

國立臺灣師範大學理學院生命科學系

博士論文

Department of Life Science

College of Science

National Taiwan Normal University

Doctoral Dissertation

天然植化素槲皮素與蘿蔔硫素

對糖尿病大鼠的泌尿系統保護機轉

The Mechanisms of Natural Phytochemicals Quercetin and  
Sulforaphane on Protection of Urinary System in Diabetic Rats

林嘉發

Lin, Chia-Fa

指導教授：鄭劍廷 博士

Advisor: Chien, Chiang-Ting, Ph.D.

中華民國 109 年 1 月

January 2020

## 誌謝

臨床中醫醫療工作近二十年，我常常宣導病人食用天然蔬果以保健身體，因為中醫的核心理念本就是「藥食同源」，運用天然植物的四氣五味，來調理相對應的臟腑以恢復健康，病重病急則用藥物，而病輕病緩當用食物。其中糖尿病患常常苦於不能吃太甜的水果，我的建議首選水果是番石榴。另外，對於容易發炎上火的體質，屬性偏涼的西蘭花則是上上之選。

沒想到與恩師鄭劍廷院長談到這些中醫保健之道時，引發了迴響。臨床工作常是知其然而不知其所以然。鄭院長在分子細胞生物學領域的專精，或許可以為這些有用的資訊提供一個厚實的基礎，進而有助於理解中醫理論中藥物性味之現代奧義。於是在他的熱忱指導下，進行了博士研究工作。

很榮幸在數年努力下，我們的研究成果表明，天然蔬果所蘊含的植化素，的確對於糖尿病大鼠的腎臟、膀胱有保護作用，可以有效地協助因糖尿病導致的泌尿系統改善其功能。中藥裡面使用天然植物的機會甚多，明代李時珍《本草綱目》就收錄了共計 1095 種植物，佔全部藥物總數的 58%，相信在此論文的基礎上，我們建立了有效的實驗模型

以利後續的探討。

再次感謝我的指導教授鄭劍廷老師，您那充滿創意、深具啟發的教導，讓我總有柳暗花明又一村的感受。無數的晨昏，伴隨著便當的氣味和著研討會議上幻燈片的明暗，讓這四年紮紮實實地學習了功課。還要感謝我碩士班的指導教授張恒鴻院長，不但幫助我建立完整的科研基礎，也是一代儒醫，以身作則教我安身立命之道。引薦我進入師大的陽明副校長楊慕華教授，提供了許多研究上的新指標，以及在生命科學的領域中，開拓我廣大視野的吳忠信教授與林豐益教授，更感謝生科院的師長與同學們互相勉勵與支持，沒有您們，沒有這份得來不易的成果！



## 中文摘要

本論文主要在探討天然植化素 (phytochemicals) 對於糖尿病大鼠的泌尿系統保護作用，並研究有關細胞凋亡 (apoptosis)、細胞自噬 (autophagy)、發炎性細胞凋亡 (pyroptosis)，和粒線體功能的作用機轉。我們建立了兩種不同誘發糖尿病的動物模型，第 II 型糖尿病 (Type 2 diabetes mellitus, T2DM) 模型，與第 I 型糖尿病 (Type I diabetes mellitus, T1DM) 模型。T2DM 模型主要研究對象是第 II 型糖尿病 (Type 2 diabetes mellitus, T2DM) 之腎臟細胞損傷與保護，而 T1DM 模型則是用於研究糖尿病的排尿功能障礙，這通常會發生在較嚴重的 T1DM 高血糖狀態，因為 T1DM 模型可以快速誘導糖尿病膀胱 (diabetic bladder) 損傷。

我們萃取富含槲皮素 (quercetin) 的番石榴汁，並混合不同比例的海藻糖 (trehalose)，來研究其對於 T2DM 大鼠腎臟和胰臟損傷的保護作用，並採用高效液相色譜分析法以測定番石榴汁的有效成分。通過腹腔注射菸鹼醯胺 (nicotinamide) 和鏈脲佐菌素 (streptozocin)，結合高果糖飲食誘導 Wistar 大鼠 T2DM 模型，持續 8 周。用不同劑量的番石榴汁混和海藻糖餵養大鼠 4 周，檢測口服葡萄糖耐量試驗 (Oral Glucose Tolerance Test, OGTT)、血漿胰島素 (insulin)、糖化血色素 (glycated

hemoglobin, HbA1c)、胰島素抗性指數 (Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance index, HOMA-IR)、 $\beta$  細胞功能和胰島素分泌指數 (Homeostasis Model Assessment of  $\beta$ -cell function, HOMA- $\beta$ )。我們也使用了免疫組織化學染色法、螢光染色法和西方墨點法來測定氧化和發炎程度，用化學發光分析儀測定了血清和腎組織活性氧類 (Reactive Oxygen Species, ROS) 濃度。

結果發現，番石榴汁中高含量的槲皮素對過氧化氫 (Hydrogen Peroxide,  $H_2O_2$ ) 和次氯酸 (hypochlorous acid, HOCl) 有清除作用，而海藻糖對  $H_2O_2$  有選擇性清除作用，而對 HOCl 無清除作用。對於 T2DM 的 OGTT、insulin、HbA1c、HOMA-IR 和 HOMA- $\beta$  水平均有影響，而番石榴混和海藻糖對 T2DM 改變的參數，除 HbA1c 外均有顯著改善。番石榴汁混和海藻糖能顯著降低 T2DM 所增強的腎臟 ROS、4-hydroxynonenal、caspase-3/apoptosis、LC3-B/autophagy，以及 IL-1 $\beta$ /pyroptosis 的水平。研究結果顯示：番石榴汁混和海藻糖的攝取，對於因 T2DM 而損傷的胰臟和腎臟細胞，具有顯著的保護作用。

嚴重的高血糖能誘發氧化壓力，造成糖尿病膀胱 (diabetic bladder)，進而引發排尿功能障礙。我們在論文中探討了蘿蔔硫素 (sulforaphane)，一種具有抗氧化力的轉錄因子 Nuclear factor erythroid 2-related factor 2

(Nrf2) 激活劑，是否具有預防糖尿病因高血糖而併發膀胱功能障礙的功用。糖尿病誘導前給予鏈脲佐菌素和蘿蔔硫素，用化學發光分析儀測定膀胱活性氧類，另用西方墨點法檢測粒線體功能、粒線體 Bcl-2-associated X protein (Bax) 和胞漿細胞色素 cytochrome c、抗氧化防禦能力 Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 / heme oxygenase-1 (Nrf2/HO-1)、內質網壓力標誌物 Activating transcription factor 6 / C/EBP Homologous Protein (ATF-6/CHOP) 和 Caspase 3 / poly ADP-ribose polymerase (Caspase 3/PARP)。糖尿病增加膀胱組織中 Keap1 的表現，並降低 Nrf2 的表現，與膀胱活性氧增加、粒線體 Bax 轉位、胞漿細胞色素 (cytochrome c) 釋放、ATF-6/CHOP、Caspase 3/PARP/apoptosis 增加有關，通過增加排尿間隔時間和排尿時間導致排尿功能障礙。蘿蔔硫素能顯著活化 Nrf2/HO-1 軸的表現，減少膀胱活性氧、粒線體 Bax 轉位、細胞色素 C 釋放、ATF-6/CHOP 和 caspase 3/PARP/apoptosis，從而通過縮短排尿間期和排尿時間來改善排尿功能。根據研究結果，我們認為蘿蔔硫素通過激活 Nrf2/HO-1 信號通路保護了粒線體功能，並抑制糖尿病誘導的 ROS、內質網壓力、細胞凋亡和排尿功能障礙。

研究顯示，天然植化素槲皮素與蘿蔔硫素，的確具有保護糖尿病大

鼠泌尿系統之效益。

關鍵字：細胞凋亡；細胞自噬；發炎性細胞凋亡；粒線體；槲皮素；海藻糖；蘿蔔硫素；氧化壓力；糖尿病；排尿功能；Nrf2 轉錄因子



# ABSTRACT

In this study, we investigated the protective effects of natural phytochemicals on urinary system in diabetic rats, and investigated the mechanisms of apoptosis, autophagy, pyroptosis, and mitochondrial function. We have established two different animal models of diabetes, T2DM (Type II diabetes) model and T1DM (Type I diabetes) model. T2DM model is used to research the protection of T2DM rats on kidney cell damage by hyperglycemia. However, T1DM model is used to study the urination disorder occurred in the more serious hyperglycemia condition in T1DM because of diabetes mellitus bladder rapidly induced by T2DM model method.

We extracted quercetin from *psidium guajava*, combined with trehalose to study the protective effect on kidney and pancreas injury in T2DM rats. Use high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis to determine the active components of guava juice. T2DM was induced in Wistar rats by intraperitoneal injection of nicotinamide and streptozocin combined with a high fructose diet for 8 weeks. Oral glucose tolerance test (OGTT), plasma insulin, glycated hemoglobin (HbA1c), homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) , homeostasis model assessment of the function of  $\beta$  cell in pancreas and insulin secretion index (HOMA- $\beta$ ) were

observed in rats fed with different doses of guava juice and trehalose for 4 weeks. The degree of oxidation and inflammation was determined by immunohistochemical staining, fluorescence staining and western blotting, and the serum and renal reactive oxygen species (ROS) were determined by chemiluminescence analysis.

The results showed that quercetin in guava juice could scavenge  $H_2O_2$  and HOCl, while trehalose could selectively scavenge  $H_2O_2$ , not for HOCl. T2DM had effects on OGTT, plasma insulin, HbA1c, HOMA-IR and HOMA- $\beta$ , while guava and trehalose had significant effects on T2DM except HbA1c. Guava juice combined with trehalose significantly decreased T2DM-enhanced renal ROS, 3-nitrotyrosine, Caspase-3 / Apoptosis, LC3-B / autophagy and IL-1 $\beta$  / pyroptosis. We found that guava juice combined with trehalose had protective effects on cells of pancreas and kidney damaged by T2DM.

Hyperglycemia evoked oxidative stress to induce diabetes voiding dysfunction. We explored whether antioxidant sulforaphane, a nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) activator, may ameliorate DM-induced bladder dysfunction. Streptozotocin and sulforaphane was administered before DM induction. Bladder ROS was determined by an ultrasensitive chemiluminescence analyzer. Mitochondrial function index, mitochondrial bax, cytosolic cytochrome c, antioxidant defense Nrf2/HO-1, endoplasmic

reticulum stress marker ATF-6/CHOP, and Caspase 3/PARP were evaluated by western blotting. DM increased Keap1 and reduced Nrf2 expression, associated with increase of bladder ROS, mitochondrial Bax translocation, cytosolic cytochrome c release, ATF-6/CHOP, Caspase-3/PARP in bladders which resulted in voiding dysfunction by increased intercontraction intervals and micturition duration. However, sulforaphane significantly increased nuclear Nrf2/HO-1 axis expression, decreased bladder ROS amount, mitochondrial Bax translocation, cytochrome c release, ATF-6/CHOP and Caspase 3/PARP/apoptosis, thereby improved the voiding function by the shortened intercontraction intervals and micturition duration. We suggested that sulforaphane via activating Nrf2/HO-1 signaling preserved mitochondrial function and suppressed DM-induced ROS, endoplasmic reticulum stress, apoptosis and voiding dysfunction.

In conclusion, these studies have shown that natural phytochemicals quercetin and sulforaphane have the benefit of protecting the urinary system in diabetic rats.

Keywords: apoptosis; autophagy; pyroptosis; mitochondria; quercetin; trehalose; sulforaphane; oxidative stress; diabetes mellitus; voiding function; Nrf2

## 縮寫

AGE, advanced glycation end products 晚期糖基化終產物

ARE, antioxidant responsive element 抗氧化反應元件

ATF-6, Activating transcription factor 6 活化轉錄因子

AUC, area under curve 曲線下面積

Bax, Bcl-2-associated X protein B 淋巴瘤-2 基因關聯蛋白

CHOP, C/EBP Homologous Protein CHOP 蛋白

DM, diabetes mellitus 糖尿病

FBG, fasted blood glucose 禁食血糖

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Hydrogen Peroxide 過氧化氫

HbA1c, glycated hemoglobin A1c 糖化血色素

HO-1, heme oxygenase-1 血鐵質氧化酶

HOCl, hypochlorous acid 次氯酸

HOMA-β, homeostasis model assessment of the function of β cell in pancreas and insulin secretion index 胰臟 β 細胞功能和胰島素分泌指數

HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance 胰島素抗性指數

IHC, immunohistochemistry 免疫組織化學

IR, insulin resistance 胰島素阻抗

IVGTT, intra venous glucose tolerance test 靜脈內注射葡萄糖耐受性試驗

Keap-1, Kelch-like ECH-associated protein 1 Keap-1 蛋白

NA, nicotinamide 菸鹼醯胺

Nrf2, Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 核轉錄因子 E2 相關因子

OGTT, oral glucose tolerance test 口服葡萄糖耐受性試驗

PARP, poly ADP-ribose polymerase 多二磷酸腺苷核糖聚合酶

ROS, Reactive oxygen species 活性氧類

STZ, streptozotocin 鏈脲佐菌素

T1DM, type I diabetes 第 I 型糖尿病

T2DM, type II diabetes 第 II 型糖尿病

# 目次

誌謝 .....	i
中文摘要 .....	iii
ABSTRACT.....	vii
縮寫 .....	x
目次 .....	xii
第一章 前言 .....	1
第一節 第 II 型糖尿病 .....	1
第二節 糖尿病腎病 .....	2
第三節 糖尿病膀胱功能障礙 .....	3
第四節 植物生化素 .....	4
第五節 番石榴與槲皮素 .....	8
第六節 海藻糖 .....	10

第七節 西蘭花、蘿蔔硫素與 Nrf2 .....	11
第八節 研究目的 .....	13
<b>第二章 材料與方法 .....</b>	<b>14</b>
<b>第一節 實驗動物 .....</b>	<b>14</b>
第一項 實驗動物 .....	14
第二項 糖尿病誘發模型 .....	15
<b>第二節 番石榴萃取物製備 .....</b>	<b>17</b>
<b>第三節 試驗方法、儀器與試劑 .....</b>	<b>18</b>
第一項 測定血糖 .....	18
第二項 測定胰島素 .....	18
第三項 測定 HOMA-IR 和 HOMA- $\beta$ .....	18
第四項 測定糖耐受性 .....	19
第五項 測定糖化血色素 .....	20

第六項 測定活性氧.....	20
第七項 測定槲皮素.....	22
第四節 粒線體蛋白質和胞漿分離的製備.....	23
第五節 切片染色製備.....	23
第一項 免疫組織化學 (Immunohistochemistry, IHC) .....	23
第二項 馬松染色法 (Masson's Stain) .....	25
第三項 螢光染色法 (Fluorescent Stain) .....	26
第六節 測量各種生理參數.....	27
第一項 以代謝籠記錄尿動力學和生理參數.....	27
第二項 測量膀胱計量參數.....	27
第三項 測量血流動力記錄.....	28
第七節 西方墨點法.....	28
第一項 腎臟和胰臟組織的檢測.....	28

第二項 膀胱組織的檢測.....	29
第八節 統計分析.....	31
第一項 番石榴混和海藻糖實驗.....	31
第二項 蘿蔔硫素排尿功能實驗.....	31
第三章 結果 .....	<b>33</b>
第一節 番石榴萃取物中槲皮素的含量 .....	33
第二節 番石榴清除體外活性氧的能力 .....	33
第三節 海藻糖清除體外活性氧的能力 .....	34
第四節 口服番石榴汁耐受性試驗 .....	34
第五節 口服糖耐受性試驗 .....	35
第六節 靜脈內注射葡萄糖和海藻糖耐受性試驗 .....	35
第七節 糖化血色素的變化 .....	36
第八節 血糖變化 .....	36

第九節 胰島素的變化 .....	36
第十節 HOMA-IR 和 HOMA- $\beta$ 的變化 .....	37
第十一節 切片染色的發現 .....	38
第一項 胰臟切片 .....	38
第二項 腎臟切片 .....	39
第三項 膀胱切片 .....	40
第十二節 活性氧的變化 .....	41
第一項 體內腎臟活性氧水準 .....	41
第二項 血清體外活性氧水準 .....	41
第三項 體內膀胱活性氧水準 .....	42
第十三節 西方墨點法分析結果 .....	42
第一項 番石榴混和海藻糖實驗 .....	42
第二項 蘿蔔硫素對排尿功能實驗 .....	43

第十四節 蘿蔔硫素對大鼠尿流動力學參數的影響 .....	45
第十五節 綜合結果論述 .....	46
<b>第四章 討論 .....</b>	<b>49</b>
第一節 番石榴中槲皮素與海藻糖保護腎臟的討論 .....	49
第二節 蘿蔔硫素與膀胱排尿功能研究的相關討論 .....	54
第三節 研究限制 .....	60
第四節 結論與未來展望 .....	62
參考文獻	
附錄	



# 第一章 前言

## 第一節 第 II 型糖尿病

第 II 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 是一種代謝性疾病，儼然成為已開發國家和開發中國家的主要健康議題<sup>1</sup>，儘管有很多關於糖尿病的研究，但是全世界患有糖尿病的人數仍在增加<sup>2 3</sup>。世界衛生組織的報告指出，迄至 2016 年，全世界有 4.22 億人患有糖尿病 (其中 T2DM 約 90%)，國際糖尿病聯盟 (International Diabetes Federation, IDF) 預期 2035 年全世界糖尿病患者將增加至 5.92 億人。此外在亞洲地區，糖尿病患者的增長率並沒有減緩的跡象<sup>4</sup>，依據我國衛生福利部國民健康署 103-106 年國民營養健康狀況變遷調查，臺灣 18 歲以上國人糖尿病盛行率為 10.1% (男性 10.9%、女性 9.4%)。其所耗費的醫療費用不貲，根據中央健康保險署統計資料，2018 年健保支出醫療費用，糖尿病排行高達第二，就醫人數 145.9 萬人，費用約佔 291 億元，僅次於慢性腎臟疾病。因此，預防和治療 T2DM 在研究上的重要性不容忽視。

T2DM 患者會出現胰島素阻抗性，這與胰臟功能隨時間下降有關。在正常情況下，胰島素是調節血糖的主要激素，胰島細胞在不同情況

下調節胰島素的作用，胰島素的作用減弱時，胰島素分泌會增加<sup>5</sup>。

胰島素阻抗是 T2DM 的特徵之一，一般會在糖尿病的早期或中期開始發生，當糖尿病基因、脂肪激素、發炎、高血糖、游離脂肪酸等因素引起胰臟  $\beta$  細胞功能障礙，導致血液循環中的糖份和脂肪酸升高，便會進一步造成胰島素阻抗<sup>6</sup>。

## 第二節 糖尿病腎病

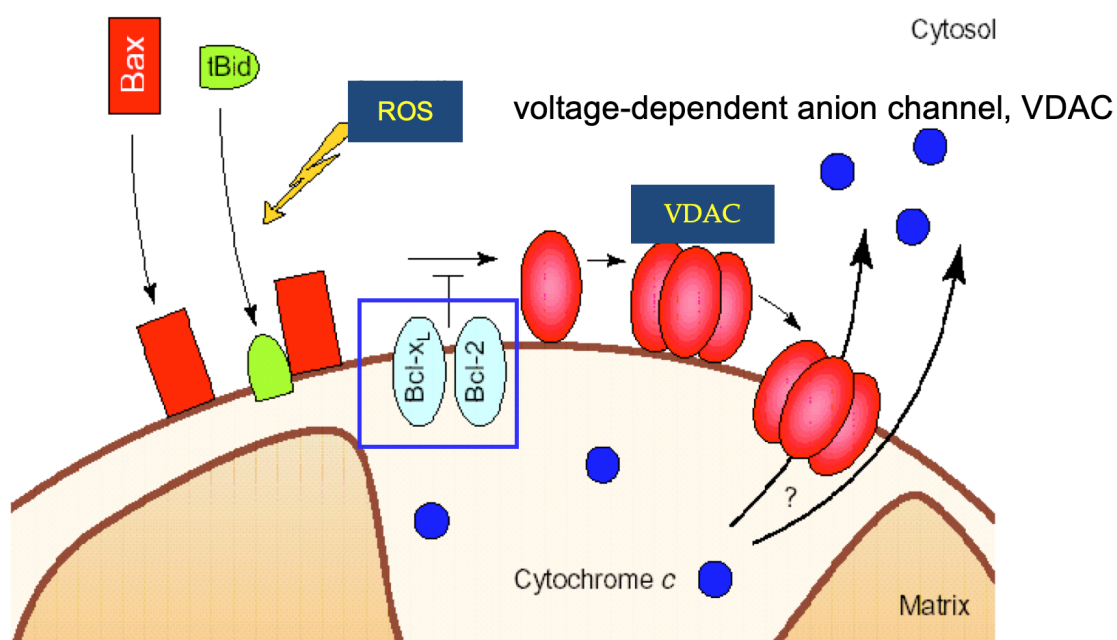
除了高血糖的損害，糖尿病患者還會發生許多併發症，包括動脈粥樣硬化、糖尿病視網膜病變和糖尿病腎病<sup>7</sup>，在這些併發症中，慢性腎臟疾病是主要的併發症。根據統計，糖尿病已成為造成末期腎衰竭最常見的原因<sup>8</sup>。長期、慢性的高血糖濃度，是腎臟肥大、腎小球硬化和腎小管間質纖維化的重要因素，這些是終末期腎功能衰竭的常見形態。

高血糖會增加組織中造成氧化壓力的活性氧，而氧化壓力被認為是影響糖尿病腎病的主要因素。細胞內和細胞外的高濃度葡萄糖都會導致活性氧產生，並引起組織損傷<sup>9</sup>。細胞外高葡萄糖水準促進晚期糖基化終產物 (Advanced Glycation End Product, AGE) 的形成，並進一步與 AGE 受體相互作用。同樣地，細胞內增加的葡萄糖水準促

進了蛋白激酶 C 和 Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) 氧化酶的活性，從而提高了活性氧的產生和一些轉錄因子的表現，如 kappa B<sup>10</sup>。

### 第三節 糖尿病膀胱功能障礙

糖尿病性膀胱功能障礙是糖尿病的主要後遺症之一，其症狀隨著糖尿病的嚴重程度和進展而變化<sup>11</sup>。糖尿病早期膀胱功能障礙表現為膀胱過度活動症狀，排尿頻率增加，後期轉變為膀胱不活動症狀<sup>11</sup>。糖尿病狀態下的高血糖會導致氧化壓力和發炎反應，從而導致糖尿病性膀胱功能障礙<sup>12</sup>。來自受損粒線體增加的活性氧類 Reactive oxygen species (ROS) 可以促進細胞凋亡，通過將胞漿 Bax 轉移到粒線體，形成外粒線體電壓依賴的陰離子電導 (VDAC) 通道，釋放粒線體細胞色素 C 進入胞漿<sup>13</sup>，以增加 caspase 3 activity/poly- (ADP-ribose) -polymerase (PARP) cleavage/apoptosis 路徑的形成<sup>14 15</sup>。



另一個胞器－內質網細胞器（ER），也可能參與了氧化壓力下的細胞損傷<sup>16</sup>。內質網恆定態的紊亂可能導致內質網壓力，這已涉及到多起病理生理學上的改變，以及整合多種細胞的反應，包括發炎反應和細胞凋亡<sup>17</sup>。然而，氧化壓力在糖尿病性膀胱功能障礙中的作用機制還有待進一步闡明；在這項研究中，我們認為增加糖尿病的氧化壓力可能導致粒線體功能障礙和內質網壓力，因而導致糖尿病性膀胱功能障礙。

#### 第四節 植物生化素

植物生化素（Phytochemicals）是存在於植物內的天然化學成分，也是植物通過初級或次級代謝產生的化學物質。通常在植物體內具

有生物活性，並在植物生長中發揮作用，或對競爭者、病原體或捕食者起到防禦作用。植化素提供植物自我保護的功能，阻抗昆蟲、細菌、真菌、病毒的感染傷害，對紫外線，輻射線，空氣及土壤污染，化學藥物等種種傷害，起保護作用。

許多傳統醫學使用天然植物做為治療疾病的藥物，包括中國傳統醫學 (Traditional Chinese Medicine, TCM) 以及印度吠陀醫學 (Indian Ayurvedic Medicine, IAM)。在中醫數千年發展所集結的經典著作中，明代李時珍所著作的《本草綱目》，就收錄了 1095 種植物，佔全部藥物總數的 58%，天然植物在當代的中醫臨床治療上，更是常見有效方劑之重要組成，居功厥偉。

常見的植物生化素種類有：

一、類黃酮素 (Flavonoids)：

(1) 槲皮素 (Quercetin)；

(2) 兒茶素 (Catechin)；

(3) 花青素 (Anthocyanidin)、前花青素 (Oligomeric Proanthocyanidins, OPC)；

(4) 檸檬黃素 (Hesperidin)；

(5) 芸香素 (Rutin)；

(6) 芹菜素 (Apigenin) 等。

## 二、有機硫化物 (Organosulfides) :

(1) 蘿蔔硫素 (Sulforaphane) ;

(2) 大蒜素 (Allicin) ;

(3) 麩胱甘肽 (Glutathione, GSH) ;

(4) 吲哚 (Indole) ;

(5) 異硫氰酸酯 (Isothiocyanates) 等。

## 三、類胡蘿蔔素 (Carotenoids) :

(1)  $\beta$ -胡蘿蔔素 ( $\beta$ -Carotenes)、 $\alpha$ -胡蘿蔔素 ( $\alpha$ -Carotenes) ;

(2) 葉黃素 (Lutein) ;

(3) 玉米黃素 (Zeaxin) ;

(4) 茄紅素 (Lycopene) ;

(5) 辣椒素 (Capsaicin) 等。

## 四、酚酸類 (Phenolic acids) :

(1) 綠原酸 (Chlorogenic acid, CGA) ;

(2) 鞣花酸 (Sourtaacid) ;

- (3) 沒食子酸 (Gallic acid) ;
- (4) 對香豆酸 (p-Coumaric acid) ;
- (5) 阿魏酸 (Ferulic acid) ;
- (6) 水楊酸 (Salicylic acid) 等。

五、植物雌激素：

- (1) 異黃酮 (Isoflavones) ;
- (2) 薯芋皂苷 (Diosgenin) ;
- (3) 木酚素 (Xyphenolin) 等。

六、其他：

- (1) 薑黃素 (Curcumin) ;
- (2) 葉綠素 (Chlorophylls) ;
- (3) 苦瓜苷 (Charantin) ;
- (4) 咖啡酸 (Caftaric acid) ;
- (5) 檸檬酸烯 (Limonene)、檸檬苦素 (Limonin) ;
- (6) 植物皂素 (Plant saponins) ;
- (7) 白藜蘆醇 (Resveratrol) ;

(8) 迷迭香酸 (Rosemary acid) 等。

本論文主要研究植化素中的「槲皮素 (quercetin)」(屬於類黃酮素)，以及「蘿蔔硫素 (sulforaphane)」(屬於有機硫化物) 兩種天然植化素，對於糖尿病大鼠泌尿系統中腎臟與膀胱的保護作用。

## 第五節 番石榴與槲皮素

番石榴 (*Psidium guajava*) 屬於桃金娘科 (Myrtaceae) 番石榴屬 (*Psidium*)，是一種熱帶水果，在亞洲和臺灣都很受歡迎<sup>18</sup>。番石榴含有多種營養成份，特別是豐富的維生素 C、類黃酮類 (如槲皮素) 和多酚類化合物<sup>19</sup>。

番石榴葉萃取物中含多元酚成分，能刺激脂肪細胞上胰島素受體的磷酸化及葡萄糖轉運蛋白的轉位，具有類似胰島素的功能，有助於糖尿病的控制。而番石榴萃取物可以降低第 I 型糖尿病小鼠腎臟中的氧化壓力、白細胞介素-6 (interlukin-6)、腫瘤壞死因數- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) 和白細胞介素- $1\beta$  (interlukin- $1\beta$ ) 的水準<sup>20</sup>。Li P.Y. 等的研究還發現番石榴具有抗氧化、抗炎和抗糖尿病作用，這些特性使番石榴受到廣泛關注<sup>21</sup>。

T2DM 占糖尿病總病例的 90%以上。雖然已有研究涉及番石榴葉萃取物與 T2DM 之間的相互作用<sup>22</sup>，但很少有研究報導番石榴的食用比例與 T2DM 之間的關係，這也是我們大感興趣的地方。

我們在研究中萃取番石榴，發現它主要含有深具抗氧化力的一種黃酮類植化素—槲皮素（Quercetin），也稱作五羥黃酮，是一種存在於天然水果、蔬菜和穀物等植物中的植源性黃酮類化合物。其英文名“quercetin”最早出現於 1857 年，其來源於“quercetum”，意為櫟樹林。

文獻回顧中，Laura K. 等人研究表明槲皮素可能具有抗炎特性<sup>23</sup>，J. Mark Davis 等認為槲皮素具有調節人體的潛在療效，<sup>24</sup> Balabolkin 等認為槲皮素可減輕花粉熱的症狀。<sup>25</sup> Nothlings U. 等人在一項長達八年的研究發現，槲皮素可以降低吸煙者罹患胰腺癌的風險。<sup>26</sup> 槲皮素已被 Laura K. 等研究證明可增加大鼠的能量代謝，但僅限於短期（短於 8 週）。<sup>23</sup> Davis JM 的研究指出，槲皮素對小鼠運動耐受性的影響與增加線粒體生物合成有關，小鼠口服 12.5 至 25 mg/kg 濃度依次增加的槲皮素，可增加線粒體生物標誌物的基因表達，並可改善運動耐受性。<sup>27</sup> 美國國立衛生研究院（NIH）的文獻回顧中，廣泛收錄了槲皮素對於結節病、哮喘、肥胖相關的研究，特別是收錄了與糖尿病的葡萄糖吸收有關的初步研究，<sup>28</sup>有鑑於此，我們設計實驗以進一步研

究番石榴中的槲皮素，是否可以改善糖尿病因高血糖及氧化損傷所造成的腎臟傷害，是否能藉由槲皮素對於腎臟細胞的保護作用，進而改善腎臟功能。

## 第六節 海藻糖

除了番石榴，我們還對海藻糖 (Trehalose) 很感興趣。早在 1984 年的著名期刊《科學》(Science) 中指出，許多能夠撐過無水狀態的生物，正是因為體內有海藻糖存在，才得以在無水的困難環境下存活。<sup>29</sup> 海藻糖能幫助生物度過艱困環境的海藻糖，也因此被稱為「生命之糖」。

海藻糖是一種天然雙糖，廣泛存在於各種生物體中，包括植物、細菌、酵母和無脊椎動物<sup>30</sup>。這種雙糖是非還原性的，它將兩個葡萄糖單位以 $\alpha,\alpha$ -1,1-glycosidic 方式連接在一起<sup>31</sup>。海藻糖在這些生物體中起著保護作用，通過防止蛋白質變性來幫助細胞抵抗環境壓力，如高溫、低溫、乾燥、脫水和氧化<sup>32</sup>。由於其獨特的性質，海藻糖已被用於深低溫環境保存哺乳動物細胞、亨頓氏病<sup>33</sup>和阿茲海默氏病上。Eroglu, A. 等人研究表明海藻糖可以大大提高哺乳動物細胞在深低溫保存期間的存活率<sup>34</sup>。Cheng Xu 等的文獻指出，海藻糖可以藉由修

正母體糖尿病所壓抑的細胞自噬與神經新生 (neurogenesis)，以避免胎兒的神經管缺陷 (neural tube defects)。<sup>35</sup>

糖尿病患者的飲食受限，降低了生活品質，我們希望能開發一種好喝又有效的糖尿病保健飲料。番石榴汁喝起來有點澀，恐怕民眾接受度不太好，如果加上一種糖以增加口感，的確會讓飲用者接受度增加。但這種糖必須具有細胞保護作用，又不會明顯上昇血糖，依據文獻海藻糖是首選。所以實驗設定以番石榴汁混和海藻糖，研究其對 II 型糖尿病大鼠腎臟和胰臟病理生理的影響及其機制。

## 第七節 西蘭花、蘿蔔硫素與 Nrf2

餐桌上常見的西蘭花 (*Brassica oleracea* var. *italica*)，也稱綠花椰菜，屬於十字花科 (*Brassicaceae*) 芸薹屬 (*Brassica*)，是深受大眾喜愛的一種蔬菜。除了顏色翠綠好看，其營養價值也甚高，特別是含有蘿蔔硫素 (sulforaphane)，在各種芸薹屬蔬菜中，蘿蔔硫素含量約為 50~2000 $\mu$ g/g，其中以西蘭花的含量最高。

蘿蔔硫素是一種紅細胞核相關因子 2 (nuclear erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 激活劑，具有抗氧化性與抗癌性。在先前的研究中，Tai HC 等已將 Nrf2 激活劑用於改善缺血性膀胱損傷<sup>17</sup>，對於降低糖

尿病所引發的氧化損傷和發炎損傷，深具未來發展性。

Wang XJ 等的研究指出，Kelch-like ECH-associated protein (Keap1) / NF-E2-related factor (Nrf2) 信號，可以作為氧化壓力的傳感器<sup>36</sup>。我們發現，Nrf2 是一種可誘導的轉錄因子，可以調節抗氧化反應元件介導的解毒和抗氧化酶的表現，如 heme oxygenase-1 (HO-1)，以提供抗氧化保護作用<sup>37</sup>。

Bcl-2 家族成員中，Bax 和 Bcl-2 與調節細胞凋亡有關<sup>38</sup>。抗凋亡 Bcl-2 存在於粒線體中，通過阻斷粒線體通透性轉換孔 (mitochondria permeability transition pore, MTP) 開放<sup>39</sup>，或是作為一種對接蛋白 (docking protein)<sup>40</sup>，以阻止效應因子 Caspases 的激活。胞漿中的 Bax 轉運到粒線體，會促使粒線體中的細胞色素 C 釋放到胞質中誘導細胞凋亡。相反地，Bcl-2 可以抑制粒線體細胞色素 C 的釋放，因而抑制細胞凋亡<sup>41</sup>。


我們假設 Nrf2 轉位的減少，可能通過 Bcl-2 在糖尿病膀胱中的相關機制，而促進氧化壓力和粒線體功能障礙的增加。此外，糖尿病誘導的氧化壓力，可能通過粒線體功能障礙和 Nrf2/HO-1 信號通路的抑制，促進受損膀胱內質網壓力和細胞凋亡的形成。抗氧化劑蘿蔔硫素藉由激活 Nrf2/HO-1 信號通路，可能阻止粒線體細胞色素 C 釋

放到胞漿中，從而減輕糖尿病患者的膀胱功能障礙。

在本論文中，我們先探討蘿蔔硫素本身對於糖尿病鼠膀胱的功能促進作用。未來的計畫中，再進一步研究如何從其他植物（如西蘭花或中藥）有效率地萃取出蘿蔔硫素。

## 第八節 研究目的

本文主要探討日常生活中常見的天然蔬果，如番石榴、西蘭花，其中所含的植物生化素槲皮素、蘿蔔硫素，是否能對糖尿病併發的泌尿系統病變，如腎臟損傷與膀胱功能障礙，具有保護及功能增進作用，並討論其細胞分子生物學的作用機制。



## 第二章 材料與方法

### 第一節 實驗動物

#### 第一項 實驗動物

##### 第一目 番石榴海藻糖實驗

實驗動物是在 BioLASCO 臺灣有限公司購買的，出生 7 周齡雌性 Wistar 大鼠，在臺灣國立臺灣師範大學動物實驗中心飼養，溫度恒定，光週期一致（光照時間為 07:00—18:00）。所有手術和實驗操作均經臺灣師範大學動物護理和使用委員會批准，並符合中華民國國家科學委員會 (NSC1997) 的指導方針。

將動物隨機分為 6 組：

1. CON：對照組
2. DM：II 型糖尿病組
3. T1：T2DM 番石榴汁 4 ml/kg+海藻糖 2 ml/kg 組
4. T2：T2DM 番石榴汁 8 ml/kg+海藻糖 4 ml/kg 組
5. T5：T2DM 番石榴汁 20 ml/kg+海藻糖 1 ml/kg 組
6. B1：T2DM 番石榴汁 4 ml/kg

## 第二目 蘿蔔硫素對排尿功能實驗

實驗動物是在 BioLASCO 臺灣有限公司購買的 12 週雌性 Wistar 大鼠 (200-250 克)，在臺灣國立臺灣師範大學動物實驗中心飼養，溫度恒定，光週期一致 (光照時間為 07:00—18:00)。所有手術和實驗操作均經台灣師範大學生命科學學院動物護理與使用委員會批准，並符合中華民國國家科學委員會 (NSC1997) 的指導方針。飼料 (LabDiet 5001) 和自來水可以任意供其使用。所有的努力都是為了盡量減少動物的痛苦，以及減少實驗過程中使用的動物數量。

將大鼠隨機分為 4 組，每組 10 隻，其中 SF 代表蘿蔔硫素 (Sulforaphane) 預先處理：

1. CON：對照組：只用玉米油
2. DM：糖尿病組，用 STZ 處理
3. CON+SF：對照組先用蘿蔔硫素處理
4. DM+SF：糖尿病組先用蘿蔔硫素處理

## 第二項 糖尿病誘發模型

### 第一目 第 II 型糖尿病誘發模型

CON 對照組採用標準飲食和正常飲水。另 5 組採用高果糖飲食誘導 T2DM，腹腔注射菸鹼醯胺 (NA) (Sigma, Missouri, USA) (230mg/kg) 和鏈脲佐菌素 (STZ) (Sigma, Missouri, USA) (65mg/kg)。高果糖飲食包括 21% 果糖水 and 60% 果糖飲食 (TD. 89247, Harlan Teklad)。高果糖飼料餵養 8 周後，給大鼠注射 NA 和 STZ，發現血糖高於 230 mg/dl 的大鼠即誘導成功為 T2DM。

## 第二目 第 I 型糖尿病誘發模型

以鏈脲佐菌素 (STZ, Sigma) 為原料，在檸檬酸鈉緩衝溶液中加入 STZ，在黑暗中用冰浴溶解，得到 1% (pH 4.2-4.4) 的 STZ 原液。糖尿病模型組於 10 分鐘內給予腹腔注射單次 STZ 65mg/kg，建立糖尿病模型。對照組則注射等量檸檬酸-檸檬酸鈉緩衝液 (5.5 ml/kg)。

在誘導糖尿病之前三天，大鼠先使用 Nrf2 活化劑—蘿蔔硫素預先處理 (SF, 12.5 mg/kg/d 溶於玉米油中，i.p.)。步驟請參見圖 8 (A)。

使用此模型可快速誘發糖尿病，並伴有多尿，當尾靜脈

血糖濃度大於 250 mmol/l (One Touch II; LIFESCAN)，即誘導成功為 T1DM<sup>42</sup>。

## 第二節 番石榴萃取物製備

以臺灣產的兩種番石榴，即泰國番石榴 (G1) 和珍珠番石榴 (G2) 為原料，研製出番石榴汁。將 50 克可食部分 (去籽部分) 的新鮮果實與 150 ml 水或 50% 乙醇混合。在室溫 (25 °c) 下保存 24 小時後，我們用紗布過濾一次，再用 Whatman No. 1 濾紙過濾一次<sup>20</sup>。C18-E 管柱 (6 ml) 首先用 12 ml 甲醇沖洗，然後用 12 ml ddH<sub>2</sub>O 沖洗。在柱中加入 24 ml 水萃取液，或 48 ml 乙醇萃取液 (用 ddH<sub>2</sub>O 稀釋 2 倍)。待萃取液滴完後，用 12 ml ddH<sub>2</sub>O 清洗管柱。我們用 12 ml 甲醇沖洗最後的濃縮萃取物。

最後得到：

番石榴水萃取物 G1 (GWE1)、G2 (GWE2)

番石榴乙醇萃取物 G1 (GEE1)、G2 (GEE2)

並貯存在 -20 °C。

### 第三節 試驗方法、儀器與試劑

#### 第一項 測定血糖

血糖濃度測定 (mg/dl) 儀器，是使用 Bayer Ascensia ELITE XL (Bayer Healthcare, Whippany, USA)。空腹血糖 (FBG) 的測量是隔夜採血，經 14 小時禁食後測量。

#### 第二項 測定胰島素

胰島素水平是由 Mercodia 大鼠胰島素酶聯免疫試劑盒 (Mercodia Rat Insulin ELISA kit, Mercodia, Uppsala, Sweden) 測定。實驗資料按曲線下面積 (min x  $\mu\text{g/l}$ ) 顯示。

#### 第三項 測定 HOMA-IR 和 HOMA- $\beta$

對於糖尿病患者要測量胰島素阻抗性，恆定態模型評估胰島素阻抗 (Homeostasis Model Assessment-Insulin Resistance, HOMA-IR) 是一種廣用的指標。HOMA- $\beta$  的數值則代表胰島  $\beta$  細胞的功能和胰島素分泌指數。若以 mg/dl 為單位，HOMA-IR 的計算公式為：

$$[\text{禁食胰島素 } (\mu\text{U/ml}) \times \text{空腹血糖 } (\text{mg/dl})] / 405。$$

HOMA-β 的計算公式為：

$(360 \times \text{禁食胰島素 } (\mu\text{U/ml}) / (\text{空腹血糖 } (\text{mg/dl}) - 63)。$

$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Glucose} \times \text{Insulin}}{22.5}$	$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Glucose} \times \text{Insulin}}{405}$
$\text{HOMA-}\beta = \frac{20 \times \text{Insulin}}{\text{Glucose} - 3.5} \%$	$\text{HOMA-}\beta = \frac{360 \times \text{Insulin}}{\text{Glucose} - 63} \%$
Glucose in Molar Units mmol/L	Glucose in mass units mg/dL

我們分別在第 0 周（4 周番石榴汁處理實驗開始）和第 4 周（4 周番石榴汁處理實驗結束）計算這 2 個數值。

#### 第四項 測定糖耐受性

##### 第一目 靜脈內注射糖耐受性試驗：

隔夜禁食後，用阿維丁 avertin (200 mg/kg BW, i.p.) (Sigma, Missouri, USA) 進行麻醉。用 PE50 管對頸動脈和頸靜脈進行插管，採集血液標本進行血糖測定，並注入葡萄糖 (0.5 g/kg)。我們注射海藻糖 (0.5 g/kg) 用以比較與葡萄糖升高血糖的能力差異。分別于注射前、注射後 1、5、10、20、30、50、75 分鐘記錄血糖值。

##### 第二目 口服糖耐受性試驗

在隔夜禁食後進行口服糖耐受性試驗 (OGTT)。口服葡萄糖負荷量 (2 g/kg) 採用灌胃法。從尾靜脈收集血液樣本，以試驗血糖水準。分別于灌胃前 (0 min) 和灌胃後 30、60、90、120 min 採集標本。除了測量番石榴汁對血糖的影響，我們也測量了對番石榴汁的耐受性。

## 第五項 測定糖化血色素

採用陽離子交換高效液相色譜法 (Cation-Exchange HPLC (HLC-723 G7 HPLC analyzer, Tosoh bioscience, Belgium)) 檢測糖化血色素 HbA1c。

## 第六項 測定活性氧

### 第一目 體外活性氧 (*in vitro*)

使用化學發光分析系統 (CLD-110, Tohoku Electronic Instrument Co., Sendai, Japan)，在一個完全黑暗的空間進行測量體外活性氧。這種儀器可以檢測到 luminol-amplified ROS 發出的化學發光<sup>43</sup>。

### 第二目 體內活性氧 (*in vivo*)

根據之前研究報告制定的方法，我們測定了大鼠腎活性氧水準<sup>43</sup>。檢測腎臟化學發光的方法，是從股靜脈連續輸注（0.01ml/min）0.4 mg/ml MCLA（2-methyl-6-(4-methoxyphenyl)-3,7-dihydroimidazo-(1,2-a)-pyrazin-3-one hydrochloride）。MCLA 與超氧陰離子自由基反應會生成化學發光。在活性氧測定後犧牲動物，收集組織用於其他實驗。

### 第三目 膀胱活性氧：

膀胱活性氧量是從膀胱表面測量<sup>44</sup>。簡要地說，從靜脈注射超氧陰離子探針 MCLA (0.2 mg/ml/hr, TCI-Ace)，即可測量體內膀胱表面超氧陰離子活性氧反應，並用化學發光分析系統（CLD-110，Tohoku Electronic inc.）記錄。為了排除膀胱以外來源的光子發射，麻醉動物被放置在一個帶屏蔽板的暗箱中。只有膀胱沒有被屏蔽，被放置在一個反射器下面，這個反射器可以將暴露在外的膀胱表面的光子反射到探測器區域。來自膀胱表面的 MCLA 增強的化學發光信號，被化學發光分析儀連續記錄。超氧陰離子活

性氧 (ROS) 值的總量乃由曲線下面積法測定。

自 0.2 mL 生理鹽水+ 1 ml MCLA (0.2 mg/mL) 所獲得的超氧陰離子活性氧數值做為負對照組，而自 0.2 ml 黃嘌呤 xanthine (0.75 mg/kg) /黃嘌呤氧化酶 xanthine oxidase (24.8 mu/kg) + 1 ml MCLA (0.2 mg/mL) 所獲得的超氧陰離子活性氧數值做為正對照組。每 10 秒連續記錄一次 MCLA 增強的化學發光。實時顯示的化學發光信號被識別為來自膀胱的 ROS 數值。

#### 第七項 測定槲皮素

我們使用由高效液相色譜泵、二極體陣列吸收檢測器所組成的高效液相色譜系統 (Ultimate 3000 HPLC system)，在 200-600nm 波長範圍內對番石榴汁樣品進行分析。用 Synergi RP-Max 管柱 (Phenomenex, Macclesfield, UK) ，在 0.1% 甲酸水溶液中，以 10-80% 乙腈 acetonitrile 為梯度，以 0.2 ml/min 的流速進行分離 40 分鐘。通過二極體陣列檢測器後，管柱洗脫液被導向裝有電噴霧介面 (Thermo Finnigan) 的 LXQ 離子阱質譜儀 (LXQ ion trap mass

spectrometer)。分析採用陰離子模式，適合槲皮素的檢測。

## 第四節 粒線體蛋白質和胞漿分離的製備

此節描述如何從新鮮膀胱製備胞漿和粒線體蛋白質<sup>45</sup>。為獲得粒線體蛋白，將膀胱組織切成小片，懸浮在緩衝液中(210 mM mannitol、70 mM sucrose、10 mM Tris-HCl、pH 7.5、10 mM KCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM EDTA、0.5 mM dithiothreitol、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>)，輕輕混合均勻。勻合後經過濾，在 4°C 的環境，先以 800 G 離心 10 分鐘，取上清液再以 1200 G 離心 10 分鐘，最後傾析後，以 15000 G 再次離心 20 分鐘，這些固態顆粒屬於粒線體分離部份。上清液用超速離心儀 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) 在 100000 G 下進一步離心 60 分鐘，上清液屬於胞漿分離部份。

## 第五節 切片染色製備

### 第一項 免疫組織化學 (Immunohistochemistry, IHC)

#### 第一目 腎臟與胰臟組織

將組織切片、脫蠟，進行免疫組織化學處理<sup>43</sup>。腎臟組

織冷凍在 Tissue-Tek 最適切割溫度複合物 (Tissue-Tek optimal cutting temperature compound (Sakura Finetek)) 中，並切成 50 $\mu$ m 切片。染色前處理，包含脫蠟、去除內生性還原酶，再加入初級抗體反應。初級抗體包括小鼠 anti IL-1 $\beta$  (1:1000; Cell Signaling Technology, Denver, MA, USA), 兔 anti Caspase-3 (1:500; Cell Signaling Technology, Denver, MA, USA), 及兔 anti 4-HNE (1:500; Alpha Diagnostic, San Antonio, TX, USA)。

之後將載玻片浸泡在 DAB (ImmPACT DAB Peroxidase Substrate; Vector, Burlingame, California, USA) 中 3-5 秒鐘，用 ddH<sub>2</sub>O 洗滌，並將載玻片浸泡在蘇木精 hematoxylin 中 5 分鐘。切片在乙醇脫水，並安置在固定介質上 (Leica, Wetzlar, Germany)。

## 第二目 膀胱組織

膀胱組織冷凍在 Tissue-Tek 最適切割溫度複合物中，並切成 50 $\mu$ m 切片，用於氧化壓力和發炎反應的檢查。使用螢光顯微鏡 (DMRD) 檢查膀胱切片。為評估細胞凋亡，摘取

膀胱並固定於甲醛中，經切片、脫蠟，蘇木精-伊紅染色 (HE stain)，採用末端脫氧核糖核酸轉移酶介導的缺口末端標記 (the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick-end labeling (TUNEL)) 方法進行分析<sup>17</sup>。

## 第二項 馬松染色法 (Masson's Stain)

腎臟切片，厚度為 5 $\mu$ m，組織固定於 Bouin 氏液，流水沖洗一晚，常規脫水包埋。切片放二甲苯中脫蠟 10min 三次，用吸水紙吸乾液體。再分別以 100% 乙醇泡 5 分鐘、95% 乙醇泡五分鐘各二次，再以流水沖洗 2 分鐘，用吸水紙吸乾水分。

使用 Weiger 氏鐵蘇木素染 5-10 分鐘，流水沖洗，再以 0.5% 鹽酸酒精分化 15 秒，流水沖洗 3 分鐘。接下來用麗春紅 (Ponceau S) 酸性品紅 (acid fuchsin) 染 8 分鐘，蒸餾水稍沖洗。使用 1% 磷鉬酸 (phosphomolybdic acid) 水溶液處理約 5 分鐘，不用水洗，直接用苯胺藍 (aniline blue) 或亮綠 (light green) 染 5 分鐘。再用 1% 冰醋酸處理 1 分鐘。以 95% 乙醇脫水 5 分鐘二次、100% 乙醇 5 分鐘二次，

用吸水紙吸乾液體。最後以中性樹膠封片。

經馬森染色後，細胞質會呈現紅色，細胞核呈現藍黑色  
而我們重點觀察的硬化區的結締組織，會呈現藍色。

### 第三項 螢光染色法 (Fluorescent Stain)

切片以二甲苯進行組織脫蠟 2 次各 10 分鐘，以濃度漸降酒精 (100, 95, 80, 70%) 進行組織回水之後，以抗原修復鍋做抗原修復 15 分鐘。接著做蛋白質封閉 (protein block)，在室溫下與 5% 牛血清白蛋白 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 非特異性結合 1 小時。經清洗後與初級抗體作用，在 4°C 孵育 18 小時，初級抗體包括 bs-2912R-Cy5 (rabbit anti MAP1A/M AP1B LC3 B polyclonal antibody, Cy5 conjugated, 1: 500, Woburn, MS, USA) 和 bs-0081R-FITC (rabbit anti-Caspase-3 polyclonal antibody, FITC conjugated, 1: 500, Woburn, MS, USA)，核染色用 Hoechst 33342 (1:1000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 在室溫下染色 1 小時。用 PBS 清洗後，組織切片用安置在固定介質 (Leica, Wetzlar, Germany)。用 Leica 徠卡 TCS SP3 鐳射共軛焦顯微鏡對

載玻片進行掃描。

## 第六節 測量各種生理參數

### 第一項 以代謝籠記錄尿動力學和生理參數

為了評估糞便和尿量以及排尿頻率，每只大鼠在手術前一天被放置在代謝籠 R-2100 代謝籠 (R-2100 metabolic cage) 中。在代謝籠研究期間，老鼠可以自由獲得飼料和水。

### 第二項 測量膀胱計量參數

我們用一個經膀胱測量尿流動力學模型來評估所有大鼠的排尿反應，該方法先前在我們實驗室得到了很好的成果<sup>44</sup>。簡要來說，用手術刀將大鼠膀胱通過腹部中線切口暴露，將 PE-50 導管（膀胱導管）通過膀胱圓頂頂端插入，通過 T 管連接輸液泵 (0.02 ml/min) 和壓力傳感器 (Gould-Statham)。膀胱內壓 (The intravesical pressure , IVP) 由 ADInstruments 數位記錄分析系統 (PowerLab 16/35) 連續記錄。(圖 14)

除此之外，採用尿流動力學試驗方法，我們測量各組的

膀胱反應變數如下：

尿流間隔時間(intercontraction interval, ICI) 收縮 $>15\text{mm}$

Hg

基準膀胱壓 (baseline bladder pressure, BP)

排尿時間 (micturition time, MT)

最大排尿壓 (maximal voiding pressure, MVP)

排尿收縮幅度 (contractile amplitude,  $A_m = \text{MVP} - \text{BP}$ )

### 第三項 測量血流動力記錄

外科手術方式如前<sup>44</sup>，將動物以 urethane (1.2g/kg) 皮下注射麻醉後，把 PE-50 導管置於左側股動脈，以測量動脈血壓 (ABP)，左側股靜脈為藥物投入處。記錄動脈血壓使用儀器為 ADI system (Power-Lab/16S, ADI Instruments)，傳感器為 Gould-Statham 產品。(參照圖 14)

## 第七節 西方墨點法

### 第一項 腎臟和胰臟組織的檢測

在腎臟和胰臟的蛋白質表現，我們使用西方墨點法來做

檢測<sup>46 47</sup>。分別採取腎臟和胰臟的組織檢體放入研鉢和研杵，並加上萃取緩衝液混合均勻。緩衝液的組成為 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 140 mM NaCl, 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 2%  $\beta$ -mercaptoethanol, 10  $\mu$ g/ml pepstatin A, 和 10  $\mu$ g/ml aprotinin。將混合物進行均勻化處理，並在 4°C 溫度下保溫 30 分鐘。12000G 離心 12 分鐘，收集上清液，用 BioRad 蛋白分析儀 (BioRad Laboratories) 測定蛋白質含量。

初級抗體包括 IL-1 $\beta$ , LC3- $\beta$  (MBL, Naka-ku, Nagoya, Japan), caspase 3, Bax, Bcl-2, Beclin-1 (由 Cell Signaling Technology, Denver, MA, USA), 和  $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)。次級抗體包括 HRP-conjugated rabbit anti-mouse IgG、HRP-conjugated donkey anti-goat IgG, 和 HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (皆為 1:10000; Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA)。

## 第二項 膀胱組織的檢測

採用西方墨點法和密度測定法檢測膀胱組織 Bax、Bcl-

2、Caspase-3、PARP、Nrf2、Keap-1 和 HO-1 的表現<sup>17</sup>。將膀胱組織檢體放入研鉢和研杵，並加上萃取緩衝液混合均勻。緩衝液的組成為 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 140 mM NaCl, 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxycholate, 2%  $\beta$ -mercaptoethanol, 10  $\mu$ g/ml pepstatin A, 和 10  $\mu$ g/ml aprotinin。將混合物進行均勻化處理，並在 4°C 溫度下保溫 30 分鐘。12000G 離心 12 分鐘，收集上清液，用 BioRad 蛋白分析儀 (BioRad Laboratories) 測定蛋白質含量。

所有以下抗體都與各自的大鼠抗原發生交叉反應。包括 rabbit monoclonal to Bax (Abcam), rabbit polyclonal to Bcl-2 (Abcam), polyclonal rabbit antihuman caspase 3 (Upstate Biotechnology), monoclonal mouse antihuman PARP (Promega), rabbit polyclonal to Nrf2 (Abcam), Keap-1 polyclonal antibody (Proteintech), rabbit polyclonal to HO-1 (Abcam) 和 monoclonal mouse antimouse  $\beta$ -actin (Sigma)。

胞漿的 Bax 轉位到粒線體，以及細胞色素 C 由粒線體滲漏到胞漿，是觸發細胞凋亡通路的必要條件<sup>14</sup>。胞漿和

粒線體組份，已在「粒線體蛋白質和胞漿組份的製備」一節描述。蛋白質濃縮液由 BioRad 蛋白質分析 (BioRad Laboratories)，使用 10 $\mu$ g 蛋白質電泳來測定。初級抗體用 polyclonal rabbit antihuman cytochrome c (Santa Cruz Biotechnology) 和 polyclonal rabbit antihuman Bax (Chemicon) used at 1:1000。

## 第八節 統計分析

### 第一項 番石榴混和海藻糖實驗

數據以平均值  $\pm$  標準差 (SEM) 表示。為了在各組資料間進行比較，我們使用單因子獨立變異數分析 (Analysis of Variance, ANOVA) 和學生未配對 t 檢驗 (Student's unpaired t-test)。p < 0.05 具有統計學意義。統計學分析採用 SPSS 18.0 統計軟件 (SPSS inc.)。

### 第二項 蘿蔔硫素排尿功能實驗

數據以平均值 $\pm$ 標準差 (SEM) 表示。生化和生理數據使用單因子獨立變異數分析 (Analysis of Variance, ANOVA)

來做統計分析。成對分析使用雙向學生 t 檢驗 (two-way Student's t tests)。p < 0.05 具有統計學意義。統計學分析採用 SPSS 18.0 統計軟件 (SPSS inc.)。



## 第三章 結果

### 第一節 番石榴萃取物中槲皮素的含量

我們試驗了番石榴汁中主要的抗氧化類黃酮—槲皮素的含量(結構見圖 1 A)。在標準混合物中鑒定了鞣花酸、阿魏酸、迷迭香酸、槲皮素和柚皮苷元等 5 種化學成分,番石榴汁中只發現了槲皮素(含量見圖 1 B)。以高效液相色譜法測定番石榴汁萃取物中槲皮素的含量(見圖 1 C),槲皮素在 GWE1 中的濃度為 182.3 ng/ml,在 GWE2 中為 133.4 ng/ml,在 GEE1 中為 223.1 ng/ml,在 GEE2 中為 244.5 ng/ml。亦即珍珠番石榴以乙醇萃取出槲皮素濃度最高。

根據番石榴汁的濃度和體積,計算出番石榴汁中槲皮素的含量為 0.633  $\mu\text{g/mL}$ 。在我們的研究中,每組大鼠每天攝入不同劑量的槲皮素。T1 和 B1 組大鼠每天攝入 2.5  $\mu\text{g/kg}$ ,T2 組大鼠每天攝入 5.0  $\mu\text{g/kg}$ , T5 組大鼠每天攝入 12.6  $\mu\text{g/kg}$ 。

### 第二節 番石榴清除體外活性氧的能力

以  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{HOCl}$  為外源活性氧來源,評價番石榴汁清除活性氧的能力。結果表明,不同濃度的番石榴汁(圖 1 D, E),及不同種類

的番石榴萃取物（圖 1 H, I）在體外對清除  $H_2O_2$ 、 $HOCl$  活性氧水準的影響也不同。以 ddH<sub>2</sub>O 為參考對照，番石榴汁含量為 5-40% 時，發現  $H_2O_2$  和  $HOCl$  的含量明顯地隨著番石榴汁的劑量降低。

四種番石榴萃取物均能顯著降低  $H_2O_2$  和  $HOCl$  的含量 ( $p < 0.05$ )。但 GWE1 和 GWE2 在清除  $H_2O_2$  和  $HOCl$  活性方面顯著高於 GEE1 和 GEE2 ( $p < 0.05$ )。也就是說，番石榴水萃取物比乙醇萃取物具有更高的活性氧清除能力。

### 第三節 海藻糖清除體外活性氧的能力

結果發現，海藻糖在濃度 10%-50% 時可以選擇性地降低  $H_2O_2$  數值，並且具有劑量依賴性（圖 1 F）。相反地，海藻糖在相同濃度範圍時，對  $HOCl$  數值沒有影響（圖 1 G）。海藻糖對活性氧的清除能力似乎是有選擇性的。

### 第四節 口服番石榴汁耐受性試驗

如圖 2 所示，為了測定三種番石榴汁對正常動物血糖水準的影響，我們以口服餵食正常大鼠 4 ml/kg 番石榴汁，分別含有 12 % 海藻糖、8 % 蔗糖或 40 % 的番石榴汁（無糖）。結果顯示，這 3 種番石

榴汁對血糖無明顯升高作用。此外，他們之間沒有顯著性差異。

## 第五節 口服糖耐受性試驗

在 CON 對照組大鼠中，血糖水準保持在一個相對較小的範圍(圖 2 D)。無論是 0 周、2 周還是 4 周，CON 對照組大鼠的血糖值均未超過 150 mg/dl。其他 5 組間差異無顯著性 (圖 2 E 和 2 F)。血糖值在 30 和 60min 最高，在 500-600 mg/dl 之間。補充番石榴汁混和海藻糖並不能降低血糖。

## 第六節 靜脈內注射葡萄糖和海藻糖耐受性試驗

為了評估靜脈注射葡萄糖或海藻糖後血糖水準的變化，我們通過靜脈注射 0.5 g/kg 體重葡萄糖或海藻糖。靜脈注射葡萄糖後 1 分鐘，血糖水準顯著升高至 302.4 mg/dl (圖 2 B)。然而，靜脈注射海藻糖後 1 分鐘，血糖並沒有明顯升高。給予葡萄糖 1 分鐘後，昇高的血糖就開始下降。然而在第 75 分鐘時，血糖仍然高於開始時禁食的血糖。另一方面，正常動物經海藻糖處理後，血糖沒有明顯變化。

## 第七節 糖化血色素的變化

DM 糖尿病大鼠糖化血色素水準為 CON 對照組大鼠的兩倍。在 T2 和 T5 大鼠中，HbA1c 水準略有下降，但沒有統計學差異（圖 2 C）。

## 第八節 血糖變化

在實驗第四週，對各組大鼠進行口服葡萄糖耐量試驗。我們比較了禁食 FBG（0 分鐘），與口服葡萄糖後（120 分鐘）的血糖（圖 3 A）。在 CON 對照組大鼠中，0 min 和 120 min 的血糖值均低於 100 mg/dl，且 0 min 和 120 min 之間無顯著性差異。糖尿病大鼠於 OGTT 試驗結束時血糖未下降，0 min 和 120 min 的血糖值差異有顯著性（ $p < 0.05$ ）。其他各組（T1、T2、T5、B1）大鼠 120 min 時的血糖反應仍較高，但差異性不顯著，這表明番石榴汁有助於 OGTT 的血糖控制。

## 第九節 胰島素的變化

胰島素水準是以曲線下面積指數（ $AUC = \text{min} \times \mu\text{g/L}$ ）表示（圖 3 B）。CON 對照組胰島素水準的 AUC 為  $66.6 \pm 2.1 \text{ min} \times \mu\text{g/L}$ 。由

於 T2DM 的細胞損傷，DM 的 AUC 下降到  $21.9 \pm 1.4 \text{ min} \times \mu\text{g/L}$ 。AUC 在 T1、T2 和 T5 組都是升高的，T1 ( $36.0 \pm 0.5 \text{ min} \times \mu\text{g/L}$ )、T2 ( $38.2 \pm 1.1 \text{ min} \times \mu\text{g/L}$ ) 和 T5 ( $41.5 \pm 4.5 \text{ min} \times \mu\text{g/L}$ ) 升高。B1 的 AUC 為  $28.9 \pm 0.8 \text{ min} \times \mu\text{g/L}$ 。實驗結果表明，番石榴汁混和海藻糖對第 II 型糖尿病大鼠胰島素分泌功能有明顯的保護作用。

## 第十節 HOMA-IR 和 HOMA- $\beta$ 的變化

CON 對照組大鼠 HOMA-IR 值在第 0 周和第 4 周約為 2 (圖 3 C)。在糖尿病大鼠，這一數值升高 (高達 4.9)，並在第 0 周至第 4 周保持穩定。T1、T2、T5、B1 各組大鼠 HOMA-IR 均在第 4 周低於第 1 周。T2、T5 兩組比較，差異有統計學意義 ( $p < 0.05$ )。用番石榴汁混和海藻糖處理 T2 和 T5 大鼠，不僅可以維持胰島素分泌功能，而且可以降低胰島素阻抗值。

在 CON 對照組大鼠，HOMA- $\beta$  值約為 20，在第 0 周和第 4 周數值很接近 (圖 3 D)。所有 T2DM 大鼠的 HOMA- $\beta$  值 (低於 5) 均低於 CON 對照組。糖尿病大鼠的 HOMA- $\beta$  值在第 0 周至第 4 周仍然較低。而其他 4 組 (T1、T2、T5 和 B1) 在第 4 周比第 1 周有升高 HOMA- $\beta$  值的趨勢。其中 T1 組與 DM 組比較差異有統計學意義 ( $p$

< 0.05)。

## 第十一節 切片染色的發現

### 第一項 胰臟切片

#### 第一目 胰臟切片的 HE 染色

在胰臟切片中，我們發現糖尿病大鼠的胰臟的蘭氏小島 (islet of Langerhans) 直徑較小 (圖 4)，這與胰島萎縮有關。糖尿病大鼠的胰臟排列不規則，細胞邊界模糊或消失，細胞壞死。與糖尿病大鼠相比，T1、T2、T5 和 B1 大鼠的胰島較大。此外，T1、T2、T5 和 B1 大鼠的胰島細胞排列比 DM 大鼠更加規則。

#### 第二目 胰臟切片的 IHC 和螢光染色

糖尿病大鼠胰臟 4-HNE、IL-1 $\beta$  和 Caspase3 的表現明顯高於其他實驗組與對照組大鼠 (圖 6)。番石榴汁加海藻糖 (T1, T2, 或 T5) 或不加海藻糖 (B1)，均能顯著降低胰臟 4-HNE、IL-1 $\beta$  和 Caspase3 的表現。與 T1、T2 和 T5 相比，B1 組大鼠胰臟組織中 4-HNE、IL-1 $\beta$  和 Caspase3 的表

現水準最高。在糖尿病大鼠胰臟切片中亦可見較高水準的 Caspase3 和 LC3-B 表現 (圖 6)。

Caspase3 表現高於 LC3-B，提示 T2DM 大鼠細胞凋亡多於細胞自噬。T1、T2 和 T5 降低了 T2DM 大鼠胰臟切片中 Caspase3 和 LC3-B 的表現。與 T1、T2 或 T5 相比，B1 明顯具有更多的 Caspase3 和 LC3-B 的表現，說明番石榴汁中加入海藻糖可以進一步保護 DM 所致的胰臟損傷。

## 第二項 腎臟切片

### 第一目 腎臟切片的 HE 染色

在腎切片中，糖尿病大鼠有出血的現象。糖尿病大鼠腎臟切片也出現中性顆粒細胞。T1、T2、T5、B1 大鼠出血較少，中性粒細胞聚集較少，表明 T2DM 對腎臟的炎性損傷得到了消除。T1、T2 和 T5 大鼠的這些特徵較 B1 大鼠明顯減弱。

### 第二目 腎臟切片的馬松染色

馬松染色可使硬化區染成藍色。我們發現硬化主要發生

在 T2DM 大鼠的腎小管，而不是腎小球（圖 4）。T1、T2、T5、B1 組大鼠腎臟切片藍區明顯少於 DM 組。T2 和 T5 組大鼠的硬化面積較 B1 組小。

### 第三目 腎臟切片的 IHC 和螢光染色

糖尿病大鼠腎小管 4-HNE、IL-1 $\beta$  和 Caspase3 的表現明顯高於 CON 對照組（圖 5）。番石榴汁加海藻糖（T1，T2，或 T5）或不加海藻糖（B1）的大鼠，4-HNE、IL-1 $\beta$  和 Caspase3 的表現較少。B1 組大鼠 4-HNE、IL-1 $\beta$  和 Caspase3 的表現水準均高於 T1、T2 和 T5。綠色螢光代表 Caspase3 介導的細胞凋亡，而紅色螢光代表 LC3-B 介導的細胞自噬。在腎臟切片中，糖尿病組胞漿中 Caspase3 和 LC3-B 的表現高於 CON 對照組（圖 5），我們還發現這兩種蛋白在糖尿病腎臟的腎小管中共存。Caspase3 和 LC3-B 蛋白在 T1、T2、T5 和 B1 的表現明顯降低。

## 第三項 膀胱切片

### 第一目 膀胱切片的 IHC 和 TUNEL 染色

我們使用 TUNEL 檢測 (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL)，來測定 4 組大鼠的平滑肌層，評價了蘿蔔硫素對 Nrf2 水平、免疫組織化學和細胞凋亡的影響 (圖 12 H-J)。我們發現，與對照組膀胱相比，糖尿病膀胱中 Nrf2 的螢光強度顯著降低(圖 12 I)，TUNEL 陽性細胞顯著增加 (圖 12 J)。蘿蔔硫素能夠恢復部份 DM 誘導的 Nrf2 表現下降 (圖 12 I)，並減少 DM+SF 膀胱內 DM 觸發 TUNEL 染色出的凋亡細胞數 (圖 12 J)。

## 第十二節 活性氧的變化

### 第一項 體內腎臟活性氧水準

原始資料 (圖 5 F) 和統計資料 (圖 5 G) 都顯示糖尿病大鼠腎臟 CL 數值最高。T1、T2、T5 和 B1 的 CL 數值比 DM 低。

### 第二項 血清體外活性氧水準

DM 大鼠血清 ROS 水準明顯高於 CON 對照組大鼠 ( $p < 0.05$ ) (圖 5 H)。T1、T2、T5、B1 組大鼠的 CL 數值均顯

著低於 DM 組 ( $p < 0.05$ )。T1、T2 和 T5 的活性氧水準低於 B1。雖然 T1 和 B1 的差異不顯著，但 T2 和 T5 的血清活性氧明顯低於 B1 ( $p < 0.05$ )。

### 第三項 體內膀胱活性氧水準

蘿蔔硫素通過降低超氧陰離子 ROS 介導的內質網壓力、細胞自噬和大鼠膀胱細胞凋亡，來改善缺血誘導的逼尿肌過度活動<sup>17</sup>。我們評估了蘿蔔硫素對 4 組大鼠體內膀胱超氧陰離子自由基水平的影響，使用 MCLA 增強的化學發光分析儀。分別給出四組大鼠膀胱超氧陰離子活性氧顯示的代表性原圖和統數數據(圖 9A)。我們的數據顯示，與 CON 對照組和 CON+SF 組相比，DM 膀胱中觀察到較高的超氧陰離子活性氧值(圖 9B)。此外，DM+SF 組的超氧陰離子活性氧水平明顯低於 DM 組。

## 第十三節 西方墨點法分析結果

### 第一項 番石榴混和海藻糖實驗

與對照組相比，糖尿病組細胞自噬相關蛋白 Beclin-1, LC3-

B, 發炎性細胞凋亡相關蛋白 IL-1 $\beta$ , 和細胞凋亡相關蛋白 Bax, Bcl-2, Caspase3 的表現明顯升高, T1、T2 和 T5 組細胞自噬相關蛋白表現明顯降低 ( $p < 0.05$ )。番石榴汁加海藻糖 (T1, T2, 或 T5) 或不加海藻糖 (B1) 均可顯著降低腎臟和胰臟細胞自噬標誌物 Beclin-1, LC3-B, 發炎性細胞凋亡標誌物 IL-1 $\beta$ , 和細胞凋亡標誌物 Bax, Bcl-2, Caspase3 的表現。B1 大鼠腎臟和胰臟細胞自噬標誌物 Beclin-1, LC3-B, 發炎性細胞凋亡標誌物 IL-1 $\beta$ , 細胞凋亡標誌物 Bax, Bcl-2, Caspase3 的表現明顯高於 T1、T2 和 T5。(見圖 7)

## 第二項 蘿蔔硫素對排尿功能實驗

為了探討糖尿病膀胱的粒線體反應和 Nrf2/Keap1 信號轉導, 我們檢測了糖尿病膀胱不同時間段粒線體 Bax、細胞色素 C、整個組織 Nrf2 和 Keap1 的表現水平。我們的數據表明, 與對照組相比, 粒線體 Bax 轉位在誘導 DM 後第 2 天顯著增加 (圖 11 A)。與對照組相比, 誘導 DM 後第 4 天 Cytosolic 細胞色素 C 釋放量顯著增加 (圖 11 B)。與對照組相比, DM 誘導後第 6 天 Nrf2 表現顯著下降 (圖 11 C), Keap1 表現顯著增加 (圖 11 D)。

這些數據表明，糖尿病可以導致粒線體功能障礙和 Nrf2 防禦機制受到抑制。我們進一步確定了蘿蔔硫素對這些大鼠粒線體 Bax、Bcl-2，和細胞色素 C 表現的可能影響。圖 11E 顯示了四組大鼠膀胱蛋白表現的初始印跡。我們的結果顯示，與 CON 對照組膀胱相比，DM 膀胱中粒線體 Bax/HSP60 (圖 11 F) 和細胞色素 C/ $\beta$ -肌動蛋白 (圖 11 I) 顯著升高，與 Bcl-2/HSP60 (圖 11 G) 和細胞色素 C/HSP60 (圖 11 H) 顯著降低有關。蘿蔔硫素能有效地保留粒線體 Bcl-2 和細胞色素 C，顯著抑制因 DM 而增強的粒線體 Bax 和細胞色素 C 的表現 (圖 11 F-I)。這些數據表明，蘿蔔硫素可部分改善 DM 引起的粒線體功能障礙。

如圖 12 所示，我們通過西方墨點法檢測這四組大鼠的整個組織，探討了蘿蔔硫素對糖尿病膀胱的 Nrf2, HO-1, ATF-6, CHOP 和 casp3, PARP 信號轉導的可能保護機制。四組大鼠的膀胱蛋白水平呈現典型的初始印跡(圖 12 A)。與 CON 對照組相比，DM 組 Nrf2/ $\beta$ -actin 比值(圖 12 B)和 HO-1/ $\beta$ -actin 比值(圖 12 C)顯著降低，ER 應激標誌物 ATF-6/ $\beta$ -actin(圖 12 D)和 CHOP/ $\beta$ -actin(圖 12 E)顯著升高，凋亡標誌物 caspase3(casp3c/casp3u;圖 12 F)和 PARP/ $\beta$ -actin 比值(圖 12 G)顯著升高。然而，蘿蔔硫素

處理顯著恢復 DM 誘導的 Nrf2/ $\beta$ -actin 和 HO-1/ $\beta$ -actin 的下降(圖 12 B-C)，並顯著抑制 DM+SF 膀胱中 DM 觸發的 ATF-6 和 CHOP(圖 12 D-E)、casp3c/casp3u 和 PARP/ $\beta$ -actin(圖 12 F-G)的增加。

#### 第十四節 蘿蔔硫素對大鼠尿流動力學參數的影響

首先，我們測定了蘿蔔硫素對四組大鼠排尿參數的影響。圖 8 B 顯示了四組大鼠典型的原始圖像和排尿參數：包括膀胱收縮間期 (ICI)、膀胱收縮幅度 (Am) 和排尿時間 (MD) 測定。我們的數據表明，蘿蔔硫素處理不影響 CON 對照組和 CON+SF 組之間的排空參數。與 CON 對照組相比，DM 組 ICI (圖 8 C) 和 MD (圖 8 E) 水平顯著升高，但對 Am 無明顯影響 (圖 8 D)。與 DM 組相比，蘿蔔硫素處理能顯著降低 DM+SF 組 DM 增長的 ICI 和 MD (圖 8 C 和圖 8 E)。實驗結果顯示：蘿蔔硫素處理後，可以縮短兩次排尿收縮間期、縮短每次排尿持續時間，且不影響膀胱收縮幅度。

此外，我們還觀察了蘿蔔硫素對四組大鼠膀胱容量的影響。圖 10 A 顯示了四組大鼠膀胱容量測定的典型原始圖。我們的數據顯示 CON 對照組和 CON+SF 組的膀胱容量沒有顯著差異。與 CON 對照

組大鼠相比，DM 大鼠的膀胱容量顯著增加（圖 10B）。與糖尿病大鼠相比，糖尿病+糖尿病組大鼠的膀胱容量明顯減少。

## 第十五節 綜合結果論述

番石榴汁中主要抗氧化物只發現了槲皮素（鞣花酸、阿魏酸、迷迭香酸、槲皮素和柚皮苷元），其中以珍珠番石榴乙醇萃取出槲皮素濃度最高。

番石榴汁含量為 5-40%時，清除活性氧（ $H_2O_2$ 、 $HOCl$ ）能力隨著劑量而增加。番石榴水萃取物比乙醇萃取物具有更高的活性氧清除能力。而海藻糖在濃度 10%-50%時，清除活性氧（ $H_2O_2$ ）能力隨著劑量而增加。

實驗中所用的各組番石榴汁口服、靜脈注射海藻糖對血糖無明顯升高作用，在口服糖耐受性試驗 OGTT 中，亦不能有效降低血糖，對 HbA1c 亦無統計學差異，但有助於口服葡萄糖後二小時的血糖控制。

番石榴汁混和海藻糖對 T2DM 胰島素分泌功能有明顯的保護作用。不僅可以維持胰島素分泌功能（insulin 升高），而且可以降低胰島素阻抗值（HOMA-IR 降低），並提昇胰臟 $\beta$ 細胞功能（HOMA- $\beta$ 昇

高)。

腎臟切片顯示，番石榴汁可以清除 T2DM 腎臟活性氧水準，減少腎臟的炎性損傷，包括減少腎出血與中性顆粒細胞聚集。

番石榴汁加或不加海藻糖可以減少腎小管細胞程序死亡的相關蛋白，包括：4-HNE（脂質過氧化和氧化應激標誌物）、Caspase3（細胞凋亡標誌物）、LC3-B（細胞自噬標誌物）、IL-1 $\beta$ （發炎性細胞凋亡標誌物）。

有關蘿蔔硫素的作用原理闡釋如下：

糖尿病誘導後，將會依天數而發生：粒線體 Bax 轉位，細胞色素 C 釋放至胞質量增加，粒線體 mBcl-2 減少，Nrf2 表現顯著下降，Keap1 表現顯著增加，顯示出糖尿病能導致粒線體功能障礙和 Nrf2 防禦機制受到抑制。

蘿蔔硫素能有效地保留粒線體 mBcl-2 和細胞色素 C (mCyt C)，顯著抑制因 DM 而增強的粒線體 mBax 和胞質細胞色素 C (cCyt C) 的表現。這些數據表明，蘿蔔硫素可部分改善 DM 引起的粒線體功能障礙。

蘿蔔硫素處理後顯著地恢復 Nrf2 和 HO-1 數值，表示激活 Nrf2 系統。並且抑制 ATF-6 和 CHOP 數值，代表內質網壓力獲得緩解。

又能增加 casp3c 和 PARP 數值，表示抑制細胞凋亡，事實證明在 TUNEL 染色出的凋亡細胞數有效地減少。

蘿蔔硫素對大鼠尿流動力學參數的影響，實驗結果發現可以縮短兩次收縮間期 (ICI)，且不影響膀胱收縮幅度 (Am)，亦能縮短每次排尿持續時間(MD)。而 DM 大鼠的膀胱容量顯著增加，顯示有尿瀦留現象，以蘿蔔硫素預處理的大鼠容量明顯改善。



## 第四章 討論

### 第一節 番石榴中槲皮素與海藻糖保護腎臟的討論

本研究證明番石榴汁混和海藻糖，對 T2DM 引起的腎臟和胰臟功能障礙有明顯的保護作用。此研究成果得到了各種生理參數改善的證據支持，反映在大鼠腎臟與胰臟中 HOMA-IR、HOMA- $\beta$ 、氧化壓力、發炎反應和細胞程序死亡的數值的改變上。

遺傳傾向、衰老、肥胖和飲食生活方式是 T2DM 的主要病因<sup>48</sup>。本研究所使用的動物模型與現今人類的的生活方式相似。高熱量和高脂肪飲食是引起代謝症候群和慢性疾病的主要飲食生活方式。這項研究中使用的高果糖飲食模仿了人類這種不健康的生活方式。已證實高果糖與胰島素阻抗、高血糖和高血壓有關<sup>49</sup>。它從肝臟誘導脂質形成，產生大量的三酸甘油酯，進而降低胰島素敏感性<sup>50</sup>。

傳統的 T2DM 模型，如 yellow A<sup>(vy/-)</sup>小鼠、db/db 小鼠，是轉基因和自發誘導的動物，它們具有穩定性和節省時間的優點，但成本也很高。這類動物的 T2DM 發展主要是遺傳的，不符合人類罹患 T2DM 真實飲食生活型態的模式<sup>51</sup>。STZ 注射液是誘發 T1DM 的一種傳統、簡便的方法，STZ 是一種氨基葡萄糖-亞硝基脲類化合物，通過葡萄

糖轉運系統進入胰島細胞，烷基化損傷 DNA，引起胰島素分泌損傷和細胞死亡。相比之下，NA 提供 NAD，由於 STZ 引起的 DNA 損傷而被消耗。給予 STZ 和 NA 的動物似乎更接近 T2DM<sup>52</sup>，這就是我們在研究中使用這個模型的原因。

番石榴及番石榴葉皆具有抗氧化性能，過去的文獻多著重在番石榴葉的抗氧化機制上，較少著墨於番石榴果實上。<sup>53</sup> 番石榴葉萃取物中含多元酚成分，能刺激脂肪細胞上胰島素受體的磷酸化及葡萄糖轉運蛋白的轉位，具有類似胰島素的功能，有助於糖尿病的控制<sup>54</sup>。番石榴果實含維生素 A、C 等營養物質及磷、鈣、鎂等微量元素，主要的抗氧化成份，是槲皮素。維生素 C 在番石榴含量為 2.283 mg/g，雖然亦具有抗氧化功能，但由於左旋維他命 C 本身不安定且易衰減，容易因實驗時間致劑量減低，在本實驗未列入檢測。未來可以加測維生素 C 含量及其抗氧化能力，以了解其在番石榴汁具有清除活性氧能力中，所扮演的角色。

研究結果表明，番石榴汁清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 HOCl 的能力較強，與前人的研究結果一致。這種能力可以經由口服後發揮作用。體外血清活性氧水準測定結果表明番石榴的抗氧化作用能清除活性氧，腎臟和胰臟切片的 4-HNE IHC 染色結果也顯示了同樣的結果。

另外，我們發現海藻糖的加入可以提高番石榴的抗氧化性能。有一種來自海藻糖缺陷突變體的白色念珠菌細胞，其對重度氧化壓力暴露（ $H_2O_2$ ）極為敏感；而在無海藻糖缺陷的細胞中，暴露  $H_2O_2$  環境下可以誘導其細胞內的海藻糖積累，進而增加它的存活率<sup>31</sup>。研究人員還認為，海藻糖可能是一種具有發展前瞻性的自由基清除劑，可協助哺乳動物器官自由基的清除<sup>31</sup>。

在我們的研究中，血清活性氧水準非常低，特別是 T2 和 T5 大鼠，甚至低於 B1 大鼠。雖然 B1 與 T1 之間沒有顯著差異，但 T1 仍顯示較 B1 低的 ROS 水準。這一發現與 4-HNE 染色結果一致。我們建議使用番石榴汁，經由高含量的槲皮素混和海藻糖來減少 ROS 誘導的氧化損傷。

我們將 T1 與 B1 進行比較，觀察海藻糖是否對 T2DM 有影響。HOMA- $\beta$  結果表明，T1 組大鼠對胰島 $\beta$ 細胞功能的控制優於 B1 組。T1 組大鼠 HOMA- $\beta$  在第 4 周略高於第 0 周，而 B1 保持不變。然而，這種保護作用在 HOMA-IR 和胰島素水準上並不持續。HOMA-IR 不僅可以作為診斷胰島素阻抗的有效方法，而且可以作為 T2DM 患者治療期間的隨訪指標<sup>55</sup>。T1 和 B1 之間 HOMA-IR 沒有差異，添加海藻糖對 T1 和 B1 之間的胰島素敏感性沒有增加。隨著番石榴汁劑量

的增加，胰島素分泌量略有增加，HOMA-IR 降低。這些結果表明，加入海藻糖有助於保護胰島β細胞功能，但不能改善胰島素阻抗。然而，番石榴汁有助於提高胰島素敏感性，劑量可能要大於 8 ml/kg BW/day (T2 和 T5 組)。

糖尿病腎病與腎小球硬化等結構異常有關<sup>8</sup>，馬松染色結果顯示腎臟膠原沉積情況，腎切片顯示多數硬化發生在腎小管區，而不是腎小球區。實驗證明，T2 和 T5 大鼠 DM 所致的硬化性損傷，可以使用番石榴汁處理。此外，番石榴汁處理保護了腎臟的溶血和發炎反應，以及胰臟的細胞排列。

糖尿病最基本的特徵是高血糖。Huang, C.S.的文獻指出，番石榴具有抗高血糖的特性<sup>56</sup>。然而，在我們的研究中，血糖並沒有明顯的改善，糖尿病大鼠與其他大鼠經番石榴汁混和海藻糖處理後的血糖差異很小。這可能的原因是：Huang, C.S.等人用的動物模型與我們的模型不同，我們使用的動物模型更可能發生在 T2DM 的後期，因為它缺乏細胞的胰島素代償，而這種代償發生在初級階段。我們成功地定義了 T2DM 來誘導 FBG 超過 230 mg/dl。這種情況似乎比其他情況更嚴重。例如，在以前的研究中，在注射 STZ 和 NA 的大鼠中，FBG 大於 11.1 mmol/l，相當於 200mg/dl，定義 T2DM<sup>2</sup>。此外，在 STZ

和 NA 注射的小鼠研究中，對照組小鼠的血漿胰島素水準保持不變。

由於這些差異，T2DM 對我們大鼠的損害可能是相對不可修復的。

我們研究了 T2DM 中三種程序性細胞死亡，包括細胞凋亡、細胞自噬和發炎性細胞凋亡。Butler 等人<sup>57</sup>發現 T2DM 患者細胞凋亡增加導致細胞缺失，Masini 等人<sup>58</sup>指出 T2DM 患者胰島細胞的自噬增加。在細胞凋亡方面，本研究發現番石榴汁混和海藻糖處理的胰臟切片 Caspase3 染色均能抑制細胞凋亡，表明番石榴汁混和海藻糖處理的胰臟切片具有抗細胞凋亡作用。在細胞自噬方面，我們發現糖尿病大鼠細胞自噬相關蛋白 Beclin-1/LC3-B 增加。Beclin-1 是一種在細胞細胞自噬中起核心作用的蛋白質，在細胞壓力期間增加<sup>59</sup>。LC3-B 是細胞自噬體形成所需的一種蛋白質。此外，我們的資料進一步表明 DM 增強的 IL-1 $\beta$ ，一種發炎性細胞凋亡的生物標誌物，在胰臟和腎臟中能被番石榴汁混和海藻糖成功地抑制。番石榴汁本身有助於保護細胞免受細胞凋亡、發炎性細胞凋亡和細胞自噬的侵襲，海藻糖的加入有助於提高胰島細胞凋亡的保護作用。

在本篇研究中的一些指標表明，T5 組大鼠每天攝入最高劑量的番石榴汁混和海藻糖，並沒有得到最好的保護作用。例如，水分攝入量、腎臟 Bax 蛋白表現量，以及 HOMA- $\beta$  在 T5 均不優於 T1 和 T2。

從邏輯上講，我們期望番石榴汁混和海藻糖的保護強度隨著劑量的增加而增強。然而，果汁與水果本身還是有一些區別的。水果攝入量與 T2DM 的發病率呈負相關。一般的果汁都經過過濾，所以纖維含量相對較低。缺乏纖維，果汁已成為一個較大的糖負荷。經常食用果汁可能導致較高的飲食血糖負荷，這與 DM 有正相關<sup>60</sup>。因此，在我們的研究中，我們發現當番石榴汁的劑量達到 20 ml/kg BW/day 時，加入海藻糖 1 ml/kg BW/day 可能會超載。T2 大鼠的劑量，亦即糖尿病鼠餵食 8 ml/kg 番石榴汁加 4 ml/kg 海藻糖，可能對 T2DM 有最好的保護作用。

綜合以上所述，番石榴的抗氧化、抗炎和抗糖尿病腎病作用，可能是通過槲皮素的作用來抑制 T2DM 引起的發炎反應和氧化損傷，防止細胞凋亡、細胞自噬和發炎性細胞凋亡，提高細胞的保護能力。而海藻糖的加入不只提昇口感，更有助於進一步加強抗氧化作用、保留胰島β細胞功能，和胰島細胞凋亡保護（圖 13）。

## 第二節 蘿蔔硫素與膀胱排尿功能研究的相關討論

糖尿病在全世界皆具有極高的盛行率，佔醫療經費的比例也水漲船高，使用可能具有預防和治療糖尿病能力的生物活性化合物，引起

了各方學者極大的興趣。蘿蔔硫素是在十字花科蔬菜中發現的一種功能性化合物，它既是一種有效的抗氧化劑，又是改善第 I 型糖尿病大鼠代謝改變的基因表現調節劑<sup>61</sup>。在我們的研究中，我們發現蘿蔔硫素通過其抗氧化劑（圖 9）、抗 ER 壓力和抗細胞凋亡作用（圖 11 和圖 12），從而減弱 DM 引起的排尿功能障礙（圖 8B-E）。

高血糖引起的活性氧產生和發炎反應損傷，被認為是神經功能障礙和後續糖尿病神經病變的因素，蘿蔔硫素經由其雙重的抗氧化和抗發炎活性，進而改善了糖尿病神經病變<sup>62</sup>。回顧文獻中 Negi G 等人<sup>62</sup>發現，蘿蔔硫素作用於神經 2a 細胞及坐骨神經，通過增加 Nrf2 和下游目標 HO-1、NAD(P)H : quinone oxidoreductase 1 的表現，改善運動神經傳導速度、神經血流量和疼痛行為（傳入感覺神經），並且降低丙二醛水平<sup>62</sup>。Matsui T 等人<sup>63</sup>證明，蘿蔔硫素能通過其抗氧化特性改善糖尿病血管損傷，從而抑制高血糖暴露的內皮細胞和灌注大鼠主動脈中存在的晚期糖基化終產物 (AGE) 所致的發炎反應。此外，Shang G 等人研究發現，蘿蔔硫素部分通過 GSK3 $\beta$ /Fyn/Nrf2 信號通路改善了實驗性糖尿病腎病<sup>64</sup>。

糖尿病 bb/w 大鼠的膀胱功能障礙特點，是罕見的高幅度不規則收縮<sup>65</sup>。最初排尿功能障礙，是發生在骨盆神經的感覺傳入纖維和副

交感神經纖維，但檢測不到神經解剖學上的損傷，這些纖維構成排尿反射弧<sup>65</sup>。結構性病變包括：進行性有髓神經纖維和無髓神經纖維的軸索萎縮，約在糖尿病後4個月才檢測得到<sup>65</sup>。

一般糖尿病性膀胱纖維化要經過四個月以上才會形成，而我們的實驗只進行十天，所以我們有足夠的理由認為，這個結果應該是神經細胞凋亡所致排尿反射弧功能喪失。

Chien 等人<sup>66</sup>報道，儘管缺乏結構改變，在糖尿病早期即發生神經損傷，包括信號傳導能力、腎-腎反射調節功能（renorenal reflex regulatory function），有關傳入神經接受器、第2型化學感受器和腎盂輸尿管機械感受器，都在早期糖尿病狀態下受損，這暗示了神經活動的早期損害。Tomechko 等人<sup>67</sup>指出，糖尿病引起的發炎反應升高、氧化壓力和組織重塑，參與了組織特異性糖尿病性膀胱功能障礙的發展。逼尿肌樣本顯示糖尿病誘導的組織重塑增加<sup>67</sup>。糖尿病尿路上皮樣本表現出氧化壓力反應，如 Nrf2 介導的氧化壓力反應通路中，主要參與者蛋白表現的抑制<sup>67</sup>。在第I型糖尿病的膀胱中，糖尿病誘發氧化壓力、內質網壓力和細胞凋亡。我們的數據表明，蘿蔔硫素處理可能有利於延緩排尿功能障礙的進展（圖 8B-E），這是通過減少實驗性糖尿病大鼠模型中的氧化壓力蛋白（圖 9）、內質網壓力和細胞

凋亡（圖 11-12）途徑進而改善的。

粒線體是活性氧（ROS）的作用靶點和來源，在生理信號機制和調控細胞凋亡途徑中發揮著重要作用<sup>14</sup>。Bolisetty 等人<sup>68</sup>通過轉染 HEK293 細胞，構建了含有錳超氧化物歧化酶（manganese superoxide dismutase）與 HO-1 基因（HO-1 cDNA）融合的粒線體序列的質粒，從而獲得了以粒線體為靶點的 HO-1 細胞系（mitochondria-targeted HO-1 cell line）。他們發現，胞漿型 HO-1 和粒線體型 HO-1 表現細胞，都可以防止缺氧依賴性細胞死亡和粒線體膜電位丟失，但這些作用在粒線體型 HO-1 中更為明顯。MTP 開放不當，導致粒線體功能障礙，破壞粒線體膜電位並誘發氧化損傷<sup>69</sup>。外粒線體 VDAC 通道通過 ROS 和 Bcl-2 家族調控介導細胞色素 C 釋放<sup>70 71</sup>。活性氧像是  $O_2^{\cdot-}$ ，能夠誘導 HepG2 細胞<sup>70</sup> 和腎小管上皮細胞<sup>14</sup> 的 VDAC-依賴性粒線体外膜通透性化。Bcl-2 家族可以調節 MTP 的狀態：Bax（形成 channel 的蛋白）能夠打開 MTP<sup>72</sup>，而 Bcl-2 能夠穩定並抑制 MTP 的開放<sup>73</sup>。

根據我們的實驗結果，DM 觸發的  $O_2^{\cdot-}$  產生可能降低 Bcl-2/Bax 比值和粒線體 Bcl-2 表現，促進 Bax 向粒線體移位，細胞色素 C 向胞漿釋放，Caspase-3 激活，PARP 片段引發細胞凋亡（圖 11-12）。

蘿蔔硫素能顯著增加粒線體 Bcl-2/Bax 比值，降低粒線體 Bax、細胞色素 C 釋放、Caspase3、PARP 片段和 DM 膀胱細胞凋亡(圖 11-12)。我們認為其他 Nrf2 激活因子如 Bardoxolone 或 Ebselen 也可以保護 DM 大鼠的粒線體功能，進而改善糖尿病性腎臟疾病<sup>74</sup>，但需要進一步的研究來確定這種保護作用。

另一方面，粒線體網絡是通過粒線體分裂和融合之間的微妙控制來維持的。粒線體分裂是由類動力蛋白 1 (dynamin-like protein 1, DRP1) 控制的，這是一種大型細胞質的 GTPase，通過類裂變刺激進入粒線體膜<sup>75</sup>。反過來，粒線體融合是導因於 3 個大的 GTPases，包括 Mitofusin 1 (Mfn1) 和 Mitofusin 2 (Mfn2) (這兩者位於粒線體外膜)，還有 optic atrophy 1 (OPA1) 蛋白 (位於粒線體內膜)<sup>75</sup>。與對照組相比，裂變蛋白 DRP1 的活性明顯增加，而第 I 型糖尿病大鼠 (27 只) 大腦皮質中粒線體融合蛋白 (如 Mfn1、Mfn2 和 OPA1) 無明顯改變<sup>76</sup>。粒線體分裂和融合是否在第 I 型糖尿病引起的排尿功能障礙中起重要作用，目前尚不清楚。這也需要進一步的研究來探索。

DM 引起的膀胱功能障礙，主要是來自於高血糖引起的長期氧化壓力。Chen S 等人研究報導，葡萄籽原花色素 (proanthocyanidin)

萃取物處理 8 周，可以降低氧化壓力水平、Bax/Bcl-2 比率、切斷 Caspase3 介導的細胞凋亡，以及保存抗氧化酶 (SOD 和 GSH-Px)<sup>77</sup>。此外，GSPE 對糖尿病大鼠的膀胱具有神經保護作用，表現為神經生長因子的表現增加。葡萄籽原花色素萃取物也能激活 Nrf2 轉錄因子，同時升高血紅素氧化酶 1 (HO-1) 下游水平<sup>77</sup>。

然而，它對糖尿病性膀胱功能障礙的保護作用還沒有被闡明。抗氧化劑 N-acetylcystine 處理可以增加核內 Nrf2 的釋放和轉運，增強 Bcl-xL 和 Bax 的結合，從而減少細胞凋亡和 (或) 細胞自噬的形成<sup>78 79</sup>。Zheng H 等的研究指出，Nrf2 激活提供了保護作用，而 Nrf2 的缺失或減少則失去了保護作用<sup>80</sup>。Li 等人<sup>81</sup>發現具有 Nrf2 功能激活的抗氧化劑可以減少 NF-κB 誘導的發炎，反應並減少細胞凋亡的形成。在我們的研究中，通過 Nrf2 激活劑蘿蔔硫素的預先處理，我們提供了深具潛力治療糖尿病引起的膀胱功能障礙的可行方法。

圖 13 顯示了本論文研究的總結圖。綜合結果論述，蘿蔔硫素可能通過激活 Nrf2、HO-1 介導路徑，抑制 CHOP 介導的內質網壓力，並減少 caspase 3、PARP 介導的細胞凋亡，進而保護了膀胱細胞。這些結果是令人鼓舞的，對於治療糖尿病引起的排尿功能障礙，提供可能的預防和治療方式，期待能夠增進糖尿病患者的生活品質。

### 第三節 研究限制

在本實驗中，我們所使用的動物大鼠每組最少 3 隻，最多 6 隻，對於所獲得的數據，難免有統計測量樣本數不夠充分之議。我們所有的實驗操作是經臺灣師範大學動物護理和使用委員會批准，並符合中華民國國家科學委員會 (NSC1997) 的指導方針。所有的努力，是希望能夠以人道且儘量減少不必要的動物犧牲而設。所以綜合考慮實驗需求與動物倫理，我們選擇了每組 3-6 隻。

另外，在自然界槲皮素的來源，除了蔬菜中以洋蔥為日常飲食攝取最佳來源<sup>82</sup>之外，就屬水果中的蘋果 (*Malus pumila*)<sup>83</sup>了。我們也可以考慮萃取蘋果汁來做為保健飲料，在口感中想必更為甘甜好喝。但以含糖量而言，番石榴 6-9g/100g，蘋果 9-12g/100g，考慮到糖尿病患者不能攝取太多糖，我們還是選擇對糖尿病患者適合的甜度較低的健康水果。

Wang P 等人的研究指出，槲皮素與兒茶素在抗氧化能力上具有協同作用。透過綠茶中的兒茶素，抑制 catechol-o-methyl transferase (COMT) 以減少槲皮素分解，就可以協同增進其抗氧化力<sup>84</sup>。芭樂綠茶或蘋果綠茶聽起來都是好喝的飲品，或許未來可以朝向這個方

面來開發。

另外，本實驗採番石榴全果去籽下去研磨萃取，未能確認究竟是番石榴皮部、肉部或是種子部的槲皮素含量較多，這是考慮到果汁的口感以去籽連皮果肉較好。但未來可以分開測量槲皮素含量，以求得更好的組成比例。

在番石榴中另有一個重要的營養成份：維生素 C (Vitamin C, or L-ascorbic acid)，是常用的一種抗氧化劑與抗氧化促進劑<sup>85</sup>，能夠增加血清中抗氧化酶的活性，並減少自由基的攻擊<sup>86</sup>。Ashor AW 等人研究指出，維生素 C 可以下降空腹胰島素水平，但對於血糖與糖化血色素沒有影響<sup>87</sup>。

本實驗未測量維生素 C 的含量。若為求實驗更精確，確定番石榴是否完全藉由槲皮素的抗氧化能力而作用，還是其中有維生素 C 的參與，應該要測量維生素 C 的含量來比較的。若討論槲皮素與維生素 C 的抗氧化能力，我們用氧自由基吸收能力 ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) 來表示<sup>88</sup>，維生素 C 的 ORAC 數值為 1890/g，遠不及槲皮素的 1000-13550/g。所以，一方面維生素 C 的抗氧化力不及槲皮素，另一方面維生素 C 很容易被空氣和光線氧化，其中性的水溶液不穩定，很快會氧化成脫氫抗壞血酸而失效。所以對實驗結

果來說，影響應當不大。

在本實驗我們以 TUNEL 染色以染出凋亡細胞，但可惜未能進一步發現凋亡細胞的種類，是神經細胞，還是平滑肌細胞？如前所述，一般糖尿病性膀胱纖維化要經過四個月以上才會形成，而我們的實驗只進行十天，所以我們有足夠的理由認為，這個結果應該是神經細胞凋亡所致排尿反射弧功能喪失，所以 TUNEL 染出的應該是凋亡的神經細胞。將來可以使用雙染色法比對，以及共軛焦顯微鏡，應可確定是平滑肌還是神經細胞受損，這將對機制的闡釋有更詳細的描述。

在 Nrf2 的西方墨點法檢測中，如果能夠偵測 p-Nrf2 的活化態，來確定磷酸化的狀態改變，是較簡單又具指標性的做法。本實驗採檢測 Nrf2 與 Keap-1 來間接證明 Nrf2 的活化態，其實也可以考慮直接檢測活化態 p-Nrf2 的定量，是將來進一步研究可以採用的指標之一。

#### 第四節 結論與未來展望

氧化壓力是多種疾病的共同問題來源，當身體能夠有效地清除氧化壓力，就等於對疾病有了防治的能力。在本論文中，我們探討了植物生化素—槲皮素與蘿蔔硫素，對於糖尿病鼠的泌尿系統，包括腎臟與膀胱的保護作用，並能有效地改善其功能。番石榴的抗氧化、抗炎

和抗糖尿病作用，是通過槲皮素的作用來抑制 T2DM 引起的發炎反應和氧化損傷。海藻糖的加入有助於進一步防止細胞凋亡、細胞自噬和發炎性細胞凋亡，保護細胞功能，提高細胞的保護能力。而蘿蔔硫素對膀胱的保護作用，與抑制 CHOP 介導的 ER 壓力(CHOP-mediated ER stress)、Caspase3/PARP 介導的細胞凋亡有關，可能通過 Nrf2/HO-1 介導的途徑，對於治療糖尿病引起的排尿功能障礙，提供可能的預防和治療方式。

其中，番石榴混和海藻糖的研究成果，可以製作為糖尿病患者樂於飲用的番石榴果汁。此外，海藻糖已經廣泛地使用於固體劑型中，如速溶片劑<sup>89</sup>，未來或許也可以開發保健錠劑，直接使用槲皮素並以海藻糖為賦形劑，這種可能讓本研究更具實用性。

Nrf2 具有抗氧化與抗發炎的雙重作用，對於人體各器官所發生的疾病，具有一定的治療潛力。未來前瞻研究，可以了解其是否除了泌尿系統的改善，還能具有全身性各器官系統的機能改善，甚至具有抗老化的作用—這是廿一世紀探討的重要議題。

擔任臨床中醫醫療工作近二十年，發現中藥對於慢性疾病有很好的改善療效。中藥使用多為天然植物，所含的植化素不但具有抗氧化壓力作用，有些更具有 Nrf2 激活劑的作用。已有多篇論文探

討中藥中的 Nrf2 激活劑，包括調節 Keap1、Nrf2、ARE 路徑，對於腫瘤的預防與治療<sup>90</sup>。

而中藥裡面含有槲皮素的，在臨床上常用的有川七、桑葉、旋覆花、雞血藤等。而具有增進 Nrf2 信號通路表現的中藥活性成分，還有虎杖、薑黃、銀杏、甘草等等<sup>90</sup>。中藥成份是否可以藉由抗氧化壓力，或是 Nrf2 激活的途徑，作為抗細胞凋亡、細胞自噬與發炎性細胞凋亡、調節粒線體功能的藥物，減少組織器官發炎與損傷，進而改善病情，是我們實驗室未來有興趣研究探討的課題。

中藥在臨床上多是採複方來治療，也就是按照君、臣、佐、使，配伍藥物成一個方劑來治病，這種方組的團隊效果，通常會比單方藥物來得有效。但通常在科學研究中，我們只研究單一標的成分的作用機制。我們在本論文中所建立的檢測方式，將來或許可以做為研究方劑是否有效的篩檢方式，我們只要研究方劑對於氧化壓力指數的影響，以及西方墨點法所得出的細胞凋亡、細胞自噬、細胞發炎性凋亡，和粒線體功能相關的各種蛋白質印跡的變化，並藉由免疫組織化學染色的觀察，就可以了解此方劑在細胞分子生物學層次上的影響，進而得知其是否具有目標器官的保護作用而決定藥效。這不啻對臨床醫療工作，提供了一個穩固的實證醫學基礎。

未來我們希望能教用相長，將臨床有效的方藥體現在研究結果上，從微觀的細胞分子機制的角度上，印證宏觀上臨床治療的良效，並進一步提出前進的方向。



## 參考文獻

1. Hunyadi, A.; Martins, A.; Hsieh, T.J.; Seres, A.; Zupkó, I.  
Chlorogenic acid and rutin play a major role in the *in vivo* anti-diabetic activity of *Morus alba* leaf extract on type II diabetic rats. PLOS ONE. 2012, e50619.
2. Nakamura, T.; Terajima, T.; Ogata, T.; Ueno, K.; Hashimoto, N.; Ono, K.; Yano, S. Establishment and pathophysiological characterization of type 2 diabetic mouse model produced by streptozotocin and nicotinamide. Biol. Pharm. Bull. 2006, 29, 1167-1174.
3. Sarah, W.; Gojka, R.; Anders, G.; Richard, S.; Hilary, K. Global prevalence of diabetes. Diabetes Care 2004, 27, 1047-1053.
4. Yoon, K.H.; Lee, J.H.; Kim, J.W.; Cho, J.H.; Choi, Y.H.; Ko, S.H.; Son, H.Y. Epidemic obesity and type 2 diabetes in Asia. Lancet. 2006, 368, 1681-1688
5. Stumvoll, M.; Goldstein, B.J.; van Haeften, T. W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. Lancet. 2005, 365, 1333-

6. Barry J. Goldstein, Dirk Mueller-Wieland; Type 2 Diabetes. Principles and Practice, Second Edition, Chapter 2. Pathogenesis of Type 2 Diabetes. 2016
7. Kakehi, T.; Yabe-Nishimura, C. NOX enzymes and diabetic complications. In Seminars in immunopathology 2008 (Vol. 30, No. 3, pp. 301-314). Springer-Verlag
8. Jha, J.C.; Gray, S.P.; Barit, D.; Okabe, J.; El-Osta, A.; Namikoshi, T.; Thallas-Bonke, V.; Wingler, K.; Szyndralewicz, C.; Heitz, F.; Touyz, R. M.; Cooper, M. E.; Schmidt, H.H.W.; Jandeleit-Dahm, K.A. Genetic targeting or pharmacologic inhibition of NADPH oxidase Nox4 provides renoprotection in long-term diabetic nephropathy. J. Am. Soc. Nephrol. 2014, 25, 1237-1254.
9. Calcutt, N.A.; Cooper, M.E.; Kern, T.S.; Schmidt, A.M. Therapies for hyperglycaemia-induced diabetic complications: from animal models to clinical trials. Nat. Rev. Drug Discov. 2009, 8, 417-430.
10. K K Yerneni, W Bai, B V Khan, R M Medford and R Natarajan. Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor

kappa B in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 1999 Apr; 48(4): 855-864.

11. Daneshgari F, Liu G, Imrey PB. Time dependent changes in diabetic cystopathy in rats include compensated and decompensated bladder function. *The Journal of urology*. 2006;176(1):380-6.
12. Szasz T, Wenceslau CF, Burgess B, Nunes KP, Webb RC. Toll-Like Receptor 4 Activation Contributes to Diabetic Bladder Dysfunction in a Murine Model of Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2016;65(12):3754-64
13. *Trend in Cell Biology*, 1999
14. Chien CT, Chang TC, Tsai CY, Shyue SK, Lai MK. Adenovirus-mediated bcl-2 gene transfer inhibits renal ischemia/reperfusion induced tubular oxidative stress and apoptosis. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2005;5(6):1194-203
15. Chung SD, Lai TY, Chien CT, Yu HJ. Activating Nrf2 signaling depresses unilateral ureteral obstruction-evoked mitochondrial stress-

related autophagy, apoptosis and pyroptosis in kidney. PloS one.

2012;7(10):e47299

16. Cao SS, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;21(3):396-413
17. Tai HC, Chung SD, Chien CT, Yu HJ. Sulforaphane Improves Ischemia-Induced Detrusor Overactivity by Downregulating the Enhancement of Associated Endoplasmic Reticulum Stress, Autophagy, and Apoptosis in Rat Bladder. *Scientific reports*. 2016;6:36110.
18. Lin, C.Y.; Yin, M.C. Renal protective effects of extracts from guava fruit (*Psidium guajava L.*) in diabetic mice. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2012, 67, 303-308
19. Flores, G.; Dastmalchi, K.; Wu, S. B.; Whalen, K.; Dabo, A. J.; Reynertson, K. A.; Foronjy, R. F.; D'Armiento, J.M.; Kennelly, E. J. Phenolic-rich extract from the Costa Rican guava (*Psidium friedrichsthalianum*) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy. *Food Chem.* 2013, 141, 889-

895.

20. Lin, C.Y.; Yin, M.C. Renal protective effects of extracts from guava fruit (*Psidium guajava* L.) in diabetic mice. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2012, 67, 303-308
21. Li, P.Y.; Hsu, C.C.; Yin, M.C.; Kuo, Y.H.; Tang, F.Y.; Chao, C.Y. Protective effects of red guava on inflammation and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic mice. *Molecules* 2015, 20, 22341-22350
22. Eidenberger, T.; Selg, M.; Krennhuber, K. Inhibition of dipeptidyl peptidase activity by flavonol glycosides of guava (*Psidium guajava* L.): A key to the beneficial effects of guava in type II diabetes mellitus. *Fitoterapia* 2013, 89, 74-79
23. Laura K. Stewart, Jeff L. Soileau, David Ribnicky, Zhong Q. Wang, Ilya Raskin, Alexander Poulev, Martin Majewski, William T. Cefalu, and Thomas W. Gettys. Quercetin transiently increases energy expenditure but persistently decreases circulating markers of inflammation in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Metabolism*. 2008, 57 .

24. J. Mark Davis, E. Angela Murphy, Martin D. Carmichael, and Ben Davis, Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2009, 296
25. Balabolkin, II; Gordeeva, GF; Fuseva, ED; Dzhunelov, AB; Kalugina, OL; Khamidova, MM. Use of vitamins in allergic illnesses in children. *Voprosy meditsinskoi khimii*. 1992, 38 (5): 36–40. PMID 1492394
26. Nöthlings U, et al. Flavonols and pancreatic cancer risk. *American Journal of Epidemiology*. 2007, 166 (8): 924–931.
27. Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD, Davis B. Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009, 296 (4): R1071–7.
28. [Clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov), National Institutes of Health
29. Crowe JH, Crowe LM, Chapman D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science*. 1984 Feb 17;223(4637):701-3.

30. Xu, C.; Li, X.; Wang, F.; Weng, H.; Yang, P. Trehalose prevents neural tube defects by correcting maternal diabetes-suppressed autophagy and neurogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2013, 305, E667-E678
31. Chen, Q.; Haddad, G.G. Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia: from flies to mammals. *J. Exp. Biol.* 2004, 207, 3125-3129
32. Sarkar, S.; Davies, J.E.; Huang, Z.; Tunnacliffe, A.; Rubinsztein, D.C. Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and  $\alpha$ -synuclein. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 5641-5652
33. Liu, R.; Barkhordarian, H.; Emadi, S.; Park, C.B.; Sierks, M.R. Trehalose differentially inhibits aggregation and neurotoxicity of beta-amyloid 40 and 42. *Neurobiol. Dis.* 2005, 20, 74-81
34. Eroglu, A.; Russo, M. J.; Bieganski, R.; Fowler, A.; Cheley, S.; Bayley, H.; Toner, M. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nat. Biotech.* 2000, 18, 163-167.
35. Cheng Xu, Xuezheng Li, et al. Trehalose prevents neural tube defects

by correcting maternal diabetes-suppressed autophagy and neurogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013 Sep 1;305(5):E667-78.

36. Wang XJ, Sun Z, Chen W, Li Y, Villeneuve NF, Zhang DD (August 2008). "Activation of Nrf2 by arsenite and monomethylarsonous acid is independent of Keap1-C151: enhanced Keap1-Cul3 interaction". *Toxicology and Applied Pharmacology.* 230 (3): 383–9. doi:10.1016/j.taap.2008.03.003. PMC 2610481. PMID 18417180.
37. Chen S, Zhu Y, Liu Z, Gao Z, Li B, Zhang D, et al. Grape Seed Proanthocyanidin Extract Ameliorates Diabetic Bladder Dysfunction via the Activation of the Nrf2 Pathway. *PloS one.* 2015;10(5):e0126457.
38. Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature.* 1994;369(6478):321-3.
39. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature.* 1999;399(6735):483-7

40. Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature*. 1997;387(6635):773-6
41. Chien CT, Chang TC, Tsai CY, Shyue SK, Lai MK. Adenovirus-mediated bcl-2 gene transfer inhibits renal ischemia/reperfusion induced tubular oxidative stress and apoptosis. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2005;5(6):1194-203.
42. Chien CT, Chien HF, Cheng YJ, Chen CF, Hsu SM. Renal afferent signaling diuretic response is impaired in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney international*. 2000;57(1):203-14.
43. Chien, C.T.; Lee, P.H.; Chen, C.F.; Ma, M.C.; Lai, M.K.; Hsu, S.M. De novo demonstration and co-localization of free-radical production and apoptosis formation in rat kidney subjected to ischemia reperfusion. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2001, 12, 973-982.
44. Yu HJ, Lin BR, Lee HS, Shun CT, Yang CC, Lai TY, et al. Sympathetic vesicovascular reflex induced by acute urinary retention evokes proinflammatory and proapoptotic injury in rat liver.

American journal of physiology Renal physiology.

2005;288(5):F1005-14.

45. Li WJ, Oh SJ. Diabetic cystopathy is associated with PARP/JNK/mitochondrial apoptotic pathway-mediated bladder apoptosis. *Neurourol Urodyn.* 2010 Sep;29(7):1332-7. doi: 10.1002/nau.20869.
46. Uchida, T.; Rossignol, F.; Matthay, M.A.; Mounier, R.; Couette, S.; Clottes, E.; Clerici, C. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 14871–14878.
47. Zhou, J.; Schmid, T.; Frank, R.; Brüne, B. PI3K/Akt is required for heat shock proteins to protect hypoxia-inducible factor 1alpha from pVHL-independent degradation. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 13506–13513.
48. Srinivasan, K.; Viswanad, B.; Asrat, L., Kaul, C.L.; Ramarao, P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening.

Pharmacol. Res. 2005, 52, 313-320

49. Yadav, H.; Jain, S.; Sinha, P.R. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition* 2007, 23, 62-68
50. Bieger, W.P.; Michel, G.; Barwich, D.; Biehl, K.; Wirth, A. Diminished insulin receptors on monocytes and erythrocytes in hypertriglyceridemia. *Metabolism* 1984, 33, 982-987
51. Srinivasan, K.; Viswanad, B.; Asrat, L., Kaul, C.L.; Ramarao, P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol. Res.* 2005, 52, 313-320
52. Masiello, P.; Broca, C.; Gross, R.; Roye, M.; Manteghetti, M.; Hillaire-Buys, D.; Novelli, M.; Ribes, G. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*, 1998, 47, 224-229
53. Suganya Tachakittirungrod, Siriporn Okonogi, Sombat Chowwanapoonpohn. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract.

54. Chen, H.Y.; Yen, G.C. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. Food Chem. 2007, 101, 686-694
55. Katsuki, A.; Sumida, Y.; Gabazza, E.C.; Murashima, S.; Furuta, M.; Araki-Sasaki, R.; Hori, Y.; Yano, Y.; Adachi, Y. Homeostasis model assessment is a reliable indicator of insulin resistance during follow-up of patients with type 2 diabetes. Diabetes Care 2001, 24, 362-365.
56. Huang, C.S.; Yin, M.C.; Chiu, L.C. Antihyperglycemic and antioxidative potential of *Psidium guajava* fruit in streptozotocin-induced diabetic rats. Food Chem. Toxicol. 2011, 49, 2189-2195.
57. Butler, A.E.; Janson, J.; Bonner-Weir, S.; Ritzel, R.; Rizza, R.A.; Butler, P.C.  $\beta$ -cell deficit and increased  $\beta$ -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. Diabetes 2003, 52, 102-110.
58. Masini, M.; Bugliani, M.; Lupi, R.; Del Guerra, S.; Boggi, U.; Filipponi, F.; Marselli, L.; Masiello, P.; Marchetti, P. Autophagy in human type 2 diabetes pancreatic beta cells. Diabetologia 2009, 52, 1083-1086.

59. Kang, R.; Zeh, H.J.; Lotze, M.T.; Tang, D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2011, 18, 571-580.
60. Bazzano, L.A.; Li, T.Y.; Joshipura, K.J.; Hu, F.B. Intake of fruit, vegetables, and fruit juices and risk of diabetes in women. *Diabetes Care* 2008, 31, 1311-1317. doi: 10.2337/dc08-0080.
61. de Souza CG, Sattler JA, de Assis AM, Rech A, Perry ML, Souza DO. Metabolic effects of sulforaphane oral treatment in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of medicinal food.* 2012;15(9):795-801.
62. Negi G, Kumar A, Sharma SS. Nrf2 and NF-kappaB modulation by sulforaphane counteracts multiple manifestations of diabetic neuropathy in rats and high glucose-induced changes. *Current neurovascular research.* 2011;8(4):294-304.
63. Matsui T, Nakamura N, Ojima A, Nishino Y, Yamagishi SI. Sulforaphane reduces advanced glycation end products (AGEs)-induced inflammation in endothelial cells and rat aorta. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD.* 2016;26(9):797-

807.

64. Shang G, Tang X, Gao P, Guo F, Liu H, Zhao Z, et al. Sulforaphane attenuation of experimental diabetic nephropathy involves GSK-3 beta/Fyn/Nrf2 signaling pathway. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2015;26(6):596-606.
65. Paro M, Prashar A, Prosdocimi M, Cherian PV, Fiori MG, Sima AA. Urinary bladder dysfunction in the BB/W diabetic rat: effect of ganglioside treatment on functional and structural alterations. *The Journal of urology*. 1994;151(3):781-6.
66. Chien CT, Chien HF, Cheng YJ, Chen CF, Hsu SM. Renal afferent signaling diuretic response is impaired in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney international*. 2000;57(1):203-14.
67. Tomechko SE, Liu G, Tao M, Schlatzer D, Powell CT, Gupta S, et al. Tissue specific dysregulated protein subnetworks in type 2 diabetic bladder urothelium and detrusor muscle. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2015;14(3):635-45.
68. Olisetty S, Traylor A, Zarjou A, Johnson MS, Benavides GA, Ricart K, et al. Mitochondria-targeted heme oxygenase-1 decreases

oxidative stress in renal epithelial cells. *American journal of physiology Renal physiology*. 2013;305(3):F255-64.

69. Petronilli V, Costantini P, Scorrano L, Colonna R, Passamonti S, Bernardi P. The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(24):16638-42.
70. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 1997;275(5303):1132-6.
71. Madesh M, Hajnoczky G. VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *The Journal of cell biology*. 2001;155(6):1003-15.
72. Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, et al. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated

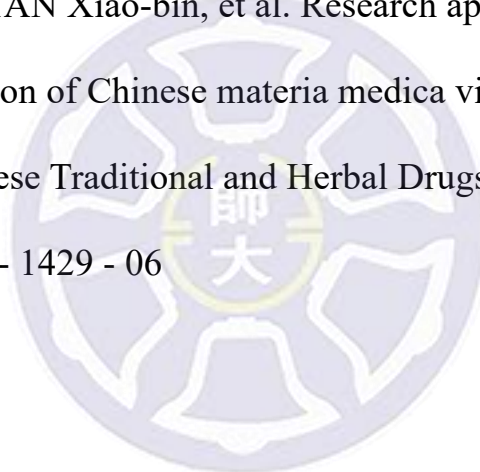
mitochondria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998;95(25):14681-6.

73. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, et al. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. The Journal of experimental medicine. 1998;187(8):1261-71.
74. Kengo Yamawaki, Hironori Kanda, Ryutaro Shimazaki, Nrf2 activator for the treatment of kidney diseases, Toxicology and Applied Pharmacology, Volume 360, 2018, Pages 30-37
75. Santos RX, Correia SC, Wang X, Perry G, Smith MA, Moreira PI, Zhu X. Alzheimer's disease: diverse aspects of mitochondrial malfunctioning Int J Clin Exp Pathol. 2010; 3: 570-81.
76. Santos RX, Correia SC, Alves MG, Oliveira PF, Cardoso S, Carvalho C, Duarte AI, Santos MS, Moreira PI. Insulin therapy modulates mitochondrial dynamics and biogenesis, autophagy and tau protein phosphorylation in the brain of type 1 diabetic rats. Biochim Biophys Acta. 2014 ;1842(7):1154-66. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.04.011. Epub 2014 Apr 18.

77. Chen S, Zhu Y, Liu Z, Gao Z, Li B, Zhang D, et al. Grape Seed Proanthocyanidin Extract Ameliorates Diabetic Bladder Dysfunction via the Activation of the Nrf2 Pathway. *PloS one*. 2015;10(5):e0126457.
78. Niture SK, Jaiswal AK. Inhibitor of Nrf2 (INrf2 or Keap1) protein degrades Bcl-xL via phosphoglycerate mutase 5 and controls cellular apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(52):44542-56.
79. Stepkowski TM, Kruszewski MK. Molecular cross-talk between the NRF2/KEAP1 signaling pathway, autophagy, and apoptosis. *Free radical biology & medicine*. 2011;50(9):1186-95.
80. Zheng H, Whitman SA, Wu W, Wondrak GT, Wong PK, Fang D, et al. Therapeutic potential of Nrf2 activators in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2011;60(11):3055-66.
81. Li W, Khor TO, Xu C, Shen G, Jeong WS, Yu S, et al. Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NF kappa B-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem Pharmacol*. 2008;76(11):1485-9.

82. Yoo KS, Lee EJ, Patil BS. Quantification of quercetin glycosides in 6 onion cultivars and comparisons of hydrolysis-HPLC and spectrophotometric methods in measuring total quercetin concentrations. *J Food Sci.* (2010)
83. Boyer, Jeanelle, and Rui Hai Liu. "Apple phytochemicals and their health benefits." *Nutrition journal* vol. 3 5. 12 May. 2004, doi:10.1186/1475-2891-3-5
84. Wang P, Heber D, Henning SM. Quercetin increased bioavailability and decreased methylation of green tea polyphenols *in vitro* and *in vivo*. *Food Funct.* (2012)
85. Jackson TS, et al. Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations. *Circ Res.* (1998)
86. Y fanti C, et al. Role of vitamin C and E supplementation on IL-6 in response to training. *J Appl Physiol.* (2012)
87. Ashor AW, et al. Effects of vitamin C supplementation on glycaemic control: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Eur J Clin Nutr.* (2017)

88. Cao G1, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med.* 1993 Mar;14(3):303-11.
89. Satoshi Ohtake, Y. John Wang. Trehalose: Current Use and Future Application. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 100, Issue 6, June 2011, Pages 2020-2053
90. LIU Wen-bo, TAN Xiao-bin, et al. Research approach on chemoprevention of Chinese materia medica via Nrf2 signal pathway. *Chinese Traditional and Herbal Drugs.* 0253 - 2670(2011)07 - 1429 - 06



## 附錄

MW. 302.24 [C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>]  
CAS No. 117-39-5

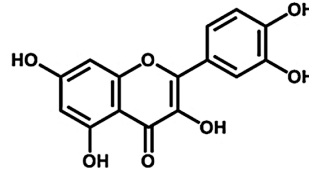


圖 1 (A) 槲皮素的化學結構和分子量

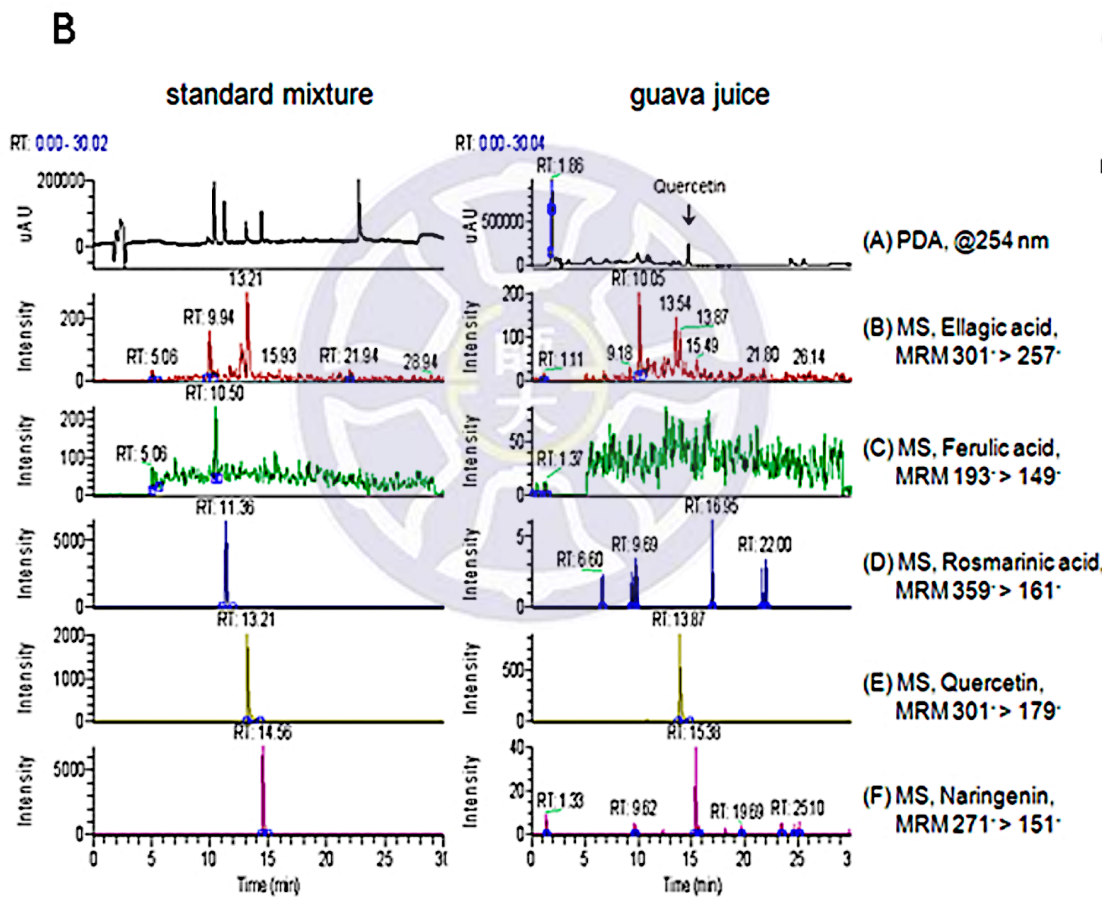


圖 1 (B) 番石榴萃取物所含主成分檢測

標準混合物的色譜圖顯示在圖左，而番石榴水萃取物的色譜圖則顯示在圖右。在標準混合物中鑒定了鞣花酸、阿魏酸、迷迭香酸、槲皮素和柚皮苷元等 5 種化學成分，番石榴汁中主要只發現槲皮素。

C

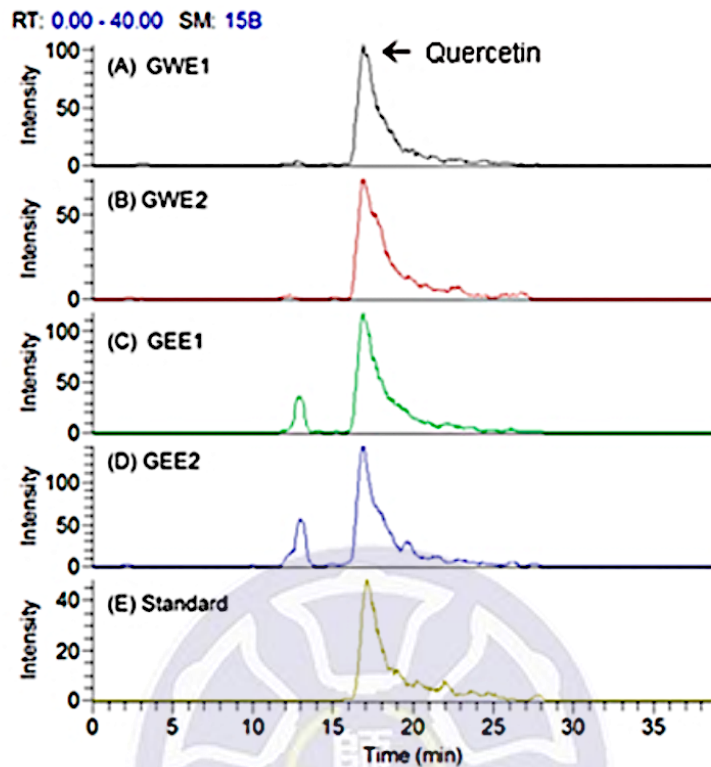


圖 1 (C) 番石榴以各種萃取方式中槲皮素的含量

高效液相色譜法測定番石榴汁萃取物中槲皮素的含量。槲皮素在 GWE1 中的濃度為 182.3 ng/ml，在 GWE2 中為 133.4 ng/ml，在 GEE1 中為 223.1 ng/ml，在 GEE2 中為 244.5 ng/ml。結果是珍珠番石榴以乙醇萃取出槲皮素濃度最高。

GWE1, guava water extraction of G1 泰國番石榴水萃取

GWE2, guava water extraction of G2 珍珠番石榴水萃取

GEE1, guava ethanol extraction of G1 泰國番石榴乙醇萃取

GEE2, guava ethanol extraction of G2 珍珠番石榴乙醇萃取

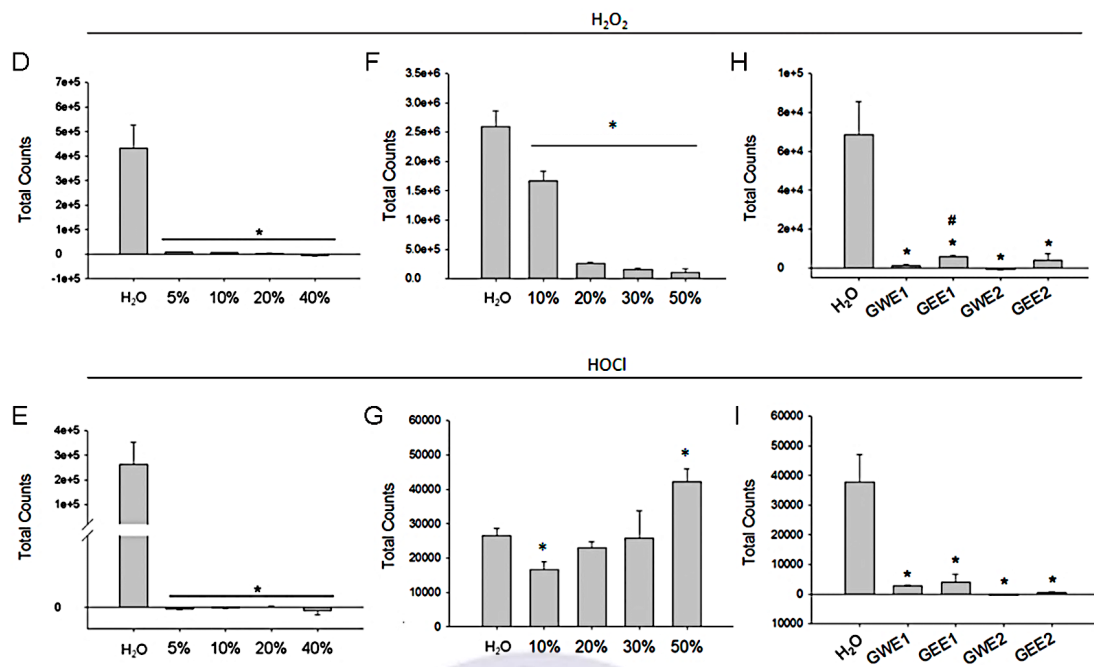


圖 1 (D-I) 番石榴汁與海藻糖清除體外活性氧的能力

不同濃度的番石榴汁 (D, E)、海藻糖 (F, G) 及不同種類的番石榴萃取物 (H, I) 在體外對清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、HOCl 活性氧水準的影響。以 ddH<sub>2</sub>O 為參考對照，番石榴汁混和海藻糖含量分別為 5-40% 和 10-50% 時，發現 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 HOCl 的含量明顯地依照著劑量降低。GWE1 和 GWE2 以及 GEE1 和 GEE2 降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 HOCl 的活性氧水準 (每組 3-5 隻)。GWE1 和 GWE2 在降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 HOCl 數值方面比 GEE1 和 GEE2 有顯著的效果。也就是說，番石榴水萃取物比乙醇萃取物具有更高的活性氧清除能力。(p < 0.05)。

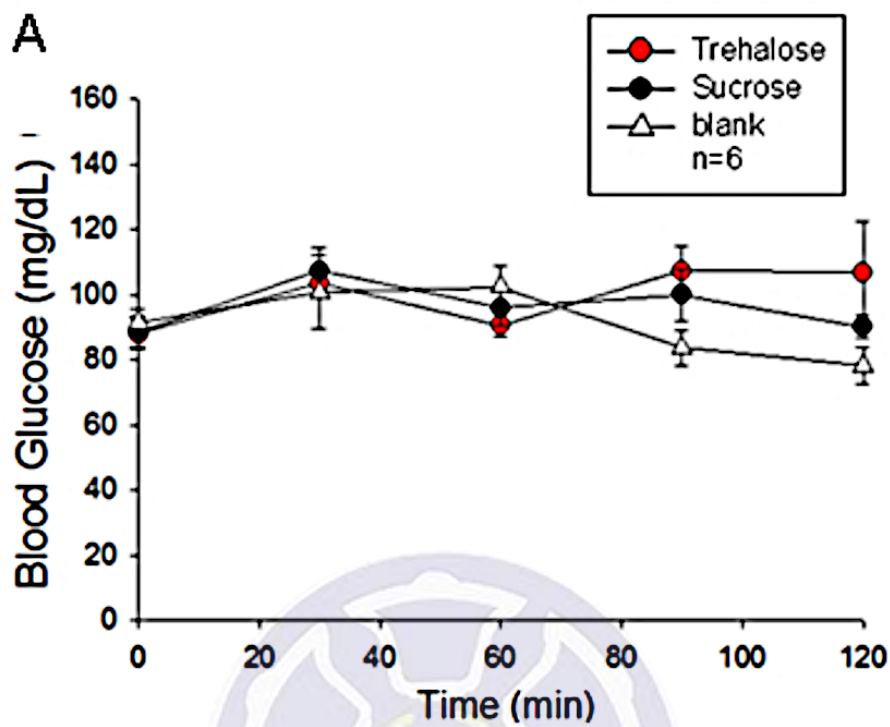


圖 2 (A) 口服番石榴汁的耐受性試驗

正常大鼠口服含有 12%海藻糖 (紅色)、8%蔗糖 (黑色) 或 ddH<sub>2</sub>O (白色) 的 40%番石榴汁。飲用三種番石榴汁對血糖水準無影響，各組之間亦無顯著性差異。

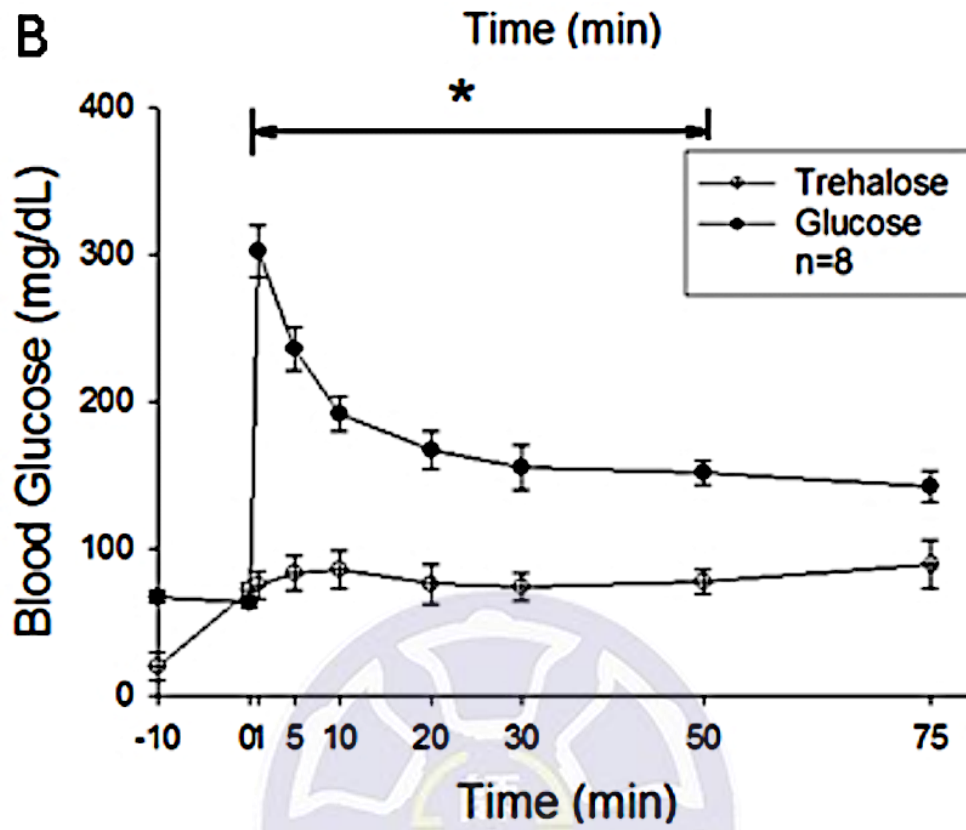


圖 2 (B) 靜脈內注射葡萄糖和海藻糖的耐受性試驗

為了評估靜脈注射葡萄糖或海藻糖後血糖水準的變化，我們通過靜脈注射 0.5g/kg 葡萄糖或海藻糖。圖中黑點曲線表示靜脈注射 0.5g/kg 葡萄糖，白點曲線表示靜脈注射 0.5g/kg 海藻糖。正常動物以葡萄糖處理後，血糖明顯高於海藻糖組，而海藻糖靜脈注射後，血糖並沒有明顯變化。

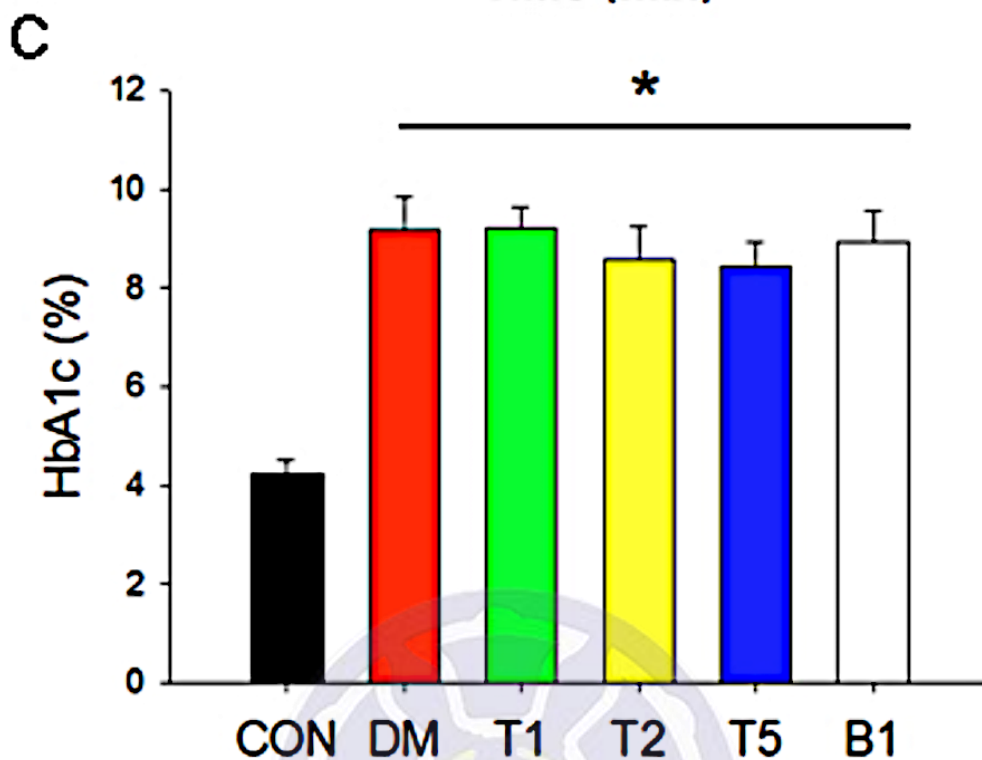


圖 2 (C) 各實驗組與對照組糖化血色素 HbA1c 的比較

糖尿病大鼠糖化血色素水準為 CON 對照組大鼠的兩倍。在 T2 和 T5 大鼠中，HbA1c 水準略有下降，但沒有統計學差異。

1. CON：對照組
2. DM：II 型糖尿病組
3. T1：T2DM 番石榴汁 4 ml/kg + 海藻糖 2 ml/kg 組
4. T2：T2DM 番石榴汁 8 ml/kg + 海藻糖 4 ml/kg 組
5. T5：T2DM 番石榴汁 20 ml/kg + 海藻糖 1 ml/kg 組
6. B1：T2DM 番石榴汁 4 ml/kg



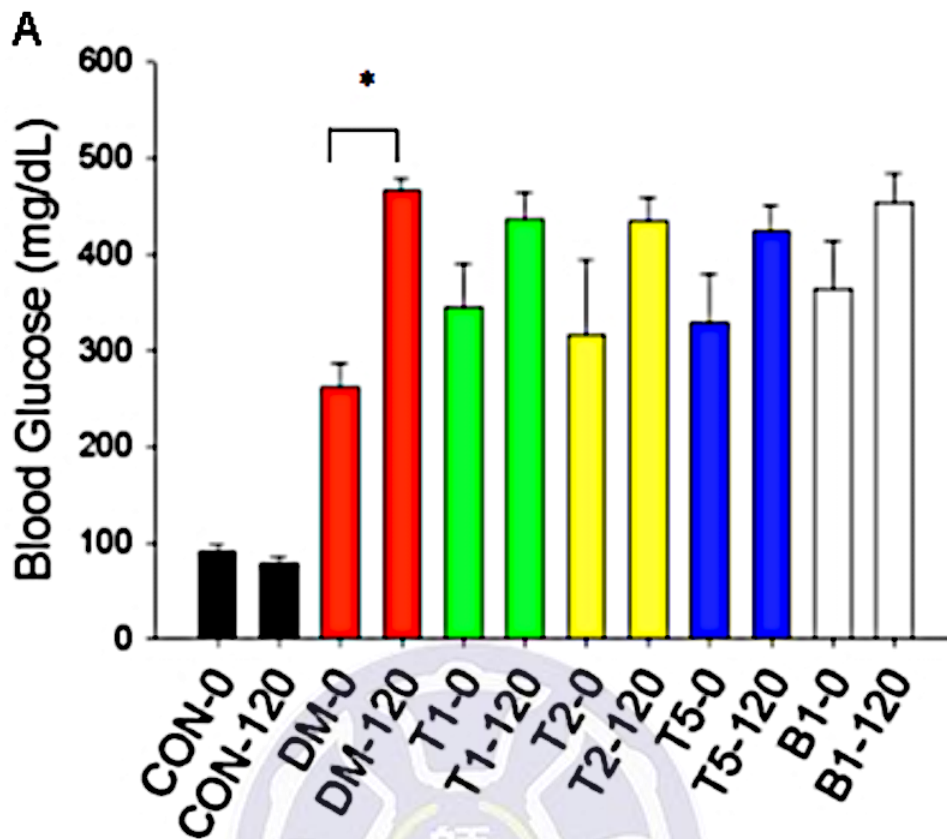


圖 3 (A) 禁食後口服葡萄糖耐量試驗二小時後血糖比較

對照組的禁食 (0 分) 與服糖二小時 (120 分) 後，血糖皆低於 100 mg/dL，二者並無差異。糖尿病組的 0 分與 120 分則有顯著差異。相對來說，實驗各組其 0 分與 120 分則無顯著差異，這可能代表番石榴混和海藻糖能夠對口服葡萄糖耐量試驗所致的血糖升高有好的影響，表明番石榴汁有助於血糖控制。注意：雖然實驗組起始的血糖值仍高，但與糖尿病組的起始血糖並無顯著差異。

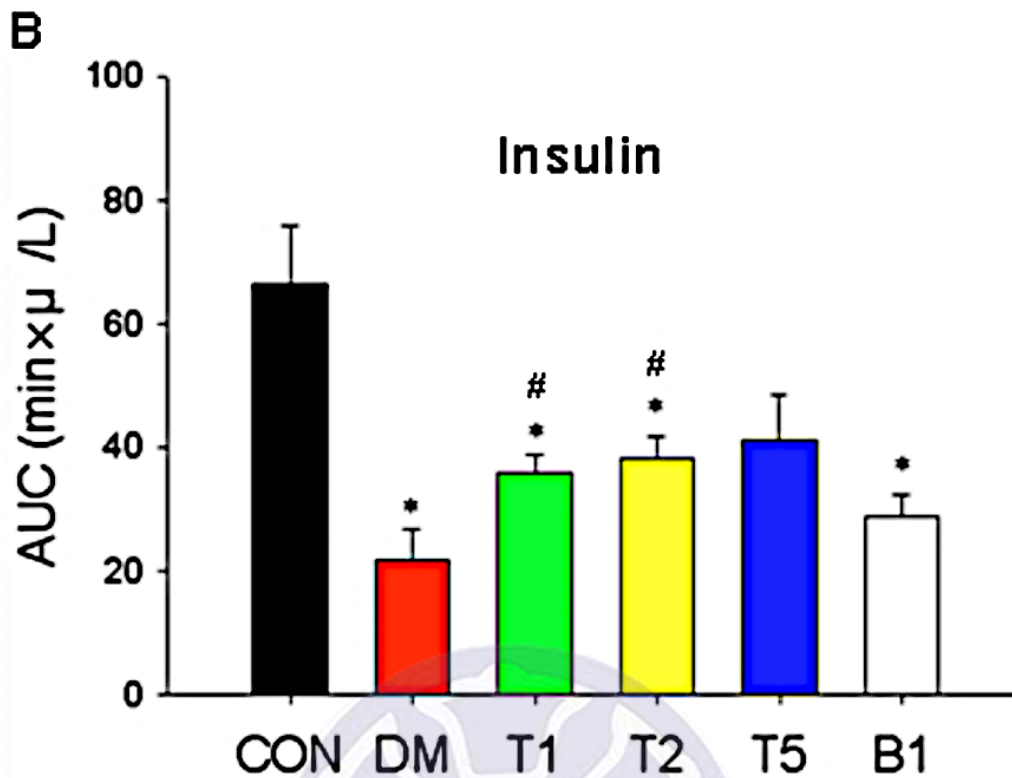


圖 3 (B) 各實驗組與對照組胰島素曲線下面積指數的比較

胰島素水準是以曲線下面積指數 (AUC = min x μg/L) 表示。CON 對照組胰島素水準的 AUC 為 66.6±2.1 min x μg/L。由於 T2DM 的細胞損傷，DM 的 AUC 下降到 21.9±1.4 min x μg/L。AUC 在 T1、T2 和 T5 組都是升高的，T1 (36.0±0.5 min x μg/L)、T2 (38.2±1.1 min x μg/L) 和 T5 (41.5±4.5 min x μg/L) 升高。B1 的 AUC 為 28.9±0.8 min x μg/L。實驗結果表明，番石榴汁混和海藻糖對第 II 型糖尿病大鼠胰島素分泌功能有明顯的保護作用。

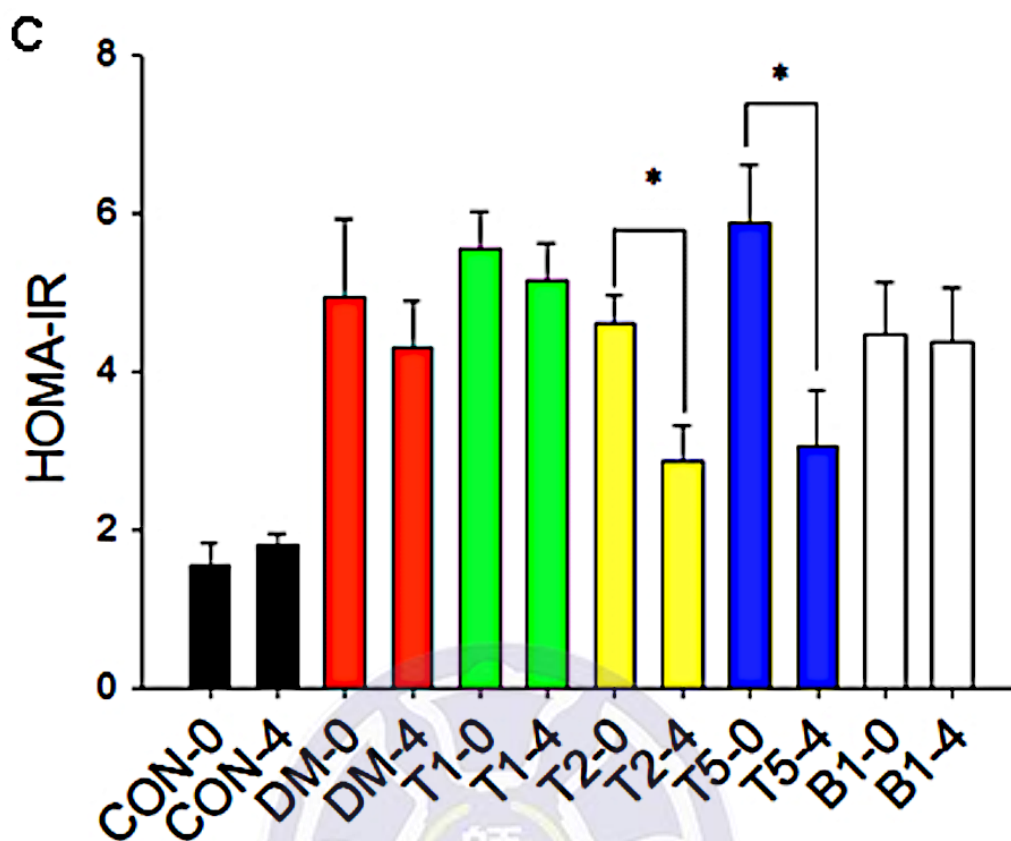


圖 3 (C) 各實驗組與對照組 HOMA-IR 指數的比較

CON 對照組大鼠 HOMA-IR 值在第 0 周和第 4 周約為 2。在糖尿病大鼠，這一數值升高（高達 4.9），並在第 0 周至第 4 周保持穩定。

T1、T2、T5、B1 各組大鼠 HOMA-IR 均在第 4 周低於第 1 周。T2、

T5 兩組比較，差異有統計學意義 ( $p < 0.05$ )。

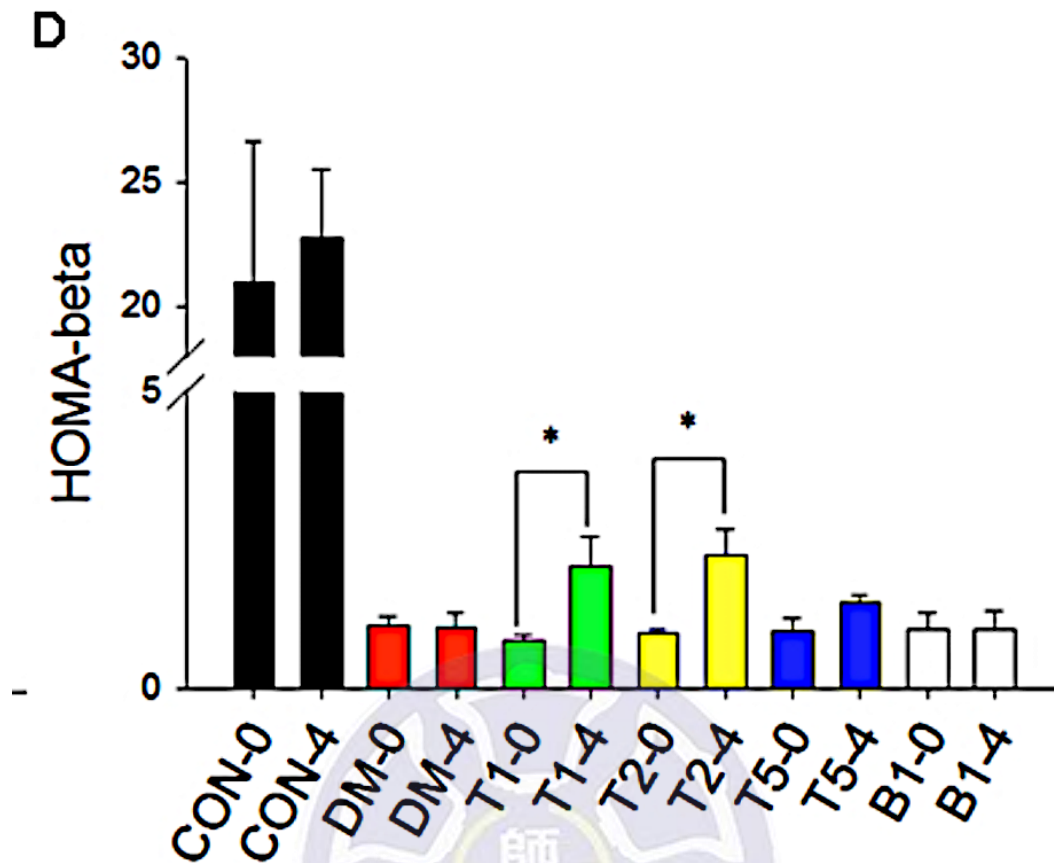


圖 3 (D) 各實驗組與對照組 HOMA-β 指數的比較

在 CON 對照組大鼠，HOMA-β 值約為 20，在第 0 周和第 4 周數值很接近。所有 T2DM 大鼠的 HOMA-β 值（低於 5）均低於 CON 對照組。糖尿病大鼠的 HOMA-β 值在第 0 周至第 4 周仍然較低。而其他 4 組（T1、T2、T5 和 B1）在第 4 周比第 1 周有升高 HOMA-β 值的趨勢。其中 T1 組與 DM 組比較差異有統計學意義 ( $p < 0.05$ )。

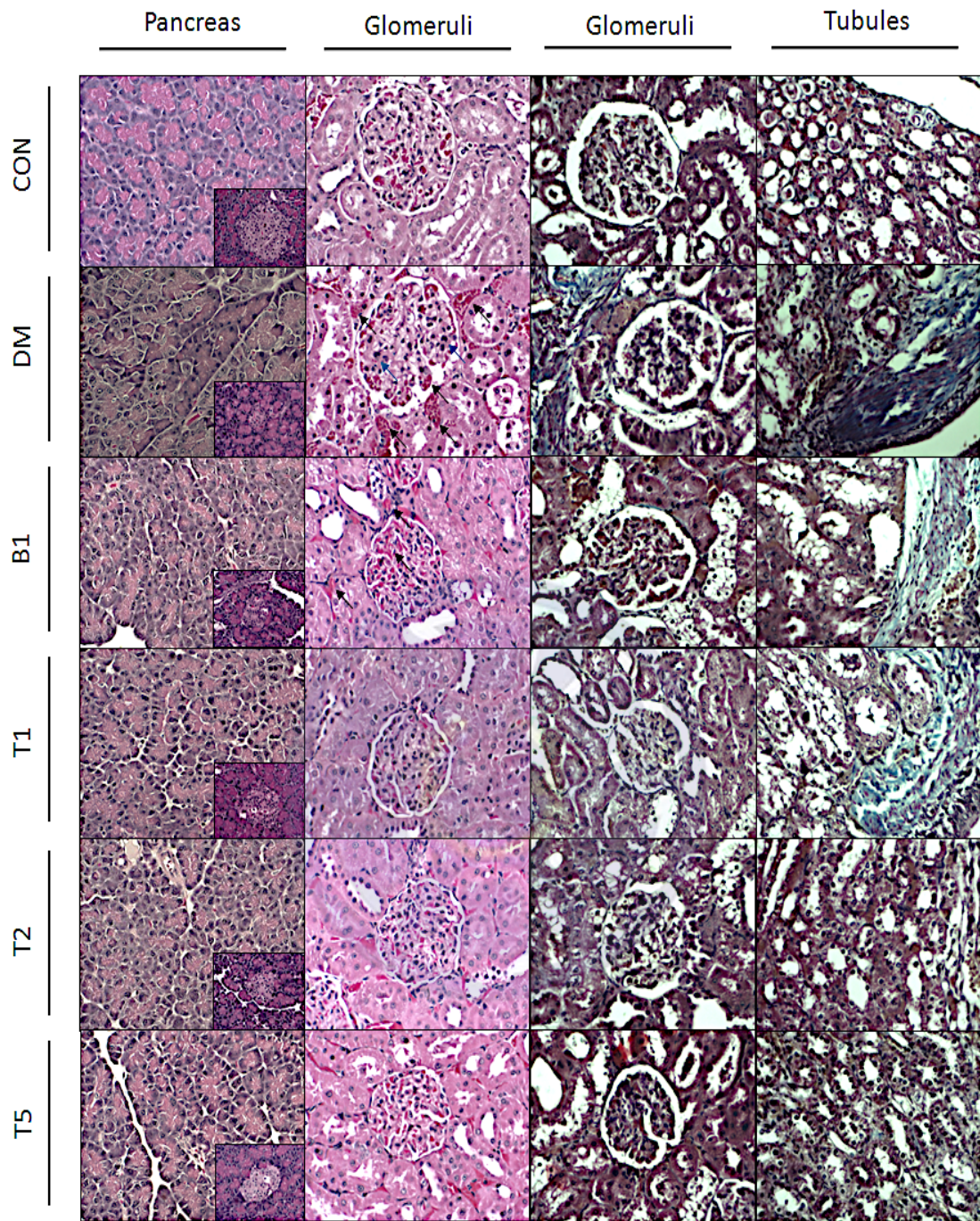
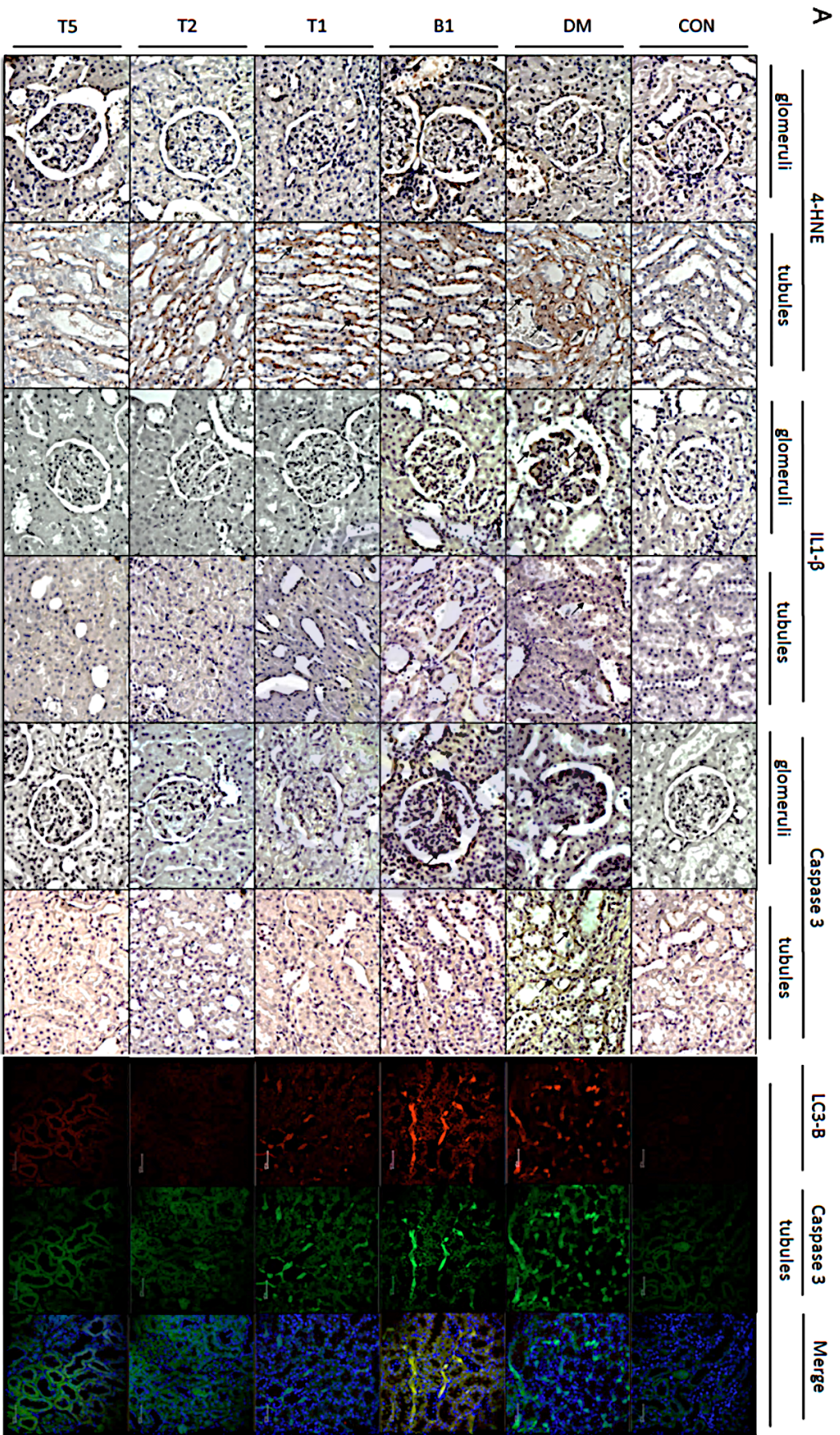


圖 4 胰臟和腎臟的 HE 染色 (左二) 和馬松染色 (右二)

在胰臟切片的 HE 染色中，右下角框格顯示胰島面積。糖尿病大鼠胰島細胞變得不規則，胰島面積縮小。T1、T2、T5、B1 組胰島萎縮得到部分改善，胰島細胞排列更加規則。在糖尿病大鼠腎臟的 HE 染色

中，部分出血區（黑箭頭）伴有中性粒細胞（藍箭頭）。其他（T1、T2、T5 和 B1）則表現出相對較少的出血區和中性粒細胞。在馬松染色中，藍色區域代表硬化區。糖尿病大鼠腎小球未見硬化區，周圍小管多見硬化區。糖尿病大鼠腎小管切片可見硬化。B1 和 T1 組大鼠仍可見藍色區域。在 T2 和 T5 大鼠中，很少觀察到硬化。





## 圖 5 (A) 腎臟切片的 IHC 和螢光染色

上半圖為 4-HNE、IL-1 $\beta$ 、Caspase-3 在腎小球和腎小管的典型顯示 (以箭頭指示的棕色區域)。石榴汁加海藻糖 (T1, T2, 或 T5) 或不加海藻糖 (B1) 的大鼠, 4-HNE、IL-1 $\beta$  和 Caspase3 的表現較少。B1 組大鼠 4-HNE、IL-1 $\beta$  和 Caspase3 的表現水準均高於 T1、T2 和 T5。

下半圖為螢光染色圖, 綠色螢光代表 Caspase3 介導的細胞凋亡, 而紅色螢光代表 LC3-B 介導的細胞自噬。在腎臟切片中, 糖尿病組細胞漿中 Caspase3 和 LC3-B 的表現高於 CON 對照組。Caspase3 和 LC3-B 蛋白在 T1、T2、T5 和 B1 的表現明顯降低。在腎小管有螢光 LC3-B (紅色)、Caspase-3 (綠色)。

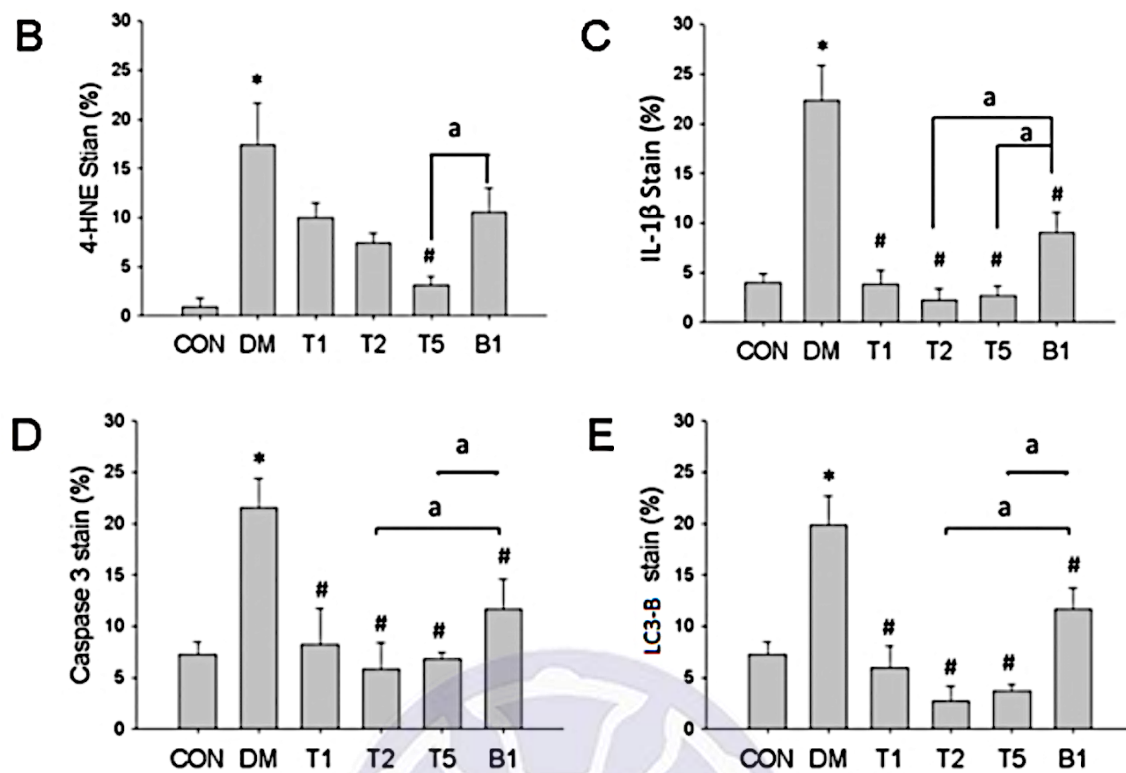


圖 5 (B-E) 腎臟 4-HNE、IL-1 $\beta$ 、Caspase-3、LC3-B 統計長條圖

4-HNE (B)、IL-1 $\beta$  (C)、Caspase3 (D) 和 LC3-B (E) 在 DM 大鼠中的表現明顯高於 CON 對照組 ( $p < 0.05$ )。在糖尿病組 4-HNE、IL-1 $\beta$ 、Caspase3 和 LC3-B 表現明顯增強，而在 T1、T2、T5 和 B1 組明顯減弱。糖尿病增強的 4-HNE、IL-1 $\beta$ 、Caspase3 和 LC3-B 表現，在 T 組明顯低於 B1。\* $p < 0.05$  vs. CON, # $p < 0.05$  vs. DM, <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. B1.

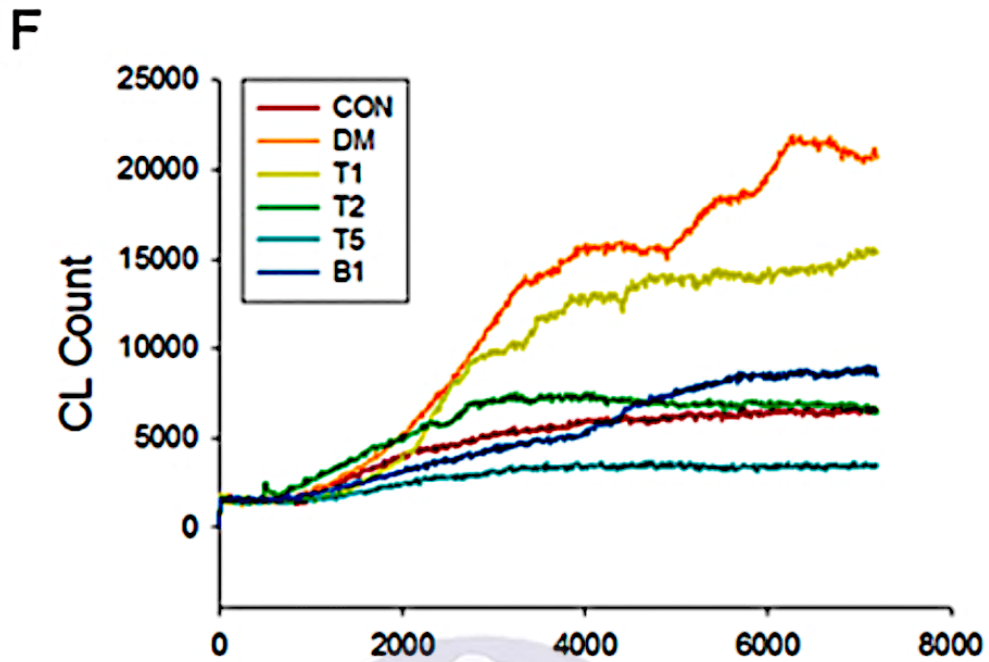


圖 5 (F) 各組體內腎臟活性氧水準比較

此圖顯示 6 組大鼠腎臟活性氧 (ROS) 在 7200 秒內的即時資料。

糖尿病大鼠腎臟 CL 數值最高，並隨著時間軸度不規則地上昇。T1、

T2、T5 和 B1 的 CL 數值比 DM 低。

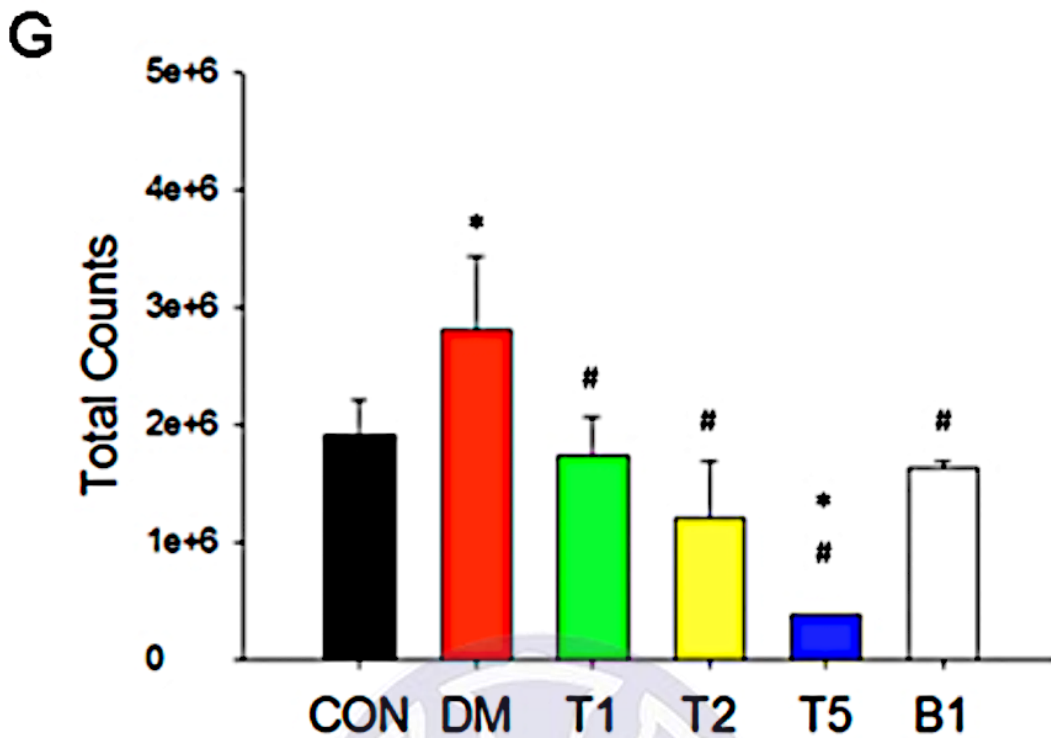


圖 5 (G) 腎臟活性氧經統計後的長條圖

將原始數據以統計學計算後，證實 DM 大鼠較其他 5 組顯示最高的 ROS 值，而 T1、T2、T5 和 B1 組的 ROS 水準顯著降低。其中，T5 組的 ROS 水準最低。 $*p < 0.05$  vs. CON,  $\#p < 0.05$  vs. 糖尿病。

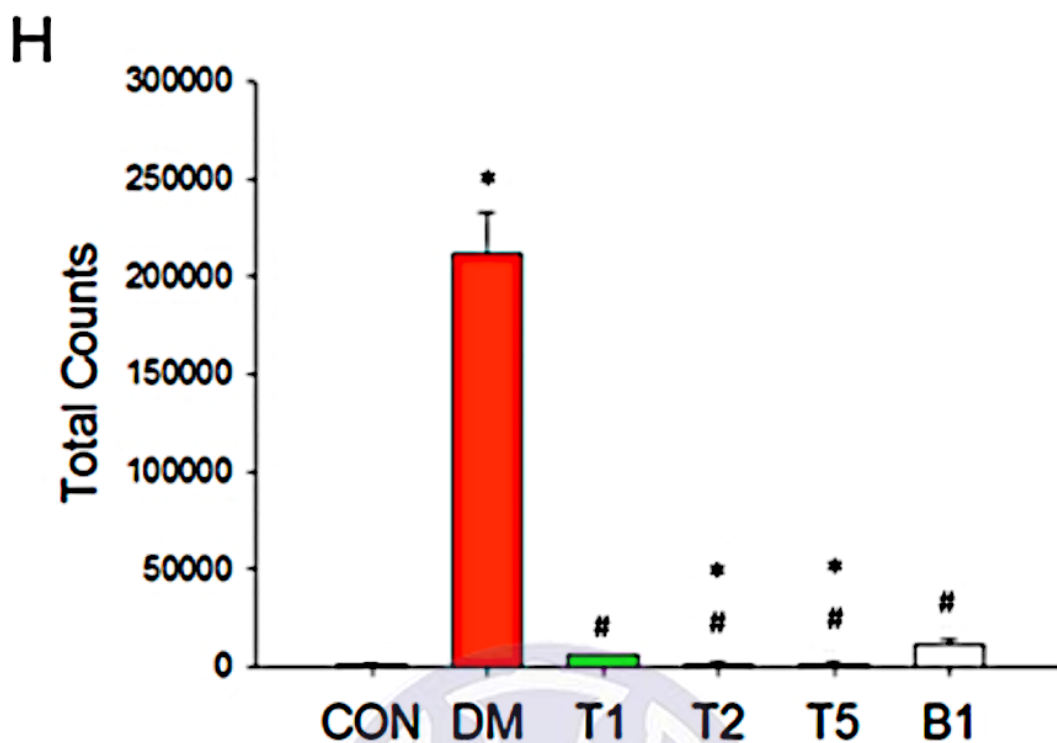


圖 5 (H) 體外的血清活性氧水準

糖尿病組血清活性氧水準顯著高於 CON 對照組，其餘 4 組與 CON 對照組無顯著性差異。與糖尿病組相比，這 4 組也顯示出明顯的下降。

此外，T2 和 T5 的總活性氧數值明顯低於 B1。每組 3-5 隻，數據表示為：平均值±平均值標準誤差 (mean ± SEM)。\* $p < 0.05$  vs. CON, # $p < 0.05$  vs. 糖尿病。

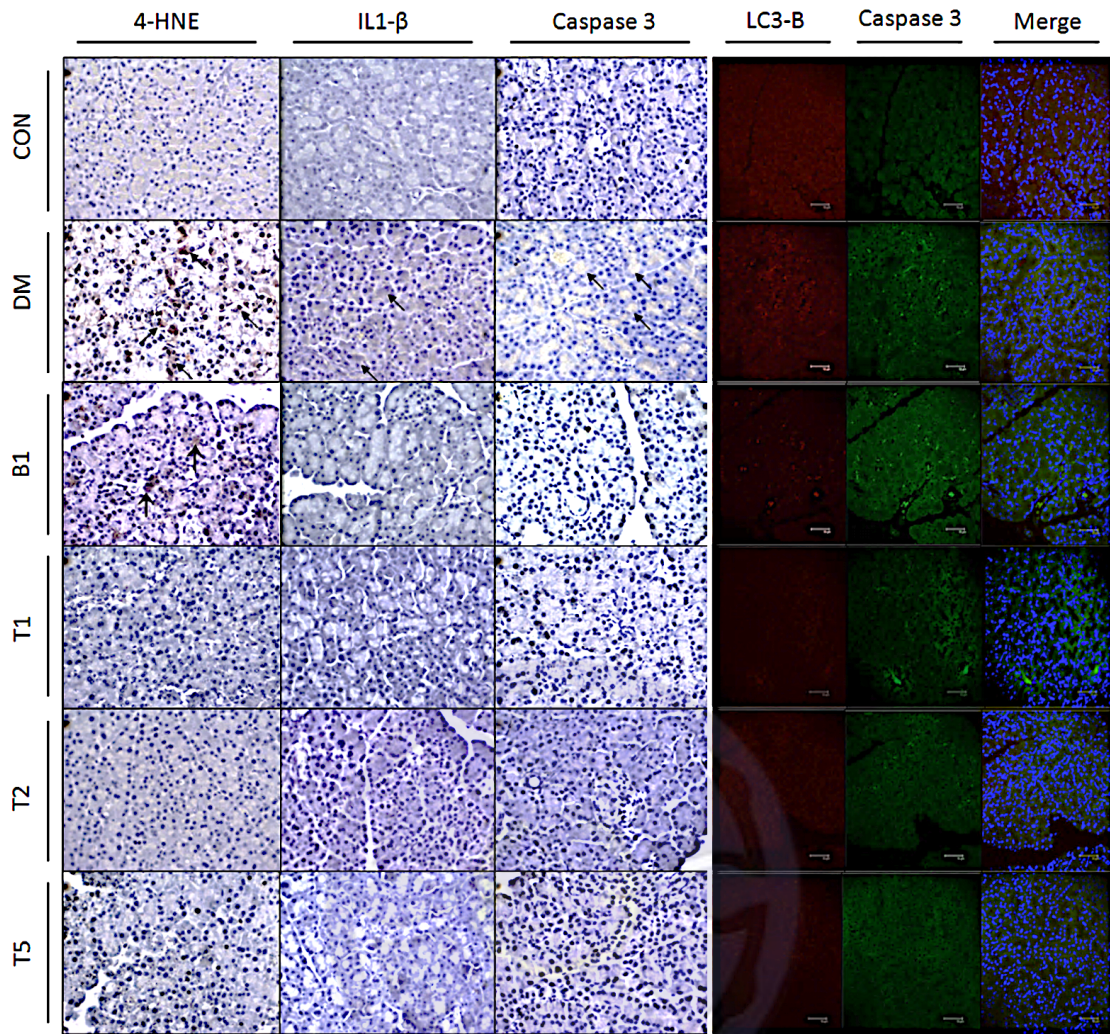


圖 6 (A) 胰臟切片的 IHC 和螢光染色

4-HNE (脂質過氧化和氧化應激標誌物)、IL-1 $\beta$  (發炎性細胞凋亡標誌物)、Caspase3 (綠色，細胞凋亡標誌物) 和螢光 LC3-B (紅色，細胞自噬標誌物) 在 6 組胰臟中的典型表現圖。糖尿病大鼠胰臟 4-HNE、IL-1 $\beta$  和 Caspase3 的表現明顯高於糖尿病大鼠。

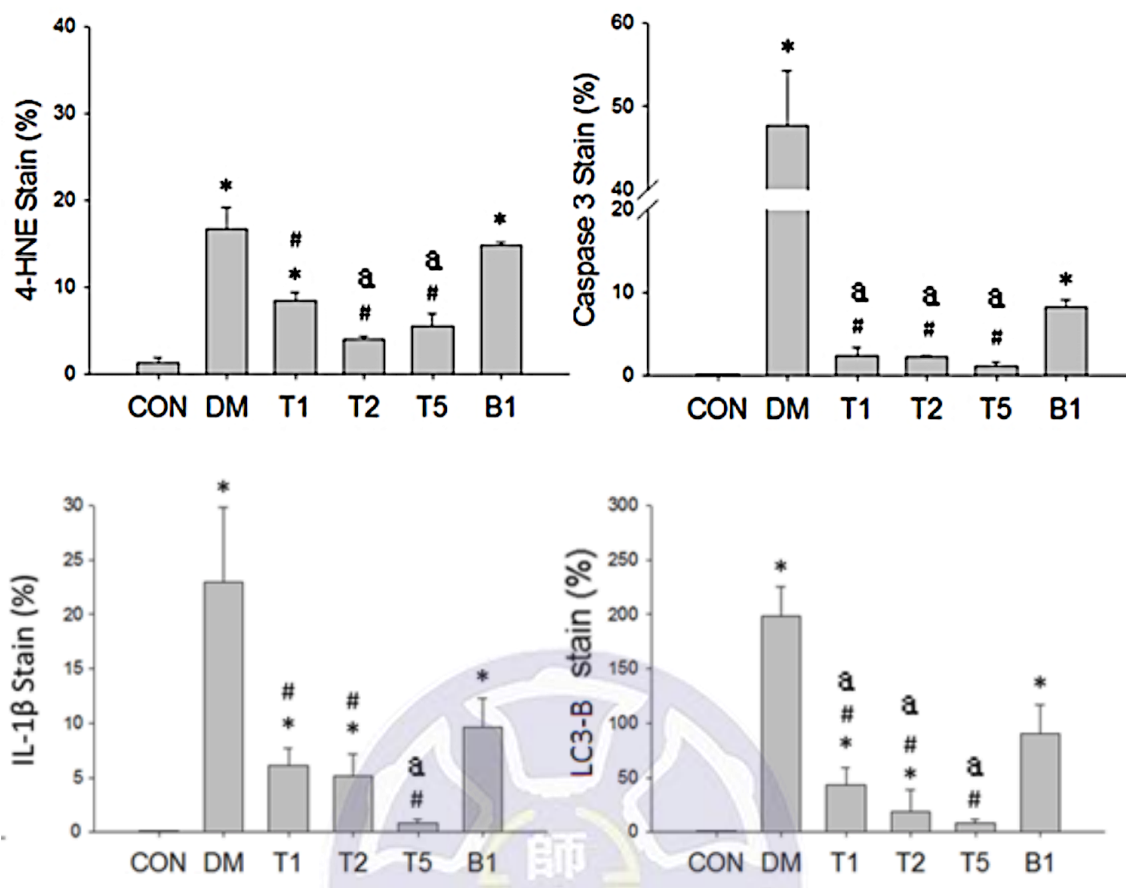


圖 6 (B) 胰臟 4-HNE、IL-1 $\beta$ 、Caspase-3、LC3-B 統計長條圖

糖尿病大鼠胰臟組織中 4-HNE、IL-1 $\beta$ 、Caspase3 和 LC3-B 的表現明顯高於 CON 對照組 ( $p < 0.05$ )。糖尿病組 4-HNE、IL-1 $\beta$ 、Caspase3 和 LC3-B 表現增強，T1、T2、T5 和 B1 組明顯減弱。糖尿病增強的 4-HNE、IL-1 $\beta$ 、Caspase3 和 LC 表現，在 T 組較 B1 明顯降低。每組 3-5 隻，數據表示為：平均值 $\pm$ 平均值標準誤差 (mean  $\pm$  SEM)。\* $p < 0.05$  vs. CON, # $p < 0.05$  vs. DM, <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs. B1.

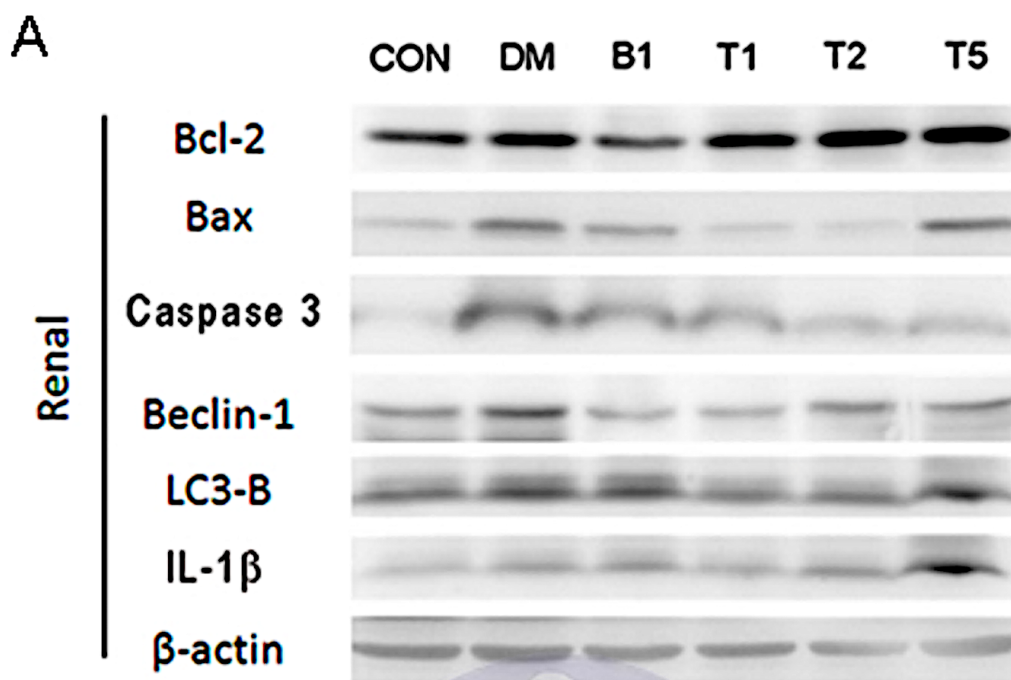


圖 7 (A) 番石榴汁混和海藻糖影響腎臟蛋白標誌物的原始印跡圖

以西方墨點法檢測番石榴汁混和海藻糖，對 II 型糖尿病腎臟細胞  
 凋亡、細胞自噬和發炎性細胞凋亡相關蛋白表現的影響。與對照組相比，  
 糖尿病組細胞自噬相關蛋白 Beclin-1, LC3-B，發炎性細胞凋亡相關蛋  
 白 IL-1 $\beta$ ，和細胞凋亡相關蛋白 Bax, Bcl-2, Caspase3 的表現明顯升高，  
 T1、T2 和 T5 組細胞自噬相關蛋白表現明顯降低。

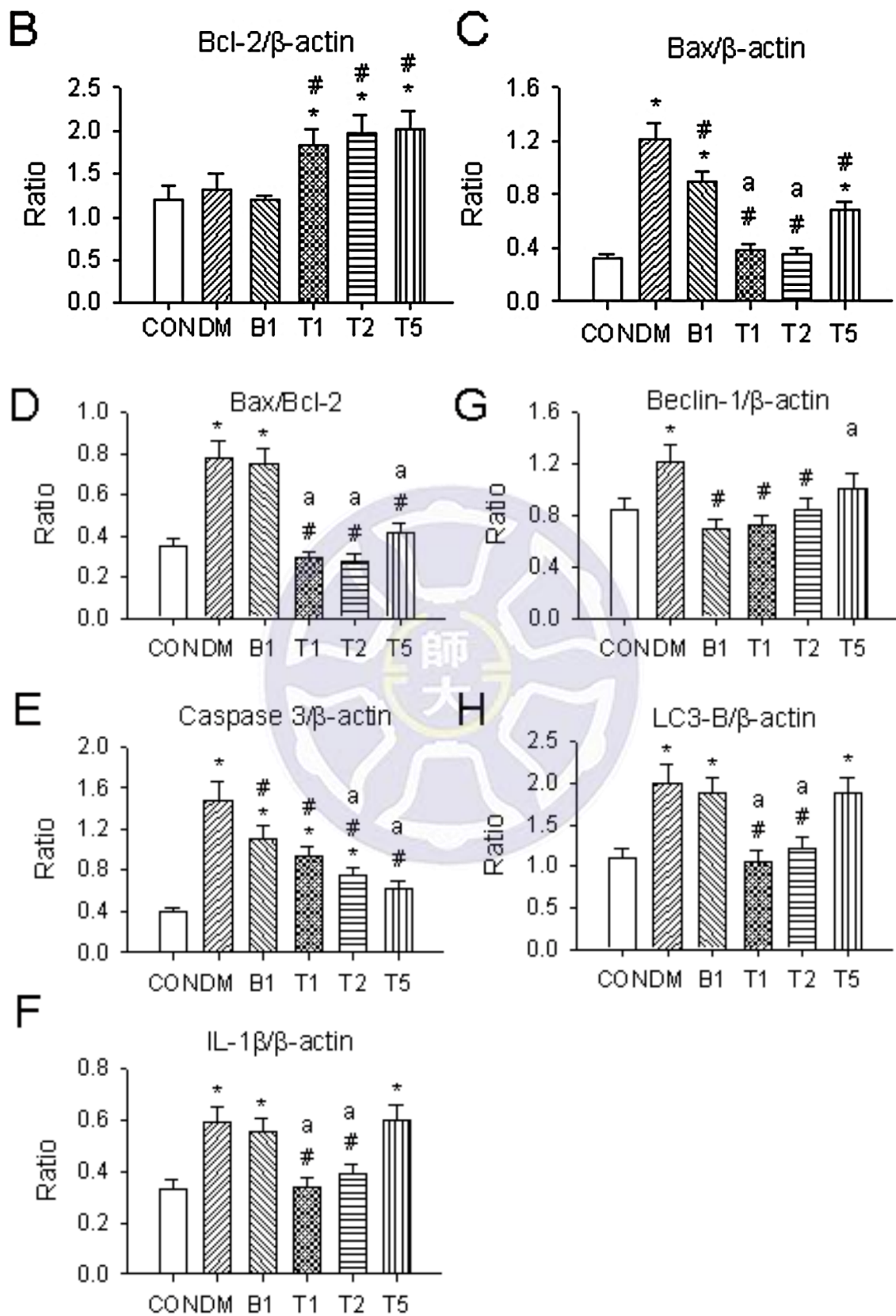


圖 7 (B-H) 番石榴汁混和海藻糖影響腎臟相關蛋白統計長條圖

番石榴汁加海藻糖 (T1, T2, 或 T5) 或不加海藻糖 (B1) 均可顯著降低腎臟細胞自噬標誌物 Beclin-1, LC3-B, 發炎性細胞凋亡標誌物 IL-1 $\beta$ , 和細胞凋亡標誌物 Bax, Bcl-2, Caspase3 的表現。B1 大鼠腎臟細胞自噬標誌物 Beclin-1, LC3-B, 發炎性細胞凋亡標誌物 IL-1 $\beta$ , 細胞凋亡標誌物 Bax, Bcl-2, Caspase3 的表現明顯高於 T1、T2 和 T5。各蛋白表現和比值的統計資料分別顯示在腎臟 (B-H) 中。每組 3-5 隻, 數據表示為: 平均值 $\pm$ 平均值標準誤差 (mean  $\pm$  SEM)。\*p < 0.05 vs. CON, #p < 0.05 vs. DM, <sup>a</sup>p < 0.05 vs. B1.



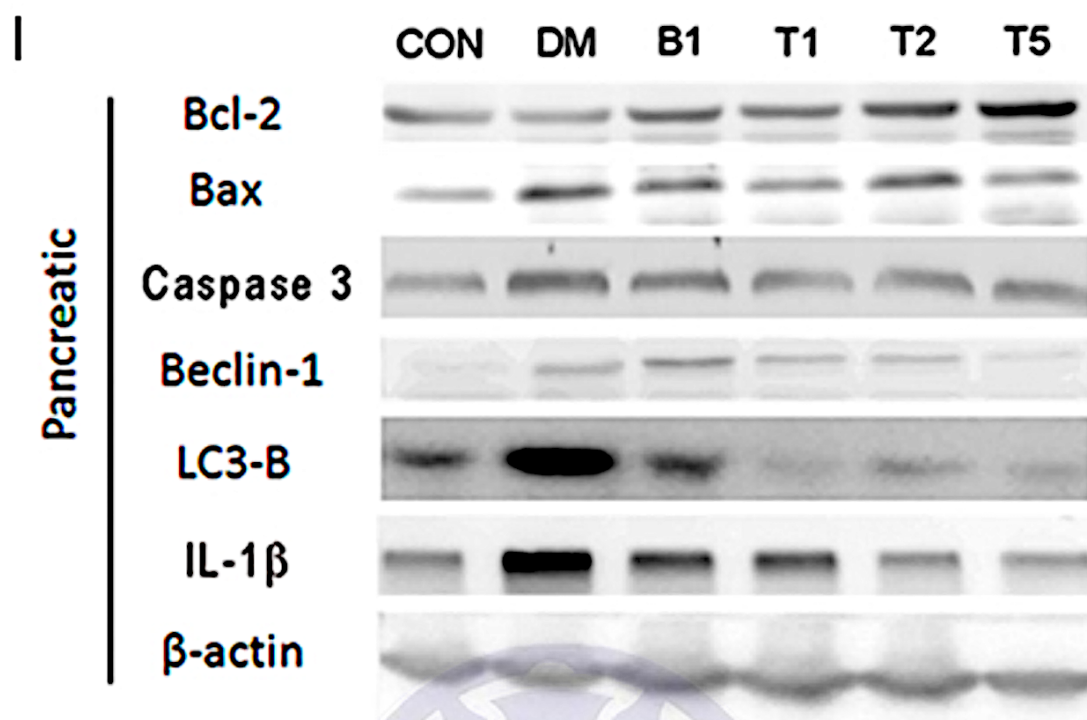


圖 7 (I) 番石榴汁混和海藻糖影響胰臟蛋白標誌物的原始印跡圖

以西方墨點法檢測番石榴汁混和海藻糖，對 II 型糖尿病胰臟細胞凋亡、細胞自噬和發炎性細胞凋亡相關蛋白表現的影響。與對照組相比，糖尿病組細胞自噬相關蛋白 Beclin-1, LC3-B，發炎性細胞凋亡相關蛋白 IL-1 $\beta$ ，和細胞凋亡相關蛋白 Bax, Bcl-2, Caspase3 的表現明顯升高，T1、T2 和 T5 組細胞自噬相關蛋白表現明顯降低。

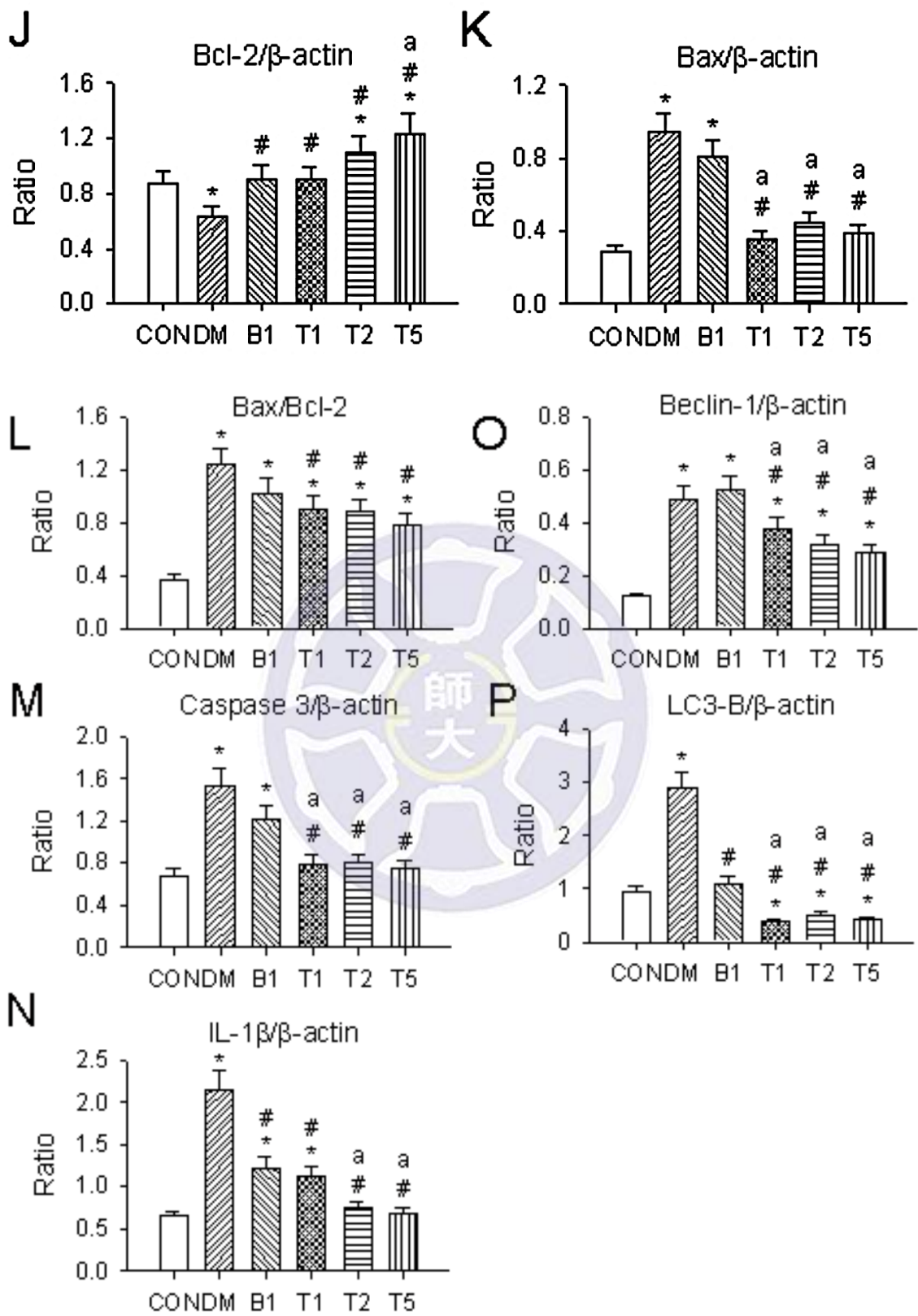


圖 7 (J-P) 番石榴汁混和海藻糖影響胰臟相關蛋白統計長條圖

番石榴汁加海藻糖 (T1, T2, 或 T5) 或不加海藻糖 (B1) 均可顯著降低胰臟細胞自噬標誌物 Beclin-1, LC3-B, 發炎性細胞凋亡標誌物 IL-1 $\beta$ , 和細胞凋亡標誌物 Bax, Bcl-2, Caspase3 的表現。B1 大鼠胰臟細胞自噬標誌物 Beclin-1, LC3-B, 發炎性細胞凋亡標誌物 IL-1 $\beta$ , 細胞凋亡標誌物 Bax, Bcl-2, Caspase3 的表現明顯高於 T1、T2 和 T5。各蛋白表現和比值的統計資料分別顯示在胰臟 (J-P) 中。每組 3-5 隻, 數據表示為: 平均值 $\pm$ 平均值標準誤差 (mean  $\pm$  SEM)。\*p < 0.05 vs. CON, #p < 0.05 vs. DM, <sup>a</sup>p < 0.05 vs. B1.



A

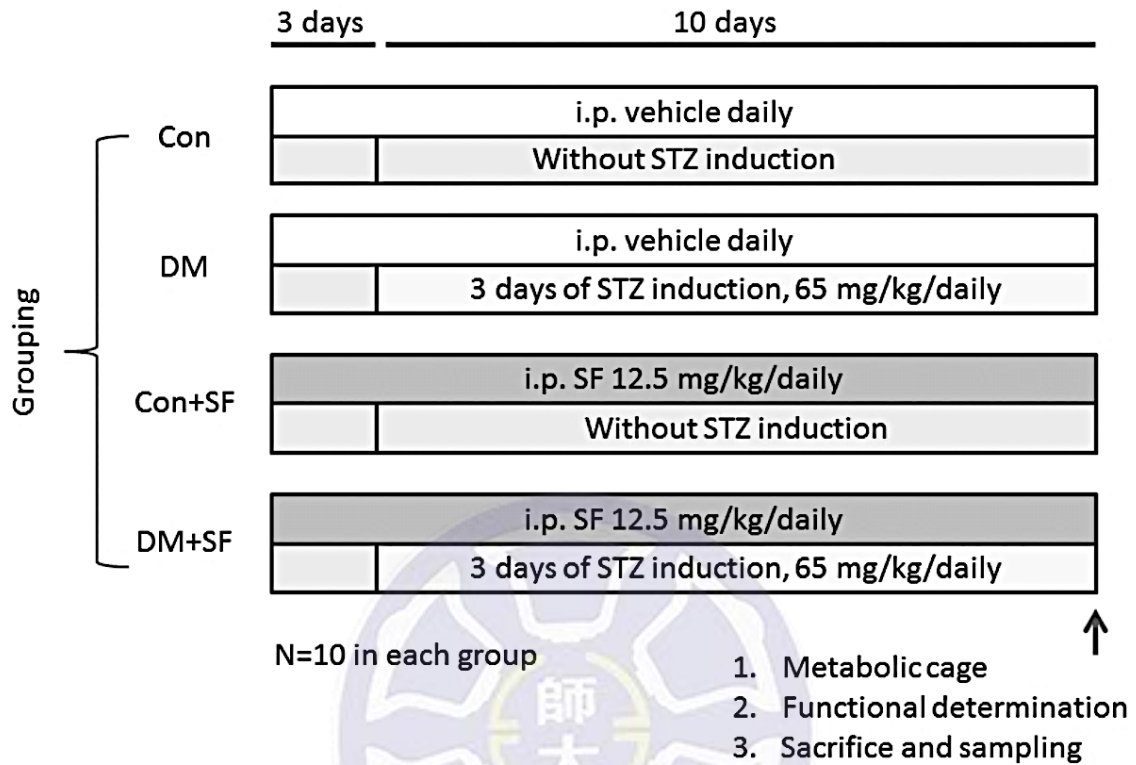


圖 8 (A) 第 I 型糖尿病誘發模型

糖尿病模型組(DM)於 10 分鐘內給予腹腔注射單次 STZ 65mg/kg，建立糖尿病模型。對照組 (Con) 則注射等量檸檬酸-檸檬酸鈉緩衝液 (5.5 ml/kg)。在誘導糖尿病之前三天，以蘿蔔硫素 sulforaphane 預先處理 (Con+SF, DM+SF)。使用此模型可快速誘發糖尿病，並伴有多尿，當尾靜脈血糖濃度大於 250 mmol/l，即誘導成功為 T1DM。

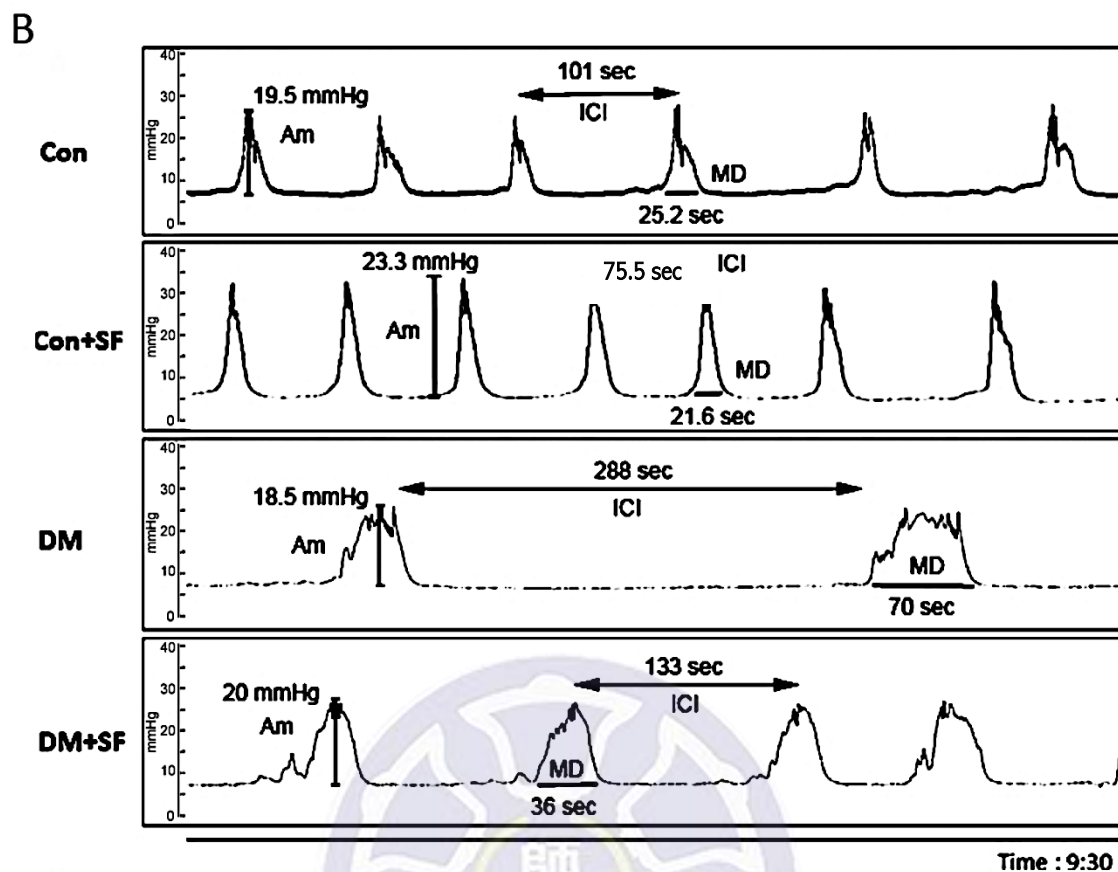


圖 8 (B) 蘿蔔硫素對大鼠尿流動力學影響之原始圖

我們測定了蘿蔔硫素對四組大鼠排尿參數的影響。原始數據包括排尿參數 (ICI、Am 和 MD) 的測定。

ICI: 兩次收縮間期 intercontraction interval

Am: 膀胱收縮幅度 amplitude of bladder contraction

MD: 排尿持續時間 micturition duration

實驗結果顯示：蘿蔔硫素處理後，可以縮短兩次排尿收縮間期、縮短每次排尿持續時間，且不影響膀胱收縮幅度。

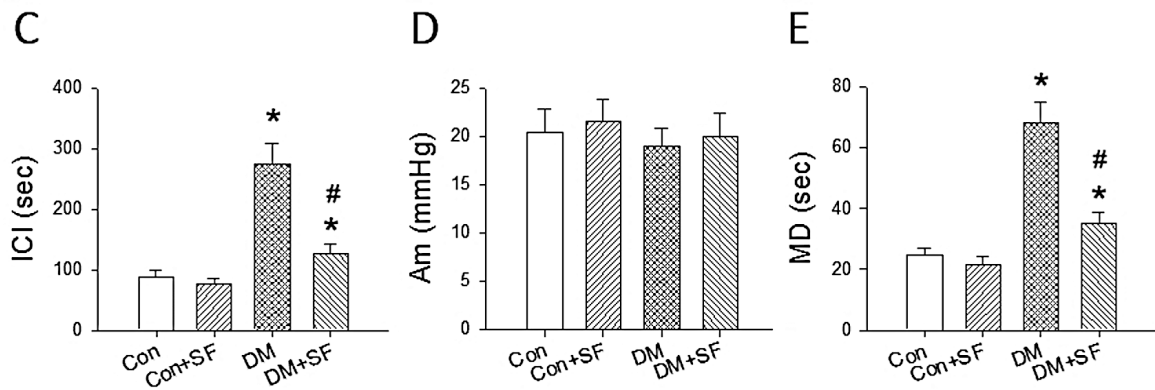


圖 8 (C-E) 蘿蔔硫素對大鼠尿流動力學影響之統計長條圖

顯示這四組的 ICI (C)、Am (D) 和 MD (E) 的統計數據。蘿蔔硫素處理不影響 CON 對照組和 CON+SF 組之間的排空參數。與 CON 對照組相比，DM 組 ICI (圖 8 C) 和 MD (圖 8 E) 水平顯著升高，但對 Am 無明顯影響 (圖 8 D)。與 DM 組相比，蘿蔔硫素處理能顯著降低 DM+SF 組 DM 增長的 ICI 和 MD (圖 8 C 和圖 8 E)。數據表示為：平均值±平均值標準誤差 (mean ± SEM)，每組 6 隻。\*  $p < 0.05$  vs. CON. #  $p < 0.05$  vs. DM.。

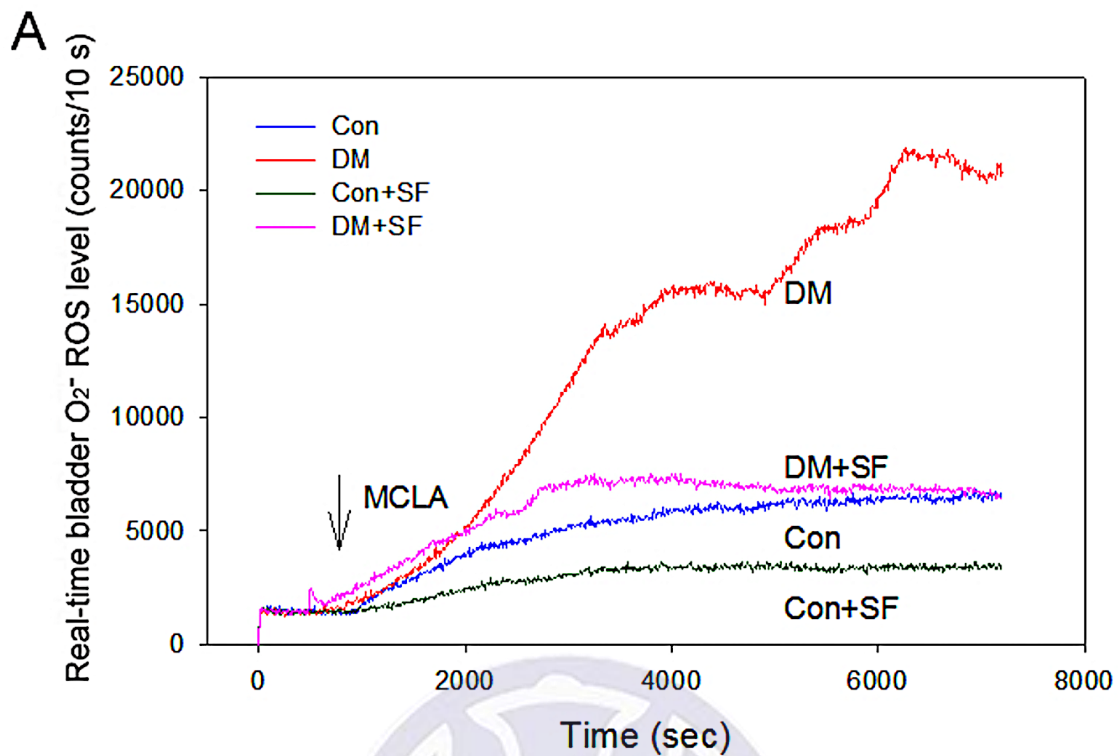


圖 9 (A) 大鼠膀胱超氧陰離子活性氧水準顯示圖

使用 MCLA 增強的化學發光分析儀來評估蘿蔔硫素對 4 組大鼠體內膀胱超氧陰離子活性氧水平的影響。原始曲線顯示各組大鼠膀胱活性氧 (ROS) 在 7200 秒內的即時資料。數據表示為：平均值±平均值標準誤差 (mean ± SEM)，每組 6 隻。\*  $p < 0.05$  vs. CON. #  $p < 0.05$  vs. DM.。

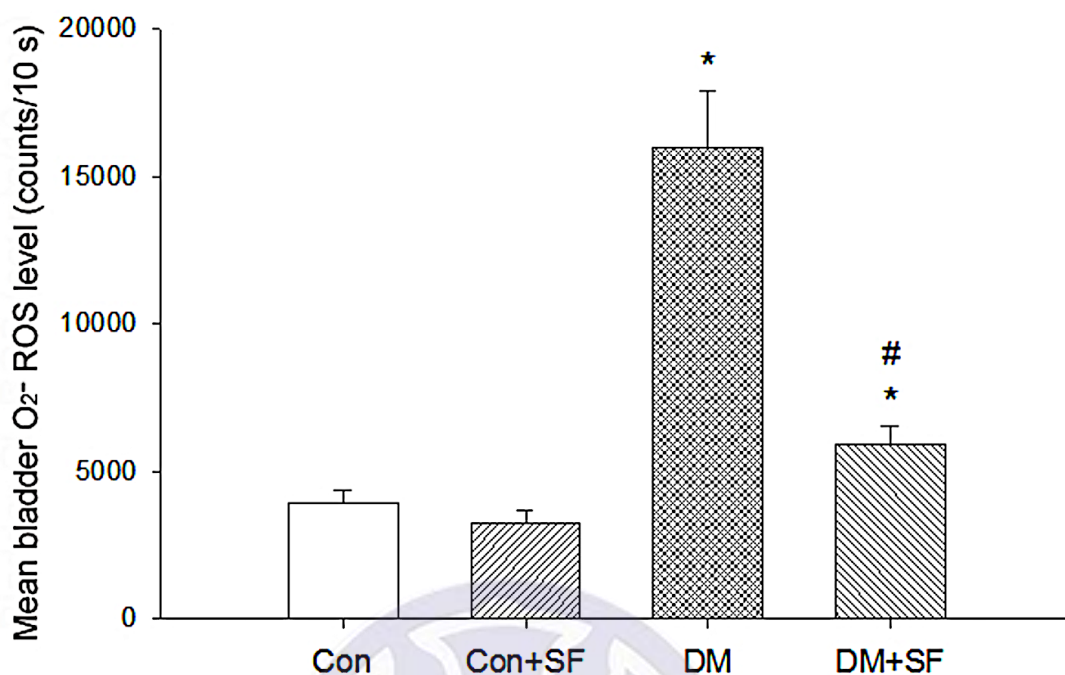
**B**

圖 9 (B) 大鼠膀胱超氧陰離子活性氧水準統計長條圖

與 CON 對照組和 CON+SF 組相比，DM 膀胱中觀察到較高的超氧陰離子活性氧值。此外，DM+SF 組的超氧陰離子活性氧水平明顯低於 DM 組。對照組 (CON)、蘿蔔硫素預先處理對照組 (CON+SF)、糖尿病組 (DM) 和蘿蔔硫素預先處理糖尿病組 (DM+SF)。數據表示為：平均值±平均值標準誤差 (mean±SEM)，每組 6 隻。\* p<0.05 vs. CON. # p<0.05 vs. DM.。

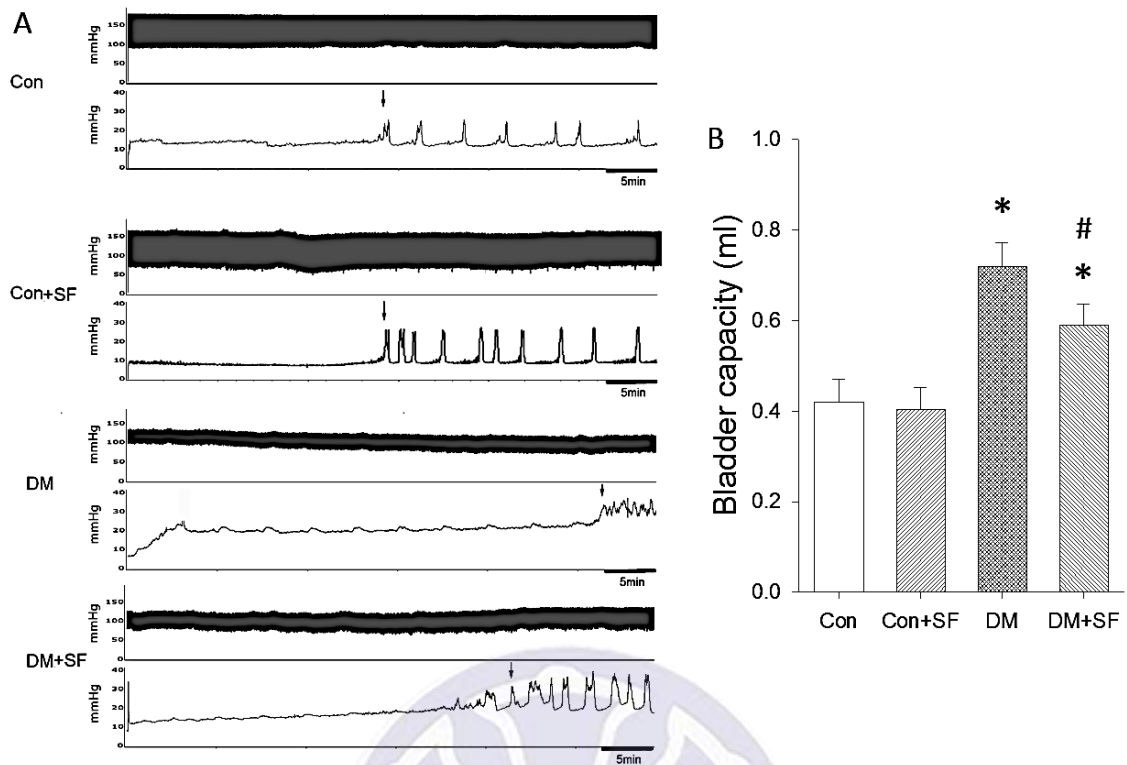


圖 10 大鼠膀胱容量測定原始圖與統計長條圖

顯示四組大鼠膀胱容量測定原始圖 (A)，四組大鼠的膀胱容量統計資料分別為 (B)。數據顯示 CON 對照組和 CON+SF 組的膀胱容量沒有顯著差異。與 CON 對照組大鼠相比，DM 大鼠的膀胱容量顯著增加 (B)。與糖尿病大鼠相比，糖尿病+糖尿病組大鼠的膀胱容量明顯減少。數據表示為：平均值±平均值標準誤差 (mean±SEM)，每組 6 隻。\* p < 0.05 vs. CON. # p < 0.05 vs. DM.。

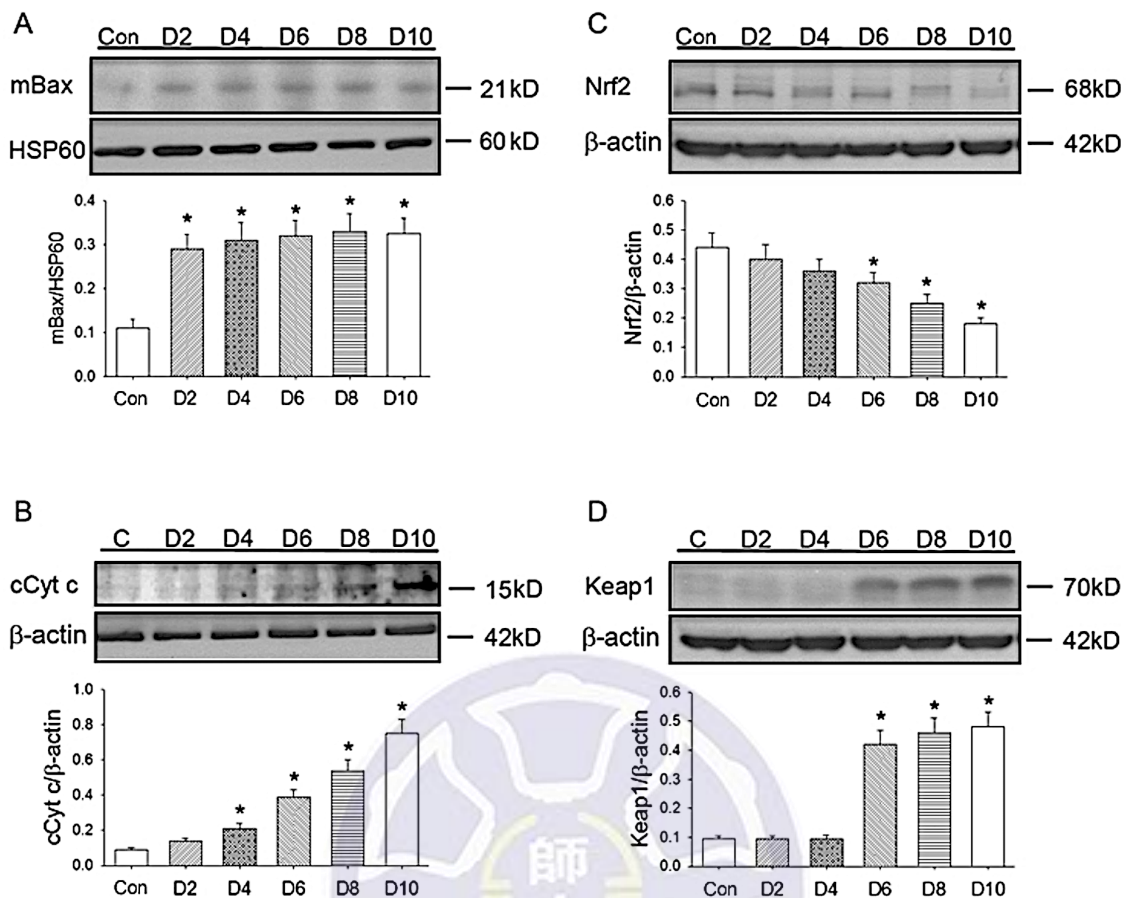


圖 11 (A-D) 糖尿病誘導後不同天數的膀胱蛋白標誌物印跡改變圖

用西方墨點法檢測不同時段 DM 膀胱中，粒線體 Bax (A)、細胞色素 C (B)、全組織 Nrf2 (C)、Keap1 (D) 蛋白表現水平。對照組和 D2-D10 組分別表示糖尿病誘發後第 2、4、6、8、10 天。 $\beta$ -actin 是樣品載量的內部控制。與對照組相比，粒線體 Bax 轉位在誘導 DM 後第 2 天顯著增加 (圖 11 A)。誘導 DM 後第 4 天 Cytosolic 細胞色素 C 釋放量顯著增加 (圖 11 B)。DM 誘導後第 6 天 Nrf2 表現顯著下降 (圖 11 C)，Keap1 表現顯著增加 (圖 11 D)。

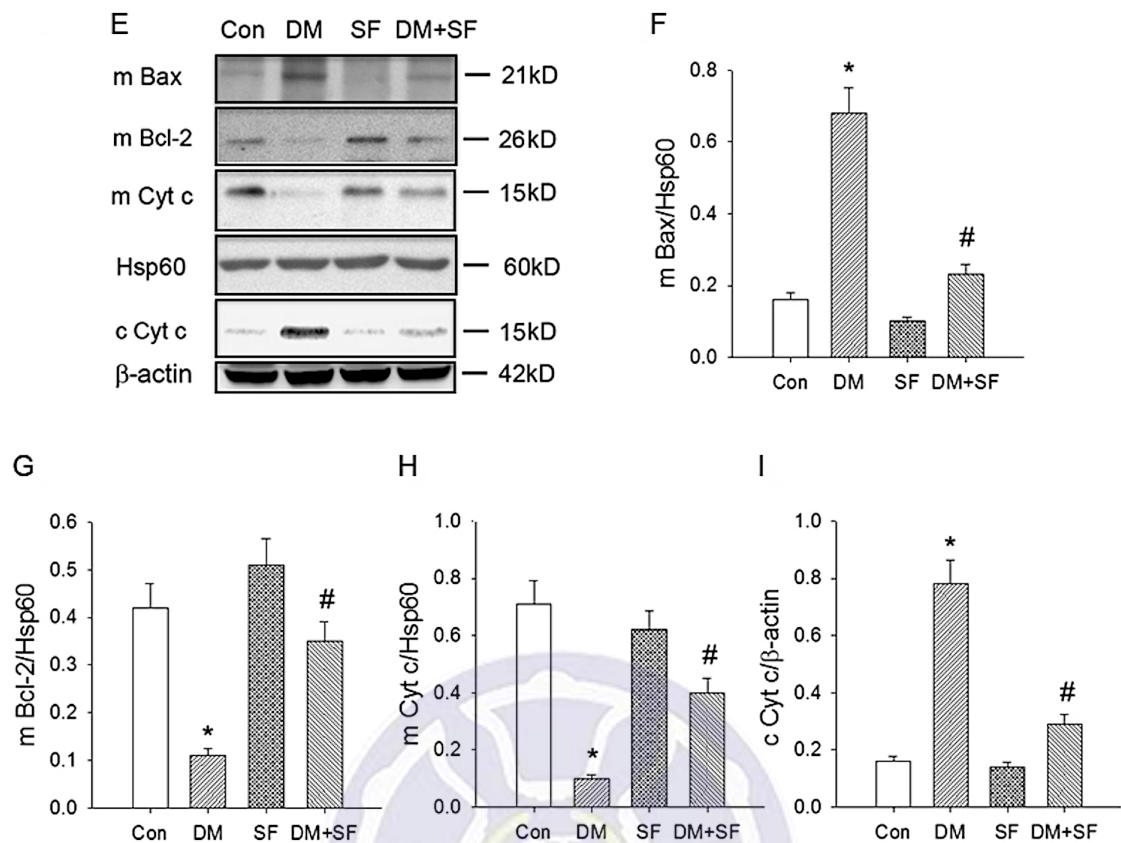


圖 11 (E-I) 蘿蔔硫素影響膀胱蛋白標誌物的原始印跡與統計長條圖

四組分別的數據顯示如圖，膀胱蛋白水平的原始斑點 (E) 和統計數據 mBax/Hsp60 (mBax/HSP60 比值; F)、mBcl-2/β-actin (G)、mCyt c/β-actin(H) 和 cCyt c/β-actin(I)。結果表明，蘿蔔硫素對粒線體 Bax(mBax)、Bcl-2 (mBcl-2)、粒線體細胞色素 C (mCyt c)、細胞色素 C (cCyt c) 和 Hsp60 表現均有影響 (E-I)。數據表明，蘿蔔硫素可部分改善 DM 引起的粒線體功能障礙。數據表示為：平均值±平均值標準誤差 (mean ± SEM)，每組 4 隻。\* p < 0.05 vs. CON. # p < 0.05 vs. CON.。

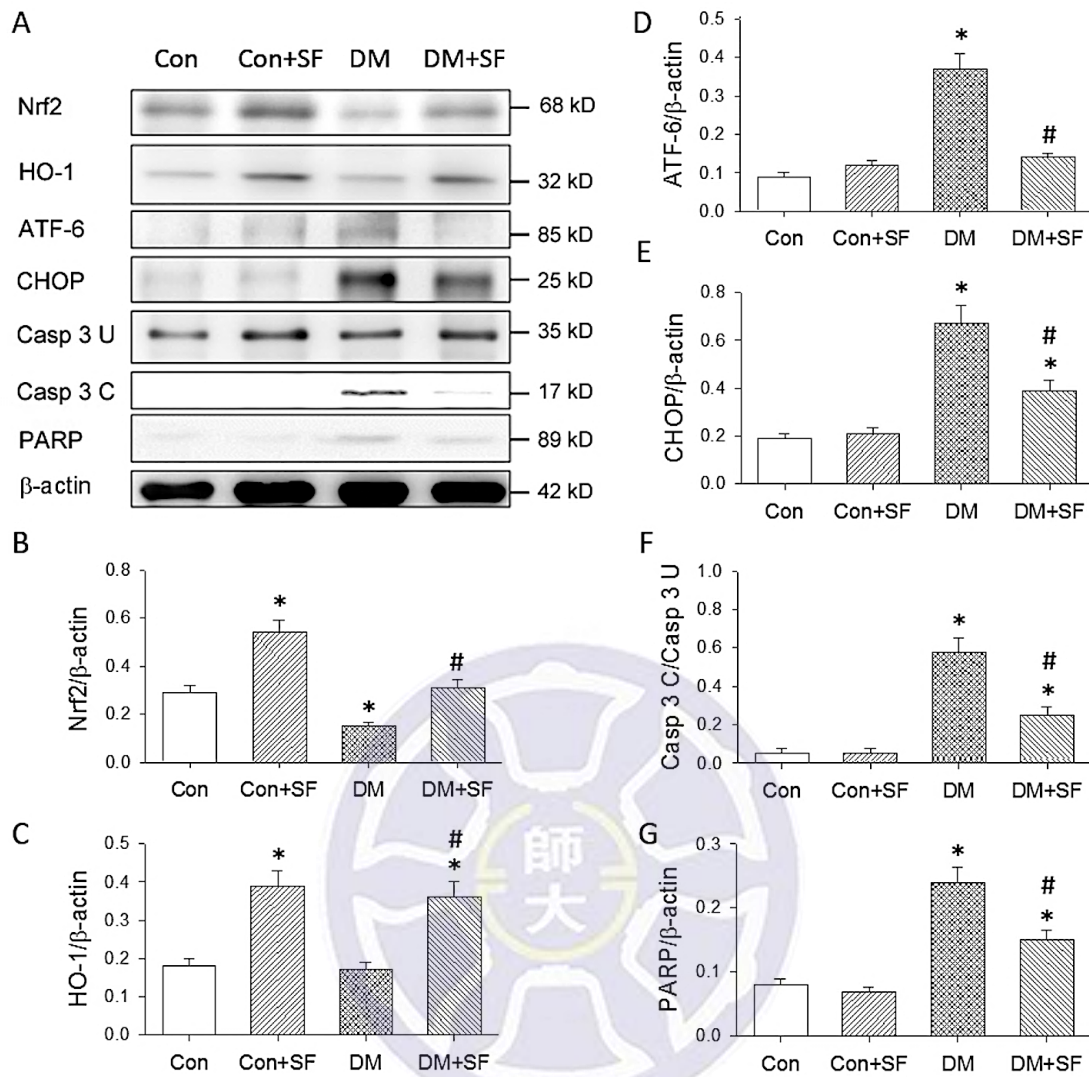


圖 12 (A-G) 蘿蔔硫素影響膀胱蛋白標誌物的原始印跡與統計長條圖

(A) 顯示大鼠的膀胱蛋白初始印跡。與 CON 對照組相比，DM 組 Nrf2/β-actin 比值 (B) 和 HO-1/β-actin 比值 (C) 顯著降低，ER 應激標誌物 ATF-6/β-actin (D) 和 CHOP/β-actin (E) 顯著升高，caspase3 (F) 和 PARP/β-actin 比值(G)顯著升高。蘿蔔硫素能逆轉 DM 誘導的 Nrf2/β-actin 和 HO-1/β-actin 的下降 (B-C) 以及逆轉 DM 誘導的 DM+SF 的 ATF-6 和 CHOP (D-E) 和 casp3c/casp3u 和 PARP/β-actin 上昇 (F-G)。

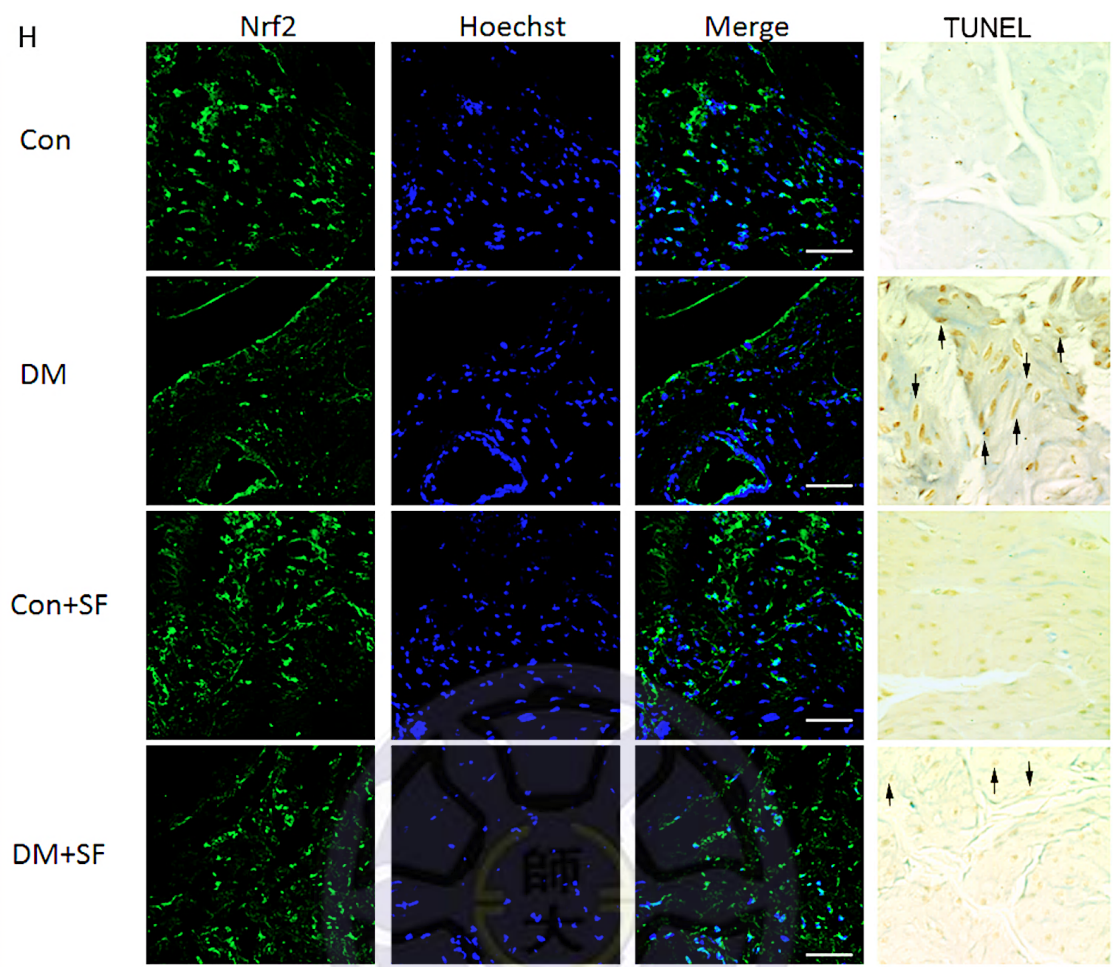


圖 12 (H) 膀胱免疫組織化學染色和 TUNEL 染色圖

我們使用免疫組織化學染色和 TUNEL 染色 (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL)，來測定 4 組大鼠膀胱的平滑肌切片，以評估蘿蔔硫素對細胞凋亡的影響。圖右箭頭指出 TUNEL 染色出的凋亡細胞。

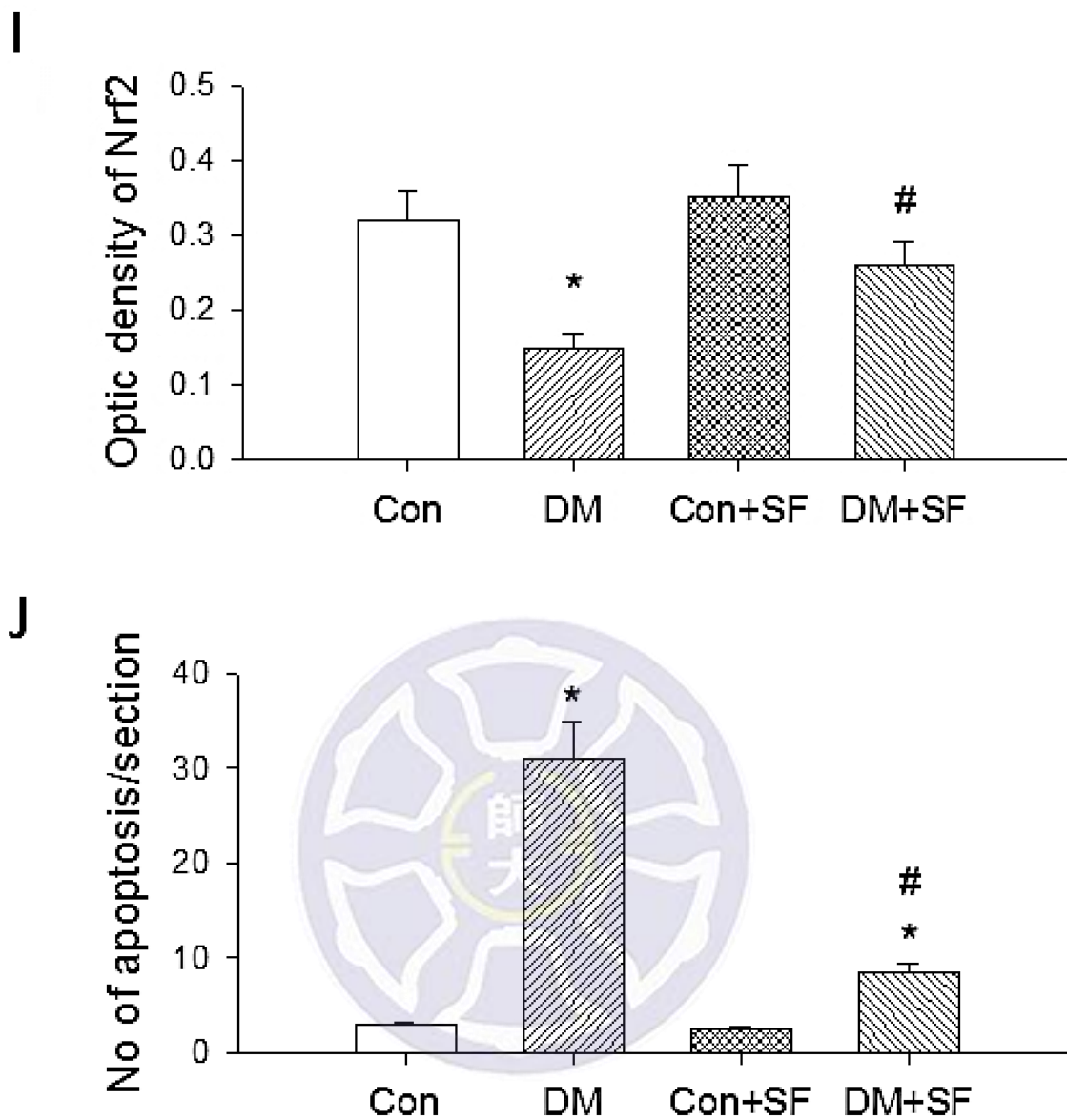


圖 12 (I-J) 膀胱組織染色呈現 Nrf2 密度和凋亡細胞數統計長條圖

統計 Nrf2 密度表現 (I) 和凋亡細胞數 (J)。與 CON 對照膀胱相比，糖尿病膀胱中 Nrf2 的螢光強度顯著降低 (I)、凋亡細胞顯著增加 (J)。蘿蔔硫素可以改善 DM 誘導的 Nrf2 表現下降 (I)，並減少 DM 觸發的凋亡細胞數 (J)。數據表示為：平均值±平均值標準誤差 (mean ± SEM)，每組 4 隻。\* p < 0.05 vs. CON. # p < 0.05 vs. CON.。

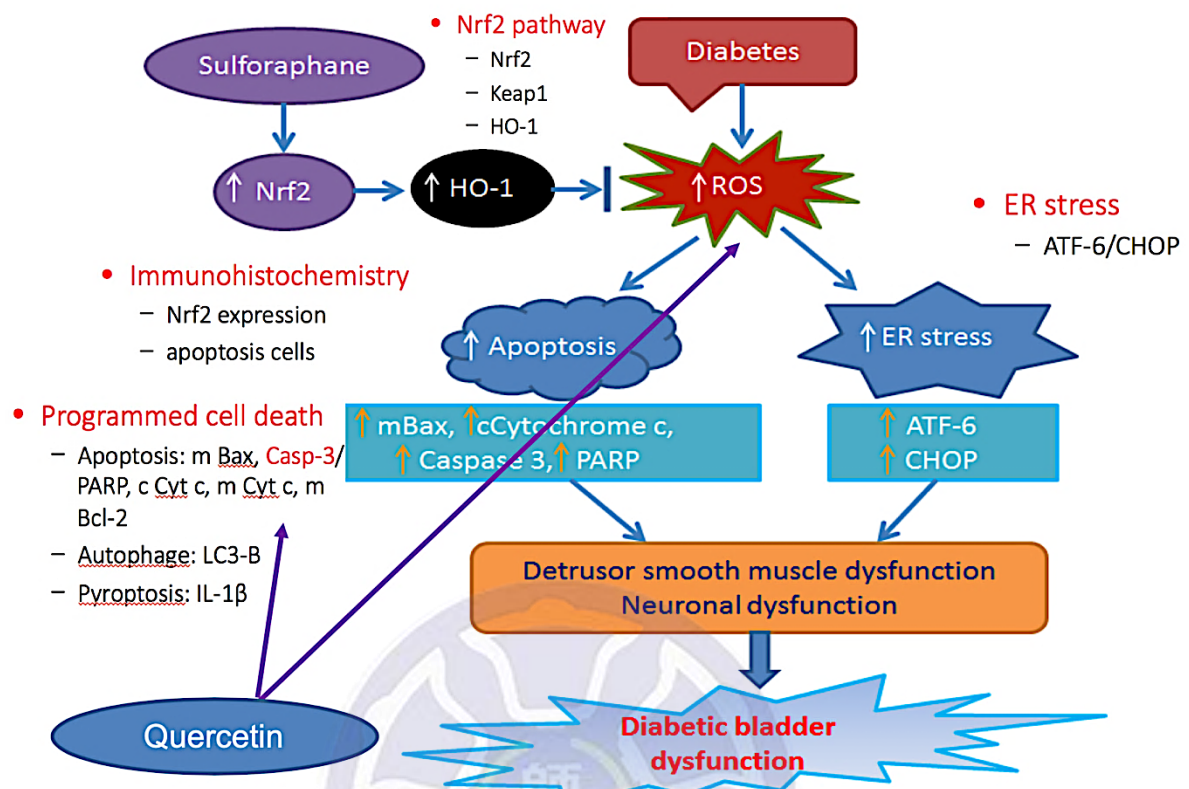


圖 13 槲皮素與蘿蔔硫素機制示意圖

綜合結果論述，番石榴的抗氧化、抗炎和抗糖尿病腎病作用，可能是通過槲皮素的作用來抑制 T2DM 引起的發炎反應和氧化損傷，防止細胞凋亡、細胞自噬和發炎性細胞凋亡，提高腎臟細胞的保護能力。

而蘿蔔硫素可能通過激活 Nrf2、HO-1 介導路徑，抑制 CHOP 介導的內質網壓力，並減少 caspase 3、PARP 介導的細胞凋亡，進而保護了膀胱細胞。

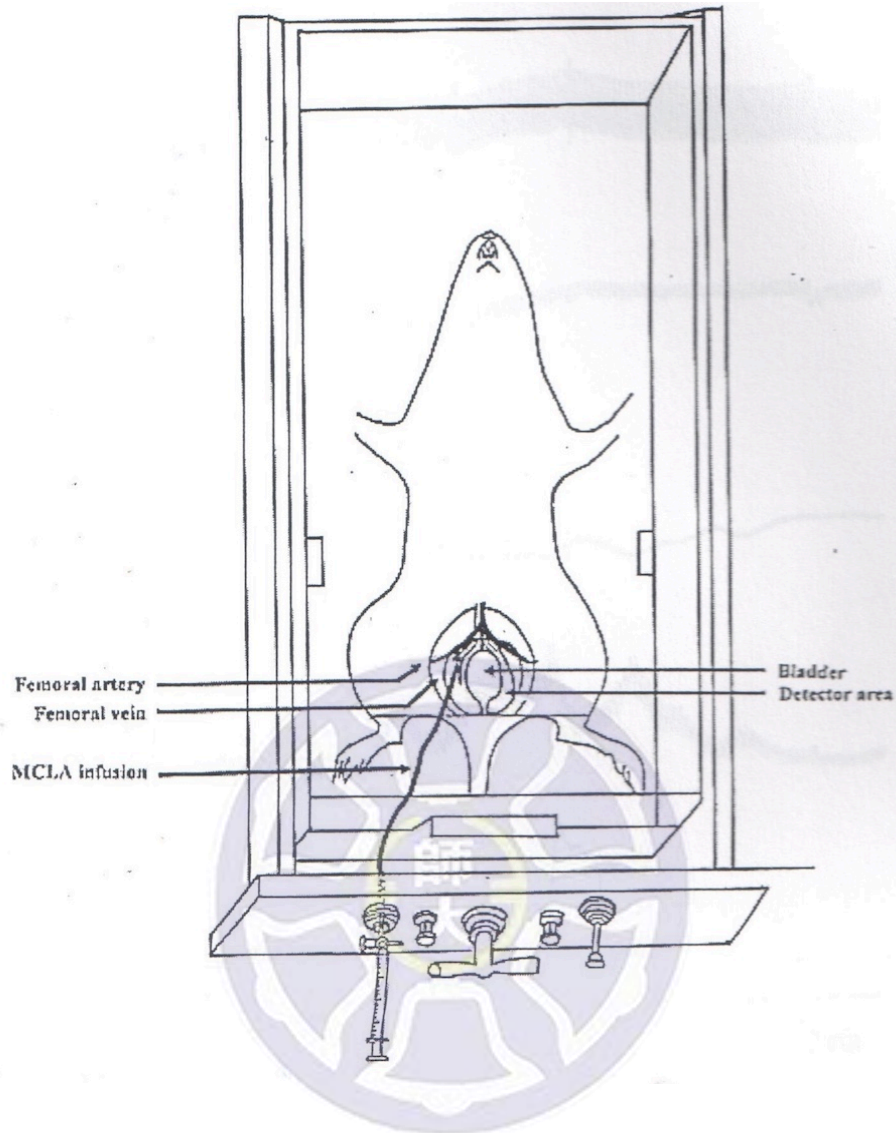


圖 14 經膀胱測量尿流動力學模型 (Transcystometric Model)

大鼠由下腹部縱向開口，將膀胱裸露出來，並作股靜脈插管，並將大鼠放置在測量的暗箱 (dark box) 中。PE-50 導管經由膀胱頂連結 MCLA 輸液泵，並經由 T 管連結壓力傳感器。