



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

香草酸對餵食高脂飼料大鼠血糖與血脂之影響

Effect of Vanillic Acid on Blood Glucose and

Blood Lipid in Rats Fed with High-fat Diet

陳甄雯

Chen-Wen Chen

指導教授：吳瑞碧 博士

共同指導教授：沈賜川 博士


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

Co-advisor : Szu-Chuan Shen, Ph.D.

中華民國一百零二年八月

August, 2013

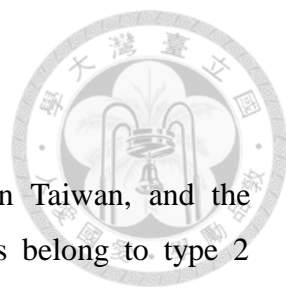
中文摘要



台灣糖尿病人口逐年攀升，已躍居國人十大死因的第五位，其中糖尿病患者約有 95 % 屬於第二型糖尿病，主因為胰島素阻抗而導致高血糖之症狀。酚酸廣泛存在於許多蔬果中，已有許多研究證實酚酸具有降血糖之生理活性，但目前仍未被完整的研究。本研究首先利用 9 種酚酸對小鼠肝臟上皮細胞株 FL83B 進行細胞存活率試驗，結果顯示，酚酸之最高安全使用劑量為 12.5 μM ，再以葡萄糖攝入試驗篩選具降血糖潛力之酚酸，香草酸在改善胰島素阻抗細胞葡萄糖攝入能力具有良好效果，接著以動物實驗探討香草酸對高脂飼料餵食大鼠之影響。實驗設計將雄性 Sprague-Dawley 大鼠隨機分為兩組，一組給予正常飲食（脂肪佔總飲食熱量 14 %），另一組給予高脂飲食（脂肪佔總飲食熱量 60 %），實驗期間定期監測大鼠禁食血糖變化；將餵食 12 週高脂飲食後成功誘導成高血糖動物模式之大鼠，再隨機分為負控制組、正控制組（餵予 pioglitazone）及實驗組（餵予香草酸）。結果顯示，以高脂飼料餵食大鼠 12 週後可成功誘發高血糖症狀，而每日餵食香草酸 (30 mg/kg b.w.) 4 週後則能顯著改善高脂飲食大鼠高血糖、高血脂、高瘦體素血症及胰島素阻抗之現象。由上述結果顯示，香草酸可能具有改善胰島素阻抗及血脂異常之效果，有助於調節糖尿病前期之血糖異常，未來具有開發成健康食品及膳食補充劑之潛力。

關鍵字：高血糖、胰島素阻抗、酚酸、香草酸、高脂飲食

Abstract



Diabetes mellitus (DM) is the 5th leading cause of death in Taiwan, and the prevalence is still growing. More than 95 % among all the cases belong to type 2 diabetes and characterized as insulin resistance that resulted in hyperglycemia. Phenolic acids are widely distributed in vegetables and fruits. Although some studies have shown the effect of phenolic acids on anti-hyperglycemia, there has been no systematic study on DM yet. In this study, the insulin resistant mouse hepatocytes FL83B cell model was established and used as the screen platform. The cell viability test showed that the critical safe dosage of 9 phenolic acids is 12.5 μ M. The result from glucose uptake test showed that vanillic acid exhibits the highest increment in glucose uptake in insulin resistant cells among tested samples. Animal model was then performed to assess the effect of vanillic acid in high fat diet-fed rats. Male Sprague-Dawley rats are randomly divided into two groups, including a control group (fed with chow diet containing 14 % kcal from fat), and a high-fat diet group (fed with high-fat diet containing 60 % kcal from fat) for the development of hyperglycemia. Furthermore, the high-fat diet group were further divided into three sub-groups, including the high-fat diet sub-group, positive control sub-group (orally administrated pioglitazone, 30 mg/kg b.w.) and treatment sub-group (orally administrated vanillic acid, 30 mg/kg b.w.). The results showed that vanillic acid significantly alleviated high-fat diet induced syndrome, including hyperglycemia, hyperlipidemia, hyperleptinemia and insulin resistance. We thus demonstrated the potential of vanillic acid in the development of health foods or dietary supplements for the prevention of hyperglycemia in prediabetes.

Key words:

Hyperglycemia, insulin resistance, phenolic acids, vanillic acid, high-fat diet

目 錄



中文摘要	I
Abstract.....	II
目 錄	III
圖 次	V
表 次	VII
第一章 前言	1
第二章 文獻回顧	2
第一節 糖尿病.....	2
一、糖尿病簡介.....	2
二、糖尿病流行病學.....	2
三、糖尿病分類.....	3
四、糖尿病診斷標準.....	7
五、常見抗糖尿病藥物治療.....	9
六、糖尿病前期.....	11
第二節 胰島素.....	13
一、胰島素簡介.....	13
二、胰島素訊息傳遞.....	15
三、胰島素阻抗.....	16
第三節 高脂飼料誘發高血糖之動物實驗模式.....	18
一、實驗模式簡介	18
二、高脂飲食與血糖及胰島素之關係	18
三、高脂飲食與血中瘦體素之關係.....	20

四、高脂飲食與肝臟脂質代謝之關係.....	21
五、高脂飲食與發炎反應之關係.....	22
第四節 酚酸與糖尿病.....	23
第三章 研究動機與實驗架構.....	26
第一節 研究動機與目的.....	26
第二節 實驗架構.....	27
第四章 材料與方法.....	28
第一節 胰島素阻抗細胞實驗模式.....	28
一、實驗材料.....	28
二、實驗方法.....	30
第二節 高脂飼料誘發高血糖動物實驗模式.....	34
一、實驗材料.....	34
二、實驗方法.....	37
第五章 結果與討論.....	45
第一節 以細胞模式篩選具有降血糖潛力之酚酸.....	45
第二節 香草酸 (Vanillic acid) 對高脂飼料大鼠生理、生化之影響.....	48
第三節 香草酸 (Vanillic acid) 對高脂飼料大鼠肝臟蛋白質表現量之影響.....	53
第六章 結論.....	75
第七章 參考文獻.....	77



圖 次



圖 2-1、 糖尿病的分類	6
圖 2-2、 胰島素調節之代謝作用	14
圖 2-3、 胰島素訊息傳遞路徑	15
圖 2-4、 肥胖相關因子所造成之胰島素阻抗	17
圖 2-5、 DAG-PKC ϵ 媒介之肝臟胰島素阻抗分子機制	19
圖 2-6、 脂肪組織所分泌之脂肪激素及促發炎細胞激素	20
圖 2-7、 非酒精性脂肪肝的可能代謝機轉	21
圖 2-8、 肥胖、胰島素阻抗與發炎反應的關係	22
圖 2-9、 酚酸之化學結構	23
圖 3-1、 實驗架構	27
圖 5-1、 酚酸(12.5 μ M)對胰島素阻抗細胞株 FL83B 葡萄糖攝入之情形.....	57
圖 5-2、 管餵 Vanillic acid 四週前餵食高脂飼料大鼠空腹血糖濃度之變化	59
圖 5-3、 管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠空腹血糖濃度之變化.....	61
圖 5-4、 管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠血清胰島素濃度之變化.....	62
圖 5-5、 管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠 HOMA-IR index 之變化.....	63
圖 5-6、 管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠口服葡萄糖耐受性(OGTT)之變化.....	64
圖 5-7、 管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠口服葡萄糖耐受性曲線下面積之變化....	65
圖 5-8、 管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠血清瘦體素之變化.....	67
圖 5-9、 管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠肝臟乙醯輔酶 A 羧化酶蛋白表現量之變化 .	68
圖 5-10、管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠肝臟中游離脂肪酸含量 之變化.....	69
圖 5-11、管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠肝臟胰島素受器蛋白表現量之變化.....	70
圖 5-12、管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠肝臟磷酸肌醇 3 激酶蛋白表現量之變化...	71
圖 5-13、管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠肝臟葡萄糖轉運蛋白-2 蛋白表現量之變化 ...	72


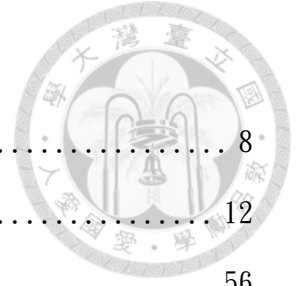



圖 5-14、管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠肝臟環氧化酶-2 蛋白表現量 之變化.....	73
圖 5-15、管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠肝臟單核球趨化蛋白-1 表現量 之變化.....	74
圖 6-1、香草酸 (vanillic acid) 藉由調節脂質代謝、胰島素訊息傳遞而改善餵 食高脂飼料大鼠肝臟胰島素阻抗之可能機制.....	76

表 次

表 2-1、糖尿病診斷標準	8
表 2-2、糖尿病前期診斷標準	12
表 5-1、不同濃度酚酸對於 FL83B 細胞株之生長抑制情形	56
表 5-2、酚酸(12.5 μ M)對具胰島素阻抗細胞株 FL83B 葡萄糖攝入之改善情形.....	58
表 5-3、高脂飼料大鼠犧牲前之飲食、體重、組織重量	60
表 5-4、高脂飼料大鼠犧牲後之血液生化分析值	66



第一章、前言



隨著生活水準的提升，人們的飲食習慣漸趨精緻化，加上生活型態的靜態化使得慢性代謝疾病，例如糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 之盛行率不斷攀升，已成為二十一世紀最重要的公共衛生課題之一。世界衛生組織 (WHO) 在 2013 年指出，目前全球至少有 3.47 億的人口罹患糖尿病，並預測 2030 年罹患糖尿病的人口數將成長至 6.92 億。根據 2012 年行政院衛生署統計，台灣死於糖尿病的人口高達 9281 人，居國人十大死因的第五位，平均每 57 分鐘就有一人死於糖尿病；台灣地區的糖尿病型態以第二型糖尿病 (type 2 DM) 為主，約佔罹患人口的 95 % 左右。而在糖尿病發展的進程上，患者會先步入糖尿病前期 (prediabetes)，此時期是一種正常人邁向糖尿病的過渡狀態，雖然還未發展成糖尿病，若未經適當控制則會有極高的風險轉為糖尿病。因此，如何控制並避免其成為高血糖之情形以避免糖尿病的發生，是治療糖尿病前期的主要原則。

酚酸 (phenolic acids) 為一種廣泛存在於蔬菜、水果中的酚類化合物，以往的研究多著重抗氧化及抗癌方面之效果，近年來已有許多研究指出，酚酸可藉由調節醣類代謝而具有降血糖、抗糖尿病之生理活性，但目前尚未有完整的研究文獻發表。

本研究藉由小鼠肝臟上皮細胞株 FL83B 進行細胞實驗篩選出最具改善胰島素阻抗潛力之天然酚酸，並進一步利用動物實驗，探討該酚酸對高脂飼料餵食 Sprague-Dawley 大鼠調節血糖之效果並釐清其減緩胰島素阻抗之機制。

第二章、文獻回顧

第一節 糖尿病



一、糖尿病簡介

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是一種自古即被發現的疾病，從古埃及約西元前 1550 年，就有「多尿」的疾病文字記載；在西元兩世紀時，古希臘哲學家亞里斯多德曾用 Diabetes (拉丁文為多尿之意) 來描述病人多尿之症狀；於西元 5~6 世紀時，中國、阿拉伯及日本的醫生先後發現糖尿病的另一病徵—「甜尿」，因此將此種疾病之病名稱作「糖尿病」(吳，2012)。

糖尿病是一種慢性代謝異常疾病，主要是由於胰島素 (insulin) 缺乏、分泌不足或是作用無法充分發揮，而引起醣類、脂肪、蛋白質代謝紊亂之現象，以致於體內出現高血糖 (hyperglycemia) 之情形，長期的高血糖狀態甚至會造成眼部、腎臟、神經、心臟及血管等器官之傷害。

糖尿病的典型症狀除了過高的血糖之外，還包括多尿 (polyuria)、多喝 (polydipsia)、體重減輕 (weight loss)，有時亦有多吃 (polyphagia) 及視力模糊 (blurred vision)、易感染等症狀。若高血糖之狀況未經適當控制，可能會導致酮酸血症 (ketoacidosis) 或是其他慢性併發症的發生，甚至影響到腦部及循環系統的正常運作，因此如何控制血糖以避免併發症的發生是非常重要的 (ADA, 2012)。

二、糖尿病流行病學

隨著醫藥衛生的發達，傳染性疾病已逐漸得到控制，然而現今人口增加、老化、靜態生活型態與肥胖的高盛行率，導致糖尿病成為二十一世紀公共衛生不容忽視的課題之一。

世界衛生組織 (WHO) 在 2013 年指出，目前全球至少有 3.47 億的人口罹患糖尿病，並預測 2030 年罹患糖尿病的人口數將成長至 6.92 億。國際糖尿

病聯盟 (International Diabetes Federation) 於 2012 年指出，全球每 10 秒就有 2 人被診斷為糖尿病，每年有 480 萬人死於糖尿病相關疾病，每 10 秒就有 1 人死於糖尿病相關疾病，顯示未來全球糖尿病盛行率將持續上升，且可能遠超過目前估計情形。

根據台灣行政院衛生署統計，1983 年糖尿病首次進入台灣十大死因排行榜，並逐年攀升；於 2012 年，死於糖尿病的人口達 9281 人，居國人十大死因的第五位，平均每 57 分鐘就有一人死於糖尿病；台灣地區的糖尿病型態以第二型糖尿病 (type 2 DM) 為主，約佔罹患人口的 95 % 左右。依據國民健康局統計，2009 年台灣糖尿病盛行率已達 9.2 %，約每 10 人就有 1 人罹患糖尿病。上述數據顯示，台灣糖尿病的罹病人數近年來快速增加，是國人主要慢性病之一。

綜合上述，若能及早發現血糖異常之情形、及早進行生活型態改變並控制血糖，是降低糖尿病盛行率的重要準則。

三、糖尿病分類

根據美國糖尿病學會 (American Diabetes Association, ADA) 最新分類方法，將糖尿病以病因為根據，區分為四大類 (ADA, 2012)：

(一) 第一型糖尿病 (type 1 diabetes)

過去稱為胰島素依賴型糖尿病 (insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM)，通常好發於幼童或青少年時發病，因此又稱為幼年型糖尿病 (juvenile-onset diabetes)。主要是由於胰臟 β 細胞的功能喪失，造成胰島素缺乏之情形。第一型糖尿病約佔糖尿病總糖尿病病患的 5~10 %。根據研究其致病的相關因子有：

1. 免疫媒介型 (immune-mediated diabetes)：

自體免疫形成抗 β -cell 抗體及細胞免疫作用攻擊 β -cell 為致病主要原因，是一種自體免疫疾病 (autoimmune-mediated diabetes)，由於胰

臟蘭氏小島 (pancreatic Langerhan islet) 的 β -cell 發生異常的自體免疫反應，攻擊破壞 β -cell 本身，造成胰島素絕對缺乏，而引發高血糖之症狀。此型病患必須注射外生性胰島素才能維持體內正常血糖濃度。

2. 自發型 (idiopathic diabetes) :

亦即不明原因造成胰島素永久性缺乏，此類型之病患很少，大多為非裔或亞裔，其具有高度遺傳性，且必須仰賴外生性胰島素才能存活。

(二) 第二型糖尿病 (type 2 diabetes)

過去稱非胰島素依賴型糖尿病 (non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM)，常發生於肥胖型病人。糖尿病患者約 90~95 % 屬於第二型，此型病患仍可分泌胰島素，但因胰島素分泌不足或功能缺失，導致胰島素阻抗、細胞對胰島素敏感性 (insulin sensitivity) 下降，最終造成胰島素訊息傳遞、體內調節血糖功能異常而發病。

(三) 其他特殊類型糖尿病 (other specific types of diabetes)

1. β -cell 功能之基因缺陷 (genetic defects of β -cell function) 型：

如第 12 對染色體肝細胞核因子-1 α [chromosome 12, HNF-1 α (MODY-3)]、第 7 對染色體葡萄糖激酶 [chromosome 7, glucokinase (MODY-2)]、第 20 對染色體肝細胞核因子-4 α [chromosome 20, HNF-1 α (MODY-1)] 等。

2. 胰島素作用之基因缺陷 (genetic defects in insulin action) 型：

如 A 型胰島素阻抗 (type A insulin resistance)、矮子症 (leprechaunism)、Rabson-Mendenhall syndrome 等。

3. 胰臟外分泌系統疾病 (diseases of the exocrine pancreas) 型：

如胰臟炎 (pancreatitis)、創傷/胰臟切除 (trauma/ pancreatectomy)、腫瘤 (neoplasia)、纖維性囊腫 (cystic fibrosis)、血色素沉著症 (hemochromatosis)、纖維鈣化性胰臟病變 (fibrocalculous pancreatopathy) 等。



4. 內分泌病變 (endocrinopathies) 型：
如肢端肥大症 (acromegaly)、庫欣氏症 (cushing's syndrome)、升糖素瘤 (glucagonoma)、嗜鉻細胞瘤 (pheochromocytoma)、甲狀腺高能症 (hyperthyroidism) 等。
5. 藥物或化學物誘發型：
如糖皮質激素 (glucocorticoids)、甲狀腺素 (thyroid hormone)、殺鼠劑 Vacor 等藥物所引起。
6. 感染 (infections) 所引起的糖尿病：
如先天性德國麻疹 (congenital rubella)、巨細胞病毒 (cytomegalovirus) 等。
7. 不尋常型式免疫媒介的糖尿病 (uncommon forms of immune-mediated diabetes)：
如僵直人 ("Stiff-man" syndrome)、抗胰島素接受器抗體 (anti-insulin receptor antibodies) 之出現等。
8. 其他有時合併糖尿病的遺傳症候群型：
如唐氏症 (Down syndrome)、紫質症 (porphyria) 等。

(四) 妊娠糖尿病 (gestational diabetes mellitus, GDM)

婦女懷孕期間，因體內荷爾蒙的變化，出現葡萄糖耐受性不良之情形，因而初次被診斷為糖尿病者，即為妊娠糖尿病，最常發生在懷孕第 24~28 週時。若懷孕初期孕婦的平均血糖值愈高，約比一般正常孕婦發生畸胎兒的機率高出 2~5 %。未能及早發現妊娠糖尿病並予以控制，生產時發生肩難產或需要剖腹產的機會會大增，且將容易導致巨嬰症。而懷孕前診斷出已患有糖尿病之婦女，則不屬妊娠糖尿病 (ADA, 2012)。



Types \ Stages	Normoglycemia	Hyperglycemia		
	Normal glucose regulation	Impaired Glucose Tolerance or Impaired Fasting Glucose (Pre-Diabetes)	Not insulin requiring	Insulin requiring for control
Type 1*	←	→		
Type 2	←	→		
Other Specific Types**	←	→		
Gestational Diabetes **	←	→		

圖 2-1、糖尿病的分類。

Fig. 2-1. Disorders of glycemia: etiologic types and stages.

*even after presenting in ketoacidosis, these patients can briefly return to normoglycemia without requiring continuous therapy (i.e., “honeymoon” remission);

**in rare instances, patients in these categories (e.g., Vacor toxicity, type 1 diabetes presenting in pregnancy) may require insulin for survival.

(ADA, 2012)

四、糖尿病診斷標準

過去十幾年來，糖尿病及血糖失衡的診斷標準，主要依據血糖數值高低來判定。而於 2009 年，美國糖尿病學會 (American Diabetes Association, ADA) 及國際糖尿病聯盟 (International Diabetes Federation) 等組織，建議增加測定糖化血色素 (glycosylated hemoglobin, HbA1C) 作為糖尿病判斷指標；自 2010 年開始，美國糖尿病學會發布的糖尿病診斷標準，已將糖化血色素列入糖尿病診斷標準之一。

根據美國糖尿病學會 (American Diabetes Association, ADA) 2013 年修訂之標準，如符合以下任一條件，即可診斷為糖尿病 (表 2-1)：

- (一) 出現典型糖尿病症狀 (例如：多吃、多喝、多尿或不明原因體重減輕) ，加上隨機血漿葡萄糖濃度 ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L) 。
- (二) 空腹至少八小時以上，其空腹血漿葡萄糖濃度 ≥ 126 mg/dL (7.0 mmol/L) (正常人為小於 100 mg/dL) 。
- (三) 口服葡萄糖耐量試驗 (oral glucose tolerance test, OGTT)
喝下含 75 克葡萄糖之糖水，2 小時的血漿葡萄糖濃度 ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L) 。
- (四) 糖化血色素 $\geq 6.5\%$ 。



表 2-1、 糖尿病診斷標準

Table 2-1. Criteria for the diagnosis of diabetes

Diabetes

Glycosylated hemoglobin (HbA1C) ^a	$\geq 6.5\%$ ^e
	or
Fasting plasma glucose (FPG) ^b	$\geq 126 \text{ mg/dL (7.0 mmol/L)}$ ^e
	or
2-h plasma glucose during OGTT ^c	$\geq 200 \text{ mg/dL (11.1 mmol/L)}$ ^e
	or
Random plasma glucose ^d	$\geq 200 \text{ mg dL (11.1 mmol/L)}$

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

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

^c The test should be performed as described by the WHO, using a glucose load containing the equivalent of 75 g anhydrous glucose dissolved in water.

^d In a patient with classic symptoms of hyperglycemia or hyperglycemic crisis.

^e In the absence of unequivocal hyperglycemia, result should be confirmed by repeat testing.

(WHO, 2013)

五、常見抗糖尿病藥物治療

藥物治療為糖尿病治療的其中一部分，當患者無法以飲食及運動的修正來控制血糖時，抗糖尿病藥物就是最佳的選擇 (Riddle, 1997)。根據美國食品藥物管理局 (FDA) 之分類，將核准用於治療糖尿病的用藥分為六大類，分述如下：

1. 胰島素治療 (insulin therapy)

此種治療以注射方式給藥，對於第一型糖尿病病患及禁用其他口服降血糖藥的病患，常使用此類藥物進行血糖控制。胰島素主要依據其在生物體內的作用高峰及持續時間進行分類，可分為速效型胰島素 Lispro、Aspart、Glulisine，短效型胰島素 (rapid-acting insulin) Regular，中效型胰島素 (intermediate-acting insulin) NPH 及 Lente，長效型胰島素 (long-acting insulin) Ultralente 及 Ultratard，極長效型胰島素 Glargine 及 Detemir。

2. 磺醯尿素類 (sulfonylureas, SU)

為促胰島素分泌劑 (insulin secretagogues)，主要作用於胰臟，藉由與胰臟 β 細胞膜上的 SU 接受器結合，而可促進胰臟胰島素之分泌，並增加周邊組織對胰島素之敏感度 (Scarsi *et al.*, 2007)。此類藥物包括 Glipizide、Gliclazide、Gliquidone 等，臨床上常使用，但要注意副作用的產生，可能會誘發低血糖、體重增加及加速 β 細胞的耗損等。

3. 非磺醯尿素類 (meglitinides)

為促胰島素分泌劑 (insulin secretagogues)，與磺醯尿素類藥物最大的相異之處為作用的接受器不同，其機轉同樣為使鉀離子通道關閉，進而促進胰島素的分泌，以及增加周邊組織對葡萄糖的吸收 (Keilson *et al.*, 2000)。此類藥物包括 Repaglinide、Nateglinide 等，其作用快速，藥效較短，對 SU 類藥物過敏者是很好的取代藥物，但偶有暫時性視覺障礙、腸胃不適等副作用。



4. 雙胍類 (biguanide, BG)

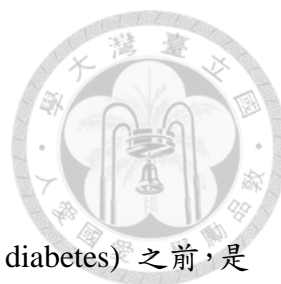
為 guanidine 之衍生物，目前已上市的藥物包括 Phenformin、Buformin 與 Metformin。Phenformin 因引起乳酸中毒而致死機率較高，故許多國家包括台灣已經禁止使用此藥物。目前使用 BG 類藥物之國家，均以 Metformin 為主（其引起乳酸中毒之機率較 Phenformin 低 10 倍）。此類藥物的作用機制至今仍未被完全了解，但已有研究指出其與降低腸胃道吸收葡萄糖、活化醣解作用、抑制醣質新生作用、減少葡萄糖從肝臟降解 (Johnson *et al.*, 1993) 及提高胰島素受體的結合力等作用有關，但並不會直接刺激胰臟分泌胰島素。此藥物有不易造成低血糖，不會造成體重增加等優點，故常被使用在臨床上；而其副作用為噁心、腹瀉等 (沈與顏, 2008)。

5. α -醣苷酶抑制劑 (α -glucosidase inhibitor, AGI)

主要作用於小腸組織，為碳水化合物吸收阻斷劑 (starch blocker)，作用機轉為競爭抑制胰臟 α -amylase 及腸內之 α -glucosidase，延緩醣類在小腸的消化吸收，降低飯後高血糖。主要為胃腸副作用，因未被吸收的醣類在大腸由腸內菌發酵，此不良反應包括腹脹、腹瀉、腹痛及腹鳴等，但副作用多在初期用藥時發生，持續用藥後症狀會逐漸緩解進而消失 (Van de laar *et al.*, 2005)。

6. Thiazolidinediones (TZDs)

為胰島素阻抗增敏劑 (insulin sensitizers)，包括 Troglitazone、Rosiglitazone 及 Pioglitazone 等。作用機轉為活化細胞核內接受器 PPAR- γ (peroxisome proliferative-activated receptor- γ)，加強周邊組織對胰島素的敏感性，同時也會降低體內干擾胰島素訊息傳遞發炎因子 TNF- α 及 IL-6 的濃度，具有降低血糖和改善胰島素阻抗之作用 (Rangwala and Lazar, 2004)。但容易發生體重增加、水腫等副作用，其中以肝毒性最受關注，不適用於罹患鬱血性心臟衰竭或肝臟損傷之患者，服用此類藥物之病患，最好能定期檢查肝功能，一旦發現肝功能異常便應立刻停用此藥物 (Panunti *et al.*, 2004)。



六、糖尿病前期

1. 糖尿病前期定義

糖尿病前期 (prediabetes) 發生於第二型糖尿病 (type 2 diabetes) 之前，是指未達糖尿病標準之代謝異常狀態。主要是由於胰島素阻抗 (insulin resistance)，導致血糖調控發生障礙、血中葡萄糖濃度無法達到平衡，因而造成空腹血糖異常 (impaired fasting glucose, IFG) 及葡萄糖耐受異常 (impaired glucose tolerance, IGT) 之情形。

此時期雖然還未發展成糖尿病，若未經適當控制則會有極高的風險轉為糖尿病，是罹患糖尿病的高危險群。因此，如何調節異常的血糖變化，以避免糖尿病的發生，是控制糖尿病前期的主要原則。

2. 糖尿病前期之流行病學

美國國家衛生研究院 (National Institutes of Health, NIH) 指出，2009 年估計有 780 萬人處於糖尿病前期，若未改變其生活型態，大多數之患者在 10 年內即進展成第二型糖尿病。

台灣行政院衛生署國民健康局調查指出，國人 15 歲以上高血糖之盛行率為 7.47%。文獻指出，台灣處於糖尿病前期之人口每年以不同比例 (1.5 ~ 7.3%) 進展為第二型糖尿病 (郭，2001)。此外，有研究比較空腹血糖值正常 (< 100 mg/dL) 與異常 (100 ~ 125 mg/dL) 者，經十年追蹤後發現，空腹血糖值異常者之糖尿病發生率 (36.8%) 遠高於空腹血糖值正常者 (1.7%)，顯示糖尿病的發生率與糖尿病前期之高血糖具高度相關性 (陳，2005)。

與正常血糖者比較，糖尿病前期罹患心血管疾病和死亡之危險性相對較高，且與十年內發展為糖尿病的危險性顯著相關；若能於糖尿病前期給予適當的介入措施，改善其高血糖之症狀，將可有效延緩或預防糖尿病的發生 (陳，2005)。



3. 糖尿病前期診斷標準

根據美國糖尿病學會 (American Diabetes Association, ADA) 2013 年修訂之標準，如符合以下任一條件，即可診斷為糖尿病前期 (表 2-2)：

- (一) 空腹血漿葡萄糖濃度 (fasting plasma glucose, FPG) ≥ 100 mg/dL 且 < 125 mg/dL，即可診斷為空腹葡萄糖異常 (impaired fasting glucose, IFG)。
- (二) 口服葡萄糖耐量試驗 2 小時血漿葡萄糖數值介於 $140 \sim 199$ mg/dL 之間，即可診斷為葡萄糖耐量異常 (impaired glucose tolerance, IGT)。
- (三) 糖化血色素 $5.7 \sim 6.4\%$ 。

表 2-2、糖尿病前期診斷標準

Table 2-2. Criteria for the diagnosis of prediabetes

Prediabetes*

Impaired fasting glucose (IFG)

Fasting plasma glucose (FPG) 100 ~ 125 mg/dL (5.6 ~ 6.9 mmol/L)

or

Impaired glucose tolerance (IGT)

2-h plasma glucose during OGTT 140 ~ 199 mg/dL (7.8 ~ 11.0 mmol/L)

or

Glycosylated hemoglobin (HbA1C) 5.7 ~ 6.4%

*For all three tests, risk is continuous, extending below the lower limit of the range and becoming disproportionately greater at higher ends of the range.

(WHO, 2013)

第二節 胰島素



一、胰島素簡介

胰島素 (insulin) 是一種由胰臟蘭氏小島 β 細胞所製造、分泌的賀爾蒙，分子量約為 6000 kDa。胰島素是人體唯一降低血糖的激素，也是唯一同時促進醣類、脂肪和蛋白質合成的激素。簡單地說，胰島素的生理作用是降低血糖、促進能量儲存以及刺激細胞生長和分化 (Rosen, 1987)。

胰島素為同化性荷爾蒙 (anabolic hormones)，以肝臟、骨骼肌與脂肪細胞為其作用之目標器官，在代謝上扮演重要的角色；其主要作用為促進身體各種細胞對醣類、脂肪、蛋白質三大營養素之利用、合成與儲存 (圖 2-1)。

(一) 醣類

胰島素與其受器結合後，能促使目標器官對葡萄糖之攝入 (glucose uptake)，協助葡萄糖運送至細胞內，藉由促進肝臟的糖解作用 (glycolysis)、抑制糖質新生作用 (gluconeogenesis)，以及促進肝臟與肌肉中之肝醣合成 (glycogenesis)，抑制肝醣降解 (glycogenolysis)，將細胞中葡萄糖有效利用，進而降低血中葡萄糖濃度。

(二) 蛋白質

胰島素可增加細胞膜對胺基酸的通透性，促進胺基酸的吸收及去氧核醣核酸 (DNA)、核醣核酸 (RNA)、蛋白質之合成；反之，當胰島素不足時，則會使蛋白質分解作用加速，造成蛋白質毀損與肌消瘦症 (林, 1986; 何, 1986)。

(三) 脂質

胰島素對脂肪組織之調控主要在抑制荷爾蒙敏感性脂解酶 (hormone sensitive lipase, HSL) 的活性，降低脂解作用 (lipolysis)，減少三酸甘油酯分解成游離脂肪酸 (free fatty acid, FFA) 與甘油 (glycerol)，進而降低血漿中游離脂肪酸的含量。此外，胰島素會增加乙醯輔酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA carboxylase, ACC) 等之活性，促進脂肪酸的合成 (*de novo* lipogenesis)。

除調控身體代謝之外，胰島素還可調控細胞正常生長與發育、促進血管舒張 (vasodilation)、抗發炎 (anti-inflammatory)、抗氧化 (anti-oxidation) 之功能 (Dandona *et al.*, 2001 ; Dandona *et al.*, 2005)。

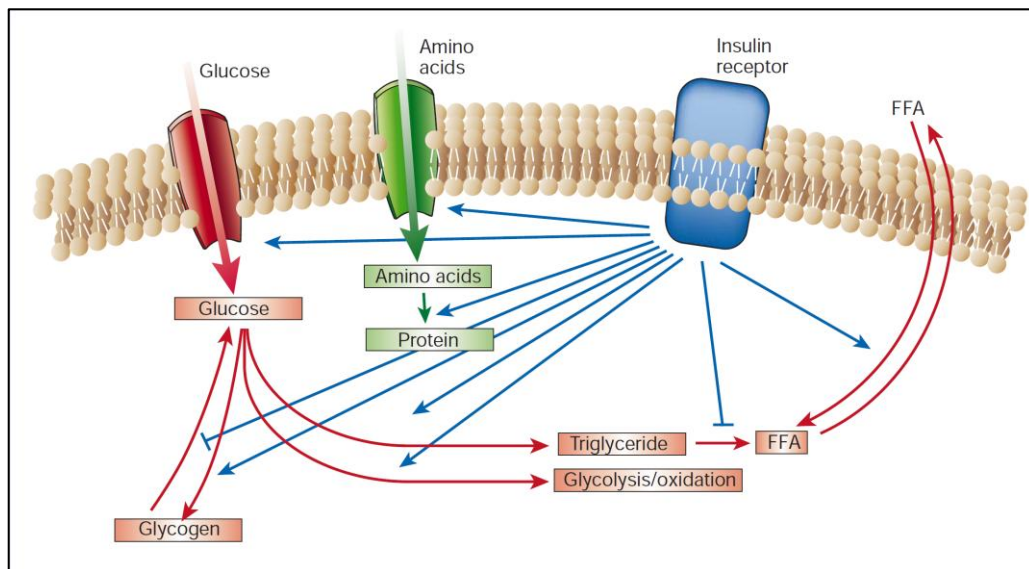


圖 2-2、胰島素調節之代謝作用。

Fig. 2-2. The regulation of metabolism by insulin. (Saltiel and Kahn, 2001)



二、胰島素訊息傳遞途徑

胰島素於人體中有三個主要之目標器官：分別為肝細胞、脂肪細胞與肌肉細胞，細胞膜上皆分布胰島素受器 (insulin receptor) 。

飽食狀態下，血液中過高的葡萄糖會經由肝臟細胞膜上的葡萄糖轉運蛋白 2 (glucose transporter-2) 運送至肝臟中，此狀態下胰臟β細胞增加分泌胰島素，當胰島素與其受器結合後，會促使受器進行 tyrosine 自體磷酸化 (autophosphorylation)，而引發下游 insulin receptor substrate (IRS)、phosphatidylinositol-3- kinase (PI3K) 及 protein kinase B (AKT / PKB) 等分子的磷酸化 (phosphorylation) 及去磷酸化 (dephosphorylation) 作用，因此產生下游一連串的訊息傳遞反應，進而協助肝臟細胞葡萄糖之代謝利用，如圖 2-3 所示。

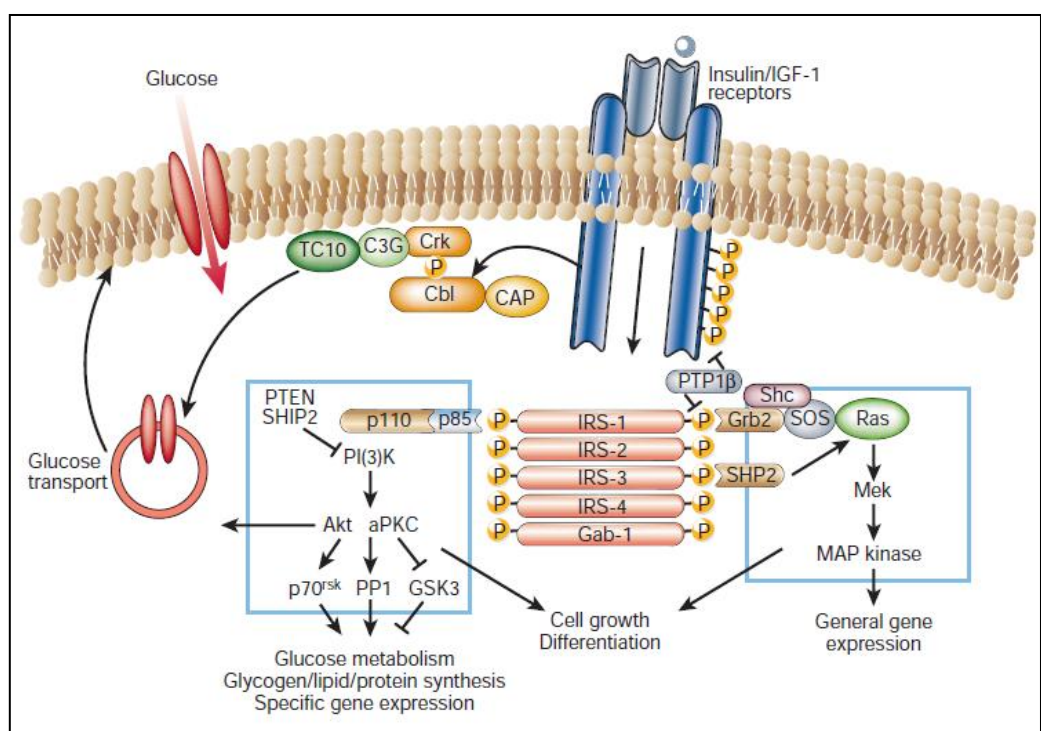


圖 2-3、胰島素訊息傳遞路徑。

Fig. 2-3. Signal transduction in insulin action. (Saltiel and Kahn, 2001)

三、胰島素阻抗

胰島素阻抗 (insulin resistance) 即為體內細胞對胰島素敏感度下降之情形，造成許多生理作用受到影響如血管發炎、體內代謝異常等，已被指出為代謝症候群 (metabolic syndrome) 的重要指標，也是導致第二型糖尿病及其併發症的主要原因 (Kendall *et al.*, 2002; Qatanani *et al.*, 2007)。

胰島素阻抗的動物體內，為了維持正常的胰島素功能， β 細胞會分泌更多的胰島素進入循環當中，造成血液中胰島素濃度增高，即為所謂的高胰島素血症 (hyperinsulinemia)。血中胰島素過量增加，會啟動負調控作用 (down regulation)，使胰島素受器數量減少，進而發生葡萄糖耐受不良之情形，此時期也就是臨床上所稱的「糖尿病前期」，若不妥善控制血糖，則會進一步會惡化並發展成第 2 型糖尿病 (Okabayashi *et al.*, 1989)。

目前已知造成胰島素阻抗的可能機制分述如下 (圖 2-4)：

(一) 脂肪異常堆積

體內長期存在過高的脂肪酸及其他脂質，導致三酸甘油酯異常堆積於肌肉及肝臟中，會增加脂質代謝中間產物 DAG (diacylglycerol) 的生成增加；DAG 可作為訊息傳遞分子活化下游 PKC (protein kinase C) 蛋白，因而抑制胰島素訊息傳遞。此外，脂肪異常堆積之情形亦會促進氧化壓力與內質網壓力增加，導致胰島素阻抗的發生 (Unger *et al.*, 2000; McGarry, 2002)。

(二) 細胞內氧化壓力增加

脂質過量堆積會促進粒線體 β oxidation 作用，使活性氧屬自由基 (reactive oxygen species, ROS) 生成增加，造成氧化壓力的上升。體內過量的 ROS 會活化 serine/threonine kinase (如：JNK、IKK、p38) 或使粒線體功能異常、內質網壓力增加，因而抑制胰島素訊息傳遞，導致胰島素阻抗的發生 (Carlsson *et al.*, 1999)。



(三) 發炎因子增加

脂肪細胞與脂肪組織巨噬細胞 (Adipose tissue macrophage, ATM) 的增加，會促使脂肪組織增加分泌發炎因子 (如：TNF- α 、IL-6)，造成發炎反應的發生，進而影響胰島素訊息傳遞，導致胰島素阻抗的發生 (Qatanani *et al.*, 2007)。

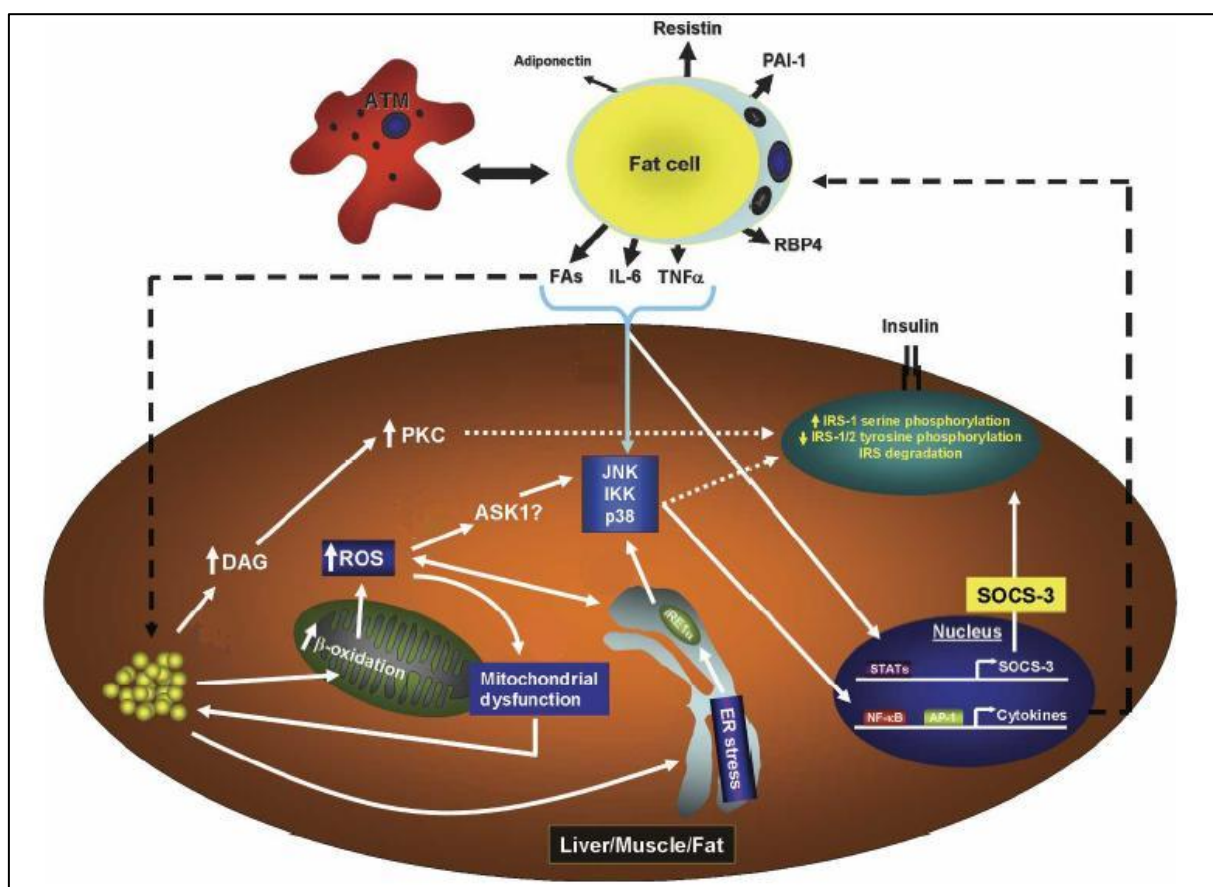


圖 2-4、肥胖相關因子所造成之胰島素阻抗。

Fig 2-4. Obesity – associated intrinsic mediators of insulin resistance.

(Qatanani *et al.*, 2007)

第三節 高脂飼料誘發高血糖之動物實驗模式



一、實驗模式簡介

高油脂飲食 (high-fat diet) 之研究最早可追溯至西元 1940 年，長期過量攝食高熱量、高油脂食物被認為會導致許多代謝症狀與疾病的發生，像是肥胖、胰島素阻抗、第二型糖尿病、血脂異常、脂肪肝等 (Buettner *et al.*, 2006)，因此許多動物實驗模式藉由提高飲食中之油脂比例，進行相關代謝疾病之研究。

高脂飲食誘發高血糖之動物模式，即是模擬人類飲食型態逐漸西化，攝取過多高油脂食物導致血糖異常之情形，此種實驗模式所使用之油脂比例大多占飲食熱量比例 40~60%，且被指出會伴隨出現體重上升 (weight gain)、高胰島素血症 (hyperinsulinemia)、血脂異常 (dyslipidemia)、高瘦體素血症 (hyperleptinemia) 等症狀 (Buettner *et al.*, 2007)。

二、高脂飲食與血糖及胰島素之關係

當攝食高油脂食物後，體內處於高血糖狀態，會造成胰島素分泌增加，對體內過高的血糖進行調節，使體內狀態維持恆定；但若持續過量攝食高熱量、高油脂之食物，會使胰島素為了維持恆定而持續分泌，此時血中胰島素量過量增加，因而導致負調控作用 (down regulation) 的發生，使胰島素受器數量減少，進而發生胰島素阻抗，造成細胞對葡萄糖的利用能力下降，最終導致血糖異常之情形 (Okabayashi *et al.*, 1989)。

於高脂飲食之動物模式中發現，無論是使用動物性油脂或是植物性油脂作為高脂飼料之油脂來源，皆會導致大鼠禁食血糖異常上升之現象，且同時存在高胰島素血症、胰島素阻抗之情形 (Watarai *et al.*, 1988; Zierath *et al.*, 1997; Song *et al.*, 2001; Gregoire *et al.*, 2002)。此外，研究亦指出，此種實驗模式下，大鼠肝臟、脂肪組織及骨骼肌之胰島素訊息傳遞蛋白的活性及表現量皆有顯著下降的現象 (Youngren *et al.*, 2001; Lalli *et al.*, 2008)。

長期攝食高脂飲食會導致血糖及血中游離脂肪酸含量上升，促使肝臟增加對脂質的攝入與合成，造成 DAG (diacylglycerol) 於肝中堆積之情形。研究指出，DAG 是脂質代謝的中間產物，可藉由活化 PKC ϵ (protein kinase C ϵ)，抑制胰島素訊息傳遞相關蛋白的活化及表現量，造成肝臟胰島素阻抗的發生 (Samuel *et al.*, 2012) (圖 2-5)。

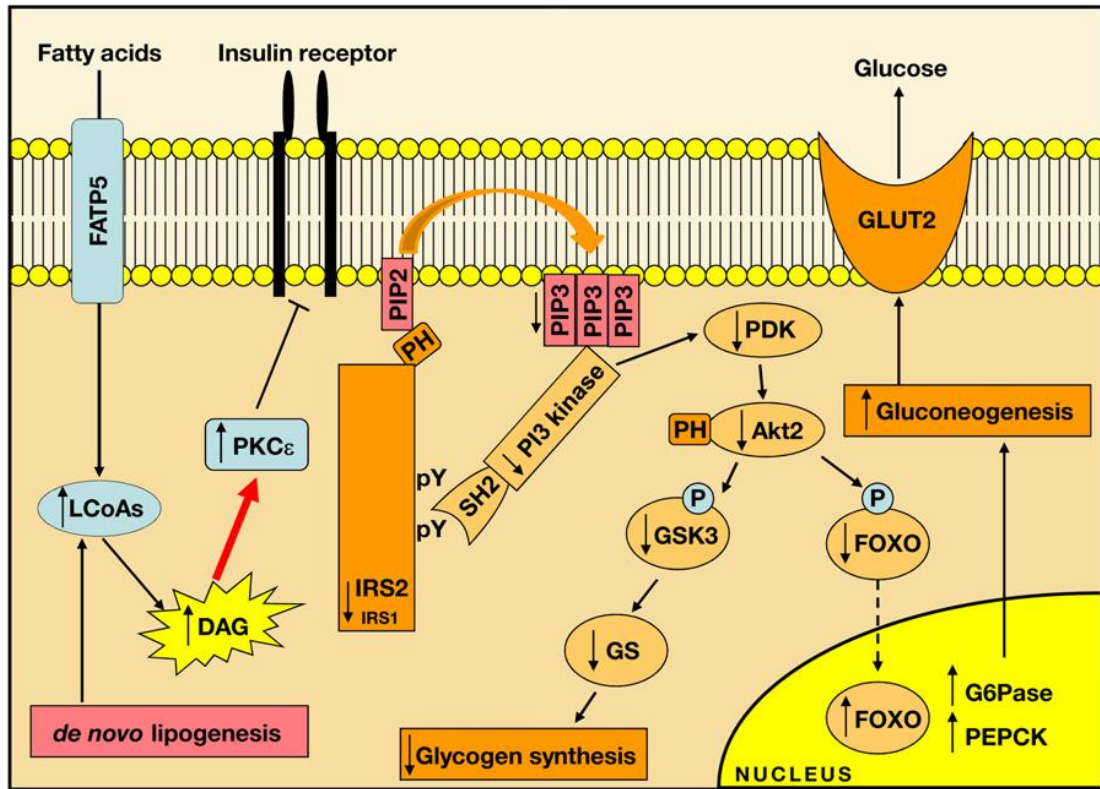


圖 2-5、DAG-PKC ϵ 媒介之肝臟胰島素阻抗分子機制。

Fig 2-5. Molecular mechanism of diacylglycerol-PKC ϵ mediated hepatic insulin resistance. (Jornayvaz *et al.*, 2012)

三、高脂飲食血中瘦體素之關係

瘦體素 (leptin) 是一種由脂肪組織所釋放的脂肪激素 (adipokines)，研究指出，肥胖情形下，脂肪組織重量的增加會造成血中瘦體素濃度的上升，甚至更進一步導致中樞神經系統出現瘦體素阻抗 (leptin resistance) 之情形 (Munzberg *et al.*, 2004) (圖 2-3)。

於高脂飲食之動物體內觀察到血中瘦體素濃度異常升高，應是由於此種飲食誘導模式之動物體內脂肪組織重量的增加，因而造成血中瘦體素濃度大幅上升。近來亦有研究指出，於肥胖情形下，動物體內對於內生性的瘦體素敏感性下降，認為此狀態下血清瘦體素的增加也許可作為體內出現瘦體素阻抗之指標 (Considine, 2011)。

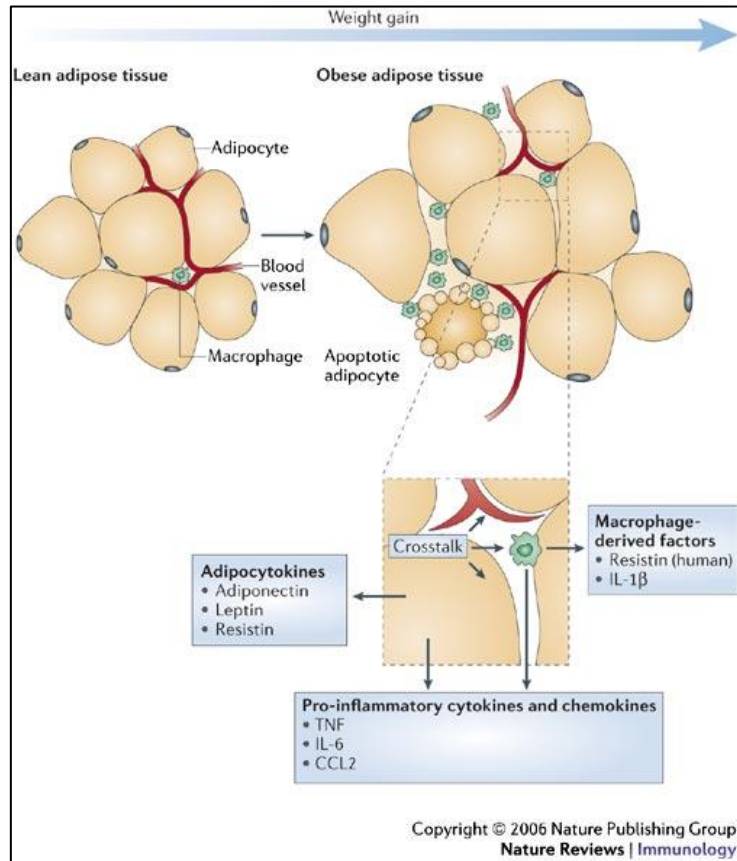


圖 2-6、脂肪組織所分泌之脂肪激素及促發炎細胞激素。

Fig.2-6. Adipose tissue : cellular components and molecules synthesized.

(Tilg *et al.*, 2006)

四、高脂飲食與肝臟脂質代謝之關係

高脂飲食與胰島素阻抗、脂質代謝異常等代謝症狀有很大的相關性。研究指出，此種飲食模式下之動物，當胰島素阻抗發生時，肝臟脂質代謝有異常的現象，過多的胰島素會促進脂質合成 (lipogenesis) 相關轉錄因子 (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ ; sterol regulatory element binding protein-1c, SREBP-1c) 的表現，活化脂質生合成基因的轉錄作用，促使肝臟脂質攝入與合成的增加，同時也會藉由抑制游離脂肪酸 (free fatty acids, FFA) 氧化作用與降低微粒體三酸甘油酯運送蛋白 (microsomal triglyceride transfer protein, MTP) 的活性與表現量，以降低脂質的氧化與分泌，導致過多脂質堆積於肝臟之情形，造成體內脂質代謝的異常 (Adams *et al.*, 2005) (圖 2-4)。

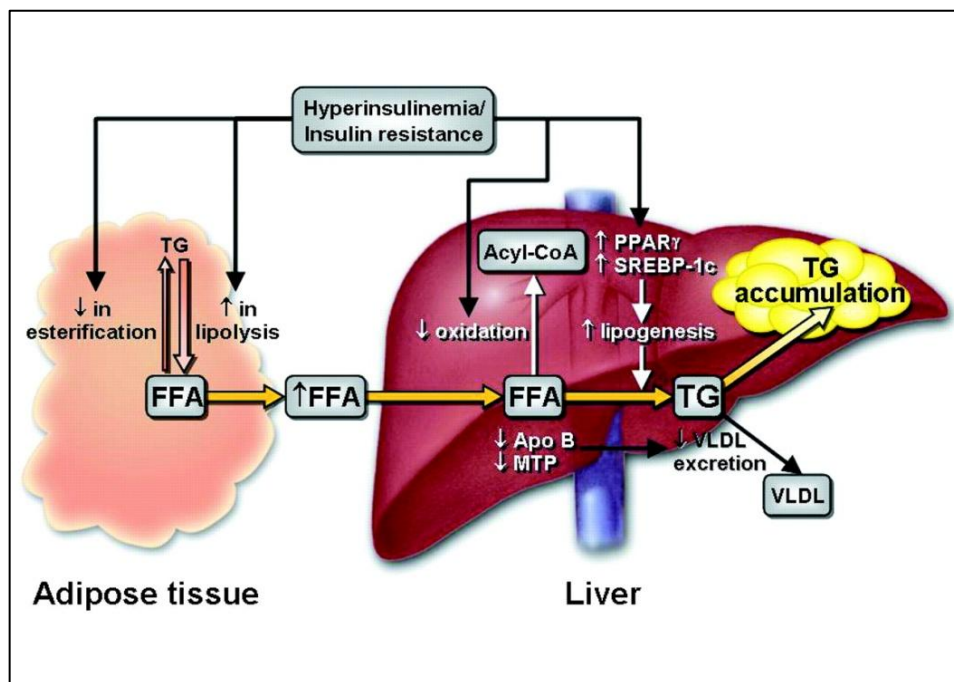


圖 2-7、非酒精性脂肪肝的可能代謝機轉。

Fig.2-7 .Development of nonalcoholic fatty liver disease. (Adams *et al.*, 2005)

五、高脂飲食與發炎反應之關係

長期攝食高油脂的飲食型態容易導致肥胖，而肥胖所引起的胰島素抵抗情形已被指出是由於體內慢性發炎所致 (Xu *et al.*, 2003)，其中，肝臟發炎反應的活化，被認為會造成局部或全身性胰島素抵抗的發生 (Arkan *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2005)。其發炎可能機制分述如下 (圖 2-5)：

- (一) 游離脂肪酸增加由脂肪細胞釋出至血液中，被肝臟或肌肉組織攝入後，活化蛋白質激酶 (如: protein kinase C, PKC)，進而影響 IKK β 、JNK、p38，造成發炎因子 (如: TNF- α 、IL-6) 的釋出，而引起體內發炎反應。
- (二) 肥胖情形下，會增加浸潤於脂肪組織的巨噬細胞 (adipose tissue macrophage, ATM) 增加形成，因而促使脂肪組織增加分泌發炎因子 (如: TNF- α 、IL-6)，導致體內發炎反應的發生。

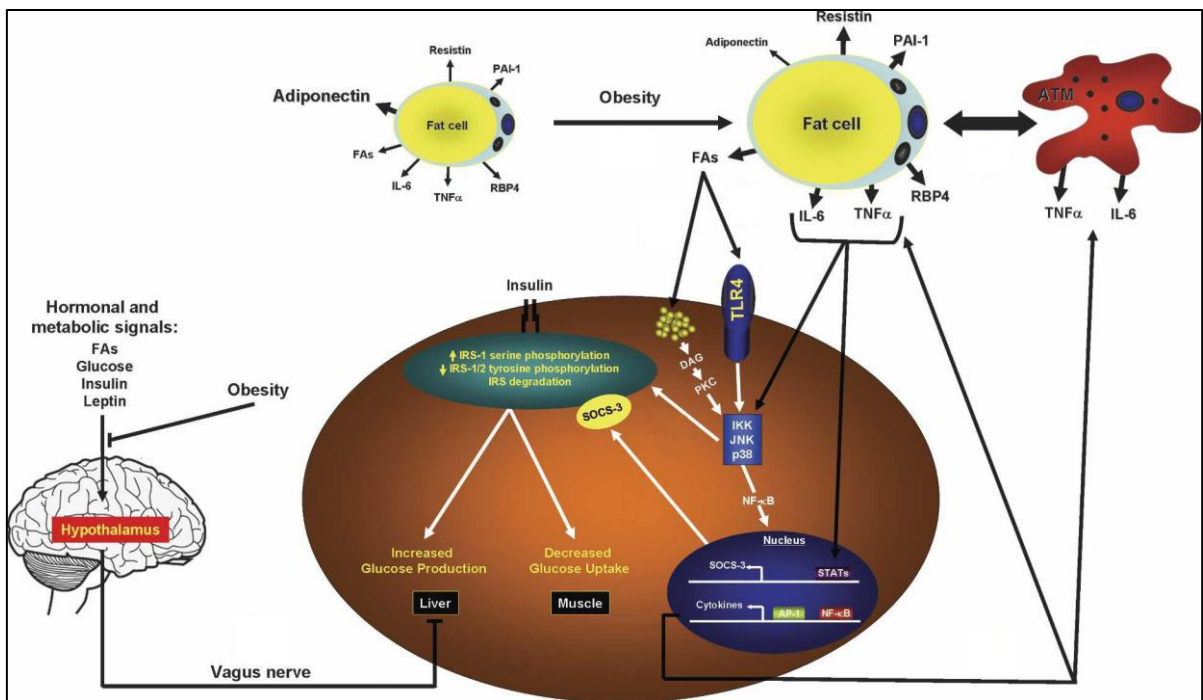


圖 2-8、肥胖、胰島素抵抗與發炎反應的關係。

Fig. 2-8 . Endocrine, inflammatory, and neuronal pathways link obesity to insulin resistance.

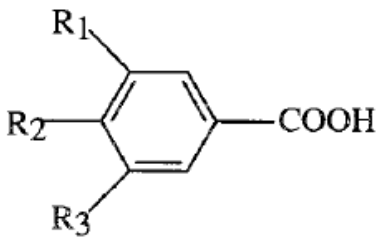
(Qatanani *et al.*, 2007)

第四節 酚酸與糖尿病



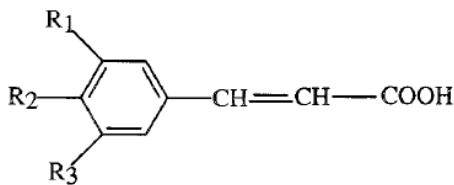
酚酸 (phenolic acids) 為廣泛存在於蔬菜、水果中的一種植化素 (phytochemicals)，主要可分為苯甲酸衍生物 (hydroxybenzoic acids derivatives) 及肉桂酸衍生物 (hydroxycinnamic acids derivatives) 兩大類 (圖 2-6)：

(A) Hydroxybenzoic acid



R1	R2	R3	Chemical name
OH	OH	OH	Gallic acid
H	OH	OCH3	Vanillic acid
OCH3	OH	OCH3	Syringic acid
OH	OH	H	Protocatechuic acid

(B) Hydroxycinnamic acid



R1	R2	R3	Chemical name
H	H	H	Cinnamic acid
OH	OH	H	Caffeic acid
OH	OCH3	H	Ferulic acid
OCH3	OH	OCH3	Sinapic acid

圖 2-9、酚酸之化學結構。

Fig. 2-9. Chemical structures of phenolic acids.

(Kilmartin *et al.*, 2001)

酚酸具有抗氧化、抗發炎、改善及預防慢性病之功能 (Scalbert *et al.*, 2005)；此外，近期也有許多研究指出，酚酸可藉由調節代謝而具有調節血糖之活性：



(一) 肉桂酸 (cinnamic acid)

Adisakwattana 等人 (2005) 利用 streptozotocin (STZ) 誘導糖尿病大鼠進行研究，結果顯示，肉桂酸衍生物 *p*-methoxycinnamic acid 可增加糖尿病大鼠肝臟糖解作用、降低肝臟糖質新生作用，並增加胰島素的分泌，而具有降血糖效果。

Hwang 等人 (2009) 利用胰島素抵抗小鼠肝臟上皮細胞株 FL83B 進行研究，結果顯示，於胰島素抵抗情況下，cinnamic acid 可有效改善肝臟葡萄糖攝入之能力。

(二) 阿魏酸 (ferulic acid)

阿魏酸為植物代謝產物，常存在穀物與其相關產品中。研究發現，無論對於 streptozotocin (STZ) 誘導第一型糖尿病小鼠，或是第二型糖尿病 KK-A^y 小鼠，阿魏酸皆能顯著降低糖尿病小鼠的血糖濃度，並具抗脂質過氧化之效果 (Ohnishi *et al.*, 2004)。

(三) 咖啡酸 (caffeic acid)

Okutan 等人 (2005) 發現，咖啡酸對 STZ 誘導之糖尿病大鼠具有抗糖尿病之效果。Jung 等人 (2006) 研究指出，於 *db/db* 第二型糖尿病小鼠動物模式中，咖啡酸可調節肝臟及脂肪細胞對葡萄糖之利用，具有降血糖之效果。

(四) 沒食子酸 (gallic acid)

沒食子酸是一種內生性的植物酚類，存在於茶、葡萄、莓果類等食物中 (Singh *et al.*, 2004)。於 STZ 誘導第二型糖尿病大鼠之動物模式中，沒食子酸藉由增加肝臟糖解作用、降低肝臟糖質新生作用，增進細胞對葡萄糖的利用，而具有降血糖效果 (Punithavathi *et al.*, 2010)。於高果糖誘導糖尿病前期大鼠動物模式中，沒食子酸可藉由減緩糖尿病前期大鼠體內發炎及氧化壓力過高

之情形，進而改善醣類代謝異常之情形，具調節血糖之效果 (施，2012)。

(五) 香草酸 (vanillic acid)

香草酸為一種天然植物酚類化合物 (phenolic compound)，廣泛存在於香草、蔬菜、水果等食物中 (Shyamala *et al.*, 2007)。研究指出，香草酸衍生物可藉由抑制 PTP1B (protein tyrosine phosphatase 1B) 蛋白作用，降低 PTP1B 對胰島素訊息傳遞蛋白之干擾，應可用於改善第二型糖尿病患者體內胰島素阻抗之情形 (Feng *et al.*, 2007)。此外，於 MG (methylglyoxal) 誘導 Neuro-2A 神經細胞凋亡之研究中指出，香草酸可能透過降低氧化壓力，調控 MAPK 發炎途徑相關蛋白 (JNK、p38 MAPK、PKC) 表現，及降低細胞內糖化終產物 CML (N- ϵ -carboxymethyllysine) 累積，而達到保護神經細胞之功效，可能具有預防糖尿病併發周邊神經病變 (diabetic peripheral neuropathy, DPN) 之功效 (Huang *et al.*, 2008)。



第三章、研究動機與實驗架構

第一節 研究動機與目的

糖尿病前期是一種發展為糖尿病的過渡時期，體內的高血糖情形為導致患者是否轉變為糖尿病的關鍵。過去已有許多文獻指出，酚酸可藉由調節醣類代謝而具有降血糖、抗糖尿病之生理活性，本實驗室先前研究也已證實 vescalagin 與 gallic acid 這兩種酚類化合物具有血糖調節之作用，皆能藉由減緩體內發炎及氧化壓力的情況，進而改善高果糖誘導糖尿病前期大鼠之胰島素阻抗及醣類代謝，但關於其他食物中常見酚酸與調節血糖之相關性目前尚未有完整的探討。

本研究藉由細胞實驗模式篩選出最具改善胰島素阻抗潛力之天然酚酸，並進一步進行動物實驗，探討該酚酸對高脂飼料餵食大鼠調節血糖之效果並釐清其減緩胰島素阻抗之機制。實驗架構圖如下：



第二節 實驗架構

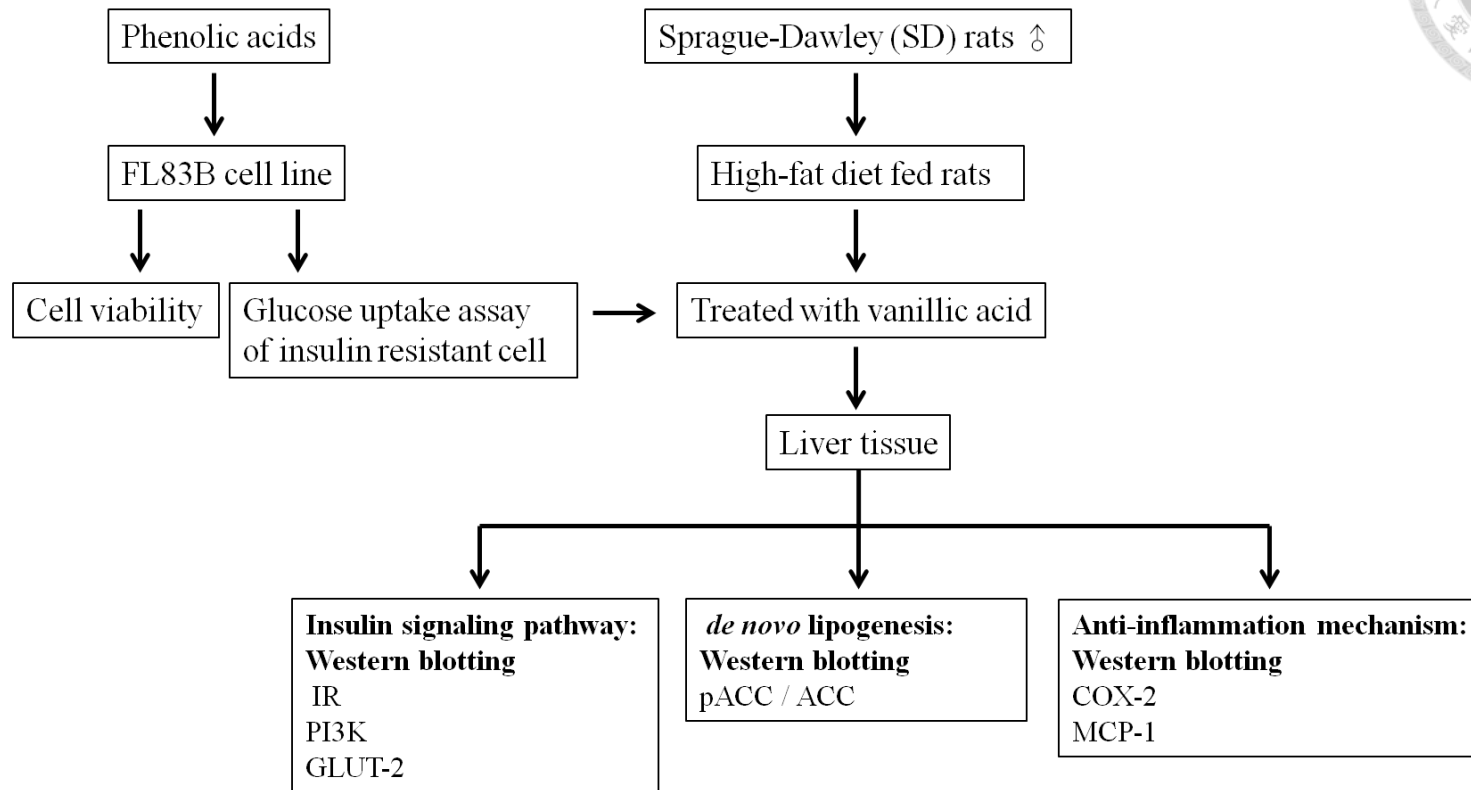


圖 3-1、實驗架構。

Fig.3-1. Experimental design.

第四章、材料與方法



第一節 胰島素抵抗細胞實驗模式

一、實驗材料

(一) 實驗樣品

皆為試藥級酚酸藥品，包括以下項目：

1. Sigma (St. Louis, MO, USA)
cinnamic acid, caffeic acid, ferulic acid, chlorogenic acid, gallic acid, sinapic acid, vanillic acid, syringic acid,
2. Alfa Aesar
protocatechuic acid

(二) 實驗細胞

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

(三) 實驗藥品及試劑

1. Sigma (St. Louis, MO, US)
bovine serum albumin (BSA), insulin, NaOH, HCl,
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT reagent), dimethyl sulfoxide (DMSO), disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4), potassium chloride (KCl), potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4), sodium chloride (NaCl), sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4), nutrient mixture F12 Ham Kaighn's modification (F12K) medium, HEPES
2. Gibco BRL (NY, USA)
fetal bovine serum (FBS)
3. JRS (Lenexa, KS, USA)
trypsin

4. Invitrogen (Eugene, Oregon, USA)

2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose

(2-NBDG)



(四) 實驗儀器設備

天平 (balance) (HR-200, A&D, USA)

免疫酵素分析儀 (microplate spectrophotometer) (Epoch, Biotek, Australia)

低溫冷凍櫃 (-20°C refrigerator) (CH-401, 進信, 台灣)

吸管輔助器 (pipeting-aid) (Matrix, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

往復式震盪恆溫槽 (reciprocating shaker baths) (BT-15D, 盛隆實業, 台灣)

流式細胞儀 (flow cytometry) (FACScan, Becton Dickinson, USA)

桌上型離心機 (centrifugator) (KUBOTA 5100, Tokyo, Japan)

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

迴轉式震盪器 (orbital shaker) (TS-500, 祥泰, 台北, Taiwan)

高速離心機 (centrifugator) (Sorvall RC 5C, DuPONT, CT, USA)

高壓滅菌釜 (autoclave) (HL-341, 雙鷹, 台北, 台灣)

二氧化碳培養箱 (CO₂ incubator) (Model TC2323, SHEL LAB, Tokyo, Japan)

無菌操作台 (laminar flow) (造鑫, 台北, 台灣)

酸鹼測定機 (hanna instruments) (HI9017, Italy)

震盪混合器 (vortex mixer) (G-560, Scientific industries, Inc., Bohemia, NY, USA)



二、實驗方法

(一) 實驗樣品配製

秤取所需量之試藥級酚酸後溶於 DMSO 中，皆配製成所需之濃度，以針筒過濾器過濾，冰於 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 備用。MTT 使用之樣品濃度分別為 12.5、25、50、100 μM ； Glucose uptake 使用之樣品濃度為 12.5 μM 。

(二) FL83B 細胞株之保存與培養

1. 實驗藥品配製

phosphate-buffered saline (PBS)

8 g NaCl / 1.15g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / 0.2 g KH_2PO_4 / 0.2 g KCl / 1 L ddH₂O。

nutrient mixture F12 Ham Kaighn's modification (F12K) medium

F-12K medium / 10% FBS / 2.5g NaHCO_3 / 1 L ddH₂O 調 pH 至 7.3。

2. 實驗步驟

解凍後之 FL83B 細胞每二至三天固定進行一次繼代培養。去除舊的培養基後，利用 PBS (phosphate-buffered saline) 溶液清洗細胞表面，再以胰蛋白酶 (trypsin) 作用切下細胞，加入培養液 (F12K + 10% FBS) 打散並懸浮細胞後，將細胞懸浮液吸至 15 ml 無菌離心管中，以 1000 rpm、5 min 之條件離心。倒除上清液再重新以培養液均勻懸浮細胞，計數細胞並將細胞數調整至 1×10^6 cells/mL。取 1 mL 懸浮液至 10 cm 培養皿中，最後置於 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，5 % CO_2 與充分溼度之培養箱內。待確定 FL83B 細胞長至八分滿後，進行細胞實驗。



(三) 細胞存活率試驗 (MTT assay)

1. 實驗樣品配製

秤取所需量之試藥級酚酸後溶於 DMSO 中，皆配製成所需之濃度 12.5、25、50、100 μM ，以針筒過濾器過濾，冰於 -20°C 備用。

2. 實驗藥品配製

MTT reagent

2 mg MTT / 1 mL ddH₂O。

phosphate-buffered saline (PBS)

8 g NaCl / 1.15g Na₂HPO₄ · 2H₂O / 0.2 g KH₂PO₄ / 0.2 g KCl / 1 L ddH₂O。

3. 實驗原理

MTT 是一種活細胞的染色法，其原理主要是利用活細胞內之粒腺體去氫酶 (mitochondrial dehydrogenase) 將淡黃色水溶性 MTT 溶液 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl- tetrazolium bromide) 還原成黑紫色之水不溶性的 formazan 沉澱，藉由生成顏色的深淺判斷活細胞數目的多寡，故可以代表細胞存活的情形 (Chan *et al.*, 2005)。

4. 實驗步驟

將培養完成之細胞調整細胞數至 1×10^5 / ml，再將調整完細胞之細胞懸浮液取 200 μl 至 96 孔盤中培養 24 小時使細胞貼附。取出培養液，再於每孔 well 中加入 20 μl 樣品及 180 μl 培養液於 37°C ，5 % CO₂ 培養箱中刺激 24 小時。取出培養液再於每孔 well 中加入 MTT 試劑 25 μl 及培養液 100 μl 避光於培養箱中反應 4 小時，再取出全部培養液後，每孔 well 均加入 100 μl DMSO 反應 15 分鐘，測 450 nm 之吸光值(吸光值越高代表其細胞存活率越高)。

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{(\text{Sample group} - \text{Blank group})}{(\text{Control group} - \text{Blank group})} \times 100 \%$$



(四) 葡萄糖攝入試驗 (glucose uptake assay)

1. 實驗樣品配製

秤取所需量之試藥級酚酸後溶於 DMSO 中，皆配製成所需之濃度 12.5 μM ，以針筒過濾器過濾，冰於 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 備用。

2. 實驗藥品配製

insulin reagent

500nM insulin。

Kerbs-Ringer Biocarbonate buffer (KRB buffer)

6.9 g NaCl / 2.1 g NaHCO_3 / 0.163 g KH_2PO_4 / 0.35 g KCl / 0.28 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / 0.29 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ / 3.574 g HEPES / 1% BSA / 1 L ddH₂O 調 pH 至 7.3。

2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose reagent (2-NBDG reagent)

200 μM 2-NBDG reagent。

phosphate-buffered saline (PBS)

8 g NaCl / 1.15g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / 0.2 g KH_2PO_4 / 0.2 g KCl / 1 L ddH₂O。

TNF- α reagent

10 μg TNF- α / 1 mL PBS 配製成 10000 ng/mL，再以 PBS 稀釋成 100 ng/mL，冰於 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 備用。

3. 實驗原理

2-NBDG (2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose) 為修飾後具螢光性的葡萄糖衍生物，藉由測定細胞對

2-NBDG 的攝入量，可了解細胞對葡萄糖之攝入情形。目前已有學者使用 2-NBDG 於葡萄糖攝入試驗，進行糖尿病相關之研究 (Louzao *et al.*, 2008)；此外，亦有研究使用 2-NBDG 探討 FL83B 細胞株於胰島素阻抗情形下，對葡萄糖之攝入情形 (Chang *et al.*, 2012)。

4. 實驗步驟

(1) TNF- α 誘導 FL83B 細胞株造成之胰島素阻抗

將 FL83B 細胞分盤培養，待其生長至八分滿時，吸去舊的培養液加入 4 mL 不含血清之培養液及 1 mL，100 ng/mL 的 TNF- α ，於 37 °C 培養箱中作用 5 小時後，即誘導造成 FL83B 細胞株之胰島素阻抗情形。

(2) 酚酸對胰島素阻抗細胞株 FL83B 之葡萄糖攝入試驗

將 FL83B 細胞分盤培養，待其生長至八分滿時，吸去舊的培養液加入 5 mL 不含血清之培養液及 TNF- α (最終濃度 20 ng/mL)，於 37 °C 培養箱中作用 5 小時後，加入胰蛋白酶 (trypsin) 並於 37 °C 培養箱中作用 5 分鐘，以 1200 μ L 的 KRB buffer 沖下細胞。取 172 μ L 懸浮細胞液、20 μ L 含 50 nM insulin 或 12.5 μ M 的樣品及 8 μ L 2-NBDG (2-NBDG 之最終濃度為 200 μ M) 混合，37 °C 水浴避光作用 1 小時後，準時將褐色微量離心管取出置於冰上終止反應，再以 3000 g (4 °C) 離心 5 分鐘，去除上清液後以 PBS 離心清洗兩次。最後加入 1 mL PBS 準備利用流式細胞儀進行分析，依螢光強度大小來判別細胞攝入葡萄糖多寡，螢光強度越強代表細胞攝入螢光葡萄糖染劑 (2-NBDG) 量越多。再經由以下公式算出酚酸對具胰島素阻抗 FL83B 細胞葡萄糖攝入之改善情形。

$$\text{Amelioration rate (\%)} = \left[\frac{(\text{2-NBDG uptake fold change of sample group}) - (\text{2-NBDG uptake fold change of TNF-}\alpha\text{- treated group})}{(\text{2-NBDG uptake fold change of TNF-}\alpha\text{- treated group})} \right] \times 100 (\%)$$

第二節 高脂飼料誘發高血糖動物實驗模式



一、實驗材料

(一) 實驗樣品

1. Sigma (St. Louis, MO, USA)
vanillic acid (香草酸)
2. 台灣武田藥品工業股份有限公司
pioglitazone hydrochloride tablets (愛妥糖)

選用經細胞實驗篩選後，認為較具減緩細胞胰島素阻抗，而改善葡萄糖攝入能力之酚酸樣品－香草酸 vanillic acid (購自 Sigma) 進行動物實驗，以複驗細胞試驗之結果，了解香草酸於胰島素阻抗與高血糖動物體內之作用。

(二) 實驗動物

雄性 Sprague-Dawley 大鼠，購自樂斯科生物科技股份有限公司，購入週齡為 8 週齡。馴養時間為 3 週，馴養期間供應充分飲水及正常實驗用錠狀飼料 (Laboratory Rodent Diet)，並將溫度維持於 25 ± 2 °C、相對溼度 40 ~ 60 %、光照週期 (light-dark cycle) 維持在 12 小時光照，12 小時黑暗的狀態下。

(三) 實驗動物飼料

1. 正常飼料：購自台北市雍立公司，飼料成分組成為 58.0 % 碳水化合物、28.5 % 蛋白質、13.5 % 脂肪、0.4 % 鈉及 1.1 % 鉀。(Laboratory Rodent Diet 5001, The Richmond's Standard, PM Feed Inc., Louis, MI, USA) (附錄 1)
2. 高脂飼料：以正常粉狀飼料加入奶油，攪拌均勻後，製成脂質熱量佔總熱量 60 % 之高脂飼料。

(四) 實驗藥品及試劑

(1) 化學試藥

1. Bio-Rad Laboratories (Richmond, VA, USA)
Bio-Rad protein assay dye reagent
2. J.T. Baker (Philipsburg, NJ, USA)
sodium dodecyl sulfate (SDS), tris base, acrylamide/ bis 37.5 : 1, 40% solution
3. Lonza (Rockland, ME, USA)
ProSieve protrack dual color protein loading buffer
4. Merck KgaA (Darmstadt, Germany)
dipotassium phosphate (K_2HPO_4), hydrochloric acid (HCl), Tween-20
5. Millipore (Billerica, MA, USA)
immobilon western chemiluminescent HRP substrate
6. Roche (Mannheim, Germany)
complete, Mini - Protease Inhibitor Cocktail Tablets in *EASY*packs
phos STOP - Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets in *EASY*packs
7. Sigma (St. Louis, MO, USA)
ammonium peroxodisulphate (APS), bovine serum albumin (BSA), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) , glycerol, glycine, phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) , sodium chloride (NaCl) , sodium hydroxide (NaOH) , sodium carbonate ($NaHCO_3$) , sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4) , sulfuric acid (H_2SO_4) , triton X-100, TEMED (N,N,N,N'-tetramethyl-eyhylenediamine)
8. 林純
disodium hydrogen phosphate anhydrous, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA-2Na), sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)



9. 昭和化學株式會社 (Tokyo, Japan)
sodium digydropen phosphate anhydropen (NaH_2PO_4)
10. 景明化工股份有限公司
methanol



(2) 酵素套組

1. rat insulin ELISA kit (Mercochia AB, Sweden)
2. mouse and rat leptin ELISA kit (BioVendor, Germany)

(3) 抗體

1. Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)
Insulin Receptor β (L55B10) Mouse mAb
PI3 Kinase p85 Antibody
Acetyl-CoA Carboxylase (C83B10) Rabbit mAb
Phospho-Acetyl-CoA Carboxylase (Ser79) Antibody
2. Gene Tex (Irvine, CA, USA)
MCP-1 Antibody
COX-2 Antibody [C3], C-term
beta Actin Antibody
Mouse IgG antibody (HRP)
Rabbit IgG antibody (HRP)
3. Millipore (Billerica, MA, USA)
Anti-GLUT-2 Antibody

(五) 實驗儀器設備

UVP 冷光生醫影像系統 UVP biospectrum image system (Level, Cambridge, UK)
天秤 (balance) (HR-200, A&D, USA)
免疫酵素分析儀 (microplate spectrophotometer) (Epoch, Biotek, Australia)
免疫轉印槽 (transfer tank) (Mini Compact Electro-blotting Unit V10-EB10, Scie-Plas, UK)



-20 °C 低溫冷凍櫃 (-20 °C refrigerator) (CH-401, 進信, 台灣)
桌上型離心機 (centrifugator) (KUBOTA 5100, Tokyo, Japan)
純水製造機 (milli-Q-ultrapure water system) (Millipore, Bedford, MA, USA)
迷你電泳槽 (mini-PROTEAN Tetra Cell, 1.5 mm, 4 gel) (Bio-Rad, USA)
迴轉式振盪器 (orbital shaker) (TS-500, 祥泰, Taipei, Taiwan)
高速離心機 (centrifugator) (Sorvall RC 5C, DuPONT, CT, USA)
組織均質機 (homogenizer) (Model DC-CH40, Pyrex, Japan)
蛋白質轉印電源供應器 power supply (Hercules 200, EZlan, Taipei, Taiwan)
硝化纖維轉漬膜 PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA, USA)
酸鹼測定機 (hanna instruments) (HI9017, Italy)
膠片鑄膠架 (casting frame) (Bio-Rad, USA)
膠體電泳電源供應器 (power supply) (Bio-Rad, USA)
濾紙 (Bio-Rad filter paper criterion size) (Bio-Rad, USA)
穩豪血糖試紙 (OneTouch Ultra test strips) (Lifescan, Milptas, CA, USA)
穩豪血糖機 (OneTouch Ultra) (Lifescan, Milptas, CA, USA)

二、實驗方法

(一) 實驗樣品配製

分別秤取 pioglitazone 及 vanillic acid 後，溶於去離子水中，皆配製成 30 mg/mL 之濃度。

(二) 動物誘導及分組

適應三週後之雄性 Sprague-Dawley 大鼠，採自由進食方式，控制組餵予正常飼料十六週；實驗組大鼠則餵食高脂飼料 (60 kcal % fat) 十六週，使其誘發高血糖 (hyperglycemia)、高胰島素血症 (hyperinsulinmia) 及胰島素阻抗 (insulin resistance) 之症狀，若高脂飼料組動物測定之禁食血

糖值與正常飼料組相比，達顯著性差異 ($p < 0.05$) 時，則視為已成功誘發高血糖動物模式，可開始進行後續動物實驗。

成功誘發高血糖動物模式後，試驗期間各組飼料及灌食劑量分組如下：

- (1) 控制組：餵食正常飼料，未誘導形成高血糖，每日管餵去離子水。
- (2) 負控制組：餵食高脂飼料，誘導形成高血糖，每日管餵去離子水。
- (3) 正控制組：餵食高脂飼料，誘導形成高血糖，每日管餵藥物 — pioglitazone (30 mg/kg b.w.)。
- (4) 實驗組：餵食高脂飼料，誘導形成高血糖，每日管餵酚酸樣品 — vanillic acid (30 mg/kg b.w.)。實驗動物管餵四週後進行犧牲。

(三) 試驗方法

1. 血液處理

將取得之全血置於 1.5 mL 之 eppendorf 中，進行離心 (4°C ，3000 g，20 分鐘) 取得之上層液，即為血清，置於 -20°C 備用。

2. 空腹血糖 (fasting plasma glucose) 之測定

利用尾端採血，以穩豪血糖機 (One Touch Ultra) 進行空腹血糖值之測定，實驗中每兩週監測一次，單位為 mg/dL。

3. 血清胰島素 (serum insulin) 之測定

利用斷尾採血，收集之血液盛裝於 1.5 mL 之 eppendorf 中，進行離心 (4°C ，3000 g，20 分鐘) 取得上層液血清後，再利用 rat insulin ELISA kit (Mercodia AB, Uppsala, Sweden) 測定血清胰島素進行定量。取 calibrators 及血清各 10 μL 加到 coated 96 well plate 中，再加入 enzyme conjugate solution 100 μL ，在室溫下 150 rpm 震盪 2 小時後，以 wash buffer 洗 6 次，加入 TMB 200 μL ，室溫反應 15 分鐘，反應完加入 stop solution 50 μL ，以免疫酵素分析儀讀取 450 nm 吸光值，由標準曲線換算得血清中胰島素濃度，單位為 $\mu\text{g/L}$ 。

4. 血清瘦體素 (serum leptin) 之測定

將取得之全血盛裝於 1.5 mL 之 eppendorf 中，進行離心 (4 °C，3000 g，20 分鐘) 取得上層液血清後，再利用 mouse and rat leptin ELISA kit (BioVendor, Germany) 測定血清瘦體素進行定量。先將血清以 dilution buffer 稀釋 20 倍後，取 calibrators 及血清各 100 µl 加到 coated 96 well plate 中，在室溫下 250 rpm 震盪 1 小時後，以 wash buffer 洗 3 次，加入 biotin labelled antibody solution 100 µl，在室溫下 250 rpm 震盪 1 小時後，以 wash buffer 洗 3 次，加入 streptavidin-HRP conjugate 100 µl，在室溫下 250 rpm 震盪 1 小時後，以 wash buffer 洗 3 次，再加入 substrate solution 100 µl，室溫反應 10 分鐘，反應完加入 stop solution 100 µl，以免疫酵素分析儀於五分鐘內讀取 450 及 630 nm 吸光值，由標準曲線換算得血清中瘦體素濃度，單位為 ng/mL。

5. 口服葡萄糖耐受性試驗 (oral glucose tolerance test, OGTT)

口服葡萄糖耐受性試驗乃依據 Clarke 等人 (1986) 的方法，將大鼠禁食 16 小時後分別秤重，先測定空腹血糖，再迅速管餵葡萄糖溶液 (濃度 1.5 g/mL ddH₂O；灌食量 1.5g / kg b.w.)，接著再於 30、60、90、120 分鐘四個時間點分別測定血糖，觀察其血糖變化狀況。

6. 臟器收集

大鼠犧牲時，利用解剖刀自胸腔取出肝臟，秤重後冰於 -20 °C 備用。

7. 肝臟脂質代謝相關訊息傳遞蛋白含量之測定

(1) 肝臟組織蛋白質萃取方式

取 0.2 克之肝臟，稍微壓碎後加入液態氮，繼續壓碎成組織顆粒狀，隨即加入 1 毫升之緩衝溶液 (含 7 M urea, 2 M thiourea, 0.002 % bromophenol blue, 65 mM DTT, 65 mM CHAPS) 於研鉢中，冰浴下研磨後於 4 °C 靜置 1 小時，以超音波細胞破

碎機處理組織均質液，再以 4°C，20000 g 之條件，離心 60 分鐘，上層澄清液即為肝臟細胞蛋白質液。



(2) 蛋白質濃度之定量

● 藥品配製

BSA (500 µg/ml)

0.05 g BSA 溶於 100ml 去離子水中。

● 實驗步驟

以胎牛血清蛋白 (bovine serum albumin ; BSA) 配置成濃度 0、100、200、300、400 與 500 µg/ml 之蛋白質標準品，使其與蛋白質染劑 (Bio-rad protein assay dye reagent) (1 : 4 之比例) 反應後於光譜分析儀下測量 595 nm 吸光值，得到蛋白質標準曲線。將樣品稀釋於標準曲線範圍內之濃度 (約稀釋 150 倍)，與蛋白質染劑作用後，相對於蛋白質標準曲線，利用內插法計算出本樣品蛋白質濃度。

(3) 西方轉漬分析 (western blot)

聚丙烯醯胺膠體電泳 (polyacrylamide gel electrophoresis)

1. 膠體配製

(1) 藥品配製

A 液：

acrylamide/ bis 37.5 : 1, 40 % 溶液

B 液：分離膠體 (separating gel) 緩衝液

18.2 g tris / 0.36 ml TEMED 加去離子水 60 ml 溶解，以 HCl 調 pH 至 8.8 後，加水至 100 ml，儲存於 4 °C。

(TEMED=N,N,N,N'-tetramethyl-eyhlylenediamine)

C 液：聚焦膠體 (stacking gel) 緩衝液

6.0 g tris / 0.4 ml TEMED 加去離子水 40 ml 溶解，以 HCl 調 pH 至 6.8 後，加水至 100 ml，儲存於 4 °C。



10 % SDS 溶液

取 1 g SDS 溶於 10 ml 去離子水中，儲存於室溫。

過硫酸銨溶液 (ammonium persulfate, APS, 10 %)

取 0.1 g APS 溶於 1 ml 去離子水中，需新鮮配製。

(2) 實驗步驟

先製備 7.5 ~ 10 % 之分離膠體 (separating gel) ，以 95 % 酒精進行壓泡後，待其凝固後以濾紙將酒精吸除；再加入 4 % 之焦集膠體 (stacking gel) ，上置樣品槽齒梳 (comb) ，待膠體凝固後以保鮮膜包覆好，冰於 4 °C 備用。

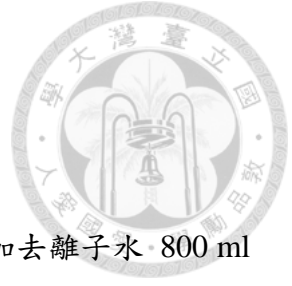
SDS-PAGE 膠體溶液 (單位：mL)

膠體溶液	分離膠體溶液 (separating gel) 10 %	焦集膠體溶液 (stacking gel) 4 %
A 液 (40 %)	2.475	0.495
B 液	2.5	-
C 液	-	1.24
10 % SDS	0.1	0.05
H ₂ O	4.875	3.115
10 % APS	0.05	0.1
總體積	10.0	5.0

※配製膠體時，APS 最後加入。

2. 樣品配製

於 1.5 mL 之 eppendorf 中，依序加入適當蛋白質溶液以及 protein loading buffer，混勻後以 95 °C 加熱 10 分鐘，冷卻備用。



3. 電泳 (gel electrophoresis)

(1) 藥品配製

電泳緩衝溶液 (running buffer) (10×)

30.29 g tris / 144.13 g glycine / 1 % SDS 加去離子水 800 ml 溶解，以 HCl 調 pH 至 8.3 後，加水至 1000 ml，儲存於 4 °C。使用前用去離子水稀釋至 1 倍。

(2) 實驗步驟

膠片之齒梳小心拔除後，將膠片組合好放入電泳槽中，倒入電泳緩衝溶液 (running buffer)。依序於樣品槽中注入 protein marker 及蛋白溶液，以固定電壓 80 V 進行電泳，待電泳完成後，取出膠體進行蛋白質轉印 (transfer) 之步驟。

4. 蛋白質轉印 (protein transfer)

(1) 藥品配製

轉印緩衝溶液 (transfer buffer) (10×)

30.3 g tris base / 144 g glycine，加去離子水 800 ml 溶解，以 HCl 調 pH 至 8.3 後，加水至 1000 ml，儲存於 4 °C。使用前用去離子水稀釋至 1 倍，其中含有 10 % 甲醇。

(2) 實驗步驟

將 PVDF 轉印膜先以 100 % 甲醇潤濕數秒鐘後，浸泡於轉印緩衝液中備用；而轉印所需之濾紙與海綿也先浸潤於轉印緩衝液中平衡備用。再將完成電泳之膠片浸於轉印緩衝液中平衡約 5 分鐘，取出轉印卡匣 (Bio-rad 濕式轉印槽)，將多孔性海綿、3M 濾紙、PVDF membrane、膠片、3M 濾紙、多孔性海綿依序鋪上，並小心避免任何氣泡之產生，即完成轉印三明治之組合。隨後，將卡匣組合放入轉印槽中，使膠片面朝向負極，PVDF 膜朝向正極，並除去卡匣外之氣泡，以避免轉印效率降低。於 4 °C 下以 400 mA 之條件進行轉印 90 分鐘。



5. Blocking

(1) 藥品配製

TBS (tris-buffered saline) (10×)

24.2 g Tris base / 80 g NaCl，加去離子水 800 ml 溶解，以 HCl 調 pH 至 7.6 後，加水至 1000 ml，儲存於 4 °C。使用前用去離子水稀釋至 1 倍。

TBST (tris-buffered saline and Tween-20)

將 10× TBS 稀釋至一倍，加入 0.05 % (v/v) Tween-20，即成為 TBST。

blocking buffer (5 % non-fat dry milk)

1 g 脫脂牛奶溶於 20 ml TBST (0.05 % (v/v) Tween-20) 中。

(2) 實驗步驟

將轉印完成之 PVDF membrane 取出，以 TBST 清洗兩次，每次 5 分鐘，再將其浸於 5 % 脫脂奶 (溶於 TBST 中)，置於室溫中 blocking 1 小時，以阻斷非專一性抗原反應。

6. 一級抗體 (primary antibody) 及二級抗體 (secondary antibody)

將 blocking 完成之 PVDF membrane，以 TBST 清洗三次，每次 15 分鐘，接著再加入一級抗體 (以 TBST 稀釋至適當之倍率) 於 4°C 反應隔夜；一級抗體回收後，以 TBST 清洗三次，每次 15 分鐘，再以 TBST 稀釋鍵結 HRP 之二級抗體，以相同方式作用於 PVDF membrane 1 小時後，以 TBST 清洗三次，每次 15 分鐘。

7. 冷光呈色方法 (chemiluminescent detection)

(1) 呈色劑配製

進行冷光呈色前，加入等體積的 luminol reagent 及 peroxide solution，均勻混合並避光。

(2) 實驗步驟

取出 PVDF 膜，以擦手紙吸除多餘 buffer，與將混合好的呈色劑反應約一分鐘後，再利用 UVP 冷光生醫影像系統進行照膠，再經過定量分析，即可得知蛋白量表現之情形。

一級與二級抗體使用之濃度

一級抗體	二級抗體	分子量 (kDa)
Anti-Actin (1 : 4000)	Anti-rabbit	42
Anti-IR (1 : 1000)	Anti-mouse	95
Anti-PI3-Kinase (1 : 1000)	Anti-rabbit	85
Anti-GLUT2 (1 : 1000)	Anti-rabbit	57
Anti-ACC (1 : 1000)	Anti-rabbit	280
Anti-pACC (1 : 1000)	Anti-rabbit	280
Anti-COX-2 (1 : 1000)	Anti-rabbit	69
Anti-MCP-1 (1 : 1000)	Anti-rabbit	35

8. 統計分析

實驗結果以 SAS v 9.0 版 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) 軟體執行統計分析，以 one-way ANOVA 判定有無差異性，再以鄧氏新多變預測驗法 (Duncan's new multiple range test) 檢定兩兩之間是否有顯著差異，以 $p < 0.05$ 作為有顯著性差異之標準。

第五章、結果與討論



第一節 以細胞模式篩選具有降血糖潛力之酚酸

一、酚酸 (phenolic acids) 對 FL83B 細胞株生長存活率 (cell viability) 之影響

細胞存活率試驗 (MTT assay) 是利用比色法來監測細胞生長的情形，常被用於判定藥物或化學物質對細胞生長抑制及毒殺效果等 (Sargent, 2003)。酚酸為酚類化合物的一種，廣泛分佈於蔬菜、水果中 (Luximon-Ramma A. *et al.*, 2003; Bahorun T. *et al.*, 2004)，具有良好的抗氧化、抗腫瘤、降血糖等生理活性 (Inoue *et al.*, 1995; Scalbert *et al.*, 2005)。然而，酚酸在濃度過高的情況下可能造成細胞毒性。因此取 12.5、25、50、100 μM 之酚酸，添加於已培養 24 小時之 FL83B 細胞培養液中，於 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 環境下共同培養 24 小時，再測定 450 nm 吸光值，利用公式計算求得細胞存活率 (cell viability)。

表 5-1 為不同濃度酚酸對於 FL83B 細胞的生長抑制情形。結果顯示，9 種酚酸中，以 100 μM 對細胞株 FL83B 進行處理時，近半數酚酸對細胞有明顯生長抑制的情形，使細胞存活率低於 80 %。而隨著樣品測試濃度的降低可發現，細胞存活率較 100 μM 處理組別呈現上升之趨勢；其中，於 12.5 μM 時，可觀察到細胞株 FL83B 之存活率皆明顯高於 80 %，表示於此處理下，細胞株 FL83B 生長狀況良好，即此濃度下之酚酸不會對細胞株 FL83B 造成毒性。

由酚酸對 FL83B 細胞存活率之測試結果可作為進行細胞葡萄糖攝入試驗時無毒性劑量之參考，亦即確定細胞於正常生長狀態下，其生長反應不受樣品影響或阻礙。綜合上述實驗結果，本研究選用酚酸濃度 12.5 μM ，進行後續以 TNF- α 誘導胰島素抵抗細胞模式之葡萄糖攝入試驗，以了解不同酚酸改善胰島素抵抗細胞其葡萄糖攝入之效果。

二、酚酸 (phenolic acids) 對具胰島素抵抗細胞株 FL83B 葡萄糖攝入 (glucose uptake) 之影響


Tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) 及 interferon- γ (INF- γ) 等促發炎因子已被證實與誘發胰島素抵抗相關 (Shiba *et al.*, 1998; Iwata *et al.*, 2001; Senn *et al.*, 2002)。研究指出，TNF- α 會干擾影響胰島素訊息傳遞，進而影響肝臟細胞、肌肉纖維母細胞及脂肪細胞等細胞對葡萄糖攝入及代謝之能力 (Feinstein *et al.*, 1993; Kroder *et al.*, 1996; Peraldi *et al.*, 1996)。

2-NBDG (2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose) 為經修飾後具螢光性的葡萄糖衍生物 (D - glucose fluorescent derivative)。早期有學者將其運用於酵母菌及大腸桿菌細胞存活率之分析 (Yoshioka *et al.*, 1996)，目前亦有學者將此染劑取代細胞葡萄糖攝入試驗時使用之輻射染劑 (2-DG) 來進行糖尿病相關之研究 (Louzao *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2012)。因此本研究參考 Chang (2012) 之方法，以 TNF- α 處理 FL83B 細胞株使其誘導成胰島素抵抗細胞後，再進行葡萄糖攝入試驗，測定細胞攝入之螢光含量評估 FL83B 細胞之葡萄糖 (2-NBDG) 攝入能力，以篩選出最具改善胰島素抵抗潛力之酚酸進行後續動物實驗。

將酚酸 (12.5 μ M) 對胰島素抵抗細胞株 FL83B 進行葡萄糖攝入試驗後所得之螢光值 (圖 5-1) 進行換算，可得表 5-2 之改善率 (amelioration rate)，由表可以了解酚酸 (12.5 μ M) 對具胰島素抵抗 FL83B 細胞葡萄糖攝入之改善情形。換算公式如下：

$$\text{Amelioration rate (\%)} = \left[\frac{\text{(2-NBDG uptake fold change of sample group)} - \text{(2-NBDG uptake fold change of TNF-}\alpha\text{- treated group)}}{\text{(2-NBDG uptake fold change of TNF-}\alpha\text{- treated group)}} \right] \times 100 (\%)$$

結果顯示，具改善胰島素抵抗潛力之前三項酚酸樣品分別為：沒食子酸 gallic acid (19.88%)、香草酸 vanillic acid (13.66%)、丁香酸 syringic acid (8.36%)。其中，此三者於統計上並未有顯著差異 ($p < 0.05$)。近期已有研究指出，Gallic acid 於 STZ 誘導第二型糖尿病大鼠及高果糖飼料誘導糖尿病前



期大鼠之動物模式中，可有效增加胰島素分泌及胰島素訊息傳遞之蛋白表現量、改善糖化血色素 (HbA1C) 之產生、降低脂質過氧化物 (MDA) 產生、降低發炎反應與氧化壓力，且藉由增加糖解作用酵素 (hexokinase) 之活性、降低糖質新生作用酵素 (glucose-6-phosphatase、fructose-1,6-bisphosphatase) 活性，以增進細胞對葡萄糖之利用，具調節血糖與改善胰島素阻抗之能力 (Punithavathi et al., 2010; 施, 2012)。由於沒食子酸與糖尿病之相關性近年來被研究探討較多，因此本研究選擇同樣具有良好胰島素阻抗改善潛力之香草酸 (vanillic acid, VA) 進行後續動物實驗。

第二節 香草酸 (vanillic acid) 對高脂飼料大鼠生理、生化數值之影響

一、高脂飼料誘導高血糖大鼠之動物模式

圖 5-2 結果顯示，正常飼料組別 (Control) 平均血糖為 91.0 ± 2.8 mg/dL，Sprague-Dawley 大鼠以高脂飼料 (脂肪熱量占總飲食熱量 60%) 誘導 12 週後，高脂飼料組別 (HF) 平均血糖為 108.8 ± 9.5 mg/dL，兩組於統計上具顯著性差異 ($p < 0.05$)。將成功誘發高血糖症狀之實驗大鼠隨機分配成 HF、HF + Pio 與 HF + VA 組別，每組六隻以進行後續實驗。先前許多研究指出，高脂飲食大鼠常伴隨肥胖、高血糖、胰島素阻抗、及高三酸甘油酯血症等現象 (Yuan *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004)，本實驗後續也將進行相關之分析。

二、香草酸 (vanillic acid) 對高脂飼料大鼠生理之影響—攝食量、體重及組織重量

實驗期間各組的飲食熱量 (energy intake) 無顯著性差異 (表 5-3)，顯示無論飲食型態或是管餵 pioglitazone 或 vanillic acid 與否，皆不影響大鼠之熱量攝取。

在體重方面，高脂飼料組 (HF) 明顯高於正常飼料組 (Control)，且達顯著性差異 ($p < 0.05$)，此結果與 Huang 等 (2004) 之研究結果相符；而當餵食 pioglitazone 或 vanillic acid 四週後，可看到此兩組大鼠之平均體重皆顯著比高脂飼料組 (HF) 低，但比正常飲食組 (Control) 高 ($p < 0.05$)。推測原因可能是餵食 pioglitazone 或 vanillic acid 後，可降低體內的脂肪生成 (lipogenesis) 作用，因而可降低體脂肪的囤積，改善高脂飲食體重顯著增加之情形。

在組織重量方面，高脂飼料組 (HF) 的肝臟、腎臟及脂肪組織重量皆顯著高於其他組別 ($p < 0.05$)，而餵食 pioglitazone 或 vanillic acid 之組別與高脂飼料組 (HF) 相比則有顯著性降低情形 ($p < 0.05$)。在動物犧牲時觀察發現，高脂飼料組其臟器周圍被脂肪組織包圍之現象非常明顯。

研究指出，高脂飲食會造成體內血中三酸甘油酯及非酯化性游離脂肪酸含量上升，導致脂肪組織生成增加，進而造成大鼠的體重明顯上升 (Frazee *et al.*, 1987; Jensen *et al.*, 1989)。高脂飲食造成腎臟重量增加及腎臟組織間質細胞

擴張之現象，可能造成腎臟的損傷 (Jiang *et al.*, 2005; Deji *et al.*, 2009)。飲食中過量油脂會被肝臟攝入利用及儲存，造成肝中脂質異常堆積之情形，因而導致肝臟組織重量增加，此情形可作為胰島素阻抗及第二型糖尿病的預測指標 (Puigserver *et al.*, 2006)。

三、香草酸 (vanillic acid) 對高脂飼料大鼠血糖相關生化數值之影響 (空腹血糖、血清胰島素及 HOMA-IR index)

空腹血糖監測是了解糖尿病患控制血糖情況的重要步驟，本研究每兩週監測一次大鼠的空腹血糖，結果如圖 5-3 所示，以高脂飼料誘導 Sprague-Dawley 大鼠 12 週後，空腹血糖明顯高於正常飼料組 (Control) ($p < 0.05$)。餵食樣品兩週後，HF + Pio 及 HF + VA 組之空腹血糖已明顯低於高脂飼料組 (HF)，但仍高於正常飼料組 (Control)，顯示餵予藥品或樣品兩週後，其空腹血糖均有改善之趨勢，但尚未回復至正常值。經餵予樣品四週後，HF + VA 組之空腹血糖仍明顯低於高脂飼料組 (HF)，與正常飼料組 (Control) 則無顯著差異 ($p < 0.05$)，顯示給予高脂飼料之大鼠在餵予 vanillic acid 四週後，可明顯改善其高血糖之情形，並可使空腹血糖回復至正常值。

研究指出，攝取高油脂飲食之實驗動物會發生高胰島素血症 (hyperinsulinemia) (Prada *et al.*, 2005)，本研究 Sprague-Dawley 大鼠以高脂飼料 (脂肪熱量占總飲食熱量 60%) 誘導 12 週，再分別每日餵食 pioglitazone 或 vanillic acid 四週後進行犧牲，以 rat insulin ELISA kit (Mercodia AB, Sweden) 測定其血清胰島素濃度。結果如圖 5-4 所示。高脂飼料組 (HF) 血清胰島素濃度高達 $4.30 \pm 1.14 \mu\text{g/L}$ ，與正常飼料組 ($0.96 \pm 0.33 \mu\text{g/L}$) 相比高出 347.9% ($p < 0.05$)，推測此時高脂飼料組 (HF) 大鼠體內可能已有嚴重的胰島素阻抗 (insulin resistance) 情形，因而導致血中胰島素濃度大幅升高；而當餵食 pioglitazone 或 vanillic acid 四週後，對血中過高的胰島素皆有顯著改善之情形 ($p < 0.05$)。

飲食中的油脂含量與胰島素阻抗呈正相關，Matthews 等人 (1985) 提出，利用休息狀態時的空腹胰島素值及血糖值以公式計算出 HOMA-IR index

(homeostasis model assessment of insulin resistance) 表示胰島素阻抗之程度， $HOMA-IR\ index = \text{insulin} (\mu\text{U}/\text{mL}) \times \text{glucose} (\text{mmol}/\text{L}) / 22.5$ 。Bonora 等人 (2000) 研究比較此方法與 glucose clamp 的相關性，確認 HOMA-IR 可取代 glucose clamp 並適用於大規模研究。HOMA-IR index 的優點為容易取得空腹胰島素值及血糖值、公式簡單而可用於大量流行病學研究，以被認為是判定胰島素阻抗情形之敏感指標 (Mattews *et al.*, 1985; Bonora *et al.*, 2000)。將圖 5-3 與圖 5-4 之實驗數據帶入上述公式計算後，可得到各組的 HOMA-IR index。HOMA-IR index 數值越高，表示其胰島素阻抗程度越高。由圖 5-5 可看出，高脂飼料組別其 HOMA-IR index 明顯較 Control 組與 HF + Pio、HF + VA 組高，證實高脂飼料組 (HF) 大鼠體內胰島素阻抗情況較為嚴重，此結果與過去研究觀察到以高脂飼料餵食大鼠，會產生胰島素阻抗等糖尿病症狀之結果相符 (Huang *et al.*, 2004)。

四、 香草酸 (vanillic acid) 對高脂飼料大鼠葡萄糖耐受性之影響 (口服葡萄糖耐受性及其曲線下面積)

口服葡萄糖耐受性試驗 (oral glucose tolerance test, OGTT) 是使大鼠口服葡萄糖後測定 0、30、60、90、120 等時間點內血糖變化，觀察其適應葡萄糖之能力。正常人口服葡萄糖後，迅速由腸胃道吸收進入血中，30~60 分鐘後血糖數值會達高峰，隨著時間增加血糖值會逐漸下降。這是由於血糖升高迅速會刺激胰島素分泌增加，血糖進入細胞代謝利用，故使血糖迅速下降，大約 2 小時血糖後值便接近正常值，3 小時即恢復正常空腹之水平；但葡萄糖耐受不良或罹患糖尿病之病患則不同，其血糖值始終處在高峰值抑或持續時間過長。

口服葡萄糖耐受性試驗 (OGTT) 結果如圖 5-6 所示，由圖中可明顯看出，高脂飼料組 (HF) 其血糖於 30 分鐘時有明顯上升趨勢，30 分鐘後血糖下降速度也較為緩慢；而 HF + Pio 及 HF + VA 組之血糖值變化則類似於正常飼料組 (Control)。將圖 5-6 之結果計算出口服葡萄糖耐受曲線下面積 (areas under the curve of OGTT)，可用來判定大鼠葡萄糖耐受性之程度，其數值越高表示大鼠之葡萄糖耐受性越差。由圖 5-7 可觀察到高脂飼料組 (HF) 大鼠之葡萄糖耐受性最差，和正常飼料組 (Control) 相比有顯著差異 ($p < 0.05$)；而 HF + Pio 及 HF+VA 組之葡萄糖耐受性皆有明顯改善，且回復至正常值 ($p < 0.05$)。許多研究指出，長期高脂飲食之動物會導致胰島素阻抗的發生 (Kraegen *et al.*, 1986; Storlien *et al.*, 1986; Pedersen *et al.*, 1991) 及胰臟降低 β -cell 胰島素之分泌，因而造成動物出現葡萄糖耐受異常之情形 (Ahren *et al.*, 1999; Kaiyala *et al.*, 1999)，本研究結果和先前之研究結果相符。

五、香草酸 (vanillic acid) 對高脂飼料大鼠血脂相關生化數值之影響 (三酸甘油酯、游離脂肪酸)

飲食中含高量油脂或脂肪組織增加時，會釋放出大量的游離脂肪酸，經由血液運送到肝臟與肌肉等組織中堆積，此現象會抑制其對肝糖與血糖的利用率，而逐漸誘發胰島素阻抗及脂肪肝的發生 (Vázquez-Vela *et al.*, 2008)。研究指出，餵食高脂飼料之大鼠有血脂異常之情形，包括血中三酸甘油酯 (triglyceride)、非酯化性游離脂肪酸 (non-essential fatty acid, NEFA) 的上升，以及高密度脂蛋白的下降 (Yuan *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004)。

血脂相關數值結果如表 5-4 所示，於三酸甘油酯及游離脂肪酸方面，高脂飼料組 (HF) 相較於正常飼料組 (Control) 有顯著升高之現象 ($p < 0.05$)，而當餵食 pioglitazone 或 vanillic acid 後，其三酸甘油酯及游離脂肪酸相較於 HF 組則有降低之趨勢，本研究結果與前述研究結果相符合。

六、香草酸 (vanillic acid) 對高脂飼料大鼠血清瘦體素 (serum leptin) 之影響

瘦體素 (leptin) 是一種由脂肪組織所分泌的激素，過去許多動物實驗證實，瘦體素具有降低體重、體脂肪、攝食量、血糖及胰島素濃度之功能 (Halaas *et al.*, 1995; Pelleymounter *et al.*, 1995)。此外，研究指出，血中瘦體素濃度與體脂肪的含量呈正相關 (Considine *et al.*, 1996)，且肥胖及第二型糖尿病病患血中的瘦體素，相較於正常人有顯著增加的情形，但卻無法發揮瘦體素應有的生理作用，學者將此情形稱之為瘦體素阻抗 (leptin resistance) (Maffei *et al.*, 1995)，其機轉可能是因為血中的瘦體素無法進入腦中所導致 (Caro *et al.*, 1996)。

由圖 5-8 可看出，高脂飼料組 (HF) 血清瘦體素濃度 (19.5 ± 7.3 ng/mL) 顯著高於正常飼料組 (3.7 ± 0.7 ng/mL) ($p < 0.05$)，推測此時高脂飼料組 (HF) 大鼠體內可能有瘦體素阻抗 (leptin resistance) 的情形，因而導致血中瘦體素濃度大幅升高；而當餵食 pioglitazone 或 vanillic acid 四週後，對過高的血中瘦體素則有顯著改善的效果 ($p < 0.05$)。

第三節 香草酸 (vanillic acid) 對高脂飼料大鼠肝臟蛋白質表現量之影響

一、香草酸 (vanillic acid) 對高脂飼料大鼠肝臟脂肪酸合成作用之影響

ACC (acetyl CoA carboxylase) 為脂肪酸合成 (*de novo lipogenesis*) 步驟中的關鍵酵素，以去磷酸化為活化型式，其作用為將 acetyl CoA 經羧化作用轉變為 malonyl CoA，而產生的 malonyl CoA 為脂肪酸合成之前驅物外，同時亦可藉由異位調節 CPT-1 (carnitine palmitoyl transferase-1) 來抑制脂肪酸的氧化，ACC 作用也會受到胰島素的調控。

圖 5-9 結果顯示，高脂飼料組 (HF) 與正常飼料組 (Control) 相比，其肝臟的 acetyl CoA carboxylase 蛋白活化型式有增加的趨勢，而當餵食 pioglitazone 或 vanillic acid 四週後，具改善高脂飼料大鼠肝臟脂肪酸合成作用上升之趨勢，仍而並未達統計顯著 ($p < 0.05$)。

此外，進一步進行肝臟游離脂肪酸含量之測定，圖 5-10 結果顯示，高脂飼料組 (HF) 與正常飼料組 (Control) 相比，其肝臟的游離脂肪酸含量的確有顯著上升之情形，而當餵食 vanillic acid 四週後，則能顯著降低餵食高脂飼料大鼠肝臟中的游離脂肪酸量，此結果與圖 5-9 之結果相互呼應。

研究指出，以高脂飼料餵食之小鼠，高胰島素血症會使肝臟或脂肪組織的脂肪酸合成作用有上升之情形，進而導致胰島素阻抗及慢性發炎反應的產生 (Shao *et al.*, 2008; Hummasti *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012)，且長期攝食高脂飲食會導致血糖及血中游離脂肪酸含量上升，促使肝臟增加對脂質的攝入與合成，進而抑制胰島素訊息傳遞相關蛋白的活化及表現量，造成肝臟胰島素阻抗的發生 (Samuel *et al.*, 2012)，以上結果皆與本研究相符。

二、香草酸 (vanillic acid) 對高脂飼料大鼠肝臟胰島素訊息傳遞路徑之影響

飲食中含高量油脂或動物體內脂肪組織增加時，會誘使動物出現慢性發炎及高氧化壓力之狀況，因而干擾了正常的胰島素訊息傳遞，於是降低了胰島素敏感性，更進一步干擾了脂質及葡萄糖代謝的恆定 (Wellen *et al.*, 2005)。

在胰島素訊息傳遞方面，結果顯示 (圖 5-11、圖 5-12、圖 5-13)，高脂飼料組 (HF) 其肝臟中胰島素訊息傳遞相關蛋白 IR (insulin receptor)、PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) 及 GLUT-2 (glucose transporter-2) 的表現量相較於正常飼料組 (Control) 皆有減少的趨勢，而當餵食 pioglitazone 或 vanillic acid 四週後，上述蛋白的表現量皆有回復之趨勢，因此判定香草酸可有效改善高脂飼料大鼠體內胰島素訊息傳遞之情形。

研究指出，血中胰島素過量增加，會啟動負調控作用 (down regulation)，使胰島素受器數量減少，進而發生葡萄糖耐受不良之情形 (Okabayashi *et al.*, 1989)。高脂飲食會增加乳糜微粒將脂質運送至肝中，脂肪細胞增加釋出游離脂肪酸進入肝臟中，以及高胰島素血症會導致肝臟脂質合成作用上升，造成 DAG (diacylglycerol) 堆積於肝臟中，進一步惡化造成脂肪肝 (fatty liver) 及胰島素阻抗的發生，降低了胰島素訊息傳遞作用 (Jornayvaz, *et al.*, 2012; Moore, 2012)，此結果與本研究相符。

三、香草酸 (vanillic acid) 對高脂飼料大鼠肝臟發炎反應之影響

長期攝食高油脂的飲食型態容易導致肥胖，而肥胖所引起的胰島素阻抗情形已被指出是由於體內慢性發炎所致 (Xu *et al.*, 2003)，其中，肝臟發炎反應的活化，被認為會造成局部或全身性胰島素阻抗的發生 (Arkan *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2005)。

COX-2 (cyclooxygenase-2) 為一種發炎反應酵素，在發炎情況下會於發炎細胞中快速增加，而在正常情況下幾乎無法偵測其存在，被認為在急、慢性發炎反應中扮演重要角色。MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)

為一種發炎激素，對單核球的趨化移動具專一性，當體內處於高血脂或發炎反應時會增加其表現量 (Bose *et al.*, 2009)。

結果顯示 (圖 5-14、5-15)，高脂飼料組 (HF) 與正常飼料組 (Control) 相比，肝臟的 COX-2 及 MCP-1 發炎相關蛋白表現量有增加的趨勢，而當餵食 pioglitazone 或 vanillic acid 四週後 COX-2 及 MCP-1 發炎相關蛋白表現量則有減少之趨勢，但皆未達顯著性差異 ($p < 0.05$)。

研究指出，飲食所導致肥胖所形成的是一種慢性的發炎反應，肥胖大鼠體內會產生發炎反應，其體內組織 COX-2 及 MCP-1 蛋白表現量皆有上升的情形 (Weisberg *et al.*, 2006; Esposito *et al.*, 2009)。但本實驗並未發現相同結果，推測本研究以富含奶油的高脂飼料餵食大鼠十六週可能未能誘發嚴重的發炎反應，因此僅能觀察到肝臟發炎因子有上升的趨勢。

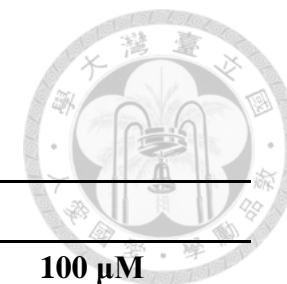


表 5-1、不同濃度酚酸對於 FL83B 細胞株之生長抑制情形

Table 5-1. Concentration effect of phenolic acids on the cell viability of FL83B cell line.

Cell Viability (%) ^a				
	12.5 μM	25 μM	50 μM	100 μM
Caffeic acid	101.8±15.8	99.4±16.8	82.0±14.3	74.3±8.6
Cinnamic acid	86.2±2.1	88.7±2.5	88.6±6.7	89.6±0.1
Ferulic acid	92.7±7.3	88.9±9.1	86.7±6.7	77.4±28.2
Gallic acid	101.8±8.8	101.0±6.3	92.6±7.7	76.3±8.0
Protocatechuic acid	91.7±10.4	91.8±9.0	75.4±8.1	71.8±9.0
Rosmarinic acid	104.3±17.6	97.2±13.1	102.5±16.5	90.7±22.4
Sinapic acid	97.2±2.9	102.1±10.1	102.0±10.5	80.0±9.2
Syringic acid	90.9±2.2	79.8±17.4	70.2±13.1	64.6±14.5
Vanillic acid	114.2±26.3	114.8±18.5	109.8±25.5	116.7±17.6

^aCell viability (%) = [A₅₇₀ of Sample group] / [A₅₇₀ of Control group] x 100 (%) .

Values are expressed as percentage relative to control value (100 %). Each value is means ± SD (n = 3).

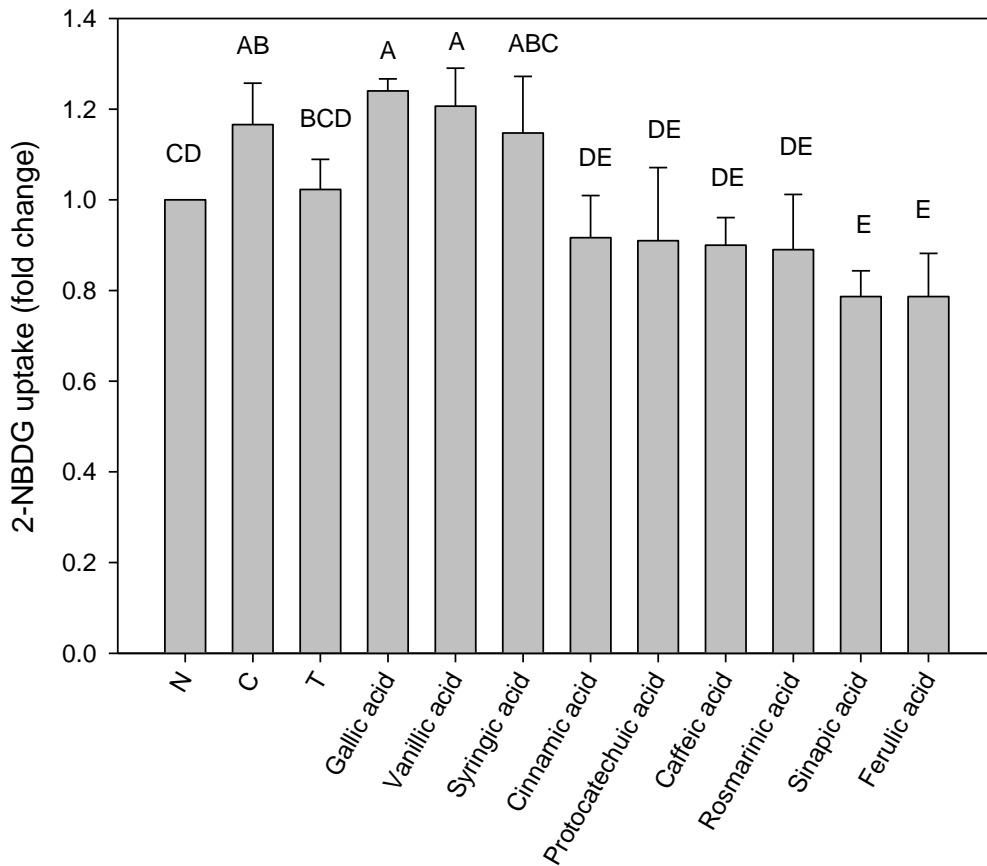


圖 5-1、酚酸 (12.5 μM) 對胰島素抵抗細胞株 FL83B 葡萄糖攝入之情形。

Fig. 5-1. Effect of phenolic acids (12.5 μM) on glucose uptake in insulin resistant FL83B cell line.

N: normal group, cells incubated with F12K medium;

C: control group, cells incubated with F12K medium containing 50 nM insulin.

T: TNF- α - treated group, cells incubated with F12K medium containing 50 nM insulin and 20 ng/mL TNF- α .

Each value means \pm SD (n = 3).



表 5-2、酚酸 (12.5 μ M) 對具胰島素阻抗細胞株 FL83B 葡萄糖攝入之改善情形

Table 5-2. Effect of phenolic acids (12.5 μ M) on amelioration rate of glucose uptake in insulin resistant FL83B cell line

Phenolic acids (12.5 μM)	Amelioration rate (%)^a
Gallic acid	19.88%
Vanillic acid	13.66%
Syringic acid	8.36%
Caffeic acid	-6.60%
Rosmarinic acid	-10.28%
Cinnamic acid	-11.30%
Protocatechuic acid	-12.90%
Sinapic acid	-15.37%
Ferulic acid	-22.01%

^aAmelioration rate (%) = [(2-NBDG uptake fold change of sample group) – (2-NBDG uptake fold change of TNF- α - treated group)] / [2-NBDG uptake fold change of TNF- α - treated group] x 100 (%).

Values are expressed as percentage relative to control value (100 %).

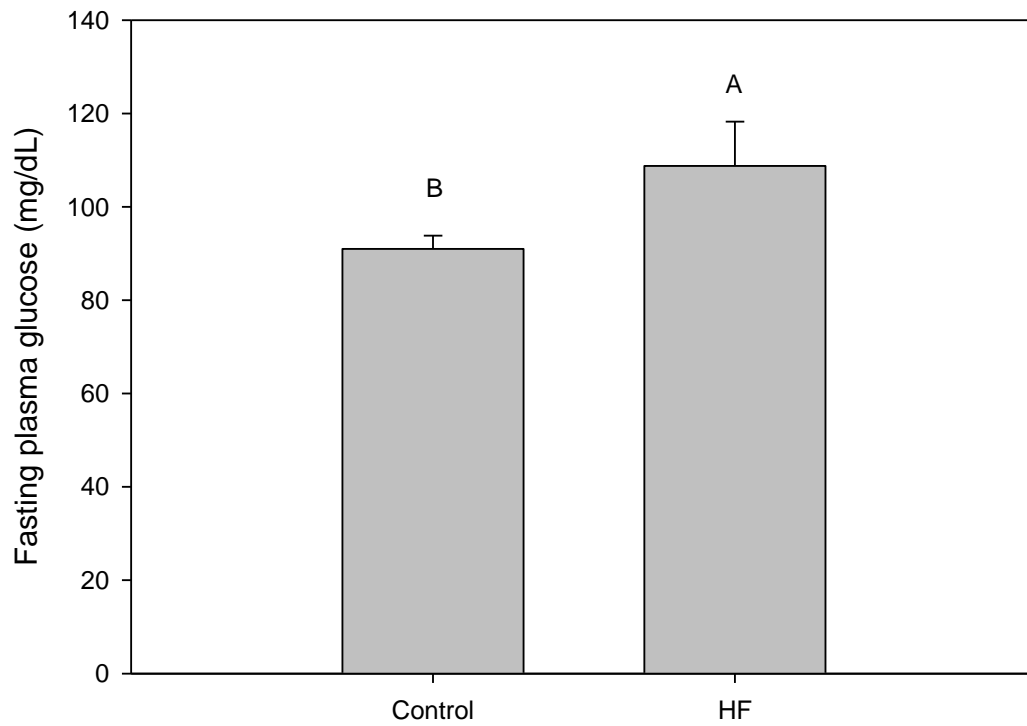


圖 5-2、管餵 Vanillic acid 四週前餵食高脂飼料大鼠空腹血糖濃度之變化。

Fig. 5-2. Changes of fasting plasma glucose in rats fed with high-fat diet before treated with vanillic acid for four weeks.

Control : Normal diet

HF : High-fat diet (60 kcal % fat);

Different letters (A, B) signify a statistically significant difference at $p < 0.05$.

Values were calculated as mean \pm S.D. for six rats in each group.



表 5-3、餵食高脂飼料大鼠犧牲前之飲食、體重、組織重量

Table 5-3. Effect of vanillic acid on body weight, tissue weight and food intake in rats fed with high-fat diet

Items / Groups	Control	HF	HF+Pio	HF+VA
Body weight (g)	630.36 ± 25.96 ^c	759.46 ± 53.37 ^a	690.47 ± 20.39 ^b	681.07 ± 56.02 ^b
Diet intake (kcal/rat/d)	102.71 ± 3.53 ^a	104.35 ± 11.40 ^a	102.82 ± 1.95 ^a	103.26 ± 4.36 ^a
Liver weight (g)	14.28 ± 0.44 ^b	19.58 ± 1.20 ^a	13.93 ± 1.15 ^b	13.93 ± 1.42 ^b
Kidney weight (g)	3.32 ± 0.08 ^{ab}	3.45 ± 0.14 ^a	3.23 ± 0.21 ^b	3.18 ± 0.19 ^b
Adipose weight (g)	17.63 ± 3.05 ^c	55.93 ± 8.91 ^a	36.13 ± 4.63 ^b	34.42 ± 8.74 ^b

Control : Normal diet

HF: High-fat diet (60 kcal % fat);

HF + Pio: HF (60 kcal % fat) + pioglitazone (30 mg/kg b.w.);

HF + VA: HF (60 kcal % fat) + vanillic acid (30 mg/kg b.w.);

Different letters (a, b, c) in the same row signify a statistically significant difference at $p < 0.05$.

Results are expressed as the mean values ± SD. (n = 6/group)

Adipose weight : including epididymal fat pad and abdominal adipose tissue weight.

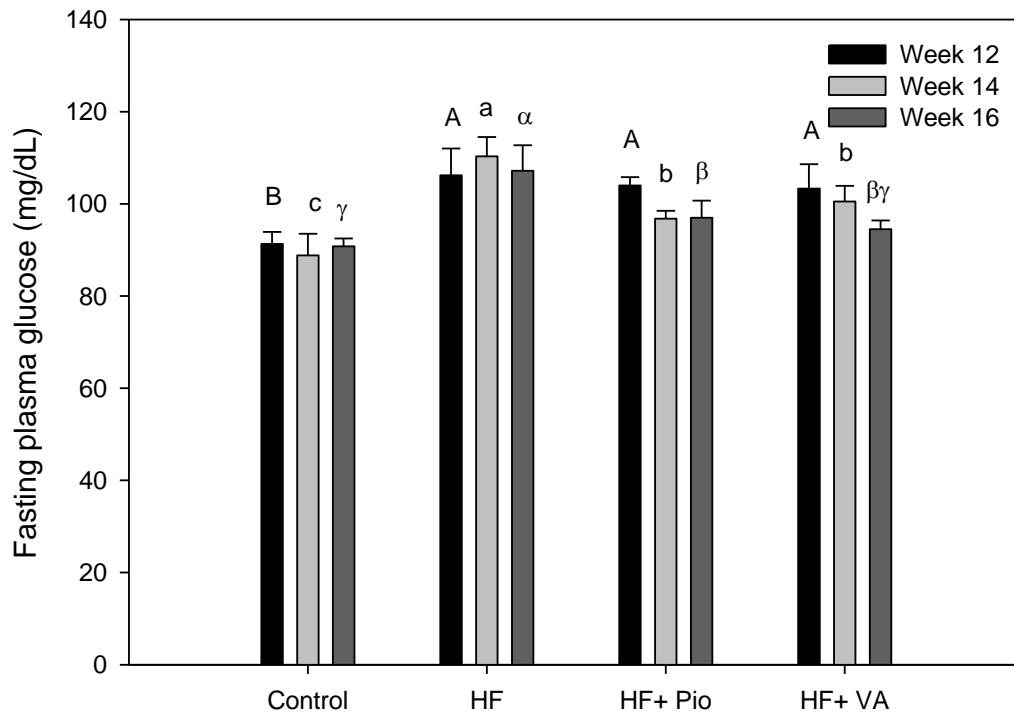


圖 5-3、管餵 Vanillic acid 四週對餵食高脂飼料大鼠空腹血糖濃度之變化。

Fig. 5-3. Changes of fasting plasma glucose in r high-fat diet fed rats treated with vanillic acid for four weeks.

Control : Normal diet

HF : High-fat diet (60 kcal % fat);

HF + Pio: HF (60 kcal % fat) + pioglitazone (30 mg/kg b.w.);

HF + VA: HF (60 kcal % fat) + vanillic acid (30 mg/kg b.w.);

Different letters (A, B, C) signify a statistically significant difference at $p < 0.05$ in week 12.

Different letters (a, b, c) signify a statistically significant difference at $p < 0.05$ in week 14.

Different letters (α , β , γ) signify a statistically significant difference at $p < 0.05$ in week 16.

Values were calculated as mean \pm S.D. for six rats in each group.

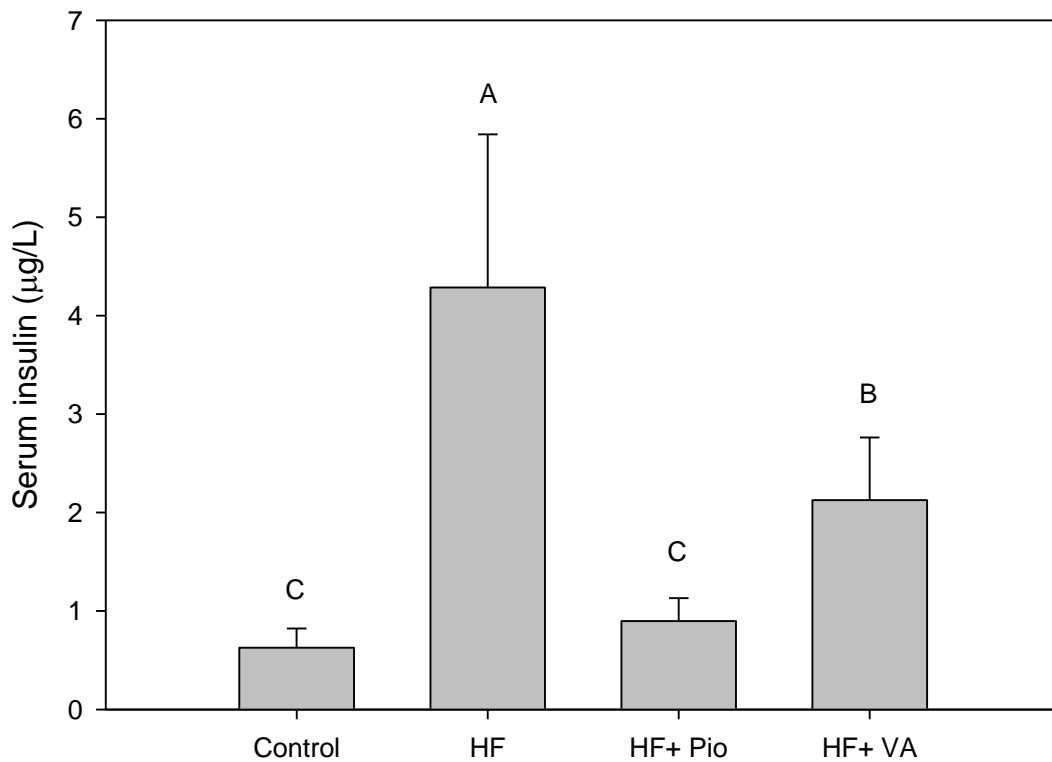


圖 5-4、管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠血清胰島素濃度之變化。

Fig. 5-4. Changes of serum insulin in high-fat diet fed rats treated with vanillic acid for four weeks.

Control : Normal diet

HF : High-fat diet (60 kcal % fat);

HF + Pio: HF (60 kcal % fat) + pioglitazone (30 mg/kg b.w.);

HF + VA: HF (60 kcal % fat) + vanillic acid (30 mg/kg b.w.);

Different letters (A, B, C) signify a statistically significant difference at $p < 0.05$.

Values were calculated as mean \pm S.D. for six rats in each group.

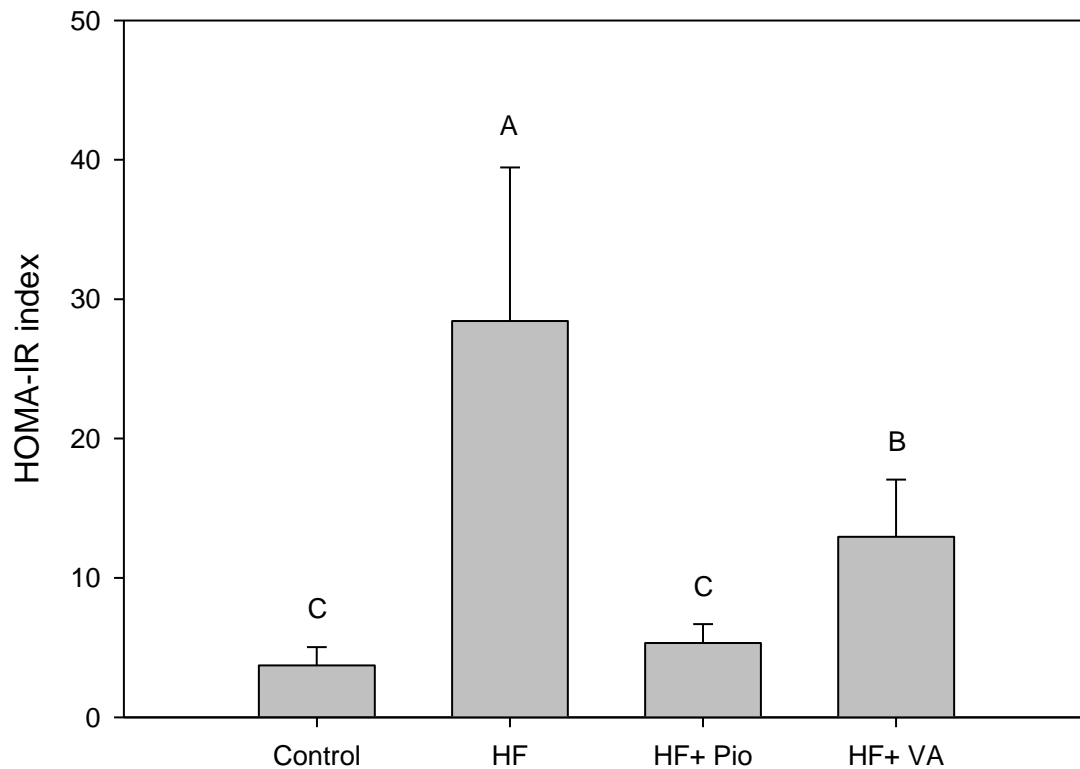


圖 5-5、管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠 HOMA-IR index 之變化。

Fig. 5-5. Changes of HOMA-IR index in high-fat diet fed rats treated with vanillic acid for four weeks.

Control : Normal diet

HF : High-fat diet (60 kcal % fat);

HF + Pio: HF (60 kcal % fat) + pioglitazone (30 mg/kg b.w.);

HF + VA: HF (60 kcal % fat) + vanillic acid (30 mg/kg b.w.);

Different letters (A, B, C) signify a statistically significant difference at $p < 0.05$.

Values were calculated as mean \pm S.D. for six rats in each group.

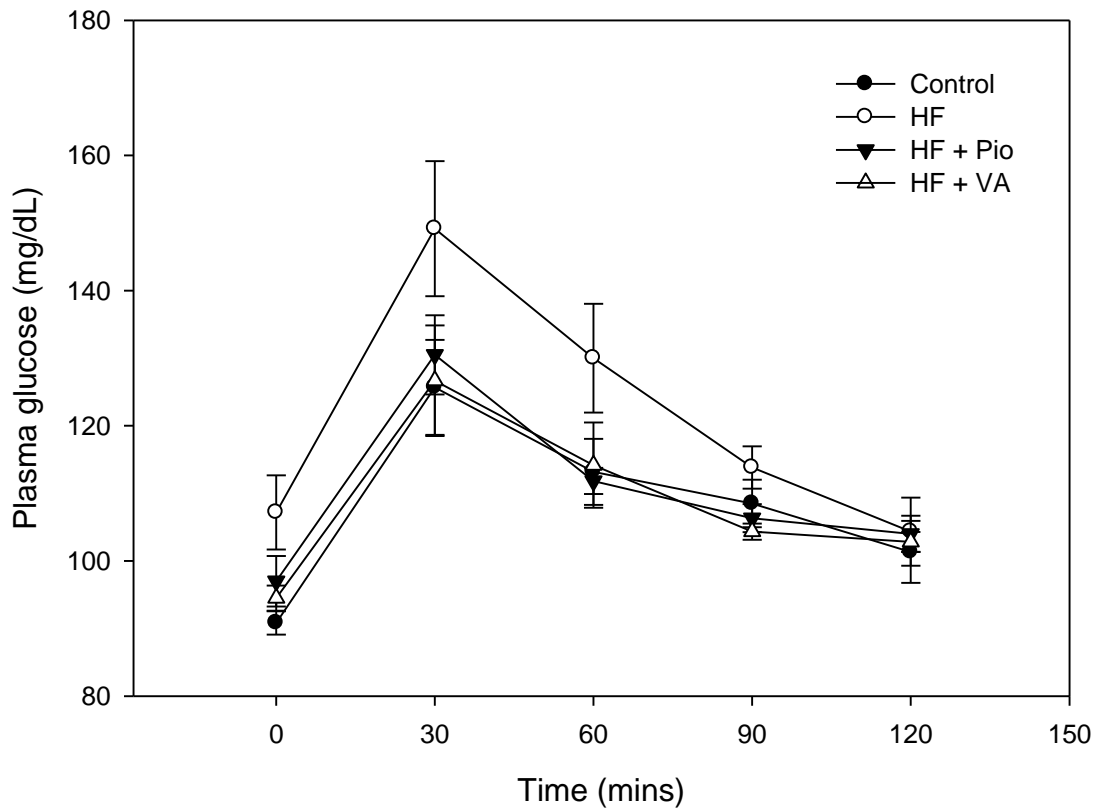


圖 5-6、管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠口服葡萄糖耐受性(OGTT)之變化。

Fig. 5-6. Changes of oral glucose tolerance test (OGTT) in high-fat diet fed rats treated with vanillic acid for four weeks.

Control : Normal diet

HF : High-fat diet (60 kcal % fat);

HF + Pio: HF (60 kcal % fat) + pioglitazone (30 mg/kg b.w.);

HF + Vanillic acid: HF (60 kcal % fat) + vanillic acid (30 mg/kg b.w.);

Values were calculated as mean \pm S.D. for six rats in each group.

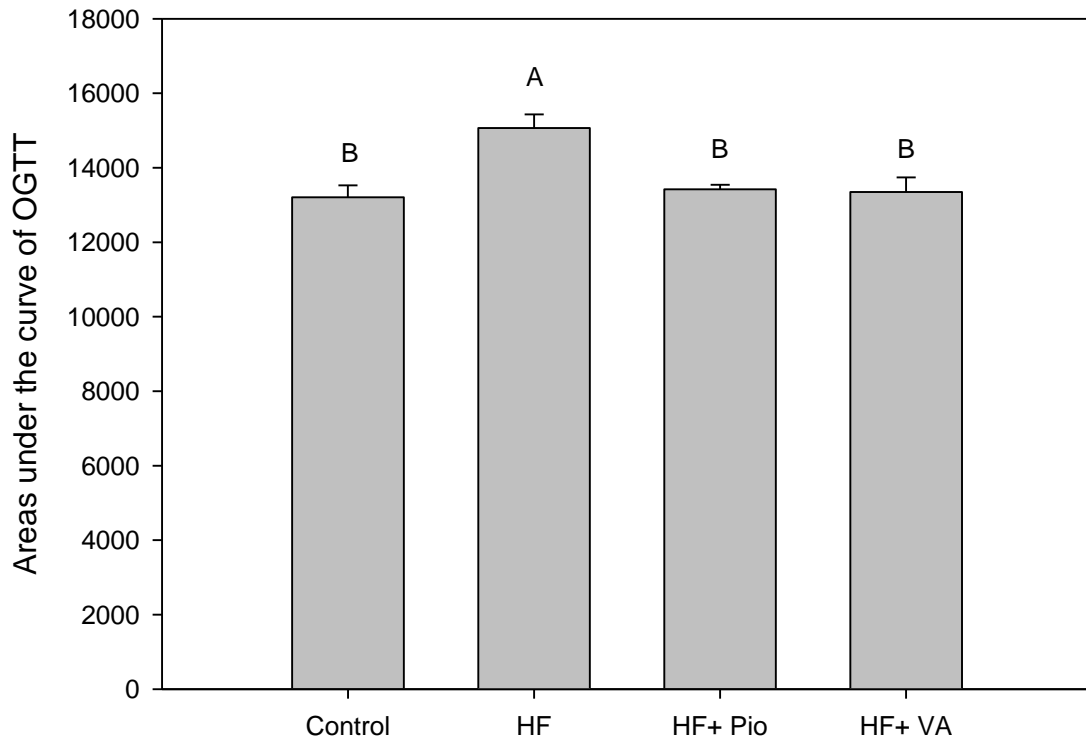


圖 5-7、管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠口服葡萄糖耐受性曲線下面積之變化。

Fig. 5-7. Changes of areas under the curve of OGTT in high-fat diet fed rats treated with vanillic acid for four weeks.

Control : Normal diet

HF : High-fat diet (60 kcal % fat);

HF + Pio: HF (60 kcal % fat) + pioglitazone (30 mg/kg b.w.);

HF + VA: HF (60 kcal % fat) + vanillic acid (30 mg/kg b.w.);

Different letters (A, B) signify a statistically significant difference at $p < 0.05$.

Values were calculated as mean \pm S.D. for six rats in each group.



表 5-4、餵食高脂飼料大鼠犧牲後之血液生化分析值

Table 5-4. Effect of vanillic acid on blood parameters in rats fed with high-fat diet

Items / Groups	Control	HF	HF+Pio	HF+VA
Triglyceride (mg/dL)	74.33 ± 14.31 ^b	90.00 ± 8.65 ^a	64.67 ± 9.29 ^b	68.83 ± 6.18 ^b
Free fatty acid (mmol/L)	0.92 ± 0.09 ^b	1.17 ± 0.26 ^a	0.69 ± 0.16 ^c	0.76 ± 0.14 ^{bc}
Total cholesterol (mg/dL)	62.83 ± 7.25 ^a	56.17 ± 13.70 ^{ab}	58.67 ± 6.41 ^a	47.17 ± 6.46 ^b
HDL- C (mg/dL)	51.33 ± 7.83 ^a	43.53 ± 9.55 ^{ab}	46.25 ± 5.82 ^{ab}	40.00 ± 5.20 ^b
LDL - C (mg/dL)	7.33 ± 1.51 ^{ab}	10.83 ± 4.02 ^a	9.33 ± 1.97 ^a	5.17 ± 1.17 ^b

Control : Normal diet ;

HF: High-fat diet (60 kcal % fat);

HF + Pio: HF (60 kcal % fat) + pioglitazone (30 mg/kg b.w.);

HF + VA: HF (60 kcal % fat) + vanillic acid (30 mg/kg b.w.);

Different letters (a, b, c) in the same row signify a statistically significant difference at $p < 0.05$.

Results are expressed as the mean values ± SD. (n = 6 /group)

HDL - C : high - density lipoprotein cholesterol ;

LDL - C : low - density lipoprotein cholesterol.

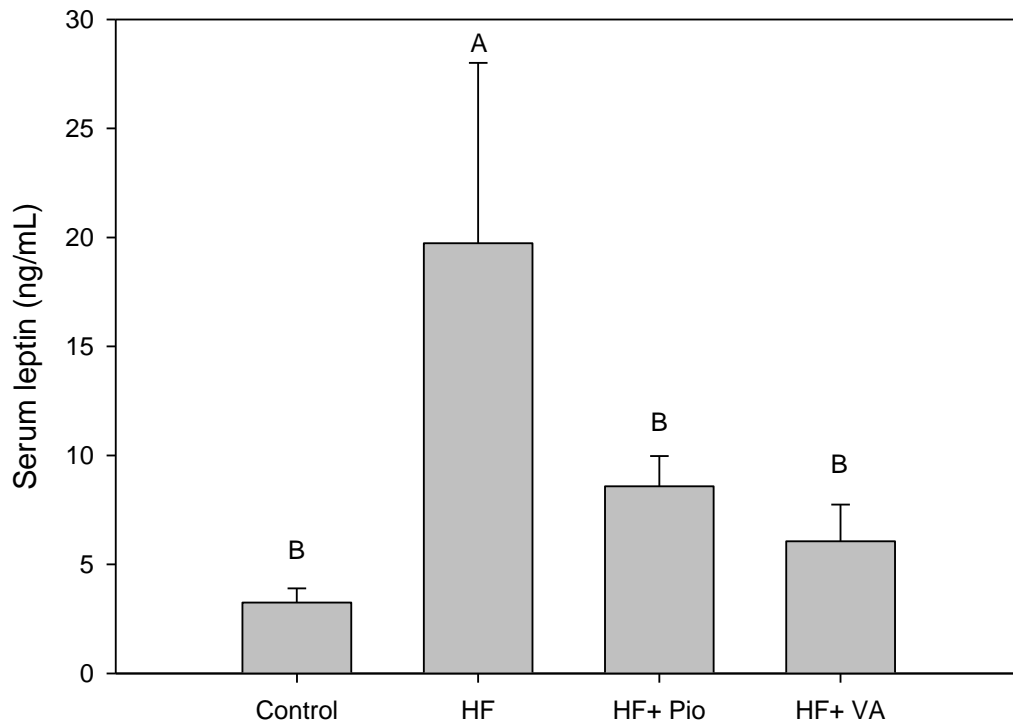


圖 5-8、管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠血清瘦體素之變化。

Fig. 5-8. Changes of serum leptin in high-fat diet fed rats treated with vanillic acid for four weeks.

Control : Normal diet

HF : High-fat diet (60 kcal % fat);

HF+Pio: HF (60 kcal % fat) + pioglitazone (30 mg/kg b.w.);

HF+VA: HF (60 kcal % fat) + vanillic acid (30 mg/kg b.w.);

Different letters (A, B) signify a statistically significant difference at $p < 0.05$.

Values were calculated as mean \pm S.D. for six rats in each group.

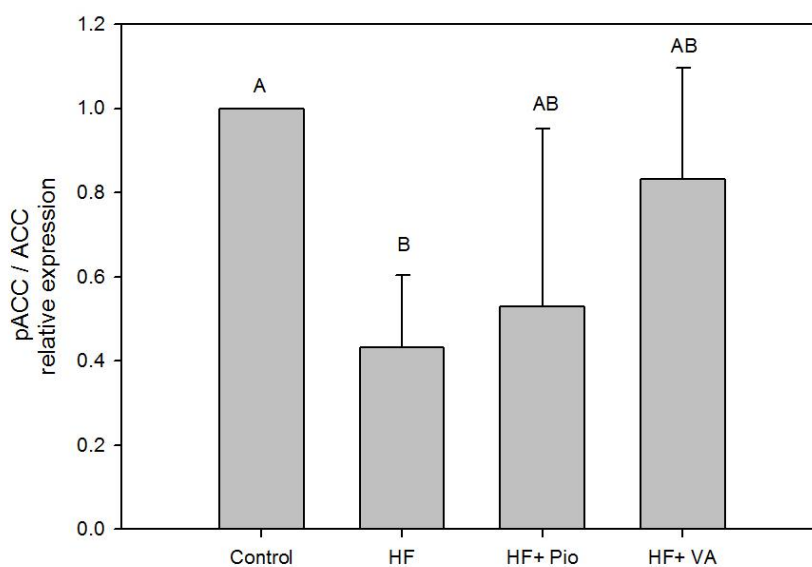
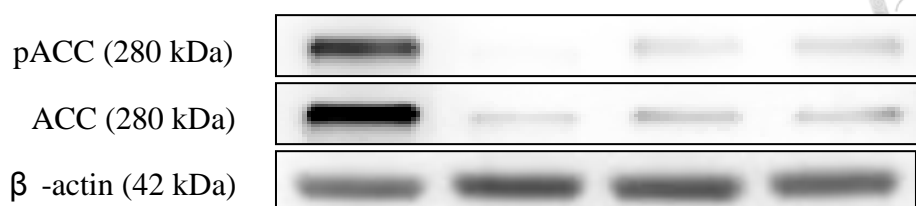


圖 5-9、管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠肝臟乙酰輔酶 A 羧化酶蛋白活化程度之變化。

Fig. 5-9. *De novo* lipogenesis protein activity in high-fat diet fed rats treated with vanillic acid for four weeks.

Control : Normal diet

HF : High-fat diet (60 kcal % fat);

HF + Pio: HF (60 kcal % fat) + pioglitazone (30 mg/kg b.w.);

HF + VA: HF (60 kcal % fat) + vanillic acid (30 mg/kg b.w.).

Different letters (A, B) signify a statistically significant difference at $p < 0.05$.
Values were calculated as mean \pm S.D. for six rats in each group.

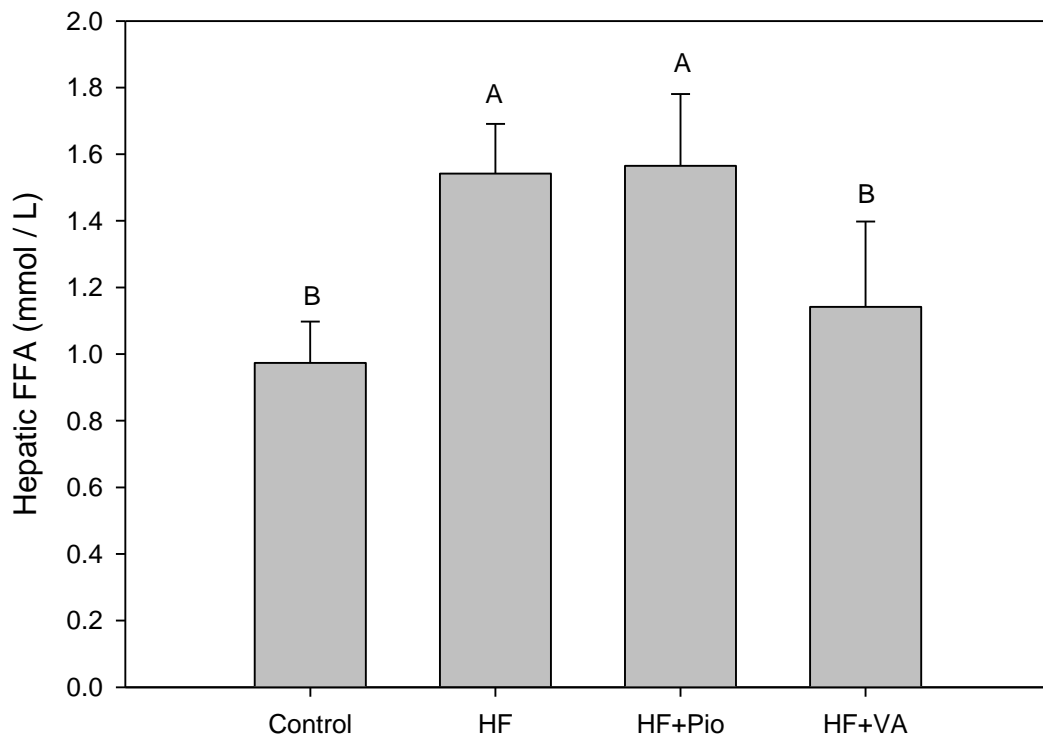


圖 5-10、管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠肝臟中游離脂肪酸含量之變化。

Fig. 5-10. Changes of hepatic free fatty acids in high-fat diet fed rats treated with vanillic acid for four weeks.

Control : Normal diet

HF : High-fat diet (60 kcal % fat);

HF+Pio: HF (60 kcal % fat) + pioglitazone (30 mg/kg b.w.);

HF+VA: HF (60 kcal % fat) + vanillic acid (30 mg/kg b.w.);

Different letters (A, B) signify a statistically significant difference at $p < 0.05$.

Values were calculated as mean \pm S.D. for six rats in each group.

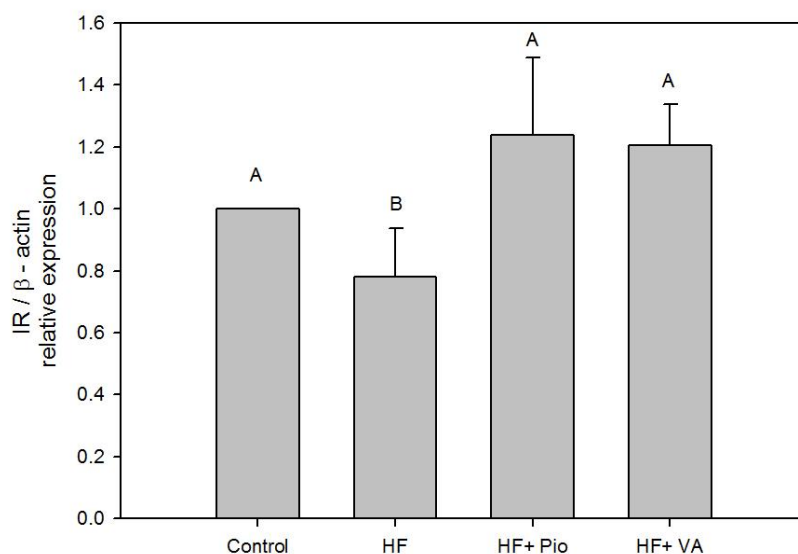
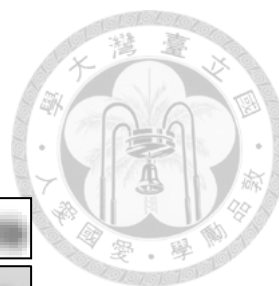


圖 5-11、管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠肝臟胰島素受器蛋白表現量之變化。

Fig. 5-11. Expression of insulin receptor (IR) protein in liver of high-fat diet fed rats treated with vanillic acid for four weeks.

Control : Normal diet

HF : High-fat diet (60 kcal % fat);

HF + Pio : HF (60 kcal % fat) + pioglitazone (30 mg/kg b.w.);

HF + VA : HF (60 kcal % fat) + vanillic acid (30 mg/kg b.w.).

Different letters (A, B) signify a statistically significant difference at $p < 0.05$.

Values were calculated as mean \pm S.D. for six rats in each group.

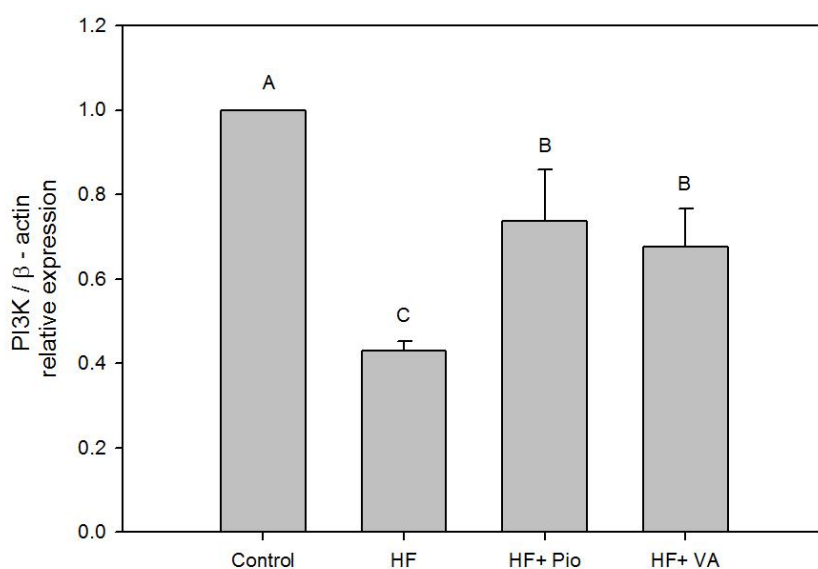
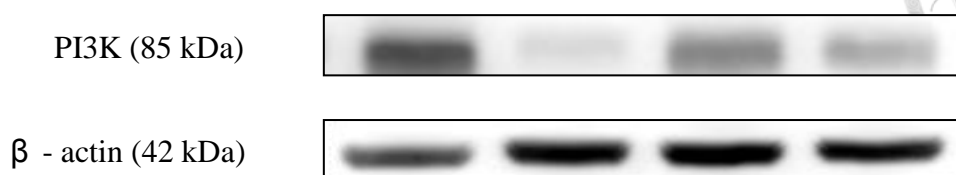


圖 5-12、管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠肝臟磷酸肌醇 3 激酶蛋白表現量之變化。

Fig. 5-12. Expression of phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) protein expression in liver of high-fat diet fed rats treated with vanillic acid for four weeks.

Control : Normal diet

HF : High-fat diet (60 kcal % fat);

HF + Pio: HF (60 kcal % fat) + pioglitazone (30 mg/kg b.w.);

HF + VA: HF (60 kcal % fat) + vanillic acid (30 mg/kg b.w.).

Different letters (A, B, C) signify a statistically significant difference at $p < 0.05$. Values were calculated as mean \pm S.D. for six rats in each group.

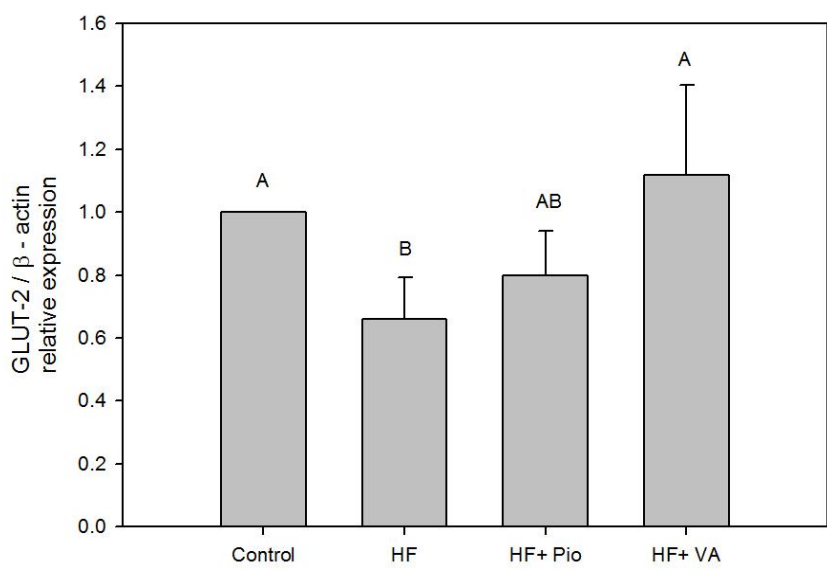
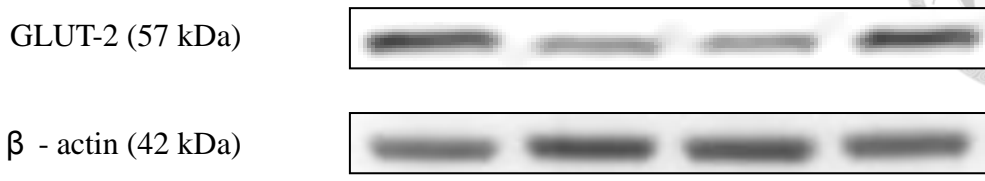


圖 5-13、管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠肝臟葡萄糖轉運蛋白-2 蛋白表現量之變化。

Fig. 5-13. Expression of glucose transporter-2 (GLUT-2) protein in liver of high-fat diet fed rats treated with vanillic acid for four weeks.

Control : Normal diet
HF : High-fat diet (60 kcal % fat);
HF + Pio: HF (60 kcal % fat) + pioglitazone (30 mg/kg b.w.);
HF + VA: HF (60 kcal % fat) + vanillic acid (30 mg/kg b.w.).

Different letters (A, B) signify a statistically significant difference at $p < 0.05$.
Values were calculated as mean \pm S.D. for six rats in each group.

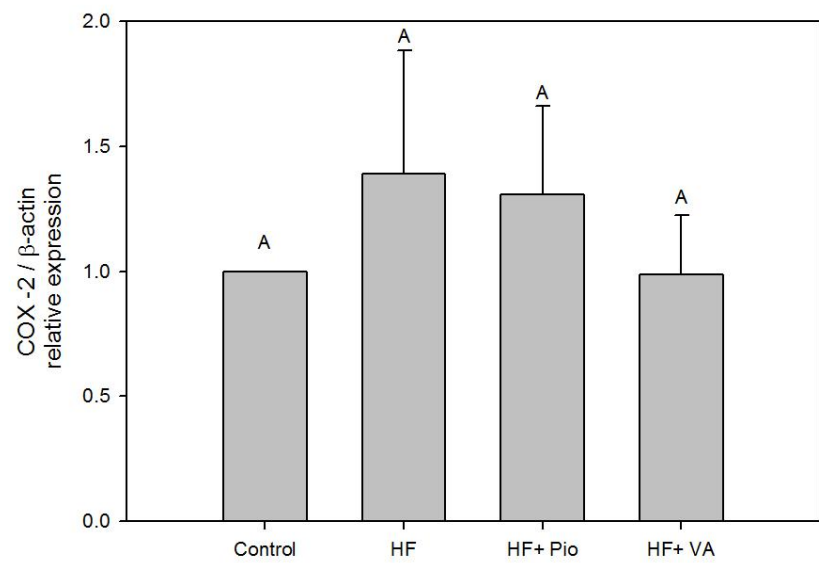
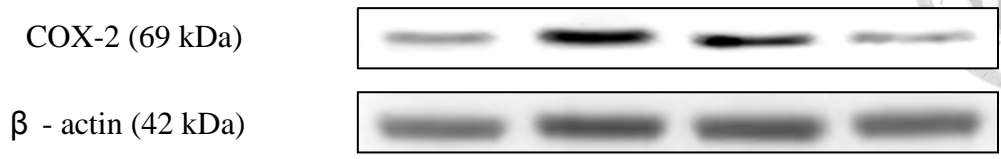


圖 5-14、管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠肝臟環氧化酶-2 蛋白表現量之變化。

Fig. 5-14. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) protein in liver of high-fat diet fed rats treated with vanillic acid for four weeks.

Control : Normal diet

HF : High-fat diet (60 kcal % fat);

HF + Pio: HF (60 kcal % fat) + pioglitazone (30 mg/kg b.w.);

HF + VA: HF (60 kcal % fat) + vanillic acid (30 mg/kg b.w.).

Values with the same letter are not statistically different at $p < 0.05$.

Values were calculated as mean \pm S.D. for six rats in each group.

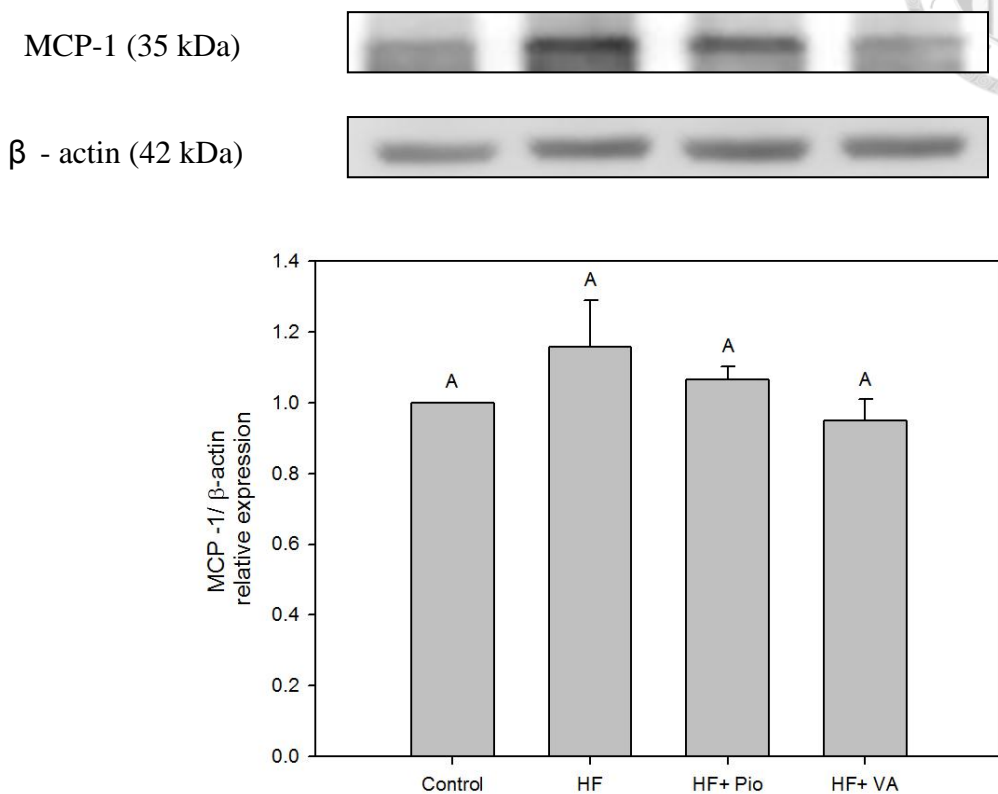


圖 5-15、管餵 Vanillic acid 四週後餵食高脂飼料大鼠肝臟單核球趨化蛋白-1 表現量之變化。

Fig. 5-15. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) protein in liver of high-fat diet fed rats treated with vanillic acid for four weeks.

Control : Normal diet

HF : High-fat diet (60 kcal % fat);

HF + Pio: HF (60 kcal % fat) + pioglitazone (30 mg/kg b.w.);

HF + VA: HF (60 kcal % fat) + vanillic acid (30 mg/kg b.w.).

Values with the same letter are not statistically different at $p < 0.05$.

Values were calculated as mean \pm S.D. for six rats in each group.

e

第六章、 結論



本研究結果可歸納出以下結論：

1. 香草酸 (vanillic acid) 在改善胰島素阻抗細胞株 FL83B 葡萄糖攝入能力具有良好效果。
2. 餵食高脂飼料之大鼠，由於血脂異常上升與高胰島素血症，造成肝臟胰島素阻抗，抑制肝臟胰島素訊息傳遞路徑，導致空腹血糖異常增加、葡萄糖耐受不良，且出現高瘦體素血症之情形。
3. 香草酸 (vanillic acid) 可有效改善高脂飲食誘發高脂飼料大鼠體內葡萄糖耐受異常及高血糖之現象，也可有效降低其血中之高三酸甘油酯、高游離脂肪酸含量，改善高胰島素血症，推測其可能機制為 (圖 6-1):
 - I. 香草酸藉由降低血清游離脂肪酸含量、減少肝臟中脂肪酸合成及攝入量，因而顯著改善高脂飼料大鼠過高的肝臟游離脂肪酸含量。
 - II. 肝臟游離脂肪酸含量顯著降低後，可減緩胰島素訊息傳遞受抑制的情形，增加胰島素訊息傳遞蛋白 (IR、PI3K、GLUT-2) 的表現量，改善了高脂飼料大鼠肝臟胰島素阻抗之狀況，使葡萄糖有效進入肝臟細胞中，供細胞代謝、利用，因此改善了高脂飼料大鼠體內葡萄糖耐受異常、高血糖及高胰島素血症之現象。

關於香草酸降低血清游離脂肪酸的相關機制目前尚未明確，目前推測香草酸可能藉由調控脂肪組織的脂質代謝，減緩高脂飼料大鼠脂肪組織於肥胖狀態下釋出大量脂肪酸至血液中，進而被肝臟攝入堆積造成脂肪肝及肝臟胰島素阻抗的發生，然而詳細情形則待後續實驗進行研究探討。

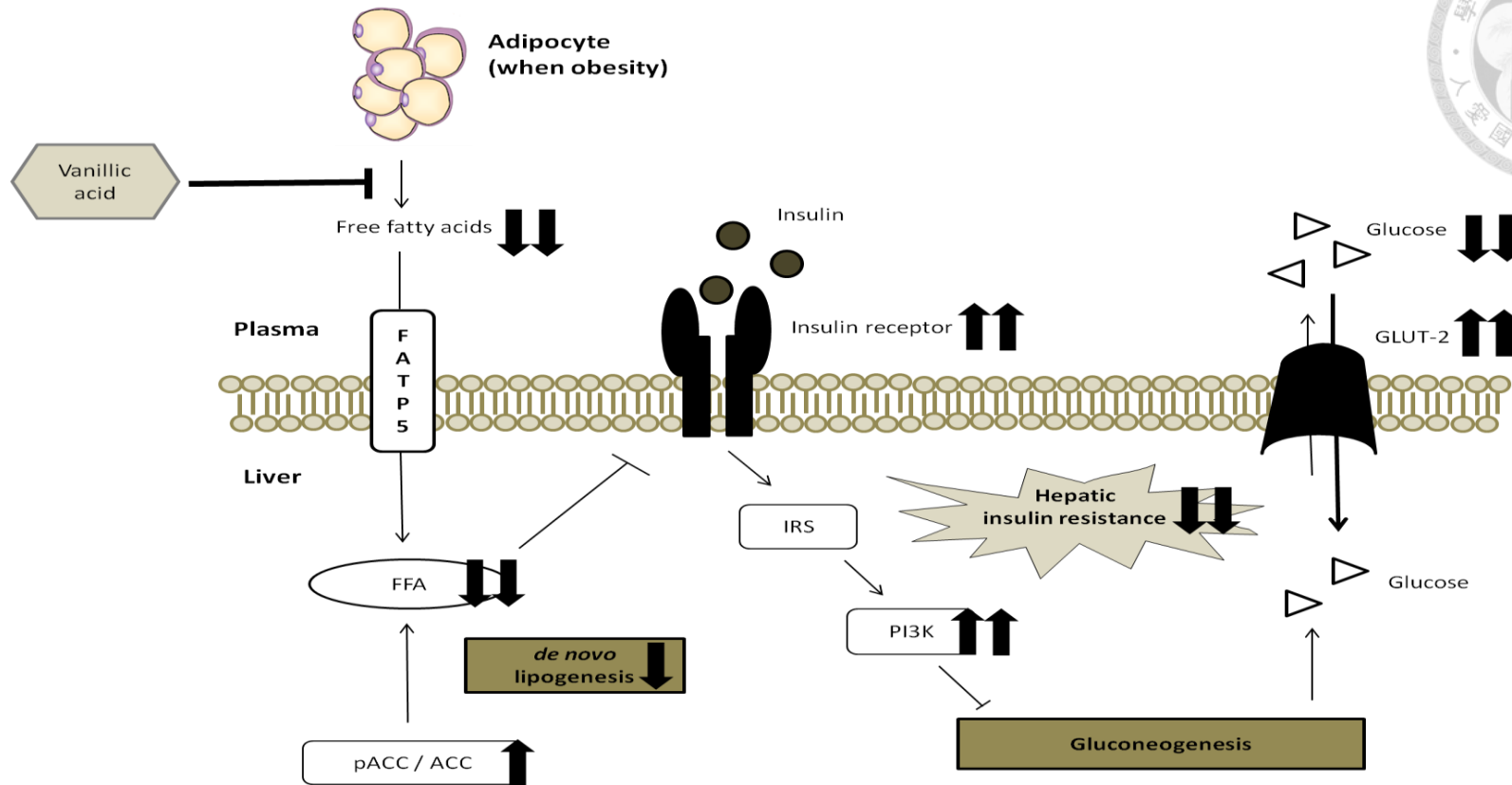


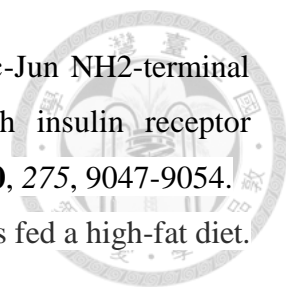
圖 6-1、香草酸 (vanillic acid) 藉由調節脂質代謝、胰島素訊息傳遞而改善餵食高脂飼料大鼠肝臟胰島素阻抗之可能機制。

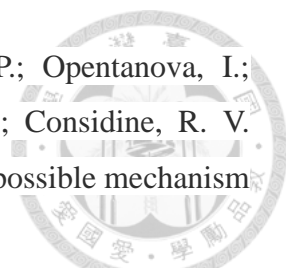
Fig. 6-1. The postulated mechanism of vanillic acid to ameliorate hepatic insulin resistance by regulating *de novo* lipogenesis and insulin signal transduction in rats fed with high-fat diet.

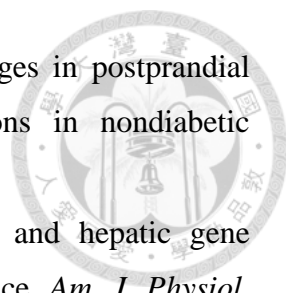
第七章、參考文獻



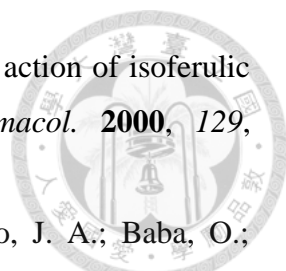
- 行政院衛生署衛生統計資訊網。2013。http://www.doh.gov.tw.
- 何橈通。糖尿病與公共衛生。臨床醫學。1986。17：300-317。
- 吳俐瑩。衛生所第二型糖尿病患者照護滿意度及相關因素之探討—以溪口鄉為例。南華大學資訊管理學系碩士論文。2012。
- 吳寧容。番石榴萃出物對 streptozotocin-nicotinamide 誘發第二型糖尿病大白鼠血糖之影響。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。2007。
- 沈德昌、顏兆熊。第二型糖尿病藥物治療新知。台灣醫界。2008。51：22-27。
- 林進丁。胰島素。藥學雜誌。1986。2：57-63。
- 施瑞雯。蓮霧幼果分離物 — Vescalagin 與 Gallic acid 對高果糖飼料誘導糖尿病前期大鼠之影響。國立臺灣師範大學人類發展與家庭學系碩士論文。2012。
- 張文昌。食用桃金娘科植物萃取物減輕小鼠肝臟細胞 (FL83B) 胰島素阻抗之探討。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。2010。
- 張巧俐。粉紅種蓮霧幼果水萃物減輕以腫瘤壞死因子 (TNF- α) 處理之小鼠肝臟細胞 (FL83B) 胰島素阻抗及改善醣類代謝之研究。國立台灣大學食品科技研究所碩士論文。2011。
- 郭熙文。飯後血糖值的控制是更理想的糖尿病治療之指標嗎。中華民國內分泌暨糖尿病會會訊。2001。14：31-33。
- 陳敏麗、黃松元。某社區民眾糖尿病篩檢中血糖值與糖尿病高危險因子及健康促進生活型態之探討。衛生教育學報。2005。24：1-24。
- 黃大維。咖啡酸及肉桂酸減輕小鼠肝臟細胞 (FL83B) 胰島素阻抗及改善碳水化合物代謝之研究。國立台灣大學食品科技研究所博士論文。2010。
- 鄭芳琪。番石榴葉水萃物降血糖作用及有效成分分離。國立台灣大學食品科技研究所博士論文。2009。
- Adams, L. A.; Angulo, P.; Lindor, K. D. Nonalcoholic fatty liver disease. *Can. Med. Assoc. J.* 2005, 172, 899-905.
- Adisakwattana, S.; Roengsamarn, S.; Hsu, W. H.; Yibchok-anun, S. Mechanisms of antihyperglycemic effect of *p*-methoxycinnamic acid in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* 2005, 78, 406-412.

- 
- Aguirre, V.; Uchida, T.; Yenush, L.; Davis, R.; White, M. F. The c-Jun NH2-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser307. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 9047-9054.
- Ahren, B.; Gudbjartsson, T.; Al-amin, A. N. Islet perturbations in rats fed a high-fat diet. *Pancreas.* **1999**, *18*, 75-83.
- Arkan, M. C.; Hevener, A. L.; Greten, F. R.; Maeda, S.; Li, Z. W.; Long, J. M.; Wynshaw-Boris, A.; Poli, G.; Olefsky, J.; Karin, M. IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 191-198.
- Bahorun, T.; Luximon-Ramma, A.; Crozier, A.; Aruoma, O.I. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and Vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *J. Sci. Food Agric.* **2004**, *84*, 1553-1561.
- Björnholm, M.; Zierath, J. R. Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in type II diabetes. *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 354-357.
- Bose, T.; Alvarenga, J. C.; Tejero, M. E.; Voruganti, V. S.; Proffitt, J. M.; Freeland-Graves, J. H. Association of monocyte chemoattractant protein-1 with adipocyte number, insulin resistance and liver function markers. *J. Med. Primatol.* **2009**, *38*, 418-424.
- Buettner, R.; Scholmerich, J.; Bollheimer, L. C. High-fat diet: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity.* **2007**, *15*, 798-808.
- Buettner, R.; Parhofer, K. G.; Woenckhaus, M.; Wrede, C. E.; Kunz-Schughart, L. A.; Scholmerich, J.; Bollheimer, L. C. Defining high-fat-diet rat models : metabolic and molecular effect of different fat types. *Mol. Endocrinol.* **2006**, *36*, 485-501.
- Butler, A. A.; LeRoith, D. Tissue-specific versus generalized gene targeting of the igflr genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology.* **2001**, *142*, 1685-1688.
- Cai, D.; Yuan, M.; Frantz, D. F.; Melendez, P. A.; Hansen, L.; Lee, j.; Shoelson, S. E. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK β and NF- κ B. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 183-190.
- Carlsson, C.; Borg, L. A.; Welsh, N. Sodium palmitate induces partial mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species in rat pancreatic islets in vitro. *Endocrinology.* **1999**, *140*, 3422-3428.

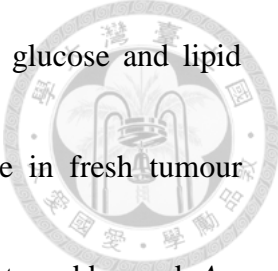
- 
- Caro, J. F.; Kolaczynski, J. W.; Nyce, M. R.; Ohannesian, J. P.; Opentanova, I.; Goldman, W. H.; Lynn, R. B.; Zhang, P. L.; Sinha, M. K.; Considine, R. V. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity : a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet*. **1996**, *348*, 159-161.
- Clarke W.L.; Larner J.; Pohn S.C. Methods in diabetes research. *John Wiley and Sons*, ENC. New York. **1986**, 39-86.
- Considine, R. V. Increased serum leptin indicates leptin resistance in obesity. *Clin. Chem*. **2011**, *57*, 1461-1462.
- Considine, R. V.; Sinha, M. K.; Heiman, M. L.; Kriauciunas, A.; Stephens, T. W.; Nyce, M. R.; Ohannesian, J. P.; Marco, C. C.; McKeel, L. J.; Baur, T. L.; Caro, J. F. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal weight and obese human. *N. Engl. J. Med*. **1996**, *334*, 292-295.
- Dandona, P.; Aljada, A.; Chaudhuri, A.; Mohanty, P.; Garg, R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. *Circulation*. **2005**, *111*, 1448-1454.
- Dandona, P.; Aljada, A.; Mohanty, P.; Ghanim, H.; Hamouda, W.; Assian, E.; Ahmad, S. Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kappaB and stimulates IkappaB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? *J. Clin. Endocrinol. Metab*. **2001**, *86*, 3257-3265.
- Deji, N.; Kume, S.; Araki, S.; Soumura, M.; Sugimoto, T.; Isshiki, K. Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. **2009**, *296*, F118-126.
- Esposito, E.; Iacono, A.; Bianco, G.; Autore, G.; Cuzzocrea, S.; Vajro, P.; Canani, R. B.; Calignano, A.; Raso, G. M.; Meli, R. Probiotics reduce the inflammatory response induced by a high-fat diet in the liver of young rats. *J. Nutr*. **2009**, *139*, 905-911.
- Feinstein, R.; Kanety, H.; Papa, M. Z.; Lunenfeld, B.; Karasik, A. Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J. Biol Chem*. **1993**, *268*, 26055-26058.
- Feng, Y.; Carroll, A. R.; Addepalli, R.; Fechner, G. A.; Avery, V. M.; Quinn, R. J. Vanillic acid derivatives from the green algae *Cladophora socialis* as potent protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors. *J. Nat. Prod*. **2007**, *70*, 1790-1792.

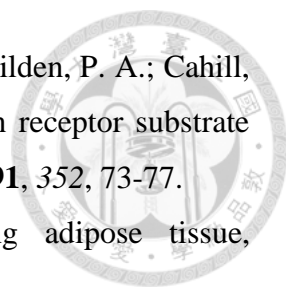
- 
- Fraze, E.; Chiou, M.; Chen, Y.; Reaven, G. M. Age-related changes in postprandial plasma glucose, insulin, and free fatty acid concentrations in nondiabetic individuals. *J. Am. Geriatr. Soc.* **1987**, *35*, 224-228.
- Gregoire, F. M.; Zhang, Q.; Smith, S. J. Diet-induced obesity and hepatic gene expression alterations in C57BL/6J and ICAM-1-deficient mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2002**, *282*, 703-713.
- Halaas, J. L.; Gajiwala, K. S.; Maffei, M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T.; Rabinowitz, D.; Lallone, R. L.; Burley, S. K.; Friedman, J. M. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science.* **1995**, *269*, 543-546.
- Huang B. W.; Chiang M. T.; Yao H. T.; Chiang W. The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. *Diabetes Obes. Metab.* **2004**, *6*, 120-126.
- Huang, D. W.; Shen, S. C.; Wu, J. S. B. Effect of caffeic acid and cinnamic acid on glucose uptake in insulin-resistant mouse hepatocytes. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 7687-7692.
- Huang, S. M.; Hsu, C. L.; Chuang, H. C.; Shih, P. H.; Wu, C. H.; Yen, G. C. Inhibitory effect of vanillic acid on methylglyoxal-mediated glycation in apoptotic Neuro-2A cells. *Neurotoxicology.* **2008**, *29*, 1016-1022.
- Inoue, M.; Suzuki, R.; Sakaguchi, N.; Li, Z.; Takeda, T.; Ogihara, Y.; Jiang, B. Y.; Chen, Y. Selective induction of cell death in cancer cells by gallic acid. *Biol Pharm. Bull.* **1995**, *18*, 1526-1530.
- Iwata, M.; Haruta, T.; Usui, I.; Takata, Y.; Takano, A.; Uno, T.; Kawahara, J.; Ueno, E.; Sasaoka, T.; Ishibashi, O.; Kobayashi, M. Pioglitazone ameliorates tumor necrosis factor- α -induced insulin resistance by a mechanism independent of adipogenic activity of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Diabetes.* **2001**, *50*, 1083-1092.
- Johnson, A. B.; Webster, J. M.; Sum, C. F.; Heseltine, L.; Argyraki, M.; Cooper, B. G. The impact of metformin therapy on hepatic glucose production and skeletal muscle glycogen synthase activity in overweight type 2 diabetic patients. *Metabolis.* **1993**, *42*, 1217-1222.
- Jensen, M. D.; Haymond, M.W.; Rizza, R. A.; Cryer, P. E.; Miles, J. M. Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity. *J. Clin. Invest.* **1989**, *83*, 1168-1173.

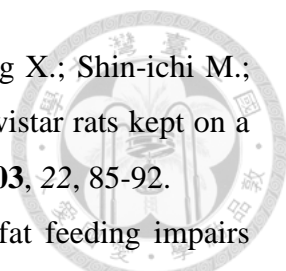
- Jiang, T.; Wang, Z.; Proctor, G.; Moskowitz, S.; Liebman, S. E.; Rogers, T. Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 32317-32325.
- Jornayvaz, F. R.; Shulman, G. I. Diacylglycerol activation of protein kinase C ϵ and hepatic insulin resistance. *Cell.* **2012**, *15*, 574-584.
- Jung, U. J.; Lee, M. K.; Park, Y. B.; Jeon, S. M.; Choi, M. S. Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid I *db/db* mice. *J. Pharmacol. Experi. Therap.* **2006**, *318*, 476-483.
- Kaiyala, K. J.; Prigeon, R. L.; Kahn, S. E.; Woods, S. C.; Porte, D.; Schwartz, M. W. Reduced β -cell function contributes to impaired glucose tolerance in dogs made obese by high-fat feeding. *Am. J. Physiol.* **1999**, *277*, E659-E667.
- Keilson, L.; Mather, S.; Walter, Y. H. Synergistic effect of neteglitinide the meal administration on insulin secretion in patients with type 2 diabetic mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2000**, *85*, 1081-1086.
- Kendall, D. M.; Harmel, A. P. The metabolic syndrome, type 2 diabetes, and cardiovascular disease : understanding the role of insulin resistance. *Am. J. Manag. Care.* **2002**, *8*, S635-653.
- Kilmartin, P. A.; Zou, H.; Waterhouse, A. L. A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1957-1965.
- Kraegen, E. W.; James, D. E.; Storlien, L. H.; Burleigh, K. M.; Chisholm, D. J. In vivo insulin resistance in individual peripheral tissues of the high fat fed rat: assessment by euglycaemic clamp plus deoxyglucose administration. *Diabetologia.* **1986**, *29*, 192-198.
- Kroder, G.; Bossenmayer, B.; Kellerer, M.; Capp, E.; Stoyanov, B.; Muhlhofer, A.; Berti, L.; Horikoshi, H.; Ullrich, A.; Haring, H. Tumor necrosis factor-alpha and hyperglycemia-induced insulin resistance. *J. Clin Invest.* **1996**, *97*, 1471- 1477.
- Lalli, C. A.; Pauli, J. R.; Prada, P. O.; Cintra, D. E.; Ropelle, E. R.; Velloso, L. A.; Saad, M. J. Statin modulates insulin signaling and insulin resistance in liver and muscle of rats fed a high-fat diet. *Metabolism.* **2008**, *57*, 57-65.
- Leahy, J.L.; Halvan, P.A.; Weir, G.D. Relative hyperscretion of proinsulin in rat model of NIDDM. *Diabetes.* **1991**, *40*, 985-989.

- 
- Liu, I. M.; Hsu, F. L.; Chen, C. F.; Cheng, J. T. Antihyperglycemic action of isoferulic acid in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* **2000**, *129*, 631-636.
- Louzao, M. C.; Espiña, B.; Vieytes, M. R.; Vega, F. V.; Rubiolo, J. A.; Baba, O.; Terashima, T.; Botana, L. M. “Fluorescent glycogen” formation with sensibility for in vivo and in vitro detection. *Glycoconj. J.* **2008**, *25*, 503–510.
- Luximon-Ramma A.; Bahorun T; Crozier A. Antioxidant action sand phenolic and Vitamin C contents of common Mauritan exotic fruits. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *83*, 496-502.
- Maffei, M.; Halaas, J.; Ravussin, E.; Pratley, R. E.; Fei, H.; Kim, S.; Lallone, R.; Ranganathan, S.; Kern, P. A.; Friedman, J. M. Leptin levels in human and rodent : measurement of plasma leptin and *ob* RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 1155-1161.
- Marchand-Brustel, Y. L.; Gual, P.; Grémeaux, T.; Gonzalez, T.; Barrès, R.; Tanti, J. F. Fatty acid-induced insulin resistance: role of insulin receptor substrate 1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signaling. *Biochem Soc Trans.* **2003**, *31*, 1152-1156.
- McGarry, J. D. Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes.* **2002**, *51*, 7-18.
- Moore, D. D. Nuclear receptors reverse McGarry’s vicious cycle to insulin resistance. *Cell.* **2012**, *15*, 615-622.
- Munzberg, H.; Flier, J.S.; Bjorbaek, C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology.* **2004**, *145*, 4880-4889.
- Ohnishi, M.; Matuo, T.; Tsuno, T.; Hosoda, A.; Normura, E.; Taniguchi, H.; Sasaki, H.; Morishita, H. Antioxidation activity and hypoglycemic effect of ferulic acid in STZ-induced diabetic mice and KK-A^y mice. *Biofactors.* **2004**, *21*, 315-319.
- Okabayashi, Y.; Maddux, B. A.; Mcdonald, A. R.; Logsdon, C. D.; Williams, J. A.; Goldfine, I. D. Mechanisms of insulin-induced insulin-receptor downregulation : decrease of receptor biosynthesis and mRNA levels. *Diabetes.* **1989**, *38*, 182-187.
- Okutan, H.; Ozcelikb, N.; Yilmazb, H. R.; Uzb, E. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clin. Biochem.* **2005**, *38*, 191-196.

- Panunti, B.; Jawa, A. A.; Fonseca, V. A. Mechanisms and therapeutic targets in type 2 diabetes mellitus. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. **2004**, *1*, 151-157.
- Paz, K.; Hemi, R.; Leroith, D.; Karasik, A.; Elhanany, E.; Kanety, H.; Zick, Y. A molecular basis for insulin resistance. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 29911-29918.
- Pedersen, O.; Kahn, C. R.; Flier, J. S.; Kahn, B. B. High fat feeding causes insulin resistance and a marked decrease in the expression of glucose transporters (Glut 4) in fat cells of rats. *Endocrinology*. **1991**, *129*, 771-777.
- Pelleymounter, M. A.; Cullen, M. J.; Baker, M. B.; Hecht, R.; Winters, D.; Boone, T.; Collins, F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. **1995**, *269*, 540-543.
- Peraldi, P.; Hotamisligil, G. S.; Buurman, W. A.; White, M. F.; Spiegelman, B. M. Tumor necrosis factor (TNF- α) inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 13018–13022.
- Pessin, J. E.; Saltiel, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **2000**, *106*, 165-169.
- Prada, P. O.; Zecchin, H.G.; Gasparetti, A. L. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology*. **2005**, *146*, 1576-1587.
- Puigserver, P.; Rodgers, J. T. Foxa2, a novel transcriptional regulator of insulin sensitivity. *Nature*. **2006**, *12*, 38-39.
- Punithavathi, V. R.; Prince, S. M.; Kumar, M. R.; Selvakumari, C. J. Protective effect of gallic acid on hepatic lipid peroxide metabolism, glycoprotein components and lipids in streptozotocin-induced type II diabetic wistar rats. *J. Bio. Mol. Toxicology*. **2010**, *25*, 68-76.
- Qatanani, M.; Lazar, M. A. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Gene. Dev.* **2007**, *21*, 1443-1455.
- Rangwala, S. M.; Lazar, M. A. Peroxisome proliferator-activated receptor γ in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol. Sci.* **2004**, *25*, 331-336.
- Riddle, M. C. Tactics for type 2 diabetes. *Endocrinol. Metab. Clin.* **1997**, *26*, 659-677.
- Rosen, O. M. After insulin binds. *Science*. **1987**, *237*, 1452-1457.

- 
- Saltiel, A. R.; Kahn, C. R. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, **2001**, *414*, 799-806.
- Sargent, J.M. The use of the MTT assay to study drug resistance in fresh tumour samples. *Recent Results Cancer Res.* **2003**, *161*, 13-25.
- Scalbert, A. R.; Johnson, I. T.; Saltmarsh, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 215S-217S.
- Scarsi, M.; Podvinec, M.; Roth, A.; Hug, H.; Kersten, S.; Albrecht, H.; Schwede, T.; Meyer, U. A.; Rucker, C. Sulfonylureas and glinides exhibit peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity : a combined virtual screening and biological assay approach. *Mol. Pharmacol.* **2007**, *71*, 398-406.
- Senn, J. J.; Klover, P. J.; Nowak, I. A.; Mooney, R. A. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes.* **2002**, *51*, 3391-3399.
- Sharabi Y.; Oron-herman, M.; Kamari, Y.; Avni, I.; Peleg, E.; Shabtay, Z.; Grossman, E.; Shamiss, A. Effect of PPAR- γ agonist on adiponectin levels in the metabolic syndrome: lessons from the high fructose fed rat model. *Am. J. Hypertens.* **2007**, *20*, 206-210.
- Shiba, T.; Higashi, N.; Nishimura, Y. Hyperglycaemia due to insulin resistance caused by interferon-gamma. *Diabet. Med.* **1998**, *15*, 435-436.
- Shyamala, B. N.; Madhava, N. M.; Sulochanamma, G.; Srinivas, P. Studies on the anti-oxidant activities of natural vanilla extract and its constituent compounds through *in vitro* models. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 7738-7743.
- Singh, J.; Rai, G. K.; Upadhyay, A. K.; Kumar, R.; Singh, K. P. Antioxidant phytochemicals in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Ind. Agric. Sci.* **2004**, *74*, 3-5.
- Song, S.; Andrikopoulos, S.; Filippis, C.; Thorburn, A. W.; Khan, D.; Proietto, J. Mechanism of fat-induced hepatic gluconeogenesis: effect of metformin. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2001**, *281*, 275-282.
- Steiner, D.; Bell, G.; Tagar, H. Chemistry and biosynthesis of pancreatic protein hormones. *Endocrinology.* **1995**, 1296-1328.
- Storlien, L. H.; James, D. E.; Burleigh, K. M.; Chisholm, D. J.; Kraegen, E. W. Fat feeding causes widespread *in vivo* insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *Am. J. Physiol.* **1986**, *251*, E576-E583.

- 
- Sun, X. J.; Rothenberg, P.; Kahn, C. R.; Backer, J. M.; Araki, E.; Wilden, P. A.; Cahill, D. A.; Goldstein, B. J.; White, M. F. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature*. **1991**, *352*, 73-77.
- Tilg, H.; Moschen, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature*. **2006**, *6*, 772-783.
- Trout, D. L.; Conway, E. S.; Putney, J. D. Dietary influences on gastric emptying of carbohydrate versus fat in the rat *J. Nutr.* **1977**, *107*, 104-111.
- Unger, R. H.; Orci, L. Lipotoxic diseases of nonadipose tissues in obesity. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **2000**, *24*, S28-S32.
- Van de Laar, F. A.; Lucassen, P. L.; Akkermans, R. P.; Van de Lisdonk, E. H.; Rutten, G. E.; Van Weel, C. Alpha-glucosidase inhibitors for type 2 diabetes mellitus. *Cochrane. Db. Sy. St. Rev.* **2005**, CD003639.
- Vázquez-Vela, M. E.; Torres, N.; Tovar, A. R. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch. Med. Res.* **2008**, *39*, 715-728.
- Watarai, T.; Kobayashi, M.; Takata, Y.; Sasaoka, T.; Iwasaki, M.; Shigeta, Y. Alteration of insulin-receptor kinase activity by high-fat feeding. *Diabetes*. **1988**, *37*, 1397-1404.
- Weisberg, S. P.; Hunter, D.; Huber, R.; Lemieux, J.; Slaymaker, S.; Vaddi, K.; Charo, I.; Leibel, R. L.; Ferrante, A. W. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J. Clin. Invest.* **2006**, *116*, 115-124.
- Xu, H.; Barnes, G. T.; Yang, Q.; Tan, G.; Yang, D.; Chou, C. J.; Sole, J.; Nichols, A.; Ross, J. S.; Tartaglia, L. A. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **2003**, *112*, 1821-1830.
- Yoshioka, K.; Oh, K. B.; Saito, M.; Nemoto, Y.; Matsuoka, H. Evaluation of 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D glucose, a new fluorescent derivative of glucose, for viability assessment of yeast. *Candida albicans. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, *46*, 400-404.
- Youngren, J. F.; Paik, J.; Barnard, R. J. Impaired insulin-receptor autophosphorylation is an early defect in fat-fed, insulin-resistant rats. *J. Appl. Physiol.* **2001**, *91*, 2240-2247.

- 
- Yuan W.; Pei-Yu W.; Li-Qiang Q.; Ganmaa D.; Takashi K.; Jiaying X.; Shin-ichi M.; Ryohei K.; Akio S. The development of diabetes mellitus in wistar rats kept on a high-fat low-carbohydrate diet for long periods. *Endocrine*. **2003**, 22, 85-92.
- Zierath, J. R.; Houseknecht, K. L.; Gnudi, L.; Kahn, B. B. High-fat feeding impairs insulin-stimulation of glucose transport in muscle: functional evaluation of potential mechanisms. *J. Biol.Chem.* **1998**, 273, 26157-26163.



Laboratory Rodent Diet

5001*

DESCRIPTION

Laboratory Rodent Diet is recommended for rats, mice, hamsters and gerbils. This diet is formulated using the unique and innovative concept of Constant Nutrition®, paired with the selection of highest quality ingredients to assure minimal inherent biological variation in long-term studies. It is formulated for life-cycle nutrition; however, it is not designed for maximizing production in mouse breeding colonies. This product has been the standard of biomedical research for over 65 years.

Features and Benefits

- Constant Nutrition® formula helps minimize nutritional variables
- High quality animal protein added to create a superior balance of amino acids for optimum performance
- Formulated for multiple species for single product inventory
- The rodent diet standard for biomedical research

Product Forms Available

- Oval pellet, 10 mm x 16 mm x 25 mm length (3/8"x5/8"x1")
- Meal (ground pellets)

Other Versions Available

- 5010 Laboratory Auoclavable Rodent Diet
- 5L0D PicoLab Laboratory Rodent Diet (Minimum order required)

GUARANTEED ANALYSIS

Crude protein not less than	23.0%
Crude fat not less than	4.5%
Crude fiber not more than	6.0%
Ash not more than	8.0%

INGREDIENTS

Ground corn, dehulled soybean meal, dried beet pulp, fish meal, ground oats, brewers dried yeast, cane molasses, dehydrated alfalfa meal, dried whey, wheat germ, porcine animal fat preserved with BHA, porcine meat meal, wheat middlings, salt, calcium carbonate, DL-methionine, choline chloride, cholecalciferol, vitamin A acetate, folic acid, menadione dimethylpyrimidinol bisulfite (source of vitamin K), pyridoxine hydrochloride, biotin, thiamin mononitrate, nicotinic acid, calcium pantothenate, dl-alpha tocopheryl acetate, vitamin B₁₂ supplement, riboflavin, ferrous sulfate, manganous oxide, zinc oxide, ferrous carbonate, copper sulfate, zinc sulfate, calcium iodate, cobalt carbonate, sodium selenite.

FEEDING DIRECTIONS

Feed ad libitum to rodents. Plenty of fresh, clean water should be available to the animals at all times.

Rats- All rats will eat varying amounts of feed depending on their genetic origin. Larger strains will eat up to 30 grams per day. Smaller strains will eat up to 15 grams per day. Feeders in rat cages should be designed to hold two to three days supply of feed at one time.

Mice- Adult mice will eat up to 5 grams of pelleted ration daily. Some of the larger strains may eat as much as 8 grams per day per animal. Feed should be available on a free choice basis in wire feeders above the floor of the cage.

Hamsters- Adults will eat up to 14 grams per day.

04/05/12

CHEMICAL COMPOSITION¹

Nutrients²

Protein, %	23.9
Arginine, %	1.41
Cystine, %	0.31
Glycine, %	1.21
Histidine, %	0.57
Isoleucine, %	1.14
Leucine, %	1.83
Lysine, %	1.41
Methionine, %	0.67
Phenylalanine, %	1.04
Tyrosine, %	0.71
Threonine, %	0.91
Tryptophan, %	0.29
Valine, %	1.17
Serine, %	1.19
Aspartic Acid, %	2.81
Glutamic Acid, %	4.37
Alanine, %	1.43
Proline, %	1.49
Taurine, %	0.02
Fat (ether extract), %	5.0
Fat (acid hydrolysis), %	5.7
Cholesterol, ppm	200
Linoleic Acid, %	1.22
Linolenic Acid, %	0.10
Arachidonic Acid, %	<0.01
Omega-3 Fatty Acids, %	0.19
Total Saturated Fatty Acids, %	1.56
Total Monounsaturated Fatty Acids, %	1.60
Fiber (Crude), %	5.1
Neutral Detergent Fiber ³ , %	15.6
Acid Detergent Fiber ⁴ , %	6.7
Nitrogen-Free Extract (by difference), %	48.7
Starch, %	31.9
Glucose, %	0.22
Fructose, %	0.30
Sucrose, %	3.70
Lactose, %	2.01
Total Digestible Nutrients, %	76.0
Gross Energy, kcal/gm	4.07
Physiological Fuel Value⁵, kcal/gm	3.36
Metabolizable Energy, kcal/gm	3.02
Minerals	
Ash, %	7.0
Calcium, %	0.95
Phosphorus, %	0.66
Phosphorus (non-phytate), %	0.39
Potassium, %	1.18
Magnesium, %	0.21

Sulfur, %	0.36
Sodium, %	0.40
Chlorine, %	0.67
Fluorine, ppm	16
Iron, ppm	270
Zinc, ppm	79
Manganese, ppm	70
Copper, ppm	13
Cobalt, ppm	0.90
Iodine, ppm	1.0
Chromium, ppm	1.2
Selenium, ppm	0.30

Vitamins

Carotene, ppm	2.3
Vitamin K (as menadione), ppm	1.3
Thiamin Hydrochloride, ppm	16
Riboflavin, ppm	4.5
Niacin, ppm	120
Pantothenic Acid, ppm	24
Choline Chloride, ppm	2250
Folic Acid, ppm	7.1
Pyridoxine, ppm	6.0
Biotin, ppm	0.30
B ₁₂ , mcg/kg	50
Vitamin A, IU/gm	15
Vitamin D ₃ (added), IU/gm	4.5
Vitamin E, IU/kg	42
Ascorbic Acid, mg/gm	—

Calories provided by:

Protein, %	28.507
Fat (ether extract), %	13.496
Carbohydrates, %	57.996

*Product Code

1. Formulation based on calculated values from the latest ingredient analysis information. Since nutrient composition of natural ingredients varies and some nutrient loss will occur due to manufacturing processes, analysis will differ accordingly.
2. Nutrients expressed as percent of ration except where otherwise indicated. Moisture content is assumed to be 10.0% for the purpose of calculations.
3. NDF = approximately cellulose, hemicellulose and lignin.
4. ADF = approximately cellulose and lignin.
5. Physiological Fuel Value (kcal/gm) = Sum of decimal fractions of protein, fat and carbohydrate (use Nitrogen Free Extract) x 4,9,4 kcal/gm respectively.

LabDiet
www.labdiet.com