

國立臺灣大學生命科學院生化科技學系



碩士論文

Department of Biochemical Science and Technology College of Life

Science

National Taiwan University

Master Thesis

孕鼠高膽固醇血症對小鼠子代非酒精性脂肪肝及代謝
疾病發展之影響

Effects of Maternal Hypercholesterolemia on
Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Metabolic Diseases
in Adult Offspring

陳筱茜

Hsiao-Chien Chen

指導教授：林甫容 博士

Advisor: Fu-Jung Lin, Ph.D.

中華民國 108 年 7 月

July , 2019

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

中文題目：孕鼠高膽固醇血症對小鼠子代非酒精性脂肪肝及
代謝疾病發展之影響

英文題目：Effects of Maternal Hypercholesterolemia on
Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Metabolic Diseases in
Adult Offspring

本論文係 陳筱茜君（學號 r05b22001）在 國立臺灣大學生化科技學系
完成之碩士學位論文，於民國108年07月10日承下列考試委員審查通
過及口試及格，特此證明

口試委員：

柯菊谷 (簽名)
(指導教授)

薛慧敏 趙清敏

黃青良

呂紹俊

系主任、所長

楊傑志 (簽名)

中文摘要



隨著飲食趨向西化以及代謝疾病的高盛行率，尋找疾病形成原因加以預防越發重要。目前認為早期發育為關鍵調控時期，因此我們欲探討孕期前後以西方飲食誘導母體血脂異常是否加速子代代謝疾病發展，並深入研究其機制。

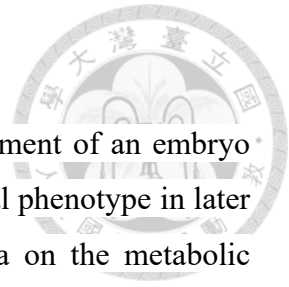
我們以 $ApoE^{-/-}$ 小鼠為模式，妊娠前分別以控制或西方飲食誘導母鼠高膽固醇血症，延續至仔鼠離乳後統一餵食控制飲食。仔鼠分為親代控制飲食-子代控制飲食 (CC) 與親代西方飲食-子代控制飲食 (WC) 兩組。

16 週齡子代雄性 WC 與 CC 相比出現非酒精性脂肪肝及葡萄糖不耐症，18.5 天胚胎肝臟基因表現中，發現母鼠以西方飲食餵食的胚胎肝臟 *de novo* lipogenesis (DNL) 相關基因會被上調，加速肝臟脂質堆積。另外，成鼠血液脂蛋白譜分析觀察到 WC 子代雄性與 CC 子代雄性相比有較少極低密度脂蛋白 (VLDL) 的趨勢，探討其機制，發現血清中與 VLDL 組裝相關的 ApoB 含量較低，肝臟 *ApoB* 基因表現也顯著較 CC 低，進一步發現 *ApoB* DNA 甲基化程度在 WC 組較 CC 高。最後，我們發現 WC 子代雄性與 CC 子代雄性相比葡萄糖耐受性較差，性腺脂肪在胰島素刺激後 AKT 磷酸化程度也較低，顯示胰島素訊息傳導受阻。

由我們實驗結果證實，母親高膽固醇血症可能會透過 DNA 甲基化方式影響子代肝臟基因表現，或胰島素訊息傳導，進而促使非酒精性脂肪肝與葡萄糖不耐症形成。

關鍵字：母體效應、高膽固醇血症、非酒精性脂肪肝、胰島素阻抗、表觀遺傳

Abstract



There is increasing evidence that early developmental environment of an embryo plays a pivotal role in the ‘programming’ of an adverse physiological phenotype in later life. Here we sought for the influence of maternal hyperlipidemia on the metabolic disorders in offspring.

In our study, ApoE knockout females were fed with either control or western diet during pregnancy and lactation to induce hyperlipidemia. All offspring were fed with control diet starting from weaning to 16-week of age. Two experimental groups were generated: CC group (maternal/postnatal control diet), and WC group (maternal western diet/postnatal control diet). We monitored body weight and serum lipid levels every month, performing glucose and insulin tolerance test at 14/15-week of age.

Our data show that WC group had impaired insulin sensitivity and hepatic lipid accumulation in adult offspring when compared to CC group. We found the hepatic de novo lipogenesis pathway (DNL pathway) was upregulated in the E18.5 embryo exposed to maternal western diet; but had adverse results in adult offspring. In addition, we investigated that the VLDL secretion reduced from liver and ApoB, which is required for VLDL component, mRNA expression was decreased in WC group; there had similar appearance in E18.5 embryo. Moreover, in the WC group, a higher percentage of ApoB DNA methylation was observed in liver compared with CC group.

Here, we demonstrate that exposure to hyperlipidemia during early developmental period will sensitize the offspring to induction of Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and Type 2 Diabetes mellitus; furthermore, the DNA methylation might be the key epigenetic regulatory mechanisms, providing a potential therapeutic target in NAFLD.

Keyword: Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD), hypercholesterolemia, Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), Insulin Resistance, epigenetics

代號與縮寫對照表



縮寫與代號	全名
3'UTR	3' untranslated region
5-mc	5-methylcytosine
AC	Adenylate cyclase
ACC	Acetyl-CoA carboxylase
Acox1	Acyl-CoA oxidase 1
AKT	Protein kinase B
AMPK	AMP-activated protein kinase
ApoB	Apolipoprotein B
ATGL	Adipose triglyceride lipase
BAT	Brown adipose tissue
BCA	Bicinchoninic acid procedure
BMI	Body Mass Index
C/EBPα/β	CCAAT-enhancer-binding proteins
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
Cd36	Cluster of differentiation 36
Cd68	Cluster of Differentiation 68
ChREBP	Carbohydrate-responsive element-binding protein
CM	Chylomicrons
Cpt1a	Carnitine palmitoyltransferase I
CREB	cAMP response element binding protein
CRTC2	cAMP-regulated transcriptional coactivator 2
DAG	Diacylglycerol
DGAT	Diacylglycerol O-acyltransferase
DNMT	DNA methyl transferases
DOHaD	Developmental Origins of Health and Disease

縮寫與代號	全名
F4/80	Adhesion G Protein-Coupled Receptor E1
FASN	Fatty acid synthase
FATP1	Fatty acid transport protein 1
FGF21	Fibroblast growth factor 21
FOXO1	Forkhead box protein O1
FOXP2	Forkhead box protein P2
G6P	Glucose-6 phosphate
G6Pase	Glucose-6-phosphatase
G6PT	Glucose-6-phosphate transporter
GC	Gas chromatography
GDM	Gestational Diabetes Mellitus
GIP	Gastric inhibitory polypeptide
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
GLUT4	Glucose transporters 4
GS	Glycogen synthase
GSK3	Glycogen synthase kinase-3
gWAT	Gonadal fat
H&E	Hematoxylin and eosin
HbA1c	Hemoglobin A1c
HDAC4	Histone deacetylases 4
HDL	High density lipoprotein
HDL-C	High density lipoprotein cholesterol
HMGCR	HMG CoA reductase
HOMA-IR	Homeostasis Model Assessment
HSL	Hormone-sensitive lipase
IDL	Intermediate density lipoprotein
IGF	Growth factor
IL	Interleukin
IMCL	Intramyocellular lipid
IRS-1	Insulin receptor substrate

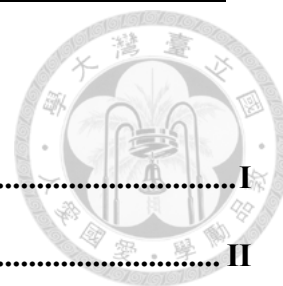
縮寫與代號	全名
iWAT	Inguinal white adipose tissue
LCFA-CoA	Along-chain fatty acyl-CoA
LDL	Low density lipoprotein
LDL-C	Low density lipoprotein cholesterol
LPL	Lipoprotein lipase
LXRα	Liver X receptor-alpha
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
MTTP	Microsomal triglyceride transfer protein
MUFA	Monounsaturated fatty acid
NAFLD	Nonalcoholic Fatty Liver Disease
NASH	Nonalcoholic steatohepatitis
NEFA	Nonesterified fatty acid
OCT	Optimal cutting temperature compound
ORO	Oil-red O
PC	Pyruvate carboxylase
PEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
PFK	Phosphofructokinase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKA	Protein kinase A
PPARα	Peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PPARγ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma
PUFA	Polyunsaturated fatty acids
PVAT	Perivascular adipose tissue
ROS	Reactive oxygen species
rWAT	Retroperitoneal white adipose tissue
Scd1	Stearoyl-CoA desaturase
SFA	Saturated fatty acid
Sirt1	Sirtuin 1
Srebf1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1

代號與縮寫對照表

縮寫與代號	全名
T1DM	Type 1 diabetes mellitus
T2DM	Type 2 diabetes mellitus
TET	ten-eleven translocation
TG	Triglycerides
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha
TSS	Transcription start site
VLDL	Very low density lipoprotein



總目錄



口試委員會審定書	I
中文摘要	II
ABSTRACT	III
代號與縮寫對照表	IV
總目錄	VIII
圖目錄	XV
表目錄	XVII
第一章 緒論	1
第一節 前言	1
第二節 文獻回顧	2
一、代謝性疾病	2
(一). 代謝症候群 (Metabolic Syndrome).....	2
(二). 高血脂症 (Hyperlipidemia)	2
1. 高血脂症的定義	2
2. 脂蛋白的種類	3
3. 高血脂症的分類	4
(三). 糖尿病 (Diabetes Mellitus).....	4
1. 糖尿病的定義	4
2. 糖尿病的分類	4
3. 葡萄糖代謝	5
4. 血糖調節	5
5. 肝臟的血糖調節	6
6. 肌肉與血糖調控	7
(四). 肥胖 (Obesity).....	9
1. 肥胖的定義	9

2.	肥胖的成因	9
3.	肥胖與胰島素阻抗	9
(五).	非酒精性脂肪肝 (Nonalcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD)	11
1.	非酒精性脂肪肝的定義	11
2.	非酒精性脂肪肝的成因與進程	11
3.	非酒精性脂肪肝與肥胖	12
4.	非酒精性脂肪肝與肝臟胰島素阻抗	13
二、	發展規劃 (Developmental Programming)	14
(一).	母體效應之調節機制 (mechanisms of maternal effect)	15
(二).	表觀遺傳 (Epigenetic)	15
1.	DNA 甲基化與去甲基化 (DNA Methylation and Demethylation)	15
2.	組蛋白修飾 (Histone Modification)	16
3.	microRNA (miRNA)	17
第三節	研究假說與實驗架構	18
一、	研究假說	18
二、	實驗架構	19
(一).	實驗對象	19
(二).	實驗分組	19
1.	親代母鼠高膽固醇血症對子代成年後代謝性疾病的影響	19
2.	親代母鼠高膽固醇血症對子代基因甲基化分析	19
3.	分析項目	20
第二章	母親高膽固醇血症對子代成年代謝性疾病的影響	21
第一節	前言	21
第二節	材料與方法	22
一、	誘發 <i>ApoE</i> ^{-/-} 母鼠孕期高膽固醇血症	22
1.	16 週齡子代的孕鼠飼養	22
2.	E18.5 子代胚胎的孕鼠飼養與組織收集	22
二、	飼料配製	23
1.	控制組飲食	23

2. 西方飲食	23
三、子代飼養	25
四、禁食血清樣本收集	25
五、腹腔注射葡萄糖耐受性測試 (Intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT)	26
1. 藥品配製	26
2. 實驗流程	26
六、腹腔注射胰島素耐受性測試 (Insulin tolerance test, ITT)	26
1. 藥品配製	26
2. 實驗流程	26
七、飽食血糖測試 (Fed glucose levels test)	27
八、禁食 6 小時的全血與血清收集 (fasting 6 hours blood and serum collection)	27
九、動物犧牲及樣品收集	27
1. 事前準備	27
2. 犧牲流程	27
十、血清生化值分析	28
(一). 血清三酸甘油酯 (triglyceride, TG) 測定	28
(二). 血清總膽固醇 (total cholesterol, TC) 測定	29
(三). 血清非酯化脂肪酸 (nonesterified fatty acid, NEFA) 測定	29
(四). 血清脂蛋白分佈分析	30
1. 事前準備	30
2. 實驗內容	30
3. 樣本分析	31
(五). 血清 ApoB 含量分析	31
(六). 血清胰島素 (insulin) 含量分析	31
十一、測量胰島素阻抗 Homeostasis Model Assessment (HOMA-IR)	32
十二、體內胰島素信號傳遞試驗 (In vivo insulin signaling studies)	32
十三、西方墨點法 (Western blotting)	32

1. 樣本前處理	32
2. 凝膠電泳	33
3. 蛋白質電泳	34
4. 蛋白質轉印	34
5. 蛋白質免疫染色	35
6. 蛋白質定量	36
十四、組織切片染色	36
(一). 脂肪組織 H&E (hematoxylin and eosin) 染色切片	36
(二). 肝臟組織 H&E (hematoxylin and eosin) 染色切片	37
(三). 肝臟組織油紅 O (Oil-red O, ORO) 染色切片	37
(四). 肝臟組織二氫乙啶 (dihydroethidium, DHE) 染色切片	38
十五、肝臟脂質分析	38
(一). 肝臟脂質萃取	38
(二). 肝臟三酸甘油酯測定	38
(三). 肝臟膽固醇測定	39
(四). 肝臟非酯化脂肪酸測定	39
十六、抽取 mRNA (Extraction of total RNA)	40
1. 事前準備	40
2. RNA 抽取	40
3. 去除 DNA	41
4. RNA 反轉錄成 cDNA	41
十七、即時聚合酶鏈鎖反應 (Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR)	42
1. 稀釋 cDNA :	42
2. 反應試劑組成比例 :	43
3. 上機	43
4. 結果計算	43
十八、純化基因組 DNA (Genomic DNA Purification)	44
1. 藥品配置	44
2. 裂解組織樣品	44

3. 沈澱 DNA	44
十九、 DNA 甲基化定序分析 (DNA Methylation analysis).....	45
(一). 重亞硫酸鈉轉換 (Bisulfite Conversion)	45
1. 藥品配置	45
2. 實驗步驟	45
(二). 硫酸氫鹽轉化之後的聚合酶鍊式反應 (PCR for Bisulfite Conversion)	
46	
1. 反應試劑組成比例	46
2. 上機條件	47
3. 電泳確認產物	47
4. 純化產物 DNA (Purify DNA)	47
(三). 放大目標序列	48
5. 配製培養基	48
6. 連接反應 (ligation)	49
7. 轉型作用 (transformation).....	50
8. 重組 DNA 檢定 (Colony PCR)	50
9. 質體 DNA 的純化 (Purification of plasmid DNA)	51
10. 定序 (sequencing)	51
二十、 統計分析	51
第三節 實驗結果	56
一、 母鼠體重與血液生化指標	56
二、 子代出生至 16 週齡犧牲時之體重變化	56
三、 子代攝食量測量	56
四、 子代離乳後至 16 週齡犧牲之血脂變化	56
五、 子代腹腔注射葡萄糖耐受性測試 (IPGTT).....	57
六、 子代胰島素耐受性測試 (ITT)	57
七、 子代 16 週齡血糖相關的生化指標	57
八、 子代 16 週齡胰島素訊號傳遞分析	58
九、 子代 16 週齡犧牲組織重量分析	58

十、	子代白色脂肪組織細胞大小定量	59
1.	性腺白色脂肪組織 (gWAT) 定量結果	59
2.	腎臟周圍白色脂肪組織 (rWAT) 定量結果	59
十一、	子代肝臟切片染色	59
十二、	子代肝脂分析	60
十三、	子代犧牲後脂蛋白譜分析與血清 ApoB 濃度	60
十四、	子代肝臟醣代謝相關 mRNA 表現量分析	60
十五、	子代肝臟脂質代謝相關基因 mRNA 表現量分析	61
1.	脂質新合成路徑 (De novo lipogenesis pathway, DNL)	61
2.	脂質分解與氧化作用	61
3.	肝臟脂質運輸路徑	61
十六、	子代性腺脂肪分解作用與脂肪功能基因表現量分析	62
十七、	子代肝臟基因甲基化分析	62
十八、	懷孕 18.5 天 (E18.5) 胚胎之體重	62
十九、	E18.5 子代肝臟脂質代謝相關基因 mRNA 表現量分析	63
二十、	E18.5 胎盤脂質傳遞相關基因 mRNA 表現量分析	63
第四節	討論	93
一、	西方飲食誘導孕鼠	93
1.	成功誘導孕鼠高膽固醇血症	93
二、	子代出生體重以及攝食量不受孕鼠高膽固醇血症影響	93
三、	WC 子代離乳時血脂異常	94
四、	WC 雄鼠子代血糖調控異常風險	94
1.	胰島素訊號傳遞受損	94
2.	肝臟與血糖的調控	96
五、	脂肪組織與胰島素阻抗關係	96
1.	WC 雄性子代性腺脂肪組織功能失調	96
2.	由脂肪組織提供游離脂肪酸可能與胰島素阻抗相關	97
六、	增加 WC 組子代肝臟三酸甘油酯堆積	98
1.	肝外的脂肪(酸)攝入沒有差異	98

2.	子代出生前肝臟脂肪合成作用 (<i>de novo</i> lipogenesis) 旺盛.....	99
3.	脂肪(酸)的氧化作用沒有差異	101
4.	脂肪(酸)排出可能受阻	102
七、	增加 WC 組雄性子代肝臟膽固醇堆積.....	104
八、	母體效應-孕期高膽固醇血症影響子代 DNA 甲基化	104
1.	<i>Lxra</i> DNA methylation 沒有差異	104
2.	增加 <i>ApoB</i> DNA methylation 機率.....	105
3.	DNA 甲基化相關因素之討論	106
4.	其他可能的表觀遺傳機制	106
九、	孕鼠誘導西方飲食增加子代代謝症候群發生之其他機制探討	107
第五節	結論	108
第三章	參考文獻	109

圖目錄



圖 一-1 脂蛋白的運輸路徑.....	3
圖 一-2 肌肉組織的胰島素傳遞路徑.....	8
圖 一-3 非酒精性脂肪肝的發展進程.....	11
圖 一-4 非酒精性脂肪肝的多重打擊假說.....	12
圖 二-1 子代體重變化與攝食量.....	65
圖 二-2 子代離乳後至犧牲前血脂變化.....	66
圖 二-3 16 週齡子代犧牲時血脂相關生化指標.....	67
圖 二-4 14 週齡子代葡萄糖耐受性測試 (IPGTT).....	68
圖 二-5 15 週齡子代胰島素耐受性測試 (ITT).....	69
圖 二-6 16 週齡雄鼠子代禁食 12 小時性腺脂肪與腓腸肌組織的胰島素傳遞訊號 敏感度試驗.....	71
圖 二-7 16 週齡雌鼠子代禁食 12 小時性腺脂肪與腓腸肌組織的胰島素傳遞訊號 敏感度試驗.....	72
圖 二-8 16 週齡雄鼠子代禁食 6 小時性腺脂肪與腓腸肌組織的胰島素傳遞訊號 敏感度試驗.....	73
圖 二-9 16 週齡雌鼠子代禁食 6 小時性腺脂肪與腓腸肌組織的胰島素傳遞訊號 敏感度試驗.....	74
圖 二-10 16 週齡腹部內臟脂肪百分率分析.....	77
圖 二-11 16 週齡子代雄鼠性腺性腺白色脂肪 H&E 染色切片.....	78
圖 二-12 16 週齡子代雌鼠性腺性腺白色脂肪 H&E 染色切片以及脂肪細胞定量	79
圖 二-13 16 週齡子代雄性腎臟周圍白色脂肪 H&E 染色切片.....	80
圖 二-14 16 週齡子代雌鼠腎臟周圍白色脂肪 H&E 染色切片.....	81
圖 二-15 16 週齡子代性腺白色脂肪組織與腎周白色脂肪組織細胞大小定量之平 均值與中位數.....	82
圖 二-16 16 週齡子代肝臟切片染色.....	83
圖 二-17 16 週齡子代犧牲後肝脂分析 (單位脂肪含量/單位肝重).....	84

圖 二-18	16 週齡子代犧牲後肝脂分析 (單位脂肪含量/全肝).....	85
圖 二-19	16 週齡子代犧牲後脂蛋白譜分佈與血清 ApoB 濃度.....	86
圖 二-20	16 週齡子代雄鼠肝臟醣類與脂質代謝相關的 mRNA 基因表現.....	87
圖 二-21	16 週齡子代性腺白色脂肪組織脂肪氧化以及功能相關 mRNA 表現.....	88
圖 二-22	子代雄性成鼠肝臟 <i>Nr1h3</i> DNA 甲基化分析.....	89
圖 二-23	子代雄性成鼠肝臟 <i>ApoB</i> DNA 甲基化分析.....	90
圖 二-24	E18.5 子代胚胎肝臟與胎盤脂質代謝路徑的基因表現.....	92
圖 二-25	肝脂堆積的可能機制.....	99
圖 二-26	肝臟三酸甘油酯的合成路徑與負調控作用.....	100
圖 二-27	脂肪酸排出受阻與肝炎進展之可能機制.....	103

表目錄

表 二-1 實驗飼料配方.....	24
表 二-2 飼料脂肪酸組成.....	25
表 二-3 抗體列表.....	36
表 二-4 qRT-PCR 使用的引子列表.....	52
表 二-5 硫酸氫鹽轉化聚合酶鍊式反應的引子列表.....	55
表 二-6 母鼠體重與血液生化指標.....	64
表 二-7 16 週齡子代齡血糖相關生化指標.....	70
表 二-8 16 週齡子代犧牲後組織與器官絕對重量.....	75
表 二-9 16 週齡子代犧牲後組織與器官相對重量.....	76
表 二-10 E18.5 子代犧牲後組織與器官絕對重量.....	91

第一章 緒論



第一節 前言

隨著肥胖、高血脂症、胰島素阻抗、第二型糖尿病或是非酒精性脂肪肝等等的代謝性疾病發生率節節上升攻佔國人死亡排行榜的現代社會，讓許多人想了解這些疾病發生原因，並尋找預防的方式。而過去我們常聽到易胖體質，在屏除後天環境或是先天遺傳基因，還有其他因素會影響到代謝性疾病的發展的，例如早年的二戰時代，母親孕期營養不良子代容易有肥胖的問題 (Ravelli et al., 1976)，在之中 Barker 也做了一系列研究關於產後壓力、子代低出生體重與母親胎盤之間的關係去討論母親在胎兒時期提供的環境以及子代成長期對日後疾病發生的影響 (Barker et al., 2007)，現在普遍認為出生前母親飲食是胎兒發育的重要調節因素，會影響到子代成年之後的代謝症候群的發生 (Taylor and Poston, 2007)，也有人將此與表觀遺傳連結 (Jimenez-Chillaron et al., 2012)，但這其中的機制卻還不是很確定，目前有研究發現皮質醇 (cortisol)、瘦素 (leptin)、胰島素 (insulin) 或是類生長激素 (ghrelin) 會在懷孕期與哺乳期影響胎兒，然而隨著越來越多的信息傳遞小分子被發現，例如脂肪細胞分泌的脂肪因子 (adipokine) 或是肝臟分泌的肝臟激素 (Hepatokines) (Meex and Watt, 2017)，對於生命早期的調控仍有很多未知可探索的地方。

因此本實驗使用易誘發高膽固醇血症的 *ApoE^{-/-}* 小鼠為動物模式，餵食西方高奶油高糖飲食誘發親代母鼠高膽固醇血症，提供不良的子宮環境作為子代產前壓力，觀察子代成年之後的代謝不良情況並尋找可能的調控機制。

第二節 文獻回顧

一、代謝性疾病

(一). 代謝症候群 (Metabolic Syndrome)

代謝症候群為許多容易導致心血管疾病的危險因子組成，根據台灣衛生福利部國民健康署的定義，代謝症候群的判定標準為 (1) 腹部肥胖:男性的腰圍 ≥ 90 cm ;女性腰圍 ≥ 80 cm。(2) 血壓偏高:收縮壓 $\geq 130/85$ mmHg，或服用高血壓治療藥物。(3) 空腹血糖偏高：空腹血糖值 ≥ 100 mg/dL，或服用治療糖尿病藥物。(4) 空腹三酸甘油酯 偏高： ≥ 150 mg/dL，或服用降三酸甘油酯藥物。(5) 高密度脂蛋白膽固醇偏低：男性 < 40 mg/dL、女性 < 50 mg/dL。以上五項組成因子，符合三項(含)以上即可判定為代謝症候群 (衛生福利部國民健康署, 2007)。

代謝症候群由 Reaven 於 1988 年根據病理生理學、流行病學、預測疾病發展情況以及治療策略等大量研究統整後提出，通常包含了高血糖、高三酸甘油酯、低高密度脂蛋白與高血壓的症狀，他們認為這是與生活型態、飲食以及遺傳交互作用後結果 (Reaven, 1988)。

雖然代謝症候群非特定疾病，但對於許多慢性疾病具相當程度的示警作用，研究指出代謝症候群的患者易有高心血管疾病發病率與死亡率 (Isomaa et al., 2001)，且顯著較高的中風風險 (Li et al., 2017)；同時代謝症候群也為 T2DM 的危險因子，約有一半的 T2DM 患者同時有代謝症候群 (Wilson et al., 2005)。

(二). 高血脂症 (Hyperlipidemia)

1. 高血脂症的定義

高血脂症為血液中有過多的脂質，如低密度脂蛋白、三酸甘油酯或是游離脂肪酸，根據 NCEP-ATP III 的過高血脂定義：成人禁食血液中，總膽固醇 (total cholesterol) ≥ 240 mg/dL、高密度脂蛋白 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) ≤ 40 mg/dL、低密度膽固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) ≥ 240 mg/dL、三酸甘油酯 (triglycerides, TG) ≥ 200 mg/dL 或是有服用降血脂藥物者，符合其中一點即為高血脂症 (行政院衛生署國民健康局, 2003)。

2. 脂蛋白的種類

由於脂肪為疏水性，故需要與脂蛋白結合來幫助運輸，其中脂蛋白種類包含乳糜微粒 (chylomicrons, CM)、極低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL)、中密度脂蛋白 (intermediate density lipoprotein, IDL)、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 與高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL)。脂蛋白於體內的運輸路徑可由圖 一-1 所示，脂肪由腸道吸收後會以 CM 的形式經肝門靜脈運送至肝臟代謝，之後肝臟避免發生脂肪肝會生成 VLDL 提供 TG 給肝外組織利用，VLDL 在組織間會被脂蛋白脂解酵素分解逐漸形成 IDL 與 LDL，釋出膽固醇供肝外組織使用，最後則由 HDL 回收膽固醇至肝臟中代謝成膽酸由腸道排出 (Acalovschi, 2001)。

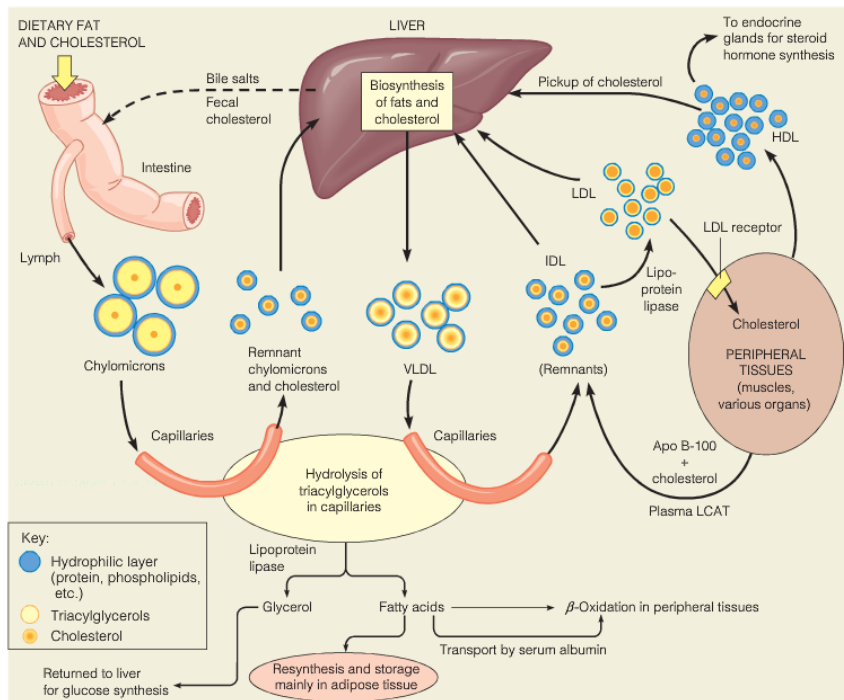


圖 一-1 脂蛋白的運輸路徑

Figure 1-1 Overview of lipoprotein transport pathways and fates. (Mathews, 2018)



3. 高血脂症的分類

(1) 原發型高血脂症：又稱家族性高血脂症，具遺傳特徵。

(2) 繼發型高血脂症：可能因疾病或是用藥等後天因素造成的高血脂症，例如研究中發現糖尿病患者伴有高血脂的情況 (Sellers et al., 2007)，且同樣的也發現高血脂症也常併發高血糖 (Howard, 1987; Okon et al., 2007)。

(三). 糖尿病 (Diabetes Mellitus)

1. 糖尿病的定義

糖尿病特徵為血糖高於正常值，且有三多一少的經典症狀：多吃、多喝、多尿與體重減輕。糖尿病為國人十大死因之一，且有許多併發症，對於國民健康與醫療負擔影響甚劇。而根據衛福部國民健康署的診斷標準為：包括以下 4 項，非懷孕狀況下只要符合其中 1 項即可診斷為糖尿病(前 3 項需重複驗證 2 次以上)，(1) 糖化血色素 (HbA1c) $\geq 6.5\%$ 。(2) 空腹血漿血糖 ≥ 126 mg/dL。(3) 口服葡萄糖耐受試驗第 2 小時血漿血糖 ≥ 200 mg/dL。(4) 典型的高血糖症狀，多吃、多喝、多尿與體重減輕，且隨機血漿血糖 ≥ 200 mg/dL (中華民國糖尿病學會, 2003)。

2. 糖尿病的分類

糖尿病傳統上可分為四類 (1) 第 1 型糖尿病 (T1DM)：胰島素缺乏的糖尿病，通常為先天性自體免疫疾病，胰島細胞遭受自己免疫細胞攻擊而破壞，使得胰島素分泌不足。(2) 第 2 型糖尿病 (T2DM)：因胰島素阻抗，造成有胰島素不足的現象。(3) 妊娠型糖尿病 (Gestational Diabetes Mellitus, GDM)：原本血糖正常的孕婦在懷孕期發生的高血糖症狀，可能會導致孕婦子癲症或是胎兒畸形等併發症，且有 GDM 的孕婦日後就較高的比例罹患糖尿病。(4) 其他糖尿病：可能因胰臟受損、藥物影響或其他疾病導致糖尿病。

3. 葡萄糖代謝

糖尿病造成高血糖的原因在於組織對於胰島素不敏感，使得血糖無法被利用造成高血糖，而生理代謝上與血糖調節有關的組織有：(1) 肝臟(2) 脂肪 (3) 肌肉，當葡萄糖吸收進到血液時會引發胰島素分泌，促進葡萄糖進入肌肉產能以及脂肪組織轉換成油脂儲存；而肝臟為重要的血糖調節器官，當血糖高時會將葡萄糖轉為肝醣儲存，於血糖低時釋放出來供組織使用。

4. 血糖調節

因葡萄糖轉為脂肪儲存為一不可逆反應，且肌肉缺乏 glucose-6-phosphatase，無法將儲存的肝醣再轉變回葡萄糖釋放回血中，所以肝臟的調節功能就變得非常重要，而體內有許多因子共同維持血糖恆定。

(1) 胰島素 (insulin)：受到餐後高血糖刺激胰臟 β cell 而分泌，用來維持餐後正常血糖，肌肉與脂肪細胞上有 glucose transporters 4 (GLUT4)，可受胰島素調控而開啟讓葡萄糖被攝入，降低血糖 (Shulman, 2000)。而肝臟被嚴密控制肝醣合成與糖質新生作用來調控血糖。而胰島素作用機轉則是由胰島素的信號傳遞 (insulin signal transduction) 來引發一連串的磷酸化，當胰島素接受器與胰島素結合後先磷酸化 (insulin receptor substrate, IRS-1), IRS-1 再活化 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)，而 PI3K 與細胞膜中的磷脂酰肌醇 4,5 二磷酸 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP2) 相連，PIP 2 再磷酸化 PIP3，PIP3 磷酸化 (protein kinase B, 也稱 Akt)，而 Akt 可開啟 GLUT4 以及活化肝醣合成酶 (glycogen synthase) 與其他肝臟同化酵素，磷酸果糖激酶 (phosphofructokinase-1, PFK-1；phosphofructokinase-2, PFK-2)，丙酮酸激酶 (pyruvate kinase) 等等，促進肝醣合成與脂肪酸生成 (Pessin and Saltiel, 2000)。

(2) 升糖素 (glucagon)：由胰臟 α -cell 分泌的激素，為體內重要的異化激素，可以促進脂肪脂解、肌肉細胞分解以及肝臟糖質新生。其作用機轉為，當升糖素與接受器結合後會活化腺苷酸環化酶 (adenylate cyclase, AC) 催化 ATP 形成 cyclic

adenosine monophosphate (cAMP)，當 cAMP 濃度增加會促進 protein kinase A (PKA) 構型改變而活化，抑制肝醣合成，促葡萄糖產生。

(3) 澱粉素 (amylin)：與胰島素共同自胰臟 β cell 分泌的激素，於餐後分泌可降低血糖，而也有研究證實 amylin 在體內累積與 T2DM 的發病預測有很大的相關性 (Ludvik et al., 1991)。另外 amylin 還能夠傳遞至腦部協助 leptin 作用，減少攝食以調節能量平衡 (Li et al., 2015)。

(4) 升糖素類似胜肽 (Glucagon-like peptide-1, GLP-1)：為腸道分泌的腸泌素之一，進食之後 GLP-1 由遠端腸道的迴腸與結腸 L-cell 所分泌，能夠抑制食慾延緩胃排空有增加飽足感的功能並且誘導胰島素分泌，降低餐後血糖，因此臨床上會用 GLP-1 類似物或是抑制 GLP-1 降解藥物來治療 T2DM。

(5) 胃抑制胜肽 (Gastric inhibitory polypeptide, GIP)：又稱為葡萄糖依賴性促胰島素肽，亦為腸泌素，由小腸的 K-cell 受脂肪與葡萄糖刺激所分泌，會減少胃酸分泌保護小腸不受酸損傷，降低食物通過胃的速度。GIP 與 GLP-1 同為腸促胰島素，能夠協助誘導胰島素分泌 (Kjems et al., 2003; Shigeto et al., 2015; Willms et al., 1996)。

5. 肝臟的血糖調節

(1) 肝醣分解與合成 (Metabolism of Glycogen)：

肝醣是動物體內糖類的主要儲存形式，就如同植物與澱粉之間的關係，其主要分佈肌肉或是肝臟當中，而雖然肝醣在肌肉中的含量最多，但因為肌肉缺乏 6-磷酸葡萄糖脫氫酶 (Glucose-6-phosphatase, G6Pase)，故肌肉中的肝醣只供產能，不參與血糖調節，所以體內快速的血糖調控就以肝臟為主。在兩餐之間血糖下降時，肝醣就會分解，產生葡萄糖釋出供組織使用，其作用機制為將 6-磷酸葡萄糖 (Glucose-6 phosphate, G6P) 透過 glucose-6-phosphate transporter 1 (G6PT1) 運送至內質網管腔內，其產物磷酸根和葡萄糖再經由 G6PT2 與 G6PT3 送至細胞質，最後的葡萄糖再由葡萄糖載體蛋白 2 (GLUT2) 自肝臟釋放；相對的飽食之後，吸收的葡萄糖被肌肉與肝臟吸收，有效率地將葡萄糖轉換成肝醣儲存。而肝醣的代謝也

是受到血糖濃度嚴格的調控著，其中 cAMP 扮演重要的角色，可以抑制肝醣合成酶 (glycogen synthase) 的去磷酸化來抑制其活性，高血糖時胰島素分泌會抑制 cAMP 產生，相反的低血糖時升糖素或是腎上腺素分泌會增加其生成 (Adeva-Andany et al., 2016)。

(2) 肝臟糖質新生作用 (gluconeogenesis)：

當長時間的飢餓或是運動造成肝醣消耗完畢時就會發生糖質新生，供給大腦、神經以及紅血球之類以葡萄糖為唯一能量來源的組織使用，意義為將非醣類物質轉變成葡萄糖或是肝醣的過程，反應路徑大致與糖解作用類似，但有三步不可逆步驟，參與酵素為 G6Pase、果糖 1,6- 雙磷酸酶 (Fructose 1,6-bisphosphatase) 與磷酸烯醇丙酮酸羧化激酶 (Phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)。糖質新生也有許多共調節因子，例如 cAMP response element binding protein (CREB), Forkhead box protein O1 (FOXO1), cAMP-regulated transcriptional coactivator 2 (CRTC2) 與 C/EBP α/β ，會刺激 PEPCK-C 和 G6Pase 的表現，這其中的機制與 PKA 引發的磷酸化有關 (Herzig et al., 2001; Zhou et al., 2004)

6. 肌肉與血糖調控

肌肉為體內另一個會影響胰島素調節的組織，肌肉攝入葡萄糖的方式是透過受胰島素調控的 GLUT4，因此不只醣類，脂肪酸在這些非脂肪組織累積對於胰島素阻抗的發生也很重要，肌肉是胰島素最主要作用調節代謝的地方，在過去有人非糖尿病與糖尿病者中急性的注射脂質後會誘導肌肉胰島素阻抗的發生，因此認為肌肉在第 2 型糖尿病發展中扮演重要的角色，也幾乎所有第 2 型糖尿病者患都有肌肉胰島素阻抗 (Boden, 1999)。另外雖然觀察到肌細胞內脂肪 (intramyocellular lipid, IMCL) 與胰島素十分相關，但反而是其他的脂質代謝物，如長鏈醯輔酶 (Along-chain fatty acyl-CoA, LCFA-CoA)、二酸甘油酯 (diacylglycerol, DAG) 或是神經醯胺 (ceramide) 才是造成阻抗的原因 (Itani et al., 2002; Summers, 2006)。臨床上也推動糖尿病患者養成有氧運動的習慣，運動除了可以增加肌肉量，並且還能夠增加胰島素敏感性，因運動之後可以促進葡萄糖攝入以及激活能量平衡有關的 AMP-activated protein kinase (AMPK)，加速下游的 TBC1D1 被磷酸化

而失活，進而增加 GLUT4 於細胞膜上聚集的數量，使得攝入葡萄糖增加，降低血糖 (Sakamoto and Holman, 2008)，另外還有其他由胰島素刺激而活化信號傳遞鏈下游蛋白 (圖 一-2)，例如 IRS-1、IRS-2 和 Akt 等可藉由磷酸化的方式被調控著。

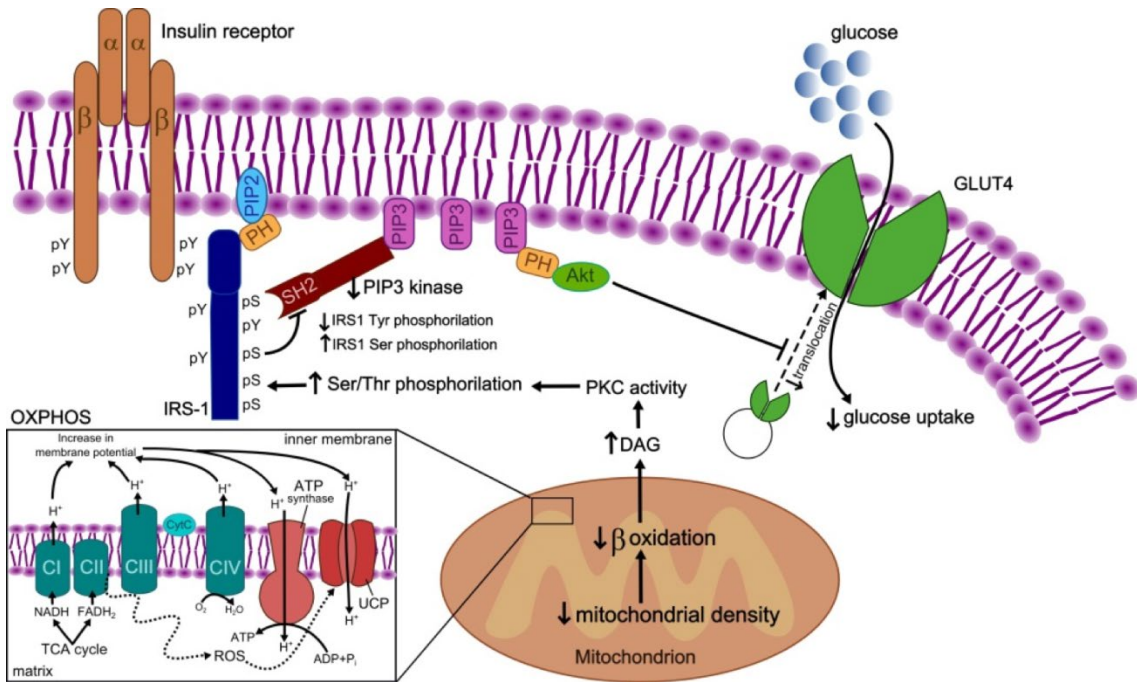


圖 一-2 肌肉組織的胰島素傳遞路徑

Figure 1-2 Molecular basis of insulin action in skeletal muscle (Gonzalez-Franquesa et al., 2012)

Once the insulin receptor has been phosphorylated, insulin receptor substrate (IRS)-1 is phosphorylated on tyrosine residues and results in activation of phosphatidylinositol (PI)-3 kinase, leading to increase in phosphatidylinositol-3,4,5 tri-phosphate (PIP3) levels. This results in phosphorylation of Akt, which facilitates the translocation of GLUT4 to the sarcolemma and subsequently stimulates entry of glucose into the muscle cell.



(四). 肥胖 (Obesity)

1. 肥胖的定義

肥胖為體組成中脂肪比例過高，儲存過多能量的結果，而我國對肥胖的定義由衛福部國民健康署根據 WHO 的身體質量指數 (Body Mass Index, BMI) 公式加上適應亞洲人而進行調整得到的標準：台灣成人健康體位為 $18.5 \leq \text{BMI} < 24$ 、 $\text{BMI} \leq 18.5$ 為過輕、 $24 \leq \text{BMI} < 27$ 則為過重，超過 27 即為肥胖。

2. 肥胖的成因

肥胖的成因多半由不良的飲食習慣、低活動量、遺傳或是衰老而導致體脂過度累積的全球性疾病，而台灣的肥胖盛行率由民國 102~105 的國民營養健康狀況變遷調查結果顯示，成人過重及肥胖率相較 82~85 年 33.2% 上升到 50% 以上，比國際肥胖盛行率來要來得高。而肥胖也會衍生許多問題，在 105 年的國人十大死因中有惡性腫瘤、心臟疾病、腦血管疾病、糖尿病、慢性下呼吸道疾病、高血壓性疾病、腎病變與慢性肝病及肝硬化都與肥胖有相關性，因此健康體重是維持健康重要的一環 (潘文涵, 2019; 潘文涵 et al., 1999; Grundy, 2004)。

3. 肥胖與胰島素阻抗

而當脂肪在腹部累積成內臟肥胖時，會產生胰島素阻抗，帶來更嚴重的代謝問題 (Bosello and Zamboni, 2000)，再加上脂肪組織也被認為是個內分泌器官，能夠分泌多種脂肪因子 (adipokine) 與血糖調節、血脂代謝、發炎反應、凝血作用、血壓調節以及攝食相關 (Coelho et al., 2013)，而與血糖代謝相關常見的 adipokine 有：

(1) 瘦素 (leptin): 是第一個被發現的 adipokine，主要由脂肪細胞分泌可進到腦中減少食慾與增加能量消耗，達到平衡體重與脂肪大小的作用，故稱為瘦素。從動物模式中看到缺乏 leptin 分泌的 ob/ob 小鼠無法抑制攝食，且有病態肥胖、糖尿病與高血脂等症狀，在長期的高濃度 leptin 浸潤之後還有可能會出現 leptin resistance (Sáinz et al., 2015; Zhang et al., 1994)。另外日前也發現 leptin 會促進一

些發炎相關的 adipokine 表現，其中包含腫瘤壞死因子 (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) 與介白素-6 (Interleukin 6, IL-6) 以及 monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1)。

(2) 脂聯素 (adiponectin)：為脂肪細胞分泌能夠對抗糖尿病與肥胖之類代謝性疾病的 adipokine，由脂肪組織分泌後產生全身性影響，在動物模式中發現可透過增加能量的消耗，降低肥胖小鼠肌肉與肝臟的三酸甘油酯含量，進而增加胰島素敏感性；在脂肪與肌肉中 adiponectin 會增加脂肪酸 β 氧化漸少脂肪累積並增加葡萄糖的攝入；肝臟中 adiponectin 則是會抑制糖質新生與脂肪合成作用，減少高血糖與脂肪肝的發生 (Xu et al., 2003; Yamauchi et al., 2001)，之後也發現 adiponectin 是經由 AMPK、p38 MAPK 以及 Rab5 調控醣類與脂肪代謝平衡 (Ruan and Dong, 2016; Waki et al., 2003)。

(3) 阻抗素 (resistin)：名字由來為其參與了胰島素阻抗，認為 resistin 與 leptin 存在一種交互干擾作用，來影響醣代謝與能量平衡，促進胰島素阻抗的發生 (Qi et al., 2006)。而目前有許多研究指出 resistin 和心血管疾病也有很大的關係，使血管平滑肌的增生以及增加血栓形成因子合成等負面影響 (Calabro et al., 2011)。在代謝症候群方面，resistin 對於氧化壓力來說為強烈刺激物，因此被認為參與了肥胖導致的發炎反應，例如在非酒精性脂肪肝演變成肝炎中扮演關鍵角色 (Filkova et al., 2009; Shen et al., 2014)。

(4) 網膜素 (omentin)：是個最近被發現的 adipokine，主要由血管周圍脂肪組織 (Perivascular adipose tissue, PVAT) 和血管基質細胞產生，在生理代謝上在脂肪細胞中能夠增加胰島素信號路徑，改善胰島素敏感性，也被發現與肥胖相關指標，如 BMI 或是腰圍負相關 (de Souza Batista et al., 2007; Maresca et al., 2015)。

(5) 發炎相關 adipokine：肥胖目前也被認為是慢性發炎的一種，因為脂肪細胞也會分泌一些具有調控作用的促發炎物質，如 TNF- α 與 IL-6 也能被歸類為 Adipokine，並被認為有可能與胰島素阻抗發生有關係 (Hotamisligil et al., 1993; Kang et al., 2016; Rotter et al., 2003)。但也有研究指出巨噬細胞與脂肪量成正比，而 TNF- α 的主要來源是巨噬細胞而非脂肪細胞本身產生的，隨著這些巨噬細胞在

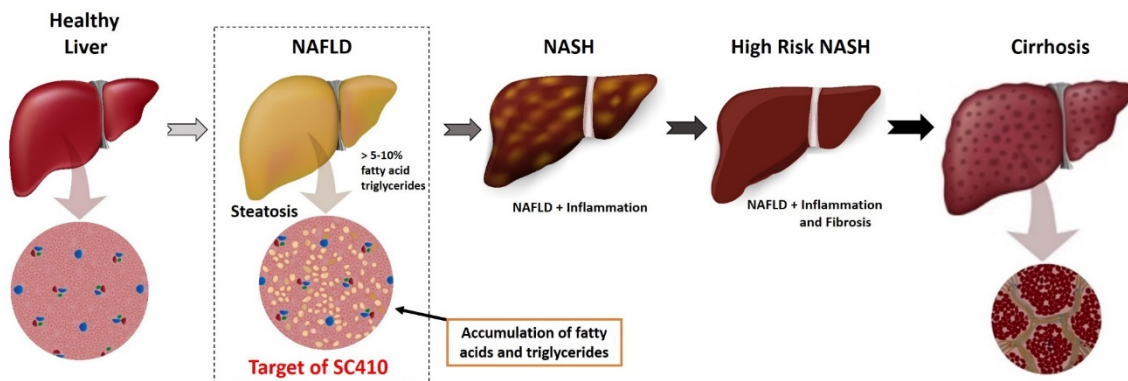
脂肪組織中漸增，肥胖會使得巨噬細胞由原本抗發炎型的 M2 逐漸走向發炎的 M1 (Lumeng et al., 2007)。



(五). 非酒精性脂肪肝 (Nonalcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD)

1. 非酒精性脂肪肝的定義

而肝臟是人體代謝中的重要器官，當肝臟脂肪的吸收、合成、氧化以及運輸出現失調就有可能導致肝臟的脂肪堆積。NAFLD 即為在沒有過度飲酒的前提下，脂肪累積於肝臟中超過 5% 就可稱為脂肪肝，此階段屬於溫和可逆的肝疾病，若



不進行治療可能會再惡化演變成肝炎、肝硬化甚至是肝癌，如圖一-3 所描述 (Chalasanani et al., 2012; Szczepaniak et al., 2005)。

圖一-3 非酒精性脂肪肝的發展進程

Figure 1-3 The progression of NAFLD (micellebiopharma.com)

NAFLD can progress to NASH and potentially to cirrhosis. Both NAFLD and NASH are thought to be reversible.

2. 非酒精性脂肪肝的成因與進程

這些過度儲存在肝臟的脂肪可分為合成三酸甘油酯過多、極低密度脂蛋白 (VLDL) 排出受阻或是肝臟能量利用較低，其中作為合成三酸甘油酯原料的脂肪酸有三個主要來源：1). 脂肪組織脂解作用釋放 2). 飲食脂質由門脈循環運入 3). 肝臟自行新合成 (*de novo* lipogenesis)。

雖然非酒精性脂肪肝進展到肝炎的比例並不高，但單純的脂肪肝開始惡化就可能會進一步伴隨血脂異常或是動脈粥狀硬化的發生，降低病人存活率 (Bugianesi et al., 2010; Shulman, 2014)，而現以多重打擊假說 (multiple-hit hypothesis) 來解釋非酒精性脂肪肝演化成非酒精性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 的過程，除了原先的二次打擊假說 (Two-hit hypothesis) 提到的脂肪，尤其是較不穩定的游離脂肪酸過度累積在肝臟，使得肝細胞處於易受氧化的狀態，這再加上粒線體中 ROS 的作用即可提供氧化壓力，都有可能促進肝癌的進展 (圖 一-4)。

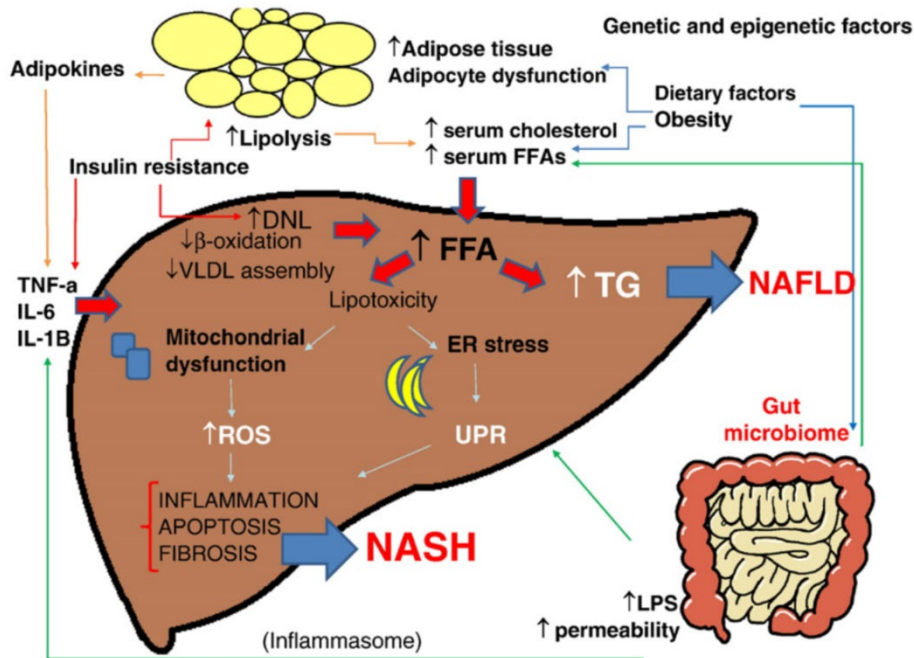


圖 一-4 非酒精性脂肪肝的多重打擊假說

Figure1-4 Multiple-hit hypothesis for the development of NAFLD. (Buzzetti et al., 2016)

3. 非酒精性脂肪肝與肥胖

脂肪不固定酯化儲存於脂肪組織，反而囤積在體內其他部位的現象稱為異位脂肪累積 (ectopic lipid accumulation)，NAFLD 即為該現象的結果之一 (Softic et al., 2016)，因此同樣被視為代謝異常疾病，與肥胖、高血脂及 T2DM 有相關性，肥胖造成的高胰島素血症可能為促使肝臟脂肪酸合成導致非酒精性脂肪肝形成

(Boza et al., 2005; Leite et al., 2009; Li et al., 2010; Machado et al., 2012; Wicklow et al., 2012)，但目前對於肥胖和 NAFLD 之間的關係仍有爭議。一派說法認為，肥胖但對胰島素有反應的正常人能夠透過胰島素抑制 cAMP 生成，進一步抑制賀爾蒙敏感性脂解酶 (hormone sensitive lipase, HSL) 的活化來減少脂肪分解產生的游離脂肪酸透過血液運送至肝臟；另外胰島素還能夠透過 Forkhead box protein O1 (FoxO1) 調控脂肪三酸甘油脂解酶 (adipose triglyceride lipase, ATGL) 的基因表現下降，增加脂解作用，所以認為肥胖為 NAFLD 形成的原因之一 (Chakrabarti and Kandror, 2009; Fabbrini et al., 2008)。另一派由臨床的研究中認為肥胖是發生是獨立於糖尿病以及 NAFLD 的，內臟肥胖只是胰島素阻抗的有利預測因子，像是 2001 年的研究對 20 位沒有 T2DM 的男性注射胰島素再用質子磁共振光譜儀測量，發現腹部肌肉脂質的累積與胰島素阻抗和體重都無關 (Virkamaki et al., 2001)，因此認為肝臟脂肪堆積和肥胖是獨立發生的事件。

4. 非酒精性脂肪肝與肝臟胰島素阻抗

目前較大多認同的 NAFLD 與胰島素阻抗之間具雙向關聯性，一旦 T2DM 伴隨脂肪肝的發生可能就會加速 NAFLD 病程進展，在流行病學統計發現兩者發病率有高度的重疊性，所以有部分學者認為 NAFLD 其實是肝臟表現出胰島素抵抗的方式，認為高胰島素阻抗不但無法抑制糖質新生還會刺激脂質合成，促使脂肪肝形成 (Anstee et al., 2013; Tolman et al., 2007; Williamson et al., 2011; Yki-Järvinen, 2015)，並認為這是種多系統性疾病 (multisystem disease)，將 NAFLD 與糖尿病一同歸類為心血管疾病的危險因子 (Shoelson et al., 2007; Stefan et al., 2008)。動物研究則指出給予高脂肪飲食誘發大鼠肝臟三酸甘油酯堆積後，會使得胰島素對於肝臟內源性葡萄糖的產生缺乏抑制作用，其中的機制與肌肉的胰島素阻抗類似，可能是肝臟的累積過多的 DAG，使得 protein kinase C ϵ 活化增加而抑制了胰島素的傳遞路徑中 IRS2, PI(3)K 與的下游的 Akt2 磷酸化，因此肝醣合成酵素：肝醣合成激酶-3 (glycogen synthase kinase-3, GSK3) 和肝醣合成酶 (glycogen synthase, GS) 的活性也隨之下降；此外胰島素作用正常可藉由增加 FOXO1 的磷酸化來抑制糖質新生作用，此路徑同樣會因為 Akt2 受損無法被傳遞，故糖質新生的關鍵酵

素：丙酮酸羧化酶 (pyruvate carboxylase, PC), 磷酸烯醇丙酮酸羧化激酶 (PEPCK) 與葡萄糖-6-磷酸酶 (G6Pase) 失去控制而持續表現，血糖更加上升，說明肝臟胰島素阻抗與糖尿病之間存在相互關係 (Samuel et al., 2004)。對部分學者來說，肝臟胰島素對於肝臟脂質生合成調控是獨立的，研究發現不論胰島素是否敏感的模式中，相較於給與胰島素，增加提供作為原料的脂肪酸更容易促進脂肪肝形成，也就是說將目標關注在減少飲食脂質攝取與抑制脂肪組織分解會比治療肝臟胰島素阻抗更佳有利 (Vatner et al., 2015)。

二、發展規劃 (Developmental Programming)

指的是胎兒在母體發育的關鍵時期會受到子宮環境刺激影響日後長期的生長，也有人稱為 DOHaD 理論 (Developmental Origins of Health and Disease)，該假說最早由英國 Barker 學者所提出 (Barker, 1990)，他從流行病學的調查中比較英國嬰兒死亡率心血管之間的關係，比較眾多因子之後發現孕婦營養與提供的子宮環境會影響到胎兒的日後代謝性疾病，而 Barker 之後的研究也證實了該假說，他還發現子宮環境和低出生體重與心血管疾病、高血壓有相關性 (Barker et al., 2010)。這種早期發育時期影響成年之後代謝疾病的原因有很多，例如 Barker 提出的節省基因表型假說 (Thrifty Phenotype) 認為當胎兒處於飢餓不利於生長的環境中，會減少能量消耗速度來增加存機會，而該現象若持續存在到有正常營養的成年後可能就會出現代謝問題 (Gluckman and Hanson, 2004; Hales and Barker, 1992)。

隨著現在肥胖問題日漸嚴重，也越來越多研究轉向孕期能量過剩與子代成年代謝性疾病發生的相關探討，也確實看到母親肥胖可能會因為子宮環境的改變使得粒線體失能或是胎兒基因受到母體效應造成子代代謝作用失調或是發炎現象的產生 (Alfaradhi et al., 2016; Bruce et al., 2009a; Shankar et al., 2008)。

(一). 母體效應之調節機制 (mechanisms of maternal effect)

探討孕期營養對於子代發育影響甚劇的研究中，胎兒宮內生長受限 (intrauterine growth retardation, IUGR) 為可能主要因素，無論是孕期營養不良亦是過剩會藉由降低或促進與胎盤生長以及營養素運輸相關的 mechanistic target of rapamycin (mTOR) 訊號傳遞，使得胎盤與胎兒的血流量受到影響，造成生長受限 (fetal growth restriction, FGR) 或巨嬰症 (macrosomia) 的發生 (Dimasuay et al., 2016; Jansson et al., 2012)，而兩者促進子代成年後罹患代謝疾病。以巨嬰症來說，由於妊娠糖尿病 (GDM) 來自母體胰島素增加或是高血糖浸潤就可能誘發子代產生胰島素阻抗 (Bush et al., 2011; Ornoy, 2011)，另外也發現因為 GDM 而增加 Leptin 的分泌，可能誘發子代出現 hyperleptinemia (Lecoutre et al., 2017)；或是隨著母親胰島素敏感度降低而隨之降低的 adiponectin，都是母體效應之一 (Catalano and deMouzon, 2015; Haghiac et al., 2014)。

(二). 表觀遺傳 (Epigenetic)

表觀遺傳是指在不改變 DNA 序列之下，透過某些機制，像是 DNA 甲基化、組蛋白修或是 microRNA 之類的方式 (Goldberg et al., 2007)，調控子代的基因表現並遺傳下去；表觀遺傳是母體效應重要機制，將胚胎時期 IUGR 的影響持續被記憶。

1. DNA 甲基化與去甲基化 (DNA Methylation and Demethylation)

這是個在 DNA 上的腺嘌呤或胞嘧啶接上甲基團的反應，而這種 DNA 甲基化便會改變細胞的基因表現，在哺乳動物中是個正常且重要的發育反應，能夠維持細胞正常的功能，且通常在生命早期的胚胎或是嬰兒期發生而持續影響的成人。然而並非 DNA 上所有的位置都能夠發生甲基化，哺乳動物中主要在序列中有許多胞嘧啶 (cytosine, C) 與鳥嘌呤 (guanine, G) 形成的 CpG islands 發生，CpG islands 通常會出現在基因序列的 5' 端的啟動子附近區域去調控基因的轉錄 (Jones, 2012)，作用的反應式為在 CpG 上 cytosine 的五號位甲基化，形成 5-methylcytosine, 5-mc)，參與的關鍵酵素為 DNA 甲基轉移酶 (DNA methyl

transferases, DNMT), 目前認為 DNMT1 負責透過複製來維持 DNA 甲基化, DNMT3a 和 DNMT3b 是負責將 CpG 甲基化 (Chen and Li, 2006)。最初的科學家認為 DNA 甲基化是個不可逆的反應, 但現在也發現當缺乏 DNMT1 持續複製, DNA 會發生去甲基化, 5-mc 透過 ten-eleven translocation (TET) 家族的共同作用, 再回到原本的 cytosine (Kohli and Zhang, 2013)。

在過去也有研究將母親肥胖或是 GDM 與甲基化做連結, Lecoutre 等人發現孕期高脂飲食誘導的子代成年後會出現肥胖與 hyperleptinemia 現象後, 進一步證實 *Leptin* 啟動子受到了 DNA 甲基化的修飾, 結果也與 mRNA 以及血清 Leptin 表現增加吻合 (Benton et al., 2015; Lecoutre et al., 2017)。在母體效應的研究上, 也將 DNA 甲基化程度視為子代基因表現被調控的主因之一, 由 Yuan 的研究中可以看到這種甲基化的修飾是可被維持且有記憶性的, 只要在給予適當的活化會再出現基因表現差異 (Yuan et al., 2018)。

2. 組蛋白修飾 (Histone Modification)

組蛋白是染色質中主要的蛋白, 因帶正電可以穩定帶負電的 DNA 結構, 用來幫助 DNA 纏繞折疊形成 DNA- 蛋白質複合體, 到需要複製時才鬆開的蛋白, 通常有 H1 (有時稱為連接組織蛋白 H5)、H2A、H2B、H3 與 H4 等五種類, 其中 H2A、H2B、H3 及 H4 稱為「核心組織蛋白」, 會集合成為八聚體 (core of 8 histone)。

對於組蛋白的轉錄後修飾有很多, 像是乙醯化 (acetylation)、磷酸化 (phosphorylation)、甲基化 (methylation)、醣基化 (glycosylation)、泛素化 (ubiquitination)、生物素化 (biotinylation)、SUMO 蛋白質修飾化 (sumoylation)、ADP 核糖基化 (ADP-ribosylation)、棕櫚酸酯化 (palmitoylation)、succinylation 以及丙二醯化修飾 (malonylation) 來影響 DNA 的轉錄 (Choi and Friso, 2010; Xie et al., 2012; Yan and Boyd, 2006; Zou et al., 2011), 例如當基因啟動子的組蛋白被乙醯化, 就會活化 DNA 的轉錄作用, 其中的作用機制為當組蛋白尾部的 lysine 被乙醯化之後會中和掉 lysine 帶的正電, 使得與 DNA 的結合力減弱, 增加 DNA 的轉錄 (Zentner and Henikoff, 2013)。而 DNA 甲基化與組蛋白修飾之間也有關聯, 例如 histone H3 lysine 9 的甲基化是由 DNA 甲基化所引發的, 且 DNA 轉甲基酶也和

組蛋白脫乙酰酶 (histone deacetylases, HDAC)、組蛋白甲基化酶 (histone methyltransferases) 有交互作用 (Fuks et al., 2000; Johnson et al., 2002)。



3. microRNA (miRNA)

miRNAs 是一段短小非編碼的 RNA 序列，大約 19 到 22 個核苷酸組成，可以對 RNA 進行負調控，結合到目標基因 3 端的非轉譯區 (3'UTR)，抑制互補的 mRNA 的轉譯或是造成它的降解 (Krol et al., 2010)。miRNA 對於體內有許多調控作用，在表觀遺傳學上 miR-165 和 miR-166 被發現是 DNA 甲基化形成的必要因子 (Bao et al., 2004)，甲基化的關鍵酵素 DNMT1 也會受到 miRNA 的調控；在組蛋白的修飾上，發現 miRNA 可以透過調節關鍵的組蛋白修飾物 (modifiers) 來影響整個染色質的構型，miR-140 也被發現在小鼠中可以和 histone deacetylase 4 互補調控其作用 (Tuddenham et al., 2006)，因此認為在表觀遺傳學調控的基因表現上 miRNAs 是重要的參與者。

第三節 研究假說與實驗架構

一、研究假說

在 Barker 過去許多研究中發現，懷孕期間母親無法提供充足營養的生長環境會影響胎兒日後永久的代謝得出 DOHaD 理論 (Barker et al., 2010)。延伸至今日，能量過剩的問題日漸嚴重，目前研究也轉向孕期肥胖的效應，母親不良的生理狀況可能會透過不同的方式傳遞給後代，增加成年之後的罹患代謝症候群的機率 (Remacle et al., 2011)。而這種在懷孕期及哺乳期對子代的影響可稱之為母體效應，也是生命發育的關鍵因子，目前研究已經證實出生前子宮環境會影響胎兒生長，增加子代疾病的易感性 (Shankar et al., 2011)；若特異性的在哺乳期給予母親刺激，子代依舊可以透過表觀遺傳的方式改變基因的表現 (Yuan et al., 2018)，因此兩個時期對於子代的日後發育都非常重要。

目前也發現母親高脂飲食會使子代脂質合成路徑的基因表現增加或是脂肪酸被氧化利用被抑制，造成異位脂肪的形成，例如累積在肝臟的非酒精性脂肪肝 (Borengasser et al., 2011)，而隨著現代飲食越來越偏向高油高膽固醇的西方飲食型態，也有研究指出當母鼠誘發高膽固醇血症的情況下，子代內生性膽固醇的合成路徑也會被活化 (Goharkhay et al., 2008a; Yu et al., 2013)，然而受母體效應調控的目標基因以及機制尚不明確。

因此本實驗假說為：在西方高油高糖高膽固醇的飲食模式下誘導母鼠懷孕前高膽固醇血症後，在懷孕期與哺乳期持續給予西方飲食，會透過表觀遺傳的方式增加子代肝臟脂質堆積、血糖調節失衡，使非酒精性脂肪肝以及胰島素抵抗的罹病風險增加。



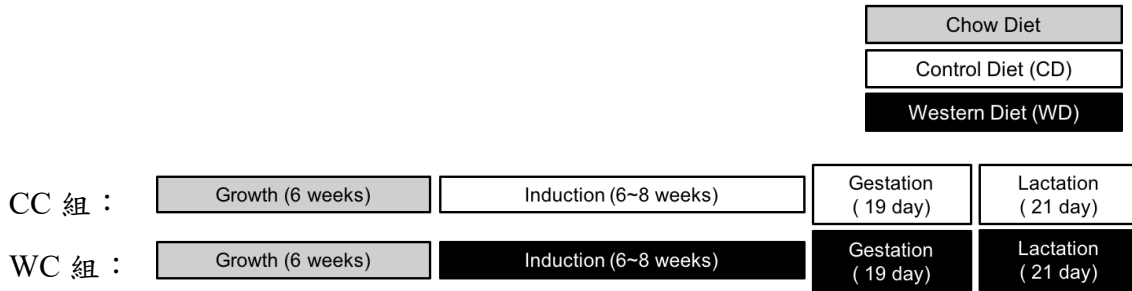
二、實驗架構

(一). 實驗對象

8 週齡，C57BL/6J *ApoE*^{-/-} 母鼠及其子代

(二). 實驗分組

1. 親代母鼠高膽固醇血症對子代成年後代謝性疾病的影響

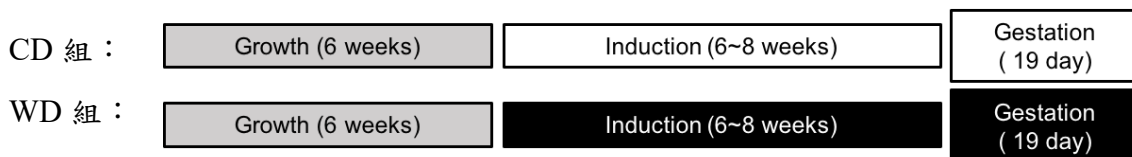


Control diet (CD) : CHO 63% kcal, fat 16% kcal, protein 20% kcal

Western diet (WD) : CHO 39% kcal, fat 44% kcal, protein 17% kcal + 0.15% cholesterol

2. 親代母鼠高膽固醇血症對子代基因甲基化分析

親代母鼠分別給予西方飲食 (Western Diet, WD) 或是控制組飲食 (Control Diet, CD)，在孕期第 18.5 天 (E18.5) 時犧牲，取胚胎的肝臟進行分析。

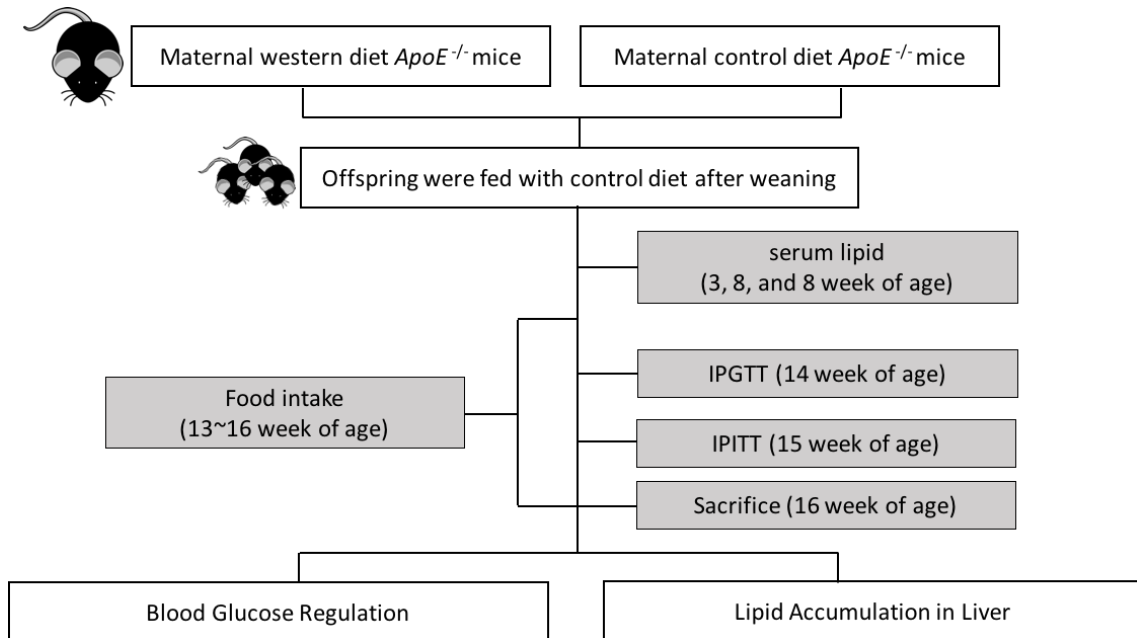




3. 分析項目

- 母親代謝異常相關：體重、血清三酸甘油酯/膽固醇定量、血糖測量、血清胰島素測量
- 子代肥胖相關：體重、攝食量、組織重量、白色脂肪組織基因分析、白色脂肪組織 H&E 切片染色、白色脂肪組織細胞大小定量
- 子代血脂異常相關：血清三酸甘油酯/膽固醇/非酯化脂肪酸定量，血清脂蛋白圖譜分析
- 子代胰島素阻抗相關：飽食血糖、禁食血糖、葡萄糖耐受性測量、胰島素耐受性測量、全身性胰島素信號傳遞反應
- 子代非酒精性脂肪肝相關：肝臟三酸甘油酯/膽固醇/非酯化脂肪酸定量、肝臟油紅切片染色、肝臟 H&E 切片染色、肝臟基因表現、肝臟基因甲基化分析

[實驗設計流程]



第二章 母親高膽固醇血症對子代成年代謝性疾病的影響



第一節 前言

為了驗證孕期的西方飲食導致子代代謝性疾病易感性的假說，本實驗使用加速高膽固醇血症誘發的 $ApoE^{-/-}$ 小鼠為動物模式，餵食西方高奶油高糖高膽固醇飲食確定親代母鼠血膽固醇顯著增加後，才與性成熟的 $ApoE^{-/-}$ 公鼠交配，觀察子代是否有出現肥胖、高血脂、胰島素阻抗或是脂肪肝等代謝不良的情況，並尋找原因以及可能機制。

第二節 材料與方法

一、誘發 *ApoE*^{-/-} 母鼠孕期高膽固醇血症

本實驗使用最初由 Dr. Nobuyo Maeda 實驗室建立的 B6.129P2-*ApoE*^{tm1Unc/J} 品系 *ApoE* 基因剔除小鼠(Piedrahita et al., 1992)。經過 *ApoE*^{-/-} 母鼠與野生型小鼠回交再得到的 *ApoE*^{-/-} 母鼠，在 6 週齡時開始進行飲食誘導，由 chow diet (LabDiet 5001, PMI Nutrition International Inc. Brentwood, MO) 改餵食控制組飲食 (Control diet, CD) 或是西方飲食 (Western diet, WD)，誘導 6~8 週後確定誘導高膽固醇血症後開始與成熟 *ApoE*^{-/-} 公鼠交配，母鼠懷孕後單獨移入塑膠籠待產，在懷孕期以及哺乳期餵食與誘導期同樣的 CD 或是 WD。

1. 16 週齡子代的孕鼠飼養

在子代出生 (Postnatal day) 的當天 (P0) 和斷乳 (P21) 時，母鼠於上午 9 點禁食 4 小時後進行採血、秤重，測量血中三酸甘油酯、膽固醇、血糖以及胰島素濃度。本實驗飼養期間採自由攝食及飲水，飼養環境溫度控制在 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ，光照期與黑暗期各為 12 小時 (8:00~20:00 為光照；20:00~8:00 為黑暗)。

2. E18.5 子代胚胎的孕鼠飼養與組織收集

母鼠確認成功誘導出高膽固醇血症後，於傍晚將 6 週齡以上的性成熟公鼠放入誘導成功母鼠的鼠籠中，隔天上午拿起公鼠，5~10 天一循環，確定母鼠懷孕後，推算出懷孕第 18.5 天將懷孕母鼠迷昏後以頸椎脫臼法犧牲，取出胚胎以及胎盤稱重，取出胚胎的肝臟秤重後，剪成兩塊裝至微量離心管立即放入液態氮中保存於 -80°C ，供之後實驗分析；剪取胚胎的尾巴，進行基因型以及性別的確認；將部份胎盤泡入 4% 的 PFA 溶液中 4°C 固定一天後，將溶液換置成 PBS 保存於 4°C 冰箱。

二、飼料配製

本實驗基本原料包括酪蛋白 (Casein)、胱胺酸 (L-Cystine)、玉米澱粉 (Corn Starch)、蔗糖 (Sucrose)、纖維素 (Cellulose)、大豆油 (Soybean Oil)、AIN-93G 礦物質混合物、AIN-93 維生素混合物、膽鹼 (Choline) 與西方飲食的特殊原料：無鹽無水奶油 (Milk Fat, Anhydrous) 及膽固醇 (Cholesterol)。配製方式為將各種粉狀原料依照配方表 (表 二-1) 比例混合均勻，再分次加入油脂，最後進行過篩後分裝密封，冷凍保存於 -20°C 。

1. 控制組飲食

本實驗的控制組飲食為參考 Reeves 等人的 AIN-93G 飼料配方 (Reeves et al., 1993) 修改而成的，三大營養素的重量百分比分別為 64.2% 碳水化合物、15.6% 脂肪及 20.2% 蛋白質。

2. 西方飲食

本實驗參考 Plump 等人於 1992 年提出的 TD.10885, Harlan Teklad 西方飲食飼料配方修改而成的，其特色為高油高糖並額外添加膽固醇，且飽和脂肪佔總脂肪酸熱量達 60% 以上 (Plump et al., 1992)。而本實驗為更符合人類日常的飲食習慣修改三大營養素重量百分比分別為 40.4% 碳水化合物、43.1% 脂肪、16.5% 蛋白質以及 0.15% 膽固醇，並在台大醫學院生理所蘇慧敏老師實驗室幫助下，以氣相色譜質譜 (Gas chromatography, GC) 分析西方飲食飼料組成，確定必需脂肪酸的充足。

表 二-1 實驗飼料配方

Table 2-1 Composition of test diets used in the experiment.

飼料組成	Control Diet	Western Diet
	g/100g diet	
Casein, 80 Mesh ¹	20	19.5
L-Cystine ¹	0.3	0.3
Corn Starch ¹	52.9	11.5
Sucrose ¹	10	34.9
Cellulose ¹	5	5
Butter, Anhydrous ¹	-	21
Soybean Oil ¹	7	2
Mineral Mix, AIN-93G-MX (94046) ²	3.5	4.2
Vitamin Mix, AIN-93-VX (94047) ²	1	1.2
Choline Bitartrate ¹	0.25	0.3
Cholesterol, USP ¹	-	0.15
Calorie density (kcal / g)	4.0	4.8
CHO (kcal / kcal) %	64.2	40.4
Fat (kcal / kcal) %	15.6	43.1
Protein (kcal / kcal) %	20.2	16.5

¹Ingredients source: Casein (MP, USA) ; L-Cystine (Wako, Japan, Cat. NO 031-05295, Lot # SAL6748) ; Corn Starch (Samayang henex, Korea) ; Sucrose (台糖) ; Cellulose (JRS, Germany) ; Butter , Anydrous (安佳無鹽無水奶油) ; Soybean Oil (台糖) ; Mineral Mix, AIN-93G-MX (MP, USA) ; Vitamin Mix, AIN-93-VX (MP, USA) ; Choline Bitartrate (Acros, Japan, Cat. NO 67-48-1, Lot # A0362262) ; Cholesterol (MP, USA, Cat. NO. 101380, Lot # M4037)

²The composition of AIN-93 Vitamin Mix and AIN-93 Vitamin Mix is as described in J Nutr, 123:1939-1951(1993) (Reeves et al., 1993)

表 二-2 飼料脂肪酸組成

Table 2-2 Fatty acid composition of the diets used in the experiment.

	Control die (n=3)	Western diet (n=3)
SFA (kcal /kcal)%	2.6 ± 0.0	28.3 ± 0.1
MUFA(kcal /kcal)%	3.7 ± 0.1	11.2 ± 0.4
n-6 PUFA(kcal /kcal)%	8.4 ± 0.0	3.0 ± 0.0
n-3 PUFA(kcal /kcal)%	1.1 ± 0.0	0.6 ± 0.0

$$\text{計算公式：} FA\% \times Fat \left(\frac{kcal}{kcal} \right) \% \div 100 = \frac{FA(kcal)}{total\ energy\ intake(kcal)} \%$$

三、子代飼養

子代出生當天記為 P0，於上午 9 點紀錄出生體重，孕鼠哺養 3 週後離乳。離乳 (P21) 當天禁食 4 小時後採血、秤重及取腳趾確定基因型，之後將雄雌鼠分籠統一給予 CD。第 3, 8, 13 週齡進行例行性的採血，測量血清中三酸甘油酯與膽固醇濃度；第 8 週齡開始測量子代攝食量並監測體重，14 週齡進行葡萄糖耐受性測試，15 週齡進行胰島素耐受性測試，16 週齡時犧牲。

四、禁食血清樣本收集

母鼠在飲食誘導前、飲食誘導 7 週後、懷孕的第一天 (E0.5)、子代出生當天 (P0) 及子代離乳 (P21)，採集禁食 4 小時血清；子代則於離乳、8 週與 13 週齡採集禁食 4 小時血清。小鼠在上午 9 點禁食 4 小時後以乙醚迷昏自眼窩採集約 100 μL 血液，靜置 30 分鐘後以 1000 rpm, 4 離心 15 分鐘，取上清液血清進行血脂分析，若未在當日進行血脂分析會將血液置於 -80°C 暫存並盡早分析。在子代 16 週齡犧牲時，禁食時間為 12 小時，於晚上 8 點禁食至隔天早上 8 點，再同樣進行眼窩採血，得到的血清進行血脂分析以及混合同性別同組間一管 200 μL 血清進行快速蛋白液相色譜 (FPLC) 分析，之後剩餘血清以每管 60 μL 分裝，凍存於 -80°C。

五、腹腔注射葡萄糖耐受性測試 (Intraperitoneal glucose tolerance test, IPGTT)

1. 藥品配製

每次新鮮配重量百分濃度為 10% 的葡萄糖溶液，取 glucose (sigma, Cat. No. G8270-1KG, Lot #SZBF2020V) 溶於滅菌的二次水均勻混合。

2. 實驗流程

在子代 14 週齡時進行，於早上 9 點禁食 6 小時至下午 3 點，實驗前 2 小時秤量小鼠體重、剪一小段末端尾巴並單獨分籠適應環境。正式實驗即將開始時以指腹按壓小鼠尾巴使血液流出並以羅氏優勝血糖儀 Accu-Chek® Performa (Roche Diagnostics, USA) 測量第 0 分鐘血糖值，接著開始正式實驗：於腹腔注射 1 mg/g 體重的葡萄糖溶液並紀錄時間，之後的 15、30、60、90 和 120 分鐘以血糖儀測量血糖 (Papacleovoulou et al., 2013)。分析兩組間各時間點的血糖值差異以及計算曲線下面積，作為判斷葡萄糖耐受程度的依據。

六、腹腔注射胰島素耐受性測試 (Insulin tolerance test, ITT)

1. 藥品配製

當天現配製濃度為 0.075 U/mL 的胰島素溶液：取原濃度為 9.5 ~ 11.5 mg/mL (約 302.4 U/mL) 的人類胰島素 (Sigma, Cat. No. I9287, Lot # SLBM5131V) 以滅菌的 PBS 稀釋 4000 倍。

2. 實驗流程

子代 15 週齡時進行，流程與 IPGTT 相同，腹腔注射 0.75U/Kg 體重胰島素後以血糖機測量 15、30、60、90 和 120 分鐘的血糖值，之後分析兩組間各時間點血糖值差異以及計算曲線下面積，作為判斷胰島素阻抗的依據。

七、飽食血糖測試 (Fed glucose levels test)

子代 15 週齡，於上午 9 點以羅氏優勝血糖儀 Accu-Chek® Performa 測量飽食血糖。



八、禁食 6 小時的全血與血清收集 (fasting 6 hours blood and serum collection)

子代 15 週齡時，於上午 9 點更換墊料並予以禁食，下午 3 點時測量血糖，收集該時間點血清保存於 -80°C 預備之後測定胰島素，同時以含有 Dipotassium EDTA 的微量真空採血管收集全血約 $50\sim 100\ \mu\text{L}$ 於冰上保存，盡快以 GlukoPet A1c 糖化血色素分析儀測定糖化血色素 (HbA1c)。

九、動物犧牲及樣品收集

1. 事前準備

配製 75% 酒精，供器械消毒使用。配製組織保存液 phosphate-buffered saline (PBS, 137 mM NaCl, 4.3 mM Na_2HPO_4 and 1.47 mM KH_2PO_4 ; pH7.4) 經滅菌後使用。配製組織固定液 Paraformaldehyde (PFA)，用經過滅菌的 PBS 加入 PFA 粉末 (EMS, Cat. NO. 19208, Lot # 170104-09) 配製成 4% 的 PFA 溶液凍存於 -20°C ，犧牲前一天移至 4°C 冰箱冷藏解凍。

2. 犧牲流程

實驗動物子代統一餵食 CD 至 16 週齡後犧牲。於晚上 8 點開始至隔天早上 8 點禁食 12 小時，動物犧牲前先秤重以及由尾巴採血使用羅氏優勝血糖儀 Accu-Chek® Performa (Roche Diagnostics, USA) 測量禁食血糖。小鼠以乙醚迷昏，眼窩採血約 $1\sim 1.5\ \text{mL}$ 後以頸椎脫臼法犧牲，依序取肩胛骨棕色脂肪組織 (interscapular brown adipose tissue, BAT)，開胸取下腹股溝白色脂肪組織 (inguinal white adipose tissue, iWAT)、肝臟 (liver)、胰臟 (pancreas)、脾臟 (spleen)、腎臟 (kidney)、腹膜後白色脂肪 (retroperitoneal white adipose tissue, rWAT)、性腺

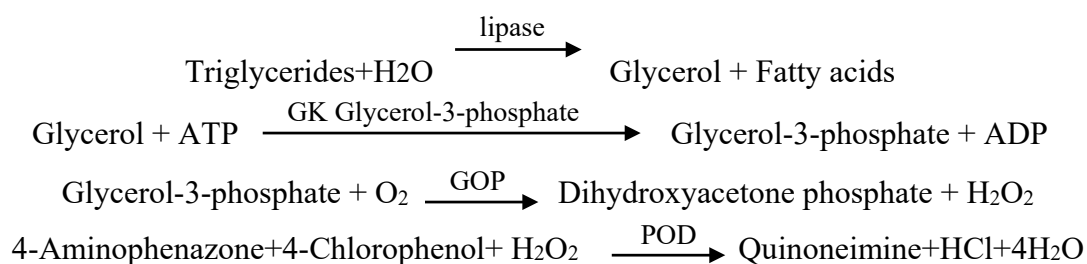
白色脂肪 (gonadal fat, gWAT)、腓腸肌 (gastrocnemius) 與比目魚肌 (soleus) 秤重後部分分裝至微量離心管立即放入液態氮中保存於 -80°C ，供之後實驗分析；取最大葉的肝臟依序浸泡在 7.5%, 15%, 30% 蔗糖溶液包埋於冷凍包埋劑 (optimal cutting temperature compound, OCT) 保存在 -80°C ，剩餘組織泡入 4% 的 PFA 溶液中 4°C 固定一天後，將溶液換置成 PBS 保存於 4°C 冰箱。

十、血清生化值分析

(一). 血清三酸甘油酯 (triglyceride, TG) 測定

利用酵素 Lipases、Glycerokinase (GK)、Glycerol-3-phosphate oxidase (GPO)、Peroxidase (POD) 與 TG 作用，最後產生淡紅色的 Quinoneimine，測量在 500 nm 的吸光值，來計算樣品三酸甘油酯之濃度。

其原理如下：



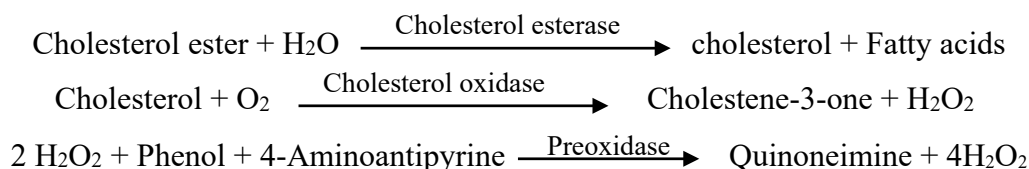
實驗方法為採用市售套組 (Randox, UK, Cat. NO. TR210)，將 Buffer 1 (含 Pipes buffer, pH 7.6、4-Chlorophenol、Magnesium ions) 與 Enzyme Reagent 2 (含 4-Aminophenazone、ATP、Lipases、Glycerol-kinase、Glycerol-3-phosphate oxidase、Peroxidase) 混合配成反應試劑。在 96 孔盤加入由 200 mg/dL 濃度序列稀釋的標準品、樣本以及作為空白實驗的二次水各 10 μL 二重複後，再以八爪 pipette 加入 200 μL reagent。混合均勻後，於室溫下反應 20 分鐘，測定 500 nm 之吸光值。再根據標準品的吸光值做成的標準曲線計算血清中三酸甘油酯濃度。



(二). 血清總膽固醇 (total cholesterol, TC) 測定

其原理為利用酵素 Cholesterol esterase、Cholesterol oxidase、Preoxidase 與 Cholesterol ester、Cholesterol 作用，最後產生淡紅色的 Quinoneimine 在 500 nm 測量吸光值，之後計算樣品膽固醇之濃度。

其原理如下：

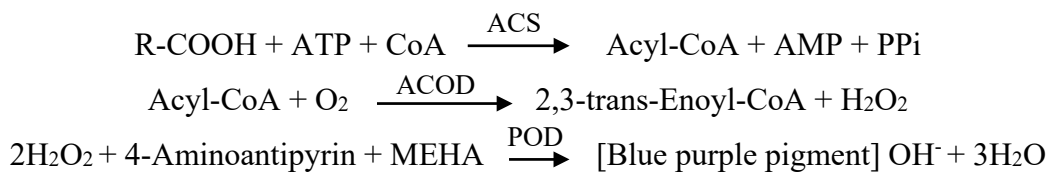


採用市售套組 (RANDOX, UK, Cat. No. CH200)。在 96 孔盤加入由 200 mg/dL 濃度開始序列稀釋的標準品、樣本以及作為空白實驗的二次水各 10 μ L 二重複後，再以八爪 pipette 加入 200 μ L reagent。混合均勻後，於室溫下反應 20 分鐘，測定 500 nm 之吸光值。再根據標準品的吸光值做成的標準曲線計算血清中膽固醇濃度。

(三). 血清非酯化脂肪酸 (nonesterified fatty acid, NEFA) 測定

以市售套組 (Wako Cat. NO. 294-63601, Japan) 分析，原理為在 Acyl-CoA synthetase (ACS) 存在下 NEFA 可形成 Acyl-CoA，之後再經由 Acyl-CoA oxidase (ACOD) 的氧化作用產生藍紫色，以 550 nm 測量吸光。

如下所示：



首先分別將含有 Coenzyme A (CoA) 與 ACS 的 Chromogen Reagent A 加入 10 mL Solvent A 配製成 color reagent A 以及含有 ACOD 的 Chromogen Reagent B 加入 20 mL Solvent B 配製成 color reagent B，製備完成後保存於 4°C，一個禮拜內使用完畢。

之後在 96 孔盤以套組提供的標準品 (Oleic acid 1 mEq/L)，序列稀釋成 4 μ L 1.97 mEq/L、1 mEq/L、0.5 mEq/L 以及 4 μ L 二次水為空白試驗，樣品同樣取 4 μ L 進行分析。先加入 color reagent A 80 μ L/well 混合後於 37°C 避光反應 10 分鐘，再加入 color reagent B 160 μ L/well 混合後於 37°C 避光反應 10 分鐘，取出降溫後測量 550 nm 測量吸光。

(四). 血清脂蛋白分佈分析

小鼠犧牲後取同組同性別的混合血清 200 μ L 至台大醫學院生化分生所呂紹俊老師實驗室協助進行快速蛋白液相色譜分析 (fast protein liquid chromatography, FPLC)。

1. 事前準備

- (1). 樣本準備: 將 200 μ L 混合血清與 300 μ L PBS 均勻混合成 500 μ L 的樣品。
- (2). 溶液準備: 上機需要 20% 酒精、PBS 以及二次水，在使用前需經過 0.22 μ m 的膜 (Millipore Express® PLUS) 抽氣過濾，再經過超音波振盪除氣 (Branson 5800 Ultrasonic Cleaner) 方能使用。

2. 實驗內容

本實驗使用的機器為 AKTA™ FPLC (GC Healthcare Life Sciences) 中、管柱為 Superose™ 6 10/300 GL (GC Healthcare Life Sciences) 和軟體 UNICRN Control Software (GC Healthcare Life Sciences)。以 1 mL 針筒注入 500 μ L 樣品後，設定以流速 0.25 mL/min PBS 沖洗，每 500 μ L 收集一管，共 40 管。

3. 樣本分析

採用市售套組 (RANDOX, UK, Cat. No. CH200)。取 200 μ L 的 FPLC 流洗收集液、25 mg/dL 的標準品與二次水 (blank) 至 6 公分的乾淨玻璃平口試管中，加入 500 μ L 的反應試劑，震盪均勻後反應 20 分鐘，測定 500 nm 吸光值，依照下列公式計算流洗液中膽固醇濃度。

$$\text{流洗液中膽固醇濃度} = \frac{\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank}}}{\text{OD}_{\text{standard}} - \text{OD}_{\text{blank}}} \times 25 \text{ (mg/dl)}$$

(五). 血清 ApoB 含量分析

測定樣品為禁食 12 小時後犧牲血清中 ApoB 濃度，採用市售套組 (MOUSE ApoB Simplestep ELISA Kit, abcam Cat. NO. ab230932) 測定。將血清樣品稀釋 8000 倍，取 50 μ L 標準品與樣品至 coated microplate，每孔再加入 50 μ L 含有以 Antibody Cocktail 稀釋過的 capture 與 detector antibody，室溫下以 400 rpm 避光放置 1 小時，重複 3 次 wash 後每孔加入 100 μ L TMB Substrate 室溫下以 400 rpm 避光放置 15 分鐘，接著加入 100 μ L Stop Solution，測量 450 nm 吸光，最後將吸光值代入標準曲線後計算出濃度。

(六). 血清胰島素 (insulin) 含量分析

測定樣品為禁食 6 以及 12 小時後犧牲血清中胰島素濃度，方法為以市售套組 (Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA, Mercodia Cat. NO. 10-1249-01) 測定。在已經覆蓋 Mouse monoclonal anti-insulin 的 96 孔盤中加入 25 μ L 的標準品與樣品後加入 100 μ L conjugate Solution (Peroxidase conjugated mouse monoclonal anti-insulin) 室溫下避光震盪 2 小時，之後重複 5 次 wash 後加入 200 μ L Substrate TMB 靜置 15 分鐘，接著加入 50 μ L Stop Solution (0.5 M H₂SO₄)，在 30 分鐘內測 450 nm 吸光。最後將樣品吸光值帶入由標準曲線得到的二次方程式，計算後得胰島素濃度。

十一、測量胰島素阻抗 Homeostasis Model Assessment (HOMA-IR)

在 1985 年由 Matthews 等人提出的 Homeostasis model assessment (HOMA) (Hill et al., 2013; Matthews et al., 1985)，測量休息狀態的空腹血糖與血清胰島素濃度，經過電腦分析發現胰島素的阻抗性和空腹胰島素濃度成正相關性，因此提出 HOMA-IR 公式來計算胰島素阻抗性。公式為：

$$\text{HOMA} - \text{IR} = \frac{\text{Glucose}(\text{mmol/L}) \times \text{Insulin}(\text{mU/L})}{22.5}$$

十二、體內胰島素信號傳遞試驗 (In vivo insulin signaling studies)

想要了解母親長期的高膽固醇血症對於子代胰島素敏感性的影響，我們將小鼠禁食 6 以及 12 小時後腹腔注射胰島素 (2U/Kg body weight)，5 分鐘立刻以頸椎脫臼法犧牲取性腺白色脂肪組織與腓腸肌，凍存於 -80°C 待日後以西方墨點法分析脂肪組織與肌肉組織中對胰島素引發的磷酸化反應強度。

十三、西方墨點法 (Western blotting)

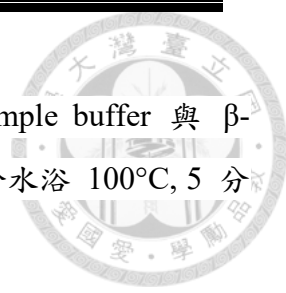
1. 樣本前處理

(1). 製備裂解液

以 Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer) (Thermofisher Cat. NO. 89900) 稀釋 7X protease inhibitor (Roche Cat. NO. 04693159001) 與 10X phosphatase inhibitor (Roche Cat. NO. 04906837001) 混合後即為樣品裂解液。

(2). 均質樣品

取 100 mg 組織與 300 μ L RIPA 裂解液以均質機均質後，在 4°C, 12,000 rpm, 20 min 進行離心取上清液。之後以 Bicinchoninic acid procedure (BCA) 法進行蛋白質定量，先將 reagent A 與 B 以 50:1 的比例混合成綠色 working reagent。在 96 孔盤中加入 25 μ L 的標準品 (0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125 mg/mL bovine serum albumin, BSA) 以及樣品後加入 200 μ L working reagent，確實混和均勻 30 秒後覆蓋保鮮膜，靜置於 60°C, 30 min，待回溫後用 ELISA reader 測 562 nm 吸光，對照標準曲線得到的公式計算蛋白質濃度。



(3). 樣品裂解

計算免疫沈澱所需要的蛋白質量後，將 4X laemmli sample buffer 與 β -Mercaptoethanol (β -ME) 以 9:1 的比例混和後加入組織均質液於水浴 100°C, 5 分鐘，進行裂解作用，未當天使用的樣本則長期保存於 -80°C。

2. 凝膠電泳

(1). 鑄膠 SDS-PAGE

	Resolving Gels		Stacking Gels
	10%	12%	5%
ddH ₂ O	4 mL	3.3 mL	3.4 mL
30% acrylamide mix ¹	3.3 mL	4 mL	0.83 mL
1.5M Tris (pH 8.8) ¹	2.5 mL	2.5 mL	
1.0M Tris (pH 6.8) ¹			0.63 mL
10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) ^{1,2}	100 μ L	100 μ L	50 μ L
10% ammonium persulfate (APS) ^{1,3}	100 μ L	100 μ L	50 μ L
TEMED ¹	4 μ L	4 μ L	5 μ L
Total	10 mL	10 mL	5 mL

¹source: 30% acrylamide mix (BIO-RAD Cat. NO. 161-0156); 1.5M Tris (pH 8.8) (BIO-RAD Cat. NO. 161-0798); 1.0M Tris (pH 6.8) (BIO-RAD Cat. NO. 161-0799); SDS powder (J.T Baker Cat. NO JT-4095-04); APS (BIO-RAD Cat. NO. 161-0700); TEMED (BIO-RAD Cat. NO. 161-0800)

²10% SDS 配製：10 g SDS 加入 100 mL 二次水，調整 pH 值至 7.8，保存室溫

³APS 配製：使用前現配製成 0.1 g/mL，未使用完保存於 4°C，儘早使用完畢



3. 蛋白質電泳

(1). 製備 10X running buffer:

Component	需要量
Tris	30.3 g
Glycine	144 g
10% SDS	100 mL
Total	1 L

Tris (Omics Bio Cat. NO. BT5011) 和 Glycine (J.T Baker Cat. NO. 4059-02) 加入 600 mL 水均勻混合溶解後，再加入 10% SDS 100 mL，調整 pH 值至 8.3，定量至 1 L，保存於 4°C；或是使用市售 10X TGS Buffer (Omics Bio Cat. NO. 1B3371)，之後使用前稀釋，不重複使用。

(2). 電泳條件設定：40 V, 40 分鐘，再 120 V, 110 分鐘。

4. 蛋白質轉印

(1) 配製 Transfer buffer:

Component	需要量
Tris	3.03 g
Glycine	14.4 g
10% SDS	100 mL
Methanol	200 mL
Total	1 L

Tris 和 Glycine 加入 600 mL 水均勻混合溶解後，再加入 10% SDS 100 mL 與 200 mL Methanol (Honeywell, SKU: AH230-4)，最後定量到 1 L；或是使用市售 10X Western Transfer Buffer (Omics Bio Cat. NO. 1B3351)，稀釋成 1X Transfer Buffer 800 mL 之後再加入甲醇 (Honeywell, SKU: AH230-4) 即可使用。之後保存於 4°C，每次使用之後過濾，重複使用。

(2). 蛋白質轉印

待轉印的 P0.45 PVDF membranes (GE Healthcare Life science Cat. NO. 10600023) 浸泡於 100% Methanol (Honeywell, SKU: AH230-4) 10 分鐘後，在 Transfer Buffer 中將卡夾、海綿、濾紙、膠片以及 PVDF membranes 組合好，使用 Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell system (BIO-RAD Cat.NO. 170-3930) 在 4°C 冰箱以 250 mA 轉印 110 分鐘，之後以 Ponceau S 確認是否轉印成功。

5. 蛋白質免疫染色

(1). 配製 10X TBS

Component	需要量
Tris	24.2 g
NaCl	88 g
Total	1 L

Tris 與 NaCl 均勻溶解後調整 pH 值為 7.5，定量至 1 L，滅菌後保存於室溫。

(2). 配製 1X TBST

將稀釋成 1X TBS 1 L 後加入 1 mL 的 TWEEN® 20 (SIGMA Cat.NO. P2287-500ML) 即為 TBST。

(3). 免疫染色

配製 5% BSA (BioShop Cat. NO. ALB001.25) 在 TBST 中，室溫下反應 1 小時進行阻攔 (blocking)，倒掉 5% BSA (in TBST) 之後直接加入以 5% BSA 稀釋的抗磷酸化蛋白的初級抗體 (表 二-3) 在室溫下反應整夜後取出回收，以 TBST 沖洗 3 次，每次 5 分鐘後，加入二級抗體，室溫下以 60 rpm，反應 1 小時取出回收。之後同樣以 TBST 沖洗 3 次後，將膜泡入 ECL (GE Healthcare Life science Cat. NO. RPN2235) 反應 1 分鐘後，在 UVP 冷光影像系統壓片。

表 二-3 抗體列表

Table 2-3 List of antibodies used for western bolt.

antibody	Host	dilution fold	company	Cat. No.
AKT (60kDa)	Rabbit	1:1000	CST	#9272
p-AKT (Thr308) (60 kDa)	Rabbit	1:1000	CST	#9275
p-AKT (Ser473) (60 kDa)	Rabbit	1:2000	EPIT MICs	#2218-1
β -actin (42 kDa)	Rabbit	1:5000	GeneTex	#109639

6. 蛋白質定量

使用 ImageJ 根據 Miller 的方式壓片結果進行蛋白質定量 (Miller, 2010)，之後將磷酸化 Akt 的定量結果除以總 Akt 得到的比值進行統計分析，計算兩組間磷酸化蛋白質的程度。

十四、組織切片染色

(一). 脂肪組織 H&E (hematoxylin and eosin) 染色切片

1. 固定：犧牲後的脂肪組織置於 4% PFA 固定一週後換成 PBS 保存。
2. 包埋：用 PBS 配製 3% agarose (Sigma, Cat. NO. SIA9414) 將一比較組的組織排列好進行固定包埋。
3. 切片染色：同樣由台大獸醫系委託 H&E (hematoxylin and eosin) 染色。
4. 拍照：以光學顯微鏡 (Zeiss, Axio Imager M2) 觀察切片並拍攝不同放大倍數下的照片 (Zeiss, AxioCam ERc5s) 進行不同組之間的比較。
5. 定量：將拍照得到的結果依照 Parlee 的方式使用圖片處理程式 Fiji 搭配套件 Adiposoft 來進行脂肪組織的定量，而定量結果利用 Microsoft Excel 公式計算，得到平均大小、中位數以及分佈頻率 (frequency) 之後進行作圖 (Parlee et al., 2014)。取樣方式為各組取 3~5 個樣本，每個樣本計算 5 張放大 200 倍率下視野。



(二). 肝臟組織 H&E (hematoxylin and eosin) 染色切片

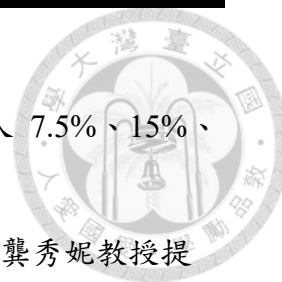
將犧牲後肝組織五個葉片各取部分置於 4% PFA 固定一個晚上後換成 PBS 長期保存。其餘步驟同脂肪組織切片。

(三). 肝臟組織油紅 O (Oil-red O, ORO) 染色切片

1. 固定：犧牲後組織置於 4% PFA 固定一個晚上後換成 PBS 長期保存
2. 包埋：自 PBS 中取出組織，以蔗糖溶液調整滲透壓，依序將組織放入 7.5%、15%、30% 蔗糖溶液，確定組織沈入溶液底部才置換成下一個濃度，最後在 30% 蔗糖溶液放置一個晚上取出在乾冰上以冷凍包埋劑 (optimal cutting temperature compound, OCT) (Sakura Finetek) 包埋，保存於 -80°C 。
3. 切片：切片之前將樣本靜置在預冷好的機器中 1 個小時以上之後，調整冷凍操作室溫度 (chamber temperature, CT) 為 -18°C 與標本頭壓縮機溫度 (operator temperature, OT) 為 -16°C ，以 $8\ \mu\text{m}$ 厚度進行切片。之後組織切片在 37°C 烘箱靜置 30~60 分鐘後保存於 -20°C 。
4. 油紅染劑配製：0.25 g ORO (Sigma-Aldrich, Cat. No O0625-25G) 粉末在 99% (v/v) 的異丙醇 (Fisher, CAS: 67-63-0) 以 30°C 中攪拌 2 小時，配製成 0.5%, 50 mL 的保存液。染色前再將保存液與二次水以 3:2 的比例稀釋，混合 10 分鐘後，以一號濾紙過濾過即可使用，6 小時以內使用完畢。
5. 染色步驟：
 - (1) 切片在室溫下回溫 1~2 天，乾燥切片
 - (2) 以 PBS 在 80 rpm, 5 分鐘沖洗三次後洗去 OCT
 - (3) 以 60% isopropanol 潤洗 3 分鐘
 - (4) 用 ORO 染劑在 50 rpm 下染 10 分鐘
 - (5) 以 60% isopropanol 潤洗 80 rpm, 4 分鐘，重複兩次後以自來水流洗掉
 - (6) 以 Hematoxylin (Sigma, Cat. NO. HHS16-500ML) 染 30 秒後以自水流洗
 - (7) 用 Lithium carbonate (bluing solution) 沾 3~4 下後以自來水流洗
 - (8) 最後以 Fluorescence Mounting Medium (Dako, Cat. NO.S3023) 封片
 - (9) 其餘拍照與保存方式與 H&E 染色切片相同。

(四). 肝臟組織二氫乙啶 (dihydroethidium, DHE) 染色切片

1. 冷凍包埋：將犧牲後肝組織最大葉片自小鼠取下後依序放入 7.5%、15%、30% 蔗糖溶液，一週內以 OCT 包埋，盡快進行冷凍切片
2. 染色配製：DHE 染劑為台灣大學解剖學暨細胞生物學科所龔秀妮教授提供，以 PBS 稀釋 2000 倍後備用
3. 染色步驟：與油紅染色相同，染劑作用條件為 30°C 靜置 30 分鐘
4. 拍照：染色完畢盡量當天進行螢光拍照



十五、肝臟脂質分析

(一). 肝臟脂質萃取

參考 Folch 等人的方法 (Folch et al., 1957)，取出分裝好的肝組織約 100 mg 置於乾淨的 6 cm 玻璃平口試管中，先以剪刀剪碎後加入少量萃取液為 CHCl_3 (Fisher, CAS: 67-66-3) 與 CH_3OH (Honeywell, SKU: AH230-4) 以體積 2:1 混合，再用均質機 (IKA, T10 basic ULTRA-TURRAX® Crushing Disperser, Germany) 磨碎，經由一號濾紙過濾到殘餘組織，再以適量萃取液沖洗濾紙，最後收集濾液以萃取液定量到 10 mL 後放入 20 mL 樣品瓶保存於 -20°C 。

(二). 肝臟三酸甘油酯測定

使用市售套組 (Randox, UK, Cat. NO. TR210) 測定。取肝脂萃取液 50 μL 至乾淨的 6 cm 玻璃平口試管靜置於抽風櫥吹乾溶劑後加入 1 mL 的反應試劑；標準品為 40 μL 200 mg/dL 的三酸甘油酯標準品同樣加入 1 mL 的反應試劑；空白試驗為 1 mL 反應試劑，充分混合之後反應 20 分鐘後取出 200 μL 至 96 孔盤測定 500 nm 吸光值。經過以下公式計算肝臟三酸甘油酯含量：

$$\frac{\text{TG (mg)}}{\text{Liver (g)}} = \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{standard}} - A_{\text{blank}}} \times 80 (\mu\text{g TG}) \times \frac{10 (\text{ml, 定量體積})}{0.05 (\text{ml, 取樣體積})} \times 10^{-3}$$

均質肝重 (g)

$$\frac{\text{TG (mg)}}{\text{Liver (g)}} \times \text{total liver (g)} = \frac{\text{TG (mg)}}{\text{總肝重}}$$

(三). 肝臟膽固醇測定

使用市售套組 (Randox, UK, Cat. NO. CH200) 測定。事先在 6 cm 玻璃平口試管中加入 20 μ L 界面活性劑 [Triton X-100 (J.T.Baker, Cat. NO. JT-X-198-07)] 與萃取液等體積混合 再加入肝脂萃取液 100 μ L，靜置於抽風櫥吹乾溶劑，之後加入 1 mL 的反應試劑；再取兩乾淨試管同樣加入 20 μ L 界面活性劑吹乾，一管加入 40 μ L 200 mg/dL 膽固醇標準品、另一管作為空白試驗同樣加入 1 mL 反應試劑，充分混合之後反應 20 分鐘後取出 200 μ L 至 96 孔盤測定 500 nm 吸光值。經過以下公式計算肝臟膽固醇含量：

$$\frac{\text{TC (mg)}}{\text{Liver (g)}} = \frac{\frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{standard}} - A_{\text{blank}}} \times 80 (\mu\text{g TC}) \times \frac{10 (\text{ml, 定量體積})}{0.1 (\text{ml, 取樣體積})} \times 10^{-3}}{\text{均質肝重 (g)}}$$

$$\frac{\text{TC (mg)}}{\text{Liver (g)}} \times \text{total liver (g)} = \frac{\text{TC (mg)}}{\text{總肝重}}$$

(四). 肝臟非酯化脂肪酸測定

使用市售套組 (Wako Cat. NO. 294-63601, Japan) 分析，藥劑的前置備如前所示，標準品取 1 mM Oleic acid 20 μ L，空白試驗取 10 μ L 二次水；樣品則是取 100 μ L 肝脂萃取液在 6 cm 玻璃平口試管在抽風櫃中吹乾。在標準品、空白試驗及樣品中加入 200 μ L 的 color reagent A 震盪混合均勻後在 37°C 反應 10 分鐘，再加入 400 μ L 的 color reagent B 震盪混合均勻後在 37°C 反應 10 分鐘，取出回溫後取 200 μ L 至 96 孔盤以 550 nm 測定吸光值。之後以下公式計算 NEFA 含量：

$$\frac{\text{NEFA (mmol)}}{\text{Liver (g)}} = \frac{\frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}}{A_{\text{standard}} - A_{\text{blank}}} \times 20 (\text{nmol NEFA}) \times \frac{10 (\text{ml, 定量體積})}{100 (\mu\text{L, 取樣體積})}}{\text{均質肝重 (g)}}$$

$$\frac{\text{NEFA (mmol)}}{\text{Liver (g)}} \times \text{total liver (g)} = \frac{\text{NEFA (mmol)}}{\text{總肝重}}$$

十六、抽取 mRNA (Extraction of total RNA)

原理為利用 TRIZOL 將 DNA 與 RNA 自組織或細胞中分離出來，再利用 chloroform 分離 DNA 與 RNA，之後以 isopropanol 進行沈澱，接下來經過 DNA 去除處理後得到的 RNA 可進行逆轉錄 (reverse transcription)，最終產物互補的 DNA (complementary DNA; cDNA) 可作為之後即時聚合酶連鎖反應 (real-Time Polymerase chain reaction; rt-PCR) 模板。

1. 事前準備

準備含有 1 mL TRIZOL (Life technologies, Cat. NO. 15596081) 的 2 mL 微量離心管；經過 75% 酒精與 RNase OUT 消毒過的剪刀、鑷子和均質棒；以市售的 RNase-free 純水與絕對酒精 (Fisher, Cat. NO. BP2818) 配製成 75% 酒精保存於 -20°C 冰箱備用。

2. RNA 抽取

- (1) 取出保存於 -80°C 組織，放入含有 1 mL TRIZOL 的 2 mL 微量離心管中均質完全後於室溫靜置 5 分鐘。
- (2) 加入 200 μ L Chloroform (Sigma, Cat. NO. SI-C2432)，震盪 15 秒後室溫下靜置 5 分鐘後以 4°C, 12000 rpm 離心 15 分鐘，取上清液至新的 RNase-free 的 1.5 mL 離心管。
- (3) 加入 500 μ L Isopropanol (Fisher, Cat. NO. BP2618)，溫和混勻後於室溫靜置 10 分鐘，由 4°C, 12000 rpm 離心 10 分鐘，移除上清液得 RNA 沈澱。
- (4) 以 1 mL 75% 冰冷酒精沖洗 2~3 次後，以 4°C, 7500 rpm 離心 10 分鐘後置於抽風櫥乾燥 RNA 沈澱。
- (5) 以適量的 RNase-free water 回融 RNA 沈澱。
- (6) 肝臟 RNA 稀釋 10 倍後取 2 μ L 至 μ DropTM Plate (Therom, NI2391) 以 ELISA reader 測得 A260 / A280 ratio 和濃度，確認比值接近 2.0 後進行下一步去除 DNA。抽取的 RNA 取部分立即進行反轉錄成 cDNA，其餘長期保存於 -80°C 冰箱。

3. 去除 DNA

以市售套組 TURBO DNA-free™ kit (Cat. NO. AM1907) 去除 DNA：

Component	需要量
4 µg RNA + RNase-free water	10 µL
10 X Buffer	1 µL
TURBO DNase (2U/µL)	0.25 µL
Total	11.25 µL

將上述樣品與試劑混合後，在 37°C 反應 30 分鐘後再加入 0.5 µL TURBO DNase，使最終體積達 11.75 µL 再次於 37°C 反應 30 分鐘後加入 2 µL 25 mM EDTA，偶爾翻轉 5 分鐘使其與 DNase 充分結合後失活。最後以桌上型離心機離心取上清液約 11.2 µL 至新的八連排離心管。

4. RNA 反轉錄成 cDNA

其原理為利用逆轉錄酶，將單股 RNA 逆轉錄為互補 DNA。本實驗使用法轉錄市售套組 SuperScript® IV Reverse Transcriptase (Fisher, Cat. NO. 18090010)

(1). 製備 Random hexamer

Component	需要量
RNA	11.2 µL
50 Mm Random hexamers	1 µL
10 mM dNTP mix	1 µL
Total	13.2 µL

將 50 Mm Random hexamers 與 10 mM dNTP mix 估算好體積後預混好加入 RNA 溶液中。在 65°C 反應 5 分鐘後，冰上冷卻 1 分鐘。

(2). 接續上步驟加入反轉錄酵素試劑

Component	需要量
5 X SSIV buffer	4 μ L
0.1 M DTT	1 μ L
RNase OUT	1 μ L
SuperScript® IV	1 μ L
Total	20 μ L

將最終體積為 20 μ L 的八連排離心管放入 PCR machine (FlexCycle2 basic unit) 中，設定反應程序為於 23°C, 10 分鐘、55°C, 10 分鐘、80°C, 10 分鐘。等待反應結束後取出加入 0.4 μ L RNase H 37°C, 20 分鐘後即完成了第一股 cDNA 合成，儲存於 -20°C 冰箱。

十七、即時聚合酶鏈鎖反應 (Quantitative Real-time PCR, qRT-PCR)

使用 SYBR Green system (QuantiNova SYBR Green PCR kit Act. No. 208056) 來進行 qRT-PCR，其原理為加入能與雙股 DNA 嵌合而釋放螢光的物質 SYBR Green，透過偵測螢光訊號強度來定量 PCR 產物，當目標 DNA 含量越高時，螢光偵測會越早達到閾值，得到循環數值 (cycle threshold, Ct) 與目標基因表現量會成反比，除以 internal control 的 Ct 值之後即可進行計算，做組間比較。

1. 稀釋 cDNA：

為了使 qRT-PCR 的 Ct 值落在 20~30 左右，先適當的將 cDNA 稀釋至適當的濃度。

第二章 母親高膽固醇血症對子代成年代謝性疾病的影響

2. 反應試劑組成比例：

Component	需要量
cDNA	2 μ L
primer	0.5 μ L
ddH ₂ O	7.4 μ L
ROX	0.1 μ L
SYBR Green	10 μ L
Total	20 μ L

計算除 cDNA 以外的試劑需要量，預先混合加入 96 well PCR Plate (Gunster, MB-Q200) 中，再加入 2 μ L cDNA 至每個 well。

3. 上機

使用 Applied Biosystem® 7500 Real-time PCR System 進行 PCR 定量分析，上機程式設定：

Step	Time	Temperature (°C)
PCR initial heat actination	2 min	95°C
2-step cycling (40 cycles)		
Denaturation	10 s	95°C
Combined annealing/extension	50 s	60°C
Dissociation cure analysis		

本實驗以 18S rRNA 作為 internal control，引子使用如附表 (表 二-4)。

4. 結果計算

$$\Delta C_T = C_T \text{ value of target gene} - C_T \text{ value of internal control}$$

$$\Delta\Delta C_T = C_T \text{ value of each sample} - \text{average } C_T \text{ of control group}$$

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

十八、純化基因組 DNA (Genomic DNA Purification)

使用市售套組 MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre, Cat. NO. MC85200)。



1. 藥品配置

- (1) 稀釋 Proteinase K：每個樣品需要包含 1 μ L Proteinase K 的 2X T and C Lysis Solution，配好暫存於冰上。
- (2) RNase A (Bio Basic Inc. Cat. NO. 9001-99-4) 配製：以二次水配成 25 mg/mL 的 RNase A 試劑，保存於 -20°C 。

2. 裂解組織樣品

- (1) 將組織放置於 2 mL 的微量離心管，加入 300 μ L PBS 進行均質。
- (2) 加入 300 μ L 包含 Proteinase K 的 2x T&C Lysis Solution，混合後在 65°C 水浴 15 分鐘，並每 5 分鐘劇烈混合一次。
- (3) 在 37°C 中降溫後，加入 12 μ L 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ RNase A，混合均勻後，在 37°C 水浴 30 分鐘。
- (4) 冰上放置 3~5 min，之後進行 DNA 的沈澱，得約 600 μ L 均質液

3. 沈澱 DNA

- (1) 加 300 μ L MPC Protein Precipitation Reagent 至 600 μ L 均質液中確實混和。
- (2) 10000g, 4°C 離心 10 分鐘，可得到蛋白質沈澱，將上清液移至乾淨的 2 ml 微量離心管，將沈澱塊丟棄。
- (3) 加入 1000 μ L 100% isopropanol (Fisher, Cat. NO. BP2618) 後，慢慢翻轉 30~40 次，以 10000g, 4°C 離心 10 分鐘，留下 DNA 沈澱。
- (4) 用 1 mL 70% 酒精清洗三次後，靜置於抽風櫃風乾。
- (5) 依照 DNA 沈澱的大小加入適當的 ddH₂O 回融。
- (6) 以 1% 洋菜膠電泳確認 RNA 是否被完全去除。

- (7) 取 2 μ L 至 μ Drop™ Plate 測得 A260 / A280 ratio、A260 / A230 ratio 以及濃度。DNA 的 A260 / A230 為 1.7~1.9; A260 / A280 為 2.0~2.4 為佳。



十九、DNA 甲基化定序分析 (DNA Methylation analysis)

(一). 重亞硫酸鈉轉換 (Bisulfite Conversion)

Bisulfite Sequencing 為基因甲基化中最常見的方式，其原理為經過 Sodium Bisulfite 處理過的 DNA，可將未甲基化的胞嘧啶 (cytosine, C) 轉變成尿嘧啶 (Uracil, U)，而有甲基化的胞嘧啶則維持不變，之後進行 PCR 時則會將尿嘧啶轉換成胸腺嘧啶 (Thymine, T)，因此只要將 PCR 產物透過定序的方式對比資料庫序列，即可計算出基因甲基化的比例。此步驟我們使用市售套組 EpiMark® Bisulfite Conversion Kit (NEW ENGLAND BioLabs INC. Cat. NO. E3318S)，先進行 bisulfite conversion，接下來進行 desulphonation 反應後，純化出 DNA，即可使用於 PCR。

1. 藥品配置

- (1) wash buffer 配製: 使用前加入 40 mL 絕對酒精至 wash buffer
- (2) Desulphonation Reaction Buffer 配製: 使用前加入 27 mL 絕對酒精至 Desulphonation Reaction Buffer
- (3) Bisulfite mix 配製: 加入 650 μ L nuclease-free H₂O 與 250 μ L Solubilization Buffer 至 solid sodium metabisulfite 完全混合後使用

2. 實驗步驟

- (1) 在 0.2 mL PCR tube 加入 2 μ g 的 Genomic DNA 10 μ L 以及 130 μ L Bisulfite mix，溫和的混和後即可上機。
- (2) 上機條件: 95°C, 5 分鐘, 65°C, 30 分鐘, 95°C, 5 分鐘, 65°C, 60 分鐘, 95°C, 5 分鐘, 65°C, 90 分鐘, 之後停在 20°C。
- (3) 轉化後的產物與 DNA Binding Buffer 短暫翻轉，加到有 EpiMark spin column 的 collection tube 離心，流洗液丟棄，以 Wash Buffer 流洗 1 次。

- (4) 加入 500 μL Desulphonation Reaction Buffer，室溫下靜置 15 分鐘後離心，流洗液丟棄，以 500 μL Wash Buffer 流洗 2 次。最後離心 12,000 g, 3 分鐘，將殘餘的 wash buffer 丟棄。
- (5) 將 spin columns 移到新的滅菌過的 1.5 mL 微量離心管，加入 20 μL Elution Buffer, 靜置 2~5 分鐘後離心 12,000 g, 2~3 分鐘，再重複回融一次，共得 20 μL 的產物，之後可直接進行 PCR。
- (6) bisulfite-converted DNA 脆弱易斷，轉化完成後儘早進行 PCR，全程在冰上使用，不可劇烈的震盪，若無法當天完成，暫存於 -20°C 。

(二). 硫酸氫鹽轉化之後的聚合酶鍊式反應 (PCR for Bisulfite Conversion)

本實驗使用適合表觀遺傳 (epigenetics) 分析的酵素 EpiMark® Hot Start Taq DNA Polymerase Guidelines for PCR (NEW ENGLAND BioLabs INC. Cat. NO. M0490)，對於 bisulfite-converted DNA 或是 AT-rich 模板具有高度的敏感性。

1. 反應試劑組成比例

Component	需要量
Bisulfite-converted DNA	2~5 μL
5X EpiMark® Hot Start Taq Reaction Buffer	5 μL
10 mM dNTPs	0.5 μL
10 μM Forward Primer1	0.5 μL
10 μM Reverse Primer1	0.5 μL
EpiMark® Hot Start Taq DNA Polymerase	0.125 μL
Nuclease-free water	to 25 μL
Total	25 μL

¹primer 序列：於列表 (表 二-5)

將反應試劑添加到 PCR tube 輕拍混勻，離心後即可上機。

2. 上機條件

Step	Time	Temperature (°C)
Initial denaturation	30 s	95°C
2-step cycling (37 cycles)		
Denaturation	15 s	95°C
annealing/extension	1 min per kb	依 primer T _m 值
Final extension	5 min	65°C

3. 電泳確認產物

PCR 產物需要以電泳，確認產物是否為單一的目標產物。

(1). 鑄膠

50X TAE buffer (Omics Bio Cat. NO. 1B3211) 稀釋成 1X 之後用於配製 1.5~2% 洋菜膠 (Agarose Low EEO) (FOCUSBio Cat. NO. FB-HA0604)，微波溶解均勻後添加體積 1/20000 的安全染劑 BioGreen safe DNA Gel buffer (Biomax Cat. NO.SDB001T) 混和倒入鑄膠台，插上齒梳待其凝固後可進行電泳。

(2). 電泳

取 2 μ L 的 PCR 產物，加入 8 μ L 二次水與 6X 追蹤染料 (tracking dye)，混和之後以 100V, 30 分鐘進行電泳，藉由產物大小來確認是否為目標產物，並辨別是否僅有單一產物存在。

4. 純化產物 DNA (Purify DNA)

得到單一目標產物後，可直接使用市售套組 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN Cat. NO. 28706) 來純化；若有多個產物，需進行跑膠將含有目標產物的膠塊切下，以同樣的套組進行純化。最後將 DNA 以 20 μ L 的二次水重複回融兩次。

(三). 放大目標序列

為了大量複製目標基因產物，會將純化完成的 DNA 插入 TA 克隆 (TA cloning) 載體，進行連接反應 (ligation)，之後再將此載體透過熱休克的方式送入 Competent Cell 中，在含有 LB/ampicillin 的培養基中培養 16 小時長出菌落，之後以重組 DNA 檢定 (colony PCR) 的方式，篩選出連接成功的菌落，純化出質體，之後進行定序。

5. 配製培養基

(1). LB medium 與 LB plate with ampicillin 配製

Component	LB medium	LB plate with ampicillin
Bacto-tryptone ¹	10 g	10 g
Becto-yeast extract ¹	5 g	5 g
NaCl ¹	5 g	5 g
100 mg/ml ampicillin ¹		50~100 μ L
Agar ¹		15 g
Total	1 L	1 L

¹source: Bacto-tryptone (BD Biosciences. Cat. NO. 211705), Becto-yeast extract (BD Biosciences. Cat. NO. 212750), NaCl (SIGMA Cat. NO. 3), Agar (FOCUSBio Cat. NO. IBA-AGAR)

將加入 agar 的 LB medium 滅菌放涼到約 50°C 後，添加 ampicillin 至最終濃度為 100 μ g/mL，之後倒入 90 mm 的培養皿中，凝固後在 4°C 避光保存，一個月內使用完畢。

第二章 母親高膽固醇血症對子代成年代謝性疾病的影響

(2). SOC medium 配製

Component	SOC medium
Bacto-tryptone	2 g
Becto-yeast extract	0.5 g
1M NaCl	1 mL
1 M KCl	0.25 mL
2M Mg ²⁺ stock	1 mL
2M glucose	1 mL
Total	100 mL

先將 Bacto-tryptone、Becto-yeast extract、NaCl、KCl 以二次水混合均勻，滅菌放涼後添加 Mg²⁺ 與 glucose，調整 pH 值為 7.0，定量到 200 mL。

6. 連接反應 (ligation)

此步驟使用 T&A™ Cloning Vector Kit (Yeastern Biotech Cat. NO. FYC001-20P)，來進行 ligation。

(1).連接反應試劑比例

Component	Standard Rxn	Negative Rxn
Ligation Buffer A	1.5 µL	1.5 µL
Ligation buffer B	1.5 µL	1.5 µL
T&ATM Cloning Vector	1 µL	1 µL
PCR product	10 µL	-
ddH2O	-	10 µL
yT4 DNA ligase	1 µL	1 µL
Total	15 µL	15 µL

將反應物加入 PCR tube 後，輕拍混勻，在 4°C 冰箱反應 16~24 小時後拿起，接下進行轉型作用。



7. 轉型作用 (transformation)

- (1) 將保存於 -80°C 的 E. coli Competent Cells (Yeastern Biotech Cat. NO. HYE307-C01) 取出，在冰上溫和解凍後，輕拍混勻。
- (2) 小心地取出 $20\ \mu\text{L}$ Competent Cells 至 $1.5\ \text{mL}$ 微量離心管，再將連接完成的產物緩慢的加入，輕拍混勻。
- (3) 混和後放置冰上 20 分鐘，使 ligation 產物附著 Competent Cells 細胞膜。
- (4) 水浴 $40\sim 50$ 秒，使 Competent Cells 的細胞膜通道打開讓載體進入。
- (5) 在冰上放置 2 分鐘，關閉細胞膜通道。
- (6) 加入室溫的 SOC medium $100\ \mu\text{L}$ ， 37°C 下培養 1 小時，修復細胞膜。
- (7) 取 $110\ \mu\text{L}$ Transformation 完成的 Competent Cells 進行在 LB/ampicillin 培養基中塗盤，在 37°C 下培養整晚 ($16\sim 24$ 小時)。

8. 重組 DNA 檢定 (Colony PCR)

使用 KAPA Taq ReadrMix (KAPABIOSYSTEMS Cat. NO. KR0354) 以及套組內附的 Colony Primer (M13) 進行檢定，挑選接合成功的菌落進行放大。

(1). Colony PCR 反應試劑比例

Component	1 Rxn
2X KAPA Taq ReadrMix	$5\ \mu\text{L}$
$10\ \mu\text{M}$ Forward primer	$0.2\ \mu\text{L}$
$10\ \mu\text{M}$ Reverse primer	$0.2\ \mu\text{L}$
ddH ₂ O	$4.6\ \mu\text{L}$
Colony	-
Total	$15\ \mu\text{L}$

(2) 步驟

- i. 用滅菌過的牙籤或是微量吸管 (tips) 沾取菌落，在含有 KAPA Taq ReadrMix、primer、ddH₂O 的 PCR tube 中攪散作為模板。
- ii. 同時將同個牙籤在含有 LB/ampicillin medium 的 96 孔盤中攪拌，標注好之後，放置於 37°C 中培養 4 小時。
- iii. 將上述 PCR 之後的產物進行跑膠，根據產物大小確認接合作用是否成功。

9. 質體 DNA 的純化 (Purification of plasmid DNA)

將確認過成功的菌落，自 96 孔盤取出約 15~25 μ L 菌液，加到含有 4 mL LB/ampicillin medium 培養管中，在台大生化科技系李昆達老師實驗室的 37°C 大型震盪培養箱培養過夜。菌液離心沈澱之後使用市售套組 Presto™ Mini Plasmid kit (Geneaid Cat. NO. PDH300) 純化出質體 DNA，之後使用限制酶切 Hind III (NEW ENGLAND BioLabs INC. Cat. NO.R014S) 位置，跑膠以分子量大小確認純化後的質體是否為目標產物。

10. 定序 (sequencing)

將純化確認過的產物，取 0.2~0.4 μ g/5 μ L ddH₂O 的 plasmid DNA 委託台灣大學生技中心進行 M13F 定序，之後以線上軟體 MAFFT version 7 將定序結果與原序列比較，得出受到甲基化的 CG 位點，每隻小鼠定序 9~18 個 clones，並計算百分比。

二十、統計分析

數據 mean \pm SEM (standard error of the mean) 來表示。實驗數據使用 SPSS 軟體進行統計，首先將所有數據經過預檢分析，以 Shapiro-Wilk 常態性檢定確認數據殘差是否符合常態分佈，若為常態分佈，接下來以 F 檢定確定變異數是否相等，之後以獨立樣本 T 檢定進行 CC 與 WC 的組間比較；若非常態分佈則以無母數分析的 Mann-Whitney U-test 來進行統計分析。分析結果如有顯著差異會以 * 表示，* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001。

第二章 母親高膽固醇血症對子代成年代謝性疾病的影響



表 二-4 qRT-PCR 使用的引子列表
Table 2-4. Primers used for qRT-PCR

Protein	Gene	NCBI Reference Sequence	Forward Primer	Reverse Primer
Adiponectin	<i>Adipoq</i>	NM_009605.5	TGA CGA CAC CAA AAG GGC TC	CAC AAG TTC CCT TGG GTG GA
ACC2	<i>Acacb</i>	XM_006530114.3	CCT TTG GCA ACA AGC AAG GTA	AGT CGT ACA CAT AGG TGG TCC
Acox1	<i>Acox1</i>	NM_001271898.1	GAA GAT GAG GGA ATT TGG CA	CCT GAT TCA GCA AGG TAG GG
ApoB	<i>Apob</i>	XM_006515078.1	GCC ATG TCC AGG TAC GAA CT	AGA TGA TGC CCC TCT TGA TG
Atgl	<i>Pnpla2</i>	NM_025802.3	ATGGTCCTCCGAGAGATGTG	CTCCAGCGGCAGAGTATAGG
Cd36	<i>Cd36</i>	NM_001159555.1	CCT TAA AGG AAT CCC CGT GT	TGC ATT TGC CAA TGT CTA GC
CD68	<i>Cd68</i>	XM_021177744.1	CTT CCC ACA GGC AGC ACA G	AAT GAT GAG AGG CAG CAA GAG G
ChREBP	<i>Mlxipl</i>	NM_021455	TTC AAA GGC CTC AAG TTG CT	GGT CAC GAA ACC ACA CAC TG
Cpt1a	<i>Cpt1a</i>	XM_006531658.3	CCA GGC TAC AGT GGG ACA TT	GAA CTT GCC CAT GTC CTT GT
Dgat1	<i>Dgat1</i>	XM_017316426.1	TCC GCC TCT GGG CAT TC	GAA TCG GCC CAC AAT CCA
Dgat2	<i>Dgat2</i>	NM_026384.3	AGT GGC AAT GCT ATC ATC ATC GT	AAG GAA TAA GTG GGA ACC AGA TCA
F4/80	<i>Adgre1</i>	NM_001355722.1	AAT GCT ACC TTC ACA ATC CTT GA	ATT CCC AGA GGG TAT CAG AAG AG
Fabp3	<i>Fabp3</i>	NM_010174.1	TGG TCA TGC TAG CCA CCT G	CTT TGT CGG TAC CTG GAA GC

第二章 母親高膽固醇血症對子代成年代謝性疾病的影響

Protein	Gene	NCBI Reference Sequence	Forward Primer	Reverse Primer
Fabp-pm	<i>Got2</i>	NM_010325.3	ATC TGG AGG TCC CAT TTC AA	ATG GCT GCT GCC TTT CAC
Fasn	<i>Fasn</i>	NM_007988.3	GCT GCG GAA ACT TCA GGA AAT	AGA GAC GTG TCA CTC CTG GAC TT
FATP1	<i>Slc27a1</i>	NM_011977.4	GGC AAG CTC CAG CAC AGG AT	CGC CGT CTT GCA GAC GAT A
FgF21	<i>Fgf21</i>	NM_020013.4	ACG ACC AAG ACA CTG AAG CC	GGA GAC TTT CTG GAC TGG G
Gpat1	<i>Gpat1</i>	NM_001356285.1	TGG GAT ACT GGG GTT GAA AA	GGA AGG TGC TGC TAT TCC TG
Gpat2	<i>Gpat2</i>	XM_006499138.3	GCT GCC AGA CCT GTA CTC CT	AGC CCA GGT CCA TTA TGC TT
Gpat3	<i>Gpat3</i>	NM_172715.3	GTG CTG GGT GTC CTA GTG C	AAG CTG ATC CCA ATG AAA GC
Gpat4	<i>Gpat4</i>	NM_018743.4	CCA CCC TGA GAA TGG AGA GA	TCC AGA GAA GTG GGA TCT TTT G
Hsl	<i>Lipe</i>	NM_001039507.2	AGA CAC CAG CCA ACG GAT AC	GGG CAT AGT AGG CCA TAG CA
LXR α	<i>Nr1h3</i>	XM_006499168.2	ACT TCA GTT ACA ACC GGG AAG A	GCT CTG GAG AAC TCA AAG ATG G
Lpl	<i>Lpl</i>	NM_008509.2	AAT TTG CTT TCG ATG TCT GAG AA	CAG AGT TTG ACC GCC TTC C
Mttp	<i>Mttp</i>	NM_008642.2	CAA GCT CAC GTA CTC CAC TGA AG	TCA TCA TCA CCA TCA GGA TTC CT
Pepck	<i>Pck1</i>	NM_011044.3	ATG CTG ATC CTG GGC ATA AC	AAC TTC ATC CAG GCG ATG TC
Ppar α	<i>Ppara</i>	XM_006520624.3	ACT ACG GAG TTC ACG CAT GTG	TTG TCG TAC ACC AGC TTC AGC

第二章 母親高膽固醇血症對子代成年代謝性疾病的影響

Protein	Gene	NCBI Reference Sequence	Forward Primer	Reverse Primer
PPAR γ	<i>Pparg</i>	NM_001308354.1	AGT GGA GAC CGC CCA GG	GCA GCA GGT TGT CTT GGA TGT
Resistin	<i>Retn</i>	NM_022984.4	CCA GAA GGC ACA GCA GTC TT	TCC CCG TCC CTG TCA ACA TA
Scd1	<i>Scd1</i>	NM_009127.4	TTC TTC TCT CAC GTG GGT TG	CGG GCT TGT AGT ACC TCC TC
Sirt1	<i>Sirt1</i>	NM_019812.3	TGA CGA TGA CAG AAC GTC ACA	GAA TTG TTC GAG GAT CGG TGC
Srebf1a	<i>Srebf1</i>	NM_001313979.1	GGC CGA GAT GTG CGA ACT	TTG TTG ATG AGC TGG AGC ATG T
Srebf1c	<i>Srebf1</i>	XM_006532716.2	GGA GCC ATG GAT TGC ACA TT	GGC CCG GGA AGT CAC TGT
Vldlr	<i>Vldlr</i>	NM_001347441.1	CCT ATA ACT AGG TCT TTG CAG ATA TGG	GAG CCC CTG AAG GAA TGC C

第二章 母親高膽固醇血症對子代成年代謝性疾病的影響



表 二-5 硫酸氫鹽轉化聚合酶鍊式反應的引子列表

Table 2-5 Primers used for bisulfite conversion

Gene	No.	Forward Primer	Reverse Primer	region	CpG quantity
<i>AopB</i>	0	TTG GAG AAA GTT AGG GTA TGT TGA	TAA CCA ACC TAC CAC CAA TTT CTA C	272-862	21
<i>AopB</i>	1	TTG GAG AAA GTT AGG GTA TGT TGA	AAA TTA CCA AAA ATC CAA AAA ACA C	272-490	9
<i>AopB</i>	2f	GTG TTT TTT GGA TTT TTG GTA ATT T	TAA CCA ACC TAC CAC CAA TTT CTA C	490-862	12
<i>H19</i>	1	AGG GTA TTT ATA TTT AGG ATT TAA AGG AAT ATG	TTT ATC AAA AAC TAA CAT AAA CCC CTA ACC		
<i>Nr1h3</i>	1	TGT TAA GAA GGA ATT GGA GAA GAG T	AAC CAA AAC AAA CAC CAA CTT TAT AA	843-1228	21
<i>Nr1h3</i>	2	TAA AGA GTT TTT AGG GTG AGG AGA G	CTA CCA AAA AAT CCT TCC TAC TAA C	1228-1445	11

第三節 實驗結果

一、母鼠體重與血液生化指標

由表二-6 可以看到兩組母鼠各有 7 隻，但部分母鼠於懷孕第 18.5 天犧牲取出胚胎，故離乳後樣本數減少。分析血脂之後確認餵食西方飲食實驗孕鼠 (WD 組)-相較餵食控制飲食母鼠 (CD 組)，在懷孕前已誘導出更高的膽固醇血症並持續至子代離乳，血清三酸甘油酯濃度、血糖與體重不論在懷孕前或泌乳期後兩組間則沒有差異。

二、子代出生至 16 週齡犧牲時之體重變化

子代出生體重為綜合本實驗雄雌鼠的數據收集與分析，在仔鼠出生當天上午進行體重秤量，由圖二-1 A 看到母鼠餵食控制飲食與西方飲食對仔鼠出生體重並無顯著影響。子代於出生後 21 天 (P21) 離乳，離乳後統一餵食控制飲食 (CD)，兩組體重維持平穩至 13 週齡 (圖二-1 B, C)，但在雌鼠在 16 週齡禁食 12 小時犧牲時觀察到 WC 組體重是顯著重於 CC 組的 (表二-8)。

三、子代攝食量測量

記錄子代在 13~16 週齡每週的個別攝食量變化，除以天數後如圖二-1 D, E 所示，每隻小鼠每天約攝食 3~4 g，平均結果兩組間沒有差異。

四、子代離乳後至 16 週齡犧牲之血脂變化

子代雄雌鼠在離乳時 (3 週齡) 到 13 週齡血脂表現的兩組趨勢類似如圖二-2 所示，剛離乳時，血清三酸甘油酯濃度 WC 組顯著較 CC 組高 (雄鼠, $p < 0.01$; 雌鼠, $p < 0.001$); 血清膽固醇濃度同樣是 WC 組顯著高於 CC 組 (雄鼠, $p < 0.01$; 雌鼠, $p < 0.001$)，離乳後統一餵食控制飲食後 WC 組血三酸甘油酯與膽固醇濃度下降與 CC 組幾近重合，延續至子代犧牲，如圖二-3 A~D 所示。另外在子代雌鼠 16 週齡測量禁食 12 小時後血清中的非酯化脂肪酸 (NEFA) 濃度反而看見 WC 組低於 CC 組的現象 ($p < 0.05$) (圖二-3 F)，雄鼠則沒有差異 (圖二-3 E)。

五、子代腹腔注射葡萄糖耐受性測試 (IPGTT)

子代於 14 週齡時進行葡萄糖耐受性測試，於上午開始禁食 6 小時後注射 1g/kg 劑量的葡萄糖溶液，結果雄鼠在初始禁食 6 小時的血糖值與注射葡萄糖之後 15 與 30 分鐘的血糖值兩組間無差異，到 90 與 120 分鐘後 CC 組與 WC 組差距開始加大 (90 分鐘, $p < 0.01$; 120 分鐘, $p < 0.001$)，WC 組的血糖下降較 CC 組來得慢，計算血糖曲線下面積發現 WC 組也較 CC 組大 ($p < 0.05$)，顯示雄鼠 WC 組的葡萄糖耐受性較 CC 組差 (圖 二-4 C)；而雌鼠各個時間點以及曲線下面積兩組間無差異 (圖 二-4 B, D)。

六、子代胰島素耐受性測試 (ITT)

子代 15 週齡時進行 ITT，禁食 6 小時的情況下注射 0.75 U/kg 的胰島素，雄鼠在初始禁食 6 小時的血糖值並無差異，但在注射胰島素後的 15、30、60 分鐘 CC 組血糖值下降的幅度較 WC 組大 (15 分鐘, $p < 0.01$; 30 分鐘, $p < 0.05$; 60 分鐘, $p < 0.05$) (圖 二-5 A)，計算曲線下面積也得到 WC 組的面積大於 CC 組 ($p < 0.05$) (圖 二-5 C)；在雌鼠方面則是看到 WC 組禁食 6 小時的血糖高於 CC 組 ($p < 0.01$) (圖 二-5 B)，計算曲線下面積則沒有統計差異 (圖 二-5 D)。

七、子代 16 週齡血糖相關的生化指標

子代小鼠 16 週齡時於上午 9 點測量血糖值，作為飽食血糖值，將飼料取出更換墊料後於下午三點測量血糖值作為禁食 6 小時血糖；另外自前一晚 8 點將飼料取出更換墊料，隔天上午 8 點統一測量血糖為禁食 12 小時血糖值。結果在禁食 6 小時的血糖值在雄鼠兩組間 WC 組顯著高於 CC 組 ($p < 0.05$) (表 二-7)，雌鼠則沒有差異，但飽食與禁食 12 小時不論雄雌鼠兩組間皆無顯著差異。進一步分析血清，也是禁食 6 小時的時候看到 WC 組的胰島素濃度顯著得高於 CC 組 (雄鼠, $p < 0.001$ ；雌鼠, $p < 0.05$)，以胰島素敏感性測量公式 HOMA-IR 計算得到 WC 組顯著的大於 CC 組的結果 (雄鼠, $p < 0.0001$ ；雌鼠, $p < 0.01$)。此外，我們也有測量 HbA1c 值可能因為樣本數過少兩組並無差異 (表 二-7)。

八、子代 16 週齡胰島素訊號傳遞分析

子代 16 週齡時於犧牲前注射定量胰島素後犧牲，分別觀察禁食 12 小時 (圖二-6、圖二-7) 與 6 小時 (圖二-8、圖二-9) 的在腓腸肌與性腺白色脂肪組織的 Akt 磷酸化程度，結果禁食 12 小時後注射每公斤體重 2U 胰島素後等待 20 分鐘犧牲在雄雌鼠皆未出現統計差異 (圖二-6、圖二-7)；而在禁食 6 小時後同樣注射每公斤體重 2U 胰島素後等待 5 分鐘犧牲的條件下，在 WC 組雄鼠性腺脂肪組織 Akt 磷酸化程度有比 CC 組顯著低的現象 (圖二-8)，說明 WC 雄鼠胰島素信號傳遞可能受損；然而雌鼠兩組則沒有差異 (圖二-9)。

九、子代 16 週齡犧牲組織重量分析

子代於 16 週齡犧牲，禁食 12 小時體重與絕對組織重量結果如表二-8 所示，將絕對重量除以小鼠體重得相對重量，如表二-9。雄鼠在絕對重量上面可以看到體重、肝臟、性腺白色脂肪組織 (gonadal white adipose tissue, gWAT)、皮下白色脂肪組織 (inguinal white adipose tissue, iWAT)、腎周圍白色脂肪組織 (retroperitoneal white adipose tissue, rWAT)、棕色脂肪組織 (brown adipose tissue, BAT) 以及腓腸肌 (gastrocnemius) 與比目魚肌 (soleus) 兩組之間沒有差異；在雌鼠的部分可以看到 WC 組的體重較 CC 組來的重 ($p < 0.05$)，但其餘白色脂肪組織、棕色脂肪組織以及肌肉，重量上皆無顯著差異。而在相對重量上，雄鼠的結果與絕對重量類似，未出現組織重量上點顯著差異；雌鼠相對組織重上則是看到了 WC 組的腓腸肌較 CC 組輕 ($p < 0.05$) (表二-9)，而白色脂肪組織雖然 WC 組都較 CC 組略重但都未有顯著差異，進一步將性腺脂肪組織與腎週圍脂肪加總後除以體重得到的內臟周圍體脂率才能夠在雌鼠看到 WC 組重於 CC 組的趨勢 ($p = 0.08$)，CC 組為 $1.60 \pm 0.15\%$ ，WC 組為 $2.15 \pm 0.29\%$ (圖二-10 B)，雄鼠依然沒有差異 (圖二-10 A)。



十、子代白色脂肪組織細胞大小定量

脂肪細胞大小與胰島素抵抗具正相關性，因此定量了屬於內臟脂肪的性腺白色脂肪組織 (gWAT)，以及腎周脂 (rWAT) 的白色脂肪的細胞大小。

1. 性腺白色脂肪組織 (gWAT) 定量結果

在雄鼠 gWAT 的 H&E 切片染色與定量結果發現 WC 組的脂肪細胞相較於 CC 組有偏小顆的現象，在以 $500 \mu\text{m}^2$ 來進行分佈作圖，可以看到 $<500 \mu\text{m}^2$ 的小顆細胞區間，WC 組有多於 CC 組的現象 ($p < 0.05$)；另外在偏大顆 $2001 \mu\text{m}^2$ 以上的區間則是都出現了 WC 組少於 CC 組的顯著差異 ($p < 0.05$) 如圖二-11B 所示，然而由組織重量與平均細胞體積推估的細胞數則沒有差異，同樣的差異我們也在經過計算的平均數 (圖二-15A) 與中位數看到 (圖二-15B)。在雌鼠的結果與雄鼠不盡相同，雌鼠的 WC 組 gWAT 的細胞相較於 CC 組是偏大顆的，如圖二-12A，但無論是細胞大小分布與估計細胞數都沒有出現統計差異 (圖二-12B)，平均數與中位數結果相同 (圖二-15A, B)。

2. 腎臟周圍白色脂肪組織 (rWAT) 定量結果

rWAT 的細胞分布由 H&E 染色發現子代雄鼠不論 CC 組或是 WC 組大小差異很大，有分布不均的現象 (圖二-13A)，因 rWAT 的大小本身就較小顆，故以 $300 \mu\text{m}^2$ 為區間來做圖，雄鼠的腎周脂的細胞大小定量結果與估計細胞數沒有差異 (圖二-13A)，進一步計算出的平均數與中位數點圖亦然 (圖二-15C, D)；雌鼠的腎周脂定量結果亦無差異，無論是細胞大小分布與估計細胞數 (圖二-14B) 或是細胞大小平均數與中位數 (圖二-15C, D)。

十一、子代肝臟切片染色

子代肝臟的 H&E 的切片染色，拍照時選擇有血管通過的視野，結果看到子代雄鼠 WC 組相較於 CC 組有較多的白色空泡，以油紅染色輔佐推論，該白色空泡可能為脂肪油滴；雌鼠 H&E 切片染色上並無發現兩組有明顯的差異，油紅染色結

果亦然，但在代表 ROS 存在的 DHE 染色 WC 雄雌鼠紅色螢光訊號似乎有比 CC 強的趨勢 (圖 二-16)，顯示 WC 組雄鼠可能有較多的脂肪堆積，且不論雄雌 WC 組的肝臟有較 CC 組多的 ROS 存在。



十二、子代肝脂分析

取 16 週齡犧牲後取得的肝臟，以氯仿與異丙醇進行均質萃取得到的肝脂萃取液，定量其中三酸甘油酯、膽固醇與非酯化脂肪酸的含量，可分別得到每克肝組織的肝脂定量 (圖 二-17) 以及整塊肝臟的定量結果 (圖 二-18)。在雄鼠的肝臟看到有三酸甘油酯 ($p<0.01$)、膽固醇 ($p<0.01$) 與非酯化脂肪酸 ($p<0.01$) WC 組相較於 CC 組有堆積的現象；雌鼠則是在非酯化脂肪酸分析中 WC 組顯著高於 CC 組 ($p<0.01$)，三酸甘油酯與膽固醇未達顯著差異。

十三、子代犧牲後脂蛋白譜分析與血清 ApoB 濃度

為了解釋肝脂堆積的現象是否為脂質運送受阻，我們將子代犧牲後同組同性別血清混和成 200 μ L 進行脂蛋白譜分析，由雄鼠二重複的結果看到，在代表極低密度脂蛋白 (VLDL) 與乳糜微粒殘留物 (CM-R) 的第一個高峰，是有 WC 組是較 CC 組低的現象 (圖 二-19 A)；雌鼠則有三重複的結果，但兩組曲線幾乎重和，看不出差異，(圖 二-19 B)。同一時間點分析血清 ApoB 濃度也呼應此結果，WC 雄鼠血清 ApoB 濃度低於 CC 組 (圖 二-19 C)，雌鼠則沒有差異 (圖 二-19 D)。

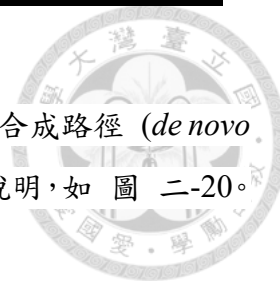
十四、子代肝臟糖代謝相關 mRNA 表現量分析

在葡萄糖耐受性測試以及胰島素耐受性測試上看到 WC 組雄鼠的耐受性較 CC 組差，再加上雄鼠肝脂堆積的情況，因此我們欲由分析肝臟糖產出基因表現的角度來解釋該現象。

分析目標基因有: *Pck1* (PEPCK) 與 *Slc37a4* (Glucose 6-phosphate transporter, G6PT)。PEPCK 作為糖質新生的關鍵酵素，G6PT 則為肝糖合成關鍵因子。但結果發現 *Pck1* 與 *Slc37a4* mRNA 表現量在兩組間並無顯著差異 (圖 二-20 A)。

十五、子代肝臟脂質代謝相關基因 mRNA 表現量分析

欲以基因表現來解釋雄鼠肝脂堆積的現象，可分別由脂質新合成路徑 (*de novo* lipogenesis pathway, DNL)、脂肪酸氧化路徑以及脂肪酸運輸來說明，如圖二-20。



1. 脂質新合成路徑 (De novo lipogenesis pathway, DNL)

分析目標基因有：*Nr1h3* (LXR α), *Srebf1a* (SREBP1a), *Srebf1c* (SREBP 1c), *Mlxipl* (ChREBP), *Acacb* (ACC2), *Fasn* (Fasn), *Scd1* (Scd1), 與 *Dgat2* (Dgat2)。

分析 DNL 相關基因看到 WC 組相比於 CC 組 mRNA 表現量普遍是下降的，最上游的 *Nr1h3* 有下降現象 ($p < 0.05$)，受其調控的 *Srebf1a* 與 *Srebf1c* mRNA 表現量較低 ($p < 0.05$)，受到葡萄糖刺激表現的 *Mlxipl* 同樣也有下降趨勢 ($p = 0.06$)，下游的 *Fasn* ($p < 0.01$) 與 *Scd1* ($p < 0.01$) 可能也隨之下降，而最後一步合成三酸甘油酯的 *Dgat2* 表現量在 WC 組也低於 CC 組 ($p < 0.01$)，這可推測是 WC 組有較多非酯化脂肪酸的原因。

2. 脂質分解與氧化作用

分析目標基因有：*Lipe* (HSL), *Pnpla2* (ATGL), *Sirt1* (Sirt1), *PPARa* (PPAR α), *Fgf21* (Fgf21), *Cpt1a* (Cpt1a) 與 *Acox* (Acox)。結果僅在轉錄因子 *PPARa* 有 WC 組顯著低於 CC 組的趨勢 ($p = 0.05$)，其餘氧化相關基因與脂質分解相關基因在兩組間沒有太大的差異 (圖二-20 C)。

3. 肝臟脂質運輸路徑

分析目標基因有：*Cd36* (Cd36), *Mttp* (Mttp), *Slc27a5* (Fatp5) 與 *ApoB* (ApoB)。

在肝臟攝入脂肪酸的通道蛋白 *Cd36* 兩組並無差異，反而是脂肪酸的轉運蛋白 *Slc27a5* (Fatp5) WC 組相比於 CC 組 mRNA 表現量下降現象 ($p < 0.05$)，另外與 VLDL 排出相關的 *Mttp* 與 *ApoB*，發現 *ApoB* 在 WC 組表現量較 CC 組較低 ($p < 0.05$)，而 *Mttp* 無顯著差異 (圖二-20 D)。

十六、子代性腺脂肪分解作用與脂肪功能基因表現量分析

在白色脂肪組織定量結果看到 WC 組的性腺脂肪相較於 CC 組來的小顆，因此欲分析 WC 組的性腺脂肪功能是否正常，分析脂肪分解目標基因有：*Lipe* (HSL), *Pnpla2* (ATGL), *Cpt1a* (Cptla), *Pparg* (Pparg)；分析脂肪功能與數量相關目標基因有：*Adipoq* (Adiponectin), *Retn* (Resistin), *Adgre1* (F4/80) 與 *Cd68* (Cd68)。

結果發現，*Lipe* 與 *Pnpla2* 兩個脂解酶表現量普遍是 WC 組低於 CC 組的 (*Lipe*, $p<0.05$, *Pnpla2*, $p<0.05$)，與脂肪酸儲存相關的 *Pparg* 出現了 WC 組低於 CC 組的現象 ($p<0.05$)，在脂肪酸氧化相關的 *Cpt1a* 則沒有差異。脂肪功能的部分，我們分析了兩種脂肪細胞激素 (adipokines)，*Adipoq* 與 *Retn* 的基因表現，結果確實是 WC 組較 CC 組低 (*Adipoq* $p<0.05$; *Retn* $p<0.05$)，說明 WC 組的脂肪功能可能較 CC 組差，但在脂肪組織的巨噬細胞表面標記物 *Adgre1* 與 *Cd68* 分析上則沒有差異，如圖二-21。

十七、子代肝臟基因甲基化分析

分析的目標基因有：*Nr1h3* (LXR α) 與 *ApoB*。

Nr1h3 片段具有 11 個 CpG site (圖二-22)，在 CC 組與 WC 組各取 5 隻雄鼠定序 10 個 clones 的情況下發現該片段幾乎沒有出現甲基化的位點，兩組均呈現低甲基化的狀態。*ApoB* 則是一包含轉錄起始點 (TSS)，有 21 個 CpG site 的片段，在兩組各取三隻雄鼠定序 9~19 個 clones，看到 WC 組的有特定位點甲基化程度有較 CC 組高的現象，我們感興趣的整個片段平均 DNA 甲基化程度相比也有同樣的趨勢，且出現統計差異 ($p<0.05$)，如圖二-23 B, C。

十八、懷孕 18.5 天 (E18.5) 胚胎之體重

欲更甚入了解生命早期的子代情況，我們推算母鼠懷孕的日子，於第 18 日取 E18.5 胚胎，兩組各收集三胎，CD 組收集了 22 個胚胎；WD 組則有 16 個。不區分雄雌胚胎一同觀察體重、肝臟重量以及胎盤重量與大小，發現無差異 (表二-10)。

十九、E18.5 子代肝臟脂質代謝相關基因 mRNA 表現量分析

同樣的分析胚胎的肝脂代謝，想了解是否與成鼠有差異。

分析目標基因有：*Nr1h3* (LXR α), *Srebf1a* (SREBP1a), *Srebf1c* (SREBP 1c), *Acacb* (ACC2), *Fasn* (Fasn), *Scd1* (Scd1), *Dgat2* (Dgat2), *ApoB* (ApoB), *Sirt1* (Sirt1), *PPARa* (PPAR α), *Cpt1a* (Cpt1a) 與 *Acox1* (Acox1)。結果顯示屬於 DNL 相關基因在 WC 組相比於 CC 組大部分都上調了 (*Nr1h3* $p<0.05$; *Srebf1a* $p<0.05$; *Srebf1c* $p<0.05$; *Scd1* $p<0.05$)，合成三酸甘油酯的 *Dgat2* 則沒有差異，而與 VLDL 排出相關的 *ApoB* 則有下降的現象 ($p<0.05$) (圖 二-24 A)，另外在偏向脂肪酸氧化的基因 *PPARa*, *Cpt1a* 與 *Acox1* mRNA 表現量是沒有差異，然而 *Sirt1* mRNA 表現量在 WC 組則有顯著的高於 CC 組 ($p<0.05$) (圖 二-24 B)。

二十、E18.5 胎盤脂質傳遞相關基因 mRNA 表現量分析

欲分析胎盤中脂質傳遞相關基因確認 WC 組中是否有較多的脂質通過胎盤傳遞給胎兒。

分析目標有：*Lpl* (Lpl), *Cd36* (Cd36), *Vldlr* (Vldlr), *Fabp3* (Fabp3), *Got2* (Fabp-pm), *Gpat1* (Gpat1), *Gpat2* (Gpat2), *Gpat3* (Gpat3) 與 *Gpat4* (Gpat4)。結果顯示在 WC 組與脂肪酸轉運相關的基因 *Fabp3* 與 *Fabp-pm* 都有顯著得上升 ($p<0.05$) *Cd36* 亦有上升的趨勢 ($p=0.065$)，說明確實有較多的脂肪酸通過胎盤。而與脂蛋白代謝相關的 lipoprotein lipase (Lpl) 以及 VLDL receptor (Vldlr) 也是在 WC 組顯著上升的 (*Lpl* $p<0.05$, *Vldlr* $p<0,01$)。另外參與三酸甘油酯代謝的 glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT) 家族基因表現分析中，*Gpat2*, *Gpat3*, *Gpat4* 也是明顯的在 WC 組上升 (*Gpat2* $p<0.01$, *Gpat3* $p<0,05$, *Gpat4* $p<0,05$) (圖 二-24 C)。

表 二-6 母鼠體重與血液生化指標

Table 2-6 The body weight and blood biochemical analysis of pregnant dams.

		Control dams (CD) (n=5~7)	Western dams (WD) (n=4~7)
Body weight (g)	Before pregnancy	21.52 ± 0.63	23.23 ± 0.75
	After lactation	25.00 ± 1.10	23.89 ± 2.22
Serum triglyceride (mg/dL)	Before pregnancy	64.86 ± 7.36	83.56 ± 19.16
	After lactation	62.88 ± 9.39	43.51 ± 7.81
Serum cholesterol (mg/dL)	Before pregnancy	256.93 ± 18.66	798.31 ± 58.50***
	After lactation	373.12 ± 71.57	1176.94 ± 92.59***
Serum glucose (mg/dL)	Before pregnancy	210.75 ± 31.18	224.50 ± 22.05
	After lactation	143.75 ± 12.58	160.50 ± 40.17

All data were collected after a 4-hour fast. Values are presented as mean ± SEM. Data were analyzed by Independent-Sample T-Test, *** $p < 0.001$ denotes significant between CD and WD group.

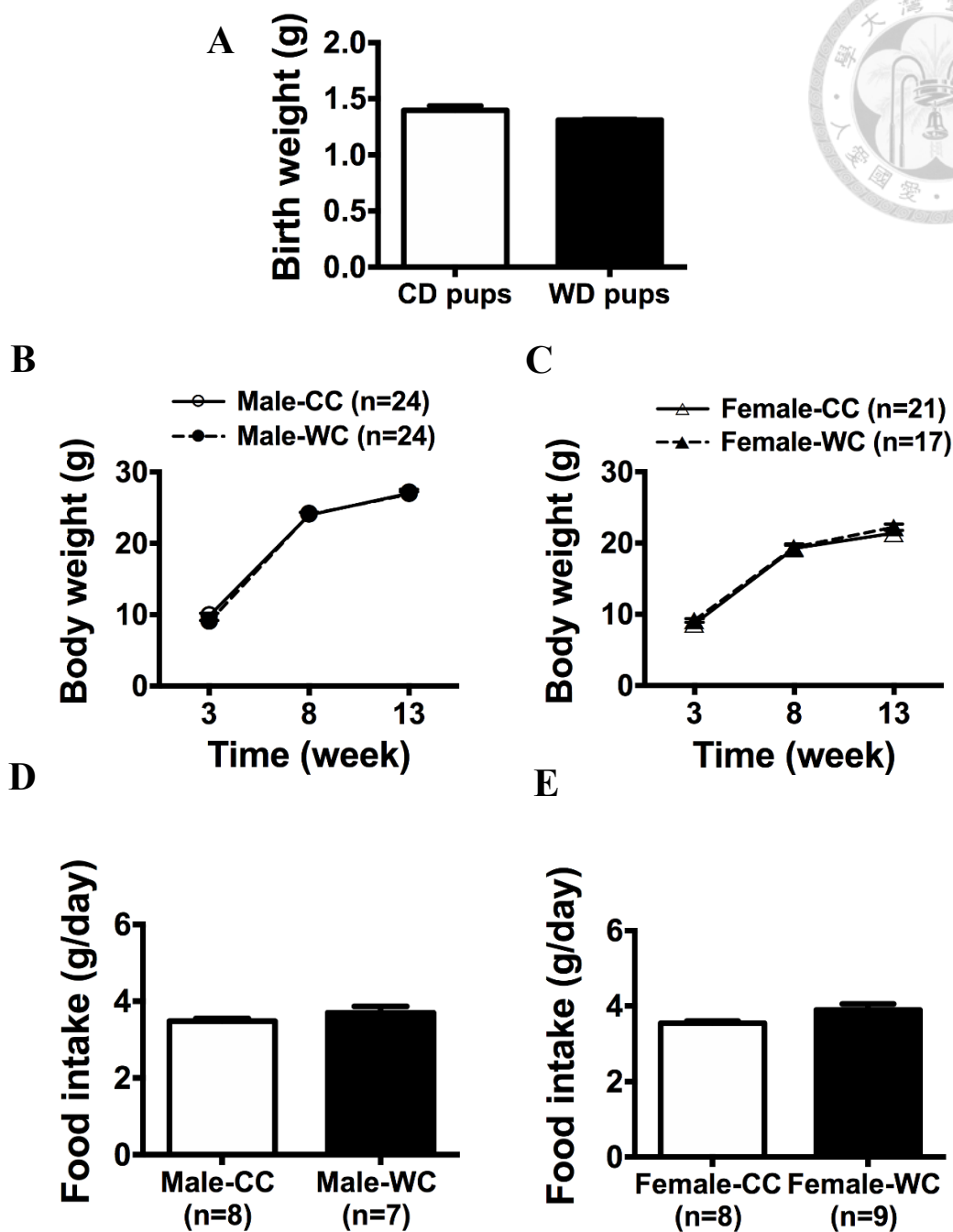


圖 二-1 子代體重變化與攝食量

Figure 2-1 Body weight and food intake of offspring from birth to 16 weeks of age. There was no difference in body weight (A-C) and food intake (D, E) between CC and WC group. The birth weight (A), body weight of male (B) and female (C) offspring at 3, 8 and 13 weeks of age. The values are the means \pm SEM. Data were analyzed by Independent-Sample T-Test, $*p < 0.05$ denotes significant between CC and WC group. CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

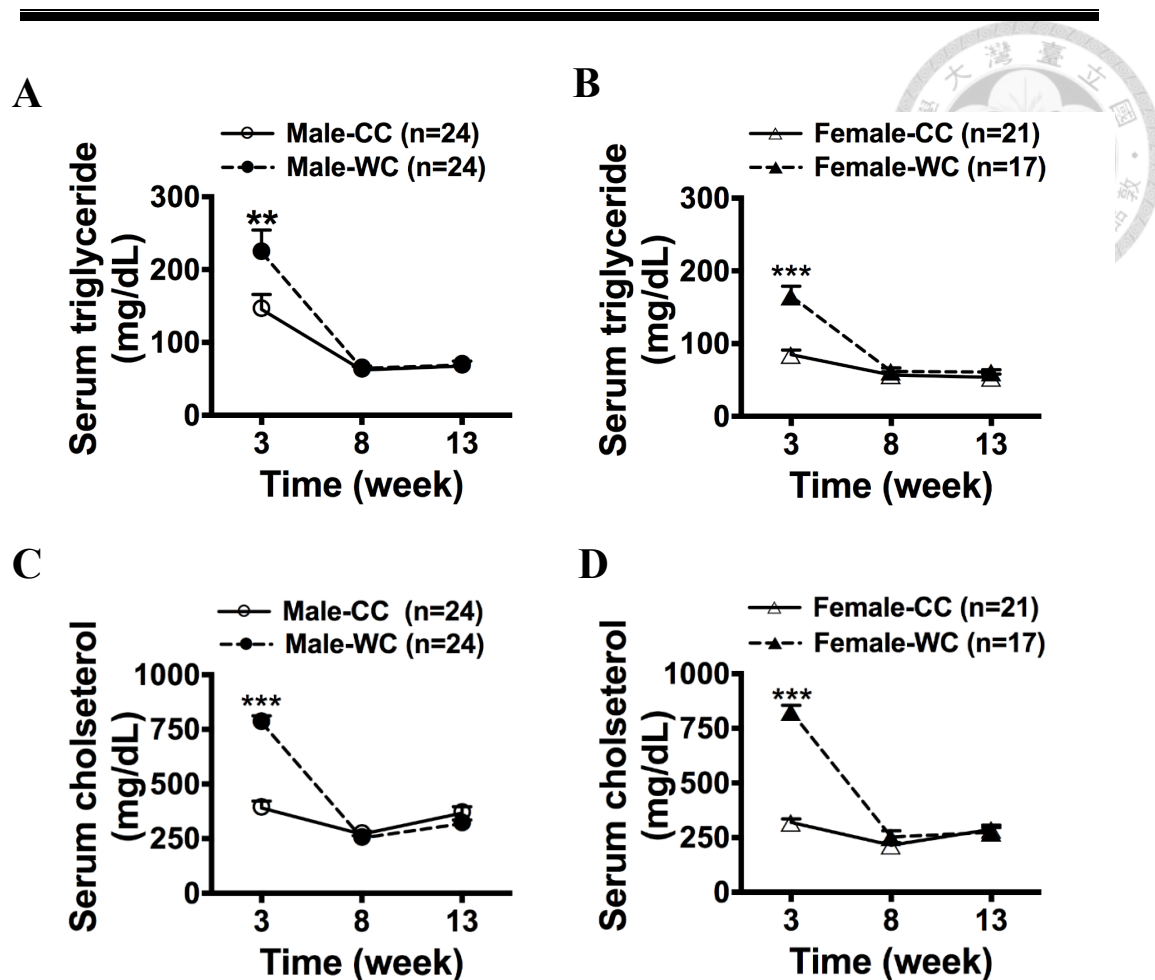


圖 二-2 子代離乳後至犧牲前血脂變化

Figure 2-2 Serum lipid levels of offspring from weaning to 13 week of age.

Maternal hypercholesterolemia led to dyslipidemia in offspring at weaning. Serum triglyceride (A, B), and cholesterol (C, D) levels of male (A, C) and female (B, D) offspring at 3, 8 and 13 weeks of age after a 4-hour fast. The values are the means \pm SEM. Data were analyzed by Independent-Sample T-Test, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ denotes significant different in offspring exposed to a different intrauterine environment. CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

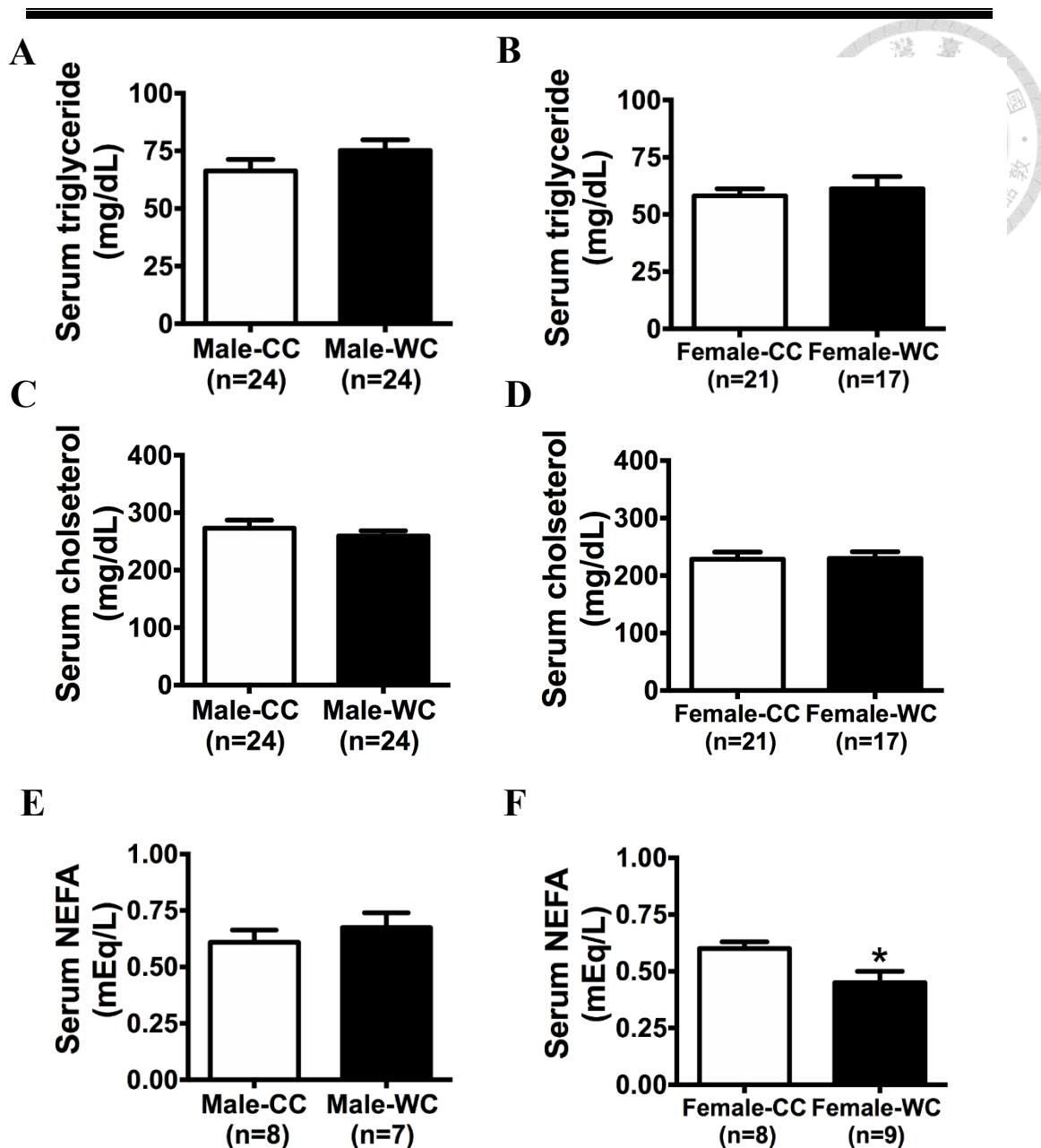


圖 二-3 16 週齡子代犧牲時血脂相關生化指標

Figure 2-3 Serum lipid levels of offspring at 16 weeks of age.

The female WC group had lower serum NEFA levels than CC group, and there was no difference in triglyceride and cholesterol levels between groups. All serum samples were collected in the morning (8:00~12:00 AM). The values are the means \pm SEM. Data were analyzed by Independent-Sample T-Test, * $p < 0.05$, denotes significant difference in offspring exposed to a different intrauterine environment. CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

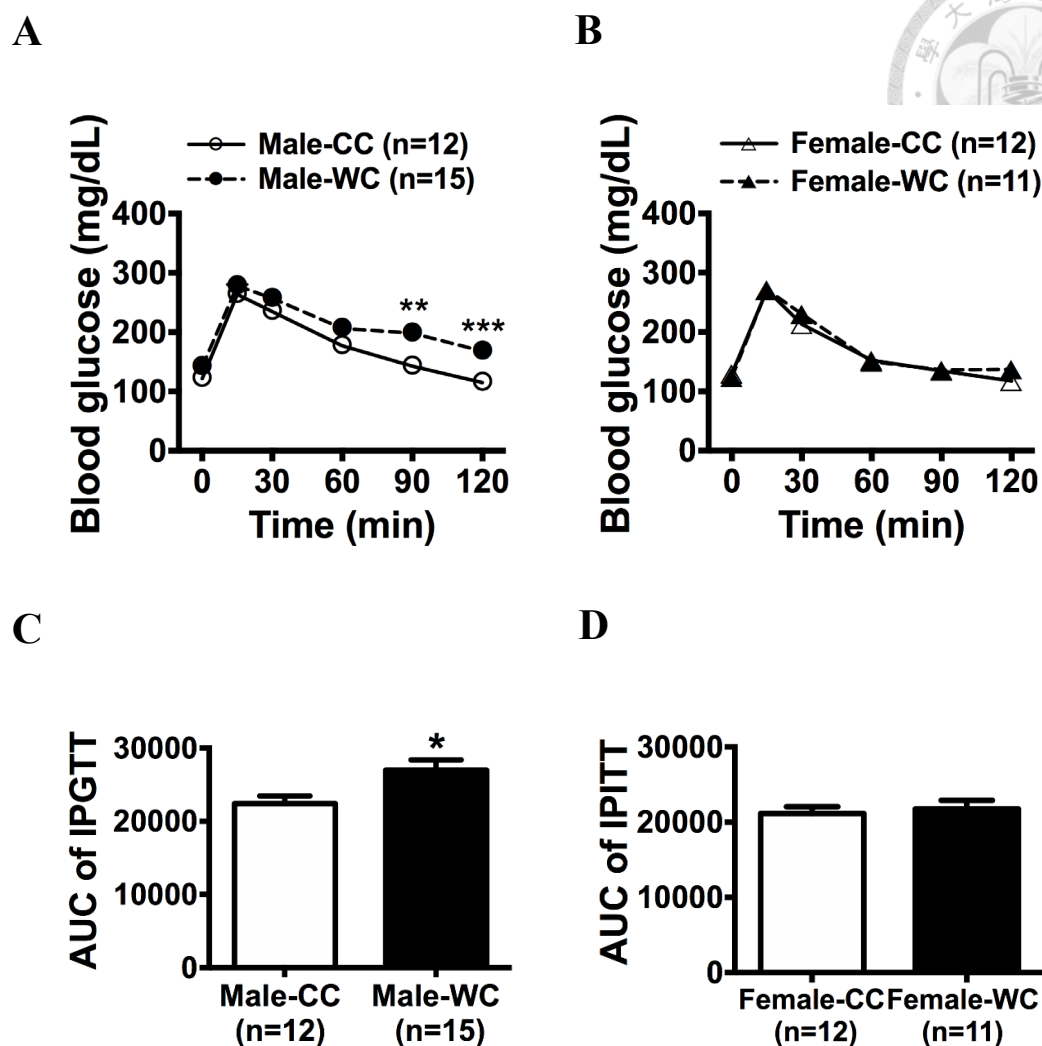


圖 二-4 14 週齡子代葡萄糖耐受性測試 (IPGTT)

Figure 2-4 Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) of offspring at 14 weeks of age.

Maternal hypercholesterolemia impaired glucose tolerance in male offspring. The mice were fasted 6 hours (9:00~15:00). The baseline blood glucose level was measured before experiment, and 1g /kg body weight glucose was injected intraperitoneally. (A, B) Glucose levels of male (A) and female (B) offspring were measured at regular interval of 15, 30, 60, 90 and 120 min. (C, D) Quantification of the area curve (AUC) from GTT results of male (C) and female (D). The values are the means \pm SEM. Data were analyzed by Independent-Sample T-Test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, denotes significant different in offspring exposed to a different intrauterine environment. CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

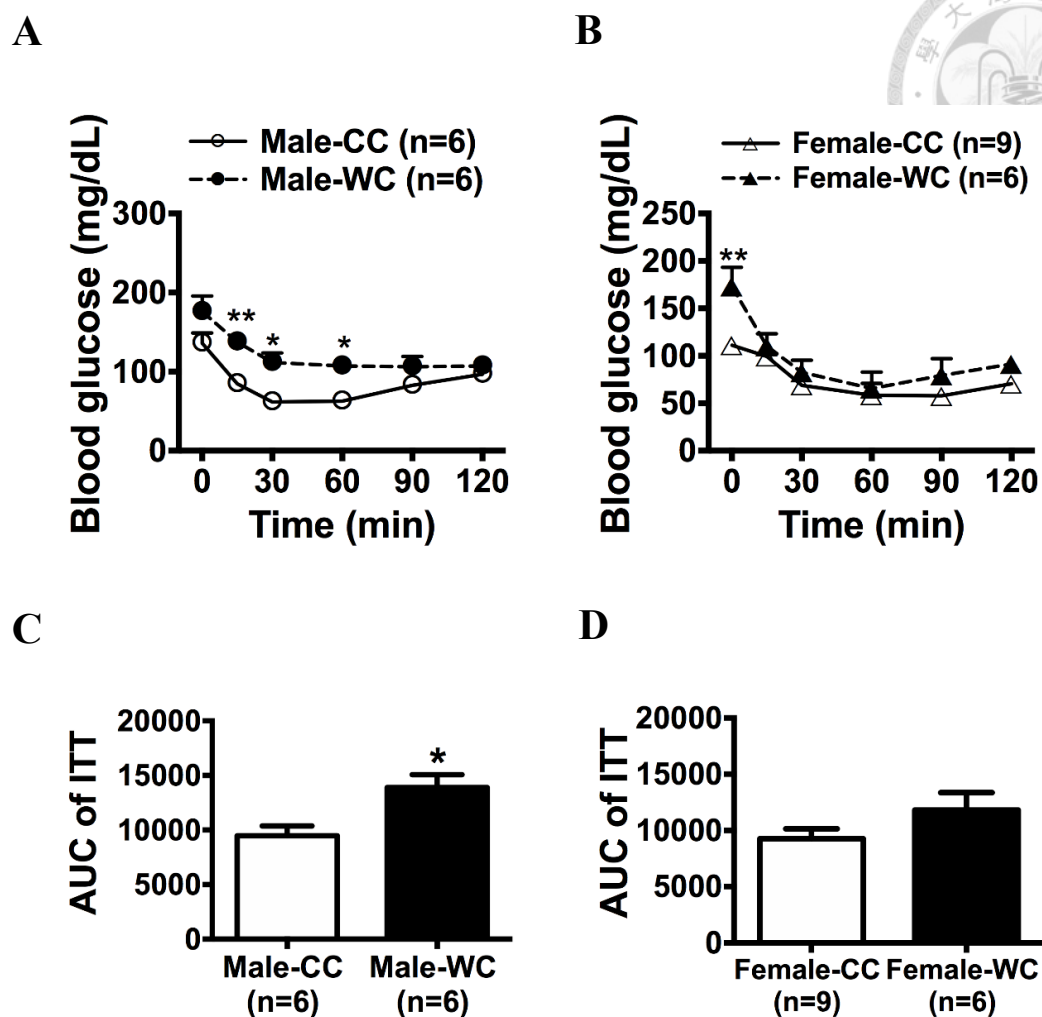


圖 二-5 15 週齡子代胰島素耐受性測試 (ITT)

Figure 2-5 Insulin tolerance test (ITT) of offspring at 15 weeks of age.

Maternal hypercholesterolemia impaired insulin tolerance in male offspring. The mice were fasted 6 hours (9:00~15:00). The baseline blood glucose was measured before experiment, and 0.75 U insulin/kg body weight was injected intraperitoneally. (A, B) Glucose levels of male (A) and female (B) offspring were measured at regular interval of 15, 30, 60, 90 and 120 min. (C, D) Quantification of the area curve (AUC) from ITT results of male (C) and female (D). The values are the means \pm SEM. Data were analyzed by Independent-Sample T-Test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ denotes significant different in offspring exposed to a different intrauterine environment. CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

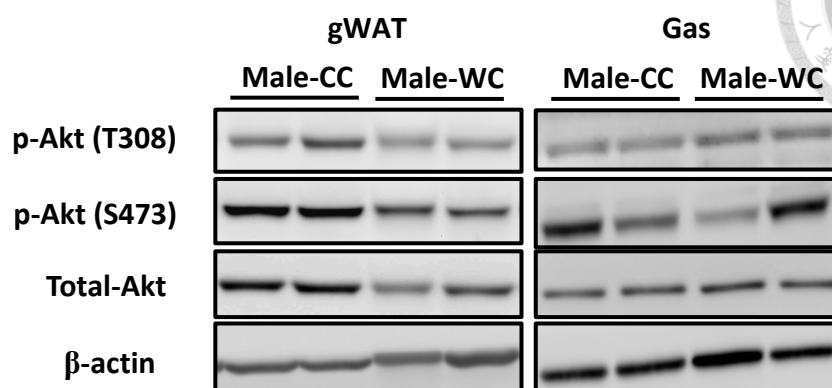
表 二-7 16 週齡子代齡血糖相關生化指標

Table 2-7 The biochemical analysis associated with glucose homeostasis of offspring at 16 weeks of age.

	Dietary groups (Male)		Dietary groups (Female)	
	CC	WC	CC	WC
	(n=7)	(n=9)	(n=9)	(n=7)
Fed glucose (mg/dL)	183.3 ± 16.5	176.4 ± 14.2	144.6 ± 8.8	161.4 ± 11.6
Fasting O/N glc (mg/dL)	96.5 ± 11.3	107.0 ± 9.0	96.0 ± 7.2	103.4 ± 10.67
Fasting O/N insulin (µg/L)	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Fasting 6h glc (mg/dL)	112.3 ± 13.0	149.8 ± 9.2*	112.8 ± 5.6	131.4 ± 7.3
Fasting 6h insulin (µg/L)	0.5 ± 0.1	1.1 ± 0.1**	0.3 ± 0.1	0.9 ± 0.2*
Fasting 6h HOMA-IR	2.6 ± 0.5	8.1 ± 0.9***	1.9 ± 0.9	6.1 ± 1.5*
HbA1c (%)	4.7 ± 0.2	4.8 ± 0.2	4.9 ± 0.1	5.3 ± 0.2

Fed glucose results were collected in the morning (9:00~10:00 AM), and fasting overnight (O/N) glucose results were measured at 8:00 AM after a 12-hour fasting. Fasting 6-hour glucose results were measured at 3:00 PM after a 6-hour-s fasting. The values are the means ± SEM. Data were analyzed by Independent-Sample T-Test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ denotes significant different in offspring exposed to a different intrauterine environment. CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

A



B

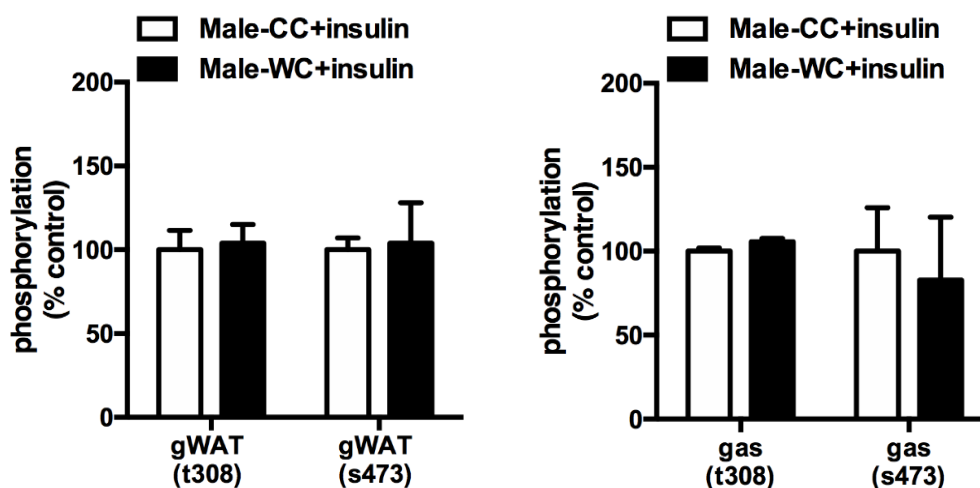


圖 二-6 16 週齡雄鼠子代禁食 12 小時性腺脂肪與腓腸肌組織的胰島素傳遞訊號敏感度試驗

Figure 2-6 Effects of maternal hypercholesterolemia on insulin signaling in gWAT and muscle of male offspring at 16 weeks after a 12-hour fast.

In vivo total Akt and phospho-Akt levels in gWAT and gastrocnemius muscle (Gas) from CC and WC male mice with insulin stimulation. After a 12-hour fast, mice were injected with 2U insulin/kg body weight intraperitoneally and sacrificed after 20 min. (A) Phosphorylated Akt and total Akt levels were measured using Western blotting. β -actin was used as a loading control. (B) Quantitation of phosphorylated Akt/total Akt in the gWAT and gastrocnemius. Data were displayed as means \pm SEM ($n = 2$). CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

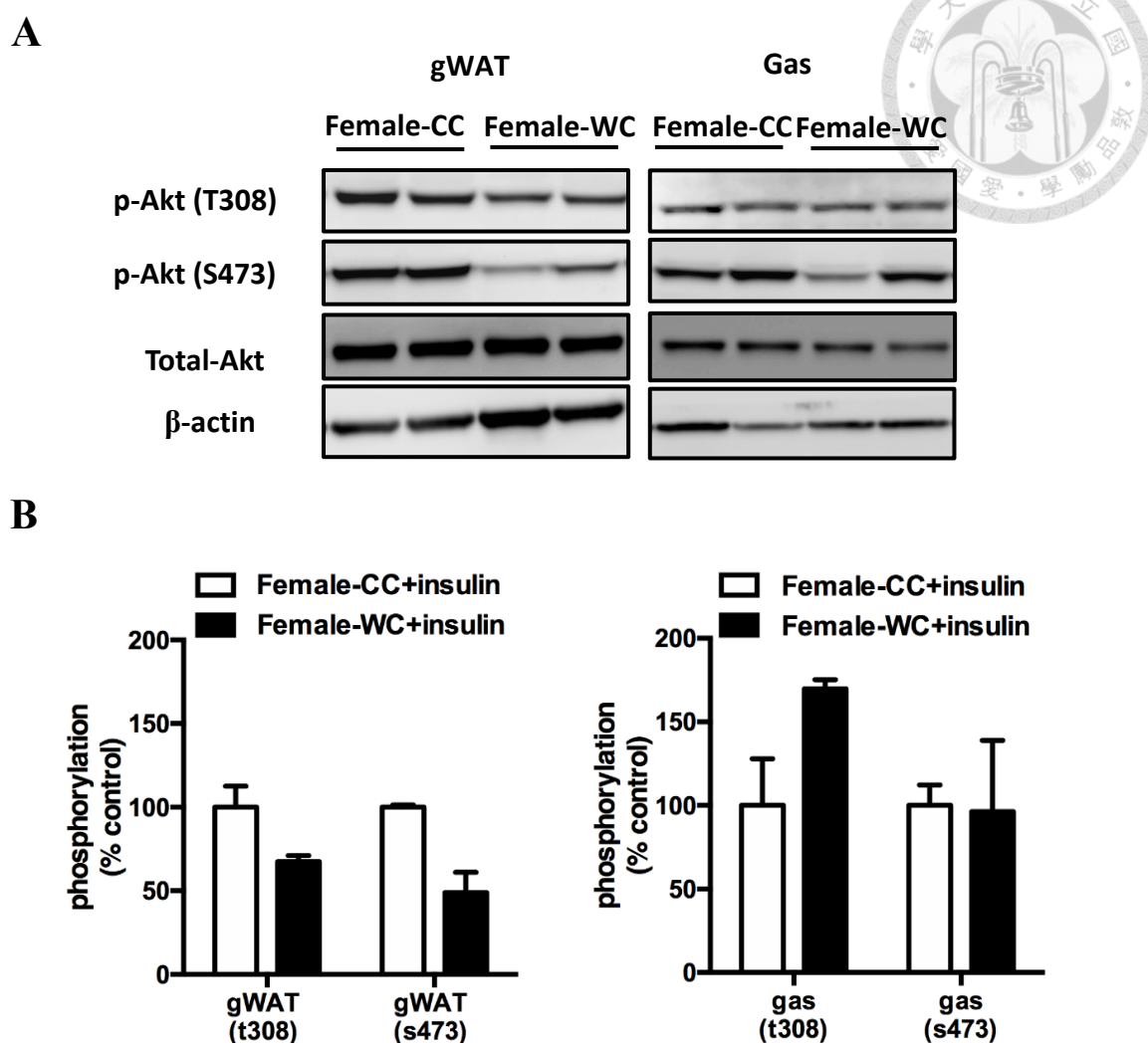


圖 二-7 16 週齡雌鼠子代禁食 12 小時性腺脂肪與腓腸肌組織的胰島素傳遞訊號敏感度試驗

Figure 2-7 Effects of maternal hypercholesterolemia on insulin signaling in gWAT and muscle of female offspring at 16 weeks after a 12-hour fast.

In vivo total Akt and phospho-Akt levels in gWAT and gastrocnemius muscle (Gas) from CC and WC female mice with insulin stimulation. After a 12-hour fast, mice were injected with 2U insulin/kg body weight intraperitoneally and sacrificed after 20 min. (A) Phosphorylated Akt and total Akt levels were measured using Western blotting. β -actin was used as a loading control. (B) Quantitation of phosphorylated Akt/tAkt in the gWAT and gastrocnemius. Data were displayed as means \pm SEM ($n = 2$). CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

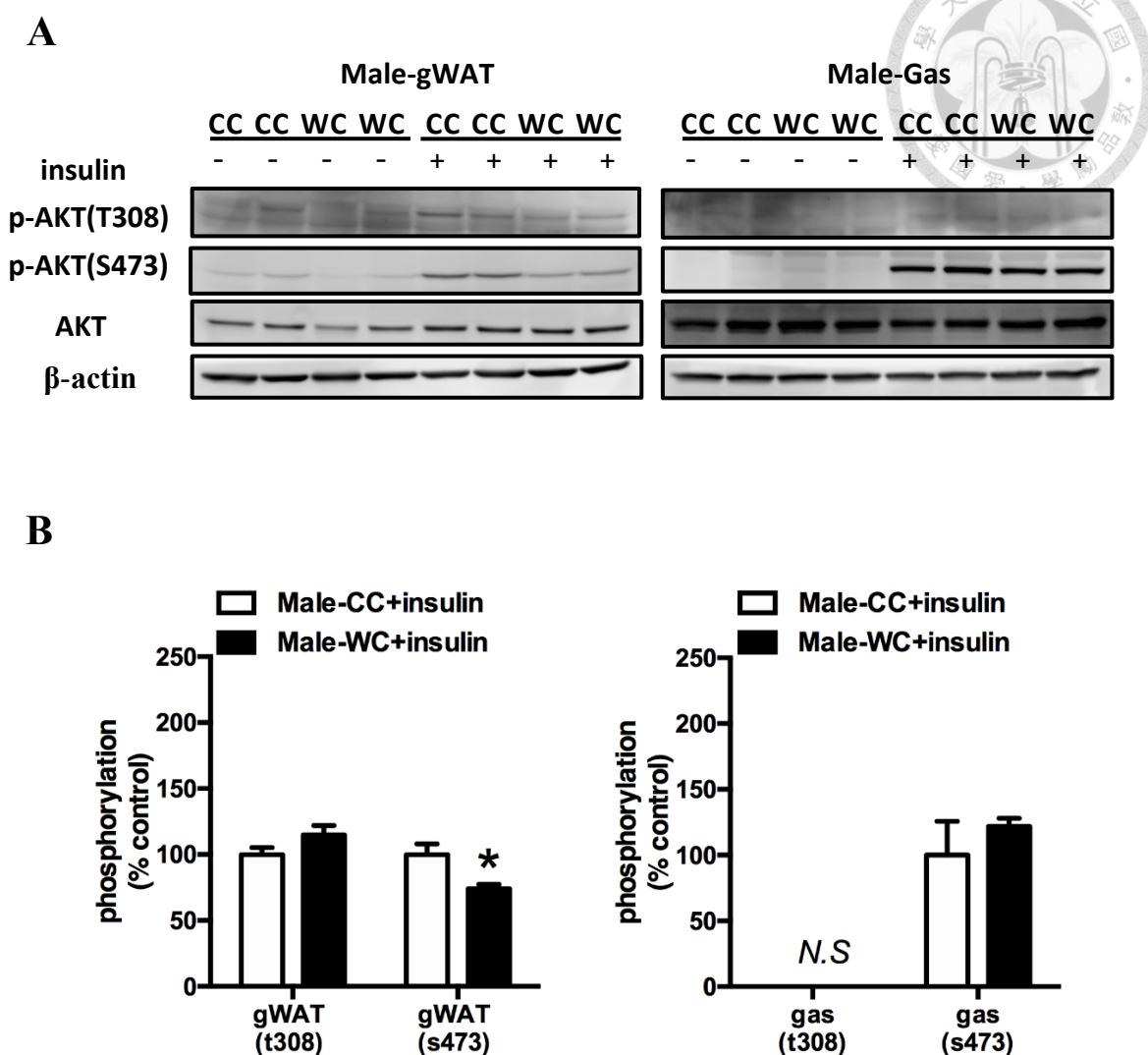


圖 二-8 16 週齡雄鼠子代禁食 6 小時性腺脂肪與腓腸肌組織的胰島素傳遞訊號敏感度試驗

Figure 2-8 Effects of maternal hypercholesterolemia on insulin signaling in gWAT and muscle of male offspring at 16 weeks after a 6-hour fast.

In vivo total Akt and phospho-Akt levels in gWAT and gastrocnemius muscle (Gas) from CC and WC malemice with insulin stimulation. After a 6-hour fast, mice were injected with 2U insulin/kg body weight intraperitoneally and sacrificed after 5 min. (A) Phosphorylated Akt and total Akt levels were measured using Western blotting. β -actin was used as a loading control. (B) Quantitation of phosphorylated Akt/tAkt in the gWAT and gastrocnemius. Data were displayed as means \pm SEM (n = 4~5). CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

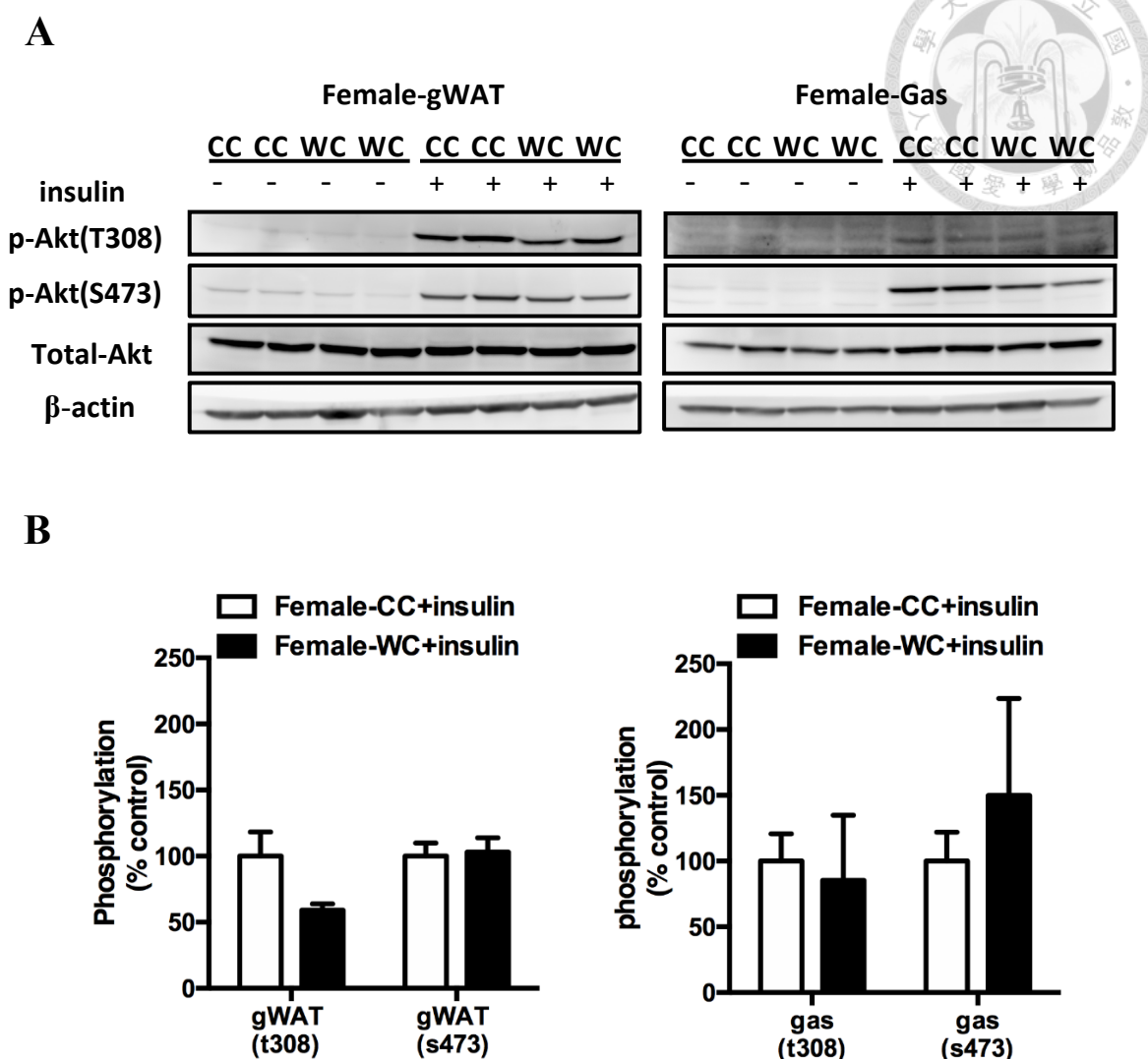


圖 二-9 16 週齡雌鼠子代禁食 6 小時性腺脂肪與腓腸肌組織的胰島素傳遞訊號敏感度試驗

Figure 2-9 Effects of maternal hypercholesterolemia on insulin signaling in gWAT and muscle of female offspring at 16 weeks after a 6-hour fast.

In vivo total Akt and phospho-Akt levels in gWAT and gastrocnemius muscle (Gas) from CC and WC female mice with insulin stimulation. After a 6-hour fast, mice were injected with 2U insulin/kg body weight intraperitoneally and sacrificed after 5 min. (A) Phosphorylated Akt and total Akt levels were measured using Western blotting. β -actin was used as a loading control. (B) Quantitation of phosphorylated Akt/tAkt in the gWAT and gastrocnemius. Data were displayed as means \pm SEM (n = 4~5). CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

表 二-8 16 週齡子代犧牲後組織與器官絕對重量

Table 2-8 The absolute organ/tissue weights of offspring at 16 weeks of age.

Absolute organ/tissue weight	Dietary groups (Male)		Dietary groups (Female)	
	CC	WC	CC	WC
	(n=24)	(n=24)	(n=21)	(n=17)
Body weight (g)	26.65±0.57	25.91±0.45	20.26±0.30	21.68±0.52*
Liver (g)	1.16±0.04	1.08±0.02	0.97±0.02	0.98±0.03
iWAT (g) ¹	0.30±0.03	0.25±0.02	0.18±0.01	0.21±0.02
gWAT (g) ²	0.48±0.04	0.45±0.03	0.21±0.02	0.30±0.05
rWAT (g) ³	0.15±0.03	0.12±0.01	0.12±0.02	0.18±0.01
BAT (g) ⁴	0.09±0.01	0.08±0.00	0.06±0.00	0.06±0.01
gastrocnemius (g)	0.30±0.01	0.31±0.01	0.23±0.01	0.24±0.01
Soleus (mg)	0.02±0.00	0.02±0.00	0.02±0.54	0.05±0.03

The values are the means \pm SEM. Data were analyzed by Independent-Sample T-Test, * $p < 0.05$, denotes significant different in offspring exposed to a different intrauterine environment. iWAT¹: Inguinal white adipose tissue; gWAT²: gonadal fat; rWAT³: retroperitoneal white adipose tissue; BAT⁴: Interscapular brown adipose tissue CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

表 二-9 16 週齡子代犧牲後組織與器官相對重量

Table 2-9 The relative organ/tissue weights of offspring at 16 weeks of age.

Relative organ/tissue weight	Dietary groups (Male)		Dietary groups (Female)	
	CC (n=24)	WC (n=24)	CC (n=21)	WC (n=17)
Liver (%)	4.36±0.14	4.19±0.06	4.79±0.09	4.53±0.11
iWAT (%) ¹	1.12±0.10	0.98±0.06	0.89±0.06	0.94±0.08
gWAT (%) ²	1.78±0.14	1.72±0.10	1.01±0.09	1.33±0.16
rWAT (%) ³	0.54±0.08	0.45±0.05	0.58±0.07	0.82±0.15
BAT (%) ⁴	0.32±0.02	0.31±0.01	0.31±0.01	0.32±0.02
gastrocnemius (%)	1.06±0.07	1.20±0.04	1.10±0.04	0.77±0.13*
Soleus (%)	0.07±0.01	0.08±0.01	0.08±0.00	0.16±0.10

Relative organ/tissue weight (%) = Absolute organ/tissue weight / body weight × 100%.

The values are the means ± SEM. Data were analyzed by Independent-Sample T-Test, * $p < 0.05$, denotes significant different in offspring exposed to a different intrauterine environment. iWAT¹: Inguinal white adipose tissue; gWAT²: gonadal fat; rWAT³: retroperitoneal white adipose tissue; BAT⁴: Interscapular brown adipose tissue

CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

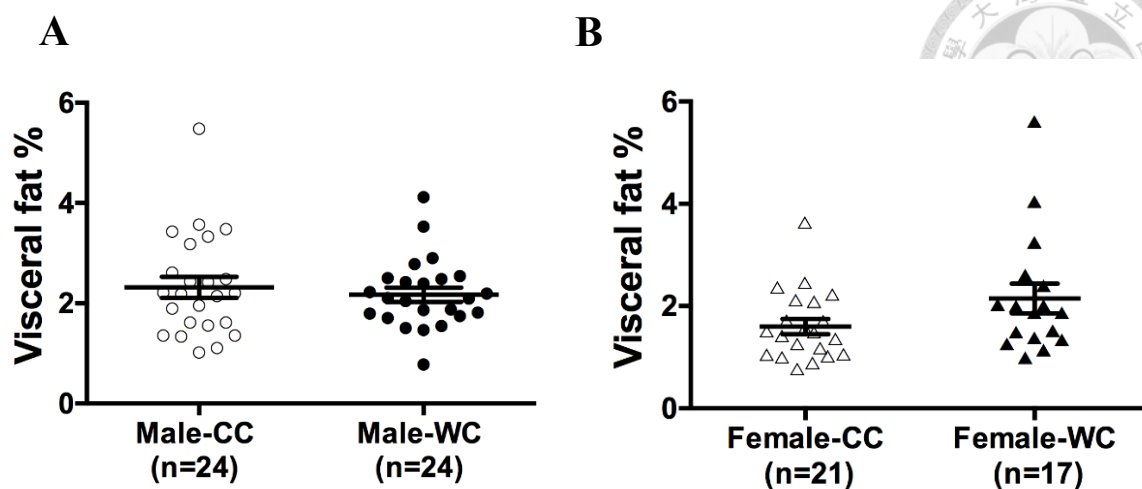


圖 二-10 16 週齡腹部內臟脂肪百分率分析

Figure 2-10 The visceral fat percentage of offspring.

The body fat percentage of (A) male and (B) female offspring. Visceral fat% = (gWAT+rWAT)/body weight \times 100%. The values are the means \pm SEM. Data were analyzed by Independent-Sample T-Test. CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

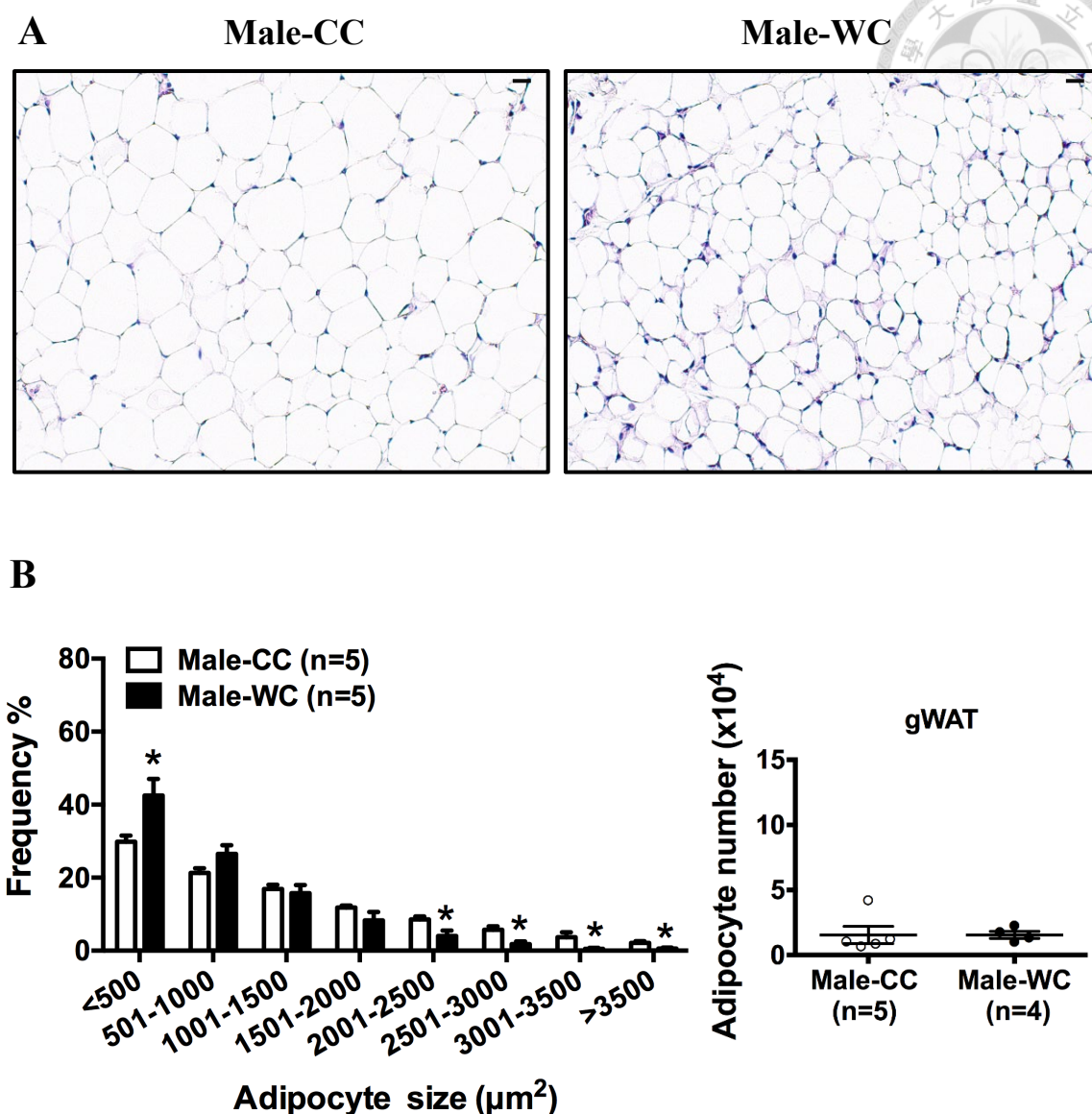


圖 二-11 16 週齡子代雄鼠性腺性腺白色脂肪 H&E 染色切片

Figure 2-11 The gWAT morphometry and adipocyte number of male offspring.

(A) Representative images of hematoxylin and eosin-stained sections of gWAT at 200X magnification of male offspring. Scale bars, 20 μm . (B) Corresponding adipocyte size and number was analyzed using adiposoft. At least 5 different areas per fat pad section of each mouse were quantified, and distribution of adipocyte areas was calculated; $n = 4\sim 5$. It seemed that WC group adipocyte size was smaller than CC group. The values are the means \pm SEM. Data were analyzed by Independent-Sample T-Test, $*p < 0.05$, denotes significant different in offspring exposed to a different intrauterine environment. CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

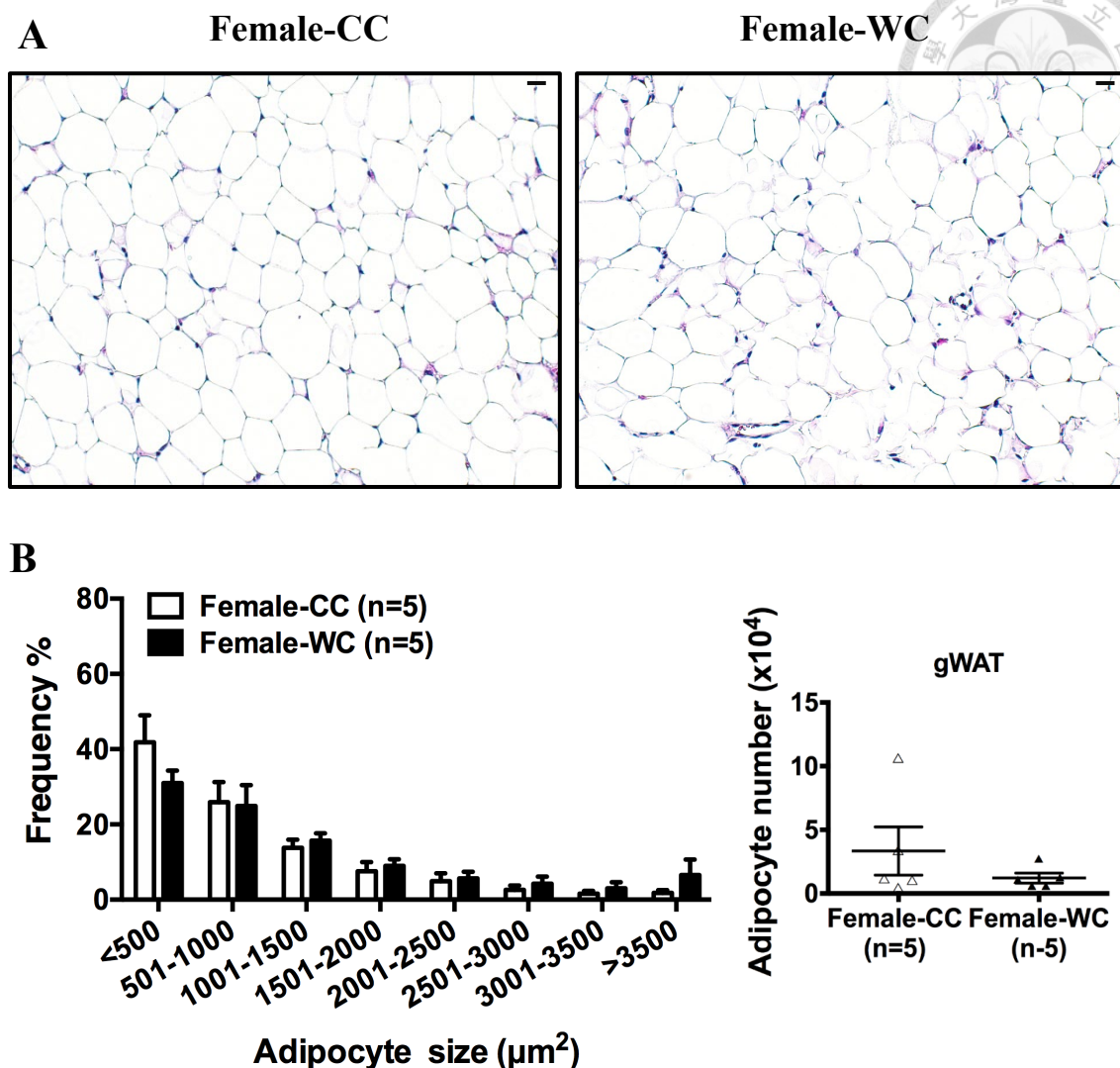


圖 二-12 16 週齡子代雌鼠性腺性腺白色脂肪 H&E 染色切片以及脂肪細胞定量

Figure 2-12 The gWAT morphometry and adipocyte number of female offspring.

(A) Representative images of hematoxylin and eosin-stained sections of gWAT at 200X magnification of female offspring. Scale bars, 20 μm . (B) Corresponding adipocyte size and number was analyzed by adiposoft. At least 5 different areas per fat pad section of each mouse were quantified, and distribution of adipocyte areas was calculated; $n = 5$. There is no significant different between CC and WC group. The values are the means \pm SEM. Data were analyzed by Independent-Sample T-Test. CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

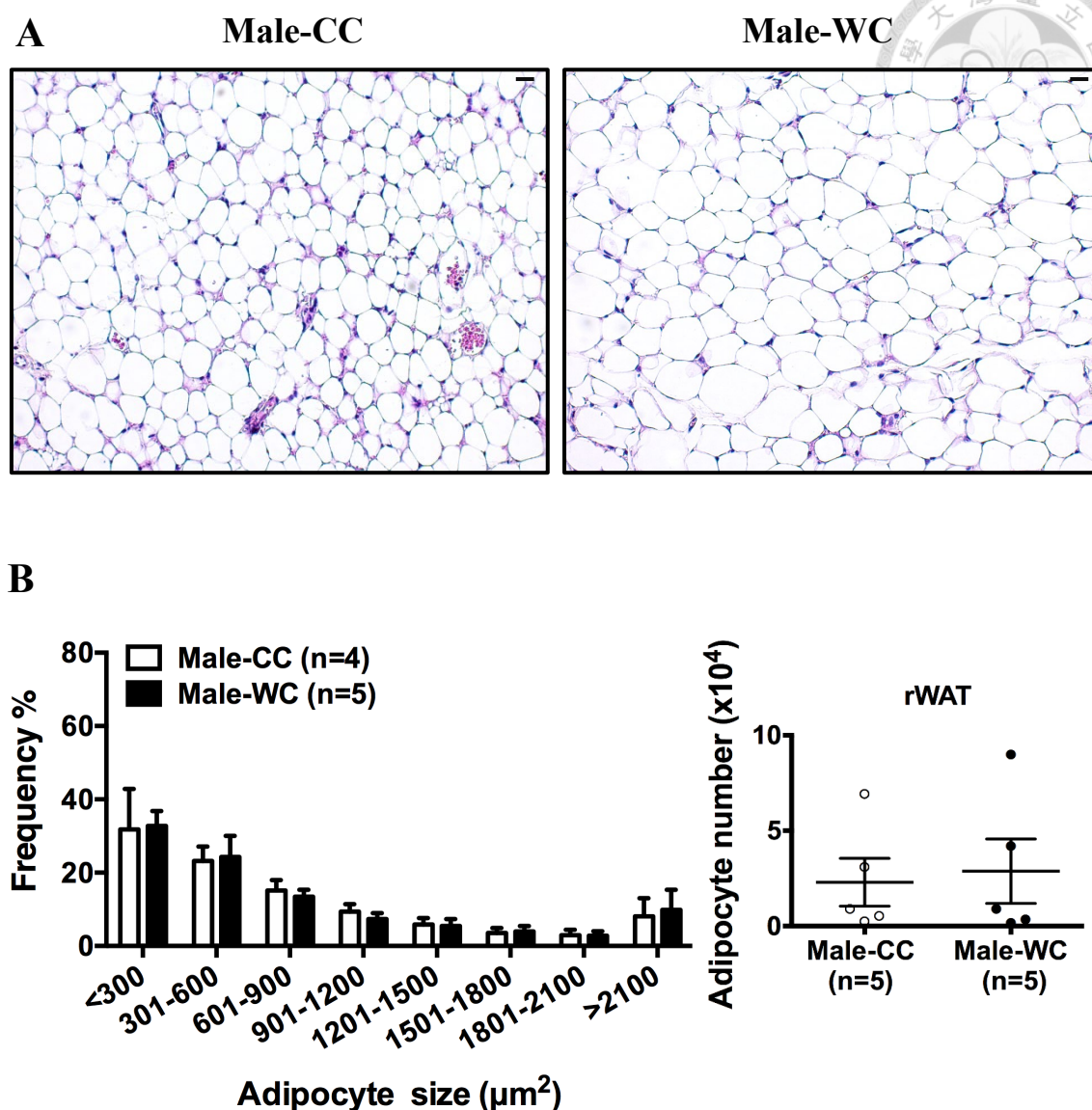


圖 二-13 16 週齡子代雄性腎臟周圍白色脂肪 H&E 染色切片

Figure 2-13 The rWAT morphometry and adipocyte number of male offspring.

(A) Representative images of hematoxylin and eosin-stained sections of rWAT at 200X magnification of male offspring. Scale bars, 20 μm . (B) Corresponding adipocyte size and number was analyzed by adiposoft. At least 5 different areas per fat pad section of each mouse were quantified, and distribution of adipocyte areas was calculated; $n = 4\sim 5$. There was no significant difference between CC and WC group. The values are the means \pm SEM. Data were analyzed by Independent-Sample T-Test. CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

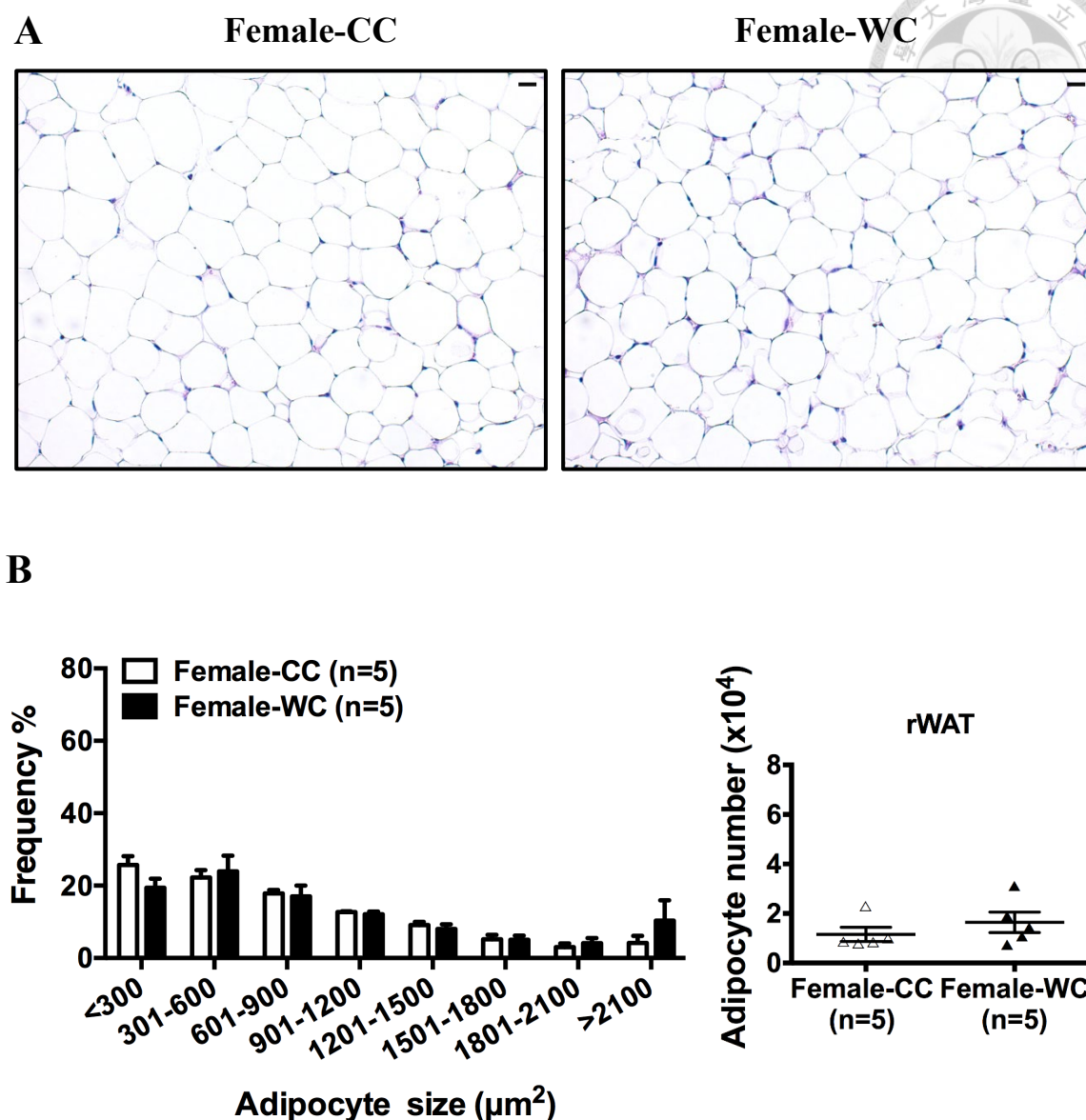


圖 二-14 16 週齡子代雌鼠腎臟周圍白色脂肪 H&E 染色切片

Figure 2-14 The rWAT morphometry and adipocyte number of female offspring.

(A) Representative images of hematoxylin and eosin-stained sections of rWAT at 200X magnification of female offspring. Scale bars, 20 μm . (B) Corresponding adipocyte size and number was analyzed by adiposoft. At least 5 different areas per fat pad section of each mouse were quantified, and distribution of adipocyte areas was calculated; $n = 5$. There was no significant difference between CC and WC group. The values are the means \pm SEM. Data were analyzed by Independent-Sample T-Test. CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

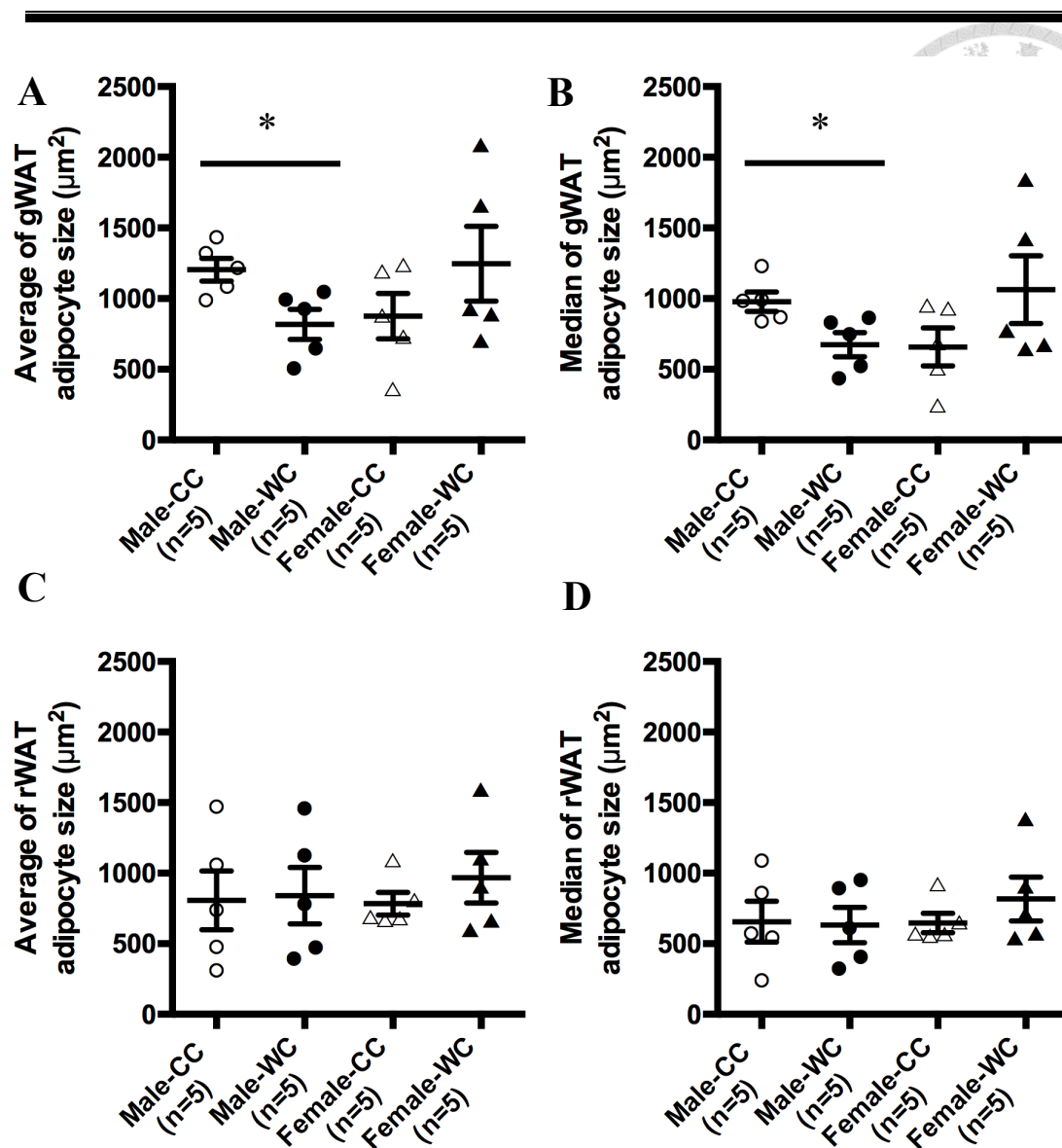


圖 二-15 16 週齡子代性腺白色脂肪組織與腎周白色脂肪組織細胞大小定量之平均值與中位數

Figure 2-15 The average and median of gWAT and rWAT adipocyte size.

The average (A, C) and median (B, D) size of adipocyte from gWAT (A, B) and rWAT (C, D) of offspring at 16 weeks of age. The average and median size of adipocyte from gWAT of male WC group was significantly smaller than that of CC group. There was no significant difference between two groups of female offspring. The values are the means±SEM. Data were analyzed by Independent-Sample T-Test. CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

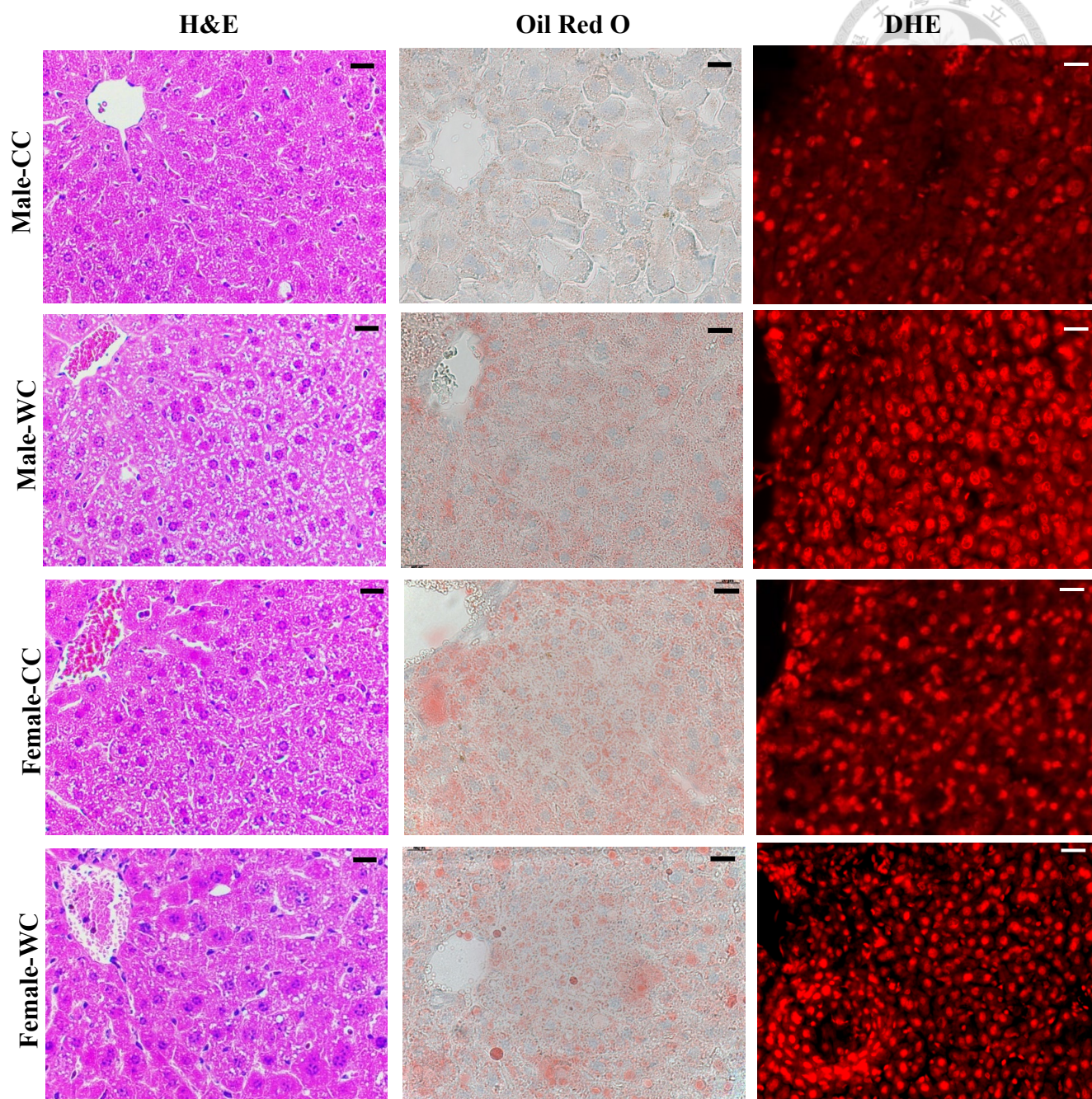


圖 二-16 16 週齡子代肝臟切片染色

Figure 2-16 Maternal hypercholesterolemia enhances hepatic lipid accumulation in male offspring.

H&E-stained, Oil Red O stained and DHE-stained sections of liver tissue from CC and WC offspring. The hepatic lipid and ROS levels were higher in WC male offspring than in CC male offspring. Scale bars, 20 μ m. The images were taken from liver sections at 400X magnification. CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

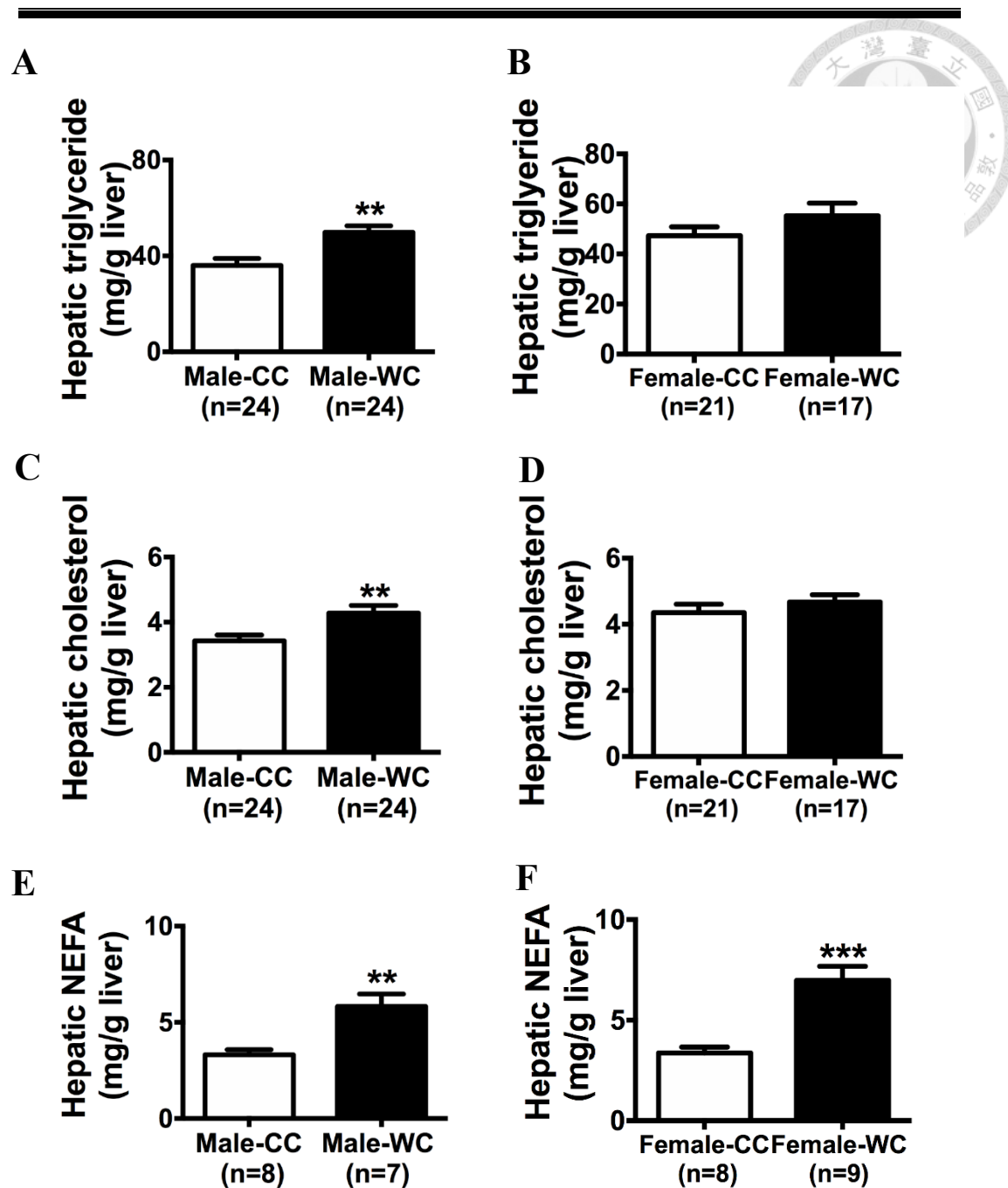


圖 二-17 16 週齡子代犧牲後肝脂分析 (單位脂肪含量/單位肝重)

Figure 2-17 Quantification of hepatic lipid levels (mg lipid/g liver) of offspring.

Hepatic triglyceride (A, B), cholesterol (C, D) and NEFA (E, F) of male (A, C, E) and female (B, D, F) offspring. The hepatic triglyceride, cholesterol and NEFA levels were significantly higher in WC male group than in CC male group; however, only hepatic NEFA level was higher in WC female group than in CC female group. The values are the means \pm SEM. Data were analyzed by Independent-Sample T-Test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ denotes significant different in offspring exposed to a different intrauterine environment. CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

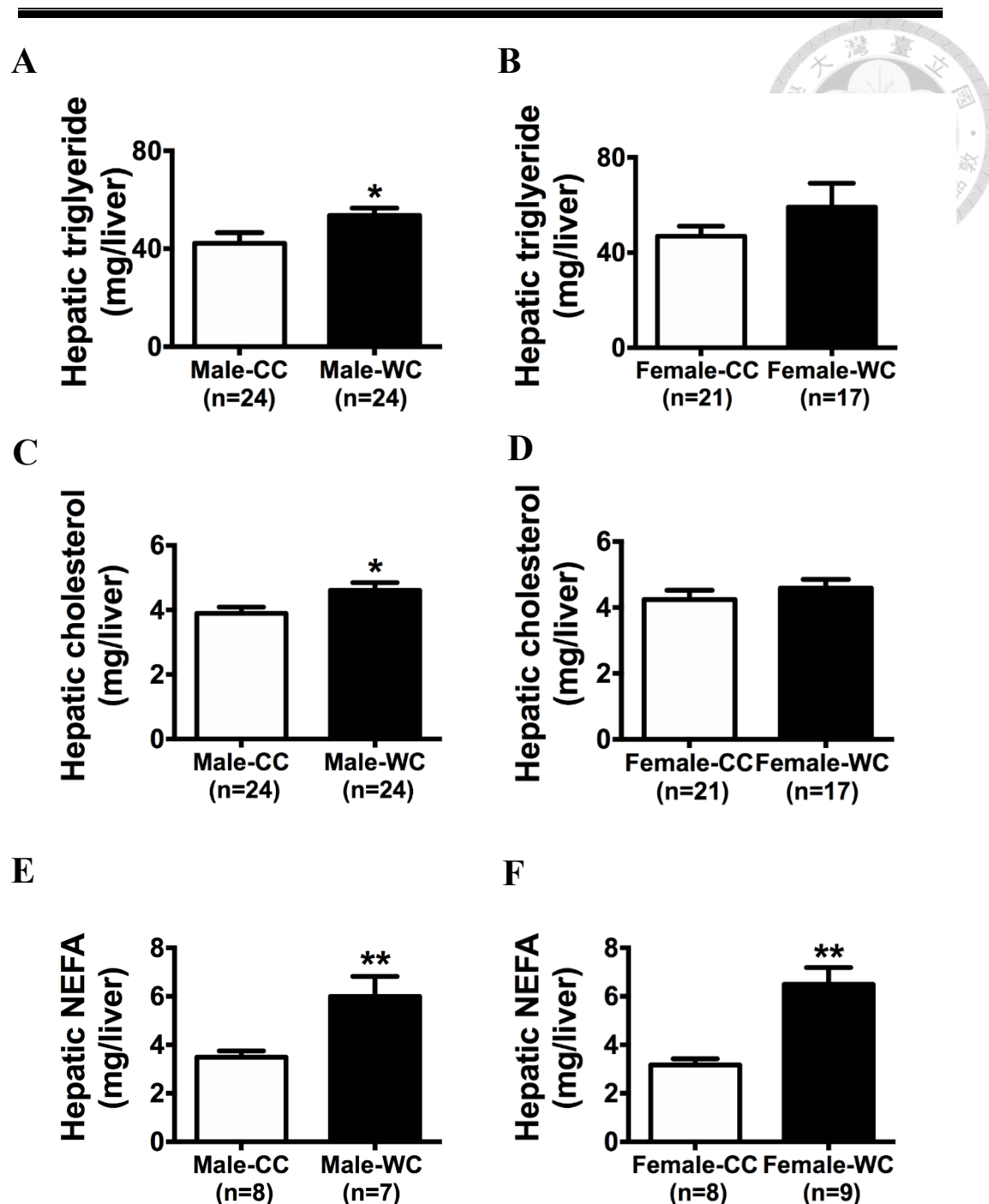


圖 二-18 16 週齡子代犧牲後肝脂分析 (單位脂肪含量/全肝)

Figure 2-18 Quantification of hepatic lipid levels (mg lipid/ liver) of offspring.

Total hepatic triglyceride (A, B), cholesterol (C, D) and NEFA (E, F) of male (A, C, E) and female (B, D, F) offspring. The hepatic lipid levels were significantly higher in WC male group than in CC male group; however, only hepatic NEFA level was higher in WC female group than CC female group. The values are the means \pm SEM. Data were analyzed by Independent-Sample T-Test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ denotes significant different in offspring exposed to a different intrauterine environment. CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

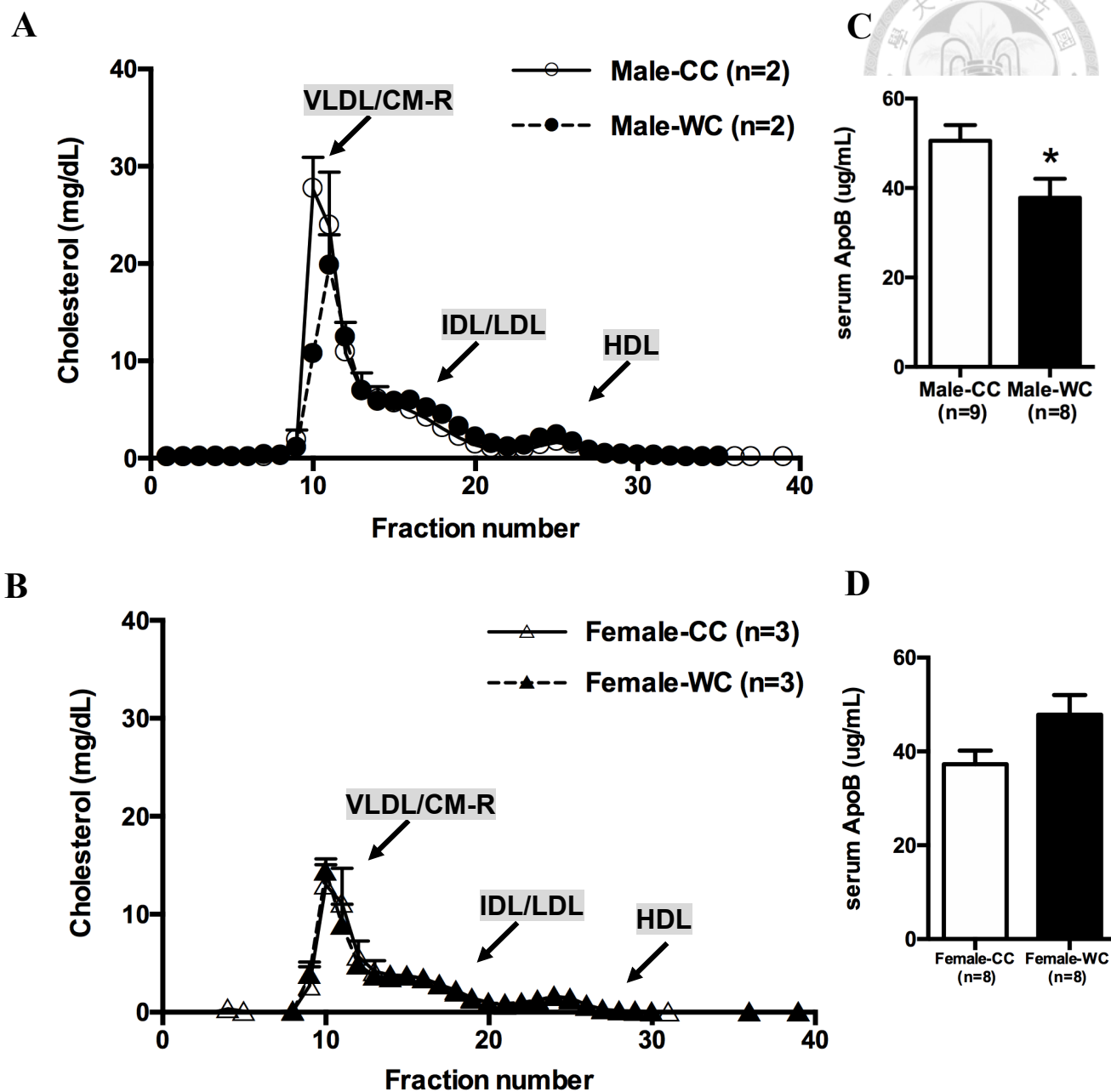


圖 二-19 16 週齡子代犧牲後脂蛋白譜分佈與血清 ApoB 濃度

Figure 2-19 The lipid profile of offspring at 16 weeks of age.

Serum lipoprotein profiles were analyzed in male (A) female and (B) offspring using FPLC. X-axis represents the number of fractions present in the mixture as a peak; Y-axis shows the cholesterol levels of the different fractions. Serum ApoB levels in male (C) and female (D) offspring. HDL : high-density lipoprotein ; IDL : intermediate-density lipoprotein ; LDL : low-density lipoprotein ; VLDL : very low-density lipoprotein. ; CM-R : chylomicron remnant. CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

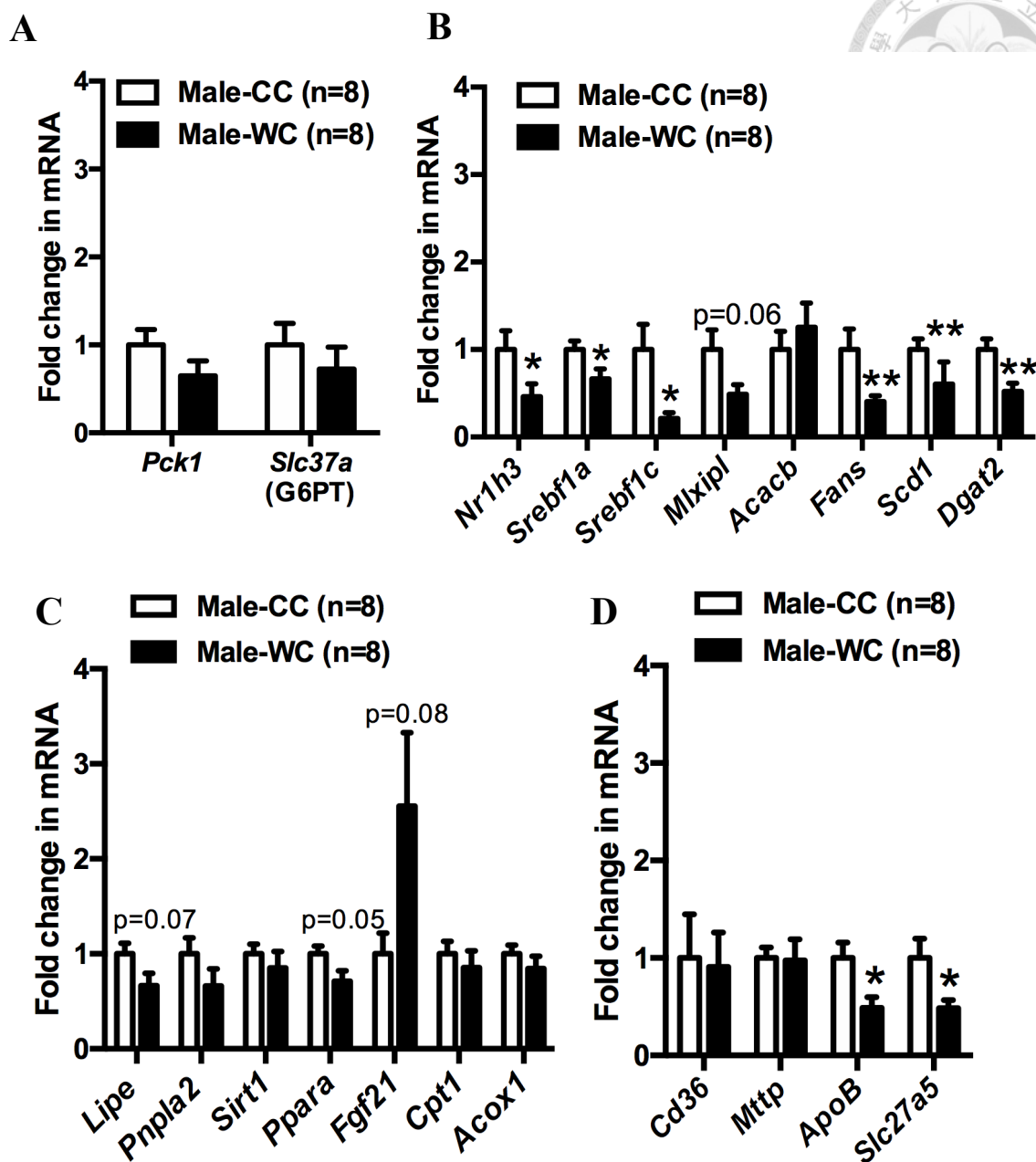


圖 二-20 16 週齡子代雄鼠肝臟醣類與脂質代謝相關的 mRNA 基因表現

Figure 2-20 mRNA expression of key factors involved in gluconeogenesis, lipid metabolism and lipid transport in livers of male offspring.

(A-D) Genes involved in gluconeogenesis (A) DNL pathway (B), lipolysis and fatty acid oxidation (C) and fatty acid transport (D). mRNA levels were measured by real-time PCR and data were normalized with the housekeeping gene 18s rRNA. The values are the means \pm SEM. Data were analyzed by Independent-Sample T-Test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ denotes significant different in offspring exposed to a different intrauterine environment. CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD..

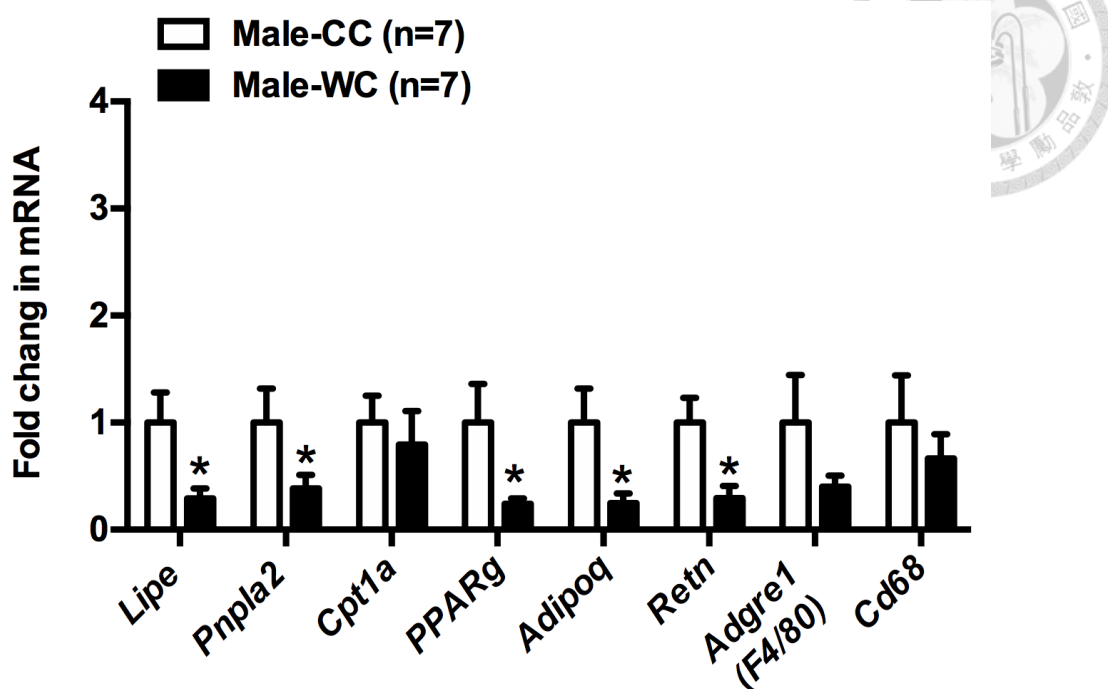


圖 二-21 16 週齡子代性腺白色脂肪組織脂肪氧化以及功能相關 mRNA 表現
Figure 2-21 mRNA expression of genes involved in lipolysis, adipokines, and inflammation in eWAT of offspring.

Data were normalized with the housekeeping gene 18s rRNA. The values are the means \pm SEM. Data were analyzed by Independent-Sample T-Test. CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

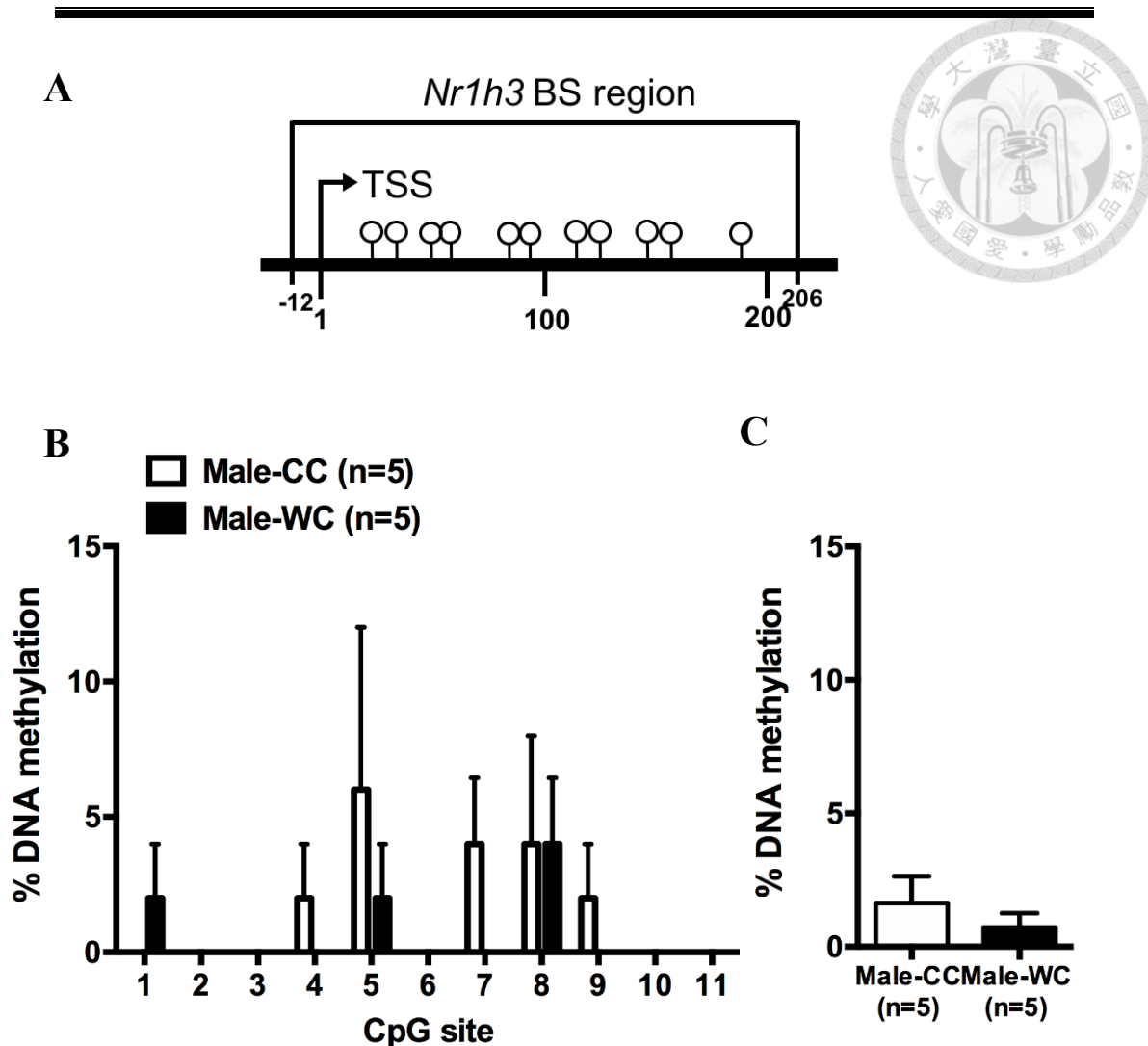


圖 二-22 子代雄性成鼠肝臟 *Nr1h3* DNA 甲基化分析

Figure 2-22 DNA methylation analysis of *Nr1h3* in Liver Samples from adult male offspring.

(A) Schematic representation of the promoter of *Nr1h3*. Bisulfite-sequencing (BS) analysis region encircling the transcription start site is indicated. (B) The graph represents the percentage of DNA methylation of individual CpG sites at A region and the average of %DNA methylation for the region. (C) The graph represents the percentage of DNA methylation of individual CpG sites at B region. The values are the means \pm SEM. Data were analyzed by Independent-Sample T-Test, CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

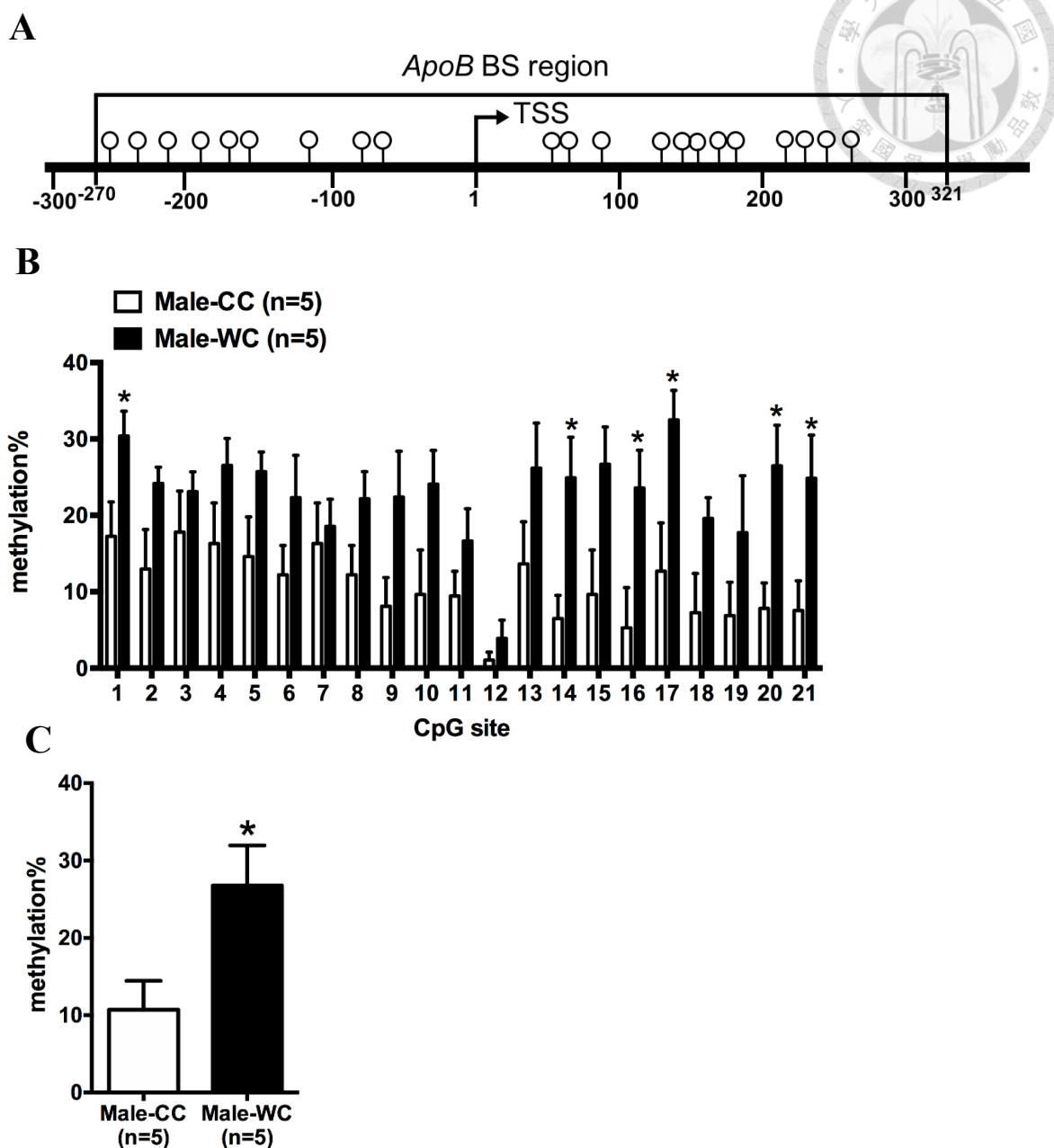




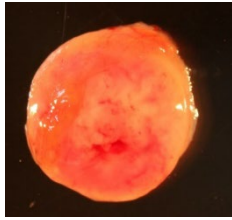
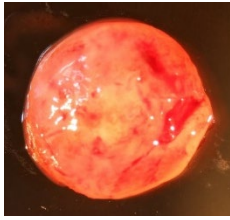
圖 二-23 子代雄性成鼠肝臟 *ApoB* DNA 甲基化分析

Figure 2-23 DNA methylation analysis of *ApoB* in Liver Samples from adult male offspring.

(A) Schematic representation of the promoter of mouse *ApoB*. Bisulfite-sequencing (BS) analysis region encircling the transcription start site is indicated. (B) The graph represented the percentage of DNA methylation of individual CpG sites. (C) The average of %DNA methylation for the region. The values are the means \pm SEM. Data were analyzed by Independent-Sample T-Test, CC: Offspring derived from control diet (CD)-fed dams was fed with a CD. WC: Offspring derived from Western diet (WD)-fed dams was fed with a WD.

表 二-10 E18.5 子代犧牲後組織與器官絕對重量

Table 2-10 The absolute organ/tissue weights of E18.5 embryos.

	Dietary groups	
	Ctrl Diet (CD) (n=22)	Western Diet (WD) (n=16)
Embryo		
Fetal weight (mg)	1123.35 ± 15.35	1133.19 ± 39.62
Liver weight (mg)	67.79 ± 1.34	66.48 ± 2.80
Placenta		
Placenta weight (mg)	87.30 ± 2.43	96.05 ± 4.01
Placenta length (cm)	0.82 ± 0.01	0.84 ± 0.02

The values are the means ± SEM. Data were analyzed by Independent-Sample T-Test.

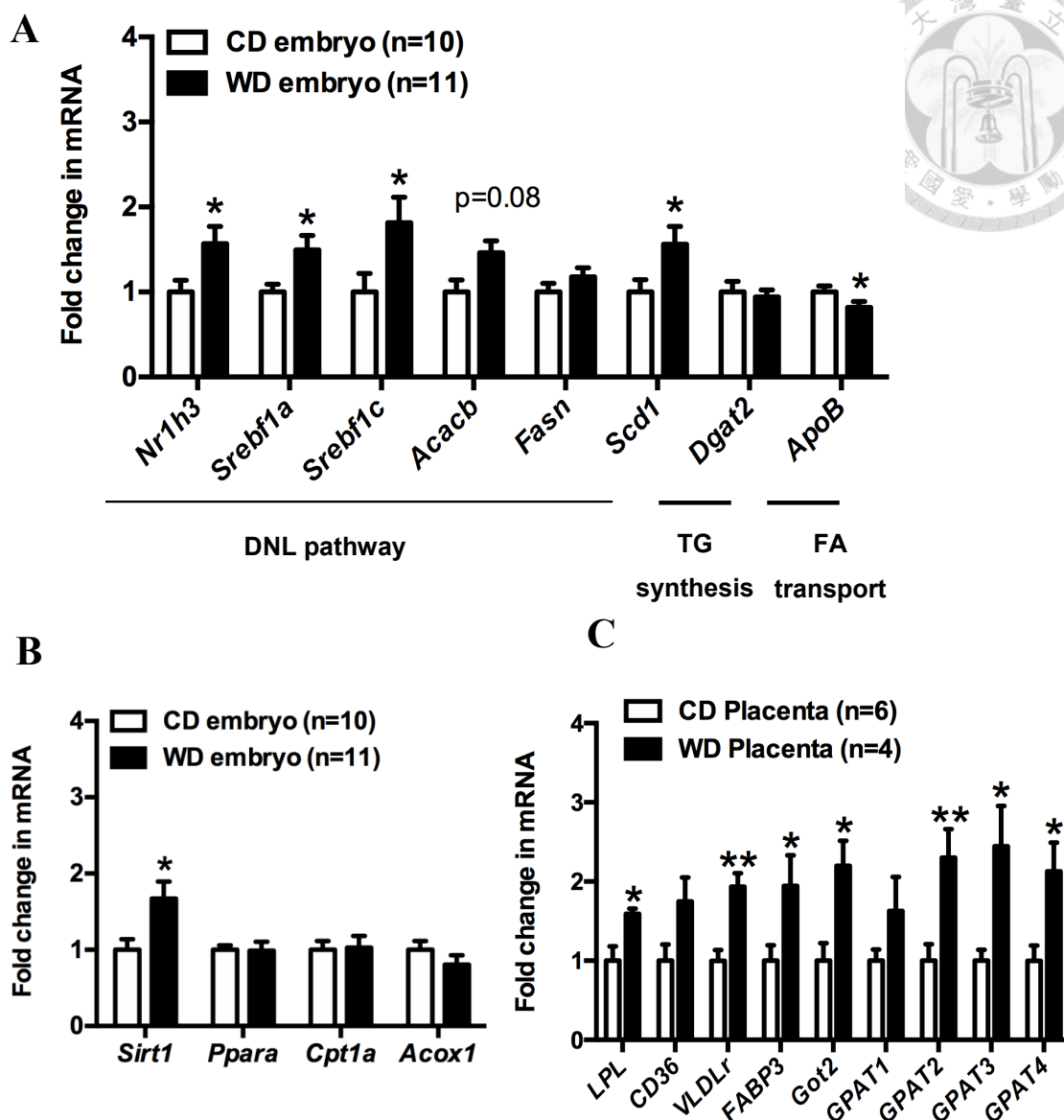


圖 二-24 E18.5 子代胚胎肝臟與胎盤脂質代謝路徑的基因表現

Figuer. 2-24 mRNA expression of key factors involved in lipid metabolism in E18.5 fetal livers and placenta.

(A, B) mRNA expression of genes involved in DNL pathway, TG synthesis and FA transport (A) and fatty acid oxidation (B) in embryonic liver. (C) mRNA expression of genes involved in FA transport in placenta. mRNA levels were measured using real-time PCR and data were normalized with the housekeeping gene 18s rRNA. The values are the means \pm SEM. Data were analyzed by Independent-Sample T-Test, * $p < 0.05$ denotes significant different in offspring exposed to a different intrauterine environment. CD : embryos derived from control diet (CD)-fed dams ; WD : embryos derived from western diet (WD)-fed dams.

第四節 討論

一、西方飲食誘導孕鼠

1. 成功誘導孕鼠高膽固醇血症

我們實驗模式用西方飲食誘導母鼠，飼料中額外添加 0.15% 膽固醇，與餵食控制飲食之母鼠相比，懷孕前確實誘導出較高的膽固醇血症並持續至子代離乳 (表二-6)。然而母鼠懷孕前及子代離乳後體重與血清三酸甘油酯濃度在兩組間並無差異，除了可能受子代數量影響母親營養狀況以外 (Capriglioni Cancian et al., 2016)，也有說法餵食高膽固醇飲食可能會啟動肝臟保護機制，增加肝臟 lipoprotein lipase 的基因表達，減少脂肪肝變性危機進一步調控飲食導致的血三酸甘油酯異常 (Weinstein et al., 2010)。

除了飲食誘導以外，另外一篇文獻是以基因型的差異探討母親高膽固醇血症對於子代影響，他們比較 $ApoE^{-/-}$ 與野生型孕鼠子代的膽固醇代謝，結果發現 $ApoE^{-/-}$ 子代可能更容易發生高膽固醇血症與動脈粥狀硬化 (Goharkhay et al., 2008b)，顯然不論是基因或是飲食的影響，孕鼠高膽固醇血症確實會對子代造成代謝失調的影響。

二、子代出生體重以及攝食量不受孕鼠高膽固醇血症影響

在我們的實驗中沒有看到餵食 WD 孕鼠與餵食 CD 的子代有出生體重差異 (圖二-1 A)，這可能的原因除了是沒有準確的在子代一出生就測量體重以外，我們實驗並沒有控制胎數 (litter size)，然而胎數大小是可能會影響出生體重，胎數較小會因為營養充足使得出生體重較重。我們也發現子代離乳之後，性別會導致的體重差異日益明顯，因此將雄雌鼠結果分開統計分析，結果發現雄鼠從 3 週齡截至犧牲 16 週齡時體重兩組間都沒有差異，反而在雌鼠 16 週齡觀察到禁食 12 小時後，WC 組體重有顯著重於 CC 組，增加的部分反應在性腺脂肪與腎周脂肪 (表二-8)，同樣的現象在 C57BL/6J 野生型的母鼠分別餵養控制飲食 (chow diet) 與高脂飲食 (45% fat) 飼養 10 週後與公鼠交配，結果發現在子代雌鼠 36 週齡時有體重增加與高膽固醇血症的情況，說明性別特異性確實存在 (Elahi et al., 2009)，



在我們實驗模式中，若要觀察子代肥胖現象，或許可以增加子代雌鼠飼養天數，待體重差異更明顯後再進行分析。

另外在我們動物模式下，*ApoE*^{-/-} 小鼠相較於同齡的野生型小鼠，體重增加幅度有略低的現象，一般野生型小鼠 6~7 週齡就可能有 25~30 g 且可持續上升 (Jensen et al., 2016)，我們的小鼠至 16 週犧牲卻僅有 25 g 左右，這可能與小鼠本身全身性剔除 *ApoE* 的原因可能有關。*ApoE* 為一載脂蛋白，體內主要扮演的角色為與肝臟上 *adiponectin* 以及 *LDL receptor* 辨識結合，降低循環中的膽固醇，但過去有研究發現，*ApoE*^{-/-} 小鼠會因為乳糜微粒殘餘物或是 *VLDL* 攝入的困難，無法透過乳糜微粒殘餘物水解得到游離脂肪酸進入脂肪組織儲存，因此就不容易看到肥胖現象 (Chiba et al., 2003)，意指我們的實驗結果可以是在非肥胖的模式來觀察母體效應產生的影響。

三、WC 子代離乳時血脂異常

由血脂變化可以觀察到小鼠飲食狀況，WD 組剛離乳可能是因為母乳成分使得血清中三酸甘油酯與膽固醇濃度較高 (圖 二-2)，雄鼠的血清三酸甘油酯數值可能因為子代生長速度出現差異，成長較快的子代可能自行攝食，然而我們實驗設定在出生後第 21 天統一離乳，故血三酸甘油酯數值出現較大的誤差。整體來說，依然看出 WD 組子代離乳的血脂異常是較 CC 組嚴重的，說明 WC 組子代在哺乳期仍持續受到母鼠西方飲食影響。這對我們觀察到結果可能也具有影響力，因為目前認為除了妊娠期刺激以外，哺乳期的影響也是非常關鍵的 (Mennitti et al., 2015)。然而血脂異常現象會在離乳後更換成控制飲食後消失，兩組間血脂變化相似維持至子代 16 週齡犧牲 (圖 二-2)。

四、WC 雄鼠子代血糖調控異常風險

1. 胰島素訊號傳遞受損

在臨床上，較高的空腹血糖與葡萄糖耐受不良都有較高的機會演變成第二型糖尿病 (Nathan et al., 2007)。在我們的實驗中，雄鼠在禁食六小時能看到 WC 組

在血糖與胰島素濃度相較於 CC 組高 (表 二-7)；在同樣的禁食條件下，WC 組雄鼠葡萄糖與胰島素耐受性也較差。雌鼠雖然也在禁食 6 小時的情況下看到 WC 組的血糖值與胰島素濃度較 CC 組高，然而在葡萄糖耐受性實驗中兩組曲線卻幾近重合，沒有差異；胰島素耐受性實驗則是在初始的 0 點 WC 組比 CC 組來的高以外，各時間點血糖值與曲線下面積計算是沒有統計差異的 (圖 二-4、圖 二-5)，說明相較於雌鼠，WC 組雄性子代更可能出現糖尿病前期的跡象，也因此進一步由胰島素刺激分析訊號傳遞過程，我們首先是在禁食 12 小時的小鼠於腹腔注射 2U 的胰島素，等待 20 分鐘後犧牲，但發現在該條件下，兩組的 Akt 蛋白磷酸化程度相當，由 ITT 中第二個時間點 (15 分鐘) 推測，20 分鐘的等待時間，兩組的磷酸化可能都已達到巔峰，血糖已快速下降，認為應將等待時間縮短為 5 分鐘 (Ding et al., 2016; Hall et al., 2014; Li et al., 2013; Takeda et al., 2013)，考量兩組子代小鼠的血糖調控有差異的時間點為禁食 6 小時，故將犧牲的禁食時間更改成 6 小時，結果發現在 WC 組雄鼠 gWAT 的 Akt Serine 473 位點磷酸化 (p-Akt, s473) 磷酸化程度顯著低於 CC 組 (圖 二-8)，而雌鼠則如同葡萄糖與胰島素耐受性結果，兩組差異不大 (圖 二-9)。

在我們實驗中發現禁食時間點的選擇會影響實驗結果，可能因為小鼠的禁食 6 小時與 12 小時的營養狀況不同，出現肝臟糖質新生作用差異而導致 (Commerford et al., 2004; Koo et al., 2008; Rodgers et al., 2005)。由我們血清生化值數據分析則是發現禁食 6 小時 WC 組的血清胰島素濃度 (1.1 ± 0.1 ug/L) 高於禁食隔夜的胰島素濃度 (0.3 ± 0.1 ug/L) (表 二-7)，顯示禁食 6 小時比禁食 12 小時胰島素訊號傳遞結果更可能受到原本存在內生性的胰島素影響。

除了比較 Akt 受到胰島素刺激的磷酸化程度，還可以深入探論胰島素傳遞路徑包括 Insulin receptor (IR), 或是 Insulin receptor substrate (IRS) 的磷酸化、PI3K 活性，甚至是分離出細胞膜上的通道蛋白 GLUT4 進行定量 (Besse-Patin et al., 2019; Hemmings and Restuccia, 2012; Taniguchi et al., 2006)，必須考慮到我們所分析的 Akt 磷酸化並非專一性受胰島素的影響，也會受到生長因子 (growth factor, IGF) 或是壓力產生的兒茶酚胺 (catecholamine) 而活化 (Gao et al., 2014; O'Neill et al., 2015; Sastry et al., 2007)。

2. 肝臟與血糖的調控

肝臟因不表現 GLUT4，所以葡萄糖攝入與釋放不如肌肉與脂肪組織快速，但有 insulin receptor 表現，仍然屬於對胰島素敏感組織，可藉由活化 Akt2 調控肝臟糖質新生以及肝醣分解作用來平衡血糖。我們分析禁食 12 小時後肝臟糖質新生重要調控點 *Pepck* 的 mRNA 表現 (Perry et al., 2014)，結果發現兩組間並無差異，顯示 WC 組並沒有因為肝臟出現胰島素阻抗而持續上調糖質新生作用，與該時間點測得的血糖以及胰島素濃度兩組濃度類似的結果符合，若要再進一步探討肝臟胰島素阻抗，可以透過 glucose clamp technique 來分析肝臟葡萄糖代謝或是給予胰島素刺激後以質譜儀分析 Akt2, Erk1/2, Foxo1 或是 GSK3 等蛋白質磷酸化程度 (Humphrey et al., 2015; Kiechl et al., 2013)。然而除了血糖調控以外，當胰島素阻抗存在會抑制 PI3K 與 MAPK 路徑而引發脂肪肝或是心血管疾病發生，造成所謂的選擇性胰島素阻抗，意指葡萄糖產出增加但同時脂肪酸也會持續合成，肝臟 *de novo* lipogenesis 中受胰島素控的 *Srebp1c* 即為可能目標 (Brown and Goldstein, 2008; Chen et al., 2004; Leclercq et al., 2007)。

五、脂肪組織與胰島素阻抗關係

肥胖與胰島素阻抗之間相輔相成，因此脂肪組織在我們模式下扮演何種角色也是我們非常關心的項目。我們的結果發現在胰島素刺激下，WC 組雄性 gWAT 有訊號傳遞受損的現象，接下來我們由組織切片與基因表現來討論兩者之間可能存在的關係。

1. WC 雄性子代性腺脂肪組織功能失調

由體重紀錄看到犧牲時 WC 組雌鼠有比 CC 組顯著來得重 (表 二-8)，此外我們還分析了與胰島素阻抗極具正相關的體組成，若體脂肪的比例較高，同樣可以視作肥胖，脂肪細胞可以透過 adipokines 或是其他發炎物質分泌影響全身代謝反應 (Guilherme et al., 2008; Kubota et al., 1999; McLaughlin et al., 2016)。由表 二-9 看到 WC 組雌鼠在同屬內臟脂肪的 gWAT 與 rWAT 相加有出現比 CC 組重的

趨勢 ($p=0.08$) (圖 二-10)。因此我們分析兩塊內臟脂肪的組織切片，只是雌鼠脂肪細胞大小在兩組分佈類似，需要進一步分析是否有細胞數量或是分化能力的差異 (van Harmelen et al., 2003)；另外有趣的是雄性子代 WC 組的性腺脂肪細胞較 CC 組顯著較小 (圖 二-11 A)，此結果與我們認知細胞肥大而有胰島素阻抗的預期相反，有研究推論該現象與脂肪組織功能不全有關 (Duval et al., 2010)，未來可以藉由測量脂肪中基因組 DNA (Genomic DNA) 來更精確的評估脂肪細胞數量。

我們在雄鼠脂肪組織進行功能性評估中，分析兩種 adipokines 基因表現，發現 WC 組 *Adipoq* (Adiponectin) 與 *Retn* (Resistin) 的 mRNA 表現量較 CC 組低，與推測 WC 組 gWAT 出現功能不全 (dysfunction) 結果符合 (Chakraborti, 2015; Ouchi et al., 2011)；另外我們也測量和脂肪細胞大小與重量具正相關性的巨噬細胞標誌物：*Adgre1* (F4/80) 與 *Cd68* (Cd68) 的 mRNA 表現量 (Lynch et al., 2012; Weisberg et al., 2003)，但發現兩組間沒有差異 (圖 二-21)，若要對脂肪組織做進一步功能性分析，未來可以自小鼠分離脂肪組織培養，並進行甘油釋放之定量 (He et al., 2015)，或者可以測量禁食前後的甘油含量差值做為評估脂肪固定油滴的能力，會是更佳的功能評估方式。

2. 由脂肪組織提供游離脂肪酸可能與胰島素阻抗相關

若脂肪組織最重要的功能為儲存脂肪並在適當時釋放作為能量來源，因此當功能不良而無法穩定固定脂肪油滴於脂肪組織，使 NEFA 在血液或其他組織流竄會造成更大的威脅 (Petersen and Shulman, 2017; Ye, 2013)。NEFA 以及因為肥胖而促發的 c-Jun NH2-terminal kinase 1 (JNK1)，會作用在 insulin signaling pathway 中 IRS-1 造成胰島素訊號傳遞中斷 (Capurso and Capurso, 2012; Sabio et al., 2008)，是造成胰島素阻抗之危險因子。首先我們分析性腺脂肪參與脂解作用 *Lipe* (Hsl) 與 *Pnpla2* (Atgl) 基因表現量，結果顯示 WC 組的 *Lipe* 與 *Pnpla2* 基因表現較低 (圖 二-21)，說明 WC 的脂解作用可能並不旺盛，與胰島素阻抗反而呈現負相關的現象，該現象在人體實驗中也被看到，由取自肥胖病人脂肪組織分析脂解酶 *Hsl* 與 *Atgl* 的基因與蛋白質表現量，結果發現與高胰島素血症同樣是負相關性 (Smit et al., 2007; Stubbins et al., 2012)，然而關於胰島素阻抗對於 *Hsl* 調控為抑制或促

進尚未有定論。過去研究證實脂肪組織脂解作用會因為對胰島素敏感度下降而增加游離脂肪酸的釋放 (Samuel and Shulman, 2012)，但對脂解酶表現量結果不一，正常的情況脂解作用會受到兒茶酚胺類激素 (catecholamine) 或生長激素磷酸化引起油滴分解，此時胰島素扮演的為抑制的角色，然而阻抗發生時，脂解酶卻不一定如預期表現量增加，其中牽扯到許多因素，例如游離脂肪酸的轉換率 (turnover rate)、胰島素作用時機或是其他參與脂解作用激素的變因 (Gaidhu et al., 2010; Lewis et al., 2002)。目前我們的組織切片實驗結果只能說明 WC 組脂肪顆粒偏小與脂解作用關聯不大，未來需要更多的實驗分析脂肪酸攝入或分泌能力來繼續探討是否有自脂肪組織消失的脂肪酸轉移至其他器官造成胰島素阻抗的可能性 (Luo and Liu, 2016)。

六、增加 WC 組子代肝臟三酸甘油酯堆積

我們透過切片染色與組織定量確定 WC 組雄鼠較 CC 組在肝臟有顯著較多的三酸甘油酯的累積，且也有較多的 NEFA 可提供作為脂肪合成的原料 (圖二-17)，為探究造成肝脂堆積的可能原因，我們從肝臟脂肪酸的來源、氧化代謝以及脂肪的排出等方向進行討論，如圖二-25 (Geisler and Renquist, 2017; Ipsen et al., 2018)。

1. 肝外的脂肪(酸)攝入沒有差異

在人體實驗以及動物實驗都已經證實自脂肪組織分解而來的脂肪酸為 NAFLD 形成的最主要來源，佔有六成左右 (Donnelly et al., 2005; Postic and Girard, 2008)，然而在我們實驗結果顯示雄鼠 gWAT 參與脂解作用 *Hsl* 以及 *Atgl* 的基因表現量兩組間沒有差異，血清 NEFA 濃度兩組間也沒有差異，甚至在雌鼠 WC 組血清 NEFA 濃度還較 CC 組低 (圖二-3F)，顯示 WC 組並沒有較 CC 組多來自脂肪組織分解而釋放的脂肪酸。

同時我們也發現肝臟運送長鏈脂肪酸的通道蛋白 *Cd36* (Glatz and Luiken, 2017) 在兩組間基因表現量也相當，且脂肪酸結合轉運蛋白 Fatty acid transport

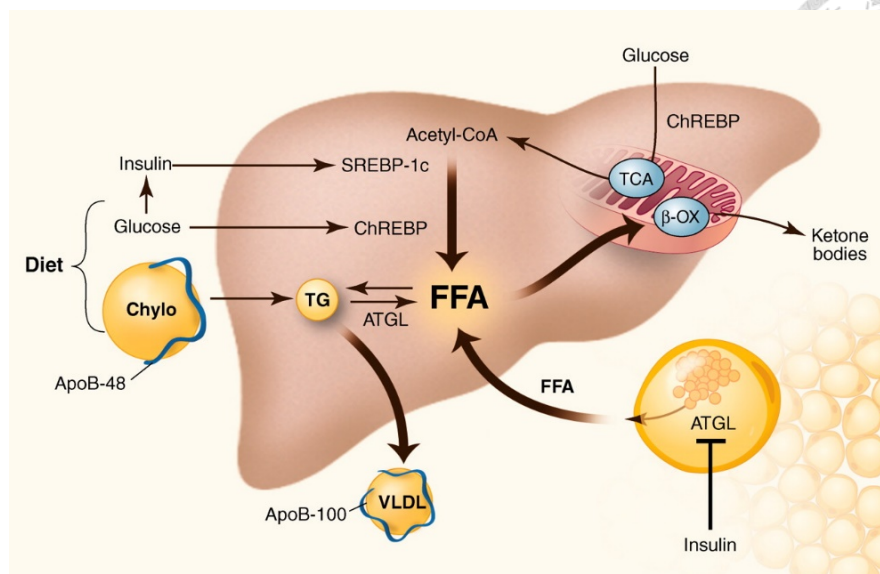


圖 二-25 肝脂堆積的可能機制

Figure 2-25 Mechanisms of hepatic lipid accumulation (Cohen et al., 2011)

Three major sources of hepatic FFAs come from diet, endogenous synthesis, and peripheral tissues. NEFA have four possible fates. They can be metabolized by β oxidation (β -OX), stored as TG in lipid droplets, or packaged into VLDL and subsequently secreted into blood.

proteins (Fatp5) (*Slc27a5*) (Storch and Thumser, 2010) mRNA 表現量在 WC 組反而下降 (圖 二-20 D)，因此再次推論子代 16 週齡禁食 12 小時的情況下，從血液運送到肝臟的脂肪酸非造成 NAFLD 的主要原因。

2. 子代出生前肝臟脂肪合成作用 (*de novo* lipogenesis) 旺盛

DNL 是指肝臟將飲食中獲得的醣類轉換成脂肪儲存的過程。經人體實驗證實 DNL 佔人體 26% 肝臟脂肪酸來源 (Donnelly et al., 2005)，可將糖解作用的產物 acetyl-CoA 經過 acetyl-CoA carboxylase (Acc) 縮合、fatty acid synthase (Fasn) 合成、Stearoyl-CoA desaturase (Scd1) 去飽和之後形成脂肪酸，最後由 diacylglycerol O-acyltransferase (Dgat) 進行酯化；該路徑有兩個重要的轉錄因子，分別是受到胰島素刺激而活化 Srebp-1c (Shimomura et al., 1999) 以及能受到醣類調控的 ChREBP，兩者皆為 LXR α 下游基因 (Repa et al., 2000; Sanders and Griffin, 2016)，然而 DNL 在 WC 雄性成鼠與 CC 組相比卻呈現抑制的狀態 (圖 二-20 B)，

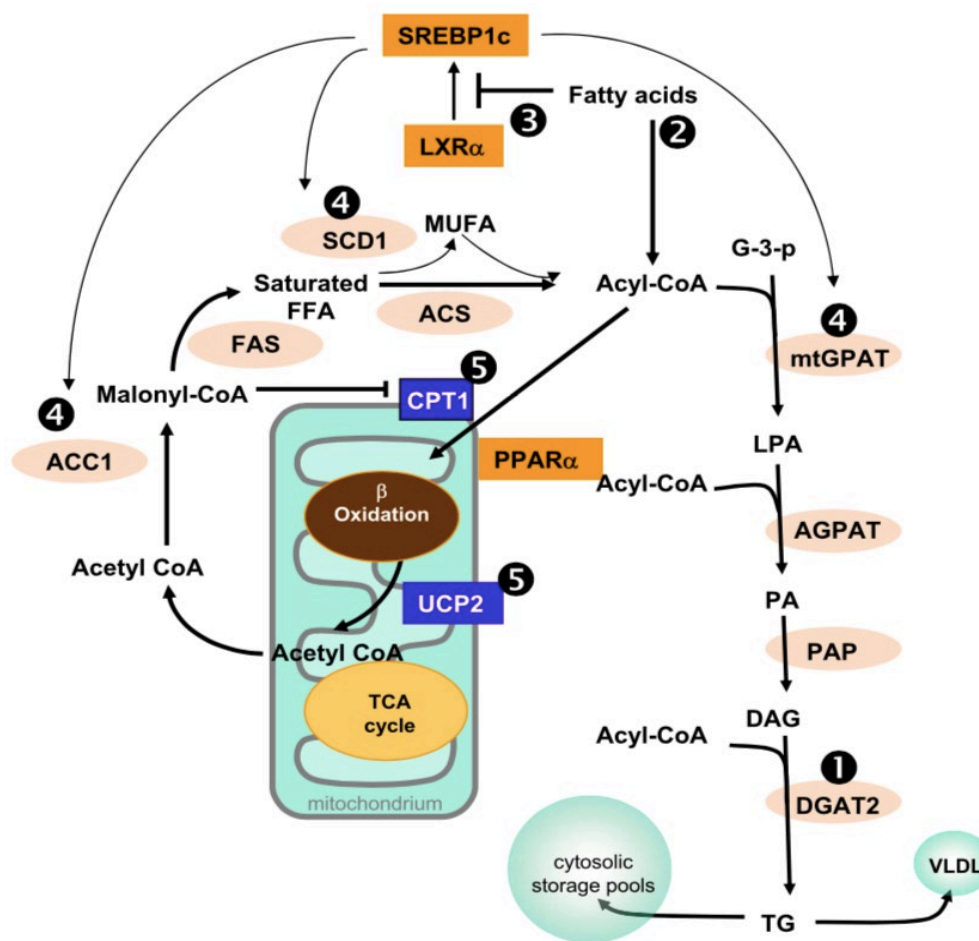


圖 二-26 肝臟三酸甘油酯的合成路徑與負調控作用

Figure 2-26 The negative regulation of hepatic *de novo* lipogenesis. (Choi et al., 2007)

DNL 相關基因表現下降與較多油滴堆積的組織切片結果不吻合，我們推論這種抑制的狀態可能是一種負調控作用。如圖 二-26 所示，有研究顯示當肝臟 Dgat2 表現受到抑制時，會使三酸甘油酯無法順利合成，此時過多的游離脂肪酸便會抑制上游 *Lxra* 基因表現或是 *Serbp-1c* 的轉錄，進而降低 DNL 作用，為了避免產生過多的 NEFA，增加肝臟的氧化壓力 (Choi et al., 2007; Howell et al., 2009)。在我們的實驗結果也發現 WC 雄性成鼠與 CC 組相比，肝臟 Dgat2 mRNA 表現量較低，肝臟 NEFA 含量較高以及肝臟切片染色 ROS 較多的現象。為了驗證母鼠餵食西式飲食會促進子代脂質合成的推測，我們收集子代出生前 E18.5 胚胎的肝臟樣品並分析 DNL 相關基因表現，發現 DNL 作用基因表現量在母鼠餵食西式飲食的胚胎普遍被上調，由上游的 *Lxra*, *Srebp-1a* 以及 *Srebp-1c* 到 *Scd1* 都是 WC

組較 CC 組基因表現量高，合成三酸甘油酯 *Dgat2* mRNA 表現量兩組則是沒有差異 (圖 二-24 A)，酯化作用沒有隨著 DNL 的製造脂肪酸而隨之增加作用，我們也推測這可能是 WC 子代肝臟成年後有較多 NEFA 的原因 (圖 二-17 E、F)。至於 E18.5 胚胎中 DNL 作用旺盛的原因可能是在母親的西方飲食浸潤下，透過胎盤傳遞了可活化 *Lxra* 配體 (ligand) 使得其受到活化增加 DNL，於生命初期已適應了高濃度的配體，一旦缺少後或許會使子代 *Lxra* 活化閾值增加，離乳後表現量開始下降。

目前我們推測在孕期西方飲食會促進自胚胎期肝臟 DNL 旺盛，三酸甘油酯堆積至成年，過量的 NEFA 反而抑制該作用，進而出現負回饋現象。除此之外胰島素阻抗造成 *Srebp-1c* 活化異常也是可能的原因之一，以肝臟胰島素接受器基因剔除鼠 (liver-specific insulin receptor knockout, LIRKO) 為模型來探討肝臟胰島素阻抗的研究，發現在肝臟直接抑制胰島素的反應會使得 *Srebp-1c* 無法被活化 (Biddinger et al., 2008)，因此我們看到的 *Srebp-1c* 下降或許也因為胰島素不敏感相關。

3. 脂肪(酸)的氧化作用沒有差異

除了來源增加，脂肪酸氧化作用旺盛，增加脂肪消耗也有可能造成肝脂累積差異，例如 *PPAR α* 能夠透過調控 lipoprotein lipase (LPL) 促進三酸甘油酯被分解 (Kersten and Stienstra, 2017; Koek et al., 2011)，雖然 WC 組雄鼠的肝臟雖然有較多可作為氧化燃料的三酸甘油酯以及脂肪酸，但我們 qPCR 結果僅看到 WC 組 *PPAR α* mRNA 表現量較低，但其他關於脂肪酸氧化的 *Cpt1a* 與 *Acox* mRNA 基因表現兩組沒有差異 (圖 二-20 C)，在 E18.5 胚胎脂肪酸氧化的相關基因表現，結果如同成鼠，兩組表現類似 (圖 二-24 B)，說明自胚胎時期延續至子代成年，WC 組可能並非因為脂肪酸利用障礙而出現肝脂堆積差異。

但也並非所有的基因在 WC 組都是沒有差異或是降低的，例如成鼠 WC 組的 *Fgf21* 就反倒有些提高 (圖 二-20 C)，*Fgf21* 一般被來說是由肝臟製造且受到 *PPAR α* 調控，但還是會受到 *PPAR α* 配體、飲食或是生理狀態影響 (Mai et al., 2009) (Lundasen et al., 2007)，因此認為可能其他因子使得 *Fgf21* 可能受到影響而

上升。再來胚胎 *Sirt1* 的基因表現在 WD 組 是比 CD 組高也是令人感到意外 (圖二-24 B)。目前研究多半認為 *Sirt1* 會透過將 *PGC1 α* deacetylation 促進粒線體消耗脂肪酸，增加胰島素敏感性並減輕肝脂堆積 (Cao et al., 2016; Nawaz et al., 2018; Sun et al., 2007)，在 DNL 中也有 *Sirt1* 作用目標，*Srebp-1c* 是其中之一，以高脂飲食餵食下本來被促進 *Srebp-1c* 基因會因為過度表現 *Sirt1* 而受抑制 (Ponugoti et al., 2010)，因此有研究認為高度表現 *Sirt1* 是長期暴露在高脂飲食環境下提供的自我保護機制 (Nguyen et al., 2019; Pfluger et al., 2008)，只是我們實驗中不論胚胎或是成鼠沒有發現 *Srebp-1c* 與 *Sirt1* 間有明顯的關聯性 (圖二-20、圖二-24)。

另外同時影響脂肪酸氧化與合成的還有 *PPAR α* ，有研究證實雖然 *SREBP-1c* 以及其下游基因並非 *PPAR α* 直接的標靶基因，但卻會受到 *PPAR α* 促效劑的正調控 (Patel et al., 2001)，而我們實驗中也看到參與 lipogenesis 重要轉錄因子 *SREBP-1c* 在成鼠 WC 子代肝臟中表現量較 CC 子代低，或許我們模式中 CC 子代肝臟可能存在 *PPAR α* 活化劑進而影響 DNL 作用。

4. 脂肪(酸)排出可能受阻

生理代謝上自飲食獲得的脂肪送入肝臟後會再以 VLDL 形式分泌至組織利用，若當 VLDL 組裝不完全，自肝臟分泌減少，就可能造成三酸甘油酯堆積在肝臟，甚至會形成氧化壓力使得脂肪肝進展為肝炎，如圖二-27 所示 (Ota et al., 2008; Stefano and Oliveira, 2011)，為探討此路徑，我們以 FPLC 分析兩組子代血清 VLDL 含量，由圖二-19 A 看到代表 VLDL 的高峰在 WC 組雄鼠比 CC 組低的現象，在肝臟製造 VLDL 時會包裹著載脂蛋白 ApoB 一同分泌至肝外，我們也測量了血清中 ApoB 濃度，與 FPLC 結果吻合，WC 雄鼠 ApoB 濃度也較低 (圖二-19 C)，之後在 WC 雄鼠肝臟同樣證實 *ApoB* 基因表現較低 (圖二-20 D)，不僅如此我們還在胚胎也看到相同的趨勢 (圖二-24 A)。另一個與 VLDL 組裝相關基因 *Microsomal triglyceride transfer protein (Mttp)*，其作用是將脂肪酸傳遞給 ApoB，並與 ApoB 表現量成正相關，當 *Mttp* 缺失會使得 ApoB 表現量隨之減少，VLDL 無法順利組成 (Fisher, 2012; Liu et al., 2017; Raabe et al., 1999; Sirwi and Hussain, 2018)，然而我們實驗中 *Mttp* mRNA 表現量兩組間沒有差異，由目前的結

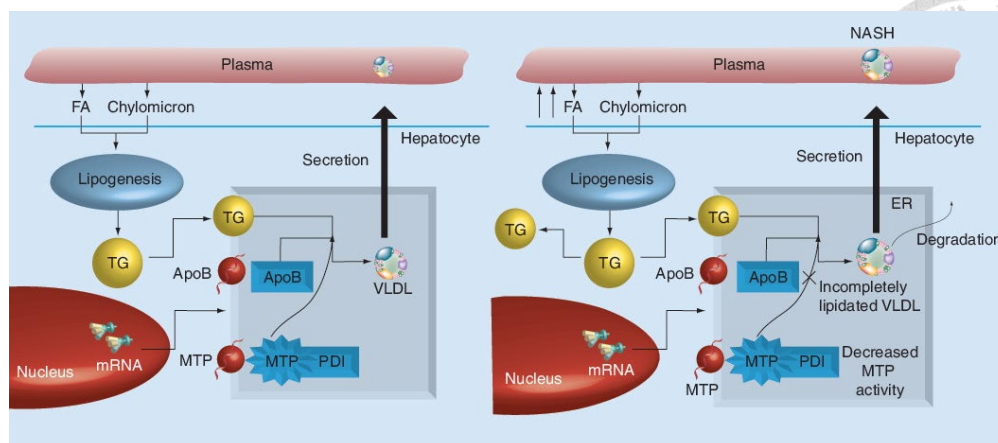


圖 二-27 脂肪酸排出受阻與肝炎進展之可能機制

Figure 2-27 The possible mechanisms of impaired VLDL secretion in livers and the developmental programming of NASH. (Stefano and Oliveira, 2011)

果說明了肝臟的脂質堆積可能與 ApoB 參與的 VLDL 組裝具相關性，類似的情況在人類當中也存在，當 ApoB 基因缺陷會導致家族性的低脂蛋白血症 (homozygous familial hypobetalipoproteinemia, Ho-FHBL)，非酒精性肝炎同為其明顯的特徵之一 (Di Filippo et al., 2014; Schonfeld et al., 2003)，因此我們認為 ApoB 可作為標的基因來調節脂肪肝的進程 (Lee et al., 2014)。

但實際上並非每個實驗中都認為 ApoB 與 NAFLD 為負相關性的，在臨床上甚至是將 ApoB 異常上升視做 NAFLD 病人發生心血管疾病的強烈預測因子 (Nass et al., 2017)，NAFLD 與 non-NAFLD 病人相比血液 ApoB 也時常看到是比較高的 (Jin et al., 2012; Walldius and Jungner, 2006)，該現象有人解釋為肝臟對於過量脂質出現的保護機制 (Higuchi et al., 2011)，與我們推論肝臟先出現的脂質堆積才有的保護作用異曲同工，不同點在於我們模式可能因為 VLDL 組裝障礙，最終過多的脂質負回饋作用在 DNL 本身。

4.1 ApoE 基因剔除對於 ApoB 的影響

同樣作為載脂蛋白 ApoB 與我們使用的動物模式為 $ApoE^{-/-}$ 小鼠出現的影響也值得思考，生理作用上 ApoB 與 ApoE 功能重疊，兩者存在交互影響，ApoE 可能會藉由信號勝肽 (signal peptide) 參與 ApoB 的分泌 (Riches et al., 1998; Watts et al., 2000)，所以認為我們看到的 VLDL 組裝障礙差異相比於野生型 C57BL/6J 小

鼠，在 *ApoE*^{-/-} 小鼠較為明顯是有可能的，這與野生型 C57BL/6J 小鼠本身血液中含有較高濃度的 HDL 與較少的 VLDL 特徵或許相關，過去我們實驗室以同樣方式分析過 C57BL/6J 小鼠血清脂蛋白譜，在以高脂飲食誘導出顯著肝臟三酸甘油酯堆積的情況下與 *ApoE*^{-/-} 小鼠比較同屬於 VLDL 的高峰，可以看到野生型小鼠 VLDL 含量是非常低的 (李世欽, 2017)，因此我認為在這種情況下要看到 VLDL 排出障礙差異是比較困難的。雖然我們可能無法在野生型小鼠得到相同的結果，但在人體實驗卻不盡然，在過去的分析人類 NAFLD 病患脂蛋白圖譜其實反倒是與 *ApoE*^{-/-} 小鼠類似的，血液中有相對較多的 VLDL 與較少的 HDL (Martinez-Una et al., 2015)，因此相信我們的結果對於人類的 NAFLD 研究可能可以提供些貢獻。

七、增加 WC 組雄性子代肝臟膽固醇堆積

我們在 WC 組雄鼠的肝臟看到較多三酸甘油酯的堆積以外，也較 CC 組存在較多的總膽固醇 (圖 二-17 C)。膽固醇合成主要透過增加 SREBP-2 活性以及增加 HMG CoA reductase (HMGCR) 表現促進內生性合成 (Musso et al., 2013)，而肝臟本身即為調控全身膽固醇的重要器官，可藉由 HDL 將血膽固醇回收，合成膽酸排出體外，降低動脈粥狀硬化發生。相較於三酸甘油酯能夠穩定的儲存，過多的游離膽固醇存在肝臟容易促進肝臟的發炎與纖維化，可能透過改變肝臟脂雙層膜的流動性使得 glutathione 流入粒線體減少以及過氧化作用增加，最終促使肝臟細胞凋亡 (Coll et al., 2003; Zhao et al., 2011)，也有研究指出肝臟較多膽固醇累積可能加重 NAFLD 進程且併發心血管疾病機率增加 (Min et al., 2012; Van Rooyen et al., 2011)。因此我們想了解 WC 組雄鼠肝臟總膽固醇堆積是否源於內生性合成路徑上調，只是在先前實驗室的數據顯示，在我們實驗模式下，WC 組較 CC 組內生性膽固醇合成路徑普遍是下調的 (陳誼甄, 2017)，可能與肝臟三酸甘油酯同為負回饋現象。

八、母體效應-孕期高膽固醇血症影響子代 DNA 甲基化

1. *Lxra* DNA methylation 沒有差異

為了解釋母體效應如何影響子代基因表現，我們探討屬於表觀遺傳之 DNA methylation 調控方式，我們首先是分析了對於調控 DNL 非常重要的上游基因 *Lxra*，在過去研究中就發現當子宮環境不良的小鼠子代會出現糖尿病與肥胖的現象，在 intrauterine growth restriction (IUGR) 動物模式下看到肝臟 *Lxra* mRNA 表現量下降，並伴隨著 gDNA methylation 改變 (Martínez et al., 2014)，因此我們分析 *Lxra* 的 CpG islands，該片段飽含 transcription start site (TSS) 的片段，結果發現不論是 16 週齡成鼠是 E18.5 的胚胎肝臟，兩組甲基化程度都非常的低 (圖 二-22)，推測可能在肝臟本身即會大量表現 *Lxra*，所以看到甲基化程度較低也合理。儘管在胚胎時期觀察到 *Lxra* 在西方飲食誘導組是顯著高於控制組的，然而該結果並無法延續至成年 16 週齡，甚至有逆轉成表現量顯著較低的現象，因此推測 *Lxra* 可能不是我們模式中受到 DNA 甲基化調控的目標。

2. 增加 *ApoB* DNA methylation 機率

過去有研究指出給予過量帶有活化甲基的 S-adenosylmethionine (SAME) 會干擾小鼠肝臟 VLDL 分泌，若是透過餵食缺乏 methionine 的飼料來調整 SAME 過量的表現可以使 VLDL 分泌正常化，其中的機制該研究認為 *ApoB* 非常的重要，在 SAME 量經過重建後 *ApoB* 的蛋白質與 mRNA 基因表現顯著提升，而 DNA 甲基化則是會降低，說明 VLDL 的組裝可能與 *ApoB* 的 DNA 甲基化具有相關性 (Martinez-Una et al., 2015)，在我們的實驗中也發現 E18.5 胚胎與成鼠的 *ApoB* mRNA 基因表現都是下降的，是可能受到母體效應調控的目標基因，雖然以 MethPrimer 軟體分析 *ApoB* 序列沒有看到明顯的 CpG islands，僅在 TSS 附近發現一些 CpG sites，但經過 DNA 甲基化分析後依然在 WC 組特定 CpG sites 甲基化程度如預期的較 CC 組高，mRNA 基因表現可能因此受到了調控。

目前我們只選定了 *Lxra* 與 *ApoB* 進行分析，其他基因例如 *Lpl*、*Fasn*、*Pparg*、*Ppara* 在人類或是啮齒類的 NAFLD 模式下被觀察到特定位點 CpG sites DNA methylation 程度的改變 (Cordero et al., 2013; Hardy et al., 2017; Pruis et al., 2014; Zeybel et al., 2015)，推測少量位點受到甲基化調控，可能影響基因表現。

3. DNA 甲基化相關因素之討論

在我們研究中有兩個時期，胚胎或是成年，可進行分析甲基化程度，事實上哺乳類動物受精後胚胎會經過一段 demethylation 時期，出生前再重新發生 *de novo* methylation，不僅如此，子代出生後的哺乳期也是甲基化作用改變的關鍵時期 (Seisenberger et al., 2013; Yuan et al., 2018)。因此為了符合表觀遺傳最重要的定義「基因甲基化必須自生命早期被改變之後維持至成年並遺傳給下一代」，我們決定以成鼠作為首要分析目標，當然之後分析子代出生前或是離乳前有相同的 DNA methylation 會成為更加強烈的證據。

目前我們只分析 *Lxra* 與 *ApoB* 特定位點 CpG sites DNA 甲基化程度，還有其他我們尚未涉及到的區域也是會調控基因表現的，目前許多研究表明外顯子 (exon)，尤其是轉錄起始點之後第一個外顯子的甲基化非常重要，然而內含子 (intron) 的影響也不可忽視，內含子所含的 GC 結構仍然會影響 DNA 甲基化程度 (Brenet et al., 2011; Gelfman et al., 2013)。除了 CpG islands 以外，在結腸癌研究中發現抑制基因表現的低甲基化會被表現在距離 CpG islands 遙遠，被稱之為 CpG islands shore 的區域 (Irizarry et al., 2009; Ziller et al., 2013)。另外一篇針對人類細胞與組織進行的全基因亞硫酸鹽定序分析也得到大多數調控基因表現的 CpG site 是位於轉錄起始點的遠端 (Ziller et al., 2013)。因此要深入研究找到特定 CpG 位點 DNA 甲基化對於基因表現的影響是很漫長而困難的，或者要更直接的驗證在我們模式下 DNL 作用相關基因有沒有受到甲基化調控可以設計實驗如同 2014 年 Martínez 等人的研究，給予即將受孕的母鼠處理 5-aza-2'-deoxycytidine (Than et al., 2018; Wijermans et al., 2000)，降低其與子代全身性甲基化程度，再比較基因表現量是否受到影響，這也是我們實驗室正在探討的研究。

4. 其他可能的表觀遺傳機制

除了 DNA methylation 以外，histone 的乙醯化 (acetylation) 也被證實與 NAFLD 發展相關。Sirt1 為 lysine deacetylase，可以由 deacetylation 調控 RNA 轉錄，在非人類的靈長類實驗模式發現 NAFLD 與 H3K14 和 K9 的 deacetylation 有關 (Suter et al)。故我們也分析肝臟 Sirt1 表現量，發現在 E18.5

胚胎並沒有觀察到 Sirt1 受到孕鼠西方飲食影響而下降的現象，有研究指出比起觀察 Sirt1 mRNA 表現，據有功能性的蛋白質表現量更加重要 (Vaquero et al., 2007; You et al., 2008)，未來可以透過分析肝臟 Sirt1 的蛋白質表現以及活性分析來進行評估我們模式下 Sirt1 是否有影響，或許有組蛋白乙酰化的作用參與在其中。

九、孕鼠誘導西方飲食增加子代代謝症候群發生之其他機制探討

許多文獻證實子代的 NAFLD 與母親的飲食型態極具相關性，若母親懷孕前期以高脂飲食餵養，後期才轉換成低脂飲食，子代的肝臟三酸甘油酯會相較於全程高脂飲食的孕期來得少，糖質新生作用獲得舒緩 (McCurdy et al., 2009)，其中的調控機制非常多元，包括我們的假說，以 WD 誘導出高膽固醇的環境作為一不良因子刺激子代產生適應性反應，還有其他伴隨 WD 而出現的因子可以直接穿透胎盤的影響胎兒 (Zhang et al., 2017)，例如：由組織分泌參與代謝的微小分子 adipokines (Aye et al., 2015; Lappas, 2014)、miRNA (Thomou et al., 2017) 或是肝臟分泌的 Hepatokines 都能夠扮演母體效應訊息傳遞。雖然在我們的實驗或許因為孕鼠資訊收集不夠完善無法看出西方飲食有高膽固醇血症以外的出現代謝失調的現象，但其他研究中還有觀察到 WD 誘導的小鼠會出現肥胖、NAFLD 以及血清高 insulin、leptin 與 adiponectin 等目前證實會增加子代代謝紊亂的因子 (Aroor et al., 2015; Machado et al., 2015)。

在孕期的西方飲食型態會促進子代代謝疾病發展的研究中我們目前是著重在肝臟代謝，然而還有許多原因尚未釐清，肝臟、肌肉或是脂肪調節功能失調都有可能造成子代胰島素阻抗，其中作為脂質與醣類代謝重要場所同時是胰島素合成所在的內質網 (endoplasmic reticulum, ER) 也是熱門研究目標，當肝臟存在 ER Stress 時會激活 JNK 破壞胰島素信號傳遞，增加 SREBP1c 與 SREBP2 作用，促進三酸甘油酯與膽固醇的生成 (Cnop et al., 2012)。此外在親代高脂飲食誘導下，ER stress 也被証實透過 histone 修飾而增加累積，使得後代更容易患有 NAFLD (Fu et al., 2012; Li et al., 2012)。

母系遺傳的粒線體為另一個關鍵因子，在針對肝臟粒線體電子傳遞鏈的酵素進行實驗中，發現母親孕期與哺乳期的高脂飲食會損害子代粒線體功能，並且影響

脂質合成的基因表現 (Bruce et al., 2009b)。在過去已經有研究表示粒線體的功能和型態與肥胖及糖尿病代謝異常十分相關，他們將粒線體中 HLH-leucine zipper transcription factors 之一的 TFE3 基因去除，會使得該小鼠模式出現粒線體缺陷而在 8~12 週後出現肥胖與糖尿病的現象，肝臟三酸甘油酯堆積、肝臟 fatty acid β -oxidation 以及 gluconeogenesis 基因表現下降，若是將 TFE3 過度表現則夠改善高脂飲食 (42% kcal milk fat) 誘導出的代謝異常，說明粒線體與代謝性疾病關係密切 (Pastore et al., 2017)，推測子代在早期的子宮環境就接收到較高的氧化力使得粒線體受損，就可能發展出代謝紊亂或是促進 NAFLD 病程進展，未來想要繼續尋找子代代謝症候群成因還可以往肝臟 ER stress 以及粒線體功能進行延伸 (Perry et al., 2014; Rani et al., 2016)。

第五節 結論

以西方飲食誘導孕鼠產生較高膽固醇血症的情況下，使子代自胚胎時期肝臟有較旺盛的脂質合成作用，導致成年後出現非酒精性脂肪肝以及胰島素阻抗等代謝紊亂現象發生，其中發現肝臟 *ApoB* mRNA 表現量下降與 *ApoB* 基因 DNA 甲基化程度較高可能有關，且認為 *ApoB* mRNA 表現量下降或許是導致 VLDL 組裝障礙的機制。

第三章 參考文獻



- 中華民國糖尿病學會, 行. (2003). 糖尿病防治手冊 (糖尿病預防、診斷與控制流程指引) -醫事人員參考.
- 行政院衛生署國民健康局 (2003). 高血脂防治手冊-國人血脂異常診療及預防指引.
- 李世欽 (2017). 探討 PPAR α 促效劑對高脂飲食誘發小鼠代謝失調及情緒障礙之影響. In 臺灣大學生化科技學系學位論文 (臺灣大學), pp. 1-156.
- 陳誼甄 (2017). 母親高膽固醇血症對小鼠子代代謝性和心血管疾病的影響. In 臺灣大學生化科技學系學位論文 (臺灣大學), pp. 1-139.
- 潘文涵 (2019). 國民營養健康狀況變遷調查 (102-105 年). 衛生福利部國民健康署委託研究計畫.
- 潘文涵, 章雅惠, 陳正義, 吳幸娟, 曾明淑, and 高美丁 (1999). Nutrition and Health Survey in Taiwan (NAHSIT) 1993-1996: Dietary Nutrient Intakes Assessed by 24-Hour Recall. 中華民國營養學會雜誌 24, 11-39.
- 衛生福利部國民健康署 (2007). 代謝症候群手冊.
- Acalovschi, M. (2001). Cholesterol gallstones: from epidemiology to prevention. *Postgraduate Medical Journal* 77, 221.
- Adeva-Andany, M.M., González-Lucán, M., Donapetry-García, C., Fernández-Fernández, C., and Ameneiros-Rodríguez, E. (2016). Glycogen metabolism in humans. *BBA Clin* 5, 85-100.
- Alfaradhi, M.Z., Kusinski, L.C., Fernandez-Twinn, D.S., Pantaleao, L.C., Carr, S.K., Ferland-McCollough, D., Yeo, G.S., Bushell, M., and Ozanne, S.E. (2016). Maternal Obesity in Pregnancy Developmentally Programs Adipose Tissue Inflammation in Young, Lean Male Mice Offspring. *Endocrinology* 157, 4246-4256.
- Anstee, Q.M., Targher, G., and Day, C.P. (2013). Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 10, 330.
- Aroor, A.R., Habibi, J., Ford, D.A., Nistala, R., Lastra, G., Manrique, C., Dunham, M.M., Ford, K.D., Thyfault, J.P., Parks, E.J., *et al.* (2015). Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibition Ameliorates Western Diet-Induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance Through Hepatic Lipid Remodeling and Modulation of Hepatic Mitochondrial Function. *Diabetes* 64, 1988.
- Aye, I.L.M.H., Rosario, F.J., Powell, T.L., and Jansson, T. (2015). Adiponectin supplementation in pregnant mice prevents the adverse effects of maternal obesity on placental function and fetal growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 12858-12863.
- Bao, N., Lye, K.W., and Barton, M.K. (2004). MicroRNA binding sites in Arabidopsis class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome. *Developmental cell* 7, 653-662.
- Barker, D.J. (1990). The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ : British Medical Journal* 301, 1111-1111.

- Barker, D.J., Gelow, J., Thornburg, K., Osmond, C., Kajantie, E., and Eriksson, J.G. (2010). The early origins of chronic heart failure: impaired placental growth and initiation of insulin resistance in childhood. *European journal of heart failure* *12*, 819-825.
- Barker, D.J., Osmond, C., Forsen, T.J., Kajantie, E., and Eriksson, J.G. (2007). Maternal and social origins of hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)* *50*, 565-571.
- Benton, M.C., Johnstone, A., Eccles, D., Harmon, B., Hayes, M.T., Lea, R.A., Griffiths, L., Hoffman, E.P., Stubbs, R.S., and Macartney-Coxson, D. (2015). An analysis of DNA methylation in human adipose tissue reveals differential modification of obesity genes before and after gastric bypass and weight loss. *Genome biology* *16*, 8.
- Besse-Patin, A., Jeromson, S., Levesque-Damphousse, P., Secco, B., Laplante, M., and Estall, J.L. (2019). PGC1A regulates the IRS1:IRS2 ratio during fasting to influence hepatic metabolism downstream of insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201815150.
- Biddinger, S.B., Hernandez-Ono, A., Rask-Madsen, C., Haas, J.T., Aleman, J.O., Suzuki, R., Scapa, E.F., Agarwal, C., Carey, M.C., Stephanopoulos, G., *et al.* (2008). Hepatic insulin resistance is sufficient to produce dyslipidemia and susceptibility to atherosclerosis. *Cell metabolism* *7*, 125-134.
- Boden, G. (1999). Free fatty acids, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Proceedings of the Association of American Physicians* *111*, 241-248.
- Borengasser, S.J., Lau, F., Kang, P., Blackburn, M.L., Ronis, M.J., Badger, T.M., and Shankar, K. (2011). Maternal obesity during gestation impairs fatty acid oxidation and mitochondrial SIRT3 expression in rat offspring at weaning. *PloS one* *6*, e24068.
- Bosello, O., and Zamboni, M. (2000). Visceral obesity and metabolic syndrome. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity* *1*, 47-56.
- Boza, C., Riquelme, A., Ibañez, L., Duarte, I., Norero, E., Viviani, P., Soza, A., Fernandez, J.I., Raddatz, A., Guzman, S., *et al.* (2005). Predictors of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH) in Obese Patients Undergoing Gastric Bypass. *Obesity Surgery* *15*, 1148-1153.
- Brenet, F., Moh, M., Funk, P., Feierstein, E., Viale, A.J., Socci, N.D., and Scandura, J.M. (2011). DNA Methylation of the First Exon Is Tightly Linked to Transcriptional Silencing. *PloS one* *6*, e14524.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2008). Selective versus Total Insulin Resistance: A Pathogenic Paradox. *Cell metabolism* *7*, 95-96.
- Bruce, K.D., Cagampang, F.R., Argenton, M., Zhang, J., Ethirajan, P.L., Burdge, G.C., Bateman, A.C., Clough, G.F., Poston, L., Hanson, M.A., *et al.* (2009a). Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. *Hepatology (Baltimore, Md)* *50*, 1796-1808.
- Bruce, K.D., Cagampang, F.R., Argenton, M., Zhang, J., Ethirajan, P.L., Burdge, G.C., Bateman, A.C., Clough, G.F., Poston, L., Hanson, M.A., *et al.* (2009b). Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. *Hepatology (Baltimore, Md)* *50*, 1796-1808.

- Bugianesi, E., Moscatiello, S., Ciaravella, M.F., and Marchesini, G. (2010). Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Current pharmaceutical design* 16, 1941-1951.
- Bush, N.C., Chandler-Laney, P.C., Rouse, D.J., Granger, W.M., Oster, R.A., and Gower, B.A. (2011). Higher maternal gestational glucose concentration is associated with lower offspring insulin sensitivity and altered beta-cell function. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 96, E803-809.
- Buzzetti, E., Pinzani, M., and Tsochatzis, E.A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: clinical and experimental* 65, 1038-1048.
- Byrne, C.D., and Targher, G. (2015). NAFLD: a multisystem disease. *Journal of hepatology* 62, S47-64.
- Calabro, P., Cirillo, P., Limongelli, G., Maddaloni, V., Riegler, L., Palmieri, R., Pacileo, G., De Rosa, S., Pacileo, M., De Palma, R., *et al.* (2011). Tissue factor is induced by resistin in human coronary artery endothelial cells by the NF-kB-dependent pathway. *Journal of vascular research* 48, 59-66.
- Cao, Y., Jiang, X., Ma, H., Wang, Y., Xue, P., and Liu, Y. (2016). SIRT1 and insulin resistance. *Journal of Diabetes and its Complications* 30, 178-183.
- Capriglioni Cancian, C.R., Leite, N.C., Montes, E.G., Fisher, S.V., Waselcoski, L., Lopes Stal, E.C., Christoforo, R.Z., and Grassioli, S. (2016). Histological and Metabolic State of Dams Suckling Small Litter or MSG-Treated Pups. *The Scientific World Journal* 2016, 1678541.
- Capurso, C., and Capurso, A. (2012). From excess adiposity to insulin resistance: The role of free fatty acids. *Vascular Pharmacology* 57, 91-97.
- Catalano, P., and deMouzon, S.H. (2015). Maternal obesity and metabolic risk to the offspring: why lifestyle interventions may have not achieved the desired outcomes. *International Journal Of Obesity* 39, 642.
- Chakrabarti, P., and Kandror, K.V. (2009). FoxO1 controls insulin-dependent adipose triglyceride lipase (ATGL) expression and lipolysis in adipocytes. *The Journal of biological chemistry* 284, 13296-13300.
- Chakraborti, C.K. (2015). Role of adiponectin and some other factors linking type 2 diabetes mellitus and obesity. *World journal of diabetes* 6, 1296-1308.
- Chalasani, N., Younossi, Z., Lavine, J.E., Diehl, A.M., Brunt, E.M., Cusi, K., Charlton, M., and Sanyal, A.J. (2012). The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology (Baltimore, Md)* 55, 2005-2023.
- Chen, G., Liang, G., Ou, J., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2004). Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 11245.
- Chen, T., and Li, E. (2006). Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *Current topics in microbiology and immunology* 301, 179-201.
- Chiba, T., Nakazawa, T., Yui, K., Kaneko, E., and Shimokado, K. (2003). VLDL induces adipocyte differentiation in ApoE-dependent manner. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23, 1423-1429.
- Choi, C.S., Savage, D.B., Kulkarni, A., Yu, X.X., Liu, Z.X., Morino, K., Kim, S., Distefano, A., Samuel, V.T., Neschen, S., *et al.* (2007). Suppression of

- diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2), but not DGAT1, with antisense oligonucleotides reverses diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *The Journal of biological chemistry* 282, 22678-22688.
- Choi, S.W., and Friso, S. (2010). Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Health. *Advances in nutrition (Bethesda, Md) 1*, 8-16.
- Cnop, M., Foufelle, F., and Velloso, L.A. (2012). Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends in molecular medicine 18*, 59-68.
- Coelho, M., Oliveira, T., and Fernandes, R. (2013). Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Archives of medical science : AMS 9*, 191-200.
- Cohen, J.C., Horton, J.D., and Hobbs, H.H. (2011). Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science (New York, NY) 332*, 1519-1523.
- Coll, O., Colell, A., García-Ruiz, C., Kaplowitz, N., and Fernández-Checa, J.C. (2003). Sensitivity of the 2-oxoglutarate carrier to alcohol intake contributes to mitochondrial glutathione depletion. *Hepatology (Baltimore, Md) 38*, 692-702.
- Commerford, S.R., Peng, L., Dubé, J.J., and O'Doherty, R.M. (2004). In vivo regulation of SREBP-1c in skeletal muscle: effects of nutritional status, glucose, insulin, and leptin. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 287*, R218-R227.
- Cordero, P., Gomez-Uriz, A.M., Campion, J., Milagro, F.I., and Martinez, J.A. (2013). Dietary supplementation with methyl donors reduces fatty liver and modifies the fatty acid synthase DNA methylation profile in rats fed an obesogenic diet. *Genes & Nutrition 8*, 105-113.
- de Souza Batista, C.M., Yang, R.Z., Lee, M.J., Glynn, N.M., Yu, D.Z., Pray, J., Ndubuizu, K., Patil, S., Schwartz, A., Kligman, M., *et al.* (2007). Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. *Diabetes 56*, 1655-1661.
- Di Filippo, M., Moulin, P., Roy, P., Samson-Bouma, M.E., Collardeau-Frachon, S., Chebel-Dumont, S., Peretti, N., Dumortier, J., Zoulim, F., Fontanges, T., *et al.* (2014). Homozygous MTTP and APOB mutations may lead to hepatic steatosis and fibrosis despite metabolic differences in congenital hypocholesterolemia. *Journal of hepatology 61*, 891-902.
- Dimasuay, K.G., Boeuf, P., Powell, T.L., and Jansson, T. (2016). Placental Responses to Changes in the Maternal Environment Determine Fetal Growth. *Frontiers in Physiology 7*.
- Ding, Y., Xian, X., Holland, W.L., Tsai, S., and Herz, J. (2016). Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 Protects Against Hepatic Insulin Resistance and Hepatic Steatosis. *EBioMedicine 7*, 135-145.
- Donnelly, K.L., Smith, C.I., Schwarzenberg, S.J., Jessurun, J., Boldt, M.D., and Parks, E.J. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest 115*, 1343-1351.
- Duval, C., Thissen, U., Keshtkar, S., Accart, B., Stienstra, R., Boekschoten, M.V., Roskams, T., Kersten, S., and Müller, M. (2010). Adipose Tissue Dysfunction Signals Progression of Hepatic Steatosis Towards Nonalcoholic Steatohepatitis in C57Bl/6 Mice. *Diabetes 59*, 3181.
- Elahi, M.M., Cagampang, F.R., Mukhtar, D., Anthony, F.W., Ohri, S.K., and Hanson, M.A. (2009). Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. *The British journal of nutrition 102*, 514-519.
- Fabbrini, E., Mohammed, B.S., Magkos, F., Korenblat, K.M., Patterson, B.W., and Klein, S. (2008). Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese

- men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 134, 424-431.
- Filkova, M., Haluzik, M., Gay, S., and Senolt, L. (2009). The role of resistin as a regulator of inflammation: Implications for various human pathologies. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 133, 157-170.
- Fisher, E.A. (2012). The degradation of apolipoprotein B100: multiple opportunities to regulate VLDL triglyceride production by different proteolytic pathways. *Biochimica et biophysica acta* 1821, 778-781.
- Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry* 226, 497-509.
- Fu, S., Watkins, S.M., and Hotamisligil, G.S. (2012). The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling. *Cell metabolism* 15, 623-634.
- Fuks, F., Burgers, W.A., Brehm, A., Hughes-Davies, L., and Kouzarides, T. (2000). DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nature genetics* 24, 88-91.
- Gaidhu, M.P., Anthony, N.M., Patel, P., Hawke, T.J., and Ceddia, R.B. (2010). Dysregulation of lipolysis and lipid metabolism in visceral and subcutaneous adipocytes by high-fat diet: role of ATGL, HSL, and AMPK. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 298, C961-C971.
- Gao, Y., Moten, A., and Lin, H.-K. (2014). Akt: a new activation mechanism. *Cell Research* 24, 785.
- Geisler, C.E., and Renquist, B.J. (2017). Hepatic lipid accumulation: cause and consequence of dysregulated glucoregulatory hormones. *The Journal of endocrinology* 234, R1-r21.
- Gelfman, S., Cohen, N., Yearim, A., and Ast, G. (2013). DNA-methylation effect on cotranscriptional splicing is dependent on GC architecture of the exon-intron structure. *Genome research* 23, 789-799.
- Glatz, J.F., and Luiken, J.J. (2017). From fat to FAT (CD36/SR-B2): Understanding the regulation of cellular fatty acid uptake. *Biochimie* 136, 21-26.
- Gluckman, P.D., and Hanson, M.A. (2004). The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 15, 183-187.
- Goharkhay, N., Tamayo, E.H., Yin, H., Hankins, G.D., Saade, G.R., and Longo, M. (2008a). Maternal hypercholesterolemia leads to activation of endogenous cholesterol synthesis in the offspring. *American journal of obstetrics and gynecology* 199, 273.e271-276.
- Goharkhay, N., Tamayo, E.H., Yin, H., Hankins, G.D.V., Saade, G.R., and Longo, M. (2008b). Maternal hypercholesterolemia leads to activation of endogenous cholesterol synthesis in the offspring. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 199, 273.e271-273.e276.
- Goldberg, A.D., Allis, C.D., and Bernstein, E. (2007). Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128, 635-638.
- Gonzalez-Franquesa, A., De Nigris, V., Lerin, C., and Garcia-Roves, P. (2012). Skeletal Muscle Mitochondrial Function/Dysfunction and Type 2 Diabetes.
- Grundy, S.M. (2004). Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89, 2595-2600.
- Guilherme, A., Virbasius, J.V., Puri, V., and Czech, M.P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 367.

- Haghiac, M., Basu, S., Presley, L., Serre, D., Catalano, P.M., and Hauguel-de Mouzon, S. (2014). Patterns of Adiponectin Expression in Term Pregnancy: Impact of Obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 99, 3427-3434.
- Hales, C.N., and Barker, D.J. (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35, 595-601.
- Hall, A.M., Soufi, N., Chambers, K.T., Chen, Z., Schweitzer, G.G., McCommis, K.S., Erion, D.M., Graham, M.J., Su, X., and Finck, B.N. (2014). Abrogating Monoacylglycerol Acyltransferase Activity in Liver Improves Glucose Tolerance and Hepatic Insulin Signaling in Obese Mice. *Diabetes* 63, 2284.
- Hardy, T., Zeybel, M., Day, C.P., Dipper, C., Masson, S., McPherson, S., Henderson, E., Tiniakos, D., White, S., French, J., *et al.* (2017). Plasma DNA methylation: a potential biomarker for stratification of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 66, 1321.
- He, J., Xu, C., Kuang, J., Liu, Q., Jiang, H., Mo, L., Geng, B., and Xu, G. (2015). Thiazolidinediones attenuate lipolysis and ameliorate dexamethasone-induced insulin resistance. *Metabolism: clinical and experimental* 64, 826-836.
- Hemmings, B.A., and Restuccia, D.F. (2012). PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 4, a011189.
- Herzig, S., Long, F., Jhala, U.S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P., *et al.* (2001). CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* 413, 179-183.
- Higuchi, N., Kato, M., Tanaka, M., Miyazaki, M., Takao, S., Kohjima, M., Kotoh, K., Enjoji, M., Nakamuta, M., and Takayanagi, R. (2011). Effects of insulin resistance and hepatic lipid accumulation on hepatic mRNA expression levels of apoB, MTP and L-FABP in non-alcoholic fatty liver disease. *Experimental and therapeutic medicine* 2, 1077-1081.
- Hill, N.R., Levy, J.C., and Matthews, D.R. (2013). Expansion of the homeostasis model assessment of beta-cell function and insulin resistance to enable clinical trial outcome modeling through the interactive adjustment of physiology and treatment effects: iHOMA2. *Diabetes care* 36, 2324-2330.
- Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (New York, NY)* 259, 87-91.
- Howard, B.V. (1987). Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. *Journal of lipid research* 28, 613-628.
- Howell, G., Deng, X., Yellaturu, C., Park, E.A., Wilcox, H.G., Raghov, R., and Elam, M.B. (2009). N-3 polyunsaturated fatty acids suppress insulin-induced SREBP-1c transcription via reduced trans-activating capacity of LXR α . *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791, 1190-1196.
- Humphrey, S.J., Azimifar, S.B., and Mann, M. (2015). High-throughput phosphoproteomics reveals in vivo insulin signaling dynamics. *Nature Biotechnology* 33, 990.
- Ipsen, D.H., Lykkesfeldt, J., and Tveden-Nyborg, P. (2018). Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 75, 3313-3327.
- Irizarry, R.A., Ladd-Acosta, C., Wen, B., Wu, Z., Montano, C., Onyango, P., Cui, H., Gabo, K., Rongione, M., Webster, M., *et al.* (2009). The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nature Genetics* 41, 178.

- Isomaa, B., Almgren, P., Tuomi, T., Forsen, B., Lahti, K., Nissen, M., Taskinen, M.R., and Groop, L. (2001). Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes care* 24, 683-689.
- Itani, S.I., Ruderman, N.B., Schmieider, F., and Boden, G. (2002). Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha. *Diabetes* 51, 2005-2011.
- Jansson, T., Aye, I.L., and Goberdhan, D.C. (2012). The emerging role of mTORC1 signaling in placental nutrient-sensing. *Placenta* 33 Suppl 2, e23-29.
- Jensen, V.S., Porsgaard, T., Lykkesfeldt, J., and Hvid, H. (2016). Rodent model choice has major impact on variability of standard preclinical readouts associated with diabetes and obesity research. *Am J Transl Res* 8, 3574-3584.
- Jimenez-Chillaron, J.C., Diaz, R., Martinez, D., Pentinat, T., Ramon-Krauel, M., Ribo, S., and Plosch, T. (2012). The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. *Biochimie* 94, 2242-2263.
- Jin, R., Le, N.-A., Liu, S., Farkas Epperson, M., Ziegler, T.R., Welsh, J.A., Jones, D.P., McClain, C.J., and Vos, M.B. (2012). Children with NAFLD Are More Sensitive to the Adverse Metabolic Effects of Fructose Beverages than Children without NAFLD. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 97, E1088-E1098.
- Johnson, L., Cao, X., and Jacobsen, S. (2002). Interplay between two epigenetic marks. DNA methylation and histone H3 lysine 9 methylation. *Current biology : CB* 12, 1360-1367.
- Jones, P.A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature reviews Genetics* 13, 484-492.
- Kang, Y.E., Kim, J.M., Joung, K.H., Lee, J.H., You, B.R., Choi, M.J., Ryu, M.J., Ko, Y.B., Lee, M.A., Lee, J., *et al.* (2016). The Roles of Adipokines, Proinflammatory Cytokines, and Adipose Tissue Macrophages in Obesity-Associated Insulin Resistance in Modest Obesity and Early Metabolic Dysfunction. *PLoS one* 11, e0154003.
- Kersten, S., and Stenstra, R. (2017). The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver. *Biochimie* 136, 75-84.
- Kiechl, S., Wittmann, J., Giaccari, A., Knoflach, M., Willeit, P., Bozec, A., Moschen, A.R., Muscogiuri, G., Sorice, G.P., Kireva, T., *et al.* (2013). Blockade of receptor activator of nuclear factor- κ B (RANKL) signaling improves hepatic insulin resistance and prevents development of diabetes mellitus. *Nature medicine* 19, 358.
- Kjems, L.L., Holst, J.J., Vølund, A., and Madsbad, S. (2003). The Influence of GLP-1 on Glucose-Stimulated Insulin Secretion. *Diabetes* 52, 380.
- Koek, G.H., Liedorp, P.R., and Bast, A. (2011). The role of oxidative stress in non-alcoholic steatohepatitis. *Clinica Chimica Acta* 412, 1297-1305.
- Kohli, R.M., and Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 502, 472-479.
- Koo, H.-Y., Wallig, M.A., Chung, B.H., Nara, T.Y., Cho, B.H.S., and Nakamura, M.T. (2008). Dietary fructose induces a wide range of genes with distinct shift in carbohydrate and lipid metabolism in fed and fasted rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1782, 341-348.
- Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature reviews Genetics* 11, 597-610.
- Kubota, N., Terauchi, Y., Miki, H., Tamemoto, H., Yamauchi, T., Komeda, K., Satoh, S., Nakano, R., Ishii, C., Sugiyama, T., *et al.* (1999). PPAR γ Mediates High-Fat

- Diet-Induced Adipocyte Hypertrophy and Insulin Resistance. *Molecular Cell* 4, 597-609.
- Lappas, M. (2014). Effect of pre-existing maternal obesity, gestational diabetes and adipokines on the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue. *Metabolism: clinical and experimental* 63, 250-262.
- Leclercq, I.A., Da Silva Morais, A., Schroyen, B., Van Hul, N., and Geerts, A. (2007). Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: Mechanisms and consequences. *Journal of hepatology* 47, 142-156.
- Lecoutre, S., Oger, F., Pourpe, C., Butruille, L., Marousez, L., Dickes-Coopman, A., Laborie, C., Guinez, C., Lesage, J., Vieau, D., *et al.* (2017). Maternal obesity programs increased leptin gene expression in rat male offspring via epigenetic modifications in a depot-specific manner. *Molecular Metabolism* 6, 922-930.
- Lee, M.R., Lee, H.Y., Lee, G.H., Kim, H.K., Kim, N.Y., Kim, S.H., Kim, H.R., and Chae, H.J. (2014). *Ixeris dentata* decreases ER stress and hepatic lipid accumulation through regulation of ApoB secretion. *The American journal of Chinese medicine* 42, 639-649.
- Leite, N.C., Salles, G.F., Araujo, A.L., Villela-Nogueira, C.A., and Cardoso, C.R. (2009). Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 29, 113-119.
- Lewis, G.F., Carpentier, A., Adeli, K., and Giacca, A. (2002). Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocrine reviews* 23, 201-229.
- Li, J., Huang, J., Li, J.-S., Chen, H., Huang, K., and Zheng, L. (2012). Accumulation of endoplasmic reticulum stress and lipogenesis in the liver through generational effects of high fat diets. *Journal of hepatology* 56, 900-907.
- Li, L., Luo, Z., Yu, H., Feng, X., Wang, P., Chen, J., Pu, Y., Zhao, Y., He, H., Zhong, J., *et al.* (2013). Telmisartan Improves Insulin Resistance of Skeletal Muscle Through Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- δ Activation. *Diabetes* 62, 762.
- Li, S., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2010). Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 3441-3446.
- Li, X., Li, X., Lin, H., Fu, X., Lin, W., Li, M., Zeng, X., and Gao, Q. (2017). Metabolic syndrome and stroke: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 40, 34-38.
- Li, Z., Kelly, L., Heiman, M., Greengard, P., and Friedman, J.M. (2015). Hypothalamic Amylin Acts in Concert with Leptin to Regulate Food Intake. *Cell metabolism* 22, 1059-1067.
- Liu, Y., Conlon, D.M., Bi, X., Slovik, K.J., Shi, J., Edelstein, H.I., Millar, J.S., Javaheri, A., Cuchel, M., Pashos, E.E., *et al.* (2017). Lack of MTP Activity in Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocytes and Cardiomyocytes Abolishes apoB Secretion and Increases Cell Stress. *Cell Reports* 19, 1456-1466.
- Ludvik, B., Lell, B., Hartter, E., Schnack, C., and Prager, R. (1991). Decrease of stimulated amylin release precedes impairment of insulin secretion in type II diabetes. *Diabetes* 40, 1615-1619.

- Lumeng, C.N., Bodzin, J.L., and Saltiel, A.R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117, 175-184.
- Lundasen, T., Hunt, M.C., Nilsson, L.M., Sanyal, S., Angelin, B., Alexson, S.E., and Rudling, M. (2007). PPAR α is a key regulator of hepatic FGF21. *Biochemical and biophysical research communications* 360, 437-440.
- Luo, L., and Liu, M. (2016). Adipose tissue in control of metabolism. *The Journal of endocrinology* 231, R77-r99.
- Lynch, L., Nowak, M., Varghese, B., Clark, J., Hogan, A.E., Toxavidis, V., Balk, S.P., O'Shea, D., O'Farrelly, C., and Exley, M.A. (2012). Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production. *Immunity* 37, 574-587.
- Machado, M.V., Goncalves, S., Carepa, F., Coutinho, J., Costa, A., and Cortez-Pinto, H. (2012). Impaired renal function in morbid obese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 32, 241-248.
- Machado, M.V., Michelotti, G.A., Xie, G., de Almeida, T.P., Boursier, J., Bohnic, B., Guy, C.D., and Diehl, A.M. (2015). Mouse Models of Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis Reproduce the Heterogeneity of the Human Disease. *PloS one* 10, e0127991.
- Mai, K., Andres, J., Biedasek, K., Weicht, J., Bobbert, T., Sabath, M., Meinus, S., Reinecke, F., Möhlig, M., Weickert, M.O., *et al.* (2009). Free fatty acids link metabolism and regulation of the insulin-sensitizing fibroblast growth factor-21. *Diabetes* 58, 1532-1538.
- Maresca, F., Di Palma, V., Bevilacqua, M., Uccello, G., Tagliatela, V., Giaquinto, A., Esposito, G., Trimarco, B., and Cirillo, P. (2015). Adipokines, vascular wall, and cardiovascular disease: a focused overview of the role of adipokines in the pathophysiology of cardiovascular disease. *Angiology* 66, 8-24.
- Martínez, D., Pentinat, T., Ribó, S., Daviaud, C., Bloks, Vincent W., Cebrià, J., Villalmanzo, N., Kalko, Susana G., Ramón-Krauel, M., Díaz, R., *et al.* (2014). In Utero Undernutrition in Male Mice Programs Liver Lipid Metabolism in the Second-Generation Offspring Involving Altered Lxra DNA Methylation. *Cell metabolism* 19, 941-951.
- Martinez-Una, M., Varela-Rey, M., Mestre, D., Fernandez-Ares, L., Fresnedo, O., Fernandez-Ramos, D., Gutierrez-de Juan, V., Martin-Guerrero, I., Garcia-Orad, A., Luka, Z., *et al.* (2015). S-Adenosylmethionine increases circulating very-low density lipoprotein clearance in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology* 62, 673-681.
- Mathews (2018). CHAPTER 17 Lipid Metabolism I: Fatty Acids, Triacylglycerols, and Lipoproteins. *Biochemistry*.
- Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., and Turner, R.C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 412-419.
- McCurdy, C.E., Bishop, J.M., Williams, S.M., Grayson, B.E., Smith, M.S., Friedman, J.E., and Grove, K.L. (2009). Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. *The Journal of Clinical Investigation* 119, 323-335.
- McLaughlin, T., Craig, C., Liu, L.-F., Perelman, D., Allister, C., Spielman, D., and Cushman, S.W. (2016). Adipose Cell Size and Regional Fat Deposition as

- Predictors of Metabolic Response to Overfeeding in Insulin-Resistant and Insulin-Sensitive Humans. *Diabetes* 65, 1245-1254.
- Meex, R.C.R., and Watt, M.J. (2017). Hepatokines: linking nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Nature reviews Endocrinology* 13, 509-520.
- Mennitti, L.V., Oliveira, J.L., Morais, C.A., Estadella, D., Oyama, L.M., Oller do Nascimento, C.M., and Pisani, L.P. (2015). Type of fatty acids in maternal diets during pregnancy and/or lactation and metabolic consequences of the offspring. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 26, 99-111.
- Miller, L. (2010). Analyzing gels and western blots with ImageJ.
- Min, H.-K., Kapoor, A., Fuchs, M., Mirshahi, F., Zhou, H., Maher, J., Kellum, J., Warnick, R., Contos, Melissa J., and Sanyal, Arun J. (2012). Increased Hepatic Synthesis and Dysregulation of Cholesterol Metabolism Is Associated with the Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell metabolism* 15, 665-674.
- Musso, G., Gambino, R., and Cassader, M. (2013). Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Progress in lipid research* 52, 175-191.
- Nass, K.J., van den Berg, E.H., Faber, K.N., Schreuder, T.C.M.A., Blokzijl, H., and Dullaart, R.P.F. (2017). High prevalence of apolipoprotein B dyslipoproteinemias in non-alcoholic fatty liver disease: The lifelines cohort study. *Metabolism: clinical and experimental* 72, 37-46.
- Nathan, D.M., Davidson, M.B., DeFronzo, R.A., Heine, R.J., Henry, R.R., Pratley, R., and Zinman, B. (2007). Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: implications for care. *Diabetes care* 30, 753-759.
- Nawaz, A., Mehmood, A., Kanatani, Y., Kado, T., Igarashi, Y., Takikawa, A., Yamamoto, S., Okabe, K., Nakagawa, T., Yagi, K., *et al.* (2018). Sirt1 activator induces proangiogenic genes in preadipocytes to rescue insulin resistance in diet-induced obese mice. *Scientific Reports* 8, 11370.
- Nguyen, L.T., Chen, H., Zaky, A., Pollock, C., and Saad, S. (2019). SIRT1 overexpression attenuates offspring metabolic and liver disorders as a result of maternal high-fat feeding. *The Journal of Physiology* 597, 467-480.
- O'Neill, Brian T., Lauritzen, Hans P.M.M., Hirshman, Michael F., Smyth, G., Goodyear, Laurie J., and Kahn, C.R. (2015). Differential Role of Insulin/IGF-1 Receptor Signaling in Muscle Growth and Glucose Homeostasis. *Cell Reports* 11, 1220-1235.
- Okon, E.B., Chung, A.W., Zhang, H., Laher, I., and van Breemen, C. (2007). Hyperglycemia and hyperlipidemia are associated with endothelial dysfunction during the development of type 2 diabetes. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 85, 562-567.
- Ornoy, A. (2011). Prenatal origin of obesity and their complications: Gestational diabetes, maternal overweight and the paradoxical effects of fetal growth restriction and macrosomia. *Reproductive Toxicology* 32, 205-212.
- Ota, T., Gayet, C., and Ginsberg, H.N. (2008). Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *J Clin Invest* 118, 316-332.
- Ouchi, N., Parker, J.L., Lugus, J.J., and Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology* 11, 85.
- Papacleovoulou, G., Abu-Hayyeh, S., Nikolopoulou, E., Briz, O., Owen, B.M., Nikolova, V., Ovadia, C., Huang, X., Vaarasmaki, M., Baumann, M., *et al.* (2013).

- Maternal cholestasis during pregnancy programs metabolic disease in offspring. *The Journal of Clinical Investigation* 123, 3172-3181.
- Parlee, S.D., Lentz, S.I., Mori, H., and MacDougald, O.A. (2014). Chapter Six - Quantifying Size and Number of Adipocytes in Adipose Tissue. In *Methods in Enzymology*, O.A. Macdougald, ed. (Academic Press), pp. 93-122.
- Pastore, N., Vainshtein, A., Klisch, T.J., Armani, A., Huynh, T., Herz, N.J., Polishchuk, E.V., Sandri, M., and Ballabio, A. (2017). TFE3 regulates whole-body energy metabolism in cooperation with TFEF. *EMBO molecular medicine* 9, 605-621.
- Patel, D.D., Knight, B.L., Wiggins, D., Humphreys, S.M., and Gibbons, G.F. (2001). Disturbances in the normal regulation of SREBP-sensitive genes in PPAR alpha-deficient mice. *Journal of lipid research* 42, 328-337.
- Perry, R.J., Samuel, V.T., Petersen, K.F., and Shulman, G.I. (2014). The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 510, 84.
- Pessin, J.E., and Saltiel, A.R. (2000). Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 106, 165-169.
- Petersen, M.C., and Shulman, G.I. (2017). Roles of Diacylglycerols and Ceramides in Hepatic Insulin Resistance. *Trends in pharmacological sciences* 38, 649-665.
- Pfluger, P.T., Herranz, D., Velasco-Miguel, S., Serrano, M., and Tschöp, M.H. (2008). Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 9793.
- Piedrahita, J.A., Zhang, S.H., Hagaman, J.R., Oliver, P.M., and Maeda, N. (1992). Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 4471-4475.
- Plump, A.S., Smith, J.D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J.G., Rubin, E.M., and Breslow, J.L. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71, 343-353.
- Ponugoti, B., Kim, D.H., Xiao, Z., Smith, Z., Miao, J., Zang, M., Wu, S.Y., Chiang, C.M., Veenstra, T.D., and Kemper, J.K. (2010). SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. *The Journal of biological chemistry* 285, 33959-33970.
- Postic, C., and Girard, J. (2008). Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* 118, 829-838.
- Pruis, M.G.M., Lendvai, Á., Bloks, V.W., Zwier, M.V., Baller, J.F.W., de Bruin, A., Groen, A.K., and Plösch, T. (2014). Maternal western diet primes non-alcoholic fatty liver disease in adult mouse offspring. *Acta Physiologica* 210, 215-227.
- Qi, Y., Nie, Z., Lee, Y.S., Singhal, N.S., Scherer, P.E., Lazar, M.A., and Ahima, R.S. (2006). Loss of resistin improves glucose homeostasis in leptin deficiency. *Diabetes* 55, 3083-3090.
- Raabe, M., Véniant, M.M., Sullivan, M.A., Zlot, C.H., Björkegren, J., Nielsen, L.B., Wong, J.S., Hamilton, R.L., and Young, S.G. (1999). Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. *The Journal of Clinical Investigation* 103, 1287-1298.
- Rani, V., Deep, G., Singh, R.K., Palle, K., and Yadav, U.C. (2016). Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life sciences* 148, 183-193.

- Ravelli, G.P., Stein, Z.A., and Susser, M.W. (1976). Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *The New England journal of medicine* 295, 349-353.
- Reaven, G.M. (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37, 1595-1607.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H., and Fahey, G.C., Jr. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of nutrition* 123, 1939-1951.
- Remacle, C., Bieswal, F., Bol, V., and Reusens, B. (2011). Developmental programming of adult obesity and cardiovascular disease in rodents by maternal nutrition imbalance. *The American journal of clinical nutrition* 94, 1846s-1852s.
- Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Mangelsdorf, D.J. (2000). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes & development* 14, 2819-2830.
- Riches, F.M., Watts, G.F., van Bockxmeer, F.M., Hua, J., Song, S., Humphries, S.E., and Talmud, P.J. (1998). Apolipoprotein B signal peptide and apolipoprotein E genotypes as determinants of the hepatic secretion of VLDL apoB in obese men. *Journal of lipid research* 39, 1752-1758.
- Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., and Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature* 434, 113.
- Rotter, V., Nagaev, I., and Smith, U. (2003). Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor- α , overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *The Journal of biological chemistry* 278, 45777-45784.
- Ruan, H., and Dong, L.Q. (2016). Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. *Journal of Molecular Cell Biology* 8, 101-109.
- Sabio, G., Das, M., Mora, A., Zhang, Z., Jun, J.Y., Ko, H.J., Barrett, T., Kim, J.K., and Davis, R.J. (2008). A Stress Signaling Pathway in Adipose Tissue Regulates Hepatic Insulin Resistance. *Science (New York, NY)* 322, 1539.
- Sáinz, N., Barrenetxe, J., Moreno-Aliaga, M.J., and Martínez, J.A. (2015). Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metabolism: clinical and experimental* 64, 35-46.
- Sakamoto, K., and Holman, G.D. (2008). Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 295, E29-E37.
- Samuel, V.T., Liu, Z.X., Qu, X., Elder, B.D., Bilz, S., Befroy, D., Romanelli, A.J., and Shulman, G.I. (2004). Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *The Journal of biological chemistry* 279, 32345-32353.
- Samuel, Varman T., and Shulman, Gerald I. (2012). Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links. *Cell* 148, 852-871.
- Sanders, F.W.B., and Griffin, J.L. (2016). De novo lipogenesis in the liver in health and disease: more than just a shunting yard for glucose. *Biological Reviews* 91, 452-468.
- Sastry, K.S., Karpova, Y., Prokopovich, S., Smith, A.J., Essau, B., Gersappe, A., Carson, J.P., Weber, M.J., Register, T.C., Chen, Y.Q., *et al.* (2007). Epinephrine protects cancer cells from apoptosis via activation of cAMP-dependent protein

- kinase and BAD phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 282, 14094-14100.
- Schonfeld, G., Patterson, B.W., Yablonskiy, D.A., Tanoli, T.S., Aversa, M., Elias, N., Yue, P., and Ackerman, J. (2003). Fatty liver in familial hypobetalipoproteinemia: triglyceride assembly into VLDL particles is affected by the extent of hepatic steatosis. *Journal of lipid research* 44, 470-478.
- Seisenberger, S., Peat, J.R., Hore, T.A., Santos, F., Dean, W., and Reik, W. (2013). Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 368, 20110330.
- Sellers, E.A., Yung, G., and Dean, H.J. (2007). Dyslipidemia and other cardiovascular risk factors in a Canadian First Nation pediatric population with type 2 diabetes mellitus. *Pediatric diabetes* 8, 384-390.
- Shankar, K., Harrell, A., Liu, X., Gilchrist, J.M., Ronis, M.J., and Badger, T.M. (2008). Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 294, R528-538.
- Shankar, K., Zhong, Y., Kang, P., Lau, F., Blackburn, M.L., Chen, J.R., Borengasser, S.J., Ronis, M.J., and Badger, T.M. (2011). Maternal obesity promotes a proinflammatory signature in rat uterus and blastocyst. *Endocrinology* 152, 4158-4170.
- Shen, C., Zhao, C.-Y., Wang, W., Wang, Y.-D., Sun, H., Cao, W., Yu, W.-Y., Zhang, L., Ji, R., Li, M., *et al.* (2014). The relationship between hepatic resistin overexpression and inflammation in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *BMC Gastroenterology* 14, 39.
- Shigeto, M., Ramracheya, R., Tarasov, A.I., Cha, C.Y., Chibalina, M.V., Hastoy, B., Philippaert, K., Reinbothe, T., Rorsman, N., Salehi, A., *et al.* (2015). GLP-1 stimulates insulin secretion by PKC-dependent TRPM4 and TRPM5 activation. *The Journal of Clinical Investigation* 125, 4714-4728.
- Shimomura, I., Bashmakov, Y., Ikemoto, S., Horton, J.D., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1999). Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 13656.
- Shoelson, S.E., Herrero, L., and Naaz, A. (2007). Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 132, 2169-2180.
- Shulman, G.I. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106, 171-176.
- Shulman, G.I. (2014). Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. *The New England journal of medicine* 371, 1131-1141.
- Sirwi, A., and Hussain, M.M. (2018). Lipid transfer proteins in the assembly of apoB-containing lipoproteins. *Journal of lipid research* 59, 1094-1102.
- Smit, E., Blaak, E.E., Hul, G.B., Saris, W.H.M., Jocken, J.W.E., Valle, C., Langin, D., Holm, C., and Arner, P. (2007). Adipose Triglyceride Lipase and Hormone-Sensitive Lipase Protein Expression Is Decreased in the Obese Insulin-Resistant State. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92, 2292-2299.
- Softic, S., Boucher, J., Solheim, M.H., Fujisaka, S., Haering, M.F., Homan, E.P., Winnay, J., Perez-Atayde, A.R., and Kahn, C.R. (2016). Lipodystrophy Due to Adipose Tissue-Specific Insulin Receptor Knockout Results in Progressive NAFLD. *Diabetes* 65, 2187-2200.

- Stefan, N., Kantartzis, K., and Haring, H.U. (2008). Causes and metabolic consequences of Fatty liver. *Endocrine reviews* 29, 939-960.
- Stefano, J.T., and Oliveira, C.P.M.S. (2011). Microsomal triglyceride transfer protein and nonalcoholic fatty liver disease AU - Pereira, Isabel VA. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 5, 245-251.
- Storch, J., and Thumser, A.E. (2010). Tissue-specific functions in the fatty acid-binding protein family. *The Journal of biological chemistry* 285, 32679-32683.
- Stubbins, R.E., Najjar, K., Holcomb, V.B., Hong, J., and Núñez, N.P. (2012). Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 14, 58-66.
- Summers, S.A. (2006). Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Progress in lipid research* 45, 42-72.
- Sun, C., Zhang, F., Ge, X., Yan, T., Chen, X., Shi, X., and Zhai, Q. (2007). SIRT1 Improves Insulin Sensitivity under Insulin-Resistant Conditions by Repressing PTP1B. *Cell metabolism* 6, 307-319.
- Szczepaniak, L.S., Nurenberg, P., Leonard, D., Browning, J.D., Reingold, J.S., Grundy, S., Hobbs, H.H., and Dobbins, R.L. (2005). Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, E462-468.
- Takeda, M., Yamamoto, K., Takemura, Y., Takeshita, H., Hongyo, K., Kawai, T., Hanasaki-Yamamoto, H., Oguro, R., Takami, Y., Tatara, Y., *et al.* (2013). Loss of ACE2 Exaggerates High-Calorie Diet-Induced Insulin Resistance by Reduction of GLUT4 in Mice. *Diabetes* 62, 223.
- Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., and Kahn, C.R. (2006). Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 85.
- Taylor, P.D., and Poston, L. (2007). Developmental programming of obesity in mammals. *Experimental physiology* 92, 287-298.
- Than, H., Qiao, Y., Huang, X., Yan, D., Khorashad, J.S., Pomicter, A.D., Kovacovics, T.J., Marth, G.T., O'Hare, T., and Deininger, M.W. (2018). Ongoing clonal evolution in chronic myelomonocytic leukemia on hypomethylating agents: a computational perspective. *Leukemia* 32, 2049-2054.
- Thomou, T., Mori, M.A., Dreyfuss, J.M., Konishi, M., Sakaguchi, M., Wolfrum, C., Rao, T.N., Winnay, J.N., Garcia-Martin, R., Grinspoon, S.K., *et al.* (2017). Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. *Nature* 542, 450-455.
- Tolman, K.G., Fonseca, V., Dalpiaz, A., and Tan, M.H. (2007). Spectrum of liver disease in type 2 diabetes and management of patients with diabetes and liver disease. *Diabetes care* 30, 734-743.
- Tuddenham, L., Wheeler, G., Ntounia-Fousara, S., Waters, J., Hajihosseini, M.K., Clark, I., and Dalmay, T. (2006). The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells. *FEBS letters* 580, 4214-4217.
- van Harmelen, V., Skurk, T., Röhrig, K., Lee, Y.M., Halbleib, M., Aprath-Husmann, I., and Hauner, H. (2003). Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *International Journal of Obesity* 27, 889-895.
- Van Rooyen, D.M., Larter, C.Z., Haigh, W.G., Yeh, M.M., Ioannou, G., Kuver, R., Lee, S.P., Teoh, N.C., and Farrell, G.C. (2011). Hepatic Free Cholesterol Accumulates in Obese, Diabetic Mice and Causes Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology* 141, 1393-1403.e1395.

- Vaquero, A., Scher, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Serrano, L., and Reinberg, D. (2007). SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature* *450*, 440-444.
- Vatner, D.F., Majumdar, S.K., Kumashiro, N., Petersen, M.C., Rahimi, Y., Gattu, A.K., Bears, M., Camporez, J.-P.G., Cline, G.W., Jurczak, M.J., *et al.* (2015). Insulin-independent regulation of hepatic triglyceride synthesis by fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *112*, 1143.
- Virkamaki, A., Korshennikova, E., Seppala-Lindroos, A., Vehkavaara, S., Goto, T., Halavaara, J., Hakkinen, A.M., and Yki-Jarvinen, H. (2001). Intramyocellular lipid is associated with resistance to in vivo insulin actions on glucose uptake, antilipolysis, and early insulin signaling pathways in human skeletal muscle. *Diabetes* *50*, 2337-2343.
- Waki, H., Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Uchida, S., Kita, S., Hara, K., Hada, Y., Vasseur, F., Froguel, P., *et al.* (2003). Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *The Journal of biological chemistry* *278*, 40352-40363.
- Walldius, G., and Jungner, I. (2006). The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy – a review of the evidence. *Journal of Internal Medicine* *259*, 493-519.
- Watts, G.F., Riches, F.M., Humphries, S.E., Talmud, P.J., and van Bockxmeer, F.M. (2000). Genotypic associations of the hepatic secretion of VLDL apolipoprotein B-100 in obesity. *Journal of lipid research* *41*, 481-488.
- Weinstein, M.M., Tu, Y., Beigneux, A.P., Davies, B.S., Gin, P., Voss, C., Walzem, R.L., Reue, K., Tontonoz, P., Bensadoun, A., *et al.* (2010). Cholesterol intake modulates plasma triglyceride levels in glycosylphosphatidylinositol HDL-binding protein 1-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* *30*, 2106-2113.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation* *112*, 1796-1808.
- Wicklow, B.A., Wittmeier, K.D., MacIntosh, A.C., Sellers, E.A., Ryner, L., Serrai, H., Dean, H.J., and McGavock, J.M. (2012). Metabolic consequences of hepatic steatosis in overweight and obese adolescents. *Diabetes care* *35*, 905-910.
- Wijermans, P., Lübbert, M., Verhoef, G., Bosly, A., Ravoet, C., Andre, M., and Ferrant, A. (2000). Low-Dose 5-Aza-2'-Deoxycytidine, a DNA Hypomethylating Agent, for the Treatment of High-Risk Myelodysplastic Syndrome: A Multicenter Phase II Study in Elderly Patients. *Journal of Clinical Oncology* *18*, 956-956.
- Williamson, R.M., Price, J.F., Glancy, S., Perry, E., Nee, L.D., Hayes, P.C., Frier, B.M., Van Look, L.A., Johnston, G.I., Reynolds, R.M., *et al.* (2011). Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis and nonalcoholic Fatty liver disease in people with type 2 diabetes: the Edinburgh Type 2 Diabetes Study. *Diabetes care* *34*, 1139-1144.
- Willms, B., Werner, J., Holst, J.J., Orskov, C., Creutzfeldt, W., and Nauck, M.A. (1996). Gastric emptying, glucose responses, and insulin secretion after a liquid test meal: effects of exogenous glucagon-like peptide-1 (GLP-1)-(7-36) amide in type 2 (noninsulin-dependent) diabetic patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* *81*, 327-332.

- Wilson, P.W., D'Agostino, R.B., Parise, H., Sullivan, L., and Meigs, J.B. (2005). Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 112, 3066-3072.
- Xie, Z., Dai, J., Dai, L., Tan, M., Cheng, Z., Wu, Y., Boeke, J.D., and Zhao, Y. (2012). Lysine succinylation and lysine malonylation in histones. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 11, 100-107.
- Xu, A., Wang, Y., Keshaw, H., Xu, L.Y., Lam, K.S., and Cooper, G.J. (2003). The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 112, 91-100.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., *et al.* (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nature medicine* 7, 941-946.
- Yan, C., and Boyd, D.D. (2006). Histone H3 acetylation and H3 K4 methylation define distinct chromatin regions permissive for transgene expression. *Molecular and cellular biology* 26, 6357-6371.
- Ye, J. (2013). Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Frontiers of medicine* 7, 14-24.
- Yki-Järvinen, H. (2015). Nutritional Modulation of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Insulin Resistance. *Nutrients* 7, 5454.
- You, M., Liang, X., Ajmo, J.M., and Ness, G.C. (2008). Involvement of mammalian sirtuin 1 in the action of ethanol in the liver. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 294, G892-898.
- Yu, H.L., Miao, H.T., Gao, L.F., Li, L., Xi, Y.D., Nie, S.P., and Xiao, R. (2013). Adaptive responses by mouse fetus to a maternal HLE diet by downregulating SREBP1: a microarray- and bio-analytic-based study. *Journal of lipid research* 54, 3269-3280.
- Yuan, X., Tsujimoto, K., Hashimoto, K., Kawahori, K., Hanzawa, N., Hamaguchi, M., Seki, T., Nawa, M., Ehara, T., Kitamura, Y., *et al.* (2018). Epigenetic modulation of Fgf21 in the perinatal mouse liver ameliorates diet-induced obesity in adulthood. *Nature communications* 9, 636.
- Zentner, G.E., and Henikoff, S. (2013). Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nature structural & molecular biology* 20, 259-266.
- Zeybel, M., Hardy, T., Robinson, S.M., Fox, C., Anstee, Q.M., Ness, T., Masson, S., Mathers, J.C., French, J., White, S., *et al.* (2015). Differential DNA methylation of genes involved in fibrosis progression in non-alcoholic fatty liver disease and alcoholic liver disease. *Clinical Epigenetics* 7, 25.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.
- Zhang, Y., Wang, Q., Wang, H., and Duan, E. (2017). Uterine Fluid in Pregnancy: A Biological and Clinical Outlook. *Trends in molecular medicine* 23, 604-614.
- Zhao, L., Chen, Y., Tang, R., Chen, Y., Li, Q., Gong, J., Huang, A., Varghese, Z., Moorhead, J.F., and Ruan, X.Z. (2011). Inflammatory stress exacerbates hepatic cholesterol accumulation via increasing cholesterol uptake and de novo synthesis. *Journal of gastroenterology and hepatology* 26, 875-883.
- Zhou, X.Y., Shibusawa, N., Naik, K., Porras, D., Temple, K., Ou, H., Kaihara, K., Roe, M.W., Brady, M.J., and Wondisford, F.E. (2004). Insulin regulation of hepatic

- gluconeogenesis through phosphorylation of CREB-binding protein. *Nature medicine* 10, 633-637.
- Ziller, M.J., Gu, H., Müller, F., Donaghey, J., Tsai, L.T.Y., Kohlbacher, O., De Jager, P.L., Rosen, E.D., Bennett, D.A., Bernstein, B.E., *et al.* (2013). Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome. *Nature* 500, 477.
- Zou, C., Ellis, B.M., Smith, R.M., Chen, B.B., Zhao, Y., and Mallampalli, R.K. (2011). Acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase I (Lpcat1) catalyzes histone protein O-palmitoylation to regulate mRNA synthesis. *The Journal of biological chemistry* 286, 28019-28025.