

國立臺灣大學生命科學院生化科技學系

碩士論文

Department of Biochemical Science and Technology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

探討紅麴二次代謝物 monascin 和 lovastatin 對過度糖化
終產物誘導的第二型糖尿病小鼠之影響

The effects of monascin and lovastatin on type 2 diabetes
in advanced glycation end-product (AGEs) induced mice

呂思詩

Si-Shi Lu

指導教授：潘子明 博士 (Tzu-Ming Pan, Ph.D.)

中華民國 102 年 7 月

July 2013



國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文

口試委員會審定書

中文題目：探討紅麴二次代謝物 monascin 和 lovastatin 對過度糖化終產物誘導的第二型糖尿病小鼠之影響

英文題目：The effects of monascin and lovastatin on type 2 diabetes in advanced glycation end-products (AGEs) induced mice

本論文係呂思詩君 (學號 R00B22054) 在國立臺灣大學生化科技學系完成之碩 (博) 士學位論文，於民國 102 年 7 月 30 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

潘子明

(簽名)

(指導教授)

蘇遠志

方良
黃慶瀛

郭友廷

系主任、所長

黃慶燦

(簽名)



誌謝

讀萬卷書，行萬里路。讀書和行路都是同樣可以發揮豐富自己內心的作用，只有自己的內心豐富了，才能去感受這個世界的美好。我之所以來臺灣讀書也是出於這兩個目的，趁年輕的時候應該多出去走走看看，多看看不同地方的年輕人的生活，接受不同思想的碰撞，這樣生命才不會像一口枯井了無生趣。

兩年在台灣的研究生生涯一轉眼就要結束，首先衷心感謝我的指導教授潘子明老師，願意接受我進入他的實驗室。感謝老師對我的包容和教誨，讓獨在異鄉的我倍感溫馨。老師對於研究科學謹慎的態度和重視產學研結合的觀點讓我受益匪淺。謝謝老師兩年來的鼓勵和栽培，在未來的日子定當以老師為榜樣繼續學習和加油。感謝中興大學獸醫病理生物研究所廖俊旺所長和吳昭慧學姐在切片染色方面給予我的指導和幫助。感謝給予指導的口試委員，國立台灣大學生化科技學系蘇遠志教授，中州科技大學曾慶瀛校長、國立中興大學方繼教授以及國立台灣大學食品科技研究所謝淑貞教授，感謝各位老師百忙中撥冗參加口試，給予建議與指正，使得論文內容更加完善，在此表示衷心的感谢。

感謝實驗室的大家這兩年來的包涵和幫助。感謝保宏學長和小花學姐的細心指導與幫助，將我這個科研的門外漢領進門。感謝瑋婷學姐在實驗期間和口試時的幫忙還有在我情緒低落的時候的心靈輔導。感謝志恒學弟過年期間不辭辛苦幫我照顧老鼠。感謝彥德、承翰、光耀學弟和郁瑩學妹在動物犧牲時給予我的幫助。感謝同儕志宣、郭睿和奕均平常互相加油打氣，給予我精神上的莫大鼓舞。感謝建利學長和力川學長在 meeting 時給予的指點，讓我在科研上迅速成長。

最後感謝我親愛的爸爸媽媽，如果沒有你們的大力支持我也沒有機會來台灣念書，體驗不一樣的人生。感謝媽媽賜予我的正能量，時時開解苦悶的我，讓我能夠堅持下去。

謝謝大家對我的支持和幫助，希望在未來可以成為理想中的自己，勇敢的去面對以後人生路上的挫折并追逐夢想，體現自身的價值。

目錄



縮寫表.....	VII
摘要.....	IX
Abstract.....	X
目錄.....	II
圖目錄.....	IV
表目錄.....	VI
第一章 前言.....	1
第二章 文獻回顧.....	3
一、糖尿病.....	3
二、過度糖化最終產物.....	4
三、胰島素訊息傳遞路徑.....	11
四、胰島素阻抗.....	15
五、核因子-紅血球之 2 相關因子-2 (nuclear factor-erythroid 2 related factor-2; Nrf2) 與糖尿病之關係.....	16
六、抗氧化防禦系統.....	17
七、紅麴.....	21
(一) 紅麴之菌種特性.....	21
(二) 紅麴生產之二級代謝產物.....	22
(三) 紅麴對糖尿病之應用.....	26
(四) 紅麴改善胰島素阻抗之可能機制.....	28
八、研究大綱與目的.....	28
第三章 材料與方法.....	31
一、實驗材料.....	31
(一) 藥品試劑.....	31
(二) 儀器設備.....	31
(三) 其他.....	32
(四) 溶液製備.....	32
二、實驗方法.....	32
(一) 過度糖化最終產物製備.....	33
(二) 動物實驗.....	33
(三) 生物統計分析方法.....	40
第四章 結果與討論.....	42
第一節 Monascin 及 lovastatin 對 AGE 在肝臟中累積之影響.....	42
第二節 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導之小鼠胰島素抗性之影響.....	42
(一) 禁食血糖.....	42
(二) 口服葡萄糖耐量實驗 (oral glucose tolerance test, OGTT) 及胰島素耐受實驗	

(insulin tolerance test, ITT).....	45
(三) 血清胰島素	48
(四) HOMA-IR 指數	50
第三節 Monascin 及 lovastatin 對胰島素蛋白質表現之影響.....	53
(一) 胰島素蛋白質之表現	53
(二) PDX-1 (pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1) mRNA 表現	53
(三) CCAAT enhancer binding protein β (C/EBP β) 之表現	56
(四) 第二型葡萄糖轉運蛋白 (glucose transporter 2; GLUT2) mRNA 之表現.....	60
第四節 Monascin 及 lovastatin 對 AGE 誘導糖尿病小鼠脂質累積影響.....	62
(一) 血脂質.....	62
(二) 肝臟脂質.....	64
第五節 Monascin 及 lovastatin 對 AGE 誘導糖尿病小鼠促發炎細胞激素之影響.....	65
(一) 胰臟促發炎細胞激素.....	65
(二) 肝臟促發炎細胞激素.....	68
(三) 腎臟促發炎細胞激素.....	72
第六節 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 造成氧化壓力之影響.....	74
(一) 肝臟 p47phox (NADPH oxidase subunit) 之表現	74
(二) 抗氧化酵素之表現	78
(三) 肝臟及腎臟病理分析	82
(四) 小結	90
第五章 綜合討論.....	93
第六章 參考文獻.....	98

圖目錄

圖 2-1 AGEs 的形成過程.....	6
圖 2-2 食物中 AGEs 的代謝過程.....	7
圖 2-3 代表性 AGEs 之化合物結構.....	8
圖 2-4 過度糖化最終產物誘導發炎之機制圖.....	10
圖 2-5 胰島素訊息傳遞路徑.....	12
圖 2-6 核因子- κ B 紅血球之活化之機制圖.....	18
圖 2-7 細胞內之抗氧化防禦系統.....	19
圖 2-8 紅麴發酵產物 monascin 和 lovastatin 之結構.....	24
圖 2-9 本論文之研究架構.....	30
圖 4-1 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠肝臟 AGE 累積之影響.....	43
圖 4-2 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠肝臟 AGE 累積之影響.....	44
圖 4-3 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠禁食血糖之影響.....	46
圖 4-4 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠 OGTT 之影響.....	47
圖 4-5 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠 ITT 之影響.....	49
圖 4-6 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠血清胰島素影響.....	51
圖 4-7 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠 HOMA-IR index 之影響.....	52
圖 4-8 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠胰島素蛋白質表現之影響.....	54
圖 4-9 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠胰島素蛋白質表現之影響.....	55
圖 4-10 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠 PDX-1 mRNA 表現量影響.....	57
圖 4-11 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠肝臟 C/EBP β 表現影響.....	58
圖 4-12 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠肝臟 C/EBP β 陽性染色面積比率影響.....	59
圖 4-13 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠 GLUT2 mRNA 表現量影響.....	61
圖 4-14 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠血清三酸甘油酯及總膽固醇之影響.....	63

圖 4-15 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠肝臟三酸甘油酯及總膽固醇濃度影響.....	64
圖 4-16 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠胰臟促發炎細胞激素影響.....	66
圖 4-17 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠肝臟促發炎細胞激素影響.....	69
圖 4-18 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠腎臟促發炎細胞激素影響.....	71
圖 4-19 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠肝臟 p47phox 表現的影響.....	73
圖 4-20 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠肝臟 p47phox 蛋白質表現影響.....	75
圖 4-21 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠胰臟抗氧化酵素活性影響.....	76
圖 4-22 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠肝臟抗氧化酵素活性影響.....	80
圖 4-23 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠腎臟抗氧化酵素活性影響.....	83
圖 4-24 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠肝臟組織影響.....	85
圖 4-25 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠腎臟組織影響.....	86
圖 4-26 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠肝腎受損指標之影響.....	88
圖 5-1 Monascin 和 lovastatin 改善胰臟功能之可能機制圖.....	94
圖 5-2 結論圖.....	95

表目錄

表 2-1: 葡萄糖相關轉運蛋白.....	14
表 3-1: 即時定量聚合酶鏈反應 (real-time PCR) 所使用之 primers.....	41
表 4-1: AGE 誘導糖尿病小鼠之肝腎受損生化指標.....	87
表 4-2: monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導糖尿病小鼠促發炎細胞因子影響之小 結.....	91
表 4-3: monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導糖尿病小鼠抗氧化酵素活性影響之小 結.....	92

縮寫表



英文縮寫	英文全名	中文全名
ADA	American diabetes association	美國糖尿病協會
ALT	alanine aminotransferase	丙胺酸轉胺酶
AGEs	advanced glycation end-products	過度糖化最終產物
ARE	antioxidant response element	抗氧化劑反應區
AST	aspartate aminotransferase	天門冬胺酸轉胺酶
BUN	blood urea nitrogen	尿素氮
BSA	bovine serum albumin	牛血清蛋白
CAT	catalase	觸酶
C/EBP β	CCAAT/enhancer-binding protein β	CCAAT 增強子結合蛋白質 β
DMSO	dimethyl sulfoxide	二甲基亞砜
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酵素免疫分析
GABA	γ -aminobutyric acid	γ -胺基丁酸
GLUT	glucose transporter	葡萄糖轉運蛋白
GSH	glutathione	麩胱甘肽
GSIS	glucose-stimulated insulin secretion	葡萄糖刺激胰島素分泌
GPx	glutathione peroxidase	麩胱甘肽過氧化物酶
H&E	hematoxylin-eosine	蘇木紫-伊紅
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide	過氧化氫
HOMA	homeostatic model assessment	胰島素抵抗指數
i.p.	interaperitoneal	腹腔
IDDM	insulin-dependent diabetes mellitus	胰島素依賴型糖尿病
IFG	impaired fasting glucose	空腹血糖異常
IGF-1	insulin-like growth factor 1	壹型胰島素樣生長因子
IGT	impaired glucose tolerance	葡萄糖耐受異常
IHC stain	immunohistochemistry stain	免疫組織化學染色
IL-1 β	interleukin-1 β	介白素-1 β
IL-6	interleukin-6	介白素-6
IR	insulin receptor	胰島素受器
IRS	insulin receptor substrate	胰島素受器基質
ITT	insulin tolerance test	胰島素耐受性試驗
LDL-C	low density lipoprotein cholesterol	低密度脂蛋白膽固醇
MG	methylglyoxal	甲基乙二醛
NAC	N-acetylcysteines	乙醯半胱胺酸
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	菸鹼醯胺腺嘌呤二核苷酸磷酸

NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease	非酒精性脂肪肝
NF- κ B	nuclear factor- κ B	核轉錄因子- κ B
NIDDM	non-insulin-dependent diabetes mellitus	非胰島素依賴型糖尿病
Nrf2	nuclear factor-erythroid 2 related factor-2	核因子-紅血球之2 相關因子-2
OGTT	oral glucose tolerance test	口服葡萄糖耐受試驗
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸緩衝溶液
PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase	磷酸肌醇-3 激酶
PKB/Akt	protein kinase B/serine protein kinase	蛋白激酶 B/絲胺酸蛋白激酶
PKC	protein kinase C	蛋白激酶 C
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor	過氧化物小體增植物啟動受體
RAGE	receptors for AGEs	過度糖化最終產物受器
ROS	reactive oxygen species	活性氧
SEM	standard error of the mean	標準誤差
SHR	spontaneously hypertensive rat	原發性高血壓老鼠
SOD	superoxide dismutase	超氧化物歧化酶
TC	total cholesterol	總膽固醇
TG	triglyceride	三酸甘油酯
TNF- α	tumor necrosis factor- α	腫瘤壞死因子
VCAM	vascular cell adhesion molecule	血管細胞黏附因子



摘要

本研究以過度糖化終產物 (advanced glycation end-products, AGEs) 建立糖尿病小鼠之動物模式，並同時以腹腔注射 monascin (MS) 和 lovastatin (LOV)，評估 MS 和 LOV 能否改善胰島素阻抗和血糖調節機制。

研究結果顯示，AGE 誘導能夠降低小鼠之胰島素敏感性和葡萄糖耐受性。MS 和 LOV 能藉由提升胰島中胰島素的合成和抗氧化酵素的表現以降低 AGE 誘導產生之高血糖和胰島素阻抗之症狀。結果顯示 AGE 可能會導致小鼠胰臟 β 細胞功能障礙和氧化壓力從而產生胰島素抗性。

本研究發現與控制組相比 AGE 組有胰島素阻抗之現象，包括血糖上升，血清胰島素含量增加，而血清 TG, TC 也分別上升。抗發炎方面，AGE 組促發炎細胞激素 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 表現量顯著提升，而 MS 和 LOV 處理後會有抑制促發炎細胞激素表現之效果。抗氧化方面，AGE 組肝臟 p47phox (NADPH oxidase subunit) 蛋白質表現顯著增加 ($p < 0.05$)，且超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、觸酶 (catalase, CAT) 和麩胱甘肽 (glutathione, GSH) 皆顯著較控制組低。同時用 MS 和 LOV 處理後，肝臟 p47phox 蛋白質表現量受到抑制，抗氧化酵素 SOD、CAT 與 GSH 亦有上升的趨勢。

關鍵詞： monascin、過度糖化終產物、胰島素阻抗、抗氧化酵素

Abstract

The aim of this study is to investigate the improvement of monascin (MS) and lovastatin (LOV) on insulin resistance and the mechanism of MS and LOV for blood glucose regulation.

In this study we also provide evidence that advanced glycation end-products (AGEs) are able to affect insulin sensitivity and glucose tolerance in vivo. AGE also reduced expression of islet insulin. Together these results suggest that the AGEs pathway may play an important role in the loss of functional β -cell mass in diabetes, at least in part through the induction of oxidative stress and the alternation of β -cell differentiation and survival.

We found that AGE induction significantly resulted in hyperglycemia in BALB/c mice, but MS and LOV effectively inhibited inflammation and hyperglycemia caused by AGE. MS and LOV inhibited TNF- α , IL-6, IL-1 β expression in pancreases, liver and kidney. We also found that MS and LOV inhibited p47phox (NADPH subunit) expression in liver. Results demonstrated that MS and LOV elevated antioxidant enzyme: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione (GSH) in pancreases, liver and kidney.

Key words: monascin, advanced glycation end-products, insulin resistance, antioxidant enzymes

第一章 前言

目前由於飲食習慣與生活形態的改變，糖尿病已成為全球開發中和已開發國家的國民健康問題。糖尿病會造成一系列併發症，其發病機制一直是研究熱點，氧化壓力傷害是糖尿病併發症的重要發病機制之一。糖尿病併發症的病理過程最主要與過度糖化終產物 (advanced glycation end-products, AGEs) 及其受體 (receptors for AGEs, RAGE) 相關。

在東方國家，紅麴是傳統的天然食用色素、防腐劑。紅麴菌 (*Monascus*) 是一種小型絲狀腐生真菌，屬於真菌界，子囊菌門 (Plectomycetes)，子囊菌綱 (Ascomycetes)，不整子囊菌目 (Plectascales)，紅麴菌科 (Monascaceae)，紅麴菌屬 (*Monascus*) (林，1983)。近年來對紅麴之研究以其二次代謝物為研究熱點。有多項研究顯示紅麴的二次代謝物具有多種生理活性並且具有保健功效。其中 lovastatin (monacolin K) 為紅麴生產之膽固醇合成抑制劑，經動物及人體試驗證實具降低血脂及減少心血管疾病風險之效果 (Alberts, 1988; Juzlova et al., 1996)。並且有研究報導指出，statins 類化合物具有調節血糖之功效；紅麴二次代謝物中多種黃色素已被分離出來，其中 ankaflavin 與 monascin 除了具抗發炎、抑制癌細胞生長等 (Su et al., 2005; Lee et al., 2006b) 多種保健功效外，也被證實具有改善糖尿病症狀之功效 (Shi and Pan, 2010a; Shi and Pan, 2010b; Shi et al., 2012; Lee et al., 2013a)，具有開發為保健食品之潛力。

核因數-紅血球之 2 相關因子-2 (nuclear factor-erythroid 2 related factor-2, Nrf2) 為抗氧化路徑的重要調控因子。當體內受到氧化壓力傷害時，此因子可轉移至核內與抗氧化劑反應區 (antioxidant response element, ARE) 結合，接著誘導其調控的下游基因，包括許多與抗氧化相關的酵素與蛋白質之表現，使其發揮作

用從而降低氧化壓力帶來的傷害。因此本研究以雄性 BALB/c 小鼠作為動物實驗評估模式，以瞭解 monascin 和 lovastatin 對 AGEs 誘導糖尿病動物胰島素阻抗和氧化壓力與發炎之調控能力，希冀 monascin 和 lovastatin 可開發成為減少胰島β細胞破壞，改善胰島素抗性之新穎治療第二型糖尿病之藥物。

第二章 文獻回顧




一、糖尿病 (diabetes)

糖尿病是一種與遺傳因素和多種環境因素相關的慢性全身代謝性疾病。近年來，由於生活水準的提高、飲食結構的改變、日趨緊張的生活節奏以及不健康的生活方式等諸多因素，導致糖尿病成為全球性的嚴重威脅人類健康之疾病。西元 2000 年全球糖尿病人口為 1.71 億，預測至西元 2030 年糖尿病人口將成長至 3.66 億 (Wild et al., 2004)。糖尿病除了會導致患者過高的尿糖外，更會引起其他併發症，包括視網膜傷害、腎臟病變及腦損傷，因此控制糖尿病原則之一為調節血糖以避免併發症發生。

根據美國糖尿病協會 (American Diabetes Association: ADA) 公佈之糖尿病判定標準，空腹 8 小時後血糖大於或等於 126 mg/dL 或口服 75 g 葡萄糖耐受試驗，2 小時血糖仍大於或等於 200 mg/dL，即可診斷為糖尿病。Weyer 等人通過糖尿病的流行病學研究提出糖尿病發病的“兩階段模式”學說 (Weyer et al., 1999)。第一階段：首先機體由於胰島素抵抗導致糖耐量正常演變為糖耐量異常 (impaired glucose tolerance, IGT)；第二階段：胰島素抵抗和 β 細胞分泌功能受損，使 IGT 演變為第 2 型糖尿病。IGT 之判定標準為飯後 2 小時的血糖值超過 140 mg/dL，但仍未達到 200 mg/dL。

Andrew 等人指出糖尿病分為五大類 (Andrew et al., 1984)，包括 (1) 第 1 型糖尿病 (type 1 diabetes)，又稱為胰島素依賴型糖尿病 (insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM)，大多數因為 β 細胞受破壞造成胰臟分泌胰島素不足所引起，患者需注射胰島素才能改善血糖。目前對第 1 型糖尿病之病因和發病機制不完全瞭解。(2) 第 2 型糖尿病 (type 2 diabetes)，又稱為非胰島素依賴型糖尿病



(non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM)，90-95%糖尿病屬於此類，主要病因為胰島素阻抗導致高血糖 (hyperglycemia)。此類患者雖然胰島 β 細胞能夠正常分泌胰島素，但因周邊組織 (肝、肌肉與脂肪等) 對胰島素敏感性降低，進而影響葡萄糖攝取作用而造成高血糖，而持續性的高血糖刺激胰島 β 細胞不斷地分泌胰島素，因而產生高胰島素血症 (hyperinsulinemia)。Bouche 等人指出長期高血糖與高血脂會造成胰島 β 細胞損傷，並逐漸使第 2 型糖尿病患者胰島 β 細胞失去分泌胰島素功能，使之最終需要依賴注射胰島素維持正常生理機能 (Bouche et al., 2004)。(3) 妊娠糖尿病 (gestational diabetes mellitus) 為婦女懷孕時呈現的糖尿病，輕者需要飲食控制，嚴重者需要進行胰島素治療。(4) 特殊類型的糖尿病：如基因缺陷造成 β 細胞異常、胰島素分泌異常、外因性胰臟功能異常、藥物或化學傷害造成異常。(5) 葡萄糖耐受異常 (impaired glucose tolerance, IGT)、空腹血糖異常 (impaired fasting glucose, IFG)：可定義為糖尿病前期，這部份人群中具有相當高比例會發展成糖尿病。

糖尿病會產生許多慢性併發症，會影響不需要胰島素的器官，像是心臟血管、眼睛、腎臟和造成神經方面的病變。由於糖尿病患者長期暴露於高血糖下，不但血糖濃度過高會使得過度糖化終產物 (AGEs) 大幅增加，而且會提升動脈硬化、心血管併發症、尿毒癥及腎臟病變等多種疾病之發生幾率。但目前這些併發症致病機轉尚未完全瞭解。

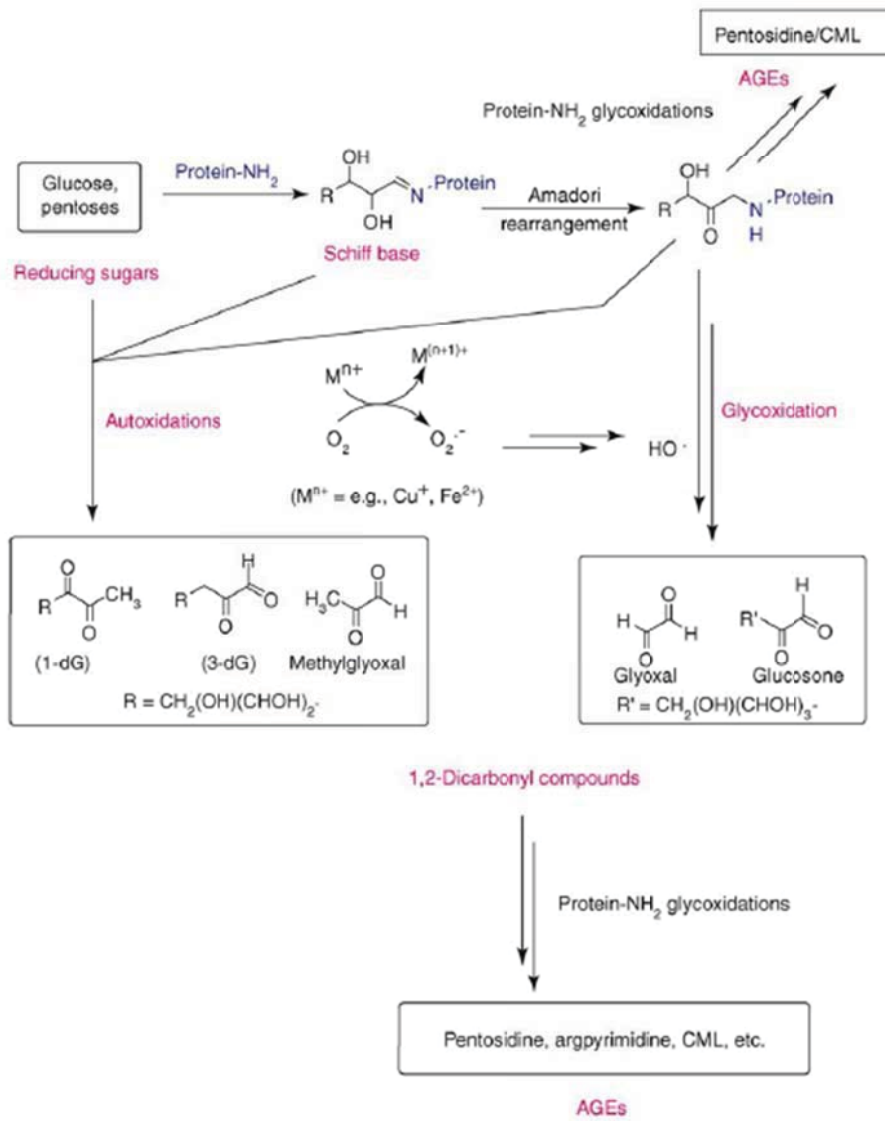
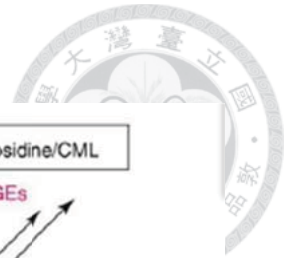
二、過度糖化終產物 (advanced glycation end-products, AGEs)

AGEs 的生成途徑：當細胞處於一定程度的高血糖環境下或是食品加工過程中，蛋白質的 amino group 和還原糖的 carbonyl group 發生非酵素性反應 (nonenzymatic reaction)，形成不穩定且高度可逆的 Schiff base，在這個過程中

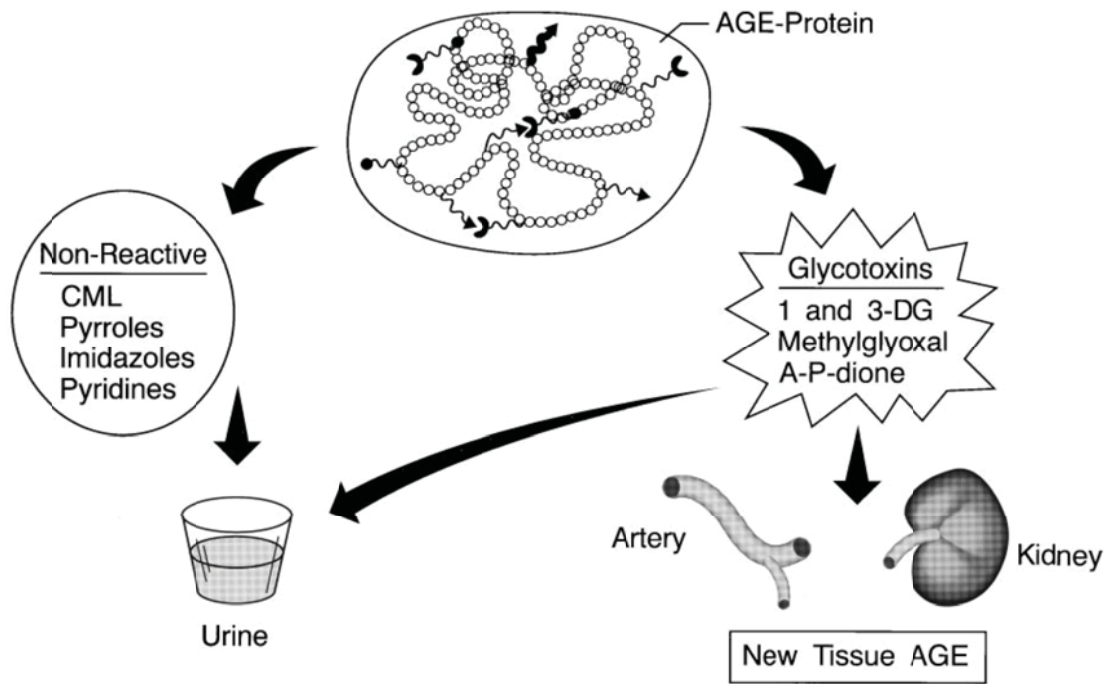
會生成棕黑色的大分子物質類黑精或稱擬黑素。除產生類黑精外，反應過程中還會產生成百上千個有不同氣味的中間體分子，包括還原酮、醛和雜環化合物，這些物質為食品提供了宜人可口的風味和誘人的色澤。之後會經由 amadori rearrangement 異構化形成 amadori product，其較穩定但仍可逆，最終經由分子間重組 (molecular rearrangement)、脫水 (dehydration) 及濃縮 (condensation) 等反應進而形成不可逆的化合物，它能與相鄰蛋白上之遊離胺基共價結合，與蛋白質交叉相互連接(cross-linking) 後，呈現褐色並發出螢光 (Amore et al., 1997)。

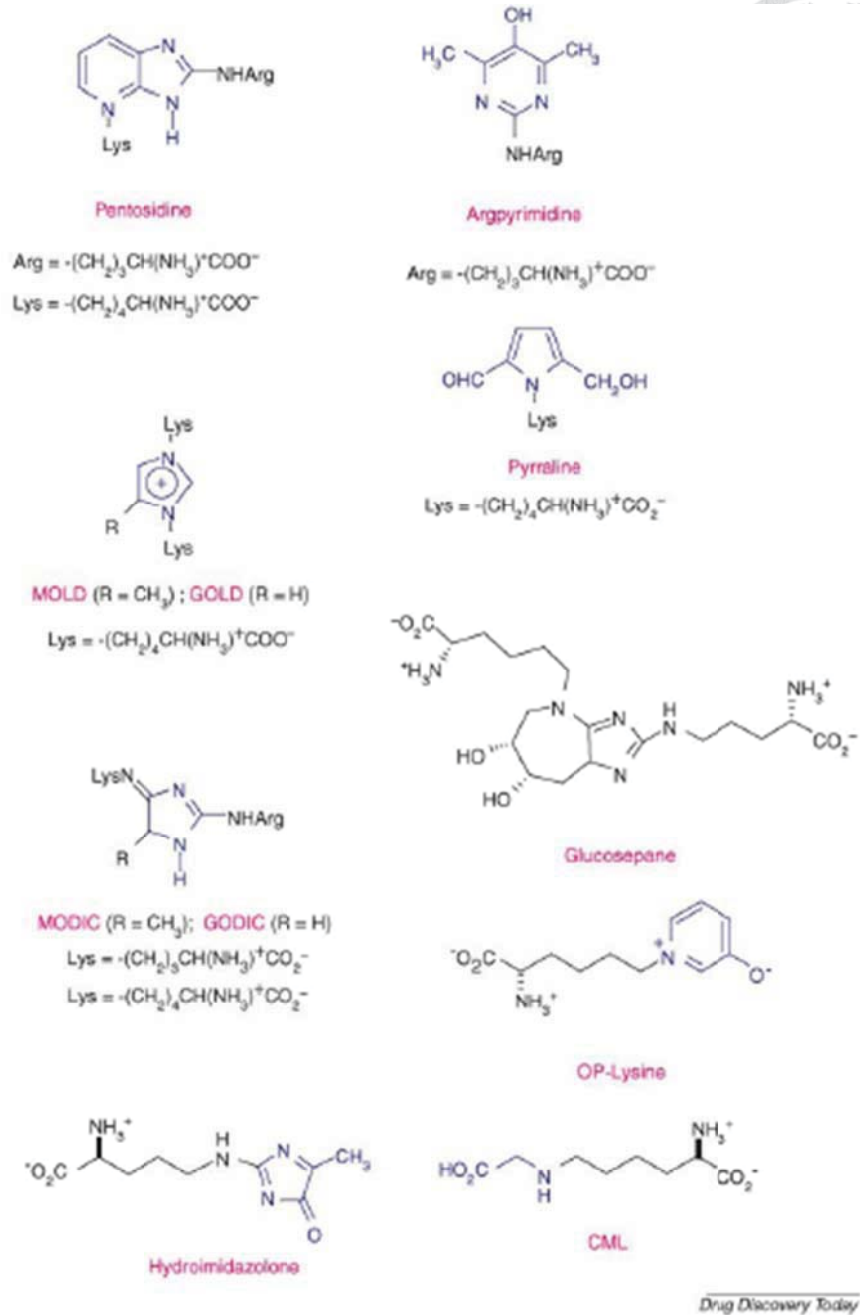
葡萄糖的自身氧化產物乙二醛 (glyoxal) 及甲基乙二醛 (methylglyoxal) 等代謝物是一類二羰基化合物 (dicarbonyl compounds)，有研究證實是藉由分子內或分子間交聯鍵結所產生，此交聯反應主要由乙二醛或甲基乙二醛與離胺酸 (lysine) 或精胺酸 (arginine) 反應所致，再與蛋白質反應形成 AGEs。AGEs 的合成路徑如圖 2-1 所示。在糖尿病患者的組織中常常存在高濃度的 AGEs，而它就是導致大多數糖尿病併發症的最主要原因，例如：動脈血管粥狀硬化 (atherosclerosis) 就是一種糖尿病併發症。Brownlee 認為高濃度的 AGEs 與糖尿病及其併發症發生有正相關性 (Brownlee, 1991)。

人體內 AGEs 的來源有兩種方式：一種是體內產生，另一種就是外源性膳食攝入，稱為外源性 AGEs，例如煙草或者可樂中都含有高濃度的 AGEs，烤鴨經過高溫烹調之後 AGEs 的含量會上升 100 倍 (Koschinsky et al., 1997)。食物中的 AGEs 代謝途徑如圖 2-2 所示。AGEs 是許多不同種的結構物的總稱，代表性 AGEs 之化合物結構如圖 2-3 所示。現已知道包括 N^ε-caroxymethyllysine (CML)、pentosidine、pyrraline、crossline、glyoxal-lysine dimer (GOLD)、methylglyoxal-lysine



Drug Discovery Today






(Reddy and Beyaz, 2006)

圖 2-3 代表性 AGEs 之化合物結構

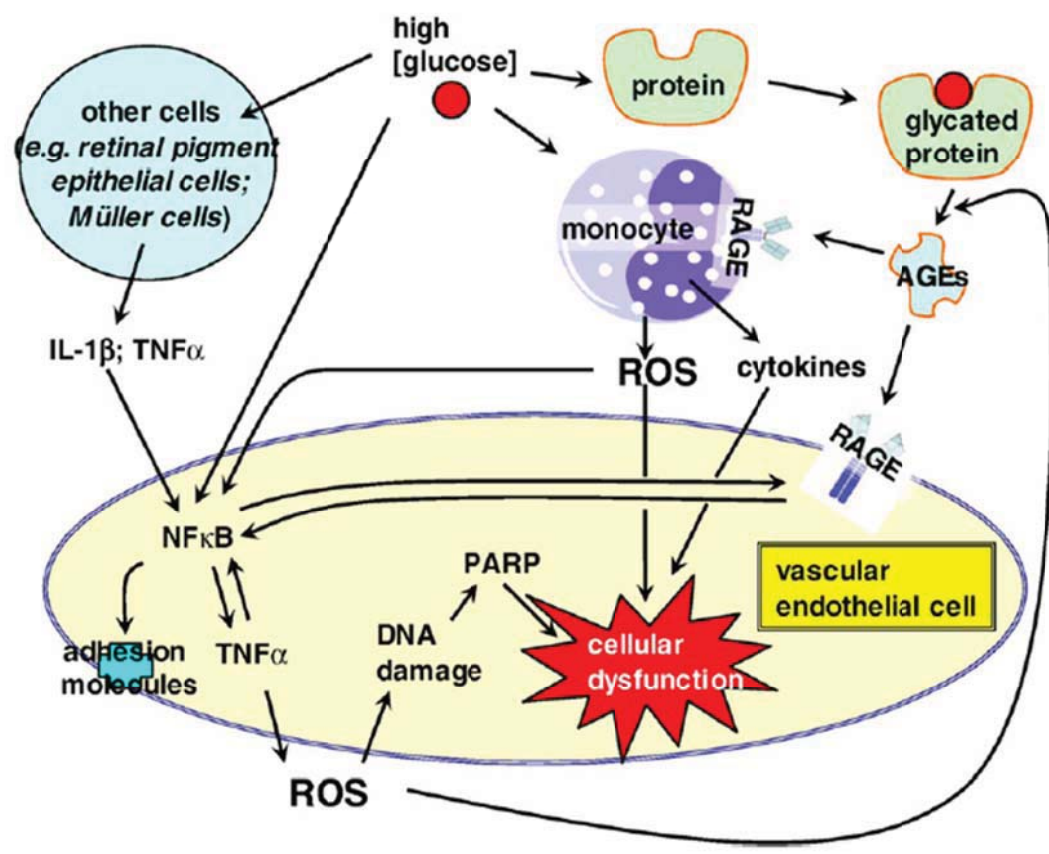
Fig. 2-3 Structures of selected advanced glycation end-products (AGEs)



dimer (MOLD) 等，還有一些物質現在仍不知道其具體結構。其中 CML 與 pentosidine 是典型的氧化的 AGEs，所以也叫做糖化氧化產物。而 pyrraline 是非氧化的 AGEs。CML 被認為是糖化標的物，而 parraline、crossline 和 pentosidine 被認為是蛋白相互交聯的標的物。Aminoguanidine 是一種可以抑制 AGEs 形成之藥物，其作用機制為將梅納產物中之碳氧雙鍵 (C=O) 改為碳氮雙鍵 (C=N)，進而抑制 AGEs 生成，減緩糖尿病併發症之症狀，包括視網膜病變、腎臟病變及血管異常 (Brownlee et al., 1986; Amore et al., 1997)。

有研究指出 AGEs 參與糖尿病併發症、腎功能不全病人的組織損傷、血脂異常及老化過程，目前對 AGEs 的研究主要集中在與糖尿病併發症相關之機制探討，因為糖尿病患者血糖較高，組織蛋白易被糖化。AGEs 形成引起的病理改變主要通過三個過程 (Brownlee, 2001)：第一，AGEs 改變了細胞外基質蛋白的性質及細胞外基質誘發的信號轉導途徑。第二，通過 AGEs 與其特異的細胞受體相互作用，改變了可溶性信號分子如細胞因子、激素和自由基的水準。第三，由葡萄糖、果糖等在細胞內形成的 AGEs 和反應活性高的中間產物能直接改變靶組織蛋白功能。

RAGE (receptor for AGE) 是 AGE 的主要受器，屬於免疫球蛋白超級家族，由 400 多個胺基酸所構成，不具有酪胺酸激酶活性。在許多重要細胞中都發現有 RAGE 的存在，包括內皮細胞 (endothelial cells)、單核吞噬細胞 (mononuclear phagocyte)、血管平滑肌細胞 (smooth muscle cells) 及肝臟星狀細胞 (hepatic stellate cells)。RAGE 的分子量以及和 AGE 結合的能力會因細胞種類而有差異。因此可能在不同細胞上的 RAGE 是屬於其家族中不同的 subtype。當 AGEs 與



(Fatehi-Hassanabad et al., 2010)

圖 2-4 過度糖化最終產物誘導發炎之機制圖

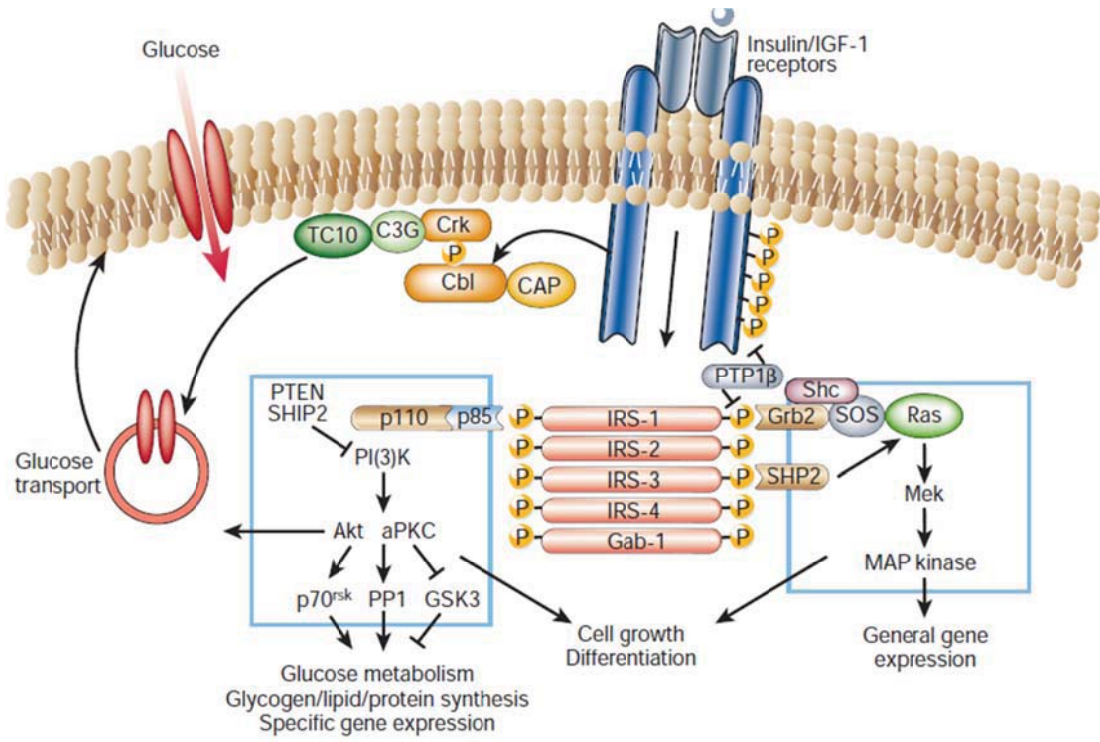
Fig. 2-4 Mechanism for inflammation induction by AGEs

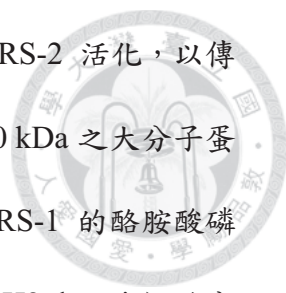
RAGE 結合後會造成下游訊息傳遞，使 p47phox (NADPH oxidase subunit) 活化，提升細胞氧化壓力進而活化 nuclear factor-kappa B (NF- κ B)，NF- κ B 活化後會轉移到細胞核內促使下游基因之轉錄，進而產生發炎細胞激素，包括 TNF- α 及 IL-1 β (Guha et al., 2000) 和血管細胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 以及促使 RAGE 本身的大量表現 (Wantier et al., 2001)，進而使得多種細胞走向凋亡，損傷組織器官功能(Huttuen et al.,1999)。AGEs 誘導發炎途徑如圖 2-4 所示。

三、胰島素訊息傳遞路徑

胰島素 (insulin) 由胰臟 β 細胞分泌產生，是維持血糖值恒定與組織生長發育的重要荷爾蒙之一，胰島素訊息傳遞路徑如圖 2-5 所示。胰島素之主要作用為促進細胞利用血液中葡萄糖而調節血糖，增加周邊組織例如肌肉與脂肪組織對葡萄糖的攝取與利用，並藉由脂質生合成 (lipogenesis) 及肝糖合成 (glycogenesis) 作用，使肝臟及肌肉與脂肪組織儲存身體中過多之能量，並對脂解 (lipolysis) 與肝糖分解 (glycogenolysis) 有抑制作用。

胰島素訊號傳遞開始於胰島素與細胞表面受器相結合，接著進行下游訊息傳遞。胰島素受器 (insulin receptor, IR) 在哺乳動物的組織細胞中廣泛存在，尤其在肌肉、脂肪及肝臟等胰島素作用組織中大量表現。IR 是一種穿膜的醣蛋白，主要由兩個 α -亞基 (subunit) 及兩個 β -亞基組成， β -亞基具有酪胺酸蛋白質激酶 (tyrosine protein kinase) 活性，藉由雙硫鍵構成四聚體。當細胞膜外的 α -亞基與胰島素結合後，會引發細胞膜上 β -亞基發生自磷酸化 (auto-phosphorylation)，而形成具有活性的 p-IR，其隨即將 (insulin receptor substrate, IRS) IRS-1 及 IRS-2





的酪胺酸位置進行磷酸化 (phosphorylation) 從而使 IRS-1 及 IRS-2 活化，以傳送下游訊號並提升胰島素敏感性。IRS-1 是一個分子量約為 180 kDa 之大分子蛋白。它具有 PTB domain，並以此結合到磷酸化的 IR，造成 IRS-1 的酪胺酸磷酸化。磷酸化的 IRS-1 可與許多具有 src homology 2 domain (SH2 domain) 的分子結合。IRS-1 的表現降低也是導致胰島素阻抗的重要因素之一 (Saltiel and Kahn, 2001)。IRS-2 受到 insulin-like growth factor 1 (IGF-1) 和其他促細胞發炎激素所調控，IRS 基因的磷酸化須藉由著 insulin receptor 接收到 insulin，而使得 receptor 上的 tyrosine kinase 磷酸化來啟動。

IRS-1 蛋白磷酸化會引起 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 的活化，促使 PIP2 向 PIP3 轉變，活化的 PI3K 傳遞多重訊息引發 PtdIns 轉成 PtdIns-(3, 4 and 5)-P3，使其去活化成具有 pleckstrin homology domains (PH) 的受體，並繼續下游之訊息傳遞作用 (Saltiel and Kahn, 2001)。

PIP3 會使 PKB/Akt 磷酸化，其磷酸化的位置主要在 threonine 308 和 serine 473。PKB 被磷酸化之後會使原本在細胞內的 glucose transporter 4 (GLUT4) 轉位 (translocation) 到細胞膜表面上表現。GLUT4 為胰島素敏感性葡萄糖轉運蛋白，主要存在於骨骼肌和脂肪細胞。最終使葡萄糖容易進入到細胞內被利用和代謝，維持血糖恒定 (Wang et al., 1999)。

葡萄糖是哺乳動物重要的能量產生的來源及生合成作用之基質，主要經由澱粉類物質水解後產生並經小腸吸收儲存利用，或由肝糖分解產生 (glycogenolysis)。由於葡萄糖是親水性的物質，無法通過脂質雙層的細胞膜，因此血液中葡萄糖皆需要葡萄糖轉運蛋白 (glucose transporter, GLUTs) 透過促進擴散 (facilitate diffusion) 的方式轉運至細胞內利用。GLUTs 轉運蛋白家族目前




表 2-1 葡萄糖相關運輸蛋白

Table 2-1 The glucose transporter (GLUT) family of facilitative sugar transporters

Isoform	Previous name	Class	Main tissue localization
GLUT1	–	I	Erythrocytes, brain, ubiquitous
GLUT2	–	I	Liver, pancreas, intestine, kidney
GLUT3	–	I	Brain
GLUT4	–	I	Heart, muscle, WAT, BAT, brain
GLUT5		II	Intestine, testes, kidney
GLUT6	GLUT 9	III	Brain, spleen, leucocytes
GLUT7		II	n.d.
GLUT8	GLUT X1	III	Testes, brain and other tissues
GLUT9	GLUT X	II	Liver, kidney
GLUT10		III	Liver, pancreas
GLUT11†	GLUT 10	II	Heart, muscle
GLUT12	GLUT 8	III	Heart, prostate, muscle, small intestine, WAT
HMIT		III	Brain

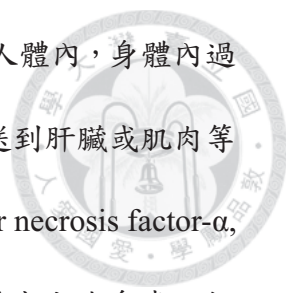
(Wood and Trayhurn, 2003)



有 GLUT 1-12 等不同異構物，於組織中分佈如表 2-1 所示。輔助性葡萄糖轉運蛋白包含 GLUT1 至 GLUT2，經由胺基酸序列比對得知彼此間存在著 39%-65% 的相似性，根據組織分佈位置差異和其被荷爾蒙所調節不同而分為三類，即 Class 1 (GLUT1-4)，Class 2 (GLUT5, 7, 9, 11) 是果糖轉運蛋白及 Class 3 (GLUT6, 8, 10, 12) 目前功能尚不清楚。GLUT1 為最基礎之葡萄糖運輸蛋白，主要分佈於對能量需求最旺盛的紅血球及腦細胞中。GLUT5 主要負責運輸果糖，存在於小腸細胞 (Davidson et al., 1992)。GLUT2 是一種和葡萄糖結合力很低的葡萄糖轉運蛋白，主要分佈於肝、腎、小腸和胰島 β 細胞。在胰島 β 細胞中，GLUT2 作為葡萄糖感受器，轉運葡萄糖進入細胞中，經一系列信號傳遞，最後促使胰島素釋放。GLUT4 是目前已知受胰島素調節最主要的葡萄糖轉運蛋白，主要分佈於脂肪組織、心臟與肌肉中，後來被發現也存在於腦組織中 (Rayner et al., 1994)。GLUT4 在胰島素抗性產生所造成的糖尿病中扮演重要角色 (Garvey et al., 1987)。受到胰島素的刺激作用後，會使原本存在細胞質內含有 GLUT4 的 vesicle 藉由胞吐作用 (exocytosis) 將 GLUT4 轉移至細胞膜表面 (Holman et al., 1990)，而提升細胞對葡萄糖吞噬作用，當胰島素刺激消失後，細胞膜上的 GLUT4 會再經由胞飲作用 (endocytosis) 重新回到細胞質內等待下一次胰島素刺激。

四、胰島素阻抗 (insulin resistance)

第 2 型糖尿病患者發病前常有胰島素阻抗現象。胰島素阻抗是指血液循環中之胰島素調節體內能量代謝之能力降低 (Zick et al., 2001)。也就是在正常濃度的胰島素生理濃度下，身體對胰島素的敏感性降低甚至對之毫無反應。胰島素阻抗的分子機制存在多種學說，包括基因缺陷、藥物、肥胖、飲食、生活形態等影響。



過多的遊離脂肪酸也是造成胰島素阻抗的重要因素。在肥胖病人體內，身體內過多的脂肪組織會增加 adipokine 與遊離脂肪酸之釋放並經血液送到肝臟或肌肉等組織。Leclercq 等人指出 adipokine 中的腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、介白素-6 (interleukin-6, IL-6) 與 resistin 會造成肝臟產生胰島素阻抗 (Leclercq et al., 2007)。胰島素阻抗造成的高胰島素血症也會增強體內鈉離子再吸收，進而增加高血壓 (hypertension) 與動脈硬化 (atherosclerosis) 及其他心血管疾病等風險 (Hanley et al., 2002)。

肝臟為調控血糖的器官之一，血液中的葡萄糖主要通過葡萄糖轉運蛋白 2 (GLUT2) 進入肝臟。當血糖濃度升高，胰島素藉由活化肝糖與脂肪合成相關的酵素從而促進肝臟汲取血液中的葡萄糖並將其轉化為肝糖或脂肪，胰島素也可以抑制肝臟中糖質新生相關基因表現。肝臟也是控制血液中胰島素濃度的重要器官，Meshkani 等人發現第 2 型糖尿病患者體內肝臟胰島素清除能力 (insulin clearance) 降低 (Meshkani et al., 2009)。

當肝臟中胰島素阻抗之情形發生後，肝臟調控血液中葡萄糖與胰島素能力不足，造成高血糖與高胰島素血症，長期持續下去可造成第 2 型糖尿病、動脈硬化或非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver, NAFLD)。Gastaldelli 等人指出糖尿病患者空腹時肝臟糖質新生作用較健康者劇烈，造成其空腹高血糖現象，且不易受胰島素所抑制 (Gastaldelli et al., 2001)。

五、核因子-紅血球之 2 相關因子-2 (nuclear factor-erythroid 2 related factor-2, Nrf2) 與糖尿病的關係

高血糖會導致 AGEs 產生，並誘導免疫細胞製造及分泌發炎因子。高血糖

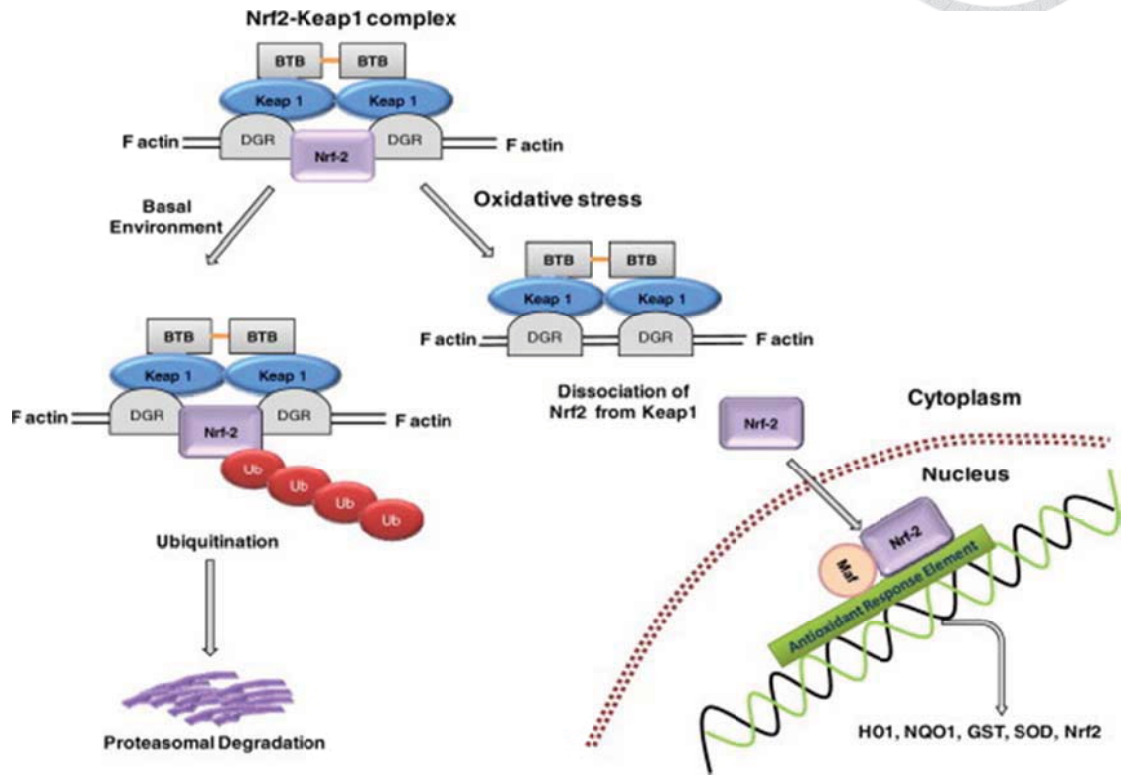
會活化 NADPH oxidase，使之產生活性氧 (reactive oxygen species, ROS)，而 ROS 增加會降低胰臟胰島抗氧化酵素的 mRNA、蛋白質及活性表現。當胰島素阻抗產生時，為了代償此現象，會藉由增加葡萄糖的代謝來增強 β 細胞釋放胰島素，也因此增加了粒線體產生 ROS。 β 細胞長期暴露於 ROS 環境下，將會造成功能障礙。胰島素阻抗發生時，骨骼肌中的氧化壓力也會增加，例如：超氧陰離子、氫氧自由基等 (Henriksen, 2006)。綜合上述，氧化壓力是造成糖尿病及其併發症發生的一項重要因子。

Nrf2 轉錄因子，當其結合至 antioxidant response element (ARE) 則會參與相關基因的調控，主要在解毒器官如肝、腎及與外界環境接觸的器官如皮膚、肺和腸道中大量表現。正常狀態下，Nrf2 位於胞質中，且與 Kelch-like ECH-associated protein-1 (Keap-1) 相互作用後降解、失活 (Kaspar et al., 2009)。當受到外界刺激後，Nrf2 與 Keap-1 分開並進入細胞核，促進相關的抗氧化酵素基因表現 (Itoh et al., 1999)。

有研究指出 protein kinase C (PKC)、phosphoinositide 3-kinase (PI3K)，extracellular signal-regulated kinase (ERK) 等會將 Nrf2 上的 serine 及 threonine 殘基進行磷酸化，從而促進 Nrf2 與 Keap-1 的解離，進而轉移至細胞核內 (Numazawa et al., 2003; Kang et al., 2002; Zipper and Mulcahy, 2002)。Nrf2 之活化機制如圖 2-6 所示。

六、抗氧化防禦系統

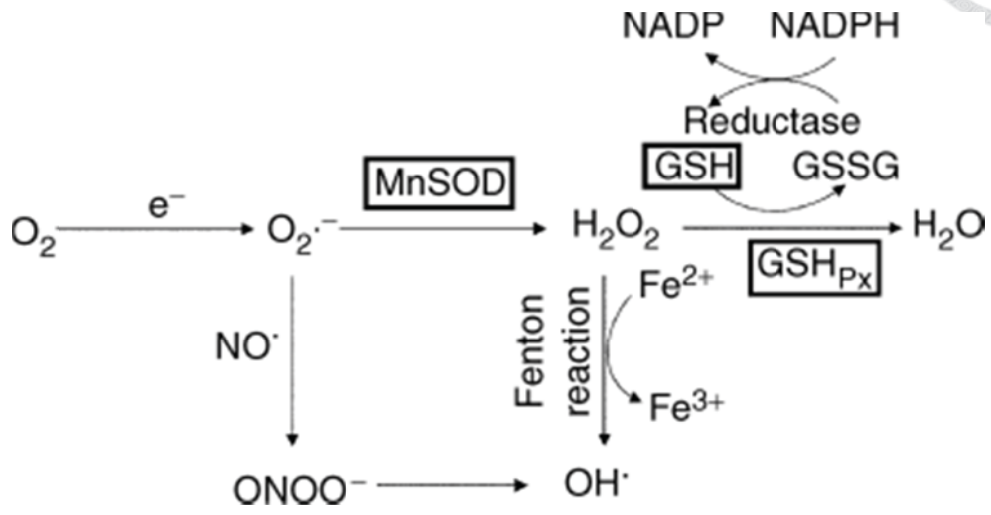
活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 及自由基 (free radical) 會造成生物體分子的損傷，導致疾病的產生。但生物體內具有抗氧化防禦系統，以減緩活性



(Negi et al., 2011)

圖 2-6 核因子-紅血球之 2 相關因子-2 活化之機制圖

Fig. 2-6 Mechanism of Nrf2 activation



(Jassem and Heaton, 2004)

氧及自由基的產生，其中包括抗氧化物及抗氧化酵素 (Chen and Yen, 1998)。細胞內之抗氧化系統如圖 2-7 所示。抗氧化酵素防禦系統主要包括 superoxide dismutase (SOD)、glutathione peroxidase (GPx)、catalase (CAT) 等。



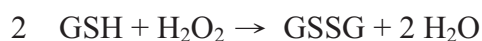
1. 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)

SOD 是一種金屬酵素 (metalloenzymes)，存在於細胞質與粒線體中，分佈於好氧性生物體內。鋅銅 SOD (Zn/Cu-SOD) 主要存在於細胞質中，錳 SOD (Mn-SOD) 主要存在於粒線體。其作用是清除超氧化物陰離子自由基，將之轉變成 H_2O_2 及 O_2 ，而 H_2O_2 可透過 GPx 或 CAT 將之代謝成不具毒性的 H_2O 。SOD 做為以下反應的酵素：



2. 麩胱甘肽過氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPx)

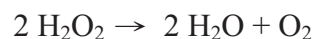
GPx 是人體內非常重要的抗氧化酵素，按其分佈位置可分為細胞質與粒線體中的 cellular glutathione peroxidase (cGPx)、血漿及血清中的 extracellular glutathione peroxidase (eGPx) 及位於細胞膜上的 phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (phGPx)。GPx 會將脂質過氧化物還原成為無毒害產物。GPx 在生物體內負責清除 H_2O_2 ，其將 H_2O_2 還原成 H_2O ，並將氧化態 GSH 還原成還原態 GSSG，以降低生物體內氧化壓力的產生。GSH 藉由 GPx 轉變為 GSSG，將細胞內外不同部位產生的 H_2O_2 及脂質過氧化物還原成水或是 lipid alcohols，再經麩胱甘肽還原酵素 (glutathione reductase；GR) 還原成為 GSSG。其清除 H_2O_2 機制如下：





3. 觸酶 (Catalase, CAT)

CAT 主要存在於過氧化體 (peroxisome)，其可特異性地將 H_2O_2 轉為 H_2O 。過氧化體內的酵素如 amino acid oxidase 和 α -hydroxy-acid oxidase 產生大量的 H_2O_2 。所以 catalase 為過氧化體中代謝過氧化氫的重要酵素。CAT 做為以下反應的酵素：



4. 麩胱甘肽 (Glutathione, GSH)

麩胱甘肽為重要水溶性抗氧化物。麩胱甘肽在異生物質新陳代謝可能直接地中和 ROS 例如油脂過氧化物，並且扮演主角。生物體中不同部位的 GSH 含量有差異。GSH 可直接與自由基作用或和 GPx 共同清除體內的 H_2O_2 及其他過氧化物質，以減輕 ROS 對生物體造成氧化性傷害。

近年來，許多研究嘗試由天然來源以尋求安全且具有強抗氧化效力之抗氧化劑，其中以多酚及類黃酮為被研究最多之抗氧化物質，其可作為抗氧化劑，能夠有效終止自由基連鎖反應。因此尋求具有強抗氧化性的天然抗氧化物質進而達到生物體保健之目的，已成為食品營養致力研究的重要課題。

七、紅麴

(一) 紅麴之菌種特性

紅麴菌屬 (*Monascus*) 是一種小型絲狀腐生真菌，由法國學者 Van Tieghem 於 1884 年分離、建立。在分類系統屬於真菌界 (Fungi)、子囊菌門 (Ascomycota)、子囊菌綱 (Ascomycetes)、散囊菌目 (Eurotiales)、紅麴菌科 (Monascaceae) (Van

Tieghem, 1884)。紅麴菌屬的特徵為菌絲呈無色，褐色或紅色，具有橫隔 (septa)，藉末端產生一個大型的有性厚壁子囊 (ascocarp) 或以單一細胞之分生孢子進行繁殖。

紅麴菌在亞洲地區應用已有上千年歷史，主要於飲食、醫藥、工業等方面應用。紅麴菌在歐洲一度被視為一種腐敗菌，但在東亞地區，紅麴菌卻是傳統食品加工的神奇微生物。自北宋初期便有相關文獻記載，本草綱目中也記載紅麴主治消食活血，健脾燥胃。紅麴普遍用於食品著色劑及日常飲食原料。以米做為基質進行固態發酵所生產之紅麴稱為紅麴米，在亞洲國家為常用之食品及傳統中草藥。近年研究發現，紅麴米含有許多具生物活性之代謝產物，其中某些化合物已被純化及鑒定。

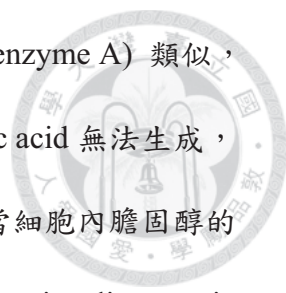
(二) 紅麴生產之二級代謝產物

早期關於紅麴的研究主要集中在酶類和色素方面。1979 年，日本遠藤教授分離出 monacolin K 之後，引起各國科學家的廣泛關注，紅麴中的一些生理活性物質陸續被發現，進一步增加紅麴的魅力。

1. 膽固醇合成抑制劑 (monacolins)

Lovastatin 即為 monacolin K，為紅麴菌所生產之降膽固醇化合物。分子式為 $C_{24}H_{36}O_5$ ，分子量 404.55，為白色結晶，可溶於 methanol、ethanol 及 acetonitrile 等有機溶劑中但不溶於水。最大吸收波長為 231、238、247 nm (Budavari et al., 1989)。

1979 年，日本東京農工大學遠藤教授自紅麴菌 *M. ruber* 的培養液中分離出天然的膽固醇合成抑制劑 monacolin K (Endo, 1979)，奠定了日後紅麴的研究基礎。



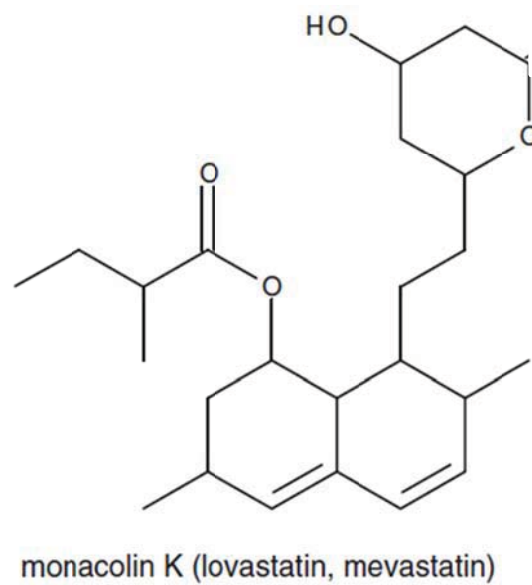
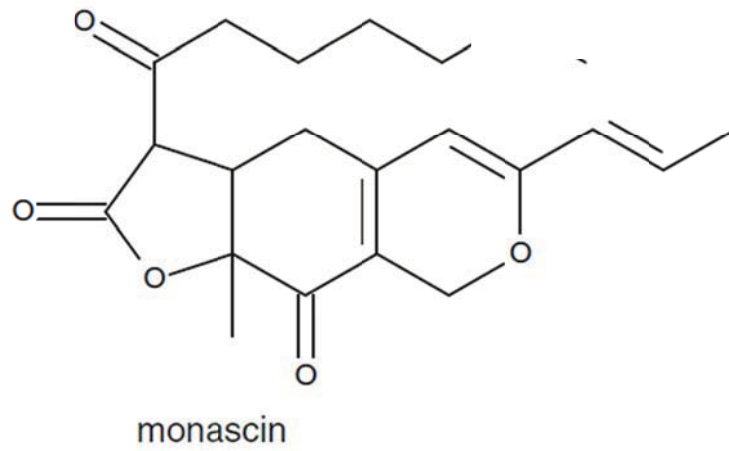
monacolin K 的結構與 HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A) 類似，會與 HMG-CoA reductase 競爭，進而抑制該酵素，使 mevalonic acid 無法生成，而間接抑制膽固醇合成，達到降低細胞內膽固醇含量之效果。當細胞內膽固醇的含量下降時會增加 LDL receptor 的表現進而提升 low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) 之代謝，也達到降低 LDL-C 含量之效果。此外，臨床研究指出，monacolin K 具有降低體內發炎反應的作用 (Lefer, 2002)，亦有抗癌之功效 (Ho and Pan, 2009)，並且具有降低非胰島素依賴性糖尿病患者之血糖功效 (Goldberg et al., 1990; Ko et al., 1998)。

本研究室發現，在蛋雞的飼料中添加含 monacolin K 之紅麴，具降低雞蛋黃中膽固醇含量 14% 之功效 (Wang and Pan, 2003)。亦能降低高脂飲食誘導倉鼠血清中膽固醇 (Lee et al., 2006a)。有報導指出，statin 類藥物具有抗發炎之功效，降低心血管疾病、中風、糖尿病、骨質疏鬆症及阿茲海默症等病之發病機率 (陳，1999)。

2. 紅麴色素

紅麴色素是紅麴菌在生長過程中產生的一系列色素的總稱，它是世界上目前僅有的利用微生物生產的食用天然色素，長期以來作為食品著色劑和香料使用。且多數中外學者的研究報告也指出紅麴色素的安全性極高，因此紅麴色素廣泛被作為天然的食品著色劑使用。

紅麴色素已被確定出化學結構且廣為人知的主要有三類，即紅色素 (monascorubramine 及 rubropunctamine)、橘色素 (monascorubrin 及 rubropunctatin) 及黃色素 (monascin、ankaflavin、yellow II 及 xanthomonascin A) 三大類。橘色素的生成是經由酵素反應生成，monascorubrin 及 rubropunctatin 具活潑的 CO 基，



(Patakova. 2012)

圖 2-8 紅麴發酵產物 monascin 和 lovastatin 之結構

Fig. 2-8 Structure of *Monascus*-fermented products, including monascin and monacolin K (lovastatin)

對胺基酸有高度親和力，當其和胺基酸反應後，則會生成水溶性的紅色素，而黃色素形成機制目前尚未完全瞭解 (Juzlova et al., 1996; Blanc, 1994)。Monascin 與 lovastatin 之結構示如圖 2-8。黃色素 monascin 及 ankaflavin 已被證實具有多種生理活性，monascin 具有抗發炎效果 (Lee et al., 2006b)，且能抑制皮膚癌；ankaflavin 藉由誘發癌細胞走向細胞凋亡達成毒殺細胞之效果。此外，monascin 與 ankaflavin 對於老鼠脾臟 T 細胞具有免疫抑制作用 (Martinkova et al., 1999)。

Yasukawa 等人發現橘色素 monascorubrin 可抑制 12-o-tetradecanpylphorbol 13-acetate (TPA) 所誘發的皮膚癌化 (Yasukawa et al., 1994)。Martinkova 等人發現橘色素 rubropunctatin 和 monascorubrin 對 *Bacillus subtilis* 及 *Candida pseudotropicalis* 的生長具有抑制作用，顯示該類色素具有良好抑菌效果 (Martinkova et al., 1995)。

本研究室利用 *Monascus purpureus* NTU 568 菌株，針對不同基質進行發酵條件與二次代謝產物生成的探討，研究結果顯示，以山藥取代傳統米類發酵，具有較高的黃色素生成量 (Lee et al., 2006)。

3. 神經傳導與降血壓物質 (γ -aminobutyric acid, GABA)

γ -胺基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 是一種中樞神經抑制性傳導物質，為 L-glutamate 經 glutamate decarboxylase 進行脫羧作用 (decarboxylation) 後所得的產物。GABA 除具降血壓之功效外，還有抗痙攣及抗憂鬱之功效，同時因其耐熱性佳，故在食品加工過程中不易被破壞。在生物體中，GABA 會與 GABA_A 及 GABA_B 結合，增加突觸後膜氯離子的傳導而抑制突觸後電位，降低末梢神經的敏感度，刺激交感神經活動並且刺激腎上腺素分泌兒茶酚胺 (catecholamine)

從而產生長效的降血壓作用。因此，當血管過度收縮引起高血壓時，GABA 能抑制神經衝動，有效控制血壓的上升 (Sawynok, 1987)。

Kohama 等人指出紅麴米所含之 GABA 經動物實驗證實具降低血壓之功效 (Kohama et al., 1987)。GABA 除了能有效降低血壓外，亦有許多報告指出 GABA 具有抗焦慮與憂鬱 (Kalueff and Nutt, 2007) 以及抗癲癇的效果 (Meldrum, 1975)。

之前本研究室利用 *Monascus purpureus* NTU 568 菌株發酵所得含高 GABA 產量之紅麴山藥飼食先天性高血壓鼠 (spontaneously hypertensive rat; SHR) 證實具有降血壓之效果 (Wu et al., 2009)。Wu 等指出紅麴山藥比紅麴米效果更佳可能是由於紅麴山藥中含有較高的 GABA、monascin 與 ankaflavin。

4. 抗氧化物質 (dimerumic acid)

1999 年，日本學者 Aniya 提出紅麴具抗氧化能力，並發現抗氧化能力成分為 dimerumic acid。他們發現 dimerumic acid 具清除 α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 自由基及抗油脂過氧化性質之能力，並由 acetaminophen (AAP) 所誘發肝壞死 (hepatic necrosis) 的動物模式證實，*M. anka* 發酵萃出物能增加 glutathione-s-transferase (GST) 的活性，減輕化學藥劑對於肝臟的傷害，預防肝臟的損傷 (Aniya et al., 2000)。

Dimerumic acid 的抗氧化機制為提供一個電子給氧化物從而還原氧化物，而本身氧化成為 nitroxide radical，接著 nitroxide radical 會再被清除，經一連串的氧化還原循環使得超氧陰離子、氫氧自由基、alkyl radical、alkoxyl radical 和 peroxy radical 得以清除達到抗氧化之效果 (Yasukawa et al., 1994)。



(三) 紅麴對糖尿病之應用

過去已有許多研究顯示紅麴的成份可用來預防許多疾病，包括抗高血壓、抗感染、降低血膽固醇、抗氧化、減少心血管疾病風險、抗腫瘤新生及糖尿病、降血脂、增強免疫作用，現在以紅麴對於糖尿病方面來加以探討。

日本學者遠藤教授等在進行紅麴菌培養降低血清膽固醇試驗的同時，發現所有試驗兔子服用後 0.5 h 內血糖降低 23%~29%，而在 1 h 後血糖仍與對照組下降 19%~29%，但其有效成份目前未明。紅麴發酵產物的降血脂和降血壓作用在糖尿病預防和輔助治療上療效肯定，有一定的穩定血糖作用，可以調節全身功能，而且相比目前開發的降血糖藥物，具有無毒副作用，療效顯著等優點。

之前本研究室利用 *M. purpureus* NTU 568 以米、山藥及薏仁做為發酵基質，將發酵產物連續八周餵食 streptozotocin (STZ) 誘發糖尿病大鼠 (200 mg/kg)，結果顯示餵食紅麴可降低大鼠血糖，亦能降低澱粉酶、三酸甘油酯及膽固醇，紅麴山藥具有良好抗氧化能力，能夠顯著降低糖尿病大鼠胰臟組織之 ROS，並能提高 glutathione disulfide reductase、glutathione reductase 及 catalase (CAT) 等抗氧化酵素活性因而能減輕 STZ 造成之胰臟組織氧化傷害，進而改善糖尿病大鼠症狀，而且紅麴發酵山藥對血糖之改善效果較紅麴發酵米及紅麴發酵薏仁為佳 (Shi and Pan, 2010a; Shi and Pan, 2010b)。

研究顯示肌肉組織的慢性發炎會導致胰島素抗性和 2 型糖尿病。過氧化物小體增植物啟動受體 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) 的配體會活化磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/Akt 途徑。

本研究室以腫瘤壞死因子- α (TNF- α ; 20 ng/mL) 誘導 C2C12 肌肉細胞產生胰島素抗性之細胞模式，探討 monascin 減輕胰島素抗性的機制。研究發現紅麴

的代謝產物 monascin (MS) 具抗發炎活性。

結果顯示，MS 抑制 p-JNK 的活性並且阻止 PPAR- γ 磷酸化，因此導致 PPAR- γ 活化和 PI3K/Akt 途徑被活化，最後 C2C12 肌肉細胞攝取 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino]-2-deoxy-D-glucose (2- NBDG) 增加。此外，在 PPAR- γ 拮抗劑 (GW9662) 的實驗，研究結果顯示，MS 可能作為 PPAR- γ 促效劑因而提高胰島素的敏感性。MS 的作用類似吡格列酮，穩定 PPAR- γ 的結構和減少 PPAR- γ 磷酸化，因而改善胰島素抗性 (Lee et al., 2011)。

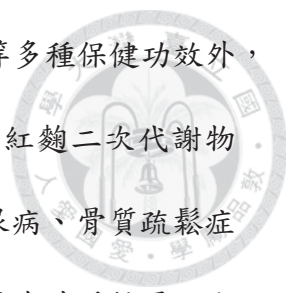
(四) 紅麴改善胰島素阻抗之可能機制

紅麴具有抗氧化作用。有研究指出，在 STZ 誘發糖尿病大鼠中，其體內血漿、紅血球、肝臟、腎臟的脂質過氧化會增加，且釋出自由基，增加體內氧化壓力，體內氧化壓力提高，胰島素阻抗也隨著增加。因此透過抗氧化酵素系統例如 glutathione、superoxide dismutase、catalase 降低 ROS，將有助於胰島素阻抗的改善。

八、研究大綱與目的

糖尿病是嚴重威脅人類身體健康的一種常見疾病，發病率日趨增高。糖尿病基本病理特點為胰島素分泌絕對或相對不足，或外周組織對胰島素敏感性下降，引起糖，脂肪，蛋白質代謝紊亂的一種全身性疾病。隨著病程發展，可以導致多組織多器官的慢性進行性病變，發生多種急、慢性併發症。

紅麴為傳統之發酵菌種，直至今日，紅麴在醫學領域與保健功效上之相關研究已多不勝數。紅麴發酵物中的色素分子已被證實具有良好的生物活性，其中黃



色素 monascin 與 ankaflavin 除了具抗發炎、抑制癌細胞生長等多種保健功效外，也具有抗動脈粥狀硬化，不易形成體脂肪等多種保健功效。紅麴二次代謝物 lovastatin 也具有抗發炎之功效，降低心血管疾病、中風、糖尿病、骨質疏鬆症及阿茲海默症等病之發病機率。本實驗室已證實紅麴發酵產物具有減緩糖尿病大鼠症狀之功效，且提升體內抗氧化酵素之活性。

因此，本研究主要利用體內動物實驗，評估紅麴黃色素 monascin 和 lovastatin 對過度糖化終產物 (advanced glycation end-products, AGEs) 誘導之動物胰島素阻抗之影響。近年來，過度糖化終產物與其受體 (receptor for AGEs, RAGE) 的相互作用所引發的病理生理效應越來越受到人們的重視。本研究以雄性 BALB/c 小鼠作為實驗動物分析 monascin 和 lovastatin 對 AGEs 誘導之動物胰臟、肝臟及腎臟中抗氧化酵素及促發炎細胞激素表現之調控及 AGEs 對胰島素訊號傳遞之影響，以瞭解 monascin 和 lovastatin 對 AGEs 誘導胰島素阻抗與胰臟 β 細胞功能之間關係，希冀 monascin 和 lovastatin 可開發成為減少胰島 β 細胞破壞，增加胰島素分泌之新穎治療第二型糖尿病之藥物。研究架構如圖 2-9 所示：

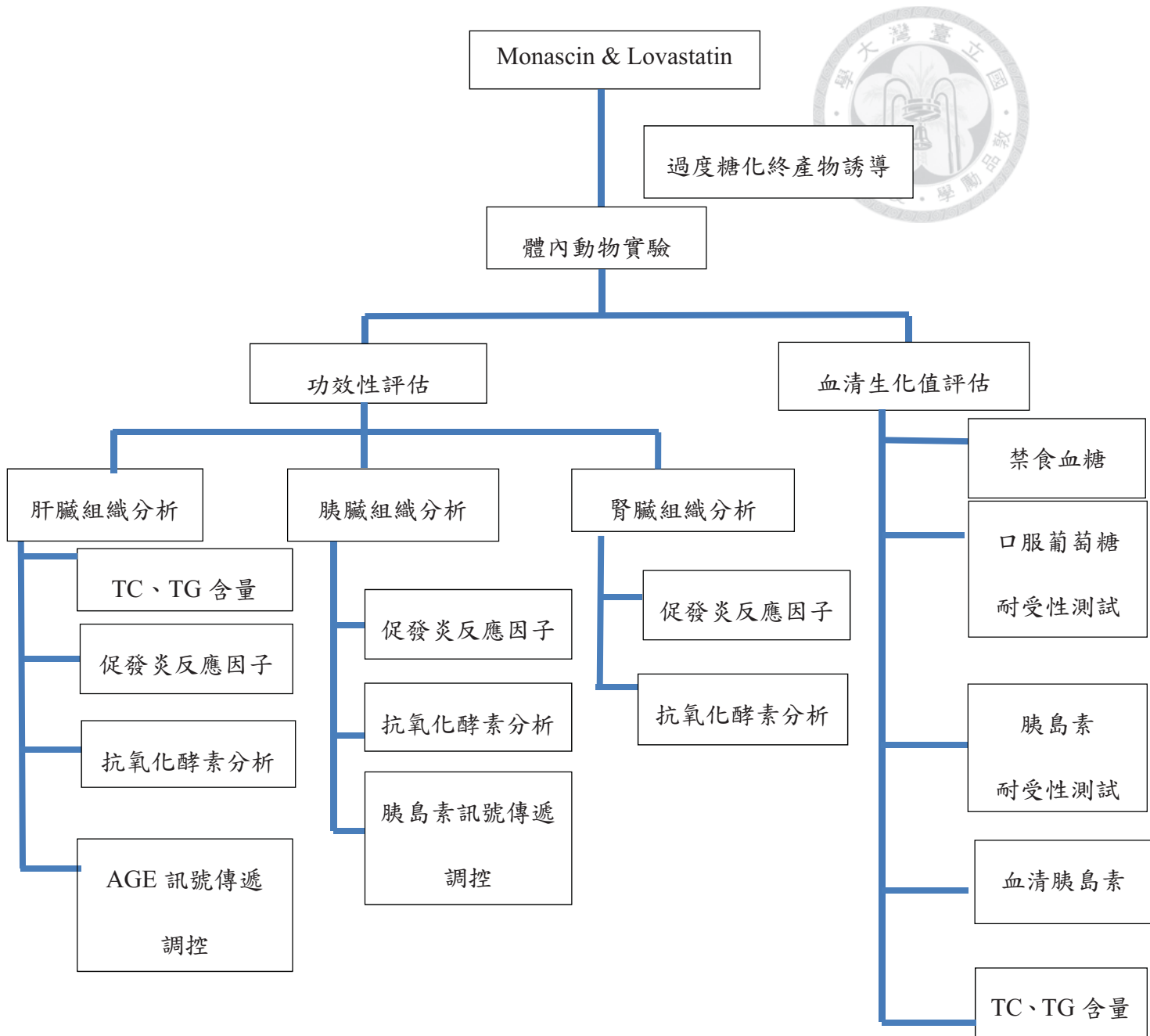


圖 2-9 本論文之研究架構

Fig. 2-9 The framework of the study

第三章 材料與方法



一、實驗材料

(一) 藥品試劑

1. D-glucose、bovine serum albumin (BSA)、Tris-HCl、dimethyl sulfoxide (DMSO)、N-acetylcysteine (NAC)、fructose 及 Triton-X 100 購自 Sigma 公司 (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)
2. NaOH 及 HCl 購自 Merck 公司 (Merck Co., Darmstadt, Germany)
3. Methanol 購自 Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ, USA)
4. Anti-p47phox antibody 及 anti-C/EBP β antibody 購自 Santa Cruz Biotechnology Inc., (Burlingame, CA, USA)
5. Anti-insulin antibody 購自 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)
6. Anti-AGE antibody 購自 Abcam (Cambridge, MA, USA)
7. Anti-rabbit antibody (secondary antibody) 購自 (GeneTex, Inc., San Antonio, TX, USA)
8. Lovastatin 購自生達化學制藥股份有限公司 (臺南, 臺灣)
9. Bio-Rad 蛋白質定量染劑購自 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA)
10. Monascin 由晨暉生技公司提供

(二) 儀器設備

1. 分光光度計 (Model U-2001, Hitachi Co., Tokyo, Japan)
2. 離心機 (Himac CR-21, Hitachi Co., Tokyo, Japan)
3. 純水製造機 (Milli-Q, Millipore Co., Molsheim, France)
4. 水浴恆溫槽 (Model DB, Deng Yng Co., Taipei, Taiwan)



5. 倒立式顯微鏡 (ECLIPSE TS100, Nikon Co., Tokyo, Japan)
6. ELISA reader (Thermo Labsystem, Beverly, MA, USA)
7. pH meter (Model SS-320, Tomy Co., Tokyo, Japan)
8. 滅菌釜 (Model SS-320, Tomy Co., Tokyo, Japan)
9. 數位相機 (COOLPIX5200, Nikon Co., Tokyo, Japan)
10. 超音波震蕩器 (Model 690D, ETL testing laboratories Inc., Cortland, NY, USA)
11. 均質機 (Model PRO 200, PRO Scientific Inc., Oxford, CT, USA)
12. 電子天平 (Model AG204, Mettler-Toledo Co., Greifensee, Switzerland)

(三) 其他

Monascin 由晨暉生技公司提供。實驗所用之樣品溶解於 DMSO 中，並控制其濃度低於 0.1% (v/v)。

(四) 溶液製備

Phosphate buffered saline (PBS)

藥品	重量 (g)
NaCl	80.1
KCl	2.0
KH ₂ PO ₄	2.0
Na ₂ HPO ₄	11.5

上述藥品加入 800 mL 逆滲透水中，調整 pH 至 7.2，加水定量至 1000 mL 為 10X stock。

二、實驗方法

(一) 過度糖化最終產物 (AGEs) 製備

研究中所使用的 AGEs 是由果糖 (fructose) 與牛血清蛋白 (BSA) 所合成之 AGEs, 其製備方法是用無菌的 BSA (60 mg/mL) 和果糖 (1.5 M) 溶於 0.2 M potassium phosphate buffer (pH 7.4, 含有 0.06% sodium azide)。取 100 μ L BSA 溶液、100 μ L 果糖溶液和 100 μ L 無菌水置於 1.5 mL 離心管, 並於 50°C 下反應 24 小時 (Wang et al., 2011)。

AGE 之濃度測定方法是將 BSA 和 AGE 之樣品利用 ELISA reader 測量 435 nm 波長之吸光值再根據 BSA 之濃度換算出 AGE 濃度。

(二) 動物實驗

1. 動物模式建立

(1) 實驗動物飼養與照料

研究中所用小鼠為平均體重 20 g 四周大 BALB/c 品系小鼠, 購自臺大醫院實驗動物中心, 4-5 周齡。採取自由進食方式, 保持飲用水及飼料充足, 每週測定飼料攝取量與體重, 每兩天換一次飲水與墊料, 並隨時維護動物房之清潔並保持安靜, 且遵循行政院農業委員會動物飼養細則與規定 (行政院農委會中華民國 99 年 1 月 27 日修正之動物保護法 (Animal Protection Law))。飼養時控制相對濕度 60%, 溫度控制於 25°C, 光照時間為 8:00-20:00 之 12 小時光照循環, 實驗為期 22 周。動物 (n=5~6) 分成:

(a) bovine serum albumin (BSA; 100 mg/kg bw; 每天進行 1 次腹腔注射)

(b) advanced glycation end-products (AGEs; 100 mg/kg bw; 每天進行 1 次腹腔注射)

(c) AGE + monascin (MS; 10 mg/kg bw; 每兩天進行一次腹腔注射)

(d) AGE + lovastatin (LOVA; 10 mg/kg bw; 每兩天進行一次腹腔注射)

(e) AGE + NAC (NAC; 100 mg/kg bw; 每兩天進行一次腹腔注射)

劑量選擇上， monascin 和 lovastatin 劑量參考本研究室 Lee 等人之前研究 (Lee et al., 2013)。BSA 組作為 control 組，因為 AGE 製作過程中使用到 BSA，所以選擇 BSA 作為 control 排除 BSA 本身可能造成的影響。NAC 是一種常用的抗氧化劑，作為本實驗的陽性對照組。NAC 劑量參考 Rana 等人的研究 (Rana et al., 2006)。NAC 的抗氧化作用是轉化為 GSH，而 GSH 則是合成體內最有效的抗氧化酵素所不可或缺的元素，有臨床研究證實，補充 NAC 能夠改善及預防與自由基相關疾病，如動脈硬化、缺氧性心肌病變、糖尿病、癌症、老年癡呆症等的發生及減緩惡化或提高癒後能力，同時也能調整免疫機能，改善過敏或抵抗力不佳的體質。

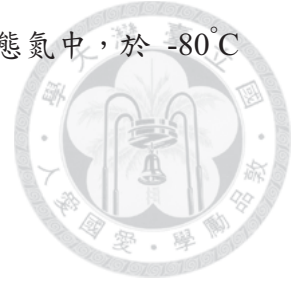
(2) 口服葡萄糖耐受試驗 (oral glucose tolerance test, OGTT) 及胰島素耐受試驗 (insulin tolerance test, ITT)

口服葡萄糖耐受試驗乃將老鼠禁食 8 小時後，測其空腹血糖值，再將老鼠以口服方式灌食葡萄糖水 (2 g/kg of bw) 及樣品後，測定 30、60、90 與 120 分鐘血糖變化。胰島素耐受試驗乃將老鼠禁食 4 小時後，測定空腹血糖，再以腹腔注射方式給予 insulin (0.5 U/kg bw)，然後測定 30、60、90 與 120 分鐘血糖變化，以探討動物對胰島素之敏感性。

(3) 動物犧牲與樣品採集

禁食 12 小時後，以臉頰採血法犧牲老鼠並取全血裝入 10 mL 含 EDTA 抗凝血管中，進行離心 (800 g, 15 min)。收集上層血清，儲存於 -20°C ，供日後測定血脂、血清胰島素與發炎因數。剪下胰臟、肝臟、心臟與腎臟。肝臟、胰臟與腎臟取下後先切出一小塊浸泡於 10% formaldehyde 固定，待後續進行組織切片

分析。剩餘之肝臟、胰臟及腎臟組織裝入夾鏈袋，迅速置於液態氮中，於 -80°C 保存，供日後測定促細胞發炎激素及抗氧化酵素含量。



2. 功效性評估

(1) 組織均質液製備

分別取 0.5 g 胰臟、肝臟及腎臟加入 9 倍 (w/v) 之磷酸緩衝溶液以組織均質機磨碎，於 4°C 下以 $12,000 \times g$ 離心 5 分鐘，取上清液為組織均質液，儲存於 -80°C 下以供日後分析抗氧化酵素、促發炎細胞激素。

(2) 肝臟脂質測定

取動物肝臟組織均質液樣本以三酸甘油酯 (triglyceride, TG)、總膽固醇 (total cholesterol, TC) 之市售套組 (Randox, Antrim, UK) 進行測定。

1. TG 測定方法：

分別取 $5 \mu\text{L}$ 序列稀釋之標準品及 $5 \mu\text{L}$ 樣品，加入 $200 \mu\text{L}$ 酵素試劑並混合均勻，於室溫反應 10 分鐘。在 60 分鐘內利用 ELISA reader 測定標準品及樣品於波長 500 nm 之吸光值，繪製標準曲線以推算出樣品濃度。

2. TC 測定方法：

分別取 $5 \mu\text{L}$ 序列稀釋之標準品及 $5 \mu\text{L}$ 樣品，加入 $200 \mu\text{L}$ 酵素試劑並混合均勻，於室溫反應 10 分鐘。在 60 分鐘內利用 ELISA reader 測定標準品及樣品於波長 500 nm 之吸光值，繪製標準曲線以推算出樣品濃度。

(3) 血清生化值評估

1. 血清脂質測定



取動物血清樣本以三酸甘油酯 (triglyceride, TG)、總膽固醇 (total cholesterol, TC) 之市售套組 (Randox, Antrim, UK) 進行測定。

2. 血清胰島素測定

利用 Mouse Insulin ELISA Kit (Mercodia, Uppsala, Sweden) 分析血清胰島素，以空腹胰島素/血糖比值作為胰島素敏感度指標。

利用酵素免疫分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 測定血清胰島素濃度，96 孔盤上已先固定一層 insulin 抗體，可與樣品中的 insulin 作用。將 insulin 結合至孔盤後，加入與過氧化酶 (peroxidase) 鍵結之 insulin 抗體，最後加入 peroxidase，受質反應呈色。

先將 50 mL conjugate solution stock 與 500 mL buffer 混合，製成 conjugate solution，並將 40 mL washing concentrate 與 800 mL 逆滲透水混合，製成 wash buffer。取 25 μ L 血清樣品加至 ELISA 96 孔盤中，接著加入 50 μ L conjugate solution，於室溫下反應 2 小時。以 wash buffer 洗去非專一性結合物質，加入 200 μ L 3,3',5,5'-tetramethy-benzidine (TMB) 做為 peroxidase 受質，於室溫下反應 15 min。最後加入 50 μ L stop solution (含 1 M H_2SO_4) 終止反應，混合均勻後，利用 ELISA reader 測量 450 nm 波長之吸光值，並與標準曲線比較，進行定量。

(4) 組織病理切片染色 (Hematoxylin-Eosine 染色)

蘇木紫 (hematoxylin) 為嗜鹼性染料，能將細胞核染成紫色；伊紅 (eosine) 為嗜酸性染料，將細胞質染成淡紅色，以進行病理切片之判讀。

將切取之小鼠肝臟組織以 10% 中性福馬林浸泡固定，進行石蠟包埋與切片 (3-5 μ m/片)。將組織切片置於 superfrost coating slide 上，以 45°C 烘片隔夜。再將切片置於 xylene 中脫蠟 3 次，每次 5 分鐘。隨後依序置入 100%、95%、90%、

80%、60%之乙醇溶液中去除 xylene。滴加 hematoxylin solution 蓋過切片表面約 1 分鐘，以慢速水流洗。滴加 eosine solution，再移至水中水洗，以完成染色。切片再依序浸於 50%、75%、95%、無水之乙醇溶液及 xylene 各約 1 小時以完成脫水。切片滴加 Canada Balsam-Xylene solution，加蓋玻片靜置過夜，完成封片。病理切片以光學顯微鏡觀察及照相。

(5) 蛋白質濃度測定

利用 Bio-Rad Dc protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) 進行蛋白質濃度之測定。將 5 μ L 蛋白質樣品與 25 μ L reagent A 及 200 μ L reagent B 混合均勻後，置於室溫下反應 10 分鐘。利用 ELISA reader，於波長 750 nm 下，測定溶液之吸光值。以 BSA 作為標準品製作蛋白質濃度標準曲線。製作標準曲線，將樣品吸光值代入，計算蛋白質濃度。

(6) 發炎激素測定

取適量肝臟和胰臟組織進行均質及蛋白質定量後儲存於 -80°C 以供試驗。以 ELISA kits (eBioscience, San Diego, CA, USA) 偵測發炎相關細胞激素 tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-1 β (IL-1 β)、interleukin-6 (IL-6) 含量。方法如下：將 capture antibody 以 1:250 稀釋倍率分別 coating 於 96 孔盤中， 4°C 放置過夜。隔日倒幹 ELISA plate，以 260 μ L wash buffer 洗五次，將 buffer 倒幹，各孔洞加入 200 μ L block buffer，室溫靜置一小時，將 buffer 倒幹，以 wash buffer 洗五次。接著各孔洞加入 200 μ L 樣品於各濃度之標準品，室溫靜置 2 小時，接著以 wash buffer 洗五次，各孔洞中加入以 1:250 稀釋倍率之 detection antibody，室溫下反應 1 小時後以 wash buffer 洗五次，加入 avidin-HRP，於室溫反應 30

分鐘後以 wash buffer 洗七次，再加入反應基質 TMB 待其作用，15 分鐘後以 stop solution 終止反應，利用 ELISA reader，於 450 nm 和 570 nm (校正) 下測定其吸光值。製作標準曲線，將樣品吸光值代入，計算其含量。



(7) 血清肝、腎功能指標分析


ALT，此種轉胺酶平時僅少量存在血清中，當組織細胞受到損傷，則酵素活性立即升高。其升高的程度端視肝臟組織傷害的範圍與強度，常被用來評估肝功能。肌酸酐 (creatinine) 是含氮化物，為肌酸的代謝產物，大都由腎臟排出，與 blood urea nitrogen (BUN) 及 albumin 同為腎功能之指標。鼠體犧牲採血後，進行離心，取血清部分，使用生化自動分析儀進行 ALT、CRE、BUN、albumin 含量分析。

(8) 抗氧化酵素活性分析

1. 麩胱甘肽 (glutathione, GSH) 含量分析

取適量胰臟、肝臟和腎臟組織液進行試驗，以 glutathione assay kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) 偵測 GSH 含量。方法如下：於各孔洞中加入 50 μ L 樣品與各濃度之標準品，配置反應液：於 50 mL 離心管中加入 11.25 mL MES buffer, 0.45 mL reconstituted cofactor mixture, 2.1 mL reconstituted enzyme mixture, 2.3 mL 逆滲透水, 0.45 mL reconstituted 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB)。配好混勻後，每孔洞加入 150 μ L 反應液。利用 ELISA reader，於 405 nm 下每隔 5 分鐘測定其吸光值，測定 30 分鐘內的吸光值變化。取 25 分鐘時的數據製作標準曲線，將樣品吸光值代入，計算其含量。

2. 觸酶 (catalase, CAT) 活性測定



取適量胰臟、肝臟和腎臟組織液進行試驗，以 catalase assay kit (Cayman Chemical Company) 偵測 CAT 活性。方法如下：於各孔洞中加入 100 μL assay buffer，30 μL methanol 和 20 μL 樣品與各濃度之標準品。接著於各孔洞中加入 20 μL hydrogen peroxide 於室溫下振盪反應 20 分鐘。接著於各孔洞中加入 30 μL potassium hydroxide 終止反應並且加入 30 μL catalase purpald (chromagen) 各孔洞中加入 10 μL catalase potassium periodate 於室溫下振盪反應 5 分鐘。利用 ELISA reader，於 540 nm 下測定其吸光值，製作標準曲線，將樣品吸光值代入，計算其活性。

3. 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性測定

取適量胰臟、肝臟和腎臟組織液進行試驗，以 SOD kit (Cayman Chemical Company) 進行活性測定。方法如下：於各孔洞中加入 200 μL radical detector 及各濃度之標準品。接著於各孔洞中加入 20 μL xanthine oxidase 常溫下反應 20 分鐘。利用 ELISA reader，於 450 nm 下測定其吸光值，製作標準曲線，將樣品吸光值帶入，計算其活性。

(9) 免疫組織化學染色

先將切片經 xylene 及 ethanol 脫蠟處理，接著以 3% H_2O_2 破壞過氧化酶活性，再經 5% 脫脂牛奶進行填補 (blocking) 後，以一級抗體 (primary antibody) 處理 12 小時並經由 PBS 清洗後，再以二級抗體 (secondary antibody) 處理 1 小時，最後再以 3'-3-diaminobenzene (DAB) chromogen 反應至呈色，再以 haematoxylin 進行復染，切片經脫水乾燥後進行封片。

採用 Image-Pro Plus 圖像分析軟體，切片在光鏡下按統一放大倍數 (10 X

40 倍) 進行分析。將每張切片按等距抽樣原則隨機攝取 5 個視野，輸入計算機作為測定圖像。計算陽性面積占總切片面積之比例。



(10) 即時定量聚合酶鏈反應 (real-time PCR)

使用儀器為 StepOne™ Real-time PCR system (Applied Biosystems)。取 5 μL 的 complimentary DNA 作為母股，依序加入 10 μL Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)、0.5 μL 20 mM primer (forward and reverse) 及 4 μL DEPC-dH₂O, 總體積為 20 μL 。反應條件設定為: 95°C 15 分鐘，接著以 95°C 15 秒, 60°C 1 分鐘的條件，作用 40 個 cycle。本研究所偵測的基因皆以 GAPDH 當做 internal control，並以 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 方法計算各個基因 mRNA 表現進行相對定量。使用之 primers (Yessoufou et al., 2010; Zhang et al., 2011; Wu et al., 2006) 如 Table 3-1 所示。

(五) 生物統計分析方法

所有實驗皆進行三重復，實驗結果以平均值 (mean) \pm 標準偏差 (standard deviation, SEM) 表示，以 SPSS 進行統計分析，並以 Student's t-test 作顯著性差異之比較，以 $p < 0.05$ 作為具有顯著性差異。



表 3-1：即時定量聚合酶鏈反應 (real-time PCR) 所使用之 primers

Table 3-1: Primers used in real-time PCR

Primers	Sense	Antisense
PDX-1	5'-CTACTGCCTTCGGGCCTTAG-3'	5'-TTGGAACGCTCAAGTTTGTACC-3'
GLUT2	5'-CTGGGTCTGCAATTTGTCA-3'	5'-TGTAACAGGGTGAAGACCA-3'
GAPDH	5'-ACGACCCCTTCATTGACC-3'	5'-AGACACCAGTAGACTCCACG-3'

第四章 結果與討論



第一節 Monascin 及 lovastatin 對 AGE 在肝臟中累積之影響

本研究以免疫組織化學 (IHC) 染色評估 AGE 在肝臟中累積程度 (褐色產物為正反應), 結果如圖 4-1 所示, AGE 組小鼠肝臟組織中 AGE 含量均增高, 顯示腹腔注射 AGE 會增加肝組織中的 AGE 含量 (IHC 陽性染色結果呈棕褐色)。與 AGE 組相比較, MS, LOV 和 NAC 均可減少肝臟 AGE 含量, 顯示 MS, LOV 和 NAC 對肝臟中的 AGE 累積有清除效果。各組肝臟中 AGE 累積程度量化結果如圖 4-2 所示, 22 周的 AGE 誘導使肝臟中 AGE 顯著高於控制組 (BSA 組) ($p < 0.05$), 同時腹腔注射 MS, LOV 與 NAC 可分別減少肝臟中 AGE 濃度, 降低率分別為 50%, 57% 與 37%, 其中 MS 與 AGE 相比有顯著差異 ($p < 0.05$)。NAC 組別跟 AGE 組相比也有降低肝臟中 AGE 累積之功效。分析以上結果, MS, LOV 與 NAC 具有降低 AGE 在肝臟中累積之效果, 且可能對 AGE 所導致高血糖新生成內源性 AGE 有抑制作用。

第二節 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導小鼠之胰島素抗性影響

一、禁食血糖

目前防治第 2 型糖尿病之工作重點為在葡萄糖耐受性不佳 (impaired glucose tolerance, IGT) 這一可逆性代謝異常階段進行預防。因為隨著經濟的發展, 生活方式的改變, 糖尿病的患病率不斷攀升, 並且全球有 IGT 患者將在 10 年內發展為第 2 型糖尿病, 這促發了第 2 型糖尿病防治策略的轉變。有研究顯示, 在 IGT 階段進行藥物或生活方式幹預, 可降低或延緩糖尿病的發生。胰島素阻抗和 β 細胞分泌缺陷是其發病的二個主要環節, 在 IGT 階段, β 細

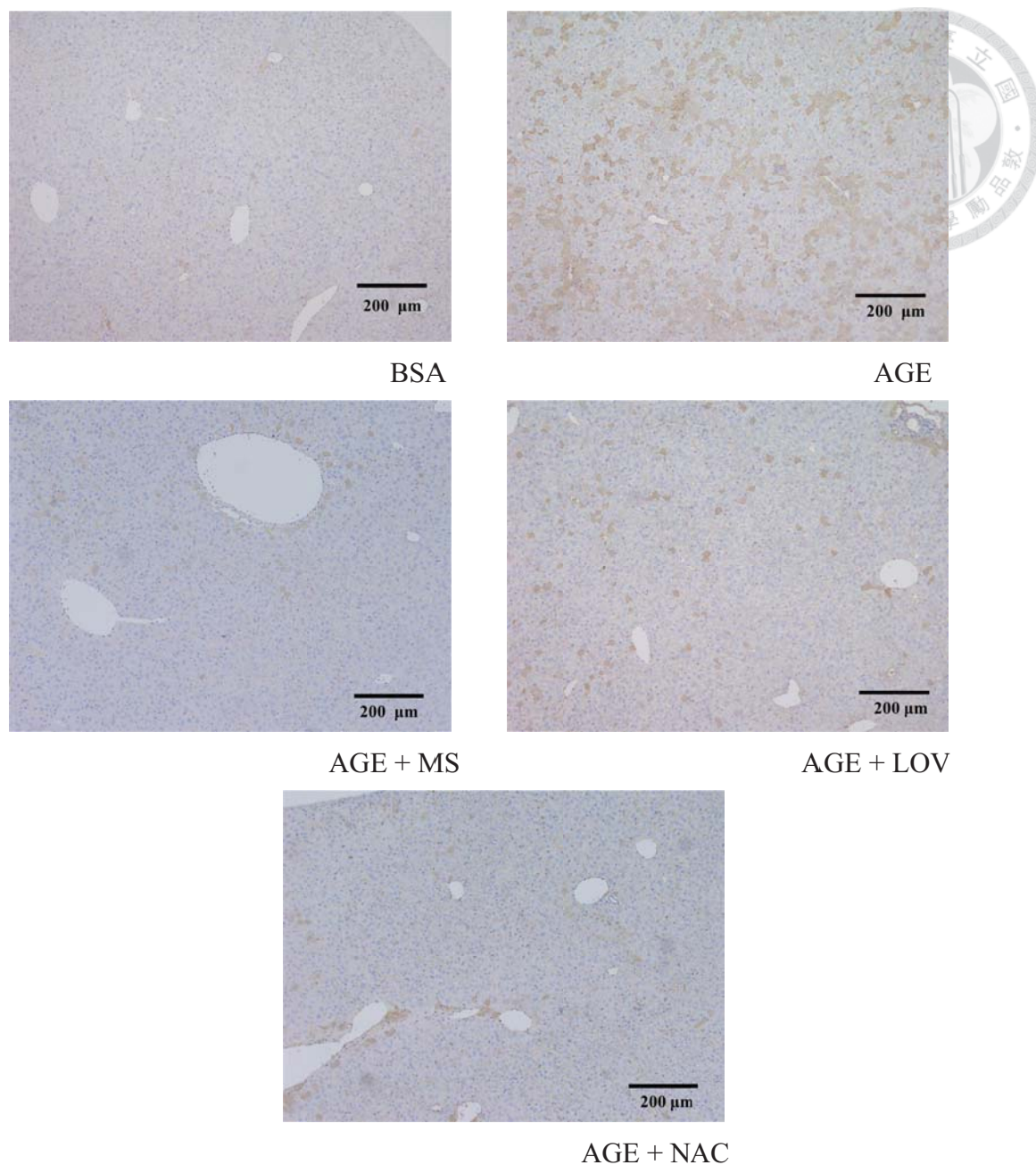


圖 4-1 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導小鼠肝臟 AGE 累積之影響。圖中比例尺大小為 200 μm

Fig. 4-1 The effect of monascin and lovastatin on hepatic AGE level of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE + MS : AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE + LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE + NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group

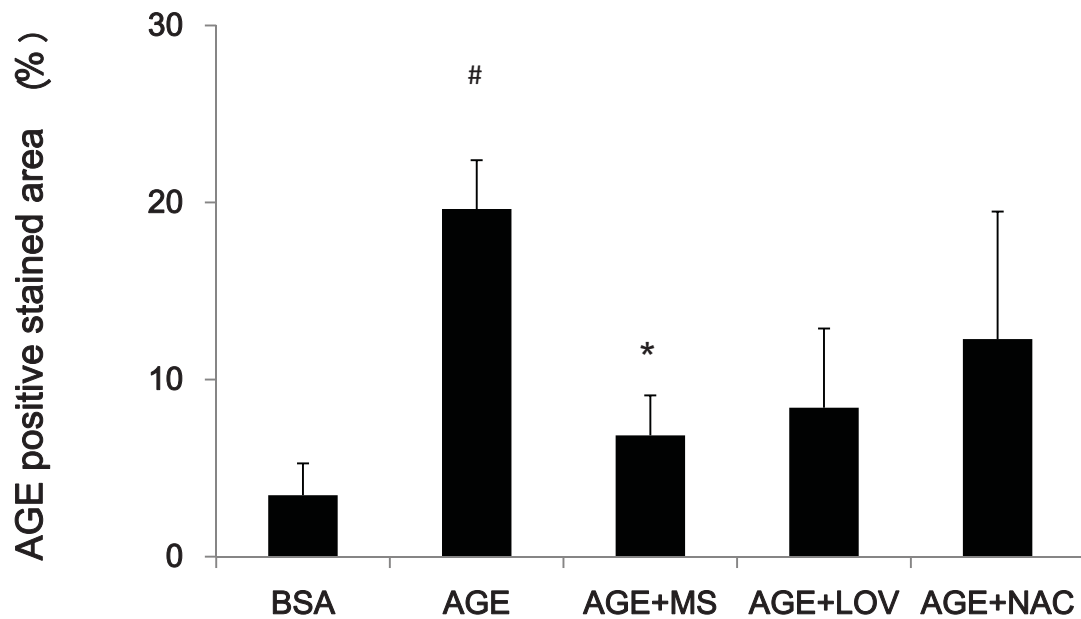


圖 4-2 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導小鼠肝臟 AGE 累積之影響

Fig. 4-2 The effect of monascin and lovastatin on hepatic AGE of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE + MS : AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE + LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE + NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group

[#] $p < 0.05$, significantly different from control (BSA) group; ^{*} $p < 0.05$, significantly different from AGE group

胞仍能通過增加胰島素的分泌代償胰島素阻抗，使血糖維持在相對較低水準。因此對 IGT 進行幹預的藥物最好是在降低高胰島素血症時又能降低血糖，即改善胰島素阻抗。

各組禁食血糖結果如圖 4-3 所示，與控制組 (BSA 組) 相比，單純以 AGE 誘導顯著增加血液中葡萄糖濃度 ($p < 0.01$)，同時腹腔注射 MS 與 LOV 均有降低血液中葡萄糖濃度之效果，下降率分別為 15% 與 23%，其中 LOV 較 MS 更具降低血中葡萄糖之功效，且達顯著差異 ($p < 0.05$)，雖 MS 效果不及 LOV，但也達顯著差異 ($p < 0.01$)。NAC 組也有降低血液中葡萄糖濃度之效果，下降率為 16%，表明服用抗氧化劑有降低血糖之效果。

二、口服葡萄糖耐量實驗 (oral glucose tolerance test, OGTT) 及胰島素耐受實驗 (insulin tolerance test, ITT)

口服葡萄糖耐量實驗 (oral glucose tolerance test, OGTT) 是檢查血糖調節功能的一種方法。正常人服用葡萄糖後，血糖濃度暫時性升高但在 2 小時內血糖濃度又可恢復至正常水準。若因內分泌功能失調等因素引起糖代謝異常時，食入葡萄糖後，血糖濃度可急劇升高，而且短時間內不能恢復到原來的濃度水準，稱為葡萄糖耐受失常。臨床上對症狀不明顯的患者，可採用口服葡萄糖耐量試驗來判斷有無葡萄糖代謝異常。

各組 OGTT 結果如圖 4-4 所示，在 0-30 分鐘內，AGE 組的血糖濃度有明顯上升之情形，且與控制組 (BSA 組) 相比達顯著差異 ($p < 0.001$)，且血糖降低速度顯著低於 MS 組與 LOV 組。NAC 組跟 AGE 組相比血糖上升趨勢較弱，且血糖回覆速度較快，表明抗氧化劑可提升小鼠對於葡萄糖耐受性。從 OGTT 的結果可看到本研究成功誘導出高血糖的糖尿病動物模式，葡萄糖在糖尿病小鼠

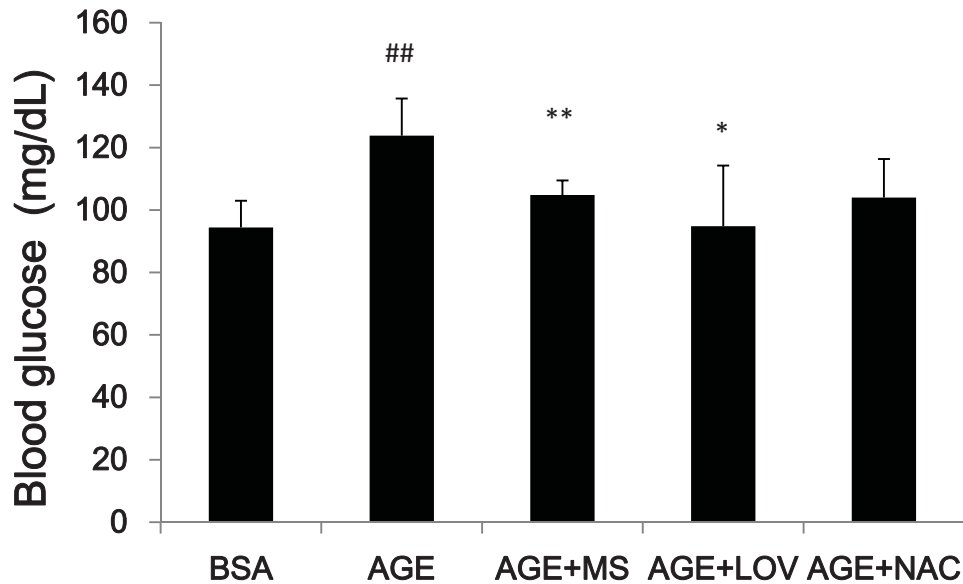


圖 4-3 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠禁食血糖之影響

Fig. 4-3 The effect of monascin and lovastatin on the blood glucose level of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE+ MS : AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE+LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE+NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group

$p < 0.01$, significantly different from control (BSA) group; ** $p < 0.01$, significantly different from AGE group; * $p < 0.05$, significantly different from AGE group

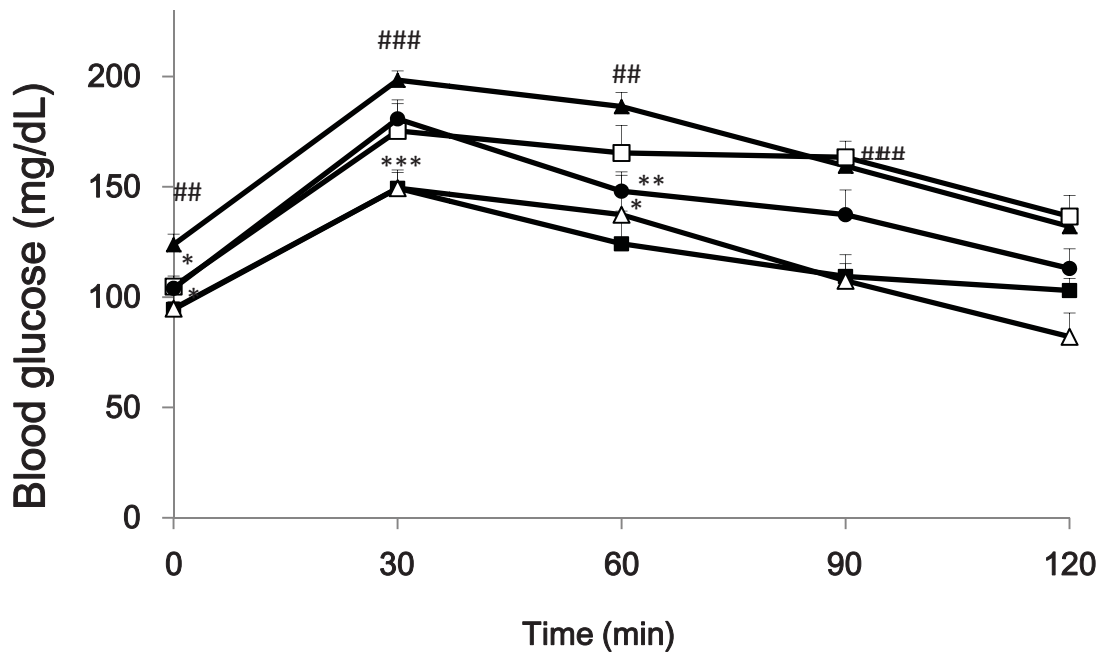



圖 4-4 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導糖尿病小鼠 OGTT 之影響

Fig. 4-4 The effect of monascin and lovastatin on oral glucose tolerance test of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

BSA : ■ AGE : ▲ AGE+MS: □ AGE+LOV : △ AGE+NAC : ●

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE+ MS: AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE+LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE+NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group

####p < 0.001, significantly different from control (BSA) group; ##p < 0.01, significantly different from control (BSA) group; ***p < 0.001, significantly different from AGE group; **p < 0.01, significantly different from AGE group; *p < 0.05, significantly different from AGE group



血漿中累積的量顯著高於正常小鼠，可知糖尿病小鼠體內組織對於葡萄糖利用率不佳，無法有效清除葡萄糖。糖尿病小鼠糖代謝異常可能有兩方面原因：(1) 葡萄糖無法刺激胰島素分泌，這有可能是血中的葡萄糖無法被 GLUT2 攝入到胰臟 β 細胞中，胰島素就無法被刺激分泌，血中葡萄糖濃度就無法降低；(2) 身體組織對於胰島素產生阻抗，無法接受胰島素訊號，進而無法攝入葡萄糖到細胞中利用，葡萄糖就會累積在血漿中，造成血糖升高。

本研究利用胰島素耐受性試驗 (insulin resistance test, ITT) 評估 MS 和 LOV 對胰島素敏感性之影響。ITT 為檢測胰島素敏感性之指標。ITT 是藉由觀察曲線變化，藉以得知每隻小鼠對胰島素的敏感度差異；若在注射完胰島素後，血糖濃度並未降低，即表示細胞無法接受到胰島素所攜帶的訊號。各組 ITT 結果如圖 4-5 所示，腹腔注射 0.5 U/kg bw 之胰島素之後，在 30 分鐘內，AGE 組別之血糖下降之情形不及 MS 組和 LOV 組。且 MS 組血糖有明顯下降之情形，並且下降之情形一直持續到 60 分鐘且與 AGE 組相比達顯著差異 ($p < 0.001$)，而 LOV 組在 90 分鐘時血糖已恢復至正常水準，回復速度較 MS 快。NAC 之效果不及 MS 與 LOV。證實 MS 和 LOV 都對 AGE 造成胰島素阻抗之情形有顯著改善之功效。

三、血清胰島素

由 OGTT 和 ITT 的實驗結果得知，AGE 組產生了胰島素阻抗之情形。研究指出，胰島素阻抗會導致胰島素敏感性減弱，因此需要分泌更多的胰島素造成血清中胰島素濃度升高。AGE 所造成的高血糖與遊離脂肪酸 (free fatty acid)，將影響 β 細胞對葡萄糖的利用，進而影響葡萄糖刺激胰島素分泌

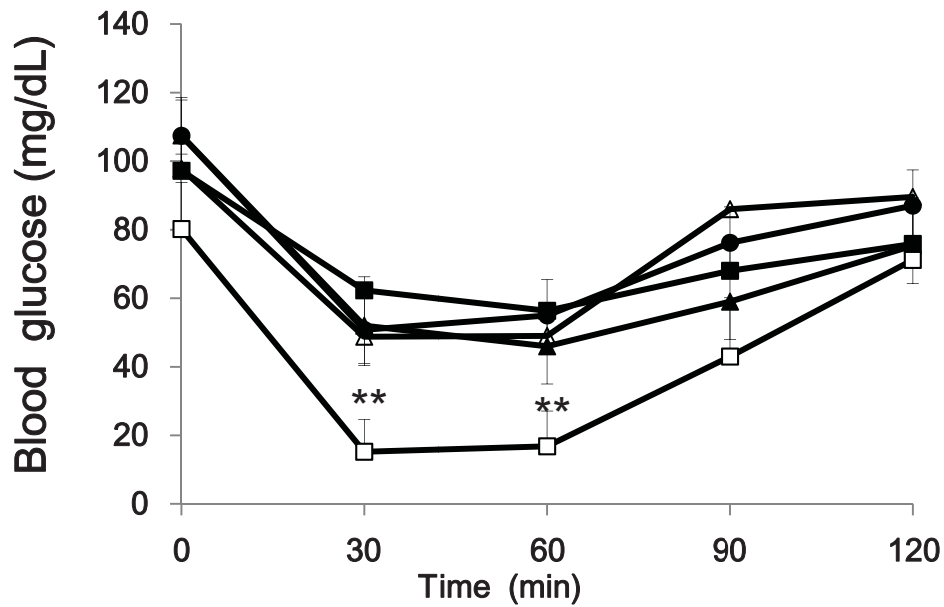


圖 4-5 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導糖尿病小鼠 ITT 之影響

Fig. 4-5 The effect of monascin and lovastatin on oral glucose tolerance test of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

BSA : ■ AGE : ▲ AGE+MS: □ AGE+LOV : △ AGE+NAC : ●

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE+ MS: AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE+LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE+NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group

**p < 0.01, significantly different from AGE group

(glucose-stimulated insulin secretion, GSIS)，造成胰島 β 細胞的補償作用，為分泌更多的胰島素以維持正常血糖值，使胰島 β 細胞的功能與體積增加，最後造成胰島 β 細胞的功能損傷及胰島素阻抗的情形。

各組血清胰島素結果如圖 4-6 所示，AGE 的組別胰島素量較控制組 (BSA 組) 有上升之情形，可能因為高血糖的情況下會促使 AGE 組之胰島素分泌。NAC 組跟 AGE 組相比血清中胰島素濃度上升 16%，表示 NAC 可能由於血糖較高刺激了胰島素的分泌。以 MS 與 LOV 處理可減輕 AGE 誘導動物血清中胰島素濃度升高之情形，下降率分別為 36% 與 7%。

四、HOMA-IR 指數

Matthews 等人提出 homeostatic model assessment (HOMA)，該公式利用休息狀態的空腹胰島素值及血糖值依下列方式計算出胰島素抗性與 β 細胞功能 (Matthews et al., 1985)。HOMA 之模型基於下列觀察：常人於空腹狀態下， β 細胞僅以 6% 之最大胰島素分泌速率即可維持穩定的血糖值。故此法較不受 β 細胞功能影響。在空腹狀態下，血糖和胰島素濃度反映出肝臟葡萄糖輸出和胰島素分泌的回饋平衡關係。在胰島素阻抗 (如肥胖) 下，空腹胰島素濃度會增加，肝臟胰島素阻抗會增加肝臟葡萄糖輸出。公式為 $HOMA-IR\ index = \text{insulin} (\mu\text{U}/\text{mL}) \times \text{glucose} (\text{mmol}/\text{L}) / 22.5$ 。正常值為 1-2.8。若 HOMA-IR 指數高於 2.8，說明產生了胰島素阻抗之情形。

各組 HOMA-IR 如圖 4-7 所示，22 周的 AGE 誘導 AGE 組 HOMA-IR 指數為 3.2，超過 2.8 標準值，而 MS 和 LOV 處理組 HOMA-IR 指數顯著低於 AGE 組，分別為 1.7 和 2.3。NAC 處理組 HOMA-IR 指數為 2.6。NAC 處理之

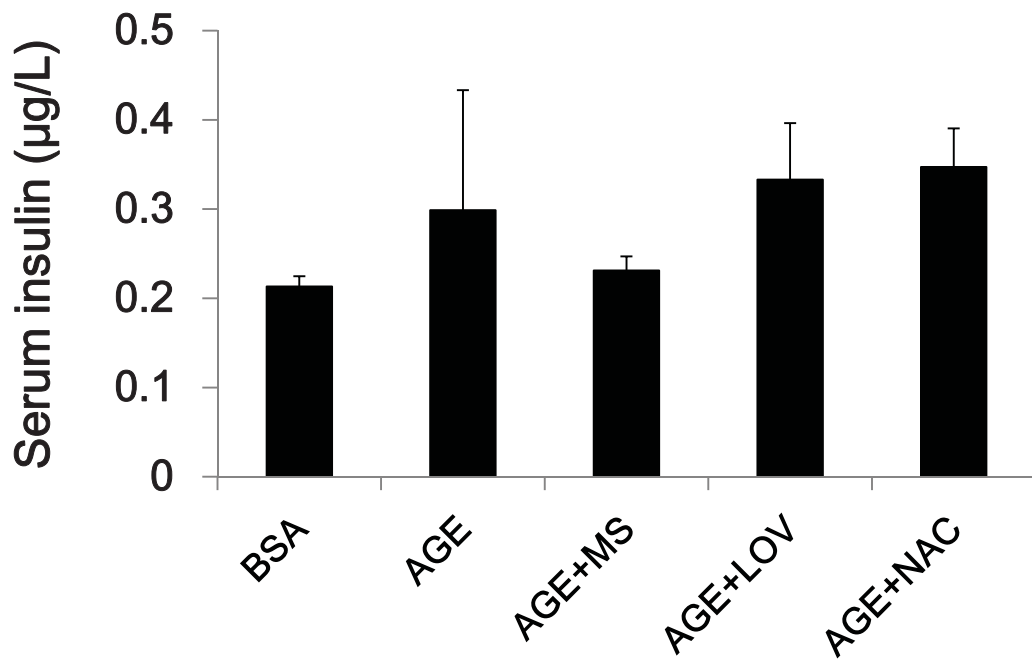


圖 4-6 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠血清胰島素影響

Fig. 4-6 The effect of monascin and lovastatin on serum insulin of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE+ MS: AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE+LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE+NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group

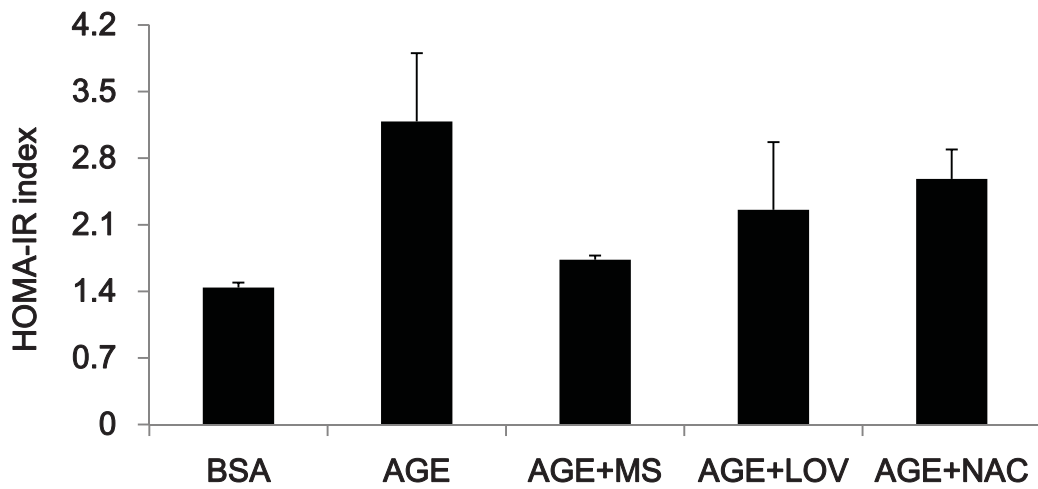


圖 4-7 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導糖尿病小鼠 HOMA-IR index 之影響

Fig. 4-7 The effect of monascin and lovastatin on HOMA-IR index of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

BSA: control group, AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE+ MS: AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE+LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE+NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group

效果不及 MS 與 LOV。綜合以上結果，經過 22 周的 AGE 誘導使小鼠產生明顯胰島素阻抗之情形，而 MS 和 LOV 有顯著改善之效果。



第三節 Monascin 及 lovastatin 對胰島素蛋白質表現之影響

一、胰島素蛋白質之表現

各組結果如圖 4-8 所示，由結果中可以看出 AGE 誘導老鼠胰島素染色較淺，胰島面積較控制組 (BSA 組) 和藥物處理組別小，顯示 22 周的 AGE 誘導對胰島中胰島素表現有抑制作用。

各組免疫組織化學染色量化結果如圖 4-9 所示，22 周的 AGE 誘導使胰島中胰島素蛋白質表現低於控制組 (BSA 組)，同時腹腔注射 MS 與 LOV 可分別增加胰臟中胰島素蛋白質表現，增加率分別為 321% 與 153%。MS 可顯著增加胰島素蛋白質之表現 ($p < 0.05$)。NAC 處理組之胰島素蛋白質表現量也高於 AGE 組，增加率為 90%。從本研究實驗結果得知，AGE 會透過抑制胰島中胰島素的蛋白質表現對 β 細胞功能造成傷害，綜合血清胰島素之結果，AGE 可能藉由直接影響胰島素合成而並沒有對高血糖刺激的胰島素分泌功能產生影響。而 MS 和 LOV 對胰島中蛋白質表現有顯著提升之作用。

二、PDX-1 (pancreatic duodenal homeobox-1, PDX-1) mRNA 表現

胰臟內有許多轉錄因子，調控著不同的生化作用，例如：differentiation、proliferation、apoptosis，糖尿病患者之胰臟中轉錄因子中常見不正常的表現，因此也就會造成 β 細胞功能不成熟。PDX-1 是 β 細胞內重要的轉錄因子，調控著 β 細胞內許多和 glucose 代謝、insulin 產生有關的基因，包括 insulin、glucokinase、GLUT2，它們也調控著 β 細胞的 neogenesis 和 differentiation，也許也調控

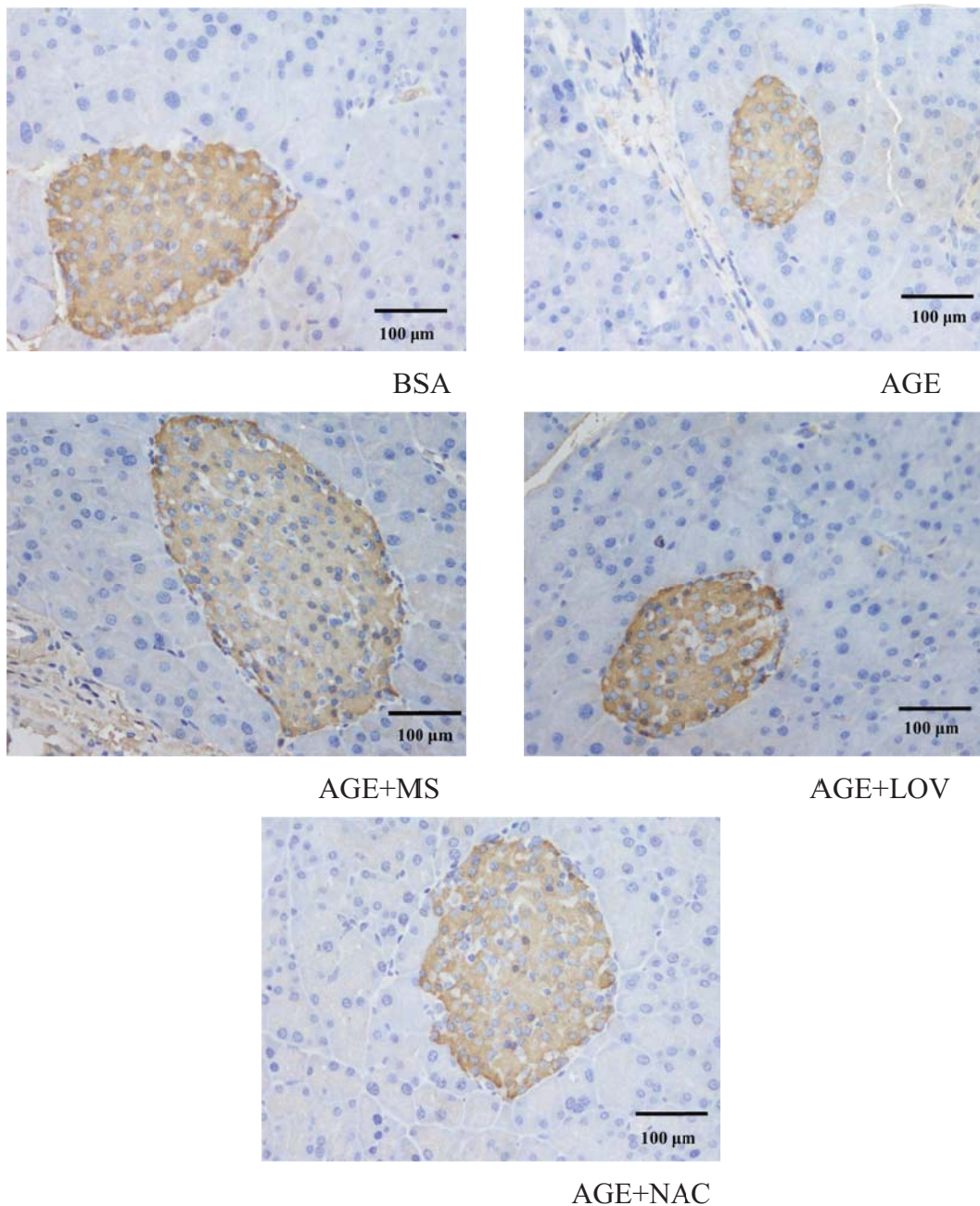


圖 4-8 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠胰島中胰島素表現之影響圖中比例尺為 100 μm

Fig. 4-8 The effect of monascin and lovastatin on islet insulin of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE +MS : AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE + LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE + NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group

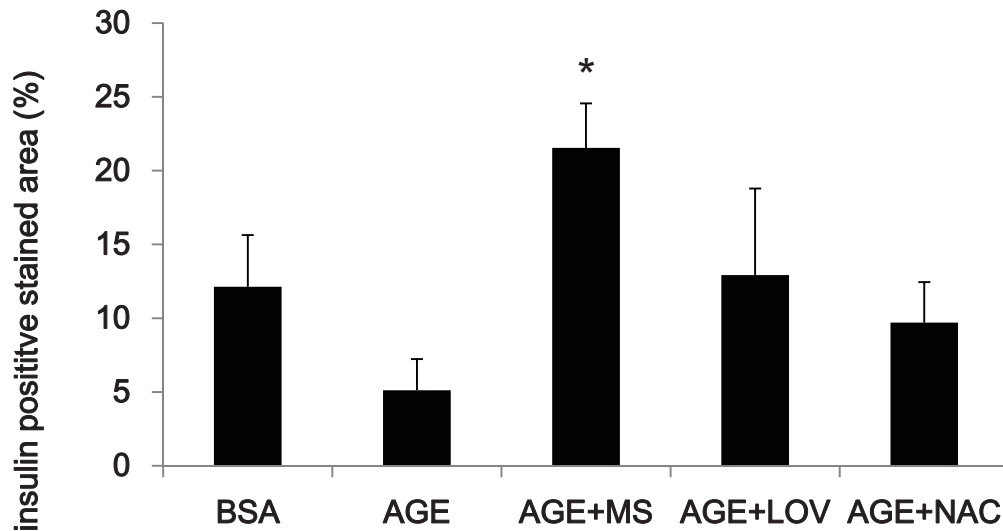


圖 4-9 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠胰島素表現之影響

Fig. 4-9 The effect of monascin and lovastatin on islet functions in vivo. immunohistochemical analysis of pancreatic islets of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE+ MS: AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE+LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE+NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group

* $p < 0.05$, significantly different from AGE group;

apoptosis，是使 β 細胞成熟、維持功能不可或缺的因子。有研究指出 PDX-1 的 DNA binding 活性減少時，將使得 β 細胞的功能惡化，導致慢性高血糖。Olson 等人指出氧化壓力會通過影響 PDX-1 結合到胰島素啟動子上從而影響胰島素基因表現 (Olson et al., 1993; 1995)。

本研究利用 real-time PCR 偵測各組 PDX-1 mRNA 表現，並以 GAPDH 作為內參。各組 PDX-1 mRNA 結果如圖 4-10 所示，AGE 組 mRNA 表現水準與 BSA 組差異不大，可能 AGE 沒有直接影響 PDX-1 的 mRNA 表現量，而是透過影響 PDX-1 蛋白質表現，或是 PDX-1 與下游基因結合之能力，從而抑制胰島素的合成。MS 和 LOV 對 PDX-1 mRNA 表現有提升之效果，提升率分別為 81% 和 67%。NAC 處理組之 PDX-1 mRNA 跟 AGE 組相比也有提升之效果，提升率為 23%。MS 與 LOV 處理組提升 PDX-1 mRNA 之效果好於 NAC 處理組。

Shu 等人通過 INS-1 細胞 (大鼠胰島素瘤細胞) 實驗證實 AGE 不會影響 PDX-1 的 mRNA 表現量，而是降低 PDX-1 蛋白質表現造成 β 細胞功能受損 (Shu et al., 2011)。

三、CCAAT enhancer binding protein β (C/EBP β) 之表現

研究指出 C/EBP β 表現量提升會造成細胞的 ER stress，並且在糖尿病小鼠胰島中有明顯上升之情形 (Matsuda et al., 2010, Meir et al., 2010)。而且，C/EBP β 活化是造成 INS-1 細胞糖脂毒性 ER stress 機轉之一 (Oh et al., 2013)。且 C/EBP β 是與 PDX-1 表現有關之重要調控因數，對 PDX-1 表現有負調控之作用。

本研究以免疫組織化學 (IHC) 染色評估 C/EBP β 在肝臟中表現程度 (褐色

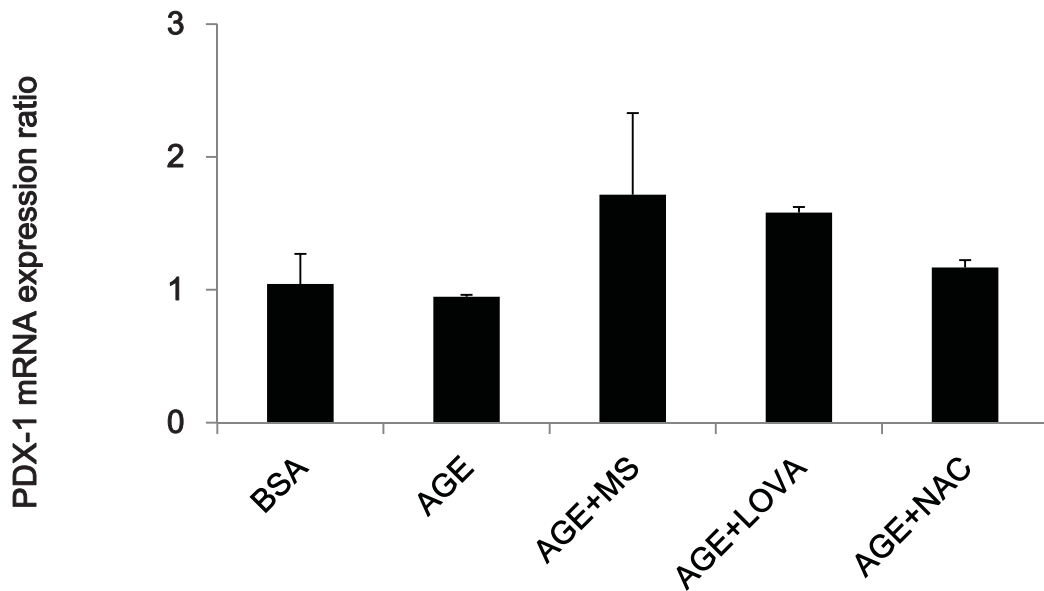


圖 4-10 Monascin 及 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠 PDX-1 mRNA 表現量影響

Fig. 4-10 The effect of monascin and lovastatin on the PDX-1 mRNA level of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE+ MS: AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE+LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE+NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group

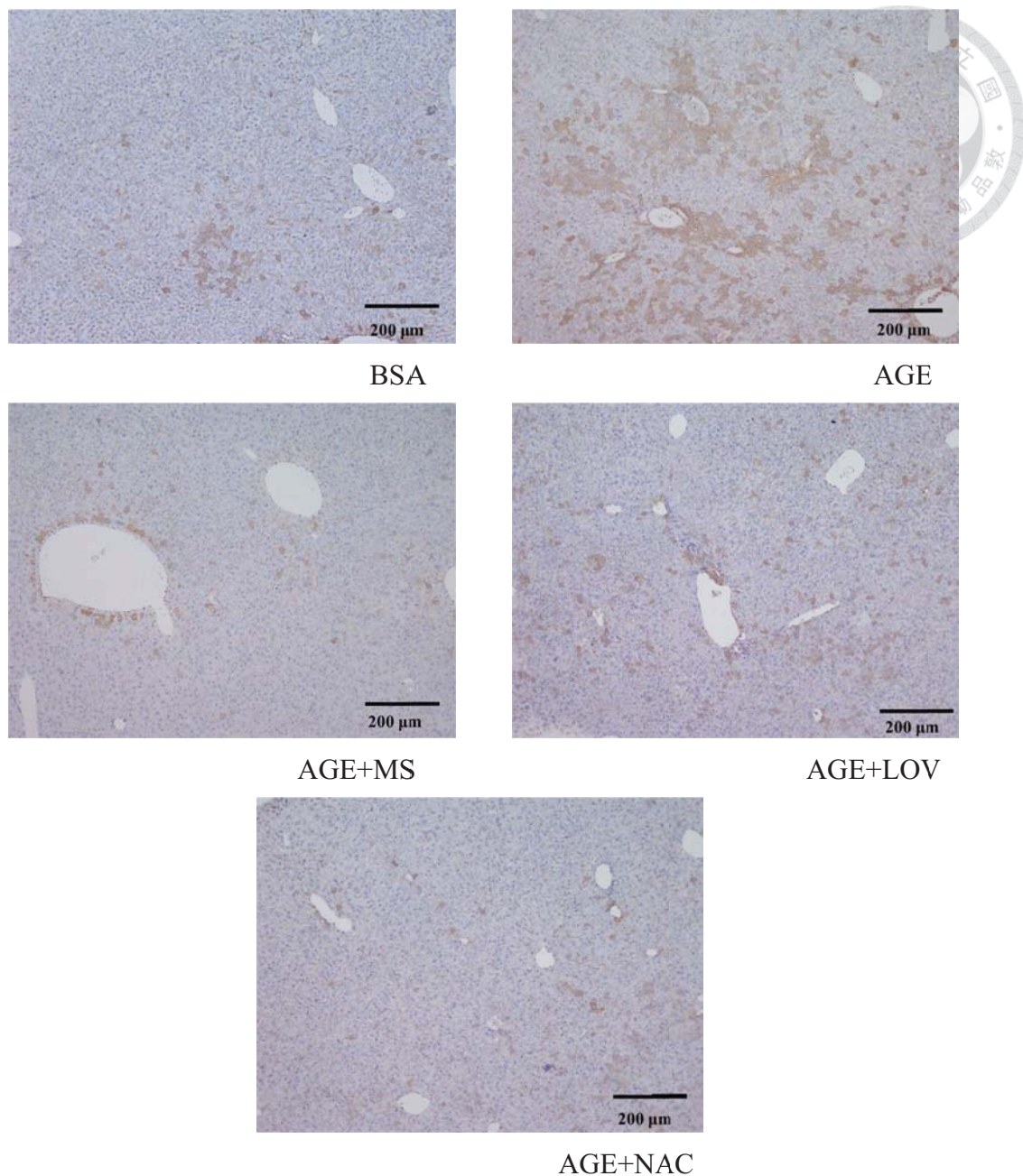


圖 4-11 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠肝臟 C/EBP β 表現影響

Fig. 4-11 The effect of monascin and lovastatin on hepatic C/EBP β of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE +MS : AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE + LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE + NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group

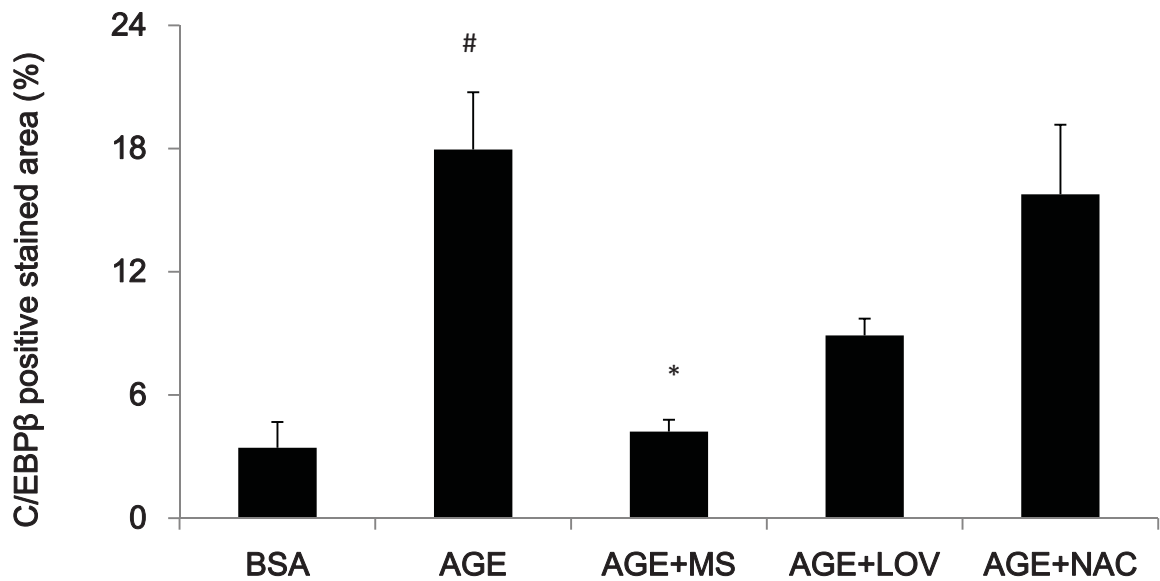


圖 4-12 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠肝臟 C/EBPβ 陽性染色面積比率影響

Fig. 4-12 The effect of monascin and lovastatin on hepatic C/EBPβ of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE+ MS: AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE+LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE+NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group

[#]p < 0.05, significantly different from control (BSA) group; ^{*}p < 0.05, significantly different from AGE group

產物為正反應)，結果如圖 4-11 所示，AGE 組小鼠肝臟組織中 C/EBP β 表達均增高，顯示高血糖狀態下，肝組織中 C/EBP β 明顯增多。AGE 組 C/EBP β 表達呈強陽性，故染色結果呈棕褐色。與 AGE 組相比較，MS 和 LOV 組表達強度減弱，陽性表現量減少，表明 MS 和 LOV 對肝臟中的 C/EBP β 表現有抑制效果，但 LOV 效果沒有 MS 來得好。

各組肝臟中 C/EBP β 表現程度量化結果如圖 4-12 所示，22 周的 AGE 誘導使肝臟中 C/EBP β 顯著高於控制組 (BSA 組) ($p < 0.05$)，腹腔注射 MS 與 LOV 可分別減少肝臟中 C/EBP β 表現量，降低率分別為 50% 與 57%，且 MS 可顯著減少 C/EBP β 之表現 ($p < 0.05$)。NAC 組跟 AGE 組相比 C/EBP β 表現量下降 12%，效果不及 MS 和 LOV。

四、第二型葡萄糖轉運蛋白 (glucose transporter 2; GLUT2) mRNA 之表現

當血液中葡萄糖濃度上升，胰臟內第二型葡萄糖轉運蛋白 (glucose transporter 2; GLUT2) 就會將葡萄糖攝入到 β 細胞內行糖解作用。第二型糖尿病患者 β 細胞的功能會降低，且 GLUT2 和 glucokinase 的表現下降，降低了葡萄糖氧化代謝作用，減少了能量產生。GLUT2 和 glucokinase 同時構成了胰臟 β 細胞的葡萄糖感受系統。GLUT2 表現減少，葡萄糖藉此進入到 β 細胞的作用就會減少，進而降低 GSIS 作用，減少了胰島素分泌的量。

本研究以 real-time PCR 偵測胰臟中 GLUT2 mRNA 表現量，並以 GAPDH 作為內參。各組 GLUT2 mRNA 結果如圖 4-13 所示，22 周的 AGE 誘導使肝臟中 AGE 顯著高於控制組 (BSA 組) ($p < 0.001$)，同時腹腔注射 MS 與 LOV 可分別提升胰臟 GLUT2 mRNA 表現量，提升率分別為 31% 與 88% ($p < 0.001$)。

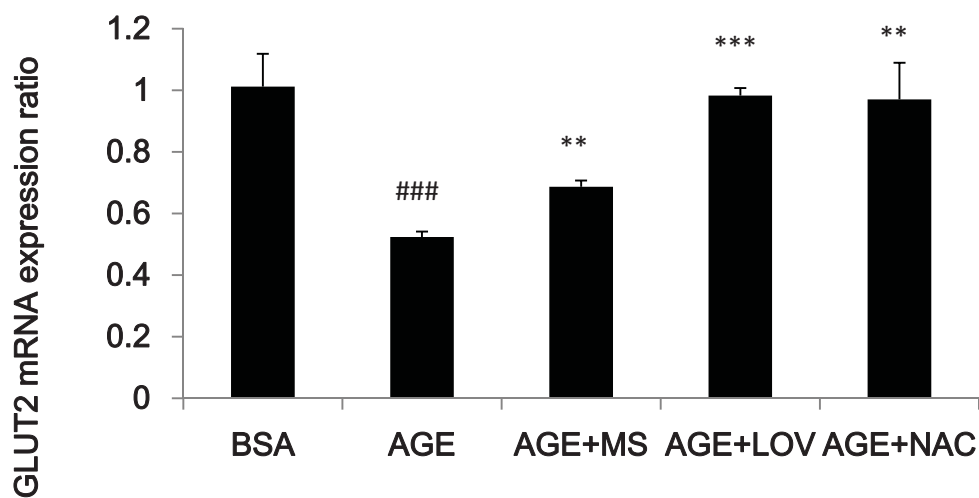


圖 4-13 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠 GLUT2 mRNA 表現量影響

Fig. 4-13 The effect of monascin and lovastatin on GLUT2 mRNA expression ratio of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE+ MS: AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE+LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE+NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group

###P < 0.001, significantly different from control (BSA) group; ***p < 0.001, significantly different from AGE group

**P < 0.01, significantly different from AGE group

NAC 組 GLUT2 mRNA 表現量提升 85%。綜合以上結果，MS 和 LOV 改善胰島 β 細胞功能的原因可能是透過提升 PDX-1 和 GLUT2 mRNA 的表現量。

目前已經有研究證實對 GLUT2 表達調節不僅在轉錄水準，而且在轉錄後水準也存在。有研究顯示 GLUT2 mRNA 水準上升，而 GLUT2 的蛋白含量不變，表明在 GLUT2 轉錄後仍然有許多調節，包括對翻譯的調節，蛋白質合成的調節，蛋白質降解的調節 (Weir., 1993)。

第四節 Monascin 及 lovastatin 對 AGE 誘導糖尿病小鼠脂質累積影響

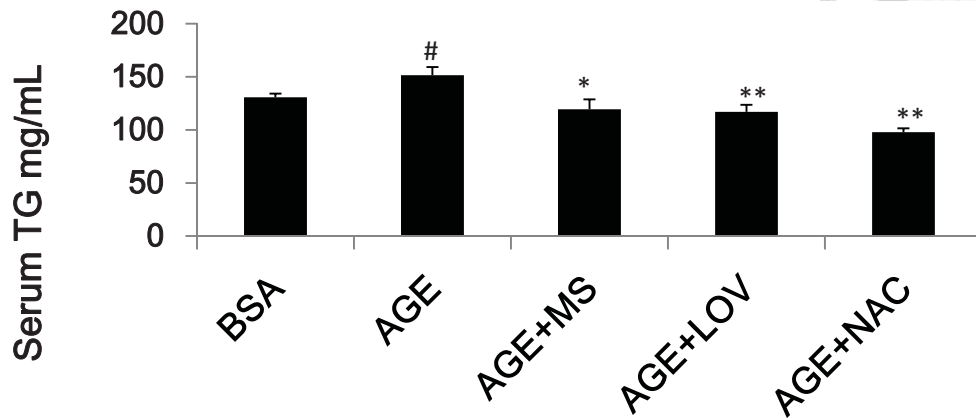
一、血脂質

第 2 型糖尿病發病機制中，脂代謝紊亂是非常重要之因素，並且有大量的臨床流行病學證實肥胖是第 2 型糖尿病的重要危險因素。血液中 TC、TG 含量增高可能是造成胰島素阻抗的重要原因。有研究顯示 TG 會活化 PKC，亦會受 mitogen-activated protein kinase family 中 c-jun N-terminal kinase (JNK) 所活化，而 JNK 可被 proinflammatory 如 tumor necrosis factor α (TNF- α) 活化，最終導致胰島素阻抗產生。

有研究證實肥胖與胰島素阻抗與第二型糖尿病相關，並且胰島素功能之一為調節脂質代謝，故胰島素阻抗會造成脂質代謝異常並使血脂偏高。長期處於高血糖與高血脂之情形下會造成胰島 β 細胞損傷，並逐漸使第二型糖尿病患者胰島 β 細胞失去分泌胰島素功能，使之必須依賴注射胰島素維持生理機能。

AGE 誘導糖尿病小鼠各組血清中 TG 結果如圖 4-14 顯示，經過 22 周 AGE 誘導後，小鼠血清中 TG 含量明顯上升，且與控制組 (BSA) 相比達到顯著差異 ($p < 0.05$)。腹腔注射 MS 與 LOV 能顯著降低因 AGE 誘導所導致之高

(A)



(B)

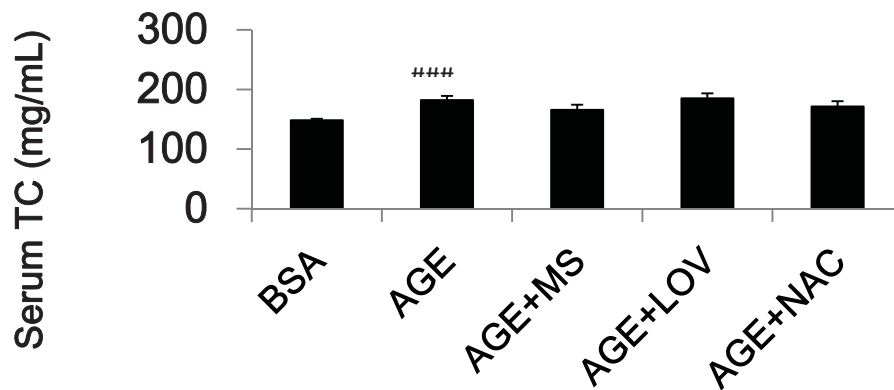


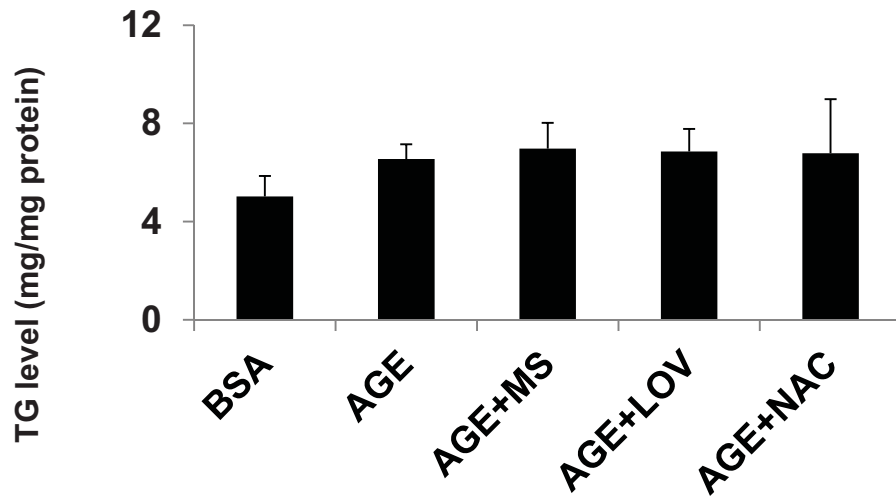
圖 4-14 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠 (A) 血清三酸甘油酯及 (B) 總膽固醇之影響

Fig 4-14 The effect of monascin and lovastatin on the serum total cholesterol and triglyceride level of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

BSA: control group, AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE+ MS: AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE+LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE+NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group

$p < 0.001$, significantly different from control (BSA) group; # $p < 0.05$, significantly from control (BSA) group; ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, significantly different from AGE group

(A)



(B)

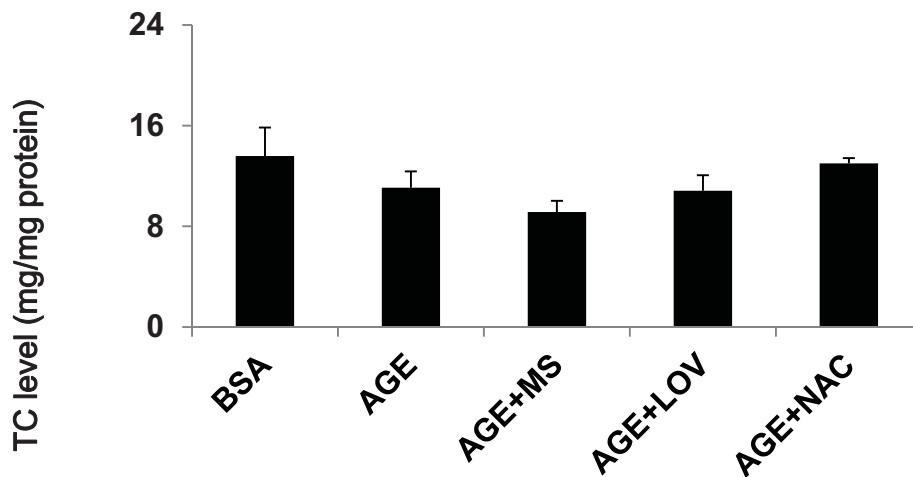


圖 4-15 Monascin 及 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠肝臟 (A) 三酸甘油酯及 (B) 總膽固醇濃度影響

Fig. 4-15 The effect of monascin and lovastatin on the liver TC、TG level of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE+ MS: AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE+LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE+NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group

血脂現象，TG 下降率分別為 21% 和 23%，且均有顯著差異($p < 0.05$, $p < 0.01$)。NAC 組 TG 下降率為 35%。根據以上實驗結果，MS 與 LOV 具有良好降低 AGE 誘導動物之血清中 TG 之效果。

各組血清中 TC 結果示如圖 4-14，22 周的 AGE 誘導使血清中 TC 顯著高於控制組 (BSA 組) ($p < 0.001$)，MS 處理組血清中 TC 濃度減少，下降率為 9%。NAC 組血清中 TC 下降率為 6%。由結果顯示，AGE 誘導 22 周後使糖尿病小鼠血清中 TC、TG 含量均明顯提升，MS 可降低血清中之 TG 和 TC 含量，對於降低血清中 TC 功效不如 TG 顯著。

二、肝臟脂質

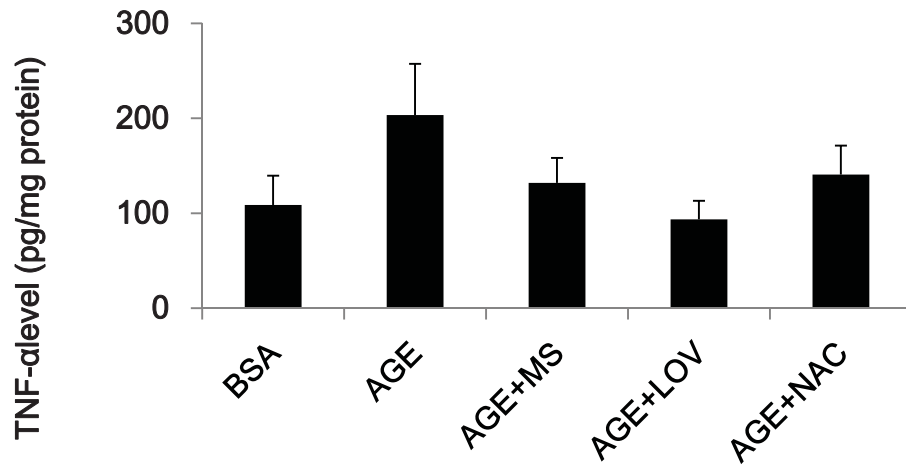
肝臟為與胰島素阻抗相關之重要調控器官。各組肝臟中 TG 濃度如圖 4-15 所示，22 周的 AGE 誘導使肝臟中 TG 高於控制組 (BSA 組) ($p < 0.01$)，同時以 MS 與 LOV 處理可使肝臟中 TG 有輕微上升。各組肝臟中 TC 濃度結果如圖 4-15 所示，經過 22 周 AGE 誘導，各組 TC 含量差異不明顯。

第五節 Monascin 及 lovastatin 對 AGE 誘導糖尿病小鼠促發炎細胞激素之影響

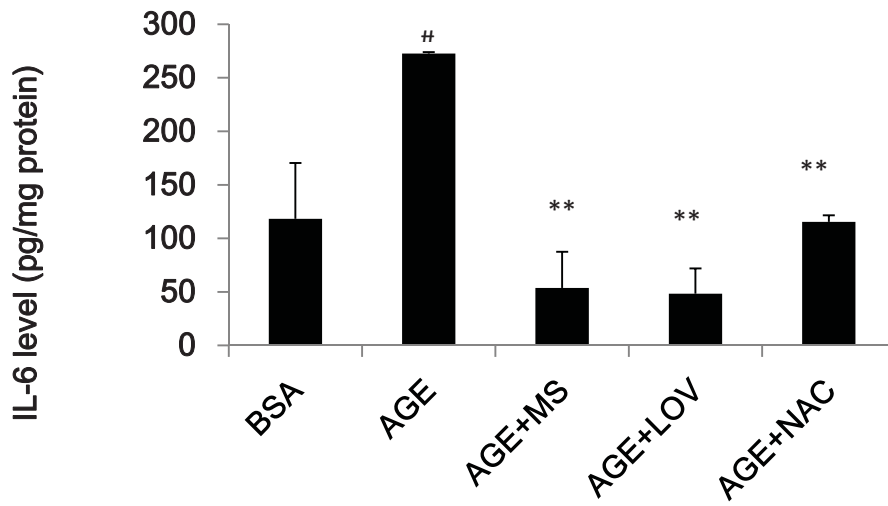
一、胰臟促發炎細胞激素 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)

單核球細胞及血管內皮細胞所分泌的促發炎細胞激素 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) 都會導致胰島素阻抗。TNF- α 是一種分子量為 26 kDa 的穿膜蛋白。雖然 TNF- α 和糖尿病、胰島素阻抗的關係並不是非常明確，但在此兩種情形之下組織中 TNF- α 的表現量增加。有研究顯示將小鼠 TNF- α 之接受器基因剔除後，可提升小鼠對胰島素敏感性並改善血漿中游離脂肪酸的含量。有研究者指出在肝臟中過多的 TNF- α 會幹擾內生性脂肪酸生合成，而太少的 TNF- α 則會幹擾脂肪酸氧

(A)



(B)



(C)

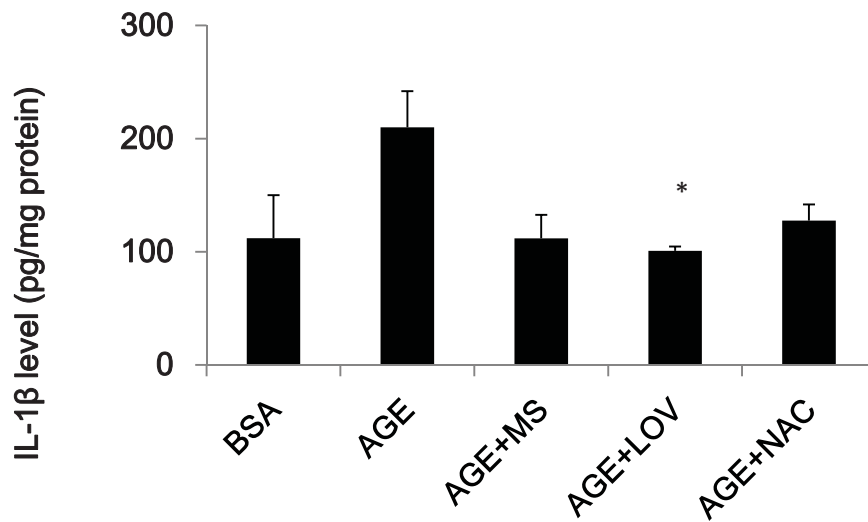


圖 4-16 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠胰臟促發炎細胞
胞激素影響

Fig. 4-16 The effect of monascin and lovastatin on pancreas (A) TNF- α , (B) IL-6 and
(C) IL-1 β of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of
advanced glycation end-products

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE+ MS:
AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE+LOV: AGE induced group
and 10 mg LOV/kg bw group; AGE+NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg
bw group

##p < 0.01, significantly different from control (BSA) group; **p < 0.01, significantly
different from AGE group; *p < 0.05, significantly different from AGE group

化。急性的 TNF- α 刺激會增加肝臟的低密度脂蛋白 (VLDL) 產出率，TNF- α 和增加的 VLDL 結合對脂肪組織的脂蛋白脂解酶有抑制之效果，使脂肪細胞內脂肪酸的利用不良，血液中呈現高三酸甘油酯血症。這可能是導致胰島素抵抗與血脂紊亂之原因。

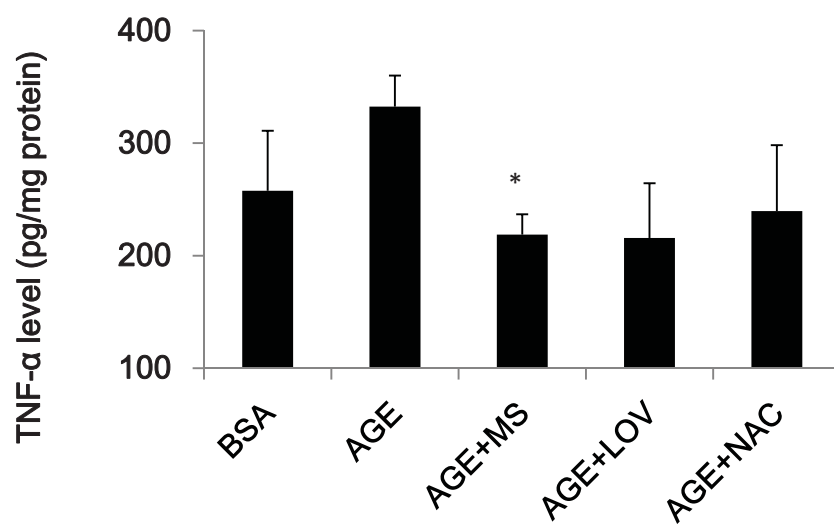
有大量研究指出 TNF- α 會抑制 IRS-1 的酪胺酸磷酸化而造成胰島素抗性之產生，並且 IL-6 濃度和胰島素抵抗程度成正相關之關係。在肥胖者體內脂肪細胞分泌 IL-6 並且 IRS 之負向調控增加，正向調控 suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) 造成肝臟中胰島素訊息傳遞路徑受阻，且增加脂肪細胞內 TG 的脂解作用造成血液中過多遊離脂肪酸。並且 IL-6 對脂肪細胞分泌 adiponectin 有抑制作用 使肝臟胰島素抵抗更加嚴重。IL-1 β 與 β 細胞的胰島素抗性有關。

各組胰臟中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 結果如圖 4-16 所示，22 周的 AGE 誘導使胰臟中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 濃度顯著高於控制組 (BSA 組) ($p < 0.01$)，同時用 MS 與 LOV 處理之組別均有減輕促發炎細胞激素之效果。由結果顯示，MS 和 LOV 均可顯著降低胰臟中 IL-6 濃度 ($p < 0.01$)，清除率分別為 80% 和 82%。NAC 對 IL-6 清除率為 58%。胰臟組織中 MS 和 LOV 對 TNF- α 清除率分別為 35% 和 54%。NAC 對 TNF- α 清除率為 31%。MS 和 LOV 對 IL-1 β 之清除率分別為 47% 和 52%，且 LOV 組跟 AGE 組相比有顯著差異 ($p < 0.05$)。NAC 對 IL-1 β 清除率為 39%。

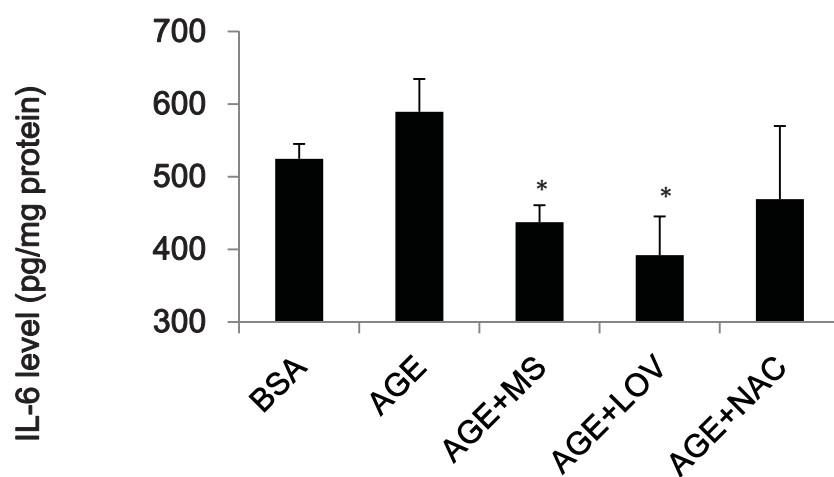
綜合以上結果，MS 和 LOV 對胰臟組織中促發炎細胞激素之清除效果以 IL-6 和 IL-1 β 較佳，降低 TNF- α 之效果不如 IL-6 和 IL-1 β 之清除效果顯著。



(A)



(B)



(C)

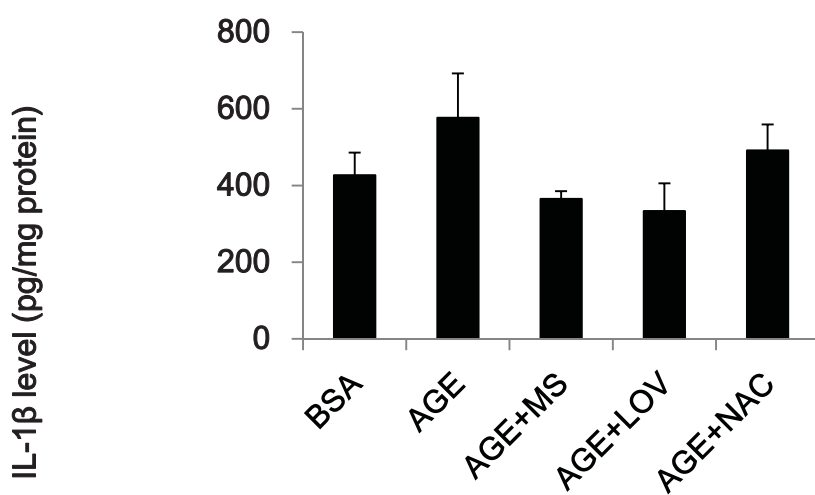


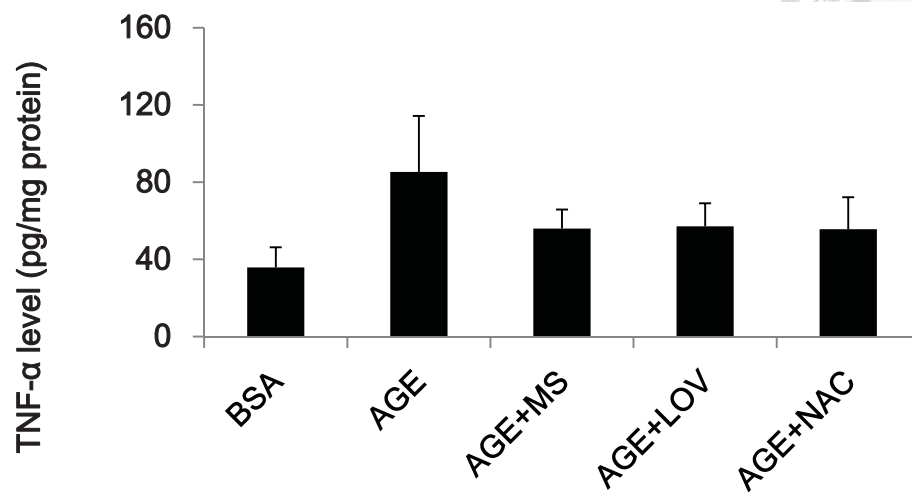
圖 4-17 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠肝臟促發炎細胞
激素影響

Fig. 4-17 The effect of monascin and lovastatin on liver (A) TNF- α , (B) IL-6 and (C) IL-1 β of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE+ MS: AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE+LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE+NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group

* $p < 0.05$, significantly different from AGE group

(A)



(B)

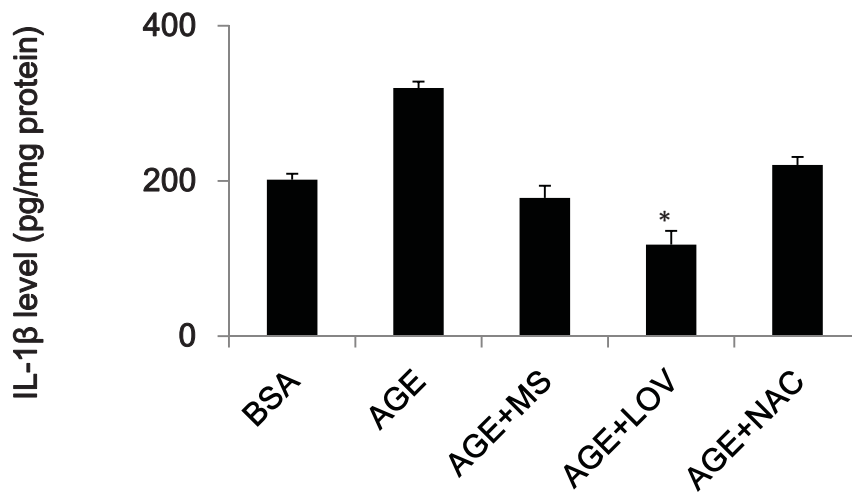



圖 4-18 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠腎臟促發炎細胞激素
影響

Fig. 4-18 The effect of monascin and lovastatin on kidney (A) TNF- α and (B) IL-1 β of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE+ MS: AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE+LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE+NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group

* $p < 0.05$, significantly different from AGE group

二、肝臟促發炎細胞激素 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)



各組肝臟組織促發炎細胞激素結果如圖 4-17 所示，22 周的 AGE 誘導使肝臟組織中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 濃度高於控制組 (BSA 組)，同時用 MS 與 LOV 處理之組別可分別減少肝臟組織中促發炎細胞激素之濃度。由結果顯示，MS，LOV 與 NAC 均可減少肝臟組織中 TNF- α 含量，清除率分別為 34%、35% 和 28%，且 MS 組跟 AGE 組相比有顯著差異 ($p < 0.05$)。肝臟組織中 MS，LOV 和 NAC 對 IL-6 的清除率分別為 26%、34% 和 20%。MS，LOV 和 NAC 對 IL-1 β 的清除率分別為 37%、42% 和 15%。

綜合以上結果，MS 和 LOV 對肝臟組織中促發炎細胞激素之清除效果以 TNF- α 和 IL-1 β 較佳，對 IL-6 之清除效果不如 TNF- α 和 IL-1 β 顯著。

三、腎臟促發炎細胞激素 (TNF- α 、IL-1 β)

有研究顯示，AGE 參與了糖尿病腎病的形成過程，AGE 會造成腎臟發炎產生細胞激素和生長因子，而這些因素都是造成糖尿病腎病的主要原因。

各組腎臟中 TNF- α 、IL-1 β 結果如圖 4-18 所示，22 周的 AGE 誘導使腎臟組織中促發炎細胞激素濃度高於控制組 (BSA 組)，同時 MS，LOV 和 NAC 處理組可分別減少腎臟組織中 TNF- α 和 IL-1 β 含量。由結果顯示，MS，LOV 與 NAC 均可減少腎臟組織中 TNF- α 含量，清除率分別為 34%、33% 和 35%，而其抑制 IL-1 β 產生的能力分別為 44%、63% 和 31%，且 LOV 組與 AGE 組相比有顯著差異 ($p < 0.05$)。綜合以上結果，MS 和 LOV 對抑制腎臟組織中 IL-1 β 效果較 TNF- α 為佳，且 LOV 對 IL-1 β 之清除效果較 MS 為佳。

分析以上結果，MS 和 LOV 對 AGE 誘導導致胰臟、肝臟和腎臟產生之促發炎細胞激素均有較好的清除效果，顯示 MS 和 LOV 具有較好的減緩 AGE

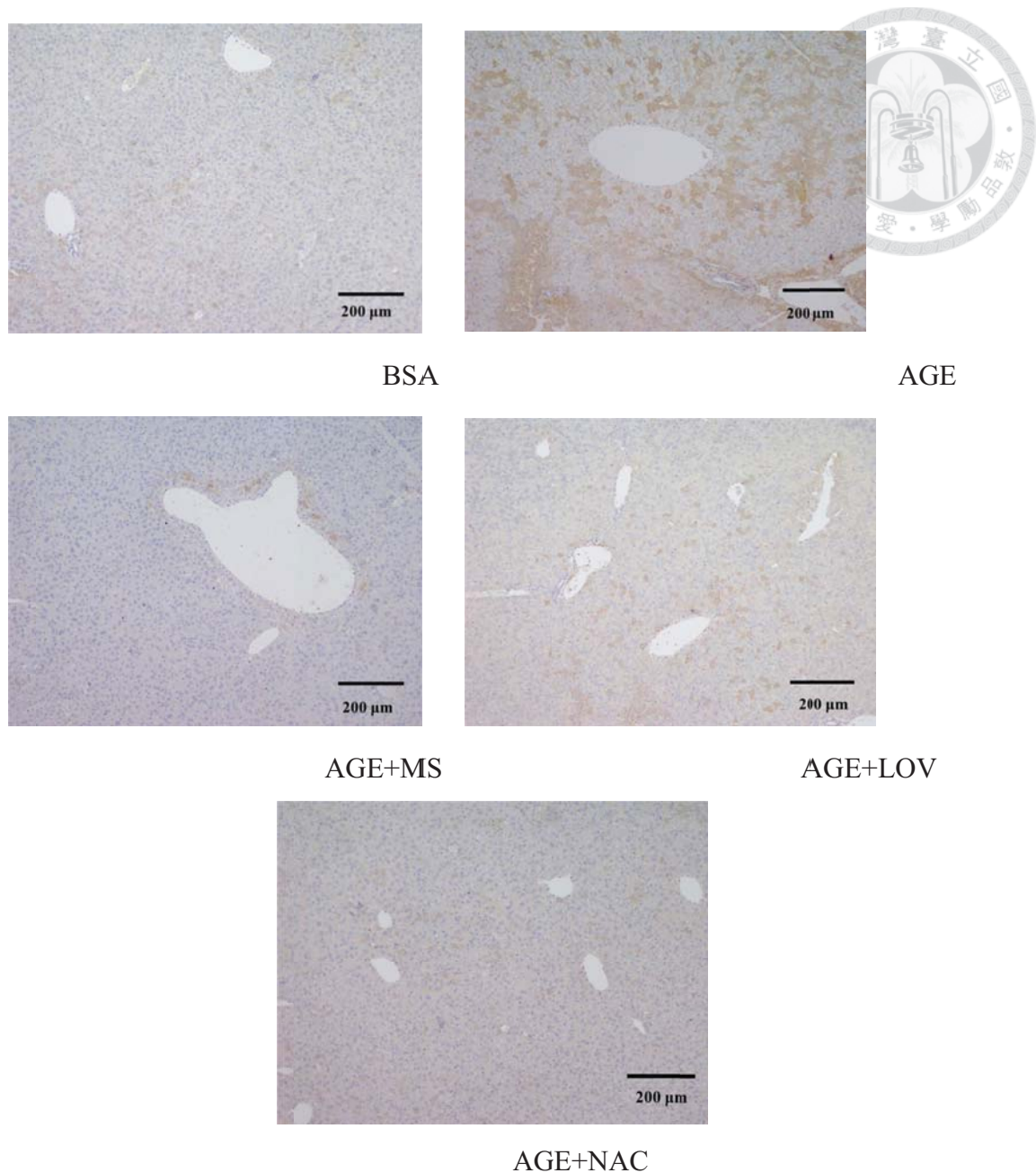


圖 4-19 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠肝臟 p47phox 表現的影響

Fig.4-19 The effect of monascin and lovastatin on hepatic p47phox of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products
 BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE+ MS: AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE+LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE+NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group

所引起的發炎反應之能力，這可能是 MS 和 LOV 減輕胰島素抵抗現象之原因。

第六節 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 造成氧化壓力之影響

一、肝臟 p47phox (NADPH oxidase subunit) 之表現

AGE 會提升氧化壓力標的物之表現，並傷害 β 細胞，並且提升糖尿病患者之胰島中與氧化壓力有關的基因之表現，儘管粒線體修復路徑是造成氧化壓力的主要來源，但體外和體內試驗證實，NADPH oxidase (NOX) 也參與了這個過程 (Morgan et al., 2007; Nakayama et al., 2005)。當 RAGE 被活化時，會導致 p47phox (NADPH oxidase subunit) 轉移至細胞膜上而具有活性並促使 NF-kappa B (NF κ B) 轉錄因子由細胞質轉移至細胞核內而被活化，導致發炎因子大量產生並最終使機體發炎 (Guha et al., 2000)。

各組肝臟 IHC 染色結果如圖 4-19 所示，褐色產物為正反應，結果顯示 AGE 組小鼠肝臟組織中 p47phox 表達均增高，顯示 AGE 誘導使肝組織中氧化壓力產生明顯增多。AGE 組 p47phox 表達呈強陽性，陽性結果呈棕褐色。與 AGE 組相比較，MS 和 LOV 組表達強度減弱，陽性結果數減少，表明 MS 和 LOV 對肝臟中的 p47phox 表現有減輕之效果。

各組 p47phox 染色陽性面積量化結果如圖 4-20 所示，22 周的 AGE 誘導使肝臟組織中 p47phox 蛋白質表現量顯著高於控制組 (BSA 組) ($p < 0.05$)，而用 MS，LOV 與 NAC 處理組可顯著抑制 p47phox 之蛋白質表現 ($p < 0.01$, $p < 0.05$)，降低率分別為 90%，77% 和 89%。

分析以上結果，MS 可顯著抑制肝臟中 p47phox 之蛋白質表現，且 LOV 抑制效果不及 MS。有研究指出，當 p47phox 蛋白質表現量增加時，會引起 NF- κ B 活化並造成下游一系列訊息傳遞，造成細胞氧化壓力傷害，進一步導致發炎。結

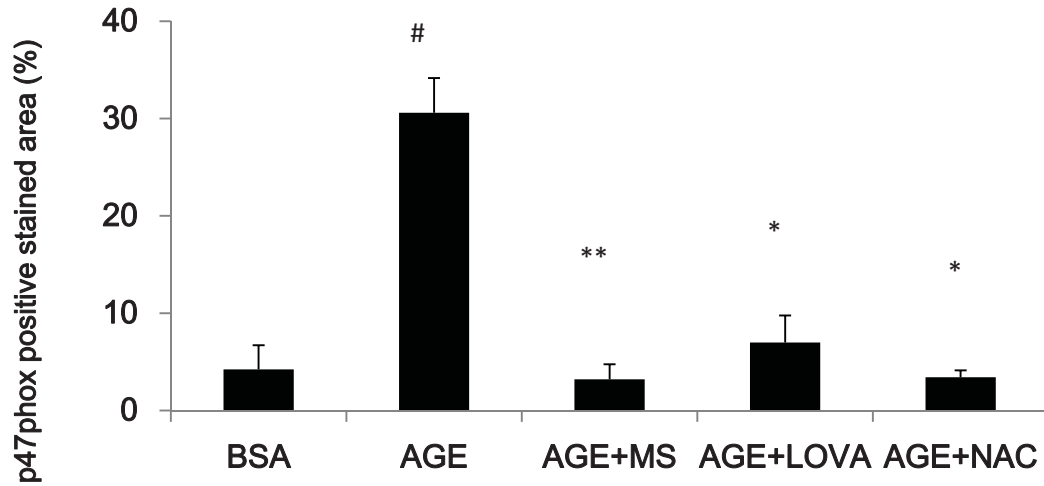


圖 4-20 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導糖尿病小鼠肝臟 p47phox 蛋白質表現影響

Fig.4-20 The effect of monascin and lovastatin on hepatic p47phox positive stained area of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE+ MS: AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE+LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE+NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group

$p < 0.05$, significantly different from control (BSA) group; ** $p < 0.01$, significantly different from AGE group; * $p < 0.05$, significantly different from AGE group

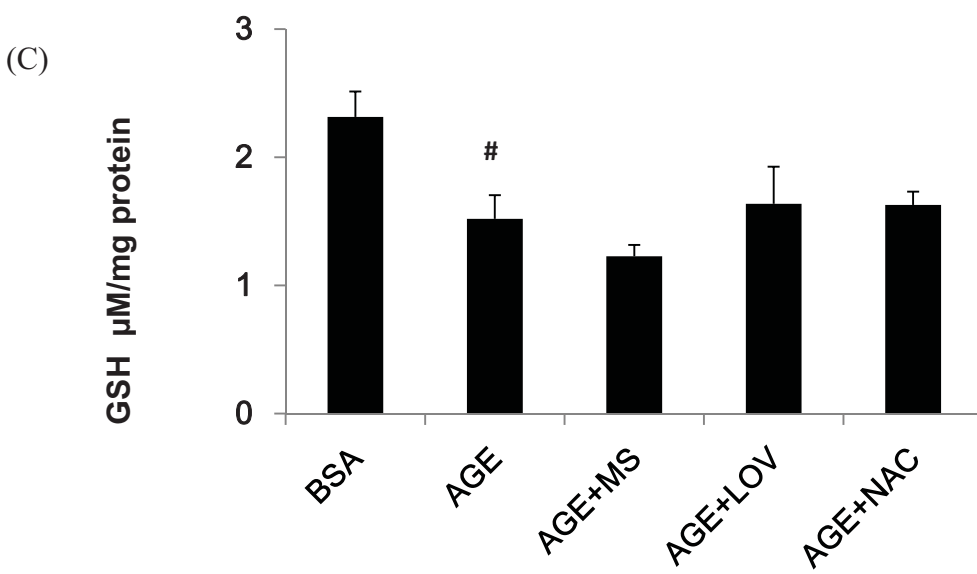
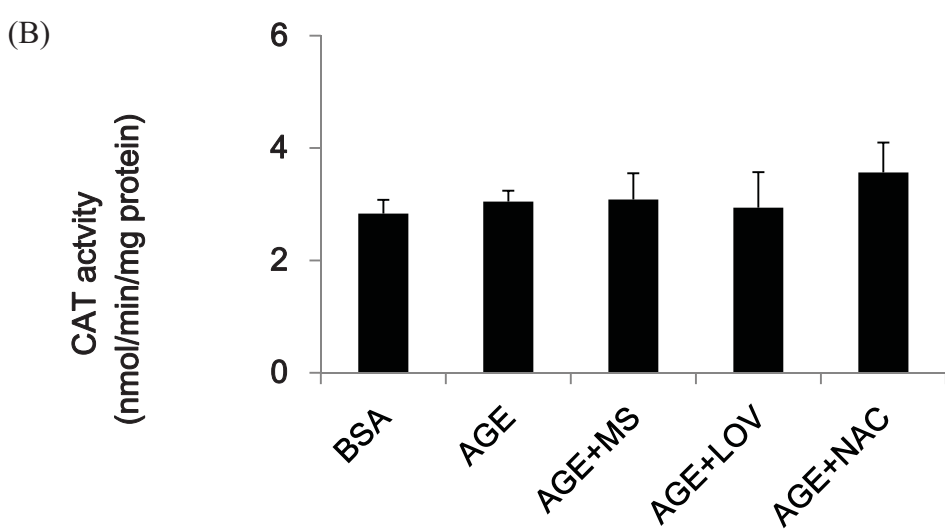
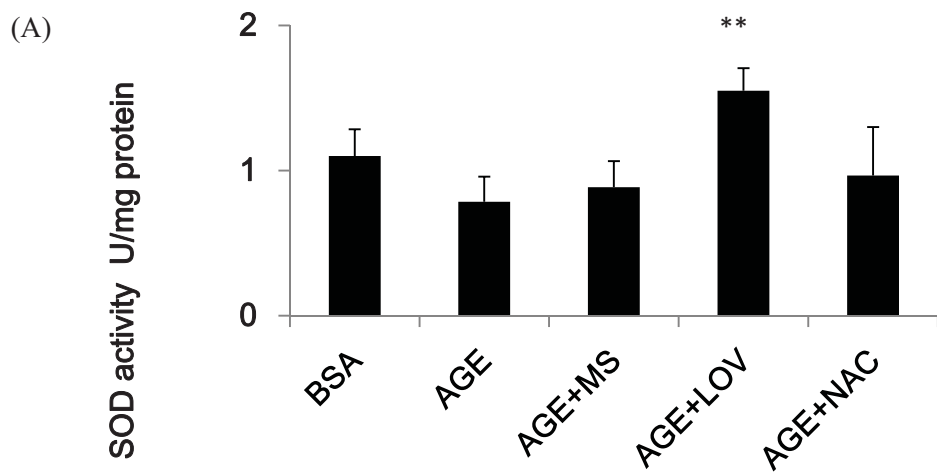


圖 4-21 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠胰臟抗氧化酵素
(A) SOD、(B) CAT and (C) GSH 活性影響

Fig. 4-21 The effect of monascin and lovastatin on (A) SOD、(B) CAT and (C) GSH
of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation
end-products

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE+ MS:
AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE+LOV: AGE induced group
and 10 mg LOV/kg bw group; AGE+NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg
bw group

#p < 0.05, significantly different from control (BSA) group; **p < 0.01, significantly
different from AGE group

果顯示黃色素 MS 和紅麴二次代謝物 LOV 可藉由調控 p47phox 蛋白質表現，進而抑制氧化發炎反應，並改善氧化發炎所導致的胰島素阻抗現象。



二、抗氧化酵素之表現

氧化壓力造成的細胞傷害是糖尿病形成的主要因素，包括胰島素阻抗和 β 細胞功能障礙 (Ceriello, 2003; Evans et al., 2002; Robertson, 2009; Son, 2007)。AGE 會改變抗氧化酵素例如超氧化物歧化酶之構型從而降低抗氧化酵素之活性，也可能會催化自由基的分子結構從而直接提升自由基之形成。但生物體內存在抗氧化酵素可以保護機體免受氧化壓力的影響從而減輕糖尿病症狀。本研究分別從胰臟、肝臟及腎臟中抗氧化酵素之活性表現評估 MS 和 LOV 之抗氧化能力。

1、胰臟抗氧化酵素

β 細胞因為細胞中之 SOD1-2, GPx1 以及 CAT 之表現量很低 (Lenzen et al., 1996; Tiedge et al., 1997; Tonooka et al., 2007) 容易受到氧化壓力傷害。並且胰島在受到氧化壓力傷害後之基因修復能力也較弱 (Modak et al., 2009)。

各組胰臟中之抗氧化酵素實驗結果如圖 4-21 所示，22 周的 AGE 誘導使抗氧化酵素 SOD 活性、GSH 含量低於控制組 (BSA 組)，其中 GSH 含量跟控制組 (BSA 組) 相比有顯著差異 ($p < 0.05$)。由結果顯示，MS, LOV 與 NAC 處理組均可提升 AGE 誘導動物胰臟組織中 SOD 活性，提升率分別為 13% , 97% 和 23%，且 LOV 組與 AGE 組相比有顯著差異 ($p < 0.01$)。LOV 可提升 AGE 誘導動物胰臟組織中 GSH 含量，提升率為 8%，而 MS 則不具有提升 GSH 之功效。NAC 提升胰臟組織中含量，提升率為 7%。NAC 屬於 intracellular thiol antioxidants 可以透過增加細胞內 GSH 的濃度，抑制 NF- κ B 活性或透過直接

清除 free radical 而達到抗氧化的能力。實驗結果顯示,MS 可提升 CAT 活性,提升率為 1%。但各組 CAT 活性並沒有顯著差異,可能 AGE 並不能直接抑制 CAT 活性,而是藉由抑制 GPx 活性造成氧化壓力之傷害。綜合以上結果,LOV 可提升胰臟中 SOD 活性和 GSH 含量,而 MS 可提升 SOD 和 CAT 之活性,但效果不及 LOV。

2、肝臟抗氧化酵素表現

各組肝臟抗氧化酵素實驗結果如圖 4-22 所示,22 周的 AGE 誘導使肝臟中 SOD, CAT, GSH 表現量皆低於控制組 (BSA 組), MS, LOV 與 NAC 處理組可分別提升肝臟中 SOD, CAT, GSH 之表現量。MS, LOV 與 NAC 對於肝臟中 SOD 活性有明顯提升效果,提升率分別為 13%, 97% 和 22%, 且 LOV 組跟 AGE 組相比有顯著差異 ($p < 0.05$)。MS, LOV 對肝臟中 CAT 之活性也具有提升之功效,但 LOV 效果不及 MS,提升率分別為 124% 和 25%, 且 MS 具顯著差異 ($p < 0.05$)。NAC (抗氧化劑)處理組 CAT 活性提升率為 162%, 與 AGE 組相比也具有顯著差異 ($p < 0.05$)。MS, LOV 和 NAC 均可提升 AGE 誘導動物胰臟組織中 GSH 含量,提升率分別為 63%, 57% 和 27%。

綜合以上結果,MS 和 LOV 均可顯著提升 AGE 誘導動物肝臟組織中抗氧化酵素之表現。MS 對 CAT 及 GSH 之表現有良好之提升效果,而 LOV 對 SOD 及 GSH 有較好之提升作用。

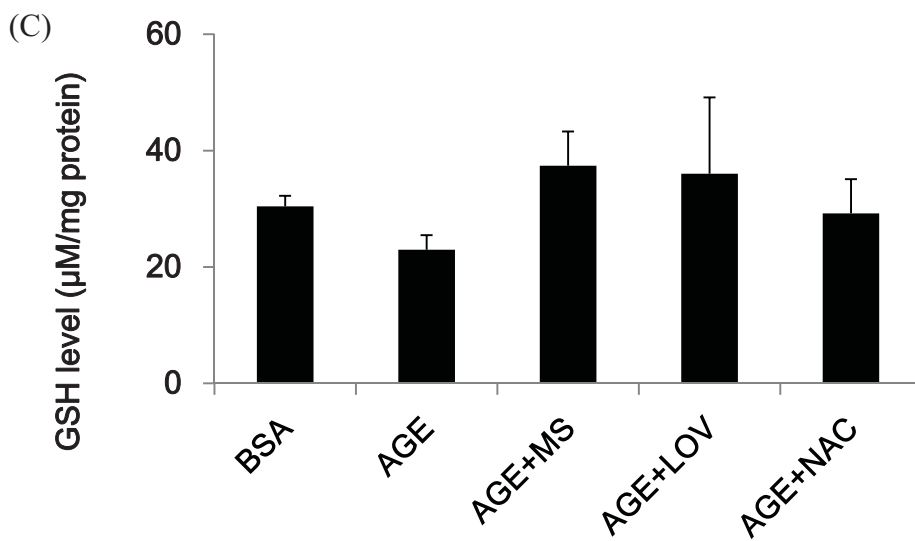
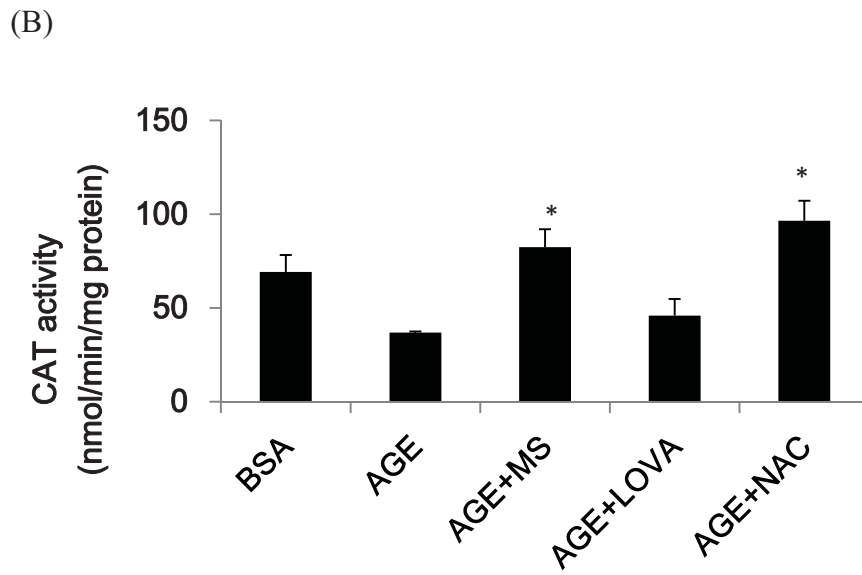
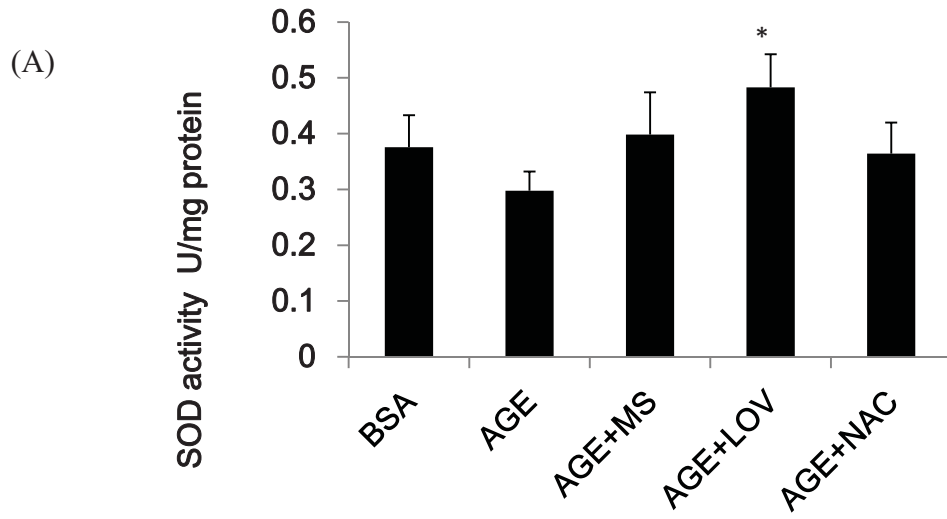


圖 4-22 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠肝臟抗氧化酶
活性影響

Fig. 4-22 The effect of monascin and lovastatin on liver (A) SOD、(B) CAT and (C)
GSH of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced
glycation end-products

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE+ MS:
AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE+LOV: AGE induced group
and 10 mg LOV/kg bw group; AGE+NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg
bw group

* $p < 0.05$, significantly different from AGE group

3、腎臟抗氧化酵素表現

各組腎臟抗氧化酵素表現結果如圖 4-23 所示，22 周的 AGE 誘導使腎臟中 SOD, CAT, GSH 表現量皆低於控制組 (BSA 組)，且皆具顯著差異 ($p < 0.05$)。MS, LOV 和 NAC 均可提升腎臟中 SOD 之活性，提升率分別為 159%，94% 和 58%。MS, LOV 和 NAC 對腎臟中 CAT 之活性也具有提升之功效，但 LOV 效果不及 MS，提升率分別為 124%，25% 和 58%，且 MS 具顯著差異 ($p < 0.05$)。MS 和 LOV 均可提升 AGE 誘導動物腎臟組織中 GSH 含量，提升率分別為 63% 和 57%。綜合以上結果，MS 和 LOV 均可顯著提升 AGE 誘導動物腎臟組織中抗氧化酵素之表現。MS 對 CAT 及 SOD 之表現有良好提升效果。

三、肝臟及腎臟病理分析

各組肝臟及腎臟病理分析如圖 4-24 和 4-25 所示，由肝臟及腎臟病理切片分析，各實驗組間並無顯著性差異。由此可知，AGE 誘導並不直接對肝臟和腎臟造成傷害，可能透過影響胰島素訊息傳遞路徑使之產生胰島素抗性所以各組病理切片結果無明顯差異。

各組肝臟及腎臟受損生化指標如表 4-1 和圖 4-26 所示。ALT 是一種平時僅少量存在血清中之轉胺酶，當組織細胞受到損傷後其酵素活性立即升高。其升高之程度與肝臟組織傷害的範圍與強度成正相關，所以常被用來評估肝功能。肌酸酐 (creatinine) 是一種含氮化物，大部份由腎臟排出，為肌酸的代謝產物。尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 及血清白蛋白 (albumin) 也都為評估腎功能之指標。由結果可知，各實驗組間肝功能和腎功能之受損指標並無顯著性差異。由此可知，AGE 並不會直接造成肝腎之損傷。

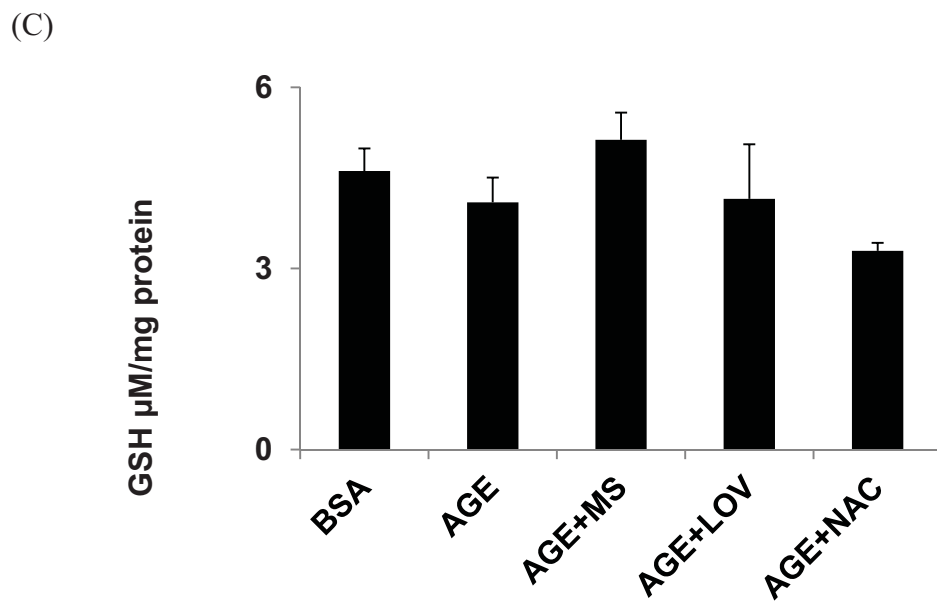
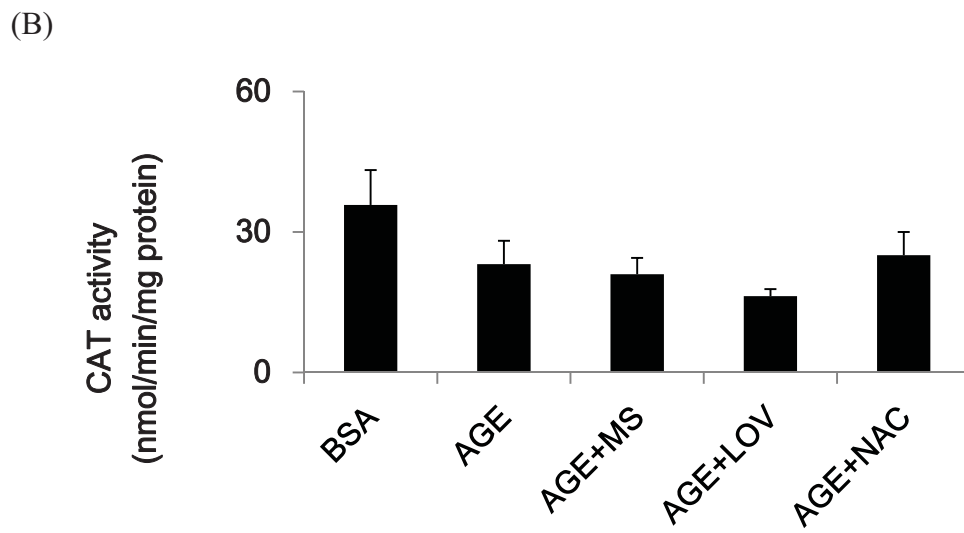
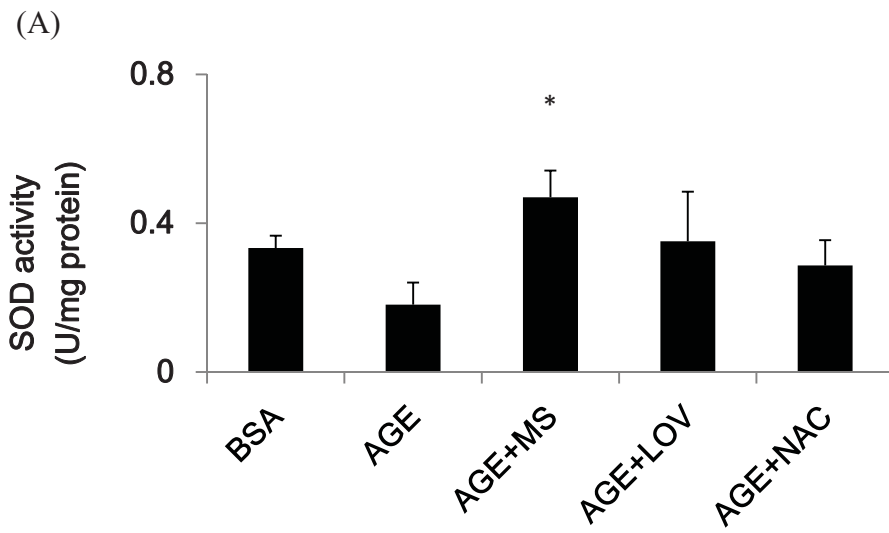


圖 4-23 Monascin 和 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠腎臟抗氧化酵素
活性影響

Fig. 4-23 The effect of monascin and lovastatin on kidney (A) SOD、(B) CAT and (C)
GSH of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced
glycation end-products

BSA: control group ; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE+
MS: AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE+LOV: AGE induced
group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE+NAC: AGE induced group and 100 mg
NAC/kg bw group

* $p < 0.05$, significantly different from AGE group

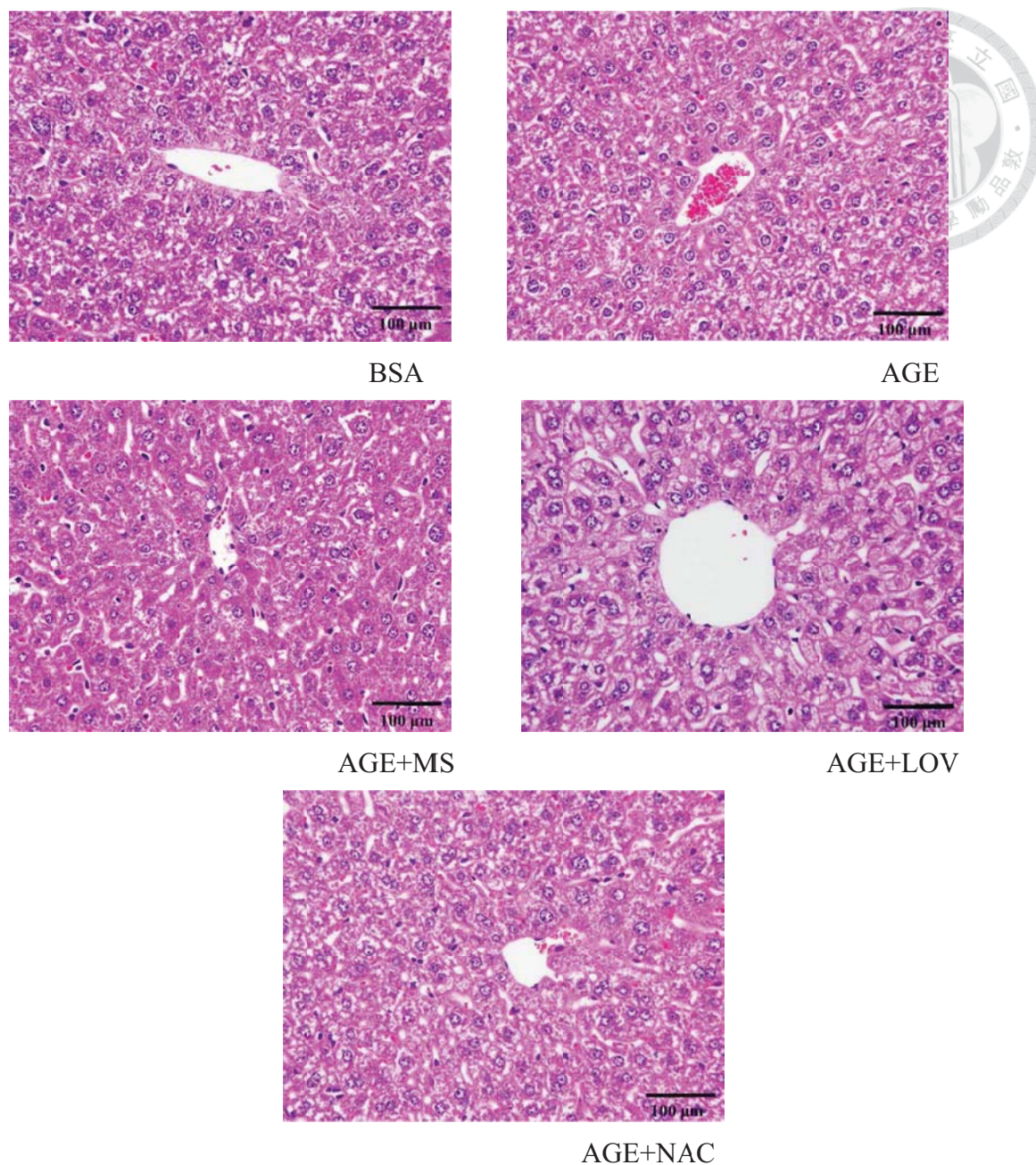


圖 4-24 Monascin 與 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠肝臟組織影響。圖中比例尺大小為 100 μm

Fig. 4-24 The effect of monascin and lovastatin on liver tissue of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE +MS : AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE + LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE + NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group

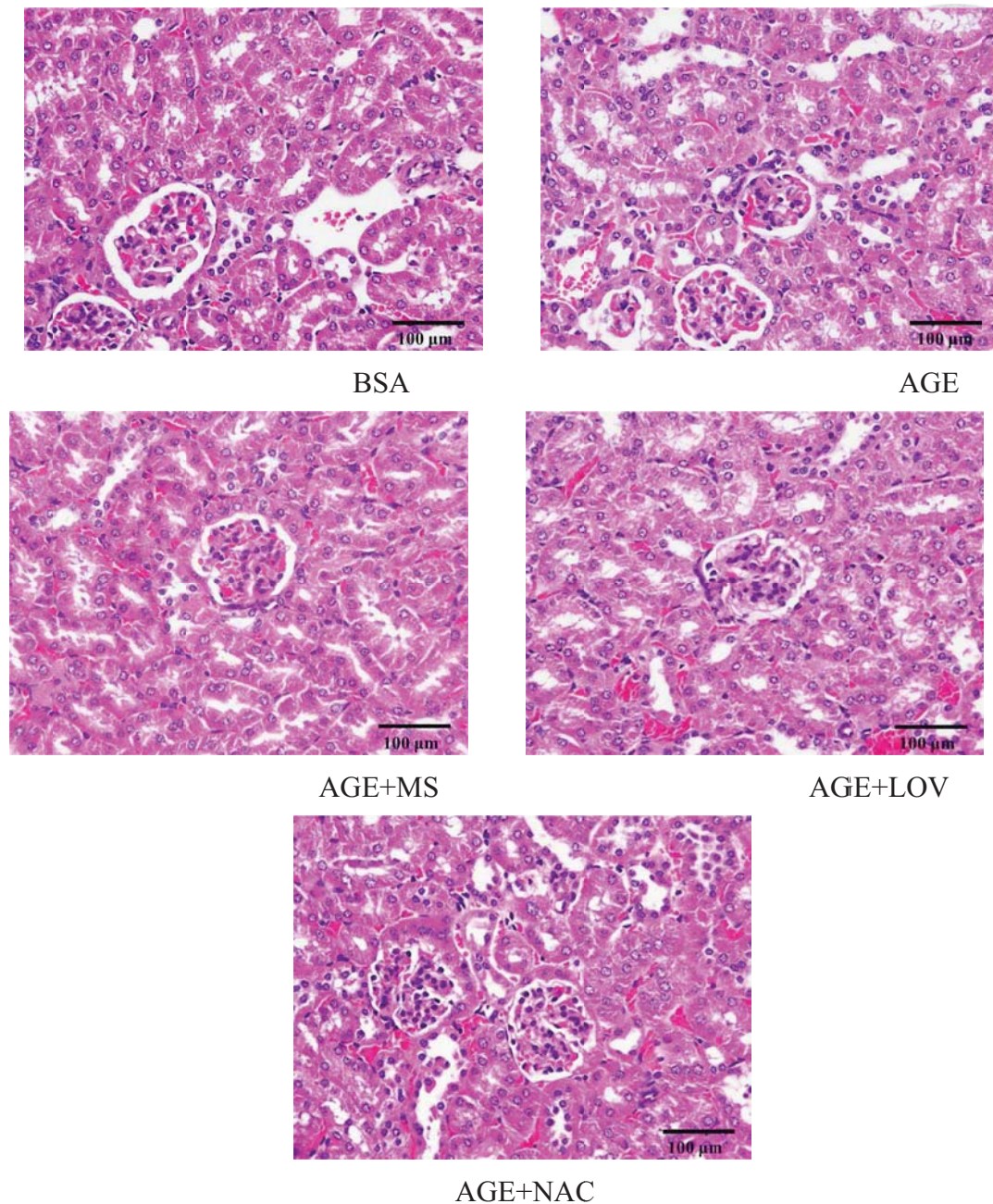


圖 4-25 Monascin 與 lovastatin 對 AGE 誘導 22 周糖尿病小鼠腎臟組織影響。圖中比例尺大小為 100 μm

Fig. 4-25 The effect of monascin and lovastatin on kidney tissue of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE +MS : AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE + LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE + NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group



表 4-1 AGE 誘導糖尿病小鼠之肝腎受損生化指標

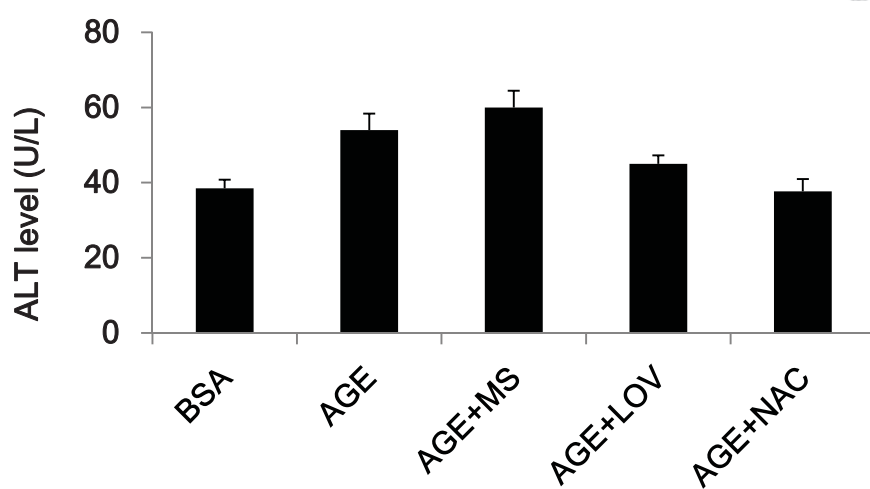
Table 4-1 the biochemical parameters of liver and kidney of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

Biochemical parameters	Groups				
	BSA	AGE	AGE+MS	AGE+LOV	AGE+NAC
ALT (U/L)	38.50±2.28	54.00±4.39	60.00±4.47	45.00±2.24	37.67±3.28
Albumin (g/dL)	2.80±0.46	2.73±0.64	2.70±0.32	2.60±0.32	2.73±0.39
BUN (mg/dL)	20.68 ±0.47	17.37±1.72	16.50±2.12	33.00±2.00	24.40±3.33
Creatinine (mg/dL)	0.09±0.16	0.04±0.21	0.04±0.07	0.06±0.14	0.05±0.14

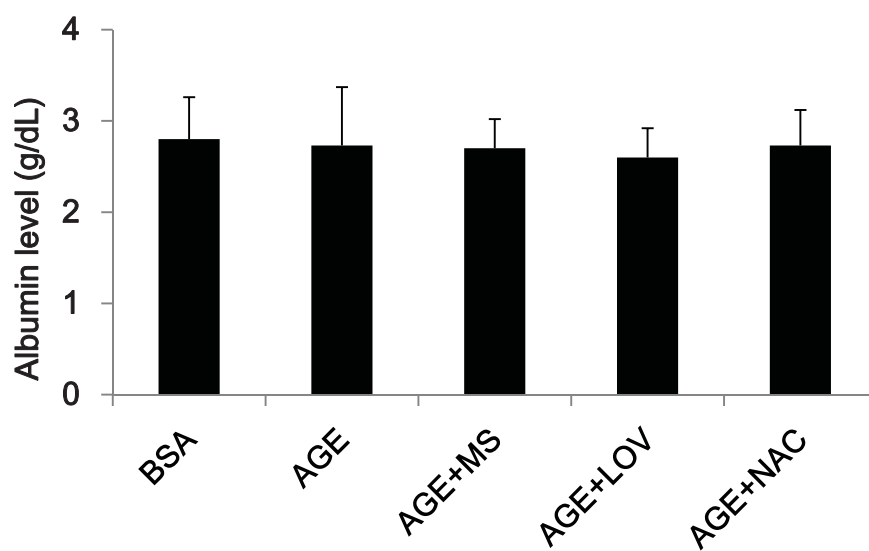
BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE+ MS: AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE+LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE+NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group



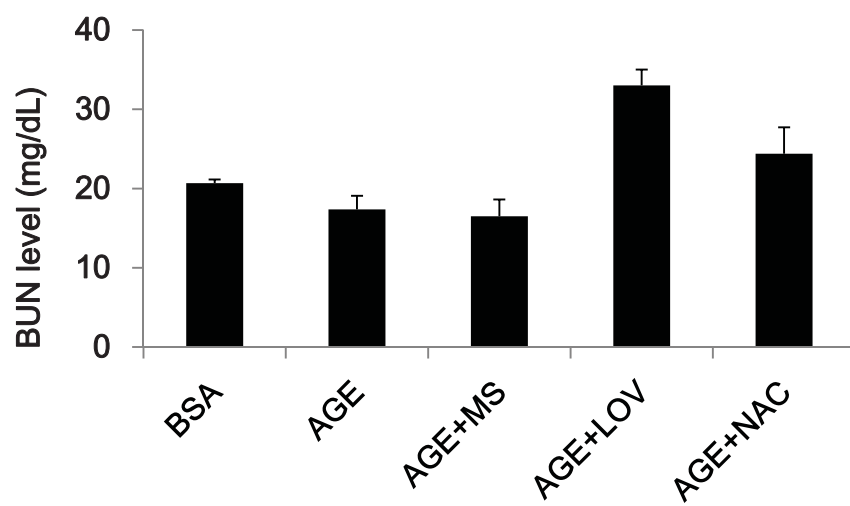
(A)



(B)



(C)



(D)

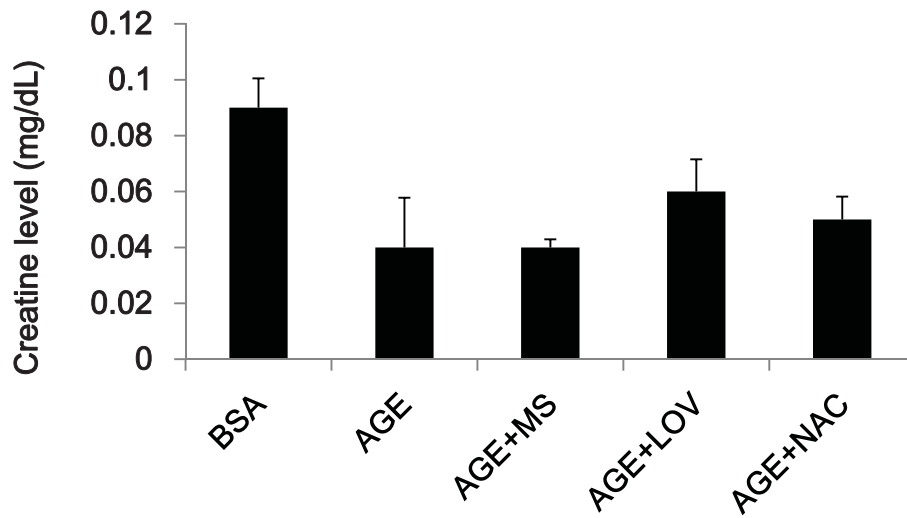


圖 4-26 AGE 誘導對小鼠肝腎受損指標 (A) ALT (B) Albumin (C) BUN (D) Creatine 之影響

Fig. 4-26 The effect of monascin and lovastatin on ALT, Albumin, BUN and Creatine of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE+ MS: AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE+LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE+NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group

四、小結

綜合促發炎細胞激素和抗氧化酵素部分的實驗結果，如表 4-2 及表 4-3 所示。紅色箭頭，黑色箭頭分別表示 AGE，MS 和 LOV 對 AGE 誘導糖尿病小鼠之影響。MS 和 LOV 對 AGE 誘導 22 周之糖尿病小鼠胰臟、肝臟和腎臟部分均有較好的抑制促發炎細胞激素和提升抗氧化酵素表現之功效，說明 MS 和 LOV 對胰島素抗性的改善可能是通過這兩個方面而達成。但在胰臟的部分，MS 對 GSH 的含量沒有明顯提升效果，在腎臟的部分，LOV 對 CAT 的活性沒有明顯提升效果，可能是 LOV 透過影響 GPx 之活性達到抗氧化之效果，而對 CAT 之活性無明顯提升效果。

表 4-2 Monascin 和 lovastatin 對抑制促發炎細胞激素表現之小結



Table 4-2 The effect of monascin and lovastatin on cytokines of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

	AGE	AGE+MS	AGE+LOV
Pancreas TNF-α	↑	↓	↓
Pancreas IL-6	↑ ↑	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓
Pancreas IL-1β	↑	↓	↓ ↓
Liver TNF-α	↑	↓ ↓	↓
Liver IL-6	↑	↓ ↓	↓ ↓
Liver IL-1β	↑	↓	↓
Kidney TNF-α	↑	↓	↓
Kidney IL-1β	↑	↓	↓ ↓

↑ , significantly elevator from BSA group

↓ , significantly inhibitory from AGE group

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE+ MS: AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE+LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE+NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group

表 4-3 Monascin 和 lovastatin 對提升抗氧化酵素活性表現之小結

Table 4-3 The effect of monascin and lovastatin on antioxidant enzymes of male BALB/c mice with 22 weeks of i.p. injection of advanced glycation end-products

	AGE	AGE+MS	AGE+LOV
Pancreas SOD	↓	↓	↑ ↑ ↑
Pancreas GSH	↓	-	↑
Pancreas CAT	-	-	-
Liver SOD	↓	↑	↑ ↑
Liver GSH	↓	↑	↑
Liver CAT	↓	↑ ↑	↑
Kidney SOD	↓	↑ ↑	↑
Kidney GSH	↓	↑	↑
Kidney CAT	↓	-	-

↑ , significantly elevator from BSA group

-, no significantly diferent from AGE group

↓ , significantly inhibitory from AGE group

BSA: control group; AGE: advanced glycation end-product induced group; AGE+ MS: AGE induced group and 10 mg MS/kg bw group; AGE+LOV: AGE induced group and 10 mg LOV/kg bw group; AGE+NAC: AGE induced group and 100 mg NAC/kg bw group

第五章 綜合討論



糖尿病是一種會造成慢性高血糖之疾病，對人體之傷害主要是引起胰島素抗性及 β 細胞功能受損，因而減少 β 細胞分泌胰島素的功能，降低胰島素分泌之機制可能透過減少胰島素基因的表現、減少胰島素的含量、減少胰島素的分泌、減少 β 細胞轉錄因子之表現達成。有研究者發現糖尿病人中 β 細胞會漸漸被破壞而死亡，高濃度的葡萄糖和脂質可能造成 β 細胞的功能減弱和凋亡之原因，另外氧化壓力傷害產生的自由基和發炎細胞激素的產生也會減少 IRS 訊號傳遞和誘發 β 細胞凋亡。

目前有大量研究顯示發炎細胞激素與第二型糖尿病發生有關；此外，在糖尿病病患中體內發現有高濃度的過度糖化終產物 (advanced glycation end-product, AGEs)，本研究以 IHC 偵測肝臟中 AGE 含量。結果發現，糖尿病小鼠中 AGE 的累積量顯著高於正常大鼠，可知在糖尿病小鼠的高糖環境中會產生 AGE，而 AGE 則會產生氧化壓力，對體內組織造成傷害，是第二型糖尿病許多併發症產生的主要原因之一。

AGE 其可透過與 AGEs 之受體 (RAGE) 結合之路徑而使免疫細胞產生大量發炎細胞激素。本研究結果顯示 MS 和 LOV 能夠抑制免疫細胞產生發炎因子、減緩發炎激素及 AGE 導致之胰島素抗性有改善作用。

本研究首次利用腹腔注射 AGE 建立糖尿病動物誘導模式。由動物實驗結果推測如圖 5-1 之機制。有研究指出，AGE 誘導之糖尿病動物模式其體內血漿、肝臟與腎臟的脂質過氧化會增加，且釋出自由基，增加體內氧化壓力，提升體內氧化壓力，增加機體之胰島素抗性。因此如果能夠透過抗氧化酵素系統，例如：SOD、CAT、GSH 使 ROS 降低，將有助於胰島素阻抗的改善。

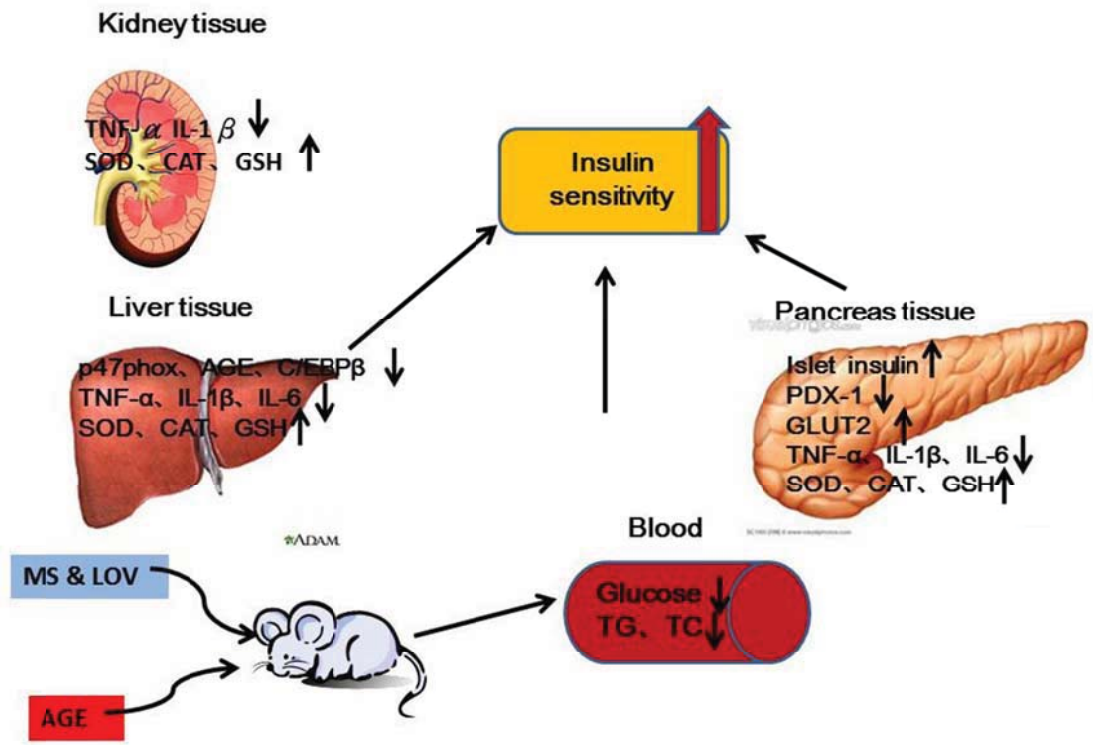


圖 5-1 Monascin 及 lovastatin 改善胰臟功能之可能機制圖

Fig. 5-1 The potential mechanism of monascin and lovastatin on pancreatic function improvement

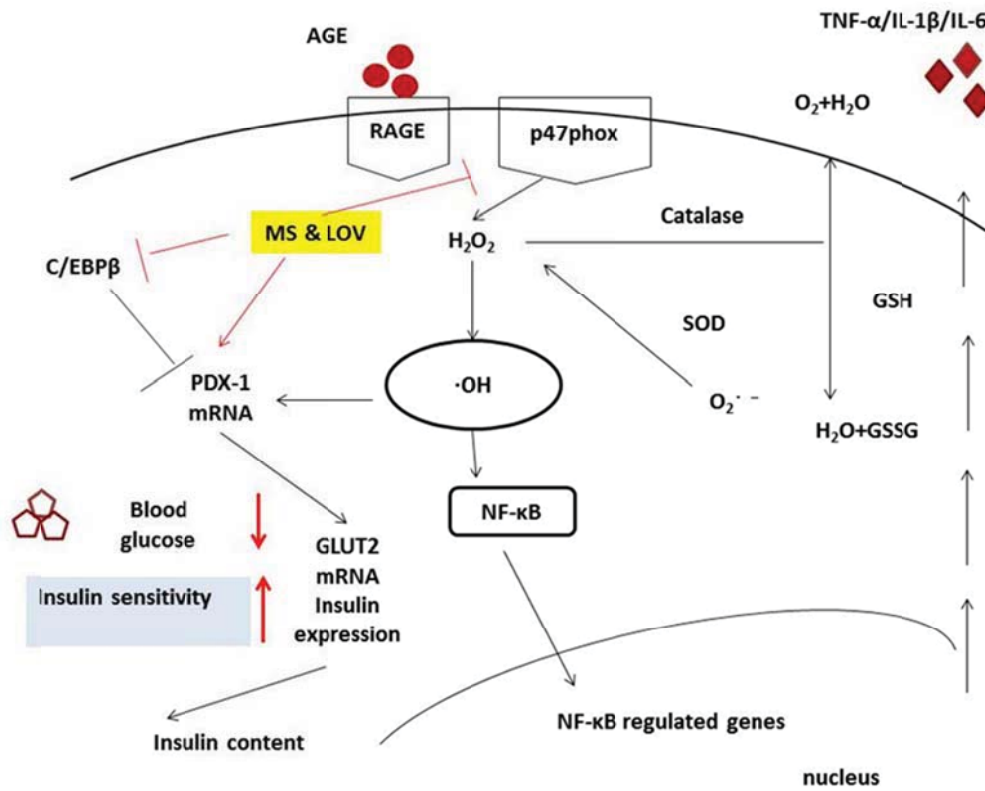
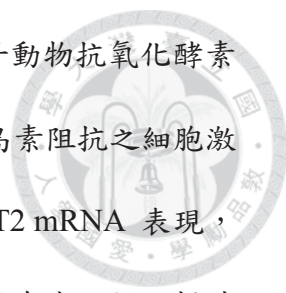


圖 5-2 結論圖

Fig. 5-2 Conclusion




本研究結果示如圖 5-2 之機制。MS 和 LOV 能藉由提升動物抗氧化酵素 (SOD、CAT、GSH) 之活性，抑制脂質合成，降低促發炎與胰島素抵抗之細胞激素 (TNF- α 、IL-6、IL-1 β) 的分泌，提升 β 細胞 PDX-1 與 GLUT2 mRNA 表現，並且抑制 C/EBP β 蛋白質表現進而影響 AGE 誘導動物之胰島素合成，從而提升小鼠對胰島素敏感度，減緩因 AGE 誘導導致之高血糖與血脂紊亂現象。AGE 可能直接抑制胰臟中胰島素之合成而不會對高血糖刺激胰島素分泌功能造成障礙。MS 和 LOV 亦可減少糖尿病小鼠糖化終產物的產生，故可能透過減少高血糖的傷害作用，而改善 β 細胞功能及周邊組織對葡萄糖之利用。由結果可知，AGE 堆積會造成體內代謝生化反應之異常，故良好調控 AGE 含量多寡應可有效降低高 AGE 飲食所誘發之第二型糖尿病發生。

本研究室 Lee 等人所發表之論文已證實 MS 能藉由活化 Nrf2 而提升與抗氧化酵素相關之基因表現，減輕 methylglyoxal 誘導之糖尿病大鼠胰島素抵抗現象 (Lee et al., 2013a)，但是 MS 和 LOV 對 AGE 誘導糖尿病小鼠之胰島素抵抗現象是否也是透過活化 Nrf2 還需要進一步探討。

之前本研究室發現 MS 具有降血糖作用，但無促進胰島素分泌作用，因此認為 MS 主要通過提升周邊組織胰島素敏感性降低血糖，本研究室之前的結果發現 MS 可促進葡萄糖在肌肉細胞轉運和消耗 (Lee et al., 2011)，進一步證實了 MS 之降糖作用可能通過促進外周組織利用葡萄糖，另外也發現 MS 具有抑制脂肪細胞分化的作用 (Lee et al., 2013b)，脂肪細胞分化過度引起脂肪細胞數目增多時導致肥胖的重要環節，因此 MS 可能對 AGE 造成肥胖和糖尿病患者之病情有改善之效果。

綜上所示，AGE 會造成小鼠體內氧化壓力升高，進而導致小鼠發炎細胞因



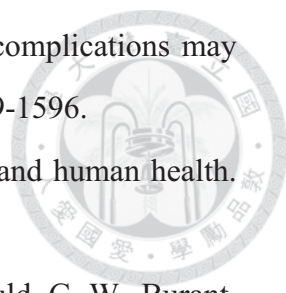
子大量分泌，導致 β 細胞功能障礙，胰島素合成減少，並使外周組織對胰島素敏感性下降，造成糖脂代謝紊亂，並進一步產生胰島素抗性，最終促成糖尿病的發展。糖尿病又可使 ROS 生成增多，加劇氧化壓力傷害，二者形成惡性循環。

未來的研究工作可繼續探討 MS 和 LOV 抗發炎和抗氧化作用是否藉由活化 Nrf2 或 PPAR- γ ，並可以探討與胰島素訊息傳遞相關之蛋白質表現，例如 IR, IRS 之表現。

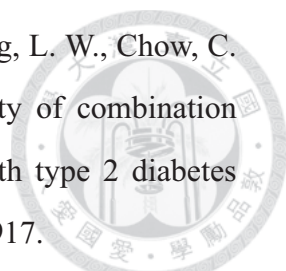
第六章 參考文獻



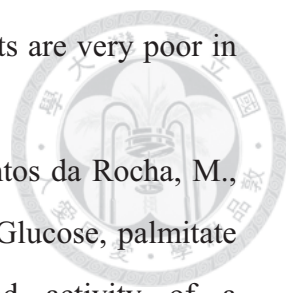
- 陳彥霖。1999。紅麴與高血壓。科學與技術。32: 54-59。
- 林讚峰。1983。紅麴菌的鑑定及實用分類法。製酒科技專討彙論。5: 104-113。
- Alberts, A. W. 1988. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. *Am. J. Cardiol.* 62: 10J-15J.
- Amore, A., Cirina, P., Mitola, S., Peruzzi, L., Gianolio, B., Rabbone, I., Sacchetti, C., Cerutti, F., Grillo, C., Coppo, R., 1997. Nonenzymatically glycated albumin (Amadori adducts) enhances nitric oxide synthase activity and gene expression in endothelial cells. *Kidney Int.* 51: 27-35.
- Andrew, W. J., Vasquez, B., Nagulesparan, M., Klimers, I., Foley, J., Unger, R., Reaven, G. M. 1984. Insulin therapy in obese non-insulin-independent diabetes induces improvement in insulin action and secretion that are maintained for two weeks after insulin withdrawal. *Diabetes.* 30: 634-642.
- Aniya, Y., Ohtani, I. I., Higa, T., Miyagi, C., Gibo, H., Schimabukuro, M., Nakanishi, H., Taira, J. 2000. Dimeric acid as an antioxidant of the mold, *Monascus anka*. *Free. Radic. Biol. Med.* 28: 999-1004.
- Blanc, P. J., Loret, M. O., Santerre, A. L., Pareilleux, A., Prome, D., Prome, J. C., Laussac, J. P., Goma, G. 1994. Pigments of *Monascus*. *J. Food Sci.* 59: 862-865.
- Bouche, C., Serdy, S., Kahn, C. R., Goldfine, A. B. 2004. The cellular fate of glucose and its relevance in type 2 diabetes. *Endor. Rev.* 25: 807-830.
- Brownlee, M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 414: 813-819.
- Brownlee, M. 1991. Glycosylation products as toxic mediators of diabetic complications. *Ann. Rev. Med.* 42: 159-166.
- Brownlee, M., Vassara, H., Kooney, A., Ulrich, P., Cerami, A. 1986. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science.* 232: 1629-1632.
- Budavari, S., Maryadele, J., Smith, A., Heckelman, P. E. 1989. *The Merck Index.* 11: 2330-2331.

- 
- Ceriello, A. 2003. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a “causal” antioxidant therapy. *Diabetes. Care.* 26: 1589-1596.
- Chen, H. Y., Yen, G. C. 1998. Free radicals, antioxidant defenses and human health. *Nutri. Sci. J.* 23: 105-121.
- Davidson, N. O., Hausman, A. M., Ifkovits, C. A., Buse, J. B., Gould, G. W., Burant, C. F., Bell, G. I. 1992. Human intestinal glucose transporter expression and localization of GLUT5. *Am. J. Physiol.* 262: 795-800.
- Endo, A. 1979. A new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. *J. Gastroenterol. Clin. Biol.* 24: 719-724.
- Evan, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., Grodsky, G. M. 2002. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 23: 599-622.
- Fatehi-Hassanabada, Z., Chana, C. B., Furnanb, B. L. 2010. Reactive oxygen species and endothelial function in diabetes. *Eur. J. Pharmacol.* 636: 8-17.
- Garvey, W. T., Olefsky, J. M., Matthaei, S., Marshall, S. 1987. Glucose and insulin co-regulate the glucose transport system in primary cultured adipocytes. *J. Biol. Chem.* 262: 189-197.
- Gastaldelli, A., Toschi, E., Pettiti, M., Frascerra, S., Quinones-Galvan, A., Sironi, A. M., Natali, A., Ferannini, E. 2001. Effect of physiological hyperinsulinemia on gluconeogenesis in nondiabetic subjects and in type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 50: 1807-1812.
- Goldberg, R., La Belle, P., Zupkis, R., Ronaca, P. 1990. Comparison of the effects of lovastatin and gemfibrozil on lipids and glucose control in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am. J. Cardiol.* 66: 16B-21B.
- Guha, M., Bai, W., Nadler, J. L., Natarajan, R. 2000. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor alpha gene expression in monocytic cells via hyperglycemia-induced oxidant stress-dependent and -independent pathways. *J. Biol. Chem.* 275: 17728-17739.
- Hanley, A. J., Williams, K., Stem, M. P., Haffner, S. M. 2002. Homeostasis model assessment of insulin resistance in relation to the incidence of cardiovascular

- disease: the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care*. 25: 1177-1184.
- Henriksen, E. J. 2006. Exercise training and the antioxidant alpha-lipoic acid in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free. Radic. Biol. Med.* 40: 3-12.
- Ho, B. Y., Pan, T. M. 2009. The *Monascus* metabolite monacolin K reduces tumor progression and metastasis of Lewis lung carcinoma cell. *J. Agric. Food Chem.* 57: 8258-8265.
- Holman, G. D., Kozka, I. J., Clark, A. E., Flower, C. J., Saltis, J., Habberfield, A.D., Simpson, I. A., Cushman, S. W. 1990. Cell surface labeling of glucose transporter isoform GLUT4 by bio-mannose photolabel. Correlation with stimulation of glucose transport in rat adipocyte cells by insulin and phorbol ester. *J. Biol. Chem.* 265: 18172-18179.
- Huttunen, H. J., Fages, C., Rauvala, H. 1999. Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 274: 19919-19924.
- Itoh, K., Ishii, T., Wakabayashi, N., Yamamoto, M. 1999. Regulatory mechanisms of cellular response to oxidative stress. *Free. Radic. Res.* 31: 319-324.
- Jassem, W., Heaton, N. D. 2004. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury in organ transplantation. *Kidney Int.* 66: 514-517.
- Juzlova, P., Martinkova, L., Kren, V. 1996. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. *J. Ind. Microbiol.* 16: 163-170.
- Kalueff, A. V., Nutt, D. J. 2007. Role of GABA in anxiety and depression. *Depress. Anxiety.* 24: 495-517.
- Kang, K. W., Choi, S. H., Kim, S. G. 2002. Peroxynitrite activates NF-E2-related factor 2/antioxidant response element through the pathway of phosphatidylinositol 3-kinase: the role of nitric oxide synthase in rat glutathione S-transfrase A2 induction. *Nitric Oxide.* 7: 244-253.
- Kaspar, J. W., Niture, S. K., Jaiswal, A. K. 2009. Nrf2: INrf2 (keap1) signaling in oxidative stress. *Free. Radic. Biol. Med.* 47: 1304-1309.

- 
- Ko, G. T., Mak, T. W., Yeung, V. T., Chan, D. C., Lam, C. W., Tsang, L. W., Chow, C. C., Cockram, C. S. 1998. Short-term efficacy and tolerability of combination therapy with lovastatin and acipimox in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus and mixed dyslipidemia. *J. Clin. Pharmacol.* 38: 912-917.
- Kohama, Y., Matsumoto, S., Mimura, T., Tanabe, N., Indada, A., Nakanishi, T. 1987. Isolation and identification of hypotensive principles in red-mold rice. *Chem. Phar. Bull.* 35: 2484-2489.
- Koschinsky, T., He, C. J., Mitsuhashi, T., Bucala, R., Liu, C., Buenting, C., Hetiman, K., Vlassara, H. 1997. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 6474-6479.
- Leclercq, I. A., Morais, A. D. S., Schroyen, B., Hul, N. V., Greerts, A. 2007. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: Mechanisms and consequences. *J. Hepatol.* 47: 142-156.
- Lee, B. H., Hsu, W. H., Huang, T., Chang, Y. Y., Hsu, Y. W., Pan, T. M. 2013a. Effects of monascin on anti-inflammation mediated by Nrf2 activation in advanced glycation end product-treated THP-1 monocytes and methylglyoxal-treated wister rats. *J. Agric. Food Chem.* 61: 1288-1298.
- Lee, B. H., Hsu, W. H., Liao, T. H., Pan, T. M. 2011. The *Monascus* metabolite monascin against TNF- α -induced insulin resistance via suppressing PPAR- γ phosphorylation in C2C12 myotubes. *Food. Chem. Toxicol.* 49: 2609-2617.
- Lee, C. L., Wen, J. Y., Hsu, Y. W., Pan, T. M. 2013b. *Monascus*-fermented yellow pigments monascin and ankaflavin showed antiobesity effect via the suppression of differentiation and lipogenesis in obese rats fed a high-fat diet. *J. Agric. Food Chem.* 61: 1493-1500.
- Lee, C. L., Tsai, T. Y., Wang, J. J., Pan, T. M. 2006a. In vivo hypolipidemic effects and safety of low dosage *Monascus* powder in a hamster model of hyperlipidemia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 533-540.
- Lee, C. L., Wang, J. J., Kuo, S. L., Pan, T. M. 2006b. *Monascus* fermentation of dioscorea for increasing the production of cholesterol-lowering agent-monacolin K

- and antiinflammation agent-monascin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 1254-1262.
- Lefer, D. J. 2002. Statins as potent anti-inflammatory drug. *Circulation.* 106: 2041-2042.
- Lenzen, S., Drinkgern, J., Tiedge, M., 1996. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free. Radical. Biol. Med.* 20: 463-466.
- Martinkova, L., Juzlova, P., Vesely, D. 1995. Biological activity of polyketide pigments produced by the fungus *Monascus*. *J. Appl. Microbiol.* 79: 609-616.
- Martinkova, L., Patakova-Juzlova, P., Krent, V., Kucerova, Z., Havlicek, V., Olsovsky, P., Hovorka, O., Rihova, B., Vesely, D., Ulrichova, J., Olsovsky, P., Hovorka, O., Rihova, B., Vesely, D., Vesela, D., Ulrichova, J., Prikrylova, V. 1999. Biological activities of oligoketide pigments of *Monascus purpureus*. *Food Addit. Contam.* 16: 15-24.
- Matsuda, T., Kido, Y., Ashara, S., Kaisho, T., Tanaka, T., Hanshimoto, N., Shigeyama, Y., Takeda, A., Inoue, T., Shibutani, Y. et al., 2010. Ablation of C/EBP β alleviates ER stress and pancreatic β cell failure through the GRP78 chaperone in mice. *J. Clin. Invest.* 120:115-126.
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., Turner, R. C. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 28: 412-419.
- Meir, O., Dvash, E., Werman, A., Rubinstein, M. 2010. C/EBP β regulates endoplasmic reticulum stress-triggered cell death in mouse and human models. *PloS. One.* 5: e9516.
- Meldrum, B. S. 1975. Epilepsy and gamma-aminobutyric acid-mediated inhibition. *Int. Rev. Neurobiol.* 17: 1-36.
- Meshkani, R. Adeli, K. 2009. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin. Biochem.* 1331-46.

- 
- Modak, M. A., Parab, P. B., Ghaskadbi, S. S. 2009. Pancreatic islets are very poor in rectifying oxidative DNA damage. *Pancreas*. 38: 23-29.
- Morgan, D., Oliverira-Emilio, H. R., Keane, D., Hirata, A. E., Santos da Rocha, M., Bordin, S., Curi, R., Newsholme, P., Carpinelli, A. R. 2007. Glucose, palmitate and proinflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line. *Diabetologia*. 50: 359-369.
- Nakayama, M., Inoguchi, T., Sonata, T., Maeda, Y., Sasaki, S., Sawada, F., Tsubouch, H., Sonoda, N., Kobayashi, K., Sumimoto, H., Nawata, H. 2005. Increased expression of NAD(P)H oxidase in islets of animal models of type 2 diabetes and its improvement by an AT1 receptor antagonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332: 927-933.
- Negi, G., Kumar, A., Joshi, R. P., Sharma, S. S. 2011. Oxidative stress and Nrf2 in the pathophysiology of diabetic neuropathy: old perspective with a new angle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 408: 1-5.
- Numazawa, S., Ishikawa, M., Yoshida, A., Tanaka, S., Yoshida, T. 2003. A typical protein kinase C mediates activation of NF-E2-related factor 2 in response to oxidative stress. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 285: 334-342.
- Oh, Y. S., Lee, Y. J., Kang, Y., Han, J., Lim, O. K., Jun, H. S. 2013. Exendin-4 inhibits glucolipotoxic ER stress in pancreatic β cells via regulation of SREBP1c and C/EBP β transcription factors. *J. Endocrinol.* 216: 343-352.
- Olson, L. K., Redom, J. B., Towle, H. C., Robertson, R. P. 1993. Chronic exposure of HIT cells to high glucose concentrations paradoxically decrease insulin gene transcription and alters binding of insulin gene regulatory protein. *J. Clin. Invest.* 92: 514-519.
- Olson, L. K., Sharma, A., Peshavaria, M., et al., 1995. Reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 β cells chronically exposed to a superphysiologic glucose concentration is associated with loss of STF-1 transcription factor expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 9127-9131.
- Patakova, P. 2012. *Monascus* secondary metabolites: productin and biological activity.

- J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 40: 169-181.
- Rana, S. V., Attri, S., Vaiphei, K., Pal, R., Attri, A., Singh, K. 2006. Role of N-acetylcysteine in rifampicin-induced hepatic injury of young rats. World. J. Gastroenterol. 12: 287-291.
- Rayner, D. V., Thomas, M. E., Trayhurn, P. 1994. Glucose transporters (GLUTs 1-4) and their mRNAs in regions of the rat brain; insulin-sensitive transporter expression in the cerebellum. Can. J. Physiol. Pharm. 72: 476-479.
- Reddy, V. R., Beyaz, A. 2006. Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. Drug Discov. Today. 11: 646-654.
- Robertson, R. P. 2009. β -cell deterioration during diabetes: what's in the gun? Trends. Endocrinol. Metab. 20: 388-393.
- Saltiel, A. R., Kahn, C. R. 2001. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature. 414: 799-806.
- Sawynok, J. 1987. GABAergic mechanisms of analgesia: an update. Pharmacol. Biochem. Behav. 26: 463-474.
- Shi, Y. C., Pan, T. M. 2010a. Antioxidant and pancreas-protective effect of red mold fermented products on streptozotocin-induced diabetic rats. J. Sci. Food Agric. 90: 2519-2525.
- Shi, Y. C., Pan, T. M. 2010b. Anti-diabetic effects of *Monascus purpureus* NTU 568 fermented products on streptozotocin-induced diabetic rats. J. Agric. Food Chem. 58: 7634-7640.
- Shi, Y. C., Liao, V. H., Pan, T. M. 2012. Monascin from red mold dioscorea as a novel antidiabetic and antioxidative stress agent in rats and *Caenorhabditis elegans*. Free. Radic. Biol. Med. 52: 109-117.
- Shu, T. T., Zhu, Y. X., Wang, H. D., Lin, Y., Ma, Z., Han, X. 2011. AGEs decrease insulin synthesis in pancreatic β -cell by repressing pdx-1 protein expression at the post-translational level. PloS. One. 6: e18782.
- Son, S. M. 2007. Role of vascular reactive oxygen species in development of vascular abnormalities in diabetes. Diabetes. Res. Clin. Pract. 77: S65-S70.
- Su, N. W., Lin, Y. L., Lee, M. H., Ho, C. Y. 2005. Ankaflavin from

- Monascus*-fermented red rice exhibits selective cytotoxic effect and induces cell death on Hep G2 cells. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1949-1954.
- Tiedge, M., Lortz, S., Drinkgern, J., Lenzen, S. 1997. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes.* 46: 1733-1742.
- Tonooka, N., Oseid, E., Zhou, H., Harmon, J. S., Robertson, R. P. 2007. Glutathione peroxidase protein expression and activity in human islets isolated for transplantation. *Clin. Transplant.* 21: 767-772.
- Van Tieghem, M. 1884. *Monascus* genre nouveau de l'ordre des Ascomycetes. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 31: 226-231.
- Wang, J. J., Pan, T. M. 2003. Effect of red mold rice supplements on serum and egg yolk cholesterol levels of laying hens. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4824-4829.
- Wang, Q., Somwar, R., Bilan, P. J., Liu, Z., Jin, J., Woodgett, J. R., Klip, A. 1999. Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in L6 myoblasts. *Mol. Cell Biol.* 19: 4008-4018.
- Wang, S. H., Chang, J. C., Pokkaew, R., Lee, F. J., Chiou, Y. R. 2011. Modified fast procedure for the detection and screening of antiglycative phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 59: 6906-6912.
- Wantier, M. P., Chappery, O., Corda, S. 2001. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidative stress to altered gene expression via RAGE. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280: 685-694.
- Weir, G. 1993. The relationship of diabetes, loss of glucose-induced insulin secretion, and GLUT2. *J. Diab. Comp.* 7: 124-129.
- Weyer, C., Bogardus, C., Mott, D. M., Pratley, R. E. 1999. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 104: 787-794.
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H. 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 27: 1047-1053.
- Wood, I. S., Trayhurn, P. 2003. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded

- families of sugar transport proteins. *Brit. J. Nutr.* 89: 3-9.
- Wu, C. L., Lee, C. L., Pan, T. M. 2009. Red mold diosorea has a greater antihypertensive effect than traditional red mold rice in spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.* 57: 5035-5041.
- Wu, X., Hou, W., Sun, S., Bi, E., Wang, Y., Shi, M., Zang, J., Dong, C., Sun, B. 2006. Novel function of IFN-gamma: negative regulation of dendritic cell migration and T cell priming. *J. Immunol.* 177: 934-943.
- Yasukawa, K., Takahashi, M., Natori, S., Kawai, K., Yamazaki, M., Takeuchi, M., Takido, M. 1994. Azaphilones inhibit tumor promotion by 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mice. *Oncology.* 51: 108-112.
- Yessoufou, A., Moutairou, K., Khan, N. A. 2011. A model of insulin resistance in mice, born to diabetic pregnancy, is associated with alterations of transcription-related genes in pancreas and epididymal adipose tissue. *J. Obes.* doi: 10.1155/2011/654967. Epub 2010 Sep 26
- Zhang, Y., Wang, Z., Zhao, Y., Zhao, M., Wang, S., Hua, Z., Zhang, J. 2012. The plasma 5'-AMP acts as a potential upstream regulator of hyperglycemia in type 2 diabetic mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302: E325-333
- Zick, Y., Liu, Y., Herschkovitz, A., Boura-Halfon, S., Ronen, D. 2001. Insulin resistance: a phosphorylation based uncoupling of insulin signaling. *Trends. Cell. Biol.* 11: 437-441.
- Zipper, L. M., Mulcahy, R. T. 2002. Inhibition of ERK and p38 MAP kinase inhibits binding of Nrf2 and induction of GCS genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278: 484-492.

