

國立臺灣大學生物資源暨農學院食品科技研究所

碩士論文

Graduate Institute of Food Science and Technology

College of Bio-Resources and Agriculture

National Taiwan University

Master Thesis

不同品種甘薯葉乙醇萃取物抗氧化及
改善葡萄糖攝入之研究

Antioxidation and glucose uptake improvement by ethanol
extracts from leaves of different sweet potato cultivars

劉斌雁

Penk-Yeir Low

指導教授：吳瑞碧博士

共同指導教授：施明智博士

Advisor: James Swi-Bea Wu, Ph. D.

Co-advisor: Ming-Chih Shih, Ph. D.

中華民國一百零二年七月

July, 2013



中文摘要




農產品及蔬果中所含之植物化學物質 (phytochemical)，如花青素、類胡蘿蔔素、類黃酮或酚類化合物 (polyphenols)，具有很強的抗氧化能力，可以降低慢性疾病的發生機率，例如心血管疾病、糖尿病、癌症等。甘薯葉富含花青素及多酚類，可被廣泛利用及開發成各種商品。

本研究主要以三個品種的甘薯葉為原材料，針對其冷凍乾燥或 40 °C 乾燥處理後之 70 % 乙醇萃取物的抗氧化特性加以探討。所用甘薯葉品種包括亞蔬 CN 1927-16、台農 64 號及 CYY 98-59。抗氧化功能測定包括螯合亞鐵離子、清除 DPPH 自由基與總抗氧化能力。之後再以小鼠肝臟上皮 FL83B 細胞進行細胞毒性 (cell viability) 測試，以確定其安全使用劑量。同時，利用 TNF- α 誘導小鼠肝臟上皮細胞產生胰島素抵抗模式，並以不同品種之甘薯葉萃取物處理前述細胞；評估其對提升葡萄糖攝入能力及改善醣類代謝之效果。

研究結果顯示，總酚含量以台農 64 號 (380.59 mg GAE/g DW) 以及 CYY 98-59 (603.09 mg GAE/g DW) 兩個品種的凍乾處理組較高。而在總黃酮類和總花青素類的結果也和總酚含量的測定相近，分別以台農 64 號 (0.30 g 總黃酮類/g DW；0.25 g 總花青素/g DW) 以及 CYY 98-59 (0.22 g 總黃酮類/g DW；0.18 g 總花青素/g DW) 兩個品種的凍乾處理組較高。在抗氧化特性部份，具有螯合亞鐵離子能力效果最佳的為 CYY 98-59 的 40 °C 乾燥處理後之 70 % 乙醇萃取物 (EC₅₀ 值為 3.98 mg/ml)；而台農 64 號以及 CYY 98-59 兩個品種對 DPPH 自由基具有較強的清除活性，EC₅₀ 值分別為 4.02 mg/ml 以及 4.11 mg/ml。在總抗氧化能力測定的方面，也以台農 64 號以及 CYY 98-59 兩個品種的凍乾處理組最佳，EC₅₀ 值為 7.64 mg/ml 以及 8.72 mg/ml。

由細胞試驗結果發現，三種品種甘薯葉之 70 % 乙醇萃取物在濃度 1 mg/ml 之內對小鼠肝臟上皮細胞均無毒性。胰島素抵抗細胞模式之葡萄糖攝入能力試驗，結果顯示，處理濃度 1 mg/ml 時，台農 64 之 40°C 乾燥處理組效果最好，與控



制組 (TNF- α 處理) 比較可增加 57.72 % 的葡萄糖攝入能力；其次為 CYY 98-59 之凍乾處理組及亞蔬 1927-16 之凍乾處理組，分別提升了 46.25 % 和 43.84 %。之後探討不同品種之甘薯葉萃取物對 TNF- α 誘導小鼠肝臟上皮細胞之胰島素訊息傳遞蛋白質及葡萄糖轉運蛋白表現量的影響。結果顯示，FL83B 細胞經 20 ng/ml TNF- α 誘導後其 IR、IRS-1 及 GLUT-2 之表現量與正控制組比較之下量並無顯著差異，其明確機轉有待探討。

綜合上述結果，甘薯葉具有抗氧化力將可提供保健食品原料業者之新選擇，並開發出符合市場需求並具保健功效之新產品，藉以提升甘薯葉加工利用多元性，增加甘薯葉之附加價值，提高農民的收益。

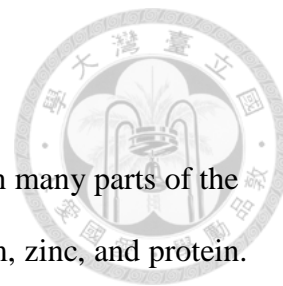
關鍵字：花青素，甘薯葉，乙醇萃取物，抗氧化活性，葡萄糖攝入

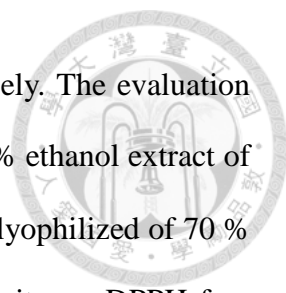
Abstract

Sweet potato leaves have been consumed as a fresh vegetable in many parts of the world. They are rich in vitamin B complex, β -carotene, iron, calcium, zinc, and protein. Recent experiments revealed that sweet potato leaves contain high contents of polyphenolics, namely anthocyanins and phenolic acids, compared with commercial vegetables.

This study was aimed to evaluate the antioxidation activities and alleviation of insulin resistance of 70 % ethanol extract of leaves of 3 sweet potato cultivars, TN 64, CYY 98-59 and CN1927. Sweet potato leaves were separated into 2 groups, lyophilized and 40 °C air-dried. Afterthat, they were extracted with 70 % ethanol at 25 °C. The antioxidation activities tests include total phenolics assay, α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) scavenging ability, ferrous ion chelating ability and scavenging ability on long-life radical anion ABTS^{•+} were performed. The *in vitro* anti-hyperglycemic activity of the extracts was investigated using glucose uptake test in FL83B mouse hepatocytes. The fluorescent dye 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino)-2-deoxyglucose was used to estimate the uptake ability of the cells.

The total phenolics of the extracts was determined spectrophotometrically according to the Folin Ciocalteu procedure and ranged from 198.49 to 603.09 mg GAE/g DW. For total flavonoids and total anthocyanins, the values were in the descending order: 0.30 > 0.22 > 0.20 > 0.05 > 0.03 > 0.01 g/g DW which were found in TN 64 > CYY 98-59 > CN 1927-16, respectively. With regard to the results of antioxidation activities of ethanol extracts from leaves of different sweet potato cultivars, the antioxidation activities of lyophilized of 70 % ethanol extract CYY 98-59 and TN 64 were significantly higher than Trolox in ABTS^{•+} radical-scavenging activity





($p < 0.05$), EC_{50} values were 8.72 mg/ml and 7.64 mg/ml respectively. The evaluation of ability to chelate ferrous ion showed that 40 °C air-drying of 70 % ethanol extract of CYY 98-59 had lower EC_{50} value (3.98 mg/ml), on the other hand, lyophilized of 70 % ethanol extract CYY 98-59 and TN 64 had higher scavenging activity on DPPH free radical with EC_{50} values at 4.11 mg/ml and 4.02 mg/ml respectively.

The cell viability test showed that the ethanol extracts from leaves of different sweet potato cultivars have no cell toxicity in concentration of 1 mg/ml. Results of the glucose uptake test in the insulin resistance cell model indicated that the highest improvement can be achieved by the 40 °C air-dried of ethanol extract TN 64 in PBS buffer. Compared with the control group (TNF- α treated group), the ethanol extract could increase the glucose uptake ability by 57.72 %. Next is the lyophilized 70 % ethanol extract of CYY 98-59 and CN 1927-16, the percentage increase of the glucose uptake were 46.25 % and 43.84 % respectively. However, the results did not show that ethanol extracts from leaves of different sweet potato cultivars promote the expressions of insulin receptor substrate-1 (IRS-1), insulin receptor and glucose transporter-2 (GLUT-2).

In conclusion, 70 % ethanol extract from sweet potato leaves has potential on physiologic effects as antioxidation and anti-hyperglycemic agents.

Keywords: Sweet potato leaves, phenolic acids, anthocyanins, antioxidation activities, glucose uptake test

目 錄

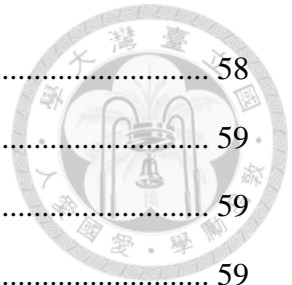


中文摘要	i
Abstract.....	iii
目 錄.....	v
圖 次.....	viii
表 次.....	ix
第一章、前言	1
第二章、文獻整理	3
一、 自由基與健康之關聯性	3
(一) 自由基與活性氧的產生及作用機制	3
(二) 自由基與氧化壓力	4
(三) 過氧化對人體造成的傷害	5
(四) 抗氧化劑	6
二、 糖尿病	9
(一) 糖尿病流行病學	9
(二) 糖尿病簡介	10
(三) 糖尿病分類	11
(四) 糖尿病藥物治療	14
三、 胰島素	17
(一) 胰島素信號傳導	17
(二) 葡萄糖代謝與胰島素阻抗之關係	19
(三) 胰島素阻抗	20
(四) 胰島素分泌缺失	21
(五) 腫瘤壞死因子 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 與胰島素阻抗	22
(六) 以細胞模式探討胰島素阻抗	23
四、 甘薯	26
第三章、 研究動機與實驗架構.....	30

第四章、不同品種甘薯葉乙醇萃取物抗氧化特性之研究	32
一、前言	32
二、實驗材料	33
(一) 原料	33
(二) 試藥級藥品	33
(三) 儀器設備	33
三、實驗方法	36
(一) 樣品 70 % 乙醇粗萃物製取	36
(二) 總酚化合物含量測定	36
(三) 總類黃酮類測定	36
(四) 總花青素類測定	36
(五) 甘薯葉乙醇粗萃物之抗氧化能力探討	37
(六) 統計分析	38
四、結果與討論	39
(一) 不同品種甘薯葉之乙醇萃取物之萃取率	39
(二) 總酚化合物含量測定	39
(三) 總黃酮類測定	40
(四) 總花青素類測定	40
(五) 甘薯葉乙醇粗萃物之抗氧化能力探討	41
五、結論	52
第五章、不同品種甘薯葉乙醇萃取物對葡萄糖攝入能力之探討	54
一、前言	54
二、實驗材料	55
(一) 原料	55
(二) 實驗細胞	55
(三) 試藥級藥品	55
(四) 實驗樣品配製	56



(五) 儀器設備	58
三、 實驗方法	59
(一) 樣品 70 % 乙醇粗萃物製取	59
(二) 小鼠肝細胞 FL83B 之保存與培養	59
(三) FL83B 細胞存活率試驗 (MTT assay)	59
(四) 甘薯葉乙醇萃物對具胰島素阻抗性 FL83B 細胞之葡萄糖攝入試驗 (Glucose uptake)	59
(五) 西方轉印分析 (Western blot).....	60
(六) 統計分析	62
四、 結果與討論	63
(一) 不同品種甘薯葉之乙醇萃取物對 FL83B 細胞生長存活率 (cell viability).....	63
(二) 甘薯葉乙醇萃物對具胰島素阻抗 FL83B 細胞葡萄糖攝入試驗 (glucose uptake)	64
(三) 不同品種甘薯葉乙醇萃取物對胰島素阻抗 FL83B 細胞胰島素訊息傳遞 蛋白質表現之影響.....	65
五、 結論	75
第六章、 總結	76
第七章、 參考文獻	77



圖次



圖 2-1. 101 年主要死因死亡率。.....	10
圖 2-2. 肝臟中胰島素代謝作用之調節。.....	18
圖 2-3. 氧化壓力活化絲胺酸激酶誘導胰島素阻抗。.....	21
圖 2-4. 腫瘤壞死因子與胰島素阻抗。.....	23
圖 3-1. 實驗架構。.....	31
圖 4-1. 本實驗所分析的 3 個甘薯品種，(a)亞蔬 CN 1927-16 (黃葉種)，(b) 台農 TN 64 (紅紫色心臟形大葉) 及 (c) CYY 98-59 (缺刻形紫葉)。.....	35
圖 4-2. ABTS 自由基形成之反應式。.....	43
圖 4-3. ABTS 氧化還原系統之二種氧化產物。.....	43
圖 4-4. 不同品種甘薯葉乙醇萃取物可能參與的抗氧化機制。.....	53
圖 5-1. 不同品種冷凍乾燥處理甘薯葉之乙醇萃取物 (1 mg/ml) 對具胰島素阻抗 FL83B 細胞葡萄糖攝入之影響。.....	70
圖 5-2. 不同品種 40 °C 乾燥處理甘薯葉之乙醇萃取物 (1 mg/ml) 對具胰島素阻抗 FL83B 細胞葡萄糖攝入之影響。.....	71
圖 5-3. 不同品種甘薯葉之乙醇萃取物 (1 mg/ml) 對具胰島素阻抗 FL83B 細胞胰島素受器表現之影響。.....	72
圖 5-4. 不同品種甘薯葉之乙醇萃取物 (1 mg/ml) 對具胰島素阻抗 FL83B 細胞胰島素受器受質蛋白質表現量之影響。.....	73
圖 5-5. 不同品種甘薯葉之乙醇萃取物 (1 mg/ml) 對具胰島素阻抗 FL83B 細胞葡萄糖轉運蛋白質表現量之影響。.....	74

表次



表 2-1. 糖尿病的分類.....	12
表 2-2. 糖尿病診斷標準.....	13
表 4-1. 不同品種甘薯葉萃取率.....	45
表 4-2. 不同品種甘薯葉之總酚類含量.....	46
表 4-3. 不同品種甘薯葉之總黃酮類含量.....	47
表 4-4. 不同品種甘薯葉之總花青素類含量.....	48
表 4-5. 不同品種甘薯葉乙醇萃取物 DPPH 自由基清除能力之 EC ₅₀ 值.....	49
表 4-6. 不同品種甘薯葉乙醇萃取物 ABTS 自由基清除能力之 EC ₅₀ 值.....	50
表 4-7. 不同品種甘薯葉乙醇萃取物螯合亞鐵離子能力之 EC ₅₀ 值.....	51
表 5-1. 不同品種甘薯葉乙醇萃取對 FL83B 細胞之細胞存活率.....	68
表 5-2. 不同品種甘薯葉乙醇萃取物 (1 mg/ml) 對具胰島素阻抗性 FL83B 細胞 葡萄糖攝入之改善情形.....	69

第一章、前言

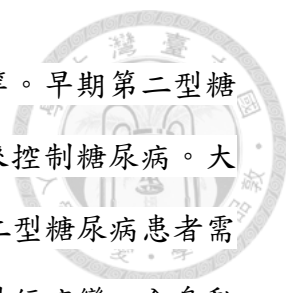
甘薯 (*Ipomoea batatas*(L.) Lam., sweet potato) 又名地瓜，適合在台灣氣候條件下生產，不受季節限制。地瓜葉在許多報告中皆被提及其營養價值很高；不但維生素 A、B1 與 C 含量高，也含有豐富的蛋白質與礦物質（鈣、磷、鐵），除此之外；其所含的膳食纖維柔細，可促進胃腸蠕動，幫助消化，預防便秘、痔瘡及大腸癌之罹病率；又能增加飽食感，具有減少熱量攝取的間接優點，有助於糖尿病患者之血糖控制，多食降低膽固醇，有益人體之健康。

除此之外，根據亞洲蔬菜研究發展中心的分析報告，甘薯葉的抗氧化活性為蔬菜類的第一名，其次分別為薑、莧菜、菠菜、茄子、青江菜、白菜類、花椰菜、苦瓜、蕃茄等 (<http://avrdc.org/>)。甘薯葉具有高含量的類黃酮及胡蘿蔔素，是抗氧化能力重要來源，可抑制過氧化的連鎖反應，其抗氧化能力和熟知的維生素 E 或維生素 C 互補。甘薯葉尚含有綠原酸，是一種重要的生物活性物質，具有抗菌、抗病毒、增高白血球、保肝利膽、抗腫瘤、降血壓、降血脂、清除自由基和興奮中樞神經系統等作用。甘薯葉含有多種花青素，其中矢車菊素 (cyanidin)，不但較穩定，抗突變和抗氧化力還遠超過其他花青素。花青素可預防糖尿病引起的視網膜病和胸部纖維囊腫病、保護視力、抗腫瘤、保護幅射傷害、保護血管、抗發炎、降低化療毒性、保護肝臟於四氯化碳傷害及保護抗氧化酶 (SOD、glutathione peroxidase、catalase) 的功能。

甘薯葉病蟲害少，高營養價值，以其為原料製作的保健食品可用於血糖、血脂、體脂肪的控制，具有保健功效，長期使用可以調控新陳代謝症後群，減少慢性疾病的發生。

第二型糖尿病也稱非胰島素依賴型糖尿病，常出現在成年人（特別是肥胖症患者）身上，其病症會導致消瘦。病因包括胰島素抗性 (insulin resistance)，使到身體不能有效地使用胰島素，或是胰島素分泌的減少，無法滿足身體所需。

糖尿病主要的臨床表現為多飲、多尿、多食和體重下降（三多一少），以及



血糖高、尿液中含有葡萄糖（正常的尿液中不應含有葡萄糖）等。早期第二型糖尿病患者可以通過改善生活方式（如健康飲食，適量運動等）來控制糖尿病。大多數患者可通過口服降血糖藥來幫助控制體內血糖。而一些第二型糖尿病患者需要胰島素注射。糖尿病會引發多種慢性疾病產生，如高血壓、神經病變、全身動脈硬化 (Shen *et al.*, 2008) 等癥狀，故為避免此現象發生，有效調節血糖或延緩糖尿病的發生即顯得格外重要。

本研究主要針對其冷凍乾燥或 40 °C 乾燥處理後之 70 % 乙醇萃取物的抗氧化特性加以探討。所用甘薯葉品種包括亞蔬 CN 1927-16、台農 64 號及 CYY 98-59。抗氧化功能測定包括螯合亞鐵離子、清除 DPPH 自由基與總抗氧化能力。之後利用 TNF- α 誘導小鼠肝臟上皮細胞產生胰島素抵抗模式，並以不同品種之甘薯葉處理前述細胞；評估其對提升葡萄糖攝入能力及改善醣類代謝之效果。

第二章、文獻整理

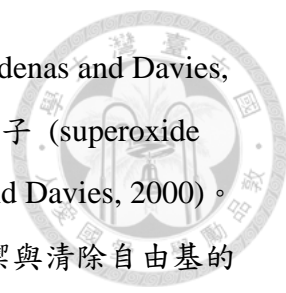
一、自由基與健康之關聯性

由於人體疾病與老化的發生，近年來醫學界開始重視自由基 (free radical) 與抗氧化物質的研究。人體內無時無刻都在產生自由基，在呼吸代謝過程中約有 2%~3% 氧會轉換成超氧自由基的活性氧 (superoxide)，尤其到了中年後，身體機能、免疫力及對於自由基的清除能力隨著年齡增長而逐漸降低，容易導致各種疾病產生。若經由適當服用抗氧化劑可將油脂在氧化過程產生的自由基清除，藉以中斷油脂氧化的連鎖反應，阻止氧化反應的進行 (Kaur and Kapoor, 2002; Halliwell, 2009)；或藉由抗氧化劑對金屬離子螯合能力 (chelating) 來抑制金屬離子促氧化的功能，而得以彌補身體抵抗氧化傷害之不足、達到抗氧化之目的，更可延緩老化而增加壽命 (Ames *et al.*, 1993; Sang *et al.*, 2002)。

(一) 自由基與活性氧的產生及作用機制

自由基是指含有一個或多個不成對電子而獨立存在之原子或分子 (Halliwell, 1989)，不同型態的自由基其化學反應性差異相當大，大部分的自由基是處於較不穩定狀態且半衰期短，其反應性較非自由基分子高，易與其他分子發生反應，使自己形成穩定電子對狀態，而生成自由基，並進一步發生連鎖反應 (廖，2004)。氧是生物體維持生命所必須的基本要素，在大氣中是以安定的三重態氧 (triplet state oxygen; $^3\text{O}_2$) 存在。而氧經由電子及能量轉移等作用，生成反應性較三重態氧分子強的含氧分子稱為活性氧 (activated oxygens)，活性氧中亦有一些自由基，這些含氧之自由基亦稱含氧自由基 (oxyradicals)，故活性氧可分為 (1) 含氧自由基，如超氧陰離子、氫氧自由基、過氧化自由基、烷氧自由基及過氧化氫自由基等；(2) 非自由基的活性氧，如過氧化氫、次氯酸、臭氧、單重氧及次溴酸。當體內的自由基與活性氧過量時則易與細胞膜上之多元不飽和脂肪酸作用而引發脂質過氧化 (lipid peroxidation) 的作用，造成細胞膜的傷害及擾亂 (陳，2004)。

活性氧族具有很高的反應性、半衰期很短且極不穩定，可能攻擊生物分子而引發自由基連鎖反應。在生理所需的濃度下，活性氧族可行使正常細胞功能；但若活性氧族過度產生，則可能造成細胞中 DNA、脂質、蛋白質等分子過度氧化，而造成細胞傷害 (Wei, 1998)。相關之研究證據顯示，活性氧族可進一步造成多種退化性疾病、老化、突變以及癌症的形成。而在所有好氧生物體 (aerobic organisms)



內，生物體內約有 95 % 的氧氣應用在粒線體內膜的呼吸鏈 (Cadenas and Davies, 2000)，在產生 ATP 的過程約有 1-2 % 的氧會轉變成超氧陰離子 (superoxide anion, O_2^-)、過氧化氫 (H_2O_2)、及其他活性氧自由基 (Cadenas and Davies, 2000)。活性氧族會在氧化磷酸化中不斷的形成及分解。而體內亦有防禦與清除自由基的系統來抵禦自由基的攻擊，並具有修補系統來修復受到自由基攻擊的組織 (Nordberg and Arner, 2001)。

正常細胞中，活性氧族可調節訊息傳遞與生理狀態 (Fleury *et al.*, 2002)，過多的活性氧族則藉由清除系統來清除。主要透過體內抗自由基氧化系統如 Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD)、Zn/Cu-SOD、catalase、glutathione peroxidase 等酵素可清除自由基。但若抗自由基氧化系統與自由基的產生有失衡現象，便會造成氧化壓力 (Wei, 1998)。

(二) 自由基與氧化壓力

在生物體中，抗氧化防禦機制可使活性氧形成的量保持在最少 (MeKee, 2003)。自由基可能涉及人體多種生物功能，例如調控細胞生長及訊息傳遞，但是當自由基的生成超出人體本身的防禦範圍時，就會有氧化壓力 (oxidative stress) 的形成，氧化壓力是指體內抗氧化系統與氧化傷害失去平衡而造成生物體受損的現象，主要是因酵素失活，多醣類去聚合作用、DNA 裂解和分子變性而導致損害，在某些情況下，例如某些代謝異常、過度使用某些藥品、曝露在強烈的輻射或反覆的接觸如二手煙等環境污染物，皆會導致嚴重的氧化傷害。

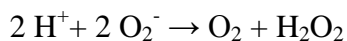
氧化壓力可能造成細胞內訊息傳遞混亂、細胞膜損害、細胞離子溝通損傷、引發細胞膜脂質過氧化 (Halliwell and Chirico, 1993)、影響細胞內所有含SH基的分子 (sulfhydryl-containing molecules)，包含蛋白質、DNA等皆會產生影響。最近的研究證據顯示活性氧族作為次級訊息傳遞物 (second messengers)，活化轉錄因數 (transcription factor)，如 AP-1 及 NF- κ B 與誘導免疫發炎相關基因表現 (Clement and Pervaiz, 1999; Desagher and Martinou, 2000)。除此之外，不同細胞種類，活性氧族可作為 mitotic stimuli、cellular senescence inducer 與 cell death mediator (Cadenas and Davies, 2000; Finkel and Holbrook, 2000; Nordberg and Arner, 2001)。



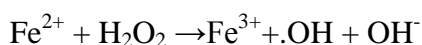
氧化傷害至少與 100 種人類疾病有關，包括癌症、循環系統失調，例如動脈硬化症、心肌梗塞、高血壓和神經失調，例如肌萎縮硬化症、帕金森氏症及阿茲海默症等。

(三)過氧化對人體造成的傷害

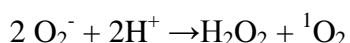
在正常的情況下，細胞組成的抗氧化防禦機制會將氧化傷害減至最小。在氧分子的還原過程中，第一個形成的活性氧是 O_2^- ，大部分的 O_2^- 都是由 complex III 的 Q cycle 或黃素蛋白 NADH 去氫酶 (complex I) 而來的電子所形成的。 O_2^- 扮演親核物質 (nucleophile)，常是氧化劑，但在特殊條件下，也有可能是還原劑，因為它的溶解特性， O_2^- 會導致細胞膜磷脂質相當大地傷害。當 O_2^- 在水溶液的環境中產生， O_2^- 會與它本身反應產生 O_2 和 H_2O_2 。



H_2O_2 不是自由基，因為它沒有未成對的電子，但其有限的反應性會因它通過細胞膜散佈更廣而增強。 H_2O_2 隨後與 Fe^{2+} (或其他轉移金屬) 反應產生一個具高度反應性的物質---羥自由基 (hydroxyl radical, $\cdot OH$)。



羥自由基是具高度反應性的分子，且是特別危險的自由基，在其與任何生物分子碰撞反應前，只會短距離的散佈，一旦開始反應，其可啟動自體催化自由基鏈反應。當雙氧吸收了充足的能量去轉移一未成對電子至較高軌域，超氧陰離子 (O_2^-) 就會形成單重態氧 (1O_2)：



單重態氧雖然不是自由基，但因為它是強力氧化劑，甚至比氫氧自由基更具反應性。

1. 破壞 DNA

氫氧自由基 ($\cdot OH$) 會破壞 DNA 的每個部份，造成 DNA 雙股的切斷或鹼基結構，導致 DNA 永久性的損傷 (Cameron *et al.*, 1976; Valko *et al.*, 2004)。DNA 遭到切斷，人體在修補的過程中，可能會因為無法正常修復而產生突變。自由基攻擊鹼基後會衍生一些副產品，這些副產品會使遺傳發生錯誤而有致癌的可能。人體若長期遭受這一連串的傷害，所造成的結果就是各種慢性疾病發生和老化。

2. 氧化脂質

體內的多元不飽和脂肪酸受到氧化後會產生有毒的醛類 (malondialdehyde, MDA), MDA 會引起突變及致癌的危險 (Carr *et al.*, 2000)。細胞膜上脂質被氧化，會使細胞膜流通性改變，養分無法進入細胞內造成細胞壞死，若細胞膜被破壞的速度大於細胞再生的速度，組織器官的功能就會受到影響而產生老化。低密度脂蛋白 (LDL) 被氧化，會增加血小板的凝集、內皮細胞的脫落，而造成動脈粥狀硬化。

3. 攻擊蛋白質

自由基攻擊胺基酸的側鏈，令蛋白質失去功能，或形成大分子，甚而斷裂，使細胞無法正常運作 (Stadtman *et al.*, 2004)。發生在皮下之膠原組織，會令皮膚失去彈性、筋骨僵硬等。

(四) 抗氧化劑

抗氧化劑具有抑制低密度脂蛋白氧化效果，故攝取含抗氧化的物質可預防心血管疾病的發生 (Salleh *et al.*, 2002; Zin *et al.*, 2002)。因此，抗氧化劑的應用引起世界廣泛關注，更引起一連串使用抗氧化劑作為養生保健食品及化妝品原料的潮流，促使「抗氧化物質」在目前各國的保健食品中有極大的市場佔有率。

近年來由於食品工業的發達，食品添加物之種類與數量逐年增加，為了消費者的健康，從自然界中尋求安全又有效的天然抗氧化劑乃成為食品界之一項重要研究。天然的抗氧化劑已被大量使用在食品工業上，其安全性高，但抗氧化性沒有人工合成的抗氧化劑有效且價格昂貴，因此尋找便宜又有效的天然抗氧化劑已成為重要的課題。

自然界中天然抗氧化物質一般可分為：

1. 酵素類

a. 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase)

SOD 是人體內最重要的抗氧化酵素系統，將活性較大的超氧化物 (superoxide, O_2^-) 作用成活性較小的過氧化氫 (H_2O_2)，反應式為： $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ ，而 SOD 需要與金屬離子結合，如： Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 或 Mn^{2+} ，當作電子的傳遞者，才有作用，SOD 在體內經氧化還原反應後可循環再利用 (McCord *et al.*, 1969; Valko *et al.*, 2007)

b. 過氧化氫酶 (Catalase)



Catalase 主要是將 SOD 產生的 H_2O_2 作用成無害的氧及水，反應式為：

$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$ ，但 catalase 需要 Fe^{3+} 來催化整個反應的進行。

c. 麩胺基硫過氧化酶 (glutathione peroxidase)

主要是活化 glutathione (GSH)，直接將過氧化脂質 R-OOH 還原成醇 R-OH 或分解 H_2O_2 ，但 glutathione peroxidase 也需要硒的催化 (Pastore *et al.*, 2003)。

2. 非酵素類

a. 維生素 C

維生素 C 是水溶性維生素，可利用分子上的氫氧基 (OH) 和自由基作用，OH 會釋出一個 H^+ 和一個電子，自由基得到電子後，成為較穩定的化合物，而維生素 C 上的 OH 則變成 O^- ，但由於其可產生共振，所以活校較低、較無破壞性。維生素 C 被氧化後會被 glutathione peroxidase 系統還原，而可以一再循環重複利用 (Cameron *et al.*, 1976; Sies *et al.*, 1992; Carr *et al.*, 1999)。

b. 維生素 E


維生素 E 是其中一個脂溶性的維生素，有酚的結構，可利用其上的 OH 基釋出一個 H^+ 和一個電子，使自由基變成較穩定的化合物，維生素 E 上的 OH 則變成 O^- ，因旁有苯環可以產生共振，成為較穩定的自由基。作用後的氧化態維生素 E，會被維生素 C 還原，因此可重複再利用 (Sies *et al.*, 1992)。

c. β 胡蘿蔔素

β 胡蘿蔔素是維生素 A 的前驅物質，不過維生素 A 並不像 β 胡蘿蔔素具有良好的抗氧化作用。 β 胡蘿蔔素在人體內有二種抗氧化能力：一、可以與脂質過氧化自由基結合而中斷脂質過氧化連鎖反應。二、吸收氧氣因為光線照射 (例如在眼睛) 而變成的激發氧氣的過多能量，阻止氧化作用的進行。 β 胡蘿蔔素的主要食物來源是深綠、黃色的蔬菜和藻類，其中以紅蘿蔔最具代表性 (Burton *et al.*, 1984)。

d. 其他植物化學物 (phytochemicals) 中的多酚類、帖類、類黃酮類及有機酸等成分

花青素屬於多酚類化合物中的類黃酮代謝所衍生的化合物，常見者包括天竺葵色素 (pelargonidin)、矢車菊素 (cyanidin)、花翠素 (delphinidin)、芍藥花素 (peonidin)、矮牽牛素 (petunidin) 及錦葵色素 (malvidin) 等 (Albert *et al.*, 2009;



詹, 2010)。花青素在植物界中是很大一群以 C6-C3-C6 芳香環為結構骨架之水性色素，主要累積在植物細胞的液泡，常存在於葉片、花瓣、種子和果實中，隨液胞中酸鹼度的不同而使其表現出不同的顏色，花青素為植物各種顏色(紅、紫、紫紅)之主要來源，其結構與抗氧化力有相當大的關係，一般與醣類形成醣苷(glycosylated)後也具有抗氧化活性。最常見的花青素是在 A、C 環 C-3 或 C-3, 5 之位置發生醣苷鍵結 (Francis, 1989)，而矢車菊色素之抗氧化性來自 B 環的 3, 4-dihydroxybenzoic acid 氧化成 3,4-diketobenzoic acid (楊, 1994)。花青素的醣化受到不同醣取代基的影響，且捕捉 OH[•] 的能力與黃酮類類似，會因 B 環 OH[•] 基含量的增多而增加其捕捉自由基的能力，及因 C 環結構 C-4 位置甲基化或 C-3 位置醣化作用，而減弱其抗氧化活性 (Zhan, 1996; 鍾, 2006)。

目前有許多研究集中於植物抗氧化潛能的開發，發現抗氧化能力與植物內多酚類含量多寡成正相關 (Yoshinaga *et al.*, 2000; Malkeet and Picha, 2008)，也有相關報告 (Tsuda *et al.*, 1996; Goda *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2004; 高等, 2005; Saigusa *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Teow *et al.*, 2007) 指出花青素在人體內的抗氧化及清除自由基的能力為維他命 E 的 50 倍、維他命 C 的 20 倍。其抗氧化能力可維持正常的細胞連結、穩定內皮細胞上的磷脂質，避免動脈與靜脈的細胞被自由基破壞。亦可增加膠質及黏多糖的合成及預防聚集物依附在血小板表面產生過度凝集現象，以維持動脈壁的完整性及避免膽固醇被氧化，增強血管彈性，增加循環，預防心血管疾病、延緩細胞老化、減緩糖尿病、改善視力及抗癌等功能。因此，花青素相關產品受到食品工業青睞，目前最常見之花青素商品有藍莓萃取物及葡萄萃取物等 (Lu *et al.*, 2001; Saijusa *et al.*, 2005)。黃 (2005) 研究指出，紫色甘薯葉含豐富的 quercetin 和 cyanidin，並且可有效避免淋巴球細胞 DNA 氧化損傷，所以紫色甘薯葉為良好抗氧化材料，故選為本研究的材料其中一項來源。



二、糖尿病

(一)糖尿病流行病學

隨著醫藥的發達，傳染性疾病的控制，世人生活型態的靜態化，肥胖之高度盛行，糖尿病已成為二十一世紀全世界最重要的公共衛生課題之一。在開發中以及新興工業化國家，它的發生率 (incidence) 及盛行率 (prevalence) 正在快速的增加中。預測至 2025 年世界衛生組織有三億三千萬名病患，其中絕大多數為第 2 型糖尿病。用以治療糖尿病及其併發症的社會和經濟成本也越來越高，可能會使國家的健康照護預算陷入潛藏性的癱瘓。目前，根據衛生署統計 (圖2-1)，台灣 2012 年十大主要死因中，原排名第 4 的糖尿病與排名第 5 的肺炎對調，死於糖尿病的人口達 9281 人，平均每天有 25 人死於糖尿病。雖然這個快速的增加可能和疾病本身的增加以及和國內的 ICD 編碼方式造成的高估都有關係，不可忽視的是糖尿病所造成的社會負擔相當可觀。以美國為例，1992 年有 700 萬名診斷確立的糖尿病人，他們雖然只佔總人口的 2.8%，但卻耗掉所有保健經費的 5.8%。另外，估計當年花在糖尿病的總費用約為 920 億美元，其中直接的醫藥支出為 452 億美元，而間接的費用則為 466 億美元。再以加拿大為例，1998 年一年間糖尿病及其併發症的花費分別為 48% 和 52%；其中，已確診糖尿病的直接花費約為 57 億，和糖尿病相關的併發症以及心臟血管疾病的花費反而高達 64 億。國內的研究顯示糖尿病患者的洗腎花費 (每年美金兩萬七千元) 較之非糖尿病患者的花費高 12%。主要是由於有糖尿病的洗腎病人的住院花費較高。

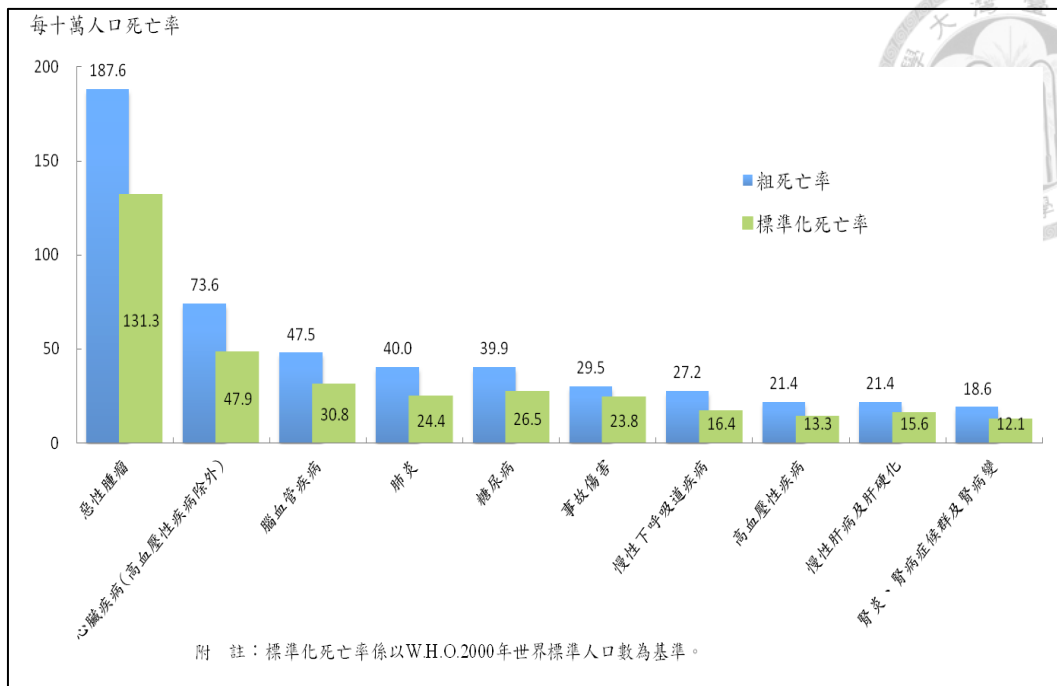


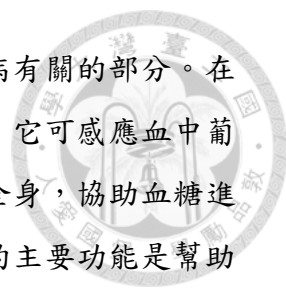
圖2-1、101年主要死因死亡率 (行政院衛生署，2013)

Figure 2-1. The top 10 causes of death in 2012.

(二)糖尿病簡介

糖尿病是一種因體內胰島素絕對或者相對不足所導致的一系列併發症，與遺傳基因有著非常密切的關聯。糖尿病的主要臨床表現為多飲、多尿、多食和體重下降（三多一少），以及血糖高、尿液中含有葡萄糖（正常的尿液中不應含有葡萄糖）等。正常人進食後，食物在腸胃道被消化分解後，產生葡萄糖，葡萄糖經由血液運送至全身，會刺激胰臟釋出胰島素，胰島素可幫助葡萄糖進入身體各組織細胞，轉變成能量，或貯存在肝、肌肉以及脂肪細胞中。如果沒有胰島素，或者身體各組織對胰島素不發生反應，則葡萄糖就不能被利用，於是血液中葡萄糖含量便會上升。當血糖升高到某一程度，超過腎臟所能回收的極限時，葡萄糖便會從尿液中“漏”出，所以稱之為糖尿病。其實血糖超過訂定的標準便算是糖尿病，不一定要有尿糖存在才算糖尿病，由於血糖要高到某程度才会有尿糖出現，所以測定血糖較尿糖準確。因此診斷糖尿病是以測定血糖為主。

胰臟是一個位於胃後下方的橫置扁長型器官，重量不到 1/4 公斤，較大的一端稱為頭部（內側），較細長的一端稱為尾部室（外側）。主要的功能包括外分泌和內分泌兩部分。胰臟外分泌部分的主要功能是直接將消化酵素分泌到腸道中，協助消化食物。在胰臟的尾部中有許多細胞聚集而成的小島，稱為胰島，主要的



功能是分泌賀爾蒙到血液中，屬於內分泌系統，也就是與糖尿病有關的部分。在胰島中有一種細胞叫做貝他細胞，主要分泌的賀爾蒙是胰島素。它可感應血中葡萄糖濃度的變化，並適時適量地分泌出胰島素到血液中，循環全身，協助血糖進入身體各細胞，維持血中葡萄糖濃度在正常範圍之內。胰島素的主要功能是幫助我們的養分進入身體組織細胞，提供細胞正常運作所需要的能量。它的作用就像一根門匙，打開葡萄糖進入細胞的通道，讓葡萄糖能夠順利進入細胞。當我們身體不能分泌胰島素時（如胰島素依賴型糖尿病）；或體內細胞對胰島素反應不好時（如非胰島素依賴型糖尿病），除了因葡萄糖不能進入細胞所產生之血糖上升外，體內的脂肪、蛋白質和碳水化合物的代謝都會發生異常現象。

(三)糖尿病分類

糖尿病的分類包括：第 1 型糖尿病、第 2 型糖尿病、其它型糖尿病及妊娠型。

表2-1、糖尿病的分類

Table 2-1. Etiologic classification of diabetes mellitus



第 1 型糖尿病 (β 細胞破壞，通常會造成胰島素絕對缺乏)
自體免疫 (autoimmune)
特發性 (idiopathic)

第 2 型糖尿病 (範圍可從胰島素阻抗為主合併胰島素相對缺乏，至以胰島素缺乏為主合併胰島素阻抗)
--

其它型糖尿病
β 細胞功能的基因缺陷
胰島素作用的基因缺陷
胰臟外分泌的疾病：胰臟炎、受傷/胰臟切除、腫瘤、囊性纖維化
內分泌疾病：Cushing's syndrome, acromegaly, pheochromocytoma, hyperthyroidism 等
藥物或化學試劑所誘發
感染
罕見的免疫性疾病
其它遺傳性症候群相關的糖尿病

妊娠型糖尿病

(American Diabetes, 2012)

目前診斷糖尿病，主要依據血糖質高低來判斷。通用的有世界衛生組織標準和美國糖尿病學會的標準。以美國糖尿病學會的標準，正常（無懷孕）成人空腹血漿中葡萄糖的濃度（簡稱血糖）是 $< 115 \text{ mg/dl}$ ；飯後兩小時血糖是 $< 140 \text{ mg/dl}$ 。若出現下列的情況，就可診斷為糖尿病：

1. 隨時測得的血糖（無論空腹與否的所謂隨機血糖）是 200 mg/dl 或以上，同時合併出現糖尿病典型症狀（包括多喝、多尿、多吃、體重下降等症狀）。
2. 空腹靜脈血糖有兩次是 140 mg/dl 或以上。

3. 空腹靜脈血糖 < 140mg/dl, 但給予口服 75 公克葡萄糖 (葡萄糖耐量試驗), 2 小時的靜脈血糖是 200 mg/dl或以上, 加上試驗過程中有一次血糖是 200 mg/dl 或以上。



表2-2、糖尿病診斷標準

Table 2-2. Criteria for the diagnosis of diabetes

A1C \geq 6.5 %.

The test should be performed in a laboratory using a method that is NGSP certified and standardized to the DCCT assay.*

FPG \geq 126 mg/dl (7.0 mmol/l).

Fasting is defined as no caloric intake for at least 8 h.*

2 hrs plasma glucose \geq 200 mg/dl (11.1 mmol/l) during an OGTT.

The test should be performed as described by the World Health Organization, using a glucose load containing the equivalent of 75 g anhydrous glucose dissolved in water.*

In a patient with classic symptoms of hyperglycemia or hyperglycemic crisis, a random plasma glucose \geq 200 mg/dl (11.1 mmol/l).

* In the absence of unequivocal hyperglycemia, criteria 1–3 should be confirmed by repeat testing.

(American Diabetes, 2012)

至於一些病人給予口服75公克葡萄糖 (葡萄糖耐量試驗)後, 2 小時的靜脈血糖介於 140 至 200 mg/dl間, 加上試驗過程中有一次血糖是 200 mg/dl或以上; 就可說是葡萄糖耐受不良。至於婦女在懷孕時第一次發現糖尿病, 分娩後又恢復正常耐糖狀態的, 稱作妊娠性糖尿病。近年來, 美國糖尿病學會建議, 婦女在懷孕 24-28 週時, 做妊娠性糖尿病篩檢。初步檢查不必空腹, 在喝過 50 公克葡萄糖沖成的糖水後一小時驗血, 如果血漿糖值超過140 mg/dl, 就應該進一步進行

100 公克葡萄糖耐量試驗。此時，孕婦在空腹及喝糖水後每隔一小時抽血一次，前後共三小時，如果四項血糖值中有二項超過判定標準確 (0、1、2 及 3 小時值分別是：105, 190, 165, 145 mg/dl)，就可診斷為妊娠性糖尿病。妊娠性糖尿病病人產後六週至三個月內，應該重新驗血 (75 公克葡萄糖耐量試驗)，確定自己的耐糖狀態分類。所以，葡萄糖耐量試驗並不是診斷糖尿病的必要手段，實施的時機，不外乎：

- (1) 空腹或隨機血糖不足以診斷糖尿病
- (2) 懷孕期間或分娩後用來確定妊娠性糖尿病診斷
- (3) 用來診斷葡萄糖耐受不良。

(四)糖尿病藥物治療

第 2 型糖尿病的治療包括營養、運動、藥物和衛教。營養與運動為基本步驟，血糖較高者則視病情不同而給予不同的藥物治療；降血糖藥物治療包括口服抗糖尿病藥與注射胰島素。症狀嚴重者，需要立即使用胰島素，否則可先行試用口服抗糖尿病藥。口服抗糖尿病藥的使用，需要依據病人的病情，包括：血糖的高低、肝、腎、心臟功能，藥物的療效以及副作用等因素而定，當然需要同時接受營養與運動治療。如果未達到治療目標，則可單獨使用一種或同時使用多種口服抗糖尿病藥，和/或注射胰島素。目前口服抗糖尿病藥依其作用機轉可分為下列五大類：

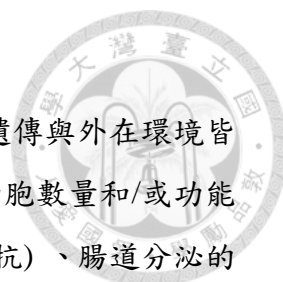
1. 雙胍類 (biguanide)：目前最常使用的雙胍類製劑是二甲雙胍 (dimethyl biguanide, metformin)，主要作用是減少肝臟葡萄糖的輸出和降低空腹血糖，但不會刺激胰島素的分泌。它不會增加體重。大約 20% 的病人服用 metformin 後會產生食慾不振、腹部不適、甚至腹瀉等副作用。Metformin 雖會影響維生素 B12 的吸收，但很少會造成貧血 (Bailey *et al.*, 1996)。Metformin 和其它的口服抗糖尿病藥相較，其不會增加體重，且單獨服用時很少發生低血糖。
2. 促胰島素分泌劑 (insulin secretagogues)：目前此類藥物有二種：
 - (a) 磺醯脲素 (sulfonylureas)：主要作用是與胰臟 β 細胞的磺醯脲素受體結合，刺激胰島素分泌。磺醯脲素大部份在肝臟代謝，其代謝產物活性大為減弱，和其它未經代謝的原型藥物一起由腎臟和/或膽道排出。因此肝、腎功能不全的病人，使用磺醯脲素時會出現磺醯脲素作用增強、時效延長的現象，此時須要特別小心低血糖的發生。腎功能不全時，應儘量避免使用經由腎臟排泄的磺醯脲素 (例如：

chlorpropamide) ，如果必須使用這類藥物，則應減少其劑量、經常檢測血糖以減少低血糖的發生。磺醯脲素的不良反應以體重增加和低血糖最為常見；低血糖可能持續數日，對老年人、腎功能不全或食無定時者更是危險。(b) 非磺醯脲素 (meglitinides 或 glinides)：現有 repaglinide 和 nateglinide 二種。主要的作用機轉是與胰臟β 細胞上磺醯脲素受體內的不同部位結合，刺激胰島素的分泌；和磺醯脲素相較，其吸收速率較快且作用時間較短，因此需隨餐服用。

3. 葡萄糖苷酶抑制劑 (α -glucosidase inhibitors)：主要作用是在近端小腸抑制澱粉和雙醣類的分解，進而延緩其吸收。此藥不被腸胃道吸收，可降低餐後血糖和胰島素濃度，但降血糖的效果不如磺醯脲素和 metformin，單獨使用並不會發生低血糖。使用本藥後，醣類大都在遠側端腸道吸收，因此會產生脹氣和其它腸胃道的副作用。葡萄糖苷酶抑制劑可預防葡萄糖失耐的病人發生糖尿病 (Chiasson *et al.*, 2003)，但其對心血管疾病的預防則有待更進一步的研究。病人服用阿爾發葡萄糖苷酶抑制劑如果出現低血糖，治療時必須使用單醣 (例如：葡萄糖或牛奶)，而不能使用雙醣或多醣，例如：蔗糖 (因乳糖酶 (lactase) 不受本藥抑制，但蔗糖酶 (sucrase) 則會受到抑制)。
4. 胰島素增敏劑 (insulin sensitizers)：現有 pioglitazone 和 rosiglitazone 二種，作用機轉為活化 PPAR- γ (peroxisome proliferative-activated receptor- γ)，增加肌肉、脂肪和肝臟對內生性或是外源性胰島素的敏感度，降低空腹血糖和血中胰島素濃度 (Yki-Järvinen, 2004)。常見的副作用有體重增加、體液滯留、周邊水腫和心臟衰竭等。過去的研究顯示，胰島素增敏劑相較於磺醯脲素與雙胍類藥物可維持較長期血糖的穩定效果 (Kahn *et al.*, 2006)，對糖尿病前期的病人則可降低其疾病進展至第 2 型糖尿病的比例 (Yusuf Set *et al.*, 2006)。胰島素增敏劑可和雙胍類、促胰島素分泌劑和胰島素合併使用。但在某些國家如加拿大，則不建議胰島素和胰島素增敏劑合併使用。
5. 二肽基酶-4 抑制劑 (dipeptidyl peptidase 4 inhibitors, DPP 4 inhibitors)：腸促胰液素 (incretins) 可調節體內葡萄糖代謝，包括類升糖素肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 和葡萄糖依賴性胰島素刺激多肽 (glucose-dependent insulinotropic polypeptide, GIP) 二種。在生理情況下，GLP-1 和 GIP 會快速的被 DPP 4 水解成不具活性的產物。DPP 4 是位於細胞膜上的蛋白質，能夠在很多的組織中表現，包括免疫細胞 (Richter *et al.*, 2008)。DPP 4 抑制劑是一

小分子，和其藉由提高活性腸泌素的濃度，可促進胰島素的釋出和抑制升糖素的分泌，達到降低血糖的作用。





三、胰島素

第 2 型糖尿病屬於多重病因的複雜性疾病，一般認為基因遺傳與外在環境皆扮演重要角色。其病理生理學上的特色為胰島素分泌缺失 (β 細胞數量和/或功能受損)、胰島素利用障礙 (肝臟、肌肉和脂肪組織產生胰島素阻抗)、腸道分泌的腸促胰液素 (incretin) 下降或功能異常、胰臟 α 細胞分泌升糖素增加、腎臟增加糖類再吸收和腦部的胰島素阻抗，而引起以高血糖和其它代謝異常為主要特徵的疾病 (DeFronzo RA, 2009)，其核心的病理生理學缺陷是胰島素分泌缺失和胰島素阻抗。胰島素是一種由胰臟 β 細胞所分泌的胜肽，它扮演著促進周邊組織對葡萄糖吸收和抑制肝臟葡萄糖新生的角色。大多數病人表現出程度不等的周邊胰島素阻抗和相對的胰島素分泌不足，二者皆可導致第 2 型糖尿病 (Taylor, 2008)。這些缺陷常發生於疾病的早期，甚至在尚未出現高血糖前就已經存在。此外第 2 型糖尿病經常伴隨著高血壓、三酸甘油酯上升、低密度膽固醇脂蛋白上升和高密度膽固醇脂蛋白降低，這些都會增加心血管疾病發生的風險 (Ecke *et al.*, 2002)。

(一)胰島素信號傳導

信號傳導有前段與後段，即上游 (upstream)，與下游 (downstream)。胰島素信號的上游需要胰島素接受器 (insulin receptor)。包括兩個 α 次單元與兩個 β 次單元， α 次單元接受器在細胞外胰島素先與之結合，透過細胞膜後，再活化細胞內的 β 次單元，其含有 tyrosine kinase 成分，結合後的複體再進行一連串的分分子反應，即在 tyrosine 分子上面，產生磷酸化反應 (phosphorylation)。在 COOH 端上的 tyrosine 產生自體磷酸化 (autophosphorylation)，促進胰島素對細胞分裂的作用。胰島素接受器表現基因，在 tyrosine 分子上面產生磷酸化，才能表現其下游的認證角色。

胰島素與胰島素接受器是胰島素信號傳導的上游，下游則與胰島素傳導器 (insulin transporter) 有關，與胰島素阻抗有關的胰島素傳導器是 4 號，簡稱 GLUT4 (glucose transporter 4)，缺乏 GLUT4，則葡萄糖的吸收不良，會產生胰島素阻抗 (Pessin *et al.*, 2000)。

下游的認證功能之一是透過胰島素刺激下，使 PI3-kinase (phosphatidylinositol-3-kinase) 的活化，GLUT4 由細胞內移至細胞膜，再帶著葡萄糖由細胞內排到細胞外。胰島素阻抗，缺少 PI-3-kinase 活化，葡萄糖耐受性

便下降，就是這個原理。PI3-kinase 作用的下游之一是 protein kinase B (PKB，也稱 AKT)，使胰島素接受器在 serine/threonine 上面產生磷酸化。

胰島素與胰島素接受器之傳導，類似神經細胞之突觸傳導，前者係由接受器前傳到接受器後，與突觸前傳到突觸後類似。胰島素阻抗不是單一基因所決定，牽連很廣，係由多種基因與環境因素，造成肥胖或感染，才產生胰島素阻抗的特徵。胰島素信號傳導異常，造成葡萄糖的吸收與代謝異常，即葡萄糖耐受性不良。

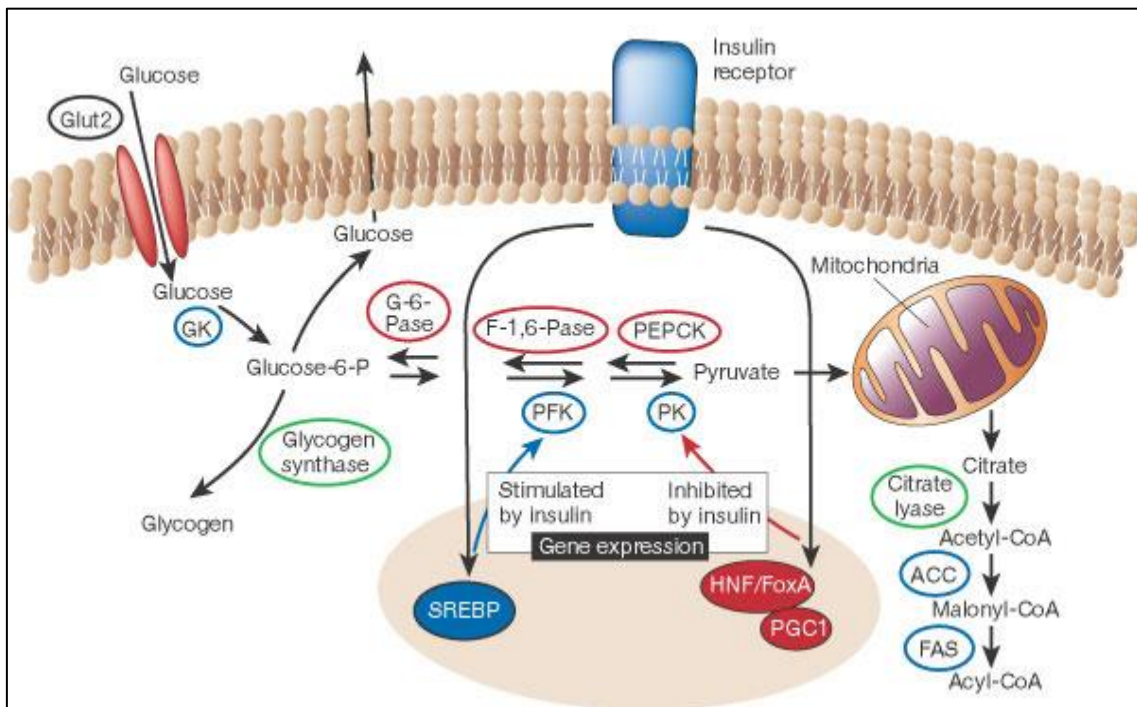


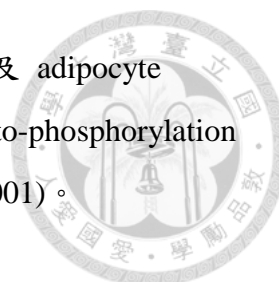
圖2-2. 肝臟中胰島素代謝作用之調節。

Figure 2-2. The regulation of glucose metabolism in the liver.

(Saltiel and Kahn, 2001)

1. 胰島素受器 (Insulin receptor, IR)

胰島素受器為一種鑲嵌於細胞膜上的醣蛋白大分子，具有 tyrosine kinase 活性，包括 insulin-like growth factor (IGF) 與 insulin receptor-related receptor (IRR) (Patti and Khan, 1998)。胰島素受器為受體酪胺酸激酶 (receptor tyrosine kinases) 中的一個次家族 (subfamily)，具異四構體之醣蛋白，主要有兩個 α 次單元及 β 次單元所構成。 α 次單元位於細胞膜外，當與胰島素結合後其構形發生改變而聚集，造成 β 次單元上 tyrosine 的自體磷酸化 (auto-phosphorylation) 而引發細胞質內的一系列訊息傳遞。細胞質中與葡萄糖攝入相關之主要胰島素接受器的受質



為 insulin receptor substrate 1-4 (IRS 1-4)、 β -adrenergic receptor 及 adipocyte lipid-binding protein (ALBP)。其中 IRS-1、2 參與胰島素受器 auto-phosphorylation 而被磷酸化，造成下游訊息傳遞的啟動序號 (Satiel and Kahn, 2001)。

2. 胰島素受器基質 (insulin receptor substrate, IRS)


目前已知胰島素受器的受質至少有九種，為親水性的蛋白質，其結構在胺基端有保護作用的 pleckstrin homology (PH) domain，並且鄰接著 phosphotyrosine binding (PTB) domain (Klaus *et al.*, 2004)。其中較普遍的為 IRS 1、IRS 2、IRS 3 及 IRS 4 (Pessin and Satiel, 2000)，其他則是 Gab-1、p60^{dok}、Cb1、APS 及 Shc 的同型體。這些蛋白質磷酸化後便可以連接下游的效應分子，而活化不同的下游路徑 (Marchand-Brustel *et al.*, 2003)。

3. 葡萄糖轉運蛋白 (glucose transporter, GLUT)

葡萄糖轉運蛋白是由一個基因群 (gene family) 轉錄合成而來，在人體中表現的葡萄糖轉運蛋白，其結構為 α -螺旋結構 (α -helix) 往返穿越細胞膜間；在細胞外側形成六個環狀結構；在細胞膜內側形成五個環狀結構。葡萄糖轉運蛋白的 C 端與 N 端皆位於細胞膜內側 (Olson and Pessin, 1996)。依據其 DNA 序列發表順序來命名，目前已知的葡萄糖轉運蛋白共有 12 種，依序分別為 GLUT 1、GLUT 2、GLUT 3 到 GLUT 12，共有 12 個具有功能性的同分異構型 (functional isoforms)，且他們於組織的分佈、調控、轉運能力及受器的專一性上皆有極大的差異。GLUT 1 和 GLUT 3 負責基礎葡萄糖攝入，它們在細胞膜上的數量不受胰島素刺激而增加，而 GLUT 2 主要存在於肝臟、胰臟 β 細胞、小腸黏膜細胞與腎小管上皮細胞中。在肝臟和胰臟 β 細胞中，GLUT 2 與同樣具有高 Km 值的葡萄糖激酶 (glucose kinase) 共同形成「葡萄糖感受器」，當組織正常分泌胰島素時則共同進行葡萄糖的代謝，但若只在胰臟 β 細胞中的 GLUT 2 的作用則可直接受血糖調節 (趙, 1997)。

(二) 葡萄糖代謝與胰島素阻抗之關係

正常人胰島素濃度與血糖濃度，飯前與飯後都維持類似或固定的水準，飯後的胰島素與血糖都增加時，靠的是肌肉合成 glycogen 來消化；糖尿病患飯後，肌肉合成 glycogen 減少 50%，飯後靠肌肉合成 glycogen 的速率減少，與第 2 型糖尿病人產生胰島素阻抗有關。第 2 型糖尿病人葡萄糖運轉程序較慢，使合成 glycogen 減少 50%。葡萄糖的運轉先受到胰島素的刺激，結果不是胰島素決定，



是 glycogen 的合成，胰島素不夠敏感，使 glycogen 合成變慢。血中的葡萄糖無法利用，導致血糖增加，即所謂葡萄糖耐受性不良 (glucose intolerance)。第 2 型糖尿病人且胰島素阻抗者，脂肪酸濃度是異常的。最近的研究證實，胰島素阻抗，肌肉的三酸甘油酯濃度異常 (特別是脂肪細胞)，原理是脂肪增加時，細胞內的粒線體，忙著燃燒脂肪，顧不了葡萄糖的運轉；脂肪燃燒氧化後，細胞內產生許多的檸檬酸 (citrate)，它會進一步抑制 PFK 造成 G-6-P 的堆積增加，使葡萄糖代謝受阻，原因是胰島素阻抗。細胞消耗熱量，主要是燃燒脂肪，約佔 90%，其次是葡萄糖，再其次才是蛋白質，這個模式早在 1963 年，由 Randle 等人提出。不過，這個理論，1996 年被 Roden 等人推翻，他們發現脂肪酸濃度增加，胰島素刺激下的肌肉的 glycogen 合成約減少 50%，葡萄糖的運轉初期確實受到抑制，接著是肌肉組織 glycogen 合成被抑制，葡萄糖氧化也被抑制。肌肉組織堆積過多的脂肪酸，或者是細胞內脂肪酸代謝太慢，產生脂肪酸代謝物，如 diacylglycerol、fatty acid Co A 與 ceramides，這些物質進一步抑制 PI3-kinase 的活化，使得胰島素接受器的磷酸化作用被抑制，造成使葡萄糖耐受性不良

(三)胰島素阻抗

產生胰島素阻抗後，會逐漸增加胰島素的分泌，所以在第 2 型糖尿病的自然進程初期時，血中胰島素濃度甚至可增加為非糖尿病人的 2-4 倍。雖然有此一代償反應來克服胰島素阻抗，但終究隨著疾病的進展，病人的血糖會逐漸上升，甚至導致 β 細胞葡萄糖毒性 (glucotoxicity) 或對一些相關基因表現產生影響，並影響到 β 細胞分泌胰島素的功能。此外在骨骼肌細胞對於餐後葡萄糖的吸收，會有胰島素受體訊號傳遞途徑、葡萄糖運送蛋白及其磷酸化、肝糖生成和葡萄糖氧化等多重功能的障礙，導致餐後血糖上升，而且骨骼肌的胰島素阻抗可解釋超過 85% 的全身葡萄糖利用 (glucose disposal) 障礙 (Pendergrass *et al.*, 2007)。

至於肝臟胰島素阻抗主要特色是葡萄糖激酶活性顯著下降，和胰島素抑制肝糖輸出功能下降 (Gulli G., 1992)。儘管血中胰島素代償性升高，但肝臟葡萄糖產生 (hepatic glucose production) 的基礎速率還是過高，再加上血中升糖素的增加且加強肝臟對升糖素的敏感度，都會導致餐後血糖或空腹血糖增高 (Bonora E *et al.*, 2006)。因此，第 2 型糖尿病人的肝臟會過度製造和未充分利用葡萄糖，而且過高的游離脂肪酸 (free fatty acid) 也會增加肝糖的輸出 (Charles MA *et al.*, 1997)。第 2 型糖尿病人多數是屬於肥胖的身材，但在非糖尿病人也會因肥胖或腹內脂肪

沉積增加時，造成周邊胰島素阻抗。此外胰島素阻抗也和高血壓、高血脂、缺血性心臟病有緊密的關聯性。所以任何加強胰島素敏感度的方式，皆是治療第 2 型糖尿病重要的選擇方式之一。

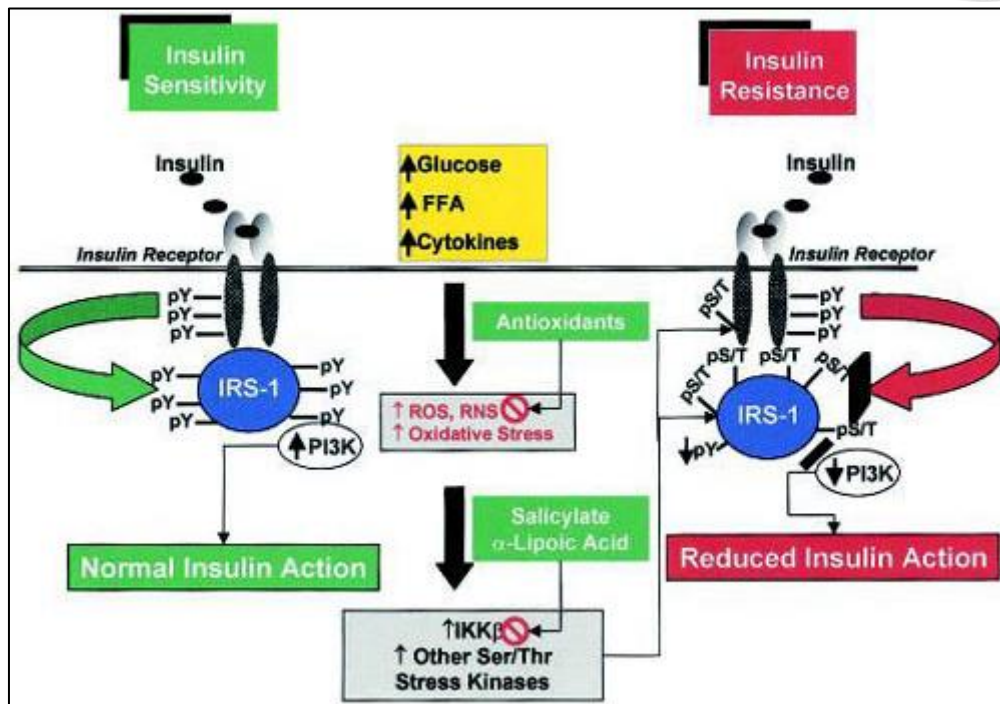


圖2-3、氧化壓力活化絲氨酸激酶誘導胰島素阻抗。

Figure 2-3. The role of serine kinase activation in oxidative stress-induced insulin resistance.

(Evans *et al.*, 2003)

(四)胰島素分泌缺失

胰島素分泌缺失 (β 細胞衰退) 的原因包括年齡老化、基因影響、胰島素阻抗、脂肪毒性 (lipotoxicity)、葡萄糖毒性、類澱粉沉積 (amyloid deposition) 和腸促胰液素分泌的缺失或作用障礙，初始的特色是當葡萄糖刺激時，其第 1 階段胰島素分泌喪失 (Pratley RE *et al.*, 2001)。近期研究發現β 細胞功能在診斷第 2 型糖尿病時就有超過 80 % 的喪失，這現象比原先的認知更早且更嚴重 (DeFronzo RA, 2009)。除 β 細胞功能下降外，在第 2 型糖尿病人的解剖研究中發現β 細胞的總量 (mass) 減少，且與β 細胞凋零 (apoptosis) 的增加相關 (Butler AE *et al.*, 2003)。第 2 型糖尿病人血液中過高的游離脂肪酸會損害 β 細胞分泌胰島素的能力，又

稱為脂肪毒性。慢性高血糖也會損害 β 細胞分泌胰島素的功能 (Patanè G *et al.*, 2002), 包括第 1 階段和第 2 階段胰島素的分泌, 此稱為葡萄糖毒性。總之, 雖然疾病初期肝臟和肌肉的胰島素阻抗早已被証實, 但造成第 2 型糖尿病發病漸進性的 β 細胞衰退 (failure) 則不可能缺席。

(五) 腫瘤壞死因子 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 與胰島素阻抗

TNF- α 是分子量為 26 kDa 的細胞穿透蛋白, 會與細胞膜上兩個 TNF- α 受器, p55 (55 kDa) 及 p75 (75 kDa) isomers, 結合引發 TNF- α 之訊息傳遞。TNF- α 與 TNF- α 受器 p55 (55 kDa) 結合後, 會促使 sphingomyelinase 分解鞘髓磷脂 (sphingomyelin) 產生神經醯胺 (ceramide) 及膽鹼 (choline), ceramide 可能會增加 IRS-1 serine phosphorylation, 導致胰島素受體 (IR) 受到抑制而干擾胰島素訊息傳遞, 但詳細機制未明。除此之外, TNF- α 也會誘導其他促發炎細胞激素的產生, 包括 interleukin-1 (IL-1)、interleukin-6 (IL-6) 及 interferon- γ (IFN- γ) 等 (Tracey and Cerami, 1993; Vandenabeele *et al.*, 1995), 而這些促發炎細胞激素也與胰島素阻抗之誘發有關 (Peraldi *et al.*, 1996; Senn *et al.*, 2002)。

近來研究發現, TNF- α 可能與肥胖型胰島素阻抗或第二型糖尿病的形成有關 (Moller, 2000), 也已有文獻證實 TNF- α 會干擾肝細胞 (hepatocytes)、纖維母細胞 (fibroblasts) 及骨髓細胞 (myeloid cells) 的胰島素訊息傳遞 (Feinstein *et al.*, 1993; Kroder *et al.*, 1996; Peraldi *et al.*, 1996)。Moller (2000) 將 TNF- α 可能造成胰島素阻抗的原因歸納如下:

1. 加速脂解與提高遊離脂肪酸濃度。
2. 降低 GLUT-4、胰島素受器 (IR) 與 IRS-1 合成速率。
3. 抑制胰島素誘發之葡萄糖轉移。
4. 抑制 peroxisomeproliferation-activated receptor (PPAR- γ) 合成。
5. 抑制 IR 磷酸化及 IRS-1 tyrosine 磷酸化。
6. 增加 IRS-1 serine/threonine 磷酸化。
7. 提升 protein tyrosine phosphatase (PTPase) 活性。

TNF- α 引起的胰島素阻抗機制仍有爭議, 例如: 雖然 TNF- α 會促使胰島素受器 (IR) 上 tyrosine kinase 活性受損, 造成 IRS-1 磷酸化程度下降 (Hotamisligi *et al.*, 1993), 但另有研究指出 TNF- α 會造成 IR、IRS-1 與 GLUT-4 含量降低 (Stephens *et al.*, 1997)。另一派學者認為, 雖然 TNF- α 會降低脂肪細胞

組織中胰島素刺激的 glucose uptake 與促進脂質降解作用，但仍缺乏證據支持 TNF- α 與胰島素阻抗形成間的關係 (Byrne, 2000)。

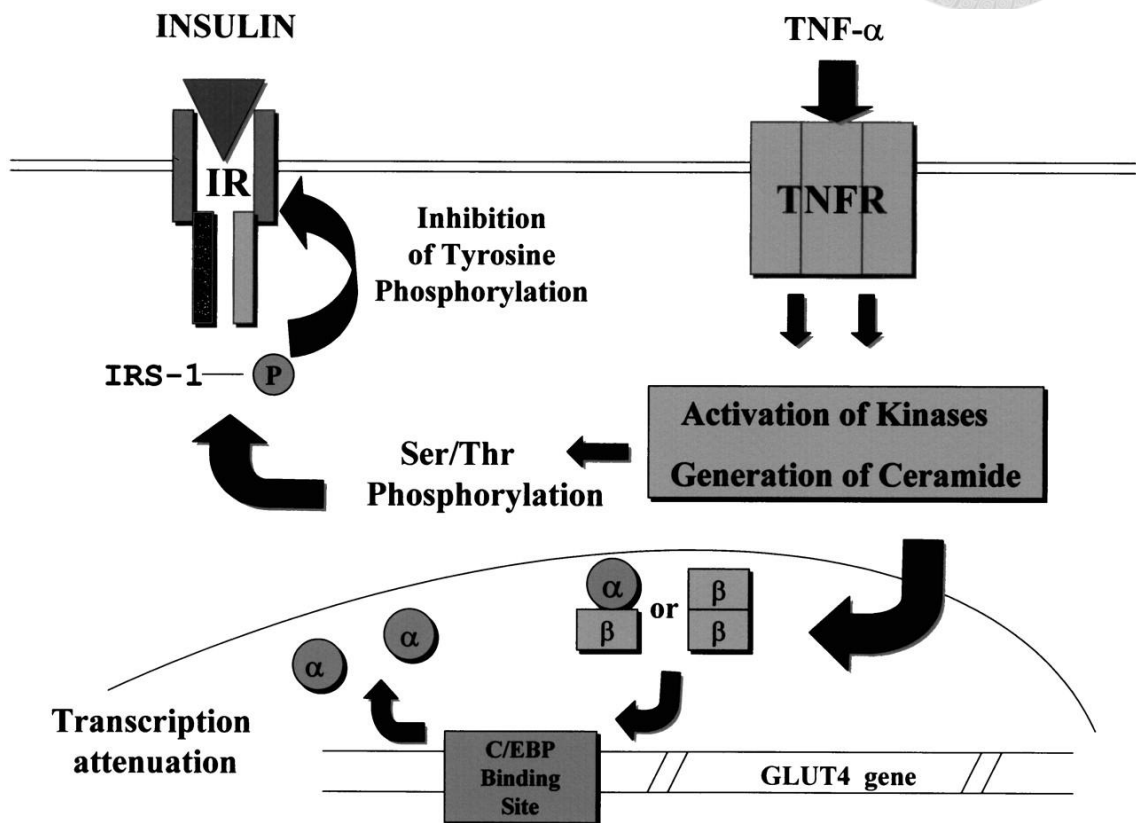


圖 2-4. 腫瘤壞死因子與胰島素阻抗。

Figure 2-4. TNF- α induced insulin resistance.

(Chen and Philip, 2000)

(六)以細胞模式探討胰島素阻抗

TNF- α 已被證實會干擾胰島素訊息傳遞，而減少大鼠體內胰島素涉及的全身葡萄糖代謝利用 (Hsu *et al.*, 1996)。另外亦有學者利用體外方式誘導細胞胰島素阻抗，並利用此模式探討抗糖尿病有效成份對胰島素阻抗細胞之影響。

1. 脂肪細胞 (adipocytes)

前脂肪細胞分化為成熟的脂肪細胞後才具有胰島素敏感性與受胰島素調控的葡萄糖攝入能力。誘發脂肪細胞胰島素阻抗模式中，較廣泛被使用的如高劑量胰島素刺激、長期胰島素刺激、飽和脂肪酸刺激 (Palmitic acid)、TNF- α 、dexamethasone 等，皆可誘發胰島素抗性 (Hoehn *et al.*, 2008)。其中以胰島素與 TNF- α 誘發的

模式被認為會減低 IRS-1 的表現量，因而削弱了胰島素訊息傳遞路徑，以 dexamethasone 誘發阻抗的機制則為減低 Akt 磷酸化而減少 GLUT 4 轉位。已有許多文獻指出，脂肪細胞以飽和脂肪酸誘發胰島素抗性是透過活化 TLR-4 (toll-like receptor 4) 而啟動發炎反應，TLR-4 在脂肪細胞分化的第 5 天開始會大量表現 (Song *et al.*, 2006); TLR-4 被活化後會接續活化 NF- κ B 而刺激下游基因如：TNF- α 、IL-6、COX-2、MCP-1 等表現量增加，而若將 TLR-4 基因剔除則發炎反應被抑制，減少胰島素抗性。Iwata 等人 (2001) 以另外一種胰島素敏感藥物 pioglitazone (TZD 的一種) 處理 TNF- α 誘發胰島素阻抗之 3T3-L1 脂肪細胞，結果發現 pioglitazone 可使脂肪細胞 IR、IRS-1 tyrosine 磷酸化與 PI3-kinase 活性恢復正常，進而改善葡萄糖攝入的能力。

2. 骨骼及細胞 (skeleton muscles)

在人體口服葡萄糖耐受性試驗中，骨骼肌負載了 70~90% 的葡萄糖攝入以維持血液中葡萄糖的恒定，而進入肌肉細胞的葡萄糖則以肝醣的形式儲存；肝醣合成的過程中需要胰島素的刺激，當肌肉細胞或肝細胞接收到胰島素的刺激後活化下游的 IRS-1、PI3K、PDK-1 及 Akt/PKB (protein kinase B)，活化的 PKB 會將 GSK 3 (glycogen synthase kinase 3) 磷酸化，當 GSK 3 被磷酸化後即失去活性而不會將 GS (glycogen synthase) 自未磷酸化的活化態轉變成磷酸化的失活態，因此 GS 持續活化而將葡萄糖以肝醣的方式儲存在肝細胞或是肌肉細胞中。

TNF- α 對骨骼肌細胞的影響仍不清楚，Del Aguila 等人 (1999) 報告指出 TNF- α 處理肌肉細胞 C₂C₁₂ 會使胰島素刺激的 IRS-1 與 IRS-2 調控 PI3K 活化能力受損，使胰島素調控的 IRS-1 tyrosine 磷酸化降低，並抑制胰島素誘發的 p42MAPK 與 p44MAPK tyrosine 的磷酸化，而發展成胰島素阻抗的細胞模式，Schmitz-Peiffer 等人 (1999) 將 C₂C₁₂ 肌肉細胞經 palmitate 處理後，結果發現飽和脂肪酸會提升細胞內 ceramide (PKB 的抑制劑) 含量及 MAPkinase 活性，並抑制肝醣合成與 PKB 的磷酸化，最後引起肌肉細胞產生胰島素阻抗；Cusi 等人 (2000) 則指出，以 palmitate 處理 C₂C₁₂ 肌肉細胞株實惠產生胰島素阻抗，但非不影響其 IRS-1 tyrosine 磷酸化。另外有研究指出，C₂C₁₂ 經 interleukin-6 (IL-6) 處理後，會降低 IR 表現量及 IR tyrosine autophosphorylation、IRS-1 含量及 IRS-1 tyrosine phosphorylation、PI3K 活性、Akt serine phosphorylation 以及葡萄糖轉運蛋白 (GLUT 4) 表現，造成 C₂C₁₂ 細胞葡萄糖攝入降低摺筋胰島素阻抗現

象，而 loperamide 則可以恢復因 IL-6 誘導所造成的胰島素減低 (Tzeng *et al.*, 2005)。

3. 肝細胞 (hepatocytes)

肌肉細胞與脂肪細胞為常應用於評估糖尿病成份的體外細胞模式，但此兩株須經分化後才可以獲得對胰島素的感受度，而且操作步驟複雜且耗時，不利應用於抗糖尿病成份之篩選 (Cheng *et al.*, 2008)。而肝細胞不需經分化即可具有對胰島素的感受度，近年之研究將肝細胞誘導成胰島素阻抗，並以此體外模式評估抗糖尿病有效成份。Cheng 等人 (2008) 先以 TNF- α 誘導小鼠肝臟細胞 FL83B 胰島素阻抗，再經胰島素處理後，以葡萄糖分析套組測定細胞培養液中葡萄糖含量，發現培養液葡萄糖含量於相同處理時間下會隨 TNF- α 濃度增加而增加，表示 TNF- α 會減少細胞經胰島素刺激的葡萄糖攝入，並以此模式快速篩選出植物中降血糖之有效成份，而這些有效成份亦可以增加 IRS-1 表現，恢復胰島素阻抗細胞中胰島素之訊息傳遞。另外，Senn 等人 (2002) 以 IL-6 處理小鼠初代肝細胞及人類肝癌細胞株 Hep G2，發現會減少經胰島素刺激之 IRS-1 及 PI3K 表現，此外亦會抑制調控胰島素訊息下游代謝活動之 Akt 的活性，最後導致小鼠初代肝細胞中肝醣合成受到抑制。因此由以上得知 TNF- α 及 IL-6 可以誘導肝細胞造成細胞層次之胰島素阻抗，並應用於降血糖及抗糖尿病成份之評估。





四、甘薯

甘薯 (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) 又叫地瓜、山芋、蕃薯，為旋花科 (Convolvulaceae)、甘薯屬 (*Ipomoea*)，匍匐地面生長特性的一年生或多年生蔓生草本植物。根據 FAO (Food and Agriculture Organization) 2005 年之調查，甘薯為世界第五大經濟作物，依序為小麥、稻米、玉米、樹薯及甘薯 (Rumbaoa *et al.*, 2009)。甘薯易於栽培管理，其塊根與莖、葉具有多種用途，是少數全株皆可被利用的雜糧與蔬菜作物，更是天災人禍時之救援作物。甘薯塊根的营养成分相當豐富，含澱粉、糖、蛋白質、脂肪、纖維、維生素 A、B 群、C 和鐵、鈣等多種營養元素，對人體保健裨益甚大，是非常好的膳食纖維來源，堪稱為現代物美價廉的保健食品；此外，亦被視為一種生理鹼性食品，可中和一些生理酸性食品，調整人體代謝機能 (黃，2002)。過去甘薯主要作為雜糧、飼料、澱粉等用途，近年來由於國人飲食習慣及膳食結構改變，食用或是食品加工用甘薯及葉菜甘薯漸受消費者青睞，甘薯為國產糧食作物中地位僅次於稻米者，種植一次可連續採收兩年，同時整年均能收穫，2012 年全省栽培面積約 3171.3 公頃左右，產量約為 78931 公噸 (台灣農業年報，2013)。

根據台灣省農業試驗所嘉義分所的資料，現今台灣省 13 種栽培最多之甘薯品種特性介紹如下 (台灣省農業試驗所，2013)：

1. 食味特性的甘薯品種 - 台農 57 號

莖黃綠色，節間帶淡紫色，毛茸少，葉形五深裂或三深裂，背面葉脈中肋及其基部均為深紫色，葉脈為淡紫色，頂葉黃綠色，塊根表皮棕黃色，無縱溝，肉色橙黃，塊根紡錘形。

2. 紅心豐產的甘薯品種 - 台農 62 號

莖黃綠色，節間帶暗紫色，葉為心臟形，背面葉脈中肋及其基部均為赤紫色，頂葉黃綠色，塊根表皮淡紅褐色，肉色橙紅，切面易氧化變為綠橙紅色，塊根為下膨紡錘形。

3. 高胡蘿蔔素的甘薯品種 - 台農 63 號

莖為黃綠色，葉為心臟形，頂葉為黃綠色，背面葉脈中肋及其基部均為綠色，塊根表皮鮮紅色，肉色深橙紅色，塊根為短紡錘形。

4. 用途廣泛的甘薯品種 - 台農 64 號



- 莖中大為紫色，葉為心臟形，頂葉為綠色，葉背基及葉脈均為紫色。塊根表皮淡棕黃色，光滑美觀，塊根肉色深橙紅，塊根為紡錘形。
5. 含量蛋白質的甘薯品種 - 台農 65 號
莖粗大為紫紅色，無毛茸，葉為心臟形，頂葉淡紫紅色，葉背面、葉脈及其基部均為淡紫色。塊根表皮棕紅色，光滑，塊根肉色橙紅，塊根為短紡錘形。
 6. 適應不同期作栽培的甘薯品種 - 台農 66 號
莖粗大且強硬，綠色，無毛茸，葉為盾形，頂葉亦為綠色，葉背面、葉脈及其基部均為綠色，塊根表皮淡棕紅色，表皮尚光滑，肉色橙紅。
 7. 澱粉消化性優良的食用及飼料用品種 - 台農 67 號
短蔓，莖淡紫紅色，無茸毛。葉為心臟形，綠色，葉背基部紫色，頂葉綠色，塊根紡錘形，表皮淡紅，肉色橙黃，表皮光滑無脈紋。
 8. 適合食品加工、製餡、油炸物兼作夏季蔬菜用品種 - 台農 68 號
短蔓，莖綠色，無茸毛。葉為心臟形，綠色，葉脈及葉背中脈基部為綠色，頂葉綠色，塊根紡錘，表皮尚光滑淡黃色，肉色淡白色。
 9. 豐產的食用紅肉甘薯品種 - 台農 69 號
短蔓，莖綠色，無茸毛。葉為長心臟形，綠色，葉脈及葉背中脈基部為綠色，頂葉綠色，塊根紡錘形，表皮脈少，無瘤目及縱溝，深紫紅色，肉色深橙紅。
 10. 耐低肥性的食用品種 - 台農 70 號
長蔓，莖綠色，無茸毛。葉為盾形，綠色，葉表中脈黃綠，葉背中脈紅紫，頂葉綠色，葉柄綠色，具茸毛。塊根紡錘形，表皮紅褐色，根痕較深，皮層薄，肉色深橙紅。
 11. 葉菜用甘薯 - 台農 71 號
莖蔓長度中等，株型半直立，莖色深綠色，無茸毛。頂葉淡綠色，成熟葉呈深綠色，新生葉之葉形為戟形，成熟葉呈鼻形，葉柄為綠色，且光滑無茸毛。
 12. 優良食用加工用夏作品種 - 桃園 1 號
短蔓，淡綠色，無茸毛。葉為心臟形，淡綠色，葉脈及葉背中脈為綠色，葉基部帶紫色，頂葉綠色，塊根紡錘形，表皮紫紅色，根痕淡，肉色橙黃微帶紫暈。
 13. 葉菜用甘薯 - 桃園 2 號

半直立型植株匍匐於地面，受颱風及豪雨之威脅較其他葉菜類輕微，較適合機械採收之株型。

甘薯葉是一年四季皆可生產的健康蔬菜，抗病蟲性強，可不噴農藥，每年可採收 7 ~ 13 次，因其生長速度快、耐淹水，在颱風季節及夏季雨水過多時，常為最佳大宗蔬菜來源之一（李，1994）。台灣地處熱帶與亞熱帶之間，環境條件非常適合甘薯生長，其生產潛力也較其他主要的熱帶食糧作物為高，所以甘薯種植非常普遍，被視為本土型之重要糧食作物。

甘薯葉中也含有維生素 B₂、鐵及蛋白質、酚類化合物、酚酸、類黃酮等物質，對於癌症、糖尿病、心血管疾病及老人癡呆症都有抑制的效果（Sakanaka *et al.*, 2005）。Islam *et al.* (2002) 研究亦指出，甘薯葉對出血性疾病及糖尿病有顯著的療效，且同時有抗衰老、提高免疫力及抗氧化功能。Shimozono *et al.* (1996) 及 Oki *et al.* (2002) 報導甘薯葉具有抗致突變性、抗微生物活性及抑制 ACE 活性。Choi 等 (1997) 發現甘薯葉中 peonidin 之衍生物具有抗氧化性。華等 (1988) 以及王等 (1988) 均發現餵食西蒙 1 號甘薯葉可增進實驗鼠之免疫力。Suda 等 (1999) 指出甘薯葉汁可改變受試者血中 GTP、GOT 與 GPT 含量，攝取葉汁後血壓會降至正常且排便有明顯改善。Park 等 (1992) 發現甘薯葉具抑制人體胃癌細胞之功效。Yoshimoto 等 (1999) 指出甘薯葉之水萃取物中，cyanidin 與 peonidin 具有抑制突變等功效。鄭等 (2008) 及 Shih *et al.* (2009) 指出不同乾燥方法處理新鮮材料會破壞細胞，適當乾燥方法可提高甘薯之抗氧化能力。故本研究將針對不同甘薯葉色品種比較花青素之萃取率，同時分別以冷凍乾燥與 40 °C 乾燥處理，測定花青素含量與抗氧化性變化、胰島素阻抗方面的生理機能性，以瞭解乾燥條件對其之影響。這些花青素原料將可運用於各類食品加工添加物，以提供保健食品原料業者之新選擇，增加甘薯葉之利用性，開發具生理機能性的新產品，並達到保健功能篩檢與驗證之目的。最後，希望能藉由本計劃的執行來提升甘薯加工利用多元性、發揮甘薯葉營養與生理保健價值、增加甘薯葉之附加價值，以提高農民的收益。

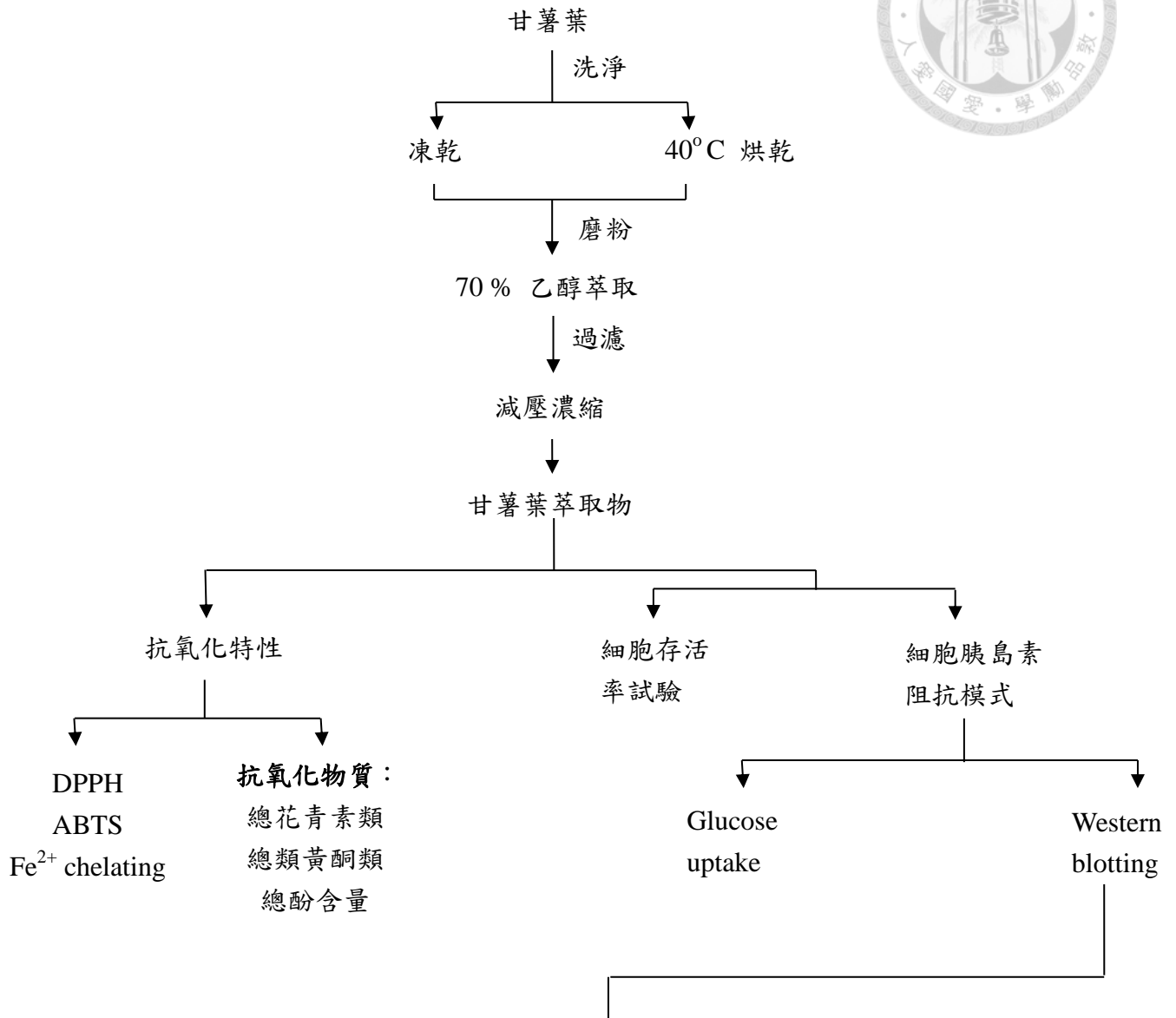
此外，不同花青素含量，除了對抗氧化能力有幫助，更可豐富甘薯色彩，增進甘薯多樣性之利用，所得結果可供甘薯葉之利用及未來育種參考。



第三章、研究動機與實驗架構

為迎合市場生產及消費者之需要、增加甘薯葉之利用、提高其附加價值，故本研究就針對不同品種的甘薯葉，分別以冷凍乾燥及風乾 (40 °C) 處理，並以 70 % 乙醇作為萃取溶劑，分析器萃取液之總酚與花青素含量，並探討甘薯葉乙醇萃取液之螯合亞鐵離子能力、清除 DPPH 自由基能力及總抗氧化力。除此之外，本研究以流式細胞儀法測定細胞中葡萄糖攝入試驗模式，並以胰島素阻抗細胞篩選具有減緩胰島素阻抗潛力之甘薯葉乙醇萃取物。實驗架構圖如下：





Anti-hyperglycemic mechanism:

Insulin receptor (IR)

Insulin receptor substrate 1 (IRS-1)

Glucose transporter-2 (GLUT-2)

圖 3-1、實驗架構

Figure 3-1. Experimental framework.

第四章、不同品種甘薯葉乙醇萃取物抗氧化特性之研究

一、前言

甘薯葉含有豐富的膳食纖維、鉀、鈣等礦物質、維生素及抗氧化物等營養素，尤其是紅或紫色甘薯葉所含的 β -胡蘿蔔素及花青素更為豐富 (Yue *et al.*, 2003; 謝等, 2004; Kano *et al.*, 2005)，具有抗氧化、提高免疫調節力、降血壓、降血膽固醇等功效，是一種極佳的天然色素來源，目前已在日本及大陸被廣泛利用及開發成各種商品 (Yamakawa *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 2004)；但是否所有紫色甘薯葉品種都含有較高且穩定的花青素而可提高其抗氧化能力，而甘薯葉在加工過程中是否會對花青素抗氧化能力有影響均值得進一步釐清。本實驗選用三個不同品種甘薯葉：(1) 測定不同甘薯葉品種之總酚含量及其生理功能性；(2) 測定不同乾燥處理後對生理功能性質是否會被破壞。



二、實驗材料

(一)原料

由行政院農業委員會農業試驗所嘉義分所研究員兼系主任賴永昌博士提供，
品種包含亞蔬 CN 1927-16、台農 64 號及 CYY 98-59。

(二)試藥級藥品

1. Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Hydrochloric acid (HCl)、potassium chloride (KCl)、sodium acetate、
1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)、Folin-Ciocalteu phenol reagent、
gallic acid、2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)、
trolox、ascorbic acid、ferrozine、potassium persulphate、sodium carbonate

2. J.T. Baker (New Jersey, USA)

Iron (II) chloride (FeCl_2)、acetic acid

3. Merck KgaA (Darmstadt, Germany)

Methanol

(三)儀器設備

1. 純水製造機 (Milli-Q ultrapure water system) (Millipore, Bedford, MA, USA)

2. 天平 (Balances) (HR-200, A&D, USA)

3. 高速離心機 (Centrifugator) (Sorvall RC 5C, DuPONT, CT, USA)

4. 光譜分析儀 (ELISA Reader) (EPOCH, Biotek, USA)

5. 熱風乾燥機 (YIH DER, LM-590R, Taiwan)

6. 減壓濃縮機 (Rotary vacuum evaporator) (Eyela N-N Series, Tokyo Rikakikai,
Tokyo, Japan)

7. 高速粉碎機 (High speed grinder) (RT-08, 全拓, 臺北, 台灣)

8. 冷凍乾燥機 (Freeze dryer) (VD400F, TAITEC, Tokyo, Japan)

9. 高效能液相層析儀 (HPLC) Pump (LC-20AT, Prominence Liquid
Chromatography, Shimadzu, Kyoto, Japan)

10. 自動注射系統 (HPLC) Auto sampler (SIL-20A Prominence, Shimadzu, Kyoto, Japan)

11. 二極體陣列式檢測系統 (HPLC) Detector (SPD-M20A Prominence Diode Array Detector, Shimadzu, Kyoto, Japan)

12. 分離管柱 ODS Column (Inertsil ODS-3 column, 4.6×250 mm, $5 \mu\text{M}$, GL Science, Japan)





(a)



(b)



(c)

圖 4-1、本實驗所分析的 3 個甘薯品種，(a)亞蔬 CN 1927-16 (黃葉種) ，(b) 台農 TN 64 (紅紫色心臟形大葉) 及 (c) CYY 98-59 (缺刻形紫葉) 。

Figure 4-1. Leaves of 3 different sweet potato cultivars: CN 1927-16, TN 64, CYY 98-59.



三、實驗方法

(一) 樣品 70 % 乙醇粗萃物製取

甘薯葉以水洗淨、瀝乾、稱重、以 40 °C 乾燥和冷凍乾燥兩種處理方式去除水分，再以粉碎機打成通過 40 mesh 之粉狀待測樣品，使用甘薯葉樣品之粉末：溶劑=1:20 之比例，以 70 % 乙醇作為萃取溶劑，並添加 1 % 的 1.5N HCl 於 25 °C 下萃取 30 分鐘，過濾後，再以相同程序重複萃取殘渣兩次。收集濾液進行減壓濃縮。最後將濃縮液分裝於棕色樣品瓶中，貯存於 -18 °C 。

(二) 總酚化合物含量測定

參考 Christer *et al.* (2000) 及 Singleton and Rossi (1965) 之方法并略加修飾，取不同濃度的甘薯葉萃取物置於 10 ml 試管中，加入 2 ml 蒸餾水及 1 ml 之 100 % Folin-Ciocalteu's phenol 試劑混合均勻。接著加入 5 ml 之 20 % Sodium carbonate 後，再次混合均勻。室溫下避光靜置 20 分鐘後，吸取 200 μ l 於 96 孔盤，再在波長 735 nm 下使用光譜分析儀測其吸光值。並以沒食子酸 (gallic acid) 做標準曲線，總酚類化合物含量以沒食子酸當量表示。每一樣品重複 3 次。

(三) 總類黃酮類測定

秤取 1.25 g 的樣品粉末，加入 62.5 % methanol 10 ml 及 6 M HCl 2.5 ml，90 °C 迴流 2 小時，超音波震盪後，4 °C、3000 rpm 下離心 5 分鐘，取上清液，測量在 540 nm 的吸光值 (Geissman, 1955)。

$$\text{類黃酮 (A}_{540}/\text{g DW)} = A_{540\text{ nm}} \times \text{萃取液總體積 (ml)} / \text{樣品的重量 (g)}$$

(四) 總花青素類測定

秤取 1.25 g 的樣品粉末，加入 62.5 % methanol 10 ml 及 6 M HCl 2.5 ml，90 °C 迴流 2 小時，超音波震盪後，4 °C、3000 rpm 下離心 5 分鐘，取上清液，於 657 nm、530 nm 測其吸光值 (Mancinelli *et al.*, 1975)。

$$\text{花青素含量 (A}_{530} - 0.33 A_{657}/\text{g DW)} = (A_{530} - 0.33 A_{657}) \times \text{萃取液體 (ml)} \times \text{稀釋倍數} / \text{樣品 (g)}$$



(五)甘薯葉乙醇粗萃物之抗氧化能力探討

1. 清除 DPPH 自由基能力測定

脂質在自行氧化的過程中會產生自由基而造成脂質酸敗，常見的抗氧化物藉由提供氫 (hydrogen doner) 來清除脂質過氧化物自由基 (peroxyl radical)，進而達到抑制氧化鏈鎖反應之進行。抗氧化的研究上，常使用 DPPH 來評估抗氧化物的供氫能力。DPPH 之甲醇溶液在 520 nm 下有較強的吸光值，被抗氧化物還原時吸光值會降低，吸光值愈低，表示抗氧化物的供氫能力愈強。實驗參考 Shimada *et al.* (1992) 之方法再加以修飾之，取 70 μl 之甘薯葉萃取物，加入 140 μl 新鮮配置之 150 μM DPPH。震盪混合均勻，並於室溫下避光靜置 30 分鐘，之後於 520 nm 的波長下使用光譜分析儀測定其吸光值。以上步驟重複測定三次，與標準品 ascorbic acid (molecular mass= 176.12 g/mol) 比較 (濃度為 5、10、15 及 20 $\mu\text{g/mL}$) 比對。

Scavenging effects = [1- (樣品反應後於 520 nm 吸光值/控制組於 520 nm 吸光值)]*100。為了避免誤差，樣品反應後之吸光值再扣掉樣品反應前之吸光值。而 EC₅₀ 值的計算運用 Microsoft Excel 中的公式 Forecast 加以計算得之。

2. 螯合亞鐵離子之能力測定

在多種金屬離子中，Fe²⁺ 是最具影響力的促氧化劑，會促進脂質氧化作用的進行。利用 Fe²⁺ 與 Ferrozine 的複合物在 562 nm 之呈色反應，可以測得樣品對 Fe²⁺ 的螯合能力。當樣品螯合 Fe²⁺ 時，會造成 562 nm 吸光值的降低。試驗方法參照 Dinis (1994) 等人方法加以修改之，取 0.25 ml 不同濃度之甘薯葉萃取物溶液，加入 0.8 ml Methanol 及 0.025 ml 2 mM Iron (II) chloride。30 秒後再加入 0.05 ml 5 mM Ferrozine，靜置 10 分鐘。使用光譜儀檢測 562 nm 之吸光值，吸光值愈低表示樣品螯合亞鐵離子的能力愈強。以上步驟重複測定三次，與標準物 gallic acid (20 ppm, molecular mass= 170.12 g/mol) 比較。

Chelating effects = [1- (樣品反應後於 562 nm 吸光值/控制組於 562 nm 吸

光值)]*100。為了避免誤差，樣品反應後之吸光值再扣掉樣品反應前之吸光值。

而 EC₅₀ 值的計算運用 Microsoft Excel 中的公式 Forecast 加以計算得之。

3. 總抗氧化能力測定 (ABTS 測定分析方法)

ABTS 在適當的氧化劑作用下氧化成綠色的 ABTS^{•+}，在抗氧化物存在時 ABTS^{•+} 的產生會被抑制，在 734 nm 或 405 nm 測定 ABTS^{•+} 的吸光度即可測定並計算出樣品的總抗氧化能力。Trolox 是一種維生素 E 的類似物，具有和維生素 E 相近的抗氧化能力，用作其它抗氧化物總抗氧化能力的參考。例如，Trolox 的總抗氧化能力為 1，相同濃度情況下，其它物質的抗氧化能力用其抗氧化能力和 Trolox 相比的倍數來表示。參考 Miller and Rice-Evans (1997)與 Arnao 等人 (2001) 之方法，ABTS 以去離子水溶解使成濃度 7 mM，加入 2.45 mM 之 potassium persulphate。將此溶液於室溫下置於暗室反應 16 小時，使其生成穩定之藍綠色 ABTS^{•+} 自由基。然後再以乙醇稀釋使其成為在分光光度計 734 nm 下，吸光值為 0.75 ± 0.05 的 ABTS^{•+} 離子溶液。加入不同濃度的標準品 (trolox) 2 μl 乙醇溶液中，再混合 180 μl ABTS^{•+} 離子溶液，在一分鐘內由分光光度計 734 nm 下測其吸光值，做成 trolox 之標準線。樣品及對照值 (乙醇) 檢測同上。而 EC₅₀ 值的計算運用 Microsoft Excel 中的公式 Forecast 加以計算得之。

(六)統計分析

每項試驗皆三重複，所得結果以 SAS 9.0 軟體進行統計分析，實驗數值以平均值 ± 標準偏差 (mean ± SD) 表示，利用 ANOVA 變異數分析檢定各處理間之差異，以鄧肯氏多變域顯著性測試 (Duncan's multiple range test) 做顯著差異比較，p < 0.05 表具有顯著差異。



四、結果與討論

(一)不同品種甘薯葉之乙醇萃取物之萃取率

3 種甘薯葉樣品 (CN 1927、CYY 98-59 和 TN 64) 以 40 °C 乾燥和凍乾兩種處理方式去除水分，利用 70 % 乙醇作為萃取溶劑，再經粗過濾、減壓濃縮、離心及冷凍乾燥後，即得各種乙醇粗萃物，其回收率介於 8.4 % ~ 41.8 % 之間 (表 4-1)。或許受到栽種和收割季節的影響，各處理的萃取率並沒有明顯地表現何種處理較高。

(二)總酚化合物含量測定

多酚類化合物 (polyphenolic compounds) 為苯環上有一個以上的氫氧基 (-OH)，其大量存在自然界之植物中特別是葉、花、蔬菜、種子、果實等植物組織中，有呈色的作用，其功能是防禦紫外線、抑制植物體過氧化作用，因具有酚基團而得名，如異黃酮類 (isoflavonoids)、酚酸 (phenolic acids) 及單寧 (tannins)，是自然界中影響花顏色的重要成分 (Karakaya, 2004; Lim, 1999; Kim, 2007; No *et al.*, 2006)。由於酚類可提供羥基上的氫原子，與脂質氧化產生的自由基反應成為較穩定的產物，這是因為此類抗氧化劑結構上的不對稱電子轉移而形成共振結構，且其缺乏氧分子攻擊之適當位置，因此相當穩定。

總酚含量以每 100 g 樣品中相當於多少 mg 的沒食子酸當量表示之 (表 4-2)。由不同品種之間作比較，結果發現 CYY 98-59 含有較高的總酚 (603.09 ± 31.43)，其次為 TN 64 (380.59 ± 10.80)。接著，以不同處理 (冷凍乾燥及 40 °C 乾燥)，除了 TN 64 表現無顯著差異之外，其他兩組的 40 °C 乾燥處理明顯降低了總酚含量 ($p < 0.05$)；值得探討的是 40 °C 乾燥對品種 TN 64 並未產生很大的影響，然而卻會對 CYY 98-59 及亞蔬 1927-16 造成一定的影響。含量多寡順序為： $CN 40\text{ °C} < CYY 40\text{ °C} = CN F = TN 40\text{ °C} = TN F < CYY F$ 。許多報告中皆指出蔬菜具有維持人體生理機能之功效，其中酚類物質是研究最廣泛的次級代謝物之一。由於其具有天然抗氧化活性，在許多研究中證實此類物質對人體有益，具有



清除自由基、增強免疫系統、降低脂質過氧化、抑制低密度膽固醇、消炎、降低血糖等化學預防作用 (chemoprevention)，更可幫組人體代謝致癌物質或其產物 (Chen *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2007)。

(三)總黃酮類測定

黃酮類化合物泛指兩個具有酚羥基的苯環通過中間三碳原子相互連接的一系列化合物。他們來自於水果、蔬菜、茶、葡萄酒、種子或是植物的根部。雖然他們不被認為是維生素，但是在生物體內的反應裡，被認為具有生理活性，曾被稱為「維生素 P」。例如像是抗氧化等或是具有一些抗發炎反應功效，也曾被認為有減緩腫瘤的形成。

總黃酮類含量以每 g 樣品乾重中含有多少 mg 表示之 (表 4-3)。由不同品種之間作比較，結果發現，台農 64 號凍乾處理組含有較高的總黃酮類 (0.30 ± 0.01 g 總黃酮類/g DW)，其次為 CYY 98-59 凍乾處理組 (0.22 ± 0.01 g 總黃酮類/g DW)。接著，以不同處理 (冷凍乾燥及 40°C 乾燥)，除了 TN 64 之外，其他兩組的 40°C 乾燥處理明顯降低了總黃酮類含量 ($p < 0.05$)；值得探討的是 40°C 乾燥對品種 TN 64 並未產生很大的影響，然而卻會對 CYY 98-59 及亞蔬 1927-16 造成一定的影響。含量多寡順序為： $\text{CN } 40^\circ\text{C} < \text{CYY } 40^\circ\text{C} < \text{CN F} < \text{TN } 40^\circ\text{C} < \text{CYY F} < \text{TN F}$ 。

(四)總花青素類測定

花青素是屬於類黃酮類之天然色素，以 C6- C3- C6 芳香環為結構骨架，環上有羥基或甲氧基取代物 (Wang *et al.*, 1997)，廣泛存在花卉、水果 (特別是漿果) 及蔬菜中。花青素是植物特有的多酚類化合物，也是黃酮類代謝所衍生的化合物，其中合成主要花青素的代謝路徑稱為花青素生合成路徑，而花青素合成路徑的中間產物也可以防禦病原菌的侵害及一些環境逆境所造成的傷害 (Padmavati *et al.*, 1997; Sarma *et al.*, 1997)。

花青素的結構會因攜帶羥基的多少、甲基化的程度及糖基數目、種類、連接

位置不同而反應出不同的顏色 (邱, 1998)。主要的花青素有紫紅色的矢車菊素 (cyanidin)、橘紅色的天竺葵素 (pelargonidin)、藍紫色的飛燕草素 (delphinidin)，此三種花青素廣泛地分佈在自然界中，而紅色的芍藥素 (peonidin) 是由矢車菊素甲基化取代而來，紫色的矮牽牛素 (petunidin) 及深紫色的錦葵素 (malvidin) 均由飛燕草素不同程度的甲基化衍生而來。


總黃酮類含量以每 g 樣品乾重中含有多少 mg 表示之 (表 4-5)。由不同品種之間作比較，結果發現 TN 64 含有較高的總花青素 (0.25 ± 0.01 g/g DW)，其次為 CYY 98-59 (0.18 ± 0.01 g/g DW)。接著，以不同處理 (冷凍乾燥及 40°C 乾燥)，除了 TN 64 表現無顯著差異之外，其他兩組的 40°C 乾燥處理明顯降低了總酚含量 ($p < 0.05$)；值得探討的是 40°C 乾燥對品種 TN 64 並未產生很大的影響，然而卻會對 CYY 98-59 及亞蔬 1927-16 造成一定的影響。含量多寡順序為： $\text{CN } 40^\circ\text{C} < \text{CYY } 40^\circ\text{C} < \text{CN F} < \text{TN } 40^\circ\text{C} = \text{CYY F} < \text{TN F}$ 。

(五)甘薯葉乙醇粗萃物之抗氧化能力探討

1. 清除 DPPH 自由基能力

脂質在氧化的過程中會產生自由基而造成脂質酸敗，常見的抗氧化物藉由提供氫原子之能力來清除脂質過氧化物自由基 (peroxyl radical) 進而達到終止自由基的連鎖反應。在抗氧化能力的研究上， α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH, $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_5$) 自由基常被用來檢測抗氧化劑提供氫原子的能力。DPPH 溶於甲醇時，會產生穩定的自由基。其溶液在 520 nm 下有最大吸收值，若測試樣品能提供電子使 DPPH 自由基接受電子形成電子對時，在 520 nm 之吸收度則會下降，因此，吸光值越低表示其清除自由基的能力越強 (Shimada *et al.*, 1992)。

對於特定的抗氧化反應， EC_{50} 通常被用來表示需要清除 50% 的自由基提取物的量或濃度，而 EC_{50} 值和清除能力正好呈反比。不同品種甘薯葉乙醇萃取物的 DPPH 自由基清除能力如表 4-5。首先可依不同品種比較的結果發現，三個品種的甘薯葉 70% 乙醇萃取物皆具有很好的 DPPH 清除能力，其中以 CN 1927-16



之 EC_{50} 值最低 (3.79 ± 1.57 mg/ml)，表示有較佳的清除能力；但經過統計分析，和其他兩個品種 (TN 64 及 CYY 98-59) 並無顯著差異。而針對乾燥處理之間的比較，實驗發現，在 TN 64 或是 CYY 98-59 的凍乾及 $40^\circ C$ 乾燥的乙醇萃取物皆具有很好的 DPPH 自由基清除能力，且無顯著差異， EC_{50} 值分別為 4.02 ± 0.19 、 5.14 ± 0.80 、 4.11 ± 1.54 及 5.27 ± 0.21 mg/ml，可見 $40^\circ C$ 乾燥並未對這兩個品種造成影響。而在品種 CN 1927-16 的 $40^\circ C$ 乾燥處理之乙醇萃取物則明顯有降低自由基清除的能力，其 EC_{50} 值為 10.73 ± 0.96 mg/ml ($p < 0.05$)。由上述結果發現， $40^\circ C$ 乾燥對品種 TN 64 及 CYY 98-59 並未產生很大的破壞，然而卻會對及亞蔬 1927-16 造成一定的影響，降低了其對 DPPH 的清除能力。

2. 螯合亞鐵離子之能力測定

類黃酮為一種廣泛存在於蔬果中的天然植物化學物質。已知其可以結合到生物聚合物，如酶、荷爾蒙載體或 DNA、螯合過渡金屬離子，如 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Mg^{2+} 、促進電子運輸和清除自由基的作用；且許多研究顯示它可作為螯合 Fe^{2+} 和清除自由基的能力很好的抗氧化劑，金屬離子的促氧化作用經常是造成脂質過氧化的主要因素，藉由 redox cycle 反應，只要少量的金屬離子便可有效的產生自由基，並加速脂質氧化的進行。在多種金屬離子中， Fe^{2+} 經常是最具影響力的助氧化劑，其會促進脂質氧化作用的進行。利用 Fe^{2+} 與 ferrozine 的複合物在 562 nm 之呈色反應，可測得樣品對 Fe^{2+} 離子的螯合能力。當樣品螯合 Fe^{2+} 離子時，會造成 562 nm 吸光值的降低。

同樣地，實驗結果以 EC_{50} 值表示，由表 4-6 的結果發現，不同品種之間以 CYY 98-59 的螯合亞鐵離子能力最強 (3.98 ± 0.89 mg/ml)，其次是亞蔬 1927-16 (7.78 ± 0.44 mg/ml)。而在乾燥處理之間比較的結果發現，不同於先前清除自由基的結果， $40^\circ C$ 乾燥處理相較於冷凍乾燥處理具有較佳的螯合亞鐵離子能力，但並沒有顯著差異 ($p < 0.05$)。不同品種甘薯葉萃取物之 EC_{50} 值依 CN 1927-16、TN 64、CYY 98-59 的凍乾組，分別為 17.56 ± 3.82 、 21.52 ± 11.52 、 14.26 ± 4.51



mg/ml，而 40 °C 乾燥的 EC₅₀ 值依 TN 64 及 CYY 98-59，為 17.85 ± 4.91 及 3.98 ± 0.89 mg/ml。

3. 總抗氧化能力測定 (ABTS 測定分析方法)

ABTS 測定分析為一種被廣泛採用的抗氧化活性測定方法，用於飲料和食品以及一些植物萃取物抗氧化活性的測定。

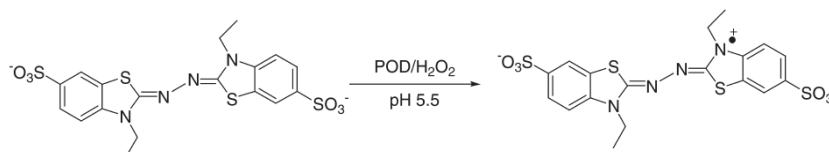
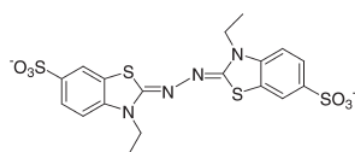


圖 4-2、ABTS 自由基形成之反應式。

Figure 4-2. Formation of ABTS free radical.

(Childs *et al.*, 1975)



2, 2'-Azion-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) (I)

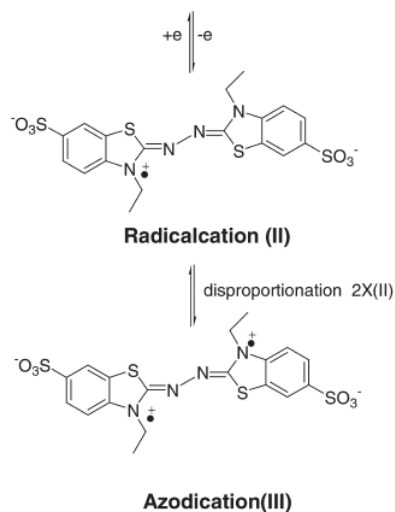
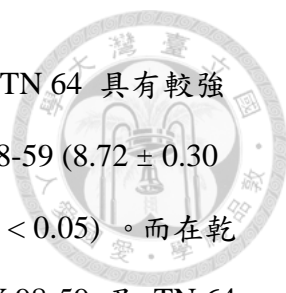


圖 4-3、ABTS 氧化還原系統之二種氧化產物。

Figure 4-3. Chemical formular of ABTS and its oxidation products.

(Childs *et al.*, 1975)



根據表 4-7 的結果顯示，在不同品種甘薯葉乙醇萃取物中，TN 64 具有較強的 ABTS 自由基清除能力 (7.64 ± 0.12 mg/ml)，其次為 CYY 98-59 (8.72 ± 0.30 mg/ml)，但是品種間的 ABTS 自由基清除能力並無顯著差異 ($p < 0.05$)。而在乾燥處理之間的比較，無論是在凍乾還是 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 乾燥的部份，CYY 98-59 及 TN 64 皆具有良好的 ABTS 自由基清除能力，在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 乾燥處理組，其 EC_{50} 值分別為 21.55 ± 2.90 及 9.77 ± 0.18 mg/ml。而在品種亞蔬 1927-16， $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 乾燥處理明顯影響了其清除 ABTS 自由基的能力， EC_{50} 值提高，從冷凍乾燥處理的 12.40 ± 0.20 上升到 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 乾燥處理的 194.59 ± 23.36 mg/ml。相較於實驗所使用的標準品 (Trolox)，甘薯葉中的酚類化合物包含類黃酮及花青素等，可能有加強清除自由基的能力。



表 4-1、不同品種甘薯葉萃取率 (%)

Table 4-1. Yield of extraction (%) from leaves of different sweet potato cultivars

	Lyophilized	40 °C dried
	Yield (%)	Yield (%)
CYY 98-59	34.2	14.8
CN 1927-16	20.8	8.4
TN 64	23.2	41.8



表 4-2、不同品種甘薯葉之總酚類含量^A (mg GAE/ml)

Table 4-2. Contents of total phenols^A (mg GAE/ml) from leaves of different sweet potato cultivars

	Lyophilized	40 °C dried
CN 1927-16	339.59 ± 4.03 ^b	198.49 ± 6.89 ^c
TN 64	380.59 ± 10.80 ^b	344.79 ± 4.63 ^b
CYY 98-59	603.09 ± 31.43 ^a	316.43 ± 0.86 ^b

^A Each value is expressed as mean ± SD (n = 3).

Mean with different letters significantly different ($p < 0.05$).



表 4-3、不同品種甘薯葉之總黃酮類含量^A (g/ g DW)

Table 4-3. Contents of total flavonoids^A (g/ g DW) from leaves of different sweet potato cultivars

	Lyophilized	40 °C dried
CN 1927-16	0.05 ± 0.00 ^d	0.01 ± 0.00 ^f
TN 64	0.30 ± 0.01 ^a	0.20 ± 0.00 ^c
CYY 98-59	0.22 ± 0.01 ^b	0.03 ± 0.00 ^e

^A Each value is expressed as mean ± SD (n = 3).

Mean with different letters significantly different ($p < 0.05$).



表 4-4、不同品種甘薯葉之總花青素類含量^A (g/g DW)

Table 4-4. Contents of total anthocyanidin^A (g/g DW) from leaves of different sweet potato cultivars

	Lyophilized	40 °C dried
CN 1927-16	0.05 ± 0.00 ^c	0.01 ± 0.00 ^e
TN 64	0.25 ± 0.01 ^a	0.17 ± 0.01 ^b
CYY 98-59	0.18 ± 0.01 ^b	0.02 ± 0.00 ^d

^A Each value is expressed as mean ± SD (n = 3).

Mean with different letters significantly different ($p < 0.05$).



表 4-5、不同品種甘薯葉乙醇萃取物 DPPH 自由基清除能力之 EC₅₀ 值^A (mg/ml)

Table 4-5. EC₅₀ values^A (mg/ml) of 70 % ethanol extracts from leaves of different sweet potato cultivars for scavenging DPPH radicals

	Lyophilized	40 °C dried
CN 1927-16	3.79 ± 1.57 ^b	10.73 ± 0.96 ^a
TN 64	4.02 ± 0.19 ^b	5.14 ± 0.80 ^b
CYY 98-59	4.11 ± 1.54 ^b	5.27 ± 0.21 ^b
Ascorbic acid^B	1.36	

^A Each value is expressed as mean ± SD (n = 3).

Mean with different letters significantly different ($p < 0.05$).

^B Positive control.



表 4-6、不同品種甘薯葉乙醇萃取物 ABTS 自由基清除能力之 EC₅₀ 值^A (mg/ml)

Table 4-6. EC₅₀ values^A (mg/ml) of 70 % ethanol extracts from leaves of different sweet potato cultivars for ABTS radicals

	Lyophilized	40 °C dried
CN 1927-16	12.40 ± 0.20 ^b	194.59 ± 23.36 ^a
TN 64	7.64 ± 0.12 ^b	9.77 ± 0.18 ^b
CYY 98-59	8.72 ± 0.30 ^b	21.55 ± 2.90 ^b
Trolox^B		21.38

^A Each value is expressed as mean ± SD (n = 3).

Mean with different letters significantly different ($P < 0.05$).

^B Positive control.



表 4-7、不同品種甘薯葉乙醇萃取物螯合亞鐵離子能力之 EC₅₀ 值^A (mg/ml)

Table 4-7. EC₅₀ values^A (mg/ml) of 70 % ethanol extracts from leaves of different sweet potato cultivars for ferrous ion chelating abilities.

	Lyophilized	40 °C dried
CN 1927-16	17.56 ± 3.82 ^{ab}	7.78 ± 0.44 ^{bc}
TN 64	21.52 ± 11.52 ^a	17.85 ± 4.91 ^{ab}
CYY 98-59	14.26 ± 4.51 ^{abc}	3.98 ± 0.89 ^c
Ascorbic acid^B	1.17	

^A Each value is expressed as mean ± SD (n = 3).

Mean with different letters significantly different ($P < 0.05$).

^B Positive control.



五、結論

近年來，由於社會型態由早期的農業社會轉變為工商社會，導致環境污染日漸增加、酒精消耗量增加、生活壓力以及藥物濫用等問題日趨嚴重，導致許多疾病叢生，其主要原因為人體存在過多的自由基所造成的危害。一般認為在細胞代謝過程中，自由基是必然的產物，包括超氧自由基、氫氧自由基以及亞鐵離子等源自生物生理反應或外生因子的活性氧，大都具有極高的危險性。因此，如何找尋一天然藥物可有效清除體內過多的自由基為近年來醫藥界的研究主流之一。在甘薯葉抗氧化活性研究中，Huang *et al.* 提及除了總酚含量對自由基清除能力有差異之外，水溶性抗氧化物質、脂溶性抗氧化物質及其他酚酸衍生物在自由基清除率及機能性皆有差異存在 (Islam *et al.*, 2003; Teow *et al.*, 2007)，且品種間之抗氧化能力受其他酚類化合物及胡蘿蔔素含量影響，因此具有不同程度的抗氧化能力 (Teow *et al.*, 2007)。根據試驗結果，可將不同品種甘薯葉乙醇萃取物之抗氧化機制彙整 (如圖 4-4 所示)。在 DPPH 自由基與 ABTS 自由基試驗中，台農 64 及 CYY 98-59 的冷凍乾燥處理組具有較佳的清除能力，而亞鐵離子螯合能力則以亞蔬 1927-16 的 40 °C 乾燥處理具有最佳的螯合能力。在總抗氧化能力測定的方面，也以台農 64 號以及 CYY 98-59 兩個品種的凍乾處理組最佳，EC 50 值為 7.64 mg/ml 以及 8.72 mg/ml。此外，CYY 98-59 之冷凍乾燥處理組具有最高的總酚含量，其值 603.09 mg GAE/g DW。而在總黃酮類和總花青素類的結果也和總酚含量的測定相近，分別以台農 64 號 (0.30 g 總黃酮類/g DW；0.25 g 總花青素/g DW) 以及 CYY 98-59 (0.22 g 總黃酮類/g DW；0.18 g 總花青素/g DW) 兩個品種的凍乾處理組較高。綜合上述試驗結果可以得知，不同品種甘薯葉乙醇萃取物富含酚類化合物與抗氧化物質。

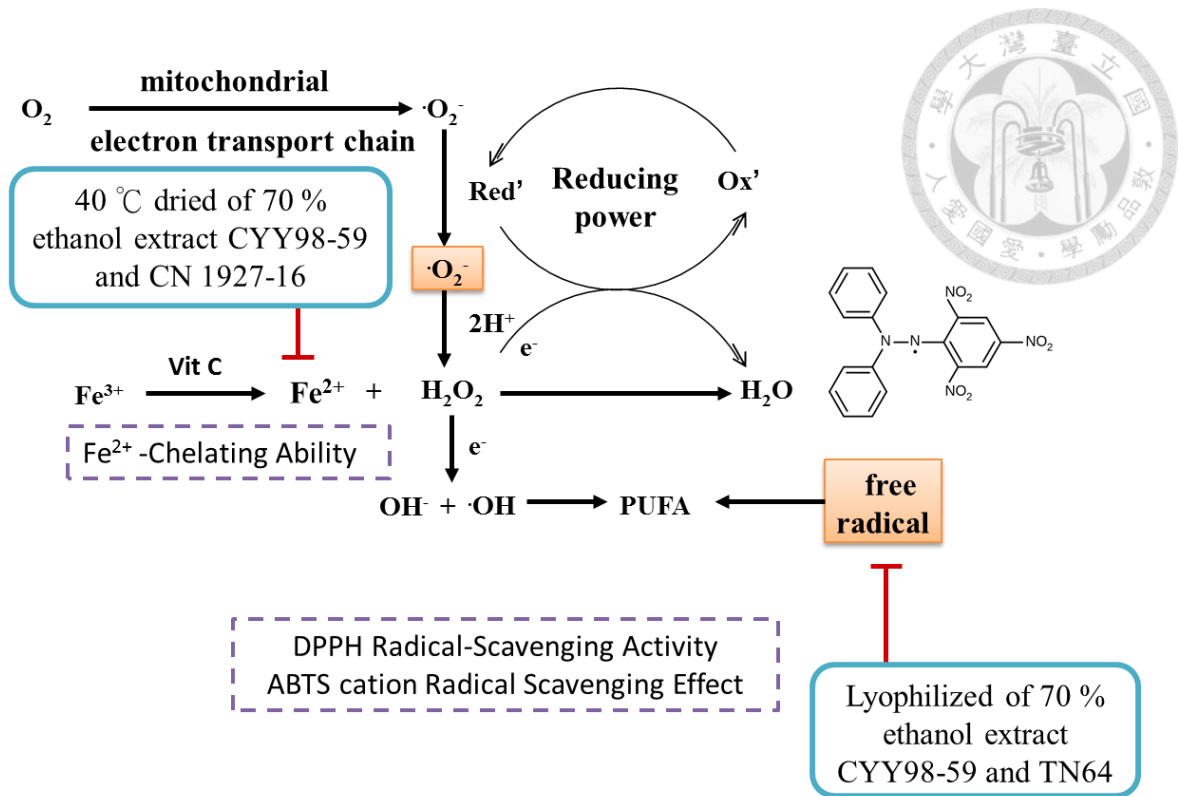


圖 4-4、不同品種甘薯葉乙醇萃取物可能參與的抗氧化機制。

Figure 4-4. Proposed antioxidation mechanisms of ethanol extracts from leaves of different sweet potato cultivars.

第五章、不同品種甘薯葉乙醇萃取物對葡萄糖攝入能力之探討

一、前言

第二型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus) 為主要的糖尿病類型，約佔所有糖尿病患的 90%，其主要導因於胰臟中的 β 細胞分泌胰島素量減少及胰島素阻抗性增加，然而罹病率隨著年齡的增加而增加，意謂著第二型糖尿病和老化在細胞生理學上有些關聯性及相似性，老化常伴隨著葡萄糖代謝異常，造成體內葡萄糖濃度升高及初期代償反應高胰島素現象，研究顯示血糖及胰島素濃度增加時，會直接刺激體內自由基的生成及降低抗氧化的能力，而這些自由基經由不同的途徑產生不同的自由基，包括經由 nicotinic adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase 生成的超氧化物 (superoxide, O_2^-)、葡萄糖氧化反應產生的氫氧自由基 (hydroxy radical, $\cdot OH$) 及經由一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase, NOSs) 所產生的一氧化氮 (NO) 和過氧亞硝基陰離子 ($ONOO^-$)。胰臟中的 β 細胞抗氧化能力較弱，對自由基相當敏感而容易被破壞進而減少胰島素的分泌，更加重糖尿病的病情，高血糖誘發自由基的生成及降低抗氧化的能力，而自由基破壞 β 細胞分泌胰島素的功能及增加糖尿病併發症發生的機率，因此氧化壓力 (oxidative stress) 及糖尿病之間是互為因果也是惡性循環。

由於人體周邊組織之胰島素是第二型糖尿病的主要成因，本實驗利用細胞激素 (TNF- α) 誘發小鼠肝臟細胞株產生胰島素阻抗之模式，配合葡萄糖攝入技術以評估甘薯葉乙醇萃取物改善胰島素阻抗之效果、測定胰島素訊息傳遞相關蛋白質表現量，並提出甘薯葉乙醇萃取物改善肝臟細胞胰島素阻抗之可能機制。



二、實驗材料

(一)原料

同第四章二、之(一)。

(二)實驗細胞

小鼠肝臟上皮細胞 FL83B 購自 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)。

解凍之後 FL83B 細胞每二至三天固定進行一次繼代培養。去除舊的培養基後，利用 PBS (Phosphate-buffered Saline) 溶液清洗細胞表面，再以胰蛋白酶 (Trypsin) 作用從培養皿底面切下細胞，加入培養液 (F-12K+ 10 % FBS) 打散並懸浮後，將細胞懸浮液吸至 15 ml 無菌離心管中，以 1000 rpm、5 mins 之條件離心。倒除上清液再重新以培養液均勻懸浮細胞胚 (pellet)，計數細胞並將細胞數調整至 1×10^6 cells/ml。取 1 ml 懸浮液至 10 cm 培養皿中，最後置於 37°C ，5 % CO_2 與充分濕度之培養箱內。待確定 FL83B 細胞長至八分滿後，進行細胞實驗。

(三)試藥級藥品

1. Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Bovine serum albumin (BSA)、Insulin、NaOH、3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT reagent)、dimethyl sulfoxide (DMSO)、sodium bicarbonate (NaHCO_3)、phenol red、potassium chloride (KCl)、potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)、sodium chloride (NaCl)、sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4)、nutrient mixture F12 Ham Kaighn's modification (F12K) medium、HEPES、Ammonium persulfate (APS)

2. Gibco BRL (NY, USA)

Fetal bovine serum (FBS)

3. JRS (Lenexa, KS, USA)

Trypsin

4. Invitrogen (Eugene, Oregon, USA)



2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose (2-NBDG)

5. Merck KgaA (Darmstadt, Germany)

Tween-20

6. J.T. Baker (New Jersey, USA)

Sodium dodecyl sulfate (SDS)

7. Millipore (Billerica, MA, USA)

Anti-GLUT-2 antibody、ECL

8. Gene Tex (Irvine, CA, USA)

Anti-actin

9. Bio-Rad Laboratories (Richmond, VA, USA)

Bio-Rad protein assay dye reagent

10. Cell signaling Technology (Danvers, MA, USA)

Anti-IR、anti-IRS-1

11. Riedel-de Haën (Seelze, Germany)

Sodium fluoride (NaF)

(四)實驗樣品配製

1. Phosphate Buffered Saline (PBS)

8 g NaCl/ 1.15 g Na₂HPO₄• 2 H₂O/ 0.2 g KH₂PO₄/ 0.2 g KCl/ 1 L 去離子水

2. KRB buffer (Krebs-Ringer Biocarbonate buffer)

6.9 g NaCl/ 2.1 g NaHCO₃/ 0.163 g KH₂PO₄/ 0.35 g KCl/ 0.28 g CaCl₂• 2 H₂O/

0.29 g MgSO₄• 7H₂O/ 3.574 g HEPES/ 1 % Albumin/ 1 L 去離子水調 pH 至 7.3

3. Nutrient mixture F12 Ham Kaighn's modification (F12K) medium

F-12K medium/ 10 % FBS/ 2.5 g NaHCO₃/ 1 L 去離子水調整 pH 至 7.3

4. MTT reagent

2 mg MTT/ 1 ml 去離子水

5. Insulin reagent



- 1000 nM insulin
6. 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose (2-NBDG reagent)
- 200 μ M 2-NBDG reagent
7. Lysis buffer
- 1.2114 g Tris/ 0.37224 g EDTA/ Triton X-100 5 ml/ 0.5 g SDS/ 0.20995 g NaF/
0.0174 g PMSF 調整 pH 至 7.4 後，加水至 500 ml，儲存於 4 °C
8. B 液：分離膠體緩衝液
- 18.2 g Tris/ 0.36 ml TEMED 加去離子水 ml 溶解後，以 HCl 調 pH 至 8.8，加去離子水定量至 100 ml，儲存於 4 °C
9. C 液：聚焦膠體緩衝液
- 6.0 g Tris/ 0.4 ml TEMED 加去離子水 4 ml 溶解後，以 HCl 調 pH 至 6.8，加去離子水定量至 100 ml，儲存於 4 °C
10. 10 % SDS 溶液
- 1 g SDS 溶於 10 ml 去離子水，經 0.45 μ M 無菌針筒過濾器過濾後備用
11. Ammonium persulfate, APS, 10 %
- 取 0.1 g APS 溶於 1 ml 去離子水中，需新鮮配製
12. 電泳緩衝液 Running buffer (10 \times)
- 121.14 g Tris/ 75.07 g glycine 加 1 L 去離子水溶解後，以 6 N HCl 調整至 pH 8.3
(使用前稀釋成 1 \times)
13. 轉印緩衝液 Transfer buffer (10 \times)
- 30.3 g Tris/ 144 g glycine 加 800 ml 去離子水溶解後，調整 pH 至 8.3，再定量至 1000 ml (使用前稀釋：200 ml methanol+ 100 ml transfer buffer 定量至 1 L)
14. PBS (phosphate buffer saline) 5 \times
- 38 g NaCl/ 7.8 g NaH₂PO₄，pH 調整至 8.3 加去離子水定量至 1 L
15. PBST (phosphate buffer saline and Tween 20)

PBS 5× 稀釋至 1×，加入 0.05 % (v/v) Tween 20，即成為 PBST



(五)儀器設備

1. 天平 (Balances) (HR-200,A&D,USA)
2. 高速離心機 (Centrifugator) (Sorvall RC 5C,DuPONT,CT,USA)
3. 培養箱 (CO2 incubator) (Model TC2323,SHEL LAB, Tokyo, Japan)
4. 無菌操作台 (Larminar flow) (造鑫，臺北，台灣)
5. 倒立式顯微鏡 (Inverted microscope) (Eclipse TE300, Nikon, Tokyo, Japan)
6. 吸管輔助器 (pipette-aid) (Matrix, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
7. 流式細胞儀 (Flow cytometry) (FACScan, Becton Dickinson, USA)
8. 光譜分析儀 (ELISA) (EPOCH, Bioteck, USA)
9. 純水製造機 (Milli-Q ultrapure water system) (Millipore, Bedford, MA, USA)
10. 高壓滅菌釜 (Autoclave) (HL-341, 雙鷹，臺北，台灣)
11. 迴轉震盪器 (Orbital Shaker) (TS-500，祥泰，臺北，Taiwan)
12. 桌上型離心機 (Centrifugator) (Sorvall RC 5C, DuPONT, CT, USA)
13. 電源供應器 Power Supply (Hercules 200, EZlan, Taipei, Taiwan)
14. 電源供應器 Power Supply (Bio-Rad, USA)
15. PVDF 轉印膜 (Millipore, Billerica, MA, USA)
16. UVP 冷光照膠系統 (Level, Cambridge, UK)
17. 迷你電泳槽 Mini-PROTEIN Tetra Cell, 1.5 mm, 4 Gel (Bio-Rad, USA)
18. 膠片鑄膠架 Casting Frame (Bio-Rad, USA)
19. 免疫轉印槽 Transfer Tank (Mini Compact Electro-blotting Unit V10-EB10, Scie-Plas, UK)



三、實驗方法

(一) 樣品 70% 乙醇粗萃物製取

同第四章三、之(一)。

(二) 小鼠肝細胞 FL83B 之保存與培養

購入之 FL83B 細胞經大量培養後，利用液態氮將細胞冷凍保存。冷凍細胞的方式是將 5×10^6 細胞加入 0.9ml FBS 中，再加入 0.1ml dimethyl sulfoxide (DMSO)，混合均勻後置入無菌冷凍小管中。之後以慢速降溫方式，先將冷凍小管放入保溫鋼瓶中（以棉花固定），置於 -80°C 冷凍櫃中隔夜，再將冷凍小管放入液態氮中保存。培養步驟則參照第五章二、之(二)。

(三) FL83B 細胞存活率試驗 (MTT assay)

將培養完成之細胞調整細胞數至 $2 \times 10^4/\text{ml}$ ，再取細胞懸浮液 200 μl /孔至 96 孔盤中培養 24 小時使細胞貼附。取出培養液後，再於每孔中加入 20 μl 樣品及 180 μl 培養液於 37°C ，5% CO_2 培養箱中培養 24 小時。去除培養液，再於每孔中加入 MTT 試劑 25 μl 及培養液 100 μl 避光於培養箱中培養 4 小時，再取出全部培養液後，每孔均加入 100 μl DMSO 反應 15 分鐘，測 $\text{OD} = 570 \text{ nm}$ 之吸光值（吸光值越高代表其細胞存活率越高）。

(四) 甘薯葉乙醇萃物對具胰島素阻抗性 FL83B 細胞之葡萄糖攝入試驗 (Glucose uptake)

將 FL83B 細胞分盤培養，待其生長至八分滿時，吸去舊的培養液加入 5 ml 新的不含血清之培養液及 $\text{TNF-}\alpha$ (最終濃度 20 ng/ml)，於 37°C 培養箱中作用 5 小時後，加入胰蛋白酶 (trypsin) 並於 37°C 培養箱中作用 5 分鐘，以 1200 μl 的 KRB buffer 沖下細胞。取 172 μl 懸浮細胞液、20 μl 含 1000 nM insulin 或 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的樣品及 8 μl 2-NBDG (2-NBDG 之最終濃度為 200 μM) 混合， 37°C 水浴避光作用 1 小時後，準時將褐色微量離心管取出置於冰上終止反應，再以 $3000 \times g$ (4°C) 離心 5 分鐘，取出上清液後以 PBS 離心清洗兩次。最後加入 1



ml PBS, 利用流式細胞儀進行分析, 依螢光強度大小來判別細胞攝入葡萄糖多寡, 螢光強度越強代表細胞攝入螢光葡萄糖染劑量越多。

(五) 西方轉印分析 (Western blot)

1. 聚丙烯醯胺凝膠電泳

先準備 8 ~ 10 % 之分離膠體 (separation gel), 待其凝固後再加入 4 % 焦集膠體 (stacking gel) (參照下表), 凝固後再將膠片組合至電泳槽上, 倒入電泳緩衝溶液。取出適量蛋白質溶液加入同體積之 SDS-PAGE 樣品溶液及 2 μ l 追蹤染料, 混勻後以 100 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘, 冷卻後再以微量吸管注入樣品槽中, 裝上電源蓋, 先以 80 V 進行電泳, 待其追蹤染料之藍色細線通過焦集膠體後, 再將電壓改成 120 V 繼續進行電泳, 待追蹤染料跑出膠體後, 關閉電源, 取出膠體進行蛋白質轉印之步驟。

常用 SDS-PAGE 膠體溶液 (單位: ml)

膠體溶液	分 離 膠 體 溶 液		焦 集 膠 體 溶 液	
	8 %		4 %	
A (40 % Bis)	3.96		0.99	
B	5		-	
C	-		2.48	
10 % SDS	0.2		0.1	
H ₂ O	10.74		6.23	
APS	0.1		0.2	
總體積	20		10	

2. 蛋白質轉印

將 PVDF 轉印膜先以 100 % 甲醇潤濕數秒鐘後, 浸泡於轉印緩衝液中備用; 而轉印所需之濾紙和海綿也先浸潤於轉印緩衝液中平衡備用。再將完成電泳之 SDS-PAGE 膠片浸泡於轉印緩衝液中平衡約 5 分鐘, 取出轉印卡匣 (Bio-rad 電

泳槽) ，將多孔性海綿、3M 濾紙、PVDF membrane、SDS-PAGE 膠片、3M 濾紙、多孔性海綿依序鋪上，並小心避免任何氣泡之產生，即完成轉印三明治之組合。隨後，將卡匣組合放入轉印槽中，使 SDS-PAGE 膠片面朝向負極，PVDF 膜朝向正極，並除去卡匣外之氣泡，以避免轉印效率降低。於 4 °C 下以 400 mA 之條件進行轉印 75 分鐘。此外，進行蛋白質轉印時，於電泳過程中加入 5 μl prestained protein marker 作為轉印效率之參考。

3. 酵素免疫染色

將轉印完成之 PVDF membrane 浸於 5 % 脫脂奶 (溶於 PBST 中) ，置於室溫中 blocking 1 小時，以阻斷非專一性抗原反應；之後以 PBST 清洗三次，每次 15 分鐘，接著再加入一次抗體 (以 PBST 稀釋至適當之倍率，參照下表) 於 4 °C 反應隔夜；倒去一級抗體後，以 PBST 清洗三次，每次 15 分鐘，接著再以 PBST 稀釋鍵結 HRP 之二級抗體 (稀釋倍率參照下表) ，以相同方式作用於 PVDF membrane 1 小時後，以 PBST 清洗三次，每次 15 分鐘。最後以 ECL 方式呈色，利用 UVP 冷光照膠系統照膠，得知雜合反應結果。

一級及二級抗體使用之濃度

Primary Ab	Secondary Ab	kDa
Anti-Actin (1:4000)	Anti-Rabbit (1:10000)	42
Anti-GLUT2 (1:1000)	Anti-Rabbit (1:10000)	57
Anti-IR (1:1000)	Anti-Mouse (1:10000)	95
Anti-IRS1 (1:1000)	Anti-Rabbit (1:10000)	180

(六)統計分析

每項試驗皆三重複，所得結果以 SAS 9.0 軟體進行統計分析，實驗數值以平均值 \pm 標準偏差 (mean \pm SD)表示，利用 ANOVA 變異數分析檢定各處理間之差異，以鄧肯氏多變域顯著性測試 (Duncan's multiple range test) 做顯著差異比較， $p < 0.05$ 表具有顯著差異。





四、結果與討論

(一)不同品種甘薯葉之乙醇萃取物對 FL83B 細胞生長存活率 (cell viability)

MTT 溶液 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl- tetrazolium bromide) 為黃色化合物，是一種接受氫離子的染料，可作用於活細胞線粒體中的呼吸鏈，在琥珀酸脫氫酶和細胞色素 C 的作用下 tetrazolium 環開裂，生成藍色的 formazan 結晶，formazan 結晶的生成量與活細胞數目成正比（死細胞中琥珀酸脫氫酶消失，不能將 MTT 還原）。可利用測吸光值得知細胞還原 MTT 的能力 (formazan 形成量)，此吸光值代表了粒線體的活性，即活細胞數目，故 MTT assay 可用作細胞存活率的指標。

甘薯葉富含的植物化學物質 (phytochemicals) 具有良好的抑菌、抗病毒、抗氧化、抗癌及降血糖等生理活性。然而，在濃度過高的情況下亦可能造成細胞毒性。取濃度 100、200、400、800、1000 $\mu\text{g/ml}$ 之不同品種甘薯葉乙醇萃取物，直接添加於已培養 24 小時之 FL83B 細胞培養液中，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 環境中共同培養 24 小時，利用 MTT 法測得其吸光值，再依生長抑制公式可求得細胞存活率 (cell viability)。

表 5-1 為不同品種甘薯葉乙醇萃取物對 FL83B 細胞培養後其細胞存活率之比較。由表中可發現，不同品種甘薯葉乙醇萃取物雖無明顯促進細胞生長之效果，但濃度達 1000 $\mu\text{g/ml}$ 時細胞仍保有良好之生長狀況，顯示無細胞毒性。樣品濃度於 1000 $\mu\text{g/ml}$ ，CN 1927-16 的凍乾和 40 $^{\circ}\text{C}$ 乾燥對細胞存活率分別為 96.28、104.09%，而 TN 64 及 CYY 98-59 的凍乾和 40 $^{\circ}\text{C}$ 乾燥對細胞存活率分別為 95.01、106.79、101.13 和 101.59%。

以上不同品種甘薯葉乙醇萃取對 FL83B 細胞存活率之測試結果，可瞭解粗萃物對細胞之安全性，並作為下一步驟細胞試驗時無毒性劑量之參考，亦即確定細胞於正常生長狀態下，其生長反應不受樣品影響或阻礙。綜合上述實驗結果，將選取不同品種甘薯葉乙醇萃取物濃度 1000 $\mu\text{g/ml}$ ，進行以下 TNF- α 誘導之胰



島素阻抗細胞模式及葡萄糖攝入實驗，以瞭解甘薯葉乙醇萃取物改善胰島素阻抗細胞之效果。

(二)甘薯葉乙醇萃物對具胰島素阻抗 FL83B 細胞葡萄糖攝入試驗 (glucose uptake)

本實驗利用小鼠肝臟 FL83B 細胞先以 20 ng/ml 之 TNF- α 誘導形成胰島素阻抗模式後，再以濃度 100 μ g/ml 之不同品種甘薯葉乙醇萃取物處理細胞，測試其對胰島素阻抗型 FL83B 細胞葡萄糖攝入之影響。TNF- α 、interleukin-1 (IL-1)、interleukin-6 (IL-6) 及 interferon- γ (IFN- γ) 等促發炎因數已證實與誘導胰島素阻抗有關 (Iwata *et al.*, 2001; Senn *et al.*, 2000; Shiba *et al.*, 1998)。

不同品種甘薯葉乙醇萃取物濃度 1 mg/ml 時，對胰島素阻抗肝臟細胞葡萄糖攝入之影響結果如圖 5-1、5-2 所示，其中圖 5-1 為冷凍乾燥之結果，而圖 5-2 為 40 $^{\circ}$ C 乾燥的結果。由圖 5-1 可發現，CN 1927-16 的凍乾組較高螢光值，與 TNF- α 處理組比較下有顯著差異 ($p < 0.05$)。在凍乾部份，不用品種甘薯葉乙醇萃取物的螢光值強弱順序為 CN 1927-16 > CYY 98-59 > TN 64，分別為 268.11 ± 57.18 、 219.89 ± 18.72 及 182.51 ± 12.00 。

在 40 $^{\circ}$ C 乾燥部份，以品種 TN 64 偵測到的螢光值較高，且與 TNF- α 處理組比較下有顯著差異 ($p < 0.05$)。不用品種甘薯葉乙醇萃取物的螢光值強弱順序為 TN 64 > CN 1927-16 > CYY 98-59，分別為 210.04 ± 13.74 、 177.79 ± 32.74 及 164.54 ± 22.89 。

將上述不同品種及不同處理的樣品對胰島素阻抗細胞之螢光值進行數據轉換，得到胰島素阻抗細胞之改善率 (amelioration ratio)，結果如表 5-2 表示。凍乾方面以 CN 1927-16 及 CYY 98-59 對胰島素阻抗細胞其改善效果較好，與 TNF- α 處理組比較，分別可提高 71.55 及 40.69 % 的葡萄糖攝入能力。

40 $^{\circ}$ C 乾燥部份可由表 5-2 發現，只有 TN 64 具有較好的改善效果，其他兩個品種之改善能力和 TNF- α 無顯著差異。甘薯葉中富含的功効成份推測和人體



健康有很大的關係，其中像是提供蔬果天然顏色的花青素就被證實具有改善有糖尿病引起的視網膜病變 (Scharer and Ober, 1981)。

綜合上述結果，TN 64 乙醇萃取物具有明顯改善 TNF- α 誘導胰島素阻抗小鼠肝臟 FL83B 細胞株葡萄糖攝入之能力。

(三)不同品種甘薯葉乙醇萃取物對胰島素阻抗 FL83B 細胞胰島素訊息傳遞蛋白質表現之影響

1. 胰島素受器 (insulin receptor substrate, IRS) 受質

胰島素受器受質 (IRS) 為細胞內訊息傳遞之載體蛋白，負責協調合併細胞外重要的生物訊息，如辨識胰島素受器所供給的訊息文獻指出，IRS-1 為主要的 insulin-like grow factor (IGFs) 受器且其表現量隨著糖尿病相關的並發症而影響，像是肝癌、胰臟癌 (Dearth *et al.*, 2007)。此外，當 IRS-1 受到胰島素刺激時，會有多個位置被磷酸化，其中包含 P85、Grb2、Nck、Crk、Fyn、Syp 及 SHP2 (Taniguchi *et al.*, 2006)，或是 IRS-1 多處的 serine/threonine phosphorylation 將抑制 tyrosine phosphorylation，進而阻斷胰島素訊息的傳遞 (Moeschel *et al.*, 2004)。研究之出，若將脂肪細胞、肝臟細胞中的 IRS-1 基因剔除，會造成胰島素阻抗，顯示 IRS-1 的基因表現欲胰島素訊息傳遞有關 (Benito, 2011)。文獻指出，受到 TNF- α 誘導時 IRS-1 產生 serine phosphorylation，當 IRS-1 上的 serine 產生磷酸化時則會導致下游 PI3K 蛋白的表現量下降，此為主要造成胰島素阻抗的主因之一 (Klaus *et al.*, 2004)。利用 TNF- α 處理小鼠骨髓細胞 32D 時，其胰島素受器活性及下游訊息傳遞蛋白時，IRS-1 表現量會受到下降 (Hotamisligil *et al.*, 1996)。

圖 5-4 分別為不同品種甘薯葉乙醇萃取物對以 TNF- α 處理之小鼠肝臟細胞 FL83B 胰島素受體受質表現之影響。研究指出，若將脂肪細胞、肝細胞中的 IRS-1 基因剔除，會造成胰島素阻抗，顯示 IRS-1 的基因表現與胰島素訊息傳遞有關



(Benito, 2011)。本實驗結果顯示，FL83B 細胞經 20 ng/ml TNF- α 誘導後其 IRS-1 之表現量與正控制組比較之下量並無顯著差異，其明確機轉有待探討。

2. 胰島素受體 (insulin receptor) 表現

胰島素與細胞膜上的胰島素接收器 (IR) 結合，活化 IR 上的 tyrosine kinase，因此刺激細胞內的一連串訊息傳遞並促進肝醣合成或酵素活化。胰島素受體 (insulin receptor, IR) 是細胞膜上正常情況下胰島素會與受體上 α 次單位結合，導致構型改變而促使兩個 α 次單元聚集引起 β 次單元之自體磷酸化 (Björholm *et al.*, 2005)。磷酸化之受體會促使胰島素受體基質 -1,2,3 (IRS-1,2,3) 酪胺酸磷酸化 (tyrosyl phosphorylation)，並活化下游之訊息分子而調節體內葡萄糖之平衡 (White, 2003; Zick, 2001)。

圖 5-3 為不同品種甘薯葉乙醇萃取物對 TNF- α 處理之 FL83B 細胞胰島素受體蛋白質表現量之影響，胰島素抵抗之 FL83B 細胞經樣品處理後，IR 表現量無明顯增加，且呈現無顯著差異，其明確機轉有待探討。但有報告提出，以 20 ng/ml TNF- α 會明顯降低其 IR 表現量，脂肪細胞 (3T3-L1) 及肝癌細胞 (Hep G2) 分別以細胞激素 TNF- α 及 IL-1 處理時，胰島素訊息傳遞中之 IR 表現會受抑制，其表現量會隨 TNF- α 濃度增加而降低 (Nov *et al.*, 2010)。

3. 葡萄糖轉運蛋白 (glucose transporter, GLUT)

目前發現至少已有 12 種葡萄糖轉運蛋白 (glucose transporters, GLUTs) 在不同的細胞中負責葡萄糖攝入的工作 (Joost *et al.*, 2002)。其中 GLUT-2 主要存在於肝臟、胰臟 β 細胞、小腸黏膜細胞與腎小管上皮細胞中 (Thorens *et al.*, 1990)，與其他轉運蛋白不同的是 GLUT-2 為葡萄糖敏感性轉運蛋白，不在肝臟細胞直接受到胰島素調控，但在胰臟 β 細胞中的 GLUT-2 則直接受血糖調節負責細胞葡萄糖攝入及輸出 (James, 1995)。

圖 5-5 分別為不同品種甘薯葉乙醇萃取物對以 TNF- α 處理之小鼠肝臟細胞 FL83B 葡萄糖轉運蛋白表現之影響。研究指出，在齧齒動物胰臟的 β 細胞中，

因葡萄糖刺激所產生的胰島素分泌過程中，GLUT-2 所扮演的是一種葡萄糖調控者的角色。本實驗結果顯示，FL83B 細胞經 20 ng/ml TNF- α 誘導後其 GLUT-2 之表現量與正控制組比較之下量並無顯著差異，其明確機轉有待探討。





表 5-1、不同品種甘薯葉乙醇萃取對 FL83B 細胞之細胞存活率

Table 5-1 · Effects of 70 % ethanol extracts from leaves of different sweet potato cultivars on the cell viability of FL83B cells

Cell viability (%)										
	Lyophilization (µg/ ml)					40 °C dried (µg/ ml)				
	100	200	400	800	1000	100	200	400	800	1000
CN 1927-16	108.94	103.35	102.42	103.75	96.28	98.71	103.41	105.46	108.00	104.09
TN 64	101.13	98.82	102.31	93.67	95.01	97.75	99.68	99.86	100.84	106.79
CYY 98-59	94.19	105.93	103.54	96.15	101.13	102.13	107.95	105.02	104.92	101.59

^A Values are percentage relative to control value (100 %).

Each value is means ± SD (n=4).

Cell viability (%) = (Sample group- Blank group)/ (Control group- Blank group) × 100

%



表 5-2、不同品種甘薯葉乙醇萃取物 (1 mg/ml) 對具胰島素阻抗性 FL83B 細胞葡萄糖攝入之改善情形

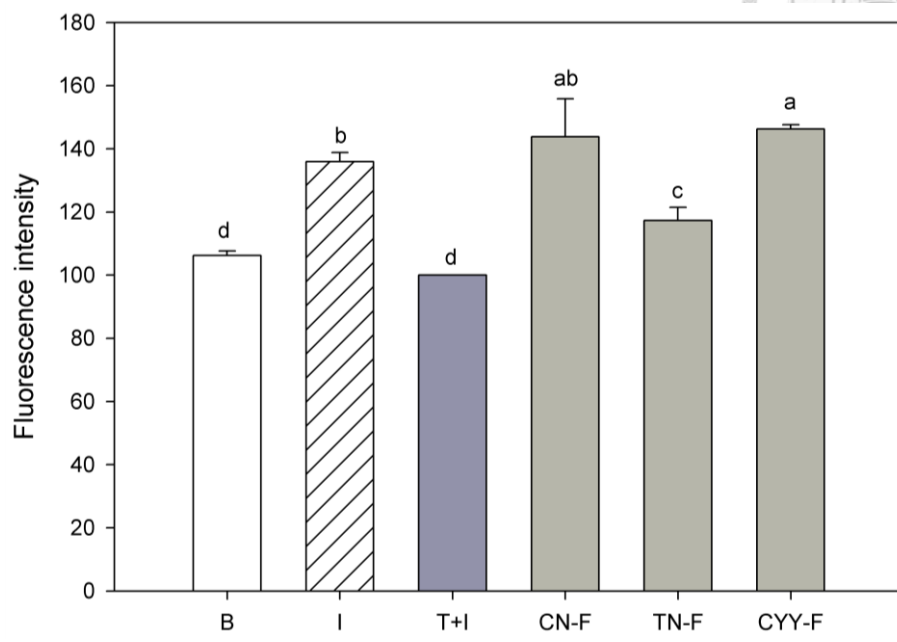
Table 5-2. Amelioration of 70 % ethanol extracts from leaves of different sweet potato cultivars (1 mg/ml) on glucose uptake in insulin resistance mouse liver FL83B cells

Rate of Amelioration (%)	Lyophilized (%)	40 °C dried (%)
CN 1927-16	43.84 ± 12.02 ^{AB}	10.66 ± 0.70 ^a
TN 64	17.26 ± 4.24 ^C	57.72 ± 2.14 ^b
CYY 98-59	46.25 ± 1.41 ^A	7.35 ± 14.14 ^a

Each value is expressed as mean ± SD (n = 3).

Mean with different letters significantly different ($p < 0.05$).

Rate of Amelioration (%) = [(Fluorescence intensity of sample - Fluorescence intensity of T+I)/ Fluorescence intensity of T+I] × 100 %



Insulin (1000 nM)	-	+	+	+	+	+
TNF- α (20 ng/ml)	-	-	+	+	+	+

圖 5-1、不同品種冷凍乾燥處理甘薯葉之乙醇萃取出物 (1 mg/ml) 對具胰島素阻抗 FL83B 細胞葡萄糖攝入之影響。

Figure 5-1. Effect of 70 % ethanol extracts from leaves of different sweet potato cultivars (1mg/ml) on glucose uptake in insulin resistant mouse liver FL83B cells.

Each value is expressed as mean \pm SD (n = 3).

Mean with different letters significantly different (p < 0.05).

B: cells incubated with F-12K medium.

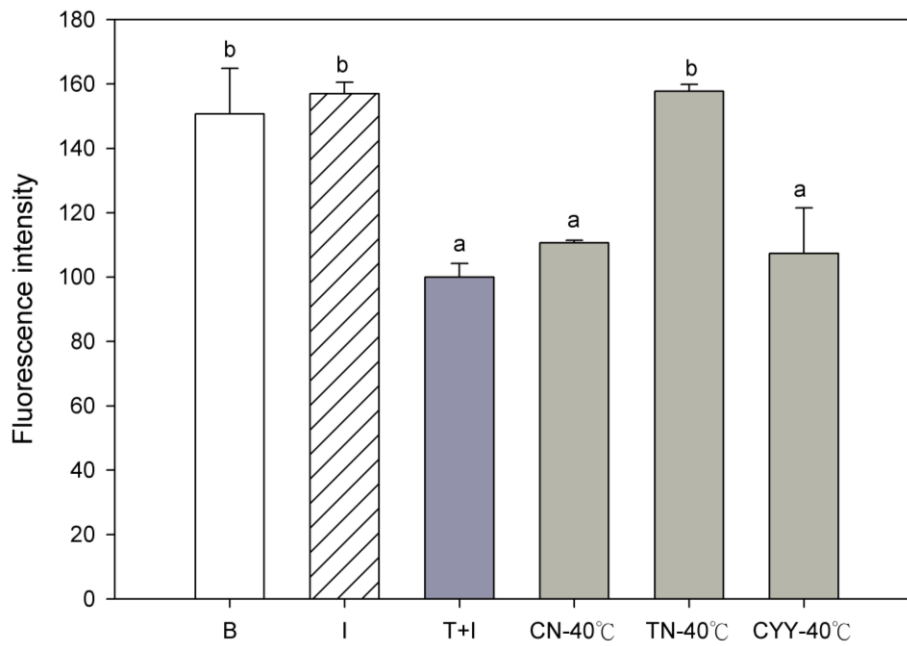
I: cells incubated with F-12K medium containing 1000 nM insulin.

T+I: TNF- α induced for insulin resistance.

CN-F: lyophilized of 70 % ethanol extract CN 1927-16, dissolved in PBS buffer.

TN-F: lyophilized of 70 % ethanol extract TN 64, dissolved in PBS buffer.

CYY-F: lyophilized of 70 % ethanol extract CYY 98-59, dissolved in PBS buffer.



Insulin (1000 nM)	-	+	+	+	+	+
TNF- α (20 ng/ml)	-	-	+	+	+	+

圖 5-2、不同品種 40 °C 乾燥處理甘薯葉之乙醇萃取物 (1 mg/ml) 對具胰島素阻抗 FL83B 細胞葡萄糖攝入之影響。

Figure 5-2. Effect of 70 % ethanol extracts from leaves of different sweet potato cultivars (1mg/ml) on glucose uptake in insulin resistant mouse liver FL83B cells.

Each value is expressed as mean \pm SD (n = 3).

Mean with different letters significantly different (p < 0.05).

B: cells incubated with F-12K medium.

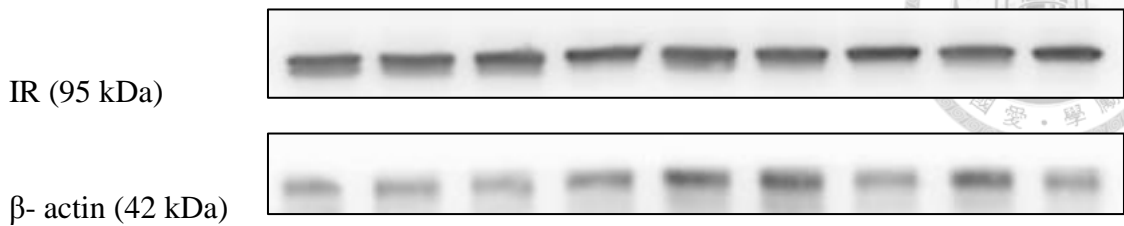
I: cells incubated with F-12K medium containing 1000 nM insulin.

T+I: TNF- α induced for insulin resistance.

CN-40 °C: 40 °C air-dried of ethanol extract CN 1927-16, dissolved in PBS buffer.

TN-40 °C: 40 °C air-dried of ethanol extract TN 64, dissolved in PBS buffer.

CYY-40 °C: 40 °C air-dried of ethanol extract CYY 98-59, dissolved in PBS buffer.



Insulin (1000 nM)	-	+	+	+	+	+	+	+	+
TNF- α (20 ng/ml)	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Sample (1 mg/ml)	-	-	-	+	+	+	+	+	+

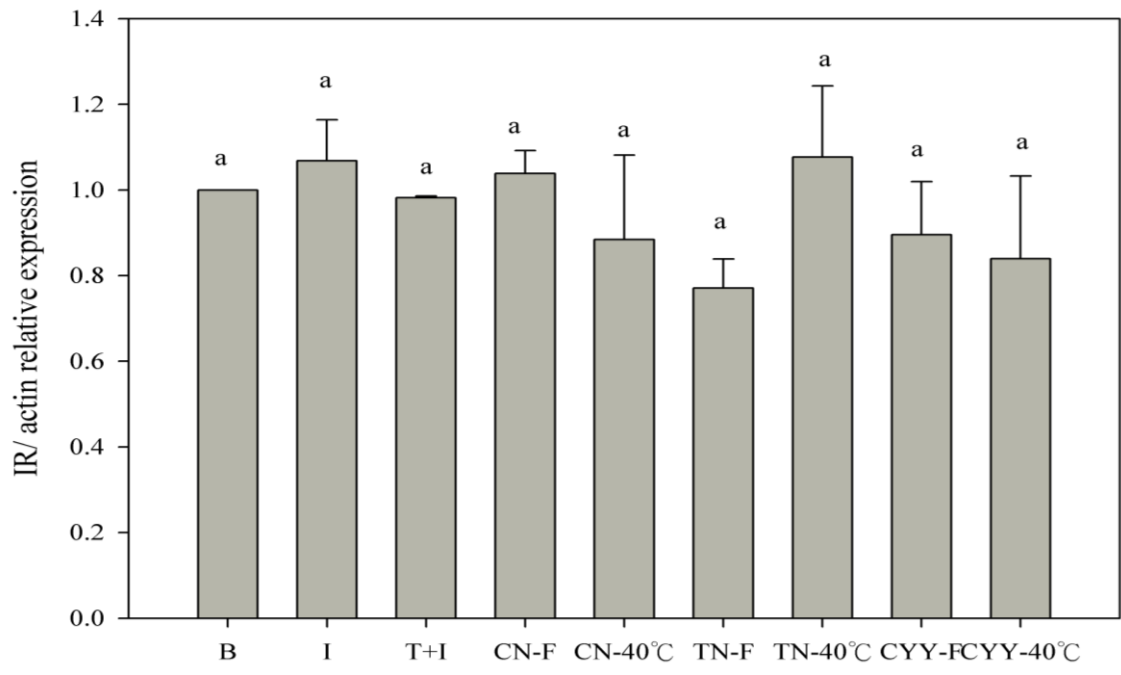
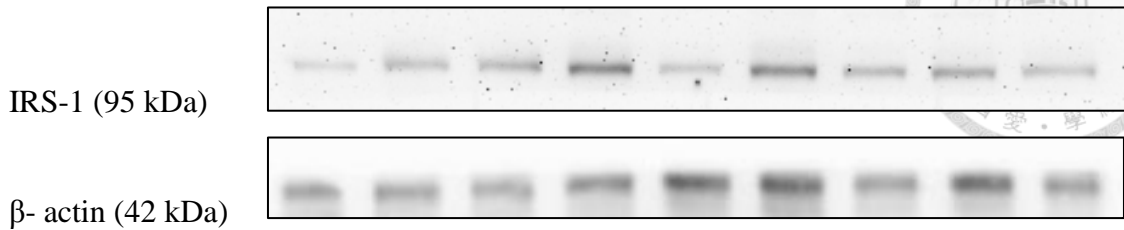


圖 5-3、不同品種甘薯葉之乙醇萃取物 (1 mg/ml) 對具胰島素阻抗 FL83B 細胞胰島素受器表現之影響。

Figure 5-3. Effect of 70 % ethanol extracts from leaves of different sweet potato cultivars (1mg/ml) on protein expression of insulin receptor (IR) in TNF- α induced insulin resistant FL83B cells.

Mean with different letters significantly different ($p < 0.05$).



Insulin (1000 nM)	-	+	+	+	+	+	+	+	+
TNF- α (20 ng/ml)	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Sample (1 mg/ml)	-	-	-	+	+	+	+	+	+

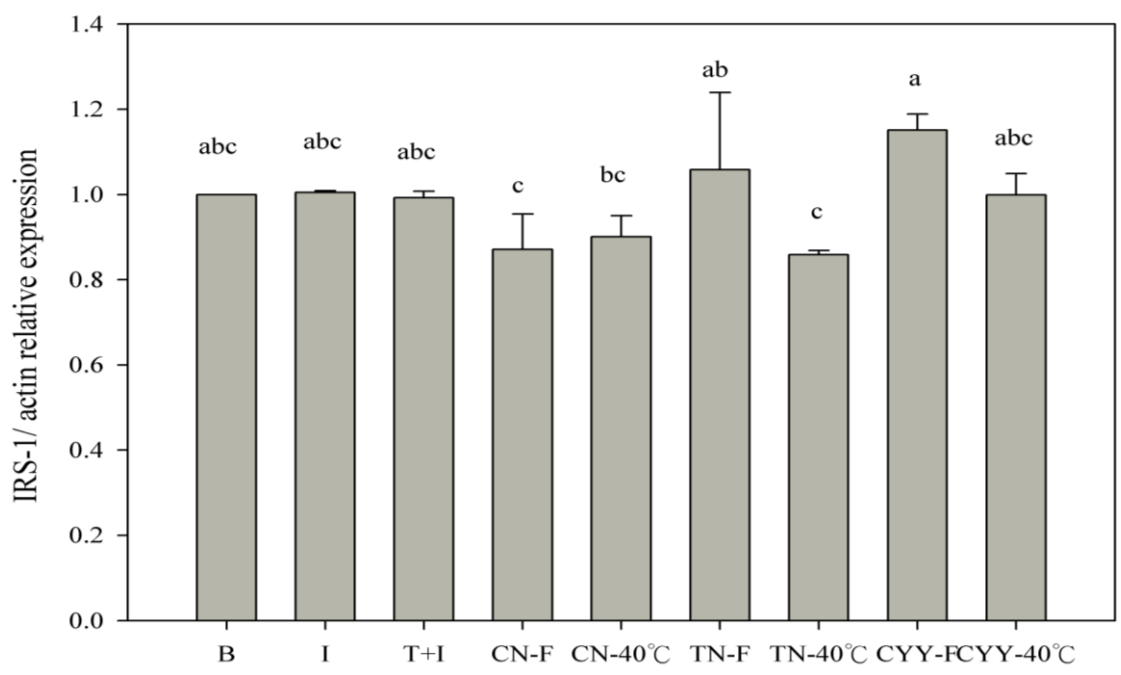


圖 5-4、不同品種甘薯葉之乙醇萃取物 (1 mg/ml) 對具胰島素阻抗 FL83B 細胞胰島素受器受質蛋白質表現量之影響。

Figure 5-4. Effect of 70 % ethanol extracts from leaves of different sweet potato cultivars (1mg/ml) on protein expression of IRS-1 in TNF- α induced insulin resistant FL83B cells.

Mean with different letters significantly different ($p < 0.05$).

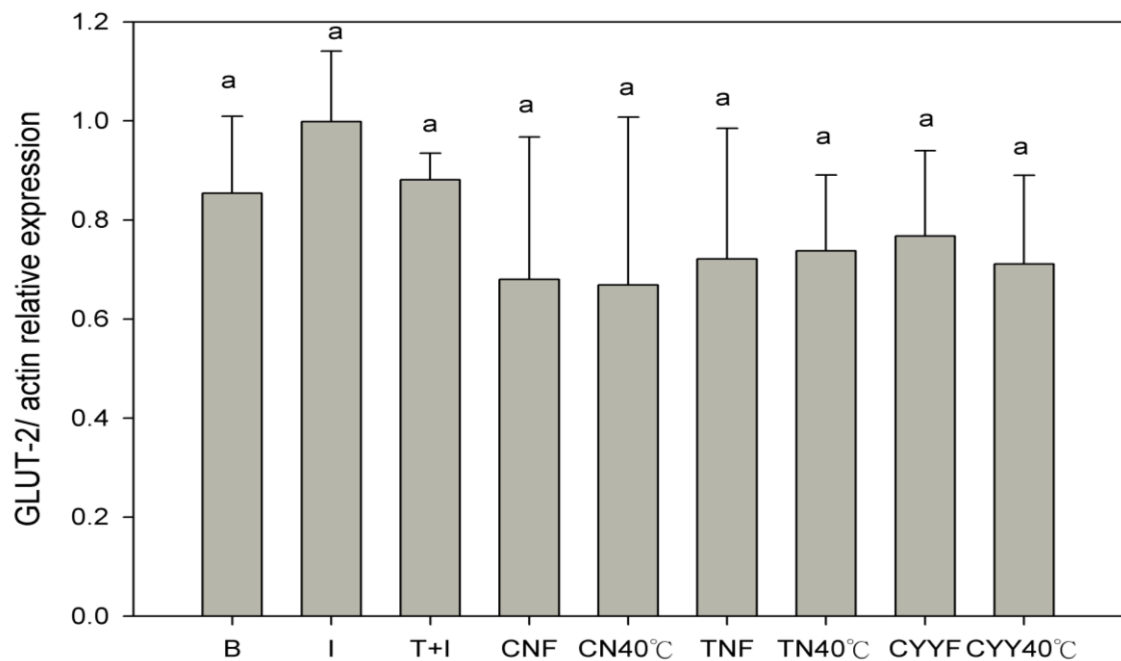


圖 5-5、不同品種甘薯葉之乙醇萃取物 (1 mg/ml) 對具胰島素阻抗 FL83B 細胞葡萄糖轉運蛋白質表現量之影響。

Figure 5-5. Effect of 70 % ethanol extracts from leaves of different sweet potato cultivars (1mg/ml) on protein expression of glucose transporter-2 (GLUT-2) in TNF- α induced insulin resistant FL83B cells.

Mean with different letters significantly different ($p < 0.05$).



五、結論

本試驗首先測定不同品種甘薯葉乙醇萃取物對小鼠肝臟 FL83B 細胞之細胞毒性，再利用 TNF- α 誘導小鼠肝臟 FL83B 細胞株產生胰島素阻抗，並添加萃取物共同培養以評估其對 FL83B 細胞葡萄糖攝入能力之影響。歸納結論如下：

三種品種甘薯葉乙醇萃取物，無論於濃度在 1000 $\mu\text{g/ml}$ 以內時對細胞不具毒性。有上述結果，將使用 1000 $\mu\text{g/ml}$ 萃取物濃度進行胰島素阻抗細胞的葡萄糖攝入試驗。

胰島素阻抗小鼠肝臟細胞之葡萄糖攝入結果顯示，TN 64 的 40 $^{\circ}\text{C}$ 風乾處理組及 CN 1927-16 和 CYY 98-59 的凍乾處理組與控制組 (TNF- α 處理) 比較，可明顯提升胰島素阻抗小鼠肝臟 FL83B 細胞葡萄糖攝入能力，改善胰島素敏感性。而在西方轉印分析的試驗結果發現，三種品種甘薯葉乙醇萃取物對具胰島素阻抗 FL83B 細胞胰島素受器、胰島素受器受質及葡萄糖轉運蛋白質表現量並無顯著上的影響。因此，減輕胰島素阻抗促進葡萄糖攝入、對醣類代謝及改善發炎反應的的詳細機轉，有待進一步試驗作探討。

第六章、總結

由本研究之實驗結果得知，在抗氧化部份，不同品種甘薯葉乙醇萃取物的凍乾處理組具有較佳的清除自由基能力，且濃度越高，其效果越好。然而，在螯合亞鐵離子能力部份則以 CN 1927-16 之 40 °C 風乾處理組具有較好的結果。

在細胞試驗的結果發現，不同品種甘薯葉乙醇萃取物對胰島素阻抗之 FL83B 細胞有明顯改善葡萄糖攝入之作用，其中以 CN 1927-16 乙醇萃取物在凍乾處理於 1 mg/ml 下具有最佳之改善效果。

而葡萄糖攝入試驗部份，從結果看到無論是 40 °C 處理還是凍乾處理，皆具有改善胰島素阻抗之葡萄糖攝入之情形，且以 TN 64 的 40 °C 風乾處理組及 CN 1927-16 和 CYY 98-59 的凍乾處理組改善能力最好。之後，利用西方轉印分析其改善阻抗之作用機制。但結果發現，FL83B 細胞經 20 ng/ml TNF- α 誘導後其 IR、IRS-1 及 GLUT-2 之表現量與正控制組比較之下量並無顯著差異，其明確機轉有待探討，以作為日後改善胰島素阻抗之第二型糖尿病參考基礎。

預期 40 °C 乾燥對樣品會有明顯的影響，但可從結果發現，差異還是依不同品種甘薯葉而定；對品種 CN 1927-16 和 CYY 98-59，40 °C 乾燥對其影響並不顯著，這表示在加工上 40 °C 乾燥可做為一個相較於冷凍乾燥較經濟和不錯的方法。

第七章、參考文獻



- 王方生、陳淑英、陳海鑫、王寒、於同泉、周端敏。Simon 1 號對免疫功能影響的研究。1988。中國甘薯 2：69-72。
- 行政院農業委員會網站 (甘薯館)。
- <http://kmweb.coa.gov.tw/subject/mp.asp?mp=190>
- 行政院衛生署網站。http://www.doh.gov.tw/CHT2006/index_populace.aspx
- 李良。台灣區雜糧發展基金會成立廿週年紀念專輯之一：雜糧作物各論 III。根及莖類。1994。p.1329-1477。
- 亞洲蔬菜研究發展中心。(AVRDC) The World Vegetable Center on <http://avrdc.org/>
- 高彥祥、李媛媛。天然色素抗氧化性研究進展。2005。食品科學 26: 56-60。
- 張文昌。食用桃金娘科植物萃取物減輕小鼠肝臟細胞 (FL83B) 胰島素阻抗之探討。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。2010。
- 張巧俐。粉紅種蓮霧幼果水萃物減輕以腫瘤壞死因子 (TNF- α) 處理之小鼠肝臟細胞 (FL83B) 胰島素阻抗及改善醣類代謝之研究。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。2011。
- 華希新、鄔景禹、王勝武、李蕾。藥用甘薯“西蒙一號”的生物學特性及栽培技術研究。1988。中國甘薯 2：51-56。
- 黃為瑜。紅色鄉土蔬菜中類黃酮抗氧化力及其對淋巴球 DNA 氧化損傷的保護作用。中國文化大學生活應用科學研究所碩士論文。2002。
- 黃雅萍。紫色蕃薯葉及其成份對於 TNF- α 所誘導人類動脈內皮細胞發炎之影響。中國文化大學生活應用科學研究所碩士論文。2005。
- 楊正憲。桑椹、紅皮甘薯花色苷之研究與花色苷之氧化和抗氧化之探討。東海大學食品科學研究所碩士論文。1994。
- 詹穗興。甘薯不同品種及期作黃酮醇、花青素與類胡蘿蔔素含量之變異。中興大學農藝學系所碩士論文。2010。
- 鄭芳琪。番石榴葉水萃物降血糖作用及有效成份分離。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。2009。
- 鄭統隆、施怡如、曾東海、賴永昌、吳明哲。甘薯花青素與多酚含量之研究。台灣農業研究。2008。57:33-48。
- 謝一芝、尹晴紅、邱瑞鏞。高花青素甘薯的研究及利用。雜糧作物 2004。24:23-25。

鍾愛嵐。青草植物抗氧化力及抗氧化功能性之研究。中國文化大學生活應用科學
研究所碩士論文。2006。

Albert, N. W.; Lewis D. H.; Zhang H.; Irving L. J.; Jameson P. E.; Davies K. M.
Light-induced vegetative anthocyanin pigmentation in *Petunia*. *J. Exp. Bot.* **2009**,
60: 2191-2202.

Ames, B. M.; Shigena M. K.; and Hagen T. M. Oxidants, antioxidant, and the
degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**. *90*:7915-7922.

Cameron E; Pauling L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer:
Prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
USA **1976**, *73*: 3685-9.

Carr AC; McCall MR; Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive
nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler.*
Thromb. Vasc. Biol. **2000**, *20*: 1716-23.

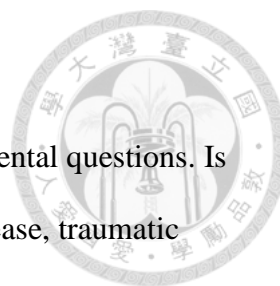
Childs, R. E. ; Bardsley, W. G. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,
2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochem. J.*
1975, *145*: 93-103.

Choi, S.W.; Chang, E.J.; Ha, T.Y.; Choi, K.H. Antioxidative activity of acylated
anthocyanin isolated from fruit and vegetables. *J. Food Sci. Nut.* **1997**, *2*: 191-196.

Dinis; T.C.P.; Madeira; V.M.C.; Almeida, L.M. Action of phenolic derivatives
(acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid
peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**,
315:161-169.

Francis, F. J. Food colorants: anthocyanins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **1989**, *28*:
273-314.

Goda, Y.; T. Shimizu, Y. Kato, M. Nakamura; T. Maitani; T. Yamada; N. Terahara; M.
Yamaguchi. Two acylated anthocyanins from purple sweet potato. *Phytochemistry*



1997, 44, 183-186.

Halliwell, B. Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. Is oxidant damage relevant to Parkinson's disease, Alzheimer's disease, traumatic injury or stroke? *Acta Neurologica Scandinavica* **2009**, 80: 23-33.

Hotamisligil G; Peraldi P; Budavari A; Ellis R; White M; Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF and obesity-induced insulin resistance. *Science*. **1996**, 271: 665-668.

Huang, D. J.; Lin C. D.; Chen H. J.; Lin Y. H. Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam 'Tainung 57'] constituents. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **2004**, 45:179-186.

Huang, Y. C.; Chang Y. H.; Shao Y. Y. Effects of genotype and treatment on the antioxidant activity of sweet potato in Taiwan. *Food Chem.* **2006**, 98:529-538.

Islam, S.; Yoshimoto, M.; Yahara, S.; Okuno, S.; Ishiguro, K.; Yamakawa, O. Identification and characterization of foliar polyphenolic composition in sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50: 3718-3722.

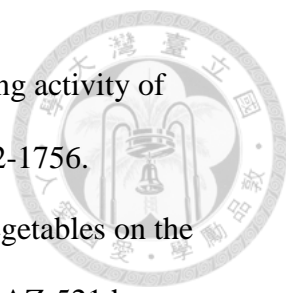
Kano, M.; Takayanagi T.; Harada K.; Makino K.; Ishikawa F. Antioxidative activity of anthocyanins from purple sweet potato, *Ipomoea batatas* cultivar ayamurasaki. *Biosci. Biotech. Biochem.* **2005**, 69, 979-988.

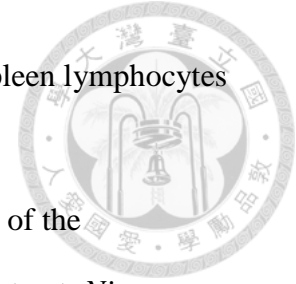
Kaur, C.; Kapoor, H. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International J. Food Sci. Technol.* **2002**, 37: 153-161.

Lu, G. Q.; Li X. L. Stability of red pigments from purple sweet potato [*Ipomea batata* (L), Lam] and other five natural red pigment. *J. Zhejiang Univ.* **2001**, 27, 635-638.

Malkeet S. Padda; David H. Picha. Quantification of phenolic acids and antioxidant activity in sweetpotato genotypes. *Scientia Horticulturae.* **2008**, 119: 17-20.

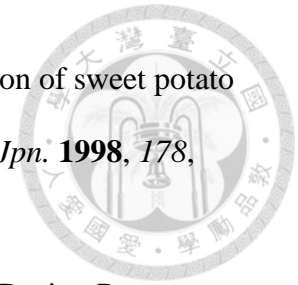
Oki, T.; Masuda M.; Furuta S.; Nishiba Y.; Terahara N.; Suda I. Involvement of

- 
- anthocyanins and other phenolic compounds in radical-scavenging activity of purple-fleshed sweet potato cultivars. *J. Food Sci.* **2002**, *67*:1752-1756.
- Park, K.Y.; Lee, K.I.; Rhee, S.H. Inhibitory effect of green-yellow vegetables on the mutagenicity in a Salmonella assay system and on the growth of AZ-521 human gastric cancer cells. *J. Korean Soc. Food Nut.* **1992**, *21*:149-153.
- Peraldi P; Hotamisligil GS; Buurman WA; White MF; Spiegelman BM. Tumor necrosis factor (TNF- α) inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*:13018–13022.
- Pessin JE; Saltiel AR: Signaling pathways in insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **2000**, *106*:165-170.
- Rumbaoa R G O; Cornago D F; Geronimo I M. Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine sweet potato (*Ipomoea batatas*) cultivars. *Food Chemistry*. **2009**, *113*, 1133-1138.
- Saigusa, N.; Terahara N.; Ohba R. Evaluation of DPPH-Radical-Scavenging activity and antimutagenicity and analysis of anthocyanins in an alcoholic fermented beverage produced from cooked or raw purple-fleshed sweet potato (*Ipomoea Batatas* cv. *Ayamurasaki*) roots. *Food Sci. Technol. Res.* **2005**, *11*(4):390-394.
- Salleh, M. N.; Runnie, I.; Roach, P. D.; Mohamed, S.; Abeywardena, M. Y. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and up-regulation of low-density lipoprotein receptor in HepG2 cells by tropical plant extracts. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*: 3693-3697.
- Sang S.; Lapsley, K.; Jeong, W.S; Lachance, P. A.; Ho, C-T; Rosen, R. T. Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*Prunus amygdalus*Batsch). *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*: 2459-2463.
- Shih, M.C.; Kuo, C.K.; Chiang, W. Effects of drying and extrusion on colour, chemical



- composition, antioxidant activities and mitogenic response of spleen lymphocytes of sweet potatoes. *Food Chem.* **2009**, *117*:114-121.
- Shimozono, H.; Kobori, M.; Shinmoto, H.; Tsushida, T. Suppression of the melanogenesis of mouse melanoma B16 cells by sweet potato extract. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi.* **1996**, *43*: 313-317.
- Shulman. GI: Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **2000**, *106*: 171-176.
- Stadtman ER. Role of oxidant species in aging. *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*: 1105-12.
- Suda, I; Yamakawa, O.; Matusgano, K.; Sugita, K.; Takeguma, Y.; Irida, K.; Tokumaru, F. Changes of serum γ -GTP, GOT and GPT levels in hepatic function- weakling subjects by ingestion of high anthocyanin sweet potato juice. *日食工誌* **1999**, *45*:611-617.
- Teow, C. C.; Truong V. D.; McFeeters R. F.; Thompson, R. L.; Pecota K. V.; Yencho G. C. Antioxidant activities, phenolic and b-carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chem.* **2007**, *103*:829-838.
- Tsuda, T.; Shiga K.; Ohshima K.; Kawadishi S.; Osawa T. Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris* L. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *52*:1033-1039.
- Valko M; Izakovic M; Mazur M; Rhodes CJ; Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell Biochem.* **2004**, *266*: 37-56.
- Wang, G. L.; Yue J.; Su D. X.; Fang H. J. Study on the antioxidant activity of sweet potato anthocyanin and its inhibiting effect on growth of cancer. *Acta Nutri. Sin.* **2006**, *28*, 71-74.
- Xie, Y. Z.; Yin Q. H.; Qiu R. L. Study and utilization of sweet potato with high anthocyanins. *Rain. Fed. Crops* **2004**, *24*, 23-25.

Yamakawa, O.; Sudam, I.; Yoshimoto, M. Development and utilization of sweet potato cultivars with high anthocyanin content. *Foods Food Incred. J. Jpn.* **1998**, *178*, 69–77.



Yang, Jing; Chen Jin-feng; Zhao Yu-ying; Mao Lin-chun. Effects of Drying Processes on the Antioxidant Properties in Sweet Potatoes. *Agricultural Sciences in China* **2010**, *9*, 1522-1529.

Yin Q. H.; Liu Y. Z.; Xie Y. Z.; Chen M. The stability of anthocyanin from purple sweet potato. *Jiangsu J. Agric. Sci.* **2004**, *20*, 111-115.

Yoshimoto, M.; Okuno S.; Yoshinaga M. Antimutagenicity of sweet potato (*Ipomea batata*) roots. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, *63*:537-541.

Yoshinaga, M.; Tanaka M.; Nakatani M. Changes in anthocyanins content and composition of developing storage root of purple-fleshed sweet potato. *Breed. Sci.* **2000**, *50*:59-64.

Yue J.; Fang H. J.; Huang H. G. Research advance of purple sweet potato color. *Liaoning Agric. Sci.* **2003**, *5*: 22-25.

Zhan, P.X. Atioxidative activity of extracts from potato and sweet potato. *Food Ferment. Ind.* **1996**, *2*:30-33.

Zin, Z. M.; Abdul-Hamid, A.; Osman, A. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. *Food Chem.* **2002**, *78*: 227-231.