

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

計 畫 名 稱	： 探討褪黑激素減緩糖尿病視網膜病變之功效：利用高糖 誘導視網膜色素上皮細胞為模式
------------	--

報 告 類 別 ： 成果報告

執行計畫學生： 林敬傑

學生計畫編號： MOST 110-2813-C-040-008-B

研 究 期 間 ： 110年07月01日至111年02月28日止，計8個月

指 導 教 授 ： 謝逸憲

處 理 方 式 ： 本計畫可公開查詢

執 行 單 位 ： 中山醫學大學醫學研究所

中 華 民 國 111年02月22日

中文摘要

糖尿病視網膜病變 (Diabetic retinopathy, DR) 是一種糖尿病主要的併發症之一，源自高血糖造成視網膜血管不正常增生、氧化壓力增加、出血、水腫.....最終導致失明，為全世界造成失明的主因之一，目前的治療多以減緩視力受損為主，並無法完全根除此疾病。褪黑激素為人體內內分泌物質，近年來許多研究指出褪黑激素可以有效抑制血管增生、降低氧化壓力和抑制細胞轉移等功效，但對於糖尿病視網膜病變的治療效果尚未明瞭，因此此計劃目的為釐清褪黑激素對於病變之視網膜色素上皮是否有治療之效用。

首先我們利用人類視網膜色素上皮細胞(ARPE-19)，將其置於低糖的環境(5mM glucose) 培養兩個月，其後在高糖 (100mM)、褪黑激素 (2、4 mM) 處理 36 小時下，發現高糖會影響細胞株 ARPE-19 的生長，加入褪黑激素後也可以看到細胞存活有上升的趨勢，因此我們進一步分析褪黑激素是否可以抑制細胞凋亡、氧化壓力的相關蛋白的訊息傳遞路徑 (NF- κ B 、 Nrf-2 /HO-1 路徑等)，和抑制血管新生 (VEGF 路徑)。由實驗結果可以發現，無論是 ROS 的螢光表現量以及氧化壓力相關蛋白 (NF- κ B 路徑) 都會因高糖而增加，加入褪黑激素後，也可以有效抑制高糖造成的氧化壓力，除此之外，在血管新生方面，藉由 VEGF 路徑蛋白分析，可以發現高糖確實會使得此路徑表現量增加，但褪黑激素是否可以有效抑制，仍須進一步的分析。

Abstract

Objectives

Diabetes retinopathy (DR), as one of the main causes of blindness all around the world, is one of the major complications of diabetes mellitus. Prolonged high-level blood glucose induced significant impairments among various retinal tissues, including retinal pigment epithelial (RPE) cells. The enhancement of oxidative stress in retinal cells leads to apoptosis and angiogenesis and ends up to retinal detachment, macula edema and lastly, blindness. Current treatments for DR including Anti-VEGF therapy and laser surgery can only slow down the progress of DR rather than curing it.

Melatonin (MLT) is an endogenous hormone that exhibits a variety of biological effects including antioxidant and anti-inflammatory functions. Thus, the goals of this study were to determine whether melatonin could ameliorate RPE injury and to explore the potential mechanisms in an in vitro model of human adult RPE cells (ARPE-19).

Materials and methods

Detecting cell viability of ARPE-19 under environment of high glucose and melatonin through cck8 array. Detecting oxidative stress level through DCFDA stain array. Measuring the expression of NF- κ B pathway protein, Nrf-2/HO-1 pathway protein, VEGF pathway protein through western blot.

Result

The high concentration of glucose (50 mM, 100 mM) lowers the cell viability of ARPE-19 cell shown by cck8 array. Besides, the high glucose enhances the ROS level in ARPE-19 cell and leads to the higher expression of oxidative stress related protein including p50, Nrf-2 and HO-1, which is suggested by the western blot. Furthermore, the angiogenesis related protein, including Hif-1 α and VEGF is elevated by high glucose shown by western blot. After combing melatonin (2 mM) and high glucose (50 mM, 100m M), the oxidative stress and protein (p50, Nrf-2 and HO-1) are downregulated.

Conclusion

Regards of the results, melatonin plays a role in attenuating the ROS level caused by high glucose on ARPE-19; however, the relation between melatonin and angiogenesis related protein remain unclear.

(一) 研究動機

根據衛生福利部國民健康署統計，糖尿病位居國人十大死因之一，每年近萬人因糖尿病死亡，截至目前全國約有 200 多萬名糖尿病的患者，並且數量持續以每年 25,000 名的速度增加，由此可見糖尿病對於國人影響之大。19 歲以上的國民一週平均會攝取 6 杯的手搖飲，國人高頻率攝取高糖的食物、飲品間接導致糖尿病的發生率提高，糖尿病視網膜變異即是最主要的併發症之一，且名列中老年人三大失明主因[1]，除此之外糖尿病的第一、二型和胰島素息息相關，胰島素的異常造成血糖升高，使身體的許多組織暴露在高糖的環境當中。在許多研究中指出人體的組織長時間暴露在高糖環境下會導致人體各類細胞發炎[2]，而糖尿病視網膜病變的致病機轉正是因胰島素功能不全，導致生長激素上揚、紅血球凝結及血小板凝聚，使得血液黏稠血流滯慢，開始造成微小血管周邊細胞喪失、內皮細胞增生及基底膜增厚，血液視網膜障壁也隨之被破壞[3]，視網膜開始缺血缺氧，長期下來便會出現不正常的新生血管群增生，並隨時可能造成視網膜出血和玻璃體出血，同時伴隨纖維結締組織增生[4]，更嚴重便會造成失明，而血液視網膜障壁的由微血管內皮細胞以及視網膜色素上皮構成，也因此希望能了解高糖對於視網膜上皮的影響來有效抑制糖尿病視網膜病變。褪黑激素是已知人體自然產生的內分泌物質，除了大家熟知可以調控睡眠週期外，已有許多研究指出褪黑激素可以減緩發炎反應以及降低細胞的氧化壓力，且目前臨床上並無有效且明確之治療方法可以治療糖尿病視網膜病變，因此我們便想來探討在人體視網膜色素上皮細胞受到高糖所引發的病變是否可由褪黑激素減緩。

(二) 研究方法

一、 細胞培養

人類視網膜色素上皮細胞取自食品工業研究所，在攝氏 37 度、5%CO₂ 的條件下，利用 F12/DMEM 培養液 (gibco®) 培養，外加 10% fetal bovine serum、100units/mL penicillin 和 100 mg/L 培養於 10cm dish 中，並每日於顯微鏡下觀察細胞型態、定期更換培養液，在開始實驗前兩個月，將細胞改用 DMEM (SIGMA-Aldrich) 混和 HAM's F12 培養液 (gibco®) 培養、馴化，模擬人體血糖濃度，此外在實驗進行前會將細胞以無血清 (serum-free) 之培養液培養 24 小時，其後進行實驗。

二、 CCK8 方法

為檢測 Melatonin、高濃度葡萄糖對於人類視網膜色素上皮細胞所造成的細胞毒性，利用 cck8 array 評估。將 Arpe-19 細胞以 2×10^4 個細胞接種在 24well 培養皿中培養 24、48 小時。於攝氏 37 度、5%CO₂ 條件下放置 24 小時後將培養液更換為 serum free medium 再分別放置 24、48 小時，其後移除培養液並加入 cck8 試劑放置 2 小時。放置 2 小時後利用 ELISA reader 以波長 450 nm 讀取吸光值

三、 蛋白萃取及定量

萃取細胞中蛋白方法如下：用 PBS 清洗細胞後，加入 Trypsin 將細胞脫盤，用含 FBS 的培養液回溶後，收入 15ml 離心管以 1000 rpm 離心五分鐘，再用 PBS 清洗並取出至 1.5 ml 微量離心管以 3000 rpm 離心五分鐘，最後加入 NETN 以破壞細胞膜、抑制蛋白水解酶。超音波震碎細胞後，以 13000rpm，4°C 離心 25 分鐘，取上清液。接著使用 Bradford 法測定蛋白質含量：使用 Coomassie Brilliant Blue G-250(CBG)測定蛋白，其在過氯酸溶液中呈紅棕

色，但與蛋白質結合後則變成藍色，呈色時用 ELISA reader 以波長 595 nm 測量吸光值間接算出其中蛋白質的含量。

四、 西方墨點法

欲分析細胞轉移、氧化壓力相關蛋白可使用西方墨點法，方法如下：樣品以每 8 μ l 置入上膠，下膠為 10% 的 SDS-PAGE 凝膠，用 80V，120 分鐘的速度跑電泳。先將 PVDF 膜放入甲醇中活化，待電泳完成將膠片取下至已有 PVDF 膜轉漬夾板以 100V 轉漬。接著利用 Block buffer(50ml 的 TBST (TBS+0.1%Tween-20) + 3g 的脫脂牛奶)反應 1 小時，再用 TBST 清洗，然後用適當稀釋的一級抗體在 4°C 環境下反應 12 小時。12 小時後，用 TBST 清洗 3 次，每次 20 分鐘，多餘的一級抗體，再與適當稀釋的二級抗體反應 1.5 小時。用 TBST 清洗 3 次，每次 20 分鐘，洗掉多餘二級抗體，之後加入呈色劑 (Chemiluminescent HRP substrate, Immobilon[®])，以化學冷光法呈色，以呈色出的 band 來判斷蛋白表現量。

五、 氧化壓力測定

欲分析細胞氧化壓力，利用 DCFDA 試劑分析，方法如下：將細胞以 8*10⁴ 數量接種於 6 well 培養皿，24 小時後將培養液更換為 serum free medium，24 小時後混合加入褪黑激素 (2 mM) 和葡萄糖 (50 mM、100 mM)，24 小時後，前後間隔 15 分鐘分別配製濃度 10 μ M 之 DCFDA 溶液和 2 μ M Hoechst 溶液加入培養皿作用，之後吸取上清液，並加入 3 ml PBS，其後使用 ImageXpress PICO 機器以 522 nm、460 to 490 nm 波長觀察。

(三) 文獻回顧與探討

一、視網膜色素上皮 RPE (Retinal pigmented epithelium)

1. 簡介

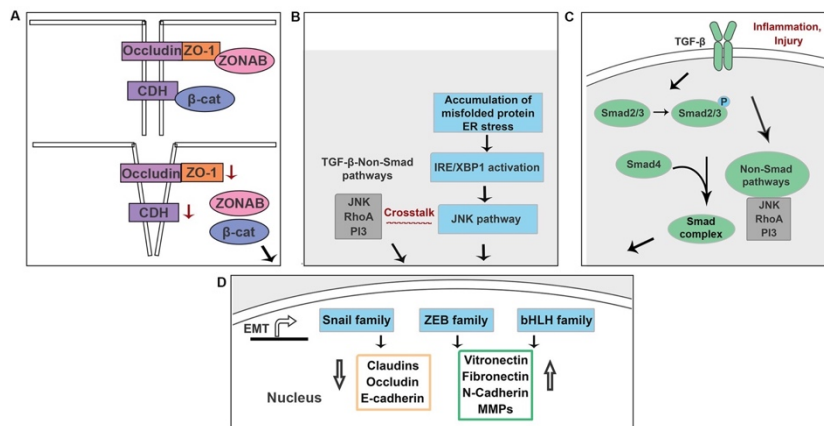
視網膜色素上皮是由單層柱狀上皮形成，源自神經外胚層，在視網膜結構中位於神經視網膜層 (Neuroretina) 和血管層 (Choroids) 之間，為維持視覺功能的重要成員之一，主要的功能有運輸養分、吸收光、避免視網膜受到光氧化傷害、吞噬脫落的感光細胞、分泌和維持視網膜結構相關之因子等[5]，此外也負責組成外層的血液視網膜障壁，此障壁中功能為控制進出視網膜的物質以隔絕外界毒性物質、血漿物質，除上述功能之外視網膜色素上皮細胞在免疫方面也扮演重要的角色。要維持視網膜色素上皮細胞功能需要許多蛋白的參與，例如：穿膜蛋白：Na⁺/K⁺-ATPases、chloride intracellular channel 4 (CLIC4), mannose receptors and proton-coupled monocarboxyate transporters 1 (MCT1)、CD36、integrins、MCT3 以及需分泌：Vascular endothelial growth factor (VEGF) pigment epithelium-derived factor (PEDF)、Ezrin、Glucose transporter (GLUT) 1、transforming growth factor- β (TGF- β) 等蛋白來維持視網膜功能，這些蛋白各自位於細胞內不同位置包括頂端 Apical 以及基底端 Basal，這也是上皮細胞具有細胞極性的特色。若視網膜色素上皮細胞功能喪失可能會導致視網膜病變、失明、視力受損等情形[6]。

2. RPE 糖尿病視網膜病變扮演之角色

在糖尿病視網膜病變中，最主要造成視力受損的原因為黃斑部水腫[7]，而黃斑部水腫是源於由內皮細胞以及視網膜上皮細胞所組成的血液視網膜障壁受損，進而使血管中成分外漏導致水腫[8]。在視網膜病變初期，可以發現 RPE 構成障壁受損、細胞極性異常、以及 microRNA-204/211 的抑制，以下敘述為視網膜色素上皮細胞在高糖下會產生的病變機制：

(1) 正常情況下，視網膜色素細胞負責將視網膜下空間大量的水分經由 Transcellular 的方式排

出[9]，但在高糖的環境下負責維持 ARPE-19 細胞通透性的 Na⁺/k⁽⁺⁾-ATPase 的功能會被破壞，導致水分無法運出導致黃斑部病變[10, 11]，另一方面，視網膜色素上皮細胞利用 GLUT1、GLUT3 蛋白將葡萄糖從血液運送至運送至感光細胞[12]，然而處在高糖的環境下，PKC-oxidative stress 訊息傳遞路徑會被活化，經由活化 AKT 路徑相關蛋白的活化，使得 GLUT-1 的表現量會下降[13]。(2)正常情況下，VEGF 可以有效避免血管內皮細胞的凋亡以及維持微血管內皮細胞的完整性，但在高糖的環境下，糖化最終產物 AGE 和氧化壓力的大量產生間接增加 VEGF 的表現量，導致血管不正常增生，相反的 PEDF 表現量會下降，最終導致黃斑部水腫[14]。(3)在先前的研究指出，在增殖型視網膜病變中，TGF-beta 表現量為正常細胞的 3 倍，表現量的增加分別會活化 SMAD2/3 (圖一 B；[15]) 以及和 JNK/p38-MAPK 路徑交互作用來調節 EMT (圖一 C；[16])，包括增加 Snail 家族、Zeb 家族、bHLH 家族蛋白表現量，最後會使得視網膜上皮細胞極性被破壞，視網膜色素上皮細胞極性的喪失，將使細胞中用以維持視網膜恆定之蛋白失去功能，導致視網膜無法維持正常生理功能[17]。



(圖一) [18]

二、糖尿病視網膜病變 (diabetic retinopathy)

1. 簡介

糖尿病視網膜病變 (diabetic retinopathy) 屬於糖尿病微血管併發症中最常見的一種[3]，主要發生於第一型及第二型的糖尿病患者，其中又以第一型為主[19]，根據台灣糖尿病學會 2012 年的年鑑指出，2000-2009 年間糖尿病患者併發糖尿病的機率為 8.91%，輕者造成視力損傷，重者則會導致失明，為台灣中老年人三大失明原因之一，隨著罹患糖尿病的時間增加，罹患糖尿病視網膜病變的機率也隨之增高[19]，據估計，到 2030 年，全世界將 1.91 億人患有此疾病[20]。糖尿病視網膜病變由許多原因所造成，依不同階段可分為非增殖型以及增殖型。非增殖型屬於早期發病階段，主要特色有血管通透性增加、微血管栓塞，可能會導致視網膜出血、滲出液的產生以及微血管瘤；隨著病程的演進，病變類型會由非增殖型轉變為增殖型，這個階段的特色為血管不正常增生且病患出現嚴重視力受損，造成視力受損的原因除了血管不正常增生導致玻璃體出血、視網膜剝離外，最重要的原因為血液視網膜障壁受損導致黃斑部水腫、增厚，稱為糖尿病黃斑水腫 (DME, Diabetic Macula Edema)，目前治療方法也多以減緩病患損失視力為目標[21]，主要有三種：1. 雷射手術 2. 注射類固醇或是抗血管內皮生長因子 3. 玻璃體切除術，但以上治療方法也僅止於減緩視力損失，並無法治療糖尿病視網膜病變，因此持續研究並尋找藥物來恢復、治療視網膜色素上皮細胞變異是刻不容緩的議題。

2. 病因

糖尿病視網膜病變主要因高糖造成一連串分子機制異常所導致，這些機制都源於視網膜葡萄糖濃度的增加，進而發生病變，主要分為四種：

i. 多元醇路徑大量活化：

當細胞內葡萄糖濃度升高，葡萄糖會藉由多元醇路徑代謝，葡萄糖會被 Aldose reductase (AR) 還原為山梨糖醇 (Sorbitol) 之後代謝為果糖，而 Aldose reductase 的輔酶為 NADPH，因此在高糖的情況下，AR 需要消耗大量的 NADPH 來還原葡萄糖，使得同樣需要 NADPH 作為輔酶的 Glutathione reductase 無法作用，導致氧化壓力上升[22, 23]。

ii. AGE 堆積：

視網膜長期暴露於高糖的環境下會導致糖化最終產物 (Advanced glycation end products, AGE) 的大量堆積，透過增加基底膜間的分子交叉鏈結 (cross-link) 以及和 RAGE 結合 (Receptor for advanced glycation end products)，來增加促凝血劑 (procoagulant)、血管通透性、細胞黏附分子 (cell adhesion molecule) 表現量、淋巴球堆積，最終導致血管受傷，其中有許多研究指出 AGE 的堆積會藉由活化 NF- κ B、AP-1 轉錄因子來增加細胞激素以及細胞黏附分子的表現量，例如：TGF- α 和 VEGF[24]。在活化 VEGF 的詳細機制尚未明瞭的情況下，有研究指出有可能和 AGE-RAGE 的結合進而活化 Ras-MAPK 路徑有關，VEGF 表現量的上升會藉由抑制細胞間連結蛋白的磷酸化增加血管通透性、促進血管內皮細胞的增生[25]，在發病早期破壞血液視網膜障壁[4]。

iii. Hexosamine 路徑的增強 (increase flux)

Hexosamine biosynthetic pathway (HBP) 主要用來後修飾蛋白質、合成糖脂質等物質，在人體中負責 2%-5% 的葡萄糖代謝，在高糖的環境下，HBP 路徑會增強，使得產物 UDP-GlcNAc 會大量增加，而 UDP-GlcNAc 的增加會使細胞內蛋白質發生以 UDP-GlcNAc 為受體的 O-linked glycosylation，透過後轉譯修飾使得 TGF- β 1、PAI-1、fibronectin 等蛋白被活化，這些蛋白會讓基底膜增厚導致視網膜結構異常，引起一連串的反應最終破壞血液視網膜障壁[26, 27]。

iv. PKC 路徑的活化

高糖誘導 PKC 的大量活化，在許多研究中已證實會導致糖尿病視網膜血管病變。在高糖的情況下第二信使 DAG 會大量表現，活化 PKC，PKC 會活化許多訊息路徑，包括 MAPK、VEGF、增加血管通透性、NF- κ B、PAI-1 和 NADPH 氧化酶等，導致糖尿病視網膜病變[28, 29]。上述四種路徑並非單獨存在，彼此之間會交互作用，例如 hexosamine pathway 會活化 PKC pathway，polyol pathway 產物會增加 AGE 生成等[30]，且四種路徑都會導致氧化壓力的上升，氧化壓力同時也會刺激以上路徑的活化使得下游致視網膜病變因子表現量增加[29]，無論如何最終都會破壞周細胞 (Pericyte) 功能，周細胞為維持微血管結構的重要成員，若周細胞受到破壞，會讓微血管的結構失去支持，產生微血管瘤，微血管瘤即是非增殖期 (早期) 的特徵之一[31]，除此之外，血管內皮細胞也會發生細胞凋亡且基底膜會增厚，此二現象會破壞視網膜上皮細胞導致血液視網膜屏壁被破壞[32]，原本被阻隔在外血管內的物質便會隨意穿透至視網膜神經纖維層，造成損傷。

三、褪黑激素 Melatonin

褪黑激素是一種在動物、植物、真菌和細菌中皆有發現的物質。在人體內主要由松果體 (Pineal gland) 製造，負責調節生理時鐘，另外在許多的研究顯示，褪黑激素可以減緩發炎反應、降低氧化壓力。褪黑激素可清除、減弱神經系統所製造的自由基，藉由增加抗氧化酵素的基因表現量，例如：GPx, GR, and SODs 來增加抗氧化酵素的數量[33]。除此之外也可以增加粒線體電子傳遞鍊的效率，以降低氧化壓力的產生，另外也有研究指出褪黑激素可以進一步調節 VEGF 表現量，由此可以減少癌症血管新生[34]，除了可以有效減少發炎、降低 ROS、VEGF 外，在近年多篇肺癌研究中都提到褪黑激素可以有效減少肺癌細胞的上皮間質轉化[35]，但對於是否可以抑制高糖破壞血液視網膜障壁顯少著墨，因此希望藉此探討褪黑激素是否可以減緩糖尿病對視網膜色素上皮細胞的傷害，在未來讓褪黑激素成為治療糖尿病視網膜病變的選項之一

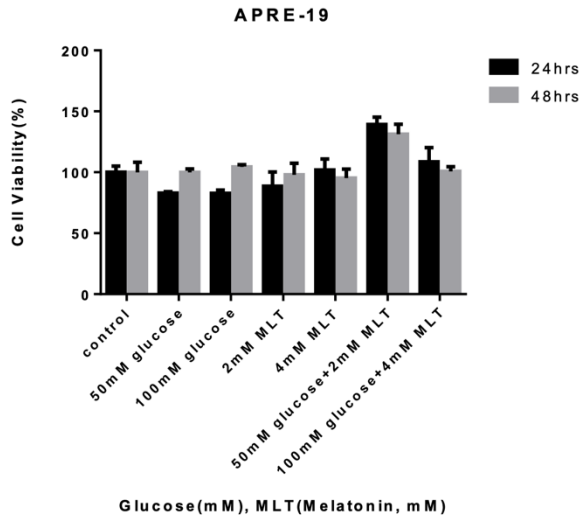
四、氧化壓力 Oxidative Stress

氧化壓力被視為造成視網膜病變重要的原因之一，氧化壓力是由於活性氧化物質 (Reactive oxygen species, ROS) 的產生與細胞的抗氧化能力的不平衡所引起的，ROS 在人體中為需氧代謝過程中產生的副產物，因粒腺體氧化磷酸化過程中 O_2 分子不完全還原為 H_2O 造成，ROS 包含超氧陰離子 (O_2^-)，過氧化氫 (H_2O_2) 和羥基自由基 (OH^\cdot)，此外，ROS 在發炎、感染、暴露到游離輻射時也會產生，在細胞基礎代謝中，ROS 為訊息傳遞路徑中的一部分，負責活化使細胞增生、凋亡、分化，免疫反應，另一方面，當 ROS 升高會破壞 DNA、蛋白質及脂質，如果不進行修復，則會導致突變[36]。氧化壓力跟很多的細胞傳訊路徑及其中參與調控的蛋白有關，例如 MAPK pathway 相關蛋白：ERK1/2、MEK、p38 α 、JNK、c-myc、p53 及 PKC，其中慢性的高血糖會活化 PKC，在眾多 PKC 的 12 種異構物中，有許多都和糖尿病視網膜病變相關，例如：PKC β 增加 NADPH 氧化酶的活性，製造超氧化物[37]；PKC δ 會去活化粒線體中的複合物 IV (complex IV) 藉此增加 ROS 的生成，增加氧化壓力[38]。

(四) 實驗結果

1. 探討褪黑激素、高糖對人類視網膜色素上皮細胞的細胞存活率的影響。

利用 CCK8 array 評估藥物 Melatonin、高糖對 ARPE-19 細胞存活率的影響，藉此探討高糖是否會誘導細胞凋亡，以及是否可以由褪黑激素抑制，由 (圖一) 得知處理 50、100mM 濃度之葡萄糖以及 2、4 mM 褪黑激素 24 及 48 小時後，結果可以發現，加入高糖之組別較控制組存活率低，且以 24 小時處理之組別較為顯著，混合處理後存活率也有提升的現象，故認為高糖會對細胞存活率產生影響，且此現象可透過褪黑激素減緩。



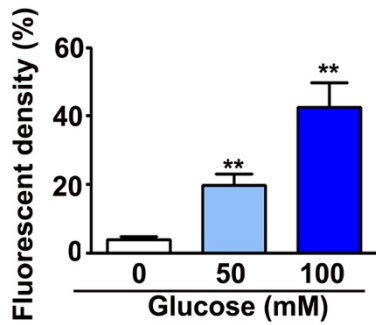
(圖一)

註：Control：單純培養液處理，Glu 50：處理 50 mM 葡萄糖，Glu 100：處理 100 mM 葡萄糖，MLT 2：處理 2 mM 褪黑激素，MLT 4：處理 4 mM 褪黑激素，Glu 100+ MLT 2：處理 50 mM 葡萄糖+2 mM 褪黑激素，Glu 100+ MLT 4：處理 100 mM 葡萄糖+4 mM 褪黑激素。

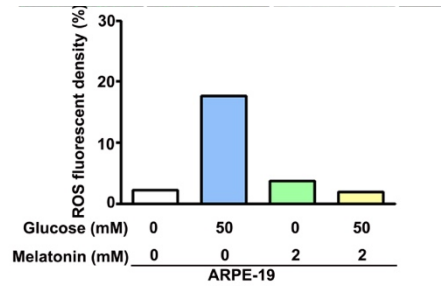
2. 探討褪黑激素、高糖對人類視網膜色素細胞氧化壓力及相關蛋白表現量的影響。

根據 DCFDA 染劑的螢光表現量可以發現隨著葡萄糖的濃度提升 (0 mM, 50 mM, 100 mM)，螢光表現量有顯著的提升，代表高糖確實會造成氧化壓力的增加，且隨後在同時處理褪黑激素 2 mM 後，顯示褪黑激素可以有效減緩氧化壓力 (圖二、三、四、五)。此計劃進一步地分析氧化壓力相關蛋白路徑：

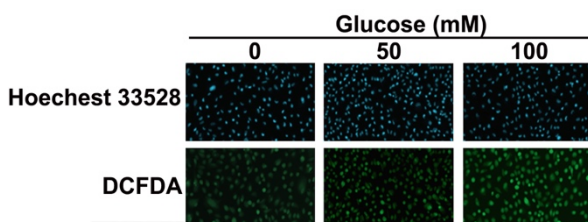
- i. NF- κ B 路徑：在葡萄糖濃度 100 mM 的情況下，p50 蛋白增加，但 p65 蛋白並無變化，加入褪黑激素 2 mM 後 p50 蛋白表現量降低，回復到和控制組相似的表現量，p65 蛋白維持不變 (圖六)。
- ii. Nrf-2/HO-1 路徑等：HO-1 和 Nrf-2 蛋白皆在加入高糖 100 mM 後表現量增加，且在加入褪黑激素 2 mM 後，表現量下降 (圖六)。



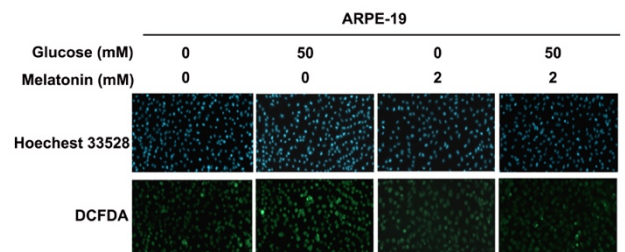
(圖二)



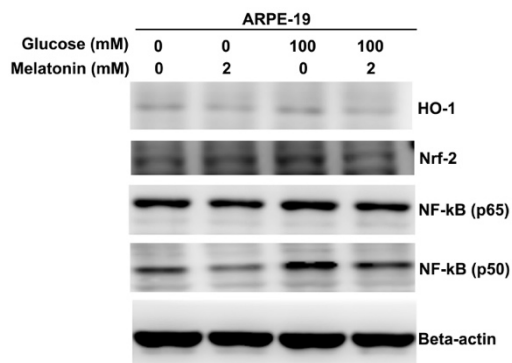
(圖三)



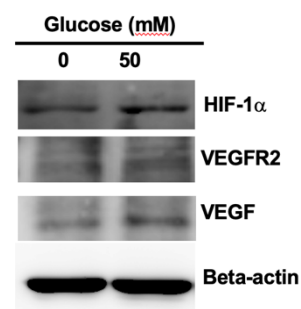
(圖四)



(圖五)



(圖六)



(圖七)

3. 探討褪黑激素、高糖對人類視網膜色素細胞血管新生相關蛋白表現量的影響。

加入高糖後可以發現人類視網膜色素上皮細胞之血管新生相關因子，包括：Hif-1α, VEGFR2, VEGF，皆有上升的趨勢，但我們尚未分析褪黑激素是否可影響血管新生相關因子的表現量（圖七）。

(五) 討論

一、氧化壓力：

1. 於 DCFDA stain 實驗中可發現褪黑激素可有效抑制氧化壓力的產生。
2. 在西方墨點法分析可以發現，高糖藉由升高 NF-κB 蛋白次單位：p50 來誘導氧化壓力的增加，且經過褪黑機素的處理後，有下降的趨勢。
3. Nrf-2/HO-1 路徑的蛋白分析結果可以推斷，因葡萄糖濃度的增加使得上游蛋白 HO-1 表現上升，增加下游蛋白 Nrf-2 之轉錄轉譯，保護細胞免於氧化壓力的傷害，且其路徑表現量也隨著同步處理高糖、褪黑激素後而下降，顯示出褪黑激素有效減緩氧化壓力。
4. 雖根據以上三點可以發現高糖（50 mM、100 mM）確實會增加人類視網膜色素上皮之氧化壓力，但實驗中發現以 50 mM 高糖處理之細胞雖在 DCFDA stain 實驗中有明顯現象，但在西方墨點法中卻沒有相同表現，唯獨 100 mM 高糖有相同結果，故未來仍須更進一步探討。

二、血管新生：利用西方墨點法可以發現，高糖會使得血管新生相關蛋白的表現量增加，此現象也符合臨床中增生性糖尿病視網膜病變之病理變化，未來仍須進一步分析褪黑激素是否可以有效降低血管新生蛋白表現量。

三、在未來的實驗中我們將繼續探討：

1. 利用西方墨點法進一步探討氧化壓力相關下游蛋白（pp53、caspase family.....）。
2. 是否褪黑激素可有效減緩高糖對人類視網膜色素上皮造成的血管新生因子表現量增加。
3. 利用動物實驗進一步驗證，褪黑激素於活體功效。

四、綜觀以上結果褪黑激素確實有能力降低高糖對於人類視網膜色素上皮的傷害，因此

希望未來能更深入探討背後機制，並成為糖尿病視網膜病變之治療處方。

(六) 參考文獻

1. Tohari, A.M., et al., *Protection by vitamin D against high-glucose-induced damage in retinal pigment epithelial cells*. Exp Cell Res, 2020. **392**(1): p. 112023.
2. Xiao, H. and Z. Liu, *Effects of microRNA-217 on high glucose-induced inflammation and apoptosis of human retinal pigment epithelial cells (ARPE-19) and its underlying mechanism*. Mol Med Rep, 2019. **20**(6): p. 5125-5133.
3. Wang, W. and A.C.Y. Lo, *Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Treatments*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(6).
4. Qaum, T., et al., *VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(10): p. 2408-13.
5. Strauss, O., *The retinal pigment epithelium in visual function*. Physiol Rev, 2005. **85**(3): p. 845-81.
6. Holtkamp, G.M., et al., *Retinal pigment epithelium-immune system interactions: cytokine production and cytokine-induced changes*. Prog Retin Eye Res, 2001. **20**(1): p. 29-48.
7. Lightman, S. and H.M. Towler, *Diabetic retinopathy*. Clin Cornerstone, 2003. **5**(2): p. 12-21.
8. Simó, R., et al., *Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy*. Curr Diabetes Rev, 2006. **2**(1): p. 71-98.
9. Hamann, S., *Molecular mechanisms of water transport in the eye*. Int Rev Cytol, 2002. **215**: p. 395-431.
10. Villarroel, M., et al., *Effects of high glucose concentration on the barrier function and the expression of tight junction proteins in human retinal pigment epithelial cells*. Exp Eye Res, 2009. **89**(6): p. 913-20.
11. Crider, J.Y., et al., *The effects of elevated glucose on Na⁺/K⁺-ATPase of cultured bovine retinal pigment epithelial cells measured by a new nonradioactive rubidium uptake assay*. J Ocul Pharmacol Ther, 1997. **13**(4): p. 337-52.
12. Senanayake, P., et al., *Glucose utilization by the retinal pigment epithelium: evidence for rapid uptake and storage in glycogen, followed by glycogen utilization*. Exp Eye Res, 2006. **83**(2): p. 235-46.
13. Kim, D.I., et al., *The involvement of phosphatidylinositol 3-kinase /Akt signaling in high glucose-induced downregulation of GLUT-1 expression in ARPE cells*. Life Sci, 2007. **80**(7): p. 626-32.
14. Yao, Y., et al., *[Downregulation of the pigment epithelium derived factor by hypoxia and elevated glucose concentration in cultured human retinal pigment epithelial cells]*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2003. **83**(22): p. 1989-92.
15. Valcourt, U., et al., *TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(4): p. 1987-2002.
16. Engel, M.E., et al., *Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-*

- beta-mediated transcription*. J Biol Chem, 1999. **274**(52): p. 37413-20.
17. Lehmann, G.L., et al., *Plasma membrane protein polarity and trafficking in RPE cells: past, present and future*. Exp Eye Res, 2014. **126**: p. 5-15.
 18. Zhou, M., et al., *Role of Epithelial-Mesenchymal Transition in Retinal Pigment Epithelium Dysfunction*. Front Cell Dev Biol, 2020. **8**: p. 501.
 19. Matuszewski, W., et al., *Prevalence of Diabetic Retinopathy in Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus Patients in North-East Poland*. Medicina (Kaunas), 2020. **56**(4).
 20. Zheng, Y., M. He, and N. Congdon, *The worldwide epidemic of diabetic retinopathy*. Indian J Ophthalmol, 2012. **60**(5): p. 428-31.
 21. Mitchell, P. and T.Y. Wong, *Management paradigms for diabetic macular edema*. Am J Ophthalmol, 2014. **157**(3): p. 505-13.e1-8.
 22. Gabbay, K.H., *The sorbitol pathway and the complications of diabetes*. N Engl J Med, 1973. **288**(16): p. 831-6.
 23. Oates, P.J., *Polyol pathway and diabetic peripheral neuropathy*. Int Rev Neurobiol, 2002. **50**: p. 325-92.
 24. Stitt, A.W., *AGEs and diabetic retinopathy*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. **51**(10): p. 4867-74.
 25. Antonetti, D.A., et al., *Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 23463-7.
 26. Wells, L., K. Vosseller, and G.W. Hart, *Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc*. Science, 2001. **291**(5512): p. 2376-8.
 27. Kolm-Litty, V., et al., *High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells*. J Clin Invest, 1998. **101**(1): p. 160-9.
 28. Donnelly, R., I. Idris, and J.V. Forrester, *Protein kinase C inhibition and diabetic retinopathy: a shot in the dark at translational research*. Br J Ophthalmol, 2004. **88**(1): p. 145-51.
 29. Kowluru, R.A. and P.S. Chan, *Oxidative stress and diabetic retinopathy*. Exp Diabetes Res, 2007. **2007**: p. 43603.
 30. Hao, H.H., et al., *Preventive effects of rutin on the development of experimental diabetic nephropathy in rats*. Life Sci, 2012. **91**(19-20): p. 959-67.
 31. Ejaz, S., et al., *Importance of pericytes and mechanisms of pericyte loss during diabetes retinopathy*. Diabetes Obes Metab, 2008. **10**(1): p. 53-63.
 32. Beltramo, E. and M. Porta, *Pericyte loss in diabetic retinopathy: mechanisms and consequences*. Curr Med Chem, 2013. **20**(26): p. 3218-25.
 33. Pandi-Perumal, S.R., et al., *Melatonin antioxidative defense: therapeutical implications for aging and neurodegenerative processes*. Neurotox Res, 2013. **23**(3): p. 267-300.
 34. Dai, M., et al., *Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1 alpha induced by CoCl2 in cultured cancer cells*. J Pineal Res, 2008. **44**(2): p. 121-6.
 35. Chao, C.C., et al., *Melatonin suppresses lung cancer metastasis by inhibition of epithelial-*

mesenchymal transition through targeting to Twist. Clin Sci (Lond), 2019. 133(5): p. 709-722.

36. Chikara, S., et al., *Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. Cancer Lett, 2018. 413: p. 122-134.*
37. Lei, S., et al., *Nitroglycerine-induced nitrate tolerance compromises propofol protection of the endothelial cells against TNF- α : the role of PKC- β 2 and NADPH oxidase. Oxid Med Cell Longev, 2013. 2013: p. 678484.*
38. Liu, S., et al., *PKC δ contributes to oxidative stress-induced apoptosis in porcine ovarian granulosa cells via activating JNK. Theriogenology, 2019. 131: p. 89-95.*