

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

探討生物素對於改善第 2 型糖尿病老鼠骨骼肌中胰島素抵抗
性與脂質代謝異常的影響

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2320-B-039-018-

執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 年 07 月 31 日

執行單位：中國醫藥大學營養學系

計畫主持人：張毓芬

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

探討生物素對於改善第2型糖尿病老鼠骨骼肌中胰島素阻抗性與脂質代謝異常的影響的影響

Effect of Biotin on improving insulin resistance and abnormal lipid metabolism in skeletal muscle of Type 2 Diabetes rat

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC - 91 - 2320 - B - 039 - 018

執行期間： 91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31 日

計畫主持人：張毓芬

共同主持人：張淳堆

計畫參與人員：蘇鈺雯、陳宏雯、湯晴如、林育筠、劉易直

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中國醫藥學院營養學系

中 華 民 國 92 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

探討生物素對於改善第2型糖尿病老鼠骨骼肌中胰島素阻抗性與脂質代謝異常的影響

Effect of Biotin on Improving Insulin Resistance and Abnormal Lipid Metabolism in Skeletal Muscle of Type 2 Diabetes Rat

計畫編號：NSC 91-2320-B-039-018

執行期限：91年8月1日至92年7月31日

主持人：張毓芬 中國醫藥學院 營養學系

一、中英文摘要

摘要

標的組織中胰島素的敏感性下降是第2型糖尿病的主要特徵，進而導致全身性對此荷爾蒙的反應減弱。在骨骼肌中所產生的胰島素阻抗性尤其重要，因為由胰島素所刺激之葡萄糖利用最主要是骨骼肌中進行。近年已愈來愈重視脂質代謝利用之增加與胰島素阻抗性之間的關係。然而，此兩者之間相關性的機制尚未明瞭。第2型糖尿病人都有明顯的胰島素阻抗性，且大多為肥胖者。其胰島素阻抗性的發生原因被認為是吸收後之空腹期因游離脂肪酸的氧化作用下降，導致骨骼肌中三酸甘油酯的堆積，進而抑制骨骼肌中葡萄糖的利用，導致骨骼肌中的胰島素阻抗性。研究指出骨骼肌中 protein kinase C (PKC) 的含量與存在位置之改變可能與骨骼肌中的胰島素阻抗性有關。一種或多種 PKC 異酵素的活性異常會導致胰島素在接受器中的傳訊減弱。另一方面有研究指出，生物素的治療可改善第2型糖尿病人的葡萄糖代謝及高血糖的現象。其他的動物與人體試驗指出，缺乏生物素會導致脂肪的代謝異常，然而目前國內外仍缺乏探討給予生物素對改善第2型糖尿病患脂質代謝異常以及對2型糖尿病患骨骼肌中 PKC 蛋白質含量分佈情形的影響。因此，本研究計畫探討第2型糖尿病老鼠給予不同劑量之生物素後是否有助於降低血糖及改善葡萄糖耐受性，改變漿中三酸甘油酯的含量以及骨骼肌中 PKC 蛋白質含量的分佈情形。30 隻第2型糖尿病 KK

小鼠先以高熱量飼料誘導出明顯的第2型糖尿病症狀後，以腹腔注射的方式分別給予四週三種不同劑量之生物素補充：分別為沒有補充生物素之對照組 (CB)；每天給予 3 mg/kg of body wt 之適量補充組；每天給予 6 mg/kg of body wt 之高劑量補充組 (HB)。試驗期間及試驗期結束後定期進行空腹血糖與葡萄糖耐受性測試，測定血漿三酸甘油酯濃度，試驗期結束後將老鼠犧牲，取其骨骼肌測定 protein kinase C 蛋白質含量的分佈情形。最後以統計方法比較各組之間及不同試驗階段各項測定值間的差異。結果顯示，三組小鼠在試驗其間之體重變化情形並無顯著差異。血糖及葡萄糖耐受性測試結果則顯示，每日補充 3 mg/kg of body wt 之生物素，已經具有降低糖尿病 KK 小鼠之空腹血糖，同時具有改善葡萄糖耐受性的效果。然而糖尿病 KK 小鼠每日補充 6 mg/kg of body wt 之生物素時，對於改善葡萄糖耐受性的效果更顯著，且優於 3 mg/kg of body wt 之生物素補充劑量。此外，生物素的補充對血漿三酸甘油酯濃度並無顯著影響，本研究預測生物素的補充可能與骨骼肌中的三酸甘油酯濃度較相關。而補充生物素對糖尿病小鼠骨骼肌細胞質中之 PKC 含量並無太大改變。雖然補充 3 mg/kg of body wt 組之骨骼肌細胞膜部位的 PKC 含量顯著低於控制組，而 6 mg/kg of body wt 組卻與控制組無太大差異。因此將來需繼續分析其他 PKC isoforms 的蛋白質含量分佈情形，可作進一步的探討。

關鍵詞：生物素，第2型糖尿病，胰島素阻抗性，骨骼肌，三酸甘油酯，二醯甘油酯

ABSTRACT

Type 2 Diabetes is characterized by a decrease in the insulin sensitivity of target tissue, resulting in a diminished whole-body response to the hormone. The insulin resistance seen in skeletal muscle is of particular importance, since this is a major site of insulin-stimulated glucose uptake. Emphasis has recently been placed on the link between the development of insulin resistance and increased lipid availability and metabolism. However, the mechanistic basis for this link is currently unknown. Nearly all individuals with type 2 diabetes are markedly insulin resistant, and the majority of them are obese. The hypothesis that is addressed for this mechanism is that tissue accumulation of triglyceride (TG) makes a major contribution to skeletal muscle insulin resistance and occurs due to reduced reliance on free fatty acid oxidation during postabsorptive conditions. Thus, lower rates of fatty acid oxidation during fasting are likely a key mechanism leading to excess lipid accumulation within skeletal muscle, which in turn contributes to insulin-resistant glucose metabolism. Several studies reporting that changes in the levels and cellular location of protein kinase C (PKC) isozymes might be associated with the development of insulin resistance in skeletal muscles. Aberrant activity of one or more PKC isozymes can lead to decreased insulin signaling from the insulin receptor. On the other hand, it has been reported that biotin treatment may improve the glucose metabolism, lower blood glucose levels and improve hyperglycemia in type 2 diabetes. Several lines of evidence suggest that biotin deficiency causes abnormalities in lipid metabolism. However, no study investigated the effect of biotin administration on the impaired lipid metabolism, PKC protein distribution in skeletal muscle of type 2 diabetes. Therefore, the purpose of this study are to understand whether biotin administration may lower blood glucose levels, improve glucose intolerance, change plasma TG level and PKC protein distribution in skeletal muscle of type 2 diabetes rats. 30 male KK mice were inheritantly glucose intolerant with insulin

resistance, and developed overt diabetes induced by high-fat diet. They were divided to three groups: high biotin group (HB) were given 6 mg/kg of body wt, moderate biotin group (MB) were given 3 mg/kg of body wt, and control group were given a comparable volume of saline. Biotin was given once daily six days a week for 4 weeks. At the baseline, 2 weeks and 4 weeks, blood was collected for fasting blood glucose and plasma triglyceride levels. Glucose tolerance tests were also tested at baseline, 2 and 4 weeks by giving a dose of 1.0 g/kg of glucose. After 4 weeks, the mice were killed and skeletal muscle was removed for PKC protein content in cytosolic and particulate fractions assay. The body weight change during the study were similar in the three groups. Moderate biotin supplement significantly lowered fasting blood glucose and improved glucose tolerance. However, these effects were more pronounced in high biotin group. The mean plasma TG levels seem has no relationship with biotin administration. We suggested that tissue TG may have a more important role in reduced skeletal muscle insulin resistant by biotin treatment. However, from our western blotting analysis data it was found that the PKC protein content in cytosolic fractions were not changed by biotin treated in the three groups. The PKC protein content in particulate fraction of MB group was significantly lower than the control group. That is, biotin treatment may decreased the PKC content in cell membrane of skeletal muscle. However, the PKC protein content in particulate fraction of HB group was similar with control group. Therefore, western blot analysis should be used to measure the protein content distribution of different PKC isoforms.

Keywords: biotin, type 2 diabetes, insulin resistance, skeletal muscle, protein kinase C, triglyceride, diacylglycerol.

二、計畫內容

前言

標的組織中胰島素(insulin)的敏感性下降是第 2 型糖尿病的主要特徵，此生理現象會進而導致全身性對此荷爾蒙的反應減弱 (Schmitz-Peiffer, 1997)。在骨骼肌(skeletal muscle)中(特別是紅色肌)所產生的胰島素阻抗性(insulin resistance)尤其重要，因為由胰島素所刺激之葡萄糖利用最主要是在骨骼肌中進行(Cortright et al., 2000)。近年已愈來愈重視脂質代謝利用之增加與胰島素阻抗性之間的關係(McGarry, 1992)。然而，此兩者之間相關性的機制尚未明瞭。幾乎所有的第 2 型糖尿病人都有明顯的胰島素阻抗性，且大多為肥胖者。其胰島素阻抗性的發生原因被認為是吸收後(postabsorptive condition)之空腹期(fasting period)因游離脂肪酸(free fatty acids, FFAs)的氧化作用下降，導致骨骼肌中三酸甘油酯(triglyceride, TG)的堆積，這些脂肪會在進食後與葡萄糖互相競爭作為能量的來源，抑制骨骼肌中葡萄糖的利用(Randle et al., 1963)，使由胰島素所刺激的葡萄糖代謝降低，也使胰島素無法抑制脂質的分解與氧化，進而導致胰島素的敏感性下降及骨骼肌中的胰島素阻抗性(Kelley and Goodpaster, 2001)。有些研究指出，骨骼肌中 protein kinase C(PKC)的含量與存在位置之改變可能與骨骼肌中的胰島素阻抗性有關(Schmitz-Peiffer, 1997)。一種或多種 PKC 異酵素(isozymes)的活性異常會導致胰島素在接受器中的傳訊減弱(Chen et al., 1991., Considine and Caro, 1993., Shmueli et al., 1993)，而 TG 與二醯甘油酯(diacylglycerol, DAG)是 PKC 的活化因子(Nishizuka, 1995)。因此，除了要改善第 2 型糖尿病人的葡萄糖代謝問題，如何同時改正其骨骼肌中脂質的代謝異常也是非常重要的。

另一方面，根據過去的研究發現，第 2 型糖尿病人的血清生物素(biotin)濃度顯著低於健康人(Maebashi et al., 1993)，而血清生物素濃度與空腹血糖值成負相關。由探討人體和動物體內生物素的狀態分別與葡萄糖代謝(glucose metabolism)及胰島素之相

關性的研究可知，生物素的缺乏會導致葡萄糖的利用受損(Bhagavan et al., 1965; Dakshinamurti and Cheah-Tan, 1968; Dakshinamurti et al., 1968; Deodhar and Mistry, 1970; Mistry et al., 1962)。相對的，近年已有許多動物試驗及少許人體試驗的研究報告認為，給予生物素的補充有助於改善糖尿病動物及糖尿病人體內的葡萄糖代謝(McCarty, 1999; McCarty, 2000a; McCarty, 2000b)。Reddi 等(1988)指出，給予先天性糖尿病幼鼠(KK mice)補充 10 週 2 mg/Kg diet 或 4 mg/ Kg diet 的生物素，可降低其餐後血糖值(post-prandial glucose levels)、增加葡萄糖耐受性(glucose tolerance)與內生性胰島素的感受性(endogenous insulin sensitivity)。近年亦有研究報告顯示，攝取補充高生物素含量的飼料(7.44 mg/Kg diet)可改善第 2 型糖尿病老鼠(OLETF rats)體內葡萄糖的代謝障礙(Zhang et al., 1996)。此外，人體試驗也顯示，給予第 2 型糖尿病人治療劑量的生物素 1 週(16 mg/day)，可降低患者血漿中的葡萄糖濃度，使高血糖現象獲得改善(Maebashi et al., 1993)。至於生物素對脂質代謝的影響方面，動物或人體試驗均指出，缺乏生物素會導致脂肪酸的代謝異常，且會改變組織中脂肪酸的組成(Kramer et al., 1984; Mock et al., 1988)。餵食老鼠缺乏生物素的飼料四週後，血漿與組織中脂肪酸的組成即開始產生異常的變化(Mock et al., 1988)。血漿中的 FFAs 是健康人骨骼肌的重要能量來源(Andres et al., 1956)，尤其在吸收後之空腹期。過去的研究顯示，第 2 型糖尿病人的骨骼肌利用血漿 FFAs 的效率及脂肪的氧化作用顯著較低(Colberg et al., 1995; Kelley and Mandarino, 1990; Kelley and Simoneau, 1994)。而血漿中 FFAs 的濃度上升會破壞由胰島素所刺激的葡萄糖代謝作用(Boden et al., 1994; Boden and Chen, 1995; Kelley et al., 1993; Roden et al., 1996)。然而，目前國內外仍缺乏研究探討給予生物素對改善第 2 型糖尿病患脂質代謝異常的影響，以及對 2 型糖尿病患骨骼肌中 PKC 蛋白質含量及胰島素阻抗性的影響。

研究目的

1. 探討第 2 型糖尿病老鼠給予不同劑量的生物素後是否有助於降低血糖。
2. 探討給予不同劑量的生物素後，第 2 型糖尿病老鼠之血漿三酸甘油酯含量是否有變化。
3. 探討給予不同劑量的生物素對第 2 型糖尿病老鼠之骨骼肌中 PKC 蛋白質含量的影響。

研究方法

研究設計

首先進行相關文獻與資料之蒐集、整理與分析，再進行試驗動物之選擇、購買與飼養。30 隻第 2 型糖尿病 KK 小鼠先以高熱量飼料誘導出明顯的第 2 型糖尿病症狀後，分成三組進行四週三種不同劑量的生物素補充期。試驗期間及試驗期結束後定期進行口服葡萄糖耐受性測試與血清胰島素與血漿三酸甘油酯濃度測定，評估胰島素阻抗性與脂質的代謝。試驗期結束後將老鼠犧牲，取其骨骼肌測定 protein kinase C 的活性。最後以統計方法比較各組之間及不同試驗階段各項測定值間的差異，藉此探討給予不同劑量的生物素對第 2 型糖尿病老鼠之血糖控制、胰島素阻抗性、脂質代謝與對骨骼肌中 protein kinase C 蛋白質含量的影響。

動物的選擇與飼養

本研究採用八週大的雄性 KK/HIJ 品系小鼠，體重約 31 公克，購自美國 The Jackson Laboratory (由樂斯科生物科技股份有限公司代理進口)，到達後先以飼料 Formulab diet, 5008 (其成分最接近在 The Jackson Laboratory 所使用之飼料 LabDiet 5K52) 調適兩週。為了誘導明顯的第 2 型糖尿病症狀表現，改以高熱量飼料 (37 % fat) 餵食兩週，經空腹血糖值高於 120 mg/dl 之標準作為確認已誘發第 2 型糖尿病後，分成三組，以腹腔注射之方式進行不同劑量之生物素補充期四週。動物房溫度維持在 23~25 °C，濕度約 60 ±5 %，光照期及黑暗期各 12 小時，試驗期間全程供應飼料及去離子水，令其自由進食，各組飲水於隔天更換避免細菌之滋生繁殖。飼養期間每日確實紀錄飼料之攝取量，

每週紀錄老鼠體重 2~3 次，且隨時觀察老鼠的生長與外觀是否有異狀。

生物素之補充

有三種不同之生物素補充劑量：分別為沒有補充生物素之對照組 (CB)，給予等量 (0.1 ml/10 g) 之 0.9 % 生理食鹽水；適量補充組 (MB)，每天給予 3 mg/kg of body wt 之生物素補充；高劑量補充組 (HB)，每天給予 6 mg/kg of body wt 之生物素補充。生物素的補充是將生物素溶解於 0.9 % 的生理食鹽水 (saline) 後經由腹腔注射的方式給予，每週六天，持續四週。

動物和組織器官樣品之處理

進行靜脈內葡萄糖耐受性測試及胰島素測定之前一晚 (18:00) 先將飼料盒移走，禁食 14 小時後，隔天早上 (8:00) 先進行秤重，自尾部靜脈收集全血測定空腹血糖，另取血以 2000 x rmp 離心後分離出血清貯存於 -25 °C 作為測定基礎胰島素濃度之用，隨後由腹腔注射葡萄糖溶液 (1 g/kg body wt)，於 30、60、90 與 120 分鐘後抽取尾部靜脈血測定血糖、血清胰島素與血漿三酸甘油酯濃度。試驗期結束後，在置死前一晚 (18:00) 先將飼料盒移走，禁食 14 小時後，進行上述之相同步驟。老鼠置死後，迅速取其骨骼肌 (red gastrocnemius 及 white quadriceps muscles)，以液態氮冷凍後置於 -80 °C 保存。

血液樣品測定

血漿葡萄糖濃度使用 Glucose C-II test kit，依據 standard glucose oxidase method (Miwa et al., 1972) 的方法以自動分析儀 Express Plus 進行分析。血漿三酸甘油酯 (triglyceride) 濃度以測試紙經乾式測定儀分析。血清胰島素濃度使用 Immulite Insulin kit，以 immunometric assay 的方法進行分析。

骨骼肌細胞膜與細胞質中 PKC 蛋白質含量的測定

先將骨骼肌製備成 cytosolic fraction 與 membrane fractions 兩部分 (Schmitz-Peiffer et al., 1997)，再以 immunoblotting 的方法進行分析 (Schmitz-Peiffer et al., 1997)。

統計分析方法

所有的結果均以 mean \pm SE 表示，以變方分析 (ANOVA) 檢定各組之間及不同試驗階段結果的顯著差異。本研究所有數據以 SAS 軟體 (SAS for windows, version 6.12) 進行統計分析，以 $p < 0.05$ 表示有統計上的差異。

研究結果

研究對象之體重變化與飼料攝取情形

本研究三組小鼠在試驗第 0 週之平均體重相似 ($p > 0.05$)，HB 組為 35.5 ± 2.0 g，MB 組為 35.0 ± 1.5 g，CB 組為 34.2 ± 1.6 g。四週試驗期結束時，雖然 CB 組之平均體重為 40.1 ± 1.2 g，較其他兩組高 (HB 組為 38.5 ± 1.5 g，MB 組為 38.5 ± 1.8 g)，但三組間仍無顯著差異 ($p > 0.05$)。飼料攝取方面，試驗前三組小鼠之平均每日飼料攝取量相似 ($p > 0.05$)。然而第 2 至 4 週試驗期間，HB 組之平均每日飼料攝取量為 3.3 ± 0.5 g，稍高於 MB 組 (2.9 ± 0.2 g) 與 CB 組 (3.0 ± 0.3 g)。

血糖及葡萄糖耐受性測試結果

試驗第 0 週時，三組之平均空腹血糖值並於顯著差異 (HB 組為 164.4 ± 47.7 mg/dl，MB 組為 164.5 ± 37.6 mg/dl，CB 組為 165.3 ± 21.8 mg/dl)。試驗第 2 週時，CB 組之平均空腹血糖值為 148.2 ± 26.0 mg/dl，顯著高於 MB 組 (126.0 ± 26.0 mg/dl) 與 HB 組 (122.1 ± 15.4 mg/dl) ($p < 0.05$)。四週試驗期結束時，CB 組之平均空腹血糖值為 180.2 ± 61.4 mg/dl，顯著高於 MB 組 (133.7 ± 18.3 mg/dl) 與 HB 組 (126.7 ± 32.0 mg/dl) ($p < 0.05$)。葡萄糖耐受性測試之結果方面，試驗第 0 週時，三組在各測試時間點之平均血糖值並於顯著差異 ($p > 0.05$)，然而分別在試驗第 2 週與四週試驗期結束時，CB 組在各測試時間點之平均血糖值均顯著高於 HB 組 ($p < 0.05$)，而 MB 組在第 60、90 及 120 分鐘之平均血糖值也顯著高於 HB 組 ($p < 0.05$)。至於 CB 組與 MB 組間，試驗第 2 週時 CB 組第 0、30 及 60 分鐘之平均血糖值顯著高於 HB 組，四週試驗期結束時 CB 組除了第 60 分鐘外其餘時間點之平均血糖

值均顯著高於 MB 組 ($p < 0.05$)。此顯示每日補充 3 mg/kg of body wt 之生物素，已經具有降低糖尿病 KK 小鼠之空腹血糖，同時具有改善葡萄糖耐受性的效果。然而糖尿病 KK 小鼠每日補充 3 mg/kg of body wt 之生物素時，對於改善葡萄糖耐受性的效果更顯著，且優於 3 mg/kg of body wt 之生物素補充劑量。

血漿三酸甘油酯濃度測試結果

試驗前，三組小鼠的血漿三酸甘油酯濃度分別是 HB 組為 151.3 ± 47.4 mg/dl，MB 組為 163.0 ± 39.5 mg/dl，CB 組為 144.8 ± 14.5 mg/dl。試驗第 2 週時，HB 組之血漿三酸甘油酯濃度為 175.4 ± 51.4 mg/dl，MB 組為 162.5 ± 54.9 mg/dl，CB 組為 179.0 ± 28.8 mg/dl。四週試驗期結束時，HB 組為 167.6 ± 24.2 mg/dl，MB 組為 199.3 ± 33.6 mg/dl，CB 組為 169.1 ± 54.1 mg/dl。以上結果顯示，生物素的補充對血漿三酸甘油酯濃度並無顯著影響，本研究預測生物素的補充可能與骨骼肌中的三酸甘油酯濃度較相關。

骨骼肌細胞膜與細胞質 PKC 含量測定結果

因 protein kinase C 自細胞質位移至細胞膜部位後才可被活化，因此細胞膜部位 protein kinase C 的蛋白質含量可作為評估此酵素活化的測定。補充較高劑量之生物素是否可降低骨骼肌細胞膜部位 protein kinase C 的蛋白質含量，由 immunoblotting 的方法進行分析所得之結果顯示，PKC 在細胞膜部位之蛋白質含量，HB 組為 0.025 ± 0.005 μ g/ μ g protein，MB 組為 0.007 ± 0.001 μ g/ μ g protein，CB 組為 0.016 ± 0.003 μ g/ μ g protein。而在細胞質部位之 PKC 蛋白質含量，HB 組為 0.016 ± 0.005 μ g/ μ g protein，MB 組為 0.015 ± 0.003 μ g/ μ g protein，CB 組為 0.015 ± 0.005 μ g/ μ g protein。此說明補充生物素對糖尿病小鼠骨骼肌細胞質中之 PKC 含量並無太大改變。雖然補充 3 mg/kg of body wt 組之骨骼肌細胞膜部位的 PKC 含量顯著低於控制組，而 6 mg/kg of body wt 組卻與控制組無太大差異。因此將來需繼續分析其他 PKC isoforms 的蛋白質含量分佈情形，可作進一步的探討。