



國立台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

初探山苦瓜萃物對 3T3-L1 脂肪細胞褐化及粒線體增生  
相關基因表現之影響

An initial approach to explore the effects of *Momordica*  
*charantia* L. extracts on the mRNA expression of  
browning and mitochondria biogenesis related genes in  
3T3-L1 adipocytes

王思文

Si-Wen Wang

指導：黃青真博士

Advisor : Ching-Jang Huang, Ph.D.

中華民國 102 年 7 月

July, 2013

中文摘要




近年臺灣地區由於西方飲食的盛行及體能活動量不足，過重及肥胖盛行率在不同性別及年齡層逐年增加。肥胖防治的主要策略是降低能量攝取、增加能量消耗。最近研究顯示，刺激白色脂肪「褐化」可消耗熱量，抑制脂肪組織累積，防止肥胖。本實驗室先前研究，小鼠攝食山苦瓜飲食可促進白色脂肪中「棕色脂肪」及粒線體相關基因 mRNA 表現，並增加能量代謝速率。本研究擬建立 3T3-L1 脂肪細胞培養為試驗平台，觀察苦瓜萃物於培養之白色脂肪細胞是否能誘發褐化及粒線體增生的特徵，並進一步觀察比較不同山苦瓜萃物/區分物對脂肪細胞褐化及增加粒線體相關基因的活性。

首先以 5  $\mu$ M troglitazone 處理，分別比較兩種分化法以及在 3 種處理時間，對於成熟脂肪細胞褐化及粒線體增生相關基因表現的影響。根據實驗結果，選擇「分化成熟前四天，樣品處理四天」，並以「分化法 1」的脂肪細胞模式進行後續實驗。試驗樣品包括：山苦瓜乙酸乙酯萃物 (EAE)、皂化物 (S)、不皂化物 (NS)、山苦瓜水萃物 (WE)、經納豆菌作用後之水萃物 (WEn) 與自苦瓜純化分離的化合物 (CLN、phytol 和 leutin)。結果顯示，低濃度的 EAE、S 及 NS 處理下，能觀察到棕色脂肪相關基因表現增加；而 EAE 也能增加脂肪細胞檸檬酸合成酶 (citrate synthase, CS) 的活性。而苦瓜中活化 PPAR $\gamma$  的活性成分也能刺激脂肪細胞的褐化。

綜合上述，3T3-L1 脂肪細胞可作為觀察褐化現象的試驗模式。而山苦瓜能活化 PPAR $\gamma$  之區分物/化合物，皆可使脂肪細胞表現褐化相關基因，與文獻中 PPAR $\gamma$  agonist 可使白色脂肪細胞表現「褐化」之現象相符。

關鍵字：肥胖、山苦瓜、脂肪細胞、褐化、粒線體

## Abstract



Due to westernized diet and insufficient physical activities, the prevalence of overweight and obesity have been increased Taiwan and other parts of the world. Managing energy balance is the principle of obesity prevention/treatment. Recent studies demonstrated that “browning” of white adipose tissue (WAT) might increase energy expenditure and prevent obesity. Previous study of our lab showed that mice fed the wild bitter melon (*Momordica charantia.L*, WBG) diet had higher metabolic rate and some characteristics of “browning” WAT, i.e., higher expressions of brown-fat-selective and mitochondria biogenesis genes. This study thus aimed to develop a cell model using cultured 3T3-L1 adipocytes for the examination of mRNA expressions of brown-fat-selective and mitochondria biogenesis genes as affected by various WBG extracts/fractions and compounds.

Two differentiation protocols and three treating stage/times were compared using 5  $\mu$ M troglitazone as the positive control. The differentiation protocol 1 and treatment during the last 4 days of differentiation showed the best results. Ethyl acetate extract (EAE), its saponifiable (S) and non-saponifiable fraction (NS), water extract without (WE) or with pretreatment (WEn) as well as 3 PPAR active compounds of WBG were then tested in the system. Low concentrations of EAE、S and NS did induce brown-fat gene expression in 3T3-L1 adipocytes ( $p<0.05$ ), and EAE can also increase the citrate synthase activity ( $p<0.05$ ). The induction of brown-fat gene expressions were also observed in cells treated with the 3 PPAR active compounds of WBG (conjugated linolenic acid, phytol and leutin), implying the involvement of WBG PPAR $\gamma$  activity in the “browning” effect.

In conclusion, 3T3-L1 adipocytes can be used as a model to investigate “browning” effect of WBG. The PPAR $\gamma$  active fractions and compounds of WBG induced mRNA

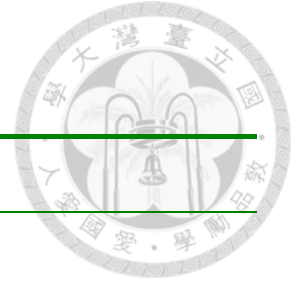
expressions of brown-fat-selective genes in this cell model.

keywords : obesity, *Momordica charantia*, adipocytes, browning, mitochondria



縮寫對照表

縮寫對照表



縮寫	全名
<b>BGP</b>	Bitter gourd
<b>CLA</b>	Conjugated linoleic acid
<b>CLN</b>	Conjugated linolenic acid
<b>CS</b>	Citrate synthase
<b>NS</b>	Non- Saponifiable
<b>PPAR</b>	Peroxisome proliferator-activated receptor
<b>RS</b>	Rat serum
<b>S</b>	Saponifiable
<b>Trog</b>	Troglitazone
<b>WE</b>	Water extract of Bitter gourd freeze powder
<b>WEn</b>	WE hydrolysis by <i>bacillus subtilis</i> natto culture in 5 % black soymilk

總目錄



中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
縮寫對照表.....	IV
總目錄.....	V
圖目錄.....	VIII
表目錄.....	IX
第一章 緒論.....	1
第一節 前言.....	1
第二節 文獻回顧.....	2
一、代謝症候群.....	2
二、過氧化體增殖劑活化受體.....	2
(一) PPAR 活化劑與 ligands.....	3
(二) PPAR $\gamma$ 與脂肪分化.....	3
(三) PPAR 與代謝症候群.....	4
三、脂肪細胞褐化現象.....	4
(一) 脂肪組織.....	4
(二) 去偶聯蛋白.....	5
(三) PPAR- $\gamma$ co-activator-1 $\alpha$ (PGC1- $\alpha$ ).....	6
(四) 白色脂肪「褐化現象」(browning).....	8
(五) 基因及粒線體指標的篩選.....	8
四、山苦瓜.....	11
(一) 苦瓜之背景.....	11
(二) 苦瓜與肥胖相關研究.....	11
(三) 苦瓜中 PPAR 活性成.....	12

第三節	實驗假說與實驗架構.....	19
	一、實驗假說.....	19
	二、實驗架構.....	19
第二章	山苦瓜萃物對於脂肪細胞褐化相關基因表現之影響.....	20
第一節	前言.....	20
第二節	材料與方法.....	21
	一、白色脂肪細胞模式建立與最佳化.....	21
	二、山苦瓜萃物促進脂肪細胞褐化.....	21
	三、細胞株.....	22
	四、培養基與藥品試劑.....	22
	(一) 細胞培養與分化.....	22
	(二) 檸檬酸合成酶活性定.....	23
	(三) quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) 法分析基因表現.....	23
	(四) 處理藥品.....	24
	五、儀器設備.....	24
	六、山苦瓜萃物之製備.....	25
	(一) 山苦瓜乙酸乙酯萃物暨其區分物.....	25
	(二) 山苦瓜水萃物.....	25
	(三) 經 5 % 黑豆漿培養之納豆菌處理山苦瓜水萃物.....	25
	七、實驗方法.....	25
	(一) 細胞培養.....	25
	(二) 細胞分化.....	26
	(三) 蛋白質測定.....	26
	(四) 處理藥品.....	27
	(五) 檸檬酸合成酶活性測定.....	27

(六) 基因表現.....	27
(七) 數據整理及統計分析.....	28
第三節 實驗結果.....	29
一、白色脂肪細胞褐化實驗模式建立與最佳化.....	29
二、山苦瓜萃物處理 3T3-L1 脂肪細胞褐化相關基因表現.....	31
三、山苦瓜萃物處理 3T3-L1 脂肪細胞之檸檬酸合成酶 (CS) 活性.....	33
四、山苦瓜中刺激 3T3-L1 脂肪細胞褐化基因表現的可能活性成分.....	34
第四節 討論.....	55
一、比較不同分化法及處理時間建立 3T3-L1 脂肪細胞褐化最佳模式...55	
二、山苦瓜萃物對於 3T3-L1 脂肪細胞褐化現象的影響.....	56
三、山苦瓜中刺激 3T3-L1 脂肪細胞褐化基因表現的可能活性成.....	58
第五節 結論.....	60
第三章 綜合討論與總結論.....	61
第一節 綜合討論.....	61
第二節 總結論.....	63
第四章 參考文獻.....	65



圖目錄

圖 1-1	成年人類中可偵測到 UCP1 positive 的棕色脂肪.....	5
圖 1-2	棕色脂肪中 UCP1 之產熱作用機制.....	6
圖 1-3	PPAR 受不同訊息分子所調控.....	7
圖 1-4	PGC1 之調控機制.....	7
圖 1-5	白色脂肪棕色化.....	11
圖 1-6	山苦瓜之各種粗萃物之製備及區分過程.....	13
圖 1-7	共軛脂肪酸 CLA 和 CLN 之化學結構.....	14
圖 2-1	分化成熟前 2 天以 troglitazone 處理 2 天對 3T3-L1 脂肪細胞褐化及粒線體 相關基因 mRNA 表現之影響.....	36
圖 2-2	分化成熟前 2 天以 troglitazone 處理 4 天對 3T3-L1 脂肪細胞褐化及粒線體 相關基因 mRNA 表現之影響.....	37
圖 2-3	分化成熟前 4 天以 troglitazone 處理 4 天對 3T3-L1 脂肪細胞褐化及粒線體 相關基因 mRNA 表現之影響.....	38
圖 2-4	兩種分化方法及三種處理時間對 troglitazone 處理 3T3-L1 脂肪細胞之褐化 與粒線體生成作用相關基因 mRNA 表現之比較.....	39
圖 2-5	山苦瓜乙酸乙酯萃物 (EAE) 及其皂化物 (S) 與不皂化物 (NS) 對 3T3-L1 脂肪細胞棕脂相關基因 mRNA 表現的影響.....	40
圖 2-6	山苦瓜乙酸乙酯萃物 (EAE) 及其皂化物 (S) 與不皂化物 (NS) 對 3T3-L1 脂肪細胞粒線體相關基因 mRNA 表現的影響.....	41
圖 2-7	山苦瓜乙酸乙酯萃物 (EAE) 及其皂化物 (S) 與不皂化物 (NS) 對 3T3-L1 脂肪細胞白色脂肪相關基因 mRNA 表現的影響.....	42
圖 2-8	山苦瓜乙酸乙酯萃物 (EAE) 及其皂化物 (S) 與不皂化物 (NS) 對 3T3-L1 脂肪細胞轉錄因子相關基因 mRNA 表現的影響.....	43
圖 2-9	山苦瓜乙酸乙酯萃物暨其區分物添加 forskolin 對分化中脂肪細胞 UCP1 及	

C/EBP $\beta$ mRNA 的影響.....	44
圖 2-10 山苦瓜水萃物及經納豆菌作用之水萃物對 3T3-L1 脂肪細胞棕脂相關基因 mRNA 表現的影響.....	45
圖 2-11 山苦瓜水萃物及經培養於 5 % 黑豆漿納豆菌作用之水萃物對 3T3-L1 脂肪細胞粒線體生成相關基因 mRNA 表現的影響.....	46
圖 2-12 山苦瓜水萃物及經納豆菌作用之水萃物對 3T3-L1 脂肪細胞白色脂肪相關基因 mRNA 表現的影響.....	47
圖 2-13 山苦瓜水萃物及經納豆菌作用之水萃物對 3T3-L1 脂肪細胞轉錄因子相關基因 mRNA 表現的影響.....	48
圖 2-14 不同山苦瓜萃物對 3T3-L1 脂肪細胞檸檬酸合成酶活性之影響.....	49
圖 2-15 山苦瓜乙酸乙酯萃物暨其區分物與 CLN 之紫外光吸光圖譜.....	50
圖 2-16 山苦瓜 PPAR 活性成分對 3T3-L1 脂肪細胞棕脂相關基因 mRNA 表現之影響.....	51
圖 2-17 山苦瓜 PPAR 活性成分對 3T3-L1 脂肪細胞粒線體生合成相關基因 Mrna 表現之影響.....	52
圖 2-18 山苦瓜 PPAR 活性成分對 3T3-L1 脂肪細胞白色脂肪相關基因 mRNA 表現之影響.....	53
圖 2-19 山苦瓜 PPAR 活性成分對 3T3-L1 脂肪細胞轉錄因子相關基因 mRNA 表現之影響.....	54

表目錄

表 1-1 PPAR agonist 刺激白色脂肪褐化之文獻整理.....	15
表 1-2 苦瓜增加 UCPI 表現之文獻整理.....	17
表 3-1 山苦瓜萃物/區分物對於 3T3-L1 脂肪細胞基因表現影響之統整表.....	64

### 第一章 緒論

#### 第一節 前言

臺灣地區近年來由於經濟成長及營養狀況的改善，加上速食文化的強力促銷下，高熱量、高脂肪食品，不但成為國人的熱門食物，更成為外食族的主要食物來源。除了熱量和脂肪的過度攝取，加上體能活動量不足及靜態活動增加，過重及肥胖盛行率在不同性別及年齡層有逐年增加趨勢，也造成台灣地區第二型糖尿病的「年輕化」，主因是當身體脂肪組織越多，細胞越容易對胰島素出現抗拒。根據衛生署國民健康局「2012 台歐健康論壇」統計發現，全台成年人三成男性體重過重 (BMI 身體質量指數 $\geq 24$ )，近兩成男性肥胖 (BMI $\geq 27$ )，肥胖率是南韓十二倍、日本八倍；而女性有近兩成過重，一成七者肥胖，肥胖盛行率為亞洲之冠，也是全球代謝症候群發生率第二高的國家 (衛生署，2011)。根據 100 年衛生署公布十大死因中，有多項與肥胖有關，其中糖尿病 (死亡人數占率 6 %) 排名第四，而高血壓 (占率 3 %) 也列於前十。這些調查顯示，肥胖及糖尿病正危及國人健康。而在非手術性的治療肥胖方式中，健康的飲食及適量的運動無疑是最正當的一種，但不易維持長久。根據最近的研究，以刺激白色脂肪細胞褐化 (Browning) 的方式來增加能量的消耗來減重，或許是研發更有效治療肥胖的方向。

本實驗室最近的研究指出，苦瓜除降血糖、血脂外，也能於長期餵食苦瓜的小鼠中，觀察到白色脂肪組織中粒線體生成及棕色脂肪相關基因的表現增加，但其有效成分及機制仍尚未被確認。另外也有研究顯示，體外培養的脂肪細胞經適當處理亦可觀察到白色脂肪細胞褐化的現象。故本研究擬建立 3T3-L1 脂肪細胞培養為試驗平台，觀察苦瓜萃物於培養之脂肪細胞是否亦可誘發出褐化及粒線體增生的相關基因表現，並進一步篩選出能促使脂肪細胞褐化及增加粒線體的活性之苦瓜萃物/區分物。

### 第二節 文獻回顧

#### 一、代謝症候群

代謝症候群 (metabolic syndrome, MetS)，是指多種代謝異常的症狀集中於一個體，使其未來發生心血管疾病及第二型糖尿病之風險增加。而這些慢性疾病，皆年居台灣十大死因榜中，已成我國及世界重要上許多國家的公共衛生議題。我國於2007 實施最新定義之代謝症候群判定標準 (行政院衛生署國民健康局,2007) ，將5 項危險因子中之腹部肥胖，單獨列為1 項危險因子；刪除身體質量指數 (BMI)，及下修空腹血糖異常值切點至 100mg/dl。以下5 項危險因子中，若包含3 項或以上即者可判定為代謝症候群：

- (1) 腹部肥胖 (腰圍)：男性 $\geq 90\text{cm}$ 、女性 $\geq 80\text{cm}$ 。
- (2) 高血壓：收縮血壓 (SBP)  $\geq 130\text{mmHg}$ 、舒張血壓 (DBP)  $\geq 85\text{mmHg}$ 。
- (3) 高血糖：空腹血糖值 (FG)  $\geq 100\text{mg/dl}$ 。
- (4) 高密度酯蛋白膽固醇 (HDL-C)：男性 $<40\text{mg/dl}$ 、女性 $<50\text{mg/dl}$ 。
- (5) 高三酸甘油酯 (TG)  $\geq 150\text{mg/dl}$ 。

其中血壓、空腹血糖值等2 危險因子之判定，包括依醫師處方使用降血壓或降血糖等藥品 (中、草藥除外)，導致血壓或血糖檢驗值正常者。

代謝症候群的核心異常因子分別為腹部肥胖和胰島素抗阻。肥胖主要是由於攝取過多的熱量，造成能量的失衡，使多餘熱量以油脂型式長期累積在脂肪組織中。脂肪細胞除了以三酸甘油脂的型式儲存能量外，也是一種內分泌細胞，過多的脂肪會促使脂肪細胞分泌細胞激素 (adipocytokines)，造成發炎反應以及胰島素阻抗。而胰島素阻抗是指細胞上之胰島素受器對胰島素的刺激敏感性降低或產生抗性，使細胞無法有效攝入及利用血液中的葡萄糖，造成代謝異常，最後導致第二型糖尿病及心血管疾病的發生。

#### 二、過氧化體增殖劑活化受體

過氧化體增殖劑活化受體 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPARs) 為一作用於細胞核的蛋白質受體，具有轉錄因子的活性，主要調控脂肪代謝相關及其它基因的表現。PPARs 家族總共有三種 isoform，分別為 PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta/\delta$ 、PPAR $\gamma$ ，這三種型態在不同的組織表現且反應不同的生理功能：



- (1) PPAR  $\alpha$  主要分布於肝臟、心臟、肌肉等脂肪酸氧化代謝活性較高的器官，調控脂質代謝。
- (2) PPAR  $\beta/\delta$  廣泛分布於各種細胞，參與胚胎發育。
- (3) PPAR  $\gamma$  主要調控脂肪細胞分化和胰島素敏感度。

其中 PPAR  $\gamma$  又可區分成 PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2, PPAR $\gamma$ 3。PPAR $\gamma$ 1 於心、肝、肌肉及脂肪中均有表現；PPAR $\gamma$ 2 專一表現在脂肪組織中，調控脂肪細胞之分化；而 PPAR $\gamma$ 3 則表現在巨噬細胞及脂肪組織中。PPAR $\gamma$  基因功能的獲得及遺失與人類的肥胖問題很有關聯，且與代謝疾病也息息相關。

### (一) PPAR 活化劑與 ligands

PPAR 為核受器家族的成員，受專一性結合的小分子 (ligand) 所調控。當 ligands 與受器蛋白質結合後，會改變受器的構型，使其與目標基因的啟動子序列上的特定 DNA 序列結合，進而啟動目標基因的轉錄，促進該基因表現。所以 ligands 是本身能與受器蛋白質直接結合而產生轉錄效應的小分子；而活化劑是指可以活化受器的分子。目前 PPARs 的 ligands 可分為合成性與天然性：

- (1) 合成性 (synthetic ligands)：fibrate 降血脂藥 (如 clofibrate 等)、過氧化體增殖劑 (如 WY-14643)、非類固醇抗發炎藥 (如 indomethacin)、抗糖尿病藥物，例如 TZDs (包含 Rosiglitazone、Pioglitazone、Troglitazone)。
- (2) 天然性 (nature ligands)：長鏈不飽和脂肪酸、支鏈、共軛與氧化脂肪酸，例如 conjugated linoleic acid (CLA) 等。

### (二) PPAR $\gamma$ 與脂肪分化

脂肪細胞是由前驅脂肪細胞 (preadipocyte) 分化而成，一般脂肪組織中皆存有前脂肪細胞。前脂肪細胞株如 3T3-L1，為脂肪細胞之分化提供良好之體外模式，於培養期間即可觀察到其分化過程，共可分為五期：細胞增生 (cell proliferation)、細胞接觸生長停滯 (cell contact, growth arrest)、細胞擴張 (clonal expansion)、生長停滯 (growth arrest) 及脂質堆積 (lipid accumulation)，並且由數種轉錄因子共同調控，包括 CCAAT enhancer binding protein (C/EBPs)、PPAR 等。整個分化過程中，先由 C/EBP $\beta$  與 C/EBP $\delta$  共同啟動 PPAR $\gamma$ ，之後再由 C/EBP $\alpha$  繼續維持 PPAR $\gamma$  的表現，顯示兩者之間具有協同的作用，共同誘發脂肪細胞特定基因表現，如：aP2 (adipocyte P2)、LPL (lipoprotein lipase) 等。

### (三) PPAR 與代謝症候群

PPARs 可調控一系列參與糖類與脂質代謝的基因和胰島 beta 細胞的功能 (Tobin et al., 2006)。多數研究指出，許多 TZDs (thiazolidinediones) 藥物為 PPAR $\gamma$  ligands，如 pioglitazone 及 rosiglitazone 等，可調節血糖、增加胰島素敏感度 (Nawrocki et al., 2006)、抑制細胞激素所引起的發炎反應 (Chinetti et al., 2000)，也可作用在粒線體膜上的蛋白質，調節粒線體代謝的功能 (Colca et al., 2004)，改善代謝症候群引起的高血脂、高血壓及高血糖。但 2007 年有研究報告指出 rosiglitazone 會增加心臟病發作和心臟病有關之死亡風險 (Nissen et al., 2007)。女性患者使用 rosiglitazone 或 pioglitazone 也有較高的骨折發生率。而最近也有研究指出，長期服用 pioglitazone 可能會增加罹患膀胱癌之風險。

### 三、脂肪細胞褐化現象

#### (一) 脂肪組織

哺乳動物的脂肪組織可分成白色脂肪組織 (WAT) 及棕色脂肪組織 (BAT)。WAT 主要功能為儲存能量，將多餘的熱量將以三酸甘油酯的型式儲存，特色是細胞內具有巨大的單一油滴，將細胞核及胞器擠至細胞邊緣。而 BAT 主要功能是消耗能量，以緊密摺疊的粒線體及表現 UCP-1 (uncoupling protein-1) 著稱。近年研究，發現棕色脂肪細胞與肌肉細胞皆源自 myf-5 muscle-like 原始細胞 (progenitor) 系 (Seale et al., 2008)。其中決定細胞往哪個方向發展，關鍵在於轉錄因子 PRDM16，一旦開啟此基因則往 BAT 分化；反之若移除 PRDM16，則分化為肌肉細胞 (Seale et al., 2011)。有研究指出，人體內 BAT 的提高具有抵抗代謝症候群的治療潛力 (Nedergaard et al., 2010)。雖然傳統認為人類在嬰兒時期之後，棕色脂肪的量會隨著年齡的增加而逐漸減少。但最近研究顯示，以  $^{18}\text{F}$ -FDG PET-CT (positron emission tomography and computed tomography，正子放射斷層掃描-電腦斷層攝影) 方式偵測到成年人體內的棕色脂肪組織 (Nedergaard et al., 2007; Yeung et al., 2003)。而短暫暴露在寒冷之下，也能觀察到 UCP1 positive 的棕色脂肪，特別是在鎖骨及脖子附近 (Cypess et al., 2009; Mirbolooki et al., 2011; Orava et al., 2011)，不過此現象所代表的生理意義仍尚未被解釋 (圖 1-1)。傳統觀念 WAT 中並不表現 UCP1，然而早已有研究指出，長時間寒冷刺激下或增加細胞內 cyclic AMP (cAMP) 的含量，WAT 中可觀察到高度表現 UCP1 的細胞，並在外觀上具有多房 (multilocular) 的特

徵 (Cousin et al., 1992; Young et al., 1984) 。另外，有學者根據數量性狀基因座定位 (quantitative trait loci, QTL mapping) ，提出 WAT 中的類棕色脂肪細胞和典型棕色脂肪細胞，其生熱能力是受到不一樣的調節 (Coulter et al., 2003) 。

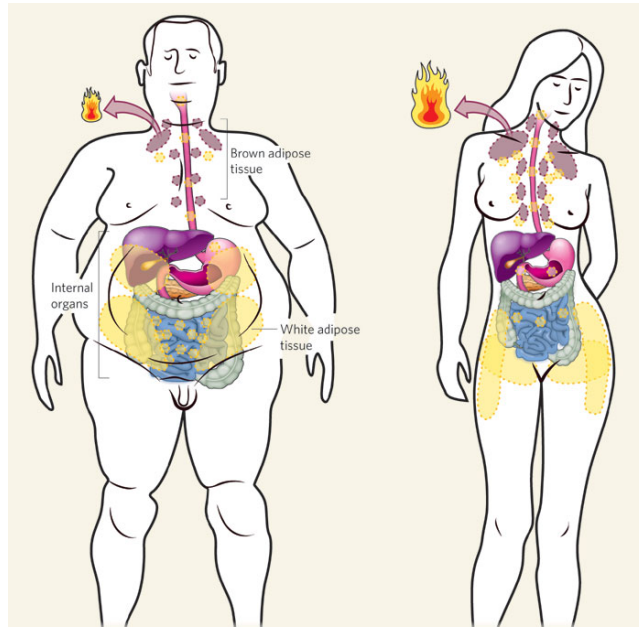


圖 1-1 成年人類中可偵測到 UCP1 positive 的棕色脂肪

**Fig 1-1** Adult humans seem to contain brown adipose tissue (BAT) primarily behind the muscles of the lower neck and collarbone, and the spine of the chest and abdomen. (Farmer, 2009)

## (二) 去偶聯蛋白 (Uncoupling proteins, UCPs)

UCP 是存在於粒線體內膜上的氫離子通道蛋白，主要有三種型態，UCP1、UCP2 及 UCP3。其中 UCP2 與 UCP3 主要調節 ROS (reactive oxygen species) ，而 UCP1 主要表現在棕色脂肪組織中，可進行去偶合作用，讓位於高能的氫離子梯度，經由此氫離子通道回到粒線體內膜裡，過程中不產生 ATP，而是把能量以熱的形式釋出，被認為可避免低體溫症及肥胖的發生，又稱為產熱素 (thermogenin) 。文獻指出，低溫的環境下或交感神經的刺激會導致棕色脂肪組織中的  $\beta$ -adrenergic receptor ( $\beta$ -AR) 活化，增加 UCP1 的表現來增加產熱作用 (Cousin et al., 1992; Guerra et al., 1998) ，並可調控粒線體生合成、促進能量代謝 (Spiegelman et al., 2000) (圖 1-2、1-3) 。

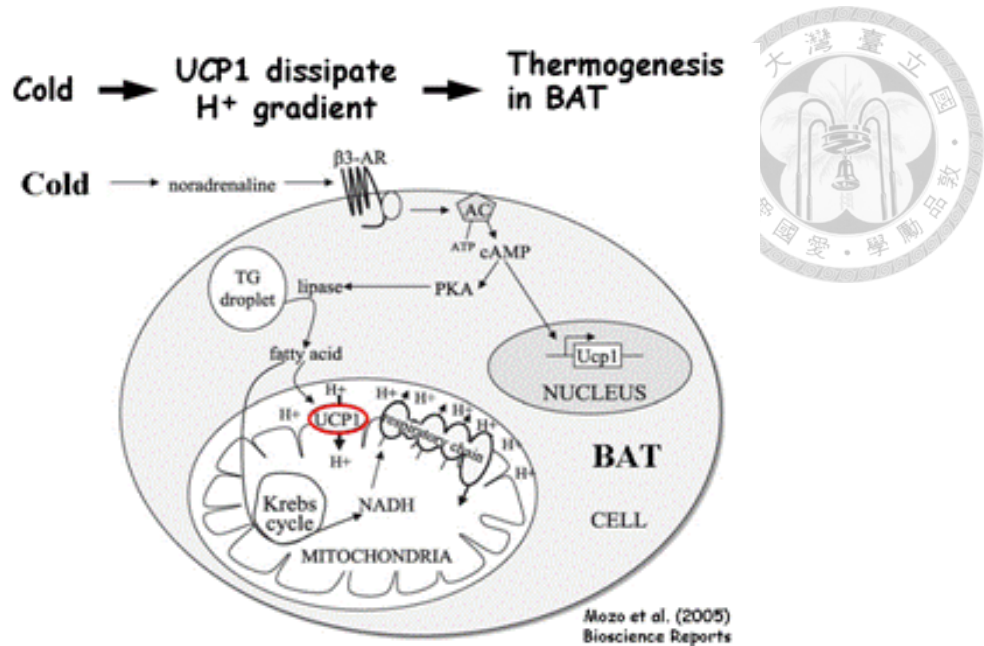


圖 1-2 棕色脂肪中 UCP1 之產熱作用機制

**Fig 1-2** Under cold conditions, placental mammals upregulate heat production in brown adipose tissue and this regulatory thermogenesis is called nonshivering thermogenesis. (Saito et al., 2008)

### (三) PPAR- $\gamma$ co-activator-1 $\alpha$ (PGC1 $\alpha$ )

PGC-1s 屬轉錄調控活化因子的家族，可誘導各種代謝基因的表現，家族成員分別有 PGC1- $\alpha$ 、PGC1- $\beta$  以及 PRC (PGC-1-related co-activator)。其中 PGC1- $\alpha$  只分布在高度耗氧的組織中，而且對粒線體的功能及能量代謝扮演重要的角色 (圖 1-3、1-4)。PGC1- $\alpha$  會受環境所調控，在低溫的刺激下，會使個體進行適應性生熱作用 (adaptive thermogenesis) (Liang et al., 2006; Puigserver et al., 1998)。此外，PGC1- $\alpha$  在肌肉中能經由運動誘導產生，進而影響粒線體生合成、提升粒線體呼吸作用 (Handschin et al., 2008)。當骨骼肌細胞中的鈣離子濃度上升，促使 CREB (cAMP response element binding protein) 受 cAMP 刺激而被活化，CREB 便與 PGC1- $\alpha$  啟動子 (promoter) 上的 CRE 序列結合而促使 PGC1- $\alpha$  的轉錄。也有研究顯示，基因轉殖鼠只要稍微增加 PGC1- $\alpha$ ，就可抵抗因年齡所產生的肥胖和糖尿病，並延長壽命 (Wenz et al., 2009)，這顯示 PGC1- $\alpha$  可能會刺激骨骼肌分泌能影響其他組織功能的因子。



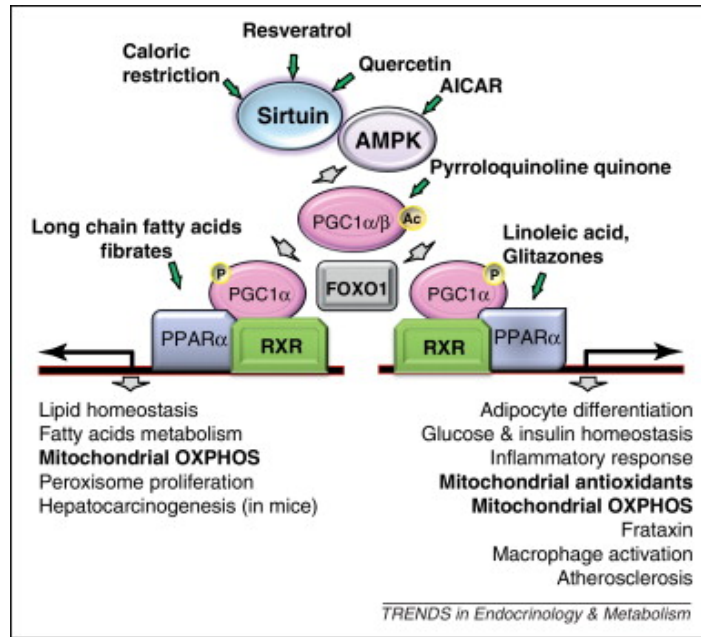


圖 1-3 PPAR 受不同訊息分子所調控

Fig 1-3 Modulation of the actions of PPAR through phosphorylation by ERK, MAPK or AMPK or through regulation of PGC-1 activity by various signaling events. (Schiff et al., 2012)

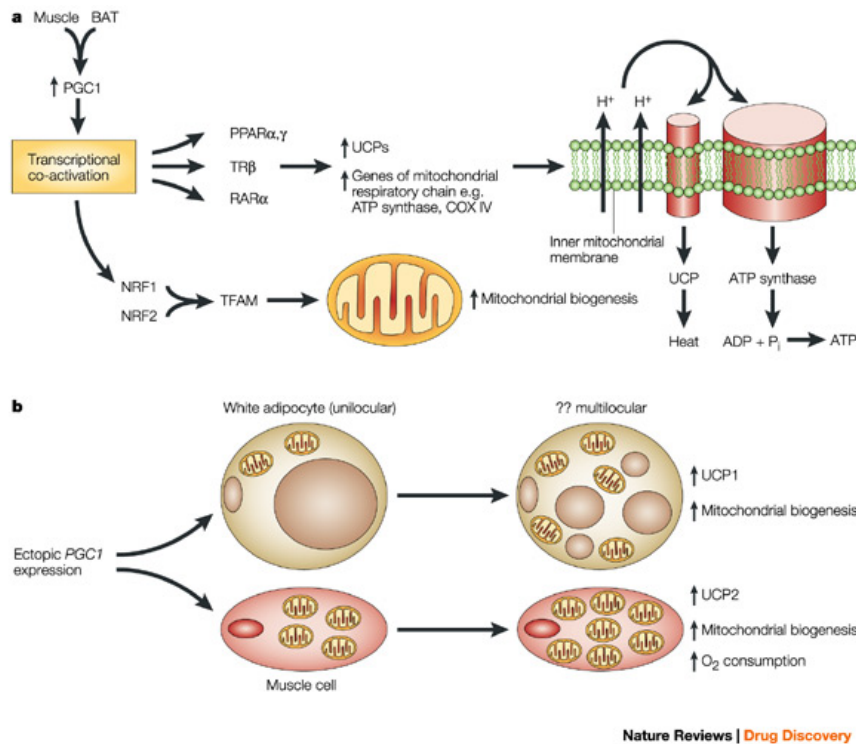


圖 1-4 PGC1 之調控機制

Fig 1-4 (a) Effects of *PGC1* expression on thermogenesis. (b) Cellular effects of ectopic *PGC1* expression. (Crowley et al., 2002)

### (四) 白色脂肪「褐化現象」 (browning)

早期研究發現，小鼠當處在寒冷環境或以  $\beta$ -adrenergic pathways 刺激，可發現棕色脂肪細胞出現在 WAT 中 (Cousin et al., 1992; Guerra et al., 1998)。這種細胞 (recruitable BAT, rBAT)，外型呈現多房的特徵，顏色也較深，和典型棕色脂肪細胞 (constitutive BAT, cBAT) 同樣含有大量細粒線體及高度表現 UCP1，並具有生熱作用的潛力，又稱為「beige cell」(J. Wu et al., 2012)、 「brite cell」(brown in white) (Petrovic et al., 2010) 或 inducible BAT (Schulz et al., 2011)。然而出現在 WAT 中這種類棕色細胞和典型棕色脂肪並非源自相同細胞系 (Seale et al., 2008; Seale et al., 2011)。不管是棕色脂肪還是 WAT 中的褐化細胞，都以 Prdm16 基因轉殖小鼠證實這兩種棕色脂肪都具有相當抗肥胖及抗糖尿病的能力 (Seale et al., 2011)。而目前也有研究指出，給予小鼠合成的 PPAR $\gamma$  agonists，可刺激 WAT 褐化現象的產生，並抑制白色脂肪相關基因的表現 (Vernochet et al., 2009)。類似的研究指出，一種第二型糖尿病藥物噻唑烷二酮類 (Thiazolidinediones, TZDs)，除了能增加對胰島素的敏感性，也能增強 PRDM16 蛋白質的效果，使白色脂肪棕色化 (Ohno et al., 2012)，但確切機制尚不清楚。另外也有研究指出，大量存在於白色脂肪組織中的視黃醛脫氫酶 (retinaldehyde dehydrogenase1, Aldh1a1) 受抑制時，也會促使褐化現象的發生，將能量以熱的形式散失，使缺乏 Aldh1a1 小鼠能耐受低溫 (Kiefer et al., 2012)。最近研究發現，經由運動誘導產生的一種天然荷爾蒙，鳶尾素 (irisin)，促進胰島素生成，也能刺激皮下脂肪細胞中 UCP1 的表現及往棕色脂肪細胞發展。只要稍微增加血液中的 irisin，能使小鼠在不改變食物攝取量及活動量下增加能量的消耗 (Bostrom et al., 2012; J. Wu et al., 2012)。白色脂肪褐化現象與 PPAR 有關之相關文獻整理於表 1。

### (五) 基因及粒線體指標的篩選

#### (1) 棕色脂肪相關基因

##### ● Cidea (Cell death-inducing DNA fragmentation factor $\alpha$ -like effector A)

Cidea 屬 CIDE 家族成員 (Inohara et al., 1998)，Cidea 會高度表現在小鼠的棕色脂肪組織當中，故被認為是 BAT 的指標之一，能藉由抑制 UCP1 的活性來調節 UCP1。Cidea 的抑制機制被認為能增加 UCP1 活性的閾值，使生熱作用能在物理刺激下更為敏感。小鼠若缺乏 Cidea 的抑制作用，能提升 uncoupling 活性，使能量消耗增加、

減少脂肪囤積使體型變瘦，顯示 Cidea 在生熱作用中扮演負調控的角色 (Zhou et al., 2003)。雖然 Cidea 和 UCP1 在寒冷的刺激下有不同反應，但由於兩者皆位於粒線體內膜上，也會受 RIP140 (hermogenic repressors) 所調控，顯示 Cidea 和 UCP1 是在相同的訊息傳遞 (cAMP-PKA pathway) 上是受到不同調控。而 Cidea 也會直接或間接受到 PPAR $\gamma$  的調控，當給予 PPAR $\gamma$  agonists 刺激，在小鼠初代脂肪細胞或分化成熟的 3T3-L1 脂肪細胞皆可觀察到 Cidea mRNA 表現增加 (Puri et al., 2008)。

- Prdm16 (PRD1-BF-1-RIZ1 Homologous Domain Containing Protein 16)

Prdm16 為轉錄調控因子，可調控棕色脂肪的分化，一般認為只會表現在 BAT 當中，但最近研究指出 prdm16 也會高度表現在皮下白色脂肪組織中。aP2-PRDM16 基因轉殖小鼠，可以調控 PGC1 $\alpha$ 、Cidea 及 UCP1 等基因表現增加，進而使 WAT 出現褐化的現象 (Seale et al., 2011)。PRDM16 也能與許多轉錄因子 (如 PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ ) 作用，增加基因的轉錄活性。

- Tfam 與 NrF1

均為粒線體生合成重要的轉錄調節因子 (Z. Wu et al., 1999)。Tfam (mitochondrial transcription factor A) 和 DNA 上的啟動子結合，進而調節粒線體基因的轉錄。而 NrF1 (nuclear respiratory factors) 則調控粒線體呼吸或粒線體 DNA 轉錄、複製等。

- Cytochrome oxidase (Cox)

Cox 於粒線體氧化機轉中扮演很重要的角色，在粒線體電子傳遞鏈中，將電子從 cytochrome c 傳送給氧分子，最終形成水分子 (Boyer, 1997)。而 Cox7a1 (cytochrome c oxidase polypeptide 7A1) 及 Cox8b (cytochrome c oxidase, subunit VIIIb) 均與粒線體電子傳遞鏈有關。

### (2) 白色脂肪相關基因

- Retn (Resistin)

是一種由脂肪細胞分泌的細胞激素，當脂肪細胞因油脂累積而增大，會促進 resistin 的合成及分泌，而造成胰島素抗性。Resistin 的合成與分泌會受到 PPAR $\gamma$  agonists 的抑制 (Patel et al., 2003)。

- Chemerin

是新發現的脂肪因子，由脂肪細胞分泌，可調節成熟脂肪細胞的脂肪生合成

及代謝相關作用，也會受到 PPAR $\gamma$  的調控 (Muruganandan et al., 2011)。



### (3) 轉錄因子相關基因

- C/EBP $\alpha$

屬於 CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP) 家族，在脂肪細胞分化過程中扮演重要的角色，會與 PPAR $\gamma$  共同調控脂質生成。有研究指出，PPAR $\gamma$  agonists troglitazone 抑制白色脂肪相關基因表現需要 C/EBP $\alpha$  的存在 (Vernochet et al., 2009)。

- C/EBP $\beta$  (CCAAT/Enhancer Binding Protein  $\beta$ )

在 BAT 中表現量高於 WAT，能調節 UCP1 的轉錄。在寒冷刺激下，也能增加 C/EBP $\beta$  mRNA 在 BAT 中的表現 (Manchado et al., 1994)。在 cAMP 刺激下，過度表現的 C/EBP $\beta$  會和 CRE (cAMP responsive element) 結合，增加白色及棕色脂肪細胞中 PGC1 $\alpha$  及 UCP1 的基因表現 (Karamanlidis et al., 2007)。先前研究指出，給予正常鼠及 ob/ob 鼠 non-TZD PPAR $\gamma$  agonist 後，對於  $\beta$ -adrenergic 的刺激，都有相當大的生熱潛力 (thermogenesis) (Sell et al., 2004)，顯示這兩種機制彼此有關。

### (4) 檸檬酸合成酶 (Citrate Synthase, CS)

存在於真核細胞的線粒體中，是催化三羧酸循環 (TCA cycle) 第一步的限速酶 (Wiegand et al., 1986)。CS 由核 DNA 編碼而成，而非線粒體 DNA，在細胞質中合成後，再運送至粒線體基質 (matrix) 中，故常作為完整粒線體的定量指標 (Holloszy et al., 1970; Hood et al., 1989)。檸檬酸合酶的組氨酸殘基作為親核試劑，使乙醯輔酶 A (acetyl CoA) 中的甲基去質子化而形成碳負離子，後者親核攻擊草醯乙酸 (oxaloacetate, OAA) 的羰基碳，縮合生成檸檬醯輔酶 A (citroyl-CoA) 中間體，將高能硫酯鍵水解後即得檸檬酸 (Citrate)。

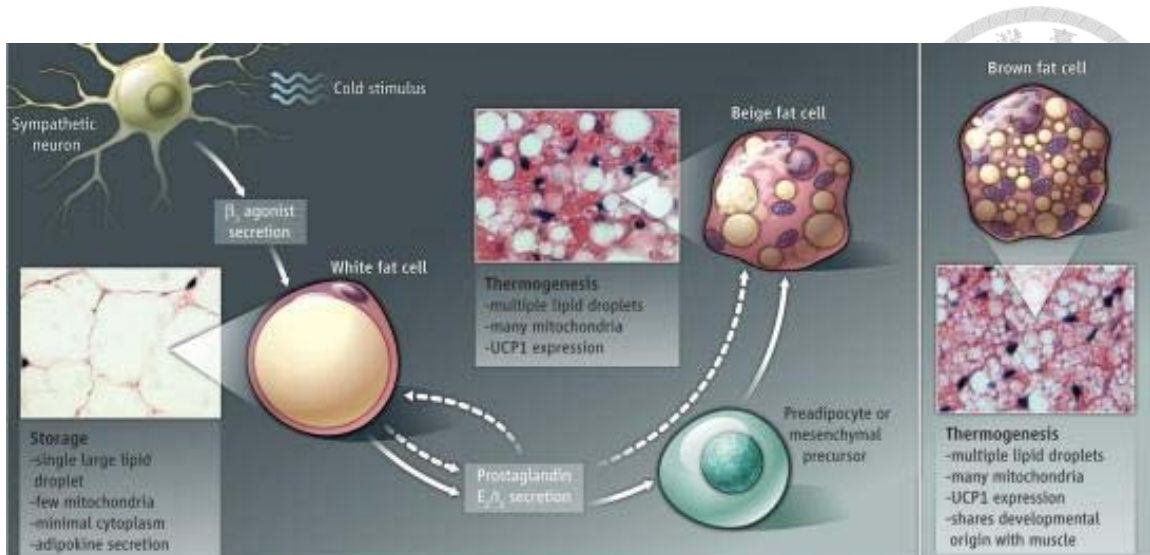


圖 1-5 白色脂肪棕色化

Fig 1-5 White to Beige fat cell conversion (Ishibashi et al., 2010).

#### 四、山苦瓜

##### (一) 苦瓜之背景

苦瓜，學名 *Momordica charantia* L.，英文名 bitter gourd 或 bitter melon，又名涼瓜、錦荔枝、癩瓜、癩葡萄，屬於葫蘆科 (Cucurbitaceae)、苦瓜屬 (Momordica)，一年生蔓性草本植物，原產於亞洲熱帶地區，包括印度、東南亞、中國大陸與台灣，台灣南部一年四季皆可生產。果實為漿果，表面有瘤狀突起，呈綠色、淺綠色或是白色，成熟後會逐漸呈橘黃色，種子呈紅色，其中果實與葉子部分常作為日常蔬菜用。【本草綱目】中，記載苦瓜有消暑解熱、解毒、清心明目與補腎潤脾等功效，現今亦有抗腫瘤、抗病毒與抗發炎之功效受重視，而許多研究則著重於苦瓜降血糖與降血脂等代謝症候群指標異常之治療潛力。

##### (二) 苦瓜與肥胖相關研究

Chen 等人給予高油飲食誘發肥胖的小鼠補充苦瓜籽油 (BMSO)，能增加 WAT 中 UCP1 的表現 (Chen et al., 2012)。而本實驗室先前研究中，也觀察到給予 C57BL/6J 公鼠山苦瓜全果凍乾粉末，能增加粒線體生合成相關基因及白色脂肪組織中 UCP1 mRNA 的表現，顯示具有棕色脂肪的特性 (Lu et al., 2013)；除此之外，餵食苦瓜組的 PGC-1 $\alpha$  基因表現量，在腓腸肌及棕色脂肪組織中也顯著高於對照組。而根據先前研究，給予飲食誘導肥胖之大鼠苦瓜果汁凍乾物，能增加肌肉中 PGC-1 $\alpha$  的表現 (Chan et al., 2005)。另一方面，給予 lean 或 *ob/ob* 小鼠 PPAR $\gamma$  的 agonist，

不但能顯著降低血糖，也能增加鼠蹊部皮下脂肪處之中 UCP1 的表現量 (Sell et al., 2004)。本實驗室也有研究證實，苦瓜乙酸乙酯萃取物為 PPAR $\alpha$  與 PPAR $\gamma$  的雙效活化劑 (Chao et al., 2003) (萃取流程如圖 1-6)。以上結果顯示，苦瓜中內含活化 PPAR $\gamma$  的成分，推測可降血糖、血脂，並進而促使白色脂肪組織棕色化。相關文獻整理於表 2。

### (三) 苦瓜中 PPAR 活性成分

#### (1) CLN

共軛亞麻油酸 (conjugated linoleic acid, CLA) 在多種動物實驗中證實有降體脂的功效，作用機制包含改變脂質代謝、抑制脂肪細胞分化及促進 (前) 脂肪細胞凋亡等 (Domeneghini et al., 2006)。但市售 CLA 商品係將亞麻油酸鹼處理而得，只要含 *c9,t11* 及 *t10,c12* 兩種異構物。許多實驗 (包含人體試驗) 發現 *t10,c12*-CLA 會促進胰島素阻抗，血液中也有發炎介質及過氧化指標有上升的情形 (Riserus et al., 2002)，有安全上的顧慮。然而共軛三烯-次亞麻油酸 (CLN) 則多存在於植物種籽中，而本實驗室先前經由分離純化，鑑定出苦瓜中此種特殊脂肪酸-*c9,t11,t13*-CLN ( $\alpha$ -eleostearic acid)，為可活化 PPARs 之化合物。

#### (2) 植醇 (Phytol)

文獻顯示，小鼠餵食富含 phytol 的飲食，能增加體內的 phytenic、phytanic 及 pristanic acid 等代謝物，並活化 PPAR $\alpha$  或其他轉錄因子，影響脂肪酸的代謝機制 (Gloerich et al., 2005)。phytol 的代謝產物 phytanic acid 能刺激棕色脂肪細胞的分化，並增加棕色脂肪細胞中 UCP1 及 Cytochrome c oxidase subunit II (CO II) 的基因表現 (Schluter et al., 2002)。

#### (3) 葉黃素 (lutein)

屬於類胡蘿蔔素 (carotenoids)，能與 PPAR $\gamma$  作用。先前文獻指出，lutein 能在不影響棕色脂肪細胞增生下，提高 UCP1 蛋白質的表現 (Serra et al., 1999)，也能增加白色脂肪細胞 PPAR $\gamma$  及 PGC1 $\alpha$  mRNA 基因表現 (Garcia-Rojas et al., 2010)。

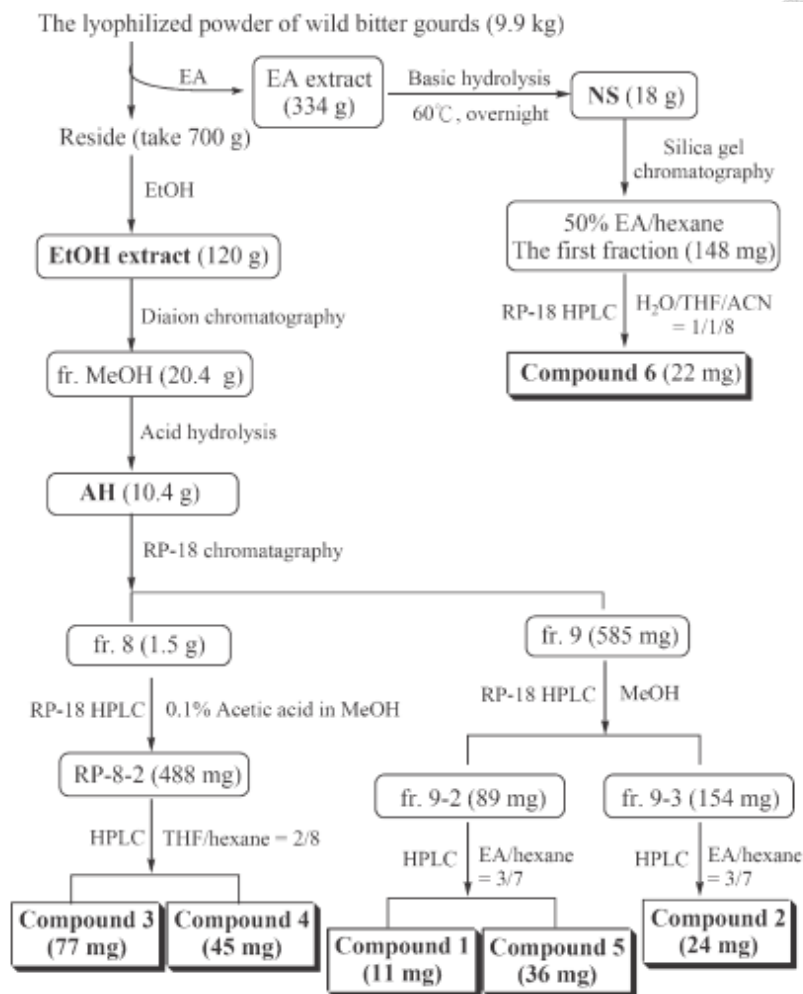


圖 1-6 山苦瓜之各種粗萃物之製備及區分過程

Fig 1-6 The scheme of separation and purification of *Momordica charantia* extracts.  
(Hsu et al., 2011)

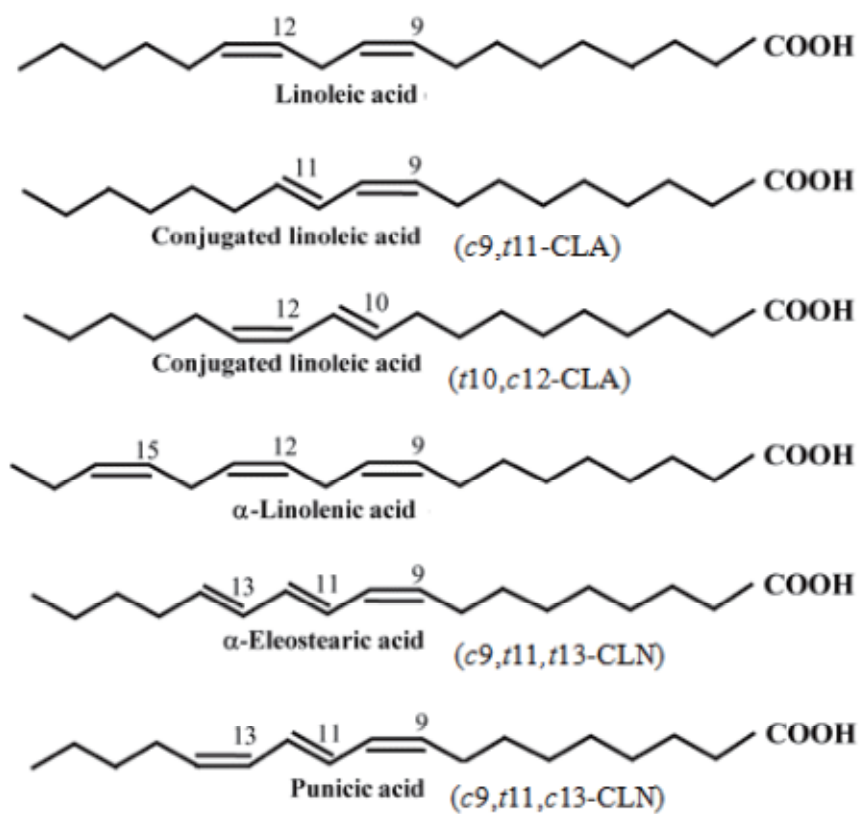


圖 1-7 共軛脂肪酸 CLA 和 CLN 之化學結構

Fig 1-7 Structure of conjugated fatty acid CLA and CLN.



表 1-1 PPAR agonist 刺激白色脂肪褐化之文獻整理

Table 1-1 Literature reviews of browning occur in white adipose tissue or adipocytes induced by PPAR agonist.



模式	樣品	實驗方法	結果 (文獻)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● male C57Bl/6 mice</li> <li>● SV cells</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Recombinant</li> <li>FGF21 protein</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 小鼠給予 FGF21 或 saline 處理 72 小時</li> <li>● 分化第六天，以 50 nM FGF21 處理 SV 細胞兩天，於第八天收細胞</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>in vivo</b></li> <li>➢ inguinal WAT (IWAT) : <i>UCP1, DIO2, PGC1<math>\alpha</math>, Cidea, Cox7a</i>↑</li> <li>➢ epididymal WAT (EWAT) : <i>UCP1, DIO2</i>↑</li> <li>➢ perirenal adipose tissue (PRWAT) : <i>UCP1, DIO2, PGC1<math>\alpha</math>, Cox7a</i>↑</li> <li>● <b>primary WAT and BAT adipocytes</b></li> <li>➢ <i>UCP1, Cidea</i>↑ (Fisher et al., 2012)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● C57BL/6J lean and obese <i>ob/ob</i> female mice</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>COOH (non-TZD PPAR agonist)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 將 PPAR<math>\gamma</math> agonist (COOH) 混於飼料中，每天給予小鼠 30 mg/kg 體重的刺激物，連續 14 天</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>UCP1 protein expression</b></li> <li>➢ BAT : <i>ob/ob</i> group↑</li> <li>➢ IWAT : lean, <i>ob/ob</i> group↑</li> </ul> <p>(Sell et al., 2004)</p>
<ul style="list-style-type: none"> <li>● primary cells of brown and white adipocytes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rosiglitazone (PPAR<math>\gamma</math> agonist)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 初代脂肪細胞以含有 1 <math>\mu</math>M rosiglitazone 培养基培養 5 days</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● <b>白色及棕色初代脂肪細胞</b></li> <li>➢ Brown-selected genes (<i>UCP1, PGC1<math>\alpha</math>, Cidea, Elovl3</i>)↑</li> </ul> <p>(Petrovic et al., 2010)</p>

## 第一章 緒論

---

<ul style="list-style-type: none"><li>● Male C57BL/6J mice</li><li>● Primary adipocytes</li></ul>	Rosiglitazone (PPAR $\gamma$ agonist)	<ul style="list-style-type: none"><li>● 小鼠於 6-8 週齡，以腹腔注射方式給予 10 mg/kg 體重的 rosiglitazone 連續 10 天</li><li>● 初代脂肪細胞於分化期間以含有 1 <math>\mu</math>M rosiglitazone 培養基培養</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>● <b>in vivo</b><ul style="list-style-type: none"><li>➤ BAT and visceral WAT : <i>UCP1</i>↑</li><li>➤ subcutaneous WAT : <i>UCP1</i>, <i>Cidea</i> ↑</li></ul></li><li>● <b>primary WAT adipocytes</b><ul style="list-style-type: none"><li>➤ IWAT : <i>UCP1</i>, <i>Cidea</i>, <i>PGC1<math>\alpha</math></i>, <i>prdm16</i>↑</li><li>➤ EWAT : <i>UCP1</i>, <i>Cidea</i>, <i>PGC1<math>\alpha</math></i>↑</li></ul></li></ul> <p>(Ohno et al., 2012)</p>
<ul style="list-style-type: none"><li>● 3T3-L1 preadipocytes</li><li>● mouse embryo fibroblasts (MEFs)</li><li>● male FVB mice</li></ul>	Troglitazone (PPAR $\gamma$ agonist)	<ul style="list-style-type: none"><li>● 3T3-L1 在分化成熟前兩天給予 troglitazone 刺激兩天</li><li>● MEFs 於整個分化期間給予 troglitazone 刺激</li><li>● 小鼠以灌食方式給予 10 mg/kg 體重的 PPAR<math>\gamma</math> agonist (COOH)及 vehicle 連續 14 天</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>● <b>3T3-L1, MEFs and in vivo</b><ul style="list-style-type: none"><li>➤ White genes (<i>chemerin</i>, <i>resistin</i>)↓</li><li>➤ Brown-selected genes (<i>UCP1</i>, <i>PGC1<math>\alpha</math></i>)↑</li></ul></li></ul> <p>(Vernochet et al., 2009)</p>

---



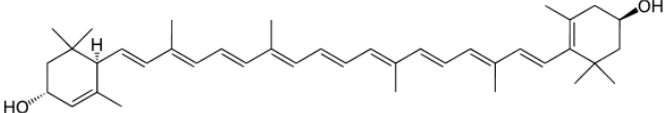
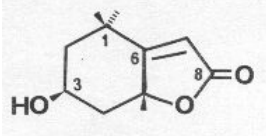
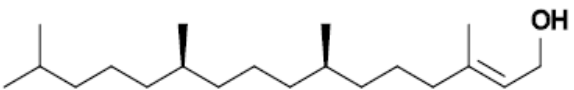
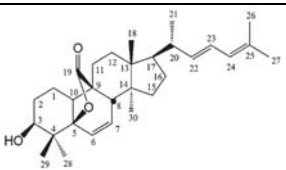
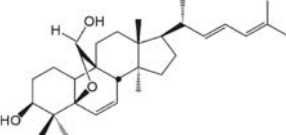
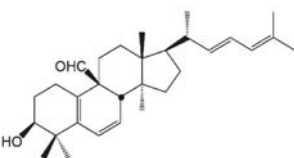
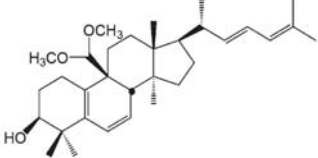
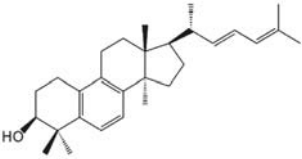
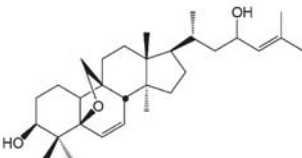
表 1-2 苦瓜增加 *UCP1* 表現之文獻整理

Table 1-2 Literature reviews of increasing *UCP1* in adipose tissue or muscle by feeding *Momordica charantia*

模式	樣品	實驗方法	結果 (文獻)
● Male Sprague-Dawley rats	經冷凍乾燥之苦瓜汁	● 大鼠經高脂飲食三週後，苦瓜樣品添加於飼料中，飼養 6 週 ➢ HF ➢ HF + 1 % BM ➢ HF + 1.25 % BM	● <b>mRNA expression in BAT and gastrocnemius muscle (G)</b> ➢ HF+1 % BM : <i>UCP1</i> , <i>UCP3</i> , <i>PGC1α</i> ↑ ➢ HF+1.25 % BM : <i>UCP1</i> , <i>UCP3</i> , <i>PGC1α</i> ↑ ● <b>protein contain in BAT and G</b> ➢ HF+1 % BM : <i>UCP1</i> (BAT), <i>UCP3</i> (G)↑ ➢ HF+1.25 % BM : <i>UCP1</i> (BAT), <i>UCP3</i> (G)↑ (Chan et al., 2005)
● male C57BL/ 6J mice	苦瓜籽油 (BMSO)	● 小鼠給予餵食添加不同比例苦瓜籽油的高脂飼料，飼養 10 週 ➢ HS : 30 % SBO (soybean oil) ➢ LBM : 25 % SBO + 5 % BMSO ➢ MBM : 20 % SBO + 10% BMSO ➢ HBM : 15 % SBO + 15 % BMSO	● <b>mRNA expression in white adipose tissue (compare to HS )</b> ➢ LBM : <i>PGC1α</i> ↑ ➢ MBM : <i>PGC1α</i> , <i>UCP2</i> ↑ ➢ HBM : <i>PGC1α</i> , <i>UCP1</i> , <i>UCP2</i> ↑  (Chen et al., 2012)
● male C57BL/ 6J mice	苦瓜全果凍乾粉末	● 小鼠給予餵食經調整的 AIN-93G 飼料，分成 Basal 組及添加 5 % 苦瓜凍乾粉末(BGP)組，飼養 22 週	● <b>mRNA expression</b> ➢ BAT : <i>PGC1α</i> , <i>NrF1</i> ↑ ➢ epididymal WAT : <i>UCP1</i> , <i>PGC1α</i> , <i>NrF1</i> ↑ ➢ gastrocnemius muscle : <i>PGC1α</i> , <i>tfam</i> ↑  (Lu et al., 2013)

表 1-3 自苦瓜分離出具活化 PPARs 之化合物整理

Table 1-3 PPARs activity of compounds from *Momordica charantia*.

compounds	Structure	PPARs activity
<b>Lutein</b> $C_{40}H_{56}O_2$		PPAR $\alpha$ + PPAR $\gamma$ +
<b>Loliolide</b> $C_{10}H_{16}O_3$		PPAR $\alpha$ + PPAR $\gamma$ +
<b>Phytol</b> $C_{20}H_{40}O$		PPAR $\alpha$ + PPAR $\gamma$ +
<b>Compound 1</b> $C_{30}H_{44}O_3$		PPAR $\alpha$ + PPAR $\gamma$ +
<b>Compound 2</b> $C_{30}H_{46}O_3$		PPAR $\alpha$ + PPAR $\gamma$ +
<b>Compound 3</b> $C_{30}H_{44}O_2$		PPAR $\alpha$ + PPAR $\gamma$ -
<b>Compound 4</b> $C_{32}H_{50}O_3$		PPAR $\alpha$ + PPAR $\gamma$ -
<b>Compound 5</b> $C_{29}H_{42}O$		PPAR $\alpha$ + PPAR $\gamma$ +
<b>Compound 6</b> $C_{30}H_{48}O_3$		PPAR $\alpha$ + PPAR $\gamma$ +



### 第三節 實驗假說與架構

#### 一. 實驗假說

先前研究顯示，小鼠餵食山苦瓜，能使白色脂肪細胞中 UCP1 及粒線體相關基因的表現量增加。另外，本實驗室也發現苦瓜中乙酸乙酯萃物能有效活化 PPAR $\gamma$ ，且從中找出活化成分，推測其能更進一步刺激下游 PGC-1 $\alpha$  基因表現量增加。所以本實驗假說為：山苦瓜中具有刺激 3T3-L1 脂肪細胞褐化及粒線體相關基因增生的成份。以此脂肪細胞做為試驗模式，給予分化過程中的脂肪細胞不同山苦瓜萃取樣品，觀察樣品是否影響脂肪細胞 UCP1 以及粒線體相關基因 mRNA 表現與酵素活性，初探山苦瓜中可能之活性成分。

#### 二. 實驗架構

以 3T3-L1 脂肪細胞模式，確立一個最佳評估樣品對於脂肪細胞棕色化的平台

以 PPAR $\gamma$  agonists 刺激成熟的脂肪細胞，比較兩種不同分化法及三種處理時間點對於脂肪細胞褐化及粒線體增生之相關基因表現變化。確立模式後，評估不同山苦瓜萃物/區分物對於增加脂肪細胞褐化及粒線體增生之基因相關表現的潛力。

### 第二章 山苦瓜萃物對於脂肪細胞褐化相關基因表現之影響

#### 第一節 前言

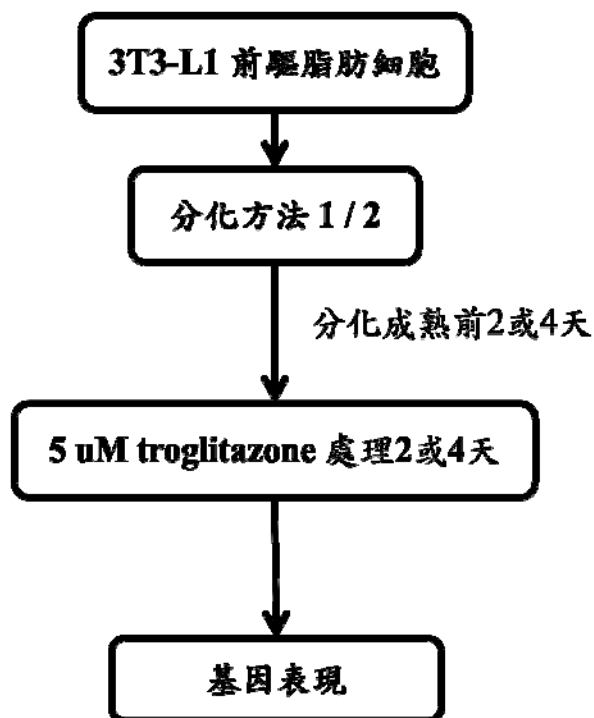
當能量攝取量大於能量消耗量，多餘的熱量以三酸甘油酯的形式儲存於脂肪組織中。脂肪可分成白色脂肪 (WAT) 和棕色脂肪組織 (BAT)，WAT 主要功能為儲存能量；棕色脂肪則以熱的形式消耗能量，維持體溫。文獻指出，低溫環境下或交感神經的刺激會導致棕色脂肪組織中的  $\beta$ -adrenergic receptor ( $\beta$ -AR) 活化，而這樣的調控是由 Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) 所刺激，可調控粒線體生合成、能量代謝 (Spiegelman et al., 2000)、UCP1 的表現來增加產熱作用 (Bostrom et al., 2012)。另一方面，早期研究發現，在低溫或交感神經的刺激下，會導致白色脂肪組織出現較深色的類棕色脂肪 (Cousin et al., 1992; Guerra et al., 1998)。此種細胞，和棕色脂肪細胞同樣含有大量粒線體及高度表現 UCP1，並具生熱作用的潛力。目前也有研究指出，給予小鼠合成的 PPAR $\gamma$  agonists，可刺激 WAT 中出現此種類棕色脂肪細胞，並抑制白色脂肪過多時的相關基因表現 (Vernochet et al., 2009)。同時投予  $\beta$ -adrenergic receptor ( $\beta$ -AR) 致效劑，則可使小鼠代謝速率增加、脂肪組織變小 (Sell et al., 2004)。

本實驗室先前的研究證實，苦瓜乙酸乙酯萃取物為 PPAR $\alpha$  與 PPAR $\gamma$  的雙效活化劑 (Chao & Huang, 2003)。經由分離純化，鑑定出 9c,11t,13t-CLN 為可活化 PPARs 之化合物 (Chuang et al., 2006)。而山苦瓜乙酸乙酯萃物之不皂化物亦具有活化 PPAR 之能力 (徐璿, 2011)。先前研究也觀察到 C57BL/6J 小鼠給予餵食山苦瓜全果凍乾粉末，能增加粒線體合成基因及白色脂肪組織中 UCP1 mRNA 的表現 (Lu et al., 2013)。此外，Chao 等人給予高油飲食誘發肥胖的小鼠補充苦瓜籽油 (BMSO)，能增加 WAT 中 UCP1 的表現以及促進 PKA 的活化 (P. H. Chen et al., 2012)。以苦瓜汁凍乾物餵食 Sprague-Dawley 大鼠，發現其血清中正腎上腺濃度較高 (Chan et al., 2005)。這些文獻暗示，苦瓜中有會影響  $\beta$ -AR 之訊息傳遞的成分，配合 PPAR $\gamma$  的活化，進而導致白色脂肪褐化。本實驗以 PPAR $\gamma$  agonists 刺激分化中之 3T3-L1 脂肪細胞株為正對照組，觀察山苦瓜萃物是否能誘發出白色脂肪細胞褐化現象，再進一步篩選具促進脂肪細胞褐化及粒線體增生相關基因表現的苦瓜萃物或區分物。

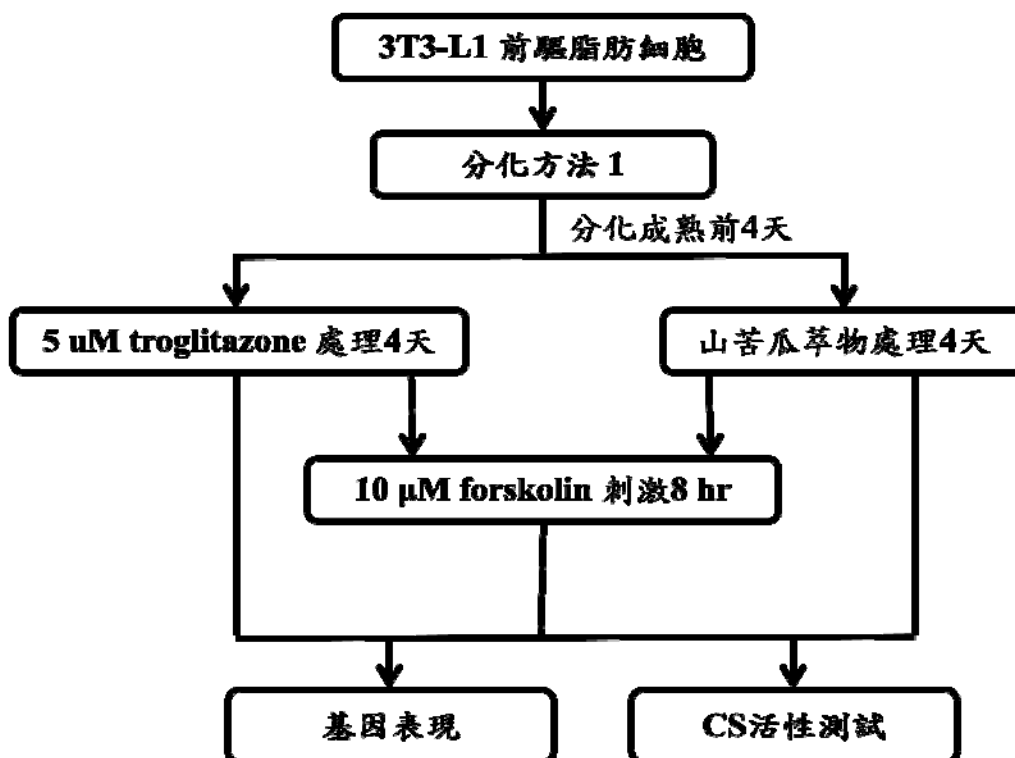


第二節 材料與方法

一、白色脂肪細胞褐化實驗模式建立與最佳化



二、山苦瓜萃物促進白色脂肪細胞褐化





### 三、細胞株

3T3-L1 細胞株 (ATCC CL-173)

組織來源：embryo, *Mus musculus*

購自食品工業發展研究所 (BCRC 60159)

### 四、培養基與藥品試劑

#### (一) 細胞培養與分化

##### 1. 培養基

---

#### 藥品

---

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco 11995)

Bovine serum (BS, Gibco 16170)

L-glutamine (Gibco 25030)

---

##### 2. 分化培養基 I

---

藥品	Stock conc.	Working conc.
Dexamethasone (DEX, Sigma 4902)	0.25 mM	0.25 $\mu$ M
3-Isobutyl-methyl-xanthine (IMX, Sigma I5879)	0.5 M	0.5 mM
Insulin (Sigma I9278)	10 mg/mL	10 $\mu$ g/mL
Biotin (Sigma B4501)	400 mg/mL	100 ng/mL

---

分化方法一：10 % BS/DMEM (4 mM Gln)

分化方法二：10 % FBS/DMEM (4 mM Gln)

---

於使用前配置。

##### 3. 分化培養基 II

---

藥品	Stock conc.	Working conc.
Insulin (Sigma I9278)	10 mg/mL	10 $\mu$ g/mL
Biotin (Sigma B4501)	400 mg/mL	100 ng/mL

---

分化方法一：10 % BS/DMEM (4 mM Gln)

分化方法二：10 % FBS/DMEM (4 mM Gln)

---

於使用前配置。





4. 0.25 % Trypsin-EDTA (GIBCO 25200)
5. 0.4 % Trypan blue solution (Sigma T8154)

(二) 檸檬酸合成酶活性測定 (Citrate Synthase activity assay)

藥品	Stock conc.	Working conc.
Tris [Tris-(hydroxymethyl)aminomethan]	1 M	0.1 M
Triton X-100	10 %	0.25 %
Oxalacetic acid (Sigma O4126)	10 mM	0.5 mM
DTNB	2 mM	0.1 mM
Acetyl CoA, lithium salt (Sigma A2181)	2 mM	0.31 mM

Tris 以 HCl 調製 pH=8.0，為 Tris-HCl buffer。

Oxalacetic acid 及 DTNB 於使用前配置。

(三) quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) 法分析基因表現

1. TRIZOL® Reagent (Invitrogen)
2. Choloform (Merck)
3. Isopropanol (Merck)
4. DEPC-H<sub>2</sub>O
5. 反轉錄試劑套組 High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, P/N : 4368814)
6. 基因表現分析套組 Probe/primer assay ID :

*Ppargc1a* (peroxisome proliferator activated receptor, gamma, coactivator 1  $\alpha$ ) (Mm01208835\_ml)

*Ucp1* (uncoupling protein 1) (Mm01244861\_ml)

*Cidea* (cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A) (Mm00432554\_ml)

*Prdm16* (PR domain containing 16) (Mm00712556\_ml)

*Nrf1* (nuclear respiratory factor 1) (Mm01135606\_ml)

*Tfam* (transcription factor A, mitochondrial) (Mm447485\_ml)

*Cox7a1* (cytochrome c oxidase subunit VIIa 1) (Mm00438296\_ml)

*Cox8b* (cytochrome c oxidase subunit VIIIb) (Mm00432648\_ml)

*Cebpa* (CCAAT/enhancer binding protein, alpha) (Mm00514283\_s1)

*Cebpb* (CCAAT/enhancer binding protein, beta) (Mm00843434\_s1)

*Retn* (resistin) (Mm00445641\_m1)

*Rarras* (retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2)

(Mm00503579\_m1)

*Ppara* (peroxisome proliferator activated receptors  $\alpha$ ) (Mm00440939\_m1)

*Ppar* (peroxisome proliferator activated receptors  $\gamma$ ) (Mm00440940\_m1)

*Ppard* (peroxisome proliferator activated receptors  $\delta$ ) (Mm00803184\_m1)

*Actb* (actin, beta) (Mm00607939\_s1)

*Gadph* (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) (Mm99999915\_gl)

7. 2 $\times$  Taqman® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, K00861)

#### (四) 處理藥品

藥品	Stock conc.	Working conc.
Troglitazone (Enzo 3-H2315r)	5 mM	5 $\mu$ M
Dimethylsulfoxide (Sigma D2650)		
Forskolin (Sigma F6886)	10 mM	10 $\mu$ M

配置於 10 % BS/DMEM (分化方法一) 或 10 % FBS/DMEM (分化方法二)。

#### 五、儀器設備

1. 二氧化碳培養箱 (REVCO RCO, Thermo Forma 3100)
2. 無菌操作台 (ESCO AC2-4S2)
3. 倒立式顯微鏡 (Nikon DIAPHOT)
4. 細胞計數器 (Hausser Science)
5. 微盤分析儀 (BioTek EL311)
6. 離心機 (KUBOTA 6500)
7. 基因定量分析儀 (ABI PRISM 7000 Sequence Detection)
8. 冷凍乾燥機 (SFD-25)
9. 減壓濃縮機 (Panchum vacuum controller VC-7600, Eyela rotary evaporator N-100, Panchum cooling circular model CC-200, water bath RB-100)



### 六、山苦瓜萃物之製備

#### (一) 山苦瓜乙酸乙酯萃物暨其區分物

本試驗使用花蓮縣吉安鄉改良場所提供之花蓮四號山苦瓜，經清洗、去蒂切片、冷凍乾燥後，經研磨後取得山苦瓜全果凍乾粉末置-20 °C 儲存。山苦瓜凍乾粉末以 20 倍乙酸乙酯攪拌進行萃取隔夜，以 Whatman No.2 濾紙進行抽氣過濾，收得乙酸乙酯苦瓜萃取液。將萃取液經減壓濃縮後即製成山苦瓜全果凍乾粉末乙酸乙酯萃物 (ethyl acetate extract, EAE)，萃率約 5%。取山苦瓜乙酸乙酯萃物，溶於五倍體積之四氫呋喃 (THF) 中，再加入同體積之 40% 氫氧化鈉溶液，以 60 °C 加熱攪拌 16-20 小時。反應液先經減壓濃縮去除有機溶劑 THF 後，改加等量之正己烷，與水層進行 3-5 次萃取。收集上層之正己烷，以水洗至中性後，經減壓濃縮後收得不皂化物 (non-saponification, NS)，萃率為約 5%。而水層部份加入鹽酸，使其酸化至 pH=2 後，加入等量乙酸乙酯萃取兩次，取上層乙酸乙酯層，以水洗至中性後，減壓濃縮即可得皂化物 (saponification, S)，萃率為 67%。樣品 stock 皆配置於絕對酒精，EAE 及 S 濃度為 50 mg/mL，NS 濃度為 25 mg/mL，分裝後存放於 -20°C。

#### (二) 山苦瓜水萃物

將 100 g 山苦瓜全果凍乾粉末添加 20 倍 (w/v) 去離子水，於 60°C 攪拌萃取隔夜，以 5000 g 離心 5 分鐘後取上清液，以 Whatman No.2 濾紙過濾，所得濾液為山苦瓜全果水萃物 (water-soluble extract; WE)。

#### (三) 經 5% 黑豆漿培養之納豆菌處理山苦瓜水萃物

納豆菌 (*Bacillus subtilis natto*) 在 3 ml LB 於 37 °C, 125 rpm 活菌 12 小時後，取適量菌液培養於 5% 黑豆漿，37 °C，125 rpm，12 小時，離心去除上清將納豆菌移至山苦瓜果汁中培養 24 小時。以 5000 g 離心 5 分鐘後取上清液，以 Whatman No.2 濾紙過濾，所得濾液為納豆菌作用之山苦瓜全果水萃物 (WEn)。

### 七、實驗方法

#### (一) 細胞培養

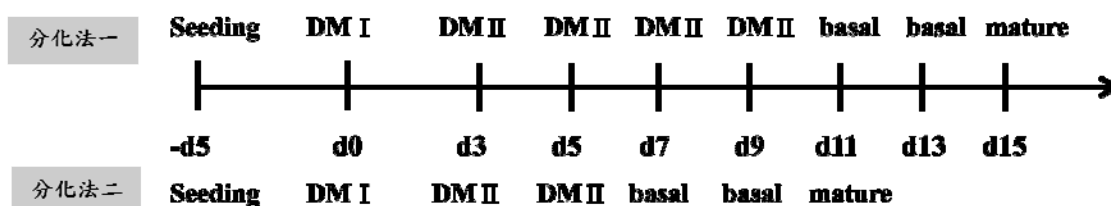
3T3-L1 前脂肪細胞株以 10% BS/DMEM 培養於 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 中。當細胞長至八分滿，移除培養基，以 PBS 清洗細胞兩次，加入 0.25% trypsin-EDTA 均勻浸潤細胞，置於 37 °C、5 分鐘，待細胞脫附後加入 10% BS/DMEM 將細胞洗

下。取少許懸浮細胞以 trypan blue solution 染色，以細胞計數器於倒立式顯微鏡計算細胞數，將  $2.5 \times 10^5$  細胞數種入新  $75 \text{ cm}^2$  培養瓶進行繼代培養，每 3 日繼代培養一次。



### (二) 細胞分化

當脂肪細胞於  $75 \text{ cm}^2$  培養瓶生長至八分滿，以 0.25 % trypsin-EDTA 將細胞脫附後，以 10 % BS/DMEM 將細胞洗下，經細胞計數後，以  $6 \times 10^4$  細胞數種入 12 孔平底培養盤，培養於  $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  中，3 日後可達全滿 (confluence)，更換培養基，繼續培養兩日 (post-confluence) 後，改以分化培養基 I (DM I) 培養 3 日。3 日後更換為分化培養基 II (DM II)，每 2 天更換一次 DM II。分化法一：培養 8 天後換回不含胰島素之 basal medium，繼續培養 4 天，即分化完成；分化法二：培養 4 天後換回不含胰島素之 basal medium，繼續培養 4 天，即分化完成 (如圖示)。



### (三) 蛋白質測定

#### 1. 原理

BCA 法蛋白質使 reagent 中銅離子由二價轉為一價，再以 BCA 與一價銅離子結核並呈紫色，在波長 540 nm 具吸光。本實驗法對於陰離子、非離子性及二價離子的清潔劑 (anionic, non-ionic, zwitterionic)、guanidine-HCl 和尿素較具容忍性，且較不受干擾。

#### 2. 實驗步驟

將溶於 1 N NaOH 之細胞溶液，取 25  $\mu\text{L}$  於 96 孔盤中，並將 kit 中的 A 液與 B 液以 50:1 之比例混和，每孔加入 200  $\mu\text{L}$  反應液，於  $37^\circ\text{C}$  反應 10 分鐘，測 540 nm 吸光。以 BSA 進行序列稀釋製作標準曲線，樣品吸光值對照標準曲線，計算其蛋白質濃度。

### (四) 樣品處理

脂肪細胞分化完成前二日或前四日，加入含 5  $\mu$ M troglitazone 或苦瓜樣品的 10 % BS/DMEM (或 10 % FBS/DMEM) 培養 2 天或 4 天，並以加入相同量的 dimethylsulfoxide (DMSO) 處理者為空白組。進行基因表現分析或粒線體活性測試前，以 10  $\mu$ M forskolin 刺激 8 小時。

### (五) 檸檬酸合成酶活性測定 (Citrate Synthase activity assay)

#### 1. 樣品製備

每  $1-2 \times 10^6$  cells/mL 細胞溶液取 110  $\mu$ L 於液態氮結凍，供日後分析。

#### 2. Reaction mixture

將 750  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O、25  $\mu$ L triton X-100 (0.25 %)、50  $\mu$ L DTNB (0.1 mM)、50  $\mu$ L oxalacetic acid (0.5 mM)、25  $\mu$ L acetyl CoA (0.31 mM) 混合均勻後，於 30°C 水浴 5-10 分鐘後，加入解凍後之 100  $\mu$ L 細胞液迅速混合均勻，取 1000  $\mu$ L 於比色管中，以未加入 acetyl CoA 的溶液作為 blank，測定三分鐘內每 15 秒在波長 412 nm 的吸光值，以蛋白質濃度校正後，測得檸檬酸合成酶活性。

### (六) 基因表現

#### 1. 總 RNA 抽取

樣品處理後之脂肪細胞吸除培養基，以 PBS 潤洗細胞一次。加入 1 mL TRIZOL® reagent，吸放數次，移至 1.5 mL 微量離心管。12000 g，4°C 離心 10 分鐘，取上清液至新 1.5 mL 微量離心管，靜置 5 分鐘。加入 0.2 mL choloform，震盪 15 秒後靜置 2-3 分鐘。12000 g，4°C 離心 20 分鐘，取上清液至新的 1.5 mL 微量離心管，加入 0.5 mL isopropanol，上下倒置數次使之均勻，室溫 10 分鐘。12000 g，4°C 離心 10 分鐘，去除上清液，加入 75 % 酒精清洗一次 (7500 g，4°C 離心 5 分鐘)。室溫晾乾後以 10  $\mu$ L DEPC-H<sub>2</sub>O 回溶，即得 RNA 溶液。以 Nano Drop 測 RNA 濃度，當 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比值接近 2 時即為純化 RNA 樣品。

#### 2. RNA 反轉錄成 cDNA

使用反轉錄試劑套組 High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, P/N: 4368814)，取 10  $\mu$ L 0.5  $\mu$ g/mL RNA 溶液加入 10  $\mu$ L 2 $\times$  Reverse Transcription Master Mix (2  $\mu$ L 10 $\times$  RT buffer, 0.8  $\mu$ L 25 $\times$  dNTP mix, 2  $\mu$ L 10 $\times$  RT

Random Primers, 1  $\mu$ L 10 $\times$  Multiscibe<sup>TM</sup> RTase, 4.2  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O) 進行反轉錄，轉錄條件為 25  $^{\circ}$ C 10 分鐘、37  $^{\circ}$ C 120 分鐘、85  $^{\circ}$ C 5 分鐘，最後冷卻至 4  $^{\circ}$ C。轉錄完成之 cDNA 儲存於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱，待日後基因表現分析。



### 3. Real-Time PCR 分析脂肪細胞基因表現

採用市售 2 $\times$  Taqman<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, K00861) 分析細胞基因表現，以  $\beta$ -actin 作為 internal control (Mm00607939\_s1)。將 cDNA 稀釋成 10 ng/ $\mu$ L，取 10  $\mu$ L cDNA 加入 12.5  $\mu$ L 2 $\times$  TaqMan Master Mix, 1.25  $\mu$ L 20 $\times$  probe/primers AssayMix 及 1.25  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O，總體積為 25  $\mu$ L。注入 ABI PRISM Optical Strip 後蓋上蓋 (MicroAmp Optical Cap)，離心去除氣泡後即可進基因定量分析，條件為 50 $^{\circ}$ C 10 分鐘、95 $^{\circ}$ C 10 分鐘、(95 $^{\circ}$ C 15 秒鐘、60 $^{\circ}$ C 1 分鐘) 共 40 個循環，所得之 Ct 值進行換算以分析基因表現量。

算式： $\Delta$ Ct = 目標基因 Ct 值 - internal control ( $\beta$ -actin) Ct 值

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \text{實驗組 } \Delta\text{Ct} - \text{空白組 } \Delta\text{Ct}$$

$$\text{Fold of change} = 2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$$

### (七) 數據整理及統計分析

重複三次以上獨立實驗，而每次獨立實驗皆有 2-3 重複，數值以平均值  $\pm$  標準差 (mean  $\pm$  S.D.) 表示。利用 excel 進行統計分析，以 Student's *t* test 檢定各組與 vehicle 組間差異之顯著性，當  $p < 0.05$  視為兩組在統計上具有顯著差異，以 \* 做標示。



### 第三節 實驗結果

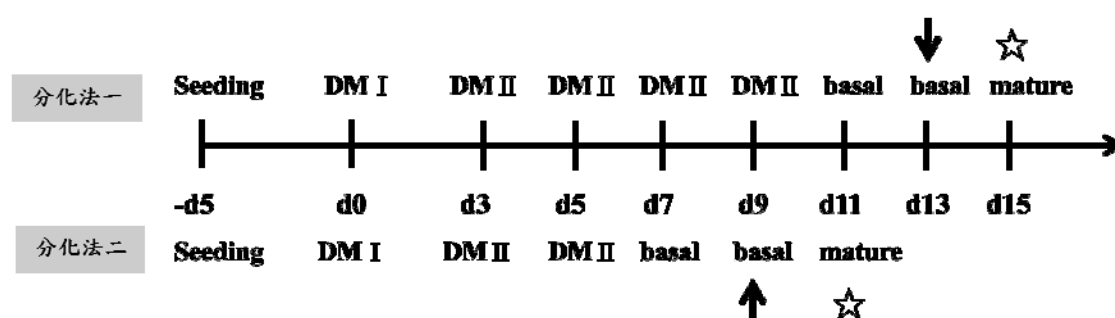
#### 一、白色脂肪細胞褐化實驗模式建立與最佳化

為建立最合適之細胞模式，本實驗比較兩種已建立之脂肪細胞培養方式，差異在於分化培養基的使用，以及分化時間長短。

分化法一 (protocol 1)：分化培養基配置於 10 % BS/DMEM，分化時間約十五天

分化法二 (protocol 2)：分化培養基配置於 10 % FBS/DMEM，分化時間約十一天

(一) 分化成熟前 2 天，troglitazone 處理 2 天

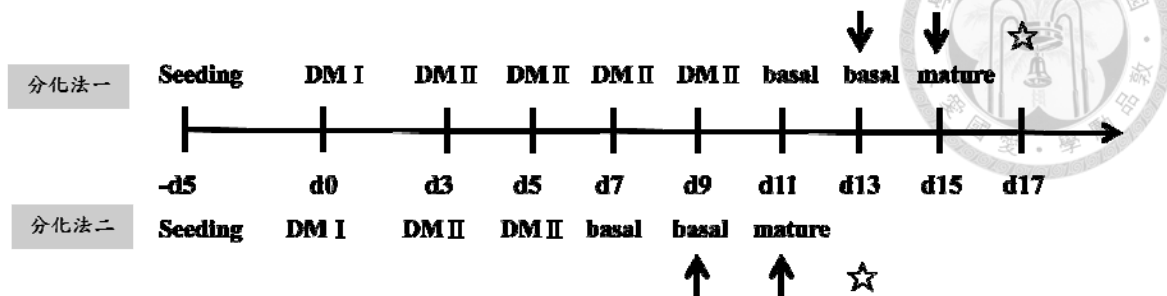


↑ / ↓ : 5 μM troglitazone treatment ; ☆ : harvest

(1) 分化法一：5 μM troglitazone 處理下，棕色脂肪相關基因 PGC1α、UCP1 與 Cidea 皆有顯著增加 ( $p < 0.05 \sim p < 0.005$ )，其中 UCP1 顯著高於空白處理組，約 1.7 倍；粒線體生合作用相關基因 Tfam 有增加的趨勢，而 NrF1 和空白組並無顯著差異 ( $p > 0.05$ )；白色脂肪相關基因表現上，Retn 顯著低於空白組 (0.6 倍) ( $p < 0.005$ )，而 Chemerin 卻有增加 (1.3 倍) 的現象 ( $p < 0.05$ )。PPAR $\gamma$  雖受抑制，但和空白組並無顯著差異 ( $p > 0.05$ ) (圖 2-1 (A))。

(2) 分化法二：5 μM troglitazone 處理下，棕色脂肪 PGC1α、UCP1、Cidea 及粒線體生合作用相關基因 NrF1、Tfam mRNA 表現雖有增加的現象，但和空白處理組並無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。白色脂肪相關基因表現上，Retn 顯著低於空白組 (0.4 倍) ( $p < 0.005$ )，而 Chemerin 顯著增加 (1.2 倍) ( $p < 0.005$ )，PPAR $\gamma$  則顯著受到抑制 (0.6 倍) ( $p < 0.005$ ) (圖 2-1 (B))。

(二) 分化成熟前 2 天，troglitazone 處理 4 天

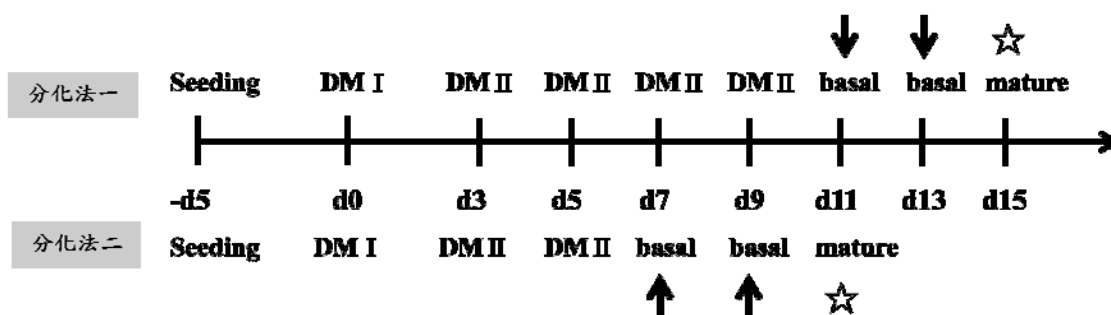


↑ / ↓ : 5 μM troglitazone treatment ; ☆ : harvest

(1) 分化法一：5 μM troglitazone 處理下，棕色脂肪相關基因 UCP1 及 Cidea 皆顯著增加 (分別為 3.3 及 4.4 倍) ( $p < 0.05 \sim p < 0.005$ )，而 PGC1α 基因表現雖有增加的趨勢，但和空白處理組並無顯著差異 ( $p = 0.06$ )。粒線體生合作用相關基因 Tfam 與 NrF1 也顯著高於空白組 (分別為 1.4 及 1.2 倍) ( $p < 0.05$ )。白色脂肪相關基因 Chemerin 有顯著增加 (2.4 倍) ( $p < 0.05$ )，而 PPARγ 和空白組並無差異 ( $p > 0.05$ ) (圖 2-2 (A))。

(2) 分化法二：5 μM troglitazone 處理下，棕色脂肪相關基因 PGC1α ( $p < 0.01$ ) 及 cidea ( $p < 0.05$ ) 皆有顯著增加，粒線體生合作用 Tfam, NrF1 mRNA 表現也有顯著增加 (分別為 1.4 及 1.2 倍) ( $p < 0.05$ )。白色脂肪相關基因 Retn 與 PPARγ 皆顯著低於空白處理組，分別為 0.4 及 0.5 倍 ( $p < 0.005$ ) (圖 2-2 (B))。

(三) 分化成熟前 4 天，troglitazone 處理 4 天



↑ / ↓ : 5 μM troglitazone treatment ; ☆ : harvest

(1) 分化法一：5 μM troglitazone 處理 4 天後，棕色脂肪 PGC1α ( $p < 0.05$ )、UCP1 ( $p < 0.05$ )、Cidea ( $p < 0.005$ ) 及粒線體生合成相關基因 Tfam ( $p < 0.005$ )、NrF1



( $p < 0.01$ ) 都有顯著增加。白色脂肪相關基因 Retn 顯著低於空白處理組 (0.6 倍) ( $p < 0.005$ )，而 Chemerin 卻顯著增加 (1.9 倍) ( $p < 0.01$ )，PPAR $\gamma$  也顯著低於空白組 (0.8 倍) ( $p < 0.01$ ) (圖 2-3 (A))。

(2) 分化法二：以 5  $\mu$ M troglitazone 處理 4 天後，棕色脂肪 PGC1 $\alpha$ 、UCP1、Cidea 及粒線體生合作用等相關基因 NrF1、Tfam 都有顯著增加 (1.4-1.9 倍) ( $p < 0.05 \sim p < 0.005$ )。白色脂肪相關基因表現 Retn 與 PPAR $\gamma$  皆都顯著受到抑制 ( $p < 0.005$ ) (圖 2-3 (B))，而 Chemerin 則無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。

根據上述結果，分化方法一培養之脂肪細胞在棕色脂肪相關基因表現上，和空白處理組相比，增加幅度都較分化方法二高。白色脂肪基因和轉錄活化因子 PPAR $\gamma$  的基因表現，分化方法一也都稍高於分化法二。批次實驗結果也顯示，分化方法一的重複性較高 (圖 2-4 (A) (B) (C))。整體而言，在分化成熟前 4 日開始，處理 4 天 (圖 2-4 (C)) 的脂肪細胞在各個目標基因表現之改變量的重複性較高。

後續山苦瓜樣品處理實驗皆以此模式進行試驗：以分化法一 (分化培養基配置於 10 % BS/DMEM) 培養 3T3-L1 脂肪細胞，樣品處理時間點為分化成熟前 4 天開始處理 4 天。

### 二、山苦瓜萃物處理 3T3-L1 脂肪細胞褐化相關基因表現

#### (一) 山苦瓜乙酸乙酯萃物暨其區分物

EAE (乙酸乙酯萃物)：脂肪細胞在低濃度 EAE 處理下，棕色脂肪相關基因 PGC1 $\alpha$ 、UCP1 及 cidea 均高於空白處理組。其中 PGC1 $\alpha$  在濃度 5 及 0.2  $\mu$ g/mL 下皆有顯著增加 ( $p < 0.05 \sim p < 0.005$ )，UCP1 在濃度 5  $\mu$ g/mL 及 1  $\mu$ g/mL 下有顯著增加 ( $p < 0.05$ )，增加幅度皆為空白組的 1.6 倍。Cidea 則是在濃度 5  $\mu$ g/mL 及 0.2  $\mu$ g/mL 下顯著較高 ( $p < 0.05 \sim p < 0.01$ ) (圖 2-5)。然而 Prdm16、Tfam、NrF1 及 cox7a1 等其他棕色脂肪及粒線體生合作用相關基因和空白組並無顯著差異 (圖 2-5、圖 2-6)。cox8b mRNA 表現在各濃度處理下，皆顯著高於空白組 ( $p < 0.05$ )。白色脂肪相關基因表現上，Retn 與 Chemerin 和空白組相比並無顯著差異 ( $p > 0.05$ ) (圖 2-7)。在轉錄調控因子基因表現上，PPAR $\alpha$  在濃度 5 及 0.2  $\mu$ g/mL 下有顯著增加 (1.4 倍、1.5 倍) ( $p < 0.05 \sim p < 0.005$ )，PPAR $\gamma$  及 C/EBP $\alpha$  表現雖高於空白組，卻無顯著差異 ( $p > 0.05$ )，C/EBP $\beta$  則在 0.2  $\mu$ g/mL 下顯著增加高於空白組 (1.2 倍) ( $p < 0.05$ ) (圖 2-8)。

S(皂化物): 脂肪細胞在低濃度 S 處理下, 棕色脂肪相關基因 PGC1 $\alpha$ 、UCP1 及 Cidea 均高於空白處理組, 其中 PGC1 $\alpha$  在濃度 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  有顯著增加 (1.4 倍) ( $p<0.01$ ), UCP1 基因表現在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度下有顯著增加 (幅度分別為 1.5 倍) ( $p<0.05$ )。Cidea 在 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度下, 有最大增加幅度 1.7 倍 ( $p<0.05$ ) (圖 2-5)。而 prdm16、Tfam、Nrf1 及 cox7a1 等其他棕色脂肪及粒線體生合成作用相關基因和空白組並無顯著差異 (圖 2-5、圖 2-6)。雖然 cox8b 有高於空白組之趨勢, 但並無顯著差異 (濃度 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時,  $p=0.052$ )。白色脂肪相關基因表現, Retn 與 Chemerin 和空白組相比並無顯著差異 ( $p>0.05$ ) (圖 2-7)。轉錄調控因子基因表現, PPAR $\alpha$  在濃度 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下有顯著增加 (1.2 倍) ( $p<0.01$ ), C/EBP $\beta$  則在山苦瓜皂化物處理濃度 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下有顯著增加 (1.3 倍) ( $p<0.005$ ), 而 PPAR $\gamma$  及 C/EBP $\alpha$  和空白組相比並無顯著差異 ( $p>0.05$ ) (圖 2-8)。

NS(不皂化物): 脂肪細胞在 NS 處理下, 棕色脂肪相關基因 PGC1 $\alpha$ 、UCP1 及 cidea 均高於空白處理組。其中 PGC1 $\alpha$  在濃度 1、0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  有顯著增加 (皆為 1.3 倍) ( $p<0.005$ )。UCP1 mRNA 基因表現在濃度 5、1、0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  處理後, 增加幅度分別為 1.2 倍、1.5 倍、1.8 倍, 在 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度下有顯著差異 ( $p<0.005$ )。在 1 及 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度 NS 處理下, Cidea mRNA 顯著高於空白組 (1.4 倍及 1.3 倍) (圖 2-5)。然而 Tfam 在各濃度皆顯著低於空白組 (0.9 倍) ( $p<0.01 \sim p<0.005$ )。Cox7a1 表現量在濃度 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  處理下有顯著減少 ( $p<0.005$ ), Prdm16 及 Nrf1 mRNA 基因表現和空白組相比並無顯著差異 ( $p>0.05$ ) (圖 2-5、圖 2-6)。Cox8b 在濃度 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  處理下顯著增加 (2.1 倍) ( $p<0.05$ )。白色脂肪相關基因表現, Retn 與 Chemerin 和空白組相比並無顯著差異 ( $p>0.05$ ) (圖 2-7)。轉錄調控因子基因表現, PPAR $\alpha$  在濃度 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下顯著較高 (1.2 倍) ( $p<0.05$ ), 而 PPAR $\gamma$  和空白處理組相比並無顯著差異。C/EBP $\alpha$  mRNA 表現在濃度 1、0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  分別增加 1.2 倍及 1.4 倍, 有顯著高於對照組的現象, ( $p<0.05$ ), 而 C/EBP $\beta$  則在濃度 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下有顯著增加 (1.2 倍) ( $p<0.05$ ) (圖 2-8)。

如圖 2-9 顯示, 以 10  $\mu\text{M}$  forskolin (cAMP 激活劑) 處理下, 可以顯著增加脂肪細胞中 UCP1 及 C/EBP $\beta$  mRNA 的表現 ( $p<0.005$ )。以 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  山苦瓜乙酸乙酯萃物 (EAE) 培養四天後, 再給予 forskolin 刺激 8 小時後, UCP1 ( $p=0.07$ ) 及 C/EBP $\beta$

表現有增加的現象，但和對照組相比 (vehicle + forskolin) 並無顯著差異。1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  皂化物 (S) 處理組在 forskolin 刺激 8 小時後，UCP1 表現有顯著高於對照組 ( $p < 0.05$ )，而 C/EBP $\beta$  表現則無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  不皂化物 (NS) 以 forskolin 刺激 8 小時後，UCP1 表現則是低於對照組，C/EBP $\beta$  表現則較高，但皆無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。

### (二) 山苦瓜水萃物及納豆菌作用後之水萃物

WE (60°C 水萃物)：在棕色脂肪相關基因 PGC1 $\alpha$ 、UCP1、Cidea、Prdm16 及粒線體生成作用相關基因 Tfam、NrF1、cox7a1、cox8b 的表現，和空白處理組相比皆無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。但值得注意的是，濃度 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 WE 處理下，脂肪細胞在各個棕色脂肪相關基因表現增加的幅度都是最大 (圖 2-10、圖 2-11)。白色脂肪相關基因表現上，Retn 在濃度 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  WE 處理下，會顯著受到抑制 (0.7 倍) ( $p < 0.05$ )，而各濃度下，Chemerin 和空白組相比並無顯著差異 ( $p > 0.05$ ) (圖 2-12)。轉錄調控因子基因表現，PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$  及 C/EBP $\beta$  的基因表現和空白組相比，皆無顯著差異 ( $p < 0.05$ ) (圖 2-13)。

WEn (納豆菌作用後之水萃物)：在濃度 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  處理下，PGC1 $\alpha$ 、Cidea、Cox7a1 及 Cox8b 的基因表現，都顯著受到抑制 ( $p < 0.01 \sim p < 0.005$ )，UCP1 在濃度 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  處理下也顯著受到抑制 ( $p < 0.05$ ) (圖 2-10、圖 2-11)。白色脂肪相關基因表現，Retn 在濃度 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  處理下顯著受到抑制 (0.6 倍) ( $p < 0.005$ )，而 Chemerin 在濃度 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  處理下有受到抑制的趨勢 ( $p = 0.057$ ) (圖 2-12)。轉錄調控因子基因表現，濃度 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  處理下，PPAR $\gamma$  及 C/EBP $\alpha$  會顯著受到抑制 ( $p < 0.05 \sim p < 0.005$ )，而相同濃度下，C/EBP $\beta$  則是顯著上升 ( $p < 0.01$ )。PPAR $\alpha$  則是在 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度下受到顯著抑制 ( $p < 0.05$ ) (圖 2-13)。

### 三、山苦瓜萃物處理 3T3-L1 脂肪細胞之檸檬酸合成酶 (CS) 活性

#### (一) 山苦瓜乙酸乙酯萃物暨其區分物

濃度 5 及 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  乙酸乙酯萃物 (EAE) 處理下，能顯著增加 CS 的活性 (約 1.2 倍) ( $p < 0.05 \sim p < 0.01$ )。但另外給予 10  $\mu\text{M}$  forskolin 刺激 8 小時，CS 活性並無顯著增加。不管有無給予 forskolin 刺激，皂化物 (S) 處理組與空白處理組 (vehicle)

及對照組 (vehicle + forskolin) 相比皆無顯著差異 ( $p>0.05$ )。各濃度不皂化物 (NS) 處理下，CS 活性和空白組相比皆無顯著差異，以 forskolin 刺激，CS 活性也無顯著增加 ( $p>0.05$ ) (圖 2-14 (A))。



### (二) 山苦瓜水萃物 (WE) 及納豆菌作用後之水萃物 (WEn)

在各濃度 WE 處理下，CS 的活性有增加的趨勢，但只有在 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度下和空白處理組相比，達顯著差異水平 ( $p=0.05$ )。而各濃度 WEn 處理下，CS 的活性和空白組相比皆無顯著差異 ( $p>0.05$ ) (圖 2-14 (B))。

## 四、山苦瓜中刺激 3T3-L1 脂肪細胞褐化基因表現的可能活性成分

由前面實驗結果，山苦瓜乙酸乙酯萃取物有刺激脂肪細胞棕色脂肪相關基因表現的潛力，乃進而探討其中可能的活性成分。先前實驗室經分離純化，鑑定出苦瓜中 9c,11t,13t-CLN 為可活化 PPARs 之化合物。CLN 由於具有共軛三烯的結構，故在 268 nm 有最大吸光值 (而 CLA 具有共軛雙烯結構，在 235 nm 有最大吸光) (Igarashi et al., 2000)。根據紫外光吸光圖譜結果顯示，EAE 與 S、NS 相比，在 270 nm 吸光值最高，顯示 EAE 中 CLN 含量較高，S 其次，NS 最低 (圖 2-15)。

### (一) 共軛次亞麻油酸 CLN

脂肪細胞在 CLN 處理下，棕色脂肪相關基因 PGC1 $\alpha$ 、UCP1、Cidea 及 Prdm16 mRNA 表現量有高於空白處理組的趨勢，皆在濃度 100  $\mu\text{M}$  有最大增加幅度 (幅度分別為 1.5 倍、2.4 倍、3.1 倍及 4.1 倍)。其中 PGC1 $\alpha$  基因表現在濃度 25  $\mu\text{M}$  有顯著增加 (1.2 倍) ( $p<0.005$ ) (圖 2-16)。粒線體生合成作用相關基因 Tfam 在濃度 50  $\mu\text{M}$  顯著高於空白組，但幅度並不大 (1.1 倍) ( $p<0.05$ )，而 NrF1 和空白組並無顯著差異 ( $p>0.05$ )。整體而言，Cox7a1 及 Cox8b 在各濃度下皆高於空白組，但只有濃度 100  $\mu\text{M}$  下，Cox7a1 基因表現顯著高於空白組 ( $p<0.05$ ) (圖 2-17)。白色脂肪相關基因表現上，Retn 與 Chemerin 和空白組相比並無顯著差異 ( $p>0.05$ ) (圖 2-18)。在轉錄調控因子基因表現上，PPAR $\alpha$  在濃度 100  $\mu\text{M}$  及 50  $\mu\text{M}$  下有顯著增加 (1.5 倍及 1.2 倍) ( $p<0.05$ )，而 PPAR $\gamma$  mRNA 表現和空白組相比並無顯著差異。C/EBP $\alpha$  在濃度 10  $\mu\text{M}$  處理下，顯著高於空白組 ( $p<0.005$ )，而 C/EBP $\beta$  則在濃度 100、50 及 10  $\mu\text{M}$  下，皆有顯著增加 (1.2 倍) ( $p<0.05 \sim p<0.005$ ) (圖 2-19)。

### (二) 植醇 phytol

脂肪細胞在 phytol 處理下，棕色脂肪相關基因 PGC1 $\alpha$  及 cidea 和空白處理組相比，雖表現較高，但並無顯著差異 ( $p>0.05$ )。而 UCP1 在各濃度下的表現量皆顯著增加 (700、350 及 175  $\mu\text{M}$  分別增加 1.8 倍、1.5 倍及 1.5 倍) ( $p<0.05 \sim p<0.005$ )。在高濃度 phytol 處理下 prdm16 表現較低，但隨著濃度減少有增加的趨勢，但並無差異 ( $p>0.05$ ) (圖 2-16)。粒線體生合成作用相關基因 Tfam 在各濃度下皆顯著高於空白組，但幅度並不大 (1.1 倍) ( $p<0.05$ )，而 NrF1 mRNA 表現在濃度 350 及 175  $\mu\text{M}$  則顯著被抑制 (0.9 倍) ( $p<0.05$ )。整體而言，Cox7a1 及 Cox8b 在各濃度 phytol 下皆高於空白組，唯因誤差較大，統計差異並不顯著 ( $p>0.05$ ) (圖 2-17)。白色脂肪相關基因表現，Retn 和對照組相比並無顯著差異，Chemerin 則是在 350  $\mu\text{M}$  濃度下，顯著較高 ( $p<0.05$ ) (圖 2-18)。PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$  及 C/EBP $\beta$  等轉錄調控因子基因表現，phytol 處理組和空白組相比並無顯著差異，而 C/EBP $\alpha$  在濃度 700  $\mu\text{M}$  處理下表現顯著升高 (1.2 倍) ( $p<0.05$ ) (圖 2-19)。

### (三) 葉黃素 lutein

脂肪細胞在 lutein 低濃度 8.75  $\mu\text{M}$  處理下，UCP1 mRNA 表現顯著高於空白組 ( $p<0.05$ )。而棕色脂肪相關基因 PGC1 $\alpha$ 、Cidea 及 prdm16 和空白組相比雖無顯著差異，但隨著濃度降低有升高的趨勢 ( $p>0.05$ )，在濃度 8.75  $\mu\text{M}$  皆有最大增加幅度 (幅度分別為 1.2 倍、1.3 倍、2.4 倍及 1.5 倍) (圖 2-16)。粒線體生合成作用相關基因 Tfam, NrF1 在各濃度處理下，和空白處理組並無顯著差異 ( $p>0.05$ )。特別的是，不同於其他棕色脂肪相關基因，在較高濃度 (35  $\mu\text{M}$ ) 處理下，Cox7a1 及 Cox8b 有最大增加幅度 (2.0 倍及 1.9 倍)，其中除了 Cox7a1 基因表現在 8.75  $\mu\text{M}$  濃度處理下有顯著增加 (1.6 倍)，其餘皆無顯著差異 ( $p>0.05$ ) (圖 2-17)。白色脂肪相關基因表現上，Retn 與 Chemerin 和空白組相比並無顯著差異 ( $p>0.05$ ) (圖 2-18)。轉錄調控因子基因表現在 lutein 處理下，PPAR $\alpha$ 、C/EBP $\alpha$  及 C/EBP $\beta$  mRNA 表現和空白組相比並無顯著差異，而濃度 0.2  $\mu\text{g/mL}$  處理下，PPAR $\gamma$  表現有顯著增加 (1.3 倍) (圖 2-19)。

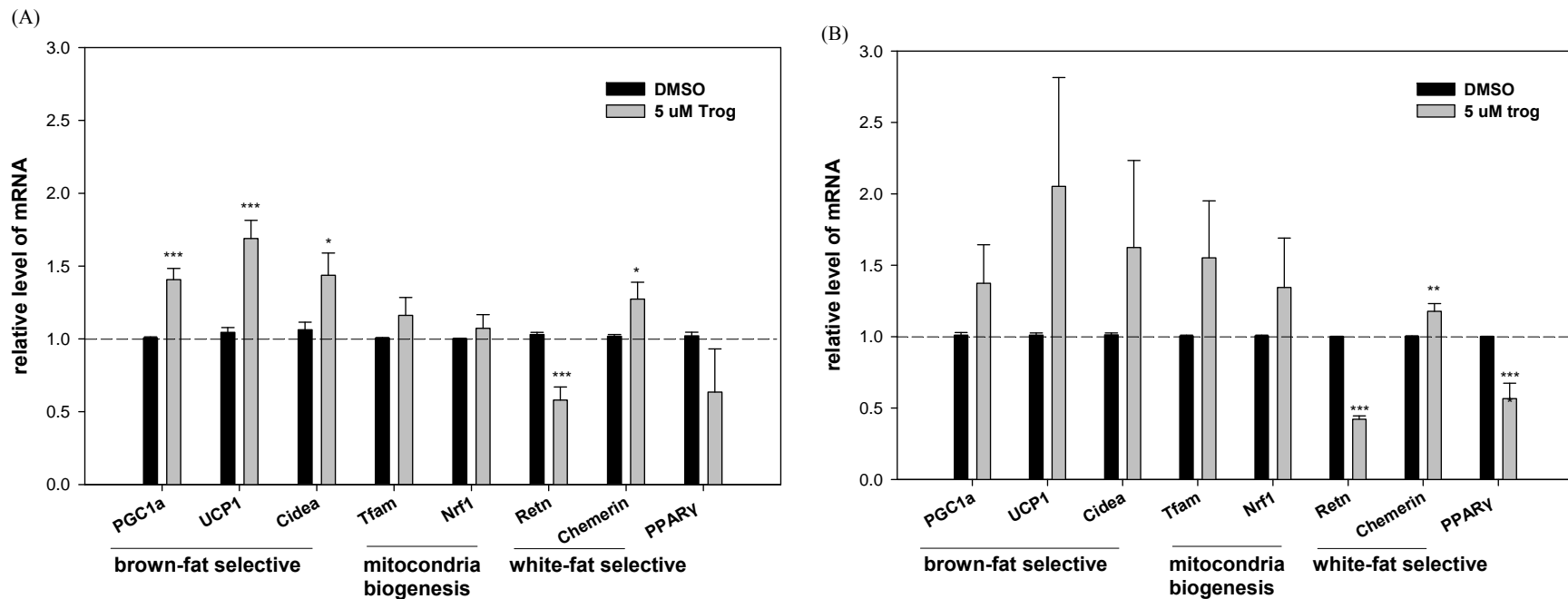


圖 2-1 分化成熟前 2 天以 troglitazone 處理 2 天對 3T3-L1 脂肪細胞褐化及粒線體相關基因 mRNA 表現之影響

**Figure 2-1 Troglitazone treatment during last 2 days of differentiation induced brown gene expression in 3T3-L1 adipocytes.**

3T3-L1 adipocytes were treated for the last 2 days before mature with 5 μM troglitazone (Trog) or vehicle (DMSO) for 2 days. 3T3-L1 cells were differentiated according to protocol 1 (A) or protocol 2 (B). Protocol 1 : cells were differentiated in Differentiation Medium (DM) I & II containing 10 % BS/DMEM, and cells were differentiated for 8 days in DM II . Protocol 2 : cells were differentiated in DM I & II containing 10 % FBS/DMEM, and cells were differentiated for 4 days in DM II . Each bar represents the mean value ± SD (n=3). Mean mRNA expression levels of vehicle treated cells were taken as 1 and those Trog treated cells were calculated as folds those of vehicle treated cells. \*, \*\* and \*\*\* denote significantly different from vehicle treated cells at  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) or  $p < 0.005$  (\*\*\*) analyzed by Student's *t*-test.

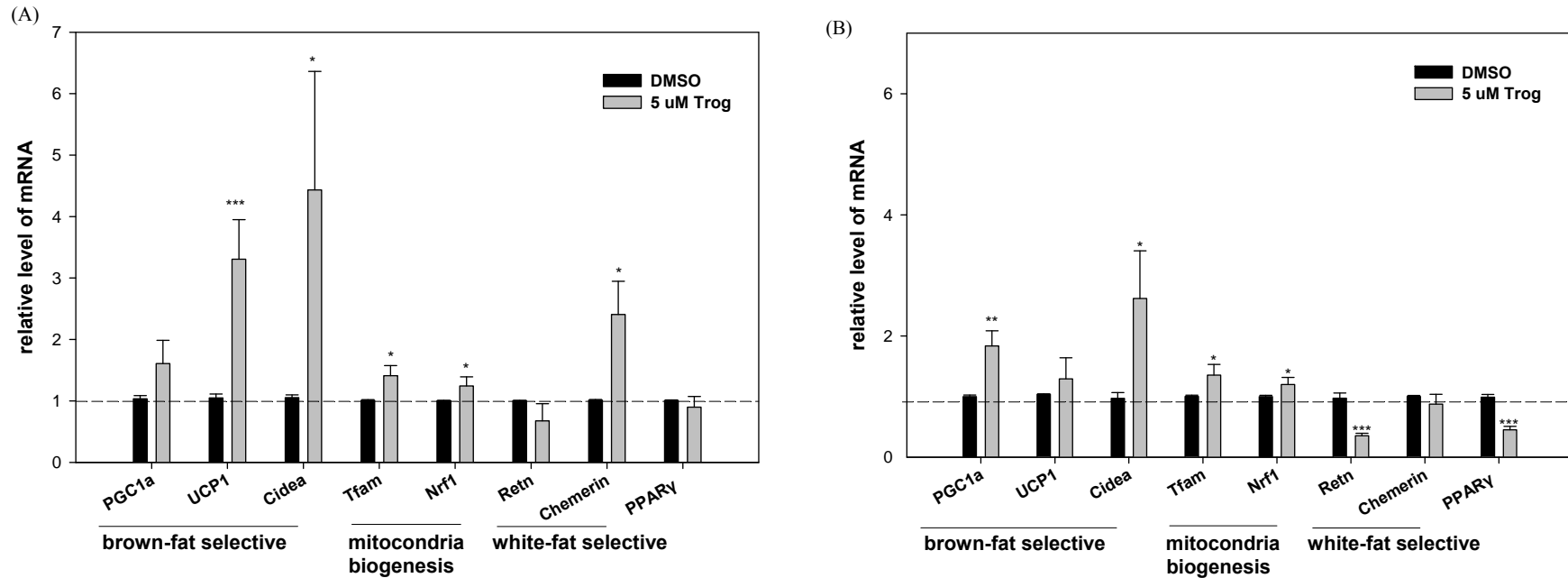


圖 2-2 分化成熟前 2 天以 troglitazone 處理 4 天對 3T3-L1 脂肪細胞褐化及粒線體相關基因 mRNA 表現之影響

**Figure 2-2 Troglitazone treatment for 4 days (last 2 days of differentiation and 2 days post differentiation) induced brown gene**

**expression in 3T3-L1 adipocytes.** 3T3-L1 adipocytes were 4 days (last 2 days of differentiation and 2 days post differentiation) with 5 μM troglitazone (Trog) or vehicle (DMSO). 3T3-L1 cells were differentiated according to protocol 1 (A) or protocol 2 (B). Protocol 1 : cells were

differentiated in Differentiation Medium (DM) I & II containing 10 % BS/DMEM, and cells were differentiated for 8 days in DM II . Protocol 2 : cells

were differentiated in DM I & II containing 10 % FBS/DMEM, and cells were differentiated for 4 days in DM II . Each bar represents the mean value ±

SD (n=3). Mean mRNA expression levels of vehicle treated cells were taken as 1 and those Trog treated cells were calculated as folds those of vehicle

treated cells. \* and \*\*\* denote significantly different from vehicle treated cells at  $p < 0.05$  (\*) or  $p < 0.005$  (\*\*\*) analyzed by Student's *t*-test.

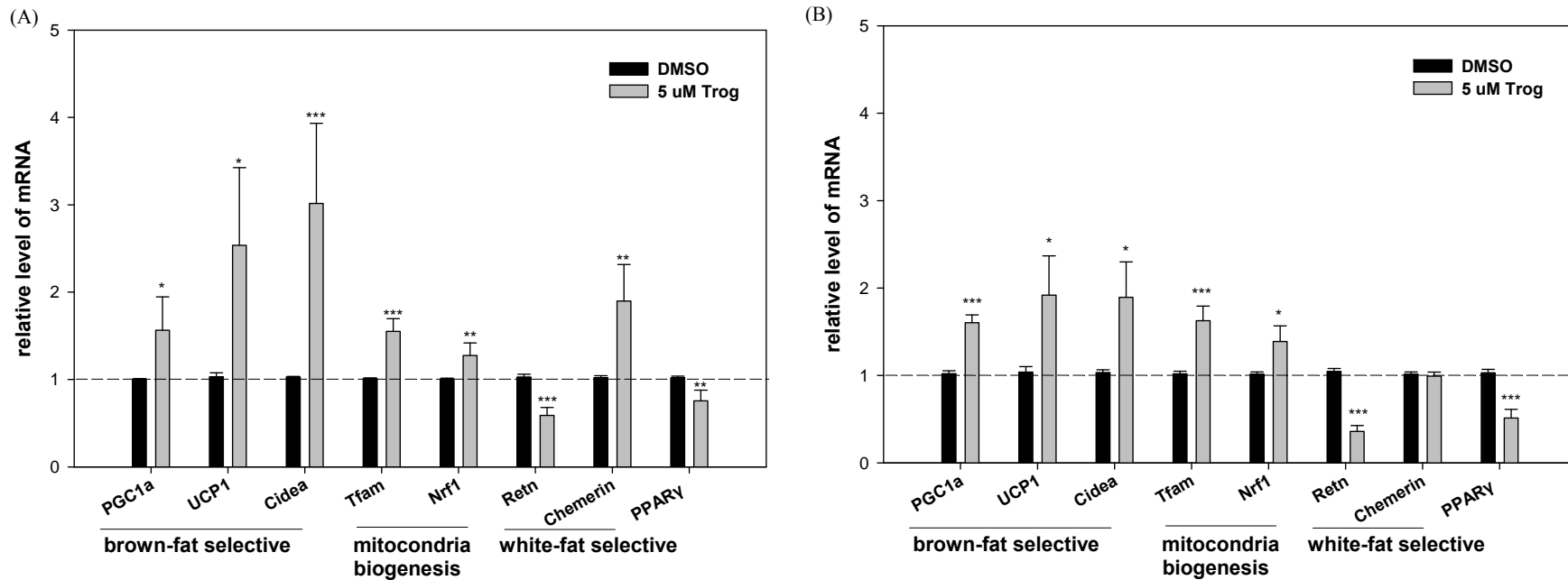


圖 2-3 分化成熟前 4 天以 troglitazone 處理 4 天對 3T3-L1 脂肪細胞褐化及粒線體相關基因 mRNA 表現之影響

**Figure 2-3 Troglitazone treatment during last 4 days of differentiation induced brown gene expression in 3T3-L1 adipocytes.**

3T3-L1 adipocytes were treated for the last 4 days before mature with 5 μM troglitazone (Trog) or vehicle (DMSO) for 4 days. 3T3-L1 cells were differentiated according to protocol 1 (A) or protocol 2 (B). Protocol 1 : cells were differentiated in Differentiation Medium (DM) I & II containing 10 % BS/DMEM, and cells were differentiated for 8 days in DM II. Protocol 2 : cells were differentiated in DM I & II containing 10 % FBS/DMEM, and cells were differentiated for 4 days in DM II. Each bar represents the mean value ± SD (n=3). Mean mRNA expression levels of vehicle treated cells were taken as 1 and those Trog treated cells were calculated as folds those of vehicle treated cells. \*, \*\* and \*\*\* denote significantly different from vehicle treated cells at  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) or  $p < 0.005$  (\*\*\*) analyzed by Student's *t*-test.



## 第二章 山苦瓜萃物對於脂肪細胞褐化相關基因表現之影響

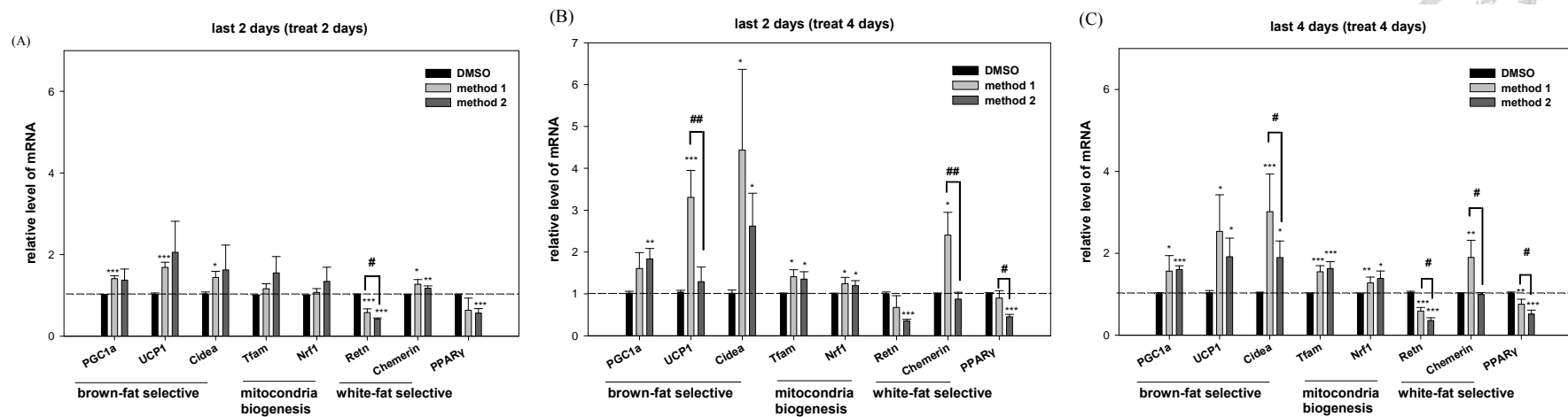


圖 2-4 兩種分化方法及三種處理時間對 troglitazone 處理 3T3-L1 脂肪細胞之褐化與粒線體生成作用相關基因 mRNA 表現之比較

**Figure 2-4 Comparison of the effects of differentiation protocol and treatment time on the mRNA expression of brown-fat selective and mitochondria biogenesis gene in troglitazone treated 3T3-L1 adipocytes.** 3T3-L1 cells were differentiated as protocol 1 and protocol 2, and were treated (A) for the last 2 days before mature with 5  $\mu$ M troglitazone (Trog) or vehicle (DMSO) for 2 days ; (B) Since the last 2 days before mature with 5  $\mu$ M Trog or DMSO for 4 days and (C) for the last 4 days before mature with 5  $\mu$ M Trog or DMSO for 4 days (C). Each bar represents the mean value  $\pm$  SD (n=3). Mean mRNA expression levels of vehicle treated cells were taken as 1 and those Trog treated cells were calculated as folds those of vehicle treated cells. \*, \*\* and \*\*\* denote significantly different from DMSO treated cells at  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) or  $p < 0.005$  (\*\*\*) analyzed by Student's *t*-test. # and ## denote significantly different between protocol 1 and 2 at  $p < 0.05$  (#) or  $p < 0.01$  (##) analyzed by Student's *t*-test.

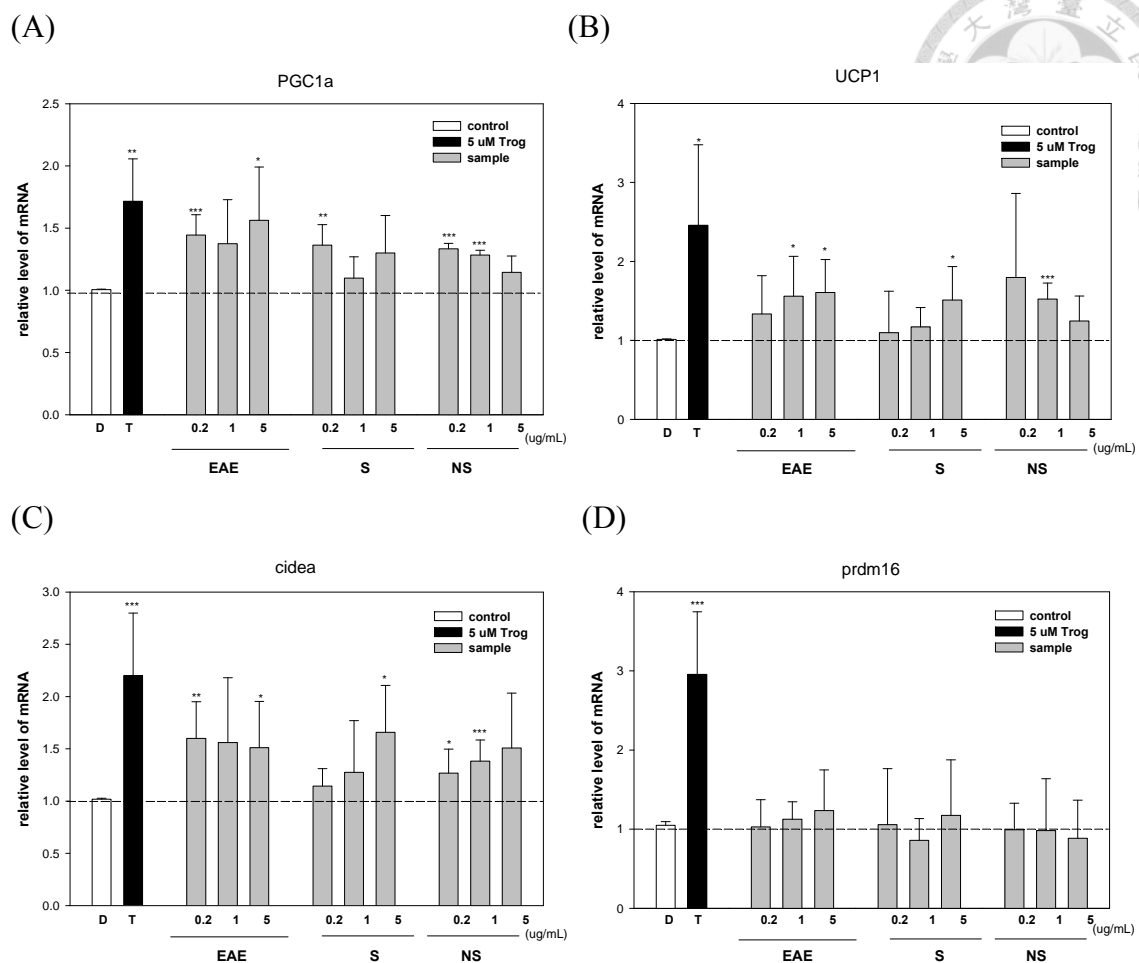


圖 2-5 山苦瓜乙酸乙酯萃物 (EAE) 及其皂化物 (S) 與不皂化物 (NS) 對 3T3-L1 脂肪細胞棕脂相關基因 mRNA 表現的影響

**Figure 2-5 mRNA expression of brown-fat-selective genes in 3T3-L1 adipocytes treated with ethyl acetate extract (EAE) of wild bitter melon and its saponifiable (S) or non-saponifiable (NS) fractions.** 3T3-L1 adipocytes were differentiated using protocol 1 and were treated with 5 μM Trog, wild bitter melon extracts or vehicle (DMSO) during the last 4 days of differentiation. Each bar represents the mean value ± SD (n=3). Mean mRNA expression levels of vehicle treated cells were taken as 1 and those Trog/extracts treated cells were calculated as folds those of vehicle treated cells. (A) PGC1α, (B) UCP1, (C) cidea, (D) prdm16. \*, \*\* and \*\*\* denote significantly different from vehicle treated cells at  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) or  $p < 0.005$  (\*\*\*) analyzed by Student's *t*-test.

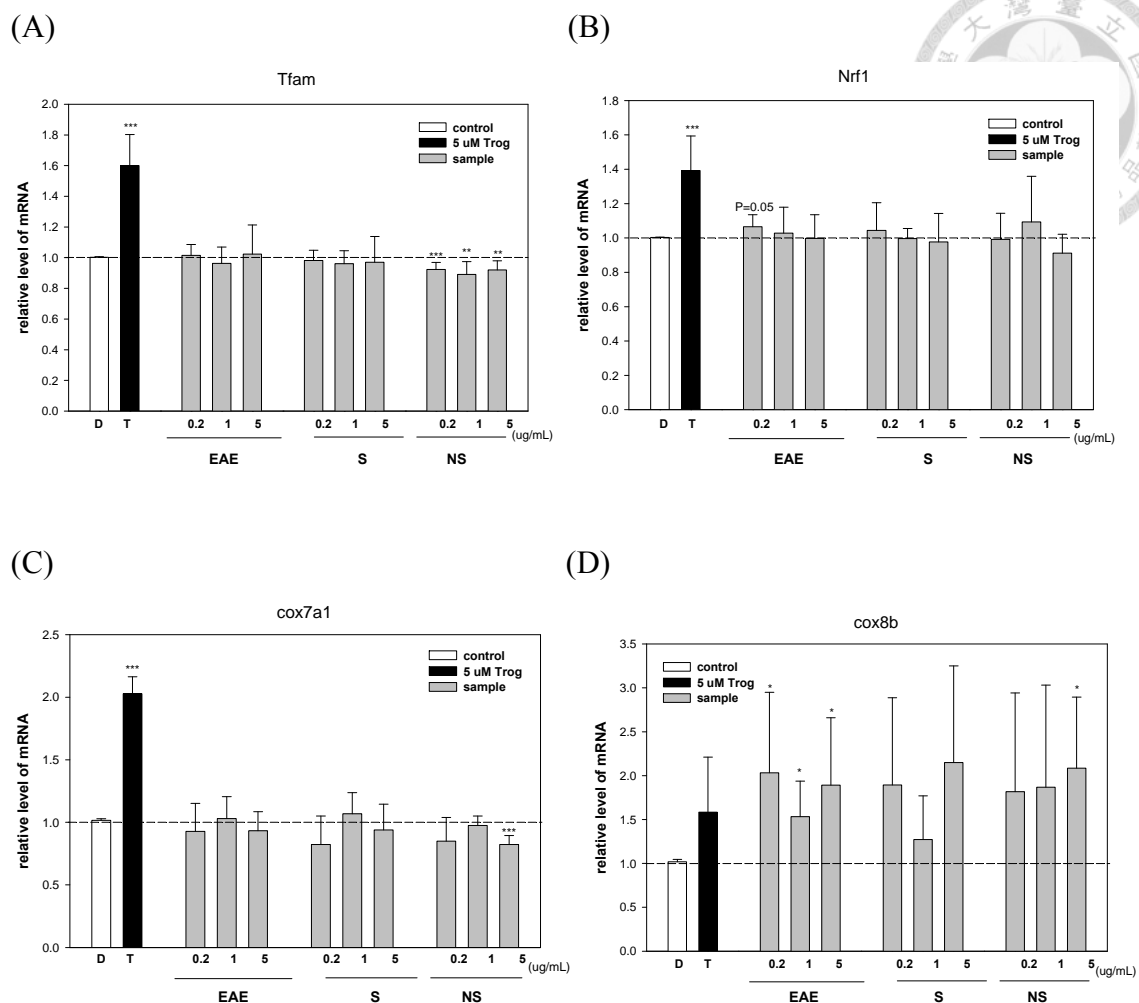


圖 2-6 山苦瓜乙酸乙酯萃物 (EAE) 及其皂化物 (S) 與不皂化物 (NS) 對 3T3-L1 脂肪細胞粒線體相關基因 mRNA 表現的影響

**Figure 2-6 mRNA expression of mitochondria biogenesis genes in 3T3-L1 adipocytes treated with ethyl acetate extract (EAE) of wild bitter gourd and its saponifiable (S) or non-saponifiable (NS) fractions.** 3T3-L1 adipocytes were differentiated using protocol 1 and were treated with 5  $\mu$ M Trog, wild bitter gourd extracts or vehicle (DMSO) during the last 4 days of differentiation. Each bar represents the mean value  $\pm$  SD (n=3). Mean mRNA expression levels of vehicle treated cells were taken as 1 and those Trog/extracts treated cells were calculated as folds those of vehicle treated cells. (A) Tfam, (B) NrF1, (C) cox7a1, (D) cox8b. \* and \*\*\* denote significantly different from vehicle treated cells at  $p < 0.05$  (\*) or  $p < 0.005$  (\*\*\*) analyzed by Student's *t*-test.

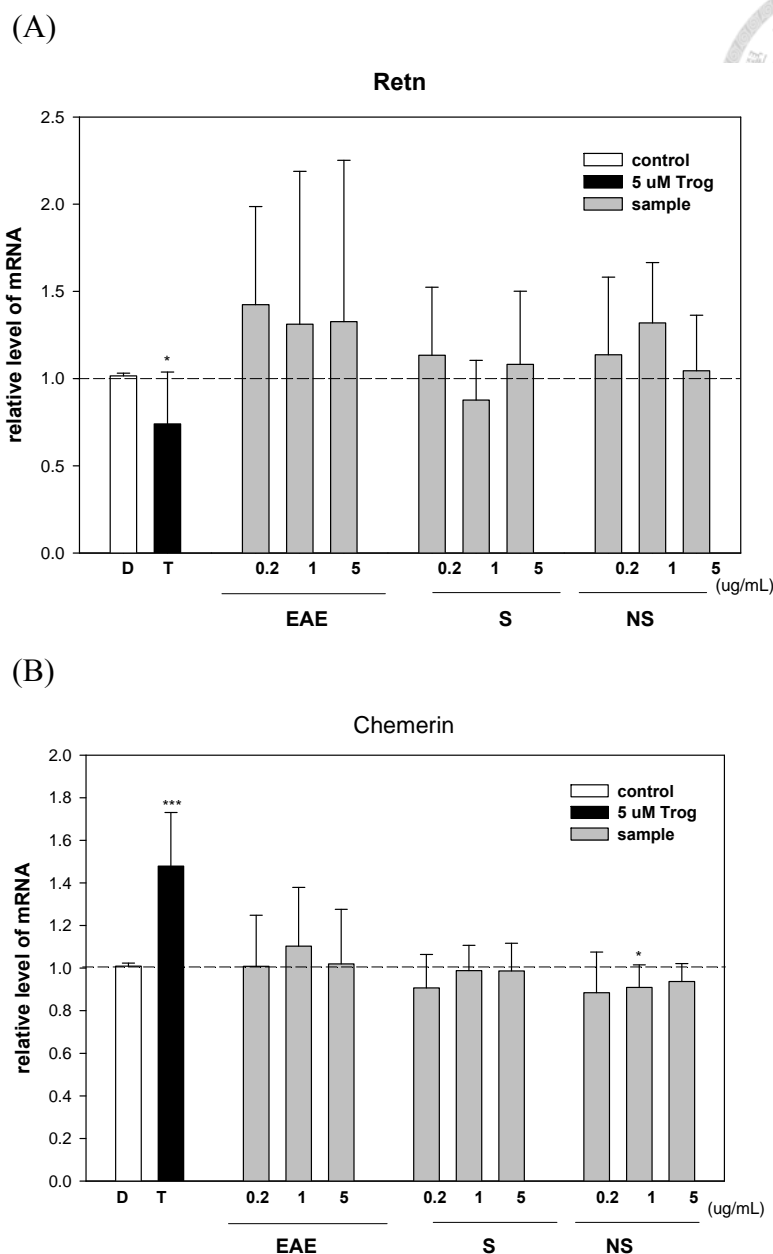


圖 2-7 山苦瓜乙酸乙酯萃物 (EAE) 及其皂化物 (S) 與不皂化物 (NS) 對 3T3-L1 脂肪細胞白色脂肪相關基因 mRNA 表現的影響

**Figure 2-7 mRNA expression of white-fat-selective genes in 3T3-L1 adipocytes treated with ethyl acetate extract (EAE) of wild bitter gourd and its saponifiable (S) or non-saponifiable (NS) fractions.** 3T3-L1 adipocytes were differentiated using protocol 1 and were treated with 5  $\mu$ M Trog, wild bitter gourd extracts or vehicle (DMSO) during the last 4 days of differentiation. Each bar represents the mean value  $\pm$  SD (n=3). Mean mRNA expression levels of vehicle treated cells were taken as 1 and those Trog/extracts treated cells were calculated as folds those vehicle of treated cells. (A) Retn and(B) Chemerin. \* and \*\*\* denote significantly different from vehicle treated cells at  $p < 0.05$  (\*) or  $p < 0.005$  (\*\*\*) analyzed by Student's *t*-test.

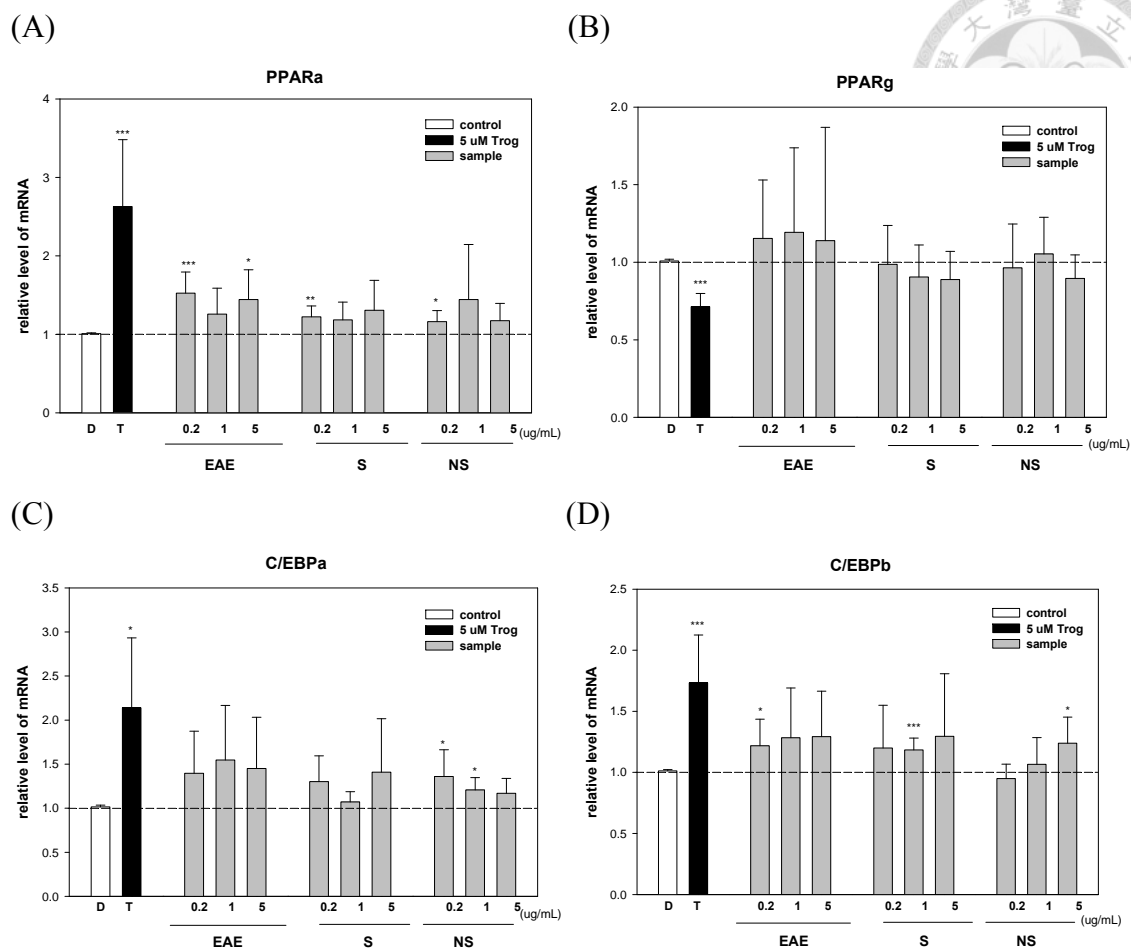


圖 2-8 山苦瓜乙酸乙酯萃物 (EAE) 及其皂化物 (S) 與不皂化物 (NS) 對 3T3-L1 脂肪細胞轉錄因子相關基因 mRNA 表現的影響

**Figure 2-8 mRNA expression of transcription factors genes in 3T3-L1 adipocytes treated with ethyl acetate extract (EAE) of wild bitter gourd and its saponifiable (S) or non-saponifiable (NS) fractions.** 3T3-L1 adipocytes were differentiated using protocol 1 and were treated with 5 μM Trog, wild bitter gourd extracts or vehicle (DMSO) during the last 4 days of differentiation. Each bar represents the mean value ± SD (n=3). Mean mRNA expression levels of vehicle treated cells were taken as 1 and those Trog/extracts treated cells were calculated as folds those of vehicle treated cells. (A) PPARα, (B) PPARγ, (C) C/EBPα, (D) C/EBPβ. \*, \*\* and \*\*\* denote significantly different from vehicle treated cells at  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) or  $p < 0.005$  (\*\*\*) analyzed by Student's *t*-test.

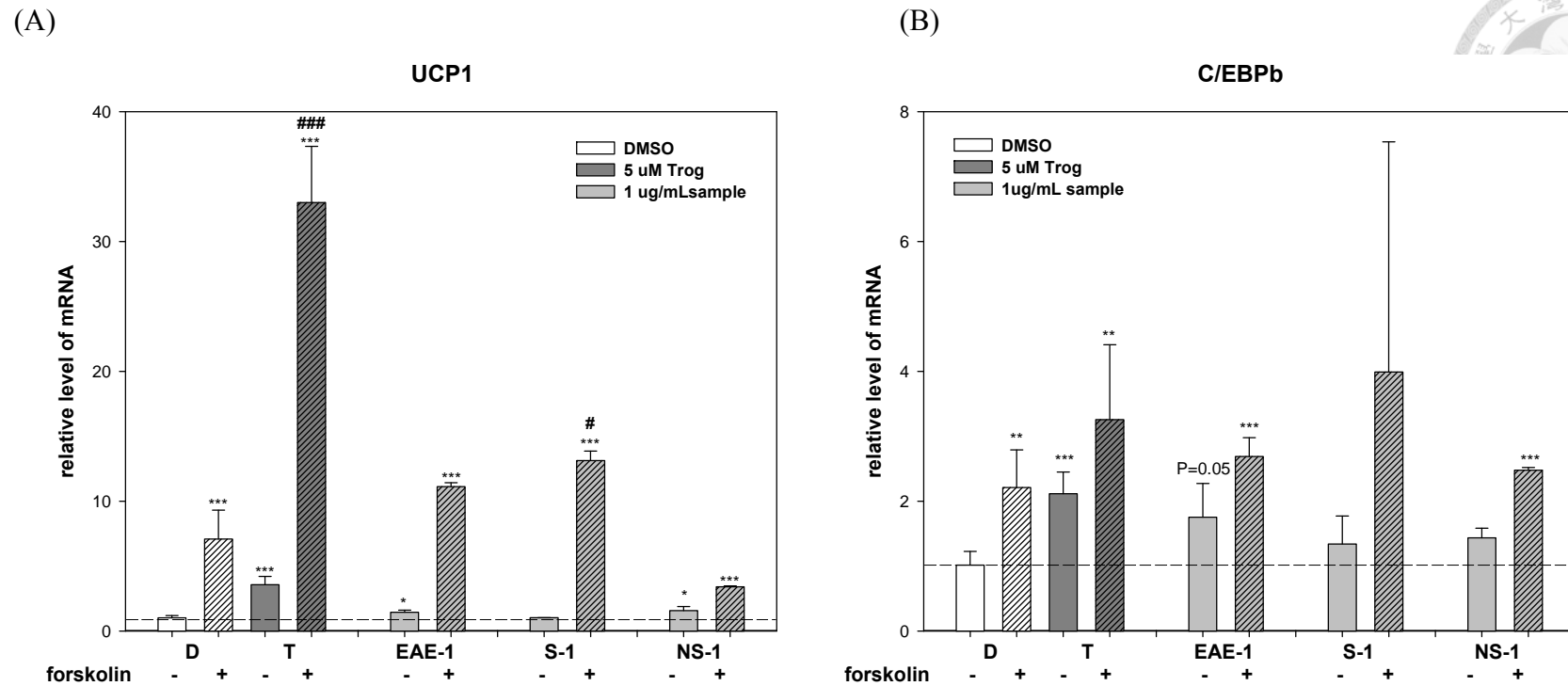


圖 2-9 山苦瓜乙酸乙酯萃物暨其區分物添加 forskolin 對分化中脂肪細胞 UCP1 及 C/EBPβ mRNA 的影響

**Figure 2-9 mRNA expression of (A) UCP1 and (B) C/EBPβ in 3T3-L1 adipocytes treated with wild bitter gourd extracts or its fraction in the presence of forskolin.** 3T3-L1 adipocytes were differentiated using protocol 1 and were treated with 5 μM Troglitazone, wild bitter gourd extracts or vehicle (DMSO) during the last 4 days of differentiation, with or without forskolin for 8 hr. Each bar represents the mean value ± SD (n=2). Mean mRNA expression levels of vehicle treated cells were taken as 1 and those Troglitazone/extracts treated cells were calculated as folds those of vehicle treated cells. \*, \*\* and \*\*\* denote significantly different from vehicle treated cells at  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) or  $p < 0.005$  (\*\*\*) analyzed by Student's *t*-test. # and ### denote significantly different from vehicle + forskolin treated cells at  $p < 0.05$  (#) or  $p < 0.005$  (###) analyzed by Student's *t*-test.

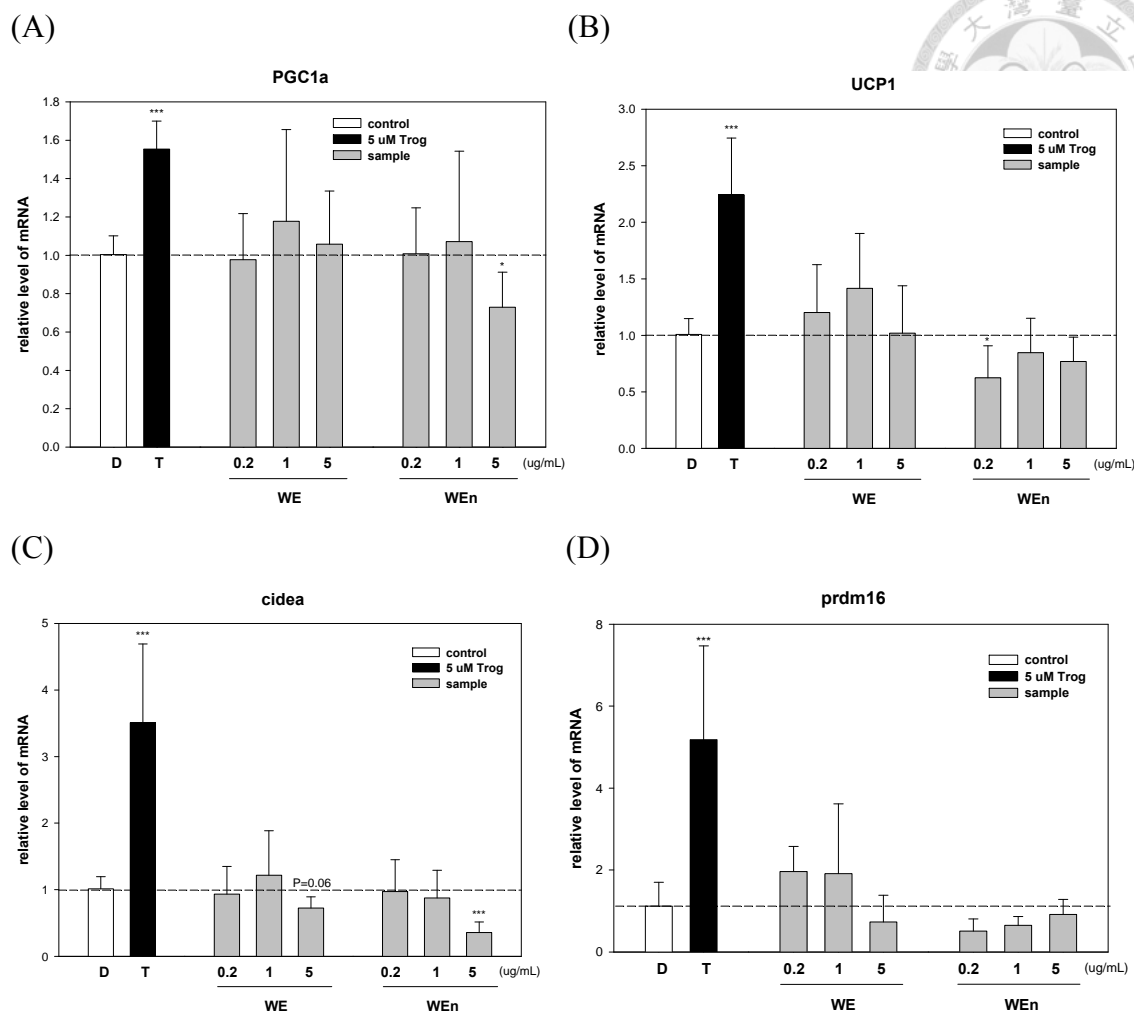


圖 2-10 山苦瓜水萃物及經納豆菌作用之水萃物對 3T3-L1 脂肪細胞棕色脂肪相關基因 mRNA 表現的影響

**Figure 2-10 mRNA expression of brown-fat-selective genes in 3T3-L1 adipocytes treated with water extract (WE) of wild bitter melon or WE pretreated with *Bacillus subtilis natto* (WEn).** 3T3-L1 adipocytes were differentiated using protocol 1 and were treated with 5 μM Troglitazone, wild bitter melon extracts (WE, WEn) or vehicle (DMSO) during the last 4 days of differentiation. Each bar represents the mean value ± SD (n=2). Mean mRNA expression levels of vehicle treated cells were taken as 1 and those Troglitazone/extracts treated cells were calculated as folds those of vehicle treated cells. (A) PGC1α, (B) UCP1, (C) cidea, (D) prdm16. \* and \*\*\* denote significantly different from vehicle treated cells at  $p < 0.05$  (\*) or  $p < 0.005$  (\*\*\*) analyzed by Student's *t*-test.

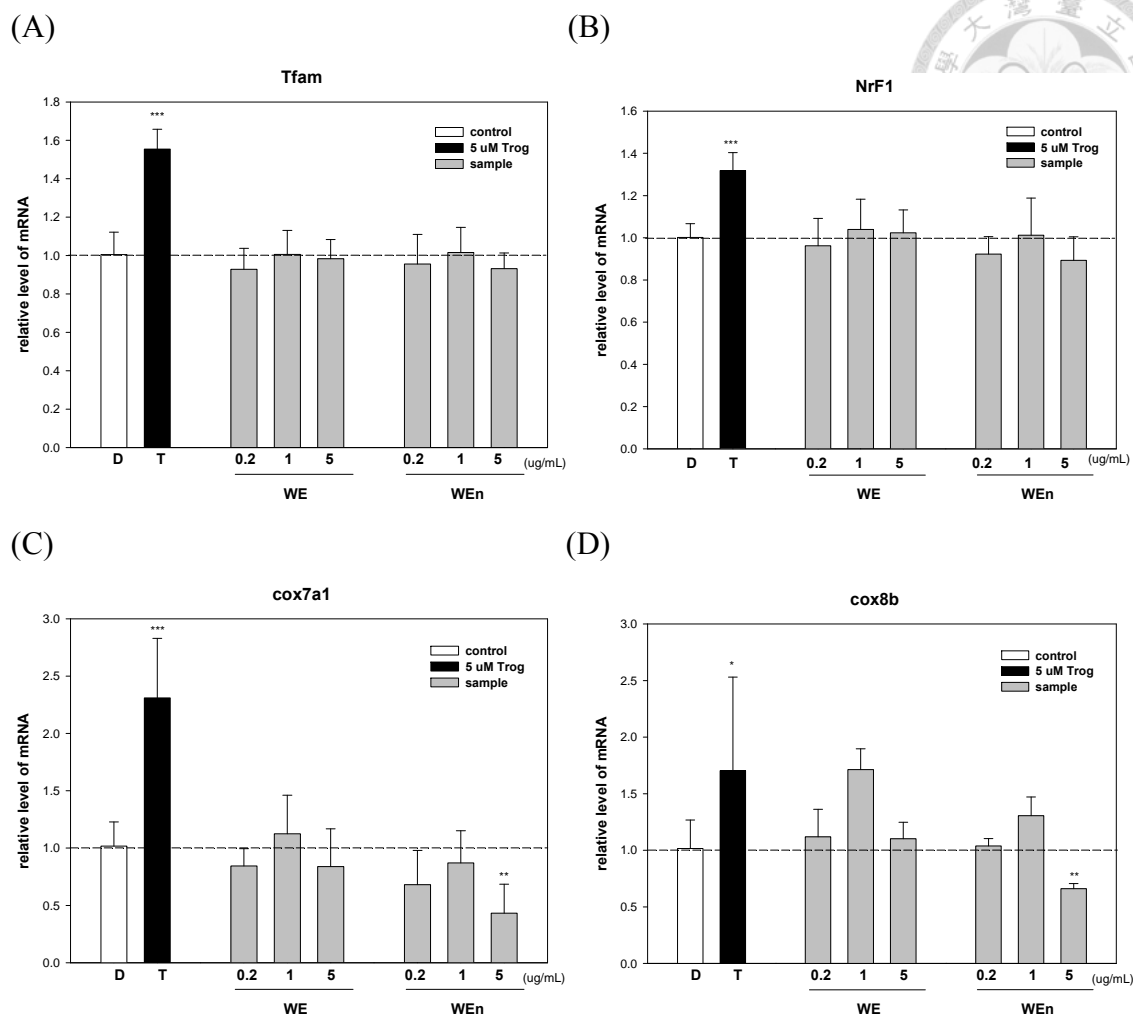


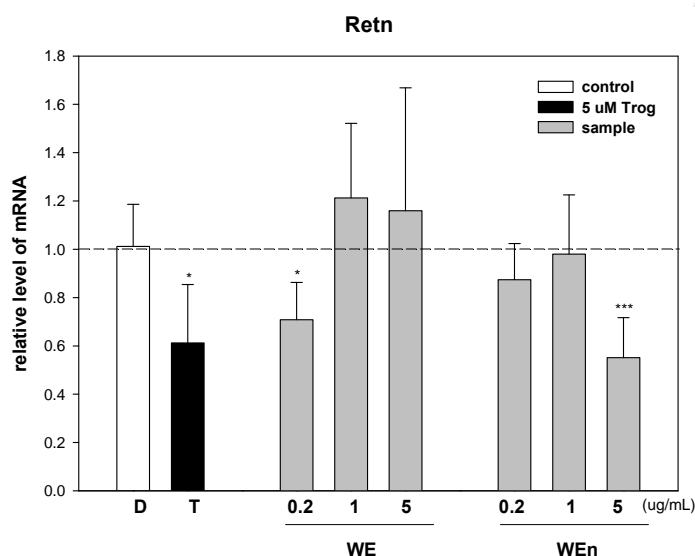
圖 2-11 山苦瓜水萃物及經培養於 5 % 黑豆漿納豆菌作用之水萃物對 3T3-L1 脂肪細胞粒線體生成相關基因 mRNA 表現的影響

**Figure 2-11 mRNA expression of mitochondria biogenesis genes in 3T3-L1 adipocytes treated with water extract (WE) of wild bitter gourd or WE pretreated with *bacillus subtilis natto* (WEn).** 3T3-L1 adipocytes were differentiated using protocol 1 and were treated with 5 μM Troglitazone, wild bitter gourd extracts (WE, WEn) or vehicle (DMSO) during the last 4 days of differentiation. Each bar represents the mean value ± SD (n=2). Mean mRNA expression levels of vehicle treated cells were taken as 1 and those Troglitazone/extracts treated cells were calculated as folds those of vehicle treated cells. (A) Tfam, (B) NrF1, (C) cox7a1, (D) cox8b. \*, \*\* and \*\*\* denote significantly different from vehicle treated cells at  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) or  $p < 0.005$  (\*\*\*) analyzed by Student's *t*-test.





(A)



(B)

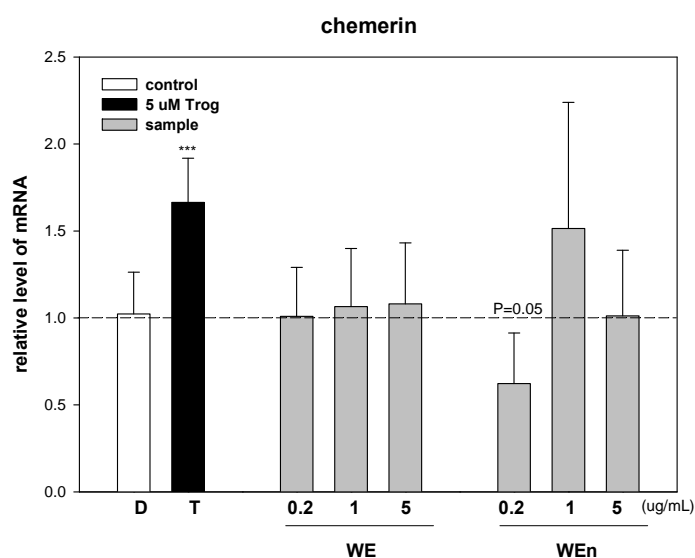


圖 2-12 山苦瓜水萃物及經納豆菌作用之水萃物對 3T3-L1 脂肪細胞白色脂肪相關基因 mRNA 表現的影響

**Figure 2-12 mRNA expression of white-fat-selective genes in 3T3-L1 adipocytes treated with water extract (WE) of wild bitter gourd or WE pretreated with *bacillus subtilis natto* (WEn).** 3T3-L1 adipocytes were differentiated using protocol 1 and were treated with 5  $\mu$ M Trog, wild bitter gourd extracts (WE, WEn) or vehicle (DMSO) during the last 4 days of differentiation. Each bar represents the mean value  $\pm$  SD (n=2). Mean mRNA expression levels of vehicle treated cells were taken as 1 and those Trog/extracts treated cells were calculated as folds those of vehicle treated cells. (A) Retn and (B) Chemerin. \* and \*\*\* denote significantly different from vehicle treated cells at  $p < 0.05$  (\*) or  $p < 0.005$  (\*\*\*) analyzed by Student's *t*-test.

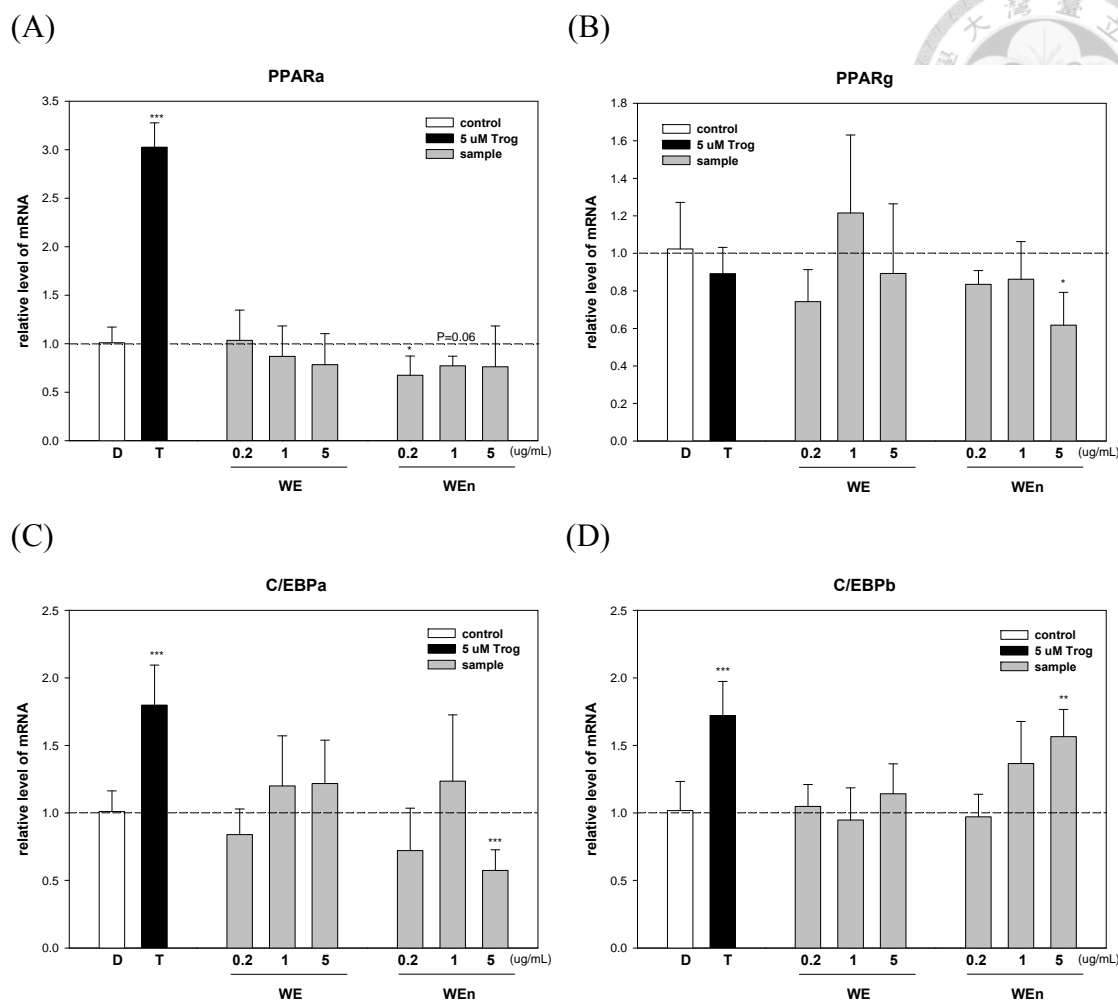


圖 2-13 山苦瓜水萃物及經納豆菌作用之水萃物對 3T3-L1 脂肪細胞轉錄因子相關基因 mRNA 表現的影響

**Figure 2-13 mRNA expression of transcription factors genes in 3T3-L1 adipocytes treated with water extract (WE) of wild bitter gourd or WE pretreated with *Bacillus subtilis natto* (WEn).** 3T3-L1 adipocytes were differentiated using protocol 1 and were treated with 5 μM Trog, wild bitter gourd extracts (WE, WEn) or vehicle (DMSO) during the last 4 days of differentiation. Each bar represents the mean value ± SD (n=2). Mean mRNA expression levels of vehicle treated cells were taken as 1 and those Trog/extracts treated cells were calculated as folds those of vehicle treated cells. (A) PPARα, (B) PPARγ, (C) C/EBPα, (D) C/EBPβ. \*, \*\* and \*\*\* denote significantly different from vehicle treated cells at  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) or  $p < 0.005$  (\*\*\*) analyzed by Student's *t*-test.

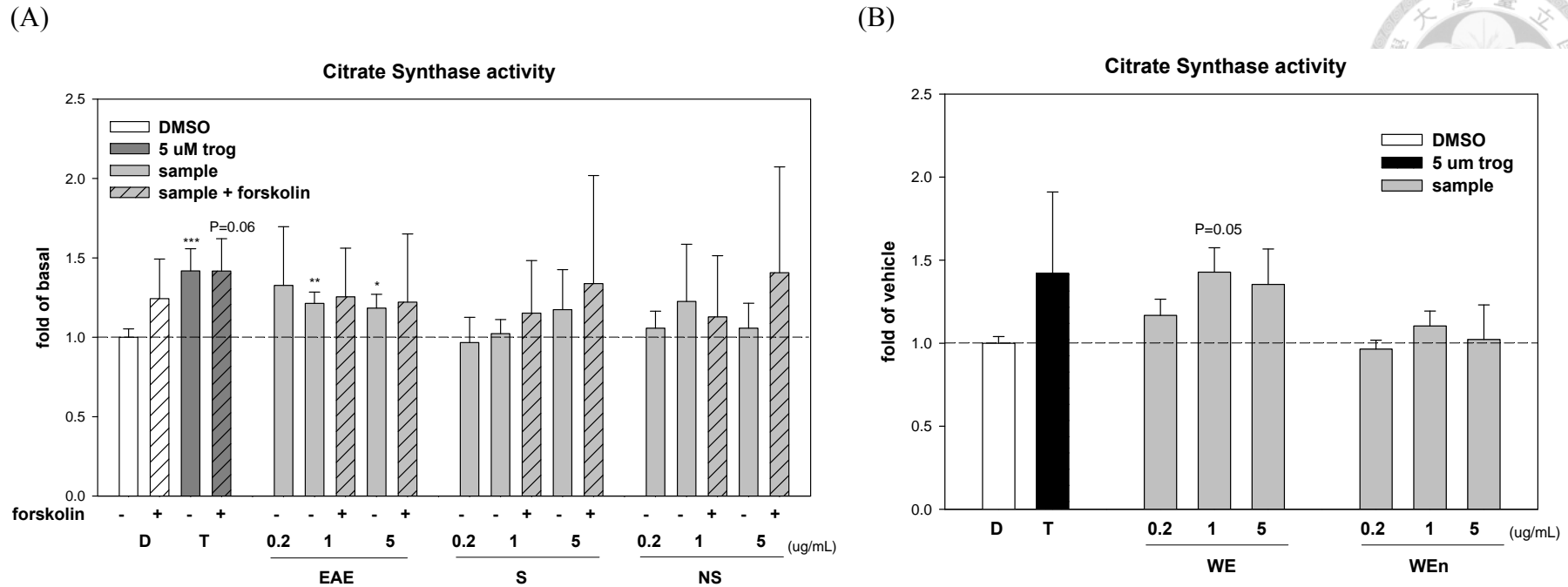


圖 2-14 不同山苦瓜萃物對 3T3-L1 脂肪細胞檸檬酸合成酶 (CS) 活性之影響

**Figure 2-14 Citrate synthase (CS) activity of differentiated 3T3-L1 adipocytes treated with various wild bitter gourd extracts.**

3T3-L1 adipocytes were differentiated using protocol 1 and treated with 5 μM Trog, wild bitter gourd extracts or vehicle (DMSO) during the last 4 days of differentiation, with or without forskolin for 8 hr. Each bar represents the mean value ± SD ( (A) n=3 and (B) n=2). The enzyme citrate synthase is used to estimate the cellular mitochondrial content. Mean enzyme activity of vehicle treated cells were taken as 1 and those Trog/extracts treated cells were calculated as folds those of vehicle treated cells. \*, \*\* and \*\*\* denote significantly different from vehicle treated cells at  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) or  $p < 0.005$  (\*\*\*) analyzed by Student's *t*-test.

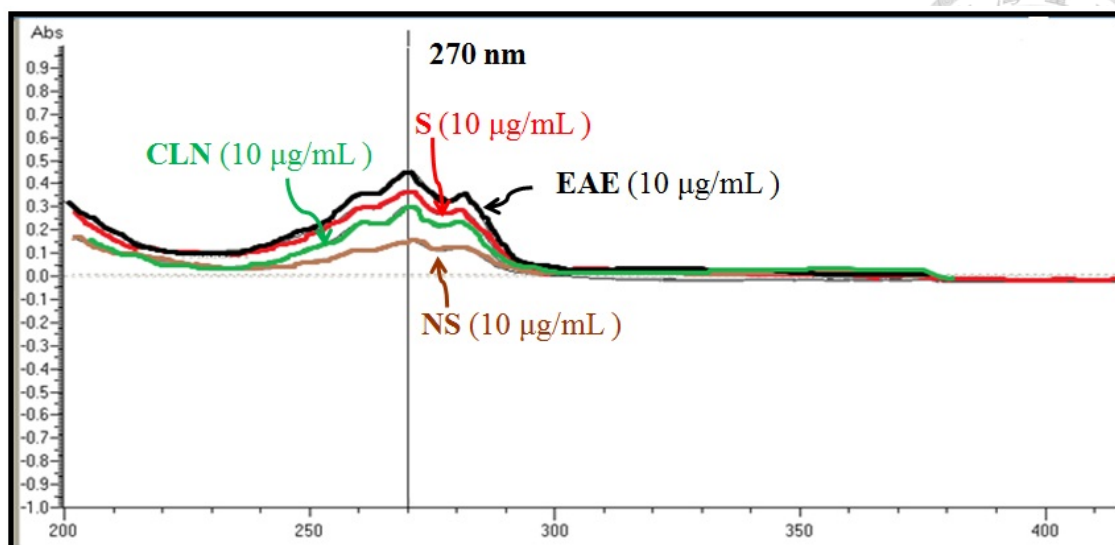


圖 2-15 山苦瓜乙酸乙酯萃物暨其區分物與 CLN 之紫外光吸光圖譜

Figure 2-15 The UV spectrum of EAE, S, NS and CLN

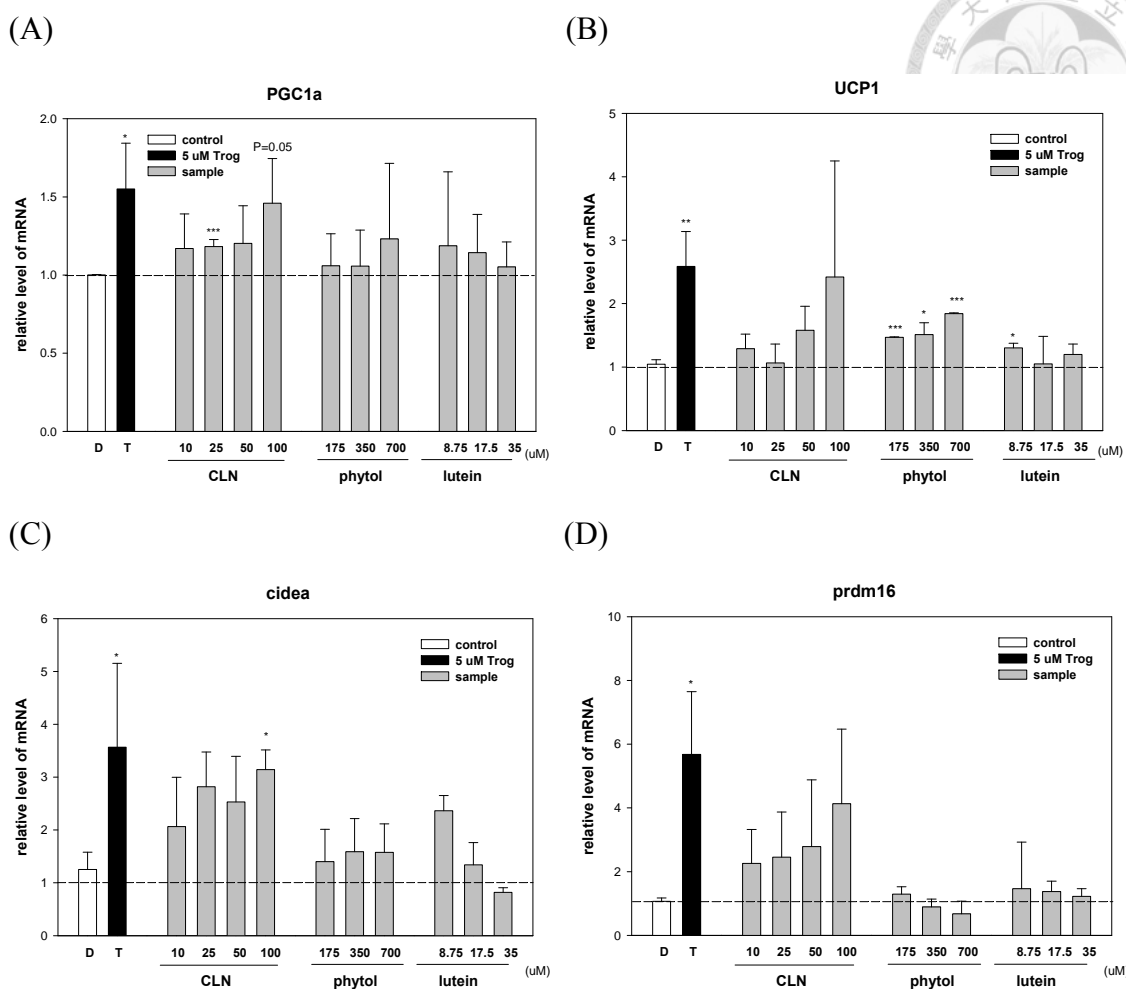


圖 2-16 山苦瓜 PPAR 活性成分對 3T3-L1 脂肪細胞棕色脂肪相關基因 mRNA 表現之影響

**Figure 2-16 mRNA expression of brown-fat-selective genes in 3T3-L1 adipocytes treated with some PPAR active compounds of wild bitter gourd.** 3T3-L1 adipocytes were differentiated using protocol 1 and treated with 5 μM Troglitazone, wild bitter gourd PPAR active compounds or vehicle (DMSO) during the last 4 days of differentiation. Each bar represents the mean value ± SD (n=3). Mean mRNA expression levels of vehicle treated cells were taken as 1 and those Troglitazone/compounds treated cells were calculated as folds those of vehicle treated cells. (A) PGC1α, (B) UCP1, (C) cidea, (D) prdm16. \*, \*\* and \*\*\* denote significantly different from vehicle treated cells at  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) or  $p < 0.005$  (\*\*\*) analyzed by Student's *t*-test.

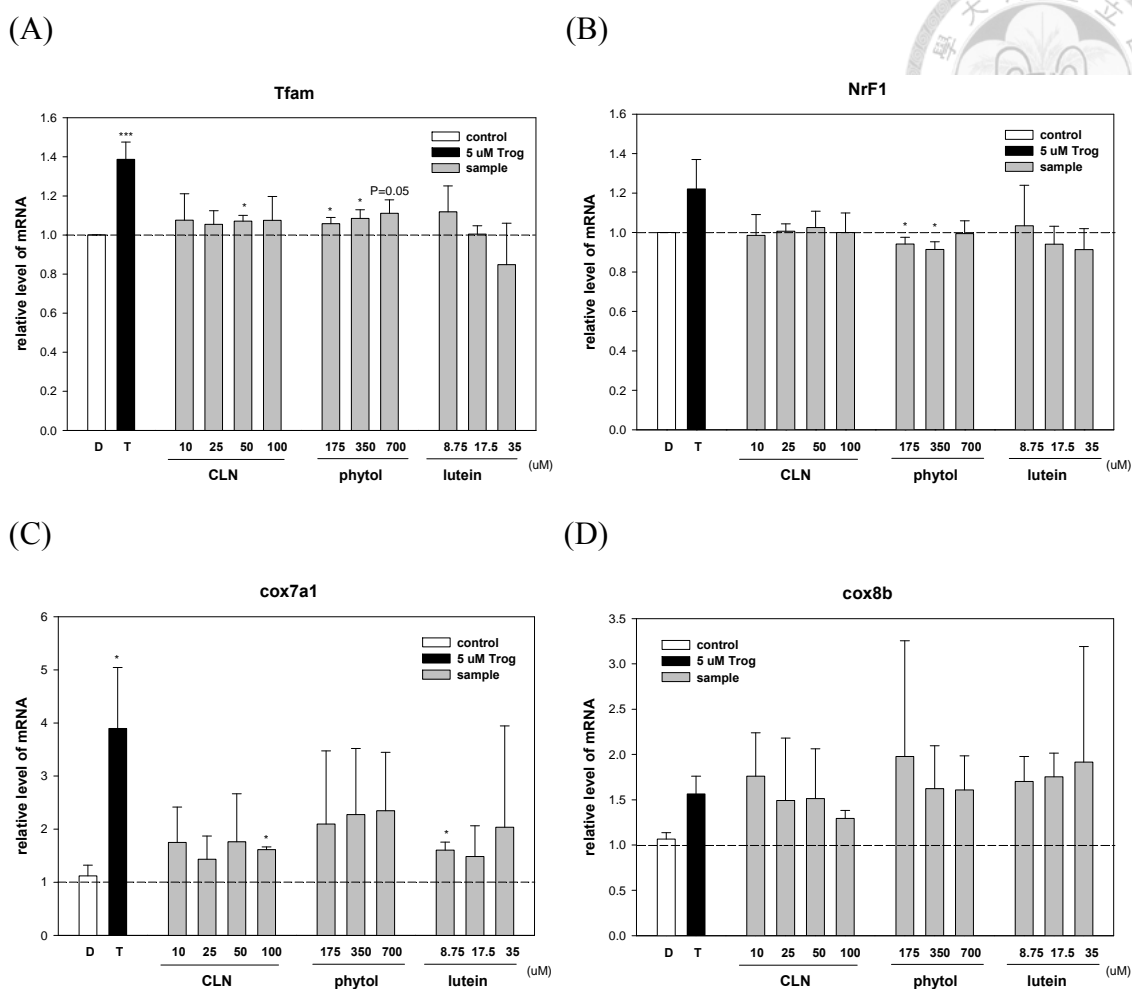
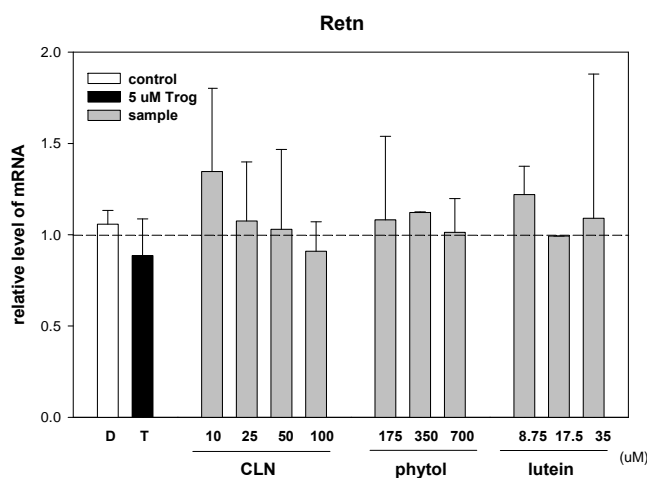


圖 2-17 山苦瓜 PPAR 活性成分對 3T3-L1 脂肪細胞粒線體生成相關基因 mRNA 表現之影響

**Figure 2-17 mRNA expression of mitochondria biogenesis genes in 3T3-L1 adipocytes treated with some PPAR active compounds of wild bitter gourd.** 3T3-L1 adipocytes were differentiated using protocol 1 and treated with 5 μM Troglitazone, wild bitter gourd PPAR active compounds or vehicle (DMSO) during the last 4 days of differentiation. Each bar represents the mean value ± SD (n=3). Mean mRNA expression levels of vehicle treated cells were taken as 1 and those troglitazone/compounds treated cells were calculated as folds those of vehicle treated cells. (A) Tfam, (B) NrF1, (C) cox7a1, (D) cox8b. \* and \*\*\* denote significantly different from vehicle treated cells at  $p < 0.05$  (\*) or  $p < 0.005$  (\*\*\*) analyzed by Student's *t*-test.



(A)



(B)

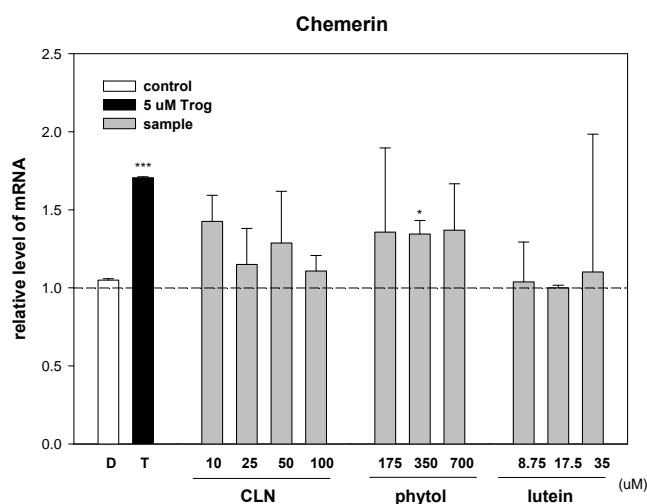


圖 2-18 山苦瓜 PPAR 活性成分對 3T3-L1 脂肪細胞白色脂肪相關基因 mRNA 表現之影響

**Figure 2-18 mRNA expression of white-fat-selective genes in 3T3-L1 adipocytes treated with some PPAR active compounds of wild bitter gourd.** 3T3-L1 adipocytes were differentiated using protocol 1 and treated with 5  $\mu$ M Trog, wild bitter gourd PPAR active compounds or vehicle (DMSO) during the last 4 days of differentiation. Each bar represents the mean value  $\pm$  SD (n=3). Mean mRNA expression levels of vehicle treated cells were taken as 1 and those trog/compounds treated cells were calculated as folds those of vehicle treated cells. (A) Retn and (B) Chemerin. \* and \*\*\* denote significantly different from vehicle treated cells at  $p < 0.05$  (\*) or  $p < 0.005$  (\*\*\*) analyzed by Student's *t*-test.

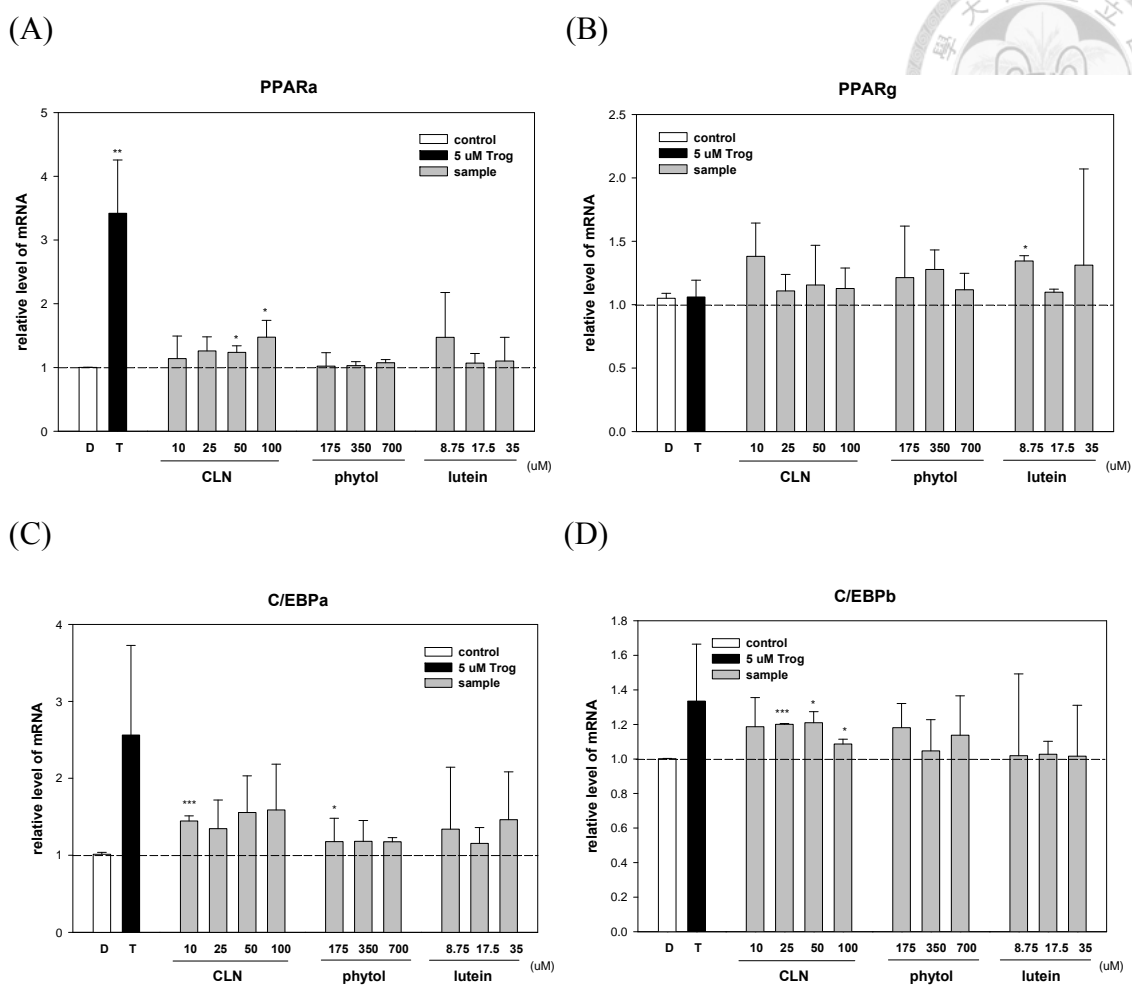


圖 2-19 山苦瓜 PPAR 活性成分對 3T3-L1 脂肪細胞轉錄因子相關基因 mRNA 表現之影響

**Figure 2-19 mRNA expression of transcription factors genes in 3T3-L1 adipocytes treated with some PPAR active compounds of wild bitter gourd.** 3T3-L1 adipocytes were differentiated using protocol 1 and treated with 5 μM Troglitazone, wild bitter gourd PPAR active compounds or vehicle (DMSO) during the last 4 days of differentiation. Each bar represents the mean value ± SD (n=3). Mean mRNA expression levels of vehicle treated cells were taken as 1 and those troglitazone/compounds treated cells were calculated as folds those of vehicle treated cells. (A) PPARα, (B) PPARγ, (C) C/EBPα, (D) C/EBPβ. \*, \*\* and \*\*\* denote significantly different from vehicle treated cells at  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) or  $p < 0.005$  (\*\*\*) analyzed by Student's *t*-test.



### 第四節 討論

#### 一、比較不同分化法及處理時間建立 3T3-L1 脂肪細胞褐化最佳模式

整體而言，以分化法一、二培養之成熟脂肪細胞，在 5  $\mu$ M troglitazone 處理下，棕色脂肪相關基因 PGC1 $\alpha$ 、UCP1、cidea 以及粒線體生合成相關基因 NrF1、Tfam 皆有增加的現象，和文獻結果符合。白色脂肪相關基因表現，Retn 低於空白處理組，轉錄因子 PPAR $\gamma$  mRNA 表現則是如文獻降低 (Vernochet et al., 2009)。其中 Chemerin 的基因表現在兩種分化條件下有不同的趨勢：分化法一有增加的現象，而分化法二的結果則是較接近文獻（預期會較低），推測是分化方法的差異（文獻以 10% FBS/DMEM 作為分化培養基）。由於分化法二培養的脂肪細胞，整體的分化程度（85%~95%）較分化方法一（70%~80%）好，顯示能調節成熟脂肪細胞的脂質生成及代謝相關作用的因子 Chemerin，受到 PPAR $\gamma$  agonist 影響較為明顯，所以在 5  $\mu$ M troglitazone 處理下，會受到較明顯的抑制；相對的以 10% BS/DMEM 培養的脂肪細胞，Chemerin mRNA 表現受到 PPAR $\gamma$  agonist 抑制較不顯著。

就分化方法，分化法一培養的 3T3-L1 脂肪細胞在棕色脂肪相關基因表現上，增加幅度都較分化法二高。而粒線體生合作用等相關基因表現，兩種分化方法則是差不多。白色脂肪基因和轉錄因子 PPAR $\gamma$  的基因表現，分化方法一也都稍高於分化法二。批次實驗結果顯示，分化法一的重複性較高，故之後山苦瓜萃物/區分物樣品處理 3T3-L1 脂肪細胞皆以**分化法一**進行培養。

而樣品處理時間點的比較，處理 4 天的基因改變幅度比處理 2 天的改變幅度大。在分化成熟前 2 日開始，處理 4 天的脂肪細胞在棕色脂肪相關基因表現的幅度雖然較大，但整體而言，在分化成熟前 4 日開始，處理 4 天的脂肪細胞在各個目標基因表現的變化上重複性較高，故之後山苦瓜萃物/區分物樣品處理皆參照此時間點：**分化成熟前 4 日開始處理 4 天**。另外，由於處理時間較長，脂肪細胞皆以低濃度（0.2、1、5  $\mu$ g/mL）苦瓜樣品作處理。而苦瓜活性成分濃度的選擇，則是參考先前實驗室「山苦瓜各單一活性成分對 PPAR $\alpha$  及 PPAR $\gamma$  轉錄活性之劑量反

應」之研究結果 (徐璿, 2010)。



### 二、山苦瓜萃物對於 3T3-L1 脂肪細胞褐化現象的影響

已經有不少研究證實，白色脂肪細胞在 PPAR $\gamma$  ligand 刺激下，會使細胞出現褐化現象，牽涉了不少和粒線體相關的基因，如 UCP1 和 cytochrome oxidase (Cox) (Wilson-Fritch et al., 2003; Wilson-Fritch et al., 2004)，而轉錄因子 PPAR $\gamma$  本身在 UCP1 基因表現的調節上也扮演了很重要角色。給予小鼠合成的 PPAR $\gamma$  agonist，也可刺激 WAT 出現褐化現象，並抑制白色脂肪相關基因的表現 (Vernochet et al., 2009)。

UCP1 主要表現在棕色脂肪組織，具產熱的功能。由於 UCP1 基因表現會受 PGC1 $\alpha$  調節，而 PGC1 $\alpha$  也會與 PRDM16 共同作用，增加棕色脂肪相關基因表現，如 Cidea (Seale et al., 2008) 等。在 cAMP 刺激下，過度表現的 C/EBP $\beta$  會和 CRE 結合，增加白色及棕色脂肪細胞中 PGC1 $\alpha$  及 UCP1 的基因表現 (Karamanlidis et al., 2007)。先前研究指出，給予正常鼠及 ob/ob 鼠 non-TZD PPAR $\gamma$  agonist 後，對於  $\beta$ -adrenergic 的刺激，都有相當大的生熱潛力 (thermogenesis) (Sell et al., 2004)，顯示這兩種機制彼此有關。而最近研究指出，forskolin 與 rosiglitazone 具協同作用，共同刺激 HIB-1B 棕色脂肪細胞株的 UCP1 mRNA 表現，作用機制可能是直接作用於 UCP1 的啟動子上，並牽涉 PKA 和 PPAR 的訊息傳遞系統 (H. Y. Chen et al., 2013)。

本實驗結果，在低濃度 (0.2-5  $\mu$ g/mL) 的山苦瓜乙酸乙酯萃物暨其區分物處理下，能顯著增加 3T3-L1 脂肪細胞棕色脂肪相關基因的表現，可能與文獻 (Chao & Huang, 2003) 指出苦瓜中含有 PPAR 活性成分所導致相關。脂肪細胞在 EAE 及 NS 處理下，能增加 UCP1 的基因表現，而單獨給予 S 處理組和空白處理組雖無顯著差異，但另外給予 forskolin 刺激後，UCP1 增加幅度 (13 倍) 卻高於 EAE + forskolin (7.7 倍) 以及 NS + forskolin 組 (3 倍)。山苦瓜乙酸乙酯暨其區分物刺激下，也能

增加脂肪細胞中 C/EBP $\beta$  的基因表現。而另外給予 forskolin 刺激，C/EBP $\beta$  的基因表現也有顯著增加的現象，其中 S 與 forskolin 共同刺激下，C/EBP $\beta$  增加幅度 (3 倍) 也是高於另外兩組 (EAE + forskolin, NS + forskolin)，和 UCP1 的結果類似。推測山苦瓜乙酸乙酯暨其區分物也可能透過 cAMP-PKA 訊息傳遞機制，與 forskolin 共同調節 UCP1 表現，而其中又以 S 效果最顯著。而山苦瓜乙酸乙酯暨其區分物處理脂肪細胞後再給予 forskolin 刺激，並無顯著增加 CS 活性，顯示單獨給予山苦瓜萃物即能有效調節粒線體的活性。

PGC1 $\alpha$ 、Tfam (mitochondrial transcription factor A) 與 NrF1 (nuclear respiratory factors) 均為粒線體生合成重要的轉錄調節因子 (Z. Wu et al., 1999)。PGC1 $\alpha$  除了能調節粒線體生合成，也透過活化許多轉錄因子 (如 PPAR $\alpha$ 、PPAR $\gamma$ ) 來參與細胞的氧化代謝途徑。根據本實驗結果，PGC1 $\alpha$  的基因表現在乙酸乙酯萃物暨其區分物刺激下有增加的現象，但 Tfam 和 NrF1 mRNA 表現在各種萃物處理下和對照組相比並無顯著差異。值得注意的是，在低濃度 EAE 處理下，脂肪細胞的粒線體 CS 活性有增加的現象，和 PGC1 $\alpha$  的基因表現結果一致，推論 EAE 能刺激 PGC1 $\alpha$  的基因表現，調節和粒線體呼吸相關的基因，而非調控 Tfam 和 NrF1 的表現來增加粒線體的生合成。

Cidea 會高度表現在小鼠的棕色脂肪組織當中，故被認為是 BAT 的指標之一。Cidea 會直接或間接受到 PPAR $\gamma$  的調控，當給予 PPAR $\gamma$  agonists 刺激，在小鼠初代脂肪細胞或分化成熟的 3T3-L1 脂肪細胞皆可觀察到 Cidea mRNA 表現增加 (Puri et al., 2008)。本實驗也觀察到，Cidea mRNA 表現在 EAE 及 NS 處理下也有增加的情形，顯示脂肪細胞可能受到苦瓜萃物中 PPAR $\gamma$  活性成分的影響，進而調控 Cidea 的表現，使白色脂肪細胞出現 BAT 的特性。

Prdm16 為轉錄調控因子，可調控棕色脂肪的分化。aP2-PRDM16 基因轉殖小鼠，可以調控 PGC1 $\alpha$ 、Cidea 及 UCP1 等基因表現增加，進而使 WAT 出現褐化的現象 (Seale et al., 2011)。而根據本實驗結果，Prdm16 基因表現並不受苦瓜萃物所

影響，推測 PGC1 $\alpha$ 、Cidea 及 UCP1 基因表現的增加，並非由 PRDM16 所調控。

Cox (cytochrome c oxidase) 於粒線體氧化機轉中扮演很重要的角色，其中 Cox7a1 及 Cox8b 均與粒線體電子傳遞鏈有關。本實驗結果顯示，Cox7a1 基因表現並不受苦瓜萃物的影響，而 Cox8b 的基因表現量雖有增加卻無顯著差異，此結果與粒線體 CS 活性增加似乎不相平行。

白色脂肪相關基因表現，Retn 是一種由脂肪細胞分泌的細胞激素，其合成與分泌會受到 PPAR $\gamma$  agonists 的抑制 (Patel et al., 2003)。Chemerin 是新發現的脂肪因子，也會受到 PPAR $\gamma$  的調控 (Muruganandan et al., 2011)。本研究結果顯示，山苦瓜萃物似乎不會影響白色脂肪細胞中此二種基因的表現。

C/EBP $\alpha$  在脂肪細胞分化過程中也扮演重要的角色，與 PPAR $\gamma$  共同調控脂質生成。有研究指出，PPAR $\gamma$  agonists troglitazone 抑制白色脂肪相關基因表現需要 C/EBP $\alpha$  的存在 (Vernochet et al., 2009)。而本實驗結果顯示，山苦瓜萃物雖可增加 C/EBP $\alpha$  基因表現，但效果並不顯著，這可能是白色脂肪相關基因表現受抑制情形不明顯的原因之一。

本實驗室先前的研究證實，山苦瓜乙酸乙酯萃取物為 PPAR $\alpha$  與 PPAR $\gamma$  的雙效活化劑 (Chao & Huang, 2003)。由於部份褐化相關基因，如 Cidea 及 PGC1 $\alpha$  等都會受 PPAR $\gamma$  所調控，而這些基因的表現也有增加，進一步證實山苦瓜乙酸乙酯萃物能活化 PPAR $\gamma$ ，並刺激褐化相關基因表現。在本實驗中，白色脂肪細胞中 PPAR $\alpha$  表現在山苦瓜乙酸乙酯萃物暨其區分物處理下皆有上升的情形，而 PPAR $\gamma$  的表現並無顯著差異。根據文獻，給予 PPAR $\gamma$  agonists 長時間處理 (2 天) 下，會使 3T3-L1 脂肪細胞 PPAR $\gamma$  的基因表現受抑制 (Vernochet et al., 2009)。而苦瓜乙酸乙酯萃物雖為 PPAR $\gamma$  活化劑，但可能含量/濃度不如正對照組高，所以結果不太相同。

### 三、山苦瓜中刺激 3T3-L1 脂肪細胞褐化基因表現的可能活性成分

由於山苦瓜乙酸乙酯萃取物有刺激脂肪細胞棕色脂肪相關基因表現的潛力，

進而探討其中可能的活性成分。先前實驗室經分離純化，鑑定出苦瓜中 *9c,11t,13t*-CLN 為可活化 PPARs 之化合物 (Chuang et al., 2006)。本實驗結果顯示，CLN 能刺激褐化相關基因表現，如 PGC1 $\alpha$ 、UCP1、Cidea 及 Cox8b 等，和山苦瓜乙酸乙酯萃取物處理結果相似。值得注意的是，給予 CLN 處理有增加 Prdm16 及 Cox7a1 基因表現的趨勢，推測山苦瓜萃物有其他物質也可能會調節這兩種基因表現，使 EAE、S 或 NS 無法顯著增加 Prdm16 及 Cox7a1 的基因表現。CLN 對於白色脂肪相關及 PPAR $\gamma$  基因並無顯著影響，但會增加 PPAR $\alpha$ 、C/EBP $\alpha$  與 C/EBP $\beta$  等轉錄因子 mRNA 的表現，顯示 CLN 可能除了直接活化 PPAR 來增加褐化相關基因表現，也能透過增加這些轉錄因子的基因表現來加強脂肪細胞褐化。

另外，山苦瓜不皂化物中分離出葉黃素 (lutein)、植醇 (phytol)、loliolide 等化合物亦具有活化 PPAR 之能力 (徐璿, 2010)。Phytol 的代謝產物 phytanic acid 能刺激棕色脂肪細胞的分化，並增加棕色脂肪細胞中 UCP1 及 CO II 的基因表現 (Schluter et al., 2002)。本實驗結果顯示 phytol 處理下，並無顯著增加脂肪細胞 PPAR $\alpha$  的基因表現，但 UCP1 與 Cidea 基因表現確實有增加的現象，而 Cox7a1 和 Cox8b 皆屬 Cytochrome c oxidase，同樣也有增加。由於 phytanic acid 也是 RXR agonist，能透過 RXR/PPAR $\gamma$  heterodimers 來增加脂肪細胞的脂質生成作用 (Tontonoz et al., 1997)。也有文獻指出 phytanic acid 能增加脂肪細胞 PPAR $\gamma$  及 PGC1 $\alpha$  mRNA 基因表現 (Garcia-Rojas et al., 2010)，和本實驗結果相符，推測 phytol 是透過調節 PPAR $\gamma$  轉錄因子來增加脂肪細胞褐化相關基因。

Lutein 能與 PPAR $\gamma$  作用，能在不影響棕色脂肪細胞增生下，提高 UCP1 蛋白質的表現 (Serra et al., 1999)，也能增加白色脂肪細胞 PPAR $\gamma$  mRNA 基因表現 (Garcia-Rojas et al., 2010)。在低濃度 (8.75  $\mu$ M) 處理下，能增加白色脂肪細胞褐化相關基因表現，如 PGC1 $\alpha$ 、UCP1、Cidea 等，顯示 lutein 如同 phytanic acid，能透過調節 PPAR $\alpha$  或 PPAR $\gamma$  轉錄因子來增加脂肪細胞褐化相關基因表現。

### 第五節 結論

本研究所建立的 3T3-L1 脂肪細胞培養條件可為快速篩選具刺激褐化的苦瓜萃物/區分物的試驗平台。山苦瓜乙酸乙酯萃物暨其區分物能有效增加此脂肪細胞的褐化基因表現，但無法抑制白色脂肪相關基因表現，其中乙酸乙酯萃物也能增加粒線體檸檬酸合成酶的活性。而自苦瓜中分離出的單一活性成分：CLN、phytol 和 lutein，都可能具有刺激脂肪細胞出現褐化現象的潛力。

## 第三章 綜合討論與總結論

### 第一節 綜合討論

人類和一般哺乳類相同，白色脂肪組織主要儲存脂肪，而棕色脂肪則燃燒脂肪具產熱功能。一般認為，人類的棕色脂肪組織在嬰兒時期最多，隨著年齡的增加則逐漸減少。但近年已研究指出，成年人體中仍可偵測到具有 UCP1 的棕色脂肪 (Cypess et al., 2009; Yeung et al., 2003)，而且這種經誘導產生在白色脂肪組織中的棕色脂肪細胞，和典型棕色脂肪一樣含有大量粒線體及高度表現 UCP1，具產熱及增加代謝速率的潛力，這種由白轉褐的現象，稱為褐化 (browning)。研究顯示，給予 PPAR $\gamma$  agonist 刺激，能增加小鼠白色脂肪組織 UCP1 基因表現 (Vernochet et al., 2009)。而初代脂肪細胞在 PPAR $\gamma$  agonist 處理下，也能增加棕色脂肪相關基因表現 (Ohno et al., 2012)，顯示 PPAR $\gamma$  agonist 具有使白色脂肪組織褐化的功能。

山苦瓜中具生物活性的化合物包含皂素 (saponins)、生物鹼 (alkaloids)、脂肪酸、三帖類 (triterpenes) 與蛋白質等。根據本實驗室先前研究，苦瓜乙酸乙酯萃物為 PPAR $\alpha$  與 PPAR $\gamma$  的雙效活化劑 (Chao & Huang, 2003)，而自苦瓜分離出的 CLN 也已證實具有活化 PPAR $\gamma$  的能力 (Chuang et al., 2006)。本實驗室也觀察到，山苦瓜凍乾粉末餵食小鼠的白色脂肪組織粒線體生合成及 UCP1 基因表現增加 (Lu et al., 2013)。綜合以上，首先推測山苦瓜能透過活化 PPAR $\gamma$  進而刺激白色脂肪組織的褐化現象。本實驗以 3T3-L1 脂肪細胞株作為試驗模式，探討山苦瓜萃物對於增加脂肪細胞褐化相關基因表現的潛力。

首先比較兩種分化方法以及三種處理時間對成熟脂肪細胞褐化及粒線體相關基因表現的影響。結果顯示，以分化方法一培養的成熟脂肪細胞，以 5  $\mu$ M troglitazone 處理 4 天，觀察到脂肪細胞褐化相關基因改變幅度比處理 2 天的改變幅度大，其中又以分化成熟前四天開始處理的結果重複性較高。後續實驗皆以「分化方法一」3T3-L1 培養脂肪細胞，並在「分化成熟前四日開始以樣品處理四天」。

綜合本實驗結果 (表 4-1)，以山苦瓜乙酸乙酯萃物 (EAE)、皂化物 (S)、不皂化物 (NS) 處理四天的脂肪細胞，PGC1 $\alpha$ 、UCP1、Cidea 等褐化相關基因表現增加。而 EAE 能增加粒線體中檸檬酸合成酶 (citrate synthase, CS) 的活性，推論 EAE 能刺激 PGC1 $\alpha$ 、Cox8b 的表現，調節和粒線體呼吸相關的基因，而非調控 Tfam、NrF1 等和粒線體生合成相關的基因。而山苦瓜中能活化 PPAR 的活性成分，

CLN、phytol 及 lutein 也能增加 UCP1 mRNA 表現，對於其他棕色脂肪相關基因也各有影響，證實了山苦瓜中的 PPAR 活性成分具刺激脂肪細胞表現褐色相關基因的能力，而山苦瓜水萃物則無此效果。

已知  $\beta$ -adrenergic 的刺激能增加棕色脂肪組織中 UCP1 的表現、cAMP 含量以及增加 PKA 的磷酸化。而根據文獻，苦瓜籽油 (BMSO) 能增加 PKA (cAMP-activated protein kinase) 磷酸化，顯示苦瓜中含有活化  $\beta$ -adrenergic 及 PKA 訊息傳遞機制的成份 (P. H. Chen et al., 2012)。另外也有研究指出，C/EBP $\beta$  能與 PRDM16 共同刺激 PGC1 $\alpha$  及 UCP1 的轉錄，作用機制可能牽涉 PKA 和 PPAR 的訊息傳遞系統。除此之外，C/EBP $\beta$  也能與 CREB 共同作用在 CRE 來增加 PGC1 $\alpha$ /UCP1 的轉錄活性 (H. Y. Chen et al., 2013)。

本實驗結果顯示，山苦瓜乙酸乙酯萃物暨其區分物與 PPAR 活性成分 CLN 皆能增加 C/EBP $\beta$  mRNA 表現，顯示山苦瓜乙酸乙酯暨其區分物及 CLN 可能透過 cAMP-PKA 訊息傳遞機制，來調節 UCP1 表現，但詳細機制仍需進一步的研究。

苦瓜已被證實其中所含之三萜類物質可活化 AMPK 而促進 GLUT4 轉位並增加葡萄糖汲取。根據本實驗室先前研究，山苦瓜水萃物暨其區分物可增加 3T3-L1 脂肪細胞對葡萄糖汲取的能力，驗證苦瓜中除 AMPK 活性外，也可刺激胰島素訊息傳遞路徑中 Akt 磷酸化 (周怡君, 2010)。給予血糖偏高之 C57BL/6J 小鼠不同山苦瓜萃物，結果顯示 WE (山苦瓜全果凍乾粉末之水萃物) 與 WE-EAE (不含乙酸乙酯可溶性成分之山苦瓜全果凍乾粉末水萃物) 具有極佳的降血糖效果，而 EAE (山苦瓜全果凍乾粉末之乙酸乙酯萃物) 並不具降血糖能力，顯示山苦瓜中改善血糖之活性成分多數屬於水可溶解，但卻不含降體脂的成份 (呂侃寬, 2012)。另外，5% 黑豆漿培養之納豆菌處理山苦瓜水萃物可透過酵素水解方式對山苦瓜內成分進行去醣基，使之具有降血糖之效果 (蔡豐隆, 2012)。綜合上述結果，推論山苦瓜水萃物 (WE) 及經納豆菌作用之水萃物 (WEn) 之所以不影響脂肪細胞褐色化及粒線體生合成相關基因表現，是由於山苦瓜乙酸乙酯萃物與水萃物內所含之活化成份不相同：前者能有效活化 PPAR $\gamma$ ，後者則具有降血糖活性成分，可能是 P fraction、saponin 等。而 WEn 可能是因為納豆菌處理之山苦瓜萃物成分組成受到改變，使效果和 WE 相比更為降低。



#### 第二節 總結論

本研究所建立之 3T3-L1 脂肪細胞株可供為快速篩選具刺激褐化的苦瓜萃物/區分物的試驗平台。山苦瓜乙酸乙酯萃物暨其區分物與自山苦瓜中分離出的單一活化成分能活化 PPAR $\gamma$ ，增加 3T3-L1 脂肪細胞的褐化基因表現以及促進粒線體檸檬酸合成酶的活性，顯示山苦瓜具有使白色脂肪細胞「褐化」的潛力。

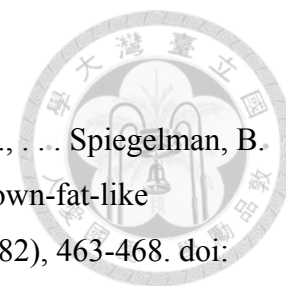
第三章 綜合討論與結論

表 3-1 山苦瓜萃物/區分物對於 3T3-L1 脂肪細胞基因表現影響之統整表

基因表現		乙酸乙酯萃物暨其區分物			水草物		PPAR 活性成分		
		EAE	S	NS	WE	WEn	CLN	Phytol	Lutein
棕色脂肪 相關	PGC1 $\alpha$	↑	↑	↑	NS	↓	↑	NS	NS
	UCP1	↑	↑	↑	(↓)	↓	(↑)	↑	↑
	Cidea	↑	↑	↑	NS	↓	↑	NS	(↑)
	Prdm16	NS	NS	NS	(↑)	NS	(↑)	NS	NS
粒線體 相關	Tfam	NS	NS	↓	NS	NS	↑	↑	NS
	NrF1	↑	NS	(↓)	NS	NS	NS	↓	NS
	Cox7a1	NS	NS	↓	NS	NS	↑	NS	↑
	Cox8b	↑	↑	↑	↓	↓	(↑)	NS	(↑)
白色脂肪 相關	Retn	NS	NS	(↑)	↓	↓	NS	NS	NS
	Chemerin	NS	NS	↓	NS	↓	NS	↑	NS
轉錄因子 相關	PPAR $\alpha$	↑	↑	↑	NS	↓	↑	(↑)	NS
	PPAR $\gamma$	NS	NS	NS	↓	↓	NS	NS	↑
	C/EBP $\alpha$	(↑)	(↑)	↑	NS	↓	↑	↑	NS
	C/EBP $\beta$	↑	↑	↑	NS	↑	↑	NS	NS

↑/↓：顯著增加 / 顯著降低 ( $p < 0.05$ )；(↑)/(↓)：增加趨勢 / 降低趨勢 ( $0.1 > p > 0.05$ )；NS：與 vehicle 組無顯著差異 ( $p > 0.05$ )

第四章 參考文獻



- Bostrom, P., Wu, J., Jedrychowski, M. P., Korde, A., Ye, L., Lo, J. C., . . . Spiegelman, B. M. (2012). A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*, *481*(7382), 463-468. doi: 10.1038/nature10777
- Boyer, P. D. (1997). The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem*, *66*, 717-749. doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.717
- Chan, L. L., Chen, Q., Go, A. G., Lam, E. K., & Li, E. T. (2005). Reduced adiposity in bitter melon (*Momordica charantia*)-fed rats is associated with increased lipid oxidative enzyme activities and uncoupling protein expression. *J Nutr*, *135*(11), 2517-2523.
- Chao, C. Y., & Huang, C. J. (2003). Bitter gourd (*Momordica charantia*) extract activates peroxisome proliferator-activated receptors and upregulates the expression of the acyl CoA oxidase gene in H4IIEC3 hepatoma cells. *J Biomed Sci*, *10*(6 Pt 2), 782-791. doi: 73966
- Chen, H. Y., Liu, Q., Salter, A. M., & Lomax, M. A. (2013). Synergism between cAMP and PPARgamma Signalling in the Initiation of UCP1 Gene Expression in HIB1B Brown Adipocytes. *PPAR Res*, *2013*, 476049. doi: 10.1155/2013/476049
- Chen, P. H., Chen, G. C., Yang, M. F., Hsieh, C. H., Chuang, S. H., Yang, H. L., . . . Chao, P. M. (2012). Bitter melon seed oil-attenuated body fat accumulation in diet-induced obese mice is associated with cAMP-dependent protein kinase activation and cell death in white adipose tissue. *J Nutr*, *142*(7), 1197-1204. doi: 10.3945/jn.112.159939
- Chinetti, G., Fruchart, J. C., & Staels, B. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res*, *49*(10), 497-505.
- Chuang, C. Y., Hsu, C., Chao, C. Y., Wein, Y. S., Kuo, Y. H., & Huang, C. J. (2006). Fractionation and identification of 9c, 11t, 13t-conjugated linolenic acid as an activator of PPARalpha in bitter gourd (*Momordica charantia* L.). *J Biomed Sci*, *13*(6), 763-772. doi: 10.1007/s11373-006-9109-3
- Colca, J. R., McDonald, W. G., Waldon, D. J., Leone, J. W., Lull, J. M., Bannow, C. A., . . . Mathews, W. R. (2004). Identification of a novel mitochondrial protein ("mitoNEET") cross-linked specifically by a thiazolidinedione photoprobe. *Am J*

- Physiol Endocrinol Metab*, 286(2), E252-260. doi: 10.1152/ajpendo.00424.2003
- Coulter, A. A., Bearden, C. M., Liu, X., Koza, R. A., & Kozak, L. P. (2003). Dietary fat interacts with QTLs controlling induction of Pgc-1 alpha and Ucp1 during conversion of white to brown fat. *Physiol Genomics*, 14(2), 139-147. doi: 10.1152/physiolgenomics.00057.2003
- Cousin, B., Cinti, S., Morroni, M., Raimbault, S., Ricquier, D., Penicaud, L., & Casteilla, L. (1992). Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J Cell Sci*, 103 ( Pt 4), 931-942.
- Crowley, V. E., Yeo, G. S., & O'Rahilly, S. (2002). Obesity therapy: altering the energy intake-and-expenditure balance sheet. *Nat Rev Drug Discov*, 1(4), 276-286. doi: 10.1038/nrd770
- Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., . . . Kahn, C. R. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med*, 360(15), 1509-1517. doi: 10.1056/NEJMoa0810780
- Domenechini, C., Di Giancamillo, A., & Corino, C. (2006). Conjugated linoleic acids (CLAs) and white adipose tissue: how both in vitro and in vivo studies tell the story of a relationship. *Histol Histopathol*, 21(6), 663-672.
- Farmer, S. R. (2009). Obesity: Be cool, lose weight. *Nature*, 458(7240), 839-840. doi: 10.1038/458839a
- Fisher, F. M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E. C., Mepani, R. J., Verdeguer, F., . . . Spiegelman, B. M. (2012). FGF21 regulates PGC-1alpha and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. *Genes Dev*, 26(3), 271-281. doi: 10.1101/gad.177857.111
- Garcia-Rojas, P., Antaramian, A., Gonzalez-Davalos, L., Villarroya, F., Shimada, A., Varela-Echavarria, A., & Mora, O. (2010). Induction of peroxisomal proliferator-activated receptor gamma and peroxisomal proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 by unsaturated fatty acids, retinoic acid, and carotenoids in preadipocytes obtained from bovine white adipose tissue<sup>1,2</sup>. *J Anim Sci*, 88(5), 1801-1808. doi: 10.2527/jas.2009-2579
- Gloerich, J., van Vlies, N., Jansen, G. A., Denis, S., Ruiter, J. P., van Werkhoven, M. A., . . . Ferdinandusse, S. (2005). A phytol-enriched diet induces changes in fatty acid metabolism in mice both via PPARalpha-dependent and -independent pathways. *J Lipid Res*, 46(4), 716-726. doi: 10.1194/jlr.M400337-JLR200

- Guerra, C., Koza, R. A., Yamashita, H., Walsh, K., & Kozak, L. P. (1998). Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J Clin Invest*, *102*(2), 412-420. doi: 10.1172/jci3155
- Handschin, C., & Spiegelman, B. M. (2008). The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. *Nature*, *454*(7203), 463-469. doi: 10.1038/nature07206
- Holloszy, J. O., Oscai, L. B., Don, I. J., & Mole, P. A. (1970). Mitochondrial citric acid cycle and related enzymes: adaptive response to exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, *40*(6), 1368-1373.
- Hood, D. A., Zak, R., & Pette, D. (1989). Chronic stimulation of rat skeletal muscle induces coordinate increases in mitochondrial and nuclear mRNAs of cytochrome-c-oxidase subunits. *Eur J Biochem*, *179*(2), 275-280.
- Hsu, C., Hsieh, C. L., Kuo, Y. H., & Huang, C. J. (2011). Isolation and identification of cucurbitane-type triterpenoids with partial agonist/antagonist potential for estrogen receptors from *Momordica charantia*. *J Agric Food Chem*, *59*(9), 4553-4561. doi: 10.1021/jf200418g
- Igarashi, M., & Miyazawa, T. (2000). Newly recognized cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on cultured human tumor cells. *Cancer Lett*, *148*(2), 173-179.
- Inohara, N., Koseki, T., Chen, S., Wu, X., & Nunez, G. (1998). CIDE, a novel family of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of the DNA fragmentation factor. *EMBO J*, *17*(9), 2526-2533. doi: 10.1093/emboj/17.9.2526
- Ishibashi, J., & Seale, P. (2010). Medicine. Beige can be slimming. *Science*, *328*(5982), 1113-1114. doi: 10.1126/science.1190816
- Karamanlidis, G., Karamitri, A., Docherty, K., Hazlerigg, D. G., & Lomax, M. A. (2007). C/EBPbeta reprograms white 3T3-L1 preadipocytes to a Brown adipocyte pattern of gene expression. *J Biol Chem*, *282*(34), 24660-24669. doi: 10.1074/jbc.M703101200
- Kiefer, F. W., Vernochet, C., O'Brien, P., Spoerl, S., Brown, J. D., Nallamshetty, S., . . . Plutzky, J. (2012). Retinaldehyde dehydrogenase 1 regulates a thermogenic program in white adipose tissue. *Nat Med*, *18*(6), 918-925. doi: 10.1038/nm.2757
- Liang, H., & Ward, W. F. (2006). PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ*, *30*(4), 145-151. doi: 10.1152/advan.00052.2006

- Lu, Kan-Ni, Hsu, Chin, Chang, Mei-Ling, & Huang, Ching-jang. (2013). Wild bitter gourd increased metabolic rate and up-regulated genes related to mitochondria biogenesis and UCP-1 in mice. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 668-678. doi: 10.1016/j.jff.2013.01.010
- Manchado, C., Yubero, P., Vinas, O., Iglesias, R., Villarroya, F., Mampel, T., & Giralt, M. (1994). CCAAT/enhancer-binding proteins alpha and beta in brown adipose tissue: evidence for a tissue-specific pattern of expression during development. *Biochem J*, 302 ( Pt 3), 695-700.
- Mirbolooki, M. R., Constantinescu, C. C., Pan, M. L., & Mukherjee, J. (2011). Quantitative assessment of brown adipose tissue metabolic activity and volume using 18F-FDG PET/CT and  $\beta$ 3-adrenergic receptor activation. *EJNMMI Res*, 1(1), 30. doi: 10.1186/2191-219x-1-30
- Muruganandan, S., Parlee, S. D., Rourke, J. L., Ernst, M. C., Goralski, K. B., & Sinal, C. J. (2011). Chemerin, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) target gene that promotes mesenchymal stem cell adipogenesis. *J Biol Chem*, 286(27), 23982-23995. doi: 10.1074/jbc.M111.220491
- Nawrocki, A. R., Rajala, M. W., Tomas, E., Pajvani, U. B., Saha, A. K., Trumbauer, M. E., . . . Scherer, P. E. (2006). Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem*, 281(5), 2654-2660. doi: 10.1074/jbc.M505311200
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., & Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293(2), E444-452. doi: 10.1152/ajpendo.00691.2006
- Nedergaard, J., & Cannon, B. (2010). The changed metabolic world with human brown adipose tissue: therapeutic visions. *Cell Metab*, 11(4), 268-272. doi: 10.1016/j.cmet.2010.03.007
- Nissen, S. E., & Wolski, K. (2007). Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med*, 356(24), 2457-2471. doi: 10.1056/NEJMoa072761
- Ohno, H., Shinoda, K., Spiegelman, B. M., & Kajimura, S. (2012). PPARgamma agonists induce a white-to-brown fat conversion through stabilization of PRDM16 protein. *Cell Metab*, 15(3), 395-404. doi: 10.1016/j.cmet.2012.01.019

- Orava, J., Nuutila, P., Lidell, M. E., Oikonen, V., Nojonen, T., Viljanen, T., . . . Virtanen, K. A. (2011). Different metabolic responses of human brown adipose tissue to activation by cold and insulin. *Cell Metab*, *14*(2), 272-279. doi: 10.1016/j.cmet.2011.06.012
- Patel, L., Buckels, A. C., Kinghorn, I. J., Murdock, P. R., Holbrook, J. D., Plumpton, C., . . . Smith, S. A. (2003). Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun*, *300*(2), 472-476.
- Petrovic, N., Walden, T. B., Shabalina, I. G., Timmons, J. A., Cannon, B., & Nedergaard, J. (2010). Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem*, *285*(10), 7153-7164. doi: 10.1074/jbc.M109.053942
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., & Spiegelman, B. M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, *92*(6), 829-839.
- Puri, V., Ranjit, S., Konda, S., Nicoloso, S. M., Straubhaar, J., Chawla, A., . . . Czech, M. P. (2008). Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(22), 7833-7838. doi: 10.1073/pnas.0802063105
- Riserus, U., Basu, S., Jovinge, S., Fredrikson, G. N., Arnlov, J., & Vessby, B. (2002). Supplementation with conjugated linoleic acid causes isomer-dependent oxidative stress and elevated C-reactive protein: a potential link to fatty acid-induced insulin resistance. *Circulation*, *106*(15), 1925-1929.
- Saito, S., Saito, C. T., & Shingai, R. (2008). Adaptive evolution of the uncoupling protein 1 gene contributed to the acquisition of novel nonshivering thermogenesis in ancestral eutherian mammals. *Gene*, *408*(1-2), 37-44. doi: 10.1016/j.gene.2007.10.018
- Schiff, M., Benit, P., Jacobs, H. T., Vockley, J., & Rustin, P. (2012). Therapies in inborn errors of oxidative metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, *23*(9), 488-495. doi: 10.1016/j.tem.2012.04.006
- Schluter, A., Barbera, M. J., Iglesias, R., Giralt, M., & Villarroya, F. (2002). Phytanic

- acid, a novel activator of uncoupling protein-1 gene transcription and brown adipocyte differentiation. *Biochem J*, 362(Pt 1), 61-69.
- Schulz, T. J., Huang, T. L., Tran, T. T., Zhang, H., Townsend, K. L., Shadrach, J. L., . . . Tseng, Y. H. (2011). Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(1), 143-148. doi: 10.1073/pnas.1010929108
- Seale, P., Bjork, B., Yang, W., Kajimura, S., Chin, S., Kuang, S., . . . Spiegelman, B. M. (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature*, 454(7207), 961-967. doi: 10.1038/nature07182
- Seale, P., Conroe, H. M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A., Ishibashi, J., . . . Spiegelman, B. M. (2011). Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest*, 121(1), 96-105. doi: 10.1172/jci44271
- Sell, H., Berger, J. P., Samson, P., Castriota, G., Lalonde, J., Deshaies, Y., & Richard, D. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism increases the capacity for sympathetically mediated thermogenesis in lean and ob/ob mice. *Endocrinology*, 145(8), 3925-3934. doi: 10.1210/en.2004-0321
- Serra, F., Bonet, M. L., Puigserver, P., Oliver, J., & Palou, A. (1999). Stimulation of uncoupling protein 1 expression in brown adipocytes by naturally occurring carotenoids. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 23(6), 650-655.
- Spiegelman, B. M., Puigserver, P., & Wu, Z. (2000). Regulation of adipogenesis and energy balance by PPARgamma and PGC-1. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24 Suppl 4, S8-10.
- Tobin, J. F., & Freedman, L. P. (2006). Nuclear receptors as drug targets in metabolic diseases: new approaches to therapy. *Trends Endocrinol Metab*, 17(7), 284-290. doi: 10.1016/j.tem.2006.07.004
- Tontonoz, P., Singer, S., Forman, B. M., Sarraf, P., Fletcher, J. A., Fletcher, C. D., . . . Spiegelman, B. M. (1997). Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(1), 237-241.
- Vernochet, C., Peres, S. B., Davis, K. E., McDonald, M. E., Qiang, L., Wang, H., . . . Farmer, S. R. (2009). C/EBPalpha and the corepressors CtBP1 and CtBP2 regulate repression of select visceral white adipose genes during induction of the



- brown phenotype in white adipocytes by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Mol Cell Biol*, 29(17), 4714-4728. doi: 10.1128/MCB.01899-08
- Wenz, T., Rossi, S. G., Rotundo, R. L., Spiegelman, B. M., & Moraes, C. T. (2009). Increased muscle PGC-1alpha expression protects from sarcopenia and metabolic disease during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(48), 20405-20410. doi: 10.1073/pnas.0911570106
- Wiegand, G., & Remington, S. J. (1986). Citrate synthase: structure, control, and mechanism. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, 15, 97-117. doi: 10.1146/annurev.bb.15.060186.000525
- Wilson-Fritch, L., Burkart, A., Bell, G., Mendelson, K., Leszyk, J., Nicoloso, S., . . . Corvera, S. (2003). Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol Cell Biol*, 23(3), 1085-1094.
- Wilson-Fritch, L., Nicoloso, S., Chouinard, M., Lazar, M. A., Chui, P. C., Leszyk, J., . . . Corvera, S. (2004). Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest*, 114(9), 1281-1289. doi: 10.1172/jci21752
- Wu, J., Bostrom, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A. H., . . . Spiegelman, B. M. (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, 150(2), 366-376. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.016
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., . . . Spiegelman, B. M. (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, 98(1), 115-124. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80611-x
- Yeung, H. W., Grewal, R. K., Gonen, M., Schoder, H., & Larson, S. M. (2003). Patterns of (18)F-FDG uptake in adipose tissue and muscle: a potential source of false-positives for PET. *J Nucl Med*, 44(11), 1789-1796.
- Young, P., Arch, J. R., & Ashwell, M. (1984). Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Lett*, 167(1), 10-14.
- Zhou, Z., Yon Toh, S., Chen, Z., Guo, K., Ng, C. P., Ponniah, S., . . . Li, P. (2003). Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nat Genet*, 35(1), 49-56. doi: 10.1038/ng1225

#### 第四章 參考文獻

---

行政院衛生署國民健康局 (2007) 修正我國代謝症候群之判定標準

周怡君 (2010) 以脂肪與肌肉細胞模式評估山苦瓜水萃物劑其區分物對細胞汲取  
葡萄糖之影響與其機制探討, 台灣大學.

呂侃霓 (2012) 山苦瓜水萃物及其區分物改善 C57BL/6J 小鼠高血糖之有效成份及  
機制探討, 台灣大學.

蔡豐隆 (2012) 山苦瓜萃取物經納豆菌 NTU-18 去醣基化作用之效果探討, 台灣大  
學.

