

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計畫名稱	蘋果多酚合併維生素D對糖尿病視網膜病變的保護作用及機轉
------	-----------------------------

執行計畫學生：莊詩涵
學生計畫編號：MOST 109-2813-C-040-026-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24日

目錄

● 中英文摘要

第一章、序論.....	1
一、糖尿病視網膜病變.....	1
二、蘋果多酚.....	2
三、維生素 D.....	3
第二章、研究動機	4
第三章、研究架構	4
第四章、實驗材料與方法	5
第五章、實驗結果	7
一、 蘋果多酚與維生素 D 對糖尿病大白鼠血糖血脂之影響.....	7
二、 蘋果多酚與維生素 D 對糖尿病大白鼠視網膜組織的影響.....	7
三、 蘋果多酚與維生素 D 對糖尿病大白鼠視網膜蛋白表現量的影響....	7
第六章、討論.....	8
第七章、參考文獻	11
第八章、實驗結果圖表	13
第九章、附錄.....	19

中文摘要

長期糖尿病導致的慢性發炎及氧化壓力可能會造成視網膜病變，除了現行的臨床治療方針外，替代治療物質的研發也漸漸受到重視。多酚類化合物向來以其抗氧化及抗發炎的特性所聞名，具有減少活性氧類、脂質過氧化產物及糖化終產物等物質的能力，根據此特性，富含多酚類化合物的蘋果多酚，值得進一步探討其對抗氧化壓力的保護作用。此外，維生素 D 則已被證實可降低氧化壓力且對於糖尿病所引發的併發症具有助益。因此，本實驗旨在探討蘋果多酚對於糖尿病視網膜病變的保護作用及其機轉，以及在併用維生素 D 時，此兩種物質是否能相互作用而達到更顯著的功效。

我們利用鏈脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 誘導第一型糖尿病的大鼠模型，每日單獨給予 0.5% 或 1.0% 飲食的蘋果多酚或同時併用每公斤體重 200 IU 的維生素 D，十周後犧牲，採集血液及眼睛進行分析，並利用組織切片進行免疫染色法分析相關蛋白的表現量。實驗結果發現蘋果多酚具有降低血漿低密度脂蛋白的作用，並且也可降低視網膜脂肪沉積量，且此作用在併用維生素 D 時效果更為顯著，此外，相較於糖尿病誘導組，蘋果多酚能夠減少視網膜 Nrf-2 蛋白表現量並且增加視網膜 TGF- β 蛋白表現量。本次實驗結果顯示蘋果多酚能透過改善血脂異常以及降低氧化壓力，對糖尿病視網膜病變具有一定的保護作用。

英文摘要

Long-term diabetes potentiates to cause retinopathy via chronic inflammation and oxidative stress. In addition to the existed clinical drugs, there is a growing awareness of the urgency of finding alternative therapeutic substances for diabetic retinopathy. With the capability of reducing reactive oxygen species levels, lipid peroxidation products, and advanced glycation end-products, polyphenols have been well-known for their anti-oxidant as well as anti-inflammatory properties. The apple polyphenol (AP), which is rich in phenolic compounds, is worthy of further study for its protective effect against oxidative stress. Vitamin D, on the other hand, has known for its capability of reducing oxidative stress and its benefit in diabetes complications. This study was aimed to examine the protective effect of AP toward diabetic retinopathy and the mechanism behind it. Furthermore, we applied AP along with vitamin D to see if they have synergistic effect.

We used streptozotocin (STZ) to induce type 1 diabetes. The diabetic rats were either treated with AP (0.5% or 1.0% of diet) alone or co-treated with 200 IU/kg body weight on a daily basis. After treating the intervention for 10 weeks, we collected the serum and retinal tissue for further analysis, and immunohistochemistry stain was performed to examine the expression of relative proteins. As expected, AP was found to reduce the level of serum low-density lipoprotein and the level of lipid deposited in the retina specimen. Additionally, the effect was more significant when apple polyphenol and Vitamin D are conducted together. Also, in comparison with the diabetic group, the expression of Nrf2 proteins was significantly decreased in the AP-treated diabetic group and the expression of TGF- β was enhanced. The evidence shown in our experiment demonstrates that AP administration has a protective effect on diabetic retinopathy through correcting dyslipidemia and reducing oxidative stress.

第一章、序論

一、糖尿病視網膜病變

糖尿病視網膜病變(Diabetic retinopathy)為糖尿病患者因長期的高血糖，而引起眼部視網膜小血管病變，根據統計，幾乎所有的第一型糖尿病患者患病 15 至 20 年後都會產生視網膜病變，而由於第二型糖尿病常在發病數年後才被診斷，因此確診時已有約 20% 的患者會合併有糖尿病視網膜病變的狀況，且在患病超過 20 年後，更有超過 60% 的第二型糖尿病患者會患有視網膜病變，其中甚至有 20% 至 30% 的病人會失明[1]。

糖尿病患者長期的高血糖將導致 ROS 過度產生，並使抗氧化防禦系統，如 SOD、Glutathione reductase、Glutathione peroxidase、Catalase 及 GSH 等受到抑制，使 ROS 無法被正常清除，因而導致氧化壓力上升。而長期的氧化壓力將使得細胞平衡受到破壞，且會再加速 ROS 的產生，而導致多種器官病變，其中視網膜富含多元不飽和脂肪酸，且對氧氣及葡萄糖氧化的需求量都較其他組織高，使得視網膜更易受到氧化壓力上升所帶來的傷害，在糖尿病的視網膜中，常可觀察到脂質過氧化以及 DNA 的受損 [2]。

除了加速 ROS 的產生，氧化壓力的上升還會誘發多項生化代謝反應，如 Polyol 及 Hexosamine 路徑、Protein kinase C (PKC) 活化、糖化終產物 (AGEs) 堆積等，使得氧化壓力更迅速地上升，而氧化壓力所導致的細胞膜脂質過氧化、細胞功能損傷、訊息傳導和基因表現改變等，更會促使細胞凋亡，長期下來便會導致視網膜的神經膠質細胞損傷、血管內皮細胞損傷與外被細胞流失等，而造成視網膜病變[3]。

此外，氧化壓力造成的粒線體功能異常也會導致視網膜微血管細胞凋亡，氧化壓力會加速視網膜細胞的粒線體產生過量 ROS，使得視網膜細胞因無法有效清除 ROS 而對氧化壓力更加敏感。除此之外，粒線體 DNA 也會受到損傷，並且細胞質中的 ROS 會使得粒線體脂膜受損，使胞器的通透性增加而腫脹。線粒體內膜內的空腔含有多種可溶性蛋白，包括細胞色素 c，在糖尿病中，視網膜及其微血管中的線粒體細胞色素 c 由線粒體釋放至細胞質的量會上升，且 Bax 從細胞質向線粒體的易位也會上升，因而驅動細胞凋亡[4]。

糖尿病早期的高糖環境會使細胞外基質纖維連蛋白及膠原蛋白的產生增加，而使視網膜微血管的基底膜增厚，進而改變血流及視網膜養分的供應 [2]。此外，長期氧化壓力所造成的血管內皮細胞損傷與外被細胞流失更會使得血液視網膜障壁(BRB)遭到破壞，視網膜微血管的異常會使得液體及血液容易滲出視網膜，長期下來將造成視網膜組織缺血，因而導致血管新生因子如血管內皮生成因子(VEGF)增加，刺激微血管內皮細胞血管新生，而新生的血管周圍會漸漸出現纖維組織，逐漸牽引網膜造成視網膜剝離而

使視力喪失[5]。

糖尿病視網膜病變可依據疾病的嚴重程度分為非增殖性糖尿病視網膜病變(NPDR)以及增殖性糖尿病視網膜病變(PDR)。其中在 NPDR 階段，新生血管僅侷限於內限膜內病變較輕微，而在 PDR 時期，新生血管已穿過內限膜延伸到玻璃體內，病變嚴重甚至可能造成失明[5]。此外，糖尿病黃斑病變(Diabetic maculopathy)為造成糖尿病視網膜病變視力喪失的主要原因，且在任何階段皆可能發生。目前對於糖尿病視網膜病變的治療多著重於晚期較嚴重的 PDR 及黃斑水腫(DME)，包括[6]:

1. 雷射治療(Laser photocoagulation):

包括局部光凝固雷射治療(Focal photocoagulation)和泛視網膜光凝固雷射治療(Panretinal photocoagulation)。ETDRS 與 DRS 研究指出局部光凝固雷射對 DME 之治療可減少 50%嚴重視力減退之比例；而泛視網膜光凝固雷射則可減少 PDR 病患 50%以上的失明機會[7]。

2. 眼球內注射類固醇或血管增生因子抑制劑:

注射 anti-VEGF(如 Aflibercept, Bbevacizumab 與 Ranibizumab)可以使 PDR 的新生血管與玻璃體出血明顯減少甚至消失[7]，並且也可改善 DME 對視力造成的影響。雖然過去有研究指出類固醇對 DME 的治療效果較 Anti-VEGF 佳，然而類固醇注射會有較高的機會發生白內障、青光眼等副作用[6]。

3. 玻璃體切除手術(Vitrectomy)

當疾病進展至更嚴重的階段，如持續性玻璃體出血、影響黃斑部的牽引性視網膜剝離或合併裂孔的牽引性視網膜剝離等情況，則需以玻璃體切除手術去除玻璃體出血和纖維組織[8]。

二、蘋果多酚

多酚(Polyphenol)為植物的次級代謝產物，具有多種生理功能，如預防冠狀動脈疾病等，常見於蘋果、巧克力等食物中[9]。蘋果是世界各地最常見的水果之一，並且極富營養價值和健康效益，其含有多種酚酸(Phenolic acid)、類黃酮(Flavonoids)如 Flavan-3ols, Flavonols, Procyanidins, Chalcones 和 Anthocyanins 等[10]。以下為過去針對蘋果萃取成分和相關功效的研究：

1. 抗氧化

氧化壓力為導致眾多疾病的因素之一，而蘋果富含多酚化合物，具有抗氧化活性，可藉由降低脂質過氧化程度、增加過氧化氫酶和谷胱甘肽(GSH)活性等降低氧化壓力。過去研究發現蘋果渣中所含有的多酚化合物，如 phloridzin、3-hydroxyphloridzin、chlorogenic acid、epicatechin, epicatechin dimer (procyanidin B2)和 quercetin glycosides 等，具有抗氧化、清除 DPPH 自由基以及超氧陰離子自由基等特質[10]。

2. 抗發炎

蘋果皮多酚可藉由(1)降低促炎性細胞因子及 COX-2 的表現量 (2)負調控 NK- κ B，一種調控多種細胞激素的轉錄因子 (3)正調控轉錄因子如 Nrf2、PGC-1a 等的表現，預防由脂多醣誘導的發炎反應。過去也有研究[11] 發現蘋果皮多酚可改善單側輸尿管阻塞(Unilateral ureteral obstruction)大鼠腎臟發炎及纖維化的情況。

3. 抗過敏。

蘋果中所含的類黃酮可藉由抑制肥大細胞釋放組織胺及細胞激素等，抑制 IgE 介導型過敏反應[12]。

4. 預防心血管疾病

Flavonols, Anthocyanins 和 Procyanidines 等類黃酮物質可藉由抗高血壓、抑制血小板凝集、增加血管內皮依賴性舒張和降血脂等作用，降低導致心血管疾病的發生的危險因子[11]。

5. 抗腫瘤

過去有研究發現蘋果多酚中的根皮素(Phloretin)可透過 GLUT2 使細胞內的葡萄糖濃度降低，因而活化轉錄因子 HNF6 而誘發 p53-mediated signals 並導致 G0/G1 細胞週期停滯，因而具有抗腫瘤的效果。此外，Phloretin 還可抑制 Paxillin/FAK、N-cadherin 及 α -SMA-mediated migratory signals，對於三陰性乳癌(TNBC)具有一定的療效[13]。

三、 維生素 D

維生素 D 為一種類固醇化合物，最主要的形式有維生素 D₂(麥角鈣化醇)和維生素 D₃(膽骨化醇)兩種，由於維生素 D₃ 在生物界含量較多，一般人們所稱的維生素 D 及指維生素 D₃。活化態的維生素 D 主要功能為調控體內鈣及磷酸鹽之平衡，此外也可作為類固醇激素，透過兩種含 Vitamin D₃ response element (VDRE)的基因增強子 C/EBP β 及 RUNX2 增加 VDR 的表現，VDR 基因表現於多種眼球結構中，為一種調控多種細胞轉錄的核受體。而過去多項文獻已指出維生素 D 具有抑制氧化壓力、抗發炎、抑制巨噬細胞增生和血管新生等作用，並且有研究發現維生素 D 可降低 H₂O₂ 誘導的視網膜色素上皮細胞氧化壓力，並且具有抗發炎的作用[14]。此外，Lee et al. (2012)更發現維生素 D 可降低老年小鼠的視網膜發炎和 β 澱粉樣蛋白沉積，並改善視覺功能[15]。

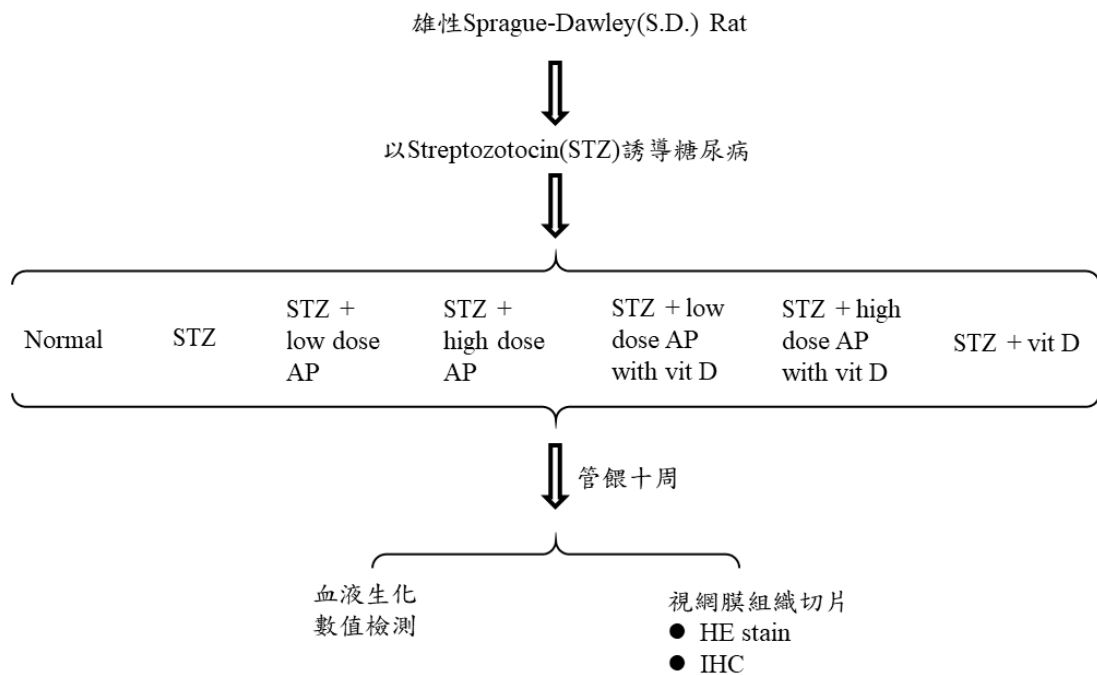
第二章、研究動機

根據世界衛生組織(WHO)估計，在 2017 年全球的糖尿病盛行率為 8.8%，並可能在 2045 時攀升至約 9.9%，糖尿病會導致多種慢性併發症，其中一項常見的病變即為糖尿病視網膜病變，其為導致台灣中老年失明最主要的原因，不論是第一型或第二型糖尿病的患者，都會受到糖尿病視網膜病變的影響[1]。

然而目前臨床上對於糖尿病視網膜疾病的治療，大多僅針對增殖性視網膜病變或是玻璃體出血等病變晚期較嚴重的狀況，至於早期較輕微的病變，則僅能藉由血糖的控制以延緩疾病的進程。

根據過去研究，多酚可藉由降低活性氧類(ROS)、脂肪過氧化物和糖化終產物，以達抗氧化和抗發炎的作用，而蘋果便富含此類物質，並且過去也有研究發現其具有抗氧化、抗發炎及抗過敏等功效，此外，由於維生素 D 對於糖尿病引起的病變具有保護的效果，且可改善視覺功能，因此我們也將維生素 D 與蘋果多酚併用，探討兩者是否會發生協同作用而產生更顯著的效果，並進一步釐清可能的機轉，希望能藉由找尋能降低糖尿病早期氧化壓力的物質，以延緩甚至避免糖尿病視網膜病變的發生。

第三章、研究架構



第四章、實驗材料與方法

【蘋果多酚來源】

本實驗所使用之蘋果多酚為日本東京 Asahi Co.的產品，其使用未成熟蘋果 (Malus pumila cv. Fuji)，先去除糖分及有機酸，再利用 50%乙醇溶析出蘋果多酚，並以蒸發器及噴霧乾燥法濃縮。

【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)，以每公斤體重 65 mg 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，接著依序進行酒精脫水：以 50%, 70%, 80%, 90%, 100%酒精各一小時後，再 100%酒精進行隔夜處理。以 Xylene 置換酒精，浸漬 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。

【蘇木紫-伊紅染色法 H&E stain】

將切片放入烘箱 30 分鐘，65°C，使蠟稍微溶解，回溫後以 Xylene 脫蠟 15 分鐘，接著依序以 100%、95%、80%、70%酒精及二次水回水各 5 分鐘。接著以 Hematoxylin 染色 1 分鐘，在以自來水沖約五分沖洗(避免直沖組織)後，以 Eosin 染色約 5 分鐘，過 100%酒精 2 次風乾後，再以 Xylene 膠封片。

【免疫組織染色 IHC】

首先將切片放入烘箱 30 分鐘，65°C，使蠟稍微溶解，回溫後以 Xylene 脫蠟 15 分鐘，接著依序以 100%、95%、80%、70%酒精及二次水回水各 5 分鐘。接下來用檸檬酸緩衝液(0.01 M, pH=6.0)煮沸 40 分鐘，待回溫後以 PBST 沿著玻片沖洗。之後以 Hydrogen Peroxide Block 覆蓋檢體於室溫下作用 10 分鐘，以 PBST 沖洗後再以 Ultra V Block 覆蓋檢體於室溫下作用 5 分鐘，接著再以 PBST 沖洗，然後加入一次抗體完全覆蓋檢體，於濕盒環境下 37°C 作用 1 小時。以 PBST 沿著玻片沖洗後加入 HRP Polymer Quanto(二抗)覆蓋檢體於室溫下避光作用 10 分鐘，PBST 沖洗後加呈色劑 DAB (1ml DAB Quanto substrate+

1 drop DAB Quanto Chromogen)於室溫下作用 5 分鐘，再以二次水沖洗。利用蘇木紫(Hematoxylin)染背景色，並用自來水沖洗，待玻片烘乾後，將封片膠滴在檢體上，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。

【免疫組織染色結果分析】

再進行完免疫組織染色後，以放大 200 倍的倍率，利用統計分析軟體 Image Pro Plus 統計累積光密度值(Integrated Optical Density, IOD)，以分析特定蛋白在各組的表現量，此外，有鑑於視網膜各分層的生理功能並不相同，因此本實驗分別選取內核層(Inner nuclear layer, INL)以及外核層(Outer nuclear layer, ONL)分別做統計。

【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，當 $P < 0.05$ 即認定為達到統計顯著，實驗數據皆以 SigmaPlot 10.0.進行統計。

第五章、實驗結果

一、蘋果多酚與維生素 D 對糖尿病大白鼠血糖血脂之影響

根據實驗結果，對照組的血糖為 171 mg/dl，在以 STZ 誘導第一型糖尿病後，血糖上升為 477 mg/dl，但我們發現不論是蘋果多酚或是蘋果多酚併用維生素 D 皆無法改變糖尿病大鼠的血糖數值。然而，蘋果多酚能有效降低糖尿病大白鼠血液中的三酸甘油酯(TG)數值，相較於對照組的三酸甘油酯為 81 mg/dl，糖尿病誘導組的上升為 352 mg/dl，而在給予蘋果多酚後，低劑量和高劑量的組別分別顯著下降至 136 mg/dl 和 100 mg/dl，但在高劑量蘋果多酚併用維生素 D 的組別僅降至 234 mg/dl，降血脂的效果並不如單獨使用蘋果多酚佳。此外，相較於對照組的血漿低密度脂蛋白為 6 mg/dl，糖尿病誘導組的上升為 9 mg/dl，而我們發現在低劑量及高劑量蘋果多酚併用維生素 D 的組別，低密度脂蛋白皆下降至 5 mg/dl，然而單獨給予蘋果多酚的組別雖有些許下降，但並未達統計顯著。(Figure.1~3)

二、蘋果多酚與維生素 D 對糖尿病大白鼠視網膜組織的影響

在經過十周實驗後，將大鼠眼睛組織切片進行蘇木素-伊紅染色(HE stain)，並以 200 倍放大倍率於顯微鏡下觀察，我們發現糖尿病組別的視網膜有脂肪沉積的趨勢，雖然給予低劑量的蘋果多酚並無法觀察到脂肪沉積有減緩的情況，然而高劑量的蘋果多酚卻能有效降低脂肪沉積量，並且在併用維生素 D 時，效果更為顯著。

(Figure.4)

三、蘋果多酚與維生素 D 對糖尿病大白鼠視網膜蛋白表現量的影響

我們也將眼睛組織切片進行免疫組織染色(IHC)分析，我們以放大 200 倍的倍率，利用統計分析軟體 Image Pro Plus 統計累積光密度值(Integrated Optical Density, IOD)，以分析特定蛋白在各組呈色量的差異，此外，有鑑於視網膜各分層的生理功能並不相同，如外核層由錐細胞、桿細胞等感光細胞之細胞核所構成，而內核層則由米勒氏細胞、水平細胞等支持細胞構成，因此我們將視網膜的內核層以及外核層分別做統計。

1. 蘋果多酚減少視網膜 Nrf-2 蛋白表現量

實驗結果顯示不論是否併用維生素 D，蘋果多酚皆可降低視網膜內核層以及內外叢狀層之 Nrf-2 蛋白表現量，然而此結果在外核層並不顯著。(Figure.5)

2. 蘋果多酚增加視網膜 TGF- β 蛋白表現量

當給予高劑量的蘋果多酚時，不論是否併用維生素 D，皆可明顯增加 TGF- β 在視網膜外核層及內核層之表現量，然而當給予低劑量的蘋果多酚時則無法增加 TGF- β 的表現量。(Figure.6)

第六章、討論

蘋果多酚富含表兒茶素(epicatechin)及兒茶素(catechin)等物質，過去研究發現表兒茶素及兒茶素等抗氧化物質，在中樞神經系統內可藉由調節 NF- κ B、Nrf-2 及 TLR4/NF- κ B 等路徑，抑制 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等發炎物質的釋放而達到抗氧化、抗發炎的作用，故能對中樞神經系統內的神經細胞達到保護的作用[16]。根據這些機轉，我們也在本次的實驗發現蘋果多酚對於同樣富含神經細胞的視網膜，具有保護的作用。此外，我們也觀察到蘋果多酚具有降低血脂以及組織脂質沉積的功效，並且在併用維生素 D 時能達到更顯著的成效，但根據免疫組織染色觀察蛋白表現量的結果，我們發現單獨使用蘋果多酚即可達到極佳的保護效果，以下依據我們在此次實驗中的發現，依序做討論。

一. 蘋果多酚降血脂及減少視網膜脂肪沉積

過去便有研究發現誘導糖尿病的大白鼠體內，由於氧化壓力的上升、活性氧族物質的增加，讓糖尿病大鼠更易發生脂質過氧化的情況，而使細胞受到損傷，此外 STZ 的注射使得大鼠的胰島 β 細胞之葡萄糖運輸器 GLUT-2(Glucose Protein-2 Transporter)親和力下降，使得胰島素的分泌量大幅下降，故而增加了血漿中的游離脂肪酸，進而導致糖尿病的諸多併發症，彰顯了在糖尿病早期控制血脂的重要性。Samarghandiant et al. (2017) 在以 STZ 誘導的糖尿病大鼠中發現，兒茶素的給予能夠降低大鼠血漿中的總膽固醇、三酸甘油酯以及低密度脂蛋白，因此具有降低心血管併發症的風險[17]。而我們也在蘋果多酚中得到了相同的結果，我們發現在給予蘋果多酚十周之後，血漿三酸甘油酯及低密度脂蛋白濃度皆有顯著的下降。

而至於血脂異常之於糖尿病視網膜病變，過去有多項研究證實血脂的異常對於糖尿病視網膜病變的進程扮演著關鍵的角色，糖尿病的發生會改變血漿中的脂質組成，並且異常的血脂也會透過血液循環，藉由微小血管進入視網膜而導致脂質沉積，此外視網膜本身也具有高組織專一性的脂質代謝路徑，然而糖尿病的發生會改變此代謝路徑，而導致視網膜異常的脂質沉積，進而發生發炎反應[18]。在本次的實驗中，我們從視網膜切片中觀察到脂肪的沉積量在給予蘋果多酚後有了顯著的減少，故推論蘋果多酚能對視網膜組織具有相當程度的保護作用，因而能延緩糖尿病視網膜病變的病程。

此外，我們也發現到在併用維生素 D 之後，血液中的低密度脂蛋白有更顯著的下降，並且視網膜脂質沉積的量也更顯著的減少。維生素 D，一種脂溶性類固醇衍生物，負責生物體內多項生理功能，維生素 D 的缺乏與多種疾病息息相關。過去更有研究指出維生素 D 與脂質的代謝途徑具有極大的關聯，維生素 D 缺乏極可能導致脂質異常[19]，說明了為何對於改善脂質異常，蘋果多酚在併用維生素 D 時會有更佳的功效。

二. 蘋果多酚減少視網膜 Nrf-2 蛋白表現量

過去研究更發現細胞長期暴露於高氧化壓力的環境，除了會增加體內活性氧化物質(ROS)、減少細胞內的抗氧化物質穀胱甘肽(GSH)，也會降低其他抗氧化酶的活性，破壞生物體內生性的抗氧化機制。Nrf-2(Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2) 即為一種調節對抗毒性物質以及氧化壓力物質的轉錄因子，對於細胞抗氧化、抗發炎扮演著極為重要的角色。在正常的狀況下，細胞質內的 Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1)會與 Nrf-2 結合，抑制 Nrf-2 的活性進而使得 Nrf-2 被降解[20]，然而當氧化壓力上升時，Keap1 會與 ROS 或其他帶電粒子結合，此時 Keap1 才會與 Nrf-2 分離，使 Nrf-2 活化並進入細胞核內與 ARE(Antioxidant Responsive Element) 結合，與 Nrf-2 結合後的 ARE 即可增強二期解毒酵素(phase II detoxifying enzymes)的轉錄，以強化細胞對抗氧化壓力的能力[21]。

Zhong et al. (2013) 便在糖尿病大鼠的視網膜發現了 Nrf2-ARE 路徑的缺損，他們觀察到了在糖尿病組別中，細胞質內的 Nrf2 及 Keap1 相較於控制組有顯著的上升，這是因為氧化壓力的上升，儘管細胞質 Nrf-2 以及 Keap1 的表現量大量上升，然而由於氧化壓力上升使得 Keap1 與帶電粒子結合的能力受到改變，因而抑制了 Nrf-2 與 Keap1 的分離，因此 Nrf-2 便無法順利進入細胞核內啟動 Nrf2-ARE 抗氧化路徑[22]。而我們也在本次的實驗也觀察到相似的情況，在糖尿病誘導組中，不論是含有水平細胞、無長軸細胞、雙極細胞細胞本體以及米勒氏細胞的內核層，或是僅含有神經突起的內外叢狀層，Nrf-2 的表現量皆顯著的上升，然而在給予蘋果多酚以及蘋果多酚併用維生素 D 後，Nrf-2 的表現量即顯著地下降。我們推測這是由於蘋果多酚降低氧化壓力的緣故，進而透過上述的機轉讓 Nrf-2 得以進入細胞核內啟動 Nrf2-ARE 抗氧化路徑，而非大量堆積在細胞質內，從給予蘋果多酚的組別的視網膜內外叢狀層 Nrf-2 表現量大幅下降，即可得知。

然而我們並未在外核層觀察到同樣的結過，但有鑑於視網膜外核層主要以視錐及視桿細胞之細胞核所構成，故我們統計到的 Nrf-2 主要是核內的蛋白表現量。糖尿病誘導組外核層 Nrf-2 的表現量上升意味著此時視網膜的氧化壓力上升，故細胞需啟動內生性的抗氧化機制 Nrf2-ARE 路徑 [21]，但我們推測糖尿病造成的長期高氧化壓力環境已使得部分的抗氧化機制受到損害，故有更多的 Nrf-2 蛋白堆積在核外，正如 Zhong et al. (2013)所觀察到的結果，糖尿病組別細胞質內的 Nrf2 出現大量地上升 [22]，這說明了為何糖尿病誘導組的 Nrf-2 在視網膜各層的表現量皆高。而在給予蘋果多酚以及蘋果多酚併用維生素 D 的組別中，Nrf-2 在外核層的表現量並未顯著的下降，我們認為這是由於蘋果多酚及維生素 D 的抗氧化功效仍不足以完全逆轉糖尿病所導致的氧化壓力上升，故細胞仍需啟動 Nrf2-ARE 抗氧化路徑，但從 Nrf-2 在內核層及內外叢狀層皆有顯著的下降

即可得知 Nrf2-ARE 抗氧化路徑並未受到損害，Nrf2 得以在第一時間進入核內啟動抗氧化路徑，降低細胞的氧化壓力，說明了為何在給予蘋果多酚後，Nrf-2 在外核層的表現量相較於糖尿病誘導組仍是較低的，然而此推論背後的詳細機轉仍需更進一步的實驗加以驗證。

此外，過去即有研究指出兒茶素、表兒茶素等抗氧化物能透過活化 Nrf2-ARE 路徑，達到抗氧化、抗發炎的作用[16]，Leonardo et al.(2013) 即在小鼠的皮質神經元中發現，表兒茶素可透過活化 Nrf2 路徑，保護神經元免於氧化物質所造成的傷害[23]，而兒茶素和表兒茶素等正是蘋果多酚內富含的物質，加以證明了蘋果多酚能降低氧化壓力的功用。

三. 蘋果多酚增加視網膜之 TGF- β 蛋白

Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)為 TGF- β 家族的一員，參與細胞生長與分化、免疫抑制和細胞修復等機制。過去有研究指出 TGF- β 可藉由降低 Bax/Bcl-2 ratio 延緩老年性黃斑部病變(AMD)，並且對於視網膜神經節細胞和血液視網膜屏障(BRB)具有保護的作用[24]。此外，Dagher et al. (2016)發現在早期糖尿病的大鼠中，視網膜血管會藉由 ALK5 (TGF β type I receptor kinase)增加 TGF- β 表現量以維持視網膜血管的完整性[25]，因此 TGF- β 表現量的上升意味著對於視網膜功能的保護。在本次的實驗中，我們觀察到了在給予高劑量的蘋果多酚時，不論是否並用維生素 D，皆可明顯增加 TGF- β 在視網膜外核層及內核層之表現量，因此由此實驗結果，我們推測蘋果多酚對於糖尿病視網膜病變具有保護效果。

第七章、參考文獻

1. 張嘉仁, 糖尿病視網膜病變. *臺灣醫界*, 2010.53(6): Pages 7-12.
2. Kowluru RA, et al., Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res*, 2007, 2007.
3. Judith L, et al., The pathology associated with diabetic retinopathy. *Vision Research*, 2017.139: Pages 7-14.
4. Kowluru RA, et al., Diabetes-induced mitochondrial dysfunction in the retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2003.44(12): Pages 5327-5334.
5. Davis MD, et al., Proliferative diabetic retinopathy. *Mosby*, 2001: Pages 1309-1349.
6. Duh EJ, et al., Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies. *JCI insight*, 2017.2(14).
7. Aiello LP, et al., Diabetic retinopathy and other ocular findings in the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study. *Diabetes Care*, 2014.37(1): Pages 17-23.
8. Zhang X, et al., Diabetic macular edema: new concepts in patho-physiology and treatment. *Cell Biosci*, 2014.4(27).
9. T Shoji, et al., The toxicology and safety of apple polyphenol extract. *Food and Chemical Toxicology*, 2004.42(6): Pages 959-967.
10. Yinrong Lu, et al., Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chemistry*, 2000.68(1): Pages 81-85.
11. Wen-Chin Lee, et al., Apple polyphenols reduce inflammation response of the kidneys in unilateral ureteral obstruction rats. *Journal of Functional Foods*, 2014.11: Pages 1-11.
12. Hiroshi AKIYAMA, et al., Antiallergic Effect of Apple Polyphenols on the Allergic Model Mouse. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2000.23(11): Pages 1370-1373.
13. Wu KH, et al., The apple polyphenol phloretin inhibits breast cancer cell migration and proliferation via inhibition of signals by type 2 glucose transporter. *J Food Drug Anal*, 2018.26(1): 221-231.
14. Tohari AM, et al., Vitamin D Attenuates Oxidative Damage and Inflammation in Retinal Pigment Epithelial Cells. *Antioxidants (Basel)*, 2019.8(9).
15. Lee, V. et al., Vitamin D rejuvenates aging eyes by reducing inflammation, clearing beta and improving visual function. *Neurobiol. Aging*, 2012.33: Pages 2382–2389.
16. Farkhondeh ,et al., Green tea catechins inhibit microglial activation which prevents the development of neurological disorders. *Neural Regeneration*

- Research. Saeed*, 2020. 15. 1792-1798.
17. Samarghandian S. et al., Catechin Treatment Ameliorates Diabetes and Its Complications in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Dose-Response*. 2017.
 18. Sandra S. et al., The role of dyslipidemia in diabetic retinopathy, *Vision Research, Volume 139*, 2017, Pages 228-236.
 19. Wang Y., et al., The Associations of Serum Lipids with Vitamin D Status. *PLoS ONE*. 2016.11(10).
 20. Nezu, Masahiro, et al., Roles of Nrf2 in Protecting the Kidney from Oxidative Damage. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020. 21.
 21. Johnson JA, et al., The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci.*, 2008.
 22. Zhong Q, et al., Transcription factor Nrf2-mediated antioxidant defense system in the development of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 2013.54.
 23. Leonardo CC, et al., Oral administration of the flavanol (-)-epicatechin bolsters endogenous protection against focal ischemia through the Nrf2 cytoprotective pathway. *Eur J Neurosci* , 2013.38:3659-3668.
 24. Platania CBM, et al., Topical Ocular Delivery of TGF- β 1 to the Back of the Eye: Implications in Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*, 2017.18 (10).
 25. Dagher Z, et al., The Increased Transforming Growth Factor- β Signaling Induced by Diabetes Protects Retinal Vessels. *Am J Pathol.*, 2017 Mar;187(3):627-638.

第八章、實驗結果圖表

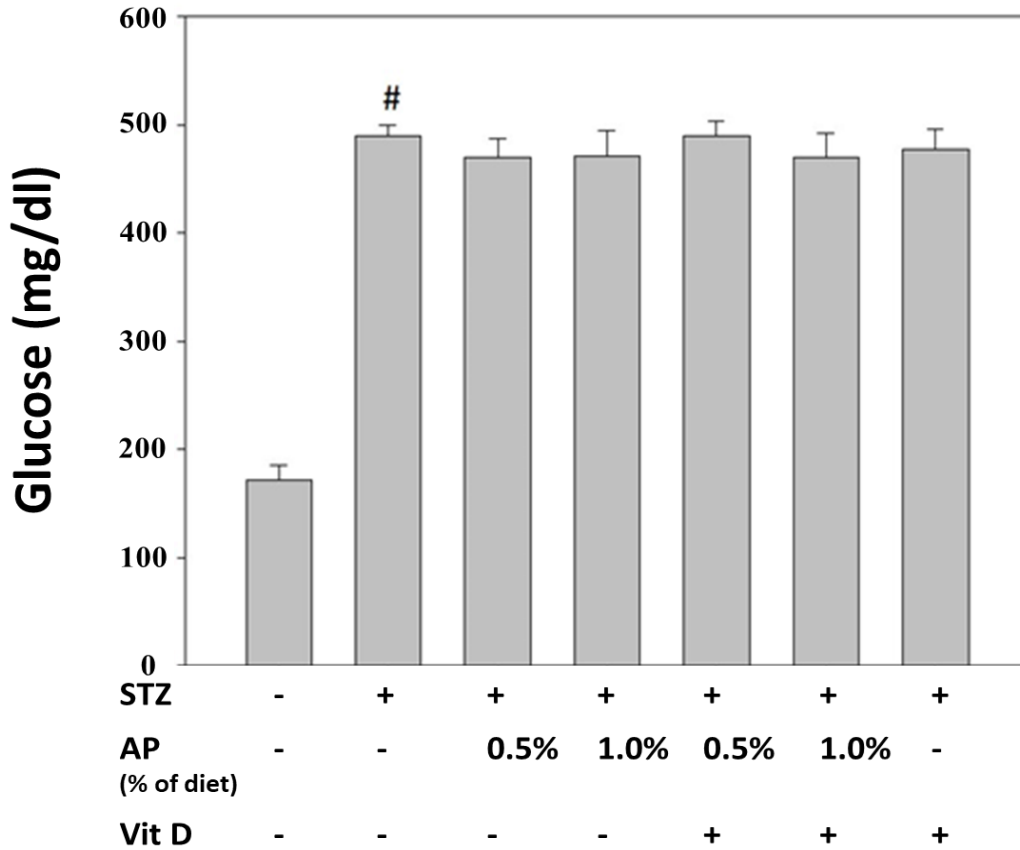


Figure 1. 實驗各組血糖數值

實驗結果顯示，不論是蘋果多酚或蘋果多酚併用維生素 D，在十周之後都無法顯著降低糖尿病大白鼠的血糖數值。以對照組為基準值與糖尿病誘導組比較，#表 $p < 0.05$ ，與對照組比較達統計顯著。

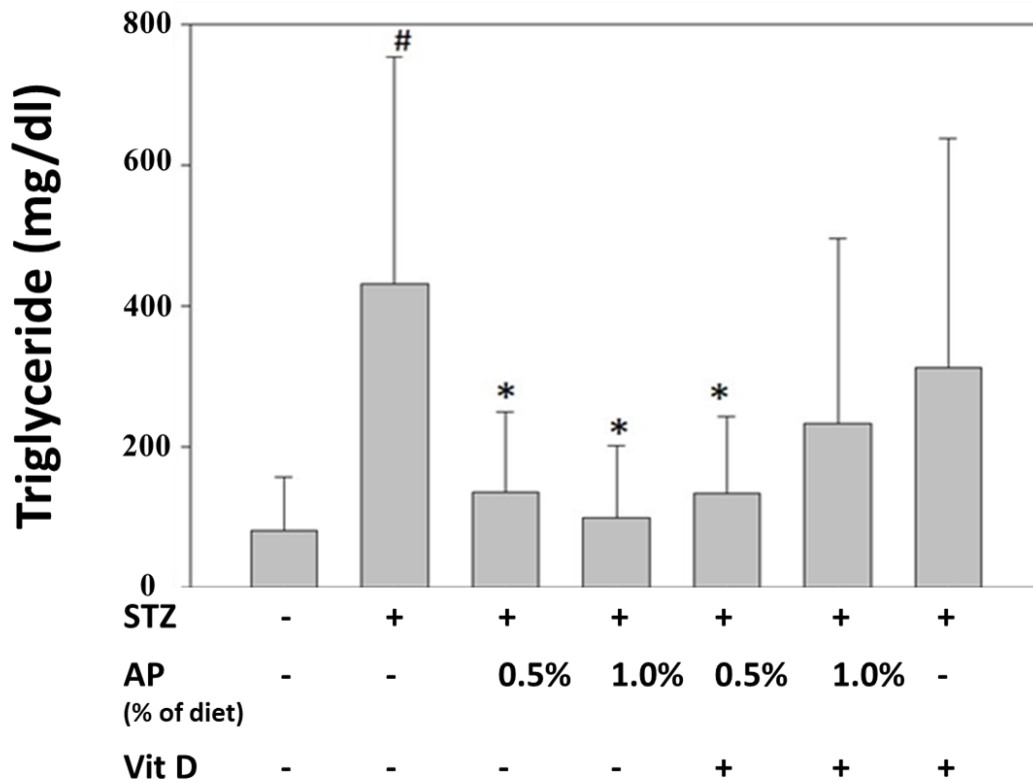


Figure 2. 實驗各組三酸甘油酯數值

實驗結果顯示，蘋果多酚能有效降低糖尿病大白鼠血液中的三酸甘油酯數值，然而併用維生素 D 後，降血脂的效果並不如單獨使用蘋果多酚佳。以對照組為基準值與糖尿病誘導組比較，# 表 $p < 0.05$ ，與對照組比較達統計顯著；以糖尿病誘導組為 100% 作為基準值與其他實驗組比較，* 表 $p < 0.05$ ，與糖尿病誘導組比較達統計顯著。

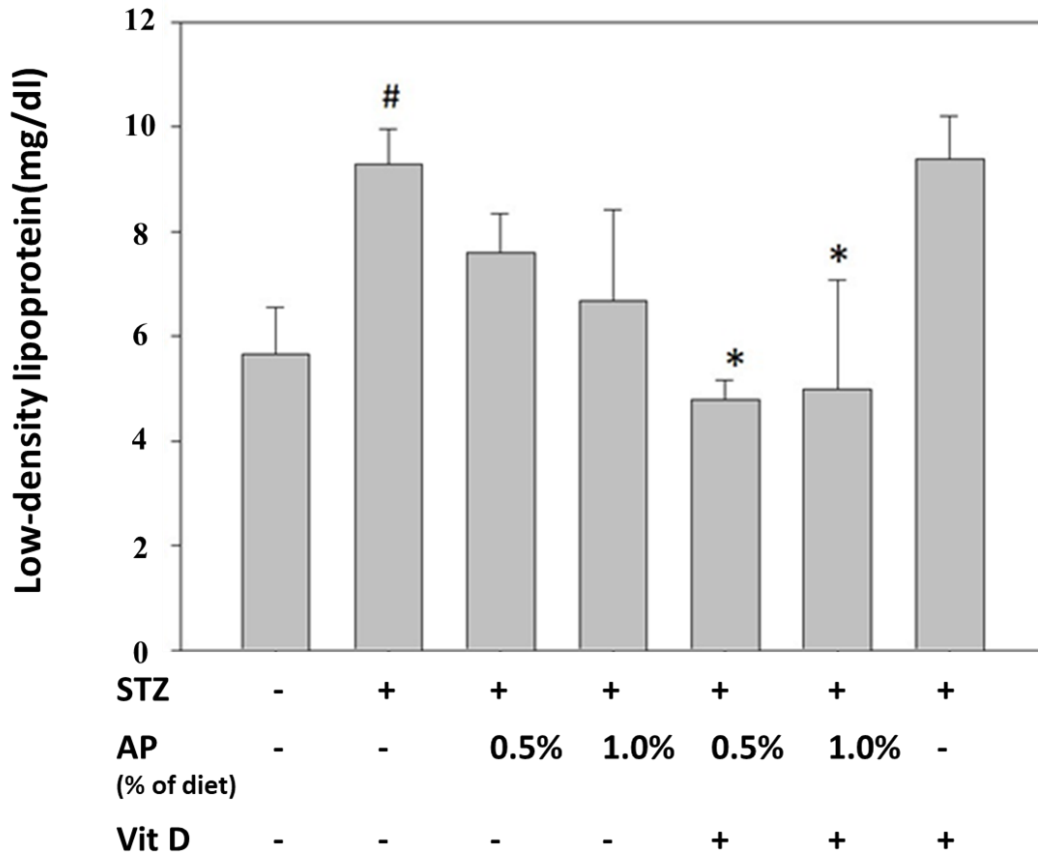


Figure 3. 實驗各組低密度脂蛋白數值

實驗結果顯示，蘋果多酚併用維生素 D 能有效降低糖尿病大白鼠血液中的低密度脂蛋白數值，效果勝過單獨給予蘋果多酚。以對照組為基準值與糖尿病誘導組比較，#表 $p < 0.05$ ，與對照組比較達統計顯著;以糖尿病誘導組為 100%作為基準值與其他實驗組比較，*表 $p < 0.05$ ，與糖尿病誘導組比較達統計顯著。

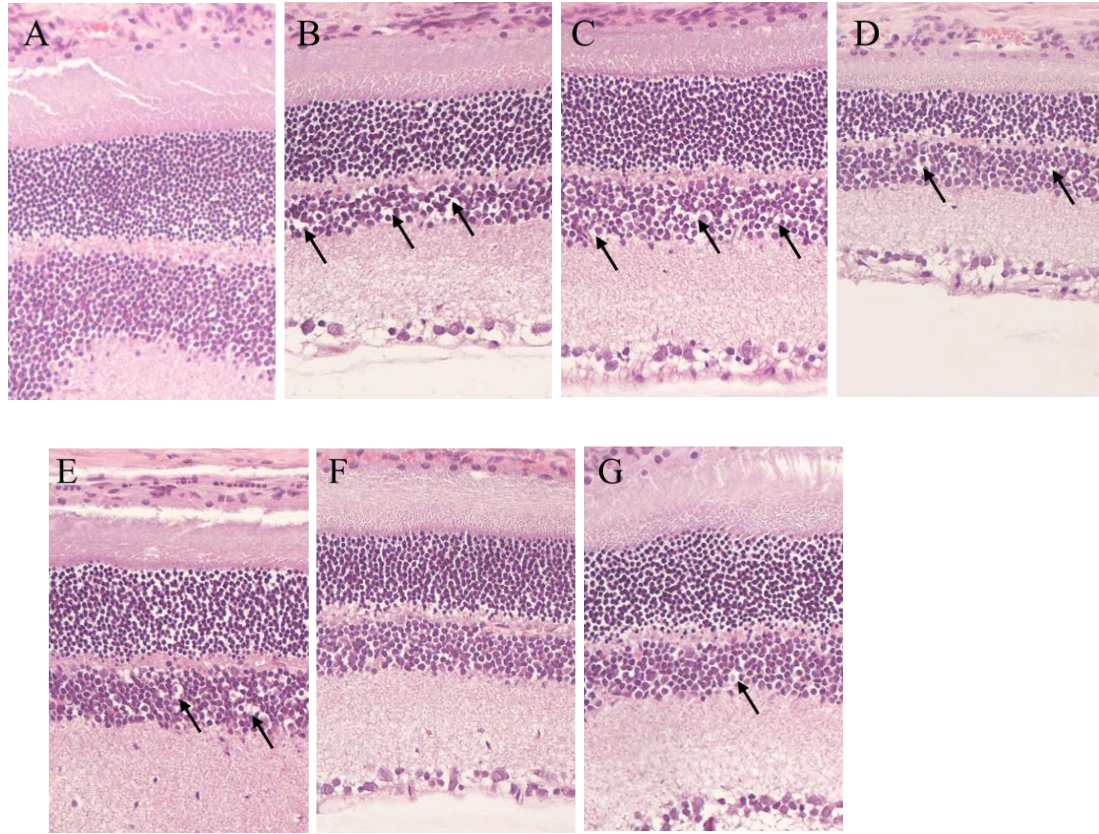


Figure 4. 蘋果多酚減少大白鼠視網膜組織之脂肪沉積量

顯微鏡下觀察 200 倍放大倍率之蘇木素-伊紅染色(HE stain)視網膜組織切片，圖中箭頭所指之處為脂質沉積處。可發現糖尿病組別的視網膜組織脂肪沉積的趨勢，然而高劑量的蘋果多酚能有效降低脂肪沉積量，並且在併用維生素 D 時，效果更為顯著。

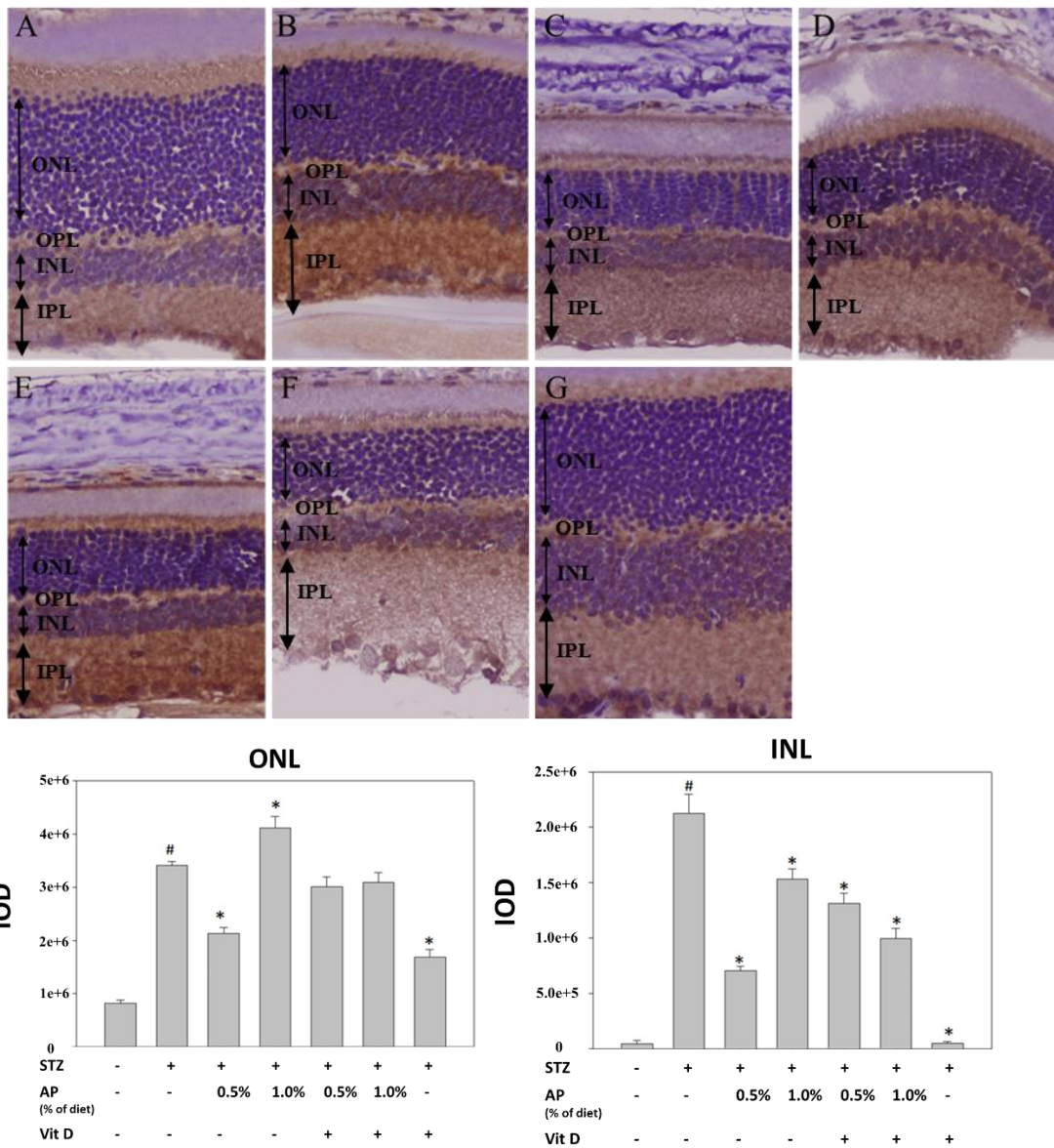


Figure 5. 蘋果多酚減少視網膜內核層之 Nrf-2 蛋白表現量

(上圖)顯微鏡下觀察 200 倍放大倍率之免疫組織化學染色(IHC)視網膜組織切片，圖中棕色呈色處為 Nrf-2 蛋白。(下圖)實驗各組 Nrf-2 蛋白之累積光密度(IOD)數值。不論是否併用維生素 D，蘋果多酚皆可降低視網膜內核層以及內外叢狀層之 Nrf-2 蛋白表現量，然而此結果在外核層並不顯著。IPL: 內叢狀層;INL:內核層;OPL:外叢狀層;ONL:外核層。

以對照組為基準值與糖尿病誘導組比較，#表 $p < 0.05$ ，與對照組比較達統計顯著;以糖尿病誘導組為 100%作為基準值與其他實驗組比較，*表 $p < 0.05$ ，與糖尿病誘導組比較達統計顯著。

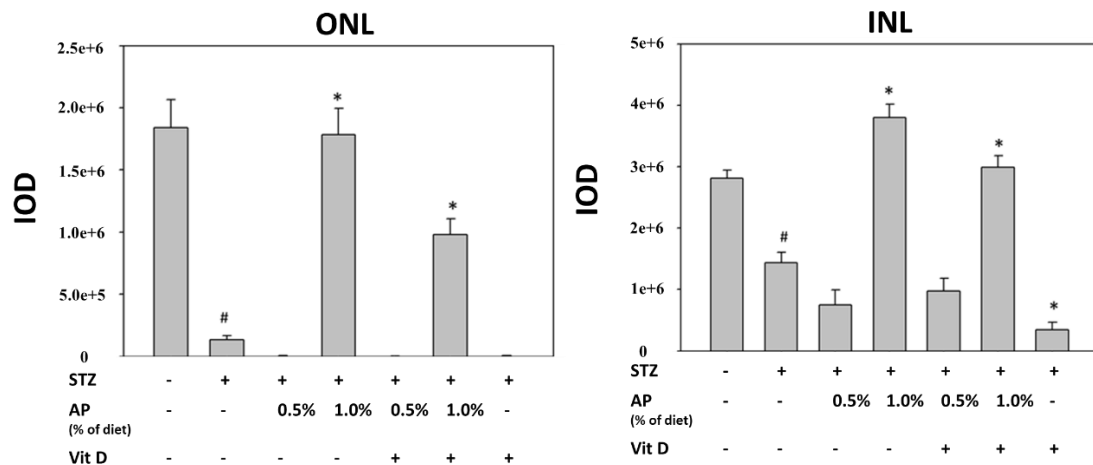
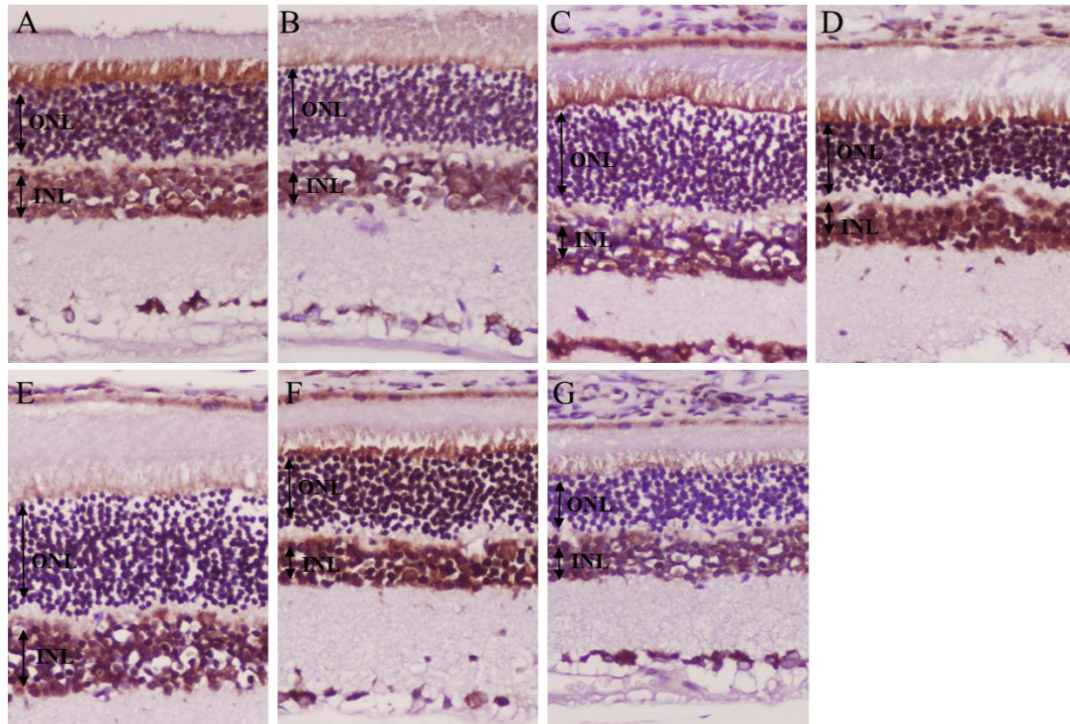
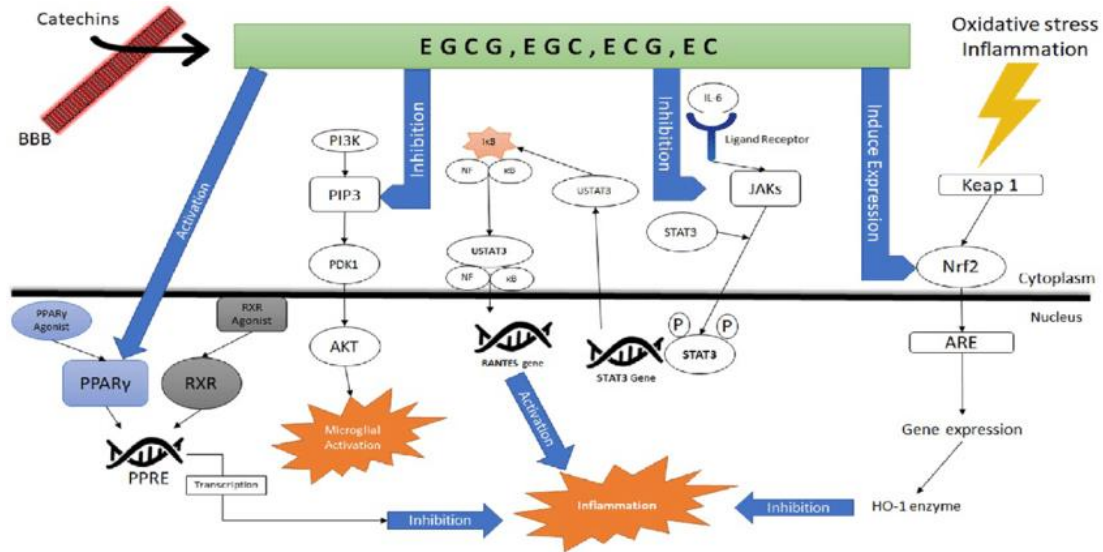


Figure 6. 蘋果多酚增加視網膜之 TGF-β 蛋白表現量

(上圖)顯微鏡下觀察 200 倍放大倍率之免疫組織化學染色(IHC)視網膜組織切片，圖中棕色呈色處為 TGF-β 蛋白。(下圖)實驗各組 TGF-β 蛋白之累積光密度(IOD)數值。高劑量的蘋果多酚不論是否併用維生素 D，皆可明顯增加 TGF-β 在視網膜外核層及內核層之表現量，然而當給予低劑量的蘋果多酚時則無法增加 TGF-β 的表現量。INL:內核層; ONL:外核層。

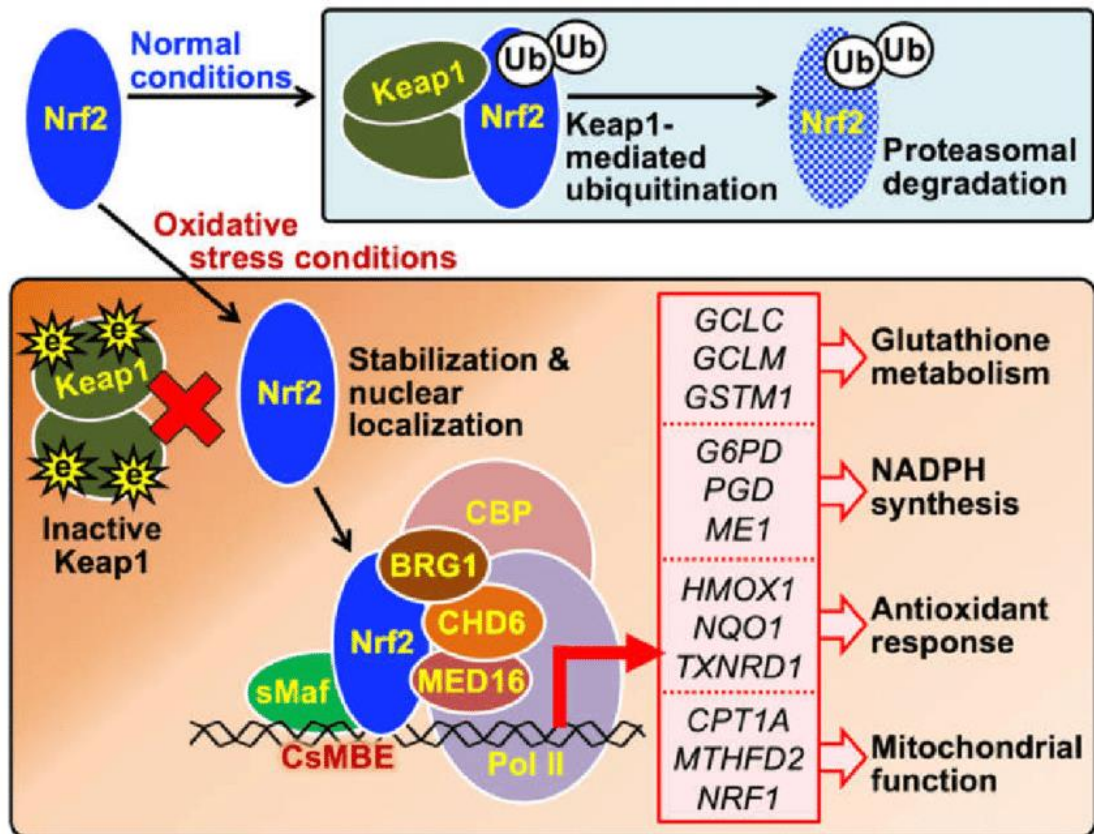
以對照組為基準值與糖尿病誘導組比較，#表 $p < 0.05$ ，與對照組比較達統計顯著;以糖尿病誘導組為 100%作為基準值與其他實驗組比較，*表 $p < 0.05$ ，與糖尿病誘導組比較達統計顯著。

第九章、附錄



附錄一、蘋果多酚之主成分兒茶素、表兒茶素等抗氧化、抗發炎之路徑

Akt: Protein kinase B; AMPK: AMP-activated protein kinase; ARE: antioxidant response element; EC: epicatechin; ECG: epicatechin-3-gallate; EGC: epigallocatechin; EGCG: epigallocatechin-3-gallate; HO-1: heme oxygenase-1; MAPK: mitogen-activated protein kinase; NF-κB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; Nrf-2: nuclear factor erythroid 2-related factor 2; PI3K: phosphatidylinositol 3 kinase; PPAR γ : peroxisome proliferation-activated receptor- γ ; PPRE: peroxisome proliferators response element; RXR: retinoid X receptor; STAT3: signal transducer activator of transcription 3.



附錄二、Nrf-2 啟動內生性抗氧化路徑之相關調節基因及蛋白

HMOX1: heme oxygenase 1; NQO1: NADPH quinone oxidoreductase 1; TXNRD1: thioredoxin reductase 1; G6PD: glucose-6-phosphate dehydrogenase; PGD: 6-phosphogluconate dehydrogenase; ME1: malic enzyme 1; GCLC: glutamate cysteine ligase catalytic subunit; GCLM: glutamate cysteine ligase modifier subunit; GSTM1: glutathione S-transferase μ 1; CPT1A: carnitine palmitoyltransferase 1A; MTHFD2: methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2; NRF1: nuclear respiratory factor 1.

全文完