

國立臺灣大學醫學院微生物學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

胰島素路徑調控肝臟雄激素受體表現的分子機制研究

Investigate the mechanism for the insulin pathway to
regulate the expression of hepatic androgen receptor

陳禹杉

Yu-Shan Chen

指導教授：葉秀慧 博士

Advisor: Shiou-Hwei Yeh, Ph.D.

中華民國 106 年 7 月

July, 2017

國立臺灣大學（碩）博士學位論文
口試委員會審定書

中文題目：胰島素路徑調控肝臟雄激素受體表現的分子機制研究

英文題目：Investigate the mechanism for the insulin pathway to regulate the expression of hepatic androgen receptor .

本論文係陳禹杉君（學號r03445139）在國立臺灣大學微生物學所完成之碩（博）士學位論文，於民國106年7月27日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

葉秀慈

（簽名）

陳培哲 (指導教授)

丁詩同

蔣體聲

系主任、所長

徐述祖

（簽名）

致謝

碩士班的生涯轉瞬間就這麼過去了，不過在這段日子的求學歷程中，我覺得自己真的獲益良多、成長了不少。

非常感謝我的指導教授葉秀慧老師這些日子細心的教導，不論是思考邏輯的訓練、面對問題時提出的解決方式、實驗結果的探討以及下一步的推論，都受到了扎實的訓練，讓我在未來面對不同的挑戰時也可以無所畏懼。也謝謝陳培哲老師在每次的討論中給予我許多面對科學正確的態度和觀念，讓我可以時時審視自己是否有全力以赴。也感謝丁詩同老師、蔡曜聲老師在口試的時候給予我許多非常重要的建議以及不同的思考方向，讓我的研究可以做得更加深入、完備。

同時也謝謝我的家人以及親友們的支持與鼓勵，讓我可以專心傾注自己的熱情在實驗中，努力完成現階段的挑戰。而實驗室的學長姐更是對我照顧有加，讓我在遇到困難的時候一同幫助我尋找解決的方法：和楷為學長一同合作同一個題目，謝謝學長和我時常討論實驗的結果，並且一同規劃實驗設計讓我可以更順利的進行；雅紋學姊在我剛進來實驗室的時候就開始教導我和細胞相關的實驗，讓我可以更加嚴謹地注意會影響實驗結果的各種變因；巧玲學姊也會在我做實驗的時候提點我各種小細節，讓我可以避免掉粗心導致的誤差；慕帆學長也常常會和我討論實驗的結果，一起研究如何解釋並且提出可能影響的原因；Toby學姊認真地帶我進行染色相關的實驗，讓我在 IHC staining 的實驗中可以染出漂亮的結果；而怡君也常常給我們帶來許多歡笑。然後也要謝謝我的好夥伴承彧、宜亭，在大家水生火熱的時候彼此的鼓勵以及支持，讓我的碩士班生活除了學習之外，更結交到了互相扶持的知心朋友。還有謝謝基因體的大學長姐們對我實驗的關心和幫助，以及微生物所的朋友們互相扶持一同完成學業，朝向人生的下一步邁進。

一個階段性的任務就在此劃下美麗的句點了，謝謝大家這些日子的照顧，希望在未來每個人都可以心想事成、完成自己人生的夢想與目標！



中文摘要



雄激素受體(androgen receptor, AR 基因)除了在生殖器官內扮演非常重要的角色外，目前研究也發現男性的肝臟也是一個會受到雄激素所調控的器官之一。我們實驗室過去發現了雄激素訊息傳遞路徑可以刺激 B 型肝炎病毒(HBV)在肝臟細胞內轉譯層面的調控機制。然而，雄激素受體在肝臟內一般的生理功能以及其調控機制仍然還未被釐清。不過從其他團隊的研究中發現當肝臟雄激素受體剔除小鼠在餵食高脂飼料後，可以觀察到有胰島素阻抗的現象產生，這樣的發現似乎點出了肝臟中的雄激素受體可能參與了葡萄糖的代謝調控。為了進一步探討雄激素受體在肝臟中的代謝功能，我們實驗室首先建立了在肝臟中會大量表現 AR 基因的轉殖基因小鼠模式。而在進行代謝相關的檢測實驗中，我們發現禁食後 AR 蛋白質的表現會大幅減少，但當我們注射 insulin 後短時間內 AR 又會大量表現。這代表肝臟中的 AR 是會受到 insulin pathway 所調控的基因之一。因此本論文的研究主要會專於探討 insulin pathway 在肝臟內調控 AR 基因表現的機制。

選用在飢餓狀態下注射不同時間 insulin 的 H-ARTG 小鼠作為我們的實驗樣品，利用西方墨點法以及 RT-qPCR 檢測蛋白質以及 RNA 的表現差異。結果發現 AR 在 insulin 刺激後短時間內表現即會大量提高，主要可能是受一個非轉譯層面的調控機制所影響。緊接著我們利用 IHC staining 的染色技術去觀察此時期 AR 在肝臟中的分佈情形，發現受到 insulin 刺激的 AR 主要會出現在肝臟中 pericentral 的區域 (zone 3 區域)。

這樣的結果表示男性肝臟中的 AR 可能會有一調控肝臟 pericentral 的區域代謝機制的生理功能。而這個特殊的分佈現象在進行去勢手術後就消失了，代表 insulin 調控 AR 在 pericentral 的區域表現是要有 androgen 的存在下才會發生。而相關的調控機制我們目前也正在進行研究中。我們預期這次研究的結果可以幫助我們在未來更深一步釐清 AR 在 pericentral 的區域的生理功能為何。

關鍵字: 雄性激素受體，胰島素，禁食，肝小葉代謝區域。

Abstract



In addition to the sex organs, liver is also identified as an androgen responsive organ in men, as our previous finding showed that the androgen/androgen receptor (AR) pathway can stimulate the transcription of HBV in hepatocytes. However, the physiological function of this pathway in liver is still remained unclear. Some clues from the conditional AR knockout mice suggested that hepatic AR might function in glucose metabolism, under the insulin resistance condition induced by high fat diet. Aiming to further study the function of hepatic AR in metabolism, our previous study established a hepatic specific AR transgenic (H-ARtg) mouse model. In this animal model, we found that the hepatic AR was significantly decreased by fasting, which however was increased by the insulin treatment. It suggests that the hepatic AR is a putative target gene responsive to the insulin pathway in liver. This study thus aims to study the mechanism for the elevation of AR stimulated by insulin pathway in liver.

The RNA and protein analysis for AR in male H-ARtg injected with insulin after fasting indicated that the AR protein is elevated shortly by insulin stimulation, mainly at the post-transcriptional level. We have established the immunohistochemistry staining procedure for detecting the AR in liver tissues, which showed that the hepatic AR protein induced by insulin preferentially locates in hepatocytes at the pericentral area in liver lobules. It thus suggests a physiological function of AR in specific pericentral metabolic zone in male livers. Such a unique pattern is diminished by castration, indicating its dependence on the androgen ligand. The mechanism to restrict the AR at pericentral zonal region is currently under investigation. We expect the results will form the basis for future investigate on the metabolic functions of AR in hepatocytes at the specific pericentral metabolic zone.

Keywords: androgen receptor, insulin, fasting, metabolic zone.

目錄



口試委員會審定書.....	I
致謝.....	II
中文摘要.....	III
Abstract.....	IV
目錄.....	V
序論.....	1
1. 雄激素受體 (Androgen receptor, AR) 之結構及功能.....	1
2. 肝臟也是一個反應雄激素路徑調控的器官.....	2
2-1 肝臟中的 AR 可以影響 HBV 在肝細胞內的轉譯調控.....	2
2. 2 剔除肝臟內的 AR 會促使餵食高脂飼料的小鼠產生肥胖的現象.....	2
3. 肝臟中肝小葉之 zonal pattern 與代謝相關的功能及調控機制.....	3
3. 1 肝小葉 (liver lobule) 之 zonal pattern 介紹.....	3
3. 2 肝小葉之 zonal pattern 調控機制.....	4
4. AR 在肝臟內表現的調控機制.....	6
5. 胰島素路徑及功能介紹.....	7
6. 胰島素在肝臟不同 zonal area 的功能.....	8
研究假說與策略.....	9
材料與方法.....	10
1. 實驗小鼠.....	10
2. 免疫組織化學染色法(Immunohistochemistry, IHC).....	12
3. 免疫螢光染色法(Immunofluorescence, IF).....	13
4. 蛋白質定量分析.....	14
5. SDS-PAGE 蛋白質膠體電泳.....	14
6. 西方墨點法(Western blotting).....	15

7. 反轉錄定量聚合酶連鎖反應(Quantitative reverse transcription-PCR, qPCR).....	16
結果.....	18
1. 在禁食狀態下 AR 的表現量不論是蛋白質或是 RNA 皆會下降.....	18
2. 禁食狀態下施予 insulin 的刺激引發 AR 蛋白質快速上升.....	18
3. 使用免疫螢光染色觀察 AR 在肝臟裡面的分布狀態.....	19
4. 建立利用免疫組織化學染色法觀察 AR 在肝臟的分佈型態之方法.....	19
5. 利用 IHC 染色觀察到 ARTG 小鼠在禁食後 AR 表現明顯下降.....	20
6. 禁食後施打 insulin 會造成 AR 在肝臟中特殊 pericentral 區域的分佈.....	20
7. 雄激素參與禁食下 insulin 刺激 AR 表現上升之調控.....	21
8. 雄激素的存在對於受 insulin 刺激的 AR 在肝臟中分佈有所影響.....	21
9. 蛋白質降解的調控和 AR 在短時間內表現量上升的關係.....	22
10. proteasome 以及 lysosome 所影響的 AR 在肝臟的分佈情形.....	22
11. 進一步探討可能影響 AR 表現在 zone 3 的因素.....	23
討論.....	24
1. 染色技術的選擇.....	24
2. 胰島素調控 AR 的機制.....	24
3. 探討 AR 在肝臟的特定區域表現和代謝機制的關聯性.....	25
圖表附錄.....	27
參考文獻.....	41

第一章 序論



1. 雄激素受體 (Androgen receptor, AR) 之結構及功能

雄激素受體(AR)為男性體內非常重要的受體之一，作為一個transcriptional factor，他會透過入核來調控下游的基因表現。人類AR的基因坐落在X染色體的q臂的11、12號帶，其中含有8個exon可以形成四個有活性的功能區域 (functional domain) ,他們分別為由exon1構成的amino terminal domain(NTD) ，他構成了超過50%的AR蛋白質，主要是透過蛋白質間的交互作用來調控下游轉譯層面的訊號傳遞；exon2、exon3形成了DBD(DNA binding domain)，此區域是AR最為穩定部分，他會決定AR和DNA連接的效率和專一性；exon4 的5端會形成hinge region，最後的exon4到exon8則會形成LBD(ligand binding domain)，他可以確保androgen進入細胞時可以和其有非常高效率專一性的結合[1-3]。

AR protein 生成後會先出現在細胞質中，受到熱休克蛋白(heat shock protein)保護避免異常活化及被降解。其作用的方式大致分為兩種，包括 genomic function 及 non-genomic function[4, 5]。 Genomic function: 游離態AR多數存在於細胞質中，當androgen，包括 dihydrotestosterone 和 testosterone，進入細胞中後，便會和AR結合，此時包裹在AR的熱休克蛋白(the heat shock protein)會和AR分開，讓AR形成dimer 後入核，透過結合至DNA上包含特定ARE (androgen receptor element) 序列之位點以調控下游標的基因的轉譯表現，來影響不同組織生理上複雜的功能，舉例來說，AR可以透過調控TGF-b1, VEGF等生長因子促進生殖器官內生殖細胞的生長與成熟[6]。 Non-genomic function: 附著在細胞膜上的AR在與其配體 (ligand)結合後，會直接影響細胞質中特定訊息傳遞路徑中磷酸酶或者激酶的活性，如PKA、



MAPK/ERK 等，無須藉由調控下游標的基因的轉譯表現，即可快速達到對細胞功能之影響 [7]。

2. 肝臟也是一個反應雄激素路徑調控的器官

2-1. 肝臟中的 AR 可以影響 HBV 在肝細胞內的轉譯調控

雖然 AR 表現量相較於生殖器官(如睪丸)低很多，AR 亦會在肝臟表現，然而其於肝臟中小鼠是否扮演任何生理功能角色仍不清楚。目前為止研究較為清楚的功能為影響 B 型肝炎病毒(HBV)轉錄層面的調控[8]。當 androgen 和 AR 做結合時，可以提高 HBV 轉錄的效率，因為 HBV 的 genome 中含有兩個位於 enhancer I 的 ARE(androgen responsive element)位點可以和 androgen 結合。這樣的機制可以促使帶有 HBV 的男性其體內的 viral titer 表現更高，使其在未來有更高的風險會得到由 HBV 誘發生成的肝癌(HCC) [9-12]。

2.2. 剔除肝臟內的 AR 會促使餵食高脂飼料的小鼠產生肥胖的現象

過去有文獻利用 hepatic specific AR 剔除鼠(AR knockout mice, KO mice) 動物模式，試圖觀察是否有任何生理功能受到影響，藉以探討 AR 在肝臟所扮演的角色。結果發現相較於一般正常小鼠，這些 ARKO 小鼠在餵食 high fat diet 情況下，會產生肥胖及胰島素阻抗的現象，進而引發脂肪肝的產生[13, 14]。這樣的結果顯示肝臟內的 AR 可能會參與調控肝臟內代謝相關的機制中。除此之外還有其他的文獻發現肝臟的 AR 會調控 IRS-1 的表現，當剔除肝臟中的 AR，insulin pathway 下游的 IRS-1 表現量會大量減少，因此即使 insulin 進入細胞和 insulin receptor 結合後磷酸化的 IR 大量表現，但是沒有 IRS-1 幫助將訊號往下游傳遞，生理會透過釋放更多 insulin 去刺激，因而會導致胰島素阻抗(insulin resistance)的現象產生。也



有文獻指出肝臟內的 AR 會促進 beta-oxidation 的發生。當缺乏 AR 時，觀察到肝臟細胞開始有脂肪堆積的現象產生，如果餵食高脂的飼料可以更明顯的觀察到相較於 WT 小鼠，肝臟內 AR 基因剔除小鼠更容易產生肥胖[15]。

以上研究發現肝臟中的AR似乎和葡萄糖的代謝以及脂肪的儲存利用有所關聯，然而，以上的研究結果主要都是建立在高脂餵食的情況中所引發的代謝相關症狀，他們的誘發原因主要都是因為胰島素阻抗而產生的現象。肝臟中AR應存在一調控正常情況下的生理功能，但是目前為止還未有文獻提出相關的研究資訊，還需等待進一步的釐清。

3. 肝臟中肝小葉之 zonal pattern 與代謝相關的功能及調控機制

3.1. 肝小葉 (liver lobule) 之 zonal pattern 介紹

肝臟是人體內參與代謝以及物質合成最重要的器官，執行包括生理上蛋白質的合成、葡萄糖的儲存或轉換、以及脂肪的代謝、外來物質的解毒等等功能。連接肝臟出入口的肝門靜脈主要會從小腸、大腸等消化器官的血液匯流回來，因此含有許多經消化系統分解大分子而形成的氨基酸、葡萄糖、以及脂肪酸，準備進行後續的利用或者儲存[16]。

由於參與多種功能之調控，因此肝臟形成了特殊的區域性分工機制，以維持生理機制的恆定。肝臟由內而外主要由三種層次構成：內層的 sinusoidal layer、中層的 lateral layer、以及最外層的 canalicular layer。Sinusoidal layer 亦含有巨噬細胞的存在(Kupffer cells)，形成先天免疫的天然屏障，內層的內皮細胞則是保持了層內氧氣的含量以供後續代謝作用的進行。Sinusoid 所形成的空間引導著自大循環回流的血液通往肝臟內的中央靜脈，我們稱自源頭的靜脈為 portal vein，而靠近肝臟內部的靜脈則為 central vein。Portal vein 附近還有肝動脈(hepatic artery)以及膽管(bile

duct)，我們將他們統稱為 portal triad 以此兩靜脈周圍將肝臟區分為 zone1 (periportal area) 和 zone3 (pericentral area)，兩區域的過度帶為 zone2 [17, 18]。

不同的 zone 在代謝分工上有自己特定所扮演的角色：zone1 目前所知主要參與了糖質新生(gluconeogenesis)，脂解作用(lipolysis or fatty acid beta-oxidation)，以及尿素的生合成(urea formation)，而 zone3 則是和糖解作用(glycolysis)，脂肪生合成(lipogenesis)，酮體生合成(ketogenesis)，膽汁生合成，以及 glutamine 的生合成有關 [19, 20]。

3.2. 肝小葉之 zonal pattern 調控機制

不同 zonal area 中之肝細胞會參與不同的代謝作用，目前所知主要原因可能和氧氣的含量以及相關基因表現調控有關：zone 1 area 的 portal triad 除了有匯集上下大靜脈血液以及養分的 portal vein 外，還有肝動脈 (hepatic artery) 所提供的氧氣，而糖質新生和脂肪分解皆需要大量的氧氣參與反應，因此多數發生在此；而 zone 3 area 的氧氣含量低，主要進行糖解以及脂肪生合成，而迄今的研究亦顯示了在肝臟中有超過一半以上的基因都有 zone 上分布的差異，例如 zone 1 有參與醣質新生(*Pck1*)、尿素代謝(*Ass1*) 相關的基因，而 zone 3 有參與醣解作用(*GK*)相關的基因 [21, 22]。

到底肝小葉之zonal pattern是如何形成的，Wnt-beta catenin pathway 目前所知是形成 zone 3 area 非常重要的調控因子[23-25]：beta-catenin 在肝臟的生長、分化以及細胞間的黏合上為一不可或缺的蛋白質，但是當肝臟成熟時，beta-catenin pathway的活性在大部分肝細胞中必須受到謹慎的調控[26-28]。在沒有Wnt ligand 的結合時，其會被由APC (adenoma polyposis coli)、GSK3 (glycogen synthase kinase3)、Axin、CK1以及 Dishevelled 的結合體所包圍，由GSK3、CK1對beta-catenin進行

磷酸化後，吸引ubiquitin ligase-beta TrCP將ubiquitin附著在beta catenin上，促使proteasome將之分解。而當Wnt ligand和膜上的 frizzled 受體以及其共同受體結合後，會將包圍beta-catenin的複合體拆解，使beta TrCP 無法將 ubiquitin 與其結合，因此有活性的 beta-catenin 便會入核和TCF、Lef 等transcriptional factor 結合，啟動Wnt相關的基因表現 [29-31]。研究顯示在成熟肝臟中Wnt/ beta-catenin pathway 只有在pericentral region 之肝細胞中活化，以beta-catenin pathway下游的glutamine synthetase (GS) 標的基因染色作為 此路徑活化之指標 [32, 33]。這樣受調控表現的pattern主要是由於Wnt pathway的ligand 只會經由座落於central vein的內皮細胞所分泌。當使用肝臟beta-catenin knockout 小鼠進行觀察時會發現：zone1、zone3 的差異就消失了，由此可見Wnt-beta catenin pathway對於zone的形成扮演非常重要的角色，尤其zone3又是Wnt ligand存在的區域 [34]。

而另外一個對於肝臟 zone 的調控非常重要的因子則為 HNF4a：其在肝臟所扮演的角色為 transactivator，嚴格的調控肝臟的分化以及脂肪的代謝機制 [35, 36]。肝臟中約有 12%的 promoter 都會和 HNF4a 結合，啟動 80%以上的下游轉譯作用。所以在 zone 上的研究指出並非 HNF4a 只會表現在特定的區域，而是 HNF4a 和 Wnt pathway 藉由交互作用來調控肝小葉的 zonal pattern [37]。利用 HNF4a 基因剔除小鼠觀察發現只會特定出現在 zone 3 的蛋白如 GS 開始在 zone 1 表現，因為 HNF4a 會和 Wnt pathway 下游的 Lef1 結合，促進 GS 的合成；反之如果沒有 Tcf1，HNF4a 反而會抑制 GS 表現。因此在沒有 Wnt pathway 的 zone 1，HNF4a 可以促使 zone 1 其他基因表現，而 zone3 透過 Wnt pathway 表現 zone 3 的基因 [38, 39]。



4. AR 在肝臟內表現的調控機制

AR對於男性生殖器官的成熟扮演重要的角色，從初期的細胞增生到分化都受到調控，但是AR的表現量必須維持在維持在一定的水平，過多容易引發不正常的細胞增生形成前列腺癌 (prostate cancer)。而目前已知位於生殖器官內的AR主要是透過 proteasome 進行蛋白質上的調控 [40]。過去的細胞實驗發現HepG2 和 LNCaP 細胞株在經過處理 MG132 (proteasome inhibitor) 後AR的表現量都會增高，而且這些沒有被降解的 AR 都會有 ubiquitin 接合在上面，這樣的現象同時也佐證了AR主要是經由ubiquitin-proteasome進行蛋白質降解 [41]。

Proteasome的作用機制主要需要三個酵素酶以及泛素(ubiquitin)的參與：首先泛素會由透過 ATP 啟動的活化酶 E1 將其與自己連接，隨後透過 E2 接合酶將泛素轉移；再由 E3 接合酶自 E2 將泛素轉往欲降解的蛋白質身上 [42]。根據研究顯示：接合泛素依據數量的不同會決定最終蛋白質的走向，如果要分解蛋白質最少需要 4 個泛素的連接[43]。這時 26S proteasome 的 19S (cap) 會辨識泛素鏈，將蛋白質帶離 E3 接合酶後送往 20S (core) 進行分解，同時去除泛素的連接鍵，使其回到細胞質中進行下一次的循環。

AR 根據是否和其配體 (androgen) 結合分為兩種調控路徑：當沒有和 androgen 結合時，細胞內的生長激素或細胞激素可以調控 AR 的表現量。常見的機制為 Akt 透過活化 AR 的磷酸位點 Ser210、Ser790，目的是要避免 AR 和 ARA70 結合將 AR 送入核。同時也磷酸化 MDM2 (E3 ligase的一種)，MDM2 會將泛素鏈連接在 AR 上，將其帶往 26S proteasome 進行分解 [44, 45]。而有 ligand 存在時，AR 在跟 androgen 結合後不像一般的 nuclear receptor 一旦和其配體連結就會快速的被去除，反而穩定的存在於細胞中。最新的研究顯示會有這樣的現象不是因為 androgen 讓 AR 比較不容易被 proteasome 分解，而是因為當



androgen-AR 啟動了下游的轉譯路徑時，由於 AR 的 mRNA 有 ARE 的存在，因此讓 AR蛋白質的表現量增加許多。

而近年也有研究顯示AR可能也有受到 Autophagy-lysosome 路徑的調控 [46]。

前列腺癌主要會在缺氧的環境下生長，學者發現當 LNCaP 前列腺癌細胞株在缺氧的還在缺氧的環境下AR的表現量較低，但是僅是蛋白質受到影響；但是當 LC3 或者 P62 這些啟動 autophagy 路徑的基因被 knockdown 後，AR 被降解的現象就消失了。

上述的研究結果都是得自前列腺癌細胞內 AR 的降解機制研究，但是肝臟裡面 AR 的調控機制目前還沒有相關的研究發表。

5. 胰島素路徑及功能介紹

胰島素對於肝臟內葡萄糖的代謝利用扮演非常重要的角色：當葡萄糖進入體內血液循環時，胰島素會自胰臟的 beta cell 分泌和胰島素受體結合，在不同的器官產生不一樣的作用：在脂肪細胞以及肌肉組織胰島素和其受體結合後會促進在細胞質內的 GLUT4 (glucose transporter 4) 移動到膜上讓 葡萄糖進入細胞內做利用產生能量 [47, 48]；肝臟則是透過抑制醣解作用以及糖質新生讓肝醣無法釋放葡萄糖到血液循環中。肝臟內的 GLUT2 (glucose transporter 2) 為一雙向通道，可以調控葡萄糖的進出，當胰島素和其受體結合後，GLUT2 會和胰島素受體一起自細胞膜上脫離進入細胞質內，因此會中斷葡萄糖的輸出 [49]。

而胰島素受體 (insulin receptor) 為 RTK (receptor tyrosine kinase) 家族的一員，平時鑲嵌在細胞膜上。其結構為兩個位於細胞外側的 α 平時鑲嵌在細和兩個鑲嵌在細胞膜上的 β -chain 所組成。 α -chain 會和胰島素結合後透過自體磷酸化 β -chain 上的多個位點如 Tyr1158、Tyr1162、Tyr1163 後自膜上行內吞作用(endocytosis)進

入細胞質中透過活化 IRSs (insulin receptor substrates) 來調控下游代謝和生長相關的機制 [50]。主要受影響的下游路徑為 (1) PI3k pathway: 受活化的 IRS-1 會磷酸化 PIP2 以促使 PIP3 的形成，活化下游的 Akt，促進細胞內脂肪的生成 (lipogenesis)、葡萄糖吸收 (glucose uptake) 以及抑制糖質新生 (gluconeogenesis)；(2) mTOR pathway: mTOR 是調控 autophagy 降解 insulin 非常重要的機制。受 IRS-1 調控的 Akt 會刺激 mTORC1、2 的產生，autophagy 因此被抑制。同時 mTORC1、2 也會調控下游蛋白質合成、促進脂肪相關代謝 [51-53]；(3) MAPK pathway: IRS-1 會活化 Src，隨後沿路活化 Sos、Ras 到 MAPK，活化的 MAPK 會入核促進細胞的生長和分化 [54-56]。

6. 胰島素在肝臟不同 zonal area 的功能

由於肝臟內不同 zone 對於葡萄糖的代謝有不一樣的作用機制，因此胰島素相關機制在 zone1、zone3 也扮演著不同的角色 [57]，但是關於胰島素受體是否有 zone 上分佈的差異或者擁有不同功能目前還未有相關的文獻探討。不過近年來有研究指出胰島素受體所影響下游的 IRS-1 可能有 zone 上分佈的差異：在肝臟胰島素受體活化會抑制糖質新生的產生，而 zone 1 主要就是發生糖質新生的地方，所以胰島素路徑活化時主要會發生在 zone 3。作者發現肝臟剔除 IRS-1 小鼠會引發胰島素阻抗以及肥胖，這是由於原本在 zone 3 受到抑制的糖質新生重新被活化，使肝臟內有過多的葡萄糖堆積，進而引發脂肪生成。而 IRS-2 則是 zone 1、zone 3 皆有表現，因此剔除 IRS-2 僅會有部分胰島素阻抗的現象產生 [58, 59]。

第二章 研究假說與策略



我們實驗室先前已經建立了肝臟 AR 轉殖基因小鼠的模式，其作用的方式是透過在 AR 的前面連接 Albumin 的 promoter。由於已知肝臟中有大量的 Albumin 存在，因此可以促使 AR 在肝臟中到處表現。我們利用這個動物模式想要去探討在一般生理狀態下，(沒有使用高脂飼料誘發相關代謝症狀)AR 在生理上真正的功能為何。

在經歷過一段時間的觀察以及比較下，我們發現了在 ARTG 小鼠才會表現的幾個有趣的現象：

- (1) 和一般 wild type 小鼠以及肝臟 AR 剔除小鼠相比，在大約 6-7 個月大以後 ARTG 小鼠普遍體重都會比較輕的趨勢。
- (2) 當 ARTG 小鼠禁食超過 12 小時，肝臟裡面的 AR 蛋白質表現大幅降低。
- (3) 在禁食大於 12 小時後施以胰島素注射，AR 蛋白質的表現量會在短時間內大量提升。

以上在 ARTG 小鼠動物模型實驗觀察到的現象，充分支持肝臟裡面的雄激素訊息傳遞路徑有參與肝臟代謝調控功能之可能性，尤其是在沒有高脂飼料的誘發下仍能在體重上看到明顯的差異。除此之外胰島素注射的實驗也能顯示肝臟的 AR 是一個會經由 insulin pathway 所調控的目標基因之一。目前我們研究的重點首先會放在釐清 insulin 是透過什麼樣的調控機制去刺激公鼠肝臟中 AR 的表現。除此之外，這些受刺激的 AR 在肝臟裡面的分佈情形也是我們想要探討的問題之一：如果有特殊分佈的現象，即可以進一步幫助我們確認 AR 在肝臟中扮演的角色以及其參與代謝作用的調控機制。

第三章 材料與方法



1. 實驗小鼠

Albumin-AR 肝臟特定 AR 基因轉殖小鼠：利用 albumin-AR 的基因轉殖小鼠在肝臟大量表現 AR。

利用以下的 primer 進行基因分型(genotyping):

AR AR-F: 5' - CTG CCT CCG AAG TGT GGT ATC-3'

AR-R: 5' -CCA GAA GCT TCA TCT CCA CAG -3'

Albumin-Cre 肝臟特定 AR 基因剔除小鼠

利用 Albumin-Cre 將小鼠 (C57BL/6 mice) 肝臟內 DNA 的同型結合 AR 基因之 exon1 剔除 (homozygous floxed AR, exon1)

我們利用以下的 primer 進行基因分型(genotyping):

H-AR^{+/y} AR-P1: 5' -AAG TGA ATG GTC TTG GC-3'

AR-P2: 5' -TTA CAG GTC TGG TGC AAG CC -3'

AR-P3: 5' -TGT TTT CAC TGT CAC TGC AGC -3'

Cre gene Cre_F: 5' -TCC AAT TTA CTG ACC GTA CAC-3'

Cre_R: 5' -CGC CGT AAA TCA ATC GAT GAG-3'

野生型 (wild type, WT)小鼠

同窩出生在經過基因分型後，確認不是轉職基因或基因剔除的小鼠。



實驗小鼠處理藥劑

Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132) -proteasome inhibitor

MG132 (Sigma, C2211, USA) 為抑制體內蛋白質降解時由 proteasome 執行分解的路徑。使用 DMSO 進行藥物回溶，初始濃度為 $10 \mu\text{g/ml}$ ，存放於-20 度冰箱中。使用腹腔注射技術 (intraperitoneal injection) 打入 3 個月大小鼠體中，使用的藥劑量為 10 mg/kg 。藥劑配置方式為利用 PBS 和乳化劑的混合物 (DMSO: Kolliphor EL: PBS = 1: 2: 7)，再依實驗需求處理 1-2 小時後犧牲小鼠取肝臟進行後續實驗。

Chloroquine-lysosome inhibitor: Chloroquine (Sigma, USA) 為一透過和細胞質內氫離子的結合降低 lysosome 酸化程度以阻止其進行降解的抑制劑。使用 PBS 將藥物盡後回溶後存放於-20 度冰箱中，初始配置濃度為 $0.1 \text{ mg}/\mu\text{l}$ 。使用腹腔注射技術 (intraperitoneal injection) 打入 3 個月大小鼠體中，使用的藥劑量為 60 mg/kg 。依實驗需求處理 30 分鐘到 2 小時候犧牲小鼠並取其肝臟進行後續實驗。

胰島素注射禁食小鼠

胰島素 (insulin) 注射實驗是將胰島素利用 PBS 進行稀釋後，使用 $0.75 \text{ IU}/\text{kg}$ 的劑量透過腹腔注射技術 (intraperitoneal injection) 打入 3 個月大小鼠體中，依實驗需求處理 2 分鐘到 2 小時候犧牲小鼠並取其肝臟進行後續實驗。

小鼠去勢手術

將三個月大小鼠進行全身麻醉後，將其兩顆睪丸摘除後縫合，經過三天後開始進行禁食相關的實驗。



2. 免疫組織化學染色法 (Immunohistochemistry, IHC)

將小鼠犧牲後拿取新鮮肝臟置入 10% formalin 浸泡進行固定 (>48 小時)，以石蠟包埋後製作 5 μ m 肝臟切片進行免疫組織化學染色。

石蠟切片製作完成後，將玻片放入烘箱 65 度溶蠟 20 分鐘，之後浸入 xylene 進行脫蠟 20 分鐘，接下透過浸置於濃度梯度酒精 (100% 兩次，接者依序為 95%、75%、50%、ddH₂O，每個濃度各 3 分鐘) 進行復水的動作。再來使用 PH=6 or PH=9 的 citrate buffer 將切片完全浸入，使用微波爐微火 20 分鐘進行 antigen retrieval，後置於室溫等待降溫 (>30 分鐘)。

先將切片以 ddH₂O wash 兩次以及 PBS wash 一次後，浸入 3% H₂O₂ 10 分鐘去除 peroxidase 的活性，然後再重複進行 ddH₂O wash 兩次以及 PBS wash 一次。

以 blocking buffer (3% BSA+1% FBS in PBS buffer) 進行 blocking 60 分鐘後再以 ddH₂O wash 兩次以及 PBS wash 一次，使用 blocking buffer 所配置的一級抗體完整覆蓋組織，於 4 度冰箱作用 20 小時。

第二日將潮濕盒至於室溫再作用 15 分鐘後，以 ddH₂O wash 兩次以及 PBS wash 一次，使用 Universal immuno peroxidase polymer 二級抗體於室溫覆蓋組織 45 分鐘後，以 ddH₂O wash 兩次以及 PBS wash 一次。

以 DAB (1 ml DAB buffer + 30 μ l DAB) 進行呈色兩分鐘，以 ddH₂O wash 兩次並使用 hematoxylin (以 ddH₂O 1: 1 稀釋) 染核 5-10 秒。以 ddH₂O wash 兩次以及 PBS wash 一次後，再重複使用 ddH₂O 置於 shaker wash 10 分鐘。

使用梯度酒精 (依序為 50%、75%、90%、100%，每個濃度各 5 分鐘) 進行脫水。在過完 100% 酒精後進行風乾 30 分鐘，後使用 xylene 稀釋的封片膠進行封片再風乾 30 分鐘。

利用 M1 螢光穿透光正立顯微鏡 (基礎醫學大樓 14 樓顯微鏡影像核心實驗室)

進行觀察並拍攝紀錄實驗結果。(使用影像軟體：Zeiss Axioplain 2)



■ IHC 所使用的抗體

<u>1st antibody</u>	<u>company</u>	<u>Cat. No.</u>	<u>2nd antibody</u>	<u>Dilute ratio</u>
AR	abacm	ab133273	rabbit	1:50
GS	BD	610518	mouse	1:600
p-IR	Thermo	44-804G	rabbit	1:100
t-IR	abacm	ab69508	rabbit	1:100
albumin	abacm	ab106582	chicken	1:400

3. 免疫螢光染色法 (Immunofluorescence staining, IF)

將小鼠犧牲後拿取新鮮肝臟置入 10% formalin 浸泡進行固定 (>48 小時)，以石蠟包埋後製作 5 μ m 肝臟切片進行免疫組織化學染色。

石蠟切片製作完成後，將玻片放入烘箱 65 度溶蠟 20 分鐘，之後浸入 xylene 進行脫蠟 20 分鐘，接下透過浸置於濃度梯度酒精 (100% 兩次，接者依序為 95%、75%、50%、ddH₂O，每個濃度各 3 分鐘) 進行復水的動作。再來使用 PH=6 or PH=9 的 citrate buffer 將切片完全浸入，使用微波爐微火 20 分鐘進行 antigen retrieval，後置於室溫等待降溫 (>30 分鐘)。

先將切片以 ddH₂O wash 兩次以及 PBS wash 一次後，以 blocking buffer (3% BSA+1% FBS in PBS buffer) 進行 blocking 60 分鐘後再以 ddH₂O wash 兩次以及 PBS wash 一次，使用 blocking buffer 所配置的一級抗體完整覆蓋組織，於 4 度冰箱作用 20 小時。

第二日將潮濕盒至於室溫再作用 15 分鐘後，以 ddH₂O wash 兩次以及 PBS wash

一次，使用二級螢光抗體完整覆蓋組織，於室溫作用 45 分鐘後，以 ddH₂O wash 兩次以及 PBS wash 一次，再以 FluoromountTM Aqueous Mounting Medium 封片在暗處烘乾 20 分鐘。利用 M1 螢光穿透光正立顯微鏡（基礎醫學大樓 14 樓顯微鏡影像核心實驗室）進行觀察並拍攝紀錄實驗結果。（使用影像軟體：Zeiss Axioplan 2）

IF 所使用的抗體

<u>1st antibody</u>	<u>company</u>	<u>Cat. No.</u>	<u>2nd antibody</u>	<u>Dilute ratio</u>
AR	abacm	ab133273	rabbit	1:50
GS	BD	610518	mouse	1:600

4. 蛋白質定量分析

使用 BCATM protein assay kit (PIERCE, Rockford, IL, USA) 進行蛋白質定量分析。吸取經由 RIPA (Temecula, CA) 抽取之蛋白質萃取液 2 μ l 以及 Bovine serum albumin 梯度濃度（標準蛋白質濃度曲線-2、1、0.5、0.25、0.125 μ g/ml）10 μ l 至於 96 well plate 中，加入 200 μ l BCATM protein assay buffer (A buffer : B buffer = 49 : 1) 置於 37 度烘箱作用 25 分鐘。使用免疫沈澱測定儀 (MicroQuant, Winooski, VT) 測量 OD=540 nm 之吸光值。利用蛋白質標準濃度梯度所測量之數值繪出含有函數方程式以及 R square 的趨勢圖，再透過內插法進行蛋白質濃度的計算。

5. SDS-PAGE 蛋白質膠體電泳

製作 10% 或 12% 的 Tris-Glycine SDS-Page gel (依據要看的蛋白質：分子量小的蛋白使用 12% gel, 分子大的蛋白質使用 10%)，同時配置適當的樣品濃度 (80-100 μ g) 和 4 倍 sample dye (300 mM Tris-HCl PH=6.8, EDTA 12 mM, 12% SDS, 0.01%

Bromophenol blue, 6% mercaptoethanol)混合均勻後，於 100 度加熱板加熱反應 10 分鐘後冷卻。

隨後利用 BioRad system 跑膠器搭配 running buffer(Glycine 14 g, Tris-base 3 g, SDS 1 g 溶於 1 公升的 ddH₂O 中)進行蛋白質分離實驗。使用的電壓為 60 伏特 20 分鐘，使蛋白質樣品在上膠時壓平使起跑點等均後，將電壓轉為 80 伏特 20 分鐘，100 伏特 30 分鐘，最後維持 125 伏特直到跑膠實驗結束。

6. 西方墨點法 (Western blotting)

在蛋白質分離實驗完成後，利用轉印卡夾、兩張多孔性海綿、六張濾紙以及浸泡過甲醇活化的 PVDF 膜置於轉印緩衝液中 (transfer buffer- 5.8g Tris-base, 29g Glycine, 10% methanol 溶於 2 公升的 ddH₂O 中)。依序放置多孔性海綿、濾紙三張、蛋白質分離完成的 SDS-PAGE 膠體、PVDF 膜、三張濾紙以及多孔性海綿，完成卡夾包裝後置於充滿 transfer buffer 的轉印槽中 (Hoefor Te22 Mini Transfer Tank)，連結 4 度冷卻機進行兩小時電壓為 100 伏特的轉印過程。

完成後取出含有蛋白質的 PVDF 膜進行室溫 blocking 1 小時 (blocking buffer-5% milk powder in TBST)，之後使用 blocking buffer 配置的一級抗體於 4 度冰箱搖晃作用 16-18 小時。

隔日取出 PVDF 膜於室溫利用 TBST buffer() 清洗 10 分鐘三次，再將膜依目標蛋白所對應的二級抗體配置於 blocking buffer 中於室溫作用 1 小時。完成後於室溫利用 TBST buffer 清洗 10 分鐘三次，最後利用呈色劑 ECL(Enhanced chemiluminescence, Amershan) 進行呈色，在暗房中利用底片偵測蛋白質表現量。

⊕ Western blot 所使用的抗體



1 st antibody	company	Cat. No.	2 nd antibody	Dilute ratio
AR	abacm	ab133273	rabbit	1:1000
GS	BD	610518	mouse	1:10000
p-IR	cell signaling	3024S	rabbit	1:1000
t-IR	cell signaling	3025S	rabbit	1:1000
p-Akt	cell signaling	4058S	rabbit	1:1000
t-Akt	cell signaling	4691S	rabbit	1:1000
GSK3b-s9	cell signaling	9336S	rabbit	1:1000
GSK3b	cell signaling	9315S	rabbit	1:2500
p53	Genetex	GTX70218	mouse	1:1000
beta catenin	BD	610154	mouse	1:5000
active beta catenin	Merck	05665	mouse	1:1000
cathepsin D	abacm	ab75852	rabbit	1:2000
LC3 a/b	cell signaling	12741S	rabbit	1:1000
P62-s403	Genetex	GTX128171	rabbit	1:500
P62	Abnova	H00008878-M01	mouse	1:10000
GAPDH	Genetex	GTX100118	rabbit	1:10000

7. 反轉錄定量聚合酶連鎖反應 (Quantitative reverse transcription-PCR, qPCR)

利用 Quick-RNA TM Mini-Prep Kit 抽取小鼠肝臟的 RNA 後，取 500 ng RNA

利用 Superscript III cDNA system(Invitrogen, Carlsbad, CA)進行反轉錄製備 cDNA 以進行後續的 qPCR 。



在進行 qPCR 前，混合待測之 cDNA 和 SYBR Green(LightCycler FastStart DNA SYBR Green kit, Roche, Mannheim, Germany)，比率為 1 μ l 的 cDNA 和 1 μ l SYBR Green, 1 μ l front primer, 1 μ l reverse primer, 0.8 μ l MgCl₂, 以及 6.2 μ l DEPC water。

再混合均勻後離心上機，使用的機器為 LightCycler 480。

qPCR 使用的 primer 以及其 program:

Primer	5'-sequence-3'	TM(°C)
mAR	F 5' - CTG CCT CCG AAG TGT GGT ATC-3'	62°C
	R 5' -CCA GAA GCT TCA TCT CCA CAG -3'	
mPBGD	F 5' - TGA AGG ATG TGC CTA CCA TAC TA-3'	62°C
	R 5' - GAG GTT TCC CCG AAT ACT CTT GA-3'	
mAlbumin	F 5' - TGT TGC CGA TGA GTC TGC -3'	62°C
	R 5' - GTC AGC CAG TTC ACC ATA GT-3'	

第四章 實驗結果



1. 在禁食狀態下 AR 的表現量不論是蛋白質或是 RNA 皆會下降

我們首先選取 3 個月大的 WT、H-ARtg 小鼠，各自包含未禁食組、禁食大於 12 小時、以及注射不同時間的 insulin 處理組作為我們此次實驗的樣本，(老鼠來源為我們實驗室的陳楷為學長)測量 AR 在肝臟中蛋白質以及 RNA 的表現差異。

根據圖一(A)的結果顯示，在未禁食的狀態下，3 個月大的 H-ARtg 小鼠和 WT 小鼠相比 AR 的表現量高出非常多，而在圖一(B)的 RT-qPCR 也有同樣的趨勢，反應了我們實驗室的 H-ARtg 小鼠確實有 AR 高表現的現象。然而不論是 WT 或者 H-ARtg 小鼠，一旦禁食超過 12 小時，AR 在蛋白質跟 RNA 的表現量都有明顯的下降。結果顯示肝臟中的 AR 是受到禁食狀態的調控的，這樣的現象不論是 WT 或者 H-ARtg 公鼠都會發生。我們以 pIR 和 pAkt 的表現作為禁食是否有完全的標的蛋白，結果顯示禁食 12 小時由於沒有外來養分進入，因此葡萄糖相關的代謝機制並未啟動，pIR 和 pAkt 的表現量都非常低。

2. 禁食狀態下施予 insulin 的刺激引發 AR 蛋白質快速上升

圖一(A)在禁食 12 小時施予 insulin 的刺激，可以觀察到 WT 小鼠的蛋白質在 60 分鐘時有明顯的上升；而 H-ARtg 小鼠則是在 15 分鐘即有大量的表現。此時的 pIR 和 pAkt 都有上升，表示 insulin 確實有和 IR 結合並且啟動了下游的訊號途徑。同時觀察圖一(B)的 RT-qPCR 結果，發現在這些 insulin injection 後不同的時間點所收集的肝臟組織中，短時間內(30 分鐘到一小時內)，WT 和 H-ARtg 小鼠的 RNA 表現量和在禁食狀態下沒有明顯的差異，這樣的結果指出短時間內 AR 的上升可能並不是 RNA 轉錄層面受到了影響，而有可能是蛋白質的穩定或者量值受到了調控。



但在一小時後，RNA 表現量有大幅上升之現象，指出此時間點 AR 的上升可能易受到 RNA 轉錄層面之調控。

3. 使用免疫螢光染色觀察 AR 在肝臟裡面的分布狀態

從圖一的結果可以知道 insulin 的刺激可以促使 AR 量的上升，因為肝臟中不同位置的蛋白質表現可能和他們在生理機制上扮演的角色有關，因此我們想要探討這些受 insulin 的刺激的 AR 在肝臟裡面是否有特別的分佈型態。我們首先嘗試利用免疫螢光染色 (IF staining) 進行觀察 WT 小鼠以及 H-ARtg 小鼠在未禁食 AR 有表現的狀態。從圖二(A)可以觀察到 3 個月 WT 小鼠似乎有一些 AR 會表現在 zone 3 區域 (GS 表現的區域)，而圖二(C) 3 個月 ARTG 小鼠則是 zone 1、zone 3 都有一點訊號。而圖二(B)是我們在 3 個月 WT 小鼠處理了蛋白質降解相關的抑制劑 (chloroquine) 後觀察到的結果，可以發現在 zone 3 有一個非常明顯的分佈。但是在同一批小鼠組織切片測試了只處理二抗進行背景測試，結果發現原先觀察到位於 zone 1、zone 3 的訊號即使只處理二抗也可以看到；而且在 AR 單一綠光的染色結果沒辦法觀察到 AR 入核的現象 (AR 為一 transcriptional factor, 只要和 androgen 結合就會入核啟動下游相關基因表現)，此結果顯示免疫螢光染色並不適用在我們偵測 AR 在肝臟分佈型態的實驗目的。

4. 建立利用免疫組織化學染色法觀察 AR 在肝臟的分佈型態之方法

我們因此選擇另外的染色方式，即免疫組織化學染色法，希望可以確實觀察到 AR 在肝臟的分佈，首先利用 H-ARtg 小鼠未禁食的樣本只處理二抗觀察是否有非專一性的訊號或背景色，結果顯示如圖三(A)免疫化學染色 (IHC staining) 沒有一抗的處理是觀察不到任何染色訊號的，因此我們進一步利用 H-ARtg、H-ARko、以及

WT 小鼠肝臟切片進行測試。圖三(B)為三個月未禁食 H-ARtg 小鼠，結果可以看到視野下 AR 的表現量很高，而且確實可以看到 AR 入核的現象；而圖三(C)三個月 H-ARko 小鼠沒有偵測到訊號。圖三(D)為三個月 WT 小鼠未禁食的染色結果，可以看到極少量的微弱訊號，也反應了一般小鼠 AR 在肝臟的本來就表現量相當少的現象。此結果顯示利用 IHC 染色方式可以幫助我們釐清 H-ARtg 小鼠受到 insulin 刺激後 AR 蛋白質在肝臟中的分佈型態。

5. 利用 IHC 染色觀察到 H-ARtg 小鼠在禁食後 AR 表現明顯下降

接下來，我們嘗試利用先前建立的免疫化學染色法測試 H-ARtg 小鼠在(1)禁食大於 12 小時(2)受到不同時間 insulin 刺激的樣本他們的 AR 在肝臟上的分佈狀況。圖四(A)我們觀察到在 3 個月 H-ARtg 小鼠在未禁食時，AR 呈現在肝臟到處表現形態，沒有觀察到有 zone 上分佈的差異，AR 在此時入核的比例也高，表示在 androgen 存在的情況下，AR 入核調控轉錄層面的機制是持續進行的。圖四(B)則是 3 個月 H-ARtg 小鼠禁食超過 12 小時的樣本，染色結果幾乎看不到 AR 的訊號。結果也反映了圖一(A)的西方墨點法分析結果，即禁食會造成 AR 表現明顯降低的現象。

6. 禁食後施打 insulin 會造成 AR 在肝臟中特殊 pericentral 區域的分佈

我們下一步想要測試 H-ARtg 小鼠在禁食大於 12 小時後，當其受到 insulin 刺激時，此時 AR 的分佈狀況為何。我們選用禁食大於 12 小時、注射 insulin 自 2 分鐘到 120 分鐘後進行犧牲，3 個月大 H-ARtg 小鼠的石蠟切片進行 IHC staining 的染色。

圖五是將禁食後施打 insulin (劑量為 0.75 IU/kg) 自 2 分鐘到 120 分鐘，所有 3 個月 H-ARtg 小鼠進行 IHC 染色去觀察 AR 在不同時間於肝臟中表現及分佈型態。我們以 GS 作為 zone 3 位置的標誌，結果顯示 insulin 刺激自 5 分鐘起一直到 120 分



鐘為止，AR 都會有一個集中在 zone 3 pericentral 區域的現象。這樣的結果顯示注射 insulin 後所刺激表現的 AR 都會有一專一表現在 zone3 pericentral 區域的分佈趨勢。接下來我們下一步想探討這樣的現象是透過什麼機制所調控，以及而這樣的現象對肝臟生理功能會造成什麼樣的影響。

7. 雄激素參與禁食下 insulin 刺激 AR 表現上升之調控

我們目前實驗是使用 3 個月 H-ARtg 的公鼠，因此我們想知道 androgen ligand 是否參與 AR 表現在 zone 3 區域的調控。因此我們將 3 個月 H-ARtg 小鼠進行去勢 (castration)手術，將小鼠的兩邊睪丸摘除後進行縫合，待其修養三天後當天晚上進行禁食，於隔日超過 12 小時起注射 insulin (劑量為 0.75 IU/kg)。我們初步先選取注射 15 分鐘以及 90 分鐘後之進行去勢和沒有進行去勢之 control H-ARtg 小鼠進行比較。圖六(A)的結果顯示當 AR 轉殖基因小鼠進行去勢(沒有 androgen 存在時)，15 分鐘 insulin 的刺激不足以讓 AR 如沒有進行去勢之 control H-ARtg 小鼠之高量表現，而 90 分鐘的結果相較於沒去勢的小鼠 AR 表現量會比較高。從我們的結果說明了透過 insulin 刺激所大量表現的 AR，除了影響的層面可能是蛋白質的降解途徑外，這樣的現象還需要在有 androgen 存在的環境下才會發生。

8. 雄激素的存在對於受 insulin 刺激的 AR 在肝臟中分佈有所影響

從前面的結果我們知道 androgen ligand 可能對 H-ARtg 公鼠肝臟中 AR 受 insulin 刺激表現上升扮演重要的角色，圖六(A)的西方墨點法也可以觀察到沒有 androgen 的組別在刺激 90 分鐘後相較於一般 H-ARtg 小鼠 AR 表現量也較高，因此我們利用 IHC staining 染色法觀察去勢小鼠 AR 在肝臟的分佈情況。結果如同圖六(A)所觀察到，去勢 H-ARtg 小鼠在 insulin 刺激 15 分鐘幾乎沒有觀察到任何訊號，和未



去勢小鼠所觀察到 AR 蛋白大量表現且聚集在 zone 3 區域有很大的差異。然而 90 分鐘 insulin 刺激之肝臟則顯示，去勢小鼠在 insulin 刺激 90 分鐘後 AR 在肝臟卻到處都有表現，沒有 zone 上的差異。

9. 蛋白質降解的調控和 AR 在短時間內表現量上升的關係

從圖一(B)和圖八(B)的結果顯示 insulin 在短時間刺激 AR 表現可能並不是 RNA 的量受到影響(非 transcriptional level 的調控)，因此我們推測可能和蛋白質的降解受到影響有關。圖九(A)為我們設計了(1) proteasome；(2)lysosome 兩種降解途徑的抑制劑使用的劑量以及實驗流程，去探究 AR 在禁食時是否進行蛋白質降解。圖九(B)的結果顯示在禁食 12 小時期間處理 MG132 兩小時或者 CQ 兩小時都有觀察到 AR 的量有增加的趨勢，MG132 的確效是經由觀察 P53、ABC 量的上升；而 CQ 則是 LC3II 的累積以及 cathepsin D mature form (28 kDa) 的減少或者 intermediate form (43 kDa) 的增加。從我們的結果顯示肝臟中的 AR 當處在大於 12 小時禁食的環境下，可能皆有受到 proteasome 以及 lysosome 這兩條降解路徑所調控。

10. proteasome 以及 lysosome 所影響的 AR 在肝臟的分佈情形

從圖九(B) 觀察到處理兩種 inhibitor 似乎都會對 AR 的蛋白質表現有影響，我們進一步想了解 MG132 和 CQ 所影響的 AR 存在肝臟的什麼區域，將經降解抑制劑處理之小鼠肝臟切片進行 IHC staining，圖十(A)是在禁食狀態下 MG132 注射 1 小時以及 2 小時的結果，可以發現 AR 也是主要分布在 zone 3；而圖十(B)則是同樣在禁食狀態下 CQ 施打半小時、1 小時以及 2 小時的結果，我們也得到了相類似的結果，即 AR 會在 zone 3 表現。這樣顯示了 AR 的蛋白質在禁食狀態下是受到兩條降解途徑所調控的，而且這些 AR 主要都是座落於肝臟內 zone3 的區域中。



11. 進一步探討可能影響 AR 表現在 zone 3 的因素

為了釐清 AR 是透過什麼調控機制，使其分佈在 zone 3 的區域，我們首先觀測直接受 insulin 所影響的其受體 insulin receptor 在肝臟中的分佈情形，是否有可能也具有 zone 上的差異。假設 IR 也有一個 zone3 的表現狀態，是否代表這就是決定 AR 在 zone3 增加的原因。當 insulin 和 insulin receptor 結合後，會透過 endocytosis 從細胞膜進入到細胞質間啟動下游的分子調控路徑。從過去的研究磷酸化的 insulin receptor 也會入核，和 DNA 的 IRE (insulin responsive element) 結合，影響和生長相關轉譯層面的表現[60, 61]。從圖十二(A)(B)我們可以觀察到在沒有 insulin 的刺激時不論是禁食或非禁食的 H-ARtg 小鼠，其 pIR 幾乎沒有表現，而當 insulin 刺激後會讓 pIR 在核的表現量增高，但是沒有觀察到有 zone 上的差異。從這次的結果說明了當 insulin 在禁食狀態下刺激時，pIR 並非決定 AR 表現在 zone3 的原因。應該存在其他的因子會去調控 AR 在 zone3 表現的這個現象，我們在未來也會繼續探討這項課題。

第五章 討論



染色技術的選擇

我們之前進行 AR 在 zone 上分佈的探討時，主要都是利用免疫螢光染色來進行，但是背景一直非常高，造成結果無法清楚判讀，得到結論。針對此點，我們進行各項測試，發現其實螢光染色比較不適合利用在我們的系統中，我們在不處理一級抗體的情況下，使用的兔子綠光二抗就會在血管附近產生不專一的訊號，就如同我們圖二的結果。尤其 AR 是一個會入核的 transcriptional factor，但是從我們的 IF 結果發現未染到入核的 AR，無法反應 AR 在細胞中真實的狀況。可能的原因為我們是使用石蠟包埋進行切片製作，此類型的切片相較於冷凍包埋會造成比較高的背景值。所以如果未來仍然想要利用免疫螢光染色去觀察兩種蛋白質的相對位置，可能要透過更換一級抗體以及二級抗體，並且調整染色的條件，以達到專一可信的染色結果。

胰島素調控 AR 的機制

從我們的實驗結果發現胰島素可能對 AR 的調控有兩個層面：前期 (30 分鐘到一小時內)可能是透過 post-transcriptional 層面進行對 AR 的調控，使 AR 可以在短時間內大量表現；後期(一小時到兩小時間)，因為從 RT-qPCR 觀察到 RNA 表現有顯著上升的現象，因此可能亦會經 RNA 轉譯層面進行對 AR 表現量的調控。

我們針對前期 post-transcriptional 層面之調控進行研究，，較可能檢測其是否為經由抑制降解 AR 蛋白質的方式，使 AR 可以在短時間內大量表現，從處理兩種蛋白質降解抑制劑的結果發現，兩種蛋白質降解抑制劑均會造成 AR 蛋白質的增加，我們因此認為兩種降解機制均可能參與調控 AR 的蛋白質表現。然而結果也顯示在



MG132 有確效的時間點，同時也可以看到 lysosome 相關的蛋白質表現量也有上升的情況，包括 LC3II 及 Cathepsin D intermediate form 累積；而 CQ 確效的組別也可以觀察到 ABC、P53 變多，表示單一藥物處理似乎即會同時抑制兩種降解機制，因此目前無法確認到底 AR 於 fasting 時經何降解路徑進行降解，未來可能需要嘗試其他的方式，在不會有 cross interaction 情況產生下，來確認 AR 於 fasting 時之降解機制。

另一方式協助釐清 3 個月的 H-ARtg 小鼠在禁食下施打 insulin 後，是透過什麼方式讓 AR 在 15 分鐘內大量表現的方式為，將不同處理時間的樣本利用西方墨點法觀察兩條降解途徑的 indicator 是否有受到影響，例如檢測我們初步的結果顯示，在 15 分鐘可以看 P62 及 P53 之表現量是否有上升的現象。

探討 AR 在肝臟的特定區域表現和代謝機制的關聯性

我們觀察到當 3 個月 H-ARtg 小鼠在禁食大於 12 小時後，注射 insulin 會看到 AR 只會出現在 zone 3 的區域，這樣的現象會一直持續到 120 分鐘。首先我們很好奇為什麼 AR 一定都只出現在 zone 3，推論應該是可能參與 zone 3 的某些代謝相關功能。zone 3 最主要進行包括醣解作用 (glycolysis) 及脂肪生成(lipogenesis)等代謝功能，而實驗室學長於 H-ARtg 小鼠也有觀察到體重較輕的現象，因此我們下一步將進行測試肝臟中 AR 可能和哪一個代謝功能之調控有關。

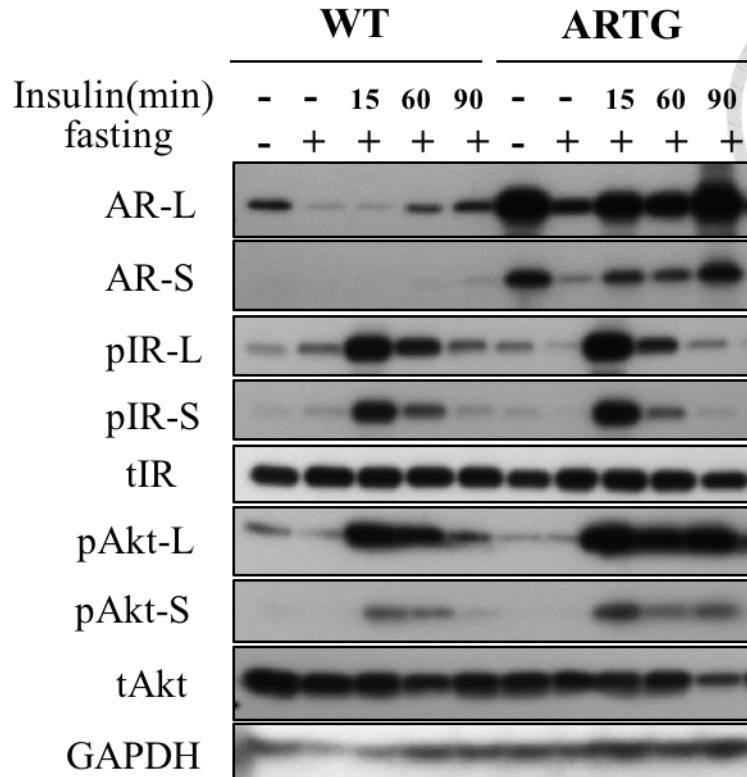
實驗室學長初步從測 serum 的結果顯示 H-ARtg 小鼠 TG (triglycerol) 的量和一般小鼠相比沒有明顯的差異，在進行犧牲的時候有沒有看到明顯的組織堆積，因此初步推定可能和脂肪生成較不相關。學長的研究同時指出 H-ARtg 小鼠有血糖較低的現象，未來將分析 AR 是否可能調控 glycolysis，為導致 H-ARtg 小鼠相對於 WT 小鼠比較瘦的原因。



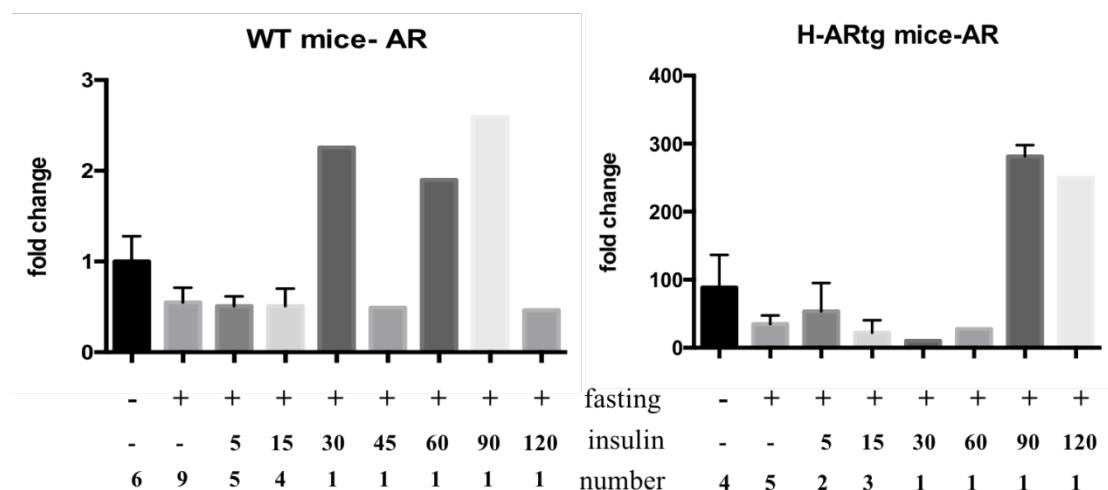
從我們的實驗結果顯示當 H-ARtg 小鼠進行去勢時，特定於 zone 3 表現的現象就消失了，所以我們認為 androgen 是調控 AR 在 zone 3 表現的重要因子之一，不過我們認為應該還存在其他 zone 3 specific 之調控因子。目前已知 zone 3 基因表現主要是由 Wnt/beta-catenin pathway 所調控，因此我們首先推論 AR 在 zone 3 可能受到 Wnt pathway 的調控。我們進行初步的測試，利用 3 個月 H-ARtg 公鼠，在禁食大於 12 小時下處理 Wnt3a (Wnt pathway 的 ligand，濃度為 50ug/kg)，2 個小時後犧牲取肝臟進行石蠟切片染色。在禁食狀態下我們的 IHC staining 是無法染到 AR 的訊號的，但是當我們施打 Wnt3a 後，發現 IHC staining 不論在 zone1 或 zone 3 都有 AR 的訊號表現。這樣的結果顯示 Wnt pathway 一但被活化可以刺激 AR 的表現。平常 Wnt pathway 只會在 zone 3 被活化，不過由於我們是利用腹腔注射技術 (intraperitoneal injection) 將 Wnt3a ligand 送入肝臟中，因此 Wnt3a 應該到處都有分佈，因此觀察到 AR 到處都有分佈的現象，之後我們將進一步探討此 Wnt3a 所影響之 AR 是否發生在影響蛋白質降解之層面。未來也將利用實驗室已有之 beta-catenin 剔除鼠動物模式進行確認之研究，觀察此調控機制是否於此動物模式中受到影響。



A



B

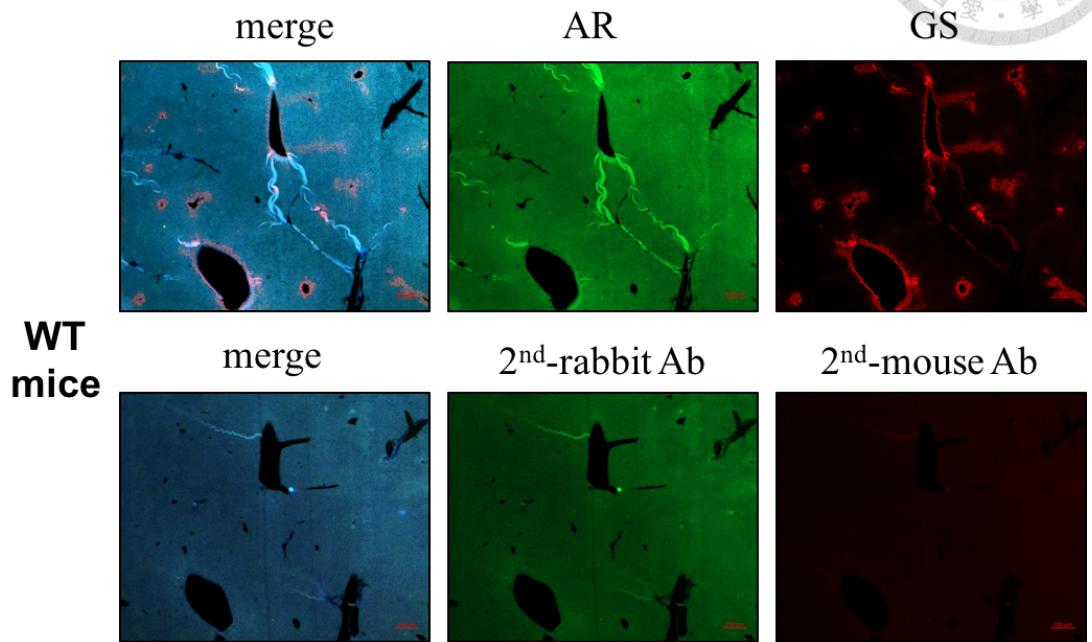


圖一、檢測禁食 (Fasting) 及施打 insulin 對肝臟中 AR 蛋白質及 RNA 表現量之影響。

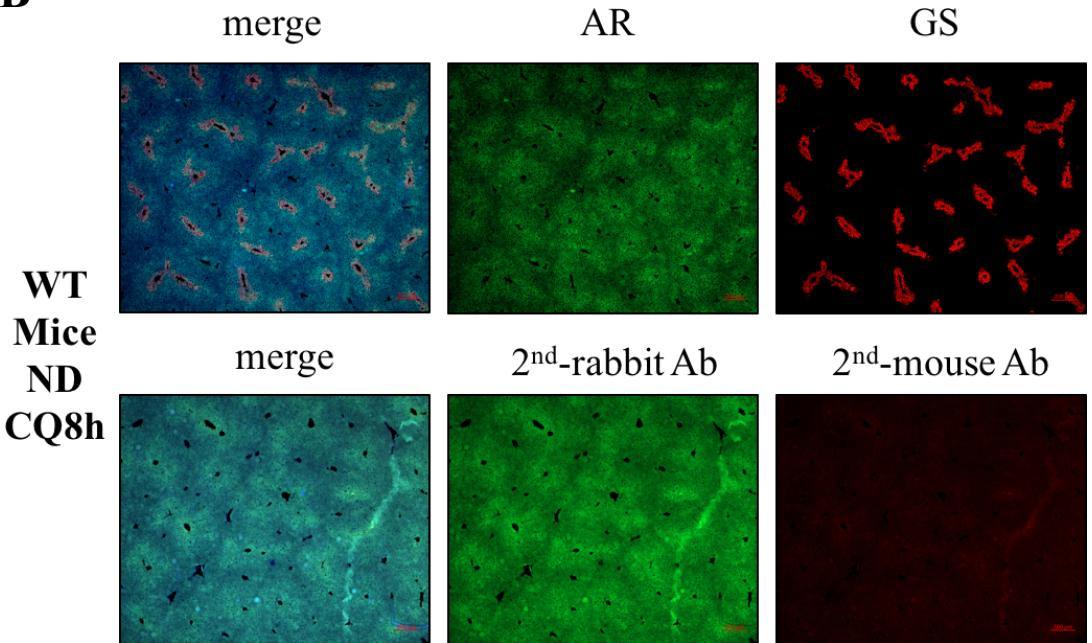
(A)利用三個月大的 WT 及 ARTG 小鼠進行大於 12 小時的禁食後施打 insulin。我們使用的濃度為 0.75 IU/kg。依不同的施打時間進行犧牲並收取肝臟組織。西方墨點法技術是透 5 過針對目標蛋白選取相對應的抗體處理後呈色得到結果如圖。(B) RT-qPCR 的 RNA 是從肝臟組織中萃取而來，之後經過 RT 得到樣品的 cDNA，以用來偵測目標基因 AR 的表現量。每個處理組的樣本數量如圖所示，圖中的數值皆和 WT 老鼠未禁食的 AR 結果平均值作了校正。

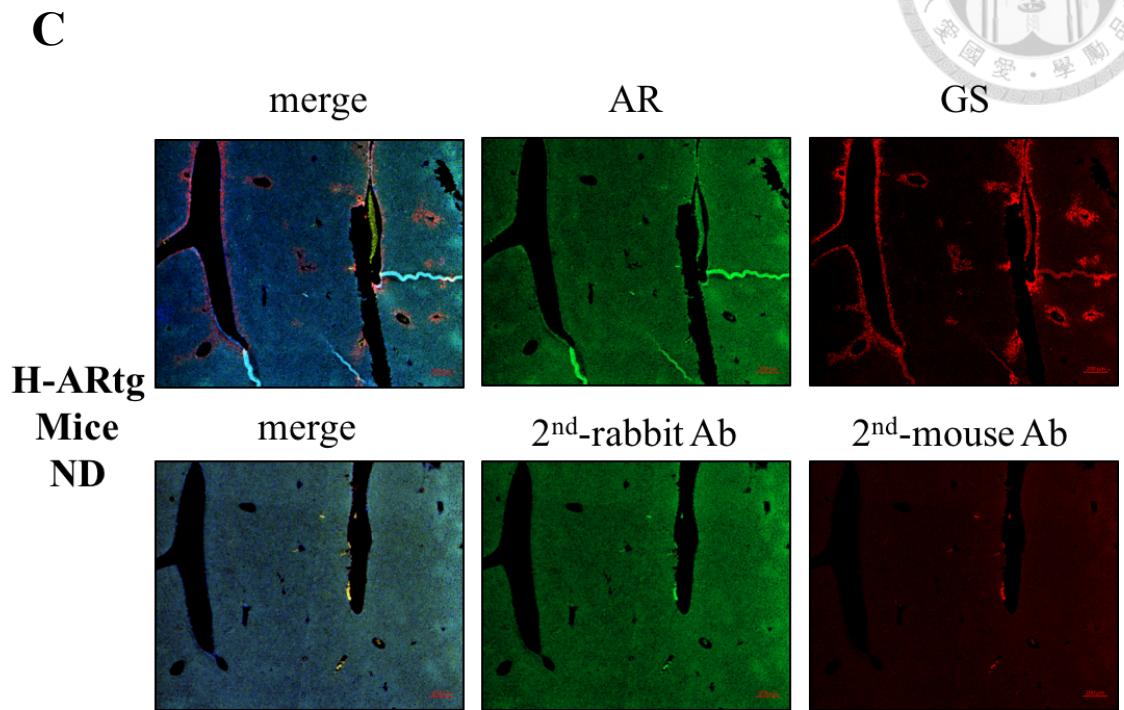


A



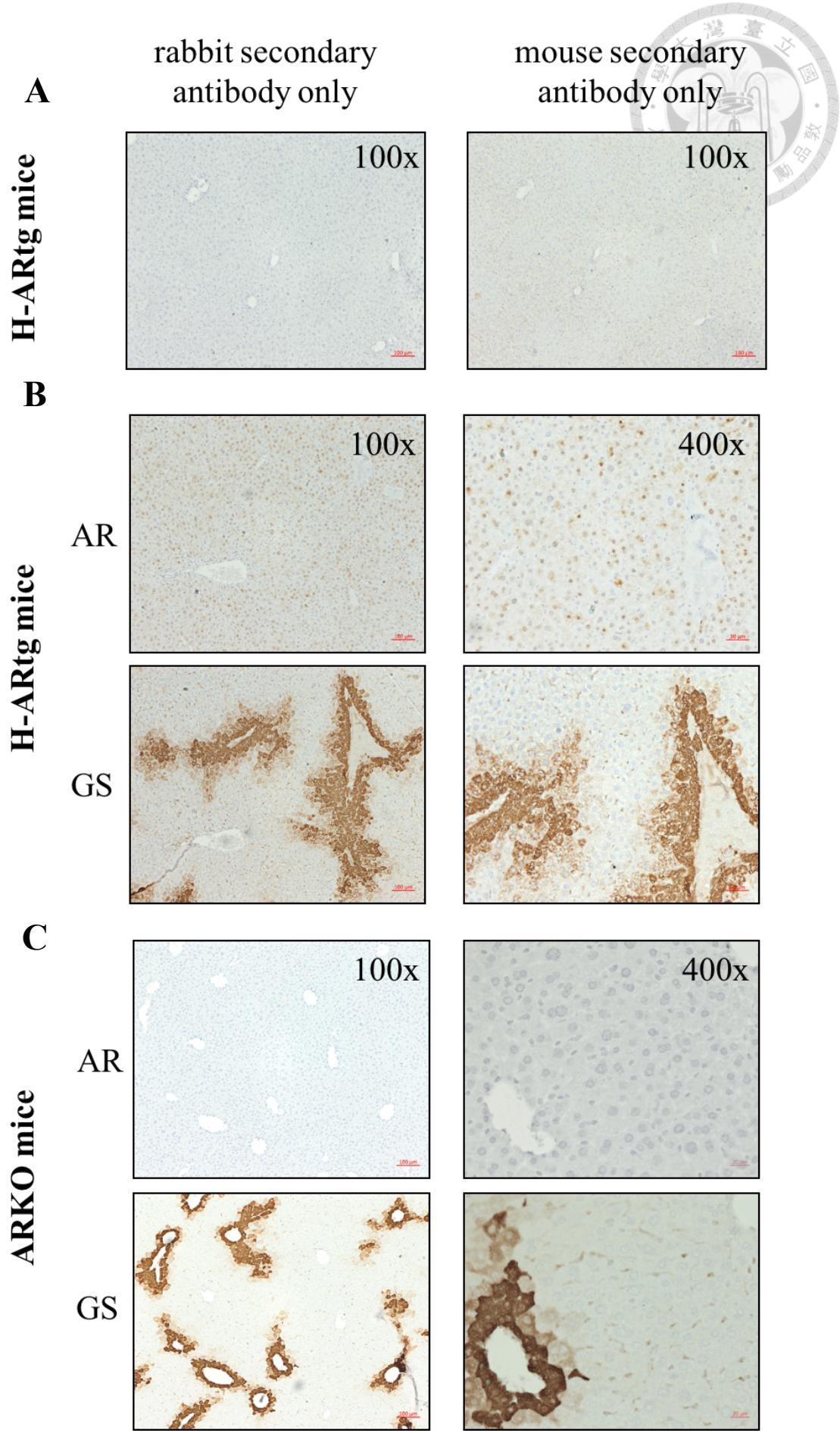
B

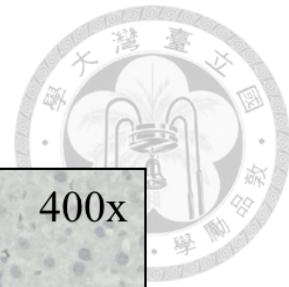




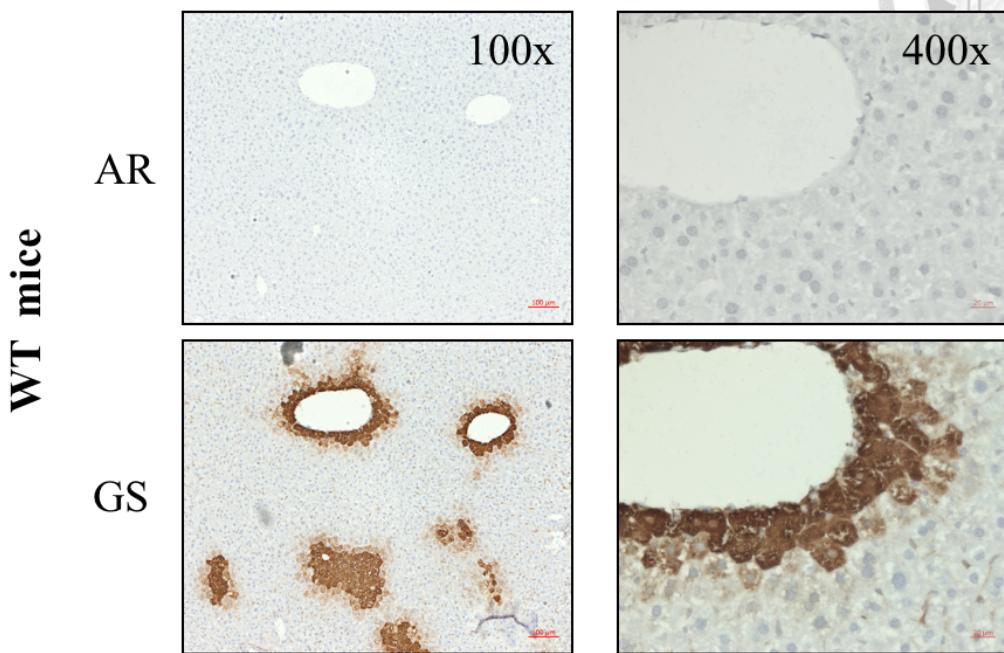
圖二、測試利用免疫螢光染色法觀察 AR 在肝臟裡表現樣式之可行性。

使用 3 個月大 WT、H-ARtg 老鼠的石蠟組織切片觀察沒有下一級抗體的切片是否會有明顯的背景色。**(A)** 3 個月大 WT 小鼠在未進食的狀態下取出其肝臟製作石蠟切片進行免疫螢光染色。**(B)** 3 個月大 WT 小鼠在未禁食的狀態下施打 lysosome 的抑制劑 chloroquine8 個小時。**(C)** 3 個月大 AR 轉殖基因小鼠未禁食時進行染色。處理一級抗體的時間皆為 20 小時，二級抗體處理 45 分鐘後封片，使用正立螢光顯微鏡進行觀察。綠光為兔子二級抗體；紅光為小鼠二級抗體。





D

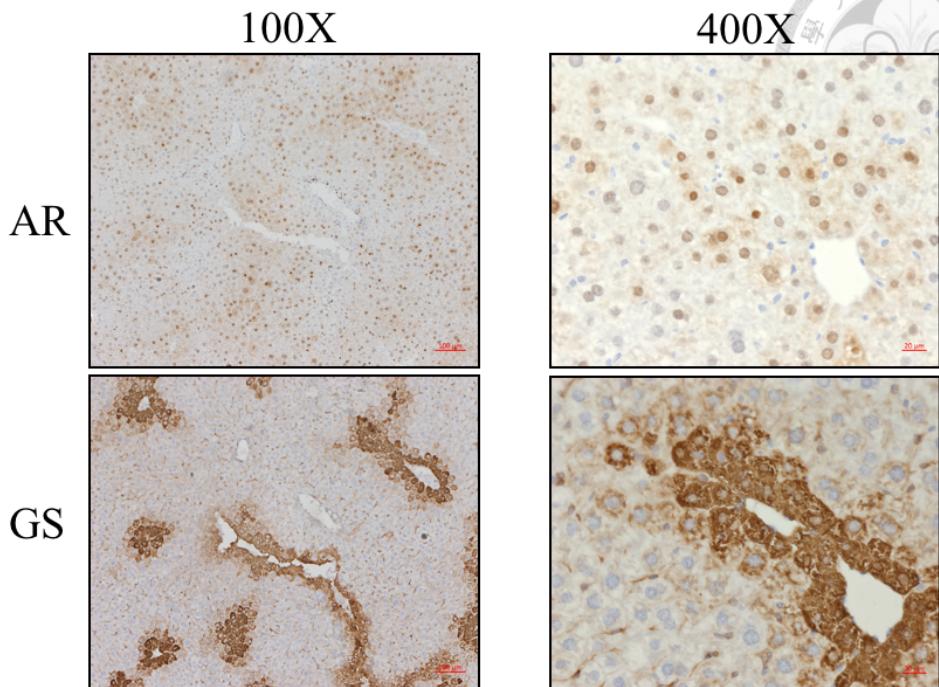


圖三、測試利用免疫組織化學染色法(immunocytochemistry staining, IHC staining)觀察 AR 在肝臟裡表現之可行性。

(A) 利用 3 個月的 H-ARtg 老鼠在未禁食的狀態下進行犧牲並取其肝臟製作石蠟切片。首先我們先進行僅處理二抗進行呈色的實驗，確認在沒有一級抗體的處理下不會有訊號的表現。隨後使用 IHC staining 於 (B) 3 個月未禁食 H-ARtg 小鼠；(C) 3 個月 H-ARko 小鼠檢視正控制與負控制是否存在於這類型的染色法；(D) 3 個月非禁食 WT 小鼠用以觀察一般情形下肝臟內的 AR 表現量。圖示左側含有兩個蛋白質的結果：AR 為我們的目標蛋白、GS 為一只會表現在 zone3 的蛋白質，用來作為標的，皆用 100 倍放大比率呈現；而右圖則是 400 倍放大圖，方便觀察是否有入核的現象。

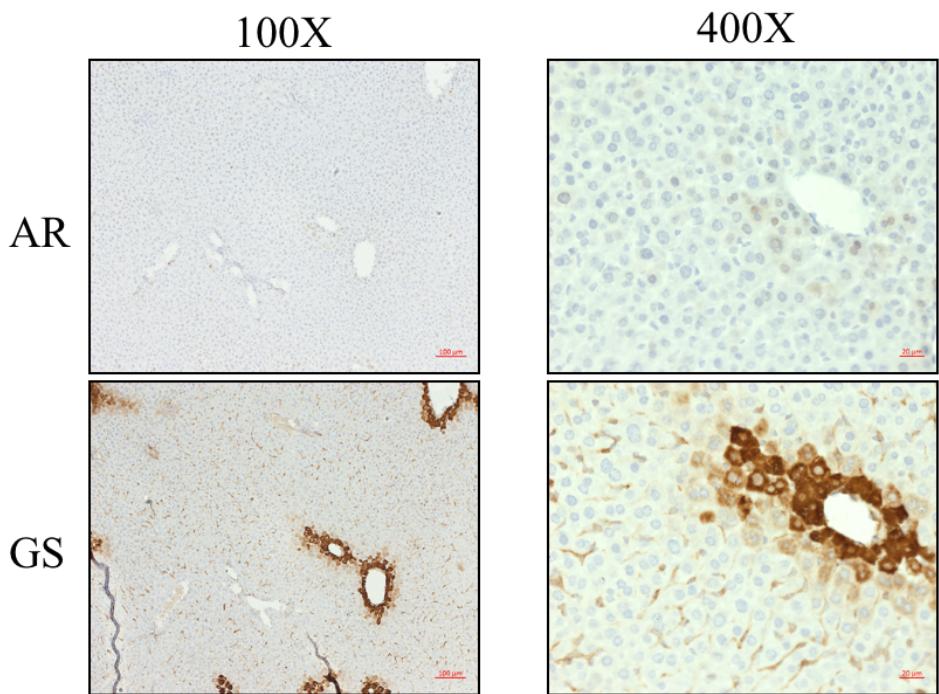
A

H-ARtg non-fasting



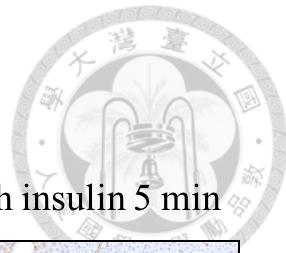
B

H-ARtg fasting 12h



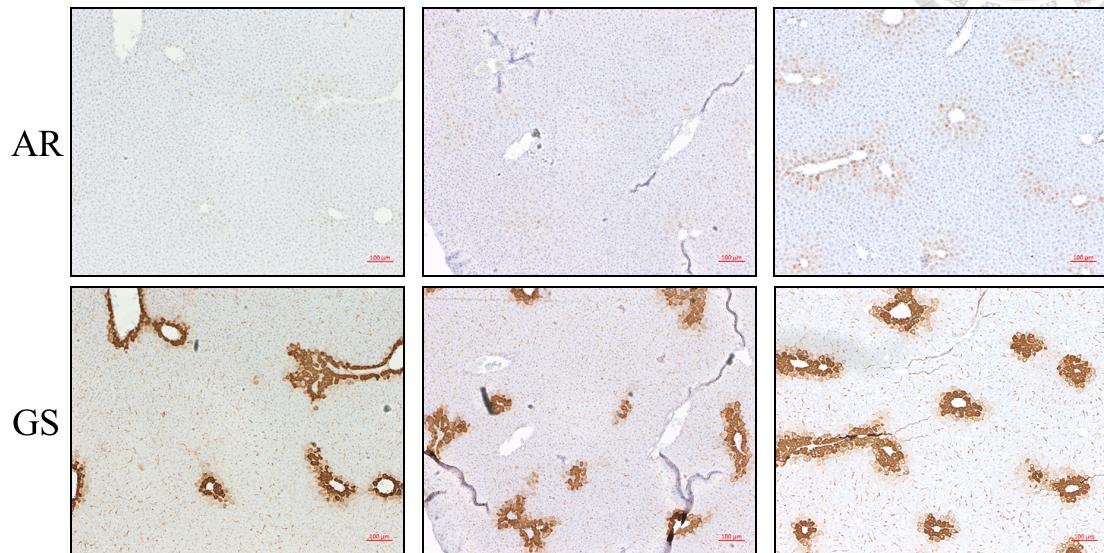
圖四、利用化學免疫染色觀察禁食狀態下 H-ARtg 小鼠肝臟組織中 AR 蛋白表現的變化。

(A)3 個月非禁食狀態 H-ARtg 小鼠 (B) 3 個月禁食狀態下 H-ARtg 小鼠利用 IHC staining 觀察 AR、GS 的表現分佈。左圖為 100 倍放大比率；右圖為 400 倍放大比率，AR 為目標蛋白，GS 為 zone3 的標的蛋白。

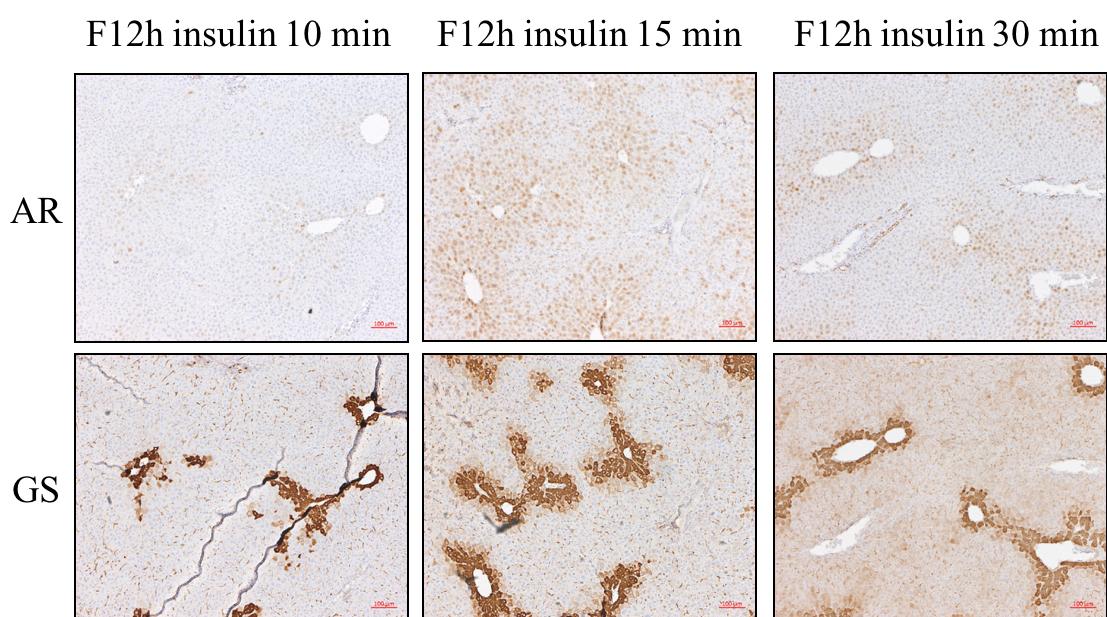


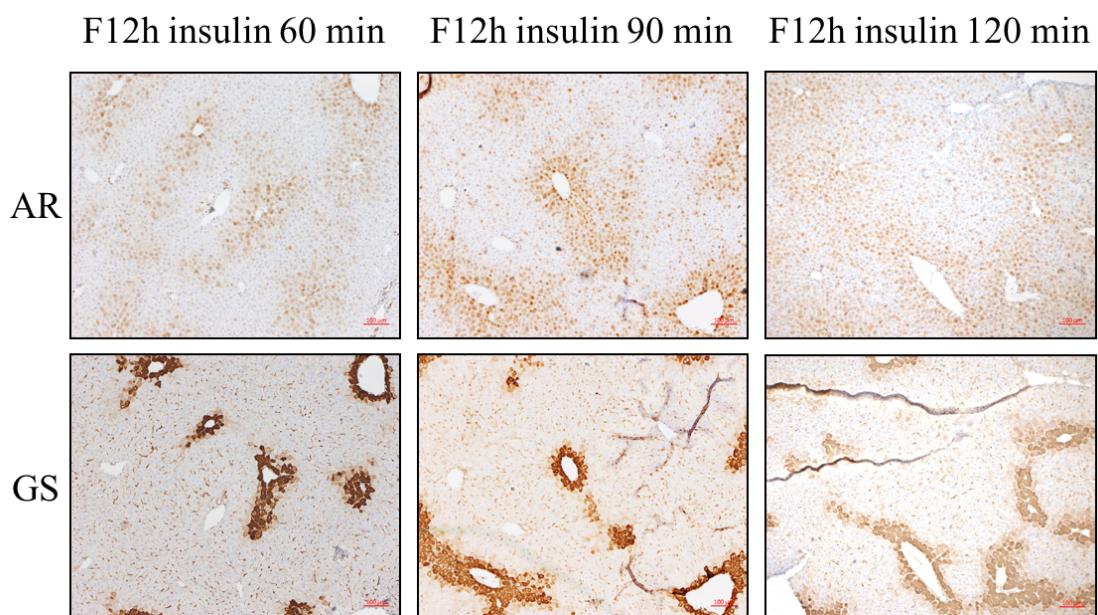
A

H-ARtg mice-fasting 12h F12h insulin 2 min



F12h insulin 5 min

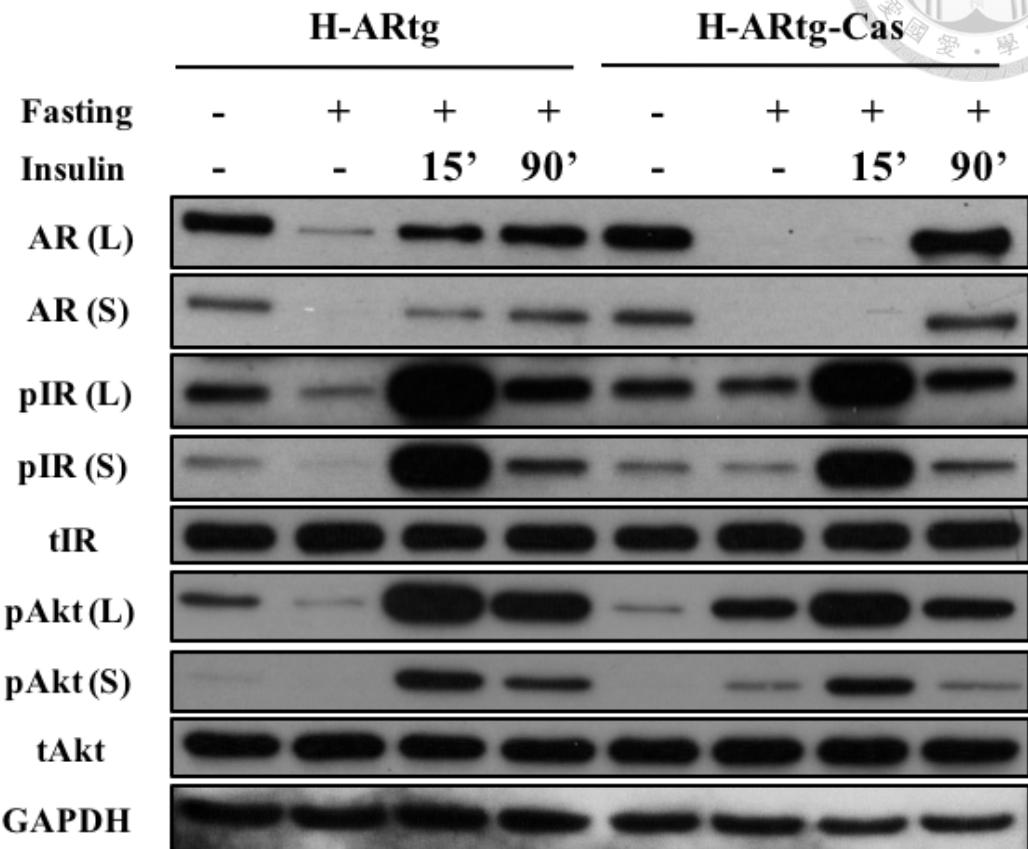




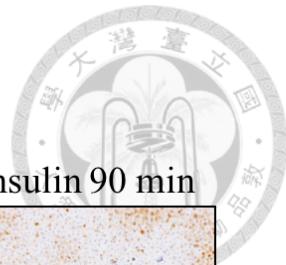
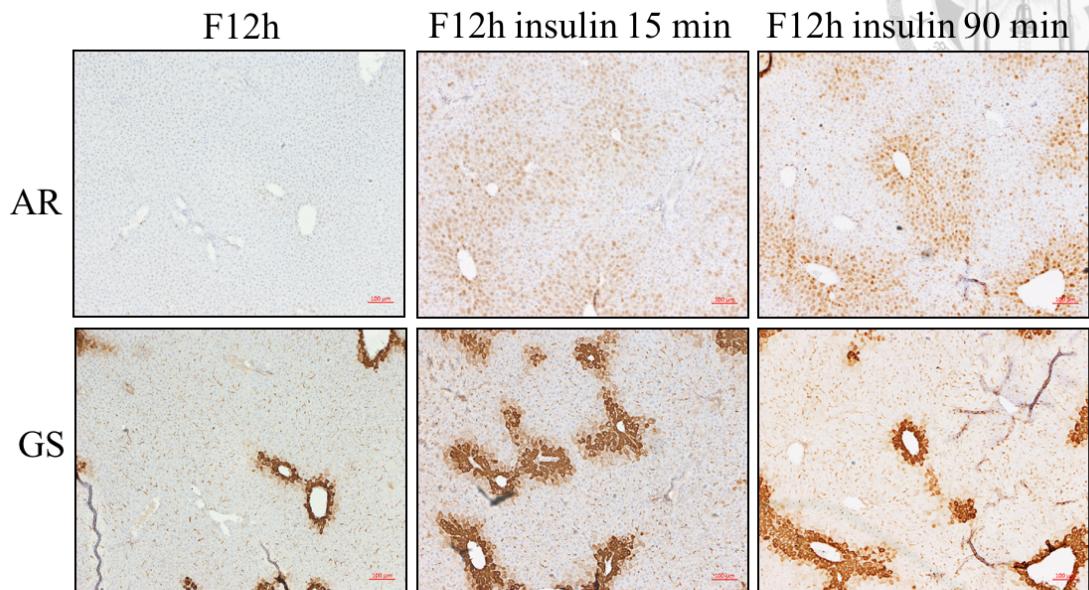
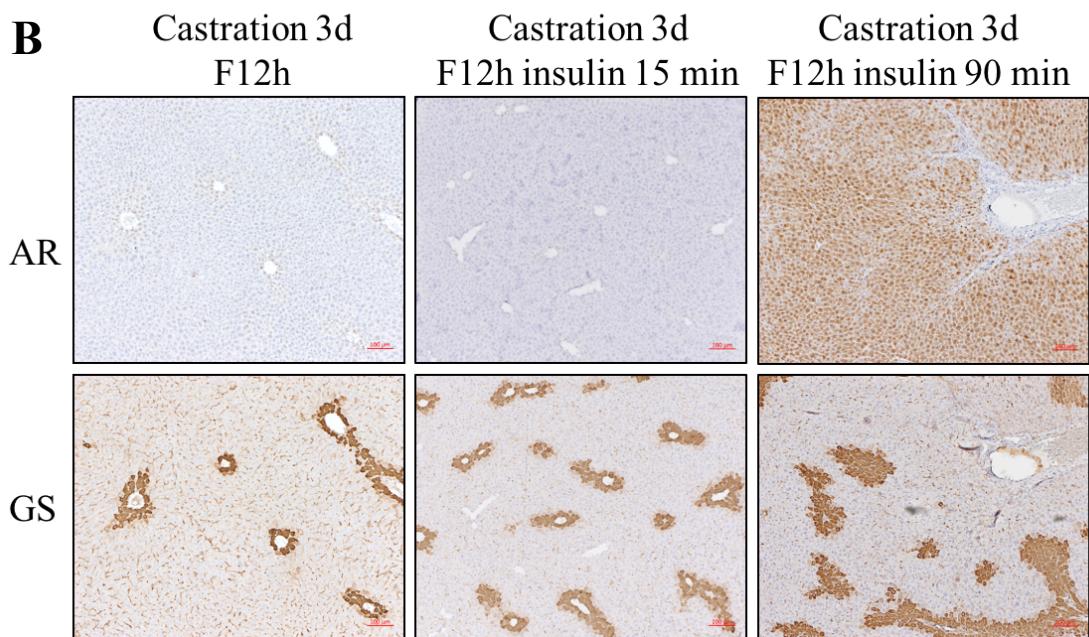
圖五、在禁食後施打 insulin 觀察 H-ARTG 小鼠肝臟組織中 AR 蛋白表現的變化。
我們選用 3 個月 ARTG 老鼠在禁食超過 12 小時後，分別施打 insulin (濃度為 0.75 IU/kg)自 2 分鐘到 120 分鐘不同的時間點如圖(A)，犧牲後取肝臟製作石蠟切片。
我們利用 IHC staining 做染色觀察。AR 為欲觀察的蛋白質，而 GS 為 zone3 的標的蛋白。圖示皆利用正立螢光顯微鏡的白光拍攝，放大比率為 100 倍。



A



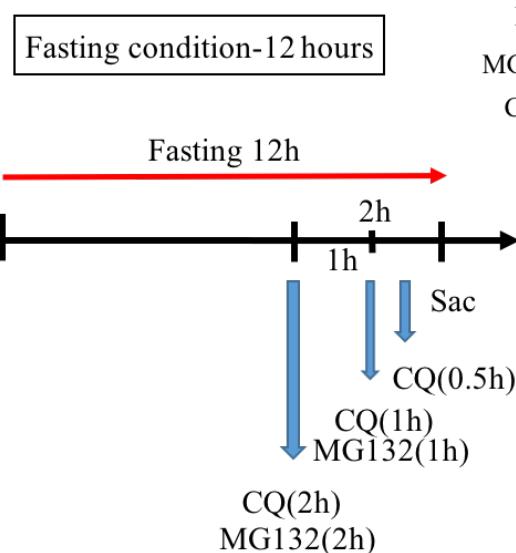
圖六、測試去勢的 H-ARtg 小鼠在禁食後透過 insulin 刺激 AR 表現是否有影響
 利用三個月大的 H-ARtg 小鼠處理去勢的手術(castration)。在縫合休養三天後首先進行禁食大於 12 小時，隔日施打 insulin 探討對於 AR 表現的影響。我們選取 insulin 注射(0.75 IU/kg)15 分鐘以及 90 分鐘後犧牲並取其肝臟組織進行。(A) 西方墨點法是透過從肝臟組織萃取蛋白質後進行蛋白質分離，欲探測之目標蛋白利用相對應的一級、二級抗體連接後進行呈色。

**A****B**

圖七、使用 IHC staining 觀察去勢後 insulin 對 AR 分佈的影響

利用 3 個月 H-ARtg 小鼠進行去勢，三天後禁食大於 12 小時下注射 insulin 15 分鐘或 90 分鐘，犧牲後取肝臟製作石蠟切片完成 IHC staining 染色。(A)沒有進行去勢的 H-ARtg 小鼠(B)去勢的 H-ARtg 小鼠，AR 為目標蛋白，GS 為 zone3 的標的蛋白。

A

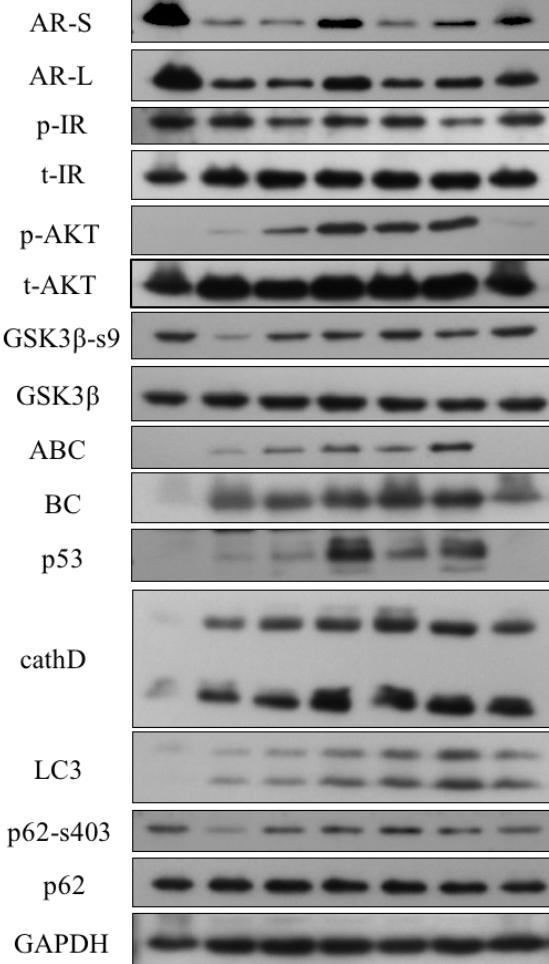


B

Fasting(12h)
MG132(10mg/kg)
CQ(60mg/kg)

H-ARtg

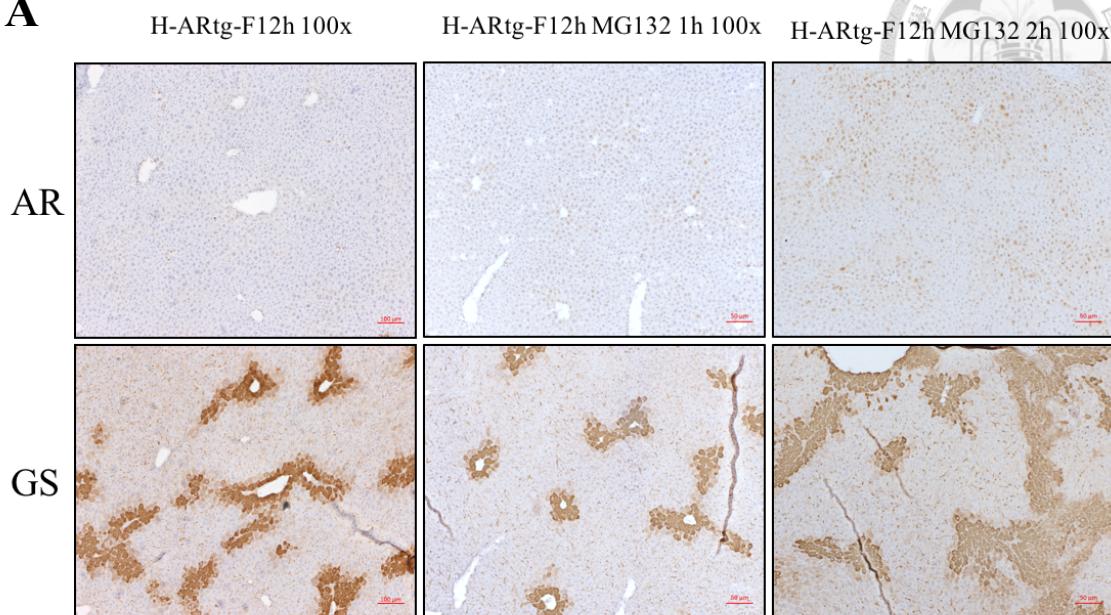
- + + + + + +
- - 1 2 - - -
- - - - 0.5 1 2



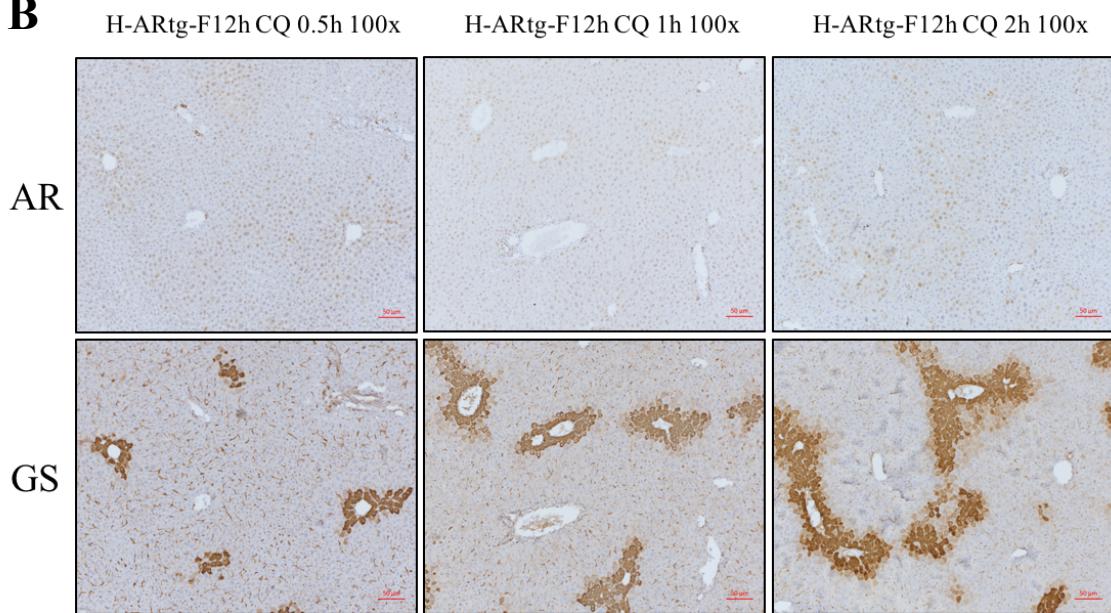
圖八、測試 proteasome 以及 lysosome 抑制劑施打對阻斷 H-ARtg 小鼠肝臟中蛋白質降解之確效。

利用 3 個月大 H-ARtg 小鼠進行大於 12 小時禁食，期間處理 proteasome 以及 lysosome 抑制劑，MG132 (10 mg/kg) 和 CQ (60 mg/kg)，施打的步驟如圖(A)。圖(B)為犧牲後取肝臟組織進行西方墨點法相關實驗，依據目標蛋白使用相對應的一級二級抗體。

A

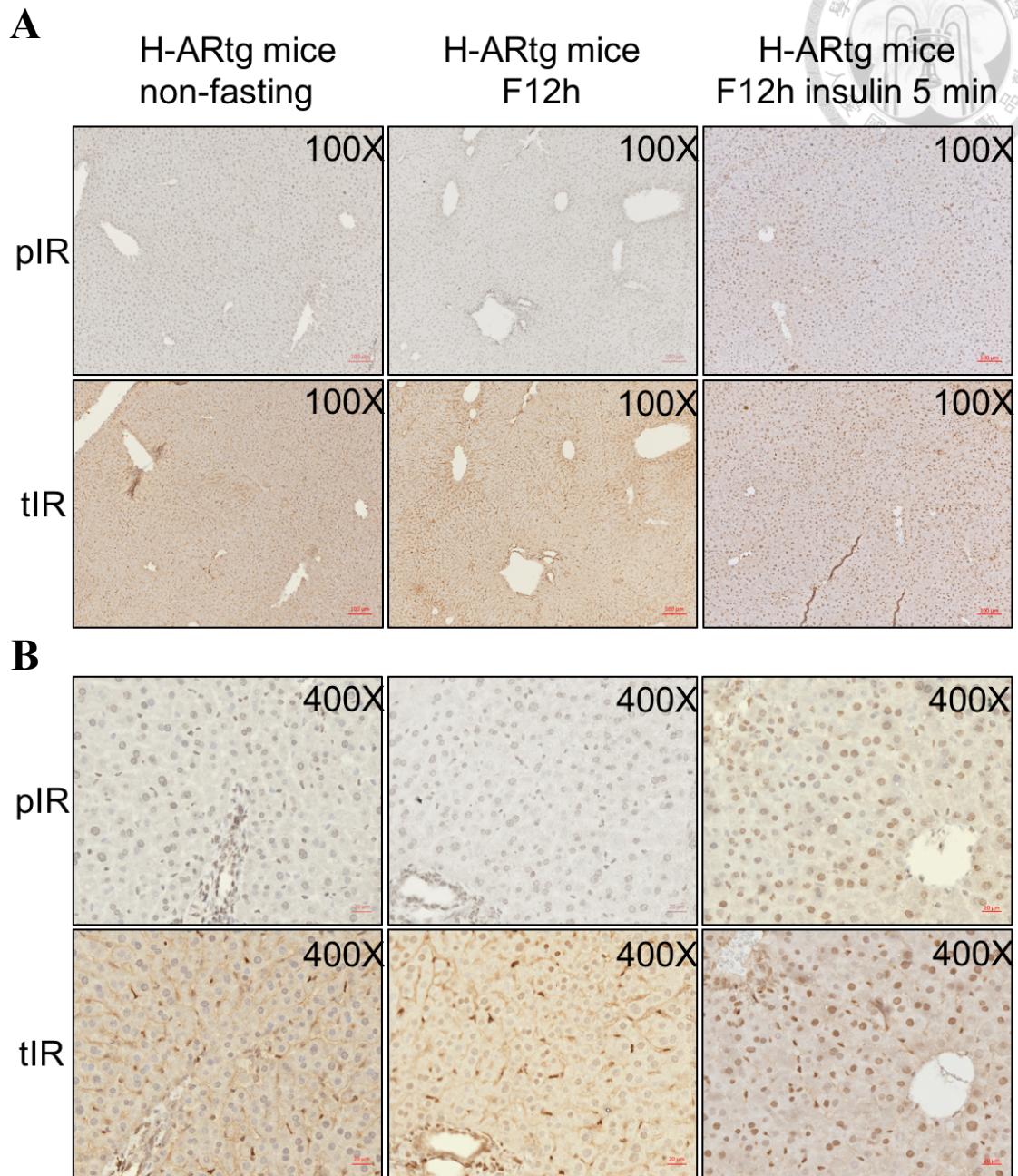


B



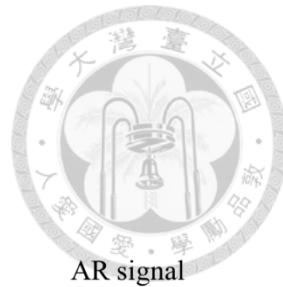
圖九、利用 IHC staining 觀察 proteasome 以及 lysosome 抑制劑對阻斷 H-ARtg 小鼠肝臟中降解之 AR 蛋白質的分佈結果。

將 3 個月 ARTG 小鼠在禁食 12 小時期間處理抑制劑後犧牲收取肝臟進行 IHC staining 染色。(A) proteasome inhibitor (MG132, 10 mg/kg) ,處理兩種不同時間(B) lysosome inhibitor (CQ, 60 mg/kg)則處理三種時間進行比較。 AR 為目標蛋白，GS 為 zone3 的標的蛋白。

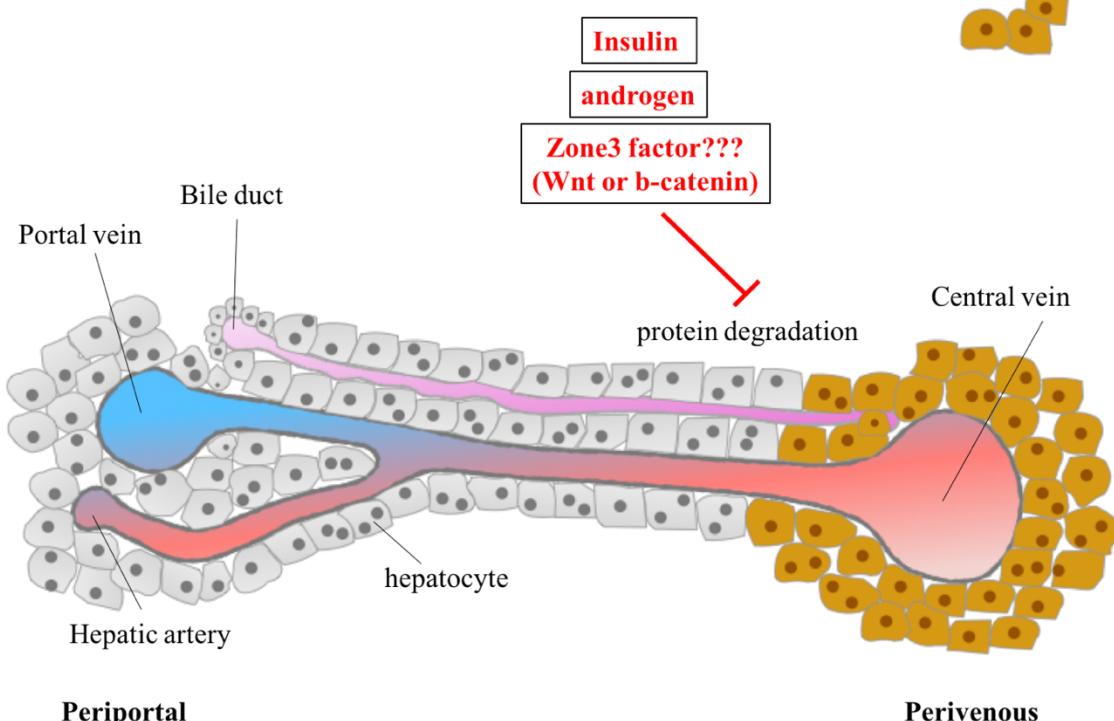


圖十、禁食後 insulin 注射其受體 insulin receptor 在肝臟的分佈。

使用 3 個月 H-ARtg 小鼠經過大於 12 小時禁食後，施打 insulin 5 分鐘犧牲小鼠，取肝臟組織進行 IHC staining 染色觀察 pIR、tIR 的分佈。(A)100X 放大倍率(B) 400X 放大倍率。



A



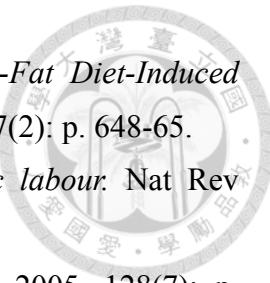
圖十一、本論文提出之假說圖示

(A) 圖示為肝臟內部示意圖，灰色區塊為肝臟細胞，血管內藍色代表氧氣含量較高之血流，紅色則為氧氣含量較低之血流。根據前面所述之實驗結果，我們提出了在禁食的狀態下，受 insulin 刺激後可能影響 AR 表現在 zone 3 的因子。

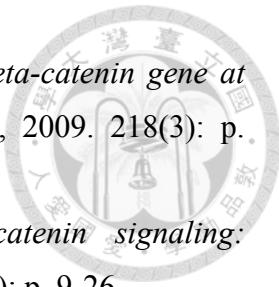
參考文獻



1. MacLean, H.E., G.L. Warne, and J.D. Zajac, *Localization of functional domains in the androgen receptor*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1997. 62(4): p. 233-42.
2. Galani, A., et al., *Androgen insensitivity syndrome: clinical features and molecular defects*. Hormones (Athens), 2008. 7(3): p. 217-29.
3. Tan, M.H., et al., *Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery*. Acta Pharmacol Sin, 2015. 36(1): p. 3-23.
4. Davey, R.A. and M. Grossmann, *Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside*. Clin Biochem Rev, 2016. 37(1): p. 3-15.
5. Mills, I.G., *Maintaining and reprogramming genomic androgen receptor activity in prostate cancer*. Nat Rev Cancer, 2014. 14(3): p. 187-98.
6. Shen, M.Q. and H. Shi, *Sex Hormones and Their Receptors Regulate Liver Energy Homeostasis*. International Journal of Endocrinology, 2015.
7. Foradori, C.D., M.J. Weiser, and R.J. Handa, *Non-genomic actions of androgens*. Front Neuroendocrinol, 2008. 29(2): p. 169-81.
8. Wang, S.H., et al., *Identification of androgen response elements in the enhancer I of hepatitis B virus: a mechanism for sex disparity in chronic hepatitis B*. Hepatology, 2009. 50(5): p. 1392-402.
9. Ma, W.L., et al., *Androgen receptor roles in hepatocellular carcinoma, fatty liver, cirrhosis and hepatitis*. Endocr Relat Cancer, 2014. 21(3): p. R165-82.
10. Wang, S.H., P.J. Chen, and S.H. Yeh, *Gender disparity in chronic hepatitis B: Mechanisms of sex hormones*. J Gastroenterol Hepatol, 2015. 30(8): p. 1237-45.
11. Kanda, T. and O. Yokosuka, *The androgen receptor as an emerging target in hepatocellular carcinoma*. J Hepatocell Carcinoma, 2015. 2: p. 91-9.
12. Wu, M.H., et al., *Androgen receptor promotes hepatitis B virus-induced hepatocarcinogenesis through modulation of hepatitis B virus RNA transcription*. Sci Transl Med, 2010. 2(32): p. 32ra35.
13. Lin, H.Y., et al., *Increased hepatic steatosis and insulin resistance in mice lacking hepatic androgen receptor*. Hepatology, 2008. 47(6): p. 1924-35.
14. Yu, I.C., et al., *Androgen receptor roles in insulin resistance and obesity in males: the linkage of androgen-deprivation therapy to metabolic syndrome*. Diabetes, 2014. 63(10): p. 3180-8.



15. Dubois, V., et al., *Androgen Deficiency Exacerbates High-Fat Diet-Induced Metabolic Alterations in Male Mice*. *Endocrinology*, 2016. 157(2): p. 648-65.
16. Bradley, C.A., *Liver: Spatial division of hepatic metabolic labour*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017. 14(3): p. 139.
17. Grompe, M., *The origin of hepatocytes*. *Gastroenterology*, 2005. 128(7): p. 2158-60.
18. Soto-Gutierrez, A., et al., *Pre-clinical and clinical investigations of metabolic zonation in liver diseases: The potential of microphysiology systems*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2017: p. 1535370217707731.
19. Kietzmann, T., *Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited*. *Redox Biol*, 2017. 11: p. 622-630.
20. Hijmans, B.S., et al., *Zonation of glucose and fatty acid metabolism in the liver: mechanism and metabolic consequences*. *Biochimie*, 2014. 96: p. 121-9.
21. Halpern, K.B., et al., *Single-cell spatial reconstruction reveals global division of labour in the mammalian liver*. *Nature*, 2017. 542(7641): p. 352-356.
22. LeCluyse, E.L., et al., *Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing*. *Crit Rev Toxicol*, 2012. 42(6): p. 501-48.
23. Behari, J., et al., *beta-catenin links hepatic metabolic zonation with lipid metabolism and diet-induced obesity in mice*. *Am J Pathol*, 2014. 184(12): p. 3284-98.
24. Yang, J., et al., *beta-catenin signaling in murine liver zonation and regeneration: a Wnt-Wnt situation!* *Hepatology*, 2014. 60(3): p. 964-76.
25. Behari, J., *The Wnt/beta-catenin signaling pathway in liver biology and disease*. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010. 4(6): p. 745-56.
26. Yun, M.S., et al., *Both ERK and Wnt/beta-catenin pathways are involved in Wnt3a-induced proliferation*. *J Cell Sci*, 2005. 118(Pt 2): p. 313-22.
27. Gerbal-Chaloin, S., et al., *The WNT/beta-catenin pathway is a transcriptional regulator of CYP2E1, CYP1A2, and aryl hydrocarbon receptor gene expression in primary human hepatocytes*. *Mol Pharmacol*, 2014. 86(6): p. 624-34.
28. Nejak-Bowen, K.N. and S.P. Monga, *Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: sorting the good from the bad*. *Semin Cancer Biol*, 2011. 21(1): p. 44-58.
29. Yardy, G.W. and S.F. Brewster, *Wnt signalling and prostate cancer*. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2005. 8(2): p. 119-26.



30. Bandapalli, O.R., et al., *Transcriptional activation of the beta-catenin gene at the invasion front of colorectal liver metastases*. J Pathol, 2009. 218(3): p. 370-9.
31. MacDonald, B.T., K. Tamai, and X. He, *Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases*. Dev Cell, 2009. 17(1): p. 9-26.
32. Burke, Z.D., et al., *Liver zonation occurs through a beta-catenin-dependent, c-Myc-independent mechanism*. Gastroenterology, 2009. 136(7): p. 2316-2324 e1-3.
33. Burke, Z.D. and D. Tosh, *The Wnt/beta-catenin pathway: master regulator of liver zonation?* Bioessays, 2006. 28(11): p. 1072-7.
34. Han, S., et al., *An endothelial cell niche induces hepatic specification through dual repression of Wnt and Notch signaling*. Stem Cells, 2011. 29(2): p. 217-28.
35. Odom, D.T., et al., *Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors*. Science, 2004. 303(5662): p. 1378-81.
36. Parviz, F., et al., *Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis*. Nat Genet, 2003. 34(3): p. 292-6.
37. Colletti, M., et al., *Convergence of Wnt signaling on the HNF4alpha-driven transcription in controlling liver zonation*. Gastroenterology, 2009. 137(2): p. 660-72.
38. Hatzis, P., et al., *Genome-wide pattern of TCF7L2/TCF4 chromatin occupancy in colorectal cancer cells*. Mol Cell Biol, 2008. 28(8): p. 2732-44.
39. Stanulovic, V.S., et al., *Hepatic HNF4alpha deficiency induces periportal expression of glutamine synthetase and other pericentral enzymes*. Hepatology, 2007. 45(2): p. 433-44.
40. Jaworski, T., *Degradation and beyond: control of androgen receptor activity by the proteasome system*. Cell Mol Biol Lett, 2006. 11(1): p. 109-31.
41. Lin, H.K., et al., *Regulation of androgen receptor signaling by PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) tumor suppressor through distinct mechanisms in prostate cancer cells*. Mol Endocrinol, 2004. 18(10): p. 2409-23.
42. Pickart, C.M., *Mechanisms underlying ubiquitination*. Annu Rev Biochem, 2001. 70: p. 503-33.
43. Thrower, J.S., et al., *Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal*. EMBO J, 2000. 19(1): p. 94-102.

44. Lin, H.K., et al., *Akt suppresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(13): p. 7200-5.
45. Hu, Y.C., et al., *Functional domain and motif analyses of androgen receptor coregulator ARA70 and its differential expression in prostate cancer*. J Biol Chem, 2004. 279(32): p. 33438-46.
46. Mitani, T., et al., *Autophagic degradation of the androgen receptor mediated by increased phosphorylation of p62 suppresses apoptosis in hypoxia*. Cell Signal, 2015. 27(10): p. 1994-2001.
47. Heuson, J.C., A. Coune, and R. Heimann, *Cell proliferation induced by insulin in organ culture of rat mammary carcinoma*. Exp Cell Res, 1967. 45(2): p. 351-60.
48. Wang, W., et al., *Mediator MED23 links insulin signaling to the adipogenesis transcription cascade*. Dev Cell, 2009. 16(5): p. 764-71.
49. Eisenberg, M.L., et al., *Insulin receptor (IR) and glucose transporter 2 (GLUT2) proteins form a complex on the rat hepatocyte membrane*. Cell Physiol Biochem, 2005. 15(1-4): p. 51-8.
50. Tatulian, S.A., *Structural Dynamics of Insulin Receptor and Transmembrane Signaling*. Biochemistry, 2015. 54(36): p. 5523-32.
51. Rubinsztein, D.C., G. Marino, and G. Kroemer, *Autophagy and aging*. Cell, 2011. 146(5): p. 682-95.
52. Laplante, M. and D.M. Sabatini, *An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis*. Curr Biol, 2009. 19(22): p. R1046-52.
53. Tzatsos, A. and K.V. Kandror, *Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation*. Mol Cell Biol, 2006. 26(1): p. 63-76.
54. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease*. Trends Endocrinol Metab, 2008. 19(10): p. 371-9.
55. Brown, A.E., et al., *p38 MAPK activation upregulates proinflammatory pathways in skeletal muscle cells from insulin-resistant type 2 diabetic patients*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2015. 308(1): p. E63-70.
56. Nyman, E., G. Cedersund, and P. Stralfors, *Insulin signaling - mathematical modeling comes of age*. Trends Endocrinol Metab, 2012. 23(3): p. 107-15.
57. Bazotte, R.B., L.G. Silva, and F.P. Schiavon, *Insulin resistance in the liver*:

- deficiency or excess of insulin? *Cell Cycle*, 2014. 13(16): p. 2494-500.
58. Kubota, N., et al., *Differential hepatic distribution of insulin receptor substrates causes selective insulin resistance in diabetes and obesity*. *Nat Commun*, 2016. 7: p. 12977.
59. Gruppuso, P.A. and J.A. Sanders, *Regulation of liver development: implications for liver biology across the lifespan*. *J Mol Endocrinol*, 2016. 56(3): p. R115-25.
60. Mounier, C. and B.I. Posner, *Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2006. 84(7): p. 713-24.
61. Gletsu, N., W. Dixon, and M.T. Clandinin, *Insulin receptor at the mouse hepatocyte nucleus after a glucose meal induces dephosphorylation of a 30-kDa transcription factor and a concomitant increase in malic enzyme gene expression*. *J Nutr*, 1999. 129(12): p. 2154-61.