



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

山苦瓜萃取物協助 IGF-1 透過 PI3K/Akt 路徑促進

小鼠骨骼肌前驅細胞生長

Wild Bitter Melon Extract Assists IGF-1 in Promoting

Mouse Skeletal Muscle Cell Proliferation Through

PI3K/Akt Pathway

黃苡慈

Yii-Tzu Huang

指導教授：黃青真 博士

Advisor : Ching-Jang Huang, Ph.D.

中華民國 106 年 7 月

July, 2017



中文摘要

肌少症 (Sarcopenia) 是指隨著年紀上升，肌肉質量、力量及功能逐漸下降，大致是由於神經退化、長期活動量降低、體內內分泌賀爾蒙雄激素睪固酮 (testosterone)、類胰島素生長因子-1 (Insulin-like growth factor-1, IGF-1) 分泌減少所導致骨骼肌修復能力降低或肌纖維蛋白質分解加速。目前改善肌少症的方針主要為運動及營養補充，亦有許多研究朝向調控肌肉生長並壯大肌肉的路徑著手。山苦瓜可調節諸多生理活性，包括血糖、血脂、免疫及改善代謝異常，然而其對於肌肉生長的研究至今甚少。因此，本研究目標為以細胞模式及動物模式探討山苦瓜對於骨骼肌生長與功能的影響。

在細胞模式中，本實驗以山苦瓜萃物處理 C2C12 肌肉前驅細胞 (myoblast) 48 小時，探討山苦瓜是否可以促進細胞增生。結果顯示，1758 品系山苦瓜乙酸乙酯萃物 (1758 EAE) 單獨處理 myoblast 雖無法使細胞數目增加，但可以促進粒線體功能指標 citrate synthase 活性。再者，1758 EAE 與 IGF-1 共同處理之下，可以顯著增加 myoblast 細胞數目。以 PI3K 抑制劑 LY294002 抑制 IGF-1 傳遞路徑後，1758 EAE 協助 IGF-1 促進細胞增生之效應消失。進一步以西方墨點法分析蛋白質表現量，結果顯示，共處理 myoblast 一小時，1758 EAE 可以幫助 IGF-1 增加下游傳遞路徑 Akt 磷酸化表現量。在動物模式中，本研究將不同品系 4% 山苦瓜全果凍乾粉添加於高脂飲食中，並餵食 C57BL/6J 公鼠進行短期 4 週動物試驗。結果顯示，山苦瓜可以減低高脂飲食誘導之體重、白色脂肪堆積及胰島素抵抗情形，並能增加腓腸肌相對重量，而 1758 品系能進一步促進小鼠腓腸肌 *IGF-1*、*Igf1r*、*Akt2*、*Hk2* 基因表現。綜合以上，1758 山苦瓜可以協同 IGF-1 促進肌肉前驅細胞增生，並具有調控骨骼肌 IGF-1 下游傳遞路徑的潛力。

關鍵字：山苦瓜、肌肉細胞、類胰島素生長因子-1、粒線體




Abstract

Sarcopenia is a gradual loss of skeletal muscle mass, function and strength associated with ageing. The main causes of sarcopenia include loss of motor neurons, physical inactivity or a decline in anabolic hormones such as testosterone and insulin-like growth factor-1 (IGF-1), which lead to reduction in regenerative capacity or increased protein degradation in skeletal muscle. Currently, the validated strategies are exercise and nutritional supplementation. On the other hand, the pathways which stimulate muscle hypertrophy have been actively investigated. Wild bitter melon (WBM) has been shown to ameliorate metabolic disorders such as hyperglycemia and hyperlipidemia. However, little research was focussed on muscle growth. Hence, the aim of this study is to examine the effect of WBM on skeletal muscle growth and function as an initial approach.

In the cell model, C2C12 myoblasts were treated with WBM extracts for 48 hours to determine the proliferation ability of WBM. The results showed that the WBM cultivar 1758 ethyl acetate extract (EAE) enhanced the activity of citrate synthase, a marker of mitochondria, and, in the presence of IGF-I, promoted myoblasts proliferation. The effect of 1758 EAE on IGF-1-mediated proliferation was diminished in the presence of PI3K inhibitor LY294002. Western blot analysis further showed that 1758 EAE increased Akt phosphorylation of C2C12 myoblasts in the presence of IGF-I after 1 hour of treatment. In the short-term animal study, C57/BL/6J male mice were fed a high-fat diet supplemented without or with 4% various cultivars of WBM for 4 weeks. WBM reduced total body weight, white adipose mass, insulin resistance, and increased relative gastrocnemius muscle mass. 1758 WBM specifically enhanced mRNA

expression levels of *IGF-1*, *Igf1r*, *Akt2*, *Hk2* in gastrocnemius muscle. These results indicate that 1758 WBG may enhance the proliferation effect of IGF-1 in myoblasts, and might regulate IGF-1 signaling pathway in skeletal muscle.

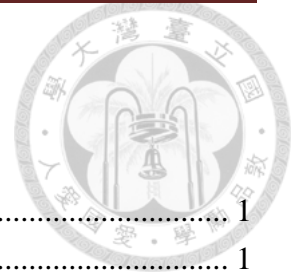
Key words: Wild bitter gourd, C2C12 myoblasts, IGF-1, Mitochondria



縮寫	全文
AKT	Protein kinase B
AMPK	5'AMP-activated kinase
Bcl2	B-cell lymphoma 2
Cnd1	G1/S-specific cyclin D1
CLN	c9, t11, t13-conjugated linolenic acid
Drp1	Dynamin-related protein 1
EAE	Ethyl acetate extract
Fis	Fission protein, mitochondria
FoxO	Forkhead box protein O
Gapdh	Gyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GLUT4	Glucose transporter 4
Hk2	Hexokinase 2
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IGF-1R	Insulin-like growth factor-1 receptor
IL-1	Interleukin-1
IR	Insulin receptor
IRS	Insulin receptor substrate
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Mfn	Mitofusin
MRFs	Myogenic regulatory factors
Mstn	Myostatin
mtDNA	Mitochondrial DNA
mTOR	Mammalian target of rapamycin
Myf5	Myogenic factor 5
MyoD	Myogenic differentiation antigen 1
NRF	Nuclear respiratory factor
OPA1	Optic atrophy 1
OXPPOS	Oxidative phosphorylation
Pax7	Paired-box transcription factor 7
PBS	Phosphate buffered saline
PGC-1 α	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKC	Protein kinase C

PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptor
ROS	Reactive oxygen species
SIRT	NAD-dependent deacetylase sirtuin
TCA cycle	Tricarboxylic acid cycle
Tfam	Mitochondrial transcription factor A
TGF- β	Transforming growth factor β
TNF- α	Tumor necrosis factor α
UPS	Ubiquitin-proteasome system
WBG	Wild bitter gourd






總目錄

第一章	緒論	1
第一節	前言	1
第二節	文獻回顧	3
一、	肌少症 (Sarcopenia)	3
二、	骨骼肌 (Skeletal muscles)	6
1.	肌纖維 (Muscle fibers)	6
2.	肌肉幹細胞與肌肉再生能力	7
三、	肌肉生長調控路徑	8
1.	類胰島素生長因子-1 IGF-1 (Insulin-like growth factor-1)	8
2.	PI3K/Akt 路徑 (圖 1-5) (Gonzalez-Franquesa et al., 2012)	9
3.	其他調控路徑	10
四、	粒線體	13
1.	粒線體生合成 (Mitochondrial biogenesis) 與粒線體動態 (mitochondrial dynamics)	13
2.	粒線體生合成調控因子	14
五、	肌肉再生能力與功能失常	16
1.	肌肉幹細胞衰老	16
2.	粒線體功能缺失與代謝異常	17
3.	肌肉與胰島素阻抗	20
六、	山苦瓜	21
第三節	研究假說及實驗架構	23
一、	研究假說	23
二、	實驗架構	23
第二章	山苦瓜萃物對 C2C12 myoblasts 增生能力之影響	24
第一節	前言與實驗設計	24
一、	前言	24
二、	實驗設計	27
第二節	實驗材料與方法	28
一、	材料	28
1.	C2C12 肌肉前驅細胞 (myoblast cells) (ATCC CRL-1772)	28
2.	培養基與藥品試劑	28
二、	細胞培養與繼代	29
三、	山苦瓜樣品製備	29

1.	山苦瓜樣品	29
2.	山苦瓜樣品水解處理	29
3.	山苦瓜樣品萃取	29
四、	細胞存活率分析—MTT assay	30
五、	細胞增生試驗—Trypan Blue Exclusion 細胞計數	30
六、	粒線體檸檬酸合成酶酵素活性分析	31
1.	樣品製備	31
2.	藥品試劑	31
3.	原理	31
4.	方法步驟	32
七、	PI3-Kinase 抑制劑 LY294002 介入試驗	33
八、	蛋白質表現量分析—西方墨點法	33
1.	樣品製備	33
2.	藥品試劑	33
3.	儀器設備	36
4.	實驗方法	36
九、	統計分析	38
第三節	實驗結果	39
一、	細胞存活率分析—MTT assay	39
二、	細胞增生試驗—Trypan Blue Exclusion 細胞計數	39
三、	粒線體檸檬酸合成酶 (Citrate synthase) 酵素活性分析	40
四、	PI3-Kinase 抑制劑 LY294002 介入試驗	40
五、	蛋白質表現量分析—西方墨點法	41
第四節	討論	53
一、	不同品系山苦瓜暨水解乙酸乙酯萃取物對 C2C12 myoblasts 增生能力的影響	53
二、	山苦瓜萃取物調控 C2C12 myoblasts 增生能力之可能活性成份 57	
1.	三萜類 (Triterpenoids)	57
2.	共軛次亞麻油酸 (9c, 11t, 13t-Conjugated Linolenic Acid, CLN)	58
三、	山苦瓜萃取物調控 C2C12 myoblasts 增生能力之調節因子相關性探討 61	
1.	PPAR- δ (Peroxisome proliferator-activated receptor δ)	61
四、	1758 山苦瓜萃取物促進 IGF-1 對 C2C12 myoblasts 增生能力之作用路徑	64
五、	1758 山苦瓜萃取物促進 C2C12 myoblasts 之粒線體功能	66

第五節	結論	66
第三章	不同品系山苦瓜對高脂飲食模式小鼠骨骼肌功能的影響	67
第一節	前言與實驗架構	67
一、	前言	67
二、	實驗設計	70
第二節	實驗材料與方法	72
一、	動物飼養	72
二、	飼料配製	72
1.	Chow diet 飼料	72
2.	高脂飲食	72
3.	添加山苦瓜之高脂飲食	73
三、	禁食血清樣本收集	76
四、	動物犧牲與樣品收集	76
1.	器具準備	76
2.	實驗流程	76
3.	組織保存	76
五、	血清生化分析	77
1.	葡萄糖 (glucose) 分析	77
2.	三酸甘油酯 (triglycerides) 測定	77
3.	膽固醇 (cholesterol) 測定	78
4.	胰島素 (insulin) 分析	79
六、	肌肉基因 mRNA 表現分析	80
1.	組織 total RNA 抽取	80
2.	Total RNA 反轉錄成 cDNA	81
3.	Quantitative Real-Time PCR	81
六、	統計分析	83
第三節	實驗結果	84
一、	生長情形	84
1.	生長曲線與體重變化	84
2.	攝食量、攝食利用率、能量攝取與能量利用率	84
3.	器官與組織重量	85
二、	血清生化分析	86
三、	骨骼肌基因 mRNA 表現分析	87
第四節	討論	111
一、	山苦瓜有助於減緩短期高脂飲食模式小鼠之代謝症候群指標	111
1.	體重變化情形、器官組織重量及血清生化分析	111



2.	短期誘發肥胖模式與過去研究之比較.....	113
二、	山苦瓜對於小鼠骨骼肌基因表現之影響.....	115
1.	粒線體生合成、融合分裂與代謝.....	115
2.	骨骼肌生長.....	116
3.	IGF-1、Akt 及下游調控路徑.....	117
第五節	結論.....	118
第四章	綜合討論與總結論.....	124
第一節	綜合討論.....	124
第二節	總結論.....	126
第五章	參考文獻.....	127
第六章	附錄.....	139



圖目錄

圖 1-1. 造成肌少症的可能原因	5
圖 1-2. 導致肌肉萎縮的路徑	5
圖 1-3. 靜止的衛星細胞、啟動的衛星細胞以及肌肉再生	11
圖 1-4. 哺乳類肌肉發育與成熟	11
圖 1-5. Insulin & IGF-1 訊息傳遞路徑	12
圖 1-6. PGC-1 α 調控途徑	16
圖 1-7. 粒線體融合分裂失調導致肌肉萎縮	19
圖 1-8. 粒線體功能失常與胰島素阻抗	19
圖 2-1. 肌肉前驅細胞分化為成熟肌小管	25
圖 2-2. 實驗設計—細胞模式	26
圖 2-3. 檸檬酸合成酶酵素活性分析原理	32
圖 2-4. 各品系山苦瓜乙酸乙酯萃物單獨處理或與 IGF-1 共處理對 C2C12 myoblasts 增生的影響 (MTT assay)	43
圖 2-5. 經不同溫度水解之 1758 山苦瓜乙酸乙酯萃物單獨處理及與 IGF-1 共處理對 C2C12 myoblasts 增生的影響 (MTT assay)	45
圖 2-6. 1758 山苦瓜乙酸乙酯萃物單獨處理及與 IGF-1 共處理對 C2C12 myoblasts 增生的影響 (Trypan Blue Exclusion 細胞計數) ..	46
圖 2-7. 1758 山苦瓜乙酸乙酯萃物對 C2C12 myoblasts 粒線體檸檬酸合 成酶酵素活性的影響	48
圖 2-8. 抑制劑 LY294002 介入對 1758 山苦瓜乙酸乙酯萃物造成 C2C12 myoblasts 增生效果之影響	50
圖 2-9. C2C12 myoblasts 給予 1758 EAE 處理 1 小時之 Akt 蛋白質及 其磷酸化表現量	51
圖 2-10. 各品系山苦瓜三萜類含量與促進 C2C12 myoblasts 增生能力 之相關性	59
圖 2-11. 各品系山苦瓜乙酸乙酯萃物之 CLN 吸收光譜	60
圖 2-12. 各品系山苦瓜乙酸乙酯萃物之 CLN 含量	60
圖 2-13. 各品系山苦瓜乙酸乙酯萃物 CLN 含量與促進 C2C12 myoblasts 增生能力之相關性	61
圖 2-14. 各品系山苦瓜乙酸乙酯萃物活化 PPAR- δ 的轉錄活性與促 進 C2C12 myoblasts 增生能力之相關性	63
圖 2-15. 山苦瓜水解乙酸乙酯萃物活化 PPAR- δ 的轉錄活性與促進 C2C12 myoblasts 增生能力之相關性	63

圖 2- 16. 胰島素受體、IGF-1 受體與雜合受體	65
圖 3- 1. 肥胖對肌肉再生能力影響之機制	69
圖 3- 2. C57BL/6J 公鼠餵食實驗飼料 4 週之生長曲線	91
圖 3- 3. C57BL/6J 公鼠餵食實驗飼料 4 週之體重增加量	92
圖 3- 4. C57BL/6J 公鼠餵食試驗飼料 4 週之能量攝取與能量效率	95
圖 3- 5. C57BL/6J 公鼠餵食試驗飼料 4 週後之脂肪組織之絕對與相對 重量	100
圖 3- 6. 小鼠餵食試驗飼料 4 週後腓腸肌、比目魚肌與脛前肌之絕對及 相對重量	101
圖 3- 7. C57BL/6J 小鼠餵食試驗飼料 4 週之血糖、血脂、血膽固醇之變 化	103
圖 3- 8. C57BL/6J 小鼠於正式實驗滿 4 週之禁食血清胰島素、血糖及胰 島素阻抗指標 HOMA-IR index	104
圖 3- 9. C57BL/6J 公鼠正式實驗滿四週之腓腸肌粒線體生合成、融合分 裂、氧化磷酸化相關基因表現	105
圖 3- 10. C57BL/6J 公鼠正式實驗滿四週之腓腸肌肌肉增生、分化相關基 因表現	106
圖 3- 11. C57BL/6J 公鼠正式實驗滿四週之腓腸肌 IGF-1、IGF-1R、Akt 及下游調控路徑基因表現	107
圖 3- 12. C57BL/6J 公鼠正式實驗滿四週之比目魚肌粒線體生合成、融合 分裂、氧化磷酸化相關基因表現	108
圖 3- 13. C57BL/6J 公鼠正式實驗滿四週之比目魚肌肌肉增生、分化相關 基因表現	109
圖 3- 14. C57BL/6J 公鼠正式實驗滿四週之比目魚肌 IGF-1、IGF-1R、 Akt 及下游調控路徑基因表現	110
圖 3- 15. 脂肪組織慢性發炎導致肌肉組織胰島素阻抗	114
圖 3- 16. C57/BL/6J 公鼠餵食實驗飼料 4 週後體重、血清胰島素、 HOMA-IR Index 與比目魚肌 <i>Mstn</i> 基因表現之相關性	123



表目錄

表 2- 1. 不同品種山苦瓜乙酸乙酯萃物對 C2C12 myoblasts 增生的影響	55
表 2- 2. 未經水解處理與經 37°C、50°C以及 60°C 水解之山苦瓜乙酸乙酯萃物對 C2C12 myoblasts 增生的影響	56
表 3- 1. C57BL/6J 小鼠各肌群的纖維型態	69
表 3- 2. 市售 Chow diet 組成	74
表 3- 3. 實驗飼料配方	75
表 3- 4. 本研究 qPCR 分析使用引子整理表	82
表 3- 5. C57BL/6J 小鼠餵食試驗飼料 4 週之初始體重、最終體重及體重增加量	93
表 3- 6. C57BL/6J 小鼠餵食試驗飼料 4 週之攝食量、攝食利用率、能量攝取與能量利用率	94
表 3- 7. C57BL/6J 小鼠餵食試驗飼料 4 週後之體重與器官絕對重量	96
表 3- 8. C57BL/6J 小鼠餵食試驗飼料 4 週後之骨骼肌、脂肪組織絕對重量	97
表 3- 9. C57BL/6J 小鼠餵食試驗飼料 4 週後之器官相對重量	98
表 3- 10. C57BL/6J 小鼠餵食試驗飼料 4 週後之骨骼肌、脂肪組織相對重量	99
表 3- 11. C57BL/6J 小鼠餵食試驗飼料 4 週之禁食血清生化分析	102
表 3- 12. 各品系山苦瓜對小鼠生長情形、組織重量及血清生化值及整理表	119
表 3- 13. 本研究與過去研究結果比較	120
表 3- 14. 各品系山苦瓜對小鼠腓腸肌相關基因表現整理	121
表 3- 15. 各品系山苦瓜對小鼠比目魚肌相關基因表現整理	122



第一章 緒論

第一節 前言

隨著醫學進步與生活條件的改善，人類平均壽命延長，與年齡相關的疾病包括神經退化性疾病、心血管疾病、代謝疾病以及癌症亦愈來愈受到重視。其中，屬於老年病症候群的肌少症 (Sarcopenia) 已成為全世界重要的公衛議題，每年為此耗費的醫療照護成本日遽增加。

肌少症 (Sarcopenia) 為一種隨著年紀上升造成內分泌失調及運動神經元所支配的運動單位 (motor unit) 數量減少，導致肌纖維萎縮，並逐漸喪失肌肉的重量與力量的症狀。造成肌少症的成因包含神經退化、活動力下降、疾病造成營養不良、體內內分泌賀爾蒙雄激素睪固酮 (testosterone)、類胰島素生長因子-1 (Insulin-like growth factor-1, IGF-1) 或壓力與細胞傷害逐漸累積，導致肌肉再生能力受損、蛋白質分解加劇，進而喪失肌肉質量與功能。目前對於肌肉萎縮的治療策略，以運動及營養補充為主，亦有研究從針對造成肌肉萎縮的路徑著手，期望能找出維持肌肉再生能力與功能，並促進肌肉肥大 (hypertrophy) 的方法。

骨骼肌的再生過程為肌肉幹細胞—衛星細胞 (satellite cell) 啟動及活化成肌肉前驅細胞 (myoblast)，再進一步增生並分化成成熟的肌纖維。IGF-1 可以透過 PI3K/Akt 路徑誘導肌肉增生與分化，調控肌肉生長，並促進蛋白質合成。因此，肌肉生長與 IGF-1 相關機制的探討亦是現今科學家著手研究治療肌少症的方向。再者，骨骼肌屬於代謝旺盛的組織，其功能與產生能量的粒線體密切相關。粒線體的生合成、動態及代謝需要受到嚴密的調控，才能使功能正常運作。因此，若能促進粒線體的活性，對於維持骨骼肌功能亦有所幫助。

過去研究指出，苦瓜 (*Momordica charantia* L) 具有諸多正面療效，包括降血糖、血脂、抗發炎與對抗肥胖等，亦有促進骨骼肌葡萄糖汲取進而增進胰島素敏感性等功效 (Manabe et al., 2003; Nerurkar et al., 2005; Shih et al., 2009)；本實驗室先前研究亦發現，山苦瓜可以使小鼠骨骼肌粒線體生合成相關基因表現增加 (蔣汶龍, 2014)，顯示其對於骨骼肌具有良性的影響。然而，山苦瓜對於骨骼肌的生長及功能調節的研究仍然甚少，因此本研究欲以小鼠骨骼肌前驅細胞株 C2C12，以及 C57BL/6J 小鼠模式來探討山苦瓜對於骨骼肌生長與功能的影響。



第二節 文獻回顧

一、肌少症 (Sarcopenia)

在高齡人口急增的這個世代，屬於老年病症候群的肌少症 (Sarcopenia) 在全世界與在台灣所造成的不良影響皆顯著加劇。隨著醫藥與科技的進步，人類平均壽命增加，高齡相關議題逐漸受到重視。世界衛生組織指出，2015 年 60 歲以上老年人口逾 9 億，預計 2050 年將高達 20 億。行政院內政部 2015 年底統計顯示，我國 65 歲以上老年人口比率占 12.5%，預計兩年後老年人口比率將突破 14%，進入高齡社會。由於高齡人口快速增加，相關疾病逐漸受到重視，肌少症也成為重要公衛議題。

肌少症是一種隨著年齡上升導致肌肉質量、強度與功能降低的症候群。其特徵包括肌肉量減少、肌力與肌耐力減弱、肌肉再生能力降低，致使肌肉無力、衰弱進而影響行動力及生活品質。研究指出，高齡 70 歲以上人口肌少症發生率高達 36.5%，而診斷罹患肌少症的長者死亡率 (67.4%) 高於未罹患患者 (41.2%)，顯示肌少症在高齡人口盛行並且會導致死亡率上升 (Brown et al., 2016; Landi et al., 2013)。

造成肌少症的可能成因包括長期不動、老年神經退化導致對於肌肉支配能力減低、體內同化性荷爾蒙 (anabolic hormones) 例如雄激素睪固酮 (testosterone)、類胰島素生長因子-1 (Insulin-like growth factor-1, IGF-1) 分泌減少、tumor necrosis factor α (TNF- α)、interleukin-1 (IL-1)、interleukin-6 (IL-6) 等發炎性細胞激素 (inflammatory cytokine) 以及壓力賀爾蒙葡萄糖皮質素 (glucocorticoid) 分泌上升等原因所致 (Hall et al., 2011)。健康的壯年人由於骨骼肌的蛋白質分解與合成速率達到平衡，因此肌肉的重量處於恆定的狀態。然而當高齡者由於肌肉再生能力減弱、疾病等致使食慾下降攝食減少，導致體內能量不足、或同化性荷爾蒙分泌下

降等原因，會造成肌肉再生減少以及骨骼肌蛋白質分解速率超過合成速率，導致肌肉纖維逐漸萎縮（圖 1-1）。

從分子機制層面探討，造成肌肉萎縮的原因可能源於代謝改變、內分泌賀爾蒙的刺激或是發炎性細胞激素增加。當營養不良使肌肉呈現分解代謝的狀態 (catabolic state)，會抑制合成性的路徑 PI3K-AKT-mTOR pathway 產生蛋白質，促進分解性的路徑 FoxO signaling，啟動一系列被稱為肌肉萎縮基因 (atrogene) 的轉錄調節因子，並且促使 ubiquitin-proteasome system (UPS) 分解肌纖維的蛋白質，同時藉由 autophagy 使粒線體被分解，導致收縮能力減低、肌力衰弱及肌肉耐受能力降低。其他外在因子刺激，包括葡萄糖皮質素 (glucocorticoid) 活化 glucocorticoid receptor、發炎性細胞激素 (inflammatory cytokine) tumor necrosis factor α (TNF- α)、interleukin-1 (IL-1)、interleukin-6 (IL-6) 活化 nuclear factor- κ B (NF- κ B)，亦會促使 atrogene 啟動，導致肌肉出現萎縮（圖 1-2）(Cohen et al., 2015)。

改善肌少症的方法，可以從抑制造成肌肉萎縮 (muscle atrophy) 的路徑，亦即促進肌肉肥大 (muscle hypertrophy) 的方向著手。目前運動是最有效的方法，可以藉由骨骼肌收縮與舒張促進肌肉活動 (Adams et al., 2007; Gielen et al., 2012)。然而行動不便的長者不容易藉由運動來改善肌肉流失，因此尚需藉助藥物的治療來增加肌肉的重量與力量。營養的補充亦為主要改善的策略。研究顯示，leucine 的下游代謝產物 β -hydroxy β -methylbutyrate (HMB) 對於肌肉萎縮的治療有所助益，可以促進合成肌肉蛋白質，回復肌肉的重量、力量與功能 (Brioché et al., 2016; Mullin, 2014)。除了運動與營養補充，亦有從其他方向著手於肌少症治療的研究，包括選擇性雄激素受器調節劑 (selective androgen receptor modulator, SARM)、肌肉生長抑制素拮抗劑 (myostatin antagonist) 等，以嘗試刺激肌肉生長，並增加蛋白質合成，期望能發展有效且副作用低的肌少症治療方法。

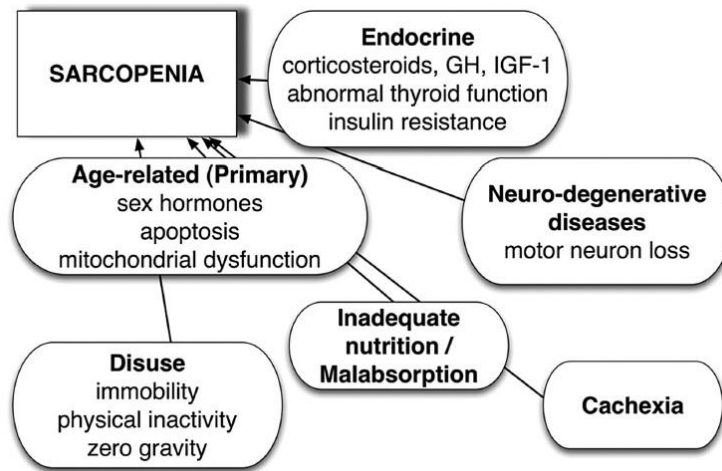


圖 1-1. 造成肌少症的可能原因

Figure 1-1. Cause of muscle atrophy in sarcopenia (Cruz-Jentoft et al., 2010)

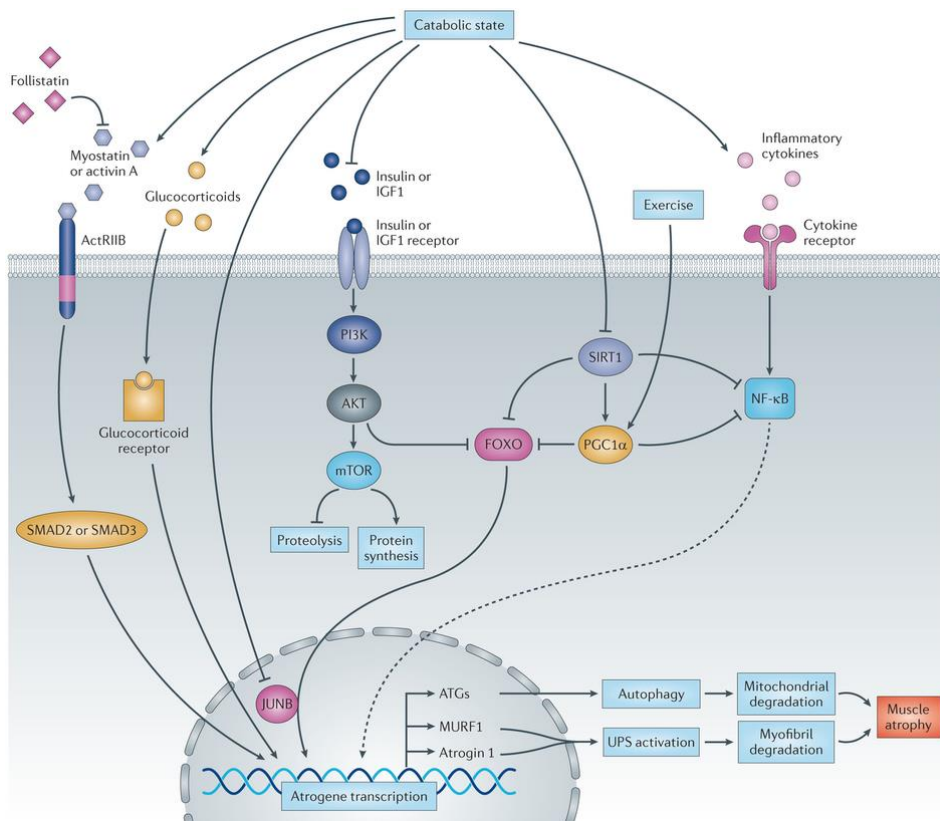


圖 1-2. 導致肌肉萎縮的路徑

Figure 1-2. Signalling pathways leading to muscle atrophy (Cohen et al., 2015)



二、骨骼肌 (Skeletal muscles)

骨骼肌 (Skeletal muscles) 屬於隨意肌，掌控所有受意識支配的收縮運動。其在全身重量中約佔 45%-55%，主要功能為由不同運動神經元控制著長梭狀的肌肉細胞——肌纖維，來調控各式各樣的體育活動。此外，骨骼肌也是體內儲存肝醣與蛋白質的重要器官之一。骨骼肌藉由汲取葡萄糖來調控血糖，肌肉吸收葡萄糖的能力亦影響了胰島素敏感度 (DeFronzo et al., 1981)。再者，骨骼肌的重量取決於肌細胞內儲存的蛋白質。成熟的肌纖維含有高量的蛋白質，特別是進行收縮及維持構造的蛋白質。因此，蛋白質含量的穩定對於骨骼肌的功能至關重要。在健康的肌肉組織，蛋白質的合成與分解處於平衡的狀態 (Burd et al., 2009)，然而在營養不良或處於壓力的情況下，肌肉細胞內的蛋白質會進行分解代謝，使肌肉重量減少 (C. Cooper et al., 2012)。

1. 肌纖維 (Muscle fibers)

骨骼肌的運動功能系統由運動單位 (motor unit) 所構成，包含一條運動神經以及其所支配的肌纖維。人類的骨骼肌肌纖維根據功能與需求具有不同型態，分別是 type I fibers 與 type II fibers。Type I fibers 又稱為慢肌，由於富含微血管，可承載大量氧氣，又被稱為紅肌。紅肌粒線體含量多，主要使用粒線體進行氧化代謝來提供能量，可以支援持久的有氧運動，抗疲乏能力強。Type II fibers 又稱快肌，依照收縮速度由慢而快可再分為 type IIa fibers 及 type IIx/d fibers。其中，type IIx/d fibers 又稱白肌，粒線體含量較少，主要使用糖解作用進行無氧代謝來產生能量，雖較容易疲乏，然而收縮速度快，可以提供瞬間的力量及爆發力。Type IIa fibers 則偏向紅肌，介於 type I fibers 與 type IIx/d fibers 之間，比起 type IIx/d fibers 含有較多的粒線體與微血管，顏色呈紅色且可行有氧代謝，抗疲勞能力較佳，而收縮能力則比 type I fibers 好 (Angione et al., 2011)。另外，齧齒類動物中多表現 type IIb fibers，其形態及功能與 type IIx/d fibers 相似，偏向使用糖解作用進行



無氧代謝 (Spangenburg & Booth, 2003)。肌肉型態並非固定不動，而是具有高度適應性的，根據不同運動訓練或是體內的一些訊號調控可以誘導肌肉纖維型態的轉換 (Bassel-Duby & Olson, 2006; Rana et al., 2008)。

2. 肌肉幹細胞與肌肉再生能力

(1) 肌肉幹細胞—衛星細胞 (Satellite cell)

骨骼肌受到損傷時具有優秀的再生能力，其再生主要由圍繞在肌纖維週遭的肌肉幹細胞—衛星細胞 (satellite cell) 所調控。衛星細胞存在於所有骨骼肌中，位於包覆肌纖維的肌纖維膜 (sarcolemma) 以及周遭的胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 之間的特殊微環境 (niche) 基底膜 (basal lamina) 之中，數目會隨著年齡增加而快速減少。當肌肉受到損傷，衛星細胞一方面會啟動、增生並分化成肌纖維，另一方面具有自我更新 (self-renewal) 的能力，得以維持衛星細胞的數目 (圖 1-3) (Charge & Rudnicki, 2004)。

(2) 肌肉重建與修復的能力

在正常的情況下，衛星細胞呈現靜止的狀態 (quiescent state)，並且會表現 Pax7 (paired box transcriptopn factor)。當肌纖維受到損傷後，衛星細胞會受到活化並且進入細胞週期 (cell cycle) 開始快速增生 (proliferation)。在這個增生階段的衛星細胞被稱作肌肉生長前驅細胞 (myogenic precursor cells, MPCs) 或成人肌肉前驅細胞 (adult myoblasts)，此時細胞會高度表現兩個 MRFs (myogenic regulatory factors)，分別是 MyoD (myogenic differentiation antigen 1) 與 Myf5 (myogenic factor 5)。MyoD 可以促進細胞進程，讓 myoblasts 進一步分化；而 Myf5 則可以誘使細胞進行 self-renewal，不對稱地分裂出不同子細胞，讓一部分的 myoblasts 繼續分化，另一部分的 myoblasts 重新回到靜止的狀態，維持衛星細胞的數目以進行日後的修復。Myoblasts 增生後，會進一步表現 myogenin 與 MRF4 這兩個 MRFs 並抑

制 Pax7，亦會活化細胞週期停滯 (cell cycle arrest) 相關蛋白 p21 並從細胞週期退出，開始進入到分化 (differentiation) 的階段，細胞開始移行 (migrate)、黏著 (adhere)。在分化階段的末期，MHC (myosin heavy-chain) 開始表現，細胞彼此互相融合，最後變成多核、長縮狀的肌小管 (myotube)，匯聚並補充受損的肌纖維 (圖 1-3、圖 1-4) (Charge & Rudnicki, 2004)。

三、肌肉生長調控路徑

在健康的骨骼肌中，肌肉從發育到成熟、損傷後修復、細胞內蛋白質的合成與分解皆受到嚴密的調控，並且處於平衡的狀態。一旦失調使平衡受到破壞，將會造成肌肉發育不良出現萎縮。

骨骼肌生長及重建修復的過程受到許多生長因子調控。HGF (Hepatocyte growth factor) 及 FGF (fibroblast growth factor) 是啟動衛星細胞的關鍵因子，可以活化 mTORC1 讓靜止的衛星細胞從細胞週期 G_0 phase 進入到 G_1 phase，並且會抑制分化 (Jones et al., 2001; Rodgers et al., 2014)。IGF-1 (insulin-like growth factor-1) 則被發現可以調控肌肉生長的諸多階段，在以下有更詳盡的介紹。另一方面，TGF- β (transforming growth factor β) 對於肌肉的生長有抑制的調控作用，TGF- β 家族成員 myostatin 被發現可以透過活化 Smad 路徑來抑制肌肉的增生與分化 (Allen & Unterman, 2007)。除了生長因子，Notch 及 Wnt 訊息傳遞路徑之間的平衡與相互作用亦會調控細胞增生與分化的進程 (Brack et al., 2008)。

1. 類胰島素生長因子-1 IGF-1 (Insulin-like growth factor-1)

當腦下垂體前額葉分泌生長激素 (growth hormone, GH)，GH 就會藉由血液循環流動到達肝臟，促使產生類胰島素生長因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1)，並作為循環性荷爾蒙 (circulating hormone) 到達並作用在其他組織；亦可以藉由自體分泌 (autocrine) 在不同組織包括肌肉組織產生 (Daughaday et al., 1972;



Isaksson et al., 1982)。研究發現，在非肝臟組織中 GH 所調節的 IGF-1 表現已經足夠供應組織正常生長 (Yakar et al., 1999)。

IGF-1 可以刺激骨骼肌衛星細胞啟動轉變成 myoblast、促進 myoblast 增生並刺激分化成 myotube。同時，IGF-1 亦會促使 myotube 細胞體積增加 (hypertrophy) 且促進蛋白質合成，進而提升骨骼肌的質量 (Rommel et al., 2001)。其機制為透過 PI3K/Akt/mTOR pathway 與 MAPK/Erk pathway，一方面可以促進細胞增生、蛋白質合成，一方面可以抑制 FoxO transcription factors，減少蛋白質分解。然而，IGF-1 過度表現在全身組織，則可能造成細胞增生迅速與體積增大，導致形成腫瘤的風險增加 (Baserga et al., 2003)。因此，若能選擇性促進肌肉中的 IGF-1 signaling 增加，則有助於改善肌肉萎縮，而不會增加癌症伴隨的可能性。

2. PI3K/Akt 路徑 (圖 1-5) (Gonzalez-Franquesa et al., 2012)

骨骼肌的生長受到多種路徑調控。其中，PI3K/Akt 路徑負責調控多種細胞合成代謝路徑 (anabolic pathway)，啟動後可以促進肌肉生長。PI3K/Akt 路徑可經由胰島素 (insulin) 或類胰島素生長因子-1 (Insulin-like growth factor-1, IGF-1) 啟動，分別結合在位於細胞膜的 insulin receptor 或 IGF-1 receptor 上，啟動訊息傳遞路徑。Insulin receptor 或 IGF-1 receptor 由一個 α subunit 及 β subunit 與另一個 α subunit 及 β subunit 構成二聚體 (dimer) 形式。當 α subunit 受到 insulin 或 IGF-1 結合後，receptor 自身的 tyrosine kinase 會被活化，並且磷酸化 β subunit 的 tyrosine。Receptor 受到活化後，召集並磷酸化 IRS 1/2 (insulin receptor substrates 1/2)，再接續召集異二聚體 (heterodimer) p85/p110-PI3K，PI3K 的 regulatory subunit p85 結合到 IRS1/2 上並得以活化 catalytic subunit p110，並將 phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP2) 轉變為二級信差 (secondary messenger) phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3)，進而將



serine/threonine-specific protein kinase B (PKB)/Akt 進行磷酸化並活化。Akt 活化後會啟動多種重要的細胞反應，包括：

- (1) 磷酸化並活化 mammalian target of rapamycin (mTOR) 與 p70/S6 kinase (S6K)，進而調控細胞生長、增生、分化及蛋白質合成。
- (2) 磷酸化並抑制 glycogen synthase kinase-3 (GSK3) 活性，進而促進葡萄糖代謝與肝醣合成。
- (3) 促進 glucose transporter GLUT4 轉位到細胞膜上，增加葡萄糖汲取。

3. 其他調控路徑

調控肌肉生長及蛋白質合成的另一條路徑則是 mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade，透過接續活化 mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) 與 extra-cellular signal-regulated kinase (ERK)，啟動衛星細胞進入細胞週期開始增生，同樣亦會活化 S6K，促進蛋白質合成 (Glass, 2005)。

另一方面，蛋白質分解是由 transcription factor forkhead box O (FoxO) 所調控，利用 ubiquitin-proteasomal system 來進行分解。當 Akt 活性降低，會使 FoxO 傾向去磷酸化的形式，表現肌肉萎縮基因 (atrogenes) 並活化 muscle-specific E3 ligases，包含 atrogin-1 (muscle atrophy F-box, MAFbx) 與 MuRF1，藉由蛋白酶體 (proteasome) 及自噬作用 (autophagy) 促使蛋白質分解 (Zhao et al., 2007)。

骨骼肌藉由收縮協助全身運動，運用不同纖維的個別特性與功能來因應爆發力與耐力等不同的運動情況，並且在遭受損傷時有良好的機制去促進幹細胞逐漸地分化為成熟的肌纖維來修補肌肉組織。在身體處於健康狀態時，骨骼肌可以維持正常的生理功能，然而當身體在飢餓、癌症等疾病或年紀上升的影響下處於不健康的狀態，就可能促使骨骼肌調控生長與蛋白質合成的訊號減少、刺激蛋白

質分解的訊號增加，進而造成骨骼肌無法正常生長，並且蛋白質分解速率大於合成速率，導致肌肉喪失重量與力量而出現萎縮。

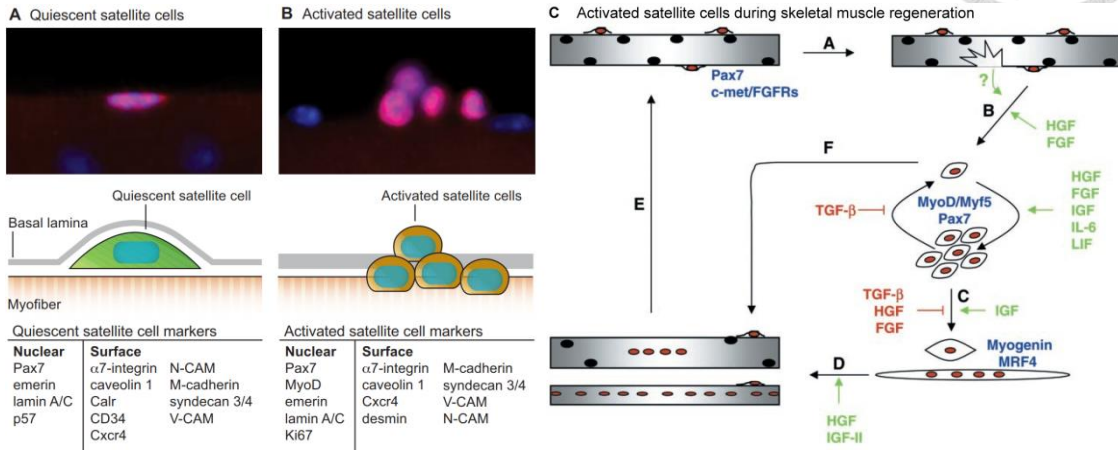


圖 1-3. 靜止的衛星細胞、啟動的衛星細胞以及肌肉再生

Figure 1-3. (A) Quiescent satellite cell (B) Activated satellite cell (C) The molecular events regulating muscle satellite cell activation during skeletal muscle regeneration. (Charge & Rudnicki, 2004; Dumon et al., 2015)

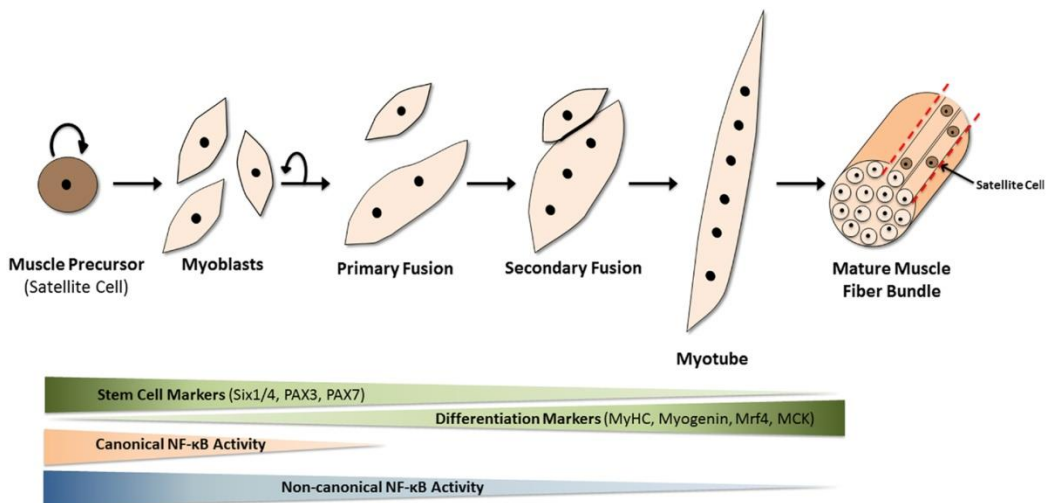


圖 1-4. 哺乳類肌肉發育與成熟

Figure 1-4. Development and maturation of mammalian skeletal muscles (Enwere et al., 2014)

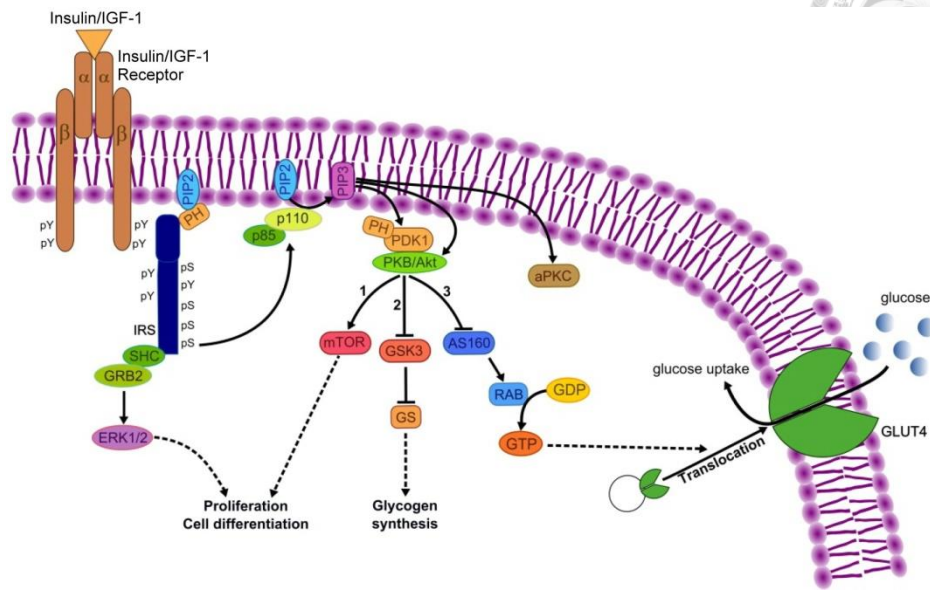


圖 1-5. Insulin & IGF-1 訊息傳遞路徑

Figure 1-5. Insulin & IGF-1 signaling pathway (Gonzalez-Franquesa et al., 2012)



四、粒線體

粒線體是存在於真核生物中的雙層膜胞器，結構由外到內分別為外膜 (outer membrane)、膜間隙 (intermembrane space)、內膜 (inner membrane) 與基質 (matrix)。其主要功能是進行檸檬酸循環 (tricarboxylic acid cycle, TCA cycle) 以及氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) 產生 ATP，為細胞提供足夠的能量。因此粒線體通常分布在細胞代謝旺盛的區域，其數量、形狀及位置都會根據細胞能量需求進行改變。粒線體是唯一擁有自己環狀雙股 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 的哺乳類胞器，包含了 37 個基因，其中尚包括 ribosomal RNA (rRNA) 與 transfer RNA (tRNA) 的基因可以進行轉錄轉譯，並產生出 OXPHOS 所需的蛋白質 (Kelly & Scarpulla, 2004)。

除了為細胞提供能量，許多其他重要的細胞功能也在粒線體進行，包括胺基酸與脂肪酸的代謝、ketone bodies 的合成、尿素循環 (urea cycle) 及鈣離子濃度調節。此外，粒線體也參與調控 DNA 的修復、產生活性氧化物 (reactive oxygen species, ROS) 以及藉由釋放細胞色素 C (cytochrome c) 調控細胞凋亡 (apoptosis) 等 (Youle & van der Bliek, 2012)。

在代謝旺盛的肌肉、肝臟等細胞中，能量需求與消耗大，含有大量的粒線體。因此，粒線體對於骨骼肌的功能影響密切。

1. 粒線體生合成 (Mitochondrial biogenesis) 與粒線體動態 (mitochondrial dynamics)

當細胞受到運動、寒冷或熱量限制時，細胞需要更多的能量，此時便會誘導粒線體生合成，使粒線體數目或質量增加，來提供細胞的能量需求。由於細胞具有動態特性，胞器分布不均，粒線體亦會隨需求沿著細胞骨架進行移動、融合 (fusion) 及分裂 (fission)。粒線體的生合成及動態運動有助於細胞調控鈣離子、能


量輸出以及掌控 ROS 的產生，因此當這個過程無法正常執行，則會導致粒線體功能障礙 (H. C. Chen & Chan, 2005; Soubannier & McBride, 2009)。

粒線體具有動態特性，可以偵測細胞需求進行融合與分裂。當粒線體受到氧化壓力，導致膜電位降低時，便會表現 Drp1 (dynamin-related protein 1) 及 Fis1 (mitochondrial fission 1 protein)，促進粒線體分裂，受損的粒線體會與功能正常的粒線體進行融合來減輕環境造成的壓力，亦或是透過粒線體自噬 (mitophagy) 來除去無法修復的粒線體。在細胞能量需求增加時，粒線體也會表現 Mfn1 (mitofusin 1)、Mfn2 (mitofusin 2) 及 OPA1 (optic atrophy 1) 幫助粒線體進行融合，來提升 OXPHOS 的效率 (Youle & van der Bliek, 2012)。

因此，粒線體的生合成及動態受到嚴密的機制進行調控，以維持正常的生理功能。

2. 粒線體生合成調控因子

粒線體生合成、融合與分裂以及代謝皆有嚴密的調控機制來確保粒線體正常運作。粒線體生合成是一個複雜的過程，需要同時受到粒線體基因體 (mitochondrial genome) 與細胞核基因體 (nuclear genome) 調控。粒線體基因體的轉錄由存在於細胞核基因體的轉錄因子 (transcription factor) TFAM (mitochondrial transcription factor A)、TFB1M (mitochondrial transcription factor B1) 及 TFB2M (mitochondrial transcription factor B2) 所控制。因此，粒線體與細胞核基因組之間需要良好的協調，才能成功表現粒線體生合成所需之蛋白質。這個協調作用需要受到一些細胞核 transcription factor 的參與，而 transcription factor 又進一步受到 cofactor 的調控。其中，PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1- α) 是非常重要的 transcriptional coactivator，調控諸多參與連接細胞核與粒線體訊息的 transcription factor (Kelly & Scarpulla, 2004)。



PGC-1 α 可以依據環境的變化，來啟動粒線體生合成調控機制。PGC-1 α 本身缺乏 DNA-binding domain，然而它可以藉由與 NRF-1 (nuclear respiratory factor 1)、NRF-2 (nuclear respiratory factor 2)、ERR α (estrogen-related receptor alpha) 及 PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) 等 transcription factor 的交互作用來誘使它們的 DNA-binding domain 結合在 promotor 上，調控粒線體功能相關基因的轉錄。NRF-1 與 NRF-2 參與調控粒線體呼吸鏈 (mitochondrial respiratory chain)，並可以誘導 TFAM、TFB1M 和 TFB2M 的表現，ERR α 則負責調控脂肪酸汲取及氧化，而 PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) 雖未直接參與粒線體生合成的調控，但也參與調控脂質及蛋白質的代謝 (圖 1-6) (Jornayvaz & Shulman, 2010)。

PGC-1 α 會根據細胞營養與能量狀態，調控粒線體生合成以及氧化代謝。在熱量限制時，代謝狀態 (NAD⁺/NADH ratio) 的改變會活化 NAD-dependent deacetylase sirtuin-1 (SIRT1)，並且藉由去乙酰 (deacetylation) 的形式促進 PGC-1 α 的活性 (Gerhart-Hines et al., 2007)。在運動時，骨骼肌能量需求增加，AMP/ATP 比例上升會活化 AMPK (AMP-activated protein kinase) 並磷酸化 PGC-1 α ，藉此活化分解代謝途徑 (catabolic pathways) 來促進能量生成以及粒線體生合成 (Jager et al., 2007)。此外，AMPK 啟動後也會促使 NAD⁺ 濃度上升，進而增加 SIRT1 的活性 (Canto et al., 2010)。

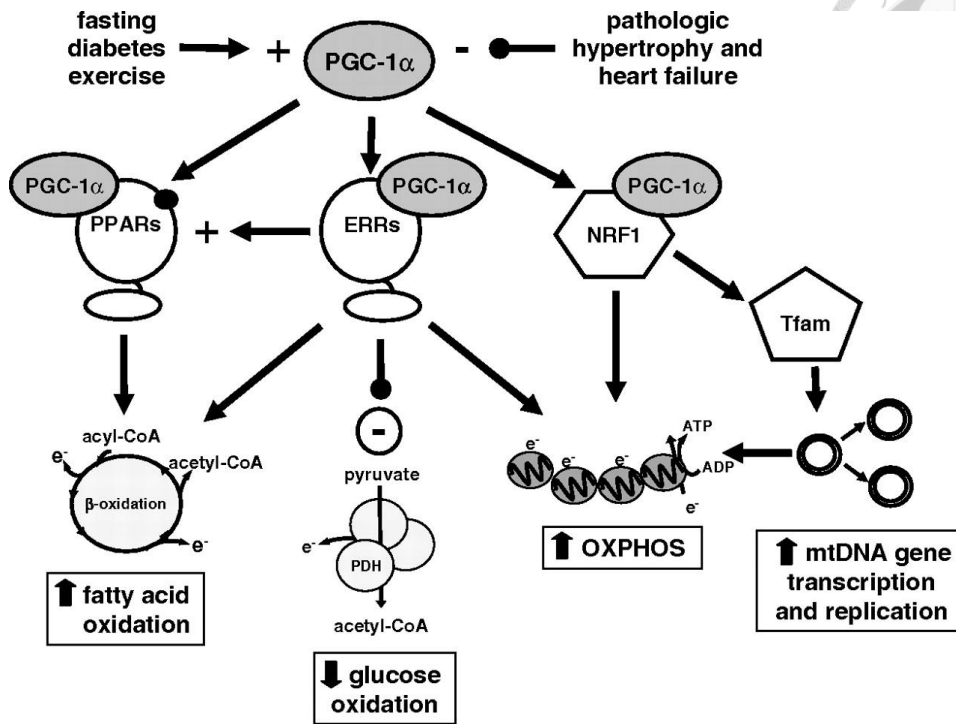


圖 1-6. PGC-1 α 調控途徑

Figure 1-6. The PGC-1 α regulatory cascade. (Finck & Kelly, 2007)

五、肌肉再生能力與功能失常

1. 肌肉幹細胞衰老

隨著年紀增加，肌肉的質量與力量逐漸下降。研究發現，老年大鼠的骨骼肌有纖維化、脂肪累積、慢性發炎以及肌纖維數量與大小減少的現象，顯示肌肉修復損傷的能力出現問題 (Barani et al., 2003)。亦有研究指出，高齡者需要更長的時間才能啟動肌肉的衛星細胞，並且 self-renewal 及啟動後衛星細胞回到靜止狀態的能力出現問題，轉變為無法逆轉的衰老 (senescence) 狀態。功能受損的衛星細胞會使肌肉的再生能力減弱，降低肌肉增生與分化，再加上老化過程蛋白質分解速率上升，最後造成肌肉量逐漸流失，導致肌少症 (Jang et al., 2011)。

衛星細胞的衰老可以從內在因子及外在因子著手探討。

在內在因子的部分，衛星細胞隨著老化而累積損傷，使其漸漸從內部失去正常功能。衛星細胞長時間維持靜止，細胞更新速率 (turnover rate) 低，因此更容易累積正常代謝以及肌肉損傷造成的氧化壓力與發炎因子，對 DNA 造成損傷，最後造成細胞衰老或細胞凋亡 (Bohr, 2002)。其次，在老化的過程，清除錯誤摺疊蛋白質的 UPS 與 chaperones 效率降低，導致蛋白質無法維持功能，進而使衛星細胞無法正常運作 (Narita, 2010)。

外在因子包括細胞外基質的分子、會釋放訊號給衛星細胞的肌纖維、支配肌纖維的運動神經、從血液循環傳遞的因子及發炎細胞因子。首先，老化時 Notch signaling 會減少，使衛星細胞無法正常啟動與增生。TGF- β 訊號增強，磷酸化 Smad 並抑制細胞進入細胞週期，進一步抑制肌肉再生能力。慢性發炎會增加免疫細胞浸潤，刺激促發炎細胞激素分泌，抑制 PI3K/Akt 路徑，使肌肉生長出現問題 (Carlson et al., 2016)。再者，肌肉中 IGF-1 會隨著年齡增加而減少，使 PI3K/Akt 路徑促進肌肉生長與蛋白質合成的訊號失去作用，並使 FoxO signaling 活化，進而啟動 atrogene 造成蛋白質被分解 (Zhao et al., 2007)。

綜合上述，治療肌少症的策略在於維持肌肉衛星細胞以及再生能力，透過探討調控肌肉生長的內在與外在因子，是目前研究肌少症療法的方向。

2. 粒線體功能缺失與代謝異常

粒線體在肌肉細胞代謝中扮演重要的角色。對於骨骼肌生理，粒線體是調控細胞重要程序的胞器，包括持續供應細胞能量、調控能量相關訊息路徑、產生活性氧化物質 (ROS)、維持鈣平衡及調控細胞凋亡 (apoptosis)。因此，粒線體功能失調會對肌肉的健康造成諸多負面影響，包括年紀上升導致肌肉功能與質量逐漸衰退的肌少症以及代謝異常導致胰島素阻抗的發展。



(1) 粒線體與衰老

在老化的細胞中，觀察到粒線體功能有缺失的情形。研究指出，將粒線體肌病 (mitochondrial myopathy) 病患肌肉中粒線體分離出來分析，發現粒線體 OXPHOS 之電子傳遞鍊 (electron transport chain, ETC) 功能缺失、mtDNA 斷裂與年紀有顯著正相關 (J. Cooper et al., 1992)。Wagatsuma 等學者提出，在老化的過程，ROS 產生造成氧化壓力的累積，使 OXPHOS 之電子傳遞鍊 (electron transport chain, ETC) 效率降低並造成傷害，肌肉收縮時無法獲得足夠能量，導致肌肉功能減退以及質量減少而造成肌肉萎縮 (Dirks et al., 2006)。此外，ROS 的累積也會對 mtDNA 造成傷害，使其轉錄出功能不正常的蛋白質，進一步導致粒線體功能失調 (Wagatsuma & Sakuma, 2012)。

另一方面，老化的細胞中也觀察到粒線體融合與分裂調控不平衡的現象。粒線體在 ROS 累積過多時會促進 mitophagy 來降低氧化壓力。然而 mitophagy 效率卻隨著年齡增加而遞減，粒線體融合的效率也漸漸大於分裂效率，使動態失衡，造成粒線體型態異常巨大卻無法執行正常功能，最後導致細胞凋亡並誘導肌肉萎縮 (圖 1-7) (Calvani et al., 2013)。

老化的過程中粒線體功能以及動態平衡漸漸喪失調控，因此，如何維持粒線體正常運作亦是現今治療肌少症的方向。

(2) 粒線體與代謝異常

代謝異常與粒線體功能失調經常伴隨發生。當熱量長時間攝取過多導致營養過剩，粒線體必需增加運作來代謝過多的營養素，若超過粒線體能夠負荷的能力，則可能使粒線體功能出現障礙。當骨骼肌累積過多脂質，一方面會使粒線體 ROS 過度產生，對 mtDNA 造成傷害並影響 OXPHOS 功能；另一方面，細胞質的壓力偵測因子 JNK (c-Jun N-terminal kinase) 以及 PKC (protein kinase C) 會受到啟



動，進而抑制 insulin 傳遞路徑並造成葡萄糖汲取能力下降，導致胰島素阻抗 (圖 1-8) (Riera & Dillin, 2015)。

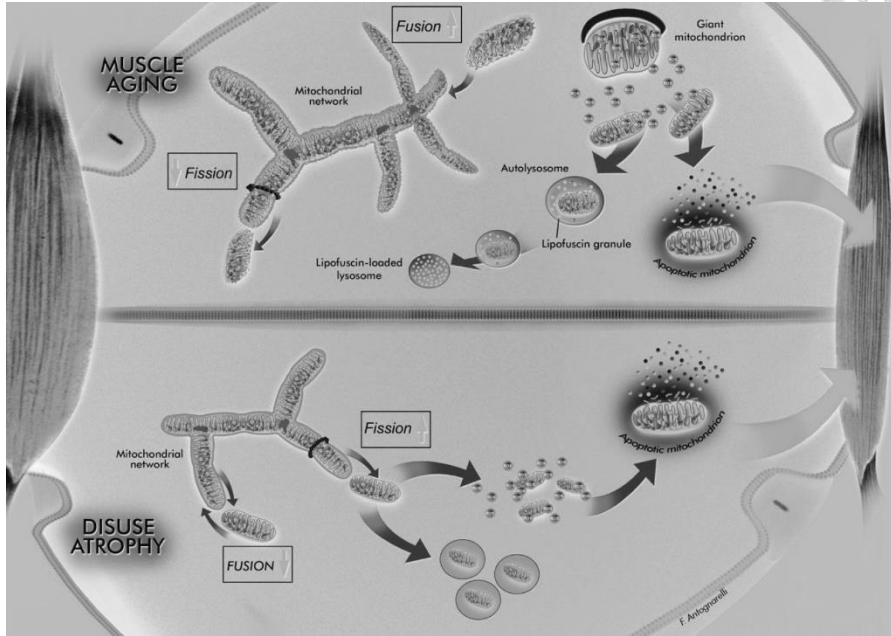


圖 1-7. 粒線體融合分裂失調導致肌肉萎縮

Figure 1-7. Synoptic representation of the putative mitochondrial pathways contributing to sarcopenia of aging and disuse muscle atrophy. (Calvani et al., 2013)

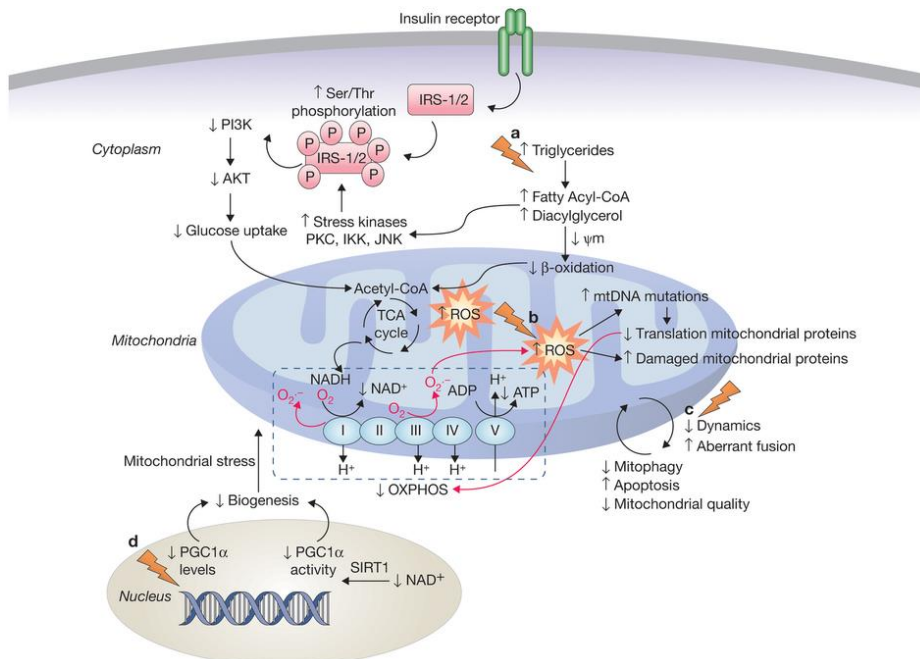


圖 1-8. 粒線體功能失常與胰島素阻抗

Figure 1-8. Effect of mitochondrial dysfunction and insulin resistance (Riera & Dillin, 2015)



3. 肌肉與胰島素阻抗

胰島素阻抗會導致代謝異常，並會使骨骼肌的再生能力以及功能受損。

(1) 胰島素阻抗的進程

在胰島素阻抗發展初期，insulin 訊息傳遞路徑失能，無法在進食後刺激骨骼肌進行葡萄糖汲取，導致血糖飆高，並且使胰臟中的 β 細胞分泌更多的 insulin。細胞無法從葡萄糖取得能量，轉而以脂肪酸 (fatty acid) 作為能量來源。體內脂肪組織 lipolysis 增加並釋放 fatty acid 到血液中，且 insulin 無法調控抑制肝臟產生葡萄糖以及促進脂肪合成，導致醣類與脂質代謝紊亂，並加速胰島素阻抗的進展 (Saltiel, 2001)。

(2) 骨骼肌能量利用異常

骨骼肌主要利用葡萄糖和脂肪酸作為能量來源。在空腹狀態，骨骼肌葡萄糖汲取低，主要利用脂肪組織 lipolysis 產生之游離脂肪酸來產生能量。在進食狀態，血液中葡萄糖濃度升高並刺激 insulin 分泌，抑制脂肪組織分解脂質，促進骨骼肌 glucose transporter 4 (GLUT4) 轉位到細胞膜，增加葡萄糖汲取，並活化葡萄糖代謝關鍵酵素 hexokinase II，迅速將葡萄糖轉變成磷酸化的形式，合成肝醣儲存或代謝產生能量。健康的個體，肌肉的能量代謝基質得以在空腹與進食之間轉換。然而，肥胖與第二型糖尿病患則無法有效進行轉換，導致葡萄糖與脂肪酸的代謝能力受損 (Kelley et al., 1999; Kelley et al., 2002)。

(3) 骨骼肌再生能力異常

研究指出，肥胖者伴隨胰島素阻抗，血液中脂肪酸濃度上升，進而使骨骼肌傾向使用脂肪酸、無法經由葡萄糖汲取作為能量來源。同時，肌肉組織累積過量三酸甘油酯、diacylglycerol 及 ceramides 等脂質衍生物，亦會刺激分泌 TNF- α 、

IL-1、IL-6 等促發炎細胞激素及造成粒線體功能缺失，進而干擾肌肉細胞中 insulin 及 IGF-1 下游之 PI3K/Akt 路徑傳訊，惡化胰島素阻抗並影響肌肉的再生能力 (Akhmedov & Berdeaux, 2013)。



六、山苦瓜

苦瓜學名為 *Momordica charantia* L，主要生長在熱帶及亞熱帶地區，在各地有許多不同品種或品系。在台灣市售常見的苦瓜為大白苦瓜，而本研究使用之山苦瓜屬於同品種不同品系，全株矮小，果皮為深綠色，且苦味極強。

苦瓜的藥用功效，無論是在傳統的中醫典籍或是現代西方學者的研究，皆有正面的評價。明代李時珍在《本草綱目》中記載「苦瓜味苦，性寒涼，無毒，具有除邪熱，解疲乏，清心明目，益氣壯陽之功。」苦瓜雖有苦味，但能刺激味覺、唾液與胃液分泌，且具有清熱解毒功效，對於中暑、痢疾、消渴（即糖尿病）等症狀具有一定療效。

以當今科學方法對苦瓜進行研究，發現苦瓜有諸多正面功效。過去研究曾發現，將苦瓜以甲醇萃取並餵食患有第二型糖尿病之大鼠，可改善葡萄糖耐受性不佳及降低血糖 (Ali et al., 1993)。以苦瓜粉餵食大鼠，發現可以抑制發炎物質，增進免疫力 (Manabe et al., 2003)。將山苦瓜凍乾粉末餵食肥胖小鼠，發現可以減少體重、降低血脂、肝脂、增進葡萄糖耐受性，進而改善代謝症候群與肥胖 (謝婉郁，2005)。上述研究顯示，苦瓜有降血糖、血脂、抗發炎與對抗肥胖等功效，具有繼續被研究開發之價值。

目前對於苦瓜在肌肉領域的研究，以調節血糖與促進胰島素敏感性為主。過去研究顯示，苦瓜可以促進骨骼肌中葡萄糖運輸蛋白 GLUT4 (glucose transporter 4) 從細胞內轉移至細胞膜，增加肌肉對於葡萄糖汲取的能力，進而促進血糖調節 (Shih et al., 2009)。亦有研究指出，從苦瓜分離出來的兩種三萜類 (triterpenoids)

3 β ,25-dihydroxy-7 β -methoxycucurbita-5,23(E)-diene

(DHM)

與

3 β ,7 β ,25-trihydroxycucurbita-5,23(E)-dien-19-al (THC) 在有胰島素的存在下，可以增加胰島素訊息傳遞路徑中 IRS (Insulin Receptor Substrate) tyrosine 的磷酸化，並接續活化 Akt，顯示有胰島素增敏劑 (insulin sensitizer) 的功能 (Chang et al., 2015)。從以上結果可推測，苦瓜具有活化 PI3K/Akt pathway，並調控肌肉生長的潛力。再者，本實驗室過去研究指出，餵食肥胖小鼠山苦瓜，可活化骨骼肌 PGC-1 α 表現，促進粒線體增殖 (蔣汶龍, 2014)，表示山苦瓜具有使骨骼肌粒線體維持健康狀態的潛力。此外，由於 PGC-1 α 可以抑制 FoxO transcription factors，進而抑制 atrogene 的表現，使肌肉蛋白質分解下降，增加肌肉的重量 (Brault et al., 2010; Lee & Goldberg, 2013; Sandri et al., 2006)，因此顯示山苦瓜可能也具有抑制肌肉萎縮基因表現，使蛋白質分解減少的能力。綜合上述，山苦瓜可能具有活化 PI3K/Akt、促進骨骼肌生長並維持粒線體功能潛在能力，因此本研究欲探討山苦瓜對於骨骼肌生長與功能的影響。



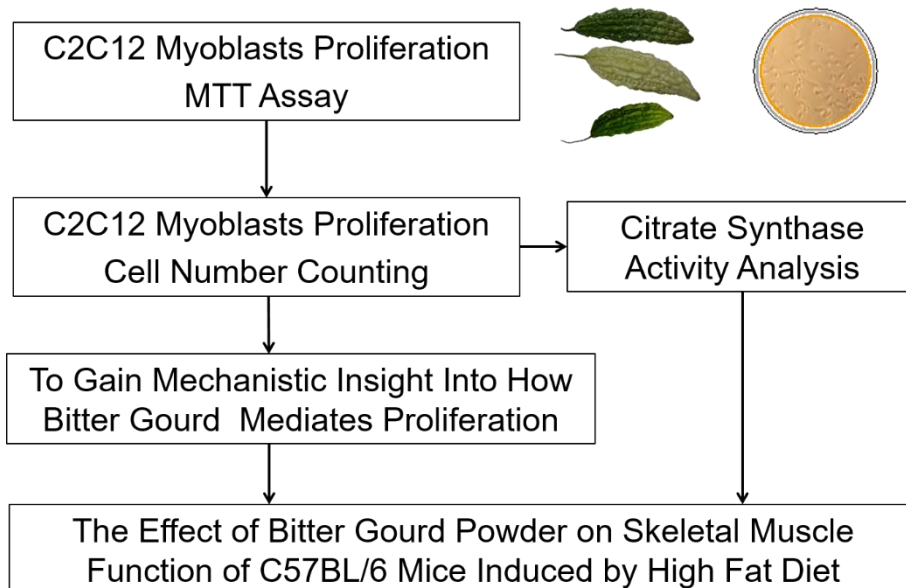
第三節 研究假說及實驗架構

一、研究假說

過去研究指出，山苦瓜可以藉由調控骨骼肌對葡萄糖的吸收來促進胰島素敏感性 (Shih et al., 2009)，亦可上調 PGC-1 α 表現並促進小鼠骨骼肌粒線體生合成 (蔣汶龍, 2014)。山苦瓜所含之三萜類 DHM 與 THC 可以透過磷酸化 Akt 增進骨骼肌葡萄糖汲取能力 (Chang et al., 2015)，且三萜類 Ursolic acid (UA) 可協同活化 IGF-I 訊號傳遞，促進肌肉蛋白質合成 (Kunkel et al., 2011)。上述研究顯示，山苦瓜可能具有啟動 PI3K/Akt 活化路徑、調控肌肉生長壯大與促進粒線體功能之潛力。因此本研究假說為：**山苦瓜可以調控肌肉細胞生長，並促進粒線體功能。**

二、實驗架構

以 C2C12 肌肉細胞模式，與 C57BL/6J 公鼠作為動物模式，探討山苦瓜介入處理對於骨骼肌生長與功能的影響。





第二章 山苦瓜萃物對 C2C12 myoblasts 增生能力之影響

第一節 前言與實驗設計

一、前言

C2C12 是小鼠骨骼肌前驅細胞株 (mouse myoblast cell line)，可以分化成肌小管 (myotube)，常作為研究肌肉發育的細胞模式。此細胞株在體外培養 (*in vitro*) 為 myoblast，在充足血清的環境下會進行增生 (proliferate)，而在低血清的條件則會分化 (differentiate) 成 myocytes，再進一步移行 (migrate)、黏著 (adhere)、融合 (fuse) 成多核的 myotube (Abmayr & Pavlath, 2012) (圖 2-1)。

肌肉的再生能力受到肌肉幹細胞—衛星細胞的啟動所調控。雖然以 C2C12 細胞模式無法觀測到衛星細胞的活化，然而仍可從此 myoblast 進行肌肉再生能力的探討。Myoblast 具有增生並分化成肌纖維的能力，當 myoblast 增生增加，及代表有更多的 myoblast 可以分化成肌纖維來進行肌肉的補充，壯大肌肉以維持其功能。藉此，本章旨在探討山苦瓜萃物對於 myoblast 增生能力的影響。其次，由於類胰島素生長因子-1 (Insulin-like growth factor-1, IGF-1) 可以調控肌肉生長，因此本研究期望了解山苦瓜對 myoblast 的影響與 IGF-1 是否有關連，固本實驗將分別探討單獨添加山苦瓜萃物培養及與 IGF-1 共同培養對 C2C12 myoblasts 增生能力的影響。

再者，本實驗室先前著重在探討花蓮四號山苦瓜的各項生理活性，然而對於其餘多種品系的研究甚少。因此，本實驗亦嘗試探討不同品系山苦瓜對肌肉細胞的影響，以篩選出效果最好的品系進行後續實驗。此外，過去文獻指出，苦瓜中不帶醣基的三萜類促進葡萄糖汲取的能力較帶醣基之三萜類佳 (Tan et al., 2008)，

本實驗室過去研究亦發現將山苦瓜以 β -glucosidase 處理去糖基並以乙酸乙酯 (ethyl acetate, EA) 萃取，對於改善代謝疾病具有較佳的功效 (呂侃寬, 2013)。因此本實驗嘗試在不同溫度下 (37°C、50°C 以及 60°C)，使山苦瓜以其內源性酵素 β -glucosidase 進行水解並以乙酸乙酯萃取，來探討對於 myoblast 增生是否有不同功效。

綜合上述，本章研究擬探討山苦瓜對於 C2C12 myoblasts 增生的影響與其作用機制。實驗設計如圖 2-2。

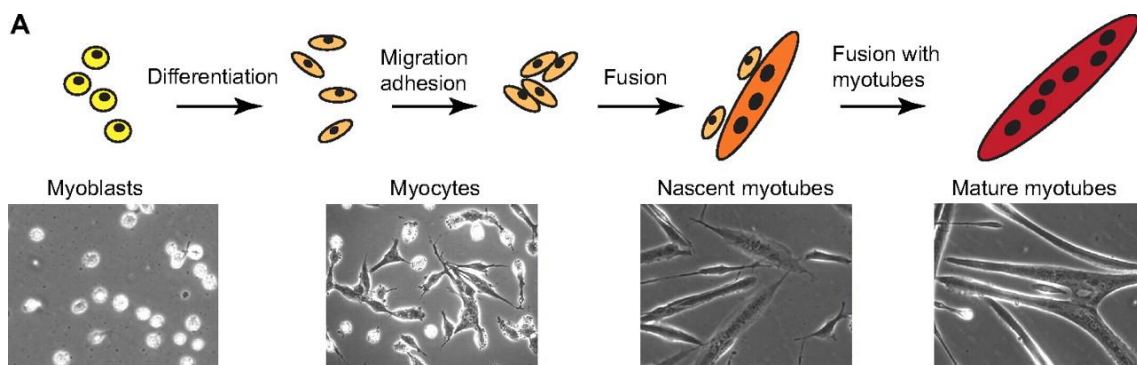


圖 2-1. 肌肉前驅細胞分化為成熟肌小管

Figure 2-1. Myoblast fusion in cultured muscle cells (Abmayr & Pavlath, 2012)

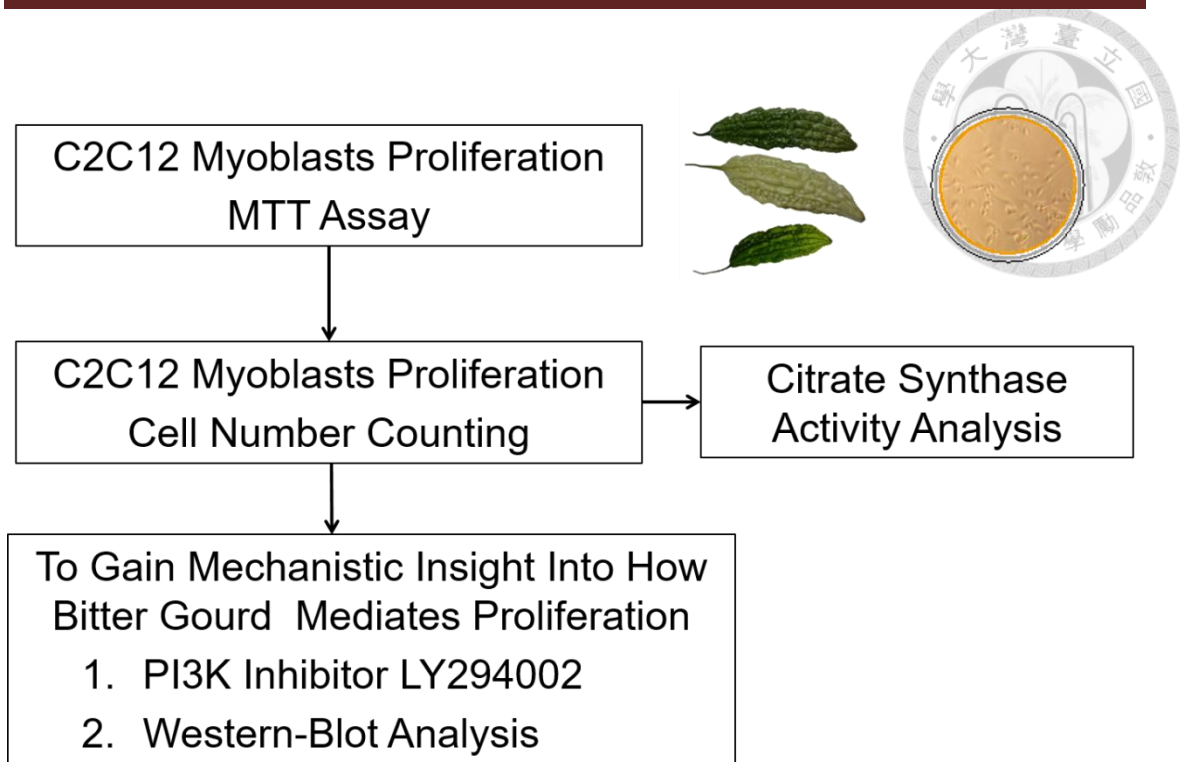
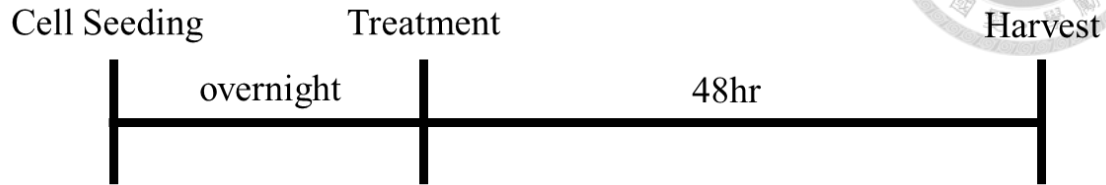


圖 2-2. 實驗設計—細胞模式

Figure 2-2. Experimental design of cell model



二、實驗設計



Cell line

C2C12 myoblast

Treatment

1. IGF-1 (Positive control)
2. BGP EAE : 1758、CKP55、P81、N81、H4、55M、V81
3. BGP 37°C, 50°C, 60°C EAE : 1758、CKP55、P81
4. LY294002 (PI3K inhibitor)

Analysis after harvest

1. MTT assay
2. Cell number counting
3. Citrate synthase activity assay
4. Western-Blot Analyses



第二節 實驗材料與方法

一、材料

1. C2C12 肌肉前驅細胞 (myoblast cells) (ATCC CRL-1772)
 - (1) 組織來源：myoblast, *Mus musculus*
 - (2) 購自食品工業發展研究所 (BCRC 60083)
2. 培養基與藥品試劑
 - (1) 培養基 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco 31600, 11995)
 - (2) 胎牛血清 Fetal bovine serum (FBS, Gibco 26140)
 - (3) Charcoal stripped, delipidated calf bovine serum (CSF)：將 FBS 經由活性碳去除雜質再過濾而成
 - (4) Phosphate-buffered saline (PBS) buffer

藥品

Potassium chloride (KCl, Nacalaitesque 28513-85)

Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4 , Nacalaitesque 28720-65)

Sodium chloride (NaCl, Nacalaitesque 31320-65)

Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4 , Nacalaitesque 31726-05)

- (5) Trypsin-EDTA (0.25 % Trypsin, 1 nM EDTA ·4Na) (Gibco 25200)
- (6) 0.4 % Trypan blue (Sigma T8154)
- (7) Bovine serum albumin (BSA) (Sigma A8806)
- (8) 類胰島素生長因子 Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) (Sigma I8779)
- (9) MTT : 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide ;
Thiazoyl blue (Sigma A2128)
- (10) 10 % FBS/DMEM：內含 10 % FBS 的 DMEM 溶液
- (11) 10 % CSF/DMEM：內含 10 % CSF 的 DMEM 溶液



(12) LY294002 (Sigma L9908)

二、細胞培養與繼代

C2C12 肌肉前驅細胞 (myoblast cells) 以 10 % FBS/DMEM 培養於 25 cm² 培養瓶，置於 37°C、5 % CO₂ 培養箱。待細胞長至八分滿，移除培養液，使用 PBS buffer 潤洗細胞，並用 0.25 % Trypsin-EDTA 將細胞洗下，以 0.4 % Trypan blue 溶液進行細胞染色並計數，將 3x10⁵ 細胞種於新 25 cm² 培養瓶，置於 37°C、5 % CO₂ 培養箱。每三天繼代培養一次。

三、山苦瓜樣品製備

1. 山苦瓜樣品

本實驗使用花蓮縣吉安鄉改良場提供之山苦瓜，品系為花蓮四號、1758、CKP55、P81、H4、N81、55M 及 V81。將各品系山苦瓜洗淨並切成薄片後，於本校食品科技研究所進行凍乾，再將凍乾後的山苦瓜研磨成粉，即為山苦瓜全果凍乾粉 (bitter gourd power, BGP)，保存於 -20°C 冰箱。

2. 山苦瓜樣品水解處理

將山苦瓜凍乾粉以 1:20 (w/v) 比例與二次水 (ddH₂O) 混勻，以 HCl 調整 pH 值至 5，並分別於 37°C、50°C 或 60°C 恆溫震盪培養箱反應 24 小時，再進行冷凍乾燥，研磨後即得山苦瓜 37°C、50°C 或 60°C 山苦瓜水解凍乾粉。

3. 山苦瓜樣品萃取

將山苦瓜全果凍乾粉或 37°C、50°C 或 60°C 山苦瓜水解凍乾粉分別以 20 倍體積之乙酸乙酯攪拌萃取 24 小時，過濾之後進行減壓濃縮抽乾，並以絕對酒精回溶後即得乙酸乙酯萃物 (ethyl acetate extract, EAE)。



四、細胞存活率分析—MTT assay

將 C2C12 myoblasts 以 10 % CSF/DMEM 稀釋為 2×10^4 cells/mL，種入 96-well plate (100 μ L/well)，置於 37°C、5% CO₂ 之培養箱培養過夜。以 0.1 % BSA/DMEM 稀釋類胰島素生長因子 (Insulin-like Growth Factor 1, IGF-1)，另外再以 0.1 % BSA/DMEM 或含有 50 ng/mL IGF-1 的 0.1 % BSA/DMEM 稀釋各品系之山苦瓜萃物，做為處理組 (treatment)；0.1 % BSA/DMEM 為 vehicle 組；50 ng/mL IGF-1 為正控制組 (positive control)。將細胞之培養液吸除，並加入各種處理之培養液，置於 37°C、5% CO₂ 之培養箱培養 48 小時。

之後吸除培養液，加入以不含血清之培養基 DMEM 稀釋 11 倍的 MTT 溶液 55 μ L/well。放入 37°C、5% CO₂ 之培養箱反應 3 小時。取出 96-well plate 再加 0.04 N HCl isopropanol (100 μ L/well)，溫和震盪 20 分鐘。待活細胞粒線體中所形成之 formazan 溶出，顏色由黃色轉變為藍紫色，以 ELISA reader 讀取 540 nm 之吸光值。

五、細胞增生試驗—Trypan Blue Exclusion 細胞計數

將 C2C12 myoblasts 以 10 % CSF/DMEM 稀釋為 2.5×10^4 cells/mL，種入 12-well plate (1 mL/well)，置於 37°C、5% CO₂ 之培養箱培養過夜。以 0.1 % BSA/DMEM 稀釋類胰島素生長因子 (Insulin-like Growth Factor 1, IGF-1)，另外再以 0.1 % BSA/DMEM 或含有 50 ng/mL IGF-1 的 0.1 % BSA/DMEM 稀釋成不同濃度的 1758 山苦瓜萃物 (10, 20, 50, 100 μ g/mL)，做為處理組 (treatment)；0.1 % BSA/DMEM 為 vehicle 組；50 ng/mL IGF-1 為正控制組 (positive control)。將細胞之培養液吸除，並加入各處理之培養液，置於 37°C、5% CO₂ 之培養箱培養 48 小時。

之後將細胞生長情形進行拍攝，並移除培養液，使用 PBS buffer 潤洗細胞，



並用 0.25 % Trypsin-EDTA 將細胞洗下，以 0.4 % Trypan blue 溶液進行細胞染色並計數。

六、粒線體檸檬酸合成酶酵素活性分析

1. 樣品製備

將 C2C12 myoblasts 以 10 % CSF/DMEM 稀釋為 2.5×10^4 cells/mL，種入 12-well plate (1 mL/well)，置於 37°C、5% CO₂ 之培養箱培養過夜。以 0.1 % BSA/DMEM 稀釋成不同濃度的 1758 山苦瓜萃物 (100, 50, 20, 10 µg/mL)，做為處理組 (treatment)；0.1 % BSA/DMEM 為 vehicle 組。將細胞之培養液吸除，並加入不同濃度處理組，置於 37°C、5% CO₂ 之培養箱培養 48 小時。

之後移除培養液，使用 PBS buffer 潤洗細胞，並用 0.25 % Trypsin-EDTA 將細胞洗下，用 PBS buffer 懸浮細胞，將體積定至 500 µL，使用超音波細胞粉碎儀破除細胞壁，以 12000 rpm、4°C 離心 10 min 收取上清液進行檸檬酸合成酶酵素活性分析。

2. 藥品試劑

藥品	Stock conc.
5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic Acid) (DTNB, Sigma D8130)	2 mM
Acetyl coenzyme A lithium salt (Sigma A2181)	12 mM
Oxaloacetic acid (OAA, Sigma O4126)	10 mM
Tris base (J.T. Baker 4109-02)	1 M
Triton X-100 (Sigma X100)	10 %

Tris base 以二次水攪拌均勻溶解，以 6 N HCl (Sigma 30721) 調整 pH 值至 8.0，定容至 250 mL，濃度為 1M。DTNB 與 OAA 於測定當日分別以 1M 與 0.5 M 之 Tris-HCl 新鮮配置。Acetyl coenzyme A 與 Triton X-100 則以二次水配置。

3. 原理

原理如圖 2-3，檸檬酸合成酶會將反應基質 OAA 與 Acetyl coenzyme A 反應成 citrate 與 coenzyme A，coenzyme A 可進一步將反應液中另一基質 DTNB 還原成 TNB，並在波長 412 nm 下有最大吸光值，由吸光值計算檸檬酸合成酶酵素活性。

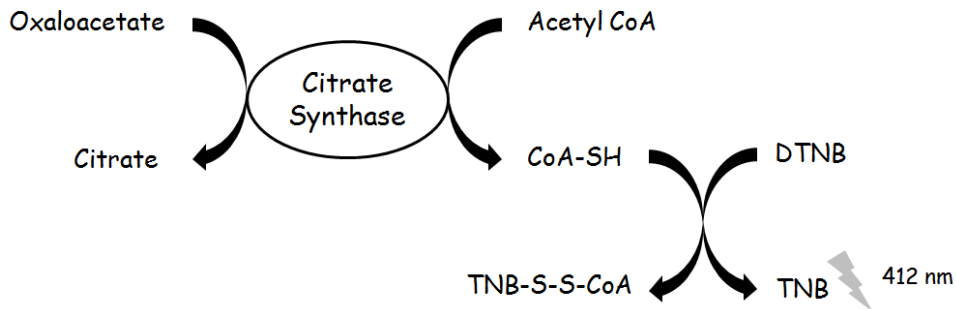


圖 2-3. 檸檬酸合成酶酵素活性分析原理

Figure 2-3. The mechanism of citrate synthase activity assay

4. 方法步驟

將 Reagent mixture 混合均勻後，注入 96 well-plate 並於 37°C 培養 10 分鐘，接著加入 OAA (20 $\mu\text{L}/\text{well}$, final conc. 1 mM) 進行反應，以 ELISA reader 讀取紀錄 405 nm 波長下吸光值，每隔 30 秒記錄一次，共 15 分鐘。取吸光值對時間曲線之回歸線 $R^2 > 0.99$ 範圍的斜率計算酵素活性，並且使用 BCA protein assay 之市售試劑套組 (Thermo) 對細胞液進行蛋白質定量，計算檸檬酸合成酶之比活性。

Reagent mixture

藥品	Volume (μL)		Final conc.
	Sample	Blank	
Cell sample	20	20	
ddH ₂ O	140	145	
Triton X-100	5	5	0.25%
Tris-base	-	-	0.1 M
DTNB	10	10	0.1 mM
Acetyl coenzyme A	5	-	0.3 mM



Total volume	180	180
--------------	-----	-----

七、PI3-Kinase 抑制劑 LY294002 介入試驗

將 C2C12 myoblasts 以 10 % CSF/DMEM 稀釋為 2×10^4 cells/mL，種入 96-well plate (100 μ L/well)，置於 37°C、5% CO₂ 之培養箱培養過夜。以抑制劑 LY294002 (1, 5, 10 μ M) 分別添加於 IGF-1 (25, 50, 75, 100 ng/mL) 與含有 50 ng/mL IGF-1 之 1758 山苦瓜萃物 (10, 20, 50, 100 μ g/mL)，作為處理組。將細胞之培養液吸除，並加入不同的處理組，置於 37°C、5% CO₂ 之培養箱培養 48 小時。之後進行 MTT 細胞存活率分析。

八、蛋白質表現量分析—西方墨點法

1. 樣品製備

將 C2C12 myoblasts 以 10 % CSF/DMEM 稀釋為 3×10^4 cells/mL，種入 6 cm culture dish (5 mL/well)，置於 37°C、5% CO₂ 之培養箱培養過夜。以 0.1 % BSA/DMEM 稀釋不同處理，處理項目分別為控制組 (0.1 % BSA/DMEM)、IGF-1 組 (50 ng/mL)、1758 EAE (100 μ g/mL) + IGF-1 (50 ng/mL)、LY294002 (50 μ M) + IGF-1 (50 ng/mL)、1758 EAE (100 μ g/mL) + LY294002 (50 μ M) + IGF-1 (50 ng/mL) 共五組。將細胞之培養液吸除，並加入不同處理組，置於 37°C、5% CO₂ 之培養箱培養 1 小時。接續進行蛋白質萃取。

2. 藥品試劑

(1) 細胞蛋白質萃取

➤ 蛋白質萃取液

藥品	添加量 (each well)
RIPA buffer (Thermo scientific 89901)	80 μ L
Protease inhibitor cocktail (Sigma P8340)	1/100 of total volume



Phosphatase inhibitor cocktail I (Sigma P2850)

1/100 of total volume

(2) 電泳與轉印

- 40 % Acrylamide-bisacrylamide (29:1) (Biomax ACR004.500), A 液
- Separation buffer, B 液

藥品	需要量
Tris-Base (J.T.Baker 4109-02), 1.5 M	90.9 g
TEMED (Sigma T-8133)	1.8 mL

溶於 300 mL ddH₂O 中，調整至 pH = 8.8，加 ddH₂O 定量為 500 mL。

- Stacking buffer, C 液

藥品	需要量
Tris-Base (J.T.Baker 4109-02), 0.5 M	6 g
TEMED (Sigma T-8133)	0.4 mL

溶於 40 mL ddH₂O 中，調整至 pH = 6.8，加 ddH₂O 定量為 100 mL。

- 10% SDS 溶液

取 10 g Sodium Dodecyl Sulfate (SDS, J.T.Baker 4095-04) 溶於 100 mL 二次水，稍微加熱 (30-40°C) 催化溶解。

- 10% APS 溶液

取 0.1 g Ammonium persulfate (Sigma A3678) 溶於 1 mL ddH₂O。

- 通用電泳緩衝液 (Running buffer) 10× Stock

藥品	需要量
Tris-Base (J.T.Baker 4109-02)	30.3 g
Glycine (J.T.Baker 4059)	137.37 g
SDS (J.T.Baker 4095-04)	10 g

用 ddH₂O 定量為 1 L，使用時稀釋 10 倍。

- Sample buffer, 4× (Bio-Rad)
- Isopropanol (Merck Millipore)



➤ 轉印緩衝液 (Transfer buffer) 10× Stock

藥品	需要量
Tris-Base (J.T.Baker 4109-02)	30 g
Glycine (J.T.Baker 4059)	142.63 g

用 ddH₂O 定量為 1 L，使用時稀釋 10 倍，並加入 Methanol (Merck Millipore) (1/10 of total volume)。

(3) 免疫染色

➤ PBST (Washing buffer)

將 PBS 加入 Tween 20 (Nacalai Tesque) (最終濃度 0.1%)。

➤ Blocking buffer：用脫脂奶粉 (Anchor) 配置 5% milk。

➤ Methanol

➤ 一次抗體

Phospho-Akt (Ser473) rabbit antibody (Cell Signaling 9271)

Akt rabbit antibody (Cell Signaling 9272)

GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) mouse antibody (Merck Millipore MAB374)

➤ 二次抗體

Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody (Epicentrics 3053-1)

Anti-mouse IgG, HRP-linked antibody (Cell Signaling 70763)

➤ 蛋白質分子量標準品 (Marker)：PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo scientific 26616)

➤ 冷光呈色劑 Western Chemiluminescent HRP Substrate (ECL) (Merck Millipore WBKLS0500)



3. 儀器設備

- (1) 鑄膠套件 (Hoefer)
- (2) 電源供應器 (Amersham Pharmacia Biotech 301, Major Science MP250)
- (3) 直立式電泳槽 (Hoefer SE-250)
- (4) 電泳轉印槽 (Hoefer TE22)
- (5) PVDF 轉印膜 (Millipore IPVH00010)
- (6) 平台震盪器
- (7) 化學冷光影像系統 (UVP autochemi system)

4. 實驗方法

(1) 細胞蛋白質萃取

樣品處理後，移除培養液，使用 PBS buffer 潤洗細胞並移除 PBS，加入蛋白質萃取液並以 scrapper 刮下細胞，置於冰上 30 分鐘使細胞破裂。12000 rpm、4°C 離心 10 min 收取上清液，以 BCA protein assay 之市售試劑套組 (Thermo) 進行蛋白質定量，再加入 1/3 體積 sample buffer，混勻後置於 100°C 水浴 10 分鐘，作為細胞蛋白質樣品。

(2) SDS 電泳膠片製備

	電泳膠體	
	10 % 分離膠體 (下膠) (mL)	4 % 聚焦膠體 (上膠) (mL)
A 液	2	0.45
B 液	2	-
C 液	-	1.116
10 % SDS	0.08	0.045
ddH ₂ O	3.88	2.799
APS	0.04	0.09
Total	8/一片	4.5/一片

鑄膠套件組裝完成後置於水平平板上，插上樣本梳，並在樣本梳下約 1 公分處做記號，拔掉樣本梳。按上表比例配置分離膠體並注入鑄膠容器中直到記號處，加入 Isopropanol 壓平液面，約 40 分鐘可凝結。按上表比例配置焦集膠體，移除 Isopropanol 後加入焦集膠體並快速插上樣本梳，約 15 分鐘可凝結。將凝結後的膠片取出，放上電泳槽，倒入 1× 通用電泳緩衝液，並小心拔除樣本梳。

(3) SDS 蛋白質電泳

將細胞蛋白質樣品用定量結果調整為相同濃度，並將相同蛋白質樣品與蛋白質分子量標準品同時注入樣品槽兩片膠內，以便於之後分別染 Phospho-Akt 及 Akt 抗體。以 80V 進行電泳 30 分鐘讓蛋白質樣品聚集，再以 140V 進行 40 分鐘，完成電泳。

(4) 轉印

PVDF 膜以甲醇潤濕以增加親水性後，浸入轉印緩衝液中平衡 10 分鐘。轉印卡夾浸入轉印緩衝液，其上放置多孔海綿，鋪上轉印濾紙後再放上 PVDF 膜。小心將電泳完之膠片取下，鋪平放在 PVDF 膜上，避免氣泡，以浸濕之轉印濾紙覆蓋與多孔海綿依序覆蓋，再蓋上轉印卡夾。轉印卡夾置於轉印槽中，注入轉印緩衝液，插上電極，膠至膜方向為負極到正極，以 400 mA 轉印 60 分鐘。

(5) 免疫染色

轉印完成之 PVDF 膜以 PBST 清洗 5 分鐘三次 (75 rpm)，再以含 5% milk 之 blocking buffer 進行填塞作用，反應 1 小時 (50 rpm)。倒除 blocking buffer 後加入適當稀釋之一次抗體 (Phospho-Akt、Akt)，4°C 反應過夜 (50 rpm)。移除一次抗體，以 PBST 清洗 5 分鐘三次 (75 rpm)，加入適當稀釋之二次抗體，反應 1 小時 (50 rpm)。移除二次抗體，以 PBST 清洗 5 分鐘三次 (75 rpm)，加入冷光呈色劑，以化學冷光影像系統分析。冷光呈色後，以 PBST 清洗 5 分鐘三次 (75 rpm)，



加入適當稀釋之一次抗體 (GAPDH)，4°C 反應過夜 (50 rpm)。接下來步驟同上，最後以化學冷光影像系統分析。

(6) 數據整理

化學冷光影像系統分析後的照片用 Image J 計算色帶面積積分進行定量。將同一片膜中蛋白質樣品之 Phospho-Akt 色帶積分值與內標準 GAPDH 色帶積分值相除進行標準化，另外將另一片膜中蛋白質樣品之 Akt 色帶積分值與內標準 GAPDH 色帶積分值相除進行標準化，並將標準化後之 Phospho-Akt 與 Akt 比值作為樣品刺激後對 Akt 磷酸化之影響。

九、統計分析

實驗中每一處理皆進行至少三重覆，數值以 mean \pm SD (standard deviation) 表示，實驗結果以 Excel 2016 (Microsoft, USA) 進行 Student's *t*-test 分析各處理。與 vehicle 組有顯著差異時 ($p < 0.05$)，於圖或表上標示星號 (*)；與 positive control 組有顯著差異時 ($p < 0.05$)，於圖或表上標示井字號 (#)。



第三節 實驗結果

一、細胞存活率分析——MTT assay

為了探討不同品系山苦瓜乙酸乙酯萃物對 C2C12 myoblasts 增生的影響，本實驗將山苦瓜萃物處理肌肉前驅細胞 myoblast 後，使用 MTT assay 測量 O.D. 540 值來分析細胞存活率。正控制組為 IGF-1，可以明顯促進 myoblast 增生，並且具有劑量效應（圖 2-4 A）。各品系山苦瓜萃物對於 myoblast 增生的影響不盡相同（圖 2-4 B-H）。其中，1758 與 CKP55 單獨處理 myoblast 皆可顯著提升 O.D. 540 值（圖 2-4 B,C）；P81、H4、N81、與 55M 單獨處理 myoblast 無法提升 O.D. 540 值，將萃物與 IGF-1 共同處理肌肉細胞兩天，則可觀察到 O.D. 540 值顯著提升，且具有劑量效應（圖 2-4 D-G）；V81 則是無論單獨處理或是與 IGF-1 共同處理，皆無法顯著提升 O.D. 540 值（圖 2-4 H）。

將 1758、CKP55 與 P81 三種品系分別在 37°C、50°C、60°C 進行水解 24 小時，以乙酸乙酯萃取，得到三苦瓜不同溫度水解萃物，以觀察山苦瓜以其內源性酵素 β -glucosidase 去除糖基後，對於 myoblast 增生是否有不同功效。實驗結果顯示，1758、CKP55 與 P81 山苦瓜在不同溫度水解之後，O.D. 540 值的趨勢皆有所改變（圖 2-5）。50°C 及 60°C EAE 在高劑量（100 μ g/mL）處理會明顯降低 O.D. 540 值，而 60°C EAE 在低劑量（5 μ g/mL）處理則比起同濃度未水解處理組可以顯著增加 O.D. 540 值。

綜合以上結果，1758 品系未經水解的萃物提升 O.D. 540 值的效果最為顯著，因此將以此萃物進行後續研究探討。

二、細胞增生試驗——Trypan Blue Exclusion 細胞計數

先前實驗使用 MTT assay 來進行 myoblast 增生試驗的探討，為了進一步確認

細胞增生的情形，這部分的實驗將實際進行細胞計數，來檢測細胞數目的增減。細胞計數的結果顯示，1758 山苦瓜萃物單獨處理肌肉細胞時，無法增加細胞數目；1758 萃物在與 IGF-1 (50 ng/mL) 共同處理時，才會顯著並劑量效應地增加肌肉細胞的數目 (圖 2-6 A)。在放大 40 倍的照片中，單獨處理 IGF-1 時，視野下細胞仍有些許空隙，而給予 1758 EAE 與 IGF-1 共同處理後，視野下細胞呈現漲滿 (圖 2-6 B,C)。

三、粒線體檸檬酸合成酶 (Citrate synthase) 酵素活性分析

將 1758 EAE 單獨處理肌肉細胞後，MTT assay O.D. 540 值顯著增加，細胞數卻與 vehicle 組無顯著差異的矛盾結果。由於 MTT assay 作用原理為測量粒線體脫氫酵素 succinate dehydrogenase 的活性作為細胞存活率的指標，因此與粒線體的活性可能有所關聯。

據此，本實驗將以 1758 EAE 單獨處理肌肉細胞兩天，並進行粒線體功能指標 citrate synthase 的活性分析。結果顯示，1758 EAE 確實可以增加 myoblast citrate synthase 的活性，且具有劑量效應 (圖 2-7)。

四、PI3-Kinase 抑制劑 LY294002 介入試驗

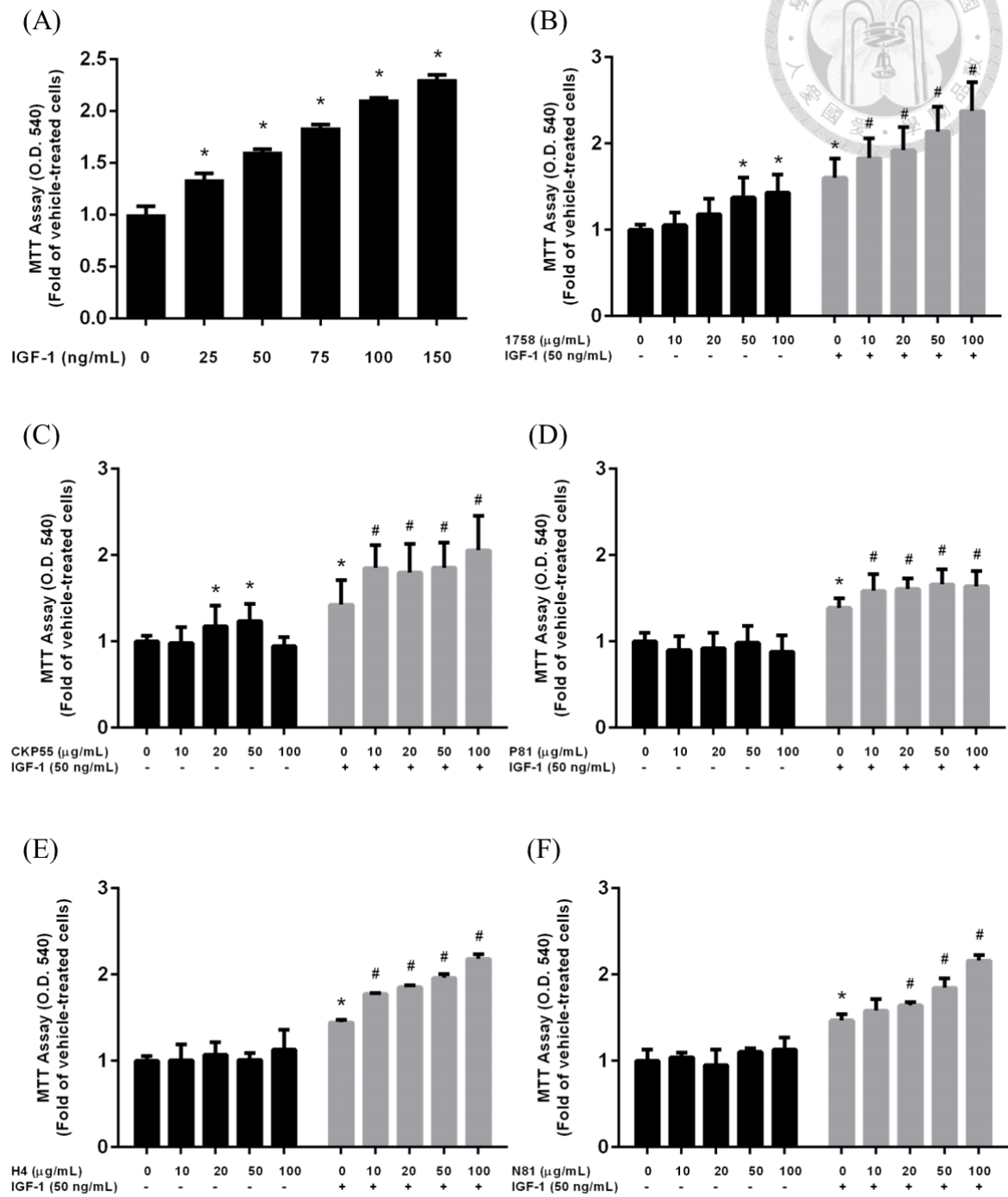
將 1758 EAE 與 IGF-1 共同處理肌肉細胞後，細胞數目顯著增加。因此本實驗將探討山苦瓜萃物促進 myoblast 增生的作用路徑。由於 1758 EAE 只有在與 IGF-1 共同處理之下才能發揮效用，因此推測其作用需透過 PI3K/Akt 路徑。據此，這部分的實驗將使用抑制劑 LY294002 (PI3K inhibitor) 來阻斷下游傳遞路徑。先將 LY294002 與 IGF-1 共同處理肌肉細胞，結果顯示，IGF-1 造成細胞增生之效應受到抑制 (圖 2-8 A)。再來，將 LY294002 與不同濃度 1758 EAE 共同處理，結果顯示，隨著 LY294002 濃度增加，1758 EAE 促進 IGF-1 對細胞增生之效應逐漸被抑制 (圖 2-8 B)。在放大 40 倍的照片中，可觀察到加入 LY294002 後，1758

EAE 已經無法再造成細胞數目增加 (圖 2-8 C,D)。

五、蛋白質表現量分析—西方墨點法

進一步使用西方墨點分析蛋白質表現量，結果顯示，處理 myoblasts 一小時後，相較於單獨處理 IGF-1 組，1758 EAE 與 IGF-1 共同處理顯著增加 Akt 磷酸化表現量 (圖 2-9)。





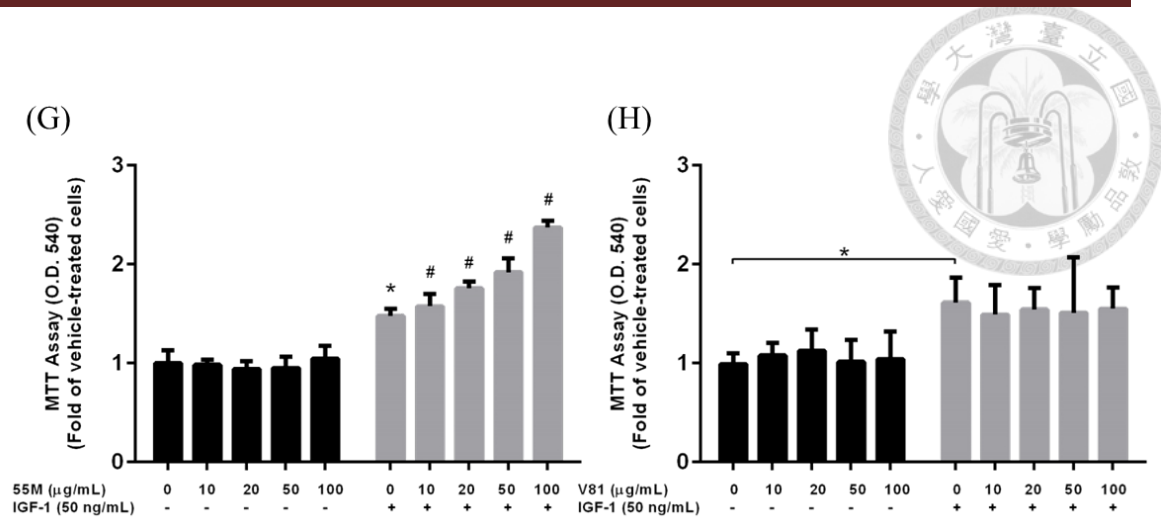
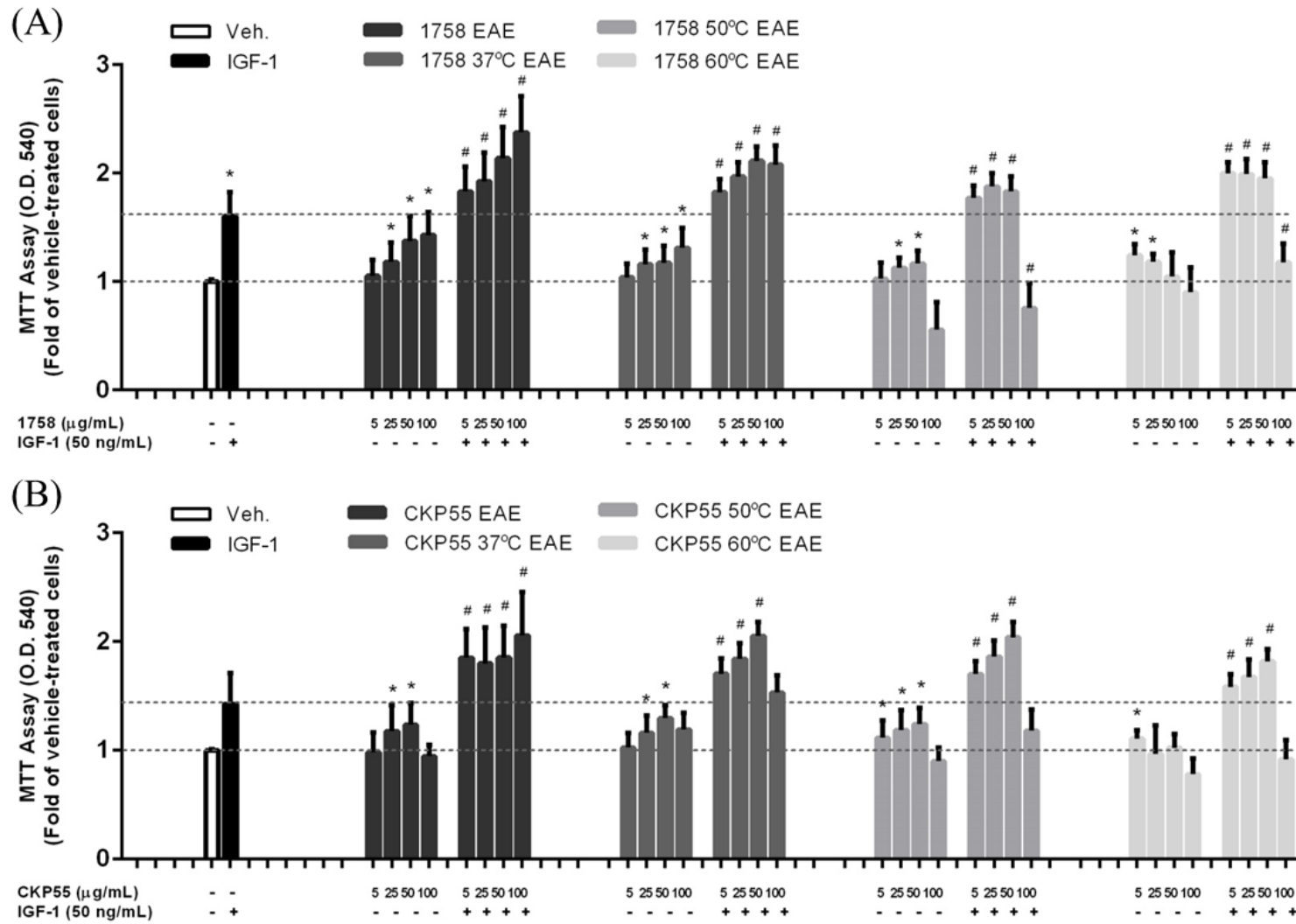


圖 2-4. 各品系山苦瓜乙酸乙酯萃物單獨處理或與 IGF-1 共處理對 C2C12 myoblasts 增生的影響 (MTT assay)

Figure 2-4. The MTT assay of C2C12 myoblasts treated with bitter gourd ethyl acetate extracts with or without IGF-1.

Cell viability was assessed by MTT assay. The optical density (OD) was measured at 540 nm. C2C12 myoblasts were treated with vehicle or various concentrations of (A) IGF-1 (B) 1758 (C) CKP55 (D) P81 (E) H4 (F) N81 (G) 55M (H) V81 bitter gourd ethyl acetate extracts for 48 hours. Data were presented as folds of vehicle-treated cells. Values are the means \pm SD of nine replicates. Significance of differences is analyzed by Student's *t* test. * denotes significant different form vehicle (0.1% BSA/DMEM) and # denotes significant different form positive control (50 ng/mL IGF-1) at $p < 0.05$.



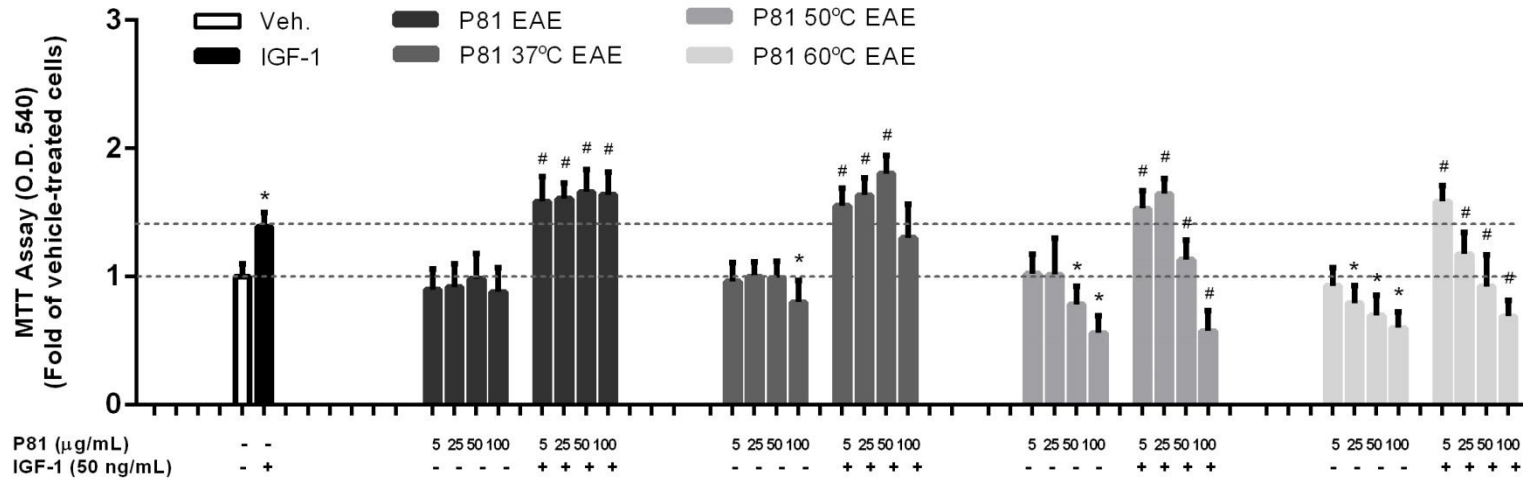


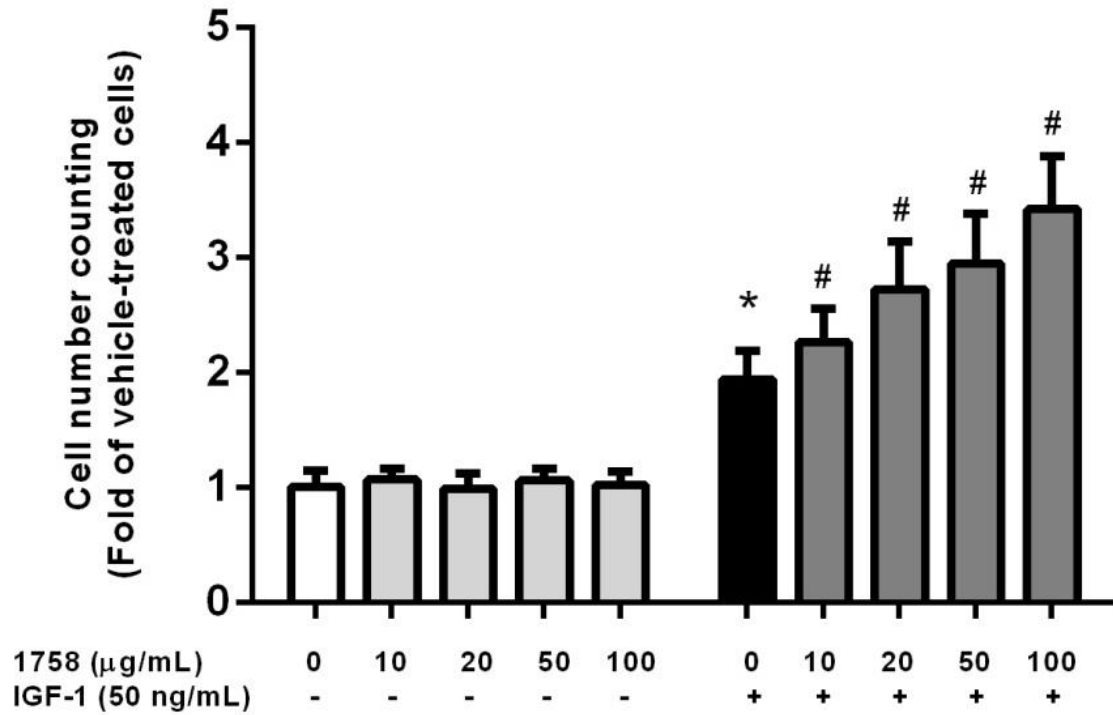
圖 2-5. 經不同溫度水解之 1758 山苦瓜乙酸乙酯萃物單獨處理及與 IGF-1 共處理對 C2C12 myoblasts 增生的影響 (MTT assay)

Figure 2-5. The MTT assay of C2C12 myoblasts treated with hydrolyzed 1758 bitter melon ethyl acetate extracts with or without IGF-1.

Cell viability was assessed by MTT assay. The optical density (OD) was measured at 540 nm. C2C12 myoblasts were treated with vehicle or hydrolyzed (A) 1758 (B) CKP55 (C) P81 bitter melon ethyl acetate extracts for 48 hours. Data were presented as folds of vehicle-treated cells. Values are the means \pm SD of nine replicates. Significance of differences is analyzed by Student's *t* test. * denotes significant different from vehicle (0.1% BSA/DMEM) and # denotes significant different from positive control (50 ng/mL IGF-1) at $p < 0.05$.



(A)



(B)



(C)



圖 2-6. 1758 山苦瓜乙酸乙酯萃物單獨處理及與 IGF-1 共處理對 C2C12 myoblasts 增生的影響 (Trypan Blue Exclusion 細胞計數)

Figure 2-6. Trypan Blue Exclusion Cell Counting Assay of C2C12 myoblasts treated with 1758 bitter gourd ethyl acetate extracts with or without IGF-1.

C2C12 myoblasts were treated with 1758 bitter gourd ethyl acetate extracts for 48 hours, (A) dissociated with Trypsin-EDTA, and counted after Trypan Blue staining. C2C12 myoblasts were treated with 100 μ M 1758 bitter gourd ethyl acetate extracts (B) with or (C) without IGF-1 for 48 hours (40X magnification). Objective with scale bar = 100 μ m. Data were presented as folds of vehicle-treated cells. Values are the means \pm SD of nine replicates. Significance of differences is analyzed by Student's *t* test. * denotes significant different from vehicle (0.1% BSA/DMEM) and # denotes significant different from positive control (50 ng/mL IGF-1) at $p < 0.05$.

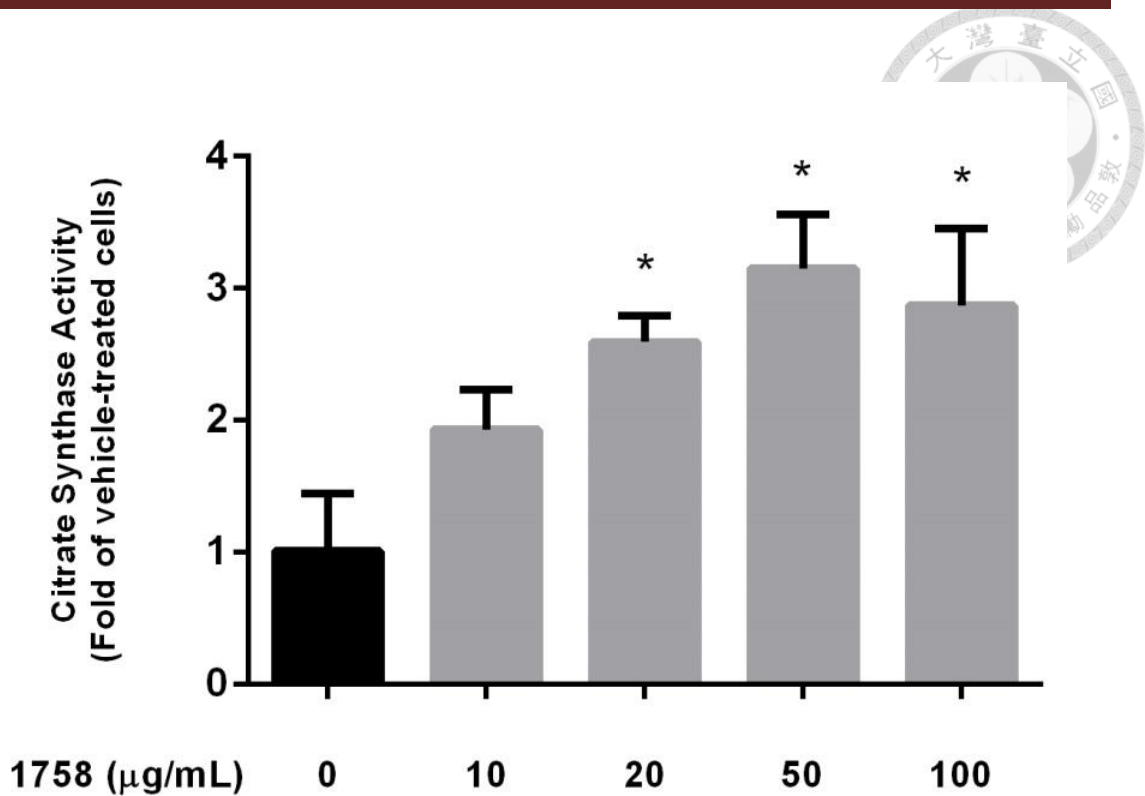


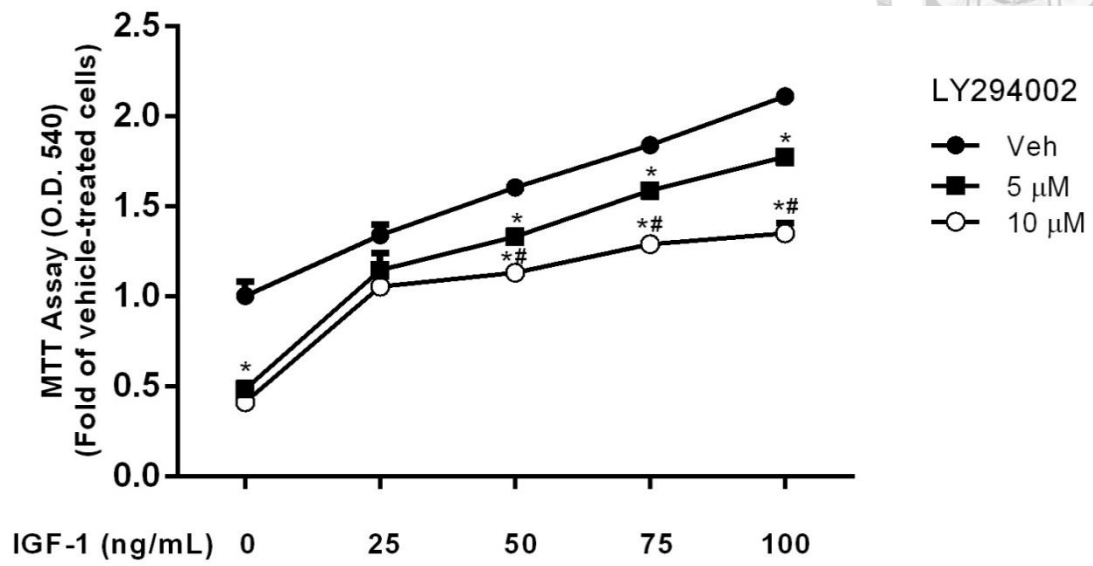
圖 2-7. 1758 山苦瓜乙酸乙酯萃物對 C2C12 myoblasts 粒線體檸檬酸合成酶酵素活性的影響

Figure 2-7. Citrate synthase activity of C2C12 myoblasts treated with 1758 bitter gourd ethyl acetate extracts

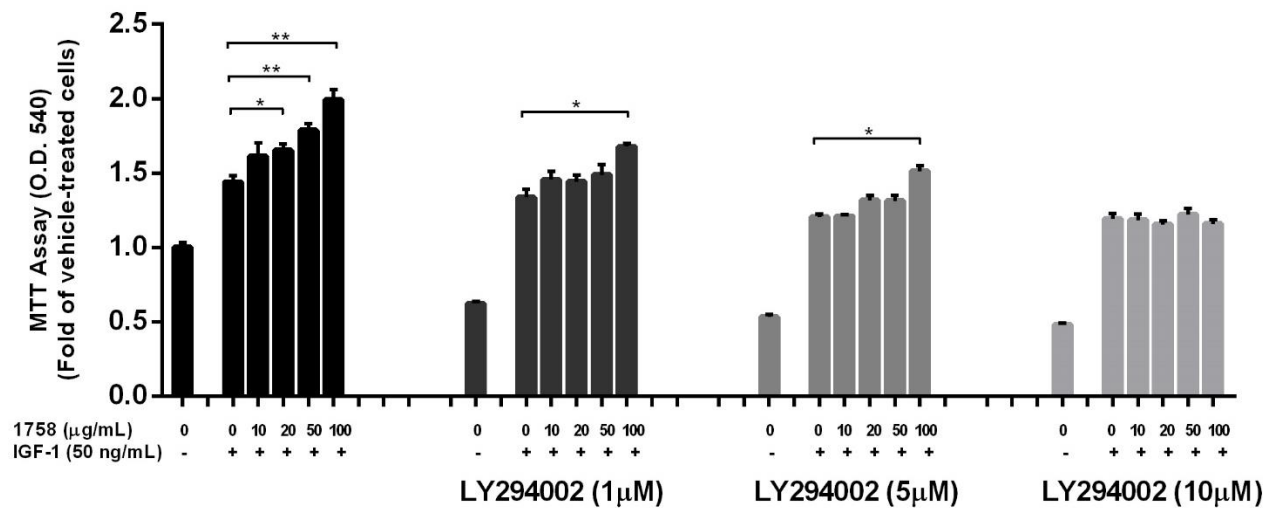
C2C12 myoblasts were treated with 1758 bitter gourd ethyl acetate extracts for 48 hours. Data were presented as folds of vehicle-treated cells. Values are the means \pm SD ($n \geq 3$). Significance of differences is analyzed by Student's *t* test. * denotes significant different from vehicle (0.1% BSA/DMEM).



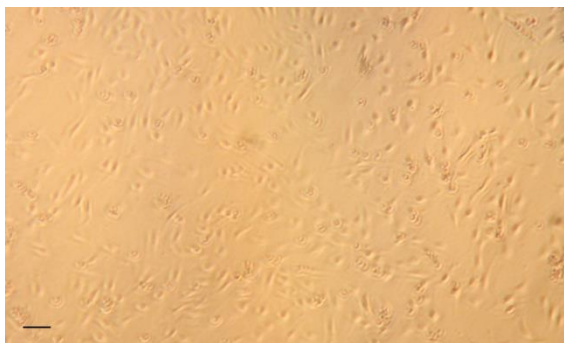
(A)



(B)



(C)



(D)

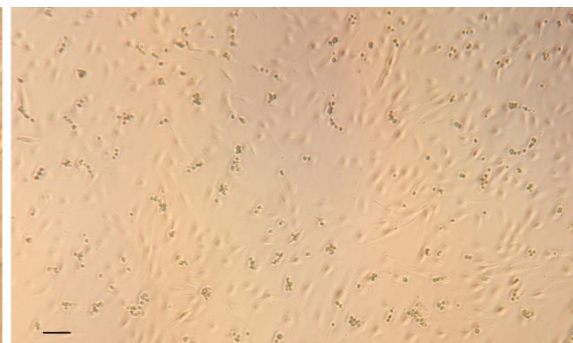


圖 2-8. 抑制劑 LY294002 介入對 1758 山苦瓜乙酸乙酯萃物造成 C2C12 myoblasts 增生效果之影響



Figure 2-8. The effect of PI3-Kinase Inhibitor LY294002 on the proliferation of C2C12 myoblasts co-treated with IGF-1 and 1758 bitter gourd ethyl acetate extracts

C2C12 myoblasts were treated with (A) various concentrations of LY294002 and IGF-1 (B) LY294002 and 1758 bitter gourd ethyl acetate extracts (C) LY294002 (10 μ M) and IGF-1 (50 ng/mL) (D) 1758 (100 μ g/mL), LY294002 (10 μ M) and IGF-1 (50 ng/mL) for 48 hours. Cell viability was assessed by MTT assay (A)(B) and digital photos were taken using 40X magnification Objective with scale bar = 100 μ m (C)(D). Data were presented as folds of vehicle-treated cells. Values are the means \pm SD ($n \geq 3$). Significance of differences is analyzed by Student's *t* test. * denotes significant different from (A) vehicle (B) IGF-1 (50 ng/mL) and # denotes significant different from (A) LY294002 (5 μ M) at $p < 0.05$.

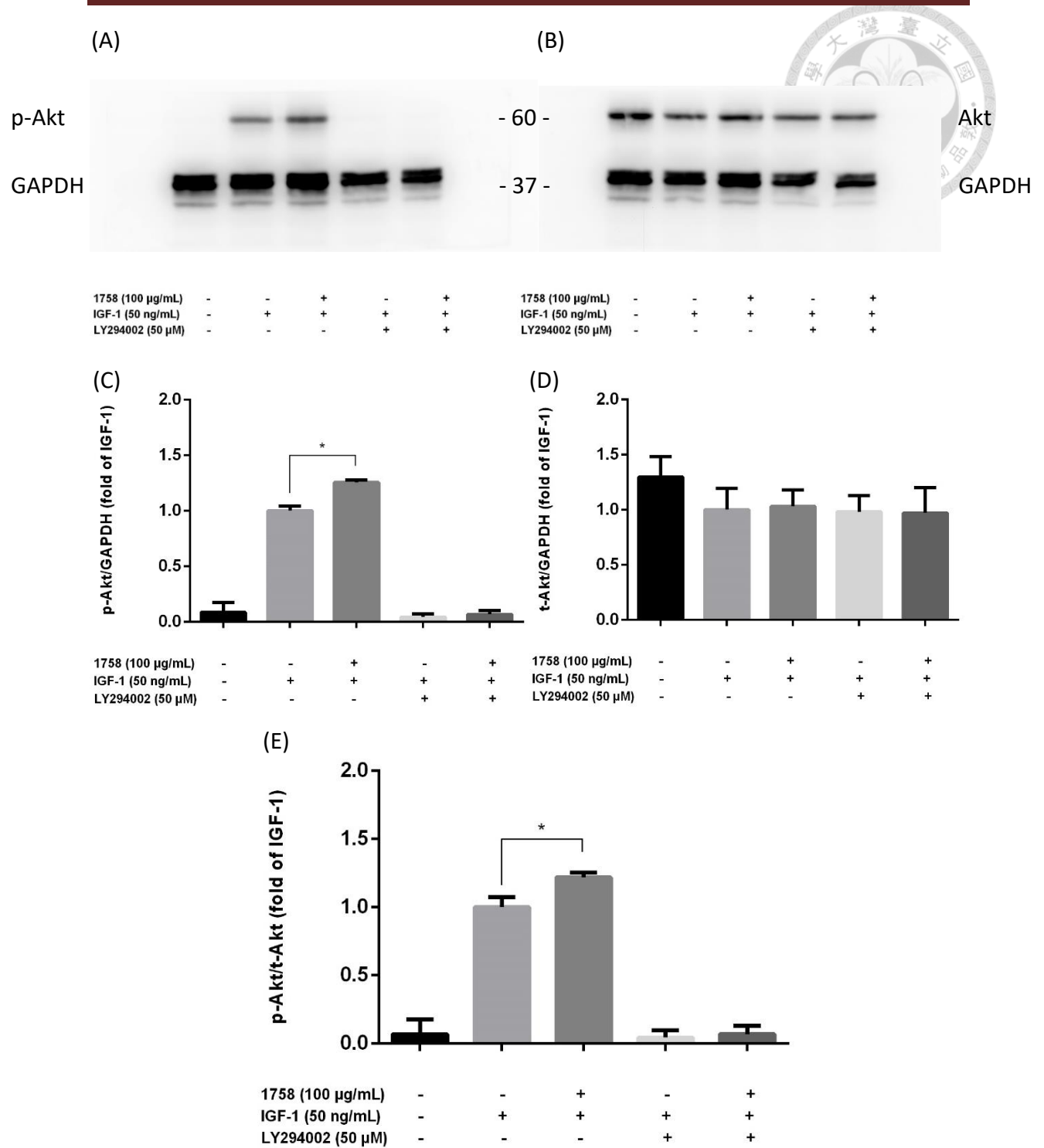


圖 2-9. C2C12 myoblasts 給予 1758 EAE 處理 1 小時之 Akt 蛋白質及其磷酸化表現量

Figure 2-9. Western-Blot Analyses to detect phospho-Akt (p-Akt) and Akt in C2C12 myoblasts extracts treated with 1758 EAE for 1 hr

Representative Western blot analysis of (A) phospho-Akt, (B) total-Akt, and GAPDH in the lysates of C2C12 myoblasts treated with IGF-1 (50 ng/mL), 1758 (100 µg/mL) + IGF-1 (50 ng/mL), LY294002 (10 µM) + IGF-1 (50 ng/mL), 1758 (100 µg/mL) + LY294002 (10 µM) + IGF-1 (50 ng/mL) for 1 hr. Quantification of (C) phospho-Akt and (D) total-Akt were normalized based on the levels of GAPDH, and quantification of (E) phospho-Akt/GADPH was normalized based on the levels of total-Akt/GADPH. Data were presented as folds of IGF-1-treated cells. Values are the means ± SD (n=3). Significance of differences is analyzed by Student's *t* test. * $p < 0.05$.



第四節 討論

一、不同品系山苦瓜暨水解乙酸乙酯萃物對 C2C12 myoblasts 增生能力的影響

本章實驗先使用 MTT assay 初探不同品系山苦瓜萃物對 C2C12 myoblasts 增生能力的影響 (圖 2-4)。雖然以細胞計數觀察時，山苦瓜單獨處理 myoblast 所造成的 MTT assay O.D. 540 值上升，並未反應在細胞數目上，暗示非常有可能是由於山苦瓜對於粒線體功能的促進。最重要的是，在山苦瓜與 IGF-1 共同處理 myoblast 時，MTT 值與細胞增生的數目有相同的趨勢 (圖 2-6、圖 2-7)。因此，用 MTT assay 來初步觀測細胞增生的情形，對於山苦瓜與 IGF-1 共同處理 myoblast 的結果仍可被接受。

經由 MTT assay 進行分析，我們觀察到各品系有不盡相同的結果。大部分的山苦瓜萃物需要在與 IGF-1 共同處理才能增加 MTT 值。唯有 1758 與 CKP55 單獨處理時就可以使 MTT 值增加，其中又以 1758 品系的結果最為顯著。因此，我們挑選 1758 進行後續的實驗。然而，若單獨看可以代表細胞增生結果的 MTT 值，亦即山苦瓜與 IGF-1 共同處理的部分，我們觀察到許多品系促進增生的效果皆不錯。其中，比起單獨處理 IGF-1，共同處理 1758 後，最有效的濃度可使 MTT 值增加 48.2%，H4 (50.7%)、55M (60.5%)、N81 (47.2%) 與 CKP55 (44.2%) 促進增生的效果亦非常卓越。P81 (19.6%) 萃物效果稍次，V81 則未觀察到有促進增生的能力 (表 2-1)。顯示，各品系之間促進增生的有效成份含量不一，並且需要在 IGF-1 存在下，才能促進細胞增生。

另一方面，經過水解的山苦瓜萃物促進增生能力則有不一樣的結果 (圖 2-5)。本實驗採用弱酸 (pH = 5)、不同溫度 (37°C、50°C、60°C) 的環境，期望山苦瓜能藉由內源性酵素 β -glucosidase 活性，將帶糖基三萜類的糖基去除。實驗結果顯示，當 1758、CKP55、P81 山苦瓜經由不同溫度水解之後，與 IGF-1 共同處理兩天，

促進增生的能力皆有不同程度的減弱，甚至在高濃度時會有抑制生長的情形（表 2-2）。值得注意的是，山苦瓜萃物以低劑量（5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）單獨處理，儘管原先未經水解的萃取物尚無法顯著使 MTT O.D. 540 值增加，但低劑量（5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）1758 及 CKP55 60°C EAE 就已經可以顯著提升 MTT O.D. 540 值，比起未處理苦瓜的控制組分別增加 24.3% 及 11%。由以上可推論山苦瓜經由水解後，成份有所改變，在低劑量時會使 MTT 值上升，然而濃度提高後，抑制細胞生長的成份影響效果加劇，導致在高濃度反而觀察到細胞數目減少的情形。實驗室過去研究指出山苦瓜經由水萃，外添加 β -glucosidase 進行水解後，再用乙酸乙酯萃取，可以增強 Akt 磷酸化，並促進 3T3-L1 脂肪細胞葡萄糖汲取（周怡君, 2010）。然而，該實驗水解方法與本實驗稍有不同，再加之其作用細胞為脂肪細胞，處理時間亦不相同。更重要的是，insulin 訊號造成之葡萄糖汲取，與 IGF-1 訊號造成之細胞增生，雖然同是活化 PI3K/Akt 路徑，其活化的條件與促進的下游路徑亦有所差異。因此，上述原因皆可能導致本實驗未能在小鼠骨骼肌細胞觀察到山苦瓜水解萃取物對於促進細胞增生有更優良的效果。



表 2-1. 不同品種山苦瓜乙酸乙酯萃物對 C2C12 myoblasts 增生的影響

Table 2-1. Effects of various cultivars of bitter melon ethyl acetate extracts on the proliferation of C2C12 myoblasts

	BGP conc. ($\mu\text{g/mL}$)		C2C12 myoblasts Proliferation Assay (MTT)	
			Maximal activity	
			% by vehicle	% by 50 ng/mL IGF-1
50 ng/mL IGF-1	-	+	-	+
1758	100	100	42.8% \uparrow	48.2% \uparrow
CKP55	50	100	23.5% \uparrow	44.2% \uparrow
P81	-	50	-	19.6% \uparrow
H4	-	100	-	50.7% \uparrow
N81		100		47.2% \uparrow
55M	-	100	-	60.5% \uparrow
V81	-	-	-	-

1. \uparrow 表示 MTT O.D. 540 值顯著增加；-：表示與對照組相比未有顯著影響。
2. % 表示當 vehicle (單獨處理) 或是 50 ng/mL IGF-1 (共同處理) 效果為 100% 時，萃物的 MTT O.D. 540 值增加的百分比。

表 2-2. 未經水解處理與經 37°C、50°C 以及 60°C 水解之山苦瓜乙酸乙酯萃物對 C2C12 myoblasts 增生的影響

Table 2-2. Effects of various cultivars of hydrolyzed 1758, CKP55, P81 bitter gourd ethyl acetate extracts on the proliferation of C2C12 myoblasts

	BGP conc. ($\mu\text{g/mL}$)		C2C12 myoblasts Proliferation Assay (MTT)	
			Maximal activity	
			% by vehicle	% by 50 ng/mL IGF-1
50 ng/mL IGF-1	-	+	-	+
1758 EAE	100	100	42.8% \uparrow	48.2% \uparrow
1758 37°C EAE	100	50	31.2% \uparrow	21.1% \uparrow
1758 50°C EAE	50	25	16.7% \uparrow	17.3% \uparrow
1758 60°C EAE	5	5	24.3% \uparrow	24.9% \uparrow
CKP55 EAE	50	100	23.5% \uparrow	44.2% \uparrow
CKP55 37°C EAE	50	50	29.7% \uparrow	43.9% \uparrow
CKP55 50°C EAE	50	50	24.3% \uparrow	43.1% \uparrow
CKP55 60°C EAE	5	50	11% \uparrow	27.6% \uparrow
P81	-	50	-	19.6% \uparrow
P81 37°C EAE	100	50	19.9% \downarrow	29.7% \uparrow
P81 50°C EAE	100	25	44% \downarrow	18.4% \uparrow
P81 60°C EAE	100	50	39.9% \downarrow	14.2% \uparrow

1. \uparrow 表示 MTT O.D. 540 值顯著增加；-：表示與對照組相比未有顯著影響。
2. % 表示當 vehicle (單獨處理) 或是 50 ng/mL IGF-1 (共同處理) 效果為 100% 時，萃物的 MTT O.D. 540 值增加的百分比。



二、山苦瓜萃物調控 C2C12 myoblasts 增生能力之可能活性成份

近幾年來，科學家們從苦瓜中分離出多種活性成份，包括維生物、礦物質、不飽和脂肪酸以及多種植化素 (phytochemicals)。根據結構及特性，苦瓜的活性成份主要分為以下五大類。

- (1) 酚類 (Phenolic compounds) 與黃酮類 (flavonoids compounds) (Kubola & Siriamornpun, 2008)
- (2) 葫蘆烷型三萜類 (Cucurbitane type triterpenoids) (J.-C. Chen et al., 2009)
- (3) 葫蘆烷型三萜類糖苷 (Cucurbitane type triterpenoids glycoside)：因帶有糖基而極性較高，適合在植物內運輸與儲存，富含於苦瓜中。包括 momordicosides、charantosides、karavilosides 等 (Yen et al., 2014)
- (4) 齊墩果烷型三萜皂甙 (Oleanane type triterpene saponins) (Liu et al., 2009)
- (5) 胜肽 (Peptides) (He et al., 2013)

為了探討促進肌肉細胞生長的可能有效成份，在此將嘗試分析不同山苦瓜品系中所含成份與促進 myoblast 增生能力之相關性。

1. 三萜類 (Triterpenoids)

苦瓜中最具代表性的植化物是四環的葫蘆烷型三萜類，其中 charantin 被證實有降血糖、改善葡萄糖耐受性、增加胰島素敏感性等諸多生理活性 (Joseph & Jini, 2013)。此外，苦瓜中亦有熊果酸 (ursolic acid)、齊墩果酸 (oleanolic acid) 等五環的三萜類，亦具有抗癌、抗發炎等功效。

其中，曾有研究指出 ursolic acid 在肌肉生長方面之影響。Kunkel 等學者指出，添加 ursolic acid 於飼料中六週，可使高脂飲食誘發肥胖的小鼠 (Kunkel et al., 2012) 骨骼肌重量增加、握力與跑步距離增強、改善葡萄糖耐受性以及減緩肥胖情形。Ursolic acid 亦可增加小鼠衛星細胞 SIRT1 及 PGC-1 α 基因表現，並使大腿

前側股直肌 (rectus femoris) 纖維型態由偏向 glycolytic fiber 的快肌轉變為偏向 oxidative fiber 的慢肌 (Bakhtiari et al., 2015)。然而，亦有研究指出 ursolic acid 雖可使分化成熟後的 C2C12 myotubes 蛋白質含量增加，卻無法促進 myoblast 增生 (Figueiredo & Nader, 2012)。值得一提的是，該實驗 ursolic acid 雖未與 IGF-1 共同處理，卻使用胎牛血清 Fetal bovine serum (FBS) 培養細胞，其中或許含有少量生長激素，而本實驗處理山苦瓜時會將培養液置換成 0.1% BSA，因此未能斷定是否與本實驗山苦瓜單獨處理未能增加 myoblast 增生的結果吻合。

將各品系山苦瓜之三萜類含量進行比較 (附錄圖 1) (數據由聶良育同學提供)，我們觀察到雖然 1758 品系三萜類含量較低，其餘增生效果不錯的品系包括 H4、N81 及 55M 三萜類含量皆相對較高。將各品系山苦瓜之三萜類含量與促進 myoblast 增生能力進行相關性分析，則的確有顯著正相關 (圖 2-10)，故推測山苦瓜萃物與 IGF-1 共同處理促進肌肉細胞生長的有效成份可能部分是三萜類。然而，1758 品系三萜類含量相對較低但促進增生效果優良，是否是由於該品系不帶醣基之三萜類較多抑或是萃物中尚有其他活性成份，則需要進一步分析。另外，實驗室過去研究發現，經由 50°C 及 60°C 水解之 H4 品系，能夠被有機溶劑萃取出來之三萜類含量較未水解及 37°C 水解高，顯示萃物經由高溫水解後三萜類含量增加 (鄒尚瑀, 2016)。經由 60°C 水解後 CKP55 EAE、H4 EAE 三萜類含量亦增加 (聶良育, unpublished data)，然而本實驗觀察到水解後的 BGP EAE 促進肌肉生長的能力不升反降，推測可能因為三萜類去除醣基後具有細胞毒性所致。山苦瓜水解之後有效成份及生物活性的改變亦需要進一步分析。

2. 共軛次亞麻油酸 (9c, 11t, 13t-Conjugated Linolenic Acid, CLN)

自然界中含有許多不飽和脂肪酸，部分以共軛型態出現。其中最著名的是含有 18 碳 2 個雙鍵的共軛亞麻油酸 (conjugated linoleic acid, CLA)，已通過臨床研究具有降體脂肪、膽固醇、減少腹部肥胖及避免復胖等減重效果 (Gaulhier et al.,

2004; Kamphuis et al., 2003; Riserus et al., 2001), 亦可以增加肥胖大鼠骨骼肌葡萄糖耐受性及胰島素敏感性, 並促進人類肌肉細胞株粒線體生合成及代謝 (Ryder et al., 2001; Vaughan et al., 2012)。山苦瓜分離出來的共軛脂肪酸是 CLN (9c, 11t, 13t-Conjugated Linolenic Acid), 含有 18 碳 3 個雙鍵, 可以活化調控脂肪代謝的核受器 PPAR- α (Chuang et al., 2006), 並具有降脂、抗癌及抗發炎等功效 (Hennessy et al., 2016; Hennessy et al., 2011)。CLN 目前在肌肉方面的研究較少, 然而其結構與 CLA 相似, 且含有 CLN 的石榴籽油可以促進肥胖小鼠的胰島素敏感性 (Vroegrijk et al., 2011), 因此亦具有調控肌肉胰島素訊號的潛力。將山苦瓜乙酸乙酯萃取物以分光光度計分析所含 CLN, 結果顯示, CLN 含量雖在各品系之間差異不大, 然而卻會隨著水解溫度提高而漸漸下降 (圖 2-12、圖 2-13)。用相關性進行分析, 亦可看出包含水解之山苦瓜萃取物 CLN 含量與其促進 myoblast 增生能力的確呈現正相關 (圖 2-14), 暗示山苦瓜對於肌肉增生的效果可能由 CLN 所貢獻。

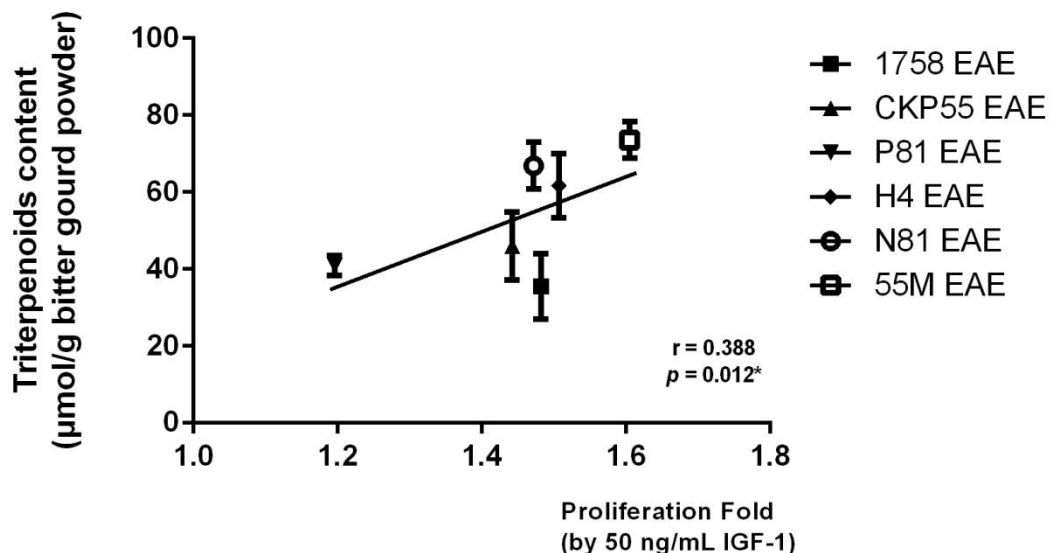


圖 2-10. 各品系山苦瓜三萜類含量與促進 C2C12 myoblasts 增生能力之相關性

Figure 2-10. Correlation between triterpenoids content and C2C12 myoblasts proliferation activity of various cultivars of wild bitter gourd



Data were analyzed by Pearson's Correlation.

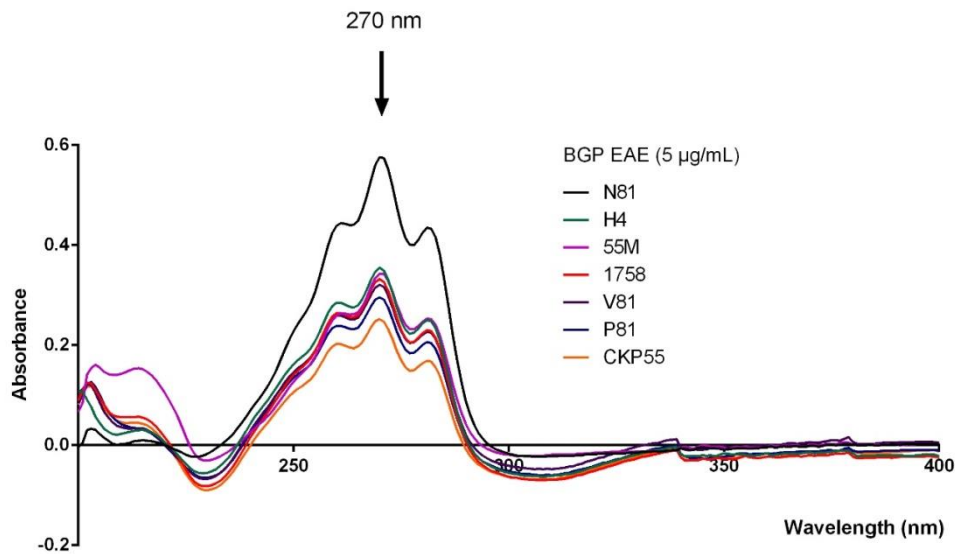


圖 2-11. 各品系山苦瓜乙酸乙酯萃取物之 CLN 吸收光譜

Figure 2-11. Absorption spectrum of CLN of various cultivars of wild bitter gourd ethyl acetate extracts

Absorption spectrum was analyzed by spectrophotometer.

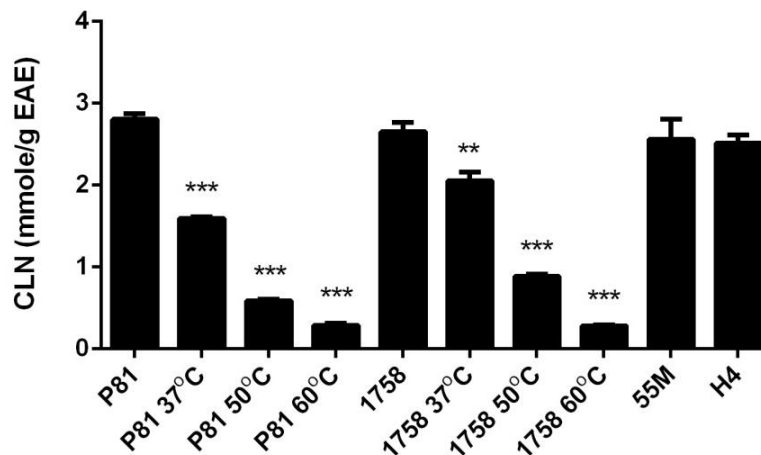


圖 2-12. 各品系山苦瓜乙酸乙酯萃取物之 CLN 含量

Figure 2-12. CLN content of various cultivars of wild bitter gourd ethyl acetate extracts

The values represent mean \pm SD (n=3). Significance of differences is analyzed by Student's *t* test. ** ($p < 0.01$) and *** ($p < 0.001$) denote significant different from non-hydrolyzed EAE of the same cultivar.

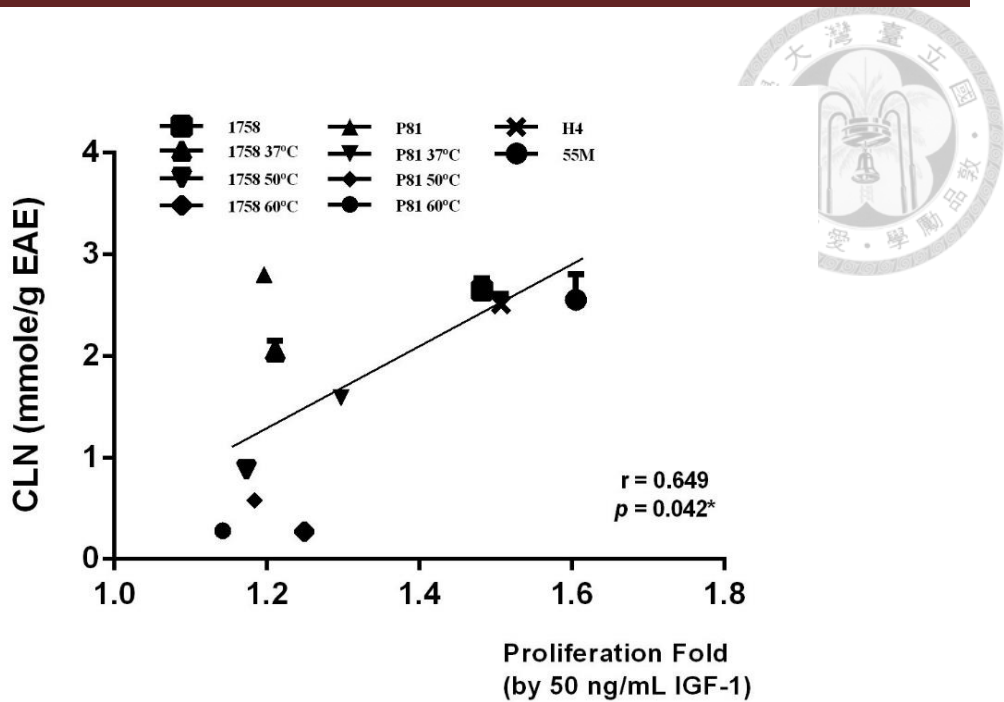


圖 2-13. 各品系山苦瓜乙酸乙酯萃物 CLN 含量與促進 C2C12 myoblasts 增生能力之相關性

Figure 2-13. Correlation between CLN content and C2C12 myoblasts proliferation activity of various cultivars of wild bitter gourd ethyl acetate extracts
Data were analyzed by Pearson's Correlation.

三、山苦瓜萃物調控 C2C12 myoblasts 增生能力之調節因子相關性探討

1. PPAR- δ (Peroxisome proliferator-activated receptor δ)

PPARs (Peroxisome proliferator-activated receptors) 屬於固醇類核受器家族，包括 PPAR- α 、PPAR- γ 、PPAR- δ 三種異形體，主要功能為參與脂質代謝的調控。其中，PPAR- δ 大量表現於骨骼肌中，並被發現可以調控脂肪酸代謝途徑中諸多重要酵素，以及可以調控促使骨骼肌纖維從 type II fiber (白肌) 轉換到 type I fiber (紅肌) 的型態 (Holness et al., 2000; Luquet et al., 2003; Y. X. Wang et al., 2004)。此外，PPAR- δ 亦被發現與調控肌肉生長有關連。將 PPAR- δ 基因在肌肉幹細胞專一性剔除後，小鼠衛星細胞數目降低、增生能力減弱，使肌肉受損後再生能力大幅下降 (Angione et al., 2011)。再者，Schuler 等學者觀察到 PGC-1 α promoter 區

域有近似於 PPRE (PPAR response element) 的序列。進一步於 C2C12 myoblasts 轉染帶有 PGC1 α promoter 的 luciferase reporter gene (pGL-PGC1 α), 再讓細胞分化成 myotubes, 發現 PPAR- δ agonist GW501516 可以促進 PGC-1 α 轉錄活性 (Schuler et al., 2006)。先前提到過, PGC-1 α 不只可以調控粒線體生合成與代謝, 亦可藉由抑制 FoxO 來增加肌肉的重量。綜合上述, PPAR- δ 亦非常有潛力成為促進肌肉生長的調控因子。

由 CHO-K1 細胞之 PPAR- δ 轉錄活化試驗結果觀察到, 多種品系的山苦瓜乙酸乙酯萃取物均可促進 PPAR- δ 的轉錄活性 (附錄圖 2) (數據由廖思齊同學提供)。不同溫度水解山苦瓜萃取物活化 PPAR- δ 的能力有些增加, 有些減少 (附錄圖 3) (數據由廖思齊同學提供)。1758 37°C EAE 及 50°C EAE 活化 PPAR- δ 轉錄活性的能力顯著較未水解組高, 其餘品系則是水解後對 PPAR- δ 轉錄活性反而降低。將各品系山苦瓜活化 PPAR- δ 的轉錄活性與促進 myoblast 增生能力進行相關性分析, 則觀察到並無顯著相關 ($p>0.1$) (圖 2-14)。然而, 比較山苦瓜不同溫度水解萃取物促進 PPAR- δ 與 myoblast 增生的相關性, 發現有正相關的趨勢 ($0.05<p<0.1$) (圖 2-15), 雖然, 這樣的相關性可能源自於大多品系水解後促進 PPAR- δ 與 myoblast 增生的能力皆會降低的緣故。藉此, 山苦瓜萃取物促進肌肉細胞增生的原因是否來自其調節 PPAR- δ 的能力, 尚需進一步實驗證實。

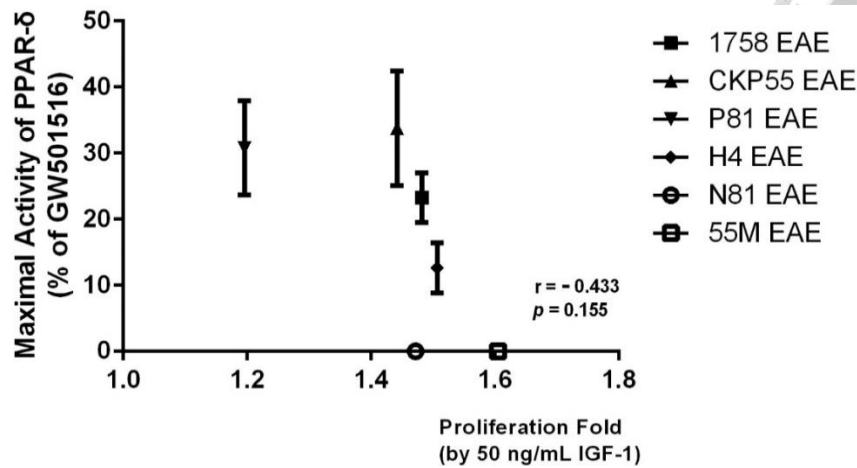


圖 2-14. 各品系山苦瓜乙酸乙酯萃取物活化 PPAR- δ 的轉錄活性與促進 C2C12 myoblasts 增生能力之相關性

Figure 2-14. Correlation between transactivation of PPAR- δ and C2C12 myoblasts proliferation activity of various cultivars of wild bitter gourd ethyl acetate extracts

Data were analyzed by Pearson's Correlation.

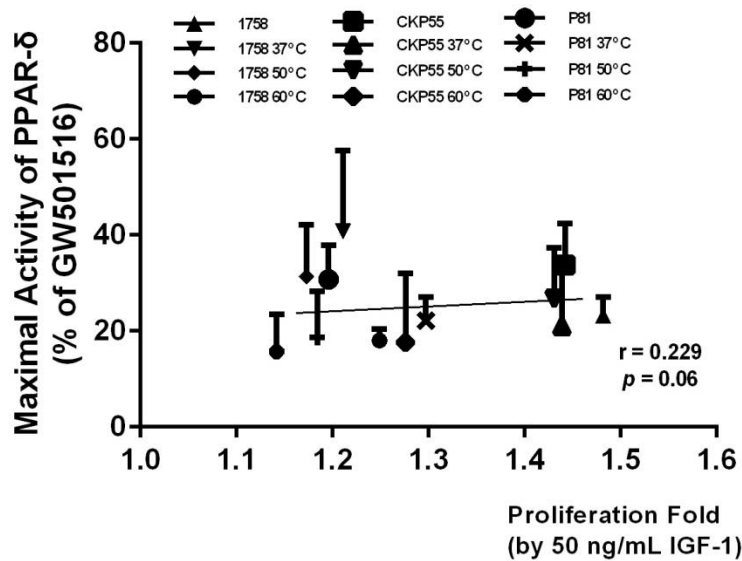


圖 2-15. 山苦瓜水解乙酸乙酯萃取物活化 PPAR- δ 的轉錄活性與促進 C2C12 myoblasts 增生能力之相關性

Figure 2-15. Correlation between transactivation of PPAR- δ and C2C12 myoblasts proliferation activity of various cultivars of wild bitter gourd hydrolyzed ethyl acetate extracts

Data were analyzed by Pearson's Correlation.

四、1758 山苦瓜萃物促進 IGF-1 對 C2C12 myoblasts 增生能力之作用路徑

胰島素訊息傳遞路徑與 IGF-1 訊息傳遞路徑有許多相似之處。胰島素受體 (Insulin receptor, IR) 或 IGF-1 受體 (IGF-1R) 皆由一個 α subunit 及 β subunit 與另一個 α subunit 及 β subunit 構成 dimer。IR 又含有兩個異形體, 分別是 IR-A 及 IR-B, 兩者皆可分別與 IGF-1R 構成 IGF-1R/IR-A 或 IGF-1R/IR-B 雜合受體 (hybrid receptor), 亦即一個 IR-A 或 IR-B 的 α 與 β subunit 結合一個 IGF-1R 的 α 與 β subunit (Slaaby et al., 2006)。胰島素可以結合到 IR-A 及 IR-B 上, 亦可與 IGF-1R 結合, 但親和力很差。IGF-1 則可以與 IGF-1R、IGF-1R/IR-A 或 IGF-1R/IR-B 結合。當 IR-A、IGF-1R 或 IGF-1R/IR-A 活化時, 通常會藉由 PI3K/Akt 啟動細胞生長相關訊號; IR-B 或 IGF-1R/IR-B 活化時, 則主要亦藉由 PI3K/Akt 但啟動細胞代謝相關訊號 (Gallagher et al., 2010) (圖 2-16), 這也是為何胰島素與 IGF-1 訊息路徑的調控經常重疊或彼此之間有互相交互作用。

山苦瓜的作用路徑亦可能在兩者之間皆有影響。過去有許多研究發現, 苦瓜中諸多有效成份具有促進胰島素傳遞路徑, 進而調節血糖的功效。從苦瓜分離出來的兩種三萜類 DHM 與 THC 在有胰島素的存在下, 可以在胰島素抵抗細胞中增加胰島素訊息傳遞路徑 IRS (insulin receptor substrates) tyrosine 的磷酸化, 並接續活化 Akt (Chang et al., 2015)。苦瓜中含有的一種胜肽 polypeptide-p, 具有與胰島素相似的結構與特性, 可以模擬胰島素並改善葡萄糖耐受性 (Paul & Raychaudhuri, 2010)。苦瓜特有葫蘆烷型三萜類 Charantin 以及從苦瓜籽分離出來的糖苷生物鹼 (glycoalkaloid) Vicine 亦被發現具有降血糖的功效 (Patel et al., 2010; Slaaby et al., 2006)。實驗室過去研究亦發現, 山苦瓜水萃物酵素水解後正丁醇萃物以及水萃物酵素水解後乙酸乙酯萃物可以增加脂肪細胞 Akt 磷酸化, 對於 L6 肌肉細胞 Akt 磷酸化則無顯著增加, 然而皆可促進脂肪細胞與肌肉細胞葡萄糖汲取 (周怡君, 2010), 顯示山苦瓜多重成份對於不同組織亦有不同的作用。

本實驗結果觀察到，1758 山苦瓜乙酸乙酯萃取物可以在 IGF-1 存在的情況下，進一步促進 Akt 磷酸化表現，並促進 C2C12 myoblasts 生長。PI3K 抑制劑阻礙 Akt 磷酸化，細胞增生的現象消失則可以進一步證實 1758 山苦瓜乙酸乙酯萃取物促進肌肉細胞生長即是透過 PI3K/Akt 路徑。然而，山苦瓜是藉由何種途徑影響 PI3K/Akt 路徑，則需要進一步探討。苦瓜中類胰島素胜肽可以藉由結合 IR 來啟動胰島素傳遞路徑，然而在本實驗單獨處理山苦瓜萃取物卻無法促使細胞增生，推測乙酸乙酯無法將可以活化 IGF-1R 的胜肽萃取出來。再者，山苦瓜部分水萃物可以直接促使脂肪細胞 Akt 磷酸化，而本實驗需要在 Akt 已經被磷酸化的情況下，得進一步增加其磷酸化表現，促進肌肉生長，暗示山苦瓜活性成份可能處於從旁協助的輔助腳色，可以增強或延長已經活化的訊號。先前提到 DHM 與 THC 兩種苦瓜含有的三萜類，被發現可以抑制 PTP-1B (protein-tyrosine phosphatase-1B) 的活性。PTP-1B 會移除胰島素受體與 IRS 中 tyrosine 的磷酸化，進而削弱胰島素傳遞路徑。因此，該結果亦暗示山苦瓜可能是藉由抑制 phosphatase 的活性來延長 IGF-1 訊息傳遞路徑中重要酵素的磷酸化表現。山苦瓜活性成份確切的作用機制仍需進一步探討。

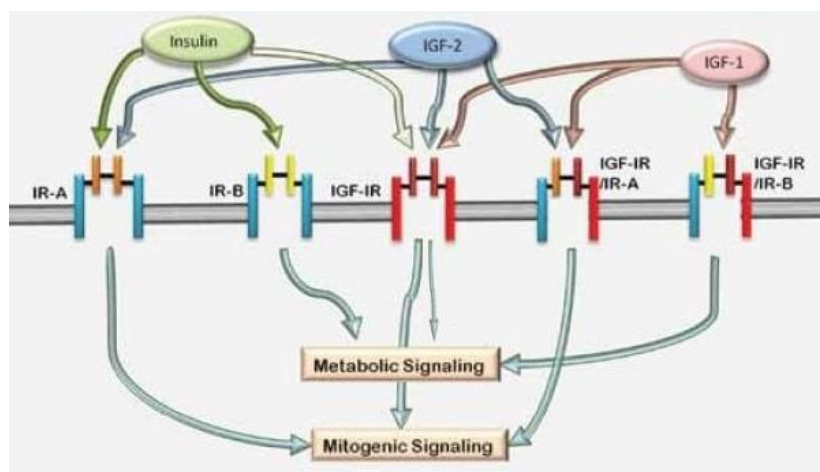


圖 2-16. 胰島素受體、IGF-1 受體與雜合受體

Figure 2-16. The insulin receptors (IR-A and IR-B), the IGF-1 receptor (IGF-1R), and the hybrid receptors (IGF-1R/IR-A and IGF-1R/IR-B) (Gallagher et al., 2010)



五、1758 山苦瓜萃物促進 C2C12 myoblasts 之粒線體功能

實驗室過去研究觀察到山苦瓜對於粒線體有諸多正面影響。在長期高脂飲食誘導肥胖小鼠模式，山苦瓜可以促進肝臟、骨骼肌粒線體生合成、融合與分裂相關基因表現，以及脂肪組織粒線體生合成相關基因表現 (董又慈, 2016 ; 鄒尚瑀, 2016 ; 汪芝翎, unpublished data)。在細胞模式中，亦觀察到山苦瓜乙酸乙酯萃物可以促進分化成熟後的 C2C12 myotubes 及 L6 myotubes 粒線體功能指標 citrate synthase 活性 (林家暉, 2015)。在本實驗亦觀察到 1758 山苦瓜乙酸乙酯萃物可以促進 C2C12 mtoblast citrate synthase 活性，顯示其對於粒線體功能有促進的作用。Citrate synthase 是進入 TCA cycle 的第一個酵素，山苦瓜萃物使酵素活性增加，即代表可使 TCA cycle 運作更有效率，促進營養素代謝並產生能量，並使肌肉細胞得以維持正常的生理功能。

第五節 結論

本實驗觀察到不同品系山苦瓜乙酸乙酯萃物與 IGF-1 共同處理 C2C12 myoblasts 肌肉前驅細胞株 48 小時可以促進前驅細胞增生，而 1758 山苦瓜乙酸乙酯萃物可以在 PI3K/Akt 路徑已經啟動的情況下，進一步增加 Akt 磷酸化表現，促進肌肉前驅細胞生長。本實驗亦觀察到單獨處理 1758 山苦瓜乙酸乙酯萃物 48 小時可以促進粒線體功能指標 Citrate synthase 活性。



第三章 不同品系山苦瓜對高脂飲食模式小鼠骨骼肌功能的影響

第一節 前言與實驗架構

一、前言

前一章研究中，我們用山苦瓜乙酸乙酯萃取物處理 C2C12 myoblasts，並觀察到其可以藉由 PI3K/Akt 路徑協助 IGF-1 促進肌肉前驅細胞生長。因此，本章節將進行動物試驗，更全面地探討給予山苦瓜對於骨骼肌整體而言在生長、代謝及粒線體功能的影響。

動物實驗採用的品系為 C57BL/6J 小鼠，並使用高脂飲食誘導肥胖的模式探討山苦瓜介入處理產生的影響。肥胖常伴隨著胰島素阻抗，造成血液中脂肪酸、diacylglycerols (DAG) 與 ceramides 等脂質濃度提高，也增加促發炎細胞激素表現。脂肪酸、DAG 及 ceramides 會活化 myostatin，藉由抑制 MyoD (myogenic differentiation antigen 1) 與 myogenin 表現以及誘導細胞凋亡來抑制 myoblast 增生及分化。Ceramides 以及促發炎細胞激素會通過抑制 IGF-1/PI3K/Akt 路徑來抑制衛星細胞啟動，降低肌肉受到損傷後的再生能力 (圖 3-1) (Akhmedov & Berdeaux, 2013)。

再者，許多研究發現高脂飲食或肥胖的動物模式對於骨骼肌會產生諸多不良的影響。過去研究顯示，肥胖的母鼠其子代肌肉分化指標 MyoD 及 myogenin mRNA 表現顯著較控制組低 (Allen et al., 2008)。Obese Zucker rats 比起同年齡 lean rats，肥腸肌分解 ATP 產生動能的 MHC1 (myosin heavy chain I) mRNA 表現顯著較低 (Peterson et al., 2007)。此外，小鼠餵食高脂飲食四週，脛骨前肌抑制肌肉生長的 myostatin mRNA 表現顯著較控制組高 (Allen et al., 2008)。小鼠餵食高脂飲食

八週，肌肉萎縮基因 atrogin-1 及 MuRF1 mRNA 表現下降，而給予 macadamia oil (澳洲堅果油) 則表現量回復 (Hirabara et al., 2013)。小鼠餵食高脂飲食三個月，注射神經毒 CTX (cardiotoxin) 誘導脛骨前肌損傷檢測肌肉再生能力，肌肉增生及分化指標 Pax7, Myf5, MyoD 及 myogenin mRNA 表現顯著較控制組低 (Fu et al., 2016)。以上實驗皆顯示高脂飲食或肥胖模式會對骨骼肌的生長及再生能力造成損傷。

另一方面，苦瓜或其所含之三萜類則被發現對於小鼠骨骼肌代謝與功能具有促進的作用。在高脂飲食中外添加三萜類 ursolic acid 餵食小鼠六週，發現骨骼肌 Igf1 及其下游調控葡萄糖的 Hk2 (hexokinase 2) 與誘導血管新生的 Vegfa (vascular endothelial growth factor A) mRNA 表現上升 (Kunkel et al., 2012)。本實驗室先前研究亦觀察到，使用高糖飲食誘發小鼠肥胖並外添加 5% 山苦瓜 25 週，可以促進紅肌粒線體生合成及動態相關基因表現 (蔣汶龍, 2014)；用高脂飲食模式外添加 5% 山苦瓜餵食小鼠 20 週，紅肌的比目魚肌以及偏向 type IIb fiber 的腓腸肌，粒線體生合成、分裂融合以及 OXPHOS 相關基因表現較高 (汪芝翎, unpublished data)。因此，山苦瓜具有調控小鼠骨骼肌代謝及粒線體功能的潛力。

因此，本實驗會將山苦瓜全果凍乾粉加入高脂飲食中，並使用容易以高熱量飲食誘導肥胖，產生胰島素阻抗的 C57BL/6J 小鼠模式，藉由測量骨骼肌重量、肌肉增生與分化相關基因表現、粒線體功能及代謝相關基因表現以及 insulin 與 IGF-1 調控路徑下游基因表現，探討山苦瓜是否可以改善高脂飲食對於骨骼肌造成的傷害。本實驗將分析山苦瓜對於不同型態骨骼肌之作用，分別為屬於混和肌的脛骨前肌 (tibialis anterior, TA) 與腓腸肌 (gastrocnemius, Gas) 及屬於紅肌的比目魚肌 (Soleus, Sol) (表 3-1)。



表 3-1. C57BL/6J 公鼠各肌群的纖維型態

Table 3-1. Skeletal muscle fiber types in C57BL6J mice (Augusto et al., 2004)

Fiber type	Muscle		
	TA	GAS	SOL
I	0.00 ± 0.0	0.81 ± 2.34	41.50 ± 12.2
IIa	25.25 ± 15.15	17.01 ± 12.64	57.56 ± 13.32
IIc	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.15 ± 2.82
IIb	74.48 ± 15.15	84.50 ± 15.29	0.00 ± 0.0

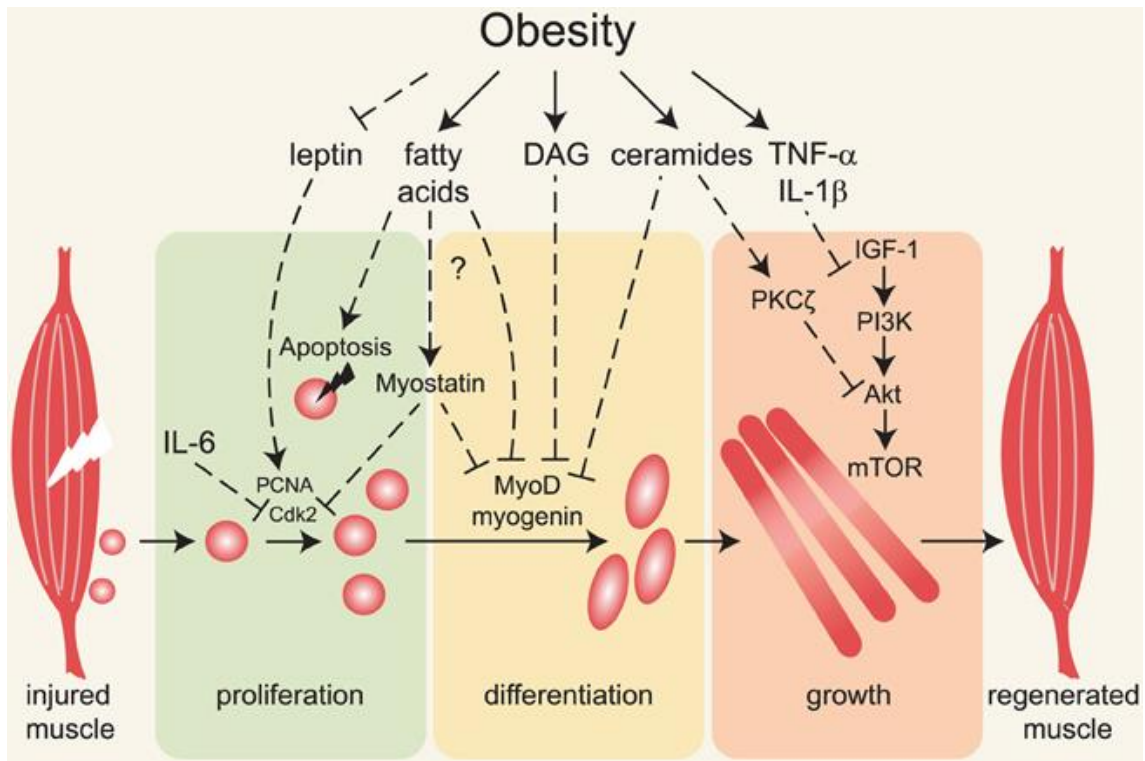
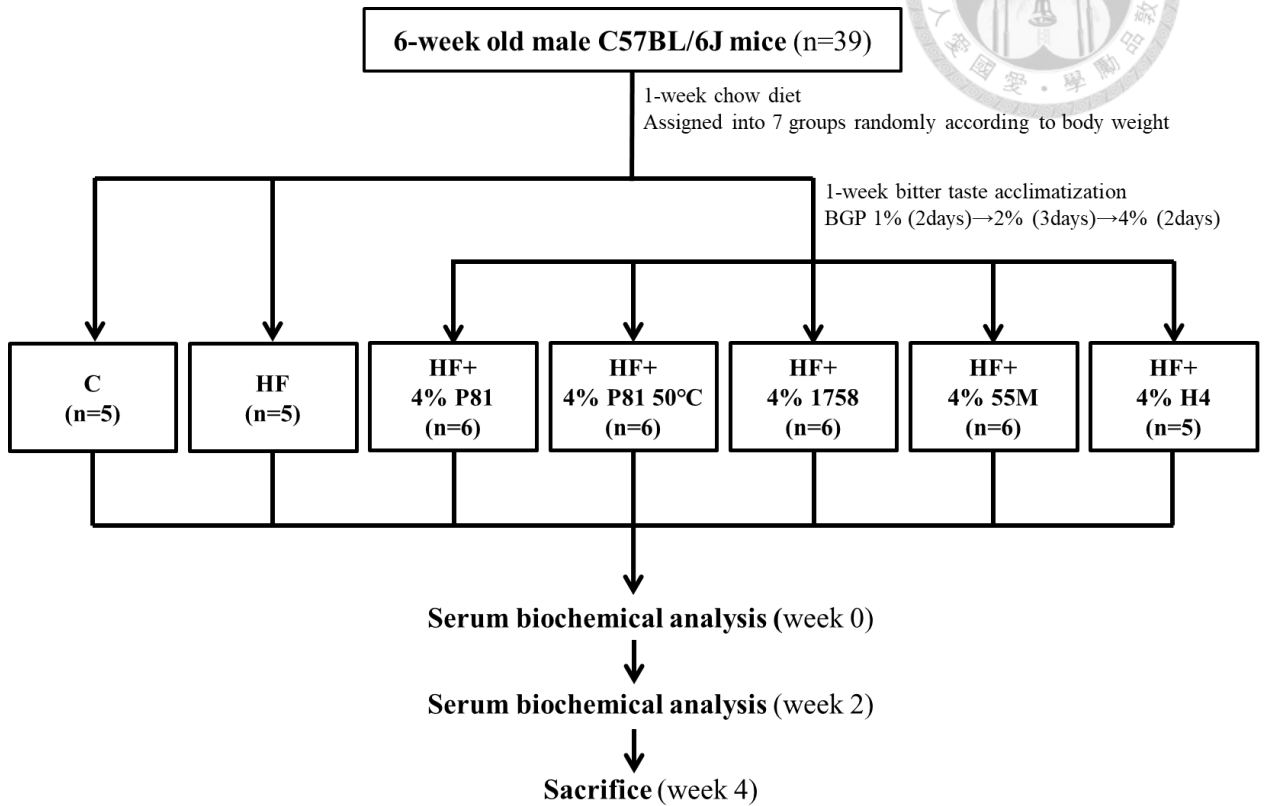


圖 3-1. 肥胖對肌肉再生能力影響之機制

Figure 3-1. Mechanisms linking obesity with impaired muscle regeneration. (Akhmedov & Berdeaux, 2013)



二、實驗設計



Diet groups:

C: Chow diet (powder)

HF: High fat diet, 30% (w/w) fat

4% BGP: 4% wild bitter gourd powder in HF diet

BGP Cultivars: 1758, 55M, H4, P81, P81 50°C hydrolyzed bitter gourd

Analysis after sacrifice:

Serum: glucose, triglyceride, cholesterol and insulin

Muscle: mRNA expression of gastrocnemius and soleus

✚ 本批動物及動物飼養過程中的實驗均與本實驗室劉又禎、廖思齊、聶良育同學共同完成。

✚ 本批動物骨骼肌粒線體基因表現分析之實驗與本實驗室廖思齊同學共同完成。





第二節 實驗材料與方法

一、動物飼養

本實驗採用 6 週齡 C57BL/6J 公鼠 39 隻，購自國家實驗動物中心。小鼠用 chow diet (LabDiet 5001, PMI Nutrition International Inc. Bretwood, MO) 適應一週後，依體重隨機分為 C 組 (chow diet) (n=5)、HF 組 (high fat diet) (n=5) 及 HF+4% 各品系山苦瓜 (BGP) 組。BGP 品系分別為 P81、P81 50°C (P81 經過 50°C 水解)、1758、55M 及 H4，均以 4% 添加於 HF diet 中。C 組於飼養期間均攝食粉狀 chow diet。BGP 組會漸進給予 1%、2%、4% BGP 進行苦味適應一週，再進入正式實驗 (第 0 週)。小鼠在起始 0 週，及餵食滿 2、4 週會進行採血，滿 4 週進行動物犧牲。受試動物個別飼養於不銹鋼絲網籠，飼養期間採自由攝食與飲水，動物房溫度控制於 23-25°C，光照期及黑暗期各 12 小時 (08:00-20:00 為光照期，20:00-08:00 為黑暗期)。飼養過程中，每週記錄一次攝食量與體重。

二、飼料配製


1. Chow diet 飼料

C 組給予磨碎之粉狀 chow diet，以便於記錄小鼠的攝食量。飼料的成分、營養素組成及熱量百分比詳如表 3-2 所示。

2. 高脂飲食

本實驗使用高脂飲食誘發小鼠肥胖之動物模式。飼料配方見表 3-3，基本組成依據 AIN-93G 飼料配方進行調整，高脂飲食以 30% 無水奶油作為主要油脂來源 (許珊菁, 2006)。配置方法為將所有飼料粉末混和均勻後，加入融化奶油並過篩混勻，裝入雙層密封袋，儲存於 -20°C 冰箱。飼料在添入小鼠飼料盒前一天預先從冰箱取出回溫。

3. 添加山苦瓜之高脂飲食



正式實驗使用之 4%BGP 組飼料以及苦味適應使用之 1%BGP 及 2%BGP 組飼料分別是在高脂飲食飼料中添加 4%、1% 或 2% 山苦瓜全果凍乾粉。山苦瓜品系分別為 1758、55M、花蓮四號 (H4)、P81 以及在 50°C 環境下進行酵素水解之 P81 (P81 50°C)。飼料配方如表 3-2 所示，BGP 組飼料依照山苦瓜凍乾粉營養成分調整飼料中酪蛋白、糖、纖維素、油脂添加量。配置方法為將所有飼料粉末混和均勻後，加入融化奶油並過篩混勻，裝入雙層密封袋，儲存於 -20°C 冰箱。飼料在添入小鼠飼料盒前一天預先從冰箱取出回溫。

表 3-2. 市售 Chow diet 組成

Table 3-2. Composition of the commercial chow diet



Laboratory Rodent Diet

5001*

DESCRIPTION

Laboratory Rodent Diet is recommended for rats, mice, hamsters and gerbils. This diet is a complete life cycle diet formulated using managed formulation, delivering Constant Nutrition®. This is paired with the selection of highest quality ingredients to assure minimal inherent biological variation in long-term studies. It is formulated for life-cycle nutrition; however, it is not designed for maximizing production in mouse breeding colonies. This product has been the standard of biomedical research for over 70 years.

Features and Benefits

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

Product Forms Available

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

Other Versions Available

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

GUARANTEED ANALYSIS

Crude protein not less than	23.0%
Crude fat not less than	4.5%
Crude fiber not more than	6.0%
Ash not more than	8.0%
Moisture not more than	12.0%

INGREDIENTS

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

FEEDING DIRECTIONS

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

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

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

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

For information regarding shelf life please visit www.labdiet.com.

CHEMICAL COMPOSITION¹

Nutrients²

Protein, %	25.0	Sulfur, %	0.36
Arginine, %	1.57	Sodium, %	0.39
Cystine, %	0.39	Chloride, %	0.64
Glycine, %	1.28	Fluorine, ppm	15
Histidine, %	0.62	Iron, ppm	240
Isoleucine, %	1.06	Zinc, ppm	85
Leucine, %	1.89	Manganese, ppm	75
Lysine, %	1.48	Copper, ppm	15
Methionine, %	0.59	Cobalt, ppm	0.91
Phenylalanine, %	1.11	Iodine, ppm	0.99
Tyrosine, %	0.77	Chromium (added), ppm	0.01
Threonine, %	0.97	Selenium, ppm	0.41
Tryptophan, %	0.28		
Valine, %	1.16		
Serine, %	1.18		
Aspartic Acid, %	2.81		
Glutamic Acid, %	4.74		
Alanine, %	1.44		
Proline, %	1.47		
Taurine, %	0.03		

Vitamins

Carotene, ppm	2.3
Vitamin K, ppm	1.3
Thiamin Hydrochloride, ppm	16
Riboflavin, ppm	4.7
Niacin, ppm	120
Pantothenic Acid, ppm	24
Choline Chloride, ppm	2250
Folic Acid, ppm	7.1
Pyridoxine, ppm	6.0
Biotin, ppm	0.30
B ₁₂ , mcg/kg	51
Vitamin A, IU/gm	15
Vitamin D ₃ (added), IU/gm	4.6
Vitamin E, IU/kg	42
Ascorbic Acid, mg/gm	—

Fat (acid hydrolysis), %

Fat (acid hydrolysis), %	6.4
Cholesterol, ppm	209
Linoleic Acid, %	1.05
Linolenic Acid, %	0.09
Arachidonic Acid, %	0.02
Omega-3 Fatty Acids, %	0.30
Total Saturated Fatty Acids, %	1.48
Total Monounsaturated Fatty Acids, %	1.62

Fiber (Crude), %

Fiber (Crude), %	5.3
Neutral Detergent Fiber ³ , %	16.7
Acid Detergent Fiber ⁴ , %	6.9

Nitrogen-Free Extract

(by difference), %	47.5
Starch, %	21.0
Glucose, %	0.19
Fructose, %	0.27
Sucrose, %	3.83
Lactose, %	2.01
Total Digestible Nutrients, %	73.8
Gross Energy, kcal/gm	4.09
Physiological Fuel Value⁵, kcal/gm	3.35
Metabolizable Energy, kcal/gm	2.91

Minerals

Ash, %	7.0
Calcium, %	0.95
Phosphorus, %	0.70
Phosphorus (non-phytate), %	0.42
Potassium, %	1.28
Magnesium, %	0.23

Calories provided by:

Protein, %	29.829
Fat (ether extract), %	13.427
Carbohydrates, %	56.744

*Product Code

1. Formulation based on calculated values from the latest ingredient analysis information. Since nutrient composition of natural ingredients varies and some nutrient loss will occur due to manufacturing processes, analysis will differ accordingly.

2. Nutrients expressed as percent of ration except where otherwise indicated. Moisture content is assumed to be 10.0% for the purpose of calculations.

3. NDF = approximately cellulose, hemicellulose and lignin.

4. ADF = approximately cellulose and lignin.

5. Physiological Fuel Value (kcal/gm) = Sum of decimal fractions of protein, fat and carbohydrate (use Nitrogen Free Extract) x 4,9,4 kcal/gm respectively.

LabDiet
www.labdiet.com



表 3-3. 實驗飼料配方

Table 3-3. Composition of the commercial chow diet

Ingredient of diet (%)	HF	1% BGP	2% BGP	4% BGP
	g/ 100g diet			
Casein	25.4	25.36	25.31	25.23
Cellulose	6.1	5.72	5.33	4.57
Sucrose	32.1	31.55	31.01	29.91
Soybean Oil	1	1	1	1
Butter	29	28.97	28.95	28.89
Mineral Mix	4.45	4.45	4.45	4.45
Vitamin Mix	1.25	1.25	1.25	1.25
L-Cystine	0.4	0.4	0.4	0.4
Choline	0.3	0.3	0.3	0.3
BGP	0	1	2	4
kcal/g	5.016	5.016	5.016	5.016
CHO calorie/ total calories (%)	25.6	25.6	25.6	25.6
Fat calorie/ total calories (%)	53.8	53.8	53.8	53.8
Protein calories/ total calories (%)	20.6	20.6	20.6	20.6

1. The composition of AIN-93 Mineral Mixture and AIN-93 Vitamin Mixture is as described in J, Nur, 123:1939-1951 (1993) (Reeves et al., 1993)
2. 材料來源：casein (ICN, USA)、cellulose (JRS, Germany)、sucrose (台糖)、soybean oil (台糖)、butter (anhydrous milkfat, Fonterra, New Zealand)、AIN-93G mineral mix (ICN, USA)、AIN-93G vitamin mix (ICN, USA)、L-cysteine (Wako, Japan)、choline bitartate (Sigma, USA)
3. Bitter gourd powder (BGP) diet is modified according to the proximate composition of the bitter gourd. BGP contains crude protein 4.5%, carbohydrate 54.6%, crude fat 2.7% and dietary fiber 38.2%.



三、禁食血清樣本收集

小鼠於正式實驗開始及餵食滿 2、4 週收集禁食血清樣本。採集血液樣本前一天晚上 12 點至隔日中午 12 點禁食 12 小時，以乙醚迷昏小鼠後進行眼窩採血，血量約 100 μ l。血液以 12000 rpm，4 $^{\circ}$ C 離心 20 分鐘兩次，收取上清液作為血清樣本，血清當日進行血糖分析，其餘保存於 -80 $^{\circ}$ C 冰箱，待日後分析血脂、膽固醇及胰島素。

四、動物犧牲與樣品收集

1. 器具準備

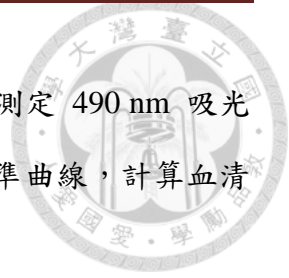
將解剖用具及收取組織所需之 1.5 mL 微量離心管使用高壓滅菌釜以 121 $^{\circ}$ C 滅菌 30 分鐘，烘乾後備用。配置足量 75% 酒精備用。

2. 實驗流程

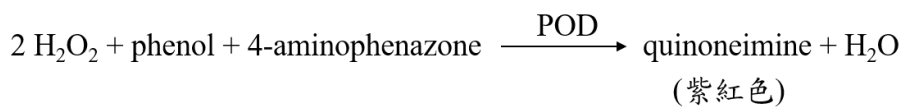
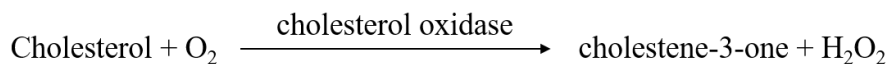
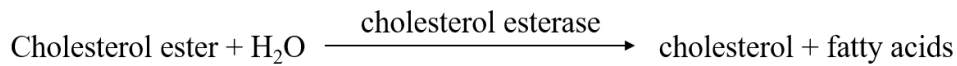
C57BL/6J 小鼠於正式實驗滿 4 週犧牲。小鼠犧牲前禁食 12 小時（凌晨 12 點至隔天中午 12 點）。犧牲前以乙醚麻醉小鼠，進行眼窩採血 100 μ l，收集血清樣品。小鼠使用二氧化碳窒息法犧牲，秤得動物體重。使用大剪於小鼠胸腹腔位置剪開，以 1.5 mL 針頭進行心臟採血，血液以 12000 rpm，4 $^{\circ}$ C 離心 20 分鐘兩次，收取上清液作為血清樣本，保存於 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。取出肝臟、心臟、脾臟、肺臟、腎臟、睪丸、副睪、儲精囊、攝護腺、提肛肌、白色脂肪組織（鼠蹊部皮下 (IWAT)、副睪周圍脂肪組織 (EWAT)、腎周圍脂肪組織 (RWAT))、後肢小腿肌肉組織（腓腸肌、比目魚肌、脛骨前肌）進行秤重。

3. 組織保存

迅速將小鼠後肢小腿肌肉組織包括腓腸肌、比目魚肌及脛骨前肌裝入 1.5 mL 微量離心管，至於液態氮中急速冷凍，保存於 -80 $^{\circ}$ C 冰箱，以待後續抽取 RNA 進



cholesterol esterase, cholesterol oxidase), 室溫靜置 10 分鐘後, 測定 490 nm 吸光值。將樣品吸光值平均後代入標準品溶液吸光值計算所得之標準曲線, 計算血清樣本中膽固醇的濃度。原理如下。



4. 胰島素 (insulin) 分析

胰島素分析採用市售套組 (Mouse insulin ELISA, Mercodia, Sweden), 利用酵素免疫測定原理 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 分析樣品中胰島素濃度。

實驗方法為將不同濃度的胰島素標準品及適當稀釋的血清 (0-4 倍), 取 25 μL 加入試劑組所提供已固定一級抗體 monoclonal anti-insulin antibody 之 96-well plate 中, 使專一性之單株抗體與胰島素分子上的特定抗原結合, 標準品進行二重複試驗。再來, 加入 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ enzyme conjugate solution 室溫震盪反應 2 小時, 使一抗與二抗 peroxidase conjugated anti-insulin antibody 進行專一性結合。以 350 $\mu\text{L}/\text{well}$ washing buffer 進行沖洗 5 次, 清洗未結合之酵素標定抗體, 降低非專一性反應。之後加入 200 μL peroxidase 之受值 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) 避光反應 15 分鐘, 進行反應呈色 (藍色), 再加入 50 μL stop solution (1 M H_2SO_4) 終止反應並呈現黃色, 最後藉由微量分析儀 (ELISA reader) 測量 450 nm 吸光值, 代入標準曲線方程式, 計算血清中胰島素之濃度。



5. 胰島素抗性指標 HOMA-IR index 計算

胰島素抗性指標 HOMA-IR index 為 Matthews 等學者於 1985 年提出之評估方法 (Matthews et al., 1985)，利用休息狀態的禁食血糖值與胰島素值計算出胰島素抗性，數值愈高表示胰島素阻抗情形愈嚴重。計算公式為：

$$\text{HOMA-IR index} = \text{serum glucose (mmol/L)} \times \text{serum insulin (mU/L)} / 22.5$$

六、肌肉基因 mRNA 表現分析

1. 組織 total RNA 抽取

肌肉組織 RNA 使用 Direct-zol™ RNA MiniPrep (ZYMO research, R2052) 進行抽取。將腓腸肌或比目魚肌放入滅菌均質管中，分別添加 1 mL 或 200 μL TRIzol® Reagent (Invitrogen 15596-018, USA)，以均質機均質 5 次 (20 秒/次)，以 12000 rpm、4°C 離心一分鐘，抽取上清液至滅菌 1.5 mL 離心管，加入等體積絕對酒精混勻，將液體移入 spin column，再以 12000 rpm、4°C 離心一分鐘，倒除收集管廢液。加入 400 μL Direct-zol™ RNA Prewash，以 12000 rpm、4°C 離心一分鐘，倒除收集管廢液，重複兩次。再加入 700 μL Direct-zol™ RNA wash buffer，以 12000 rpm、4°C 離心一分鐘，倒除收集管廢液，再以 12000 rpm、4°C 離心 2 分鐘。將 spin column 移至新的滅菌微量離心管，加入 30 μL RNase/DNase-free water，再以 12000 rpm、4°C 離心一分鐘，將 RNA 流洗下來，得到純化的 RNA 溶液。

將 RNA 溶液以 Nanodrop (ND-2000, Thermo scientific, USA) 測量吸光值，計算 RNA 濃度 ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) = $A_{260} \times 40 \times$ 稀釋倍數 (1 unit = 40 μg RNA/mL)，同時測量 A_{260}/A_{280} 判定 RNA 品質，若比值接近 2.0 表示為純化的 RNA，測量 A_{260}/A_{230} 判定是否有有機鹽類殘留，理想質介於 2.0-2.4。RNA 溶液立即進行反轉錄或保存於 -80°C 冰箱。



2. Total RNA 反轉錄成 cDNA

使用市售反轉錄試劑套組 High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA)。將 RNA 溶液以 RNase/DNase-free water 稀釋為 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 RNA，並取 10 μL 再加入 10 μL 2 \times Reverse Transcription Master mix (2 μL 10 \times RT buffer、0.8 μL 25 \times dNTP buffer、2 μL 10 \times RT Random Primers、1 μL 10 \times MultiscibeTM Reverse Transcription、4.2 μL ddH₂O)，RNA 以 2 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$ 進行反轉錄。反轉錄條件為 25 $^{\circ}\text{C}$ 10 分鐘、37 $^{\circ}\text{C}$ 120 分鐘、85 $^{\circ}\text{C}$ 5 分鐘，最後冷卻並維持在 4 $^{\circ}\text{C}$ ，即完成 RNA 反轉錄。完成之 cDNA 產物保存於 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱待進行基因表現分析。

3. Quantitative Real-Time PCR

將 cDNA 以無菌二次水稀釋為 1 ng/mL，取 10 μL cDNA，加入 12.5 μL 2 \times Taqman[®] Universal PCR Master Mix (K00861, Applied Biosystems, USA)、1.25 μL Probe/Primer Mixture 及 1.25 μL 無菌水，總體積為 25 μL ，作為樣品液。將樣品液放入 MultipleTM 96 well PCR plates (bio-rad, USA)，短暫離心去除氣泡，再將 plate 放入 CFX ConnectTM Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD, 185-2000) 進行即時定量以分析 RNA 表現量。上機條件為 50 $^{\circ}\text{C}$, 2 min (Step 1) \rightarrow 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 min (Step 2) \rightarrow 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 sec (Step 2) \rightarrow 60 $^{\circ}\text{C}$, 1 min (Step 4)，再回到 Step 3 重複 40 個循環。以 *Gadph* 作為 internal control。將測得之 Ct 值進行換算以分析基因表現量。所有 Probe/primer AssayMix ID (Applied Biosystems) 見表 3-4。



表 3-4. 本研究 qPCR 分析使用引子整理表

Table 3-4. Taqman® Probe/Primer ID used in the qPCR in this study

Gene symbol	Gene names	Probe/primer (Applied Biosystems, USA)	AssayMix ID
<i>Akt2</i>	AKT Serine/Threonine Kinase 2	Mm02026778_g1	
<i>Bcl2</i>	B-cell lymphoma 2	Mm00477631_m1	
<i>Ccnd1</i>	G1/S-specific cyclin D1	Mm00432359_m1	
<i>Cox7a1</i>	Cytochrome c oxidase subunit 7A1	Mm00438296_m1	
<i>Cox7a2</i>	Cytochrome c oxidase subunit 7A2	Mm00438299_m1	
<i>Cox8a</i>	Cytochrome c oxidase Subunit 8A	Mm02342396_g1	
<i>Fis1</i>	fission 1 (mitochondrial outer membrane) homolog (yeast)	Mm00481850_m1	
<i>Gapdh</i>	Gyceraldehyde dehydrogenase	3-phosphate Mm99999915_g1	
<i>Hk2</i>	Hexokinase 2	Mm00443385_m1	
<i>Igf1</i>	Insulin-like growth factor 1	Mm00439560_m1	
<i>Igf1r</i>	Insulin-like growth factor 1 receptor	Mm00802831_m1	
<i>Mfn1</i>	Mitofusin 1	Mm00612599_m1	
<i>Mfn2</i>	Mitofusin 2	Mm00500120_m1	
<i>Mstn</i>	Myostatin	Mm01254559_m1	
<i>Myf5</i>	Myogenic factor 5	Mm00435125_m1	
<i>Myh4</i>	Myosin heavy chain 4, MyHC-IIb	Mm01332541_m1	
<i>Myod1</i>	Myogenic differentiation 1	Mm00440387_m1	
<i>Myog</i>	Myogenic factor 4	Mm00446194_m1	
<i>Nrf1</i>	Nuclear respiratory factor 1	Mm01135606_m1	

<i>Opal</i>	Optic atrophy 1	Mm01349707_g1
<i>Pax7</i>	Paired box 7	Mm01354484_m1
<i>Pgc-1α</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α	Mm01208835_m1
<i>Tfam</i>	transcription factor A, mitochondrial	Mm00447485_m1
<i>Tfb2m</i>	transcription factor B2, mitochondrial	Mm01620397_s1

算式： $\Delta Ct = Ct \text{ value of target gene} - Ct \text{ value of internal control}$

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

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

六、統計分析

數據以 mean \pm SD (standard deviation) 或 mean \pm SEM (standard error of mean) 表示。以 SPSS version 21 (IBM Corporation, USA) 進行單因子變異數 (one-way ANOVA) 及 Duncan's multiple range test 事後檢定比較各組差異、以 Excel 2016 (Microsoft, USA) 進行 Student *t*-test 檢定分析。以 $p < 0.05$ 表示組間有統計差異。



第三節 實驗結果

一、生長情形

1. 生長曲線與體重變化

實驗伊始，C57BL/6J 小鼠經過 chow diet 適應一週後依照體重隨機分為 C 組 (chow diet)、HF 組 (high fat diet) 以及 HF+4% 苦瓜各組 (P81, P81 50°C, 1758, 55M, H4)，各組之間體重無顯著差異 ($p>0.05$)。再來，苦瓜各組經過苦味適應 (1% BGP 2 天→2%BGP 3 天→4% BGP 2 天) 一週後，HF 組、苦瓜各組與 C 組體重已經出現顯著差異，苦瓜各組與 HF 組體重已拉開，55M 組體重顯著低於 HF 組 ($p<0.05$)。進入正式實驗後，HF 組與苦瓜各組之間差異越來越大。正式實驗一週後，苦瓜各組的體重全部顯著低於 HF 組，其中，P81、H4 及 55M 體重與 C 組無差異。餵食兩週後，HF 組體重上升幅度比苦瓜組高，而苦瓜組中除了上述組別外，1758 組亦與 C 組無顯著差，P81 50°C 體重則尚顯著高於 C 組。實驗滿三週，苦瓜各組之間無顯著差，並仍然顯著低於 HF 組 (圖 3-2)。

實驗進行到最後一週，測得犧牲前最後的體重，HF 組平均體重為 31.2 ± 3.6 g，苦瓜各組介於 26-28 g 之間，C 組平均體重為 24.4 ± 1.3 g (表 3-5)。HF 組最後體重顯著高於 C 組，顯示小鼠餵食飼料 4 週後已被高脂飲食誘發肥胖。苦瓜各組體重顯著低於 HF 組，顯示可以減緩高脂飲食造成的體重增加。在餵食試驗飼料 4 週之體重增加量，HF 組體重增加量顯著高於 C 組；而苦瓜各組則顯著低於 HF 組，並與 C 組沒有差異 (圖 3-3)。

2. 攝食量、攝食利用率、能量攝取與能量利用率

正式餵食實驗 4 週的攝食量，C 組顯著高於 HF 組與苦瓜組。但由於 chow diet 單位熱量較低 (3.36 kcal/g)，因此能量攝取與其他各組都沒有差異 ($p>0.05$)。

攝食利用率（攝食等重飼料所增加的體重）也比其他組都還低。再者，P81 組及 1758 組攝食量稍微低於 HF 組，造成能量攝取也較 HF 低，而苦瓜其他各組在攝食量與能量攝取都與 HF 無差異。最後苦瓜各組攝食利用率皆顯著低於 HF 組，能量利用率也顯著比 HF 低，而與 C 組沒有差異，亦即攝取同樣熱量，苦瓜組增加的體重顯著比 HF 組低，顯示苦瓜之減重效果，並非只因為攝取的熱量較低（圖 3-4、表 3-6）。

3. 器官與組織重量

正式實驗滿四週後，小鼠禁食 12 小時進行犧牲，並秤取犧牲時體重。HF 犧牲時體重顯著高於苦瓜組，又再高於 C 組，苦瓜各組之間沒有差異（表 3-7）。取出小鼠各器官與組織進行秤重，記錄為絕對重量（表 3-7、表 3-8）；將小鼠各器官組織除以犧牲時體重，便得到相對重量（表 3-9、表 3-10）。

(1) 器官重量

心臟絕對重量各組間沒顯著差異，但 C 組相對重量高於 HF 組。肝臟 HF 絕對重量顯著高於 C 組與苦瓜各組，但相對重量 HF 組與苦瓜組沒有差異。副睪絕對重量各組間沒顯著差，但相對重量 HF 組顯著低於 C 組及除了 1758 以外的苦瓜各組。攝護腺 HF 組及苦瓜各組絕對重量高於 C 組，但相對重量之前無顯著差異（表 3-7、表 3-9）。

(2) 脂肪組織重量

在白色脂肪組織的部分，無論是絕對重量或相對重量，HF 組 EWAT、RWAT 及 IWAT 重量皆顯著比 C 組還重，而苦瓜各組皆顯著比 HF 還低。在苦瓜各組之間，H4 組的 IWAT 絕對重量與相對重量顯著高於 P81 組以及 P81 50°C 組。以上顯示，高脂飲食誘導四週會導致脂肪累積，而添加苦瓜可以減緩脂肪累積的情形，其中又以 H4 效果最為顯著（圖 3-5、表 3-8、表 3-10）。



在棕色脂肪組織的部分，HF 組 BAT 絕對重量顯著高於苦瓜組及 C 組，然而相對重量各組之間並無差異 (圖 3-5、表 3-8、表 3-10)。

(3) 骨骼肌肌肉組織重量

在絕對重量的部分，無論是腓腸肌、比目魚肌、脛骨前肌還是提肛肌，HF 組、苦瓜各組與 C 組之間皆無顯著差異 (圖 3-6、表 3-8)。

將絕對重量對體重校正得到相對重量後，部分肌肉組織出現差異。HF 組腓腸肌重量顯著低於 C 組，而苦瓜各組重量顯著高於 HF 組，其中，H4 組重量與 C 組無差異。比目魚肌 HF 組顯著低於 C 組，雖 HF 組與苦瓜各組之間並無差異，然而 1758 重量較高，亦與 C 組之間沒有差異。脛骨前肌及提肛肌在各組之間並無差異 (圖 3-6、表 3-10)。

二、血清生化分析

於實驗開始及餵食滿 2、4 週收集小鼠禁食血清，分析血清葡萄糖、三酸甘油酯與膽固醇各週含量以及胰島素滿 4 週的含量，並計算胰島素抵抗指標。

(1) 血清葡萄糖分析

經由苦味適應一週後進入正式實驗第 0 週，HF 組血糖值 (337.7 ± 36.3) 已經顯著高於 C 組 (241.8 ± 27.0)、55M 組及 H4 組，並與 P81 組、P81 50°C 組及 1758 組沒有差異。實驗滿二週，僅 1758 組與 55M 組血糖顯著低於 HF 組，其餘苦瓜各組與 HF 組沒有差異。實驗滿四週，唯 C 組及 H4 組血糖顯著低於 HF 組，其餘苦瓜各組與 HF 組沒有差異 (圖 3-7 A、圖 3-8 B、表 3-11)。因此，H4 組較能改善高脂飲食誘導增加的血糖值。

(2) 血清三酸甘油酯分析

經由苦味適應一週後進入正式實驗第 0 週，HF 組與部分苦瓜組血脂顯著高

於 C 組，唯 P81 50°C 組及 1758 組與 C 組沒有差異。實驗滿二週，HF 組與苦瓜各組血脂皆顯著高於 C 組，唯 H4 組顯著低於 HF 組。實驗滿四週，HF 組除了 H4 組以外的苦瓜各組血脂皆顯著高於 C 組，唯 H4 組血脂已經與 C 組沒有差異，並且顯著低於 P81 50°C 組。(圖 3-7 B、表 3-11)。因此，H4 組較能使高脂飲食誘導增加的血脂降低。

(3) 血清膽固醇分析

經由苦味適應一週後進入正式實驗第 0 週，HF 組與苦瓜各組血膽固醇皆顯著高於 C 組，其中，P81 組血膽固醇最高，顯著高於 55M 組及 H4 組。實驗滿二週，HF 組與苦瓜各組皆顯著高於 C 組，唯 H4 血膽固醇較低，顯著低於 HF 組及其餘苦瓜組。實驗滿四週，所有苦瓜組血膽固醇皆已經顯著低於 HF 組，其中，H4 組又顯著低於其餘苦瓜組 (圖 3-7 C、表 3-11)。以上顯示，苦瓜各組皆可以改善高脂飲食誘導增加的血膽固醇，其中又以 H4 效果最為顯著。

(4) 血清胰島素與胰島素阻抗指標

以滿四週實驗結束時的小鼠血清進行胰島素分析，結果顯示，HF 組血清胰島素顯著高於 C 組，而除了 P81 50°C 組以外的苦瓜各組血清胰島素皆顯著比 HF 組低，然而包含 P81 50°C 組的所有苦瓜各組皆與 C 組沒有差異。以血清胰島素以及葡萄糖換算成胰島素阻抗指標，則趨勢與胰島素大致相同，HF 組胰島素阻抗指標顯著比 C 組嚴重，所有苦瓜各組顯著低於 HF 組，並與 C 組無差異 (圖 3-8 A,C)。以上顯示，高脂飲食誘發 4 週已經會使小鼠出現胰島素阻抗，而餵食苦瓜則可以改善胰島素阻抗的情形。

三、骨骼肌基因 mRNA 表現分析

小鼠在正式實驗四週後進行犧牲，並分別對小腿之腓腸肌 (Gas) 及比目魚肌 (Sol) 進行基因表現量分析，評估山苦瓜對於小鼠骨骼肌生長及功能的影響。



(1) 骨骼肌粒線體相關 mRNA 基因表現分析

為了探討山苦瓜是否可以促進小鼠骨骼肌粒線體活性，實驗檢測了粒線體合成 (*Pgc-1 α* 、*Tfam*、*Tfb2m*、*Nrf1*)、融合分裂 (*Mfn1*、*Mfn2*、*Fis1*、*Opal*) 以及參與氧化磷酸化的 cytochrome c oxidase (*Cox7a1*、*Cox7a2*、*Cox8a*) 相關基因表現量。

然而，分析結果顯示，苦瓜各組粒線體相關基因表現並未較佳 (圖 3-9、圖 3-12)。於腓腸肌中，與 C 組相比，HF 組 *Cox7a1*、*Cox8a* 基因表現量顯著較高，其餘各組均與 C 組沒有差異。與 HF 組相比，P81 組 *Tfam* 基因表現量較低 ($0.05 < p < 0.1$)，*Nrf1* 基因表現量顯著較低，P81 50°C 組 *Tfam* 基因表現量顯著較低，1758 組 *Pgc-1 α* 、*Tfam* 基因表現量較低 ($0.05 < p < 0.1$)，*Fis1* 基因表現量顯著較低，55M 組 *Pgc-1 α* 、*Opal* 基因表現量較低 ($0.05 < p < 0.1$)，*Tfam*、*Nrf1*、*Fis1*、*Cox8a* 基因表現量顯著較低，H4 組 *Mfn1*、*Mfn2* 基因表現量較低 ($0.05 < p < 0.1$)，*Tfam*、*Fis1*、*Opal*、*Cox7a2*、*Cox8a* 基因表現量顯著較低 (圖 3-9)。於比目魚肌中，與 C 組相比，HF 組 *Opal*、*Cox8a* 基因表現量較高 ($0.05 < p < 0.1$)，其餘各組均與 C 組沒有差異。與 HF 組相比，P81 組 *Mfn2* 基因表現量顯著較高，1758 組 *Opal* 基因表現量、55M 組 *Tfb2m* 基因表現量、H4 組 *Cox8a* 基因表現量皆較低 ($0.05 < p < 0.1$)，其餘各組與 HF 組無顯著差異 ($p > 0.1$) (圖 3-12)。因此，以上結果顯示，在此動物模式下，四週高脂飲食並未造成粒線體功能障礙，山苦瓜除了 P81 組可以促進粒線體融合分裂基因 *Mfn2* 表現以外，其他品系處理亦尚未能促進高脂飲食小鼠之粒線體功能。

(2) 骨骼肌增生分化相關基因 mRNA 表現分析

為了探討山苦瓜對於小鼠骨骼肌生長的影响，實驗檢測了肌肉增生與分化相關基因表現量。*Pax7* (Paired box 7) 是肌肉增生指標，*Myf5* (Myogenic factor 5) 與

Myod1 (Myogenic differentiation 1) 則會表現在增生及分化中的肌肉細胞中，*Myh4* (Myosin heavy chain 4) 及 *Myog* (Myogenic factor 4) 是肌肉分化的指標，而 *Mstn* (Myostatin) 會抑制肌肉增生與分化，是抑制肌肉生長的指標。

於腓腸肌中，與 C 組相比，HF 組 *Pax7*、*Myod1* 基因表現量顯著較高，*Myog* 基因表現量較高 ($0.05 < p < 0.1$)。與 HF 組相比，P81 50°C 組 *Myf5* 基因表現量顯著較高，1758 組、55M 組、H4 組 *Myf5* 基因表現量較高 ($0.05 < p < 0.1$) (圖 3-10)。於比目魚肌中，HF 組 *Mstn* 基因表現量顯著較 C 組高，苦瓜各組比起 HF 組有較低的趨勢 ($0.05 < p < 0.1$)。其餘基因在 C 組、HF 組或苦瓜各組之間皆未達顯著或趨勢差異 (圖 3-13)。整體而言，在此動物模式下，高脂飲食對於小鼠骨骼肌有上調 *Mstn* 基因表現的情形，然而山苦瓜對於高脂飲食小鼠骨骼肌增生與分化的影響尚不明顯。

(3) 骨骼肌 IGF-1 及 PI3K/Akt 下游調控路徑基因 mRNA 表現分析

PI3K/Akt 路徑是調控骨骼肌生長與代謝的路徑，可藉由 insulin 或 IGF-1 結合到 receptor 而活化。為了探討山苦瓜對於骨骼肌 PI3K/Akt 路徑的影響，本實驗測量骨骼肌中 *Igf1* (Insulin-like growth factor 1)、*Igf1r* (Insulin-like growth factor 1 receptor)、*Akt2* (AKT Serine/Threonine Kinase 2) 以及路徑下游調控葡萄糖代謝的 *Hk2* (Hexokinase 2)、調控細胞週期的 *Ccnd1* (G1/S-specific cyclin D1) 與抑制細胞凋亡的 *Bcl2* (B-cell lymphoma 2)。

分析結果顯示，與 C 組相比，HF 組腓腸肌 *Igf1*、*Ccnd1*、*Bcl2* 基因表現量顯著較高，*Akt2*、*Hk2* 基因表現量較高 ($0.05 < p < 0.1$)，比目魚肌 *Ccnd1* 基因表現量較高 ($0.05 < p < 0.1$)。與 HF 組相比，P81 組腓腸肌 *Akt2* 及 *Hk2*、比目魚肌 *Ccnd1* 及 *Bcl2* 基因表現量較高 ($0.05 < p < 0.1$)；P81 50°C 組腓腸肌 *Igf1* 基因表現量較高 ($0.05 < p < 0.1$)，*Akt2*、*Hk2* 基因表現量顯著較高，比目魚肌 *Ccnd1*、*Bcl2* 基

因表現量較高 ($0.05 < p < 0.1$) ; 1758 組腓腸肌 *Igf1*、*Igf1r*、*Akt2*、*Hk2* 基因表現量皆顯著較高，比目魚肌 *Ccnd1* 基因表現量較高 ($0.05 < p < 0.1$) ; 55M 組腓腸肌 *Igf1*、*Akt2*、*Hk2* 基因表現量較高 ($0.05 < p < 0.1$)，比目魚肌 *Ccnd1* 基因表現量較高 ($0.05 < p < 0.1$) ; H4 組腓腸肌 *Hk2* 基因表現量顯著較高，*Igf1*、*Akt2* 基因表現量較高 ($0.05 < p < 0.1$)，比目魚肌 *Ccnd1* 基因表現量較高 ($0.05 < p < 0.1$)，*Bcl2* 基因表現量較低 ($0.05 < p < 0.1$)。上述結果顯示，山苦瓜普遍能使高脂飲食模式下小鼠骨骼肌 PI3K/Akt 路徑相關基因表現有上升的趨勢 ($0.05 < p < 0.1$)，而 1758 組能較明顯地上調 PI3K/Akt 路徑中蛋白質之基因表現。

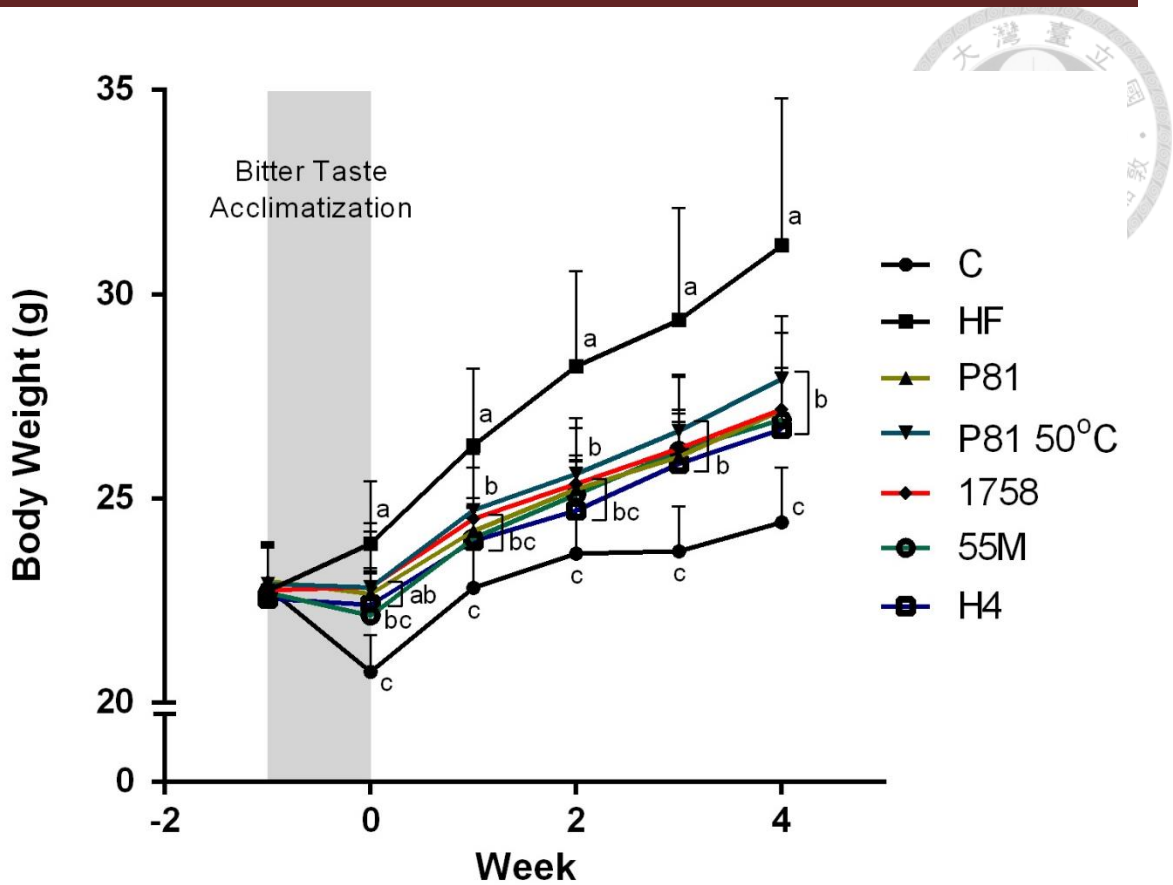


圖 3-2. C57BL/6J 公鼠餵食實驗飼料 4 週之生長曲線

Figure 3-2. The body weight of C57BL/6J male mice fed test diet for 4 weeks.

The values represent mean \pm SD (n=5-6/ group). The diets are C: powdered chow diet, HF : high fat diet, 4% BGP of various cultivars (P81, 50°C hydrolyzed P81, 1758, 55M, H4) in HF diet. Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

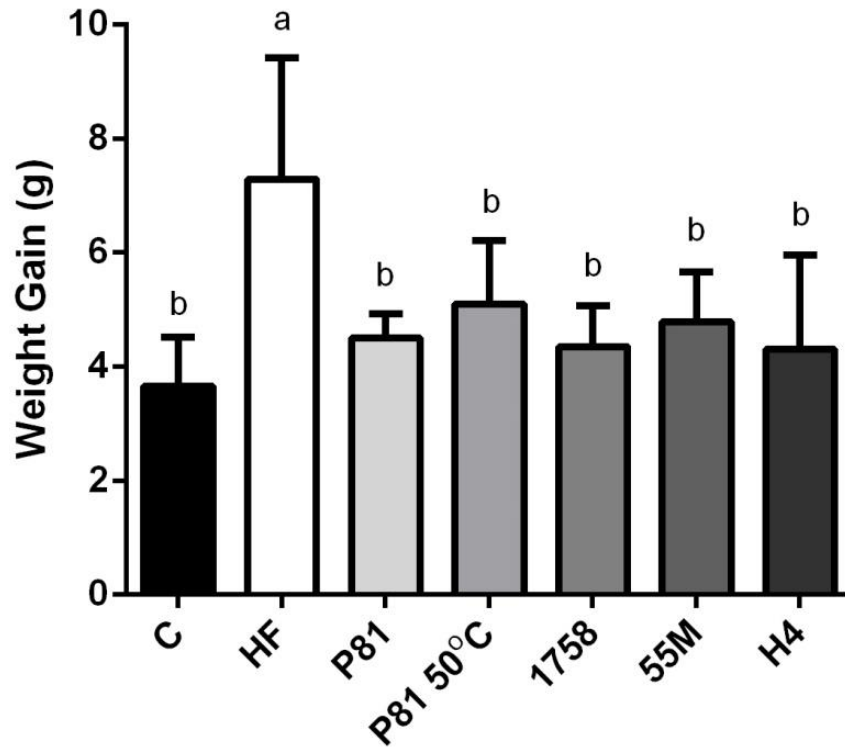


圖 3-3. C57BL/6J 公鼠餵食實驗飼料 4 週之體重增加量

Figure 3-3. Weight gains of C57BL/6J male mice fed test diet for 4 weeks.

The values represent mean \pm SD (n=5-6/ group). The diets are C: powdered chow diet, HF : high fat diet, 4% BGP of various cultivars (P81, 50°C hydrolyzed P81, 1758, 55M, H4) in HF diet. Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).



表 3- 5. C57BL/6J 公鼠餵食試驗飼料 4 週之初始體重、最終體重及體重增加量

Table 3-5. The initial body weights, final body weights, and weight gains of C57BL/6J male mice fed test diet for 4 weeks.

Dietary Group	n	Initial Body Weight	Final Body Weight	Weight Gain
		(g)		
C	5	20.76 ± 0.98 ^c	24.42 ± 1.34 ^c	3.66 ± 0.86 ^b
HF	5	23.90 ± 1.11 ^a	31.19 ± 3.61 ^a	7.29 ± 2.13 ^a
P81	6	22.67 ± 0.95 ^{ab}	27.17 ± 0.93 ^b	4.50 ± 0.43 ^b
P81 50°C	6	22.83 ± 0.96 ^{ab}	27.93 ± 1.53 ^b	5.10 ± 1.11 ^b
1758	6	22.84 ± 1.05 ^{ab}	27.19 ± 1.86 ^b	4.35 ± 0.71 ^b
55M	6	22.14 ± 1.10 ^{bc}	26.94 ± 1.15 ^b	4.79 ± 0.87 ^b
H4	5	22.40 ± 1.30 ^{ab}	26.70 ± 1.50 ^b	4.30 ± 1.66 ^b

1. The values represent mean ± SD (n=5-6/ group).
2. The diets are C: powdered chow diet, HF : high fat diet, 4% BGP of various cultivars (P81, 50°C hydrolyzed P81, 1758, 55M, H4) in HF diet.
3. Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).



表 3-6. C57BL/6J 公鼠餵食試驗飼料 4 週之攝食量、攝食利用率、能量攝取與能量利用率

Table 3-6. The food intake, feed efficiency, energy intake and energy efficiency of C57BL/6J male mice fed test diet for 4 weeks.

Dietary Group	n	Food Intake	Feed Efficiency	Energy Intake	Energy Efficiency
		(g/day)	(g BW/100g diet)	(kcal/day)	(g BW/ 1000 kcal)
C	5	3.58 ± 0.20 ^a	3.79 ± 0.93 ^c	12.04 ± 0.66 ^{ab}	11.29 ± 2.78 ^b
HF	5	2.66 ± 0.33 ^b	9.99 ± 1.82 ^a	13.36 ± 1.65 ^a	19.91 ± 3.63 ^a
P81	6	2.33 ± 0.12 ^c	7.16 ± 0.69 ^b	11.68 ± 0.62 ^b	14.27 ± 1.38 ^b
P81 50°C	6	2.58 ± 0.35 ^{bc}	7.33 ± 1.30 ^b	12.93 ± 1.78 ^{ab}	14.62 ± 2.59 ^b
1758	6	2.33 ± 0.14 ^c	6.96 ± 1.35 ^b	11.70 ± 0.71 ^b	13.88 ± 2.69 ^b
55M	6	2.45 ± 0.07 ^{bc}	7.27 ± 1.38 ^b	12.27 ± 0.35 ^{ab}	14.50 ± 2.75 ^b
H4	5	2.61 ± 0.32 ^{bc}	6.02 ± 1.95 ^b	13.07 ± 1.63 ^{ab}	12.01 ± 3.89 ^b

1. The values represent mean ± SD (n=5-6/ group).
2. The diets are C: powdered chow diet, HF : high fat diet, 4% BGP of various cultivars (P81, 50°C hydrolyzed P81, 1758, 55M, H4) in HF diet.
3. Feed efficiency = body weight gain/ total food intake × 100; energy efficiency = body weight gain/ total energy intake × 1000
4. Calorie content: 3.36 kcal/g chow diet; 5.016 kcal/g.HF diet and BGP contained HF diet.
5. Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

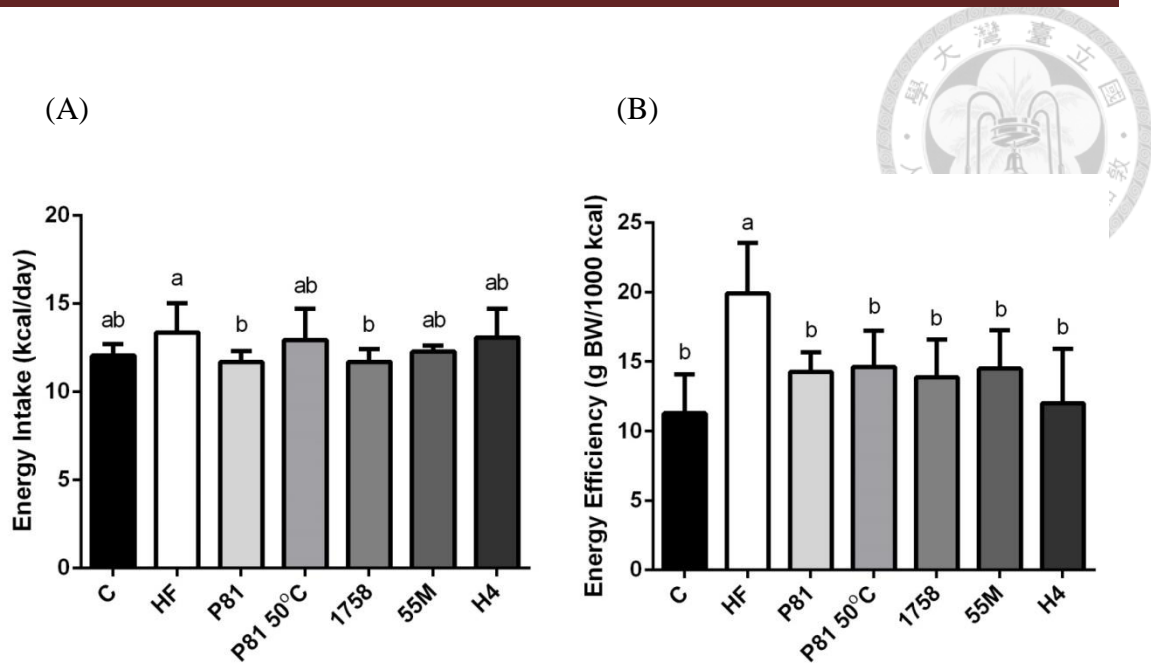


圖 3-4. C57BL/6J 公鼠餵食試驗飼料 4 週之能量攝取與能量效率

Figure 3-4. The energy intake and the energy efficiency of C57BL/6J male mice fed test diet for 4 weeks.

The values represent mean \pm SD (n=5-6/ group). The diets are C: powdered chow diet, HF : high fat diet, 4% BGP of various cultivars in HF diet. Energy efficiency = body weight gain/ total energy intake \times 1000. Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).



表 3-7. C57BL/6J 公鼠餵食試驗飼料 4 週後之體重與器官絕對重量

Table 3-7. The body weights and absolute organ weights of C57BL/6J male mice fed test diets for 4 weeks.

Dietary Group	n	Body Weight (g)	Heart (g)	Liver (g)	Lung (g)	Spleen (g)
C	5	22.12 ± 0.62 ^c	0.122 ± 0.005	1.065 ± 0.072 ^b	0.134 ± 0.009 ^{bc}	0.054 ± 0.005 ^b
HF	5	29.76 ± 3.24 ^a	0.133 ± 0.013	1.272 ± 0.199 ^a	0.148 ± 0.014 ^{abc}	0.071 ± 0.005 ^a
P81	6	25.77 ± 1.18 ^b	0.121 ± 0.008	1.065 ± 0.096 ^b	0.131 ± 0.007 ^c	0.068 ± 0.005 ^a
P81 50°C	6	26.52 ± 1.29 ^b	0.125 ± 0.011	1.093 ± 0.086 ^b	0.158 ± 0.023 ^a	0.069 ± 0.004 ^a
1758	6	25.83 ± 1.73 ^b	0.130 ± 0.012	1.082 ± 0.112 ^b	0.142 ± 0.011 ^{abc}	0.069 ± 0.004 ^a
55M	6	25.48 ± 1.24 ^b	0.121 ± 0.014	1.031 ± 0.052 ^b	0.151 ± 0.022 ^{abc}	0.069 ± 0.006 ^a
H4	5	25.02 ± 1.56 ^b	0.128 ± 0.017	1.039 ± 0.104 ^b	0.154 ± 0.017 ^{ab}	0.072 ± 0.014 ^a
Dietary Group	n	Kidney (g)	Testis (g)	Epididymis (g)	Prostate (g)	Seminal Vesicle (g)
C	5	0.307 ± 0.014 ^b	0.169 ± 0.011 ^b	0.091 ± 0.011	0.045 ± 0.005 ^b	0.182 ± 0.020 ^d
HF	5	0.376 ± 0.055 ^a	0.182 ± 0.007 ^a	0.086 ± 0.018	0.056 ± 0.015 ^a	0.271 ± 0.029 ^a
P81	6	0.359 ± 0.021 ^a	0.178 ± 0.011 ^{ab}	0.096 ± 0.012	0.053 ± 0.007 ^a	0.240 ± 0.018 ^{bc}
P81 50°C	6	0.381 ± 0.029 ^a	0.180 ± 0.007 ^{ab}	0.103 ± 0.015	0.057 ± 0.011 ^a	0.262 ± 0.019 ^{ab}
1758	6	0.360 ± 0.019 ^a	0.177 ± 0.007 ^{ab}	0.092 ± 0.007	0.056 ± 0.007 ^a	0.231 ± 0.014 ^c
55M	6	0.358 ± 0.011 ^a	0.176 ± 0.010 ^{ab}	0.098 ± 0.015	0.059 ± 0.008 ^a	0.246 ± 0.007 ^{bc}
H4	5	0.387 ± 0.066 ^a	0.175 ± 0.008 ^{ab}	0.098 ± 0.013	0.054 ± 0.005 ^a	0.221 ± 0.024 ^c

1. The values represent mean ± SD (n=5-6/ group).
2. The diets are C: chow diet, HF : high fat diet, 4% BGP of various cultivars (P81, 50°C hydrolyzed P81, 1758, 55M, H4) in HF diet.
3. Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

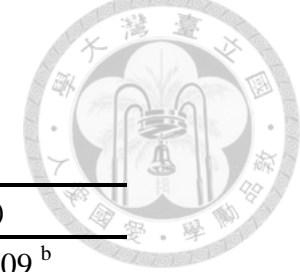


表 3-8. C57BL/6J 公鼠餵食試驗飼料 4 週後之骨骼肌、脂肪組織絕對重量

Table 3-8. The absolute skeletal muscle and adpose tissue weights of C57BL/6J male mice fed test diets for 4 weeks.

Dietary Group	n	EWAT (g)	RWAT (g)	IWAT (g)	BAT (g)
C	5	0.257 ± 0.034 ^c	0.072 ± 0.029 ^c	0.178 ± 0.069 ^d	0.085 ± 0.009 ^b
HF	5	1.261 ± 0.370 ^a	0.484 ± 0.162 ^a	0.695 ± 0.160 ^a	0.146 ± 0.017 ^a
P81	6	0.737 ± 0.139 ^b	0.224 ± 0.047 ^b	0.435 ± 0.075 ^b	0.109 ± 0.033 ^b
P81 50°C	6	0.801 ± 0.167 ^b	0.261 ± 0.060 ^b	0.457 ± 0.083 ^b	0.114 ± 0.021 ^b
1758	6	0.723 ± 0.249 ^b	0.222 ± 0.089 ^b	0.391 ± 0.097 ^{bc}	0.111 ± 0.022 ^b
55M	6	0.680 ± 0.197 ^b	0.210 ± 0.060 ^b	0.387 ± 0.094 ^{bc}	0.107 ± 0.016 ^b
H4	5	0.540 ± 0.182 ^b	0.159 ± 0.078 ^{bc}	0.284 ± 0.096 ^{cd}	0.107 ± 0.026 ^b

Dietary Group	n	Gastrocnemius (g)	Soleus (g)	TA (g)	LA (g)
C	5	0.145 ± 0.008	0.011 ± 0.002	0.046 ± 0.005	0.055 ± 0.015
HF	5	0.155 ± 0.018	0.011 ± 0.002	0.045 ± 0.014	0.060 ± 0.013
P81	6	0.150 ± 0.004	0.010 ± 0.001	0.048 ± 0.010	0.055 ± 0.008
P81 50°C	6	0.154 ± 0.006	0.010 ± 0.001	0.048 ± 0.011	0.055 ± 0.009
1758	6	0.152 ± 0.009	0.011 ± 0.002	0.050 ± 0.010	0.058 ± 0.006
55M	6	0.153 ± 0.007	0.010 ± 0.002	0.047 ± 0.015	0.054 ± 0.011
H4	5	0.155 ± 0.012	0.010 ± 0.001	0.048 ± 0.005	0.49 ± 0.012

1. The values represent mean ± SD (n=5-6/ group), data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).
2. EWAT : epididymal white adipose tissue, RWAT : retroperitoneal white adipose tissue, IWAT : inguinal white adipose tissue, BAT : brown adipose tissue, TA: tibialis anterior muscle, LA: levator ani muscle.

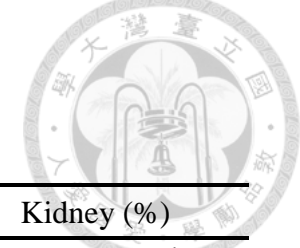


表 3-9. C57BL/6J 公鼠餵食試驗飼料 4 週後之器官相對重量

Table 3-9. The relative organ weights of C57BL/6J male mice fed test diets for 4 weeks.

Dietary Group	n	Heart (%)	Liver (%)	Lung (%)	Spleen (%)	Kidney (%)
C	5	0.55 ± 0.01 ^a	4.81 ± 0.30 ^a	0.61 ± 0.03 ^a	0.24 ± 0.02 ^b	1.39 ± 0.06 ^{ab}
HF	5	0.45 ± 0.05 ^c	4.26 ± 0.24 ^b	0.50 ± 0.05 ^b	0.24 ± 0.04 ^b	1.26 ± 0.10 ^b
P81	6	0.47 ± 0.04 ^{bc}	4.13 ± 0.24 ^b	0.51 ± 0.03 ^b	0.26 ± 0.02 ^{ab}	1.40 ± 0.08 ^{ab}
P81 50°C	6	0.47 ± 0.04 ^{bc}	4.12 ± 0.23 ^b	0.60 ± 0.07 ^a	0.26 ± 0.02 ^{ab}	1.44 ± 0.08 ^a
1758	6	0.50 ± 0.05 ^{abc}	4.20 ± 0.49 ^b	0.55 ± 0.06 ^{ab}	0.27 ± 0.02 ^{ab}	1.40 ± 0.12 ^{ab}
55M	6	0.48 ± 0.05 ^{bc}	4.05 ± 0.10 ^b	0.59 ± 0.08 ^a	0.27 ± 0.02 ^{ab}	1.41 ± 0.08 ^{ab}
H4	5	0.51 ± 0.05 ^{ab}	4.16 ± 0.46 ^b	0.61 ± 0.05 ^a	0.29 ± 0.05 ^a	1.54 ± 0.22 ^a
Dietary Group	n	Testis (%)	Epididymis (%)	Prostate (%)	Seminal Vesicle (%)	
C	5	0.76 ± 0.04 ^a	0.41 ± 0.05 ^a	0.20 ± 0.02	0.82 ± 0.09 ^c	
HF	5	0.62 ± 0.06 ^c	0.30 ± 0.09 ^b	0.19 ± 0.05	0.91 ± 0.04 ^{abc}	
P81	6	0.69 ± 0.03 ^b	0.37 ± 0.05 ^a	0.21 ± 0.03	0.93 ± 0.05 ^{ab}	
P81 50°C	6	0.68 ± 0.04 ^b	0.39 ± 0.06 ^a	0.22 ± 0.04	0.99 ± 0.08 ^a	
1758	6	0.69 ± 0.05 ^b	0.36 ± 0.05 ^{ab}	0.22 ± 0.04	0.89 ± 0.04 ^{bc}	
55M	6	0.69 ± 0.05 ^b	0.37 ± 0.06 ^a	0.23 ± 0.03	0.97 ± 0.06 ^{ab}	
H4	5	0.70 ± 0.03 ^b	0.39 ± 0.03 ^a	0.22 ± 0.03	0.89 ± 0.10 ^{bc}	

1. Relative organ weight (%) = absolute organ weight/body weight × 100%
2. The values represent mean ± SD (n=5-6/ group), data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).



表 3- 10. C57BL/6J 公鼠餵食試驗飼料 4 週後之骨骼肌、脂肪組織相對重量

Table 3-10. The relative skeletal muscle and adpose tissue weights of C57BL/6J male mice fed test diets for 4 weeks.

Dietary Group	n	EWAT (%)	RWAT (%)	IWAT (%)	BAT (%)
C	5	1.16 ± 0.14 ^d	0.33 ± 0.13 ^c	0.81 ± 0.32 ^d	0.39 ± 0.05
HF	5	4.17 ± 0.88 ^a	1.60 ± 0.48 ^a	2.33 ± 0.47 ^a	0.49 ± 0.04
P81	6	2.85 ± 0.42 ^{bc}	0.87 ± 0.16 ^b	1.69 ± 0.25 ^b	0.42 ± 0.11
P81 50°C	6	3.00 ± 0.51 ^b	0.98 ± 0.19 ^b	1.72 ± 0.26 ^b	0.43 ± 0.07
1758	6	2.76 ± 0.78 ^{bc}	0.84 ± 0.29 ^b	1.50 ± 0.29 ^{bc}	0.43 ± 0.08
55M	6	2.64 ± 0.68 ^{bc}	0.82 ± 0.21 ^b	1.51 ± 0.31 ^{bc}	0.42 ± 0.06
H4	5	2.13 ± 0.59 ^c	0.63 ± 0.27 ^{bc}	1.12 ± 0.31 ^{cd}	0.43 ± 0.11
Dietary Group	n	Gastrocnemius (%)	Soleus (%)	TA (%)	LA (%)
C	5	0.65 ± 0.04 ^a	0.050 ± 0.009 ^a	0.21 ± 0.02	0.25 ± 0.07
HF	5	0.52 ± 0.05 ^c	0.036 ± 0.007 ^b	0.15 ± 0.05	0.21 ± 0.07
P81	6	0.58 ± 0.02 ^b	0.039 ± 0.004 ^b	0.19 ± 0.04	0.21 ± 0.03
P81 50°C	6	0.58 ± 0.02 ^b	0.038 ± 0.002 ^b	0.18 ± 0.04	0.21 ± 0.03
1758	6	0.59 ± 0.05 ^b	0.044 ± 0.010 ^{ab}	0.19 ± 0.05	0.23 ± 0.03
55M	6	0.60 ± 0.03 ^b	0.039 ± 0.006 ^b	0.18 ± 0.06	0.21 ± 0.05
H4	5	0.62 ± 0.04 ^{ab}	0.040 ± 0.005 ^b	0.19 ± 0.02	0.20 ± 0.04

1. The values represent mean ± SD (n=5-6/ group), data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).
2. EWAT : epididymal white adipose tissue, RWAT : retroperitoneal white adipose tissue, IWAT : inguinal white adipose tissue, BAT : brown adipose tissue, TA: tibialis anterior muscle, LA: levator ani muscle.

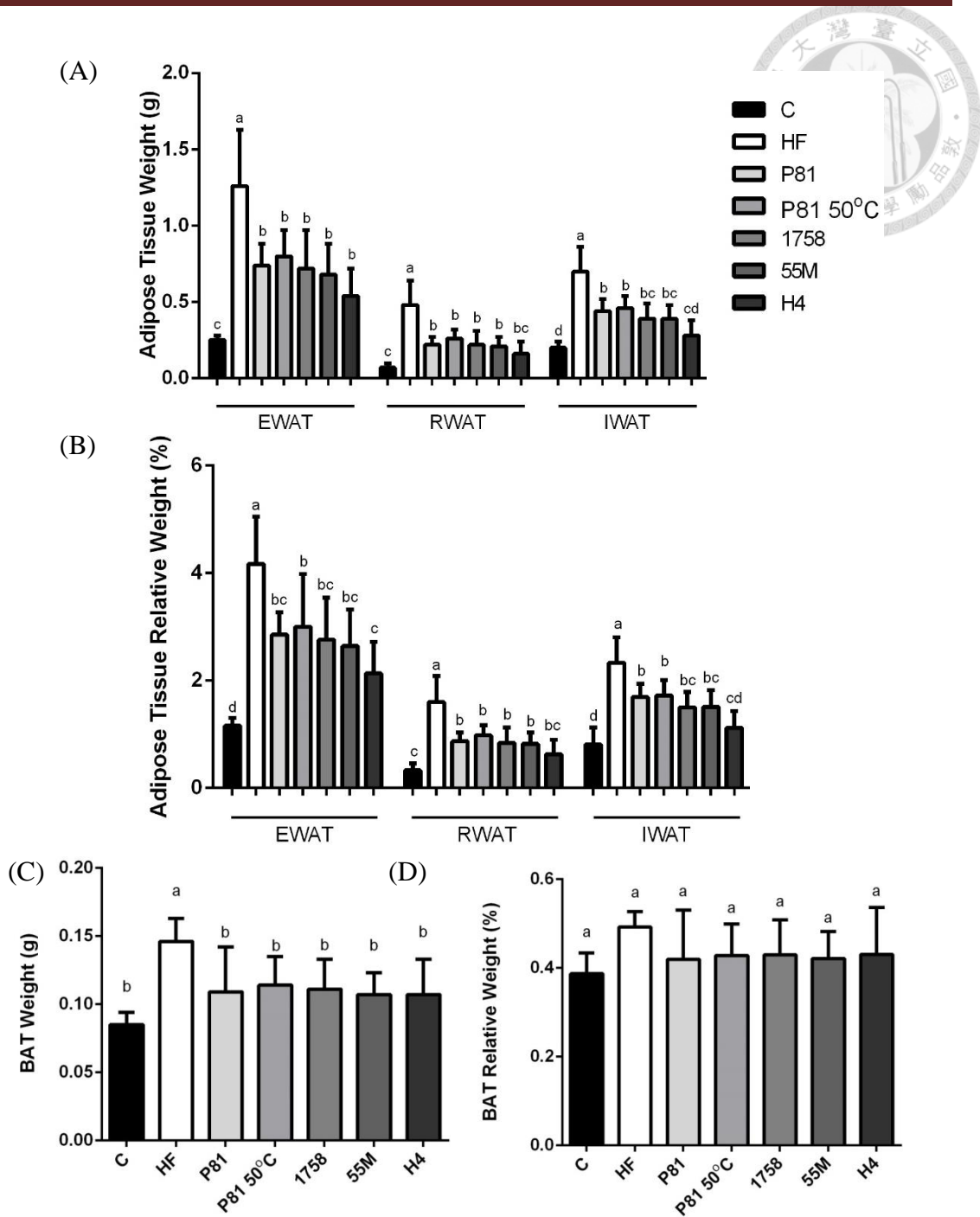


圖 3-5. C57BL/6J 公鼠餵食試驗飼料 4 週後之脂肪組織之絕對與相對重量

Figure 3-5. The absolute and relative weights of adipose tissues of C57BL/6J male mice fed test diets for 4 weeks.

(A) Absolute and (B) relative weights of white adipose tissues. (C) Absolute and (D) relative weights of brown adipose tissues. The values represent mean \pm SD (n=5-6/ group). Relative tissue weight (%) = absolute tissue weight/body weight \times 100%. EWAT : epididymal white adipose tissue, RWAT : retroperitoneal white adipose tissue, IWAT : inguinal white adipose tissue, BAT : brown adipose tissue. Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

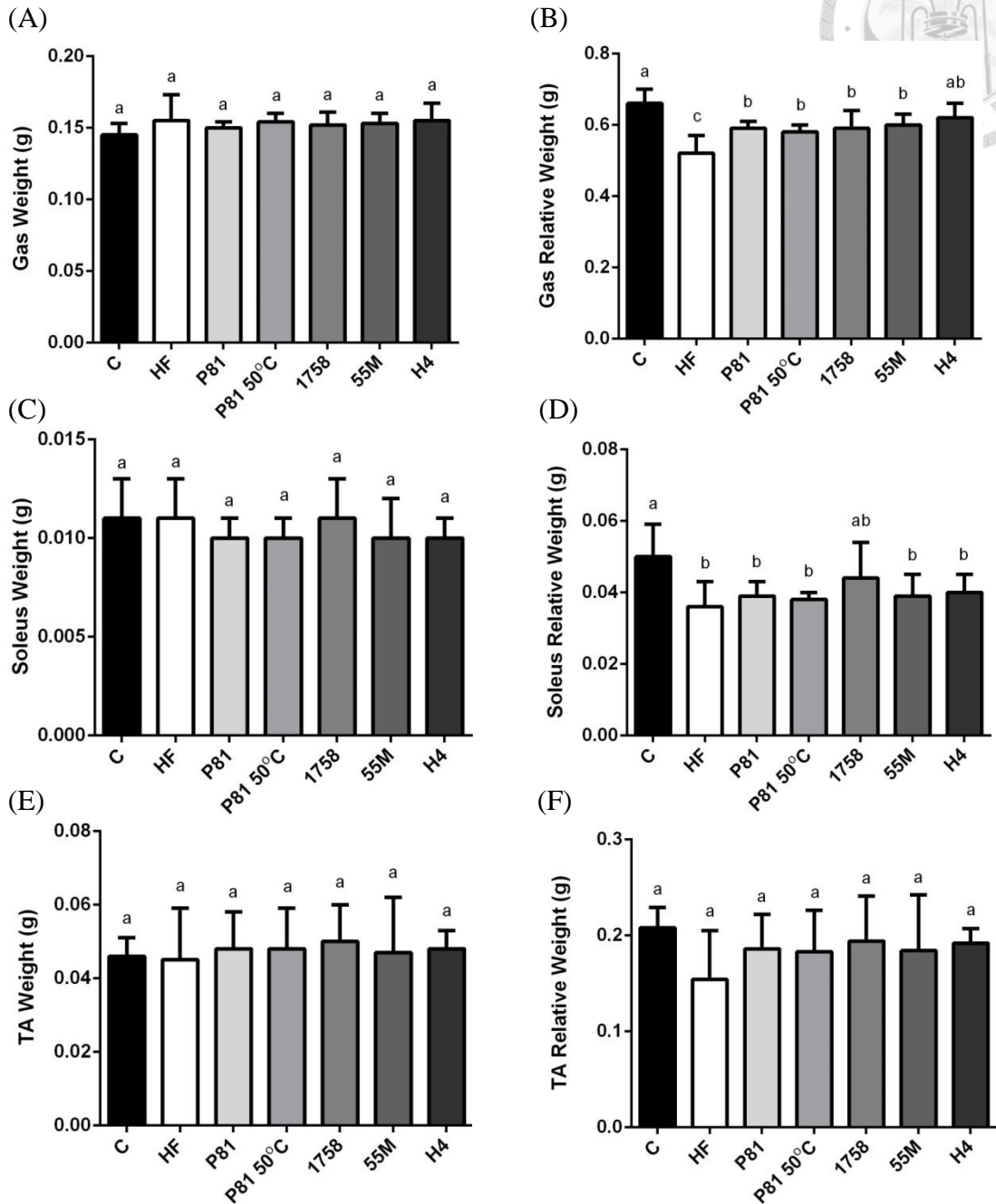


圖 3-6. 小鼠餵食試驗飼料 4 週後腓腸肌、比目魚肌與脛前肌之絕對及相對重量
Figure 3-6. The absolute and relative weights of gastrocnemius muscle, soleus muscle, and tibialis anterior muscle of C57BL/6J male mice fed test diets for 4 weeks.

(A) Absolute and (B) relative weights of gastrocnemius muscle. (C) Absolute and (D) relative weights of soleus muscle. (E) Absolute and (F) relative weights of tibialis anterior muscle. Relative muscle weight (%) = absolute muscle weight/body weight \times 100%. The values represent mean \pm SD (n=5-6/ group). Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

表 3-11. C57BL/6J 小鼠餵食試驗飼料 4 週之禁食血清生化分析
Table 3-11. The fasting serum biochemical analysis of C57BL/6J male mice .

Dietary Group	n	Serum Glucose (mg/dL)	Serum TG (mg/dL)	Serum Cholesterol (mg/dL)
Week 0				
C	5	241.8 ± 27.0 ^b	55.3 ± 10.9 ^b	68.7 ± 8.7 ^c
HF	5	337.7 ± 36.3 ^a	81.4 ± 16.1 ^a	126.2 ± 9.6 ^{ab}
P81	6	297.3 ± 65.4 ^{ab}	76.9 ± 17.7 ^a	138.3 ± 11.4 ^a
P81 50°C	6	328.4 ± 63.7 ^a	70.9 ± 10.9 ^{ab}	125.2 ± 11.9 ^{ab}
1758	6	336.6 ± 83.4 ^a	70.6 ± 15.3 ^{ab}	129.0 ± 18.5 ^{ab}
55M	6	244.2 ± 30.2 ^b	79.0 ± 17.6 ^a	114.3 ± 16.8 ^b
H4	5	216.8 ± 43.4 ^b	76.4 ± 11.1 ^a	108.8 ± 26.9 ^b
Week 2				
C	5	324.3 ± 68.1 ^{ab}	49.8 ± 4.6 ^c	71.5 ± 6.2 ^c
HF	5	379.6 ± 73.4 ^a	102.2 ± 12.0 ^a	147.3 ± 18.1 ^a
P81	6	304.6 ± 51.8 ^{ab}	84.3 ± 16.4 ^{ab}	138.8 ± 5.7 ^a
P81 50°C	6	301.3 ± 59.1 ^{ab}	88.5 ± 24.6 ^{ab}	138.3 ± 10.0 ^a
1758	6	270.4 ± 72.2 ^b	89.3 ± 27.0 ^{ab}	138.1 ± 25.2 ^a
55M	6	304.5 ± 67.8 ^b	78.8 ± 8.9 ^{ab}	132.6 ± 17.8 ^a
H4	5	317.3 ± 83.1 ^{ab}	73.8 ± 14.4 ^b	108.8 ± 22.9 ^b
Week 4				
C	5	216.5 ± 98.8 ^b	59.5 ± 17.2 ^c	73.7 ± 10.4 ^d
HF	5	318.8 ± 71.8 ^a	103.2 ± 20.1 ^a	171.6 ± 19.0 ^a
P81	6	291.2 ± 49.9 ^{ab}	90.5 ± 20.2 ^{ab}	147.1 ± 12.0 ^b
P81 50°C	6	280.9 ± 38.6 ^{ab}	100.8 ± 22.3 ^a	151.5 ± 10.2 ^b
1758	6	242.8 ± 42.2 ^{ab}	93.1 ± 19.9 ^{ab}	146.7 ± 12.5 ^b
55M	6	255.0 ± 33.6 ^{ab}	86.1 ± 22.8 ^{ab}	133.2 ± 13.9 ^b
H4	5	230.7 ± 51.5 ^b	67.1 ± 16.5 ^{bc}	112.4 ± 20.4 ^c

The values represent mean ± SD (n=5-6/ group). Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters at the same time point are significantly different ($p < 0.05$).

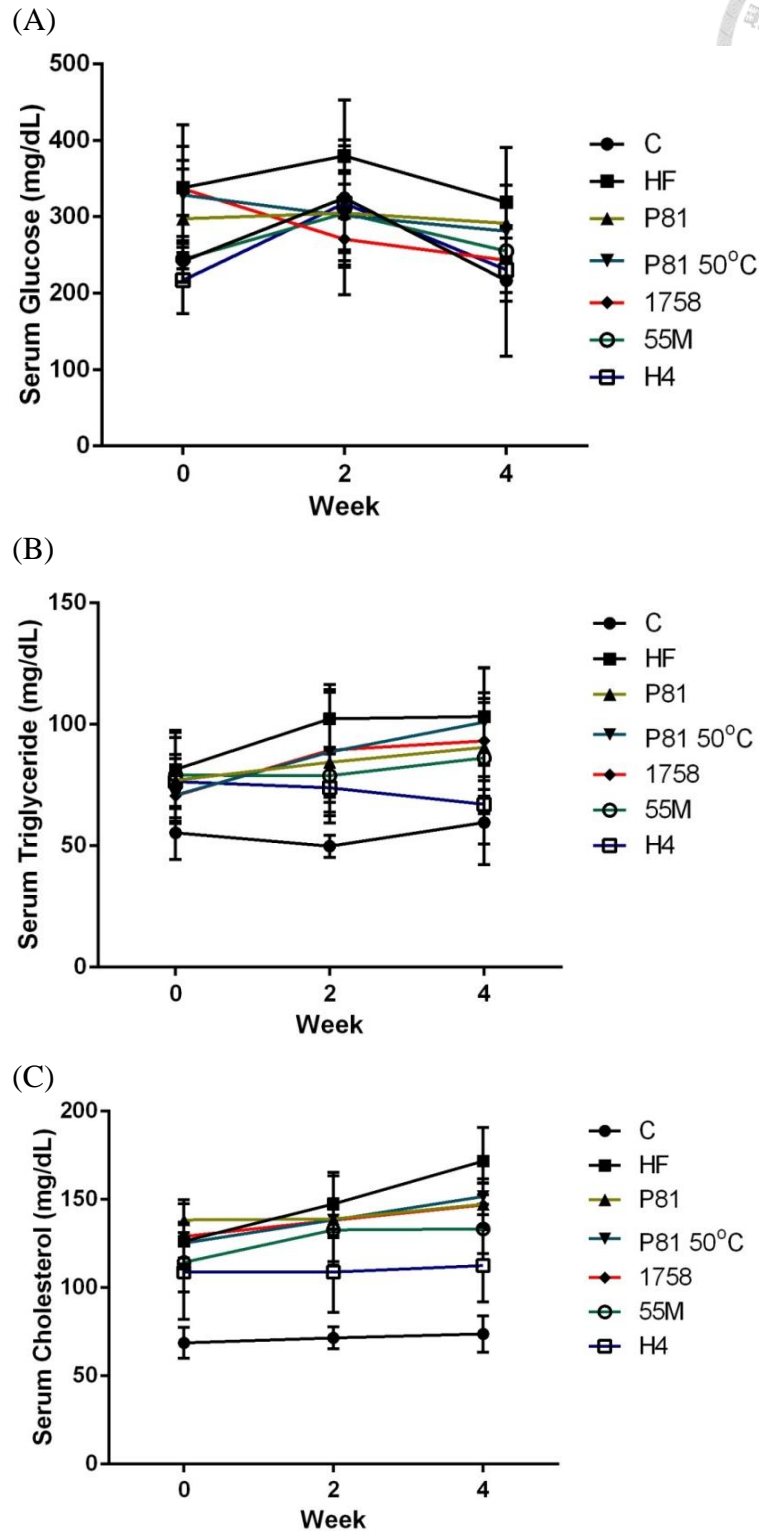


圖 3-7. C57BL/6J 小鼠餵食試驗飼料 4 週之血糖、血脂、血膽固醇之變化

Fig. 3-7. The serum biochemical analysis of C57BL/6J mice fed test diets for 4 weeks.

(A) Fasting serum glucose level, (B) fasting serum triacylglycerol level and (C) fasting serum cholesterol level at week 0, 2, 4. The values represent mean \pm SD (n=5-6/ group).

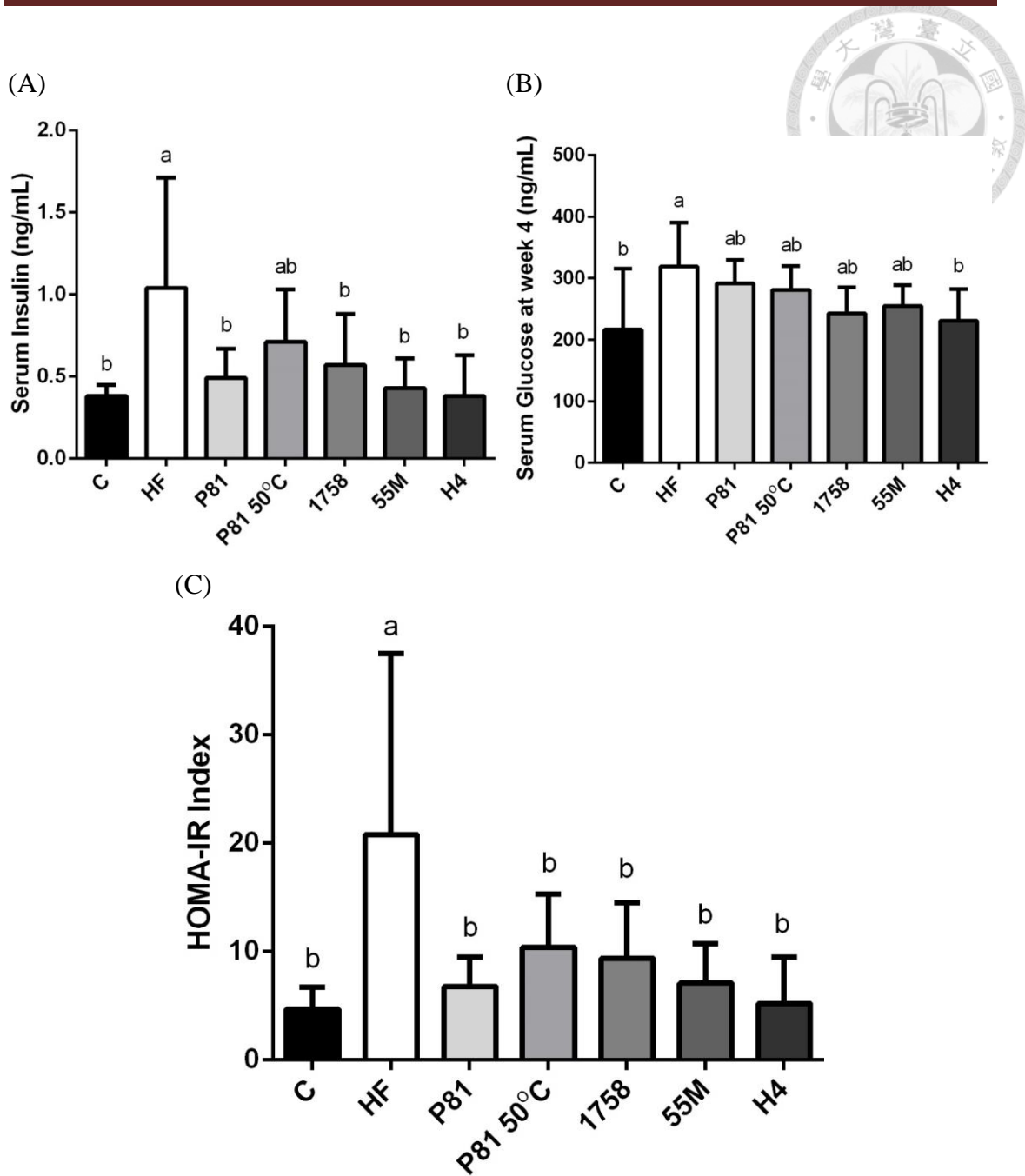


圖 3-8. C57BL/6J 小鼠於正式實驗滿 4 週之禁食血清胰島素、血糖及胰島素阻抗指標 HOMA-IR index

Fig. 3-8. Fasting serum insulin level, serum glucose level and HOMA-IR index of C57BL/6J mice fed test diets for 4 weeks.

(A) Fasting serum insulin level. (B) Fasting serum glucose level. (C) HOMA-IR index. HOMA-IR index = serum glucose (mmol/L) × serum insulin (mU/L). The values represent mean ± SD (n=5-6/ group). Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

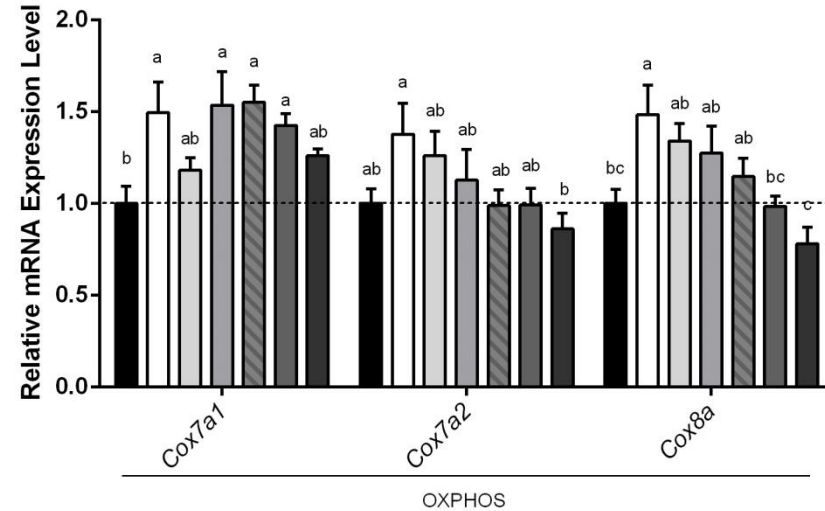
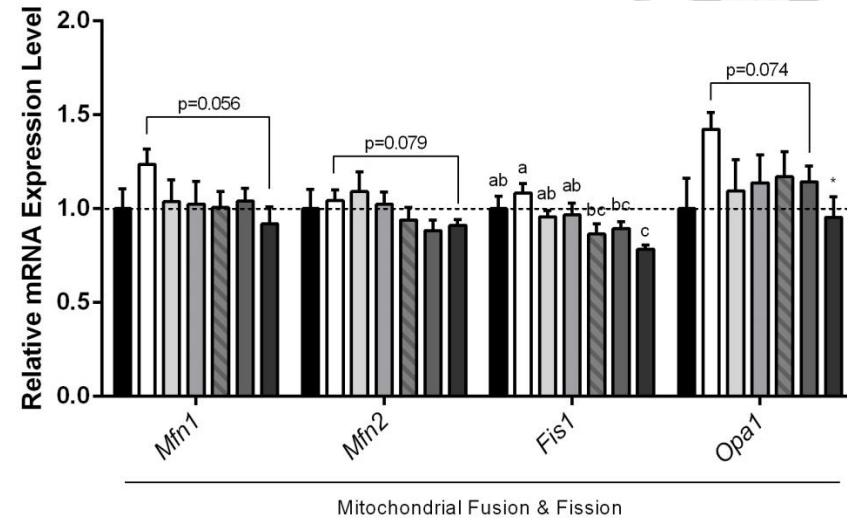
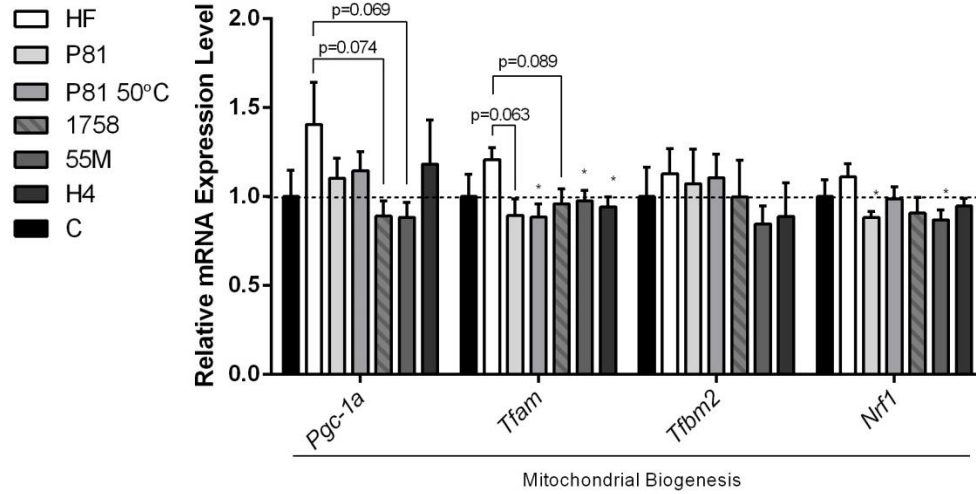
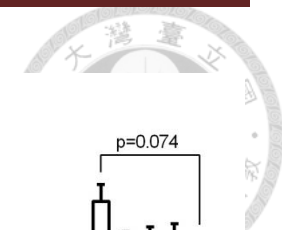


圖 3-9. C57BL/6J 公鼠正式實驗滿四週之腓腸肌粒線體生成、融合分裂、氧化磷酸化相關基因表現

Figure 3-9. The mRNA expression levels of genes related to mitochondrial biogenesis, fussion/fission and OXPHOS in gastrocnemius muscle of C57BL/6J mice fed test diet for 4 weeks.

The values represent mean \pm SEM (n=4-6/ group). Data were analyzed by one-way ANOVA, Duncan's multiple range test and Student's *t* test. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$). * denotes significant different form HF group ($p < 0.05$). *Pgc-1a* :

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α , *Tfam* : transcription factor A, mitochondrial, *Tfb2m* : transcription factor B2, mitochondrial, *Nrf1* : Nuclear respiratory factor 1, *Mfn1* : Mitofusin 1, *Mfn2* : Mitofusin 2, *Fis1* : fission 1 (mitochondrial outer membrane) homolog (yeast), *Opa1* : Optic atrophy 1, *Cox7a1* : Cytochrome c, *Cox7a2* : Cytochrome c oxidase subunit 7A2, *Cox8a* : Cytochrome c oxidase Subunit 8A.

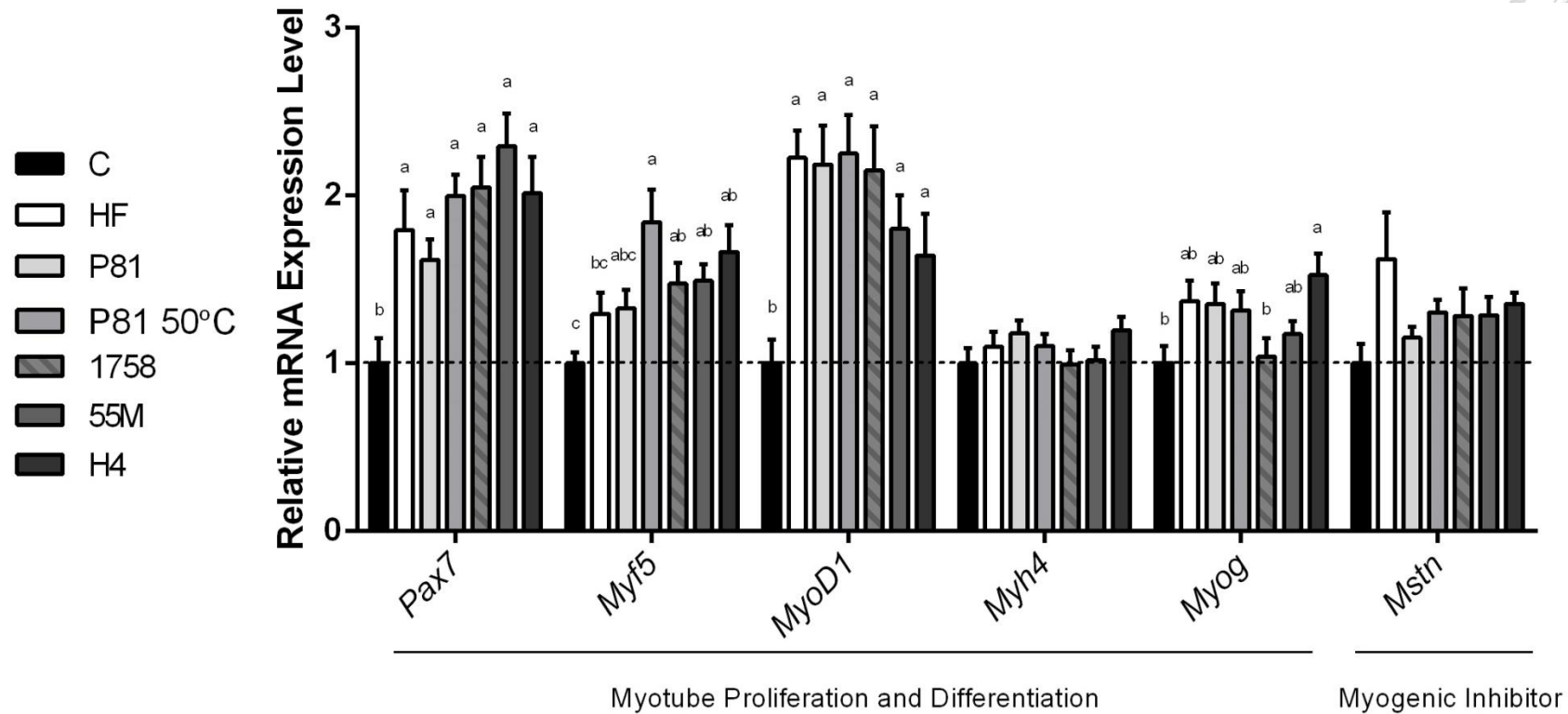


圖 3- 10. C57BL/6J 公鼠正式實驗滿四週之腓腸肌肌肉增生、分化相關基因表現

Figure 3-10. The mRNA expression levels of genes related to muscle proliferation and differentiation in gastrocnemius muscle of C57BL/6J mice fed test diet for 4 weeks.

The values represent mean \pm SEM (n=4-6/ group). Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$). Pax7 : Paired box 7, Myf5 : Myogenic factor 5, MyoD1 : Myogenic differentiation 1, Myh4 : Myosin heavy chain 4, Myog : Myogenic factor 4, Mstn : Myostatin.

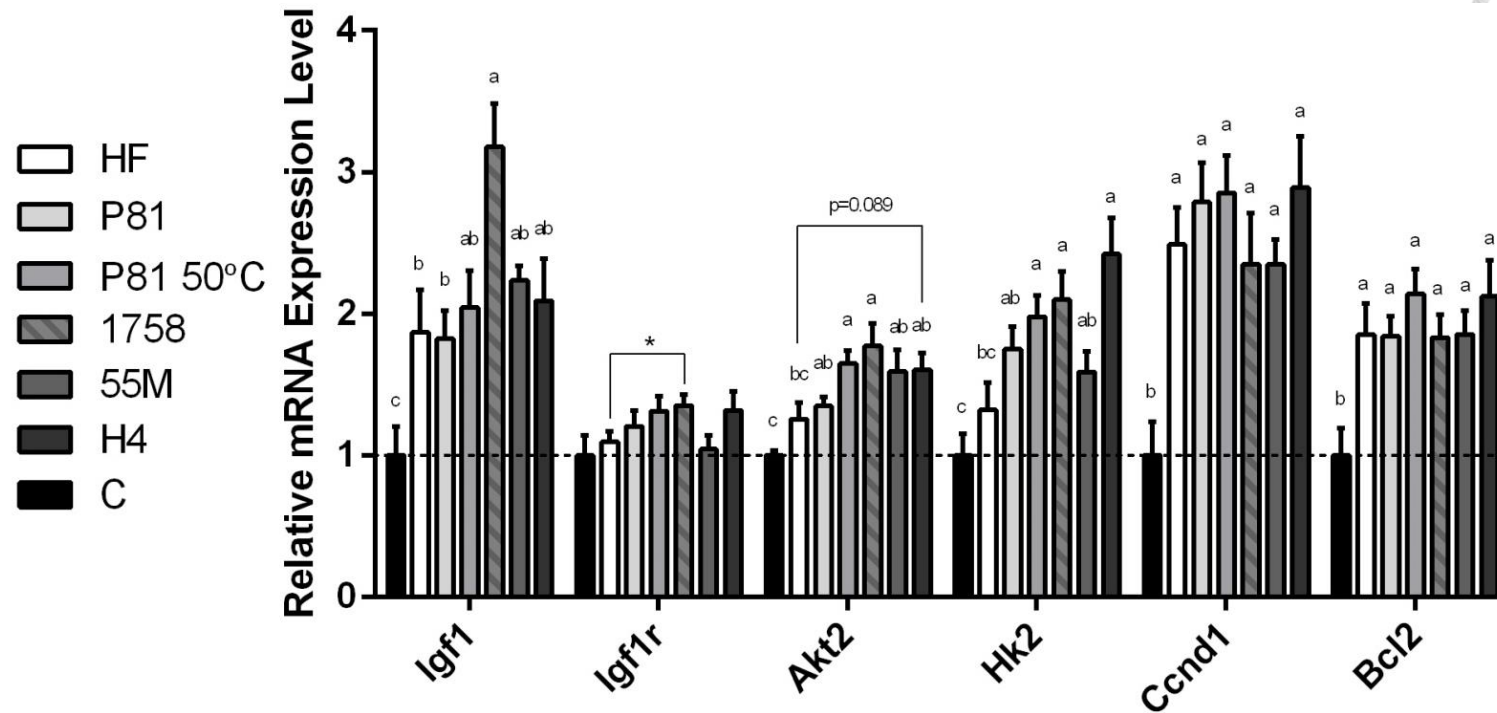


圖 3- 11. C57BL/6J 公鼠正式實驗滿四週之腓腸肌 IGF-1、IGF-1R、Akt 及下游調控路徑基因表現

Figure 3-11. The mRNA expression levels of genes related to IGF-1, IGF-1R, Akt and its downstream in gastrocnemius muscle of C57BL/6J mice fed test diet for 4 weeks.

The values represent mean \pm SEM (n=4-6/ group). The values represent mean \pm SEM (n=4-6/ group). Data were analyzed by one-way ANOVA, Duncan's multiple range test and Student's *t* test. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$). * denotes significant different from HF group ($p < 0.05$). *Igf1* : Insulin-like growth factor 1, *Igf1r* : Insulin-like growth factor 1 receptor, *Akt2* : AKT Serine/Threonine Kinase 2, *Hk2* : Hexokinase 2, *Ccnd1* : G1/S-specific cyclin D1, *Bcl2* : B-cell lymphoma 2.

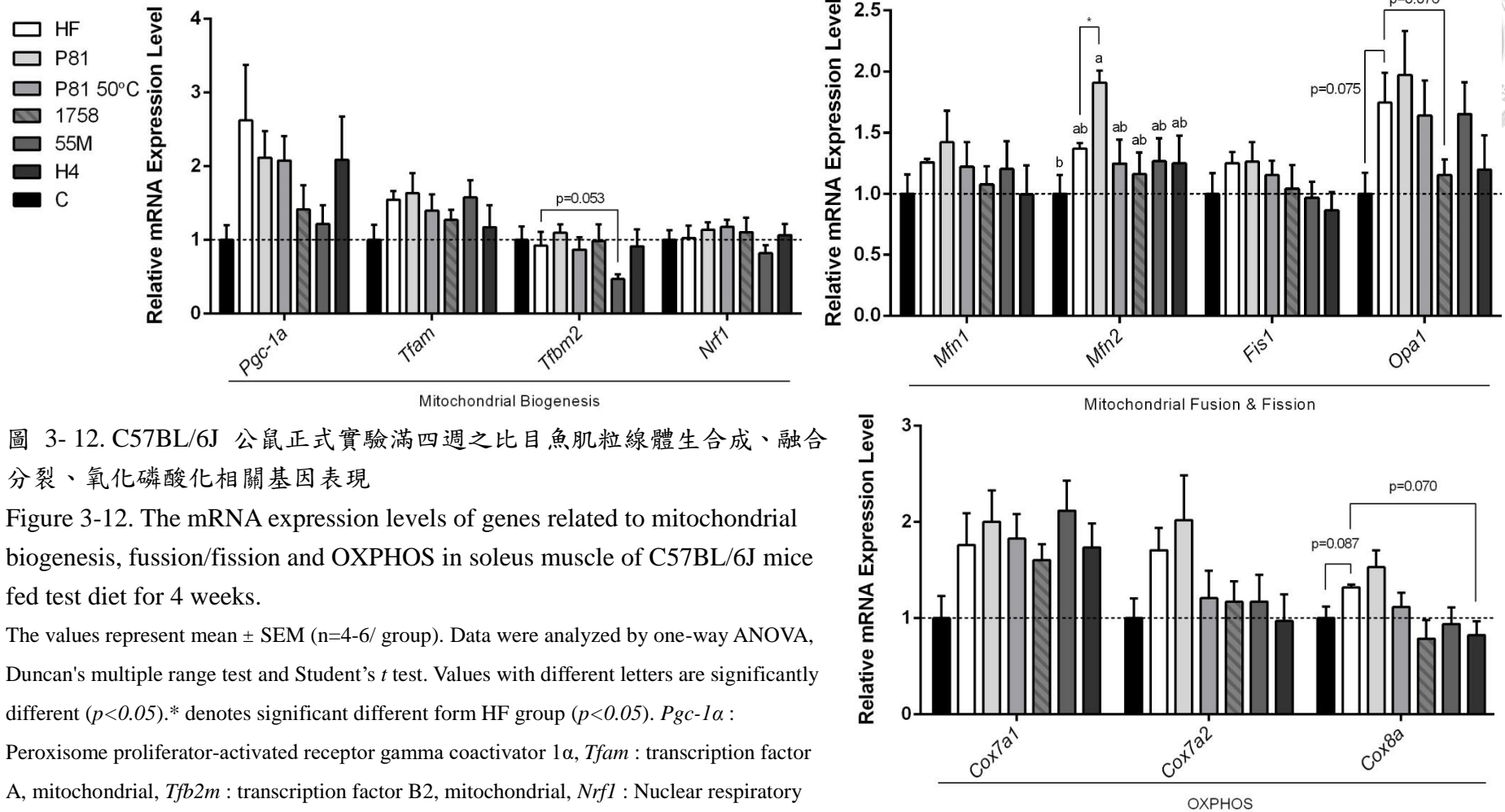


圖 3-12. C57BL/6J 公鼠正式實驗滿四週之比目魚肌粒線體生合成、融合分裂、氧化磷酸化相關基因表現

Figure 3-12. The mRNA expression levels of genes related to mitochondrial biogenesis, fusion/fission and OXPHOS in soleus muscle of C57BL/6J mice fed test diet for 4 weeks.

The values represent mean \pm SEM (n=4-6/ group). Data were analyzed by one-way ANOVA, Duncan's multiple range test and Student's *t* test. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$). * denotes significant different from HF group ($p < 0.05$). *Pgc-1a* :

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α , *Tfam* : transcription factor A, mitochondrial, *Tfbm2* : transcription factor B2, mitochondrial, *Nrf1* : Nuclear respiratory factor 1, *Mfn1* : Mitofusin 1, *Mfn2* : Mitofusin 2, *Fis1* : fission 1 (mitochondrial outer membrane) homolog (yeast), *Opa1* : Optic atrophy 1, *Cox7a1* : Cytochrome c, *Cox7a2* :

Cytochrome c oxidase subunit 7A2, *Cox8a* : Cytochrome c oxidase Subunit 8A.

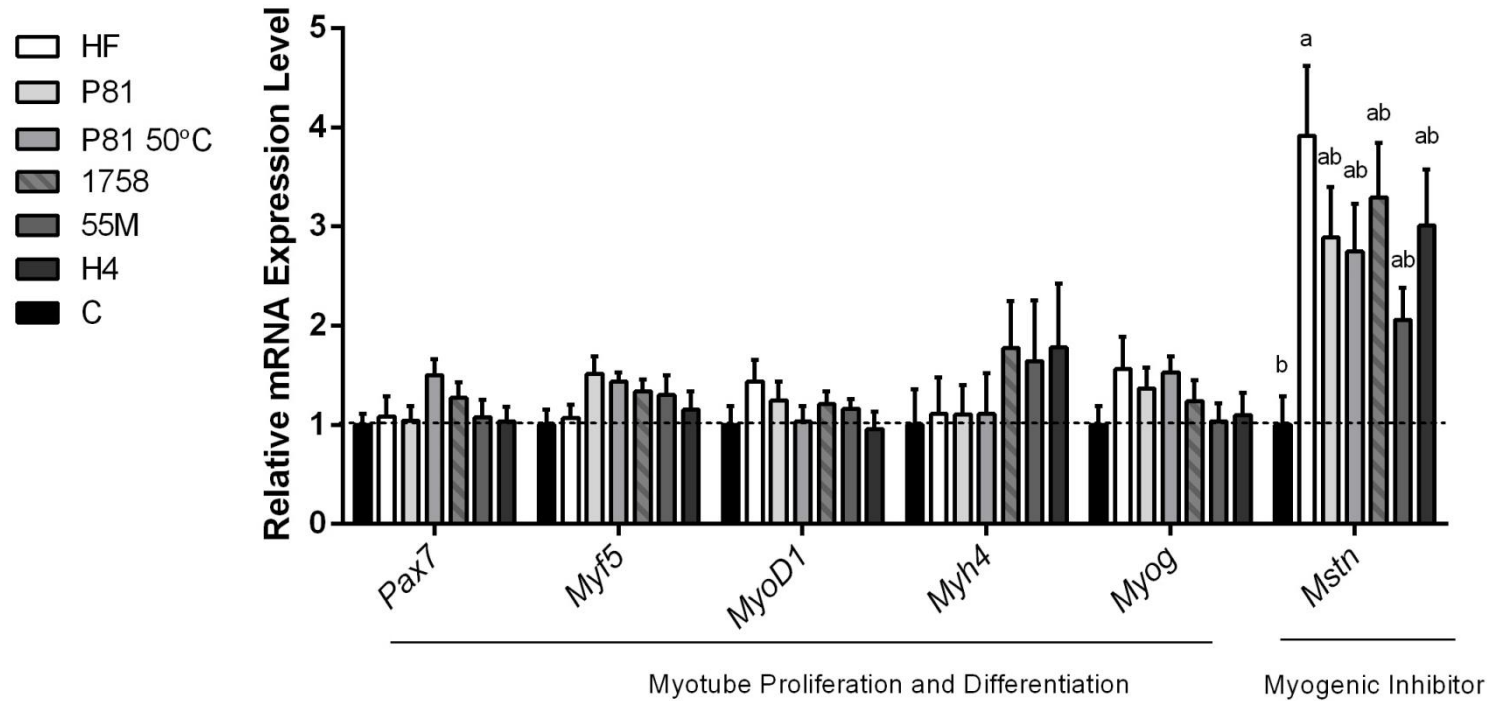


圖 3-13. C57BL/6J 公鼠正式實驗滿四週之比目魚肌肌肉增生、分化相關基因表現

Figure 3-13. The mRNA expression levels of genes related to muscle proliferation and differentiation in soleus muscle of C57BL/6J mice fed test diet for 4 weeks.

The values represent mean \pm SEM (n=4-6/ group). Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$). *Pax7* : Paired box 7, *Myf5* : Myogenic factor 5, *MyoD1* : Myogenic differentiation 1, *Myh4* : Myosin heavy chain 4, *Myog* : Myogenic factor 4, *Mstn* : Myostatin.

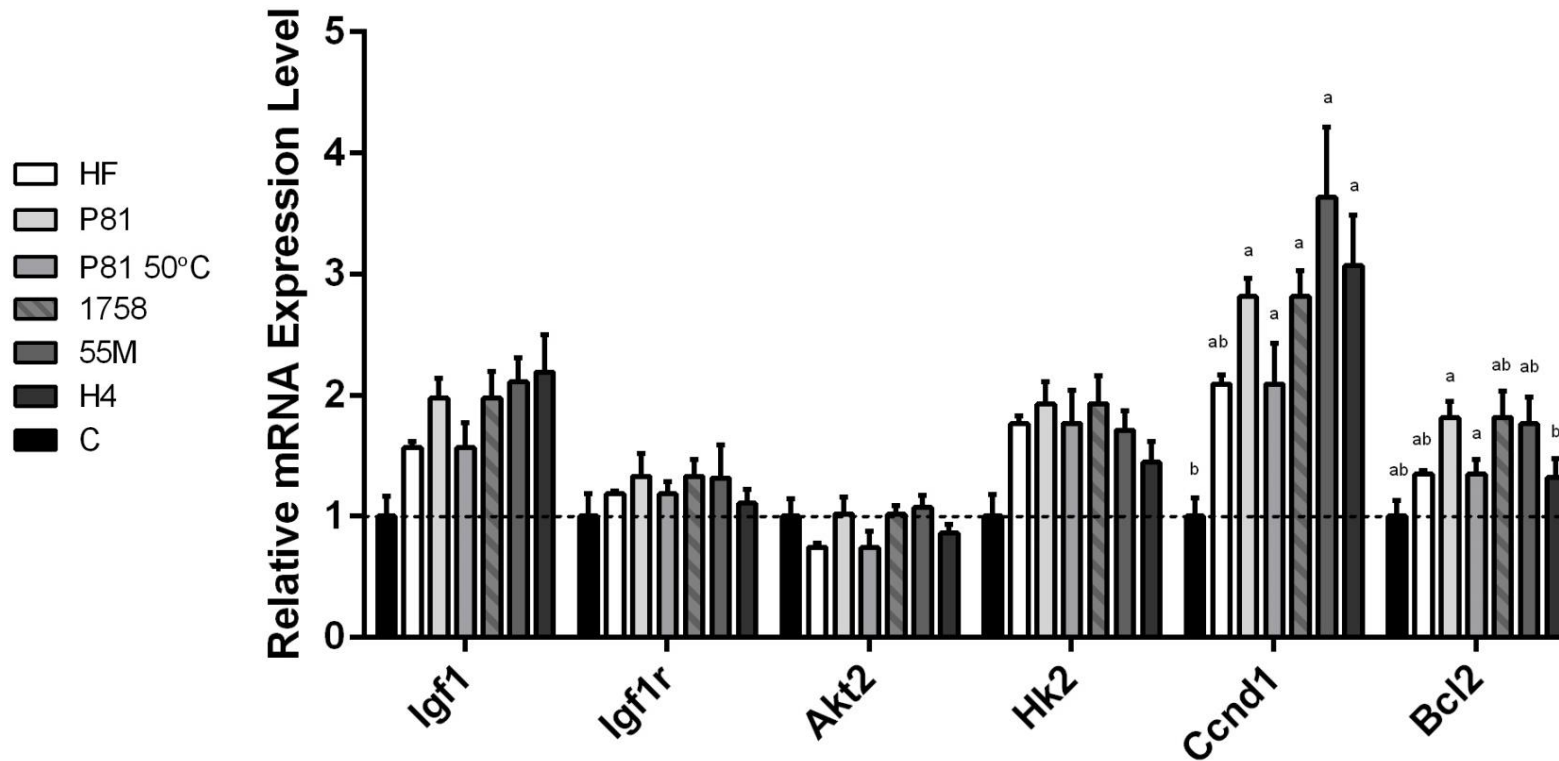


圖 3-14. C57BL/6J 公鼠正式實驗滿四週之比目魚肌 IGF-1、IGF-1R、Akt 及下游調控路徑基因表現

Figure 3-14. The mRNA expression levels of genes related to IGF-1, IGF-1R, Akt and its downstream in soleus muscle of C57BL/6J mice fed test diet for 4 weeks.

The values represent mean \pm SEM (n=4-6/ group). Data were analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$). *Igf1* : Insulin-like growth factor 1, *Igf1r* : Insulin-like growth factor 1 receptor, *Akt2* : AKT Serine/Threonine Kinase 2, *Hk2* : Hexokinase 2, *Ccnd1* : G1/S-specific cyclin D1, *Bcl2* : B-cell lymphoma 2.



第四節 討論

為了探討動物模式中不同品系山苦瓜減緩小鼠代謝異常之功效，本研究從各項細胞模式中挑選出 P81、P81 50°C (P81 經過 50°C 水解)、1758、55M 及 H4 五種山苦瓜品系，以其全果凍乾粉末添加在高脂飲食中餵食小鼠，並觀察各項代謝指標。其中，1758 品系能顯著促進 C2C12 myoblasts 細胞增生；P81 與 P81 50°C 品系抑制攝護腺癌細胞生長能力最佳 (實驗由劉又禎同學進行)；55M 品系在肝臟細胞中有良好表現 (實驗由聶良育同學進行)；H4 為實驗室過去使用於多項細胞與動物實驗之材料。因此，於動物模式中，分析山苦瓜各品系對於高脂飲食誘發肥胖小鼠之體重變化、血清生化指標、器官組織重量等影響，並於本研究中，進一步探討山苦瓜對於小鼠骨骼肌生長、代謝及功能之效用。

於實驗室過去研究中，將 C57BL/6J 小鼠用高脂飲食誘發肥胖 15 週後，再將 3% 或 5% H4 山苦瓜粉末添於高脂飼料中進行 20 週長期動物試驗，觀察山苦瓜在小鼠誘發肥胖後改善代謝異常的能力，結果顯示，5% H4 能有效減輕小鼠體重、改善血清生化指標等，而 3% H4 改善代謝異常能力則較輕微 (董又慈, 2016; 鄒尚瑀, 2016; 汪芝翎, unpublished data)。基於此等結果，本實驗嘗試進行短期動物試驗，觀察高脂飲食 4 週對於小鼠代謝異常之影響程度，並將山苦瓜粉末在實驗初始直接添於高脂飼料中，探討未先經過肥胖誘導的小鼠於高脂飲食中額外補充山苦瓜是否可以減緩代謝異常之情形，以及對於骨骼肌生長代謝之影響。

一、山苦瓜有助於減緩短期高脂飲食模式小鼠之代謝症候群指標

1. 體重變化情形、器官組織重量及血清生化分析

經過苦味適應一週進入正式實驗，除了 HF 組體重上升之外，苦瓜各組體重均無變化，C 組體重反而下降，原因可能為苦味造成不適感導致攝食量下降，以

及採血前禁食所致。隨著實驗持續進行，HF 組體重與苦瓜各組體重差距逐漸增加，並且從能量利用率即可看出差異不全是攝食量所貢獻。觀察小鼠在短期實驗期間體重變化情形，所有組別體重仍持續增加。由於正式實驗才 4 週，小鼠犧牲時才 11 週齡，因此體重仍有上升空間。比較實驗室過去長期動物試驗，高脂飲食小鼠體重可以穩定上升直到約 30 週才到達飽和狀態（董又慈, 2016；鄒尚瑀, 2016；汪芝翎, unpublished data)。顯示，在本研究短期試驗中，高脂飲食小鼠體重雖然在 4 週就可以顯著與 C 組達到差異，然而其肥胖程度還未十分嚴重。

於其他代謝指標中，我們亦觀察到短期餵食高脂飲食 4 週之小鼠，已經觀察到初步代謝異常情形，而補充各品系山苦瓜則能夠不同程度地減輕代謝異常。HF 組白色脂肪累積，腓腸肌與比目魚肌相對重量減少，血糖、血脂、血膽固醇與血清胰島素含量皆顯著高於 C 組，並且亦有胰島素抵抗情形（表 3-12)。許多研究顯示，當脂肪累積過多，脂肪組織中 M1 型巨噬細胞 (macrophage) 便會分泌 TNF- α ，導致組織慢性發炎，並促使多餘的游離脂肪酸釋放到血液，再進入肌肉中，活化 JNK、PKC 等 Ser/Thr kinase，並干擾 IRS 磷酸化，使胰島素訊息傳遞路徑受阻礙，同時也會抑制肌肉生長（圖 3-15) (Guilherme et al., 2008；Akhmedov & Berdeaux, 2013；Riera & Dillin, 2015)。本實驗給予山苦瓜補充後，白色脂肪組織堆積情形皆有效減緩、腓腸肌相對重量比起 HF 亦有所回復、血清生化指標大致亦有改善，各品系山苦瓜效果不盡相同。過去研究指出，苦瓜可以透過 PI3K/Akt 路徑或 AMPK 路徑來促進 GLUT 轉位到細胞膜上，增加骨骼肌對於葡萄糖的汲取，進而調節血糖 (Tan et al., 2008；Z. Q. Wang et al., 2011)，本研究亦觀察到山苦瓜可以減輕短期高脂飲食造成的血糖增高，並降低血清胰島素，改善胰島素抵抗，其中以 H4 品系效果最佳。大部分品系亦能降低血膽固醇，並有降低血脂的趨勢，而 H4 則是可以顯著降低血酯與血膽固醇，比起其他品系改善血清生化指標能力最好。綜合以上，山苦瓜對於短期 4 週高脂飲食試驗已經有明顯的效果。



2. 短期誘發肥胖模式與過去研究之比較

在短期實驗 4 週，HF 組已成功誘發肥胖，然而肥胖程度相較於過去實驗仍較輕微。在此比較本研究與實驗室過去中短期 8 週誘發肥胖動物試驗 (蔣汶龍, 2014; 穆偉傑, 2014)，以及長期動物試驗 (董又慈, 2016; 鄒尚瑀, 2016; 汪芝翎, unpublished data)，探討高脂飲食模式在不同時間誘發肥胖的情形，以及添加山苦瓜減輕或改善肥胖的效果 (表 3-13)。於中短期動物模式，實驗初始將 5% H4 山苦瓜粉末直接添於高脂飼料，並餵食小鼠 8 週犧牲，與本研究條件相似。於長期動物模式，小鼠先以高脂飲食誘發肥胖 15 週，再添 5% H4 山苦瓜粉末於高脂飼料中 20 週犧牲。由於先前實驗使用山苦瓜品系皆為 H4，因此本研究亦比較 4% H4 山苦瓜粉末直接添於高脂飼料，並餵食小鼠 4 週之結果。

本研究中，HF 組最終體重才 31.2 ± 3.6 g，低於 8 週誘導之 34.8 ± 2.8 g，甚至遠低於長期實驗 49.0 ± 2.7 g，體重增加量亦遠遠不及前述兩項研究，再者，無論是 EWAT、RWAT、IWAT 皆顯著較 C 組重，然而相較於前述兩項研究，脂肪重量占全身重量之百分比還是較少，顯示在肥胖的病程中算比較早期，並且症狀尚輕。添加山苦瓜後在三個研究皆可以顯著減輕體重，本研究山苦瓜組最終體重皆約比 HF 組少 14%，8 週中短期研究減少 11%，而長期研究則少約 18%。山苦瓜在本研究、中短期研究亦可減緩白色脂肪堆積的情形，然而在長期研究中則未能觀察到改善情形，可能由於脂肪累積更為嚴重，已超出苦瓜能改善的程度。本研究 HF 組最後測得血膽固醇值約為 171 mg/dL，4% H4 112 mg/dL (HF 組血膽固醇值之 65%)，在長期研究中，HF 組餵食高脂飲食近 35 週，血膽固醇已經超過 400 mg/dL，5% H4 組約 300 mg/dL (HF 組血膽固醇值之 77%)。再者，長期研究中，HF 組胰島素抗性指標將近 50，而本研究才約 20，雖有顯著高於 C 組，但顯然胰島素阻抗情形並不嚴重。長期研究中，5% H4 組胰島素抗性指標約 35 (HF 組胰島素抗性指標之 70%)，本研究 H4 組約 5 (HF 組胰島素抗性指標之 25%)。



以上顯示，在短期 4 週實驗中，雖然高脂飲食誘導肥胖的程度較輕，山苦瓜改善代謝異常的效果亦十分顯著。

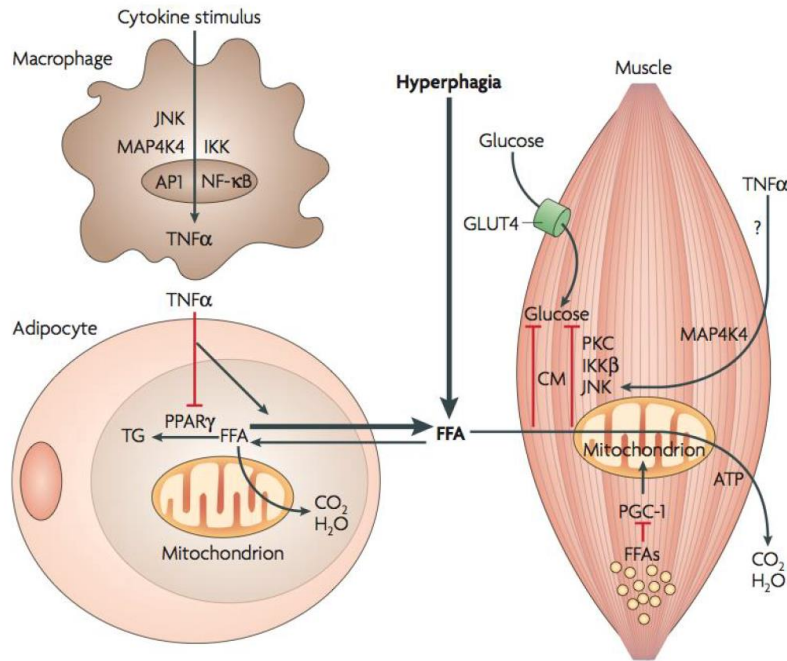


圖 3- 15. 脂肪組織慢性發炎導致肌肉組織胰島素阻抗

Figure 3-15. Chronic inflammation impairs triglyceride deposition in adipose tissue.

(Guilherme et al., 2008)



二、山苦瓜對於小鼠骨骼肌基因表現之影響

為了探討不同品系山苦瓜對於短期高脂飲食誘導肥胖模式小鼠骨骼肌之影響，本實驗分析小鼠後肢小腿骨骼肌腓腸肌與比目魚肌粒線體、肌肉生長以及 IGF-1/Insulin 路徑相關基因表現量。

1. 粒線體生合成、融合分裂與代謝

骨骼肌倚靠收縮與舒張進行運動，能量需求大，需要粒線體維持正常的功能不斷地產生能量，因此粒線體生合成、融合分裂及代謝需要受到嚴密的調控，才能讓骨骼肌維持生理活動。當熱量攝取過多，使粒線體過度負荷進行脂肪酸 β -oxidation，產生 ROS 累積氧化壓力並造成 mtDNA 斷裂、突變，最終導致粒線體不堪負荷而出現功能障礙 (Fariss et al., 2005)。5% H4 山苦瓜在過去長期動物研究中 (董又慈, 2016; 鄒尚瑀, 2016; 汪芝翎, unpublished data)，觀察到可以改善高脂飲食小鼠誘發之代謝異常，促進腓腸肌粒線體生合成 (*Pgc-1 α* 、*Tfam*、*Nrf1*)、融合分裂 (*Mfn1*、*Mfn2*、*Fis1*、*Opal*) 以及氧化磷酸化 (*Cox7a1*) 相關基因表現，以及比目魚肌粒線體生合成 (*Pgc-1 α* 、*Tfam*、*Nrf1*)、融合分裂 (*Fis1*) 以及氧化磷酸化 (*Cox7a1*) 相關基因表現。

然而，在本研究中，普遍並未觀察到山苦瓜對於小鼠骨骼肌粒線體相關基因表現有促進的情形。在 HF 組，腓腸肌部分粒線體基因表現比 C 組高，苦瓜組則一些粒線體基因表現比 HF 組低 (表 3-14)。這樣的結果可能的解釋為，在這短期 4 週實驗，HF 組因為攝取熱量較高，因此粒線體尚在增加負荷代謝脂肪酸的階段，腓腸肌參與氧化磷酸化的 *Cox7a1*、*Cox8a* 基因表現會較高，而苦瓜組因為代謝異常情況較為緩和，粒線體負荷相對較低，因此基因表現未明顯上調。在過去中短期 8 週實驗中，亦觀察到苦瓜組腓腸肌粒線體生合成、融合分裂基因表現並未比 HF 組高 (表 3-13) (蔣汶龍, 2014; 穆偉捷, 2014)，推測可能 8 週高脂飲



食誘發試驗尚不足以觀察到苦瓜對於粒線體功能基因的改善。本實驗顯示，在短期 4 週實驗，尚無法觀察到高脂飲食導致粒線體功能障礙的情況，以及補充苦瓜改善粒線體功能的現象。

2. 骨骼肌生長

骨骼肌在生長期間，或是受到損傷時，衛星細胞會活化成肌肉前驅細胞 (myoblast) 並表現 Pax7、MyoD 及 Myf5，進入細胞週期開始增生，並進一步進行分化。在分化早期，MyoD 及 Myf5 尚持續會表現，亦會表現 Myog，在分化晚期則會表現 Myh4，細胞互相融合成成熟的肌纖維 (Charge & Rudnicki, 2004)。肥胖者肌肉組織會累積脂肪酸及其代謝物，促使 TGF- β 家族成員 myostatin (Mstn) 表現並抑制 MyoD 與 myogenin 表現，抑制肌肉的增生與分化 (Akhmedov & Berdeaux, 2013)。同時，myostatin 亦被證實與胰島素阻抗呈現相關性，研究發現，將小鼠皮下注射 myostatin (15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) 7 天，會抑制小鼠腓腸肌 Akt 磷酸化表現，阻礙胰島素訊號 (Hittel et al., 2010)。

在本研究中，我們觀察到 HF 組小鼠比目魚肌 *Mstn* 表現顯著較 C 組高，腓腸肌 HF 組 *Mstn* 表現雖無顯著差但亦有上升 (表 3-14、表 3-15)。從相關性分析，我們觀察到 myostatin 的確與體重、血清胰島素呈現顯著正相關 ($p < 0.05$)，並與胰島素阻抗指標呈現趨勢正相關 ($p = 0.059$) (圖 3-16)。以上顯示，短期 4 週高脂飲食誘導致使體重增加，已經會造成小鼠骨骼肌活化 myostatin，並且可能進而抑制胰島素訊號，對於小鼠胰島素阻抗的情形有所貢獻。由於 HF 組 *Mstn* 表現較高，因此我們推論對於小鼠肌肉增生與分化指標會有抑制的影響。然而，小鼠腓腸肌 HF 組 *Pax7* 與 *MyoD1* 表現量卻是比 C 組還要高的，推測可能是因為高脂飲食誘導時間較短，尚未看出對於肌肉產生之負面影響，而這時由於熱量攝取較多，提供更多能量，促使肌肉進行合成性反應，反而造成肌肉生長。至於苦瓜組對於骨骼肌生長基因表現的影響，則並沒有很顯著。在 P81 50°C 組中，觀察

到腓腸肌 *Myf5* 表現顯著較 HF 組高，而在其餘品系雖然亦觀察到腓腸肌 *Pax7*、*Myf5*，比目魚肌 *Myf5*、*Myh4* 表現較 HF 組高，然而並沒有顯著差異。此外，由於本實驗模式並未誘導肌肉損傷，無法觀察到骨骼肌修復損傷的能力，這可能是為何本研究與先前研究不同，並未觀察到高脂飲食對於小鼠肌肉生長相關基因有所抑制，而山苦瓜對於肌肉生長的影響可能也因此較為侷限。

3. IGF-1、Akt 及下游調控路徑

肥胖者肌肉組織三酸甘油脂累積、促發炎因子增加，會導致 PI3K/Akt 路徑受到抑制，使胰島素及 IGF-1 訊息傳遞受到阻礙，一方面加劇胰島素阻抗，另一方面抑制肌肉生長 (Akhmedov & Berdeaux, 2013)。在本章實驗中，我們則觀察到餵食高脂飲食 4 週之小鼠，腓腸肌 *IGF-1*、*Ccnd1*、*Bcl2* 表現較 C 組高。*Cyclin D1* (G1/S-specific cyclin D1) 參與在細胞週期 G1 期，啟動 G1 到 S 期的轉變，而 IGF-1 會透過 PI3K/Akt/mTOR pathway 與 MAPK/Erk pathway 調控 *Cyclin D1* 的基因及蛋白質表現 (Baldin et al., 1993; Musgrove, 2006)。*Bcl-2* (B-cell lymphoma 2) 則是抑制細胞凋亡的蛋白質，其基因表現會受到 Akt 活化而上調 (Romashkova & Makarov, 1999)。HF 組 IGF-1 路徑蛋白質之基因表現較高，推測原因可能為餵食時間只有 4 週，對於肌肉的負面影響尚不明顯，而由於熱量攝取較多，反而表現更多 IGF-1 促使肌肉進行合成性反應，並促進細胞分裂生長。事實上，HF 組體重較重，腓腸肌絕對重量雖稍高於 C 組但無顯著差。

另外，高脂飲食補充山苦瓜則可以促進 IGF-1 及其下游傳遞路徑之基因表現。本研究結果顯示，1758 組可以上調 *IGF-1*、*Igf1r*、*Akt2*、*Hk2* 基因表現，P81 50°C 組能上調 *Akt2*、*Hk2* 基因表現，H4 組亦能上調 *Hk2* 基因表現。*Hexokinase 2* 是葡萄糖代謝的第一個酵素，可以將葡萄糖轉變為 glucose-6-phosphate，並且開啟糖解作用或肝醣儲存的步驟 (Berg et al., 2002)。多種山苦瓜可以促進骨骼肌 *Hexokinase 2* 表現，並且可以降低血清胰島素及血糖，暗示山苦瓜可以增進胰島

素敏感性。在過去研究亦發現苦瓜可以透過胰島素傳遞路徑來增加葡萄糖汲取。研究指出，在高脂飲食添加 1.2% 苦瓜水草物 12 週可以增加 C57BL/6J 小鼠股外側肌 (vastus lateralis) 胰島素傳遞路徑之 IR β 、IRS-2、GLUT4 蛋白質表現量及 IRS-1、Akt1、Akt2 蛋白質磷酸化表現量 (Z. Q. Wang et al., 2011)。而 1758 可以促進 IGF-1 及其下游傳遞路徑蛋白質之基因表現，亦暗示其具有藉由 IGF-1 調控骨骼肌生長、肥大的潛力，值得進一步在誘導肌肉損傷或肌肉萎縮的模式研究。

第五節 結論

在短期 4 週高脂飲食誘導肥胖小鼠模式中，我們觀察到補充 4% 山苦瓜全果凍乾粉可以降低小鼠體重、能量利用率、白色脂肪重量及胰島素阻抗情形，亦能增加腓腸肌重量。在血清生化指標中，所有品系山苦瓜皆可降低血清膽固醇，H4 品系能進一步降低血糖與血脂。在骨骼肌基因表現中，P81 品系可以上調比目魚肌粒線體動態基因 *Mfn2* 表現，P81 50°C 可以上調腓腸肌肌肉增生指標 *Myf5* 基因表現，1758 可以上調 IGF-1 及其下游傳遞路徑蛋白質之基因表現。綜合以上，山苦瓜可以改善短期高脂飲食導致之代謝異常，並有潛力可以透過 IGF-1 訊息傳遞路徑促進肌肉生長。

表 3-12. 各品系山苦瓜對小鼠生長情形、組織重量及血清生化值及整理表

Table 3-12. Effects of wild bitter gourd on growing, tissue weights and biochemical analysis of mice.

	HF vs. C	vs. HF				
		P81	P81 50°C	1758	55M	H4
Final body weight	↑	↓	↓	↓	↓	↓
Body weight gain	↑	↓	↓	↓	↓	↓
Energy efficiency	↑	↓	↓	↓	↓	↓
Relative adipose tissue weights						
EWAT	↑	↓	↓	↓	↓	↓
RWAT	↑	↓	↓	↓	↓	↓
IWAT	↑	↓	↓	↓	↓	↓
Relative muscle weights						
Gastrocnemius	↓	↑	↑	↑	↑	↑
Soleus	↓			(↑)		
Tibialis anterior						
Biochemical analysis (4 th week)						
Serum glucose	↑	(↓)	(↓)	(↓)	(↓)	↓
Serum insulin	↑	↓	(↓)	↓	↓	↓
HOMA-IR index	↑	↓	↓	↓	↓	↓
Serum triacylglycerol	↑	(↓)		(↓)	(↓)	↓
Serum cholesterol	↑	↓	↓	↓	↓	↓

EWAT : epididymal white adipose tissue, RWAT : retroperitoneal white adipose tissue, IWAT : inguinal white adipose tissue. Data were analyzed by one-way ANOVA and Student's *t* test. ↑/↓ means significant different between groups according to the result of one-way ANOVA and Student's *t* test ($p < 0.05$). (↑)/(↓) indicates $0.05 < p < 0.1$ according to the result of one-way ANOVA and Student's *t* test.

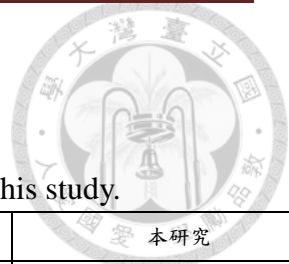


表 3-13. 本研究與過去研究結果比較

Table 3-13. Comparison between the results of previous studies and this study.

分析項目	蔣汶龍、穆偉傑 (2014)		董又慈、鄒上瑀、汪芝翎 (2016)		本研究			
餵食模式	5% BGP + HF 8 wk		HF 15 wk→5% BGP + HF 20 wk		4% BGP + HF 4 wk			
犧牲鼠齡	19 wk		44 wk		12 wk			
組別	HF 組	H4 (vs. HF)	HF 組(vs. C)	H4 (vs. HF)	HF 組(vs. C)	H4 (vs. HF)		
Final body weight (g)	34.8 ± 2.8	30.7 ± 2.4 ↓	49.0 ± 2.7 ↑	40.1 ± 3.5 ↓	31.2 ± 3.6 ↑	26.7 ± 1.5 ↓		
Body weight gain	10.0 ± 1.7	6.6 ± 2.0 ↓	10.6 ± 2.6 ↑	6.3 ± 1.7 ↓	7.3 ± 2.1 ↑	4.3 ± 1.7 ↓		
Energy efficiency	▪	↓	↑	↓	↑	↓		
Relative adipose tissue weights (%)								
EWAT	6.12 ± 1.73	3.73 ± 1.28 ↓	6.2 ± 0.2 ↑	6.2 ± 0.8 -	4.17 ± 0.88 ↑	2.13 ± 0.59 ↓		
RWAT	1.78 ± 0.82	1.14 ± 0.74 ↓	3.3 ± 0.2 ↑	2.7 ± 0.4 -	1.6 ± 0.48 ↑	0.63 ± 0.27 ↓		
IWAT	×	×	4.9 ± 0.7 ↑	3.8 ± 0.6 -	2.33 ± 0.47 ↑	1.12 ± 0.31 ↓		
Relative muscle weights								
Gastrocnemius	▪	-	↓	↑	↓	↑		
Soleus	×	×	-	-	↓	-		
Tibialis anterior	×	×	↓	↑	-	-		
Biochemical analysis								
Serum glucose	▪	6 wk ↓	11 wk ↑ 20 wk ↑	11 wk ↑ 20 wk -	4 wk ↑	4 wk ↓		
Serum insulin	▪	-	20 wk ↑	20 wk ↓	4 wk ↑	4 wk ↓		
Serum triacylglycerol	▪	6 wk ↓ 8 wk ↓	11 wk ↑ 20 wk ↑	11 wk - 20 wk -	4 wk ↑	4 wk ↓		
Serum cholesterol	▪	8 wk ↓	11 wk ↑ 20 wk ↑	11 wk ↓ 20 wk ↓	4 wk ↑	4 wk ↓		
Skeletal muscle mRNA expression level of genes related to mitochondria								
Muscle	Gas		Gas	Sol	Gas	Sol	Gas	Sol
<i>Pgc-1α</i>	▪	-	-	-	↑	↑	-	-
<i>Tfam</i>	▪	-	-	-	↑	↑	-	↓
<i>Nrf1</i>	▪	-	-	↓	↑	↑	-	-
<i>Mfn1</i>	▪	-	-	-	↑	-	-	-
<i>Mfn2</i>	▪	-	-	-	↑	-	-	-
<i>Fis1</i>	▪	-	-	-	↑	↑	-	↓

↑↓: 實驗組顯著高於或低於對照組 ($p < 0.05$), -: 兩者間沒有顯著差異, ×: 未分析, ▪: 沒有 C 組可以比較

表 3-14. 各品系山苦瓜對小鼠腓腸肌相關基因表現整理

Table 3-14. Effects of wild bitter gourd on the mRNA expression in gastrocnemius muscle of mice.

Gene	HF vs. C	vs. HF				
		P81	P81 50°C	1758	55M	H4
Mitochondria related gene						
<i>Pgc-1α</i>				(↓)	(↓)	
<i>Tfam</i>		(↓)	↓	(↓)	↓	↓
<i>Tfbm2</i>						
<i>Nrf1</i>		↓			↓	
<i>Mfn1</i>						(↓)
<i>Mfn2</i>						(↓)
<i>Fis1</i>	(↑)	(↓)	(↓)	↓	↓	↓
<i>Opa1</i>					(↓)	↓
<i>Cox7a1</i>	↑	(↓)				(↓)
<i>Cox7a2</i>	(↑)	(↓)	(↓)	(↓)	(↓)	↓
<i>Cox8a</i>	↑	(↓)	(↓)	(↓)	↓	↓
Proliferation and differentiation marker						
<i>Pax7</i>	↑					
<i>Myf5</i>	(↑)		↑	(↑)	(↑)	(↑)
<i>MyoD1</i>	↑					
<i>Myh4</i>						
<i>Myog</i>				(↓)		(↑)
<i>Mstn</i>						
IGF-1 and Akt downstream						
<i>IGF-1</i>	↑		(↑)	↑	(↑)	(↑)
<i>Igf1r</i>				↑		
<i>Akt2</i>	(↑)	(↑)	↑	↑	(↑)	(↑)
<i>Hk2</i>	(↑)	(↑)	↑	↑	(↑)	↑
<i>Ccnd1</i>	↑					
<i>Bcl2</i>	↑					

Data were analyzed by one-way ANOVA and Student's *t* test. ↑/↓ means significant different between groups according to the analysis of one-way ANOVA and Student's *t* test ($p < 0.05$). (↑)/(↓) indicates $0.05 < p < 0.1$ according to the result of one-way ANOVA and Student's *t* test.

表 3-15. 各品系山苦瓜對小鼠比目魚肌相關基因表現整理

Table 3-15. Effects of wild bitter gourd on the mRNA expression in soleus muscle of mice.

Gene	HF vs. C	vs. HF				
		P81	P81 50°C	1758	55M	H4
Mitochondria related gene						
<i>Pgc-1α</i>						
<i>Tfam</i>						
<i>Tfbm2</i>					(↓)	
<i>Nrf1</i>						
<i>Mfn1</i>						
<i>Mfn2</i>		↑				
<i>Fis1</i>						
<i>Opa1</i>	(↑)			(↓)		
<i>Cox7a1</i>						
<i>Cox7a2</i>						
<i>Cox8a</i>	(↑)					(↓)
Proliferation and differentiation marker						
<i>Pax7</i>						
<i>Myf5</i>						
<i>MyoD1</i>						
<i>Myh4</i>						
<i>Myog</i>						
<i>Mstn</i>	↑	(↓)	(↓)	(↓)	(↓)	(↓)
IGF-1 and Akt downstream						
<i>IGF-1</i>						
<i>Igf1r</i>						
<i>Akt2</i>						
<i>Hk2</i>						
<i>Ccnd1</i>	(↑)	(↑)	(↑)	(↑)	(↑)	(↑)
<i>Bcl2</i>		(↑)	(↑)			(↓)

Data were analyzed by one-way ANOVA and Student's *t* test. ↑/↓ means significant different between groups according to the analysis of one-way ANOVA and Student's *t* test ($p < 0.05$). (↑)/(↓) indicates $0.05 < p < 0.1$ according to the result of one-way ANOVA and Student's *t* test.

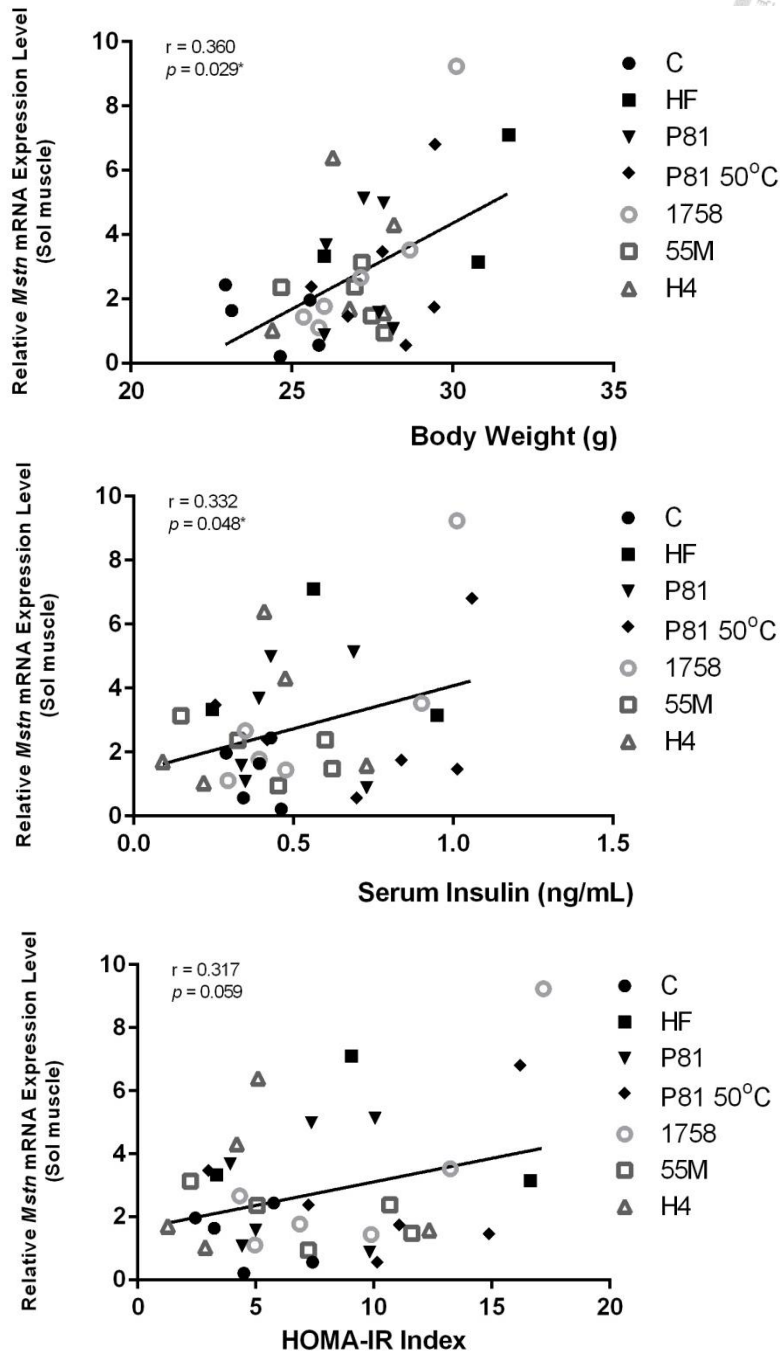
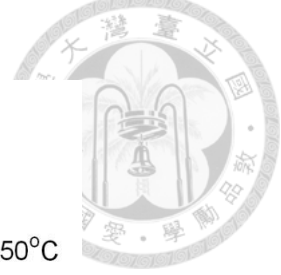


圖 3-16. C57/BL/6J 小鼠餵食實驗飼料 4 週後體重、血清胰島素、HOMA-IR Index 與比目魚肌 *Mstn* 基因表現之相關性

Figure 3-16. Correlation between body weights, serum insulin, HOMA-IR Index and soleus muscle *Mstn* relative mRNA expression of mice fed test diet for 4 weeks.

Data were analyzed by Pearson's Correlation.



第四章 綜合討論與總結論

第一節 綜合討論

隨著年紀上升，神經逐漸衰退、運動能力降低伴隨體內同化性賀爾蒙 IGF-1 分泌減少，可能使老年人肌肉重建與修復能力受損、肌肉蛋白質分解加劇，並有肌肉萎縮之風險 (Hall et al., 2011)。本研究欲探討山苦瓜是否可以促進肌肉生長並維持肌肉功能，期望能夠降低肌肉流失之可能性。

本研究細胞模式欲探討山苦瓜對於肌肉前驅細胞 myoblast 增生能力的影響，以及其可能調控機制。我們觀察到單獨處理山苦瓜乙酸乙酯萃取物 (EAE) 48 小時，1758 及 CKP55 EAE 可以增加 myoblast 細胞存活率 (MTT assay)，進一步進行細胞計數後，從結果可看出細胞數目並未受到影響，暗示山苦瓜單獨處理對於 myoblast 粒線體活性影響之可能性。於是，將 1758 EAE 單獨處理 myoblast 48 小時，粒線體功能指標 citrate synthase 活性的確有劑量效應增加，顯示有促進粒線體功能之效果。此外，將 1758 EAE 與 IGF-1 共同處理 myoblast 48 小時，細胞存活率 (MTT assay) 及細胞數目皆有劑量效應增加，顯示 1758 EAE 可以協助 IGF-1 促進 myoblast 增生。IGF-1 是調控肌肉生長的訊號，可由肌肉自行分泌，並啟動衛星細胞、調控 myoblast 增生與分化，並促進蛋白質合成 (Rommel et al., 2001)。本研究接下來探討可能參與的機制，因此給予 IGF-1 傳遞路徑 PI3K 之抑制劑 LY294002，抑制其下游 Akt 的磷酸化來阻斷 IGF-1 訊號。實驗結果可看出，隨著 LY294002 濃度提升，1758 EAE 幫助 IGF-1 促進 myoblast 增生的效果逐漸受到抑制。進一步以西方墨點法分析蛋白質表現量，結果顯示，1758 可以幫助 IGF-1 增加 Akt 磷酸化表現量。

接下來，本研究進行短期動物試驗，以高脂飲食誘發小鼠肥胖，並同時補充 4%

山苦瓜 4 週，欲探討山苦瓜對於骨骼肌生長與功能之影響。我們觀察到，山苦瓜補充有效改善高脂飲食小鼠之體重、脂肪堆積與血清胰島素等代謝異常指標，亦能增加腓腸肌重量。於腓腸肌中，我們亦觀察到 1758 品系山苦瓜可以上調 IGF-1、IGF-1R 及其下游路徑 Akt2、HK2 基因表現。在比目魚肌中，山苦瓜亦有上調細胞週期相關基因 Ccnd1 表現、下調肌肉生長抑制素 Mstn 基因表現的趨勢。以上結果顯示，1758 在動物模式中對於小鼠骨骼肌有正面影響。

在細胞模式，我們觀察到 1758 EAE 可以透過 PI3K/Akt 路徑協助 IGF-1 促進肌肉前驅細胞增生，暗示山苦瓜對於肌肉生長過程有所調控。在動物模式中，也觀察到 1758 可以上調 IGF-1 下游路徑蛋白質之基因表現。因此我們推測，1758 可能具有透過 IGF-1 路徑促進骨骼肌生長的潛力。由於 IGF-1 訊號活化可能伴隨著癌症發生的風險 (Chan et al., 1998)，故參考本實驗室劉又禎同學進行之研究《初探山苦瓜萃取物之雄性激素受體調節相關活性》，結果顯示，山苦瓜品系 P81 在經過 50°C 水解後，可以顯著抑制攝護腺癌細胞 LNCaP IGF-1 及 IGF-1R 基因表現。在與本研究同一批動物模式中，亦未觀察到山苦瓜有促進小鼠攝護腺 IGF-1 及 IGF-1R 基因表現的現象。綜合以上，山苦瓜非常可能具有組織專一性調控 IGF-1 路徑的能力，並能專一性透過活化骨骼肌 IGF-1 路徑促進肌肉生長。



第二節 總結論

本研究以細胞模式及動物模式探討山苦瓜對於肌肉生長與功能的影響。在細胞模式中，1758 品系山苦瓜乙酸乙酯萃取物能夠促進粒線體功能指標 citrate synthase 活性，同時亦能夠在 IGF-1 訊息傳遞路徑被啟動的情況下促進肌肉前驅細胞 myoblast 增生，並能增加 Akt 磷酸化表現。在動物模式中，1758 山苦瓜可以減緩高脂飲食誘發之代謝異常，上調腓腸肌 IGF-1 及其下游傳遞路徑 *IGF-1*、*Igf1r*、*Akt2*、*Hk2* 之基因表現，並增加腓腸肌相對重量。因此，1758 山苦瓜品系可能具有藉由 IGF-1 路徑調控肌肉生長的潛力，值得進一步研究探討。



第五章 參考文獻

- 呂侃霓 (2013)。以 C57BL/6J 小鼠模式研發血糖恆定調節之山苦瓜萃物。國立臺灣大學生化科技系博士論文。
- 林家暉 (2015)。初探山苦瓜萃取物對 L6 與 C2C12 肌肉細胞粒線體增殖與功能之影響。國立臺灣大學生化科技系碩士論文。
- 周怡君 (2010)。以脂肪與肌肉細胞模式評估山苦瓜水萃物暨其區分物對細胞汲取葡萄糖之影響與其機制探討。國立臺灣大學生化科技系碩士論文。
- 許珊菁 (2006)。鼠模式中高脂飲食、肥胖與脂質調控基因之表現。國立臺灣大學生化科技系博士論文。
- 董又慈 (2016)。山苦瓜改善高脂飲食誘發小鼠代謝異常,脂肪肝與肝相關基因 mRNA 表現。國立臺灣大學生化科技系碩士論文。
- 謝婉郁 (2005)。山苦瓜改善血糖血脂代謝異常之效應探討。國立臺灣大學生化科技系碩士論文。
- 蔣汶龍 (2014)。探討山苦瓜對飲食誘導肥胖模式小鼠骨骼肌粒線體增殖之影響。國立臺灣大學生化科技系碩士論文。
- 鄒尚瑀 (2016)。長期餵食山苦瓜對高脂飲食誘導肥胖小鼠代謝異常及白色脂肪組織褐化相關基因表現之效應。國立臺灣大學生化科技系碩士論文。
- 穆偉捷 (2014)。山苦瓜上調 C57BL/6J 公鼠肝 Fgf21 mRNA 並誘發副睪脂褐化。國立臺灣大學生化科技系碩士論文。
- Abmayr, S. M., & Pavlath, G. K. (2012). Myoblast fusion: lessons from flies and mice.



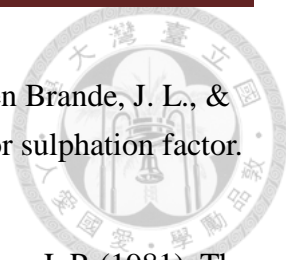
Development, 139(4), 641-656.

- Adams, G. R., Haddad, F., Bodell, P. W., Tran, P. D., & Baldwin, K. M. (2007). Combined isometric, concentric, and eccentric resistance exercise prevents unloading-induced muscle atrophy in rats. *J Appl Physiol* (1985), 103(5), 1644-1654.
- Akhmedov, D., & Berdeaux, R. (2013). The effects of obesity on skeletal muscle regeneration. *Frontiers in Physiology*, 4.
- Ali, L., Khan, A. K., Mamun, M. I., Mosihuzzaman, M., Nahar, N., Nur-e-Alam, M., et al. (1993). Studies on hypoglycemic effects of fruit pulp, seed, and whole plant of *Momordica charantia* on normal and diabetic model rats. *Planta Med*, 59(5), 408-412.
- Allen, D. L., Cleary, A. S., Speaker, K. J., Lindsay, S. F., Uyenishi, J., Reed, J. M., et al. (2008). Myostatin, activin receptor IIb, and follistatin-like-3 gene expression are altered in adipose tissue and skeletal muscle of obese mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 294(5), E918-E927.
- Allen, D. L., & Unterman, T. G. (2007). Regulation of myostatin expression and myoblast differentiation by FoxO and SMAD transcription factors. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 292(1), C188-C199.
- Angione, A. R., Jiang, C. H., Pan, D. N., Wang, Y. X., & Kuang, S. H. (2011). PPAR delta regulates satellite cell proliferation and skeletal muscle regeneration. *Skeletal Muscle*, 1.
- Augusto, V., Padovani, C. R., & Campos, G. R. (2004). Skeletal muscle fiber types in C57BL6J mice. *Braz J Morphol Sci*, 21(2), 89-94.
- Bakhtiari, N., Hosseinkhani, S., Tashakor, A., & Hemmati, R. (2015). Ursolic acid ameliorates aging-metabolic phenotype through promoting of skeletal muscle rejuvenation. *Medical Hypotheses*, 85(1), 1-6.
- Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M., Pagano, M., & Draetta, G. (1993). Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes & Development*, 7(5), 812-821.
- Barani, A. E., Durieux, A. C., Sabido, O., & Freyssenet, D. (2003). Age-related changes in the mitotic and metabolic characteristics of muscle-derived cells. *Journal of Applied Physiology*, 95(5), 2089-2098.



- Baserga, R., Peruzzi, F., & Reiss, K. (2003). The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int J Cancer*, 107(6), 873-877.
- Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2006). Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annual Review of Biochemistry*, 75, 19-37.
- Berg, J. M., Tymoczko, J., & Stryer, L. (2002). Glycolysis is an energy-conversion pathway in many organisms. *Biochemistry*. 5th ed. New York: WH Freeman.
- Bohr, V. A. (2002). Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(9), 804-812.
- Brack, A. S., Conboy, I. M., Conboy, M. J., Shen, J., & Rando, T. A. (2008). A temporal switch from Notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell Stem Cell*, 2(1), 50-59.
- Brault, J. J., Jespersen, J. G., & Goldberg, A. L. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha or 1beta overexpression inhibits muscle protein degradation, induction of ubiquitin ligases, and disuse atrophy. *J Biol Chem*, 285(25), 19460-19471.
- Brioche, T., Pagano, A. F., Py, G., & Chopard, A. (2016). Muscle wasting and aging: Experimental models, fatty infiltrations, and prevention. *Mol Aspects Med*, 50, 56-87.
- Brown, J. C., Harhay, M. O., & Harhay, M. N. (2016). Sarcopenia and mortality among a population-based sample of community-dwelling older adults. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 7(3), 290-298.
- Burd, N. A., Tang, J. E., Moore, D. R., & Phillips, S. M. (2009). Exercise training and protein metabolism: influences of contraction, protein intake, and sex-based differences. *Journal of Applied Physiology*, 106(5), 1692-1701.
- Calvani, R., Joseph, A. M., Adhietty, P. J., Miccheli, A., Bossola, M., Leeuwenburgh, C., et al. (2013). Mitochondrial pathways in sarcopenia of aging and disuse muscle atrophy. *Biological Chemistry*, 394(3), 393-414.
- Canto, C., Jiang, L. Q., Deshmukh, A. S., Matak, C., Coste, A., Lagouge, M., et al. (2010). Interdependence of AMPK and SIRT1 for Metabolic Adaptation to Fasting and Exercise in Skeletal Muscle. *Cell Metabolism*, 11(3), 213-219.

- Carlson, M. E., Hsu, M., & Conboy, I. M. (2016). Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells (vol 454 , pg 528, 2008). *Nature*, 538(7624).
- Chan, J. M., Stampfer, M. J., Giovannucci, E., Gann, P. H., Ma, J., Wilkinson, P., et al. (1998). Plasma insulin-like growth factor I and prostate cancer risk: A prospective study. *Science*, 279(5350), 563-566.
- Chang, C.-I., Chou, C.-H., Liao, M.-H., Chen, T.-M., Cheng, C.-H., Anggriani, R., et al. (2015). Bitter melon triterpenes work as insulin sensitizers and insulin substitutes in insulin-resistant cells. *Journal of Functional Foods*, 13, 214-224.
- Charge, S. B. P., & Rudnicki, M. A. (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological Reviews*, 84(1), 209-238.
- Chen, H. C., & Chan, D. C. (2005). Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Human Molecular Genetics*, 14, R283-R289.
- Chen, J.-C., Liu, W.-Q., Lu, L., Qiu, M.-H., Zheng, Y.-T., Yang, L.-M., et al. (2009). Kuguacins F–S, cucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia*. *Phytochemistry*, 70(1), 133-140.
- Chuang, C.-Y., Hsu, C., Chao, C.-Y., Wein, Y.-S., Kuo, Y.-H., & Huang, C.-j. (2006). Fractionation and identification of 9c, 11t, 13t-conjugated linolenic acid as an activator of PPAR α in bitter melon (*Momordica charantia* L.). *Journal of biomedical science*, 13(6), 763-772.
- Cohen, S., Nathan, J. A., & Goldberg, A. L. (2015). Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies. *Nat Rev Drug Discov*, 14(1), 58-74.
- Cooper, C., Dere, W., Evans, W., Kanis, J. A., Rizzoli, R., Sayer, A. A., et al. (2012). Frailty and sarcopenia: definitions and outcome parameters. *Osteoporosis International*, 23(7), 1839-1848.
- Cooper, J., Mann, V., & Schapira, A. (1992). Analyses of mitochondrial respiratory chain function and mitochondrial DNA deletion in human skeletal muscle: effect of ageing. *Journal of the neurological sciences*, 113(1), 91-98.
- Cruz-Jentoft, A. J., Baeyens, J. P., Bauer, J. M., Boirie, Y., Cederholm, T., Landi, F., et al. (2010). Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing*, 39(4), 412-423.

- 
- Daughaday, W. H., Hall, K., Raben, M. S., Salmon, W. D., Jr., van den Brande, J. L., & van Wyk, J. J. (1972). Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature*, 235(5333), 107.
- Defronzo, R. A., Jacot, E., Jequier, E., Maeder, E., Wahren, J., & Felber, J. P. (1981). The Effect of Insulin on the Disposal of Intravenous Glucose - Results from Indirect Calorimetry and Hepatic and Femoral Venous Catheterization. *Diabetes*, 30(12), 1000-1007.
- Dirks, A. J., Hofer, T., Marzetti, E., Pahor, M., & Leeuwenburgh, C. (2006). Mitochondrial DNA mutations, energy metabolism and apoptosis in aging muscle. *Ageing Research Reviews*, 5(2), 179-195.
- Dumon, N. A., Wang, Y. X., & Rudnicki, M. A. (2015). Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Development*, 142(9), 1572-1581.
- Enwere, E. K., LaCasse, E. C., Adam, N. J., & Korneluk, R. G. (2014). Role of the TWEAK-Fn14-cIAP1-NF-kappa B signaling axis in the regulation of myogenesis and muscle homeostasis. *Frontiers in Immunology*, 5.
- Fariss, M. W., Chan, C. B., Patel, M., Van Houten, B., & Orrenius, S. (2005). Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Molecular interventions*, 5(2), 94.
- Figueiredo, V. C., & Nader, G. A. (2012). Ursolic acid directly promotes protein accretion in myotubes but does not affect myoblast proliferation. *Cell biochemistry and function*, 30(5), 432-437.
- Finck, B. N., & Kelly, D. P. (2007). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. *Circulation*, 115(19), 2540-2548.
- Fu, X., Zhu, M. J., Zhang, S. M., Foretz, M., Viollet, B., & Du, M. (2016). Obesity Impairs Skeletal Muscle Regeneration Through Inhibition of AMPK. *Diabetes*, 65(1), 188-200.
- Gallagher, E., Fierz, Y., Ferguson, R., & LeRoith, D. (2010). The pathway from diabetes and obesity to cancer, on the route to targeted therapy. *Endocrine Practice*, 16(5), 864-873.
- Gaullier, J. M., Halse, J., Høye, K., Kristiansen, K., Fagertun, H., Vik, H., et al. (2004). Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(6), 1118-1125.

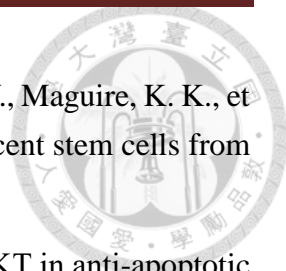
- Gerhart-Hines, Z., Rodgers, J. T., Bare, O., Kim, C. L. S. H., Kim, S. H., Mostoslavsky, R., et al. (2007). Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 alpha. *Embo Journal*, 26(7), 1913-1923.
- Gielen, S., Sandri, M., Kozarez, I., Kratzsch, J., Teupser, D., Thiery, J., et al. (2012). Exercise training attenuates MuRF-1 expression in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure independent of age: the randomized Leipzig Exercise Intervention in Chronic Heart Failure and Aging catabolism study. *Circulation*, 125(22), 2716-2727.
- Glass, D. J. (2005). Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(10), 1974-1984.
- Gonzalez-Franquesa, A., De Nigris, V., Lerin, C., Garcia-Roves, P. M., & Cseri, J. (2012). Skeletal muscle mitochondrial function/dysfunction and type 2 diabetes (pp. 257-292): InTech Croatia.
- Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V., & Czech, M. P. (2008). Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(5), 367-377.
- Hall, D. T., Ma, J. F., Di Marco, S., & Gallouzi, I. E. (2011). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in muscle wasting syndrome, sarcopenia, and cachexia. *Aging-Us*, 3(8), 702-715.
- He, W.-J., Chan, L. Y., Clark, R. J., Tang, J., Zeng, G.-Z., Franco, O. L., et al. (2013). Novel inhibitor cystine knot peptides from *Momordica charantia*. *PloS one*, 8(10), e75334.
- Hennessy, A. A., Ross, P. R., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2016). Sources and Bioactive Properties of Conjugated Dietary Fatty Acids. *Lipids*, 51(4), 377-397.
- Hennessy, A. A., Ross, R. P., Devery, R., & Stanton, C. (2011). The Health Promoting Properties of the Conjugated Isomers of alpha-Linolenic Acid. *Lipids*, 46(2), 105-119.
- Hirabara, S. M., de Sousa, L. G. O., Rodrigues, C. F., Martins, A. R., Neto, J. C. R., Rodrigues, A. C., et al. (2013). Skeletal muscle protein degradation induced by high-fat diet is decreased by macadamia oil supplementation: Role of E3 ubiquitin enzyme ligase MuRF-1 and atrogin-1. *Faseb Journal*, 27.
- Hittel, D. S., Axelson, M., Sarna, N., Shearer, J., Huffman, K. M., & Kraus, W. E. (2010).

- Myostatin Decreases with Aerobic Exercise and Associates with Insulin Resistance. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 42(11), 2023-2029.
- Holness, M. J., Kraus, A., Harris, R. A., & Sugden, M. C. (2000). Targeted upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK)-4 in slow-twitch skeletal muscle underlies the stable modification of the regulatory characteristics of PDK induced by high-fat feeding. *Diabetes*, 49(5), 775-781.
- Isaksson, O. G., Jansson, J. O., & Gause, I. A. (1982). Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science*, 216(4551), 1237-1239.
- Jager, S., Handschin, C., Pierre, J., & Spiegelman, B. M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(29), 12017-12022.
- Jang, Y., Sinha, M., Cerletti, M., Dall'Osso, C., & Wagers, A. (2011). *Skeletal muscle stem cells: effects of aging and metabolism on muscle regenerative function*. Paper presented at the Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology.
- Jones, N. C., Fedorov, Y. V., Rosenthal, R. S., & Olwin, B. B. (2001). ERK1/2 is required for myoblast proliferation but is dispensable for muscle gene expression and cell fusion. *Journal of Cellular Physiology*, 186(1), 104-115.
- Jornayvaz, F. R., & Shulman, G. I. (2010). Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays in Biochemistry: Mitochondrial Function*, 47, 69-84.
- Joseph, B., & Jini, D. (2013). Antidiabetic effects of *Momordica charantia* (bitter melon) and its medicinal potency. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3(2), 93-102.
- Kamphuis, M. M. J. W., Lejeune, M. P. G. M., Saris, W. H. M., & Westerterp-Plantenga, M. S. (2003). The effect of conjugated linoleic acid supplementation after weight loss on body weight regain, body composition, and resting metabolic rate in overweight subjects. *International Journal of Obesity*, 27(7), 840-847.
- Kelley, D. E., Goodpaster, B., Wing, R. R., & Simoneau, J. A. (1999). Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 277(6), E1130-E1141.
- Kelley, D. E., Goodpaster, B. H., & Storlien, L. (2002). Muscle triglyceride and insulin

- resistance. *Annual Review of Nutrition*, 22, 325-346.
- Kelly, D. P., & Scarpulla, R. C. (2004). Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes & Development*, 18(4), 357-368.
- Kubola, J., & Siriamornpun, S. (2008). Phenolic contents and antioxidant activities of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) leaf, stem and fruit fraction extracts in vitro. *Food Chemistry*, 110(4), 881-890.
- Kunkel, S. D., Elmore, C. J., Bongers, K. S., Ebert, S. M., Fox, D. K., Dyle, M. C., et al. (2012). Ursolic acid increases skeletal muscle and brown fat and decreases diet-induced obesity, glucose intolerance and fatty liver disease. *PLoS One*, 7(6), e39332.
- Kunkel, S. D., Suneja, M., Ebert, S. M., Bongers, K. S., Fox, D. K., Malmberg, S. E., et al. (2011). mRNA expression signatures of human skeletal muscle atrophy identify a natural compound that increases muscle mass. *Cell Metab*, 13(6), 627-638.
- Landi, F., Cruz-Jentoft, A. J., Liperoti, R., Russo, A., Giovannini, S., Tosato, M., et al. (2013). Sarcopenia and mortality risk in frail older persons aged 80 years and older: results from ilSIRENTE study. *Age Ageing*, 42(2), 203-209.
- Lee, D., & Goldberg, A. L. (2013). SIRT1 protein, by blocking the activities of transcription factors FoxO1 and FoxO3, inhibits muscle atrophy and promotes muscle growth. *J Biol Chem*, 288(42), 30515-30526.
- Liu, J.-Q., Chen, J.-C., Wang, C.-F., & Qiu, M.-H. (2009). New cucurbitane triterpenoids and steroidal glycoside from *Momordica charantia*. *Molecules*, 14(12), 4804-4813.
- Luquet, S., Lopez-Soriano, J., Holst, D., Fredenrich, A., Melki, J., Rassoulzadegan, M., et al. (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. *Faseb Journal*, 17(15), 2299-2301.
- Manabe, M., Takenaka, R., Nakasa, T., & Okinaka, O. (2003). Induction of anti-inflammatory responses by dietary *Momordica charantia* L. (bitter gourd). *Biosci Biotechnol Biochem*, 67(12), 2512-2517.
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., & Turner, R. C. (1985). Homeostasis Model Assessment - Insulin Resistance and Beta-Cell Function from Fasting Plasma-Glucose and Insulin Concentrations in Man. *Diabetologia*, 28(7), 412-419.



- Mullin, G. E. (2014). Nutrition supplements for athletes: potential application to malnutrition. *Nutr Clin Pract*, 29(1), 146-147.
- Musgrove, E. A. (2006). Cyclins: Roles in mitogenic signaling and oncogenic transformation. *Growth Factors*, 24(1), 13-19.
- Narita, M. (2010). Quality and quantity control of proteins in senescence. *Aging-Us*, 2(5), 311-314.
- Nerurkar, P. V., Pearson, L., Efird, J. T., Adeli, K., Theriault, A. G., & Nerurkar, V. R. (2005). Microsomal triglyceride transfer protein gene expression and ApoB secretion are inhibited by bitter melon in HepG2 cells. *J Nutr*, 135(4), 702-706.
- Patel, S., Patel, T., Parmar, K., Bhatt, Y., Patel, Y., & Patel, N. (2010). Isolation, characterization and antimicrobial activity of charantin from *Momordica charantia* linn. Fruit. *International Journal of Drug Development and Research*.
- Paul, A., & Raychaudhuri, S. S. (2010). Medicinal uses and molecular identification of two *Momordica charantia* varieties-a review. *Electronic Journal of Biology*, 6(2), 43-51.
- Peterson, J. M., Mannan, S. K., Bryner, R. W., Frisbee, J., & Alway, S. E. (2007). The effects of obesity and exercise on myogenic regulatory factors. *Faseb Journal*, 21(6), A830-A830.
- Rana, Z. A., Gundersen, K., & Buonanno, A. (2008). Activity-dependent repression of muscle genes by NFAT. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(15), 5921-5926.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey, G. C. (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. *Journal of Nutrition*, 123(11), 1939-1951.
- Riera, C. E., & Dillin, A. (2015). Tipping the metabolic scales towards increased longevity in mammals. *Nature Cell Biology*, 17(3), 196-203.
- Riserus, U., Berglund, L., & Vessby, B. (2001). Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomised controlled trial. *International Journal of Obesity*, 25(8), 1129-1135.

- 
- Rodgers, J. T., King, K. Y., Brett, J. O., Cromie, M. J., Charville, G. W., Maguire, K. K., et al. (2014). mTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from G(0) to G(Alert). *Nature*, *510*(7505), 393-+.
- Romashkova, J. A., & Makarov, S. S. (1999). NF- κ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*, *401*(6748), 86-90.
- Rommel, C., Bodine, S. C., Clarke, B. A., Rossman, R., Nunez, L., Stitt, T. N., et al. (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nature Cell Biology*, *3*(11), 1009-1013.
- Ryder, J. W., Portocarrero, C. P., Song, X. M., Cui, L., Yu, M., Combatsiaris, T., et al. (2001). Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid - Improved glucose tolerance, skeletal muscle insulin action, and UCP-2 gene expression. *Diabetes*, *50*(5), 1149-1157.
- Saltiel, A. R. (2001). New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of Type 2 diabetes. *Cell*, *104*(4), 517-529.
- Sandri, M., Lin, J., Handschin, C., Yang, W., Arany, Z. P., Lecker, S. H., et al. (2006). PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(44), 16260-16265.
- Schuler, M., Ali, F., Chambon, C., Duteil, D., Bornert, J. M., Tardivel, A., et al. (2006). PGC1 α expression is controlled in skeletal muscles by PPAR β , whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes. *Cell Metabolism*, *4*(5), 407-414.
- Shih, C. C., Lin, C. H., Lin, W. L., & Wu, J. B. (2009). Momordica charantia extract on insulin resistance and the skeletal muscle GLUT4 protein in fructose-fed rats. *J Ethnopharmacol*, *123*(1), 82-90.
- Slaaby, R., Schaffer, L., Lautrup-Larsen, I., Andersen, A. S., Shaw, A. C., Mathiasen, I. S., et al. (2006). Hybrid receptors formed by insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) have low insulin and high IGF-1 affinity irrespective of the IR splice variant. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(36), 25869-25874.
- Soubannier, V., & McBride, H. M. (2009). Positioning mitochondrial plasticity within

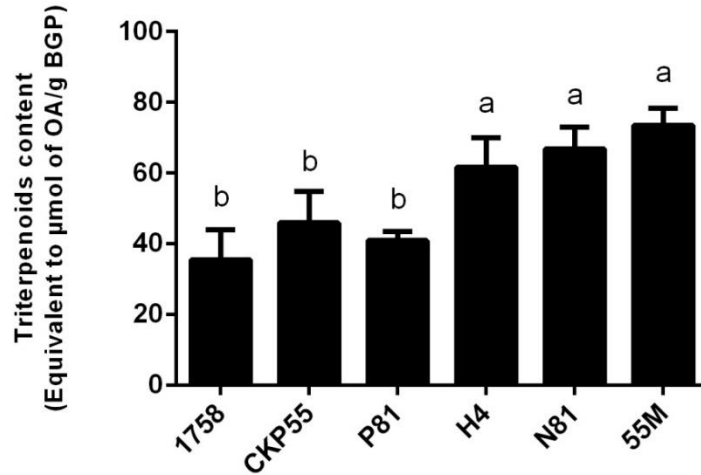
- cellular signaling cascades. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1793(1), 154-170.
- Spangenburg, E. E., & Booth, F. W. (2003). Molecular regulation of individual skeletal muscle fibre types. *Acta Physiologica Scandinavica*, 178(4), 413-424.
- Tan, M. J., Ye, J. M., Turner, N., Hohnen-Behrens, C., Ke, C. Q., Tang, C. P., et al. (2008). Antidiabetic activities of triterpenoids isolated from bitter melon associated with activation of the AMPK pathway. *Chem Biol*, 15(3), 263-273.
- Vaughan, R. A., Garcia-Smith, R., Bisoffi, M., Conn, C. A., & Trujillo, K. A. (2012). Conjugated linoleic acid or omega 3 fatty acids increase mitochondrial biosynthesis and metabolism in skeletal muscle cells. *Lipids in Health and Disease*, 11.
- Vroegrijk, I. O. C. M., van Diepen, J. A., van den Berg, S., Westbroek, I., Keizer, H., Gambelli, L., et al. (2011). Pomegranate seed oil, a rich source of punicic acid, prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 49(6), 1426-1430.
- Wagatsuma, A., & Sakuma, K. (2012). Molecular mechanisms for age-associated mitochondrial deficiency in skeletal muscle. *J Aging Res*, 2012, 768304.
- Wang, Y. X., Zhang, C. L., Yu, R. T., Cho, H. K., Nelson, M. C., Bayuga-Ocampo, C. R., et al. (2004). Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol*, 2(10), e294.
- Wang, Z. Q., Zhang, X. H., Yu, Y. M., Poulev, A., Ribnicky, D., Floyd, Z. E., et al. (2011). Bioactives from bitter melon enhance insulin signaling and modulate acyl carnitine content in skeletal muscle in high-fat diet-fed mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(11), 1064-1073.
- Yakar, S., Liu, J. L., Stannard, B., Butler, A., Accili, D., Sauer, B., et al. (1999). Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(13), 7324-7329.
- Yen, P. H., Dung, D. T., Nhiem, N. X., Anh, H. T., Hang, D., Yen, D., et al. (2014). Cucurbitane-type triterpene glycosides from the fruits of *Momordica charantia*. *Natural product communications*, 9(3), 383-386.
- Youle, R. J., & van der Bliek, A. M. (2012). Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science*, 337(6098), 1062-1065.

Zhao, J., Brault, J. J., Schild, A., Cao, P., Sandri, M., Schiaffino, S., et al. (2007). FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab*, 6(6), 472-483.



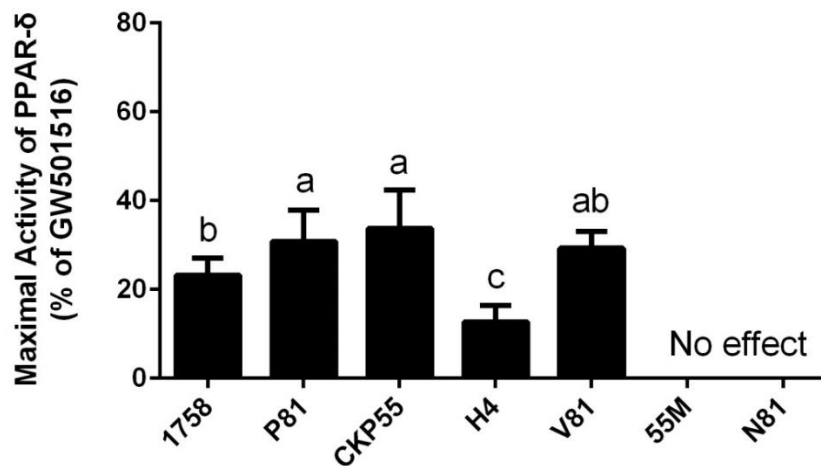


第六章 附錄



附錄圖 1. 各品系山苦瓜三萜類含量

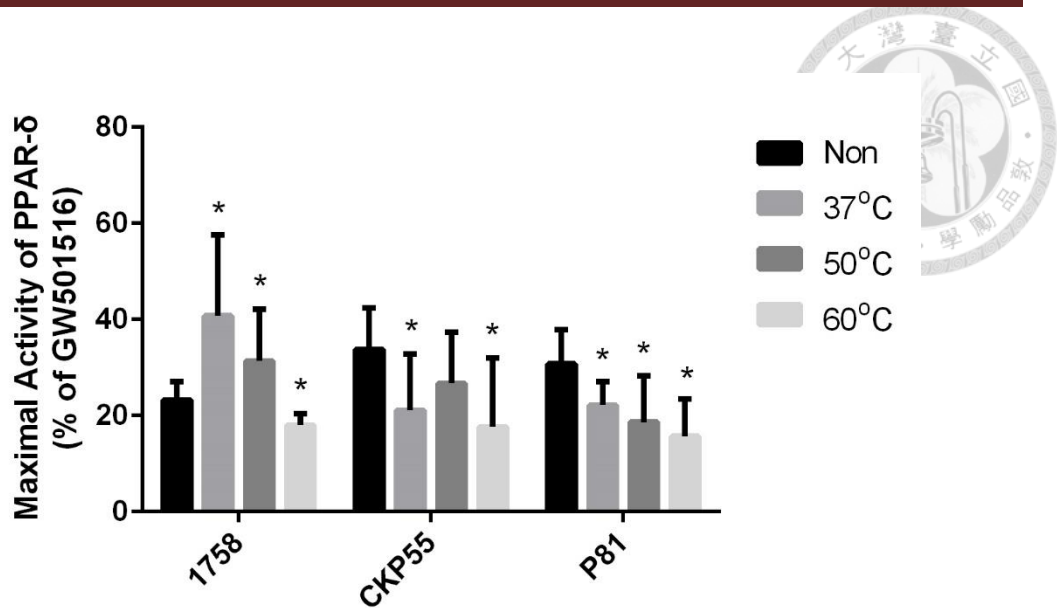
Appendix fig 1. Triterpenoids content of various cultivars of wild bitter melon (數據由聶良育同學提供)



附錄圖 2. 各品系山苦瓜乙酸乙酯萃取物活化 PPAR-δ 的轉錄活性

Appendix fig 2. Transactivation of PPAR-δ by various cultivars of wild bitter melon ethyl acetate extracts (數據由廖思齊同學提供)

The values represent the transactivation activity of maximum effective concentration (50 μg/mL). GW501516 (10 nM), a PPAR-δ agonist, is the positive control. Data were mean ± SD and were analyzed by one-way ANOVA ($p < 0.05$).



附錄圖 3. 未經水解處理與經 37°C、50°C 以及 60°C 水解之山苦瓜乙酸乙酯萃物活化 PPAR- δ 的轉錄活性

Appendix fig 3. Transactivation of PPAR- δ by hydrolyzed wild bitter gourd ethyl acetate extracts (數據由廖思齊同學提供)

The values represent the transactivation activity of maximum effective concentration (1758 EAE : 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1758 37°C EAE : 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1758 50°C EAE : 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1758 60°C EAE : 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CKP55 EAE : 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CKP55 37°C EAE : 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CKP55 50°C EAE : 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CKP55 60°C EAE : 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, P81 EAE : 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, P81 37°C EAE : 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, P81 50°C EAE : 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, P81 60°C EAE : 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). GW501516 (10 nM), a PPAR- δ agonist, is the positive control. Data were mean \pm SD and were analyzed by Student's *t* test. * ($p < 0.05$) denotes significant different from non-hydrolyzed EAE of the same cultivar.