

國立臺灣師範大學教育學院

人類發展與家庭學系營養科學與教育組

碩士論文

Graduate Institute Department of Human Development and  
Family Studies, Nutritional Science and Education, College  
of Education, National Taiwan Normal University

Master Thesis

沒食子酸(gallic acid)對高果糖飼料誘導高血糖大鼠  
血糖及脂質代謝之影響

Effect of gallic acid on hyperglycemia and lipid  
metabolism in high fructose diet-induced diabetic rats

研究生：楊恆叡 (Heng-Rui Yang)

指導教授：沈賜川 博士 (Szu-Chuan Shen, PhD.)

中華民國一百零二年一月

January, 2013

## 中文摘要

高血糖症(hyperglycemia)為糖尿病(diabetes mellitus)主要病徵，常伴隨胰島素阻抗(Insulin resistance)，使肝臟、肌肉、脂肪等週邊組織對於胰島素敏感性(Insulin sensitivity)降低，影響血糖利用，導致人體長期對於葡萄糖耐受性不良。沒食子酸(gallic acid)為苯甲酸(benzoic acid)的衍生物，化學名3,4,5-trihydroxybenzoic acid，廣泛存在於各類植物中。近期研究發現酚酸類化合物具有抗氧化及改善葡萄糖攝入(glucose uptake)之功效。本研究探討沒食子酸對高果糖飼料誘導高血糖大鼠降血糖及脂質代謝之影響。餵食 66%高果糖飼料 12 週後之 Wistar 大鼠分為四組(每組 6 隻)，分別為：高果糖組、臨床糖尿病用藥(pioglitazone hydrochloride)組、低劑量(10 mg/kg B.W.)沒食子酸組、高劑量(30 mg/kg B.W.)沒食子酸組，糖尿病用藥與沒食子酸每日管餵一次，並與控制組(正常大鼠)作比較。老鼠於實驗進行 17 週後犧牲，結果顯示，糖尿病大鼠餵食 30 mg/kg B.W.沒食子酸 4 週後，相較於高果糖組有明顯降低禁食血糖(fasting glucose) (從 224.17 mg/dL 降至 84.83 mg/dL)及降低高胰島素血症 (從 0.99  $\mu$ g/L 降低至 0.42  $\mu$ g/L)的效果；體脂肪方面，採集腎周脂肪(perirenal fat)及副睪脂肪(epididymal fat)進行分析，高劑量 gallic acid 組相較於高果糖組，明顯降低腎周脂肪(從 6.7 mg 降低至 5.58 mg) 及副睪脂肪(從 2.95 mg 降低至 2.02 mg)；於脂肪組織中胰島素訊息傳遞方面，以西方墨點法偵測蛋白質表現量，結果顯示，餵食高劑量沒食子酸組相較於高果糖組可提昇 54 % 葡萄糖轉運蛋白(glucosetransporter-4, GLUT4)表現量。綜合以上結果推論，沒食子酸對於高果糖誘導高血糖大鼠具有降低血糖及調控脂質代謝之效果。

**關鍵詞：**沒食子酸、高血糖、胰島素阻抗、胰島素訊息傳遞、糖尿病。

## Abstract

Hyperglycemia is a major symptom of diabetes mellitus. It often associated with insulin resistance which will lower the insulin sensitivity of liver, muscles and adipose, futher effect the assimilation of blood sugar and lead to long-term impaired glucose tolerance (IGT). Gallic acid is the derivatives of benzoic acid (formula: 3,4,5-trihydroxybenzoic acid) exists in various kinds of plants. Recent researches demonstrated that phenoic compounds exhibit anti-oxidation and improve glucose uptake activities *in vitro*. This study investigated the effect of gallic acid on hypoglycemia and lipid metabolism in high-fructose diet (HFD)-induced diabetic rats. After fed the 66% fructose for twelve weeks, the Wistar rats were devided into 4 groups (6 rats each group): HFD, pioglitazone hydrochloride, low dose (10 mg/kg B.W.) gallic acid, high dose (30 mg/kg B.W.) gallic acid groups. Rats fed the pioglitazone hydrochloride and the high dose (30 mg/kg B.W.) gallic acid once a day and were sacrificed after experimenting for 17 weeks. The the fasting glucose and insulin levels of HFD rats significantly reduced (the former declined from 224.17 mg/dL to 84.83mg/dL, the latter declined from 0.99  $\mu$ g/L to 0.42  $\mu$ g/L) after a 4-week feeding of gallic acid (30 mg/kg B.W.). The perirenal and epididymal fats of the high dose gallic acid group significantly decreased compared to the HFD rats (the former declined from from 6.7 mg to 5.58 mg, the latter declined from 2.95 mg to 2.02 mg). The western blot analysis was conducted to evaluate the effect of gallic acid on insulin signal transduction pathway in adipose tissue of HFD rats. The high dose gallic acid increased 54% glucose transporter-4 (GLUT4) compared with the HFD rats. We postulate that gallic acid may alleviate hyperglycemia and modulate lipid metabolism of adipose in HFD rats.

Keywords: gallic acid; hypoglycemia; lipid metabolism; insulin signaling; diabetic rats.



## 目錄

	頁次
中文摘要.....	2
英文摘要.....	3
目錄.....	5
圖次.....	9
表次.....	10
第一章 前言.....	12
第二章 文獻回顧.....	13
2.1 酚酸.....	13
2.1.1 酚酸簡介.....	13
2.1.2 酚酸種類.....	13
2.1.3 酚酸與糖尿病.....	13
2.2 糖尿病.....	14
2.2.1 糖尿病定義.....	14
2.2.2 糖尿病分類.....	14
2.2.3 糖尿病診斷標準.....	16
2.2.4 糖尿病流行病學.....	16
2.3 胰島素阻抗.....	17
2.3.1 胰島素簡介.....	17
2.3.2 PI3K(Phosphatidylinositol-3-kinase)pathway.....	18
2.3.3 葡萄糖轉運蛋白.....	20
2.3.5 高果糖與胰島素阻抗.....	23
2.3.6 脂肪組織與胰島素阻抗.....	25
2.4 參與醣類代謝與脂質代謝之關鍵酵素.....	29

2.4.1 Glycolysis pathway.....	29
2.4.2 De novo lipogenesis pathway.....	29
2.4.3 Lipolysis pathway.....	31
2.5 樣品與抗糖尿病藥物.....	35
2.5.1 沒食子酸.....	35
2.5.2 愛妥糖.....	35
第三章 實驗架構.....	37
第四章 材料與方法.....	38
4.1 實驗材料.....	38
4.1.1 實驗樣品來源.....	38
4.1.2 實驗動物.....	38
4.1.3 動物飼料.....	38
4.1.4 實驗藥品與試劑.....	38
4.1.4.1 化學藥品.....	38
4.1.4.2 酵素套組.....	39
4.1.4.3 抗體.....	40
4.1.4.4 儀器設備.....	40
4.2 實驗方法.....	41
4.2.1 動物飼養.....	41
4.2.2 動物分組與誘導.....	41
4.2.3 樣品餵食劑量.....	42
4.2.4 口服葡萄糖耐受性試驗.....	42
4.2.5 血液的收集與處理.....	42
4.2.6 臟器的採集.....	42



4.2.7 血漿葡萄糖濃度測定.....	42
4.2.8 血漿胰島素濃度測定.....	43
4.2.9 脂質代謝相關訊息傳遞蛋白測定.....	43
4.3 統計分析.....	47
第五章 結果.....	48
5.1 灌食沒食子酸 4 週後大鼠進行口服葡萄糖耐受性試驗血漿葡萄糖濃度之變化.....	48
5.2 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中葡萄糖濃度之變化.....	48
5.3 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中果糖胺濃度之變化.....	48
5.4 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中胰島素濃度之變化.....	48
5.5 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中 C 肽濃度之變化.....	48
5.6 灌食沒食子酸 4 週後大鼠體內脂肪組織堆積之變化.....	49
5.7 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中三酸甘油酯濃度之變化.....	49
5.8 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中游離脂肪酸濃度之變化.....	49
5.9 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中高密度脂蛋白濃度之變化.....	49
5.10 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 Glut4 蛋白表現量之影響.....	49
5.11 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 IR 蛋白表現量之影響.....	50
5.12 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 PKC- $\zeta$ 蛋白表現量之影響.....	50
5.13 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 PFK 蛋白表現量之影響.....	50
5.14 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 PK 蛋白表現量之影響.....	50
5.15 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 FAS 蛋白表現量之影響.....	50
5.16 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 ATGL 蛋白表現量之影響.....	51
第六章 討論.....	52
6.1 高果糖動物模式.....	52

6.2 灌食沒食子酸對高果糖誘導高血糖大鼠高血糖症之影響.....	52
6.3 灌食沒食子酸對高果糖誘導高血糖大鼠高胰島素血症之影響.....	52
6.4 灌食沒食子酸對高果糖誘導高血糖大鼠高血脂症之影響.....	53
6.5 灌食沒食子酸對高果糖誘導高血糖大鼠內臟脂肪堆積之影響.....	53
6.6 灌食沒食子酸對高果糖誘導高血糖大鼠腎周脂肪胰島素訊息傳遞之影響...	54
6.7 灌食沒食子酸對高果糖誘導高血糖大鼠腎周脂肪糖解代謝之影響.....	55
6.8 灌食沒食子酸對高果糖誘導高血糖大鼠腎周脂肪脂質代謝之影響.....	56
第七章 結論.....	58
參考文獻.....	76





## 圖次

圖 2-1、100 年十大主要死因死亡人數.....	17
圖 2-2、胰島素訊息傳遞路徑.....	19
圖 2-3 葡萄糖轉運蛋白跨膜蛋白構型.....	20
圖 2-4 葡萄糖轉運蛋白家族.....	21
圖 2-5 果糖代謝.....	25
圖 2-6 果糖對各組織器官影響.....	26
圖 2-7 脂肪細胞激素引發代謝症候群之病理機轉.....	27
圖 2-8 胰島素阻抗病理機轉.....	28
圖 2-9 人類具有功能性區塊的脂肪酸合成酶二元體構型.....	33
圖 2-10 脂肪細胞中調控三酸甘油酯同化及異化作用之代謝路徑.....	33
圖 2-11 肝臟組織調控葡萄糖代謝.....	34
圖 5-1 灌食沒食子酸 4 週後大鼠進行口服葡萄糖耐受性試驗血漿葡萄糖濃度之變化.....	59
圖 5-2 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中葡萄糖濃度之變化.....	60
圖 5-3 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中果糖胺濃度之變化.....	61
圖 5-4 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中胰島素濃度之變化.....	62
圖 5-5 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中 C 胜鏈濃度之變化.....	63
圖 5-6 灌食沒食子酸 4 週後大鼠體內脂肪組織堆積之變化.....	64
圖 5-7 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中三酸甘油酯濃度之變化...65	65
圖 5-8 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中游離脂肪酸濃度之變化...66	66
圖 5-9 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中高密度脂蛋白濃度之變化 67	67
圖 5-10 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 Glut4 蛋白表現量之影響.....	68
圖 5-11 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 IR 蛋白表現量之影響.....	69

圖 5-12 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 PKC- $\zeta$  蛋白表現量之影響.....70

圖 5-13 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 PFK 蛋白表現量之影響.....71

圖 5-14 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 PK 蛋白表現量之影響.....72

圖 5-15 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 FAS 蛋白表現量之影響.....73

圖 5-16 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 ATGL 蛋白表現量之影響.....74

圖 7-1、沒食子酸於脂肪細胞中調控醣類與脂質代謝之可能機制.....75



表次

表 2-1 胰島素於標的組織之功用.....18

表 2-2 葡萄糖轉運蛋白家族.....22



## 第一章 前言

依據行政院衛生署 2011 年公佈統計資料顯示，近年來台灣糖尿病人口不斷逐年增加，且排名國人十大死亡原因第五位。全球第 2 型糖尿病之盛行率呈現上升趨勢，在台灣根據 2003 年在全國的中、小學生所作的調查顯示第 2 型糖尿病已占這個族群的 54.2%，遠超過第 1 型糖尿病。第 2 型糖尿病的發生主要由於胰島素刺激周邊組織吸收葡萄糖及抑制肝糖分解能力缺陷或胰臟  $\beta$  細胞功能不全導致胰島素分泌不足，而造成胰島素阻抗(insulin resistanse)。沒食子酸(gallic acids)為酚酸(phenolic acids)化合物的一類，廣存於各類植物中。近期研究指出沒食子酸具有降血糖、降血脂，改善高胰島素血症、降低體脂肪堆積等作用(Hsu and Yen, 2007; Latha and Daisy, 2011; Prince et al., 2011; Paunithavathi et al., 2011)。因此，沒食子酸可能具有調節醣類代謝與脂質代謝之能力。本實驗以高果糖模式誘導 Wistar 大鼠成為高血糖症(Hyperglycemia)，再分別管餵高劑量(30mg/kg B.W.)與低劑量(30mg/kg B.W.)沒食子酸，之後測定參與醣類代謝與脂質代謝之重要訊息傳遞蛋白，以探討沒食子酸改善高血糖症之功效，期望能進一步了解沒食子酸於生化代謝上所扮演之角色，作為日後改善中間型肥胖、代謝症候群、第二型糖尿病等代謝性疾病之參考。

## 第二章 文獻回顧

### 2.1 酚酸

#### 2.1.1 酚酸簡介

酚酸(phenolic acids)為多酚化合物(polyphenols)的一類，廣存於各類可食性植物中，如飲食中的茶葉、咖啡、紅酒，藥用植物中的忍冬科的金銀花，薔薇科的托盤根，菊科的蒲公英、燈盞花，唇形科的鼠尾草，橄欖科的方欖，繖形科的當歸、川芎(中華民國藥師公會藥學雜誌, 2011) phenolic acids 其結構上的特徵即苯環上接有 OH 基(hydroxyl group)可提供氫原子，具有還原力，因此為良好的抗氧化物質。許多研究顯示 phenolic acids 類的化合物有許多生理功效如:抗癌、抗氧化、降低心血管疾病、抗糖尿病等(李, 2004)。

#### 2.1.2 酚酸的種類

Phenolic acids 主要可在分為兩大類，一為苯甲酸(benzoic acid)衍生物，含有 7 個碳原子如沒食子酸(gallic acid)，另一類為肉桂酸(cinnamic acid)衍生物，含有 9 個碳原子如阿魏酸(ferulic acid)、咖啡酸(caffeic acid)，兩類衍生物其苯環皆被 hydroxy 基團取代(李, 2004)。

#### 2.1.3 酚酸與糖尿病

Caffeic acid 與 cinnamic acid 於體外實驗中，能夠減輕小鼠肝臟細胞(FL83B)胰島素情況(Huang and Shen, 2012)。Caffeic acid 於動物實驗中證實能顯著改善 C57BL/KsJ-*db/db* mice 高血糖、高胰島素血症情況，且增加肝中葡萄糖轉運蛋白表現量(Jung et al., 2006)。綠原酸(chlorogenic acid) 於 *db/db* mice 骨骼肌細胞中，顯示亦能降低禁食血糖、增加葡萄糖轉運蛋白轉位至細胞膜上，增加骨骼肌利用葡萄糖能力。*Terminalia bellerica* Roxb 萃取的 gallic acid 對於 STZ 誘導糖尿病鼠，

能夠顯著降低血漿葡萄糖(Rosemary and Daisy, 2010)。由此可知酚酸類化合物具有改善高血糖症之能力。

## 2.2 糖尿病

### 2.2.1 糖尿病定義

糖尿病(Diabetes mellitus)是由一群代謝性疾病所造成，主要為胰島素(insulin)分泌不足或胰島素功能缺失，導致身體組織對葡萄糖(glucose)的利用能力低下，甚至無法利用，最終引起不適當的高血糖症(hyperglycemia)。(一)臨床症狀包含：多食(polyphagia)、多飲(polydipsia)、多尿(polyuria)、疲倦(asthenia)、體重減輕(weight loss)、視力模糊(blurred vision)、易感染(infection)、傷口不易癒合、糖尿(glycouria)、酮尿(ketonuria)。(二)急性高血糖併發症：(1)糖尿病酮酸中毒(diabetes ketoacidosis; DKA)：血糖值大於 250mg/dL。(2)高滲透壓高血糖非酮酸性昏迷(non-ketotic hyperosmolar hyperglycemic reaction; HHNK)：血糖值 600~2000mg/dL，滲透壓大於 350mOsm/kg。(3)胰島素休克(insulin shock)：血糖值低於 60mg/dL。(三)慢性高血糖併發症：(1)大血管疾病(macrovascular):高血壓、冠狀動脈疾病、腦血管疾病、周邊血管疾病。(2)小血管疾病(microrvascular)：眼球病變(ophthalmologic)、腎病變(Nephropathy)、腎衰竭(Kimmelstiel-Wilson Disease)。(3)神經病變(neuropathy)：多神經病變(polyneuropathy)、自律神經病變(autonomic neuropathy)。(4)骨質病變(osteopenia)。

### 2.2.2 糖尿病分類

#### 一、第一型糖尿病

又稱為幼年型糖尿病，通常於 30 歲前診斷出來，任何年齡都可能發病。因自體免疫攻擊胰臟蘭氏小島的  $\beta$  細胞，再加上胰島素自體抗體(insulin antoantibody; IAA)對 insulin 攻擊，導致於體內有效循環的胰島濃度逐漸降低，當

$\beta$  細胞的數量與分泌能力受到  $>90\%$  的破壞程度時，就會出現與糖尿病診斷相符的高血糖症狀，最終會導致胰島素完全缺乏。與人類白血球抗原基因 (human leukocyte antigen; HLA) 有關，超過  $90\%$  的第一型糖尿病白種人似乎有 (HLA-DR3 或 HLA-DR4)。患者體重通常很輕。有強烈的傾向發展成酮酸血症。胰島素細胞抗體 (Islet cell antibody; ICA) 呈陽性。胰島素接受器正常，但缺乏內源性胰島素。

## 二、第二型糖尿病

又稱為成年型糖尿病，通常於 30 歲後診斷出來，任何年齡都有可能發病。第二型糖尿病約佔台灣糖尿病患的  $98\%$ 。患者體內血糖高但胰島素濃度不一，周邊組織對胰島素敏感性降低，為 IFG 的初期階段，特徵為胰島素阻抗 (insulin resistance)。與遺傳有關但與 HLA 無關。患者體型為過重或肥胖。不易發生酮酸中毒，除非有急性併發症。胰島素接受器較少，但內源性胰島素不致缺乏 (中華民國糖尿病衛教學會, 2010)。

## 三、妊娠型糖尿病

Gestational diabetes (GDM)：於懷孕期間只要有葡萄糖耐受不良症發生，不論程度輕重皆可定義為妊娠型糖尿病。由於懷孕期間孕婦體內複雜的新陳代謝及內分泌變化，以致葡萄糖耐受量異常。大多因胎盤產生抗胰島素因子。

## 四、其他特異型糖尿病

(一) $\beta$ -細胞功能基因缺損：第 12 對染色體 (肝細胞核因子-1 $\alpha$ )、第 20 對染色體 (肝細胞核因子-4 $\alpha$ )、第 7 對染色體 (葡萄糖激酶)。

(二)胰島素作用的基因缺陷：A 型胰島素缺陷、Rabson-Mendenhall syndrome、矮妖精貌症候群、脂萎縮性糖尿病。

(三)外分泌胰臟疾病：胰臟炎、創傷/胰臟切除、腫瘤、纖維性囊腫、血色素沉著症、纖維鈣化性胰臟病變。

(四)內分泌病變：肢端肥大症、庫辛氏症候群、昇糖素瘤、嗜鉻細胞瘤、甲狀腺高能症、體抑素瘤、鞣固酮腺瘤。

(五)藥物或化學物質引起：菸鹼酸、糖皮質素、甲狀腺素、TZD、 $\beta$  腎上腺素促效劑、干擾素。

(六)感染：先天性德國麻疹、巨細胞病毒。

(七)不尋常形式免疫媒介糖尿病：筆直人症候群、抗胰島素受器抗體。

(八)合併糖尿病的其他遺傳症候群：唐氏症、Klinefelter 氏症候群、Turner 氏症候群、Wolfram 氏症候群、Friendreich 氏運動失調、Huntington 氏舞蹈症、Lawrence Moon Biedl 症候群、肌強直性失養症、紫質症(porphyria)、Prader Willi 症候群。

### 2.2.3 糖尿病的診斷標準

三項診斷項目中任一項方法將可診斷為糖尿病，但隨後一天要再證實。(1)隨機血漿葡萄糖 $\geq 200\text{mg/dL}$ (2)空腹血漿葡萄糖 $\geq 126\text{mg/dL}$ (空腹至少 8 小時)(3)口服葡萄糖耐受性試驗(oral glucose tolerance test; OGTT)：口服 75g 葡萄糖，2 小時後血漿葡萄糖 $\geq 200\text{mg/dL}$ 。糖尿病前期(Pre-diabetes)意指血糖恒定受損的代謝狀態，介於正常及糖尿病之間，其診斷項目包含兩項。(1)空腹血糖障礙(impaired fasting glucose; IFG)：空腹血糖濃度 $\geq 100\text{mg/dL}$ ，但 $< 126\text{mg/dL}$ 。(2)葡萄糖耐受不良(impaired glucose tolerance; IGT)：OGTT 值 $\geq 140$ ，但 $< 200\text{mg/dL}$ 。

### 2.2.4 糖尿病的流行病學

由於文明的進步，社會的繁榮，全世界第二型糖尿病盛行率呈現上升趨勢。2007 年全球已有兩億四千六百萬的糖尿病人口，預估 2025 年全球糖尿病盛行率將由 6.0% 提升至 7.3%，糖尿病人口將達三億八千萬人。全球 IGT 人數在 2007 年的估算是三億八百萬，預估到 2025 年 IGT 盛行率將由 7.5% 提升至 8.0%，IGT 人口數將達四億一千八百萬人。此種增加趨勢又以亞洲地區最明顯。此外，



糖尿病發生年齡有向下延伸之趨勢。在台灣根據 2002 年國民健康局的三高調查中，發現糖尿病盛行率約為 7.47%，其中男性約為 8.2%而女性為 6.2%(中華民國糖尿病衛教學會, 2010)。

在台灣，於 1987 年起糖尿病始終高居十大死因之前五名，依據行政院衛生署 100 年死因分析統計，糖尿病排名第四順位，死亡人數 9080 人，死因死亡人數佔總死亡人數 6.0%，死亡人數增幅 10.6%，平均每日發生件數為 25 件，每隔 57 分 53 秒有一人死於糖尿病(行政院衛生署, 2012)。

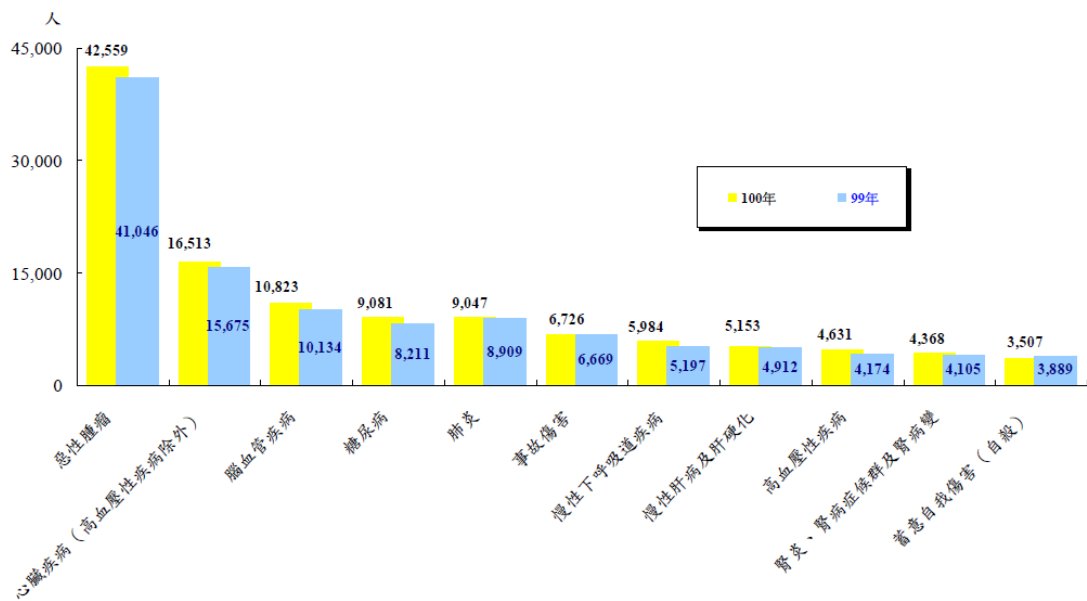


圖2-1、100年十大主要死因死亡人數。

## 2.3 胰島素阻抗

### 2.3.1 胰島素簡介

胰島素(Insulin)是維持血糖恆定(glucose homeostasis)的重要激素。由胰臟蘭氏小島(Islets of langerhans)中的  $\beta$ -cell 所分泌，經轉譯作用後首先會釋出前胰島素(proinsulin)，此時具有三個多胜肽(polypeptide)，分別為 A-chain(由 21 個胺基酸構成)與 B-chain(由 30 個胺基酸構成)，C-chain(由 31 個胺基酸構成)，最終經

轉譯後修飾 (post-translational modification)，C-chain 會被激素原轉化酶 (prohormone convertase; POMC) 剪切掉，剩下 A 鏈及 B 鏈兩者在互相以雙硫鍵 (disulfide bond) 鍵結，形成真正具有生物活性的胰島素，含 51 個胺基酸，分子量 5808KDa。被切除的游離 C-chain 又稱為 C-peptide，可作為檢測評估糖尿病病人之  $\beta$  cell 分泌能力及內源性 insulin 含量的指標 (張, 2010)。insulin 會於各組織器官藉由訊息傳遞作用，增加細胞對葡萄糖的攝入，並增加 glycolysis，達到降血糖的目的。胰島素除了降血糖功能外，亦具有促進同化及抗異化作用，藉此機制調控三大營養素代謝。於肝臟組織：促進肝醣合成、蛋白質合成、脂肪酸合成、cAMP 水解，抑制肝醣分解、糖質新生、酮體生成；肌肉組織：增加肝醣合成、胺基酸吸收、蛋白質合成，抑制蛋白分解、生糖性胺基酸釋出；脂肪組織：促進脂肪酸合成、甘油合成、三酸甘油酯合成、血管壁上脂蛋白脂解酶活性，抑制三酸甘油酯分解、游離脂肪酸釋出。

表 2-1、Insulin function in target tissue

Tissue	Enhance	Reduce
Liver	Glycogen synthesis Protein synthesis Fatty acid synthesis	Glycogenolysis Gluconeogenesis Ketogenesis
Muscle	Protein synthesis	Protein degradation
Adipose	Lipogenesis Lipoprotein lipase	Hormone sensitive lipase

### 2.3.2 PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) pathway

胰島素主要的標的器官(target tissue)為肝臟、肌肉、脂肪。胰島素藉由 I3K 的訊息傳遞路徑促使這些組織將葡萄糖攝入。組織的細胞表面佈滿著二聚體 (dimer) 型式的胰島素接受體 (insulin receptor; IR)，當 insulin 與 receptor 結合後，會使 receptor  $\beta$  次單元 C 端的 tyrosine 自磷酸化 (autophosphorylation)，並使下游

的 (insulin receptor substrate; IRS)及(growth factor receptor-binding protein; Grb1)活化。IRS 分為 IRS1 及 IRS2，在脂肪與肌肉組織中以 IRS1 為主，在肝臟組織中則是兩者並存。活化型的 IRS (tyrosine 被磷酸化)及 Grb1，能夠活化 (phosphatidylinositol-3-kinase; PI3K)，使 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PIP<sub>2</sub>) 磷酸化成 (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate; PIP<sub>3</sub>)，PIP<sub>3</sub> 將與 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1; PDK1)結合，使下游的 AKT (PKB, protein kinase B)和 Protein kinase C zeta (PKC $\zeta$ )活化。藉由以上訊息傳遞促使 (glucose transporter 4; GLUT4)轉位(translocation)至細胞膜上，使細胞得以攝入葡萄糖(glucose uptake) (Eriksson, 2007)。

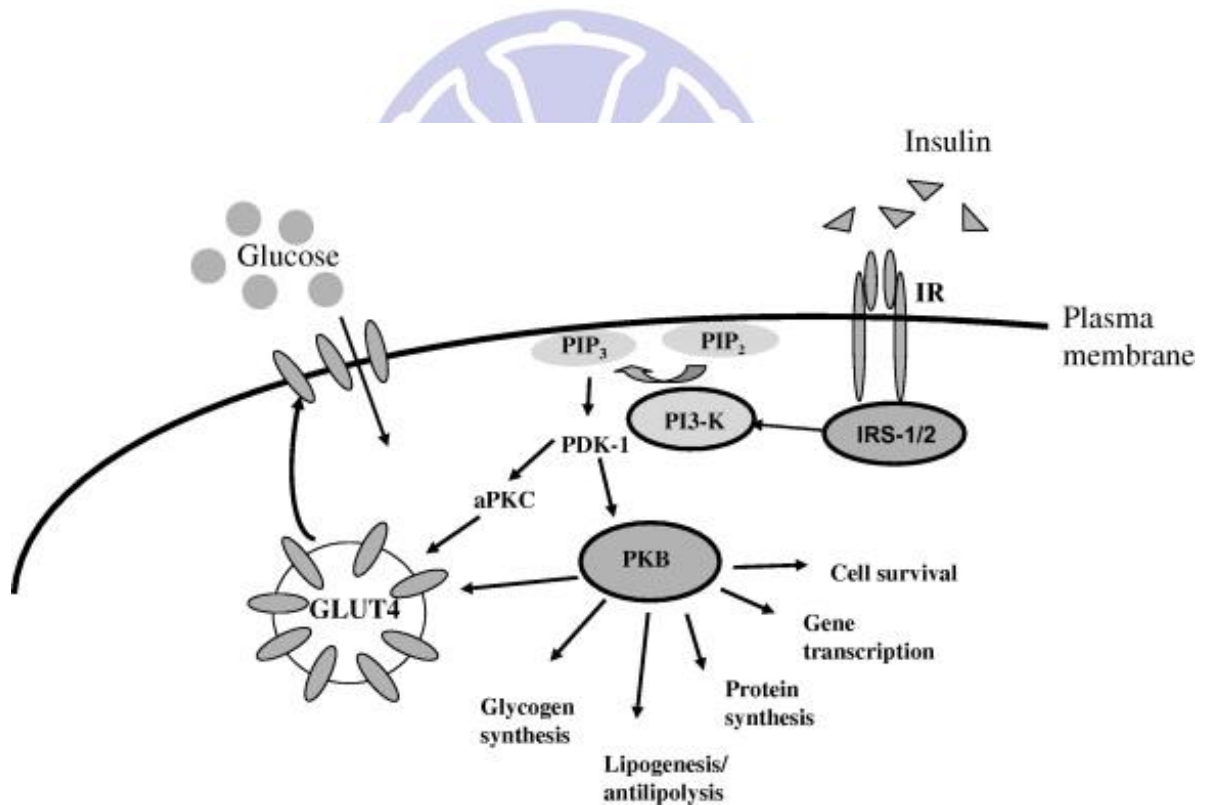


圖2-2、胰島素訊息傳遞路徑。

Insulin signalling via the PI3K-dependent pathway in adipocytes and skeletal muscle. Insulin binding to its receptor will lead to glucose transport activation and other metabolic effects and this is exerted via a cascade of signaling proteins. GLUT4, glucose transporter 4; IR, insulin receptor; IRS1/2, insulin receptor substrates 1 and 2;

PDK1, phosphatidylinositol dependent protein kinase 1, PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PIP2, phosphatidylinositol-3,4-phosphate; PIP3, phosphatidylinositol-3,4,5-phosphate; aPKC, atypical protein kinase C; PKB, protein kinase B. (Eriksson, 2007)

### 2.3.3 葡萄糖轉運蛋白 (glucose transporter; GLUT)

目前已知人類的葡萄糖轉運蛋白家族中有 13 種，其共同特徵為跨膜蛋白，均跨越細胞膜 12 次，序列的 N 端及 C 端均位於細胞質內。根據序列同質性與結構相似度，可分為三群：第一群為 GLUT1-4，主司葡萄糖運輸；第二群為 GLUT5,7,9,11，主司果糖運輸；第三群為 GLUT6,8,10。第一群中 GLUT1-3 主要負責細胞基礎狀態下對葡萄糖的攝取，會持續表現，不受胰島素刺激而改變細胞膜上的數目。GLUT-2 主要維持細胞的促進擴散作用 (facilitated diffusion) 來運輸 glucose，亦不受胰島素影響。而 GLUT4 是唯一能受 insulin 刺激而增加 glucose uptake 的轉運蛋白，以骨骼肌及脂肪組織的表現量最高。(張, 2010; 李, 2008)

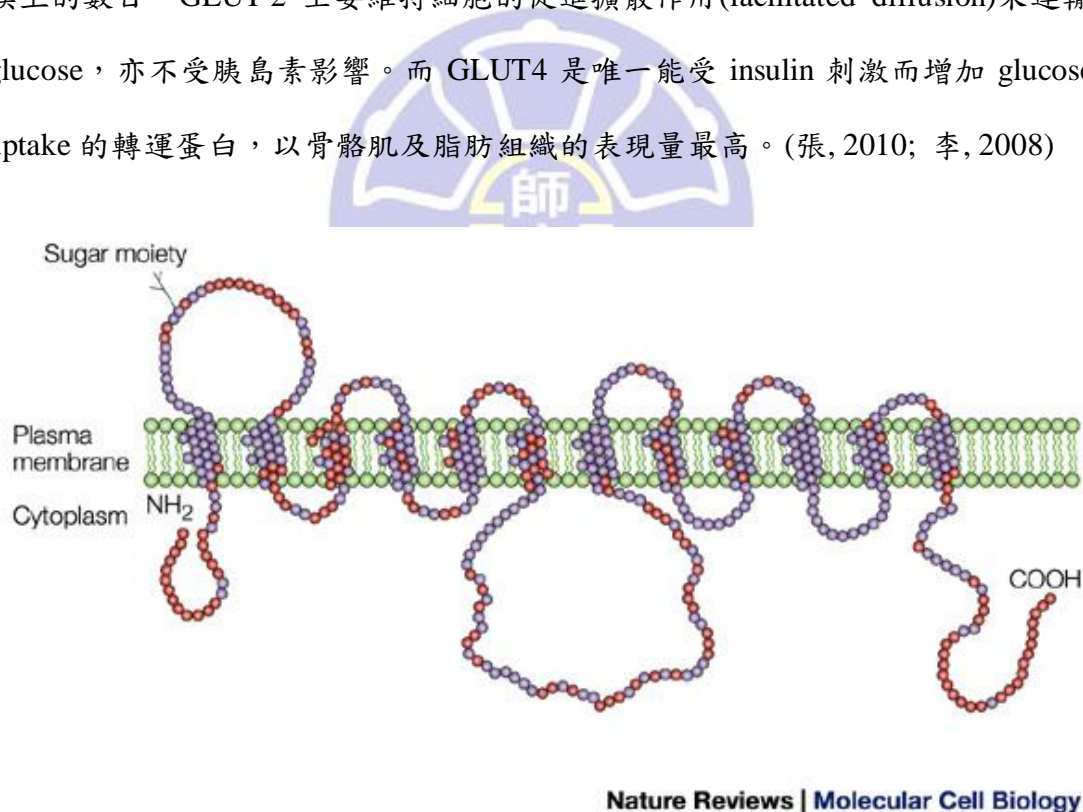


圖 2-3、葡萄糖轉運蛋白跨膜蛋白構型。

GLUT family of proteins comprises 13 members at present, which are predicted to span the membrane 12 times with both amino- and carboxyl-termini located in the cytosol. On the basis of sequence homology and structural similarity, three subclasses of sugar transporters have been defined: Class I (GLUTs 1–4) are glucose transporters;

Class II (GLUTs 5, 7, 9 and 11) are fructose transporters; and Class III (GLUTs 6, 8, 10, 12 and HMIT1) are structurally atypical members of the GLUT family, which are poorly defined at present. The diagram shows a homology plot between GLUT1 and GLUT4. Residues that are unique to GLUT4 are shown in red. (Bryant, 2002)

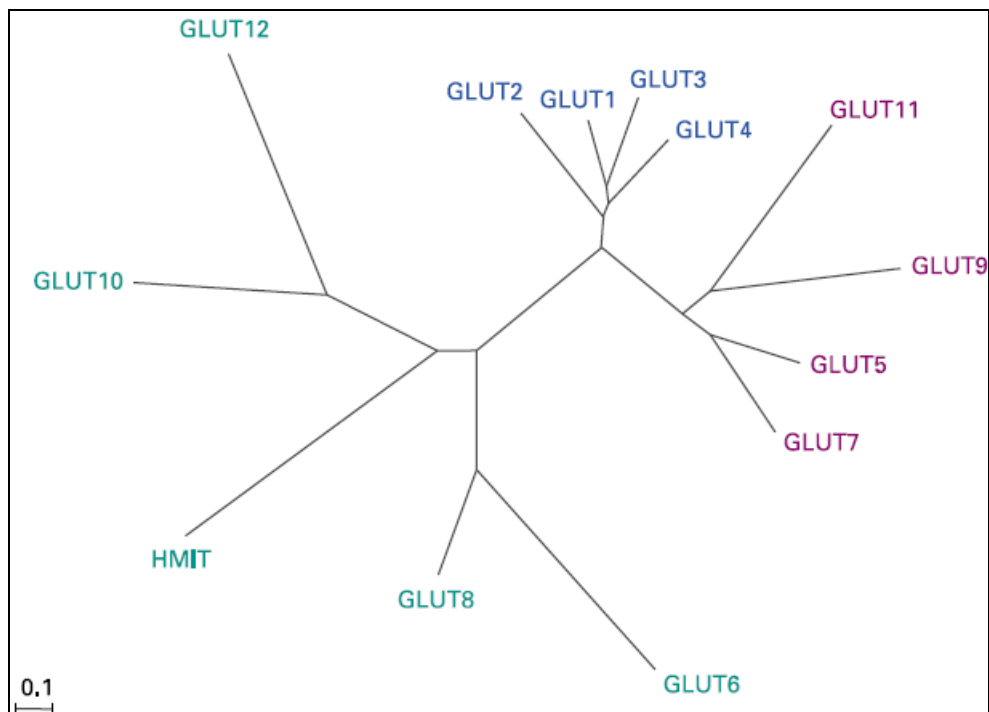


圖 2-4 葡萄糖轉運蛋白家族。

Dendrogram of the glucose transporter (GLUT) family. An unrooted radial phylogram was drawn from a multiple sequence alignment of the thirteen members of the human GLUT family. The tree was constructed using neighbour-joining analysis of a distance matrix generated with PHYLIP software (Felsenstein, 1989). The three classes of GLUT proteins are colour-coded as: blue, class I; red, class II; green, class III. The scale bar represents 0.1 substitutions per amino acid position. HMIT,  $H^+$ -coupled myo-inositol transporter. (Wood and Trayhurn, 2003)

表、2-2 葡萄糖轉運蛋白家族

Glucose transporter (GLUT) family

Isoform	Previous name	Class	Main tissue localization	Insulin sensitive?	Functional characteristics (transport)	Present in skeletal muscle?*	Present in white adipose tissue?*
GLUT1	–	I	Erythrocytes, brain, ubiquitous	No	Glucose	Yes	Yes
GLUT2	–	I	Liver, pancreas, intestine, kidney	No	Glucose (low affinity); fructose	No	No
GLUT3	–	I	Brain	No	Glucose (high affinity)	No	Yes (m)
GLUT4	–	I	Heart, muscle, WAT, BAT, brain	Yes	Glucose (high affinity)	Yes	Yes
GLUT5		II	Intestine, testes, kidney	No	Fructose; glucose (very low affinity)	Yes	Yes
GLUT6	GLUT 9	III	Brain, spleen, leucocytes	No	Glucose	No	n.d.
GLUT7		II	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GLUT8	GLUT X1	III	Testes, brain and other tissues	No (yes in blastocytes)	Glucose	Yes (m)	Yes (m)
GLUT9	GLUT X	II	Liver, kidney	n.d.	n.d.	No	n.d.
GLUT10		III	Liver, pancreas	No	Glucose	Yes (m)	n.d.
GLUT11†	GLUT 10	II	Heart, muscle	No	Glucose (low affinity); Fructose (long form)	Yes (m)	No
GLUT12	GLUT 8	III	Heart, prostate, muscle, small intestine, WAT	Yes	n.d.	Yes	Yes
HMIT		III	Brain	n.d.	H <sup>+</sup> -myo-inositol	No (m)	Yes (m)



#### 2.3.4 高果糖與胰島素阻抗

果糖(fructose)於果糖代謝路徑中經由果糖激酶(fructokinase)、醛縮酶 B (aldolase B)、三碳糖激酶(triosekinase)作用產生甘油醛-3-磷酸(glyceraldehyde-3-phosphate, GA3P)，GA3P可直接進入糖解代謝(glycolysis pathway)，因此相較於 glucose 而言，fructose 能夠更快速的併入 glycolysis 進行醣類代謝。glycolysis 最終產物為 pyruvate 再經由丙酮酸脫氫酶(pyruvate dehydrogenase; PDH)複合體作用生成 Acetyl-CoA，Acetyl-CoA 藉由檸檬酸合成酶(citrate synthase)的作用，得以通過粒線體膜至細胞質，並於細胞質內經由乙酰輔酶 A 羧化酶(Acetyl-CoA carboxylase; ACC)、脂肪酸合成酶 (Fatty acid synthase; FAS)進行脂肪酸的生合成(de novo synthesis) (黃, 2009)。三酸甘油酯(triglycerol; TG)的前驅物為帶有輔酶 A 的脂肪酸以及甘油-3-磷酸(glycerol-3-phosphate; G3P)，當 1 分子的 fructose 經果糖代謝後會生成一分子的 GA3P 及一分子的磷酸雙羧丙酮(dihydroxyacetone phosphate; DHAP)，GA3P 可再轉換成 DHAP，而 DHAP 經由甘油磷酸脫氫酶(glycerol phosphate dehydrogenase)的還原作用可生成 G3P。高果糖飲食會導致內生性的脂質增加，G3P 與 fatty acid 於肝中酯化成 TG，再經由極低密度脂蛋白(very low density lipoprotein; VLDL)運送至血液循環，造成高血脂症(hyperlipidemia)，當攜帶大量 TG 的 VLDL 會轉變成(intermediate density lipoprotein; IDL)，會被血管壁中的脂蛋白脂解酶(lipoprotein lipase; LPL)分解成低密度脂蛋白(low density lipoprotein; LDL)，並將 TG 分解成 Free fatty acid 及 DG、MG，進入脂肪組織後再酯化成 TG 儲存，導致體脂肪堆積。由於體脂肪質量增加，肥胖者位於細胞表面的胰島素接受器(insulin receptor)數目減少，影響胰島素訊息傳遞，insulin 無法抑制脂肪細胞中的荷爾蒙敏感性脂解酶(hormone-sensitive lipase; HSL)，造成脂肪細胞分解 TG 並釋出大量 free fatty acids 至血液循環，造

成 insulin resistance (謝, 2005; Johnson et al., 2008)。

### 2.3.5 脂肪組織與胰島素阻抗

脂肪組織除了以三酸甘油脂型式儲存能量的生理功能外，同時具有內分泌的功能，能夠分泌多種細胞激素，統稱脂肪細胞激素(adipocytokine)，例如：脂聯素(adiponectin; ApN)、瘦體素(leptin)、腫瘤壞死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、介白素-6 (IL-6)、纖維蛋白溶解酶原激活抑制素(plasminogen activator inhibitor-1; PAI-1) 血清張力素原(angiotensinogen; AGT)、視網醇結合蛋白(retinol-binding protein-4; RBP-4)、單核球趨化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1)，將會影響各組織器官的胰島素敏感性(Maury and Brichard, 2010)。





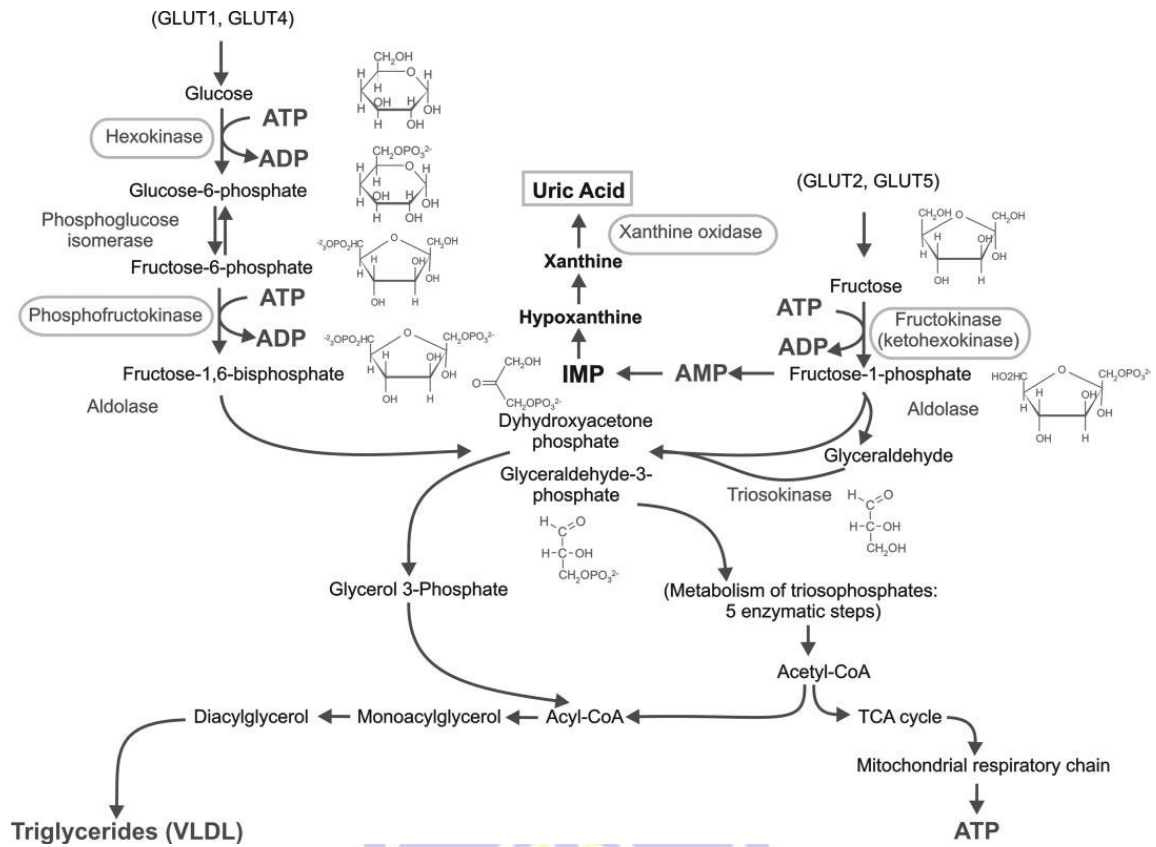


圖2-5、果糖代謝。

Fructose metabolism.

Fructose enters cells via a transporter (typically Glut 5, Glut 2, or SLC2A9) where it is preferentially metabolized by fructokinase (KHK) to generate fructose-1-phosphate. Unlike phosphofructokinase, which is involved in glucose metabolism, fructokinase has no negative feedback system to prevent it from continuing to phosphorylate substrate, and as a consequence ATP can be depleted, causing intracellular phosphate depletion, activation of AMP deaminase, and uric acid generation. In addition, fructose is lipogenic and can generate both glycerol phosphate and acyl coenzyme A, resulting in triglyceride formation that is both secreted and stored in hepatocytes. IMP, Inosine monophosphate; TCA, trichloroacetic acid. (Johnson et al., 2008)

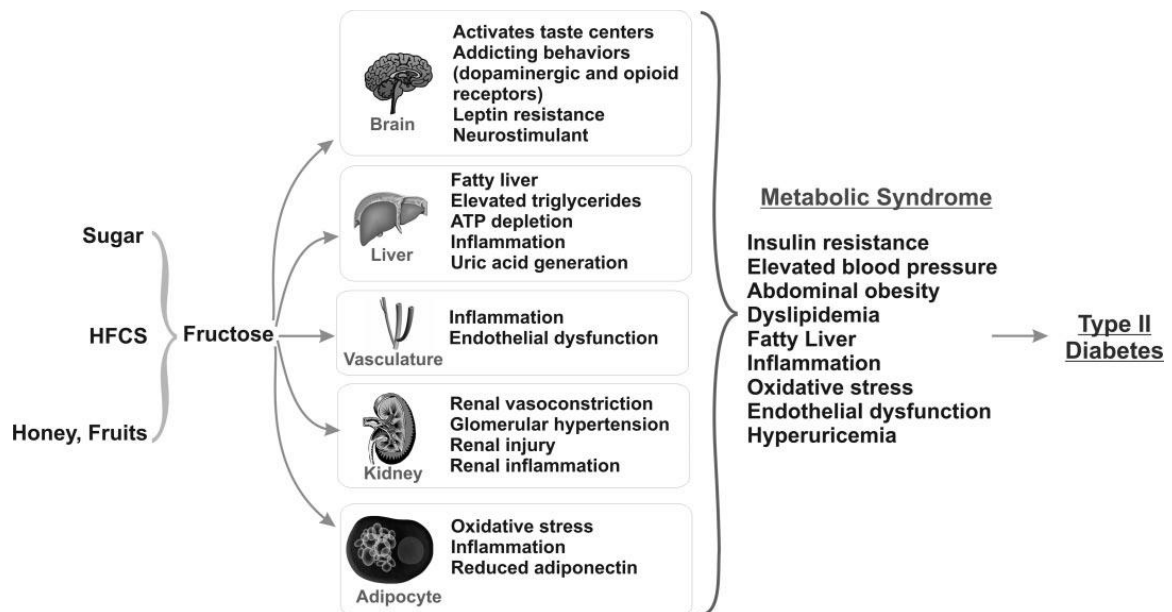


圖 2-6、果糖對各組織器官影響。

Effect of fructose on various organ systems.

Table sugar, HFCS, and natural sources provide fructose, which in excess has numerous effects on the brain, liver, vasculature, kidney, and adipocyte. The net effects induce all features of the metabolic syndrome and ultimately type 2 diabetes. (Johnson et al., 2008)

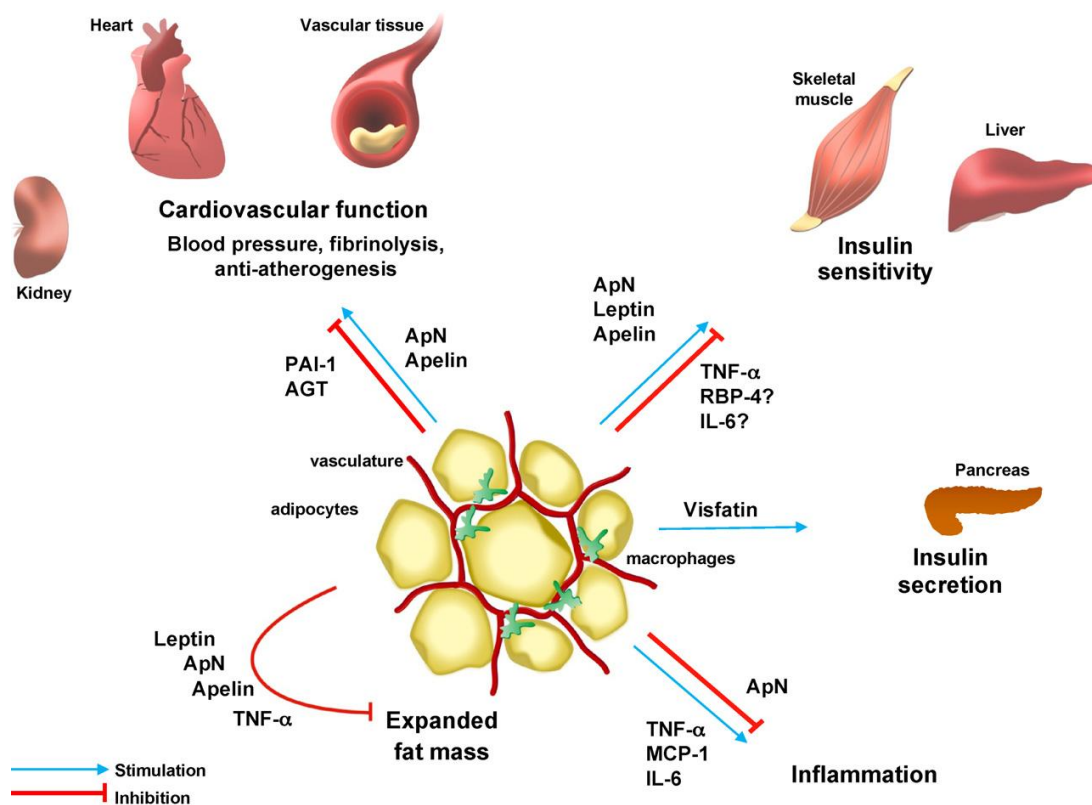


圖2-7、脂肪細胞激素引發代謝症候群之病理機轉。

Adipokines involved in the pathogenesis of the metabolic syndrome

Adipokines may modulate insulin sensitivity, cardiovascular homeostasis, inflammation and fat mass. Adiponectin (ApN) and omentin are downregulated in obesity, while most adipokines are overproduced. ApN, leptin and possibly vaspin are adipocyte-specific, while other adipokines may also be produced by non-adipose cells (including macrophages) of adipose tissue and by non-adipose tissues as well. PAI-1, plasminogen activator inhibitor type 1; AGT, angiotensinogen; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; RBP-4, retinol-binding protein-4; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; IL-6, interleukin-6. (Maury and Brichard, 2010)

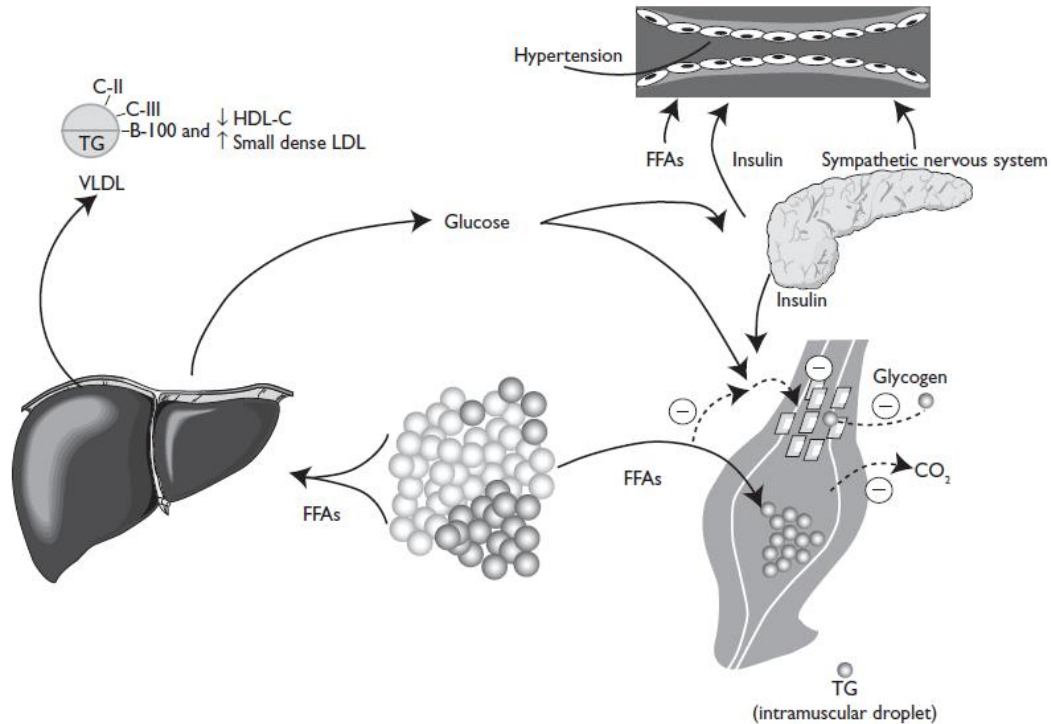


圖2-8、胰島素阻抗病理機轉。

Pathophysiology of insulin resistance.

Free fatty acids (FFAs) released from adipose tissue increase production of glucose and triglycerides (TGs) and secretion of very-low-density lipoprotein(VLDL) in the liver. Associated lipid/lipoprotein abnormalities include decreased levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and increased levels of small dense low-density lipoprotein (LDL) particles. FFAs also reduce insulin sensitivity in muscle by inhibiting insulin mediated glucose uptake. Increases in circulating glucose increase pancreatic insulin secretion, resulting in hyperinsulinemia. Hyperinsulinemia may result in enhanced sodium reabsorption and increased sympathetic nervous system activity. It also may contribute to the development of hypertension. (Jellinger, 2007)

## 2.4 參與醣類代謝與脂質代謝之關鍵酵素

### 2.4.1 Glycolysis pathway

糖解作用代謝路徑關鍵酵素如下：

#### (一)六碳醣激酶(Hexokinase; HK)

Glycolysis 第一步驟，需鎂離子( $Mg^{2+}$ )作為輔因子，將 glucose 轉變成 6-磷酸葡萄糖 (glucose-6-phosphate; G-6-P)，並消耗 1 分子的腺核苷三磷酸 (adenosine-5'-triphosphate; ATP)，生成 1 分子的腺核苷二磷酸 (adenosine diphosphate; ADP)，反應會受到 G-6-P 的負向調控。

#### (二)磷酸果糖激酶(Phosphofructokinase; PFK)

Glycolysis 第二步驟，將 6-磷酸果糖(fructose-6-phosphate; F-6-P)轉變為 1,6 雙磷酸果糖(fructose-1,6-bisphosphate; F-1,6BP)，消耗 1 分子 ATP，生成 1 分子 ADP，此步為 glycolysis 的限速步驟，被檸檬酸(citrate)、ATP 負向調節，2,6 雙磷酸果糖(fructose-2,6-bisphosphate)、ADP、AMP 會促進此步反應。

#### (三)丙酮酸激酶 (Pyruvate kinase; PK)

Glycolysis 第十步驟，將磷酸烯醇丙酮酸(phosphoenolpyruvate; PEP)轉變為丙酮酸(pyruvate)，反應過程中將磷酸根轉移給 ADP，生成 1 分子的 ATP，此步為受質磷酸化作用。

### 2.4.2 De novo lipogenesis pathway

#### (一)乙醯輔酶 A 羧化酶 (Acetyl-CoA carboxylase; ACC)

脂肪酸的合成需要起始分子 Acetyl-CoA 及數個丙二醯輔酶 A (Malonyl-CoA)，連續性的組合。此步為脂肪酸合成的第一步驟及關鍵調控步驟，作用於 cytosol、需要生物素(biotin)當作輔成基(prosthetic group)，為羧化作用

(carboxylation)，將一分子的 Acetyl-CoA 與  $\text{CO}_2$  羧化成 Malonyl-CoA，並消耗一分子的 ATP 及  $\text{H}_2\text{O}$ ，受 Acetyl-CoA 負向調控、citrate 會促進此反應。

## (二) 脂肪酸合成酶 (Fatty acid synthase; FAS)

脂肪酸合成酶為複合體，是含有 7 種酵素活性的 polypeptide，須以 dimer 形式存在才具有催化活性，並同時合成 2 分子 Fatty acid。每一回合反應依序為縮合、還原、脫水、還原。合成方向為甲基端往羧端。複合酶組成如下：

a. 醯基攜帶蛋白 (Acyl carrier protein; ACP)：於複合酶的中心，能與醯基中間代謝物共價結合。

b. ACP-乙醯基轉移酶 (ACP-acetyltransferase; AT)：為第一步驟，將 Acetyl-CoA 的乙醯基轉移給 ACP。

c. ACP-丙二醯基轉移酶 (ACP-malonyltransferase; MT)：將 Malonyl-CoA 的丙二醯轉移給 ACP。

d.  $\beta$ -酮基-醯基-ACP-合成酶 ( $\beta$ -ketoacyl-ACP-synthase; KS)：將乙醯基與丙二醯進行縮合反應，釋放出一分子  $\text{CO}_2$ ，形成乙醯乙醯基 (acetoacetyl group)。

e.  $\beta$ -酮基-醯基-ACP-還原酶 ( $\beta$ -ketoacyl-ACP-reductase; KR)：於乙醯乙醯 ACP (acetoacetyl-S-ACP) 上之羰基 (carbonyl group)：產生還原反應，形成 D- $\beta$ -羥丁醯-ACP (D- $\beta$ -hydroxybutyryl-S-ACP)。需消耗 NADPH 提供還原力。

f.  $\beta$ -羥化醯基-ACP-脫水酶 ( $\beta$ -Hydroxyacyl-ACP dehydratase; HD)：將 D- $\beta$ -hydroxybutyryl-S-ACP，脫水形成反式- $\Delta^2$ -丁基烯醯 ACP (trans- $\Delta^2$ -butenoyl-S-ACP)。

g. 烯醯-ACP 還原酶(Enoyl-ACP reductase; ER)：將 trans-delta<sup>2</sup>-butenoyl-S-ACP 的雙鍵還原成丁醯-ACP (butyryl-S-ACP)，需 NADPH 提供還原力。

### 2.4.3 Lipolysis pathway

脂解作用代謝路徑關鍵酵素如下：

#### (一) 脂肪細胞三酸甘油酯脂解酶(adipose triglyceride lipase; ATGL)

存在於脂肪組織，能將 TG 分解成雙醯甘油酯(diglycerides; DG)並釋放出 free fatty acid，但不具有分解 DG 能力(Braseamle, 2010; Lass et al., 2006)，不會受體內中 cAMP-dependent protein kinase 的磷酸化調控改變其活性(Langin, 2006)。ATGL 能催化三酸甘油酯的脂解反應，研究指出 ATGL 對三酸甘油酯的第一個酯鍵，專一性比起 HSL 更高。動物實驗中將 HSL 基因剔除老鼠體內，仍可發現受 ATGL 所分解的 DG 堆積。(Braceamle, 2010)

#### (二) 荷爾蒙敏感性脂解酶(hormone sensitive triacylglycerol lipase; HSL)

存在於脂肪組織，將 TG 分解成 DG 並釋放出 free fatty acid，脂解作用的限速步驟，細胞中 cAMP 為關鍵的第二信息傳遞者(second messenger)能啟動細胞內數種訊息傳遞路徑(Chen et al., 2010)，cAMP 可使 cAMP-dependent protein kinase 活化，而讓 HSL 磷酸化而活化。昇糖激素(glucagon)藉由促進腺苷環化酶(adenylate cyclase; AC)來活化 cAMP 促使 HSL 磷酸化而活化。而胰島素及甲基次黃嘌呤類物質(methyl xanthines)如：caffeine，將藉由促進磷酸二酯酶(phosphodiesterase; PDE)來抑制 cAMP 促使 HSL 去磷酸化而失活(Clucas et al., 2005)。

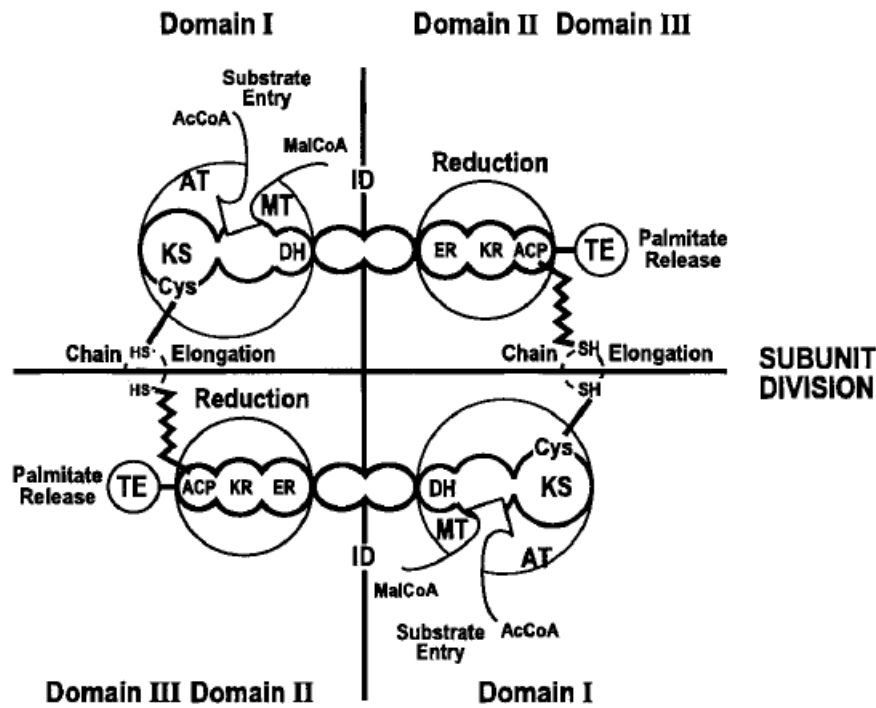


圖2-9、人類具有功能性區塊的脂肪酸合成酶二元體構型

The structural and functional organization of animal and human FAS dimer. The linear arrangement of the component activities and their domains are indicated in the subunits of FAS. The dimer formation results in two active centers. The functional division indicates the participation of DI of one subunit and DII and DIII of the second subunit in generating the active center. The ID regions (ID) have no known catalytic activities but play an essential role in the structural organization of catalytically active FAS. AT, acetyl transacylase; MT, malonyl transacylase; ER, enoyl reductase; KR,  $\beta$ -ketoacyl reductase; DH,  $\beta$ -hydroxyacyl dehydratase. (Chirala et al., 2000)



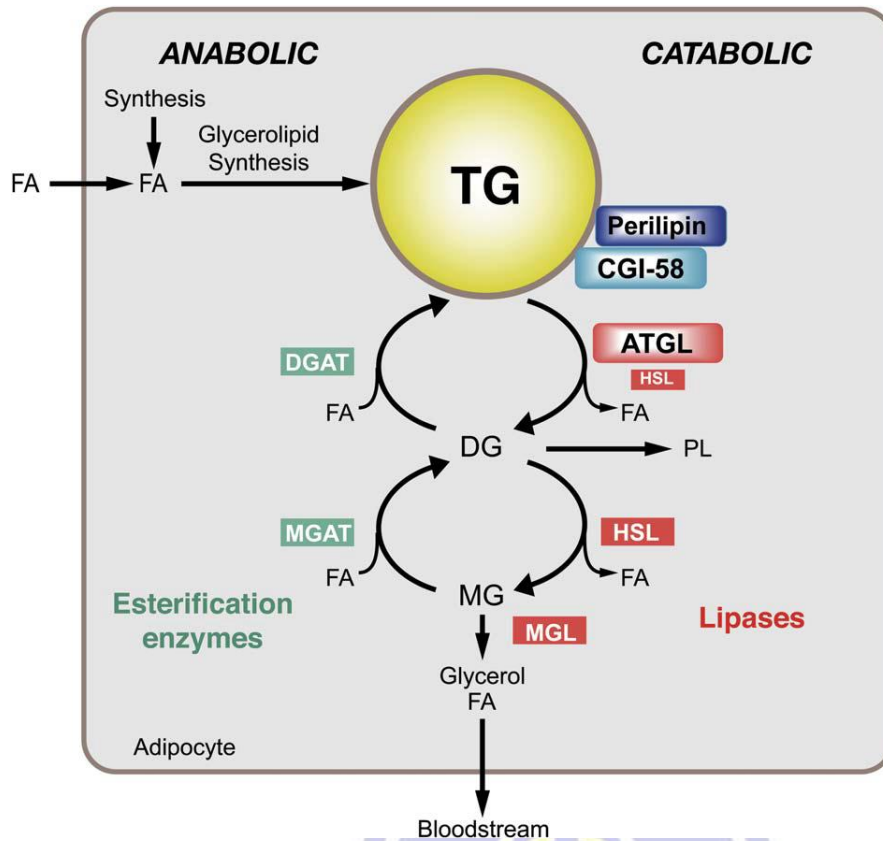


圖2-10、脂肪細胞中調控三酸甘油酯同化及異化作用之代謝路徑

Model of anabolic and catabolic pathways that regulate triglyceride (TG) levels in adipocytes.

The catabolic pathways involve ATGL, HSL, and monoacylglycerol lipases, which act on TG in a series of reactions to yield glycerol and fatty acids. CGI-58, which binds to perilipin and localizes to adiposomes, is an activator of ATGL. The nature of this activation is unknown. Intermediates of this catabolic pathway may also be recycled for phospholipids and TG synthesis. The anabolic pathways involve the esterification of fatty acids to glycerol. Fatty acids, derived from cellular uptake, de novo synthesis, or lipolytic breakdown of intracellular TG, are “activated” by the addition of a CoA moiety (via the action of acyl CoA synthetases, not shown for simplicity), and are subsequently esterified to glycerol through the actions of enzymes of the glycerolipid synthesis pathways. Significant amounts of hydrolysis products are normally reesterified (Leibel and Hirsch, 1985), a process that may be regulated. The model proposes that MGAT and DGAT enzymes are involved in this reesterification. TG, triacylglycerol; DG, diacylglycerol; MG, monoacylglycerol; FA, fatty acid; ATGL, adipose triglyceride lipase; HSL, hormone-sensitive lipase; MGL, monoacylglycerol lipase; DGAT, acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase; MGAT, acyl CoA:monoacylglycerol acyltransferase. (Yen and Farese, 2006)

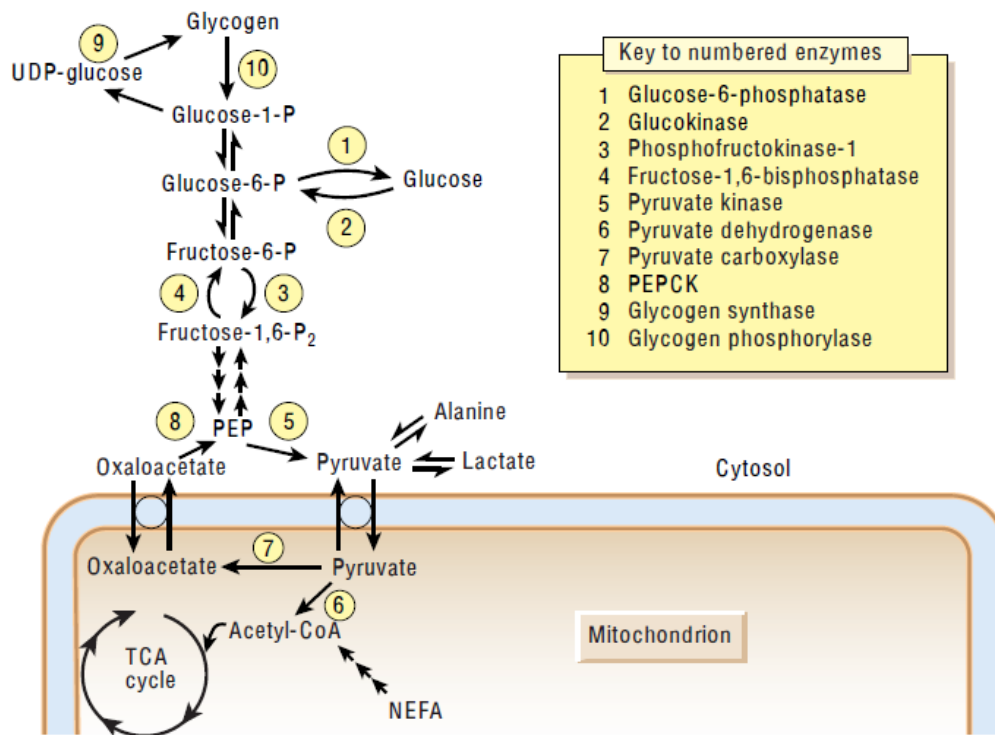


圖2-11、肝臟組織調控葡萄糖代謝。

Important pathways regulating glucose metabolism in the liver.

Excessive hepatic glucose output occurs in diabetes through increases in glycogenolysis and/or gluconeogenesis. Inhibitors of glycogen phosphorylase inhibit glucose output by decreasing hepatic glycogen catabolism. Other relevant targets include fructose-1,6- bisphosphatase, which controls a rate-limiting step in gluconeogenesis, and glucose-6-phosphatase, which catalyses the final common step required for release of glucose from the liver. NEFA, non-essential fatty acids; PEP, phosphoenolpyruvate. (Moller, 2001)

## 2.5 樣品與抗糖尿病用藥

### 2.5.1 沒食子酸

沒食子酸(gallic acid; GA)為酚酸(phenolic acids)化合物，屬於苯甲酸(benzoic acid)類衍生物，化學名 3,4,5-三羥基苯甲酸(3,4,5-trihydroxybenzoic acid)，分子式  $C_6H_2(OH)_3COOH$ ，分子量 170.12 g/nmol，外觀為白色粉末，屬厭水性(hydrophobic)，常用於多酚含量試驗的定量標準品。(Jang et al., 2008)

### 2.5.2 愛妥糖

愛妥糖(ACTOS)為口服抗糖尿病藥物，主要作用為降低 insulin resistance，主治第 2 型糖尿病，其功效成分為 pioglitazone hydrochloride 能改善肌肉及脂肪組織的 insulin sensitivity，且抑制肝臟 gluconeogenesis，同時能降低血中的 insulin 濃度。

#### (一)Pioglitazone hydrochloride 的理化特性

Pioglitazone hydrochloride 為白色結晶狀粉末，分子式  $C_{19}H_{20}N_2O_3SHCl$ 、分子量 392.9，可溶於 N,N-dimethyl-formamide，微溶於無水酒精，極易溶於 acetone 及 acetonitrile，不溶於水、乙醚。

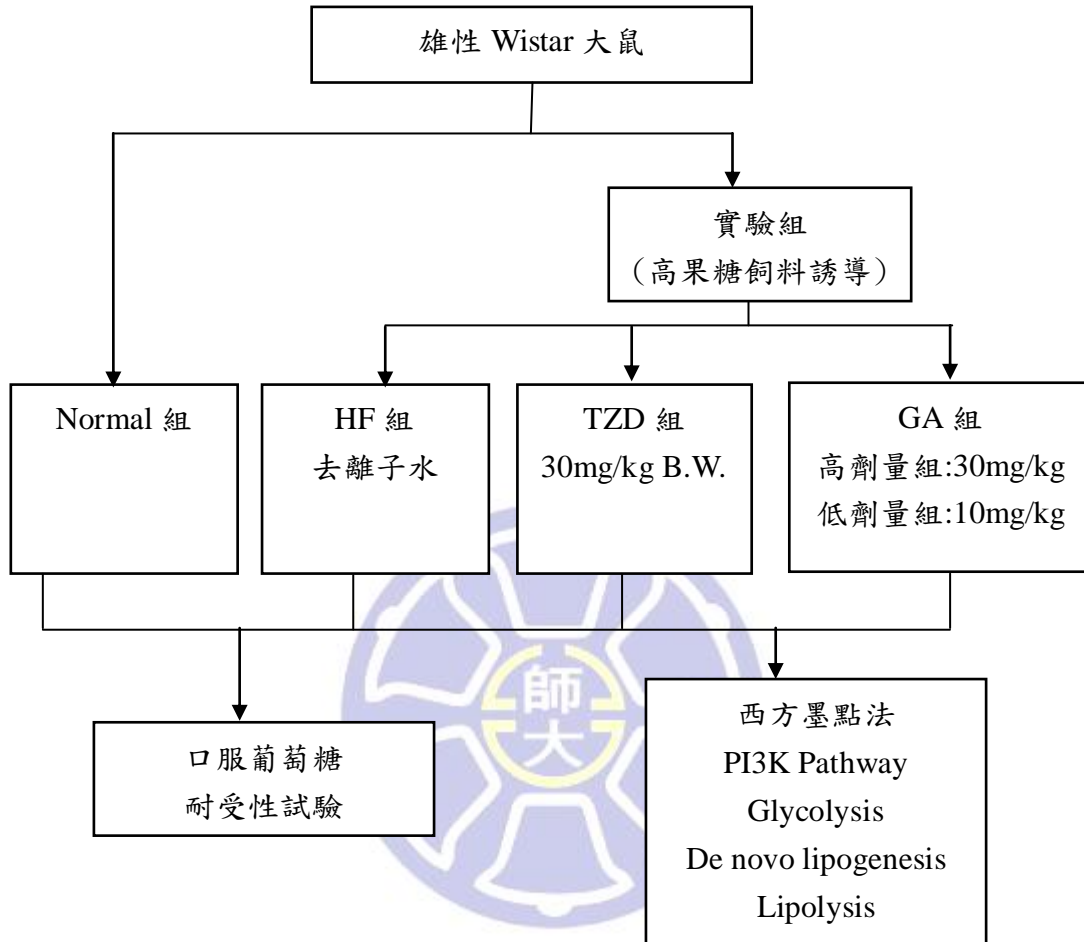
#### (二)Pioglitazone hydrochloride 的藥理機轉

Pioglitazone hydrochloride 是 thiazolidinedione 類的糖尿病用藥，需要有胰島素存在下才能發揮功效，其可降低周邊組織與肝臟的 insulin resistance 現象，增加依賴胰島素的葡萄糖利用，且降低肝糖(glycogen)含量。但不同於磺基尿素藥物，此藥不會促進 insulin 分泌，其為 PPAR $\gamma$  的強力高選擇性作用劑，PPAR 的受器存在於許多胰島素敏感性組織如:肝、肌肉、脂肪。故活化 PPAR $\gamma$  細胞核受器可調控數種受 Insulin 作用影響葡萄糖代謝及脂質代謝的基因轉錄作用。

於動物實驗模式下，pioglitazone 能降低第 2 型糖尿病的 hyperglycemia、高胰島素血症(hyperinsulinemia)及高三酸甘油脂血症(hypertriglyceridemia)等胰島素阻抗症狀([http://www.takeda.com.tw/products\\_actos.html](http://www.takeda.com.tw/products_actos.html))。



### 第三章 實驗架構



## 第四章 材料與方法

### 4.1 實驗材料

#### 4.1.1 實驗樣品來源

Gallic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Pioglitazone Hydrochloride(台灣武田藥品工業股份有限公司)

#### 4.1.2 實驗動物

雄性 Wistar 大鼠，購自樂斯科生物科技中心，購入週齡為 6 週。

#### 4.1.3 動物飼料

大鼠飼料 (Rodent Chow diet)，其組成份為 23% Crude protein、4.5% Crude fat、6.0% Crude fiber、8.0% Ash、2.5% Minerals、56% Carbohydrate。

#### 4.1.4 實驗藥品與試劑

##### 4.1.4.1 化學藥品

Bio-Rad Laboratories (Richmond, VA, USA) :

Ammonium persulfate (APS)

N,N,N,N-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED)

Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) :

RIPA buffer (10X)

J.T.Baker (Phillipsburg):

Sodium dodecylsulfate (SDS)

Sodium chloride (NaCl)



Merck KgaA (Darmstadt , Germany) :

Tween-20

Millipore(Billerica, MA, USA)

Anti-Acetyl-CoA Carboxylase-1

Anti-phospho-Acetyl-CoA Carboxylase-1(Ser79)

Sigma (St. Louis, MO, USA) :

Bovine serum albumin (BSA)

bromophenol blue

glycerol molecular biology reagent

2-mercaptoethanol (2-ME)

Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)

Phosphatase Inhibitor Cocktail 2

Phosphatase Inhibitor Cocktail 3

Skim milk powder

PerkinElmer(Boston, MA, USA) :

Transfer Membrane

Western Lightning

Thermo

Albumin Standard

4.1.4.2 酵素套組

Bio-Rad Laboratories (Richmond, VA, USA) :

Bio-Rad protein assay dye reagent

Mercodia(Uppsala, Sweden)

Rat Insulin ELISA Kits

RANDOX

glucose(GLUC-PAP)

#### 4.1.4.3 抗體

Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) :

ATGL antibody

Insulin Receptor  $\beta$  (L55B10) Mouse mAb

Gene Tex (Irvine, CA, USA) :

alpha Tubulin 4a antibody

Actin antibody

Fatty Acid Synthase antibody [N1], N-term

GLUT4 antibody [EP(2)AY], C-term

PFKL antibody

PKC zeta antibody

Pyruvate Kinase (liver/RBC) antibody

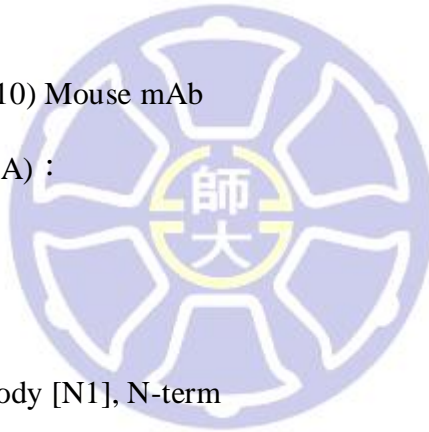
Mouse IgG antibody (HRP)

Rabbit IgG antibody (HRP)

#### 4.1.4.4 儀器設備

迴轉式震盪器 ORBITAL SHAKER(TS-500, 祥泰, 台北, 台灣)

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





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

桌上型離心機(Centrifugator)(KUBOTA5100,Tokyo,Japan)

免疫酵素分析儀(Precision microplate reader)

(Bio tek,Epoch,Thermo Fisher Scientific Inc.,Vermont, USA)

天秤 Balance(HR-200, A & D,USA)

冷凍離心機(Universal 30RF, Hettich, German)

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

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

酸鹼測定機 Hanna instruments(HI9017, Italy)

## 4.2 實驗方法

### 4.2.1 動物飼養

自樂斯科生物科技中心購入 6 週齡的 Wistar 大鼠，飼養於國立台灣大學食品科技研究所動物房，溫度維持 25°C，light-dark cycle 維持 12 小時光照，12 小時黑暗，供給飲水及飼料，讓老鼠自由攝食，每週記錄體重變化，於第 17 週犧牲。

### 4.2.2 動物分組與誘導

適應兩週後的雄性 Wistar 大鼠 40 隻，給予 66% 的高果糖飼料誘導 8 週後，進行口服葡萄糖耐受性試驗，再依血糖濃度及體重分為 5 組：

正常組：不誘導高血糖，管餵去離子水。

控制組：有誘導高血糖，管餵去離子水。

實驗組(共三組):有誘導高血糖，管餵 Pioglitazone hydrochloride 及不同濃度 Gallic acid。

#### 4.2.3 樣品餵食劑量

Pioglitazone hydrochloride 組(Pio30)：溶液濃度為 30 mg/mL，餵食量為 30 mg/kg B.W.

Gallic acid 高劑量組(GA30)：溶液濃度為 30 mg/mL，餵食量為 30 mg/kg B.W.

Gallic acid 低劑量組(GA10)：溶液濃度為 30 mg/mL，餵食量為 10 mg/kg B.W.

#### 4.2.4 口服葡萄糖耐受性試驗

5 組大鼠經 12 小時禁食後，先採取空腹血糖，再管餵 1.5 g/mL/kg B.W.的葡萄糖水，之後分別於 30、60、90、120 分鐘(含 0 分鐘共 5 個時間點)，使用斷尾方法各採血一次，採後將血液於 4°C 下離心 3000 rpm、20 min，取上清液分析葡萄糖濃度。

#### 4.2.5 血液的收集與處理

將全血置於含 15 mL 離心管，將血液於 4°C 下離心(3000 rpm、20 min)，取上清液分析。

#### 4.2.6 臟器的採集

大鼠犧牲時，採集腹週脂肪及副睪脂肪，秤重後冰-20°C。

#### 4.2.7 血漿葡萄糖濃度測定

取血漿 10 uL 與葡萄糖 Enzymatic kits(Audit Diagnostics)試劑 1mL 混合均勻，於 37°C 水浴 10 分鐘，利用分光光度計測定 500 nm 波長下吸光值，換算葡萄糖含量。測定原理為 glucose 經由 glucose oxidase 作用，氧化成 gluconic acid 及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 再經由 peroxidase 轉換 phenol 及 4-aminoantipyrine 成為 red quinone，在 500 nm 波長下測定 red quinone 含量。

#### 4.2.8 血漿胰島素濃度測定

取 25 uL 血漿及 50 uL Enzyme conjugate，在室溫下以 70 rpm 搖擺震盪 2 小時，以 wash buffer 清洗後，加入 TMB 試劑反應 15 分鐘，反應後加入 50 uL stop solution，利用分光光度計測定 450 nm 吸光值。

#### 4.2.9 脂質代謝相關訊息傳遞蛋白測定

##### a. 脂肪細胞蛋白質萃取方法

秤取 0.5-1 g 腎週脂肪(perirenal fat pad)，加入生理食鹽水清洗，加入 3 倍量 (1:3) 的 RIPA buffer 於均質管中，於冰浴下以組織均質機固定轉速均質 10 分鐘，移至 15 mL 離心管，於 4°C 下離心 3000 rpm/5 min 後，取下層澄清液至 eppendorff，於 4°C 下離心 15000 g/20 min，再取下層澄清液至新 eppendorff，冰 -80°C 貯存。

##### b. 蛋白質萃取液溶液配置

ddw 8.7 mL / 10x RIPA buffer 1 mL / 100mM PMSF 100 uL / Phosphatase Inhibitor Cocktail2 100 uL / Phosphatase Inhibitor Cocktail3 100 uL

##### c. 西方墨點法分析

###### 1. 蛋白質定量

以胎牛血清(BSA)做為蛋白質標準液，配置由不同濃度所構成的檢量線 (0-500 ug/mL)，分別取 10 uL 的組織均質液及 BSA 至 96 well，加入 190 uL Bio-Rad protein assay dye，利用分光光度計測定 595nm 吸光值，再以蛋白標準品的濃度與吸光值做出標準曲線，求得樣品蛋白質濃度。

###### 2. 蛋白質變性(denature)

將脂肪蛋白質溶液，加入 sample buffer 混合，以 95°C 加熱 10 分鐘，經冰浴

冷卻後，冰-20°C 貯存。

### 3. 蛋白質電泳(electrophoresis)

選用適當的隔板厚度(1.0、1.5 mm)的長玻璃，製備 10% 之焦集膠(stack gel)及分離膠(separation gel)，凝固後將膠片組合架至電泳槽心上，倒入電泳緩衝液。利用針筒清理 stacking gel 內的殘膠，依序注入 protein marker 及蛋白溶液，以固定電壓 50V 進行電泳 40 min，待樣品蛋白進入 separation gel 階段，改用 100-120V 繼續電泳，待追蹤染料(Dye)跑離膠體後，取出膠片，浸泡轉印緩衝溶液 10min。

### 4. 蛋白質轉印(transfer)

將 PVDF 膜浸泡甲醇(Methanol)溶液 10 min 後，使用轉印緩衝溶液浸泡 10 min。若使用半乾式轉漬槽，其底部為陽極電極板，上部為陰極電極板，放置順序由下而上為濾紙、PVDF 膜、膠片、濾紙，蓋上蓋後設定電壓 10-15V、30-60 分鐘。若採用濕式電泳槽，黑色槽心為陰極，紅色槽心為陽極，放置順序由黑色夾片為底依序為濾紙、膠片、PVDF 膜、濾紙，黑色夾片面向黑色槽心放置，於電泳槽中放入攪拌棒(Stir bar)並置於攪拌器上、蓋上蓋後設定電壓 100V、60 min，並於 4°C 低溫條件下處理。

### 5. 蛋白質阻斷(blocking)

將轉漬完成的 PVDF 膜，置入含有 5% 脫脂奶粉的 Blocking Buffer，浸漬 2-8 小時。

#### 一級抗體(primary antibody)

將 Blocking 完成的 PVDF 膜，利用 TBST buffer 先漂洗 1 次，再浸漬含有 3% 胎牛血清的一級抗體，一抗濃度為 1:1000-1:2000，於 4°C 條件下，緩速搖盪 2-8 小時。

#### 二級抗體(secondary antibody)

將浸漬一級抗體後的 PVDF 膜，利用 TBST buffer 先漂洗 2 次，每次 10 分鐘，再浸漬含有 5% 脫脂奶粉的二級抗體，二抗濃度為 1:5000-1:10000，於室溫條件下，緩速搖盪 2 小時。

#### 6. 數位影像擷取與分析

將浸漬二級抗體後的 PVDF 膜，利用 TBST buffer 先漂洗 3 次，每次 10 分鐘，最終再用 TBS buffer 先漂洗 1 次後加入 ECL buffer，於照膠系統中設定壓片時間並拍攝電泳圖。拍攝後將已編輯過的圖片，點選工具列 Image Tool 選項，跳出另一視窗並點選 Crop，此時將出現一個紅色框，拉選四個角落的矛點即可將所要的畫面擷取出來，選擇 Crop，選擇上方工具列 File → Export → Export for Publication，此時將出現一個視窗，選擇 Current View 600 dpi，點選下方 Export，選擇需要的副檔名(tif,jpg,bmp,png)。

#### 7. 西方墨點法之溶液配置

##### 2X Sample buffer

ddw 3.55 mL / 0.5 M Tris-Base (pH6.8) 1.25 mL / glycerol 2.5 mL / 10% SDS 2 mL / 0.5% Bromophenol blue 0.2 mL /  $\beta$ -mercaptoethanol 500 uL

##### 1.5 M Tris-Base / pH 8.8

藥品	MW	終濃度	100 mL
Tris-base	121.14	1.5 M	18 g
Add ddH <sub>2</sub> O dilute to 100 mL / 0.22 或 0.45 filter 過濾/ 4°C			

##### 0.5 M Tris-Base / pH 6.8

藥品	MW	終濃度	100mL
Tris-base	121.14	0.5 M	6 g
Add ddH <sub>2</sub> O dilute to 100 mL / 0.22 或 0.45 filter 過濾/ 4°C			

##### 10% SDS buffer

藥品	MW	終濃度	100 mL
SDS	288.38	10%	10 g
Add ddH <sub>2</sub> O dilute to 100 mL			

#### 10%APS

藥品	MW	終濃度	100 uL
APS	228.18	10%	10 mg
加去離子水 100 uL 現配			

#### Stacking gel(10%)

ddw 4.1 mL / 30% Degassed Acryamide 3.3 mL / 0.5 M Tris-Base(pH6.8) 2.5 mL / 10% SDS 0.1 mL / 10% APS 50 uL / TEMED 10 uL

#### Separating gel(10%)

ddw 4.1 mL / 30% Degassed Acryamide 3.3 mL / 1.5 M Tris-Base(pH8.8) 2.5 mL / 10% SDS 0.1 mL / 10% APS 50 uL / TEMED 10 uL

#### Running buffer

藥品	MW	終濃度	1 L
Tris-base	121.14	25 mM	5 g
Glycine	75.07	192 mM	14 g
SDS	288.38	0.1%	1 g
Add ddH <sub>2</sub> O dilute to 1L			

#### Transfer buffer

藥品	MW	終濃度	1 L
Tris-base	121.14	25 mM	5 g
Glycine	75.07	192 mM	14 g
Methanol		20%	200 mL
Add ddH <sub>2</sub> O dilute to 1 L			

#### TBS buffer

藥品	MW	終濃度	1 L
Tris-base	121.14	4 mM	2.4 g
NaCl	58.44	100 mM	29 g
Add ddH <sub>2</sub> O dilute to 1L / pH=7.6			

### TBST buffer

藥品	MW	終濃度	1 L
Tris-base	121.14	4 mM	2.4 g
NaCl	58.44	100 mM	29 g
Tween-20		0.01%	1 mL
Add ddH <sub>2</sub> O dilute to 1 L / pH=7.6			

Blocking Buffer 3% (for primary antibody)

BSA 3 g / 100 mL TBST buffer

Blocking Buffer 5% (for blocking & secondary antibody)

Skim milk powder 5 g / 100 mL TBST buffer

### Stripping buffer

藥品	MW	終濃度	1 L
Glycine	75.07	192 mM	14 g
SDS	288.38	0.1%	1 g
Tween-20		0.1%	10 mL
Add ddH <sub>2</sub> O dilute to 1 L / pH=2.2			

### 4.3 統計方法

實驗結果是以平均值±標準偏差 (Mean±SD) 表示，數據統計採用 SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., USA) 軟體執行 One way ANOVA 分析，並依鄧氏多變域測驗 (Duncan's multiple range test) 檢定各實驗組間之差異，在統計上  $P < 0.05$  視為具顯著差異。

## 第五章 結果

### 5.1 灌食沒食子酸 4 週後大鼠進行口服葡萄糖耐受性試驗血漿葡萄糖濃度之變化

大鼠灌食沒食子酸 4 週後行口服葡萄糖耐受性試驗，結果如圖 5-1 所示。HF 組的血漿葡萄糖濃度，於 0、30、60、90、120 分鐘均明顯高於另外 4 組。GA30 組的血漿葡萄糖濃度，於 0、30 分鐘均明顯低於 GA10 組，但於 60、90、120 分鐘則無顯著差異。

### 5.2 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中葡萄糖濃度之變化

大鼠飼養 17 週後，禁食犧牲分析血漿中葡萄糖濃度，結果如圖 5-2 所示。HF 組的血漿葡萄糖濃度顯著高於另外 4 組( $p < 0.05$ )。Normal 組與 Pio 組、GA30 組、GA10 組之間沒有顯著差異。

### 5.3 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中果糖胺濃度之變化

大鼠飼養 17 週後，禁食犧牲分析血漿中果糖胺濃度，結果如圖 5-3 所示。HF 組的血漿中果糖胺濃度顯著高於另外 4 組( $p < 0.05$ )。Normal 組與 Pio 組、GA30 組、GA10 組之間沒有顯著差異。

### 5.4 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中胰島素濃度之變化

大鼠飼養 17 週後，禁食犧牲分析血漿中胰島素濃度，結果如圖 5-4 所示。HF 組的血漿胰島素濃度顯著高於另外 4 組( $p < 0.05$ )。Normal 組與 Pio 組、GA30 組、GA10 組之間沒有顯著差異。

### 5.5 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中 C 肽濃度之變化

大鼠飼養 17 週後，禁食犧牲分析血漿中葡萄糖濃度，結果如圖 5-5 所示。HF 組的血漿葡萄糖濃度顯著低於另外 4 組( $p < 0.05$ )。Normal 組與 Pio 組、GA30



組、GA10 組之間沒有顯著差異。

#### 5.6 灌食沒食子酸 4 週後大鼠體內脂肪組織堆積之變化

大鼠飼養 17 週後，犧牲採集腎周脂肪及副睪脂肪進行秤重，結果如圖 5-6 所示。HF 組的脂肪組織克數顯著高於另外 4 組( $p < 0.05$ )。Normal 組與 Pio 組、GA30 組、GA10 組之間沒有顯著差異。

#### 5.7 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中三酸甘油酯濃度之變化

大鼠飼養 17 週後，禁食犧牲分析血漿中三酸甘油酯濃度，結果如圖 5-7 所示。HF 組的血漿中三酸甘油酯濃度顯著高於另外 4 組( $p < 0.05$ )。Normal 組與 Pio 組、GA30 組、GA10 組之間沒有顯著差異。Pio 組濃度顯著低於 GA30 組( $p < 0.05$ )，但與 GA10 組沒有顯著差異。

#### 5.8 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中游離脂肪酸濃度之變化

大鼠飼養 17 週後，禁食犧牲分析血漿中游離脂肪酸濃度，結果如圖 5-8 所示。HF 組的血漿中游離脂肪酸濃度顯著高於 Normal 組及 Pio 組，但與 GA30 組、GA10 組沒有顯著差異。Normal 組濃度顯著高於 Pio 組，但與 GA30 組、GA10 組沒有顯著差異。

#### 5.9 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中高密度脂蛋白濃度之變化

大鼠飼養 17 週後，禁食犧牲分析血漿中高密度脂蛋白濃度，結果如圖 5-9 所示。HF 組的血漿中高密度脂蛋白濃度顯著低於 Normal 組及 Pio 組，但與 GA30 組、GA10 組沒有顯著差異。Normal 組與 Pio 組、GA30 組、GA10 組之間沒有顯著差異。

#### 5.10 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 Glut4 蛋白表現量之影響

大鼠飼養 17 週後，犧牲採集腎周脂肪均質後，進行西方墨點法測定結果如圖 5-10 所示。HF 組的 Glut4 蛋白表現量顯著低於 Normal 組、Pio 組、GA30 組，但與 GA10 組沒有顯著差異。

#### 5.11 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 IR 蛋白表現量之影響

大鼠飼養 17 週後，犧牲採集腎周脂肪均質後，進行西方墨點法測定結果如圖 5-11 所示。HF 組的 IR 蛋白表現量顯著低於 Normal 組、Pio 組、GA30 組，但與 GA10 組沒有顯著差異。

#### 5.12 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 PKC- $\zeta$ 蛋白表現量之影響

大鼠飼養 17 週後，犧牲採集腎周脂肪均質後，進行西方墨點法測定結果如圖 5-12 所示。HF 組的 PKC- $\zeta$  蛋白表現量顯著低於另外 4 組。GA30 組及 GA10 組表現量顯著高於 Normal 組。

#### 5.13 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 PFK 蛋白表現量之影響

大鼠飼養 17 週後，犧牲採集腎周脂肪均質後，進行西方墨點法測定結果如圖 5-13 所示。HF 組的 PFK 蛋白表現量顯著低於 Normal 組、HF 組、GA10 組，但與 Pio 組沒有顯著差異。

#### 5.14 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 PK 蛋白表現量之影響

大鼠飼養 17 週後，犧牲採集腎周脂肪均質後，進行西方墨點法測定結果如圖 5-14 所示。HF 組的 PFK 蛋白表現量顯著低於 Normal 組，但與另外 4 組沒有顯著差異。

#### 5.15 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 FAS 蛋白表現量之影響

大鼠飼養 17 週後，犧牲採集腎周脂肪均質後，進行西方墨點法測定結果如

圖 5-15 所示。HF 組的 FAS 蛋白表現量顯著低於 Pio 組及 GA30 組，但與另外 2 組沒有顯著差異。

#### 5.16 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 ATGL 蛋白表現量之影響

大鼠飼養 17 週後，犧牲採集腎周脂肪均質後，進行西方墨點法測定結果如圖 5-16 所示。HF 組的 ATGL 蛋白表現量顯著低於 Normal 組、Pio 組、GA30 組，但與 GA10 組沒有顯著差異。Pio 組顯著高於所有組別。



## 第六章 討論

### 6.1 高果糖動物模式

本實驗中以高果糖飼料餵食大鼠 11 週後，造成血糖、血脂、血漿中胰島素的濃度顯著增加。因此證實長期餵食高果糖飼料可誘發大鼠體內產生高血糖、高血脂、高胰島素血症等現象(Punithavathi et al., 2011; Prince, 2011)。

### 6.2 灌食沒食子酸對高果糖誘導高血糖大鼠高血糖症之影響

實驗動物灌食沒食子酸 4 週後，觀察 OGTT、犧牲後血漿葡萄糖濃度及血漿中果糖胺濃度結果，GA30 組及 GA10 組其血糖顯著較 HF 組低，由此可見給予沒食子酸不論高劑量或低劑量皆能改善因高果糖飲食所造成的高血糖現象，但卻沒有呈現劑量效應。研究指出酚酸類物質(如 caffeic acid、cinnamic acid、gallic acid)具有改善胰島素抵抗細胞葡萄糖攝入之能力(Huang and Shen, 2012)。本篇研究結果餵食低劑量(10 mg/kg B.W.)及高劑量(30 mg/kg B.W.)沒食子酸顯著改善高果糖飼料誘導糖尿病大鼠高血糖症狀。文獻指出，連續餵食 10 mg/kg B.W.及 20 mg/kg B.W.沒食子酸 21 天，均能顯著降低 STZ 誘導的糖尿病鼠血漿葡萄糖濃度(Prince et al.,2011)，該作者解釋沒食子酸能夠降血糖原因乃是降低氧化自由基及保護胰臟  $\beta$ -細胞的功能之故。沒食子酸具有良好的抗氧化能力(Yeh, 2008)，推測其改善高血糖現象與這類方式有關。果糖胺為血漿中蛋白與葡萄糖經非酵素性作用生成的糖化初期產物，臨床上可作為評估血糖狀況的指標(Jakus et al.,2012)。本篇研究結果顯示 GA30 組及 GA10 組兩種不同劑量的沒食子酸皆能改善血漿中果糖胺濃度。

### 6.3 灌食沒食子酸對高果糖誘導高血糖大鼠高胰島素血症之影響

實驗動物灌食沒食子酸 4 週後，觀察血漿胰島素與 C-peptide 濃度，結果顯示

GA30組及GA10組其血漿胰島素與C-peptide濃度顯著較HF組低，由此可見給予沒食子酸不論高劑量或低劑量皆能改善因高果糖飲食所造成的高胰島素血症現象，但卻沒有呈現劑量效應。文獻指出餵食10 mg/kg B.W.及20 mg/kg B.W.的沒食子酸連續21天，能顯著降低STZ誘導第二型糖尿病鼠的血漿胰島素濃度(Punithavathi et al., 2011)，本研究結果與之相符合。研究也顯示高果糖誘導動物中給予抗氧化物質能夠改善高胰島素血症情況(Faure et al., 1997 ; Lee et al., 2012)由此推測沒食子酸改善胰島素抵抗機制可能與此方式有關。

#### 6.4 灌食沒食子酸對高果糖誘導高血糖大鼠高血脂症之影響

高果糖飲食會造成內生性三酸甘油脂的堆積，其經由專屬的果糖代謝路徑，再經由 glycerolphosphate dehydrogenase 的作用生成 glycerol-3-phosphate，G3P 再會與 free fatty acid 酯化，增加 VLDL 的生成及分泌，造成高血脂症(孫, 2007; 謝, 2005)。實驗動物灌食沒食子酸 6 週後，觀察血漿中三酸甘油酯、游離脂肪酸、高密度脂蛋白濃度，結果顯示 GA30 組及 GA10 組皆能降低血漿中三酸甘油酯，但其血漿中游離脂肪酸與 HF 組沒有顯著差異。GA30 組及 GA10 組與 HF 組相比也無法提高血漿中 HDL-C 濃度。沒食子酸或許能夠經由降低 G3P 與 free fatty acid 酯化，降低內生性三酸甘油酯，但卻無法降低血漿中游離脂肪酸，以及無法藉由提升 HDL-C 濃度來攜帶油脂至肝臟中代謝。

#### 6.5 灌食沒食子酸對高果糖誘導高血糖大鼠脂質堆積之影響

內臟脂肪組織 (visceral adipose tissue, VAT) 存在腹膜腔，其包含有腸繫膜脂肪(mesenteric fat)、副睪脂肪(epididymal fat)、腎周脂肪(perirenal fat) 和背部脂肪(dorsal fat) (Gesta et al., 2006)。實驗動物灌食沒食子酸6週後，採集腎周脂肪及副睪脂肪進行秤重，結果顯示GA30組及GA10組相較於HF組皆能顯著降低脂質堆積。文獻指出高脂誘導糖尿病鼠連續灌食50 mg/kg B.W.及100 mg/kg B.W.的沒

食子酸10週，能顯著降低副睪脂肪、腎周脂肪的含量，但沒有呈現劑量效應(Hsu and Yen, 2007)。本篇研究使用10 mg/kg B.W.及30 mg/kg B.W.的劑量，也沒有呈現劑量效應。Hsu等人在同年發表了另一篇論文其中採用3T3-L1細胞株，給予100 $\mu$ M的沒食子酸48小時測定細胞凋亡，結果顯示沒食子酸能藉由粒線體介導途徑(mitochondria-mediated pathway)導致脂肪細胞凋亡而降低體脂肪堆積(Hsu et al., 2007)。本篇研究灌食沒食子酸能降低大鼠體內脂肪堆積，可能與此理論有關。

#### 6.6 灌食沒食子酸對高果糖誘導高血糖大鼠腎周脂肪胰島素訊息傳遞之影響

血漿中的葡萄糖被攝入細胞的過程，需要經由葡萄糖轉運蛋白的作用，在脂肪細胞中轉運蛋白為Glut4，而胰島素能夠經由一連串的訊息傳遞路徑作用，進而使葡萄糖轉運蛋白轉位至細胞膜上，使葡萄糖轉運蛋白能將葡萄糖攝入細胞膜內以供細胞利用(Czech and Silva, 1999 ; Wood and Trayhum, 2003)。於脂肪細胞中胰島素的訊息傳遞路徑中可經由AMPK路徑(Long and Zierath, 2006; Gauthier et al., 2008)及PI3K路徑(Dresner et al., 1999; Eriksson, 2007)來促使葡萄糖轉運蛋白轉位至細胞膜上。

##### a. 葡萄糖轉運蛋白4 (Glucose transporter 4; Glut4)

葡萄糖被攝入細胞須仰賴葡萄糖轉運蛋白的協助，而脂肪組織為胰島素敏感性組織之一，其負責協助葡萄糖攝入的轉運蛋白為 glucose transporter-4。文獻指出於香椿萃取物經改善高血糖症狀主要由於增加脂肪組織中 Glut4 的蛋白表現量(Hwei et al., 2007)。因此得知，脂肪組織中 Glut4 的蛋白表現量將能促進胰島素的訊息傳遞。本篇研究結果顯示，高果糖組腎周脂肪內 Glut4 蛋白表現量顯著低於正常組，給予沒食子酸 30 mg/kg B.W.及 10 mg/kg B.W.兩種濃度相較於高果糖組皆能提昇 Glut4 表現量，但沒有呈現劑量效應。由此推論，灌食沒食子酸可藉由增加葡萄糖轉運蛋白表現量增加高血糖大鼠對葡萄糖之利用。

## b. 胰島素接受器 (Insulin receptor; IR)

胰島素要於組織細胞中產生作用須仰賴胰島素接受器才能進行 (Minokoshi et al., 2003)。胰島素接受器為細胞膜上具有四構體的糖蛋白，由兩個同源的  $\alpha$  次單位及  $\beta$  次單位，經雙硫鍵鍵結而成，當胰島素與  $\alpha$  次單位結合後，會引起構型改變並造成  $\beta$  次單位的 tyrosine kinase 自體磷酸化，之後使 IR-S 磷酸化而活化下游的訊息傳遞路徑，刺激葡萄糖轉運蛋白轉位，增加葡萄糖攝入 (Birnbaum, 2001; White, 2002)。本篇研究結果顯示，高果糖組腎周脂肪內 IR 表現量顯著低於正常組，給予沒食子酸 30 mg/kg B.W. 及 10 mg/kg B.W. 兩種濃度相較於高果糖組皆能提昇 IR 表現量，但沒有呈現劑量效應。由此推論，灌食沒食子酸可改善高血糖大鼠上游之胰島素訊息傳遞。

## c. 蛋白激酶 C- $\zeta$ (Protein kinase C-zeta; PKC- $\zeta$ )

胰島素的訊息傳遞除了上游的胰島素接受器，位於下游的 PI3K 路徑亦扮演重要角色，PI3K 路徑可再分為 PKB(AKT) 及 PKC 兩條路徑 (Eriksson, 2007)。文獻指出於 3T3-L1 細胞中，沒食子酸可活化 PI3K 路徑使 Glut4 蛋白表現量增加，但主要是經由活化 PKC $\zeta$ ，而非經由 PKB 路徑 (Prasad et al., 2010)。本篇研究結果顯示，高果糖組腎周脂肪內 PKC- $\zeta$  表現量顯著低於正常組，給予沒食子酸 30 mg/kg B.W. 及 10 mg/kg B.W. 兩種濃度皆能提昇 PKC- $\zeta$  的表現量但沒有呈現劑量效應。與上述作者研究結果相似。顯示灌食沒食子酸對於高血糖大鼠而言，可改善胰島素訊息傳遞下游代謝。

## 6.7 灌食沒食子酸對高果糖誘導高血糖大鼠腎周脂肪糖解代謝之影響

### a. 磷酸果糖激酶 (Phosphofructokinase; PFK)

磷酸果糖激酶為糖解路徑中的速率決定步驟，於肝臟、肌肉、脂肪中皆有表現，文獻指出於大鼠實驗中，糖尿病鼠的 PFK 蛋白表現量相較於正常組的蛋白

表現量低，而經由 metformin 藥物治療後不論於肝臟、肌肉或脂肪皆可提高 PFK 的蛋白表現量(Silva et al., 2010)。胰島素可調控 PFK 活性，當胰島素分泌時將提昇，細胞中 PFK 活性(Silva et al., 2004)。本篇研究結果顯示，HF 組的 PFK 表現量顯著低於 Normal 組，GA30 及 GA10 組顯著高於 HF 組且彼此間仍具有顯著差異，灌食沒食子酸能提昇高血糖大鼠脂肪組織中糖解第二步驟，且呈現劑量效應。

#### b. 丙酮酸激酶(Pyruvate kinase; PK)

研究指出將糖尿病鼠給與胰島素治療後發現其肝中 PK 的 mRNA 表現量顯著增加(Yamada, 1999)。將 SD 大鼠以 alloxan monohydrate 誘導成糖尿病，給予皮下注射常規胰島素 10 天，之後測定肝臟組織中 PK 的酵素活性及含量，結果顯示相較於糖尿病組給予胰島素治療後能增加 PK 的酵素活性及數量改善高血糖情況(Parks and Drake,1982)。本篇研究結果顯示 Pio 組及 GA30 組與 HF 組相比，如圖中所示有提高 PK 表現量的趨勢，但尚未達到顯著差異，顯示沒食子酸組無法有效提高糖解作用最終步驟。本篇研究中沒食子酸能提昇高血糖大鼠脂肪組織中 PFK 活性，卻無法顯著提高 PK 表現量，果糖可能被 PFK 代謝後產物 GA3P 傾向於經由 glycerolphosphate dehydrogenase 的作用生成 glycerol-3-phosphate(謝, 2005)。

### 6.8 灌食沒食子酸對高果糖誘導高血糖大鼠腎周脂肪脂質代謝之影響

#### a. 脂肪酸合成酶(Fatty acid synthase; FAS)

FAS能催化脂肪酸合成反應，屬於長期調控脂肪酸合成的限速酵素。研究指出單醣類對FAS的調控，較複合糖類更具顯著影響 (Semenkovich, 1997)。本篇研究結果顯示，HF組腎周脂肪內FAS蛋白表現量相較於Normal組，有稍微提高但沒有顯著差異，給予沒食子酸30 mg/kg B.W.濃度下，相較於高果糖組明顯增加FAS



蛋白表現量，且達顯著差異。

b.脂肪細胞三酸甘油酯脂解酶(Adipose triglyceride lipase; ATGL)

游離脂肪酸主要由脂解酶分解三酸甘油酯而來，脂解功能異常將導致能量代謝異常，引起肥胖及胰島素阻抗(Zimmermann et al., 2004)。體內主要分解TG的脂解酶包括 HSL 與 ATGL。本篇研究顯示實驗動物灌食沒食子酸 6 週後，HF 組 ATGL 顯著低於 Normal 組，顯示高果糖誘導模式將會降低脂解作用。GA30 組顯著高於 HF 組，但與 GA10 組沒有顯著差異，由此可知灌食沒食子酸 30 mg/kg B.W. 可顯著提升 ATGL 增加脂解作用，但灌食沒食子酸 10 mg/kg B.W.則沒有影響。



## 第七章 結論

本篇研究結果可歸納以下幾點結論：

1. 灌食 30 mg/kg B.W. 沒食子酸可有效改善高果糖飼料誘導高血糖 Wistar 大鼠高血糖、高胰島素血症等現象。
2. 灌食 30 mg/kg B.W. 沒食子酸可有效降低高果糖飼料誘導高血糖 Wistar 大鼠體脂肪及血漿中三酸甘油酯濃度。
3. 灌食 30 mg/kg B.W. 沒食子酸可藉由提高 Glut4、IR、PKC- $\zeta$  等胰島素訊息傳遞蛋白，來改善高果糖飼料誘導高血糖 Wistar 大鼠葡萄糖代謝。
4. 灌食 30 mg/kg B.W. 沒食子酸可藉由提高 ATGL 蛋白表現量，來增加高果糖飼料誘導高血糖 Wistar 大鼠三酸甘油酯分解，並降低體脂肪。



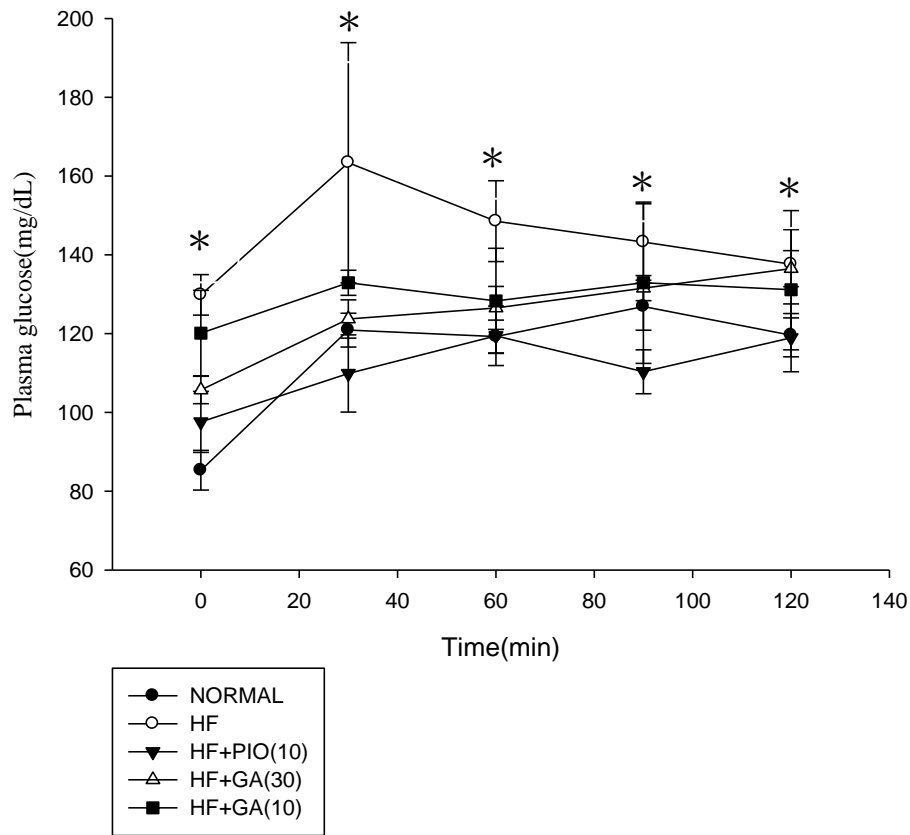


圖 5-1 灌食沒食子酸 4 週後大鼠進行口服葡萄糖耐受性試驗血漿葡萄糖濃度之變化。

Figure.5-1 Oral glucose tolerance test (OGTT) curve on plasma glucose level of rats after 4 weeks feeding test.

Normal: Normal rats treated with saline

HF: High fructose diet rats treated with saline

HF+Pio(30): High fructose diet rats treated with pioglitazone(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(30): High fructose diet rats treated with gallic acid(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(10): High fructose diet rats treated with gallic acid(10 mg/kg B.W.)

\*: Indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ) compared with the other group.

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

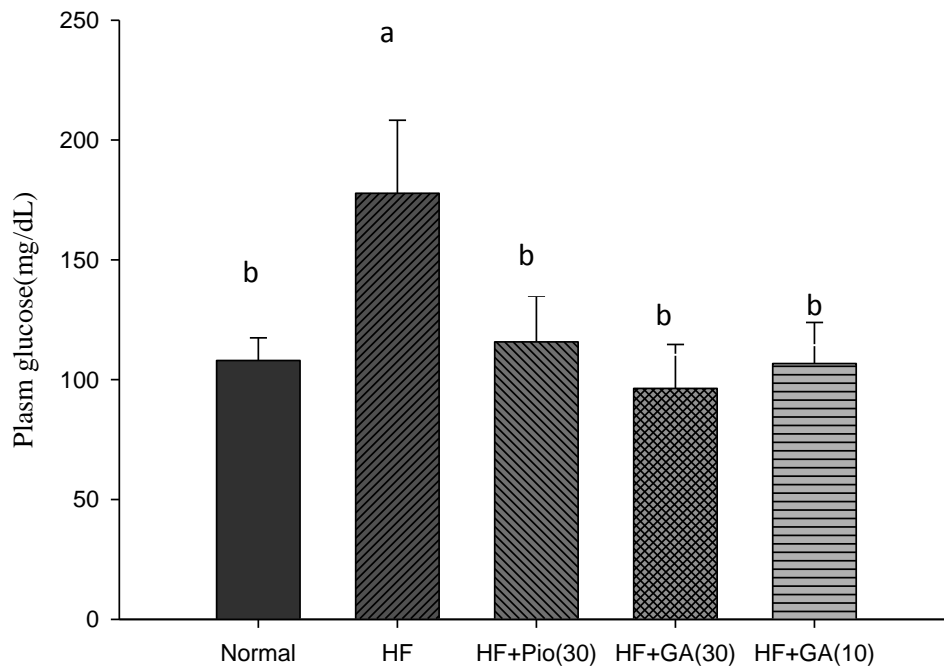


圖 5-2 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中葡萄糖濃度之變化。

Figure.5-2 Plasma glucose levels of rats after 4 weeks feeding test.

Normal: Normal rats treated with saline

HF: High fructose diet rats treated with saline

HF+Pio(30): High fructose diet rats treated with pioglitazone(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(30): High fructose diet rats treated with gallic acid(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(10): High fructose diet rats treated with gallic acid(10 mg/kg B.W.)

a~b Letter is significantly different among all samples tested(  $P < 0.05$  ).

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

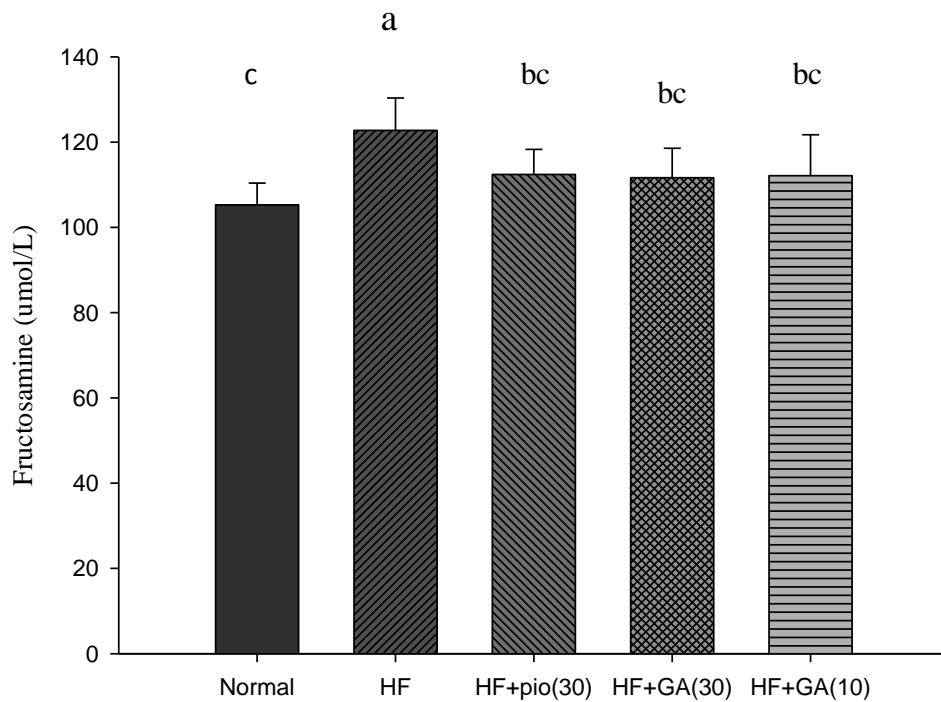


圖 5-3 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中果糖胺濃度之變化。

Figure.5-3 Plasma fructosamine levels of rats after 4 weeks feeding test.

Normal: Normal rats treated with saline

HF: High fructose diet rats treated with saline

HF+Pio(30): High fructose diet rats treated with pioglitazone(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(30): High fructose diet rats treated with gallic acid(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(10): High fructose diet rats treated with gallic acid(10 mg/kg B.W.)

a~c Letter is significantly different among all samples tested(  $P < 0.05$  ).

Values were calculated as mean±S.E for six rats in each group.

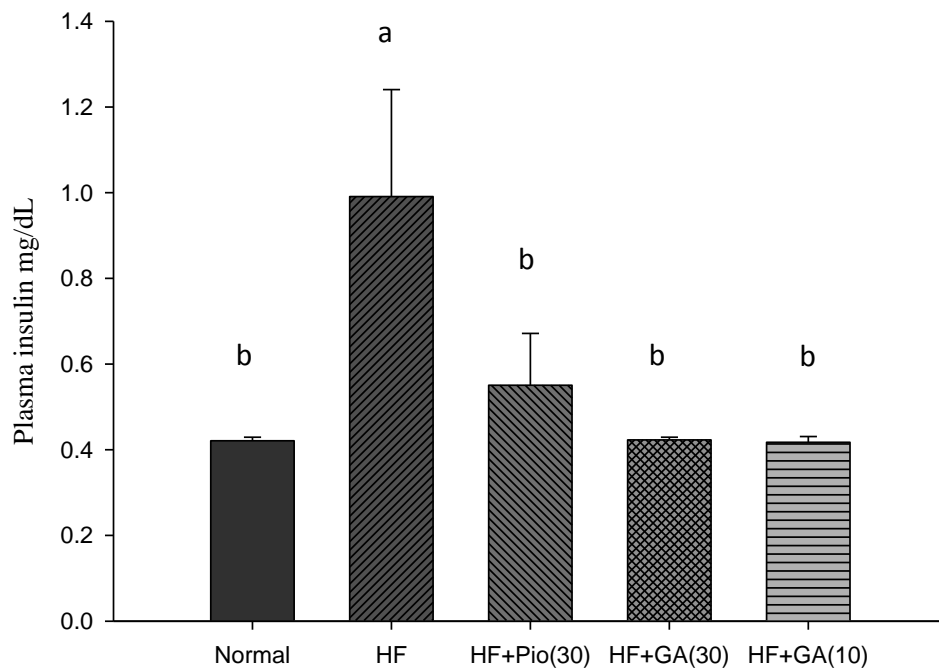


圖 5-4 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中胰島素濃度之變化。

Figure.5-4 Plasma insulin levels of rats after 4 weeks feeding test.

Normal: Normal rats treated with saline

HF: High fructose diet rats treated with saline

HF+Pio(30): High fructose diet rats treated with pioglitazone(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(30): High fructose diet rats treated with gallic acid(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(10): High fructose diet rats treated with gallic acid(10 mg/kg B.W.)

a~b Letter is significantly different among all samples tested(  $P < 0.05$  ).

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

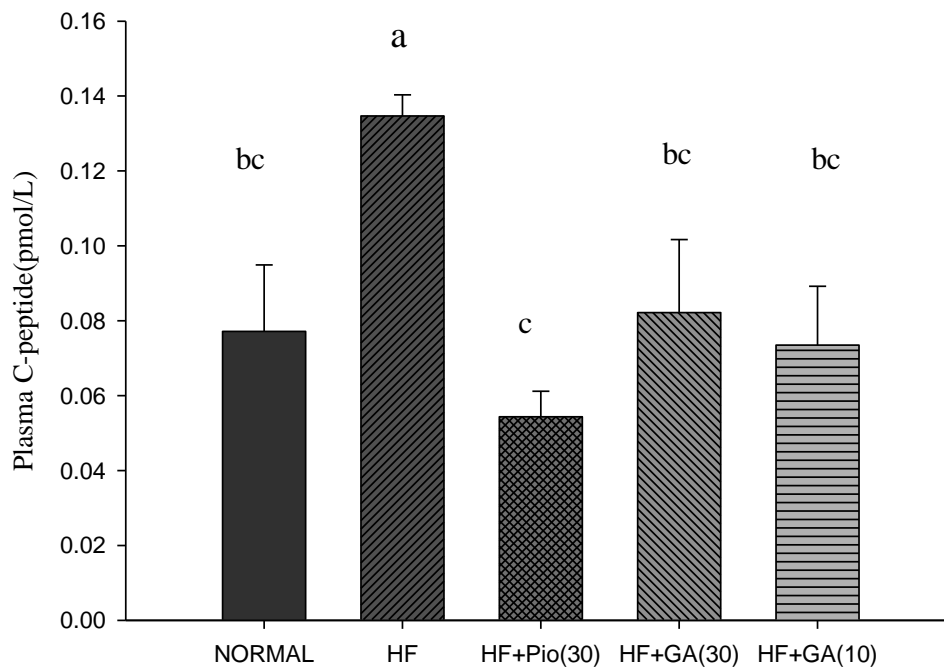


圖 5-5 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中 C 胜鏈濃度之變化。

Figure.5-5 Plasma C-peptide levels of rats after 4 weeks feeding test.

Normal: Normal rats treated with saline

HF: High fructose diet rats treated with saline

HF+Pio(30): High fructose diet rats treated with pioglitazone(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(30): High fructose diet rats treated with gallic acid(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(10): High fructose diet rats treated with gallic acid(10 mg/kg B.W.)

a~c Letter is significantly different among all samples tested(  $P < 0.05$  ).

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

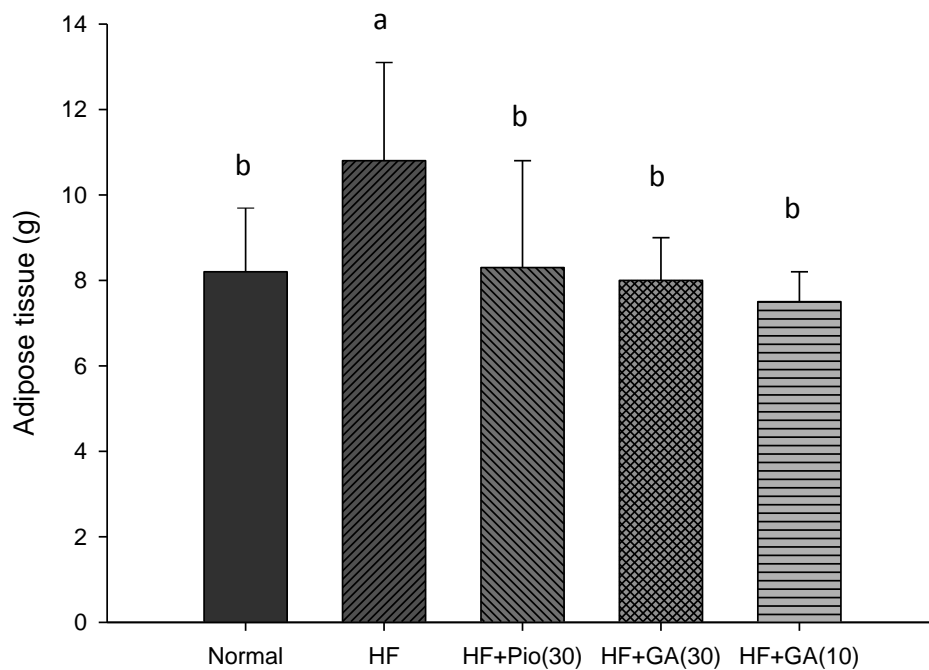


圖 5-6 灌食沒食子酸 4 週後大鼠體內脂肪組織堆積之變化。

Figure.5-6 Adipose tissue accumulation of rats after 4 weeks feeding test.

Normal: Normal rats treated with saline

HF: High fructose diet rats treated with saline

HF+Pio(30): High fructose diet rats treated with pioglitazone(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(30): High fructose diet rats treated with gallic acid(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(10): High fructose diet rats treated with gallic acid(10 mg/kg B.W.)

a~b Letter is significantly different among all samples tested(  $P < 0.05$  ).

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



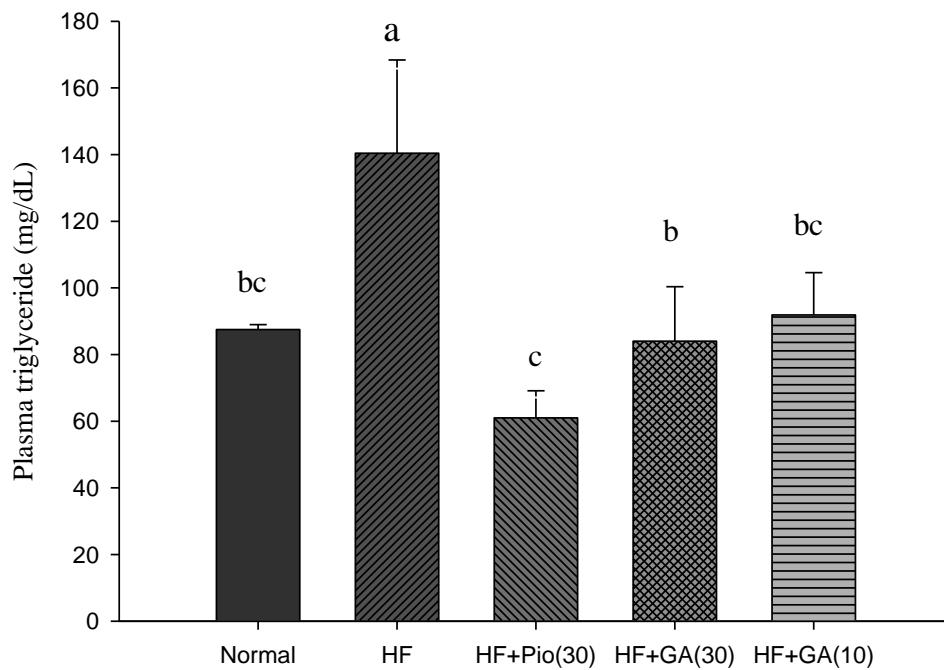


圖 5-7 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中三酸甘油酯濃度之變化。

Figure.5-7 Plasma triglyceride levels of rats after 4 weeks feeding test.

Normal: Normal rats treated with saline

HF: High fructose diet rats treated with saline

HF+Pio(30): High fructose diet rats treated with pioglitazone(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(30): High fructose diet rats treated with gallic acid(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(10): High fructose diet rats treated with gallic acid(10 mg/kg B.W.)

a~c Letter is significantly different among all samples tested(  $P < 0.05$  )

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

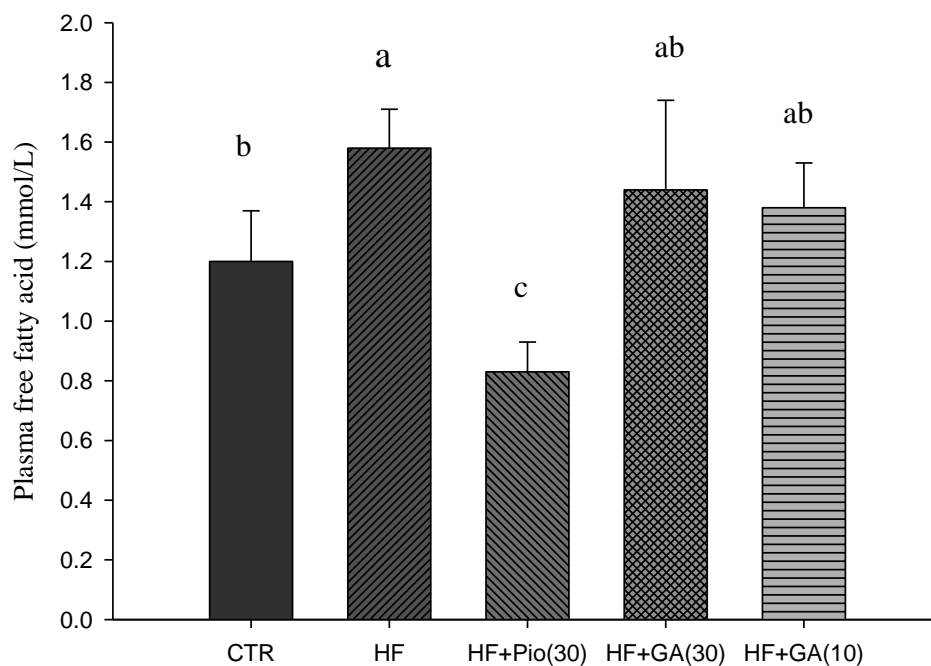


圖 5-8 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中游離脂肪酸濃度之變化。

Figure.5-8 Plasma free fatty acid levels of rats after 4 weeks feeding test.

Normal: Normal rats treated with saline

HF: High fructose diet rats treated with saline

HF+Pio(30): High fructose diet rats treated with pioglitazone(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(30): High fructose diet rats treated with gallic acid(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(10): High fructose diet rats treated with gallic acid(10 mg/kg B.W.)

a~c Letter is significantly different among all samples tested(  $P < 0.05$  )

Values were calculated as mean±S.E for six rats in each group.

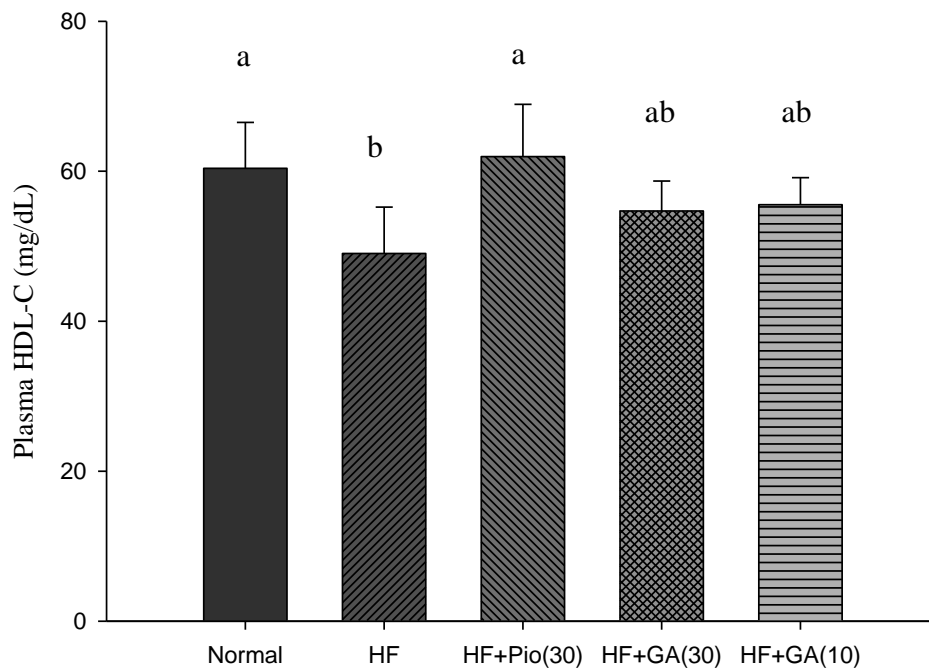


圖 5-9 灌食沒食子酸 4 週後大鼠於禁食情況下血漿中高密度脂蛋白濃度之變化。

Figure.5-9 Plasma high density lipoprotein levels of rats after 4 weeks feeding test.

Normal: Normal rats treated with saline

HF: High fructose diet rats treated with saline

HF+Pio(30): High fructose diet rats treated with pioglitazone(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(30): High fructose diet rats treated with gallic acid(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(10): High fructose diet rats treated with gallic acid(10 mg/kg B.W.)

a~b Letter is significantly different among all samples tested(  $P < 0.05$  ).

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

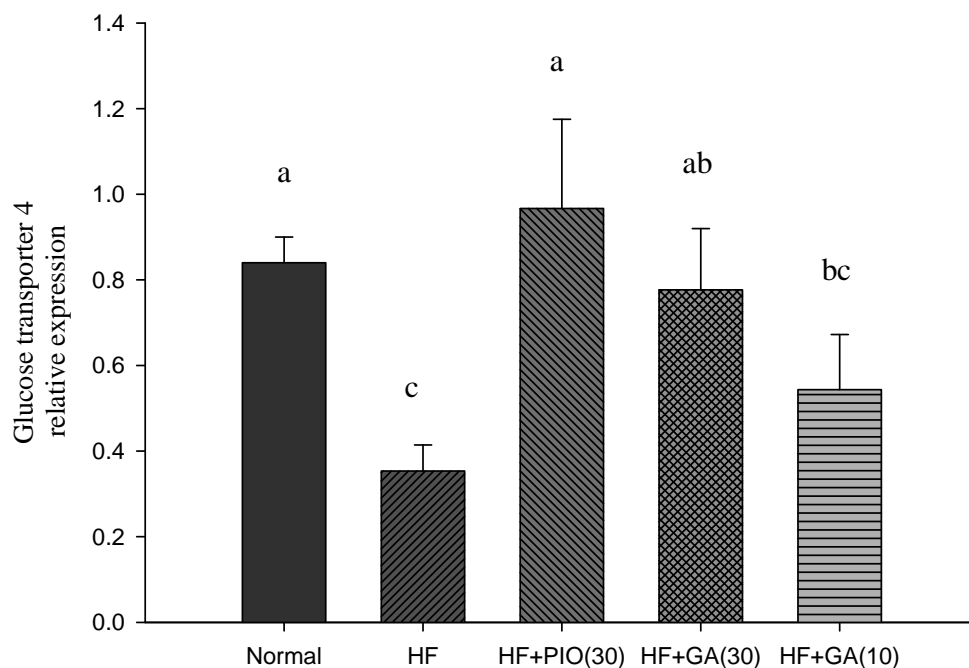
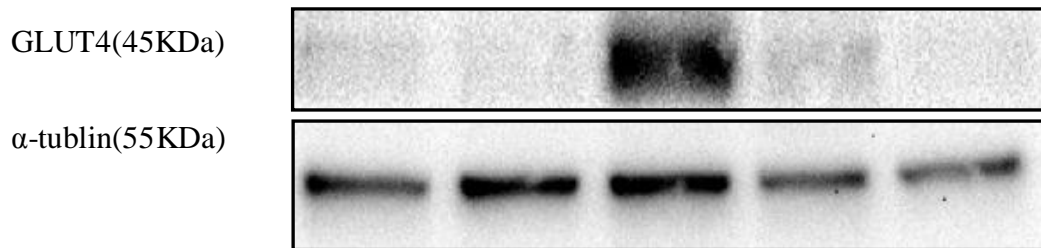


圖 5-10 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 Glut4 蛋白表現量之影響。

Figure.5-10 Relative expression of glucose transporter 4 in perirenal fat isolated from rats after 4 week feeding test.

Normal: Normal rats treated with saline

HF: High fructose diet rats treated with saline

HF+Pio(30): High fructose diet rats treated with pioglitazone(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(30): High fructose diet rats treated with gallic acid(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(10): High fructose diet rats treated with gallic acid(10 mg/kg B.W.)

a~c Letter is significantly different among all samples tested(  $P < 0.05$  ).

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

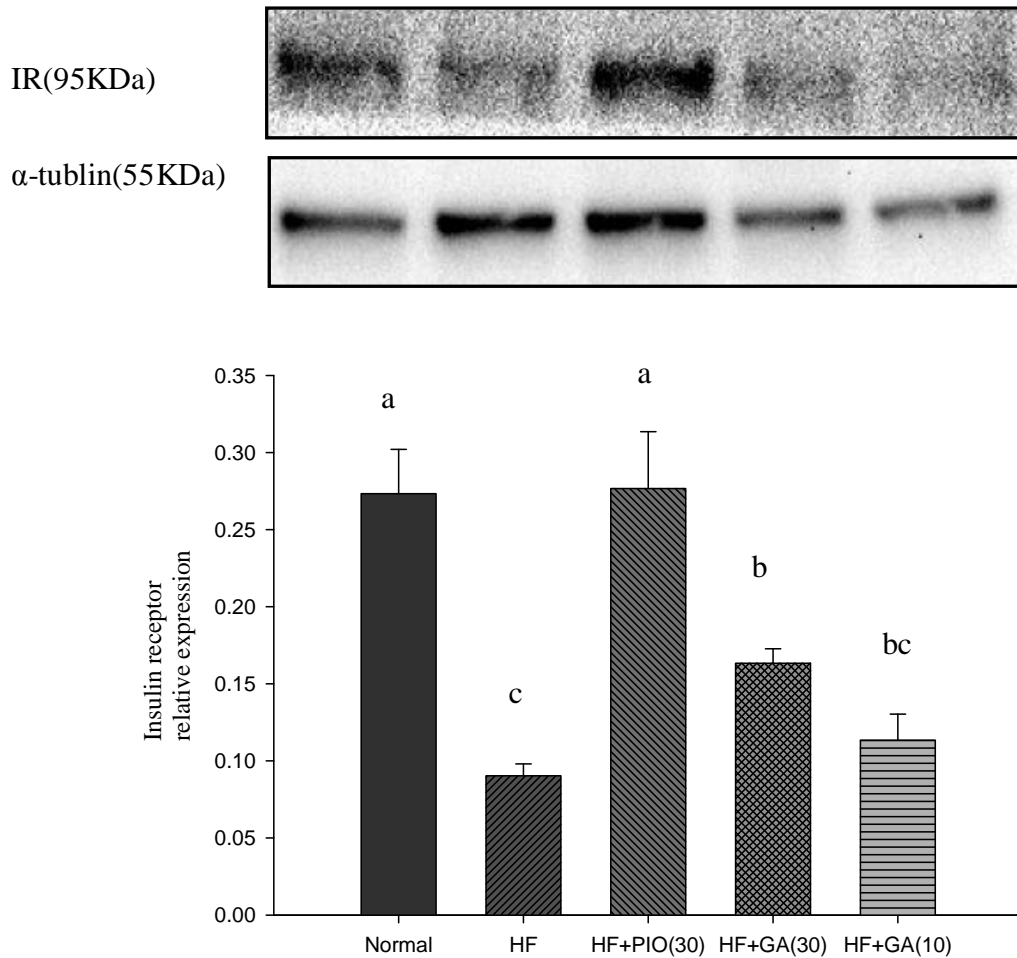


圖 5-11 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 IR 蛋白表現量之影響。

Figure.5-11 Relative expression of insulin receptor in perirenal fat isolated from rats after 4 week feeding test.

Normal: Normal rats treated with saline

HF: High fructose diet rats treated with saline

HF+PIO(30): High fructose diet rats treated with pioglitazone(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(30): High fructose diet rats treated with gallic acid(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(10): High fructose diet rats treated with gallic acid(10 mg/kg B.W.)

a~c Letter is significantly different among all samples tested(  $P < 0.05$  ).

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

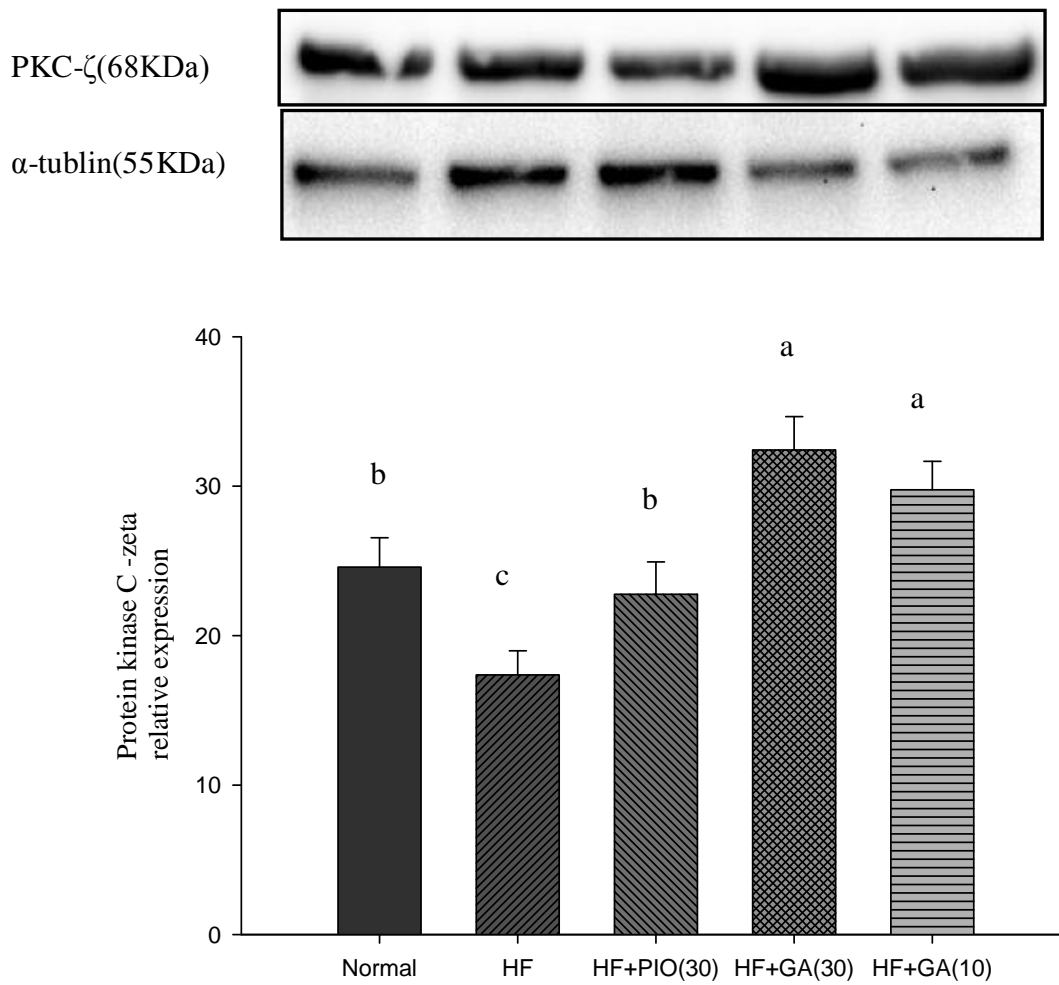


圖 5-12 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 PKC- $\zeta$  蛋白表現量之影響。

Figure.5-12 Relative expression of protein kinasein C-zeta in perirenal fat isolated from rats after 4 week feeding test.

Normal:Normal rats treated with saline

HF: High fructose diet rats treated with saline

HF+Pio(30):High fructose diet rats treated with pioglitazone(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(30):High fuctose rdiet rats treated with gallic acid(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(10):High fructose diet rats treated with gallic acid(10 mg/kg B.W.)

a~c Letter is significantly different among all samples tested(  $P < 0.05$  ).

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

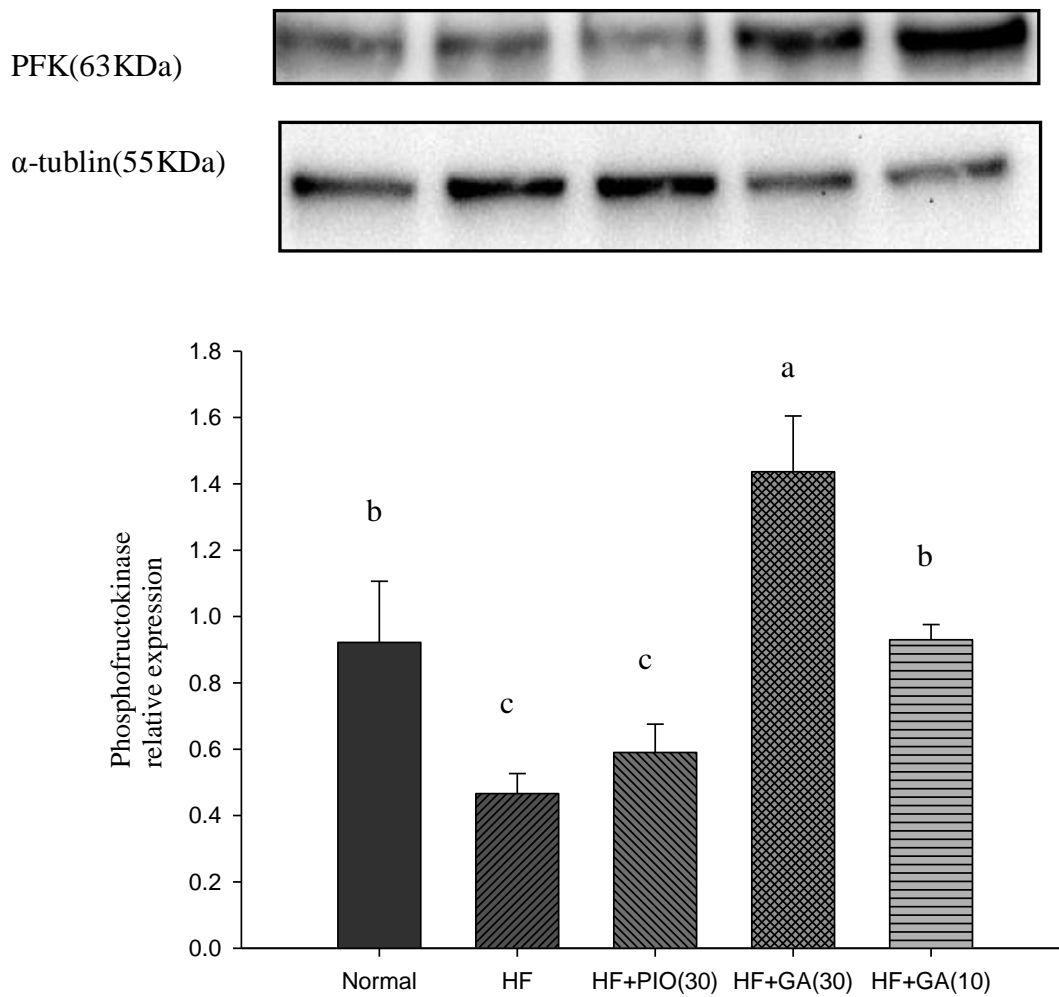


圖 5-13 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 PFK 蛋白表現量之影響。

Figure.5-13 Relative expression of phosphofructokinase in perirenal fat isolated from rats after 4 week feeding test.

Normal: Normal rats treated with saline

HF: High fructose diet rats treated with saline

HF+PIO(30): High fructose diet rats treated with pioglitazone(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(30): High fructose diet rats treated with gallic acid(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(10): High fructose diet rats treated with gallic acid(10 mg/kg B.W.)

a~c Letter is significantly different among all samples tested ( $P < 0.05$ ).

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

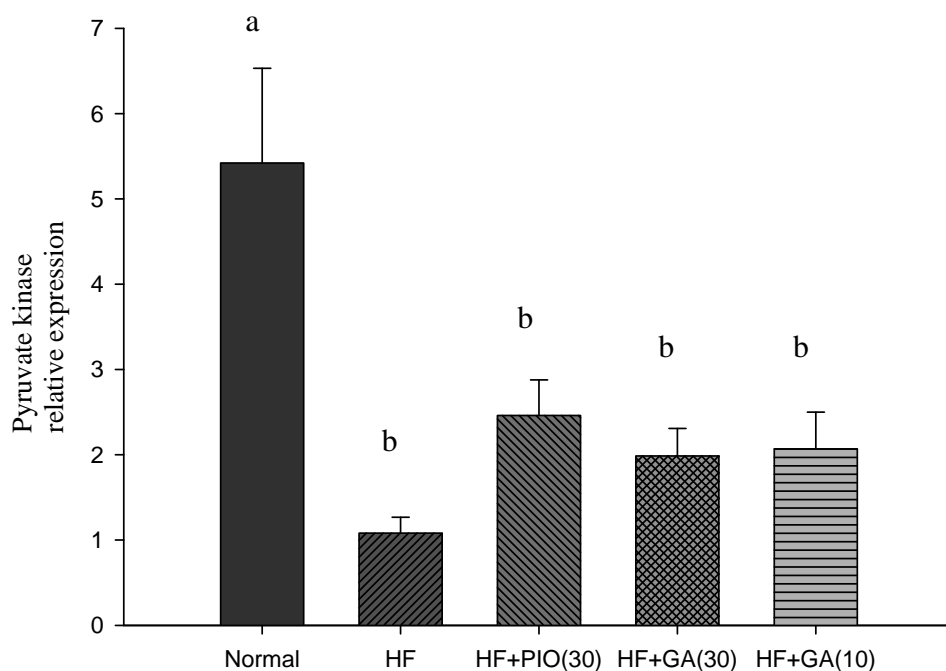
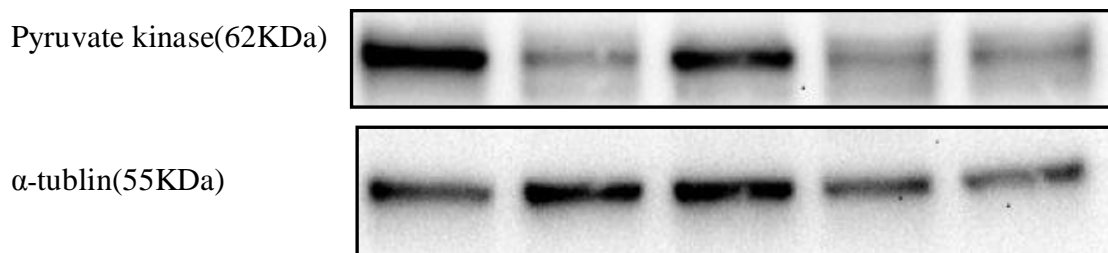


圖 5-14 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 PK 蛋白表現量之影響。

Figure.5-14 Relative expression of pyruvate kinase in perirenal fat isolated from rats after 4 week feeding test.

Normal: Normal rats treated with saline

HF: High fructose diet rats treated with saline

HF+Pio(30): High fructose diet rats treated with pioglitazone(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(30): High fructose diet rats treated with gallic acid(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(10): High fructose diet rats treated with gallic acid(10 mg/kg B.W.)

a~b Letter is significantly different among all samples tested(  $P < 0.05$  ).

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



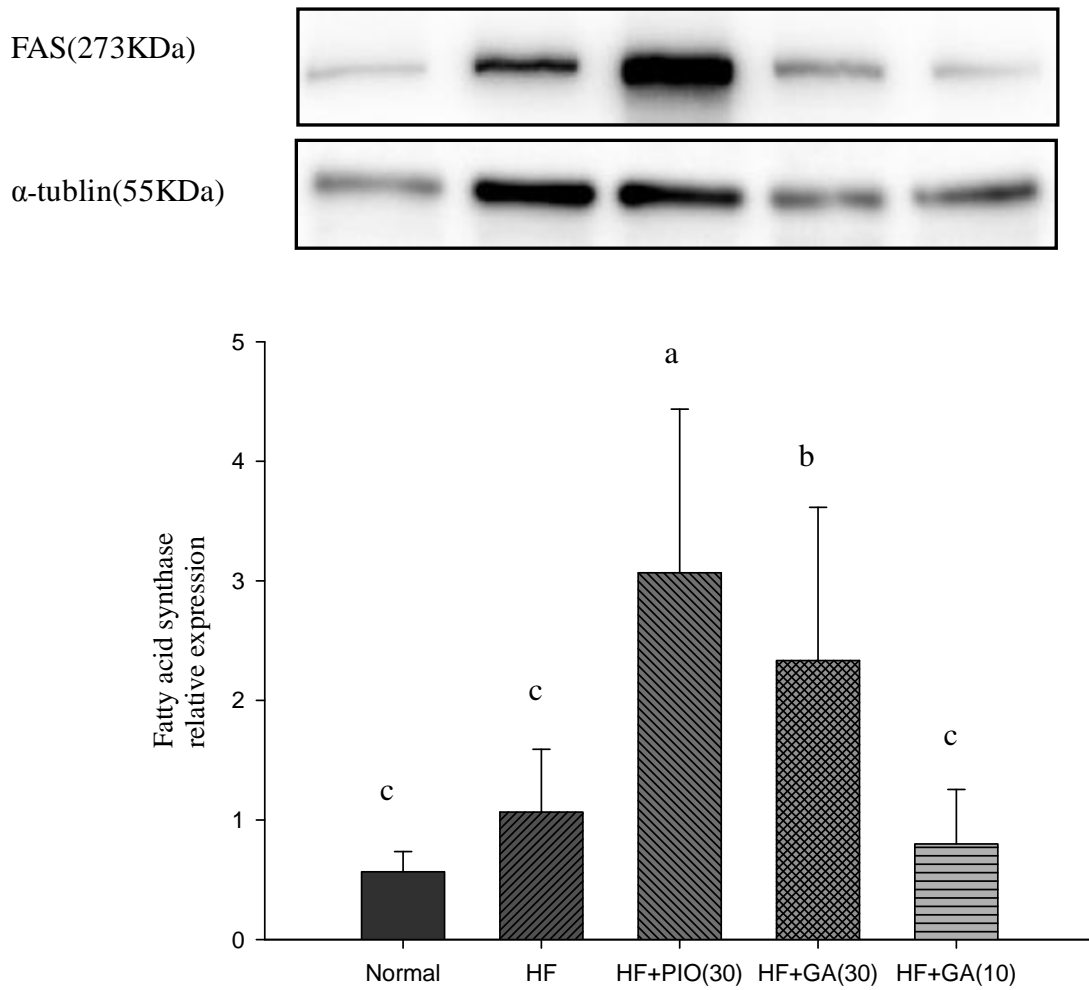


圖 5-15 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 FAS 蛋白表現量之影響。

Figure.5-15 Relative expression of fatty acid synthase in perirenal fat isolated from rats after 4 week feeding test.

Normal: Normal rats treated with saline

HF: High fructose diet rats treated with saline

HF+PIO(30): High fructose diet rats treated with pioglitazone(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(30): High fructose diet rats treated with gallic acid(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(10): High fructose diet rats treated with gallic acid(10 mg/kg B.W.)

a~c Letter is significantly different among all samples tested(  $P < 0.05$  ).

Values were calculated as mean ± S.E for six rats in each group.

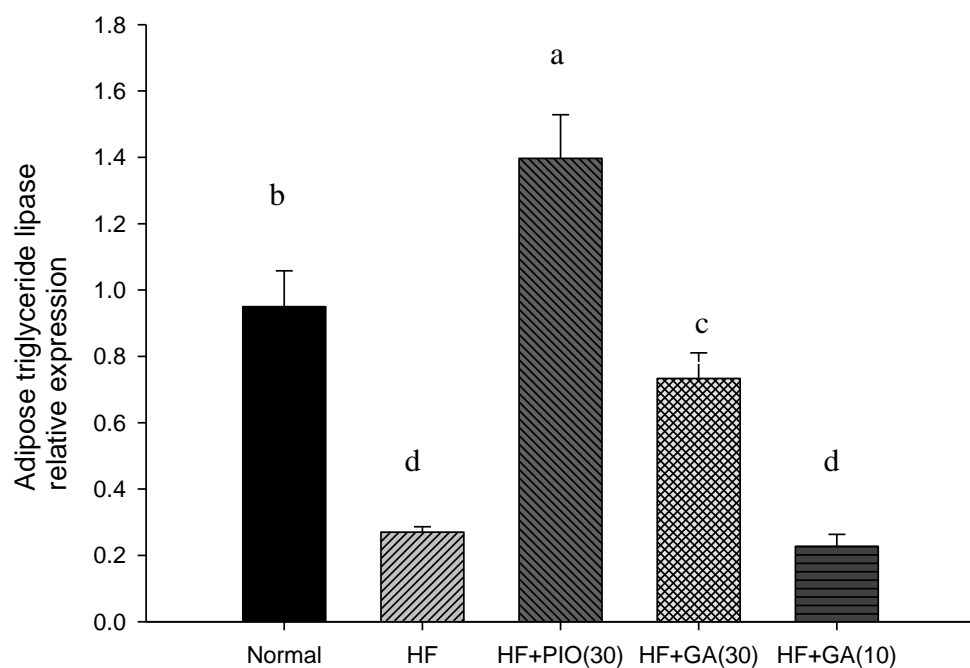
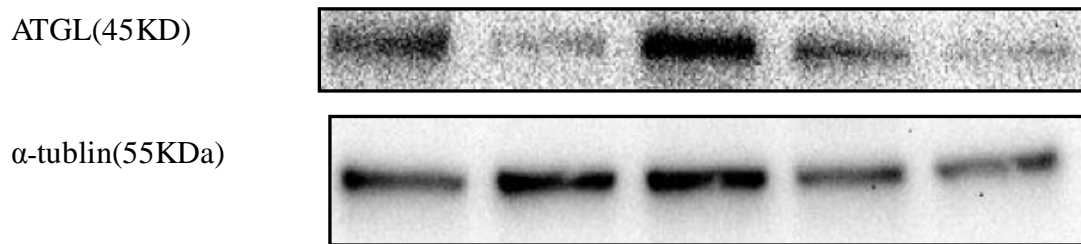


圖 5-16 灌食沒食子酸 4 週後對大鼠腎周脂肪 ATGL 蛋白表現量之影響。

Figure.5-16 Relative expression of adipose triglyceride lipase in perirenal fat isolated from rats after 4 week feeding test.

Normal: Normal rats treated with saline

HF: High fructose diet rats treated with saline

HF+PIO(30): High fructose diet rats treated with pioglitazone(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(30): High fructose diet rats treated with gallic acid(30 mg/kg B.W.)

HF+GA(10): High fructose diet rats treated with gallic acid(10 mg/kg B.W.)

a~d Letter is significantly different among all samples tested(  $P < 0.05$  ).

Values were calculated as mean±S.E for six rats in each group.

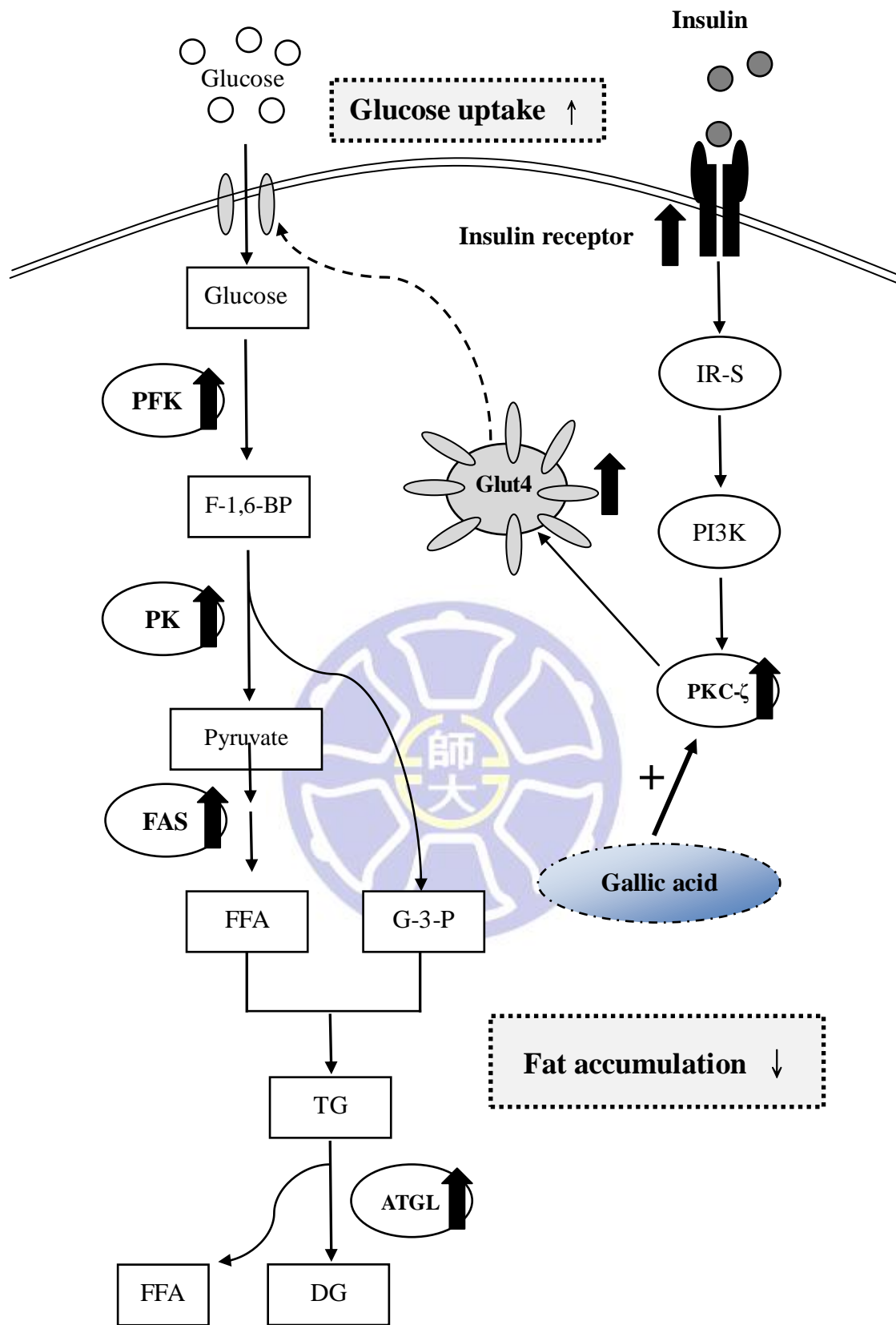


圖 7-1、沒食子酸於脂肪細胞中調控醣類與脂質代謝之可能機制

Figure. 7-1 The postulated mechanism for gallic acid to regulate carbohydrate and lipid metabolism of adipocytes in high fructose diet-induced diabetic rats.

## 參考文獻

- 中華民國糖尿病衛教學會。2010。糖尿病衛教核心教材。
- 中華民國藥師公會藥學雜誌。2011。106:110-11
- 王錫崗。2008。人體生理學。pp. 655-668。
- 李天瑞。2008。數種食材萃物對脂肪或肌肉細胞葡萄糖攝取之影響。國立台灣大學。生命科學院微生物與生化學研究所。碩士論文。
- 行政院衛生署。2012。行政院衛生署衛生統計資訊網。<http://www.doh.gov.tw>
- 李雅婷。2004。酚酸衍生物之合成及其生物活性之研究。國立陽明大學。藥理學研究所。博士論文。
- 吳寧容。2007。番石榴葉萃出物對 streptozotocin-nicotinamide 誘發第二型糖尿大白鼠血糖之影響。國立台灣大學。食品科技研究所。碩士論文。
- 孫慧芸。2007。龍眼花水萃物對高果糖誘發代謝症候群大鼠之影響。國立台灣大學。食品科技研究所。碩士論文。
- 黃士懿。2005a。營養生化學。pp.4.1-8。
- 黃士懿。2005b。營養生化學。pp.6.1-52。
- 張文昌。2010。食用桃金娘科植物萃取物減輕小鼠肝臟細胞(FL83B)胰島素阻抗之探討。國立台灣大學。食品科技研究所。碩士論文。
- 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.
- Bhattacharya, S., Dey, D., and Roy, S.S. (2007). Molecular mechanism of insulin resistance. *J Biosci* 32, 405-413.
- Birnbaum, M.J. 2001. Turning down insulin signaling. *J Clin Invest* 108: 655-659.
- Brasaemle, D.L. (2010). Lipolysis Control: The Plot Thickens. *Cell Metabolism* 3, 173-174.
- 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.
- 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.
- 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.
- Chirala, S.S., Jayakumar, A., Gu, Z.W., and Wakil, S.J.(2000). Human fatty acid synthase: Role of interdomain in the formation of catalytically active synthase dimer. *PNAS* 98, 3104-3108
- Ciaraldi, T., and Henry, R.R. (1997). Thiazolidinediones and their effects on glucose

- transporters. *Eur J Endocrinol* 137, 610-612.
- Claus, T.H., Lowe, D.B., Liang, Y., Salhanick, A.I., Lubeski, C.K., Yang, L.L., Lemoine, L.L., Zhu, J., Clairmont, K.B. (2005). Specific Inhibition of Hormone-Sensitive Lipase Improves Lipid Profile while Reducing Plasma Glucose. *JPET* 315:1396–1402.
- Czech, M.P., and Corvera, S. (1999). Signaling mechanisms that regulate glucose transport. *J Biol Chem* 274, 1865-1868.
- Day, C., Cartwright, T., Provost, J., and Bailey, C.J. (1990). Hypoglycaemic effect of *Momordica charantia* extracts. *Planta Med* 56, 426-429.
- 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.
- 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-42.
- Eriksson, J.W. (2007). Metabolic stress in insulin's target cells leads to ROS accumulation –A hypothetical common pathway causing insulin resistance. *FEBS Letters* 581, 3734–3742.
- J. 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
- Faure P, Rossini E, Lafond JL, Richard MJ, Favier A, Halimi S. 1997. Vitamin E improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity of rats fed high fructose diets. *J Nutr* 127(1):103-107.
- 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.
- 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.
- Gesta, S., Bluher, M., Yamamoto, Y., Norris, A.W., Berndt, J., Kralisch, S., Boucher, J., Lewis, C. and Kahn, C.R. (2006) Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution . *Proc Natl Acad Sci* 103: 6676-6681.
- Goossens, G.H. (2008). The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol Behav* 94, 206-218.
- 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.
- Hajdouch, 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.
- 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.
- 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, 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, S., and Czech, M.P. (2007). The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab* 5, 237-252.
- Hwei, W.P., Tsai, M.J., Hsu, C.Y., Wang, C.Y., Hsu, H.K., Weng, C.F.(2007). *Toona sinensis* Roem (Meliaceae) leaf extract alleviates hyperglycemia via altering adipose glucose transporter 4. *Food Chem Toxicol* 7,2554-2560.
- 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.

- Jakus, V., Sapak, M., Kostolanska, J.(2012)Circulating TGF- $\beta$ 1, Glycation, and Oxidation in Children with Diabetes Mellitus Type 1. *Exp Diabetes Res*,1-7
- Jellinger, P.S., Mace, M.D.(2007). Metabolic Consequences of Hyperglycemia and Insulin Resistance. *Clinical Cornerstone [Suppl 7]:S30–S42.*
- 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.
- Johnson, R.J., Perez-Pozo, S.E., Sautin, Y.Y., Manitius, J., Sanchez-Lozada, L.G., Feig, D.I., Shafiu, M., Segal, M., Glasscock, R.J., Shimada, M., Roncal, C., and Nakagawa, T.(2009). Hypothesis: Could Excessive Fructose Intake and Uric Acid Cause Type 2 Diabetes? *Endocrine Reviews* 30(1):96–116.
- 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.
- 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.
- 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, C.C., Hsu, .W.H., Shen, S.R., Cheng, Y.H., Wu, .S.C.(2012). Fagopyrum tataricum (Buckwheat) Improved High-Glucose-Induced Insulin Resistance in Mouse Hepatocytes and Diabetes in Fructose-Rich Diet-Induced Mice.10, *Exp Diabetes Res* 375673-375683.
- 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.
- Langin, D. (2006). Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. *Biologies* 329, 598-607
- 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.
- 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.
- Lowell, B.B., and Shulman, G.I. (2005). Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 307, 384-387.
- Maury, E., and Brichard, S.M. (2010). Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology* 314, 1-16.
- 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. *Issue* 346, p. re7
- McAnuff, M.A., Harding, W.W., Omoruyi, F.O., Jacobs, H., Morrison, E.Y., and Asemota, H.N. (2005a). Hypoglycemic effects of steroidal saponins isolated from Jamaican bitter yam, *Dioscorea polygonoides*. *Food Chem Toxicol* 43, 1667-1672.
- 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.
- 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. (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.
- 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.
- Parks, W.C., Darke, R.L.(1982).Insulin mediates the stimulation of pyruvate kinase by a dual mechanism. *Biochem. J.* 208, 333-337.
- 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.
- 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.
- Prasad, C.N.V., Anjana, T., Banerji, A., Gopalakrishnapillai, A.(2010)Gallic acid induces GLUT4 translocation and glucose uptake activity in 3T3-L1 cells. *FEBS Letters* 584, 531–536
- Punithavathi, V. R., Prince, P.S.M., Kumar, M.R., Selvakumari, C.J.(2011).

- Protective Effects of Gallic Acid on Hepatic Lipid Peroxide Metabolism, Glycoprotein Components and Lipids in Streptozotocin-Induced Type II Diabetic Wistar Rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2, 68-76.
- 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.
- Saltiel, A.R., and Olefsky, J.M. (1996). Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes* 45, 1661-1669.
- 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.
- Silva, A.P.P., Alves, G.G., Araujo, A.H.B., SOLA-PENNA, M.(2004). Effects of insulin and actin on phosphofruktokinase activity and cellular distribution in skeletal muscle. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 76, 541-548.
- Silva, D.D., Zancan, P., Coelho, W.C., Gomez, .L.S(2010)Metformin reverses hexokinase and 6-phosphofructo-1-kinase inhibition in skeletal muscle, liver and adipose tissues from streptozotocin-induced diabetic mouse. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 496, 53–60.
- Semenkovich, C.F.(1997).Regulation of fatty acid synthase. *Prog. Lipid Res.* 36:43–53.
- 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.
- Spiegelman, B.M., and Flier, J.S. (1996). Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* 87, 377-389.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Yamada, K., Noguchi, T. (1999). Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochem. J.* 337, 1-11.
- Yen, C.L., Farese, R.V. (2006). Fat breakdown: A function for CGI-58 (ABHD5) provides a new piece of the puzzle. *Cell Metabolism* 5, 305-307.
- Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Gruenberger, R.B., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., Zechner, R. (2004). Albin Hermetter, 3Rudolf Zechner Fat Mobilization in Adipose Tissue Is Promoted by Adipose Triglyceride Lipase. *Science* 306, 1383-1386.