

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 ： 探討洛神葉萃取物保護腎臟細胞免於高糖損傷之研究 名 稱

執行計畫學生：連宜靖
學生計畫編號：MOST 108-2813-C-040-028-B
研究期間：108年07月01日至109年02月28日止，計8個月
指導教授：陳璟賢

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學營養學系（所）

中華民國 109年03月11日

目錄

目錄	I
圖表目錄	III
摘要	1
第一章、 研究動機研究問題	3
第二章、 文獻回顧與探討	5
2.1 糖尿病腎病變(Diabetic nephropathy, DN)	5
2.1.1 多元烴基路徑(Polyol pathway)的活化	5
2.1.2 蛋白激酶 C (Protein kinase C, PKC)的活化	6
2.1.3 終極糖化產物(Advanced glycated end product, AGE)的堆積	6
2.1.4 葡萄糖進入己糖胺路徑(Hexosamine pathway)代謝	6
2.2 洛神葉(<i>Hibiscus</i> leaf)	7
第三章、 研究方法與步驟	9
3.1 洛神葉萃取物(<i>Hibiscus</i> leaf extracts, HLE)之配製及成份分析	9
3.1.1 HLE 之配製	9
3.1.2 總多酚含量測定(Total phenolic content assay)	9
3.1.3 總黃酮含量測定(Total flavonoid content assay)	9
3.2 動物實驗	10
3.2.1 糖尿病腎病變小鼠模式之建立	10
3.2.2 蘇木紫-伊紅染色(Hematoxyline-Eosin stain, H&E stain)	11
3.2.3 膠原蛋白染色(Masson's trichrome stain)	11
3.2.4 醣類染色(Periodic acid-schiff stain, PAS stain)	12
3.2.5 免疫組織化學染色(Immunohistochemistry stain, IHC stain)	13
3.2.6 西方墨點法(Western blotting)	13
3.2.6.1 蛋白萃取與定量	14
3.2.6.2 Western blotting	14
3.3 細胞實驗	14
3.3.1 細胞培養	15
3.3.2 細胞加藥處理	15
3.3.3 細胞存活測試(Cell viability assay)	15
3.3.4 油紅 O 染色(Oil red O staining)	16
3.3.5 細胞內活性氧(Reactive oxygen species, ROS)含量測定	16
3.4 高糖傷害途徑分析	16
3.4.1 醛糖還原酶(Aldose reductase, AR)比活性測定	17
3.4.2 果糖(Fructose)含量測定	17
3.4.3 果糖胺(Fructosamine)活性測定	18
3.4.4 甲基乙二酸(Methylglyoxal, MG)含量測定	18

3.4.5 羧甲基化離胺酸(N-ε-carboxymethyl-lysine, CML)含量測定	18
3.5 統計(Statistical analysis)	19
第四章、 結果與討論	19
4.1 洛神葉萃取物成分分析	20
4.2 探討 HLE 對於對於 STZ 誘導糖尿病腎病變小鼠血清生化值和尿蛋白之 影響	20
4.3 探討 HLE 對於 STZ 誘導糖尿病腎病變小鼠中腎臟組織病理變化之影響	21
4.4 探討 HLE 對於 STZ 誘導糖尿病腎病變小鼠中腎臟組織之高糖傷害途徑 之影響	21
4.5 探討 HLE 對於高糖誘導腎間質細胞存活之影響	22
4.6 探討 HLE 對於高糖誘導腎間質細胞脂質堆積之影響	23
4.7 總結	24
第五章、 參考文獻	25
第六章、 圖表	27

圖表目錄

附圖一：研究動機	4
Table 1. Composition of the HLE	27
Table 2. Effects of HLE on the serum biochemical parameters of mice induced by a HFD combined STZ treatment	28
Figure 1. Effect of HLE on serum glucose level and urine protein level of albumin in DN model mice.	29
Figure 2. Effect of HLE on kidney histopathology and pathological changes in DN model mice.....	30
Figure 3. Effect of HLE on renal protein expressions of fibrotic factors and lipid metabolism regulator in DN model mice.....	31
Figure 4. Effect of HLE on protein levels of TGF β and SREBP-1 <i>in vivo</i>	33
Figure 5. Effects of glucose (Glc), HLE alone or in combination on cell viability in SV40MES13 cells.	34
Figure 6. Inhibitory effect of HLE on the Glc-induced lipid accumulation in SV40MES13 cells... ..	35

摘要

臺灣洗腎率為連年世界之冠，導因於糖尿病腎病變 (diabetic nephropathy, DN)，此病變也是末期糖尿病患之主要死因。由於患者高血糖或胰島素作用不足，進而影響腎臟功能，在高血糖環境中所誘發的氧化壓力 (oxidative stress) 可能是促進 DN 的主要機轉。有研究指出抗氧化物質 (antioxidants) 具有開發為保護腎臟之輔助試劑的潛力，已知富含多酚 (polyphenols) 之天然物--洛神葉 (*Hibiscus sabdariffa* leaf) 具有降血糖、抗氧化、抗動脈硬化及抗癌之功效，本計劃擬探討洛神葉萃取物 (*H. leaf extracts*, HLE) 是否具有抑制 DN 之作用。首先，利用高脂飲食合併腹腔注射鏈脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 誘發小鼠糖尿病之動物模式，研究證實 HLE 可顯著改善腎功能，以及降低高血糖和高脂之血清指標數值，HLE 對於白蛋白尿也有抑制的效果。以腎臟組織病理切片染色分析顯示 HLE 能改善腎小管萎縮、基底膜增厚，以及慢性損傷病徵之形成。分子機制顯示 HLE 能抑制 STZ 誘發纖維化 (fibrosis) 指標蛋白 transforming growth factor-beta (TGF β) 和脂質調控因子 sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) 之表現，HLE 也可能調控高糖傷害途徑以及減緩腎臟脂質堆積 (lipid accumulation) 之作用。細胞實驗則以研究 HLE 保護小鼠腎臟間質細胞 (renal mesangial cells) SV40MES13 對抗高糖所造成的氧化傷害的能

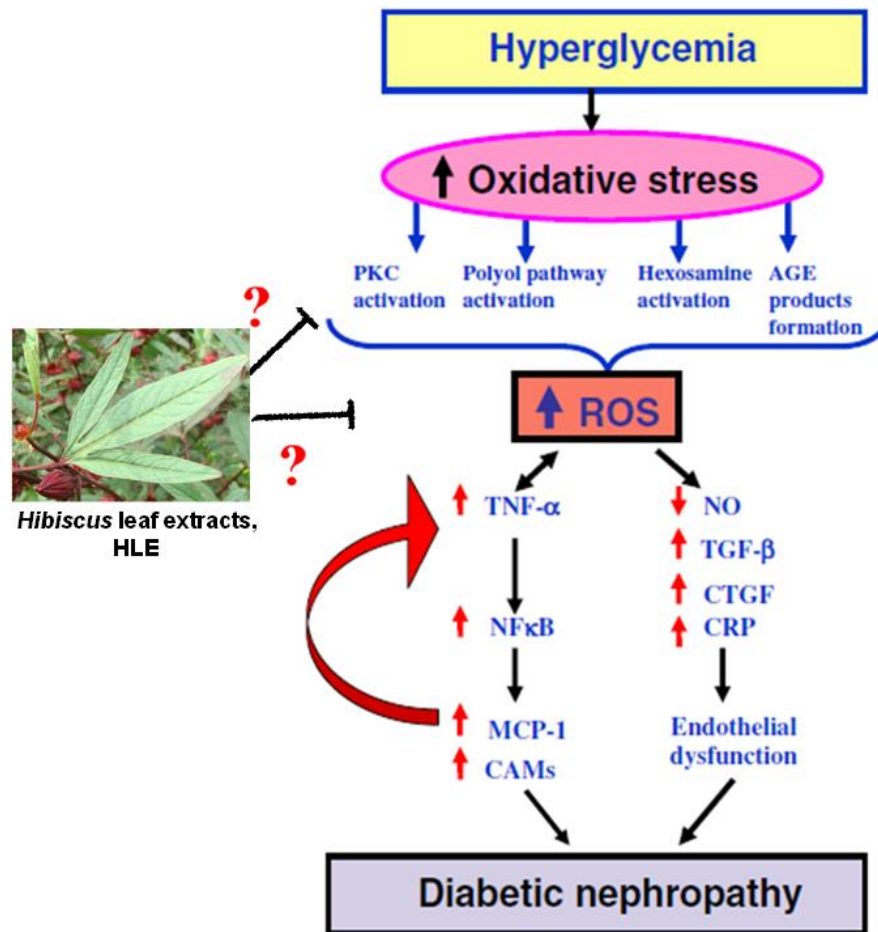
力。利用高濃度葡萄糖誘導 SV40MES13 細胞氧化傷害作為實驗模式，處理 HLE 對於細胞生長、活性氧分子(reactive oxygen species, ROS)含量與脂質堆積皆具有抑制作用，且呈現濃度依賴性。總結，我們預期 HLE 具有可保護腎臟細胞免於高糖傷害途徑，透過降低氧化壓力達到改善 DN 的功效。

關鍵字：糖尿病腎病變、高血糖、氧化壓力、洛神葉萃取物、纖維化、腎臟間質細胞、脂質堆積、活性氧分子

第一章、研究動機研究問題

目前對於糖尿病腎病變(diabetic nephropathy, DN)的治療，除了積極控制血糖外，還有藥物針對致病機轉中長期高血糖造成組織糖化、氧化壓力(oxidative strss)等來減緩腎功能惡化，雖然已有各種臨床試驗的藥物用來治療 DN，但大部分的藥物都具有許多的副作用。因此近年來對於治療 DN 藥物的開發傾向於副作用較少且藥效溫和的天然物萃取來減緩或改善 DN 所致的腎損傷應具有可行性，在過去的研究中已證實多酚(polyphenols)物質具抗氧化、降血糖、保肝及護腎的功效。而已知臺灣本土洛神葉(*Hibiscus sabdariffa* leaf)為富含天然多酚之植物，其具有降血脂、降血糖、抗氧化以及抑制腫瘤細胞生長和惡性轉移的作用。因此，本計劃將進一步探討洛神葉萃取物(*H. leaf* extracts, HLE)是否具有保護腎臟細胞免於高糖損傷之潛力(附圖一)。

附圖一：研究動機



第二章、文獻回顧與探討

2.1 糖尿病腎病變(Diabetic nephropathy, DN)

糖尿病腎病變(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病患主要的小血管併發症之一，約有 20-40% 糖尿病患者會發展成 DN，最終走向末期腎臟病(end stage renal disease, ESRD) [1, 2]。根據統計，國內目前洗腎患者之中約有 40-50% 是由糖尿病引起的。近年來糖尿病患治療除了給予控制血糖藥物之外，飲食型態的調整對 DN 亦相當重要。DN 主要病理變化，包括腎絲球(glomeruli)或腎小管(renal tubules)細胞增生(hyperplasia)或肥大(hypertrophy)、基底膜增厚、腎絲球足細胞(podocyte)受損及死亡、腎絲球及腎小管間質(tubulointerstitial)組織增生，最後腎絲球和腎小管間質產生纖維化(fibrosis)，演變成不可逆的慢性腎臟病(chronic kidney disease) [3, 4]。高血糖引起 DN 的作用機轉非常多，目前研究顯示主要有四種致病機轉：

2.1.1 多元烴基路徑(Polyol pathway)的活化

血糖正常時，細胞內葡萄糖進入糖解路徑(glycolytic pathway)。在高糖下，過多的葡萄糖會進入多元烴基路徑(polyol pathway)，降低體內還原作用所需的兩種輔酶(NADH 和 NAD)，導致穀胱甘肽(glutathione, GSH)減少、一氧化氮(nitric oxide, NO)濃度降低，胞內產生高化壓力和滲透壓力，增加甘油二脂(diacylglycerol, DAG)的合成，

進而活化蛋白激酶 (protein kinase) 和增加糖化終產物 (advanced glycation end products, AGE) 的合成，最終誘導活性氧化物質 (reactive oxygen species, ROS) 生成[5]。

2.1.2 蛋白激酶 C (Protein kinase C, PKC) 的活化:

高糖誘導蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 過度活化，影響血管通透性及收縮性、細胞增生、細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 增加、激素及生長蛋白的信號傳遞路徑。研究指出 PKC- β 被活化後會破壞腎絲球內皮細胞上的接受器及一連串反應，最後造成腎絲球纖維化[6]。

2.1.3 終極糖化產物 (Advanced glycated end product, AGE) 的堆積:

由非酵素催化的梅納反應 (Maillard reaction) 使蛋白質、脂肪、核酸等大分子糖化為終極糖化產物 (advanced glycated end product, AGE)，AGE 和其特殊接受器 (receptors for AGE, RAGE) 結合後誘發 ROS 的生成及引起發炎反應，經由活化細胞核因子 (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 和腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)，造成間質纖維化和腎絲球硬化[7]。

2.1.4 葡萄糖進入己糖胺路徑 (Hexosamine pathway) 代謝:

當葡萄糖進入己糖胺路徑 (hexosamine pathway) 代謝將活化纖維連接蛋白 (fibronectin)、轉化生長因- β (transforming growth factor-beta,

TGF- β)等的表現，誘發發炎反應和纖維化[8]。

2.2 洛神葉(*Hibiscus leaf*)

洛神花是錦葵科木槿屬一年生草本植物或多年生灌木，學名為 *Hibiscus sabdariffa*，又稱洛神葵、洛濟葵、山茄、紅葵。傳統中藥藥理上，洛神花具有降血壓、補血、促進陳代謝、利尿等作用。進一步研究顯示洛神花萃取物中含有類黃酮(flavonoids)、原兒茶酸(protocatechuic acid)和花青素(proanthocyanidins)等成分，而這些有效成分則具有有抗菌(antibacterial)、抗氧化(antioxidant)、肝腎保護、抗糖尿病以及降血壓等功能[9]。並在動物模式中發現洛神花多酚萃取物可以抑制高血糖(hyperglycaemia)及高血脂(hyperlipidemia) [10, 11]，進一步研究指出此萃取物可藉由減輕胰島素抗性和腎上皮間質轉換來改善 DN [12]；但目前的研究大多關注在花萼的部分，相較之下，關於洛神葉的研究便為少數。近年來，我們實驗室研究發現洛神葉富含多酚(polyphenols)成分，多酚是植物中化學物質的統稱，結構中含有多個酚基團。多酚化合物的共同特點是具有良好的抗氧化活性以及清除自由基(free radical)的能力。進一步有關於洛神葉萃取物(*H. leaf extracts*, HLE)的研究，我們證實 HLE 可抑制前列腺癌細胞 LNCaP 生長及惡性遷移作用[13, 14]。洛神葉多酚萃取物(*H. leaf polyphenolic extract*, HLP)可促進黑色素癌細胞 A375 凋亡及細胞自噬死亡[15]，

HLP 也能夠有效抑制低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)氧化和泡沫細胞生成[16]，以及保護內皮細胞免於損傷[17]，有鑑於此，HLE 可能具有預防或改善 DN 之潛力。

第三章、研究方法與步驟

3.1 洛神葉萃取物(*Hibiscus leaf extracts*, HLE)之配製及成份分析

3.1.1 HLE 之配製

秤取每 100 g 的乾燥洛神葉加入 6 L distilled water，以電磁爐加熱至 100°C 煮 2 小時，待冷卻後取其液體進行過濾，將濾液冷凍乾燥後取得之粉末即為 HLE，產率約為 50%。

3.1.2 總多酚含量測定(Total phenolic content assay)

利用在磷鉬酸複合物(Folin-Ciocalteu's reagent)中，苯環(phenol)可以還原鉬(molybdenum)的原理，當樣品中的苯酚越多時，則酚基與 Folin & Ciocalteu's phenol reagent 反應會產生越多的藍綠色複合物。待測萃取物樣品秤取 1 g，溶於酒精與二次水配製成體積 10 mL，作為 1 g/10 mL 的樣品 Stock 1，再以 1:20 的稀釋倍數稀釋成為 Stock 2，並以 0.45 μm 濾網過濾之，即為本實驗的待測樣品。接著配製標準品 GA (gallic acid) 10 mg/25 mL 甲醇並避光，再分別取 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 mL，換算濃度為 20、40、60、80、100 μg 再依序加入甲醇 0.95、0.9、0.85、0.8、0.75 mL 使標準品每管成 1 mL 體積。待測樣品則自 Stock 2 取 0.1 mL 並加入 0.9 mL 甲醇。而後標準品與待測樣品皆依序加入 0.5 mL 的 2 N Folin & Ciocalteu's reagent 混合均勻，再加 3 mL 20% Na_2CO_3 ，混合均勻後避光室溫靜置 15 分鐘。再加入 5 mL

ddH₂O，以 1200 rpm 離心 5 分鐘，取上清液 1 mL 以波長 725 nm 測其 OD 值，並使用甲醇當 blank。最後依回歸方程式計算樣品中多酚的含量。

3.1.3 總黃酮含量測定(Total flavonoid content assay)

測定黃酮的含量以 rutin (mg/ml) 為標準品。甲醇溶解後分別取不同的體積，以 30% 乙醇稀釋並補足體積至 10 ml 搖勻。接著各加 0.3 ml 之 1M NaNO₃ 後搖勻，室溫靜置 6 分鐘。再加 0.3 ml 之 10% AlNO₃ 後搖勻，室溫靜置 6 分鐘。最後加入 4 ml 之 4% NaOH 溶液混合均勻，補 0.4 ml 去離子水至刻度，放置 15 分鐘。在波長 510 nm 下測吸光值 (乙醇歸零)，吸光值為縱座標，濃度為橫座標，得一標準曲線。並計算回歸方程式。樣品泡好濃度，取 0.1 ml 樣品加 0.9 ml 甲醇，以下步驟同標準品，按標準曲線下測吸光值，依回歸方程式計算黃酮的含量。

3.2 動物實驗

3.2.1 糖尿病腎病變小鼠模式之建立

高脂飲食合併鏈脲佐菌素(streptozotocin, STZ)誘發 BALB/c 小鼠作為糖尿病腎病變之動物模式。BALB/c 小鼠適應三天後先給予高脂飲食(60% cal from fat)兩週，再合併注射 STZ。STZ 注射方式為劑量 40 mg/kg BW，溶於以 0.1 M citric acid 滴定 pH 值至 4.2 的生理食鹽

水中，老鼠禁食 4~6 小時後，每隻老鼠經由腹腔注射 200 μ l 的 STZ 溶液，連續注射 5 天。STZ 誘發 14 天後，由尾巴採血測定空腹血糖 (fasting plasma glucose) 及口服葡萄糖耐受試驗 (oral glucose tolerance test, OGTT)、測血壓和體重加以確認，與正常小鼠相比皆有顯著差異 ($p < 0.05$)，即代表 BALB/c 小鼠糖尿病模式誘發成功。

3.2.2 蘇木紫-伊紅染色 (Hematoxyline-eosin stain, H&E stain)

組織學最常用的染色方法之一，利用組織結構對不同染料的結合程度不同，hematoxyline 將嗜鹼性結構染成藍紫色，通常包括含有核酸的部分，而 eosin 將嗜酸性結構染成粉紅色，通常為細胞內及細胞間的蛋白質部分。將包埋的臟器切片，以二甲苯、序列酒精 (100%、95%、75%) 脫蠟，用二次水清洗，再以 Mayer's hematoxylinz 反應 5 分鐘後二次水清洗，加入 eosin solution 反應 1 分鐘，以 95%、100% 酒精及二甲苯脫水，最後用阿拉伯膠封片，利用光學顯微鏡觀察。

3.2.3 膠原蛋白染色 (Masson's trichrome stain)

Masson's trichrome stain 常用於區分細胞周圍的結締組織，會將細胞膠原纖維染成藍色，細胞質呈紅色，而細胞核呈黑色。將包埋的腎臟切片，以二甲苯、序列酒精 (100%、95%、75%) 脫蠟，用二次水清洗，再以 Bouin's solution 於 56°C 反應 15 分鐘，用二次水清洗，共 3 次，加入 Weigert's iron hematoxylin 反應 5 分鐘，用二次水清洗，

共 3 次，再以 phosphotungstic/phosphomolybdic acid solution 反應 5 分鐘之後和 aniline blue 反應 5 分鐘，和 1% acetic acid 反應 2 分鐘後以 95%、100% 酒精及二甲苯脫水，最後用阿拉伯膠封片。利用光學顯微鏡觀察腎纖維化病灶。

3.2.4 醣類染色(Periodic acid-schiff stain, PAS stain)

PAS 常用於檢測組織中的醣類，會呈紫紅色。將包埋的腎臟切片，以二甲苯、序列酒精（100%、95%、75%）脫蠟，用二次水清洗，再以 PAS 反應 10 分鐘，用二次水清洗，共 4 次，加入 Schiff's solution 反應 30 分鐘，先用溫熱自來水沖洗，再以二次水清洗，共 2 次，再以 Hematoxylin 反應 3 分鐘之後流水反藍 3 分鐘，Bluing Reagent 反應 30 秒，用二次水清洗，共 2 次，後以 95%、100% 酒精及二甲苯脫水，最後用阿拉伯膠封片。利用光學顯微鏡觀察病灶。

3.2.5 免疫組織化學染色(Immunohistochemistry stain, IHC stain)

IHC 利用抗原抗體的專一性結合及抗體上標定可呈色的化學物質，即可在細胞或組織中檢測目標抗原蛋白，依位置所在量化表現量。首先將包埋的腎臟切片，以二甲苯、序列酒精（100%、95%、85%、70%、50%、30%）脫蠟，用二次水清洗，再加入 Peroxidase suppressor 反應 30 分鐘，用 wash buffer 清洗 3 分鐘，共 2 次，加入 blocking buffer 反應 30 分鐘，再加入一級抗體反應 30 分鐘，用 wash buffer 清洗 3

分鐘，共 2 次，加入二級抗體反應 30 分鐘，用 wash buffer 清洗 3 分鐘，共 2 次，再加入 1X Metal DAB Substrate Working solution 反應 10 分鐘，用 wash buffer 清洗 3 分鐘，共 2 次，再以二次水稍微潤濕玻片並瀝乾，再加入 hemotoxylin 反應 2 分鐘，以二次水清洗玻片數次，再用 wash buffer 清洗 1 分鐘，後以二次水沾濕玻片並待其風乾，最後用 Mounting Medium 封片，並利用光學顯微鏡觀察記錄。

3.2.6 西方墨點法(Western blotting)

3.2.6.1 蛋白萃取與定量

秤取 100 mg 腎臟，加入 RIPA buffer (150 mM NaCl、1% NP-40、0.5 % deoxycholic acid、0.1% SDS、50 mM Tris-base，pH 7.5)後，再加入蛋白酶抑制劑(1 mM sodium orthovanadate、100 μ g PMSF、170 μ g/ml leupeptin)。以均質機破壞組織後加入蛋白酶抑制劑，於 4°C、12000rpm 下離心 10 分鐘，保留上清液。以 BCA protein assay kit 定量及 562 nm 測定吸光值並換算蛋白濃度，調整蛋白量。

3.2.6.2 Western blotting

以定量出的蛋白濃度將所需的蛋白調整至一致，以二次水補至同體積再加入 loading dye，將所配置的樣本用加熱器以 100°C 加熱 10 分鐘使其變性後離心，以 8% 聚丙烯醯胺凝膠(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)進行 70 伏特的電壓電泳約三小時，依其分子量不同而分離。依順序將海綿、兩片濾紙、8% 聚丙烯醯胺凝膠、硝化

纖維膜、兩片濾紙和海綿夾好，再將夾子放置於轉置槽中，以電壓 100 伏特 100 分鐘使蛋白轉印到硝化纖維膜上。將轉印完成的硝化纖維膜以麗春紅紅染，裁剪所需的蛋白部分，再以 TBS (tris-buffered saline)將紅染清洗掉。接著浸泡在 5%的脫脂牛奶中一個小時，以 TBS + tween 清洗三次，每次十分鐘。加入一抗於 4°C 下反應 overnight 後，重複上述清洗步驟，加入對應的二級抗體反應一小時後重複上述清洗步驟。將顯影劑 ECL 加在硝化纖維膜上，用冷光儀拍攝，最後以分析軟體透過深淺不同來定量蛋白質表現情形。

3.3 細胞實驗

3.3.1 細胞培養

本文以小鼠腎絲球間質細胞 SV40MES13 作為實驗對象，95% Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12)培養液，並外加 1.5 g/L sodium bicarbonate、14 mM HEPES、1% penicillin，pH 7.2~7.3，再加上 5% fetal bovine serum (FBS) 作為增殖培養基。培養在 75 cm² Nunclon™ delta treated flask 中，並放置 37°C、5% CO₂ 環境的恆溫箱裡。每 2 至 3 天更換一次培養液，5~7 日繼代細胞一次。

3.3.2 細胞加藥處理

將細胞培養於 6-well 中，且每個 well 以細胞計數方式確認所種下之細胞數皆相等，每個 well 中種入 5 X 10⁵ 個細胞，待細胞完全貼壁

且型態完全後以 PBS 潤洗細胞，再加入 starvation medium (即不含有 10% FBS 的培養液)放回 5% CO₂ 之 37°C 無菌恆溫培養箱中 24 小時後以 PBS 潤洗細胞，並將培養液換回有添加 10% FBS 的培養液，每個 well 中以 30 mM 高葡萄糖(high glucose, high Glc)處理 SV40MES13 細胞模擬高糖誘導糖尿病腎病變之細胞模式，分別加入不同劑量之 HLE 置於 5% CO₂ 之 37°C 無菌恆溫培養箱中培養 24 小時。

3.3.3 細胞存活測試(Cell viability assay)

將欲實驗的細胞每個 well 種入約 2.5×10^4 /mL 細胞培養在 6-well 裡，並使其均勻分布在培養盤中，培養於 5% CO₂、37°C 的恆溫環境。經 24 小時後，將培養液更換為 starvation medium 進行飢餓處理，並放回培養箱中反應 24 小時。之後再換回正常的培養液並給予特定濃度的 Glc 及 HLE 處理 24 小時後，去除培養盤中的上清液，並將細胞收集於 1.5 mL eppendorf 中，再以 PI (propidium iodide) 染色並使用流式細胞儀(Flow cytometry) (Merck) 進行細胞計數。經處理後的細胞經 trypsin-EDTA 作用，並以培養液中中和沖洗下來，離心收集細胞後，加入 1 mL PBS 潤洗，再次離心加入 300 μ L PBS 混合均勻後，取 10 μ L PI 染劑(0.5 mg PI 粉末溶於 50 mL PBS)加入細胞均質液中，避光反應計時 5 分鐘後上機分析細胞存活變化。細胞存活測試利用 PI 染色並以 Flow cytometry 進行，PI 能染上死亡的細胞，但無法使具有完整細胞

膜的活細胞染色，因此可測得訊號推算活細胞數。

3.3.4 油紅 O 染色(Oil red O staining)

油紅 O 為一種蘇丹染劑，對於脂肪有強烈親和力，能在中性脂肪中溶解使之呈色，藉由染色後的紅色表現進行分析得知細胞內脂質之含量，因此 Oil red O 為良好脂溶性染劑。將 oil red O 粉末溶於異丙醇配成 5 mg/ml 之原液，再加入二次水將之稀釋 1.5 倍，之後以 0.22 μm 的過濾膜過濾溶劑。將細胞以 PBS 潤洗 2 次，加入 10% paraformaldehyde 在 37°C 的溫箱中固定 30 分鐘，之後加入過濾過之 oil red O 染劑於室溫下反應 15 分鐘使細胞呈色，再以 PBS 洗去多餘染劑，最後以倒立式顯微鏡進行觀察並拍照記錄，觀察結束立即以異丙醇將染劑溶下，並將各組溶下之染劑分別吸取 1 ml 置入 96 孔盤中，再以 ELISA reader 檢測波長 492 nm 之吸光值，比較脂質染色訊號強弱。

3.3.5 細胞內活性氧(Reactive oxygen species, ROS)含量測定

細胞飢餓處理 24 小時後，將舊的 medium 移除，以 PBS 清洗細胞後再加入正常的 medium，接著先將細胞以 50 μM dichlorofluorescein diacetate (DCFDA)處理，再放回 5% CO_2 之 37°C 無菌恆溫培養箱中使其生長。1 小時後，將含有 DCFDA 的 medium 移除，以 PBS 清洗細胞後再加入正常的 medium，並將細胞給予特定濃

度的 Glc 及 HLE，再放回 5% CO₂ 之 37°C 無菌恆溫培養箱中使其生長。於 24 小時後，加入適量的 trypsin，於恆溫箱中反應 10 分鐘，使細胞脫落，隨後加入 5~10 ml 的 medium 以終止 trypsin 的反應並沖刷細胞，再將其吸到 15 mL 離心管中，接著以 1000 rpm 離心 5 分鐘後去除上清液，再以 PBS 清洗細胞後上機測定 DCF 螢光表現，即代表細胞內 ROS 的含量。

3.4 高糖傷害途徑分析

3.4.1 醛糖還原酶(Aldose reductase, AR)比活性測定

參考Tong Gui等人的方法加以修改，取樣品血液10 μL (以90 μL的50 mM PPB稀釋)或臟器均質液20 μL (以80 μL的50 mM PPB稀釋)，加入 800 μL 的 reagent buffer (0.4 M Lithium sulfate 和 10 mM DL-glyceraldehyde)混和均勻，最後加入100 μL的0.1 mM NADPH，在波長340 nm下測1分鐘內吸光值的變化。AR比活性=(樣品的△吸光值- Blank的△吸光值) × 10⁶ / 6.22 × 樣品量(μL) × 樣品蛋白量(mg/mL)。單位表示：nmole NADPH /min/mg pt。

3.4.2 果糖(Fructose)含量測定

選用購自BioVision的Fructose Assay Kit進行分析，先將50 μL的標準品或樣品加入well中，再加入50 μL reagent(含有OxiRed probe、enzyme mix、fructose converting enzyme)，於37°C下培養1個小時，利

用分光光譜儀測波長570 nm的吸光值。濃度計算：將樣品的吸光值代入已知的標準曲線，乘以樣品的稀釋倍數。單位以nmole表示。

3.4.3 果糖胺(Fructosamine)活性測定

果糖胺是由血漿中蛋白質之胺基與還原糖的醛基所糖化形成的（反應蛋白質主要為白蛋白，半衰期為19天），故可反映1-3個星期平均血糖濃度的高低。血中果糖胺是一種大分子酮胺類化合物，鹼性條件下果糖胺具有還原力，可將四氮唑藍(nitroblue tetrazolium)還原成紫色的formazan，其生成量與果糖胺濃度成正比。經由測定formazan的生成量即可由標準品之標準曲線換算果糖胺濃度。

3.4.4 甲基乙二酸(Methylglyoxal, MG)含量測定

將收集檢體(血清、組織、細胞)蛋白利用甲基乙二酸商業分析套組(OxiSelect™ Methylglyoxal (MG) Competitive ELISA Kit)進行分析，將檢體加入分析盤中，再加入 anti-MG 一級抗體，最後再加入 HRP 二級抗體，最後利用分光光譜儀以 450 nm 波長偵測，與 MG-BSA 標準品濃度比對後換算出檢體 MG 含量。

3.4.5 羧甲基化離胺酸(N-ε-carboxymethyl-lysine, CML)含量測定

使用 CircuLex CML/Nε-(Carboxy -methyl) lysine ELISA Kit 進行分析，先將 50 μL 標準品或稀釋樣品和 50 μL anti-CML-adduct monoclonal antibody 混勻後 加入 well 中，室溫下培養 1 小時，以 wash

buffer 洗四次，再分別加入 100 μL 的 HRP conjugated Detection Antibody，室溫下培養 1 小時，再用 wash buffer 洗四次，再加入 100 μL 的 Substrate Reagent，室溫下避光培養 10-20 分鐘後，再加入 100 μL stop solution，測波長 450/540 nm 吸光值。濃度計算：測得樣品的吸光值，代入標準品求得之 four-parameter 方程式，即得 CML 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)。

3.5 統計(Statistical analysis)

以 Sigma-Plot 軟體分析數據，mean \pm SD 表示。利用 t-test-Unpaired 來評估統計差異。以*表示 $P < 0.05$ ，**則表示 $P < 0.01$ 。

第四章、結果與討論

4.1 洛神葉萃取物成分分析

從附圖 Table 1 可知，以定量分析測得洛神葉萃取物(*Hibiscus leaf extracts*, HLE)中總多酚(total polyphenol)含量約有 $5.2 \pm 0.1\%$ ；以及總黃酮(total flavonoid)約有 $21.0 \pm 1.7\%$ ，初步確認洛神葉為富含類黃酮(flavonoids)之萃取物。

4.2 探討 HLE 對於對於 STZ 誘導糖尿病腎病變小鼠血清生化值和尿蛋白之影響

首先，利用鏈脲佐菌素(streptozotocin, STZ)誘發糖尿病腎病變(diabetic nephropathy, DN)之動物模式，動物分組如下：(I) control group、(II) STZ group、(III) STZ + 1% HLE group、(IV) HLE alone group。實驗結果顯示相較於 STZ 誘導組，HLE 試驗組之血清中腎功能指標血清尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、肌酸酐(creatinine, Cre)含量明顯改善(Table 2)。血糖代謝異常是以空腹血糖值空腹血糖(fasting plasma glucose)及葡萄糖耐受測試(oral glucose tolerance test, OGTT)血糖變化作為評估項目，在 STZ 誘導組中可以明顯觀察到高血糖數值(Figure 1A)，以及透過 OGTT 曲線下有較高於控制組之趨勢(Figure 1B)，顯示糖尿病誘發之表徵；此外，DN 中微蛋白尿指標則以 SDS-PAGE 進行尿中白蛋白(albumin)含量分析，由 Figure 1C 可觀察到誘導組中

albumin 蛋白表現量增加，HLE 可顯著抑制其表現。上述分析試驗皆可確認 STZ 可成功地誘導小鼠產生 DN，而此些腎功能指標、血糖數值及微蛋白尿，1% HLE 組都能顯示具有降低或減緩之效果，代表 HLE 可有效的抑制 DN 的發展。

4.3 探討 HLE 對於 STZ 誘導糖尿病腎病變小鼠中腎臟組織病理變化之影響

藉由動物實驗取得各組之腎臟組織進行切片及蘇木素-伊紅染色 (hematoxylin and eosin stain, H&E stain) 染色，在 STZ 誘導組別之腎臟組織細胞型態呈現不規則排列且組織結構鬆散；HLE 給予下明顯回復此些病變表現(Figure 2A)。後續以醣類染色(Periodic acid-schiff stain, PAS stain)分析 STZ 組的腎臟組織切片中可以發現腎絲球正常，腎小管間質有顯著的細胞浸潤、萎縮(atropy)及間質性纖維化(fibrosis)，這些腎小管間質損傷的情形在給予 1% HLE 後，呈現回復與正常組相當的情形(Figure 2B)。綜合上述，腎臟組織病理切片染色分析顯示 HLE 能改善腎小管萎縮、基底膜增厚，以及慢性損傷病徵之形成。

4.4 探討 HLE 對於 STZ 誘導糖尿病腎病變小鼠中腎臟組織之高糖傷害途徑之影響

接著利用免疫組織化學染色(Immunohistochemistry stain, IHC stain)偵測腎臟組織當中纖維化和脂質代謝(lipid metabolism)調控分子

之特異性蛋白表現顯示：在 STZ 誘導組方面，結果發現其有明顯的 anti- α -平滑肌動蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、anti-結締組織生長因子(connective tissue growth factor, CTGF)、固醇調節元件結合蛋白 1 (sterol regulatory element-binding protein 1, SREBP-1)及脂肪酸合酶(fatty acid synthas, FAS)特異性染色呈現(Figure 3A)，以此可推論 DN 有纖維化之病徵；而 HLE 則具有抑制上述分子表現之趨勢(Figure 3B-E)。

進一步分析各組腎臟組織蛋白表現情形，以西方墨點法(Western blotting)分析探討高糖傷害途徑相關調控分子，包含轉化生長因子(transforming growth factor beta, TGF β)和 SREBP-1 (Figure 4A)。結果顯示 STZ 誘導組中兩者蛋白表現量顯著上升；在 HLE 試驗組則明顯回復趨近於對照組之表現(Figure 4B)。後續實驗利用醛糖還原酶(aldose reductase, AR)比活性、果糖(fructose)含量、果糖胺(fructosamine)活性、甲基乙二酸(methylglyoxal, MG)含量、羧甲基化離胺酸(N- ϵ -carboxymethyl-lysine, CML)含量測定等方法分析腎臟組織中高糖傷害途徑之影響，以及釐清 HLE 是否具有抑制高糖代謝途徑之功效。相較於 STZ 誘導組，HLE 試驗組腎臟組織中 AR 比活性、果糖含量、果糖胺活性和 MG 含量皆為顯著下降(data not shown)。

4.5 探討 HLE 對於高糖誘導腎間質細胞存活之影響

另一方面，細胞實驗以小鼠腎間質細胞(renal mesangial cells) SV40MES13 處理不同劑量的葡萄糖(glucose, Glc) (0、5、10、15、30、50 mM)反應 24 小時，利用流式細胞儀(Flow cytometric assay)進行細胞存活分析(cell viability assay)。量化結果顯示相較於對照組，在加入高濃度 Glc (30 和 50 mM)的組別對於 SV40MES13 細胞之生長有較明顯的抑制效果(Figure 5A)，因此篩選對細胞生長產生顯著影響的 Glc 劑量 30 mM 作為腎臟細胞損傷模式之高糖誘導組(high Glc)。此外，以不同濃度的萃取物 HLE (0、0.1、0.5、1、5、10、50、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)處理 SV40MES13 細胞同樣進行存活分析，結果發現在高濃度 HLE (50 和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)具有明顯之細胞毒性(Figure 5B)，因此後續實驗選擇無細胞毒性之 HLE 濃度範圍($< 50 \mu\text{g}/\text{ml}$)進行探討。經細胞毒性試驗挑選合併處理劑量後，顯示 Flow cytometric assay 分析細胞存活的結果及其量化(Figure 3C)，細胞處理 high Glc 後存活率明顯降低，而合併處理 HLE 的組別則能有效保護細胞，維持細胞存活率，且具有濃度依賴性效應。

4.6 探討 HLE 對於高糖誘導腎間質細胞脂質堆積之影響

進一步，透過油紅 O 染色(Oil red O staining)分析，在顯微鏡下結果顯示經 high Glc 處理後之 SV40MES13 細胞紅色油滴明顯表現(Figure 6A)，收取染劑後之量化結果也明顯上升(Figure 6B)；而以不

同濃度 HLE (5、10、20 $\mu\text{g/ml}$)處理後，可減低細胞中紅色油滴之含量，且量化結果也明顯下降(Figure 6B)，因此推論 HLE 能有效降低 SV40MES13 細胞中脂肪堆積之情形。

4.7 總結

在本文顯示體內及體外試驗中，HLE 所具改善 DN 之功效。研究以動物試驗確認 STZ 造成小鼠血清腎功能異常和蛋白尿的現象，以及其促進腎小管萎縮及間質性纖維化等慢性損傷之病徵，成功誘導為 DN 模式。在本研究中，給予 HLE 六週後可以顯著改善腎功能和微蛋白尿，在腎損傷程度上有明顯的保護效果；並以細胞試驗分析 HLE 可抑制高糖誘發腎臟間質細胞生長、氧化壓力與脂質堆積，且呈現濃度依賴性效應。總結，我們提出 HLE 具有保護腎臟細胞免於高糖傷害途徑、脂質代謝異常，並透過降低氧化壓力達到改善 DN 的功效，未來具有開發 HLE 為保護腎臟之輔助試劑的潛力。

第五章、參考文獻

1. 許志成、熊昭、陳鴻鈞等人，2017，2015 Annual Report of Kidney Disease in Taiwan。
2. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001, 414, 782-7.
3. Elmarakby AA, Abdelsayed R, Yao Liu J, Mozaffari MS. Inflammatory cytokines as predictive markers for early detection and progression of diabetic nephropathy. *EPMA J*. 2010, 1, 117-29.
4. 陳育忠，2017，薑黃素(curcumin)對糖尿病腎病變的效果。
5. Brownlee M: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414:813-20
6. Mima A, Hiraoka-Yamamoto J, Li Q, et al. Protective effects of GLP-1 on glomerular endothelium and its inhibition by PKC β activation in diabetes. *Diabetes*. 2012, 61, 2967-79
7. Chao CY, Mong MC, Chan KC, Yin MC. Anti-glycative and anti-inflammatory effects of caffeic acid and ellagic acid in kidney of diabetic mice. *Mol Nutr Food Res*. 2010, 54, 388-95.
8. Goldberg H, Whiteside C, Fantus IG. O-linked beta-Nacetylglucosamine supports p38 MAPK activation by high glucose in glomerular mesangial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011, 301, 713-26.
9. Da-Costa-Rocha I, Bonnlaender B, Sievers H, Pischel I, Heinrich M. Hibiscus sabdariffa L. - a phytochemical and pharmacological review. *Food Chem*. 2014, 165, 424-43.
10. Peng CH, Yang YS, Chan KC, Wang CJ, Chen ML, Huang CN. Hibiscus sabdariffa polyphenols alleviate insulin resistance and renal epithelial to mesenchymal transition: a novel action mechanism mediated by type 4 dipeptidyl peptidase. *J Agric Food Chem*. 2014, 62, 9736-43.
11. Peng CH, Chyau CC, Chan KC, Chan TH, Wang CJ, Huang CN. Hibiscus sabdariffa polyphenolic extract inhibits hyperglycemia, hyperlipidemia, and glycation-oxidative stress while improving insulin resistance. *J Agric Food Chem*. 2011, 59, 9901-9.
12. Huang CN，Wang CJ，Yang YS，Lin CL，Peng CH Hibiscus sabdariffa polyphenols prevent palmitate-induced renal epithelial mesenchymal transition by alleviating dipeptidyl peptidase-4-mediated insulin resistance. *Food Funct*. 2016 Jan;7(1):475-82.
13. Lin HH, Chan KC, Sheu JY, et al. Hibiscus sabdariffa leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Food Chem*. 2012, 132, 880-91.
14. Chiu CT, Chen JH, Chou FP, Lin HH. Hibiscus sabdariffa Leaf Extract Inhibits Human Prostate Cancer Cell Invasion via Down-Regulation of Akt/NF- κ B/MMP-9 Pathway. *Nutrients*. 2015, 7, 5065-87.
15. Chiu CT, Hsuan SW, Lin HH, et al. Hibiscus sabdariffa leaf polyphenolic extract induces human melanoma cell death, apoptosis, and autophagy. *J Food Sci*. 2015, 80, H649-58.
16. Chen JH, Wang CJ, Wang CP, et al. Hibiscus sabdariffa leaf polyphenolic extract inhibits LDL oxidation and foam cell formation involving up-regulation of

- LXR α /ABCA1 pathway. *Food Chem.* 2013, 141, 397-406.
17. Chen JH, Lee MS, Wang CP, Hsu CC, Lin HH. Autophagic effects of Hibiscus sabdariffa leaf polyphenols and epicatechin gallate (ECG) against oxidized LDL-induced injury of human endothelial cells. *Eur J Nutr.* 2017, 56, 1963-81.

第六章、圖表

Table 1. Composition of the HLE

Polyphenolic compound	HLE (%)
Total polyphenol (Folin-Ciocalteu method)	5.2 ± 0.1
Total flavonoid (Jia method)	21.0 ± 1.7

Table 2. Effects of HLE on the serum biochemical parameters of mice induced by a HFD combined STZ treatment^a

variable ^b	Control group	STZ group	STZ + HLE group	HLE group
BUN (mg/dL)	20.02 ± 2.52	34.67 ± 0.89 ^d	25.90 ± 3.59 ^e	23.3 ± 3.93
CRE (mg/dL)	0.31 ± 0.03	0.42 ± 0.04 ^c	0.33 ± 0.05 ^e	0.31 ± 0.04
Triglycerides (mg/dL)	154.61 ± 16.10	147.92 ± 7.87	91.33 ± 9.02 ^f	136.25 ± 17.58
Cholesterol (mg/dL)	146.08 ± 17.44	199.54 ± 20.65 ^d	160.50 ± 3.54 ^e	130.00 ± 7.44
LDL-c (mg/dL)	62.27 ± 5.16	83.20 ± 3.96 ^d	71.50 ± 7.78 ^e	66.60 ± 0.55
HDL-c (mg/dL)	54.15 ± 10.61	67.67 ± 9.56 ^c	81.67 ± 2.52 ^e	51.33 ± 7.15
GOT (U/L)	188.78 ± 16.61	217.80 ± 33.19 ^d	171.50 ± 9.19	221.50 ± 27.58
GPT (U/L)	41.88 ± 11.68	43.50 ± 6.36	45.00 ± 7.07	48.75 ± 9.07

^aEach value is expressed as the mean ± SD (n = 8/group). Duration of the experiment = 6 weeks. Results were statistically analyzed with Student's t test. ^b LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase; BUN, blood urea nitrogen; CRE, creatinine. ^cp < 0.01 compared with the control group. ^dp < 0.05 compared with the control group. ^ep < 0.05 compared with the HFD + STZ group. ^fp < 0.01 compared with the HFD + STZ group.

Fig. 1

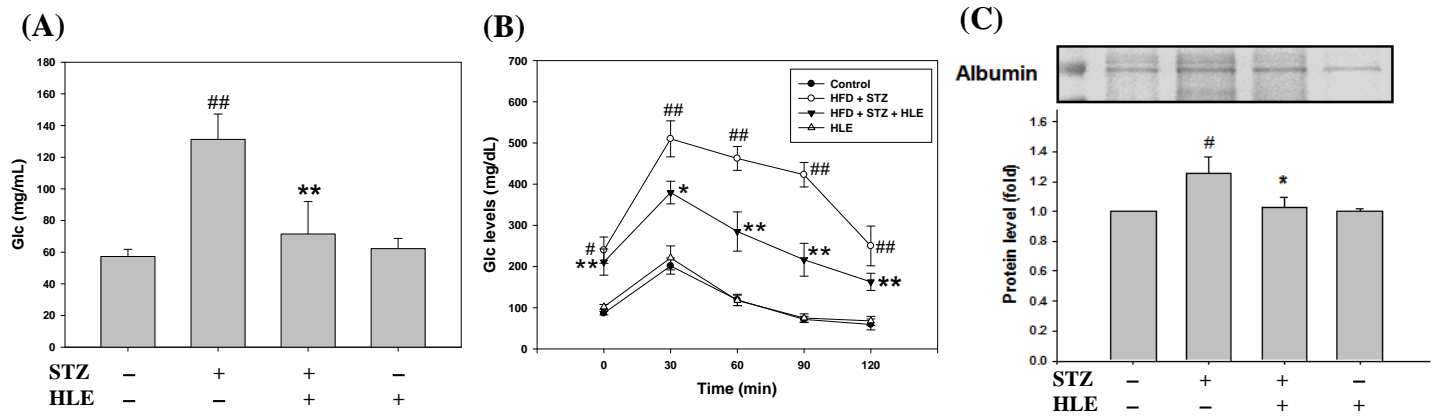
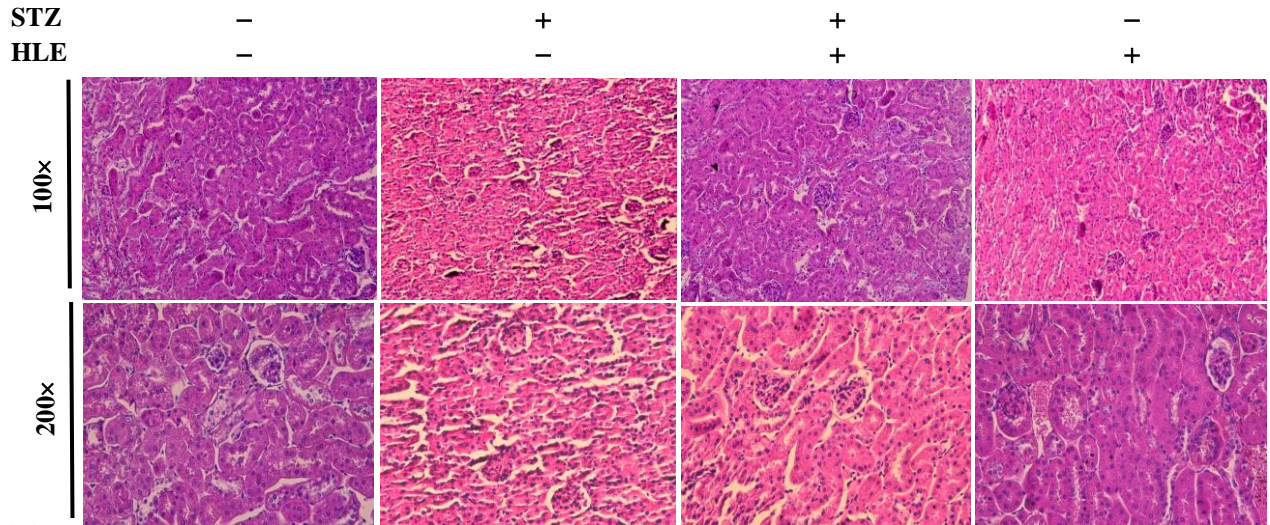


Figure 1. Effect of LSE on serum glucose level and urine protein level of albumin in DN model mice. HFD combined STZ treatment-induced the DN model mice were treated with 1% HLE for 6 weeks. The fasting plasma glucose (A) and serum OGTT (B) were detected. (C) The mice were sacrificed after 6 weeks, and urine was collected for analysis. SDS-PAGE analysis of albumin expression was carried out with urine from them. The quantitative data are presented as mean \pm SD (n = 3) from one independent experiments. #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with the control group. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the STZ group.

Fig. 2

(A)



(B)

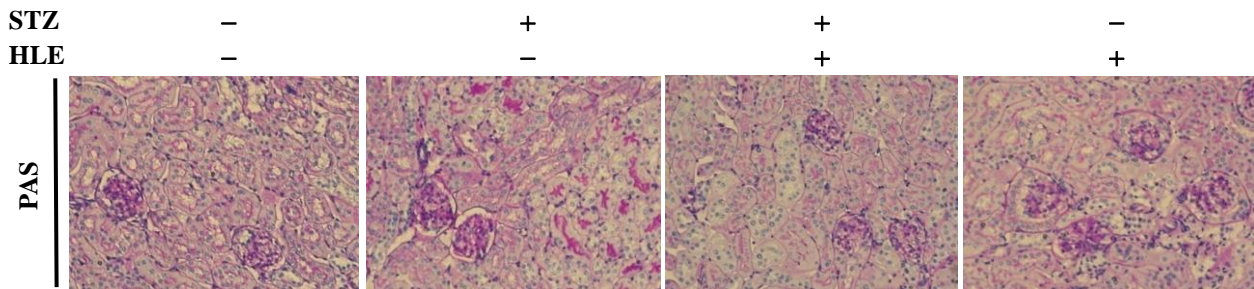
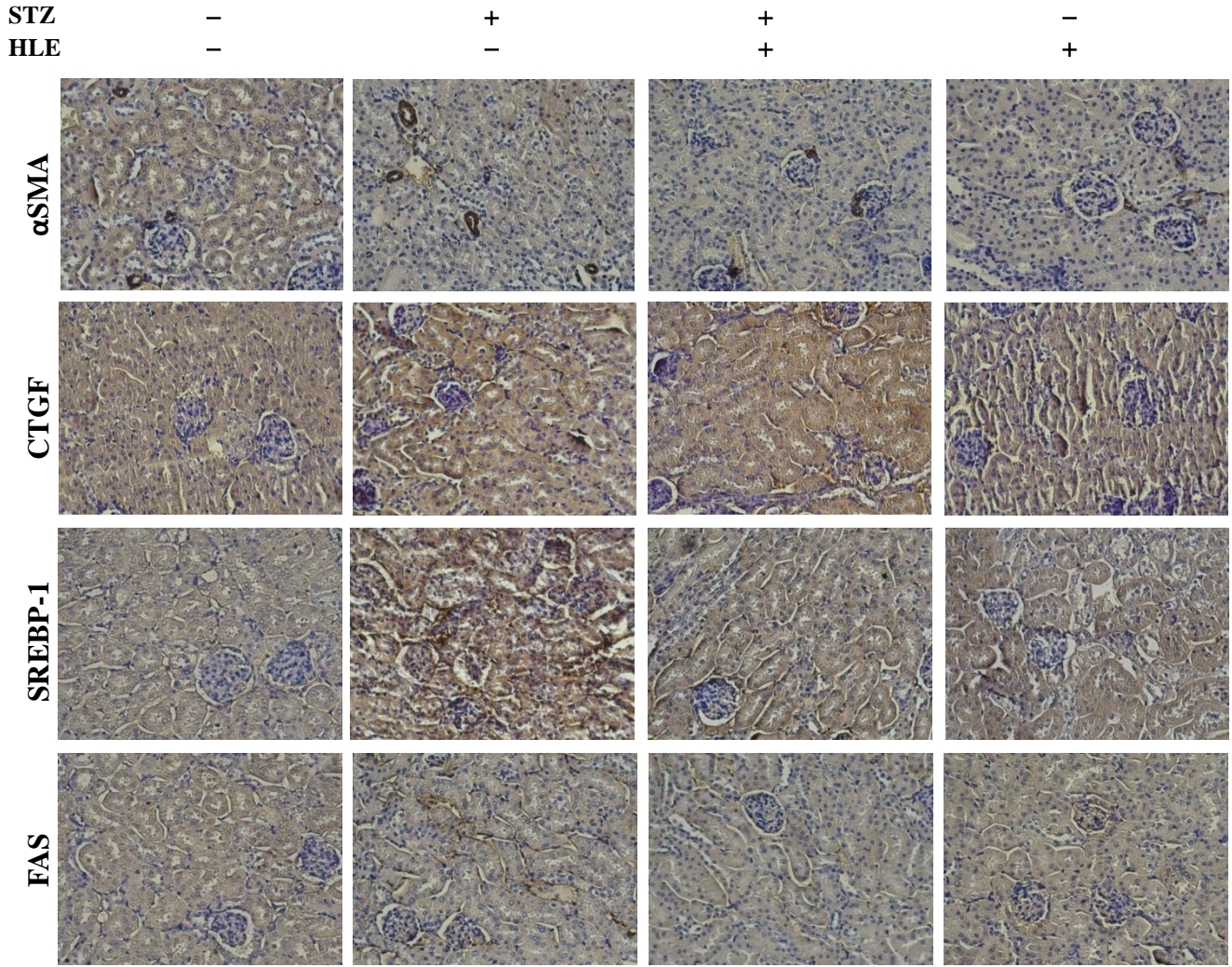


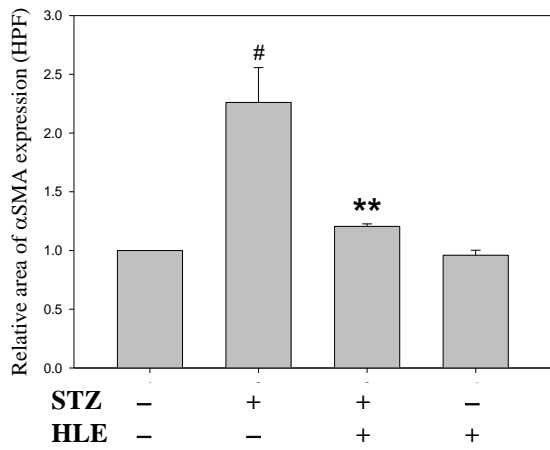
Figure 2. Effect of HLE on kidney histopathology and pathological changes in DN model mice. HFD combined STZ treatment-induced the DN model mice were treated with 1% HLE for 6 weeks. The mice were sacrificed after 6 weeks, and kidney tissues were collected for analysis. Representative images of kidney sections from different dietary treatments (n = 6/group) stained with H&E (100X, *upper panel* and 200X, *down panel*) **(A)**, and PAS staining (200X) **(B)** to display the renal histological abnormalities.

Fig. 3

(A)



(B)



(C)

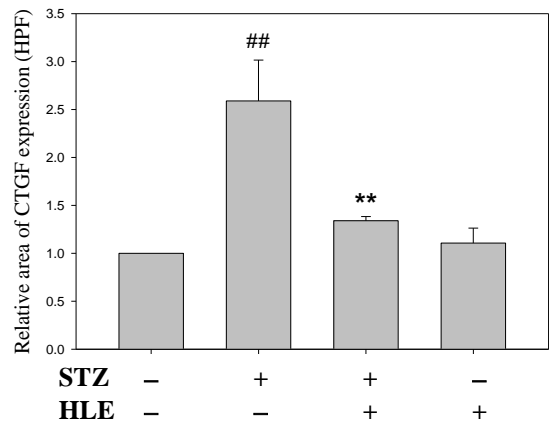


Fig. 3

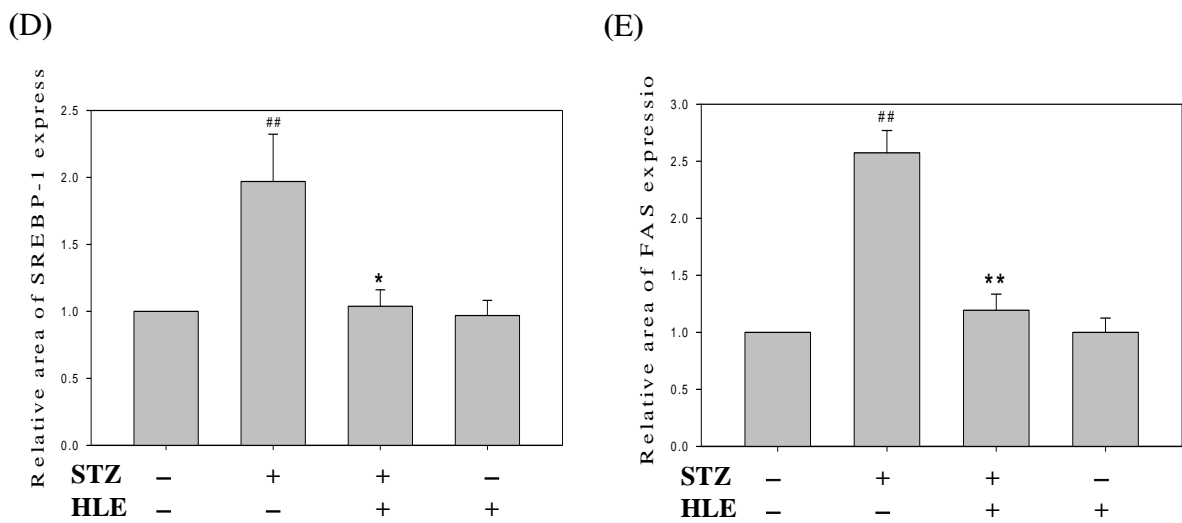


Figure 3. Effect of HLE on renal protein expressions of fibrotic factors and lipid metabolism regulator in DN model mice. HFD combined STZ treatment-induced the DN model mice were treated with 1% HLE for 6 weeks. The mice were sacrificed after 6 weeks, and kidney tissues were collected for analysis. (A) Representative 400X images of kidney sections from different dietary treatments (n = 6/group) stained with IHC of α -SMA, CTGF, SREBP-1, and FAS. Statistic analysis of relative area of α SMA (B), CTGF (C), SREBP-1 (D), and FAS (E) expressions ia presented as mean \pm SD from one independent experiment. #p< 0.01 compared with the control group. *p< 0.05 compared with the STZ group.

Fig. 4

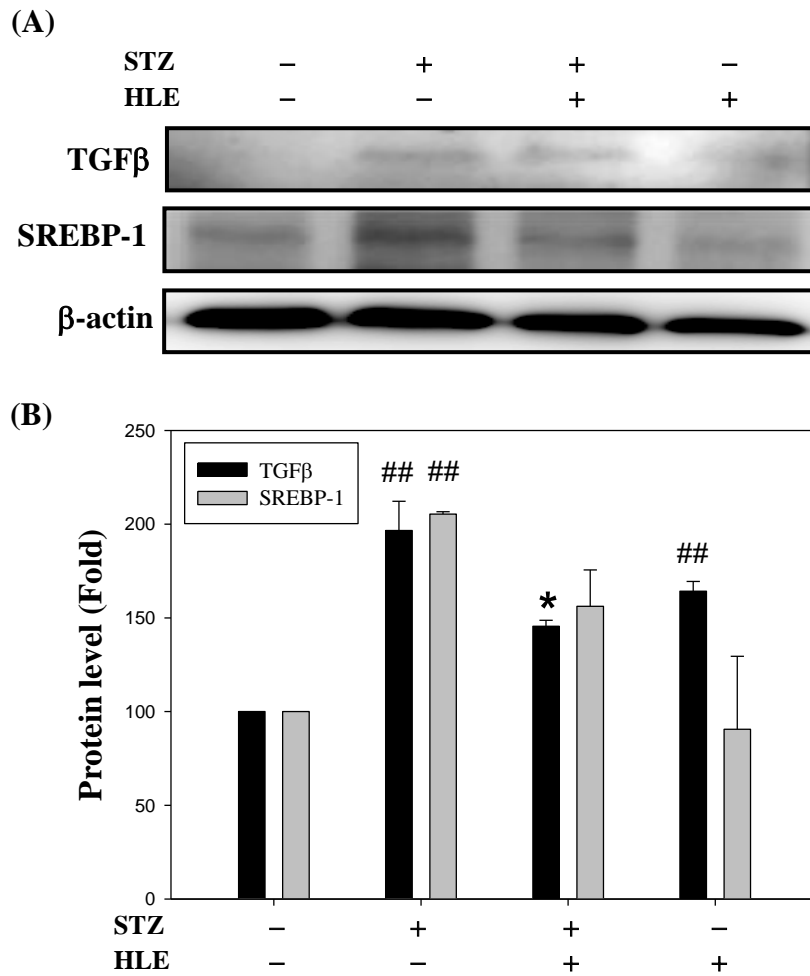


Figure 4. Effect of HLE on protein levels of TGF β and SREBP-1 *in vivo*. (A) HFD combined STZ treatment-induced the DN model mice were treated with 0.1% HLE for 6 weeks. Western blot analysis of TGF β and SREBP-1 protein expressions was carried with the tissue extracts from them. β -actin served as an internal control. (B) The quantitative data are presented as mean \pm SD from three independent experiments. # $p < 0.01$ compared with the control group. * $p < 0.05$ compared with the STZ group.

Fig. 5

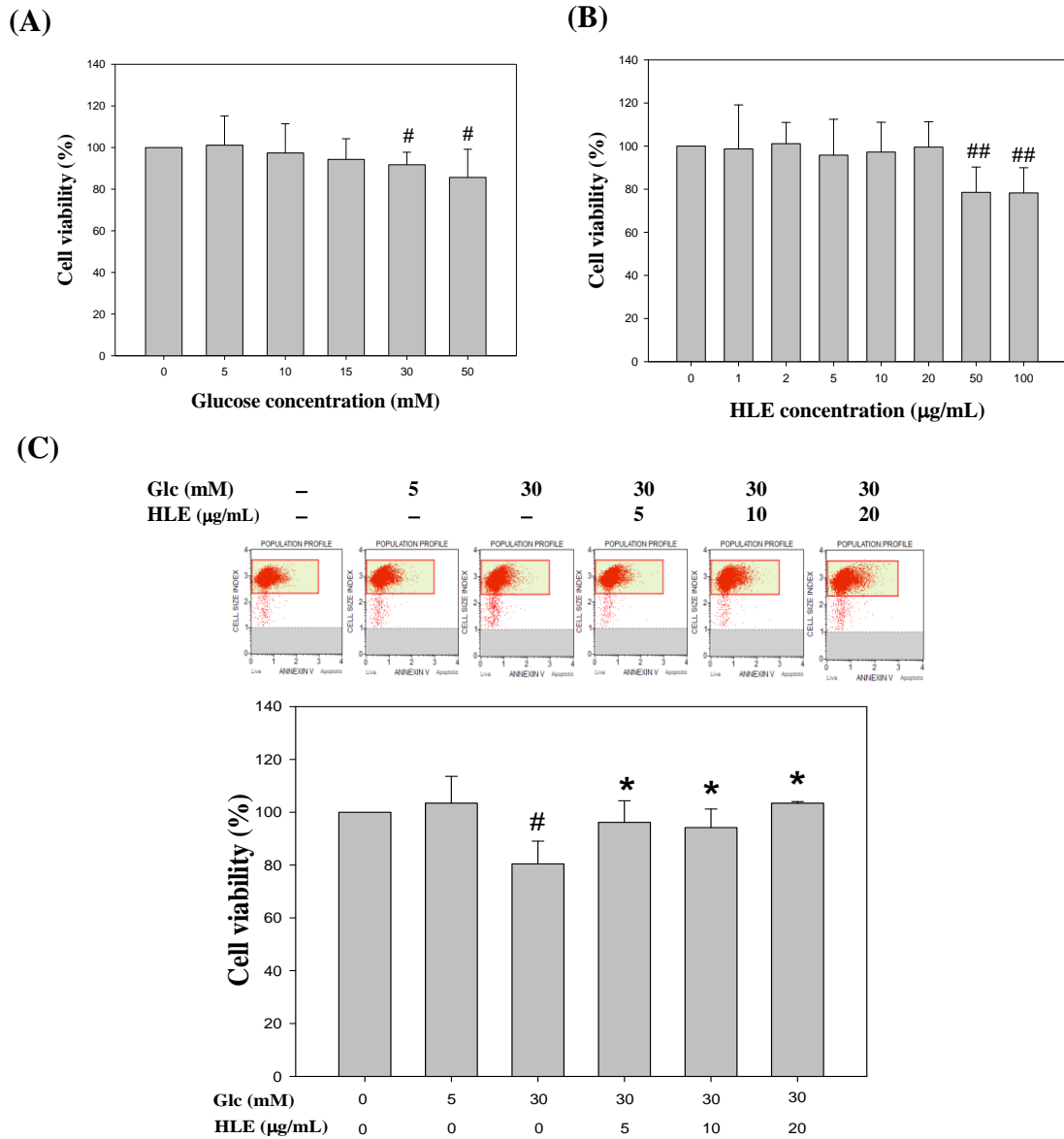
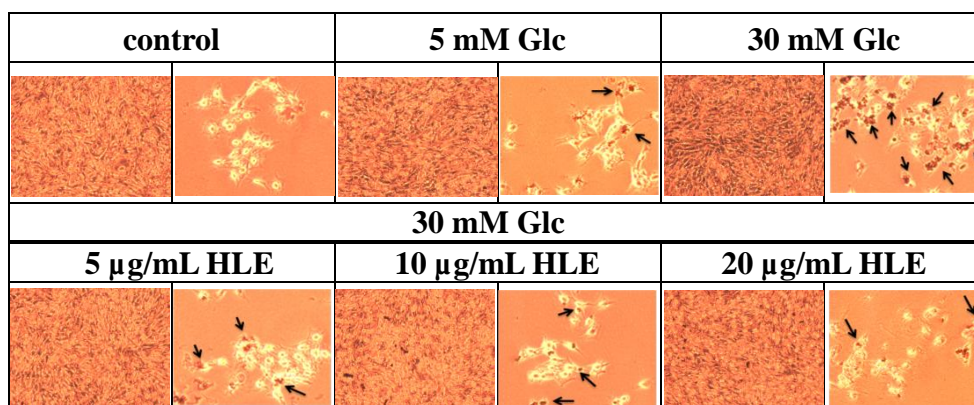


Figure 5. Effects of glucose (Glc), HLE alone or in combination on cell viability in SV40MES13 cells. SV40MES13 cells were treated with various concentration of various concentrations of Glc (0-50 mM, **A**), HLE (0-100 µg/mL, **B**), or 5 and 30 mM of Glc in the presence or absence of indicated concentrations of HLE (5, 10 and 20 µg/mL) (**C**) for 24 h. Cell viability was measured by flow cytometric analysis. The results represent the average of three independent experiments \pm SD. [#] $p < 0.05$, ^{##} $p < 0.01$ compared with the control. ^{*} $p < 0.05$ compared with the 30 mM of Glc alone.

Fig. 6

(A)



(B)

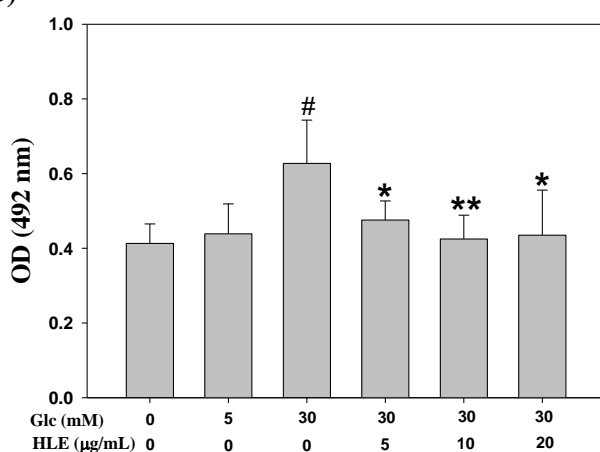


Figure 6. Inhibitory effect of HLE on the Glc-induced lipid accumulation in SV40MES13 cells. (A) SV40MES13 cells were treated with 5 or 30 mM of Glc in the presence or absence of various concentrations of HLE (5, 10 and 20 μg/mL) for 24 h. After the incubation, the cells were stained with Oil Red O and then observed under the microscope (200x). Panels show (from *left to right*) 8×10^4 cell/mL, and 6×10^4 cell/mL cell density. The red droplets accumulated in the cells were indicated as the stained lipid. (B) Adding 1 mL of isopropanol to the stained culture dish, the extracted dye was diluted 5x in ddH₂O, and then its absorbance was monitored at 492 nm. The results represent the average of three independent experiments ± SD. #p < 0.05 compared with the control. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the 30 mM of Glc alone.