

國立臺灣大學生物資源暨農學院食品科技研究所

碩士論文

Graduate Institute of Food Science and Technology

College of Bioresources and Agriculture

National Taiwan University

Master thesis

結合螢光與基因工程以建立可偵測 GLUT4 轉運及
葡萄糖攝取能力之細胞平台

A combination of fluorescence detection and genetic
engineering the establishment of a cell platform to
evaluate GLUT4 translocation and glucose uptake

王栩兒

Hoi-I Wong


指導教授：謝淑貞 博士

Advisor: Shu-Chen Hsieh, Ph. D

中華民國 106 年 7 月


July, 2017

謝誌




兩年的時間轉眼間過去，首先要感謝我的指導教授—謝淑貞老師給我的教導和訓練。記得老師說過希望大家能喜歡自己所做的題目，做自己喜歡的事情，謝謝老師給了我一個具有挑戰性但有趣的題目，和我一起腦力激盪，當我提出新的想法時總是鼓勵我嘗試，雖然在過程中遇到很多挫折，但很感謝您一直相信我的能力和對我的肯定。另外還有三位在百忙之中抽空前來的口試委員，謝謝你們指出不足的地方和給了我很多建議，讓我的論文變得更完整。另外想謝謝醫學院第一共研顯微影像實驗室的徐華蔓技師，每次看到你都是坐在儀器前面，忙著幫大家拍下實驗結果，感謝你跟我分享很多影像分析要注意的小細節，還有幫我拍攝很多漂亮的照片。

這兩年幾乎每天都會來的 R205 實驗室裡，也有很多我想說謝謝的人。實驗室的羿涵學姐，謝謝你在我甚麼都不會的時候教了我很多實驗技術，幫忙我解決問題，很喜歡晚上在實驗室跟你一起聊天的時間。實驗室的學弟妹們，君倩、育璋、佳諭、曉雯，謝謝你們幫忙分擔實驗室的事情，還有在送舊時做給我們的小卡片，升碩二了要加油哦。當然少不了 R04 的同學們，很開心在食科所這兩年之間有你們的陪伴，心思細膩又可靠的思涵、各種反轉魅力的婉君、充滿興致又積極的綺雯、愛撒嬌和帶給大家歡樂的舒暢、還有認真又隨和的尹婷。從一開始看上去個性完全不同的我們，慢慢變得愈來愈相似，最後能成為一起喝酒聊天、出國旅遊和互相照顧的人，雖然我要回家工作了，大家也要在不同的城市發展，希望下一次再跟大家聚在一起不會是很久很久以後的事。另外就是要謝謝我的朋友們、大學同學和 230 室友，謝謝你們在我每次放假或是回家的時候還是會找我一起吃喝玩樂，偶爾跟你們吃飯聊天，都是能讓我暫時放下壓力和好好休息的時間。



最後要感謝我最愛的家人，雖然這段路比我想像中的難走，謝謝你們一直無條件支持我，讓我去做自己想做的事情，在我覺得疲憊或失去信心的時候，你們也總是能好好的鼓勵我繼續往前走。在這段時間內所學到的比想像中的要多，除了學術上的知識，更多的是面對不同問題時的處理方法和時間規劃的重要性，讓我在思考問題時變得更有邏輯和更全面，安排事情上也變得有效率，相信無論以後是否繼續在這個領域發展，這些都能幫助我解決以後將要面對的難題。

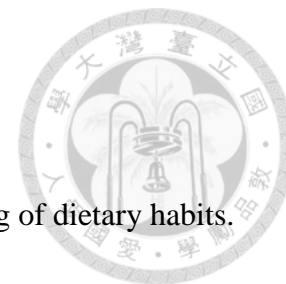
摘要



隨著現代飲食習慣的改變，糖尿病為全球性之健康問題，並有年輕化的趨勢。血液中的葡萄糖主要由骨骼肌細胞與脂肪細胞攝取和分解，葡萄糖轉運蛋白 4 (glucose transporter 4, GLUT4) 對細胞在血糖升高時所誘導之攝取作用中扮演重要角色，其功能受胰島素所調控，當體內出現胰島素阻抗時，降低細胞對胰島素刺激的靈敏度，使細胞無法有效攝入葡萄糖，造成高血糖的現象。然而目前檢測葡萄糖攝取的方法除了價格昂貴、耗時、步驟繁瑣外，在檢測原理上也容易受細胞內其它代謝途徑影響，或是不能與生理環境比較。基於上述缺點，我們希望能提供一個快速、直接的檢測平台，以完善整個葡萄糖攝取的分析流程。因此本研究以 GLUT4 作為標的，轉染可表現其重組蛋白和綠色螢光蛋白—eGFP 的質體到 CHO-K1 細胞，隨後利用抗生素篩選出能穩定及大量表現此重組蛋白之細胞株，透過分析螢光重組蛋白的螢光強度與分佈，確認植株的表現量，以及在胰島素處理下偵測到螢光的轉位，顯示此 GLUT4 重組蛋白對胰島素具有反應。後續利用全內反射螢光顯微鏡偵測細胞膜上的螢光數量，並與傳統檢測法進行確效與比較，顯示此檢測方法的結果與葡萄糖的攝取具有正相關性，代表此細胞平台可應用於日後篩選具促進葡萄糖攝取潛力的樣品。

關鍵字：糖尿病、葡萄糖攝取、重組蛋白、細胞平台、全內反射螢光顯微鏡

Abstract



Diabetes becomes a global health issue as a result of the shifting of dietary habits.

Previously, the population of patients was seen mainly in the middle-aged and elderly, but it is getting more frequently among young people. Glucose serves as energy source for most cells. Blood sugar rises after a meal and is mainly absorbed by skeletal muscles and adipose tissues. Glucose transporter 4 (GLUT4), the downstream effector of insulin, takes an important role in glucose uptake. Insulin resistance would cause defective insulin response in target cells, leading to hyperglycemia. However, approaches in measuring glucose uptake are considered to be time consuming, expensive and not easy to operate. Also, the results may be affected by other metabolic pathways in cells, and is incompatible with the actual physiological environments. According to these disadvantages, we attempted to establish a more rapid and intuitive method to measure glucose uptake through the construction of a cell platform. Based on this reason, we transfected a recombinant plasmid into CHO-K1 to produce GLUT4-eGFP recombinant protein. Antibiotics selection was carried out to exclude the non-transfected cells. The fluorescence intensity was analyzed to estimate the stability and expression efficiency of this fusion protein. In addition, the GLUT4-eGFP recombinant protein is responsive upon insulin stimulation, and the fluorescence was detected by Total internal reflection fluorescent microscope (TIRFM) afterwards. The result shows that our detection

method is correlated to glucose uptake and is more efficient than the traditional methods, indicating that this cell platform can be applied to screen potential compounds with the ability to increase cellular glucose uptake.



Keywords: Diabetes, glucose uptake, recombinant protein, cell platform, TIRFM


目錄



第一章 前言	1
第二章 文獻回顧	3
第一節 代謝症候群	3
第二節 糖尿病	4
一、 糖尿病定義	4
二、 分類	4
三、 診斷指標	5
四、 全球盛行率	5
五、 治療方式	5
第三節 胰島素	7
一、 胰島素的分泌	7
二、 胰島素的作用	7
三、 胰島素阻抗	7
四、 胰島細胞凋亡	8
第四節 葡萄糖轉運蛋白	10
一、 功能與簡介	10
二、 結構與分類	10
三、 葡萄糖攝取之調控機制	14
四、 細胞內之動態平衡	15
第五節 葡萄糖攝取	16
一、 葡萄糖於細胞中的代謝作用	16
二、 目前偵測葡萄糖攝取的方法	16
第六節 全內反射螢光顯微鏡	18



第三章 研究目的與實驗架構	19
第一節 研究目的	19
第二節 實驗架構	20
第四章 實驗材料與方法	21
第一節 實驗材料	21
第二節 實驗方法	25
一、質體製備與確認	25
二、細胞平台建立	28
三、細胞數存活率試驗	29
四、BSA 蛋白質定量	30
五、即時定量聚合酶連鎖反應	30
六、2-DG 葡萄糖攝取試驗	32
七、2-NBDG 葡萄糖攝取試驗	33
八、細胞免疫螢光染色法	34
九、流式細胞儀樣品製備	35
十、統計方法	35
第五章 結果與討論	36
一、CHO-K1 平台建立	36
1. pcDNA3-mycG4eGFP 質體的大小與序列確認	36
2. pcDNA3-mycG4eGFP 質體表現之確認	39
3. CHO-K1 對胰島素靈敏度的評估	42
4. G418 對 CHO-K1 之毒殺性測試	46
5. pcDNA3-mycG4eGFP 於 CHO-K1 中表現效率的比較	48
二、CHO-K1 平台確效	52
1. GLUT4 重組蛋白的轉運作用	52



2.	以 2-DG 探討 GLUT4 轉位與葡萄糖攝取的相關性	57
3.	偵測具促進 GLUT4 轉運之潛力物質的應用	59
4.	CHO-K1 平台於不同代數下的穩定度	62
5.	反覆冷凍解凍對 CHO-K1 平台穩定度的影響	64
第六章 結論		66
第七章 參考文獻		67
第八章 附圖		74

圖目錄



圖一、實驗架構圖	20
圖二、利用 DNA 電泳確認 pcDNA3-mycG4eGFP 質體大小	37
圖三、pcDNA3-mycG4eGFP 之定序結果	38
圖四、L6、3T3-L1 與 CHO-K1 之轉染效率	40
圖五、CHO-K1 GLUT1 與 GLUT4 之 mRNA 表現量	41
圖六、不同處理條件對 CHO-K1 攝取葡萄糖的影響	44
圖七、以不同濃度胰島素處理的 CHO-K1 橫切面影像	45
圖八、不同濃度之 G418 處理不同天數後對 CHO-K1 的毒殺效應	47
圖九、CHO-K1 clone 與 CHO-K1 的 GLUT4 mRNA 相對表現量	49
圖十、CHO-K1 clone 於 525 nm 下的螢光強度	50
圖十一、CHO-K1 clone 的 pcDNA3-mycG4eGFP 螢光表現量	51
圖十二、CHO-K1 細胞與 clone 5 於明視野下與不同波長雷射光激發後之影像 ..	54
圖十三、以不同濃度胰島素處理 CHO-K1 clone 5 後之細胞影像	55
圖十四、螢光分佈面積比例	56
圖十五、不同處理下對 clone 5 攝取的葡萄糖影響	58
圖十六、RSV 與 COE 對細胞存活率的影響	60
圖十七、以 RSV 與 COE 處理 CHO-K1 clone 5 後之細胞影像	61
圖十八、細胞代數對 pcDNA3-mycG4eGFP 螢光表現量的影響	63
圖十九、反覆冷凍解凍對 pcDNA3-mycG4eGFP 螢光表現量的影響	65

表目錄



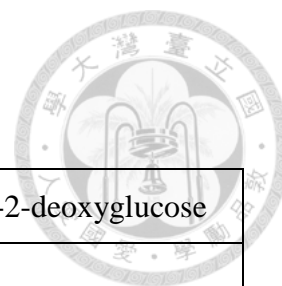
表一、GLUTs 的特性與及其主要分佈範圍	13
表二、 <i>E. coli</i> (DH5 α) 培養基配方	25
表三、質體與限制酶反應配方	27
表四、RT buffer premix 配方	31
表五、RT 作用條件	31
表六、RT-qPCR SYBR premix 配方	32
表七、Primer 序列	32

附圖目錄



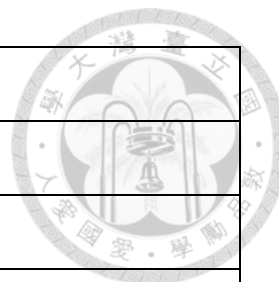
附圖一、胰島素阻抗的誘發途徑(Tateya et al., 2013)	74
附圖二、脂肪細胞發炎反應(Donath and Shoelson, 2011)	74
附圖三、GLUT 的穿膜結構特徵(Augustin, 2010)	75
附圖四、胰島素的 PI3K/Akt 訊號傳遞路徑(Hajiaghaalipour et al., 2015)	75
附圖五、胰島素的 CAP/Cb1/TC10 訊號傳遞路徑(Hajiaghaalipour et al., 2015)	76
附圖六、葡萄糖與 2-DG 之化學結構(Yamamoto and Ashida, 2012)	76
附圖七、2-NBDG 與 6-NBDG 之化學結構(Yamamoto and Ashida, 2012)	77
附圖八、pcDNA3-mycG4eGFP 質體。	77
附圖九、CHO-K1 以不同濃度胰島素處理後的橫切面影像。	80
附圖十、CHO-K1 clone 的 pcDNA3-mycG4eGFP 螢光表現量。	81
附圖十一、細胞代數於 pcDNA3-mycG4eGFP 螢光表現量的影響	82

縮寫表



2-NBDG	2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxyglucose
2-DG	2-deoxyglucose
2-DG6P	2-deoxyglucose-D-glucose-6-phosphate
Akt	
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine Serum Albumin
COE	Chinese Olive Extract
CVD	Cardiovascular Diseases
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
eGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FBS	Fetal Bovine Serum
GLUT1	Glucose transporter 1
GLUT4	Glucose transporter 4
GLUTs	Glucose transporters
GSVs	GLUT4 storage vesicles
IR	Insulin receptor
IRS	Insulin receptor substrate
IDF	International Diabetes Federation
KRPH	Krebs-Ringer-Phosphate-HEPES
LB	Luria-Bertani
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphate-buffered saline

PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
RSV	Resveratrol
RT	Reverse transcription
RT-qPCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction
SGLTs	Sodium-driven sugar cotransporters
TAE	Tris-acetate-EDTA
TNF	Tumor necrosis factor
T1D	Type 1 diabetes
T2D	Type 2 diabetes



第一章 前言



攝取過多的熱量和缺乏運動等不良生活習慣除了容易引起肥胖或過重，除了同時也是導致糖尿病盛行的主要原因。世界衛生組織(World Health Organization, WHO) 在 2016 年發佈的一份報告中指出，在 2014 年全球的糖尿病患者為 4.2 億人，當中第二型糖尿病患者約為 3.87 億人，為 1980 年時的四倍，同時具有年輕化的趨勢。而糖尿病也是造成失明、下體截肢的主因，造成患者行動不便，間接降低其生活品質。然而長期使用糖尿病藥物會使患者會出現低血糖、乳酸血症、影響肝臟與神經傳導的功能等副作用。

以台灣為例，糖尿病近年來一直位居十大死因之一，截止 2016 年，全國約有 200 多萬名糖尿病患者。此外，糖尿病還會增加各種併發症的風險，如中風、失明、心臟疾病、腎臟疾病、下體截肢等，增加治療費用與降低患者的生活品質。目前糖尿病仍然是一種無法痊癒的疾病，因此一但罹患糖尿病，大部份患者需要一直依賴藥物來維持血糖穩定。然而長期糖尿病藥物可能會伴隨著副作用的產生，例如低血糖、乳酸血症、影響肝臟與神經傳導的功能等。

糖尿病為體內胰島素靈敏度下降，或是失去分泌胰島素的能力所導致的疾病，探討其致病機制與調控路徑能夠協助後續的治療。然而如何降低藥物的副作用也愈來愈受到大家的重視，近年來傳統中草藥與存在於植物中的多酚類物質皆成為調控血糖之研究對象，希望能降低患者對糖尿病藥物之依賴性及其副作用。本實驗室發現中國橄欖甲醇萃取物的乙酸乙酯區分層具有促進肌肉及脂肪細胞中葡萄糖攝取的潛力，以及在大鼠動物模式下證實中國橄欖乙醇萃取物可提升骨骼肌攝取葡萄糖的能力，並且透過分子機制探討其可能的調控模式。

一般來說，若要評估一個物質是否具有促進葡萄糖攝取的潛力時，首先會探討該物質是否能增加葡萄糖的攝取後，再利用分子機制證實。然而在目前常用的檢測方法中，容易使檢測結果受其它因素的影響，如細胞氧化壓力或其它的代謝路徑，或是不能與實際生理狀況比較。同時在研究分子機制的調控上也

需要花費大量的金錢與時間。因此本研究將以綠色螢光蛋白 eGFP 標定的 GLUT4 重組蛋白作為檢測對象，結合光學檢測的特異性及靈敏度，建立一個能夠快速獲取 GLUT4 轉位資訊的細胞平台，以應用於篩選具有促進葡萄糖攝取潛力的物質。



第二章 文獻回顧



第一節 代謝症候群

代謝症候群是指遺傳因素與環境之間相互作用所導致的慢性輕度發炎，其衡量標準為透過檢測體重、腰圍、血糖、血壓、三酸甘油酯(Triglyceride, TG)等生理數值，以判斷受試者是否屬於代謝症候群，上述的這些因子都與糖尿病、動脈粥狀硬化性心血管疾病和增加死亡的風險有關(Kaur, 2014)。

目前常用的定義標準分別包括世界衛生組織(World Health Organization, WHO)、歐洲胰島素抵抗研究小組(European Group for the Study of Insulin Resistance, EGIR)、國際糖尿病聯盟(International Diabetes Federation, IDF) 等。而這些生理數值與疾病之間的關聯性在不同國籍的人也會不一樣，其中 IDF 配合了不同國籍和種族來制定標準(Kaur, 2014)。而台灣則是根據 IDF 的定義作為判定標準，選出的五個危險因子分別為：腰圍（男性 ≥ 90 cm；女性 ≥ 80 cm）、血壓（收縮壓 ≥ 130 mmHg、舒張壓 ≥ 85 mmHg）、高密度脂蛋白膽固醇（男性 ≤ 40 mg/dl；女性 ≤ 50 mg/dl）、空腹血糖值（ ≥ 100 mg/dl）以及 TG（ ≥ 150 mg/dl）等，有三項或以上超標，即判定為代謝症候群，若有任一項者則為代謝症候群高危險群(衛生福利部國民健康署, 2016)。



第二節 糖尿病

一、糖尿病定義

糖尿病為胰臟的 β 細胞(Pancreatic β -cell)失去分泌胰島素(Insulin)或胰島素不能有效的引起後續訊息傳導路徑所致，是一種代謝上的慢性疾病，患者的典型症狀有小便頻繁、易渴、易餓、容易疲倦、視力模糊、傷口癒合緩慢、手腳麻痺等(American Diabetes, 2015)。

二、分類

目前糖尿病主要可分為第一型糖尿病(Type 1 diabetes, T1D)、第二型糖尿病(Type 2 diabetes, T2D)、妊娠糖尿病(Gestational diabetes) 以及其它類型糖尿病。而當中第二型糖尿病患者的比例為糖尿病總人口之 90–95%，以下為各種類型糖尿病的簡介 (American Diabetes, 2015; Fang et al., 2016)。

1. 第一型糖尿病

身體失去分泌胰島素的功能，好發於兒童和青少年。

2. 第二型糖尿病

體內細胞對胰島素的刺激產生耐受性而造成高血糖的現象，為最常見的糖尿病類型。

3. 妊娠糖尿病

婦女於懷孕期間血糖偏高的現象，但一般未達至糖尿病的臨界值。

4. 其它類型糖尿病

單基因糖尿病綜合症(Monogenic diabetes syndromes)，具明顯的遺傳性，如新生兒糖尿病或 MODY (Maturity onset diabetes of the young)。外分泌胰腺疾病，如囊性纖維化(Cystic fibrosis)。藥物或化學性誘導，如接受 HIV /AIDS 治療或器官移植。

三、診斷指標

糖尿病可由糖化血紅素(HbA1C)、禁食血糖(Fasting plasma glucose, FPG)、口服葡萄糖耐受試驗(Oral glucose tolerance test, OGTT) 以及隨機血糖濃度的檢測結果界定是否患上糖尿病，若符合以下其中一項且伴隨糖尿病典型症狀，即診斷為糖尿病(American Diabetes, 2015)。

1. 糖化血色素(HbA1C) \geq 6.5%
2. 禁食血糖(FPG) \geq 126 mg/dL (7.0 mmol/L)
3. OGTT 測試 2 小時後血糖濃度(2-h PG) \geq 200 mg/dL (11.1 mmol/L)
4. 隨機血糖 \geq 200 mg/dL (11.1 mmol/L)

四、全球盛行率

過去數十年間罹患糖尿病的人數急速地上升，第二型糖尿病是一種慢性代謝疾病(Chronic metabolic disorder)，其成因與患者的基因遺傳、生活環境以及生活型態有關。另外由於老齡人口的增加，預計在未來十年某些國家受其影響的人數將是現在的兩倍，這無疑會增加醫療保健的負擔(Olokoba et al., 2012)。根據流行病學調查表示，目前全球有 3.7 億的糖尿病患者，預計在 2030 年糖尿病患者將達到 5.52 億人(Fang et al., 2016)。同時第二型糖尿病會增加患者罹患其它併發症的風險，例如心血管疾病(Cardiovascular diseases, CVD)、高血壓和中風等(Adeniyi et al., 2012; Oggioni et al., 2014)，由於第二型糖尿病的初期症狀並不明顯，延誤了確診和治療時間，增加併發症的發病率和死亡率，導致患者的早逝(Premature death) (Olokoba et al., 2012)。

五、治療方式

降血糖的治療方法包括改變生活方式和服用降血糖藥物(Olokoba et al., 2012)，目前治療糖尿病的藥物可以分為：胰島素增敏劑(Insulin sensitizers)、促胰島素分泌劑(Insulin secretagogues) 和 α -葡萄糖苷酶抑制劑(α -glucosidase

inhibitors)。但大部份降血糖藥物可能會產生副作用，包括低血糖、特異性肝細胞損傷(Idiosyncratic liver cell injury)、乳酸血症(Lactic acidosis)、永久性神經功能受損(Permanent neurological deficit)、消化不良、頭痛和眩暈等。

以 Metformin(Met) 為例，它是目前治療肥胖的一線藥物(First line medication)，屬於 Biguanides 的一種，可使透過增加胰島素敏感度、減少腸道吸收葡萄糖，同時藉由活化肝臟中 AMP-activated protein kinase (AMPK)，降低肝臟中醣質新生(Gluconeogenesis) 的作用。但由於 Met 可能導致乳酸血症，且 Met 主要是透過腎臟過濾後排出(Lipska et al., 2011)，因此高齡和腎功能不全(Renal impairment) 人士在使用 Met 上則需特別注意(Lipska et al., 2011; Olokoba et al., 2012)。

然而目前尚未發現可完全治癒糖尿病的方法(Olokoba et al., 2012)，隨著近年來對 T2D 的病理生理學研究，已引入一些新的治療方式，例如類胰高血糖素胜肽 1 (Glucagon-like peptide 1 analogues)、抑制鈉—葡萄糖協同轉運蛋白 2 (Sodium-glucose cotransporter 2)、葡萄糖激酶活化劑(Glucokinase activators) 等(Olokoba et al., 2012)，分別可降低肝臟中醣質新生(Armstrong et al., 2016)、降低葡萄糖於腸道的吸收與腎臟中的重吸收作用(Kanwal et al., 2012)，以及活化醣解作用中的酵素。



第三節 胰島素

一、胰島素的分泌

在進食後因體內血糖上升，血液中的葡萄糖進入胰臟β細胞後，增加 ATP 的產生，使 ADP/ATP 改變，導致細胞膜上的鉀離子通道(Potassium channels)關閉，鈣離子通道(Voltage-sensitive Ca^{2+} channels) 打開，進入細胞的鈣離子增加，促使胰島素的分泌量上升(Hajiaghaalipour et al., 2015; Rutter, 2004; Schnell et al., 2007)。

二、胰島素的作用

胰島素由胰臟的β細胞分泌，並可隨著血液到達肌肉組織、脂肪組織和肝臟等器官，通過促進肌肉與脂肪細胞中 GLUT4 的轉運(translocation)，增加葡萄糖攝取，並降低肝臟中醣質新生的作用，使體內血糖回復正常水平(Leto and Saltiel, 2012)。

三、胰島素阻抗

當體內出現胰島素阻抗(Insulin resistance)時，代表體內的胰島素無法有效刺激肌肉和脂肪組織吸收葡萄糖，同時其抑制肝臟中醣質新生的能力也會下降。胰島素阻抗一般認為與肥胖有關，通常由飲食過量或缺少運動所造成(Tateya et al., 2013)。以美國為例，大約八成以上的 T2D 患者的體重都屬於過重。因此，肥胖所誘發的胰島素阻抗是導致代謝症候群與 T2D 的主要原因(Johnson and Olefsky, 2013)。雖然目前還不能完全確定肥胖是如何導致胰島素阻抗(Boden et al., 2015)，近年來已有多篇文獻指出肥胖與胰島素阻抗的關連性，是由於脂肪組織的發炎反應(Johnson and Olefsky, 2013; Kaur, 2014; Samuel and Shulman, 2016)與脂質代謝異常(Johnson and Olefsky, 2013; Sears and Perry, 2015; Tangvarasittichai, 2015)所致。

肥大的脂肪組織會分泌 Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) 到循環系統中，誘發免疫反應，其路徑如附圖一所示。活化的巨噬細胞會釋放出促炎性因子(Pro-inflammatory cytokines)，如 Tumor necrosis factor (TNF)、Interleukin-6 (IL-6) 等。c-Jun N-terminal kinase (JNK) 和 I κ B kinase (IKK) 受 TNF- α 活化後，會藉由磷酸化 IRS 上的 serine 來抑制 IR 的訊息傳遞(Tateya et al., 2013)。

在 Donath 等人的文獻中提到，體內營養過剩時，葡萄糖和游離脂肪酸會對胰臟、脂肪組織、肝臟和肌肉組織等造成壓力，導致發炎因子如 Interleukin-1 β (IL-1 β) 與 TNF 的釋放。另外，由 β 細胞產生的 IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) 也會減少，詳見附圖二。IL-1 β 與 TNF 將誘導免疫細胞聚集並促進胰島素與胰島素敏感性的組織發炎(Donath and Shoelson, 2011)。

發炎的白色脂肪組織(White adipose tissue, WAT) 中，巨噬細胞浸潤(Infiltration) 到 WAT 並導致脂肪分解(Lipolysis) 的增加(Xu et al., 2003)，進而使肝臟中 TG 的合成和脂肪酸(Fatty acid, FA) 的酯化作用(Esterification) 上升。與此同時，巨噬細胞誘導的脂肪分解會促進肝臟中的醣質新生，而肝臟內 FA 的增加將導致乙酰輔酶 A (Acetyl-CoA) 的含量增加，Acetyl-CoA 可以活化丙酮酸羧化酶(Pyruvate carboxylase)，促進甘油轉化成葡萄糖，進而使血糖升高(Samuel and Shulman, 2016)。此外，肌肉量減少，如肌纖維比例改變，氧化壓力上升等(Boden et al., 2015; Tangvarasittichai, 2015)也可能是導致胰島素阻抗的原因。

綜合以上所述，胰島素阻抗的發生是由於身體因長期處於慢性發炎的狀態下，使胰島素的靈敏度降低、促進脂肪分解、增加肝臟中醣質新生等多種因素導致的結果(Johnson and Olefsky, 2013; Tateya et al., 2013)。

四、胰島細胞凋亡

發炎因子會導致 β 細胞受損，使 β 細胞的功能逐漸衰退(Cerf, 2013)，同時為了補償胰島素阻抗， β 細胞需要分泌更多的胰島素以維持血糖穩定，而 β 細

胞長期處於這種壓力環境下，將導致其功能異常或走向細胞凋亡
(Hajiaghaalipour et al., 2015; Miriam Cnop, 2005)， β 細胞的數量減少是誘發 T1D
與 T2D 的關鍵因素(Lo et al., 2013)。





第四節 葡萄糖轉運蛋白

一、功能與簡介

葡萄糖為生物體的主要能量來源，在哺乳動物細胞中，可以次級主動運輸 (Secondary active transport) 或促進性擴散 (Facilitative diffusion) 的方式進入細胞。依其運輸方式可分為 Sodium-driven sugar cotransporters (SGLTs) 與葡萄糖轉運蛋白 (Glucose transporters, GLUTs) (Augustin, 2010)。其中 SGLTs 分佈在腸胃道與腎臟中，負責體內葡萄糖的吸收與重吸收 (Reabsorption)，而體內的大部份組織與器官可藉由 GLUTs 來攝取葡萄糖，例如大腦、肝臟、脾臟、腎臟、肌肉與脂肪組織等 (Wood and Trayhurn, 2003)，由於其廣泛的分佈在各個組織中，因此體內葡萄糖之動態平衡 (Glucose homeostasis) 主要是透過 GLUTs 來調控 (Mueckler and Thorens, 2013)。

二、結構與分類

GLUTs 是一類跨膜的蛋白，屬於促進性擴散的運輸蛋白，如附圖三所示，GLUTs 具有 12 個跨膜片段 (Transmembrane segments)，這些片段在細胞膜上組成一個與細胞質連接的區域 (Cytoplasmic linker domain)。目前已被發現的 GLUTs 共有十四種，依其序列之相似度 (Sequence similarity) 和基質特異性 (Substrate specificity) 可分為三大類 (Cura and Carruthers, 2012; Mueckler and Thorens, 2013)。

第一類 (Class I) GLUTs 為最早被發現與最為廣泛研究的一群，包括 GLUT1-4 和 GLUT14，主要負責葡萄糖的攝取。第二類 (Class II) GLUTs 包括 GLUT5、GLUT7、GLUT9 和 GLUT11，這一類的 GLUTs 同樣有轉運葡萄糖的能力，但它們在體內的主要作用為轉運果糖。第三類 (Class III) GLUTs 則包括 GLUT6、GLUT8、GLUT10、GLUT12 和 HMIT (H^+ /myo-inositol symporter)，它們的特點是對於葡萄糖的親和力較低，並且在結構上有異於前述




兩類 GLUTs (Augustin, 2010; Cura and Carruthers, 2012)。第一類與第二類的醣基化修飾(N-linked glycosylation) 位於第 1 段連接帶(Exofacial loop) 的一個氮原子上，而第三類 GLUTs 的 N-linked glycosylation 則是位於第 5 段連接帶上 (Mueckler and Thorens, 2013)，詳見附圖三。這三類 GLUTs 之間的共通點是它們皆具有組織特異性表現 (Tissue-specific expression) (Cura and Carruthers, 2012; Mueckler and Thorens, 2013)。每種 GLUT 的分布情形(Tissue distribution) 根據其作用組織和調控方式各不相同(Augustin, 2010; M Lehen, 2013)。Glucose transporter 1 (GLUT1) 為分佈最廣泛的 GLUT(Wood and Trayhurn, 2003)，GLUT4 為胰島素訊號傳遞路徑中負責調控血糖的主要蛋白(Leto and Saltiel, 2012)，以下將對 GLUT1 與 GLUT4 進行詳細的介紹。

1. GLUT1

GLUT1 為最早被分離純化的膜轉運蛋白(Membrane transporters)，也是其中最為廣泛研究的 GLUT，它們分佈於全身多個組織中(Mueckler and Thorens, 2013)，其中主要分佈於紅血球、心肌細胞、平滑肌細胞、血管及血腦屏障(Blood-brain barrier)，以及腎臟、結腸與肝臟等組織中。除葡萄糖外，甘露糖、半乳糖、葡萄糖胺等也可以透過 GLUT1 進入細胞，而 GLUT1 主要是由疊氮化合物(Azide) 與滲透壓、缺糖現象(Glucose deprivation) 等來活化(Hajiaghaalipour et al., 2015)。因 GLUT1 是一個對葡萄糖具有高親和力的葡萄糖轉運蛋白，具有在缺乏胰島素刺激的情況下也可進行葡萄糖的攝取(Kim et al., 2007)，使之負責維持體內基礎的葡萄糖攝取(Basal glucose uptake) (Mueckler and Thorens, 2013)。

2. GLUT4

GLUT4 為體內所占比例最高的 GLUT (M Lehen, 2013)，主要分佈在脂肪細胞、骨骼肌和心肌細胞中，為一種胰島素應受性(Insulin-responsive) 的葡萄糖轉運蛋白，胰島素為其主要之調控方式，並且具有劑量效應



(Dose-dependent manner) (Govers et al., 2004)。一般情況下，GLUT4 儲存於儲存囊泡(GLUT4 storage vesicles, GSVs) 中，在進食後醣類會被消化成小分子的單糖或雙糖，這些糖類經由小腸吸收至循環系統當中，使血糖升高，促進 β 細胞分泌胰島素，胰島素藉由血液到達肌肉組織、脂肪組織和肝臟等器官(Leto and Saltiel, 2012)，與細胞膜上的胰島素接受器(Insulin receptor, IR) 結合，活化其下游路徑，促進 GSVs 轉運(Translocate) 到細胞膜上，進而增加葡萄糖的吸收，並降低肝臟中醣質新生的作用，使體內血糖回復正常水平。另外運動為其次要之調控方式，通過肌肉收縮可以增加 GLUT4 之表現量和 GSVs 轉運至細胞膜之數量(Govers et al., 2004; Kishi, 1998; M Lehnen, 2013)。

而 GLUT4 失去轉運到細胞膜上的能力是胰島素阻抗和第二型糖尿病的初期症狀 (Leto and Saltiel, 2012)。其中細胞骨架(Cytoskeleton)、微管(Microtubules)和肌動蛋白(Actin) 對 GLUT4 之轉運上扮演著重要的功能。如驅動蛋白(Kinesin) 負責把 GSVs 帶到細胞膜附近，肌動蛋白絲上的 MYO1C 辨認 GSVs 後，使其從細胞內往外移動並與細胞膜融合，使 GLUT4 嵌入細胞膜，促進葡萄糖攝取 (Glucose uptake)。最後，隨著胰島素訊號減弱，細胞膜上 GLUT4 的回收作用增加，GLUT4 經過高基氏體後重新回到 GSVs 中，以維持血糖恆定。因此胰島素對 GLUT4 的調控在血糖上具有顯著的重要性(Lanzerstorfer et al., 2014)。

表一、GLUTs 的特性與及其主要分佈範圍

Table 1. The characteristics of GLUTs and their distribution. (Mueckler and Thorens, 2013; Wood and Trayhurn, 2003)

Isoform	Class	Insulin sensitivity	Predominant substrates	Tissue Distribution
GLUT1	I	✗	Glucose, galactose, mannose, glucosamine	Ubiquitous
GLUT2	I	✗	Glucose, galactose, fructose, mannose,	Liver, pancreas, intestine, kidney
GLUT3	I	✗	Glucose, galactose, mannose, xylose	Brain
GLUT4	I	✓	Glucose, glucosamine	Heart, muscle, WAT, brain
GLUT5	II	✗	Fructose	Small intestine, kidney
GLUT6	III	✗	Glucose	Brain, spleen, leukocytes
GLUT7	II	n.d.	Glucose, fructose	Small intestine, colon, testis
GLUT8	III	✗	Glucose, fructose, galactose	Testis, brain, adrenal gland, liver
GLUT9	II	n.d.	Urate	Liver, kidney, small intestine
GLUT10	III	✗	Glucose, galactose	Heart, liver, pancreas, skeletal muscle
GLUT11	II	✗	Glucose, fructose	Heart, muscle
GLUT12	III	✓	Glucose	Heart, prostate, skeletal muscle, small intestine, WAT
GLUT14	I	n.d.		testis

(n.d.= not determined)



三、葡萄糖攝取之調控機制

從表一可以得知，GLUT 的調控方式主要可分為 insulin-dependent 與 insulin-independent 兩種，然而近年來也有研究發現運動可以增加肌肉組織中 GLUT4 的表現，以及運動後可增加 insulin sensitivity (M Lehnen, 2013; Ojuka et al., 2012)，以下將主要介紹在 insulin-dependent 的情況下，調控 GLUT4 轉運的路徑。當脂肪和肌肉細胞受到胰島素的刺激時，主要透過誘發 PI3K/Akt 與 CAP/Cb1/TC10 這兩條路徑中蛋白質的磷酸化，使細胞中的 GLUT4 轉運到細胞膜上(Hajiaghaalipour et al., 2015; Leto and Saltiel, 2012)，以下將分別介紹這兩條路徑以及其中參與調控之蛋白質。

1. PI3K/Akt 路徑

胰島素結合到 IR 後，促使 Insulin receptor substrate (IRS) 上的酪氨酸 (Tyrosine, Tyr) 磷酸化，提供停靠點(Docking site) 給 PI3K(Phosphoinositide 3-kinase) 的調節次體(Regulatory subunit) p85，被活化的 PI3K 接著使 Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) 轉化成 Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3) (Leto and Saltiel, 2012)，PIP3 透過活化 Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1)、Protein kinase B (Akt) 及其下游蛋白質，使 GLUT4 轉運到細胞膜上以進行葡萄糖攝取，其參與調控之蛋白質和調控路徑如附圖四所示(Hajiaghaalipour et al., 2015)。

2. CAP/Cb1/TC10 路徑

在此路徑中，活化的 IR 會吸引 (Recruits) 轉接蛋白 (adapter protein) APS 到 IR 的 β subunit 上，並磷酸化 Cb1 與 Cb1 associated protein (CAP)，使 CrKII 聚集並結合到 C3G 上，催化 TC10 的 GDP 轉化成 GTP，促使 GLUT4 轉運和促進葡萄糖攝取，其參與調控之蛋白質和調控路徑如附圖五所示(Hajiaghaalipour et al., 2015)。

四、細胞內之動態平衡

在缺乏胰島素的情況下，超過 90% 的 GLUT4 位於細胞核周邊區域 (Perinuclear regions) 的 GSVs 或內體(Endosomes) 中。餘下的 GLUT4 有一部份在細胞膜上不斷的被回收利用，而回收回來的 GLUT4 會經過高基氏體的修飾，包裹在 GSVs 內，再重新轉運到細胞膜上(Hou and Pessin, 2007; Leto and Saltiel, 2012)。在此狀態下只有約 5% 的 GLUT4 位於細胞膜上，整個過程連續且緩慢，以維持動態平衡。當血液中胰島素濃度上升，GSVs 轉運到細胞膜的比率會增加，同時回收作用減少，此時細胞膜上的 GLUT4 數量可比基礎狀態下多出十倍或以上。最後，隨著胰島素訊號減弱，細胞內的 GLUT4 再次回復到動態平衡(Govers et al., 2004; Hou and Pessin, 2007)。



第五節 葡萄糖攝取

一、葡萄糖於細胞中的代謝作用

葡萄糖在進入細胞後會經由醱解作用被細胞分解，產生能量以供細胞利用。而肝臟、肌肉與脂肪組織是體內維持血糖恆定的三個主要器官，其中 GLUT1 和 GLUT4 是表現在肌肉和脂肪組織的兩個主要的轉運蛋白。如前所述，GLUT1 負責維持基本的葡萄糖攝取(Yamamoto and Ashida, 2012)，而 GLUT4 在胰島素的精確調控下，可增加肌肉細胞和脂肪細胞葡萄糖的攝取。葡萄糖為肌肉細胞進行收縮之重要燃料，可利用促進擴散(Facilitated diffusion)的方式經由 GLUT4 進入肌肉細胞，而其中經由 GLUT4 吸收到肌肉細胞的葡萄糖約為 90% (Leto and Saltiel, 2012)，脂肪細胞約為 5 - 10% (Samuel and Shulman, 2016)。葡萄糖於肌肉細胞和脂肪細胞內分別可以以糖原(Glycogen) 或 TG 的形式儲存，而脂肪細胞對體內能量動態平衡(Body energy homeostasis) 和激素分泌(Hormones secretion)，如調控肌肉、肝臟和大腦之細胞因子上起著重要的調節作用(Leto and Saltiel, 2012; M Lehnen, 2013)。

二、目前偵測葡萄糖攝取的方法

1. 2-DG

2-Deoxyglucose (2-DG) 是一種葡萄糖的類似物，從附圖六可得知其結構與葡萄糖十分相似，因此可被醱解作用第一個步驟中的 Hexokinase 磷酸化成 2-deoxy-D-glucose-6-phosphate (2-DG6P)，但由於 2-DG6P 不能進一步的被細胞代謝，而堆積於細胞中(Stoltzman et al., 2008)。因此此檢測法的原理為利用 2-DG6P 氧化時產生的 NADPH，透過還原反應受質，偵測其螢光強度或吸光值。反應受質一般可分為 PicoProbe 或 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DNTB) 兩種。PicoProbe 被 NADPH 還原後會產生螢光，並可於 590 nm 偵測其螢光強度，而 DTNB 則需要先經由 NADPH 協

助 Glutathione reductase 作用，使 Glutathione 從氧化態轉換成還原態時，同時把 DTNB 轉換成紫藍色的 TNB，並於 412 nm 下偵測其吸光值。

從 2-DG 的偵測原理可知其檢測對象為細胞中 NADPH，或是 glutathione reductase 的效率。而細胞質內的 NADPH 主要由 Pentose Phosphate Pathway 產生，因其於細胞內扮演著氧化還原作用中傳遞電子的角色，細胞增殖(Proliferation)、脂質合成(Lipid biosynthesis)，以及細胞應激等路徑也需要 NADPH 的參與(Lewis et al., 2014)。因此，藉由 NADPH 來代表細胞的葡萄糖攝取並不是一個理想的方法。

2. 2-NBDG

2-(*N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-amino)-2-deoxy-d-glucose (2-NBDG) 與 6-(*N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-6-deoxy-d-glucose 是在葡萄糖上接有螢光基團的葡萄糖類似物，附圖七為它們的化學結構，其中以 2-NBDG 比較常用(Joseph et al., 2014; Kanwal et al., 2012)。由於它們不能在醱解作用中被細胞代謝而堆積在細胞中，因此其產生的螢光與細胞的葡萄糖攝取成正比，可利用螢光顯微鏡或流式細胞儀檢測(Yamamoto et al., 2015)。但 2-NBDG 在檢測上具有一些限制，例如其螢光訊號微弱、使用劑量高、以及不能與生理環境比較等(Yamamoto and Ashida, 2012)。

第六節 全內反射螢光顯微鏡

全內反射螢光顯微鏡(Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy, TIRFM) 是近年來研究分子動力學上一個重要的工具，有別於一般傳統的螢光顯微鏡，TIRFM 能夠選擇性的激發細胞膜附近的螢光訊號。其原理為利用光線從光密介質進入光疏介質，當其入射角大於臨界角(Critical angle, θ_c) 時所產生的全內反射現象，根據 Snell's law：

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$$

其中 n_1 、 n_2 為介質 1 與介質 2 之折射率， θ_1 為入射角， θ_2 為法線與折射光線之間的夾角。換言之，當發生全反射的現象時，光線不會發生折射，此時折射光線與法線之間的夾角為直角，即 $\theta_2 = 90^\circ$ ，由此可以知道兩介質間若要產生全內反射的最小入射角，或臨界角為：

$$\theta_c = \sin^{-1} \left(\frac{n_2}{n_1} \right)$$

當全內反射發生時，會伴隨著消散波(Evanescent wave) 的產生，形成一個消散區間(Evanescent field)，其範圍僅為介面~100 nm 附近，並且其強度會隨著穿透距離呈指數性減少(Taitt et al., 2016)，若有螢光物質位於此區間內，則可受到電磁波的激發而產生螢光訊號，而 TIRFM 正是利用消散波作為激發光源，因此愈靠近細胞膜表面的位置便愈容易受到激發(Fang, 2015; Guggenheim et al., 2017)。利用 TIRFM 此一成像特性，可以專一偵測到細胞膜附近的螢光訊號，從而得知目標分子在細胞內的分佈情況。

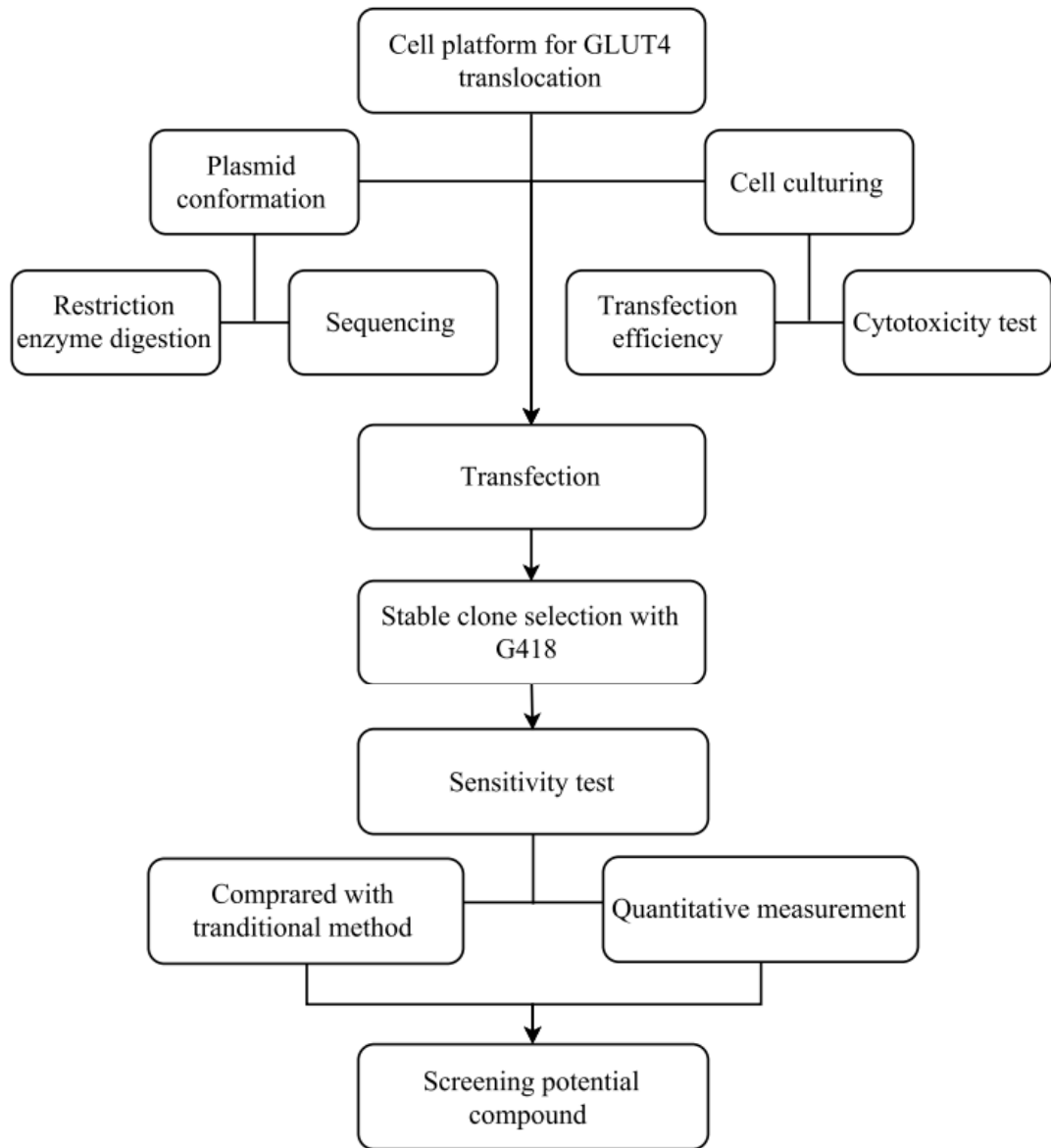
第三章 研究目的與實驗架構



第一節 研究目的

由於傳統上檢測葡萄糖攝取的方法較為昂貴、耗時，以及其結果容易受操作者技術影響等缺點，同時缺少分子機制之探討。而 GLUT4 在葡萄糖的攝取上扮演著重要的角色，本實驗目的為藉由 GLUT4 重組蛋白，利用基因工程的方法，建立出新穎且快速的細胞平台，以直接評估細胞膜上 GLUT4 的數量，完善葡萄糖攝取的檢測流程，同時可以取得簡單的分子機制資訊，並評估此平台下葡萄糖攝取與 GLUT4 轉位的相關性，期待能改善檢測的準確度及效率。

第二節 實驗架構



圖一、實驗架構圖

Figure 1. Experimental flowchart

第四章 實驗材料與方法



第一節 實驗材料

一、化學藥品與試劑

1. 以下藥品購自 Bioshop Cemical Co.

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)

Agar

Glycerol

Tryptone

Yeast extract

2. 以下藥品購自 Geneaid Biotech Ltd.

50× TAE buffer

Geneaid™ Midi Plasmid Kit (PI025)

Presto™ Mini Plasmid Kit (PDH100, PDH300)

3. 以下化學藥品購自 Mallinckrodt Baker, Inc. (J.T. Baker)

Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)

Potassium chloride (KCl)

4. 以下化學藥品購自 Merk Cemical Co.

Calcium chloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Dimethyl sulfoxid (DMSO)

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

Isopropanol

Methanol



Potassium phosphate (KH_2PO_4)

Sodium bicarbonate (NaHCO_3)

Sodium chloride (NaCl)

Tris base Ultrapure

5. 以下化學藥品購自 Sigma-Aldrich Chemical Co.

Ethanol (absolute, $\geq 99.8\%$)

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)

Glucose Uptake Colorimetric Assay Kit (MAK083)

Insulin

Magnesium sulfate (MgSO_4)

Paraformaldehyde

Sodium phosphate (Na_3PO_4)

6. 以下化學藥品購自 Thermo Fisher Scientific Inc.

0.4% Trypan blue solution

0.5% Trypsin

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

Calf serum

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Fetal bovine serum (FBS)

Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, EDTA-free (100 \times)

Ham's F-12

Lipofectamine 3000

Penicillin/Streptomycin (P/S)

7. 其它

Bovine serum albumin (BSA) 購自 Bionovas Biotechnology Co., Ltd.

Buffer 2.1 購自 NEW ENGLAND Biolabs® Inc.

KAPA SYBR® FAST qPCR kit 購自 Kapa Biosystems

Passive lysis buffer, 5× 購自 Promega

Primer 合成自明欣生物科技有限公司

SMART™ MMLV Reverse Transcriptase 購自 Clontech Laboratories, Inc.

Tripure Isolation Reagent 購自 Roche Diagnostics Indianapolis, US



8. 酵素與抗體

Anti-Myc antibody (ab9106) 購自 Abcam

Alexa Fluor 594 Goat anti-Rabbit IgG secondary antibody (A11037) 購自

Thermo Fisher Scientific Inc.

Restriction enzyme: EcoRI, NotI 購自 NEW ENGLAND Biolabs® Inc.

9. 細胞株

3T3-L1 來自食品工業發展研究所(BCRC No. 60159)

CHO-K1 來自食品工業發展研究所，感謝國立台灣大學食品科技研究所

沈立言教授提供

L6 購自 ATCC® (CRL-1458™)

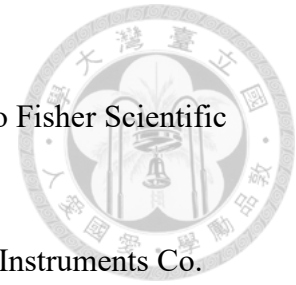
10. 質體

pcDNA3-mycG4eGFP 來自美國加利福尼亞州 Diabetes and Metabolism

Research Institute，感謝 Debbie C. Thurmond, Ph.D 提供

二、儀器設備

1. ELISA reader (Multiskan[®] FC Microplate Photometer, Thermo Fisher Scientific Instruments Co. Ltd.)
2. Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Instruments Co. Ltd.)
3. pH meter (6173 pH, Jenco Electronics, Ltd.)
4. StepOne™ Real-Time PCR Systems (Life Technologies)
5. 二氧化碳培養箱 (SCA-165PS, ASTEC Co.)
6. 生物安全操作櫃 (TBH-420)
7. 全內反射螢光顯微鏡 (Carl Zeiss Laser TIRF 3)
8. 共軛焦顯微鏡 (Zeiss LSM 780 Confocal)
9. 低溫離心機 (KUBOTA 3500)
10. 冷光螢光影像照相分析系統 (UVP CPQ 8478, Ultra-Violet Products Ltd, Cambridge UK.)
11. 流式細胞分析儀 (Cytomics FC 500, Beckman Coulter)
12. 倒立式光學顯微鏡 (CKX41, Olympus)
13. 螢光儀 (Fluoroskan Ascent Microplate Fluorometer, Thermo Fisher Scientific Instruments Co. Ltd.)
14. 離心機 (KUBOTA 2100)



第二節 實驗方法

一、質體製備與確認

1. Competent cell 製備

(1) 試劑製備：

- i. CM1: 10 mM KOAc pH 6.2, 50 mM MnCl₂, 5 mM NaCl
- ii. CM2: 10 mM KOAc pH 6.2, 5% glycerol, 70 mM CaCl₂, 5 mM MnCl₂

(2) 實驗方法：

挑選 *E. coli* (DH5 α) 的單一菌落接種到 3 mL LB broth 中，於 37 °C 放大培養 2 小時後，取 1.5 mL 菌液平均加到 250 mL LB broth，以相同條件培養 16 小時，於 4°C 下以 5,000 \times g 離心 5 分鐘，移除上清液，菌體置冰並加入 50 mL CM1 使菌體重新懸浮後於冰上靜置 20 分鐘，4 °C 下以相同條件離心並去除上清液，加入 10 mL CM2 並使菌體重新懸浮，以無菌滴管迅速分裝至微量離心管，每管體積約為 100 μ L，以液態氮冷卻後於 -80 °C 保存。

2. 轉形

(1) 試劑製備：

表二、*E. coli* (DH5 α) 培養基配方

	LB broth	LB agar
Yeast extract	2.5 g	2.5 g
Tryptone	5 g	5 g
NaCl	5 g	5 g
Agar		7.5 g
ddH ₂ O	500 mL	500 mL





(2) 實驗方法：

從- 80 °C 取出預先製備的 competent cells 放在冰上退冰，加入 1 ng 質體或 ligation 產物到完全退冰的 competent cells 中，於冰上放置 15 分鐘後以 42 °C 水浴加熱 90 秒，放回冰上 2 分鐘。加入 800 μ L LB broth，於 37 °C 震盪培養 1 小時後，均勻塗布在 LB agar plate (100 μ g/mL Ampicillin) 上，於無菌操作台中吹乾後放進 37 °C 培養箱倒置培養 16 小時。

3. Plasmid DNA mini-preparation

(1) 實驗方法：

取 3 mL LB broth 加到 15mL 離心管中，加入 3 μ L Ampicillin，挑選單一菌落接種到 LB/Amp broth 中，並以膠帶封口，於 37 °C 振盪培養 16 小時，以 5,000 \times g 離心 5 分鐘，移附上清液，加入 200 μ L PD1，振盪使菌體重新懸浮後移到 1.5 mL 離心管，加入 200 μ L PD2，上下倒置離心管數次，再加入 200 μ L PD3，同樣上下倒置離心管數次，以 16,000 \times g 離心 10 分鐘，轉移上清液到 spin column 中，加入 600 μ L wash buffer，以 16,000 g 離心 1 分鐘，以相同條件離心 3 分鐘以去除殘留的 wash buffer，隨後把 spin column 移到新的離心管，加入 35 μ L elution buffer，靜置 5 分鐘後以 16,000 g 離心 3 分鐘以取得 DNA。

4. 限制酶切反應

(1) 實驗方法：

限制酶(Restriction enzyme) 可辨認 DNA 上的特定序列並進行切割 (Digestion)，不同的限制酶需要不同的反應環境，而 1 μ g 的 DNA 需要 3 – 5 unit 限制酶作用，且限制酶之體積不可超過總反應體積的 1 / 10。質體與限制酶的作用配方如表三所示，使其均勻混合後於 37°C 與質體作用 2 小

時，以 65 °C 水浴 10 分鐘，使限制酶失活後和適量的 6× DNA loading dye 混勻，於 1% 瓊脂糖凝膠(agarose gel) 進行電泳。

表三、質體與限制酶反應配方

pcDNA3-mycG4egfp (500 ng/μL)	1 μL
Buffer 2.1	2 μL
<i>EcoRI/NotI</i>	0.5 μL
ddH ₂ O	16.5 μL
總體積	20 μL

5. 膠體電泳

(1) 實驗方法：

秤取適量的瓊脂糖(agarose) 加到三角錐形瓶，並加入 1× TAE buffer，放入微波爐開始加熱，待 agarose 溶液開始沸騰即停止加熱，取出瓶子搖晃數秒，再繼續加熱，重複上述步驟使 agarose 溶液沸騰三次後，變為澄清液體後可視為加熱完成。待三角錐形瓶冷卻至不燙手的溫度後即可倒至鑄膠模具並插入齒梳，若有產生氣泡可以塑膠吸管尖端去除之，最後靜置待膠體成形。膠體放置於電泳槽後加入 1× TAE buffer，取 500 ng DNA 與 loading dye 混勻並注入膠體，以 100 V 進行電泳，使用 Ethidium bromide (EtBr) 外染後置於 UV 箱中拍照，並和 DNA ladder marker 比對 DNA 片段之大小。

6. NCBI BLAST

質體送交明欣生物科技有限公司定序，定序結果與 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 資料庫進行 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)，比對質體資訊，以確認質體的正確性。



二、細胞平台建立

1. CHO-K1 繼代

(1) 試劑製備：

- i. Ham's F-12：取一包 Ham's F-12 粉末回溶於 800 mL 去離子水中，加入 1.18 g NaHCO_3 ，完全溶解後以 1 N HCl 調整至 pH 7.4，以去離子水補至 1 L 後過濾。

(2) 實驗方法：

CHO-K1 細胞以含有 10% FBS 及 $1\times$ P/S 的 Ham's F-12 培養於 10 cm 培養皿，放置於 37°C 、5% CO_2 之細胞培養箱中。當細胞生長密度達全滿時，取 1/10 進行繼代培養，使之於 3 天後密度再達至全滿。繼代時先移除原有的 Ham's F-12，以 PBS 潤洗細胞後移除，接著加入 1 mL 0.05% Trypsin 潤洗細胞，把 Trypsin 移除並放入培養箱 2 分鐘，其後細胞開始脫落，以 Ham's F-12 將細胞打下並打散，取總體積的 1/10 移至裝有 8 mL Ham's F-12 之 10 cm 培養皿中，搖勻並於顯微鏡觀察後，放置於細胞培養箱中培養。

2. 抗生素之細胞毒性

(1) 實驗方法：

細胞實驗中所用到的抗生素為 Geneticin (G418)，用於篩選成功轉殖質體之細胞株。細胞種在 24 孔盤中使之生長至密度達 80% 時，把培養基分別置換成 400、500、600、700、800、900、1,000 ng/mL G418 與不含 G418 之培養基，細胞對抗生素不具抗性，因此在含抗生素的培養基下無法存活。而由於 Ham's F-12 所含之養份較少，實驗期間每兩天更換一次含抗生素之培養基，確保細胞不會因為缺少養份而死亡。每天觀察細胞的存活情況，選擇於 6-8 天間可把細胞完全殺死之抗生素濃度作為篩選條件。



3. 轉染 (Transfection)

(1) 試劑製備：

- i. Lipofectamine 3000: 內含 Lipofectamine 3000 與 P3000 reagent。

(2) 實驗方法：

Lipofectamine™ 3000 為一高轉染效率、低細胞毒性之真核細胞轉染試劑。細胞於轉染前 18 至 24 小時培養於 24 孔盤中，使細胞在轉染前之生長密度達至 90% 滿，並於轉染 30 分鐘前更換新的培養基。Lipofectamine 3000 reagent 先以不含血清之 Ham's F-12 調整體積至 25 μ L，質體與 P3000 reagent 以 1 μ g : 2 μ L 之比例混合後同樣以不含血清之 Ham's F-12 調整體積至 25 μ L，將兩者混合後於室溫靜置 15 分鐘，加到細胞中，輕輕拍打使其均勻混合，於 37°C 培養箱培養，24 小時後觀察轉染情況及其表現效率。

三、細胞數存活率試驗

(1) 試劑製備：

- i. 取 50 mg MTT 回溶於 10 mL PBS 配成 stock solution，避光並保存於 4°C，使用時以 Ham's F-12 作 10 倍稀釋。

(2) 實驗方法：

MTT 是一種可溶於水的黃色化合物，可被活細胞粒腺體內的酵素 (Succinate-tetrazolium reductase, SDH) 還原成深紫色的 Formazan 結晶。而死細胞並沒有還原 MTT 的能力，因此可藉由吸光值來推估細胞存活率。以含有 MTT 的 Ham's F-12 於 37°C 培養 1 小時後把培養基移除，以 PBS 潤洗一次後利用 DMSO 使細胞膜破裂，並溶解 Formazan 結晶，最後以 ELISA reader 讀取其於 570 nm 波長下的吸光值。



四、BSA 蛋白質定量

(1) 試劑製備：

- i. 取 50 mg BSA 溶解於 50 mL 去離子水，製成 1 mg/mL BSA 溶液，分裝並儲存於-20°C。

(2) 實驗方法：

每個樣品皆以兩重複取樣 2 μ l 蛋白質萃取液加入 96 孔盤中，接著以 1 mg/mL 的 BSA 配置成濃度為 0、0.5、1、2、4、6、8、10 μ g/mL 的標準品，各取 2 μ l 至 96 孔盤中作為標準曲線。加入 200 μ L 1 \times Bio-red protein assay buffer，避光反應 10 分鐘後，使用 ELISA reader 於波長 595 nm 下測量樣品吸光值，將吸光值換算至標準曲線的濃度，以得每個樣品的蛋白質濃度。

五、即時定量聚合酶連鎖反應

(1) 試劑製備：

- i. 75% 乙醇：以 DEPC 水稀釋 99.8% 乙醇。
- ii. PCR-grade water: 以 Minisart[®] Syringe Filter (16534-K) 過濾去離子水。

(2) 實驗方法：

i. RNA 萃取

細胞於 10 cm 培養皿培養至全滿，去除培養基並加入 1 mL Tripure Isolation Reagent，於冰上反應 5 分鐘後吸取到微量離心管中，並加入 100 μ L BCP，劇烈振盪至完全混勻，靜置於冰上 10 分鐘。於 4°C 下以 12,000 \times g 離心 15 分鐘，此時可以看到明顯的分層，取上清液至新的微量離心管中，加入等體積的 isopropanol 後上下倒置 10 次，在冰上靜置 2 分鐘後於 4°C 下以 12,000 \times g 離心 10 分鐘，移除上清液，加 1 mL 75% 乙醇清洗 pellet，吸走乙醇後

於室溫下風乾 pellet，直至 pellet 變透明後以 30 μL DEPC 水，於 65 $^{\circ}\text{C}$ 下乾浴 3 分鐘，確定 pellet 回溶後以 Nanodrop 1000 定量，RNA 冰於 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存或進行反轉錄。



ii. 反轉錄作用 (Reverse transcription, RT)

以 5000 ng RNA 進行反轉錄，以 DEPC 水調整體積至 9 μL ，並與 2.5 μL Random hexamer primer 加至 PCR tube，離心後放入 PCR machine 以表五條件進行反轉錄，並於 4 $^{\circ}\text{C}$ 時加入 8.5 μL RT buffer premix，在 42 $^{\circ}\text{C}$ 反應 60 min 後完成。

表四、RT buffer premix 配方

5 \times First-strand buffer	4 μL
10 mM dNTP	2 μL
100 mM DTT	2 μL
SMART MMLV Reverse transcriptase	0.5 μL
總體積	8.5 μL

表五、RT 作用條件

Reverse transcription	Time
70 $^{\circ}\text{C}$	3 min
4 $^{\circ}\text{C}$	Hold
42 $^{\circ}\text{C}$	60 min
8 $^{\circ}\text{C}$	99 min

iii. 即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)

cDNA 模版以 PCR-grade water 稀釋至所需濃度後，以 PCR-grade water 把體積補至 4.6 μL ，依照表六以 KAPA SYBR[®] FAST

qPCR kit 配製 SYBR premix，與 cDNA 混合均勻後於 StepOne™ Real-Time PCR Systems 進行即時定量，以 $\Delta\Delta CT$ 計算相對定量。

表六、RT-qPCR SYBR premix 配方

SYBR premix	
10 μ M Forward primer	0.2 μ L
10 μ M Reverse primer	0.2 μ L
2X KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix2	5 μ L
總體積	5.4 μ L

表七、Primer 序列

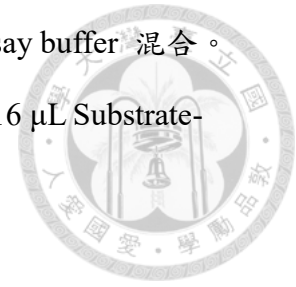
Primer	序列
18S	5' : TCC CAG TAA GTG CGG GTC ATA A
	3' : AGG GCC TCA CTA AAC CAT CCA A
GLUT1	5' : GAA GGT CAC CAT CCT GGA GC
	3' : CCT TCT CGA AGA TGC TCG CT
GLUT4	5' : GCT GTG CCA TCT TGA TGA CGG
	3' : TGA AGA AGC CAA GCA GGA GGA C

六、2-DG 葡萄糖攝取試驗

(1) 試劑製備：

- i. KRPH buffer: 20 mM HEPES, 5 mM KH_2PO_4 , 1 mM $MgSO_4$, 1 mM $CaCl_2$, 136 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2% (w/v) BSA，調整 pH 至 7.4。
- ii. Glucose uptake colorimetric assay kit (MAK083): 內含 Extraction buffer, Neutralization buffer, 2-Deoxyglucose (10 mM), Assay buffer, Enzyme mix, Recycling mix, 2-DG6P standard, Glutathione reductase, Substrate-DNTB

- iii. Reaction mix A: 取 2 μL Enzyme mix 與 8 μL Assay buffer 混合。
- iv. Reaction mix B: 取 20 μL Glutathione reductase、16 μL Substrate-DNTB 與 2 μL Recycling mix 混合。



(2) 實驗方法：

i. 挨餓試驗


將 96 孔盤中的細胞培養基移除，以 200 μL PBS 潤洗三次。接著在每個 well 中加入 100 μL serum-free DMEM，於細胞培養箱中培養 6 小時後，以 200 μL PBS 潤洗兩次，以 100 μL KRPH (Krebs-Ringer-Phosphate-HEPES) buffer 培養 40 分鐘。

ii. 2-DG 試驗

以 PBS 潤洗後，加入不同濃度之胰島素或待測物培養 20 分鐘後，於每 well 中加入 10 μL 的 10 mM 2-DG，繼續培養 20 分鐘。以 200 μL PBS 潤洗三次後，加入 80 μL Extraction buffer，以液態氮急速冷凍細胞後，在 85 $^{\circ}\text{C}$ 培養 40 分鐘，並置於冰上 5 分鐘，然後加入 10 μL Neutralization buffer，把細胞裂解液移至離心管中，並以 13,000 $\times g$ 離心，吸取 5 μL 上清液至新的 96 孔盤後以 45 μL Assay buffer 進行 10 倍稀釋。另外以 2-DG6P 配製成 0.01 mM 之標準品，分別取 0、2、4、6、8、10 μL ，以 Assay buffer 補至上 50 μL 。於每個 well 中加入 10 μL Reaction mix A，搖晃使其與細胞裂解液均勻混合，在細胞培養箱中避光培養 1 小時後，加入 90 μL Extraction Buffer，並以鋁箔紙密封 96 孔盤，於 90 $^{\circ}\text{C}$ 培養 40 分鐘，置於冰上 5 分鐘。最後加入 12 μL Neutralization buffer 和 38 μL Reaction mix B，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 培養 40 分鐘後，於波長 412 nm 下測定其吸光值。

七、2-NBDG 葡萄糖攝取試驗

(1) 試劑製備：

- 
- i. 2-NBDG: 5 mg 之 2-NBDG 粉末以 146 μ L 去離子水回溶，分裝至棕色微量離心管並保存於 -20°C 。

(2) 實驗方法：

將 24 well 中的細胞培養基移除，以 KRPH 潤洗兩次，給予胰島素或其它萃取物於 KRPH 處理 20 分鐘，接著以 KRPH 潤洗，加入配置於 KRPH 的 100 μ M 2-NBDG，於 37°C 培養 30 分鐘後，以冰 PBS 潤洗兩次以去除未被細胞吸收的 2-NBDG 後，加入 $1\times$ Passive lysis buffer 於 4°C 進行裂解。吸取裂解液至離心管並以 $20,000\times g$ 於 4°C 下離心 10 分鐘，取其上清液至 96 孔盤，於 538 nm 下測定吸光值，並以 BSA 蛋白質定量進行標準化。

八、細胞免疫螢光染色法

(1) 試劑製備：

- i. Mounting buffer: 20 mM Tris (pH 8.0), 90% glycerol (w/v)
- ii. 4% (w/v) Paraformaldehyde: 取 4 g Paraformaldehyde 至 80 mL PBS，水浴加熱至 $55-60^{\circ}\text{C}$ ，調整 pH 至 7.4，完全溶解後以 PBS 補至 100 mL。

(2) 實驗方法：

- i. 細胞固定

以 Confocal 或 TIRFM 觀察之細胞需要培養於蓋玻片上，蓋玻片在放進培養皿前要先以 75% 乙醇浸泡，並以 UV 照射 30 分鐘。細胞之生長密度不宜太滿，否則難以在顯微鏡下觀察單顆細胞。固定時先以 PBS 潤洗兩次後把培養皿放於冰上，加入 4% (w/v) Paraformaldehyde 或冰甲醇於冰上進行固定 20 分鐘，以 PBS 潤洗兩次，於載玻片上加一小滴 mounting buffer。放上蓋玻片時有細胞的一面朝下，並用指甲油封片，或是進行免疫螢光染色。

ii. 免疫螢光染色

細胞固定後以 PBS 潤洗，加入 30–50 μL 一級抗體到細胞貼附的一面，於室溫下反應 1 小時後，以 PBS 潤洗三次以除去沒有結合的抗體，加入等體積之二級抗體，於室溫下避光反應一小時，最後以 PBS 潤洗三次後，封片或是浸泡於 PBS 保存，並儘快於螢光顯微鏡下觀察。

九、流式細胞儀樣品製備

(1) 實驗方法：

細胞以 Trypsin 潤洗後，以 PBS 把細胞打下並收集到微量離心管中，以 500 $\times g$ 離心 5 分鐘，把上清液移除後再加入等量的 PBS 並重新懸浮細胞。使用同樣條件離心，把上清液移除後加入 100 μL 冰甲醇把細胞重新懸浮，於冰上靜置 5 分鐘，加入 1 mL PBS 後離心，重覆兩次以洗去甲醇，最後以 200 μL PBS 重新懸浮細胞後，加到 FALCON[®] 5 mL Polystyrene round-bottom tube 進行過濾，最後再加入 400 μL PBS 調整總體積至 600 μL 。

十、統計方法

實驗數據標準化後以平均值 \pm 標準差呈現，兩組間差異以 Student's t-test 進行比較，兩組以上的數據以 One-way ANOVA 檢驗後以 Tukey's test 進行比較，各組間統計上達顯著差異者以* 或# 表示 ($p < 0.05$)、** 或## 表示 ($p < 0.001$)、*** 或### 表示 ($p < 0.0001$)。

第五章 結果與討論

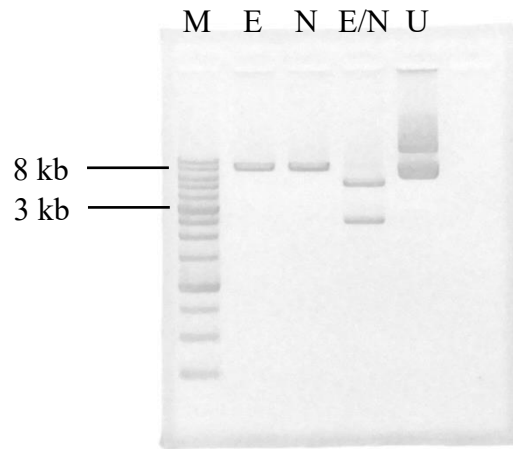


一、CHO-K1 平台建立

1. pcDNA3-mycG4eGFP 質體的大小與序列確認

pcDNA3-mycG4eGFP 質體大小為 7949 bp，如附圖八所示，此質體上帶有 GLUT4 和綠色螢光蛋白(Enhanced Green Fluorescent Protein, eGFP) 的重組蛋白 GLUT4-eGFP，並在 GLUT4 的 N 端上接有一個 myc-tag。為了確認質體之正確性，以限制酶 *EcoRI* 和 *NotI* 於 37°C 培養箱反應 2 小時，利用電泳確認。結果如圖二所示，質體經過 *EcoRI* 和 *NotI* 共同剪切後會形成 5373 bp 與 2576 bp 的片段，其中 2576 bp 為帶有 GLUT4-eGFP 的片段。

質體隨後送交明欣生物科技有限公司進行定序，引子序列 CMV promoter 上的片段 (GAGCTCTCTGGCTAACTA)。其定序結果如圖三所示，並以 NCBI BLAST 比對出與其高度吻合的基因為 *Rattus norvegicus* solute carrier family 2 member 4 (*slc2a4*)。



圖二、利用 DNA 電泳確認 pcDNA3-mycG4eGFP 質體大小

以限制酶 *EcoRI* 和 *NotI* 處理 pcDNA3-mycG4eGFP 質體後，於 1% agarose 的電泳結果，質體大小為 7949 bp，以限制酶剪切後兩片段分別為 5373 bp 與 2576 bp (M : 1 kb ladder ; E : 以 *EcoRI* 剪切 ; N : 以 *NotI* 剪切 ; E/N : 以 *EcoRI* 與 *NotI* 剪切 ; U : 未經限制酶剪切) 。

Figure 2. Confirmation the size of pcDNA3-mycG4eGFP plasmid by gel electrophoresis

The plasmid was digested with restriction enzyme *EcoRI* and *NotI*, and then separate in a 1% agarose gel. The molecular size of the plasmid was 7949 bp, and cut into 5373 bp and 2576 bp by the indicated restriction enzymes. (M: 1 kb ladder; E: digested with *EcoRI*; N: digested with *NotI*; E/N: digested with both *EcoRI* and *NotI*; U: without digestion)



Rattus norvegicus solute carrier family 2 member 4 (Slc2a4), mRNA

Sequence ID: [NM_012751.1](#) Length: 2506 Number of Matches: 2

[▶ See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 339 to 747 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
750 bits(406)	0.0	408/409(99%)	0/409(0%)	Plus/Plus
Query 442	GGGGGACCGGACTCCATCCCACAAGGCACCCCTCACTACCCCTTTGGGCTCTCTCCGTGGCC			501
Sbjct 339	GGGGGACCGGACTCCATCCCACAAGGCACCCCTCACTACCCCTTTGGGCTCTCTCCGTGGCC			398
Query 502	ATCTTCTCTGTGGGTGGCATGATTTCTCCTTTCTCATTGGCATCATTTCTCAATGGTTG			561
Sbjct 399	ATCTTCTCTGTGGGTGGCATGATTTCTCCTTTCTCATTGGCATCATTTCTCAATGGTTG			458
Query 562	GGAAGGAAAAGGGCTATGCTGGCCAACAATGTCTTGGCTGTGCTGGGGGGCGCCCTCATG			621
Sbjct 459	GGAAGGAAAAGGGCTATGCTGGCCAACAATGTCTTGGCTGTGCTGGGGGGCGCCCTCATG			518
Query 622	GGCTAGCCAATGCCCGGCCCTCTATGAGATACTATTCTCGGACGGTTCTCATTGGC			681
Sbjct 519	GGCTAGCCAATGCCCGGCCCTCTATGAGATACTATTCTCGGACGGTTCTCATTGGC			578
Query 682	GCCTACTCAGGGCTAACATCAGGGTTGGTGCCATGTATGTGGGAGAAATCGCCCCATT			741
Sbjct 579	GCCTACTCAGGGCTAACATCAGGGTTGGTGCCATGTATGTGGGAGAAATCGCCCCACT			638
Query 742	CATCTTCGGGTGCCCTTGGGAACACTCAACCAATTGGCCATCGTCATTGGCATTCTGGTT			801
Sbjct 639	CATCTTCGGGTGCCCTTGGGAACACTCAACCAATTGGCCATCGTCATTGGCATTCTGGTT			698
Query 802	GCCCAGGTGTTGGGTTTGGAGTCTATGCTGGGCACAGCTACCCTGTGGC			850
Sbjct 699	GCCCAGGTGTTGGGTTTGGAGTCTATGCTGGGCACAGCTACCCTGTGGC			747

Range 2: 1 to 337 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match ▲ First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
623 bits(337)	3e-174	337/337(100%)	0/337(0%)	Plus/Plus
Query 62	CTTGGGTTGTGGCAGTGAGTCCACCAGACCCGCCCTTGCACACCCTTCCGAAGGCCG			121
Sbjct 1	CTTGGGTTGTGGCAGTGAGTCCACCAGACCCGCCCTTGCACACCCTTCCGAAGGCCG			60
Query 122	GGGTC TTCTGCCGCCAGGCCGGGACACTATACCCATTCAtttttttATTGAGTGCCT			181
Sbjct 61	GGGTC TTCTGCCGCCAGGCCGGGACACTATACCCATTCAtttttttATTGAGTGCCT			120
Query 182	GAGTCTTCTTTTAAAAACAAGATGCCGTCGGGTTTCCAGCAGATCGGCTCTGAAGATGGGG			241
Sbjct 121	GAGTCTTCTTTTAAAAACAAGATGCCGTCGGGTTTCCAGCAGATCGGCTCTGAAGATGGGG			180
Query 242	AACCCCTCAGCAGCGAGTGACTGGGACACTGGTCCTTGTGATTCTCAGCTGTGCTTG			301
Sbjct 181	AACCCCTCAGCAGCGAGTGACTGGGACACTGGTCCTTGTGATTCTCAGCTGTGCTTG			240
Query 302	GCTCCCTTCAGTTTGGCTATAACATTGGAGTCATCAACGCCCCACAGAAAGTATTGAAC			361
Sbjct 241	GCTCCCTTCAGTTTGGCTATAACATTGGAGTCATCAACGCCCCACAGAAAGTATTGAAC			300
Query 362	AGAGCTACAATGCAACTTGGCTGGGTAGGCAGGGTCC			398
Sbjct 301	AGAGCTACAATGCAACTTGGCTGGGTAGGCAGGGTCC			337

圖三、pcDNA3-mycG4eGFP 之定序結果

利用 NCBI BLAST 進行比對後，與其高度吻合之基因為 *Rattus norvegicus* solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4 (*slc2a4*)。

Figure 3. The sequencing result of pcDNA3-mycG4eGFP plasmid

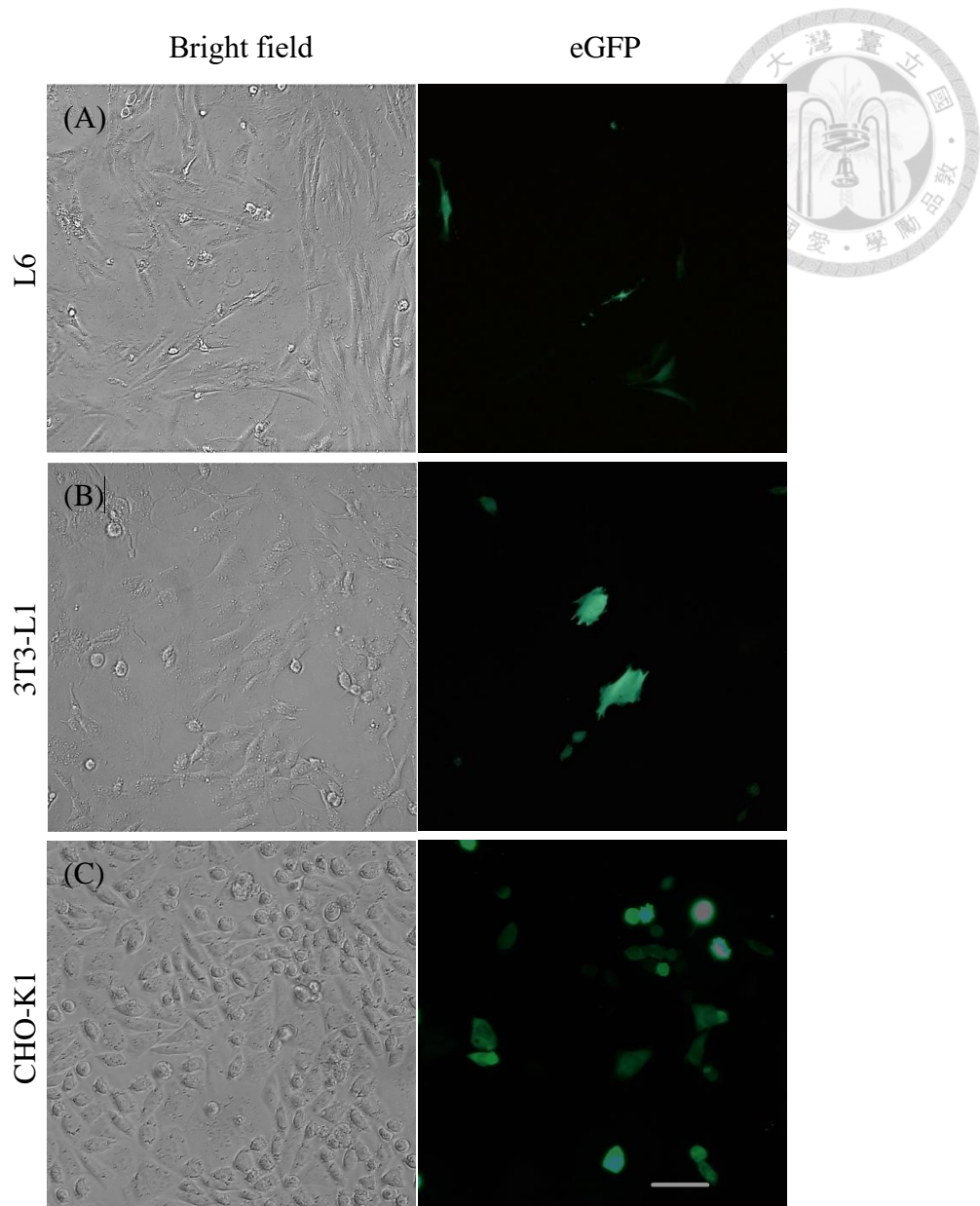
NCBI BLAST of the sequencing result shows that the plasmid sequence is highly conserved with *Rattus norvegicus* solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4 (*slc2a4*).

2. pcDNA3-mycG4eGFP 質體表現之確認

首先為了確認質體上帶有綠色螢光蛋白 eGFP，使用 Lipofectamine 3000 分別轉染 pcDNA3-mycG4eGFP 至 L6、3T3-L1 以及 CHO-K1 三株細胞，24 小時後在 488 nm 雷射光激發下於螢光顯微鏡觀察，可看到細胞表現綠色螢光，結果如圖四所示。

GLUT4 為體內主要調控葡萄糖攝取的蛋白，因此一般在檢測葡萄糖攝取的實驗時，L6 (Taha et al., 1997; Yap et al., 2007) 與 3T3-L1 (Lim et al., 2015) 為常用的細胞株，因為它們分別來自肌肉組織與脂肪組織，為常用的 *in vitro* 模式(Yamamoto et al., 2015)。而 CHO-K1 容易接受與表現外來質體，為常用於生產目標蛋白的細胞株(Wurm, 2004; Wurm and Hacker, 2011; Xu et al., 2015)。

從圖四的結果可觀察到綠色螢光，因此能確定 GLUT4-eGFP 重組蛋白為一 in-frame 的片段，而且可以發現 L6 與 3T3-L1 的轉染效率明顯低於 CHO-K1。另外，從圖五的 RT-qPCR 結果顯示，GLUT1 的表現率明顯比 GLUT4 高，顯示 GLUT4 不是 CHO-K1 中主要表現的葡萄糖轉運蛋白。由於本研究目的為建構一個可以快速偵測 GLUT4 轉運的細胞平台，在考慮到質體在這兩株細胞的表現量，以及不希望 GLUT4-eGFP 重組蛋白在轉運到細胞膜的過程中會與 endogenous GLUT4 競爭等因素，我們選擇 CHO-K1 作為此平台的細胞株。



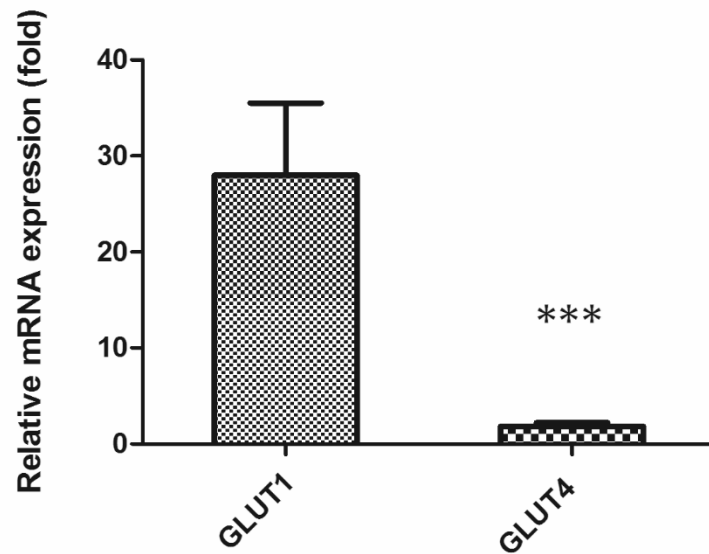
圖四、L6、3T3-L1 與 CHO-K1 之轉染效率

細胞以 Lipofectamine 3000 轉染 24 小時後之質體表現。比例尺為 200 μm 。

Figure 4. The transfection efficiency of L6, 3T3-L1 and CHO-K1

The cells were transfected by using Lipofectamine 3000, and observed after 24 hours.

Scale bar represents 200 μm .



圖五、CHO-K1 GLUT1 與 GLUT4 之 mRNA 表現量

以 RT-qPCR 檢測 GLUT1 與 GLUT4 的 mRNA 表現量，與 18S RNA 比較後計算相對值。實驗結果以平均值±標準差所示，並利用 Student's t-test 比較差異，以*** 表示統計上具顯著差異($p < 0.0001$)。

Figure 5. The relative mRNA expression of GLUT1 and GLUT4 in CHO-K1

The expression GLUT1, GLUT4 and GLUT12 was measured by RT-qPCR. Relative expression is calculated by normalizing with 18S RNA. Results presented as mean \pm SD and analyzed by Student's t-test. Statistical significance with is indicating with *** ($p < 0.0001$).

3. CHO-K1 對胰島素靈敏度的評估

在 Selvi 等人的文獻中指出，CHO-K1 對葡萄糖的攝取會受培養基的胺基酸濃度所影響(Selvi et al., 2010)，結果顯示在分別添加 2.5 mM 與 5 mM 丙胺酸、精胺酸或離胺酸時，在不同葡萄糖濃度的培養基中皆可促進 CHO-K1 攝取葡萄糖，且攝取量的上升與 GLUT4 的轉位有關。過去也有文獻利用轉殖 GLUT4 後的 CHO-K1 來進行葡萄糖攝取研究的例子 (Lanzerstorfer et al., 2014; Zhang et al., 2012)，但仍然需要證明我們的 GLUT4-eGFP 重組蛋白可受胰島素誘導後轉運至細胞膜上，並且確認 GLUT4 轉位與葡萄糖攝取之間的相關性。

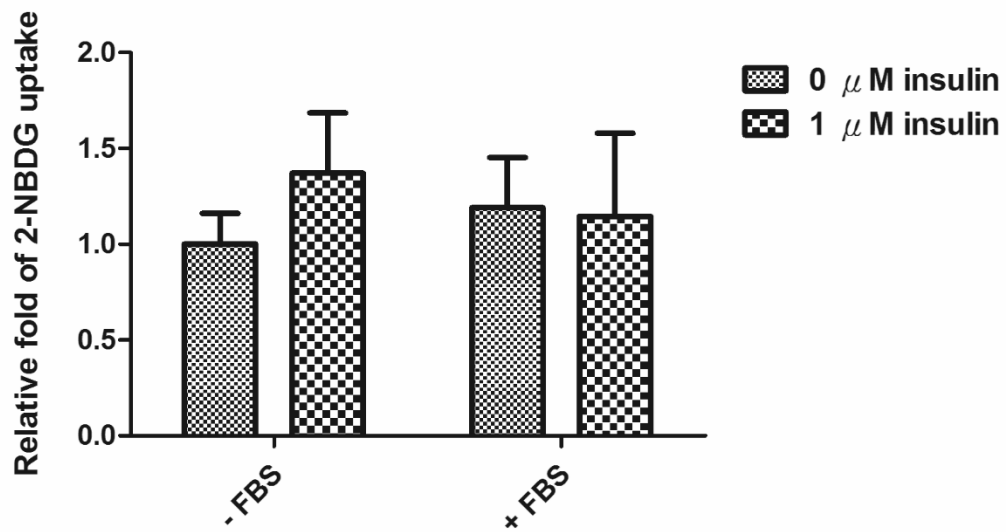
首先探討胰島素對 CHO-K1 葡萄糖攝取的影響，實驗以未轉殖 pcDNA3-mycG4eGFP 質體的 CHO-K1 進行，我們利用 2-NBDG 探討在胰島素誘導下，CHO-K1 葡萄糖攝取的變化量。在 Berenguer 等人的文獻中曾指出，血清含有影響 3T3-L1 細胞中 GLUT4 轉位和葡萄糖攝取的因子，並且具有劑量效應。特別的是該因子在胰島素抵抗的細胞中也能夠影響 GLUT4 的轉位，同時也增加細胞膜上的 GLUT1。他們得出的結論是，除了胰島素外，還有其他生物蛋白質因子存在，有助於 GLUT4 調節，並且能在胰島素抵抗中起調控作用(Berenguer et al., 2010)。

因此為了確認血清是否會影響 CHO-K1 攝取葡萄糖，在進行 2-NBDG 實驗的 6 小時前，把培養基分別更換成不含血清或含有 10 % FBS 之 Ham's F-12，並比較胰島素對葡萄糖攝取的影響。結果如圖六所示，CHO-K1 在 1 μ M insulin 的誘導下，在不含血清的組別中葡萄糖攝取增加 1.30 倍，且與 0 μ M insulin 處理的組別比較時達顯著差異，顯示胰島素有增加葡萄糖攝取的趨勢。而在含有血清的組別中，胰島素並不影響葡萄糖的攝取。相較於利用 L6 與 3T3-L1 檢測葡萄糖攝取的文獻，1 μ M insulin 分別可增加約 1.75 倍 (Lai et al., 2012) 與 6.2 倍 (Van Epps-Fung et al., 1997) 的葡萄糖攝取。本實驗室也曾以 L6 與 3T3-L1 探討胰島素對葡萄糖攝取

的促進效果，並且其結果皆顯示以 100 nM 胰島素處理 30 分鐘後，葡萄糖攝取分別增加 1.17 倍（林，2013）與 2 倍（郭，2015）。推測可能是 CHO-K1 endogenous GLUT4 的表現量較少，或是 CHO-K1 對胰島素的靈敏度比較低所導致。

接下來我們利用不同濃度之胰島素誘導轉染 pcDNA3-mycG4eGFP 後的 CHO-K1 細胞，並利用共軛焦顯微鏡(Confocal Microscopy) 拍攝細胞的橫切面影像，以觀察在不同濃度之胰島素誘導後，GLUT4 在細胞內的分佈情況。結果如圖七與附圖九所示。細胞分別以 0、1、17 μ M insulin 進行誘導，再換成 Ham's F-12 培養 30 分鐘後，以 4% Paraformaldehyde 固定，可觀察到若在 1 μ M 與 17 μ M insulin 的誘導下，綠色螢光會聚集在細胞的表面，而沒有以胰島素誘導的組別則沒有這個現象發生，由此可以推測 GLUT4 重組蛋白在胰島素的誘導下會發生轉位的現象，顯示 CHO-K1 為 insulin sensitive 的細胞株。然而目前還不能確定葡萄糖攝取量的上升是來自於 endogenous GLUT4 轉運到細胞膜上的數量增加所致，也可能是由於 GLUT1 或其它葡萄糖轉運蛋白的表現量上升，因此這個部份在後續實驗中再進行確認。

綜合以上結果，可以確認 pcDNA3-mycG4eGFP 質體上具有大鼠 GLUT4 與綠色螢光蛋白 eGFP，GLUT4-eGFP 在胰島素的誘導下會發生轉位的現象，然而從 2-NBDG 的結果指出，相較於 L6 與 3T3-L1，CHO-K1 對胰島素的靈敏度較差。

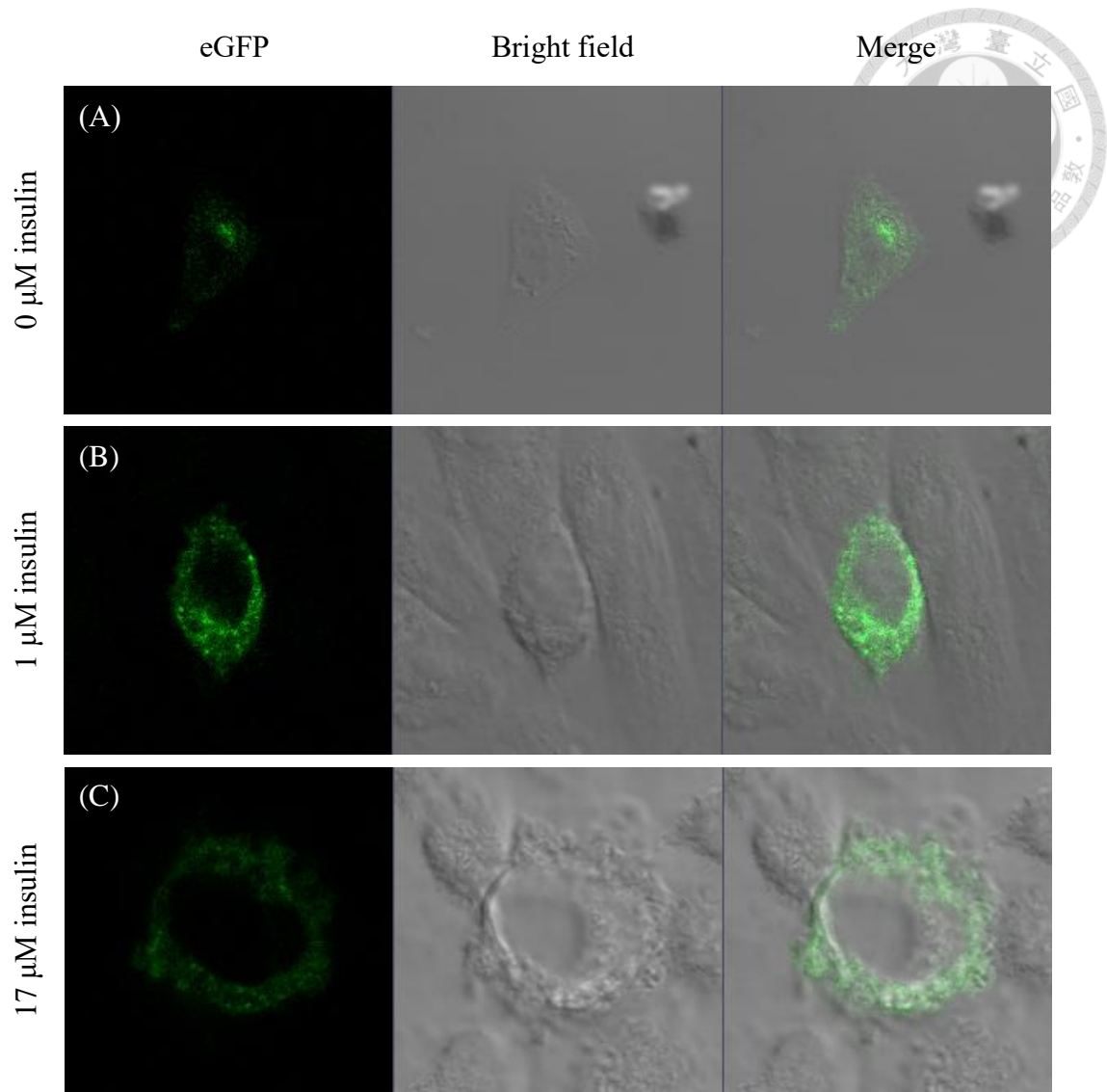


圖六、不同處理條件對 CHO-K1 攝取葡萄糖的影響

以 2-NBDG 評估血清對葡萄糖攝取的影響。實驗結果以平均值 \pm 標準差所示，並利用 Student's t-test 比較與兩者間差異，以* 表示統計上具有顯著差異的組別 ($p < 0.05$)。

Figure 6. The effects of different treatments on glucose uptake in CHO-K1

Glucose uptake was measured by 2-NBDG. The results presented as mean \pm SD and were analyzed by Student's t-test. Statistical significance was marked with * ($p < 0.05$).



圖七、以不同濃度胰島素處理的 CHO-K1 橫切面影像

CHO-K1 轉染 pcDNA3-mycG4eGFP 24 小時後，分別給予(A) 0 μ M (B) 1 μ M (C) 17 μ M insulin，並在 confocal 下拍攝的細胞橫切面影像。

Figure 7. Cross-section image of CHO-K1 under various insulin concentration

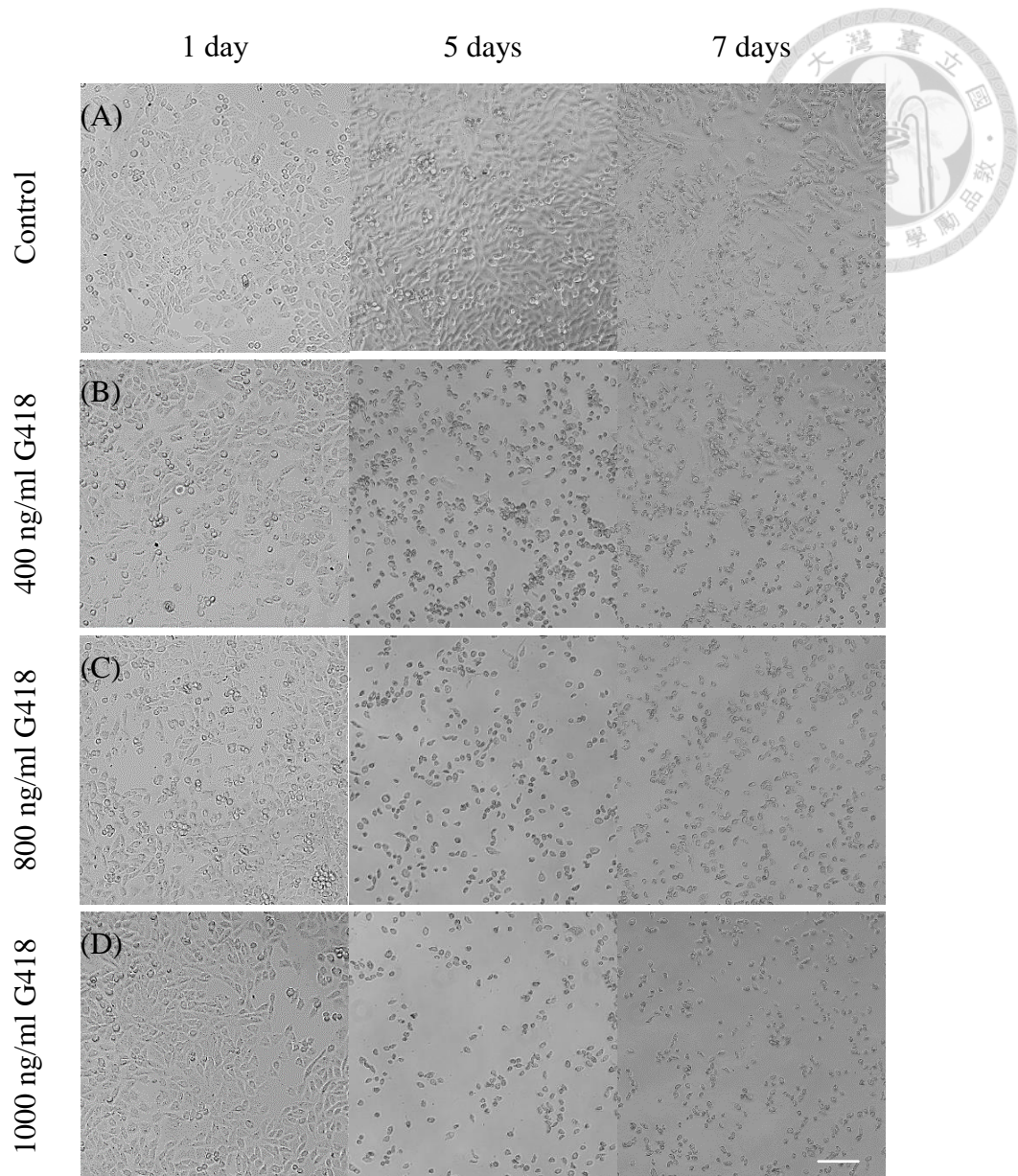
After the transfection of pcDNA3-mycG4eGFP for 24 hours, cells were treated with (A) 0 μ M (B) 1 μ M (C) 17 μ M insulin respectively. Cross-section images were captured by confocal microscopy.

4. G418 對 CHO-K1 之毒殺性測試

為了使此細胞平台可以穩定的表現 pcDNA3-mycG4eGFP，以及提高後續實驗的穩定度與準確度，在 CHO-K1 轉染 pcDNA3-mycG4eGFP 後利用抗生素 G418 毒殺不帶有質體的細胞。由於質體上帶有對抗 Neomycin 的基因片段，又 CHO-K1 細胞對 G418 不具抗性，利用此特性可選用 G418 作為篩選條件，因成功轉殖質體的細胞因可對抗 G418，不帶有質體的細胞株則會被毒殺，從而保留成功轉殖的細胞株。

因此首先測試一般情況下 CHO-K1 對 G418 之耐受性，細胞於 24 孔盤的滿度達至 80% 時，分別給予細胞 400、500、600、700、800、900、1,000 ng/mL G418 的 Ham's F-12，以及沒有加入 G418 之對照組，每隔兩天更換一次新的培養基，觀察以 G418 處理不同天數後 CHO-K1 的存活率。CHO-K1 以 G418 處理後的存活率如圖八所示，結果顯示以 400 ng/mL G418 處理七天後仍有細胞存活，若以 600 ng/mL、800 ng/mL 或 1,000 ng/mL G418 處理皆可於七天後將細胞完全殺死，最後選定 800 ng/mL G418 處理七天為篩選條件。

細胞在轉染質體 24 小時後以極稀的細胞數目繼代，同時以 G418 進行篩選，細胞在篩選五天後會開始形成單一聚落(colony)，進行至第十天時在螢光顯微鏡的觀察下，找出成功轉殖質體的 colony，挑選至 96 孔盤中繼續培養，待細胞數足夠時把細胞繼代至 24 孔盤、12 孔盤，逐漸放大至 10 cm 培養皿後冷凍保存，期間一直使用 800 ng/mL G418 的 Ham's F-12 培養。



圖八、不同濃度之 G418 處理不同天數後對 CHO-K1 的毒殺效應

以(A) 不加入 G418 之控制組 (B) 400 ng/ml (C) 800 ng/ml (D) 1,000 ng/ml G418 處理 CHO-K1 一天、五天及七天之結果。比例尺為 200 μm 。

Figure 8. Evaluation of the cytotoxicity of G418 at different concentration and different time points

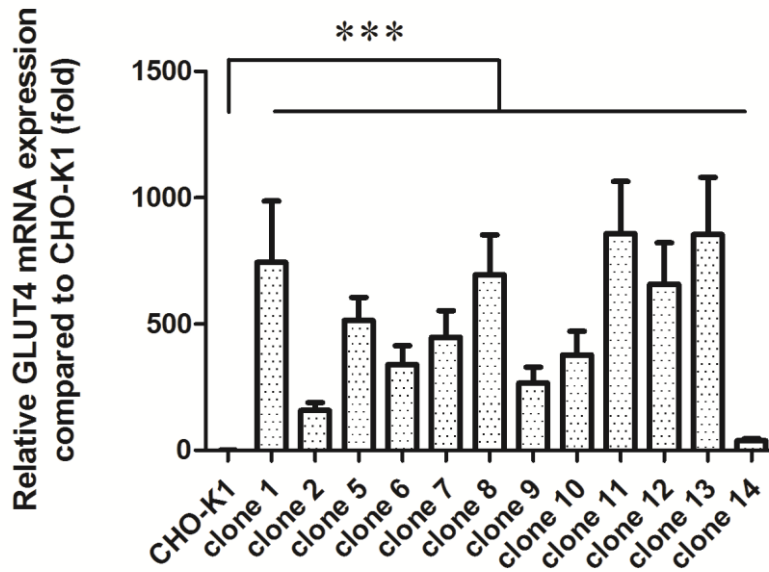
(A) A control group without G418 treatment (B) 400 ng/ml (C) 800 ng/ml (D) 1,000 ng/ml G418 were treated to CHO-K1 for 1 day, 5 days and 7 days. Scale bar represents 200 μm .

5. pcDNA3-mycG4eGFP 於 CHO-K1 中表現效率的比較

在 G418 的篩選下，最後成功挑選的 clone 共 12 株，分別命名為 clone 1, 2, 5, 6, 7... 14，由於質體經抗生素篩選後在細胞內會有不同的表現效率，為了比較它們表現量的差異，以 RT-qPCR 對 GLUT4 mRNA 進行定量，其結果如圖九所示，轉殖 pcDNA3-mycG4eGFP 後的細胞株之 GLUT4 mRNA 表現量與 CHO-K1 相比皆有顯著的提高。

同時為了確認挑選到的 clone 皆為單一來源，利用流式細胞儀可以收集每顆細胞螢光訊號的特性來分析 CHO-K1 clone，並從中選擇表現量較高的殖株作為後續實驗所用。各個 clone 的螢光強度如圖十與附圖十所示，由於 clone 1 與 clone 2 的螢光分佈與其它 clone 較不一致，因此把 clone 1、clone 2 和 clone 5 分別與 CHO-K1 的結果進行比較後如圖十一所示。雖然從圖十的量化結果中可看到 CHO-K1 clone 的螢光強度與沒有轉殖質體的 CHO-K1 相比有明顯的統計差異，但從 clone 1 與 clone 2 的結果顯示，儘管細胞株經過 G418 篩選，仍然有可能選到非單一來源的細胞株。

綜合上述結果，除了 clone 1 與 clone 2 的螢光訊號分佈較不集中，其它 clone 的螢光強度與分佈大致相似，最後選擇 clone5 作為後續平台確效之用。

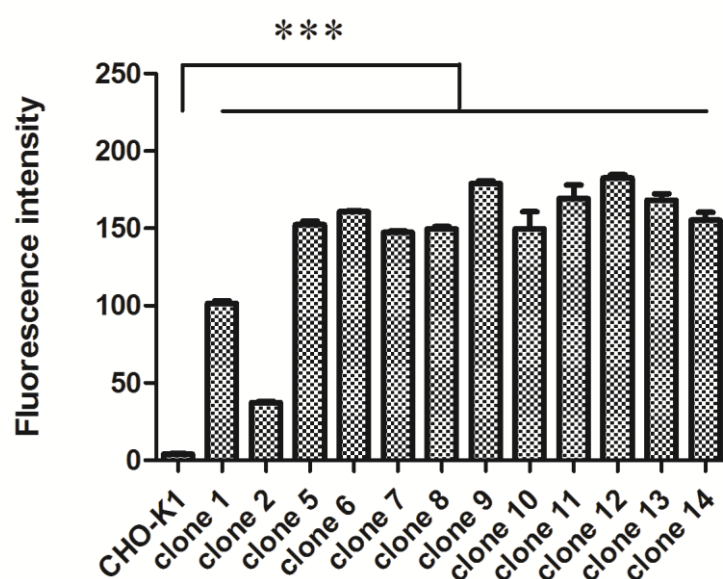


圖九、CHO-K1 clone 與 CHO-K1 的 GLUT4 mRNA 相對表現量

細胞抽取 RNA 後以 RT-qPCR 檢測其 GLUT4 的 mRNA 表現量，與 18S RNA 比較後計算與 CHO-K1 的相對值。實驗結果以平均值±標準差所示，並利用 Student's t-test 比較與兩者間差異，以*** 表示統計上具有顯著差異的組別 ($p < 0.0001$)。

Figure 9. Expression of GLUT4 mRNA relative to CHO-K1

Total RNA was extracted and GLUT4 expression of each clone was measured by RT-qPCR. Relative expression is calculated by normalizing with 18S RNA and compared to CHO-K1. Data presented as mean \pm SD. Results were analyzed by Student's t-test. Statistical significance is indicating with *** ($p < 0.0001$).

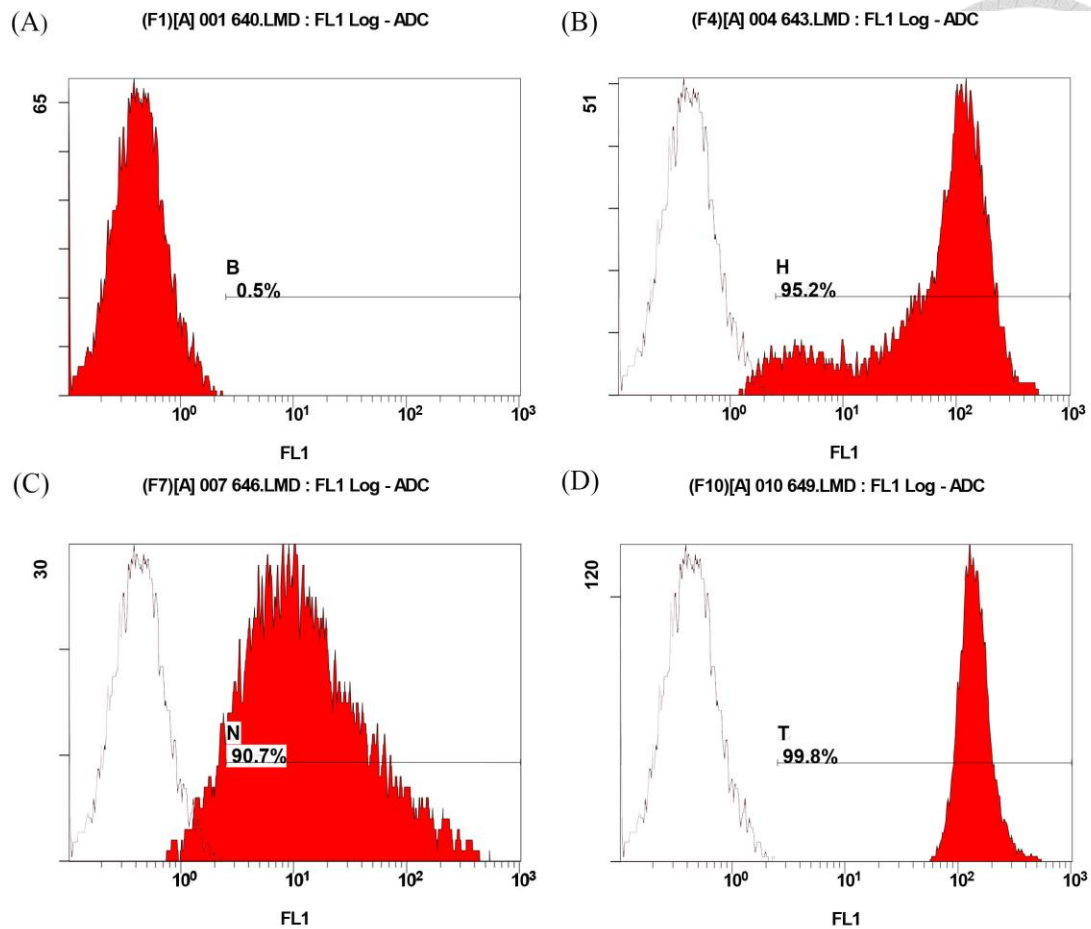


圖十、CHO-K1 clone 於 525 nm 下的螢光強度

流式細胞儀分析結果以平均值±標準差所示，並以 Student's t-test 比較 clone 與 CHO-K1 的差異，以*** 表示統計上具有顯著差異 ($p < 0.0001$)。

Figure 10. Fluorescence intensity of CHO-K1 clone under the detection of 525 nm

The results of flow cytometry were presented as mean \pm SD of each sample, analyzed by Student's t-test. Statistical significance is indicating with *** ($p < 0.0001$).



圖十一、CHO-K1 clone 的 pcDNA3-mycG4eGFP 螢光表現量


於 525 nm 下偵測(A) CHO-K1 (B) clone1 (C) clone2 (D) clone5 的螢光訊號，每張圖為分析 10,000 顆細胞的結果。

Figure 11. Fluorescence performance of pcDNA3-mycG4eGFP expression with different clones

Fluorescence intensity of (A) CHO-K1 (B) clone1 (C) clone2 (D) clone5, under the detection of 525 nm. Each graph represents 10,000 cells.

二、CHO-K1 平台確效

1. GLUT4 重組蛋白的轉運作用



TIRFM 的特點是可以激發位於細胞膜附近的螢光訊號，而細胞內部的螢光物質因不會受到激發而不會被觀察到，可以利用在觀察細胞膜 GLUT4 的訊號。由於後續需要利用 TIRFM 來確認 GLUT4 轉位的情況，因此分別對 CHO-K1 以及 clone 5 利用冰甲醇固定後，進行免疫螢光染色後於螢光顯微鏡下觀察，以確認 anti-Myc tag 抗體可以辨認到質體表現的 Myc。因為冰甲醇會使細胞膜上形成孔洞，此時抗體可以穿過細胞膜與細胞內的蛋白質結合，圖十二為 CHO-K1 與 clone 5 在明視野與螢光顯微鏡下的影像，綠色螢光與紅色螢光分別代表質體所表現的 GLUT4-eGFP 與利用抗體辨認之 Myc。從 eGFP 的螢光結果顯示，在使用 G418 篩選後的殖株可以穩定表現 pcDNA3-mycG4eGFP，且 anti Myc-tag 可以辨認質體所表現的 Myc。

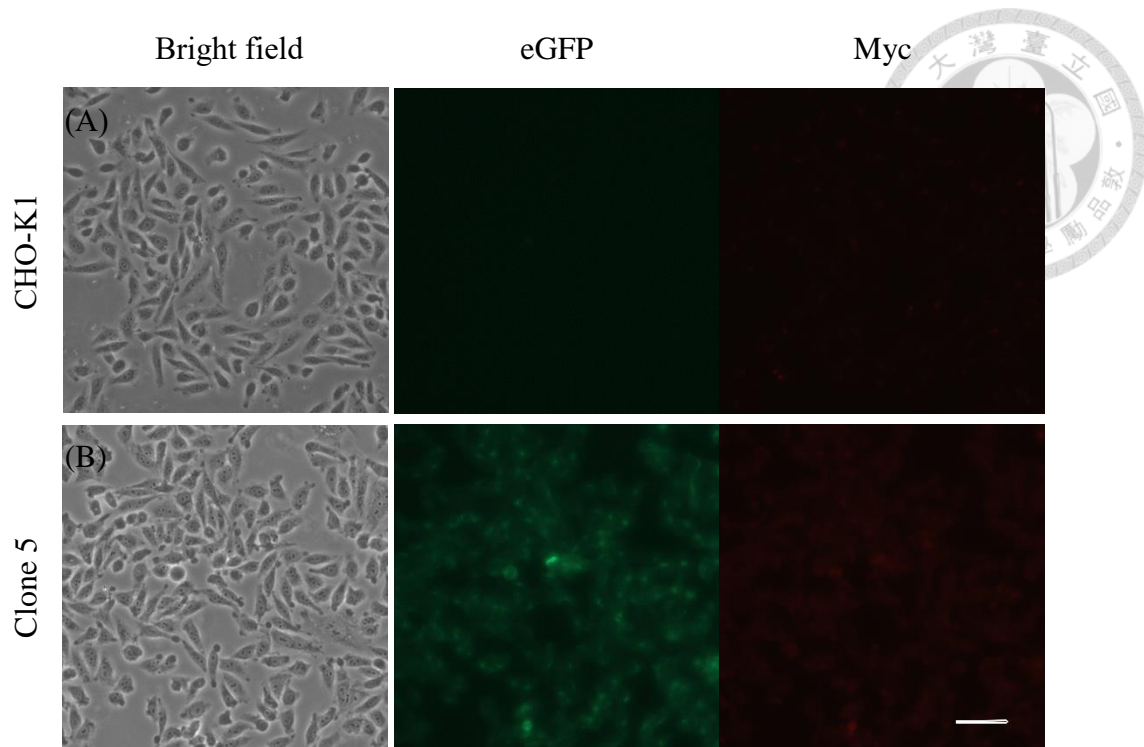
在免疫螢光染色法中常見的細胞固定方法包括使用甲醇或其它有機溶劑使細胞脫水，這些有機溶劑一般會引起細胞膜脂質的擾動(perturbation)，使細胞膜透化(permeabilization)，另一種固定方式是使用交聯劑(cross-linking reagents)，但是交聯劑僅在高濃度下才會對細胞膜造成影響，若要達到有效的透化，需要使用第二種溶劑以增加細胞膜的通透性。但由於我們要觀察的對象是位於細胞膜上的 GLUT4，因此在利用 TIRFM 觀察時，選用對細胞膜結構影響較小的 Paraformaldehyde 進行固定。

接下來為了證明 CHO-K1 clone 表現的 GLUT4 重組蛋白能夠在胰島素的誘導下轉運至細胞膜上，分別以 0、0.1 與 1 μM insulin 誘導細胞 20 分鐘後，更換成不含血清的 Ham's F-12 培養 30 分鐘，接著以 4% Paraformaldehyde 固定，因 GLUT4-eGFP 轉運到細胞膜後，Myc 位於細胞膜外，因此能被抗體辨認，可以 anti Myc-tag 進行免疫螢光染色。隨後在 TIRFM 下觀察，以確認是否能以 eGFP 作為後續判斷 GLUT4 轉運到細胞

膜上的依據。我們分別拍攝入射光在全內反射的情況，與入射光垂直穿透細胞下的影響，結果如圖十三所示，TIRF 代表入射光發生全內反射，此時只有位於細胞膜附近的螢光訊號被激發，在沒有給予胰島素處理的組別中，沒有觀察到 GLUT4-eGFP 的螢光訊號，顯示 GLUT4 沒有發生轉位的現象，而在 0.1 μM 和 1 μM insulin 的處理下，皆可觀察到 GLUT4-eGFP 的轉位。同時在 100 nM wortmannin 預處理 30 分鐘後，相較於 0.1 μM 和 1 μM insulin 誘導的組別，GLUT4 轉運至細胞膜上的數量明顯下降，顯示胰島素能透過 PI3K 來調控 GLUT4 的轉位。

eGFP 和 Myc 的影像則是在入射光垂直穿透細胞的模式下所拍攝，分別代表細胞內的 GLUT4 數量和細胞膜上的 GLUT4 數量。

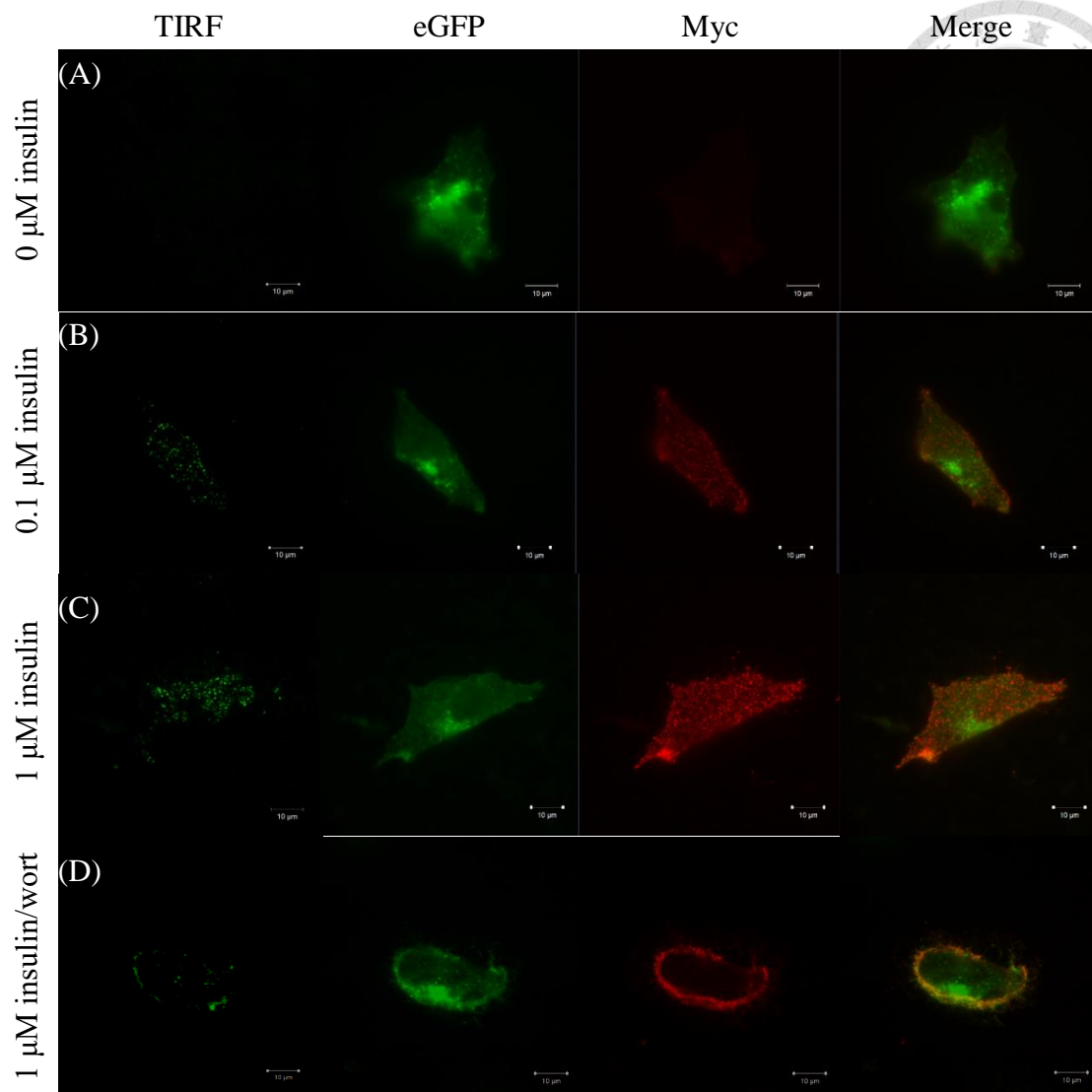
圖十四為圖十三利用軟體進行量化後，分別計算 TIRF/eGFP 與 Myc/eGFP 的比例，從 0 μM insulin 的結果顯示，TIRF 比 Myc 有較低的背景值。而在以胰島素處理的組別中，TIRF 與 Myc 的結果皆顯示在 1 μM insulin 誘導下，細胞膜上的 GLUT4 數量顯著提高，以 0.1 μM insulin 誘導後雖然有上升的趨勢，但未達顯著差異。證實在此細胞平台下，GLUT4 重組蛋白可受胰島素誘導後轉運到細胞膜上，並且胰島素的濃度與細胞膜上 GLUT4 的數量呈現正相關。



圖十二、CHO-K1 細胞與 clone 5 於明視野下與不同波長雷射光激發後之影像。經 G418 篩選後之 clone 可以表現 pcDNA3-mycG4eGFP 質體而發出綠色螢光，並且可被抗體被認。一次抗體為 anti-Myc tag antibody 以 1：500 稀釋，二次抗體為 Alexa Fluor 594 Goat anti-Rabbit antibody 以 1：300 稀釋。(A) CHO-K1 細胞與 (B) clone 5。比例尺為 200 μm 。

Figure 12. Images of CHO-K1 cell and clone 5 under bright field and excited with different laser respectively

The cells were selected with G418 and after the day of transfection. The stable clone expresses pcDNA3-mycG4eGFP with green fluorescence. Cells were incubated with primary anti-Myc antibody (1:500) followed by Alexa Fluor 594 Goat anti-Rabbit IgG secondary antibody (1:300). (A) CHO-K1 cells. (B) Clone 5. Scale bar represents 200 μm .

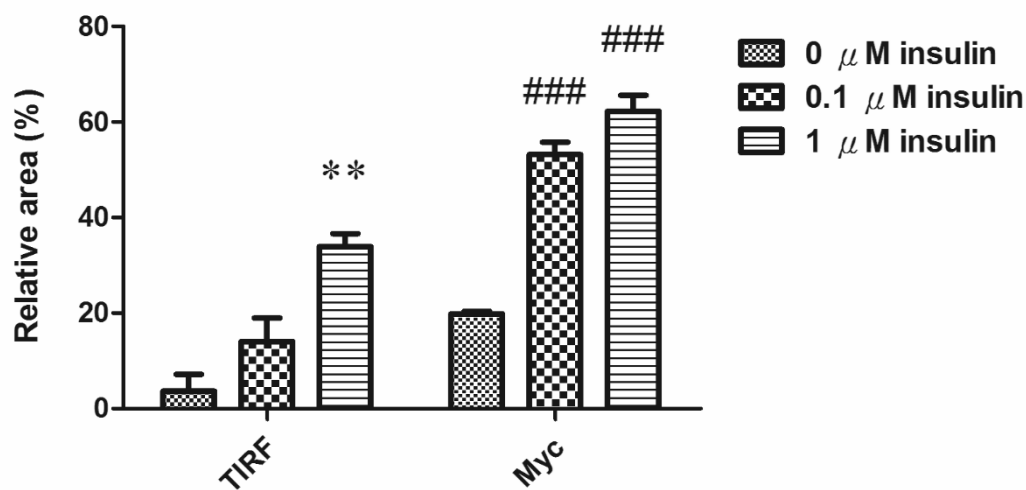


圖十三、以不同濃度胰島素處理 CHO-K1 clone 5 後之細胞影像

分別給予 clone 5 (A) 0 μM (B) 0.1 μM (C) 1 μM insulin (D) 1 μM insulin /wort 20 分鐘，進行固定與免疫螢光染色後拍攝的細胞影像。一次抗體為 anti-Myc tag antibody 以 1 : 500 稀釋，二次抗體為 Alexa Fluor 594 Goat anti-Rabbit antibody 以 1 : 300 稀釋。比例尺為 10 μm 。

Figure 13. Images of CHO-K1 clone 5 under various insulin concentration

Clone 5 were treated with (A) 0 μM (B) 0.1 μM (C) 1 μM insulin respectively. Images were captured after fixation and immunofluorescence staining. Cells were incubated with primary anti-Myc antibody (1:500) followed by Alexa Fluor 594 Goat anti-Rabbit IgG secondary antibody (1:300). Scale bar represents 10 μm .



圖十四、螢光分佈面積比例

TIRF 與 Myc 的螢光分佈面積以 Zen 軟體分析後，計算其與 eGFP 面積的比例。實驗結果以平均值 \pm 標準差所示，並利用 One-way ANOVA 與 Tukey 事後檢定比較差異，以** 表示在統計上與 TIRF - 0 μ M 具有顯著差異的組別 ($p < 0.001$)，### 表示統計上與 Myc - 0 μ M 具有顯著差異的組別 ($p < 0.0001$)。

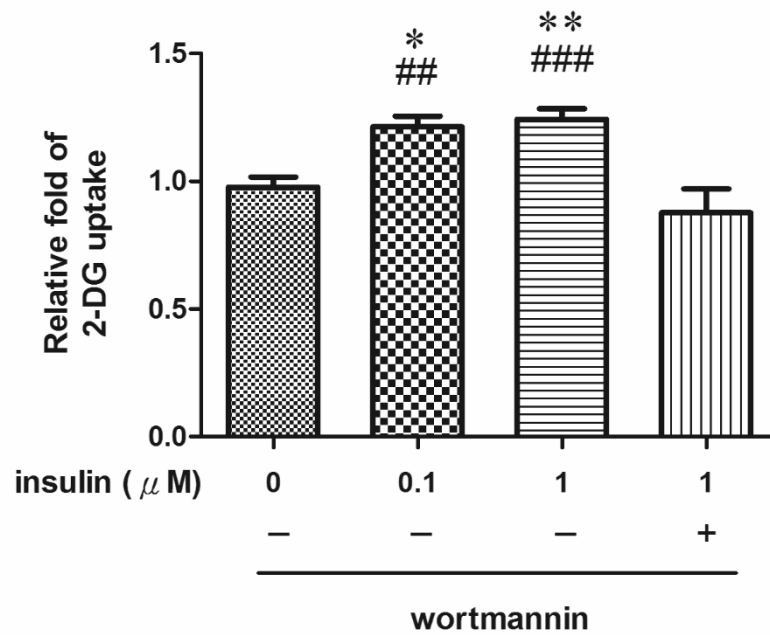
Figure 14. Fluorescence distribution ratio

The fluorescence area of TIRF and Myc were analyzed with Zen. The results represented the relative ratio of TIRF/eGFP and Myc/eGFP, showed in mean \pm SD, and were analyzed by One-way ANOVA followed by Tukey's test. Statistical significance with TIRF - 0 μ M is indicating with ** ($p < 0.001$), or Myc - 0 μ M indicating with ### ($p < 0.0001$).

2. 以 2-DG 探討 GLUT4 轉位與葡萄糖攝取的相關性

在確認 CHO-K1 clone 所表現之 GLUT4 重組蛋白可以受到胰島素的調控後，為了確認此平台下 GLUT4 的轉位與葡萄糖攝取具有相關性，與常用於檢測葡萄糖攝取的方法—2-DG 比較，並檢測在不同處理下，clone5 的葡萄糖攝取表現與 GLUT4 轉位之間的相關性。結果如圖十五所示，在 0.1 μM insulin 誘導下，葡萄糖攝取量比控制組上升 1.21 倍，以及在 1 μM insulin 誘導下上升 1.24 倍，顯示其結果與胰島素濃度呈現正相關。若使用 100 nM wortmannin 預處理 30 分鐘後，相較於 0.1 μM 和 1 μM insulin 誘導的組別，其葡萄糖攝取量顯著下降。綜合圖十三與圖十五的結果，顯示胰島素可透過 PI3K 調控 GLUT4 的轉位，影響細胞的葡萄糖攝取。

同時在 TIRFM 的結果中也顯示細胞膜上的 GLUT4-eGFP 數量會隨著胰島素濃度的上升，推測葡萄糖攝取量上升的現象與 GLUT4 轉位至細胞膜上的數量有關。因此利用 Pearson correlation 分析兩者之間的相關性，得出相關係數(Pearson correlation coefficient, r^2)為 0.659，而 GLUT4 轉位至細胞膜上的數量與胰島素的 r^2 為 0.895，顯示 GLUT4 的轉位與葡萄糖攝取和胰島素濃度皆具有相關性。



圖十五、不同處理下對 clone 5 攝取的葡萄糖影響

以 2-DG 評估 clone 5 的葡萄糖攝取。實驗結果以平均值±標準差所示，並利用 One-way ANOVA 與 Tukey 事後檢定比較差異，以* ($p < 0.05$) 與** ($p < 0.001$) 分別表示統計上與 0 μM insulin 具有顯著差異，## ($p < 0.001$) 與### ($p < 0.0001$) 分別表示統計上與 wortmannin(+) 具有顯著差異。

Figure 15. The effects of different treatments on glucose uptake in clone 5

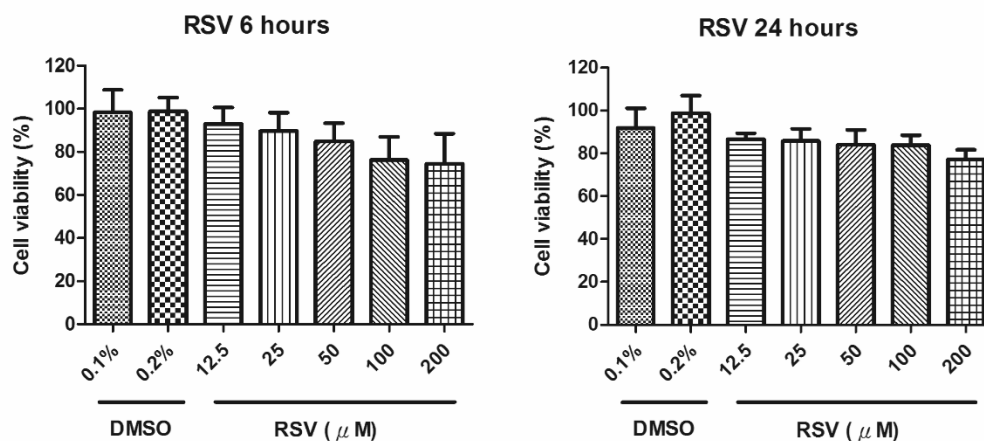
Glucose uptake was measured with 2-DG assay. The results presented as mean \pm SD of each treatment and were analyzed by One-way ANOVA followed by Tukey's test. Statistical significance is indicating with * ($p < 0.05$) or ** ($p < 0.001$) compared to 0 μM insulin. Statistical significance is indicating with ## ($p < 0.001$) or ### ($p < 0.0001$) compared to wortmannin (+).

3. 偵測具促進 GLUT4 轉運之潛力物質的應用

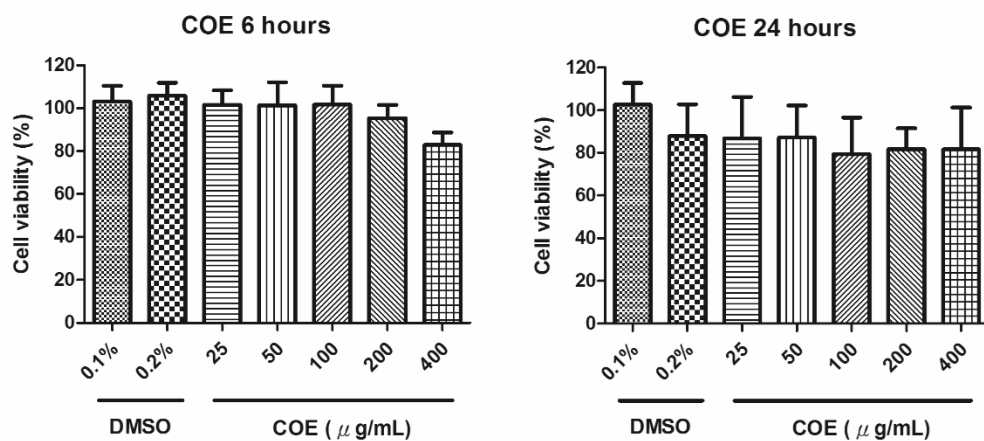
為了確認後續可利用此細胞平台來篩選可增加葡萄糖攝取潛力的化合物，分別以白藜蘆醇(Resveratrol, RSV) 與中國橄欖萃取物(Chinese Olive Extract, COE) 測試此細胞平台的靈敏度。RSV 為已知具有降血糖功效的多酚類物質，且其調控機制與 PI3K/Akt 路徑有關(Breen et al., 2008)，並且有文獻指出 RSV 是透過增加 GLUT4 轉位以增加葡萄糖攝取(Tan et al., 2012)。COE 為中國橄欖的萃取物，本實驗室於其甲醇萃取之乙酸乙酯區分層中發現其具有促進 L6 (林, 2013) 與 3T3-L1 (郭, 2015) 攝取葡萄糖的效果，惟在分子機制上未發現 COE 有增加 GLUT4 轉運的能力。

圖十六為不同濃度 RSV 與 COE 對細胞處理 6 小時和 24 小時後，以 MTT 檢測細胞存活率的結果，分別選用 50 μ M RSV 與 200 μ g/mL COE 作為後續實驗的處理條件，並於 TIRFM 下觀察 GLUT4 轉位的情況，從圖十七的 TIRF 結果顯示，以 RSV 預處理後會促使 GLUT4 的轉運，與前述文獻的論述相符，顯示此細胞平台能夠偵測出具有促進 GLUT4 轉運潛力的物質。

(A)



(B)

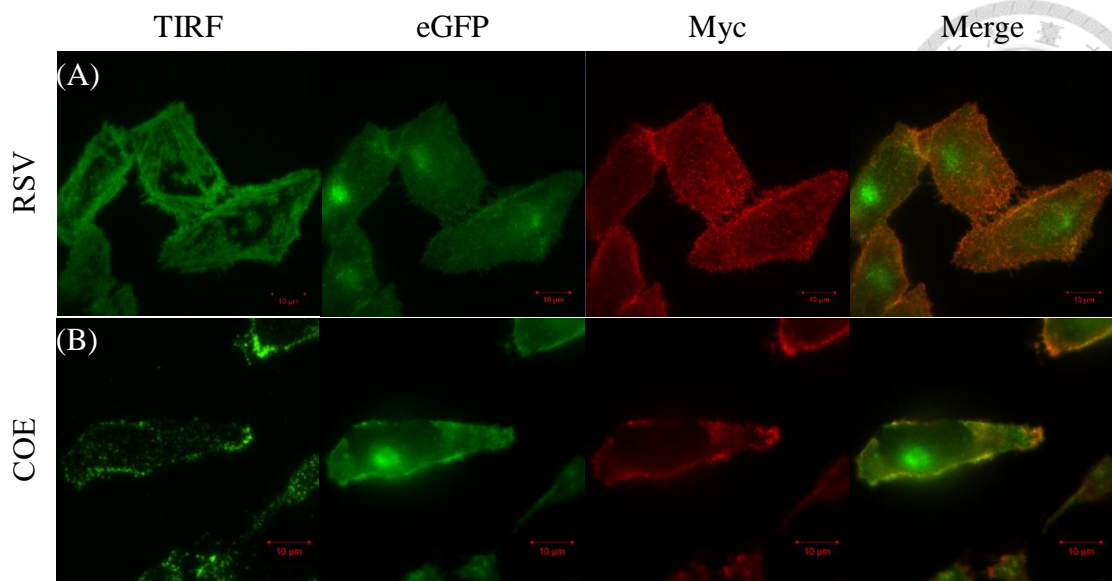


圖十六、RSV 與 COE 對細胞存活率的影響

利用 MTT 檢測探討(A) RSV 與 (B) COE 分別以不同濃度處理細胞 6 小時與 24 小時後對細胞存活率的影響。

Figure 16. The effects on cell viability of RSV and COE

Using MTT to Evaluate the effects on cell viability of (A) RSV or (B) COE under different concentration with 6 hours and 24 hours.




圖十七、以 RSV 與 COE 處理 CHO-K1 clone 5 後之細胞影像

以 (A) 50 μM RSV 與 (B) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ COE 進行預處理後，以免疫螢光染色後拍攝的細胞影像。一次抗體為 anti-Myc tag antibody 以 1 : 500 稀釋，二次抗體為 Alexa Fluor 594 Goat anti-Rabbit antibody 以 1 : 300 稀釋。比例尺為 10 μm 。

Figure 17. Images of CHO-K1 clone 5 after the pretreatment of RSV and COE

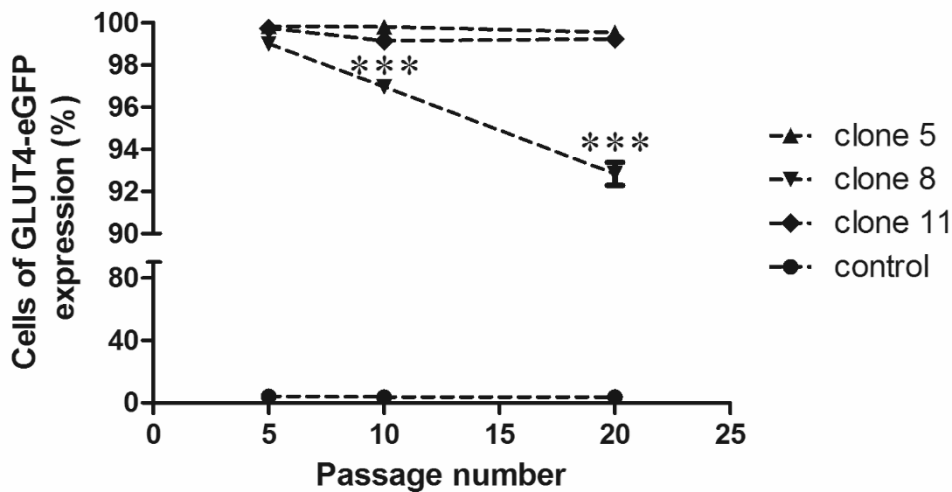
Clone 5 were pretreated with (A) 50 μM RSV and (B) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ COE respectively. Images were captured after fixation and immunofluorescence staining. Cells were incubated with primary anti-Myc antibody (1:500) followed by Alexa Fluor 594 Goat anti-Rabbit IgG secondary antibody (1:300). Scale bar represents 10 μm .

4. CHO-K1 平台於不同代數下的穩定度



接下來為了確認此細胞平台的穩定度，即 CHO-K1 clone 在一定代數內，質體表現之螢光強度不會隨著細胞老化而減少，確保不會因為細胞老化使質體表現下降而造成平台的靈敏度降低。因此隨機選擇三個 clone 在沒有添加 G418 的培養基下進行繼代培養，並在 pn+5、pn+10 以及 pn+20 這三個代數時分別以流式細胞儀分析其螢光強度，其結果如圖十八與附圖十一所示，clone 5 與 clone 11 在 pn+20 仍然保持穩定的螢光強度與分佈。而 clone 8 在 pn+5 時已經有一部份細胞的螢光強度比較弱，並且其數量會隨著繼代的時候放大，推測可能的原因是質體沒有插入(integrate) CHO-K1 的染色體中，因此在沒有使用抗生素的情況下繼代，質體不會隨著細胞一起複製，造成沒有質體的細胞數目愈來愈多。另外基於其螢光強度比沒有質體的 CHO-K1 強，推測另一個可能的原因是 clone 8 為非單一來源的細胞株。

綜合以上，clone 5 與 clone 11 在沒有抗生素的培養基持續培養下，其螢光強度與分佈能夠穩定的表現，不會影響 TIRFM 的觀察，反之 clone 8 因為其螢光分佈並不穩定，不適用於作為篩選平台。



圖十八、細胞代數對 pcDNA3-mycG4eGFP 螢光表現量的影響

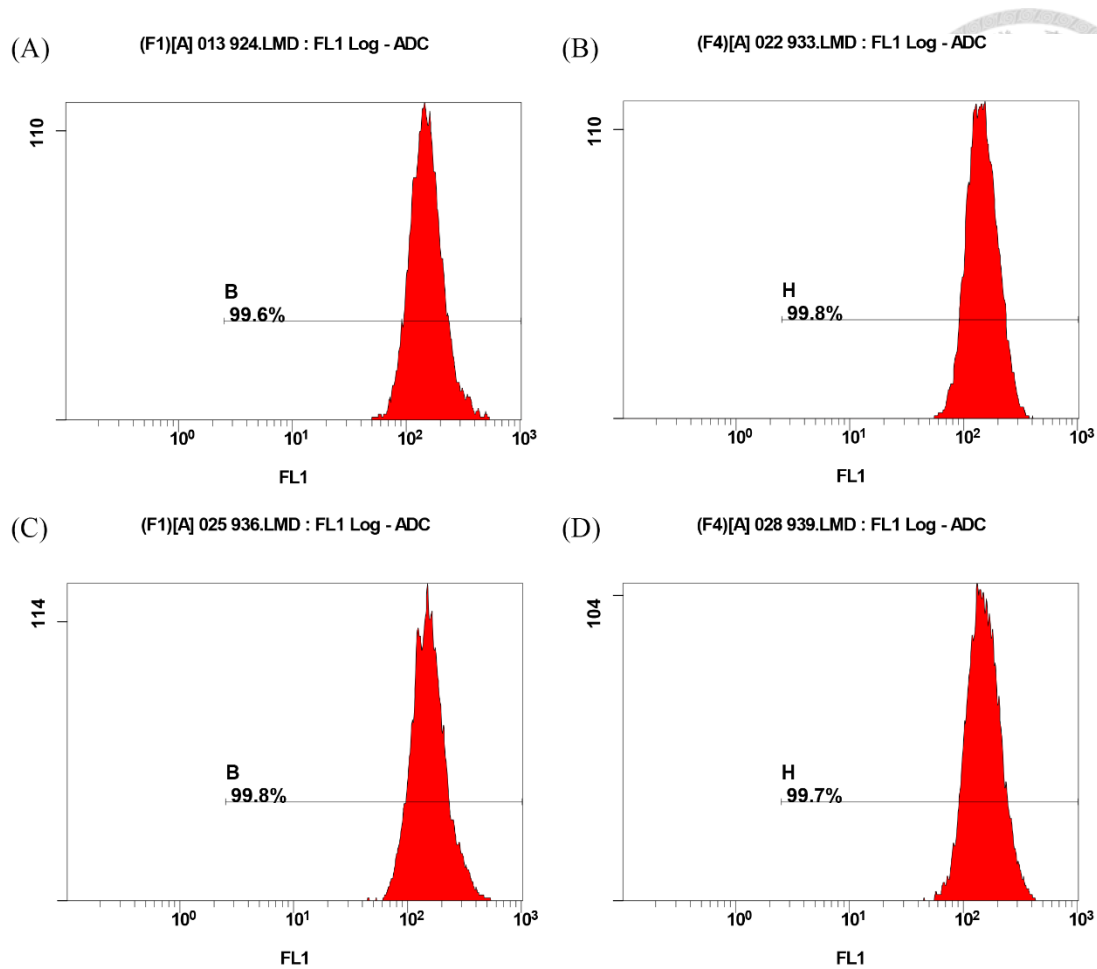
以 525 nm 偵測(A) clone 5 (B) clone 8 (C) clone 11 分別於 pn+5、pn+10 和 pn+20 時的螢光訊號。結果進行量化後以平均值±標準差所示，並以 One-way ANOVA 與 Tukey 事後檢定比較不同代數間之差異，以*** 表示統計上具有顯著差異 ($p < 0.0001$)。

Figure 18. The effects on fluorescence performance of pcDNA3-mycG4eGFP expression at different passage number

Fluorescence intensity of (A) clone 5 (B) clone 8 (C) clone 11 at pn+5, pn+10 and pn+20 under the detection of 525 nm. The results were presented as mean \pm SD of each sample, analyzed by One-way ANOVA followed by Tukey's test. Statistical significance is indicating with *** ($p < 0.0001$).

5. 反覆冷凍解凍對 CHO-K1 平台穩定度的影響

細胞在培養過程會經過冷凍解凍的步驟，為了確認質體的表現量不會受細胞被反覆冷凍解凍所影響，對 clone5 不斷地進行冷凍解凍的過程，細胞從-80°C 解凍後，隔天以繼代培養一次，待細胞滿盤後再進行冷凍，兩天後再重新解凍，重複上述過程四次，並利用流式細胞儀分析細胞的螢光強度，以了解質體的表現會否受冷凍解凍的次數影響。圖十九結果為 clone 5 分別冷凍解凍 1-4 次後的螢光表現量，顯示質體的表現量在冷凍解凍 4 次後與冷凍解凍一次之間沒有明顯差異。



圖十九、反覆冷凍解凍對 pcDNA3-mycG4eGFP 螢光表現量的影響

以 525 nm 偵測 clone 5 在經過冷凍解凍(A) 一次 (B) 兩次 (C) 三次 (D) 四次後的螢光訊號，每張圖為分析 10,000 顆細胞的結果。

Figure 19. The effect of freeze/thaw cycles on the stability of the fluorescence performance of pcDNA3-mycG4eGFP

Fluorescence intensity of clone 5 after freeze/thaw cycles by (A) once (B) twice (C) third times (D) fourth times. Each graph represents 10,000 cells under the detection of 525 nm.

第六章 結論

本研究已成功利用 CHO-K1 建立可檢測 GLUT4 轉位之細胞平台，在胰島素誘導下可促進細胞的葡萄糖攝取，並證實 GLUT4 的轉位與胰島素濃度呈正相關。此平台有別於傳統免疫螢光染色的方法，不需要經過免疫染色的步驟，便可以快速獲取 GLUT4 轉位的資訊，同時可以利用平台的結果對 GLUT4 調控機制進行簡單的探討，並且適用於觀察活細胞的影像。後續應再深入探討影響葡萄糖攝取之因子，以增加平台的靈敏度。另一方面，可嘗試模擬糖尿病的現象，對平台進行胰島素阻抗的誘導，利用糖尿病藥物作為正控制組，檢測 GLUT4-eGFP 轉運到細胞膜上的數量。若能成建立胰島素阻抗的模式，可使此平台的應用範圍更為廣泛。



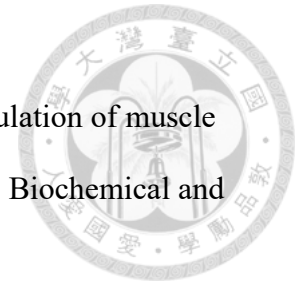
第七章 參考文獻

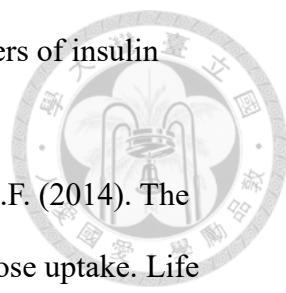


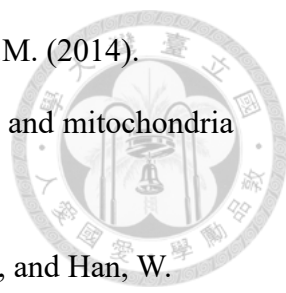
1. 林孟儒。2013。中國橄欖甲醇萃取－乙酸乙酯區分層之促葡萄糖攝取功效探討。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。台北
2. 郭靜如。2015。中國橄欖甲醇萃取－乙酸乙酯區分層對 3T3-L1 葡萄糖攝取之功效與機制探討。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。台北
3. 衛生福利部國民健康署。2016。105 年代謝症候群學習手冊
4. Adeniyi, A., Idowu, O., Ogwumike, O., and Adeniyi, C. (2012). Comparative Influence of Self-Efficacy, Social Support and Perceived Barriers on Low Physical Activity Development in Patients with Type 2 Diabetes, Hypertension or Stroke. *Ethiopian journal of health sciences* 22.
5. American Diabetes, A. (2015). Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 38 *Suppl*, S8-S16.
6. Armstrong, M.J., Hull, D., Guo, K., Barton, D., Hazlehurst, J.M., Gathercole, L.L., Nasiri, M., Yu, J., Gough, S.C., and Newsome, P.N. (2016). Glucagon-like peptide 1 decreases lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of hepatology* 64, 399-408.
7. Augustin, R. (2010). The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life* 62, 315-333.
8. Berenguer, M., Martinez, L., Giorgetti-Peraldi, S., Le Marchand-Brustel, Y., and Govers, R. (2010). A serum factor induces insulin-independent translocation of GLUT4 to the cell surface which is maintained in insulin resistance. *PLoS One* 5, e15560.
9. Boden, G., Homko, C., Barrero, C.A., Stein, T.P., Chen, X., Cheung, P., Fecchio, C., Koller, S., and Merali, S. (2015). Excessive caloric intake acutely causes oxidative stress, GLUT4 carbonylation, and insulin resistance in healthy men.


Science translational medicine 7, 304re307-304re307.

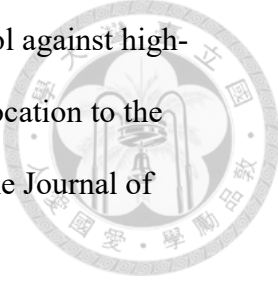
10. Breen, D.M., Sanli, T., Giacca, A., and Tsiani, E. (2008). Stimulation of muscle cell glucose uptake by resveratrol through sirtuins and AMPK. *Biochemical and biophysical research communications* 374, 117-122.
11. Cerf, M.E. (2013). Beta cell dysfunction and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4, 37.
12. Cura, A.J., and Carruthers, A. (2012). Role of monosaccharide transport proteins in carbohydrate assimilation, distribution, metabolism, and homeostasis. *Compr Physiol* 2, 863-914.
13. Donath, M.Y., and Shoelson, S.E. (2011). Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 11, 98-107.
14. Fang, P., Shi, M., Zhu, Y., Bo, P., and Zhang, Z. (2016). Type 2 diabetes mellitus as a disorder of galanin resistance. *Exp Gerontol* 73, 72-77.
15. Fang, Y. (2015). Total internal reflection fluorescence quantification of receptor pharmacology. *Biosensors (Basel)* 5, 223-240.
16. Govers, R., Coster, A.C., and James, D.E. (2004). Insulin increases cell surface GLUT4 levels by dose dependently discharging GLUT4 into a cell surface recycling pathway. *Mol Cell Biol* 24, 6456-6466.
17. Guggenheim, E.J., Lynch, I., and Rappoport, J.Z. (2017). Imaging In focus: Reflected light imaging: Techniques and applications. *Int J Biochem Cell Biol* 83, 65-70.
18. Hajiaghaalipour, F., Khalilpourfarshbafi, M., and Arya, A. (2015). Modulation of glucose transporter protein by dietary flavonoids in type 2 diabetes mellitus. *Int J Biol Sci* 11, 508-524.
19. Hou, J.C., and Pessin, J.E. (2007). Ins (endocytosis) and outs (exocytosis) of GLUT4 trafficking. *Curr Opin Cell Biol* 19, 466-473.



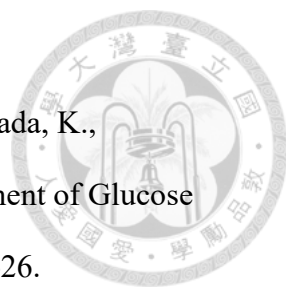
- 
20. Johnson, A.M., and Olefsky, J.M. (2013). The origins and drivers of insulin resistance. *Cell* 152, 673-684.
21. Joseph, D., Kimar, C., Symington, B., Milne, R., and Essop, M.F. (2014). The detrimental effects of acute hyperglycemia on myocardial glucose uptake. *Life Sci* 105, 31-42.
22. Kanwal, A., Singh, S.P., Grover, P., and Banerjee, S.K. (2012). Development of a cell-based nonradioactive glucose uptake assay system for SGLT1 and SGLT2. *Anal Biochem* 429, 70-75.
23. Kaur, J. (2014). A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiology research and practice*.
24. Kim, S.H., Shin, E.-J., Kim, E.-D., Bayaraa, T., Frost, S.C., and Hyun, C.-K. (2007). Berberine activates GLUT1-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 30, 2120-2125.
25. Kishi, K. (1998). Bradykinin Directly Triggers GLUT4 Translocation Via an Insulin-Independent Pathway. *Diabetes* 47, 550-558.
26. Lai, Y.C., Liu, Y., Jacobs, R., and Rider, M.H. (2012). A novel PKB/Akt inhibitor, MK-2206, effectively inhibits insulin-stimulated glucose metabolism and protein synthesis in isolated rat skeletal muscle. *Biochem J* 447, 137-147.
27. Lanzerstorfer, P., Stadlbauer, V., Chtcheglova, L.A., Haselgrubler, R., Borgmann, D., Wruss, J., Hinterdorfer, P., Schroder, K., Winkler, S.M., Hoglinger, O., *et al.* (2014). Identification of novel insulin mimetic drugs by quantitative total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. *Br J Pharmacol* 171, 5237-5251.
28. Leto, D., and Saltiel, A.R. (2012). Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 383-396.
29. Lewis, C.A., Parker, S.J., Fiske, B.P., McCloskey, D., Gui, D.Y., Green, C.R.,

- 
- Vokes, N.I., Feist, A.M., Vander Heiden, M.G., and Metallo, C.M. (2014). Tracing compartmentalized NADPH metabolism in the cytosol and mitochondria of mammalian cells. *Mol Cell* 55, 253-263.
30. Lim, C.Y., Bi, X., Wu, D., Kim, J.B., Gunning, P.W., Hong, W., and Han, W. (2015). Tropomodulin3 is a novel Akt2 effector regulating insulin-stimulated GLUT4 exocytosis through cortical actin remodeling. *Nat Commun* 6, 5951.
31. Lipska, K.J., Bailey, C.J., and Inzucchi, S.E. (2011). Use of metformin in the setting of mild-to-moderate renal insufficiency. *Diabetes Care* 34, 1431-1437.
32. Lo, K.A., Labadorf, A., Kennedy, N.J., Han, M.S., Yap, Y.S., Matthews, B., Xin, X., Sun, L., Davis, R.J., Lodish, H.F., *et al.* (2013). Analysis of in vitro insulin-resistance models and their physiological relevance to in vivo diet-induced adipose insulin resistance. *Cell Rep* 5, 259-270.
33. M Lehnen, A. (2013). Changes in the GLUT4 Expression by Acute Exercise, Exercise Training and Detraining in Experimental Models. *Journal of Diabetes & Metabolism* 01.
34. Miriam Cnop, N.W. (2005). Mechanisms of Pancreatic β -Cell Death in Type 1 and Type 2 Diabetes. *DIABETES* 54, 97-105.
35. Mueckler, M., and Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med* 34, 121-138.
36. Oggioni, C., Lara, J., Wells, J., Soroka, K., and Siervo, M. (2014). Shifts in population dietary patterns and physical inactivity as determinants of global trends in the prevalence of diabetes: An ecological analysis. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 24, 1105-1111.
37. Ojuka, E.O., Goyaram, V., and Smith, J.A. (2012). The role of CaMKII in regulating GLUT4 expression in skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 303, E322-E331.

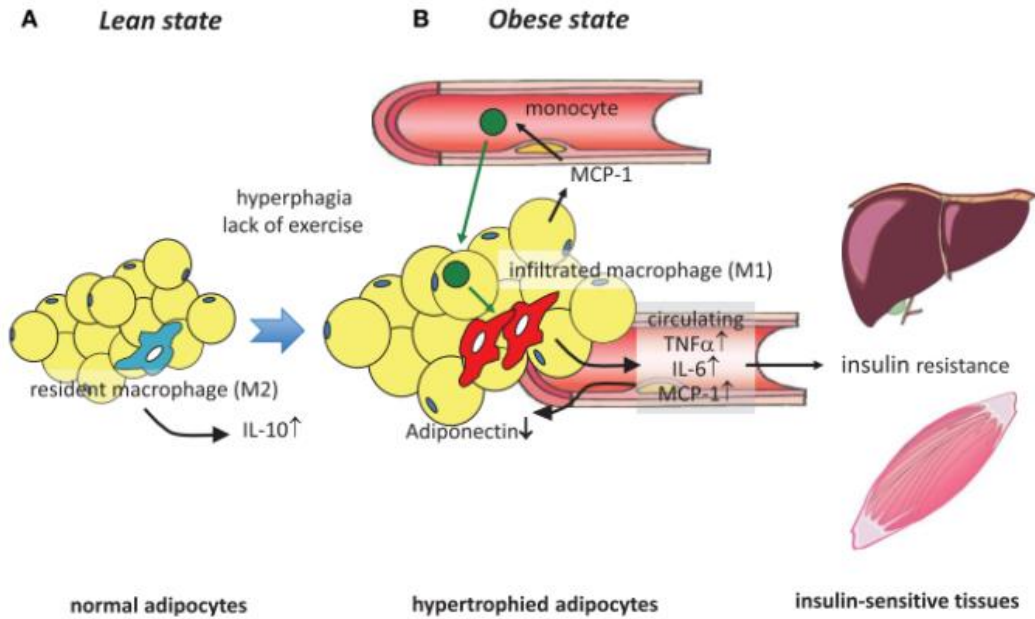
- 
38. Olokoba, A.B., Obateru, O.A., and Olokoba, L.B. (2012). Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Med J* 27, 269-273.
39. Rutter, G. (2004). Visualising insulin secretion. The Minkowski lecture 2004. *Diabetologia* 47, 1861-1872.
40. Samuel, V.T., and Shulman, G.I. (2016). The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest* 126, 12-22.
41. Schnell, S., Schaefer, M., and Schofl, C. (2007). Free fatty acids increase cytosolic free calcium and stimulate insulin secretion from beta-cells through activation of GPR40. *Mol Cell Endocrinol* 263, 173-180.
42. Sears, B., and Perry, M. (2015). The role of fatty acids in insulin resistance. *Lipids in health and disease* 14, 121.
43. Selvi, R., Angayarkanni, N., Asma, B., Seethalakshmi, T., and Vidhya, S. (2010). Amino acids influence the glucose uptake through GLUT4 in CHO-K1 cells under high glucose conditions. *Mol Cell Biochem* 344, 43-53.
44. Stoltzman, C.A., Peterson, C.W., Breen, K.T., Muoio, D.M., Billin, A.N., and Ayer, D.E. (2008). Glucose sensing by MondoA:MLX complexes: a role for hexokinases and direct regulation of thioredoxin-interacting protein expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6912-6917.
45. Taha, C., Tsakiridis, T., McCall, A., and Klip, A. (1997). Glucose transporter expression in L6 muscle cells: regulation through insulin- and stress-activated pathways. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism* 273, E68-E76.
46. Taitt, C.R., Anderson, G.P., and Ligler, F.S. (2016). Evanescent wave fluorescence biosensors: Advances of the last decade. *Biosens Bioelectron* 76, 103-112.
47. Tan, Z., Zhou, L.-J., Mu, P.-W., Liu, S.-P., Chen, S.-J., Fu, X.-D., and Wang, T.-

- 
- H. (2012). Caveolin-3 is involved in the protection of resveratrol against high-fat-diet-induced insulin resistance by promoting GLUT4 translocation to the plasma membrane in skeletal muscle of ovariectomized rats. *The Journal of nutritional biochemistry* 23, 1716-1724.
48. Tangvarasittichai, S. (2015). Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World journal of diabetes* 6, 456.
49. Tateya, S., Kim, F., and Tamori, Y. (2013). Recent advances in obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4, 93.
50. Van Epps-Fung, M., Gupta, K., Hardy, R.W., and Wells, A. (1997). A role for phospholipase C activity in GLUT4-mediated glucose transport. *Endocrinology* 138, 5170-5175.
51. Wood, I.S., and Trayhurn, P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* 89, 3-9.
52. Wurm, F.M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* 22, 1393-1398.
53. Wurm, F.M., and Hacker, D. (2011). First CHO genome. *Nat Biotechnol* 29, 718-720.
54. Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., *et al.* (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 112, 1821-1830.
55. Xu, N., Ou, J., Gilani, A.-K.A., Zhou, L., and Liu, M. (2015). High-level expression of recombinant IgG1 by CHO K1 platform. *Frontiers of Chemical Science and Engineering* 9, 376-380.
56. Yamamoto, N., and Ashida, H. (2012). Evaluation methods for facilitative glucose transport in cells and their applications. *Food Science and Technology*

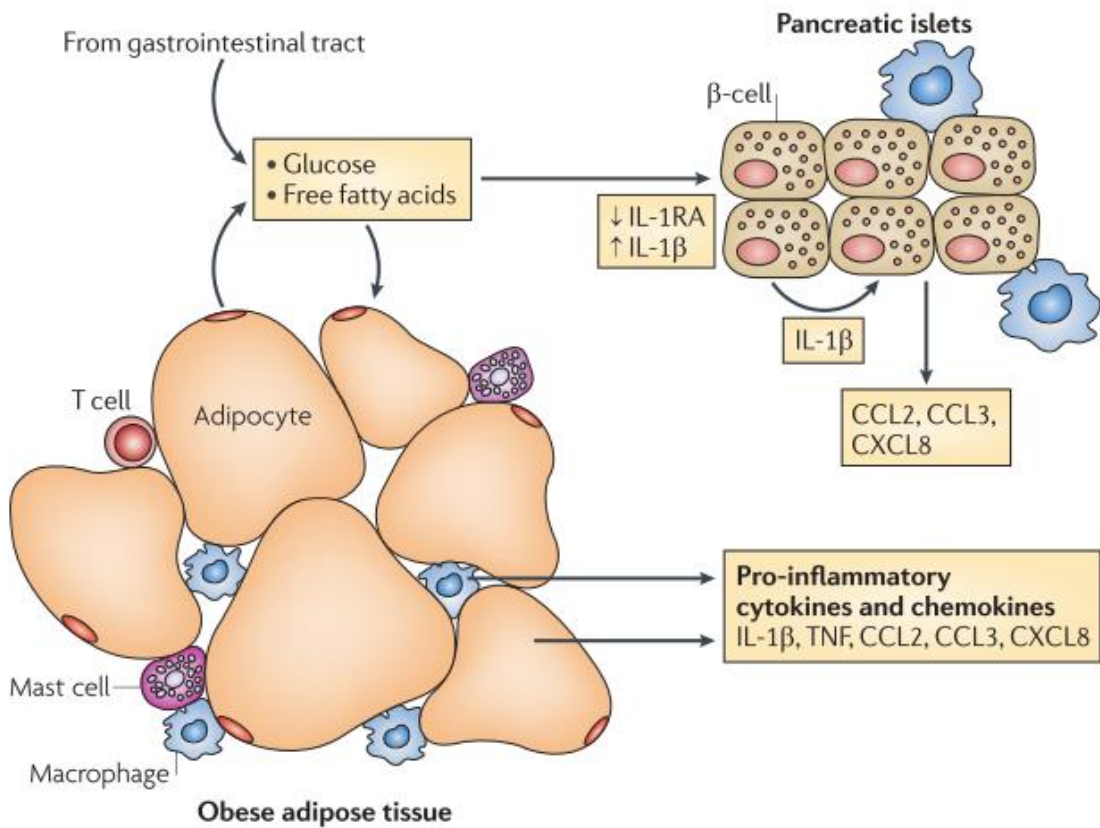
Research 18, 493-503.

- 
57. Yamamoto, N., Ueda-Wakagi, M., Sato, T., Kawasaki, K., Sawada, K., Kawabata, K., Akagawa, M., and Ashida, H. (2015). Measurement of Glucose Uptake in Cultured Cells. *Curr Protoc Pharmacol* 71, 12.14.11-26.
58. Yap, A., Nishiumi, S., Yoshida, K., and Ashida, H. (2007). Rat L6 myotubes as an in vitro model system to study GLUT4-dependent glucose uptake stimulated by inositol derivatives. *Cytotechnology* 55, 103-108.
59. Zhang, Y., Zhang, H., Yao, X.G., Shen, H., Chen, J., Li, C., Chen, L., Zheng, M., Ye, J., Hu, L., *et al.* (2012). (+)-Rutamarin as a dual inducer of both GLUT4 translocation and expression efficiently ameliorates glucose homeostasis in insulin-resistant mice. *PLoS One* 7, e31811.
60. 衛生福利部國民健康署 (2016). 105 年代謝症候群學習手冊.

第八章 附圖

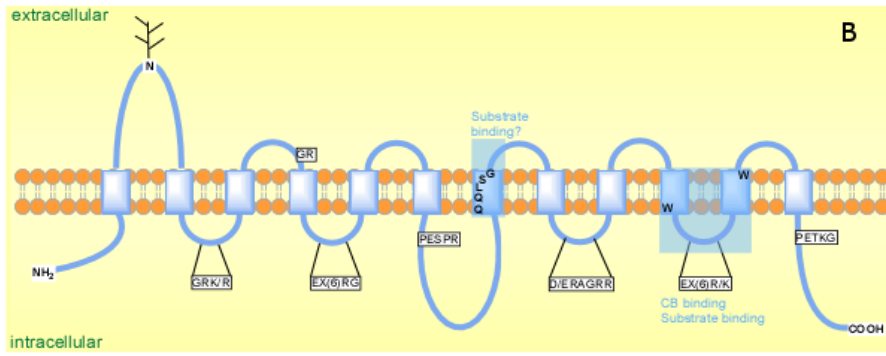


附圖一、胰島素阻抗的誘發途徑(Tateya et al., 2013)

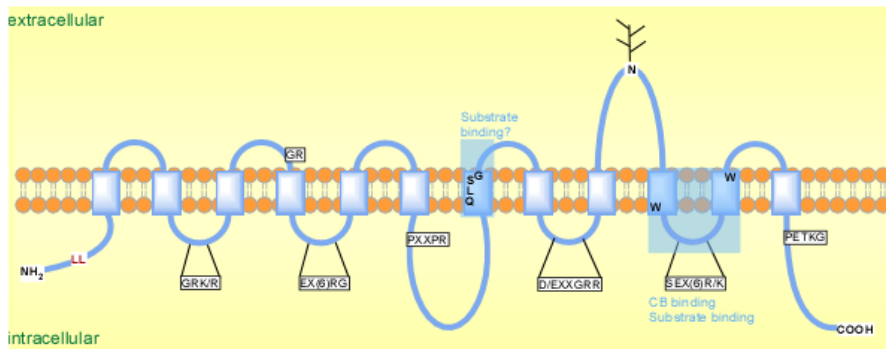


附圖二、脂肪細胞發炎反應(Donath and Shoelson, 2011)

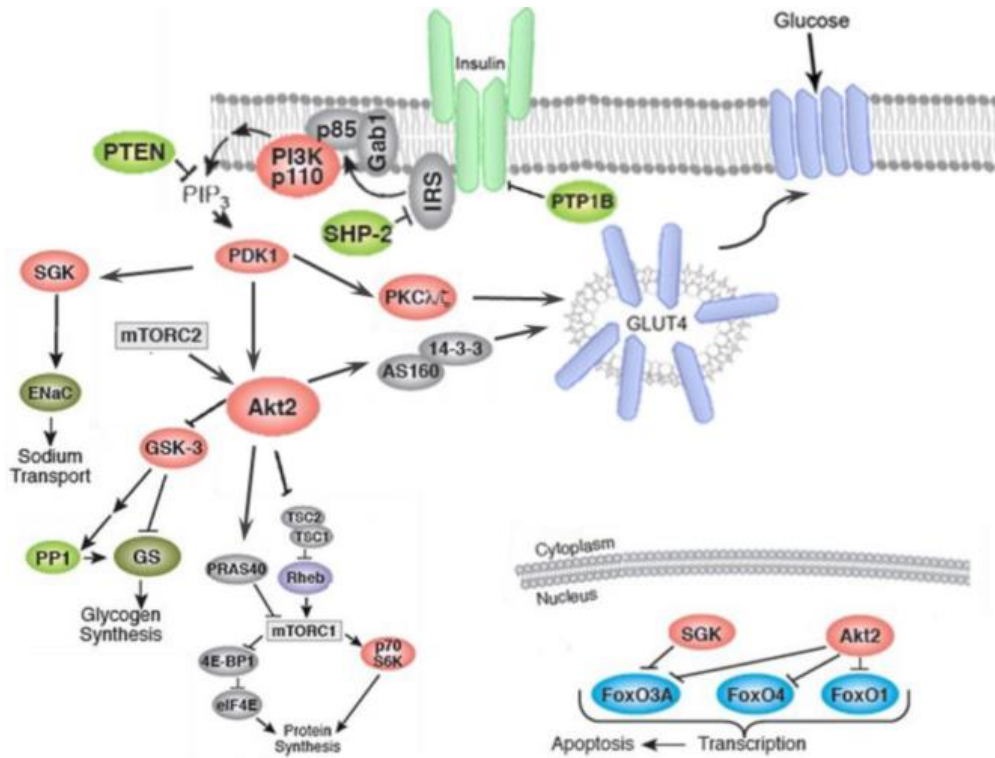
Class I and II family members



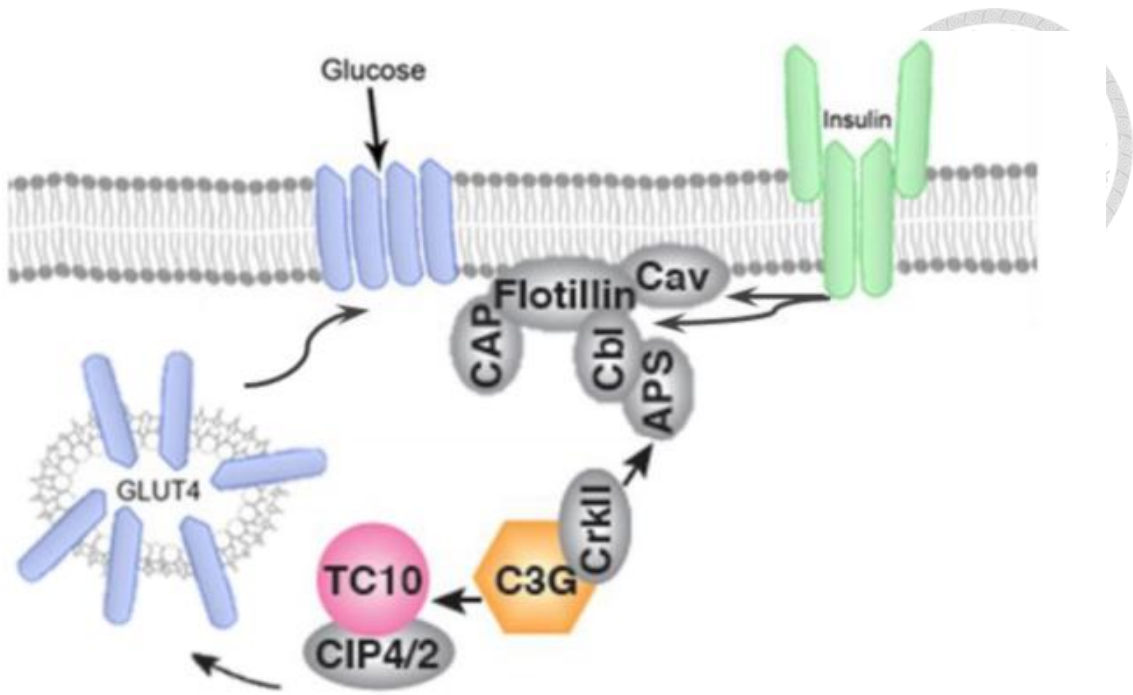
Class III family members



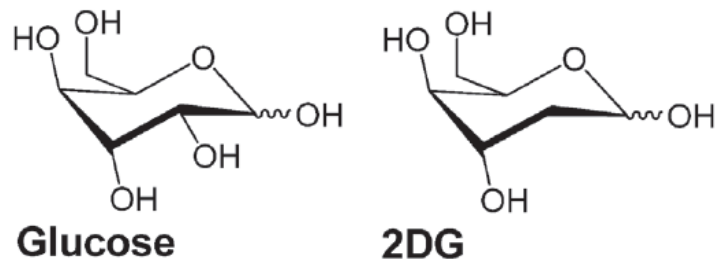
附圖三、GLUT 的穿膜結構特徵(Augustin, 2010)



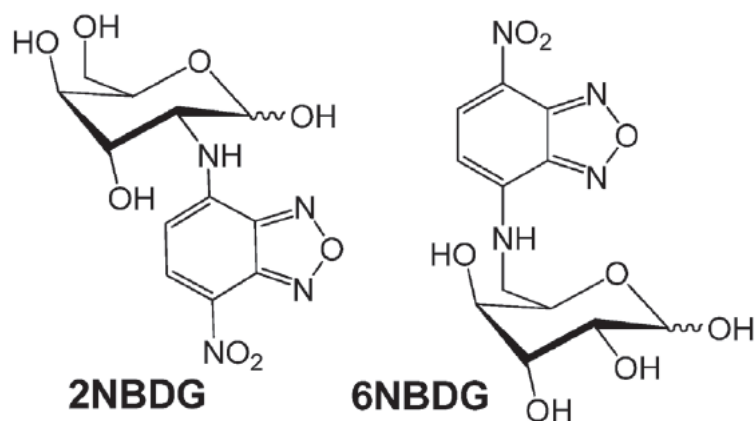
附圖四、胰島素的 PI3K/Akt 訊號傳遞路徑(Hajiaghaalipour et al., 2015)



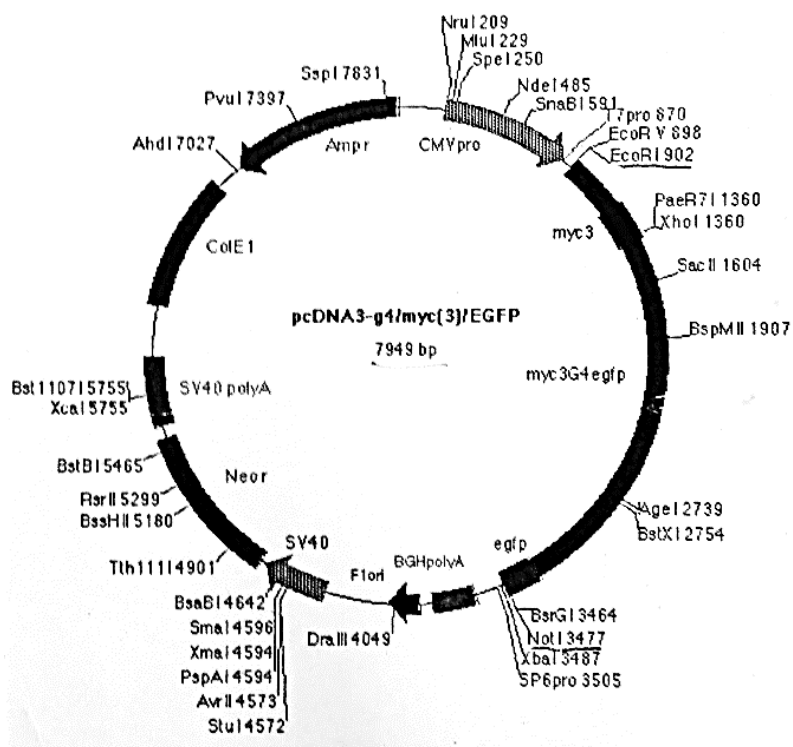
附圖五、胰島素的 CAP/Cb1/TC10 訊號傳遞路徑(Hajiaghaalipour et al., 2015)



附圖六、葡萄糖與 2-DG 之化學結構(Yamamoto and Ashida, 2012)

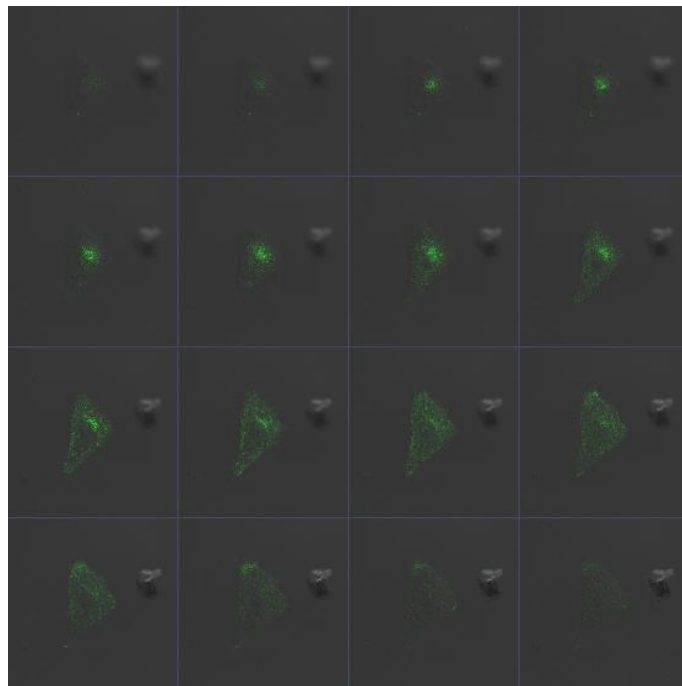
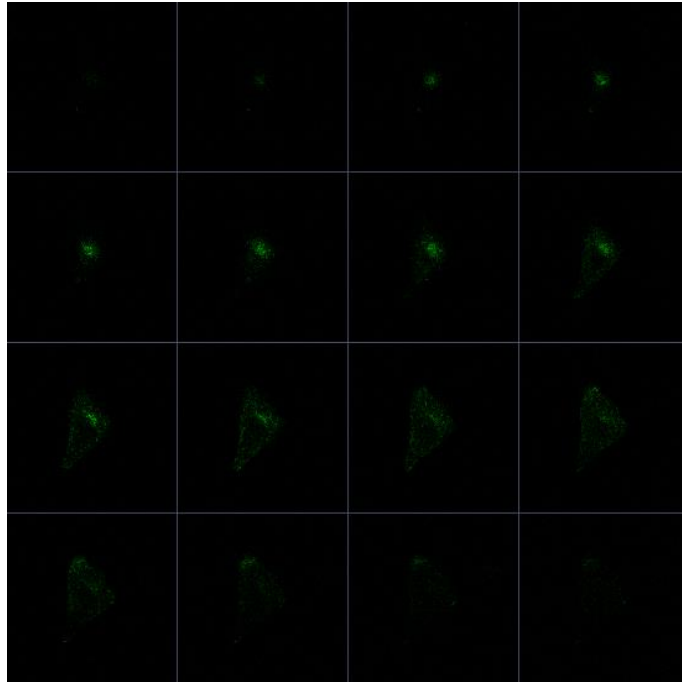


附圖七、2-NBDG 與 6-NBDG 之化學結構(Yamamoto and Ashida, 2012)。

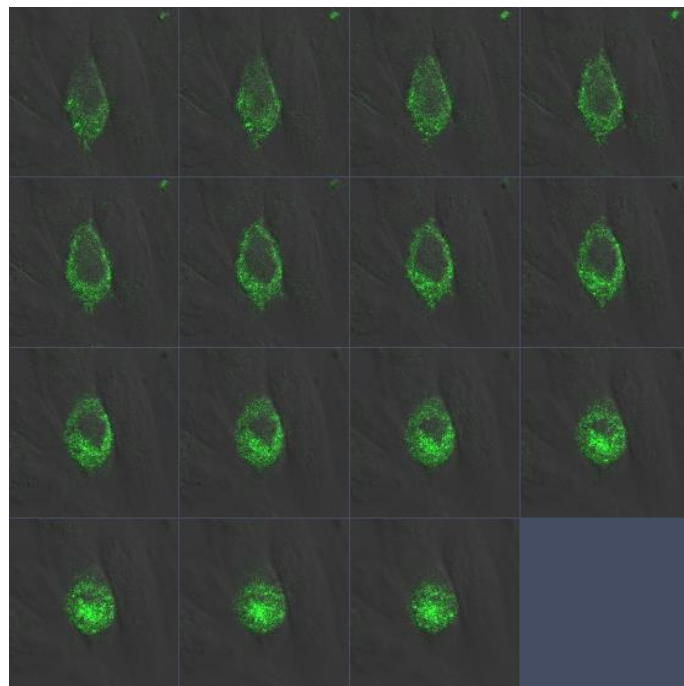
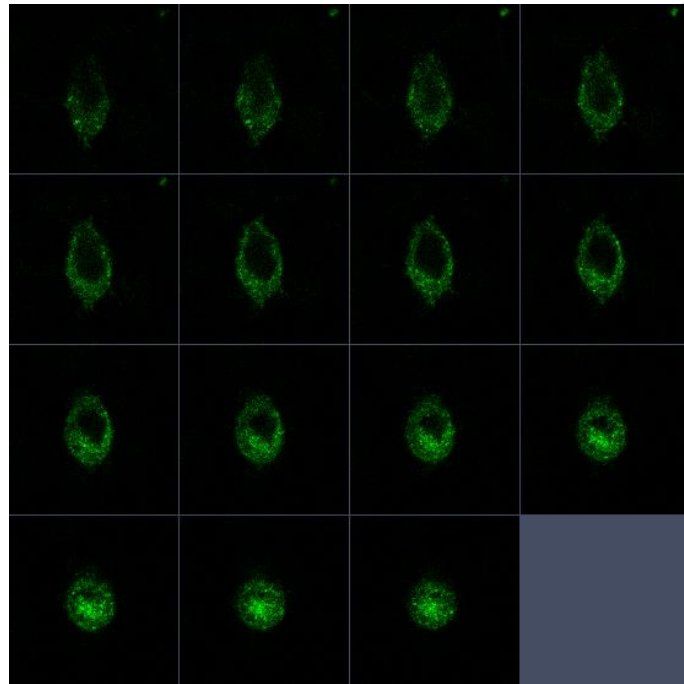


附圖八、pcDNA3-mycG4eGFP 質體。

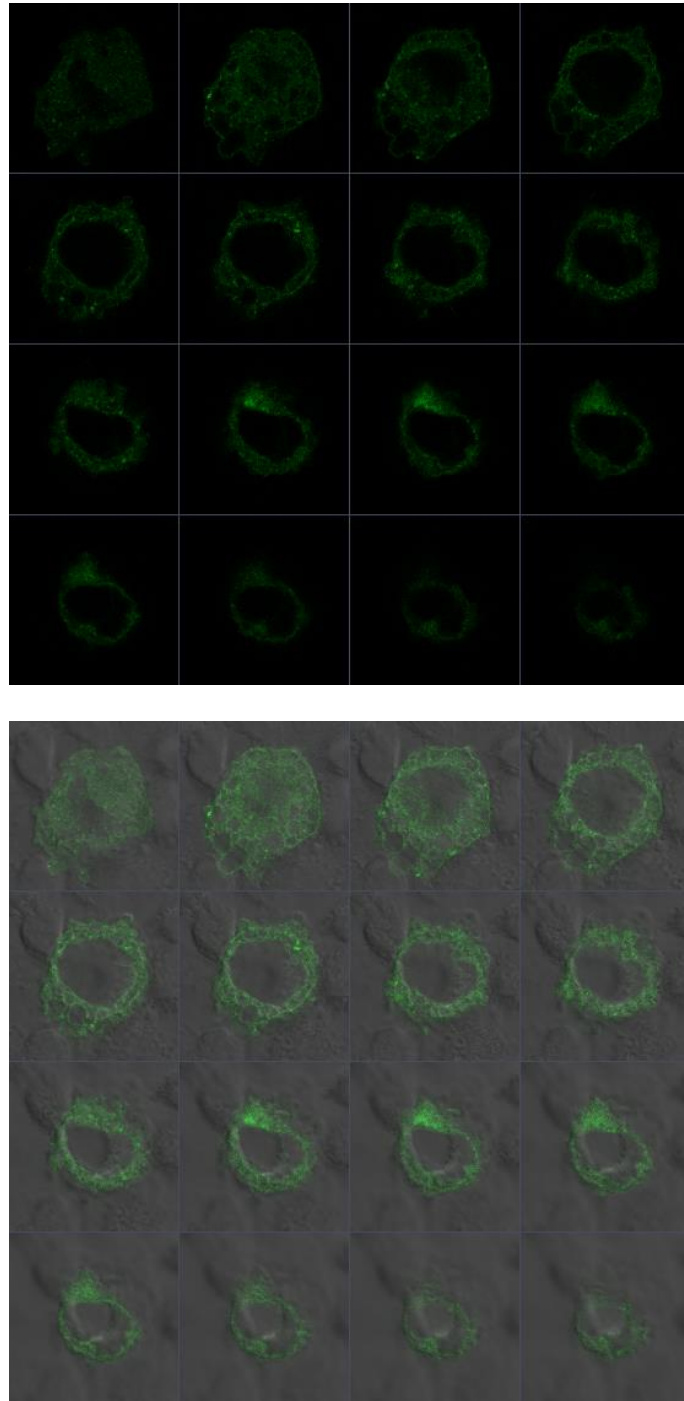
(A)



(B)

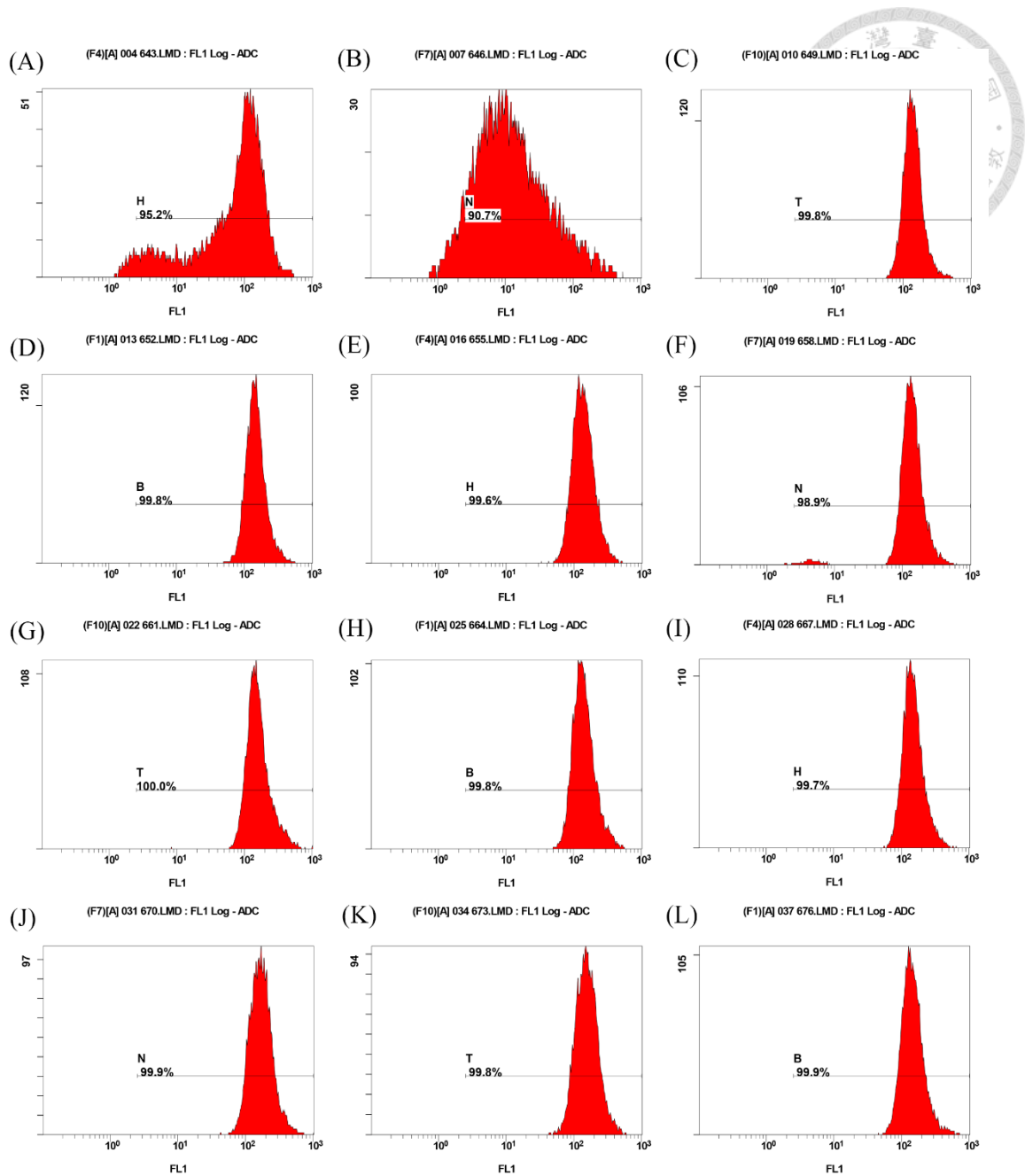


(C)



附圖九、CHO-K1 以不同濃度胰島素處理後的橫切面影像。

CHO-K1 轉染 pcDNA3-mycG4eGFP 24 小時後，分別給予(A) 0 μM (B) 1 μM (C) 17 μM insulin，並在 confocal 下拍攝同一顆細胞於不同焦平面下的橫切面影像，每張影像的焦距差為 50 nm。

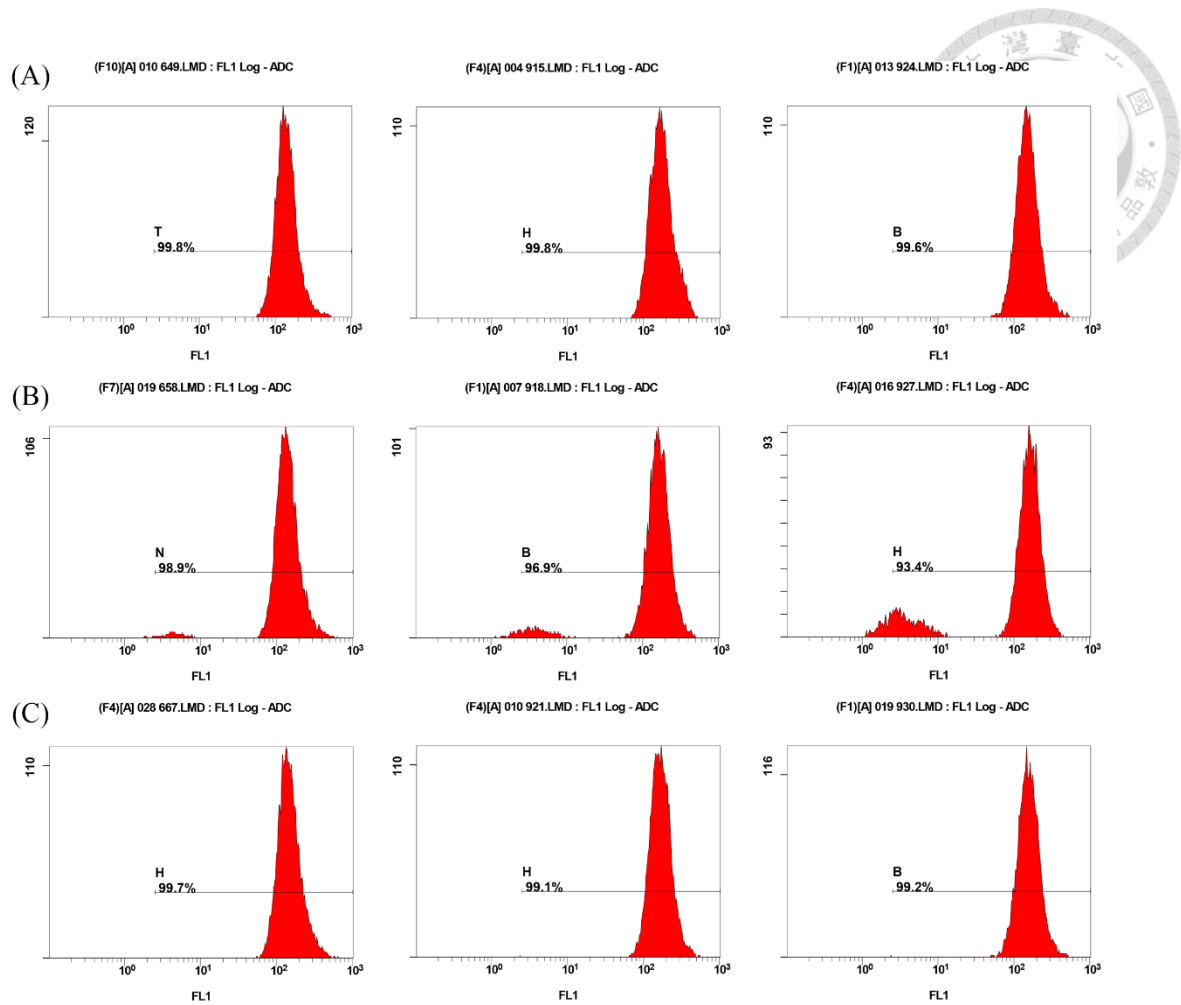


附圖十、CHO-K1 clone 的 pcDNA3-mycG4eGFP 螢光表現量。

於 525 nm 下偵測(A) clone1 (B) clone2 (C) clone5 (D) clone6 (E) clone7 (F) clone8

(G) clone9 (H) clone10 (I) clone11 (J) clone12 (K) clone13 (L) clone14 的螢光訊號，每

張圖為分析 10,000 顆細胞的結果。



附圖十一、細胞代數於 pcDNA3-mycG4eGFP 螢光表現量的影響

以 525 nm 偵測(A) clone 5 (B) clone 8 (C) clone 11 分別於 pn+5、pn+10 和 pn+20 時的螢光訊號，每張圖為分析 10,000 顆細胞的結果。