

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	Apple polyphenol along with 1,25- dihydroxycholecalciferol decreases TGF- β in diabetes nephropathy
------------	---

執行計畫學生：王婕瑜

學生計畫編號：MOST 109-2813-C-040-030-B

研究期間：109年07月01日至110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 110年03月28日

目錄

● 中英文摘要.....	1,2
第一章、序論.....	3
第二章、研究動機與研究問題.....	8
第三章、實驗材料與方法.....	9
第四章、實驗結果.....	12
一、蘋果多酚與維生素D對糖尿病腎病變大鼠蛋白表現量的 影響.....	12
二、蘋果多酚與維生素D對糖尿病腎病變大鼠的BUN與 CRE數值之影響.....	12
三、蘋果多酚與維生素D對腎絲球細胞的影響.....	12
第五章、討論.....	13
第六章、參考文獻.....	15
第七章、實驗結果圖表.....	17

中文摘要

糖尿病在體內的高濃度葡萄糖會導致氧化壓力增加及促細胞發炎，進而使腎絲球發炎形成糖尿病腎病變。由此可知，若是能對發炎反應及氧化壓力的產生加以控管，糖尿病腎病變便可望能被及早控制甚至延緩末期腎病變的疾病進程。蘋果多酚及維生素 D 目前已被證實有抗氧化、抗發炎的功效，因此本實驗利用蘋果多酚萃取物及維生素 D 餵食經 STZ 誘導產生之第一型糖尿病的大鼠，以觀察此二種物質單獨或是合併使用是否能在腎臟產生抗氧化、抗發炎的效

果。實驗方法為利用 STZ 誘導大鼠產生第一型糖尿病後，將蘋果多酚或是合併維生素 D 依不同劑量進行管餵，經十週後犧牲，收集腎臟組織、血液及尿液進行分析。利用組織切片、免疫染色及生化分析等方法檢測蘋果多酚及維生素 D 對抗氧化及抗發炎的功效；另外以腎絲球細胞進行細胞實驗，以釐清可能的機轉。本研究發現，以蘋果多酚及維生素 D 為營養補充劑時，能因降低氧化壓力而延緩糖尿病腎病變。

英文摘要

Hyperglycemia potentiates to cause nephropathy via chronic inflammation and oxidative stress. Due to the process occurring earlier, intervention of substances to decelerate nephropathy is an important task. Both of apple polyphenol (AP) and 1,25-dihydroxycholecalciferol (Vitamin D) were reported to be available for anti-oxidation and anti-inflammatory. This study conducted AP and Vitamin D in different dozes in type 1 diabetes induced by streptozotocin (STZ) to examine its effect in diabetic nephropathy. After treating the intervention for 10 weeks, we collected the kidney tissue and serum for further analysis and immunohistochemistry stain was performed to examine the expression of relative proteins in order to figure out the effect. Additionally, we conducted AP and Vitamin D in granular cell directly to make sure the results were similar. The evidences revealed that after conducting AP and Vitamin D as nutritional supplement, diabetic nephropathy would be decelerated because of the decreased oxidative stress.

第一章、序論

一、糖尿病腎病變

糖尿病腎病變是糖尿病的併發症之一，長期的高血糖狀態使腎臟出現不可逆的機能喪失，包括腎絲球硬化、血管變性及腎小管間質纖維化。[1]

2015年，台灣的糖尿病腎病變發生率為215.5（人/百萬人/年），在該年台灣由於糖尿病導致末期腎病的患者高達45.3%。過去十幾年間（2002~2015年）台灣因糖尿病導致的透析族群人數比例也呈現逐年增加的趨勢。[2]

糖尿病腎病變主要因代謝及血型動力學異常造成。代謝異常主因為高血糖，次因為血脂異常，這兩者會造成粒線體的ROS(Reactive Oxygen Species)增加，進而活化Glucose Dependent Pathway啟動下游的生長因子、發炎細胞激素及氧化壓力增加；血型動力學異常主因為高血壓，包含系統性高血壓(Systemic Hypertension)及腎絲球內高血壓(Intraglomerular Hypertension)。造成腎絲球內高血壓的機轉為：一、vasoconstrictors的增加，如Angiotensin II、Endothelin-1，使出球小動脈收縮；二、vasodilators的增加，如NO、ANP、kinins及COX，使入球小動脈擴張；三、Tubuloglomerular Feedback (TGF)，是腎小管及腎絲球間互相調控的機制。[3]

目前糖尿病腎病變的治療方式，是將上述的致病機轉加以阻斷，分為：[4]

第一型糖尿病患者治療選擇

ACE inhibitors 護腎機制

研究指出，對於血壓正常但患有中等程度蛋白尿的病人投予ACE inhibitor，相較於使用安慰劑的對照組，可減少尿蛋白排出且延緩兩年之內糖尿病腎病變病程的進展。

第二型糖尿病患者治療選擇

1. ARBs 護腎機制

根據RENAAL隨機分佈實驗，針對第二型糖尿病患者給予ARBs治療，可減少25%患者血清肌酸酐上升，並減少28%患者進展為末期腎病。

2. ACE inhibitors 護腎機制

經ADVANCE試驗，長期使用ACE inhibitors可使血壓平均值下降並使蛋白尿增加的比例下降，但對於血清肌酸酐數值上升或進展至末期腎臟病的速率並無法獲得明顯改善，意即可減少蛋白尿排出量及延緩腎功能退化的速度，但無法改變糖尿病患者最終將進入末期腎病的事實。

3. 鈣離子阻斷劑

針對糖尿病腎病變患者，除上述ARBs或ACE inhibitors外，唯有Diltiazem與Verapamil具有減少蛋白尿的功效，此外與ARBs或ACE inhibitors並用會有加乘效果。目前對於鈣離子阻斷劑改善蛋白尿的機制並不完全了解，部分認為non-dihydropyridine鈣離子阻斷劑除了可降低腎絲

球內部壓力，於動物試驗發現可能藉由回縮增生的腎絲球達到減輕蛋白尿的效果，而另一項人體試驗則認為 Diltiazem 可改變腎絲球體積而有助於減少蛋白尿。

4. 血壓控制

研究顯示，不受控制的高血壓會大幅地加速腎功能的惡化，嚴格的血壓控制能夠防止第二型糖尿病腎病變及其他併發症的發生。血壓控制方面目前常用藥物為 RAAS inhibitors，能使出球小動脈擴張，進而降低腎絲球內的壓力，不僅能降低血壓還可以減少蛋白尿。目前對於有蛋白尿的病患，要求血壓控制目標需低於 130/80mmHg;若單次尿液 protein-to-creatinine ratio (UPCR)在 1000mg/g 以上或有糖尿病腎病變，考慮將收縮壓控制更低。但過於嚴格的血壓控制非但對 CKD 預後沒有幫助，還會增加 All-Cause Mortality。所有患者的收縮壓應避免低於 110mmHg;有冠狀動脈疾病患者之舒張壓不應低於 75mmHg。

5. 體重控制

研究顯示肥胖的糖尿病患者進行減重後，可觀察到蛋白尿明顯改善，雖然最終對於腎功能無明顯影響，但若持續追蹤應能發現對於腎臟的益處。另外在血脂的控制方面，也發現有控制三酸甘油脂的患者無論是蛋白尿或腎功能的惡化都有所改善，因此目前體重及血脂控制在糖尿病腎病變患者身上皆建議使用。

6. 血糖控制

在過去的研究中可發現嚴格控制血糖能改善蛋白尿，常見建議藥物為 SGLT-2 inhibitors (Empagliflozin, Canagliflozin); DPP-4 inhibitor (Linagliptin); GLP-1 agonist (Liraglutide)。其中 SGLT-2 inhibitors 的機轉是除了增加葡萄糖從尿液排洩外，也使入球小動脈收縮並同時使出球小動脈擴張，進而降低腎絲球內的壓力，目前有證據支持的是 Empagliflozin 和 Canagliflozin。[3]

7. 鹽份攝取控制

部分研究顯示，糖尿病患者採取高鈉飲食已被證實與減弱 ACE inhibitors/ARBs 調節蛋白尿效力有關。因此，若病患使用 ACE inhibitors 或 ARBs 時，血壓獲得初步控制而蛋白尿未明顯改善時，會建議患者採取低鈉飲食。目前建議每日限鈉 ≤ 100 meq/天，並檢驗 24 小時尿液之鈉離子與肌酸酐濃度，計算尿液鈉離子清除率，來追蹤患者是否遵循低鈉飲食。若飲食無法改變，可考慮使用利尿劑排出鈉離子，增強腎素系統抑制劑抗蛋白尿的效果。

二、蘋果多酚

近年來，對於多酚類化合物的研究日漸增加，發現多酚類化合物存在於許多食用及藥用植物中，據研究，多酚類化合物在醫學上具有抗氧化及抗發

炎的功效，對於許多疾病具有延緩疾病進程的功效。據研究，蘋果多酚具有下列幾種功能：

1. 抗氧化

據研究，蘋果多酚可以透過改變內生性發炎蛋白質的活性及表現量而具有抗發炎功效。經 Bajt et al. 實驗，由使用普拿疼過量的大鼠可發現因過量氧化壓力造成的肝臟損傷[5]，經研究在使用蘋果多酚進行預治療後發現具有預防肝臟損害的功效[6]。亦有期刊指出蘋果多酚可抑制維生素 E 的消耗及抑制氧化酵素[7]，可預防氧化腦損傷的增加及認知能力衰退。[8]

2. 抗發炎作用

研究顯示，蘋果多酚中的 Phldz 和 Phlor 可調節前列腺素(PGE2)的產生進而影響巨噬細胞中 IL-8 的產生，降低發炎反應，經推測可改善間質發炎反應[9]。另外，在腎臟的發炎反應中，MCP-1 是重要的中介者，蘋果多酚經研究亦能降低 MCP-1 表現量[10]。

3. 預防心血管疾病

據研究，蘋果多酚具抗高血壓、限制血小板聚集、促進內皮依賴性血管舒張及降膽固醇的功效[11]，亦能抑制 LDL 氧化酶氧化，消除血液脂肪[12]，另外可以顯著減少動脈粥樣硬化病變和肝脂肪變性[13]，因此可預防心血管疾病。

4. 抗腫瘤作用

據研究，蘋果多酚成分之一的原花青素(oligomeric procyanidin)可增加腫瘤細胞粒線體膜的通透性及細胞色素 C 的釋放，並活化 caspase-3 及 caspase-9，可限制腫瘤細胞的複製及促進腫瘤細胞的自體凋亡。[14]

三、維生素 D

維生素 D 是人體必需的脂溶性維生素之一，人體獲得維生素 D 的主要途徑包括食物攝取，如鱈魚肝油、含油量較多的魚類、蛋黃、以及維生素 D 強化食品等，另一來源則藉由陽光中的 UVB 照射將皮下的去氫膽固醇(7-dehydrocholesterol)轉換為維生素 D；由食物中攝取所得或是皮下產生之維生素 D 進入血液循環後可能貯存在脂肪組織或肌肉組織，或是進入肝臟以進行第一次的羥化(hydroxylation)作用而形成 25-hydroxy- vitamin D (25(OH)D)，並由肝臟釋出再次進入血液循環中。血液中的 25(OH)D 通常被視為個體維生素 D 營養狀況的指標，但並不具有生理活性，需再經轉換為 1,25-dihydroxy vitamin D (1,25(OH)2D, 或 calcitriol)[15]。人體內扮演內分泌功能所需的大量 1,25(OH)2D 主要由腎臟近端腎小管上皮細胞合成，然而其他包括免疫細胞在內的正常或腫瘤上皮細胞亦具有 CYP27B1；惟由腎臟外其他組織或細胞所合成的 1,25(OH)2D 主要以旁分泌(paracrine)或胞內分泌(intracrine)的形式作用而非進入血液循環的內分泌形式。

由於含有維生素 D 的天然食物種類並不多，因此除了維生素 D 強化食品及補充劑之外，照射陽光是獲得維生素 D 的主要來源，約莫佔人體內維生素

D總量的 80-90%；許多可能影響照射日光的因素，如居住地區的緯度、季節、膚色(種族)、年齡、以及防曬產品的使用等，均可能影響體內維生素 D 的多寡[15,16,17]。老年族群因皮下組織減少而缺少足夠的 7-去氫膽固醇及/或肝臟和腎臟羥化作用效率降低，因而可能需仰賴飲食攝取以獲得維生素 D[18]；此族群往往也是維生素 D 缺乏的高危險群。

目前對於維生素 D 功能的研究主要發現其有下列幾項功能：[18]

1. 維持血中鈣磷的平衡及骨骼健康

食物是獲得鈣的主要來源，當體內的鈣不足而攝取的鈣足夠時，維生素 D 會使小腸對鈣的吸收增加，使腎臟對鈣的排出減少，藉此增加體內的鈣使骨骼保持健康並維持血中鈣的平衡；當體內的鈣不足且攝取的鈣亦不足時，維生素 D 則會作用在骨骼，使骨骼釋出鈣以維持血中鈣的平衡。維生素 D 對於骨骼的作用主要是經由造骨細胞(osteoblast)的 VDR 與活性維生素 D 結合後，使細胞核因子 kB 接受器活化因子(receptor activator for nuclear factor kappa B, RANK)的配位體(ligand 即 RANKL)增加並與前蝕骨細胞(preosteoclast)細胞膜上的 RANK 結合而使前蝕骨細胞轉變為成熟的蝕骨細胞(osteoclast)，而蝕骨細胞會使鈣及磷由骨骼移出以維持血中鈣磷的平衡。

2. 腎臟保護作用

維生素 D 與腎臟受傷及腎臟功能惡化相關的兩大機轉有關，即腎素-血管張力素系統(renin-angiotensin system, RAS)及細胞核因子 kB (nuclear factor kappa B, NF-kB)途徑的活化。RAS 的過度活化會對腎臟造成發炎及纖維化相關的細胞激素及生長因子的產生、免疫細胞浸潤、刺激細胞增生肥大、使細胞外基質增加、造成足細胞受傷等傷害；NF-kB 途徑的活化則會促進氧化壓力、發炎、及纖維化等而使腎臟受傷。

維生素 D 與近腎絲球器(juxtaglomerular apparatus)中緻密斑(macula densa)細胞的 VDR 作用進而抑制腎素的表現，使血管張力素 II(Ang II)的產生減少，亦即抑制腎素-血管張力素系統(RAS)的活化，維生素 D 也會抑制 NF-kB 途徑的活化而產生腎臟保護的作用。

3. 心臟血管保護作用

心肌細胞、血管的內皮及平滑肌細胞皆有 VDR 及 1α -羥化酶，因此維生素 D 可直接影響心肌及血管細胞，目前知道維生素 D 可能對心肌肥大有預防的效果，對血管的作用則較為複雜，一方面會使血管鈣化，一方面抑制血管平滑肌細胞增生、減少動脈粥狀硬化及改善內皮細胞功能不良而產生保護血管的作用。

維生素 D 也有改善高血壓的效果，對 RAS 有抑制的作用，也抑制纖維化及發炎相關的激素及因子的產生而產生保護心臟的作用。其他心血管疾病相關的危險因子如高血脂、胰島素抗性、糖尿病及肥胖等，維生素 D 也有其重要的角色。

4. 預防及改善癌症作用

會產生癌化的細胞有 VDR 的存在，如皮膚、乳房組織、攝護腺及大腸的上皮細胞等，維生素 D 可經由 VDR 產生抗癌症的作用。對於癌細胞，維生素 D 有抗增生的作用(antiproliferation) 包括會使其細胞週期停止，也有抑制血管新生的作用 (antiangiogenesis)、抗發炎的作用(antiinflammation)、促進分化(differentiation)及促進細胞凋亡的作用，也有修復去氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA)的作用，這些作用對癌症有預防及改善的效果。

5. 免疫調節作用

免疫系統中大多數的細胞皆有 VDR 包括 T 淋巴細胞(T lymphocyte)、中性粒細胞(neutrophil)及抗原呈現細胞(antigen presenting cell)如巨噬細胞 (macrophage)與樹突細胞(dendritic cell)等，維生素 D 會經由 VDR 對這些免疫細胞產生調節的作用。另外維生素 D 亦有活化先天性免疫反應及抑制後天性免疫反應等作用。

6. 其他非骨骼健康作用

維生素 D 可促進胰島素分泌、保護 β 細胞及減少其受到分及免疫反應的傷害；神經系統方面，可以影響神經滋養、傳遞及保護等功能，能夠維持良好的腦部及神經功能；生殖系統方面，可以影響兩性賀爾蒙的產生，並與男性精子、精液的形成及女性的子宮內膜成長、蛻膜化與良好的胎盤功能有關；呼吸系統方面，能夠強化抗菌及自體吞噬作用來保護呼吸系統；維生素 D 與 VDR 可維持正常毛髮細胞週期及完整皮膚功能。維生素 D 其他的功能尚包括維持良好的肌肉功能等，也與慢性肝臟疾病的發炎、纖維化及其嚴重程度相關。

第二章、研究動機與研究方法

一、研究動機

在 2016 美國腎臟資料系統 (USRDS) 的年報中，台灣無論是末期腎病變 (ESRD) 的發生率 (455 人/百萬人口/年) 或盛行率 (3,219 人/百萬人口) 都是世界最高。台灣腎臟學會從 2000-2012 年做的統計也顯示 ESRD 無論在發生率或盛行率都呈現持續上升趨勢。由 2014 年門診 ESRD 的病人群分析，末期腎病變的最大病因是糖尿病腎病變，約佔得病人口的 51.5%，因此糖尿病腎病變的預防便顯得至關重要。據研究，糖尿病腎病變會導致末期腎衰竭及心血管疾病。目前用於糖尿病腎病變的方法主要著墨於控制代謝、血壓、血脂，以及抑制 RAAS 等。由於糖尿病造成的高血糖會導致代謝異常，使粒線體的 ROS (Reactive Oxygen Species) 增加，進而活化下游的促發炎細胞激素及使氧化壓力增加，導致腎絲球發炎、纖維化及白蛋白尿的產生，形成糖尿病腎病變，因此若是能降低氧化壓力以及抗發炎，便可望能延緩糖尿病腎病變的疾病進程甚至能避免產生末期腎衰竭及心血管疾病等後續疾病。

蘋果多酚經研究具有抗發炎及降低氧化壓力的效果；另外，維生素 D 也被證實具有相同功用，因此本實驗想要探討此二種物質單獨或合併使用對糖尿病造成的氧化壓力及發炎反應的影響及機轉。

二、研究問題

1. 探討蘋果多酚的劑量多寡對於糖尿病腎病變是否有降低氧化壓力及抗發炎的效果？
2. 探討蘋果多酚合併使用維生素 D 是否對降低氧化壓力及抗發炎有加成效果？
3. 在動物腎臟及腎絲球細胞中，對於蘋果多酚及維生素 D 所呈現的抗氧化作用及機轉是否有一致性？

第三章、實驗材料與方法

【蘋果多酚來源】

本實驗採用的蘋果多酚來源為 Applephenon(AP)，是由未削皮的富士蘋果得出的萃取物所製的商業化產品，由日本 Asahi 公司發售。此產品的主成份為表兒茶酚及兒茶素，常被使用於食品添加物以防食品成分氧化，並可望被應用於機能性食品(functional food)中。

【維生素 D】

購自市售 iHerb Ddrops，並換算成每公斤體重 200 IU 給予。

【動物分組及管餵】

將雄性 Sprague-Dawley 大白鼠分為七組，每組八隻大白鼠，分組如下：

- A. 對照組：不做任何處理。
- B. 誘導組：利用鏈脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ) 誘導糖尿病。
- C. 低濃度 AP：誘導糖尿病後，每日以 0.5% 飲食的劑量管餵。
- D. 高濃度 AP：誘導糖尿病後，每日以 1.0% 飲食的劑量管餵。
- E. 低濃度 AP+維生素 D: 誘導糖尿病後，每日以 0.5% 飲食的劑量管餵，另於每兩日併用每公斤體重 200 IU 維生素 D。
- F. 高濃度 AP+維生素 D: 誘導糖尿病後，每日以 1.0% 飲食的劑量管餵，另於每兩日併用每公斤體重 200 IU 維生素 D。
- G. 維生素 D: 誘導糖尿病後，每兩日以每公斤體重 200 IU 的劑量管餵。

【石蠟組織包埋與切片:H&E stain】

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 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 μ 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。

【免疫組織染色 IHC】

實驗過程，首先將切片放入烘箱 overnight，56°C，使臘稍微溶解；回溫後用蠟筆框出檢體位置，並以 Xylene 及酒精進行脫臘程序；用檸檬酸緩衝液(0.01 M, pH6.0)煮沸 15 分鐘後浸泡 5 分鐘 ddH₂O 回溫。之後以 Dual Endogenous Enzyme Block 覆蓋檢體作用 5-10 分鐘，分別以 ddH₂O 及 PBST 沖洗，然後加入一次抗體完全覆蓋檢體，於 4°C 作用 1 小時。以 PBST 沿著玻片沖洗後加入 Labelled polymer(二抗)覆蓋檢體 30 分鐘，PBST 沖洗後加呈色劑 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 度角覆蓋在檢體上，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。

【動物實驗】

我們將實驗大鼠分為對照組、糖尿病組(DM, 以 STZ 誘導)、低劑量蘋果多酚組，低劑量組別給予佔大鼠體重 0.5%劑量的蘋果多酚，以及合併維生素 D 管餵等分別訂為 A、B、C、D 四組，來進行預做實驗。每一周對大鼠的血糖數值進行測量，並在實驗進行十週後進行生化數值測量及組織切片分析。大鼠經過十週實驗後犧牲，為了得知各組別的個別蛋白表現量，我們將大鼠的腎臟組織染色切片(IHC stain, 如下圖所示)，並在 200x 的照片中隨機選取五個相同面積的區域，利用軟體定量照片中代表蛋白表現區域的棕色區塊，加以統計。

【細胞實驗】

我們以預先合成的 AGE，取 400 ng/mL 處理 RMC 共 72 小時，發現隨著處理天數增加，AGE 具有延遲細胞生長的現象。我們以 400 ng/mL AGE，共同處理不同劑量的蘋果多酚與維生素 D 於 RMC，時間為 72 小時，發現兩者會改善 AGE 延遲細胞生長的現象，且存在劑量依存性。

【AGE 製備】

參考 Bavani Arumugama 的資料 [19]，經調整後，將 10 mg/mL BSA、0.5 M D-glucose、0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 和 0.1 mg/mL sodium azide (NaN₃)，配製完成後放入培養箱在 40°C 下均勻混合反應 140 小時，並測定蛋白量，調整處理細胞的終濃度為 400 ng/mL。

【細胞培養】

本實驗使用老鼠腎絲球細胞(RMC)，培養於 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)，培養液中含 15%FBS、100µg/ml penicillin、100µg/ml streptomycin、4 mM L-glutamine、0.4 mg/ml G418、1.5 g/L sodium bicarbonate、4.5 g/L glucose。所有細胞均培養於 5% CO₂、37°C 的恆溫環境。依細胞生長速度而定，更換培養液的時間及次數，原則上每 2-3 天更換一次。

【Cell viability】

將細胞種在 12-well plate (density of 2×10^4 cells per well)，再加入不同濃度的蘋果多酚或維生素 D 和 AGE (400 ng/ml)，經過 72 小時，加入 MTT 反應劑 (500 µg/ml) 反應 4 小時，之後再加入 isopropanol 溶解 MTT-formazan complex，最後用分光光度計(調在 563 nm)測量其吸光值。

【西方墨點法 Western blot】

將細胞利用 RIPA buffer 溶解，並加入蛋白質水解酶抑制劑(Proteinase inhibitor)，在 4°C 下震盪 2 小時，4°C 高速離心 12,000 rpm，5 分鐘，吸取上清液到新的微量離心管中，儲存在 -20°C。取定量之 whole cell lysate，加水補至固定體積，然後再加入追蹤染劑混合均勻，以 95~100 °C 加熱 5 分鐘，再迅速置於

冰上。隨後進行 SDS-PAGE，完畢後將膠體取出，轉漬到聚偏二氟乙烯膜 (PVDF membrane) 上，用 TBS buffer 漂洗，以 5% blocking buffer 於室溫下 1 小時作用，換上一級抗體和二級抗體作用，最後加入 ECL 顯色，並以冷光儀偵測，觀察相關調節蛋白表現量之變化。

【統計方法】

本實驗結果將以變異數分析 (analysis of variance, ANOVA) 和 Duncan's Multiple Range 進行檢測， $P < 0.05$ 認定為具差異性。分析實驗結果的軟體使用 SigmaPlot12.5、SigmaStat10 software 進行統計。

第四章、實驗結果

一、蘋果多酚與維生素D對糖尿病腎病變大鼠蛋白表現量的影響

1. TGF- β 的表現量

經實驗結果組織染色後發現，經蘋果多酚處理過後的組別，其 TGF- β 的表現量較糖尿病組為低，且其效果隨劑量增多而顯著。另外，透過表中亦能發現蘋果多酚合併維生素 D 的組別，其所造成的效果較蘋果多酚單獨處理的組別為明顯。(Figure 1.)

2. Nrf 的表現量

經實驗結果組織染色後發現，經蘋果多酚處理過後的組別，其 Nrf 的表現量較糖尿病組為低，但其效果不隨劑量增多而顯著。另外，透過表中發現蘋果多酚合併維生素 D 的組別，其所造成的效果並不較蘋果多酚單獨處理的組別為明顯。(Figure 2.)

二、蘋果多酚與維生素 D 對糖尿病腎病變大鼠的 BUN 與 CRE 數值之影響

我們觀察到以蘋果多酚單獨處理的組別，其 BUN 與 CRE 數值即有下降，而合併維生素 D 處理的組別，其兩者數值的下降量皆更為顯著。(Figure 3.)(Figure 4.)

三、蘋果多酚與維生素D對腎絲球細胞的影響

我們利用蘋果多酚、其主要成分 Catechin 以及維生素 D 分別處理處於氧化壓力下的腎絲球細胞，發現單獨以蘋果多酚、Catachin 或維生素 D 處理的組別，其細胞存活量皆較誘導組為高，且蘋果多酚及 Catechin 分別合併維生素 D 處理後的組別，其效果又比單獨給予蘋果多酚與 catechin 的組別為明顯。(Figure 5.)

第五章、討論

蘋果是國人日常所食且易取得的水果，其中含有大量的多酚類，包含原花色素(oligomeric procyanidin)、表兒茶酚(epicatechin)、兒茶素(catechin)、綠原酸(chlorogenic acid)、盧丁(rutin)及磷黴素(phloridzin)等[20]。這些酚類成分經研究具有抗氧化、消臭、保鮮、護色、防止維生素損失等作用，現代多用於加工食品製造，可顯著提高其產品質量及保質期。蘋果多酚亦具有許多生理上的保健功能，如抗高脂血症、抗氧化、抗腫瘤、預防齲齒、預防高血壓、預防過敏反應及阻礙紫外線吸收等生理功能的功效。本實驗也發現蘋果多酚對於抗氧化作用有顯著功效，並在合併維生素 D 時有更顯著的成效，以下依據我們在此次實驗的發現，做出討論：

一、蘋果多酚降低 TGF- β 表現量

Transforming growth factor β (TGF- β)是促進細胞纖維化最有力且普遍的細胞激素，先前的研究皆指出在纖維化疾病及纖維化的實驗樣本中，TGF- β 的表現量均會上升。這是因為 TGF- β 會增加細胞中的氧化物質，並降低細胞內可以抗氧化的麩胱甘肽(Glutathione)的含量，達到促進細胞氧化及纖維化的結果。[21]因此推斷若是細胞中 TGF- β 的含量能減少，對於糖尿病腎病變的進程便能有所緩解。本次實驗中發現單獨給予蘋果多酚，其 TGF- β 的下降量便隨劑量增多而增加，其結果在合併維生素 D 處理時更加顯著，因此由實驗結果，我們推測蘋果多酚及維生素 D 對糖尿病腎病變具保護效果。

二、蘋果多酚增加 Nrf-2 表現量

Transcription factor nuclear factor erythroid 2 (NF-E2)-related factor 2 (Nrf-2)主要調控細胞氧化還原、代謝及蛋白質的體內平衡，並與體內其他訊息傳遞交互作用。[22]當面對過多氧化壓力時，Nrf-2 會增加基因表現轉錄出抗氧化物質如穀胱甘肽(GSH)與 NADPH 以保護細胞免受傷害，是細胞抗氧化、抗發炎及重要的因子。細胞生理方面，正常情況下 NRF2 會持續合成並受泛素連接酶複合體降解調控，細胞質內的 Keap-1 (Kelch-like ECH-associated protein 1)會與 Nrf-2 結合並使之被降解，降低其在細胞中的含量。一旦細胞中氧化壓力上升，Keap-1 會遭 ROS 或其他帶電粒子變性並與 Nrf-2 分離，使 Nrf-2 活化並進入細胞核內與 CsMBE 或是抗氧化基因的促成因子結合，並促使抗氧化基因的轉錄出抗氧化物質，如 HMOX1 (heme oxygenase 1)、NQO1 (NADPH quinone oxidoreductase 1)、TXNRD1 (thioredoxin reductase 1) 以強化細胞對抗氧化壓力的能力。[23]

在糖尿病衍生的血管病變中，糖尿病視網膜病變與腎病變皆屬於小血管病變，其致病機轉皆為氧化壓力造成細胞損傷導致病變。在相關的研究中，發現糖尿病視網膜病變的大鼠，其 Keap-1 表現量較正常組大增，Nrf-

2 的表現量也有所提升，然而因為氧化壓力上升使 Keap-1 的構型改變導致其與 Nrf-2 無法分離，進而使 Nrf-2 無法進入細胞核內轉錄出抗氧化因子，因而發現 Nrf-2 分佈在細胞質的量是正常組別的兩倍，細胞核內的 Nrf-2 量相比正常組別卻減少了百分之四十。[24]在此次實驗中，我們發現糖尿病組的 Nrf-2 表現量增加，在給予蘋果多酚後，其表現量隨之減少，在合併維生素 D 後期表現量下降幅度更為明顯。由相似的致病機轉我們推測，在投以蘋果多酚與維生素 D 後，細胞中的氧化壓力降低，使得 Keap-1 的構型並未有太大的改變，便能正常地與 Nrf-2 分離，使之順利進入細胞核進行轉錄，從而造成整體 Nrf-2 表現量下降的情形。

三、

關於蘋果多酚以及它的主要成份 catechin 對腎絲球細胞的保護作用，我們用葡萄糖衍生的 AGE 誘導細胞損傷後，發現蘋果多酚及 catechin 可以保護腎絲球細胞免於死亡，這部分可能與抑制細胞損傷和調節細胞死亡相關，但是詳細的分子機轉，必須進一步再做檢測。

第六章、參考文獻

1. Huei-Jane Lee, Wen-Chin Lee. *Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy*. Tungs' Med J 7 2013; 1-9
2. Chih-Wer Chiang, Chia-Ter Chao, Chih-Kang Chiang. *Diabetic Kidney Disease: Clinical Features, Risk Factors and Indigenous Epidemiology*, Kidney Dialysis 30, 109-113
3. 楊翼寧, 陳銳溢, 王憲奕, 鄭高珍. 糖尿病腎病變的診斷與治療. 內科學誌, 2018; 29: 240-249
4. 劉旅安, 姜至剛. 糖尿病腎病變治療新進展. 內科學誌 2019; 30:70-78
5. Bajt ML, Knight TR, Lemasters JJ, Jaeschke H. *Acetaminophen-induced oxidant stress and cell injury in cultured mouse hepatocytes: protection by N-acetyl cysteine*. Toxicol Sci 2004; 80: 343-9.
6. Lee HJ. *Apple Polyphenols Decelerate AcetaminophenInduced Oxidative Stress*. Tungs' Med J 2014; 8: 6-11.
7. Akazome, Y.. *Characteristics and physiological functions of polyphenols from apples*. Biofactors 2004; 22: 311-4.
8. Tchanchou F, G.M., Ortiz D, Rogers E, Shea TB. *Dietary supplementation with apple juice concentrate alleviates the compensatory increase in glutathione synthase transcription and activity that accompanies dietary- and genetically-induced oxidative stress*. J Nutr Health Aging 2004; 8: 492-6.
9. Danuta Zielinska, José Moisés Laparra-Llopis, Henryk Zielinski, Dorota Szawara-Nowak, Juan Antonio Giménez-Bastida. *Role of Apple Phytochemicals, Phloretin and Phloridzin, in Modulating Processes Related to Intestinal Inflammation*. Nutrients 2019; 11: 1173.
10. Vieira JM, Mantovani E, Rodrigues LT, Dellê H, Noronha IL, Fujihara CK, et al. *Simvastatin attenuates renal inflammation, tubular transdifferentiation and interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction*. Nephrol Dial Transplanta 2005; 20: 1582-91.
11. Chong MF, Macdonald R, Lovegrove JA. *Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies*. Brit J Nutri 2010; 104: S28-39. 2
12. Liu, Y.-F.C.a.R.H., *Cardioprotective potentials of apple phytochemicals in LDL oxidation and LDL receptor expression*. Cornell Institute of Food Science Symposium 2005; 5: 22-24.
13. Zhe-Rong Xu, Jin-You Li , Xin-Wei Dong , Zhong-Ju Tan, Wei-Zhen Wu, Qiang-Min Xie, Yun-Mei Yang. *Apple Polyphenols Decrease Atherosclerosis and Hepatic Steatosis in ApoE^{-/-} Mice through the ROS/MAPK/NF- κ B Pathway*. Nutrients 2015; 7: 7085-7105
14. Tomisato Miura, Mitsuru Chiba, Kosuke Kasai, Hiroyuki Nozaka, Toshiya Nakamura, Toshihiko Shoji1 , Tomomasa Kanda1 , Yasuyuki Ohtake1, Tatsusuke Sato. *Apple procyanidins induce tumor cell apoptosis through*

- mitochondrial pathway activation of caspase-3*. Carcinogenesis 2008 vol.29 no.3: 585–593,
15. Holick MF, Garabedian M. Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications. In: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. M. J. Favus et al. Washington, DC, U.S.A., American Society for Bone and Mineral Research: 106-115.
 16. Guessous I. *Role of Vitamin D Deficiency in Extraskeletal Complications: Predictor of Health Outcome or Marker of Health Status?* BioMed Research International **2015**; 563403.
 17. Halfon M, Phan O and Teta D. *Vitamin D: A Review on Its Effects on Muscle Strength, the Risk of Fall, and Frailty*. BioMed Research International 2015; 11.
 18. Te-En Shih, Lun-Hsin Yang. *Vitamin D and Human Health*, Journal of Internal Medicine of Taiwan 2014; 25(4)
 19. B. Arumugam, U. D. Palanisamy, K. H. Chua, and U. R. J. J. o. F. F. Kuppusamy, *Amelioration of hyperglycemia-induced oxidative damage in ARPE-19 cells by myricetin derivatives isolated from Syzygium malaccense*, vol. 67, p. 103844, 2020.
 20. T Shoji, Y Akazome, T Kanda, M Ikeda. *The toxicology and safety of apple polyphenol extract*, Volume 42, Issue 6, 2004; 959-967
 21. R.-M. Liu, K. A. Gaston Pravia, *Oxidative stress and glutathione in TGF- β -mediated fibrogenesis*. Free Radical Biology and Medicine 2010; 48: 1-15
 22. Matthew Dodson, Montserrat Rojo de la Vega, Aram B. Cholanians, Cody J. Schmidlin, Eli Chapman, and Donna D. Zhang, *Modulating NRF2 in Disease: Timing Is Everything*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, Vol. 59:555-575
 23. Nezu, Masahiro, et al., *Roles of Nrf2 in Protecting the Kidney from Oxidative Damage*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. 21.
 24. Zhong Q, et al., *Transcription factor Nrf2-mediated antioxidant defense system in the development of diabetic retinopathy*. Invest Ophthalmol Vis Sci.,2013.54.

第七章、 實驗結果圖表

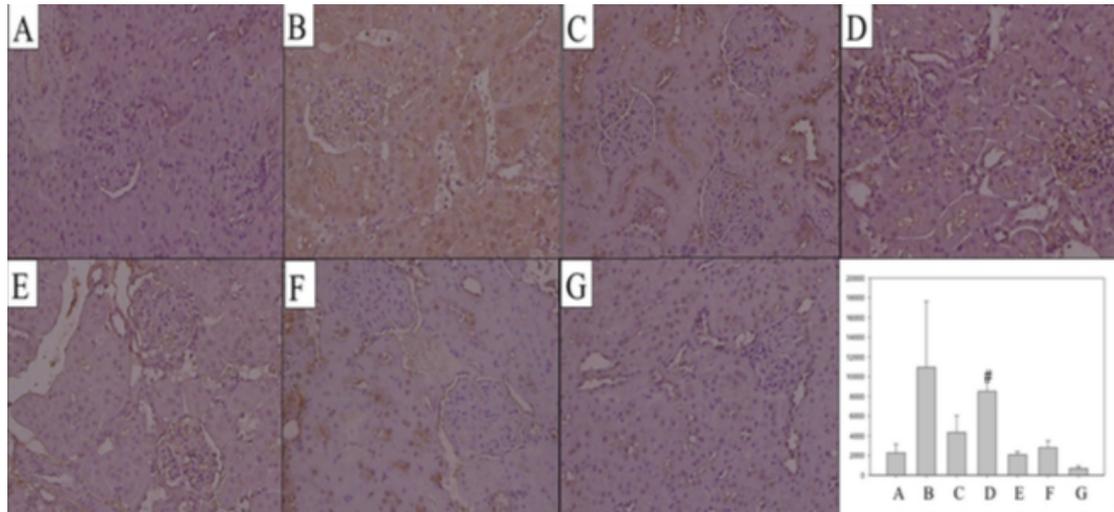


Figure 1.

顯微鏡下觀察 200 倍放大倍率之免疫組織化學染色(IHC)腎組織切片，圖中棕色呈色處為 TGF-β 蛋白。(右下圖) 實驗各組 TGF-β 蛋白之累積光密度(IOD)數值。

經蘋果多酚處理後，其 TGF-β 表現量較糖尿病組別低，合併維生素 D 後效果更加顯著。

以對照組(A)為基準值與誘導組(B)比較，#表 $p < 0.05$ ，與對照組比較達統計顯著；以誘導組(B)為 100%作為基準值與其他實驗組比較，*表 $p < 0.05$ ，與誘導組比較達統計顯著。

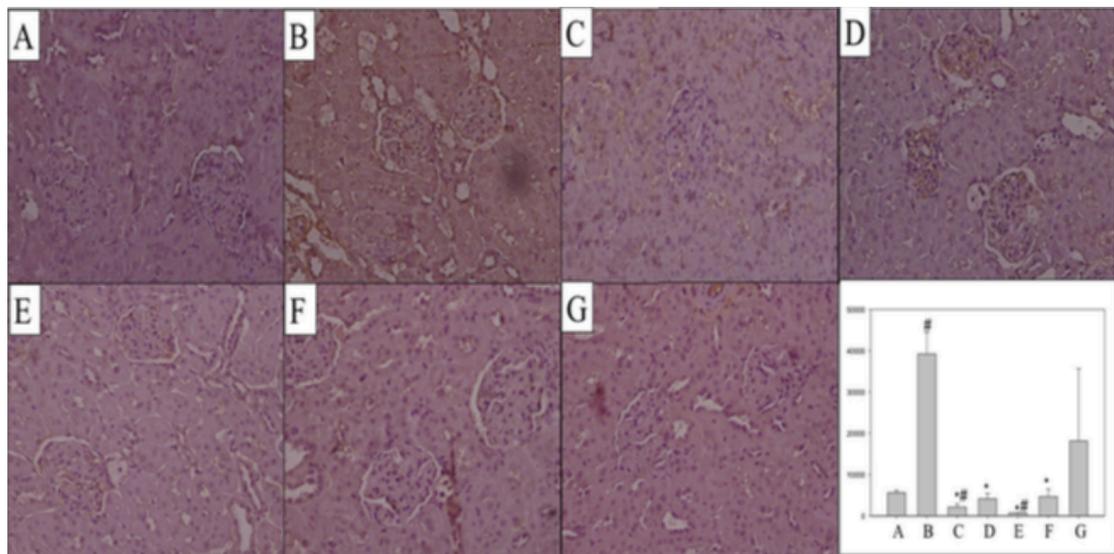


Figure 2.

顯微鏡下觀察 200 倍放大倍率之免疫組織化學染色(IHC)腎組織切片，圖中棕色呈色處為 Nrf-2 蛋白。(右下圖)實驗各組 Nrf-2 蛋白之累積光密度(IOD)數值。

經蘋果多酚處理過後的組別，其 Nrf 的表現量較糖尿病組為低，但其效果不隨劑量增多而顯著。另外，透過表中發現蘋果多酚合併維生素 D 的組別，其所造成的效果並不較蘋果多酚單獨處理的組別為明顯。

以對照組(A)為基準值與誘導組(B)比較，#表 $p < 0.05$ ，與對照組比較達統計顯著；以誘導組(B)為 100%作為基準值與其他實驗組比較，*表 $p < 0.05$ ，與誘導組比較達統計顯著。

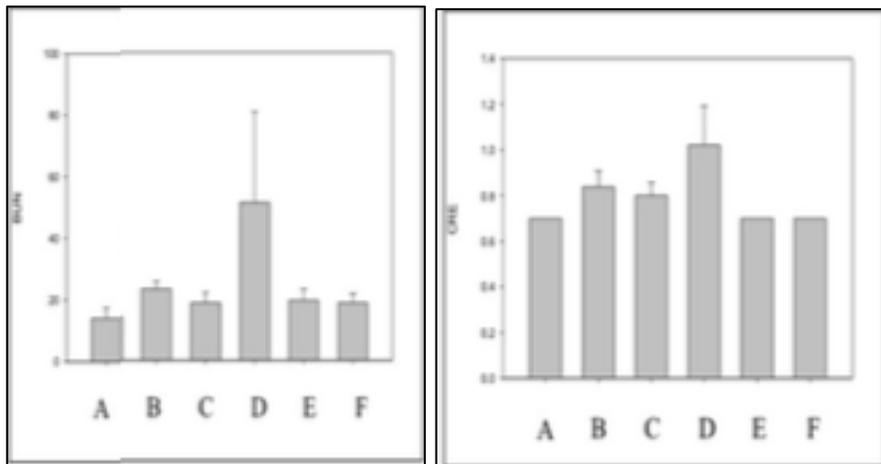


Figure 3. 、Figure 4.

各組的 BUN(Figure 3.)、CRE(Figure 4.)數值，可以發現以蘋果多酚單獨處理的組別，其 BUN 與 CRE 數值即有下降，而合併維生素 D 處理的組別，其兩者數值的下降量皆更為顯著

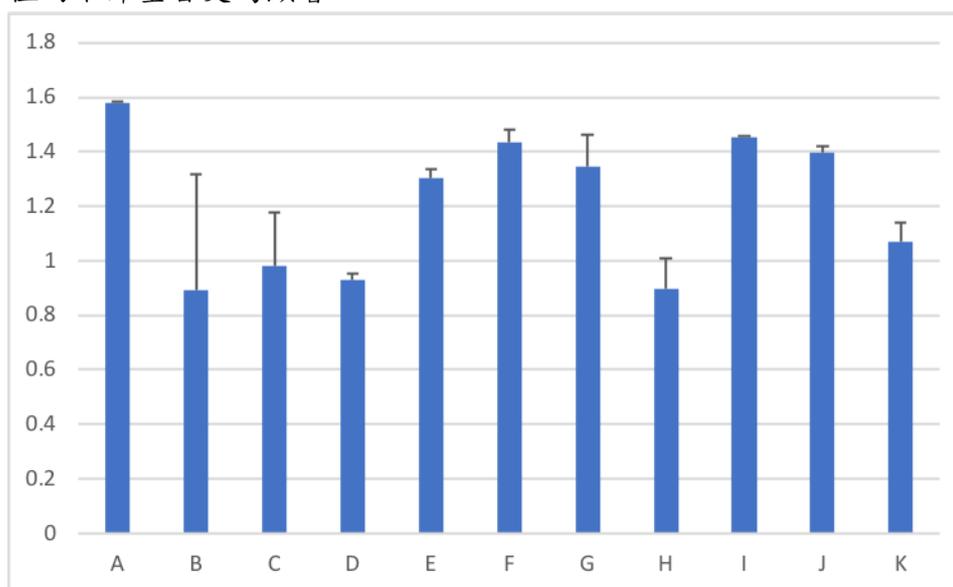


Figure 5.

加入蘋果多酚、Catechin 及維生素 D 對細胞存活量的影響，可以看到單獨以蘋果多酚、Catechin 或維生素 D 處理的組別，其細胞存活量皆較誘導組為高，且蘋果多酚及 Catechin 分別合併維生素 D 處理後的組別，其效果又比單獨給予蘋果多酚與 catechin 的組別為明顯。

(A：對照組；B：誘導組；C：AP 低劑量；D：AP 高劑量；E：AP 低劑量+Vitamin D；F：AP 高劑量+Vitamin D；G：Catechin 低劑量；H：Catechin 高劑量；I：Catechin 低劑量+Vitamin D；J：Catechin 高劑量+Vitamin D；K：Vitamin D)