

中國醫藥大學藥學院
中國藥學暨中藥資源學系博士論文

編號:ICPS-D78

指導教授：林文川 教授

台灣金線連對小鼠高血糖及高血脂的改善作用

**Ameliorative effect of *Anoectochilus formosanus* on
hyperglycemia and hyperlipidemia in mice**

研究生：中文名 吳岳文

英文名 Wu Yueh-Wern

中華民國

101 年 6 月

摘要

先前的研究指出台灣金線連水萃取物具有抗氧化、降血糖及降血脂功用，這些結果顯示台灣金線可能具有減緩代謝症候群的效果。本論文進一步探討台灣金線連有效分劃 (AFEF)的降血糖作用機轉。另外，以同時具有高血糖及高血脂，肥胖及高血脂的動物模式探討 AFEF 的改善效果。

AFEF 對正常小鼠血糖及腎上腺素誘發高血糖沒有降糖作用。對小鼠葡萄糖耐受性試驗具有降血糖的效果。對 streptozotocin (STZ) 誘發高血糖小鼠，單一劑量投與 AFEF 具有降血糖作用。對 STZ 誘發高血糖小鼠，長期投與 AFEF，具有降血糖、糖化血紅素、膽固醇及三酸甘油脂的作用，對肝臟肝糖濃度有減少作用。西方墨點法的分析顯示 AFEF 能增強骨骼肌 Glucose transporter Type 4 (GLUT4) 蛋白的表現。RT-PCR 的分析顯示，AFEF 對骨骼肌 GLUT4、AMP-activated protein kinase 及肝臟 phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA 的表現有增強作用。

對 STZ 糖尿病小鼠餵食高脂肪飼料同時誘發及高血脂，AFEF 具有降血糖、降膽固醇及降三酸甘油脂的作用。對此模型，AFEF 也能降低低密度脂蛋白，同時提升高密度脂蛋白。AFEF 對小鼠餵食高脂肪飼料，或酒精加高脂肪飼料所造成的肥胖沒有減輕的作用。

結論，AFEF 具有降血糖、降血脂的作用，但對肥胖沒有改善的效果。AFEF 降血糖機轉是活化骨骼肌中 AMPK 而改善骨骼肌對葡萄糖的吸收。

關鍵字：台灣金線連；高脂肪食物；酒精；降血糖；streptozotocin；葡萄糖轉運蛋白第4型；AMP活化蛋白激酶；高血脂



Abstract

Previous studies have indicated that aqueous extracts of *Anoectochilus formosanus* (AFE) have antioxidative, hypoglycemic and anti-hypertriglyceridemic effects. These studies suggest that AFE may have benefits for metabolic syndromes. In the present study, we further examined the anti-hyperglycemic mechanisms of *A. formosanus* effective fraction (AFEF). In addition, we also investigated the amelioratory effects of AFEF on the hyperglycemic and hyperlipidemic, and obesity and hyperlipidemic animal models.

AFEF did not reduce the blood glucose levels in normal mice and epinephrine-induced hyperglycemic mice. AFEF suppressed the elevated blood glucose concentrations on glucose tolerance test in mice. Single administration of AFEF could inhibit the blood glucose levels in streptozotocin (STZ)-induced hyperglycemic mice. Chronic treatments with AFEF could reduce blood levels of glucose and glycated hemoglobin, and serum concentrations of triglycerides and cholesterol in STZ-induced hyperglycemic mice. AFEF also decreased the hepatic glycogen levels. In STZ-induced hyperglycemic mice, Western blot analysis showed that AFEF inhibited the glucose transporter type 4 (GLUT4) protein expression in skeletal muscle. AFEF also decreased the mRNA expression of GLUT4 and AMP-activated protein kinase in skeletal muscle, and suppressed hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA expression.

In a model that combined high-fat diet-induced hyperlipidemia

with STZ-induced hyperglycemia in mice, AFEF could attenuate the blood levels of glucose, triglycerides and cholesterol. In this model, AFEF not only decreased LDL cholesterol, but also increased HDL cholesterol. However, AFEF did not decrease the obesity induced by high-fat diet or by high-fat diet supplied with drinking water containing 10% alcohol.

In conclusion, AFEF has anti-hyperglycemic anti-hyperlipidemic effects. But, AFEF has no anti-obesity activity. The hypoglycemic mechanisms of AFEF are due to activation of AMPK to improve the resistance of glucose uptake into skeletal muscle in diabetic mice.

Keywords: *Anoectochilus formosanus*; anti-hyperglycemia; Streptozotocin; glucose transporter type 4; adenosine monophosphate kinase; hyperlipidemic high fat food

目錄

第一章 緒論	1
第一節：研究背景及目的	1
第二節：台灣金線連文獻考察	4
一、藥用植物基原考察	6
二、成分考察	9
三、藥理活性考察	10
第三節：代謝症候群與高血糖、高血脂及肥胖之關係	15
第二章 台灣金線連降血糖機轉之研究	22
第一節：研究材料與方法	23
第二節：研究結果	33
第三節：討論	37
第三章 台灣金線連對糖尿病高血脂之影響	56
第一節：研究材料與方法	57
第二節：研究結果	60
第三節：討論	63
第四章 台灣金線連對肥胖之影響	77
第一節：研究材料與方法	80

第二節：研究結果	83
第三節：討論	87
第五章 結論	106
參考文獻	108



表目錄

Table 2-1	Primer sequences of PCR amplification.	41
Table 2-2	Effect of AFEF on blood glucose in mice.	42
Table 2-3	Effect of AFEF on intraperitoneal glucose tolerance test in mice.	43
Table 2-4	Effect of AFEF on blood glucose in epinephrine-induced hyperglycemic mice.	44
Table 2-5	Effect of single dose administration of AFEF on fasting blood glucose in streptozotocin-induced hyperglycemic mice.	45
Table 2-6	Chronic effect of AFEF on fasting blood glucose in streptozotocin-induced hyperglycemic mice.	46
Table 2-7	Chronic effect of AFEF on intestinal activities of disaccharides enzymes in streptozotocin-induced hyperglycemic mice.	47
Table 4-1	Effect of AFEF on body weight in mice with high fat diet-induced obesity.	90
Table 4-2	Effect of AFEF on plasma triglycerides in mice with high fat diet-induced obesity.	91
Table 4-3	Effect of AFEF on plasma cholesterol in mice with high fat diet-induced obesity.	92
Table 4-4	Effect of AFEF on plasma AST and ALT activities in mice with high fat diet-induced obesity.	93
Table 4-5	Effect of AFEF on body weight in mice were fed a	

HFD supplemented with 10% alcohol.94

Table 4-6 Effect of AFEF on plasma triglycerides in mice were fed a HFD supplemented with 10% alcohol.....95

Table 4-7 AFEF on plasma cholesterol in mice were fed a HFD supplemented with 10% alcohol.96

Table 4-8 Effect of AFEF on plasma GOT and GPT activities in mice were fed a HFD supplemented with 10% alcohol. ..97



圖目錄

Fig. 1-1 臺灣金線連組織培養。.....	18
Fig. 1-2 臺灣金線連移植培養土培養。.....	19
Fig. 1-3 臺灣金線連穗狀花序。.....	20
Fig. 1-4 Metabolic pathways underlying metabolic syndrome.	21
Fig. 2-1 Chronic effect of AFEF on plasma triglycerides in streptozotocin-induced hyperglycemic mice.	48
Fig. 2-2 Chronic effect of AFEF on plasma cholesterol in streptozotocin-induced hyperglycemic mice.	49
Fig. 2-3 Chronic effect of AFEF on glycated hemoglobin in streptozotocin-induced hyperglycemic mice.	50
Fig. 2-4 Chronic effect of AFEF on liver triglycerides in streptozotocin-induced hyperglycemic mice.	51
Fig. 2-5 Chronic effect of AFEF on liver glycogen in streptozotocin-induced hyperglycemic mice.	52
Fig. 2-6 Chronic effect of AFEF on the GLUT4 protein expression in skeletal muscular in streptozotocin-induced hyperglycemic mice.	53
Fig. 2-7 Chronic effect of AFEF on the <i>AMPK</i> and <i>GLUT4</i> mRNA expression in skeletal muscular in streptozotocin-induced hyperglycemic mice. A, Fragments were amplified by RT-PCR. The expression levels of <i>AMPK</i> (B), and <i>GLUT4</i> (C) mRNA were measured and quantified densitometrically. Values were normalized to GAPDH mRNA expression.	54
Fig. 2-8 Chronic effect of AFEF on the <i>PEPCK</i> mRNA	

expression in liver in streptozotocin-induced hyperglycemic mice. A, Fragments were amplified by RT-PCR. The expression levels of *PEPCK* (B) mRNA were measured and quantified densitometrically. Values were normalized to GAPDH mRNA expression.55

Fig. 3-1 Effect of AFEF on blood glucose in STZ-induced hyperglycemia in mice were fed a high fat diet.66

Fig. 3-2 Effect of AFEF on glycated hemoglobin in STZ-induced hyperglycemia in mice were fed a high fat diet.67

Fig. 3-3 Effect of AFEF on urine volume for 24 hours in STZ-induced hyperglycemia in mice were fed a high fat diet.68

Fig 3-4 Effect of AFEF on urine creatinine for 24 hours in STZ-induced hyperglycemia in mice were fed a high fat diet.69

Fig. 3-5 Effect of AFEF on liver weight in STZ-induced hyperglycemia in mice were fed a high fat diet.70

Fig. 3-6 Effect of AFEF on epididymal fat weight in STZ-induced hyperglycemia in mice were fed a high fat diet.71

Fig. 3-7 Effect of AFEF on plasma triglycerides concentration in STZ-induced hyperglycemia in mice were fed a high fat diet.72

Fig. 3-8 Effect of AFEF on plasma cholestrol concentration in STZ-induced hyperglycemia in mice were fed a high fat diet.73

Fig. 3-9 Effect of AFEF on plasma low density lipoprotein concentration in STZ-induced hyperglycemia in mice were fed a high fat diet.74

Fig. 3-10 Effect of AFEF on plasma high density lipoprotein concentration in STZ-induced hyperglycemia in mice were fed a high fat diet.	75
Fig. 3-11 Glucose-accelerated atherosclerosis.	76
Fig. 4-1 Effect of AFEF on perinephic fat weight percentage (%) in mice with high fat diet-induced obesity.	98
Fig. 4-2 Effect of AFEF on epididymal fat weight percentage (%) in mice with high fat diet-induced obesity.	99
Fig. 4-3 Effect of AFEF on visceral fat weight percentage (%) in mice with high fat diet-induced obesity.	100
Fig. 4-4 Effect of AFEF on liver weight percentage (%) in mice with high fat diet-induced obesity.	101
Fig. 4-5 Effect of AFEF on perinephic fat weight percentage (%) in mice were fed a HFD supplemented with 10% alcohol.	102
Fig. 4-6 Effect of AFEF on epididymal fat weight percentage (%) in mice were fed a HFD supplemented with 10% alcohol.	103
Fig. 4-7 Effect of AFEF on visceral fat weight percentage (%) in mice were fed a HFD supplemented with 10% alcohol.	104
Fig. 4-8 Effect of AFEF on relative liver weight percentage (%) in mice were fed a HFD supplemented with 10% alcohol.	105

第一章 緒論

第一節 研究背景及目的

隨著醫療科技的進步，台灣人的壽命也逐漸延長，根據內政部 100 年初步估計，國人零歲的平均餘命分別為男性 76.0 歲，女性 82.7 歲，與 10 年前相較，男性增加 1.9 歲，女性增 2.7 歲⁽¹⁾。許多慢性疾病如肥胖、糖尿病、心血管疾病等慢性疾病發生率持續的增加。

行政院衛生署 100 年統計國人主要十大死因依序為⁽¹⁾：1. 惡性腫瘤佔 28.0%；2. 心臟疾病佔 10.9%；3. 腦血管疾病佔 7.1%；4. 糖尿病佔 6.0%；5. 肺炎佔 6.0%；6. 事故傷害佔 4.4%；7. 慢性下呼吸道疾病佔 3.9%；8. 慢性肝病及肝硬化佔 3.4%；9. 高血壓性疾病佔 3.0%；10. 腎炎、腎徵候群及腎性病變佔 2.9%，其中與代謝症候群 (metabolic syndrom) 所衍生之相關疾病如腦血管疾病、心臟病、糖尿病、高血壓等慢性疾病，皆居台灣十大死因榜中第 2、3、4、9 位，代謝症候群已經成為我國及世界之新興重要公共衛生議題。

代謝症候群是指數個與心血管疾病及第 2 型糖尿病有關的危險因子群聚之代謝異常現象，包括腹部肥胖、高血壓、高血糖、血脂異常合併胰島素阻抗等群集。近年來科技及醫療的發達，人口的老化，人民生活習慣多趨向於缺乏運動、高脂等不當飲食、肥胖等等因素導致

代謝症候群的發生率逐年增加。在衛生署統計發現肥胖男性已由過去 10 年的 33.4% 上升到 50.8%，男性在身體質量指數 (BMI) 超過 24 的比例達 50%，且在腰圍、高密度脂蛋白和三酸甘油脂等都有顯著惡化現象；而女性肥胖率則由 31.7% 上升到 36.9%，顯示肥胖人口越來越多是⁽²⁾，這是代謝症候群增加的一個主要原因。

代謝症候群形成的機制並未完全釐清，根據 Natali 及 Feeranini 兩人的研究，顯示胰島素阻抗 (insulin resistance) 是肥胖、高血糖、高血壓、及高血脂之間共同相連的因子⁽³⁾，胰島素阻抗使低密度脂蛋白 (Low-density lipoprotein; LDL) 轉化高密度脂蛋白 (High-density lipoprotein; HDL) 的脂蛋白脂酵素活性下降，結果造成 LDL 上升及 HDL 減少⁽⁴⁾，增高的 LDL 氧化容易造成動脈粥樣硬化，逐漸形成心血管疾病。HDL (其組成成分如 apolipoproteins 和磷脂質) 具有抗發炎、抗氧化、抗凝集及抗凝結等等作用，可以改善血管壁活性，減少動脈粥樣硬化的產生⁽⁵⁾。

產生的動脈粥樣硬化逐漸形成心血管疾病，以及胰島素阻抗逐漸形成糖尿病，兩者進一步交互作用，糖尿病造成更進一步高脂血症加速腦血管疾病、心臟病及高血壓的產生⁽⁶⁻⁷⁾。

先前研究顯示臺灣金線連水萃取物對正常飼料餵食的大鼠具有抗氧化作用、降高血糖及高血脂，在本論文中將以小鼠誘導糖尿病、

糖尿病合併高血脂及肥胖等動物模式探討，台灣金線連對心血管疾病之治療效果是否存在及可能作用機轉。



第二節 台灣金線連文獻考察

臺灣金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hayata) 為蘭科 (Orchidaceae) 金線連屬 (*Anoectochilus*) 之小型地生蘭，屬多年生藥用植物，全草皆可入藥，是民間極珍貴藥材。金線連屬植物全世界超過 35 種，印度、喜馬拉雅山脈、東南亞各國、印尼、新喀里多尼亞以及夏威夷一帶皆有分佈，臺灣金線連則為臺灣特有種。

台灣金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hayata) 及金線蓮 (*Anoectochilus roxburghii*) 長期做為金線蘭要用植物的來源《全國中草藥匯編》，它在民間使用範圍較廣，幾百年來作為民間常用草藥⁽⁸⁾。其功用如下所述：

一、藥性：

味甘，性平。

二、功能：

清熱涼血，除濕解毒，平衡陰陽、扶正固本，陰陽互補、生津養顏、調和氣血、五臟、養壽延年的功用。

三、歸經：

入腎、心、肺三經，能全面提高人體免疫力，增強人體對疾病的抵抗力。

四、主治：

肺熱咳嗽，肺結核咯血，尿血，小兒驚風，破傷風，腎炎水腫，風濕痺痛，跌打損傷，毒蛇咬傷、支氣管炎、膀胱炎、糖尿病、血尿、急慢性肝炎、風濕性關節炎腫瘤等疑難病症，也兼除青春痘

五、歷代醫書總結金線連驗方⁽⁹⁾如下所示：

1. 風氣膝痛：金線連 6 g，老母雞 1 隻，黃酒半斤沖燉服。
2. 風濕性關節炎：金線連 15-20 g，雞 1 隻，偏寒者加酒燉，偏熱者加水加冰糖，飲湯，渣外擦痛處《福建藥物志》。
3. 風濕性關節炎：金線連乾品 30 g，豬肉 120 g，燉熟，沖入黃酒適量，2 次服完《溫州地市中草藥臨床經驗交流資料》。
4. 咳嗽痰稠：金線連鮮品 30 g，冰糖 30 g，開水沖燉服，早晚 2 次服完《溫州地市中草藥臨床經驗交流資料》。
5. 肝火同癆：金線連鮮品 15 g，冬蜜 15 g，開水燉服。
6. 風溼性心臟病：金線連乾品 9 g，瘦肉 30 g，燉服。
7. 跌打損傷：金線連鮮品 30 g，紅糖 15 g，沖燉服，藥渣搗爛敷患處《福州市民間草藥》。
8. 肺癰、肺萎、咳血吐膿：金線連乾品 15 g，冬瓜糖 30 g，開水沖燉服。
9. 腎炎、膀胱炎：金線連 60 g，冰糖少許燉服。

10. 毒蛇咬傷：金線連鮮品 3-6g ，冷開水洗淨，搗爛開水送下，

另用鮮品搗爛外敷。

11. 小兒驚風：金線連 3g ，水煎服。

12. 糖尿病：金線連 3-9 g 水煎服。

一、藥用植物基原考察

1. 臺灣金線連之植物學分類

分類地位：

植物界 (Plantae)

被子植物門 (Angiospermae)

單子葉植物綱 (Monocotyledonae)

蘭目 (Orchidales)

蘭科 (Orchidaceae)

金線連屬 (*Anoectochilus*)

臺灣金線連 (*Anoectochilus formosanus*)

2. 台灣金線連屬植物考察

金線連屬植物全世界超過 35 種，印度、喜馬拉雅山脈、東南亞

各國、印尼、新喀里多尼亞以及夏威夷一帶皆有分佈，臺灣金線連則為臺灣特有種。臺灣金線連分布於臺灣全島海拔 500-1500 m左右的闊葉林床，北自台北縣的北插天山，新竹縣竹東，苗栗縣南庄、大湖，台中縣武陵農場、青山、谷關、白冷，南投縣仁愛鄉、蘆山、溪頭，嘉義縣吳鳳鄉，南至高雄縣旗山、扇平、阿卑縣，屏東縣霧台、來義、潮洲萬金庄、南仁山，東至台東縣中央山脈之水波、金山、太麻里、關山而至花蓮縣玉里、鳳林、太魯閣等陰濕身森林內皆可見其蹤跡⁽¹⁰⁾。

台灣自產金線連屬之植物有四種：

臺灣金線連(*Anoectochilus formosanus* Hayata)

單囊開唇蘭(*Anoectochilus inabai* Hayata)

高雄金線連(*Anoectochilus koshunensis* Hayata)

二囊開唇蘭(*Anoectochilus lanceolatus* Lindl)

「金線連」為臺灣重要的民間用藥，其基源植物以臺灣金線連為主，亦使用高雄金線連（恆春金線連），作生藥時兩者皆可採用，以臺灣金線連供鮮食較為普遍，目前可由組織培養大量繁殖(圖 1-1)。

3. 台灣金線連屬之形態及生長特性

臺灣金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hayata) 之植物形態株高 20 ~ 30 cm (圖 1-2)，花序高可達 14.5 ~ 26.5 cm，主根肥厚，長約 4 ~ 5 cm；不定根數平均為 3 ~ 4 條。莖圓筒狀，肉質，基部直徑 2.8 ~ 5.0 mm。葉分開互生於莖具平滑的金色或銀色線條，葉呈橢圓型或卵型，表面為暗綠色，葉背為紫紅色，葉長約 3-4 cm，葉寬約 2-3 cm，全株葉片數約 8 枚，成株則剩約 4 ~ 6 枚，先端尖銳，基部擴大呈圓形為鞘而抱垂。花數少，頂生有 3 ~ 4 朵之穗狀花序(圖 1-3)，花序柄紅褐色，有白色柔毛，柄上具 2 ~ 3 片披針形鞘狀苞。萼片數 3 個，微紅色，外密被柔毛，倒卵形長約 6 mm，寬約 5 mm，銳頭。上部萼片與二較少小花瓣形成兜狀，側生的萼片卵狀橢圓形，長約 9 mm，寬約 5 mm，唇瓣長伸，已相當特化，外形與花瓣迥異，基部有一短距長約 5 mm，距內有二腺體，唇瓣前端裂成 2 尖瓣，每片長約 6 mm，其中段爪部有細絲狀構造，兩邊各約 6 條，長短不一，外形很像梳子。花柱較短，柱頭 2 個，花藥帽卵形，花粉塊微黃色，粉質。每年約 9 月抽苔，10 ~ 11 月開花，未授粉的小花可持續到 12 月底才凋謝。

高雄金線連(*Anoectochilus koshunensis* Hayata) 另稱恒春金線連，其根莖葉等植株外部形態與臺灣金線連極為相似，兩者主要的差

別在於花數及唇瓣構造，臺灣金線連之花數較少而唇瓣爪部為深梳狀，距長約 5 mm。高雄金線連之花數較多，唇瓣爪部為非梳狀，距較長，約 1 cm。兩者其他的區別點在於高雄金線連之節數較多，節間較長，且莖徑較細，莖色紫紅，故顯的植株較高，株色較深。此外高雄金線連的葉片長及寬都較小。

二、 台灣金線連成分考察

台灣金線連全植株所含之營養成分約有脂質 2.7%、蛋白質 2.2%、醣類 6.4%、灰份 1.0%及粗纖維 0.7%；另外，每 100 公克乾物重中含有約 125 毫克的維生素 C；其餘像是鎂、鉀、鈉、磷及鈣含量約有 252、640、206、163 和 192 毫克，微量元素鐵、錳、鋅、銅也各含有 53、16、11 及 3 毫克⁽¹¹⁾。

台灣金線連成分目前被分離出的成分如下所示：

金線連糖苷 (kinsenocide) 及 nicoloxide 之化合物結構、3-glucosyloxy- γ -butyrolactone、3-glucosyloxy-4-isoproxybutyric acid、3-glucopyranosyloxy- γ -butyrolactone、 α -生育酚 (α -tocopherol) 與 β -生育酚 (β -tocopherol)、campesterol、stigmasterol、 β -sitosterol、isosrborinol、gastrodigenin；

p-hydroxybenzyl alcohol、槲皮素 (quercetin)、二氫槲皮素 (dihydroquercetin)、異鼠李素 (isorhamnetin)、等黃酮類成分及特殊的金線連酮 (kinsenone)、pheophytin a、linoleic acid、*trans*- β -carotene、8-hydroxycoumarin 及 1,2-di-2-furanyl-1,2-ethenediol 等成分。

三、藥理活性考察

1. 增強學習記憶力

高雄金線連可以純化出天麻素 [gastrodin；4-(β -d-glucopyranosyloxy)benzylalcohol]，江芙美等人⁽¹²⁾研究也顯示台灣金線連水萃物也含有相當量的天麻素及天麻元 (gastrodigenin；*p*-hydroxybenzyl alcohol)，鄭浩元等人研究也顯示台灣金線連水萃物確能減弱東莨菪鹼誘發的健忘作用，增強學習記憶的能力⁽¹³⁾。

2. 抗氧化作用

徐麗芬等⁽¹⁴⁾人的研究指出台灣金線連含有黃酮類成分及特殊的金線連酮 (kinsenone)，具有很強的抗氧化作用。

台灣金線連水萃物也被證實有很好的清除含氧自由基的作用以

及改善高血脂倉鼠低密度脂蛋白的氧化⁽¹⁵⁾，可以保護 HL-60 細胞株因 H₂O₂ 氧化造成的凋亡⁽¹⁶⁾。

3. 降高血糖及高血脂

金線連糖及其它相關的三個化合物有降高血糖及高血脂的作用⁽¹⁷⁻¹⁸⁾。

台灣金線連水萃取物也被證實對 streptozotocin 誘發的糖尿病大鼠有降低血糖、膽固醇及三酸甘油脂濃度⁽¹⁹⁾。

4. 保肝

台灣金線連水粗取物能降低四氯化碳及 acetaminophen 引起的大鼠急性肝炎⁽²⁰⁻²¹⁾，也能保護大鼠初代肝細胞對抗四氯化碳引起的損傷⁽²²⁾。

施純青等人的實驗也證實台灣金線連水萃取物能改善四氯化碳及二甲基亞硝胺 (dimethylnitrosamine) 所引起的慢性肝炎⁽²³⁾，促進二甲基亞硝胺肝損傷後的肝臟再生⁽²⁴⁾。

5. 免疫調節作用

曾金章等人研究顯示體外試驗，台灣金線連水萃取物能增強小鼠腹腔吞噬細胞的吞噬作用⁽²⁵⁾。蔣建興等人證實台灣金線連分離出中性與

酸性多醣區分，對人體週邊血液單核細胞均具有刺激產生腫瘤致死因子 (TNF- α) 與間白素-2 (IL-2) 的作用⁽²⁶⁾。張文潔等人研究顯示台灣金線連純化出免疫調節蛋白，能活化多種免疫細胞⁽²⁷⁾。

徐致芬等人研究也顯示，台灣金線連多醣分劃使其腹腔巨噬細胞的吞噬作用明顯上升，體外實驗也顯示該多醣分劃能活化 RAW264.7 巨噬細胞的吞噬作用及釋出 nitric oxide、間白素-2、 γ -干擾素等⁽²⁸⁾。

台灣金線連有效萃取物對卵蛋白誘發小鼠呼吸道過度反應之免疫調節作用可能會透過 CD25⁺/CD4⁺T 細胞作用的影響而達到免疫抑制的效果⁽²⁹⁾。

6. 對腸道益生菌的影響

曾金章等人⁽²⁵⁾及施純青等人⁽³⁰⁾的研究皆指出台灣金線連水草物可直接促進腸道乳酸桿菌數明顯增加。

7. 抗腫瘤

台灣金線連水草提取物可加速 MCF7 乳癌細胞凋亡⁽³¹⁾，可經由減少谷胱甘太的量而抑制肝癌細胞 HepG2 的生長⁽³²⁾，可以強烈抑制 CT-26 colon cancer cells 皮下移植到 BALB/c 小鼠的腫瘤活性⁽³³⁾。

8. 抗發炎及抗過敏

台灣金線連分離出 pheophytin a、linoleic acid、*trans*-β-carotene 三個有效成分對 n-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) 引發嗜中性白血球釋放 β-glucuronidase 和 lysozyme 的體外試驗和 compound 48/80 引發肥胖細胞釋放 β-glucuronidase 和 histamine 的體外試驗均有顯著抑制作用⁽³⁴⁾。

9. 對花生四烯酸 (Arachidonic acid) 的代謝影響

臺灣金線連分離出 8-hydroxycoumarin 及 1,2-di-2-furanyl-1,2-ethenediol 兩個能抑制血小板 thromboxane A₂ 產生⁽³⁵⁾。

臺灣金線連水萃取物有抑制血小板 thromboxane A₂ 產生及促進動脈內皮組織 prostaglandin I₂ 產生⁽³⁶⁾。

10. 抗病毒

詹前朕等人⁽³⁷⁾的研究指出臺灣金線連水萃取物能抑制 A 型流行性感冒病毒在細胞內的表現。

11. 改善骨質疏鬆

台灣金線連水萃取物對能減少去卵巢大鼠造成體重增加、以及第四腰椎骨質疏鬆及骨鈣含量的減少均有改善作用⁽³⁸⁾。

12. 金線連糖苷 (kinsenocide) 藥理作用

可由金線連屬 (*Anoectochilus*) 之台灣金線連 (*Anoectochilus formosanus*) 及金線連 (*Anoectochilus roxburghii*) 分離出產量最多之成分，目前研究被證實藥理作用如下所示：

1. 保肝作用⁽³⁹⁻⁴⁰⁾

(1). 經由抑制 Kupffer cells 活化而減少四氯化碳引起的肝損傷。

(2). 經由減少H₂O₂誘導小鼠肝細胞細胞毒性。

2. 抑制發炎反應作用⁽⁴¹⁾

抑制多醣內毒素引起巨噬細胞發炎反應及減少小鼠休克死亡。

3. 抑制脂肪沉積作用⁽²²⁾

(1). 抑制高脂肪誘導大鼠肥胖。

(2). 抑制 aurothioglucose誘導小鼠肥胖⁽⁴²⁾。

4. 降血糖作用⁽⁴³⁾

減少 streptozotocin 誘導大鼠糖尿病，改善脂肪代謝混亂。

第三節代謝症候群與高血糖、高血脂肪及肥胖之關係

一、代謝症候群定義：

代謝症候群是指數個與心血管疾病和第 2 型糖尿病有關的危險因子群集之代謝異常現象，可以預測罹患心血管疾病和 2 型糖尿病的發生機率。腹部的肥胖與胰島素阻抗 (insulin resistance) 是形成代謝症候群最主要的因素⁽⁴³⁻⁴⁵⁾，缺乏運動⁽⁴⁶⁾、老化⁽⁴⁷⁾、賀爾蒙失調如多囊性卵巢症候群⁽⁴⁸⁾及睪丸固酮分泌不足⁽⁴⁹⁾也是形成的原因。

代謝症候群的症狀最早是在 1923 年由 Kylin 提出高血壓，高血糖及痛風此 3 種疾病的群集為一種症候群，1988 年 Reaven 首次提出 X 症候群 (syndrome X)⁽⁵⁰⁾，此症候群為心血管疾病的危險因子的群集，包括高血壓、葡萄糖耐受不良、高三酸甘油脂血症、高胰島素血症，及低的高密度膽固醇濃度，並指出與胰島素阻抗有關，1998 年世界衛生組織 (WHO) 把此症候群正式命名為代謝症候群⁽⁵¹⁾。

二、代謝症候群重要性

代謝症候群的盛行率全球快速成長，在美國約有 40% 的成人到達 60 歲時會罹患代謝症候群⁽⁵²⁾，至少有四分之一的歐洲成人會罹患代謝症候群⁽⁵³⁻⁵⁵⁾，拉丁美洲的成人至少有四分之一會罹患代謝症候群⁽⁵⁶⁾，在亞洲國家如新加坡、中國、日本及韓國代謝症候群盛行率男性約 8%–13%，女性約 2%–18%⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾，在台灣大於 20 歲成年人代謝症候群盛行率約男性為 20.3%，女性為行率約 19.3%⁽⁶⁰⁾。

三、代謝症候群標準：

根據行政院衛生署國民健康局 2007 判定標準⁽⁶¹⁾：

成人（20 歲以上）代謝症候群為以下 5 項危險因子中，若包含 3 項或以上者可判定之，其判別標準如下所示：

1. 腹部肥胖：(腰圍:男性 ≥ 90 cm、女性 ≥ 80 cm)。
2. 高血壓：收縮血壓 (SBP) ≥ 130 mmHg/ 舒張血壓 (DBP) ≥ 85 mmHg。
3. 高血糖：空腹血糖值 (FG) ≥ 100 mg/dl。
4. 高密度酯蛋白膽固醇 (HDL-C)：男性 < 40 mg/dl、女性 < 50 mg/dl。
5. 高三酸甘油酯 (TG) ≥ 150 mg/dl。

四、代謝症候群與高血糖、高血脂及肥胖之關係：

1. 盛行率之關係

依據國民健康局 2002 年及 2007 年台灣地區高血壓、高血糖、高血脂之追蹤調查研究結果顯示，女性腰圍大於 80 公分比率由 28.1% 增為 41.9%；男性平腰圍大於 90 公分的比率由 27.7% 增為 36.6%。肥胖的腹部脂肪組織將會影響身體代謝，導致血液三酸甘油脂濃度、血糖升高，增加罹患心血管疾病和糖尿病的風險。

腹部肥胖的民眾，其未來罹患代謝症候群風險，將是一般人的 4 至 6 倍。另外在腹部肥胖者中，亦有 50% 機率會罹患代謝症候群，而代謝症候群的民眾未來罹患「糖尿病」、「高血壓」、「高血脂症」、「心臟病及腦中風」的機率，分別為一般人的 6 倍、4 倍、3 倍、2 倍⁽⁶²⁾。

2. 代謝症候群產生原因之相關

人體脂肪分為兩種：一是皮下脂肪較穩定，不會釋放游離脂肪酸，所以相對穩定，一是內臟脂肪，腹部肥胖者內臟脂肪較活躍，釋放出較多的游離脂肪酸。如圖 1-4 所示，脂肪組織易釋放游離脂肪酸及脂肪激素 (Adipokines)，脂肪激素形成易發炎狀態 (proinflammatory state)、易血栓狀態 (prothrombotic state)，游離脂肪酸增加在骨骼肌細胞中抑制胰島素作用造成胰島素阻抗 (insulin resistance ; IR) 以及提升血中葡萄糖濃度，長期高游離脂肪酸產生脂肪細胞毒性促使胰臟β細胞功能受損，以及經由糖質新生作用使肝中葡萄糖輸出量增加 (hepatic glucose output; HGO) 使血中葡萄糖更加上升，肥胖形成高血壓機轉尚未明確，肥胖形成易發炎狀態經由促使IR產生使預先有傾向產生前期糖尿病 (prediabetes)，肥胖會形成血漿中三酸甘油脂 (triglyceride; TG) 濃度上升及減少高密度脂蛋白 (High-density lipoprotein; HDL)，形成易發炎狀態及易血栓狀態 (prothrombotic state) 易造成動脈癥形成，逐漸產生心血管疾病⁽⁶³⁾。

五、代謝症候群治療：

1. 生活型態的改變

藉由飲食控制及運動減少體重治療代謝症候群，文獻顯示減少重量 7% 導致形成糖尿病的機率下降 58%⁽⁶⁴⁾。

2. 藥物治療以降低低密度脂蛋白 (Low-density lipoprotein; LDL) 為主要目標

臨床上常使用 Statins、Fibrates、Omega-3 Fatty Acids (Fish Oils) 及膽酸等降低 LDL 濃度，減少動脈癥的形成。



Fig 1-1. 臺灣金線連組織培養 (圖片取自 <http://ecaaser5.ecaa.ntu.edu.tw/weifang/lab551/plant1.htm>)。



Fig 1-2. 臺灣金線連移植培養土培養(圖片取自
<http://www.inks.com.tw/html/front/bin/partprint.phtml?Part=vivi990311-01&Category=&Style=3>)



Fig 1-3. 臺灣金線連穗狀花序 (圖片取自 <http://www.afa.gov.tw/Forward.asp?tableName=Publish&CatID=2859&NewsID=>)

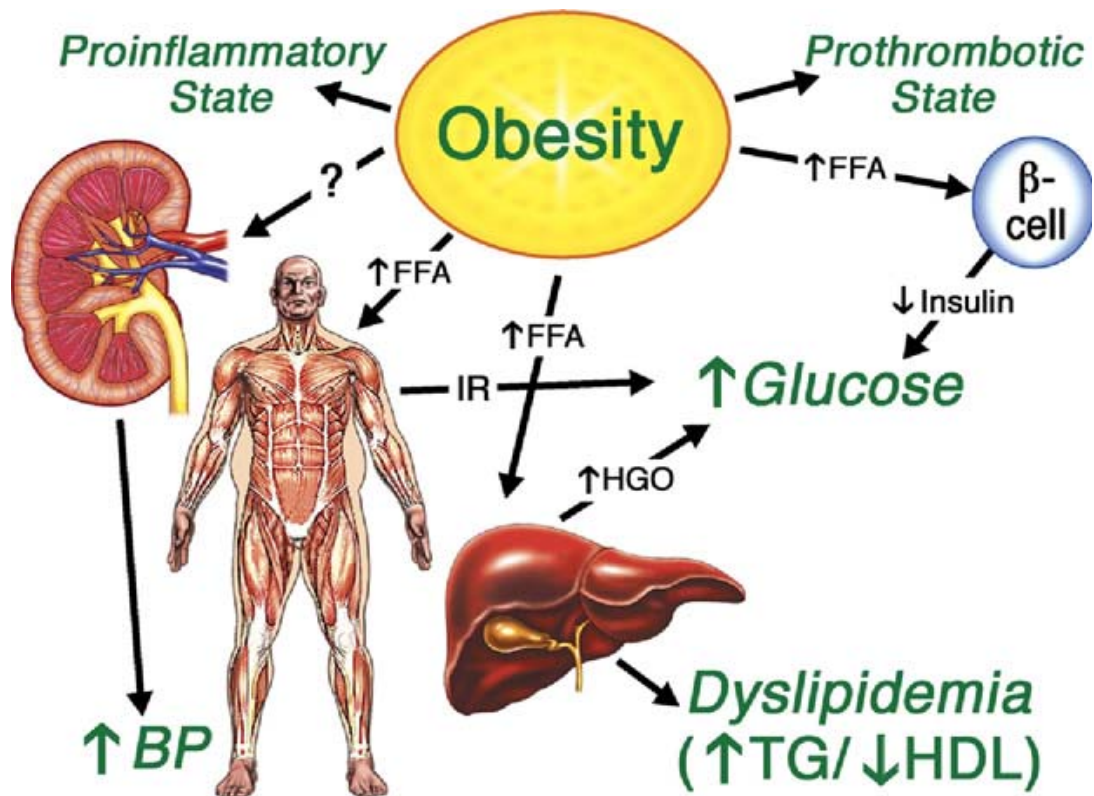


Fig 1-4 Metabolic pathways underlying metabolic syndrome⁽⁶³⁾.

第二章 台灣金線連降血糖機轉之研究

前言

糖尿病分為 2 型，胰島素缺乏 (insulin-dependent) 及胰島素阻抗 (insulin-resistance)，第 1 型 (type1) 形成原因複雜，其中可能牽涉環境、基因遺傳及自體免疫等引起 T 細胞調節發炎的因素所形成⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾。胰島素缺乏主要特徵為胰臟蘭氏小島 β 細胞壞死、單核細胞浸潤之發炎，產生的原因與遺傳學的傾向、男性增加易感受性及抗胰臟內分泌細胞免疫調節這些因素有關⁽⁶⁸⁾。

第 1 型 (type1) 糖尿病因 β 細胞被完全破壞造成胰島素缺乏，無法抑制脂肪分解⁽⁶⁹⁾、增加肝醣輸出⁽⁷⁰⁾及減少骨骼肌肉利用血糖⁽⁷¹⁾，結果造成高血糖。誘導糖尿病動物模式中，腹腔多次注射低劑量 streptozotocin (STZ) 誘導小鼠胰臟引起免疫性發炎 (pancreatic insulinitis)，其病理特徵相似於人類第 1 型 (type1) 糖尿病⁽⁷²⁻⁷⁴⁾。

台灣金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hyata) (plant family: Orchidaceae) 是台灣昂貴的原物種生藥，被稱為藥王，具有多種藥效：如治療骨質疏鬆⁽⁷⁵⁾、抗肥胖⁽⁴²⁾、抗疲勞⁽⁷⁶⁾及保肝作用等等，目前在台灣已經成功以組織培養、大量繁殖，並且成功推廣成高經濟農

作物。先前研究已經證實台灣金線連水萃取物 (AFE) 具有降血糖效果，但是降血糖機轉尚未明瞭，因此本篇研究目的在於進一步探討台灣金線水萃取物進一步分層的有效分劃 (AFEF) 對以低劑量多次投與小鼠 streptozotocin 誘導糖尿病降血糖作用是否仍在，以及探討可能的降血糖機轉。

第一節 研究材料與方法

一、試藥與儀器

1. Roche: triglyceride, cholesterol, Glycated hemoglobin。
2. Sigma: streptozotocin, KOH, Na₂SO₄, glucose, lactose, sucrose, galactose, triton 100, sodium dodecyl sulfate(SDS) , chloroform, isopropanol, tri base, bradford reagent, heparin, bovine serum albumin。
3. Wako : methanol。
4. Novo : NovoRapid®, NovoMix®50。
5. 中國化學製藥 : Epinephrine。
6. 福壽公司 : 正常飼料。
7. Panreac : Absolute alcohol。
8. Invitrogen : trizol。

9. Fermentas : MMLV RT 套組 , PCR Master 套組 , Ethidium Bromide 。
10. Promega : Agarose gel 。
11. Perkin Elmer : 冷光試劑 。
12. Intron : 蛋白質萃取試劑 。
13. Amersco : 40% Acrylamide/bis-acrylamide (37.5:1) , Ammonium persulfate (APS) , N,N,N',N'-tetramethylenediamine (TEMED) 。
14. Santa-Cruz : anti-GLUT4 antibodies, Goat anti-Rabbit IgG 。
15. 血糖機 (model 1500: SideKick Analyzer: YSI, Tellow Spring, OH, USA) 。
16. 自動生化分析儀器 (Cobas Mira; Roche) 。
17. 酸鹼度計 (TOA pH Meter HM-5S) 。
18. PCR system 9700 (Applied Biosystem) 。
19. 離心機 (KUBOTA 3500) 。
20. Spectrophotometer (Hitachi) 。
21. 影像分析軟體 Western blotting detection system (ECL Plus, Amersham) 。
22. 影像分析軟體分析 (Alpha Digi Doc 1201) 。

二、台灣金線連水萃取物有效分劃製備過程 (AFEF)

台灣金線連購自埔里有容農場栽培種，基原經由中國醫藥大學中國藥學暨中藥資源學系確認，樣品以編號 CMCP 1253 保存。新鮮整株台灣金線連以水煎煮萃取濃縮後，以乙酸乙酯 (ethyl acetate) 分層後取水層，去除乙酸乙酯層，所得即為台灣金線連粗抽出物的有效分劃 (AFEF)，經過減壓濃縮後可得到濃縮浸膏劑。台灣金線連鮮品 1 kg 乾燥後剩 90 g，AFEF 產率為鮮品 2%⁽⁷⁷⁾，即得乾燥重量為 20 g，金線蓮糖苷 (kingsenoside) 經由 HPLC 測得含量為 180 mg/g (AFEF 乾燥重量)。

三、動物

購自於財團法人國家實驗研究院實驗動物中心雄性小黑鼠 (C57BL/6J) 10 週大，體重 24-26 g，飼養於溫度維持 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相對濕度 45 - 65% 和半日照環境中，自由飲水及進食標準飼料，小鼠分組每組 6-8 隻。

四、AFEF 對正常小鼠血糖之影響

小鼠分為後，控制組給予去離子水，實驗組分別口服給予 AFEF 0.5、1.0 及 1.5 g/kg，及正對照藥胰島素組 (皮下注射 1U/kg，NovoRapid®)。投藥後第 0，1，2，3，4 小時由眼眶靜脈採血，測

定血糖值。全血使用血糖機 (model 1500: SideKick Analyzer: YSI, Tellow Spring, OH, USA) 以葡萄糖氧化酵素方法測定血糖濃度。

五、AFEF 對正常小鼠腹腔注射葡萄糖耐受性測試

實驗前小鼠先禁食 4 小時，控制組給予去離子水，實驗組分別口服給予 AFEF 0.5、1.0 及 1.5 g/kg，及正對照藥胰島素組(皮下注射 1U/kg, NovoRapid®)。藥物投與後 30 分鐘，腹腔注射葡萄糖溶液 (2 g/kg)。於葡萄糖溶液注射後第 0、60、90、120、180 分鐘由眼眶靜脈採血，測定血糖值。

六、AFEF 對正腎上腺素 (epinephrine) 誘導小鼠高血糖之影響

小鼠分組後，控制組給予去離子水，實驗組分別口服給予 AFEF 0.5、1.0 及 1.5 g/kg，及正對照藥胰島素組(皮下注射 1U/kg, NovoRapid®)。投藥後第 30 分鐘腹腔注射 epinephrine 溶液 (1 mg/kg)，epinephrine 注射後第 0、1、2 小時由眼眶靜脈採血，測定血糖值。

七、糖尿病誘導

小鼠連續 5 天腹腔注射 STZ 40 mg/kg 誘導小鼠糖尿病⁽⁷²⁾，腹腔注射前，先將 STZ 溶解於 50 mM 檸檬酸鈉緩衝液中 (pH 4.0)，

所製備溶液須在 5 分鐘內注射完畢，小鼠誘導 1 週後血糖過低者須追加 2 劑，誘導 3 週後由小鼠眼眶採血，測定空腹血糖值。糖尿病小鼠標準須達到空腹血糖大於 200 mg/dl 以上。

1. AFEF 對 STZ 誘導糖尿病小鼠血糖之急性影響

糖尿病小鼠分組後，分別給予去離子水、AFEF 0.5、1.0 及 1.5 g/kg 及對照藥物(皮下注射胰島素 3U/kg, NovoRapid®)。於投藥後第 0、60、90、120、180、240 分鐘由眼眶採血，測定血糖值。

2. AFEF 對 STZ 誘導糖尿病小鼠血糖之影響

糖尿病小鼠分組後，分別給予去離子水、AFEF 0.5、1.0 及 1.5 g/kg 及對照藥物(皮下注射胰島素 5U/kg, NovoMix®50)。每天 1 次為期 6 週。6 週後小鼠在乙醚麻醉下由腹腔靜脈採血(加入抗凝血劑)，取出肝，小腸，後腿冰凍保存，供進一步分析。

3. 血漿中三酸甘油脂 (triglyceride) 及膽固醇 (cholesterol) 及糖化血紅素 (HbA1c)

全血離心 10 分鐘 (2100g, 4°C) 後，取上層液，使用自動生化分析儀器 (Cobas Mira; Roche) 以市售試劑 (Roche Diagnostics) 測定三酸甘油脂及總膽固醇。沉澱之血球加入生理食水混合、離心後，去除上清液，重複 3 次後將血球稀釋以市售試劑組 (Sigma Diagnostics)

測定糖化血紅素。

4. 肝中三酸甘油脂及肝醣之測定

肝臟均質後測定肝中三酸甘油脂及肝醣含量。肝中三酸甘油脂含量以 Nassir 等人方法測定⁽⁷⁸⁾，先將肝臟加入有機溶劑 chloroform-methanol (2:1) 後，以均質機均質、萃取後，以氮氣吹乾，乾燥物再溶解於異丙醇 (isopropanol)，以市售三酸甘油脂測定試劑 (Roche)，使用自動生化分析儀器測定。肝醣以 Lo 等人方法測定⁽⁷⁹⁾，先將均漿加入 30% KOH 以 Na_2SO_4 飽和，煮沸 30 分鐘時間分解均漿，冷卻後再加入乙醇沉澱，沉澱物加入硫酸水解肝醣，分解的葡萄糖以分光光度計儀器測量。

5. 小腸雙糖酵素測定

以 Messer 和 Dahlqvist 的方法加以修飾後測定小腸乳糖、蔗糖及半乳糖分解酵素活性⁽⁸⁰⁾。先將小腸黏膜均漿，分別加入乳糖、蔗糖及半乳糖於 37°C 靜置 30 分鐘，分解的葡萄糖以血糖機器測定。小腸蛋白質以 Lowry 等人的方法測定⁽⁸¹⁾。

6. 西方墨點分析骨骼肌肉葡萄糖轉運蛋白第 4 型 (glucose transporter type 4; GLUT4) 之蛋白質含量

骨骼肌肉 GLUT4 蛋白質的表現以西方墨點法分析⁽⁸²⁻⁸³⁾，其步驟如下所示：

(1). 蛋白質萃取

液態氮冰凍的組織 0.1 克 加入蛋白質萃取試劑後，將組織均質後，置於冰上 30 分鐘，離心 1 小時 (38,000 rpm, 4°C) 後，取上清液即可。

(2). 蛋白質定量

以胎牛血清蛋白質為標準品，稀釋為 0，5，10，25，50，100 µg/ml，加入 200 µl Bradford 試劑，以波長 595 nm 測定吸光值，求出標準曲線 (standard curve)，蛋白質樣品以此檢量線計算濃度，並乘以稀釋倍數，以求得實際蛋白質濃度。

(3). 變性電泳 (SDS-PAGE)

組成 (2 片膠量)	下膠層 (12.5% Separation gel)	上膠層 (5% Stacking gel)
DDW	2.15 ml	3.65 ml
1.5M Tris (pH=8.8)	2.1 ml	-
0.5M Tris (pH=6.8)	-	625 µl
10% SDS	3.125 ml	625 µl

40% Acrylamide/Bis (39:1)	75 μ l	50 μ l
10% Ammonium Persulfate(APS)	37.5 μ l	50 μ l
TEMED	37.5 μ l	5 μ l

上下 2 片膠體鑄好後，將樣品與樣品緩衝液混合總體積 10 μ l，上層蛋白質 (40 μ g/10 μ l)，100°C 加熱 5 分鐘後，待冷卻，即可將樣品注入樣品槽中，以 150 伏特 (V) 跑 1 小時。

(4). 轉漬 (transfer)

將海綿及 3M 濾紙在轉漬緩衝液內浸濕，PVDF 轉漬膜以甲醇潤濕 15 秒，再浸泡於轉漬緩衝液，依序放上海綿、濾紙、膠片、PVDF 轉漬膜、濾紙、海綿組成類似三明治結構，小心去除氣泡，放入轉漬夾，以 50 伏特，300 mA，1 小時為條件，進行蛋白質轉漬。

將轉漬膜浸泡於 5% 脫脂奶(溶於 0.1% tween 20/TBS 緩衝溶液) 室溫 1 小時進行阻斷非特異性反應步驟，以 0.1% tween 20/TBS 緩衝液清洗 5 分鐘，重複 3 次，取封口袋放入 2 ml 脫脂奶(溶於 0.1% tween 20/TBS 緩衝溶液) 加入 anti-GLUT4 抗體培養隔夜 (4°C)，以 0.1% 0.1% tween 20/TBS 緩衝液清洗 5 分鐘，重複 3

次，取封口袋放入 2 ml 脫脂奶(溶於 0.1% tween 20/TBS 緩衝溶液) 加入 Goat anti-Rabbit IgG 加入培養 1 小時 (37°C) ，以 0.1% 0.1% tween 20/TBS 緩衝液清洗 5 分鐘，重複 3 次，以 TBS 緩衝液清洗 5 分鐘後進行壓片，以柯達底片感光，之後放進顯影劑顯影，清水沖洗 1 分鐘，放入定影劑 3 分鐘，清水沖洗後底片晾乾，以影像分析軟體 Western blotting detection system (ECL Plus, Amersham)測量，然後以NIH image program 定量強度大小。

7、反轉錄聚合酵素鏈鎖反應 (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 分析

肝中及骨骼肌肉中 mRNA 以 acid guanidum thiocyanate -phenol -chloroform⁽⁸⁴⁾ 萃取方式分離，其步驟如下所示：

(1). 肝中及骨骼肌肉中 mRNA 萃取

取液態氮冰凍的肝中及骨骼肌肉組織 0.1克 加入 1 mL trizol 試劑，將組織均質後，離心 (3700g、4°C) 10 分鐘後，取上清液加入 0.2 ml 氯仿 (chloroform) 劇烈震盪 15 秒後，靜置冰上 3 分鐘，離心 15 分鐘 (14700g、4°C) 後取上清液加入異丙醇 (isopropanol) 混合後靜置冰上 10 分鐘使 RNA 沉澱，再離心 10 分鐘後 (14700g、4°C) 留下沉澱物加入 75%酒精，靜置冰箱 30 分鐘(負

30°C) ，離心 5 分鐘後 (9100g, 4°C) 倒掉上清液，加入適量 DEPC 水將 RNA 溶解，於波長 260nm 測定吸光值，計算 RNA 濃度。

(2). 合成 cDNA

cDNA 的製備主要是採用 MMLV reverse transcriptase (first strand cDNA synthesis) ，使用 MMLV RT 套組， AMPK, GLUT4 及 PEPCK 的引子配對參照 Manoucheri *et al* 的設計⁽⁸⁵⁾。取 1 µg mRNA 加入 1 µl the primer pairs ，10µl DEPC 水，再加入 4 µl 5X MMLV RT 緩衝液、2 µl MMLV RT、2 µl 10 mM dNTP，混合後於 37°C 反應 60 分鐘。

(3). 聚合酵素鍊鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

利用 PCR Master Mix 套組，將特定 cDNA 量化，取去離子水 9.5 µl、PCR Master Mix 12.5 µl、1 µl 10 mM 引子 (primer)、1 µl cDNA，反應過程為 5 分 at 95°C、30 sec at 95°C, 30 sec at 55°C and 30 sec at 72°C for 32 cycles in a Perkin Elmer 9700 Gene Amp PCR system.

(4). 確認DNA結果

取 5 µL cDNA 產物 加入 1 µl 6x DNA loading dye，以混合

Ethidium Bromide 的 2% 洋菜膠 (Agarose gel)，50 伏特、50 分鐘跑膠，結束後在暗箱以紫外線照射及攝影，以影像分析軟體分析 (Alpha Digi Doc 1201)，每一樣品基因表現均會以 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA 表現強度作對比，比值為目標基因/GAPDH，再以控制組表現為基準值，分析組別之間的表現差異。

8. 統計分析(Statistical analysis)

數據結果以平均值(mean) ± 標準偏差 (standard deviation, SD) 表示，使用單尾變異數分析 (one-way analysis of variance) 及 Dunnett 測試， $p < 0.05$ 表示在統計學上具有顯著差異。

第二節 研究結果

一、AFEF 對正常小鼠血糖之影響

如表 2-2 所示，口服 AFEF 0.5、1.0 及 1.5 g/kg body weight 對小鼠血糖值沒有影響，但胰島素 (1 U/kg body weight) 皮下注射後第 1、2、3、4 小時明顯使血糖濃度下降 ($p < 0.05$)。

二、AFEF 對正常小鼠腹腔注射葡萄糖耐受性測試

如表 2-3 所示，控制組小鼠注射葡萄糖溶液後 30 分鐘血糖明顯上升，然後逐漸下降。給予 AFEF (1.0 及 1.5 g/kg body weight) 及胰島素 (1 U/kg body weight) 能降低血糖濃度之上升，且持續至 120 分鐘，降糖效果以胰島素最強。

三、AFEF 對 Epinephrine 誘導小鼠高血糖之影響

結果如表 2-4 所示，控制組小鼠腹腔注射 epinephrine 後 1 小時血糖升高至 336.8 ± 13.6 mg/dl，口服 AFEF 0.5、1.0 及 1.5 g/kg body weight 無法將升高的血糖下降，但胰島素 (1U/kg body weight) 可以明顯減少 epinephrine 誘導的高血糖至 47.5 ± 14.6 mg/dl ($p < 0.01$)。

四、AFEF 對 STZ 誘導糖尿病小鼠血糖之影響

1. AFEF 對 STZ 誘導糖尿病小鼠血糖之急性影響

如表 2-5 所示，STZ + H₂O 組小鼠血糖上升至 285.1 ± 24.5 mg/dl，單次投與 AFEF 1.0 及 1.5 g/kg body weight 後的第 1 小時及 2 小時可以明顯降低糖尿病小鼠血糖濃度，對照組胰島素 (3 U/kg body weight) 單次皮下注射後第 0、1、2、3、4 小時皆可以明顯降低糖尿病小鼠血糖。降血糖效果以胰島素最強。

2. AFEF 對 STZ 誘導糖尿病小鼠血糖之慢性影響

(1). 血糖

結果如表 2-6 所示，STZ + H₂O 組小鼠血糖明顯上升，長期投與 AFEF 1.0 及 1.5 g/kg body weight 及胰島素 5 U/kg body weight，在第 7、14、28、42 天測量空腹血糖，皆明顯降低糖尿病小鼠的血糖，而降糖效果仍以胰島素最強。

(2). 血漿中三酸甘油酯及膽固醇及糖化血紅素

STZ 誘導糖尿病小鼠三酸甘油酯 (圖 2-1)、膽固醇 (圖 2-2) 及糖化血紅素 (圖 2-3) 明顯上升，長期投與 AFEF 1.0 及 1.5 g/kg body weight 及胰島素 5U/kg body weight 可以明顯降低糖尿病小鼠糖化血紅素及三酸甘油酯濃度。AFEF 1.0 及 1.5 g/kg body weight 可以明顯降低糖尿病小鼠血漿中膽固醇濃度，但是胰島素 5 U/kg body weight 對糖尿病小鼠升高血漿中膽固醇濃度則無影響。上述結果顯示 AFEF 1.0 及 1.5 g/kg body weight 降低糖尿病小鼠血漿中三酸甘油酯及膽固醇的強度大於胰島素 5 U/kg body weight。

(3). 肝中三酸甘油酯及肝醣含量

如圖 2-4 所示，STZ 誘導糖尿病小鼠肝臟中三酸甘油酯濃度比控制組小鼠低，長期投與 AFEF 1.5 g/kg body weight 肝臟中三酸甘

油脂濃度並無明顯回復作用。長期投與胰島素 5 U/kg body weight，肝臟中三酸甘油酯含量明顯回復。

如圖 2-5 所示，STZ 誘導糖尿病小鼠肝臟中肝糖含量與控制組比較沒有差異，長期投與 AFEF 1.0 及 1.5 g/kg body weight，肝臟中肝糖含量明顯更低於糖尿病小鼠肝臟中肝糖含量。長期投與胰島素 5 U/kg body weight 肝臟中肝糖含量明顯較糖尿病小鼠肝臟中肝糖含量高。上述結果顯示 AFEF 與胰島素降血糖效果於肝臟的作用並不相同。

(4). 小腸雙糖酵素

結果如表 2-7 所示，小腸乳糖、蔗糖及半乳糖分解酵素在控制組及糖尿病組並無差異性。投與 AFEF 或胰島素與糖尿病小鼠並無統計上差別

(5). 骨骼肌 GLUT4 蛋白之表現

如圖 2-6 所示，STZ 誘導糖尿病小鼠骨骼肌中 GLUT4 蛋白表現量明顯較控制組低，長期投與 AFEF (0.5, 1.0, 及 1.5 g/kg body weight) 及胰島素明顯增加糖尿病小鼠骨骼肌中 GLUT4 蛋白表現量。

(6). 骨骼肌 AMPK 及 GLUT4 及肝臟 PEPCK mRNA 的表現

如圖 2-7 所示，糖尿病小鼠骨骼肌中 AMPK/GAPDH、GLUT4/GAPDH 比值比控制組低。長期投與 AFEF 1.5 g/kg body weight 及胰島素明顯增加糖尿病小鼠 AMPK 及 GLUT4 mRNA 的表現量。

如圖 2-8 所示，糖尿病小鼠肝臟中 PEPCK /GAPDH 比值和控制組比較沒有差異，長期投與 AFEF 1.5 g/kg body weight 能夠增加糖尿病小鼠 PEPCK mRNA 表現量，胰島素則無此效果。

第三節 討論

本篇研究顯示口服投與 AFEF 不會影響正常小鼠血糖，而胰島素對正常小鼠降血糖效果明顯。腹腔葡萄糖耐受性試驗中，單一劑量 AFEF 及胰島素投與可以減少葡萄糖誘導之血糖上升，同樣也可以減少 STZ 誘導糖尿病空腹高血糖。長時間投與 AFEF 可以減少糖尿病小鼠升高的血糖、三酸甘油酯、膽固醇、及糖化血紅素。長時間投與胰島素可減少糖尿病小鼠升高的血糖，糖化血紅素，三酸甘油酯，但是無法減少升高的膽固醇，這些結果顯示 AFEF 對糖尿病小鼠具有降血糖作用，但是藥效強度遠小於胰島素。

第 1 型糖尿病中有 3 個主要降血糖機轉，其分別為 (1). 延緩小腸葡萄糖吸收，(2). 減少肝糖輸出量，或是 (3). 促進骨骼肌利用葡萄糖。延緩小腸葡萄糖吸收的藥物如 α -glucosidase，抑制酵素可以延緩碳水化合物分解成葡萄糖而減低飯後血糖的上升；Acarbose 抑制胰臟及唾液腺 α -amylase 及 disaccharidases 活性阻礙碳水化合物分解成葡萄糖而減低飯後血糖的急遽上升⁽⁸⁶⁾。投與 AFEF，在糖尿病小鼠小腸三種雙糖酵素 (sucrase, lactase 及 galactase activity) 並未受影響。

不論在胰島素缺乏及胰島素阻抗的糖尿病⁽⁸⁷⁾，肝臟葡萄糖的產生主要是造成糖尿病高血糖最重要的因素，糖質新生及肝糖分解是肝臟葡萄糖的產生主要的來源，荷爾蒙如 Glucagon、catecholamines (epinephrine and norepinephrine)、cortisol 及 growth hormone 均能刺激肝糖分解及糖質新生作用使肝臟葡萄糖產量增加⁽⁸⁸⁻⁸⁹⁾，PEPCK 是肝中糖質新生作用控制速率的重要酵素⁽⁹⁰⁾，PEPCK 基因的轉錄可受 glucagon (via cAMP) 及 glucocorticoids 刺激增加，受到胰島素抑制，在一定的條件下葡萄糖也可減少 PEPCK 基因表現。

口服 AFEF 1.5 g/kg body weight 並不影響 epinephrine 誘導正常小鼠上升的血糖。在 STZ 誘導的糖尿病小鼠，長期投與 AFEF 1.5

g/kg body weight 明顯減少肝糖含量及有意義增加肝中 PEPCK mRNA 表現量,些結果顯示 AFEF 不會影響糖尿病小鼠肝臟中葡萄糖產生,但是胰島素減少 epinephrine 誘導正常病小鼠上升的血糖及回復肝糖的減少,並且不增加肝中 PEPCK mRNA 表現量,這些結果顯示 AFEF 對肝臟中降血糖機轉不同於胰島素。

葡萄糖由血中運送至骨骼肌細胞中依賴 GLUT4 在細胞膜上產生的運糖作用,不論在胰島素缺乏及胰島素阻抗的骨骼肌中有 2 種訊息機轉導致 GLUT4⁽⁹¹⁾ 由細胞質胞器中轉移到細胞膜上,(1). 與胰島素無關的路徑是活化 AMPK, 促進細胞質中的 GLUT4 胞器轉移到細胞膜而增加葡萄糖被吸收 (uptake)⁽⁹²⁾, (2). 則是藉由 phosphorylating histone deacetylase 使 GLUT4 基因表現增加⁽⁹³⁻⁹⁴⁾, 此兩種方式皆可以增加細胞膜上 GLUT4 的量,進而增加葡萄糖由血中運送至骨骼肌細胞中的量。長期投與 AFEF (0.5, 1.0, 及 1.5 g/kg body weight) 及胰島素明顯增加糖尿病小鼠骨骼肌中 GLUT4 蛋白表現量,長期投與 AFEF 1.5 g/kg body weight 及胰島素明顯增加糖尿病小鼠 AMPK 及 GLUT4 mRNA 的表現量,結果顯示 AFEF 降血糖機轉主要在促進骨骼肌利用葡萄糖。

結論, AFEF 呈現明顯降血糖效果,其機轉不同於胰島素作用。AFEF 明顯增加糖尿病小鼠調降 GLUT4 和 AMPK 基因表現量,

顯示降血糖機轉可能是經由活化骨骼肌中 GLUT4 和 AMPK 基因表現途徑達成降血糖作用。



Table 2-1. Primer sequences of PCR amplification.

mRNA		Primer sequences	Length (bp)
GLUT4:	Sense	5' ACC CTG GGC TCT GTA TCCC 3'	202
GLUT4	Antisense	5' GGT TCG TCA TTG AGC GAG GAG 3'	
PEPCK:	Sense	5' GTC TAT GAA GCC CTC AGC T 3'	127
PEPCK:	Antisense	5' AAG AAG GGT CGC ATG GCAA 3'	
AMPK:	Sense	5' ATT GAA ATC ACC GAA AAC AC 3'	266
AMPK:	Antisense	5'CCT AAC AGC TGC TGA AGT TT 3'	
GAPDH:	Sense	5'TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA3'	76
GAPDH:	Antisense	5' CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA 3'	

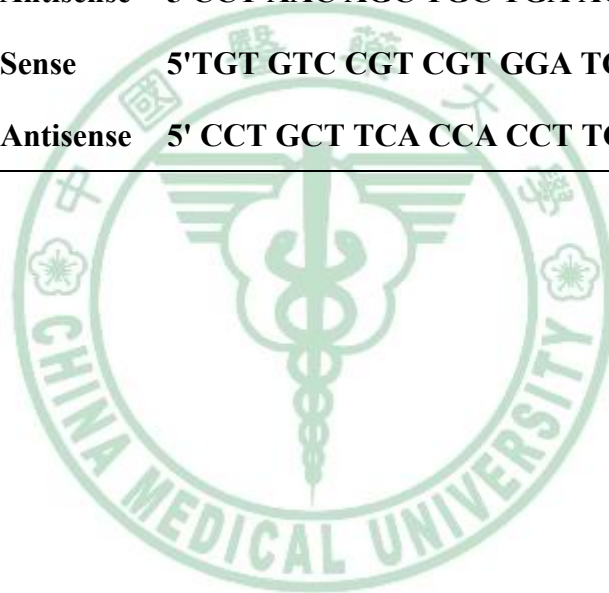


Table 2-2. Effect of AFEF on blood glucose in mice

Treatment	Dose	Blood glucose (mg/dl)				
		0 hr.	1 hrs.	2 hrs.	3 hrs.	4 hrs.
Control		109±7	118±12	122±14	109±13	110±5
AFEF	0.5 g/kg	111±12	125±7	124±13	104±11	103±12
	1.0 g/kg	105±5	115±6	1174±15	107±10	99±10
	1.5 g/kg	111±19	111±13	102±6	107±10	97±6
Insulin	1 U/kg	109±14	50±8**	70±12*	85±2**	83±8**

All values are means ± S.D. (N=6). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared with the control group.



Table 2-3. Effect of AFEF on intraperitoneal glucose tolerance test in mice

Treatment	Dose	Blood glucose (mg/dl)					
		0 min.	30 mins.	60 mins.	90 mins.	120 mins.	180 mins.
Control		123±11	284±49	265±31	222±29	213±13	164±7
AFEF	0.5 g/kg	124±7	276±2	247±21	231±12	191±26	162±118
	1.0 g/kg	123±13	164±45**	152±14**	164±17**	164±14**	144±17
	1.5 g/kg	121±4	202±49.3*	176±15**	173±8**	179±15*	149±9
Insulin	1 U/kg	127±9	56±7***	67±10***	94±15***	123±9***	144±19

All values are means ± S.D. (N=6). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ as compared with the control group.

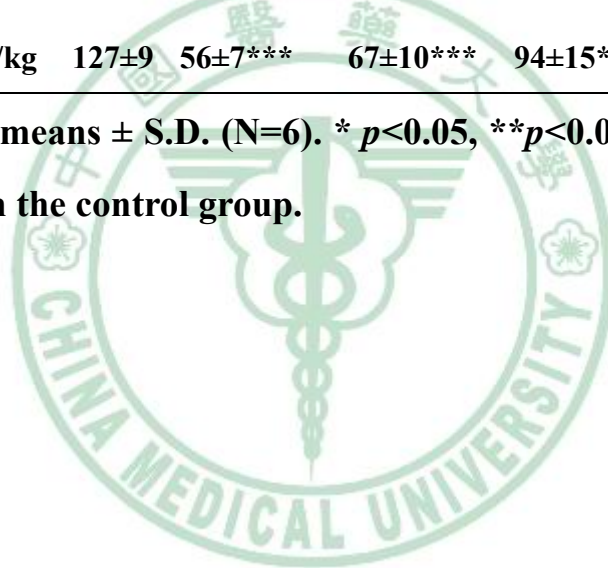


Table 2-4. Effect of AFEF on blood glucose in epinephrine-induced hyperglycemic mice

Treatment	Dose	Blood glucose (mg/dl)		
		0 hr.	1 hrs.	2 hrs.
EPI + H ₂ O		115±11	337±14	190±29
EPI+AFEF	0.5 g/kg	116±17	353±74	212±87
	1.0 g/kg	113±11	330±17	180±30
	1.5 g/kg	115±68	341±58	219±10
EPI+ Insulin	1 U/kg	130±28	48±15**	89±39**

All values are means ± S.D. (N=6). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the EPI + H₂O group.

EPI: epinephrine

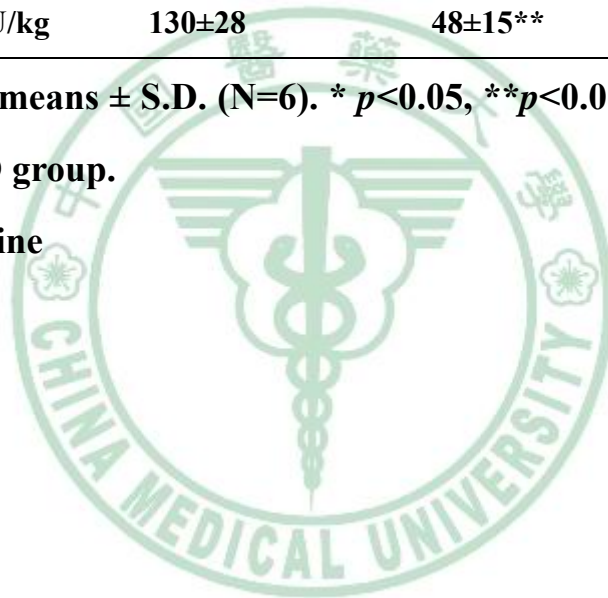


Table 2-5. Effect of single dose administration of AFEF on fasting blood glucose in streptozotocin-induced hyperglycemic mice

Treatment	Dose	Blood glucose (mg/dl)				
		0 hr.	1 hrs.	2 hrs.	3 hrs.	4 hrs.
STZ + H ₂ O		285±25	293±12	295±40	278±27	291±59
STZ+AFEF	0.5 g/kg	292±38	279±24	269±18	272±42	268±56
	1.0 g/kg	278±34	246±32**	252±6*	242±25	253±35
	1.5 g/kg	299±63	237±40**	238±50**	237±38	241±35
STZ+Insulin	3 U/kg	319±33	46±18***	71±15***	136±70***	194±54**

All values are means ± S.D. (N=8). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ as compared with the STZ+ H₂O group.

STZ: Streptozotocin

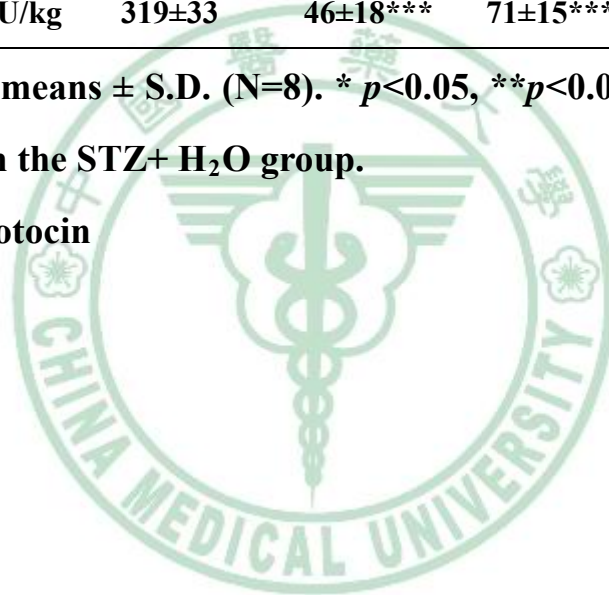


Table 2-6. Chronic effect of AFEF on fasting blood glucose in streptozotocin-induced hyperglycemic mice

Treatment	Dose	Blood glucose (mg/dl)				
		Week 0	Weeks 1	Weeks 2	Weeks 4	Weeks 6
control		72±17	69± 17	77±24	76 ±9	89±22
STZ+ H ₂ O		268±12	298 ±21 ^{###}	277±17 ^{###}	293±27 ^{###}	284±19 ^{###}
STZ+AFEF	0.5 g/kg	266.0±39	271 ±13	252±13	258±4	269±12
	1.0 g/kg	262±18	249 ±20 ^{**}	224±23 [*]	201±75 ^{**}	210±81 ^{**}
	1.5 g/kg	263±18	249 ±44 ^{**}	240±27 [*]	204±52 ^{**}	212±55 ^{**}
STZ+Insulin	5 U/kg	264±20	190 ±35 ^{***}	195±40 ^{***}	134±53 ^{***}	103±30 ^{***}

All values are means ± S.D. (N=8). ^{###} $p < 0.001$ as compared with the control group. ^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$, ^{***} $p < 0.001$ as compared with the STZ+H₂O group.

STZ: Streptozotocin

Table 2-7 Chronic effect of AFEF on intestinal activities of disaccharides enzymes in streptozotocin-induced hyperglycemic mice

Treatment	Dose	sucrase	lactase	galactase
		μM glucose/mins. /mg protein	μM glucose/mins. /mg protein	μM glucose/mins. /mg protein
control		401 \pm 59	31 \pm 7	46 \pm 23
STZ+ H ₂ O		453 \pm 52	34 \pm 5	46 \pm 7
STZ+AFEF	0.5 g/kg	541 \pm 74	43 \pm 5	55 \pm 15
	1.5 g/kg	476 \pm 81	40 \pm 3	50 \pm 5
STZ+Insulin	5 U/kg	392 \pm 86	26 \pm 3*	41 \pm 8

All values are means \pm S.D. (N=8). * p <0.05 as compared with the STZ+ H₂O group.

STZ: Streptozotocin

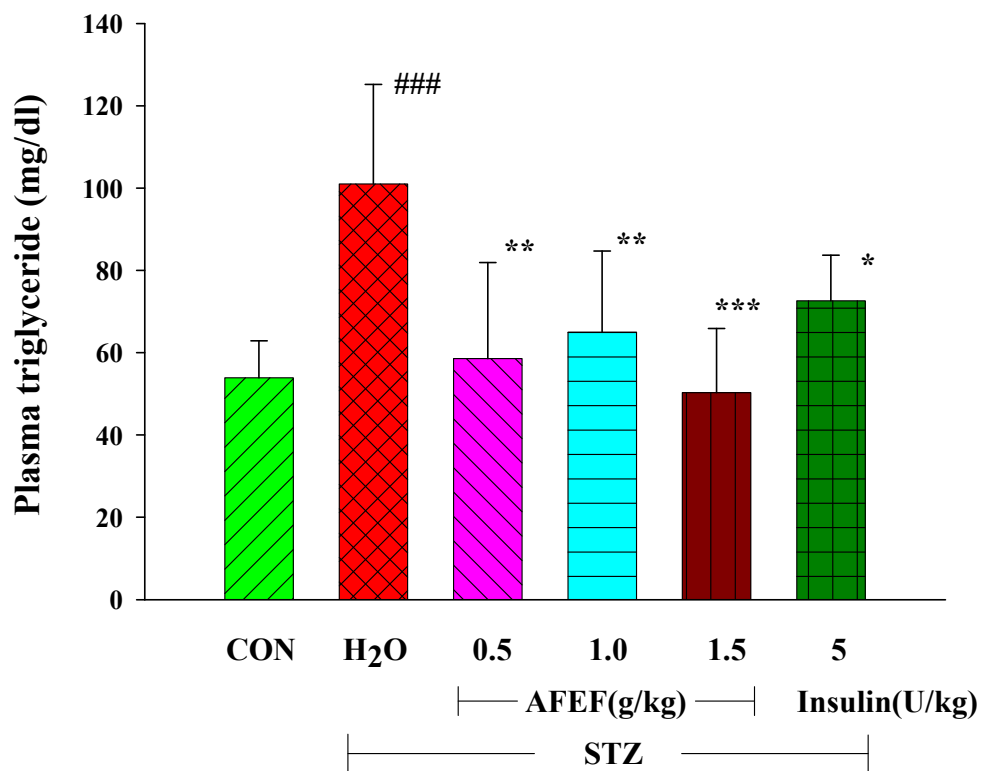


Fig. 2-1 Chronic effect of AFEF on plasma triglycerides in streptozotocin-induced hyperglycemic mice. All values are means \pm S.D. (N=8). ### $p < 0.001$ as compared with the control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$ as compared with the STZ+ H₂O group.**

CON: control; STZ: Streptozotocin

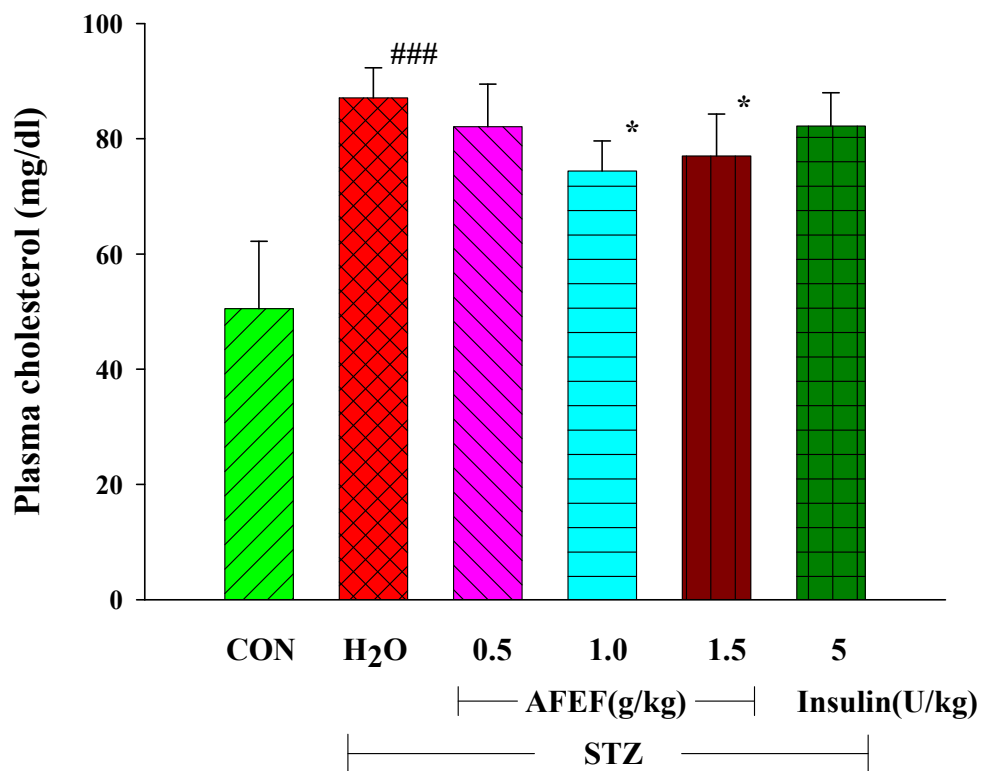


Fig. 2-2 Chronic effect of AFEF on plasma cholesterol in streptozotocin-induced hyperglycemic mice. All values are means \pm S.D. (N=8). ### $p < 0.001$ as compared with the control group. * $p < 0.05$, as compared with the STZ+ H₂O group.

CON: control; STZ: Streptozotocin

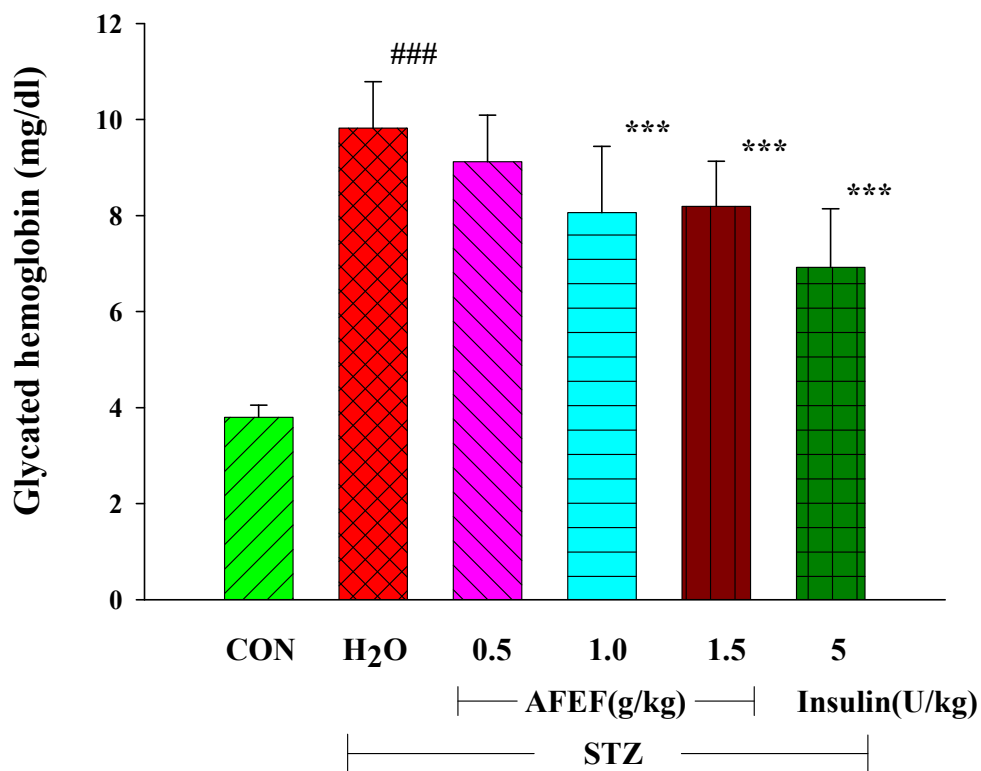


Fig. 2-3 Chronic effect of AFEF on glycated hemoglobin in streptozotocin-induced hyperglycemic mice. All values are means \pm S.D. (N=8). ### $p < 0.001$ as compared with the control group. * $p < 0.001$ as compared with the STZ+ H₂O group.**

CON: control; STZ: Streptozotocin

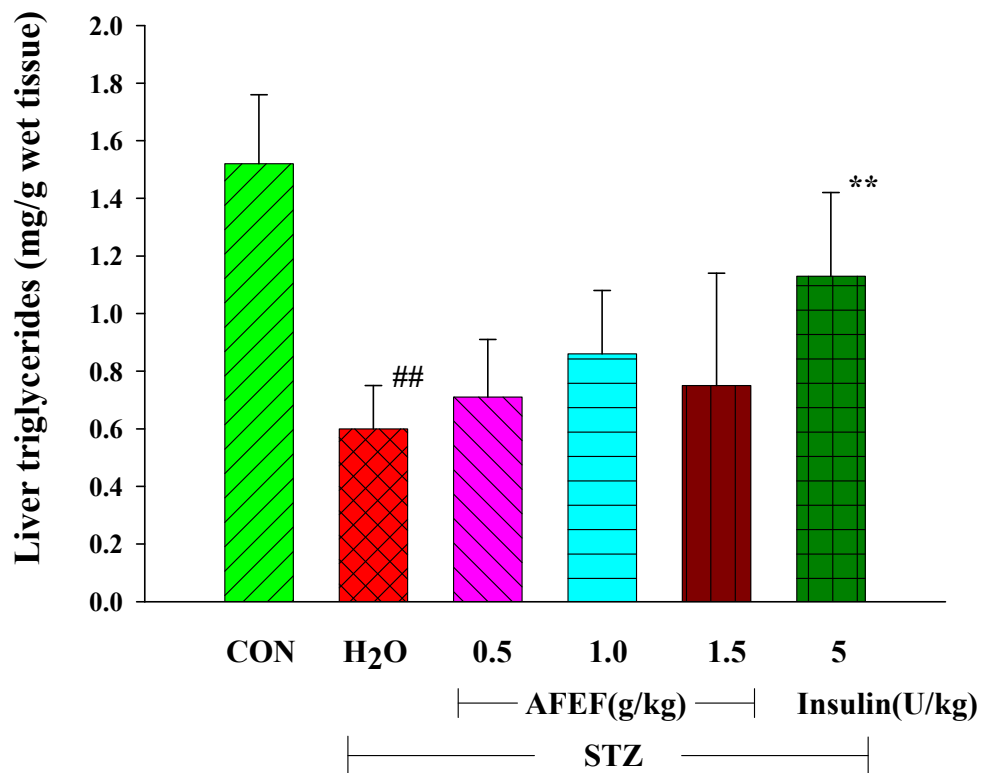


Fig. 2-4 Chronic effect of AFEF on liver triglycerides in streptozotocin-induced hyperglycemic mice. All values are means \pm S.D. (N=8). ## $p < 0.01$ as compared with the control group. ** $p < 0.01$ as compared with the STZ+ H₂O group.

CON: control; STZ: Streptozotocin

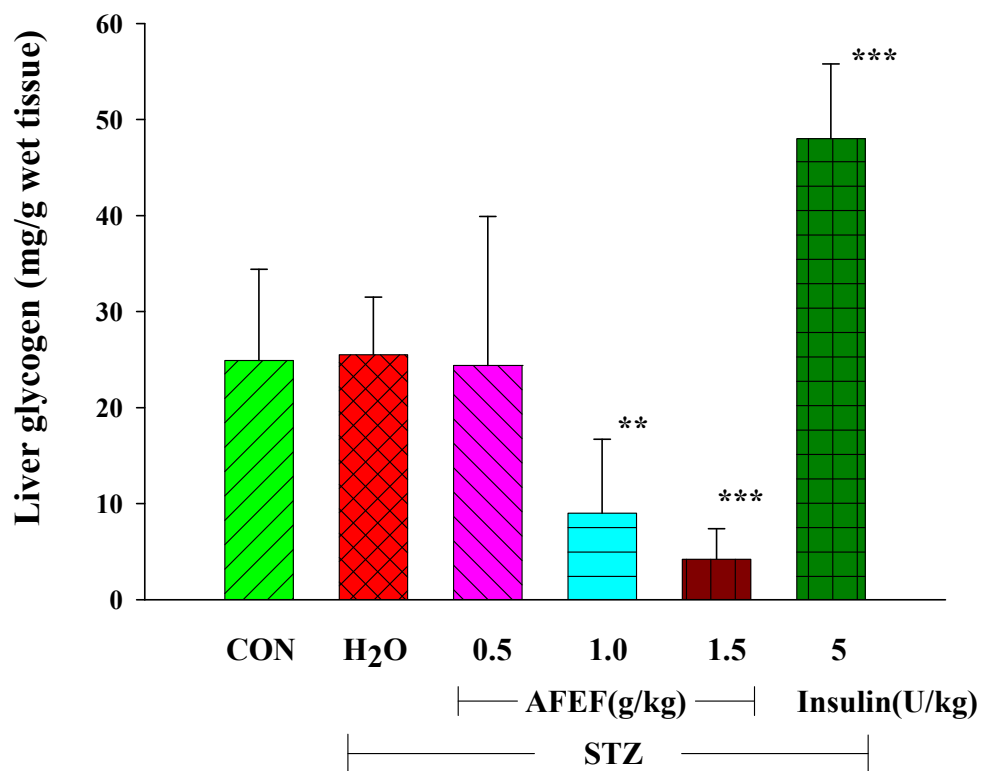


Fig. 2-5 Chronic effect of AFEF on liver glycogen in streptozotocin-induced hyperglycemic mice. All values are means \pm S.D. (N=8). ** p <0.01, * p <0.001 as compared with the STZ+ H₂O group.**

CON: control; STZ: Streptozotocin

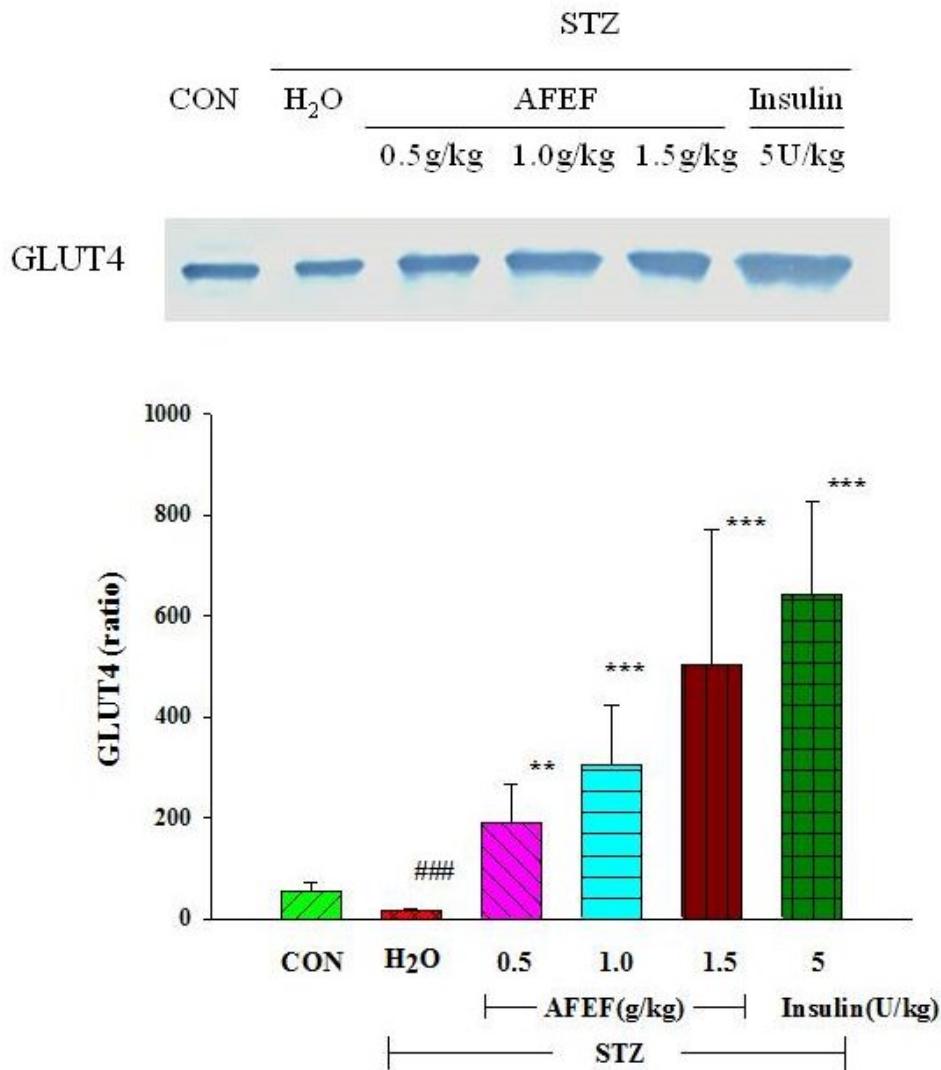


Fig. 2-6 Chronic effect of AFEF on the GLUT4 protein expression in skeletal muscular in streptozotocin-induced hyperglycemic mice.

All values are means \pm S.D. (N=8). ### $p < 0.001$ as compared with the control group. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ as compared with the STZ+ H₂O group.

CON: control; STZ: Streptozotocin

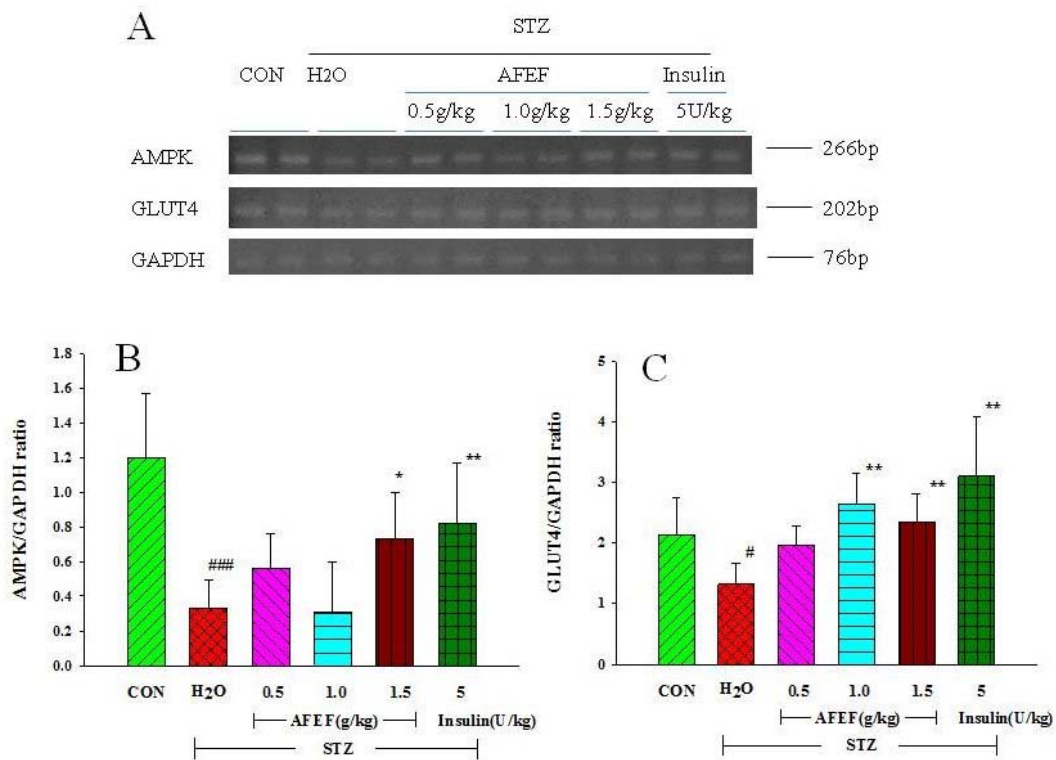


Fig. 2-7 Chronic effect of AFEF on the AMPK and GLUT4 mRNA expression in skeletal muscular in streptozotocin-induced hyperglycemic mice. A, Fragments were amplified by RT-PCR. The expression levels of AMPK (B), and GLUT4 (C) mRNA were measured and quantified densitometrically. Values were normalized to GAPDH mRNA expression. All values are means \pm S.D. (N=8). # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ as compared with the control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared with the STZ+ H₂O group.

CON: control; STZ: Streptozotocin

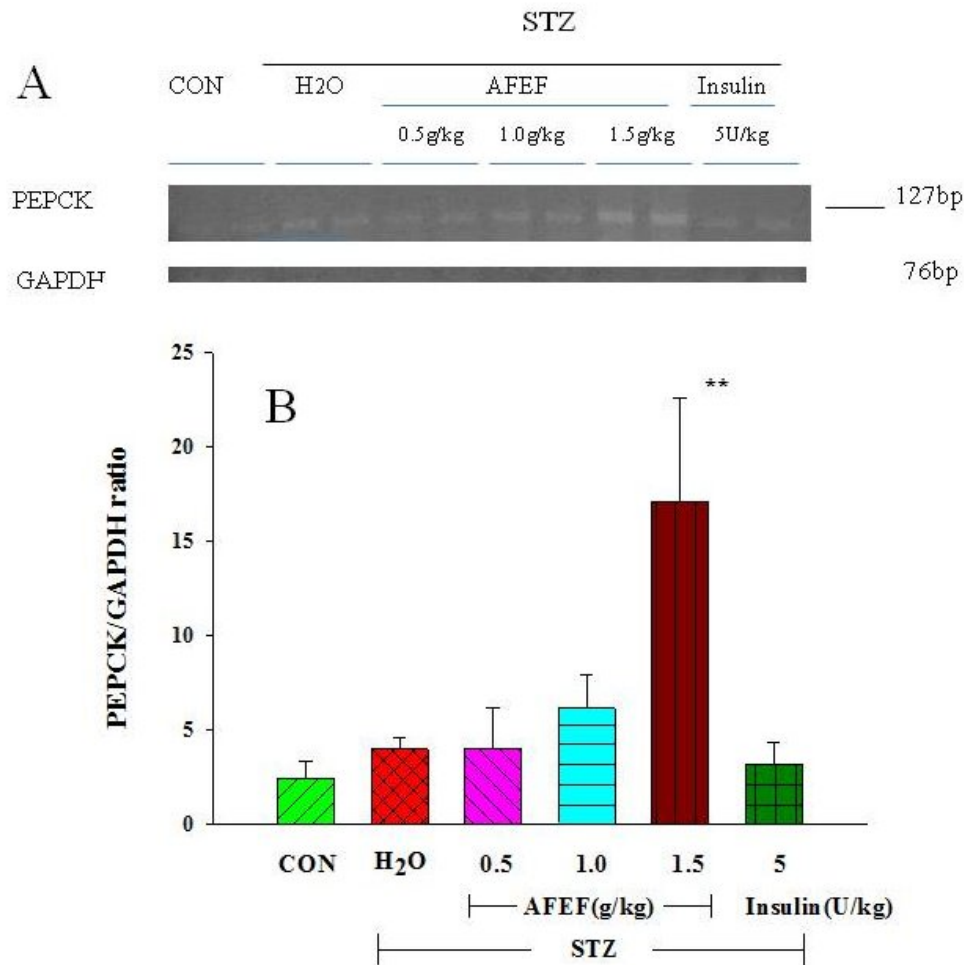


Fig. 2-8 Chronic effect of AFEF on the PEPCK mRNA expression in liver in streptozotocin-induced hyperglycemic mice. A, Fragments were amplified by RT-PCR. The expression levels of PEPCK (B) mRNA were measured and quantified densitometrically. Values were normalized to GAPDH mRNA expression. All values are means \pm S.D. (N=8). ** p <0.01 as compared with the STZ+ H₂O group.

CON: control; STZ: Streptozotocin

第三章 台灣金線連對糖尿病高血脂之影響

前言

隨著人口的老化，人民生活習慣多趨向於缺乏運動、高脂等不當飲食、肥胖等因素導致心血管疾病發生率逐年上升，其中與心血管疾病相關的腦血管疾病、心臟病、糖尿病、高血壓等慢性疾病，皆居台灣十大死因榜中第 2、3、5、9 位，已經成為我國及世界之新興重要公共衛生議題。

流行病學研究顯示血中低的高密度脂蛋白 (High-density lipoprotein; HDL) 及高三酸甘油血症是產生冠狀動脈疾病的重要獨立危險因子⁽⁹⁵⁾，血中高三酸甘油血症合併有高的低密度脂蛋白 (Low-density lipoprotein; LDL) 或高的 LDL /HDL 比值會使冠狀性心臟疾病發生率增加 6 倍，而 HDL 本身 (其組成的成分如 apolipoproteins 和磷脂質) 具有抗發炎、抗氧化、抗凝集及抗凝結作用可以改善血管壁活性，減少動脈粥樣硬化的產生⁽⁹⁶⁾。

在胰島素缺乏或是阻抗的情況下皆會造成 LDL 上升 及 HDL 減少⁽⁹⁷⁾，增高的 LDL 容易造成動脈粥樣硬化，逐漸形成心血管疾病，而胰島素阻缺乏或是阻抗逐漸形成糖尿病則會造成更進一步高血脂症，加速腦血管疾病、心臟病及高血壓的產生⁽⁹⁸⁻⁹⁹⁾，糖尿病患者合

併高脂血症極為常見，同時高脂血症也是引起動脈粥樣硬化、冠心病、腦血管意外，最終導致糖尿病患者死亡的主要因素⁽¹⁰⁰⁻¹⁰¹⁾。因此預防或治療糖尿病及改善高脂血症是減少糖尿病冠狀動脈疾病死亡的主要目標。

台灣金線連水萃取物 (AFE) 先前研究顯示對正常飼料餵食的大鼠以 STZ 發的糖尿病症，具有降血糖，降三酸甘油脂及總膽固醇效果⁽¹⁹⁾。Takashi 等人研究顯示金線連糖苷及其三個相關化合物具有降血糖及降血脂作用⁽¹⁷⁻¹⁸⁾，本論文第二章之研究結果顯示 AFEF 對正常飼料誘導小鼠糖尿病症，具有降血糖及降血脂效果，以上文獻及結果顯示台灣金線連具有治療糖尿病及改善輕度高脂血症效果，在本篇進一步研究以高脂肪飼料加重糖尿病小鼠重度高脂血症，探討台灣金線連對糖尿病合併嚴重高脂血症是否具有減少高脂血症效果及可能作用機轉。

第一節 研究材料與方法

一、試藥及儀器

1. Roche : triglyceride, Cholesterol, Low-density lipoprotein (LDL-C), High-density lipoprotein (HDL-C), Glycated hemoglobin (HbA1c), creatinine。

2. Sigma : heparin , Streptozotocin 。
3. Novo : NovoMix®50 。
4. TestDiet® : 高脂肪飼料 (58Y1) 。
5. 福壽公司 : 正常飼料 。
6. 血糖機 (model 1500: SideKick Analyzer: YSI, Tellow Spring, OH, USA) 。
7. 自動生化分析儀器 (Cobas Mira; Roche) 。
8. 酸鹼度計 (TOA pH Meter HM-5S) 。
9. 離心機 (KUBOTA 3500) 。

二、台灣金線連水萃取物有效分劃 (AFEF) 的製備

詳見第二章第一節材料與方法之二、台灣金線連水萃取物有效分劃 (AFEF) 的製備。

三、動物

購自於財團法人國家實驗研究院實驗動物中心雄性小黑鼠 (C57BL/6J) 10 週大，體重 24-26 g，飼養於溫度維持 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相對濕度 45 - 65% 和半日照環境中，自由飲水及進食標準飼料，小鼠分組每組 8-10 隻。

四、糖尿病誘導

詳見第二章第一節 材料與方法之七、糖尿病誘導。

五、AFEF 對高脂肪飼料誘導糖尿病小鼠高血脂之影響

小鼠分為控制組，即正常小鼠餵食高脂肪飼料 (TestDiet® 58Y1)。糖尿病小鼠餵食高脂肪飼料組分為去離子水組、 AFEF 0.5 及 1.5 g/kg body weight 組及正對照組。正對照組每天 1 次皮下注射胰島素 5 U/kg body weight。投藥後滿 16 週，以代謝籠收集小鼠 24 小時尿液，測量尿量及尿中肌酸酐含量。投藥後滿 17 周，小鼠在乙醚麻醉下腹腔靜脈抽血(加入 heparin 抗凝血劑)，取出肝臟及副睪旁脂肪秤重後冰凍保存供進一步分析用。

六、血漿中三酸甘油脂，膽固醇，低密度脂蛋白膽固醇 (LDL-C) ，高密度脂蛋白膽固醇 (HDL-C) ，及糖化血紅素

全血 以 2100 g、4°C 離心 10 分鐘後取上層液，使用自動生化分析儀器 (Cobas Mira; Roche) 以市售試劑 (Roche Diagnostics) 測定三酸甘油脂、總膽固醇、 LDL-C 、 HDL-C 濃度。沉澱之血球加入生理食水混合、離心後去除上清液，重複3次後將血球稀釋以市售試劑組 (Sigma Diagnostics) 測定糖化血紅素。

七、尿中24小時 肌酐酸(creatinine) 含量測定

以代謝籠收集 24 小時尿液，使用自動生化分析儀器 (Cobas Mira; Roche) 以市售試劑 (Roche Diagnostics) 測定肌酐酸濃度。

八、統計分析 (Statistical analysis)

數據結果以平均值 (mean) \pm 標準偏差 (standard deviation, SD) 表示，使用單尾變異數分析 (one-way analysis of variance) 及 Dunnett 測試， $p < 0.05$ 表示在統計學上具有顯著差異。

第二節 研究結果

一、AFEF 對 STZ 誘導糖尿病小鼠血糖之影響

如圖 3-1 及 3-2 所示，以高脂飼料飼養 16 周後的糖尿病小鼠，其血糖 (303.3 ± 13.2 mg/dl) 及糖化血紅素 (9.27 ± 0.13 %) 明顯高於高脂飼料正常組血糖 (142.2 ± 6.0 mg/dl) 及糖化血紅素 (3.37 ± 0.06 %)。AFEF 1.5 g/kg body weight 及胰島素兩組能有降低高脂肪飼料飼養的糖尿病小鼠血糖及糖化血紅素濃度。但胰島素藥效強度明顯大於 AFEF。

二、AFEF 對 STZ 誘導糖尿病小鼠 24 小時尿量之影響

如圖 3-3 所示，給與高脂飼料飼養的糖尿病小鼠，收集 24 小時的尿量 (8.87 ± 1.00 ml) 明顯高於高脂飼料正常組 (0.73 ± 0.16 ml)，給予 AFEF 1.5 g/kg body weight 及胰島素皆能減少 24 小時尿量。但胰島素藥效強度明顯大於 AFEF。

三、AFEF 對 STZ 誘導糖尿病小鼠 24 小時尿中肌酐酸含量之影響

如圖 3-4 所示，給與高脂飼料飼養的糖尿病小鼠，其 24 小時尿液中肌酐酸含量 (0.164 ± 0.016 mg) 明顯高於高脂飼料正常組 (0.042 ± 0.009 mg)，給予 AFEF 0.5 及 1.5 g/kg body weight 及胰島素皆能減少 24 小時尿液中肌酐酸含量。

四、AFEF 對 STZ 誘導糖尿病小鼠肝臟及脂肪重量之影響

如圖 3-5 所示，給與高脂飼料飼養的糖尿病小鼠，肝臟重量 (1.22 ± 0.04 g) 明顯高於正常組 (1.71 ± 0.24 g)。AFEF 1.5 g/kg body weight 及胰島素皆能減少高脂飼料飼養的糖尿病小鼠的肝臟重量。

如圖 3-6 所示，給與高脂飼料飼養的糖尿病小鼠副睪旁脂肪重量 (0.45 ± 0.05 g) 明顯低於高脂飼料正常組 (2.02 ± 0.29 g)，AFEF 1.5 g/kg body weight 及胰島素皆能增加高脂飼料飼養的糖尿病小鼠的脂肪重量，胰島素藥效強度仍是明顯大於 AFEF。

五、AFEF 對 STZ 誘導糖尿病小鼠血中三酸甘油脂及總膽固醇濃度之影響

如圖 3-7 及 3-8 所示，給與高脂飼料飼養的糖尿病小鼠，其血中三酸甘油脂 (919.0 ± 160.9 mg/dl) 及總膽固醇 (166.4 ± 10.2 mg/dl) 濃度明顯高於高脂飼料正常組血中三酸甘油脂 (63.1 ± 5.9 mg/dl) 及總膽固醇 (143.3 ± 3.4 mg/dl) 濃度，給予 AFEF 1.5 g/kg body weight 及胰島素皆能減少高脂飼料飼養的糖尿病小鼠血中三酸甘油脂及總膽固醇濃度，胰島素藥效強度仍是明顯大於 AFEF。

六、AFEF 對 STZ 誘導糖尿病小鼠血中 LDL 及 HDL 之影響

給與高脂飼料飼養的糖尿病小鼠，其血中 LDL (41.4 ± 13.0 mg/dl) 濃度明顯高於高脂飼料正常組血中 LDL (28.7 ± 3.3 mg/dl) (圖 3-9)，其血中 HDL 濃度與高脂飼料正常組無統計上差異 (圖 3-10)。給予 AFEF 1.5 g/kg body weight 能減少高脂飼料飼養的糖尿病小鼠血中 LDL 濃度及提升血中 HDL 濃度，但是胰島素組對於高脂肪飼料飼養的糖尿病小鼠升高血中 LDL 及 HDL 無統計上差異。

第三節 討論

糖尿病患者高血糖容易在血液循環中及蛋白質上形成糖化最終產物 (advanced glycosylation end products, AGEs) ，AGEs 會與不同細胞表面接受器 (receptors for AGE, RAGE) 及 scavenger receptors (SRs) 結合，活化發炎反應如圖 3-11 所示⁽¹⁰²⁾，改變內皮細胞組成及過多葡萄糖攝取造成過多活性氧產生 (reactive oxygen species, ROS) ，結果增加過多脂肪酸 (fatty acids) ，造成內皮細胞損傷，加速動脈硬化的形成。

糖尿病患者 80% 與動脈硬化 (atherosclerosis accounts) 相關疾病有死亡率，有糖尿病患者得到心血管疾病的機率為無糖尿病患者的 2-3 倍，由 the large Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S) 和 the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) 研究發現降低膽固醇藥物能減少糖尿病患者心血管疾病的發生⁽¹⁰³⁾，目前針對減少糖尿病患者心血管疾病發生率，使用方法為降低 LDL cholesterol 濃度小於 100mg/dl，降低血壓小於 130/85 mm Hg，降血糖，減少動脈癥形成的脂肪如 TG 及增加 high-density lipoprotein [HDL] levels ，治療微白蛋白尿 (microalbuminuria) ，減少胰島素阻抗 (insulin resistance) ，減少血液凝集危險⁽¹⁰⁴⁾，目前糖尿病患者降血脂⁽¹⁰⁵⁾減少 LDL 濃度小於 100 mg/dl，對高危險群患者 LDL 濃度小於 70 mg/dl，男性 HDL 濃度大於 40 mg/dl，女性 HDL 濃度大於 50 mg/dl，TG 濃度小於 150 mg/dl 主為要目標，除了生活型態的改變如運動，飲食控制外，使用降血脂藥物，積極控制糖尿病高血脂症是降低心血管疾病發生機率首要目標。

動物模式研究顯示猴子以 STZ 誘導糖尿病可以形成高脂血症，

使 LDL 增加及 HDL 減少⁽¹⁰⁶⁻¹⁰⁸⁾，食物及化學藥物誘導豬糖尿病可以產生動脈粥樣硬化，以alloxan 誘導豬糖尿病造成LDL 上升2倍⁽¹⁰⁹⁾，以STZ 加 高脂肪飼料 誘導豬隻糖尿病高三酸甘油酯症，兩者皆加重豬隻動脈粥樣硬化程度⁽¹¹⁰⁾。

STZ 誘導糖尿病小鼠餵食高脂肪飼料造成血中高血糖、高糖化血色素、尿量增加、尿中肌酐酸含量增加、脂肪減少、及肝臟重量增加。這些症狀可因長期投與 AFEF 1.5 g/kg body weight 及胰島素獲得改善。但胰島素藥效強度遠大於 AFEF。

STZ 誘導糖尿病小鼠餵食高脂肪飼料造成血中高三酸甘油酯及總膽固醇，高 LDL 與高脂肪飼料正常組有明顯統計上差別。長期投與 AFEF 1.5 g/kg body weight 與胰島素明顯減少糖尿病小鼠餵食高脂肪飼料造成的血中高三酸甘油酯、總膽固醇濃度。此結果顯示 AFEF 及胰島素因降血糖而改善脂肪代謝混亂的情況。

AFEF 1.5 g/kg body weight 減少糖尿病小鼠餵食高脂肪飼料造成血中高LDL 及更加提升 HDL 濃度。胰島素對血中高 LDL 及 HDL 並無影響，此點與 AFEF 降血脂肪效果明顯不同。AFEF 0.5 g/kg body weight 不具有降血糖效果，但對糖尿病小鼠餵食高脂肪飼料造成血中高三酸甘油酯及 LDL 有明顯的下降，結果顯示 AFEF 尚有其他降血脂機轉存在。

由上述結果可知，AFEF 降血脂效果除了因降血糖而改善脂肪代

謝混亂的情況外，尚有經由減少 LDL 及提高HDL 來調節脂肪代謝而達到降血脂效果，其調節脂肪代謝之機轉仍需進一步研究。



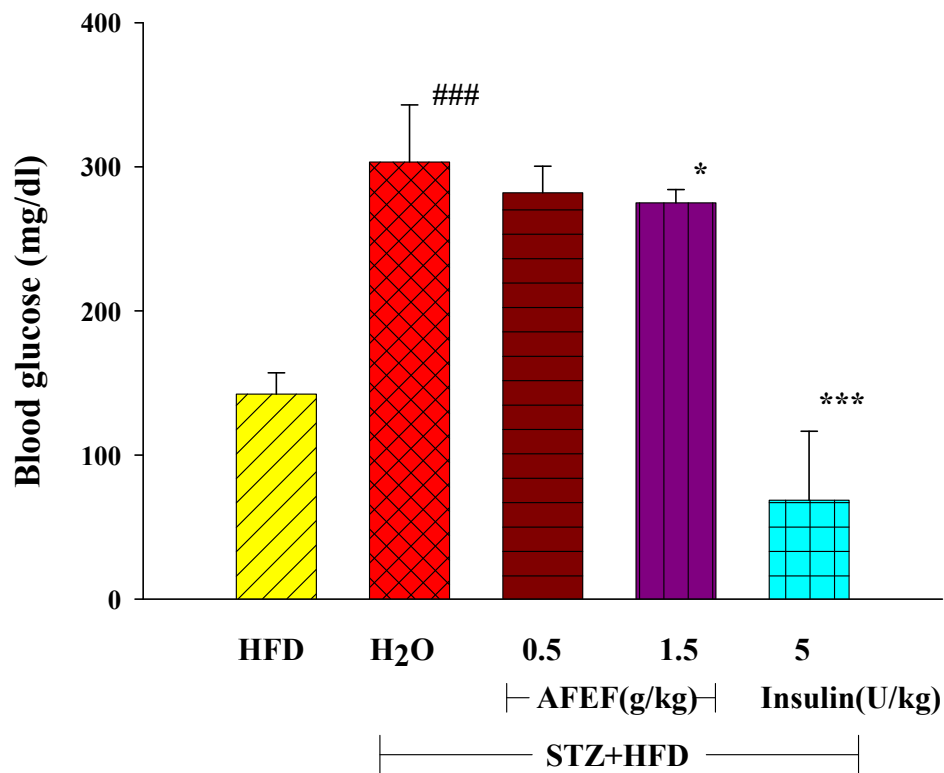


Fig. 3-1 Effect of AFEF on blood glucose in STZ-induced hyperglycemia in mice were fed a high fat diet. All values are means \pm S.D. (N=8). ### $p < 0.001$ as compared with the HFD group. * $p < 0.05$, * $p < 0.001$ as compared with the STZ +HFD + H₂O group.**

STZ: Streptozotocin; HFD: high fat diet

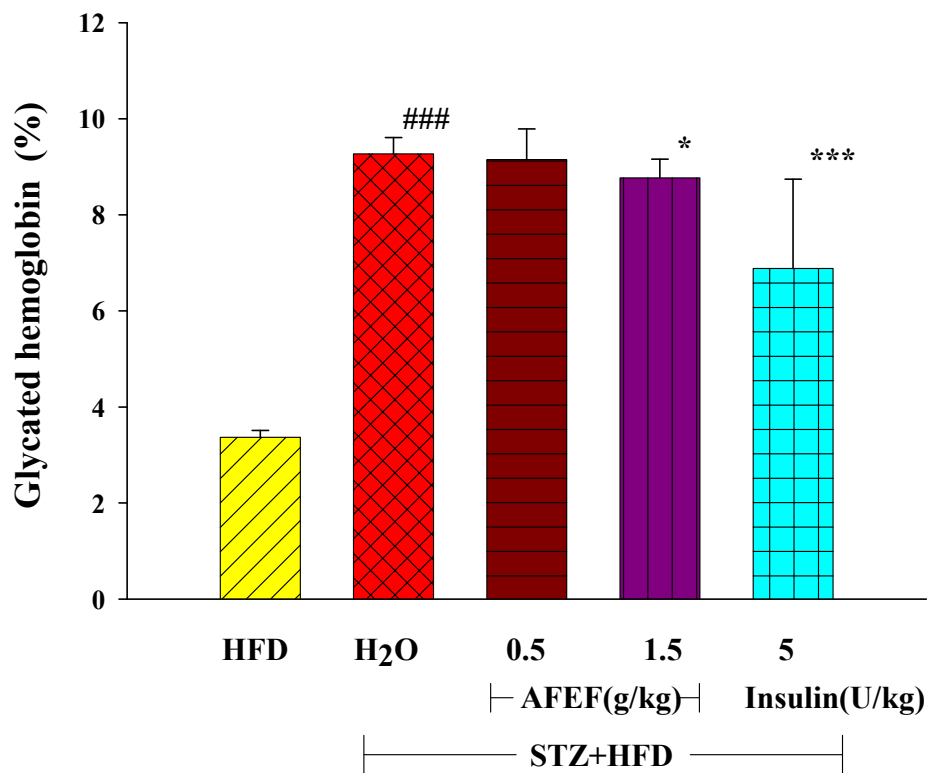


Fig. 3-2 Effect of AFEF on glycated hemoglobin in STZ-induced hyperglycemia in mice were fed a high fat diet. All values are means \pm S.D. (N=8). ### $p < 0.001$ as compared with the HFD group. * $p < 0.05$, * $p < 0.001$ as compared with the STZ +HFD + H₂O group.**

STZ: Streptozotocin; HFD: high fat diet

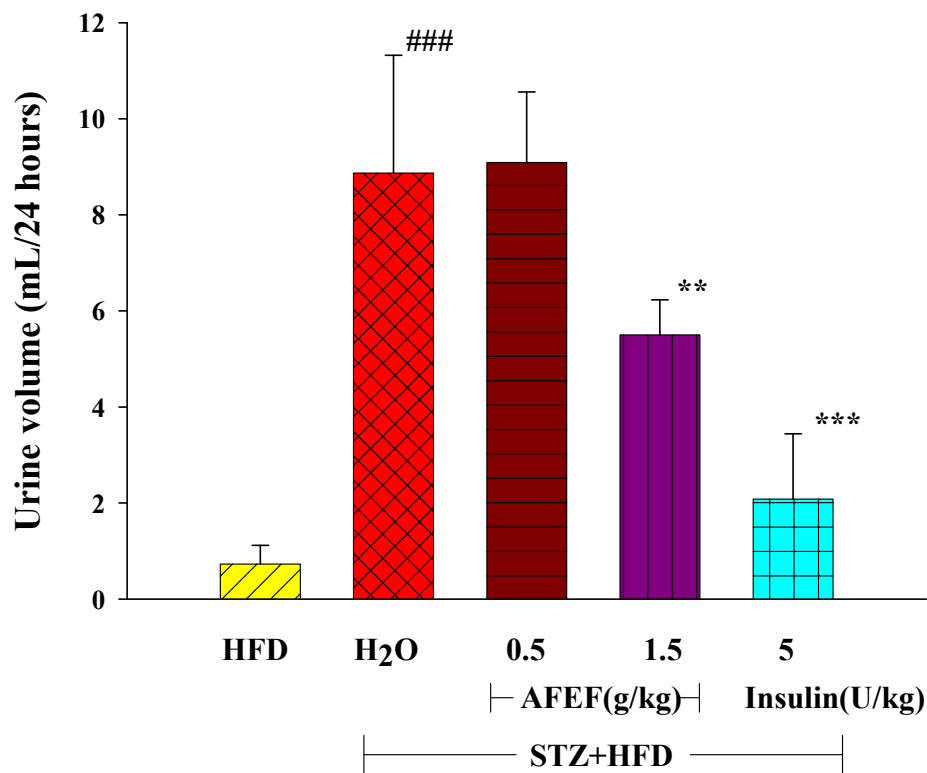


Fig. 3-3 Effect of AFEF on urine volume for 24 hours in STZ-induced hyperglycemia in mice were fed a high fat diet. All values are means \pm S.D. (N=8). ### $p < 0.001$ as compared with the HFD group. * $p < 0.05$, * $p < 0.001$ as compared with the STZ +HFD + H₂O group.**

STZ: Streptozotocin; HFD: high fat diet

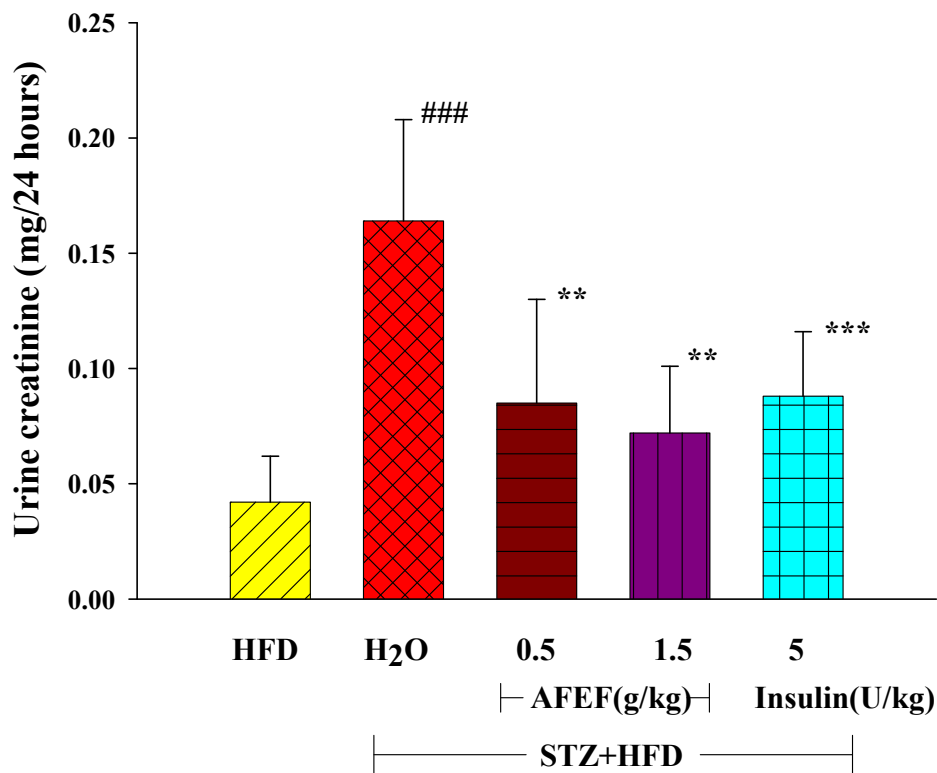


Fig. 3-4 Effect of AFEF on urine creatinine for 24 hours in STZ-induced hyperglycemia in mice were fed a high fat diet. All values are means \pm S.D. (N=8). ### $p < 0.001$ as compared with the HFD group. * $p < 0.05$, * $p < 0.001$ as compared with the STZ +HFD + H₂O group.**

STZ: Streptozotocin; HFD: high fat diet

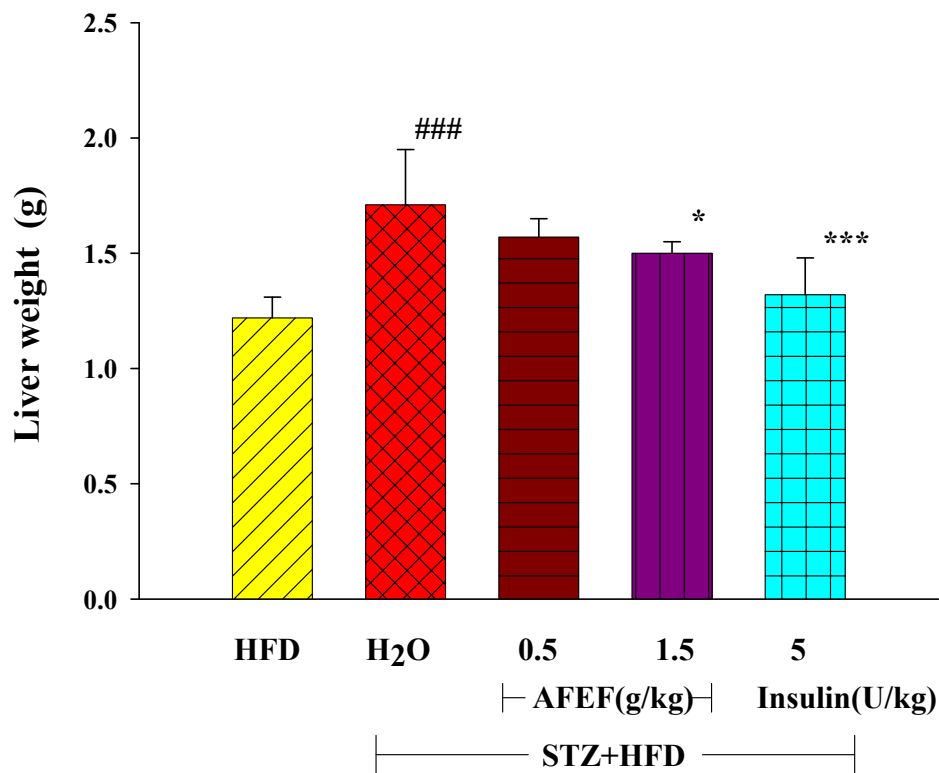


Fig. 3-5 Effect of AFEF on liver weight in STZ-induced hyperglycemia in mice were fed a high fat diet. All values are means \pm S.D. (N=8). ### $p < 0.001$ as compared with the HFD group. * $p < 0.05$, * $p < 0.001$ as compared with the STZ +HFD + H₂O group.**

STZ: Streptozotocin; HFD: high fat diet

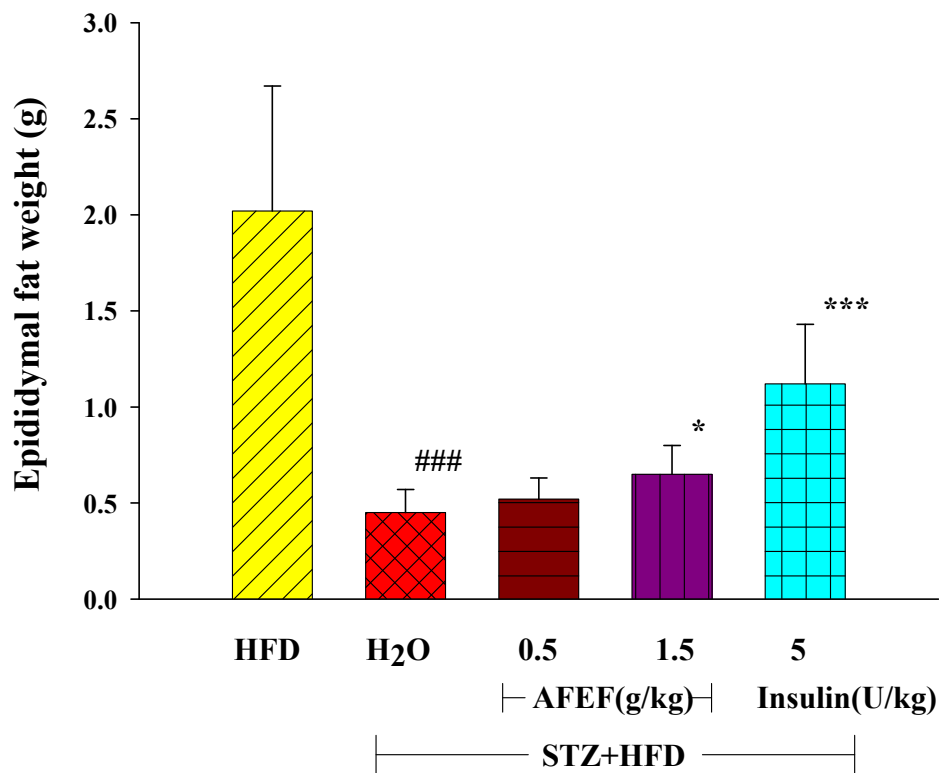


Fig. 3-6 Effect of AFEF on epididymal fat weight in STZ-induced hyperglycemia in mice were fed a high fat diet. All values are means \pm S.D. (N=8). ### $p < 0.001$ as compared with the HFD group. * $p < 0.05$, * $p < 0.001$ as compared with the STZ +HFD + H₂O group.**

STZ: Streptozotocin; HFD: high fat diet

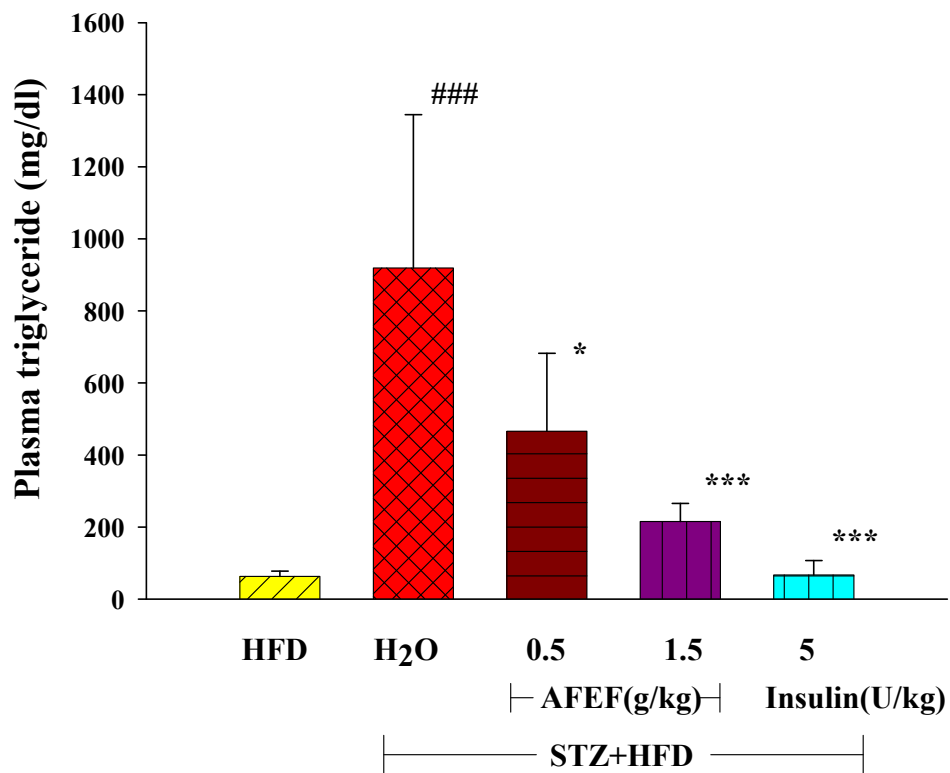


Fig. 3-7 Effect of AFEF on plasma triglycerides concentration in STZ-induced hyperglycemia in mice were fed a high fat diet. All values are means \pm S.D. (N=8). ### $p < 0.001$ as compared with the HFD group. * $p < 0.05$, * $p < 0.001$ as compared with the STZ +HFD + H₂O group.**

STZ: Streptozotocin; HFD: high fat diet

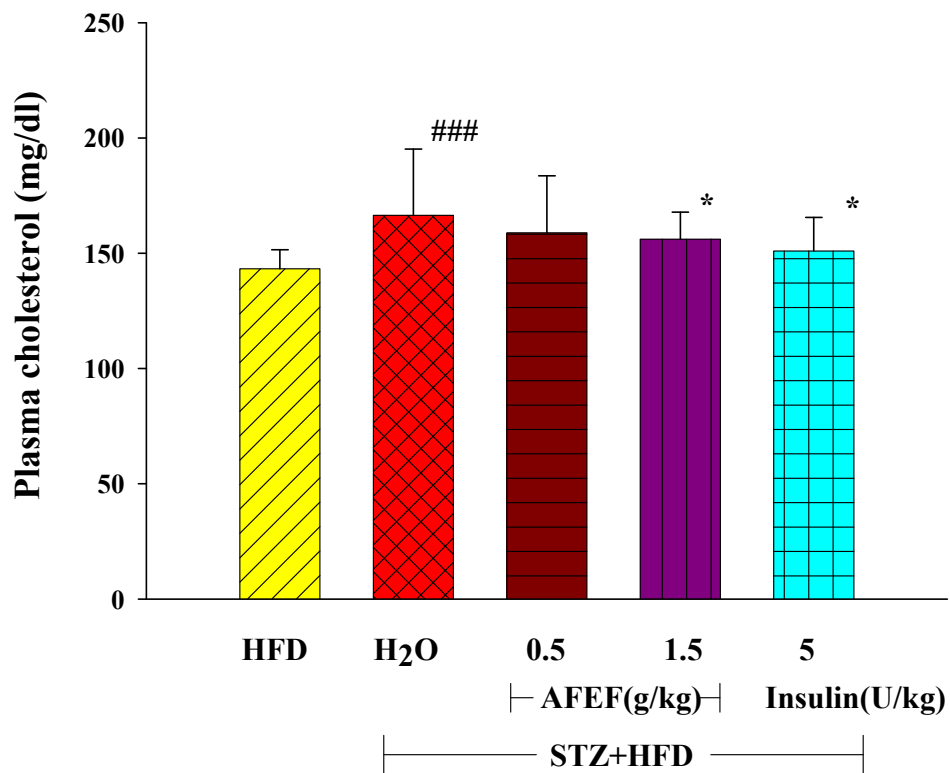


Fig. 3-8 Effect of AFEF on plasma cholesterol concentration in STZ-induced hyperglycemia in mice were fed a high fat diet. All values are means \pm S.D. (N=8). ### $p < 0.001$ as compared with the HFD group. * $p < 0.05$, as compared with the STZ +HFD + H₂O group.

STZ: Streptozotocin; HFD: high fat diet

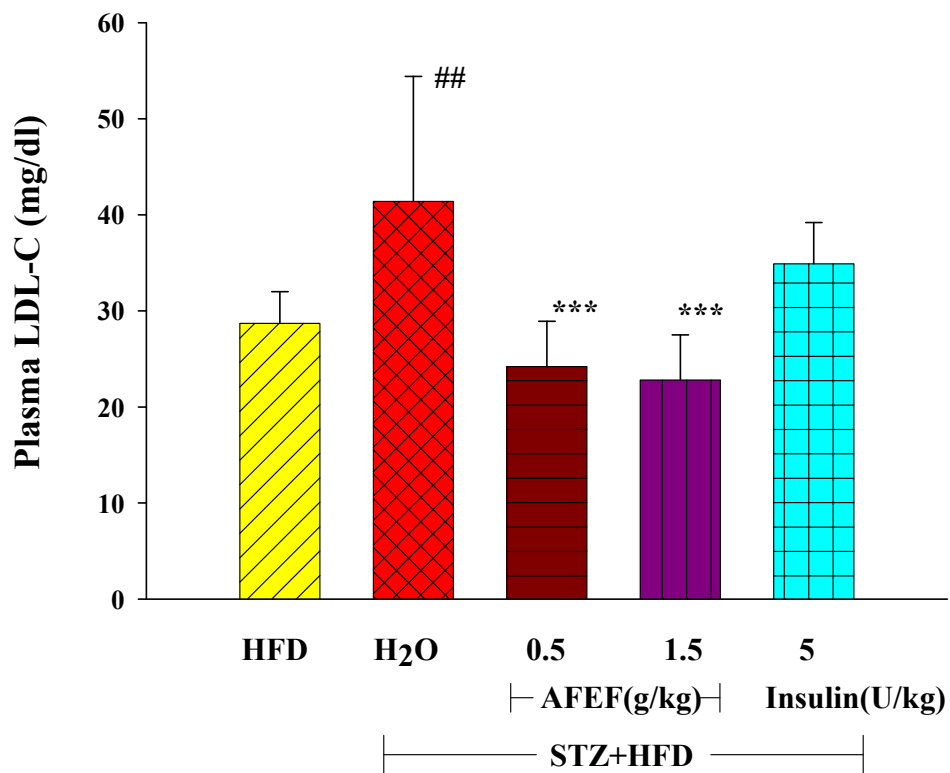


Fig. 3-9 Effect of AFEF on plasma low density lipoprotein concentration in STZ-induced hyperglycemia in mice were fed a high fat diet. All values are means \pm S.D. (N=8). ## $p < 0.01$ as compared with the HFD group. * $p < 0.001$, as compared with the STZ +HFD + H₂O group.**

STZ: Streptozotocin; HFD: high fat diet

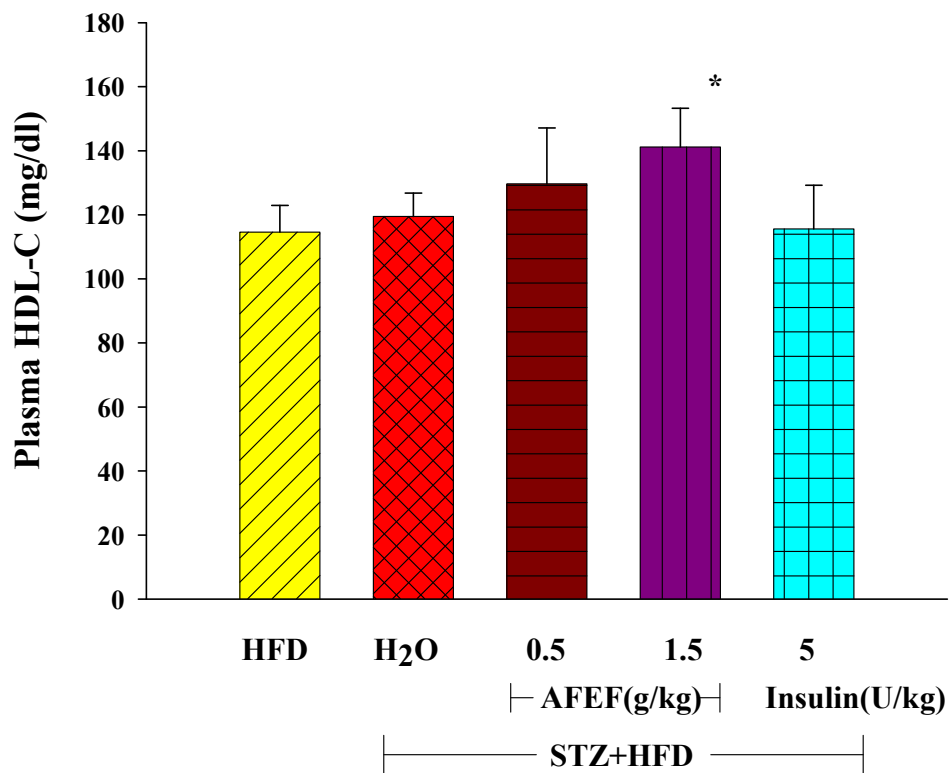


Fig. 3-10 Effect of AFEF on plasma high density lipoprotein concentration in STZ-induced hyperglycemia in mice were fed a high fat diet. All values are means \pm S.D. (N=8). * $p < 0.05$, as compared with the STZ +HFD + H₂O group.

STZ: Streptozotocin; HFD: high fat diet

Glucose-accelerated atherosclerosis

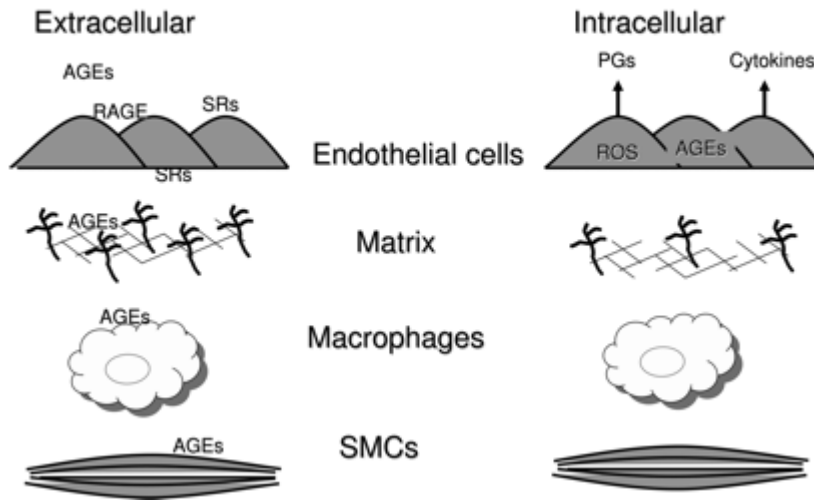


Fig. 3-11 Glucose-accelerated atherosclerosis. (102)



第四章 台灣金線連對肥胖之影響

前言

肥胖是現代文明病之一，皮下脂肪及內臟脂肪過多的一種症狀，肥胖形成的原因主要是熱量攝取過盛(如喜食高脂肪食物或是飲酒等等)，或是熱量消耗緩慢而形成脂肪堆積。根據行政院衛生署國民健康局健康九九網站公告，目前常用來檢測體重是否過重或是肥胖的指標，基本上可分為：「脂肪過量」以及「脂肪分布」等二類。肥胖不僅對疾病的罹患率有影響，也與代謝症候群相關。

脂肪過量與肥胖常用的測量方法如下⁽¹¹¹⁾：

一、標準體重（較少使用）

1. 男性 = (身高 - 80) × 0.7；女性 = (身高 - 70) × 0.6
2. 其判斷標準為：- 10% ~ + 10% 為標準體重；+ 10% ~ + 20% 為體重過重；> + 20% 為肥胖。

二、身體質量指數（BMI）（目前主流）

1. BMI = 體重 / (身高)² 公斤 / (公尺)²
2. 衛生署新修訂的肥胖判斷標準如下：

BMI 範圍 (kg/m ²)	體型
BMI < 18.5	消瘦
18.5 ≤ BMI ≤ 23.9	正常
24.0 ≤ BMI ≤ 26.9	過量
27.0 ≤ BMI ≤ 29.9	輕度肥胖
30.0 ≤ BMI ≤ 34.9	中度肥胖
BMI ≥ 35.0	重度肥胖

三、體脂肪比率：

年齡與性別	肥胖之判斷標準
30 歲以上	
男性	≥ 25%
女性	≥ 30%
30 歲以下	
男性	≥ 20%
女性	≥ 25%

四、脂肪分布（腰臀比）與肥胖測量方法如下：

1.腰臀比（W/H）

(1). 計算方法：腰圍÷臀圍（以公分或吋為單位均可）

(2). 若男性 腰臀比 ≥ 0.9 ，女性腰臀比 ≥ 0.85 ，則稱為肥胖。

2. 腰圍

我國衛生署建議之標準如下：

男性腰圍 ≥ 90 公分(約 35.5 吋)，女性腰圍 ≥ 80 公分(約 31.5 吋)，則屬於肥胖。

身體質量指數及腰圍與代謝症候群及心血管疾病發生之危險性

關係如下所述：

		相對於正常體重及腰圍之危險性	
	BMI (kg/m^2)	正常腰圍	腰圍男性 > 90 公分，女性 > 80 公分
消瘦	< 18.5	—	—
正常體重	18.5—24	—	—
過重	24—27	增加	高
輕度肥胖	27—30	高	很高
中度肥胖	30—35	很高	很高
重度肥胖	≥ 35	極高	極高

積極減緩肥胖的形成可以降低代謝症候群及心血管疾病發生的機率，文獻研究顯示台灣金線連分離出的金線連糖苷 (kinsenoside) 能抑制 aurothioglucose 所誘發肥胖小鼠肥胖的脂肪沉積⁽²²⁾，而對其他原因造成的肥胖，台灣金線連是否仍有減緩效果尚未被證實，本篇進一步研究以高脂肪飼料及酒精性加高脂肪飼料誘導小鼠肥胖來探討台灣金線連對肥胖的影響。

第一節 研究材料與方法

一、試藥及儀器

1. Roche : glutamic oxaloacetic transaminase, glutamic pyruvic transaminase, triglyceride, Cholesterol。
2. Sigma : clenbuterol, silymarin, heparin。
3. TestDiet® : 高脂肪飼料 (58Y1)。
4. 福壽公司 : 正常飼料。
5. Panreac : Absolute alcohol。
6. 自動生化分析儀器 (Cobas Mira; Roche)。
9. 離心機 (KUBOTA 3500)。

二、台灣金線連水萃取物有效分劃製備過程 (AFEF)

詳見第二章第一節材料與方法之二、台灣金線連水萃取物有效分劃 (AFEF) 的製備。

三、動物

購自於財團法人國家實驗研究院實驗動物中心雄性小黑鼠 (C57BL/6J) 10 週大，體重 24-26 g，飼養於溫度維持 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相對濕度 45 - 65% 和半日照環境中，自由飲水及進食標準飼料，小鼠分組每組 8 隻。

四、AFEF 對高脂肪飼料餵食小鼠肥胖之影響

將小鼠分為 5 組，一組為控制組餵食正常飼料。其餘4組為高脂肪飼料 (high-fat diet; HFD) 組，分別口服給予去離子水、AFEF 0.5、1.5 g/kg body weight 及 clenbuterol 2 mg/kg body weight (正對照組)。投藥每天 1 次，為期 8 週，於實驗第 0，2，4，6，8 週，秤小鼠體重及由眼眶採血測血漿中三酸甘油脂及膽固醇。8 週後犧牲小鼠，以乙醚麻醉後腹腔靜脈採血(加入抗凝血劑 heparin) 測三酸甘油脂、膽固醇、麩氨酸草乙酸轉氨 (AST)、麩氨酸丙氨基轉氨 (ALT)。取出肝臟，腎臟旁及副睪旁脂肪秤重，冰凍儲存待進一步分析。

五、AFEF 對酒精及 HFD 餵食小鼠肥胖之影響

將動物分為 5 組，一組小鼠為餵食 HFD 之控制組，其餘4組除餵食 HFD 外，另給予含 10% 酒精 (alcohol) 之飲水，同時分別口服給予去離子水，AFEF 0.5、1.5 g/kg body weight 及正對照組 silymarin 50 mg/kg body weight。每天1次為，為期8週。於實驗第 0，2，4，6，8 週，秤重小鼠體重及眼眶採血測血漿三酸甘油酯及膽固醇。8 週後犧牲小鼠，以乙醚麻醉後腹腔靜脈採血(加入抗凝血劑 heparin) 測三酸甘油酯、膽固醇、AST、ALT。取出肝臟，腎臟旁及副睪脂肪秤重，冰凍後待進一步分析。

六、血漿中三酸甘油酯、膽固醇、AST 及 ALT

全血以 2100 g、4°C 離心 10 分鐘後取上層液，使用自動生化分析儀器 (Cobas Mira; Roche) 以市售試劑 (Roche Diagnostics) 測定三酸甘油酯、總膽固醇、AST 及 ALT。

五、統計分析

數據結果以平均值 (mean) ± 標準偏差 (standard deviation, SD) 表示，使用單尾變異數分析 (one-way analysis of variance) 及 Dunnett 測試， $p < 0.05$ 表示在統計學上具有顯著差異。

第二節研究結果

一、AFEF 對 HFD 餵食小鼠肥胖之影響

1. 體重

如表 4-1 所示，小鼠第 0 週起始重量並無差異，經過 4 週餵食 HFD 飼料後，HFD 料組小鼠體重 (31.5 ± 0.7 g) 明顯大於控制組 (28.8 ± 0.8 g)，但 HFD + AFEF 及 HFD + clenbuterol 組小鼠體重與 HFD + H₂O 組沒有差異。

2. 血漿三酸甘油酯濃度

如表 4-2 所示，小鼠餵食 HFD 後滿 2、4、6、8 週，採血測血漿三酸甘油酯濃度。HFD + H₂O 組與控制組血中三酸甘油酯濃度於第 4 週有明顯差異，HFD + AFEF 及 HFD + clenbuterol 組之血中三酸甘油酯濃度與 HFD + H₂O 組沒有差異。

3. 血漿膽固醇濃度

如表 4-3 所示，經過 2、4、6、8 週餵食 HFD 後，HFD + H₂O 的膽固醇濃度明顯大於控制組。HFD + AFEF 及 HFD + clenbuterol 組的血中膽固醇濃度與 HFD + H₂O 組無統計上差別。

4. 血漿 AST 及 ALT

如表 4-4 所示，小鼠投藥滿 8 週後犧牲，HFD + H₂O 組與控制組血漿 AST 及 ALT 活性沒有差異，HFD + AFEF 及 HFD + clenbuterol 組之血漿 AST 及 ALT 活性與 HFD + H₂O 組也沒有差異。

5. 脂肪重量

如圖 4-1、4-2、4-3 所示，小鼠投藥滿 8 週後犧牲，HFD + H₂O 組腎臟旁脂肪相對重量、副睪旁脂肪相對重量、及腎臟旁脂肪+副睪旁脂肪相對重皆明顯大於控制組。HFD + AFEF 組脂肪相對重與 HFD + H₂O 無統計上差別。HFD + clenbuterol 組腎臟旁脂肪相對重量、副睪旁脂肪相對重量、及腎臟旁脂肪+副睪旁脂肪相對重量三者明顯低於 HFD + H₂O 組。

6. 肝臟重量

如圖 4-4 所示，小鼠投藥 8 周犧牲後，HFD + H₂O 組肝臟相對重量明顯小於控制組肝臟相對重量。HFD + AFEF 組與 HFD + clenbuterol 組肝臟相對重量與 HFD + H₂O 組無統計上差別。

二、AFEF 對酒精飲水及 HFD 餵食小鼠肥胖之影響

1. 體重

如表 4-5 所示，第 0 週起始重量並無差異，經過 4 週 HFD + alcohol + H₂O 組體重 30.1 ± 0.6 g 明顯大於 HFD + H₂O + H₂O 組 27.1 ± 0.7 g。但 HFD + alcohol + AFEF 及 HFD + alcohol + silymarin 組體重則與 HFD + alcohol + H₂O 組無統計上差別。

2. 血漿三酸甘油脂濃度

如表 4-6 所示，HFD + alcohol + H₂O 組小鼠第 2、4、6、8 週血漿三酸甘油脂濃度與 HFD + H₂O + H₂O 組沒有差異，HFD + alcohol + AFEF 及 HFD + alcohol + silymarin 組之血中三酸甘油脂濃度與 HFD + alcohol + H₂O 組也無明顯差異。

3. 血漿膽固醇濃度

如表 4-7 所示，HFD + alcohol + H₂O 組小鼠第 2、4、6、8 週血漿膽固醇濃度與 HFD + H₂O + H₂O 組沒有差異，HFD + alcohol + AFEF 及 HFD + alcohol + silymarin 組之血漿膽固醇中濃度與 HFD + alcohol + H₂O 組也無明顯差異。

4. 血漿 AST 及 ALT 活性

如表 4-8 所示，HFD + alcohol + H₂O 組小鼠血漿 AST 及 ALT 活性與 HFD + H₂O + H₂O 組沒有差異，HFD + alcohol + AFEF 及 HFD + alcohol + silymarin 組之血漿 AST 及 ALT 活性與 HFD + alcohol + H₂O 組也無明顯差異。

5. 脂肪重量

如圖 4-5、4-6、4-7 所示，小鼠投藥 8 週後犧牲，HFD + alcohol + H₂O 組腎臟旁脂肪相對重量、副睪旁脂肪相對重量、及腎臟旁+副睪旁脂肪相對重量明顯大於 HFD + H₂O + H₂O 組。HFD + alcohol + AFEF 組的脂肪相對重量與 HFD + alcohol + H₂O 組無統計上的差別。正對照 silymarin 組腎臟旁脂肪相對重量，副睪旁脂肪相對重量，及腎臟旁+副睪旁脂肪相對重量明顯低於 HFD + alcohol + H₂O 組。

6. 肝臟重量

如圖 4-8 所示，HFD+ alcohol + H₂O 組小鼠肝臟相對重量明顯大於 HFD + H₂O + H₂O 組，HFD + alcohol + AFEF 及 HFD + alcohol + silymarin 組之肝臟相對重量與 HFD + alcohol + H₂O 組無明顯差異。

第三節 討論

脂肪恆定主要由脂肪組織，肝臟，肌肉，消化道，胰臟及神經系統共同運輸及傳送脂肪酸 (fatty acids) 而精準調節脂肪及能量的恆定，脂肪酸是產生細胞能量的重要物質，也是所有種類脂肪的重要前驅物 (essential precursors)，當攝食過多的營養時，身體會以脂肪酸酯化、主要以三酸甘油脂形式形成脂肪滴 (lipid droplets) 儲存，在空腹時或運動需要熱量時，分解成脂肪酸及三酸甘油氧化、提供能量，脂肪滴主要是由中性脂肪組成，其成分有三酸甘油脂及膽固醇酯 (cholesteryl esters)，磷脂及未酯化脂膽固醇及多種蛋白質⁽¹¹²⁻¹¹⁴⁾，在哺乳類動物中脂肪主要儲存在白色脂肪組織中(white adipose tissue)。

給予小鼠過多營養誘導肥胖的動物實驗中，與控制組比較，小鼠餵食 HFD 後體重，脂肪相對重量，血中膽固醇濃度及肝臟相對重量明顯增加，顯示小鼠經過 8 周誘導後肥胖明顯形成。

投與 AFEF 組的體重及體內脂肪相對重量與 HFD + H₂O 組皆無差異，顯示 AFEF 對單純高脂肪飼料造成的肥胖無減緩效果。

Clenbuterol 是一種 β_2 腎上腺素受體促效劑 (β_2 -adrenergic agonist)，類似麻黃素 (ephedrine) 作用，有明顯的促進生長、提高瘦肉率及減少脂肪的效果⁽¹¹⁵⁻¹¹⁶⁾，被畜牧業作為瘦肉精使用。由於食物殘留 clenbuterol 會使人體可能產生肌肉筋攣，頭痛，緊張，焦慮，

噁心反胃，心悸，血壓上升，喪失部分記憶等等副作用⁽¹¹⁷⁾，歐洲共同體⁽¹¹⁸⁾於1988年1月1日起禁止clenbuterol當飼料添加劑使用，1991⁽¹¹⁹⁾年被美國FDA禁止當飼料添加劑使用。

clenbuterol對體重及肝臟相對重量雖然與HFD + H₂O組無統計上的差異，但對腎臟旁脂肪相對重量，副睪旁脂肪相對重量，及腎臟旁+副睪旁脂肪相對重量皆明顯輕於HFD + H₂O組，此結果顯示對照藥物clenbuterol減重效果明顯。

小鼠以酒精加HFD餵食，使小鼠獲得熱量更高，所以體重及體內脂肪明顯增加，與單獨餵食HFD有統計上的差異，此顯示酒精使小鼠肥胖更增加，但血中三酸甘油酯及膽固醇及相對肝臟重量並無明顯變化，顯示血中三酸甘油酯進一步形成脂肪堆積。

AFEF有保肝作用，是否能經由保肝作用而減少酒精引起之肥胖，為此選擇保肝藥silymarin為對照藥物，結果顯示投與AFEF組的體重及體內脂肪重量與高脂肪飼料加酒精組比較皆無差異，顯示AFEF雖有保肝作用，但對酒精加重的肥胖則無減緩效果。

相反的對照藥物silymarin對體重及肝臟相對重量雖然與高脂肪餵食加酒精組比較沒有差異，但對腎臟旁脂肪相對重量，副睪旁脂肪相對重量，及腎臟旁 + 副睪旁脂肪相對重量皆明顯輕於HFD + alcohol + H₂O組，此結果顯示對照藥物silymarin對酒精更增加的

肥胖有減少效果。

文獻的研究顯示金線連糖苷 (kinsenocide) 能抑制 aurothioglucose 所誘發肥胖小鼠，aurothioglucose 形成肥胖的機轉主要是經由下視丘腹側正中核 (ventromedial hypothalamus) 的病變造成食慾旺盛、攝食過多所形成的肥胖⁽¹²⁰⁾，而本研究使用高熱量食物如高脂肪飼料或高脂肪飼料加酒精以誘發肥胖，其機轉不同，但 AFEF 則無減緩此種肥胖的效果，此結果顯示台灣金線連並非對於各種原因造成脂肥胖皆有效。



Table 4-1 Effect of AFEF on body weight in mice with high fat diet-induced obesity

Treatment	Dose (g/kg)	Body weight (g)				
		Week 0	Weeks 2	Weeks 4	Weeks 6	Weeks 8
control		27.8±1.6	29.0±1.9	28.8±2.1	29.7±2.3	29.1±2.2
HFD + H ₂ O		28.3±1.2	29.3±1.4	31.5±1.9 [#]	34.9±2.7 ^{###}	35.6±2.9 ^{###}
HFD+ AFEF	0.5	28.5±0.9	29.2±1.4	31.3±1.6	34.0±2.0	34.1±2.1
	1.5	28.9±1.1	29.3±1.2	31.8±2.0	35.2±2.0	35.6±3.2
HFD+clenbuterol	0.002	28.0±0.5	29.6±2.0	31.6±1.7	33.2±2.1	34.0±1.9

All values are means ± S.D. (N=8). [#] $p < 0.05$, ^{###} $p < 0.001$ as compared with the control group.

HFD: high fat diet

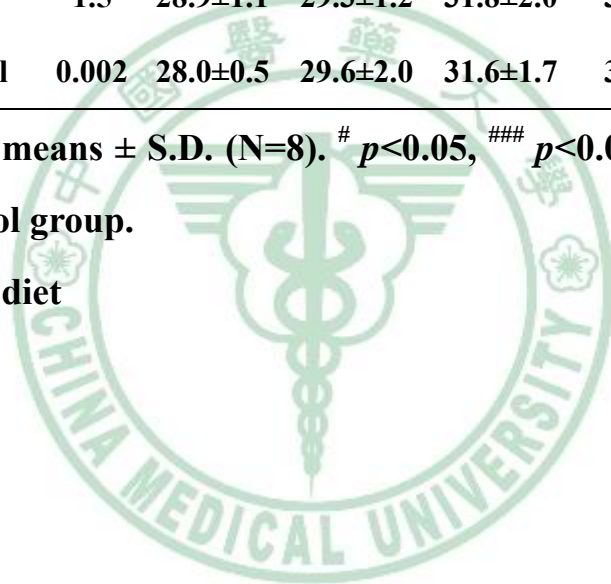


Table 4-2 Effect of AFEF on plasma triglycerides in mice with high fat diet-induced obesity

Treatment	Dose (g/kg)	Triglycerides (mg/dl)			
		Weeks 2	Weeks 4	Weeks 6	Weeks 8
control		66.4±17.2	52.1±21.6	61.8±18.0	56.8±20.6
HFD + H ₂ O		79.0±8.1	87.7±15.2##	73.2±16.1	49.0±14.6
HFD+ AFEF	0.5	77.9±12.4	99.6±16.2	58.7±21.1	57.2±18.6
	1.5	81.2±12.7	80.4±17.0	62.5±22.5	47.9±14.7
HFD+clenbuterol	0.002	81.2±6.7	67.0±18.4	57.3±26.3	37.2±15.7

All values are means ± S.D. (N=8). ## $p < 0.01$ as compared with the control group.

HFD: high fat diet

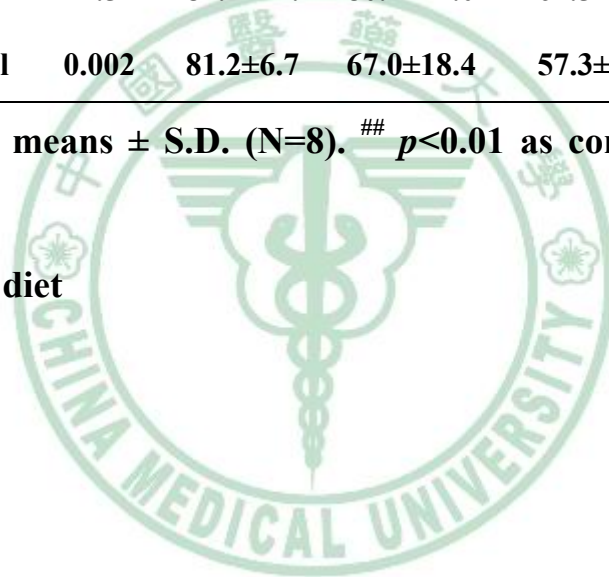


Table 4-3 Effect of AFEF on plasma cholesterol in mice with high fat diet-induced obesity

Treatment	Dose (g/kg)	Cholesterol (mg/dl)			
		Weeks 2	Weeks 4	Weeks 6	Weeks 8
control		73±7	74±8	70±9	68±18
HFD + H ₂ O		103±15 ^{###}	136±25 ^{###}	156±18 ^{###}	150±9 ^{###}
HFD+ AFEF	0.5	115±14	146±17	155±187	147±14
	1.5	116±14	152±18	159±15	161±16
HFD+clenbuterol	0.002	100±11	125±13	138±13	155±19

All values are means ± S.D. (N=8). ^{###} $p < 0.001$ as compared with the control group.

HFD: high fat diet

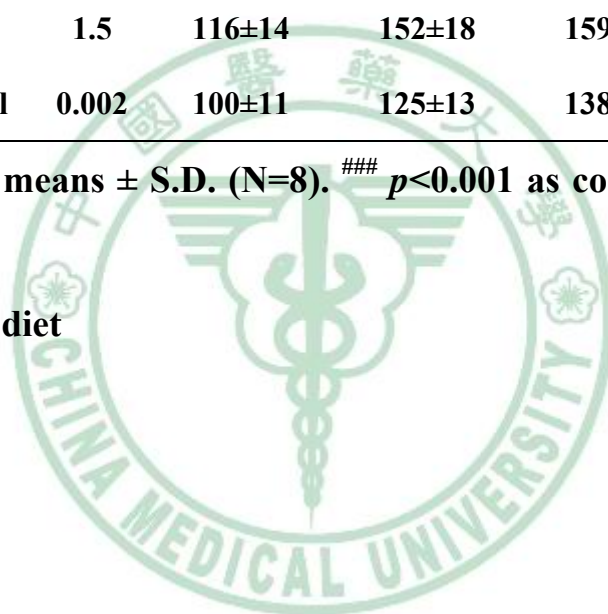


Table 4-4 Effect of AFEF on plasma AST and ALT activities in mice with high fat diet-induced obesity

Treatment	Dose (g/kg)	AST (U/dl)	ALT (U/dl)
control		69.0±19.3.	42.3±8.5
HFD + H₂O		73.4±18.2	26.4±22.5
HFD+ AFEF	0.5	65.4± 4.0	19.4±3.4
	1.5	60.4± 9.0	19.7±17.9
HFD+clenbuterol	0.002	64.0±23.1	21.6±4.4

All values are means ± S.D. (N=8).

HFD: high fat diet

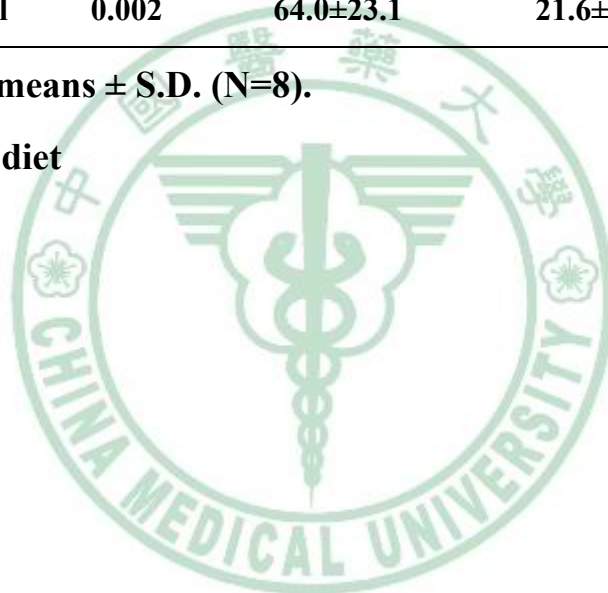


Table 4-5 Effect of AFEF on body weight in mice were fed a HFD supplemented with 10% alcohol

Treatment	Dose	Body weight				
	(g/kg)	Week 0	Weeks 2	Weeks 4	Weeks 6	Weeks 8
HFD + H ₂ O + H ₂ O		25.9±0.4	25.7±1.7	27.1±1.6	28.8±2.5	28.3±1.8
HFD + alcohol + H ₂ O		26.7±0.7	28.0±1.3	30.1±1.5 [#]	33.3±1.4 [#]	32.9±1.4 [#]
HFD + alcohol + AFEF	0.5	26.6±1.4	27.3±1.8	28.7±2.4	31.3±2.8	30.9±2.5
	1.5	26.1±1.1	27.4±1.7	29.0±2.3	31.2±3.4	31.2±3.9
HFD +alcohol + silymarin	0.05	26.3±0.6	27.0±1.4	28.4±1.6	31.1±2.0	30.7±2.4

All values are means ± S.D. (N=8). [#] *p* < 0.05 as compared with the control group.

HFD: high fat diet

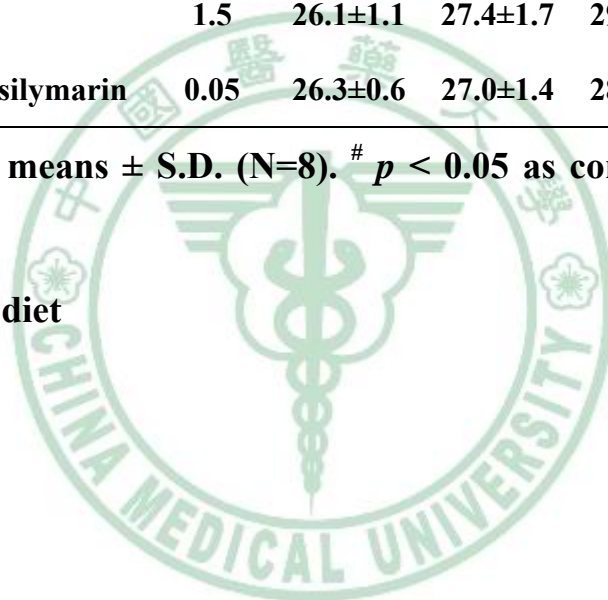


Table 4-6 Effect of AFEF on plasma triglycerides in mice were fed a HFD supplemented with 10% alcohol

Treatment	Dose (g/kg)	Triglycerides (mg/dl)			
		Weeks 2	Weeks 4	Weeks 6	Weeks 8
control		58.0±17.3	40.8±24.8	56.0±78.4	44.5±13.2
HFD + alcohol + H ₂ O		70.2±10.7	61.7±13.1	58.7±33.5	47.6±32.3
HFD + alcohol + AFEF	0.5	83.4±36.5	68.7±29.3	67.5±37.2	67.9±21.4
	1.5	82.7±25.1	78.8±30.4	44.9±23.3	52.2±35.6
HFD +alcohol + silymarin	0.05	75.2±8.9	54.5±14.8	59.3±31.6	51.4±26.4

All values are means ± S.D. (N=8).

HFD: high fat diet

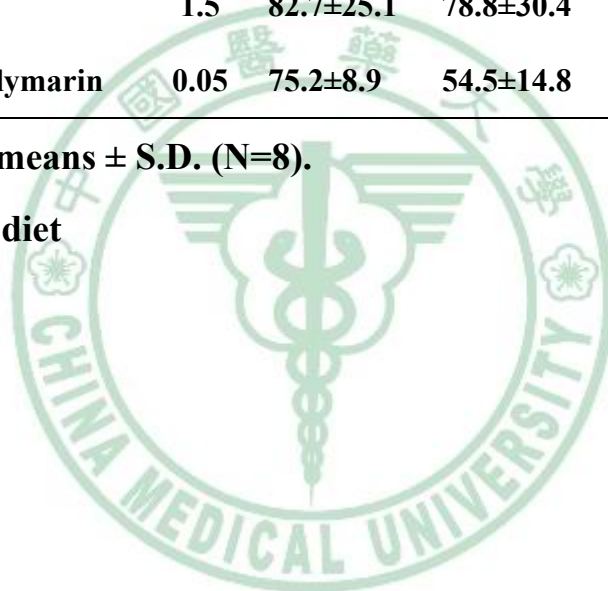


Table 4-7 AFEF on plasma cholesterol in mice were fed a HFD supplemented with 10% alcohol

Treatment	Dose	Cholesterol			
	(g/kg)	Weeks 2	Weeks 4	Weeks 6	Weeks 8
control		120±8	135±16	142±11	128±20
HFD + alcohol + H ₂ O		116±9	133±12	137±12	129±7
HFD + alcohol + AFEF	0.5	112±10	132±9	143±14	128±14
	1.5	105±12	132±14	136±19	131±9
HFD +alcohol + silymarin	0.05	107±5	125±21	132±20	129±28

All values are means ± S.D. (N=8).

HFD: high fat diet

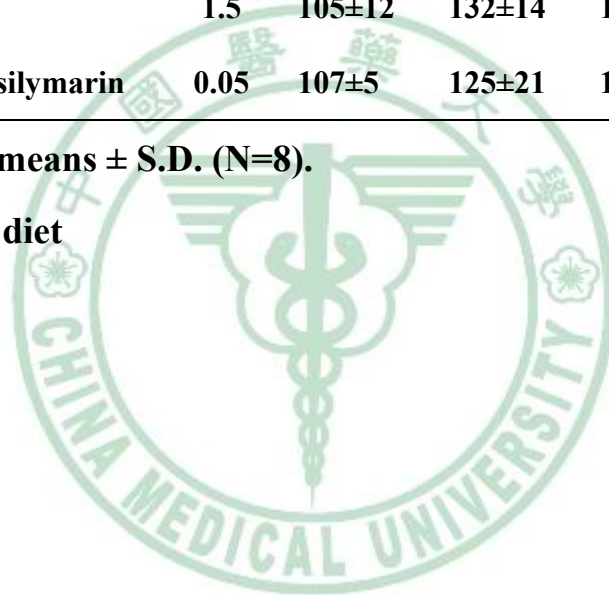


Table 4-8 Effect of AFEF on plasma AST and ALT activities in mice were fed a HFD supplemented with 10% alcohol

Treatment	Dose (g/kg)	AST (U/dl)	ALT (U/dl)
control		55.0±4.3	21.6±6.1
HFD + alcohol + H₂O		59.0±7.8	14.4±2.9
HFD + alcohol + AFEF	0.5	66.0±15.0	21.2±6.5
	1.5	59.5±6.3	14.5±4.5
HFD +alcohol + silymarin	0.05	61.0±11.8	16.9±7.2

All values are means ± S.D. (N=8).

HFD: high fat diet



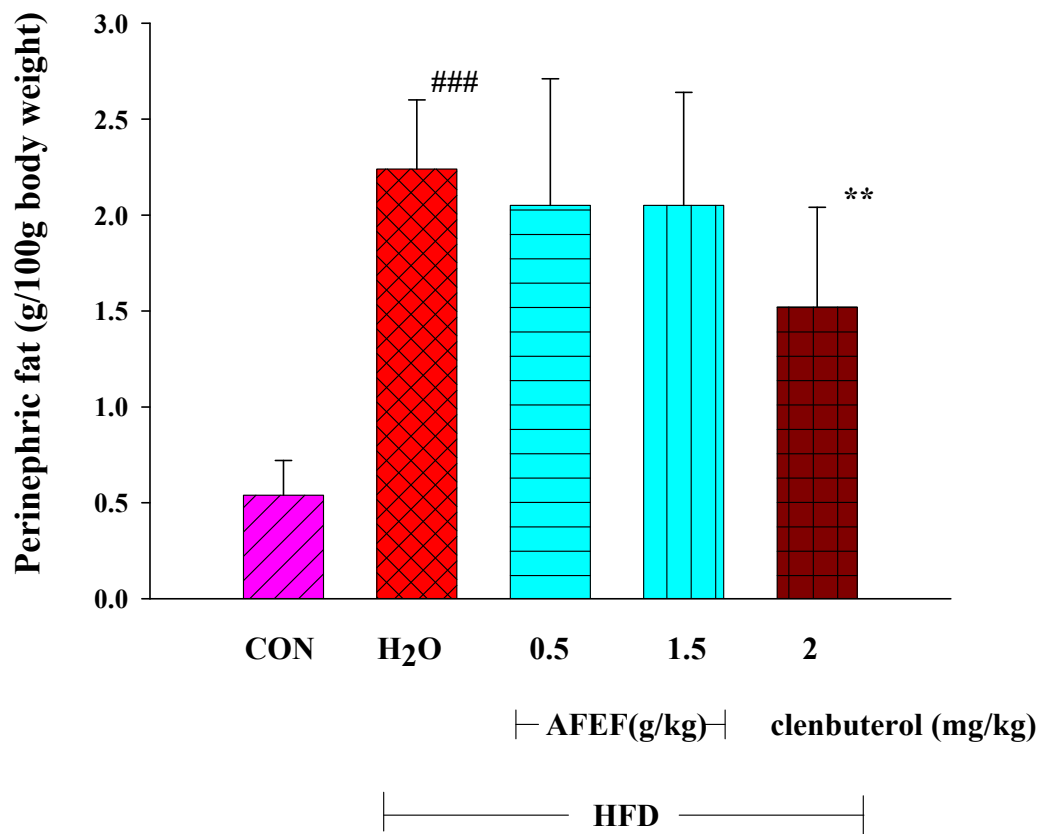


Fig. 4-1 Effect of AFEF on perinephric fat weight percentage (%) in mice with high fat diet-induced obesity. All values are means \pm S.D. (N=8). ### $p < 0.001$ as compared with the control group. ** $p < 0.01$, as compared with the HFD + H₂O group.

HFD: high fat diet

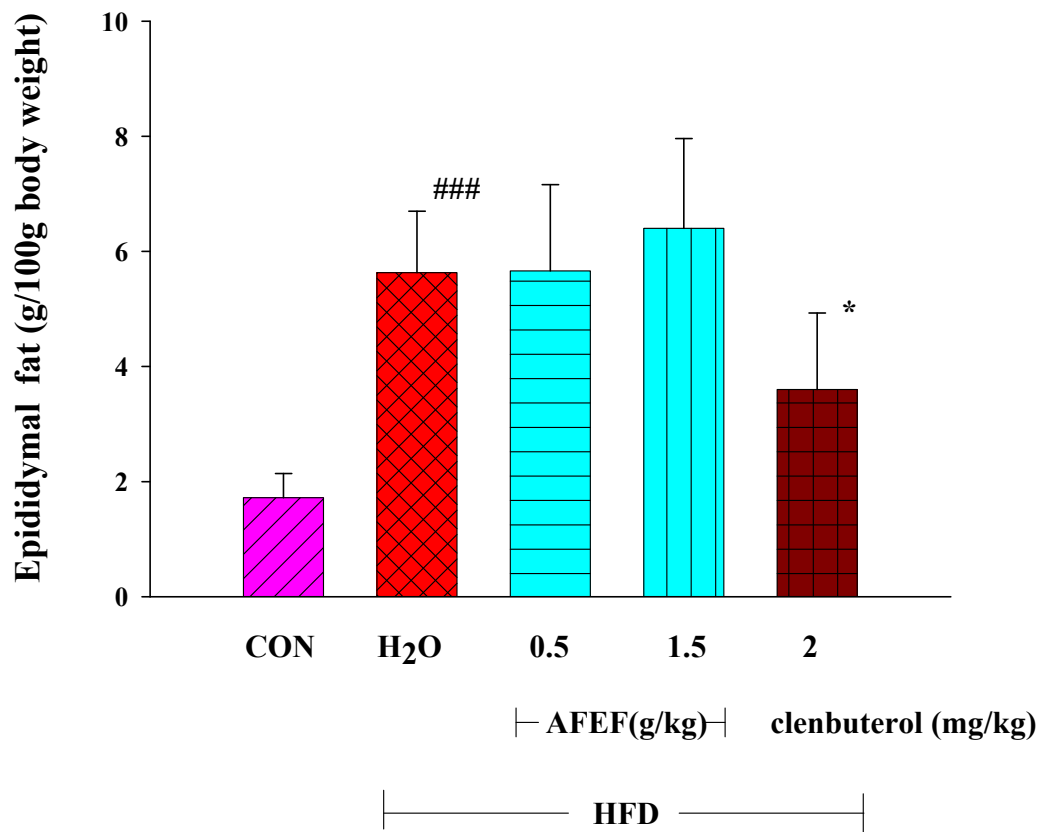


Fig. 4-2 Effect of AFEF on epididymal fat weight percentage (%) in mice with high fat diet-induced obesity. All values are means \pm S.D. (N=8). ### $p < 0.001$ as compared with the control group. ** $p < 0.01$, as compared with the HFD + H₂O group.

HFD: high fat diet

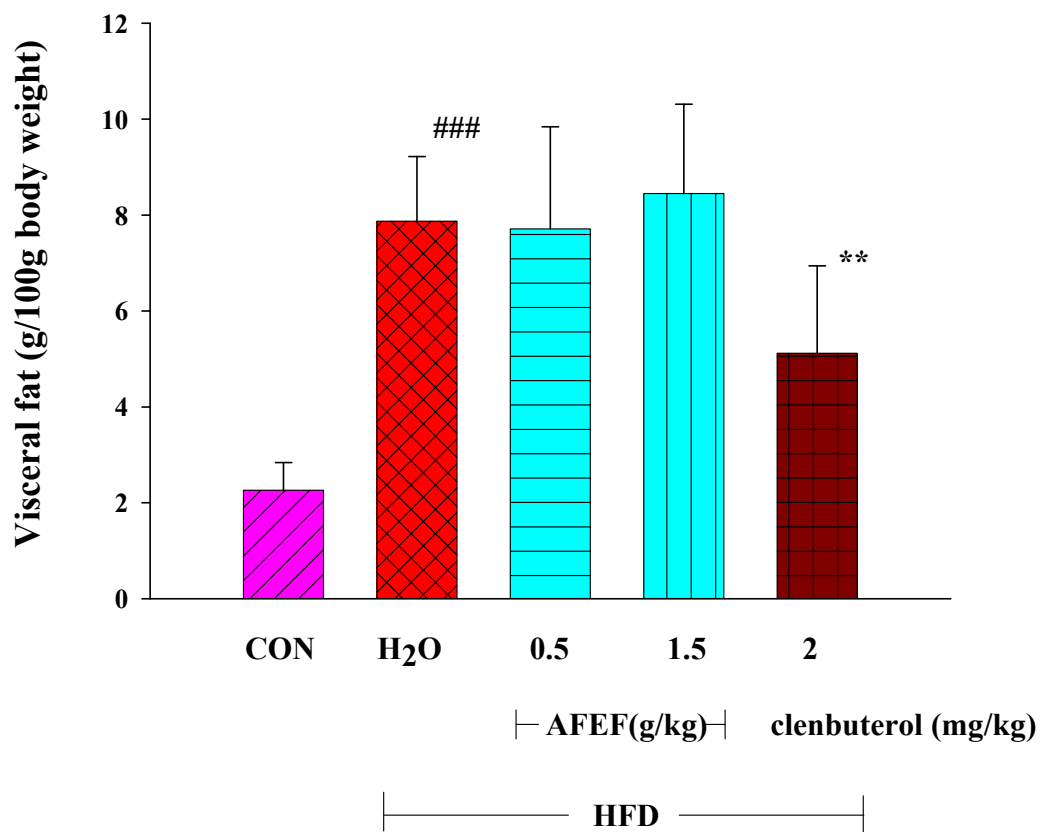


Fig. 4-3 Effect of AFEF on visceral fat weight percentage (%) in mice with high fat diet-induced obesity. All values are means \pm S.D. (N=8). ### $p < 0.001$ as compared with the control group. ** $p < 0.01$, as compared with the HFD + H₂O group.

HFD: high fat diet

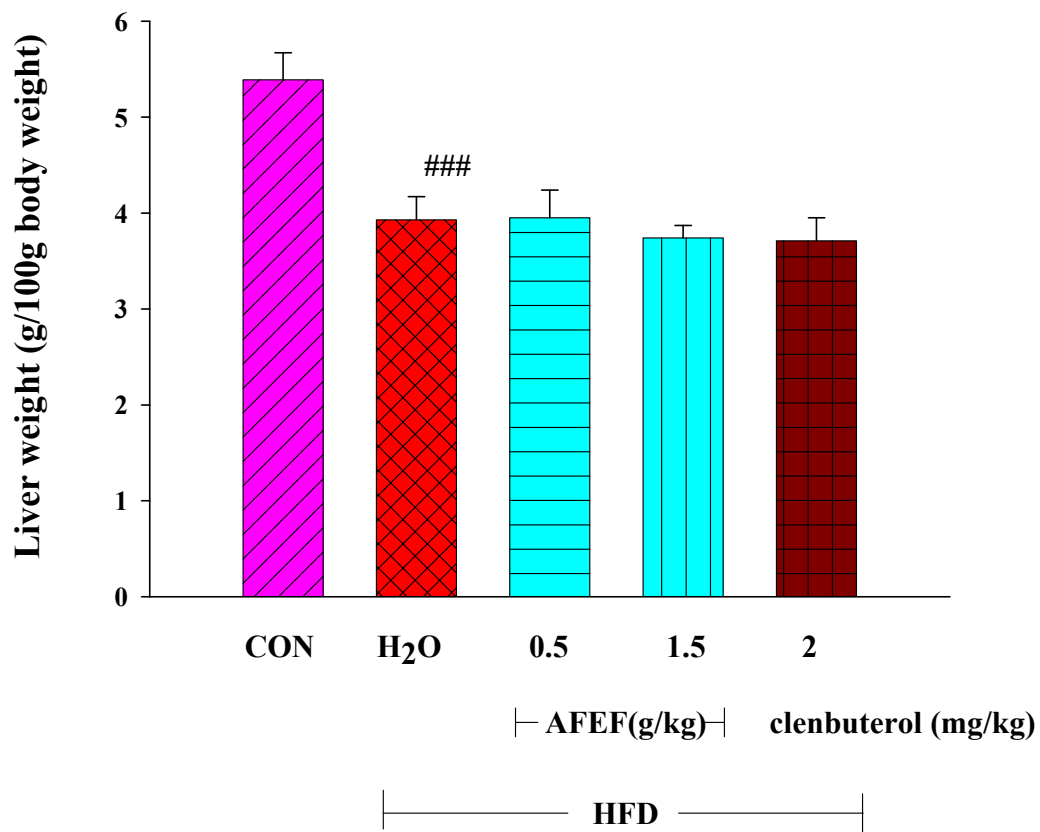


Fig. 4-4 Effect of AFEF on liver weight percentage (%) in mice with high fat diet-induced obesity. All values are means \pm S.D. (N=8). ^{###} $p < 0.001$ as compared with the control group.

HFD: high fat diet

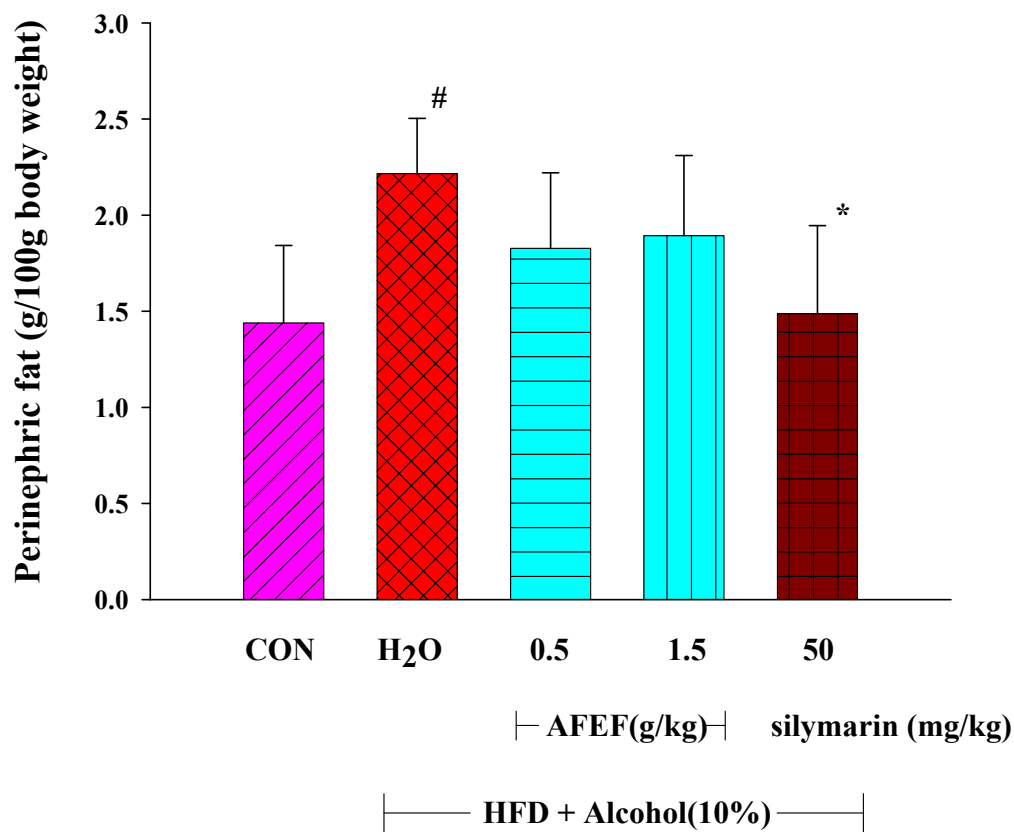


Fig. 4-5 Effect of AFEF on perinephric fat weight percentage (%) in mice were fed a HFD supplemented with 10% alcohol. All values are means \pm S.D. (N=8). # p <0.05 as compared with the control group. * p <0.05, as compared with the HFD +10% alcohol + H₂O group.

HFD: high fat diet

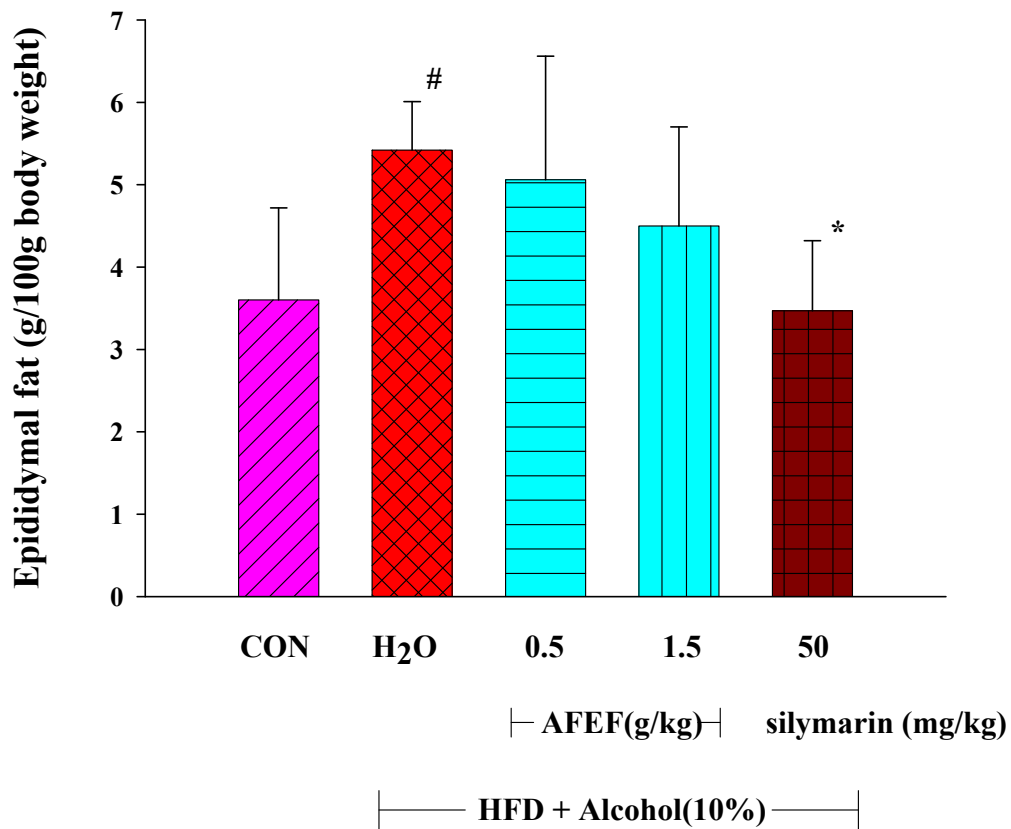


Fig. 4-6 Effect of AFEF on epididymal fat weight percentage (%) in mice were fed a HFD supplemented with 10% alcohol. All values are means \pm S.D. (N=8). # p <0.05 as compared with the control group. * p <0.05, as compared with the HFD +10% alcohol+ H₂O group.

HFD: high fat diet

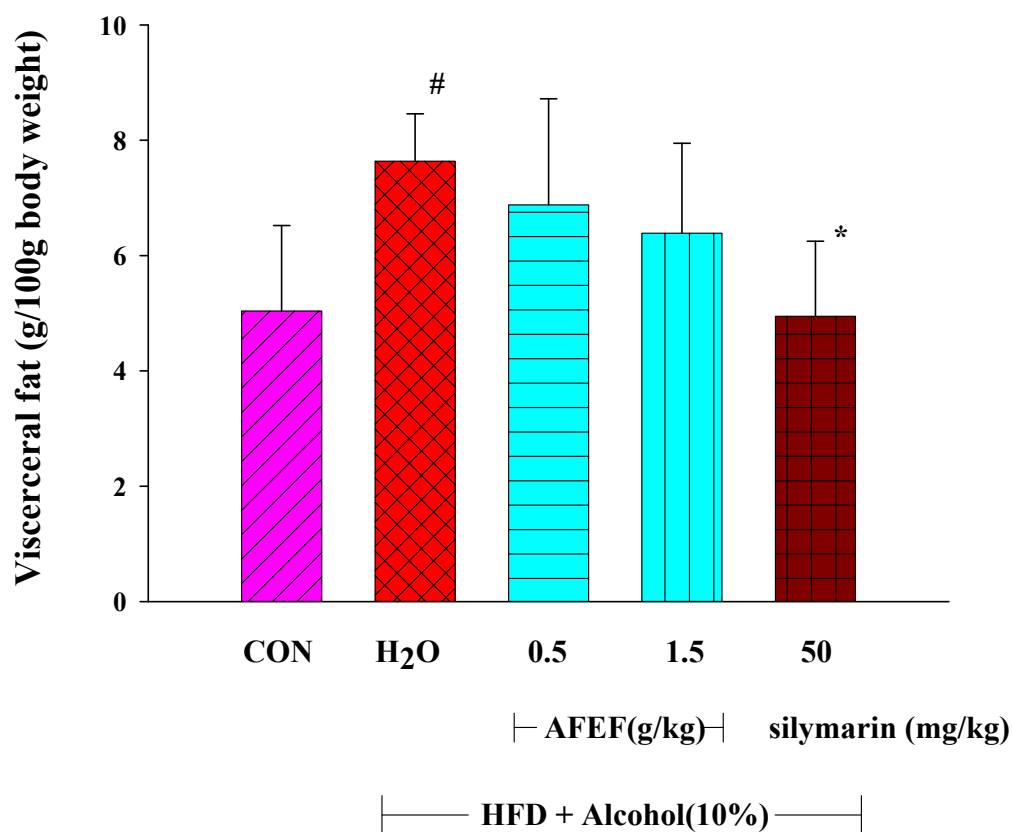


Fig. 4-7 Effect of AFEF on visceral fat weight percentage (%) in mice were fed a HFD supplemented with 10% alcohol. All values are means \pm S.D. (N=8). # p <0.05 as compared with the control group. * p <0.05, as compared with the HFD +10% alcohol+ H₂O group.

HFD: high fat diet

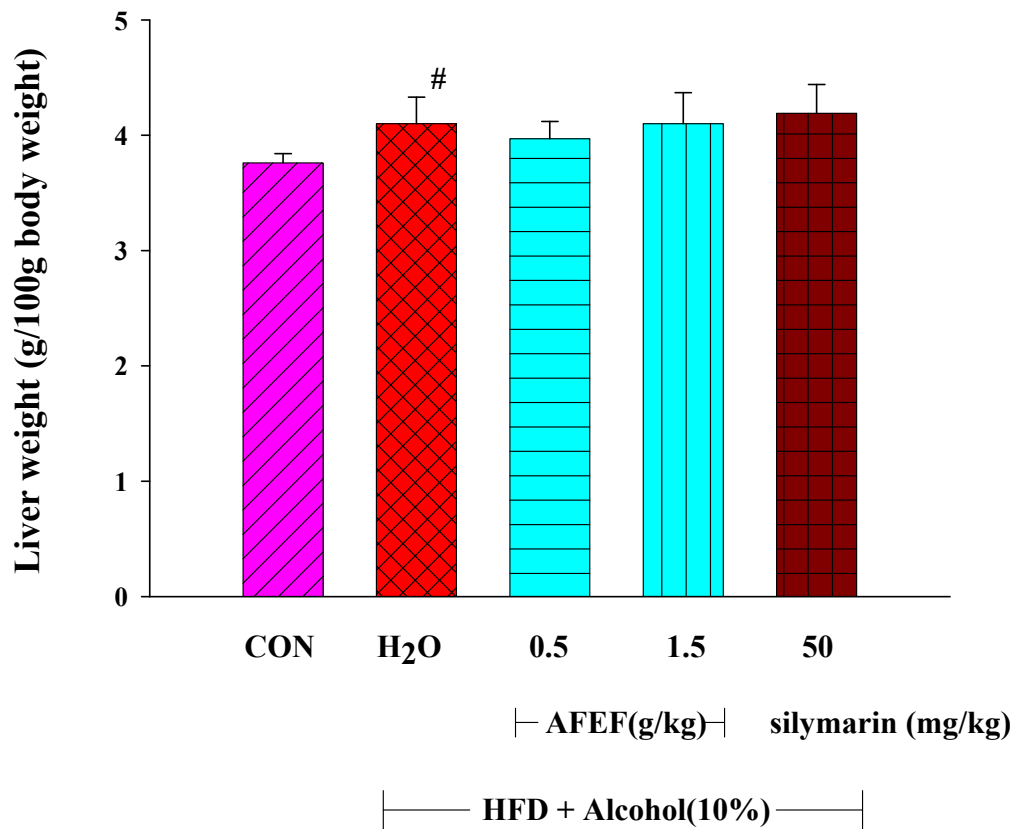


Fig. 4-8 Effect of AFEF on relative liver weight percentage (%) in mice were fed a HFD supplemented with 10% alcohol. All values are means \pm S.D. (N=8). [#] $p < 0.05$ as compared with the control group.

HFD: high fat diet

第五章 結論

代謝症候群代表容易產生心血管疾病的一群特定危險因素，預防或減緩代謝症候群可以減少心血管疾病的發生，對糖尿病患者合併心血管疾病高死亡率顯的尤為重要。在本論文中將以小鼠誘導糖尿病、糖尿病合併高血脂及肥胖等動物模式探討台灣金線連對心血管疾病之治療效果是否存在。

多次低劑量 STZ 誘導糖尿病的機轉為使胰臟蘭氏小島 β 細胞免疫性發炎、最後 β 細胞完全破壞無法產生胰島素，在此動物模式中排除改善胰島素阻抗的降血糖機轉，而探討其他的降血糖作用如延緩小腸吸收葡萄糖速率、減少肝中葡萄糖產生及改善骨骼肌中非經由胰島素作用的其他機轉，這些降血糖機轉為胰島素缺乏或阻抗之共同機轉。

在糖尿病動物實驗中顯示，AFEF 降血糖機轉可能是活化糖尿病小鼠骨骼肌中葡萄糖轉運蛋白第 4 型 (glucose transporter type 4 ; GLUT4) 和 AMP 活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase; AMPK) 基因表現，結果顯示 AFEF 可以改善胰島素缺乏或阻抗造成的高血糖，可以應用於治療第 1 型及第 2 型糖尿病。

糖尿病合併高血脂的動物實驗中顯示， AFEF 降血脂機轉除了

與胰島素相同作用，可能經由降血糖作用而改善脂肪代謝混亂外，也可以經由減少低密度脂蛋白 (Low-density lipoprotein; LDL) 及提高高密度脂蛋白 (High-density lipoprotein; HDL) 代謝而達到降血脂效果，可以應用於明顯降低糖尿病患者合併心血管疾病高死亡率。

總結以上結果，台灣金線連可應用於減少代謝症候群的發生，治療第 1 型及第 2 型糖尿病及減少動脈粥樣硬化造成的心血管疾病。



參考文獻

1. 行政院衛生署， 100 年國人主要死因統計，取自 http://www.doh.gov.tw/CHT2006/DM/DM2_p01.aspx?class_no=25&level_no=1&doc_no=84788，2011。
2. 李蜚鴻，「飲食沒概念，台灣男女更胖了」，健康世界 2009; 288: 64。
3. Natali A, Ferrannini E. Hypertension, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2004; 33: 417-429.
4. 張林，糖尿病人為何容易高血脂，中華養生保健 2009; 8: 7。
5. Fruchart JC, Duriez P. HDL-C and triglyceride as therapeutic targets. *Curr Opin Lipidol.* 2002; 13: 605-616.
6. 宋剛、徐作蘭，頸動脈硬化與糖尿病及合併高血脂高血壓的關係，中國誤診學雜誌 2009; 9: 581-582。
7. 康瑋、趙麗岩，糖尿病高血脂與冠心病相關性研究，現代中西醫雜誌 2007; 16: 3509-3510。
8. 中華本草，上海科學技術出版社 1999; 8: 672。
9. 曾健、林竟成、黃堅航，金線連應用與開發，海峽藥學 1996; 8: 82-83。
10. Su HJ. Orchidaceae.-In: Huang TC. The Editorial Committee of the Flora of Taiwan, Department of Botany, national Taiwan University, Taipei. *Flora of Taiwan* 2000; 5: 984-990.
11. 蕭翌柱、高瑞隆、賴瑞聲、胡敏夫，台灣金線連之產品開發及利用，林業研究專訊 2007; 14(4): 34-36。
12. 江芙美，台灣金線連成分天麻素及天麻元及尿密啶之藥物動力學

研究，中國醫藥大學碩士論文 2003。

13. Cheng HY, Lin WC, Kiang FM, Wu LY, Peng WH. *Anoectochilus formosanus* attenuates amnesia induced by scopolamine in rats. *J Chin Med.* 2003; 14: 235-245.
14. Wang SY, Kuo YH, Chang HN, Kang PL, Tsay HS, Lin KF, Yang NS, Shyur LF. Profiling and characterization antioxidant activities in *Anoectochilus formosanus* Hayata. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 1859-1865.
15. Shih CC, Wu YW, Lin WC. Scavenging of reactive oxygen species and inhibition of the oxidation of low density lipoprotein by the aqueous extraction of *Anoectochilus formosanus*. *Am J Chin Med.* 2003; 31: 25-36.
16. Wang LF, Lin CM, Shih CM, Chen HJ, Su B, Tseng CC, Gau BB, Cheng KT. Prevention of cellular oxidative damage by an aqueous extract of *Anoectochilus formosanus*. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1042: 379-386.
17. Ito K, Kasai R, Yamasaki K, Sugimoto H. Aliphatic and aromatic glucosides from *Anoectochilus koshunensis*. *Phytochemistry* 1993; 33: 1133-1137.
18. Takashi T, Yago H, Nakamura M. Hypoglycemics and lipid metabolism-improving agents containing 3-glucosyloxy-4-hydroxybutyric acid or its derivatives from plant. *Jpn Kokai Tokyo Koho JP.* 1995; 7: 76522.
19. Shih CC, Wu YW, Lin WC. Antihyperglycaemic and anti-oxidant properties of *Anoectochilus formosanus* in diabetic rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2002; 29: 684-688.
20. Lin JM, Lin CC, Chiu HF, Yang JJ, Lee SG. Evaluation of the anti-inflammatory and liver-protective effects of *Anoectochilus formosanus*, *Ganoderma lucidum* and *Gynostemma pentaphyllum*

- in rats. *Am J Chin Med.* 1993 ; 21: 59-69.
21. Lin CC, Huang PC, Lin JM. Antioxidant and hepatoprotective effects of *Anoectochilus formosanus* and *Gynostemma pentaphyllum*. *Am J Chin Med.* 2000 ; 28: 87-96.
 22. Du XM, Sun NY, Hayashi J, Chen Y, Sugiura M, Shoyama Y. hepatoprotective and antihyperliposis activities of in vitro cultured *Anoectochilus formosanus*. *Phytother Res.* 2003; 17: 30-33.
 23. Shih CC, Wu YW, Lin WC. Aqueous extract of *Anoectochilus formosanus* attenuate hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Phytomedicine* 2005 ; 12: 453-460.
 24. Shih CC, Wu YW, Hsieh CC, Lin WC. Effect of *Anoectochilus formosanus* on fibrosis and regeneration of the liver in rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004; 31: 620-5.
 25. 曾金章、許政成、鄭可大，台灣金線連免疫及抗腫瘤活性成分之研究，天然藥物研討會 2000; 45。
 26. 蔣建興、呂思潔、呂廷璋，台灣金線連 (*Anoectochilus formosanus* Hayata) 水溶性多醣的免疫調節活性，台灣保健食品學會 2004; 59。
 27. 張文潔、許如君、莊文儀、許輔，台灣金線連免疫調節蛋白之純化與活性分析，台灣保健食品學會 2004; 56。
 28. 徐致芬，台灣金線連有效分劃對小鼠非特意異性免疫的調節，中國醫藥大學碩士論文 2004。
 29. 蕭宏柏，台灣金線連有效萃取物對卵蛋白誘發小鼠呼吸道過度反應之免疫調節作用，中國醫藥大學碩士論文 2004。
 30. 施純青，台灣金線連對大鼠之藥理活性研究，中國醫藥大學博士論文 2002。

31. Yang NS, Shyur LF, Chen CH, Wang SY, Tzeng CM. Medicinal herb extract and a single-compound drug confer similar complex pharmacogenomic activities in mcf-7 cells. *J Biomed Sci.* 2004; 11: 418.
32. 謝俊生，台灣金線連抑制肝癌細胞生長抗氧化機制的探討，中國醫藥大學碩士論文 2002。
33. Tseng CC, Shang HF, Wang LF, Su B, Hsu CC, Kao HY, Cheng KT. Antitumor and immunostimulating effects of *Anoectochilus formosanus* Hayata. *Phytomedicine* 2006; 13(5): 366-370.
34. 林宗輝，臺灣蘭科植物石斛、連珠石斛與臺灣金線連之化學成分及藥理活性研究，中國醫藥大學博士論文 2001。
35. 陳慧如，中藥金線連對兔子血小板花生四烯酸新陳代謝的影響及其有效成分之研究，成功大學碩士論文 1993。
36. Huang DD, Law RCS, Mak OT. Effects of tissue-cultured *Anoectochilus formosanus* Hay. Extracts on the arachidonate metabolism. *Bot Bull Academia Sinica* 1991; 32: 113-119.
37. 詹前朕、侯嘉隆、鍾楚紅、劉武哲，以體外細胞培養法建立抗病毒中藥篩檢，*藥物食品分析* 1994; 2: 13-132。
38. Shih CC, Wu YW, Lin WC. Ameliorative effects of *Anoectochilus formosanus* extract on osteopenia in ovariectomized rats. *J Ethnopharmacol.* 2001; 77: 233–238.
39. Huang L, Cao Y, Xu H, Chen G. Separation and purification of ergosterol and stigmasterol in *Anoectochilus roxburghii* (wall) Lindl by high-speed counter-current chromatography. *J Sep Sci.* 2011; 34: 385-392.
40. Wu JB, Lin WL, Hsieh CC, Ho HY, Tsay HS, Lin WC. The hepatoprotective activity of kinsenoside from *Anoectochilus formosanus*. *Phytother Res.* 2007; 21: 58-61.

41. Hsiao HB, Wu JB, Lin H, Lin WC. Kinsenoside isolated from *Anoectochilus formosanus* suppresses LPS-stimulated inflammatory reactions in macrophages and endotoxin shock in mice. *Shock* 2011; 35: 184-190.
42. Du XM, Irino N, Furusho N, Hayashi J, Shoyama Y. Pharmacologically active compounds in the *Anoectochilus* and *Goodyera* species. *J Nat Med.* 2008; 62: 132-148. °
43. Zhang Y, Cai J, Ruan H, Pi H, Wu J. Antihyperglycemic activity of kinsenoside, a high yielding constituent from *Anoectochilus roxburghii* in streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2007; 114: 141-145.
43. Anderson PJ, Critchley JA, Chan JC, Cockram CS, Lee ZS, Thomas GN, Tomlinson B. Factor analysis of the metabolic syndrome: obesity vs insulin resistance as the central abnormality. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001; 25: 1782-1788.
44. Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL, Kodama K, Retzlaff BM, Brunzell JD, Shofer JB, Fish BE, Knopp RH, Kahn SE. Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes* 2004; 53: 2087-2094.
45. Nesto RW. The relation of insulin resistance syndromes to risk of cardiovascular disease. *Rev Cardiovasc Med.* 2003; 4: S11-18.
46. Gustat J, Srinivasan SR, Elkasabany A, Berenson GS. Relation of self-rated measures of physical activity to multiple risk factors of insulin resistance syndrome in young adults: the Bogalusa Heart Study. *J Clin Epidemiol.* 2002; 55: 997-1006.
47. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic

- syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 2002; 287: 356-359.
48. Apridonidze T, Essah PA, Iuorno MJ, Nestler JE. Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90: 1929-1935.
49. Saad F, Gooren L. The role of testosterone in the metabolic syndrome: a review. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009; 114: 40-43.
50. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37: 1595-1607.
51. Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: Report of the national heart, lung, and blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004; 109: 433-438.
52. Ford ES, Li C, Zhao G. Prevalence and correlates of metabolic syndrome based on a harmonious definition among adults in the US. *J Diabetes* 2010; 2: 180-193.
53. Martínez MA, Puig JG, Mora M, Aragón R, O'Dogherty P, Antón JL, Sánchez-Villares T, Rubio JM, Rosado J, Torres R, Marcos J, Pallardo LF, Banegas JR; MAPA (Monitorización Ambulatoria de la Presión Arterial) Working Group. Metabolic syndrome: prevalence, associated factors, and C-reactive protein: the MADRIC (MADrid RIESgo Cardiovascular) study. *Metabolism* 2008; 57: 1232-1240.
54. Zanchetti A, Hennig M, Baurecht H, Tang R, Cuspidi C, Carugo S, Mancia G. Prevalence and incidence of the metabolic

- syndrome in the European Lacidipine Study on atherosclerosis (ELSA) and its relation with carotid intima-media thickness. *J Hypertens.* 2007; 25: 2463-2470.
55. Athyros VG, Bouloukos VI, Pehlivanidis AN, Papageorgiou AA, Dionysopoulou SG, Symeonidis AN, Petridis DI, Kapousouzi MI, Satsoglou EA, Mikhailidis DP; MetS-Greece Collaborative Group. The prevalence of the metabolic syndrome in Greece: the MetS-Greece Multicentre Study. *Diabetes Obes Metab.* 2005; 7: 397-405.
56. Escobedo J, Schargrotsky H, Champagne B, Silva H, Boissonnet CP, Vinueza R, Torres M, Hernandez R, Wilson E. Prevalence of the metabolic syndrome in Latin America and its association with sub-clinical carotid atherosclerosis: the CARMELA cross sectional study. *Cardiovasc Diabetol.* 2009; 8: 52.
57. Thomas GN, Ho SY, Janus ED, Lam KS, Hedley AJ, Lam TH; Hong Kong Cardiovascular Risk Factor Prevalence Study Steering Committee. The US National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III) prevalence of the metabolic syndrome in a Chinese population. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005; 67: 251-257.
58. Lee J, Ma S, Heng D, Tan CE, Chew SK, Hughes K, Tai ES. Should central obesity be an optional or essential component of the metabolic syndrome? Ischemic heart disease risk in the Singapore Cardiovascular Cohort Study. *Diabetes Care* 2007; 30: 343-347.
59. Park HS, Kim SM, Lee JS, Lee J, Han JH, Yoon DK, Baik SH, Choi DS, Choi KM. Prevalence and trends of metabolic syndrome in Korea: Korean National Health and Nutrition Survey. 1998-2001. *Diabetes Obes Metab.* 2007; 9: 50-58.

60. 行政院衛生署，代謝症候群防治工作手冊(96年初版)，取自
http://www.bhp.doh.gov.tw/bhpnet/portal/Them_Show.aspx?Subject=200712250023&Class=2&No=200803200034。
61. 行政院衛生署國民健康局，成人(20歲以上)代謝症候群之判定標準(2007台灣)，6月21日，取自
http://www.bhp.doh.gov.tw/BHPnet/Portal/Them_Show.aspx。
62. 行政院衛生署國民健康保險局，2009年台灣代謝症候群認知調查，取自
<http://www.bhp.doh.gov.tw/BHPnet/Portal/PressShow.aspx?No=200912100002>。
63. Grundy SM. Pre-diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 59: 635-643.
64. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med.* 2002; 346: 393-403.
65. Lee WC, Wang CJ, Chen YH, Hsu JD, Cheng SY, Chen HC, Lee H J. Polyphenol extracts from *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus attenuate nephropathy in experimental type 1 diabetes. *J Agric Food Chem.* 2009; 57: 2206-2210.
66. Rabinovitch A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev.* 1998; 14: 129-151.
67. Tisch R, McDevitt H. Insulin-dependent diabetes mellitus *Cell.* 1996; 85: 291-297.
68. Kromann H. Experimentally induced glucose intolerance as model of insulin-dependent diabetes mellitus. *Dan Med Bull.* 1983; 30: 309-320.
69. Heptulla RA, Stewart A, Enocksson S, Rife F, Ma TY, Sherwin

- RS, Tamborlane WV, Caprio S. In situ evidence that peripheral insulin resistance in adolescents with poorly controlled type 1 diabetes is associated with impaired suppression of lipolysis: a microdialysis study. *Pediatr Res.* 2003; 53: 830-835.
70. Prager R, Wallace P, Olefsky JM. Direct and indirect effects of insulin to inhibit hepatic glucose output in obese subjects. *Diabetes* 1987; 36: 607-611.
71. Kahn BB, Rosen AS, Bak JF, Andersen PH, Damsbo P, Lund S, Pedersen O. Expression of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle of humans with insulin-dependent diabetes mellitus: regulatory effects of metabolic factors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992; 74: 1101-1109.
72. Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 1976; 193: 415-417.
73. Paik SG, Fleischer N, Shin SI. Insulin-dependent diabetes mellitus induced by subdiabetogenic doses of streptozotocin: obligatory role of cell-mediated autoimmune processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77: 6129-6133.
74. Kromann H, Christy M, Lernmark A, Nedergaard M, Nerup J. The low dose streptozotocin murine model of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: studies in vivo and in vitro of the modulating effect of sex hormones. *Diabetologia* 1982; 22: 194-198.
75. Shih CC, Wu YW, Lin WC. Ameliorative effects of *Anoectochilus formosanus* extract on osteopenia in ovariectomized rats. *J Ethnopharmacol.* 2001; 77: 233-238.
76. Ikeuchi M, Yamaguchi K, Nishimura T, Yazawa K. Effects of *Anoectochilus formosanus* on endurance capacity in mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2005; 51: 40-44.

77. Fang H L, Wu JB, Lin W L, Ho HY, Lin W C. Further studies on the hepatoprotective effects of *Anoectochilus formosanus*. *Phytother Res*. 2008; 22: 291-296.
78. Nassir F, Blanchard RK, Mazur A, Cousins RJ, Davidson NO. Apolipoprotein B mRNA editing is preserved in the intestine and liver of zinc-deficient rats. *J Nutr*. 1996; 126: 860-864.
79. Lo S, Russell JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol*. 1970; 28: 234-236.
80. Messer M, Dahlqvist A. A one-step ultramicro method for the assay of intestinal disaccharidases. *Anal Biochem*. 1966; 14: 376-392.
81. Lowry OH, Rosebrough NL, Farr AL, Randdall RJ. Protein measurement with the folinophenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-275.
82. Nagasaki M, Nakai N, Oshida Y, LiZ, Xu M, Obayashi M, Murakami T, Yoshimura A, Fujitsuka N, Shimomura Y, Sato Y. Exercise training prevents maturation-induced decreases in insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in rat skeletal muscle. *Metabolism* 2000; 49: 954-959.
83. Nakai N, Shimomura Y, Ohsaki N, Sato J, Oshida Y, Ohsawa I, Fujitsuka N, Sato Y. Exercise training prevents maturation-induced decrease in insulin sensitivity. *J Appl Physiol*. 1996; 80: 1963-1967.
84. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162: 156-159.
85. Manoucheri M, Karunaratne HB. The role of imaging techniques in stress testing. *Prim Care* 1994 ; 21: 535-555.
86. Kageyama S, Nakamichi N, Sekino H, Nakano S. Comparison of

- the effects of acarbose and voglibose in healthy subjects. *Clin Ther.* 1997 ; 19: 720-729.
87. Guthrie RA, Guthrie DW. Pathophysiology of diabetes mellitus. *Crit Care Nurs Q* 2004; 27: 113-125.
 88. Cherrington AD, Stevenson RW, Steiner KE, Connolly CC, Wada M, Goldstein RE. Acute hormonal regulation of gluconeogenesis in the conscious dog. *Adv Exp Med Biol.* 1993; 334: 199-208.
 89. Cherrington AD, Fuchs H, Stevenson RW, Williams PE, Alberti KG, Steiner KE. Effect of epinephrine on glycogenolysis and gluconeogenesis in conscious overnight-fasted dog. *Am J Physiol.* 1984; 247: E137-E144.
 90. Scott DK, O'Doherty RM, Stafford JM, Newgard CB, Granner DK. The repression of hormone-activated PEPCK gene expression by glucose is insulin-independent but requires glucose metabolism. *J Biol Chem.* 1998; 273: 24145-24151.
 91. Jessen N, Goodyear LJ. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2005; 99: 330-337.
 92. Kurth-Kraczek EJ, Hirshman MF, Goodyear LJ, Winder WW. 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes* 1999 ; 48: 1667-1671.
 93. Zheng D, MacLean PS, Pohnert SC, Knight JB, Olson AL, Winder WW, Dohm GL. Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase. *J Appl Physiol.* 2001; 91: 1073-1083.
 94. McGee SL, van Denderen BJ, Howlett KF, Mollica J, Schertzer JD, Kemp BE, Hargreaves M. AMP-activated protein kinase regulates GLUT4 transcription by phosphorylating histone deacetylase 5. *Diabetes* 2008; 57: 860-867.

95. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A. Hypertriglyceridemia and elevated lipoprotein(a) are risk factors for major coronary events in middle-aged men. *Am J Cardiol.* 1996; 77: 1179-1184.
96. Fruchart JC, Duriez P. HDL and triglyceride as therapeutic targets. *Curr Opin Lipidol.* 2002; 13: 605-616.
97. 張林，糖尿病人為何容易高血脂，*中華養生保健雜誌* 2009; 8: 7。
98. 宋剛、徐作蘭，頸動脈硬化與糖尿病及合併高血脂高血壓的關係，*中國誤診學雜誌* 2009; 9: 581-582。
99. 康瑋、趙麗岩，糖尿病高血脂與冠心病相關性研究，*現代中西醫雜誌* 2007; 16 : 3509-3510。
100. 汪鳳蘭、王秋芬、王寶霞，血脂異常與超重、高血壓病、冠心病、糖尿病關係分析，*心血管康復醫學雜誌* 1999; 8 : 63-64。
101. 黃瑞鴻，老年糖尿病併冠心病的臨床分析，*心血管康復醫學雜誌* 2001; 10: 348-349。
102. Goldberg IJ, Dansky HM. Diabetic vascular disease: an experimental objective. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 1693-701.
103. Goldberg RB. Hyperlipidemia and cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes. *Am J Manag Care* 2000; 6: S682-91.
104. Carneiro AV. Coronary heart disease in diabetes mellitus: risk factors and epidemiology. *Rev Port Cardiol.* 2004t; 23: 1359-66.
105. Moon YS, Kashyap ML. Pharmacologic treatment of type 2 diabetic dyslipidemia. *Pharmacotherapy* 2004; 24: 1692-1713.
106. Harano Y, Kojima H, Kosugi K, Suzuki M, Harada M, Nakano T, Hidaka H, Kashiwagi A, Torii R, Taniguchi Y, Nishimoriç T, Yasudaa Y, Shigeta Y. Hyperlipidemia and atherosclerosis in

- experimental insulinopenic diabetic monkeys. *Diabetes Res Clin Pract.* 1992; 16: 163–173.
107. Litwak KN, Cefalu WT, Wagner JD. Chronic hyperglycemia increases arterial low-density lipoprotein metabolism and atherosclerosis in cynomolgus monkeys. *Metabolism* 1998; 47: 947–954.
108. Tsutsumi K, Iwamoto T, Hagi A, Kohri H. Streptozotocin-induced diabetic cynomolgus monkey is a model of hypertriglyceridemia with low high-density lipoprotein cholesterol. *Biol Pharm Bull.* 1998; 21: 693–697.
109. Dixon JL, Stoops JD, Parker JL, Laughlin MH, Weisman GA, Sturek M. Dyslipidemia and vascular dysfunction in diabetic pigs fed an atherogenic diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 2981–2992.
110. Gerrity RG, Natarajan R, Nadler JL, Kimsey T. Diabetes-induced accelerated atherosclerosis in swine. *Diabetes* 2001; 50: 1654–1665
111. 行政院衛生署國民健康局九九網站，柳腰豐臀的完美對話—身體曲線與健康，取自 <http://health99.doh.gov.tw/TXT/PreciousLifeZone/print.aspx?ToPicNo=52&DS=1-Article>。
112. Brasaemle DL. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res.* 2007; 48: 2547–2559.
113. Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3–L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 2004;

- 279: 46835–46842.
114. Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP, Kimmel AR. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin Cell Dev Biol.* 1999; 10: 51–58.
 115. Duncan ND, Williams DA, Lynch GS. Deleterious effects of chronic clenbuterol treatment on endurance and sprint exercise performance in rats. *Clin Sci.* 2000; 98: 339-347.
 116. Hoshino D, Yoshida Y, Holloway GP, Lally J, Hatta H, Bonen A. Clenbuterol, a β 2-adrenergic agonist, reciprocally alters PGC-1 alpha and RIP140 and reduces fatty acid and pyruvate oxidation in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2012 ; 302: R373-384.
 117. Zhang Y, Wu Y. Toxicological effects of clenbuterol in human and animals. *Wei Sheng Yan Jiu.* 2002; 31:328-330.
 118. Kuiper HA, Noordam MY, van Dooren-Flipsen MM, Schilt R, Roos AH. Illegal use of beta-adrenergic agonists: European Community. *J Anim Sci.* 1998; 76:195-207.
 119. Mitchell GA, Dunnavan G. Illegal use of beta-adrenergic agonists in the United States. *J Anim Sci.* 1998; 76:208-211.
 120. Ogasawara M, Hirose A, Ono M, Aritake K, Nozaki Y, Takahashi M, Okamoto N, Sakamoto S, Iwasaki S, Asanuma T, Taniguchi T, Urade Y, Onishi S, Saibara T, Oben JA. A novel and comprehensive mouse model of human non-alcoholic steatohepatitis with the full range of dysmetabolic and histological abnormalities induced by gold thioglucose and a high-hfd diet. *Liver Int.* 2011; 31: 542-551.