

國立臺灣大學生命科學院微生物與生化學研究所

碩士論文

Institute of Microbiology and Biochemistry

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

數種食材萃物對脂肪或肌肉細胞葡萄糖攝取之影響  
The Effects of Several Food Extracts on Glucose Uptake  
in 3T3-L1 Adipocytes and C2C12 Myotubes

李天瑞

Tien-Jui Lee

指導教授：黃青真 博士

Advisor: Ching-Jang Huang, Ph.D.

中華民國 97 年 12 月

December, 2008

國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書

數種食材萃物對脂肪或肌肉細胞  
葡萄糖攝取之影響

The Effects of Several Food Extracts on Glucose Uptake  
in 3T3-L1 Adipocytes and C2C12 Myotubes

本論文係李天瑞君 (R95B47301) 在國立臺灣大學微生物與生化學研究所完成之碩士學位論文，於民國 97 年 12 月 24 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

黃青友 (簽名)  
(指導教授)

林麗鳳

吳文惠

吳亮宜

趙蓓敏

所長

潘子明 (簽名)

## 謝誌

回顧這八百多個日子，許多往事就如同昨日般歷歷在目。感謝三年前的同一時間，蘇慧敏老師、蕭寧馨老師、李昆達老師的肯定，讓我得以開啟嶄新的人生階段。三年後，也感激吳文惠老師、趙蓓敏老師與終於得以親見的吳亮宜老師撥冗指正論文並提供許多意見，為我碩士班生涯劃下珍貴句點。尤其謝謝林璧鳳老師不僅這一路上都沒有缺席，在數不清多少個一大清早，到達空盪盪的實驗室，您辦公室中點亮的燈光和飄散的咖啡香，給予我心靈莫大的溫暖與安慰。特別要感謝的則是一直鼓勵著我的黃青真老師，謝謝您自始至終的信任，即使在我都懷疑自己的當下，您還是放手讓我盡情的摸索，並適時的導引，從未有過責罵。這份信賴一直是支持我努力的動力，您的指教也總讓我覺得豁然開朗、受益良多，這一直是我認為幸運又幸福的事！

此外要謝謝生化組王愛玉老師、楊健志老師與張世宗老師與食科所周先生對於許多儀器與空間使用上的協助。以及張睿哲學長對於閃爍計數上的指教，謝毅霖學長的關心鼓勵，讓實驗得以順利進行。

營養實驗室學長姐、學弟妹們一路上總是給予我許多援助。謝謝美鈴學姐在我碩一上投下的震撼彈，之後總被我抓著問東問西的學了很多實驗技巧；瑋宜學姐對諸多觀念的提點讓我避掉許多錯誤。最後這半年多的時間多虧了亦臻學姐與徐璿學姐的照顧和指導，這本論文才能順利產生。也謝謝妙齡學姐、永瀚學長和育蟬學姐不論是實驗或生活上的諸多幫助。謝謝永如與懿寧從我們相識開始一直以來的關心照顧，總能在關鍵時刻伸出援手，有你們真的讓我無比心安。謝謝在細胞培養室一同打拼的思晴，有你在我的右手邊時間便不再那麼漫長。雖然是學妹的誠珠和婉貞卻會像姊姊一樣地給我打氣，讓人覺得好貼心；而活力充沛的婷妮總讓我感到開心喜悅，能幫到你很有成就感呢。此外也謝謝怡君帶來許多經驗，對我幫助甚多；智雄一直是我實驗上的好幫手，謝謝你帶給我許多線索與靈感；惟蒂則幫了我許多大大小小生活上的問題。

更謝謝與我從頭一起打拼的眾多伙伴們。謝謝佩諭總讓事情變得簡單，以後還有許多可愛的學弟妹，不要怕孤單；好像什麼都能迎刃而解的夢婷，你一直是我的標竿之一。謝謝我在碩士班交到的第一個新朋友，總是帶來歡笑的偲慈，謝

謝許多個夜深人靜有你陪伴，與我並肩作戰到最後；好幾次探頭進細胞培養室和放射線室問我有沒有在裡面昏倒的繼恆，你的細心讓我既驚訝又感動，別忘了大聽錄音帶的夜晚啊。謝謝泰均像哥哥般，和你聊天是件安心的事。更感謝政諺一路上的支持包容和諸多照顧，成為我有力的精神支柱，你一直是我努力的目標。

亦感謝過去即出現在我生命之中的諸多好友們，即使不在身邊，但你們的關心我一直感受得到，謝謝你們帶給我溫暖與力量。

最後要感謝的，是偉大的母親，因為您無微不至的照顧，我才能夠度過重重難關走到這裡。您的一句「不論你做什麼決定，我都支持你」真的讓我無以為報！

天瑞 2008 年歲末



## 中文摘要

現今罹患代謝症候群的人口日益增加，有鑑於藥物治療所難以避免的副作用，傳統中草藥或食材的替代療法與其有效成分漸受重視。山藥與苦瓜長久以來被視為具有降血糖、改善糖尿病的食材，且於許多動物與人體試驗中獲得證實，但對於其中有效成分及作用機制卻不完全明瞭。因此本研究以 C2C12 肌肉細胞與 3T3-L1 脂肪細胞株的葡萄糖攝取模式，在正常無胰島素抗性的情況與以 1 mM 棕櫚酸誘發胰島素抗性下，探討山藥乙酸乙酯萃物與苦瓜乙酸乙酯萃物與其中不皂化物、乙醇萃物、水萃物是否有改善胰島素抗性的效果。結果發現山藥乙酸乙酯萃物對正常肌肉細胞具有類似胰島素效應，對於基礎與胰島素刺激下葡萄糖攝取均有促進效果，但對脂肪細胞則無促進效果。而苦瓜不皂化物可增進脂肪細胞葡萄糖攝取，但對胰島素抗性無改善。苦瓜以水萃物最有潛力，12 小時處理下對於正常或有胰島素抗性的脂肪細胞，皆可隨劑量增進其葡萄糖攝取，卻會受熱破壞此一活性。此效果不會被 compound c 抑制，也無法完全被 wortmannin 所抑制，並不造成 AMPK 或 Akt 磷酸化增加。且苦瓜水萃物對長時間高胰島素所誘發的胰島素抗性沒有改善效果。而不同於先前研究的結果，發現 3kDa 以下小分子亦含有活性成分，顯示整體苦瓜水萃物改善胰島素抗性效應於低濃度時來自非蛋白質部分。針對於苦瓜水萃物發現的活性物質與其作用機制途徑值得進一步探討，具有改善胰島素抗性潛力。

**【關鍵字】** 胰島素抗性、苦瓜、山藥、脂肪細胞、肌肉細胞、葡萄糖



## Abstract

Metabolic syndrome and insulin resistance have become worldwide epidemiological issues. Dietary supplement and traditional medicines may be a natural source of for the development of the treatment to counteract insulin resistance in stead of those widely used agents with many side effects. Yam and bitter gourd are common vegetable and tonic foods in Asian and have been shown to exert hypoglycemic effects in animal models and humans, but the mechanism and active constituents are not totally understood. Here we measured  $^3\text{H}$ -labeled 2-deoxyglucose uptake by normal and pamitate-induced insulin resistance 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes, and evaluated whether various extracts from yam and bitter gourd could improve. It is found that yam EA extract showed an insulin-like pattern in myotubes but not in adipocytes. Bitter gourd water extract is the most active fraction that showed a promotion of glucose uptake in both normal or insulin resistant 3T3-L1 adipocytes in a dose-dependent manner. This activity is diminished by heating the extract at  $100^\circ\text{C}$  for 10 min. The activity was not inhibited by compound c but was partially inhibited by wortmannin. Neither AMPK phosphorylation nor Akt activation was changed. Interestingly, the water extract of bitter gourd could not improve the insulin resistance that induced by chronic insulin treatment. It has also been found that constituents with a MW less than 3 kDa were also active. The precise structure in bitter gourd water extract and mechanism of action of those active molecules are worth to be further examined. Bitter gourd thus has the potential for ameliorating insulin resistance.

**【Key word】** insulin resistance, bitter gourd, yam, adipocyte, myotube, glucose





## 總目錄

口試委員會審定書 .....	I
謝誌 .....	II
中文摘要 .....	IV
英文摘要 .....	VI
<b>第一章 緒論 .....</b>	<b>1</b>
<b>第一節 研究動機與目的 .....</b>	<b>1</b>
<b>第二節 文獻回顧 .....</b>	<b>2</b>
<b>一、代謝症候群 .....</b>	<b>2</b>
(一) 代謝症候群的定義 .....	2
(二) 我國代謝症候群的現狀 .....	2
<b>二、胰島素抗性 .....</b>	<b>4</b>
(一) 胰島素 .....	4
(二) 胰島素促進葡萄糖攝取的訊息傳遞路徑 .....	5
(三) 葡萄糖轉運子 .....	7
(四) AMPK (AMP-activating protein kinase) pathway .....	8
(五) 肌肉組織與胰島素抗性 .....	10
(六) 脂肪組織與胰島素抗性 .....	10
(七) 發炎反應 .....	13
<b>三、過氧化體增生劑活化受器 .....</b>	<b>15</b>
(一) PPAR 種類與作用機制 .....	15
(二) PPAR 與胰島素抗性 .....	15
<b>四、食材樣品 .....</b>	<b>17</b>

(一) 山藥 .....	17
(二) 苦瓜 .....	17
第三節 實驗假說與架構設計 .....	24
<b>第二章 數種食材萃物對脂肪細胞葡萄糖攝取之影響 .....</b>	<b>27</b>
第一節 前言 .....	27
第二節 材料與方法 .....	28
一、細胞株 .....	28
二、培養基與藥品試劑 .....	28
三、儀器設備 .....	29
四、實驗材料 .....	30
五、實驗方法 .....	31
六、數據整理與統計分析 .....	33
第三節 結果 .....	35
一、細胞模式之建立 .....	35
二、山藥乙酸乙酯萃物對已分化 3T3-L1 脂肪細胞葡萄糖攝取之影響 ....	35
三、2381 山苦瓜乙酸乙酯萃物對已分化 3T3-L1 脂肪細胞葡萄糖攝取 之影響 .....	36
四、2381 山苦瓜不皂化物對已分化 3T3-L1 脂肪細胞葡萄糖攝取之影響	36
五、2381 山苦瓜水萃物對已分化 3T3-L1 脂肪細胞葡萄糖攝取之影響 ...	37
六、CK 山苦瓜乙醇萃物對已分化 3T3-L1 脂肪細胞葡萄糖攝取之影響 ..	37
七、白苦瓜水萃物對已分化 3T3-L1 脂肪細胞葡萄糖攝取之影響 .....	38
第四節 討論 .....	47
第五節 結論 .....	50
<b>第三章 白苦瓜水萃物增進脂肪細胞葡萄糖攝取之探討 .....</b>	<b>51</b>
第一節 前言 .....	51

第二節 材料與方法 .....	52
一、細胞株 .....	52
二、培養基與藥品試劑 .....	52
三、儀器設備 .....	55
四、實驗材料 .....	56
五、實驗方法 .....	56
六、數據整理與統計分析 .....	58
第三節 結果 .....	59
一、白苦瓜水萃物無法改善高胰島素處理引起脂肪細胞之胰島素抗性 ..	59
二、白苦瓜水萃物加熱後減弱對脂肪細胞胰島素抗性的改善功效 .....	59
三、白苦瓜水萃物改善脂肪細胞胰島素抗性能力與胰島素訊息傳遞路徑 有關 .....	59
四、白苦瓜水萃物改善脂肪細胞胰島素抗性能力並非透過AMPK途徑 ..	60
五、白苦瓜水萃物小於3 kDa成分參與了部分改善胰島素抗性的角色 ...	60
第四節 討論 .....	69
第五節 結論 .....	72
<b>第四章 數種食材萃物對肌肉細胞葡萄糖攝取之影響 .....</b>	<b>73</b>
第一節 前言 .....	73
第二節 材料與方法 .....	74
一、細胞株 .....	74
二、培養基與藥品試劑 .....	74
三、儀器設備 .....	74
四、實驗材料 .....	74
五、實驗方法 .....	75
六、數據整理與統計分析 .....	76

第三節 結果 ..... 77

    一、細胞模式之建立 ..... 77

    二、山藥乙酸乙酯萃物對已分化 C2C12 肌肉細胞株葡萄糖攝取之影響 .. 77

    三、白苦瓜水萃物對已分化 C2C12 肌肉細胞株葡萄糖攝取之影響 ..... 78

第四節 討論 ..... 83

第五節 結論 ..... 86

**第五章 綜合討論與總結論 ..... 87**

    第一節 綜合討論 ..... 87

    第二節 總結論 ..... 92

**第六章 參考文獻 ..... 93**



## 圖目錄

圖 1-1	人類 proinsulin 胺基酸序列與物種同質性.....	5
圖 1-2	胰島素訊息傳遞路徑 .....	6
圖 1-3	GLUT4 的結構特徵 .....	7
圖 1-4	細胞調控 GLUT4 轉位的主要途徑 .....	8
圖 1-5	肌肉細胞粒線體功能低下造成胰島素抗性的可能機制 .....	9
圖 1-6	肥胖、發炎反應與胰島素抗性 .....	11
圖 1-7	脂肪酸誘發胰島素抗性機制 .....	14
圖 1-8	PPAR 與藥物改善胰島素抗性的作用機制 .....	16
圖 1-9	實驗架構 .....	25
圖 2-1	已分化 3T3-L1 脂肪細胞葡萄糖攝取之時間反應曲線 .....	39
圖 2-2	不同濃度胰島素處理對已分化 3T3-L1 脂肪細胞葡萄糖攝取效應 .....	40
圖 2-3	山藥乙酸乙酯萃物對已分化脂肪細胞葡萄糖攝取之影響 .....	41
圖 2-4	2381 品系山苦瓜乙酸乙酯萃物對已分化脂肪細胞葡萄糖攝取之影響 .....	42
圖 2-5	2381 品系山苦瓜不皂化物對已分化脂肪細胞葡萄糖攝取之影響 .....	43
圖 2-6	2381 品系山苦瓜水萃物對已分化脂肪細胞葡萄糖攝取之影響 .....	44
圖 2-7	CK 品系山苦瓜乙醇萃物對已分化脂肪細胞葡萄糖攝取之影響 .....	45
圖 2-8	白苦瓜水萃物對已分化脂肪細胞葡萄糖攝取之影響 .....	46
圖 3-1	白苦瓜水萃物對長時間胰島素處理產生胰島素抗性的脂肪細胞葡萄糖 攝取之影響 .....	61
圖 3-2	加熱後白苦瓜水萃物對具胰島素抗性的脂肪細胞葡萄糖攝取之影響 .....	62
圖 3-3	白苦瓜水萃物對具胰島素抗性的脂肪細胞胰島素訊息傳遞路徑之影響..	63
圖 3-4	白苦瓜水萃物對具胰島素抗性的脂肪細胞 Akt 磷酸化之影響 .....	64
圖 3-5	白苦瓜水萃物對具胰島素抗性的脂肪細胞 AMPK 訊息傳遞路徑之影響..	65

圖 3-6	白苦瓜水萃物對具胰島素抗性的脂肪細胞 AMPK 磷酸化之影響 .....	66
圖 3-7	白苦瓜水萃物小分子物質 (<3 kDa) 對具胰島素抗性的脂肪細胞葡萄糖攝取之影響 .....	67
圖 3-8	白苦瓜水萃物與當中小分子物質 (<3 kDa) 對具胰島素抗性的脂肪細胞葡萄糖攝取之比較 .....	68
圖 4-1	C2C12 肌肉細胞株分化情形 .....	79
圖 4-2	不同濃度胰島素處理對已分化 C2C12 肌肉細胞葡萄糖攝取效應 .....	80
圖 4-3	山藥乙酸乙酯萃物對已分化肌肉細胞葡萄糖攝取之影響 .....	81
圖 4-4	白苦瓜水萃物對已分化肌肉細胞葡萄糖攝取之影響 .....	82



## 表目錄

表 1-1	代謝症候群診斷標準 .....	3
表 1-2	我國 2006 年修訂代謝症候群判定標準 .....	4
表 1-3	Adipokines 的作用與葡萄糖恆定 .....	12
表 1-4	PPAR 分類及其分佈與功能 .....	15
表 1-5	山藥降血糖相關文獻整理 .....	18
表 1-6	苦瓜對脂肪與肌肉細胞相關文獻整理 .....	20
表 3-1	數種誘發胰島素抗性模式的可能途徑 .....	69
表 4-1	C2C12 與 L6 肌肉細胞株比較 .....	84
表 5-1	食材萃物對脂肪與肌肉細胞葡萄糖攝取之影響總整理 .....	91







# 第一章 緒論

## 第一節 研究動機與目的

自九〇年代起，人們開始注意到確診為糖尿病患者人數急遽成長。根據統計，2003年世界上已有一億九千四百萬人受糖尿病所苦，且估計至2025年將會人數會高達三億以上 (Erkelens, 2001; Petersen and Shulman, 2006)。其中第二型糖尿病患者會伴隨著罹患心血管疾病風險的增加，這也是第二型糖尿病患者的主要致命原因。胰島素抗性 (insulin resistance) 被視為兩者之間的重要關鍵因子，超過90%的第二型糖尿病患者會出現嚴重的胰島素抗性 (Reaven, 2008)。因此，許多胰島素增敏劑 (insulin-sensitizing agents) 的相關研究應運而生，目前主要使用藥物之主要作用目標是針對 PPARs (peroxisome proliferator-activating receptors) 或是 AMPK (AMP-activated protein kinase) 這兩種機制所研發出的 TZDs (thiazolidinedione) 與 biguanides 類藥物，但都具有其副作用 (Moller, 2001)。而以傳統中草藥作為替代或輔助藥物，或進一步做為藥品開發的來源的可能，逐漸為人們所重視。

苦瓜 (*Momordica charantia*) 與山藥 (*Dioscorea* spp.) 為許多亞洲國家常見的蔬菜與養生食材之一。前者在許多動物模式與人體試驗中均有良好的降血糖、改善胰島素抗性的效果 (Grover and Yadav, 2004)，而後者則多著重在動物實驗，發現其對於正常與糖尿病大鼠的血糖調節均有所助益。但對於當中有效成分與作用機制卻少有深入探討。因此本研究建立脂肪與肌肉細胞葡萄糖攝取之實驗模式，探討這兩種食材樣品對細胞葡萄糖利用之影響，評估在無胰島素抗性之正常狀況與有胰島素抗性下是否可達到增進細胞葡萄糖利用的效果，以供進一步分析當中可能有效成分或作用機制。

## 第二節 文獻回顧

### 一、代謝症候群 (metabolic syndrome)

#### (一) 代謝症候群的定義

早在西元前，人們就已經發現到肥胖、痛風、中風與過度飲食之間，有著密切的關係 (張天鈞, 1994)。到了二十世紀，逐漸有許多科學研究指出過量的攝取食物、運動缺乏、基因遺傳與社會文化等因素，會導致肥胖，尤其是中廣型肥胖，會增加罹患痛風、高血脂、高血壓與第二型糖尿病，並且進一步演變為心血管疾病，導致動脈粥狀硬化的發生 (DeFronzo and Ferrannini, 1991; Vague, 1956)。1988年，Reaven 首先提出胰島素抗性是代謝症候群的主要致命原因，其他尚包含高胰島素血症、葡萄糖不耐症、血漿三酸甘油酯增加、高密度脂蛋白膽固醇下降與高血壓等因子，並在當時將代謝症候群命名為 syndrome X (Reaven, 1988)。

1999年，世界衛生組織 (WHO) 公布了糖尿病的分類指標，也同時對代謝症候群 (metabolic syndrome) 做出定義，現今世界各組織對於代謝症候群的臨床定義與診斷標準略有不同，但都包含了造成代謝症候群的主要因子 (表 1-1)。總括來說，代謝症候群可以視為造成心血管疾病發生率與死亡率的多因子總稱 (Day, 2007)。

#### (二) 我國代謝症候群現況

以行政院衛生署在 1995 年所公布的國人十大死因當中有五項疾病與代謝症候群關係密切，其中包含了：腦血管 9.5%、心臟病 9.3%、糖尿病 7.6%、慢性腎病 3.5%、高血壓 1.4%，加總起來高達 31.3%，已超過多年位居第一的惡性腫瘤 (26.8%)。因此，我國已於 2007 年 1 月公布並實施最新定義的代謝症候群判定標準 (表 1-2)。而根據 2002 年針對 20-79 歲共 7566 位國人三高 (高血脂、高血糖、高血壓) 的統計，台灣民眾腹部肥胖盛行率約 30.2%，高三酸甘油酯血症為 27.6%，低高密度脂蛋白膽固醇為 23.8%，高血壓為 29.9%，葡萄糖不耐症則為

表 1-1. 代謝症候群診斷標準

Table 1-1. Diagnostic criteria for the metabolic syndrome (modified from Day, 2007)

components	WHO	EGIR	NCEP (ATP III)	AACE	IDF	AHA/NHLBI
IFG (FPG) or	≥ 6.1	≥ 6.1	≥ 5.6	≥ 6.1	≥ 5.6 or Rx	≥ 5.6 or Rx
IGT (2h PG) (mmol/L)	≥ 7.8 or NIDDM			≥ 7.8 not NIDDM		
Waist (cm) or WHR	WHR > 0.9/ 0.85*	≥ 94/ 80	> 102/ 88		≥ 94/ 80**	> 120/ 88**
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	> 30			> 25		
BP (mmHg)	≥ 140/90	≥ 140/90	≥ 130/85	≥ 130/85	≥ 130/85 or Rx	≥ 130/85 or Rx
TG (mmol/L)	≥ 1.7	> 2.0	≥ 1.7	≥ 1.7	≥ 1.7 or Rx	≥ 1.7 or Rx
HDL-C (mmol/L)	< 0.9/ 1.0	< 1.0	< 1.04/ 1.29	< 1.04/ 1.29	≤ 1.03/ 1.29 or Rx	≤ 0.9/ 1.1 or Rx
Number of components for diagnosis	IR or IFG or IGT plus ≥ 2 others from: central obesity (using WHR +/- or BMI), ↑BP, dyslipidaemia (↑ TG +/- ↓HDL-C) or microalbuminuria	IR plus ≥ 2 others from: central obesity (waist circumference), IFG, ↑BP, dyslipidaemia (↑ TG +/- ↓HDL-C)	≥ 3 of the components above	Diagnosis depends on clinical judgement based on risk factors/features of insulin resistance	Central obesity (waist circumference) plus 2 other components. Waist circumference defined for different ethnic groups	≥ 3 of the components above

\*Italics: values in females; \*\*In Europids

**Abbreviations:** WHO = World Health Organization; EGIR = European Group for the Study of Insulin Resistance; NCEP (ATP III) = National Cholesterol Education Program (Adult Treatment Panel III); AACE = Association of American Clinical Endocrinologists; IDF = International Diabetes Federation; AHA/NHLBI = American Heart Association/ National Heart, Lung and Blood Institute; IFG = impaired fasting glucose; FPG = fasting plasma glucose; IGT = impaired glucose tolerance; PG = plasma glucose; WHR = waist: hip ratio; BMI = body mass index; BP = blood pressure; TG = triglycerides; HDL-C = high-density lipoprotein cholesterol; IR = insulin resistance; Rx = receiving treatment

表 1-2. 我國 2006 年修訂代謝症候群判定標準

Table 1-2. Diagnostic criteria for the metabolic syndrome in Taiwan

危 險 因 子	異 常 值
以下 5 項危險因子中，若包含 3 項或以上者，即可判定為代謝症候群	
腹部肥胖 (central obesity)	腰圍 (waist): 男性 $\geq 90$ cm 女性 $\geq 80$ cm
血壓 (BP) 上升	SBP $\geq 130$ mmHg DBP $\geq 85$ mmHg
高密度脂蛋白膽固醇 (HDL-C) 過低	男性 $< 40$ mg/dl 女性 $< 50$ mg/dl
空腹血糖值 (fasting glucose) 上升	FG $\geq 100$ mg/dl
三酸甘油酯 (triglyceride) 上升	TG $\geq 150$ mg/dl

註：其中血壓(BP)、空腹血糖值(FG)等 2 危險因子之判定，包括依醫師處方使用降血壓或降血糖等藥品(中、草藥除外)，導致血壓或血糖檢驗值正常者。

10.6%。以目前代謝症候群修正後判斷標準，總罹患率約為 16.4%，而若加以性別區分，男性盛行率為 16.9%，女性為 13.8%，並且罹患的比率隨年齡增加而上升 (行政院衛生署)。

## 二、胰島素抗性 (insulin resistance)

### (一) 胰島素 (insulin)

胰島素是維持血糖正常、組織發育與生長有關的重要賀爾蒙。它是由胰臟蘭氏小島 (islets of Langerhans) 當中的  $\beta$ -cell 所分泌，經由轉錄轉譯出的 proinsulin 必須經過適當折疊，兩端的 A-chain 與 B-chain 以雙硫鍵相鍵結，再經由 prohormone convertase (PC1 與 PC2) 的剪切，去除 C-chain 與 N 端、C 端的部分序列，才成為以 51 個胺基酸所組成，分子量為 5808 Da 具有生物活性的胰島素分子。在脊椎動物中，不同物種間胰島素的同質性相當高 (圖 1-1)，即使是某些魚類的胰島素也可

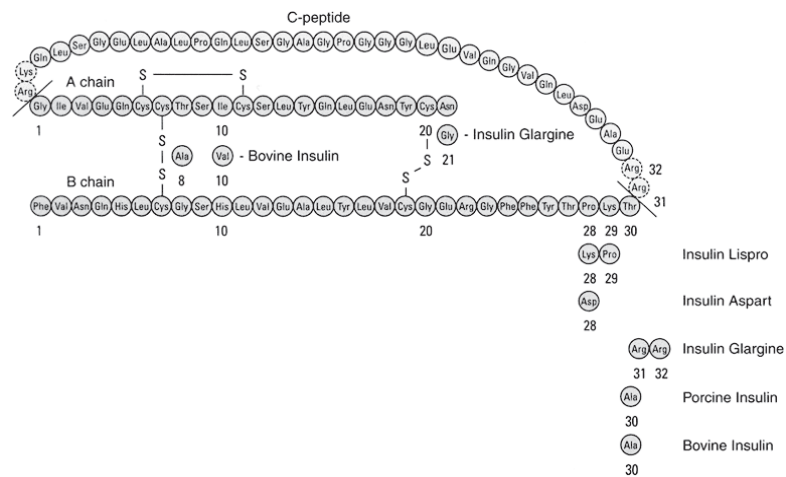


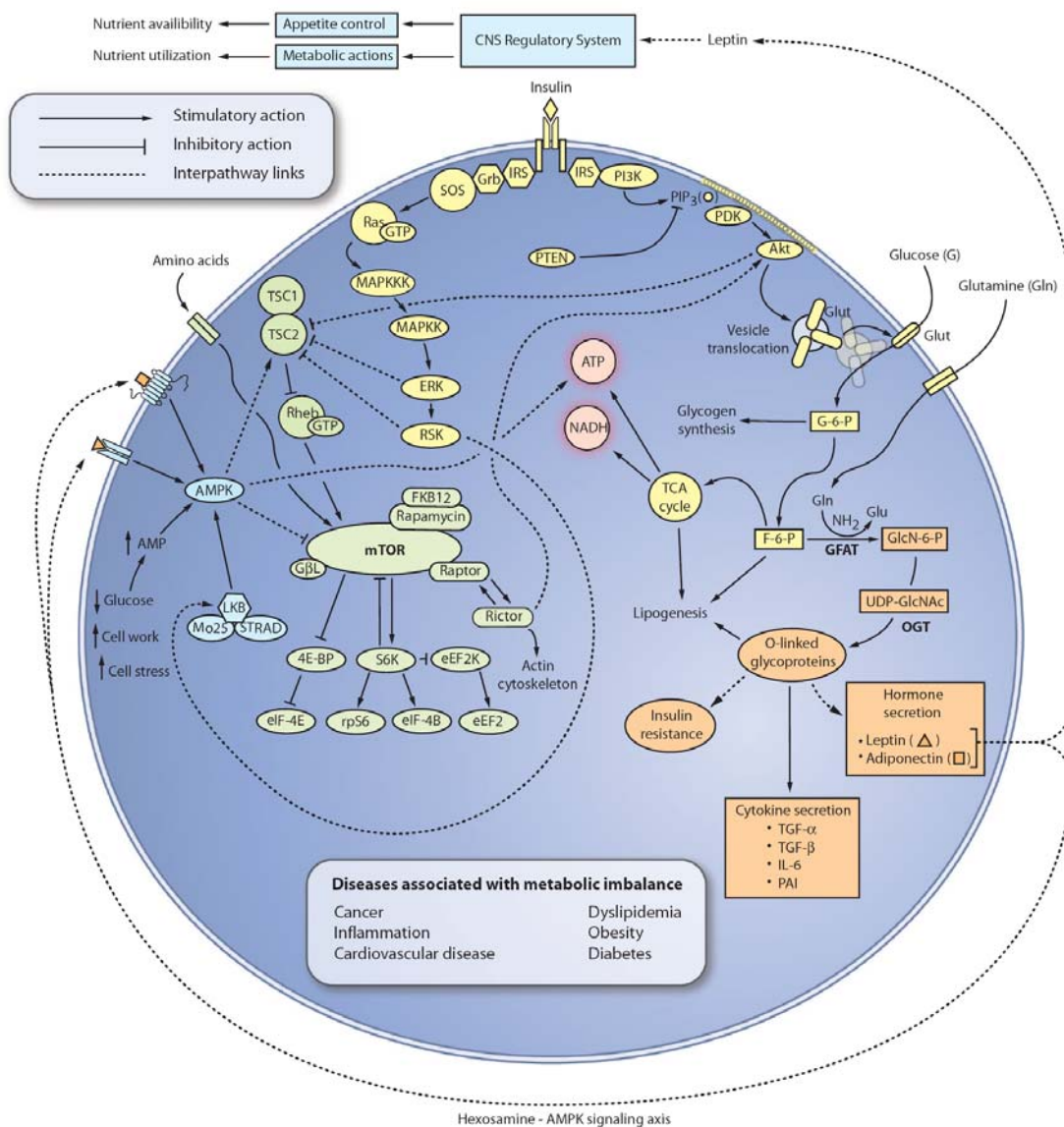
圖 1-1. 人類 proinsulin 胺基酸序列與物種同質性 (Tofade and Liles, 2004)

Figure 1-1. Amino acid sequences and homology of proinsulin in human.

在人體中發揮作用，這種演化上的高保守性顯示了胰島素對於生物體基本代謝的過程扮演了十分重要的角色。

## (二) 胰島素促進葡萄糖攝取的訊息傳遞路徑 (圖 1-2)

胰島素最主要的功能便是促進細胞葡萄糖的攝取，主要標的組織包含肝臟、肌肉與脂肪，這些組織能夠攝取葡萄糖並加以利用或儲存。細胞表面佈有以 dimer 形式存在的胰島素受器 (insulin receptor)，當胰島素與受器結合，使受器  $\beta$  次體 C 端的 tyrosin 自我磷酸化 (autophosphorylation)，並磷酸化下游的 IRS (insulin receptor substrate)。IRS1 與 IRS2 是胰島素調控葡萄糖恆定最主要的兩種，在肌肉與脂肪組織以前者為主，而肝臟則是兩種同時存在並互補 (Thirone et al., 2006)。此時 tyrosine 被磷酸化的活化型 IRS 又可以活化 PI3K (Phosphatidylinositol-3-kinase)，使 PI3K 分解為 PIP2 (Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate) 及 PIP3 (Phosphatidylinositol 3, 4, 5-tiphosphate)，後者將與 PDK1 結合，繼續使得下游的 Akt (或稱 PKB, protein kinase B) 及 PKC $\zeta$  得以活化。因而促使 GLUT4 (glucose transporter 4) 轉位至細胞膜上，細胞得以攝取葡萄糖 (White and Kahn, 1994)。



**Fig. 1.** Model of nutrient- and hormone-signaling pathways. The AMPK pathway (blue) senses diminished ATP levels and restores ATP concentration by phosphorylating downstream targets that stimulate catabolic pathways generating ATP and inhibit anabolic pathways that consume ATP. The mTOR-GbL-raptor (mTORC1) pathway (green) senses amino acid availability and functions to regulate cell proliferation and the growth of cells, tissues, and organs. The mTORC1 pathway enhances the rate of protein synthesis, inhibits autophagy, and stimulates ribosomal biogenesis. The mTOR-GbL-riCTOR (mTORC2) pathway regulates actin organization and activates Akt. The hexosamine pathway (orange) functions as a glucose sensor coupled to a transductional cascade that directly regulates intracellular fuel metabolism, controls glucose metabolism by modulating insulin signaling, and facilitates the release of metabolic hormones (such as leptin and adiponectin) from adipose tissue. In the central nervous system (CNS), leptin acts to influence appetite and modulate neuroendocrine secretion, thereby altering nutrient utilization in various peripheral tissues. In muscle and liver, leptin and adiponectin influence fuel metabolism. The insulin pathway (yellow) regulates glucose and lipid metabolism, facilitates cell growth and proliferation, promotes cell survival through inhibition of apoptosis, and protects cells from oxidative stress and DNA damage. The insulin pathway also modulates the actions of various nutrient-signaling pathways. Interpathway reactions are shown by dotted lines and illustrate that these four pathways comprise a metabolic regulatory network.

圖 1-2. 胰島素訊息傳遞路徑 (Marshall, 2006)

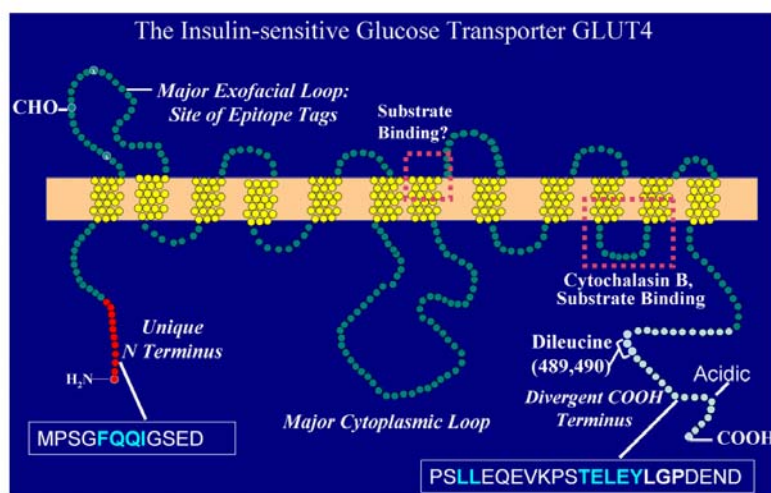
Figure 1-2. Insulin signaling pathway



### (三) 葡萄糖轉運子 (glucose transporter)

目前已知人體的葡萄糖轉運子家族中有 13 個成員，其共同的特徵便是均跨越細胞膜 12 次，且序列的 N 端與 C 端均位於細胞質內。依照序列的同質性與結構的相似度，可以分為三個次群：第一群包含 GLUT1-4，主要作用為葡萄糖的運輸，最受人廣泛討論；第二群包含 GLUT5, 7, 9, 11，主要負責果糖的運輸；第三個次群則是 GLUT6, 8, 10 和 HMIT1，他們並非典型的 GLUT 家族成員，目前對此次群的瞭解仍舊甚少 (Bryant et al., 2002)。

第一次群當中 GLUT1-3 主要是負責細胞基礎狀態的葡萄糖攝取，且是持續表現的，GLUT4 則是唯一能受胰島素刺激而增加細胞葡萄糖攝取的轉運子。GLUT4 在身體中以脂肪組織與骨骼肌的表現量最高，但以個別組織來看，肌肉組織中主要負責糖類運輸的轉運子是 GLUT1, 5, 12 (Stuart et al., 2000; Stuart et al., 2006)，而脂肪組織則為 GLUT8, 12 與 HMIT (Wood et al., 2003; Wood and Trayhurn, 2003)。GLUT4 平時在胰島素傳遞途徑沒有活化的情況下，處於細胞質內，直到胰島素或有其他刺激才被輸送至細胞膜上 (Czech and Corvera, 1999)。



**Figure 1. Structural Features of the Insulin-Regulated GLUT4 Glucose Transporter Protein**  
The unique sensitivity of GLUT4 to insulin-mediated translocation appears to derive from sequences shown in the N-terminal (required phenylalanine) and COOH-terminal (required dileucine and acidic residues) regions. These sequences are likely involved in rapid internalization and sorting of GLUT4 in intracellular membranes termed GLUT4 storage vesicles (GSV), as outlined in Figure 3. See text for further details.

**圖 1-3. GLUT4 的結構特徵 (Huang and Czech, 2007)**

**Figure 1-3. Structural features of GLUT4.**

GLUT4 具有獨特結構，在其 N 端與 C 端均有特有的胺基酸序列 (圖 1-3) 被認為是 GLUT4 能夠行 endocytosis 進入細胞膜上，並能 exocytosis 回到細胞質內回收的主要原因。經過轉錄、轉譯過程所表現出來的 GLUT4 蛋白質，會與高基氏體形成 endosome，當有胰島素刺激存在，便會開始往細胞膜方向移動，上頭的 v-SNARE 可與細胞膜上存在的 t-SNARE 專一性結合為 docking complex，而能與細胞膜融合使 GLUT4 在膜上表現 (Huang and Czech, 2007)。但此時的 GLUT4 尚未有運輸葡萄糖的能力，需進一步的活化之後才能將葡萄糖以 facilitating transport 的方式運送進細胞內 (Funaki et al., 2004; Michelle Furtado et al., 2003)。而最後 GLUT4 又能回收形成 endosome。

#### (四) AMPK (AMP-activating protein kinase) pathway

細胞當中主要能夠促進 GLUT4 轉位的除了胰島素訊息傳遞途徑以外，便屬 AMPK 了。在多數的哺乳動物當中，AMPK 在周邊組織扮演了控制葡萄糖與脂質代謝的角色，也可作用於下視丘調節食慾與身體的能量代謝。AMPK 由具有

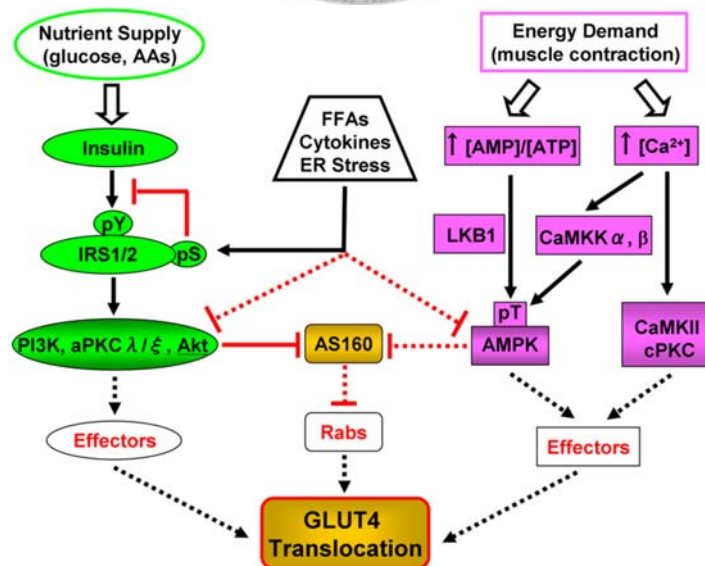


圖 1-4. 細胞調控 GLUT4 轉位的主要途徑 (Huang and Czech, 2007)

Figure1-4. Two independent pathways mainly regulate GLUT4 translocation.



催化功能的  $\alpha$  次體，與主司調節的  $\beta$  和  $\gamma$  次體所組成。當細胞內 AMP 與 ATP 的比率增加時，也就是缺乏能量來源時，AMP 便會與 AMPK 結合，並使 LKB1 在其 Thr-172 的位置磷酸化而被活化。此時 AMPK 會促進如脂肪酸的氧化途徑使細胞產生 ATP，同時抑制 lipogenesis、糖質新生、三酸甘油酯合成等消耗 ATP 的途徑。近來，亦有研究證實 CaMKK (calmodulin-dependent protein kinase kinase) 也是 AMPK 的上游分子，在細胞鈣離子濃度增加的時候活化 AMPK，而此路徑主要在中樞神經系統中所發現 (Gauthier et al., 2008; Long and Zierath, 2006) (圖 1-4)。

AMPK 相關功能及調控機制目前尚未完全明瞭，較多的研究是針對肌肉與肝細胞，而對於脂肪細胞的研究則較少。有學者認為脂肪細胞 AMPK 的活化其實是受 lipolysis 作用影響的結果 (Gauthier et al., 2008)。值得一提的是，metformin 及 thiazolidinedione 及這兩種常被用作治療第二型糖尿病的藥物，會造成 AMPK 活性上升，因此 AMPK 也成為目前研發治療第二型糖尿病藥物的主要標的之一 (Moller, 2001)。

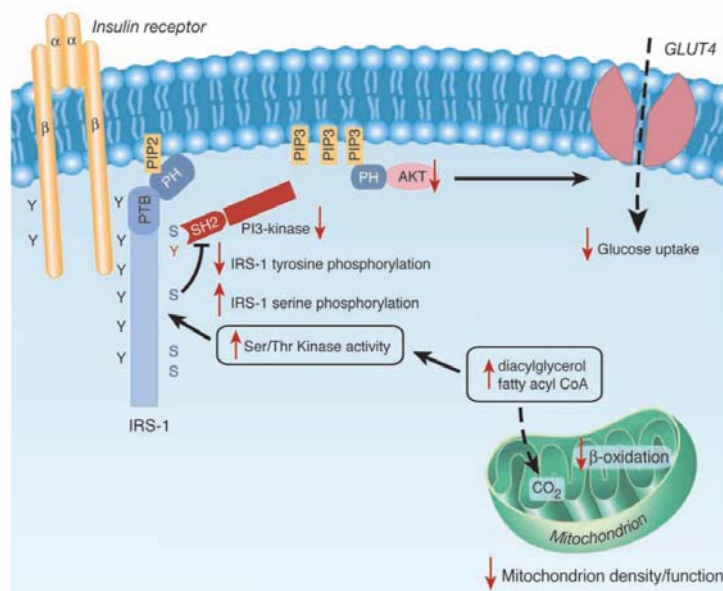


圖 1-5. 肌肉細胞粒線體功能低下造成胰島素抗性的可能機制

Figure 1-5. Mechanism of mitochondrial dysfunction induced insulin resistance in skeletal muscle. (Lowell and Shulman, 2005)

### (五) 肌肉組織與胰島素抗性

身體當中約有 75% 的葡萄糖最終被運送至骨骼肌中被利用或儲存，是胰島素的最主要標的細胞，也因此當肌肉組織發生胰島素抗性時，對於整體葡萄糖恆定有很大影響 (Bhattacharya et al., 2007)。將有胰島素抗性的病患與胰島素敏感度正常者相比，會發現前者第一型與第二型肌纖維的比值是較低的，而第一型肌纖維中具有較高量的粒線體，粒線體則扮演了正常情況下由葡萄糖刺激胰臟  $\beta$ -cell 分泌胰島素的重要關鍵角色。因此有假說認為人類胰島素抗性的產生是因為粒線體脂肪酸氧化的能力下降 (圖 1-5)，其中主要原因可能來自於粒線體的數目減少，或是粒線體的功能喪失 (Lowell and Shulman, 2005)。的確也有研究指出，第二型糖尿病患者粒線體中的氧化酵素活性較正常人為低 (Kelley et al., 2002)。但相反的，亦有動物實驗以肌肉組織專一性剔除 PGC-1 (Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator) 這個調控粒線體生合成與功能的重要轉錄因子，雖可觀察到粒線體功能明顯下降，卻並未出現嚴重胰島素抗性 (Handschin et al., 2007)。

Koves 等人研究高脂飲食誘發胰島素抗性的大鼠，發現其粒線體  $\beta$ -oxidation 能力是增加的，但其他氧化途徑卻沒有上升。因此證明過多脂肪酸代謝中間產物累積於細胞內，因而造成胰島素抗性 (Koves et al., 2008)。此外也有研究指出，長鏈飽和脂肪酸如 palmitic acid 的代謝物 ceramide 可以藉由活化 PKC 及 NF $\kappa$ B，使 TNF $\alpha$  表現量上升，並且也使得 IL-6 表現量增加，導致 GLUT4 mRNA 表現量降低，影響肌肉細胞受胰島素刺激時的葡萄糖攝取，另一方面也會造成 PGC-1 $\alpha$  的表現量下降，因而引發胰島素抗性 (Jove et al., 2005; Jove et al., 2006)。

### (六) 脂肪組織與胰島素抗性

脂肪組織是由鬆散的結締組織所連結，其中除成熟脂肪細胞外，也包含前脂肪細胞、纖維母細胞、免疫細胞等。脂肪組織為身體當中最主要的能量儲存場所，但其在早年的議題當中並未受到很大重視。直到研究發現脂肪細胞除了

具有儲存三酸甘油酯的功能以外，同時也是重要的內分泌器官 (Spiegelman and Flier, 1996)，其所分泌的多種細胞激素，統稱為 adipokines，除了影響脂肪組織大小與能量平衡外，尚與血壓、葡萄糖與脂質恆定、免疫功能、心血管疾病的發生息息相關 (表 1-3) (Rabe et al., 2008)。

與肌肉細胞相同，當身體一下子攝入過多油脂，使得  $\beta$ -oxidation 或下游代謝途徑的能力不足以清除過多的中間代謝產物而造成累積時，脂肪細胞亦會有胰島素抗性的發生，且其過程與肌肉細胞相近 (Bhattacharya et al., 2007; Petersen and Shulman, 2006)。加上脂肪組織維繫了脂肪酸的恆定性，會影響肝臟與肌肉的脂肪酸儲存，因此使得胰島素抗性日益明顯 (Smith, 2002) (圖 1-6)。

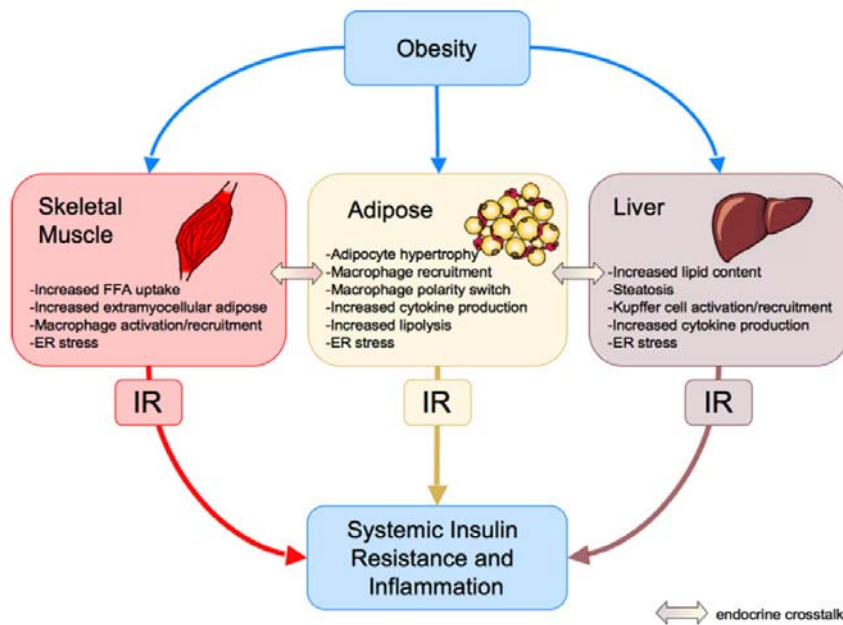


圖 1-6. 肥胖、發炎反應與胰島素抗性 (de Luca and Olefsky, 2008)

Figure 1-6. Obesity and the development of inflammation and insulin resistance.

### 表 1-3. Adipokines 的作用與葡萄糖恆定 (Rabe et al., 2008)

Figure 1-3. Functions of adipokines and the relationship to glucose homeostasis

Table 1. Adipokines, adipokine interplay and the effects on glucose homeostasis<sup>a</sup>

Adipokine	Receptor	Effects on other adipokines	Metabolic function
Adiponectin	AdipoR1, AdipoR2, T-cadherin	Suppression of TNF- $\alpha$ and IL-6 expression	Suppression of hepatic gluconeogenesis Stimulation of fatty acid oxidation in liver and skeletal muscle
Chemerin	CMKLR1	Suppression of TNF- $\alpha$ and IL-6 expression Stimulation of adiponectin expression	Stimulation of glucose uptake in skeletal muscle Stimulation of insulin secretion Modulation of food intake and energy expenditure Enhancement of insulin-stimulated glucose uptake and IRS-1 phosphorylation in 3T3-L1 adipocytes
Leptin	LR isoforms $\alpha$ - $\epsilon$ <sup>b</sup>	Stimulation of TNF- $\alpha$ and IL-6 expression Suppression of resistin and retinol binding protein 4 expression Stimulation of adiponectin expression	Repression of food intake Promotion of energy expenditure Stimulation of fatty acid oxidation in liver, pancreas and skeletal muscle Modulation of hepatic gluconeogenesis Modulation of pancreatic $\beta$ -cell function
Omentin	Unknown	Unknown	Enhancement of insulin-stimulated glucose transport and AKT phosphorylation in human adipocytes
Resistin	Unknown	Stimulation of TNF- $\alpha$ and IL-6 expression	Induction of insulin resistance in mice Lack of a clear function in glucose metabolism in humans
Retinol binding protein 4	unknown (RAR, RXR, cell surface receptors?)	Unknown	Stimulation of hepatic gluconeogenesis in mice Impairment of skeletal muscle insulin signaling in mice Uncertain effect on insulin resistance in humans
Tumor necrosis factor- $\alpha$ and IL-6	TNFR, IL-6R/gp130	Stimulation of leptin, resistin, and visfatin/PBEF/Nampt expression Suppression of adiponectin and retinol binding protein 4 expression	Modulation of hepatic and skeletal muscle insulin signaling
Vaspin	— <sup>c</sup>	Suppression of leptin, resistin, and TNF- $\alpha$ expression Stimulation of adiponectin expression	Improvement of insulin sensitivity in mice Uncertain effect on insulin sensitivity in humans
Visfatin/PBEF/Nampt	— <sup>d</sup>	Stimulation of TNF- $\alpha$ and IL-6 expression	Stimulation of insulin secretion in mice Uncertain effect on insulin resistance in rodents and humans

<sup>a</sup>Abbreviations in table: AdipoR1, adiponectin receptor 1; AdipoR2, adiponectin receptor 2; CMKLR1, chemokine like receptor-1; IL-6R, interleukin-6 receptor; IRS-1, insulin receptor substrate-1; LR, leptin receptor; Nampt, nicotinamide phosphoribosyltransferase; PBEF, pre-B cell colony-enhancing factor; RAR, retinoic acid receptor; RXR retinoic acid-X receptor; TNFR, Tumor necrosis factor- $\alpha$  receptor; vaspin, visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor.

<sup>b</sup>LRb is restricted to the hypothalamus, brainstem and key regions of the brain which control feeding, energy balance and glucose metabolism.

<sup>c</sup>Effects likely to be mediated through inhibition of a yet-unknown protease.

<sup>d</sup>Effects mediated through nicotinamide adenine dinucleotide biosynthetic activity.

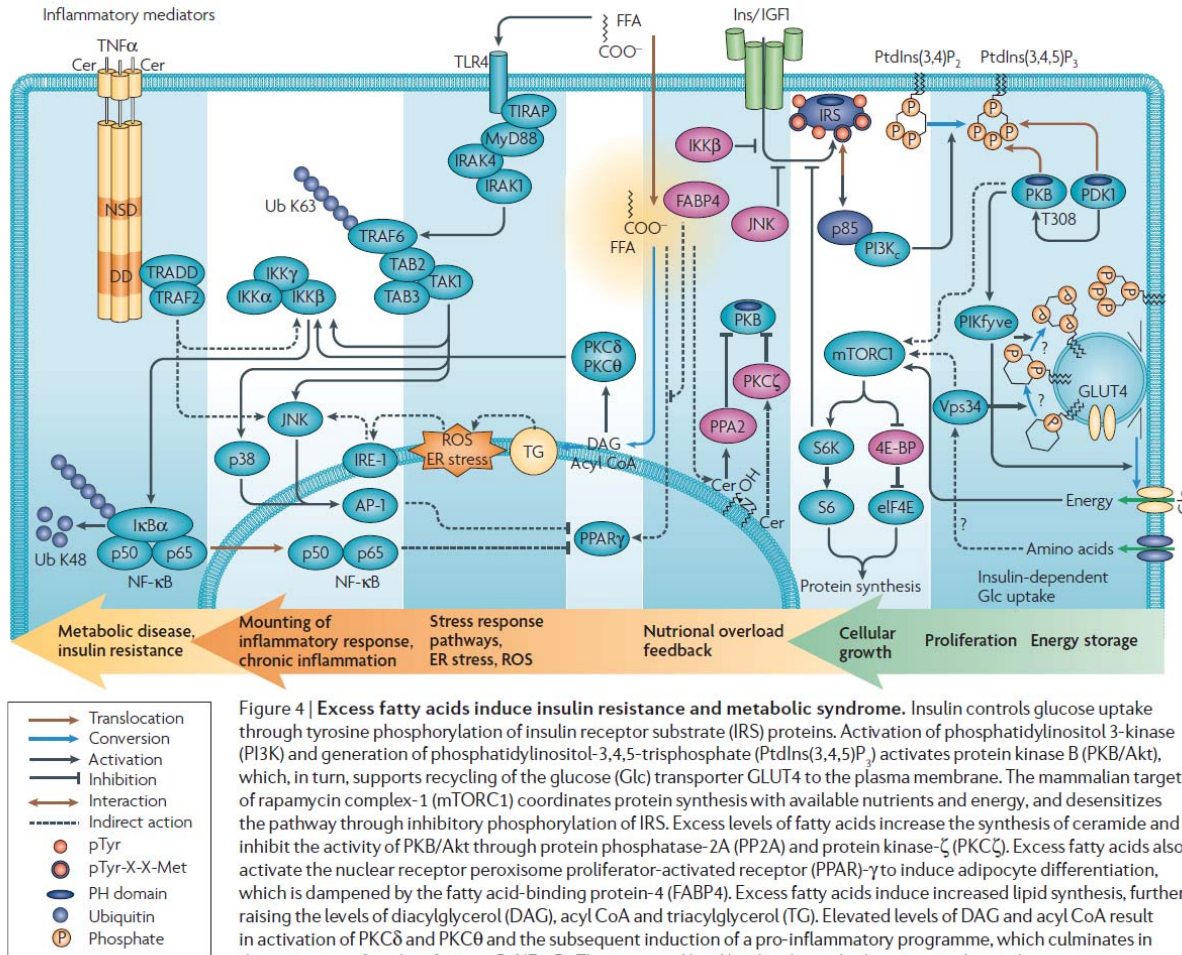
## (七) 發炎反應

早在 1950 年代便有流行病學的研究指出發炎反應可能與胰島素抗性的因子 (如肥胖) 有相關性，但當中的機制並不明瞭。直到近來許多文獻指出發炎物質可能導致胰島素抗性，發炎前期的細胞激素與急性發炎期所產生的物質會直接降低細胞胰島素敏感度，例如 IL-6, IL-8, TNF $\alpha$  等 (Hoene and Weigert, 2008; Nieto-Vazquez et al., 2008)。在生理的角度，由發炎反應連結到肥胖或胰島素抗性的起始因子依舊未十分明瞭。目前最為人接受的一種解釋是當脂肪組織儲存過多脂質而不斷增大時，會造成局部氧氣供應不足而對細胞產生壓力。這使得細胞自行產生發炎現象而分泌出細胞激素，引起前期發炎反應與胰島素敏感度下降。此外，脂肪細胞所分泌的趨化激素更會吸引巨噬細胞進入脂肪組織內，聚集在正處於凋亡過程或已凋亡的脂肪細胞周圍。這些巨噬細胞也會分泌趨化激素，因而使得胰島素抗性更為嚴重。這種發炎反應不只在脂肪組織上演，肥胖同樣會造成肝臟的發炎途徑啟動，Kupffer cell 被活化後分泌趨化激素使胰島素抗性加劇 (de Luca and Olefsky, 2008; Goossens, 2008)。

近幾年有學者利用 *in vitro* 培養的巨噬細胞，發現食物中常見的長鏈飽和脂肪酸會活化其 TLR4 (toll-like receptor 4) 造成 IL-6, TNF $\alpha$  的分泌增加 (Shi et al., 2006)。更進一步的研究也證實脂肪酸使脂肪細胞 TLR4 活化，並增加細胞 resistin 分泌量 (Schaeffler et al., 2008; Tschop and Thomas, 2006)。因此 TLR4 目前被認為在主動免疫與營養代謝相互連結上扮演了一重要角色 (圖 1-7)。

不過發炎反應與胰島素抗性之間的關係仍舊有些爭議性，例如在人體試驗中投予受試者 TNF $\alpha$  抗體，未如預期有降低胰島素抗性的狀況。IL-6 雖會影響肌肉與脂肪細胞的代謝，但也有文獻指出 IL-6 會促進肌肉與脂肪細胞的胰島素敏感度 (Steensberg et al., 2002)。





**Figure 4 | Excess fatty acids induce insulin resistance and metabolic syndrome.** Insulin controls glucose uptake through tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate (IRS) proteins. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and generation of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) activates protein kinase B (PKB/Akt), which, in turn, supports recycling of the glucose (Glc) transporter GLUT4 to the plasma membrane. The mammalian target of rapamycin complex-1 (mTORC1) coordinates protein synthesis with available nutrients and energy, and desensitizes the pathway through inhibitory phosphorylation of IRS. Excess levels of fatty acids increase the synthesis of ceramide and inhibit the activity of PKB/Akt through protein phosphatase-2A (PP2A) and protein kinase-ζ (PKCζ). Excess fatty acids also activate the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-γ to induce adipocyte differentiation, which is dampened by the fatty acid-binding protein-4 (FABP4). Excess fatty acids induce increased lipid synthesis, further raising the levels of diacylglycerol (DAG), acyl CoA and triacylglycerol (TG). Elevated levels of DAG and acyl CoA result in activation of PKCδ and PKCθ and the subsequent induction of a pro-inflammatory programme, which culminates in the activation of nuclear factor-κB (NF-κB). The increased lipid load in the endoplasmic reticulum induces a stress response and leads to the production of reactive oxygen species (ROS). This leads to the activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and induction of activator protein-1 (AP-1). Both molecules inhibit PPARγ, which further increases the detrimental action of elevated levels of fatty acids, and induces the synthesis of pro-inflammatory cytokines such as tumour necrosis factor-α (TNFα). This response is further amplified by activation of the Toll-like receptor-4 (TLR4) and its effectors by elevated plasma fatty acid levels, which then results in chronic inflammation. Both inhibitor of NF-κB kinase (IKK)-β and JNK further desensitize insulin responsiveness through inhibitory serine phosphorylation of IRS.

圖 1-7. 脂肪酸誘發胰島素抗性機制 (Wymann and Schneiter, 2008)

Figure 1-7. Mechanism of fatty acid induced insulin resistance

### 三、過氧化體增生劑活化受器 (PPARs)

#### (一) PPAR 種類與作用機制

PPAR (peroxisome proliferators-activated receptor) 是核受器 superfamily 當中的一員，目前已知有三種 isoform:  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$ ,  $\gamma$  (表 1-4)。PPAR $\alpha$  主要表現於肝臟，主司脂質代謝；PPAR $\beta/\delta$  廣泛分佈於全身，主要調控三酸甘油酯的代謝；PPAR $\gamma$  又可分為 PPAR $\gamma$ 1 及 PPAR $\gamma$ 2，前者表現於心臟、肝臟、肌肉及脂肪組織，後者則專一地表現於脂肪組織中，與脂肪細胞分化的調控有關。

當 PPAR 與其受質專一性的結合後，便會與 RXR (retinoid X receptor) 結合形成 heterodimer，再與標的基因的啟動子 (promotor) 上面稱為 PPRE (peroxisome proliferator responsive element) 特定序列結合，進而啟動下游基因的表現 (圖 1-8)。

#### (二) PPAR 與胰島素抗性

PPAR $\alpha$  可以藉由調控細胞膜上游離脂肪酸轉運蛋白，以及過氧化體中與  $\beta$ -oxidation 相關的蛋白質表現，來達到對脂質代謝及葡萄糖的恆定作用 (Chawla et al., 2001; Motojima et al., 1998)。PPAR $\alpha$  的活化物已經在許多動物實驗當中證

表 1-4. PPAR 分類及其分佈與功能 (Semple et al., 2006)

Figure 1-4. Roles and distribution of PPARs

Table 1

Simplified overview of current understanding of the metabolic roles of the 3 PPAR isoforms

	PPAR $\alpha$	PPAR $\gamma$	PPAR $\delta$
Sites of highest expression	Liver, kidney, heart	Adipose tissue, macrophages	Adipose tissue, skin, brain, but widespread
Cellular processes activated	Fatty acid $\beta$ -oxidation, lipoprotein synthesis, amino acid catabolism	Adipocyte differentiation, triglyceride synthesis	Fatty acid $\beta$ -oxidation
Physiological function	Coordination of metabolic response to fasting	Differentiation of adipocytes, FA trapping	Muscle fiber type determination?
Examples of target genes	<i>Carnitine palmitoyl transferase 1</i> , <i>HMG CoA synthase 2</i> , <i>apoA-1</i>	<i>Fatty acid-binding protein 4</i> , <i>lipoprotein lipase</i> , <i>adiponectin</i>	<i>Acyl-CoA oxidase</i> , <i>carnitine palmitoyl transferase 1</i>
Metabolic phenotype of knockout mice	Fasting hypoglycemia, hypothermia, hypoketonemia, and hepatic steatosis	-/- Lethal, +/- more insulin sensitive at baseline	Reduced base-line adiposity; increased obesity on high-fat feeding

實，能有效降低血漿三酸甘油酯，避免高油飲食所引起的肥胖等作用，達到改善胰島素敏感度的效果 (Guerre-Millo et al., 2000; Kim et al., 2003)。Fibrate 和 bezafibrate 等 PPAR $\alpha$  弱效活化劑已被用在臨床高三酸甘油酯血症的治療。

PPAR $\gamma$  則是在脂肪組織調控脂肪細胞的基因表現與分化 (Rosen et al., 1999)，並且也於葡萄糖恆定中扮演了重要的角色。TZD (thiazolidinedione) 這類藥物便是以 PPAR $\gamma$  為標的來改善胰島素敏感度，包括早期會產生肝細胞毒性副作用的 troglitazone，以及後來改良的 rosiglitazone 與 pioglitazone 等，均可以促進組織對葡萄糖攝取，降低肝臟葡萄糖釋出而達到降血糖的效果 (Saltiel and Olefsky, 1996)。

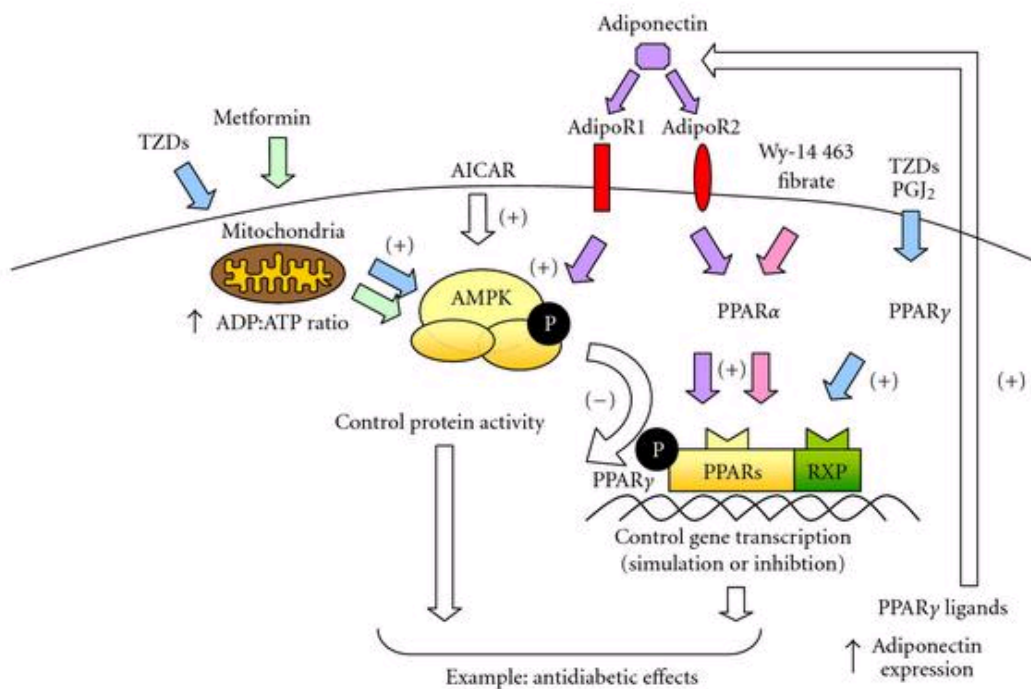


圖 1-8. PPAR 與藥物改善胰島素抗性的作用機制 (www.hindawi.com)

Figure 1-8. Mechanism of PPAR activation and drug target to improve insulin resistance.



#### 四、食材樣品

##### (一) 山藥

山藥是薯蕷科 (*Dioscoreaceae*)、薯蕷屬 (*Dioscorea*) 的多年蔓生植物，其根莖、塊莖部分在亞洲地區是相當常見的食用農作物。山藥的中藥名為淮山，《本草綱目》當中對山藥的敘述為「益腎氣，健脾胃，止瀉痢，化痰涎，潤皮毛」，也常見於治療糖尿病的傳統複方當中。實際上山藥具有多種生理效用，包括降血糖 (表 1-5) (Iwu et al., 1990; 盧崇如, 2003)，調節免疫功能 (Choi et al., 2002)、雌激素活性 (鄭瑋宜, 2007)、PPAR $\alpha/\gamma$  活性 (陳永如, 2007)、抗氧化並降低血清中三酸甘油酯、增加高密度脂蛋白 (Araghiniknam et al., 1996)、抗癌 (Wang et al., 2006) 等。而山藥研究中的降血糖成分多為皂苷類，已確知的為山藥多醣 (dioscoran C) 與 dioscoretine。

##### (二) 苦瓜

苦瓜又名涼瓜，也有別名錦荔枝、癩瓜、癩葡萄，是葫蘆科 (*Cucurbitaceae*)、苦瓜屬 (*Momordica*) 的一年生攀援草本植物。其果實長橢圓形，表面具有多數不整齊瘤狀突起，亦是亞洲地區常見蔬菜之一。苦瓜藥食兩用已有幾千年的歷史，在炎夏用來佐餐，可以清熱解暑，促進食欲，屬於寒涼性質，做為藥用則有清熱解毒的功效。明代《本草綱目》記載，苦瓜微苦、寒、無毒，具有除邪熱等功效。中醫認為，苦瓜味苦，性寒；歸心、肺、脾、胃經。具有消暑清熱，解毒、健胃的功效。主要用於發熱、中暑、痢疾、目赤疼痛、惡瘡等。而許多研究已經證實，苦瓜具有抗病毒抗菌 (Huang et al., 1999; Lee-Huang et al., 1995; Takemoto et al., 1983)、抗癌、調節免疫 (Spreafico et al., 1983)、降血脂、降血糖的功效 (Basch et al., 2003; Grover and Yadav, 2004; Raza et al., 1996)。

表 1-5. 山藥降血糖相關文獻整理

Table 1-5. Literature review of hypoglycemic effects of *Dioscorea*

品系	萃取	模式	處理時間	結果	文獻
<i>D. opposita</i>	80% EtOH	(1) Dex IR SD 大鼠 (2) Dex IR 3T3-L1	(1) 14 天 (2) 2 天	(1) serum ins & glc↓ (2) GLUT4 mRNA↑ 2DG uptake↑	Gao et al., 2007
<i>D. rhizoma</i>		60%高果糖飲食 male Wistar	管餵 3 天	(1) IPGTT Insulin & glc 之 AUC 均↓	Hsu et al., 2007
<i>D. rhizoma</i>	40% EtOH	SD 大鼠	6 週	serum glc↓	Jeon et al., 2006
<i>D. polygonoides</i> ( <i>Jamaican bitter yam</i> )	去皮後 3.5 M HCl 處理再以石 油醚萃，分得 saponin	STZ induced diabetic Wistar	3 週	plasma glc↓可能是因 (2) intestinal Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase 活性↓ (3) liver G6PDH 活性↑	McAnuff-Harding et al., 2006; McAnuff et al., 2005a; McAnuff et al., 2005b
<i>D. rhizoma</i>		Male Wistar	管餵 1 小時後測血糖	與 control 比無影響	Liou et al., 2004
<i>D. cayenesis</i>		STZ induced diabetic Wistar	4 週	serum glc↓ malic enzyme 活性↑	Grindley et al., 2001
<i>D. dumetorum</i>	MeOH 萃後的水萃物	(1) normal rabbits (2) alloxan diabetic rabbits	i.p.注射 1 小時後測血糖	plasma glc↓	Iwu et al., 1990
<i>D. japonica</i>	MeOH/water 萃後區分出六種 glycan 與 dioscoran 類有效 (3.9 -110 kDa)	(1) normal mice (2) alloxan-induced hyperglycemic mice		hypoglycemic effects	Hikino et al., 1986

---

<i>D. dumetorum</i>	hydroalcoholic 萃物區分 (1) alkaloid-containing fraction (2) glycosidic portion	(1) mice, rabbits and alloxan-diabetic rabbits (2) alloxan-diabetic rabbits	空腹血糖↓	Undie and Akubue, 1986
---------------------	--	---	-------	------------------------

---



表 1-6. 苦瓜對脂肪與肌肉細胞相關文獻整理

Table 1-6. Literature review of effects of *Momordica charantia* in adipocytes and myotubes.

萃取部分	萃取方式	模式	結果	文獻
freeze-dried fruit powder	80% EtOH 萃物以氯仿/n-BuOH 區分， 管注層析 n-BuOH 可溶部分，酸水解	3T3-L1 L6	得 4 種 <b>triterpenoids</b> : GLUT4 轉位↑ AMPK 活性↑	Tan et al., 2008
<i>M. charantia</i> L. freeze-dried whole fruit powder		高油 male Wistar	Fat mass, TG content, large adipocytes↓ 脂肪組織 FAS, ACC1, LPL, aP2 mRNA↓	Huang et al., 2008
去籽苦瓜果肉榨汁去渣		高油 male Wistar 管餵 10 ml/kg/day 兩週	Fasting insulin, TAG, cholesterol, epididymal fat↓; skeletal muscle IRS1 phosphorylation↑	Sridhar et al., 2008
“moonlight” variety freeze-dried unripe whole fruit powder	(1) ddH <sub>2</sub> O 萃 (2) 氯仿萃後殘渣以 95% EtOH 萃， 55°C 乾燥	3T3-L1	(1) 低濃度低胰島素下 2DG uptake↑ 但可被 wortmannin 抑制; adiponectin↑ (2) 2DG uptake↓	Roffey et al., 2007
Thai BG pulp	酸酒精萃，丙酮沈澱蛋白質，透析>10 kDa	(1) STZ-induced diabetic male Wistar 皮下注射 (2) 3T3-L1, C2C12	<b>Slow acting protein</b> (1) 4h 後 plasma glc↓ insulin secretion↑ (2) 處理 4h 後 2DG uptake↑	Yibchok-Anun et al., 2006

萃取部分	萃取方式	模式	結果	文獻
去籽苦瓜果肉榨汁凍乾		高油 male Sprague-Dawley rats	Muscle: TG ↓ ; UCP-3 ↑ mitochondria CPT1, acyl-CoA DH↑ visceral fat mass↓ BAT: UCP-1↑	Chan et al., 2005
去籽苦瓜果肉榨汁	(1) 苦瓜汁離心凍乾 (2) 苦瓜汁離心凍乾後以氣仿萃取	L6	Basal 2DG uptake↑ (5 µg/mL 最有效), 可被 wortmannin 抑制 insulin-like bioactivity	Singh et al., 2004
榨汁凍乾		L6	5 µg/mL↑ basal 2DG uptake, 可被 wortmannin 抑制 10-200 µg/mL ↓ basal 2DG uptake	Ahmed et al., 2004
		Isolated rat and hamster adipocytes	(1) Mannose-binding and N-acetylglucosamine binding <b>lectins:</b> antilipolytic and lipogenic activities (2) Fucose-binding <b>lectins:</b> antilipolytic activity	Ng et al., 1989

萃取部分	萃取方式	模式	結果	文獻
seeds	酸酒精萃，pH8 沈澱以管柱層析	Isolated rat adipocytes	2 種約 8 kDa peptides: antilipolytic and lipogenic activities	Ng et al., 1987b
Fruits and seeds	酸酒精萃，pH3 以丙酮沈澱蛋白質，透析。P 區分以 fetuin agarose 得 unadsorbed fraction (F)，再膠體過濾得 unretarded fraction (F1) and a retarded fraction (F2)	Isolated rat adipocytes	P fraction: antilipolytic 促進 3H-glucose→lipids F1: <b>saponin</b> containing fraction 抑制 lipolysis 與 glucose→lipid F2:促進 glucose→lipid	Ng et al., 1987a
seeds	酸酒精萃，經膠體過濾、離子交換、脫鹽，得 7 區分物	isolated adipocytes	3 區分: antilipolytic and lipogenic 1 區分: lipogenic insulin-like bioactivity	Ng et al., 1986b
	石油醚去脂質，PBS 萃取，硫酸銨沈澱蛋白質	Isolated rat adipocytes	3 subunits 組成 <b>124 kDa</b> galactose-binding <b>lectin</b> : antilipolytic and lipogenic activities that could be destructed by heat, trypsin, chymotrypsin, glutathione and galactose	Ng et al., 1986c

萃取部分	萃取方式	模式	結果	文獻
seeds	去脂質後 saline 萃，硫酸銨沈澱後上清以 n-BuOH 萃	isolated rat adipocytes	<b>Saponin</b> resistant to heat, trypsin, chymotrypsin, pronase, and glutathione: noncompetitive inhibitor of corticotropin, glucagon, and epinephrine in lipolysis; antagonize dibutyryl cAMP induced lipolysis 抑制 glucose→lipid	Ng et al., 1986d
<i>M. charantia</i> L. fruit, seeds, and tissue	酸酒精萃，pH3 以丙酮沈澱蛋白質，透析>6 kDa。層析得與 BSA 相近點	Gerbils, langurs, 第一型糖尿病病患；皮下注射	<b>Polypeptide-P</b> Blood glc ↓	Khanna et al., 1981



### 第三節 實驗假說與架構設計

本實驗主要假說為山藥與山苦瓜乙酸乙酯萃物、苦瓜水萃物具有改善胰島素抗性的潛力，且主要作用組織在肌肉或脂肪。因此，本研究首先需建立一胰島素抗性的脂肪及肌肉細胞實驗模式，並以測量細胞對葡萄糖的利用率作為標準，評估各食材樣品是否具有改善胰島素抗性的功效。而實驗架構包括以下三部分：

#### 1. 對已分化肌肉細胞胰島素敏感度的影響

對於正常或誘發胰島素抗性後的已分化肌肉細胞，添加樣品處理是否可以改善基礎或有胰島素刺激下的葡萄糖攝入能力。

#### 2. 對已分化脂肪細胞胰島素敏感度的影響

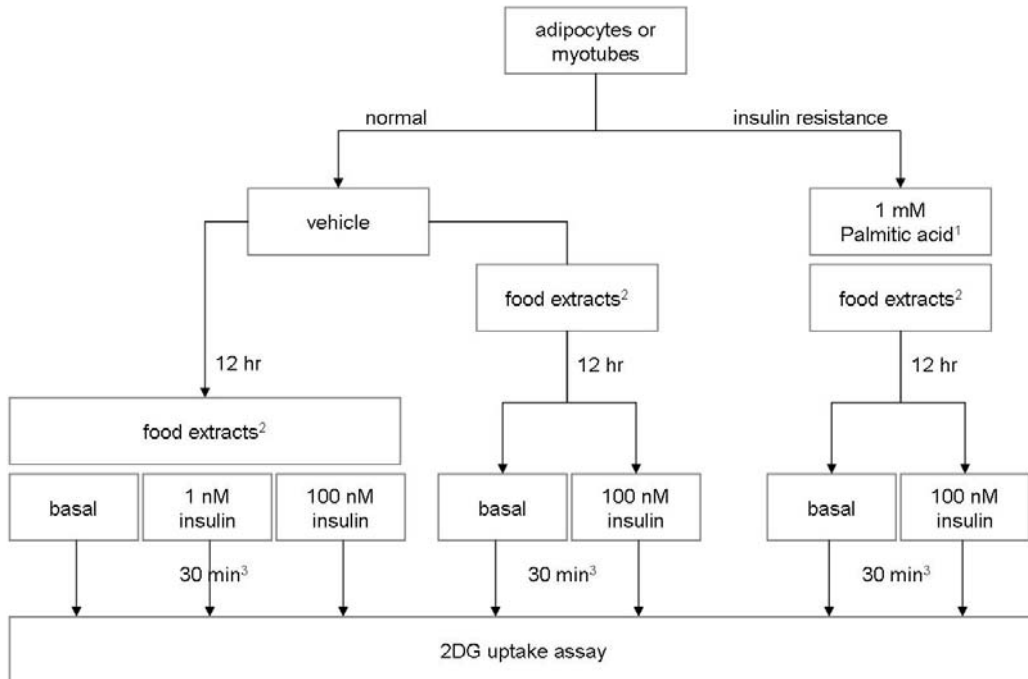
對於正常或誘發胰島素抗性後的已分化脂肪細胞，添加樣品處理是否可以改善有或沒有胰島素刺激下的葡萄糖攝入能力。

#### 3. 對具改善胰島素抗性潛力之樣品成分或作用機制進行初步探討

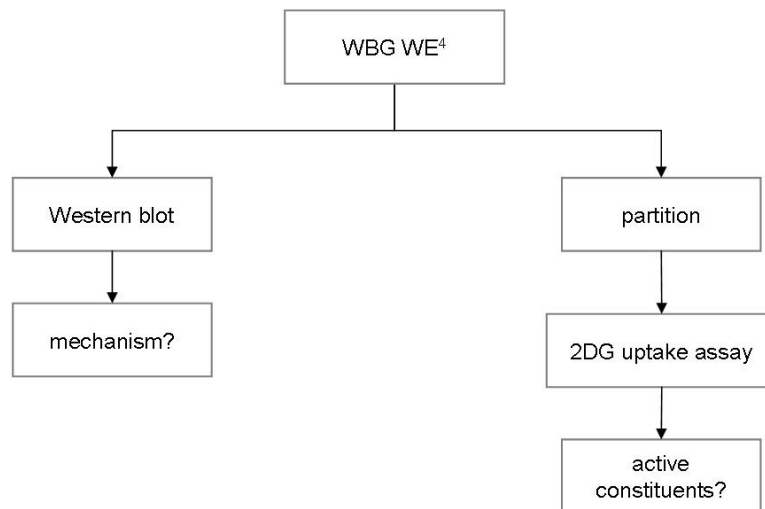
將前述實驗之中，具有改善肌肉細胞或脂肪細胞胰島素敏感度之萃物，更進一步進行區分，重複進行前項試驗，初步評估其活性成分之特性。此外，以檢查胰島素訊息傳遞路徑或葡萄糖轉運子之分佈，探討有效萃物或成分的改善胰島素抗性的可能機制。



### A. Glucose Uptake Assay



### B. Mechanism Prview



<sup>1</sup> 0.75 mM in myotubes

<sup>2</sup> Food extracts include yam ethyl acetate extract, bitter melon water/ethanol/ethyl acetate extract

<sup>3</sup> 6h in myotubes

<sup>4</sup> White bitter melon water extract. It could improve palmitic acid-induced insulin resistance in adipocytes in part A.

圖 1-9. 實驗架構

Figure 1-9. Scheme of experimental design



## 第二章 數種食材萃物對脂肪細胞葡萄糖攝取之影響

### 第一節 前言

脂肪細胞亦是胰島素作用的標的細胞之一，可以將葡萄糖加以代謝轉換。另外脂肪組織現今也被視為重要的內分泌器官，其所釋出的多種 adipokines 在維持身體的能量平衡上扮演相當重要的角色 (Spiegelman and Flier, 1996)。脂肪組織為身體脂質的主要儲存處，可以調節脂肪酸的釋出以及三酸甘油酯的清除率來達到脂質平衡。當體內過多脂質存在，使脂肪組織調節不及平衡時，會使其他如肝臟、肌肉等組織亦產生三酸甘油酯堆積，逐漸發生胰島素抗性 (Goossens, 2008)。此外，過多脂肪酸進入肝臟會增加糖質新生 (gluconeogenesis) 作用，降低胰島素在肝臟清除率 (Fanelli et al., 1993; Lewis et al., 1997)，造成葡萄糖耐受性下降、高血脂、高胰島素血症等。

活化 PPAR $\alpha$  可以改善代謝症候群的血脂異常現象，而活化 PPAR $\gamma$  則可以減輕第二型糖尿病患者胰島素抗性的程度 (Fievet et al., 2006)。PPAR $\gamma$  主要表現在脂肪組織，除調控脂肪細胞的基因表現與分化以外，也在葡萄糖恆定中扮演了重要的角色 (Rosen et al., 1999)。

本實驗旨在利用 3T3-L1 細胞株進行模式之建立，評估本實驗室先前已知具有 PPAR $\gamma$  活性之山藥與山苦瓜乙酸乙酯萃物，及數種不同苦瓜萃物，對於分化成熟的脂肪細胞，在未誘發胰島素抗性的正常狀況下或於誘發胰島素抗性後，細胞對葡萄糖攝取的影響。

## 第二節 材料與方法

### 一、細胞株

3T3-L1 細胞株 (ATCC CL-173)

組織來源：embryo, *Mus musculus* (mouse)

購自食品工業研究中心/國家衛生研究院細胞庫 (BCRC 60159)。

### 二、培養基與藥品試劑

#### (一) 細胞培養與分化

1. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco 11995)

需添加 2 mM L-glutamine (Gibco 25030)

2. 小牛血清 (BS, Gibco 16170)

3. 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco 25200)

4. 0.4% Trypan blue solution (Sigma T8154)

5. Insulin (Sigma I6634)

6. Biotin (Sigma B4510)

7. Dexamethasone (DEX, Sigma D4902)

8. 3-Isobutyl-1-methyl-xanthine (IMX, Sigma I5879)

#### (二) 葡萄糖攝取試驗

1. 牛血清白蛋白 (BSA, Sigma A8806)

2. Insulin (Sigma I6634)

3. Palmitic acid (Sigma P5585)

4. SDS (J. T. Baker 4109-02)

5. 2-Deoxy-D-[1-<sup>3</sup>H] glucose (GE Healthcare TRK383, Moravek Biochemicals MT-1611)

6. 2-Deoxy-D-glucose (Sigma D6134)

7. Cytochalasin B (Sigma C6762)



8. 液態閃爍計數液 (Amersham NBCS-104)

9. 蛋白質定量分析試劑 (Bio-rad 500-0006)

以二次水稀釋 5 倍，經一號濾紙 (Whatman) 過濾後，可於 4°C 保存兩週。

10. Phosphate buffered saline (PBS) 10X stock

NaCl (Mallinckrodt 7581-06)	80.0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Nacalai tesque 317-26)	29.2 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Nacalai tesque 28720-65)	2.0 g
KCl (Nacalai tesque 28513-85)	2.0 g

以二次水混勻後以 1 N KOH 或 NaOH 調至 pH 7.4，定容至 1 L。

使用前以二次水稀釋 10 倍，121°C, 30 min 滅菌。

11. KRHP buffer

NaCl (Mallinckrodt chemicals 7581-06)	6.90 g
HEPES (Sigma H3375)	5.96 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O (Hanawa)	0.32 g
KCl (Nacalai tesque 28513-85)	0.35 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Nacalai tesque 28720-65)	0.14 g
CaCl <sub>2</sub> (Hanawa 030-00715)	0.28 g

以二次水溶解後，以 NaOH 調至 pH 7.4，定容至 1 L。以 0.22 μm

濾杯 (Millipore SCGPT05RE) 過濾至已滅菌血清瓶。

### 三、儀器設備

1. 液態閃爍計數儀 (Beckman LS5000CE)
2. 二氧化碳培養箱 (REVCO RCO3000, Thermo Forma 310)
3. 無菌操作台 (ESCO AC2-4S2)
4. 倒立式顯微鏡 (Nikon DIAPHOT)
5. 細胞計數器 (Hausser Scientific)

6. 微盤分析儀 (BioTek EL311)
7. 冷凍乾燥機 (SFD-25)
8. 離心機 (KUBOTA 6500) 與轉子 (RS-720G)
9. 減壓濃縮機 (Panchum vecuum controller VC-7600, Eyela rotary evaporator N-1000, Panchum cooling circulator model CC-2000, water bath RB-100)

#### 四、實驗材料

##### 1. 白苦瓜水萃物 (WBG WE)

市售之白苦瓜 (購自松青超市) 加以清洗去蒂後切片，經冷凍乾燥後，以磨粉機研磨得白苦瓜全果凍乾粉末，置於  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。萃取時添加二十倍體積去離子水，於  $4^{\circ}\text{C}$  以攪拌子攪動萃取隔夜。萃取完成後以 3000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  離心 10 分鐘，上清液經一號濾紙過濾兩次後再凍乾，置於  $-20^{\circ}\text{C}$  保存備用。水萃物凍乾粉末以無菌 PBS 回溶為 100 mg/mL，即為樣品 stock，置於  $-20^{\circ}\text{C}$  避光保存。

##### 2. 山藥乙酸乙酯萃物 (yam EAE)

台農二號品系山藥 (DNG2, *D. alata* L., 購自南投縣名間鄉產銷班) 經去皮、切丁後加以冷凍乾燥，所得凍乾粉末置於  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。萃取時以二十倍體積乙酸乙酯攪動萃取隔夜，完成後經一號濾紙進行抽氣過濾及減壓濃縮抽乾溶劑，得乙酸乙酯萃物。以絕對酒精回溶，最終濃度為 50 mg/mL，是為樣品 stock， $-20^{\circ}\text{C}$  避光保存。

##### 3. 2381 山苦瓜水萃物 (2381 WE)

2381 品系山苦瓜 (來自花蓮區農業改良場) 加以清洗去蒂後切片，經冷凍乾燥，以磨粉機研磨後得全果凍乾粉末，置於  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。萃取時添加二十倍體積去離子水，於  $4^{\circ}\text{C}$  以攪拌子攪動萃取隔夜，萃取完成後以 3000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$  離心 10 分鐘，上清液經一號濾紙過濾兩次後再凍乾，置於  $-20^{\circ}\text{C}$  保存備用。水萃物凍乾粉末以無菌 PBS 回溶為 100 mg/mL，即為樣品 stock，置於  $-20$

°C 避光保存。

4. 2381 山苦瓜乙酸乙酯萃物 (2381 EAE)

2381 品系山苦瓜全果凍乾粉末以二十倍體積乙酸乙酯攪動萃取隔夜，完成後經一號濾紙進行抽氣過濾及減壓濃縮抽乾溶劑，得乙酸乙酯萃物。以絕對酒精回溶，最終濃度為 100 mg/mL，是為樣品 stock，-20°C 避光保存。

5. 2381 山苦瓜不皂化物 (2381 NS)

由本實驗室博士班徐璿提供。2381 山苦瓜乙酸乙酯萃物溶於五倍體積之四氫噁喃 (THF) 中，再加入相同體積之 40% 氫氧化鈉水溶液，以 60°C 加熱攪拌 16-20 小時。反應液經減壓濃縮抽除其中有機溶劑 THF 後，改加入等量之正己烷與水層進行萃取，共進行 3-5 次。收集上層正己烷層以水洗至中性，減壓濃縮後可收得不皂化物之區分。以絕對酒精回溶，最終濃度為 100 mg/mL，是為樣品 stock，-20°C 避光保存。

6. CK 山苦瓜乙醇萃物 (CK EE)

由本實驗室博士班徐璿提供。CK 品系山苦瓜 (來自花蓮區農業改良場) 加以清洗、去蒂、切片，經冷凍乾燥，以磨粉機研磨後得全果凍乾粉末，置於 -20°C 保存。以二十倍體積乙酸乙酯攪動萃取隔夜，完成後經一號濾紙進行抽氣過濾，剩餘乾燥殘渣再改以絕對酒精進行萃取，經抽氣過濾與減壓濃縮抽乾溶劑後，得乙醇萃物樣品。以絕對酒精回溶為 100 mg/mL，-20°C 避光保存。

## 五、實驗方法

### 1. 細胞培養

以含 10% BS DMEM 培養於 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 中。當細胞達到 70% 滿度時，移除培養基，用 PBS 清洗細胞兩次後，加入 0.25% trypsin-EDTA 均勻浸潤細胞，於 37°C, 3 分鐘待細胞脫附後取出，加入 10% BS DMEM 均勻懸浮細胞。取少許細胞懸浮液以 trypan blue solution 進行染色，利用細胞計數盤於倒立式顯微鏡下細胞計數。以  $2.5 \times 10^5$  細胞數種入新 75 cm<sup>2</sup> 培養瓶中進行繼代培養，

每 3 日繼代培養一次。

## 2. 細胞分化

繼代培養時經細胞計數後，以  $6 \times 10^4$  細胞數種入 12 孔平底細胞培養盤，培養於  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  中，3 日後可達全滿 (confluence)。更換培養基，繼續培養 2 日 (post-confluence)，改以添加含有 0.25  $\mu\text{M}$  Dex, 0.5 mM IMX, 100 ng/mL biotin, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulin 之 10% BS DMEM 分化培養基 (DM I) 培養 3 日。更換為僅含 100 ng/mL biotin 與 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulin 之 10% BS DMEM 分化培養基 (DM II)，每 2 日更換 DM II 一次，12 日後分化完成。

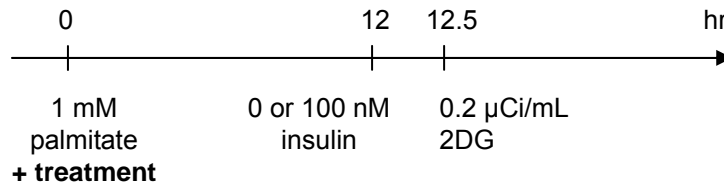
## 3. 胰島素抗性之誘發與葡萄糖攝取試驗

主要參考前人的方法並加以修改 (Singh et al., 2004; Van Epps-Fung et al., 1997; Verma et al., 2004)。細胞完成分化前一日，吸除 DM II，並以 KRHP 緩衝液清洗細胞一次，將 palmitic acid 與 fatty acid-free BSA conjugate，配製為不含血清之 1 mM palmitic acid, 10 nM glucose, 2% fatty acid-free BSA KRHP，於  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培養 12 小時，藉以誘發胰島素抗性。之後以 KRHP 緩衝液清洗細胞一次，加入含有或不含 100 nM insulin KRHP 緩衝液培養 30 分鐘。改加入 0.2  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$  2-Deoxy-D-[1- $^3\text{H}$ ] glucose (配製於 10  $\mu\text{M}$  非同位素標定之 2-deoxy-glucose KRHP 緩衝液中)，繼續培養 30 分鐘，並且以添加 10  $\mu\text{M}$  cytochalasin B (葡萄糖轉運子抑制物) 組別作為非專一性攝取之背景值。之後以 ice-cold PBS 清洗細胞 3 次，以終止反應並移除未反應之放射線標定 2DG。細胞以 0.1% SDS 溶解後取出部分以供蛋白質定量使用，其餘部分則添加閃爍計數液進行液態閃爍計數。

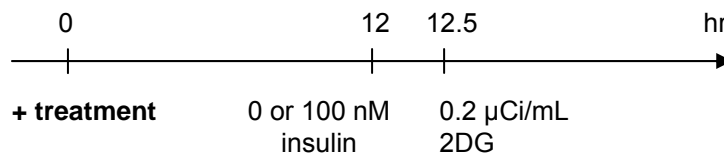
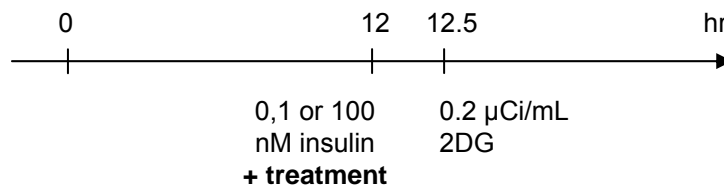


## 4. 樣品處理

## (1) 胰島素抗性誘發組別

Pretreatment with 1 mM palmitate for 12h

## (2) 無胰島素抗性正常組別

Pretreatment without 1 mM palmitate for 12hNo pretreatment

## 六、數據整理與統計分析

葡萄糖攝取試驗所測得 CPM 數值皆以蛋白質定量結果校正為 CPM/mg protein，再扣除非專一性攝取背景值。並以未誘發胰島素抗性且無胰島素刺激下 vehicle 組攝取量為基準，換算各組相對量。各樣品均重複進行三次以上獨立實驗，數值以平均值  $\pm$  標準差表示。

利用 SAS 9.0 版統計軟體 (Cary, NC, USA) 進行 RCBD (randomized complete block design) 與 one-way ANOVA 進行組間分析，並以 Tukey's test 檢

定各組間差異是否有顯著性。另外再利用 Student's *t* test，檢定與 vehicle 組間差異之顯著性。當  $p < 0.05$  視為兩者具有統計上之顯著差異。



### 第三節 結果

#### 一、細胞模式之建立

為評估本實驗方法中葡萄糖攝取試驗的最佳反應時間，因此給予細胞不同時間 2DG 處理，可以發現於 30 分鐘內不論是否有胰島素刺激下，細胞的葡萄糖攝取量均與時間成正相關，且有良好之線性關係 (圖 2-1)。

另外為得知 3T3-L1 前脂肪細胞株經分化為成熟的脂肪細胞後，細胞對於葡萄糖攝取量是否可因為胰島素刺激而增加，以及利用 1 mM palmitic acid 前處理 12 小時是否可誘發細胞產生胰島素抗性，因而降低細胞對葡萄糖的利用，因此給予不同濃度胰島素刺激 30 分鐘後進行葡萄糖攝取試驗 (圖 2-2)。結果顯示有胰島素刺激的組別均可較 vehicle 組顯著增加葡萄糖攝入，且有隨給予胰島素濃度上升而增加之趨勢。而葡萄糖攝入率約於 25 nM 胰島素刺激下開始逐漸趨於飽和，亦即再繼續增加胰島素濃度並無法明顯增加細胞對葡萄糖的利用，此時細胞攝入之葡萄糖量約為不給予胰島素組的 2 倍左右。

若先以 1 mM palmitic acid 細胞處理 12 小時，再給予不同濃度胰島素刺激，所有組別均可較不誘發胰島素抗性的情況下，顯著降低葡萄糖攝取的能力。而 100 nM 胰島素刺激下，誘發胰島素抗性組別較未誘發組細胞葡萄糖攝取率下降約 40%。

在後續的樣品分析試驗中，主要即是探討在無胰島素 (basal, 0 nM) 與低胰島素 (1 nM) 或高胰島素 (100 nM) 刺激下，樣品是否可於 30 分鐘內增加已分化脂肪細胞的葡萄糖攝取量，評估樣品是否有類似胰島素的作用，或是抑制胰島素的作用。並且探討給予樣品處理 12 小時較長時間，對於正常無胰島素抗性之已分化脂肪細胞，或是以 1 mM palmitic acid 誘發胰島素抗性的已分化脂肪細胞，在 0 或 100 nM 胰島素刺激下葡萄糖攝取之影響。

#### 二、山藥乙酸乙酯萃物對已分化 3T3-L1 脂肪細胞葡萄糖攝取之影響 (圖 2-3)

無胰島素抗性的情況下，以 1 nM 胰島素刺激葡萄糖攝取的同時給予山藥

乙酸乙酯萃物處理，脂肪細胞葡萄糖攝取量在 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  萃物處理下比 vehicle 組減少約 14% ( $p<0.05$ )，樣品處理濃度再提高時則又恢復與 vehicle 相當。而以 100 nM 胰島素刺激或是無胰島素的 basal 狀況下亦有相同趨勢，但未達統計上的顯著性。

以 1 mM palmitic acid 處理細胞 12 小時藉以誘發脂肪細胞胰島素抗性的模式中，山藥乙酸乙酯萃物於誘發過程中同時給予，之後再以胰島素刺激，測定樣品是否具有改善胰島素抗性、增加細胞攝入葡萄糖的潛力。結果發現，脂肪細胞在沒有胰島素刺激的狀況下，100 與 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  樣品處理組均較 vehicle 組降低葡萄糖攝取能力達約 41% ( $p<0.05$ )。然而在 100 nM 胰島素刺激的情況下，則對於脂肪細胞攝取葡萄糖能力並無顯著影響。

### 三、2381 山苦瓜乙酸乙酯萃物對已分化 3T3-L1 脂肪細胞葡萄糖攝取之影響(圖 2-4)

在細胞未誘發胰島素抗性的正常情況下，沒有給予胰島素刺激，僅添加 2381 山苦瓜乙酸乙酯萃物處理 30 分鐘，會降低脂肪細胞對葡萄糖利用率約 15-20% ( $p<0.01$ )，但並沒有明顯的濃度效應。而不論樣品在低濃度 (1 nM) 或高濃度 (100 nM) 胰島素共同處理之下，25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  2381 EAE 會顯著降低細胞葡萄糖利用分別達 25% 及 15% ( $p<0.05$ )，增加處理濃度則無明顯影響。

若在細胞未誘發胰島素抗性的正常情況下，增加給予 2381 山苦瓜乙酸乙酯萃物處理時間達 12 小時，之後再經 30 分鐘 0 nM 或 100 nM 胰島素刺激，則看不出樣品處理對脂肪細胞攝取葡萄糖的影響。另一方面，於樣品處理的 12 小時中，亦同時處理 1 mM palmitic acid 以誘發脂肪細胞之胰島素抗性，雖隨樣品處理濃度增加，似乎有改善細胞對葡萄糖之攝取的趨勢，但並未達到統計上之顯著性。

### 四、2381 山苦瓜不皂化物對已分化 3T3-L1 脂肪細胞葡萄糖攝取之影響 (圖 2-5)

未誘發胰島素抗性之正常情況下，脂肪細胞處理 2381 不皂化物 12 小時，在沒有胰島素刺激之下，10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上樣品約可顯著增加細胞 20-30% ( $p<0.05$ )

的葡萄糖攝取率；而給予 100 nM 胰島素刺激之後，則於 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  樣品處理可顯著增加 23% 葡萄糖攝取率 ( $p<0.05$ )。

然而在以 1 mM palmitic acid 誘發細胞胰島素抗性的同時給予樣品處理，無論之後是否有胰島素刺激，葡萄糖攝取在低濃度樣品處理下都呈一上升的趨勢，並在 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  達到最高，但未達統計上的顯著性。

#### 五、2381 山苦瓜水萃物對已分化 3T3-L1 脂肪細胞葡萄糖攝取之影響 (圖 2-6)

在細胞沒有誘發胰島素抗性的正常情況，將 2381 山苦瓜水萃物單獨處理 30 分鐘，不會對脂肪細胞的葡萄糖攝取產生影響。若是將樣品改與 1 nM 或 100 nM 胰島素共同處理之下，也沒有顯著差異。但在 12 小時樣品處理下，即使未給予胰島素刺激 (basal)，50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上 2381 水萃物即可顯著增加脂肪細胞對葡萄糖攝取能力，且有劑量效應，在 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  樣品濃度下比 vehicle 顯著增加達 90% ( $p<0.05$ )。若給予樣品處理 12 小時後，測量 100 nM 胰島素刺激下脂肪細胞葡萄糖攝取量，亦與 basal 狀況同樣有促進效果，於樣品濃度 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  下有最為顯著，約較 vehicle 增加 60% ( $p<0.01$ )。

此外，在 1 mM palmitic acid 誘發胰島素抗性同時，給予 2381 山苦瓜水萃物處理 12 小時，在無胰島素刺激下，2381 水萃物在濃度 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上可顯著增加脂肪細胞對葡萄糖攝取能力，500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  比 vehicle 顯著增加 102% ( $p<0.05$ )，甚至較無胰島素抗性之下的脂肪細胞 vehicle 組 (無樣品處理) 之葡萄糖攝取能力更為提升 (data not shown)。而給予 100 nM 胰島素刺激下的葡萄糖攝取情況，則是於 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上便有顯著增加，500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  比 vehicle 顯著增加 88% ( $p<0.05$ )，亦較無胰島素抗性的脂肪細胞 vehicle 組之葡萄糖攝取能力更為提升 (data not shown)。

#### 六、CK 山苦瓜乙醇萃物對已分化 3T3-L1 脂肪細胞葡萄糖攝取之影響 (圖 2-7)

無胰島素抗性下短時間 (30 分鐘) 給予 CK 山苦瓜乙醇萃物，在低濃度有抑制脂肪細胞葡萄糖攝取的現象。與 100 nM 胰島素共處理時，脂肪細胞葡萄

糖攝取情況則隨樣品濃度增加，呈現先下降後上升的趨勢，在 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  較 vehicle 顯著下降了 47% ( $p<0.05$ )。

已分化脂肪細胞給予樣品處理達 12 小時，無胰島素刺激下 CK 山苦瓜乙醇萃物似對脂肪細胞葡萄糖攝取有抑制情形，100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  即有顯著下降，比 vehicle 降低約 30-35% ( $p<0.001$ )。在處理樣品後脂肪細胞經 100 nM 胰島素刺激下的葡萄糖攝取，亦可看出下降趨勢，且 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  顯著比 vehicle 降低 25% ( $p<0.05$ )。但若在樣品處理 12 小時同時給予 1 mM palmitic acid 誘發胰島素抗性，則不論是否有胰島素刺激，脂肪細胞的葡萄糖攝取率在各濃度樣品處理下均與 vehicle 組無顯著差異。

#### 七、白苦瓜水萃物對已分化 3T3-L1 脂肪細胞葡萄糖攝取之影響 (圖 2-8)

一般情況下給予白苦瓜水萃物處理 30 分鐘，500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  樣品處理對脂肪細胞 basal 狀況下之葡萄糖攝取有抑制情形 ( $p<0.01$ )，但在有胰島素刺激下 (1 或 100 nM) 各濃度樣品處理則對脂肪細胞葡萄糖攝取無影響。增加樣品處理時間至 12 小時後，250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  白苦瓜水萃物可顯著增加基礎葡萄糖攝取量達 27% (basal,  $p<0.05$ )，500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  時更增加為 49% ( $p<0.01$ )。但有 100 nM 胰島素刺激時脂肪細胞的葡萄糖攝取量則不受樣品處理影響。

而有 1 mM palmitic acid 誘發胰島素抗性的模式中，無論是否經過胰島素刺激，均在樣品處理大於 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上時有顯著促進脂肪細胞攝取葡萄糖的效果，basal 狀況下最高濃度 (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  WBG WE) 可較 vehicle 增加 266% ( $p<0.001$ )，100 nM 胰島素刺激下則為 115% ( $p<0.001$ )，且均較不處理樣品的無胰島素抗性脂肪細胞之葡萄糖攝取量為高 (data not shown)。

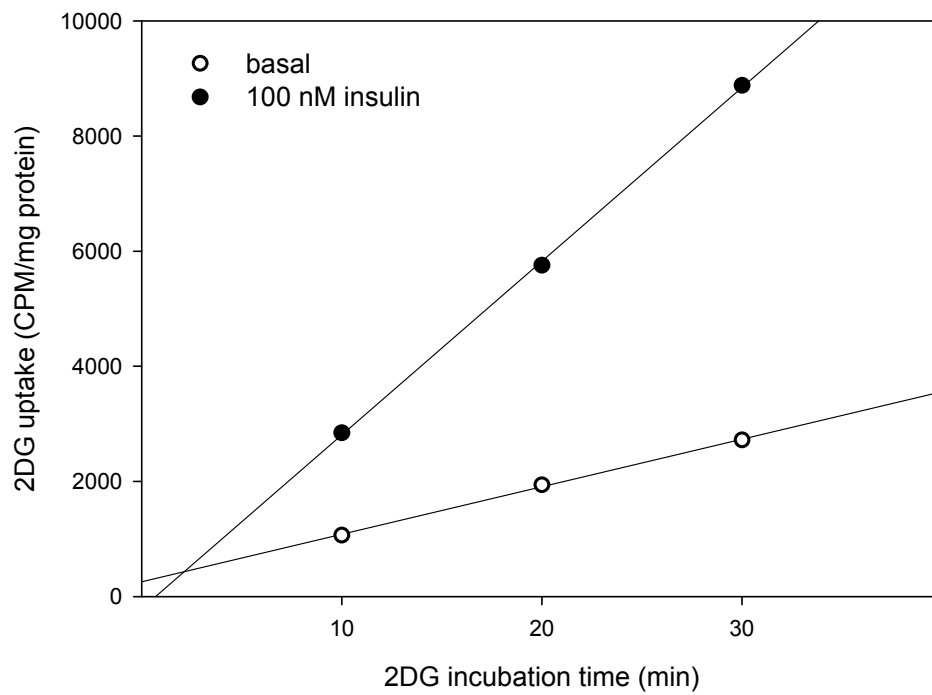


圖 2-1. 已分化 3T3-L1 脂肪細胞葡萄糖攝取之時間反應曲線

**Figure 2-1.** Time course of glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes incubated with 0.2  $\mu\text{Ci/mL}$  2DG. After the 12-hour incubation with 2% BSA KRHP buffer, cells were incubated with 0 (basal) or 100 nM insulin for 30 minutes. Then cells were assayed for 2DG uptake for indicated time.

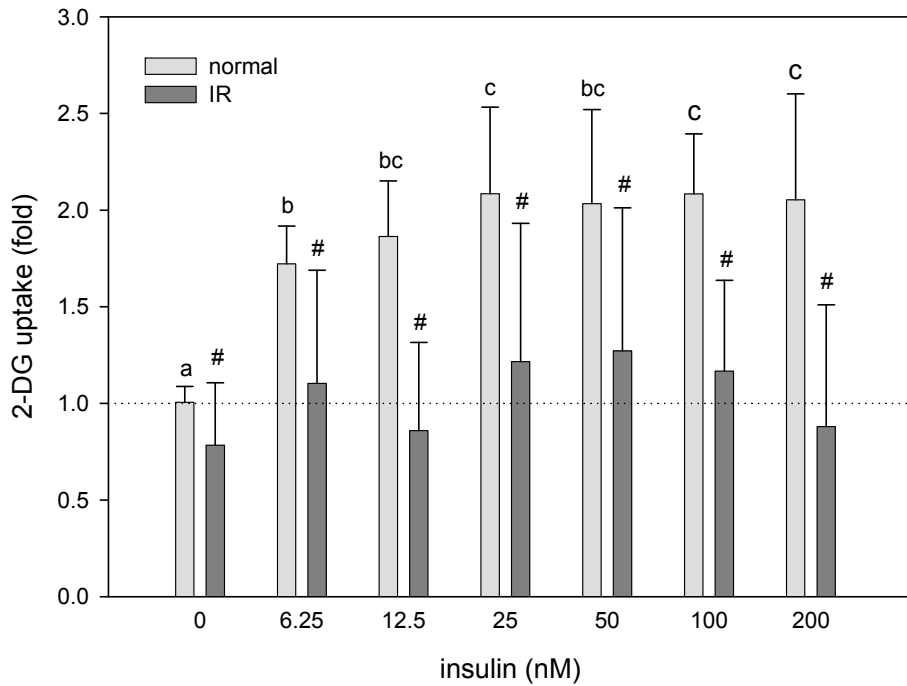


圖 2-2. 不同濃度胰島素處理對已分化 3T3-L1 脂肪細胞葡萄糖攝取效應

**Figure 2-2.** The insulin dose response curve of 2DG assay in 3T3-L1 adipocytes. Cells were treated with (IR) or without (normal) 1mM palmitic acid for 12 hours and incubated with various concentration of insulin for 30 minutes. The 2DG uptake by untreated 3T3-L1 adipocyte was taken as 1.0. Data are shown in mean  $\pm$  SD and are analyzed by one-way ANOVA,  $p < 0.05$  is considered statistically significant. # indicates  $p < 0.05$  versus corresponding normal groups by Student's  $t$  test.



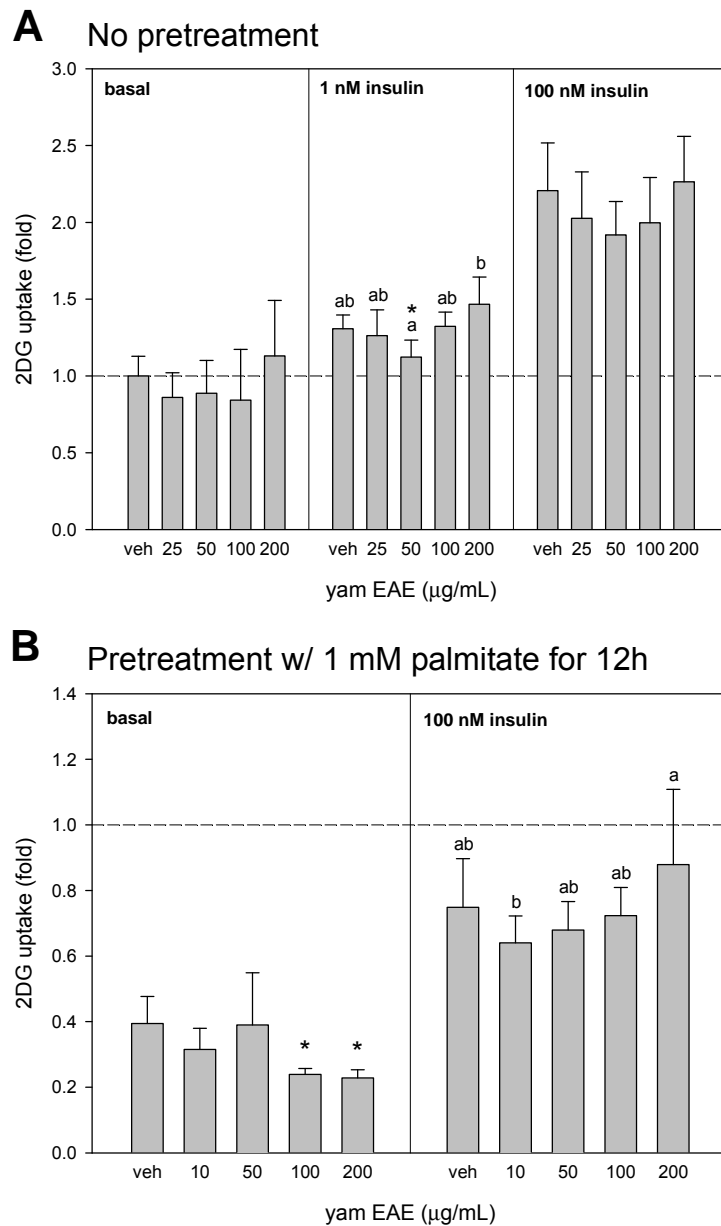


圖 2-3. 山藥乙酸乙酯萃物對已分化脂肪細胞葡萄糖攝取之影響

**Figure 2-3.** Effects of yam EA extract on glucose uptake in differentiated 3T3-L1 adipocytes. (A) Cells were treated with yam EAE in the presence of various concentrations of insulin for 6 hours. (B) Following an 12-hour pretreatment with yam EAE and 1 mM palmitic acid, cells were incubated with or without 100 nM insulin for 30 minutes. The 2DG uptake by untreated 3T3-L1 adipocyte was taken as 1.0. Data are shown in mean  $\pm$  SD and are analyzed by one-way ANOVA. \* indicates significant difference ( $p < 0.05$ ) from vehicle by Student's  $t$  test.

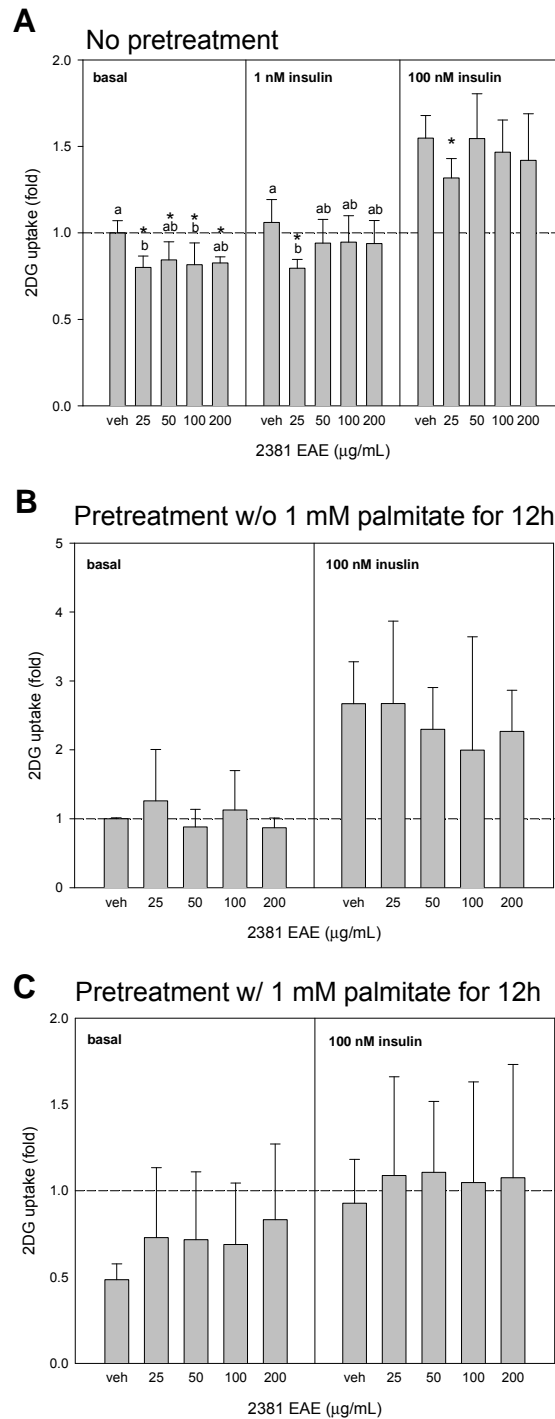


圖 2-4. 2381 品系山苦瓜乙酸乙酯萃物對已分化脂肪細胞葡萄糖攝取之影響

**Figure 2-4.** Effects of 2381 bitter gourd EA extract on glucose uptake in differentiated 3T3-L1 adipocytes. (A) 2381 EAE were treated with various concentrations of insulin for 30 minutes. In the other hand, samples were treated w/o (B) or w/ (C) 1 mM palmitic acid for 12 hours followed by a 30-minute incubation with or without 100 nM insulin. The 2DG uptake by untreated 3T3-L1 adipocyte was taken as 1.0. Data are shown in mean  $\pm$  SD and are analyzed by one-way ANOVA. \* indicates significant different ( $p < 0.05$ ) from vehicle by Student's  $t$  test.

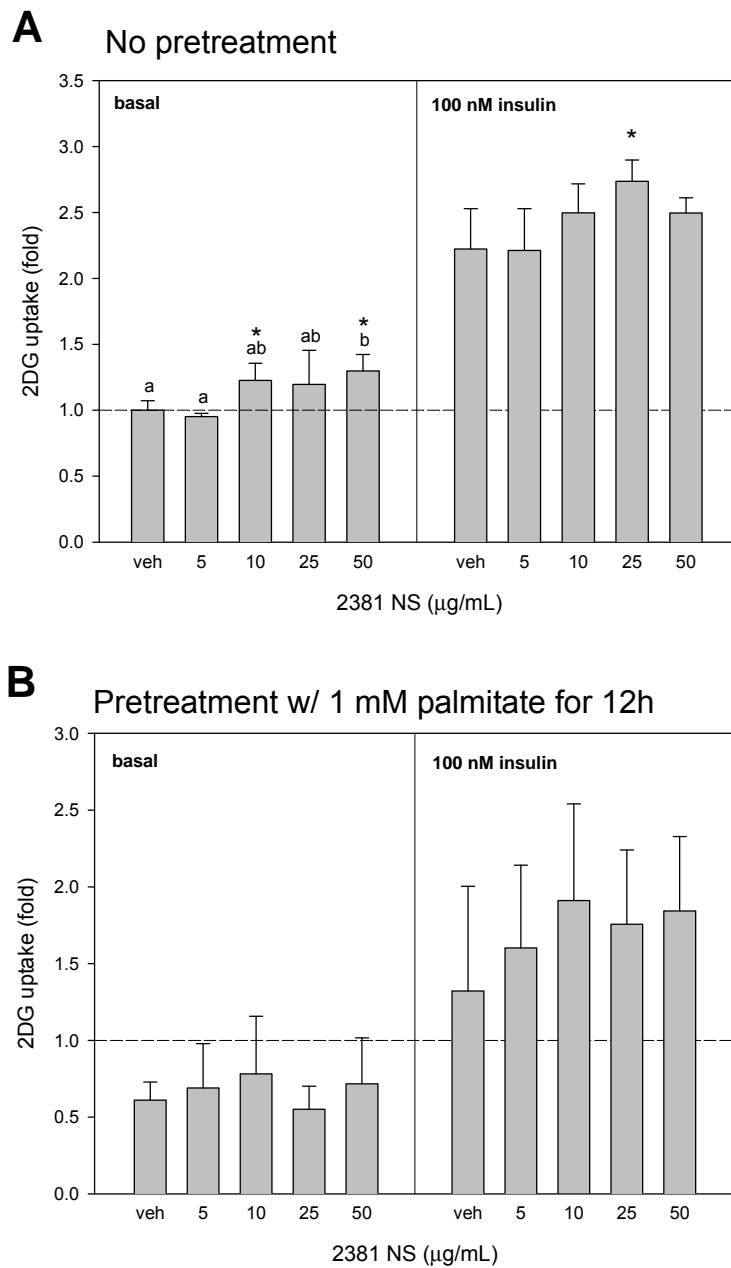


圖 2-5. 2381 品系山苦瓜不皂化物對已分化脂肪細胞葡萄糖攝取之影響

**Figure 2-5.** Effects of 2381 bitter gourd unesterified extract on glucose uptake in differentiated 3T3-L1 adipocytes. 2381 NS were treated without (A) or with (B) 1 mM palmitic acid for 12 hours followed by a 30-minute incubation under basal or 100 nM insulin stimulation. The 2DG uptake by untreated 3T3-L1 adipocyte was taken as 1.0. Data are shown in mean  $\pm$  SD and are analyzed by one-way ANOVA. \* indicates significant different ( $p < 0.05$ ) from vehicle by Student's *t* test.

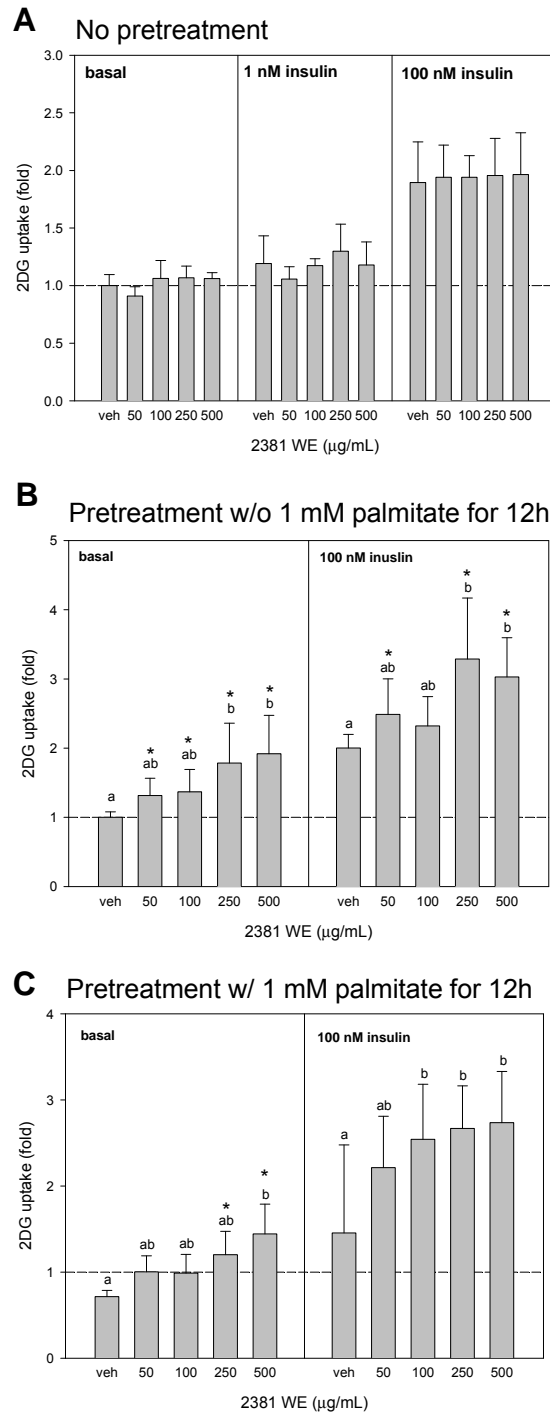


圖 2-6. 2381 品系山苦瓜水萃物對已分化脂肪細胞葡萄糖攝取之影響

**Figure 2-6.** Effects of 2381 bitter melon water extract on glucose uptake in differentiated 3T3-L1 adipocytes. (A) 2381 WE were treated with various concentrations of insulin for 30 minutes. In the other hand, samples were treated w/o (B) or w/ (C) 1 mM palmitic acid for 12 hours followed by a 30-minute incubation under basal or 100 nM insulin stimulation. The 2DG uptake by untreated 3T3-L1 adipocyte was taken as 1.0. Data are shown in mean  $\pm$  SD and are analyzed by one-way ANOVA. \* indicates significant different ( $p < 0.05$ ) from vehicle by Student's *t* test.

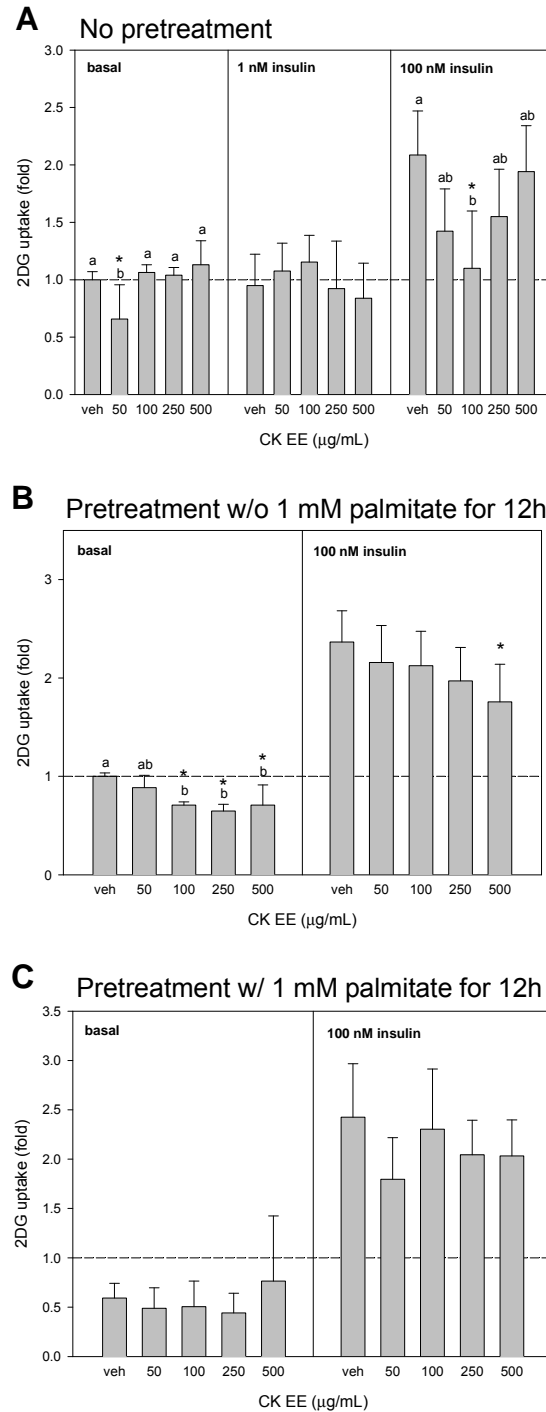


圖 2-7. CK 品系山苦瓜乙醇萃物對已分化脂肪細胞葡萄糖攝取之影響

**Figure 2-7.** Effects of CK bitter gourd ethanol extract on glucose uptake in differentiated 3T3-L1 adipocytes. (A) CK EE were treated with various concentrations of insulin for 30 minutes. In the other hand, samples were treated w/o (B) or w/ (C) 1 mM palmitic acid for 12 hours followed by a 30-minute incubation under basal or 100 nM insulin stimulation. The 2DG uptake by untreated 3T3-L1 adipocyte was taken as 1.0. Data are shown in mean  $\pm$  SD and are analyzed by one-way ANOVA. \* indicates significant different ( $p < 0.05$ ) from vehicle by Student's *t* test.

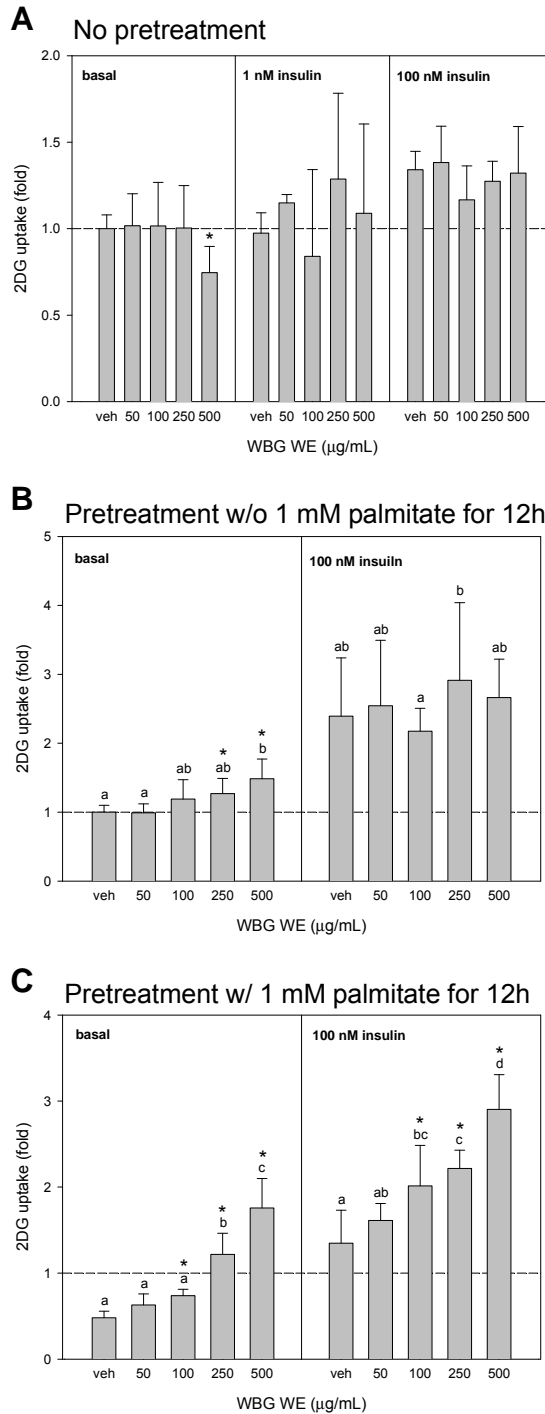


圖 2-8. 白苦瓜水萃物對已分化脂肪細胞葡萄糖攝取之影響

**Figure 2-8.** Effects of white bitter gourd water extract on glucose uptake in differentiated 3T3-L1 adipocytes. (A) WBG WE were treated with various concentrations of insulin for 30 minutes. In the other hand, samples were treated w/o (B) or w/ (C) 1 mM palmitic acid for 12 hours followed by a 30-minute incubation under basal or 100 nM insulin stimulation. The 2DG uptake by untreated 3T3-L1 adipocyte was taken as 1.0. Data are shown in mean  $\pm$  SD and are analyzed by one-way ANOVA. \* indicates significant different ( $p < 0.05$ ) from vehicle by Student's  $t$  test.

#### 第四節 討論

脂肪組織相關的實驗的常用材料主要是初代脂肪細胞或 3T3-L1 前脂肪細胞株，而本實驗旨在以 3T3-L1 細胞株經分化成熟後，測量樣品處理對細胞葡萄糖攝取情況的影響，並以 palmitic acid 試圖誘發胰島素抗性，瞭解各食材萃物是否有改善功效。而除確認本分析方法在不同胰島素刺激下脂肪細胞的葡萄糖攝取量有劑量效應外，以 1 mM palmitic acid 處理細胞 12 小時，於 100 nM 胰島素刺激下脂肪細胞葡萄糖攝取率下降至正常狀況的 60%，與文獻報導相符 (Van Epps-Fung et al., 1997)。因此，本模式應可供評估各食材萃物樣品對脂肪細胞攝取葡萄糖是否有改善功效。

PPAR $\gamma$  的表現除了對促進脂肪細胞分化極其重要 (Rosen et al., 1999)，根據 Liao 等人利用 siRNA 的方法顯示 PPAR $\gamma$  knockdown 會使得分化後 3T3-L1 的 GLUT1 與 GLUT4 表現量均下降，因此同時影響了 basal 與胰島素刺激下的葡萄糖攝取 (Liao et al., 2007)。先前亦有研究指出 TZD 類專一性活化 PPAR $\gamma$  的藥物增加已分化脂肪細胞的基礎葡萄糖攝取率 (basal glucose uptake)，且增加 GLUT1 的表現 (Tafari, 1996)。更有研究進一步指出以 0.1  $\mu$ M rosiglitazone 處理 3T3-L1，24 小時後可增加脂肪細胞基礎葡萄糖攝取率，48 小時後亦開始觀察到胰島素刺激下的葡萄糖攝取增加。但 48 小時處理下，細胞無論是否有胰島素刺激，GLUT1 的表現量較對照組上升，GLUT4 表現量卻無改變 (Nugent et al., 2001)。另外也有文獻指出 TZD 可以增加 3T3-L1 脂肪細胞 IRS2 的 mRNA 表現，但不影響 IRS1, Akt, GLUT4; PPAR $\alpha$  活化劑則是對 IRS2 亦無影響 (Smith et al., 2001)。本研究也以 BRL 49653 作為樣品處理有誘發胰島素抗性脂肪細胞時的正對照組，但細胞葡萄糖攝取率並未回復至無胰島素抗性細胞的相同程度 (data not shown)。而回顧文獻中以脂肪酸誘發脂肪細胞胰島素抗性後再以 TZD 類藥物改善的相關研究卻付之闕如。

本實驗室先前確認具有活化 PPAR $\gamma$  效力的山苦瓜及山藥乙酸乙酯萃物，在本研究中對於有胰島素抗性的 3T3-L1 脂肪細胞葡萄糖攝取未有促進，甚至山藥乙酸

乙酯萃物在高濃度有些許抑制的效果，這與先前文獻指出活化 PPAR $\gamma$  有增加葡萄糖攝取率、改善胰島素抗性的結果不符 (Chiarelli and Di Marzio, 2008)。推究其原因除了食材萃物 PPAR $\gamma$  活化效力不及藥物的因素以外，由於乙酸乙酯萃物當中存在許多脂肪酸，其對於脂肪細胞胰島素抗性的影響也值得加以考慮。此外，針對山藥乙酸乙酯萃物與胰島素共處理 30 分鐘時有抑制葡萄糖攝取的情況 (圖 2-3A)，可以推測山藥乙酸乙酯萃物當中或許尚有胰島素的拮抗物或抑制 GLUT4 活化的物質，但仍需進一步的研究來證實。不過山苦瓜乙酸乙酯萃物則是對 basal 的葡萄糖攝取有較顯著的抑制情形，比較偏向於 GLUT1 的作用被抑制。值得一提的是，大鼠脂肪組織分離出的脂肪細胞中，所有葡萄糖轉運蛋白約有 97% 屬於 GLUT4 (Oka et al., 1988)，但在 3T3-L1 當中 GLUT4 大約只佔了 33% (Calderhead et al., 1990)，意即在此細胞株中 GLUT1 的表現量較高，而 Liao 等人的研究認為在 3T3-L1 當中，GLUT1 不只參與了基礎葡萄糖攝取，對於胰島素刺激下的葡萄糖攝取也扮演了一部份的角色 (Liao et al., 2006)。因此在 2381 山苦瓜乙酸乙酯萃物當中所見對胰島素的些許拮抗效果可能會對 GLUT1 產生影響，造成基礎葡萄糖攝取下降。此外，文獻當中亦有指出以 clofibrate 此種 PPAR $\alpha$  活化劑處理分化後之 3T3-L1 細胞 12 小時，會降低 GLUT4 mRNA 表現量，與活化 PPAR $\gamma$  相反 (Long and Pekala, 1996)。而山藥與山苦瓜乙酸乙酯萃物在本實驗室以 transactivation assay 分析，兩者均為 PPAR $\alpha/\gamma$  雙效活化劑，且對 PPAR $\alpha$  的活化效果較高。因此本研究中以樣品前處理 12 小時再進行葡萄糖攝取試驗的模式中，並未看到此二種樣品對已誘發胰島素抗性之脂肪細胞葡萄糖攝取的促進，可能便是活化不同形式 PPAR 交互影響的結果。

雖然山藥及 2381 山苦瓜乙酸乙酯萃物之 PPAR $\gamma$  活性在本實驗模式中對脂肪細胞的葡萄糖利用似乎看不出明顯相關性，但 2381 山苦瓜乙酸乙酯萃物當中的不皂化物，卻在 12 小時樣品處理之下，能夠有效增加 basal 與 100 nM 胰島素刺激下的葡萄糖攝取。由於 2381 山苦瓜的不皂化物是乙酸乙酯萃物當中 PPAR $\gamma$  活性相對較



高的部分，因此有可能是因為不皂化物部分較整體乙酸乙酯萃物成分更為單純，除去了脂肪酸對於成熟脂肪細胞降低葡萄糖攝取的影響，而更能顯示出活化 PPAR $\gamma$  在脂肪細胞葡萄糖攝取上的角色。然而不論是乙酸乙酯萃物或不皂化物，仍須進一步純化分離出 PPAR $\gamma$  的活性成分，才能進一步證實此推論。

苦瓜是亞洲地區可作為中草藥的常見蔬果之一，其降血糖效果最引人注意，且已在許多動物模式與人體試驗當中獲得證實 (Grover and Yadav, 2004)。因此本研究更進一步分析 CK 品系山苦瓜除去乙酸乙酯可溶性物質後的乙醇萃物，發現無法改善有胰島素抗性下脂肪細胞的葡萄糖攝取能力，但無胰島素抗性誘發下經 12 小時樣品處理卻反而呈現抑制脂肪細胞攝取葡萄糖的現象。先前 Yibehok-Aunu 等人的研究，利用酸性酒精萃取苦瓜果肉部分，所得萃物當中 >10 kDa 的蛋白質部分具有增加分化後 3T3-L1 細胞 basal 和有胰島素刺激下的葡萄糖攝取的效果，在 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  樣品處理 4 小時以上均能看到顯著增加 (Yibchok-Anun et al., 2006)，與本實驗結果不相符。而 Roffey 等人利用氯仿除去苦瓜全果脂溶性物質後，再以 95% 乙醇萃取，萃物處理脂肪細胞 30 分鐘會降低 basal 與 50 nM 胰島素下的葡萄糖攝取，且有劑量效應 (Roffey et al., 2007)，則又與本實驗結果相近。因此推測本實驗與 Yibehok-Aunu 等人的研究差異主要是由於萃取方式有很大不同，導致所得萃物成分差異亦大的關係。

此外，本實驗室先前以 C57BL/6J 小鼠實驗結果顯示，餵食山苦瓜水萃物能有效降低血糖值，因此本研究也利用 2381 山苦瓜與市售常見的白苦瓜水萃物進行脂肪細胞的葡萄糖攝取試驗。先前 Roffey 等人的研究中指出苦瓜水萃物可能具有類似胰島素物質，在低濃度胰島素刺激下有 synergistic 效應，但改以高濃度胰島素刺激則呈現隨樣品濃度增加而抑制的趨勢。作者推測可能是該物質會與胰島素競爭胰島素受器且可活化胰島素訊息傳遞路徑的綜合效果 (Roffey et al., 2007)。然而在本研究中則不見兩種苦瓜水萃物有類似效應，反倒是在 12 小時較長時間樣品處理後，在無胰島素抗性與有誘發胰島素抗性的模式下，有隨樣品劑量增加而增加脂

肪細胞葡萄糖攝取的效果。將兩種苦瓜品系增加葡萄糖攝取的能力加以比較可以發現，在細胞無胰島素抗性的正常情形下以 2381 的促進效果較高，且不論是否有胰島素刺激下，皆於 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度以上便顯著比 vehicle 增加；但有胰島素抗性誘發時，同樣不論是否有胰島素刺激，則是以白苦瓜改善細胞葡萄糖攝取的效果較好。值得注意的是，在有胰島素抗性下兩種苦瓜水草物最高濃度對於脂肪細胞葡萄糖攝取能力的改善幅度，已超過無胰島素抗性情況下的 vehicle 組。而本實驗所選用誘發脂肪細胞胰島素抗性的方法是以 1 mM palmitic acid 處理 12 小時，文獻指出此法是透過細胞 NF $\kappa$ B 轉錄增加，進而使得 IL-6 與 TNF $\alpha$  的表現量上升，逐步影響 PI3K 此一胰島素訊息傳遞路徑的活化 (Ajuwon and Spurlock, 2005)。因此要達到改善胰島素抗性效果可能有以下幾方面：(1) 抑制脂肪酸進入細胞內，(2) 增加細胞對於脂肪酸的代謝，如增加  $\beta$ -oxidation，(3) 抑制訊息傳遞路徑中免疫分子表現或 PKC $\delta$  磷酸化 (Dey et al., 2006)。除此之外，由於苦瓜水草物對無胰島素抗性的情況下也有促進效果，且不限於有胰島素刺激下的情況，顯示萃物成分可能直接或間接增進葡萄糖轉運蛋白 (例如 GLUT1) 的表現，而不只侷限於活化胰島素訊息傳遞路徑，因此在胰島素抗性模式下，才會看到比正常情形更高的葡萄糖攝取率。然而苦瓜水草物究竟透過何種路徑、其中的有效成分為何仍需更進一步的探討。

## 第五節 結論

苦瓜之成分具有增進脂肪細胞葡萄糖攝取的能力，並可改善胰島素抗性。此有效成分不限於單一品種，且存在於水草物，屬於較高極性的物質，值得進一步探討。

## 第三章 白苦瓜水萃物增進脂肪細胞葡萄糖攝取之探討

### 第一節 前言

苦瓜是亞洲地區可作為養生食材的常見蔬果之一，其降血糖效果最引人注意，且已在許多動物模式與人體試驗當中獲得證實 (Grover and Yadav, 2004)。在許多針對脂肪細胞的研究文獻中，認為苦瓜水萃物或酸酒精萃物，可能含有 (1) insulin-like peptide 具有 antilipolytic 及 lipogenic 的活性 (Ng et al., 1986b)，(2) saponin 會抑制 lipolysis，並促進細胞葡萄糖轉為脂質儲存 (Ng et al., 1986d, 1987a)，(3) lectin (Ng et al., 1986a; Ng et al., 1989) 可促進 lipogenic 途徑，(4) 其他尚未完全明瞭的蛋白質類，可以促進脂肪細胞對葡萄糖的攝取等 (Roffey et al., 2007; Yibchok-Anun et al., 2006)。此外，近來有文獻已更分離鑑定出苦瓜當中的 triterpenoid 可以藉由活化 AMPK (AMP-activated protein kinase) 訊息傳遞路徑，增加細胞 GLUT4 轉位，具有改善胰島素抗性的功效 (Tan et al., 2008)。

在前一章中，已經確認白苦瓜與山苦瓜水萃物均具有增進成熟 3T3-L1 脂肪細胞葡萄糖攝取的能力，且對於脂肪酸所誘發的胰島素抗性有回復的效果，且以白苦瓜水萃物效果更加顯著。因此，本章將針對白苦瓜水萃物做更進一步探討，藉以推測當中的有效成分與作用機制。

## 第二節 材料與方法

### 一、細胞株

同第二章第二節

### 二、培養基與藥品試劑

#### (一) 細胞培養與分化

同第二章第二節

#### (二) 葡萄糖攝取試驗

1. wortmannin (Sigma W1628)

2. compound c (Sigma P5499)

其餘同第二章第二節

#### (三) 細胞蛋白質萃取

1. IGEPAL CA-630 (Sigma I7771)

2. Protease inhibitor cocktail (Sigma P8340)

3. Phosphatase inhibitor cocktail 1/2 (Sigma P2850/P5726)

4. BCA protein assay kit (Pierce 23227)

5. Buffer A

Tris-HCl (Sigma T3253)	788.0 mg
------------------------	----------

Dithiothreitol (DTT, Sigma D0632)	7.7 mg
-----------------------------------	--------

---

二次水混勻後調至 pH 8.0，定容至 100 mL。4°C 保存。

#### (四) SDS 蛋白質電泳

1. APS (Sigma A3678)

2. SDS (J. T. Baker 4095-04)

3. 蛋白質標準品 Prestained protein ladder (Fermentas SM0671, SM0672)

4. 追蹤染料

1 mg bromophenol blue 溶於 5 mL 通用電泳緩衝液，加 5mL 甘油混勻

5. A 液 40% acrylamide/bis-acrylamide 37.5:1 (Bioshop ACR005.500)

使用前以二次水稀釋為 30%

6. B 液

Tris (J. T. Baker 4109-02)	18.2 g
TEMED (Merck K22419132 702)	0.36 mL

二次水混勻後調至 pH 8.8，定容至 100 mL。4°C 避光保存。

7. C 液

Tris (J. T. Baker 4109-02)	6 g
TEMED (Merck K22419132 702)	0.4 mL

二次水混勻後調至 pH 6.8，定容至 100 mL。4°C 避光保存。

8. SDS 膠體電泳樣本溶液 5X stock

Tris (J. T. Baker 4109-02)	0.75 g
EDTA · 2Na (Merck K37887118)	37.25 g
SDS (J. T. Baker 4095-04)	1.00 g
β-mercaptoethanol (Sigma M3148)	2.50 mL

二次水混勻後調至 pH 6.8，定容至 10 mL。

9. SDS 電泳緩衝液 5X stock

Tris (J. T. Baker 4109-02)	54.5 g
EDTA · 2Na (Merck K37887118)	4.7 g
Boric acid (Sigma B6768)	24.8 g

以二次水混勻後調至 pH 8.4，定容至 1 L。使用前以二次水稀釋 5 倍，並加入 1% SDS。

(五) 蛋白質電泳轉印與酵素免疫染色

1. 一次抗體

Phospho-AMPK $\alpha$  (Thr172) rabbit mAb (Cell signaling 2535)

Phospho-Akt (Ser 473) rabbit mAb (Cell signaling 9271)

AMPK $\alpha$  rabbit mAb (Cell signaling 2532)

Akt rabbit mAb (Cell signaling 9272)

GAPDH rabbit mAb (Cell signaling 14C10)

$\beta$ -actin mouse mAb (Sigma A5441)

2. 二次抗體

Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody (Cell signaling 7074)

Anti-mouse IgG, HRP-linked antibody (Cell signaling 7076)

3. 呈色劑 ECL plus (GE Healthcare RPN2132)

4. PBST

PBS 5X stock 以二次水稀釋時加入 0.05% Tween 20

5. 甲醇 (Merck)

6. 轉印緩衝液 10X stock

Tris (J. T. Baker 4109-02) 30.3 g

Glycine (J.T. Backer 4059-02) 144 g

以二次水混勻後調至 pH 8.3，定容至 1 L。使用前以二次水稀釋 10 倍。

7. 明膠-NET

Gelatin (Sigma G2500) 2.50 g

NaCl (Mallinckrodt 7581-06) 8.75 g

EDTA • 2Na (Merck K37887118) 1.80 g

Tris (J. T. Baker 4109-02) 6.05 g

Tween 20 (Merck S4927784-802) 0.5 mL

以二次水加熱混勻後調至 pH 8.0，定容至 1 L。

8. PBS 5X stock

NaCl (Mallinckrodt 7581-06) 38.0 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Nacalai tesque 317-20) 7.8 g

以二次水混勻後調至 pH 7.0，定容至 1 L。使用前以二次水稀釋 5 倍。

9. PBST

PBS 5X stock 以二次水稀釋時加入 0.05% Tween 20

10. ECL plus (GE Healthcare RPN2132)

三、儀器設備

(一) 細胞培養與葡萄糖攝取試驗

同第二章第二節

(二) 樣品製備

1. 3 kDa 超過濾濾膜與濾杯 (PALL JUMBOSEP disc and starter)
2. 離心機 (KUBOTA 3700) 與轉子 (AF-2724A)

(三) 蛋白質電泳、轉印與免疫呈色

1. 鑄膠套件：

鑄膠器 (Hoefer dual gel caster, 4-gel caster)

玻璃片

陶瓷片

塑膠片

0.75 mm 間隔條

10-well 樣本梳

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 Immobilon-P)
6. 平台震盪器
7. 化學冷光影像系統 (UVP autochemi system)

#### 四、實驗材料

1. 白苦瓜水萃物 (WBG WE)

同第二章第二節

2. 加熱白苦瓜水萃物 (cooked WBG WE)

100 µg/mL 回溶白苦瓜水萃物 stock 實驗前以 100°C 水浴 10 分鐘，立刻置於冰上冷卻。

3. <3 kDa 小分子白苦瓜水萃物

白苦瓜水萃物以 3 kDa 超過濾膜進行離心區分，<3 kDa 部分經冷凍乾燥，回收率為 52%，於 -20°C 保存。以二次水回溶為 100 µg/mL stock，-20°C 避光保存。



#### 五、實驗方法

1. 細胞培養與分化

- (1) 葡萄糖攝取實驗細胞

同第二章第二節

- (2) 蛋白質萃取實驗細胞

繼代培養時經細胞計數後，以  $3 \times 10^5$  細胞數種入 10 cm 平底細胞培養盤，培養於 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 中。4 日後達全滿 (confluence) 時更換培養基，繼續培養 2 日 (post-confluence)，改以添加含有 0.25 µM Dex, 0.5 mM IMX, 100 ng/mL biotin, 10 µg/mL insulin 之 10% BS DMEM 分化培養基 (DM I) 培養 4 日。更換為僅含 100 ng/mL biotin 與 10 µg/mL insulin 之 10% BS DMEM 分化培養基 (DM II)，每 2 日更換 DM II 一次，12 日後分化完成。



## 2. 胰島素抗性之誘發與葡萄糖攝取試驗

同第二章第二節。唯在專一性抑制 Akt/PI3K 途徑或 AMPK 途徑的實驗中，400 nM wortmannin 與 40  $\mu$ M compound c 的處理與 1 mM palmitic acid, 10 nM glucose, 2% fatty acid-free BSA KRHP 同時，共 12 小時處理時間。

## 3. 細胞蛋白質萃取

主要參考 Nishiumi 與 Ashida 的方法並加以修改 (Nishiumi and Ashida, 2007)。細胞以冰 KRHP 清洗後，以含 0.1% IGEPAL CA-630, 1% protease inhibitor, 1% phosphatase inhibitor 之冰 buffer A 刮下細胞，均質後以 1 mL 針筒來回過 25G 針頭三次。經 4°C, 1000 $\times$ g 離心 10 分鐘，沈澱部分以 1% protease inhibitor, 1% phosphatase inhibitor 之冰 buffer A 懸浮，冰浴 10 分鐘，再以 4°C, 1000 $\times$ g 離心 10 分鐘。混合兩次離心所得上清部分，以 4°C, 16000 $\times$ g 離心 10 分鐘，上清部分即為細胞蛋白質樣品，以 BCA protein assay kit 測定蛋白質濃度後置於 -80°C 保存。

## 4. 預鑄 SDS 蛋白質電泳膠片

電泳膠片依下列比例配製 (單位 mL)：

膠體溶液	10% 分離膠體	4% 焦集膠體
二次水	4.0	2.95
A 液	3.3	0.66
B 液	2.5	—
C 液	—	1.24
10% SDS	0.1	0.05
10% APS	0.1	0.10
總體積	10	5.00

鑄膠套件組合完成後，加入分離膠體至 2/3 至 3/4 高度，再於上方加入約 200  $\mu$ L 異丙醇壓平膠面。靜置待膠體完全凝固後，倒出上方異丙醇，加滿焦集膠體，立刻插入樣本梳。靜置待膠體完全凝固後，拆卸鑄膠套件取出膠片，將多餘凝膠去除，可與少量二次水封於封口袋中置於 4°C 暫存。

## 5. SDS 蛋白質電泳

10  $\mu\text{g}$  蛋白質樣品加入 1/4 體積 SDS 膠體電泳樣本溶液，再加入約 2  $\mu\text{L}$  追蹤染料，於 100°C 水浴 5 分鐘。立刻置於冰上冷卻。回復室溫的膠片架上電泳槽夾妥後，注入稀釋後之 SDS 電泳緩衝液，清洗樣本槽。蛋白質標準品與冷卻後之樣品，經離心後分別注入樣本槽中，以 120V 進行電泳。

## 6. 轉印

PVDF 轉印膜先以甲醇潤溼，浸入轉印緩衝液中平衡。多孔海綿以轉印緩衝液浸溼，鋪上一張濾紙，小心將膠片置於其上，再覆上 PVDF 轉印膜 (各層間不可有氣泡)，並蓋上一張濾紙與多孔海綿，以轉印卡匣夾緊。轉印卡匣置入注滿轉印緩衝液的轉印槽中，PVDF 面朝正極，除去卡匣內氣泡，以 400 mA 進行轉印 60 分鐘。

## 7. 酵素免疫染色

轉印完成之 PVDF 轉印膜以 PBST 震盪清洗 10 分鐘四次，加入以明膠-NET 1:1000 (Thr172 p-AMPK, AMPK, Ser473 p-Akt, Akt, GAPDH) 或 1:5000 ( $\beta$ -actin) 稀釋的一次抗體，室溫震盪 1 小時或 4°C 隔夜。移除一次抗體後以 PBST 震盪清洗 10 分鐘三次，加入以明膠-NET 1:5000 稀釋的二次抗體 (anti-rabbit IgG HRP-linked Ab 或 anti-mouse IgG HRP-linked Ab)，室溫震盪 1 小時。移除二次抗體後再以 PBST 震盪清洗 10 分鐘三次。除去 PBST 後，加入呈色劑，以化學冷光顯影系統偵測照相。

## 六、數據整理與統計分析

同第二章第二節

### 第三節 結果

#### 一、白苦瓜水萃物無法改善高胰島素處理引起脂肪細胞之胰島素抗性 (圖 3-1)

改以 100 nM 胰島素處理達 12 小時，代替上章中利用 1 mM palmitic acid 來作為胰島素抗性的誘發模式，結果發現原本可於 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  便有顯著改善胰島素刺激下脂肪細胞葡萄糖攝取效果的白苦瓜水萃物，在此看不到任何促進葡萄糖攝取的功效。

#### 二、白苦瓜水萃物加熱後減弱對脂肪細胞胰島素抗性的改善功效 (圖 3-2)

利用加熱後的白苦瓜水萃物處理以 1 mM palmitic acid 誘發胰島素抗性的成熟脂肪細胞，在 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度下才對葡萄糖攝取有顯著的促進，約比 vehicle 組增加 35%。這比第二章中白苦瓜水萃物於 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  可增加 115% 相較之下，效果減弱許多，意即加熱對於白苦瓜促進脂肪細胞葡萄糖攝取的能力減弱至原來的三分之一。

#### 三、白苦瓜水萃物改善脂肪細胞胰島素抗性能力與胰島素訊息傳遞路徑有關

PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) 與 Akt (或稱 PKB, protein kinase B) 是胰島素訊息傳遞路徑下游的重要分子，在有胰島素刺激下可受磷酸化而活化，進行訊息傳遞。Wortmannin 可以通透細胞膜，和 PI3K 的 110kD 催化次體 (catalytic subunit) 相結合，專一性抑制 PI3K，因而抑制 PI3K/Akt 的訊息傳遞途徑。在以 1 mM palmitic acid 誘發胰島素抗性並處理樣品的同時，給予 400 nM wortmannin，可以看到原本不論在 basal 或 100 nM 胰島素刺激下，均可有效增加脂肪細胞葡萄糖攝取的白苦瓜水萃物，其改善的功效會因為添加 wortmannin 而降低，但並未完全被抑制 (圖 3-3)。

而利用西方點墨法分析 Akt，可以發現利用脂肪酸誘發胰島素抗性對 Akt 的總表現量並沒有影響，添加白苦瓜水萃物亦然。然而誘發胰島素抗性會造成脂肪細胞在胰島素刺激下的 Akt 磷酸化程度下降，對 basal 沒有影響，而添加

500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  白苦瓜水萃物後雖有上升的趨勢但並未達到統計上之顯著性 (圖 3-4)。

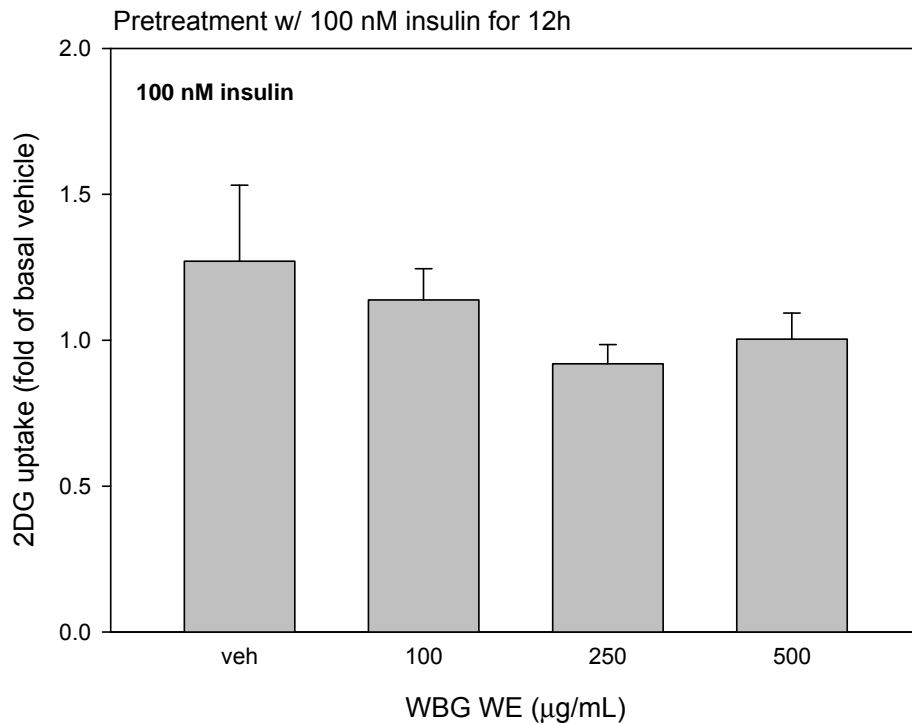
#### 四、白苦瓜水萃物改善脂肪細胞胰島素抗性能力並非透過 AMPK 途徑

AMPK (AMP-activated protein kinase) 是除了胰島素訊息傳導途徑以外，另一主要可以引發 GLUT4 轉位到細胞膜上的路徑 (Huang and Czech, 2007)。而 compound c 為一可透過細胞膜，專一性抑制 AMPK 的化合物。然而在處理樣品的同時給予 40  $\mu\text{M}$  compound c，並不影響白苦瓜水萃物在 basal 或 100 nM 胰島素刺激下改善具胰島素抗性脂肪細胞的效果 (圖 3-5)。另一方面，利用西方點墨法分析細胞中 AMPK 的表現與其磷酸化情況，可以發現胰島素抗性與否對脂肪細胞 AMPK 的總表現量與磷酸化活化形式的 AMPK 都沒有顯著影響，同樣地，白苦瓜水萃物處理也對兩者均無顯著影響 (圖 3-6)。

#### 五、白苦瓜水萃物小於 3 kDa 成分參與了部分改善胰島素抗性的角色

利用超過濾 (ultrafiltration) 的方式將白苦瓜水萃物在分子量 3 kDa 做簡單區分，小於 3 kDa 的部分在無胰島素刺激的情況下，可以小幅改善脂肪細胞因胰島素抗性所產生葡萄糖攝取能力下降的情況，在 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上可顯著較 vehicle 組增加約 12-14% ( $p < 0.05$ )。而在有胰島素刺激時，則是在 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  濃度下較 vehicle 組顯著增加 39% ( $p = 0.03$ )。(圖 3-7)

將小於 3 kDa 分子量的部分 (約佔整體白苦瓜水萃物的 52%) 與整體白苦瓜水萃物的效應作一比較，得知 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  白苦瓜水萃物顯著增加葡萄糖攝取的效果來自於小分子物質，兩者無論有無胰島素刺激下皆無顯著差異。但高濃度下白苦瓜水萃物的效果可能是來自較大分子的物質 (圖 3-8)。



**圖 3-1.** 白苦瓜水萃物對長時間胰島素處理產生胰島素抗性的脂肪細胞葡萄糖攝取之影響

**Figure 3-1.** Effects of white bitter gourd water extract on glucose uptake in differentiated 3T3-L1 adipocytes which were induced insulin resistance by chronic insulin. Cells were cotreated with WBG WE and 100 nM insulin for 12 hours followed by the measurement of insulin-stimulated glucose uptake. The 2DG uptake by untreated 3T3-L1 adipocyte was taken as 1.0. Data are shown in mean  $\pm$  SD and are analyzed by one-way ANOVA and Student's *t* test.  $p < 0.05$  is considered as significantly difference.

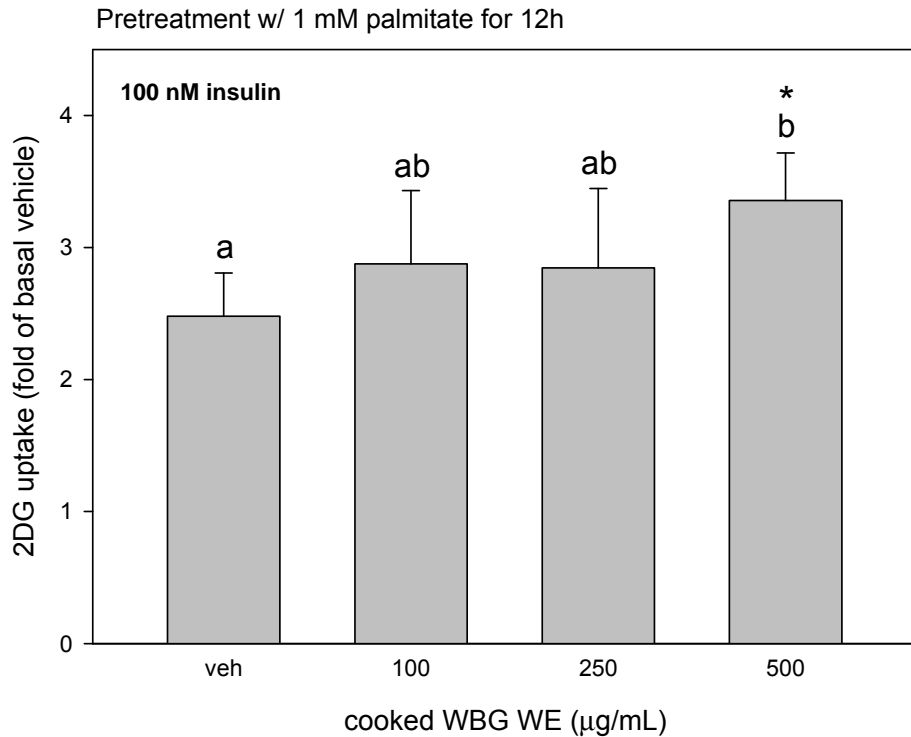


圖 3-2. 加熱後白苦瓜水萃物對具胰島素抗性的脂肪細胞葡萄糖攝取之影響

**Figure 3-2.** Effects of cooked white bitter gourd water extract on glucose uptake in differentiated 3T3-L1 adipocytes with insulin resistance. WBG WE was heated at 100°C water bath for 10 minutes and cooled on ice immediately. Cells were cotreated with cooked WBG WE and 1 mM palmitic acid for 12 hours followed by the measurement of insulin-stimulated glucose uptake. The 2DG uptake by untreated 3T3-L1 adipocyte was taken as 1.0. Data are shown in mean  $\pm$  SD and are analyzed by one-way ANOVA. \*  $p < 0.05$  versus vehicle group by Student's *t* test.

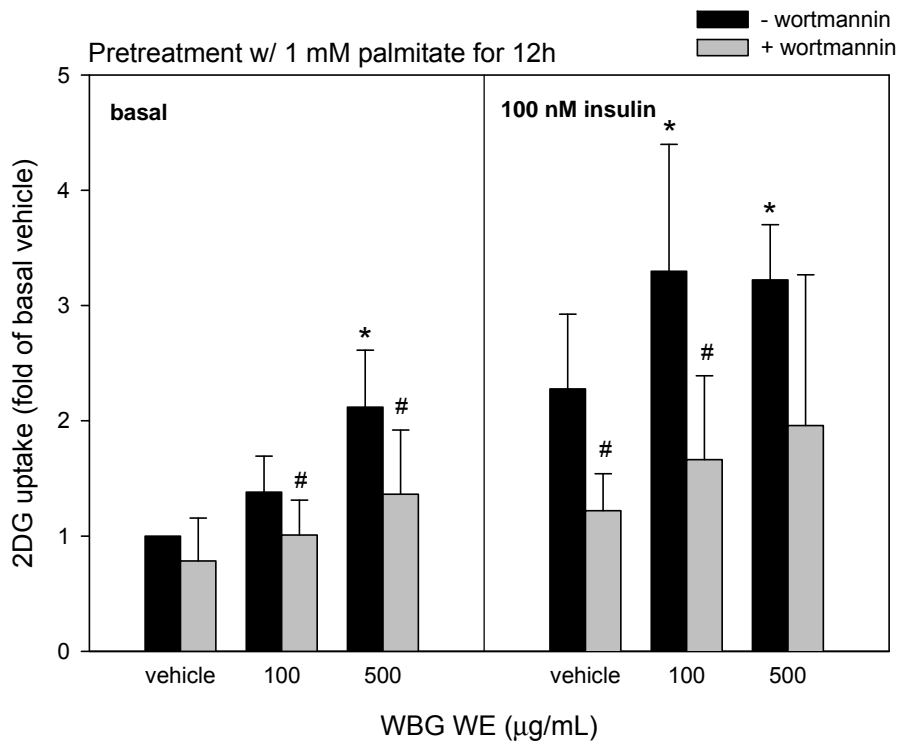


圖 3-3. 白苦瓜水萃物對具胰島素抗性的脂肪細胞胰島素訊息傳遞路徑之影響

**Figure 3-3.** Effects of white bitter gourd water extract on insulin signalling pathway in differentiated 3T3-L1 adipocytes with insulin resistance. Cells were cotreated with cooked WBG WE, 1 mM palmitic acid in the presence of vehicle or 400 nM wortmannin for 12 hours followed by a 30-minute incubation under basal or 100 nM insulin stimulation. Data are shown in mean  $\pm$  SD and are analyzed by paired *t* test. \*  $p < 0.05$  versus vehicle group. #  $p < 0.05$  versus corresponding group.

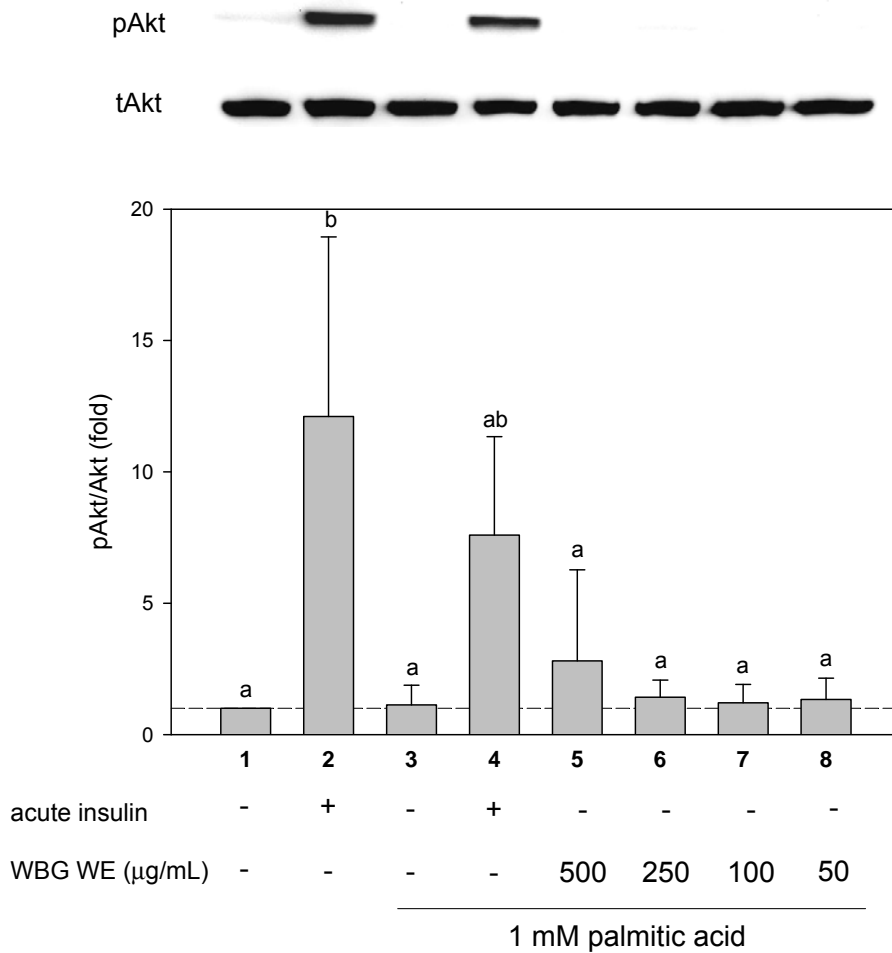


圖 3-4. 白苦瓜水萃物對具胰島素抗性的脂肪細胞 Akt 磷酸化之影響

**Figure 3-4.** Effects of white bitter gourd water extract on Akt phosphorylation in differentiated 3T3-L1 adipocytes with insulin resistance. Cells were cotreated with cooked WBG WE, 1 mM palmitic acid for 12 hours followed by a 30-minute incubation under basal or 100 nM insulin (acute insulin) stimulation. Equal amounts of cell lysates were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted for phospho-Akt (Ser473) and Akt. Quantifications are shown in mean  $\pm$  SD of three independent experiments and analyzed by one-way ANOVA ( $p < 0.05$ ).



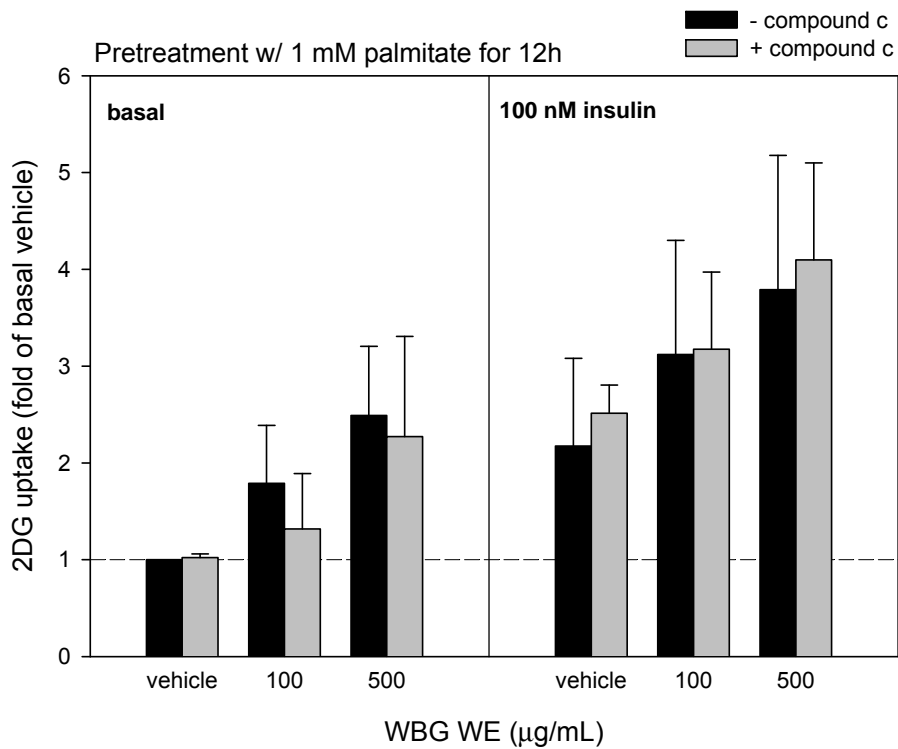
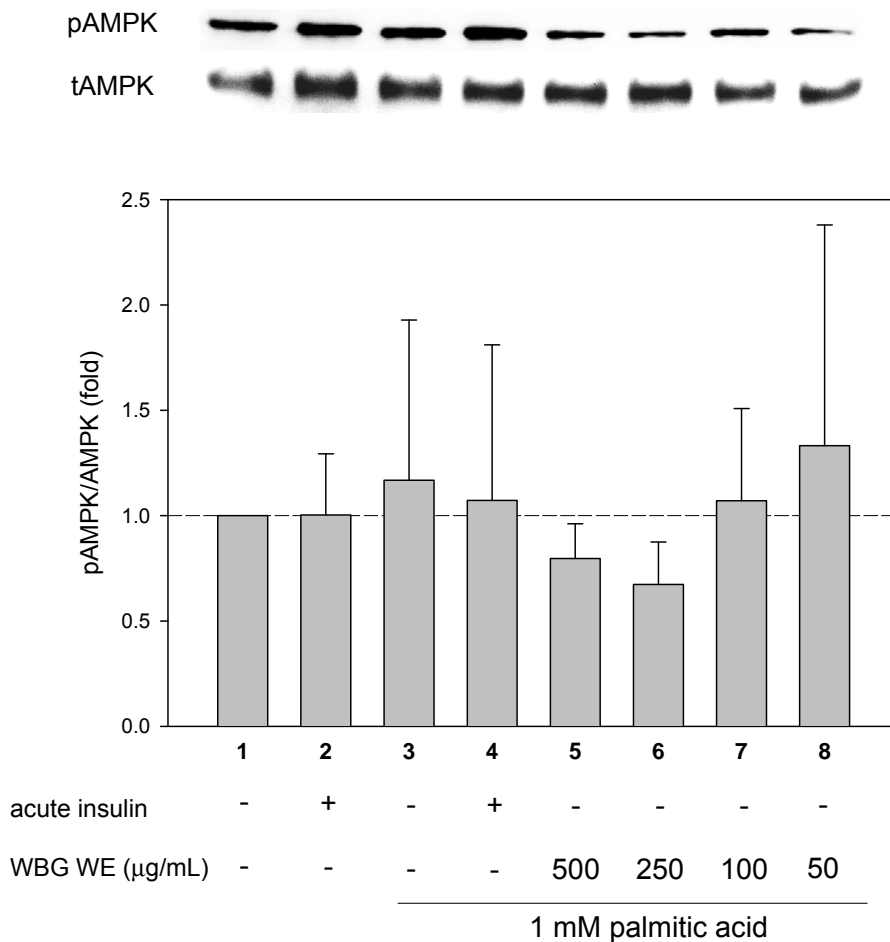


圖 3-5. 白苦瓜水萃物對具胰島素抗性的脂肪細胞 AMPK 訊息傳遞路徑之影響

**Figure 3-5.** Effects of white bitter gourd water extract on AMPK pathway in differentiated 3T3-L1 adipocytes with insulin resistance. Cells were cotreated with WBG WE, 1 mM palmitic acid in the presence of vehicle or 40 μM compound c for 12 hours followed by a 30-minute incubation under basal or 100 nM insulin stimulation. Data are shown in mean ± SD and are analyzed by Student's *t* test.



**圖 3-6.** 白苦瓜水萃物對具胰島素抗性的脂肪細胞 AMPK 磷酸化之影響

**Figure 3-6.** Effects of white bitter gourd water extract on AMPK phosphorylation in differentiated 3T3-L1 adipocytes with insulin resistance. Cells were cotreated with WBG WE, 1 mM palmitic acid for 12 hours followed by a 30-minute incubation under basal or 100 nM insulin (acute insulin) stimulation. Equal amounts of cell lysates were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted for phospho-AMPK (Thr172) and AMPK. Quantifications are shown in mean  $\pm$  SD of three independent experiments and analyzed by one-way ANOVA ( $p < 0.05$ ).

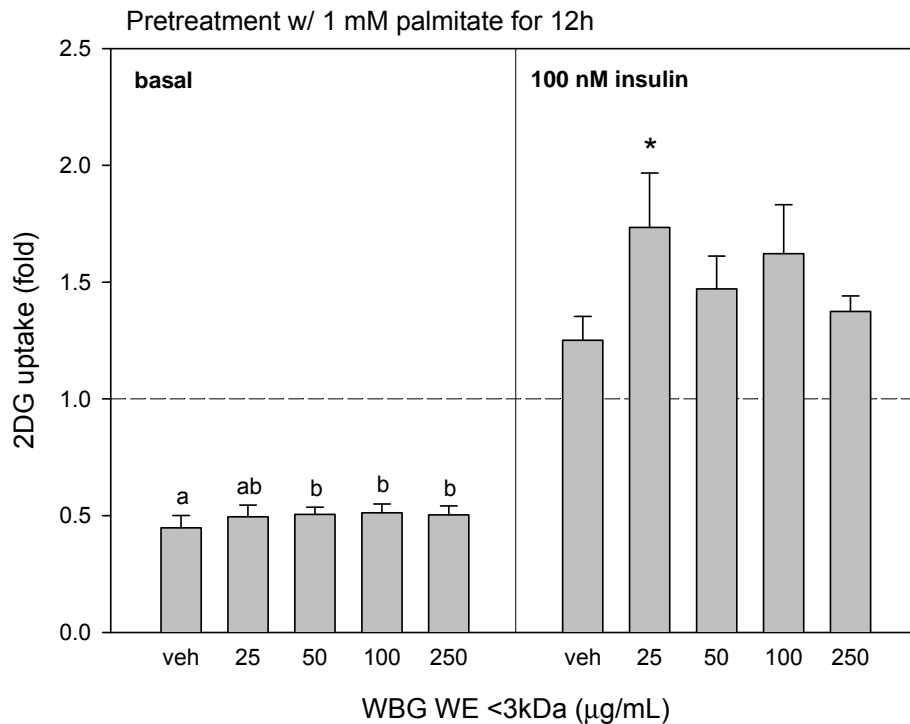
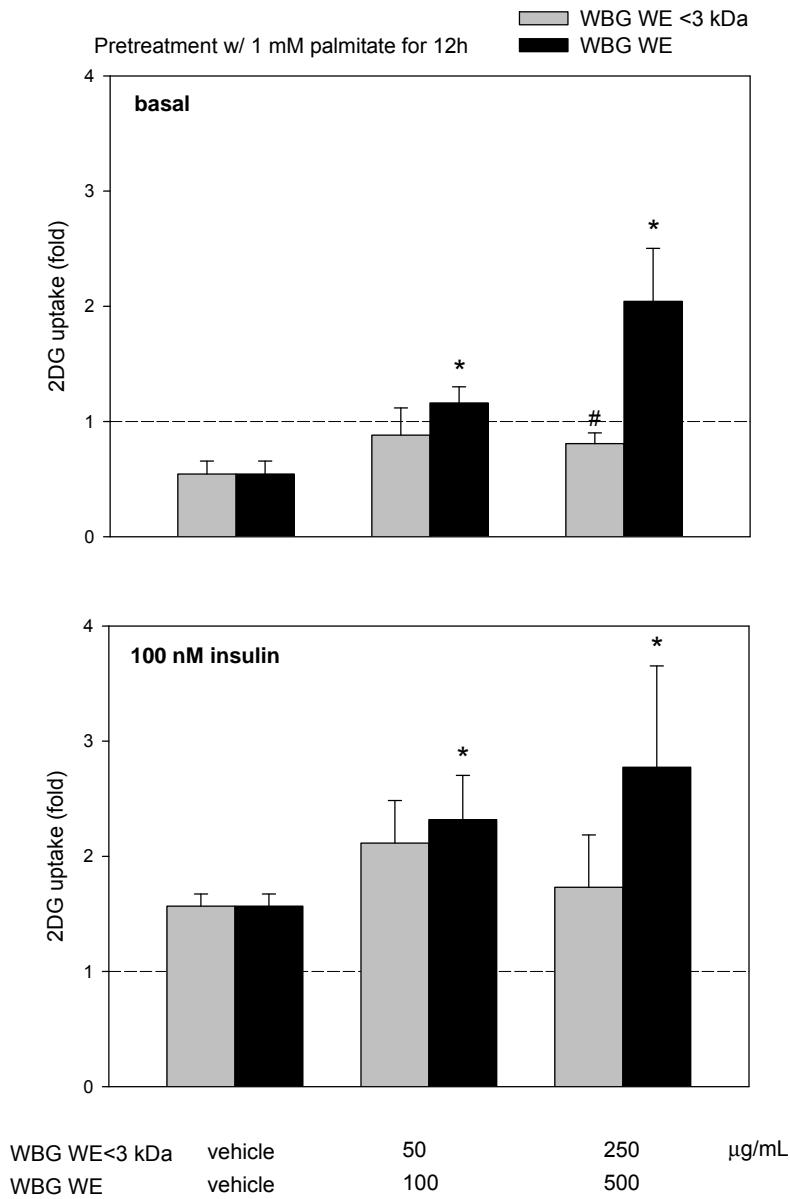


圖 3-7. 白苦瓜水萃物小分子物質 (<3 kDa) 對具胰島素抗性的脂肪細胞葡萄糖攝取之影響

**Figure 3-7.** Effects of the small molecule fraction (<3 kDa) of white bitter gourd water extract on glucose uptake in differentiated 3T3-L1 adipocytes with insulin resistance. Cells were cotreated with the <3 kDa fraction of WBG WE and 1 mM palmitic acid for 12 hours followed by a 30-minute incubation under basal or 100 nM insulin stimulation. The 2DG uptake by untreated 3T3-L1 adipocyte was taken as 1.0. Data are shown in mean  $\pm$  SD and are analyzed by one-way ANOVA.\*  $p < 0.05$  versus vehicle by Student's  $t$  test.



**圖 3-8.** 白苦瓜水萃物與當中小分子物質 (<3 kDa) 對具胰島素抗性的脂肪細胞葡萄糖攝取之比較

**Figure 3-8.** Comparison of the small molecule fraction (<3 kDa) and white bitter gourd water extract on glucose uptake in differentiated 3T3-L1 adipocytes with insulin resistance. Cells were cotreated with the <3 kDa fraction of WBG WE and 1 mM palmitic acid for 12 hours followed by a 30-minute incubation under basal or 100 nM insulin stimulation. The 2DG uptake by untreated 3T3-L1 adipocyte was taken as 1.0. Data are shown in mean  $\pm$  SD and are analyzed by one-way ANOVA. \*  $p < 0.05$  versus vehicle group. #  $p < 0.05$  versus vehicle by Student's  $t$  test.

#### 第四節 討論

細胞中 GLUT4 的轉位促進了胰島素刺激下的葡萄糖攝取，當此過程無法受到正常調控便有可能發生胰島素抗性，這點可以從缺乏 GLUT4 的動物實驗加以驗證 (Minokoshi et al., 2003)。而胰島素要對細胞產生作用必須透過細胞膜上的胰島素受器 IR，因此長久以來許多研究文獻試圖釐清從 IR 到 GLUT4 之間的環節 (Govers et al., 2004)，期望可從中明瞭胰島素抗性的源頭為何，而當中最普遍被視為主角的便是 IRS1 (Dresner et al., 1999; White, 2002; Zick, 2005)。在利用 *in vitro* 模式探討胰島素抗性的研究中，脂肪細胞可以藉由數種方法達到誘發胰島素抗性的效果，包括了 (1) 增加細胞氧化壓力 (Houstis et al., 2006)，(2) dexamethasone (Sakoda et al., 2000; Turnbow et al., 1994)，(3) TNF $\alpha$  (Ishizuka et al., 2007; Stephens and Pekala, 1992)，(4) 棕櫚酸或其代謝產物 ceramide (Dresner et al., 1999; Mei et al., 2003)，(5) 胰島素長時間處理 (Hajdуч et al., 1992)，(6) 長時間葡萄糖處理 (Hosaka et al., 1999)。然而，近來的研究指出這些方法對細胞產生胰島素抗性的原因是藉由不同途徑所達成的 (Hoehn et al., 2008) (表 3-1)，因此藉由其他種胰島素誘發的方式或許有助於釐清白苦瓜水萃物透過何種途徑達到改善胰島素抗性的功效。

表 3-1. 數種誘發胰島素抗性模式的可能途徑 (Hoehn et al., 2008)

Table 3-1. The possible defects of several insulin resistance models

	IRS1 Defect		Phospho-Akt		Phospho-TBC1D4		GLUT4/2-DOG		Primary Defect
	Phospho-Tyr	Expression	Insulin	PDGF	Insulin	PDGF	Insulin	PDGF	
Glucose oxidase	-	-	-	-	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	IRS-independent
Chronic insulin	-	↓↓	↓↓	-	-	-	↓↓	↓	IRS-dependent
TNF $\alpha$	↓↓	↓↓	↓↓	-	-	-	↓↓	↓↓	both
Dexamethasone	-	↓↓	↓↓	↓↓	-	-	↓↓	↓↓	both
Palmitate	-	-	-	-	-	-	↓↓	↓↓	IRS-independent
17 days HFD	-	-	-	-	-	-	↓↓	↓↓	IRS-independent

Summary of defects in insulin- and PDGF-stimulated signal transduction and GLUT4 translocation (for cell culture models) and 2-DOG uptake (for animal model). Arrows indicate the severity of the defect for each variable, and minus sign (-) represents the absence of a defect. The last column indicates the existence of IRS-dependent and/or -independent defects.

本章實驗中改以 12 小時 100 nM 胰島素處理已分化脂肪細胞，類似高胰島素血症的情況來作為誘發胰島素抗性的方法，經文獻指出此法是直接影響胰島素訊息傳遞路徑中 IRS1 的表現量降低，且近似於動物或人體所觀察到的趨勢 (Hoehn, et al., 2008)。但實驗結果卻發現白苦瓜水萃物處理無法改善胰島素引起的胰島素抗性。由於前章實驗結果得知白苦瓜水萃物可顯著改善脂肪細胞因脂肪酸誘導之胰島素抗性 (圖 2-8C)，顯示白苦瓜水萃物造成影響的目標分子之一可能是 IRS1 本身，故當以 100 nM 胰島素前處理 12 小時使磷酸化的 IRS1 減少而造成胰島素抗性時，白苦瓜水萃物即無法促進脂肪細胞葡萄糖攝取。

另一方面，棕櫚酸引起的胰島素抗性在 Hoehn 等人的研究中已經證實並非直接透過 IRS1 的途徑，改變了過去許多文獻的看法 (Dresner et al., 1999)，推測磷酸化 IRS1 的下降是胰島素抗性產生後的結果，也有愈來愈多研究認為脂肪酸所引起的胰島素抗性應是起因於發炎反應 (Ajuwon and Spurlock, 2005; Bhattacharya et al., 2007)。因此在棕櫚酸誘發胰島素抗性模式下，更進一步觀察 IRS1 下游的訊息傳遞分子 Akt，其磷酸化比率雖較無胰島素誘發組低，但未達顯著性 (圖 3-4)。而前一章中在無胰島素刺激下 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  白苦瓜水萃物可以增加葡萄糖攝取率比 100 nM 胰島素更高 (圖 2-8C)，但在本章分析磷酸化 Akt 卻未看到同樣顯著的活化效果。再者，利用 wortmannin 專一性抑制 PI3K 後，可以把 100 nM 胰島素刺激所增加的葡萄糖攝取量降低至與 basal 相當，但卻無法完全抑制白苦瓜水萃物的促進效應。由此也可以得知白苦瓜水萃物改善胰島素抗性的效果可能是多方面的，部分來自於對胰島素訊息傳遞路徑的活化，部分則可能來自於降低脂肪酸所引起的發炎反應，但這仍須進一步實驗分析加以驗證。

此外，細胞的葡萄糖攝取與葡萄糖轉運子息息相關，本實驗也分析了除胰島素訊息傳遞路徑以外，另一可促進 GLUT4 轉位至細胞膜上的重要途徑，AMPK。在 Tan 等人近期從苦瓜 80% 乙醇萃取物中所分離鑑定出的四種 triterpenoids，可以透過增加正常成熟的 3T3-L1 細胞在無胰島素刺激情況下 AMPK 的磷酸化，達到

增加 GLUT4 轉位的效果 (Tan et al., 2008)。但在本實驗中並未觀察到無胰島素刺激下 AMPK 的活化增加，利用 compound c 這種 AMPK 專一性抑制劑也未抑制白苦瓜水萃物促進葡萄糖攝取的效果。有趣的是，先前研究利用 AICAR (aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside) 這種 AMPK 活化劑處理分化成熟的 3T3-L1，發現其雖會增加 GLUT4 轉位與基礎葡萄糖攝取率，但對於有胰島素刺激下的葡萄糖利用卻呈現抑制的情況 (Salt et al., 2000)。在本實驗中白苦瓜水萃物的促進效果同時存在於 basal 與有胰島素刺激的狀況，故可以推測其並非透過 AMPK 途徑來影響脂肪細胞葡萄糖攝取的作用。

過去文獻針對脂肪細胞所篩選出苦瓜中的有效成分以蛋白質或 peptide 居多，且大於 8 kDa (表 1-6)。而在本實驗中發現白苦瓜水萃物當中小於 3 kDa 的部分亦有促進脂肪細胞葡萄糖攝取的功效，但效果較整體水萃物下降許多，在胰島素刺激下反而是於低濃度才有顯著促進效果。若將兩者做一比較可以發現，白苦瓜水萃物於 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  便有促進效果，可能是藉由小於 3 kDa 的物質的功用，但高濃度水萃物的效果則可能來自於較大的分子，其中包含了許多蛋白質類的物質，有可能包括了部分先前報導過的有效成分。再者，將白苦瓜水萃物加熱後便會使得促進效果降低至原來的三分之一左右，極有可能是有功效蛋白質或 peptides 的被熱破壞的緣故。但根據本實驗室先前的研究結果，以餵食的方式給予小鼠苦瓜水萃物，仍舊具有降血糖功效，顯示當中有效成分可以抵抗胃酸的破壞，更驗證了苦瓜水萃物中可能含有多種類物質，具有增進脂肪細胞對葡萄糖利用、改善胰島素抗性的潛力，這仍需更進一步的實驗來佐證。

## 第五節 結論

白苦瓜水萃物可能可以藉由活化胰島素受器達到促進脂肪細胞葡萄糖攝取的效用，且存在其他尚未確認的活化途徑，而其功效可能是 peptides 與小分子物質共同作用的結果。





## 第四章 數種食材萃物對肌肉細胞葡萄糖攝取之影響

### 第一節 前言

人體約有 75% 的葡萄糖最終被運輸至骨骼肌中代謝，是胰島素作用最主要的標的細胞 (Bhattacharya et al., 2007)。胰島素可引起 GLUT4 轉位至細胞膜上，促進葡萄糖運送至細胞內，並且可以進一步合成為肝糖、三酸甘油酯、蛋白質等形式加以儲存 (Chavez and Summers, 2003)。

許多研究已經指出具有胰島素抗性及第二型糖尿病病患，肌肉細胞粒線體的氧化磷酸化能力較正常人低，或是有粒線體數目較少的現象 (Delarue and Magnan, 2007; Lim et al., 2006; Lowell and Shulman, 2005)。當有過多的游離脂肪酸被運送至細胞內，但  $\beta$ -oxidation 的速度不足以代謝，造成大量 fatty acyl-CoA 等中間產物的累積，進而影響胰島素訊息傳遞路徑，最終造成肌肉細胞攝取葡萄糖的能力降低。

活化 PPAR $\alpha$  可以改善代謝症候群的血脂異常現象，而活化 PPAR $\gamma$  則可以減輕第二型糖尿病患者胰島素抗性的程度 (Fievet et al., 2006)。雖然 PPAR $\gamma$  在肌肉細胞的表現量遠較脂肪細胞低，但先前研究已證實 PPAR $\gamma$  的表現的確可以調控 C2C12 此一骨骼肌細胞株的胰島素敏感度 (Verma et al., 2004)，且誘發的胰島素抗性可被 TZD 類藥物改善 (Kumar and Dey, 2003)。

本實驗旨在利用 C2C12 細胞株進行模式之建立，評估本實驗室先前已知具有 PPAR $\gamma$  活性之山藥乙酸乙酯萃物，及前章中可增進脂肪細胞葡萄糖攝取之白苦瓜水萃物，在無胰島素抗性下或誘發胰島素抗性後，對於分化成熟的肌肉細胞葡萄糖攝取的影響。

## 第二節 材料與方法

### 一、細胞株

C2C12 細胞株 (ATCC CRL-1772)

Mouse muscle myoblast. Strain: C3H

購自食品工業研究中心/國家衛生研究院細胞庫 (BCRC 60083)。

### 二、培養基與藥品試劑

#### (一) 細胞培養與分化

1. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco 12800)

需添加 1.5 g/L NaHCO<sub>3</sub> (Sigma S5761) 以二次水攪拌至全溶，以 2N NaOH (Nacalai tesque 31511-05) 調整 pH 值至 7.2，定容至 1 L 後，以 0.22 μm 濾杯 (Millipore SCGPT05RE) 過濾至已滅菌血清瓶。

2. 胎牛血清 (FBS, Gibco 26140)

3. 馬血清 (HS, Gibco 16050)

4. 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco 25200)

5. 0.4% Trypan blue solution (Sigma T8154)

6. 肌酸酐酶活性試劑套組 (Randox CK355)

#### (二) 葡萄糖攝取試驗

同第二章第二節

### 三、儀器設備

同第二章第二節

### 四、實驗材料

1. 白苦瓜水萃物 (WBG WE)

同第二章第二節

2. 山藥乙酸乙酯萃物 (yam EAE)

## 同第二章第二節

## 五、實驗方法

## 1. 細胞培養

以含 10% FBS DMEM 培養於 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 中。當細胞達到 80% 滿度時，移除培養基，用 PBS 清洗細胞兩次後，加入 0.25% trypsin-EDTA 均勻浸潤細胞，置於 37°C, 3 分鐘待細胞脫附後取出，加入 10% FBS DMEM 均勻懸浮細胞。取少許細胞懸浮液以 trypan blue solution 進行染色，利用細胞計數盤於倒立式顯微鏡下細胞計數。以  $2.5 \times 10^5$  細胞數種入新 75 cm<sup>2</sup> 培養瓶中進行繼代培養，每 3 日繼代培養一次。

## 2. 細胞分化

繼代培養時經細胞計數後，以  $1 \times 10^5$  細胞數種入 12 孔平底細胞培養盤，培養於 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 中。隔 2 日細胞密度達到全滿時，吸除培養基，改以 2% HS DMEM 培養，每 2 日更換分化培養基一次，4 日後分化完成。

## 3. 肌酸酐酶 (creatinine kinase) 活性分析

細胞以 PBS 清洗兩次，冷凍於 -80°C。分析當天取出靜置冰上緩慢解凍後，加入 300 μL 二次水冰浴 1 小時，再於 -80°C 冷凍 1 小時破細胞。靜置冰上緩慢解凍後將趴附底面的細胞沖下均勻懸浮，4°C 離心 12000 rpm, 10 分鐘，上清液是為樣品液。取樣品液 20 μL 加入 500 μL 分析套組試劑，30°C 反應 2 分鐘後，測量第 0, 1, 2, 3 分鐘 A<sub>340</sub>。以每分鐘時間間隔吸光值差的平均值，計算肌酸酐酶活性如下:  $U/l = 4127 \times \Delta A_{340nm}/min$ 。

## 4. 胰島素抗性之誘發與葡萄糖攝取試驗

主要參考並加以修改前人的方法 (Chavez and Summers, 2003; Singh et al., 2004; Verma et al., 2004)。細胞分化 3 日後，吸除分化培養基，並以 KRHP 緩衝液清洗細胞一次，將 palmitic acid 與 fatty acid-free BSA conjugate，配製不含血清之 1 mM palmitic acid, 2% fatty acid-free BSA DMEM，於 37°C, 5% CO<sub>2</sub>

培養 12 小時，藉以誘發胰島素抗性。之後以 KRHP 緩衝液清洗細胞一次，加入不含 (basal) 或含有 100 nM insulin KRHP 緩衝液培養 6 小時。改加入 0.2  $\mu\text{Ci/mL}$  2-Deoxy-D-[1- $^3\text{H}$ ] glucose (配製於 10  $\mu\text{M}$  非同位素標定之 2-deoxy-glucose KRHP 緩衝液中)，繼續培養 30 分鐘，並且以添加 10  $\mu\text{M}$  cytochalasin B 組別作為非專一性攝取之背景值。之後以 ice-cold PBS 清洗細胞 3 次，以終止反應並移除未反應之放射線標定 2DG。細胞以 0.1% SDS 溶解後取出部分以供蛋白質定量使用，其餘部分則添加閃爍計數液進行液態閃爍計數。

## 六、數據整理與統計分析

同第二章第二節



### 第三節 結果

#### 一、細胞模式之建立

本實驗以含 2% 馬血清 DMEM 作為 C2C12 細胞株之分化培養基，測量 creatine kinase 酵素活性作為細胞分化成熟之指標 (圖 4-1)，於分化第 5 天會達最高值，為分化前的 8.5 倍。與不給予分化培養基之 vehicle 組相較，經分化處理 3 天之細胞 CK 活性為未分化 (vehicle) 組 2.7 倍。七天後細胞開始死亡，因此本實驗採分化後第 4 天進行葡萄糖攝取實驗。

為得知 C2C12 肌肉細胞株在給予分化劑誘發成熟後，是否可受胰島素刺激增加細胞對葡萄糖的攝取量，因此給予不同濃度胰島素刺激 6 小時後，測量細胞葡萄糖攝取率，結果如圖 4-2 所示。當胰島素濃度達 25 nM 以上，細胞便可較不給予胰島素組顯著增加葡萄糖攝入，且有隨給予胰島素濃度增加而增加之趨勢。在此實驗中亦可發現，葡萄糖攝入率很快趨於飽和，意即再繼續增加胰島素濃度並無法明顯增加細胞對葡萄糖的利用。此實驗結果顯示，100 nM 胰島素濃度刺激下，細胞攝入之葡萄糖量約為無胰島素刺激組的 1.8 倍。後續的樣品處理試驗中，乃選擇在 0, 1 或 100 nM 胰島素刺激下，探討同時給予樣品處理是否可增加成熟肌肉細胞的葡萄糖攝取量。另外，增加樣品處理時間達 12 小時，測量樣品對於無胰島素抗性或利用脂肪酸誘發胰島素抗性之肌肉細胞葡萄糖攝取的影響。

#### 二、山藥乙酸乙酯萃物對已分化 C2C12 肌肉細胞株葡萄糖攝取之影響 (圖 4-3)

在未誘發胰島素抗性的正常情況下，以低濃度 (1 nM) 胰島素刺激，同時給予山藥乙酸乙酯萃物處理，隨樣品處理濃度增加，肌肉細胞葡萄糖攝取量呈現先上升後下降的趨勢，在 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  樣品處理時肌肉細胞葡萄糖攝取量比 vehicle 組顯著增加約 7% ( $p=0.01$ )。若是以 100 nM 胰島素刺激，樣品處理比於低濃度胰島素刺激下更能提升細胞葡萄糖攝取的能力。10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  山藥乙酸乙酯

萃物處理可較 vehicle 組顯著增加肌肉細胞葡萄糖攝取量 20% ( $p=0.01$ )。反之，若不給予胰島素刺激 GLUT4 轉位時 (basal)，單獨給予山藥乙酸乙酯萃物 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  比 vehicle 組顯著增加 10% ( $p=0.001$ ) 肌肉細胞葡萄糖攝取量。

以 0.75 mM palmitic acid 處理細胞 12 小時誘發肌肉細胞胰島素抗性的模式中，山藥乙酸乙酯萃物於誘發過程中同時給予，之後再以胰島素刺激，測定樣品是否具有改善胰島素抗性、增加細胞攝入葡萄糖的潛力。結果發現，不論是否有 100 nM 胰島素刺激下，樣品處理組均無法較 vehicle 組增加葡萄糖攝取能力。甚至在 basal 狀況下，5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  山藥乙酸乙酯萃物處理與 vehicle 相較反而有顯著下降的情形 ( $p=0.01$ )。

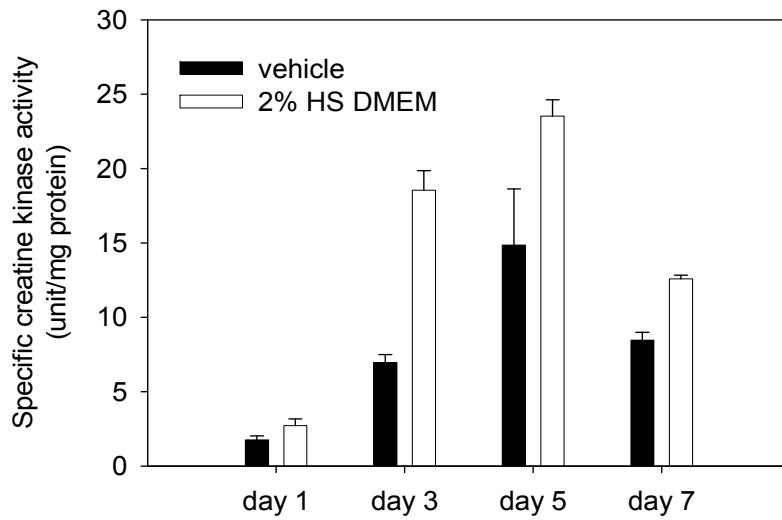
### 三、白苦瓜水萃物對已分化 C2C12 肌肉細胞株葡萄糖攝取之影響 (圖 4-4)

在細胞未誘發胰島素抗性的正常情況下，沒有給予胰島素刺激，僅添加白苦瓜水萃物處理 6 小時，肌肉細胞葡萄糖利用狀況呈現隨處理濃度增加而降低的趨勢，且於 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  樣品處理時比 vehicle 組顯著下降了 17% ( $p<0.001$ )。給予 1 nM 胰島素刺激時則無明顯改變。改以給予 100 nM 胰島素刺激下，與無胰島素刺激時情況相同，白苦瓜水萃物處理會造成肌肉細胞葡萄糖利用效率降低，50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  樣品處理較 vehicle 組顯著下降了 31% ( $p<0.05$ )。

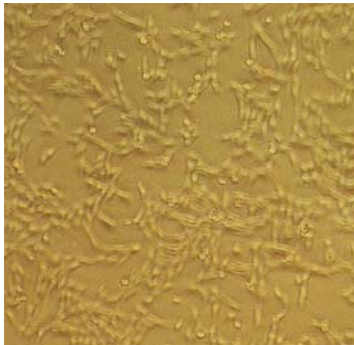
若在無胰島素抗性下，增加給予白苦瓜水萃物處理時間達 12 小時，之後再經 6 小時 100 nM 胰島素刺激，則看不出樣品處理對肌肉細胞攝取葡萄糖的影響。反之，若不給予胰島素刺激下，100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  白苦瓜水萃物仍舊會造成細胞葡萄糖利用率下降 14% ( $p<0.05$ ) 左右。

另一方面，以 0.75 mM palmitic acid 處理細胞 12 小時並同時處理白苦瓜水萃物樣品，不論之後是否有胰島素刺激，均看不出處理組與 vehicle 之間的顯著差異。

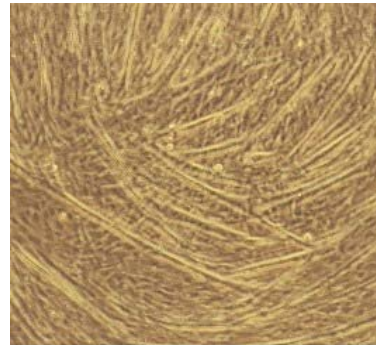
**A**



**B**

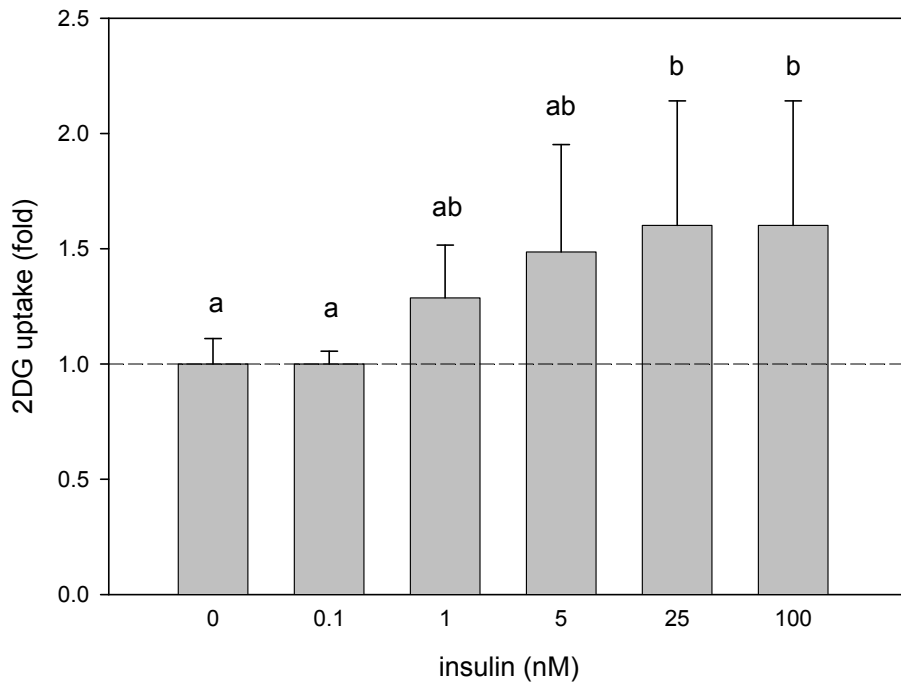


**C**



**圖 4-1.** C2C12 肌肉細胞株分化情形

**Figure 4-1.** The differentiation status of C2C12 myocytes. (A) The time effects of differentiation of C2C12 in 2% HS DMEM. The differentiation rate is evaluated by creatine kinase activity. Data are shown in mean  $\pm$  SD. (B) The morphology of C2C12 myocytes in microscopy at 40X. (C) The morphology of mature myotubes in microscopy at 40X.



**圖 4-2.** 不同濃度胰島素處理對已分化 C2C12 肌肉細胞葡萄糖攝取效應

**Figure 4-2.** The dose response curve of insulin on 2DG assay in C2C12 myotubes. Cells were incubated with different concentration of insulin for 6 hours. Data are shown in mean  $\pm$  SD and are analyzed by one-way ANOVA. Those not sharing the same superscript letters are significantly different from one another ( $p < 0.05$ ).



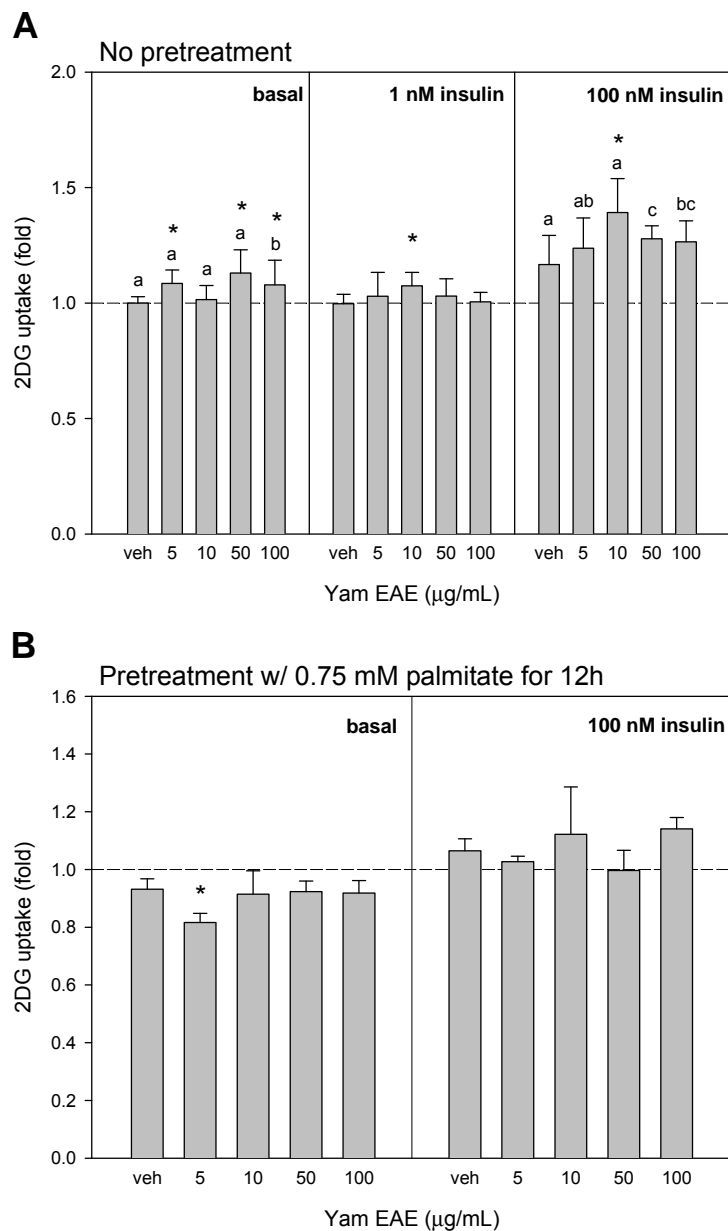


圖 4-3. 山藥乙酸乙酯萃物對已分化肌肉細胞葡萄糖攝取之影響

**Figure 4-3.** Effects of yam EA extract on glucose uptake in differentiated C2C12 myotubes. (A) Cells were treated with yam EAE in the presence of various concentrations of insulin for 6 hours. (B) Cells were cotreated with yam EAE and 0.75 mM palmitic acid for 12 hours followed by a 6-hour incubation with or without 100 nM insulin. The 2DG uptake by untreated C2C12 myotubes was taken as 1.0. Data are shown in mean  $\pm$  SD and are analyzed by one-way ANOVA. \* indicates significant difference ( $p < 0.05$ ) from vehicle by Student's *t* test.

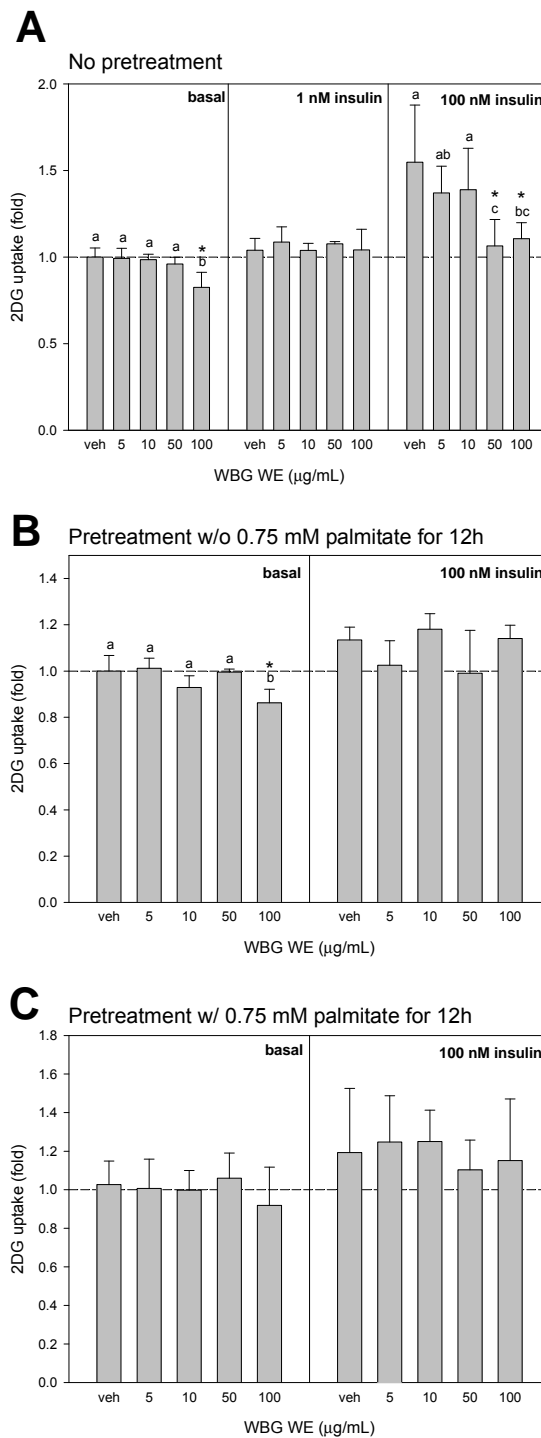


圖 4-4. 白苦瓜水萃物對已分化肌肉細胞葡萄糖攝取之影響

**Figure 4-4.** Effects of white bitter gourd water extract on glucose uptake in differentiated C2C12 myotubes. WBG WE were treated with various concentrations of insulin for 6 hours (A). In the other hand, samples were treated w/o (B) or w/ (C) 0.75 mM palmitic acid for 12 hours followed by a 6-hour incubation with or without 100 nM insulin. The 2DG uptake by untreated C2C12 myotubes was taken as 1.0. Data are shown in mean  $\pm$  SD and are analyzed by one-way ANOVA. \* indicates significant different ( $p < 0.05$ ) from vehicle by Student's  $t$  test.

#### 第四節 討論

分化成熟肌肉細胞常用的測量指標包括 myosin, myogenin, myoD, creatine kinase 等 (Kumar and Dey, 2002), 前三者需要以西方點墨法或免疫螢光染色進行分析, 而後者則可以利用酵素反應進行測量。當肌原細胞 (myoblast, myocyte) 在 confluence 的情況下, 加上低濃度馬血清刺激, 可以融合成長條狀的成熟肌肉細胞 (myotube), creatine kinase 開始表現。由本實驗可以看出在分化 3 天後, 達到與 vehicle 組最大差異約 2.7 倍, 與前人研究相近 (Goto et al., 1999)。

在肌肉細胞葡萄糖攝取的細胞實驗中, 除了初代肌肉細胞外, 常用的細胞株主要有 C2C12 與 L6 兩種, 前者來源為小鼠, 後者則是大鼠的骨骼肌細胞株。這兩種細胞株有許多不同之處 (表 4-1), 相較起來, L6 細胞株的實驗模式, 在 100 nM 胰島素刺激下的葡萄糖攝取與 basal 的差別會比 C2C12 的模式來得高 (Kumar and Dey, 2003), 但 C2C12 細胞株之 PPAR $\gamma$  受器表現量卻較多。因此本實驗選用 C2C12 建立細胞模式。從本實驗可以看出受胰島素刺激而增加的葡萄糖攝取的確有限, 與 Singh 等人 (Singh et al., 2004) 於 L6 細胞模式, 100 nM 胰島素刺激可增加達 3 倍相去甚遠。這可能源於 C2C12 細胞株葡萄糖轉運蛋白的表現是以 GLUT1 為主要形式, 而非受胰島素調控的 GLUT4 (Berti et al., 1997)。

在 L6 細胞模式中, 誘發胰島素抗性可以藉由 (1) 高胰島素高葡萄糖處理 (Huang et al., 2002), (2) 高胺基酸處理 (Tremblay and Marette, 2001), (3) palmitic acid 處理 (Turpin et al., 2006) 等, 但除觀察到受胰島素刺激下的葡萄糖攝取下降或 GLUT4 轉位減少, 並未被利用於可改善胰島素抗性藥物或材料回復其功能的進一步研究。而在 C2C12 細胞模式則可藉由 (1) 長時間胰島素處理 (Kumar and Dey, 2003) (2) TNF $\alpha$  (del Aguila et al., 1999) 或 (3) palmitic acid (Schmitz-Peiffer et al., 1999) 處理來誘發細胞產生胰島素抗性。更進一步的研究指出, palmitic acid 的代謝物 ceramide 可以藉由活化 PKC 及 NF $\kappa$ B, 使 TNF $\alpha$  表現量上升, 因而引發胰島素抗性 (Jove et al., 2006)。

表 4-1. C2C12 與 L6 肌肉細胞株比較

Table 4-1. Comparison of C2C12 and L6 skeletal muscle cell lines

	<b>C2C12</b>	<b>L6</b>	<b>reference</b>
<b>Species</b>	<i>Mus musculus</i> (mouse)	<i>Rattus norvegicus</i> (rat)	
<b>myogenesis</b>	repressed by ERK1/2	activated by ERK1/2 with IGF-1	Tortorella et al., 2001 Coolican et al., 1997
<b>differentiation medium</b>	serum-free condition is possible	serum is absolutely required	Lawson and Purslow, 2000
<b>IGFs expression</b>	high	low	Rosen et al., 1993 Yoshiko et al., 1996
<b>MyoD expression</b>	yes	no	
<b>PPARs expression</b>	PPAR $\alpha$ PPAR $\gamma$ PPAR $\delta$	PPAR $\delta$ 為主	Cabrero et al., 2000

ERK, extracellular signal regulated kinase

IGFs, insulin-like growth factors

PPAR, peroxisome proliferator activated receptor

在本實驗利用 0.75 mM palmitic acid 處理肌肉細胞 12 小時，約降低胰島素刺激下的葡萄糖攝取量 10-15% (data not shown)，但不添加胰島素的 basal 情況下則無顯著差異。根據 Schmitz-Peiffer 等人以 0.75 mM palmitic acid 處理肌肉細胞 16 小時，不論是否有胰島素刺激處理，皆可比正常組降低約 20% 葡萄糖攝取量 (Schmitz-Peiffer et al., 1999)。但 Jove 等人改以 0.5 mM palmitic acid 處理肌肉細胞 16 小時，則不改變 basal 情況之葡萄糖攝取，僅 100 nM 胰島素刺激下降低葡萄糖攝取量約 34% (Jove et al., 2005)。因此 palmitic acid 處理強度與時間長短，對於 C2C12 肌肉細胞株產生胰島素抗性似乎有不同階段的影響，至於此一脂肪酸究竟透過何種途徑影響非胰島素刺激下的葡萄糖攝取情形尚未有定論，仍須進一步探討。

在先前陳氏利用 CHO-K1 短暫轉染系統，指出山藥乙酸乙酯萃物在 10  $\mu\text{g/mL}$  便具有顯著活化 PPAR $\gamma$  的能力，活化效果約為 0.1  $\mu\text{M}$  rosiglitazone (BRL 49653) 的 10% (陳永如, 2007)。而根據文獻指出 PPAR $\gamma$  表現可以調控 C2C12 此一骨骼肌細胞株的胰島素敏感度 (Verma et al., 2004)。在本實驗中，利用山藥乙酸乙酯萃物處理成熟的 C2C12 細胞 6 小時，發現其不論有胰島素存在與否，皆可增加細胞葡萄糖攝取，具有增加胰島素敏感度的潛力。但在誘發胰島素抗性的同時給予樣品，之後不論是在 basal 或有 100 nM 胰島素刺激下，肌肉細胞葡萄糖攝取的能力卻均未獲得改善。推測其可能原因在於成熟肌肉細胞對於樣品耐受性不及 CHO-K1 來得高，在此較低濃度樣品處理下活化 PPAR $\gamma$  的程度有限，尚不足以扭轉此一以脂肪酸誘發之胰島素抗性。且根據前人研究文獻指出，於 C2C12 分化全程以高胰島素處理誘發胰島素抗性，給予 pioglitazone 此一專一性活化 PPAR $\gamma$  的 TZD 類藥物，需 25  $\mu\text{M}$  (9  $\mu\text{g/mL}$ ) 以上處理 24 小時才有顯著改善的功效 (Kumar and Dey, 2003)。然而本實驗所用山藥乙酸乙酯萃物為一混合物，當中具有 PPAR $\gamma$  活性之成分與含量仍未完全明瞭，其活性成分所佔比例或許是在本胰島素抗性模式中無法看出差異的原因之一。另一方面，相較於 TZD 類藥物對於細胞需要較長時間處理才能有改善效果，山藥乙酸乙酯萃物的促進效果十分快速，顯示山藥乙酸乙酯萃物可能具有其他活性成分透過不同路徑影響肌肉細胞葡萄糖攝取。

白苦瓜水萃物在本實驗模式中，並無增加胰島素敏感度的效用，反而在 basal 或與 100 nM 胰島素一同處理會有降低的效果。文獻中 Singh 等人以 L6 為細胞模式，5  $\mu\text{g/mL}$  去籽研磨的苦瓜汁凍乾物及其氣仿萃物，可增加細胞在無胰島素刺激情況下的葡萄糖攝取，但高濃度效果反而下降 (Singh et al., 2004)。這與其他文獻指出苦瓜或其萃物在低濃度下有降血糖的潛力，但在高濃度反而是不利的情況相符 (Platel and Srinivasan, 1997)。但在本實驗中，即使在低濃度苦瓜水萃物處理也為一抑制的情況，而且抑制程度會隨處理樣品濃度上升而增加。由趨勢看來，白苦瓜水萃物有近似於胰島素的 antagonist 存在。其他同樣以 C2C12 細胞模式進

行的文獻中，以酸性酒精萃取分子量大於 10 kDa 的蛋白質部分，10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  處理細胞 14-18 小時可以有效增加 basal 與 10 nM 胰島素刺激下的葡萄糖攝取率 (Yibchok-Anun et al., 2006)。但在本實驗中白苦瓜水萃物則分別呈現抑制與無影響的結果，而這可能與本實驗是使用苦瓜全果凍乾粉末進行萃取，且萃取方式亦有不同，雖水萃物可萃取出大多數蛋白質部分，但其中所含該文獻所報導之有效成分的比例可能甚少。

## 第五節 結論

山藥乙酸乙酯萃物具有增進肌肉細胞胰島素敏感性的潛力，而白苦瓜水萃物則否。但 C2C12 細胞株之胰島素刺激下葡萄糖攝取率較低，並非一絕佳篩選系統。



## 第五章 綜合討論與總結論

### 第一節 綜合討論

本實驗主要是利用肌肉細胞與脂肪細胞株葡萄糖攝取的分析方法，並以棕櫚酸作為誘發胰島素抗性的模式，探討數種食材萃物是否對特定組織具有促進葡萄糖攝取、改善胰島素抗性的潛力。

本研究以肌肉或脂肪細胞直接攝取葡萄糖的多寡作為評估方法，瞭解細胞儲存或利用葡萄糖的能力，並且使用發生胰島素抗性的細胞，作為評估食材樣品在不同狀況下是否有促進或改善的效果。相較於許多以葡萄糖轉運子轉位至細胞膜上作為分析指標的文獻，雖無法明確區分出究竟是 GLUT1 或 GLUT4 所帶來的效應，但卻避免了 GLUT4 活化與否可能帶來的影響 (Michelle Furtado et al., 2003)，而反映出真正細胞利用葡萄糖的結果。

文獻中指出，活化 PPAR $\gamma$  可以減輕第二型糖尿病患者胰島素抗性的程度 (Fievet et al., 2006)，且 TZD 類專一性活化 PPAR $\gamma$  的藥物可促使已分化的脂肪細胞增加基礎葡萄糖攝取率，並增加 GLUT1 的表現，也可改善肌肉細胞模式誘發的胰島素抗性 (Kumar and Dey, 2003; Tafuri, 1996)。此外亦有文獻指出，TZD 可增加分化後的 L6 肌肉細胞株 GLUT1 與 GLUT4 mRNA 表現量 (el-Kebbi et al, 1994)。山藥為亞洲地區普遍的農作物，也常見於傳統治療糖尿病的中藥複方中。目前對山藥的研究文獻發現其山藥多糖 (dioscoran C) 與 dioscoretine 具有降低血糖的效果 (Hikino et al., 1986; 盧崇如, 2003)，山藥中降血糖之活性成分多存在於甲醇或乙醇萃物 (表 1-5)，乙酸乙酯萃物中含量應極微。前人以卵巢剔除的小鼠作為探討代謝症候群動物模式的研究中，山藥乙酸乙酯萃物亦無降低血清葡萄糖或改善口服葡萄糖耐受性的效果 (吳夢婷, 2008)。雖然山藥乙酸乙酯萃物於先前的報導中已被證實是 PPAR $\gamma$  的活化劑 (陳永如, 2007)，在本實驗中，短時間處理對於肌肉細胞似乎有類似胰島素的效用，但不能改善棕櫚酸引起的胰島素抗性，對於脂肪細胞也

沒有促進葡萄糖攝取的功效。若本實驗中所觀察到促進現象是透過活化胰島素受器的 peptide 類物質，應不容易被乙酸乙酯萃取出，且此種活化現象應不受限於肌肉細胞而對脂肪細胞無影響。再者，若山藥乙酸乙酯萃物能夠增加肌肉細胞 GLUT1 與 GLUT4 的表現量，的確有可能造成 basal 或胰島素刺激下葡萄糖攝取都增加，但此促進效果應不只在 30 分鐘樣品處理模式中有效，長時間處理應會更為顯著。此外，棕櫚酸所引發的胰島素抗性主要是引發發炎反應與抑制 GLUT4 的轉位 (Ajuwon and Spurlock, 2005; Hoehn et al., 2008; Wei et al., 2008)，山藥乙酸乙酯萃物若可增加 GLUT1 與 GLUT4 的表現量，在有誘發胰島素抗性的模式下，山藥乙酸乙酯萃物也應具促進效果。然而乙酸乙酯萃物中含有許多脂肪酸，是否會對脂肪酸胰島素敏感度造成影響也是需要考慮的因素。因此山藥乙酸乙酯萃物對肌肉細胞葡萄糖攝取的促進效果究竟是透過何種機制，且其是否具有改善胰島素抗性的效果仍有待進一步探究。

苦瓜亦是亞洲地區常見養身食材，而其降血糖效果最受人廣泛討論，且已在許多動物模式與人體試驗當中獲得證實 (Grover and Yadav, 2004)。目前文獻中已知可能與降血糖或增進細胞葡萄糖攝取的成分，可能包含了 polypeptide-p, flavonid, saponin (triterpenoid) 與其他未確定的 peptides (Anila and Vijayalakshmi, 2000; Khanna et al., 1981; Ng et al., 1987b; Tan et al., 2008; Yibchok-Anun et al., 2006)，這些成分主要是以乙醇或水溶液所萃取出而得。本實驗分析數種苦瓜乙酸乙酯、乙醇、水萃物，結果亦為水萃物對於增進脂肪細胞葡萄糖攝取的功效最大。先前針對脂肪細胞的相關文獻指出苦瓜在短時間內對促進葡萄糖攝取的有效成分在低濃度較有效 (Roffey et al., 2007; Singh et al., 2004)，但本實驗則是以長時間 (12 小時) 處理且隨濃度增加而有更好的促進效果。

因此在本研究更進一步的實驗中，確認白苦瓜水萃物改善胰島素抗性的效果不是透過 AMPK 途徑增加 GLUT4 轉位，與先前文獻中所報導的 triterpenoids 不同 (Tan et al., 2008)。根據本實驗結果推測有可能部分效果是透過 IRS1 達成，另外尚



有未明瞭的途徑可促進脂肪細胞攝取葡萄糖。但胰島素的訊息傳遞可在數分鐘之內達成，使 GLUT4 轉位至細胞膜上。對於本研究中白苦瓜水萃物在肌肉細胞的模式未能看到效果，也無法在短時間 (30 分鐘) 的處理下增加脂肪細胞葡萄糖攝取，這與白苦瓜水萃物可活化胰島素訊息傳遞路徑的推論似乎有所矛盾。且活化胰島素訊息傳遞途徑並不足以解釋利用 1 mM palmitic acid 誘發胰島素抗性時，白苦瓜水萃物對脂肪細胞葡萄糖攝取的改善效果。故白苦瓜水萃物應可透過其他途徑促進脂肪細胞對葡萄糖的利用。先前 Yibchok-Anun 等人的研究中，將苦瓜以酸性酒精萃取，再以透析方式得到含有至少二種蛋白質的混和萃物，對分化成熟的 3T3-L1 必須處理超過 4 小時以上才有增進葡萄糖利用的效果，且不受限於有胰島素刺激的狀況 (Yibchok-Anun et al., 2006)，則與本實驗結果相近。然而也有學者針對苦瓜當中報導過降血糖的有效成分加以整理，認為可以區分為以下兩類：(1) 水萃物或以鹼性氯仿萃取過後的剩餘物質，具有短時間內迅速降血糖的效果 (rapid hypoglycemic effect)，(2) 酸性氯仿萃取物，降血糖效應較緩慢 (slow antihyperglycemic effect) (Day et al., 1990)。此文獻看似與本實驗結果不符，但該分類方法主要是根據食用或以管餵方式給予的動物實驗歸納而得，故必須考量若有效成分屬於蛋白質或 peptide，經過腸胃道可能受到降解或破壞的因素。

在本實驗當中，以加熱的方式作為對白苦瓜水萃物當中蛋白質類的破壞，結果發現對具胰島素抗性脂肪細胞失去原有改善效果，顯示其有效成分的確具有易受熱破壞的特性。不過 Yibchok-Anun 等人的研究表示萃物處理超過 4 小時以上才有增進葡萄糖利用的效果雖與本實驗相近，但其所得到的蛋白質萃物當中主要的二種分子量各為 10 與 20 kDa，且先前所報導過的有效 peptides 類均在 8 kDa 以上。而本研究發現在白苦瓜水萃物小於 3 kDa 的非蛋白質部分亦有改善胰島素抗性的效用，且其對基礎葡萄糖攝取率的促進亦有效果，因此當中可能具有小分子物質可以增加脂肪細胞 GLUT1 的表現量。

飽和的長鏈脂肪酸會引發肌肉與脂肪細胞發炎反應導致胰島素抗性的發生

(Ajuwon and Spurlock, 2005)。在脂肪細胞中，此過程可能需透過 TLR4 達成 (Kennedy et al., 2009)。文獻中指出，db/db 小鼠脂肪組織當中 TLR4 mRNA 表現量會較正常小鼠大幅增加 (Song et al., 2005)，而缺乏 TLR4 之 C57BL/6 雌性小鼠雖會有肥胖的情況，但卻不容易產生因高脂飲食而誘發的胰島素抗性現象 (Shi et al., 2006)。以 3T3-L1 細胞株來說，分化前 TLR4 幾乎不表現，而 TLR4 表現量會隨著分化期間逐漸增加 (Schaeffler et al., 2008)，以 LPS 此一 TLR4 agonist 可以活化脂肪細胞 NF $\kappa$ B 訊息傳遞途徑，且游離脂肪酸亦有相同作用，會造成發炎性細胞激素 (如 TNF $\alpha$ , IL-6) 的表現量增加，導致胰島素抗性發生 (Shi et al., 2006)。Schaeffler 等人更進一步指出脂肪酸對 TLR4/NF $\kappa$ B 訊息傳遞途徑的活化存在劑量效應，且並非由脂肪酸直接與 TLR4 相結合所造成，有可能是游離脂肪酸刺激脂肪細胞產生了內源性的 ligand (Schaeffler et al., 2008)。反觀肌肉細胞，TLR4 雖在 C2C12 分化前後均有表現，但文獻指出脂肪酸誘發肌肉細胞胰島素抗性必須透過 TLR2。TLR2 亦在 C2C12 分化前後均有表現。文獻中以 TLR2 抗體或 RNAi 的方式抑制 TLR2，棕櫚酸便無法引發 IL-6 表現量上升及胰島素抗性等情形。TLR2 雖是脂肪酸誘發肌肉細胞胰島素抗性的必要條件，但其是否為充分條件尚未有明確證據 (Frost et al., 2005; Senn, 2006)。因此，苦瓜水萃物可促進脂肪細胞的葡萄糖攝取及胰島素敏感度，卻對肌肉細胞沒有功效 (表 5-1)，推測苦瓜水萃物有效成分可能藉由抑制 TLR4 而達成。

根據本研究結果，未來應可進一步將苦瓜水萃物純化分離，找出先前未被報導過的其他有效物質能夠促進脂肪細胞的葡萄糖攝取，而有改善胰島素抗性的功效。另一方面，也可繼續針對不同可能途徑做更進一步的探討，找出其作用機制。

表 5-1. 食材萃物對脂肪與肌肉細胞葡萄糖攝取之影響總整理

Table 5-1. Summary of effects of food extracts on glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes

	adipocyte							myotube						
	No pretreatment			12h pretreatment w/ vehicle		12h pretreatment w/ 1 mM palmitate		No pretreatment			12h pretreatment w/ vehicle		12h pretreatment w/ 0.75 mM palmitate	
acute insulin (nM)	0	1	100	0	100	0	100	0	1	100	0	100	0	100
山藥 EA	-	↓	-			↓	-	↑	↑	↑			-	-
山苦瓜 EA	↓	↓	↓	-	-	-	-							
山苦瓜 NS				↑	↑	-	-							
山苦瓜 EtOH	↓	-	↓	↓	↓	-	-							
山苦瓜 WE	-	-	-	↑	↑	↑	↑							
白苦瓜 WE	↓	-	-	↑	-	↑	↑	↓	-	↓	↓	-	-	-

## 第二節 總結論

山藥乙酸乙酯萃物具有增加肌肉細胞葡萄糖攝取的效果。白苦瓜與 2381 山苦瓜水萃物則於長時間處理下，可提高脂肪細胞對葡萄糖的攝入，並且改善脂肪酸所誘發胰島素抗性所造成葡萄糖利用率降低的情形。當中有效成分可能為多種物質且透過不同途徑達到改善效果。白苦瓜水萃物對脂肪細胞葡萄糖攝取的影響包含：

- (1) 無胰島素抗性脂肪細胞經 12 小時樣品處理後，無論是否有胰島素刺激，皆可增加脂肪細胞葡萄糖攝取，且有濃度效應。
- (2) 同樣給予 12 小時樣品處理，白苦瓜水萃物可改善以 1 mM palmitic acid 所誘發之胰島素抗性，增加脂肪細胞葡萄糖攝取，且有濃度效應。但對於 100 nM 胰島素所誘發胰島素抗性則無改善效果。
- (3) 白苦瓜水萃物增進胰島素抗性脂肪細胞葡萄糖攝取的能力會加熱而降低為三分之一。
- (4) 白苦瓜水萃物增進胰島素抗性脂肪細胞葡萄糖攝取的能力不被 compound c 抑制，似非透過增加磷酸化 AMPK 所致。
- (5) 苦瓜水萃物增進胰島素抗性脂肪細胞葡萄糖攝取的能力會被 wortmannin 部分抑制，然其對磷酸化 Akt 的影響並不顯著。
- (6) 苦瓜水萃物 <3 kDa 非蛋白質部分亦有增進胰島素抗性脂肪細胞葡萄糖攝取的能力。

## 第六章 參考文獻

Ahmed, I., Adeghate, E., Cummings, E., Sharma, A.K., and Singh, J. (2004). Beneficial effects and mechanism of action of *Momordica charantia* juice in the treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus in rat. *Mol Cell Biochem* 261, 63-70.

Ajuwon, K.M., and Spurlock, M.E. (2005). Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr* 135, 1841-1846.

Anila, L., and Vijayalakshmi, N.R. (2000). Beneficial effects of flavonoids from *Sesamum indicum*, *Emblca officinalis* and *Momordica charantia*. *Phytother Res* 14, 592-595.

Araghiniknam, M., Chung, S., Nelson-White, T., Eskelson, C., and Watson, R.R. (1996). Antioxidant activity of dioscorea and dehydroepiandrosterone (DHEA) in older humans. *Life Sci* 59, PL147-157.

Basch, E., Gabardi, S., and Ulbricht, C. (2003). Bitter melon (*Momordica charantia*): a review of efficacy and safety. *Am J Health Syst Pharm* 60, 356-359.

Berti, L., Kellerer, M., Capp, E., and Haring, H.U. (1997). Leptin stimulates glucose transport and glycogen synthesis in C2C12 myotubes: evidence for a P13-kinase mediated effect. *Diabetologia* 40, 606-609.

Bhattacharya, S., Dey, D., and Roy, S.S. (2007). Molecular mechanism of insulin resistance. *J Biosci* 32, 405-413.

Bryant, N.J., Govers, R., and James, D.E. (2002). Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 267-277.

Cabrero, A., Alegret, M., Sanchez, R.M., Adzet, T., Laguna, J.C., and Vazquez, M. (2000). Down-regulation of uncoupling protein-3 and -2 by thiazolidinediones in C2C12 myotubes. *FEBS Lett* 484, 37-42.

Calderhead, D.M., Kitagawa, K., Tanner, L.I., Holman, G.D., and Lienhard, G.E. (1990). Insulin regulation of the two glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 265, 13801-13808.

Chan, L.L., Chen, Q., Go, A.G., Lam, E.K., and Li, E.T. (2005). Reduced adiposity in bitter melon (*Momordica charantia*)-fed rats is associated with increased lipid oxidative enzyme activities and uncoupling protein expression. *J Nutr* 135, 2517-2523.

Chavez, J.A., and Summers, S.A. (2003). Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Arch Biochem Biophys* 419, 101-109.

Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J. (2001). Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294, 1866-1870.

Chiarelli, F., and Di Marzio, D. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists and diabetes: current evidence and future perspectives. *Vasc Health Risk Manag* 4, 297-304.

Choi, E.M., and Hwang, J.K. (2002). Enhancement of oxidative response and cytokine production by yam mucopolysaccharide in murine peritoneal macrophage. *Fitoterapia* 73, 629-637.

Ciaraldi, T., and Henry, R.R. (1997). Thiazolidinediones and their effects on glucose transporters. *Eur J Endocrinol* 137, 610-612.

Coolican, S.A., Samuel, D.S., Ewton, D.Z., McWade, F.J., and Florini, J.R. (1997). The

mitogenic and myogenic actions of insulin-like growth factors utilize distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 272, 6653-6662.

Czech, M.P., and Corvera, S. (1999). Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem* 274, 1865-1868.

Day, C. (2007). Metabolic syndrome, or What you will: definitions and epidemiology. *Diab Vasc Dis Res* 4, 32-38.

Day, C., Cartwright, T., Provost, J., and Bailey, C.J. (1990). Hypoglycaemic effect of *Momordica charantia* extracts. *Planta Med* 56, 426-429.

de Luca, C., and Olefsky, J.M. (2008). Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett* 582, 97-105.

DeFronzo, R.A., and Ferrannini, E. (1991). Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes care* 14, 173-194.

del Aguila, L.F., Claffey, K.P., and Kirwan, J.P. (1999). TNF-alpha impairs insulin signaling and insulin stimulation of glucose uptake in C2C12 muscle cells. *Am J Physiol* 276, E849-855.

Delarue, J., and Magnan, C. (2007). Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10, 142-148.

Dey, D., Basu, D., Roy, S.S., Bandyopadhyay, A., and Bhattacharya, S. (2006). Involvement of novel PKC isoforms in FFA induced defects in insulin signaling. *Mol Cell Endocrinol* 246, 60-64.

Dresner, A., Laurent, D., Marcucci, M., Griffin, M.E., Dufour, S., Cline, G.W., Slezak, L.A., Andersen, D.K., Hundal, R.S., Rothman, D.L., *et al.* (1999). Effects of free fatty

acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest* 103, 253-259.

el-Kebbi, I.M., Roser, S., and Pollet, R.J. (1994). Regulation of glucose transport by pioglitazone in cultured muscle cells. *Metabolism* 43, 953-958.

Erkelens, D.W. (2001). Insulin resistance syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 88, 38J-42J.

Fanelli, C., Calderone, S., Epifano, L., De Vincenzo, A., Modarelli, F., Pampanelli, S., Perriello, G., De Feo, P., Brunetti, P., Gerich, J.E., *et al.* (1993). Demonstration of a critical role for free fatty acids in mediating counterregulatory stimulation of gluconeogenesis and suppression of glucose utilization in humans. *J Clin Invest* 92, 1617-1622.

Fievet, C., Fruchart, J.C., and Staels, B. (2006). PPARalpha and PPARgamma dual agonists for the treatment of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Curr Opin Pharmacol* 6, 606-614.

Frost, R.A., Nystrom, G.J., and Lang, C.H. (2006). Multiple Toll-like receptor ligands induce an IL-6 transcriptional response in skeletal myocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290, R773-784.

Funaki, M., Randhawa, P., and Janmey, P.A. (2004). Separation of insulin signaling into distinct GLUT4 translocation and activation steps. *Mol Cell Biol* 24, 7567-7577.

Gao, X., Li, B., Jiang, H., Liu, F., Xu, D., and Liu, Z. (2007). *Dioscorea opposita* reverses dexamethasone induced insulin resistance. *Fitoterapia* 78, 12-15.

Gauthier, M.S., Miyoshi, H., Souza, S.C., Cacicedo, J.M., Saha, A.K., Greenberg, A.S., and Ruderman, N.B. (2008). AMP-activated protein kinase is activated as a



consequence of lipolysis in the adipocyte: potential mechanism and physiological relevance. *J Biol Chem* 283, 16514-16524.

Goossens, G.H. (2008). The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol Behav* 94, 206-218.

Goto, S., Miyazaki, K., Funabiki, T., and Yasumitsu, H. (1999). Serum-free culture conditions for analysis of secretory proteinases during myogenic differentiation of mouse C2C12 myoblasts. *Anal Biochem* 272, 135-142.

Govers, R., Coster, A.C., and James, D.E. (2004). Insulin increases cell surface GLUT4 levels by dose dependently discharging GLUT4 into a cell surface recycling pathway. *Mol Cell Biol* 24, 6456-6466.

Grindley, P.B., Omoruyi, F.O., Asemota, H.N., and Morrison, E.Y. (2001). Effect of yam (*Dioscorea cayenensis*) and dasheen (*Colocassia esculenta*) extracts on the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Food Sci Nutr* 52, 429-433.

Grover, J.K., and Yadav, S.P. (2004). Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *J Ethnopharmacol* 93, 123-132.

Guerre-Millo, M., Gervois, P., Raspe, E., Madsen, L., Poulain, P., Derudas, B., Herbert, J.M., Winegar, D.A., Willson, T.M., Fruchart, J.C., *et al.* (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators improve insulin sensitivity and reduce adiposity. *J Biol Chem* 275, 16638-16642.

Hajduch, E.J., Guerre-Millo, M.C., Hainault, I.A., Guichard, C.M., and Lavau, M.M. (1992). Expression of glucose transporters (GLUT 1 and GLUT 4) in primary cultured rat adipocytes: differential evolution with time and chronic insulin effect. *J Cell Biochem* 49, 251-258.

Handschin, C., Choi, C.S., Chin, S., Kim, S., Kawamori, D., Kurpad, A.J., Neubauer, N., Hu, J., Mootha, V.K., Kim, Y.B., *et al.* (2007). Abnormal glucose homeostasis in skeletal muscle-specific PGC-1 $\alpha$  knockout mice reveals skeletal muscle-pancreatic beta cell crosstalk. *J Clin Invest* 117, 3463-3474.

Hikino, H., Konno, C., Takahashi, M., Murakami, M., Kato, Y., Karikura, M., and Hayashi, T. (1986). Isolation and Hypoglycemic Activity of Dioscorans A, B, C, D, E, and F; Glycans of *Dioscorea japonica* Rhizophors1. *Planta Med* 52, 168-171.

Hoehn, K.L., Hohnen-Behrens, C., Cederberg, A., Wu, L.E., Turner, N., Yuasa, T., Ebina, Y., and James, D.E. (2008). IRS1-independent defects define major nodes of insulin resistance. *Cell Metab* 7, 421-433.

Hoene, M., and Weigert, C. (2008). The role of interleukin-6 in insulin resistance, body fat distribution and energy balance. *Obes Rev* 9, 20-29.

Hosaka, T., Yaga, K., and Oka, Y. (1999). Regulation of insulin-stimulated glucose transport by chronic glucose exposure in 3T3-L1 adipocytes. *Endocr J* 46, 349-357.

Houstis, N., Rosen, E.D., and Lander, E.S. (2006). Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440, 944-948.

Hsu, J.H., Wu, Y.C., Liu, I. M. and Cheng, J. T. (2007). *Dioscorea* as the principal herb of Die-Huang-Wan, a widely used herbal mixture in China, for improvement of insulin resistance in fructose-rich chow-fed rats. *J Ethnopharmacol* 112, 577-584.

Huang, C., Somwar, R., Patel, N., Niu, W., Torok, D., and Klip, A. (2002). Sustained exposure of L6 myotubes to high glucose and insulin decreases insulin-stimulated GLUT4 translocation but upregulates GLUT4 activity. *Diabetes* 51, 2090-2098.

Huang, H.L., Hong, Y.W., Wong, Y.H., Chen, Y.N., Chyuan, J.H., Huang, C.J., and Chao,

P.M. (2008). Bitter melon (*Momordica charantia* L.) inhibits adipocyte hypertrophy and down regulates lipogenic gene expression in adipose tissue of diet-induced obese rats. *Br J Nutr* 99, 230-239.

Huang, P.L., Sun, Y., Chen, H.C., Kung, H.F., and Lee-Huang, S. (1999). Proteolytic fragments of anti-HIV and anti-tumor proteins MAP30 and GAP31 are biologically active. *Biochem Biophys Res Commun* 262, 615-623.

Huang, S., and Czech, M.P. (2007). The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab* 5, 237-252.

Ishizuka, K., Usui, I., Kanatani, Y., Bukhari, A., He, J., Fujisaka, S., Yamazaki, Y., Suzuki, H., Hiratani, K., Ishiki, M., *et al.* (2007). Chronic tumor necrosis factor-alpha treatment causes insulin resistance via insulin receptor substrate-1 serine phosphorylation and suppressor of cytokine signaling-3 induction in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 148, 2994-3003.

Iwu, M.M., Okunji, C.O., Ohiaeri, G.O., Akah, P., Corley, D., and Tempesta, M.S. (1990). Hypoglycaemic activity of dioscoretine from tubers of *Dioscorea dumetorum* in normal and alloxan diabetic rabbits. *Planta Med* 56, 264-267.

Jeon, J.R., Lee, J.S., Lee, C.H., Kim, J.Y., Kim, S.D., and Nam, D.H. (2006). Effect of ethanol extract of dried Chinese yam (*Dioscorea batatas*) flour containing dioscin on gastrointestinal function in rat model. *Arch Pharm Res* 29, 348-353.

Jove, M., Planavila, A., Laguna, J.C., and Vazquez-Carrera, M. (2005). Palmitate-induced interleukin 6 production is mediated by protein kinase C and nuclear-factor kappaB activation and leads to glucose transporter 4 down-regulation in skeletal muscle cells. *Endocrinology* 146, 3087-3095.

Jove, M., Planavila, A., Sanchez, R.M., Merlos, M., Laguna, J.C., and Vazquez-Carrera, M. (2006). Palmitate induces tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in C2C12 skeletal muscle cells by a mechanism involving protein kinase C and nuclear factor- $\kappa$ B activation. *Endocrinology* 147, 552-561.

Kelley, D.E., He, J., Menshikova, E.V., and Ritov, V.B. (2002). Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51, 2944-2950.

Kennedy, A., Martinez, K., Chuang, C.C., LaPoint, K., and McIntosh, M. (2009). Saturated fatty acid-mediated inflammation and insulin resistance in adipose tissue: mechanisms of action and implications. *J Nutr* 139, 1-4.

Khanna, P., Jain, S.C., Panagariya, A., and Dixit, V.P. (1981). Hypoglycemic activity of polypeptide-p from a plant source. *J Nat Prod* 44, 648-655.

Kim, H., Haluzik, M., Asghar, Z., Yau, D., Joseph, J.W., Fernandez, A.M., Reitman, M.L., Yakar, S., Stannard, B., Heron-Milhavet, L., *et al.* (2003). Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  agonist treatment in a transgenic model of type 2 diabetes reverses the lipotoxic state and improves glucose homeostasis. *Diabetes* 52, 1770-1778.

Koves, T.R., Ussher, J.R., Noland, R.C., Slentz, D., Mosedale, M., Ilkayeva, O., Bain, J., Stevens, R., Dyck, J.R., Newgard, C.B., *et al.* (2008). Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab* 7, 45-56.

Kumar, N., and Dey, C.S. (2002). Metformin enhances insulin signalling in insulin-dependent and-independent pathways in insulin resistant muscle cells. *Br J Pharmacol* 137, 329-336.

Kumar, N., and Dey, C.S. (2003). Development of insulin resistance and reversal by thiazolidinediones in C2C12 skeletal muscle cells. *Biochem Pharmacol* 65, 249-257.

Lawson, M.A., and Purslow, P.P. (2000). Differentiation of myoblasts in serum-free media: effects of modified media are cell line-specific. *Cells Tissues Organs* 167, 130-137.

Lee-Huang, S., Huang, P.L., Chen, H.C., Bourinbaiar, A., Huang, H.I., and Kung, H.F. (1995). Anti-HIV and anti-tumor activities of recombinant MAP30 from bitter melon. *Gene* 161, 151-156.

Lewis, G.F., Vranic, M., Harley, P., and Giacca, A. (1997). Fatty acids mediate the acute extrahepatic effects of insulin on hepatic glucose production in humans. *Diabetes* 46, 1111-1119.

Liao, W., Nguyen, M.T., Imamura, T., Singer, O., Verma, I.M., and Olefsky, J.M. (2006). Lentiviral short hairpin ribonucleic acid-mediated knockdown of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 147, 2245-2252.

Liao, W., Nguyen, M.T., Yoshizaki, T., Favelyukis, S., Patsouris, D., Imamura, T., Verma, I.M., and Olefsky, J.M. (2007). Suppression of PPAR-gamma attenuates insulin-stimulated glucose uptake by affecting both GLUT1 and GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E219-227.

Lim, J.H., Lee, J.I., Suh, Y.H., Kim, W., Song, J.H., and Jung, M.H. (2006). Mitochondrial dysfunction induces aberrant insulin signalling and glucose utilisation in murine C2C12 myotube cells. *Diabetologia* 49, 1924-1936.

Liou, S.S., Liu, I.M., Hsu, S.F., and Cheng, J.T. (2004). Corni fructus as the major herb of Die-Huang-Wan for lowering plasma glucose in Wistar rats. *J Pharm Pharmacol* 56,

1443-1447.

Long, S.D., and Pekala P.H. (1996). Regulation of GLUT4 gene expression by arachidonic acid. *J Biol Chem* 271, 1138-1144.

Long, Y.C., and Zierath, J.R. (2006). AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest* 116, 1776-1783.

Lowell, B.B., and Shulman, G.I. (2005). Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 307, 384-387.

Marshall, S. (2006). Role of insulin, adipocyte hormones, and nutrient-sensing pathways in regulating fuel metabolism and energy homeostasis: a nutritional perspective of diabetes, obesity, and cancer. *Sci STKE* 2006, re7.

McAnuff-Harding, M.A., Omoruyi, F.O., and Asemota, H.N. (2006). Intestinal disaccharidases and some renal enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats fed sapogenin extract from bitter yam (*Dioscorea polygonoides*). *Life Sci* 78, 2595-2600.

McAnuff, M.A., Harding, W.W., Omoruyi, F.O., Jacobs, H., Morrison, E.Y., and Asemota, H.N. (2005a). Hypoglycemic effects of steroidal sapogenins isolated from Jamaican bitter yam, *Dioscorea polygonoides*. *Food Chem Toxicol* 43, 1667-1672.

McAnuff, M.A., Omoruyi, F.O., Morrison, E.Y., and Asemota, H.N. (2005b). Changes in some liver enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats fed sapogenin extract from bitter yam (*Dioscorea polygonoides*) or commercial diosgenin. *West Indian Med J* 54, 97-101.

Mei, J., Wang, C.N., O'Brien, L., and Brindley, D.N. (2003). Cell-permeable ceramides increase basal glucose incorporation into triacylglycerols but decrease the stimulation by insulin in 3T3-L1 adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27, 31-39.

Michelle Furtado, L., Poon, V., and Klip, A. (2003). GLUT4 activation: thoughts on possible mechanisms. *Acta Physiol Scand* 178, 287-296.

Minokoshi, Y., Kahn, C.R., and Kahn, B.B. (2003). Tissue-specific ablation of the GLUT4 glucose transporter or the insulin receptor challenges assumptions about insulin action and glucose homeostasis. *J Biol Chem* 278, 33609-33612.

Moller, D.E. (2001). New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 414, 821-827.

Motojima, K., Passilly, P., Peters, J.M., Gonzalez, F.J., and Latruffe, N. (1998). Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem* 273, 16710-16714.

Ng, T.B., Hon, W.K., Lo, L.H., Li, W.W., and Yeung, H.W. (1986a). Effects of alpha-momorcharin, beta-momorcharin and alpha-trichosanthin on lipogenesis and testicular and adrenal steroidogenesis in vitro and plasma-glucose levels in vivo. *J Ethnopharmacol* 18, 45-53.

Ng, T.B., Li, W.W., and Yeung, H.W. (1989). Effects of lectins with various carbohydrate binding specificities on lipid metabolism in isolated rat and hamster adipocytes. *Int J Biochem* 21, 149-155.

Ng, T.B., Wong, C.M., Li, W.W., and Yeung, H.W. (1986b). Insulin-like molecules in *Momordica charantia* seeds. *J Ethnopharmacol* 15, 107-117.

Ng, T.B., Wong, C.M., Li, W.W., and Yeung, H.W. (1986c). Isolation and characterization of a galactose binding lectin with insulinomimetic activities. From the seeds of the bitter gourd *Momordica charantia* (Family Cucurbitaceae). *Int J Pept*

Protein Res 28, 163-172.

Ng, T.B., Wong, C.M., Li, W.W., and Yeung, H.W. (1986d). A steryl glycoside fraction from *Momordica charantia* seeds with an inhibitory action on lipid metabolism in vitro. *Biochem Cell Biol* 64, 766-771.

Ng, T.B., Wong, C.M., Li, W.W., and Yeung, H.W. (1987a). Acid-ethanol extractable compounds from fruits and seeds of the bitter gourd *Momordica charantia*: effects on lipid metabolism in isolated rat adipocytes. *Am J Chin Med* 15, 31-42.

Ng, T.B., Wong, C.M., Li, W.W., and Yeung, H.W. (1987b). Peptides with antilipolytic and lipogenic activities from seeds of the bitter gourd *Momordica charantia* (family Cucurbitaceae). *Gen Pharmacol* 18, 275-281.

Nieto-Vazquez, I., Fernandez-Veledo, S., Kramer, D.K., Vila-Bedmar, R., Garcia-Guerra, L., and Lorenzo, M. (2008). Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Arch Physiol Biochem* 114, 183-194.

Nishiumi, S., and Ashida, H. (2007). Rapid preparation of a plasma membrane fraction from adipocytes and muscle cells: application to detection of translocated glucose transporter 4 on the plasma membrane. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 2343-2346.

Nugent, C., Prins, J.B., Whitehead, J. P., Savage, D., Wentworth, J.M., Chatterjee, V.K., and O'Rahilly S. (2001). Potentiation of glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by PPAR $\gamma$  agonists is maintained in cells expressing a PPAR $\gamma$  dominant-negative mutant: evidence for selectivity in the downstream response to PPAR $\gamma$  activation. *Mol Endocrinol* 15, 1729-1738.

Oka, Y., Asano, T., Shibasaki, Y., Kasuga, M., Kanazawa, Y., and Takaku, F. (1988). Studies with antipeptide antibody suggest the presence of at least two types of glucose



transporter in rat brain and adipocyte. *J Biol Chem* 263, 13432-13439.

Petersen, K.F., and Shulman, G.I. (2006). Etiology of insulin resistance. *Am J Med* 119, S10-16.

Platel, K., and Srinivasan, K. (1997). Plant foods in the management of diabetes mellitus: vegetables as potential hypoglycaemic agents. *Nahrung* 41, 68-74.

Rabe, K., Lehrke, M., Parhofer, K.G., and Broedl, U.C. (2008). Adipokines and insulin resistance. *Mol Med* 14, 741-751.

Raza, H., Ahmed, I., Lakhani, M.S., Sharma, A.K., Pallot, D., and Montague, W. (1996). Effect of bitter melon (*Momordica charantia*) fruit juice on the hepatic cytochrome P450-dependent monooxygenases and glutathione S-transferases in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem Pharmacol* 52, 1639-1642.

Reaven, G.M. (1988). Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37, 1595-1607.

Reaven, G.M. (2008). Insulin resistance: the link between obesity and cardiovascular disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 37, 581-601, vii-viii.

Roffey, B.W., Atwal, A.S., Johns, T., and Kubow, S. (2007). Water extracts from *Momordica charantia* increase glucose uptake and adiponectin secretion in 3T3-L1 adipose cells. *J Ethnopharmacol* 112, 77-84.

Rosen, E.D., Sarraf, P., Troy, A.E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D.S., Spiegelman, B.M., and Mortensen, R.M. (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4, 611-617.

Rosen, K.M., Wentworth, B.M., Rosenthal, N., and Villa-Komaroff, L. (1993). Specific, temporally regulated expression of the insulin-like growth factor II gene during muscle

cell differentiation. *Endocrinology* 133, 474-481.

Sakoda, H., Ogihara, T., Anai, M., Funaki, M., Inukai, K., Katagiri, H., Fukushima, Y., Onishi, Y., Ono, H., Fujishiro, M., *et al.* (2000). Dexamethasone-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is due to inhibition of glucose transport rather than insulin signal transduction. *Diabetes* 49, 1700-1708.

Salt, I.P., Connell, J.M., and Gould, G.W. (2000). 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) inhibits insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 49, 1649-1656.

Saltiel, A.R., and Olefsky, J.M. (1996). Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes* 45, 1661-1669.

Schaeffler, A., Gross, P., Buettner, R., Bollheimer, C., Buechler, C., Neumeier, M., Kopp, A., Schoelmerich, J., and Falk, W. (2008). Fatty acid-induced induction of Toll-like receptor-4/nuclear factor-kappaB pathway in adipocytes links nutritional signalling with innate immunity. *Immunology* [Epub ahead of print]

Schmitz-Peiffer, C., Craig, D.L., and Biden, T.J. (1999). Ceramide generation is sufficient to account for the inhibition of the insulin-stimulated PKB pathway in C2C12 skeletal muscle cells pretreated with palmitate. *J Biol Chem* 274, 24202-24210.

Semple, R.K., Chatterjee, V.K., and O'Rahilly, S. (2006). PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest* 116, 581-589.

Senn, J.J. (2006). Toll-like receptor-2 is essential for the development of palmitate-induced insulin resistance in myotubes. *The Journal of biological chemistry* 281, 26865-26875.

Shi, H., Kokoeva, M.V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., and Flier, J.S. (2006). TLR4

links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116, 3015-3025.

Singh, J., Hundal, H.S., Wackerhage, H., Hope, M., Belle, M., Cummings, E., and Adeghate, E. (2004). *Momordica charantia* fruit juice stimulates glucose and amino acid uptakes in L6 myotubes. *Mol Cell Biochem* 261, 99-104.

Smith, U. (2002). Impaired ('diabetic') insulin signaling and action occur in fat cells long before glucose intolerance--is insulin resistance initiated in the adipose tissue? *Int J Obes Relat Metab Disord* 26, 897-904.

Smith, U., Gogg, S., Johansson, A., Olausson, T., Rotter, V., and Svalstedt, B. (2001). Thiazolidinediones (PPAR $\gamma$  agonists) but not PPAR $\alpha$  agonists increase IRS-2 gene expression in 3T3-L1 and human adipocytes. *FASEB J* 15, 215-220.

Song, M.J., Kim, K.H., Yoon, J.M., and Kim, J.B. (2006). Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 346, 739-745.

Spiegelman, B.M., and Flier, J.S. (1996). Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* 87, 377-389.

Spreafico, F., Malfiore, C., Moras, M.L., Marmonti, L., Filippeschi, S., Barbieri, L., Perocco, P., and Stirpe, F. (1983). The immunomodulatory activity of the plant proteins *Momordica charantia* inhibitor and pokeweed antiviral protein. *Int J Immunopharmacol* 5, 335-343.

Sridhar, M.G., Vinayagamoorthis, R., Arul Suyambunathan, V., Bobby, Z., and Selvaraj, N. (2008). Bitter gourd (*Momordica charantia*) improves insulin sensitivity by increasing skeletal muscle insulin-stimulated IRS-1 tyrosine phosphorylation in

high-fat-fed rats. *Br J Nutr* 99, 806-812.

Steensberg, A., Keller, C., Starkie, R.L., Osada, T., Febbraio, M.A., and Pedersen, B.K. (2002). IL-6 and TNF- $\alpha$  expression in, and release from, contracting human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E1272-1278.

Stephens, J.M., and Pekala, P.H. (1992). Transcriptional repression of the C/EBP- $\alpha$  and GLUT4 genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor- $\alpha$ . Regulations is coordinate and independent of protein synthesis. *J Biol Chem* 267, 13580-13584.

Stuart, C.A., Wen, G., Gustafson, W.C., and Thompson, E.A. (2000). Comparison of GLUT1, GLUT3, and GLUT4 mRNA and the subcellular distribution of their proteins in normal human muscle. *Metabolism* 49, 1604-1609.

Stuart, C.A., Yin, D., Howell, M.E., Dykes, R.J., Laffan, J.J., and Ferrando, A.A. (2006). Hexose transporter mRNAs for GLUT4, GLUT5, and GLUT12 predominate in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E1067-E1073.

Tafari, S.R. (1996). Troglitazone enhances differentiation, basal glucose uptake, and Glut1 protein levels in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 137, 4706-4712.

Takemoto, D.J., Jilka, C., Rockenbach, S., and Hughes, J.V. (1983). Purification and characterization of a cytostatic factor with anti-viral activity from the bitter melon. *Prep Biochem* 13, 371-393.

Tan, M.J., Ye, J.M., Turner, N., Hohnen-Behrens, C., Ke, C.Q., Tang, C.P., Chen, T., Weiss, H.C., Gesing, E.R., Rowland, A., *et al.* (2008). Antidiabetic activities of triterpenoids isolated from bitter melon associated with activation of the AMPK pathway. *Chem Biol* 15, 263-273.

Thirone, A.C., Huang, C., and Klip, A. (2006). Tissue-specific roles of IRS proteins in

insulin signaling and glucose transport. *Trends Endocrinol Metab* 17, 72-78.

Tofade, T.S., and Liles, E.A. (2004). Intentional overdose with insulin glargine and insulin aspart. *Pharmacotherapy* 24, 1412-1418.

Tortorella, L.L., Milasincic, D.J., and Pilch, P.F. (2001). Critical proliferation-independent window for basic fibroblast growth factor repression of myogenesis via the p42/p44 MAPK signaling pathway. *J Biol Chem* 276, 13709-13717.

Tremblay, F., and Marette, A. (2001). Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 276, 38052-38060.

Tschop, M., and Thomas, G. (2006). Fat fuels insulin resistance through Toll-like receptors. *Nat Med* 12, 1359-1361.

Turnbow, M.A., Keller, S.R., Rice, K.M., and Garner, C.W. (1994). Dexamethasone down-regulation of insulin receptor substrate-1 in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 269, 2516-2520.

Turpin, S.M., Lancaster, G.I., Darby, I., Febbraio, M.A., and Watt, M.J. (2006). Apoptosis in skeletal muscle myotubes is induced by ceramides and is positively related to insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E1341-E1350.

Undie, A.S., and Akubue, P.I. (1986). Pharmacological evaluation of *Dioscorea dumetorum* tuber used in traditional antidiabetic therapy. *J Ethnopharmacol* 15, 133-144.

Vague, J. (1956). The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *Am J Clin Nutr* 4, 20-34.

Van Epps-Fung, M., Williford, J., Wells, A., and Hardy, R.W. (1997). Fatty acid-induced insulin resistance in adipocytes. *Endocrinology* 138, 4338-4345.

Verma, N.K., Singh, J., and Dey, C.S. (2004). PPAR-gamma expression modulates insulin sensitivity in C2C12 skeletal muscle cells. *Br J Pharmacol* 143, 1006-1013.

Wang, T.K., Yam, W.C., Yuen, K.Y., and Wong, S.S. (2006). Misidentification of a mucoid strain of *Salmonella enterica* serotype choleraesuis as *Hafnia alvei* by the Vitek GNI+ card system. *J Clin Microbiol* 44, 4605-4608.

Wei, Y., Chen, K., Whaley-Connell, A.T., Stump, C.S., Ibdah, J.A., and Sowers, J.R. (2008). Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294, R673-R680.

White, M.F. (2002). IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283, E413-E422.

White, M.F., and Kahn, C.R. (1994). The insulin signaling system. *J Biol Chem* 269, 1-4.

Wood, I.S., Hunter, L., and Trayhurn, P. (2003). Expression of Class III facilitative glucose transporter genes (GLUT-10 and GLUT-12) in mouse and human adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 308, 43-49.

Wood, I.S., and Trayhurn, P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* 89, 3-9.

Wymann, M. P., and Schneider, R. (2008). Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 162-176.

Yibchok-Anun, S., Adisakwattana, S., Yao, C.Y., Sangvanich, P., Roengsumran, S., and Hsu, W.H. (2006). Slow Acting Protein Extract from Fruit Pulp of *Momordica charantia*

with Insulin Secretagogue and Insulinomimetic Activities. *Biol Pharm Bull* 29, 1126-1131.

Yoshiko, Y., Hirao, K., Sakabe, K., Seiki, K., Takezawa, J., and Maeda, N. (1996). Autonomous control of expression of genes for insulin-like growth factors during the proliferation and differentiation of C2C12 mouse myoblasts in serum-free culture. *Life Sci* 59, 1961-1968.

Zick, Y. (2005). Ser/Thr phosphorylation of IRS proteins: a molecular basis for insulin resistance. *Sci STKE* 2005, pe4.

吳夢婷 (2008). 數種具植物雌激素活性材料對卵巢剔除鼠代謝症候群及鈣代謝之影響. 國立台灣大學微生物與生化學研究所碩士論文.

陳永如 (2007). 數種植物雌激素食材萃物對PPAR、脂肪細胞生成及雌激素活性特質鑑定. 國立台灣大學微生物與生化學所碩士論文.

鄭瑋宜 (2007). 山藥具雌激素活性成分之單離與鑑定研究. 國立台灣大學微生物與生化所博士論文.

盧崇如 (2003). 基隆山藥區分物對大白鼠血糖與血脂之影響. 國立台灣大學食品科技研究所碩士論文.

張天鈞 (1994). 新陳代謝症 (metabolic syndrome) 的歷史演進、定義和臨床意義. *當代醫學* 31, 3.