

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

蘋果多酚減緩糖尿病腎病變之功效及其機轉之探討(第3年)

研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 98-2320-B-040-018-MY3
執行期間：100年08月01日至101年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學系

計畫主持人：李慧禎

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：王旨吟

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 101 年 10 月 30 日

中文摘要：糖尿病腎病變為末期糖尿病患之主要死因，在高血糖環境中所誘發的氧化壓力及衍生出之 oxLDL 可能是促進併發症的主要機轉。除了先前文獻的研究資料顯示糖尿病腎的致病機轉外，在我們預做的實驗中，也發現糖尿病引起腎臟病變的現象如下：(1) 在 HE stain 中顯示出 hydropic change；(2) 電鏡檢查中則出現腎絲球基底增厚的現象；(3) 在血脂肪亦出現高 LDL 及高 TG；(4) 腎臟組織中 lipid peroxidation 增加；(5) 腎臟組織中 GSH 減少及 catalase 活性下降。因此具有抗氧化能力的物質或許可以藉由提升糖尿病患體內之抗氧化能力及降低 oxLDL，來達到改善併發症的功效。本研究採用之蘋果多酚為天然抗氧化物，先前已知其具有抗癌症、抗氧化及抗發炎的能力，且對於 oxLDL 之氧化傷害及脂肪酸的氧化具有抑制作用，因此我們推測蘋果多酚應能有效清除細胞代謝高血糖所產生的過量自由基及降低 oxLDL，來減少氧化壓力與腎間質細胞的損傷，進而抑制糖尿病腎病變的形成。

本研究透過以 STZ 誘發第一型糖尿病之動物模式，證實蘋果多酚之抗氧化能力具改善糖尿病腎病變之效用並可改善檢體中的氧化壓力狀態。另外利用腎絲球細胞於氧化壓力下，蘋果多酚的抗氧化能力可改善氧化壓力及抑制細胞死亡。當腎絲球細胞於 oxLDL 存在下，蘋果多酚抑制 oxLDL 所造成的腎絲球損傷及抑制凋謝死亡。

從以上的研究結果，我們得知蘋果多酚有 (1) 改善糖尿病腎病變；(2) 抑制 high oxidative stress-induced mesangial cell damage 是經由抑制細胞死亡而產生；(3) 抑制 oxLDL-induced mesangial cell damage 是經由抑制細胞死亡。因此，以上的研究得知蘋果多酚有潛能發展為一種預防糖尿病腎病變之保健食品。

中文關鍵詞：蘋果多酚、糖尿病腎病變、氧化壓力、氧化型低密度脂蛋白、凋謝死亡

英文摘要：

英文關鍵詞：

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

期中進度報告
 期末報告

蘋果多酚減緩糖尿病腎病變之功效及其機轉之探討

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC98-2320-B-040-018-MY3

執行期間：98年08月01日至101年07月31日

執行機構及系所：中山醫學大學醫學院醫學系生化科

計畫主持人：李慧禎

共同主持人：

計畫參與人員：王旨吟

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 ____ 份：

移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

中 華 民 國 1 0 1 年 1 0 月 3 0 日

目錄

中文摘要.....	II
英文摘要.....	III
計畫內容.....	4
研究目的.....	9
相關之國內外研究.....	9
研究方法.....	10
結果與討論.....	12
重要參考文獻.....	13
計畫成果自評.....	16
圖與表.....	18

中文摘要

關鍵詞：蘋果多酚、糖尿病腎病變、氧化壓力、氧化型低密度脂蛋白、凋謝死亡

糖尿病腎病變為末期糖尿病患之主要死因，在高血糖環境中所誘發的氧化壓力及衍生出之 oxLDL 可能是促進併發症的主要機轉。除了先前文獻的研究資料顯示糖尿病腎的致病機轉外，在我們預做的實驗中，也發現糖尿病引起腎臟病變的現象如下：(1) 在 HE stain 中顯示出 hydropic change；(2) 電鏡檢查中則出現腎絲球基底增厚的現象；(3) 在血脂肪亦出現高 LDL 及高 TG；(4) 腎臟組織中 lipid peroxidation 增加；(5) 腎臟組織中 GSH 減少及 catalase 活性下降。因此具有抗氧化能力的物質或許可以藉由提升糖尿病患體內之抗氧化能力及降低 oxLDL，來達到改善併發症的功效。本研究採用之蘋果多酚為天然抗氧化物，先前已知其具有抗癌症、抗氧化及抗發炎的能力，且對於 oxLDL 之氧化傷害及脂肪酸的氧化具有抑制作用，因此我們推測蘋果多酚應能有效清除細胞代謝高血糖所產生的過量自由基及降低 oxLDL，來減少氧化壓力與腎間質細胞的損傷，進而抑制糖尿病腎病變的形成。

本研究透過以 STZ 誘發第一型糖尿病之動物模式，證實蘋果多酚之抗氧化能力具改善糖尿病腎病變之效用並可改善檢體中的氧化壓力狀態。另外利用腎絲球細胞於氧化壓力下，蘋果多酚的抗氧化能力可改善氧化壓力及抑制細胞死亡。當腎絲球細胞於 oxLDL 存在下，蘋果多酚抑制 oxLDL 所造成的腎絲球損傷及抑制凋謝死亡。

從以上的研究結果，我們得知蘋果多酚有(1)改善糖尿病腎病變；(2)抑制 high oxidative stress-induced mesangial cell damage 是經由抑制細胞死亡而產生；(3) 抑制 oxLDL-induced mesangial cell damage 是經由抑制細胞死亡。因此，以上的研究得知蘋果多酚有潛能發展為一種預防糖尿病腎病變之保健食品。

英文摘要

Key words : apple polyphenol 、 diabetic nephropathy 、 oxidative stress 、 oxidized low density lipoprotein 、 apoptosis

Diabetic nephropathy is a major mortal cause in patients with end stage diabetes. This disorder is associated with high glucose increasing the production of reactive oxygen species (ROS) or ROS-derived oxidized low density lipoprotein (oxLDL). Previous studies showed that ROS play a role in pathogenesis and pathophysiological mechanisms triggering diabetic nephropathy. In our preliminary data, in diabetic rats, we also find the phenomena as following: (1) showing hydropic change in kidney specimen (HE stain), (2) showing thickness in glomerular basement membrane (Electron microscope examination), (3) high LDL and high triglyceride in plasma, (4) increasing lipid peroxidation in kidney specimen, (5) reducing GSH and catalase activity in kidney specimen. According to the above, in diabetes, the usage of antioxidative materials might elevate antioxidation status and reduce oxLDL to decelerate the development of diabetic nephropathy.

Base on the previous studies, apple polyphenol possesses anti-cancer, anti-oxidation, anti-inflammation, and oxLDL-induced oxidative damage and fatty acid oxidation. In this study, we used apple polyphenol to address this issue. We assumed that apple polyphenol possesses the ability to reduce high glucose induced ROS and oxLDL, to reduce oxidative damage and mesangial cell damage, and further to ameliorate diabetic nephropathy.

We used streptozotocin to induce type 1 diabetes in SD rat, and the results show apple polyphenol can improve the progression of diabetic nephropathy and the oxidative status. When the mesangial cell is given high oxidative stress, apple polyphenol can decelerate the oxidative stress and cell apoptosis. As well as the oxidative stress, oxLDL also cause mesangial cell death and induce higher oxidative stress. Apple polyphenol improve the oxLDL-induced cell damage.

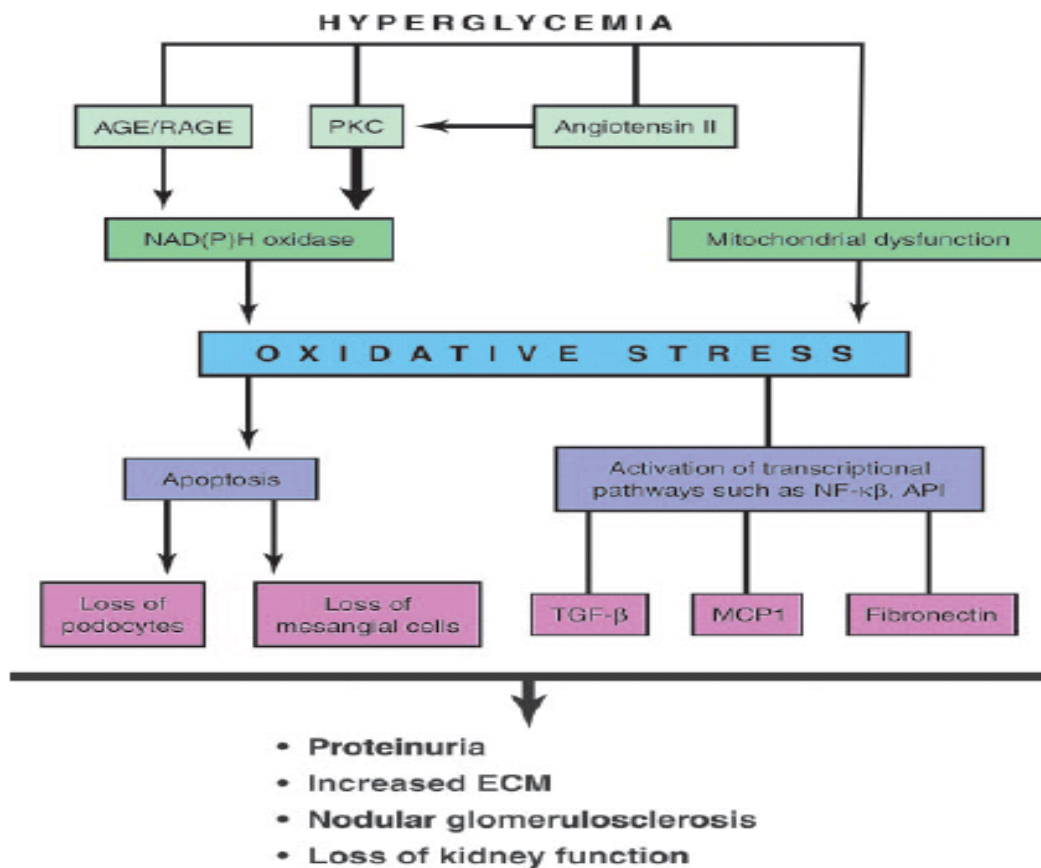
Taken the above together, we prove apple polyphenol possess the effects including: (1) decelerating diabetic nephropathy, (2) decreasing high glucose-induced mesangial cell damage via reducing cell death; (3) decreasing oxLDL-induced mesangial cell damage via reducing cell death. According to those, the apple polyphenol possesses the potential to develop to a health-caring food in ameliorating diabetic nephropathy.

一、計畫內容

【前言】

壹、糖尿病腎病變(Diabetic Nephropathy):

糖尿病腎病變主要是歸因於細胞外基質 (extracellular matrix; ECM)的堆積，使得腎絲球 (glomerular)及腎小管基底膜 (tubular basement membranes)增厚；增加腎絲球間部基質 (mesangial matrix)，造成腎絲球硬化及腎小球纖維化。糖尿病腎病變會使腎功能惡化，其病理上的改變伴隨著高度的浸潤 (hyperfiltration)及蛋白尿 (microalbuminuria) (Fioretto, 2007)。組成腎臟的細胞包括: glomerular endothelia, mesangial cells, podocytes, 及 tubular epithelia 等。許多研究顯示高血糖是造成糖尿病血管併發症的原因之一，高血糖可以活化不同型態的腎臟細胞經由不同的訊息路徑，其代謝路徑產生葡萄糖中間產物-高度醣化終產物 (advanced glycation products; AGEs)、活化 protein kinase C (PKC)、增加 transforming growth factor- β (TGF- β)的表現、GTP-binding protein 及產生活性氧(reactive oxygen species; ROS)等 (如下圖)。另外，由血糖代謝異常而引起的脂肪代謝異常，因此在糖尿病人血中脂質會增加，特別是低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL)。由於高血糖所衍生的自由基增加，也會使得細胞中氧化型低密度脂蛋白 (oxidized, oxLDL)增加而造成腎臟細胞的損傷以加速腎病變 (Hammad, 2003)。

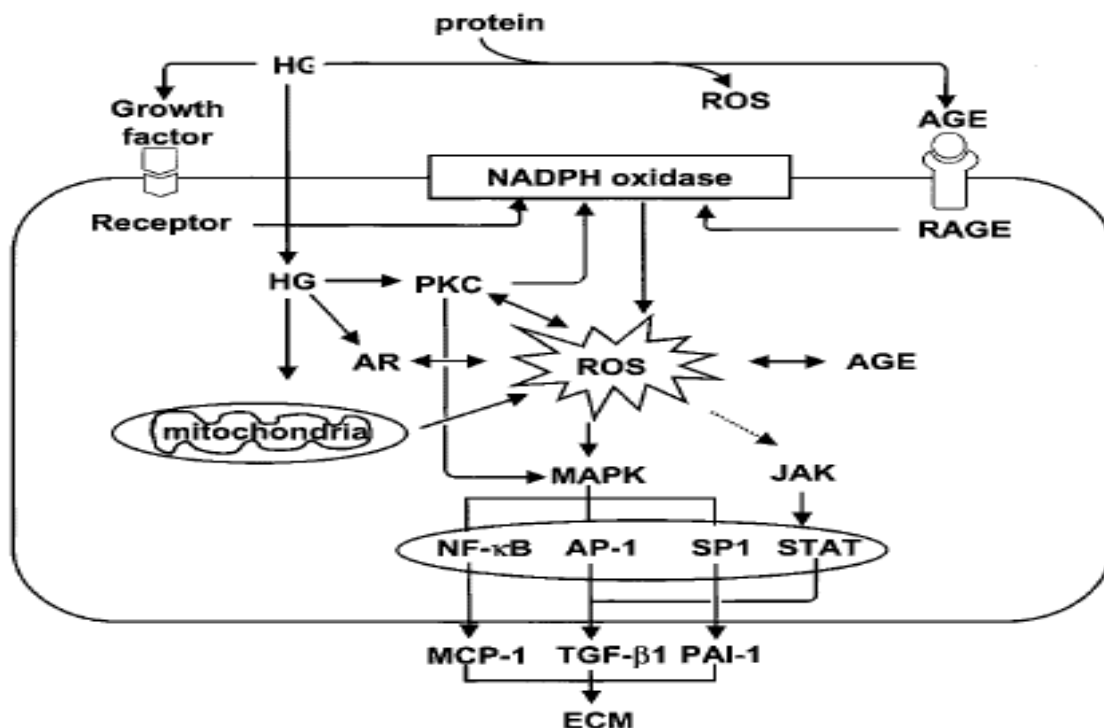


J Am Soc Nephrol, 2007

(一). Production of ROS in diabetes

生物體在正常的代謝過程中，原本就會產生自由基與 ROS，包含 superoxide (O_2^-)、hydroxyl radical ($OH\cdot$)、hydrogen peroxide (H_2O_2)和 nitric oxide (NO)等，這些自由基會攻擊體內蛋白質、脂質、核酸等大分子，對生物體造成氧化傷害。In vitro 實驗指出，背根神經細胞 (dorsal root ganglia cells)加入 10-20mM 葡萄糖會增加 $O_2\cdot^-$ 、 H_2O_2 的產生，導致脂質的氧化及神

經細胞的死亡，當加入 IGF-1 部分抑制了 ROS 的產生，則細胞死亡的現象受到抑制 (Russell, 1999)。氧化壓力與糖尿病之間的關係相當密切，在第一型的糖尿病人(type I)氧化壓力是年幼的病人早期診斷的指標；隨著病程的進展，抗氧化能力降低、血清中脂質過氧化產物增加，皆與血糖的控制程度相關 (Tsai, 1994)。第二型糖尿病人其脂質过氧化物的增加與年齡成正相關，並且血清中的 GSH 和 GSH 代謝相關的酶降低，抗氧化能力降低，直接造成複雜的併發症 (Altomare, 1992; Zaltzberg H, 1999)。



J Am Soc Nephrol 2003

(二).Relevance of AGEs in the pathogenesis of Diabetic nephropathy

在提高濃度之下的葡萄糖會經由“非酶”的作用 (nonenzymic reaction)與蛋白質上的胺基酸形成一醴化殘基稱為 Amadori products，之後經由一系列的脫水及片段的反應，Amadori products 形成穩定的共價產物稱為高度醴化終產物: AGEs (Thornalley, 2002)。這些醴化的蛋白直接與葡萄糖的濃度有關，其產生都是因為血糖控制不佳而引起。研究顯示 AGEs 能引起糖尿病病人的氧化壓力進而促使腎病變的發生 (Singh, 2001)。

AGEs 結合至細胞表面的接受器稱為 RAGE (receptor for AGE)；屬於 Ig superfamily 中的一員。細胞內的 AGEs 與接受器結合會啟動一系列的訊號傳遞包括活化 PKC、MAPKs、轉錄因子如 NF-κB 等，接著增加各種生長因子的活性如 TGF-β，以及改變 ECM 中的蛋白表現 (Jakus, 2004)。除此之外，AGEs 與 RAGE 結合後會透過 NADPH oxidase 而產生 ROS (Deuther-Conrad, 2001)。因此 AGEs 引起 ROS 的產生參與了血管內皮細胞的活化及糖尿病血管併發症 (Cameron, 1999; Mullarkey, 1990)。

(三).The polyol pathway (多元醇路徑)

Aldose reductase 可將有毒的 aldehydes 轉換成 alcohols。正常情況下葡萄糖與此酶的親合力很低，但在高糖的情況下，細胞內增加的葡萄糖會經由 aldose reductase 與 NADPH 作用代謝成山梨糖醇 (sorbitol)，sorbital 因不易穿透過細胞膜，因此使細胞內滲透壓增加，導致水分堆積造成組織水腫及細胞氧化壓力增加，產生病變 (Steves, 1993)。另一方面，glutathione disulfide (GSSG) 還原成 glutathione 過程中需要 NADPH 作為輔因子，而在 polyol pathway 代謝過程中會消耗大量 NADPH，影響 GSH 之還原，隨後削弱了 GSH 的抗氧化作用。

(四). Protein kinase C (PKC) activation

Dihydroxyacetone (DHAP)為醣解作用之中間產物。在高糖環境下，DHAP 會經 NADH 還原成 glycerol-3-phosphate，再進一步醞化 (acylation) 生合成 diacylglycerol (DAG)。DAG 會活化蛋白質激酶 C (protein kinase C; PKC)，或者經由 ROS 的產生而活化 PKC (Li, 2006)。PKC 的活化會導致內皮細胞失去功能，伴隨著降低 NO 的產生、增加 endothelin-1 及 VEGF (vascular endothelial growth factor) 的表現，導致血流異常及不正常血管新生作用 (Inoguchi, 2003)。另外，研究指出，糖尿病的老鼠其視網膜、腎臟及微小血管都有大量 PKC 表現，不過目前沒有足夠的證據顯示 PKC isoforms 活性的改變與週邊神經元有關 (Lee, 1989)；這顯示了非神經元的細胞中 PKC 的活化主要透過 DAG (Ishii, 1998)。一旦 PKC 活化，接著會活化 MAPKs 及轉錄因子而改變基因的調控 (Tomlinson, 1999)。MAPKs 有三個成員：ERK1/2, JNK, p38 等，在糖尿病老鼠的背根神經細胞皆會被活化，之前研究顯示，給予抗氧化劑會降低 ERKs 的活化，但是增加 JNK 的表現，推測其 ERKs 與血管損傷有關，而 JNK 則是保護的角色 (Tomlinson, 1999)。Oh-Hashi 等人也指出 peroxynitrite 會因起神經母細胞 (neuroblastoma cells) 產生氧化壓力而活化 p38，導致細胞生長停滯及細胞凋亡 (Oh-Hashi, 2001)。目前的研究仍須再釐清 MAPKs 在糖尿病腎病變中期訊息傳遞路徑的機制。

(五). High glucose induced Cellular damage pathways via TGF- β

AGEs、ROS、DAG、及 PKC 皆可活化 TGF- β 的訊息傳遞路徑 (Leak, 2004)，另外還有高糖所造成的傷害包括血管活性物質 (vasoactive substances): angiotensin II、endothelin、thromboxane，及 cyclical stretch (Wolf, 2006)。研究指出在 *in vitro* 腎絲球間質細胞 (mesangial cell) 中，發現造成糖尿病腎病變致病因素與 TGF- β 表現增加有關 (Chen, 2001; Kim, 2005)。最終的結果導致 ECM 中的蛋白不正常的聚集，Ziyadeh 等人也指出在糖尿病腎病變中，TGF- β 是 ECM 病理上致病的主要細胞激素 (cytokine) (Ziyadeh, 2004)。首先，TGF- β 與 type II receptor 結合，之後與 Smad2 及 Smad3 作用，與 Smad4 形成複合體 (Co-Smad4)，接著與 TGF- β target genes 的 promoters 結合例如: collagen α 1、PAI-1、Jun B、c-Jun 及 fibronectin 等，進而調控其轉錄 (Schiffer, 2000)。除了 Smads 之外，MAPKs (ERK1/2, c-Jun, p38, JNK/SAPK) 也參與在高糖所導致的 TGF- β 訊息路徑 (Schiffer, 2000)；MAPKs 亦可透過 AP-1 (activated protein-1) 調節 ECM 基因的轉錄，首先 AP-1 受到 ERK 及 JNK 調控，之後與 Smad3/4 形成複合體而結合到 TGF- β target genes 的 promoters 上，顯示在高糖的情況下，Smads 和 MAPKs 的路徑兩者產生 cross-talk (Schiffer, 2000)。因此，不管在 *in vitro* 或是 *in vivo* 的高糖模式中，TGF- β 之生物活性都扮演重要的角色。

(六). High glucose induced Cellular damage pathways via excess ROS production

在健康細胞 ROS 的產生受到嚴密的監控，當代謝失調而過渡表現 ROS，導致細胞受損。ROS 中的 O₂-及 NO 結合其形成 highly reactive peroxynitrite，進而攻擊且抑制蛋白質及脂質。除此之外，O₂-及 NO 可以攻擊酶的鐵硫中心 (iron-sulfur centers) 和其他蛋白質而釋放鐵原子，隨後抑制了酶及蛋白質的活性，包括電子傳遞鏈的 complexes I-III 的重要蛋白 (Brown, 1999)。脂質主要存在血漿、粒腺體及內質網膜上等，皆是 ROS 主要的目標 (target)；脂質氧化的終產物如: lipid peroxides，其會對細胞產生毒性，須經由 GSH 將其分解去除。同樣的，蛋白質及核酸也會被過氧化和 nitrosylation。即使這些終產物通常不會對細胞直接造成毒性，但這些不活化的蛋白會聚集，使細胞重複利用他們的能力負荷過重，最後導致 DNA 受損而開啟了細胞凋亡的機制。因此，轉錄因子的氧化修飾 (oxidative modification) 不僅降低許多蛋白的表現如: 細胞凋亡抑制因子、complex I 及 Bcl2 等，而且導致壓力蛋白的表現增加如: cyclooxygenase 2、poly-ADP ribose polymerase 和 JNK 等 (Paschen, 2001; Pugazhenti, 2003)。氧化壓力所導致嚴重的結果被認為是 DNA modifications，其會產生基因體的不穩定及突變 (Bohr, 1999)，況且粒腺體的 DNA 對於氧

化傷害相當的敏感導致能量調控異常，尤其對於需要高能量的神經元格外重要。氧化壓力造成的神經元退化存在許多的神經退化疾病中 (Kikuchi, 2002)。

(七). High glucose induced Cellular damage pathways via excess oxLDL production

(1) 高糖分與脂質的氧化

由先前研究得知高血糖環境下顯著地增加倉鼠體內的氧化損傷，而胰島素的給予，能顯著降低糖尿病倉鼠的脂質及蛋白質氧化損傷程度和低密度脂蛋白(LDL)的糖化程度 (Adeli K, 2001)。這樣的結果說明了高血糖會促使脂質過氧化及蛋白質糖化的過程更加速的進行。若能抑制高血糖則可減少低密度脂蛋白(LDL)的早期氧化。綜而言之，極低密度脂蛋白(VLDL)、三酸甘油(TG)的濃度升高，與高密度脂蛋白(HDL)的值下降，有可能是連貫胰島素不敏感性到第二型糖尿病的過程，若糖尿病患者不能控制不良脂質攝食、不良脂蛋白的產生，且又欠缺某些抗氧化營養素(維生素 C、E)，就有可能會造成大小血管病變的發生。

(2) 糖尿病/脂質氧化和糖尿病腎病變之關聯

研究糖尿病與腎臟病的模式，是以大鼠尾靜脈注射 Streptozotocin (STZ 100mg/kg) 後二個月，血糖增加約 90%，其體重降低約 20%，食量增加約 73%，飲水量增加約 162%，排尿量增加約 70%，腎臟/體重比增加約 46%，尿中蛋白質含量約增加 4.2 倍，尿中白蛋白/肌酸酐比值約增加 4.4 倍，這些就是糖尿病的標準症狀。前述高脂血症及動脈硬化是糖尿病人常見的現象，但高脂血症在實驗動物模式中可導致腎絲球的硬化 (Hammad, 2003; Maiti, 2004; Murali, 2003)。而在已有腎臟病之動物中，更會受高脂血症影響而加速腎臟病之惡化。由於糖尿病患者腎病變的主要變化，是腎絲球的硬化現象，而此種腎絲球的硬化與動脈硬化在型態上很相似，因此糖尿病人的高脂血症與腎絲球的硬化現象可能有密切相關。當低密度脂蛋白(LDL)隨糖尿病病程而增加的同時，其影響腎絲球所產生之收縮性介質 ET-1 (Endothelin-1)會持續增加，但擴張性介質如 PGE 則降低，此與長期糖尿病腎絲球之硬化有密切相關。早期糖尿病腎病變之進行有所關連，oxLDL 可能經由刺激腎臟間質細胞 ET-1 之基因表現，來影響慢性腎臟病變的進行。

一氧化氮(NO)是一種體內訊息傳遞因子，具有強力的血管舒張特性，並且在腎臟能自行合成。學者研究發現尿液中一氧化氮代謝產物的量，在糖尿病誘發後第二天中度高血糖組及重度高血糖組尿液中，一氧化氮代謝物就有明顯增加的現象，並且在實驗的四十二天期間均持續上升 (Granstam, 2003; Wu, 1999)。其產量和血糖值($r=0.77$)以及尿鈉排泄量($r=0.59$)呈現明顯的正相關。於腎臟傳訊者核糖核酸的測定方面，先前研究發現於可誘發式一氧化氮合成酵素傳訊者核糖核酸在腎臟各部位並無變動，但是構成一氧化氮合成酵素傳訊者核糖核酸則在外側髓質以及腎乳頭區域表現量有增加，但於皮質則無變化。由以上的實驗結果得知，高血糖會影響一氧化氮的合成，且一氧化氮可能和糖尿病早期的利鈉、利尿作用有關聯。而腎臟一氧化氮合成酵素有增加的區域在外側髓質與腎乳頭，且只有構成一氧化氮合成酵素在糖尿病狀態下被誘發。在糖尿病早期腎臟一氧化氮合成量的增加，與糖尿病早期腎病變的進行有關連。

(八). cellular antioxidant defense

抗氧化劑可提供一個氫原子給自由基而終結氧化還原反應。細胞可維持一定量的抗氧化劑，可經由飲食的攝取及體內自行合成，使其具有抗氧化能力。過多的自由基產生會消耗細胞內的抗氧化劑，導致氧化壓力。在第二型糖尿病人其血糖濃度增加，而增加自由基的產生和降低抗氧化劑 (Tessier, 1999)。分析抗氧化系統中各別的 vitamins A 和 E，發現在糖尿病人的組成明顯的改變。

(1) Dietary antioxidant

水溶性的 vitamins C 和脂溶性的 vitamins E 是哺乳動物細胞中的抗氧化系統。Vitamins C 是血漿中最重要之抗氧化劑，其可形成第一線防禦系統去抵抗脂質的過氧化 (Frei B, 1990)。Vitamins E 主要有兩類衍生物，分別是生育醇 (tocopherol)，其結構式具有飽和之側鏈；另一個是生育三醇 (tocotrienol)，其結構式則具有不飽和之側鏈。每一類又根據 chromanol 環尚甲基位置與數量知不同，共包含四個同質異構物 (α 、 β 、 γ 及 δ) 與 DL- α -tocopherol，不同的異構物的性質已被辨識出來，其中又以 α 生育醇 (α -tocopherol) 之活性最高，而主要的抗氧化作用在於清除脂質過氧化所產生的自由基 (Di Mambro, 2003)。然而，tocotrienol，而不是 tocopherol，經由每日飲食補充而具有抑制腫瘤血管新生的效果 (Inokuchi, 2003)。研究顯示 tocotrienol 可以直接調控 12-lipoxygenase 的活性，因而具有神經保護的能力有別於抗氧化能力的作用 (Khanna, 2003)。

(2) GSH (Glutathione)

是大部分哺乳動物細胞中最重要的抗氧化劑，由三種胺基酸組成，分別是甘胺酸 (glycine)、半光胺酸 (cysteine)、麩胺酸 (glutamic acid)，具有獨特的硫醇 (thiol) 性質是一個有效的還原劑。大多數的細胞經由 de novo 的方式合成 GSH，GSH 在哺乳動物細胞中主要的濃度為 0.2—10mM (Anderson, 1998)。GSH 最重要的角色是當一個水溶性的抗氧化劑，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。除此之外，GSH 亦與胺基酸的運送、DNA 合成有關、維持具有硫醇的蛋白質於還原形式的正常功能，並與有毒的物質結合 (如 xenobiotics)，使其在細胞的濃度減少 (Hayes, 1999)。在參與還原反應之後，GSH 會經由 GSSG reductase 與 NADPH 作用而再合成 GSH。研究指出，氧化性傷害會消耗細胞內的 GSH (Rizzardini, 2003)；相反的過度表現 glutathione-S-transferase 於神經母細胞，會增加其對氧化壓力的抗性 (Xie, 2001)。

(3) antioxidant enzymes

除了酶其可合成及維持抗氧化分子如 GSH 之外，還有一個獨特的酶為 SOD (superoxide dismutase)；其具有三個異構物: cytosolic CuZn-SOD (SOD1)、mitochondrial SOD (SOD2)，及 extracellular SOD。Extracellular SOD 其結構與 SOD1 相似，其主要位於細胞外的空間。SOD 可以將 O_2^- 轉換成 H_2O_2 及氧。降低 SOD2 的表現會導致粒線體的 GSH 降低及增加氧化壓力 (Williams, 1998)，完全將 SOD2 踢除會造成老鼠一出生則因為腎功能不全而死亡 (Lebovitz, 1996)。Catalase 是一個位於細胞質的酶，其可將 H_2O_2 轉換成水，因此其活性必須 SOD 是活化的。

貳、蘋果多酚 (apple polyphenol)

多酚 (polyphenols) 廣泛存在於植物中，多酚的分類主要依據其結構而分為 phenolic acids、flavonoids、stilbenes 及 lignans (Scalbert, 2000)，其存在許多的飲料 (如: 紅酒及綠茶) 和食物 (如: 巧克力、葡萄及蘋果) 中。最近的研究顯示每天攝取的 flavonoid 為 total phenols 0.15-1g (Scalbert, 2000; Stahl, 2002)，飲食中的多酚被認為可預防各種退化性疾病 (Scalbert, 2005)；在 in vitro 具有抗氧化的能力 (Rice, 2000)；疾病存在著氧化壓力時具有保護的作用，例如心臟血管疾病、癌症及發炎等 (Scalbert, 2005)。

Apple (Rosaceae Malus sp.) 自古以來為廣泛食用的水果之一，除了直接食用之外並可製成成果汁、果醋及果醬等。其含有豐富且不同種類之多酚，包括 hydroxycinnamates、flavan-3-ols、flavonols、dihydrochalcones 及 anthocyanins 等，不同種類的蘋果則含不同類型之多酚 (Manach, 2004; Kahle, 2005)。然而蘋果多酚與綠茶及葡萄籽多酚的種類是不同的，在綠茶中主要之多酚為 flavan-3-ols (例如: epigallocatechin gallate, 及 catechin) (Shahidi, 1995)；而葡萄籽主要之多酚為 proanthocyanidins (Krueger, 2000)。相反的，蘋果多酚包含主要酚酸衍生物及其它 flavonoids。

蘋果多酚已經被證實有許多的生理功能包括：

1. 增加老鼠血中的抗氧化能力 (Breinholt, 2003)
2. 在 obese Zucker rat 中延緩 hypercholesterolemia, oxidative stress 及 renal dysfunction 的發

展 (Aprikian, 2002)

3. 抑制低密度脂蛋白氧化 (Pearson, 1999)

4. 在 ApoE-deficient mice 中延緩動脈粥狀硬化 (Auclair, 2008)

5. Eberhardt 等人指出新鮮蘋果在腸癌及肝炎細胞具有抗發炎的能力 (Eberhardt, 2000)。

6. 在 in vitro 及 in vivo 抑制某些酶及接受器的活性 (Saito, 2002)

這些研究顯示蘋果多酚具有很好的抗發炎及抗氧化能力，基於此類作用所衍生出的疾病保護效果，值得更進一步詳加探討。

參、糖尿病鼠的動物模式 (Animal model of diabetes mellitus)

為了要深入探討糖尿病導致腎病變的機制，利用動物模式做為研究的對象

動物模式: 在誘導大白鼠產生糖尿病大都是利用腹腔注射化學藥物去破壞胰島的功能。最常使用的化學藥物如 Alloxan、streptozotocin 來誘導糖尿病發生。而我們主要以 streptozotocin 作為誘導劑。Streptozotocin，也被簡稱為 STZ，經常用於動物實驗中誘導糖尿病的發生。STZ 可以誘發動物第一型及第二型糖尿病的產生，在已成年大白鼠上注射單一高劑量 (50-65mg/kg) 或是以多次低劑量注射 (25-30mg/kg)，兩者都可誘發第一型糖尿病 (IDDM)；而在未成年大白鼠出生 1-5 天內注射單一高劑量，可誘發成年後第二型糖尿病 (NIDDM)。STZ 誘導糖尿病的機轉分為下列三種：

- (1). 傷害胰臟 β -cell 的細胞膜，使其功能受損，而無法正常釋放出胰島素 (Insulin) 調節身體內葡萄糖代謝。
- (2). 讓粒線體 (mitochondria) 大量產生自由基的累積。
- (3). 造成胰臟 β -cell DNA 的 damage，DNA 的鍵結斷裂，STZ 主要是針對於 DNA 序列中 GGG 中央的 guanine 或 3' 端的兩個 guanine，藉由甲基化 (methylation) 造成 DNA 的傷害，使 β -cell 走向 apoptosis，最後導致糖尿病發生 (Bolzan, 2002)。

【研究目的】

糖尿病腎病變為末期糖尿病患之主要死因，在高血糖環境中所誘發的氧化壓力及衍生出之 oxLDL 可能是促進併發症的主要機轉。在我們預做的實驗中也發現糖尿病會引起腎臟病變，現象如下：(1) 在 HE stain 中顯示出 hydropic change；(2) 電鏡檢查中則出現腎絲球基底增厚的現象；(3) 在血脂肪亦出現高 LDL 及高 TG；(4) 腎臟組織中 lipid peroxidation 增加；(5) 腎臟組織中 GSH 減少及 catalase 活性下降。因此具有抗氧化能力的物質或許可以藉由降低糖尿病患者體內的氧化壓力及降低 oxLDL，來達到改善併發症的功效。如果可以提升糖尿病患體內之抗氧化能力，應能改善因氧化壓力所帶來的損傷與併發症之發生。而本研究採用之蘋果多酚為天然抗氧化物，目前已知其具有抗癌症、抗氧化及抗發炎的能力，且對於 oxLDL 之氧化傷害及脂肪酸的氧化具有抑制作用，因此我們推測蘋果多酚應能有效清除細胞代謝高血糖所產生的過量自由基及降低 oxLDL，來減少氧化壓力與腎間質細胞的損傷，進而抑制糖尿病腎病變的形成。

本研究目的：

第一年：以 STZ 誘發第一型糖尿病之動物模式，來探討蘋果多酚之抗氧化能力對改善糖尿病腎病變之影響及其機制探討；

第二年：利用腎絲球細胞於高糖環境下，探討蘋果多酚的抗氧化效果及清除自由基能力，以及高糖產生 ROS 的機制探討。

第三年：利用腎絲球細胞於 oxLDL 存在的狀況下，探討蘋果多酚抑制 oxLDL 所造成的腎絲球損傷及其相關的機轉。

【相關之國內外研究】

壹、關於具抗氧化性天然萃物減緩糖尿病腎病變之研究

1. 在糖尿病併有高血壓的大白鼠中，以綠茶萃物 (green tea, *Camellia sinensis*) 可藉由 down-regulate Nox4 NADPH oxidase 而減緩糖尿病腎病變 (Ribaldo, 2008)

2. 在糖尿病鼠中，葡萄籽前花青素萃物可減低 AGEs 及 bone morphogenetic protein-7 以延緩糖尿病併發症 (Li, 2008)

3. 在糖尿病鼠中，紅色甘藍菜可減緩糖尿病腎病變 (Kataya, 2008)

貳、關於蘋果多酚功效之研究

1. 增加老鼠血中的抗氧化能力 (Breinholt, 2003)

2. 在 obese Zucker rat 中延緩 hypercholesterolemia, oxidative stress 及 renal dysfunction 的發展 (Aprikian, 2002)

3. 抑制低密度脂蛋白氧化 (Pearson, 1999)

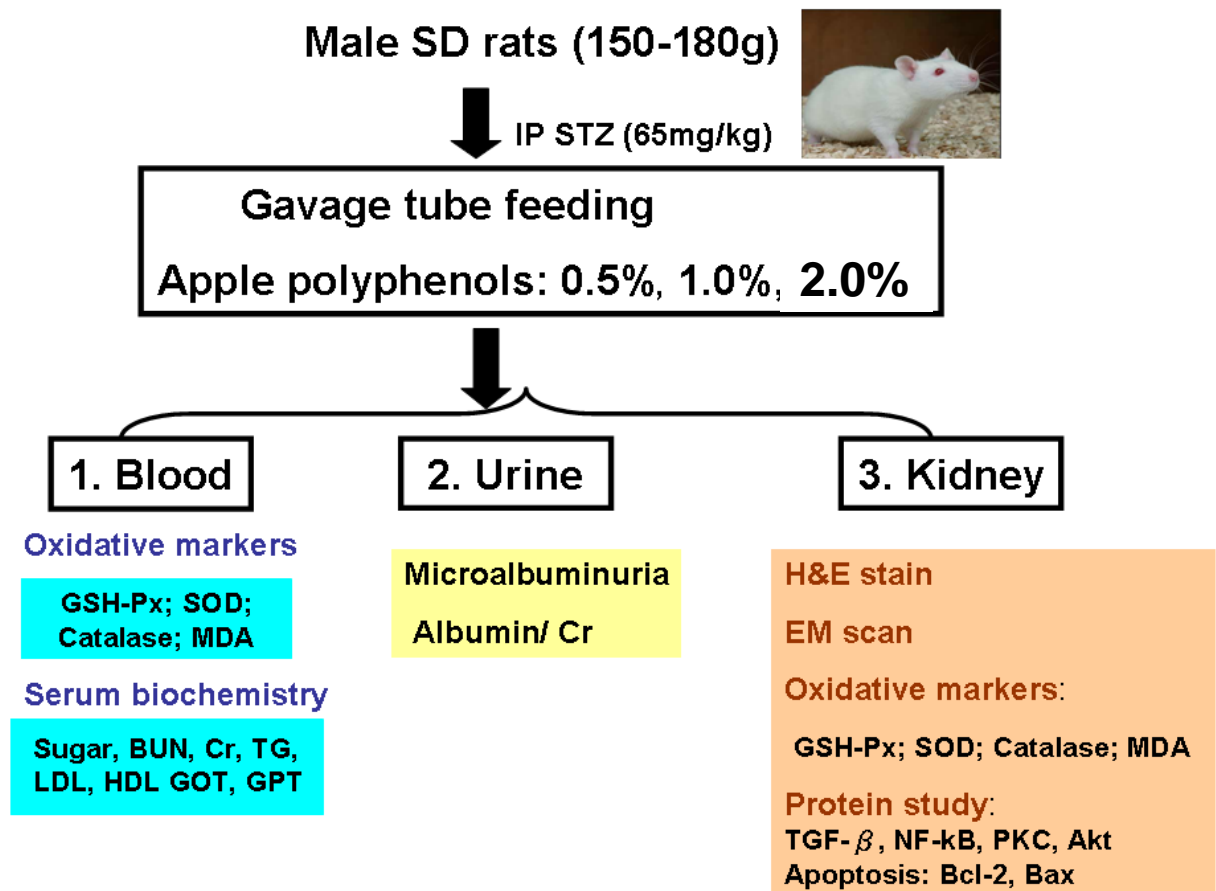
4. 在 ApoE-deficient mice 中延緩動脈粥狀硬化 (Auclair, 2008)

5. Eberhardt 等人指出新鮮蘋果在腸癌及肝炎細胞具有抗發炎的能力 (Eberhardt, 2000)。

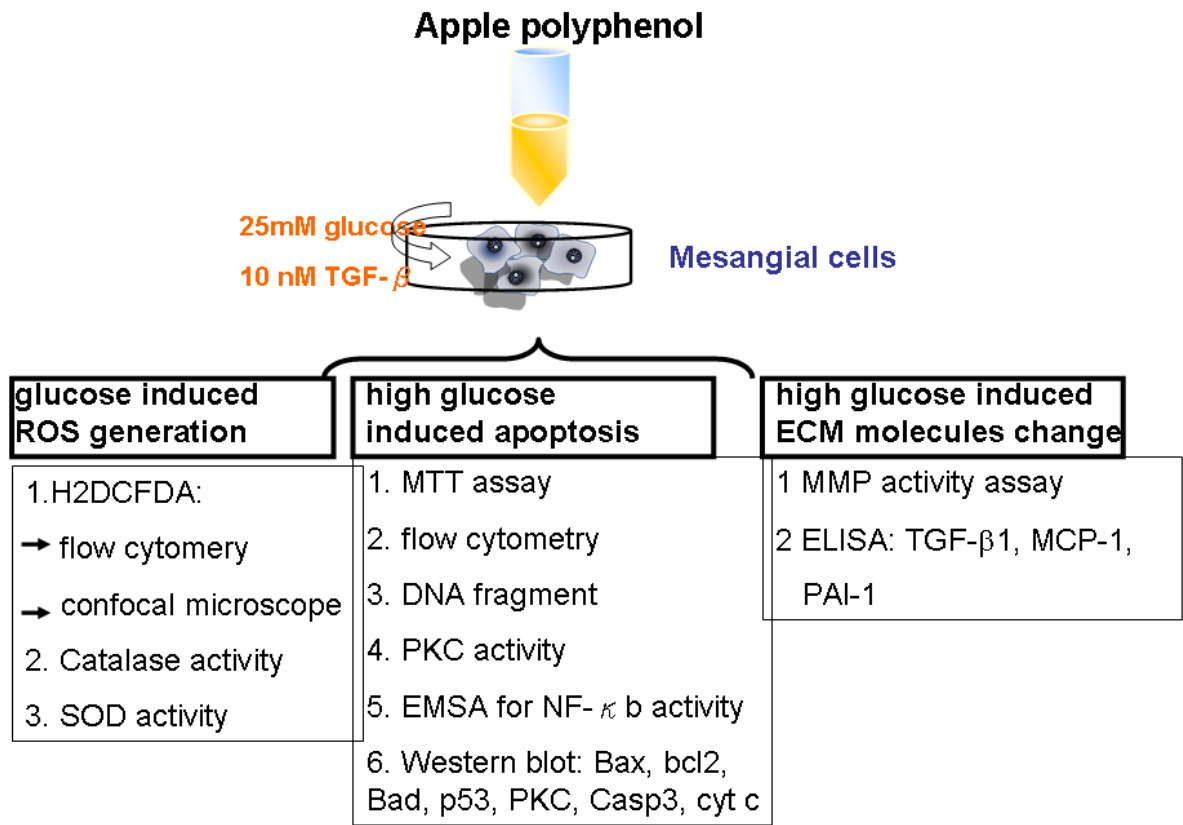
6. 在 in vitro 及 in vivo 抑制某些酶及接受器的活性 (Saito, 2002)

【研究方法】

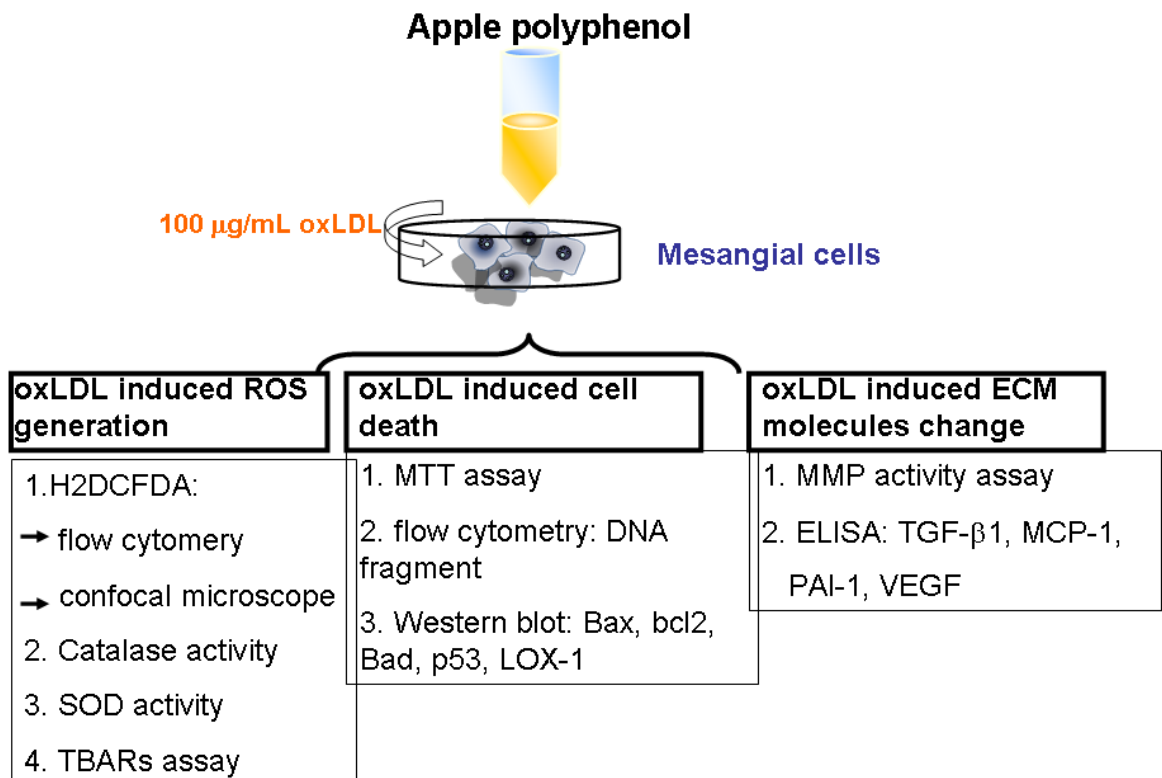
本研究計劃擬以三年時間完成，第一年動物試驗架構如下：



第二年腎絲球細胞給予氧化壓力的試驗架構如下：



第三年 oxLDL 處理腎絲球細胞試驗架構如下：



【結果與討論】

1. 蘋果多酚可以改善糖尿病腎的外觀及早期腎病變

在我們的實驗中發現處理 0.5%、1.0% 及 2.0% 蘋果多酚可以在外觀上明顯改善糖尿病腎的損傷。由文獻中指出, 65 mg/kg 的 STZ 並不會對動物的器官造成傷害, 因此在圖一中所呈現的損傷應是來自於糖尿病所引起的病變。圖二結果顯示餵食蘋果多酚並不會降低血糖, 也無法使體重下降的情形得到改善, 但是由圖三及表一可以發現糖尿病所引起的多尿狀況在處理蘋果多酚後得到改善, 而且早期腎病變的指標 (單次尿中的 microalbumin/creatinine ratio) 也顯著降低。此外, 我們觀察了組織切片, 發現蘋果多酚減緩糖尿病腎的腎絲球肥大及水樣變化 (hydropic change), 由此我們初步得知蘋果多酚具有改善糖尿病引起之早期腎病變的功能。

2. 蘋果多酚使糖尿病腎之粒線體型態趨於正常

在觀察電子顯微鏡下糖尿病腎的變化中, 我們發現糖尿病腎的粒線體 critae 模糊, 粒線體形狀不規則, 但處理蘋果多酚的組別, 其粒線體型態則較接近於正常組。因此我們認為蘋果多酚對糖尿病腎的粒線體會有改善作用, 但其作用方式及機轉則尚待釐清。

3. 蘋果多酚改善糖尿病腎的組織抗氧化狀態

由圖六及圖七中, 我們在腎組織中測試到蘋果多酚具有降低脂質過氧化的能力, 此外他也具有增加 total GST 及 GST pi 活性的能力。這可能是蘋果多酚改善糖尿病腎功能及減低腎損傷的機轉之一。

在我們提出計畫之初, 我們認為基於先前研究所證實的蘋果多酚具有好的抗氧化能力, 它應該具有降低氧化壓力而延緩腎病變的功能。至目前所顯現之研究成果, 應予提出此計畫的想法相符, 我們將繼續進行細胞實驗以探究其機轉。

4. 蘋果多酚可以改善糖尿病腎的基底膜增厚

在我們先前的實驗中發現處理蘋果多酚可以在外觀上明顯改善糖尿病腎的損傷。由圖八的電子顯微鏡切片中呈現蘋果多酚可減低基底膜增厚的現象。糖尿病所引起腎基底膜增厚將會持續變化, 以致在產生臨床腎病變現象時會發現基底膜纖維化的病變。已有文獻指出 TGF- β 及轉錄因子 NF- κ B 在纖維化過程扮演極重要角色。圖九到圖十一結果顯示餵食蘋果多酚的組別可減低 TGF- β 及 NF- κ B 的蛋白量。此外在圖十二中, 我們也觀察到另一個與纖維化相關的因子 PAI-1, 在給予蘋果多酚的組別中有減少的顯著性, 由此我們得知蘋果多酚具有改善糖尿病引起之早期腎病變的功能, 可能與減緩腎絲球基底膜增厚的機轉相關。

5. 蘋果多酚改善 H₂O₂ 處理腎絲球細胞產生之細胞死亡及自由基增加的現象

我們以腎絲球細胞處理 H₂O₂ 的模式進行蘋果多酚延緩腎病變的機轉探討。在預作實驗中, 我們發現處理 AGEs 後會在細胞中產生大量 H₂O₂, 因此便直接給予 H₂O₂ 以模擬高血糖引起的氧化壓力狀態。在處理 H₂O₂ 6 小時後, 細胞出現顯著死亡, 而預先處理蘋果多酚的組別則出現減少死亡的現象 (圖十三), 並且自由基也明顯減少 (圖十四), 這可能與第一年研究中發現蘋果多酚對糖尿病腎的粒線體有改善作用的機制相關, 可能接起因於蘋果多酚的清除自由基之抗氧化特性相關, 但其作用方式及機轉則尚待釐清。

6. 蘋果多酚改善 H₂O₂ 處理腎絲球細胞產生之氧化狀態

由圖十五到十七中, 我們將 H₂O₂ 處理腎絲球細胞中, 測試到蘋果多酚具有降低脂質過氧化的能力, 此外他也具有增加 GSH 及 catalase 活性的能力。這與蘋果多酚在糖尿病動物中改善糖尿病腎功能及減低腎損傷的改善抗氧化機轉相一致。

7. 蘋果多酚改善 H₂O₂ 處理腎絲球細胞產生氧化狀態之相關蛋白量

關於蘋果多酚減少 H₂O₂ 引起腎絲球細胞死亡及產生大量自由基的現象, 我們檢查了位於粒線體膜上的 Bax 及 Bid 蛋白, 結果發現蘋果多酚會經由調節粒線體膜蛋白以延緩腎絲球細胞死亡 (圖十八)。另外 PKC 及 P53 亦皆受到蘋果多酚調節, 我們還不清楚 PKC 是

否與腎絲球纖維化調節相關，P53 除可能在細胞週期調節中扮演重要角色外，是否亦調節腎絲球纖維化過程，尚需更深入探討。在我們提出計畫之初，我們認為基於先前研究所證實的蘋果多酚具有好的抗氧化能力，它應該具有降低氧化壓力而延緩腎病變的功能。至目前所顯現之研究成果，在動物模式及細胞模式皆得到印證。除抗氧化作用外，我們將嘗試找尋蘋果多酚是否在延緩糖尿病腎病變過程中具有其他機轉。

8. 蘋果多酚改善 oxLDL 處理腎絲球細胞產生之細胞死亡的現象

我們以腎絲球細胞處理 oxLDL 的模式進行蘋果多酚延緩腎病變的機轉探討。在預作實驗中，我們發現處理 oxLDL 後會使細胞死亡(圖十九)，並在細胞中產生大量 lipid peroxidation (圖二十)。而預先處理蘋果多酚的組別則出現減少死亡的現象(圖二十一及二十二)，這可能指出第一年研究中發現蘋果多酚對糖尿病腎的粒線體有改善作用的機制相關，也許部分原因是來自於蘋果多酚減低 oxLDL 之抗氧化特性相關。另外我們也檢查了細胞膜上的 oxLDL 接受器，發現蘋果多酚對於 SREBP-1 及 CD36 有減少的作用(圖二十三)，但其作用方式及機轉則尚待釐清。

9. 蘋果多酚改善 oxLDL 處理腎絲球細胞產生細胞凋亡時之相關蛋白量

關於蘋果多酚減少 oxLDL 引起腎絲球細胞死亡的現象，我們檢查了位於粒線體膜上的 Bax/Bid 蛋白及 caspase 3，結果發現蘋果多酚會經由調節粒線體膜蛋白以延緩腎絲球細胞死亡(圖二十四及二十五)。但是否尚有其他機轉仍需更深入探討。在我們提出計畫之初，我們認為糖尿病腎病變的起因可能與 oxLDL 相關，基於先前研究所證實的蘋果多酚具有好的抗氧化能力，它應該具有降低 oxLDL 所給予的氧化壓力而延緩腎病變的功能。至目前所顯現之研究成果得到部分印證。但在細胞系統中欲探究蘋果多酚對於改善糖尿病腎病變的胞外基質影響有部分障礙，我們可在未來嘗試找尋蘋果多酚是否在延緩糖尿病腎病變過程中具有其他機轉，以使此機轉探討更趨完整。

二、重要參考文獻

- Adeli K., Taghibiglou C., Van Iderstine S.C., Lewis G.F. Mechanisms of hepatic very low-density lipoprotein overproduction in insulin resistance: Trends in Cardiovasc Med 11, 170, 2001.
- Akazome Y. Characteristics and physiological functions of polyphenols from apples. Biofactors 22, 311-314, 2004.
- Altomare E., Vendemiale G., Chicco D., Procacci V., Cirelli F. Increased lipid peroxidation in type 2 poorly controlled diabetic patients. Diabete Metab 18, 264-71, 1992.
- Anderson M. E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. Chem Biol Interact 136, 111-112, 1998.
- Aprikian O., Busserolles J., Manach C., Mazur A., Morand C., Davicco M.J., Besson C., Rayssiguier Y., Remesy C., Demigne C. Lyophilized apple counteracts the development of hypercholesterolemia, oxidative stress, and renal dysfunction in obese Zucker rats. J Nutr 132, 1969-1976, 2002.
- Auclair S., Silberberg M., Gueux E., Morand C., Mazur A., Milenkovic D., Scalbert A. Apple polyphenols and fibers attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. J Agric Food Chem 56, 5558-5563, 2008.
- Ballantyne F.C. Role of the clinical biochemistry laboratory in the assessment of dyslipoproteinaemias. Ann Clin Biochem 21, 166-175, 1984.
- Bohr V.A., Dianov G.L. Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. Biochimie 81, 155-60, 1999.
- Bolzan A.D., Bianchi M. S. Genotoxicity of streptozotocin. Mutat Res 512, 121-134, 2002.
- Breinholt V.M., Nielsen S.E., Knuthsen P., Lauridsen S.T., Daneshvar B., Sorensen A. Effects of commonly consumed fruit juices and carbohydrates on redox status and anticancer biomarkers in female rats. Nutr Cancer 45, 46-52, 2003.

- Brown G.C., Borutaite V. Nitric oxide, cytochrome c and mitochondria. *Biochem Soc Symp* 66, 17-25, 1999.
- Cameron N.E., Cotter M.A. Effects of antioxidants on nerve and vascular dysfunction in experimental diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 45, 137-46, 1999.
- Chen S., Cohen M.P., Lautenslager G.T., Shearman C.W., Ziyadeh F.N. Glycated albumin stimulates TGF-beta 1 production and protein kinase C activity in glomerular endothelial cells. *Kidney Int* 59, 673-81, 2001.
- Chen Y., Cai J., Murphy T.J., Jones D.P. Overexpressed human mitochondrial thioredoxin confers resistance to oxidant-induced apoptosis in human osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 277, 33242-8, 2002.
- Deuther-Conrad W., Loske C., Schinzel R., Dringen R., Riederer P., Munch G. Advanced glycation endproducts change glutathione redox status in SH-SY5Y human neuroblastoma cells by a hydrogen peroxide dependent mechanism. *Neurosci Lett* 312, 29-32, 2001.
- Di Mambro V.M., Azzolini A.E., Valim Y.M., Fonseca M.J. Comparison of antioxidant activities of tocopherols alone and in pharmaceutical formulations. *Int J Pharm* 262, 93-99, 2003.
- Eberhardt M.V., Lee C.Y., Liu R.H. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 405, 903-904, 2000.
- Fioretto P., Mauer M. Histopathology of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol* 27, 195-207, 2007.
- Frei B., Stocker R., England L., Ames B.N. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol* 264, 155-163, 1990.
- Granstam E., Granstam S.O. Involvement of nitric oxide in the regulation of regional hemodynamics in streptozotocin-diabetic rats: *Physiol Res* 52, 159, 2003.
- Hammad S.M., Hazen-Martin D.J., Sohn M., *et al.* Nephropathy in a hypercholesterolemic mouse model with streptozotocin-induced diabetes: *Kidney & Blood Pressure Research* 26, 351, 2003.
- Hayes J.D., McLellan L.I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 31, 273-300, 1999.
- Inoguchi T., Sonta T., Tsubouchi H., Etoh T., Kakimoto M., Sonoda N., Sato N., Sekiguchi N., Kobayashi K., Sumimoto H., Utsumi H., Nawata H. Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol* 14, S227-232, 2003.
- Inokuchi H., Hirokane H., Tsuzuki T., Nakagawa K., Igarashi M., Miyazawa, T. Anti-angiogenic activity of tocotrienol. *Biosci Biotechnol Biochem* 67, 1623-1627, 2003.
- Ishii H., Koya D., King G.L. Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in diabetes mellitus. *J Mol Med* 76, 21-31, 1998.
- Jakus V., Rietbrock N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res* 53, 131-142, 2004.
- Kahle K., Kraus M., Richling E. Polyphenol profiles of apple juices. *Mol Nutr Food Res* 49, 797-806, 2005.
- Kataya H.A., Hamza A.A. Red Cabbage (*Brassica oleracea*) Ameliorates Diabetic Nephropathy in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 5, 281-287, 2008.
- Khanna S., Roy S., Ryu H., Bahadduri P., Swaan P.W., Ratan R.R., Sen C.K. Molecular basis of vitamin E action: tocotrienol modulates 12-lipoxygenase, a key mediator of glutamate-induced neurodegeneration. *J Biol Chem* 278, 43508-43515, 2003.
- Kikuchi H., Furuta A., Nishioka K., Suzuki S.O., Nakabeppu Y., Iwaki T. Impairment of mitochondrial DNA repair enzymes against accumulation of 8-oxo-guanine in the spinal motor neurons of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 103, 408-414, 2002.
- Kim Y.S., Xu Z.G., Reddy M.A., Li S.L., Lanting L., Sharma K., Adler S.G., Natarajan R. Novel interactions between TGF- β 1 actions and the 12/15-lipoxygenase pathway in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 16, 352-62, 2005.
- Krueger C.G., Dopke N.C., Treichel P.M., Folts J., Reed D. Matrix-assisted laser

- desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of polygalloyl polyflavan-3-ols in grape seed extract. *J Agri Food chem* 48, 1863-1867, 2000.
- Leask A., Abraham D.J. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 18, 816-827, 2004.
- Lebovitz R.M., Zhang H., Vogel H., Cartwright J., Jr. Dionne L., Lu N., Huang S., Matzuk M.M. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 9782-9787, 1996.
- Lee T.S., Saltsman K.A., Ohashi H., King G.L. Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 5141-5, 1989.
- Li J., Gobe G. Protein kinase C activation and its role in kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 11, 428-34, 2006.
- Li X., Xu L., Gao H., Li B., Cheng M. Effects of grape seed proanthocyanidins extracts on AGEs and expression of bone morphogenetic protein-7 in diabetic rats. *J Nephrol.* 21, 722-733, 2008.
- Maiti R., Jana D., Das U.K., Ghosh D. Antidiabetic effect of aqueous extract of seed of *Tamarindus indica* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 92, 85, 2004.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79, 727-747, 2004.
- Miura S., Watanabe J., Tomita T. The inhibitory effects of tea polyphenols (flavan-3-ol derivatives) on Cu²⁺-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *Biol Pharm Bull* 17, 1567, 1994.
- Mullarkey C.J., Edelstein D., Brownlee M. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 173, 932-939, 1990.
- Murali B., Umrani D.N., Goyal R.K. Effect of chronic treatment with losartan on streptozotocin-induced renal dysfunction: *Mol Cell Biochem* 249, 85, 2003.
- Oh-Hashi K., Maruyama W., Isobe K. Peroxynitrite induces GADD34, 45, and 153 VIA p38 MAPK in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Free Radic Biol Med* 30, 213-221, 2001.
- Paschen W., Mengesdorf T., Althausen S., Hotop S. Peroxidative stress selectively down-regulates the neuronal stress response activated under conditions of endoplasmic reticulum dysfunction. *J Neurochem* 76, 1916-1924, 2001.
- Pearson D.A., Tan C.H., German J.B., Davis P.A., Gersgwin M.E. Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation. *Life Sci* 64, 1913-1920, 1999.
- Pugazhenthii S., Nesterova A., Jambal P., Audesirk G., Kern M., Cabell L., Eves E., Rosner M.R., Boxer L.M., Reusch J.E. Oxidative stress-mediated down-regulation of bcl-2 promoter in hippocampal neurons. *J Neurochem* 84, 982-996, 2003.
- Rizzardini M., Lupi M., Bernasconi S., Mangolini A., Cantoni L. Mitochondrial dysfunction and death in motor neurons exposed to the glutathione-depleting agent ethacrynic acid. *J Neurol Sci* 207, 51-8, 2003.
- Rice-Evans C., Spencer J.P.E., Schroeter H., Rechner A.R. Bioavailability of flavonoids and potential bioactive forms in vivo. *Drug Metab Drug Interact* 17, 291-310, 2000.
- Ribaldo P.D., Souza D.S., Biswas S.K., Block K., Lopes de Faria J.M., Lopes de Faria J.B. Green tea (*Camellia sinensis*) Attenuates Nephropathy by Downregulating Nox4 NADPH Oxidase in Diabetic Spontaneously Hypertensive Rats. *J Nutr* 138, 13084-13097, 2008.
- Russell J.W., Sullivan K.A., Windebank A.J., Herrmann D.N., Feldman E.L. Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. *Neurobiol Dis* 6, 347-363, 1999.
- Saito T., Miyake M., Toba M., Okamatsu H., Shimizu S., Noda M. Inhibition by apple polyphenols of ADP-ribosyltransferase activity of cholera toxin and toxin-induced fluid accumulation in mice. *Microbiol Immunol* 46, 249-255, 2002.
- Scalbert A., Johnson I.T., Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* 81, 215S-217S, 2005.
- Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C., Jimenez L. Dietary polyphenols and the

- prevention of disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45, 287-306, 2005.
- Scalbert A., Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 130, 2073S-2085S, 2000.
- Schiffer M., von Gersdorf G., Bitzer M., Susztak K., Bottinger E.P. Smad proteins and transforming growth factor- β signaling. *Kidney Int* 58, S45-S52, 2000.
- Shahidi F., Naczki M. Food phenolics. Technomic publishing company, Inc, Switzerland. pp109-115, 1995.
- Singh R., Barden A., Mori T., Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44, 129-146, 2001.
- Southon S., van Vliet T., Vina-Ribes J., Williamson G., Astley S.B. Bioavailability and metabolism. *Mol Aspects Med* 23, 39-100, 2002.
- Stevens M.J., Lattimer S.A., Kamijo M., Van Huysen C., Sima A.A., Greene D.A. Osmotically-induced nerve taurine depletion and the compatible osmolyte hypothesis in experimental diabetic neuropathy in the rat. *Diabetologia* 36, 608-614, 1993.
- Tessier D., Khalil A., Fulop T. Effects of an oral glucose challenge on free radicals/antioxidants balance in an older population with type II diabetes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 54, M541-545, 1999.
- Thornalley P.J. Glycation in diabetic neuropathy: characteristics, consequences, causes, and therapeutic options. *Int Rev Neurobiol* 50, 37-57, 2002.
- Tomlinson D.R. Mitogen-activated protein kinases as glucose transducers for diabetic complications. *Diabetologia* 42, 1271-1281, 1999.
- Tsai E.C., Hirsch I.B., Brunzell J.D., Chait A. Reduced plasma peroxy radical trapping capacity and increased susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. *Diabetes* 43, 1010-1014, 1994.
- Williams M.D., Van Remmen H., Conrad C.C., Huang T.T., Epstein C.J., Richardson A. Increased oxidative damage is correlated to altered mitochondrial function in heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mice. *J Biol Chem* 273, 28510-28515, 1998.
- Wolf G. Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor- β pathway. *Kidney Int* 70, 1914-1919, 2006.
- Wu J., Han X., Zhou J. Relationship between nitric oxide and oxygen free radicals in different duration of diabetes in rat kidney: *Bull Hunan Medica Uni* 24, 543, 1999.
- Xie C., Lovell M.A., Xiong S., Kindy M.S., Guo J., Xie J., Amaranth V., Montine T.J., Markesbery W.R. Expression of glutathione-S-transferase isozyme in the SY5Y neuroblastoma cell line increases resistance to oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 31, 73-81, 2001.
- Zaltzberg H., Kanter Y., Aviram M., Levy Y. Increased plasma oxidizability and decreased erythrocyte and plasma antioxidative capacity in patients with NIDDM. *Isr Med Assoc J* 1, 228-231, 1999.
- Ziyadeh F.N. Mediators of diabetic renal disease: the case for $\text{tgf-}\beta$ as the major mediator. *J Am Soc Nephrol* 15 Suppl 1, S55-57, 2004.

三、計畫成果自評：(是否達成預定成效，如進度落後請說明原因)

【對於學術研究、國家發展及其他應用方面之貢獻】

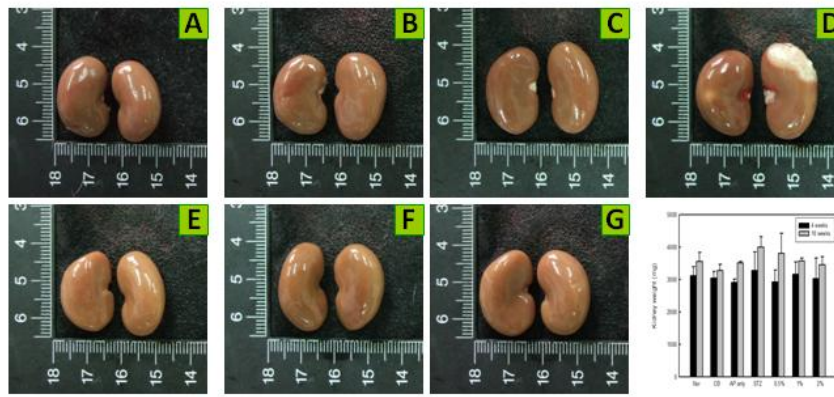
1. 已確認蘋果多酚具抗糖尿病併發 nephropathy 之作用。
2. 已得知蘋果多酚在此作用中應與抗氧化角色有關。
3. 已得知蘋果多酚在此作用中應與抗氧化及調節 TGF- β 角色有關。
4. 確認蘋果多酚對糖尿病所增加的 oxLDL 引起的腎絲球細胞死亡具有抑制作用。
5. 本研究已發表 2 篇研討會論文。
6. 配合國家以預防醫學替代治療醫學並降低醫療成本之政策，本研究發現蘋果多酚可應用在推廣保健食品時，並具科學數據及其相關效用。

7. 抗糖尿病併發腎病變機制之模式，可提供作為參考。
8. 提供民眾在預防糖尿病併發症方面的正確觀念，而使這些併發症不再被忽略，並可進一步減低糖尿病腎病變的醫療損耗。
9. 提供業界對於蘋果多酚作用之新觀點。

【對於參與之工作人員獲得之訓練】

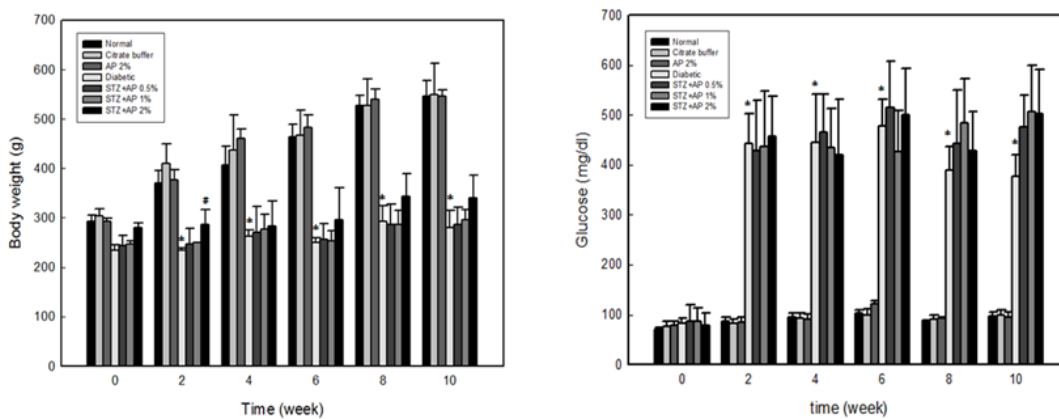
1. 本研究已培養一位碩士生畢業。
2. 本研究使參與人員已學習藥物誘發動物致病之模式。
3. 本研究提供參與人員學習致病機轉之探討及相關技術的應用，包括動物採血、電子顯微鏡技術、immunohistochemistry、Western blot、細胞培養、zymography 及 ELISA 等技術之應用。

圖一、蘋果多酚減緩 STZ 誘導之糖尿病腎損傷



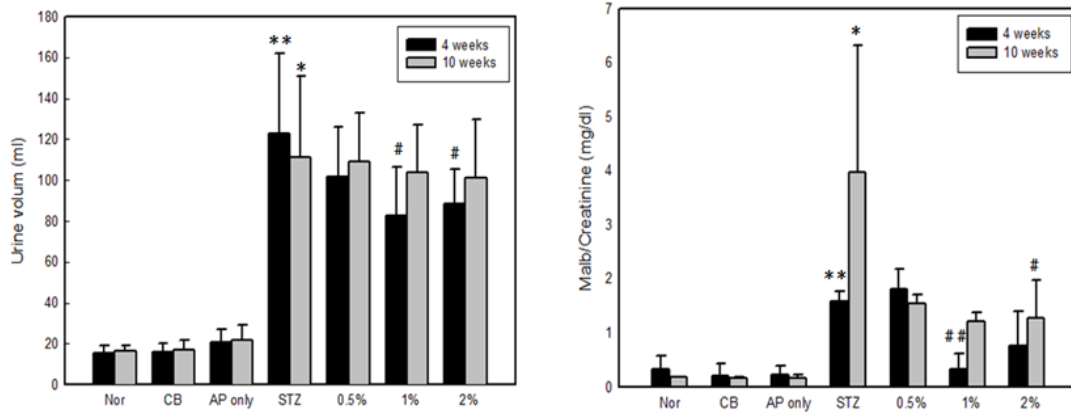
AP reduce kidney damage induced by STZ. Kidney obtained from A, normal rat without treated; B, treated with citrate buffer; C, treated with 2% AP only; D, diabetic group; E, diabetic rats treated with 0.5% AP; F, diabetic rats treated with 1% AP; G, diabetic rats treated with 2% AP.

圖二、蘋果多酚無法改善糖尿病之高血糖及體重下降情形



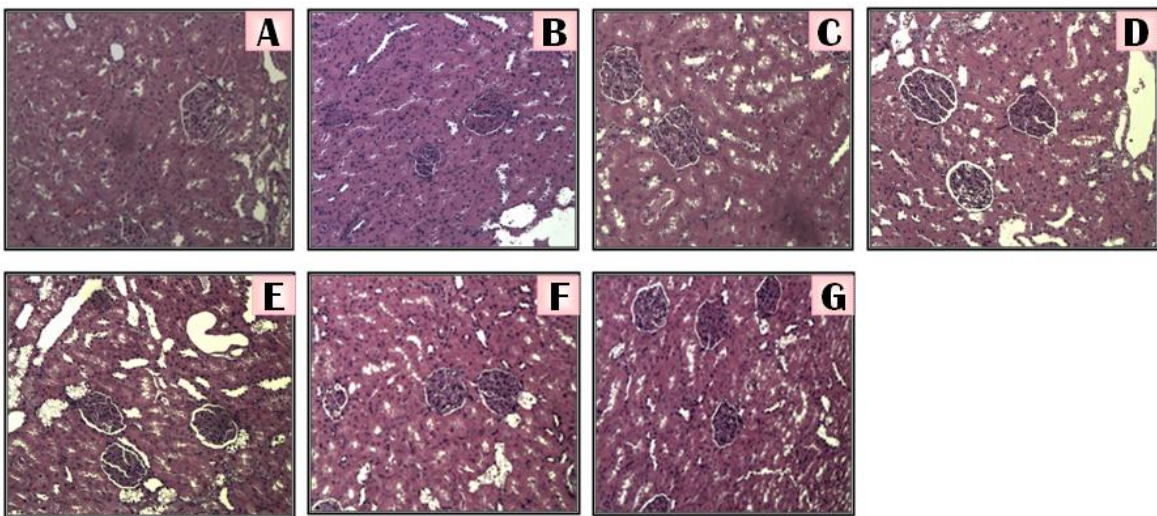
AP cannot affect body weight and blood glucose in diabetic rats. Statistical analysis was carried out by the unpaired Student's t-test. Left panel, $*P < 0.01$, compared with the normal group, $\#P < 0.05$, compared with the STZ-induced group; Right panel, $*P < 0.00005$, compared with the normal group.

圖三、蘋果多酚減緩早期糖尿病腎病變



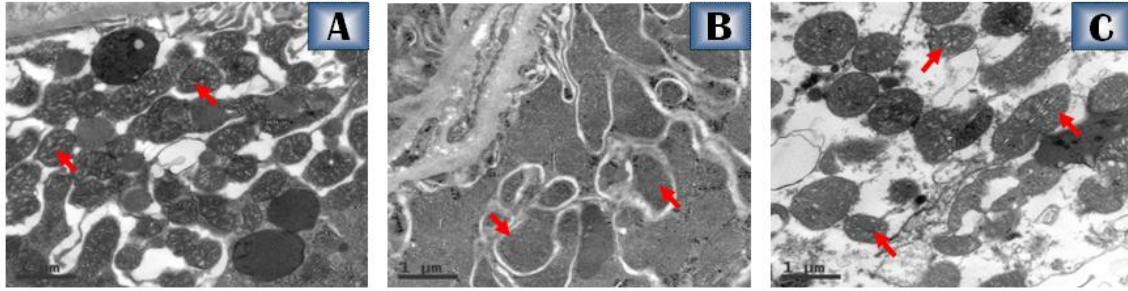
AP decelerate the early diabetic nephropathy. Left, AP reduce the urine volume in diabetic rats significantly. * $P < 0.005$; ** $P < 0.000005$ compared with the normal group, # $P < 0.05$, compared with the diabetic group. Right, AP reduce the ACR (spot urine microalbumin/creatinine ratio) in diabetic rats significantly. * $P < 0.05$; ** $P < 0.0001$, compared with the normal group. # $P < 0.05$; ## $P < 0.0005$, compared with the diabetic group.

圖四、蘋果多酚改善糖尿病腎的腎絲球肥大及水樣變化 (hydropic change)



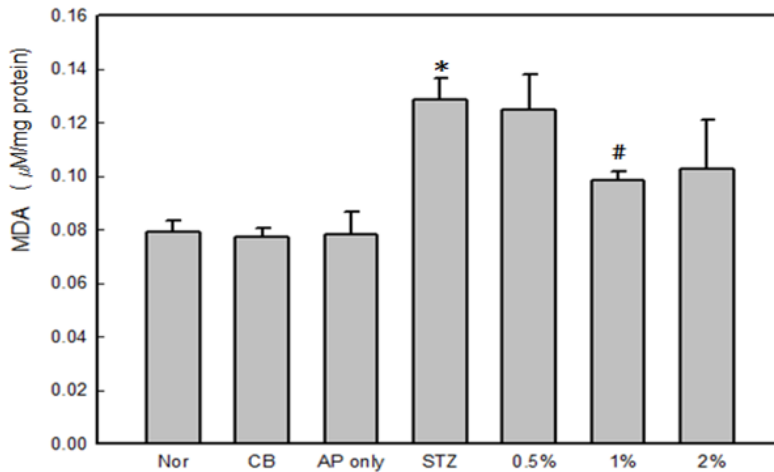
AP reduce the hydropic change and glomerular basement membrane (GBM) thickness in diabetic nephropathy. A, normal; B, citrate buffer; C, 2% AP only; D, diabetic group; E, diabetic rats treated with 0.5% AP; F, diabetic rats treated with 1% AP; G, diabetic rats treated with 2% AP. Black arrows point the hydropic changes shown as pale and swollen change of the proximal convoluted tubules, which was more pronounced in the diabetic groups and less in the treatment groups. Blue arrows represent the GBM shown as white edge surrounding the glomeruli. In the groups treated with AP, GBM become thinner than diabetic group.

圖五、蘋果多酚使糖尿病腎之粒線體型態趨於正常



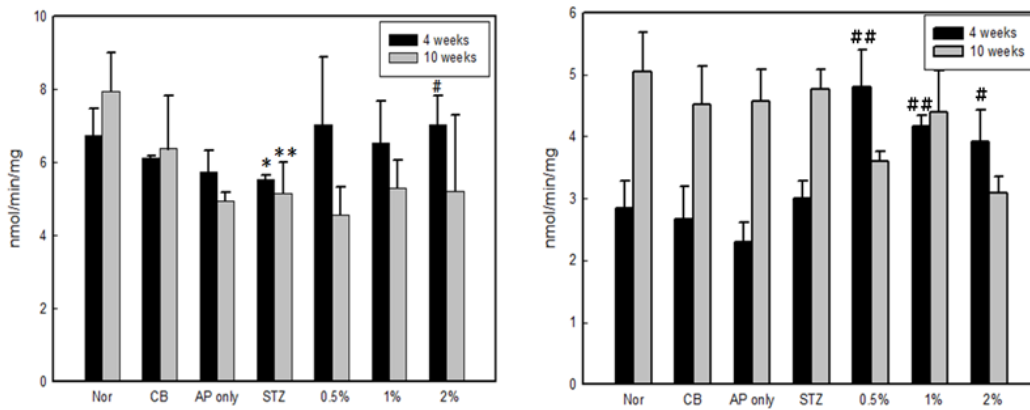
AP improve the mitochondrial morphology destroyed in diabetic kidney. The mitochondrion are examined under electromicroscope (20000x). A, normal, B, diabetes, C, diabetic rats treated with 0.5% AP. Red arrows represent the cristae in mitochondrion.

圖六、蘋果多酚減緩糖尿病腎組織之脂質過氧化



AP reduce lipid peroxidation in diabetic rats. The TBARS assay (lipid peroxidation) showed that a significantly increased level existed in the diabetic group as represented by the substrate MDA at 10 weeks ($P < 0.001$). Treatment of 1% AP decreased the MDA levels significantly at 10 weeks. ($P < 0.01$).

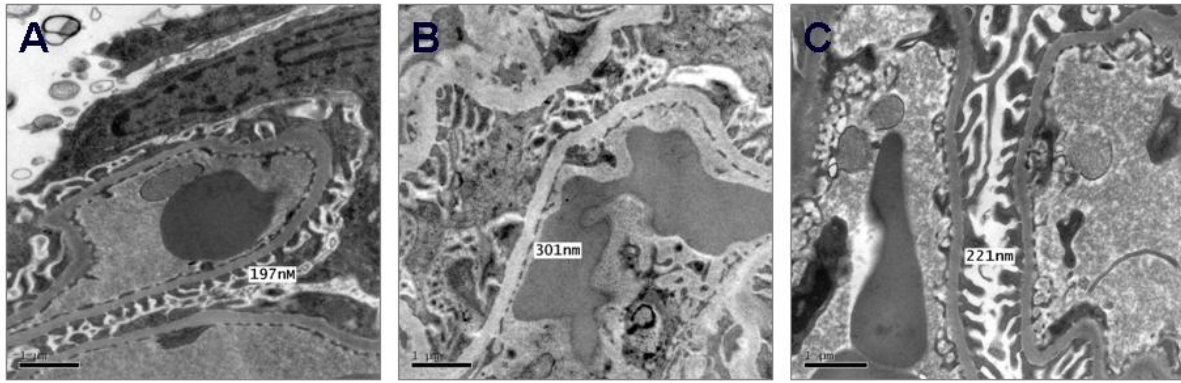
圖七、蘋果多酚增加糖尿病腎組織中的 total GST 及 GST pi 活性



AP increase total GST, GST Pi activity in diabetic kidney.

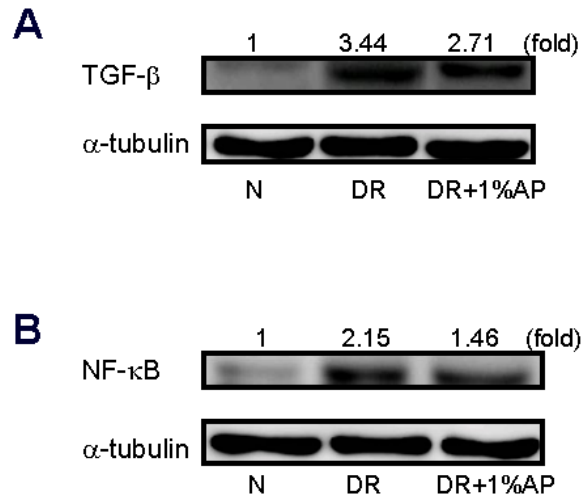
Statistical analysis was carried out by the unpaired Student's t-test. Left panel is total GST, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, compared with the normal group, # $P < 0.05$, compared with the diabetic rats; Right panel is GST Pi, # $P < 0.05$; ## $P < 0.005$, compared with the diabetic group.

圖八、蘋果多酚減緩 STZ 誘導之糖尿病腎絲球基底膜增厚



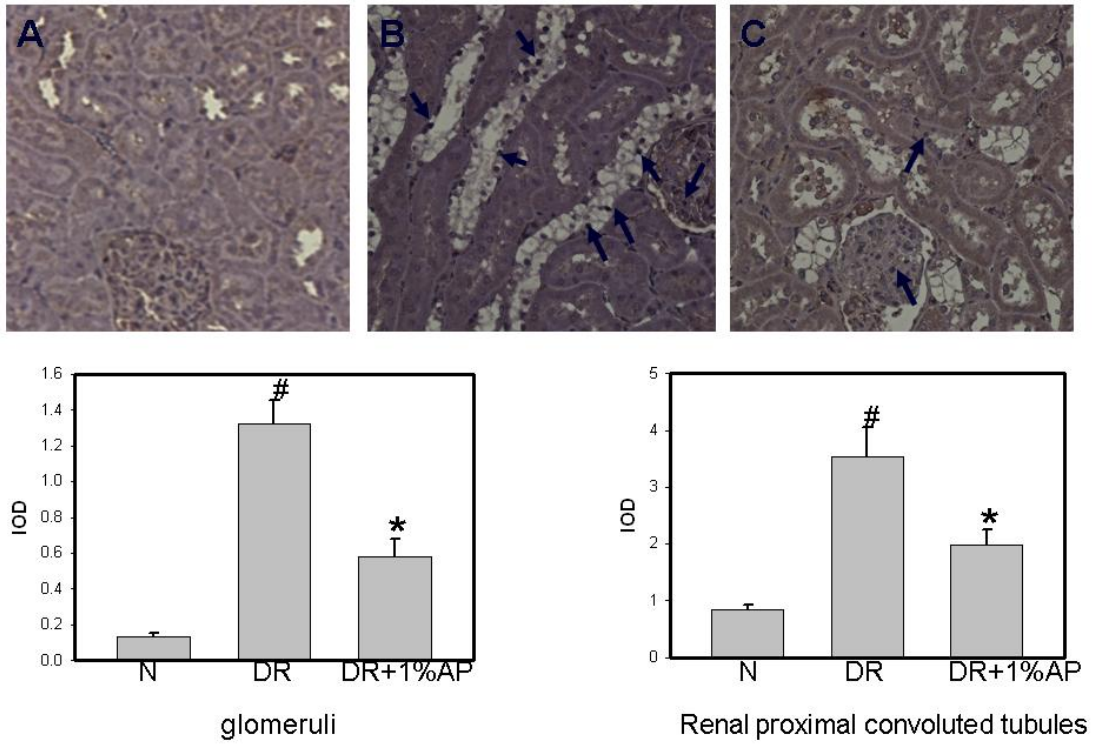
腎臟組織於電子顯微鏡下觀察腎絲球基底膜厚度。A, 正常組；B, 糖尿病組；C, 糖尿病並處理 1% 蘋果多酚，20000X。

圖九、蘋果多酚降低糖尿病腎組織 TGF- β 及 NF- κ B 蛋白量

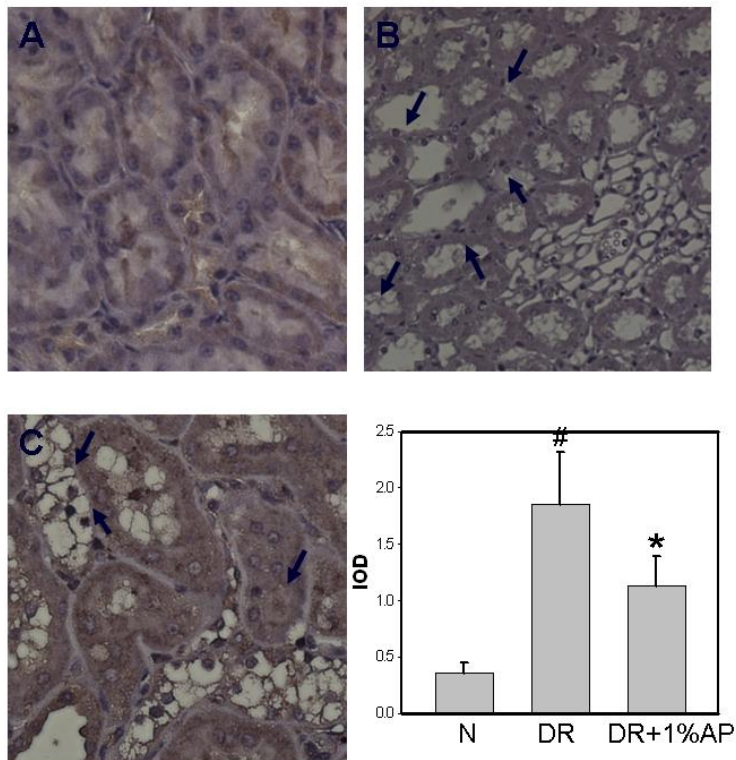


N, 正常組；DR, 糖尿病組；DR+1%AP, 糖尿病並處理 1% 蘋果多酚，20000X。

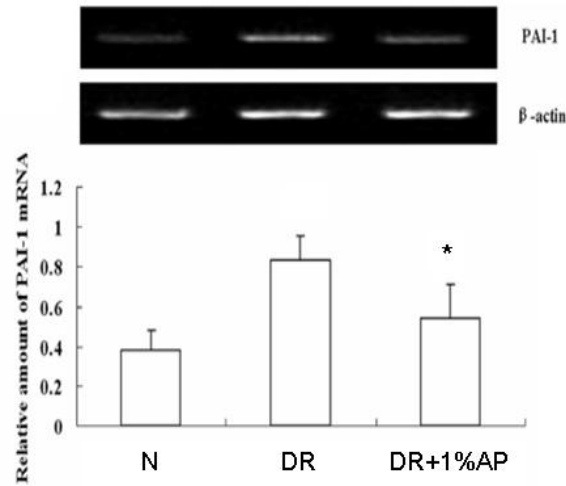
圖十、蘋果多酚降低糖尿病腎絲球及近曲小管 TGF-β 蛋白量



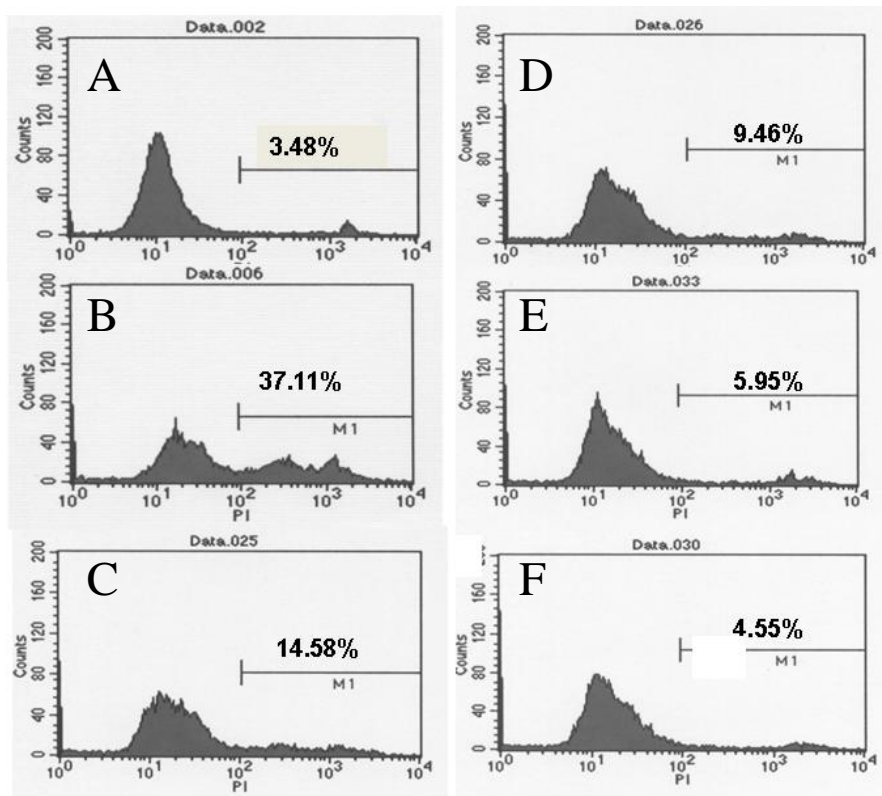
圖十一、蘋果多酚降低糖尿病腎近曲小管 NF-kB 蛋白量



圖十二、蘋果多酚降低糖尿病腎組織 PAI-1 mRNA 量

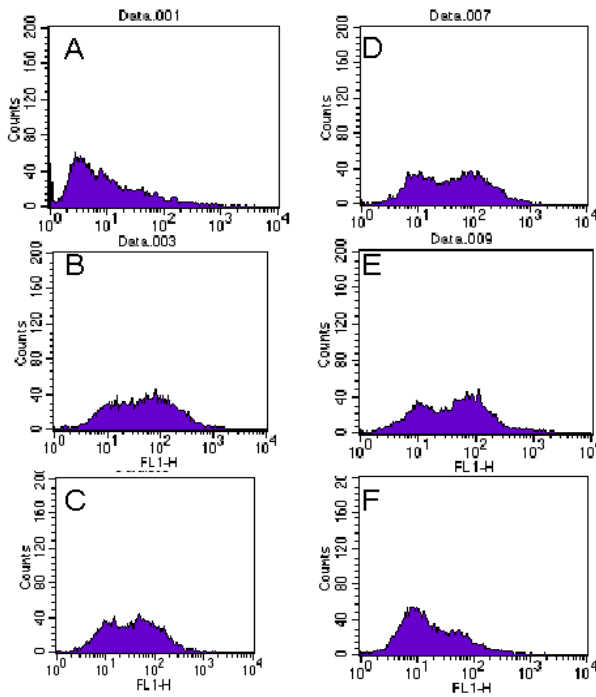


圖十三、蘋果多酚降低 H₂O₂ 誘導之腎絲球細胞死亡



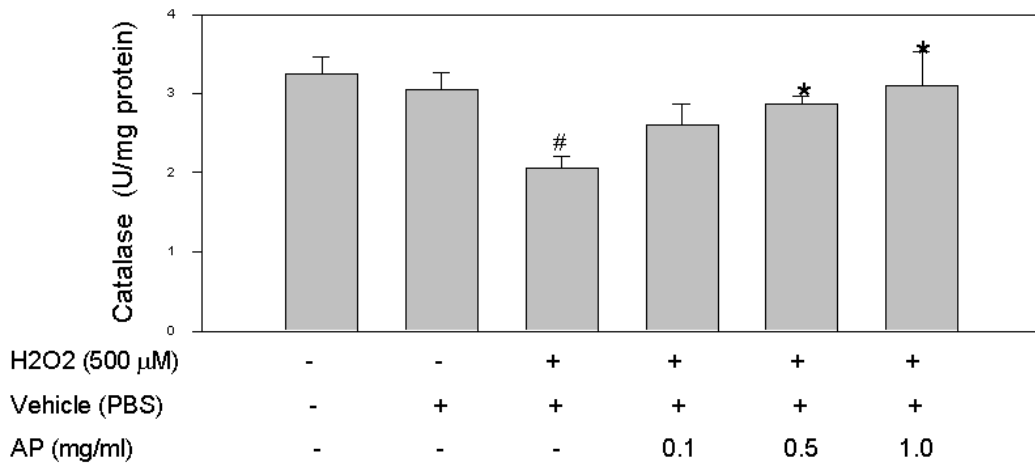
腎絲球細胞處理 500 μ M H₂O₂ 6 小時後，收取細胞進行流式細胞分析，顯示數字為 PI 染色後的死亡細胞群落。A, 正常組；B, 500 μ M H₂O₂；C, 500 μ M H₂O₂+0.1 mg/ml AP；D, 500 μ M H₂O₂+0.3 mg/ml AP；E, 500 μ M H₂O₂+0.5 mg/ml AP；F, 500 μ M H₂O₂+1.0 mg/ml AP。

圖十四、蘋果多酚降低腎絲球細胞中 H2O2 誘導之自由基

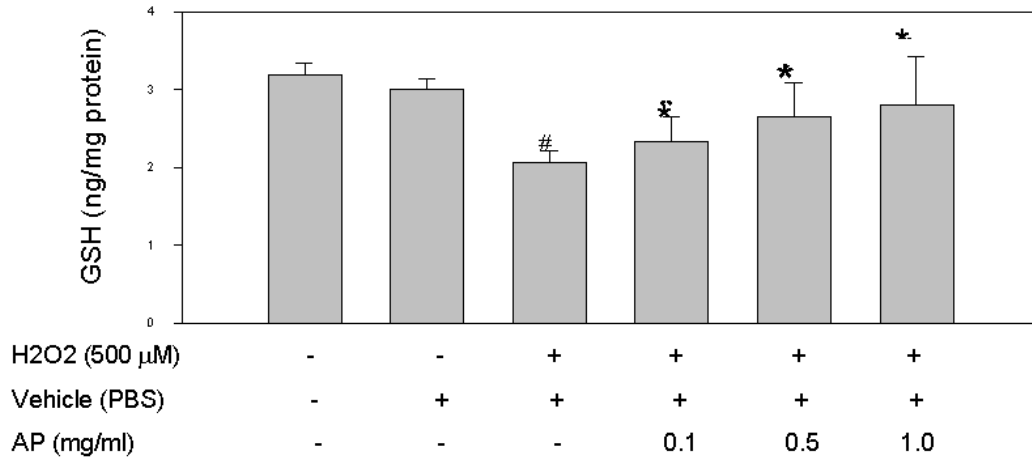


腎絲球細胞處理 500 μM H2O2 6 小時後，處理 DCFDA 後，收取細胞進行流式細胞分析，細胞群落右移顯示自由基增加。A, 正常組；B, 500 μM H2O2；C, 500 μM H2O2+0.1 mg/ml AP；D, 500 μM H2O2+0.3 mg/ml AP；E, 500 μM H2O2+0.5 mg/ml AP；F, 500 μM H2O2+1.0 mg/ml AP。

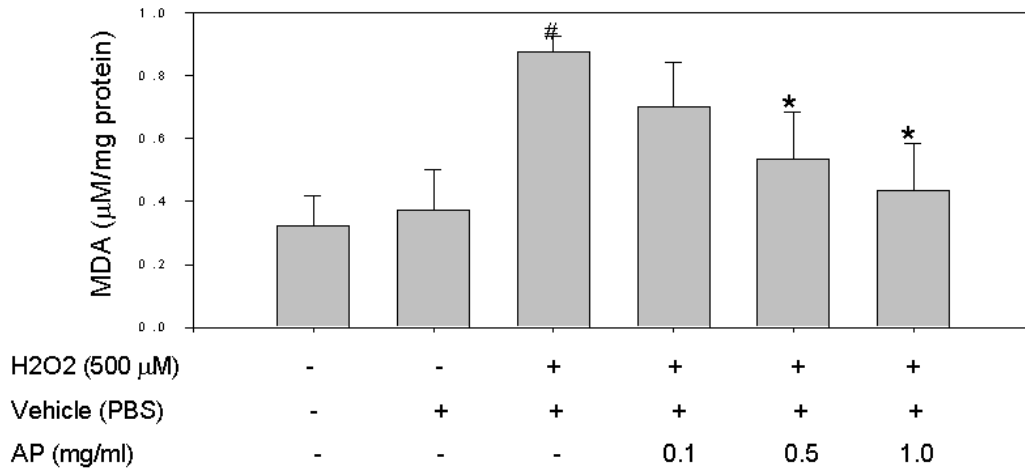
圖十五、蘋果多酚增加 H2O2 誘導腎絲球流失之 catalase 活性



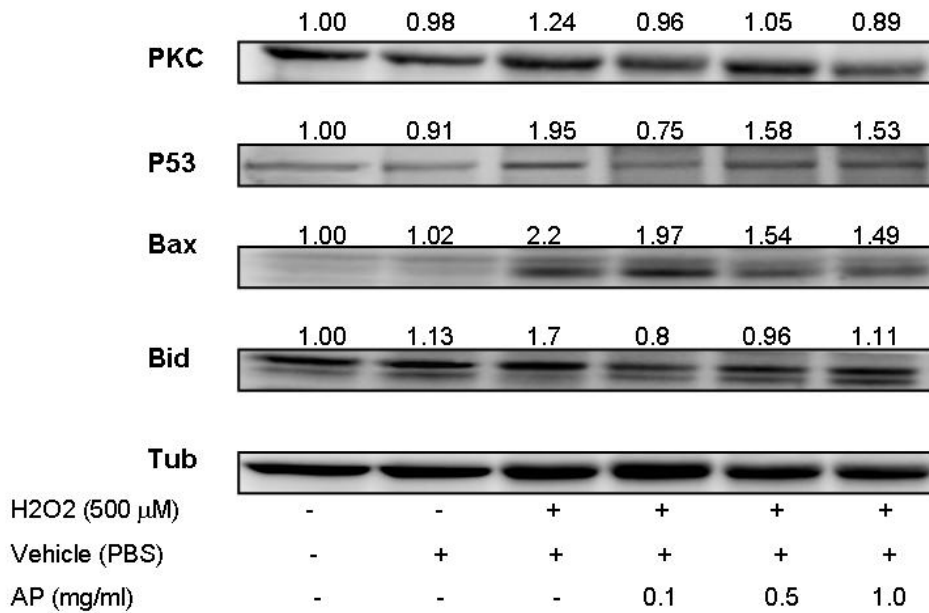
圖十六、蘋果多酚增加 H2O2 誘導腎絲球減低之 GSH 分子



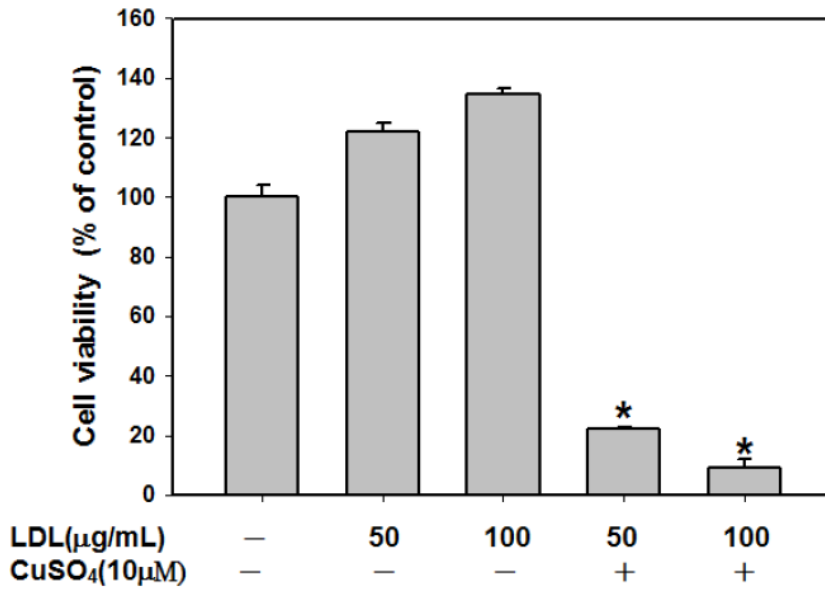
圖十七、蘋果多酚降低 H2O2 誘導腎絲球增加之 lipid peroxidation



圖十八、蘋果多酚改變 H2O2 誘導腎絲球引起之蛋白質變化

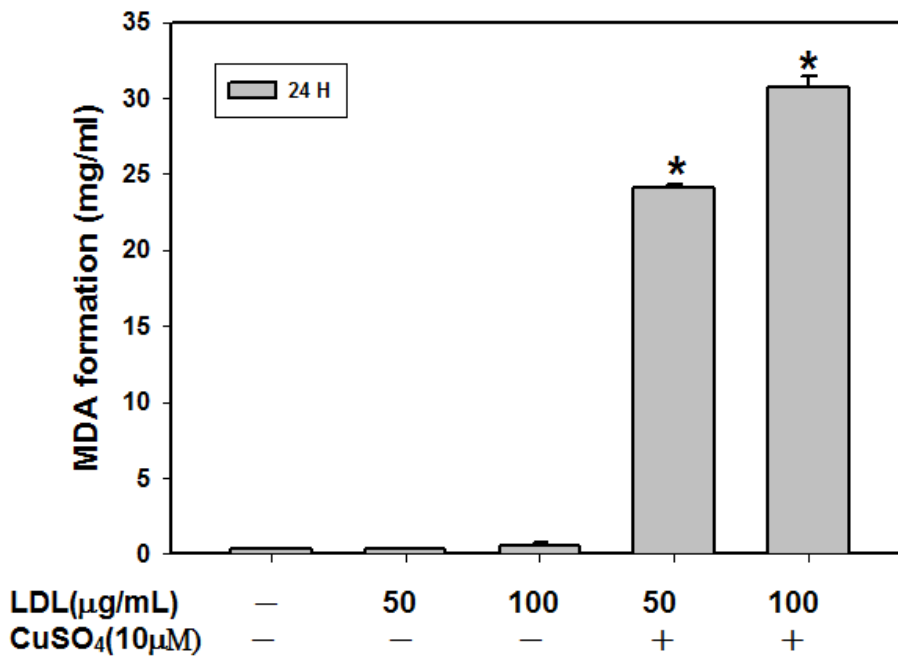


圖十九、oxLDL 誘導腎絲球死亡



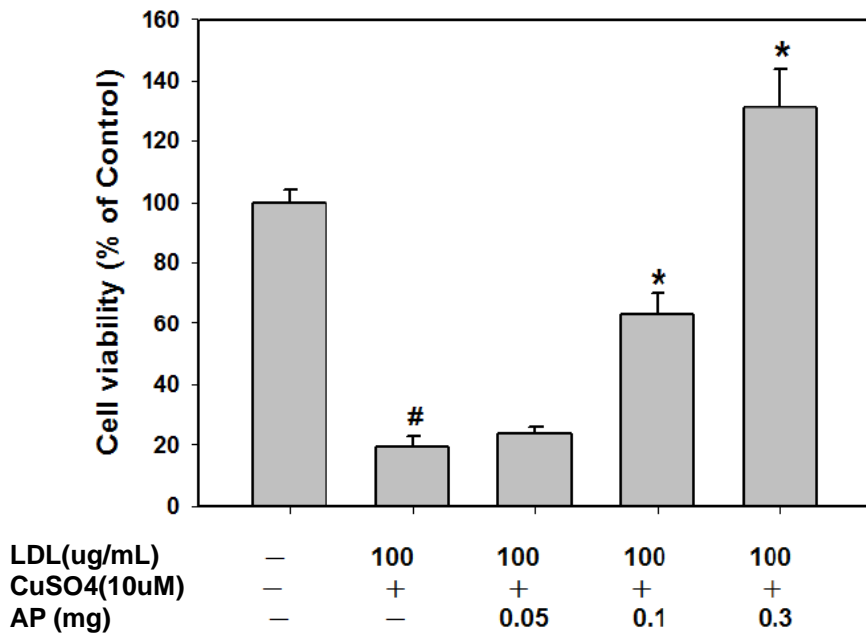
RMC cell treated with 50µg/mL or 100µg/mL LDL accompanied by 10µM CuSO₄ for 24 hrs. Cell viability was analyzed by MTT assay. The data were represented as means ± SD from 3 samples for each group. * p<0.05 compared with normal group.

圖二十、oxLDL 誘導 lipid peroxidation 增加



* p<0.05 compared with normal group.

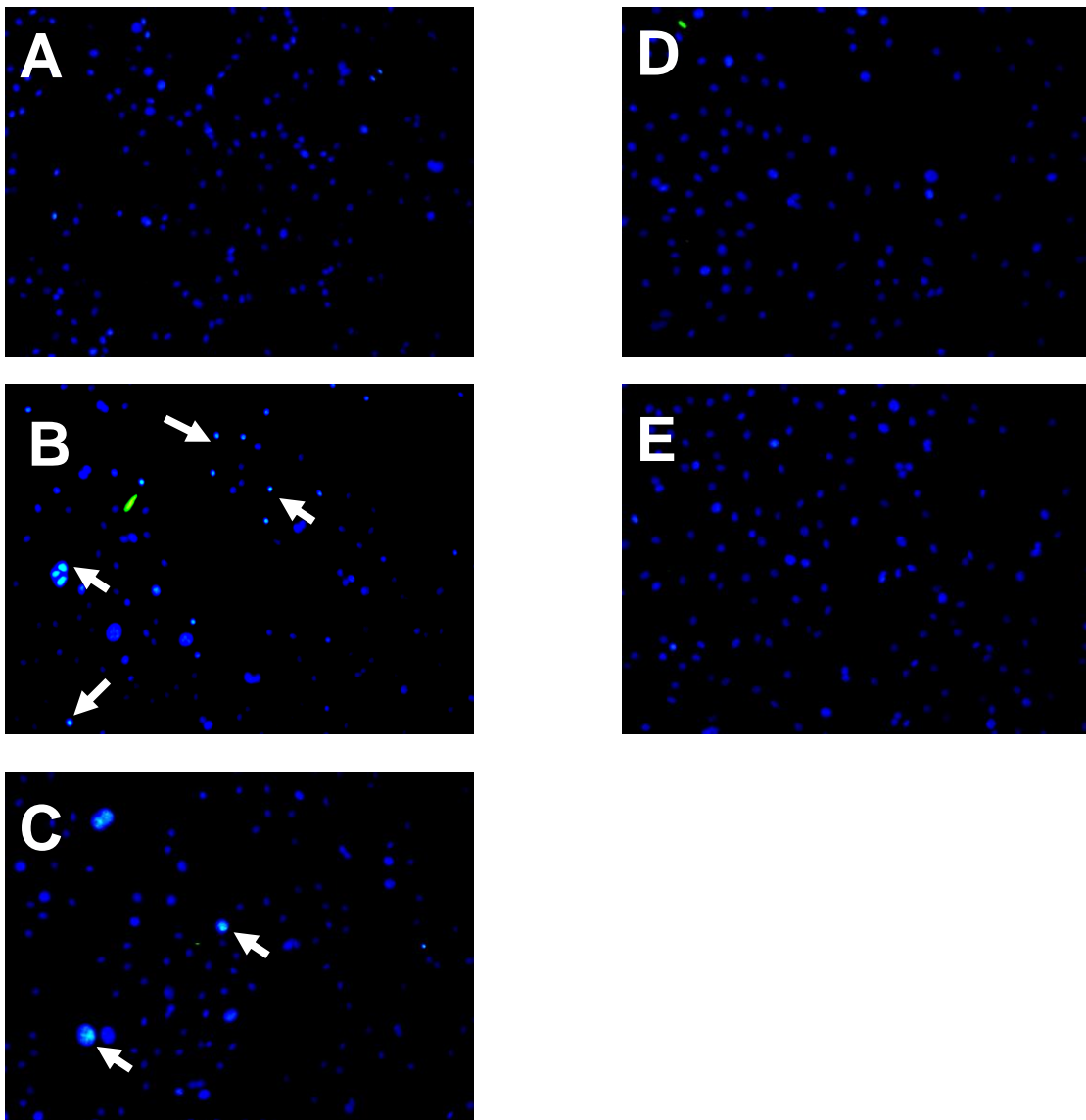
圖二十一、蘋果多酚改變 oxLDL 誘導腎絲球死亡現象



The data were represented as mean \pm SD from 3 samples for each group.

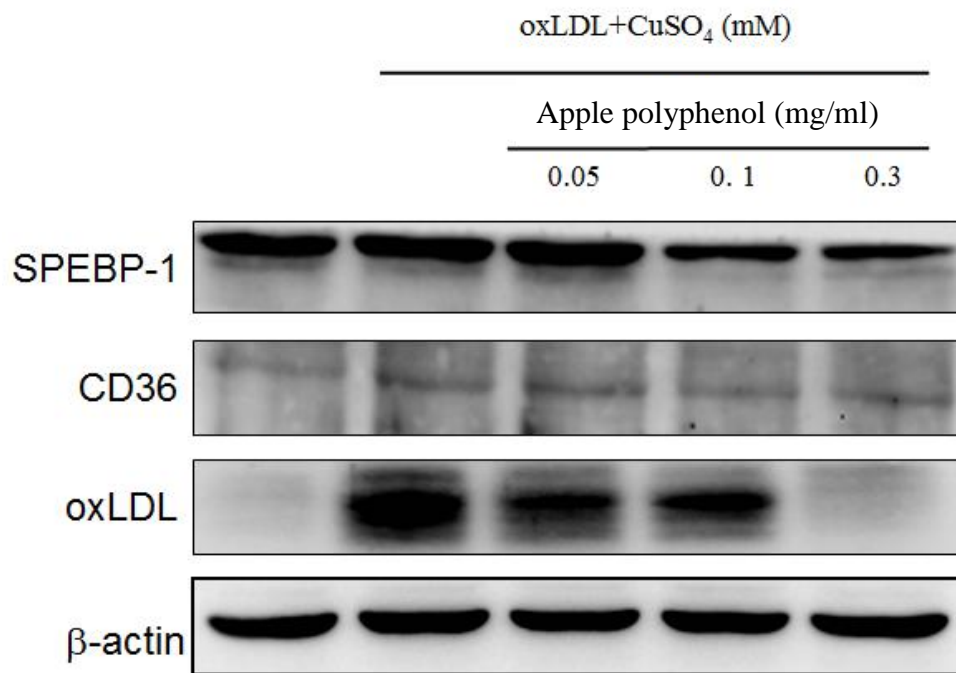
*, $P < 0.05$, compared with oxLDL treatment. #, $P < 0.05$, compared with control group.

圖二十二、蘋果多酚改變 oxLDL 誘導腎絲球死亡現象

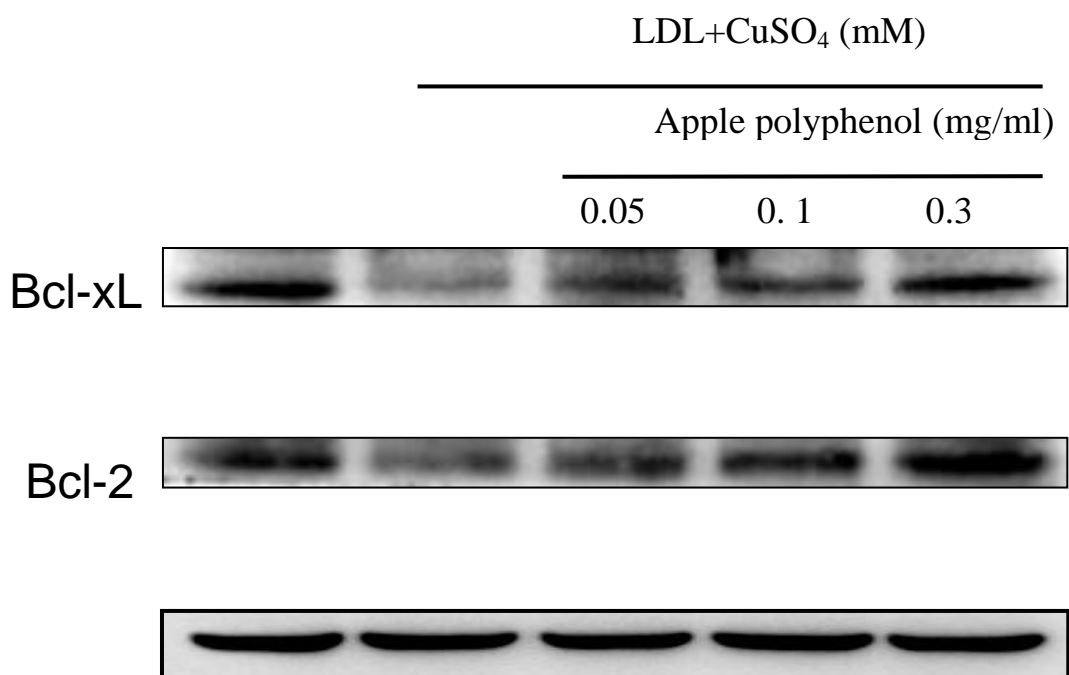


RMC cell treated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ LDL and 10 μM CuSO_4 accompanying with the apple polyphenol for 12 hrs. (A) RMC (B) RMC treated with 100 $\mu\text{ g}/\text{mL}$ oxLDL only. RMC treated with 100 $\mu\text{ g}/\text{mL}$ oxLDL and (C) 0.05 mg; (D) 0.1 mg; and (E) 0.3 mg apple polyphenol. The arrows pointed out showed the dead cell.

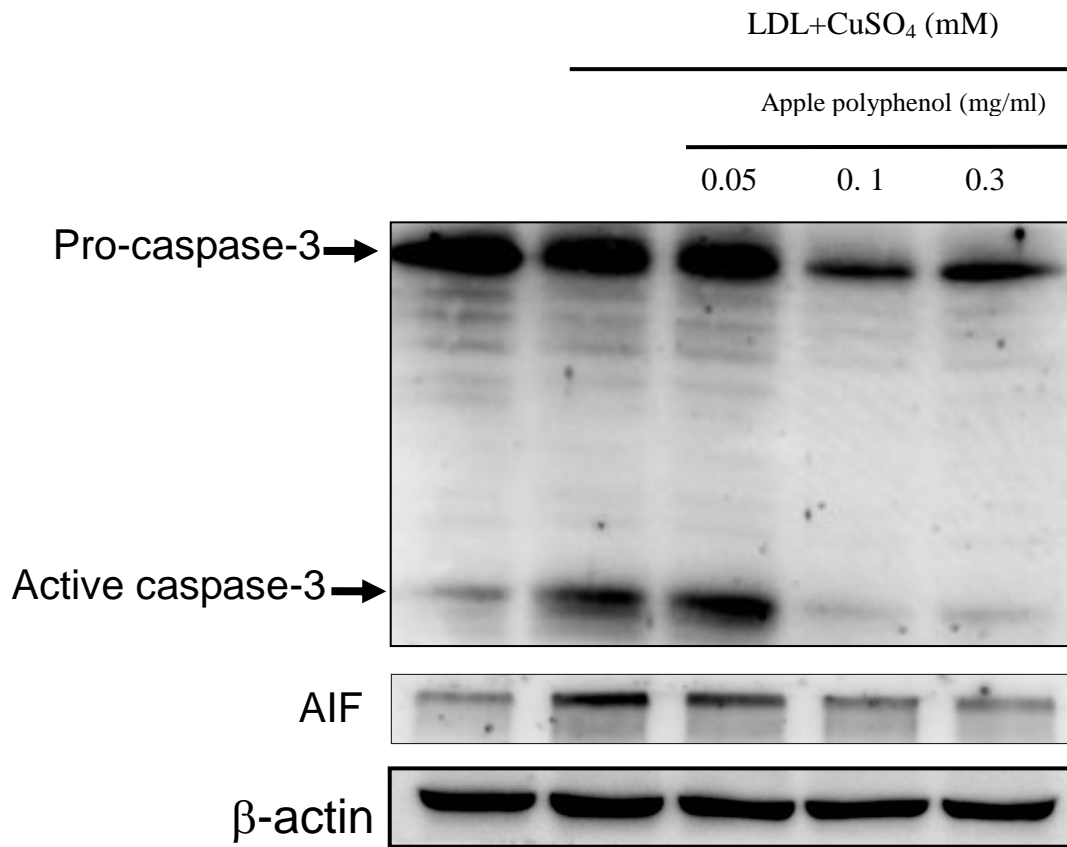
圖二十三、蘋果多酚改變 oxLDL 誘導腎絲球引起之蛋白質變化



圖二十四、蘋果多酚改變 oxLDL 誘導腎絲球引起之凋亡細胞蛋白質變化



圖二十五、蘋果多酚改變 oxLDL 誘導腎絲球引起之凋亡細胞蛋白質變化



表一、蘋果多酚處理糖尿病鼠後之血液生化值

a,b	Normal		Citrate buffer		2% AP		STZ		STZ + 0.5 % AP		STZ + 1 % AP		STZ + 2 % AP	
	4 weeks	10 weeks	4 weeks	10 weeks	4 weeks	10 weeks	4 weeks	10 weeks	4 weeks	10 weeks	4 weeks	10 weeks	4 weeks	10 weeks
ALB,mg/DL	3.25±0.13	3.28±0.13	3.25±0.13	3.33±0.15	3.15±0.24	3.18±0.05	2.65±0.26	2.33±0.12 ^f	2.55±0.31	2.53±0.25	2.80±0	2.65±0.06 ⁱ	2.78±0.25	2.55±0.21
ALT,mg/dL	57.25±13.30	58.25±5.44	65.00±6.93	51.75±7.04	56.75±8.38	56.50±4.65	149.50±67.93 ^c	105.67±14.47 ^d	86.25±28.11	150.50±51.19	200.33±72.51	119.50±41.15	162.50±33.32	247.50±13.98
AST,mg/dL	119.25±39.96	150.25±40.14	100.75±16.34	127.75±22.31	91.75±6.23	159.50±36.74	191.50±57.08	147.00±42.32	134.75±18.01	193.25±99.59	286.33±20.35	143.50±31.50	199.25±65.27	390.25±48.32
B/C,mg/dL	29.25±3.77	26.32±1.34	31.50±4.43	27.57±3.96	27.00±6.22	25.70±6.44	82.30±23.74 ^e	106.90±25.31 ^f	79.57±10.39	98.03±4.82	70.60±7.68	88.66±14.76	79.15±8.27	58.00±6.61 ^h
BUN,mg/dL	15.25±1.25	15.80±0.80	15.75±2.21	15.72±1.23	13.50±3.10	13.82±3.00	34.52±8.34 ^e	41.33±7.55 ^f	39.17±1.98	59.37±24.09	33.23±7.40	51.10±9.46	48.32±20.42	40.22±22.61
CRE,mg/dL	0.52±0.05	0.60±0	0.50±0	0.57±0.05	0.50±0	0.55±0.10	0.42±0.05 ^c	0.46±0.11	0.50±0.08	0.46±0.05	0.46±0.05	0.52±0.05	0.47±0.09	0.52±0.05
HDL,mg/dL	19.75±3.77	20.25±2.98	18.25±1.70	22.75±5.90	16.00±3.91	19.75±3.86	31.25±5.12 ^d	20.00±8.88	25.25±6.23	27.00±2.00	35.33±7.50	29.00±4.69	34.00±8.28	21.25±3.59
LDL,mg/dL	12.25±1.50	10.00±1.15	14.75±3.30	12.75±3.77	10.50±1.00	13.25±2.63	13.50±3.41 ^c	7.66±3.51	8.50±2.51	15.00±10.48	11.33±3.78	10.25±8.50	13.33±4.61	12.50±6.40
TG,mg/dL	76.66±3.21	88.50±12.76	82.66±10.06	76.00±11.40	86.00±16.09	71.00±15.87	291.25±32.24 ^g	285.50±32.22 ^c	126.33±61.71 ^e	264.00±67.06	139.50±30.40 ^e	141.33±86.77	285.75±74.51	166.66±67.51
TCHO,mg/dL	68.33±5.85	61.00±6.97	66.33±6.35	74.66±6.80	56.66±6.65	65.33±5.50	76.00±2.82	36.00±19.79	57.33±2.05	54.00±2.82	77.66±8.62	72.33±25.10	89.00±5.65	67.00±15.13

^a, Data represented as mean ± SD, n=4.

^b, ALB, albumin; ALT, Alanine Aminotransferase; AST, Aspartate Aminotransferase; B/C, the ratio of BUN to creatinine; BUN, blood urea nitrogen; CRE, creatinine; TG, triglyceride.

Statistical significance analyzed by Student's t-distribution. ^c, $P < 0.05$; ^d, $P < 0.01$; ^e, $P < 0.005$; ^f, $P < 0.001$; ^g, $P < 0.0001$, compared to the normal group; ^h, $P < 0.05$; ⁱ, $P < 0.01$; ^j, $P < 0.005$, compared to the diabetes group.

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以500字為限）

【對於學術研究、國家發展及其他應用方面之貢獻】

1. 已確認蘋果多酚具抗糖尿病併發 nephropathy 之作用。
2. 已得知蘋果多酚在此作用中應與抗氧化角色有關。
3. 已得知蘋果多酚在此作用中應與抗氧化及調節 TGF- β 角色有關。
4. 確認蘋果多酚對糖尿病所增加的 oxLDL 引起的腎絲球細胞死亡具有抑制作用。
5. 本研究已發表 2 篇研討會論文。
6. 配合國家以預防醫學替代治療醫學並降低醫療成本之政策，本研究發現蘋果多酚可應用在推廣保健食品時，並具科學數據及其相關效用。
7. 抗糖尿病併發腎病變機制之模式，可提供作為參考。
8. 提供民眾在預防糖尿病併發症方面的正確觀念，而使這些併發症不再被忽略，並可進一步減低糖尿病腎病變的醫療損耗。
9. 提供業界對於蘋果多酚作用之新觀點。

【對於參與之工作人員獲得之訓練】

1. 本研究已培養一位碩士生畢業。
2. 本研究使參與人員已學習藥物誘發動物致病之模式。
3. 本研究提供參與人員學習致病機轉之探討及相關技術的應用，包括動物採血、電子顯微鏡技術、immunohistochemistry、Western blot、細胞培養、zymography 及 ELISA 等技術之應用。

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期：__年__月__日

國科會補助計畫	計畫名稱：		
	計畫主持人：		
	計畫編號：	領域：	
研發成果名稱	(中文)		
	(英文)		
成果歸屬機構		發明人 (創作人)	
技術說明	(中文)		
	(200-500 字)		
	(英文)		
產業別			
技術/產品應用範圍			
技術移轉可行性及預期 效益			

註：本項研發成果若尚未申請專利，請勿揭露可申請專利之主要內容。

國科會補助專題研究計畫移地研究心得報告

日期：__年__月__日

計畫編號	NSC — — — — —		
計畫名稱			
出國人員 姓名		服務機構 及職稱	
出國時間	年 月 日至 年 月 日	出國地點	

一、移地研究過程

二、研究成果

三、建議

四、其他

國科會補助專題研究計畫出席國際學術會議心得報告

日期：__年__月__日

計畫編號	NSC — — — — —		
計畫名稱			
出國人員 姓名		服務機構 及職稱	
會議時間	年 月 日至 年 月 日	會議地點	
會議名稱	(中文) (英文)		
發表題目	(中文) (英文)		

一、參加會議經過

二、與會心得

三、發表論文全文或摘要

四、建議

五、攜回資料名稱及內容

六、其他

國科會補助專題研究計畫國際合作研究計畫國外研究報告

日期：__年__月__日

計畫編號	NSC — — — — —		
計畫名稱			
出國人員姓名		服務機構及職稱	
出國時間	年 月 日至 年 月 日	出國地點	
合作國家		外國合作計畫主持人英文姓名	(First Name) (Last Name)
外國合作機構			

註：1.若出國人員不只一位，應分列姓名。2.外國合作機構及主持人應寫全名。

一、國際合作研究過程（若不只一位研究人員出國，應敘明分工情況及個人角色）

二、研究成果

三、心得與建議

四、本項與國外合作研究之性質，屬：（可複選）

- 分工收集研究資料
- 交換分析實驗或調查結果
- 共同執行理論建立模式並驗證
- 共同執行歸納與比較分析
- 元件或產品分工研發
- 其他（請填寫）_____

五、其他：（本項國合計畫若有下列各項情況，但不以為限，請分項敘述說明）

- （一）除了我方派員前往研究，是否有國外研究人員來台參與研究？若是，請補充來台人員姓名、期間及其活動重點。
- （二）是否包括年輕研究人員（一般指博士生或博士後研究人員）之培育？
- （三）雙方合作成果，是否有與國外共同產生之期刊或會議論文已/擬進行發表？論文名稱（若已有）為何？
- （四）雙方是否已/將有申請共同專利或展開技術移轉之研發成果？若已進行，則擬申請專利之國家或期間為何？

(五)未來雙方是否有持續合作之規劃？

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2012/10/30

國科會補助計畫	計畫名稱: 蘋果多酚減緩糖尿病腎病變之功效及其機轉之探討
	計畫主持人: 李慧禎
	計畫編號: 98-2320-B-040-018-MY3 學門領域: 保健營養
無研發成果推廣資料	

98 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：李慧禎		計畫編號：98-2320-B-040-018-MY3				計畫名稱：蘋果多酚減緩糖尿病腎病變之功效及其機轉之探討	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	1	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	1	1	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	<p>Jyy-Yin Wang, Huei-Jane Lee, 2010, The ameliorative effect of apple polyphenol on streptozotocin induced diabetic nephropathy. The Twenty Fifth Joint Annual Conference of Biomedical Sciences, Taipei, R.O.C.</p>
--	---

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

Jyy-Yin Wang, Huei-Jane Lee, 2010, The ameliorative effect of apple polyphenol on streptozotocin induced diabetic nephropathy. The Twenty Fifth Joint Annual Conference of Biomedical Sciences, Taipei, R. O. C.

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

【對於學術研究、國家發展及其他應用方面之貢獻】

1. 已確認蘋果多酚具抗糖尿病併發 nephropathy 之作用。
2. 已得知蘋果多酚在此作用中應與抗氧化角色有關。
3. 已得知蘋果多酚在此作用中應與抗氧化及調節 TGF- β 角色有關。
4. 確認蘋果多酚對糖尿病所增加的 oxLDL 引起的腎絲球細胞死亡具有抑制作用。
5. 本研究已發表 2 篇研討會論文。
6. 配合國家以預防醫學替代治療醫學並降低醫療成本之政策，本研究發現蘋果多酚可應用在推廣保健食品時，並具科學數據及其相關效用。
7. 抗糖尿病併發腎病變機制之模式，可提供作為參考。
8. 提供民眾在預防糖尿病併發症方面的正確觀念，而使這些併發症不再被忽略，並可進一步減低糖尿病腎病變的醫療損耗。
9. 提供業界對於蘋果多酚作用之新觀點。

【對於參與之工作人員獲得之訓練】

1. 本研究已培養一位碩士生畢業。
2. 本研究使參與人員已學習藥物誘發動物致病之模式。
3. 本研究提供參與人員學習致病機轉之探討及相關技術的應用，包括動物採血、電子顯

微鏡技術、immunohistochemistry、Western blot、細胞培養、zymography 及 ELISA 等技術之應用。