光強度；Y 軸為接收到 Fxp3 的螢光強度；(B)圖比較 WT、KO、Tg 小鼠 CD4⁺T 細胞分化成 Treg 的成效：將(A)圖中第一象限的比例做數據統計，繪製成長條圖（無★：P ≥ 0.05；★：0.01 < P < 0.05；★★：0.001 < P ≤ 0.01；★★★★：P ≤ 0.001）

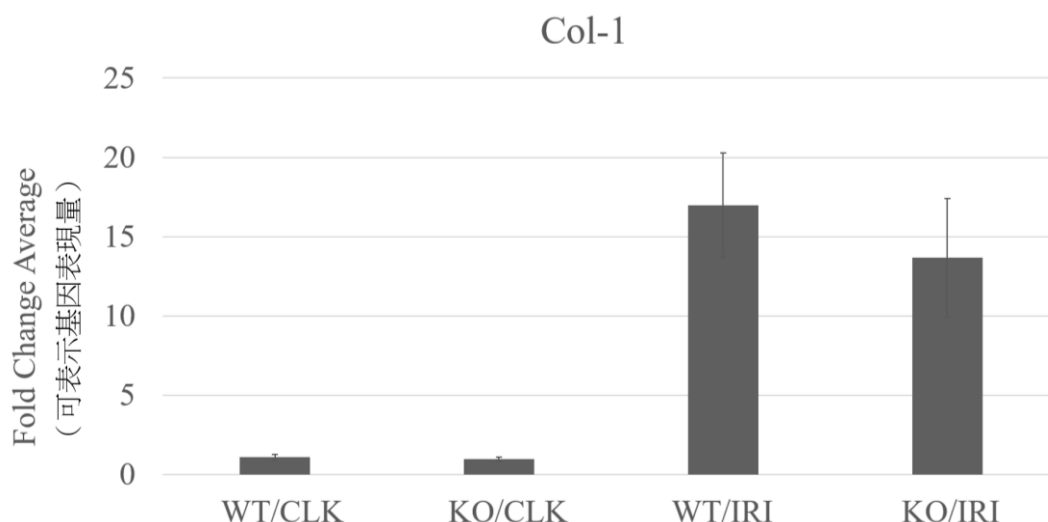
圖六、七及八之(A)皆為使用流式細胞儀後細胞測定的結果（五重複）。檢測結果之第一象限為兩者皆有染色到的細胞，即為成功分化成目標細胞之 Naïve T 細胞，將其結果整理繪製成為三圖之(B)。

從 Th1 的分化結果來看，比較 WT 和 Tg 的 Naïve CD4⁺ T 細胞分化情形，可以發現 Th1 在 miR-17-92 基因數量較多時，分化的比例是較高的（圖六之 B）。從分化為 Th17 的結果來看，可以發現分化為 Th17 的數量與 miR-17-92 基因的數量關係無顯著差異（圖七之 B）。從分化為 Treg 的結果來看，比較 WT 和 Tg 二組實驗結果可以發現在 miR-17-92 基因數量較多時，分化為 Treg 的數量較低（圖八之 B）。

二、了解 miR-17-92 與腎纖維化的關係

（一）用 RT-qPCR 測量小鼠在 T 細胞中 miR-17-92 基因數量不同時第一型膠原蛋白基因表現量

由文獻得知，在腎纖維化的腎臟中第一型膠原蛋白會大量表現，因此可藉由測定第一型膠原蛋白之 mRNA 的表現量做為腎纖維化的指標。而小鼠若經手術夾住其單側腎動脈 30 分鐘後放開(IRI 處理模式)，在 14 天之後會逐漸轉變為慢性腎纖維化。因此我們分別對 WT 與 KO 小鼠進行手術，並於 14 天後再取其腎臟，利用 RT-qPCR 技術測定第一型膠原蛋白之基因(Col-1)表現量，希望藉由基因的表現了解 T 細胞中 miR-17-92 對腎纖維化的影響。實驗結果如圖九。



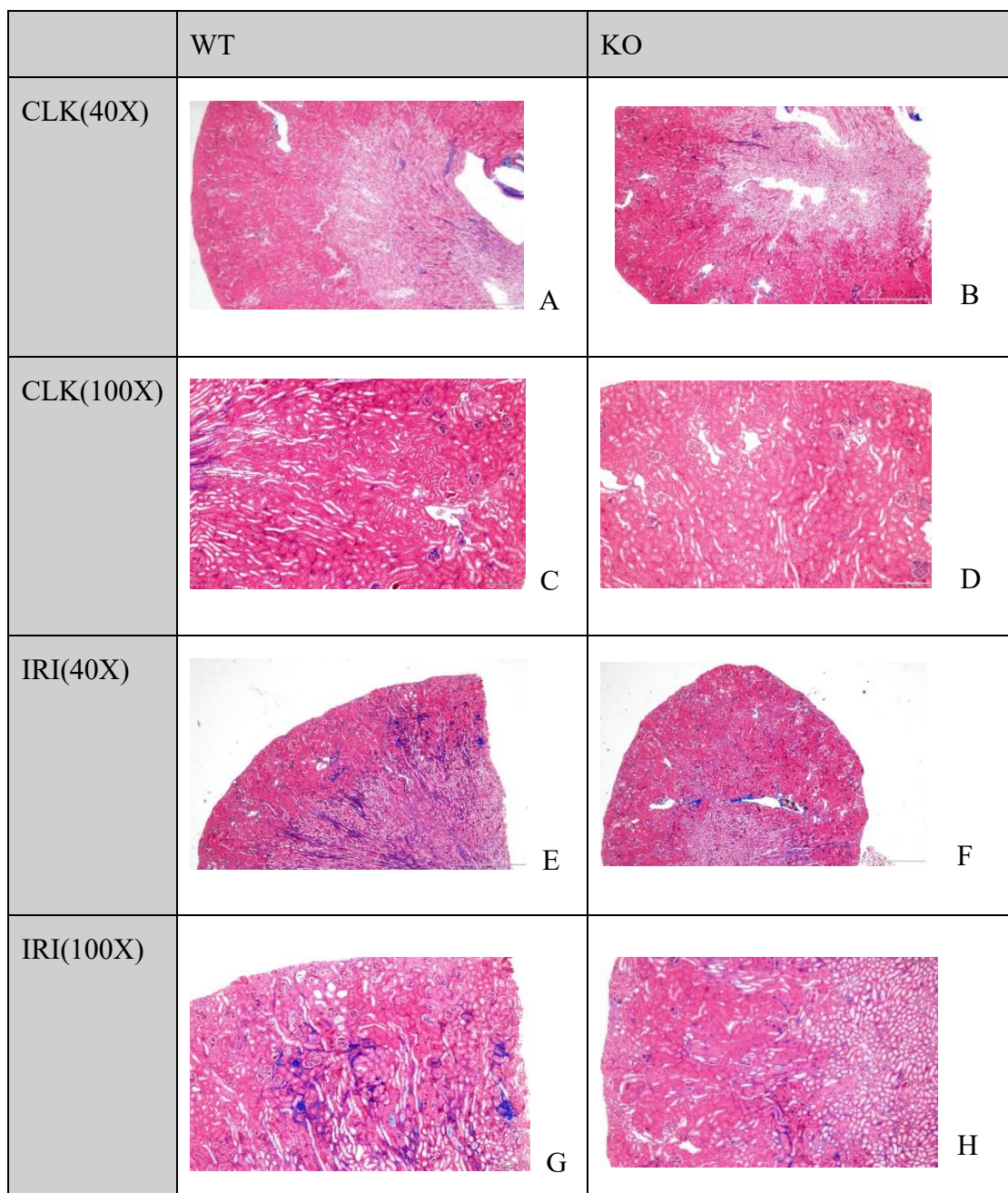
圖九：T 細胞中 miR-17-92 基因數量不同的 WT、KO 小鼠在 CLK 與經 IRI 處理後的 14 天，其腎臟中 Col-1 表現量的差異（六重複）

統計實驗結果，得知 Col-1 於一般情況下(CLK)，在小鼠體內的表現量(Col-1 的 mRNA)都不高。但在經過 IRI 的處理後，Col-1 的表現量雖然都有顯著的升高，但 KO 小鼠的表現量是低於 WT 小鼠的（圖九）。

（二）以 Trichrome 染色觀察在小鼠 T 細胞中，miR-17-92 基因數量不同時，腎纖維化相關蛋白質之表現差異

實驗中正常小鼠腎臟與經過 IRI 模式處理的小鼠腎臟藉由 Trichrome 將與腎纖維化相關的蛋白質（腎纖維化時於腎臟皮質處產生）染為藍色，以觀察 T 細胞中 miR-17-92 基因數量差異在蛋白質層面對腎纖維化之影響。實驗結果如圖十。

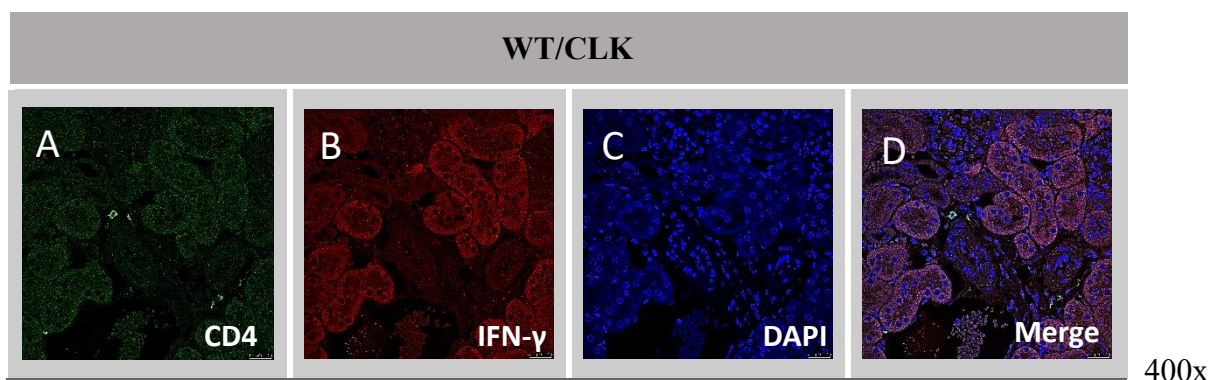
從 Trichrome 的結果可以得知，在沒有經過 IRI 處理的腎臟(CLK)中，WT 與 KO 小鼠在腎臟皮質處的藍色區塊並不多（圖十之 A、B、C、D）。而經歷 IRI 的小鼠中可以發現，WT 小鼠的腎臟不論放大倍率為 40 倍還是 100 倍的，藍色區塊的面積都明顯高於 KO 小鼠（圖十之 E、F、G、H）。



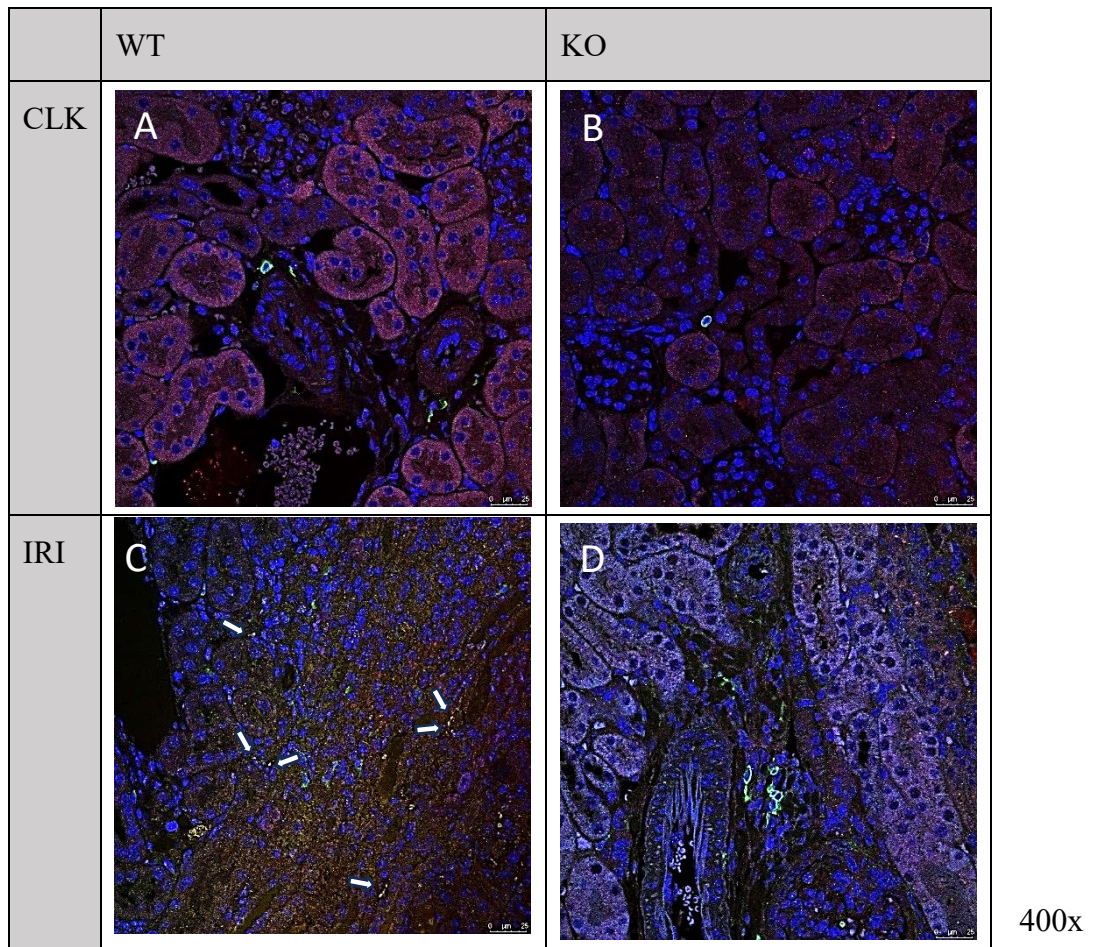
圖十：T 細胞中 miR-17-92 基因數量不同的 WT、KO 小鼠在 CLK 與經 IRI 處理後的第 14 天，將腎臟進行 Trichrome 染色之結果，其中(A)為 40X WT/CLK；(B)為 40X KO/CLK；(C)為 100X WT/CLK；(D)為 100X KO/CLK；(E)為 40X WT/IRI；(F)為 40X KO/IRI；(G)為 100X WT/IRI；(H)為 100X KO/IRI。

三、藉由螢光染色確認腎纖維化為 T 細胞分化差異所造成的結果

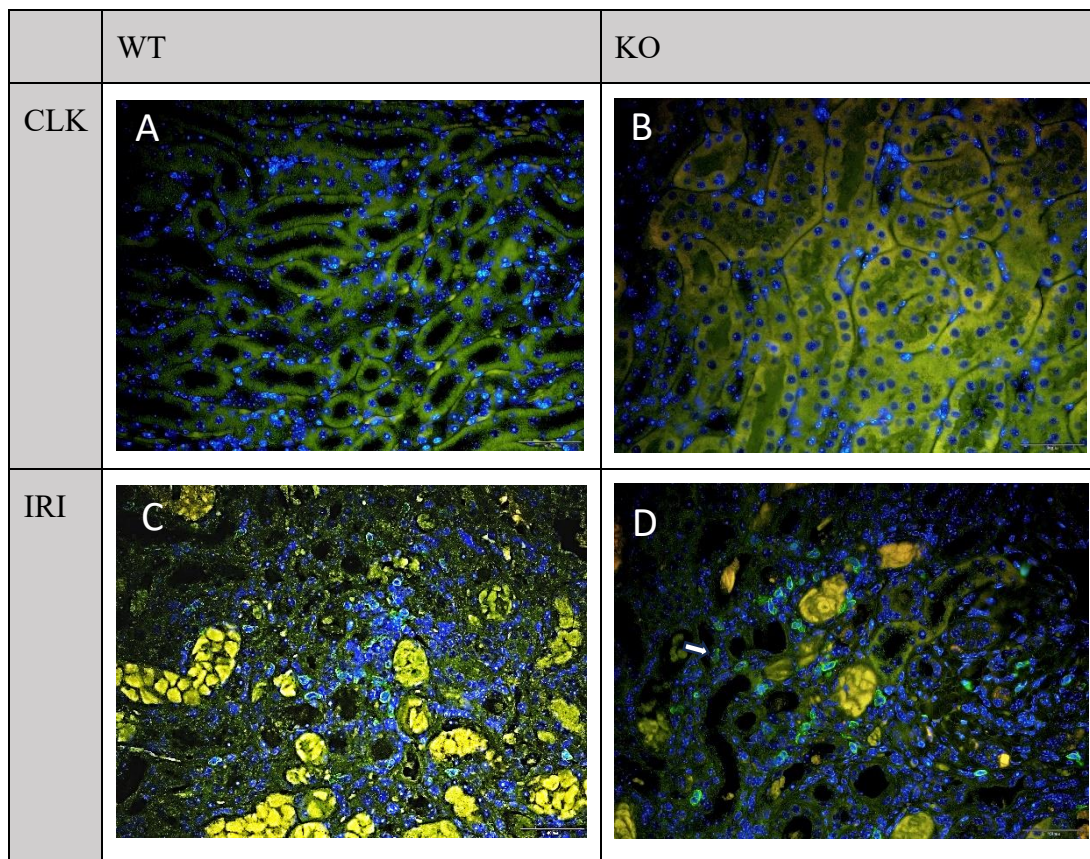
文獻顯示，不同 T 細胞可能造成不同程度的腎纖維化，因此我們藉由螢光染色觀察腎纖維化時腎臟中 T 細胞的數量以及 T 細胞的種類來確認腎纖維化為 T 細胞分化差異所造成。這次實驗中，我們同樣取 WT 與 KO 小鼠進行 IRI 處理，並藉由染表面標記（確認為 T 細胞）、細胞激素(IFN- γ)或轉錄因子(Foxp3)（確認為 Th1 或 Treg 細胞）與細胞核（確認細胞位置），在疊合後觀察 WT 與 KO 小鼠在腎臟未進行 IRI 與經 IRI 處理後的第 14 天 Th1 與 Treg 的數量差異（三種染色皆有之細胞）。實驗結果如圖十一、十二、十三。



圖十一：螢光染色的原理應用，四圖為 WT 小鼠在 CLK 腎臟中 Th1 的染色結果。(A)為將表面標記 CD4 染色，其染色結果為綠色；(B)為將細胞激素 IFN- γ 染色，其染色結果為紅色；(C)為藉由 DAPI 染色細胞核，其染色結果為藍色；(D)為 A、B、C 疊合後的結果，當細胞膜上有大量 CD4⁺（一圈綠色螢光）且細胞內含有 IFN- γ （內有紅色螢光）則視為 Th1 細胞，而只有一圈綠色螢光的為 CD4⁺細胞



圖十二：T 細胞中 miR-17-92 基因數量不同的 WT、KO 小鼠在 CLK 與 IRI 14 天後，腎臟中 T 細胞染色之結果整理(400X)。藍色細胞核染色外帶有一圈綠色的為 CD4⁺細胞，疊合後外圈有綠色螢光(CD4⁺)，胞內有紅色螢光(IFN- γ)者為 Th1 (箭頭處)。



圖十三：T 細胞中 miR-17-92 基因數量不同的 WT、KO 小鼠在 CLK 與經歷 IRI 處理後第 14 天的腎臟，腎臟中 T 細胞染色之結果(400X)。Treg 染色處理大致與 Th1 相同，只是紅色改為染 Treg 的轉錄因子 Foxp3。藍色細胞核染色外帶有一圈綠色的一樣為 T 細胞，其中含有染為紅色的 Foxp3 則為 Treg (箭頭處)。

由疊合之結果可以發現，在經歷 IRI 處理後第 14 天的腎臟中 (圖十二和十三之 C、D)，相較於未經處理的 CLK 腎臟 (圖十二和十三之 A、B)，同時染到藍色與綠色的細胞數量有所增加。而在 IRI 14 天後 WT 與 KO 小鼠 T 細胞數量的比較中，可以發現到 WT 小鼠可明顯觀察到三種染色皆染上之 Th1 (圖十二 C 的箭頭處)，但卻難以觀察到 Treg (圖十三之 C)；KO 小鼠的實驗結果顯示較無法觀察到 Th1 (圖十二之 D)，但觀察到的 Treg 數量相對增加 (圖十三 D 的箭頭處)。

伍、討論

一、以細胞培養探討 miR-17-92 對 T 細胞分化的影響

首先，從體外分化實驗我們得知，當我們在小鼠 CD4⁺細胞中使 miR-17-92 基因數量增加時（Tg 小鼠），CD4⁺細胞分化成 Th1 的比例相較於野生型小鼠（WT 小鼠）大幅上升，而 CD4⁺細胞分化成 Treg 的比例相較於野生型小鼠（WT 小鼠）則大幅下降，不過對於 Th17 則無顯著差異。由此我們推論，miR-17-92 會促進 CD4⁺細胞分化成 Th1 並抑制其分化為 Treg。

二、了解 miR-17-92 與腎纖維化的關係

因為在腎纖維化的腎臟中，第一型膠原蛋白會被大量表現，因此我們以第一型膠原蛋白的 mRNA 作為腎纖維化指標，利用進行缺血再灌注傷害(IRI)後第十四天的小鼠腎臟組織，萃取其 mRNA 進行 RT-qPCR 實驗觀察第一型膠原蛋白的 mRNA 表現量。由實驗結果可以看到，在經過 IRI 處理後的第 14 天，第一型膠原蛋白的 mRNA 表現量都有明顯的上升，但在缺乏 miR-17-92 基因的小鼠（KO 小鼠）中，第一型膠原蛋白的 mRNA 表現量低於 WT 小鼠，亦即 KO 小鼠腎纖維化的程度可能低於 WT 小鼠。

接著，我們在經過 IRI 處理後的第 14 天將小鼠腎臟利用馬森三色染色法(Trichrome)把腎纖維化時會大量出現的細胞間質（膠原蛋白、纖維蛋白）染成藍色，觀察其腎纖維化的差異。比較染色和 RT-qPCR 的結果，可推論當 miR-17-92 於 CD4⁺細胞的數量降低時（KO 小鼠），小鼠腎纖維化的程度會下降，亦即在 CD4⁺細胞中 miR-17-92 的基因數量會促進腎纖維化。

三、藉由螢光染色確認腎纖維化為 T 細胞分化差異所造成的結果

最後，我們將經過 IRI 處理後第 14 天的小鼠腎臟進行細胞螢光染色，將染 CD4⁺、細胞激素或轉錄因子及細胞核的圖疊合後可以發現，經過 IRI 處理後的腎臟 CD4⁺細胞數量較

CLK (未經過 IRI 處理的腎臟) 高, 而 WT 小鼠中的 Th1 數量又高於 KO 小鼠。而在染 Treg 的實驗結果中在 IRI 處理過的腎臟中 CD4⁺細胞數量大於 CLK, 但其野生型小鼠 (WT 小鼠) 中的 Treg 數量則低於 CD4⁺細胞缺乏 miR-17-92 基因的小鼠 (KO 小鼠)。綜合實驗結果推論, miR-17-92 會使腎臟中的 Th1 數量上升, 並減少 Treg 的數量, 進而促使腎纖維化的生成。結合上述實驗結果與文獻中的資料, 推論 WT 與 KO 小鼠腎纖維化的程度差異有部分是 T 細胞分化差異所造成。

根據以上三點, 我們推論 miR-17-92 會藉由調控 T 細胞分化 (促進 CD4⁺細胞分化成 Th1 並抑制其分化為 Treg), 進而造成促進腎纖維化的結果。

陸、結論

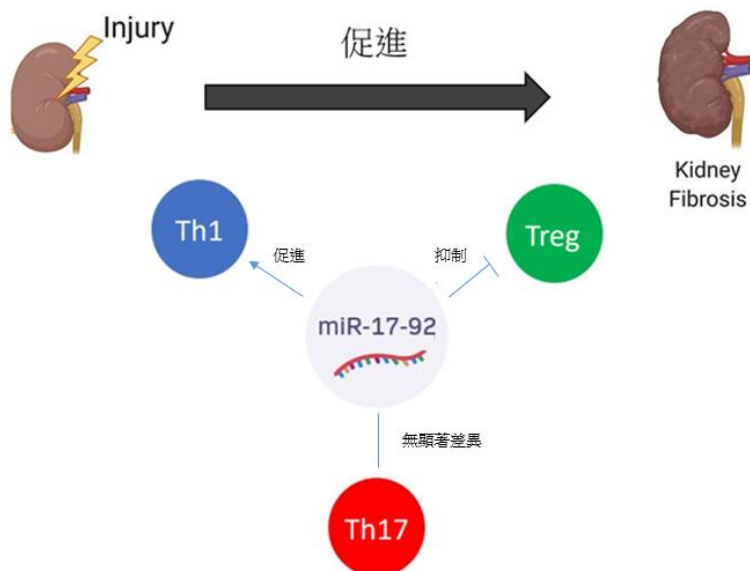
本研究探討 miR-17-92 對腎纖維化的影響及其作用關係, 並以細胞培養及動物實驗等方面進行探究。

- 一、根據體外分化實驗, 可以推論 miR-17-92 與 T 細胞的分化有關聯性。miR-17-92 可能會促進 CD4⁺T 細胞分化為 Th1 和抑制 CD4⁺T 細胞分化為 Treg, 但對分化成 Th17 的影響不顯著。
- 二、根據 RT-qPCR 和 Trichrome 染色實驗, 可以推論 miR-17-92 對腎纖維化有一定的影響。經過 IRI 處理後的第 14 天, miR-17-92 基因數量較多的小鼠腎臟中第一型膠原蛋白的 mRNA 表現量較多, 同時染色後藍色區塊 (膠原蛋白) 的總面積明顯較大, 顯示腎纖維化程度較嚴重。
- 三、根據螢光染色實驗, 可以推論在腎纖維化的腎臟中, miR-17-92 和 T 細胞的數量有所關聯。經過 IRI 處理後的第 14 天, miR-17-92 基因數量較多的小鼠腎臟中 Th1 的數量上

探討 miR-17-92 透過調控 T 細胞分化影響腎纖維化

升，Treg 的數量下降。

綜合以上，miR-17-92 在 T 細胞中，可能藉由促進 CD4⁺T 細胞分化成 Th1 和抑制其分化成 Treg，進而使小鼠體內的腎纖維化更為嚴重。



圖十六：miR-17-92 藉由調控 T 細胞分化影響腎纖維化的過程

柒、未來展望

- 一、進一步研究 miR-17-92 的調節機制，對開發出更加準確、有效的腎臟損傷檢測方法提供可能的研究方向。例如，通過測量 miR-17-92 在患者尿液或血液中的表現量，來檢測患者是否存在腎臟損傷。這將有望在臨床上實現早期檢測腎纖維化。
- 二、進一步探索 miR-17-92 在腎纖維化進程中的詳細作用機制，並通過了解與腎纖維化之間的關係，在開發新的腎纖維化治療方法上提供可能的研究方向。例如靶向調節 miR-17-92 表達的藥物。
- 三、透過更深入的了解 miR-17-92 對於 T 細胞的影響，期望未來可以利用這些影響進行細胞治療，解決一些免疫相關疾病。

捌、參考文獻

一、資料

1. Djudjaj S, Boor P. Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis. *Mol Aspects Med.* 2019 Feb;65:16-36.
2. 蔡崇煌、張金堅(2015)。組織纖維化是器官損傷或衰竭的共同路徑嗎？*臺灣醫界* Vol.58, No.9。澄清綜合醫院中港院區。
3. Kinsey GR, Okusa MD. Expanding role of T cells in acute kidney injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2014 Jan;23(1):9-16.
4. Zhang M, Zhang S. T Cells in Fibrosis and Fibrotic Diseases. *Front Immunol.* 2020 Jun 26;11:1142.
5. Alikhan MA, Huynh M, Kitching AR, Ooi JD. Regulatory T cells in renal disease. *Clin Transl Immunology.* 2018 Jan 30;7(1):e1004.
6. Concepcion CP, Bonetti C, Ventura A. The microRNA-17-92 family of microRNA clusters in development and disease. *Cancer J.* 2012 May-Jun;18(3):262-7.
7. Kuo G, Wu CY, Yang HY. MiR-17-92 cluster and immunity. *J Formos Med Assoc.* 2019 Jan;118(1 Pt 1):2-6.

二、圖片

圖二：<https://ntuhmc.ntuh.gov.tw/epaper-7th.htm>

圖三：<https://reurl.cc/XLl41D>

圖四：<https://www.cusabio.com/c-20858.html>

圖五：<https://reurl.cc/3xLQaM>

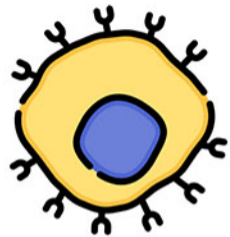
圖十六：https://www.ntu.edu.tw/spotlight/2021/1945_20210513.html

<https://research.sinica.edu.tw/motor-neuron-diseases-mir-17-92/>

【評語】 052009

1. 該研究未涉及對人體的臨床試驗或臨床樣本的收集和分析。缺乏人體資料的支持，限制了該研究對於腎纖維化疾病的實際應用和相關性的評估。
2. 該研究提到 miR-17-92 可能對腎纖維化產生影響，但未提供充分的機制解釋和相關的信號路徑分析。缺乏對該基因在腎纖維化機制中作用的詳細研究，限制了對其確切作用和機制的全面理解。
3. 研究題材很新穎，未來在醫學上有研究的潛力，但難度也很高。作者為何選擇 miR-17-92 的論述不夠完整。
4. 宜分析人類腎纖維化之相關基因，來確認 miR-17-92 是否扮演重要角色，他和纖維化相關基因之關聯性。

作品海報



探討miR-17-92



透過調控T細胞分化影響腎纖維化

研究動機

腎臟纖維化為多數慢性腎病最終的走向，影響50%的70歲以上成年人和10%的世界人口[1]。根據衛服部資料顯示，台灣慢性腎臟病盛行率高達14%，僅次於日本和美國，洗腎人口密度更是世界第一。這些都顯示腎臟疾病在臺灣乃至於世界是相當重要且極需解決的問題。不過目前慢性腎臟疾病的治療藥物中，針對腎臟纖維化治療的選擇相當有限，許多病患即使接受治療，腎臟功能仍然持續惡化，因此尋找針對腎臟纖維化的新型治療方法成為相當重要的課題。

研究背景

纖維化是正常器官或組織因受到超出自身修復能力的損傷後，修復過程中受損處轉化為由纖維母細胞及細胞外基質(膠原蛋白、纖維蛋白)所構成的纖維化組織[1]。而在纖維化的過程中，有許多免疫細胞的參與，其中Th1、Th17、Treg被證實對腎臟纖維化有一定的影響。[2][3][4]

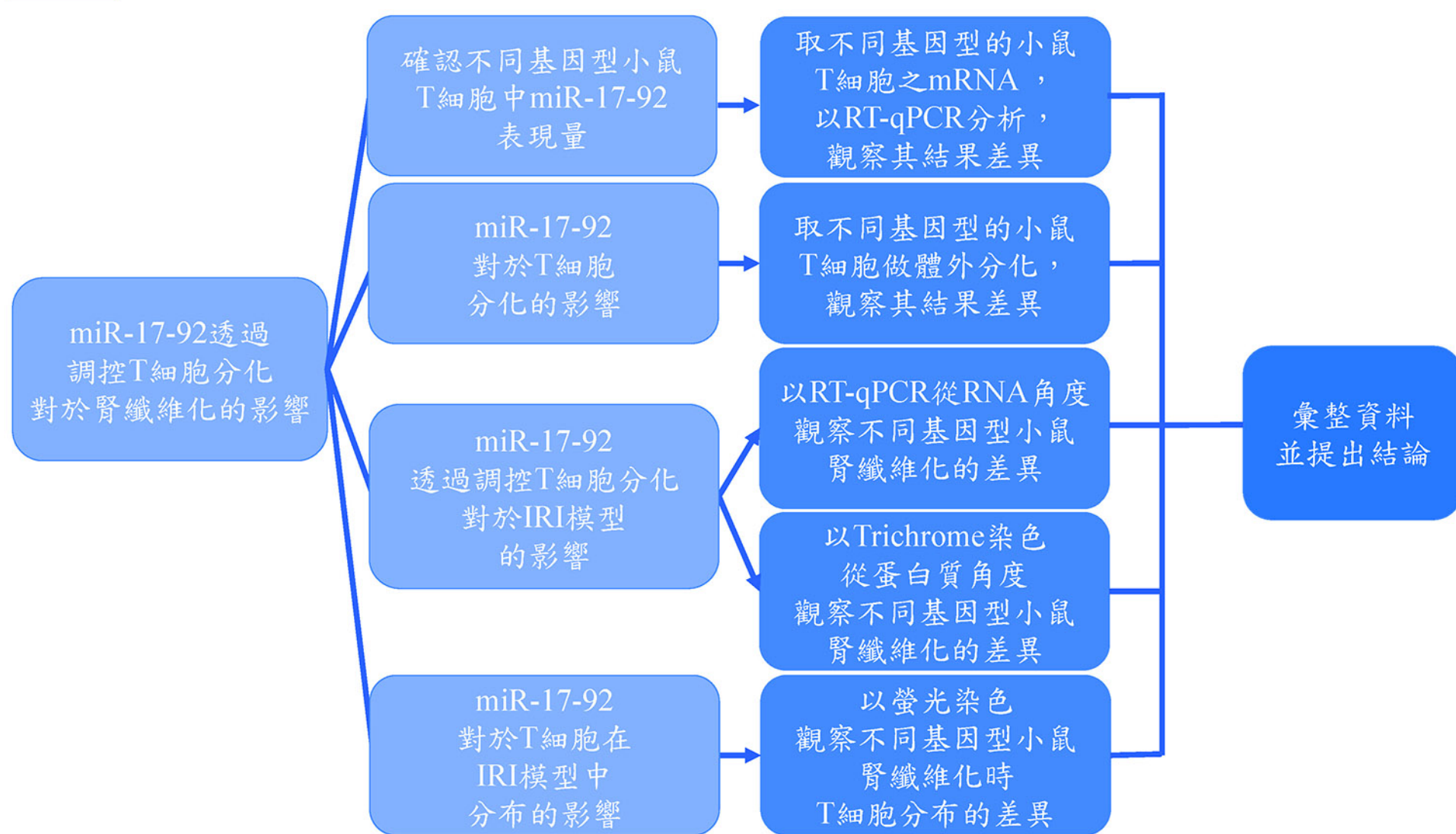
閱讀文獻後發現，近年來被廣泛研究的miR-17-92會影響T細胞的分化。miR-17-92是一簇(cluster) miRNA，miRNA會靶向特定的mRNA然後進行降解或抑制轉譯的發生。其中，miR-17-92於2004年被提出和淋巴瘤的形成有關，後來也被證明它是致癌的基因。此外，miR-17-92過度表現的小鼠會表現出B細胞和T細胞的異常增生[5]。

綜合以上，CD4⁺T細胞因其分化成各種T細胞亞型而可以促進或抑制腎臟纖維化，且miR-17-92會影響T細胞的分化。因此本研究以小鼠模型研究miR-17-92透過調控T細胞分化對於腎臟纖維化的影響。

研究目的

- 一、探討miR-17-92對於CD4⁺T細胞分化為Th1、Th17和Treg的影響
- 二、探討miR-17-92透過調控T細胞分化對於腎臟纖維化的影響

研究流程與方法

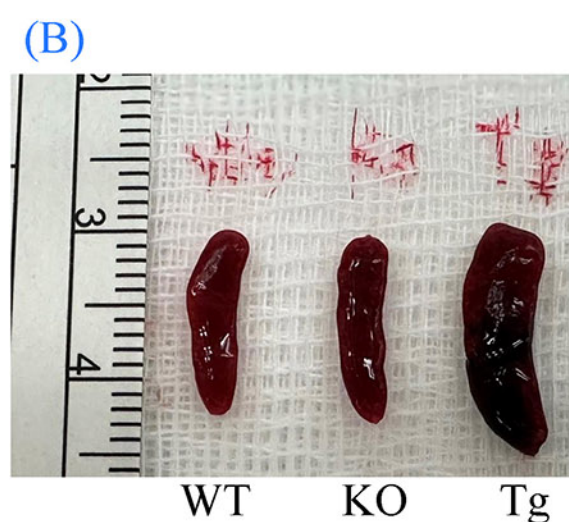
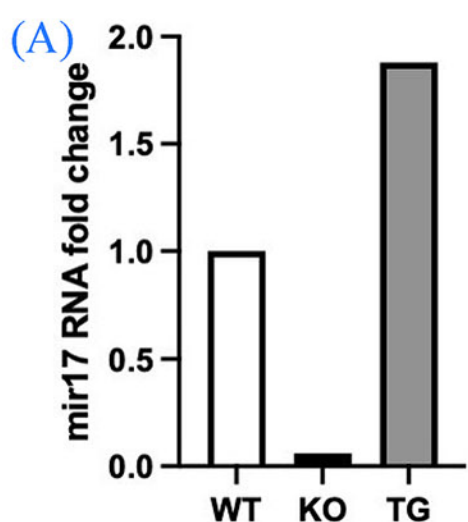


圖一：研究流程圖

研究結果

一、確認不同基因型小鼠內miR-17-92是否符合預期

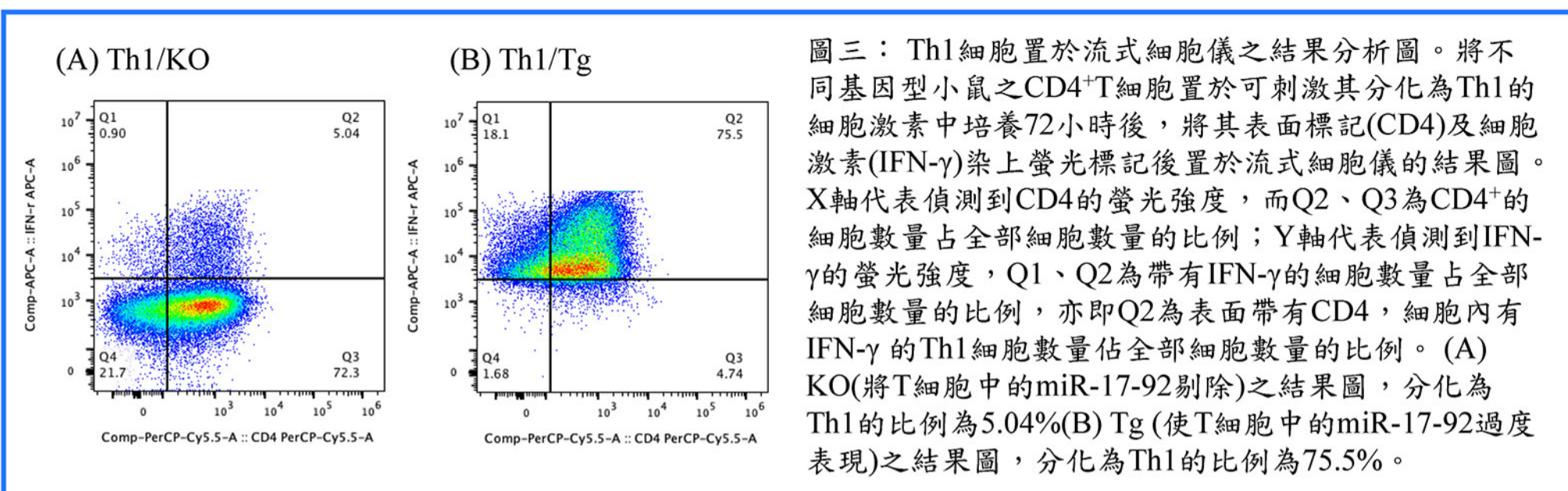
此實驗使用野生型(WT)、於T細胞中剔除miR-17-92(KO)、T細胞過度表現miR-17-92(Tg)小鼠。以RT-qPCR測量其T細胞中miR-17-92表現量，確認結果與預期相符。



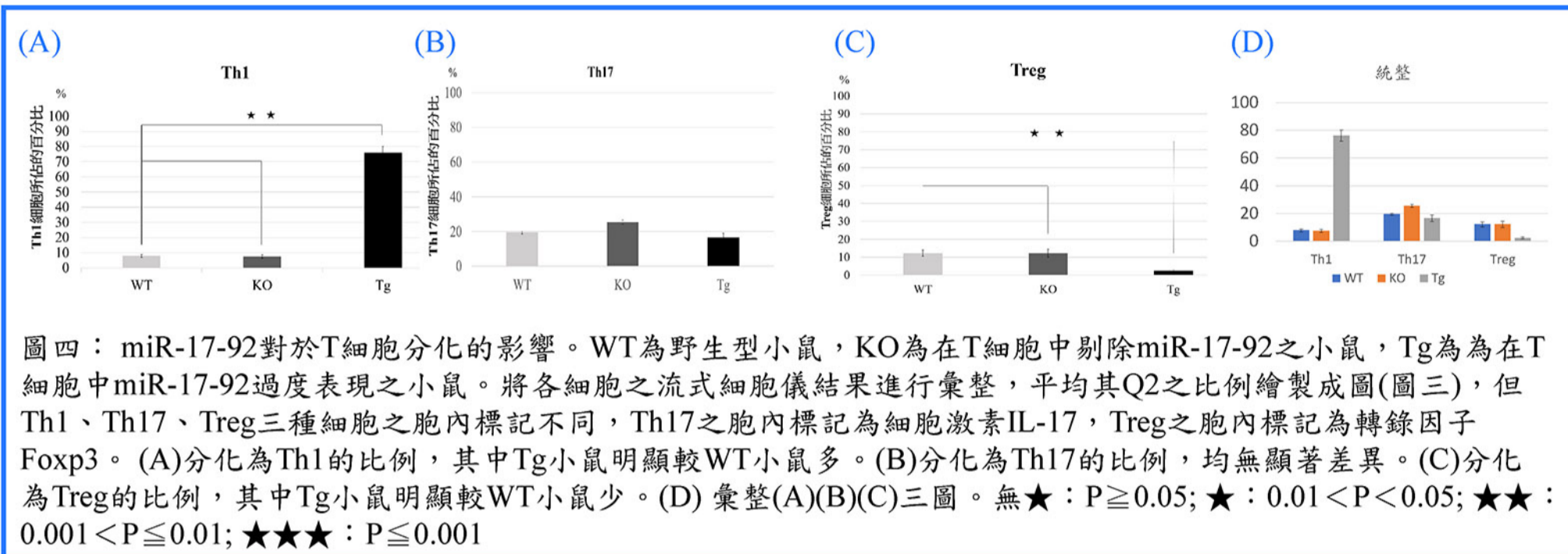
圖二：不同基因型小鼠T細胞中miR-17-92表現量的差異。(A)WT(野生型)、KO(於T細胞中剔除miR-17-92)、Tg(T細胞過度表現miR-17-92)小鼠的CD4⁺T細胞中miR-17-92表現量 KO<WT<Tg，符合預期；(B)比較WT、KO、Tg小鼠脾臟大小，Tg小鼠脾臟明顯較大，與文獻相符。

二、miR-17-92對於CD4⁺T細胞分化為Th1、Th17和Treg的影響

將WT(野生型)、KO(將T細胞中的miR-17-92剔除)和Tg(使T細胞中的miR-17-92過度表現)小鼠的CD4⁺T細胞分別放入含不同細胞激素和營養物的培養液中進行體外分化，以流式細胞儀觀察並分析其分化的差異。



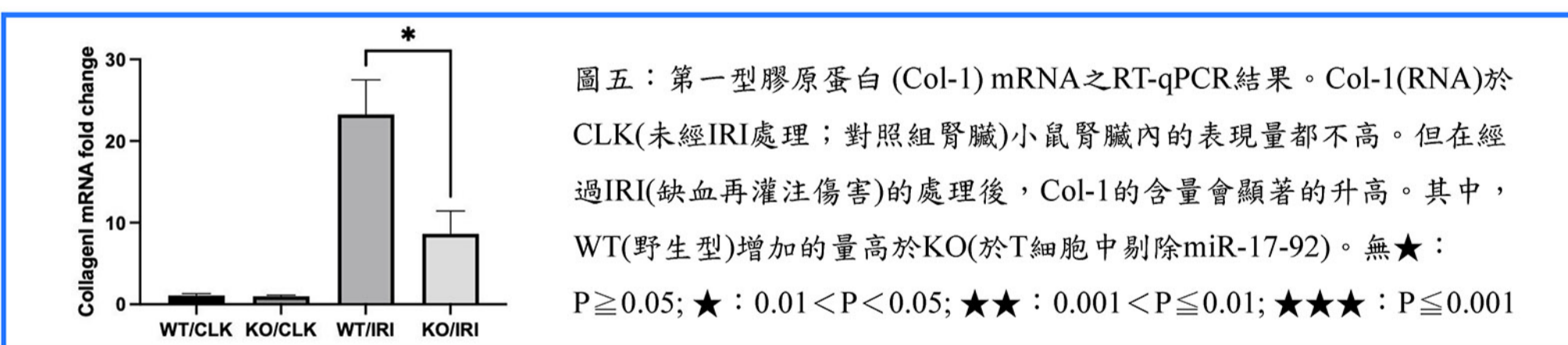
圖三：Th1細胞置於流式細胞儀之結果分析圖。將不同基因型小鼠之CD4⁺T細胞置於可刺激其分化為Th1的細胞激素中培養72小時後，將其表面標記(CD4)及細胞激素(IFN-γ)染上螢光標記後置於流式細胞儀的結果圖。X軸代表偵測到CD4的螢光強度，而Q2、Q3為CD4⁺的細胞數量占全部細胞數量的比例；Y軸代表偵測到IFN-γ的螢光強度，Q1、Q2為帶有IFN-γ的細胞數量占全部細胞數量的比例，亦即Q2為表面帶有CD4，細胞內有IFN-γ的Th1細胞數量佔全部細胞數量的比例。(A) KO(將T細胞中的miR-17-92剔除)之結果圖，分化為Th1的比例為5.04%(B) Tg(使T細胞中的miR-17-92過度表現)之結果圖，分化為Th1的比例為75.5%。



圖四：miR-17-92對於T細胞分化的影響。WT為野生型小鼠，KO為在T細胞中剔除miR-17-92之小鼠，Tg為在T細胞中miR-17-92過度表現之小鼠。將各細胞之流式細胞儀結果進行彙整，平均其Q2之比例繪製成圖(圖三)，但Th1、Th17、Treg三種細胞之胞內標記不同，Th17之胞內標記為細胞激素IL-17，Treg之胞內標記為轉錄因子Foxp3。(A)分化為Th1的比例，其中Tg小鼠明顯較WT小鼠多。(B)分化為Th17的比例，均無顯著差異。(C)分化為Treg的比例，其中Tg小鼠明顯較WT小鼠少。(D)彙整(A)(B)(C)三圖。無★：P ≥ 0.05; ★：0.01 < P < 0.05; ★★：0.001 < P ≤ 0.01; ★★★：P ≤ 0.001

三、利用RT-qPCR 探討miR-17-92透過調控T細胞分化對於IRI模型的影響

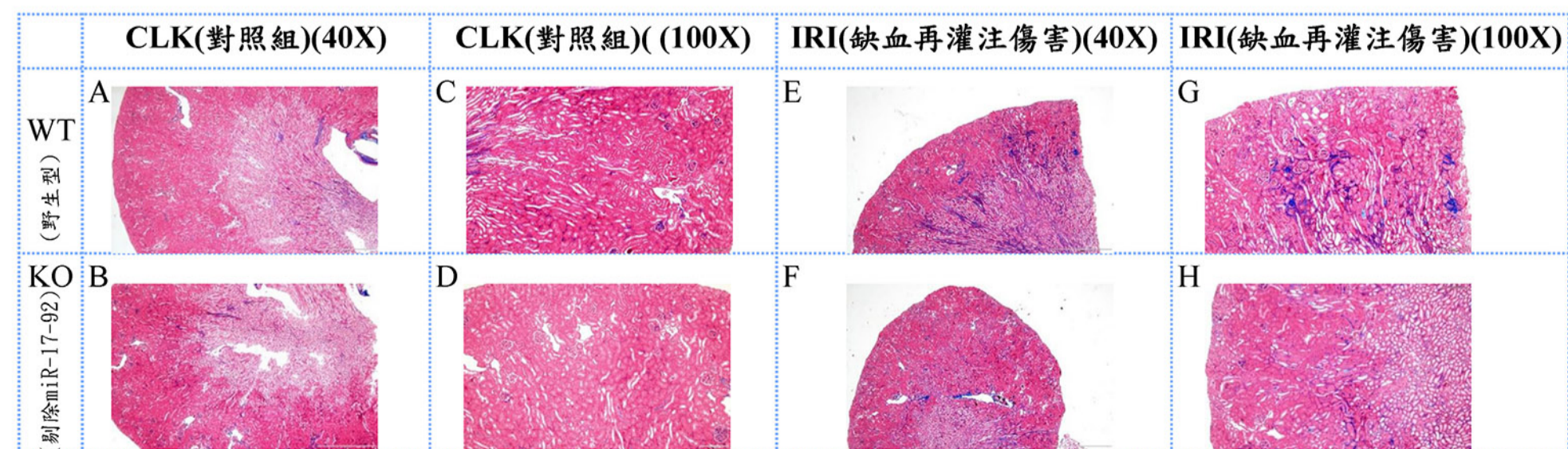
IRI全名為缺血再灌注傷害，指組織經歷一段時間的缺血後，再恢復血流所受到的傷害，經過IRI處理之腎臟會在組織修復的過程中發生纖維化的情形。此實驗中將小鼠單側腎動脈以止血鉗夾住30分鐘後放開，14天後觀察腎臟組織，對側未經處理之腎臟為CLK，經缺血再灌注之腎臟則為IRI。我們使用RT-qPCR定量小鼠腎臟中第一型膠原蛋白(Col-1)的RNA表現量，從基因角度觀察miR-17-92對於腎纖維化基因層面的影響。



圖五：第一型膠原蛋白 (Col-1) mRNA之RT-qPCR結果。Col-1(RNA)於CLK(未經IRI處理；對照組腎臟)小鼠腎臟內的表現量都不高。但在經過IRI(缺血再灌注傷害)的處理後，Col-1的含量會顯著的升高。其中，WT(野生型)增加的量高於KO(於T細胞中剔除miR-17-92)。無★：P ≥ 0.05; ★：0.01 < P < 0.05; ★★：0.001 < P ≤ 0.01; ★★★：P ≤ 0.001

四、以Trichrome染色法探討miR-17-92透過調控T細胞分化對於IRI模型的影響

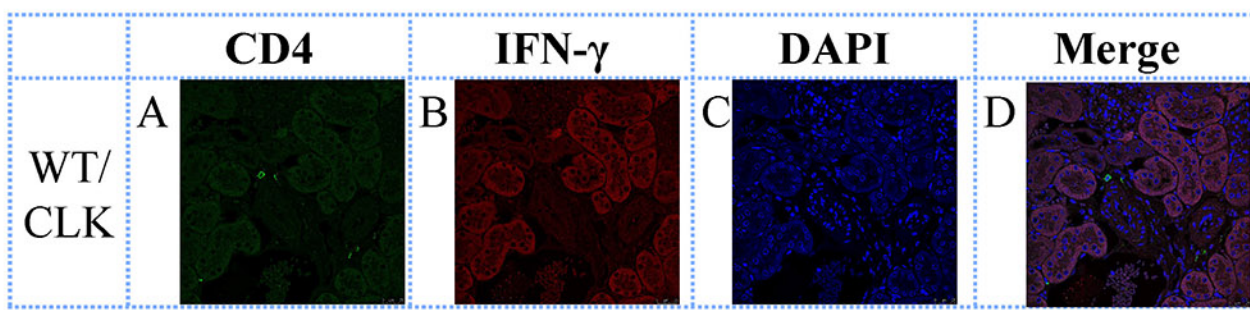
藉由馬森三色染色法(Trichrome)將腎纖維化的指標-膠原蛋白和纖維蛋白染成藍色，觀察腎纖維化的程度差異，從蛋白質層面的影響來驗證PCR實驗的結果。



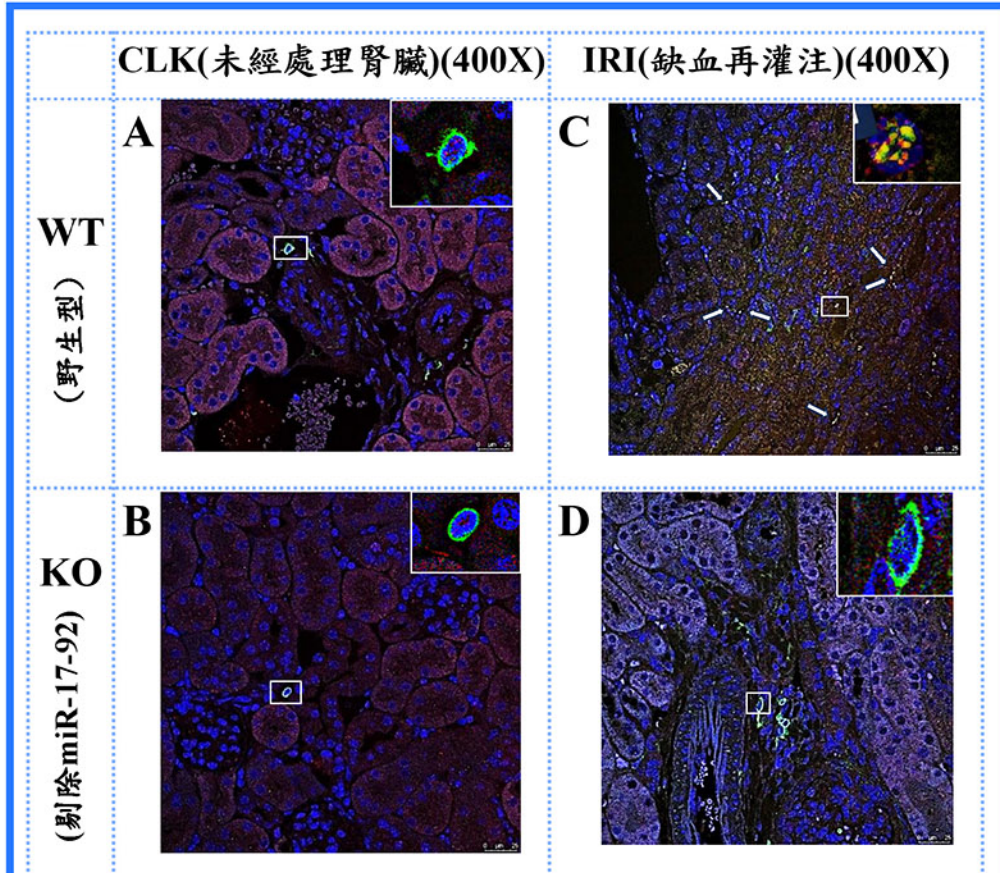
圖六：Trichrome染色結果觀察圖，CLK為未經IRI處理之對照組腎臟。觀察圖(A)、(B)、(C)、(D)，在CLK腎臟中，WT與KO小鼠在腎臟皮質處的藍色區塊的面積不多，代表兩者皆無明顯腎纖維化。圖(E)、(F)、(G)、(H)，這些經歷IRI的小鼠腎臟中，WT小鼠的腎臟藍色區塊的面積明顯多於KO小鼠。

五、利用螢光染色確認腎纖維化為T細胞分化差異所造成的結果

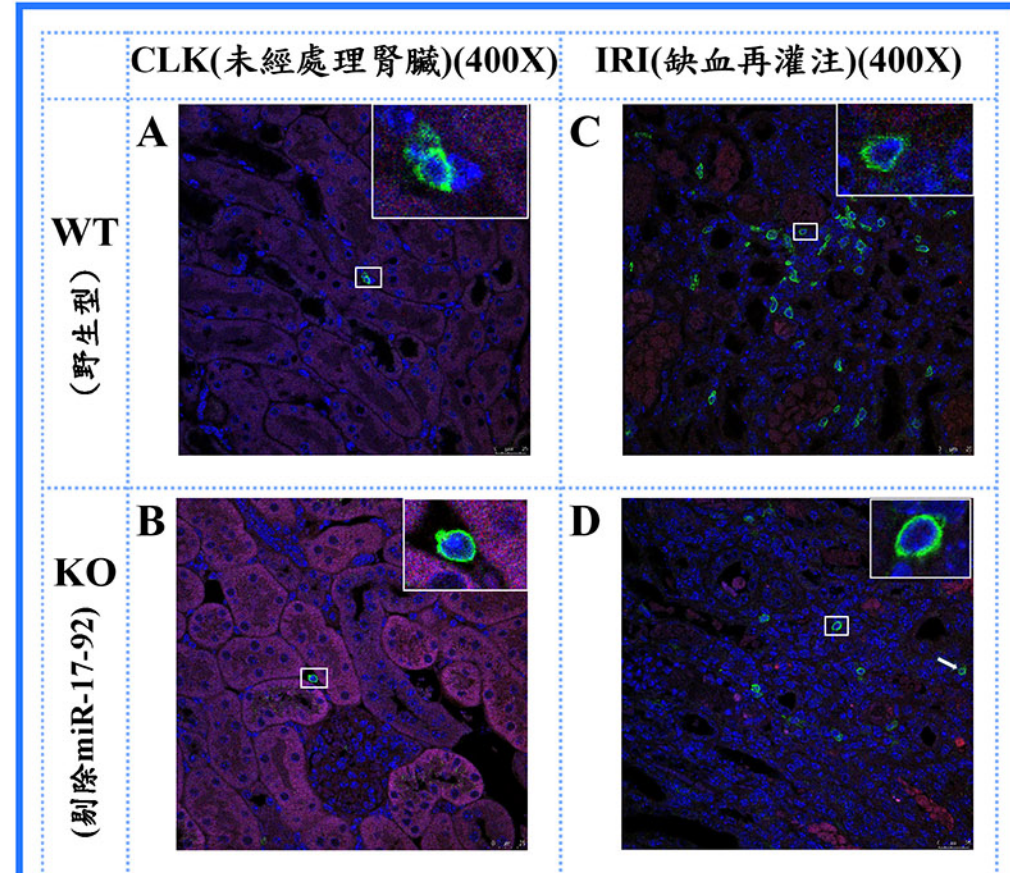
利用螢光染色，我們藉著螢光染色觀察Th1與Treg在WT與KO小鼠腎臟中的數量差異，並藉此推論miR-17-92造成的T細胞分化差異為腎纖維化的原因。



圖七：螢光染色的原理應用(400X)
(A)染T細胞表面標記CD4⁺ (綠色)
(B)染Th1細胞激素IFN- γ (紅色)
(Treg則改染轉錄因子Foxp3)
(C)為藉由DAPI染細胞核(藍色)
(D)為圖(A)、(B)、(C)疊合後的結果



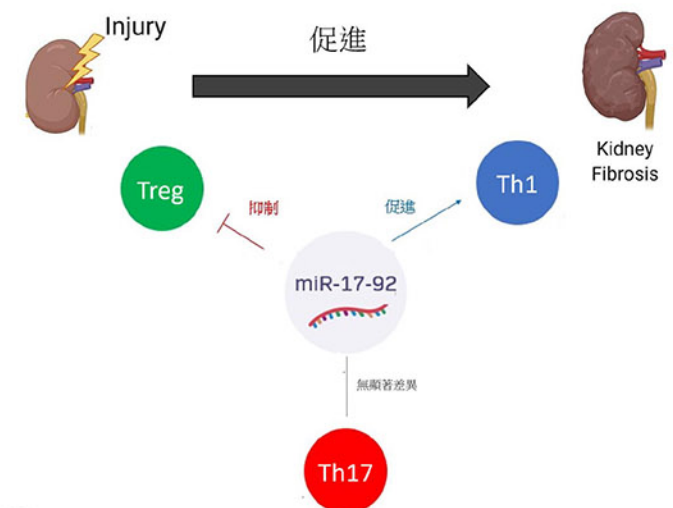
圖八：Th1在不同小鼠中之染色結果疊合圖。觀察到的細胞，其外圈有綠色螢光，胞內無紅色螢光為CD4⁺T細胞；外圈有綠色螢光，胞內有紅色螢光為Th1細胞(箭頭處)。(A)WT/CLK，觀察到的是CD4⁺T細胞；(B)KO/CLK，觀察到的是CD4⁺T細胞；(C)WT/IRI，觀察到的是Th1細胞和其餘CD4⁺T細胞；(D)KO/IRI，觀察到的是CD4⁺T細胞。圖(C)、(D)相較於圖(A)、(B)，圖內CD4⁺T細胞數量有所增加，再比較圖(C)、(D)可以發現圖(C)中的Th1較圖(D)多。



圖九：Treg在不同小鼠中之染色結果疊合圖。觀察到的細胞，其外圈有綠色螢光，核內無紅色螢光為CD4⁺T細胞；外圈有綠色螢光，核內有紅色螢光為Treg細胞(箭頭處)。(A)WT/CLK，觀察到的是CD4⁺T細胞；(B)KO/CLK，觀察到的是CD4⁺T細胞；(C)WT/IRI，觀察到的是CD4⁺T細胞；(D)KO/IRI，觀察到的是Treg細胞和其餘CD4⁺T細胞。圖(C)、(D)相較於圖(A)、(B)，圖內CD4⁺T細胞數量有所增加，再比較圖(C)、(D)可以發現圖(D)中的Treg較圖(C)多。

結論

- 一、miR-17-92可能會促進CD4⁺T細胞分化為Th1和抑制CD4⁺T細胞分化為Treg，但對分化成Th17的影響不顯著。
- 二、經過IRI處理後的第14天，KO(於T細胞中剔除miR-17-92)相較於WT(野生型)小鼠，其腎臟中Th1的數量較少、Treg的數量較多。
- 三、經過IRI處理後的第14天，KO(於T細胞中剔除miR-17-92)相較於WT(野生型)小鼠腎纖維化程度較低。



圖十：研究結果示意圖

綜合以上結果，miR-17-92在T細胞中，可能藉由促進CD4⁺T細胞分化成Th1和抑制其分化成Treg，進而使小鼠體內的腎纖維化更為嚴重。

未來展望

- 一、進一步研究miR-17-92的調節機制，期望為腎臟損傷程度檢測方法提供增加準確度之研究方向。
- 二、進一步探索miR-17-92在腎纖維化進程中的作用機制，並通過了解與腎纖維化之間的關係，提供開發新的腎纖維化治療方法的研究方向。
- 三、研究miR-17-92靶向的基因，並尋找其參與的其他生理反應，期望能為更多相關疾病提供幫助。

參考文獻

1. Djurdjaj S, Boor P. Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis. *Mol Aspects Med.* 2019 Feb;65:16-36.
2. Kinsey GR, Okusa MD. Expanding role of T cells in acute kidney injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2014 Jan;23(1):9-16.
3. Zhang M, Zhang S. T Cells in Fibrosis and Fibrotic Diseases. *Front Immunol.* 2020 Jun 26;11:1142.
4. Alikhan MA, Huynh M, Kitching AR, Ooi JD. Regulatory T cells in renal disease. *Clin Transl Immunology.* 2018 Jan 30;7(1):e1004.
5. Kuo G, Wu CY, Yang HY. MiR-17-92 cluster and immunity. *J Formos Med Assoc.* 2019 Jan;118(1 Pt 1):2-6.