

**科技部補助**  
**大專學生研究計畫研究成果報告**

計 畫 名 稱	： 海洋深層水在鏈脲佐菌素誘導的第一型糖尿病引起之腎病變的延緩作用及機制
------------	--------------------------------------

執行計畫學生：葉達昇

學生計畫編號：MOST 107-2813-C-040-028-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：李慧禎

處理方式：本計畫可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學系

中華民國 108年03月29日

## 目錄

目錄.....	1
摘要.....	2
(一) 序論.....	3
(二) 研究動機與研究問題.....	6
(三) 實驗材料與方法.....	7
(四) 實驗結果與討論.....	9
1. 腎纖維化與氧化壓力的關連.....	9
2. 腎病變與發炎反應的關連.....	11
3. 鎂離子與腎病變.....	12
(五) 參考文獻.....	13
(六) 實驗結果圖表.....	15

## 摘要

長期糖尿病引發腎臟腎絲球的硬化及病變，造成漸進式的腎臟病變，高血糖所造成的氧化壓力上升而引起之慢性發炎或纖維化可能是糖尿病腎病的原因之一。因此除了目前現有之臨床藥物外，找尋並試驗其他能夠延緩腎臟病變的物質可協助糖尿病患者。鎂是細胞中含量第二高之元素，以鎂陽離子之型態參與 350 種以上的酵素生化反應，包括訊息傳遞、能量代謝及增加抗氧化力等。本計畫利用含有高濃度鎂離子的海洋深層水 (Deep ocean water, DOW)，將大白鼠以鏈脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ) 誘導之第一型糖尿病做為動物模式，觀察是否能延緩或抑制糖尿病鼠腎臟病變的現象，並進一步研究其中可能之機轉。實驗方法為誘導第一型糖尿病後，將高含鎂海洋深層水依不同劑量管餵，經十週後犧牲，犧牲前一週取 24 小時之間之尿液，犧牲後取血液、腎臟進行分析。利用組織切片、免疫組織染色等方法檢測高含鎂海洋深層水對於腎臟病變是否有延緩或抑制的效果，並探討可能的機制。結果發現餵食海洋深層水可以減少腎細胞水腫變化 (Hydropic change) 與腎絲球基底膜增厚的程度，對於 Nrf2、VCAM-1 和 TIMP-2 等蛋白質的表現量也有顯著降低的作用，但 E-cad、TGF- $\beta$  和 SOD1 等蛋白質的表現則是較無明顯的差異，並維持高血糖的狀態，推測高含鎂之海洋深層水(DOW)可藉由鎂離子在氧化還原反應與發炎反應中參與的角色，調控降低氧化壓力與慢性發炎，使 VCAM-1、TIMP-2 等發炎相關蛋白，及抗氧化壓力蛋白如 Nrf2 數值降低。本計畫除探究海洋深層水是否具延緩腎臟病變的效果之外，也期待未來可應用於臨床醫療，提供延緩糖尿病腎病變的另一選擇。

## (一) 序論

1. 糖尿病所引發的併發症中，腎臟病變是末期糖尿病患者最主要死因之一，約有 25~30% 的第一型糖尿病患者與 8~10% 的第二型糖尿病患者會發生糖尿病腎病變[1]，且在高血糖情況下所誘發的氧化壓力及產生的 oxLDL 可能是促進併發症的主要機轉。出現蛋白尿症狀的糖尿病患者罹患心血管疾病之機率倍增，壽命顯著減少，而透析治療每年耗費健保支出高達 150 億以上，已成為台灣健保沈重的負擔[2]。

糖尿病引發的腎臟病變常見的特色有三：腎絲球基底膜增厚、腎臟繫膜膨脹、結節性腎硬化[1]，且可以分為以下幾期：(1) 腎絲球高濾過率期、(2) 正常白蛋白尿期、(3) 微量白蛋白尿期、(4) 蛋白尿期、(5) 腎衰竭期和尿毒期。其中以微量白蛋白尿其最為關鍵，此時期若能有效控制血壓與血糖，可能避免進展為末期腎病變，腎功能有機會恢復[3]。

- (1) 腎絲球高濾過率期：病患腎絲球濾過率 (Glomerular filtration, GFR) 比正常人高 20~40%，腎臟血漿流量 (Renal plasma flow, RPF) 增加 9~14%，腎臟體積增加 20% 左右，此時尚未出現微量白蛋白尿。
  - (2) 正常白蛋白尿期：又稱為「寧靜期」，糖尿病診斷後無出現微量白蛋白尿，GFR 較正常人高，腎臟亦肥大，可能維持數十年[1]。
  - (3) 微量白蛋白尿期：微量白蛋白尿的定義為半年內三次 24 小時尿液白蛋白排泄率 (Urinary albumin excretion rate, UAER) 有二次以上介於 30-300 mg/d (20-200  $\mu\text{g}/\text{min}$ )，或早晨尿液白蛋白／肌酸肝比值介於 30~300  $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。第一型病患微量白蛋白尿盛行率為 5-37%，平均 10~15 年會出現微量白蛋白尿，此時會高血壓，且腎絲球基底膜和繫膜有增厚情況。若此時期控制好血壓與血糖，則腎功能有機會恢復。
  - (4) 蛋白尿期：GFR 降低，每日尿液蛋白質流失量超過 500 mg 以上，亦即每天白蛋白排泄率大於 300 mg。患者通常在罹病後十到二十年出現蛋白尿，持續性蛋白尿者十五年內約有 75% 進入腎衰竭期，一旦到此時期則被視為腎臟功能無法再恢復。
  - (5) 腎衰竭期和尿毒期：GFR 降低至 30 ml/min 以下，有明顯的噁心、嘔吐、倦怠、酸血症、心臟衰竭和更嚴重的貧血，無法再從事日常活動。此時期腎臟代謝胰島素能力減退，胰島素注射量應減少，若持續惡化則需透析治療或換腎[4]。
2. 糖尿病腎病變的致病機轉，主要由腎臟細胞外基質 (Extracellular matrix, ECM) 的堆積，導致腎絲球基底膜增厚、腎纖維化和硬化。而高血糖所造成的氧化壓力與損傷，是糖尿病併發症的重要原因之一。高血糖可活化許多不同的代謝路徑，如產生高度醣化終產物 Advanced glycation end products (AGEs)，一群具有破壞性的修飾性蛋白質/脂質[5]、大量產生活性氧自由基中間產物 Reactive oxygen species (ROS)、活化 Protein kinase C (PKC)、促進 Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 的表現。高血糖的異常代謝亦使脂肪代謝異常，血脂濃度上升伴隨著低密度脂蛋白增加，和自由基而反應形成氧化態低密度脂蛋白 (Oxidized, oxLDL)，加速腎臟的破壞與病變。過去的腎臟病變代謝變化研究如下：
    - (1) 糖尿病患的血糖控制不良時，會造成部分腎絲球細胞受損，正常的腎絲球細胞為了維持腎臟功能，過濾的負擔將加重，使 GFR 上升，卻也同時造成腎絲球高血壓的問題。長期將導致腎絲球的壞死、病理切片可見腎絲球有硬化的現象[1]。
    - (2) 高濃度的葡萄糖會和胺基酸作用形成醣化殘基，經過一系列脫水與片段的反應後形成高度醣化終產物 (AGEs)。研究報告指出高血糖會使腎絲球的繫膜細胞 (Mesangial cells) 上的 Glucose transporter 增加，促使 AGEs 進入繫膜細胞，和細胞內受器結合後啟動訊息傳遞，透過 NADPH oxidase 產生 ROS，可活化

PKC、MAPKs、轉錄因子 NF- $\kappa$ B 等，接著增加各種生長因子的活性如 TGF- $\beta$ ，造成氧化壓力。AGEs 長期累積在繫膜細胞中將造成繫膜細胞基質增生，破壞腎功能[5]。

- (3) ROS 與自由基在正常的生化代謝中就會產生，包括 Superoxide ( $O_2^-$ )、Hydroxyl radical ( $OH\cdot$ )、Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) 和 Nitric oxide (NO) 等，會攻擊生物體內 DNA、蛋白質、脂質等大分子，造成氧化傷害。實驗指出，在背根神經細胞 (Dorsal root ganglia cells) 中加入 10-20mM 葡萄糖將增加  $O_2^-$ 、 $H_2O_2$  的產生，導致脂質的氧化和神經細胞的死亡，當加入 IGF-1 可部分降低 ROS 的產生，細胞死亡的現象亦受到抑制[6]。
  - (4) PKC 的活化會導致內皮細胞失去功能、NO 的生產降低，導致血流異常與血管異常增生。研究指出，糖尿病的老鼠視網膜、腎臟及微小血管都有大量 PKC 表現，接著會活化 MAPKs 和轉錄因子而改變基因調控，導致細胞生長停滯及凋亡[6]。
  - (5) AGEs、ROS 及 PKC 皆可活化 TGF- $\beta$  的訊息傳遞路徑，研究指出 TGF- $\beta$  表現增加會導致 ECM 的蛋白質異常聚集，是腎臟病變致病的主要細胞激素[5]。
  - (6) 高血糖促進的氧化壓力會使氧化態低密度脂蛋白 (oxLDL) 增加，而 oxLDL 可介導血管內皮的破壞，使內皮失去功能，在糖尿病引發的血管病變中扮演重要的角色，其中研究發現糖尿病患的 oxLDL 受器表現量上升，與高血壓、缺血再灌流 (Ischemia-reperfusion) 和高膽固醇血症有正相關性，也會強化 p38MAPK、NF- $\kappa$ B、PKC 的活化[7]。
3. 海洋深層水是指位於海平面以下深達 250 至 1500 公尺的海水，在世界各海域中緩慢的以溫鹽環流流動，約 2000 年循環一週期。因為無日照及生物活動，比起淺層海水乾淨、富含無機礦物鹽且組成成分安定，具有「高鎂低氯」的特性，在地球上超過 95% 的海水為海洋深層水，但因開採不易，因此尚未普及的使用在各領域。經過淡化 (Desalinated) 後，可製成不同含鎂量的濃縮液，其中鎂離子濃度約 40000ppm 的濃縮液為本次實驗選用之材料。過去針對海洋深層水濃縮液及相關功效的研究如下：
- (1) Mitsuhiro M. 等人研究日本高知縣室戶岬淺層及深層海水對於預防經飲食誘導引起高脂血症的兔子，於動脈粥狀硬化等影響之差異。結果發現血脂相關指標，如低密度脂蛋白 (LDL) 於深層海水組 ( $433.0\pm 40.3$  mg/dl) 較給予淺層海水組 ( $477.2\pm 25.4$  mg/dl) 來的低，且具有顯著性 ( $P<0.05$ )。整體而言，深層海水對於預防高脂血症以及動脈粥狀硬化較淺層海水效果佳[9]。
  - (2) Byung GH. 等人利用高脂飲食所誘導的糖尿病小鼠，給予淡水與海洋深層水提取之礦物質混合物 (Balanced Deep-Sea Water, BDSW)，將硬度調整至介於 500-2000 之間。BDSW 可能藉由調節肌肉及肝臟 AMPK 路徑來調節葡萄糖與脂肪相關之代謝、增加肌肉對葡萄糖吸收等方式，來改善葡萄糖耐受不良的現象[10]。
  - (3) Hwang, H. S. 等人比較以自來水 (對照組) 和硬度 1000 的海洋深層水 (實驗組) 作為飲用水，餵食小鼠 84 日後，發現實驗組小鼠的體重增加比對照組多 7%，血漿葡萄糖的濃度較對照組下降了 35.4%。海洋深層水增加了血漿中的脂聯素 (Adiponectin)、骨骼肌中的 GLUT4 和 AMP-activated protein kinase，也同時減少了血漿中 Resistin、RBP4 和 Fatty acid binding protein 的濃度。此結果顯示海洋深層水可有效調節肥胖和糖尿病相關的分子，達到抗肥胖、抗糖尿病的效果[11]。
  - (4) Fan, H. 等人研究 Imprinting control region (ICR) 小鼠的運動後疲勞現象，發現海洋深層水可延緩小鼠游泳疲勞的時間、減少游泳前、游泳後和休息後的 Blood

lactate (BLA)曲線下面積，且降低丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 和游泳後的尿素氮 (Blood urea nitrogen, BUN)、乳酸脫氫酶 (Lactate dehydrogenase) 和肌酸激酶 (Creatine kinase)，更能增加 Superoxide dismutase、Glutathione peroxidase 等抗氧化酵素的活性。整體而言，海洋深層水可增強 ICR 小鼠的抗氧化能力，以達到增進運動能力及緩解疲勞的效用[12]。

4. 抗氧化物可經飲食補給或體內自行合成，能提供一個氧原子給自由基，終結氧化還原反應以減少氧化壓力。
  - (1) 水溶性的 Vitamin C 和脂溶性的 Vitamin E 是哺乳動物細胞中的抗氧化系統，Vitamin C 是血漿中最重要的抗氧化物，可形成抵抗脂質過氧化的第一道防線。Vitamin E 的衍生物可清除脂質過氧化所產生的自由基，以及抑制腫瘤的血管新生作用。
  - (2) GSH (Glutathione) 是哺乳類動物體內最重要的水溶性抗氧化物，由三種胺基酸 Glycine、Cysteine、Glutamate 組成，具有獨特的硫醇 (Thiol) 性質是強還原劑。有毒性的脂質過氧化物可以與兩分子的 GSH 結合，透過 GSH peroxidase 形成 Lipid hydroxyl group、GSH disulfide (GSSG) 及水，達到解毒的作用。
  - (3) 超氧化物歧化酶 SOD (Superoxide dismutase) 具有三個異構物: Cytosolic CuZn-SOD (SOD1)、Mitochondrial SOD (SOD2)，及 Extracellular SOD。可將  $O_2^-$  轉換成  $H_2O_2$  及氧，再經過 Catalase 將  $H_2O_2$  分解為氧氣和水。研究發現當 ROS 量上升時，SOD1 會回到核仁，作為轉錄調控因子以避免氧化壓力對 DNA 造成的傷害[13]。若降低 SOD2 會使粒線體的 GSH 下降，氧化壓力加強對細胞造成損害[14]。

## (二) 研究動機與研究問題

### 1. 研究動機

- (1) 糖尿病長期穩居台灣十大死因中第五名，在台灣，多數病例為第二型糖尿病，第一型糖尿病僅佔百分之三，但長期高血糖狀況下所引起的多重併發症幾無差異，包括急性酮酸中毒、足部問題、眼睛、心臟、大血管、神經或腎臟病變等，對於身體的傷害是全面性的。其中糖尿病引發的腎臟病變已成為先進國家末期腎衰竭的最主要原因，透析治療每年花費健保支出超過 150 億元以上，已成為財政和病患家庭沉重的負擔。因此尋找可延緩或抑制糖尿病腎臟病變的方法刻不容緩，是醫療界和科學家們共同努力的目標。
- (2) 海洋深層水：來自大洋海平面深度 600 公尺下，具有「高鎂低氯」的特性，富含無機鹽且組成成分穩定，在微生物學、物理化學方面的性質安定。其中含有高濃度鎂離子的特性，可作為額外補充鎂離子的來源，又鎂離子參與多項細胞中的生化代謝反應包括抗氧化作用，因此本計畫欲以高含鎂海洋深層水作為實驗材料，探討攝取高濃度鎂離子後，對於糖尿病腎臟病變是否有延緩、抑制或其他助益的效果。

### 2. 研究問題

- (1) 觀察高含鎂海洋深層水是否具有延緩或抑制糖尿病所引起之腎臟病變的效果。
- (2) 探討鎂離子參與糖尿病腎病變生化代謝反應的機轉。
- (3) 判別高低濃度之高含鎂海洋深層水的攝取，對於腎臟病變的延緩有無效果的差異。

### (三) 實驗材料與方法

1. **高含鎂海洋深層水來源**：本實驗採用 Deep Ocean Water (DOW) 是由泓發樂活氏水科技服務股份有限公司所製備的含鎂深層海水濃縮液，原料來自於台灣東岸太平洋 (Pacific Ocean) 海平面下深度達 600 公尺的深層海水。濃縮液中含鎂離子 (Magnesium) 43400ppm，鈉 22900ppm，鉀 9270ppm，鈣 359ppm。
2. **動物第一型糖尿病模型建立**：由樂斯科實驗動物中心提供 4 週齡 (150-165g)，雄性 Sprague-Dawley (S.D) 大白鼠。動物飼養條件為自動光照控制 (12 小時白晝、12 小時黑夜)、室溫控制於 25°C、相對濕度 55%，並提供動物自來水及標準大鼠飼料，讓其自由進食及飲水。經過一週的適應期，禁食 8 小時後利用鏈脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ) 以 65mg/kg 的劑量腹腔注射入大白鼠體內。三天後測量血糖上升至 250 mg/dl 以上的認定為糖尿病之狀態，此為定義為 Day 0，之後每日管餵，試驗為期 10 週。試驗進行時，每週由尾靜脈採血測量血糖變化，並於實驗完成後，犧牲動物採血液進行生化值分析；另外取腎臟進行組織切片。
3. **動物分組及管餵**：分為 5 組，每組 8 隻，分組方式如下：
  - A. **控制組**：無糖尿病，餵食正常飲食。
  - B. **誘導組**：僅誘導出糖尿病，餵食正常飲食。
  - C. **低濃度 DOW 組**：誘導出糖尿病後，每日以 0.35ml/kg 的劑量管餵，餵食正常飲食。
  - D. **高濃度 DOW 組**：誘導出糖尿病後，每日以 0.7ml/kg 的劑量管餵，餵食正常飲食。
  - E. **MgSO<sub>4</sub> 組**：為了對照鎂離子作用，在誘導出糖尿病後，每日 MgSO<sub>4</sub> 以 50 mg/kg 的劑量管餵，餵食正常飲食。

#### 4. 研究方法

- (1) **病理組織切片**：組織以 70% Alcohol 浸泡加以固定 24 小時，接著以序列酒精脫水 (Dehydration with ethanol)：以 50%, 70%, 80%, 90%, 100% 酒精各一小時後，再以 100% 酒精進行隔夜處理。以二甲苯 (Xylene) 置換酒精，浸置 2 小時，隔 1 小時換一次，再以二甲苯隔夜處理後，更換石蠟浸潤以滲透組織。將石蠟完全浸潤的組織置於包埋框中，加入溶化的石蠟靜待冷卻後除去模子，以 5 $\mu$ m 的厚度連續切片，置於 38°C 水中使其完全伸展後至於玻片上烘乾。以蘇木紫-伊紅 (Hematoxylin-Eosin 染色法, H&E stain)。將封片膠滴於已染色的組織切片上，以 45°C 慢慢蓋上蓋玻片以避免氣泡產生，待封片膠凝固後即完成封片。

#### (2) 免疫組織染色：

- A. 烤片：切片放入烘箱 30 分鐘，65°C，使臘稍微溶解。
- B. 脫臘、回水：以 Xylene 及酒精進行脫臘及回水程序，各 15 分鐘。
- C. 用檸檬酸緩衝液 (0.01 M, pH6.0) 煮沸 15 分鐘後浸泡 5 分鐘 ddH<sub>2</sub>O 回溫。
- D. 以 PBST wash 三次、PAP Pen 框出檢體位置。
- E. Hydrogen Peroxide Block 覆蓋檢體作用 10 分鐘，再以 PBST wash 三次。
- F. Ultra V Block 覆蓋檢體作用 5 分鐘，再以 PBST wash 三次。
- G. 加入一次抗體完全覆蓋檢體，於濕盒環境 37°C 作用 1 小時，再以 PBST wash 三次。

一次抗體種類與來源：E-cadherin (來源-Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、SOD1 (來源-Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、TGF- $\beta$ 1 (來源-Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、TIMP-2 (來源-Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、VCAM-1 (來源-Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、Nrf2 (來源-Santa Cruz



Biotechnology, Inc.)，以 1:200 稀釋倍數稀釋後使用。

H. 加入 Primary Antibody Amplifier Quanto 覆蓋檢體作用 30 分鐘，再以 PBST wash 三次。

I. HRP Polymer Quanto 避光環境覆蓋檢體作用 10 分鐘，再以 PBST wash 三次。

J. 加入呈色劑 DAB (1ml buffered substrate+1 drop DAB) 呈色。利用蘇木紫 (Hematoxylin) 作對比染色，將載玻片置於濾紙片上，滴上封面膠於檢體上，再用蓋玻片以 45° 覆蓋在檢體上，藉由毛細現象使封面膠佈滿，避免氣泡產生。等封片膠凝固，即完成封片。

- (3) **統計分析**: 研究結果之所有描述性統計數據，皆以平均數 (Means) ± 標準差 (SD) 表示，統計方法使用 one-way ANOVA (變異數分析, Analysis of variance) 比較組間差異趨勢，並以 Duncan's new multiple range test 做各組間差異比較，當  $P < 0.05$  為兩者間具顯著性差異。本實驗結果均以電腦統計軟體 SigmaStat (Jandel Scientific Software, USA) 進行數據分析。

#### (四) 實驗結果與討論

我們挑選(A)：控制組、(B)誘導組、(C)：低濃度 DOW 組、(D)：高濃度 DOW 組以及(E)：MgSO<sub>4</sub> 組等六組來進行實驗，並每週尾靜脈採血方式測量血糖，共採血 10 週，以血糖值大於 250mg/dl 作為是否誘導第一型糖尿病成功的標準。結果觀察到，餵食含高濃度鎂離子之海洋深層水(C)或(D)或 MgSO<sub>4</sub>(E)並不會使血糖有顯著的變化。(Figure 1.)

將經石蠟包埋的組織切片做病理染色 (H&E stain)，以顯微鏡在 200 倍的放大倍率下進行觀察，從實驗結果得知，當大白鼠誘發糖尿病後，誘導組 (B) 和控制組 (A) 相比，近曲小管內的腎臟細胞部分，白色箭頭所指之處，有水腫的變化 (Hydropic change) 而呈現腫大的空隙，且當高血糖的時候，會使得腎絲球基底膜(Glomerular basement membrane, GBM)增厚，而導致糖尿病腎病變。比較誘導組 (B) 和控制組 (A)，可見黑色箭頭所指之處，有腎絲球基底膜增厚情形。觀察發現，在給予低濃度(C) 或 高濃度(D) 的海洋深層水或 MgSO<sub>4</sub>(E)十週之後，水腫的變化和基底膜增厚有減少的現象。(Figure 2.)

而糖尿病慢性腎病變(Chronic kidney disease ,CKD)的致病機轉，主要由腎臟細胞外基質(Extracellular matrix, ECM)的堆積，導致腎絲球基底膜增厚、腎纖維化和硬化。其中腎纖維化(Renal fibrosis)是導致終階腎病變(End stage renal disease)最常見的途徑，氧化壓力與損傷，以及後續引發的發炎反應，則是腎纖維化的重要原因。以下將分別敘述氧化壓力和發炎反應，與腎纖維化之間的相關性，以及鎂離子對抗腎病變的機制：

##### 1. 腎纖維化與氧化壓力的關連

腎纖維化被證明與氧化壓力、腎小球硬化、腎小管間質纖維化(TIF)、發炎介質的浸潤以及 alpha 平滑肌肌動蛋白活化形成的肌纖維母細胞( $\alpha$ -SMA-positive myofibroblasts)相關。其中，腎小管間質纖維化(TIF)是最關鍵的潛在性致病因子，且 TIF 的核心在於腎小管上皮-間質轉變(epithelial-to-mesenchymal transition, EMT)，或腎小管細胞至肌纖維母細胞的轉分化[15]。

在上皮-間質轉變(EMT)中，上皮細胞逐漸失去了原先的特性，並得到了間質中的蛋白質，一系列的變化分為不同階段：

- (1) 失去上皮細胞間的連結物，如 Epithelial (E)-cadherin (**E-cad**) 和 Zonula occludens protein (ZO-1)。
- (2) 由間質性的 Markers  $\alpha$ -SMA 和 Intermediate filament protein vimentin 取代。
- (3) 細胞骨架重塑與型態上的變化導致腎小管基底膜(Tubular basement membrane, TBM)的損傷。
- (4) 肌纖維母細胞活動性與增生性增加，細胞由 TBM 遷徙至間質，促進 ECM 堆積與腎纖維化的進程。

其中上皮鈣黏蛋白 Epithelial (E)-cadherin (**E-cad**)是一種跨膜蛋白，功能為細胞之間的連接，大多分布在腎小管上皮的細胞膜，因為作用時需鈣離子而得名，在細胞結構的整合與極性的維持扮演重要的角色。已有研究顯示高度糖化終產物 (AGEs)和 TGF- $\beta$  誘導的上皮-間質轉變(EMT)會抑制細胞中 **E-cad** 的表現量與功能，進而造成尿液中 **E-cad** 量上升[16]。我們利用免疫組織染色 (IHC)，比較各組別之間 **E-cad** 的表現量，經單向 ANOVA 以 Duncan 法統計定量後，控制組(A)表現量最高，誘導組(B)表現量下降，有顯著差異，但餵食不同濃度的海洋深層水(C、D) 後無明顯差異，餵食 MgSO<sub>4</sub>(E)組的表現量更為下降。(Figure 3.)

Transforming Growth Factor-beta (**TGF-β**)是一種肥大性與纖維化的細胞因子和致病因子，會影響腎小球繫膜擴張和腎功能缺損，許多研究顯示 **TGF-β1** 和其下游的 Smad 傳訊級聯反應是糖尿病腎病變中，造成腎纖維化的關鍵介導者。**TGF-β** 可藉由結合至膜上的 TGF-β receptor complex，影響膜內的 Smad 蛋白群磷酸化，並轉位進入細胞核中調控基因轉錄，促使 ECM 的堆積與上皮-間質轉變(EMT)。[17]

**TGF-β** 的增加與高濃度葡萄糖關係甚密，高濃度的葡萄糖會和胺基酸作用形成醯化殘基，經過一系列脫水與片段的反應後形成高度醯化終產物 (AGEs)。研究報告指出高血糖會使腎絲球的繫膜細胞 (Mesangial cells) 上的 Glucose transporter 增加，促使 AGEs 進入繫膜細胞，和細胞內受器結合後啟動訊息傳遞，透過 NADPH oxidase 產生 ROS，可活化 PKC、MAPKs、轉錄因子 NF-κB 等，形成氧化壓力。ROS 中，Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)可正調控 **TGF-β** 等各種生長因子的表現量與生物活性，使腎的近曲小管與繫膜細胞肥大，細胞外基質(ECM)和 Fibronectin 生成增加[18]。我們利用免疫組織染色 (IHC)與定量統計後，比較各組別之間 **TGF-β1** 的表現量，發現誘導組(B)的 **TGF-β1** 表現量有顯著上升，餵食低濃度 DOW(C)或 MgSO<sub>4</sub>(E)後明顯下降，但與餵食高濃度 DOW(D)並無明顯差異。(Figure 4.)

細胞可藉超氧化物歧化酶 **SOD** (Superoxide dismutase)對抗氧化壓力，SOD 具有三個異構物: Cytosolic CuZn-SOD (SOD1)、Mitochondrial SOD (SOD2)，及由血管平滑肌細胞合成的 Extracellular SOD (SOD3)。SOD 可將 O<sub>2</sub><sup>-</sup>轉換成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及氧，再經過 Catalase 將 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解為氧氣和水。研究發現 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可透過 ATM-dependent manner (ATM serine/threonine kinase)調控 SOD，當 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的量上升時，**SOD1** 會由細胞質回到核仁，作為轉錄調控因子以避免氧化壓力對 DNA 造成的傷害[19]。

在 Hiroki Fujita 等人的研究中，KK/Ta-Akita mice 與 C57BL/6-Akita mice 兩糖尿病模型有相同的高血糖水平，但 KK/Ta-Akita mice 發展出糖尿病腎病變，C57BL/6-Akita mice 則是出現腎病變的抵抗性，觀察發現 KK/Ta-Akita mice 糖尿病腎病變組的 SOD 發生了負調控(Down-regulation)，數量與活性明顯下降，C57BL/6-Akita mice 則是沒有差異，說明 SOD 的下降與糖尿病腎病變的進程有關聯[20]。我們利用免疫組織染色 (IHC)與定量統計，發現誘導組(B)的 **SOD1** 表現量有顯著上升，餵食高濃度 DOW (D)可明顯下降，但餵食低濃度 DOW(C)或 MgSO<sub>4</sub>(E)後則與誘導組(B)無明顯差異，與前述 **SOD1** 的表現量結果不同，推測因為不同時期之腎病變所致，早期腎病變中為了對抗氧化壓力，**SOD1** 表現量會上升，但當進展至終末期腎病變，則會使 **SOD1** 表現量與活性下降，減弱對抗氧化壓力之能力。。 (Figure 5.)

另外，Nuclear factor erythroid 2 (NFE2)-related factor 2 (**Nrf2**)是 Basic region leucine zipper (bZip)轉錄因子中，Cap 'n' Collar(CNC)次家族的其中一員。透過結合在 NFE2-binding motif，**Nrf2** 可進行選殖(Cloned)，而 **Nrf2** 也誘導藥物代謝酵素(Drug metabolizing enzymes ,DMEs)如 Glutathione S-transferase (GST)和 NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1)的活化，對於對抗氧化壓力以及對抗促發炎訊號都有著重要的角色[21]。

**Nrf2** 通常都被 Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)螫隔(Sequestered)，而 Keap1 可促使蛋白酶體降解[22]。**Nrf2** 由 Keap1 釋放後可進入細胞核中，結合至 Antioxidant response element (ARE)並開啟抗氧化基因的轉錄，增加 DMEs 的表現以對抗氧化壓力[23]。

目前已有的研究指出，在糖尿病腎病變的條件下，**Nrf2** 誘導之下游訊號傳遞表現增加，顯示抗氧化壓力的反應有顯著的正調控(Upregulation)[24]。我們經過免疫組織

染色 (IHC)與定量統計，觀察到誘導組(B)的 **Nrf2** 表現量有顯著上升，在餵食低濃度 DOW(C)、高濃度 DOW(D)或  $MgSO_4$ (E)後都可明顯的降低 **Nrf2** 的表現量，可能與氧化壓力的降低有關。(Figure 6.)

## 2. 腎病變與發炎反應的關連

過去研究並不認為糖尿病與發炎及免疫有關，但近來的研究顯示腎的發炎在糖尿病進程中扮演重要的角色。在糖尿病狀態中，巨噬細胞和 T 細胞會聚集在腎小球與間質，而白血球的召集可分為三個階段[25]：

- (1) Selectin 依賴型的白血球移動至內皮細胞附近。
- (2) Chemokine-dependent integrin 活化，白血球黏附至血管內皮上。
- (3) 白血球由血管內皮一側穿出至間質一側，造成發炎反應。

糖尿病中期的高血糖狀態與高度醣化終產物 Advanced glycation end products (AGEs)可刺激 interleukin-8 (CXCL8)、Monocyte-chemoattractant protein-1 (MCP-1)、 $INF-\gamma$  inducible protein (CXCL10)、Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ /CCL3) 以及 RANTES (CCL5)等發炎相關細胞激素的生成[26]。

在白血球黏附至血管內皮時，Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)參與了此步驟，白血球透過黏附 **VCAM-1** 以穿過內皮[25]。糖尿病狀態中，可發現氧化壓力透過 ROS 及 AGEs 等產物，活化 NF- $\kappa$ B 並提升了 **VCAM-1** 的表現量，促進白血球的浸潤，導致腎發炎狀況加劇，也和糖尿病高血壓造成白蛋白尿的嚴重程度成正相關 [27]。我們的實驗結果發現，誘導組(B)中 **VCAM-1** 表現量大幅上升，而在餵食低濃度 DOW (C)、高濃度 DOW (D)或  $MgSO_4$ (E)後都可顯著降低。(Figure 7.)

而 **TGF- $\beta$**  不僅與氧化壓力有關，也參與了發炎反應，可誘導 **TIMP** 蛋白家族的表現。Tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP2)是 **TIMP** 家族中的其中一員，為基質金屬蛋白酶(Matrix metalloproteinases, MMPs)的天然抑制劑[28]。MMP 可蛋白水解細胞外基質(ECM)，而 **TIMP-2** 可抑制 ECM 的分解。在高葡萄糖的環境中，MMP 的表現量下降，**TIMP-2** 的表現量上升，兩者的失衡導致 Type 4 collagen (ECM 中主要的物質)降解減少，造成 ECM 堆積[29]。

但在 Rysz, Jacek 等人的研究中，在糖尿病腎病變時，MMPs 和 TIMPs 蛋白家族的表現量皆下降，而 MMP/TIMP 的比值上升，意謂 TIMPs 降幅較大，其原因應為糖尿病腎病變的發炎反應中，TNF-a 和 IL-1b 等發炎相關細胞激素(Cytokine)會降低內皮細胞分泌 TIMPs[30]。而我們經過免疫組織染色 (IHC)與定量統計，觀察到在誘導組 (B)中，TIMP-2 的表現量比控制組(A)顯著上升，餵食低濃度 DOW(C)、高濃度 DOW(D)或  $MgSO_4$  皆可明顯降低 TIMP-2 的表現量，因此我們綜合前述 VCAM-1 與 TIMP-2 下降的結果，推測高含鎂物質如海洋深層水或  $MgSO_4$  可有效降低腎發炎的狀況。(Figure 8.)

### 3. 鎂離子與腎病變

海洋深層水具有「高鎂低氯」的特性，而鎂離子參與了超過 350 種的酵素生化反應，如能量生成、蛋白質合成、離子運輸和細胞傳訊等，為一重要 co-factor，是人體維持機能不可或缺的基本物質。已有實驗證實鎂離子缺乏會增加 NO 量而使酵素受到 nitrosative damage，這會促進自由基累積造成氧化傷害，和心血管疾病、骨質疏鬆、代謝性症候群、高血壓、第二型糖尿病、慢性疲勞症候群和慢性腎疾病 CKD (Chronic kidney disease) 有關。一個鎂元素可容納 80 個水分子，相較於其他金屬元素如鈣只能容納 4~8 個水分子，這項特性使它成為天然保濕因子，可長時間留住水分，在運動的營養補給、水分補充、化妝品的應用和骨頭及心血管的健康都有助益[8]。

Moeini-Nodeh, S. 等人以氧化鎂奈米粒子 (MgO NPs) 在大鼠胰島細胞發現抗氧化、抗凋亡的效果。經過 24 小時的作用，100ppm 的 MgO NPs 可降低 75.77% 的 ROS 產生，脂質的過氧化物也有顯著的下降，整體抗氧化力 Total antioxidant power (TAP) 更是從 53.625 上升至 93.125 nmol/ $\mu$ g protein。此外，MgO NPs 抑制了 Caspase-9 活性而抵抗細胞不正常的凋亡，使胰島素的分泌增加[31]。

Hwang, M. H. 等人以海洋深層水萃取出 3、135、405、675 mg/kg 等不同的高鎂濃度萃取物，餵食糖尿病小鼠六週，觀察到實驗組小鼠的空腹葡萄糖濃度，在三週後逐漸降低，最終 675mg/kg 劑量之鎂萃取物與正控制組小鼠的空腹葡萄糖濃度呈顯著差異，有明顯的下降。在口服葡萄糖耐量試驗 (Oral Glucose Tolerance Test, OGTT) 中，也發現補充鎂離子能有效降低血液中葡萄糖量，達到抗糖尿病的效果[32]。

Parvizi, M. R. 等人以 MgSO<sub>4</sub> 的型態，加強 STZ 誘導第一型糖尿病的大鼠之鎂攝取量，經過八週後，觀察到氧化壓力指標的 MDA 和腎損傷指標的 BUN、Creatinine 都明顯下降。鎂可增加 GLUT4 mRNA 的表現，促進葡萄糖的運輸，降低血糖值，因此減緩氧化壓力與腎的損害[33]。

而氧化壓力與鎂之間呈現循環的關係，鎂可參與 GSH 的合成，降低氧化壓力，而氧化壓力的增加也將造成低血鎂。多因子抗氧化蛋白 PARK7/DJ-1 在氧化還原反應中扮演重要角色，調控著 Androgen receptor- dependent transcription，編碼出與鎂流出系統相關的基因。低血鎂將降低血液中的 HDL-C，易導致頸動脈內膜增厚和動脈硬化[34]；低血鎂也會提高細胞內的鈣離子濃度，產生過量的氫氧自由基 (OH $\cdot$ ) 和 Peroxynitrite (ONOO $-$ )，使氧化壓力更加嚴重，還會提高 Circulating substance P，促進細胞發炎[35]。

綜合以上實驗結果與參考文獻討論，我們推測誘導第一型糖尿病模型成立後，其高血糖與高度醣化終產物帶來的氧化壓力，以及細胞激素浸潤所介導的慢性發炎反應會進展成慢性腎病變，而餵食含有高鎂離子之海洋深層水(DOW)，可能可以在維持高血糖的狀態下，藉由鎂離子在氧化還原反應及發炎反應中扮演的角色，降低氧化壓力與發炎相關等生物指標，達到延緩腎病變進程的目標，可供未來慢性腎病變治療提供不同的選擇與研究基礎。

## (五) 參考文獻

1. 蕭匡智, et al. (2013). "糖尿病腎病變." 腎臟與透析 25(1): 31-34.
2. 辛錫璋, 糖尿病腎臟病變, 衛生福利部國民健康署, 糖尿病防治手冊 (糖尿病預防、診斷與控制流程指引) - 醫事人員參考
3. Trevisan R, Viberti GC. "Pathophysiology of diabetic nephropathy." In: LeRoith D, Taylor SI, Olefsky JM.(eds), Diabetes Mellitus: A fundamental and Clinical Text. 2000; 898-910
4. Andersen, A., et al. (1983). "Diabetic nephropathy in type 1 (insulin-dependent) diabetes: an epidemiological study." Diabetologia 25(6): 496-501.
5. Nowotny, K., et al. (2015). "Advanced glycation end products and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus." Biomolecules 5(1): 194-222.
6. Lindblom, R., et al. (2015). "Targeting Mitochondria and Reactive Oxygen Species-Driven Pathogenesis in Diabetic Nephropathy." The review of diabetic studies: RDS 12(1-2): 134-156.
7. Zhang, L., et al. (2016). "The involvement of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 and p38MAPK in early diabetic nephropathy." Int J Clin Exp Med 9(2): 2391-2398.
8. JACOBS, A. P. "INTRODUCTION TO PROFILED DEEP OCEAN MINERALS (DOM)."
9. Mitsuhiro M, Saburo Y, Atsuhide H, et al, Difference between deep seawater and surface seawater in the preventive effect of atherosclerosis. Biol Pharm Bull 27: 1784-1787, 2004.
10. Byung GH, Eun JS, Jung-EP, Anti-diabetic effect of balanced deep-sea water and its mode of action in high-fat diet induced diabetic mice. Mar Drugs 11:4193-4212, 2013.
11. Hwang, H. S., et al. (2009). "Anti-obesity and antidiabetic effects of deep sea water on ob/ob mice." Marine biotechnology 11(4): 531.
12. Fan, H., et al. (2016). "Deep sea water improves exercise and inhibits oxidative stress in a physical fatigue mouse model." Biomedical reports 4(6): 751-757.
13. Tsang, C. K., et al. (2014). "Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance." Nature communications 5: 3446.
14. Miranda-Díaz, A. G., et al. (2016). "Oxidative stress in diabetic nephropathy with early chronic kidney disease." Journal of diabetes research 2016.
15. Hills, C. E. and P. E. Squires (2011). "The role of TGF- $\beta$  and epithelial-to mesenchymal transition in diabetic nephropathy." Cytokine & growth factor reviews 22(3): 131-139.
16. Jiang, H., et al. (2009). "Identification of urinary soluble E-cadherin as a novel biomarker for diabetic nephropathy." Diabetes/metabolism research and reviews 25(3): 232-241.
17. Soldatos, G. and M. Cooper (2008). "Diabetic nephropathy: important pathophysiologic mechanisms." Diabetes research and clinical practice 82: S75-S79.
18. Lv, W., et al. (2018). "Oxidative stress and renal fibrosis: recent insights for the development of novel therapeutic strategies." Frontiers in physiology 9: 105.
19. Tsang, C. K., et al. (2014). "Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance." Nature communications 5: 3446.
20. Fujita, H., et al. (2009). "Reduction of renal superoxide dismutase in progressive diabetic nephropathy." Journal of the American Society of Nephrology 20(6): 1303-1313.
21. Ma, Q. (2013). "Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity." Annual review of pharmacology and toxicology 53: 401-426.
22. Cheng, Y., et al. (2016). "Up-regulation of Nrf2 is involved in FGF21-mediated

- fenofibrate protection against type 1 diabetic nephropathy.*" Free Radical Biology and Medicine 93: 94-109.
23. Brosius III, F. C. and C. E. Alpers (2013). "*New targets for treatment of diabetic nephropathy: what we have learned from animal models.*" Current opinion in nephrology and hypertension 22(1): 17.
  24. Jha, J. C., et al. (2016). "*Diabetes and kidney disease: role of oxidative stress.*" Antioxidants & redox signaling 25(12): 657-684.
  25. Lim, A. K. and G. H. Tesch (2012). "*Inflammation in diabetic nephropathy.*" Mediators of inflammation 2012.
  26. Duran-Salgado, M. B. and A. F. Rubio-Guerra (2014). "*Diabetic nephropathy and inflammation.*" World journal of diabetes 5(3): 393.
  27. Guillén-Gómez, E., Bardají-de-Quixano, B., Ferrer, S., Brotons, C., Knepper, M. A., Carrascal, M., ... & Fernández-Llama, P. (2018). *Urinary Proteome Analysis Identified Nephrilysin and VCAM as Proteins Involved in Diabetic Nephropathy.* Journal of diabetes research, 2018.
  28. Arpino, V., et al. (2015). "*The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis.*" Matrix Biology 44: 247-254.
  29. McLennan, S. V., et al. "*Decreased matrix degradation in diabetic nephropathy: effects of ACE inhibition on the expression and activities of matrix metalloproteinases.*" Diabetologia 45.2 (2002): 268-275.
  30. Rysz, J., et al. (2007). "*Serum matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 and metalloproteinase tissue inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in diabetic nephropathy.*" Journal of nephrology 20(4): 444-452.
  31. Moeini-Nodeh, S., et al. (2017). "*Functional Improvement in Rats' Pancreatic Islets Using Magnesium Oxide Nanoparticles Through Antiapoptotic and Antioxidant Pathways.*" Biological trace element research 175(1): 146-155.
  32. Hwang, M. H., et al. (2017). "*Anti-diabetic effect of magnesium salt extracts from deep-sea water in C57BLKS/J-db/db mice.*" Applied Biological Chemistry 60(1): 95-99.
  33. Parvizi, M. R., et al. (2014). "*Protective effect of magnesium on renal function in STZ-induced diabetic rats.*" Journal of Diabetes & Metabolic Disorders 13(1): 84.
  34. Salmonowicz, B., et al. (2014). "*Trace elements, magnesium, and the efficacy of antioxidant systems in children with type 1 diabetes mellitus and in their siblings.*" Adv Clin Exp Med 23(2): 259-268.
  35. Morais, J. B. S., et al. (2017). "*Role of magnesium in oxidative stress in individuals with obesity.*" Biological trace element research 176(1): 20-26.

## (六) 實驗結果圖表

Figure 1.

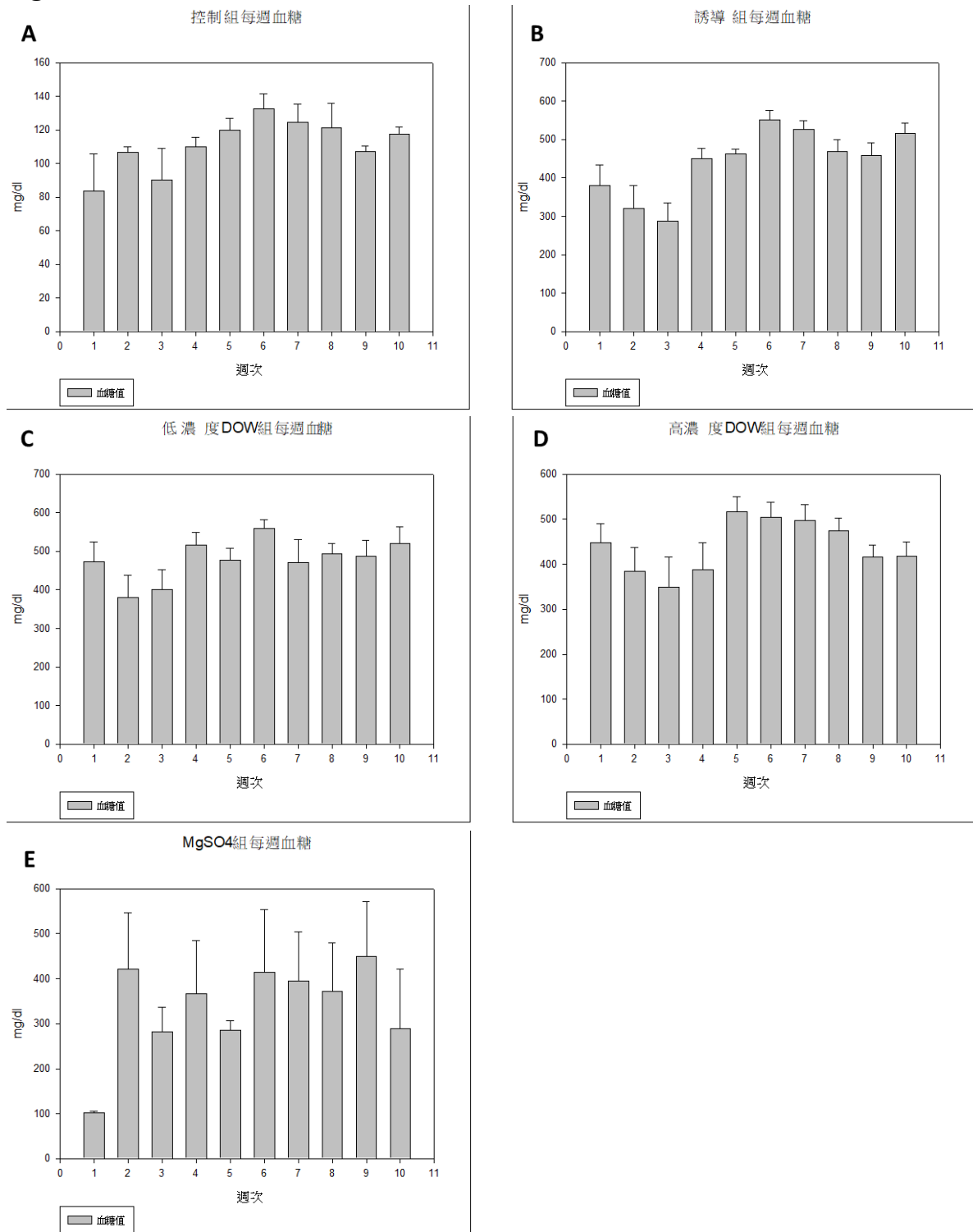


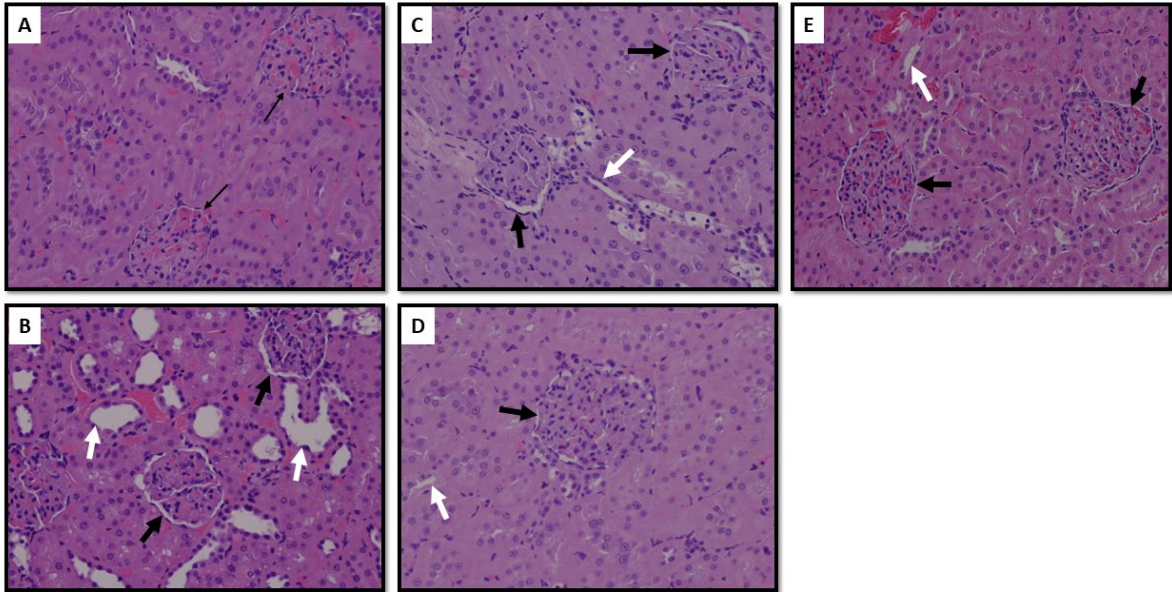
Figure 1.每週血糖值測量結果

(A)：控制組；(B)誘導組；(C)：低濃度 DOW 組；(D)：高濃度 DOW 組；(E)：MgSO<sub>4</sub> 組

圖中可以發現，十週之間控制組(A)維持正常血糖值，誘導第一型糖尿病成功之(B)、(C)、(D)、(E)餵食高鎂離子物質後血糖無明顯變化。



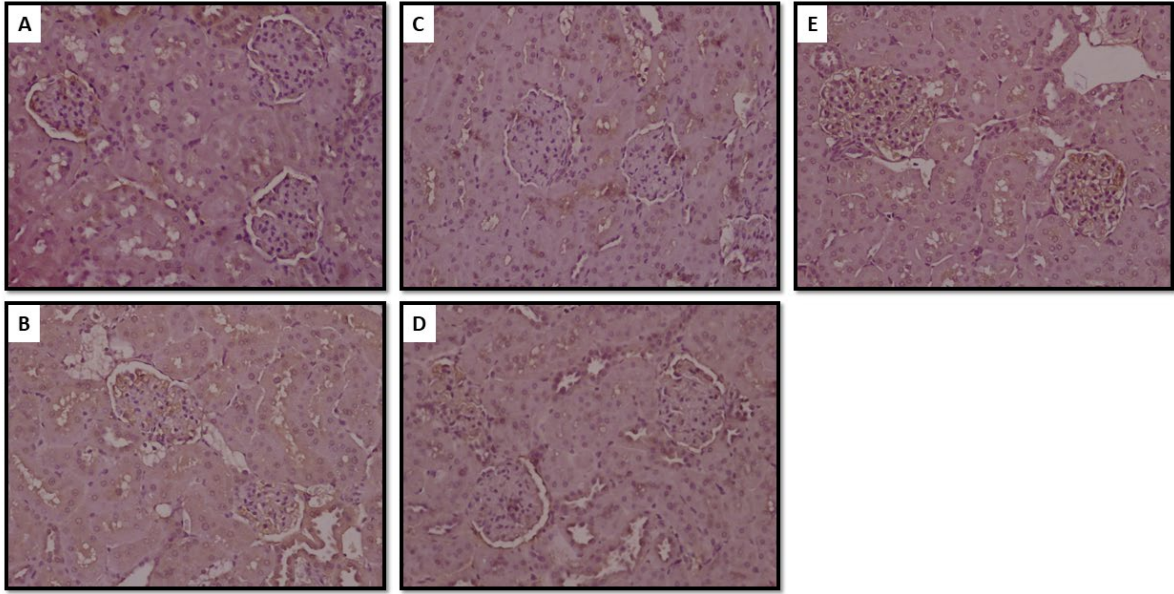
Figure 2.



**Figure 2. DOW 與  $MgSO_4$  降低糖尿病大鼠細胞水腫與腎絲球基底膜增厚程度**  
(A)：控制組；(B)誘導組；(C)：低濃度 DOW 組；(D)：高濃度 DOW 組；(E)：  
 $MgSO_4$  組

顯微鏡下觀察 200 倍放大倍率之 HE Stain 病理組織切片，發現餵食 DOW 與  $MgSO_4$  可降低糖尿病大鼠細胞水腫變化(白箭頭處)和腎絲球基底膜增厚(黑箭頭處)的程度。

Figure 3.



E-cadherin表現量

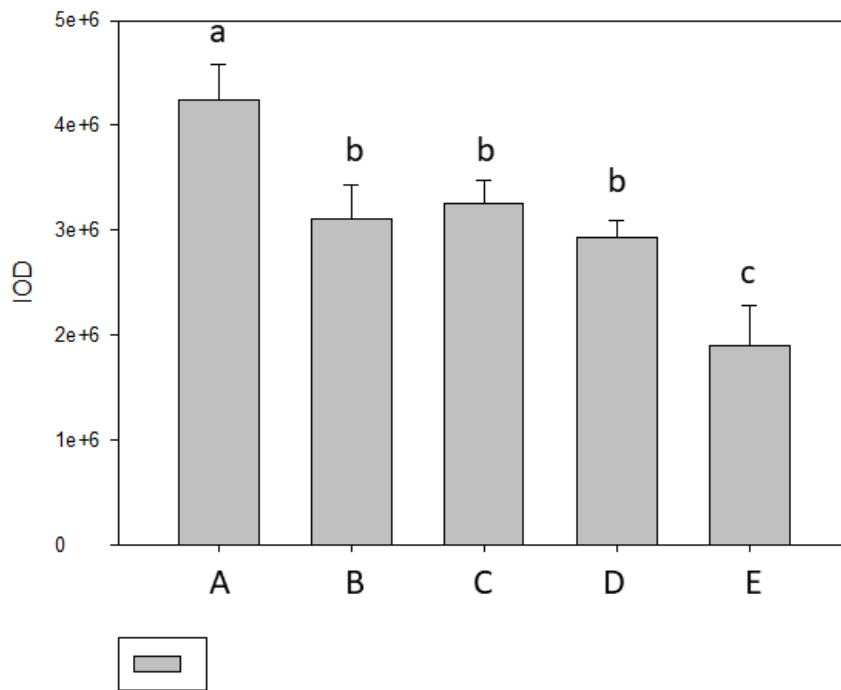


Figure 3.E-cadherin 在腎表現量無顯著差異

(A)：控制組；(B)誘導組；(C)：低濃度 DOW 組；(D)：高濃度 DOW 組；(E)：MgSO<sub>4</sub> 組

免疫組織染色(IHC)後，以 200 倍放大倍率在顯微鏡下觀察並定量統計，結果並無顯著差異。

Figure 4.

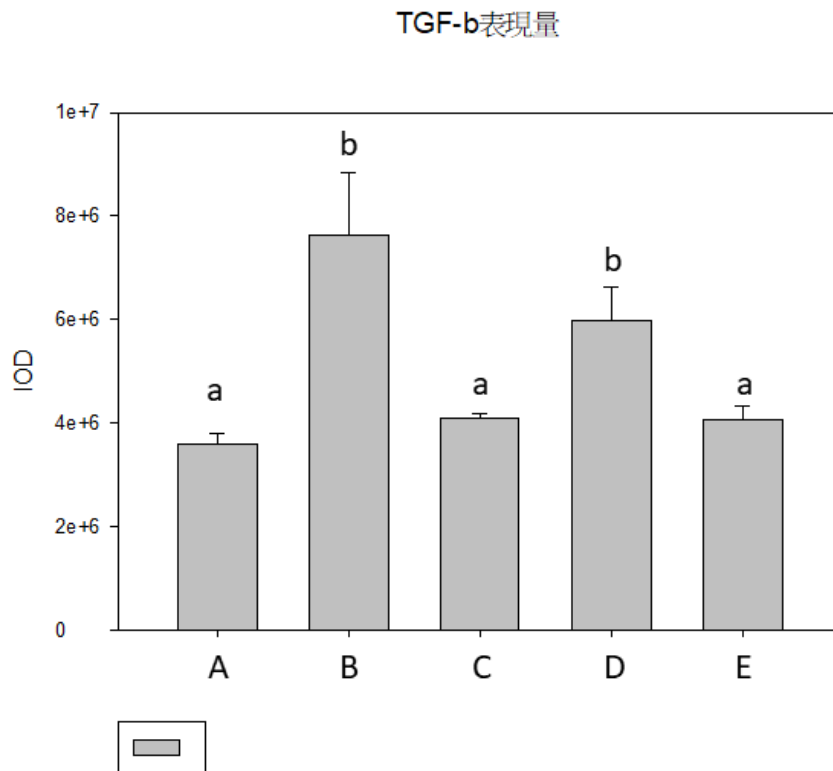
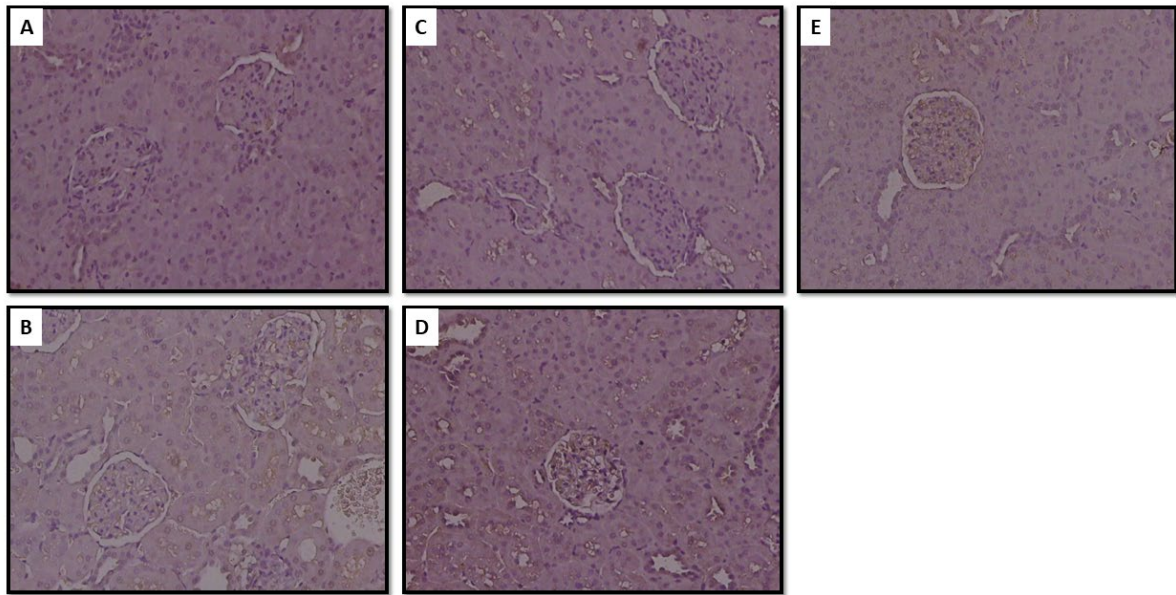
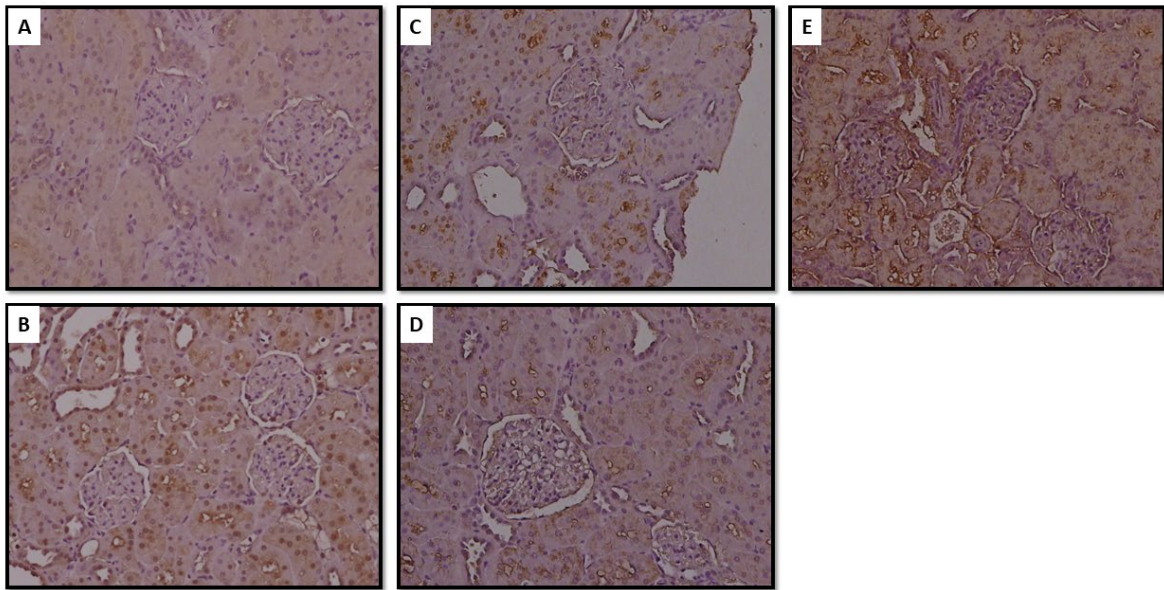


Figure 4. TGF- $\beta$ 1 在腎表現量

(A)：控制組；(B)誘導組；(C)：低濃度 DOW 組；(D)：高濃度 DOW 組；(E)：MgSO<sub>4</sub> 組

免疫組織染色(IHC)後，以 200 倍放大倍率在顯微鏡下觀察並定量統計，餵食低濃度 DOW(C)或 MgSO<sub>4</sub>(E)後表現量明顯下降，但餵食高濃度 DOW(D)則與誘導組(B)無明顯差異。

Figure 5.



SOD1表現量

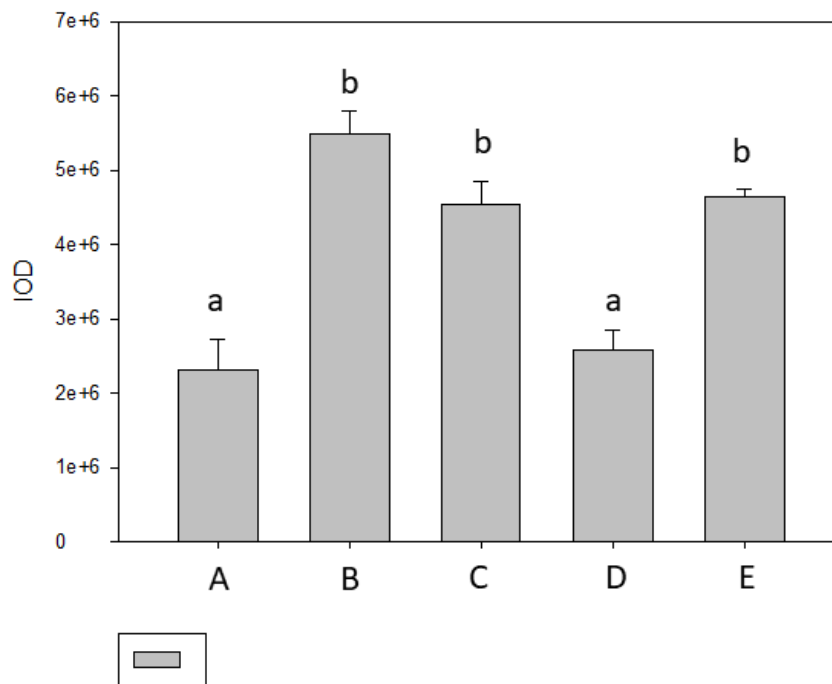
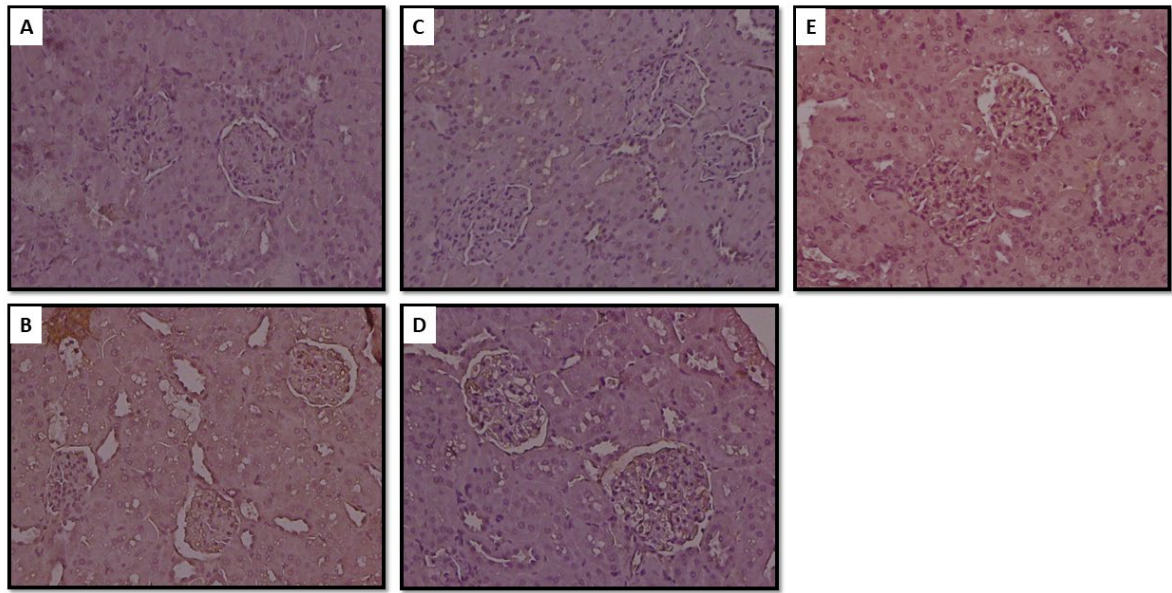


Figure 5. SOD1 在腎表現量

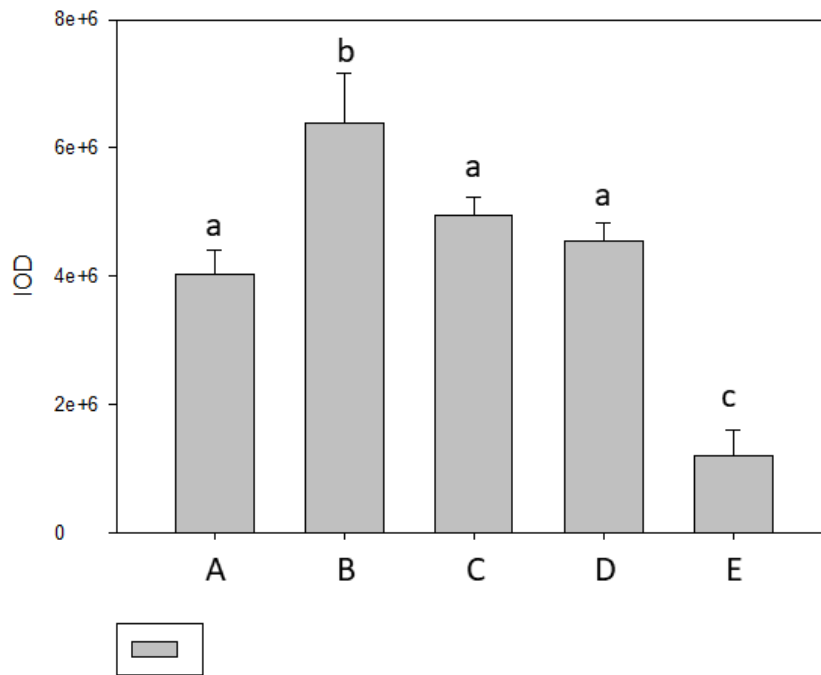
(A)：控制組；(B)誘導組；(C)：低濃度 DOW 組；(D)：高濃度 DOW 組；(E)：MgSO<sub>4</sub> 組

免疫組織染色(IHC)後，以 200 倍放大倍率在顯微鏡下觀察並定量統計，餵食高濃度 DOW (D)表現量明顯下降，但餵食低濃度 DOW(C)或 MgSO<sub>4</sub>(E)與誘導組(B)無明顯差異。

Figure 6.



Nrf2表現量

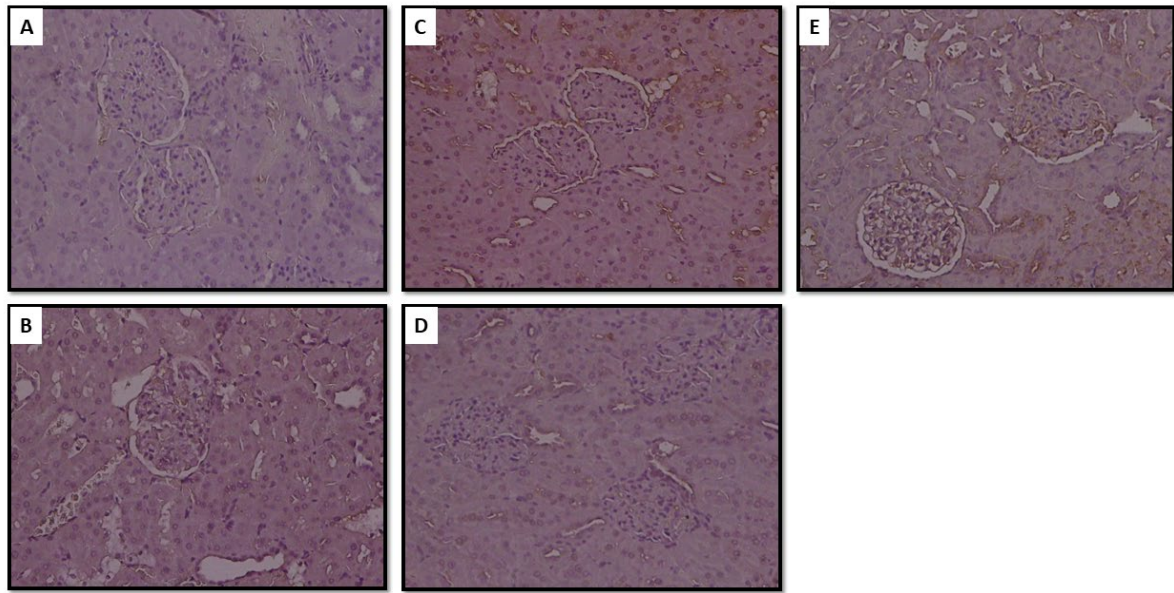


**Figure 6. 餵食高含鎂物質可有效降低 Nrf2 在腎表現量**

(A)：控制組；(B)誘導組；(C)：低濃度 DOW 組；(D)：高濃度 DOW 組；(E)：MgSO<sub>4</sub> 組

免疫組織染色(IHC)後，以 200 倍放大倍率在顯微鏡下觀察並定量統計，觀察到(C)、(D)、(E)組的 Nrf2 表現量與誘導組(B)相比都有顯著降低。

Figure 7.



VCAM表現量

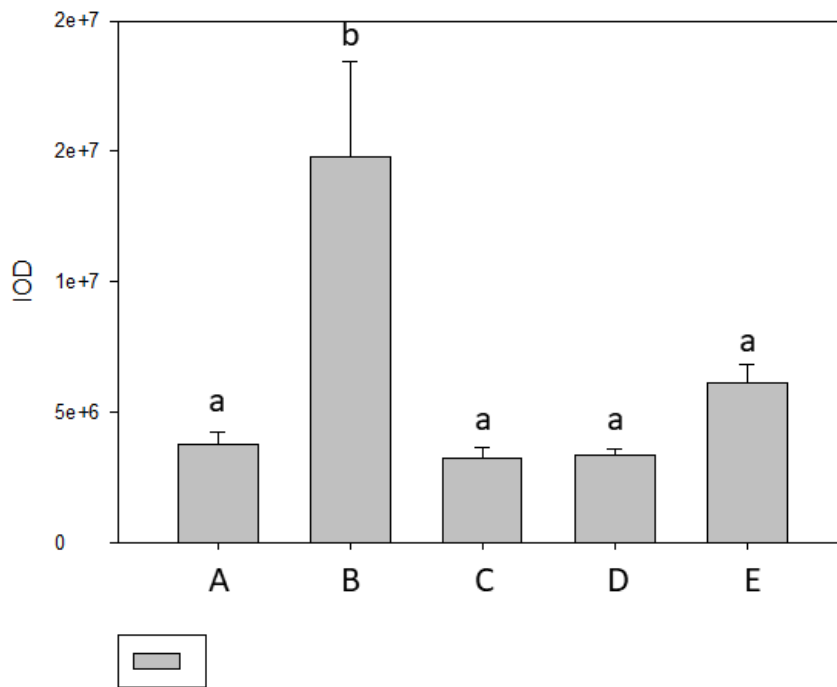
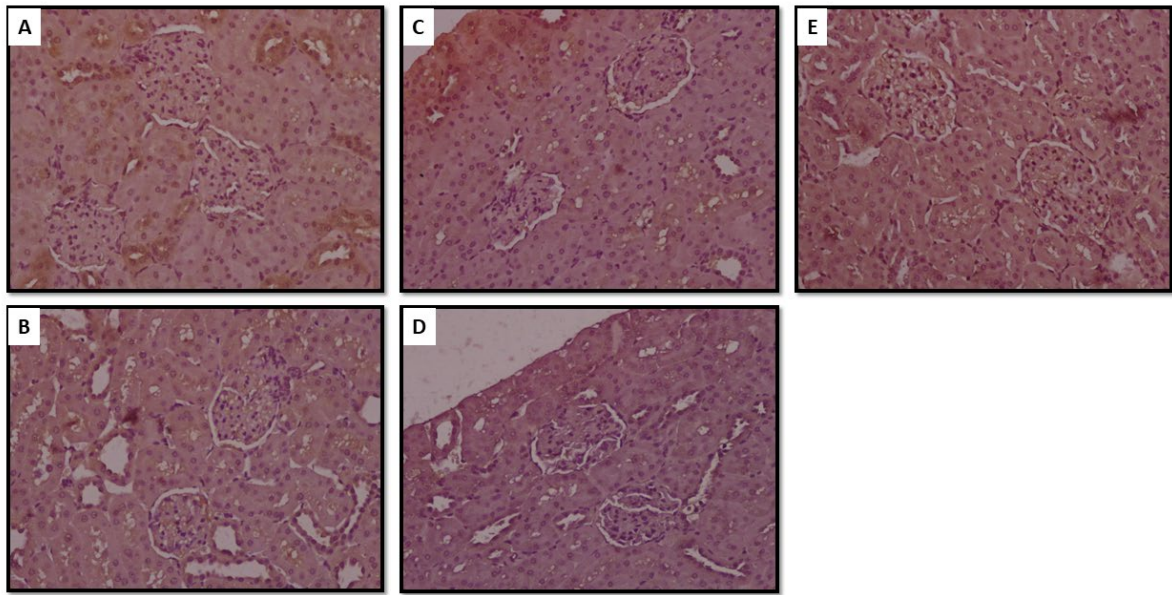


Figure 7. 高含鎂物質可降低腎發炎，VCAM-1 在腎表現量顯著下降 (A)：控制組；(B)誘導組；(C)：低濃度 DOW 組；(D)：高濃度 DOW 組；(E)：MgSO<sub>4</sub> 組

免疫組織染色(IHC)後，以 200 倍放大倍率在顯微鏡下觀察並定量統計，觀察到餵食海洋深層水之(C)、(D)或餵食 MgSO<sub>4</sub> (E)皆可顯著降低糖尿病大鼠腎的 VCAM-1 表現量。

Figure 8.



TIMP-2表現量

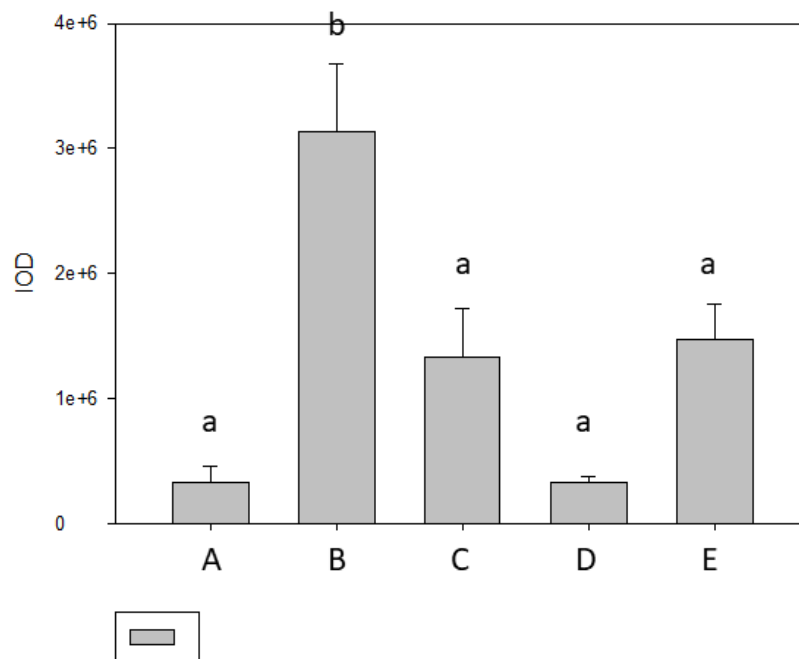


Figure 8. 高含鎂物質可降低腎發炎，TIMP-2 在腎表現量顯著下降  
(A)：控制組；(B)誘導組；(C)：低濃度 DOW 組；(D)：高濃度 DOW 組；(E)：MgSO<sub>4</sub> 組

免疫組織染色(IHC)後，以 200 倍放大倍率在顯微鏡下觀察並定量統計，觀察到餵食海洋深層水之(C)、(D)或餵食 MgSO<sub>4</sub>(E)皆可顯著降低糖尿病大鼠腎的 TIMP-2 表現量。