

# 中華民國第 65 屆中小學科學展覽會

## 作品說明書

高級中等學校組 農業與食品學科

第三名

052209

牛樟芝萃取物改善糖尿病性視網膜病變——以  
果蠅實驗模型為例

學校名稱： 臺中市立臺中第一高級中等學校

作者：	指導老師：
高二 彭彥翔	張建鴻
高二 楊哲乙	
高二 潘柏鈞	

關鍵詞： 糖尿病性視網膜病變、果蠅、牛樟芝萃取物

## 摘要

糖尿病性視網膜病變(Diabetic Retinopathy，以下簡稱 DR)是糖尿病主要的併發症，是造成後天性失明的主要原因。我國含有高糖的飲品在年輕族群盛行，可能是造成糖尿病罹患率年輕化趨勢的原因，這是我們中學生必須關心與解決的切身問題。本研究發現牛樟芝萃取物在視力功能上能夠改善糖尿病性視網膜病變果蠅的趨光能力與視網膜電位；在視網膜形態學(morphology)上，複眼結構及光感受器排列可被觀察到由凌亂漸趨完整。在粒線體(mitochondrion)與蛋白表現上，能避免粒線體受損，維持粒線體數量和能量代謝，並降低細胞凋亡(apoptosis)相關指標如 cytochrome c 和 cleaved-caspase 3 表達，同時也促進抗氧化因子(antioxidants)如 Catalase 和 SOD1 表達，顯示牛樟芝萃取物具有改善 DR 的潛力。

# 壹、研究動機

## 一、糖尿病性視網膜病變的流行病學

糖尿病性視網膜病變 (Diabetic Retinopathy，以下簡稱 DR) 是造成後天性失明的主要原因(Xu et al., 2018)。DR 是糖尿病主要的併發症，會對視力造成不可逆的傷害，並且與危及生命的全身血管併發症（包括中風、冠狀動脈疾病和心臟衰竭）的風險增加有關(Cheung et al., 2010)。DR 在長期糖尿病患者中，可能有 60% - 80% 的患者會引發視網膜病變，20 年以上的糖尿病罹患者中，約有 5% - 10% 可能會失明(Kohner & Oakley, 1975)。DR 已是全球性的公共衛生議題，對個人造成嚴重的健康影響、對醫療與社會造成負面的經濟影響(Sivaprasad et al., 2012)。以年齡層區分當中，DR 尤其影響 40 - 59 歲的「中年」族群，但在年輕型病發的第 1 型糖尿病和第 2 型糖尿病患者中，黃斑部水腫 (DME) 和增殖性糖尿病性視網膜病變 (PDR) 盛行率分別達到驚人的 62.5% / 65.8%、10% / 12.7% 及 7.3% / 9.3%，甚至超過半數的年輕型糖尿病患者在罹患糖尿病後 10 - 12 年內，會併發視網膜病變(Rajalakshmi et al., 2014; Standl et al., 2019)。台灣第 2 型糖尿病人口高達 230 萬人，並已有年輕化趨勢。中華民國糖尿病衛教學會今公布最新統計發現，2000 年至 2014 年全台第 2 型糖尿病患者人數上升約 2.6 倍。我國含有高糖的飲品盛行，糖尿病罹患率有年輕化趨勢，顯示年輕族群在控制血糖以預防 DR 的必要性，也成為我們中學生必須關切與解決的切身問題。

DR 的發生來自高血糖誘發影響視網膜的病理機制，包括遺傳和表觀遺傳因素、並在體內發現增加自由基 (Free Radical)、晚期糖化終產物 (Advanced glycation end products, AGEs)、發炎因子 (inflammatory factors) 和血管內皮生長因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 等因子的產生(Kowluru et al., 2015; Wu et al., 2018)。早期的視網膜病變特徵包含微動脈瘤 (microaneurysms)、斑點狀出血 (ecchymosis)、微血管滲漏而產生的局部水腫，或在視網膜神經纖維層 (retinal nerve fiber layer, RNFL) 留下硬脂蛋白沉積物(Lechner et al., 2017)。不過，從研究文獻顯示，粒線體功能的缺失導致氧化壓力上升，以及視網膜神經細胞凋亡 (Apoptosis)，是 DR 發病機制中最重要的一環(Kowluru et al., 2015; Wu et al., 2018)，而「氧化壓力 (oxidative stress) / 粒線體功能障礙 (mitochondrial defect) / 細胞凋亡」，也較所觀察到的「病理學特徵」先發生(Kowluru, 2020)。其中，氧化壓力來源於高血糖誘導的粒線體超氧化物過量產生(Brownlee, 2005)，當血液持續轉運高血糖的狀態下，會損害視網膜粒線體，粒線體因為部分結晶溶解而腫脹導致內膜受損，細胞色素 c (cytochrome c) 進而洩漏到細胞質內，導致粒線體膜電位 (Mitochondria membrane potential) 發生改變(Sorour et al., 2023)。從死後人類視網膜的組織學切片進行的研究顯示，糖尿病增加了神經

元的凋亡，特別是在視網膜神經節細胞所在的視網膜內層(Salkar et al., 2024)。神經元無法增殖，因此這些細胞的凋亡造成了不可逆的功能損失，導致神經退化。目前，DR 相關的治療方法存在兩大問題，分別是治療效果的侷限性與所產生的後遺症。抗血管內皮生長因子（Anti-vascular endothelial growth factor）治療(Sorour et al., 2023)雖能改善黃斑水腫（Macular edema），但藥物效果的持續時間短，需要頻繁注射，在已有視網膜纖維化的情況下可能導致牽引性視網膜剝離（tractional retinal detachment）(Osaadon et al., 2014)；對於增殖性糖尿病性視網膜病變患者來說，視網膜雷射光凝術（Pan-retinal Photocoagulation）(Lock & Fong, 2010)是主要的治療方法，但由於採取組織破壞性的手術方式，可能對視網膜周遭組織造成傷害；以及，反覆和長期玻璃體內注射（intravitreal injection）給醫療健保系統、患者和醫療人員帶來沉重的負擔，也可能承擔重大的風險(Kim & D'Amore, 2012)。因此，尋找安全的方法與藥物治療 DR 漸漸成為醫學研究的一個方向，天然成分藥物的選擇，可以減少治療導致的視網膜副作用(Huang et al., 2010)。

## 二、牛樟芝萃取物對於糖尿病性視網膜病變研究可行性

醫學研究上，天然物的成分因具有豐富的化學物質和較低的副作用，被認為是具有治療視網膜病變潛力的藥物，像是靈芝等蕈菇類、薑黃素、異甘草素等天然物皆被證實具有治療的潛力(Tsay et al., 2021)。牛樟芝屬蕈菇類為臺灣特有種真菌，已被證實具有多種生物活性，如降血糖、保肝、抗腫瘤、抗發炎、抗病毒、和免疫調節等活性(Kuang et al., 2022; Kuang et al., 2021; Kuo et al., 2015; Lin et al., 2019)。牛樟芝（*Antrodia cinnamomea*）是擔子菌門、多孔菌科。它只生長在牛樟（*Cinnamomum kanehirai Hayata*）的樹幹上(Kuang et al., 2022; Kuang et al., 2021)。研究指出，牛樟芝在高葡萄糖誘導的 HUVEC 細胞系中表現出顯著的 ROS 清除活性（63.9% - 70.5%）(Huang et al., 2010)。在神經保護研究方面，牛樟芝萃取物在乙型類澱粉樣蛋白（ $\beta$ -amyloid peptide 40，以下簡稱 A $\beta$  40）處理的 PC-12 神經細胞中顯示出顯著的神經保護活性(Chen & Read, 2019)，也可以改善 A $\beta$  40 誘導的阿茲海默症（Alzheimer's disease）模型大鼠的記憶和學習能力，並增加了海馬迴中 Nrf2 的表達並減少了組蛋白去乙醯化酶 2 (HDAC2) 的表達。更重要的是，研究顯示牛樟芝具有抗糖尿病作用(Halder et al., 1995; Venken & Bellen, 2005)；此外，在經誘導的糖尿病小鼠抗發炎反應實驗中，也證實了牛樟芝有助於高血糖引起的糖尿病傷口（Diabetic foot ulcer）的傷口改善(Wu & Chen, 2016)。惟其對於糖尿病性視網膜病變的治療效果仍未被研究，因此我們選定牛樟芝作為研究的目標。

## 三、果蠅在糖尿病性視網膜病變研究模型

果蠅的視覺傳導與哺乳類動物在感光的視網膜神經節細胞中的相關反應特別相似，

常用於探討視力方面的疾病與基因間的相關性(Shieh, 2011)。自 20 世紀起，果蠅已被廣泛被認為是一種可靠的遺傳法則及神經科學研究工具，相較於其他實驗模型，果蠅有著明顯的優勢。果蠅的生命週期為 56 - 58 天，幼蟲僅需 10 天孵化為成蟲，短時間內以數百倍的放大數量繁殖(Kitani-Morii et al., 2021)，進行基因或藥物研究行為相對可行。已有研究指出，75% 的人類致病基因與果蠅有同源性(Chen & Read, 2019)，透過基因靶向 (gene targeting) 技術，能夠將人類的致病基因表達在果蠅的序列上，進行藥物開發研究(Halder et al., 1995; Venken & Bellen, 2005)。帶有人類致病基因的黑腹果蠅模型具有多種優勢，例如遺傳研究、高度保守 (conservative) 的疾病途徑和相對低的實驗成本(Pandey & Nichols, 2011)，可以有效地用於篩選藥物，廣泛用於研究癌症、腦神經退化、代謝等相關疾病的治療方法(Yamaguchi et al., 2021)。在我們的研究中， $w^{1118}$  黑腹果蠅為野生型， $w^{1118}; P\{w[+mC]=GMR-InR.A1325D\}3^*$  為轉基因果蠅，是以  $w^{1118}$  此果蠅的基因進行修改，修改方式是在視網膜基因座 1325 的位置上把 A 換成 D (A 是 Alanine, D 是 Aspartic acid)(Longo et al., 1992a)，果蠅視網膜中的胰島素受體 (Insulin receptor, InR) 會過度表現 (over expression)，讓視網膜中轉運過多葡萄糖，模擬糖尿病性視網膜病變的情況。

綜合上述，本研究目標為探索牛樟芝萃取物對於糖尿病性視網膜病變的治療效果，因此我們選定以果蠅試驗作為研究的模式。本研究在了解牛樟芝萃取物對糖尿病的治療基礎下，我們近一步探討牛樟芝萃取物改善 DR 的形態學、基因與蛋白相關表現。

\*註：*GMR* (*Glass Multiple Reporter*) 啟動子：這是一種在果蠅眼睛發育中高度表達的啟動子，通常用來驅動基因表達於眼睛組織。

\* $P\{...\}$ ：表示這是一個  $P$  元件 ( $P$ -element) 插入的轉基因構造。

\*  $w[+mC]$ ：這表示該  $P$  元件攜帶了一個功能性 *white* ( $w^+$ ) 基因，通常用來作為標記，使轉基因果蠅的眼睛變紅色，以便於篩選攜帶插入的個體。

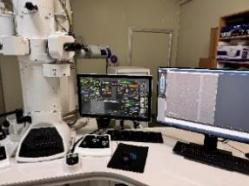
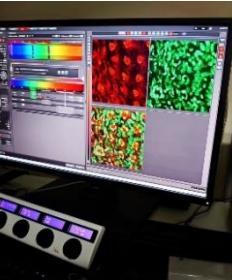
## 貳、 研究目的

本研究目的以果蠅試驗作為研究，探討牛樟芝萃取物改善糖尿病性視網膜病變果蠅的視力功能、顯微形態學、粒線體相關與蛋白相關表現。其觀察研究如下。

- 一、觀察牛樟芝萃取物對果蠅對光刺激的視力 (vision) 改善情況。
- 二、觀察牛樟芝萃取物對果蠅複眼外部形態學改善情況。
- 三、觀察牛樟芝萃取物對果蠅光感受器 (Photoreceptor) 改善情況。
- 四、以生理及分子機制探討牛樟芝萃取物對果蠅的神經保護作用。
- 五、探討牛樟芝萃取物對果蠅視網膜細胞粒線體功能、數量、外觀改善。
- 六、探討服用牛樟芝萃取物之果蠅抗氧化 (anti-oxidation) 及抗凋亡 (anti-apoptosis) 情形。

## 參、 研究設備及器材

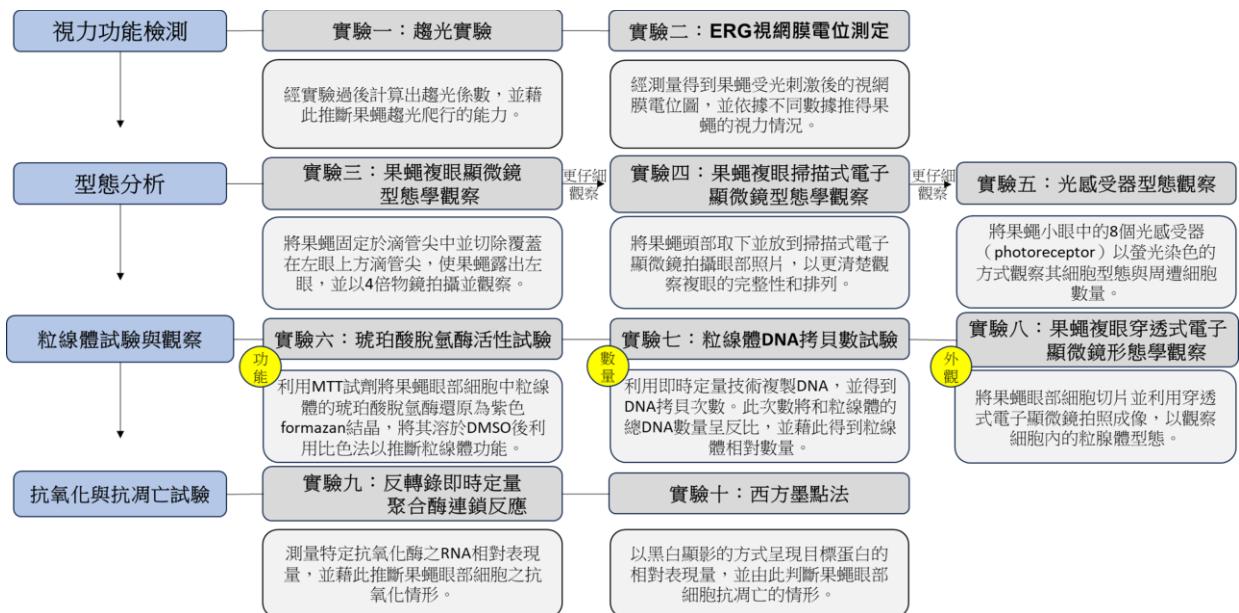
一、研究設備：

			
Phototaxis Analyzer	SUTTER P-2000 / P97 & Narishige PC-10	Voltage Patch Clamp Amplifier (GeneClamp 500)	場發射掃描式電子 顯微鏡 (JEOL JSM- 6700F)
			
Olympus BX41	雷射掃描共軛焦分 光光譜顯微鏡 Leica SP8 (Confocal Spectral Microscope)	Applied Biosystems StepOnePlus Real- Time PCR System	Applied Biosystems Thermal Cycler Real- Time PCR System
			
Hoefer SE206 electrophoresis	JEOL JEM-1400 (FLASH)	GE ImageQuant LAS 4000 Mini	AX26 Delta Range Compartment
	BioTech Microplate reader (EPOCH2)		

表一、研究設備

## 肆、研究過程與方法

### 一、實驗架構與流程



圖一、研究流程示意圖（出處詳圖片來源 1）

圖一：本研究之實驗架構與流程。本研究以兩種視覺功能分析，評估牛樟芝萃取物對果蠅視力改善的情況，進一步觀察果蠅複眼形態及眼部細胞粒線體的情況，最後再進行細胞抗氧化、抗凋亡情形的試驗，確定牛樟芝萃取物對改善果蠅視力具有功效。

### 二、果蠅養育方法與藥物劑量測試

#### (一) 實驗材料：

1. 藥物與溶劑：牛樟芝萃取物 (*Antrodia cinnamomea*, 以下簡稱 AC) 、二甲基亞礦 (Dimethyl sulfoxide, 以下簡稱 DMSO)
2. 果蠅培養基：酵母粉、白糖、玉米粉、葡萄糖、洋菜膠
3. 其他溶液：KCl (3M) 、丙酸、磷酸、酒精、對羥基苯甲酸甲酯

#### (二) 野生型與基因轉殖果蠅株：

1. 對照組： $w^{1118}$
2. 實驗組： $w^{1118};P\{GMR-InR.A1325D\}3$  (以下簡稱 InR-mutant)
3. 培養：以製備 1 L 的果蠅食物為例，秤取原料：洋菜膠粉 10.52 g，葡萄糖 55.26 g，白糖 27.57 g，玉米粉 47.85 g，酵母粉 63.16 g。先加入適量一次水混合均勻，再加水至 1.2 L，並微波 3 次 3 分鐘、2 次 5 分鐘及 1 次 2 分鐘，中途充分攪拌均勻使食物裡的水分蒸發至 1 L 後，讓食物緩緩降溫至 65°C。降溫時，配置兩種試劑，配方如下表：

- (1) 一號試劑(取其中的 10.63 mL)含丙酸 418 mL、85% 磷酸 41.5 mL、水 540.5 mL。
- (2) 二號試劑 (取其中的 13.16 mL) 對羥基苯甲酸甲酯 200 g 加酒精至 1 L。

加入這兩種試劑便可讓食物具有防黴抗菌的效果。之後充分攪拌，即可倒入培養管中。若要製備含藥物的食物，則需再倒入培養管之前加入藥物充分攪拌。靜置一天，等待凝固後，包裝並放入冰箱儲存。

### (三) 果蠅品系的培養 (Drosophila culture)

每種基因型的果蠅分別放入不同培養管或培養皿中，並至於恆溫 25°C 之培養箱中。10 - 12 天換管一次，成齡 3 天內的果蠅產卵數量較多，因此，可將第 0 天齡的果蠅放入培養管後，每 3 天轉管一次，產生兩批以 3 天為間隔單位的子代，此繼代方法用於大放果蠅數量時使用。一般培養在轉管後丟棄舊管，放大數量時則需留下舊管。視情況可添加酵母粉、次氯酸、棉花、衛生紙等，達到防霉、防菌與防潮的效果。

### (四) 不同培養基中，AC 的劑量調配：

實驗組與對照組	牛樟芝萃取物於培養基中的濃度
w <sup>1118</sup>	0.5% DMSO
InR-mutant	0.5% DMSO
InR-mutant + AC 250 mg/L	AC 於培養基中含量 250 mg/L，0.5% DMSO 作為溶劑
InR-mutant + AC 1000 mg/L	AC 於培養基中含量 1000 mg/L，0.5% DMSO 作為溶劑

表二、不同培養基中，AC 的劑量調配

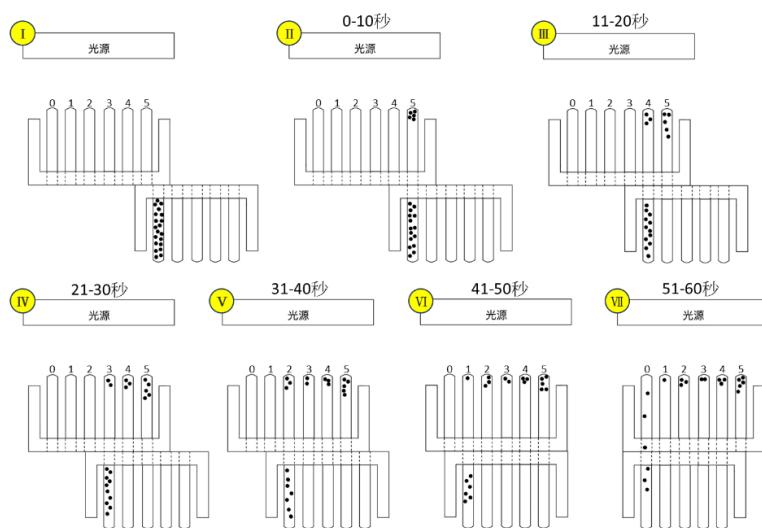
## 三、實驗方法

### (一) 果蠅趨光測定 (phototaxis assay) (Steymans et al., 2021) :

1. 原理：果蠅受到光刺激後向光源移動，展現趨光性(Gorostiza et al., 2016; Hadler, 1964)。果蠅在適應黑暗環境後，接受光脈衝可作為一種刺激，透過視神經的訊息傳遞，因而在實驗中觀察到果蠅趨近光源的行為。果蠅的「光刺激/行為」機制，廣泛用於研究神經功能性、運動（掙扎、爬行、飛行）與神經及行為的可塑性(Qiu et al., 2016)。因此，希望透過果蠅趨光性的表現，佐證藥物對果蠅視力功能的改善。
2. 實驗步驟：
  - (1) 準備 w<sup>1118</sup>、InR-mutant、InR-mutant + AC 250 mg/L、InR-mutant + AC 1000 mg/L 四組果蠅各 40 隻。
  - (2) 將實驗果蠅放置於暗室 1 小時（黑暗環境適應）。
  - (3) 暗室內，轉移果蠅至爬行試管中（果蠅在黑暗環境下爬行能力差）。
  - (4) 打開前方燈源後，滑動試管裝置（圖二 A），果蠅眼部接收光訊號後向前爬行。

- (5) 以 10 秒為週期滑動試管裝置（圖二 B），共六組試管，單次實驗時間總計 50 秒。
- (6) 記錄六組試管內各自的果蠅數量後（圖二 C），將果蠅轉回培養皿中。
- (7) 計算趨光係數：

五組試管的加權分數分別為 5 分 - 0 分。果蠅在感受到光源後，若直接爬入光源方向的試管內，顯示其眼睛功能可能較好，因此加權分數為 5 分。實驗結束時，若果蠅在 50 秒內都未向光源方向趨近，顯示其眼睛可能最差，因此加權分數為 0 分。五組試管內果蠅隻數加權後的和，再除以實驗果蠅總隻數後，我們定義為趨光係數。一般而言，趨光係數越大，果蠅眼睛越好。



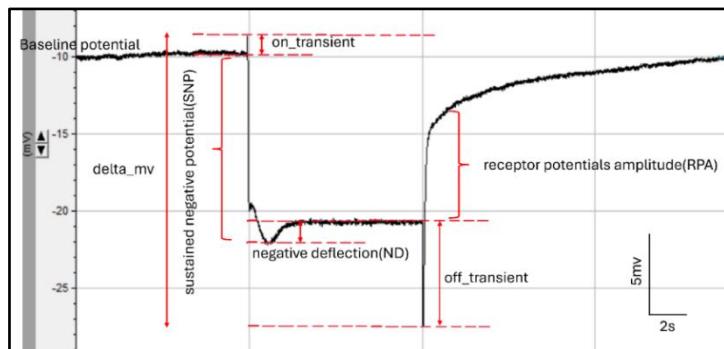
圖二、趨光試驗流程圖（出處詳圖片來源 2）

圖二：打開燈源（I）；每 10 秒滑動試管裝置，至 60 秒結束，加權計算趨光係數（II - VII）。

## （二）果蠅視網膜電位圖（Electroretinogram，以下簡稱 ERG）

視網膜電位測定是一種廣泛用於果蠅光傳導的體內電生理研究，測定神經纖維層中的光感受器和神經元，受光刺激後所產生的電位反應(Wu et al., 2022)。目前也廣泛運用 ERG 在測定人類視力退化與視覺神經電位傳導的關係(Gupta et al., 2022)。ERG 主要的組成包含：(1)細胞外記錄的光感受器電位(2)光脈衝開始和結束時的「開」和「關」瞬間變化(3)光適應後神經膠質細胞的緩慢反應。

### 1. 數值代稱與意義：



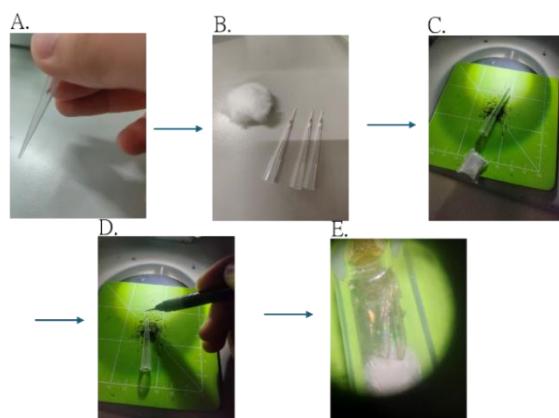
圖三、果蠅視網膜電位圖譜（出處詳圖片來源 3）

圖三：果蠅的 ERG 數值記錄中包含了六種元素：

- (1) On transient：椎板神經元 L1 (lamina neurons, L1) (Joesch et al., 2010)的過極化。
- (2) SNP: 持續的角膜負電位(Moehlman et al., 2018)，即為視網膜光感受器的去極化。
- (3) RPA: 所有光感受器對光產生持續到刺激結束的去極化電位(Pak et al., 1969)。
- (4) ND：在 SNP 後更加去極化的角膜負電位。
- (5) Off transient：椎板神經元 L2 (lamina neurons, L2) (Joesch et al., 2010)的再極化。
- (6) Delta mV：總電位差。

## 2. 實驗步驟：

- (1) 兩組電極分別插入電極支架中。
- (2) 將硼矽酸鹽玻璃（borosilicate glass）放入玻璃微電極拉製器（SUTTER P-2000 / P97 & Narishige PC-10），設置適合的參數後（影響加熱時間）完成拉針。
- (3) 細長尖端的注射器內裝有 KCl(3M)溶液，探針內大約注入 2/3 滿。
- (4) 手指輕彈探針的前端，減少氣泡殘留。
- (5) 使用三用電表檢測探針，電阻值需落在 1.2 - 1.8 MΩ 區間。
- (6) 探針與電極接合（電極需浸泡在 KCl 中）。
- (7) 製備果蠅滴管尖（圖四）：



圖四、果蠅滴管尖製作流程圖（出處詳圖片來源 4）

圖四：(A) 讓果蠅爬入透明滴管尖中；(B 與 C) 輕輕地以棉花塞緊固定；(D 與 E) 以筆刀消除覆蓋在頭部上方的滴管尖，使果蠅露出腦殼及左眼。

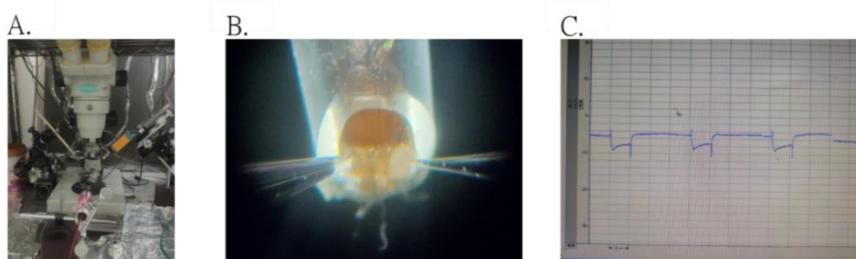
(8) 將滴管尖放置於顯微鏡下，並以黏土固定。

(9) 操作顯微鏡（圖五）：

左探針從三顆單眼中間插入腦殼，右探針輕抵果蠅左眼。打開燈源，對果蠅施予 2 秒的光脈衝，接著是 6 秒的黑暗，持續 7 個週期。

(10) GeneClamp 500 記錄 ERG 與統計分析（圖五）：

使用 Axoscope 軟體錄製波形、數據，使用 Excel 公式計算六種元素的數值，再利用 SigmaPlot 10.0 繪製長條圖與統計分析 p 值（p value）。



圖五、ERG 測定儀操作及記錄 ERG（出處詳圖片來源 5）

圖五：(A) 視網膜電位測定儀；(B) ERG 探針固定；(C) 記錄 ERG 與統計分析。

### (三) 以光學顯微鏡觀察果蠅眼部

1. 原理：果蠅的眼部外觀，如細胞排列及眼部大小，有時也能作為突變種的標誌，或者功能的強弱指標。透過眼部外觀放大拍攝，希望能夠看出顯著差異。

2. 實驗步驟：

- (1) 讓果蠅爬入透明滴管尖中並輕輕地以棉花塞緊固定，以筆刀削除覆蓋在左眼上方滴管尖，使果蠅露出左眼。
- (2) 將光學顯微鏡（Olympus BX41）的環形燈套上 4 倍的物鏡，並將滴管尖固定在載玻片上，調整角度，方便拍攝。
- (3) 以 Pylon Viewer 軟體拍攝果蠅眼部，並調整解析度、亮度、對比度等，使眼部表面排列清晰呈現。

### (四) 以掃描式電子顯微鏡 SEM 量測果蠅眼部

1. 原理：利用熱游離（thermal ionization）放出電子，電磁線圈控制電子方向，朝試片方向射出電子束。電子束觸碰觀測物後，反彈出背向散射電子（back-scattered electron）和二次電子（secondary electron）兩種電子，經電子接收器感應電子多寡後成像。

2. 實驗步驟：

- (1) 以 CO<sub>2</sub> 麻醉果蠅，置於 3.7% paraformaldehyde 於 4°C 隔夜固定。
- (2) 以 1% osmium tetroxide 於通風櫃中室溫浸泡 1 小時。
- (3) 以 30% 酒精溶液清洗組織標本，並進行酒精梯度脫水處理( 10%, 30%, 50%, 70%, 85%, 95%, 100%，每次間隔 30 分鐘）。
- (4) 樣本經臨界點乾燥處理 (C.P.D) ，並在真空環境鍍金 3 - 4 分鐘。
- (5) 以場發射掃描式電子顯微鏡 (JEOL JSM-6700F) 於 20 kV 及 700 X 下觀察並拍攝照片。

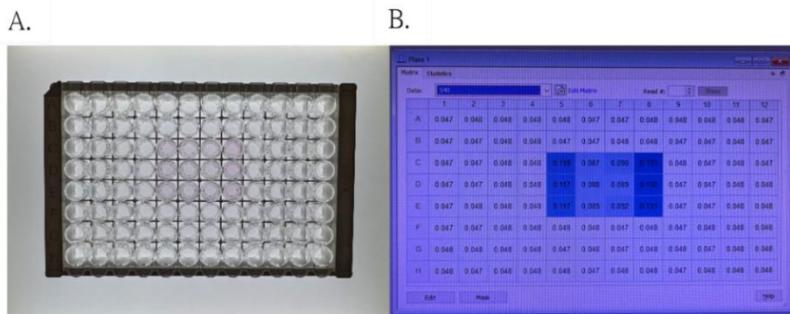
#### (五) 果蠅光感受器觀察(Gambis et al., 2011)

1. 原理：果蠅的每個小眼中含有 8 個光感受器，藉由螢光染色將其與其他細胞區別開，希望藉由觀察其排列和細胞外觀，發現出顯著差異。
2. 實驗步驟(Gambis et al., 2011; Pichaud & Desplan, 2001)：
  - (1) 以 CO<sub>2</sub> 麻醉果蠅，置於磷酸鹽緩衝生理鹽水中。
  - (2) 利用精密鑷子與血管剪取下果蠅的視網膜組織，並挑除果蠅的角膜，並於 3.7% paraformaldehyde 於 4°C 隔夜固定。
  - (3) 以山羊血清 (goat serum) 對果蠅視網膜進行封閉，並以磷酸鹽緩衝生理鹽水清洗後加入一級抗體 (Lamin Dm0) 於 4°C 放置過夜。
  - (4) 24 小時後在避光環境下加入二級抗體。
  - (5) 1 小時後以磷酸鹽緩衝生理鹽水清洗，並加入 phalloidin 螢光染劑，將果蠅光感受器進行染色。
  - (6) 1 小時後以雷射掃描共軛焦分光光譜顯微鏡 Leica SP8 (Confocal Spectral Microscope) (488 nm / 561 nm) 拍攝視網膜切片成像。
  - (7) 藉螢光訊號分布觀察果蠅光感受器的狀況。

#### (六) 琥珀酸脫氫酶活性試驗

1. 原理：MTT 試劑〔全名是 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide，一種黃色、接受氫離子的化合物〕，被細胞內活粒線體中的琥珀酸脫氫酶 (Succinate dehydrogenase) 還原，形成紫色 formazan 結晶（結晶量與果蠅視網膜內活粒線體數量呈正比），經 DMSO 溶劑溶解後，使用比色法及測定吸光值 540 nm 的結果，比較細胞內活粒線體的相對表現量。
2. 實驗步驟：
  - (1) 冷凍處理後，以 1X PBS 清洗果蠅視網膜，轉移至微量離心管。
  - (2) 向每個樣本中加入 MTT (0.5 mg/mL in PBS)，37 °C 放置 3 - 4 小時，直到形成紫色 formazan 結晶。

- (3) 1X PBS 輕微清洗，去除未被還原的 MTT。
- (4) 以 DMSO 充分溶解 formazan (圖六 A)。
- (5) 使用 BioTech Microplate reader (EPOCH2) 測定吸光度，設置波長為 540 nm，記錄每個樣本的吸光度值 (圖六 B)。
- (6) 吸光度數據反映各組粒線體相對活性。



圖六：(A) DMSO 溶解 formazan 及 (B) 吸光度值分析 (出處詳圖片來源 6)

#### (七) 果蠅粒線體 DNA 拷貝數分析 (copy number)

1. 原理：mtDNA copy number 是透過即時定量聚合酶連鎖反應 (Quantitative Reverse Transcription PC 或 qPCR)，雙股 DNA 加熱後形成單股 DNA，加入 DNA 引子，擷取的 DNA 片段會從 3' 向 5' 複製，在即時定量下得到 DNA 拷貝次數。拷貝次數會與粒線體原有的 DNA 量成反比，藉此可推算粒線體的相對表現量。粒線體擁有自己的 DNA，複製週期與細胞核本身的複製週期不相同，因此拷貝數又能間接反映果蠅視網膜粒線體的數量，其中，正常果蠅的粒線體受試片段中，應含有 3 - 5 個 mtDNA。
2. 實驗流程：Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System
  - (1) 利用均質機將果蠅視網膜勻漿，並使用 DNA 萃取試劑盒萃取 DNA。
  - (2) 利用 NanoDrop Microvolume 分光光譜儀測量獲得的 DNA 濃度，並統一稀釋至 200 ng/ $\mu$ L。
  - (3) 在 96 孔盤中以一孔加入 2  $\mu$ g DNA 並混合 mt:ND1 的 F/R primer 及 SYBR 試劑。
  - (4) 以下列參數在 Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System 上進行 PCR：
    - Stage 1 : 50°C 反應 2 分鐘。
    - Stage 2 : 95°C 反應 10 分鐘。
    - Stage 3 : 95°C 反應 15 秒，60°C 反應 1 分鐘。
    - Stage1 - Stage3 一共進行 40 個週期。

#### (八) 以穿透式電子顯微鏡 TEM 觀察果蠅眼部粒線體

1. 原理：電子槍 (electron gun) 產生高能電子束，經過電磁透鏡加速、聚焦，讓電子

穿透過樣品，並由下方偵測器收集訊號。透射電子強度變化形成明場影像，繞射電子產生暗場影像或電子繞射圖案。TEM 能觀察到樣品內部結構、形態和應力狀態。

2. 實驗步驟：

- (1) 以 CO<sub>2</sub> 麻醉果蠅。
- (2) 以血管剪及精密鑷子解剖果蠅複眼並在 3.7% paraformaldehyde 中固定 2 小時。
- (3) 1X PBS 去除固定劑，洗滌 3 次，每次 10 分鐘。
- (4) 1% osmium tetroxide 固定 1 小時，保護細胞結構。
- (5) 以 ddH<sub>2</sub>O 洗去殘留的 osmium tetroxide 後，以 2% uranyl acetate 固定視網膜樣本 24 小時。
- (6) 以 ddH<sub>2</sub>O 洗去殘留的 uranyl acetate 後，將樣本按乙醇梯度 (30% - 100%) 脫水。
- (7) 浸泡在 LR white 樹脂中，於 60°C 烤箱烘乾硬化 48 小時。
- (8) 樣本以 Leica EM UC7 超薄切片機切割為 50 nm 的切片。
- (9) 以 lead citrate 進行後染色後，使用穿透式電子顯微鏡 JEOL JEM-1400 (FLASH) 進行成像，獲取高解析度影像。

(九) 反轉錄即時定量聚合酶連鎖反應 (Quantitative Reverse Transcription PCR 或 RT-qPCR)

1. 原理：將欲試驗的單股 RNA 反轉錄成單股 DNA，加入 DNA 聚合酶合成雙股 DNA，以 PCR 技術放大雙股 DNA 數量，透過 SYBR Green 染料與雙股 DNA 結合，定時下反映出的螢光含量，作為該種 RNA 在不同試驗組別中的相對表現量。

2. 實驗步驟：

- (1) 將果蠅視網膜勻漿後以 Trizol 萃取 RNA，並利用 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit cDNA 反轉錄試劑盒在 MiniAmp™ Thermal Cycler 反轉錄成 cDNA。
- (2) 配製 5 μM Forward / Reverse primer：將 9 μL ddH<sub>2</sub>O 加入 Eppendorf 管，再加入 1 μL 50 μM Forward / Reverse primer stock。
- (3) 將 primer、SYBR Green Master Mix 試劑及 2 μg 的 cDNA 加入 96 孔盤的每個孔。
- (4) 封膜貼緊 96 孔盤，確保封閉緊密後準備上即時定量聚合酶連鎖反應儀 (Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System) 測定。
- (5) Real-Time PCR 條件：  
Stage 1 : 50°C 反應 2 分鐘。  
Stage 2 : 95°C 反應 10 分鐘。  
Stage 3 : 95°C 反應 15 秒，60°C 反應 1 分鐘。  
Stage 1 - Stage 3 一共進行 40 個週期。

## (十) 西方墨點法

1. 原理：蛋白質存在各異的帶電量和等電點，經電泳可分離不同蛋白質，依分子大小轉移到薄膜上。利用抗體和抗原蛋白具專一性，用來偵測目標蛋白，再透過薄膜的顯色或發光，觀察與分析蛋白質的表現量。
2. 實驗步驟：
  - (1) 1X PBS 清洗果蠅視網膜，轉移至微量離心管。
  - (2) 加入 100  $\mu$ L RIPA buffer (含 Protease Inhibitor 及 EDTA) 裂解細胞。
  - (3) 超音波震盪 25 次，在碎冰上靜置 10 分鐘。
  - (4) 4°C 下，以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，收集上清液。
  - (5) BSA Protein Assay 測定蛋白濃度。
  - (6) 樣本加 4X Laemmli buffer，95°C 下加熱 5 分鐘，使蛋白完全變性。
  - (7) SDS-PAGE 電泳：配製 12% 膠體，樣本加 1X Laemmli buffer 煮沸後電泳 (Hoefer SE206 electrophoresis, Hoefer PS300B PWR SUPPLY)，100V，90 分鐘。
  - (8) 使用 1X Transfer buffer 轉漬到 PVDF 膜，80V，100 分鐘。
  - (9) 以 5% BSA/TBST 稀釋一級抗體 (1:1000)，4°C 下搖晃放置一晚。
  - (10) 1X TBST 洗膜 3 次，每次 10 分鐘，去除未結合抗體。
  - (11) 以 5% BSA / TBST 稀釋 HRP-conjugated 二級抗體 (1:5000)，室溫放置 1 小時，並重複步驟 (10)。
  - (12) ECL substrate 反應 5 分鐘，以冷光儀 (GE ImageQuant LAS 4000 Mini) 拍照記錄數據。

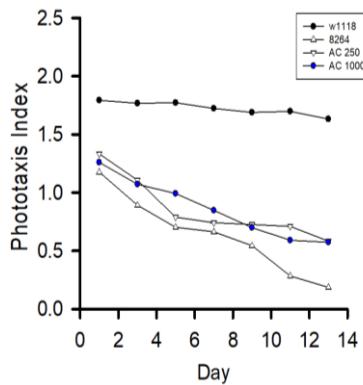
## (十一) 統計分析

實驗數據表示為至少三次獨立實驗的平均值的標準誤差 ( $\pm$ SEM)。我們使用 student paired t-test 進行統計，以評估實驗組和對照組之間的差異， $p$  值為 0.05 或更低被視為具有統計意義。

# 伍、研究結果

## 一、牛樟芝萃取物改善糖尿病性視網膜病變果蠅的趨光能力

檢測 InR-mutant 果蠅在 AC 治療下視網膜病變改善，因此，藉由觀察成齡果蠅第 0 天 - 第 14 天內的趨光能力的變化，得知果蠅眼部對光的敏感度，進而量化 InR-mutant 果蠅的趨光能力 (圖七)。隨著羽化時間的增加，InR-mutant 果蠅的趨光能力呈現大幅下降，而  $w^{1118}$  則幾乎不受影響。而在給予 InR-mutant 果蠅服用 AC 後，無論是高、低濃度對果蠅趨光能力皆有改善，並且在第 10 天後觀察到比較顯著的落差 (圖七)。



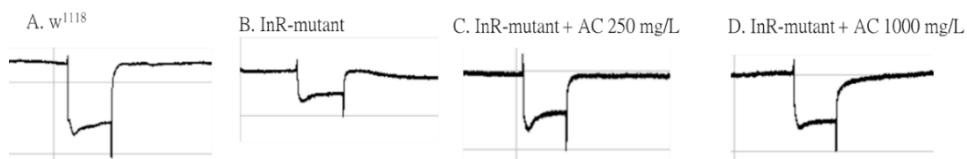
圖七、果蠅趨光係數折線圖（出處詳圖片來源 7）

圖七：橫軸記錄時間實驗進行的天數(第 0 天 - 第 14 天)，縱軸記錄果蠅趨光係數， $w^{1118}$ 、InR-mutant、InR-mutant + AC 250 mg/L、InR-mutant + AC 1000 mg/L 四組分別以不同圖例代表說明。本次實驗進行 14 天，以 2 天一次作為測定週期，記錄果蠅連續七次的趨光係數。

## 二、牛樟芝萃取物逆轉了糖尿病性視網膜病變果蠅的視網膜電位損傷

從第 7 天成齡果蠅的 ERG 波形圖上（圖八），可以觀察到 InR-mutant 果蠅與其他三組差異甚大， $\text{delta\_mv}$  和  $\text{off\_transient}$  的波形幅度明顯變小，在服用 AC 後能大幅度改善，直觀顯現 AC 對神經可能有改善效果。

背景  $w^{1118}$  對照組相比 InR-mutant 果蠅在趨光試驗中表現眼部功能的喪失，而服用藥後有了改善。為了進一步檢測果蠅視網膜的電位，並分析波形圖與統計數據，進而量化了果蠅視網膜神經的退化程度（圖九）。六項數值的分析中， $w^{1118}$  皆與 InR-mutant 果蠅呈顯著差異。其中圖九（A）對  $\text{delta\_mv}$  分析的結果， $w^{1118}$  比 InR-mutant 果蠅對光的反應更強烈，代表著對神經訊號的傳遞功能更好，但 InR-mutant 果蠅在服用無論 250 mg/L 或 1000 mg/L 濃度的 AC 後， $\text{delta\_mv}$  大幅攀升，與 InR-mutant 果蠅皆呈顯著差異，顯示視網膜神經元可能得到保護與改善。

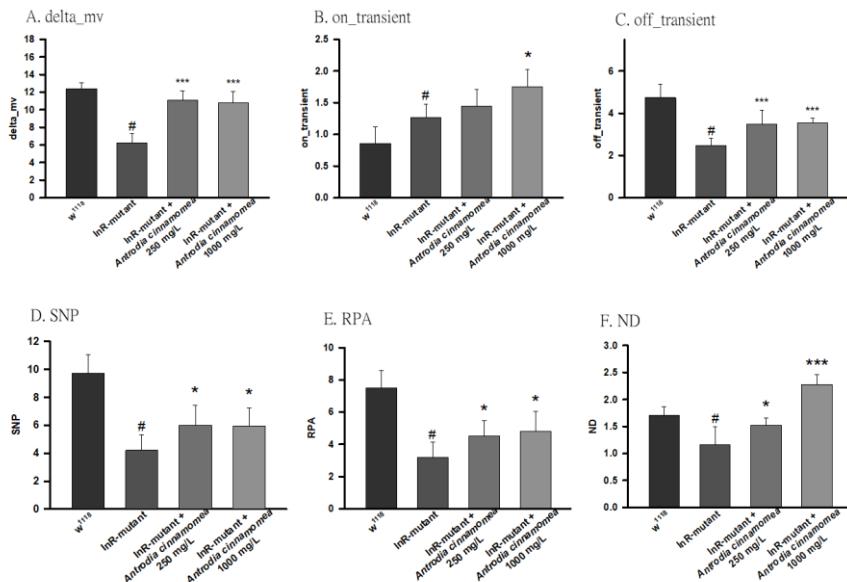


圖八、擷取 ERG 過程中 Axoscope 軟體錄製的波形圖（出處詳圖片來源 8）

圖八：(A) - (D) 為 8 秒期間（持續 2 秒 650 lux 白光及持續 6 秒黑暗），果蠅一次 ERG 的波形圖。由左至右依序是  $w^{1118}$ 、InR-mutant 果蠅、InR-mutant + AC 250 mg/L 及 InR-mutant + AC 1000 mg/L。（橫線間電位間格 10mv）

服用高濃度 AC 果蠅在  $\text{on\_transient}$  與  $\text{off\_transient}$ ，與 InR-mutant 果蠅皆有顯著差異，

低濃度則是在 off\_transient 與 InR-mutant 果蠅具有顯著差異（圖九 B、C）。光開與關時電位瞬間變化的產生，源於椎板神經元 L1、L2 的去極化，顯示 AC 可能對椎板神經元有修復與改善。SNP、ND 與 RPA 記錄了角膜負電位及光感受器的回復電位，受到 TRP 及 TRPL 離子通道的活化影響。在三項統計中，所有服用 AC 的果蠅皆與 InR-mutant 果蠅呈顯著差異，再次佐證了 AC 改善訊號傳遞與保護神經的效果（圖九 D - F）。



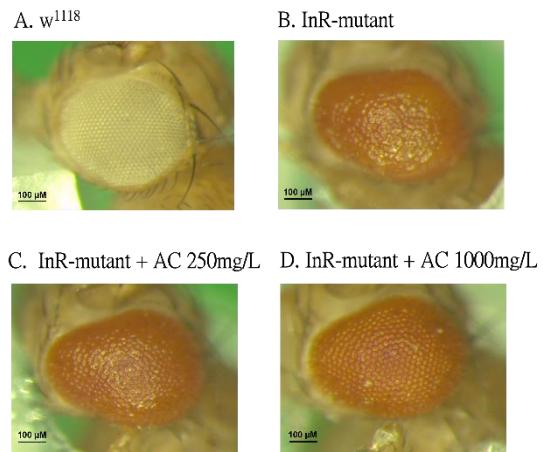
圖九、AC 改善果蠅 delta\_mv、on\_transient、off\_transient、SNP、ND、RPA 六項指標

(出處詳圖片來源 9)

圖九：( A ) - ( F ) 為分別記錄 delta-mv 、 on\_transient 、 off\_transient 、 SNP 、 ND 及 RPA 數值的長條圖。長條圖橫軸由左至右依序是  $w^{118}$  、 InR-mutant 果蠅、 InR-mutant + AC 250 mg/L 及 InR-mutant + AC 1000 mg/L 。以平均值  $\pm$  SEM ， InR-mutant + AC 250 mg/L 及 InR-mutant + AC 1000 mg/L ，皆用 \* ( $p < 0.05$ ) , \*\* ( $p < 0.01$ ) 和 \*\*\* ( $p < 0.001$ ) 與 InR-mutant 做出比較，用 # ( $p < 0.05$ ) , ## ( $p < 0.01$ ) 和 ### ( $p < 0.001$ ) 比較  $w^{118}$  與 InR-mutant 。

### 三、牛樟芝萃取物改善糖尿病性視網膜病變果蠅的複眼形態

我們拍攝第 7 天成齡果蠅的眼部外觀。光學顯微鏡下，我們能看見果蠅複眼的大致排列和網格，而如同 DR 患者的常出現黃斑部水腫，從眼部外觀的觀察，能反映 InR-mutant 果蠅服用 AC 後眼睛的改善與否。可以發現圖十 ( A ) 中果蠅的複眼結構完整，邊界明顯可見，眼睛上蜂巢般的六角形構造清晰，但圖十 ( B ) 中果蠅的複眼表面不平整，邊界不清楚，且眼部呈現潰爛狀，不過從圖十 ( C ) 、圖十 ( D ) 中可以發現隨著服用的 AC 濃度的提升，果蠅的眼部結構有越發明顯的改善，減少了複眼邊界不清楚的情況，眼部呈現潰爛的情況減少，圖十 ( D ) 更顯示了在服用高濃度的 AC 後，果蠅眼上可重新觀察到與圖十 ( A ) 相同的六邊形構造 ( 圖十 ) 。

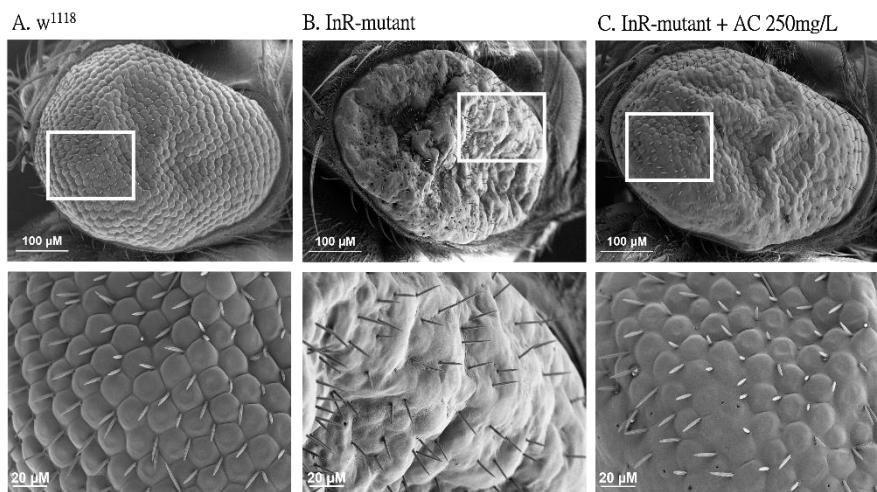


圖十、以光學顯微鏡觀察 AC 改善果蠅的外部複眼形態（出處詳圖片來源 10）

圖十：( A ) 為培養於未加 AC 之培養皿的  $w^{1118}$  果蠅之眼部照片；( B ) 為培養於未加 AC 之培養皿的 InR-mutant 果蠅之眼部照片；( C ) 為培養於添加 AC，濃度 250 mg/L 之培養皿的 InR-mutant 果蠅之眼部照片；( D ) 為培養於添加 AC，濃度 1000 mg/L 之培養皿的 InR-mutant 果蠅之眼部照片。

#### 四、牛樟芝萃取物改善糖尿病性視網膜病變果蠅複眼微觀形態

在利用倍率相對較小的光學顯微鏡觀察果蠅眼部外觀後，我們使用放大倍率更高的掃描式電子顯微鏡以仔細的觀察複眼結構，包含剛毛排列及凹陷程度，將有助於判斷 InR-mutant 果蠅服用 AC 後的眼部改善狀況。可以發現圖十一 (A) 中果蠅眼部的剛毛排列有規律不雜亂，凹陷不嚴重，如同光學顯微鏡觀察到複眼結構完整且邊界分隔明顯可見，但圖十一 (B) 中果蠅的眼部剛毛不整齊排列，複眼也嚴重凹陷。相比於圖十一 (B)，圖十一 (C) 中服用 AC 的果蠅眼部結構有了明顯的改善，複眼凹陷減少，邊界尚存，且剛毛排列整齊 (圖十一)。



圖十一、以掃描式電子顯微鏡觀察牛樟芝萃取物改善果蠅外部複眼形態

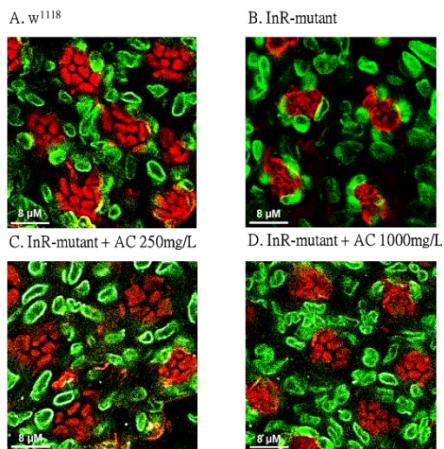
（出處詳圖片來源 11）

圖十一：( A ) 為培養於未加 AC 之培養皿的  $w^{1118}$  果蠅之 SEM 成像照片；( B ) 為培養於

未加 AC 之培養皿的 InR-mutant 果蠅之 SEM 成像照片；( C ) 為培養於添加 AC，濃度 250 mg/L 之培養皿的 InR-mutant 果蠅之 SEM 成像照片。(白色方框為放大部分)。

## 五、牛樟芝萃取物改善糖尿病性視網膜病變光感受器

果蠅的複眼由許多小眼構成，其中每個小眼中都含有 8 個光感受器，因此我們藉由螢光染色將光感受器與其他周圍細胞區分開來，並藉此觀察光感受器（紅色螢光）之完整性及間隔細胞（綠色螢光）數量，以推斷服用 AC 後的 InR-mutant 果蠅視力之改善情況。比較圖十二 (A)、圖十二 (B) 二者可以發現  $w^{1118}$  相較於 InR-mutant 果蠅具有較完整的光感受器，並未出現如 InR-mutant 果蠅的光感受器萎縮的情況，同時， $w^{1118}$  間隔細胞的數量也相對較多。比較圖十二 (B)、圖十二 (C)、圖十二 (D) 三圖則可以發現，隨著 AC 濃度的提升，圖十二 (C)、圖十二 (D) 二圖的光感受器明顯改善，細胞萎縮的情況減少，間隔細胞數量也跟著提升（圖十二）。



圖十二、以雷射共軛顯微鏡觀察 AC 改善果蠅內部視網膜光感受器形態

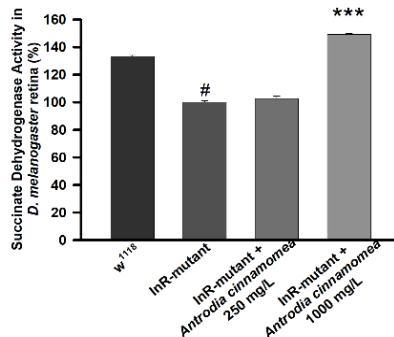
(出處詳圖片來源 12)

圖十二：( A ) 為培養於未加 AC 之培養皿的  $w^{1118}$  果蠅之眼部細胞染色照片；( B ) 為培養於未加 AC 之培養皿的 InR-mutant 果蠅之眼部細胞染色照片；( C ) 為培養於添加 AC，濃度 250 mg/L 之培養皿的 InR-mutant 果蠅之眼部細胞染色照片；( D ) 為培養於添加 AC，濃度 1000 mg/L 之培養皿的 InR-mutant 果蠅之眼部細胞染色照片。細胞與螢光顏色：光感受器（紅色螢光）及間隔細胞（綠色螢光）。

## 六、牛樟芝萃取物改善糖尿病性視網膜病變果蠅琥珀酸脫氫酶活性試驗

由前述可知，InR-mutant 果蠅是經由改變  $w^{1118}$  果蠅之基因以模擬糖尿病性視網膜病變的情況，而高血糖又會造成粒線體功能受損的情形，因此我們藉由琥珀酸脫氫酶活性試驗可推得果蠅眼部粒線體的功能是否有缺陷，進而反映果蠅眼部細胞的存活狀況，最終反映 AC 的治療效果。圖中可以發現  $w^{1118}$  的琥珀酸脫氫酶活性明顯高於 InR-mutant 果蠅，顯示其粒線體功能較 InR-mutant 果蠅健全。而 InR-mutant + AC 250 mg/L 與 InR-mutant 並未顯示出明顯的差異，但隨著劑量的提升，InR-mutant + AC 1000 mg/L 則具有較大的提升，顯

示出相較於低濃度，高濃度對於粒線體的改善較為明顯（圖十三）。

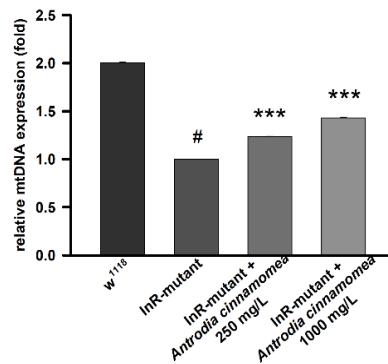


圖十三、AC 對琥珀酸脫氫酶活性試驗分析（出處詳圖片來源 13）

圖十三：在不同條件下，第 7 天成齡果蠅視網膜的琥珀酸脫氫酶活性（Succinate Dehydrogenase Activity）。以平均值±SEM，InR-mutant + AC 250 mg/L 及 InR-mutant + AC 1000 mg/L，皆用\* ( $p < 0.05$ )，\*\* ( $p < 0.01$ ) 和\*\*\* ( $p < 0.001$ ) 與 InR-mutant 做出比較，用# ( $p < 0.05$ )，## ( $p < 0.01$ ) 和### ( $p < 0.001$ ) 比較 *w<sup>1118</sup>* 與 InR-mutant。

## 七、牛樟芝萃取物改善糖尿病性視網膜病變果蠅粒線體 DNA 拷貝數

不同於琥珀酸脫氫酶活性試驗，此實驗是藉由檢測粒線體的數量來推斷果蠅眼部細胞的情況，並藉此判斷 AC 對於 InR-mutant 視力改善的有效性。從圖中可以發現 *w<sup>1118</sup>* 相對於 InR-mutant 有較高的 DNA 表現量，表示其眼部細胞具有較多的粒線體，細胞功能較健全。不過隨著不同濃度 AC 的服用，InR-mutant 果蠅的 DNA 表現量得到部分的提升，顯示 AC 有效的改善細胞的功能性，增加了粒線體的數量（圖十四）。

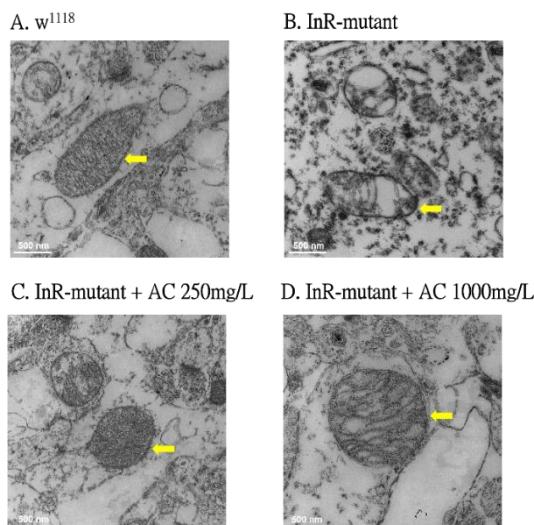


圖十四、AC 改善果蠅粒線體 DNA 拷貝數量試驗（出處詳圖片來源 14）

圖十四：在不同條件下，第 7 天成齡果蠅眼部細胞粒線體 DNA 的相對表現量（relative mtDNA expression）。以平均值±SEM，InR-mutant + AC 250 mg/L 及 InR-mutant + AC 1000 mg/L，皆用\* ( $p < 0.05$ )，\*\* ( $p < 0.01$ ) 和\*\*\* ( $p < 0.001$ ) 與 InR-mutant 做出比較，用# ( $p < 0.05$ )，## ( $p < 0.01$ ) 和### ( $p < 0.001$ ) 比較 *w<sup>1118</sup>* 與 InR-mutant。

## 八、牛樟芝萃取物改善糖尿病性視網膜病變果蠅複眼粒線體形態學觀察

粒線體 DNA 的拷貝數的結果顯示，InR-mutant 果蠅的粒線體的數量減少，伴隨粒線體功能損壞與活性缺失。我們從果蠅複眼的 TEM 成像照片中，進一步確認了 InR-mutant 果蠅粒線體的缺失與受損，以及 InR-mutant 果蠅服用 AC 後，粒線體的修復情形。可以發現圖十五（A）中果蠅視網膜的粒線體結構完整，內膜的皺褶（cristae）密集且清晰可見，但圖十五（B）中果蠅視網膜的粒線體結構缺損，內膜的皺褶近乎消失、基質腫脹，周圍部分胞器喪失功能。相比於圖十五（B），從圖十五（C）及圖十五（D）中可以發現隨著 AC 濃度的提升，減緩果蠅視網膜的粒線體損壞的狀況，內膜皺褶數增加，部分胞器凋亡的狀況改善（圖十五）。



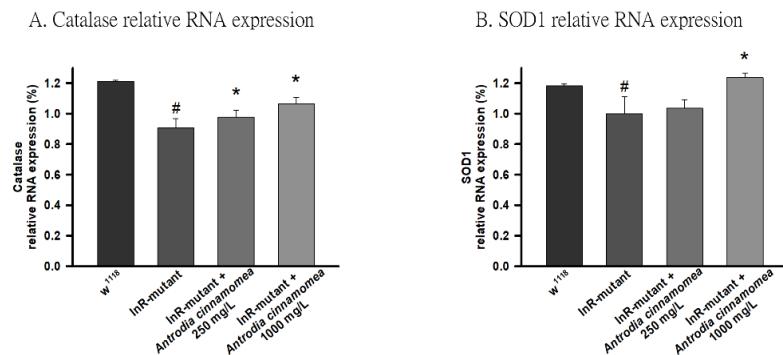
圖十五、以穿透式電子顯微鏡觀察 AC 改善果蠅粒線體微觀形態分析（出處詳圖片來源 15）

圖十五：(A) 為培養於未加 AC 之培養皿的  $w^{1118}$  果蠅之 TEM 成像照片；(B) 為培養於未加 AC 之培養皿的 InR-mutant 果蠅之 TEM 成像照片；(C) 為培養於添加 AC，濃度 250 mg/L 之培養皿的 InR-mutant 果蠅之 TEM 成像照片；(D) 為培養於添加 AC，濃度 1000 mg/L 之培養皿的 InR-mutant 果蠅之 TEM 成像照片。(黃色箭頭為粒線體)。

#### 九、牛樟芝萃取物增加糖尿病性視網膜病變抗氧化酶——Catalase 與 SOD1 的表現量

目前對 DR 已知的機轉，與粒線體的活性缺失後，進而導致氧化壓力上升有關。動物體中存在多種抗氧化的酵素，此天然機制可以緩解氧化壓力與對抗自由基。常見的抗氧化酶：超氧化物歧化酶（Superoxide dismutase，以下簡稱 SOD）、過氧化氫酶（Catalase）、麩胱甘肽過氧化物酶（Glutathione peroxidase，以下簡稱 GSHPx）等。於是，通過抗氧化酶的表現量，我們可以檢測 InR-mutant 果蠅，服用 AC 後體內是否增加抗氧化酶，加以驗證 AC 的治療可行性。圖十六（A）中，InR-mutant 的 Catalase RNA 相對表現量最低，其僅有較少的抗氧化酶作用以減緩氧化壓力，與對照組  $w^{1118}$  呈現顯著差異；InR-mutant + AC 250 mg/L 與 InR-mutant 比較下呈現顯著差異，顯示低濃度的藥物已經有提升 Catalase 表現

量的效果；InR-mutant + AC 1000 mg/L 與 InR-mutant 的比較下同樣呈現顯著差異，更顯示 Catalase 的改善程度隨 AC 濃度增加而提升。圖十六（B）中，InR-mutant 的 SOD1 RNA 相對表現量最低，其僅有較少的抗氧化酶作用以減緩氧化壓力、與對照組  $w^{1118}$  呈現顯著差異；InR-mutant + AC 250 mg/L 與 InR-mutant 比較下並無顯著差異，但增加 AC 濃度後，InR-mutant + AC 1000 mg/L 與 InR-mutant 比較下呈現顯著差異，顯示高濃度 AC 有效提升 SOD1 抗氧化酶的表現（圖十六）。

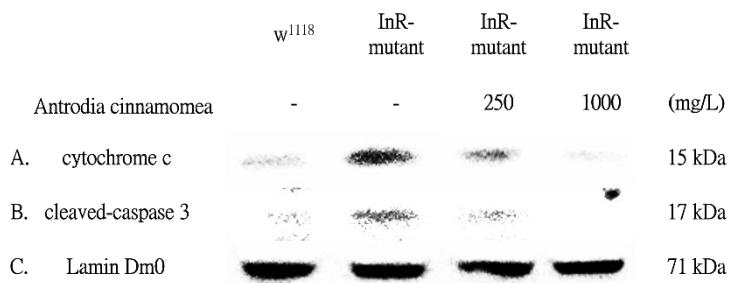


圖十六、過氧化氫酶與超氧化物歧化酶 1 之 RNA 相對表現量（出處詳圖片來源 16）

圖十六：（A）為不同條件下第 7 天成齡果蠅，其過氧化氫酶（Catalase）之 RNA 相對表現量（Catalase relative RNA expression）；（B）為不同條件下第 7 天成齡果蠅，其超氧化物歧化酶 1（SOD1）之 RNA 相對表現量（SOD1 relative RNA expression），以平均值±SEM，InR-mutant + AC 250 mg/L 及 InR-mutant + AC 1000 mg/L，皆用\* ( $p < 0.05$ )，\*\* ( $p < 0.01$ ) 和\*\*\* ( $p < 0.001$ ) 與 InR-mutant 做出比較，用# ( $p < 0.05$ )，## ( $p < 0.01$ ) 和### ( $p < 0.001$ ) 比較  $w^{1118}$  與 InR-mutant。

#### 十、牛樟芝萃取物減低糖尿病性視網膜病變果蠅 cytochrome c 與 cleaved-caspase 3 的表現量

研究顯示細胞凋亡會造成粒線體受損。當細胞接收到凋亡訊號後，粒線體被破壞，釋放出 cytochrome c，誘導胱天蛋白酶（caspase）的活化，其中，cleaved-caspase 3 會降解細胞骨架蛋白、導致 DNA 梯狀斷裂、促進凋亡小體的行成，是細胞凋亡的重要指標(Zuo et al., 2014)。因此，我們透過西方墨點法，以黑白顯影呈現 cytochrome c 和 cleaved-caspase 3 的相對表現量，檢測 InR-mutant 果蠅服用 AC 後，能否抑制細胞凋亡的產生。圖十七（A）中 InR-mutant 果蠅的 cytochrome c 的表現量最多，與圖十七（B）中 InR-mutant 果蠅的 cleaved-caspase 3 表現量關聯，屬於細胞凋亡機制誘導兩者的程序性表現；InR-mutant + AC 250 mg/L 在圖十七（A）和圖十七（B）中的 cytochrome c 與 cleaved-caspase 3 顯影變淺，顯示兩者的蛋白表現量降低；InR-mutant + AC 1000 mg/L 在圖十七（A）和圖十七（B）中的顯影幾乎消失，表示僅偵測到極少的蛋白，這項結果顯示了 AC 對 cytochrome c 與 cleaved-caspase 3 蛋白量有抑制作用，且高濃度的成效較低濃度更顯著（圖十七）。



圖十七、AC 減少細胞凋亡蛋白 cytochrome c 與 cleaved-caspase 3 表現量（出處詳圖片來源 17）

圖十七：( A ) 為不同條件下第 7 天成齡果蠅的 cytochrome c 蛋白質表現量；( B ) 為不同條件下第 7 天成齡果蠅的 cleaved-caspase 3 蛋白質表現量；( C ) 為不同條件下第 7 天成齡果蠅的 Lamin 表現量。Lamin Dm0：果蠅核纖層蛋白（Dm 是 *drosophila melanogaster* 的縮寫）的一致表現，確保了圖十七 (A)、圖十七 (B) 蛋白表現結果的可信度。  
kDa：千道耳頓（西方墨點法依據分子量大小分離蛋白質）。

## 陸、 討論

糖尿病性視網膜病變 (DR) 是一種糖尿病引起的視力障礙，持續威脅人類的健康，並造成醫療負擔(Mwangi et al., 2018)。早期糖尿病性視網膜病變偏向神經方面的退化，其嚴重程度可以通過觀察視網膜神經纖維層厚度、神經節細胞密度、光感受器敏感性、視網膜厚度和視網膜細胞外結構的變化來推斷，從而導致血視網膜屏障 (BRB) 損傷 (R. Simó & C. Hernández, 2014; Rafael Simó & Cristina Hernández, 2014)。在人類 2 型糖尿病臨床研究中，大量視網膜神經細胞凋亡可能誘導視網膜神經變性 (Abu-El-Asrar et al., 2004)。在慢性糖尿病患者中，高血糖和血脂異常可誘導視網膜粒線體損傷的活性氧 (ROS) 累積(Kowluru & Chan, 2007)。先前多項研究中，科學家們驗證了果蠅作為糖尿病性視網膜病變的模型，顯示糖尿病性視網膜病變的一系列特徵，包括光傳導缺陷、視網膜結構紊亂和細胞凋亡(Catalani et al., 2021; Longo et al., 1992b)。果蠅與脊椎動物的視網膜有許多相似之處，從視網膜神經元結構來看，果蠅視網膜的髓質內源神經元 (medulla intrinsic neurons) 與脊椎動物視網膜的水平細胞 (horizontal cell) 具有共同的演化起源與無長突細胞 (amacrine cells) 相似 (Lefebvre et al., 2012)。此外，從視覺傳遞途徑的角度來看，果蠅與脊椎動物的視網膜突觸主要皆以多接觸突觸為主要特徵(Akerboom et al., 2012)，這種特徵會共用分層訊號傳輸，將顏色和運動訊號輸出到神經系統的不同層(Sanes & Zipursky, 2010)。牛樟芝萃取物改善糖尿病性視網膜病變果蠅的趨光能力（圖七）

眾所周知，2 型糖尿病的一個典型特徵是胰島素阻抗 (insulin resistance)，這會增加活性氧 (ROS) 的產生並損害粒線體功能，從而導致視網膜神經突觸受損 (Hong et al., 2020)。突觸損傷構成了無長突細胞損傷和神經退行性疾病基礎。值得注意的是，無長突蛋白細胞可以形

成訊號通路來傳遞光訊號(Frazão et al., 2011; Hirasawa et al., 2015)，視網膜電位圖中提到的“on-transient”和“off-transient”是指通過光感受器和層神經元之間的突觸進行的光傳導(Hotta & Benzer, 1970; Pak et al., 1970)。在本研究中，我們使用果蠅視網膜電圖(ERG)用於記錄果蠅視網膜回應光/暗刺激的電壓變化( $\Delta V$ )，其中光感受器的去極化由受體電位振幅(receptor potential amplitude, RPA)表示，顯示明/暗狀態基線之間的電壓差(Ziegler et al., 2015)，而負偏轉(negative deflection, ND)反映了on-transient後的快速下降，說明了視網膜中ABCG2類轉運蛋白的穩定狀態(Vilinsky & Johnson, 2012)。此外，我們發現牛樟芝的給與改善了果蠅視覺能力與視網膜結構，包括ERG(圖九)、趨光反應(圖七)和光感受器的排列(圖十二)，顯示牛樟芝對視覺改善有積極影響。因此我們假設攝入的牛樟芝對受損的神經元視網膜有直接的有益影響。我們通過掃描式(圖十一)及穿透式電子顯微鏡(圖十五)，驗證了果蠅的視網膜由於高血糖狀況，導致了雜亂無章的小眼(ommatidia)排列和模糊的邊界、光感受器排列異常、視網膜神經細胞、粒線體受損以及等與光傳導模式相關的缺陷，而服用牛樟芝後會發生顯著改善這類的損傷。

果蠅視網膜神經元中ROS的積累通常由葡萄糖代謝中的一系列異常事件引起(Kang & Yang, 2020)，而這種氧化損傷導致會啟動促凋亡蛋白反應，導致粒線體外膜穿孔，釋放細胞色素c，啟動caspase級聯反應，並誘導細胞凋亡(Eskes et al., 2000; Wei et al., 2000)。抗氧化酶的存在，如超氧化物歧化酶、過氧化氫酶等抗氧化酶的表現可以減輕ROS累積，被認為是糖尿病性視網膜病變中神經退化部分治療的可行靶點(Cecerska-Heryć et al., 2021)。根據已發表的研究，超氧化物歧化酶的表達可以防止糖尿病等代謝疾病誘導的粒線體電子傳遞鏈功能障礙(Kanwar et al., 2007)。在脊椎動物中，超氧化物歧化酶的缺失會導致粒線體氧化損傷，並且對於傳遞氧化和葡萄糖訊號至關重要(Chung, 2017; Reddi & Culotta, 2013)。超氧化物歧化酶是粒線體中超氧自由基的主要清除劑，在氧化增加的情況下，超氧化物歧化酶的缺乏會導致粒線體腫脹和形態改變。通過分子生物學技術分析，我們推斷果蠅上述視網膜病變是由ROS累積誘導的氧化應激、粒線體凋亡、細胞色素c和裂解型caspase 3的釋放引起的(Frappaolo et al., 2022)。而當我們餵食牛樟芝後，視網膜病變果蠅呈劑量依賴性的增加抗氧化酶表達(包含超氧化物歧化酶及過氧化氫酶)(圖十六)。實驗結果以趨光實驗與視網膜電位圖證實糖尿病視網膜病變果蠅的視力嚴重受損，而在給予牛樟芝萃取物後視力受損的情況有所改善。

從巨觀形態學的角度來看，糖尿病視網膜病變果蠅的視力受損包含了外部複眼的潰爛以及內部光感受器的崩壞，而牛樟芝萃取物可以緩解糖尿病性視網膜病變果蠅的複眼的潰爛以及具備重塑光感受器的能力。從更微觀的角度來探討，琥珀酸脫氫酶活性試驗與粒線體DNA拷貝數分析說明糖尿病性視網膜病變果蠅的視力受損與眼部潰爛牽涉到視網膜粒線體的損壞，

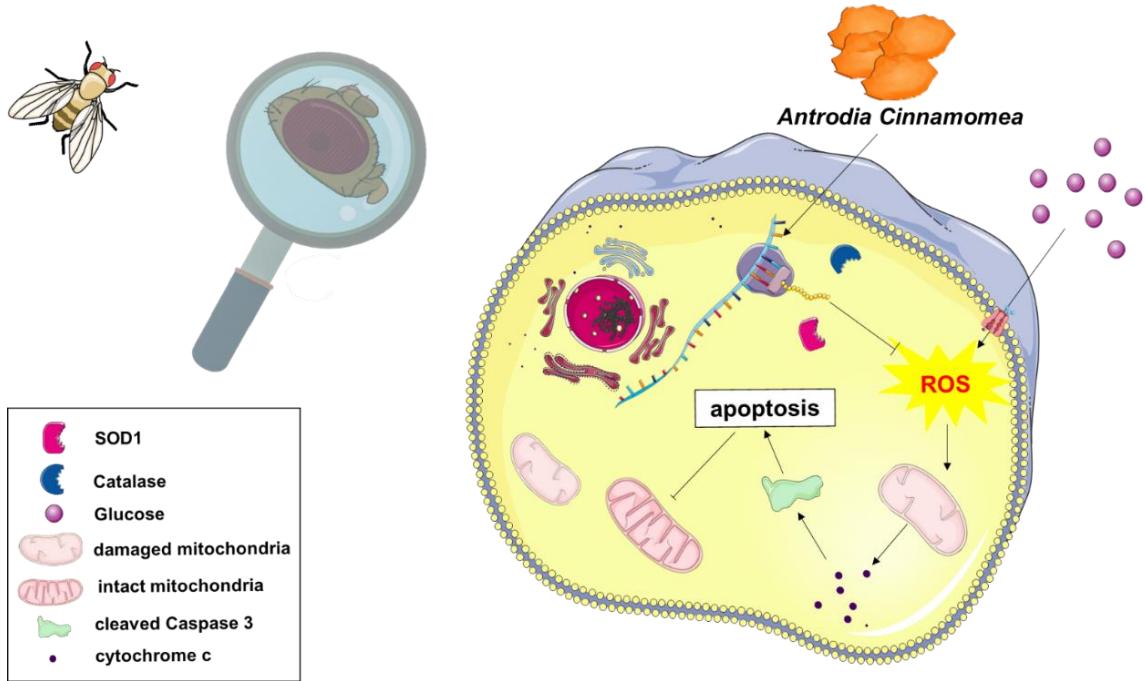
穿透式電子顯微鏡不僅證實這點，也顯示糖尿病性視網膜病變細胞凋亡的特徵，而牛樟芝萃取物修復了粒線體的形態與功能，也似乎抑制了細胞凋亡的發生。

透過分子生物學技術，我們回溯了與細胞凋亡及粒線體相關的蛋白標記物——cleaved caspase 3 及 cytochrome c，證實細胞凋亡的發生以及與粒線體的相關性，而牛樟芝萃取物的確能夠有效抑制細胞凋亡。文獻指出糖尿病性視網膜病變牽涉的細胞凋亡與粒線體的損壞與氧化壓力上升有關，因此我們檢測了超氧化物歧化物酶與過氧化氫酶，發現在糖尿病視網膜病變果蠅視網膜中確實有抗氧化能力受損的情況發生（亦即氧化壓力上升），而牛樟芝可以有效提升抗氧化能力來抑制糖尿病性視網膜病變。

我們對果蠅視網膜粒線體的功能與結構做了全面的分析，透過琥珀酸脫氫酶活性試驗與拷貝數分析的結果，我們數據化了各組別中視網膜粒線體的相對數量與活性關係，實驗結果顯示糖尿病性視網膜病變會導致粒線體活性下降，以及粒線體數量的降低，這說明了糖尿病性視網膜的確正發生神經退化，而穿透式電子顯微鏡則將這個結果可視化：糖尿病性視網膜病變中的果蠅視網膜會有粒線體破裂、皺褶消失、基質腫脹等後果；而給與牛樟芝後，不僅視網膜中粒線體活性增加，數量也顯著上升，更重要的是粒線體的外觀變得更加完整。我們推論牛樟芝通過抗氧化作用（至少部分）逆轉糖尿病視網膜損傷。而這種抗氧化作用又牽涉了前面敘述的粒線體損壞以及凋亡因子的減少。因此綜合實驗結果，我們認為牛樟芝改善視網膜粒線體的修復與抗氧化作用密不可分。

## 柒、 結論

依據本研究結果顯示，牛樟芝在果蠅模型上可以有效治療糖尿病性視網膜病變，因時間與參與研究合作因素，無法確認牛樟芝內含的成分，與這些化合物在糖尿病性視網膜病變中又與哪些基因的轉錄轉譯機理，有鑑於目前次世代定序（Next Generation Sequencing, NGS）及人工智慧（artificial intelligence, AI）在醫療上的地位日趨重要，我們不禁思考如此龐大數量的化合物與基因是否能透過人工智慧的蓬勃發展快速篩選並鎖定呢？我們未來會努力念書並多方涉獵發展，希望有朝一日可以進入相關領域持續探索，為全人類做出貢獻。



圖十八、牛樟芝在果蠅模型上可以有效治療糖尿病性視網膜病變（出處詳圖片來源 18）

## 捌、參考文獻

- 一、中華民國糖尿病衛教學會。《臺灣糖尿病年鑑 2019 第 2 型糖尿病》。2019 年 10 月
- 二、Abu-El-Asrar, A. M., Dralands, L., Missotten, L., Al-Jadaan, I. A., & Geboes, K. (2004). Expression of apoptosis markers in the retinas of human subjects with diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(8), 2760-2766. <https://doi.org/10.1167/iovs.03-1392>
- 三、Akerboom, J., Chen, T. W., Wardill, T. J., Tian, L., Marvin, J. S., Mutlu, S., Calderón, N. C., Esposti, F., Borghuis, B. G., Sun, X. R., Gordus, A., Orger, M. B., Portugues, R., Engert, F., Macklin, J. J., Filosa, A., Aggarwal, A., Kerr, R. A., Takagi, R., . . . Looger, L. L. (2012). Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. *J Neurosci*, 32(40), 13819-13840. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2601-12.2012>
- 四、Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, 54(6), 1615-1625. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.6.1615>
- 五、Catalani, E., Silvestri, F., Bongiorni, S., Taddei, A. R., Fanelli, G., Rinalducci, S., De Palma, C., Perrotta, C., Prantero, G., & Cervia, D. (2021). Retinal damage in a new model of hyperglycemia induced by high-sucrose diets. *Pharmacol Res*, 166, 105488. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105488>
- 六、Cecerska-Heryć, E., Surowska, O., Heryć, R., Serwin, N., Napiontek-Balińska, S., & Dołęgowska, B. (2021). Are antioxidant enzymes essential markers in the diagnosis and monitoring of cancer patients - A review. *Clin Biochem*, 93, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2021.03.008>
- 七、Chen, A. S., & Read, R. D. (2019). *Drosophila melanogaster* as a Model System for Human Glioblastomas. *Adv Exp Med Biol*, 1167, 207-224. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-23629-8\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-030-23629-8_12)
- 八、Cheung, N., Mitchell, P., & Wong, T. Y. (2010). Diabetic retinopathy. *Lancet*, 376(9735), 124-136. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(09\)62124-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(09)62124-3)

- 九、Chung, W. H. (2017). Unraveling new functions of superoxide dismutase using yeast model system: Beyond its conventional role in superoxide radical scavenging. *J Microbiol*, 55(6), 409-416.  
<https://doi.org/10.1007/s12275-017-6647-5>
- 十、Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., & Martinou, J. C. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol*, 20(3), 929-935.  
<https://doi.org/10.1128/mcb.20.3.929-935.2000>
- 十一、Frappaolo, A., Karimpour-Ghahnavieh, A., Cesare, G., Sechi, S., Fraschini, R., Vaccari, T., & Giansanti, M. G. (2022). GOLPH3 protein controls organ growth by interacting with TOR signaling proteins in Drosophila. *Cell Death Dis*, 13(11), 1003. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05438-9>
- 十二、Frazão, R., McMahon, D. G., Schunack, W., Datta, P., Heidelberger, R., & Marshak, D. W. (2011). Histamine elevates free intracellular calcium in mouse retinal dopaminergic cells via H1-receptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(6), 3083-3088. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6160>
- 十三、Gambis, A., Dourlen, P., Steller, H., & Mollereau, B. (2011). Two-color in vivo imaging of photoreceptor apoptosis and development in Drosophila. *Dev Biol*, 351(1), 128-134.  
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.12.040>
- 十四、Gorostiza, E. A., Colomb, J., & Brembs, B. (2016). A decision underlies phototaxis in an insect. *Open Biol*, 6(12). <https://doi.org/10.1098/rsob.160229>
- 十五、Gupta, S. K., Chakraborty, R., & Verkicular, P. K. (2022). Electroretinogram responses in myopia: a review. *Doc Ophthalmol*, 145(2), 77-95. <https://doi.org/10.1007/s10633-021-09857-5>
- 十六、Hadler, N. M. (1964). HERITABILITY AND PHOTOTAXIS IN DROSOPHILA MELANOGASTER. *Genetics*, 50(6), 1269-1277. <https://doi.org/10.1093/genetics/50.6.1269>
- 十七、Halder, G., Callaerts, P., & Gehring, W. J. (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in Drosophila. *Science*, 267(5205), 1788-1792.  
<https://doi.org/10.1126/science.7892602>
- 十八、Hirasawa, H., Contini, M., & Raviola, E. (2015). Extrasynaptic release of GABA and dopamine by retinal dopaminergic neurons. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 370(1672).  
<https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0186>
- 十九、Hong, C. T., Chen, K. Y., Wang, W., Chiu, J. Y., Wu, D., Chao, T. Y., Hu, C. J., Chau, K. D., & Bamodu, O. A. (2020). Insulin Resistance Promotes Parkinson's Disease through Aberrant Expression of  $\alpha$ -Synuclein, Mitochondrial Dysfunction, and Dereulation of the Polo-Like Kinase 2 Signaling. *Cells*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/cells9030740>
- 二十、Hotta, Y., & Benzer, S. (1970). Genetic dissection of the Drosophila nervous system by means of mosaics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 67(3), 1156-1163. <https://doi.org/10.1073/pnas.67.3.1156>
- 二十一、Huang, G. J., Huang, S. S., Lin, S. S., Shao, Y. Y., Chen, C. C., Hou, W. C., & Kuo, Y. H. (2010). Analgesic effects and the mechanisms of anti-inflammation of ergostatrien-3beta-ol from *Antrodia camphorata* submerged whole broth in mice. *J Agric Food Chem*, 58(12), 7445-7452.  
<https://doi.org/10.1021/jf1013764>
- 二十二、Joesch, M., Schnell, B., Raghu, S. V., Reiff, D. F., & Borst, A. (2010). ON and OFF pathways in Drosophila motion vision. *Nature*, 468(7321), 300-304.  
<https://doi.org/10.1038/nature09545>

- 二十三、 Kang, Q., & Yang, C. (2020). Oxidative stress and diabetic retinopathy: Molecular mechanisms, pathogenetic role and therapeutic implications. *Redox Biol*, 37, 101799. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101799>
- 二十四、 Kanwar, M., Chan, P. S., Kern, T. S., & Kowluru, R. A. (2007). Oxidative damage in the retinal mitochondria of diabetic mice: possible protection by superoxide dismutase. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(8), 3805-3811. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-1280>
- 二十五、 Kim, L. A., & D'Amore, P. A. (2012). A brief history of anti-VEGF for the treatment of ocular angiogenesis. *Am J Pathol*, 181(2), 376-379. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.006>
- 二十六、 Kitani-Morii, F., Friedland, R. P., Yoshida, H., & Mizuno, T. (2021). Drosophila as a Model for Microbiota Studies of Neurodegeneration. *J Alzheimers Dis*, 84(2), 479-490. <https://doi.org/10.3233/jad-215031>
- 二十七、 Kohner, E. M., & Oakley, N. W. (1975). Diabetic retinopathy. *Metabolism*, 24(9), 1085-1102. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(75\)90102-x](https://doi.org/10.1016/0026-0495(75)90102-x)
- 二十八、 Kowluru, R. A. (2020). Diabetic Retinopathy: Mitochondria Caught in a Muddle of Homocysteine. *J Clin Med*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/jcm9093019>
- 二十九、 Kowluru, R. A., & Chan, P. S. (2007). Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res*, 2007, 43603. <https://doi.org/10.1155/2007/43603>
- 三十、 Kowluru, R. A., Kowluru, A., Mishra, M., & Kumar, B. (2015). Oxidative stress and epigenetic modifications in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res*, 48, 40-61. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.05.001>
- 三十一、 Kuang, Y., Chai, Y., Su, H., Lo, J. Y., Qiao, X., & Ye, M. (2022). A network pharmacology-based strategy to explore the pharmacological mechanisms of *Antrodia camphorata* and antcin K for treating type II diabetes mellitus. *Phytomedicine*, 96, 153851. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153851>
- 三十二、 Kuang, Y., Li, B., Wang, Z., Qiao, X., & Ye, M. (2021). Terpenoids from the medicinal mushroom *Antrodia camphorata*: chemistry and medicinal potential. *Nat Prod Rep*, 38(1), 83-102. <https://doi.org/10.1039/d0np00023j>
- 三十三、 Kuo, Y. H., Lin, C. H., & Shih, C. C. (2015). Antidiabetic and Antihyperlipidemic Properties of a Triterpenoid Compound, Dehydroeburicoic Acid, from *Antrodia camphorata* in Vitro and in Streptozotocin-Induced Mice. *J Agric Food Chem*, 63(46), 10140-10151. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04400>
- 三十四、 Lechner, J., O'Leary, O. E., & Stitt, A. W. (2017). The pathology associated with diabetic retinopathy. *Vision Res*, 139, 7-14. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2017.04.003>
- 三十五、 Lefebvre, J. L., Kostadinov, D., Chen, W. V., Maniatis, T., & Sanes, J. R. (2012). Protocadherins mediate dendritic self-avoidance in the mammalian nervous system. *Nature*, 488(7412), 517-521. <https://doi.org/10.1038/nature11305>
- 三十六、 Lin, C. H., Hsiao, L. W., Kuo, Y. H., & Shih, C. C. (2019). Antidiabetic and Antihyperlipidemic Effects of Sulphurenic Acid, a Triterpenoid Compound from *Antrodia camphorata*, in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Int J Mol Sci*, 20(19). <https://doi.org/10.3390/ijms20194897>

- 三十七、 Lock, J. H., & Fong, K. C. (2010). Retinal laser photocoagulation. *Med J Malaysia*, 65(1), 88-94; quiz 95.
- 三十八、 Longo, N., Shuster, R. C., Griffin, L. D., Langley, S. D., & Elsas, L. J. (1992a). Activation of insulin receptor signaling by a single amino acid substitution in the transmembrane domain. *J Biol Chem*, 267(18), 12416-12419.
- 三十九、 Longo, N., Shuster, R. C., Griffin, L. D., Langley, S. D., & Elsas, L. J. (1992b). Activation of insulin receptor signaling by a single amino acid substitution in the transmembrane domain. *Journal of Biological Chemistry*, 267(18), 12416-12419.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)42290-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42290-9)
- 四十、 Moehlman, A. T., Casey, A. K., Servage, K., Orth, K., & Krämer, H. (2018). Adaptation to constant light requires Fic-mediated AMPylation of BiP to protect against reversible photoreceptor degeneration. *eLife*, 7, e38752. <https://doi.org/10.7554/eLife.38752>
- 四十一、 Mwangi, N., Ng'ang'a, M., Gakuo, E., Gichuhi, S., Macleod, D., Moorman, C., Muthami, L., Tum, P., Jalango, A., Githeko, K., Gichangi, M., Kibachio, J., Bascaran, C., & Foster, A. (2018). Effectiveness of peer support to increase uptake of retinal examination for diabetic retinopathy: study protocol for the DURE pragmatic cluster randomized clinical trial in Kirinyaga, Kenya. *BMC Public Health*, 18(1), 871. <https://doi.org/10.1186/s12889-018-5761-6>
- 四十二、 Osaadon, P., Fagan, X. J., Lifshitz, T., & Levy, J. (2014). A review of anti-VEGF agents for proliferative diabetic retinopathy. *Eye (Lond)*, 28(5), 510-520.  
<https://doi.org/10.1038/eye.2014.13>
- 四十三、 Pak, W. L., Grossfield, J., & Arnold, K. S. (1970). Mutants of the visual pathway of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 227(5257), 518-520. <https://doi.org/10.1038/227518b0>
- 四十四、 Pak, W. L., Grossfield, J., & White, N. V. (1969). Nonphototactic mutants in a study of vision of *Drosophila*. *Nature*, 222(5191), 351-354. <https://doi.org/10.1038/222351a0>
- 四十五、 Pandey, U. B., & Nichols, C. D. (2011). Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol Rev*, 63(2), 411-436.  
<https://doi.org/10.1124/pr.110.003293>
- 四十六、 Pichaud, F., & Desplan, C. (2001). A new visualization approach for identifying mutations that affect differentiation and organization of the *Drosophila* ommatidia. *Development*, 128(6), 815-826. <https://doi.org/10.1242/dev.128.6.815>
- 四十七、 Qiu, S., Xiao, C., & Robertson, R. M. (2016). Pulsed Light Stimulation Increases Boundary Preference and Periodicity of Episodic Motor Activity in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*, 11(9), e0163976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163976>
- 四十八、 Rajalakshmi, R., Amutha, A., Ranjani, H., Ali, M. K., Unnikrishnan, R., Anjana, R. M., Narayan, K. M., & Mohan, V. (2014). Prevalence and risk factors for diabetic retinopathy in Asian Indians with young onset type 1 and type 2 diabetes. *J Diabetes Complications*, 28(3), 291-297.  
<https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2013.12.008>
- 四十九、 Reddi, A. R., & Culotta, V. C. (2013). SOD1 integrates signals from oxygen and glucose to repress respiration. *Cell*, 152(1-2), 224-235. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.046>
- 五十、 Salkar, A., Wall, R. V., Basavarajappa, D., Chitranshi, N., Parilla, G. E., Mirzaei, M., Yan, P.,

- Graham, S., & You, Y. (2024). Glial Cell Activation and Immune Responses in Glaucoma: A Systematic Review of Human Postmortem Studies of the Retina and Optic Nerve. *Aging Dis*, 15(5), 2069-2083. <https://doi.org/10.14336/ad.2024.0103>
- 五十一、Sanes, J. R., & Zipursky, S. L. (2010). Design principles of insect and vertebrate visual systems. *Neuron*, 66(1), 15-36. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.01.018>
- 五十二、Shieh, B. H. (2011). Molecular genetics of retinal degeneration: A Drosophila perspective. *Fly (Austin)*, 5(4), 356-368. <https://doi.org/10.4161/fly.5.4.17809>
- 五十三、Simó, R., & Hernández, C. (2014). Neurodegeneration in the diabetic eye: new insights and therapeutic perspectives. *Trends Endocrinol Metab*, 25(1), 23-33. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.09.005>
- 五十四、Simó, R., & Hernández, C. (2014). Neurodegeneration in the diabetic eye: new insights and therapeutic perspectives. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 25(1), 23-33. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.09.005>
- 五十五、Sivaprasad, S., Gupta, B., Crosby-Nwaobi, R., & Evans, J. (2012). Prevalence of diabetic retinopathy in various ethnic groups: a worldwide perspective. *Surv Ophthalmol*, 57(4), 347-370. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2012.01.004>
- 五十六、Sorour, O. A., Levine, E. S., Baumal, C. R., Elnahry, A. G., Braun, P., Girgis, J., & Waheed, N. K. (2023). Persistent diabetic macular edema: Definition, incidence, biomarkers, and treatment methods. *Surv Ophthalmol*, 68(2), 147-174. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2022.11.008>
- 五十七、Standl, E., Khunti, K., Hansen, T. B., & Schnell, O. (2019). The global epidemics of diabetes in the 21st century: Current situation and perspectives. *Eur J Prev Cardiol*, 26(2\_suppl), 7-14. <https://doi.org/10.1177/2047487319881021>
- 五十八、Steymans, I., Pujol-Lereis, L. M., Brembs, B., & Gorostiza, E. A. (2021). Collective action or individual choice: Spontaneity and individuality contribute to decision-making in Drosophila. *PLoS One*, 16(8), e0256560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256560>
- 五十九、Tsay, H. J., Liu, H. K., Kuo, Y. H., Chiu, C. S., Liang, C. C., Chung, C. W., Chen, C. C., Chen, Y. P., & Shiao, Y. J. (2021). EK100 and Antrodin C Improve Brain Amyloid Pathology in APP/PS1 Transgenic Mice by Promoting Microglial and Perivascular Clearance Pathways. *Int J Mol Sci*, 22(19). <https://doi.org/10.3390/ijms221910413>
- 六十、Venken, K. J., & Bellen, H. J. (2005). Emerging technologies for gene manipulation in Drosophila melanogaster. *Nat Rev Genet*, 6(3), 167-178. <https://doi.org/10.1038/nrg1553>
- 六十一、Vilinsky, I., & Johnson, K. G. (2012). Electoretinograms in Drosophila: a robust and genetically accessible electrophysiological system for the undergraduate laboratory. *J Undergrad Neurosci Educ*, 11(1), A149-157.
- 六十二、Wei, M. C., Lindsten, T., Mootha, V. K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C. B., & Korsmeyer, S. J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev*, 14(16), 2060-2071.
- 六十三、Wu, J., Tian, Y., Dong, W., & Han, J. (2022). Protocol for electoretinogram recording of the Drosophila compound eye. *STAR Protoc*, 3(2), 101286.

<https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101286>

- 六十四、 Wu, M. Y., Yang, G. T., Lai, T. T., & Li, C. J. (2018). The Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction during the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 3420187. <https://doi.org/10.1155/2018/3420187>
- 六十五、 Wu, Y. S., & Chen, S. N. (2016). Extracted Triterpenes from Antrodia cinnamomea Reduce the Inflammation to Promote the Wound Healing via the STZ Inducing Hyperglycemia-Diabetes Mice Model. *Front Pharmacol*, 7, 154. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00154>
- 六十六、 Xu, Z. H., Gao, Y. Y., Zhang, H. T., Ruan, K. F., & Feng, Y. (2018). Progress in Experimental and Clinical Research of the Diabetic Retinopathy Treatment Using Traditional Chinese Medicine. *Am J Chin Med*, 1-27. <https://doi.org/10.1142/s0192415x1850074x>
- 六十七、 Yamaguchi, M., Lee, I. S., Jantrapirom, S., Suda, K., & Yoshida, H. (2021). Drosophila models to study causative genes for human rare intractable neurological diseases. *Exp Cell Res*, 403(1), 112584. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2021.112584>
- 六十八、 Ziegler, A. B., Ménagé, C., Grégoire, S., Garcia, T., Ferveur, J. F., Bretillon, L., & Grosjean, Y. (2015). Lack of Dietary Polyunsaturated Fatty Acids Causes Synapse Dysfunction in the Drosophila Visual System. *PLoS One*, 10(8), e0135353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135353>
- 六十九、 Zuo, H., Lin, T., Wang, D., Peng, R., Wang, S., Gao, Y., Xu, X., Li, Y., Wang, S., Zhao, L., Wang, L., & Zhou, H. (2014). Neural cell apoptosis induced by microwave exposure through mitochondria-dependent caspase-3 pathway. *Int J Med Sci*, 11(5), 426-435. <https://doi.org/10.7150/ijms.6540>

#### 圖片來源:

1. 本圖片由作者親自製作
2. 本圖片由作者親自製作
3. 本圖片由作者親自製作
4. 本圖片由作者親自拍攝並製作
5. 本圖片由作者親自拍攝
6. 本圖片由作者親自拍攝
7. 本圖片由作者親自製作
8. 本圖片由作者親自擷取
9. 本圖片由作者親自製作
10. 本圖片由作者親自拍攝
11. 本圖片由作者親自處理樣本後交由專業人員拍攝
12. 本圖片由作者親自處理樣本後交由專業人員拍攝
13. 本圖片由作者親自製作
14. 本圖片由作者親自製作
15. 本圖片由作者親自處理樣本後交由專業人員拍攝
16. 本圖片由作者親自製作
17. 本圖片由作者親自製作
18. 本圖片由作者親自製作

## 【評語】052209

糖尿病性視網膜病變 (DR) 是糖尿病的主要併發症，導致後天性失明，尤其在年輕族群中日益普遍。研究指出，台灣的第 2 型糖尿病患者數量在上升，且年輕化趨勢明顯，這使得 DR 成為亟需解決的公共衛生問題。

文字書寫仍須改進，一般表標題應置於表上方。

在描述實驗過程時，可以提供更多的細節，例如每一步的具體操作時間和環境條件，以便其他研究者能夠重現實驗。

本研究使用果蠅作為模型，雖然其視覺系統與哺乳類相似，但仍無法完全模擬人類的生理和病理狀態。建議在後續研究與未來發展方向說明應對策略。

利用具胰島素受體過度表現之突變種果蠅，模擬糖尿病性視網膜病變的情況，並以不同濃度之牛樟芝萃取物飼養，探討改善糖尿病性視網膜病變果蠅的視力功能、顯微型態學變化及粒線體相關蛋白之表現，結果顯示牛樟芝在果蠅模型上可以有效治療糖尿病性視網膜病變，在人類糖尿病性視網膜病變的治療上提供了

重要參考。希望未來能在上述方面進一步改善，使研究成果更加完善，並能夠推向更廣泛的應用。

作品海報

# 牛樟芝萃取物改善糖尿病性視網膜病變—— 以果蠅實驗模型為例

## 壹、摘要

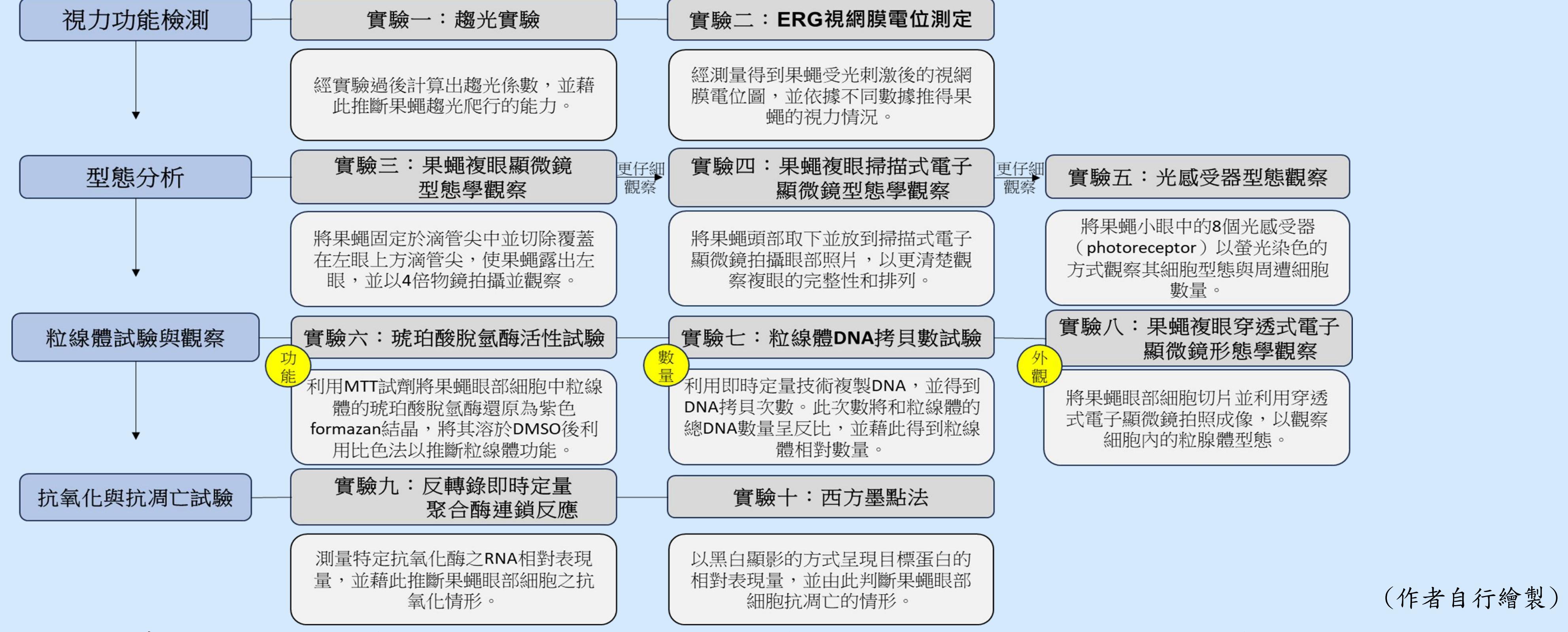
糖尿病性視網膜病變(Diabetic Retinopathy，以下簡稱DR)是糖尿病主要的併發症，是造成後天性失明的主要原因。我國含有高糖的飲品在年輕族群盛行，可能是造成糖尿病罹患率年輕化趨勢的原因，這是我們中學生必須關心與解決的切身問題。本研究發現牛樟芝萃取物在視力功能上能夠改善糖尿病性視網膜病變果蠅的趨光能力與視網膜電位；在視網膜形態學(morphology)上，複眼結構及光感受器排列可被觀察到由凌亂漸趨完整。在粒線體(mitochondrion)與蛋白表現上，能避免粒線體受損，維持粒線體數量和能量代謝，並降低細胞凋亡(apoptosis)相關指標如cytochrome c和cleaved-caspase 3表達，也促進抗氧化因子(antioxidants)如Catalase和SOD1表達，顯示牛樟芝萃取物具有改善DR的潛力。

## 貳、研究動機與目的

高糖飲料盛行於台灣年輕族群，長期攝取過量糖分可能對健康造成影響，進一步查閱文獻後，我們發現糖尿病發病趨勢年輕化並伴隨許多嚴重併發症。其中，糖尿病性視網膜病變造成視力不可逆傷害[1]，其原因可能為粒線體功能缺失，導致氧化壓力上升及視網膜神經細胞凋亡[2,3]。現行治療多具副作用與感染風險，因此希望從副作用小且可以口服的天然物中尋找替代選擇。牛樟芝(*Antrodia cinnamomea*)是臺灣特有種真菌類，具有降血糖、保護肝臟、抗腫瘤與抗發炎等作用[4]。本研究以果蠅作為實驗模型，在初步研究發現，牛樟芝萃取物在糖尿病性視網膜病變果蠅的視力功能檢測中有改善效果，可能具有視力保護作用，對糖尿病性視網膜病變的治療潛力待深入探討，因此進行此相關機轉的深入研究。

## 參、研究方法與流程

牛樟芝萃取物對糖尿病性視網膜病變果蠅的研究方法，可分為視力(vision)功能檢測，複眼形態學分析、粒線體試驗觀察與抗氧化(anti-oxidation)及抗凋亡(anti-apoptosis)試驗四大類別。實驗組別分為野生型果蠅(w<sup>1118</sup>)、糖尿病性視網膜病變果蠅(InR-mutant/DR)、糖尿病性視網膜病變果蠅餵食含有不同劑量之牛樟芝萃取物(InR-mutant+AC 250/1000 mg/L)。詳細進行十種研究方法分析如下：

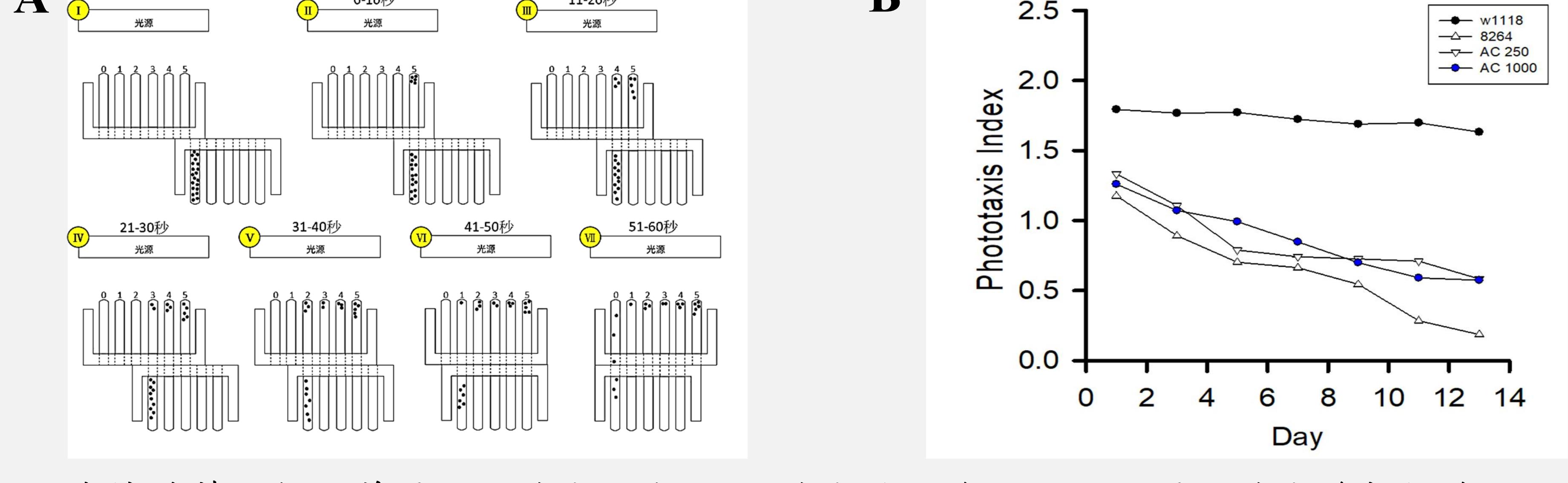


圖一、研究流程示意圖。研究分為視力功能檢測，複眼形態學分析、粒線體試驗與抗氧化與抗凋亡試驗

## 四、研究結果

### 一、牛樟芝萃取物改善果蠅的趨光能力

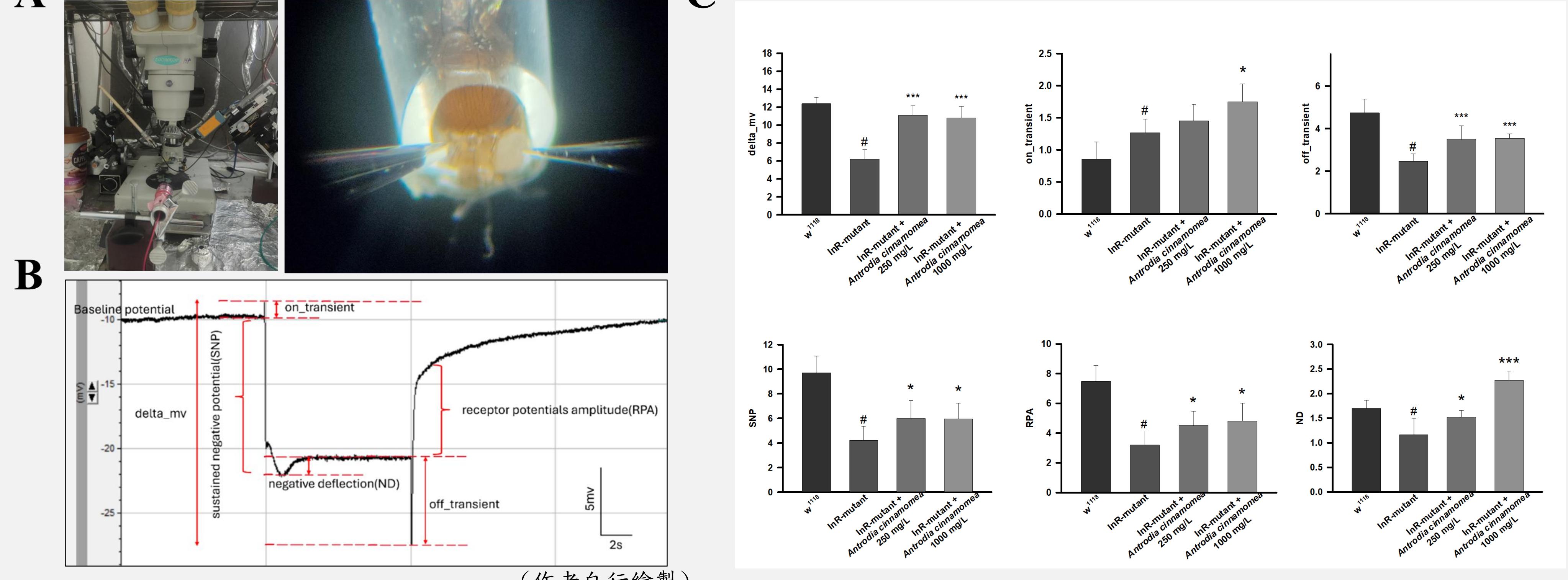
趨光試驗的測定方法參考文獻研究，修飾流程如圖二A。研究結果顯示糖尿病性視網膜病變果蠅的趨光能力隨著羽化天數退化(圖二B)，發現牛樟芝萃取物能有效改善果蠅退化的趨光能力(圖二B)。



圖二、牛樟芝萃取物改善果蠅的趨光能力。A. 趨光試驗流程圖。B. 果蠅趨光係數折線圖。(作者自行繪製)

### 二、牛樟芝萃取物改善果蠅的視網膜電位損傷

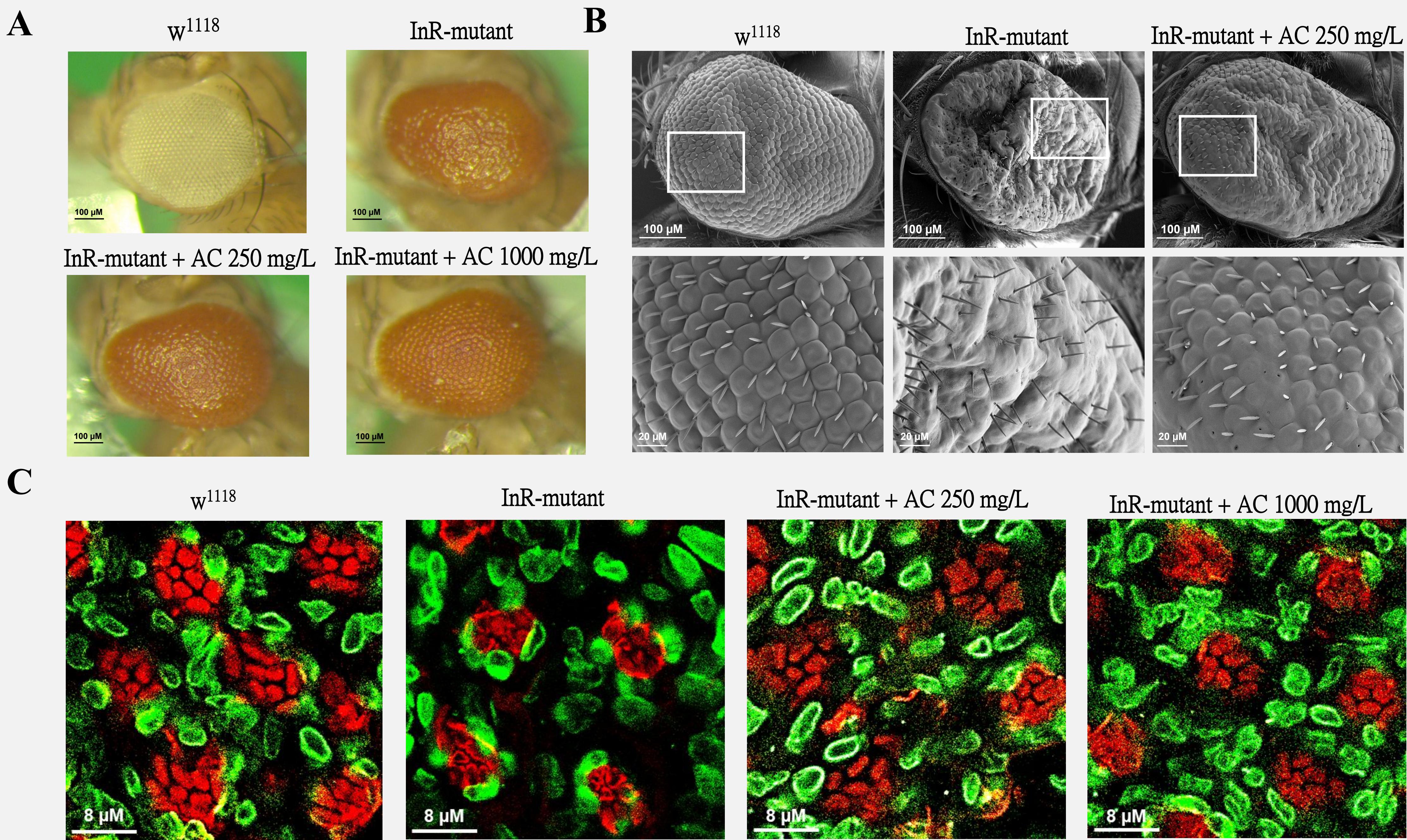
本研究以ERG測定儀測定(圖三A)，顯示果蠅視網膜電位圖譜(圖三B)，結果顯示牛樟芝萃取物對糖尿病性視網膜病變果蠅的六項ERG指標數值皆有回升趨勢(圖三C)，具有強化視覺傳導與神經保護效果。



圖三、牛樟芝萃取物改善果蠅的視網膜電位損傷。A. ERG測定。B. 果蠅視網膜電位圖譜。C. 牛樟芝萃取物改善果蠅delta\_mv、on\_transient、off\_transient、SNP、ND、RPA六項指標。與w<sup>1118</sup>果蠅顯著差異(#p<0.05)，與糖尿病性視網膜病變果蠅顯著差異(\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001)。

### 三、牛樟芝萃取物改善果蠅的外部複眼形態與內部視網膜光感受器形態

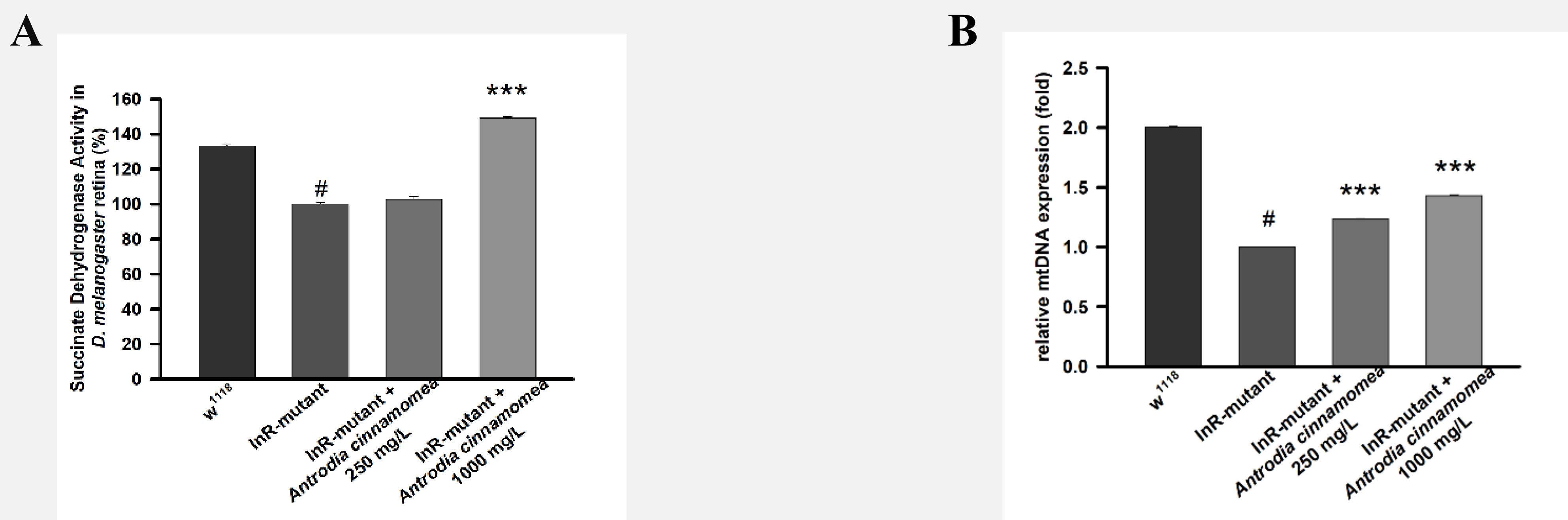
巨觀角度來看，牛樟芝萃取物改善果蠅複眼的潰爛，濃度越高效果越明顯(圖四A)。微觀角度下，牛樟芝萃取物改善果蠅眼部刷毛不整齊及複眼凹陷，修復複眼上網格邊界，恢復刷毛的整齊排列(圖四B)。雷射共軛顯微鏡下， $w^{1118}$ (背景對照組)光感受器完整，間隔細胞數量較多；糖尿病性視網膜病變果蠅光感受器萎縮，間隔細胞數量較少。隨著給與的牛樟芝萃取物濃度提升，修復果蠅光感受器，細胞萎縮減少，間隔細胞數量增加(圖四C)。



圖四、牛樟芝萃取物改善果蠅的外部複眼形態與內部視網膜光感受器形態。A. 以光學顯微鏡觀察牛樟芝萃取物改善果蠅的外部複眼形態。B. 以掃描式電子顯微鏡觀察牛樟芝萃取物改善果蠅外部複眼形態。C. 以雷射共軛顯微鏡觀察牛樟芝萃取物改善果蠅內部視網膜光感受器(紅色螢光)與間隔細胞(綠色螢光)形態。

### 四、牛樟芝萃取物改善果蠅粒線體數量與功能檢測

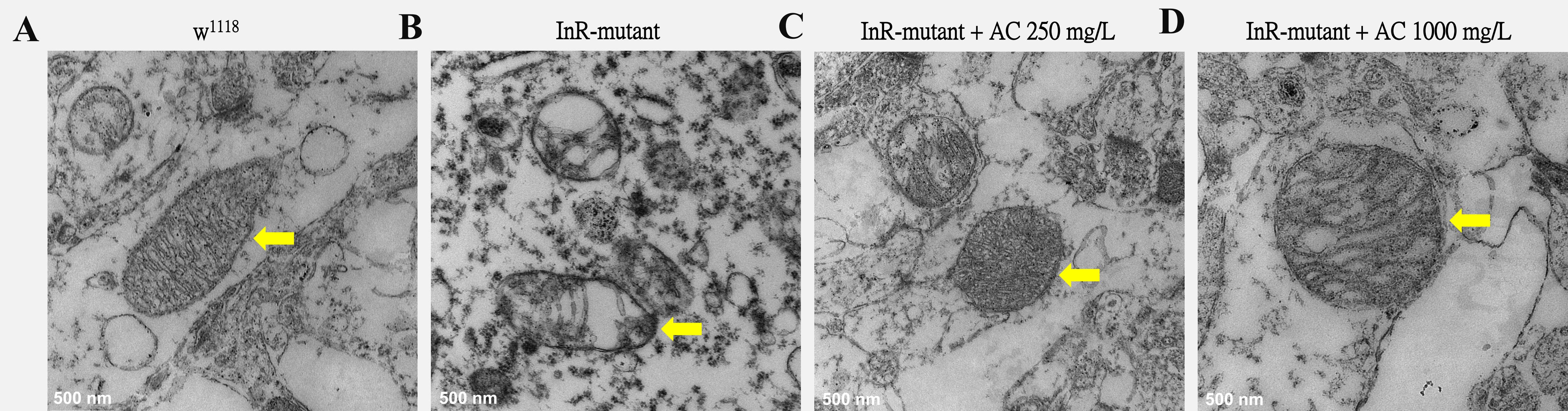
以琥珀酸脫氫酶顯示果蠅粒線體活性，DNA拷貝數表示粒線體數量。果蠅服用牛樟芝萃取物後，琥珀酸脫氫酶活性顯著提升(圖五A)，也增加粒線體DNA拷貝數(圖五B)。結果顯示牛樟芝萃取物能夠改善果蠅視網膜粒線體數量與功能。



圖五、牛樟芝萃取物改善果蠅粒線體數量與功能研究分析。A. 牛樟芝萃取物對琥珀酸脫氫酶活性試驗分析。B. 牛樟芝萃取物改善果蠅粒線體DNA拷貝數量試驗。與 $w^{1118}$ 果蠅顯著差異(#p<0.05)，與糖尿病性視網膜病變果蠅顯著差異(\*p<0.05，\*\*\*p<0.001)。

### 五、以穿透式電子顯微鏡觀察牛樟芝萃取物改善果蠅粒線體微觀形態分析

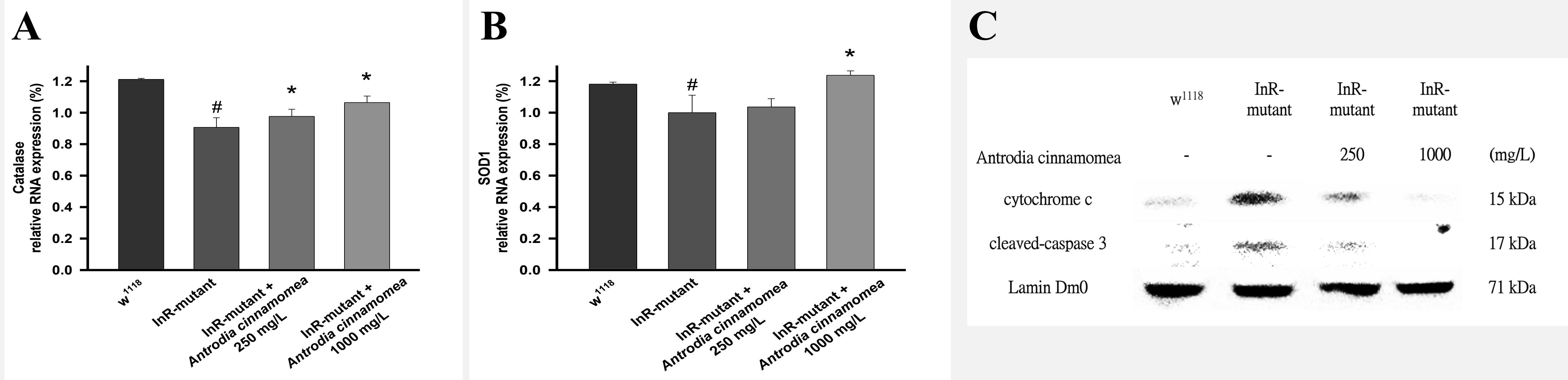
以穿透式電子顯微鏡觀察牛樟芝萃取物改善果蠅粒線體的微觀形態，結果發現在 $w^{1118}$ 果蠅比較下(圖六A)，糖尿病性視網膜病變果蠅的視網膜粒線體結構明顯缺損，內膜的皺褶近乎消失、基質腫脹，周圍部分胞器喪失(圖六B)。隨著牛樟芝萃取物濃度提升，減緩粒線體損壞，增加內膜皺褶，改善粒線體結構(圖六C與D)。



圖六、以穿透式電子顯微鏡觀察牛樟芝萃取物改善果蠅粒線體微觀形態分析。A.  $w^{1118}$ 果蠅細胞器微觀觀察。B. 糖尿病性視網膜病變果蠅細胞器微觀觀察。C. 牛樟芝萃取物濃度250 mg/L改善果蠅細胞器微觀觀察。D. 牛樟芝萃取物濃度1000 mg/L改善果蠅細胞器微觀觀察。(黃色箭頭為粒線體)。

## 六、牛樟芝萃取物促進抗氧化因子與抑制凋亡蛋白表現

DR會導致粒線體功能異常，引發氧化壓力上升，抗氧化酶如Catalase與SOD1可減緩損傷，糖尿病性視網膜病變果蠅僅有較少的抗氧化酶作用以減緩氧化壓力。牛樟芝萃取物濃度增加顯著提升果蠅的Catalase表現量(圖七A)；牛樟芝萃取物顯著提升果蠅SOD1表現量(圖七B)。氧化壓力上升促使細胞凋亡與破壞粒線體，釋放cytochrome c及活化cleaved-caspase 3，分解細胞骨架與DNA。牛樟芝萃取物抑制果蠅cytochrome c與cleaved-caspase 3表現，減少細胞凋亡(圖七C)。



圖七、牛樟芝萃取物促進抗氧化因子與抑制凋亡蛋白表現。A. 過氧化氫酶之RNA相對表現量(Catalase relative RNA expression)。B. 超氧化物歧化酶1之RNA相對表現量(SOD1 relative RNA expression)。C. 牛樟芝萃取物減少細胞凋亡蛋白cytochrome c與cleaved-caspase 3表現量。Lamin Dm0為果蠅核纖層蛋白，驗證結果的可信度。kDa表示蛋白質的分子量。與w<sup>1118</sup>果蠅顯著差異(#p<0.05)，與糖尿病性視網膜病變果蠅顯著差異(\*p<0.05)。

## 伍、討論

### 一、牛樟芝萃取物改善果蠅視力功能與複眼型態

由ERG與趨光實驗可得知牛樟芝萃取物有效地改善糖尿病性視網膜病變果蠅的視覺功能。通過光學與掃描式電子顯微鏡觀察，驗證果蠅視網膜由於高血糖狀況，導致雜亂無章小眼(ommatidia)排列和模糊邊界、光感受器排列異常，服用牛樟芝萃取物可以改善對光刺激的趨光反應與ERG。在微觀形態學方面，可以改善果蠅複眼外部結構受損與內部光感受器型態，具神經保護作用。

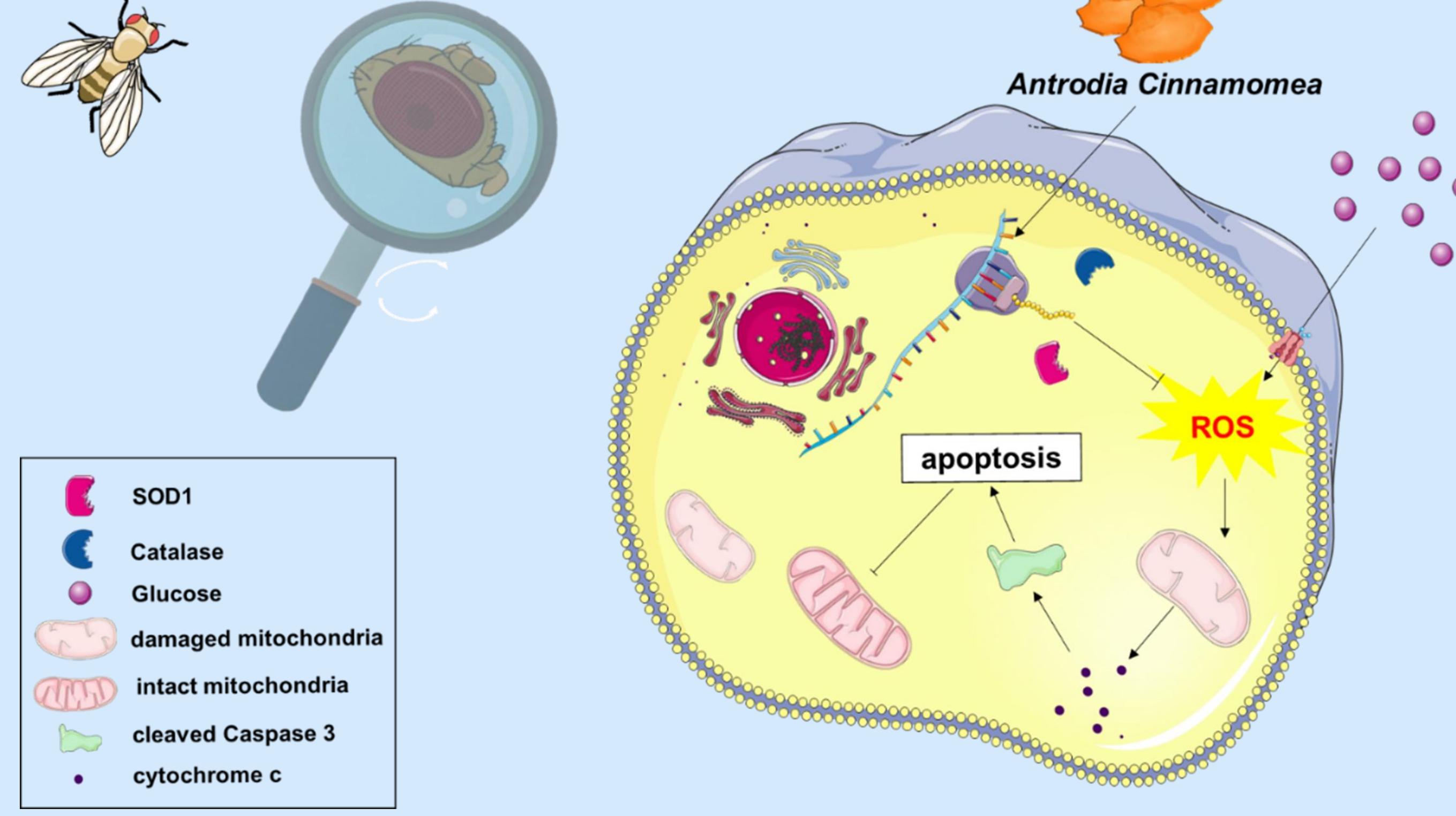
### 二、牛樟芝萃取物改善視果蠅網膜神經細胞粒線體功能、數量與外觀

實驗結果顯示DR會導致粒線體活性下降，以及粒線體數量的降低，這說明糖尿病性視網膜的確正發生神經退化，而穿透式電子顯微鏡則將這個結果可視化：糖尿病性視網膜病變果蠅的視網膜會有粒線體破裂、皺褶消失、基質腫脹等後果。牛樟芝萃取物不僅使視網膜中粒線體活性增加，數量也顯著上升，更重要的是粒線體外觀變得更加完整。

### 三、牛樟芝萃取物改善果蠅視網膜神經細胞凋亡及氧化

我們發現在糖尿病視網膜病變果蠅視網膜中有抗氧化能力受損的情況發生(亦即氧化壓力上升)，而牛樟芝萃取物可有效提升抗氧化能力來抑制DR。透過細胞凋亡及粒線體相關的蛋白標記物cleaved caspase 3及cytochrome c，而牛樟芝萃取物的確能有效抑制細胞凋亡。

本研究結果牛樟芝萃取物對糖尿病性視網膜病變果蠅具促進抗氧化物產生、減少細胞凋亡作用、增加粒線體數量與功能，具有改善視網膜病變(圖八)。



圖八、牛樟芝萃取物在果蠅模型上改善糖尿病性視網膜病變簡圖(作者自行繪製)

## 陸、結論

綜合研究結果顯示，牛樟芝萃取物對糖尿病性視網膜病變果蠅具有促進抗氧化物產生、減少細胞凋亡作用、保護粒線體數量與功能，預防果蠅複眼外部結構與內部光感受器型態受損，改善趨光能力與視網膜神經保護作用，具有改善視網膜病變的潛力。期許未來能分析牛樟芝萃取物的成分，並進行相關細胞與動物研究，希望藉次世代定序(Next Generation Sequencing, NGS)及人工智慧(artificial intelligence, AI)幫助，更加了解牛樟芝萃取物中化合物在糖尿病性視網膜病變扮演的角色。期待這些結果有助於牛樟芝萃取物成為糖尿病性視網膜病變防治的重要候選藥物。

## 柒、主要參考資料

- Standl, E., et al., The global epidemics of diabetes in the 21st century: Current situation and perspectives. *Eur J Prev Cardiol*, 2019. 26(2\_suppl): p. 7-14.
- Kuang, Y., et al., Terpenoids from the medicinal mushroom *Antrodia camphorata*: chemistry and medicinal potential. *Nat Prod Rep*, 2021. 38(1): p. 83-102.
- Murillo-Maldonado, J.M., et al., Drosophila insulin pathway mutants affect visual physiology and brain function besides growth, lipid, and carbohydrate metabolism. *Diabetes*, 2011. 60(5): p. 1632-6.
- Catalani, E., et al., Neuroprotective role of plumbagin on eye damage induced by high-sucrose diet in adult fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2023. 166: p. 115298.