

中國醫藥大學營養學系碩士班  
碩士論文

山苦瓜改善高油高糖餵食大鼠  
腹部體脂堆積及胰島素抗性

**Wild Bitter Melon Ameliorate Abdominal  
Fat Accumulation and Insulin Resistance  
in High Fat High Sugar Fed Rats**

研究生：洪雅雯 撰 Ya - Wen Hong

指導教授：趙蓓敏 博士 Pei - Min Chao, Ph. D

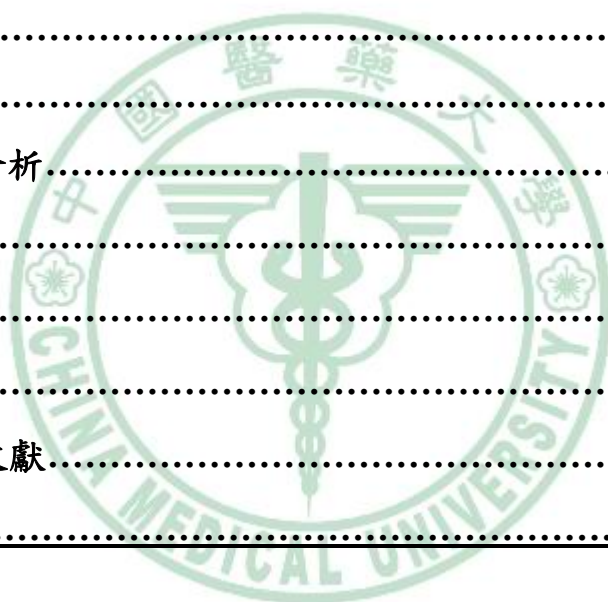
中華民國九十五年六月  
June, 2006

## 目錄

縮寫對照表.....	I
組別縮寫意義.....	III
摘要.....	IV
Abstract.....	VI
第一章 前言.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
一、 過氧化體與過氧化體活化增殖接受器.....	2
(一) 過氧化體 Peroxisome.....	2
(二) Peroxisomal fatty acid $\beta$ - oxidation.....	2
(三) 過氧化體增殖劑 Peroxisome proliferators.....	3
(四) 過氧化體增殖劑活化接受器 Peroxisome proliferator - activated receptor.....	3
二、 脂肪細胞生合成 Adipogenesis.....	11
(一) 脂肪細胞生合成的 In vitro 模式.....	11
(二) 脂肪組織來自 Multipotent stem cells.....	12
(三) 脂肪細胞生合成的過程.....	13
(四) 脂肪細胞生合成的轉錄調控.....	16
(五) 刺激脂肪細胞生合成的因子.....	27
(六) 抑制脂肪細胞生合成的因子.....	28
三、 脂肪細胞是內分泌器官影響胰島素抗性.....	33
(一) Secretory function of adipose tissue.....	33
(二) Insulin resistance.....	34
(三) Adipocytokines.....	36
四、 代謝症候群 Metabolic syndrome.....	43
(一) Characteristic of metabolic syndrome.....	43
(二) Definition of metabolic syndrome.....	44

五、 苦瓜 <i>Momordica charantia</i> .....	46
(一) 苦瓜的植物化學成分(Phytochemicals).....	47
(二) 苦瓜的藥理特性.....	48
(三) 苦瓜與PPAR.....	51
(四) 抗肥胖活性 Antiobesity activity.....	51
(五) 台灣山苦瓜.....	53
第三章 材料與方法.....	55
實驗設計.....	55
實驗流程設計.....	56
一、 山苦瓜凍乾粉的製備.....	57
二、 山苦瓜凍乾粉乙酸乙酯萃物.....	57
三、 試驗飼料之配製.....	57
四、 動物飼養.....	60
五、 動物犧牲及樣品收集.....	61
六、 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) 酵素活性測定	62
七、 Lipoprotein lipase (LPL) 酵素活性測定.....	66
八、 脂解速率測定.....	70
九、 血清脂質分析.....	72
(一) 血清三酸甘油酯含量測定.....	72
(二) 血清膽固醇含量測定.....	73
(三) 血清游離脂肪酸測定.....	74
十、 脂肪組織三酸甘油酯含量測定.....	75
十一、 脂肪組織 DNA 含量測定.....	76
十二、 鐵酸染色固定.....	78
十三、 口服葡萄糖耐受測試 Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)...	81

十四、 禁食全血葡萄糖含量測定.....	81
十五、 禁食血清胰島素測定.....	82
十六、 禁食血清 Adiponectin 測定.....	83
十七、 以北方點墨法(Northern blot)分析 PPAR $\gamma$ 、Adiponectin、 Leptin、LPL 及 ADD1 / SERBP1 c mRNA 表現量.....	84
(一) 總 RNA 之抽取.....	84
(二) RNA 電泳.....	85
(三) RNA 轉印.....	88
(四) 探針標誌.....	89
(五) 雜交反應.....	90
十八、 統計分析.....	92
第四章 結果.....	93
第五章 討論.....	137
第六章 結論.....	150
第七章 參考文獻.....	151
附錄.....	185



## 表目錄

---

表 3 - 1	山苦瓜凍乾粉成分分析.....	58
表 3 - 2	大鼠試驗飼料組成.....	59
表 4 - 1	Wistar 大鼠餵食試驗飲食九週之初始體重、最終體重、攝食量、能量攝取、飼料效率及能量效率.....	100
表 4 - 2	Wistar 大鼠餵食試驗飲食九週之絕對組織重.....	111
表 4 - 3	Wistar 大鼠餵食試驗飲食九週之相對組織重.....	112
表 4 - 4	Wistar 大鼠餵食試驗飲食九週之腹膜後脂肪(RE)的脂肪細胞直徑.....	113
表 4 - 5	Wistar 大鼠餵食試驗飲食九週之副睪脂肪(EP)的脂肪細胞直徑.....	114
表 4 - 6	Wistar 大鼠餵食試驗飲食九週之腹膜後脂肪(RE)所含三酸甘油酯、DNA 與每毫克 DNA 中所含三酸甘油酯含量.....	115
表 4 - 7	Wistar 大鼠餵食試驗飲食九週之副睪脂肪(EP)所含三酸甘油酯、DNA 與每毫克 DNA 中所含三酸甘油酯含量.....	116
表 4 - 8	Wistar 大鼠餵食試驗飲食九週之禁食血脂質.....	117
表 5 - 1	大鼠餵食試驗飲食脂肪組織中脂質生合成基因表現.....	144

---

## 圖目錄

圖 2 - 1	PPAR之結構特徵.....	6
圖 2 - 2	PPAR之基因轉錄作用機制.....	7
圖 2 - 3	脂肪細胞生合成的過程.....	16
圖 2 - 4	A model of the transcriptional cascade leading to adipogenesis .....	25
圖 2 - 5	胰島素抗性、肥胖與代謝症候群之相關.....	44
圖 2 - 6	山苦瓜.....	54
圖 3 - 1	山苦瓜改善高油高糖餵食大鼠腹部體脂堆積及胰島素抗性之實 驗大綱.....	55
圖 3 - 2	山苦瓜改善高油高糖餵食大鼠腹部體脂堆積及胰島素抗性 之實驗流程設計.....	56
圖 4 - 1	Wistar 大鼠餵食試驗飲食期間之生長曲線.....	118
圖 4 - 2	Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週之腹部脂肪塊堆積重量.....	119
圖 4 - 3	Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週之腹膜後脂肪(RE)與副睪脂肪 (EP) G3PDH 酵素活性.....	120
圖 4 - 4	Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週之腹膜後脂肪(RE)與副睪脂肪 (EP) LPL 酵素活性.....	121
圖 4 - 5	Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週之腹膜後脂肪(RE)刺激與基礎 脂解速率.....	122
圖 4 - 6	Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週之副睪脂肪(EP)刺激與基礎 脂解速率.....	123
圖 4 - 7	Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週以北方點墨法偵測腹膜後脂肪 (RE) PPAR $\gamma$ mRNA 相對量.....	124

圖 4 - 8	Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週以北方點墨法偵測副睪脂肪(EP) PPAR $\gamma$ mRNA 相對量.....	125
圖 4 - 9	Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週以北方點墨法偵測腹膜後脂肪 (RE) Adiponectin mRNA 相對量.....	126
圖 4 - 10	Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週以北方點墨法偵測副睪脂(EP) Adiponectin mRNA 相對量.....	127
圖 4 - 11	Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週以北方點墨法偵測腹膜後脂肪 (RE) Leptin mRNA 相對量.....	128
圖 4 - 12	Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週以北方點墨法偵測副睪(EP) Leptin mRNA 相對量.....	129
圖 4 - 13	Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週以北方點墨法偵測腹膜後脂肪 (RE) LPL mRNA 相對.....	130
圖 4 - 14	Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週以北方點墨法偵測副睪(EP) LPL mRNA 相對量.....	131
圖 4 - 15	Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週以北方點墨法偵測腹膜後脂肪 (RE) ADD1 / SREBP1c mRNA 相對量.....	132
圖 4 - 16	Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週以北方點墨法偵測副睪脂(EP) ADD1 / SREBP1c mRNA 相對量.....	133
圖 4 - 17	Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週之禁食全血葡萄糖變化.....	134
圖 4 - 18	Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週之禁食血清胰島素變化.....	135
圖 4 - 19	Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週之血清 Adiponectin 濃度....	136
圖 5 - 1	Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週之 GOT 和 GPT 酵素活性...	149

附圖 1 - 1 五種山苦瓜品種乙酸乙酯萃物處理 24 小時對 3T3 - L1 前脂肪 細胞增生之影響.....	193
附圖 1 - 2 五種山苦瓜品種乙酸乙酯萃物處理 48 小時對 3T3 - L1 前脂肪 細胞增生之影響.....	194
附圖 1 - 3 TZD (BRL 49653) 處理 24 及 48 小時對 3T3 - L1 前脂肪細胞 增生之影響.....	195
附圖 1 - 4 四種山苦瓜品種乙酸乙酯萃物處理 7 天對 3T3 - L1 前脂肪細 胞分化之影響.....	196
附圖 1 - 5 四種山苦瓜品種乙酸乙酯萃物處理 11 天對 3T3 - L1 前脂肪細 胞分化之影響.....	197
附圖 1 - 6 18 : 1 游離脂肪酸與 Conjugated linolenic acid (CLN) 脂肪酸 處理 7 天對 3T3 - L1 前脂肪細胞分化之影響.....	198
附圖 1 - 7 18 : 1 游離脂肪酸與 Conjugated linolenic acid (CLN) 脂肪酸 處理 11 天對 3T3 - L1 前脂肪細胞分化之.....	199

---





**縮寫對照表**

縮 寫	全 名
<b>Acrp30</b>	<b>Adiponectin</b>
<b>ACC</b>	<b>Acetyl - CoA carboxylase</b>
<b>ACS</b>	<b>Acyl - CoA synthetase</b>
<b>ACO</b>	<b>Acetyl - CoA oxidase</b>
<b>ADD1</b>	<b>Adipocyte determination and differentiation factor 1</b>
<b>ADSF</b>	<b>Adipocyte - specific secretory factor</b>
<b>ALBP</b>	<b>Adipocyte lipid binding protein</b>
<b>AMPK</b>	<b>AMP - activated protein kinase</b>
<b>AP - 1</b>	<b>Activator Protein 1</b>
<b>aP2</b>	<b>Adipocyte specific fatty acid binding protein</b>
<b>bHLH</b>	<b>Basic helix - loop - helix</b>
<b>B M</b>	<b>Bitter melon</b>
<b>C / EBP</b>	<b>CCAAT / enhancer binding protein</b>
<b>CLA</b>	<b>Conjugated linoleic acid</b>
<b>CLN</b>	<b>Conjugated linolenic acid</b>
<b>CYP4A</b>	<b>Cytochrome P<sub>450</sub>4A</b>
<b>DBD</b>	<b>DNA binding domain</b>
<b>DEX</b>	<b>Dexamethasone</b>
<b>ES</b>	<b>Embryonic stem</b>
<b>ECM</b>	<b>Extracellular matrix</b>
<b>FAT</b>	<b>Fatty acid transporter</b>
<b>FATP</b>	<b>Fatty acid transport protein</b>
<b>FAS</b>	<b>Fatty acid synthase</b>
<b>FIZZ</b>	<b>Found in inflammatory zone</b>
<b>G3PDH</b>	<b>Glycerol - 3 - phosphate dehydrogenase</b>
<b>GCs</b>	<b>Glucocorticoids</b>
<b>GLUT</b>	<b>Glucose transporter</b>
<b>HDL</b>	<b>High density lipoprotein</b>
<b>HSL</b>	<b>Hormone sensitive lipase</b>

<b>IL</b>	<b>I n t e r l e u k i n</b>
<b>IRS - 1</b>	<b>I n s u l i n r e c e p t o r s u b s t r a t e s 1</b>
<b>LBD</b>	<b>L i g a n d b i n d i n g d o m a i n</b>
<b>LPL</b>	<b>L i p o p r o t e i n l i p a s e</b>
<b>LPS</b>	<b>L i p o p o l y s a c c h a r i d e</b>
<b>L X R</b>	<b>L i v e r X r e c e p t o r</b>
<b>MADS</b>	<b>M u l t i p o t e n t a d i p o s e - d e r i v e d s t e m</b>
<b>MAPK</b>	<b>M i t o g e n - a c t i v a t e d p r o t e i n k i n a s e</b>
<b>MIX</b>	<b>M e t h y l i s o b u t y l x a n t h i n e</b>
<b>MMP</b>	<b>M e t a l l o p r o t e i n a s e</b>
<b>NF - <math>\kappa</math>B</b>	<b>N u c l e a r f a c t o r - <math>\kappa</math>B</b>
<b>PAI - 1</b>	<b>P l a s m i n o g e n a c t i v a t o r i n h i b i t o r - 1</b>
<b>PBP</b>	<b>P P A R <math>\gamma</math> b i n d i n g p r o t e i n</b>
<b>PEPCK</b>	<b>P h o s p h e n o l p y r u v a t e c a r b o x y k i n a s e</b>
<b>PG</b>	<b>P r o s t a g l a n d i n</b>
<b>15d - PGJ<sub>2</sub></b>	<b>15 - d e o x y - <math>\delta</math>12 - 14 - P G J<sub>2</sub></b>
<b>PGC</b>	<b>P e r o x i s o m e p r o l i f e r a t o r - a c t i v a t e d r e c e p t o r <math>\gamma</math> c o a c t i v a t o r</b>
<b>PI3K</b>	<b>P h o s p h a t i d y l i n o s i t o l - 3 k i n a s e</b>
<b>PK</b>	<b>P y r u v a t e k i n a s e</b>
<b>PPAR</b>	<b>P e r o x i s o m e p r o l i f e r a t o r - a c t i v a t e d r e c e p t o r</b>
<b>PPRE</b>	<b>P e r o x i s o m e p r o l i f e r a t o r r e s p o n s i v e e l e m e n t</b>
<b>Pref - 1</b>	<b>P r e - a d i p o c y t e f a c t o r 1</b>
<b>RARs</b>	<b>R e t i n o i c a c i d r e c e p t o r s</b>
<b>RELMs</b>	<b>R e s i s t i n - l i k e m o l e c u l e s</b>
<b>RXR</b>	<b>R e t i n o i d X r e c e p t o r</b>
<b>SCD</b>	<b>S t e a r o y l - C o A d e s a t u r a s e</b>
<b>SREBPs</b>	<b>S t e r o l r e g u l a t o r y e l e m e n t b i n d i n g p r o t e i n s</b>
<b>SREs</b>	<b>S t e r o l r e g u l a t o r y e l e m e n t s</b>
<b>TZD</b>	<b>T h i a z o l i d i n e d i o n e</b>
<b>TRs</b>	<b>T h y r o i d h o r m o n e r e c e p t o r s</b>
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<b>T u m o r n e c r o s i s f a c t o r <math>\alpha</math></b>
<b>UCP</b>	<b>U n c o u p l i n g p r o t e i n</b>

組別縮寫意義

組別縮寫	縮寫意義
BM	Wild bitter melon lyophilized powder
EAE	Ethyl acetate extract form wild bitter melon lyophilized powder
TZD	Positive control (Thiazolidinedione)
HF	High fat control (High fat high sugar die)
LF	Low fat control (Low fat diet)



# 山苦瓜改善高油高糖餵食大鼠腹部體脂堆積及胰島素抗性

中國醫藥大學營養學系碩士班 洪雅雯

## 摘要

在亞洲，苦瓜 (Bitter melon; *Momordica charantia*) 為廣泛使用的食材。已有研究指出，苦瓜具降血糖、降血脂和抗發炎的作用，但其作用機制與功能性成分仍不明確。近來，有研究顯示苦瓜可活化 Peroxisome proliferator - activated receptor (PPAR) $\alpha$  和  $\gamma$ ，暗示苦瓜在預防和治療代謝症候群上具有應用之潛力。目前臨床廣泛使用之 Thiazolidinedione (TZD) 治療糖尿病藥物雖可改善胰島素敏感性，但卻具有肥胖的副作用。因此，本研究擬利用體內模式探討山苦瓜對於改善大鼠腹部體脂堆積和胰島素敏感性之功效並與 TZD 藥物做比較。

實驗採用 40 隻 6 週齡雄性 Wistar 大鼠，其中 34 隻先以含 30% 奶油的高脂飲食餵食 3 週誘導肥胖後，分成 4 組。BM 組(含 5% 山苦瓜凍乾粉之高脂飲食)、EAE 組(含 0.25% 山苦瓜凍乾粉乙酸乙酯萃物之高脂飲食)、HF 組(高脂對照)及 TZD 組(含 0.01% Pioglitazone 之高脂飲食做為正對照)。另外 6 隻大鼠餵食含 5% 新鮮大豆油 (LF 組) 做低脂對照。分組餵食 9 週後犧牲，分別取腹膜後脂肪、副睪脂肪和腹股溝脂肪秤重代表腹部脂肪堆積。取腹膜後脂肪和副睪脂肪進一步分析脂肪細胞大小、三酸甘油酯和 DNA 含量、脂質生合成酵素活性和脂解速率與脂肪細胞分化相關基因表現。在實驗期間，每隔 3 週採取尾巴血測量禁食血糖及胰島素。

結果顯示，TZD 組在體重上顯著高於 LF 組( $p < 0.05$ )，此結果與 TZD 藥物肥胖的副作用相符合。在腹部脂肪重量方面，HF 組、EAE 組和 TZD 組都顯著高於 LF 組( $p < 0.006$ )，而 BM 組與 LF 組無顯著差異，表示山苦瓜凍乾粉可以改善高脂飲食誘導的腹部體脂堆積。分離自腹膜後脂肪和副睪脂肪的脂肪細胞，其大小比例分佈的結果顯示，BM 組與 HF 組相較之下，有較多小的以及較少大的脂肪細胞。此外，BM 組脂肪組織三酸甘油酯堆積有減少的傾向。Glycerol - 3 - phosphate dehydrogenase (G3PDH) 是脂肪細胞中重要的脂質合成酵素。BM 組與 LF 組副睪脂肪中 G3PDH 活性，皆顯著低於 TZD 組( $p < 0.05$ )。在北方點墨定量結果中，BM 組副睪脂肪的 ADD1 / SREBP1c 調控脂肪酸生合成之轉錄因子 mRNA 顯著低於 TZD

組( $p < 0.05$ )。HF 組在高脂飲食下會誘發高胰島素血症，但此現象不發生在 TZD 組和 BM 組。

以上這些結果指出山苦瓜如同 TZD 藥物可改善高脂飲食誘發之高胰島素血症，但相較於 TZD 有肥胖的副作用，山苦瓜反而抑制腹部體脂堆積。並且山苦瓜的降體脂作用可能與抑制脂質生合成有關。然而，本研究中使用山苦瓜凍乾粉乙酸乙酯萃物也許劑量不足，並沒有呈現如山苦瓜凍乾粉之效用。

關鍵詞：山苦瓜、Peroxisome proliferator - activated receptor (PPAR)、Thiazolidinedione (TZD)、腹部脂肪、胰島素抗性



# **Wild Bitter Melon Ameliorate Abdominal Fat Accumulation and Insulin Resistance in High Fat High Sugar Fed Rats**

Ya - Wen Hong

## **Abstract**

In Asia countries, bitter melon (*Momordica charantia*; BM) is a commonly used vegetable. It had been reported that the bitter melon has hypoglycemic, hypolipidemia and anti - inflammatory effects. But its mechanism and functional component are still unknown. Recently, bitter melon was found to activate both peroxisome proliferator - activated receptor (PPAR)  $\alpha$  and  $\gamma$  which may be valuable in prevention and amelioration of metabolic syndrome. The clinically used antidiabetic drug TZD (thiazolidinedione) is effective in ameliorating insulin resistance, but has side effect of obesity.

In this study, the effect of wild BM lyophilized powder on anti - adiposity and insulin sensitivity in high fat diet fed rats was evaluated and compared with the antidiabetic drug TZD. We used forty Wistar male rats at the age of 6 weeks. Thirty-four rats were fed with high fat high sugar diet containing 30% butter to induce obesity, then divided into four groups: BM (a high fat diet containing 5% wild BM lyophilized powder), EAE (a high fat diet containing 0.25% EA extract from wild BM lyophilized powder), HF (a high fat diet serve as a high fat control), and TZD (a high fat diet containing 0.01% clinically used antidiabetic drug - pioglitazone, serve as a positive control). For comparison, six rats fed with a low fat diet containing 5% soybean oil serve as LF group. After 9 weeks, rats were sacrificed and abdominal fat including retroperitoneal, epididymal, and injuinal fat were excised and weighted. Epididymal and retroperitoneal fat were also used for determination of adipocyte size, triglycerides and DNA contents. The activities of enzymes participate in lipogenesis and lipolysis, and the genes expression of adipocyte differentiation markers were also determined in epididymal and retroperitoneal fat pads. At wk 0, 3, 6, 9, fasting blood was collected from tail for glucose and insulin determination.

Our results showed, the body weight gain of TZD group of rats was significantly higher than that of LF group of rats ( $p < 0.05$ ), and this was in accordance with the well - known TZD side effect of obesity. HF, EAE and TZD group of rats also showed a significantly ( $p < 0.006$ ) higher abdominal fat accumulation (retroperitoneal, epididymal and injuinal fat) than LF group, but there was no significant difference between BM and LF groups of rats. This result indicated that wild BM lyophilized powder was effective in inhibiting abdominal fat accumulation induced by high fat diet. The distribution of adipocytes size, isolated from retroperitoneal and epididymal fat, showed there were more smaller cells and less larger cells in BM group of rats when compared with those of HF group of rats. In addition, the triglycerides contents in adipose tissue of BM group of rats tended to be lowered. In epididymal fat, the activity of glycerol - 3 - phosphate dehydrogenase (G3PDH) which is an important lipogenic enzyme in adipose tissue, was comparable between BM and LF, and significantly lower than TZD group of rats ( $p < 0.05$ ).

Northern blot showed that ADD1 / SREBP1c mRNA, a transcription factor for regulating fatty acid synthesis, was significantly lower in BM group of rats than TZD group of rats ( $p < 0.05$ ) in epididymal fat. Hyperinsulinemia induced by high fat diet was only observed in HF , but not in TZD and BM group of rats.

These results indicate wild bitter melon, as well as TZD, could ameliorate insulin resistance induced by high fat diet. In contrast to the well - known obesity side effect of TZD, wild bitter melon is more beneficial in inhibiting abdominal fat accumulation. The anti - adiposity effect of wild bitter melon may be related to the inhibition of lipogenesis. However, the dose of EA extract from wild BM lyophilized powder used in this study (0.25%) may be too low to show its effect.

**Keywords:** Wild bitter melon, Peroxisome proliferator - activated receptor (PPAR), Thiazolidinedione (TZD), Abdominal fat, Insulin resistance

## 第一章 前言

代謝症候群(Metabolic syndrome)意指腹部肥胖、血脂紊亂、高血糖及高血壓，已成為是世界性主要的公共健康問題，並且是第二型糖尿病與心血管疾病的危險因子。雖然導致代謝症候群的原因還未清楚，但目前認為高胰島素血症與腹部肥胖是主要原因。

苦瓜(*Momordica charantia*) 是常被用做藥物使用的植物之一。在亞洲，苦瓜主要是栽培作為蔬菜食用；在印度，常作為治療糖尿病的傳統用藥。雖然許多研究指出苦瓜有許多藥理特性，例如抗癌、降血糖及降三酸甘油酯等的作用，其中以降血糖的作用最常被研究，但這些作用機制與功能性成分並不清楚。

近來，轉活化研究顯示苦瓜可活化 Peroxisome proliferator - activated receptor (PPAR)  $\alpha$  和  $\gamma$ ，PPAR 是細胞核荷爾蒙接受器之轉錄因子。已知 Fibrate 類降血脂藥物與 Thiazolidinedione (TZD)類抗糖尿病藥物分別是 PPAR $\alpha$  和 PPAR $\gamma$  的活化劑，雖然 TZD 可改善胰島素敏感性，但卻具有肥胖的副作用。畢竟這些都作為藥物治療使用，若是能由飲食來源中來找尋出可活化 PPAR 的天然食物，即可同時改善高血脂與高血糖。這也暗示了苦瓜可能具有同時調節葡萄糖利用與脂質代謝的潛力，可應用於預防或治療代謝症候群。

苦瓜降低血糖是已被確認的作用，近來對苦瓜的研究轉移集中在抗肥胖的潛在作用。在 2003 年香港大學首度證實了苦瓜可抑制腹部體脂的堆積，並推測可能藉此改善血糖，但苦瓜對脂肪細胞型態或生合成影響並未被研究。因此，本研究擬利用餵食高油高糖飲食誘發肥胖大鼠探討山苦瓜對於改善腹部體脂堆積和胰島素敏感性之功效，並且與已知抗糖尿病藥 TZD 比較。



## 第二章 文獻回顧

## 一、過氧化體與過氧化體增殖劑活化接受器

## (一) 過氧化體 Peroxisome

過氧化體是一小的單層膜胞器，含有各種代謝反應如能量代謝的酵素，而過氧化體至少含有 50 種不同酵素參與不同細胞型態的各種生物路徑(Biochemical pathways)。

1954 年 Rhodin 在腎細胞中發現 Microbodies 此胞器(1)，之後有學者利用細胞分離與顯微鏡觀察對此新胞器做鑑定(2)。de Duve 將此胞器命名為過氧化體，即為含有氫氧化代謝酵素的胞器(1)，此酵素含有分解  $H_2O_2$  (Catalase)與生成  $H_2O_2$  ( $H_2O_2$  - generating oxidases)的酵素。過氧化體在脂肪酸  $\beta$  - oxidation 中扮演重要角色(3)，當過氧化體生合成中基因突變時，就會造成 Zellweger disease、X - linked adrenoleukodystrophy (X - ALD)等基因突變疾病。這些患者因過氧化體中脂肪酸的氧化作用受損，而血液和組織中大量堆積極長鏈脂肪酸(Very - long - chain fatty acids, VLCFA)(4, 5)，因此可見過氧化體在人類生理角色上是必需的。

(二) Peroxisomal fatty acid  $\beta$  - oxidation

雖然脂肪酸能藉由不同機制發生氧化作用，但大部分的脂肪酸是經由  $\beta$  - oxidation 的方式而被降解。過氧化體與粒線體一樣都具有脂肪酸  $\beta$  - oxidation 的機制，包括了4個反應階段：Dehydrogenation、Hydration (of the double bond)、Dehydrogenation again與Thiolytic cleavage (6)。透過此4步驟，從每個脂肪酸水解下來的2 - carbon unit會形成Acetyl - CoA unit，接著進入Citric acid (Krebs) cycle 生成二氧化碳和水。過氧化體與粒線體的 $\beta$  - oxidation system催化不同脂肪酸及其衍生物的 $\beta$  - oxidation，粒線體催化衍生自飲食包括Palmitate、Oleate、Linoleate和Linolenate的脂肪酸，而過氧化體是催化Hexacosanoic acid (C26:0)的極長鏈脂肪

酸、Pristanic acid (2, 6, 10, 14 - tetramethylpentadecanoic acid) 以及 Di - 和 Trihydroxycholestanoic acid (DHCA和THCA)。

因為過氧化體缺乏呼吸鏈與Citric acid (Krebs) cycle，所以脂肪酸 $\beta$  - oxidation的最終產物如Acetyl - CoA、Propionyl - CoA和Medium - chain acyl - CoA esters，必需以Carnitine esters的形式運送到粒線體中。另外，在粒線體中是由Carnitine cycle攜帶脂肪酸橫跨粒線體細胞內膜，而在過氧化體中是藉由ATP - binding cassette transporter (ABC transporter) 催化脂肪酸橫跨細胞膜的運送。

### (三) 過氧化體增殖劑 Peroxisome proliferators

1965年Hess等學者首次發現到大鼠肝細胞中過氧化體增殖(Peroxisome proliferation)的現象(7)，隨後在1966年Svoboda與Azarnoff也觀察到此現象(8)。降血脂藥物Clofibrate的主要作用在降低血漿中三酸甘油酯與膽固醇濃度(9)，有研究指出降血脂藥物Clofibrate會增加大鼠肝臟過氧化體中Fatty acyl - CoA oxidizing system (10)。

過氧化體增殖劑是一群包括有降血脂藥物、除草劑和Industrial plasticisers的化學物質(11-13)，當給予齧齒類動物這些物質會造成明顯肝臟的過氧化體增殖如同肝細胞的增生(Liver hyperplasia)一樣(14)。此現象會增加長鏈脂肪酸Peroxisomal  $\beta$  - oxidation以及Cytochrome P<sub>450</sub> IV family基因的轉錄作用(9, 12, 15)。

### (四) 過氧化體增殖劑活化接受器

#### Peroxisome proliferator - activated receptor, PPAR

1990年，Isseman和Green從小鼠肝臟cDNA library篩選出與其它細胞核接受器的DNA binding domain中，具高度保留序列相似的新類固醇荷爾蒙接受器，並以其過氧化體增殖的特性命名之(16)。之後其它的PPAR在不同物種與組織中被鑑定出(17, 18)，這些PPAR在序列上具同源性(Homology)以及組織分佈差異。在過去十年，PPAR的研究揭開了對脂質代謝調控的新機制，以及對包括第二型糖尿病和肥胖這些代謝性疾病的可能分子因子。

## 1. PPAR的種類

PPAR是屬於細胞核接受器的Superfamily，這些細胞核接受器包括有Retinoic acid receptors (RARs)、Thyroid hormone receptors (TRs)以及Steroid receptors (19)。到目前為止以不同基因轉殖並鑑定出三種PPAR種類，分別為PPAR $\alpha$  (NR1C1)、PPAR -  $\delta$  /  $\beta$  (NR1C2)和PPAR $\gamma$  (NR1C3)。已知天然的脂肪酸以及Fibrate類降血脂藥物是PPAR的活化劑(Activators)，PPAR調控許多對脂質與葡萄糖代謝相關的基因表現(20)。在一些研究中發現PPAR $\gamma$  agonists在脂肪細胞分化上扮演重要決定角色，以及是抗糖尿病藥物TZD的作用位置(21, 22)。

### (1) PPAR $\alpha$

已知Fibrate類降血脂藥是PPAR $\alpha$ 的活化劑，PPAR $\alpha$ 在齧齒類動物和人類的許多組織中表現，包括有肝臟、腎臟、心臟、骨骼肌和棕色脂肪(18, 23)，而且也有研究指出PPAR $\alpha$ 在血管細胞如內皮細胞(24)、VSMCs (vascular smooth muscle cells)(25, 26)和單核細胞 / 巨噬細胞(27)也有表現。

### (2) PPAR - $\delta$ / $\beta$

目前對PPAR -  $\delta$  /  $\beta$ 的功能鑑定仍然不明確，已知PPAR -  $\delta$  /  $\beta$ 廣泛表現在許多組織和細胞中，而在腦、脂肪組織和皮膚是高度表現(18, 28)。

### (3) PPAR $\gamma$

目前有七種PPAR $\gamma$  mRNA已被鑑定出(29, 30)，它們都是由不同的Initiation promoter和5 - terminal region (A1、A2、B、C和D)的五個Exons所剪輯，而產生相同的PPAR $\gamma$ 基因。PPAR $\gamma$ 2在N - terminus比PPAR $\gamma$ 1多了30個氨基酸。PPAR $\gamma$ 1廣泛表現在許多組織中如結腸、肝臟和血管細胞，但PPAR $\gamma$ 2專一表現在脂肪組織中(31)，PPAR $\gamma$ 3大量表現在巨噬細胞、大腸和脂肪組織(32)，PPAR $\gamma$ 4和PPAR $\gamma$ 5只表

現在巨噬細胞中而PPAR $\gamma$ 6和PPAR $\gamma$ 7則是在脂肪組織中可偵測得到(33)。

有研究指出Prostaglandin (PG) - related compounds如15 - deoxy - delta12 - 14 - PGJ<sub>2</sub> (15d - PGJ<sub>2</sub>)是PPAR $\gamma$ 有效的活化劑(34)。另外在Primary human trophoblasts的研究指出，氧化脂質如9 - HODE、13 - HODE和15 - HETE也是PPAR $\gamma$ 有效的活化劑(35)。已知Thiazolidinedione (TZD)類藥物如Troglitazone、Ciglitazone、Pioglitazone和Englitazone對PPAR $\gamma$ 是專一性的活化劑(36)。

近來也鑑定出一些新的PPAR $\gamma$  agonists和antagonists，Triterpenoid 2 - cyano - 3、12 - dioxooleana - 1, 9 - dien - 28 - oic acid (CDDO)是PPAR $\gamma$  agonists (37, 38)，而Bisphenol diglycidyl ether (BADGE)和LG - 100641是PPAR $\gamma$  antagonists (39, 40)。雖然這些化合物具較少的臨床意義，但可能對於了解PPAR $\gamma$ 的生理作用以及新活化劑的鑑定是有幫助的。除了利用化學合成方式外，在天然產物的研究中也發現一些有效的PPAR $\gamma$  agonists，例如一些藥用植物中，從*Saururus chinensis* (*Saururaceae*)來的Saurufuran A，一些黃酮類像是Chrysin、Apigenin和Kampferol以及*Glycyrrhiza uralensis* (*Fabaceae*)中的酚類化合物，都是近來被發現新的PPAR $\gamma$  agonists (41-43)。

## 2. PPAR之結構特徵

三種PPAR isoforms在結構和功能上有相似的特性，是由四個Functional domains中的6個Structural regions所組成，包括有A/B、C、D和E/F。N端的A/B domains含有PPAR磷酸化反應的Ligand - independent activation function 1 (AF - 1)(44)。DNA binding domain (DBD)或C domain是促進PPAR與目標基因上Promoter region的Peroxisome proliferator responsive element (PPRE)結合(45)。D site是Cofactors的Docking domain。E domain或Ligand binding domain (LBD)對Ligand是專一性反應，並活化PPAR結合到PPRE上增加目標基因的表現(28)。位在E / F domain的Ligand - independent activation function 2 (AF - 2)可吸引PPAR cofactors，來促進基因轉錄的活性(46)。

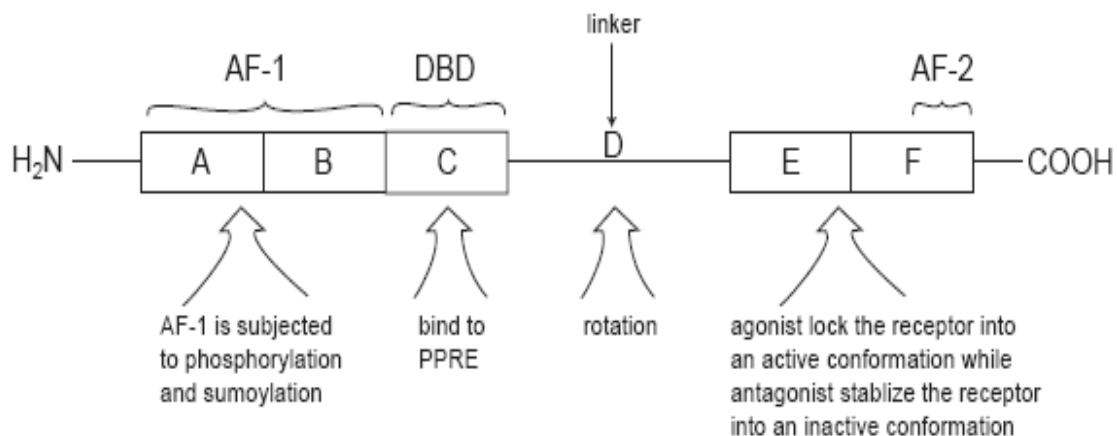


圖2 - 1 PPAR之結構特徵

資料來源：Guo and Tabrizchi., 2005 (47)

### 3. PPAR之基因轉錄作用機制

除了天然與合成的Ligands可活化PPAR外，其它像是Retinoid X receptor (RXR)、PPRE和Coactivators也在轉錄作用上扮演重要角色。

#### (1) Coactivators / Corepressor (Cofactors)

許多做為Coactivators或Corepressor的蛋白質可調節細胞核接受器的起始或抑制轉錄作用的能力，這些蛋白質是以Ligand - dependent的方式與細胞核接受器來作用(17)。在沒有Ligand的情況下，Heterodimer形式的細胞核接受器與含有Histone deacetylase activity的Multicomponent co - repressors，像是Nuclear receptor co - repressor (NCoR) 和 Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor(SMRT)相連結(48, 49)，在Deacetylated下的Histone會抑制轉錄作用(50)。相反的，像是Steroid receptor co - activator (SRC) - 1和PPAR binding protein (PBP) 這些具有Histone acetylase activity的Coactivators，會啟動並誘導Ligand與基因轉錄序列的結合(51, 52)。

## (2) PPRE與PPAR目標基因

PPRE序列是由2組Hexanucleotides以單一核酸間隔的AGGTCA sequence所組成的Direct repeat (DR) - 1 elements (17, 53)。不同於其它細胞核接受器的Responsive element DR - 3和DR - 4，此DR - 1 elements具PPAR - RXR heterodimer專一性。當有Ligand結合在LBD時，會促進PPAR與RXR形成Heterodimer，並與Coactivators結合到PPRE上，啟動基因轉錄作用。在一些調節脂質代謝相關基因中如Fatty acid transporter (FAT)、Adipocyte lipid binding protein (ALBP)、Acyl - CoA synthetase (ACS)和Acetyl - CoA oxidase (ACO)都含有PPRE序列(54)。

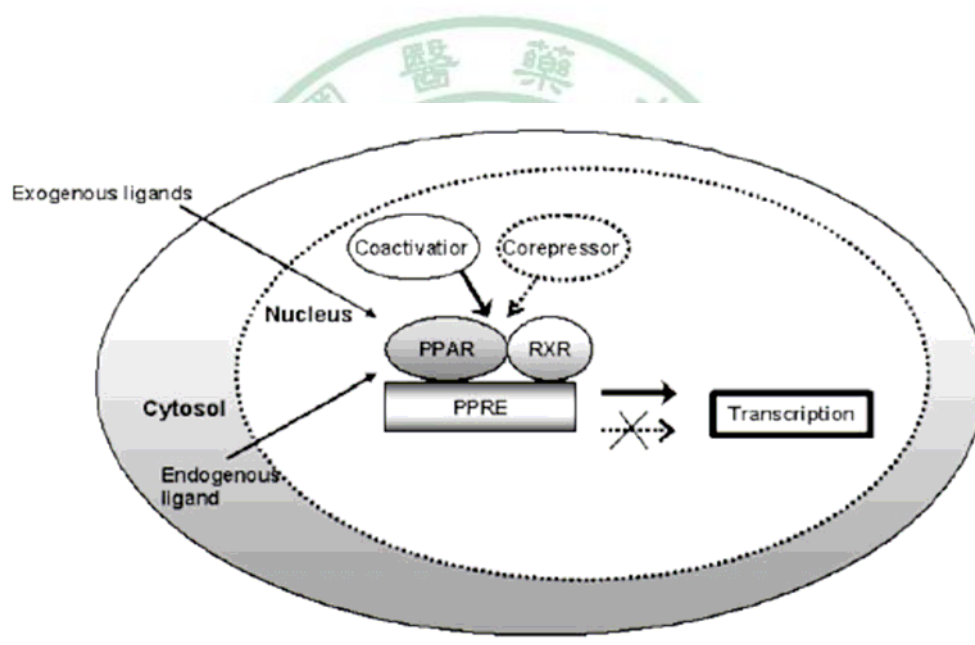


圖2 - 2 PPAR之基因轉錄作用機制

資料來源：Kota *et al.*, 2005 (55)

#### 4. PPAR生理角色

##### (1) PPAR $\alpha$

PPAR $\alpha$ 在脂質代謝、發炎反應與動脈粥狀上都具有作用，已知PPAR $\alpha$  agonists對脂肪酸 $\beta$  - oxidation的調節扮演重要的角色(56)。此外，PPAR $\alpha$  agonists藉由增加Fatty acid transport protein (FATP)和Fatty acid transporter (FAT)的表現，刺激細胞對脂肪酸的汲取(57)。PPAR $\alpha$ 的Ligands如Fibrates和其它Peroxisome proliferator agents會促進Cytochrome P<sub>450</sub>4A (CYP4A)的表現，CYP4A subclass的Cytochrome P<sub>450</sub> enzyme催化脂肪酸的 $\omega$ -hydroxylation (58)，這些機制有益於降低三酸甘油酯的生合成。另外，PPAR $\alpha$ 的活化會增加Lipoprotein lipase (LPL)的表現(59)和抑制肝臟中的Apolipoprotein (apo) C - III (22)，而降低三酸甘油酯濃度。

PPAR $\alpha$ 藉由調節對脂肪酸汲取和氧化反應的基因來供給能量給心肌(60)，在心臟PPAR $\alpha$ 會降低脂肪酸氧化作用和抑制LPL(61)。另外，PPAR $\alpha$  agonists已被指出可活化ApoA - I的表現(62)，ApoA - I是高密度脂蛋白(High density lipoprotein, HDL)的主要Apolipoprotein，在周邊細胞的Reverse cholesterol transport (RCT)扮演重要的角色。PPAR $\alpha$ 的活化也影響巨噬細胞其Cholesterol efflux “pump”中的ATP binding cassette A - 1 (ABCA1)之表現(63)，這是ApoA - I調節RCT路徑的重要角色。一些研究顯示PPAR $\alpha$ 的活化會增強Liver X receptor (LXR $\alpha$ )來促進ABCA1之表現(64)。因此，PPAR $\alpha$ 和LXR $\alpha$  agonists可能具有預防或減輕動脈粥狀作用。

PPAR $\alpha$  agonists在血管細胞中有抗發炎作用，這些作用包括抑制細胞激素誘導Vascular cell adhesion molecular - 1 (VACAM - 1)的表現(65)，以及增加Endothelial nitric oxide synthase (eNOS)的表現(66)。在內皮細胞中，PPAR $\alpha$  agonists降低血漿中Interleukin - 6 (IL - 6)濃度以及藉由Nuclear factor -  $\kappa$ B (NF -  $\kappa$ B) signaling repression降低VSMCs中Cyclooxygenase - 2的表現(26)。PPAR $\alpha$ 也誘發Apoptosis(27)和向下調節細胞激素活化的巨噬細胞中其Tissue factor (TF)和Metalloproteinase (MMP)的表現(67, 68)。

## (2) PPAR - $\delta$ / $\beta$

PPAR $\beta$  agonists已發現對高血脂症、動脈粥狀硬化、肥胖、Cholesterol efflux和肌肉中能量消耗是有益的(69, 70)。Selective PPAR $\beta$  agonists會活化PPAR $\beta$ ，顯著降低第二型糖尿病動物模式中三酸甘油酯和葡萄糖濃度(71)；PPAR $\beta$ 活化棕色脂肪組織中的Heat - producing uncoupling enzymes (Uncoupling protein, UCP1和3)以及肌肉中的UCP2，此作用可能有益於肥胖的控制(72)。

近來有研究指出PPAR $\beta$ 與癌症的關係，在Gastrointestinal neoplasias的形成中，PPAR $\beta$ 做為 $\beta$  - catenin和Sulindac (NSAID) - sensitive factor直接轉錄目標(73)，表示PPAR $\beta$ 與小腸和結腸腫瘤形成有關(74)。相反的，在缺乏PPAR $\beta$ 小鼠的研究中指出，PPAR $\beta$ 抑制直腸致癌物的生成(75)，因此PPAR $\beta$ 對直腸癌的作用仍是需要進一步的研究。

PPAR $\beta$ 在神經系統上也具有角色，先前研究表示PPAR $\beta$ 大量表現在中樞神經系統，特別在前額皮質、神經節以及丘腦核仁這些地方中具高度表現(76)。Bromopalmitate和L - 165041這些PPAR $\beta$  agonists被發現可增加寡狀神經膠質細胞的分化，顯示出PPAR $\beta$ 參與軸突的Myelination，也指出了PPAR $\beta$ 可能在腦中脂質代謝上扮演重要角色(77, 78)。近來，Smith等人培養大鼠小腦粒狀神經細胞的研究指出，PPAR $\beta$ 有神經保護特性，顯示了PPAR $\beta$ 在神經退化過程中具潛在作用(79)。

## (3) PPAR $\gamma$

PPAR $\gamma$ 對發炎反應與動脈粥狀有密切關係，PPAR $\gamma$ 在內皮細胞、血管平滑肌細胞以及巨噬細胞中的表現，對脂質代謝的影響是值得注意的問題，因而促進對PPAR $\gamma$ 其抗發炎特性的研究。另外，PPAR $\gamma$ 在慢性發炎疾病如動脈粥狀硬化、關節炎和Inflammatory bowel syndrome也被研究，PPAR $\gamma$  agonists在抗動脈粥狀硬化上也扮演重要角色的，這些Agonists會促進單核球上Scavenger receptor CD36之表現，增加併吞氧化型LDL而增加Foam cells的形成(80)。在內皮細胞中，TZD抑制黏附因子VCAM - 1和Intercellular adhesion molecule (ICAM - 1)的表現，使動脈內膜的單核細胞堆積減少(81)。在人類單核細胞衍生的巨噬細胞中，PPAR $\gamma$  agonists抑制



MMP - 9 gelatinolytic activity，而MMP - 9為具有斑塊脫落(Plaque rupture)的酵素(82)。VSMCs在動脈粥狀硬化的形成中是最重要的角色，而近來研究顯示其為PPAR $\gamma$  agonists的主要作用目標，TZD藉由降低Retinoblastoma protein的磷酸化以及增加Cyclin dependent inhibitor p27的表現，而抑制VSMCs的增生(83)。

PPAR $\gamma$  agonists在巨噬細胞脂質恆定中會調節一些基因的表現如Apolipoprotein E (apoE)(84)，而PPAR $\gamma$  agonists也會調節巨噬細胞的細胞激素生成，但其作用仍然不清楚。較早之前研究指出TZD或15d - PGJ<sub>2</sub>會活化PPAR $\gamma$ ，使培養的巨噬細胞大量表現各種前發炎細胞激素(Pro - inflammatory cytokines)如Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )或IL - 6 (85)，但這些作用在LPS - challenged mice中並未發現(86)。此外，也有研究曾指出巨噬細胞的分化是不需要PPAR $\gamma$ ，顯示出PPAR $\gamma$ 沒有專一性抑制巨噬細胞生成細胞激素(87)。一些其它研究對此指出的機制包括有① PPAR $\gamma$ 抑制巨噬細胞中ApoB - 48 receptor，② PPAR $\gamma$ 增加巨噬細胞的Apoptosis，③ PPAR $\gamma$ 藉由降低Activator Protein 1 (AP - 1)、Signal Transducer and Activator Transcription (STAT)和Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF -  $\kappa$ B)，來抑制Nitric oxide synthase、Gelatinase B和Scavenger receptor A的基因表現(88-90)。綜合而言，PPAR $\gamma$  agonists在控制發炎反應與動脈粥狀硬化上具有益處。

另外也有報告指出PPAR $\gamma$ 與癌症的關係，在一些In vivo和In vitro的動物模式中發現，PPAR $\gamma$ 促進Apoptosis和細胞分化作用的特性對不同癌症如乳癌、結腸癌、前列腺癌、胰臟癌和胃癌的治療是有益的(91)。另外還有PPAR $\gamma$ 影響Retinal disorders的文獻指出，在Retinal pigment epithelial (RPE) cells和Bovine choroidal endothelial cells (CECs)中，Troglitazone抑制血管內皮生長因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)誘導的Choroidal angiogenesis，TZD也抑制大鼠和猴子中Choroidal neovascularization的形成(90)。PPAR $\gamma$ 調節TZD對大鼠的Retinal ganglion cells (RGC - 5)之抗氧化特性(92)。這些作用顯示PPAR $\gamma$  ligands對Age - related和Diabetes - induced retinal disorders具潛在的作用。

## 二、脂肪細胞生合成 Adipogenesis

脂肪組織(Adipose tissue)的形成與身體能量恆定調節相關，當能量攝取超過能量消耗時，會使脂肪組織重量增加最後造成肥胖(Obesity)。在細胞層次上，正的能量平衡會刺激成熟脂肪細胞(Adipocytes)，經由增加三酸甘油酯的儲存來調節過多的能量，當脂肪細胞達到一個臨界大小閾值時，會傳送訊息給前脂肪細胞(Preadipocytes)去刺激新的脂肪細胞產生，來儲存過多的能量。在幼年期，主要是經由新的脂肪細胞形成或脂肪細胞增生(Hyperplasia)使脂肪組織擴大，人與齧齒類動物在生命期中具有從前脂肪細胞形成新脂肪細胞的能力，與瘦的動物相比較下，肥胖的動物有較多且較大的脂肪細胞。脂肪組織重量在肥胖和 Lipodystrophy 中扮演重要角色，而肥胖又與第二型糖尿病和胰島素抗性息息相關。因此，對於了解脂肪細胞生合成的正向與負向調節是必要的。

### (一) 脂肪細胞生合成的 In vitro 模式

在研究脂肪細胞生合成的 In vitro 模式中，最常用的是分離自 Swiss 3T3 cells 的 3T3 - L1 和 3T3 - F442A 齧齒類前脂肪細胞株(Preadipocyte cell lines)(93, 94)。另外，衍生自 *ob / ob* mice 副單脂肪的 ob17 cell line 也是常被使用到的(95)。在 1970 年間，Green 與其團隊發展出 3T3 - L1 system 來研究脂肪細胞生合成(94)，這些鼠科細胞的形態與增殖類似纖維母細胞(Fibroblasts)。研究顯示，細胞在長滿之前會在擴大生長的階段，當長滿時接著給予 Proadipogenic agents 如胰島素、Dexamethasone 和 Phosphodiesterase inhibitor，就會停止生長然後進入分化階段。在分化非常早期時，因為細胞外基質和 Cytoskeleton proteins 使細胞從纖維狀變成圓形，未成熟的脂肪細胞需要有絲分裂信號(Mitogenic signals)的 Clonal expansion，此作用可增加最後已分化的脂肪細胞比例，之後接著進入最後成熟階段變成脂肪細胞。此分化作用的 In vitro 模式與 In vivo 的過程極為相似，因為培養的細胞會堆積脂質，表現出成熟脂肪細胞的特徵並且具有胰島素敏感性。相反的，因為 Catecholamine - sensitive lipolytic pathway 的調節，在能量喪失時脂肪細胞也會

水解三酸甘油酯，最後成熟的脂肪細胞具有生合成並分泌許多 Factors 的能力，其中這些 Factors 與 Endocrine control 的能量恆定有關。

在 In vivo 研究指出，注射 3T3 - L1 或 Ob17 preadipocyte cell lines 到 Nude mice 體內中，形成的脂肪組織與正常小鼠體內的脂肪組織是無法區分的(96)，此結果表示 In vitro - differentiated adipocytes 與 In vivo adipocytes 具有相似的機制來發生脂肪細胞生合成。近來也發展出 Human preadipocyte cell lines，例如有分別衍生自脂肪肉瘤以及 Simpson - Golabi - Behmel syndrome 嬰孩的 Human preadipocyte cell strains (97, 98)，還有新生兒肩胛骨棕色脂肪的 SV40 T - Ag transformation 來的 Brown preadipocyte cell line PAZ1 (99)。將重組的 Telomerase activity 結合 Human papillomavirus - E7 表現，可使 Human preadipocyte 在 Immortalization 之後保留其分化能力(100)。

更近來，也發展出分離自年幼捐贈者脂肪組織的 Multipotent adipose - derived stem (MADS) cells，這些細胞可以維持 Ex vivo 的特性，表示在體內有 Self - renewal 的能力，因此可表現出正常的二倍體染色體(Diploid karyotype)，且保持有分化為許多 Mesenchymal cell types 作用的能力(101, 102)。

In vivo 中，脂肪組織分布在許多部位，包括在生殖器周邊的、腹膜後的以及皮下的脂肪，分離自不同部位的前脂肪細胞有不同的脂質生合成潛力，這個問題至今仍是未知的。除此之外，不同部位的成熟脂肪細胞其代謝反應也不同，例如內臟脂肪與皮下脂肪對腎上腺素所刺激的脂解反應就有所差異。因此，建立前脂肪細胞的細胞株來研究脂肪細胞生合成是必要的。

## (二) 脂肪組織來自 Multipotent stem cells

進來研究指出脂肪組織來自是 Multipotent stem cells，根據接收不同的信號 Multipotent stem cells 可分化為不同的細胞類型。在 In vitro 中 Mouse embryonic stem (ES) cells 的分化是脂肪細胞的來源之一，可用來了解早期脂肪細胞生合成以及對調節基因和環境因子的鑑定(103)。Multipotent stem cells 也存在於成熟的組織中，最早是從骨髓中被分離出來(104)。在現在，脂肪組織也可分離出 Stem

cells(105)。從人脂肪組織來的Multipotent stem cells可被誘導分化成為其它細胞類型，包括有軟骨(Cartilage)、骨頭和肌肉(106, 107)。hMADS cells也可形成脂肪細胞，將hMADS cells培養在無血清促脂肪細胞生成的培養基下，會有脂質油滴堆積以及脂肪細胞分化指標和轉錄因子的表現(101)，特別的是會像人的脂肪細胞一樣有Lipolytic pathway，而能分泌出Leptin和Adiponectin。人脂肪組織中的Stroma vascular fraction可衍生出具功能的Cardiomyocyte - like cells、Endotheliallike cells和Insulin - secreting cells (108-110)。脂肪組織衍生的細胞也能參與骨骼肌的再生以及促進新血管形成(111, 112)，這些顯示出衍生自脂肪組織的Multipotent stem cells可能對疾病的治療是重要的。

### (三) 脂肪細胞生合成的過程

前脂肪細胞在轉變成脂肪細胞前具維持生長的能力，在脂肪細胞分化期間，脂肪細胞的表型(Phenotype)是許多基因的表現，此反映在早期、中期和晚期 mRNA / protein markers 的表現以及三酸甘油酯堆積(113, 114)。這些變化主要是發生在轉錄層次(Transcriptional level)上，除了基因的活化之外，這些抑制脂肪細胞生合成的或對脂肪細胞功能不需要的基因會被抑制。

#### 1. Growth arrest

前脂肪細胞株和初代前脂肪細胞一樣，當長滿時就會停止生長。已知的兩個轉錄因子，CCAAT / enhancer binding protein -  $\alpha$  (C / EBP $\alpha$ )和 PPAR $\gamma$  是有轉錄活性的脂肪細胞專一性基因(Transactivate adipocyte specific genes)，C / EBP $\alpha$  和 PPAR $\gamma$  似乎都與停止生長有關且對於脂肪細胞分化是需要的。McKnight 和其團隊利用 C / EBP $\alpha$  - estrogen receptor fusion protein 使 C / EBP $\alpha$  具抗有絲分裂活性(Antimitotic activity)，在給予 Estrogen 的活化作用下，觀察細胞數目和 DNA 合成的結果顯示出有細胞會停止生長(115)。Darlington 等人的研究中發現 C / EBP $\alpha$  會增加 p21 / SDI - 1 mRNA 和蛋白質的表現，因為 Antisense p21 / SDI - 1 可削減 C / EBP $\alpha$  的生長抑制作用，這表示 C / EBP $\alpha$  具有增加 p21 / SDI - 1 表現的功能。

Spiegelman 和其團隊指出 PPAR $\gamma$  可誘發纖維母細胞和 Adipogenic simian virus 40 large T antigen – transformed cells 停止生長，在這些表現有 PPAR $\gamma$  的細胞中，因為 DP – 1 的磷酸化和 Serine / threonine phosphatase PP2A catalytic subunit 表現減少而使細胞週期退去，並伴隨 E2F / DP - 1 complex 的轉錄活性和 DNA 結合活性的減少(116)。因此，C / EBP $\alpha$  和 PPAR $\gamma$  可能共同作用來使生長停止，雖然 C / EBP $\alpha$  和 PPAR $\gamma$  在脂肪細胞分化期間顯著地增加表現，但在前脂肪細胞中的低表現能夠在分化之前調節使細胞停止生長。

## 2. Clonal expansion

當長滿時而停止生長之後，前脂肪細胞必須受到適當的 Mitigenic signals 和 Adipogenic signals 的組合來繼續之後的分化步驟。在前脂肪細胞株的研究顯示，停止生長的細胞會進行細胞分裂發生 DNA 複製和細胞增殖，來使細胞複製放大。對 3T3 - F442A 和 Ob17 細胞而言，細胞分裂增加與晚期 mRNA markers 的表現有關，而抑制細胞分裂會防止脂肪細胞的形成，但是 Primary human preadipocytes 即使培養在含有絲分裂抑制劑條件下，還是能正常發生分化作用(117)。這表示了對培養的 Cell line system 而言，需要依賴外來的刺激使長滿後的細胞進行有絲分裂，但對分離自脂肪塊的前脂肪細胞，其在 In vivo 就已發生了與之後脂肪細胞發展階段相關的細胞分裂。

## 3. Early changes in gene expression

Lipoprotein lipase (LPL) mRNA 的表現通常作為脂肪細胞分化的早期指標，LPL 是由成熟的脂肪細胞所分泌且在控制脂質堆積上扮演重要的角色(118)。C / EBPs 和 PPAR $\gamma$  這兩個轉錄因子在脂肪細胞分化早期就被誘導，C / EBPs 和 PPAR $\gamma$  的早期表現與之後參與最後分化的 Adipocyte specific genes 有關(119)。PPAR $\gamma$  的表現在荷爾蒙誘導分化作用之後會快速地增加，在 3T3 - L1 脂肪細胞分化的第 2 天期間就能測得 PPAR $\gamma$  而且在成熟脂肪細胞中達到最大的表現。PPAR $\delta$  的誘導似乎在 PPAR $\gamma$  之前，但是 PPAR $\delta$  的表現是廣泛分佈的，在各種組織中和一些培養的細胞

株中包括 CH310T1 / 2、3T3 - C2 和 NIH 3T3 都能測得。C / EBP $\beta$  和 C / EBP $\delta$  短暫的增加是在 PPAR $\gamma$  表現增加之前，C / EBP $\beta$  和 C / EBP $\delta$  在早期和中期分化階段之後會減少並伴隨誘導 C / EBP $\alpha$  mRNA 的表現，在 Adipocyte specific genes 表現之前 C / EBP $\alpha$  會輕微地增加表現(120)。

在脂肪細胞分化期間，細胞從纖維狀變成圓形並且在形態上、Cytoskeletal components 和 Extracellular matrix (ECM) components 的濃度和型式有明顯的改變。許多 Cytoskeletal 和 ECM components 對脂肪細胞分化影響的研究指出脂肪細胞轉錄因子的特徵，這些變化可能是影響脂肪細胞分化期間 PPAR 或 C / EBPs 的表現和作用。

#### 4. Late events and terminal differentiation

在分化的最後階段，培養中的脂肪細胞主要增加 De novo lipogenesis (脂質生成)和對胰島素的敏感性。一些參與三酸甘油酯代謝的酵素包括有 ATP citrate lyase、Malic enzyme、Acetyl - CoA carboxylase (ACC)、Stearoyl - CoA desaturase (SCD1)、Glycerol - 3 - phosphate acyltransferase、Glycerol - 3 - phosphate dehydrogenase (G3PDH)、Fatty acid synthase (FAS)和 Glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase，它們的活性、蛋白質和 mRNA 表現增加了 10 ~ 100 倍 (121)，Glucose transporters、Insulin receptor 的數量和胰島素敏感性也都增加。在脂肪細胞分化期間， $\beta_1$  - adrenergic receptors 的減少以及  $\beta_2$  - 和  $\beta_3$  - subtypes 的增加，增加了 Total adrenergic receptor 的數量。除了與脂質代謝相關蛋白質的 mRNA 增加外，脂肪細胞也合成其它脂肪組織專一性產物，包括 Adipocyte specific fatty acid binding protein (aP2)，FAT / CD36 這個 Fatty acid transporter 以及 Perilipin 這種 Lipid droplet - associated protein。除此，脂肪細胞還生成一些 Secreted products 包括有作為 Angiogenic agent 的 Monobutyrin、屬於 Serine protease complement factor D 的 Adipsin、Acrp30 / AdipoQ、PAI - 1 和 Angiotension II (122)。PPAR $\gamma$  和 C / EBP $\alpha$  共同活化一些基因的表現包括了 aP2、GLUT4、SCD1、Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)和 Leptin (123)。

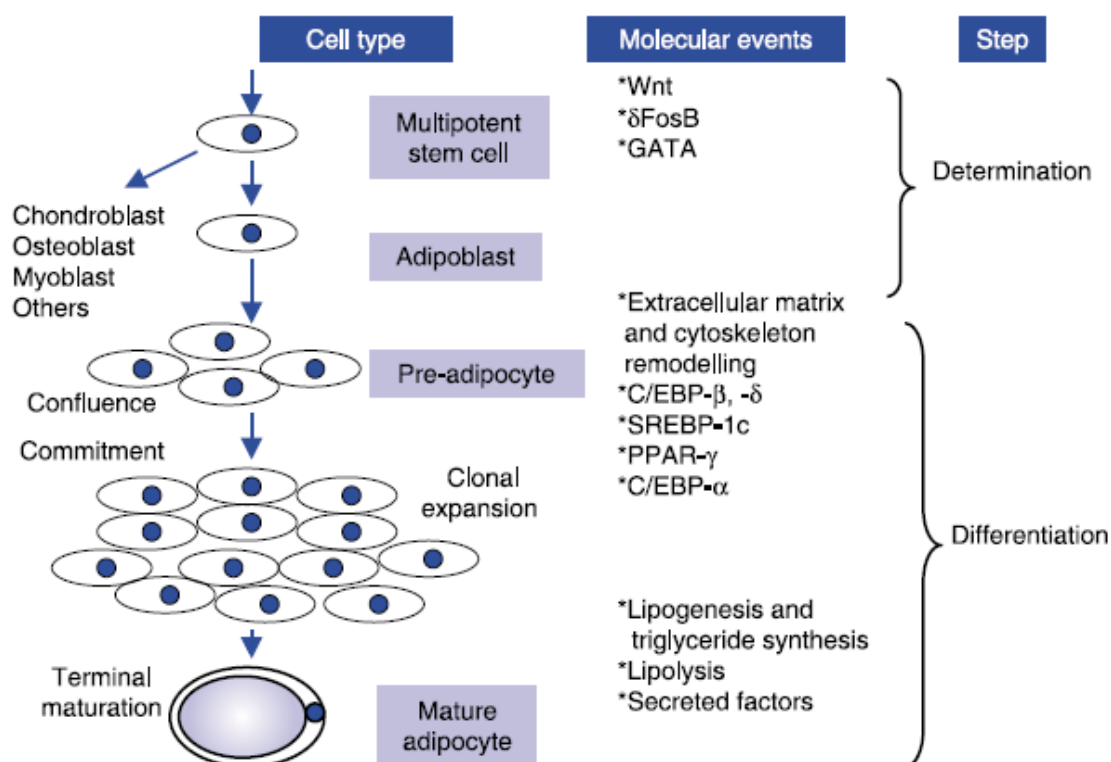


圖 2 - 3 脂肪細胞生合成的過程

資料來源：Feve., 2005 (120)

#### (四) 脂肪細胞生合成的轉錄調控

已知有許多促進或抑制脂肪細胞生合成的轉錄因子會影響脂肪細胞生合成，一些 *In vitro* 和 *In vivo* 的研究顯示出，脂肪細胞生合成的調控是一連串的 Transcription cascade。在脂肪細胞發展過程中，有三個主要直接影響脂肪細胞生合成的轉錄因子，分別是 PPAR $\gamma$ 、C / EBPs 和 The basic helix – loop - helix family (ADD1 / SREBP1c)。

## 1. 轉錄因子

### (1) PPAR $\gamma$

#### ① Role of PPAR $\gamma$ in adipocyte differentiation

先前已知TZD是PPAR $\gamma$ 的Ligands，而Kletzien等人發現TZD可以啟動脂肪細胞生合成(124)。PPAR $\gamma$ 最早是在哺乳動物中被發現(125)，但Spiegelman發現脂肪細胞專一的PPAR $\gamma$ 並在其團隊的研究也顯示出PPAR $\gamma$ 主要在脂肪細胞生合成期間被誘導，而且大量表現在脂肪組織中(126, 127)，因此Lehmann等人鑑定出TZD是PPAR $\gamma$ 高親和力的Ligand (21)。Tontonoz等人將纖維母細胞利用Retrovirus異位表現PPAR $\gamma$ 的Gain - of - function研究最先指出，PPAR $\gamma$ 在脂肪細胞生合成中的重要角色(128)。除此，在脂肪細胞生合成的過程中需要PPAR $\gamma$ 的存在，當C/EBP $\alpha$ 在沒有PPAR $\gamma$ 的存在下是無法誘發脂肪細胞的分化，但PPAR $\gamma$ 在沒有C/EBP $\alpha$ 下能誘導脂肪細胞分化(129)，此表示PPAR $\gamma$ 對脂肪細胞分化是主要的調節者。

在Adipose cell - selective fatty acid binding protein aP2的模式中，其5' flanking region被鑑定是轉錄的起始，此Enhancer可開啟培養的與基因轉殖小鼠的脂肪細胞中Promoter的基因表現(130)。Tontonoz等人鑑定出此Region是ARF6與ARE6和ARE7結合的Cis - acting elements，並指出PPAR $\gamma$ 與RXR這個Heterodimer可與aP2基因的5' flanking region結合(126, 131)。PPAR $\gamma$ 除了誘導aP2基因的表現外，也會活化許多其它Adipocyte specific genes的Promoter，在脂肪細胞中PEPCK的表現需要PPAR $\gamma$ 的結合(132)。在培養的脂肪細胞與基因轉殖小鼠In vivo的研究也發現，一些脂肪細胞中其Promoter的活化是需要PPAR $\gamma$ ，但在其它組織中並不需(133)。

許多Loss - of - function研究也指出PPAR $\gamma$ 對脂肪細胞生合成的重要性。最早在1999年，完全剔除胚胎PPAR $\gamma$ 的小鼠在胚胎期10 ~ 10.5天期間，因為不正常的胎盤形成而胎死腹中(134, 135)。由於齧齒類動物的脂肪細胞生合成大部份是發生在出生之後，為了解決PPAR $\gamma$ <sup>-/-</sup> embryo無法存活的問題，Rosen等人利用Wild - type ES cells與完全剔除PPAR $\gamma$ 的ES cells製造出Chimeric mice，這些小鼠可存活下來並有正常的組織發育(136)。因為ES cell genotype可干擾PPAR $\gamma$ 對形成其它特異細胞類型或



器官發展的需要，因此得知PPAR $\gamma$ 對於早期胎盤的形成是需要的。Rosen等人也觀察了Wild - type和PPAR $\gamma^{-/-}$  ES cell的In vitro分化發現到，PPAR $\gamma^{+/+}$  cells可發生脂肪細胞生合成，而PPAR $\gamma^{-/-}$  cells不會堆積脂質、表現分化指標或有胰島素敏感性。另外Barak等人利用正常的Tetraploid cells來校正胎盤的缺失來製造Chimeric embryos，這些小鼠在出生後可短暫存活下來，且在解剖後發現沒有棕色或白色脂肪組織(137)，Heterozygous PPAR $\gamma$  - deficient mice與高脂飲食的Wild - type mice相較下，其副睪脂肪、腹膜後脂肪和周邊脂肪塊重量是減少的，且有增加的胰島素敏感性。

Cre - loxP策略是用來產生專一性剔除組織PPAR $\gamma$ 的表現，這些小鼠都有相似的特徵，像是全身脂肪塊重量減少的脂肪萎縮(Lipodystrophy)以及胰島素抗性。目標專一性降低脂肪組織中PPAR $\gamma$ 活性的Knockout小鼠，皮下和副睪脂肪塊會逐漸減少，血漿游離脂肪酸與三酸甘油酯增加，且血漿Leptin和Adiponectin減少(138)。選擇性破壞PPAR $\gamma$ 2會使腹膜後脂肪、腹股溝脂肪和生殖器周邊脂肪減少(139)。利用Neomycin - resistant gene cassette對序列轉錄干擾，來降低脂肪組織中PPAR $\gamma$ 2和PPAR $\gamma$ 1表現的PPAR $\gamma$  Hypomorphic mice，也發現有脂肪萎縮的現象(140)。目標專一性剔除肌肉組織中PPAR $\gamma$ 的小鼠，會慢慢形成胰島素抗性且會增加脂肪組織重量(141)，上述這些小鼠模式清楚的指出PPAR $\gamma$ 對脂肪細胞生合成的重要性。

## ② Adipose as the target tissue for insulin sensitizing effects of PPAR $\gamma$ ligands

一些啮齒類與人類的基因研究指出PPAR $\gamma$ 的活化具有胰島素敏感性作用。在PPAR $\gamma$ 基因上有Pro12Ala基因多型性的人有較好的胰島素敏感性(142)，在一些少數病人身上發現，Heterozygous mutation的PPAR $\gamma$ 會造成嚴重的胰島素抗性(143)。此外，抑制小鼠PPAR $\gamma$ 的Serine122磷酸化可增加PPAR $\gamma$ 活性，使其不會發生因肥胖所致的胰島素抗性(144)，出乎意料地發現缺少其中一個PPAR $\gamma$ 對偶基因的小鼠，比正常小鼠有較好的胰島素敏感性(145)，但這個原因尚不清楚，有可能是削減了基因抑制作用，因而降低在缺乏Ligands時PPAR $\gamma$ 的表現。不管如何，PPAR $\gamma$ 最佳活性的表現決定於其作為胰島素敏感性轉錄調節者的作用(146)。

TZD是PPAR $\gamma$ 專一性的Ligands，而脂肪組織是一內分泌器官且大量表現PPAR $\gamma$ ，在低血糖且嚴重脂肪萎縮的小鼠中，TZD是沒有作用的(147)，這顯示出脂肪組織是TZD作用的主要位置。TZD可改善肌肉和肝臟中的胰島素敏感性(148)，雖然PPAR $\gamma$ 在骨骼肌中表現很低，但專一剔除肌肉中PPAR $\gamma$ 的小鼠有肝的胰島素抗性現象，然而，在給予TZD之後能有效反轉其胰島素抗性(141)。相反的，另一個專一剔除肌肉中PPAR $\gamma$ 模式的小鼠有肌肉的胰島素抗性現象，但給予TZD並未改善其肝臟的作用(149)。雖然其它組織可能也具角色，但目前研究顯示脂肪組織是TZD作用的主要位置，藉由改變Adipose factors的分泌，在肌肉和肝臟中有間接的胰島素敏感性作用。

### ③ PPAR $\gamma$ regulation of adipocyte genes that modulate insulin sensitivity

一些脂肪細胞的內分泌產物會改變周邊組織特別是肌肉和脂肪的胰島素敏感性，已知PPAR $\gamma$  ligands TZD影響胰島素敏感性作用中的多種脂肪細胞基因。脂肪細胞會分泌一些多胜肽，這些與葡萄糖恆定和胰島素敏感性有關，包括有TNF $\alpha$ 、IL-6、Leptin、Adiponectin和Resistin，這些基因表現會受到TZD的調節(150)。另一個TZD主要的作用是降低循環的游離脂肪酸，而游離脂肪酸顯示與肥胖所致的胰島素抗性有關(151)。TZD同時向上調節脂肪細胞中游離脂肪酸汲取相關基因如LPL和FATP (152)，以及游離脂肪酸再回收相關基因如PEPCK和Glycerol kinase (GyK)(132)的表現。因此，TZD藉由對增加脂肪細胞汲取游離脂肪酸以及降低釋放到循環中，因而降低血清游離脂肪酸濃度。

### (2) CCAAT / enhancer binding protein (C / EBP) family

C / EBPs是屬於Basic - leucine zipper的轉錄因子，已知有六種Isoforms，每一種都有高度保留的bZIP domain以Homo - and / or heterodimers的類型作用(119)，其Basic DNA - binding domain與Regulatory element結合在下游基因的Promoters或Enhancers上。C / EBPs gene的表現會調節三種蛋白質( $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\delta$ )，它們的組織分佈並不侷限於脂肪組織中，大部分表現在脂肪與肝臟。它們有相似的DNA - binding

activities，而且在它們的Promoters上有C / EBP regulatory elements的Trans - activating reporter gene。C / EBP protein在顆粒白血球(Granulocytes)和肝細胞的最後分化作用上也扮演角色，另外C / EBPs對感染反應的抗性也有重要角色(114)。C / EBPs可調節許多層次包括了細胞中mRNA表現的轉錄作用，In vitro中cAMP已知是脂肪細胞生合成的Inducer，能夠同時增強C / EBP $\alpha$ 和C / EBP $\beta$ 的表現。

在脂肪細胞生合成期間，一些C / EBP family members的表現是受到調節，近來在Gain - and loss - of - function研究中指出，這些蛋白質深深影響脂肪細胞的發展。在培養的前脂肪細胞株誘導分化時，C / EBP $\beta$ 和 $\delta$ 其mRNA和蛋白質是最早且短暫的表現，C / EBP $\alpha$ 則在分化後期的階段被誘發出來，並可轉活化一些Adipocyte specific gene的Promoters (119)。

In vitro的Gain - of - function研究清楚表示了C / EBP $\beta$ 和 $\delta$ 的Proadipogenic角色，在沒有荷爾蒙的誘導下，異位表現C / EBP $\beta$ 能夠誘發3T3 - L1 cells的分化作用。對C / EBP $\delta$ 而言，仍是需要有促分化藥劑的存在，但C / EBP $\delta$ 可加速脂肪細胞生合成。C / EBP $\beta$ 也能促進一些細胞分化成為脂肪細胞，異位表現C / EBP $\beta$ 的NIH - 3T3纖維母細胞在荷爾蒙的誘導下可進行脂肪細胞生合成，當胚胎的纖維母細胞缺少C / EBP $\beta$ 或 $\delta$ 時，會輕微降低脂肪細胞生合成的潛力，但是當細胞同時缺少C / EBP $\beta$ 和 $\delta$ 時，會嚴重阻礙纖維母細胞發展成脂肪細胞(120)。

In vitro的研究也強烈顯示出C / EBP $\alpha$ 在脂肪細胞生合成之角色，Retroviral表現C / EBP $\alpha$ 的3T3 - L1前脂肪細胞或纖維母細胞可被誘導分化成為成熟的脂肪細胞，而當這些細胞表現有C / EBP $\alpha$  antisense RNA時，會抑制其分化作用(153)。

### (3) ADD1 / SREBP1c

Adipocyte determination and differentiation factor 1 (ADD1)是Basic helix - loop - helix (bHLH)的轉錄因子，bHLH protein有組織專一性的調節作用，特別是在肌肉中，與脂肪有共同的Mesodermal origin。ADD1是根據與E - boxes motif (CANNTG)這個bHLH protein的DNA recognition site結合能力，從大鼠脂肪細胞cDNA中分離出來的(154)，ADD1高度表現在棕色脂肪，其次是白色脂肪，肝臟和腎

臟。Sterol regulatory element binding proteins (SREBPs)調節膽固醇與脂肪酸代謝相關基因的轉錄作用(155)，Yokoyama等人依據與Sterol regulatory element結合能力所獨立選殖出來與ADD1相同的轉錄因子，命名為Sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1)。在哺乳動物中有三種SREBPs，分別是SREBP1a、SREBP1c和SREBP2。ADD1與SREBP1c的Amino terminus是相同的(156)，ADD1 / SREBP1c有同時與Sterol regulatory elements (SREs)和E - boxes結合的Dual DNA - binding specificity。

Kim與Spiegelman將ADD1 / SREBP1c mRNA表現在前脂肪細胞株中發現可明顯誘導刺激分化作用，表示了ADD1 / SREBP1c在脂肪細胞生合成之角色(157)。高度表現ADD1 / SREBP1c的3T3 - L1 cells在有荷爾蒙的誘導分化下，與控制組相比較有增加的Adipocyte marker表現以及脂質堆積。此外，異位表現ADD1 / SREBP1c的纖維母細胞在強力誘導分化下會有一些脂肪細胞的轉變，這些都指出ADD1 / SREBP1c與脂肪細胞生合成有關。

ADD1 / SREBP1c的脂肪細胞生成功能的機制目前還是不清楚，而一些研究指出與PPAR $\gamma$ 有關。Kim與Spiegelman在PPAR $\gamma$  reporter system中共同表現ADD1 / SREBP1c與PPAR $\gamma$ 發現有更大的轉錄活性，但單獨表現ADD1 / SREBP1c則是少的作用(157)，另一解釋為ADD1 / SREBP1c會生成一些因子而增加了PPAR $\gamma$ 的活性。Kim等人利用顯性抑制ADD1 / SREBP1c來阻斷脂肪細胞的分化，但當給予PPAR $\gamma$  ligands TZD時可完全回復其分化。綜合而言，這些結果顯示ADD1 / SREBP1c促進內生性PPAR $\gamma$  ligand的生成(158)。

雖然ADD1 / SREBP1c對脂肪細胞生合成的影響尚不清楚，但已知ADD1 / SREBP1c刺激許多脂質生合成與醣解酵素基因的表現，這些基因包括有LPL、Fatty acid synthase (FAS)、ACC、Spot 14或Pyruvate kinase (L - PK)和Glycerol phosphate acyltransferase (159, 160)。當飢餓後再餵食會刺激脂肪組織中ADD1 / SREBP1c的表現而促進脂質生合成，ADD1 / SREBP1c剔除的小鼠會對餵食後脂質生合成的反應遲鈍，而胰島素可調節再餵食的作用，因此強力地調節脂肪與肝臟中ADD1 / SREBP1c的表現(161, 162)。

#### (4) 其它轉錄因子

近來有一些其它轉錄因子可能與脂肪細胞生合成有關，但是這些轉錄因子並沒有像PPAR $\gamma$ 與C / EBPs一樣是影響脂肪細胞形成的主要調節者，它們可能是做為對脂肪細胞發展與功能上某些層面之調節者。

##### ① PPAR $\delta$

PPAR $\delta$ 是廣泛表現的，一些研究顯示利用非專一的PPAR活化劑給予某些異位表現PPAR $\delta$ 的纖維母細胞，可促進脂肪細胞生合成(163)，但其它的研究指出，以各種Ligands來活化異位表現PPAR $\delta$ 的細胞並不會促進脂肪細胞生合成。Berger等人用PPAR $\delta$  ligands給予內生性表現有PPAR $\delta$ 的3T3 - L1 cells，發現並沒有誘導脂肪細胞的形成(71)。由這些研究可知PPAR $\delta$ 對脂肪細胞生合成的角色仍然是不明確的。

##### ② GATA family

GATA - 2和GATA - 3這兩個GATA family的轉錄因子，是參與發展過程的Zinger - finger DNA-binding protein，它們表現在前脂肪細胞中並在最後成熟作用期間被向下調節。GATA - 2和GATA - 3的重組表現會抑制脂肪細胞分化，此對脂肪細胞生合成的抑制作用可能是透過降低PPAR $\gamma$ 活性來調節的。此外，缺乏GATA - 3的EC cells可增強分化為脂肪細胞的能力；在基因的肥胖小鼠，其脂肪組織中GATA - 2和GATA - 3的表現顯著地被向下調節(164)。

##### ③ FOXC2

轉錄因子FOXC2在脂肪細胞中對基因表現是Pleiotropic action，一些研究指出這個蛋白質可能在脂肪細胞發展與代謝中扮演重要角色。過度表現FOXC2的小鼠其脂肪組織有瘦的表型且會增加胰島素敏感性，並增加了脂肪細胞中 $\beta$  - adrenergic responsiveness以及氧消耗(165)。

#### ④ Olf - 1 / early B - cell factor (O / E - 1)

O / E - 1是Helix - loop - helix的轉錄因子，大量表現在B淋巴細胞、神經細胞和脂肪組織中(166)，O / E - 1控制B淋巴細胞專一性的基因以及轉錄調控Olfactory receptor neurons中的基因(166-168)。有研究指出O / E - 1參與脂肪細胞中GLUT4基因的調控(169)，但其在脂肪細胞生合成中的角色仍然未知。

Akerblad等人以Retrovirus感染3T3 - L1 cells、NIH - 3T3和MEF cells使其表現O / E - 1，發現了在誘導分化2天之後PPAR $\gamma$ 2、aP2、G3PDH和GLUT4這些Adipocyte specific gene有較高的表現，且O / E - 1可刺激最後脂肪細胞的分化作用。另外，顯性抑制3T3 - L1 cells中O / E - 1的表現會降低其最後分化為脂肪細胞的能力，而且一些在分化期間的Adipocyte specific gene如G3PDH、Adipsin和GLUT4表現會下降，也發現了aP2、PPAR $\gamma$ 1和 $\gamma$ 2以及C / EBPA表現減少。這些結果顯示出O / E - 1直接參與脂肪細胞的最後分化而且也參與了脂肪細胞發展的起始作用，指出了O / E - 1在脂肪細胞生合成中扮演新的Initiator和Stimulator之角色(170)。

#### ⑤ Liver X receptor $\alpha$ (LXR $\alpha$ )

近來研究顯示LXR $\alpha$ 這個細胞核接受器與脂質和膽固醇代謝的調節有關(171, 172)，LXR $\alpha$ 主要表現在與脂質代謝相關的組織中，如肝臟、脂肪組織、腎臟和脾臟。在肝臟中LXR $\alpha$ 的表現是受PPAR $\alpha$ 的調節(173)，而在巨噬細胞中會受PPAR $\gamma$ 的調節(174)。

Juvet等人對LXR $\alpha$ 在脂肪組織中的角色之研究，指出LXR $\alpha$ 對成熟脂肪細胞中調控脂質堆積的角色，並暗示了LXR $\alpha$ 與PPAR $\gamma$ 在脂質代謝中的關連性。其發現給予PPAR $\gamma$  agnoists會向上調節Obese Zucker rats、Human adipocytes和成熟3T3 - L1 adipocytes中LXR $\alpha$ 的表現；在分化中的3T3 - L1 adipocytes給予LXR $\alpha$  agnoists之後，會增加其脂質堆積的情況。另外，給予內生性LXR $\alpha$  agnoists會增加成熟3T3 - L1 adipocytes、Human adipocytes和剔除LXR $\alpha$ 小鼠中LXR $\alpha$ 的表現，也會增加脂質生合成基因的表現(175)。

LXR $\alpha$ 是否直接參與脂肪細胞分化的過程還是不確定的。Seo等人研究了LXR $\alpha$ 在脂肪細胞分化的角色，在分析脂肪細胞分化期間的活化作用發現到，以LXR $\alpha$  agonists處理3T3 - L1 preadipocytes、3T3 - F442A preadipocytes和Primary human preadipocytes，會促進脂肪細胞分化加速油滴堆積並增加一些Adipocyte specific gene如PPAR $\gamma$ 和aP2的表現。另外，利用EMSA分析活化的LXR $\alpha$ 是否會直接結合到PPAR $\gamma$  promoter上，其結果發現PPAR $\gamma$ 是LXR $\alpha$ 新的Target gene。這些結果顯示LXR $\alpha$ 藉由調節脂質生合成與Adipocyte specific gene表現，而參與脂肪細胞分化作用(176)。

## 2. A transcription network

在對脂肪細胞生合成的研究顯示出有一個轉錄調控網的模式，這是與C / EBPs和PPAR $\gamma$ 連續的活化作用有關，C / EBP $\beta$ 和 $\delta$ 在此模式中主要功能之一是誘發PPAR $\gamma$ 的表現。在較早階段，C / EBP $\beta$ 和 $\delta$ 內生性的表現是在PPAR $\gamma$ 之前，而C / EBP $\beta$ 和 $\delta$ 的異位表現則誘發出PPAR $\gamma$ 的表現(177)，此誘導作用是透過在PPAR $\gamma$  promoter中C / EBP binding sites的直接轉錄作用。異位表現PPAR $\gamma$ 的Gain - of - function之研究或應用專一性PPAR $\gamma$  ligands誘導C / EBP $\alpha$  mRNA之研究指出了，PPAR $\gamma$ 有誘導C / EBP $\alpha$ 的反應。當胚胎纖維母細胞或胚胎幹細胞完全缺乏PPAR $\gamma$ 時，這些細胞無法變成脂肪細胞，它們雖然有正常C / EBP $\beta$ 和 $\delta$ 的表現，但C / EBP $\alpha$ 的表現極低。然而，C / EBP $\alpha$ <sup>-/-</sup>的纖維母細胞其PPAR $\gamma$ 的表現減少，且培養在荷爾蒙誘導劑中無法快速形成脂肪細胞，當以Retroviral vector把C / EBP $\alpha$ 送入到這些細胞中時，回復了PPAR $\gamma$ 以及分化的能力。此顯示出在PPAR $\gamma$ 和C / EBP $\alpha$ 互相增強表現作用的Cascade中，有一個Positive feedback loop，表示了一旦開始分化，Cascade會維持這些主要因子的表現一直到最後的分化階段。另外，可能是有C / EBPs和PPAR $\gamma$ 的上游、下游或以平行方式來促進或維持脂肪細胞生合成，而ADD1 / SREBP1c在此模式中扮演這樣的角色，ADD1 / SREBP1c會誘導PPAR $\gamma$ 表現以及經由生成內生性Ligands來活化PPAR $\gamma$  (121)。

到底C / EBPs與PPAR $\gamma$ 在脂肪細胞生合成中的作用是平行且相互增強的，或是只是由其中一個因子調控脂肪細胞生合成，然後再與其它因子調節整個過程？已知的是PPAR $\gamma$ 可以刺激大部分但並非全部C / EBP $\alpha$  - deficient cells的脂肪細胞生合成，C / EBP $\alpha$  - deficient cells可以堆積脂質且表現大部分脂肪細胞生合成的指標，因為有較低的胰島素接受器和IRS - 1的表現以及在胰島素傳訊中缺乏Postreceptor，而有差的胰島素敏感性。另外，也知道PPAR $\gamma$ 和C / EBP $\alpha$ 具協同作用，可活化在分化過程中相關基因之表現(118)，此協同作用的機制仍不清楚，但許多脂肪細胞基因同時有C / EBP protein與PPAR $\gamma$  / RXR的Binding sites，例如PEPCK (132)和aP2 (126)，此可能顯示出一般轉錄調節者的相互作用。

最後綜合而言，PPAR $\gamma$ 在脂肪細胞生合成中是絕對需要的，但C / EBP $\alpha$ 則是扮演輔助的角色，主要是提升PPAR $\gamma$ 在細胞中的表現。另外，C / EBP $\alpha$ 也在維持已分化的脂肪細胞其胰島素敏感性中扮演重要角色(178, 179)。

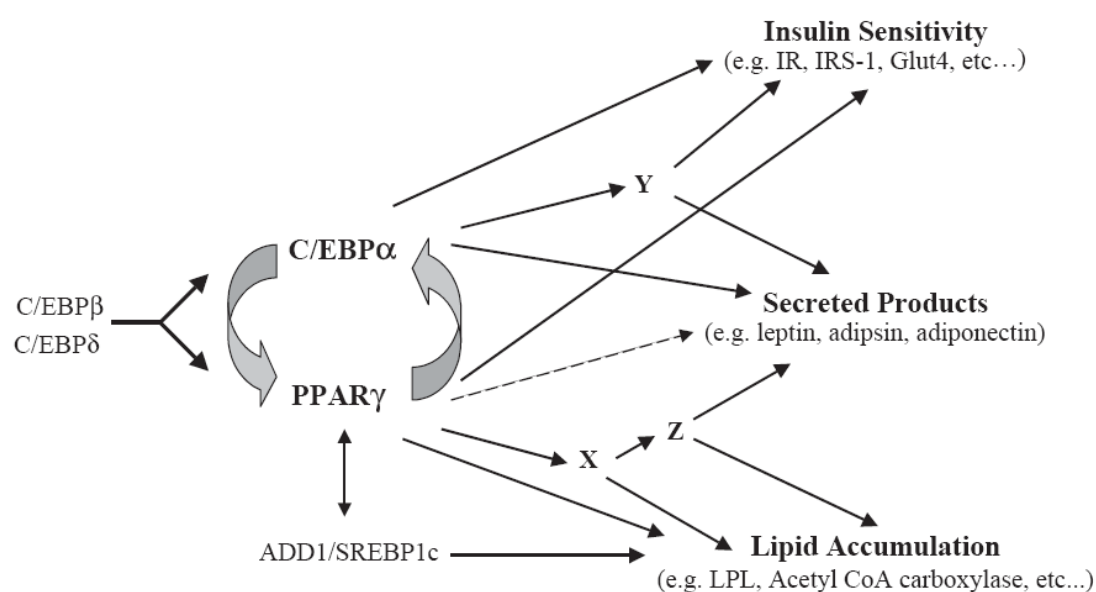


圖2 - 4 A model of the transcriptional cascade leading to adipogenesis

資料來源：Rosen., 2005 (180)



### 3. Coactivators of transcriptional regulation by PPAR $\gamma$ and C / EBPs

為了活化其下游基因，轉錄因子會與其Coregulators結合來修飾染色質結構以及調節它們轉活化特性，這作用是由一群稱為Coactivators的蛋白質以Temporotemporal manner調節，可能影響脂肪細胞分化的過程(181)。PPAR $\gamma$ 會和p160 family、CBP / p300或其它的Coactivators相互作用，當有Ligands結合時，這些Coactivators結合到PPAR $\gamma$ 的Carboxy - terminal AF - 2 domain。

有兩種主要類型的Coactivator complex，分別為p160 / CBP / p300 complex以及DRIP / TRAP complex。第一種類型有SRC - 1 / NCoA1、TIF2 / GRIP1 / NCoA2和pCIP / ACTR / AIB1 (116)，這些蛋白質除了結合在PPAR $\gamma$ 的AF - 2 domain外，也會和CBP / p300相互作用，而CBP / p300可直接和PPAR $\gamma$ 作用因此使Complex更穩定。第二種類型有DRIP / TRAP / ARC complex會以Ligand dependent的方式與細胞核接受器相互作用(114)，其中對轉錄活化作用的Complex是DRIP205 / TRAP220，此Complex與PPAR $\gamma$  binding protein (PBP)一樣是以PPAR $\gamma$ 誘導利用Yeast two - hybrid screen所選殖出來的。

兩種PPAR $\gamma$ 的Coactivators分別是PPAR $\gamma$  coactivator - 1和 - 2 (PGC - 1, - 2)，它們不是Ligand dependent但顯示有生物專一性，PGC - 1是以PPAR $\gamma$ 誘導利用Yeast two - hybrid screen從棕色脂肪中所選殖出來的；PGC - 2是以Amino - terminal AF - 1 domain誘導利用Two - hybrid screen從白色脂肪Library中所選殖出來的。較少知道有與C / EBPs相互作用的Coactivator complex，已知有兩種類型的Coactivators會與C / EBP $\beta$ 相互作用(181)，一種是Chromatin remodeling SWI / SNF complex，其存在於骨髓細胞中活化一些基因；第二種是CBP / p300 coactivator，其因為也是PPAR $\gamma$ 的有效Coactivator，所以CBP / p300可能對C / EBPs與PPAR $\gamma$ 之間的協同作用是重要的。

## (五) 刺激脂肪細胞生合成的因子

### 1. Glucocorticoids (GCs)

Rubin 等人利用 Dexamethasone (DEX) 這個合成的 GCs，來作為 3T3 - L1 cells 的 DEX / MIX differentiation cocktail 的成分，而且 DEX 也常用在其它前脂肪細胞株和衍生自齧齒類或人類脂肪塊初代前脂肪細胞的分化上，在 PPAR $\gamma$  和 C / EBP $\alpha$  的 Transfection 研究中(182)，DEX 可以誘導纖維母細胞分化為脂肪細胞。在 3T3 - L1 cells 中，GCs 誘導 C / EBP $\delta$  的表現，C / EBP $\delta$  的增加可能是因為 C / EBP $\delta$  與 C / EBP $\beta$  heterodimers 的形成，然後接著使 PPAR $\gamma$  表現。在 Ob1771 前脂肪細胞的研究中，GCs 的調節作用是透過增加 Arachidonic acid 的代謝使得 Prostacyclin 的生成增加，然後增加細胞內的 cAMP (177, 178, 183)。

### 2. Methylisobutylxanthine (MIX)

MIX 加速前脂肪細胞株和初代前脂肪細胞的分化，MIX 就像是 GCs 一樣，常用在各種前脂肪細胞的分化上，MIX 會增加 C / EBP $\beta$  的表現，而且此增加對於之後 PPAR $\gamma$  的表現以及脂肪細胞分化是需要的。MIX 作用的明確方式還未了解，已知 MIX 是抑制 Phosphodiesterases 以及競爭抑制 A<sub>1</sub> adenosine receptor，也藉由阻斷 Inhibitory regulatory protein G<sub>1</sub> 來刺激 Adenylyl cyclase 的活性，這表示 MIX 可能是透過增加 cAMP 的方式來作用(113)。

### 3. 其它

在脂肪細胞生合成的早期階段 MEK / ERK signalling pathway 的 Transient activation，對促進分化過程的轉變似乎是重要的(184)。Bost 等人利用 ERK1<sup>-/-</sup> mice 的研究指出缺少此蛋白質會減少脂肪細胞，而且可以抑制高脂飲食誘導的肥胖與胰島素抗性，在培養從 ERK1<sup>-/-</sup> mice 的前脂肪細胞中發現其脂肪細胞生合成是受阻的(185)。

p38 mitogen - activated protein kinase (MAPK)對脂肪細胞生合成也是需要的，p38的活化促進前脂肪細胞自發性的分化作用(186)，在脂肪細胞中，胰島素可以刺激p38的活性(187)。

#### (六) 抑制脂肪細胞生合成的因子

##### 1. Protease inhibitors : highly active antiretroviral therapy

Highly active antiretroviral therapy是對HIV / AIDS病人體脂分布與代謝問題的治療方法，這些病人有胰島素抗性、血脂紊亂、周邊脂肪肥大(Lipohypertrophy)的現象(188)。在細胞培養的研究指出一些Protease inhibitors尤其是Nelfinavir和Indinavir，會降低前脂肪細胞分化與脂質生合成，且增加Apoptosis和脂解作用(189-193)。近來，In vitro研究指出Efavirenz這個Non - nucleoside reverse transcriptase inhibitor可強力地抑制脂肪細胞分化期間脂質的堆積，而此現象與SREBP1c顯著向下調節有關(194)。

##### 2. WNT family

WNT family經由Autocrine或Paracrine的方式影響許多細胞種類的發展，異位表現WNT1 gene抑制脂肪細胞生合成(195)。WNT完全抑制PPAR $\gamma$ 和C / EBP $\alpha$ 的表現，相反的在前脂肪細胞中抑制WNT signaling可有自發性的分化作用，表示了前脂肪細胞會產生內生性的WNT而抑制分化。一些研究指出WNT10b gene高度表現在前脂肪細胞中並隨著分化時間而向下調節，缺乏WNT10b可增加Myofibers中脂質堆積並且增加Myoblasts的脂肪細胞生合成潛力，相反的若是過度表現WNT10b則抑制白色與棕色脂肪組織的形成(196)。

### 3. Pre - adipocyte factor 1 (Pref - 1)

Pref - 1是屬於Epidermal – growth – factor - like repeats containing transmembrane proteins (197)，其高度表現在前脂肪細胞中，並在脂肪細胞分化期間表現會隨之減少，且在成熟脂肪細胞中偵測不到Pref - 1的表現，過度表現Pref - 1會抑制3T3 - L1 cells的脂肪細胞生合成(198)。有新的研究指出，將Soluble form的Pref - 1表現在小鼠脂肪組織或肝臟中，會降低脂肪組織的重量並增加胰島素抗性(199)；另一研究也指出，Pref - 1 knockout mice會出現肥胖(200)。這些研究顯示In vivo中，Pref-1是負向的調節者。

### 5. Cytokines

發炎細胞激素包括有Tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )、Interleukin - 1 (IL - 1)、IL - 6、IL - 11、Leukaemia inhibitory factor、Interferon -  $\gamma$ 、Oncostatin M和Ciliary neurotrophic factor (CNTF)都與抑制脂肪細胞生合成有關(201-203)。例如 IL - 1會抑制3T3 - L1 cells分化以及骨髓Stroma - derived H - 1 / A cells的脂肪細胞分化；Interferon -  $\gamma$ 和IL - 1抑制3T3 - derived preadipocyte cell lines和Primary rodent preadipocytes的脂肪細胞分化。TNF $\alpha$ 減少LPL合成以及抑制脂肪細胞分化，當長期以高劑量的TNF $\alpha$ 給予成熟脂肪細胞一段時間，會使細胞質內的脂質減少，並有類似前脂肪的表型。除此，給予TNF $\alpha$ 會快速地降低PPAR $\gamma$ 的mRNA和蛋白質表現，也同時降低PPAR $\gamma$  DNA binding activity，並也有減少的C / EBP $\alpha$ 和aP2表現，此顯示TNF $\alpha$ 影響成熟脂肪細胞作用的機制可能是向下調節PPAR $\gamma$ 。

TGF -  $\beta$ 也是一種細胞激素，在大部分的細胞培養模式中，TGF -  $\beta$ 對脂肪細胞分化是有效的抑制劑，而TGF -  $\beta$ 抑制脂肪細胞分化的可能機制是藉由增加ECM components的合成。在In vitro中TGF -  $\beta$ 會刺激前脂肪細胞的增生並抑制脂肪細胞生合成，當小鼠過度表現TGF -  $\beta$ 時會減少脂肪組織的。這些TGF -  $\beta$ 抑制脂肪細胞分化的作用是受轉錄因子SMAD3所調節，來阻斷C / EBP $\alpha$ 和PPAR $\gamma$ 的表現(120)。

## 6. Dietary factors

### (1) Medium - chain triglycerides (MCTs)

雖然大部分的脂肪酸如Linoleic acid會增加人脂肪細胞中三酸甘油酯的儲存,但已知一些脂肪酸會抑制脂肪細胞生合成。飲食的MCTs降低齧齒類動物的脂肪細胞數目及大小(204),此作用可能與抑制脂肪細胞生合成,以及降低PPAR $\gamma$ 、C / EBP $\alpha$ 和ADD1 / SREBP1c基因與蛋白質的表現有關(205, 206)。臨床上,給予含有MCTs飲食的受試者可降低體脂,但此作用是因為MCTs影響脂肪酸的氧化作用。

### (2) Conjugated linoleic acid (CLA)

CLA是Linoleic acid (18 : 2 n6)的異構物,主要的兩種異構物為*c9*, *t11*和*t10*, *c12*,在反芻動物腸道中經由細菌作用而產生。在動物研究中*t10*, *c12* CLA顯示會降低體脂重量並增加瘦體重量而改變體組成(207)。許多In vitro研究指出,給予CLA異構物會抑制脂肪細胞中的脂質堆積,以*t10*, *c12* CLA處理3T3 - L1 adipocytes會減少細胞內三酸甘油酯含量(208),在人脂肪組織SV cells的初代培養中也有相同的結果(209)。CLA的抑制脂肪細胞生合成作用之機制仍然不清楚,有研究發現*t10*, *c12* CLA下降3T3 - L1 preadipocytes中PPAR $\gamma$ 和 $\alpha$ 2的表現,以及降低Primary human preadipocytes中PPAR $\gamma$ 、C / EBP $\alpha$ 和 $\alpha$ 2的表現(210)。

Guanlund等人研究*t10*, *c12* CLA影響脂肪細胞中脂質堆積的分子機制,其發現*t10*, *c12* CLA同時抑制3T3 - L1 cells和Human adipocytes的脂質堆積,也發現即使*t10*, *c12* CLA不是PPAR $\gamma$  ligands但卻可以降低成熟脂肪細胞中PPAR $\gamma$ 的活化,以及向下調節PPAR $\gamma$ 及其下游基因如 $\alpha$ 2和LXR $\alpha$ 的表現。這些結果指出在脂肪細胞生合成期間,*t10*, *c12* CLA是做為PPAR $\gamma$ 的調節者來降低3T3 - L1 adipocytes中Adipogenic marker gene的表現,因而抑制脂肪細胞中脂質堆積(211)。

接著Guanlund等人繼續探討是否*t10*, *c12* CLA向下調節脂肪細胞分化期間所有的Adipogenic marker gene表現,以及給予脂肪細胞*t10*, *c12* CLA的時間與處理時間的長短如何影響脂質的堆積。其結果顯示在分化早期(分化第0到6天)給予*t10*, *c12*

CLA，向下調節PPAR $\gamma$ 和C/EBP $\alpha$ 表現，當增加處理時間(分化第0到11天)則會抑制PPAR $\gamma$ 下游基因如LXR $\alpha$ 、aP2和CD36的表現。這些結果指出了*t10, c12* CLA抑制脂肪細胞分化期間的脂質堆積，此與分化早期的PPAR $\gamma$ 和C/EBP $\alpha$ 以及晚期的LXR $\alpha$ 、aP2和CD36，這些Adipogenic marker gene之間的相互調節有關(212)。

### (3) Flavonoids

Flavonoids 是大量存在於植物和水果中的酚類化合物，大部分對 Flavonoids 的研究都在其抗氧化活性上。Kuppusamy 和 Das 發現一些 Flavonoids 對 Primary rat adipocytes 有 Epinephrine - induced lipolysis 的作用(213, 214)，另外 Shusheva 和 Shechter 發現 Quercetin 這種 Flavonoids，藉由抑制 Insulin receptor tyrosin kinase 阻斷了胰島素調節的脂質生合成(215)。這些 Flavonoids 對大鼠脂肪細胞中潛在的脂解與抑制脂質生合成作用，顯示出 Flavonoids 可能降低脂肪組織的重量或抑制脂肪細胞生合成。

Genistein 是具有生物活性多酚類的 Flavonoids，可預防心血管疾病、卵巢癌、前列腺癌、骨質疏鬆和更年期症狀，近來有研究指出 Genistein 對一些脂肪細胞有抑制脂肪細胞生合成的作用，但其作用機制仍不清楚(216)。Harmon 等人的研究指出，Genistein 抑制長滿前與長滿後 3T3 - L1 preadipocytes 增生，其抑制脂肪細胞生合成的作用是發生在誘導分化之後的前 72 小時期間，當發生分化時給予 Genistein，會經由降低 C/EBP $\beta$  與其下游的 Adipogenic transcription factors 的表現與活化而阻斷脂肪細胞的形成(217)。

已知 AMP - activated protein kinase (AMPK)調控能量的恒定，而且也促進 Apoptosis (218, 219)，之前研究指出 Genistein 會抑制脂肪細胞分化，另外一些研究指出某些天然化合物誘發 Apoptosis 促進體脂的減少(220)。因此，Hwang 等人假設 Genistein 會抑制脂肪細胞分化與誘發成熟脂肪細胞 Apoptosis 是透過 AMPK signaling。其研究指出，Genistein 是透過 AMPK 的活化以及誘發脂肪細胞的 Apoptosis，而具有脂肪細胞分化的抑制作用，同時也指出綠茶多酚 EGCG 和紅辣椒多酚 Capsaicin 可以抑制 3T3 - L1 adipocytes 的分化(221)。

Procyanidins 也是 Flavonoids 的一種，先前有研究指出 Grape seed procyanidin extract (GSPE) 調節脂肪的代謝，且 PPAR $\gamma$  在 GSPE 對脂肪細胞的脂解作用中扮演重要角色(222)。Pinent 等人研究了 GSPE 是否影響 3T3 - L1 cells 的脂肪細胞生合成，並且是首次指出 GSPE 會干擾 3T3 - L1 adipocytes 一開始的分化，以 GSPE 處理 3T3 - L1 cells 後分化的 24 小時期間，Adipocyte specific gene 如 G3PDH 會下降以及 Pref-1 的表現會增加；在 Microarray 分析中發現 GSPE 向下調節分化早期中與細胞週期以及生長相關的基因表現。這些結果顯示了 GSPE 主要影響分化而干擾脂肪細胞生合成，並且 Procyanidins 可能在抑制脂肪細胞形成上扮演一新角色(223)。



### 三、脂肪細胞是內分泌器官影響胰島素抗性

#### Adipose tissue as an endocrine organ : impact on insulin resistance

一直以來，脂肪組織被認為只是儲存過多能量而造成肥胖的器官，但近幾年顯露出脂肪細胞會分泌一群信號因子並同時表現有這因子的接受器，指出脂肪組織不僅是能量儲存的器官，也會分泌一大群蛋白質，這些分泌出的蛋白質稱作 Adipokines 或 Adipocytokines (224)。在現在認為脂肪組織參與調節體重恆定、葡萄糖與脂質代謝、生殖、免疫、血壓控制、纖維蛋白溶解(Fibrinolysis)、血液凝固以及血管生成(Angiogenesis)等作用，許多 Adipocyte - secreted proteins 顯示出對脂肪組織重量變化的調節，例如過度餵食(Overfeeding)以及脂肪萎縮(Lipodystrophy)，因此指出了與肥胖之相關性。胰島素抗性通常與體重增加有關，而 Adipocyte - secreted proteins 在肥胖下會改變且影響胰島素敏感性(225)。

#### (一) Secretory function of adipose tissue

脂肪組織的內分泌活性(Endocrine activity)首先被Siiteri所提出，其表示此活性是組織有分泌固醇類荷爾蒙的能力(122)，特別是直到 Leptin 的發現之後，Adipocyte - secreted proteins 才被重視。脂肪組織分泌的蛋白質廣泛地包含有酵素如 LPL 或 Hormone sensitive lipase (HSL)、荷爾蒙如 Leptin 或 Adiponectin、以及細胞激素如 IL - 6 或 TNF $\alpha$ ，還有其它結構的和功能的相關胜肽如 Adipsin 或 Plasminogen activator inhibitor - 1 (PAI - 1)。脂肪組織的內分泌作用參與脂質代謝中的產物生合成，例如 Perilipin、aP2、Cholesteryl ester transfer protein (CETP) 和 Retinol - binding protein (RBP)。另外，脂肪組織也被認為可產生參與免疫與血壓反應中的免疫因子如 Acylation - stimulating protein (ASP) 和 Metallothionein (226)。近來，Angiotensinogen (Agt)、Adiponectin、PPAR $\gamma$  angiopoietin - related protein / fasting - induced adipose factor (PGAR / FIAF)、以及 C - reactive protein (CRP)，這些 Adipocyte - secreted proteins 對心血管功能控制的重要角色已被證實(227)。脂肪組織也具有 Autocrine - paracrine 的功能，這些 Adipocyte - secreted proteins 也與其它



因子的分泌有關，例如PPAR $\gamma$ 、Insulin like growth factor - 1 (IGF - 1)、Monobutyrim和Uncoupling proteins (UCPs)。雖然有一些脂肪組織所分泌的因子不被認為是典型的Adipocytokines，但至少如固醇類和Leptin這些由脂肪組織合成並分泌的荷爾蒙是確定的Adipocytokines (224)。

## (二) Insulin resistance

肥胖，特別是中央型肥胖(Central obesity)與胰島素抗性相關，許多研究探討其相關性的機制，例如肌肉與肝臟中脂質堆積以及近來發現的 Adipocytokines。胰島素抗性會減弱對胰島素的生理反應，是第二型糖尿病的重要特徵也與脂肪萎縮有關，並且是代謝症候群的重要因素。

### 1. The insulin signaling cascade

胰島素是胰臟 $\beta$  cells合成的重要代謝荷爾蒙，會刺激各種器官對葡萄糖的汲取，特別是肌肉、脂肪組織和肝臟，並抑制脂肪組織的脂解作用。胰島素傳訊路徑的起始步驟是胰島素與胰島素接受器(Insulin receptor)結合在具胰島素敏感性組織的細胞膜上，胰島素接受器是由兩個Insulin - binding extracellular  $\alpha$  subunits和兩個主要的Intracellular  $\beta$  subunits組成的橫跨細胞膜的Heterotetrameric receptor ( $\alpha_2\beta_2$ )(228)。胰島素與 $\alpha$  subunits結合會使本身的Tyrosine kinase活化、胰島素接受器自體磷酸化以及胰島素傳訊路徑中主要蛋白質Insulin receptor substrates 1 (IRS - 1)磷酸化(229, 230)，此作用會發生細胞內一連串的反應，包括有Phosphatidylinositol - 3 (PI - 3) kinase酵素的活化、葡萄糖轉運子GLUT4從細胞囊泡位移到細胞膜上來增加細胞對葡萄糖的汲取，接著在最後改變一些對肝糖與三酸甘油酯有關的酵素活性，此反應不是增加合成就是減少分解。

## 2. Metabolic links between obesity and insulin resistance

胰島素傳訊路徑中專一性缺失會使胰島素調節的葡萄糖汲取受損，其機制可能是胰島素敏感性組織中脂質過度供給而造成胰島素抗性。腹部區域的脂肪堆積被認為是全身性胰島素抗性的主因(231)，相反的周邊脂肪組織似乎與不利的代謝結果無關，而且可能具保護性。在In vivo研究中，使用Hyperinsulinemic - euglycemic clamp來直接測量正常或過重女性其胰島素敏感性，發現了中央腹部脂肪比全身、四肢或軀幹脂肪更是決定胰島素敏感性的因子(232)。在非脂肪組織具胰島素敏感性的器官如肌肉和肝臟中，脂肪酸的堆積會減少這些組織中胰島素調節的葡萄糖汲取(The lipid supply hypothesis of insulin resistance)(233)；雖然一般認為脂肪酸氧化作用抑制的影響使葡萄糖氧化作用減少(The Randle hypothesis)，近來也有其它研究提出脂質種類誘發胰島素抗性的機制(234)。除了脂肪酸的作用外，脂肪細胞生成的荷爾蒙也會調節胰島素作用，近幾年提出的Adipocytokines或Peptide messengers，包括有Adiponectin、Resistin、TNF $\alpha$ 以及Leptin都是與肥胖以及胰島素抗性相關(150, 235)。

## 3. Hormone and drugs influencing insulin sensitivity

一些臨床與動物研究顯示，增加交感神經系統的活性會導致胰島素抗性。在分子層次上， $\beta$  - adrenergic activation 抑制對胰島素作用的胰島素信號分子如 IRS protein，而且  $\beta$  - adrenoceptor 刺激作用是強力促進脂解，使血清游離脂肪酸濃度增加，隨後抑制胰島素信號而造成胰島素抗性(236)。除了  $\beta$  - adrenergic agonists 外，各種 Adipocytokines 包括有 IL - 6 和 TNF $\alpha$ ，以 Actocrine 機制刺激脂肪細胞的脂質來增加全身游離脂肪酸濃度而導致胰島素抗性(235)。高胰島素血症(Hyperinsulinemia)與周邊胰島素抗性相關，是主要造成發展成第二型糖尿病並且向下調節胰島素信號分子，因此破壞了血清胰島素增加促進胰島素敏感性的作用。In vivo 中，Glucocorticoids 導致胰島素抗性，但是在肥胖中造成胰島素抗性的Glucocorticoids 濃度範圍仍不清楚。此外，在 In vivo 和 In vitro 中，Growth hormone 強力地抑制胰島素敏感性的組織如肌肉、脂肪組織和肝臟中胰島素的作用，因此長期給予 Growth hormone 的大鼠會有胰島素抗性並伴隨有胰島素接受器活性和 IRS

protein phosphorylation 的減少(237)。

TZD類藥物包括有Troglitazone、Pioglitazone和Rosiglitazone，是臨床上普遍用來治療第二型糖尿病，可增加胰島素敏感性，在分子層次上TZD是PPAR $\gamma$ 的專一性Ligand且作用在脂肪組織中(238)。雖然TZD促進胰島素敏感性的機制尚未完全了解，但已知是TZD的作用是經由影響體脂肪來調節的。PPAR $\gamma$ 的活化會增加前脂肪細胞的增生與分化，而形成成熟的脂肪細胞，特別是非內臟的(周邊的)脂肪。在皮下的(Subcutaneous)脂肪細胞中，脂肪酸儲存增加會造成Lipid steal，導致較低循環的脂肪酸以及減少肌肉和肝臟中三酸甘油酯濃度(239)。因為周邊皮下脂肪堆積而使體重增加是TZD普遍的副作用，TZD同時促進脂肪細胞的脂肪細胞生合成以及脂肪酸的汲取，也藉由改變脂肪細胞荷爾蒙生成，使Adiponectin和TNF $\alpha$ 減少(235, 240)。

### (三) Adipocytokines

#### 1. Interleukin - 6 (IL - 6)

##### (1) Modulators of IL - 6 production

IL - 6 是具多功能循環的細胞激素，由許多細胞種類如纖維母細胞、內皮細胞、單核球細胞、巨噬細胞、T - cell lines 以及脂肪細胞所生成的分子量 21 ~ 28 kD 的蛋白質(241)。最初是被鑑定為 Leukocyte - derived proinflammatory protein，因為約 10% 全身的 IL - 6 是由脂肪組織所分泌，所以此蛋白質也屬於 Adipocytokines (242)。在齧齒類動物與人的脂肪細胞中，IL - 6 的生成是受 Catecholamines 刺激而被 Glucocorticoids 所抑制(243)。另一個刺激 IL - 6 釋放的因子是 TNF $\alpha$ ，有研究顯示 TNF $\alpha$  會增加 3T3 - L1 adipocytes 中 30 倍的 IL - 6 生成。有研究指出培養的脂肪細胞會分泌 IL - 6 並發現有 mRNA 的表現，Omental fat 比皮下脂肪組織產生 3 倍多的 IL - 6，且分離自 Omental fat 的脂肪細胞也比分離自皮下的分泌較多的 IL - 6 (244)。

## (2) IL - 6 in obesity and insuline resistance

IL - 6會干擾胰島素敏感性，Omental fat分泌的IL - 6直接進入到肝臟，可能刺激肝的三酸甘油酯分泌，此外藉由降低IRS - 1和PI3K的活化使IL - 6直接損害初代大鼠肝細胞和3T3-L1 preadipocytes中的胰島素傳訊，也破壞肝細胞中胰島素誘導的醣質新生(245, 246)。在齧齒類動物與人的In vivo研究中，給予重組的IL - 6會降低肝的醣質新生，接著導致高血糖(Hyperglycaemia)和補償性高胰島素血症(Compensatory hyperinsulinacmia)。在胰島素抗性與肥胖的鼠科動物及人類中，血漿IL - 6濃度顯著地被向上調節，而且基礎值下的IL - 6濃度與形成第二型糖尿病的風險是互相獨立的(241)。

## 2. Tumor necrosis factor $\alpha$ (TNF $\alpha$ )

### (1) Modulators of TNF $\alpha$ production

最初 TNF $\alpha$  被認為是巨噬細胞分泌的產物，為代謝失調的慢性發炎反應與惡性腫瘤中的細胞激素(237)，TNF $\alpha$  有許多生物作用包括有誘發胰島素抗性、厭食以及體重減少。脂肪組織同時也會分泌 TNF $\alpha$  並且是其作用目標(247)；在巨噬細胞和單核球細胞中，TNF $\alpha$  的表現與生成是受內毒素如 Lipopolysaccharide (LPS)所刺激。LPS 會刺激人脂肪組織以及 In vitro 中的脂肪細胞產生 5 倍的 TNF $\alpha$ ，TZD 會降低肥胖齧齒類動物脂肪細胞中 TNF $\alpha$  的釋放，但對 In vitro 中人的脂肪組織並不影響(248)。脂肪酸或三酸甘油酯也會調節 TNF $\alpha$  的表現，在 In vivo 中高脂飲食會使脂肪組織中 TNF $\alpha$  mRNA 表現顯著增加，而且缺乏 aP2 的小鼠其脂肪組織中不表現 TNF $\alpha$ ，表示脂肪酸在脂肪組織中對 TNF $\alpha$  表現的調節是重要的(247, 249)。

## (2) Relation between TNF $\alpha$ , obesity and insuline resistance

在齧齒類動物中，TNF $\alpha$  是胰島素敏感性主要調節者，TNF $\alpha$  誘發 In vitro 中 IRS - 1 的 Serine phosphorylation，然後 Serine phosphorylated IRS - 1 抑制 Insulin receptor kinase activity 和下游信號 PI3K 的活化，因此 TNF $\alpha$  干擾胰島素傳訊導致胰島素阻抗，此外 TNF $\alpha$  誘導脂解以及向下調節 IRS - 1 和 GLUT4。在肥胖中，TNF $\alpha$  以 Actocrine 方式被向上調節因此改變脂肪組織，在 *fa / fa* 大鼠中 TNF $\alpha$  的 Neutralisation 會改善胰島素敏感性，但在肥胖糖尿病病人中並不會發生作用。許多基因轉殖造成胰島素抗性和肥胖的動物模式中，包括有 *ob / ob* 小鼠、*db / db* 小鼠和 *fa / fa* 大鼠都有 TNF $\alpha$  過度表現的現象。在人的脂肪中，TNF $\alpha$  mRNA 和蛋白質的表現是低的，但與身體脂肪細胞是正相關，而且當肥胖者體重減少之後，其表現也降低了，但是血清 TNF $\alpha$  濃度在符合 BMI 的胰島素抗性者與胰島素敏感性者之間是沒有差異的。In vivo 中 TZD 會抑制肥胖 Zucker rats 脂肪中 TNF $\alpha$  mRNA 的表現，表示 TNF $\alpha$  可能是此藥物影響胰島素敏感性作用目標之一(236, 237, 241)。

## 3. Leptin

### (1) Modulators of leptin production

在 1994 年為了要更加了解脂肪細胞及其對能量恆定的角色，因此發現了 Leptin (250)，Leptin 是位在 Chromosome 7931 的 *ob* gene 之產物，此蛋白質由 67 個胺基酸所組成。Leptin 主要表現在脂肪組織中，Leptin 作用在下視丘的 Neuropeptide - containing regions 並增加 Leptin signaling 來降低食物攝取、增加能量消耗和增加生熱作用，因此促進體重減少。Leptin 的表現與儲存的體脂成正相關，因此肥胖者有較高的 Leptin (251)。在禁食期間 Leptin 表現會快速減少但於餵食後可回復。胰島素、葡萄糖和 Glucocorticoids 會刺激 *ob* gene 的表現而增加 Leptin mRNA 的表現，而游離脂肪酸和 Growth hormone 則是抑制的作用(252)。在分子層次上，刺激 PPAR $\gamma$  會向下調節 Leptin 生成，但 C/EBP $\alpha$  會刺激 Leptin 生成；In vivo 和 in vitro 中 TZD 會降低齧齒類動物脂肪中 Leptin 表現。此外，*ob* gene 的表現與循環的 Leptin 濃度有明顯的性別差異，女性幾乎有高於男性二倍的 Leptin 濃度。Leptin 除了參與

調節食物攝取與體重控制外，也有廣泛的生理功能，例如葡萄糖代謝、生殖、免疫、造血、血管形成、造骨、傷口癒合以及血壓恆定(241)。

## (2) Role of leptin in obesity and insuline resistance

一開始對 Leptin 的了解是作為抗肥胖的荷爾蒙，由下述研究所表示其作用的。首先，缺乏 Leptin 的 *ob / ob* 小鼠和缺乏 Leptin receptor 的 *db / db* 小鼠會有食慾過剩(Hyperphagia)而增加脂肪細胞形成肥胖、降低能量消耗以及胰島素抗性。再來，以靜脈或腦內注射 Leptin 到 *ob / ob* 小鼠中，會因為抑制食物攝取和增加能量消耗而降低體重和脂肪重量。最後，在下視丘發現的 Leptin receptor 參與調節食物攝取與能量平衡(253)。許多肥胖者有增加的血清 Leptin 濃度，表示肥胖呈現出 Leptin 抗性階段，Leptin 對胰島素敏感性的組織如肌肉、肝臟和脂肪組織，它們對胰島素的反應有不一致的結果；另外在臨床研究中血清 Leptin 和胰島素濃度之關連性與肥胖是獨立的(236)。

## 4. Adiponectin

### (1) Modulators of adiponectin production

Adiponectin 又稱作 Acrp30、AdipoQ、apM1 和 GBP28，是近幾年由許多研究團隊以不同方式發現的，Adiponectin 是一種由脂肪組織所分泌 30 kD 循環的蛋白質(241)，Adiponectin 專一表現在脂肪細胞分化期間並沒有表現在纖維母細胞中。胰島素、IGF - 1 和 TZDs 刺激 Adiponectin 的表現，而 TNF $\alpha$  和  $\beta$  - adrenergic stimulation 則是抑制 3T3 - L1 adipocytes 中 Adiponectin 基因表現。Adiponectin 參與能量平衡的調節與胰島素作用，也有抗前發炎反應和抗動脈粥狀形成的特性，其在心臟功能上也扮演重要角色(254)。研究指出 Adiponectin 參與防止動脈粥狀斑塊的形成，透過 cAMP - dependent pathway 降低 NF -  $\kappa$ B signaling 來抑制單核球黏附到內皮細胞上；此外 Adiponectin 也顯示經由對內皮細胞直接的作用來調節血管的發炎情況，還有藉由降低血小板衍生因子(Platelet - derived growth factor) 和 Heparin - binding epidermal growth factor 來降低血管平滑肌細胞增生和遷移。除此之外，在 *ob / ob* 小

鼠和缺乏ApoE小鼠動脈粥狀的齧齒類模式研究指出，Adiponectin具保護作用使這些小鼠不會形成動脈粥狀硬化和第二型糖尿病(236)。

## (2) Serum and mRNA levels of adiponectin in obesity and insuline resistance

血漿 Adiponectin 濃度在肥胖、胰島素抗性和第二型糖尿病的發病情況下是減少的，在隱性糖尿病的情況下，血漿 Adiponectin 濃度是低的且同時減少胰島素敏感性，當發展為明顯的第二型糖尿病時這個情況仍持續發生。Adiponectin 會降低餐後上升的血漿游離脂肪酸，而改善吸收後由胰島素調節所抑制肝的葡萄糖產生，此顯示出血漿 Adiponectin 濃度與全身胰島素敏感性有強烈相關性。在胰島素抗性和肥胖下，脂肪組織和血漿中 Adiponectin mRNA 表現減少，當 Adiponectin 表現增加時可改善胰島素敏感性和體重流失。In vivo 和 In vitro 的研究指出，TZD 可增加 Adiponectin mRNA 的生成與分泌，給予糖尿病患者 TZD 藥物增加了 2 倍的血漿 Adiponectin 濃度(255-257)。

許多荷爾蒙會誘發胰島素抗性而向下調節 Adiponectin 表現(225)，In vitro 中  $\beta$ -adrenergic action 會抑制分化的 3T3 - L1 cells 其 Adiponectin mRNA 表現；同樣的在 In vitro 中  $\beta$  - adrenoceptor agonists 向下調節 Human adipocytes 的 Adiponectin mRNA 和蛋白質生成。長期給予 3T3 - L1 adipocytes 胰島素會降低 Adiponectin mRNA 表現，此與 In vivo 中禁食胰島素濃度和血漿 Adiponectin 濃度是負相關的結果相符合。Glucocorticoids 同時降低 3T3 - L1 cells 和 Human adipocytes 的 Adiponectin mRNA 表現和蛋白質分泌，此外許多研究指出以 TNF $\alpha$  處理 3T3 - L1 adipocytes 和 Human primary adipocytes 之後，Adiponectin mRNA 表現和蛋白質分泌都減少；還有 IL - 6 會向下調節 3T3 - L1 adipocytes 的 Adiponectin 分泌和 mRNA 表現。綜合以上而言，Adiponectin 會受到 TZD 而向上調節，而會被  $\beta$  - adrenoceptor agonists、Glucocorticoids、TNF $\alpha$  和 IL - 6 所抑制，在此表示了 Adiponectin 是一重要的內生性 Insulin sensitizer (236, 237)。

### (3) Theory with regard to possible mechanism of action of adiponectin

Adiponectin 的 Globular C - terminal fragment 可以降低血漿葡萄糖濃度以及增加肌肉中脂肪酸氧化作用，這可能與 Adiponectin 影響胰島素敏感性有關。其它研究也指出 Globular fragment 與 Full length adiponectin 相較下，Globular fragment 較能增加肌肉中脂肪酸氧化作用，因此降低血漿葡萄糖濃度，但有研究指出在 In vivo 和 In vitro 中，只有 Full length adiponectin 可有效增加胰島素誘導的抑制肝細胞葡萄糖生產。在 Adiponectin knockout mice 研究中，這種小鼠有受損的胰島素敏感性，表示了 Adiponectin 是內生性的 Insulin sensitizer。最近兩種 Adiponectin receptors 分別是 AdipoR1 和 AdipoR2 被鑑定出，AdipoR1 大量表現在骨骼肌中，而 AdipoR2 主要表現在肝臟中。這些 Receptors 似乎藉由增加 AMPK 和 PPAR $\gamma$  ligands 的活性，以及增加脂肪酸氧化作用和葡萄糖汲取，來調節 Adiponectin 的 Insulin - sensitizing action (241)。

## 5. Resistin

### (1) Modulators of resistin expression

2001年Steppan等人分離出Resistin這個新的Adipocytokines，其分子量為12.5 kD，Resistin是屬於Cysteine - rich secretory proteins又稱為Resistin - like molecules (RELMs)或Found in inflammatory zone (FIZZ)。另外Kim等人將這個Adipocyte - secreted factor鑑定為Adipocyte - specific secretory factor (ADSF) / Resistin，近來發現Resistin不僅表現在脂肪組織中也在腸胃管、腎上腺以及骨骼肌中有表現(258)。許多會降低Resistin基因表現的因子包括有胰島素、TNF $\alpha$ 、Epinephrine、 $\beta$  - adrenoreceptor stimulation、TZD，但當胰島素、 $\beta$ -adrenoreceptor stimulation和TZD與其它因子如Glucose、Growth hormone和Glucocorticoids一起作用時，發現會增加Resistin表現，因此對於Resistin基因表現的調節目前仍是不清楚的(241)。



## (2) Resistin in obesity and insuline resistance

在In vitro中Resistin會抑制3T3 - L1 cells的脂肪細胞分化，在棕色和白色脂肪組織中分泌的Resistin與脂肪大小儲存量成比例，會降低葡萄糖耐受性與胰島素作用。Steppan等人發現TZD會抑制Resistin，並最先指出Resistin對胰島素抗性的功能與肥胖和糖尿病相關，其發現基因肥胖 $ob / ob$ 和 $db / db$ 小鼠與高脂飲食誘導肥胖小鼠，牠們循環的Resistin濃度增加。Resistin immunoneutralization會改善高脂飲食誘導肥胖小鼠的高血糖和胰島素抗性，但給予正常小鼠重組的Resistin反而會使葡萄糖耐受性及胰島素作用受損。此外衍生自脂肪組織的Resistin和衍生自腸類似Resistin分子(Gut - derived resitin - like molecule -  $\beta$ )會選擇性破壞葡萄糖生成中的胰島素作用(237, 259, 260)。

這些研究都指出Resistin與調節脂肪細胞生合成和胰島素抗性有關，因此Kim等人探討Resistin在脂肪細胞生合成以及葡萄糖恆定的功能角色，其建構了表現有顯性抑制Resistin的vector (ADSF - hFc)，用顯性抑制的方式可以防止因為Resistin抑制3T3 - L1 cells的分化。過度表現ADSF - hFc的基因轉殖小鼠其脂肪細胞組織中顯示出，有增加且變大的脂肪細胞以及增加的Adipocyte marker表現，ADSF - hFc基因轉殖小鼠因為Resistin表現減少了，所以有改善的葡萄糖耐受性及胰島素敏感性。因為也增強了脂肪細胞的分化，所以ADSF - hFc基因轉殖小鼠的脂肪組織中，Leptin和Adiponectin的表現增加，因為循環的Leptin和Adiponectin增加因而降低血漿三酸甘油酯與游離脂肪酸濃度，這可能是改善這些基因轉殖鼠葡萄糖與胰島素耐受性的原因。這些結果顯示出Resistin的作用是抑制脂肪細胞生合成並增加胰島素抗性(150, 235, 237)。

另外在人體的研究上仍然是具爭議，Nagaev 等人在有胰島素抗性和肥胖病人的脂肪細胞中沒有發現 Resistin mRNA 表現；另一研究則是在肥胖病人的脂肪組織中與瘦者相比較下，發現有增加的 Resistin mRNA，但在新鮮分離的 Human adipocytes 中是減少表現的。除了在一些胰島素抗性者無法測得 Resistin mRNA 表現，Janke 等人發現在培養的 Human preadipocytes 與成熟 Adipocytes 相比較，有增加的 Resistin mRNA 表現，但 Resistin 基因表現與胰島素抗性或體重之間的關連性還是

無法得知。雖然在腹部脂肪組織有較高的 Resistin mRNA 表現可能可解釋腹部肥胖會增加代謝異常，但 Resistin mRNA 在皮下脂肪和 Omental fat 中的表現非常相似，因此還是無法了解 Resistin 在腹部脂肪細胞以及胰島素抗性之間的相關性(241)。

#### 四、代謝症候群 Metabolic syndrome

##### (一) Characteristic of metabolic syndrome

1923年，代謝症候群最早被敘述為包括有高血壓(Hypertension)、高血糖(Hyperglycaemia)和高尿酸血症(Hyperuricaemia)的症候群。在1947年的研究指出腹部肥胖(Abdominal obesity)和脂質分佈與糖尿病及其他疾病的相關性；接著在1965年再次敘述到此症候群是含有高血壓、高血糖以及肥胖的症候群。Reaven於1988年將腹部肥胖、高胰島素血症(Hyperinsulinemia)、高三酸甘油酯血症(Hypertriglyceridemia)、高血壓以及Low-HDL-cholesterol，這一群對糖尿病和心血管疾病的危險因子命名為Syndrome X，並指出代謝症候群主因是與胰島素抗性有關(261)。也有其它學者將其命名為The Deadly Quartet (262)以及The Insulin Resistance Syndrome (263)。

造成代謝症候群的原因是複雜且目前尚不明確，一般認為胰島素抗性與腹部肥胖是代謝症候群的主因，胰島素抗性是第二型糖尿病主要發病特徵，而第二型糖尿病又與Atherogenic dyslipidaemia和前發炎反應階段有關。一些數據指出胰島素抗性或其相關的高胰島素血症對心血管疾病(CVD)的相關性是獨立的危險因子，而此關聯性上需要更一步的探討(264-268)。一些研究指出特別是中央脂肪堆積的內臟肥胖與代謝症候群最相關，且肥胖又與高血糖、高血壓、高血清膽固醇、Low-HDL-cholesterol、胰島素抗性有關，這些肥胖相關性是較高的心血管疾病危險因子。在臨床以及病理研究中，肥胖與所有心血管疾病危險因子有強烈相關聯，但其中央肥胖尤其是內臟肥胖與代謝症候群之間的機制也是不明確且複雜的(269)。儘管造成代謝症候群的原因都指向是胰島素抗性與肥胖，但其它因子如Endothelial dysfunction、生活型態的改變加上基因的影響，都指出可能與代謝症候群有關(270)。

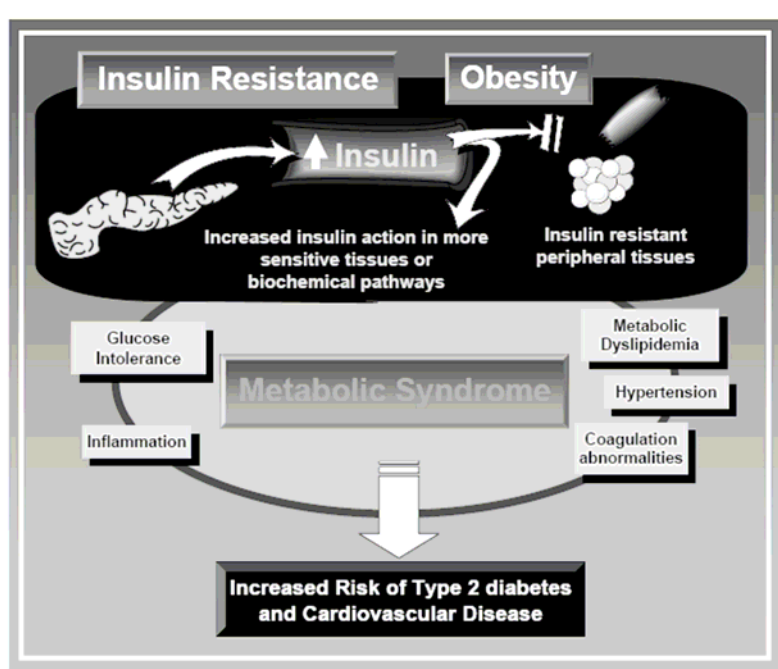


圖2 - 5 胰島素抗性、肥胖與代謝症候群之相關性

資料來源：Avramoglu *et al.*, 2006 (271)

## (二) Definition of metabolic syndrome

有一些組織對代謝症候群建立的判斷標準，這些組織有The World Health Organization (WHO)、The European Group for study of Insulin Resistance (EGIR)與The National Cholesterol Education Program—Third Adult Treatment Panel (NCEP ATP III)(271)。

### 1. The 1999 WHO definition

最早是在 1999 年由 WHO 所建立的，其判斷標準為有受損的葡萄糖調節包括葡萄糖耐受性受損、胰島素抗性或糖尿病，並伴隨其中兩項因子，包括有增加的血壓、高三酸甘油酯血症或 Low - HDL - cholesterol、以腰臀比 Wasit / Hip ratio 或身體質量指數 BMI 評估出來的肥胖。

### 2. The 1999 EGIR definition

接者EGIR對WHO所建立的判斷標準加以調整成必須要同時有糖尿和高胰島素血症，以腰圍來評估肥胖(272)。

### 3. The 2001 ATP III definition

ATP III所建立的判斷標準是目前最廣泛被使用的，其主要是針對心血管疾病的危險所建立的判斷標準，較少有以葡萄糖或胰島素為主的評估。其判定為須符合五項因子的其中三項以上即認為有代謝症候群而會增加罹患心血管疾病的風險，包括有中央肥胖、增加的血壓、增加的三酸甘油酯、Low HDL - cholesterol以及禁食高血糖(273)。

### 4. New IDF definition

在2004年，International Diabetes Federation (IDF)建立出適用於任何國家，且可同時判定具高風險心血管疾病的和有糖尿的人。所建立的判斷標準包括有評估腹部脂肪堆積、胰島素抗性、Atherogenic dyslipidaemia、增加的血壓、Proinflammatory state和Pothrombotic state。目前IDF在2005年又建立了最新的判斷標準，是針對不同民族和性別提出不同的腰圍標準來評估肥胖(274)。

## 五、苦瓜 *Momordica charantia*

植物與藥草常常被用作傳統醫療用藥，苦瓜是常被用做藥物使用的植物之一(275, 276)。苦瓜，學名為*Momordica charantia*的葫蘆科攀緣植物，英文名為Bitter gourd或Bitter melon；印度名稱為karelar。*Momordica*意指其葉子呈齒狀的邊緣，所有部位包括果實的味道是苦的，果實的形狀類似胡瓜的橢圓形狀，未成熟時是鮮綠色的，當成熟時會轉變為橘黃色。苦瓜生長在亞洲、亞馬遜河、東非等這些熱帶地區，栽培作為蔬菜食用，在一些發展中國家如中國、印度等也作為治療糖尿病、消除脹氣及治療腹痛的傳統用藥(277); (<http://www.raintree.com/bitmelon.htm>)。其他用途包括有治療創傷、內服或外用於處理寄生蟲、作為調經劑、抗麻疹和肝炎病毒；在土耳其民間醫療中，苦瓜的成熟果實外服於傷口幫助癒合，並內服治療消化性潰瘍。在印度，苦瓜具有許多藥物用途，包括有抗糖尿病藥、墮胎藥、驅蟲劑、避孕藥、抗瘧藥、以及通便劑等，但最普遍的用途是作為蔬菜食用。

關於苦瓜的效用與安全性，在近十年來有數百篇研究指出苦瓜有抗糖尿病、抗病毒、抗腫瘤、抗白血病、抗細菌、驅除腸內寄生蟲、抗突變、抗黴菌、抗氧化、抗潰瘍、抗發炎、降低膽固醇、降低三酸甘油酯、降血壓、刺激免疫的特性(278, 279)。在動物實驗中顯示低劑量的苦瓜是安全的，Virdi 等人的研究表示，給予糖尿病大鼠每公斤體重20 mg的苦瓜水萃粉末4週，對肝和腎沒有肝毒性與腎毒性(280)，且不影響大鼠食物攝取、生長發育和血液生化質(281)。

### (一) 苦瓜的植物化學成分(Phytochemicals)

苦瓜含有許多生物活性化學物質，包括有配醣類(Glycosides)、皂素(Saponins)、Alkaloids、Fixed oils、三松烯(Triterpenes)、蛋白質以及固醇類(<http://www.raintree.com/bitmelon.htm>)；未成熟的果實是維生素C良好來源，而且也提供了維生素A、磷和鐵(<http://momordica.allbio.org/>)。許多其他植物化學成分也已被分離出來，如Momorcharins、Momordenol、Momordicilin、Momordicins、Momordicinin、Momordin、Momordolol、Charantin、Charine、Cryptoxanthin、Cucurbitins、Cucurbitacins、Cucurbitanes、Cycloartenols、Diosgenin、Elaeostearic acids、Erythrodiol、Galacturonic acids、Gentisic acid、Goyaglycosides、Goyasaponins和Multiflorenol (282-285))，而這些成分存在於整個植物中(286)。苦瓜的降血糖化學成分有報告提及是Charantins、Insulin-like peptides和Alkaloids的Steroidal saponins混合物，這些成分集中在苦瓜的果實中，因此苦瓜果實具較明顯的降血糖與抗高血糖活性(287)。

苦瓜種子中脂質含量大於40%的乾重，Takagi和Itabashi指出在這些脂質中，苦瓜種子油含有56.2%的 $\alpha$ -eleosteraric acid，這類*c9, t11, t13* - 18:3 (Conjugated linolenic acid, CLN)的多元不飽和脂肪酸(288)。其他成分如分子量28.6 kD的MRK29、分子量30 kD的*M. charantia* protein (MAP30) 以及Lectin這類的HIV抑制蛋白質(HIV inhibitory proteins)(289)，還有Trypsin inhibitors (290)、Elastase inhibitors (291)、Aguanylate cyclase inhibitors (292)與D - (+) - trehalose的 $\alpha$ -glucosidase inhibitor (293)也都存在於苦瓜中。

## (二) 苦瓜的藥理特性

### 1. 抗糖尿病活性 Antidiabetic activity

#### (1) 動物模式

苦瓜的抗糖尿病活性是最常被研究的，其所有部位包括果肉、種子、果實和整株植物對正常動物都有降血糖活性(294, 295)，以及在藥物誘導的(296, 297)和基因模式(298)的糖尿病啮齒類動物中具抗高血糖活性。

給予糖尿病大鼠含苦瓜的多種藥草，會降低大鼠血糖和糖化血色素，並增加血漿胰島素和總血紅蛋白(299)。Vridi等人在糖尿病大鼠研究中證實，苦瓜果實的抗高血糖活性(280)。Kar等人給予藥物誘導的糖尿病大鼠，餵食苦瓜乙醇萃取物2週後發現，大鼠的血糖達到幾近正常血糖值(296)。另外，以苦瓜水萃取物分別餵食Alloxan糖尿病大鼠1、2、3和4個月，以及STZ糖尿病大鼠40、50和60天之後發現，這些大鼠血漿葡萄糖濃度都顯著降低(297)。一些從苦瓜分離出來的植物化學成分如Charantin、Polypeptide - p、Momordin Ic、Oleanolic acid、3 - O - monodesmoside和Oleanolic acid 3 - O - glucuronide，都具有降血糖活性(300)。給予正常和NIDDM大鼠苦瓜果肉製成的果汁與萃取自果實中不含皂素的果汁甲醇萃取物，在禁食與餐後的狀況下有顯著的降血糖作用，但在IDDM大鼠中沒有(287)。

苦瓜降低血糖的機制還不是很清楚，在STZ糖尿病大鼠研究中指出，餵食苦瓜果汁可增加胰臟 $\beta$ 細胞的數目(301)。在其它研究中顯示，苦瓜有類似胰島素的作用或促進胰島素釋放(302, 303)。另外有些研究表示苦瓜的降血糖活性是胰臟外的作用(304)，包括有增加肌肉中葡萄糖轉運蛋白GLUT4 (298)、增加肝臟和肌肉中葡萄糖的利用(305)、抑制肝臟中的Glucose - 6 - phosphatase和Fructose - 1, 6 - biphosphatase以及刺激肝臟的Glucose - 6 - phosphate dehydrogenase活性(306)。Matsuda等人認為苦瓜的降血糖活性是因為抑制小腸刷狀緣中葡萄糖的運送(307)；Rathi等人發現給予苦瓜會回復糖尿病小鼠肝臟中Hexokinase、Glucokinase、Phosphofructokinase和Substrate glucose - 6 - phosphate這些醣類代謝酵素活性(308)。

## (2) 對糖尿病併發症的作用 Effect on diabetic complications

糖尿病通常會引起其他的併發症，而對許多器官如腎臟、眼睛、神經和血管會造成不可逆的傷害(American Diabetes Association, 1998)。在一些動物研究中，苦瓜已指出可預防以及延緩糖尿病併發症的進展，如腎病、神經疾病、Gastroapresis、白內障和胰島素抗性(297, 309, 310)。

胰島素抗性是糖尿病重要特徵之一，且與肥胖、高血壓、脂質紊亂和動脈粥狀硬化有關(311)。以高果糖餵食大鼠可誘發出Syndrome X包括有高血糖、高胰島素血症、高三酸甘油酯血症以及肥胖(312)，以苦瓜水萃物餵食高果糖飲食的大鼠，發現可預防大鼠發生高血糖和高胰島素血症。

在西方國家白內障是糖尿病重要的危險因子，在糖尿病大鼠研究中給予苦瓜果實或苦瓜水萃物，可延緩或抑制大鼠白內障的形成(313)。

## (3) 臨床試驗

在人體試驗研究指出，苦瓜果實水萃物顯著降低NIDDM病患血中葡萄糖濃度，在每日飲食中補充乾燥苦瓜果實可改善糖尿病患者的葡萄糖耐受性，但在血清胰島素濃度則沒有增加(314)。Welihinda與其團隊發現苦瓜果汁明顯改善已發病的糖尿病患者的葡萄糖耐受性(315)。



## 2. 抗病毒活性 Antiviral activity

苦瓜以及一些分離自苦瓜的植物化學成份如 $\alpha$ -和 $\beta$ -momorcharin、Lectin以及MAP 30，在In vitro都指出具有可抵抗疱疹病毒、科薩奇病毒、Epstein-Barr、HIV和脊髓灰質病毒(316-318)。

MAP 30是最重要的抗HIV活性成分，MAP 30的抗病毒活性是因為對HIV - 1 integrase的抑制作用(319)。Cunnick等人在In vitro中發現，苦瓜葉子萃取物具增加抵抗病毒感染的能力，也有免疫刺激的作用 ((320)。 $\alpha$ -和 $\beta$ -momorcharin這兩種存在於苦瓜種子、果實和葉子中的成分，在In vitro中指出具抗HIV活性(321, 322)，而且發現可抑制HIV - 1 integrase。

## 3. 抗癌症活性 Anticancer activity

對苦瓜粗萃取物與其純化物如MAP 30和*c9, t11, t13 - 18 : 3 CLN*的In vitro與In vivo研究中，顯示苦瓜有抗癌活性可抵抗淋巴白血病、淋巴瘤、絨毛腺癌、黑色素瘤、乳癌、皮膚腫瘤、前列腺癌、舌喉癌、人類膀胱癌、Hodgkin's disease以及結腸癌(279, 323, 324)。

## 4. 降血膽固醇與抗氧化 Hypocholesterolemic and anti-oxidant potential

在一些正常與糖尿病動物模式研究中指出，苦瓜具降血膽固醇的作用(325)。Dhar等人指出餵食大鼠4週分離自苦瓜種子油中的*c9, t11, t13 - 18 : 3 CLN*，顯著下降血漿中脂質過氧化和紅血球細胞膜脂質過氧化，因為CLN會與自由基結合而被氧化，因此降低 $H_2O_2$ 形成而具有抗氧化性(326)。

## 5. 其它活性

另外一些研究也指出苦瓜的其他藥理特性，如抗細菌活性(277)、抗潰瘍活性(307)、免疫調節活性(327)、抗發炎活性(328)、降血壓活性(289)。

### (三) 苦瓜與PPAR

PPAR是脂質活化的轉錄因子，透過基因的作用調節能量恆定，PPAR與調節脂質和葡萄糖恆定、細胞分化及凋亡、癌症形成以及控制發炎反應相關。許多研究也指出苦瓜有許多藥理特性，例如抗癌、降血糖以及降三酸甘油酯的作用(329)。已知Fibrate類降血脂藥物與TZD類抗糖尿病藥物分別是PPAR $\alpha$ 和PPAR $\gamma$ 的活化劑，但這些都作為藥物治療使用，若由飲食或食物來源中找出PPAR的活化劑，可能更具健康上之效益。

因此，Chao等人從各種蔬菜、水果、藥草的萃取物去篩選是否有可同時活化PPAR $\alpha$ 和PPAR $\gamma$ 的飲食因子(330)。在轉活化試驗中證實，苦瓜乙酸乙酯萃取物可同時活化PPAR $\alpha$ 和PPAR $\gamma$ ，另外在H4IIEC3肝癌細胞株的In vitro中發現，苦瓜乙酸乙酯萃取物增加ACO活性以及ACO和FABP mRNA的表現。此發現有利於之後從一般蔬果來源去找尋如同PPAR $\alpha$ 和PPAR $\gamma$ 在改善高血脂與高血糖上的作用。

### (四) 抗肥胖活性 Antiobesity activity

苦瓜降低血糖是已被確認的作用，近來對苦瓜的研究轉移集中在抗肥胖的潛在作用，2003年香港大學Chen等人首度證實苦瓜降低體脂堆積的作用(331)。給予高脂飲食誘導肥胖的大鼠餵食冷凍乾燥的苦瓜汁，改善葡萄糖耐受性，降低血漿葡萄糖、血清胰島素和Leptin濃度，增加血清游離脂肪酸濃度。除此，在不影響食物攝取與脂質吸收的情況下，可降低體脂堆積與體重增加。苦瓜降低體脂堆積的機制仍不清楚，這些受質與荷爾蒙的變化顯示，在低胰島素環境下同時給予苦瓜可能有利於脂解作用，的確在餵食苦瓜的高脂飲食大鼠中發現其血清游離脂肪酸濃度增加。

另外其他研究也指出，餵食苦瓜的大鼠其血漿與肝臟中的三酸甘油酯含量較低(332, 333)。綜合這些結果指出了苦瓜可能抑制低油組大鼠的脂質合成或高油組大鼠的脂質儲存，因此苦瓜在改善胰島素敏感性及體重控制上扮演新的角色。

血漿中腎上腺素和正腎上腺這類兒茶酚胺(Cetacholamines)可調節交感活性，而交感活性增加與降低體重有關。有研究指出綠茶中的兒茶素經由增加交感活性來促

進生熱作用(334)，雖然沒有報告指出苦瓜含有兒茶素，但已知苦瓜富含CLN而且可能轉變為CLA(335)，而CLA已指出可增加交感活性(336)。在Chen等人先前研究發現苦瓜可降低體脂(331)，且餵食苦瓜的高脂飲食大鼠其血漿中游離脂肪酸濃度增加。因此，在2005年Chen等人探討組織中降低的脂質含量是否為苦瓜降體脂的現象，以及觀察與胰島素抗性相關器官中三酸甘油酯含量與血漿中兒茶酚胺濃度來監測交感活性變化，結果發現苦瓜降低肝臟中三酸甘油酯含量，並再度證明苦瓜可降低體脂堆積，而且也首次發現苦瓜增加血漿中兒茶酚胺濃度及降低骨骼肌中三酸甘油酯含量(337)。

在Chen等人2003與2005年的研究指出，苦瓜可降低高脂飲食大鼠的體重增加與改善胰島素敏感性。給予苦瓜可降低主要器官的三酸甘油酯含量，增加血漿中兒茶酚胺濃度與血清游離脂肪酸顯示增強了交感活性與脂解作用，這些結果提供了苦瓜的抗肥胖活性可能有益於體重和血糖的控制(337, 338)。

但是，苦瓜降低體脂含量和改善胰島素敏感性這些的生理反應還是不清楚。Chen等人在2003的研究發現，餵食苦瓜的大鼠其血清游離脂肪酸增加，而這些大鼠組織中三酸甘油酯含量較少，也有較好的葡萄糖耐受性。這個結果與先前其他研究指出的游離脂肪酸會誘導胰島素抗性的結果不符合(339)，或許游離脂肪酸如同PPAR的活化劑一樣，經由向上調節Uncoupling protein的表現而促進 $\beta$  - oxidation以及產熱來消耗能量(340)。另外，也有研究指出苦瓜乙酸乙酯萃取物可活化PPAR和向上調節H4IEC3肝癌細胞中ACO基因表現，來影響脂質氧化作用(330)。

接著在同樣研究團隊中，Chan等人繼續探討苦瓜抗肥胖活性的可能機制。在齧齒類動物中，棕色脂肪組織是重要的生熱調節(341)，在高脂飲食或低溫時會誘導棕色脂肪組織中UCP的表現(342)，許多因子如交感活化作用也會影響UCP的表現(343)。Peroxisome proliferator - activated receptor -  $\alpha$  coactivator - 1 $\alpha$  (PGC - 1 $\alpha$ )可與細胞核轉錄因子相互作用，而且其主要調節粒線體的生物合成與氧化磷酸化作用(344)，PGC - 1 $\alpha$ 也是UCP的活化劑(345)。因為在不影響食物攝取與脂質吸收的情況下，苦瓜可降低體脂堆積與體重增加(331)，因此，Chan等人假設可能是UCP影響能量恒定，所以探討苦瓜對UCP表現的影響。此研究是首次指出苦瓜對高脂飲食誘導肥胖大鼠的UCP和PGC - 1 $\alpha$ 表現的作用，結果顯示苦瓜可增加UCP和PGC -

1 $\alpha$ 的表現(337)。

### (五) 台灣山苦瓜

在台灣，苦瓜又稱作錦荔枝、癩葡萄、癩瓜等，年栽培面積約3,000公頃，分布於台灣東部及中南部平原至低海拔山區。苦瓜種類繁多，依果色可分為白色、白綠色、綠色及濃綠色等；就果面突起可分為珍珠突起、尖銳突起及條肋狀突起；而果實形狀又可分為紡錘形、短橢圓形、長橢圓形、圓形、三角形等。早期台灣苦瓜以皮白、肉厚、苦味淡較受一般人歡迎，近年來由於多元化食用方式盛行，綠皮尖銳突起之小果型的山苦瓜也漸漸引起消費者的興趣。本省山苦瓜的主要栽培地區是花蓮縣的壽豐鄉，生產面積有20幾公頃，5~10月是盛產季節。

山苦瓜又名小苦瓜、野生苦瓜、野苦瓜。其品種特性分述如下。

#### 1. 植株型態

株型為蔓性，分枝多，莖蔓中等，深裂葉，葉色綠，花瓣黃色，雌雄同株異花，雌花於主蔓第11節開花，早晨開花，生長勢強，春作定植後約31天，夏作約29天，進入始花期。

#### 2. 果實型態

果皮綠色，果面具珍珠突起及條狀突起，長橢圓形，果長約13公分，平均果重130~150公克，春作開花後約20-25天採收，夏作開花後約15~20天採收。

#### 3. 果實產量

每公頃產量春作約為22.3公噸，夏作約為17.3公噸。

#### 4. 生育日數

育苗日數約為14~20天，定植至始花日數30天，定植至採收日數春作約為50天，夏作約為45天。採收期：45天至60天；總生育日數：110天至130天(播種至完成採收總日數)。

### 5. 成份分析

行政院農業委會花蓮區農業改良場分析山苦瓜之後發現，其含有維生素C 758 ppm、膳食纖維3.95%、粗纖維1.57%、葉酸等營養元素及磷、鈣、鎂等多種礦物質。營養價值高，為重要瓜類蔬菜。(資料來源：農政與農情)

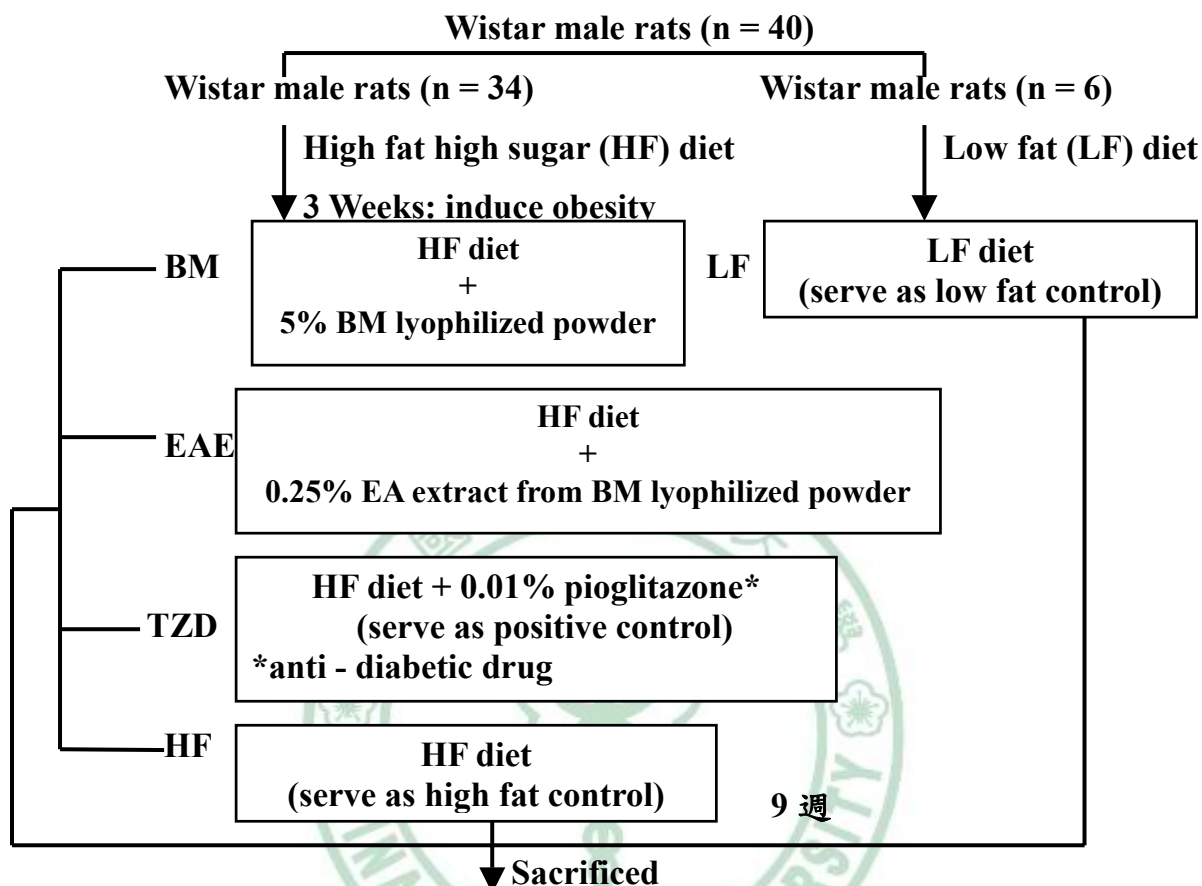


圖2 - 6 山苦瓜



## 第三章 材料與方法

## 實驗設計



- 組織秤重
- 血脂質測定
- 脂肪細胞 G3PDH、LPL 酵素活性及脂解速率測定
- 脂肪組織三酸甘油酯及 DNA 含量測定
- 脂肪組織鐵酸染色固定觀察
- 脂肪細胞分化指標(PPAR $\gamma$ 、LPL 及 ADD1 / SREBP1c) mRNA 測定
- 脂肪細胞激素(Adiponectin 及 Leptin) mRNA 測定
- 第 3、6、9 週進行口服葡萄糖耐受測試(OGTT)
- 禁食全血葡萄糖及禁食血清胰島素測定
- 禁食血清 Adiponectin 測定

圖 3 - 1 山苦瓜改善高油高糖餵食大鼠腹部體脂堆積及胰島素抗性之實驗大綱

實驗流程設計

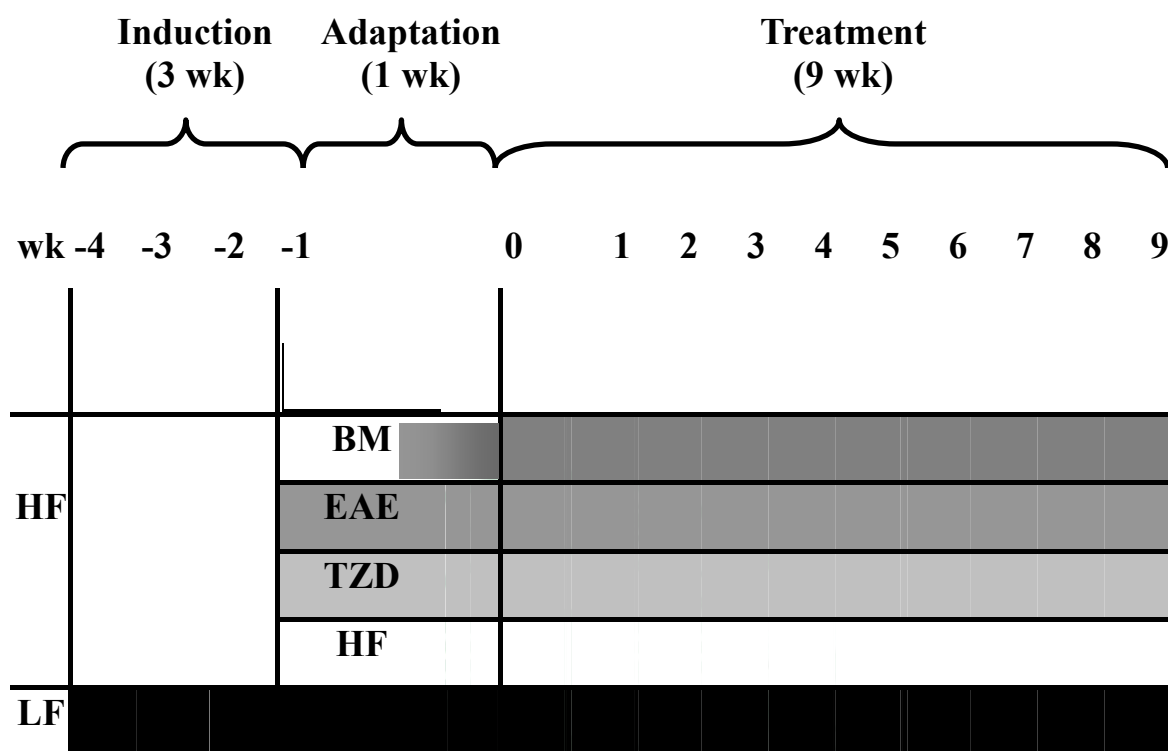


圖 3-2 山苦瓜改善高油高糖餵食大鼠腹部體脂堆積及胰島素抗性之實驗流程設計

### 一、山苦瓜凍乾粉的製備

本研究所採用的山苦瓜(HM2381)是由花蓮縣吉安鄉農業改良場所提供。將山苦瓜全果(含籽)切片後平鋪於不銹鋼盤上，置於冷凍庫凍乾 6 小時，取出置於加壓艙中進行加壓乾燥 12 小時，最後將其研磨成粉狀凍於-20℃冰箱儲存備用。(達群企業股份有限公司)

### 二、山苦瓜凍乾粉乙酸乙酯萃物

本研究所採用的山苦瓜乙酸乙酯萃物由台灣大學黃青真教授所提供，其產率約為 4.9%。

### 三、試驗飼料之配製

飼料的基本組成依據 AIN - 76(American Institute of Nutrition, 1977)配方，由於高脂飲食所含高卡路里會降低大鼠攝食量，因此作適度調整，以使高脂與低脂飼料的蛋白質/熱量、礦物質/熱量和維生素/熱量比值相當。高脂飲食與低脂飲食之差別主要在，高脂飼料含 30%奶油，醣類來源含玉米澱粉及蔗糖。低脂飼料含 5%新鮮大豆油，醣類來源不含蔗糖。飼料成份包括酪蛋白、玉米澱粉、蔗糖、纖維素、AIN - 76 礦物質混合物、AIN - 76 維生素混合物、甲硫胺酸、膽鹼、山苦瓜凍乾粉、山苦瓜凍乾粉乙酸乙酯萃物及 TZD 藥(本實驗使用 Pioglitazone)，將各種粉狀材料依照表 3 - 2 比例先行混合均勻，再依照配方比例分別拌入 5%新鮮大豆油或 30%奶油，所有組別之試驗飼料皆需攪拌均勻，飼料過篩混勻後密封置於-20℃冰箱凍存，以供動物飼養實驗之用。



表 3 - 1 山苦瓜凍乾粉成分分析

Table 3 - 1 The composition of wild bitter melon powder

	水分 (%)	TDF	Ash	Protein	Fat	可溶性糖
山苦瓜粉末	3.82	38.2	6.7	4.51	2.66	8.65
5%飼料含量		1.91	0.33	0.23	0.13	0.43

(台灣大學 謝婉郁)



表 3 - 2 大鼠試驗飼料組成

Table 3 - 2 The composition of experimental diets

	LF <sup>1</sup>	HF	BM	EAE	TZD
	%				
Casein <sup>2</sup>	20	26	25.77	26	26
DL-Methionine <sup>2</sup>	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Corn starch <sup>2</sup>	65	16	13.6	16	16
Sucrose <sup>2</sup>	—	16	16	16	16
Cellulose <sup>2</sup>	5	6.1	4.19	6.1	6.1
Butter oil <sup>2</sup>	—	30	29.87	30	30
Soybean oil <sup>2</sup>	5	—	—	—	—
Vitamin mixture <sup>3</sup>	1	1.2	1.2	1.2	1.2
Mineral mixture <sup>3</sup>	3.5	4.2	3.87	4.2	4.2
Choline <sup>2</sup> bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
BM powder	—	—	5	—	—
EA extract	—	—	—	0.25	—
Pioglitazone <sup>2</sup>	—	—	—	—	0.01
Calorie density (kcal / g)	3.85	5.02	5.02	5.02	5.02
Protein / calorie (g / 1000 kcal)	52	52	52	52	52
Vitamins / calorie (g / 1000 kcal)	2.6	2.6	2.6	2.6	2.6
Minerals / calorie (g / 1000 kcal)	9	9	9	9	9

<sup>1</sup>Four experimental diets were contain 5% fresh soybean oil (LF) or 30% butter oil (HF, BM, EAE and TZD).

<sup>2</sup>Sources of ingredient: casein, ICN (Aurora, Ohio); corn starch, Samyang (Seoul Korea); sucrose, TAIWAN SUGAR (Kaohsiung, Taiwan) cellulose, ICN (Aurora, Ohio); soybean oil, President Co. (Tainan, Taiwan); butter oil, Anchor (New Zealand); methionine and choline, Sigma Chemical Co.(St. Louis, Mo); pioglitazone, Takeda Pharmaceutical Company Ltd (Osaka, Japan).

<sup>3</sup>AIN - 76 mineral mixture and AIN - 76 vitamin mixture (AIN 1977).

#### 四、動物飼養

實驗動物採用 Wistar 品系六週齡雄性大鼠(體重約 150 ~ 200 g) 40 隻，購自台灣大學動物中心。大鼠先分成兩大組，6 隻為整個實驗期間皆餵食含 5%新鮮大豆油 (LF)，另外 34 隻餵食含 30%奶油之高脂飼料誘導肥胖 3 週後，再分成四組，分別為 BM 組(n = 9)、EAE 組(n = 9)、TZD 組(n = 8)、HF 組(n = 8)。其中的 BM 組為避免因山苦瓜凍乾粉的苦味造成大鼠食慾減退而影響攝食量，因此將山苦瓜凍乾粉添加劑量由 1%逐漸增加到實驗設計的 5%，為期一週的適應期，之後才開始正式分組給予試驗飲食進行 9 週的實驗期(圖 3 - 2)。

受試動物均個別飼養於不鏽鋼絲網籠，動物房溫度維持於  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，光照及黑暗各 12 小時(0800 - 2000 為光照期，其餘為黑暗期)。飼料及飲水均使其自由攝取，每 2 ~ 3 天記錄飼料攝取量，每週記錄一次動物體重，共飼養 13 週(wk -4 ~ wk 9)。



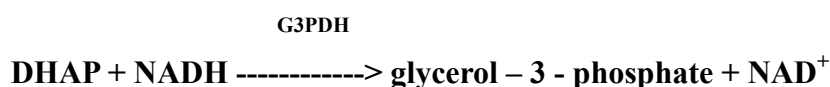
## 五、動物犧牲及樣品收集

飼養期間在第 0、3、6 及 9 週取禁食尾巴血測血糖及胰島素，在第 9 週犧牲，犧牲前予以禁食隔夜(16 小時)，當天用 CO<sub>2</sub> 將動物窒息。秤取動物犧牲前之體重，以不含抗凝劑的採血管(SPECIMEN TUBES, SUN MIN)自下腔大靜脈取血，並迅速剪下 2 塊約 0.2 克重的肝臟分別裝入已滅菌的 1.5 mL 離心管內，秤重記錄後立即投入液態氮中，保存於-80°C，供日後 RNA 之抽取及分析。其餘肝臟取下後，以 Saline 清洗瀆乾後秤重裝入封口袋中，保存於-20°C，供日後肝脂質分析。另外亦迅速剪下 4 塊約 0.5 克重的腹膜後脂肪(Retroperitoneal fat, RE)及副睪脂肪(Epididymal fat, EP)，分別以滅菌錫箔紙包住裝入封口袋中，秤重記錄後立即投入液態氮中，保存於-80°C，供日後 RNA 之抽取及分析。其餘 RE 與 EP 取出秤重後，分別各取 1 克、0.5 克和 0.4 克重以供 Lipoprotein lipase (LPL)、Glycerol - 3 - phosphate dehydrogenase (G3PDH)酵素活性以及脂解速率分析；另外，再剪下各約 0.1 克重泡入固定液中，待日後鐵酸染色分析之用。剩餘之 RE 與 EP 分別裝入封口袋中，保存於-20 °C，供日後脂質與 DNA 含量分析。之後，分別取下大鼠腎臟、左小腿腓腸肌、腹股溝脂肪(Injuinal fat)及睪丸等秤重。取得之全血以 3000 xg、20 分鐘、4 °C 下離心(himac CR21, Hitachi)，將血漿與血球分開，取得之血清少量分裝後置於-20 °C 保存，以供日後分析。

## 六、 Glycerol – 3 - phosphate dehydrogenase (G3PDH) 酵素活性測定

## (一) 原理：

此為參考 Kozak & Jensen (1974) 之方法(346)。細胞質的 G3PDH 酵素在三酸甘油酯合成路徑中，扮演一重要角色，因此為測量三酸甘油酯合成之指標酵素。其催化反應為：



## (二) 藥品配製：

## 1. Extraction buffer

藥品	需要量	最終濃度
Tris - HCl (Merck)	7.88 g	50 mM
EDTA (BDH)	0.292 g	1 mM
$\beta$ - mercaptoethanol (Merck)	70 $\mu$ L	1 mM
Triton X - 100 (Merck)	5 mL	0.5%

將 Tris - HCl 和 EDTA 溶於 800 mL 二次水中，再加入  $\beta$  - mercaptoethanol 和 Triton X - 100。調整 pH 值至 7.5，再以二次水定量至 1 L，儲存於 4°C。

## 2. Reaction buffer

藥品	需要量	最終濃度
Triethanolamine / HCL (Merck)	18.56 g	100 mM
EDTA (BDH)	0.7305 g	2.5 mM
$\beta$ - mercaptoethanol (Merck)	7 $\mu$ L	0.1 mM

將上述藥品溶於 800 mL 的二次水中，調整 pH 值至 7.5，再以二次水定量至 1 L，貯於 4°C。

## 3. 反應受質

## (1) NADH 1000x stock

藥品	需要量	最終濃度
$\beta$ - nicotinamide adenine dinucleotide reduced (MP Biomedicals)	0.08513 g	120 mM

將 NADH powder 取到 1.5 mL 離心管中，溶於 1 mL 的二次水中（微黃色），分裝貯於-20°C。

## (2) DHAP 1000 x stock

藥品	需要量	最終濃度
Dihydroxyacetone phosphate (Sigma)	0.017 g	200 mM

將 DHAP powder 取到 1.5 mL 離心管中，溶於 0.5 mL 的二次水中（無色透明），分裝貯於-20°C。

## 4. Working buffer

(100 mM Tris-HCl, pH 7.5 containing 2.5 mM EDTA, 0.1 mM  $\beta$  - mercaptoethanol, 120  $\mu$ M NADH and 200  $\mu$ M DHAP)

藥品	需要量
Reaction buffer	1 mL
NADH 1000 x stock	1 $\mu$ L
DHAP 1000 x stock	1 $\mu$ L

Reaction buffer : NADH 1000 x stock : DHAP 1000 x stock = 1000 : 1 : 1。每次依照比例混好所需體積並新鮮配製。

## (三) 方法：

大鼠犧牲後將取脂肪組織(0.5 克)置入均質管中，加入約 1.5 mL 之 Extraction buffer，在冰浴中均質約 3 分鐘，之後倒入 15 mL 離心管中並以 Extraction buffer

定量至 2 mL，接著在冰浴中以超音波(Vibra cell™)打 5 秒。以 10,000 xg、15 分鐘、4°C 離心(himac CR21, Hitachi)以去除脂肪層，取中間層(約 1 mL)至超高速離心管中，以 100,000 xg、1 小時、4°C 超高速離心(CS100FX, Hitachi)取上層萃取液(約 0.5 mL)至 1.5 mL 離心管。取 35  $\mu$ L 萃取液加入 1000  $\mu$ L Working buffer 於 Cuvette 中，輕輕上下搖晃混勻後放入分光光度儀(U-2000 spectrophotometer, Hitachi)中，以 1000  $\mu$ L Working buffer 做為空白組，每 30 秒測其 340 nm 吸光值，共進行 3.5 分鐘，以換算其下降速率，以 Lowry's method 測量其蛋白質濃度。

#### (四) 酵素活性計算：

$$\text{NADH} : \epsilon_{340 \text{ nm}} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

比爾定律：

$$A = \epsilon bc \quad (A : \text{吸光}; \epsilon : \text{消光係數}; b : \text{光鏡 cm}; c : \text{濃度})$$

$$c = A / \epsilon b$$

G3PDH 酵素活性(nmole / mg protein min)

$$\frac{\Delta A / \text{min} \div 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}}{X \mu\text{g protein}}$$

$$= \Delta OD \div 6.22 \div X (\mu\text{g protein}) \times 10^6$$

#### (五) Lowry's method 蛋白質濃度測定

##### 1. 藥品配製：

(1) Reagent A (0.5%  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  in 1%  $\text{Na}_3\text{-citrate} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

藥品	需要量	最終濃度
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (聯工)	0.5 g	0.02 M
$\text{Na}_3\text{-citrate} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (USB)	1.14 g	0.04 M

將 0.5 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  溶於 80 mL 二次水，再加入 1.14 g 的  $\text{Na}_3\text{-citrate} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，最後以二次水定量至 100 mL。

(2) Reagent B (2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 0.1 N NaOH)

藥品	需要量	最終濃度
$\text{Na}_2\text{CO}_3$ (聯工)	20 g	0.2 M
NaOH (Katayama chemical)	4 g	0.1 N

將 20 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶於 800 mL 二次水中，再加入 4 g NaOH，最後以二次水定量至 1 L。

## (3) Reagent C (Reagent A: Reagent B=1:50)

取 1 mL Reagent A 加 50 mL Reagent B (新鮮配製)。

## (4) Reagent D (Folin &amp; Ciocalteu's phenol reagent : 二次水 = 1:1)

藥品	需要量
Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Merck)	10 mL
二次水	10 mL

取 10 mL Folin & Ciocalteu's phenol reagent 加 10 mL 二次水，混合均勻後需避光(新鮮配製)。

## (5) Standard

先將 1 mg BSA (Sigma) 溶於 1 mL 二次水中，製成 1 mg / mL 的 Stock。再以此 stock 做不同濃度之序列稀釋(0 ~ 0.7 mg / mL)。

## 2. 方法：

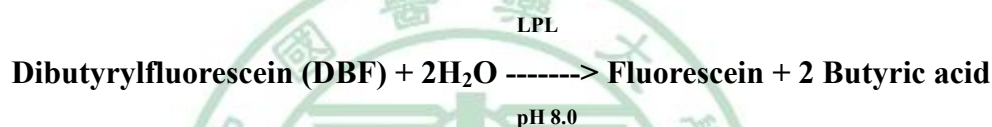
萃取液先以二次水稀釋 10 倍後。取 30  $\mu\text{L}$  的 Sample 或 30  $\mu\text{L}$  的 Standard，以 30  $\mu\text{L}$  的二次水作為 Blank。依序加到 96 孔透明盤中後，加入 150  $\mu\text{L}$  Reagent C，在 Microplate mixture vortex 上混合均勻反應 15 分鐘，再加入 15  $\mu\text{L}$  Reagent D，於 Microplate mixture vortex 上混合均勻反應 30 分鐘。以 ELISA Reader ( $\mu\text{Quant}$ ) 測 660 nm 之吸光值，再以吸光值比較標準曲線換算蛋白質濃度並乘回稀釋倍數。



## 七、Lipoprotein lipase (LPL) 酵素活性測定

### (一) 原理：

此方法為參考 Hamosh 等人(1970)和 Del Prado 等人(1994)(347, 348)。LPL 為一種細胞外酵素，作用在微血管內皮細胞表面會水解循環中脂蛋白內的三酸甘油酯。此法利用 Dibutyrilfluorescein (DBF) 為此酵素之受質，當酵素將 DBF 水解，即可以偵測 DBF 水解後所釋放出之螢光強度，評估 LPL 酵素活性，而此酵素活性會受 NaCl 抑制。



### (二) 藥品配製：

#### 1. 0.1 M Phosphate buffer

藥品	需要量	最終濃度
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (和光)	33.38 g	0.09 M
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (和光)	0.94 g	6.8 mM

將上述藥品溶於 800 mL 的二次水中，調整 pH 值至 8，再以二次水定量至 1 L，貯於 4°C。

#### 2. 0.1 M Phosphate buffer containing 1 M NaCl

藥品	需要量	最終濃度
Phosphate buffer	500 mL	
NaCl (USB)	29.22 g	1 M

以 Phosphate buffer 溶解 NaCl 後，貯於 4°C。

## 3. 25 mM Extraction buffer

藥品	需要量	最終濃度
Tris - HCl (Merck)	1.97 mL	25 mM
Heparin (Sigma)	3 mg	1 u / mL

將上述藥品溶於 400 mL 的二次水中，調整 pH 值至 8，再以二次水定量至 500 mL，貯於 4°C。

## 4. Substrate solution

藥品	需要量	最終濃度
Dibutyrilfluoresceine (DBF) (Fluka)	0.5 mg	20 $\mu$ M
Ethyleneglycerol monomethyl ether (Fluka)	2.5 mL	5%

將上述藥品以 0.1 M Phosphate buffer 定量至 50 mL，需新鮮配製。

## 5. Substrate solution containing 1 M NaCl

藥品	需要量	最終濃度
Dibutyrilfluoresceine (DBF) (Fluka)	0.5 mg	20 $\mu$ M
Ethyleneglycerol monomethyl ether (Fluka)	2.5 mL	5%

將上述藥品以 0.1 M Phosphate buffer containing 1 M NaCl 定量至 50 mL，需新鮮配製。

## (三) 螢光檢量線：

將 10 mg fluoresceine (Fluka) 溶於 100 mL phosphate buffer (300  $\mu$ M) 中，製成 Stock solution。再以 Phosphate buffer 做不同濃度之系列稀釋(0.08、0.4、2、10  $\mu$ M)。

## (四) 方法：

大鼠犧牲後取脂肪組織(1 克)，先以 Saline (0.9% NaCl)清洗瀝乾後，以 20 mL 預冷的 Acetone (TEDIA)均質。均質後的樣品以 Whatman # 1 濾紙用布氏漏斗抽氣過濾，並以適量之預冷乙醚(TEDIA)沖洗三次。最後將殘留在濾紙上已除去脂肪的殘餘組織風乾，風乾後以刮杓將殘渣輕輕刮下收集至 1.5 mL 離心管中，於測定前可先儲存於-80°C 冰箱中。測定前加入 1 mL Extraction buffer 至收集的殘餘物，以迷你均質器(Mini cordless grinder, SSI)均質樣品，並在冰浴中反應 60 分鐘，期間偶爾拿起震盪均勻。反應完後以 5,000 xg、10 分鐘、4°C 下離心(himac CR21, Hitachi)，取上清液至另一 1.5 mL 離心管中即為酵素萃取液。取 5  $\mu$ L 酵素萃取液加入 200  $\mu$ L Substrate solution 或 Substrate solution containing 1 M NaCl 於 96 孔黑盤，在 Microplate mixture vortex 上混合均勻後放置三分鐘，置入螢光儀(FLx800 / Microplate Fluorescence Reader, Bio-TEK instruments Inc.)測量 Em 528 nm、Ex 485 nm，每五分鐘讀盤一次，共進行二十分鐘(Temp：37°C、Sensitivity：40)。另外做螢光檢量線，在同樣條件設定下測量螢光強度，求出 Fluoresceine concentration 與 Intensity 直線方程式，用來比對樣品濃度。

## (五) 酵素活計算：

先利用直線方程式將  $\Delta$  fluoresceine intensity / 20 min (不 NaCl)與  $\Delta$  fluoresceine intensity / 20 min (含 NaCl)分別換算為 Fluoresceine concentration ( $\mu$ M)。

計算：

LPL 酵素活性(pmol / hr  $\times$  protein ( $\mu$ g))

=  $\left[ (\Delta \text{fluoresceine concentration} / 20 \text{ min (不含 NaCl)} - \Delta \text{fluoresceine concentration} / 20 \text{ min (含 NaCl)}) \times 3 \times 205 \mu\text{L} \right] / \text{protein concentration (mg / mL)} \times 5 \mu\text{L}$

## (六) Bio-Rad Protein assay 蛋白質濃度測定

## 1. 藥品配製

## (1) Dye Reagent

藥品	需要量
Dye Reagent Concentrate (Sigma)	1 x
二次水	4 x

用二次水稀釋 5 倍後，以 Whatman # 1 濾紙過濾來除去顆粒。Dilute reagent 需避光，於室溫下可儲存 2 星期。

## (2) Standard

先將 1 mg BSA (Sigma) 溶於 1 mL 二次水中，製成 1 mg / mL 的 Stock。再以此 Stock 做不同濃度之系列稀釋(0 ~ 0.7 mg / mL)。

## 2. 方法

萃取液先以二次水稀釋 2 倍後。取 10  $\mu$ L 的 Sample 或 Standard 於 96 孔透明盤中。加入 250  $\mu$ L 的 Dilute reagent。以 Microplate mixture 混合均勻後，於室溫下反應 5 分鐘，最多不超過 1 小時。以 ELISA reader ( $\mu$ Quant) 測 630 nm 之 OD 值。再以吸光值比較標準曲線換算蛋白質濃度並乘回稀釋倍數。

Note：若樣品中含 Triton x - 100 則不適用此方法。

## 八、 脂解速率測定

## (一) 原理：

此測定方法為參考 Berger & Barnard (1999)與 Morimoto 等人(2001)(349, 350)。因脂肪組織中 Glycerol kinase 含量很低，水解釋出的 Glycerol 不太會被 Glycerol kinase 利用，因此測量 Medium 中 Glycerol 濃度可以代表脂肪組織內脂解速率。

## (二) 藥品配製：

## 1. 25 mM TES buffer (pH 7.4)

藥品	需要量	最終濃度
TES (Sigma)	5.725 g	25 mM
NaCl (USB)	7.83 g	135 mM
KCl (Riedel - deHaën)	0.37 g	5 mM
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O (Riedel - deHaën)	0.203 g	1 mM
BSA (Sigma)	25 g	2.5%

將上述藥品溶於二次水中，調整 pH 至 7.4，再以二次水定量至 1 L，顏色會呈淺黃色，儲存於 4°C。因 BSA 存在，Buffer 易發黴，因此最好適量配製。

## 2. 10 mM isoproterenol stock solution

將 0.025 g 的 Isoproterenol (Sigma)溶於 10 mL 二次水，配於棕色瓶中，避光貯存於 4°C (為透明無色，顏色變褐色丟棄)。

## 3. Working buffer : 25 mM TES buffer containing 1 μM isoproterenol

取 10 mL 25 mM TES buffer 加 1 μL Isoproterenol stock solution，每次使用前新鮮配製。

## (三) 方法：

取脂肪組織浸泡於 Saline (0.9% NaCl) 後，分成兩塊(約 0.2 g)在擦手紙吸乾後，各自置於燒杯且精確秤重並記錄。準備 12 孔培養盤，所有 Samples 先於 Well 內用剪刀均勻剪碎，待全部剪完後，所有 Samples 同時加入預先 37°C 回溫之 2 mL 25 mM TES buffer (Basal) 或 2 mL 25 mM TES buffer containing 1  $\mu$ M isoproterenol (Stimulated)。在 37°C incubator 中反應(Shake : 30 rpm / min)，分別於 1、2、3 小時吸取 0.1 mL Medium 於 1.5 mL 離心管中，70°C 加熱 10 min，冰浴後以 100  $\mu$ g、30 秒、37°C 下離心(himac CR21, Hitachi)，離心後取上清置於冰桶中，以市售試劑組(RANDOX GY105, Amtrim, UK)測定 glycerol 含量。在 96 孔透明盤中加入 200  $\mu$ L 配好之 Reagent，再分別加入 40  $\mu$ L 二次水(Blank)、Standard (100  $\mu$ M Glycerol)、Samples (Basal or Stimulated)，室溫反應 10 分鐘後以 ELISA Reader ( $\mu$ Quant)測 520 nm 之吸光值，再以吸光值比較標準曲線換算 Glycerol 濃度。

## (四) 脂解速率計算

Basal 或 Stimulated 分別計算

a. 標準品濃度：100  $\mu$ M

b. 利用與吸光度比值計算 Sample 濃度：

$$Y (\mu\text{M}) = (A_{\text{sample}} / A_{\text{STD}}) \times 100 (\mu\text{M})$$

c. 最後算出每克組織所釋放的 Glycerol ( $\mu$ mol)

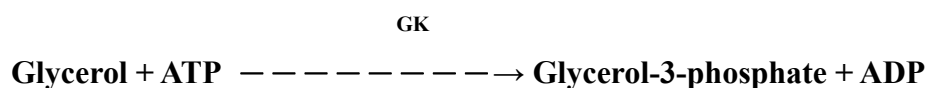
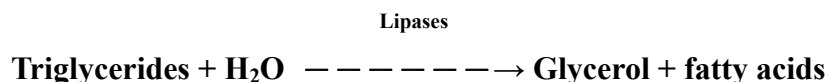
$$\text{Lipolysis rate } (\mu\text{mol glycerol released / g tissue})$$

$$= Y (\mu\text{M}) \times 0.002 (\text{L}) / W (\text{g})$$

## 九、 血清脂質分析

## (一) 血清三酸甘油酯含量測定

## 1. 原理：



測定Quinoneimine (紫紅色)在500 nm 的吸光值。

## 2. 方法：

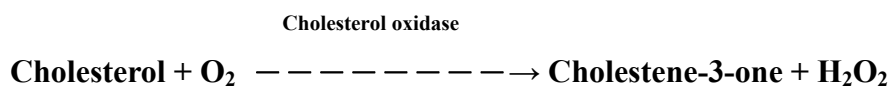
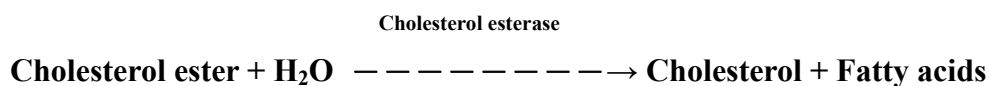
採用市售試劑組(RANDOX TR 213, Amtrim, UK)。將Buffer 1 (含Pipes buffer, pH 7.5、4-chloro-phenol、Magnesium-ions)與Enzyme Reagent 2 (含4-aminophenazone、ATP、Lipases、Glycerol-kinase、Glycerol-3-phosphate oxidase、Peroxidase)混合，配成Enzyme Reagent，取10 μL Samples或Triglycerides standard (200 mg / dL)置於玻璃試管中，加入1 mL Enzyme Reagent，於室溫反應10分鐘，以1 mL Enzyme Reagent做為Blank。測500 nm之吸光值，即可得樣品血清之三酸甘油酯含量。

## 3. 計算：

$$\text{三酸甘油酯濃度(mg / dL)} = \frac{\Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{standard}}} \times \text{Standard 濃度(200 mg / dL)}$$

## (二) 血清膽固醇含量測定

## 1. 原理：



測定Quinoneimine(紫紅色)在500 nm 的吸光值。

## 2. 方法：

採用市售試劑組(RANDOX CH 201, Amtrim, UK)。取4 μL Samples 或 Cholesterol standard (200 mg / dL)於96孔透明盤中，加入200 μL反應試劑(含 Phosphate buffer pH 6.5、Surfactant、4 - aminoantipyrine、Phenol、Peroxidase、Cholesterol esterase、Cholesterol oxidase)，室溫反應10分鐘，以4 μL二次水加200 μL反應試劑做為Blank，測定500 nm之吸光值，即可得樣品血清之膽固醇含量。

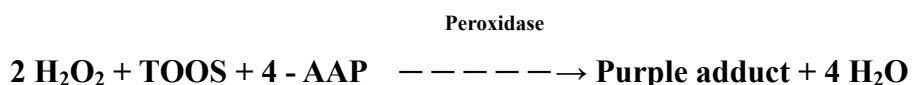
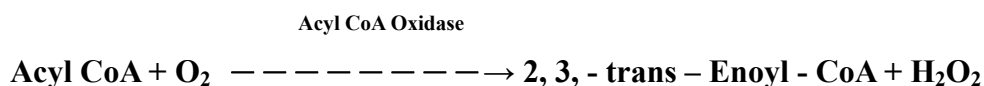
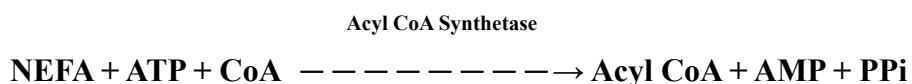
## 4. 計算：

$$\text{膽固醇濃度(mg / dL)} = \frac{\Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{standard}}} \times \text{Standard 濃度(200 mg / dL)}$$



## (三) 血清游離脂肪酸測定

## 1. 原理：



測定Purple adduct (青紫色)在550 nm的吸光值。

NEFA: Non Esterified Fatty Acids

4 - AAP = 4 - aminoantipyrine

TOOS = N - ethyl - N - (2 hydroxy - 3 - sulphopropyl) m - toludine

## 2. 方法：

採用市售試劑組(RANDOX FA 115, Amtrim, UK)。先將10 mL Buffer (含 Phosphate buffer, pH 6.9、Magnesium chloride、Surfactant)加入Enzyme / Coenzyme (含 Acyl coenzyme A synthetase、Ascorbate oxidase、Coenzyme A、ATP、4-aminoantipyrine)即為 Reagent 1。將 Enzyme Diluent (含 Phenoxyethanol、surfactant)與 Maleimide 混和均勻，再與 Enzyme Reagent (含 Acyl coenzyme A oxidase、Peroxidase、TOOS)混和均勻，即為 Reagent 2。取4 μL Samples或NEFA standard (1 mmol / L)於96孔透明盤中，加入80 μL Reagent 1，在37°C下反應10分鐘後，再加入160 μL Reagent 2，在37°C下反應10分鐘，以4 μL 二次水加反應試劑做為Blank。測550 nm之吸光值，即可得樣品血清游離脂肪酸之含量。

## 5. 計算：

$$\text{游離脂肪酸濃度}(\text{mmol} / \text{L}) = \frac{\Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{standard}}} \times \text{Standard 濃度}(1 \text{ mmol} / \text{L})$$

## 十、 脂肪組織三酸甘油酯含量測定

### (一) 脂肪組織脂質均質液製備

#### 1. 藥品配製：

萃取液(Chloroform : Methanol = 2 : 1)

藥品	需要量
Chloroform (TEDIA)	2x
Methanol (TEDIA)	1x

將氯仿和甲醇以 2 : 1 的比例混合均勻。先估計使用量，再依照所需當天配製，不要一次配製太多，因為容易揮發掉。

#### 2. 方法：

採 Folch 等學者(1957)之方法(351)。脂肪組織完全解凍後，用濾紙盡量將液體瀆乾。取 0.5 g RE 或 EP 並記錄實際稱取量。加入少量萃取液於冰浴中以均質機 (Polytron, IKA LABORTECHNIK) 均質磨碎。將均質液以濾紙過濾到 15 mL 離心管中。以萃取液定量至 10 mL (蓋子鎖緊)。

### (二) 脂肪組織三酸甘油酯含量測定

將脂質均質液以萃取液稀釋10倍。取5  $\mu$ L稀釋的脂質均質液於玻璃試管中。將玻璃試管置於通風櫥使溶劑完全揮發，之後分析方法同血清三酸甘油酯。

## 十一、脂肪組織 DNA 含量測定

### (一) 原理：

此法參考修改至自 Saha 等人(1994)的方法(352)。利用螢光物質 Hoechst 33258 (2 - (2 - (4 - hydroxyphenyl) - 6 - benzimidazolyl) - 6 - (1 - methyl - 4 - piperazyl) - benzimidazol · 3HCl)與 DNA large grooves 具高度親和力的原理來偵測 DNA 含量，當 DNA 與 Hoechst 33258 結合後，給予 365 nm 之激發光，可以偵測到 460 nm 之放射光。且 Hoechst 33258 對 DNA 具有專一且高靈敏度的螢光呈色反應。由於試劑會與 DNA 雙股螺旋形成穩定結構，因此呈色後 16 小時均可測定。

### (二) 藥品配製：

#### 1. 2 x PSE buffer stock

藥品	需要量	最終濃度
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O (和光)	35.8 g	100 mM
NaCl (USB)	233.6 g	4 M
EDTA · Na <sub>2</sub> (BDH)	3.72 g	2 mM

將上述藥品溶解在 800 mL 的二次水中，以 10 N NaOH 調整 pH 至 7.4。再以二次水定量至 1 L 後滅菌。

#### 2. 1 x PSE buffer stock

將 2 x PSE buffer 於使用前以滅菌水稀釋為 1 倍即可。

#### 3. Hoechst 33258 stock solution (1 mg / mL)

將 Hoechst 33258 以滅菌水製備成 1 mg / mL 的 Hoechst 33258 stock solution，避光存於 4°C 備用。於測定前以 1 x PSE buffer 稀釋 1000 倍(1 µg / mL)，即可使用於呈色反應。

#### 4. Calf thymus DNA stock solution (1 mg / mL)

以滅菌水將 Type I highly polymerized calf thymus DNA (Sigma)製備成 1 mg / mL 的 Calf thymus DNA stock solution。於使用前以 2 x PSE buffer 稀釋為 500 µg / mL 之後，再以 1 x PSE buffer 稀釋為 20 µg / mL 之後，再進行序列稀釋 (20、10、5、2.5、1.25、0.625 µg / mL)。(Type I highly polymerized calf thymus DNA 極不容易溶於水中，所以可用超音波震盪器使之溶解，或置於 4°C 下約一星期使其慢慢溶解)

### (三) 方法：

#### 1. 脂肪組織 Fat - free 均質液製備

脂肪組織完全解凍後，用濾紙盡量將液體瀆乾。取 0.5 g 脂肪組織並記錄實際稱取量。將脂肪組織剪碎，加入適量 1 x PSE buffer 於冰浴中以均質機(Polytron, IKA LABORTECHNIK)均質。以 15 mL 離心管將均質液定量至 14 mL。若均質液因為脂肪組織結塊，無法震盪混合均勻時，統一將所有 Sample 的下層取出到另一 15 mL 離心管並記錄取出之下清液體積。取 1 mL 均質液加入 7 mL Cold acetone，在冰浴中震盪均勻 20 分鐘來去脂。以 1800 xg、4°C、15 分鐘離心(himac CR21, Hitachi)。除去上清液，置於通風櫥使 Acetone 完全揮發。加入 1 mL 的 1x PSE buffer，以 Sonicater 將 Pellet 充分打散、溶解。再以 1 x PSE buffer 定量至 2 mL，即得脂肪組織 Fat - free 均質液。

#### 2. 脂肪組織 DNA 含量測定

取 500 µL 的 Fat - free 均質液、Calf thymus DNA 標準品或 1 x PSE buffer (做 Blank)於玻璃試管中。加入 1500 µL 的稀釋 1000 倍 Hoechst 33258 螢光試劑，混合均勻。以螢光光度計(F-2000 Fluorescence Spectrophotometer, HITACHI)測量 Ex 365 nm、Em 460 nm 之螢光強度。再比對標準曲線換算 DAN 濃度。

## 3. DAN 濃度計算

$$\text{DAN 濃度 (mg / g)} = \frac{A \times 2 \times (\text{下清液體積} / V) \times 10^{-3}}{\text{脂肪組織重 (g)}}$$

A：比對標準曲線換算的濃度 ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )

V：去脂步驟所取的均質液體積

## 十二、鐵酸染色固定

## (一) 原理：

此測定方法為參考 Hirsch & Gallian (1968)、Etherton 等人(1977)與 Mersmann 等人(1986)(353, 354)。利用鐵酸( $\text{OsO}_4$ )能與脂肪酸形成鍵結將脂肪細胞固定並染色，並以 Urea 將固定的細胞從脂肪組織中釋放出來。

## (二) 藥品配製：

## 1. 0.2 M Collidine

藥品	需要量	最終濃度
Collidine (ACROS)	24.236 g	
(Xd = 0.91)	(26.63 mL)	0.22 M

溶解後以 0.9% NaCl 定量至 1L。

## 2. 0.05 M Collidine - HCl buffer (pH 7.4)

藥品	需要量	最終濃度
0.2 M Collidine	25 mL	0.05 M
0.1 N HCl	22.5 mL	

混合均勻之後將 pH 值調至 7.4。再以 0.9% NaCl 定量至 100 mL。

## 3. 8 M Urea

藥品	需要量	最終濃度
Urea (plusone)	480 g	8 M

溶解後以 0.9% NaCl 定量至 1 L (稍加熱來溶解)。

## 4. 0.01% Triton X - 100 (in 0.9% NaCl)

藥品	需要量	最終濃度
Triton X - 100 (MERCK)	0.1 mL	0.01%

以 0.9% NaCl 定量至 1 L。

## 5. 3% Osmium Tetroxide

藥品	需要量	最終濃度
O <sub>5</sub> O <sub>4</sub> (PGM)	0.15 g	3%
0.05 M Collidine - HCl buffer (pH 7.4)	5 mL	

因 O<sub>5</sub>O<sub>4</sub> 具揮發性及致癌，需戴手套於抽風櫥中配製。將一瓶 O<sub>5</sub>O<sub>4</sub> 取出後，先用酒精噴一噴後擦乾淨，從頂端將瓶子折斷全部丟入加有所需量 0.05 M Collidine - HCl buffer (pH 7.4) 的玻璃瓶中(例如 1 g O<sub>5</sub>O<sub>4</sub> 對 33 mL Buffer)，於室溫下放置 2-3 天溶解，溶解完為黃色澄清液體，用錫箔紙將瓶身包住藏放於密封罐子中，存放於 4°C。

### (三) 方法：

#### 1. Cell Fixation

取脂肪組織(< 200 mg)以 37°C、0.9% NaCl 浸潤三次，將 Tissue slice 放入含有 2 mL 之 0.05 M Collidine - HCl buffer (pH 7.4) 的 Counting vial 內，移至抽風櫥內再加入 2 mL 之 3% OsO<sub>4</sub>，蓋緊後於室溫下放置三到四天。

#### 2. Urea - solubilization of connective tissue

吸出 OsO<sub>4</sub>- collidine - HCl buffer，以約 5 mL 之 0.9% NaCl 沖洗後吸出，再加入 5 mL 之 0.9% NaCl 於室溫下放置一天。吸出 0.9% NaCl 後改加 10 mL 之 8 M Urea，於室溫下放置一天，期間偶爾旋轉 Vial 促使細胞從 Connective tissue 釋放出來，可在顯微鏡下看見由 OsO<sub>4</sub> 染成黑色的細胞。將 Urea freed particles 倒在 335 μm Nylon mesh net 上，用玻棒磨一磨使脂肪組織通過 Net 而過濾到燒杯中並以 0.9% NaCl 沖洗 Nylon mesh net 數次，收集的濾液再用 10 μm Nylon mesh net 來抽氣過濾並以 0.01% Triton x - 100 (in 0.9% NaCl) 沖洗數次。過濾完後，脂肪細胞會像沙子一樣附著在 10 μm Nylon mesh net 上，小心取下 10 μm Nylon mesh net，在乾淨燒杯上方倒轉 10 μm Nylon mesh net，用 0.01% Triton x - 100 (in 0.9% NaCl) 將附在 10 μm Nylon mesh net 上的脂肪細胞沖到 Counting vial。

#### 3. 脂肪細胞計數

吸出少許的脂肪細胞至載玻片上，蓋上蓋玻片，用螢光倒立式顯微鏡 (OLYMPUS I × 71) 以 10 × 10 之倍率觀察。將每個 Sample 以相機(Diagnostic)將所得影像拍攝數張，再使用影像處理軟體(SPOT Advanced)來計算細胞大小，每個 Sample 總共至少要算到 100 個細胞以上。測量每個細胞的直徑大小並作記錄，若有橢圓形的細胞時，以(最長直徑 + 最短直徑)/2 做為細胞直徑大小。

### 十三、口服葡萄糖耐受測試 Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

#### (一) 藥品配製：

##### Glucose solution

#### 1. 3.5 M Glucose solution (用於 3 - 6 週之大鼠)

取 63 g Glucose (Riedel - deHaën) 以 2 次水定量至 100 mL。

#### 2. 4.5 M Glucose solution (用於 6 - 9 週之大鼠)

取 81 g Glucose (Riedel - deHaën) 以 2 次水定量至 100 mL。

Note：葡萄糖濃度可隨大鼠週數來作調整

#### (二) 方法：

大鼠在給予試驗飼料第 3、6、9 週時進行口服葡萄糖耐受測試，於採血前一天 6:00 pm 將大鼠禁食。採血當天先採集 0 分鐘血液，將大鼠以保定器或 45 cm × 45 cm 見方之紗布固定住，使大鼠的尾巴外露，並盡可能的使大鼠不受到驚嚇。以解剖刀片將尾巴末端約 0.1 cm 處截斷，以手指順著尾巴將血液推出，滴少量血至血糖試紙(MediSense Optium™)上測定其血糖值，再收集約 0.15 mL 血液於 1.5 mL 離心管中，並保持在冰浴上。葡萄糖的劑量為每公斤體重給予 1.5 克葡萄糖，將葡萄糖溶液以胃管直接從大鼠口腔給予，再給予葡萄糖後第 30、60、90、120 分鐘，以同樣的方法採集血液並測定血糖值。將所收集的 0 分鐘全血，以 3,000 ×g、20 分鐘、4°C 離心(himac CR21, Hitachi)，取血清至另一個 1.5 mL 離心管中，以供禁食血清胰島素測定。

### 十四、禁食全血葡萄糖含量測定

將 OGTT 時所採集到大鼠的尾巴血液，以血糖試紙(MediSense Optium™)測量其血糖值。



## 十五、禁食血清胰島素測定

### (一) 原理：

利用 Solid phase two-site 酵素免疫原理測定，利用兩個具專一性之單株抗體與胰島素分子上特定抗原結合 (三明治法)，使樣品中的胰島素先和已固定在 96 孔盤上的一抗 Anti - insulin antibody 結合之後，再和 Peroxidase conjugated anti - insulin antibody 反應，再以 buffer 清洗未結合之酵素標定抗體，以降低非專一性反應。之後加入 Peroxidase 之受質 3, 3', 5, 5' - tetramethylbenzidine (TMB) 反應呈色(藍色)，最後以硫酸終止反應後呈黃色，讀取其 450 nm 之吸光值後即可套入標準曲線換算出胰島素濃度。

### (二) 方法：

利用大鼠 OGTT 時 0 分鐘採得的尾巴血液，收集約 0.15 mL 血液於 1.5 mL 離心管中，並保持在冰浴上，將所收集血液，以  $3,000 \times g$ 、20 分鐘、 $4^{\circ}C$  離心(himac CR21, Hitachi)，取血清至另一個 1.5 mL 離心管中，可凍於  $-20^{\circ}C$  以供分析之用。

採用市售試劑組(Merckodia rat insulin ELISA)。先將 50 mL Conjugate solution stock (含 Peroxidase conjugated mouse monoclonal anti - insulin)加入 450 mL Conjugate buffer (含 Colour coded blue)即得 Conjugate solution。把 40 mL Washing concentrate 加入 800 mL 二次水中即得 Washing solution。

將 25  $\mu$ L 血清樣品及胰島素標準品(0, 0.15, 0.4, 1, 3  $\mu$ g / L)分別加入 96 孔盤中 (含 Mouse monoclonal antibody)，再加入 50  $\mu$ L Conjugate solution 反應 2 小時，反應後以 Washing solution 將非特异性連結物沖洗掉，加入 200  $\mu$ L TMB 當受質，反應 15 分鐘，最後加入 50  $\mu$ L Stop solution (含 1 M  $H_2SO_4$ )，混和均勻後以 ELISA reader ( $\mu$ Quant)測 450 nm 之吸光值。再以吸光值比對標準曲線換算胰島素含量。

## 十六、禁食血清 Adiponectin 測定

### (一) 原理：

此分析是利用定量的三明治酵素免疫分析技術 (Sandwich enzyme immunoassay)。將 Mouse Adiponectin 專一性的 Monoclonal antibody 事先塗在 Microplate 上，當 Standards、Controls 和 Samples 注入 well 中，Mouse adiponectin 會和 Immobilized antibody 結合，之後洗去沒有結合的受質，再加入對 Mouse adiponectin 專一性的 Enzyme - linked polyclonal antibody 到 Well 中，接著洗去移除掉未結合的 Antibody - enzyme reagent 再加入受質溶液 (Substrate solution) 到 Well 中。酵素反應會生成藍色產物當終止溶液 (Stop Solution) 加入之後會轉變成黃色，顏色強度代表樣品中 Adiponectin 結合量的比例。

### (二) 方法：

大鼠犧牲時取得之全血以 3,000 xg、20 分鐘、4°C 下離心 (himac CR21, Hitachi)，將血漿與血球分開，取得之血清少量分裝後置於 -20 °C 保存，以供日後分析。採用市售試劑組 (R&D Systems Mouse Adiponectin)。混合 Conjugate concentrate (含 Polyclonal antibody) 和 Conjugate diluent 即得 Mouse adiponectin conjugate。以二次水將 Wash buffer concentrate 製備成 Wash buffer。取 Calibrator diluent RD5-26 concentrate 加二次水製備成 Calibrator diluent RD5 - 26 (1 x)。Color reagent A (含 Hydrogen peroxide) 和 B (Tetramethylbenzidine) 以等體積的比例混合均勻即得 Substrate solution。

加入 50  $\mu$ L 的 Assay diluent 到每一個 well 中，將 50  $\mu$ L 的 Standard 或 Sample 加入到每一個 Well 中，慢慢地輕拍 Plate 一分鐘。貼上膠膜於室溫下搖晃反應 3 小時。吸出 Well 中的溶液以 400  $\mu$ L 的 Wash buffer 清洗 5 次。加入 100  $\mu$ L 的 Diluted mouse Adiponectin Conjugate 到每一個 Well 中，貼上新的膠膜於室溫下搖晃反應 1 小時。吸出 Well 中的溶液以 400  $\mu$ L 的 Wash buffer 清洗 5 次。加入 100  $\mu$ L 的

Substrate solution 到每一個 well 中，於室溫下避光反應 30 分鐘。加入 100  $\mu$ L 的 Stop solution(含 Hydrochloric acid solution)到每一個 well 中，慢慢地輕拍 plate 確定混合均勻(或放在 Microplate vortex 上混勻)。測量 450 nm 之吸光值(波長校正設定 540 nm 或 570 nm)，以標準曲線來換算 Sample 內 Adiponectin 濃度。

## 十七、以北方點墨法(Northern blot)分析 PPAR $\gamma$ 、Adiponectin、Leptin、LPL 及 ADD1 / SERBP1 c mRNA 表現量

### (一) 總 RNA 之抽取

#### 1. 藥品配製：

##### (1) 0.1% DEPC - H<sub>2</sub>O

藥品	需要量
DEPC (Diethyl pyrocarbonate) (Sigma)	1 mL
滅菌水	1 L

使用 DEPC - H<sub>2</sub>O 配製專用三角瓶 (4 L)，先將滅菌水倒入瓶中後，移至抽風櫥中加入 DEPC 後，攪拌隔夜(8 小時)，滅菌後才能使用。

##### (2) 3M Na $\cdot$ acetate (pH 5.2)

取 49.22 g Na $\cdot$  acetate (USB) 先以適量二次水溶解，以冰醋酸調整 pH 至 5.2，定量至 200 mL 然後滅菌。

#### 2. 方法：

以 TRIZOL reagent (Invitrogen) 抽取白色脂肪總 RNA。將冷凍的脂肪組織約 0.5 g 放入均質管中加入 5 mL 之 TRIZOL reagent，以組織均質機(Homogerizer Glas-Col)均質至均勻，移入 15 mL 離心管中，再以滅菌針筒 (3 mL 針筒+ 22 G 針頭) 吸取數次後，於冰浴中靜置 5 分鐘，再以 12,000  $\times$ g、4 $^{\circ}$ C 下離心 10 分鐘後，取下層粉紅層於另一 15 mL 離心管中，目的為將油脂去除。加入 1 mL Chloroform 振盪均勻後於室溫下

靜置2~3分鐘，以12,000 xg、4°C下離心10分鐘後，上層為無色水層，下層為紅色之Phenol - chloroform層，小心吸取上層液至新的15 mL離心管中，加入2.5 mL Isopropanol (Sigma)震盪混勻，於室溫下靜置10分鐘，以12,000 xg、4°C下離心20分鐘，倒去上清液，沈澱之Pellet加入0.4 mL DEPC - H<sub>2</sub>O劇烈振盪使Pellet溶解再加入0.4 mL DEPC - H<sub>2</sub>O saturated phenol (pH 4, USB)，震盪均勻後，再以12,000 xg、4°C離心5分鐘，取上層水層於1.5 mL離心管中再加入0.4 mL Chloroform，震盪均勻後，以12,000 xg、4°C離心5分鐘，取上層液於另一個1.5 mL離心管，加入40 μL 3 M Sodium acetate與1 mL絕對酒精(Merck)，混勻置於-20°C 1小時以上或隔夜進行RNA沈澱，以12,000 xg、4°C離心10分鐘，倒去上清液，以1 mL DEPC - H<sub>2</sub>O配製的70%酒精清洗RNA（將Na·acetate洗去），再以12,000 xg、4°C離心5分鐘，將酒精移去，Pellet (RNA)於室溫下晾乾後，以10 μL之DEPC - H<sub>2</sub>O溶解RNA。取1 μL RNA溶液經以DEPC - H<sub>2</sub>O稀釋1000倍後，測260、280 nm波長之吸光值，以260 nm吸光值1 unit = 40 μg RNA / mL公式計算RNA濃度，並以260 / 280 nm比值粗略估計RNA純度(比值1.4~2代表蛋白質污染少)。

## (二) RNA 電泳

### 1. 藥品配製：

#### (1) 10 x MOPS

藥品	需要量	最終濃度
MOPS (MERK)	41.2 g	0.2 M
Sodium acetate (USB)	6.56 g	0.08 M
0.5 M EDTA (pH 8) (Sigma)	20 mL	0.01 M

將上述藥品加 800 mL DEPC - H<sub>2</sub>O 溶解後，以 2 N NaOH 調整 pH 至 7.0，再以 DEPC - H<sub>2</sub>O 定量至 1 L，滅菌後即可使用（溶液呈黃色，以錫箔紙避光，於室溫下儲存）。

## (2) 電泳緩衝液(1 x MOPS)

取 10 x MOPS 50 mL 以滅菌水定量至 500 mL 即可。

## (3) Formaldehyde gel loading buffer (10 x)

藥品	需要量	最終濃度
Glycerol (Sigma)	7.5 mL	50%
1 mM EDTA (pH 8) (Sigma)	30 $\mu$ L	2 $\mu$ M
Bromophenol blue (Plusone)	37.5 mg	3.73 $\mu$ M
Xylene cyanol FF (Sigma)	3.5 mg	0.43 $\mu$ M

將上述藥品以 DEPC - H<sub>2</sub>O 混勻溶解後定量至 15 mL，存於 4 °C。

## 2. 鑄膠：

藥品	需要量	最終濃度
Agarose (GibcoBRL)	0.35 g	1%
DEPC - H <sub>2</sub> O	25.8 mL	
10 x MOPS	3.5 mL	1x
37% Formaldehyde (Merck)	6.25 mL	3.7%

此鑄膠液約為一小片膠的量。將 Agarose 加 DEPC - H<sub>2</sub>O 後，微波 2 ~ 3 min 至完全溶解，移至抽風櫥中，待溫度降至 60 °C 時加入 10 x MOPS 及 37% Formaldehyde 搖晃均勻。注意台面是否有水平，將鑄膠液倒入 RNA gel 鑄膠槽並插入齒模，避免產生氣泡，待其凝固後即可用於 RNA 電泳或存放於 4 °C 保鮮盒中（於保鮮盒中加入些許的 DEPC - H<sub>2</sub>O 保持溼度）。

## 3. 樣品前處理：

藥品	需要量	最終濃度
RNA sample	x $\mu\text{L}$	
DEPC - H <sub>2</sub> O	(4.5 - x) $\mu\text{L}$	
10x MOPS	2 $\mu\text{L}$	1 x
37% Formaldehyde (Merck)	3.5 $\mu\text{L}$	0.22 M
Formamide (USB)	10 $\mu\text{L}$	50%

將RNA與上述藥品混合均勻後，於70°C下水浴10分鐘，隨即冰浴3分鐘，Spin down後加入2  $\mu\text{L}$  Gel loading buffer (10 x)及1  $\mu\text{L}$ 之1  $\mu\text{g} / \mu\text{L}$  EtBr (BDH)，混勻後即可用於RNA電泳。

## 4. 方法：

首先製備1%洋菜膠體(Agarose gel)，內含有1% Agarose，3.7% Formaldehyde，1 x MOPS (20 mM MOPS, 8 mM Sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 7.0)。分別取20  $\mu\text{g}$  RNA進行樣品前處理：於RNA溶液中加入2  $\mu\text{L}$  10 x MOPS、3.5  $\mu\text{L}$  37% Formaldehyde及10  $\mu\text{L}$  Formamide，以DEPC - H<sub>2</sub>O補體積至20  $\mu\text{L}$ ，混均後70 °C下水浴10分鐘，隨即冰浴3分鐘，避免RNA回復二級結構，Spin down後加入2  $\mu\text{L}$  Gel loading buffer (10 x)及1  $\mu\text{L}$ 之1  $\mu\text{g} / \mu\text{L}$  EtBr (BDH)，混勻後即可注入洋菜膠體中，以50 ~ 70伏特電壓進行電泳，當色帶泳動至洋菜膠體之3 / 4時停止，取出膠體置於UV box (LONGLIFE FILTER, SPECTROLINE)上觀察rRNA 28S / 18S 的比例，若約等於2 : 1表示RNA品質良好，無降解現象便可直接進行轉印。

## (三) RNA 轉印法

## 1. 藥品配製：

## (1) 20 x SSC

藥品	需要量
NaCl (USB)	175.3 g
Citric acid (USB)	88.2 g

將上述藥品以800 mL二次水溶解後調整pH至7.0，最後定量至1 L。每1 L加1 mL DEPC攪拌過夜然後分裝，滅菌；或上述粉末溶於DEPC - H<sub>2</sub>O。

## (2) 2 x SSC

取5 mL的20 x SSC以滅菌水定量至50 mL。

## 2. 方法：

將RNA電泳後的膠片浸泡在DEPC - H<sub>2</sub>O中搖晃30分鐘二次，再浸泡於20 x SSC中50 ~ 60分鐘。此時先準備轉印用具：取一塊比膠片大的吸水海綿放入一塑膠盒中，加入20 x SSC使吸水海綿完全浸溼，溶液高度並達海綿的2 / 3高度，並利用玻棒趕走海綿中的氣泡；同時準備六片與海綿大小相同的厚濾紙(Whatman No.3)，以20 x SSC沾溼放到海綿上。剪裁比膠片大一些之Nylon membrane (Hybridization transfer membrane, NEN Life Science Products, Inc.)並在其右上角做一斜角記號，先以DEPC - H<sub>2</sub>O潤溼後，再泡於20 x SSC中備用，當膠片浸泡完全後，將三片厚濾紙平鋪於海綿上，並以玻棒將氣泡趕走，即可將膠片放到濾紙上，背面向上用玻棒將氣泡趕走，剪四條投影片蓋住膠體周圍的海綿，將Nylon membrane平鋪於膠體上以玻棒將氣泡趕走，再蓋上五片厚濾紙於Nylon membrane上，在疊的過程中勿產生氣泡，再疊上約6公分高度的擦手紙，最後以約0.5公斤的平板重物壓住，注意四周要平衡，開始進行轉漬，塑膠盒周圍以包鮮膜覆蓋，室溫中轉印12 ~ 16小時，期間更換擦手紙1 ~ 2次，並補充20 x SSC。轉印完成後，移去平板重物、擦手紙等，以鉛筆在Nylon membrane和膠片接觸面做記號，將Nylon membrane浸泡在2 x SSC中

5分鐘，以洗去Nylon membrane上的洋菜膠殘留物，再將Nylon membrane放在濾紙上，室溫晾乾30分鐘，再以UV Cross - linker (Select Series, SPECTROLINE)設定在Optimal crosslink的能量將RNA固定於Nylon membrane上，室溫收藏，供作北方轉漬法分析之用。

#### (四) 探針標誌

本實驗選取 PPAR $\gamma$  cDNA (AB019561, base: 164 ~ 1151)、Adiponectin cDNA (AY033885, base: 250 ~ 755)、Leptin cDNA (D49653, base: 13 ~ 373)、LPL cDNA (L03294, base: 1005 ~ 1864, 感謝黃青真老師實驗室提供)、ADD1 / SREBP1c cDNA (AF286470, base: 896 ~ 1319)及 18S cDNA (M111881297, base: 1 ~ 1297, 感謝黃青真老師實驗室提供)片段作為探針，cDNA 探針之放射性標幟製備採用市售試劑組 (Ready To Go DNA Labelling Beads - dCTP, Amersham Pharmacia Biotech Inc., NJ, USA)來進行。首先取目標 cDNA (25 ~ 50 ng)溶液，以滅菌水補體積至 45  $\mu$ L，在 100 $^{\circ}$ C 下 Denature 3 分鐘，隨即冰浴 2 分鐘，迅速離心；將已 Denature 的 DNA 溶液 45  $\mu$ L 加至 Reaction Mix Bead (含有緩衝液、dATP、dGTP、dTTP、FPLCpure Klenow : 7 ~ 12 units 和 Random oligodeoxyribonucleotides : 9 - mers)中，之後再加入 5  $\mu$ L [ $\alpha$  -  $^{32}$ P] dCTP (3000 Ci / mmol)，於 37 $^{\circ}$ C 下反應 30 ~ 60 分鐘。將 Micro Spin<sup>TM</sup> G - 50 Column (Amersham Pharmacia Biotech Inc., NJ, USA)混合一下，將其下方的 1/4 處折斷，蓋子旋鬆 1/4 圈，置於 1.5 mL 離心管中，於 1,000  $\times$ g 下離心 1 分鐘，之後將 Column 置換至另一新的 1.5 mL 離心管中，將反應完的樣品(含 cDNA 及 [ $\alpha$  -  $^{32}$ P] dCTP 等)小心地加到 Column 內的 Resin bed，於 1,000  $\times$ g 下離心 2 分鐘，離心下來的即是已去掉 Unincorporated labelled nucleotides 的 cDNA 探針，在進行雜交反應前需於 100 $^{\circ}$ C 下加熱 5 分鐘，加熱後立即冰浴，方可使用於雜交反應。



## (五) 雜交反應

## 1. 藥品配製：

## (1) TE buffer

藥品	需要量	最終濃度
1 M Tris - HCl (pH 8.0)	5 mL	10 mM
0.5 M EDTA	1 mL	1 mM

以二次水定量至500 mL，滅菌後即可使用。

## (2) Salmon sperm DNA (5 mg / mL)

取1克Salmon sperm DNA (Deoxyribonucleic acid, Sodium salt, Sigma)溶於180 mL TE buffer，混合均勻後於冰浴下以超音波震碎，至溶液不在黏稠為止，定量至200 mL。

## (3) Hybridization buffer / Prehybridization buffer

藥品	需要量	最終濃度
99.7% Formamide	25 mL	50%
50 x Denhardt's solution (BDH)	5 mL	5 x
10% SDS	5 mL	1%
20 x SSC	12.5 mL	5 x

以滅菌水定量至50 mL。

## (4) Wash buffer

## ① Buffer I (2 x SSC ; 1% SDS)

藥品	需要量
20 x SSC	5 mL
10% SDS	5 mL

以滅菌水定量至50 mL。

## ② Buffer II (0.1 x SSC ; 1% SDS)

藥品	需要量
20 x SSC	0.25 mL
10% SDS	5 mL

以滅菌水定量至50 mL。

## ③ Buffer III (1 x SSC)

藥品	需要量
20 x SSC	2.5 mL

以滅菌水定量至50 mL。

## ④ 6 x SSC

藥品	需要量
20 x SSC	300 mL

以滅菌水定量至1 L。

## (5) Deprobe solution (0.1 x SSC ; 1% SDS)

藥品	需要量
20 x SSC	5 mL
10% SDS	100 mL

以滅菌水定量至1 L。

## 2. 方法：

先將轉印好RNA nylon membrane於6 x SSC中平衡1小時，此時先取200  $\mu$ L Sonicated salmon sperm DNA (5 mg / mL)，予以加熱100°C、10分鐘，立刻冰浴3分鐘，然後加至5 mL的雜交溶液(50% Formamide, 5 x Denhart's solution, 1% SDS, 5 x SSC)中，再將平衡完成之RNA nylon membrane加入此雜交溶液(5 mL / tube)，於42°C下Prehybridization 6小時或隔夜。倒去Prehybridization之雜交溶液，再加入5 mL含有<sup>32</sup>P標誌cDNA 探針之雜交溶液，於42°C下Hybridization 12~16小時。將探針溶液小心吸出(可回收重複使用)。接下來進行Wash步驟，首先以12.5 mL Buffer I (2 x SSC, 1% SDS)於室溫下洗2次，每次5分鐘，再以12.5 mL Buffer II (0.1 x SSC, 1% SDS)於45~55°C下洗2次，每次30分鐘，最後以12.5 mL Buffer III (1 x SSC)於室溫下洗2次，每次5分鐘。將洗完之Nylon membrane取出，正面朝上置於塑膠膜中，再以底片(Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA)於-80°C進行放射性顯影，經適當時間後即可洗片顯影、定影之，結果再以影像處理系統(Multimage™ LIGHT Cabinet - Alpha Innotech Corporation)分析定量。

## 十八、統計分析

實驗結果均以平均值  $\pm$  標準偏差(Mean  $\pm$  SD)表示。數據之統計均須確定認為常態分布，否則轉型為對數值(Log)。數據以單向變方分析(one way ANOVA)檢定檢定組間差異之顯著性，再以 Duncan's Multiple Range Test 來檢定各組獨立樣本其組間之差異( $p < 0.05$ )。統計分析係以 SAS 軟體(SAS 8.2, Cary, NC, USA)執行。

## 第四章 結果

## 一、山苦瓜對大鼠攝食及飼料效率之影響

表 4-1 為各組別實驗期間體重增加、飼料攝取量、能量效率及飼料效率。以誘導肥胖之後的體重來作為初始體重，EAE 組顯著高於 LF 組與 BM 組( $p < 0.05$ )，而 BM、TZD、HF 組與 LF 組相較有較高的趨勢，但無統計上的差異。在最終體重上，TZD 組顯著高於 LF 組( $p < 0.05$ )，此結果與 TZD 藥物所造成的肥胖相符合。而 BM、EAE、HF 組與 LF 或與 TZD 組沒有差異。體重之平均日增重，五組之間沒有差異。

油脂含量會影響食物攝取量。每天飼料攝取量，LF 低油組飼料熱量密度較低，因此 LF 組攝食量高於高脂組，除了 TZD 組。而從攝食量看來，山苦瓜並不影響大鼠的食慾，因 BM 與 EAE、HF 組之間並無顯著差異。以熱量攝取來衡量，EAE、TZD、HF 組顯著高於 LF 組( $p < 0.0006$ )，而 TZD 組又顯著高於 HF 組。BM 組與 EAE、HF 和 LF 組沒有差異，而顯著低於 TZD 組( $p < 0.0006$ )。

在飼料效率上，BM、EAE、TZD、HF 組顯著高於 LF 組( $p < 0.0001$ )，而 TZD 組又顯著高於 EAE 組( $p < 0.05$ )，四組高脂飲食的飼料效率高於低脂組是因為其飼料熱量高。在熱量效率上，EAE 和 HF 組顯著低於 TZD 和 LF 組( $p < 0.01$ )，而 BM 組則與其它四組沒有差異。

## 二、山苦瓜對大鼠體重之影響

圖 4-1 為生長曲線圖，從誘導肥胖至分組餵食試驗飲食九週後山苦瓜對大鼠體重變化的影響。在開始給予試驗飲食第 0、1 週及第 3 週直到整個試驗結束，TZD 組體重持續顯著高於 LF 組( $p < 0.008$ )，此與已知 TZD 藥物會造成肥胖副作用相符合。而 BM、EAE 和 HF 組體重與 LF 或 TZD 組沒有差異，除了在第四週時，BM 組曾顯著低於 TZD 組( $p < 0.05$ )。

## 三、山苦瓜對組織的絕對與相對重量之影響

表 4-2 為各組大鼠餵食試驗飲食九週後組織絕對重量表。在不考慮體重變化對組織的影響下，不管是肝臟、腎臟、左小腿腓腸肌、睪丸和腎上腺的組織重量，五組之間都沒有差異。在脂肪塊重量上，腹膜後脂肪塊(RE)與副睪脂肪塊(EP)的重量，五組之間都沒有差異。但在腹股溝脂肪塊(Injuinal fat)重量上，TZD 組顯著高於 LF 組( $p < 0.05$ )。

因為考慮到因為體重的變化，每個組織重量可能也會隨之變化，因此將各組織重量除以體重，而得到相對組織重。表 4-3 為各組大鼠餵食試驗飲食九週後組織相對重量表。同樣的，不管是肝臟、腎臟、左小腿腓腸肌、睪丸和腎上腺的組織重量，五組之間都沒有差異。

在脂肪塊重量上，腹膜後脂肪塊(RE)相對重量，EAE、TZD、HF 組顯著高於 LF 組( $p < 0.05$ )，而 BM 組與 LF 組沒有差異。副睪脂肪塊(EP)相對重量，TZD、HF 組顯著高於 LF 組( $p < 0.05$ )，而 BM 和 EAE 組與 LF 組沒有差異。至於腹股溝脂肪塊(Injuinal fat)相對重量，TZD 組顯著高於 BM、EAE、HF 和 LF 組( $p < 0.05$ )，而 BM、EAE、HF 組與 LF 組沒有差異。

由這些結果得知，除了脂肪重量外，山苦瓜不影響大鼠其它組織重量；另外在脂肪塊重量上看到，TZD 組因其肥胖的副作用，而使其有較重的脂肪組織。

#### 四、山苦瓜對腹部體脂堆積之影響

圖 4-2 為餵食試驗飲食九週後腹部脂肪堆積量，腹部體脂堆積以三種脂肪塊包括腹膜後脂肪塊(RE)、副睪脂肪塊(EP)和腹股溝脂肪塊(Injuinal fat)總和代表。EAE、TZD 和 HF 組腹部體脂堆積顯著高於 LF 組( $p < 0.006$ )，而 BM 組則與 LF 組沒有差異，此結果顯示山苦瓜凍乾粉可改善高脂飲食所導致的腹部體脂堆積，而乙酸乙酯萃物沒有如同山苦瓜凍乾粉之功效。

#### 五、山苦瓜對脂肪細胞大小之影響

表 4-4 及 4-5 分別為各組大鼠餵食試驗飲食九週後，腹膜後脂肪(RE)與副睪脂肪(EP)的脂肪細胞直徑。因為山苦瓜可降低腹部體脂堆積，因此觀察山苦瓜對分離自腹部脂肪的脂肪細胞大小之影響。首先在腹膜後脂肪(RE)的脂肪細胞直徑，BM、TZD、HF 組與 LF 組的細胞直徑中位數沒有差異，EAE 組的細胞直徑中位數顯著高於 BM 和 LF 組( $p < 0.05$ )。接著，將細胞直徑由小到大做四個區分，為 20~100  $\mu\text{m}$ 、100~180  $\mu\text{m}$ 、180~260  $\mu\text{m}$  以及 > 260  $\mu\text{m}$ ，發現 BM 組與 HF 組相較下，有較多小直徑的脂肪細胞分佈百分比，有較少大直徑的脂肪細胞分佈百分比。

在副睪脂肪(EP)的脂肪細胞直徑，五組之間其細胞直徑中位數沒有差異。同樣也發現 BM 組與 HF 組相較下，有較多小直徑的脂肪細胞分佈百分比，有較少大直徑的脂肪細胞分佈百分比。

這些結果表示了山苦瓜凍乾粉可有效抑制高脂飲食所誘導的脂肪細胞肥大，而乙酸乙酯萃物同樣沒有如同山苦瓜凍乾粉之功效。

## 六、山苦瓜對脂肪細胞中三酸甘油酯與 DNA 含量之影響

表 4 - 6 及 4 - 7 分別為各組大鼠餵食試驗飲食九週後，腹膜後脂肪(RE)與副睪脂肪(EP)所含三酸甘油酯及 DNA 含量，並計算每毫克 DNA 中所含三酸甘油酯，以間接評估平均細胞內三酸甘油酯含量。因為發現山苦瓜可抑制脂肪細胞肥大，因此測量脂肪細胞中三酸甘油酯含量是否也減少。在腹膜後脂肪(RE)中，五組之間每克組織三酸甘油酯含量沒有差異。每塊組織三酸甘油酯含量，EAE 組顯著高於 BM 與 LF 組( $p < 0.02$ )。BM 和 HF 組與 LF 組沒有差異，但是 BM 組脂肪組織中三酸甘油酯堆積有減少的傾向。五組的每克組織 DNA 含量與每塊組織 DNA 含量都沒有差異。因為細胞數目與 DNA 含量成正比，此表示山苦瓜不影響脂肪細胞的數目。而五組的每毫克 DNA 中所含三酸甘油酯沒有差異。

在副睪脂肪(EP)中也有類似的結果，五組之間每克組織三酸甘油酯含量沒有差異，每塊組織三酸甘油酯含量，EAE、HF 和 TZD 組顯著高於 LF 組( $p < 0.03$ )，BM 與其它四組沒有差異，但是與其它高脂組相較，BM 組脂肪組織中三酸甘油酯堆積有減少的傾向。每克組織 DNA 含量與每塊組織 DNA 含量，BM 組顯著高於 LF 組( $p < 0.03$ )，表示 BM 組之副睪脂肪(EP)有較多脂肪細胞數，EAE、TZD 和 HF 組則與 BM 或 LF 組沒有差異，五組的每毫克 DNA 中所含三酸甘油酯沒有差異，但 BM 組有較小的趨勢。

## 七、山苦瓜對脂肪組織脂質生合成酵素活性之影響

圖 4 - 3 及 4 - 4 分別為各組大鼠餵食試驗飲食九週後，腹膜後脂肪(RE)與副睪脂肪(EP)脂質生合成酵素 Glycerol - 3 - phosphate dehydrogenase (G3PDH)與 Lipoprotein lipase (LPL)活性。因為觀察到山苦瓜可使腹部體脂堆積減少，脂肪細胞減小以及脂肪細胞中三酸甘油酯有減少的傾向，所以觀察山苦瓜是否影響脂質生合成相關酵素。G3PDH 是脂肪組織中三酸甘油酯合成的酵素，在圖 4-3 可見 G3PDH 活性在兩種脂肪組織(RE 和 EP)中活性差不多，五組腹膜後脂肪(RE)中的 G3PDH 活性沒有差異，但在副睪脂肪(EP)，BM 和 LF 組顯著低於 TZD 組( $p < 0.05$ )，EAE 和 HF 組與其它組沒有差異，推測山苦瓜可能抑制 G3PDH 活性而使三酸甘油酯合成減少。

另一個脂質生合成酵素為 LPL，其為細胞外酵素可將脂蛋白中的三酸甘油酯水解，運送到脂肪組織中合成三酸甘油酯。在圖 4 - 3 顯示 LPL 活性在腹膜後脂肪(RE)大於副睪脂肪(EP)，五組副睪脂肪(EP)中的 LPL 活性沒有差異，但在腹膜後脂肪(RE)，BM 和 TZD 組顯著高於 EAE、HF 和 LF 組( $p < 0.05$ )。雖然山苦瓜的抑制脂肪細胞三酸甘油酯堆積無法以 LPL 活性解釋，但此作用是否加速血脂質三酸甘油酯清除，值得探討。

## 八、山苦瓜對脂肪組織脂解速率之影響

圖 4 - 5 及 4 - 6 分別為各組大鼠餵食試驗飲食九週後，腹膜後脂肪(RE)與副睪脂肪(EP)的刺激與基礎脂解速率。脂肪細胞內三酸甘油酯堆積決定於脂質生合成與脂解速率間之平衡，Hormone sensitive lipase (HSL)是脂肪細胞內水解三酸甘油酯的酵素，其會受到腎上腺素的刺激，在此我們以 Isopreterenol 刺激脂肪細胞脂解。如圖所示，刺激後甘油釋出速率稍增加，結果顯示不管是在腹膜後脂肪(RE)還是副睪脂肪(EP)中，TZD 組的刺激與基礎脂解速率顯著高於 LF 組( $p < 0.05$ )，BM、EAE 和 HF 組與 TZD 或 LF 組沒有差異。本實驗不能證明山苦瓜經由增加脂肪組織脂解達到降體脂功能。



## 九、山苦瓜對脂肪細胞分化指標 mRNA 之影響

為了解山苦瓜是否會影響脂肪細胞分化指標基因表現如：PPAR $\gamma$ 、LPL 和 ADD1 / SREBP1c，以及脂肪細胞激素基因表現如：Adiponectin 和 Leptin，以北方轉漬法定量 mRNA 量。圖 4 - 7 ~ 4 - 16 為各組大鼠餵食試驗飲食九週後，腹膜後脂肪(RE) 與副睪脂肪(EP)中基因表現。結果發現不管是在腹膜後脂肪(RE)或副睪脂肪(EP)，PPAR $\gamma$ 、Adiponectin、Leptin、LPL 和 ADD1 / SREBP1c mRNA 表現五組間都沒有差異。除了在副睪脂肪(EP)中 ADD1 / SREBP1c mRNA 表現，BM 和 LF 組顯著低於 TZD 組( $p < 0.05$ )。

## 十、山苦瓜對禁食血糖與胰島素之影響

為了解山苦瓜對大鼠胰島素敏感性之影響，五組大鼠餵食試驗飲食第 0、3、6 及 9 週，以 OGTT 測試葡萄糖耐受性，可惜曲線下血糖面積(AUC<sub>GLU</sub>)五組間並無顯著差異(結果未示)。圖 4 - 17 為各組大鼠餵食試驗飲食期間，禁食全血葡萄糖變化。結果不管是第 0、3、6 及 9 週，五組的禁食全血葡萄糖含量都沒有差異。

圖 4 - 18 為各組大鼠餵食試驗飲食期間，禁食血清胰島素變化。在第 3 週時，EAE 和 HF 組顯著高於 LF 組( $p < 0.05$ )，BM 和 TZD 組與 LF 組沒有差異。在第 0、6 及 9 週，五組的禁食血清胰島素含量都沒有差異，但 HF 組有較高的趨勢。結果表示 BM 和 TZD 組可避免在高脂飲食下誘發的高胰島素血症，而 EAE 組並未顯示功效。

## 十一、山苦瓜對血清 Adiponectin 之影響

圖 4 - 19 為各組大鼠餵食試驗飲食九週後，血清 Adiponectin 濃度。脂肪組織可分泌荷爾蒙稱之為脂肪細胞激素(Adipocytokines)，Adiponectin 為其中一種，與胰島素敏感性有關。在圖 4 - 19，TZD 組血清 Adiponectin 濃度顯著高於 LF 組( $p < 0.05$ )，表示 TZD 組有較好的胰島素敏感性與已知 TZD 促進 Adiponectin 分泌改善胰島素敏感性相符。BM、EAE 和 HF 組與 LF 組或與 TZD 組都沒有差異。

## 十二、山苦瓜對血脂質之影響

表 4 - 8 為各組大鼠餵食試驗飲食九週後禁食血脂質，包括了三酸甘油酯、膽固醇和游離脂肪酸。其結果不管是血清三酸甘油酯濃度、血清膽固醇濃度和血清游離脂肪酸濃度，五組之間都沒有差異。因此，在此模式下山苦瓜不影響血脂質含量。



表 4 - 1 Wistar 大鼠餵食試驗飲食九週之初始體重、最終體重、攝食量、能量攝取、飼料效率及能量效率  
1, 2

Table 4 - 1 Initial body weight, final body weight, food intake, energy intake, feed efficiency and energy efficiency of rats fed with experimental diets for 9 weeks <sup>1, 2</sup>

	Initial body weight	Final body weight	Body weight gain	Food intake	Energy intake	Feed efficiency	Energy efficiency
	(g)	(g)	(g / d)	(g / d)	(kcal / d)	(g gain / g feed)	(g gain / kcal feed)
BM (n = 9)	280 ± 26 <sup>b</sup>	485 ± 48 <sup>ab</sup>	3.27 ± 0.47	19.6 ± 2.1 <sup>b</sup>	96.1 ± 10.1 <sup>bc</sup>	0.17 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.034 ± 0.002 <sup>ab</sup>
EAE (n = 7)	312 ± 28 <sup>a</sup>	520 ± 58 <sup>ab</sup>	3.30 ± 0.58	20.5 ± 2.3 <sup>ab</sup>	102.8 ± 11.5 <sup>ab</sup>	0.16 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.032 ± 0.003 <sup>b</sup>
TZD (n = 8)	293 ± 33 <sup>ab</sup>	539 ± 66 <sup>a</sup>	3.91 ± 0.62	22.0 ± 2.0 <sup>a</sup>	110.7 ± 10.1 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.035 ± 0.004 <sup>a</sup>
HF (n = 7)	295 ± 25 <sup>ab</sup>	497 ± 38 <sup>ab</sup>	3.21 ± 0.33	19.7 ± 1.3 <sup>b</sup>	98.7 ± 6.5 <sup>b</sup>	0.16 ± 0.14 <sup>ab</sup>	0.032 ± 0.002 <sup>b</sup>
LF(n = 6)	274 ± 17 <sup>b</sup>	469 ± 32 <sup>b</sup>	3.09 ± 0.34	22.5 ± 1.3 <sup>a</sup>	86.6 ± 5.0 <sup>c</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.036 ± 0.003 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Values are means ± S.D..

<sup>2</sup> The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

表 4 - 2 Wistar 大鼠餵食試驗飲食九週之絕對組織重<sup>1,2</sup>Table 4 - 2 Tissue weights of rats fed experimental diets for 9 wks<sup>1,2</sup>

	Liver	Kidney	Retroperitoneal fat (RE)	Epididymal fat (EP)	Injuinal fat	Gastrocnemius	Testis	Adrenal
	(g)							
BM (n = 9)	12.89 ± 1.46	2.95 ± 0.28	15.39 ± 3.88	11.73 ± 2.88	1.27 ± 0.41 <sup>ab</sup>	2.63 ± 0.23	3.50 ± 0.52	0.09 ± 0.03
EAE (n = 7)	14.40 ± 2.55	3.14 ± 0.51	18.95 ± 5.98	13.75 ± 4.08	1.33 ± 0.32 <sup>ab</sup>	2.90 ± 0.27	3.70 ± 0.71	0.08 ± 0.03
TZD (n = 8)	12.87 ± 1.89	3.11 ± 0.31	18.43 ± 5.44	15.09 ± 4.14	1.95 ± 0.64 <sup>a</sup>	2.94 ± 0.30	3.90 ± 0.76	0.08 ± 0.02
HF (n = 7)	13.66 ± 1.89	2.99 ± 0.30	16.35 ± 4.55	12.86 ± 3.75	1.31 ± 0.47 <sup>ab</sup>	2.85 ± 0.37	3.73 ± 0.86	0.08 ± 0.03
LF (n = 6)	12.11 ± 2.36	2.99 ± 0.21	11.59 ± 3.45	9.29 ± 3.24	0.94 ± 0.28 <sup>b</sup>	2.83 ± 0.27	3.81 ± 0.46	0.08 ± 0.20

<sup>1</sup> Values are means ± S.D..

<sup>2</sup> The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

表 4 - 3 Wistar 大鼠餵食試驗飲食九週之相對組織重<sup>1,2</sup>Table 4 - 3 Relative tissue weights of rats fed experimental diets for 9 wks<sup>1,2</sup>

	Liver	Kidney	Retroperitoneal fat (RE)	Epididymal fat (EP)	Injuinal fat	Gastrocnemius	Testis	Adrenal
	(%)							
BM (n = 9)	2.74 ± 0.32	0.62 ± 0.04	3.22 ± 0.59 <sup>ab</sup>	2.46 ± 0.41 <sup>ab</sup>	0.26 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.56 ± 0.03	0.74 ± 0.09	0.02 ± 0.01
EAE (n = 7)	2.78 ± 0.20	0.66 ± 0.1	3.63 ± 0.79 <sup>a</sup>	2.64 ± 0.58 <sup>ab</sup>	0.26 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.57 ± 0.06	0.73 ± 0.13	0.01 ± 0.00
TZD (n = 8)	2.46 ± 0.29	0.60 ± 0.05	3.45 ± 0.64 <sup>a</sup>	2.83 ± 0.45 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.05	0.74 ± 0.12	0.02 ± 0.00
HF (n = 7)	2.88 ± 0.46	0.63 ± 0.10	3.41 ± 0.76 <sup>a</sup>	2.69 ± 0.70 <sup>a</sup>	0.27 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.60 ± 0.09	0.79 ± 0.21	0.02 ± 0.00
LF (n = 6)	2.69 ± 0.33	0.67 ± 0.05	2.57 ± 0.61 <sup>b</sup>	2.05 ± 0.55 <sup>b</sup>	0.21 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.63 ± 0.08	0.85 ± 0.08	0.02 ± 0.01

<sup>1</sup> Values are means ± S.D..

<sup>2</sup> The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

表 4 - 4 Wistar 大鼠餵食試驗飲食九週之腹膜後脂肪(RE)的脂肪細胞直徑<sup>1,2</sup>

Table 4 - 4 The diameter of adipocytes in retroperitoneal fat of rats fed with experimental diets for 9 weeks<sup>1,2</sup>

	BM	EAE	TZD	HF	LF
Medium ( $\mu\text{m}$ )	$135 \pm 23^b$	$158 \pm 15^a$	$145 \pm 11^{ab}$	$147 \pm 16^{ab}$	$137 \pm 13^b$
	Cell number (%)				
20 ~ 100 $\mu\text{m}$	$22.7 \pm 16.4^a$	$6.7 \pm 6.7^b$	$8.5 \pm 5.3^b$	$13.6 \pm 3.5^{ab}$	$15.6 \pm 8.8^{ab}$
100 ~ 180 $\mu\text{m}$	$66.4 \pm 12.0^{ab}$	$66.6 \pm 6.6^{ab}$	$79.7 \pm 5.7^a$	$68.5 \pm 14.4^b$	$70.9 \pm 7.1^{ab}$
180 ~ 260 $\mu\text{m}$	$10.9 \pm 10.3^b$	$25.7 \pm 11.4^a$	$11.9 \pm 7.7^b$	$17.0 \pm 14.9^{ab}$	$13.5 \pm 4.8^b$
$\geq 260 \mu\text{m}$	0.0	$1.0 \pm 1.6$	$1.0 \pm 1.6$	$1.0 \pm 1.3$	0.0

<sup>1</sup> Values are means  $\pm$  S.D..

<sup>2</sup> The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

表 4 - 5 Wistar 大鼠餵食試驗飲食九週之副睪脂肪(EP)的脂肪細胞直徑<sup>1,2</sup>

Table 4 - 5 The diameter of adipocytes in epididymal fat of rats fed with experimental diets for 9 weeks<sup>1,2</sup>

	BM	EAE	TZD	HF	LF
Medium ( $\mu\text{m}$ )	133 $\pm$ 9	150 $\pm$ 14	142 $\pm$ 18	145 $\pm$ 16	137 $\pm$ 15
	Cell number (%)				
20 ~ 100 $\mu\text{m}$	7.8 $\pm$ 6.2	3.1 $\pm$ 1.7	8.4 $\pm$ 10.4	6.2 $\pm$ 2.3	10.0 $\pm$ 10.9
100 ~ 180 $\mu\text{m}$	89.0 $\pm$ 6.7 <sup>a</sup>	76.5 $\pm$ 12.9 <sup>ab</sup>	77.8 $\pm$ 9.9 <sup>b</sup>	81.1 $\pm$ 10.9 <sup>ab</sup>	84.6 $\pm$ 8.3 <sup>ab</sup>
180 ~ 260 $\mu\text{m}$	4.3 $\pm$ 2.6	15.0 $\pm$ 11.0	13.4 $\pm$ 12.8	12.3 $\pm$ 12.4	5.3 $\pm$ 4.4
$\geq$ 260 $\mu\text{m}$	0.0	0.1 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.9	0.4 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	0.0

<sup>1</sup> Values are means  $\pm$  S.D..

<sup>2</sup> The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

表 4 - 6 Wistar 大鼠餵食試驗飲食九週之腹膜後脂肪(RE)所含三酸甘油酯、DNA 與每毫克 DNA 中所含三酸甘油酯含量<sup>1,2</sup>

Table 4 - 6 Triglycerides, DNA and triglycerides / DNA content in retroperitoneal fat pads of rats fed with experimental diets for 9 weeks<sup>1,2</sup>

	Triglycerides		DNA		Triglycerides / DNA
	(mmol / g)	(mmol / Tissue)	(mg / g)	(mg / Tissue)	(mmol / mg)
BM (n = 9)	0.35 ± 0.12	5.29 ± 1.76 <sup>bc</sup>	0.12 ± 0.01	1.76 ± 0.41	3.04 ± 0.93
EAE (n = 7)	0.43 ± 0.06	8.39 ± 3.52 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.02	2.22 ± 0.91	3.81 ± 0.64
TZD (n = 8)	0.41 ± 0.03	7.58 ± 2.18 <sup>ab</sup>	0.14 ± 0.06	2.45 ± 0.62	3.22 ± 1.04
HF (n = 7)	0.38 ± 0.08	6.06 ± 1.26 <sup>abc</sup>	0.14 ± 0.03	2.26 ± 0.39	2.69 ± 0.42
LF(n = 6)	0.38 ± 0.10	4.48 ± 2.19 <sup>c</sup>	0.16 ± 0.05	1.92 ± 0.99	2.72 ± 1.60

<sup>1</sup> Values are means ± S.D..

<sup>2</sup> The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .



表 4 - 7 Wistar 大鼠餵食試驗飲食九週之副睪脂肪(EP)所含三酸甘油酯、DNA 與每毫克 DNA 中所含三酸甘油酯含量<sup>1,2</sup>Table 4 - 7 Triglycerides, DNA and triglycerides / DNA content in epididymal fat pads of rats fed with experimental diets for 9 weeks<sup>1,2</sup>

	Triglycerides		DNA		Triglycerides / DNA
	(mmol / g)	(mmol / Tissue)	(mg / g)	(mg / Tissue)	(mmol / mg)
BM (n = 9)	0.33 ± 0.06	3.74 ± 0.07 <sup>ab</sup>	0.21 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.47 ± 0.76 <sup>a</sup>	1.64 ± 0.51
EAE (n = 7)	0.32 ± 0.05	4.37 ± 1.64 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.08 <sup>ab</sup>	2.05 ± 1.45 <sup>ab</sup>	2.56 ± 1.27
TZD (n = 8)	0.30 ± 0.05	4.52 ± 1.28 <sup>a</sup>	0.16 ± 0.05 <sup>ab</sup>	2.43 ± 0.87 <sup>ab</sup>	1.99 ± 0.52
HF (n = 7)	0.37 ± 0.05	4.50 ± 1.50 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.06 <sup>ab</sup>	2.03 ± 1.09 <sup>ab</sup>	2.32 ± 0.65
LF(n = 6)	0.30 ± 0.11	2.72 ± 1.10 <sup>b</sup>	0.11 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.98 ± 0.10 <sup>b</sup>	2.67 ± 1.60

<sup>1</sup> Values are means ± S.D..

<sup>2</sup> The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

表 4 - 8 Wistar 大鼠餵食試驗飲食九週之禁食血脂質<sup>1,2,3</sup>Table 4 - 8 Fasting serum lipids of rats fed with experimental diets for 9 weeks<sup>1,2,3</sup>

	Triglycerides	Cholesterol	NEFA
	(mmol / L)	(mmol / L)	(mmol / L)
BM (n = 9)	1.10 ± 0.27	1.25 ± 0.38	0.66 ± 0.09
EAE (n = 7)	0.80 ± 0.11	1.49 ± 0.42	0.64 ± 0.32
TZD (n = 8)	0.91 ± 0.31	1.14 ± 0.21	0.70 ± 0.28
HF (n = 7)	1.19 ± 0.49	1.38 ± 0.43	0.62 ± 0.15
LF(n = 6)	0.99 ± 0.27	1.45 ± 0.19	0.60 ± 0.11

<sup>1</sup> Values are means ± S.D..

<sup>2</sup> The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

<sup>3</sup> NEFA: Non esterified fatty acid.

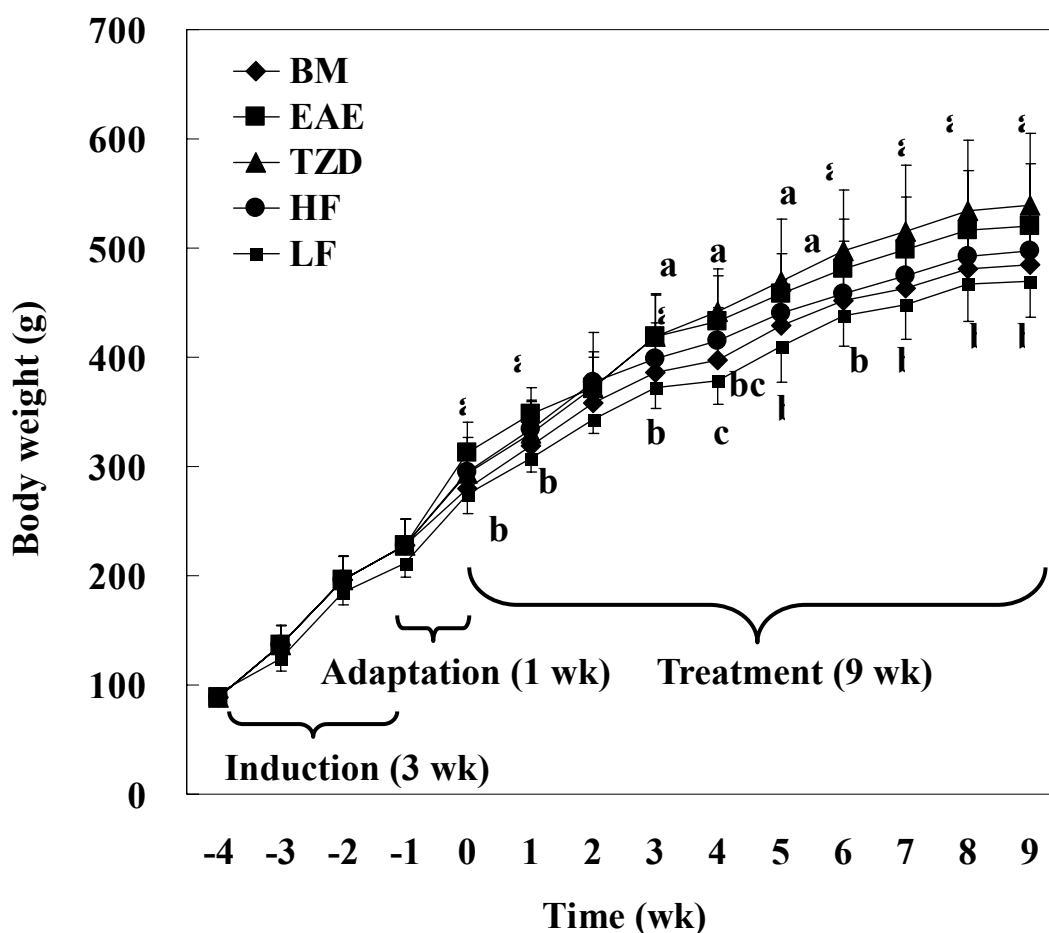


圖 4 - 1 Wistar 大鼠餵食試驗飲食期間之生長曲線

Fig. 4 - 1 The growth curve of rats fed with experimental diets during the whole experimental period. Values are means  $\pm$  S.D. ( $n = 6 \sim 9$ ). The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

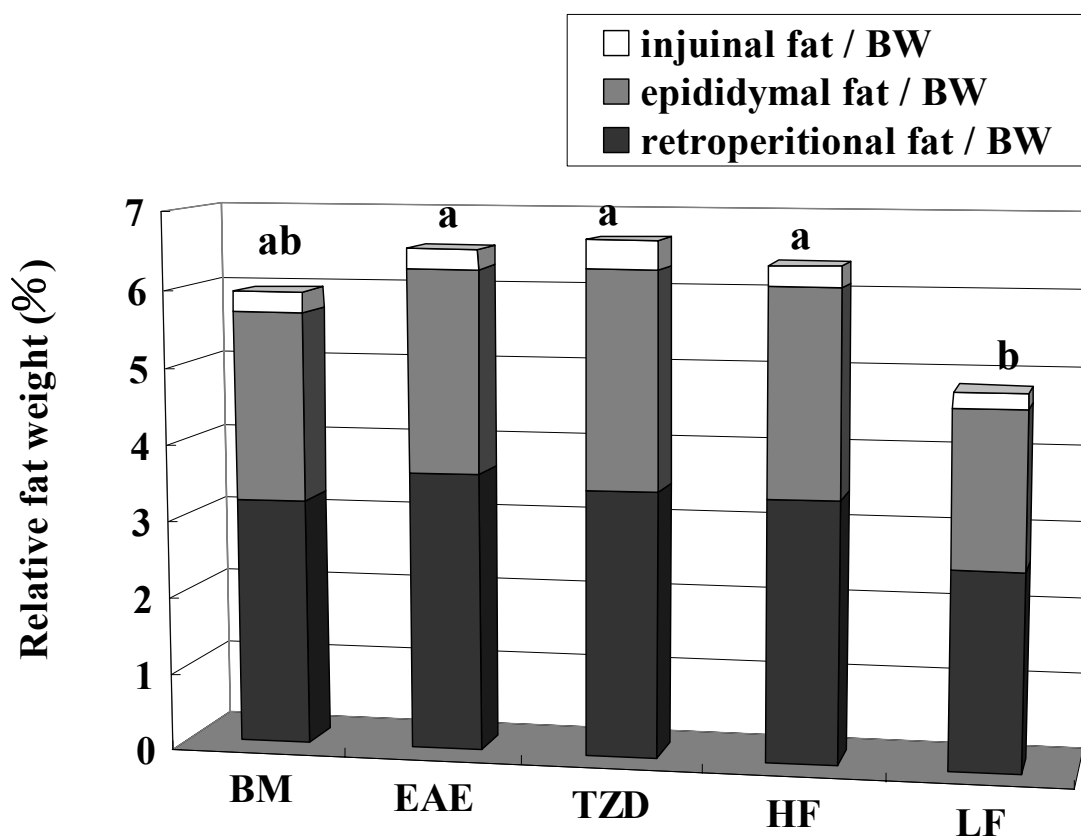


圖 4 - 2 Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週之腹部脂肪塊堆積重量

Fig. 4 - 2 The accumulated weight of abdominal fat pads of rats fed with experimental diets for 9 weeks. Values are means  $\pm$  S.D. ( $n = 6 \sim 9$ ). The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

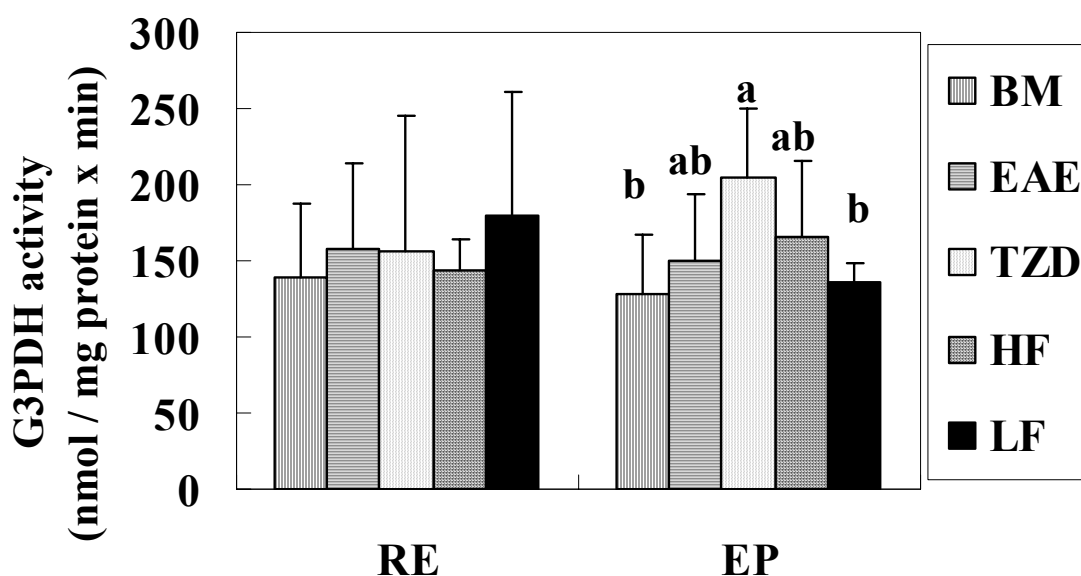


圖 4-3 Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週之腹膜後脂肪(RE)與副睪脂肪 (EP) G3PDH 酵素活性

Fig. 4 - 3 The glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) activity in retroperitoneal (RE) and epididymal (EP) fat pads of rats fed with experimental diets for 9 weeks. Values are means  $\pm$  S.D. ( $n = 6 \sim 9$ ). The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

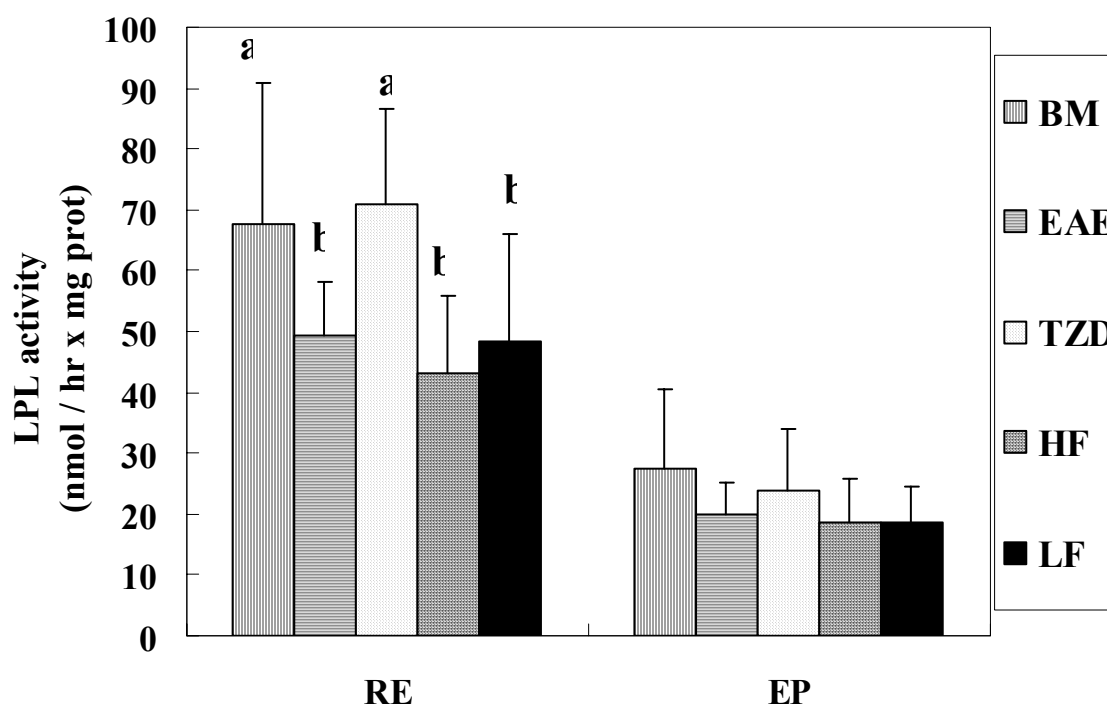


圖 4 - 4 Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週之腹膜後脂肪(RE)與副睪脂肪 (EP) LPL 酵素活性

Fig. 4 - 4 The lipoprotein lipase (LPL) activity in retroperitoneal (RE) and epididymal (EP) fat pads of rats fed with experimental diets for 9 weeks. Values are means  $\pm$  S.D. (n = 6 ~ 9). The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

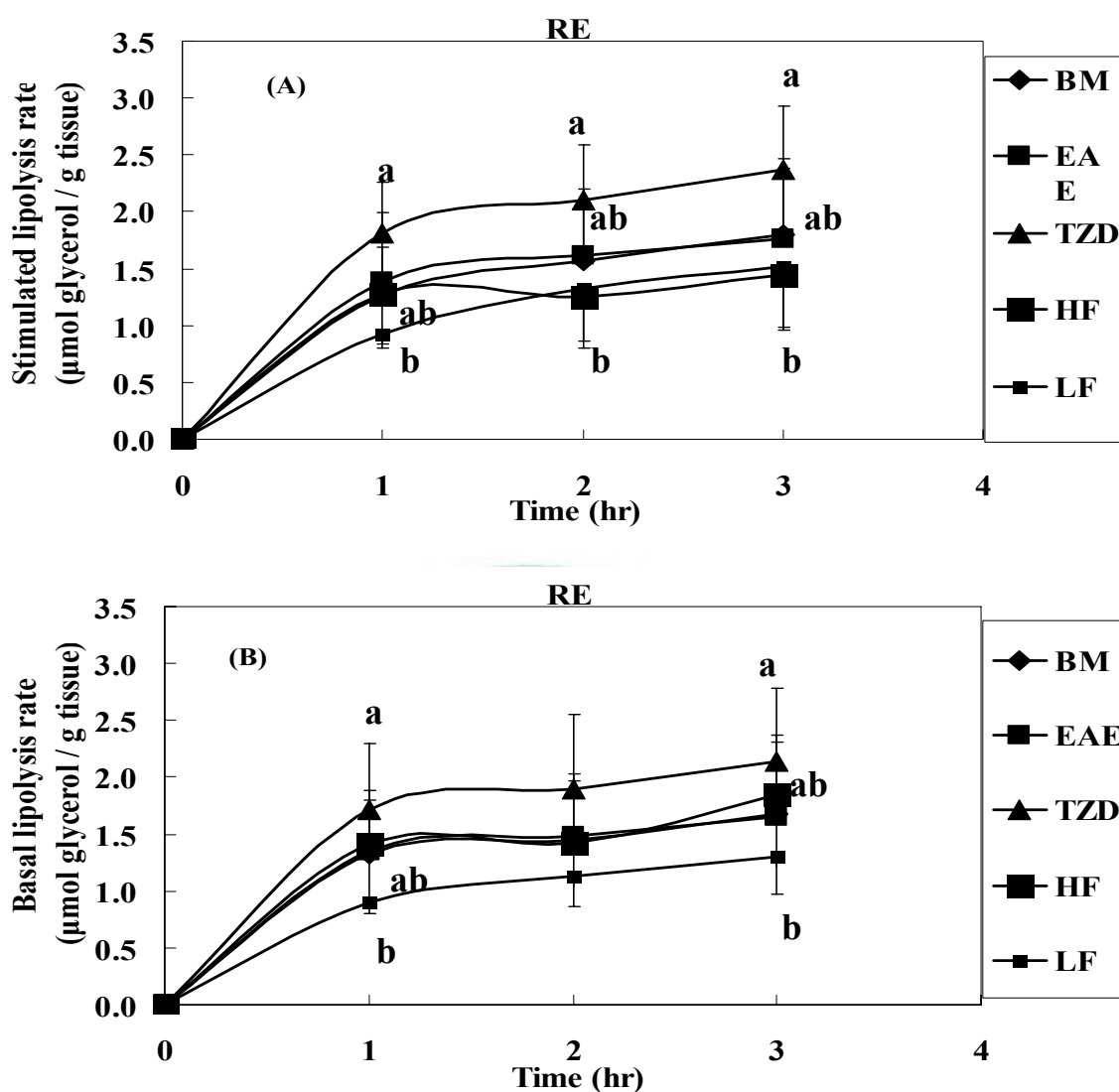


圖 4 - 5 Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週之腹膜後脂肪(RE)刺激與基礎脂解速率

Fig. 4 - 5 The stimulated (A) and basal (B) lipolysis rate of retroperitoneal fat pads of rats fed with experimental diets for 9 weeks. Values are means  $\pm$  S.D. ( $n = 6 \sim 9$ ). The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

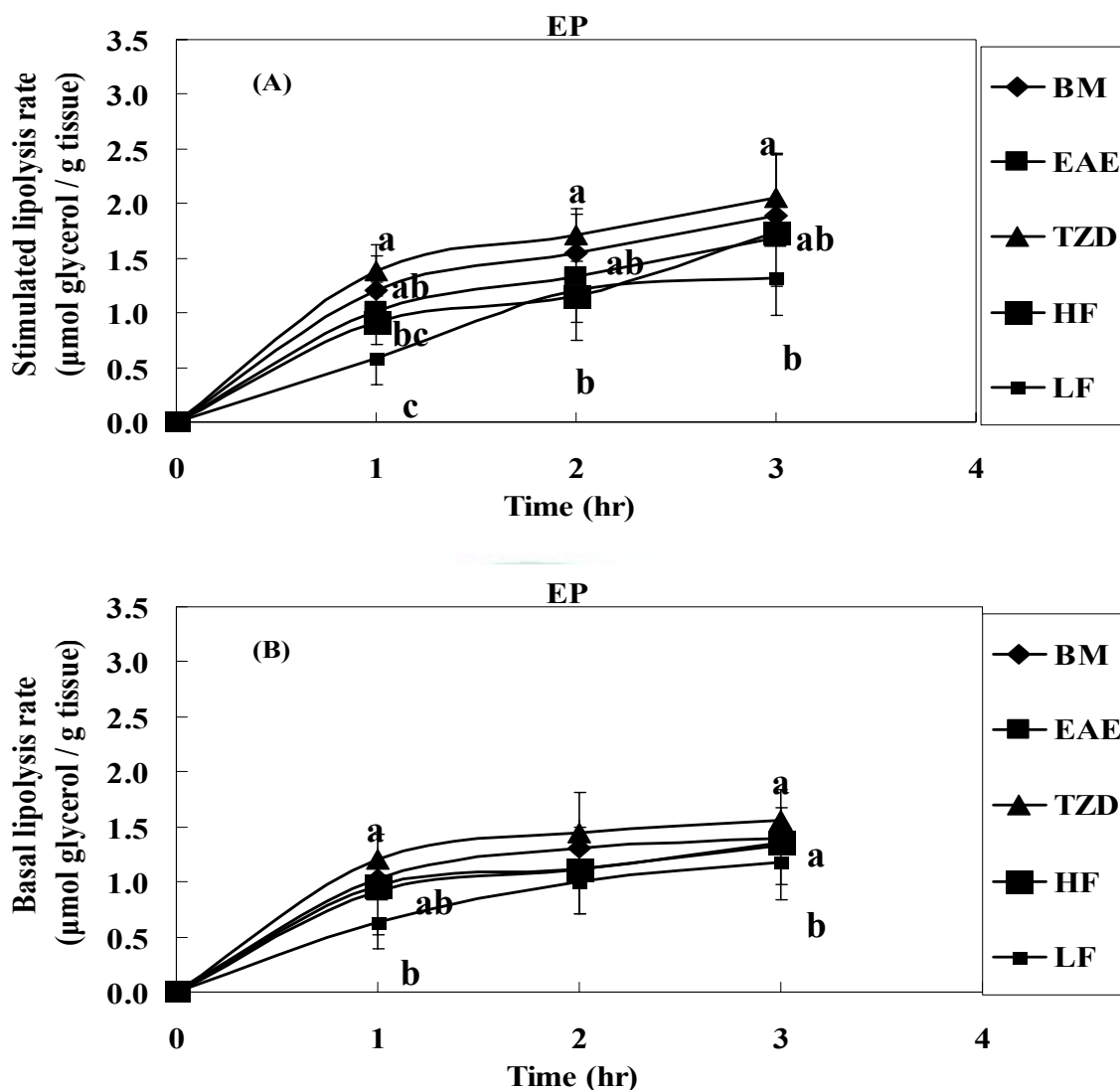


圖 4 - 6 Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週之副睪脂肪(EP)刺激與基礎脂解速率

Fig. 4 - 6 The stimulated (A) and basal (B) lipolysis rate of epididymal fat pads of rats fed with experimental diets for 9 weeks. Values are means  $\pm$  S.D. ( $n = 6 \sim 9$ ). The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .



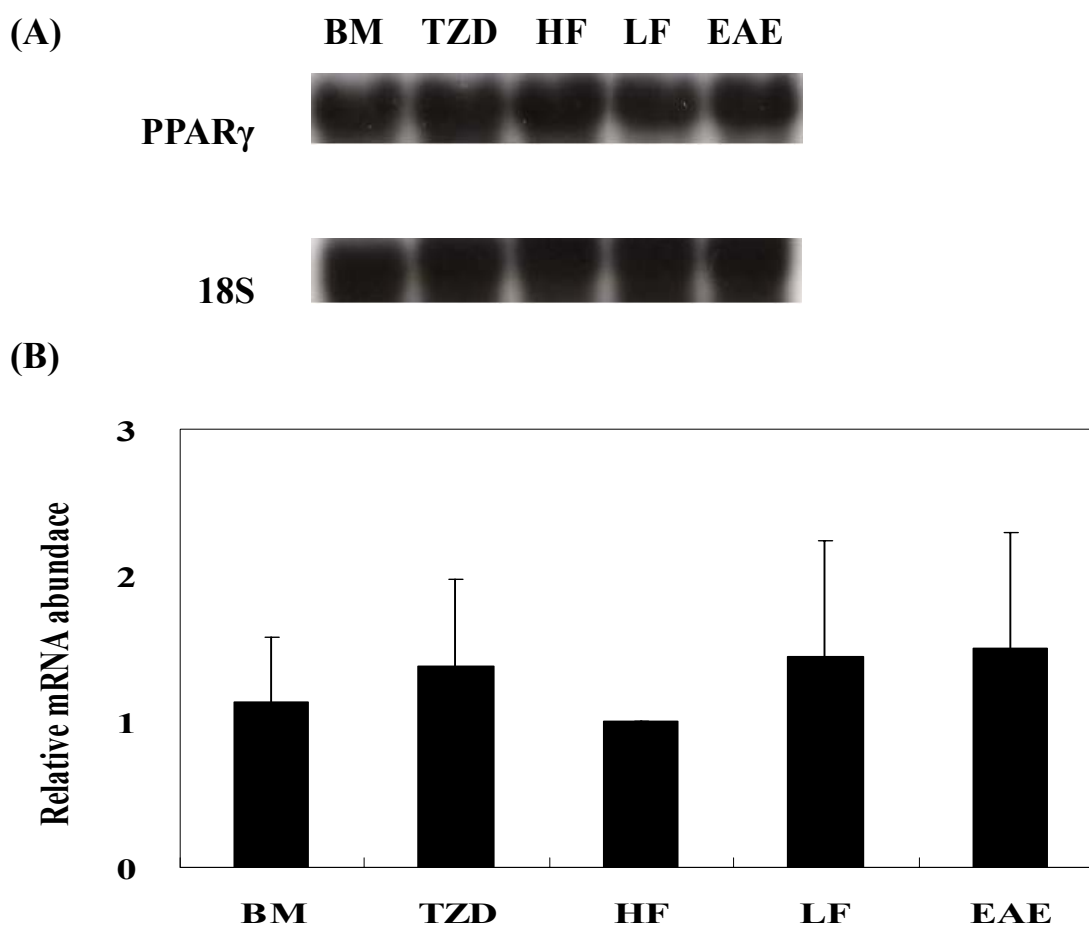


圖 4 - 7 Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週以北方點墨法偵測腹膜後脂肪 (RE) PPAR $\gamma$  mRNA 相對量

Fig. 4 - 7 Northern blot analysis (A) for mRNA of PPAR $\gamma$  in retroperitoneal (RE) fat pads of rats fed with experimental diets for 9 weeks. Signals were quantitated by image analysis. (B) Each value was normalized by 18S. The fold induction was calculated by taking the normalized value of HF group as 1. Values are means  $\pm$  S.D. (n = 6 ~ 9). The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

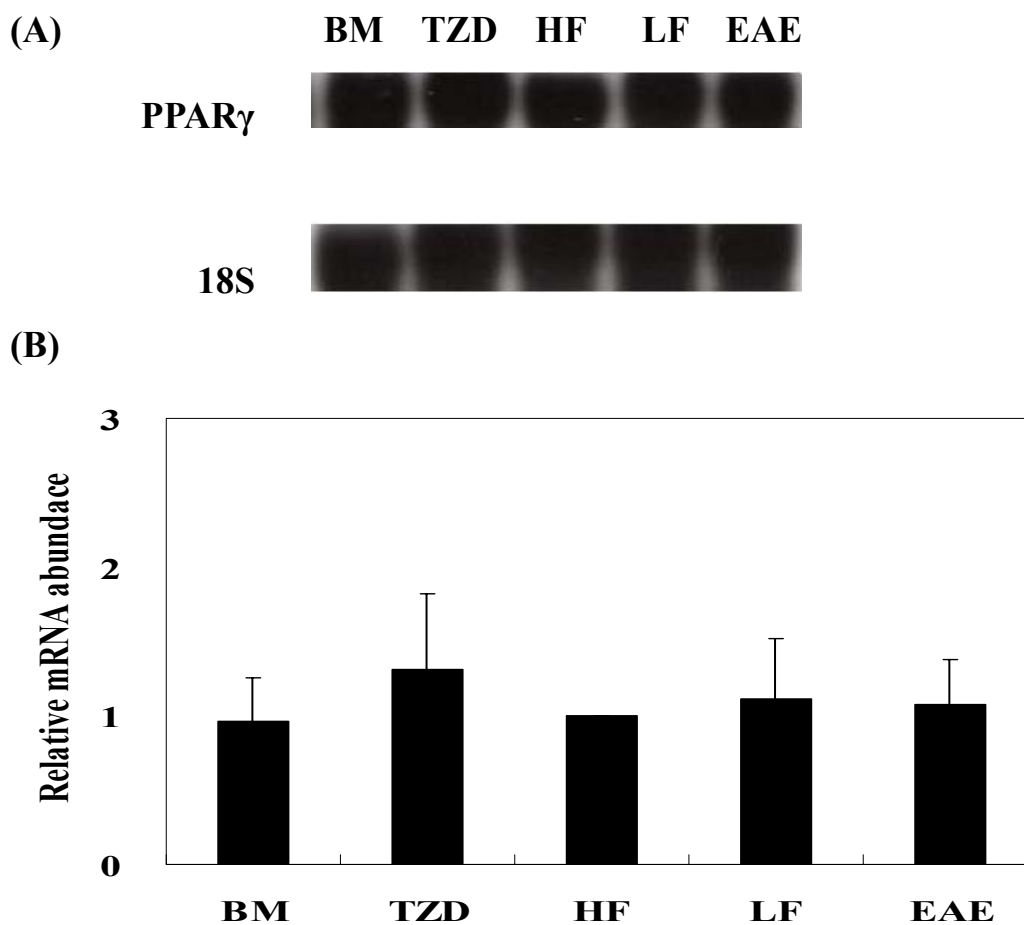


圖 4 - 8 Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週以北方點墨法偵測副睪脂肪(EP) PPAR $\gamma$  mRNA 相對量

Fig. 4 - 8 Northern blot analysis (A) for mRNA of PPAR $\gamma$  in epididymal (EP) fat pads of rats fed with experimental diets for 9 weeks. Signals were quantitated by image analysis. (B) Each value was normalized by 18S. The fold induction was calculated by taking the normalized value of HF group as 1. Values are means  $\pm$  S.D. (n = 6 ~ 9). The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

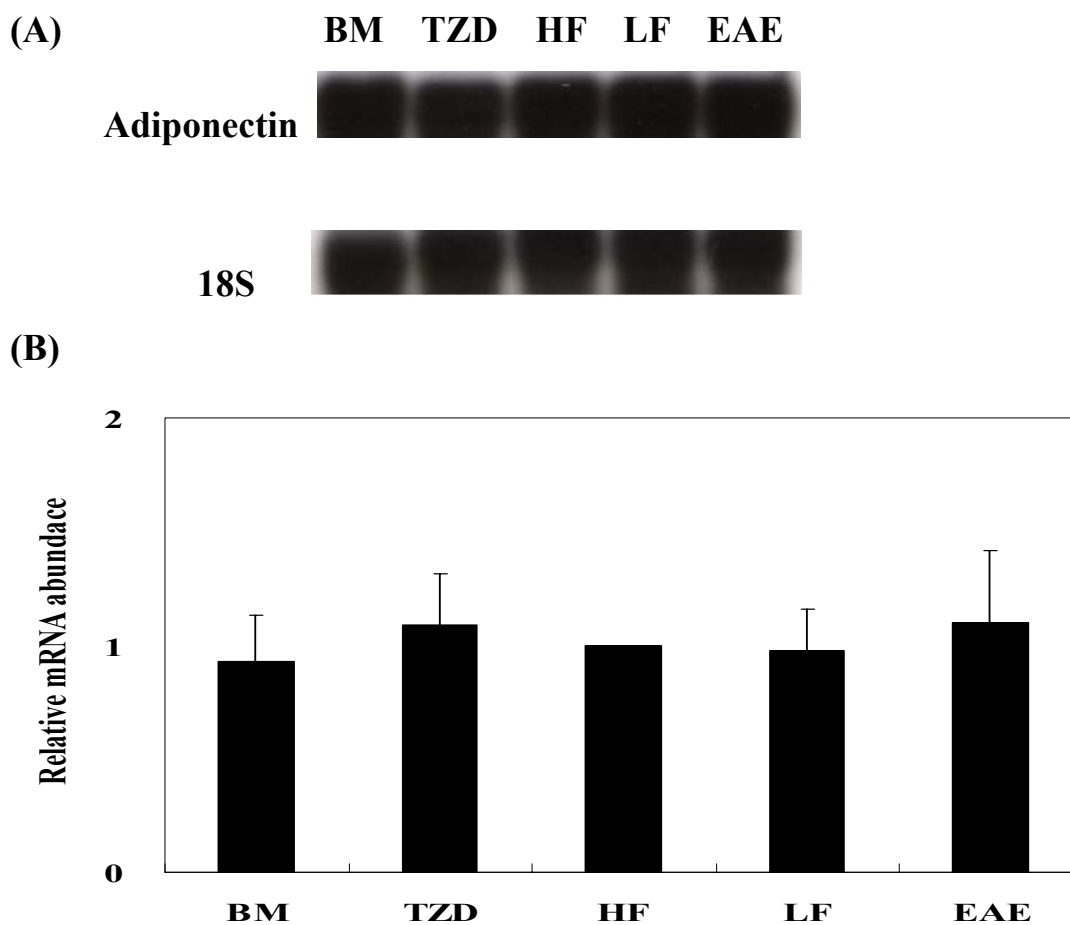


圖 4 - 9 Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週以北方點墨法偵測腹膜後脂肪 (RE) Adiponectin mRNA 相對量

Fig. 4 - 9 Northern blot analysis (A) for mRNA of adiponectin in retroperitoneal (RE) fat pads of rats fed with experimental diets for 9 weeks. Signals were quantitated by image analysis. (B) Each value was normalized by 18S. The fold induction was calculated by taking the normalized value of HF group as 1. Values are means  $\pm$  S.D. ( $n = 6 \sim 9$ ). The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

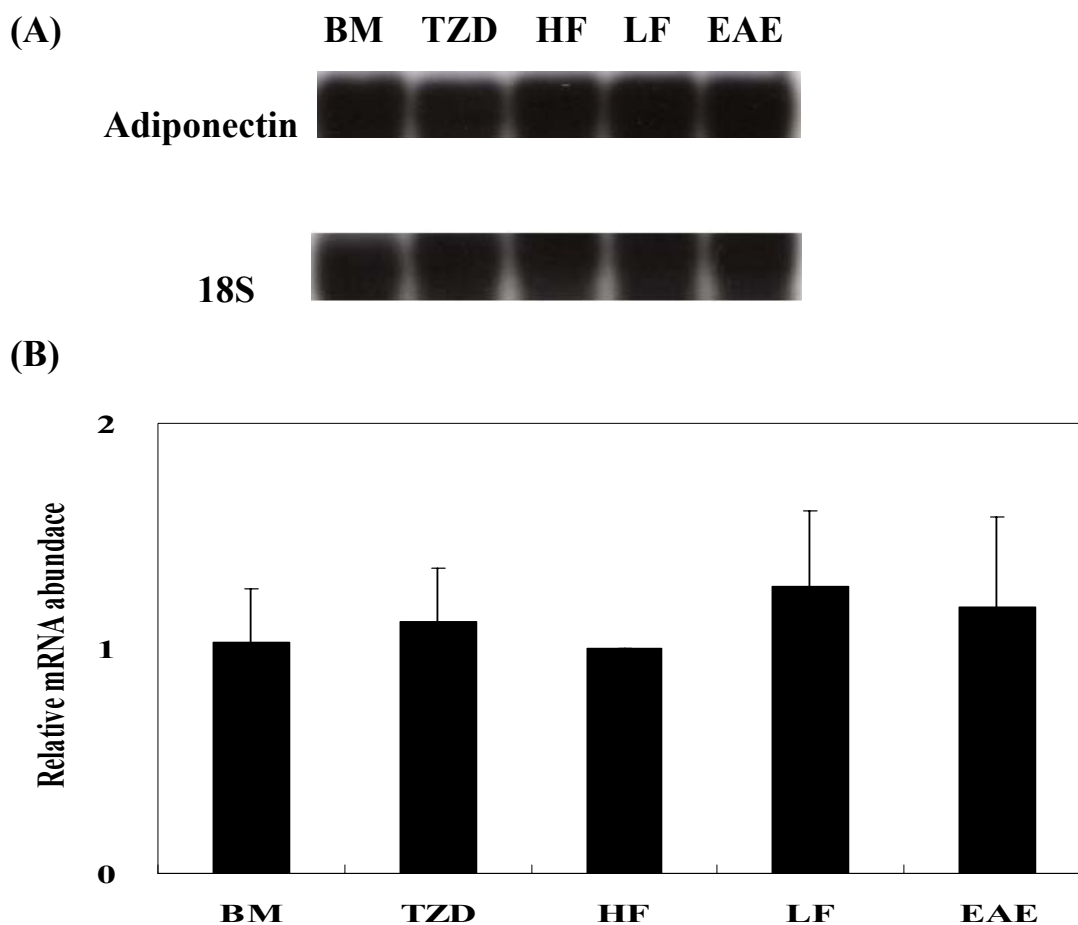


圖 4 - 10 Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週以北方點墨法偵測副睪脂肪(EP) Adiponectin mRNA 相對量

Fig. 4 - 10 Northern blot analysis (A) for mRNA of adiponectin in epididymal (EP) fat pads of rats fed with experimental diets for 9 weeks. Signals were quantitated by image analysis. (B) Each value was normalized by 18S. The fold induction was calculated by taking the normalized value of HF group as 1. Values are means  $\pm$  S.D. ( $n = 6 \sim 9$ ). The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

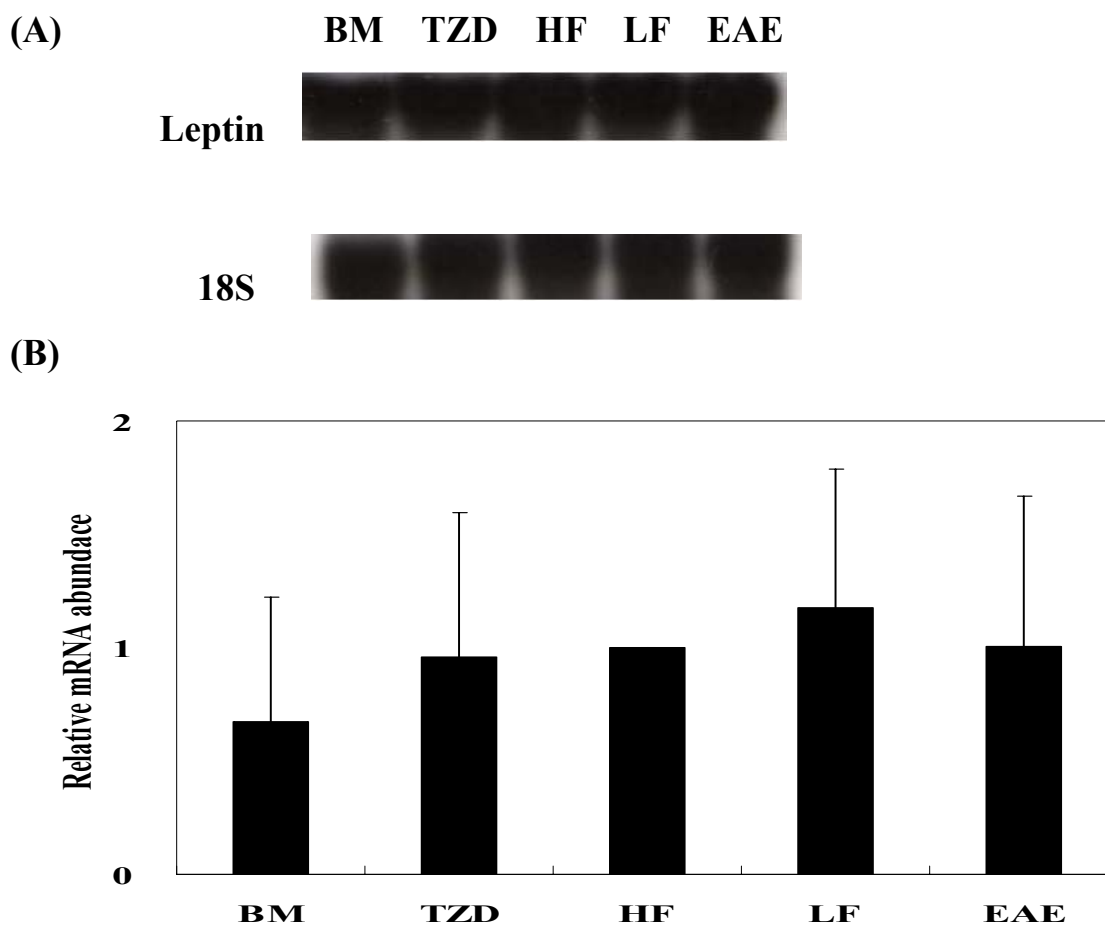


圖 4 - 11 Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週以北方點墨法偵測腹膜後脂肪 (RE) Leptin mRNA 相對量

Fig. 4 - 11 Northern blot analysis (A) for mRNA of leptin in retroperitoneal (RE) fat pads of rats fed with experimental diets for 9 weeks. Signals were quantitated by image analysis. (B) Each value was normalized by 18S. The fold induction was calculated by taking the normalized value of HF group as 1. Values are means  $\pm$  S.D. ( $n = 6 \sim 9$ ). The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

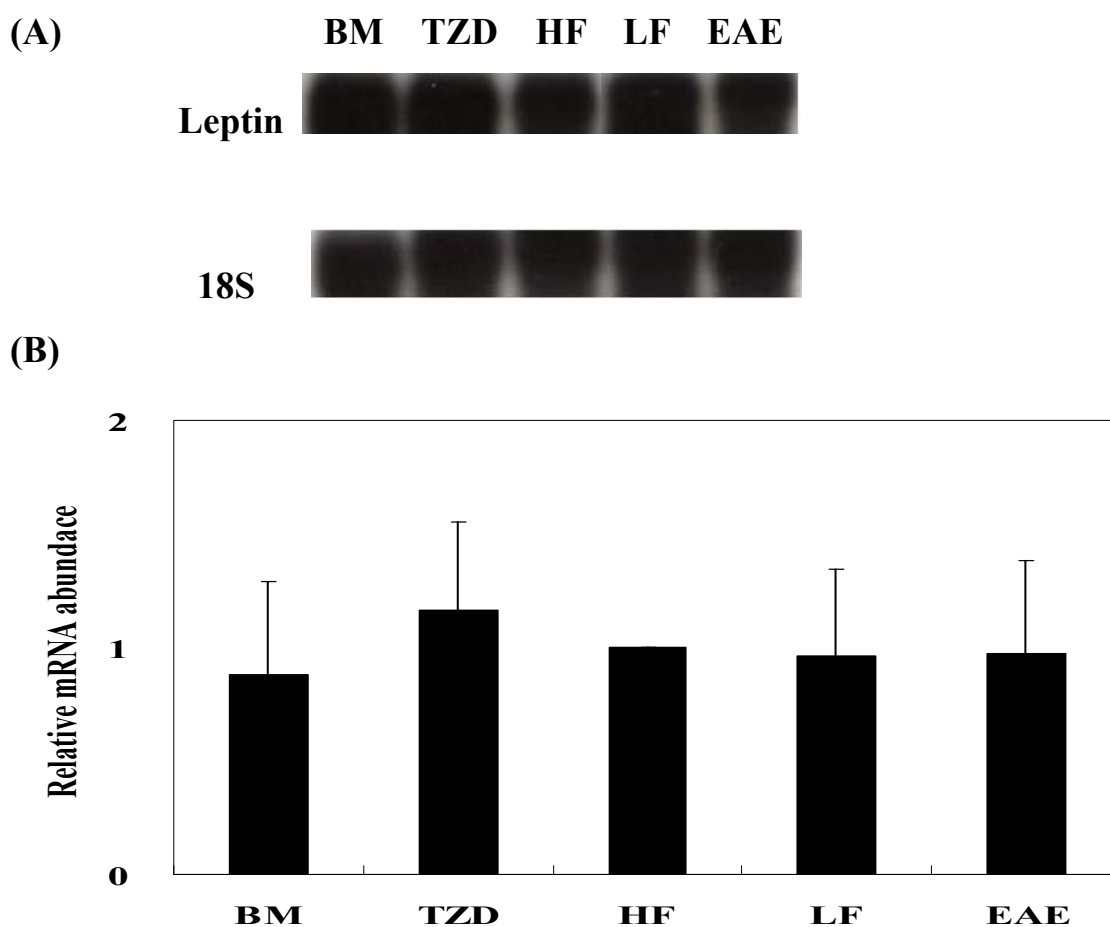


圖 4 - 12 Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週以北方點墨法偵測副睪脂肪(EP) Leptin mRNA 相對量

Fig. 4 - 12 Northern blot analysis (A) for mRNA of leptin in epididymal (EP) fat pads of rats fed with experimental diets for 9 weeks. Signals were quantitated by image analysis. (B) Each value was normalized by 18S. The fold induction was calculated by taking the normalized value of HF group as 1. Values are means  $\pm$  S.D. ( $n = 6 \sim 9$ ). The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

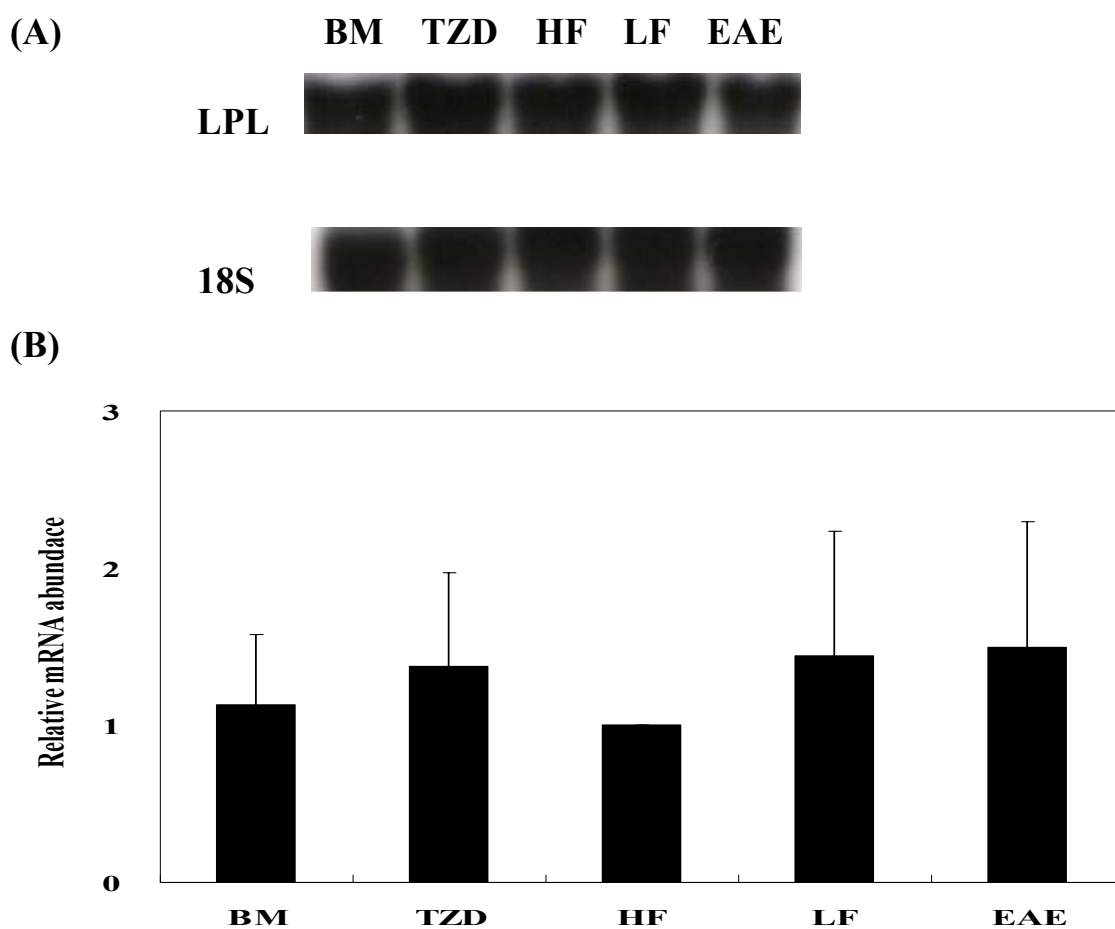


圖 4 - 13 Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週以北方點墨法偵測腹膜後脂肪 (RE) LPL mRNA 相對量

Fig. 4 - 13 Northern blot analysis (A) for mRNA of LPL in retroperitoneal (RE) fat pads of rats fed with experimental diets for 9 weeks. Signals were quantitated by image analysis. (B) Each value was normalized by 18S. The fold induction was calculated by taking the normalized value of HF group as 1. Values are means  $\pm$  S.D. ( $n = 6 \sim 9$ ). The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

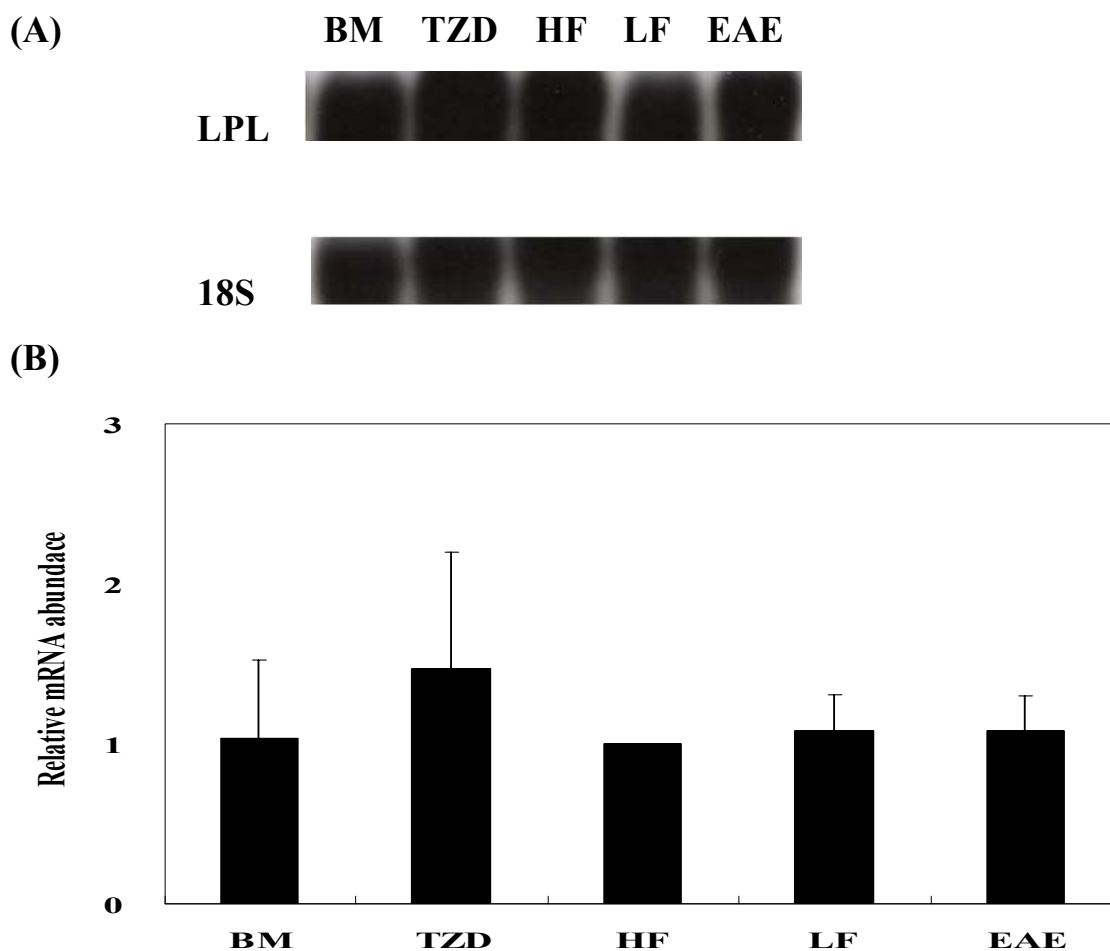


圖 4 - 14 Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週以北方點墨法偵測副睪脂肪(EP) LPL mRNA 相對量

Fig. 4 - 14 Northern blot analysis (A) for mRNA of LPL in epididymal (EP) fat pads of rats fed with experimental diets for 9 weeks. Signals were quantitated by image analysis. (B) Each value was normalized by 18S. The fold induction was calculated by taking the normalized value of HF group as 1. Values are means  $\pm$  S.D. ( $n = 6 \sim 9$ ). The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .



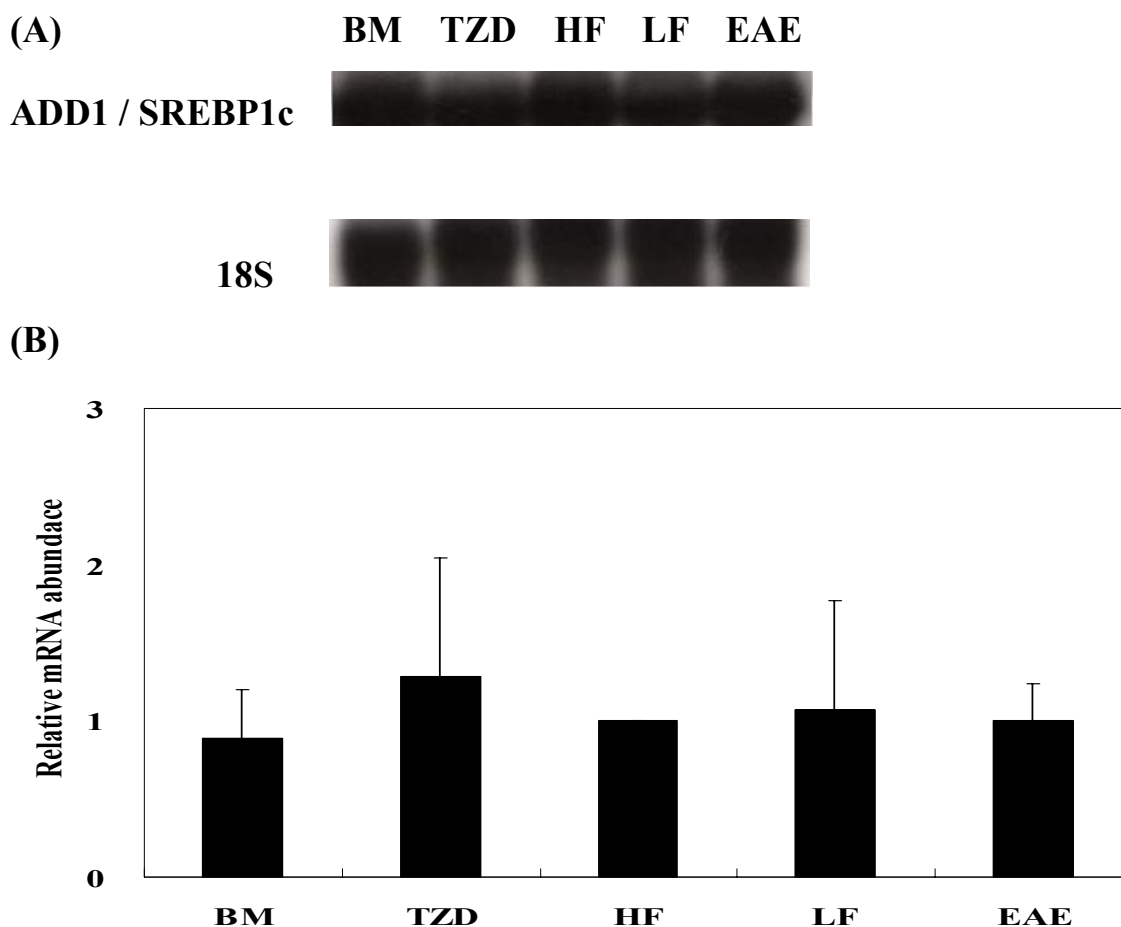


圖 4 - 15 Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週以北方點墨法偵測腹膜後脂肪 (RE) ADD1 / SREBP1c mRNA 相對量

Fig. 4 - 15 Northern blot analysis (A) for mRNA of ADD1 / SREBP1c LPL in retroperitoneal (RE) fat pads of rats fed with experimental diets for 9 weeks. Signals were quantitated by image analysis. (B) Each value was normalized by 18S. The fold induction was calculated by taking the normalized value of HF group as 1. Values are means  $\pm$  S.D. (n = 6 ~ 9). The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

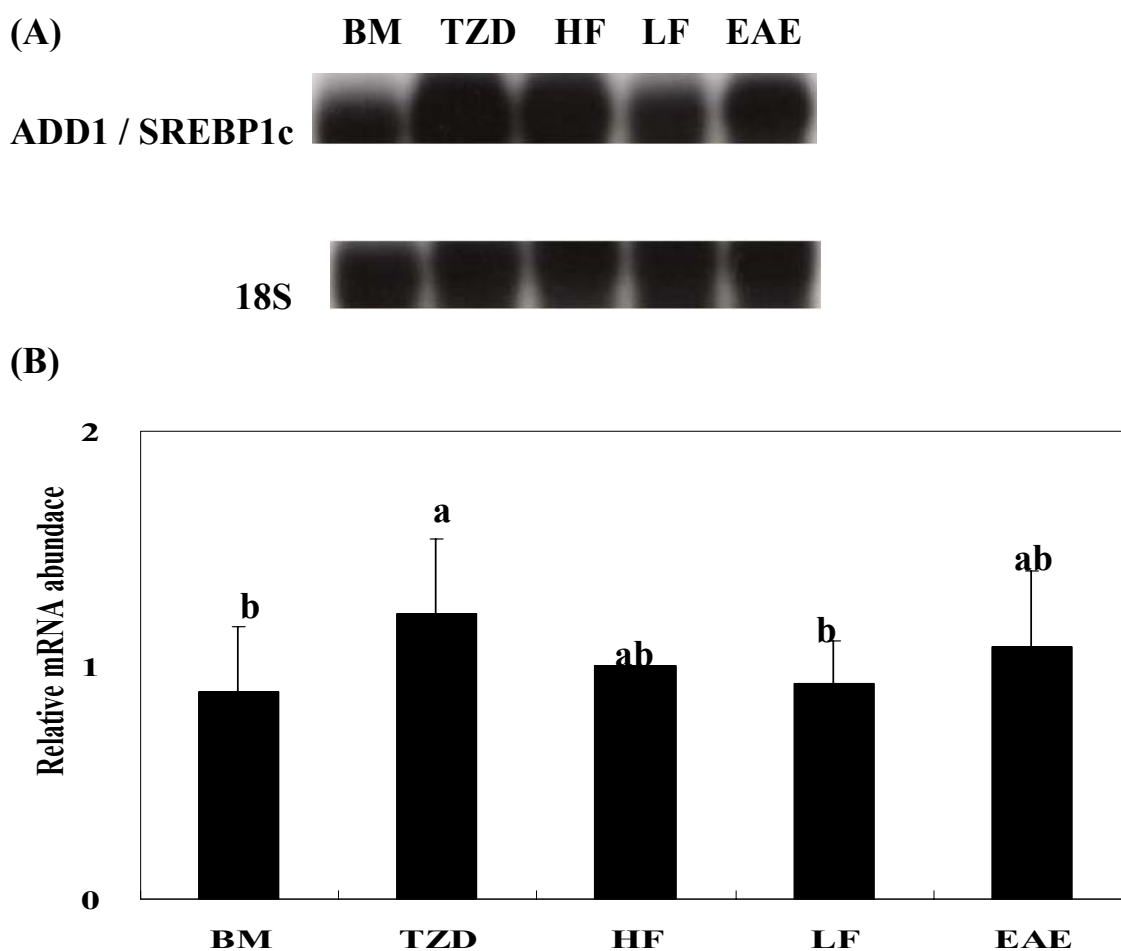


圖 4 - 16 Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週以北方點墨法偵測副睪脂肪(EP) ADD1 / SREBP1c mRNA 相對量

Fig. 4 - 16 Northern blot analysis (A) for mRNA of ADD1 / SREBP1c in epididymal (EP) fat pads of rats fed with experimental diets for 9 weeks. Signals were quantitated by image analysis. (B) Each value was normalized by 18S. The fold induction was calculated by taking the normalized value of HF group as 1. Values are means  $\pm$  S.D. (n = 6 ~ 9). The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

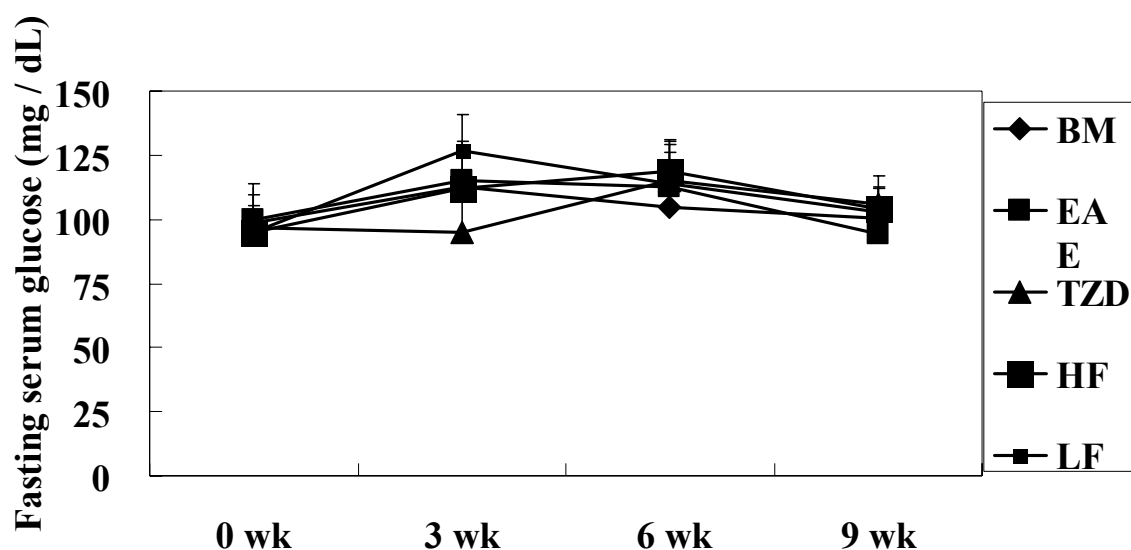


圖 4 - 17 Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週之禁食全血葡萄糖變化

Fig. 4 - 17 The change of fasting blood glucose of rats fed with experimental diets for 9 weeks. Values are means  $\pm$  S.D. ( $n = 6 \sim 9$ ). The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

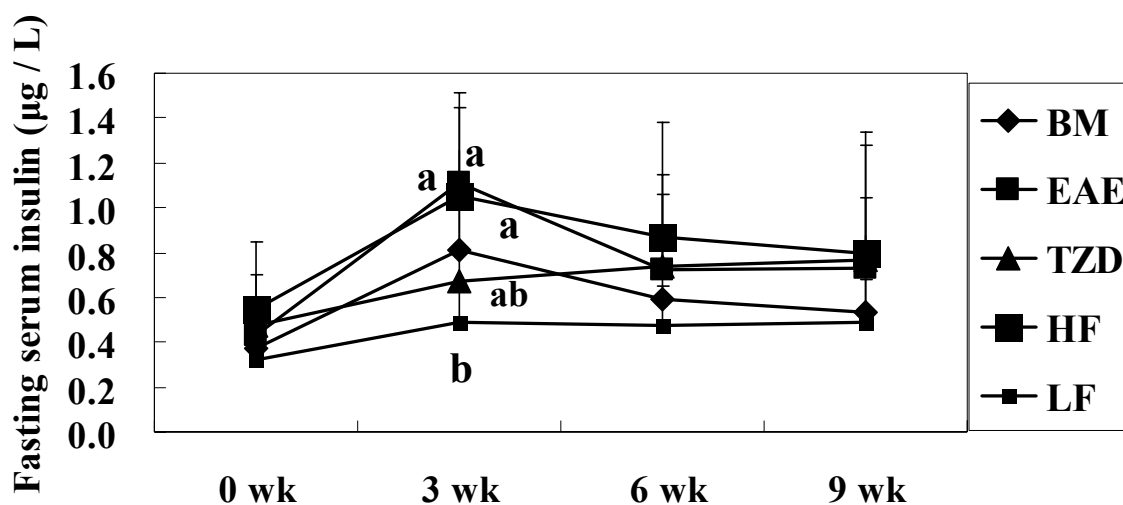


圖 4 - 18 Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週之禁食血清胰島素變化

Fig. 4 - 18 The change of fasting serum insulin of rats fed with experimental diets for 9 weeks. Values are means  $\pm$  S.D. ( $n = 6 \sim 9$ ). The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

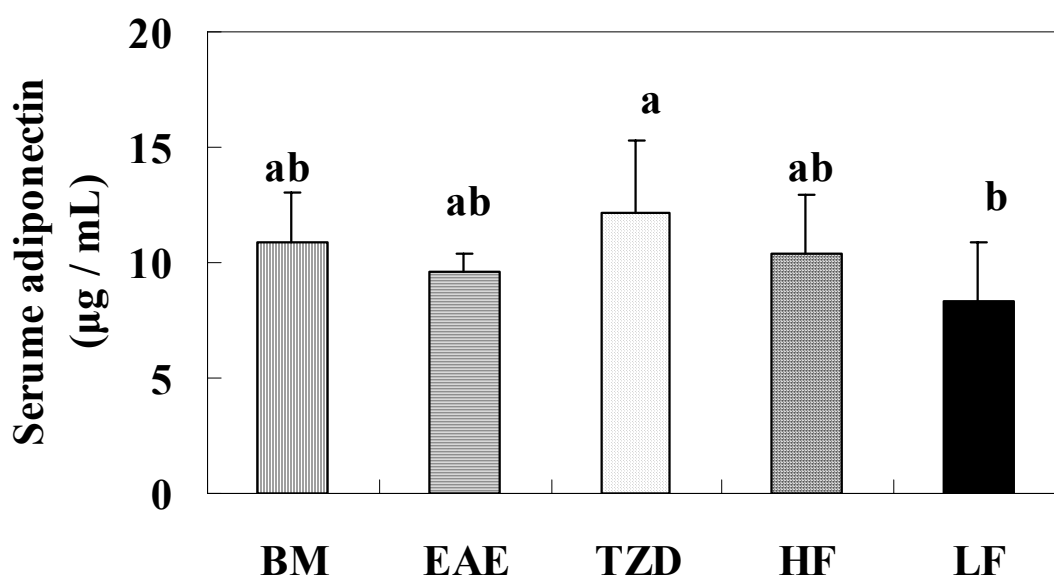


圖 4 - 19 Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週之血清 Adiponectin 濃度

Fig. 4 - 19 The concentration of serum adiponectin of rats fed with experimental diets for 9 weeks. Values are means  $\pm$  S.D. ( $n = 6 \sim 9$ ). The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## 第五章 討論

### 一、大鼠攝食情形、飼料效應與體重及組織變化

在本實驗中，部份大鼠餵以 5% (g / g) 油脂的低脂飲食(LF diet)作為低脂對照，其它大鼠餵以 30% (g / g) 油脂的高脂飲食(HF diet)誘導肥胖。依許的研究(2006)，30% 奶油及含蔗糖的飼料餵食 Wistar 大鼠 15 週可成功誘發大鼠肥胖及胰島素阻抗。另在高脂飲食誘發肥胖大鼠區分為 BM、EAE、TZD 和 HF 組，根據趙(2003)的研究，5%劑量的山苦瓜凍乾粉具作用，因此設計 BM 組為高脂飲食添加 5% 山苦瓜凍乾粉；先前研究證實山苦瓜凍乾粉乙酸乙酯萃物可活化 PPAR，而其萃取產率約為 5%，因此設計 EAE 組為高脂飲食添加 0.25% 山苦瓜凍乾粉乙酸乙酯萃物。另外設計 TZD 組為高脂飲食添加 0.01% Pioglitazone 抗糖尿病藥作為正對照組；HF 組則為高脂飲食不添加任何處理作為高脂對照。

本實驗中高脂飲食的熱量密度為 5.02 kcal / g，較低脂飲食 3.85 kcal / g 高，因為大鼠本身會有熱量平衡調節機制，攝食量會因高脂飲食而降低，以維持熱量攝取相當，本實驗結果亦可觀察到此現象，除了 TZD 組攝食量(及熱量)有較高情形(表 4-1)。在飼料效率上，BM、EAE、TZD 和 HF 等高脂飲食組顯著高於 LF 組( $p < 0.05$ )，也反映了高脂飲食的飼料熱量高。

若高脂飲食中其它營養素成分(重量百分比)保持與低脂飲食相同，則會因為攝食量降低造成蛋白質、維生素、礦物質等重要營養素攝取減少，因此本實驗調整高脂飲食(包括 BM、EAE、TZD 和 HF 組)中蛋白質、纖維素、維生素混合物和礦物質混合物的成分，使上述營養素 / 熱量比值在高脂與低脂飲食之間相當，如此可確保五組間各營養素攝取相當。其中的山苦瓜凍乾粉(BM 組)是以取代(Replacement)營養素的方式添加，因此扣除掉與高脂飲食中相同的營養素成分。由於採用取代而非補充(Supplement)方式添加在飼料中，因此本實驗觀察到山苦瓜降體脂功能並非增加膳食纖維攝取所致。在香港大學的研究中(338)，是以補充方式將冷凍乾燥苦瓜汁添加在飼料中，未扣除掉其中相同的營養素成分。

我們在餵食山苦瓜凍乾粉的大鼠，將其添加劑量由 1% 增加至 5% 為期一週的適應期，以避免山苦瓜凍乾粉的苦味造成大鼠食慾減退而影響攝食量，造成體重降低。從飼料攝取量看來，我們成功的控制大鼠適應山苦瓜，BM 組攝食量並未因山苦瓜介入而降低。在生長變化(圖 4-1)與組織變化(表 4-2 和 4-3)上，五組大鼠均呈現體重增加，也無明顯器官腫大或萎縮。已知 TZD 藥物有肥胖副作用，因此我們也觀察到 TZD 組體重顯著高於 LF 組(圖 4-1)，在脂肪塊重量也看到有較重的脂肪組織(圖 4-2 與表 4-2 和 4-3)。

## 二、山苦瓜降體脂之作用

在 2003 年香港大學的研究首度證實苦瓜降低體脂堆積的作用(338)，其發現給予高脂飲食誘導肥胖的大鼠餵食冷凍乾燥的苦瓜汁，在不影響食物攝取與脂質吸收的情況下，可降低體脂堆積與體重增加，並將苦瓜的降血糖功效歸因於體脂有效降低。香港大學的研究只呈現苦瓜使脂肪組織重量減少之結果，而苦瓜對脂肪細胞型態、組成與脂質代謝影響仍然未知，本研究則針對脂肪細胞改變作進一步探討。

### (一) 山苦瓜對腹部體脂堆積之影響

我們以三種脂肪塊包括腹膜後脂肪塊(RE)、副睪脂肪塊(EP)和腹股溝脂肪塊(Injuinal fat)，來評估腹部體脂堆積的情況(圖 4 - 2)。結果顯示 EAE、TZD 和 HF 組腹部體脂堆積顯著高於 LF 組( $p < 0.05$ )，而 BM 組則與 LF 組沒有差異，指出山苦瓜凍乾粉具有降體脂作用，可改善高脂飲食所導致的腹部體脂堆積，而乙酸乙酯萃物在本實驗劑量則沒有呈現如同山苦瓜凍乾粉的降體脂作用。

### (二) 山苦瓜對脂肪細胞大小之影響

在腹部體脂堆積的結果發現到山苦瓜的降體脂作用，因此觀察山苦瓜對分離自腹部脂肪的脂肪細胞大小之影響(表 4 - 4 和 4 - 5)。我們利用了鐵酸染色固定法，將新鮮脂肪細胞固定住，此方法之優點為固定的脂肪細胞與實際大小相同，並不會因為傳統利用組織切片法會使細胞因為脫水處理而皺縮。

不管是腹膜後脂肪(RE)或是副睪脂肪(EP)，BM 組的脂肪細胞直徑中位數並沒有顯著低於 HF 組。因此，我們將脂肪細胞直徑由小到大做四個區分，為 20 ~ 100  $\mu\text{m}$ 、100~ 180  $\mu\text{m}$ 、180 ~ 260  $\mu\text{m}$  以及 > 260  $\mu\text{m}$ ，發現到 BM 組與 HF 組相較下，有較多小直徑的脂肪細胞分佈百分比，有較少大直徑的脂肪細胞分佈百分比。此結果指出了山苦瓜凍乾粉的降體脂作用，乃是有效抑制高脂飲食所誘導的脂肪細胞肥大，而 EAE 組也許是劑量不足的關係，沒有如同山苦瓜凍乾粉呈現功效。另外，



雖然 TZD 藥物會導致肥胖，也發現到 TZD 組大鼠的腹膜後脂肪(RE)，其肥大的脂肪細胞百分比不如 HF 組。

### (三) 山苦瓜對脂肪細胞中三酸甘油酯與 DNA 含量之影響

已知肥胖可能是脂肪細胞肥大(Hypertrophy)或脂肪細胞數目增加(Hyperplasia)。三酸甘油酯堆積會使脂肪細胞肥大，而細胞數目又與 DNA 含量成正比。因為發現山苦瓜可抑制脂肪細胞肥大，因此測量脂肪組織中三酸甘油酯與 DNA(表 4-6~4-7)。結果不管是腹膜後脂肪(RE)或是副睪脂肪(EP)，五組之間脂肪細胞三酸甘油酯堆積(TG/DNA)沒有差異，但是餵食山苦瓜凍乾粉大鼠脂肪組織中三酸甘油酯堆積(TG/Tissue)有減少的傾向。

在腹膜後脂肪(RE)，五組之間脂肪組織 DNA 含量沒有差異，表示山苦瓜不影響腹膜後脂肪(RE)中脂肪細胞的數目，但在副睪脂肪(EP)，BM 組脂肪組織 DNA 含量顯著高於 LF 組，另三組與 BM 或 LF 組無差異。脂肪組織中並非只含有成熟脂肪細胞，也包括有其它種類的細胞如 Stromal vascular cells，它們也都含有 DNA。是否表示山苦瓜可能造成副睪脂肪(EP)中脂肪細胞數目增加，此點有待釐清。這些結果指出山苦瓜凍乾粉的降體脂作用，乃是減少脂肪組織中三酸甘油酯堆積，並非減少脂肪細胞數目。

### (四) 山苦瓜降體脂作用機制

#### 1. 山苦瓜對脂肪組織脂質生合成酵素活性之影響

因為觀察到山苦瓜使腹部體脂堆積減少，抑制脂肪細胞肥大以及脂肪組織中三酸甘油酯有減少的傾向，而脂肪組織中三酸甘油酯的儲存是由多種脂質生合成酵素與脂解酵素相互作用結果，因此從脂肪代謝相關酵素活性來探討可能的作用機制。脂肪組織中兩種重要的脂質生合成酵素為 G3PDH 與 LPL。

在脂肪組織中，G3PDH 是催化糖解中間產物 Dihydroxyacetone phosphate (DHAP)形成 Glycerol-3-phosphate，提供合成三酸甘油酯的原料，因此可視為三酸甘油酯合成的指標。在副睪脂肪(EP)，BM 和 LF 組顯著低於 TZD 組( $p < 0.05$ ) (圖 4-3)。推測山苦瓜可能抑制 G3PDH 活性而降低三酸甘油酯的生成，抑制了脂肪細胞的三酸甘油酯堆積而有較小的脂肪細胞。

LPL 則是將循環的脂蛋白內之三酸甘油酯水解，使脂肪細胞汲取水解後的脂肪酸並進行再酯化以儲存在脂肪組織中，LPL 受胰島素刺激而被兒茶酚胺所抑制，也會受 ApoC II 所活化而受 ApoC III 抑制。在腹膜後脂肪(RE)，BM 和 TZD 組顯著高於 EAE、HF 和 LF 組( $p < 0.05$ ) (圖 4-4)。此結果似乎不能解釋山苦瓜抑制脂肪組織三酸甘油酯堆積的結果，但從另一角度來看，已知 LPL 受 ApoC II 活化和受 ApoC III 抑制，而 ApoC III 又受 PPAR $\alpha$  向下調節，前人證實苦瓜可活化 PPAR $\alpha$ (330, 355)，也許能藉由 ApoC III 減少因此造成 LPL 活性增加，而 LPL 活性增加或許有助於血液脂蛋白中三酸甘油酯的清除。

## 2. 山苦瓜對脂肪組織脂解速率之影響

除了觀察脂質生合成酵素，我們也測定脂解速率。測量基礎狀態下和以 Isopreterenol (作用如同腎上腺素，會促進 HSL 酵素)刺激狀態下甘油的釋放率。因為體內真正的 HSL 活性涉及酵素的位移，因此我們的測定只能表示脂肪組織的脂解速率，而非真正體內 HSL 活性。我們做了 Time course 來觀察脂解速率，不管是在腹膜後脂肪(RE)或副睪脂肪(EP)中的刺激與基礎脂解速率，BM、EAE 和 HF 組與 TZD 和 LF 組沒有差異(圖 4-5)。指出山苦瓜似乎不是經由增加脂解速率，來達到降體脂作用。

另外，TZD 組的刺激與基礎脂解速率顯著高於 LF 組( $p < 0.05$ )。曾有研究指出，在肥胖的大鼠及人，脂肪組織中有較高的 HSL 活性。並也指出較大的脂肪細胞會汲取較多的葡萄糖來提供合成三酸甘油酯，同樣的也有較多的脂肪酸被水解釋出(356-358)。學者以這些結果解釋肥大的脂肪細胞中 HSL 活性較高。這或許能解釋本結果中 TZD 組有較高的 HSL 活性。

雖然我們的實驗方法不能證明山苦瓜增加脂肪組織脂解速率，但香港大學 2005 年研究指出(337)，大鼠餵食苦瓜有較高的血漿正腎上腺素濃度，已知正腎上腺素可調節交感活性，而交感活性增加與降低體重有關並可增加脂肪組織的脂解作用。因此，可能與苦瓜的降體脂作用有關。

### 3. 山苦瓜對脂肪細胞分化指標之影響

在先前結果我們發現，山苦瓜的降體脂作用並非抑制脂肪細胞增生，而是抑制脂肪細胞脂質生合成與堆積。因此，我們進一步探討山苦瓜對脂肪細胞分化指標之影響，以北方轉漬法分析腹膜後脂肪(RE)與副睪脂肪(EP)中調控脂質生合成基因表現之轉錄因子：PPAR $\gamma$  和 ADD1 / SREBP1c，PPAR $\gamma$  下游基因：LPL，以及脂肪細胞激素基因如：Adiponectin 和 Leptin 等 mRNA 之含量。

結果發現副睪脂肪(EP)中 ADD1 / SREBP1c mRNA 表現，BM 和 LF 組顯著低於 TZD 組( $p < 0.05$ )，而其它 mRNA 含量五組間並無差異(圖 4-7~4-16)。ADD1 / SREBP1c 是調節膽固醇與脂肪酸代謝相關基因的轉錄因子，會刺激一些脂質生合成相關基因如 FAS 和 ACC 的表現。Kim 等人首先指出 ADD1 / SREBP1c 與胰島素有關角色，其指出在小鼠脂肪組織中 ADD1 / SREBP1c 調節胰島素對 FAS 基因的作用(157)。其它研究也指出胰島素會刺激 ADD1 / SREBP1c 的表現(161)。我們發現了餵食山苦瓜大鼠其 ADD1 / SREBP1c mRNA 表現較低，表示山苦瓜可能降低 ADD1 / SREBP1c mRNA 來減少脂質生合成基因如 FAS、ACC、SCD 和 S14 表現，因此降低脂肪組織內三酸甘油酯。

此推論可在本實驗室另一批實驗得到支持。本實驗室以同樣條件飼養大鼠(LF、HF 和 BM 三組)，但因為進行 Steady - status plasma glucose (SSPG)，所有大鼠犧牲前施打胰島素(以 11  $\mu\text{L} / \text{min}$  速度注入進行 180 分鐘)。以 Real - time PCR 分析脂肪組織脂質生合成相關基因之表現，包括有 FAS、ACC1、LPL 和 aP2 (表 5-1)。結果發現餵食山苦瓜大鼠其 FAS、ACC1、LPL 和 aP2 mRNA 表現較低，由於 FAS 和 ACC1 是受 ADD1 / SREBP1c 調控之下游基因，此結果與本研究 ADD1 / SREBP1c mRNA 表現減少相符合。

FAS 是主要是催化 Acetyl - CoA 和 Malonyl - CoA 前驅物生合成 Palmitate 這種飽和脂肪酸的酵素。FAS 高度表現在肝臟和脂肪組織中。ACC 是催化 Acetyl - CoA 形成 Malonyl - CoA 的 ATP - dependent carboxylation 的酵素，是脂肪酸生合成的限制酵素。ACC 有兩種 Isoforms 分為 ACC1 和 ACC2，ACC1 表現在脂質生成的組織中如肝臟和脂肪組織，而 ACC2 則是表現在氧化作用的組織中如肝臟、心臟和骨骼肌(359)。

由這些基因表現的結果，我們推測山苦瓜降體脂的作用可能與抑制 ADD1 / SREBP1c mRNA 表現，因而使 FAS 與 ACC1 mRNA 表現降低，所以減少脂質的合成，而達到降體脂的作用。

#### 4. 其它可能機制

香港大學的研究指出，苦瓜可降低高脂飲食大鼠的體重增加，給予苦瓜可降低主要器官的三酸甘油酯含量(337)。Chao 等人的研究指出苦瓜乙酸乙酯萃物可活化 PPAR $\alpha$  和 PPAR $\gamma$ ，並向上調節 H4IIEC3 肝癌細胞中 ACO 活性以及 ACO 和 FABP mRNA 的表現，來影響脂質氧化作用(330)。這些結果表示出苦瓜活化 PPAR $\alpha$  促進脂肪酸氧化酵素 ACO 和 FABP 基因轉錄，增加脂質代謝降低組織中三酸甘油酯，因而達到降體脂的作用。

在齧齒類動物中，棕色脂肪組織是重要的生熱調節(341)。許多因子如交感活化作用會影響 UCP 的表現(343)，PGC - 1 $\alpha$  也是 UCP 的活化劑(345)。Chan 等人首次指出苦瓜對高脂飲食誘導肥胖大鼠的 UCP 和 PGC - 1 $\alpha$  表現的作用，其結果顯示苦瓜可增加 UCP 和 PGC - 1 $\alpha$  的表現，增加生熱作用來達到抗體脂作用(360)。

另外，血漿中腎上腺素和正腎上腺素這類兒茶酚胺(Cetacholamines)可調節交感活性，而交感活性增加與降低體重有關。Chen 等人研究指出苦瓜增加血漿中兒茶酚胺濃度，因而促進代謝使體重降低達到降體脂作用(337)。

表5 - 1 大鼠餵食試驗飲食脂肪組織中脂質生合成基因表現<sup>1, 2, 3</sup>Table 5 - 1 Lipogenic gene expression in adipose tissue of rats fed with experimental diets<sup>1, 2, 3</sup>

	mRNA level (%)			
	FAS	ACC1	LPL	aP2
BM	0.37 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.51 ± 0.22 <sup>b</sup>	0.45 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.68 ± 0.18 <sup>b</sup>
HF	1 ± 0.4 <sup>a</sup>	1 ± 0.6 <sup>a</sup>	1 ± 0.2 <sup>a</sup>	1 ± 0.2 <sup>a</sup>
LF	0.74 ± 0.47 <sup>ab</sup>	1.07 ± 0.44 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.04 <sup>a</sup>	1 ± 0.17 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Values are means ± S.D..

<sup>2</sup> The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

<sup>3</sup>FAS: Fatty acid synthetase, ACC1: Acetyl - CoA carboxylase, LPL: Lipoprotein lipase, aP2: Adipocyte fatty acid - binding protein

(感謝黃惠玲老師提供)

### 三、山苦瓜與胰島素敏感性

脂肪組織與葡萄糖代謝有密切相關，過多或過少都會造成胰島素抗性。苦瓜降低血糖常見於許多文獻，但其降血糖的作用機制仍然不明確。香港大學研究指出給予高脂飲食誘導肥胖的大鼠餵食冷凍乾燥的苦瓜汁，改善葡萄糖耐受性，降低血漿葡萄糖、血清胰島素(338)，因此我們也探討了山苦瓜對胰島素敏感性的關係。

在我們的研究中，比較了五組禁食全血葡萄糖(圖 4-17)與血清胰島素變化(圖 4-18)，來觀察山苦瓜對大鼠胰島素敏感性之影響。禁食全血葡萄糖變化的結果，五組都沒有差異。禁食血清胰島素變化的結果，在第 3 週時，EAE 和 HF 組顯著高於 LF 組( $p < 0.05$ )。有研究曾指出在動物模式中，以高油高蔗糖飲食(HFS diet)餵食動物，會發展成肥胖並伴隨胰島素抗性的發生(355)。我們的結果中也看到在高脂飲食下 HF 組可誘發高胰島素血症，但不發生在 BM 和 TZD 組(圖 4-18, wk 3)。在第 6 及 9 週，五組的禁食血清胰島素含量雖沒有差異，但 BM 組仍有低於 HF 組的趨勢。表示 BM 和 TZD 組有較好的胰島素敏感性。

Adiponectin 是由脂肪組織所分泌的一種與胰島素敏感性有關的脂肪細胞激素，被認為與肥胖和胰島素抗性有關(225)。TZD 藥物增加胰島素敏感性，與增加刺激 Adiponectin 表現有關(240)。因此我們也同時測量了各組大鼠血清 Adiponectin 濃度。在結果中顯示(圖 4-19)，TZD 組血清 Adiponectin 濃度顯著高於 LF 組( $p < 0.05$ )，但 BM、EAE 和 HF 組又與 TZD 或 LF 組沒有差異，同樣的山苦瓜並未增加脂肪組織 Adiponectin mRNA。

在啮齒類動物中，TNF $\alpha$  是胰島素敏感性主要的調節者(241)。且根據肥大的脂肪細胞較易釋出 TNF $\alpha$ ，因而干擾了胰島素傳訊(249)。本實驗證實攝食山苦瓜可有效抑制脂肪細胞肥大，因此理論上攝食山苦瓜應可藉降低 TNF $\alpha$  分泌而改善胰島素敏感性。或許我們可以再進一步測量各組大鼠血清 TNF $\alpha$  濃度，來確認 BM 組抑制脂肪細胞肥大與胰島素敏感性改善之關係。

#### 四、山苦瓜與代謝症候群及其降體脂可能之功能成分

本研究初始動機乃是 Chao 等人研究指出苦瓜可同時活化 PPAR $\alpha$  和 PPAR $\gamma$ (330)，可應用於改善高血脂與高血糖，理論上應可改善代謝症候群。代謝症候群包括有肥胖、血脂紊亂、高血糖與高血壓，其中腹部肥胖與胰島素抗性被認為與其最為相關(261)。本研究證實山苦瓜在大鼠可同時抑制高脂飲食誘發的腹部體脂堆積和高胰島素血症，證實了山苦瓜的確有助於預防或治療代謝症候群。

雖然 TZD 是臨床使用的抗糖尿病藥物，但常見有肥胖的副作用(240)。山苦瓜在本實驗中證實如同 TZD 可改善高胰島素血症，但卻不會有肥胖副作用，且相對還可以降體脂。

因為先前研究利用各種萃取方式來萃取苦瓜凍乾粉中的成分，並在轉活化試驗中發現，乙酸乙酯萃物可活化 PPAR。因此我們推測苦瓜降體脂的功能成分可能是脂溶性的。在本實驗中所設計的乙酸乙酯萃物添加劑量為 0.25%。理論上，0.25% 的乙酸乙酯萃物應相當於 5% 劑量的山苦瓜凍乾粉。但是在我們的結果中發現，山苦瓜凍乾粉乙酸乙酯萃物並沒有抑制腹部體脂堆積或改善胰島素敏感性。我們推測可能是其功能性成分，在乙酸乙酯萃取期間而流失，因此造成使用的劑量不等於山苦瓜凍乾粉之劑量，而沒有呈現如同山苦瓜凍乾粉的降體脂作用。

關於苦瓜降體脂功能成份目前尚未清楚。有研究指出綠茶中的兒茶素經由增加交感活性來促進生熱作用，而交感活性增加與降低體重有關(334)。雖然沒有報告發現苦瓜含有兒茶素，但已知苦瓜富含 Conjugated linolenic acid (CLN) 而且可能轉變為 CLA，而 CLA 已指出可增加交感活性(336)。CLN 是苦瓜種籽中主要的脂肪酸，而我們動物實驗使用的山苦瓜凍乾粉原料是包含種籽的，且在莊(2004)的研究對山苦瓜活化 PPAR 之成分分離及鑑定中發現，*c9, t11, t13* - conjugated linolenic acid 這種 CLN 活化 PPAR $\alpha$  能力最好，而一些特殊植物固醇則可能是活化 PPAR $\gamma$ ，因此 CLN 可能是山苦瓜降體脂功能成份之一。

另外，在趙(2003)的研究中利用穩定轉染建構篩選 PPAR $\alpha$  活化物之細胞株，來尋找飲食中之食材及化合物，經過純化分離鑑定出苦瓜中能活化 PPAR $\alpha$  的成分包括有 Phytol 及一些帶有 Hydroxyl group 或 Methyl group 的不飽和脂肪酸。Phytanic acid (3, 7, 11, 15 – tetramethylhexadecanoic acid)是葉綠素(Chlorophyll)中葉綠醇(Phytol)支鏈的衍生物。一般人可從飲食中攝取到 Phytol 後，經由過氧化體中的酵素如 Phytanoyl – CoA hydroxylase 代謝生成 Phytanic acid。在篩選可活化細胞核荷爾蒙接受器的天然產物之研究中發現，Phytanic acid 可活化 RXR 與 PPAR $\alpha$  (361)。Schluter 等人對 Phytanic acid 所做的一些研究指出，Phytanic acid 可活化 PPAR $\gamma$  促進 UCP1 基因表現並活化棕色脂肪細胞的分化(362)。因此 Phytanic acid 也可能是苦瓜降體脂功能成份之一。

在我們的實驗中使用的山苦瓜凍乾粉與香港大學所使用的冷凍乾燥苦瓜汁比較下，降體脂功能成分可能不同。香港大學使用的是去籽後的苦瓜，榨汁後即進行冷凍乾燥並未以任何方式去做萃取(330)。而本實驗所用的是含籽的全果且功能成分可能存在於乙酸乙酯萃物(根據 Chao 的轉活化試驗)，而都同樣發現苦瓜有降體脂的作用，因此可能還有其它的苦瓜降體脂功能成分。



## 五、山苦瓜凍乾粉之安全性評估

另外，本實驗室測量血清中 Aspartate aminotransferase (GOT)和 Alanine aminotransferase (GPT)濃度(圖 5 - 1)，來評估 5%山苦瓜凍乾粉實驗劑量的安全性。GOT 和 GPT 是存在於肝臟中的酵素，若是當肝臟受藥物或疾病損傷時，則會大量釋放到血液中，因此可用來做肝功能之評估。其結果五組的 GOT 與 GPT 活性都在正常值以下(GOT < 37 U / L ; GPT < 40 U / L)，表示本實驗所用 5%劑量山苦瓜凍乾粉沒有肝毒性。

以大鼠一天攝食量約為 20 克來估計，本實驗 5%劑量山苦瓜凍乾粉相當於大鼠每天攝取 1 克的山苦瓜凍乾粉，假設一隻大鼠體重為 400 克，此劑量相當於每公斤體重的大鼠攝取 2.5 克的山苦瓜凍乾粉(2.5 g BM powder / kg Body Weight)。當考量不同動物等效劑量換算係數，換算 60 公斤人的劑量後相當於每天 25 克的山苦瓜凍乾粉的攝取，換句話說相當於每天攝取 250 克的新鮮山苦瓜。

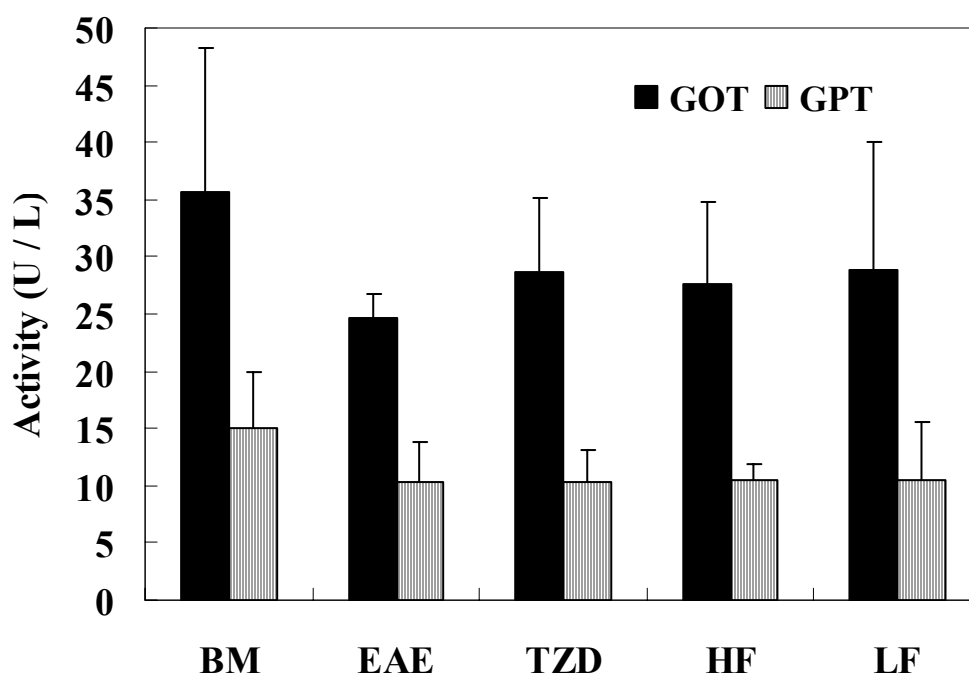


圖 5 - 1 Wistar 大鼠餵食試驗飲食 9 週之 GOT 和 GPT 酵素活性

Fig. 5 - 1 The activity of GOT (aspartate aminotransferase) and GPT (alanine aminotransferase) in serum of rats fed with experimental diets for 9 weeks. Values are means  $\pm$  S.D. (n = 6 ~ 9). The significance of differences among the five groups (LF, HF, BM, EAE and TZD) was analyzed statistically by one-way ANOVA and Duncan's multiple range tests. Values were transformed to log values for the statistical analysis if the variances were not homogeneous. The General Linear Model of the SAS package (SAS institute, Cary, NC) was employed for both statistical analysis and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

(感謝黃惠玲老師提供)

## 第六章 結論

本研究目的在探討山苦瓜對於改善腹部體脂堆積和胰島素敏感性之功效，並且與已知抗糖尿病藥 TZD 做比較。所得到的重要結果如下：

- 一、 山苦瓜可有效抑制高脂飲食所導致的腹部體脂(腹膜後脂肪、副睪脂肪和 Injuinal fat)堆積。並且有效抑制高脂飲食所誘導的脂肪細胞肥大及三酸甘油酯堆積。這些顯示出山苦瓜具有降體脂之功效，但其乙酸乙酯萃物並沒有如同山苦瓜的作用。
- 二、 山苦瓜的降體脂功效在於抑制脂肪細胞肥大，而非抑制脂肪細胞的增生。此外，山苦瓜降低了脂肪組織中 G3PDH 活性，推測是抑制脂肪細胞肥大的原因之一。
- 三、 我們利用北方轉漬分析脂肪細胞分化相關基因表現，發現山苦瓜降低副睪脂肪(EP)中 ADD1 / SREBP1c mRNA 表現，而 ADD1 / SREBP1c mRNA 負責調控脂質生合成基因表現，因此推測可能是山苦瓜降體脂作用的原因，但山苦瓜並不影響 PPAR $\gamma$  mRNA。
- 四、 在高脂飲食下會誘發高胰島素血症，但此現象不發生在 BM 和 TZD 組。所以山苦瓜如同 TZD 同樣具有改善胰島素敏感性的作用，可惜乙酸乙酯萃物在本實驗中並未呈現如同山苦瓜凍乾粉的作用。

以上結果顯示，山苦瓜如同 TZD 藥物具有改善胰島素敏感性的作用，但相較於 TZD 有肥胖的副作用，山苦瓜反而有抑制腹部體脂堆積效用。然而，本研究使用的乙酸乙酯萃物也許劑量不足，並沒有呈現如同山苦瓜凍乾粉之效用。山苦瓜的降體脂作用可能與抑制脂肪細胞肥大、G3PDH 活性與 ADD1 / SREBP1c mRNA 表現，因而降低脂質生合成有關。

第七章 參考文獻

趙哲毅。苦瓜活化過氧化體增殖劑活化受器及改變脂質代謝相關基因之表現。台灣大學微生物與生化學研究所博士論文，2003。

莊佳穎。山苦瓜活化過氧化體增殖劑活化受器PPARs之成份分離與鑑定。台灣大學微生物與生化學研究所碩士論文，2004。

行政院農委會出版農政與農情，94年5月第155期。

許珊菁。鼠模式中高脂飲食、肥胖與脂質調控基因之表現。台灣大學微生物與生化學研究所博士論文，2006。

1. Latruffe N, Vamecq J. Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism. *Biochimie*. 1997;79:81-94.
2. Baudhuin P, Beaufay H, De Duve C. Combined biochemical and morphological study of particulate fractions from rat liver. analysis of preparations enriched in lysosomes or in particles containing urate oxidase, D-amino acid oxidase, and catalase. *The Journal Of Cell Biology*. 1965;26:219-43.
3. Brown FR,3rd, McAdams AJ, Cummins JW, Konkol R, Singh I, Moser AB, Moser HW. Cerebro-hepato-renal (zellweger) syndrome and neonatal adrenoleukodystrophy: Similarities in phenotype and accumulation of very long chain fatty acids. *The Johns Hopkins Medical Journal*. 1982;151:344-51.
4. Watkins PA, Gould SJ, Smith MA, Braiterman LT, Wei HM, Kok F, Moser AB, Moser HW, Smith KD. Altered expression of ALDP in X-linked adrenoleukodystrophy. *American Journal Of Human Genetics*. 1995;57:292-301.
5. Feigenbaum V, Lombard-Platet G, Guidoux S, Sarde CO, Mandel JL, Aubourg P. Mutational and protein analysis of patients and heterozygous women with X-linked adrenoleukodystrophy. *American Journal Of Human Genetics*. 1996;58:1135-44.
6. Wanders RJA. Peroxisomes, lipid metabolism, and peroxisomal disorders. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2004;83:16-27.
7. Hess R, Staubli W, Riess W. Nature of the hepatomegaly effect produced by ethyl-chlorophenoxy-isobutyrate in the rat. *Nature*. 1965;208:856-8.

8. Svoboda DJ, Azarnoff DL. Response of hepatic microbodies to a hypolipidemic agent, ethyl chlorophenoxyisobutyrate (CPIB). *The Journal Of Cell Biology*. 1966;30:442-50.
9. Havel RJ, Kane JP. Drugs and lipid metabolism. *Annual Review Of Pharmacology*. 1973;13:287-308.
10. Lazarow PB, De Duve C. A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 1976;73:2043-6.
11. Reddy JK, Lalwai ND. Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: Evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans. *Critical Reviews In Toxicology*. 1983;12:1-58.
12. Reddy JK, Goel SK, Nemali MR, Carrino JJ, Laffler TG, Reddy MK, Sperbeck SJ, Osumi T, Hashimoto T, Lalwani et a. Transcription regulation of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase and enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in rat liver by peroxisome proliferators. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 1986;83:1747-51.
13. Lock EA, Mitchell AM, Elcombe CR. Biochemical mechanisms of induction of hepatic peroxisome proliferation. *Annual Review Of Pharmacology And Toxicology*. 1989;29:145-63.
14. Reddy JK, Qureshi SA. Tumorigenicity of the hypolipidaemic peroxisome proliferator ethyl-alpha-p-chlorophenoxyisobutyrate (clofibrate) in rats. *British Journal Of Cancer*. 1979;40:476-82.
15. Hardwick JP, Song BJ, Huberman E, Gonzalez FJ. Isolation, complementary DNA sequence, and regulation of rat hepatic lauric acid omega-hydroxylase (cytochrome P-450LA omega). identification of a new cytochrome P-450 gene family. *The Journal Of Biological Chemistry*. 1987;262:801-10.
16. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators.[see comment]. *Nature*. 1990;347:645-50.
17. Lemberger T, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: A nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. [review] [116 refs]. *Annual Review of Cell & Developmental Biology*. 1996;12:335-63.
18. Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*. 1996;137:354-66.

19. Laudet V, Hanni C, Coll J, Catzeflis F, Stehelin D. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J.* 1992;11(3):1003-13.
20. Wahli W, Braissant O, Desvergne B. Peroxisome proliferator activated receptors: Transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more.... [review] [38 refs]. *Chem Biol.* 1995;2:261-6.
21. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem.* 1995;270:12953-6.
22. Staels B, Vu-Dac N, Kosykh VA, Saladin R, Fruchart JC, Dallongeville J, Auwerx J. Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates. *J Clin Invest.* 1995;95:705-12.
23. Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: No alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes.* 1997;46:1319-27.
24. Inoue I, Shino K, Noji S, Awata T, Katayama S. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in primary cultures of human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;246:370-4.
25. Diep QN, Touyz RM, Schiffrin EL. Docosahexaenoic acid, a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligand, induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Hypertension.* 2000;36:851-5.
26. Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebreton M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, et al. Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature.* 1998;393:790-3.
27. Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem.* 1998;273:25573-80.
28. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med.* 2002;53:409-35.

29. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, et al. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem.* 1997;272:18779-89.
30. Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. PPARgamma3 mRNA: A distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* 1998;438:55-60.
31. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb et a. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *The Journal Of Biological Chemistry.* 1997;272:18779-89.
32. Fajas L, Fruchart J, Auwerx J. PPAR[gamma]3 mRNA: A distinct PPAR[gamma] mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Letters.* 1998;438:55-60.
33. Zhou J, Wilson KM, Medh JD. Genetic analysis of four novel peroxisome proliferator activated receptor-[gamma] splice variants in monkey macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2002;293:274-83.
34. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell.* 1995;83:803-12.
35. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell.* 1998;93:229-40.
36. Willson TM, Cobb JE, Cowan DJ, Wiethe RW, Correa ID, Prakash SR, Beck KD, Moore LB, Kliewer SA, Lehmann JM. The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones. *J Med Chem.* 1996;39:665-8.
37. Mukherjee R, Hoener PA, Jow L, Bilakovics J, Klausling K, Mais DE, Faulkner A, Croston GE, Paterniti JR, Jr. A selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) modulator blocks adipocyte differentiation but stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol.* 2000;14:1425-33.
38. Wright HM, Clish CB, Mikami T, Hauser S, Yanagi K, Hiramatsu R, Serhan CN, Spiegelman BM. A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 2000;275:1873-7.

39. Suh N, Wang Y, Williams CR, Risingsong R, Gilmer T, Willson TM, Sporn MB. A new ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), GW7845, inhibits rat mammary carcinogenesis. *Cancer Res.* 1999;59:5671-3.
40. Cobb JE, Blanchard SG, Boswell EG, Brown KK, Charifson PS, Cooper JP, Collins JL, Dezube M, Henke BR, et al. N-(2-benzoylphenyl)-L-tyrosine PPARgamma agonists. 3. structure-activity relationship and optimization of the N-aryl substituent. *J Med Chem.* 1998;41:5055-69.
41. Liang YC, Tsai SH, Tsai DC, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by flavonoids in mouse macrophages. *FEBS Lett.* 2001;496:12-8.
42. Hwang BY, Lee JH, Nam JB, Kim HS, Hong YS, Lee JJ. Two new furanoditerpenes from saururus chinensis and their effects on the activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Nat Prod.* 2002;65:616-7.
43. Kuroda M, Mimaki Y, Sashida Y, Mae T, Kishida H, Nishiyama T, Tsukagawa M, Konishi E, Takahashi K, et al. Phenolics with PPAR-gamma ligand-binding activity obtained from licorice (*glycyrrhiza uralensis* roots) and ameliorative effects of glycyrrin on genetically diabetic KK-A(y) mice. *Bioorg Med Chem Lett.* 2003;13:4267-72.
44. Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbaek C, Vidal-Puig AJ, Flier JS. Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J Biol Chem.* 1997;272:20230-5.
45. Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature.* 1992;358:771-4.
46. Gearing KL, Gottlicher M, Teboul M, Widmark E, Gustafsson JA. Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:1440-4.
47. Guo L, Tabrizchi R. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a drug target in the pathogenesis of insulin resistance. *Pharmacol Ther.* 2006;111:145-73.
48. Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors.[see comment]. *Nature.* 1995;377:454-7.



49. Horlein AJ, Naar AM, Heinzel T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Soderstrom M, Glass CK. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor.[see comment]. *Nature*. 1995;377:397-404.
50. Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. [review] [57 refs]. *Curr Opin Genet Dev*. 1999;9:140-7.
51. Zhu Y, Qi C, Calandra C, Rao MS, Reddy JK. Cloning and identification of mouse steroid receptor coactivator-1 (mSRC-1), as a coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Gene Expr*. 1996;6:185-95.
52. Zhu Y, Qi C, Jain S, Rao MS, Reddy JK. Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem*. 1997;272:25500-6.
53. Juge-Aubry C, Pernin A, Favez T, Burger AG, Wahli W, Meier CA, Desvergne B. DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. importance of the 5'-flanking region. *J Biol Chem*. 1997;272:25252-9.
54. Michalik L, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: Three isotypes for a multitude of functions. *Curr Opin Biotechnol*. 1999;10:564-70.
55. Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research*. 2005;51:85-94. A
56. Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: The PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:7473-8.
57. Motojima K, Passilly P, Peters JM, Gonzalez FJ, Latruffe N. Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem*. 1998;273:16710-4.
58. Yu S, Rao S, Reddy JK. Peroxisome proliferator-activated receptors, fatty acid oxidation, steatohepatitis and hepatocarcinogenesis. *Curr Mol Med*. 2003;3:561-72.
59. Schoonjans K, Peinado-Onsurbe J, Lefebvre AM, Heyman RA, Briggs M, Deeb S, Staels B, Auwerx J. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J*. 1996;15:5336-48.

60. Vosper H, Khoudoli GA, Graham TL, Palmer CN. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists, hyperlipidaemia, and atherosclerosis. *Pharmacol Ther.* 2002;95:47-62.
61. Carroll R, Severson DL. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligands inhibit cardiac lipoprotein lipase activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281:888-94.
62. Vu-Dac N, Chopin-Delannoy S, Gervois P, Bonnelye E, Martin G, Fruchart JC, Laudet V, Staels B. The nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha and rev-erbalpha mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates. *J Biol Chem.* 1998;273:25713-20.
63. Olefsky JM. Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Clin Invest.* 2000;106:467-72.
64. Knight BL, Patel DD, Humphreys SM, Wiggins D, Gibbons GF. Inhibition of cholesterol absorption associated with a PPAR alpha-dependent increase in ABC binding cassette transporter A1 in mice. *J Lipid Res.* 2003;44:2049-58.
65. Marx N, Sukhova GK, Collins T, Libby P, Plutzky J. PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation.* 1999;99:3125-31.
66. Goya K, Sumitani S, Xu X, Kitamura T, Yamamoto H, Kurebayashi S, Saito H, Kouhara H, Kasayama S, Kawase I. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists increase nitric oxide synthase expression in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:658-63.
67. Marx N, Mackman N, Schonbeck U, Yilmaz N, Hombach V, Libby P, Plutzky J. PPARalpha activators inhibit tissue factor expression and activity in human monocytes. *Circulation.* 2001;103:213-9.
68. Shu H, Wong B, Zhou G, Li Y, Berger J, Woods JW, Wright SD, Cai TQ. Activation of PPARalpha or gamma reduces secretion of matrix metalloproteinase 9 but not interleukin 8 from human monocytic THP-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;267:345-9.
69. Dressel U, Allen TL, Pippal JB, Rohde PR, Lau P, Muscat GE. The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol Endocrinol.* 2003;17:2477-93.

70. Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y, Watanabe M, Magoori K, Ioka RX, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:15924-9.
71. Berger J, Leibowitz MD, Doebber TW, Elbrecht A, Zhang B, Zhou G, Biswas C, Cullinan CA, Hayes NS, et al. Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPARdelta ligands produce distinct biological effects. *J Biol Chem*. 1999;274:6718-25.
72. Wolf G. The function of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor delta in energy homeostasis. *Nutr Rev*. 2003;61:387-90.
73. He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW. PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell*. 1999;99:335-45.
74. Barak Y, Liao D, He W, Ong ES, Nelson MC, Olefsky JM, Boland R, Evans RM. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:303-8.
75. Harman FS, Nicol CJ, Marin HE, Ward JM, Gonzalez FJ, Peters JM. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta attenuates colon carcinogenesis. *Nat Med*. 2004;10:481-3.
76. Moreno S, Farioli-Vecchioli S, Ceru MP. Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience*. 2004;123:131-45.
77. Saluja I, Granneman JG, Skoff RP. PPAR delta agonists stimulate oligodendrocyte differentiation in tissue culture. *Glia*. 2001;33:191-204.
78. Basu-Modak S, Braissant O, Escher P, Desvergne B, Honegger P, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor beta regulates acyl-CoA synthetase 2 in reaggregated rat brain cell cultures. *J Biol Chem*. 1999;274:35881-8.
79. Smith SA, Monteith GR, Robinson JA, Venkata NG, May FJ, Roberts-Thomson SJ. Effect of the peroxisome proliferator-activated receptor beta activator GW0742 in rat cultured cerebellar granule neurons. *J Neurosci Res*. 2004;77:240-9.
80. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. 1998;93:241-52.
81. Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation*. 2000;101:235-8.

82. Marx N, Sukhova G, Murphy C, Libby P, Plutzky J. Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: Differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma(PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. *Am J Pathol.* 1998;153:17-23.
83. Wakino S, Kintscher U, Kim S, Yin F, Hsueh WA, Law RE. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit retinoblastoma phosphorylation and G1--> S transition in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2000;275:22435-41.
84. Akiyama TE, Sakai S, Lambert G, Nicol CJ, Matsusue K, Pimprale S, Lee YH, Ricote M, Glass CK, et al. Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux. *Mol Cell Biol.* 2002;22:2607-19.
85. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature.* 1998;391:82-6.
86. Thieringer R, Fenyk-Melody JE, Le Grand CB, Shelton BA, Detmers PA, Somers EP, Carbin L, Moller DE, Wright SD, Berger J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma does not inhibit IL-6 or TNF-alpha responses of macrophages to lipopolysaccharide in vitro or in vivo. *J Immunol.* 2000;164:1046-54.
87. Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med.* 2001;7:48-52.
88. Haraguchi G, Kobayashi Y, Brown ML, Tanaka A, Isobe M, Gianturco SH, Bradley WA. PPAR(alpha) and PPAR(gamma) activators suppress the monocyte-macrophage apoB-48 receptor. *J Lipid Res.* 2003;44:1224-31.
89. Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:7614-9.
90. Murata T, He S, Hangai M, Ishibashi T, Xi XP, Kim S, Hsueh WA, Ryan SJ, Law RE, Hinton DR. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:2309-17.
91. Koeffler HP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers. *Clin Cancer Res.* 2003;9:1-9.

92. Aoun P, Simpkins JW, Agarwal N. Role of PPAR-gamma ligands in neuroprotection against glutamate-induced cytotoxicity in retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:2999-3004.
93. Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell.* 1974;3:127-33.
94. Green H, Kehinde O. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell.* 1976;7:105-13.
95. Negrel R, Grimaldi P, Ailhaud G. Establishment of preadipocyte clonal line from epididymal fat pad of ob/ob mouse that responds to insulin and to lipolytic hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75:6054-8.
96. Green H, Kehinde O. Formation of normally differentiated subcutaneous fat pads by an established preadipose cell line. *J Cell Physiol.* 1979;101:169-71.
97. Wabitsch M, Bruderlein S, Melzner I, Braun M, Mechtersheimer G, Moller P. LiSa-2, a novel human liposarcoma cell line with a high capacity for terminal adipose differentiation. *Int J Cancer.* 2000;88:889-94.
98. Wabitsch M, Brenner RE, Melzner I, Braun M, Moller P, Heinze E, Debatin KM, Hauner H. Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001;25:8-15.
99. Zilberfarb V, Pietri-Rouxel F, Jockers R, Krief S, Delouis C, Issad T, Strosberg AD. Human immortalized brown adipocytes express functional beta3-adrenoceptor coupled to lipolysis. *J Cell Sci.* 1997;110:801-7.
100. Darimont C, Zbinden I, Avanti O, Leone-Vautravers P, Giusti V, Burekhardt P, Pfeifer AM, Mace K. Reconstitution of telomerase activity combined with HPV-E7 expression allow human preadipocytes to preserve their differentiation capacity after immortalization. *Cell Death Differ.* 2003;10:1025-31.
101. Rodriguez AM, Elabd C, Delteil F, Astier J, Vernochet C, Saint-Marc P, Guesnet J, Guezennec A, Amri EZ, et al. Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;315:255-63.

102. Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne JY, Wdziekonski B, Villageois A, Bagnis C, Breittmayer JP, et al. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med.* 2005;201:1397-405.
103. Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois P, Darimont C, Ailhaud G. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci.* 1997;110:1279-85.
104. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature.* 2002;418:41-9.
105. Verfaillie CM. Adult stem cells: Assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol.* 2002;12:502-8.
106. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13:4279-95.
107. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7:211-28.
108. Planat-Benard V, Menard C, Andre M, Puceat M, Perez A, Garcia-Verdugo JM, Penicaud L, Casteilla L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res.* 2004;94:223-9.
109. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: Physiological and therapeutic perspectives. *Circulation.* 2004;109:656-63.
110. Linscheid P, Seboek D, Zulewski H, Keller U, Muller B. Autocrine/paracrine role of inflammation-mediated calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin expression in human adipose tissue. *Endocrinology.* 2005;146:2699-708.
111. Bacou F, el Andaloussi RB, Daussin PA, Micallef JP, Levin JM, Chammas M, Casteilla L, Reyne Y, Nougues J. Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells increases mass and functional capacity of damaged skeletal muscle. *Cell Transplant.* 2004;13:103-11.

112. Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumie A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*. 2004;110:349-55.
113. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*. 1998;78:783-809.
114. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*. 2000;14:1293-307.
115. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev*. 1998;78:783-809.
116. Rangwala SM, Lazar MA. Transcriptional control of adipogenesis. *Annu Rev Nutr*. 2000;20:535-59.
117. Entenmann G, Hauner H. Relationship between replication and differentiation in cultured human adipocyte precursor cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1996;270:C1011-1016.
118. Ntambi JM, Young-Cheul K. Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr*. 2000;130(12):3122S-6S.
119. Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem*. 1998;273:30057-60.
120. Feve B. Adipogenesis: Cellular and molecular aspects. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2005;19:483-99.
121. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*. 2000;14:1293-307.
122. Siiteri PK. Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr*. 1987;45:277-82.
123. Clarke SL, Robinson CE, Gimble JM. CAAT/Enhancer binding proteins directly modulate transcription from the peroxisome proliferator- activated receptor [ $\gamma$ ]2 promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1997;240:99-103.
124. Kletzien RF, Clarke SD, Ulrich RG. Enhancement of adipocyte differentiation by an insulin-sensitizing agent. *Mol Pharmacol*. 1992;41:393-8.

125. Chen F. , Law S. W. , Omalley B. W. . Identification of two mPPAR related receptors and evidence for the existence of five subfamily members. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;196:671-7.
126. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: Tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 1994;8:1224-34.
127. Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: Adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology.* 1994;135:798-800.
128. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 1994;79:1147-56.
129. Rosen ED, Hsu C, Wang X, Sakai S, Freeman MW, Gonzalez FJ, Spiegelman BM. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: A unified pathway. *Genes Dev.* 2002;16:22-6.
130. Graves RA, Tontonoz P, Spiegelman BM. Analysis of a tissue-specific enhancer: ARF6 regulates adipogenic gene expression. *Mol Cell Biol.* 1992;12:1202-8.
131. Tontonoz P, Graves RA, Budavari AI, Erdjument-Bromage H, Lui M, Hu E, Tempst P, Spiegelman BM. Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha. *Nucleic Acids Res.* 1994;22:5628-34.
132. Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol.* 1995;15:351-7.
133. Devine JH, Eubank DW, Clouthier DE, Tontonoz P, Spiegelman BM, Hammer RE, Beale EG. Adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase promoter requires peroxisome proliferator-activated receptor gamma and 9-cis-retinoic acid receptor binding to an adipocyte-specific enhancer in vivo. *J Biol Chem.* 1999;274:13604-12.
134. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. PPAR[gamma] is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Molecular Cell.* 1999;4:585-95.
135. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T. PPAR[gamma] mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Molecular Cell.* 1999;4:597-609.



136. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. PPAR[gamma] is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell*. 1999;4:611-7.
137. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. PPAR[gamma] is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Molecular Cell*. 1999;4:585-95.
138. He W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, Nelson M, Ong E, Olefsky JM, Evans et al. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 2003;100:15712-7.
139. Zhang J, Fu M, Cui T, Xiong C, Xu K, Zhong W, Xiao Y, Floyd D, Liang J, Li et al. Selective disruption of PPARgamma 2 impairs the development of adipose tissue and insulin sensitivity. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 2004;101:10703-8.
140. Koutnikova H, Cock T, Watanabe M, Houten SM, Champy M, Dierich A, Auwerx J. Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR gamma hypomorphic mice. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. 2003;100:14457-62.
141. Norris AW, Chen L, Fisher SJ, Szanto I, Ristow M, Jozsi AC, Hirshman MF, Rosen ED, Goodyear LJ, Gonzalez et al. Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *J Clin Invest*. 2003;112:608-18.
142. Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC, Nemesh J, Lane CR, Schaffner SF, Bolk S, Brewer et al. The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2000;26:76-80.
143. Tsai Y, Maeda N. PPAR[gamma]: A critical determinant of body fat distribution in humans and mice. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2005;15:81-5.
144. Rangwala SM, Rhoades B, Shapiro JS, Rich AS, Kim JK, Shulman GI, Kaestner KH, Lazar MA. Genetic modulation of PPAR[gamma] phosphorylation regulates insulin sensitivity. *Developmental Cell*. 2003;5:657-63.
145. Miles PD, Barak Y, He W, Evans RM, Olefsky JM. Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR-gamma deficiency. *J Clin Invest*. 2000;105:287-92.

146. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Ide T, Kubota N, Terauchi Y, Tobe et al. The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) deficiency and PPARgamma agonist improve insulin resistance. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2001;276:41245-54.
147. Chao L, Marcus-Samuels B, Mason MM, Moitra J, Vinson C, Arioglu E, Gavrilova O, Reitman ML. Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J Clin Invest*. 2000;106:1221-8.
148. Inzucchi SE, Maggs DG, Spollett GR, Page SL, Rife FS, Walton V, Shulman GI. Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1998;338:867-72.
149. Hevener AL, He W, Barak Y, Le J, Bandyopadhyay G, Olson P, Wilkes J, Evans RM, Olefsky J. Muscle-specific pparg deletion causes insulin resistance. *Nat Med*. 2003;9:1491-7.
150. Stepan CM, Lazar MA. Resistin and obesity-associated insulin resistance. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2002;13:18-23.
151. Lazar MA. PPAR[gamma], 10 years later. *Biochimie*. 2005;87:9-13.
152. Rangwala SM, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor [gamma] in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25:331-6.
153. Freytag SO, Paielli DL, Gilbert JD. Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev*. 1994;8:1654-63.
154. Tontonoz P, Kim JB, Graves RA, Spiegelman BM. ADD1: A novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol*. 1993;13:4753-9.
155. Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foulle F. SREBP transcription factors: Master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*. 2004;86:839-48.
156. Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL, Brown MS. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*. 1993;75:187-97.
157. Kim JB, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes & Development*. 1996;10:1096-107.

158. Kim JB, Wright HM, Wright M, Spiegelman BM. ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:4333-7.
159. Edwards PA, Tabor D, Kast HR, Venkateswaran A. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2000;1529:103-13.
160. Ericsson J, Jackson SM, Kim JB, Spiegelman BM, Edwards PA. Identification of glycerol-3-phosphate acyltransferase as an adipocyte determination and differentiation factor 1- and sterol regulatory element-binding protein-responsive gene. *J Biol Chem*. 1997;272:7298-305.
161. Kim JB, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G, Lowell BB, Spiegelman BM. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest*. 1998;101:1-9.
162. Kim SY, Kim HI, Kim TH, Im SS, Park SK, Lee IK, Kim KS, Ahn YH. SREBP-1c mediates the insulin-dependent hepatic glucokinase expression. *J Biol Chem*. 2004;279:30823-9.
163. Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): Tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*. 1996;137:354-66.
164. Tong Q, Dalgin G, Xu H, Ting CN, Leiden JM, Hotamisligil GS. Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science*. 2000;290:134-8.
165. Cederberg A, Gronning LM, Ahren B, Tasken K, Carlsson P, Enerback S. FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell*. 2001;106:563-73.
166. Hagman J, Belanger C, Travis A, Turek CW, Grosschedl R. Cloning and functional characterization of early B-cell factor, a regulator of lymphocyte-specific gene expression. *Genes Dev*. 1993;7:760-73.
167. Akerblad P, Sigvardsson M. Early B cell factor is an activator of the B lymphoid kinase promoter in early B cell development. *J Immunol*. 1999;163:5453-61.
168. Akerblad P, Rosberg M, Leanderson T, Sigvardsson M. The B29 (immunoglobulin beta-chain) gene is a genetic target for early B-cell factor. *Mol Cell Biol*. 1999;19:392-401.
169. Dowell P, Cooke DW. Olf-1/early B cell factor is a regulator of glut4 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 2002;277:1712-8.

170. Akerblad P, Lind U, Liberg D, Bamberg K, Sigvardsson M. Early B-cell factor (O/E-1) is a promoter of adipogenesis and involved in control of genes important for terminal adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol.* 2002;22:8015-25.
171. Lu TT, Repa JJ, Mangelsdorf DJ. Orphan nuclear receptors as eLiXiRs and FiXeRs of sterol metabolism. *J Biol Chem.* 2001;276:37735-8.
172. Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* 1995;9:1033-45.
173. Tobin KA, Steineger HH, Alberti S, Spydevold O, Auwerx J, Gustafsson JA, Nebb HI. Cross-talk between fatty acid and cholesterol metabolism mediated by liver X receptor-alpha. *Mol Endocrinol.* 2000;14:741-52.
174. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, et al. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell.* 2001;7:161-71.
175. Juvet LK, Andresen SM, Schuster GU, Dalen KT, Tobin KA, Hollung K, Haugen F, Jacinto S, Ulven SM, et al. On the role of liver X receptors in lipid accumulation in adipocytes. *Mol Endocrinol.* 2003;17:172-82.
176. Seo JB, Moon HM, Kim WS, Lee YS, Jeong HW, Yoo EJ, Ham J, Kang H, Park MG, et al. Activated liver X receptors stimulate adipocyte differentiation through induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *Mol Cell Biol.* 2004;24:3430-44.
177. Wu Z, Bucher NL, Farmer SR. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol Cell Biol.* 1996;16:4128-36.
178. Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.* 1991;5:1538-52.
179. Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 1998;273:30057-60.
180. Rosen ED. The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2005;73:31-4.
181. Fajas L. Adipogenesis: A cross-talk between cell proliferation and cell differentiation. *Ann Med.* 2003;35:79-85.

182. MacDougald OA, Cornelius P, Lin FT, Chen SS, Lane MD. Glucocorticoids reciprocally regulate expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha and delta genes in 3T3-L1 adipocytes and white adipose tissue. *The Journal Of Biological Chemistry*. 1994;269:19041-7.
183. Joyner JM, Hutley LJ, Cameron DP. Glucocorticoid receptors in human preadipocytes: Regional and gender differences. *J Endocrinol*. 2000;166:145-52.
184. Prusty D, Park BH, Davis KE, Farmer SR. Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and C/EBPalpha gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem*. 2002;277:46226-32.
185. Bost F, Aouadi M, Caron L, Even P, Belmonte N, Prot M, Dani C, Hofman P, Pages G, et al. The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis. *Diabetes*. 2005;54:402-11.
186. Engelman JA, Berg AH, Lewis RY, Lin A, Lisanti MP, Scherer PE. Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) or salicylate induces spontaneous 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem*. 1999;274:35630-8.
187. Sweeney G, Somwar R, Ramlal T, Volchuk A, Ueyama A, Klip A. An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. *J Biol Chem*. 1999;274:10071-8.
188. Leow MK, Addy CL, Mantzoros CS. Clinical review 159: Human immunodeficiency virus/highly active antiretroviral therapy-associated metabolic syndrome: Clinical presentation, pathophysiology, and therapeutic strategies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:1961-76.
189. Caron M, Auclair M, Sterlingot H, Kornprobst M, Capeau J. Some HIV protease inhibitors alter lamin A/C maturation and stability, SREBP-1 nuclear localization and adipocyte differentiation. *AIDS*. 2003;17:2437-44.
190. Jain RG, Lenhard JM. Select HIV protease inhibitors alter bone and fat metabolism ex vivo. *J Biol Chem*. 2002;277:19247-50.
191. Dowell P, Flexner C, Kwiterovich PO, Lane MD. Suppression of preadipocyte differentiation and promotion of adipocyte death by HIV protease inhibitors. *J Biol Chem*. 2000;275:41325-32.

192. Lenhard JM, Furfine ES, Jain RG, Ittoop O, Orband-Miller LA, Blanchard SG, Paulik MA, Weiel JE. HIV protease inhibitors block adipogenesis and increase lipolysis in vitro. *Antiviral Res.* 2000;47:121-9.
193. Zhang B, MacNaul K, Szalkowski D, Li Z, Berger J, Moller DE. Inhibition of adipocyte differentiation by HIV protease inhibitors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:4274-7.
194. Hadri KE, Glorian M, Monsempes C, Dieudonne MN, Pecquery R, Giudicelli Y, Andreani M, Dugail I, Feve B. In vitro suppression of the lipogenic pathway by the nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz in 3T3 and human preadipocytes or adipocytes. *J Biol Chem.* 2004;279:15130-41.
195. Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA. Inhibition of adipogenesis by wnt signaling. *Science.* 2000;289:950-3.
196. Vertino AM, Taylor-Jones JM, Longo KA, Bearden ED, Lane TF, McGehee RE, Jr, MacDougald OA, Peterson CA. Wnt10b deficiency promotes coexpression of myogenic and adipogenic programs in myoblasts. *Mol Biol Cell.* 2005;16:2039-48.
197. Villena JA, Kim KH, Sul HS. Pref-1 and ADSF/resistin: Two secreted factors inhibiting adipose tissue development. *Horm Metab Res.* 2002;34:664-70.
198. Smas CM, Sul HS. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell.* 1993;73:725-34.
199. Lee K, Villena JA, Moon YS, Kim KH, Lee S, Kang C, Sul HS. Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (pref-1). *J Clin Invest.* 2003;111:453-61.
200. Moon YS, Smas CM, Lee K, Villena JA, Kim KH, Yun EJ, Sul HS. Mice lacking paternally expressed pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol Cell Biol.* 2002;22:5585-92.
201. Gaillard D, Negrel R, Lagarde M, Ailhaud G. Requirement and role of arachidonic acid in the differentiation of pre-adipose cells. *Biochem J.* 1989;257:389-97.
202. Gimble JM, Wanker F, Wang CS, Bass H, Wu X, Kelly K, Yancopoulos GD, Hill MR. Regulation of bone marrow stromal cell differentiation by cytokines whose receptors share the gp130 protein. *J Cell Biochem.* 1994;54:122-33.

203. Ron D, Brasier AR, McGehee RE, Jr, Habener JF. Tumor necrosis factor-induced reversal of adipocytic phenotype of 3T3-L1 cells is preceded by a loss of nuclear CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP). *J Clin Invest.* 1992;89:223-33.
204. Geliebter A, Bracco EF, Van Itallie TB, Hashim SA. Medium-chain triglyceride diet and obesity. *Int J Obes.* 1984;8:191-2.
205. Han J, Farmer SR, Kirkland JL, Corkey BE, Yoon R, Pirtskhalava T, Ido Y, Guo W. Octanoate attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr.* 2002;132:904-10.
206. Han J, Hamilton JA, Kirkland JL, Corkey BE, Guo W. Medium-chain oil reduces fat mass and down-regulates expression of adipogenic genes in rats. *Obes Res.* 2003;11:734-44.
207. Evans M, Geigerman C, Cook J, Curtis L, Kuebler B, McIntosh M. Conjugated linoleic acid suppresses triglyceride accumulation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *Lipids.* 2000;35:899-910.
208. Kang K, Liu W, Albright KJ, Park Y, Pariza MW. Trans-10,cis-12 CLA inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreases PPAR gamma expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;303:795-9.
209. Brown JM, Boysen MS, Jensen SS, Morrison RF, Storkson J, Lea-Currie R, Pariza M, Mandrup S, McIntosh MK. Isomer-specific regulation of metabolism and PPARgamma signaling by CLA in human preadipocytes. *J Lipid Res.* 2003;44:1287-300.
210. Brodie AE, Manning VA, Ferguson KR, Jewell DE, Hu CY. Conjugated linoleic acid inhibits differentiation of pre- and post- confluent 3T3-L1 preadipocytes but inhibits cell proliferation only in pre-confluent cells. *J Nutr.* 1999;129:602-6.
211. Granlund L, Juvet LK, Pedersen JI, Nebb HI. Trans10, cis12-conjugated linoleic acid prevents triacylglycerol accumulation in adipocytes by acting as a PPARgamma modulator. *J Lipid Res.* 2003;44:1441-52.
212. Granlund L, Pedersen JI, Nebb HI. Impaired lipid accumulation by trans10, cis12 CLA during adipocyte differentiation is dependent on timing and length of treatment. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1687:11-22.
213. Kuppusamy UR, Das NP. Potentiation of beta-adrenoceptor agonist-mediated lipolysis by quercetin and fisetin in isolated rat adipocytes. *Biochem Pharmacol.* 1994;47:521-9.

214. Kuppasamy UR, Das NP. Effects of flavonoids on cyclic AMP phosphodiesterase and lipid mobilization in rat adipocytes. *Biochem Pharmacol.* 1992;44:1307-15.
215. Shisheva A, Shechter Y. Quercetin selectively inhibits insulin receptor function in vitro and the bioresponses of insulin and insulinomimetic agents in rat adipocytes. *Biochemistry.* 1992;31:8059-63.
216. Szkudelska K, Nogowski L, Szkudelski T. Genistein affects lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000;75:265-71.
217. Harmon AW, Harp JB. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001;280:C807-13.
218. Kemp BE, Stapleton D, Campbell DJ, Chen ZP, Murthy S, Walter M, Gupta A, Adams JJ, Katsis F, et al. AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochem Soc Trans.* 2003;31:162-8.
219. Meisse D, Van de Castele M, Beauloye C, Hainault I, Kefas BA, Rider MH, Fougelle F, Hue L. Sustained activation of AMP-activated protein kinase induces c-jun N-terminal kinase activation and apoptosis in liver cells. *FEBS Lett.* 2002;526:38-42.
220. Carriere A, Fernandez Y, Rigoulet M, Penicaud L, Casteilla L. Inhibition of preadipocyte proliferation by mitochondrial reactive oxygen species. *FEBS Lett.* 2003;550:163-7.
221. Hwang JT, Park IJ, Shin JI, Lee YK, Lee SK, Baik HW, Ha J, Park OJ. Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338:694-9.
222. Ardevol A, Blade C, Salvado MJ, Arola L. Changes in lipolysis and hormone-sensitive lipase expression caused by procyanidins in 3T3-L1 adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000;24:319-24.
223. Pinent M, Blade MC, Salvado MJ, Arola L, Hackl H, Quackenbush J, Trajanoski Z, Ardevol A. Grape-seed derived procyanidins interfere with adipogenesis of 3T3-L1 cells at the onset of differentiation. *Int J Obes (Lond).* 2005;29:934-41.
224. Guerre-Millo M. Adipose tissue hormones. *J Endocrinol Invest.* 2002;25:855-61.
225. Cederberg A, Enerback S. Insulin resistance and type 2 diabetes--an adipocentric view. *Curr Mol Med.* 2003;3:107-25.



226. Trayhurn P, Beattie JH. Physiological role of adipose tissue: White adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc.* 2001;60:329-39.
227. Havel PJ. Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: Leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Curr Opin Lipidol.* 2002;13:51-9.
228. White MF, Kahn CR. The insulin signaling system. *J Biol Chem.* 1994;269:1-4.
229. Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 1999;103:931-43.
230. Hunter SJ, Garvey WT. Insulin action and insulin resistance: Diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system. *Am J Med.* 1998;105:331-45.
231. Carey DG, Jenkins AB, Campbell LV, Freund J, Chisholm DJ. Abdominal fat and insulin resistance in normal and overweight women: Direct measurements reveal a strong relationship in subjects at both low and high risk of NIDDM. *Diabetes.* 1996;45:633-8.
232. Samaras K, Campbell LV. Increasing incidence of type 2 diabetes in the third millennium: Is abdominal fat the central issue? *Diabetes Care.* 2000;23:441-2.
233. Hegarty BD, Furler SM, Ye J, Cooney GJ, Kraegen EW. The role of intramuscular lipid in insulin resistance. *Acta Physiol Scand.* 2003;178:373-83.
234. Schmitz-Peiffer C. Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: Mechanisms induced by lipid oversupply. *Cell Signal.* 2000;12:583-94.
235. Greenfield JR, Campbell LV. Insulin resistance and obesity. *Clin Dermatol.* 2004;22:289-95.
236. Fruhbeck G, Salvador J. Role of adipocytokines in metabolism and disease. *Nutr Res.* 2004;24:803-26.
237. Fasshauer M, Paschke R. Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia.* 2003;46:1594-603.
238. Furnsinn C, Waldhauser W. Thiazolidinediones: Metabolic actions in vitro. *Diabetologia.* 2002;45:1211-23.
239. Gurnell M, Savage DB, Chatterjee VK, O'Rahilly S. The metabolic syndrome: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its therapeutic modulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:2412-21.

240. Satoh N, Ogawa Y, Usui T, Tagami T, Kono S, Uesugi H, Sugiyama H, Sugawara A, Yamada K, et al. Antiatherogenic effect of pioglitazone in type 2 diabetic patients irrespective of the responsiveness to its antidiabetic effect. *Diabetes Care*. 2003;26:2493-9.
241. Jazet IM, Pijl H, Meinders AE. Adipose tissue as an endocrine organ: Impact on insulin resistance. *Neth J Med*. 2003;61:194-212.
242. Purohit A, Ghilchik MW, Duncan L, Wang DY, Singh A, Walker MM, Reed MJ. Aromatase activity and interleukin-6 production by normal and malignant breast tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80:3052-8.
243. Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: Depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83:847-50.
244. Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, Hainque B. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:3338-42.
245. Mohamed-Ali V, Flower L, Sethi J, Hotamisligil G, Gray R, Humphries SE, York DA, Pinkney J. Beta-adrenergic regulation of IL-6 release from adipose tissue: In vivo and in vitro studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:5864-9.
246. Vicennati V, Vottero A, Friedman C, Papanicolaou DA. Hormonal regulation of interleukin-6 production in human adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002;26:905-11.
247. Sewter CP, Digby JE, Blows F, Prins J, O'Rahilly S. Regulation of tumour necrosis factor-alpha release from human adipose tissue in vitro. *J Endocrinol*. 1999;163:33-8.
248. Peraldi P, Xu M, Spiegelman BM. Thiazolidinediones block tumor necrosis factor-alpha-induced inhibition of insulin signaling. *J Clin Invest*. 1997;100:1863-9.
249. Morin CL, Eckel RH, Marcel T, Pagliassotti MJ. High fat diets elevate adipose tissue-derived tumor necrosis factor-alpha activity. *Endocrinology*. 1997;138:4665-71.
250. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372:425-32.
251. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 1996;334:292-5.

252. Lonnqvist F, Arner P, Nordfors L, Schalling M. Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nat Med.* 1995;1:950-3.
253. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: Evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science.* 1995;269:546-9.
254. Shimada K, Miyazaki T, Daida H. Adiponectin and atherosclerotic disease. *Clinica Chimica Acta.* 2004;344:1-12.
255. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem.* 1995;270:26746-9.
256. Halleux CM, Takahashi M, Delporte ML, Detry R, Funahashi T, Matsuzawa Y, Brichard SM. Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;288:1102-7.
257. Kappes A, Loffler G. Influences of ionomycin, dibutyryl-cycloAMP and tumour necrosis factor-alpha on intracellular amount and secretion of apM1 in differentiating primary human preadipocytes. *Horm Metab Res.* 2000;32:548-54.
258. Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, O'Rahilly S. Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes.* 2001;50:2199-202.
259. Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Luft FC, Sharma AM. Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes Res.* 2002;10:1-5.
260. Nagaev I, Smith U. Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;285:561-4.
261. Reaven GM. Banting lecture 1988. role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 1988;37:1595-607.
262. Kaplan NM. The deadly quartet. upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern Med.* 1989;149:1514-20.
263. Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP, Mitchell BD, Morales PA, Stern MP. Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes.* 1992;41:715-22.
264. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, Nissen M, Taskinen MR, Groop L. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care.* 2001;24:683-9.

265. Bonora E, Formentini G, Calcaterra F, Lombardi S, Marini F, Zenari L, Saggiani F, Poli M, Perbellini S, et al. HOMA-estimated insulin resistance is an independent predictor of cardiovascular disease in type 2 diabetic subjects: Prospective data from the verona diabetes complications study. *Diabetes Care*. 2002;25:1135-41.
266. Resnick HE, Jones K, Ruotolo G, Jain AK, Henderson J, Lu W, Howard BV, Strong Heart Study. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular disease in nondiabetic american indians: The strong heart study. *Diabetes Care*. 2003;26:861-7.
267. DECODE Study Group, European Diabetes Epidemiology Group. Is the current definition for diabetes relevant to mortality risk from all causes and cardiovascular and noncardiovascular diseases? *Diabetes Care*. 2003;26:688-96.
268. Hills SA, Balkau B, Coppack SW, Dekker JM, Mari A, Natali A, Walker M, Ferrannini E, EGIR-RISC Study Group. The EGIR-RISC STUDY (the european group for the study of insulin resistance: Relationship between insulin sensitivity and cardiovascular disease risk): I. methodology and objectives. *Diabetologia*. 2004;47:566-70.
269. Carr A, Workman C, Carey D, Rogers G, Martin A, Baker D, Wand H, Law M, Samaras K, et al. No effect of rosiglitazone for treatment of HIV-1 lipodystrophy: Randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2004;363:429-38.
270. Grundy SM, Brewer HB, Jr, Cleeman JI, Smith SC, Jr, Lenfant C, American Heart Association, National Heart, Lung, and Blood Institute. 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;109:433-8.
271. Avramoglu RK, Basciano H, Adeli K. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clin Chim Acta*. 2006;368:1-19.
272. Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. european group for the study of insulin resistance (EGIR). *Diabet Med*. 1999;16:442-3.
273. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III). *JAMA*. 2001;285:2486-97.
274. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A consensus statement from the international diabetes federation. *Diabet Med*. 2006;23:469-80.

275. Giron LM, Freire V, Alonzo A, Caceres A. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the caribs of guatemala. *J Ethnopharmacol.* 1991;34:173-87.
276. Lans C, Brown G. Observations on ethnoveterinary medicines in trinidad and tobago. *Prev Vet Med.* 1998;35:125-42.
277. Yesilada E, Gurbuz I, Shibata H. Screening of turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-helicobacter pylori activity. *J Ethnopharmacol.* 1999;66:289-93.
278. Ng TB, Chan WY, Yeung HW. Proteins with abortifacient, ribosome inactivating, immunomodulatory, antitumor and anti-AIDS activities from cucurbitaceae plants. [review] [75 refs]. *Gen Pharmacol.* 1992;23:579-90.
279. Basch E, Gabardi S, Ulbricht C. Bitter melon (*momordica charantia*): A review of efficacy and safety. [review] [30 refs]. *American Journal of Health-System Pharmacy.* 2003;60:356-9.
280. Virdi J, Sivakami S, Shahani S, Suthar AC, Banavalikar MM, Biyani MK. Antihyperglycemic effects of three extracts from *momordica charantia*. *J Ethnopharmacol.* 2003;88:107-11.
281. Platel K, Shurpalekar KS, Srinivasan K. Influence of bitter gourd (*momordica charantia*) on growth and blood constituents in albino rats. *Nahrung.* 1993;37:156-60.
282. Parkash A, Ng TB, Tso WW. Purification and characterization of charantin, a napin-like ribosome-inactivating peptide from bitter gourd (*momordica charantia*) seeds. *Journal of Peptide Research.* 2002;59:197-202.
283. Husain J, Tickle IJ, Wood SP. Crystal structure of momordin, a type I ribosome inactivating protein from the seeds of *momordica charantia*. *FEBS Lett.* 1994;342:154-8.
284. Xie H, Huang S, Deng H, Wu Z, Ji A. Study on chemical components of *momordica charantia*. *Zhong Yao Cai.* 1998;21:458-9.
285. Yuan YR, He YN, Xiong JP, Xia ZX. Three-dimensional structure of beta-momorcharin at 2.55 Å resolution. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography.* 1999;55:1144-51.
286. Murakami T, Emoto A, Matsuda H, Yoshikawa M. Medicinal foodstuffs. XXI. structures of new cucurbitane-type triterpene glycosides, goyaglycosides-a, -b, -c, -d, -e, -f, -g, and -h, and new oleanane-type triterpene saponins, goyasaponins I, II, and III, from the fresh fruit of japanese *momordica charantia* L. *Chem Pharm Bull.* 2001;49:54-63.

287. Ali L, Khan AK, Mamun MI, Mosihuzzaman M, Nahar N, Nur-e-Alam M, Rokeya B. Studies on hypoglycemic effects of fruit pulp, seed, and whole plant of *momordica charantia* on normal and diabetic model rats. *Planta Med.* 1993;59:408-12.
288. Takemoto DJ, Dunford C, McMurray MM. The cytotoxic and cytostatic effects of the bitter melon (*momordica charantia*) on human lymphocytes. *Toxicon.* 1982;20:593-9.
289. Wang HX, Ng TB. Examination of lectins, polysaccharopeptide, polysaccharide, alkaloid, coumarin and trypsin inhibitors for inhibitory activity against human immunodeficiency virus reverse transcriptase and glycohydrolases. *Planta Med.* 2001;67:669-72.
290. Chakraborty S, Bhattacharya S, Ghosh S, Bera AK, Haldar U, Pal AK, Mukhopadhyay BP, Banerjee A. Structural and interactional homology of clinically potential trypsin inhibitors: Molecular modelling of cucurbitaceae family peptides using the X-ray structure of MCTI-II.[erratum appears in protein eng. 2003 mar;16(3):241]. *Protein Eng.* 2000;13:551-5.
291. Hamato N, Koshiha T, Pham TN, Tatsumi Y, Nakamura D, Takano R, Hayashi K, Hong YM, Hara S. Trypsin and elastase inhibitors from bitter gourd (*momordica charantia* LINN.) seeds: Purification, amino acid sequences, and inhibitory activities of four new inhibitors. *J Biochem.* 1995;117:432-7.
292. Takemoto DJ, Kresie R, Vaughn D. Partial purification and characterization of a guanylate cyclase inhibitor with cytotoxic properties from the bitter melon (*momordica charantia*). *Biochemical & Biophysical Research Communications.* 1980;94:332-9.
293. Matsuura H, Asakawa C, Kurimoto M, Mizutani J. Alpha-glucosidase inhibitor from the seeds of balsam pear (*momordica charantia*) and the fruit bodies of *grifola frondosa*. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry.* 2002;66:1576-8.
294. Jayasooriya AP, Sakono M, Yukizaki C, Kawano M, Yamamoto K, Fukuda N. Effects of *momordica charantia* powder on serum glucose levels and various lipid parameters in rats fed with cholesterol-free and cholesterol-enriched diets. *J Ethnopharmacol.* 2000;72(1-2):331-6.
295. Bailey CJ, Day C, Turner SL, Leatherdale BA. Cerasee, a traditional treatment for diabetes. studies in normal and streptozotocin diabetic mice. *Diabetes Research.* 1985;2:81-4.
296. Kar A, Choudhary BK, Bandyopadhyay NG. Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2003;84:105-8.
297. Rathi SS, Grover JK, Vikrant V, Biswas NR. Prevention of experimental diabetic cataract by indian ayurvedic plant extracts. *Phytotherapy Research.* 2002;16:774-7.

298. Miura T, Itoh C, Iwamoto N, Kato M, Kawai M, Park SR, Suzuki I. Hypoglycemic activity of the fruit of the *momordica charantia* in type 2 diabetic mice. *Journal of Nutritional Science & Vitaminology*. 2001;47:340-4.
299. Pari L, Ramakrishnan R, Venkateswaran S. Antihyperglycaemic effect of diamed, a herbal formulation, in experimental diabetes in rats. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*. 2001;53:1139-43.
300. Khanna P, Jain SC, Panagariya A, Dixit VP. Hypoglycemic activity of polypeptide-p from a plant source. *J Nat Prod*. 1981 Nov-Dec;44:648-55.
301. Ahmed I, Adeghate E, Sharma AK, Pallot DJ, Singh J. Effects of *momordica charantia* fruit juice on islet morphology in the pancreas of the streptozotocin-diabetic rat. *Diabetes Research & Clinical Practice*. 1998;40:145-51.
302. Welihinda J, Karunanayake EH. Extra-pancreatic effects of *momordica charantia* in rats. *J Ethnopharmacol*. 1986;17:247-55.
303. Higashino H, Suzuki A, Tanaka Y, Pootakham K. Hypoglycemic effects of siamese *momordica charantia* and *phyllanthus urinaria* extracts in streptozotocin-induced diabetic rats (the 1st report). *Nippon Yakurigaku Zasshi - Folia Pharmacologica Japonica*. 1992;100:415-21.
304. Day C, Cartwright T, Provost J, Bailey CJ. Hypoglycaemic effect of *momordica charantia* extracts. *Planta Med*. 1990;56:426-9.
305. Sarkar S, Pranava M, Marita R. Demonstration of the hypoglycemic action of *momordica charantia* in a validated animal model of diabetes. *Pharmacological Research*. 1996;33:1-4.
306. Shibib BA, Khan LA, Rahman R. Hypoglycaemic activity of *coccinia indica* and *momordica charantia* in diabetic rats: Depression of the hepatic gluconeogenic enzymes glucose-6-phosphatase and fructose-1,6-bisphosphatase and elevation of both liver and red-cell shunt enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochem J*. 1993;292:267-70.
307. Matsuda H, Li Y, Murakami T, Matsumura N, Yamahara J, Yoshikawa M. Antidiabetic principles of natural medicines. III. structure-related inhibitory activity and action mode of oleanolic acid glycosides on hypoglycemic activity. *Chem Pharm Bull*. 1998;46:1399-403.
308. Rathi SS, Grover JK, Vats V. The effect of *momordica charantia* and *mucuna pruriens* in experimental diabetes and their effect on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism. *Phytotherapy Research*. 2002;16:236-43.

309. Grover JK, Vats V, Rathi SS, Dawar R. Traditional indian anti-diabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice. *J Ethnopharmacol.* 2001;76:233-8.
310. Grover JK, Rathi SS, Vats V. Amelioration of experimental diabetic neuropathy and gastropathy in rats following oral administration of plant (*eugenia jambolana*, *mucuna pruriens* and *tinospora cordifolia*) extracts. *Indian J Exp Biol.* 2002;40:273-6.
311. Reaven GM. Banting lecture 1988. role of insulin resistance in human disease. [review] [71 refs]. *Diabetes.* 1988;37:1595-607.
312. Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome.[see comment]. [review] [134 refs]. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:911-22.
313. Srivastava Y, Venkatakrishna-Bhatt H, Verma Y. Effect of *momordica charantia* linn. pomous aqueous extract on cataractogenesis in murrin alloxan diabetics. *Pharmacol Res Commun.* 1988;20:201-9.
314. Ahmad N, Hassan MR, Halder H, Bennoor KS. Effect of *momordica charantia* (karolla) extracts on fasting and postprandial serum glucose levels in NIDDM patients. *Bangladesh Med Res Counc Bull.* 1999;25:11-3.
315. Welihinda J, Karunanayake EH, Sheriff MH, Jayasinghe KS. Effect of *momordica charantia* on the glucose tolerance in maturity onset diabetes. *J Ethnopharmacol.* 1986;17:277-82.
316. Foa-Tomasi L, Campadelli-Fiume G, Barbieri L, Stirpe F. Effect of ribosome-inactivating proteins on virus-infected cells. inhibition of virus multiplication and of protein synthesis. *Arch Virol.* 1982;71:323-32.
317. Bourinbaiar AS, Lee-Huang S. The activity of plant-derived antiretroviral proteins MAP30 and GAP31 against herpes simplex virus in vitro. *Biochemical & Biophysical Research Communications.* 1996;219:923-9.
318. Wang HX, Ng TB. Studies on the anti-mitogenic, anti-phage and hypotensive effects of several ribosome inactivating proteins. *Comparative Biochemistry & Physiology.Toxicology & Pharmacology: Cbp.* 2001;128:359-66.
319. Lee-Huang S, Huang PL, Huang PL, Bourinbaiar AS, Chen HC, Kung HF. Inhibition of the integrase of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 by anti-HIV plant proteins MAP30 and GAP31. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:8818-22.



320. Cunnick JE, Sakamoto K, Chapes SK, Fortner GW, Takemoto DJ. Induction of tumor cytotoxic immune cells using a protein from the bitter melon (*momordica charantia*). *Cell Immunol.* 1990;126:278-89.
321. Zheng YT, Ben KL, Jin SW. Alpha-momorcharin inhibits HIV-1 replication in acutely but not chronically infected T-lymphocytes. *Zhongguo Yao Li Xue Bao/Acta Pharmacologica Sinica.* 1999;20:239-43.
322. Au TK, Collins RA, Lam TL, Ng TB, Fong WP, Wan DC. The plant ribosome inactivating proteins luffin and saporin are potent inhibitors of HIV-1 integrase. *FEBS Lett.* 2000;471:169-72.
323. Licastro F, Franceschi C, Barbieri L, Stirpe F. Toxicity of *momordica charantia* lectin and inhibitor for human normal and leukaemic lymphocytes. *Virchows Archiv.B.Cell Pathology.* 1980;33:257-65.
324. Sun Y, Huang PL, Li JJ, Huang YQ, Zhang L, Huang PL, Lee-Huang S. Anti-HIV agent MAP30 modulates the expression profile of viral and cellular genes for proliferation and apoptosis in AIDS-related lymphoma cells infected with kaposi's sarcoma-associated virus. *Biochemical & Biophysical Research Communications.* 2001;287:983-94.
325. Singh N, Tyagi SD, Agarwal SC. Effects of long term feeding of acetone extract of *momordica charantia* (whole fruit powder) on alloxan diabetic albino rats. *Indian Journal of Physiology & Pharmacology.* 1989;33:97-100.
326. Dhar P, Ghosh S, Bhattacharyya DK. Dietary effects of conjugated octadecatrienoic fatty acid (9 *cis*, 11 *trans*, 13 *trans*) levels on blood lipids and nonenzymatic in vitro lipid peroxidation in rats. *Lipids.* 1999;34:109-14.
327. Spreafico F, Malfiore C, Moras ML, Marmonti L, Filippeschi S, Barbieri L, Perocco P, Stirpe F. The immunomodulatory activity of the plant proteins *momordica charantia* inhibitor and pokeweed antiviral protein. *Int J Immunopharmacol.* 1983;5(4):335-43.
328. Choi J, Lee KT, Jung H, Park HS, Park HJ. Anti-rheumatoid arthritis effect of the *kochia scoparia* fruits and activity comparison of momordin Ic, its prosapogenin and sapogenin. *Arch Pharm Res.* 2002;25:336-42.
329. Grover JK, Yadav SP. Pharmacological actions and potential uses of *momordica charantia*: A review. *Journal of Ethnopharmacology.* 2004;93:123-32.

330. Chao CY, Huang CJ. Bitter gourd (*momordica charantia*) extract activates peroxisome proliferator-activated receptors and upregulates the expression of the acyl CoA oxidase gene in H4IIEC3 hepatoma cells. *J Biomed Sci.* 2003;10:782-91.
331. Chen Q, Chan LL, Li ET. Bitter melon (*momordica charantia*) reduces adiposity, lowers serum insulin and normalizes glucose tolerance in rats fed a high fat diet. *J Nutr.* 2003;133:1088-93.
332. Grover JK, Yadav SP. Pharmacological actions and potential uses of *momordica charantia*: A review. *J Ethnopharmacol.* 2004;93:123-32.
333. Ahmed I, Lakhani MS, Gillett M, John A, Raza H. Hypotriglyceridemic and hypocholesterolemic effects of anti-diabetic *momordica charantia* (karela) fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract.* 2001;51:155-61.
334. Dulloo AG, Seydoux J, Girardier L, Chantre P, Vandermander J. Green tea and thermogenesis: Interactions between catechin-polyphenols, caffeine and sympathetic activity. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000;24:252-8.
335. Tsuzuki T, Igarashi M, Komai M, Miyazawa T. The metabolic conversion of 9,11,13-eleostearic acid (18:3) to 9,11-conjugated linoleic acid (18:2) in the rat. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2003;49:195-200.
336. Ohnuki K, Haramizu S, Oki K, Ishihara K, Fushiki T. A single oral administration of conjugated linoleic acid enhanced energy metabolism in mice. *Lipids.* 2001;36:583-7.
337. Chen Q, Li ET. Reduced adiposity in bitter melon (*momordica charantia*) fed rats is associated with lower tissue triglyceride and higher plasma catecholamines. *Br J Nutr.* 2005;93:747-54.
338. Chen Q, Chan LL, Li ET. Bitter melon (*momordica charantia*) reduces adiposity, lowers serum insulin and normalizes glucose tolerance in rats fed a high fat diet. *J Nutr.* 2003;133:1088-93.
339. Boden G, Cheung P, Stein TP, Kresge K, Mozzoli M. FFA cause hepatic insulin resistance by inhibiting insulin suppression of glycogenolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;283:12-9.
340. Armstrong MB, Towle HC. Polyunsaturated fatty acids stimulate hepatic UCP-2 expression via a PPARalpha-mediated pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;281:1197-204.
341. Himms-Hagen J. Does brown adipose tissue (BAT) have a role in the physiology or treatment of human obesity? *Rev Endocr Metab Disord.* 2001;2:395-401.

342. Rippe C, Berger K, Mei J, Lowe ME, Erlanson-Albertsson C. Effect of long-term high-fat feeding on the expression of pancreatic lipases and adipose tissue uncoupling proteins in mice. *Pancreas*. 2003;26:36-42.
343. Bouillaud F, Ricquier D, Mory G, Thibault J. Increased level of mRNA for the uncoupling protein in brown adipose tissue of rats during thermogenesis induced by cold exposure or norepinephrine infusion. *J Biol Chem*. 1984;259:11583-6.
344. Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, et al. Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*. 1999;98:115-24.
345. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*. 1998;92:829-39.
346. Kozak LP, Jensen JT. Genetic and developmental control of multiple forms of L-glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem*. 1974;249:7775-81.
347. Hamosh M, Clary TR, Chernick SS, Scow RO. Lipoprotein lipase activity of adipose and mammary tissue and plasma triglyceride in pregnant and lactating rats. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. 1970;210:473-82.
348. Del Prado M, Hernandez-Montes H, Villalpando S. Characterization of a fluorometric method for lipoprotein lipase. *Arch Med Res*. 1994;25:331-5.
349. Berger JJ, Barnard RJ. Effect of diet on fat cell size and hormone-sensitive lipase activity. *J Appl Physiol*. 1999;87:227-32.
350. Morimoto C, Kameda K, Tsujita T, Okuda H. Relationships between lipolysis induced by various lipolytic agents and hormone-sensitive lipase in rat fat cells. *J Lipid Res*. 2001;42:120-7.
351. FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226:497-509.
352. Saha SK, Moriya M, Ohinata H, Kuroshima A. Lipid interference with fluorometric assay of DNA in adipose tissues under various conditions. *Jpn J Physiol*. 1994;44:421-31.
353. Hirsch J, Gallian E. Methods for the determination of adipose cell size in man and animals. *J Lipid Res*. 1968;9:110-9.
354. Etherton TD, Thompson EH, Allen CE. Improved techniques for studies of adipocyte cellularity and metabolism. *J Lipid Res*. 1977;18:552-7.

355. Barnard RJ, Roberts CK, Varon SM, Berger JJ. Diet-induced insulin resistance precedes other aspects of the metabolic syndrome. *J Appl Physiol.* 1998;84:1311-5.
356. Smith U. Effect of cell size on lipid synthesis by human adipose tissue in vitro. *J Lipid Res.* 1971;12:65-70.
357. Bjorntorp P, Karlsson M. Triglyceride synthesis in human subcutaneous adipose tissue cells of different size. *Eur J Clin Invest.* 1970;1:112-7.
358. Bjorntorp P, Sjostrom L. The composition and metabolism in vitro of adipose tissue fat cells of different sizes. *Eur J Clin Invest.* 1972;2:78-84.
359. Kim KH. Regulation of mammalian acetyl-coenzyme A carboxylase. *Annu Rev Nutr.* 1997;17:77-99.
360. Chan LL, Chen Q, Go AG, Lam EK, Li ET. Reduced adiposity in bitter melon (*Momordica charantia*)-fed rats is associated with increased lipid oxidative enzyme activities and uncoupling protein expression. *J Nutr.* 2005;135:2517-23.
361. Schluter A, Barbera MJ, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. Phytanic acid, a novel activator of uncoupling protein-1 gene transcription and brown adipocyte differentiation. *Biochem J.* 2002;362:61-9.
362. Schluter A, Yubero P, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. The chlorophyll-derived metabolite phytanic acid induces white adipocyte differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002;26:1277-80.
363. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods.* 1986;89:271-7.
364. Takamura T, Nohara E, Nagai Y, Kobayashi K. Stage-specific effects of a thiazolidinedione on proliferation, differentiation and PPAR[gamma] mRNA expression in 3T3-L1 adipocytes. *Eur J Pharmacol.* 2001;422:23-9.
365. McNeel RL, Mersmann HJ. Effects of isomers of conjugated linoleic acid on porcine adipocyte growth and differentiation. *J Nutr Biochem.* 2003;14:266-74.
366. Azain MJ, Hausman DB, Sisk MB, Flatt WP, Jewell DE. Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. *J Nutr.* 2000;130:1548-54.

367. Poulos SP, Sisk M, Hausman DB, Azain MJ, Hausman GJ. Pre- and postnatal dietary conjugated linoleic acid alters adipose development, body weight gain and body composition in sprague-dawley rats. *J Nutr.* 2001;131:2722-31.



## 附錄 建立細胞培養模式以探討山苦瓜降體脂功能成分

### 一、前言

我們已成功利用 In vivo 模式證明山苦瓜凍乾粉如同 TZD 治療糖尿病藥物可減輕高油高糖飲食誘發大鼠之高胰島素血症，卻沒有肥胖副作用，且 5% 山苦瓜凍乾粉劑量可有效抑制腹部脂肪細胞肥大及體脂堆積。因此擬建立 In vitro 模式應用於未來篩選山苦瓜降體脂堆積的功能成分，利用前脂肪細胞株 3T3 - L1，在不同階段以不同品種的山苦瓜乙酸乙酯萃物處理，並與 TZD 做比較。探討：1. 山苦瓜乙酸乙酯萃物對前脂肪細胞增生 (Proliferation) 影響；2. 對前脂肪細胞分化 (Differentiation) 成為脂肪細胞影響。

### 二、材料與方法

#### (一) 細胞培養

1. 細胞株：前脂肪細胞株 3T3 - L1 購自食品工業發展研究所菌種中心 / 國家衛生研究院細胞庫，菌種中心編號：BCRC 60159，細胞株來源 ATCC CL - 173，組織來源：Mouse embryo。
2. 培養基與培養條件：10% 小牛血清 (Calf serum, Gibco) 之 DMEM (Gibco) (含 4 mM L - glutamine, Biological industries; 1 x Antibiotic - Antimycotic, Gibco)，於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下培養。每 3~4 天以  $4 \times 10^5$  cells / 75 sq cm flasks 進行繼代培養。

#### (二) 山苦瓜乙酸乙酯萃物

五種品種的山苦瓜乙酸乙酯萃物分別為 110310、2381、8153、HM18 和 K922，以絕對酒精配製 100 mg / mL 之 Stock solution，由台灣大學黃青真教授所提供。

### (三) 前脂肪細胞增生試驗 – MTT test

#### 1. 原理：

MTT (3 - (4, 5 - Dimethyl - 2 - Thiazolyl) - 2, 5 - Diphenyl Tetrazolium Bromide) 試驗是一種活細胞染色法 (Denizot 等人, 1986), 由於活細胞粒線體內的 Dehydrogenase 會將 MTT 之 Tetrazolium ring 打斷形成 Formazan, 此時 MTT 由黃色變成紫色, 可用酸性 Isopropanol 將 Formazan 溶出, 測定 540 nm 之吸光值, 判定細胞存活數(363)。

#### 2. 藥品配製：

##### (1) MTT stock solution

將 MTT powder (USB) 溶於滅菌的 1 x PBS 中, 製備成 5 mg / mL Stock, 再以 0.2  $\mu$ m Filter 過濾。分裝於 1.5 mL 離心管, 貯存在 -20°C。

##### (2) Acidic isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)

將 1.6 mL 之 12 N HCl 以 Isopropanol (TEDIA) 定量至 500 mL, 室溫儲存。

##### (3) MTT solution

藥品	需要量
滅菌 1 x PBS	50 $\mu$ L / well
MTT stock solution	5 $\mu$ L / well

當天配製, 混合所需的滅菌 1 x PBS + MTT stock solution 於 15 mL 滅菌離心管, 外覆錫箔紙避光。

### 3. 方法：

在 96 微孔培養皿接種 3T3 - L1 ( $10^4$  cells / well)，待細胞貼附加入五種山苦瓜乙酸乙酯萃物，濃度為 10, 50, 100, 200  $\mu\text{g} / \text{mL}$  並以絕對酒精作為 Vehicle control。另也以 10  $\mu\text{M}$  TZD (BRL 49653) 處理細胞並以 DMSO 作為 Vehicle control。培養 0、24 及 48 小時後進行 MTT 試驗。在 96 微孔培養皿內吸除培養液後，以滅菌 1 x PBS 先 Wash 並吸除乾淨之後，每槽加入預混的 55  $\mu\text{L}$  之 MTT solution 放入培養箱 37°C 反應 3 小時後，每槽再加入 100  $\mu\text{L}$  Acidic isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)，震盪 20 分鐘使染劑溶出後，以 ELISA 測量 540 nm 之吸光值。

#### (四) 前脂肪細胞分化試驗

##### 1. 分化培養基製備

##### (1) 分化培養基 I

藥品	Stock conc.	Working conc.
Dexamethasone (DEX) (Sigma)	0.25 mM	0.25 $\mu\text{M}$
3 - isobutyl - 1 - methylxanthine (MIX) (Sigma)	0.5 M	0.5 mM
Insulin (Sigma)	10 mg / mL	10 $\mu\text{g} / \text{mL}$
Biotin (Sigma)	100 $\mu\text{g} / \text{mL}$	100 ng / mL
10% CS - DMEM		

##### (2) 分化培養基 II

藥品	Stock conc.	Working conc.
Insulin (Sigma)	10 mg / mL	10 $\mu\text{g} / \text{mL}$
Biotin (Sigma)	100 $\mu\text{g} / \text{mL}$	100 ng / mL
10% CS - DMEM		



## 2. 方法-1

### (1) 方法

在 6 公分培養皿接種 3T3 - L1 ( $3 \times 10^5$  cells)，待細胞長滿 (At confluence) 後，再繼續培養細胞 2 天之後 (Day 0 : 2 day postconfluence) 開始進行誘導分化。將細胞培養在分化培養基 I 三天後，換成分化培養基 II 培養兩天 (Day 3) 後，再換成 10% CS - DMEM (Day 5)，之後每隔兩天更換一次培養基。細胞在 Day 0 以山苦瓜乙酸乙酯萃物處理並以絕對酒精作為 Vehicle control，另外以 10  $\mu$ M 之 TZD (BRL 49653) 作正對照組並以 DMSO 作為 Vehicle control，直到分化第九天 (Day 9) 將細胞刮下測量 G3PDH 酵素活性。

### (2) 細胞 G3PDH 酵素活性測定

吸乾舊的 Medium，緩慢加入 1 mL 之 1x PBS，濕潤整個培養皿後吸除，重複兩次，以細胞刮勺將細胞刮下，加入適量的 1x PBS 將細胞沖下，細胞液收集至 1.5 mL 離心管中。以 100 xg 離心 3 分鐘，小心去除上清液，加入 200  $\mu$ L 冰的 Extraction buffer，以 Pipette 上下吸放，形成均勻的細胞液，冰浴 30 分鐘，每 5 分鐘拿起來以 Vortex 混勻一下，再以 25,000 xg、4°C 離心 1 小時 (Hitach CR21, rotor R21A - 339)，取出上清液至新的 1.5 mL 離心管，混勻後分裝凍於 -80°C，以供日後分析 G3PDH，G3PDH 活性測定同材料與方法六。

### 3. 方法-2

#### (1) 方法

在 6 公分培養皿接種 3T3 - L1 ( $3 \times 10^5$  cells)，待細胞長滿 (At confluence) 後，再繼續培養細胞 2 天之後 (Day 0 : 2 day postconfluence) 開始進行誘導分化。將細胞培養在分化培養基 I 三天後，換成分化培養基 II 培養兩天 (Day 3) 後，再換成 10% CS - DMEM (Day 5)，之後每隔兩天更換一次培養基。細胞在 Day 0 以山苦瓜乙酸乙酯萃物處理並以絕對酒精作為 Vehicle control。另外也以 18:1 游離脂肪酸與 Conjugated linolenic acid (CLN) 脂肪酸處理細胞，以絕對酒精作為 Vehicle control。直到分化第七天 (Day 7) 與第十一天 (Day 11) 天將細胞刮下，測量細胞內三酸甘油酯含量。

#### (2) 細胞內三酸甘油酯含量測定

吸乾舊的 Medium，緩慢加入 1 mL 之 1x PBS，濕潤整個培養皿後吸除，重複兩次。以細胞刮勺將細胞刮下，加入適量的 1x PBS 將細胞沖下，細胞液收集至 1.5 mL 離心管中，以 100 xg 離心 3 分鐘，小心去除上清液，加入 0.5 mL 二次水，以 Pipette 上下吸放，將 Pellete 打散，以 Sonicater 將細胞震破。儲存於 -20°C，以供測量三酸甘油酯並以 Bio - Rad protein assay 定量蛋白質，三酸甘油酯含量測定同材料與方法九。

### 三、 結果

#### (一) 山苦瓜乙酸乙酯萃物對前脂肪細胞增生影響

附圖 1 - 1 及 1 - 2 為比較五種山苦瓜品種乙酸乙酯萃物對 3T3 - L1 前脂肪細胞增生之影響。我們以四種不同濃度(10, 50, 100, 200  $\mu\text{g} / \text{mL}$ )處理細胞 24 及 48 小時，來觀察不同品種對 3T3-L1 前脂肪細胞增生的作用。

在處理 24 小時後，10  $\mu\text{g} / \text{mL}$  的 2381、HM18 和 K922 品種增生顯著高於 8153 品種( $p < 0.02$ )，而 110310 與其它四種沒有差異。50  $\mu\text{g} / \text{mL}$  的 2381 品種增生與其它四種沒有差異，而 HM18 顯著高於 8153 品種( $p < 0.04$ )，五種品種在 100 和 200  $\mu\text{g} / \text{mL}$  濃度下沒有差異。

在處理 48 小時後，10、50 和 200  $\mu\text{g} / \text{mL}$  的 2381 與 HM18 增生顯著高於 8153 品種( $p < 0.05$ )，10 和 200  $\mu\text{g} / \text{mL}$  的 K922 增生顯著高於 8153 品種( $p < 0.05$ )。110310、2381、HM18 和 K922 在四種濃度下都沒有差異，五種品種在 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$  濃度下沒有差異。

結果顯示與 Vehicle control 相較，山苦瓜乙酸乙酯萃物可促進 3T3 - L1 前脂肪細胞增生。在處理細胞 48 小時的結果顯示有 Dose - response 的作用，比較五種山苦瓜品種乙酸乙酯萃物在促前脂肪細胞增生效果，依序為 2381 > HM18 > 110310 / K922 > 8153。

附圖 1 - 3 為以 10  $\mu\text{M}$  TZD (BRL 49653) 處理 3T3 - L1 前脂肪細胞觀察其對增生之影響。結果發現在處理細胞後，與 Vehicle control 相較下有促進 3T3 - L1 前脂肪細胞增生。

## (二) 山苦瓜乙酸乙酯萃物對前脂肪細胞分化影響

附圖 1 - 4 及 1 - 5 為比較四種山苦瓜品種乙酸乙酯萃物 110310、2381、8153、CK18 (因 K922 用盡，另外 HM18 以 CK18 代替)。對 3T3 - L1 前脂肪細胞分化之影響。我們以四種不同濃度(10, 50, 100, 200  $\mu\text{g} / \text{mL}$ )處理細胞 7 及 11 天，來觀察不同品種對 3T3 - L1 前脂肪細胞分化的作用。

當細胞長滿後要進入分化階段時就會停止生長，當以山苦瓜乙酸乙酯萃物處理 3 天之後，可以發現 3T3 - L1 前脂肪細胞的形狀由紡錘狀慢慢變成圓形，接著隨著分化天數增加，形成圓形的脂肪細胞不但比例越來越多，且細胞內會有油滴的生成並堆積。因此，我們測量細胞內三酸甘油酯含量來作為分化的指標。

在處理 7 天之後，10  $\mu\text{g} / \text{mL}$  和 50  $\mu\text{g} / \text{mL}$  的 2381 品種促進 3T3 - L1 前脂肪細胞分化顯著高於 8153 與 CK18 品種( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ )，而與 110310 沒有差異。10  $\mu\text{g} / \text{mL}$  的 110310 品種分化顯著高於 CK18 ( $p < 0.01$ )，100  $\mu\text{g} / \text{mL}$  的 2381 品種分化顯著高於 110310、8153 與 CK18 ( $p < 0.03$ )，而 110310、8153 與 CK18 三種品種之間沒有差異，四種品種在 200  $\mu\text{g} / \text{mL}$  濃度下沒有差異。

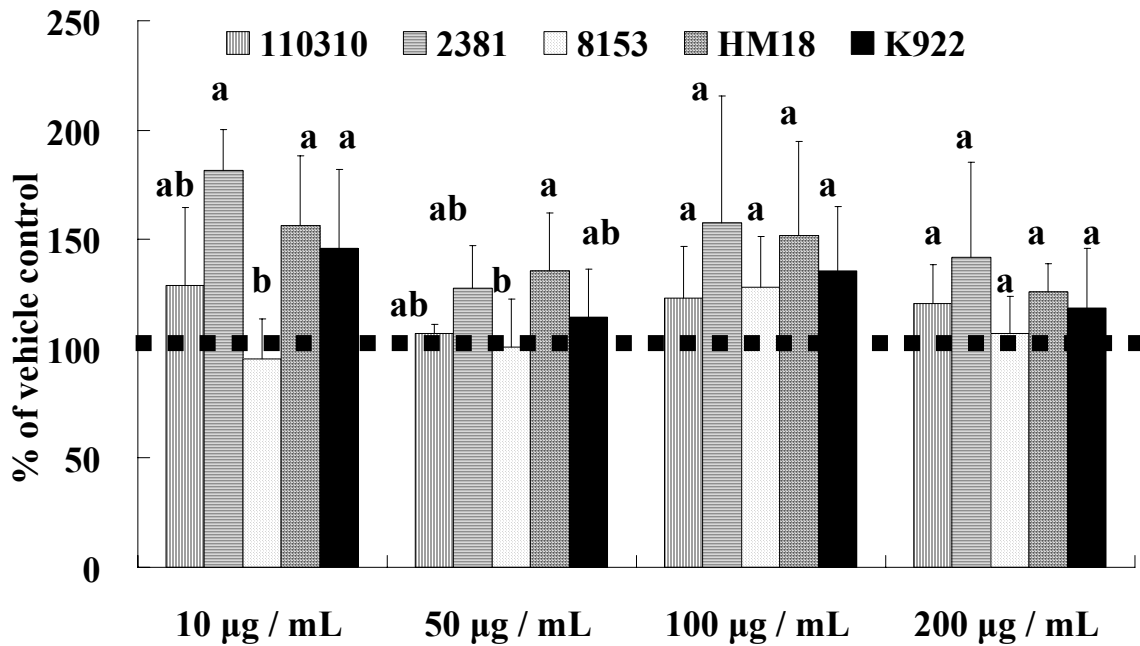
在處理 11 天之後，四種品種在 10  $\mu\text{g} / \text{mL}$  的濃度下沒有差異，50  $\mu\text{g} / \text{mL}$  的 2381 品種分化顯著高於 110310、8153 與 CK18 ( $p < 0.005$ )，而 110310、8153 與 CK18 三種品種之間沒有差異。100  $\mu\text{g} / \text{mL}$  的 110310 和 2381 品種分化顯著高於 8153 與 CK18 品種( $p < 0.001$ )，110310 和 2381 或 8153 與 CK18 兩種品種之間沒有差異，200  $\mu\text{g} / \text{mL}$  的 2381 品種分化顯著高於 110310、8153 與 CK18 ( $p < 0.002$ )，而 110310、8153 與 CK18 三種品種之間沒有差異。

這些結果顯示與 Vehicle control 相較，山苦瓜乙酸乙酯萃物可促進 3T3 - L1 前脂肪細胞分化。在處理細胞 11 天的結果顯示有 Dose - response 的作用。比較四種山苦瓜品種乙酸乙酯萃物在促進前脂肪細胞分化效果，依序為 2381 > 110310 > 8153 > CK18，第七天與第十一天趨勢一致。

附圖 1 - 6 與 1 - 7 為 18 : 1 游離脂肪酸與 Conjugated linolenic acid (CLN) 脂肪酸對 3T3 - L1 前脂肪細胞分化影響之結果，同樣以細胞內三酸甘油酯堆積作為分化指標。18 : 1 與 CLN 均可促進 3T3 - L1 前脂肪細胞分化，然而同濃度相較下 CLN 促進分化效果更勝於 18 : 1。

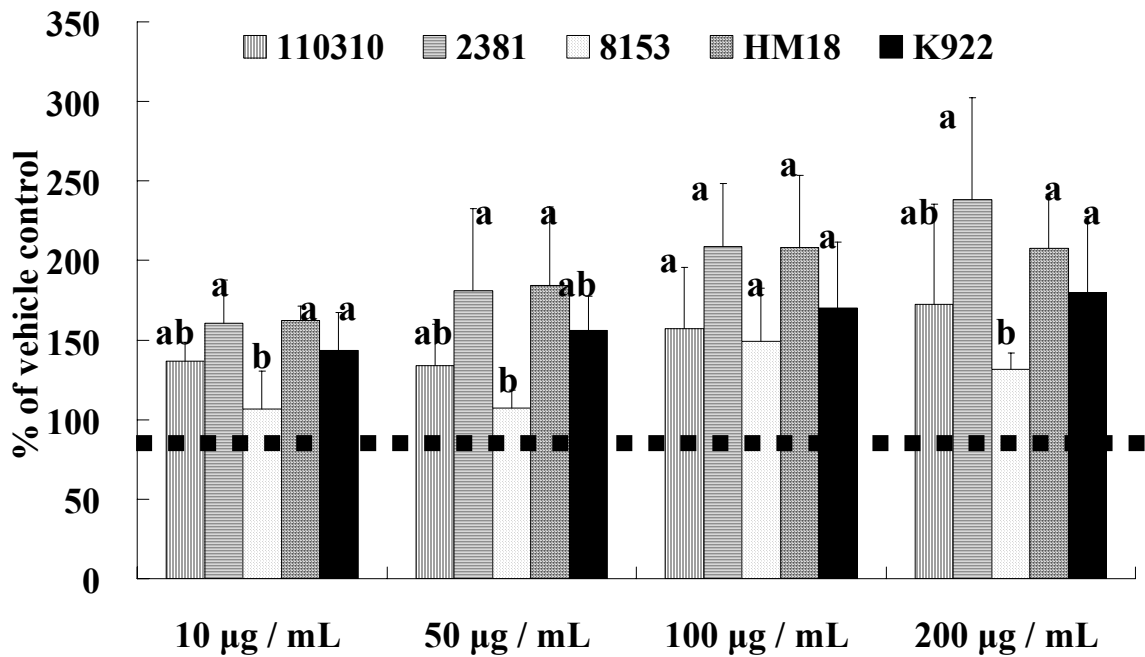
徐等人曾以 270 nm 吸光值評估五種山苦瓜品種乙酸乙酯萃物中 CLN 含量，結果 2381 與 K922 其 CLN 含量高於其它品種乙酸乙酯萃物。因此，2381 的促脂肪細胞分化結果是否與其中含較高量的 CLN 有關，值得探討。





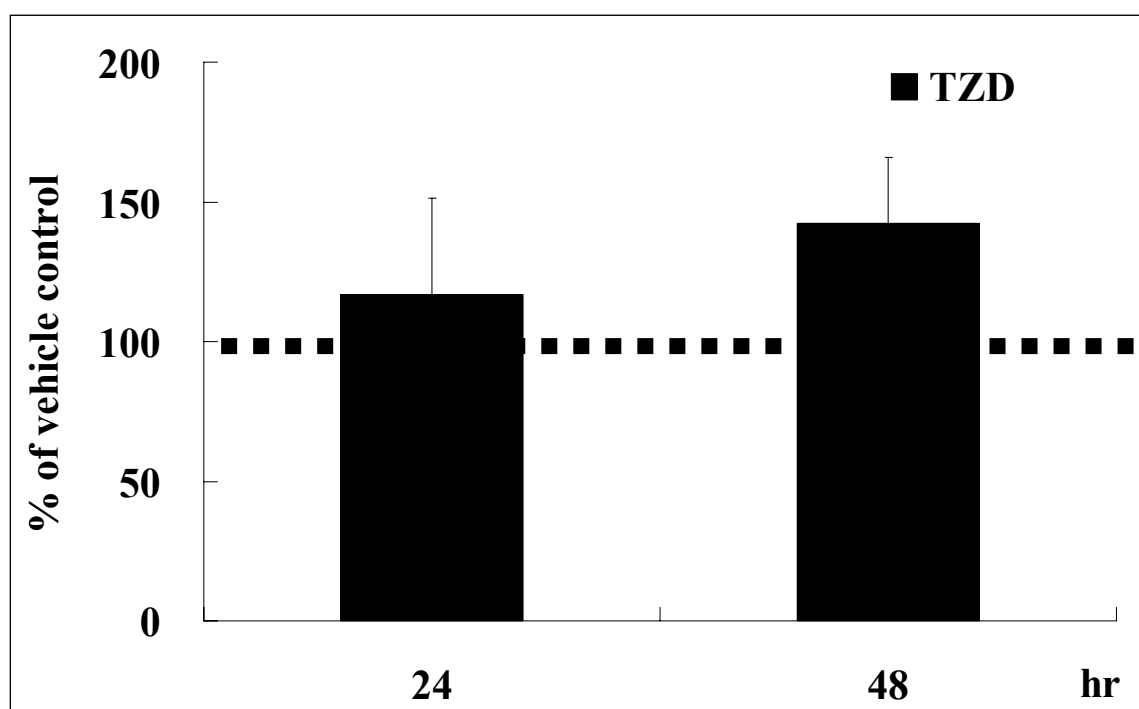
附圖 1 - 1 五種山苦瓜品種乙酸乙酯萃物處理 24 小時對 3T3 - L1 前脂肪細胞增生之影響

Fig. 1 - 1 Effect of EA extracts from five species of wild bitter melon on 3T3 - L1 preadipocytes proliferation. The 3T3 - L1 preadipocytes were treated with various concentration of EA extracts from wild bitter melon for 24 hours. The proliferation rate was determined by MTT and compared with their vehicle control. The significance of difference among five species of wild bitter melon in the same treated concentration were analysed by one-way ANOVA and Duncan's Multiple Range test. Values not sharing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).



附圖 1 - 2 五種山苦瓜品種乙酸乙酯萃物處理 48 小時對 3T3 - L1 前脂肪細胞增生之影響

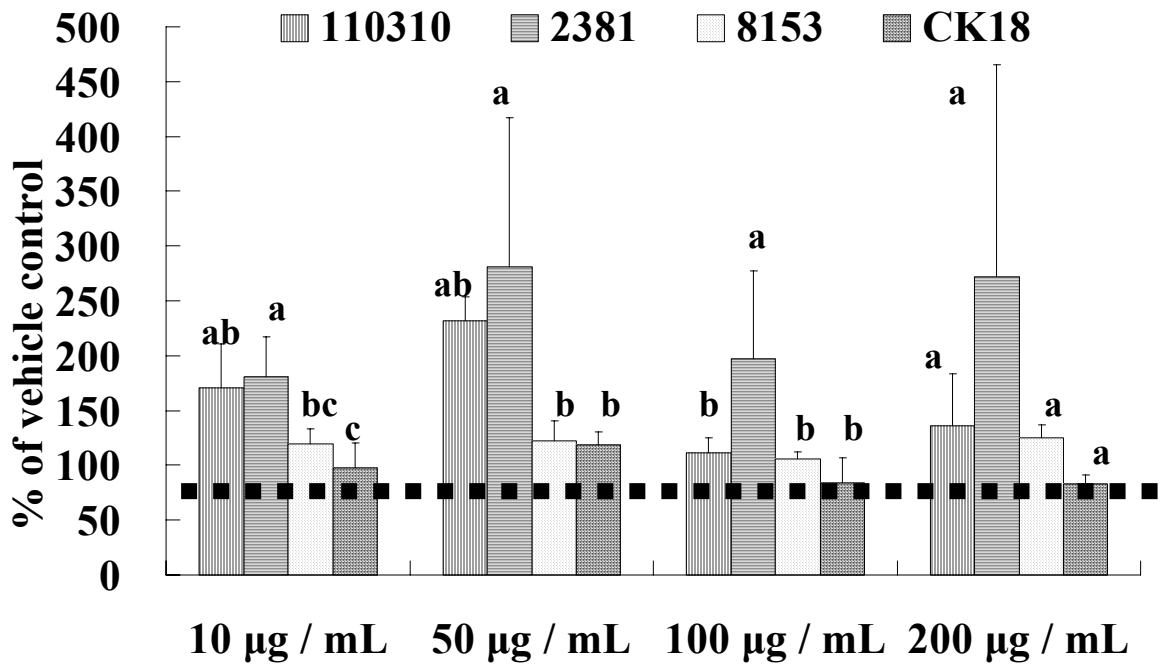
Fig. 1 - 2 Effect of EA extracts from five species of wild bitter melon on 3T3 - L1 preadipocytes proliferation. The 3T3 - L1 preadipocytes were treated with various concentration of EA extracts from wild bitter melon for 48 hours. The proliferation rate was determined by MTT and compared with their vehicle control. The significance of difference among five species of wild bitter melon in the same treated concentration were analysed by one-way ANOVA and Duncan's Multiple Range test. Values not sharing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).



附圖 1 - 3 TZD (BRL 49653) 處理 24 及 48 小時對 3T3 - L1 前脂肪細胞  
增生之影響

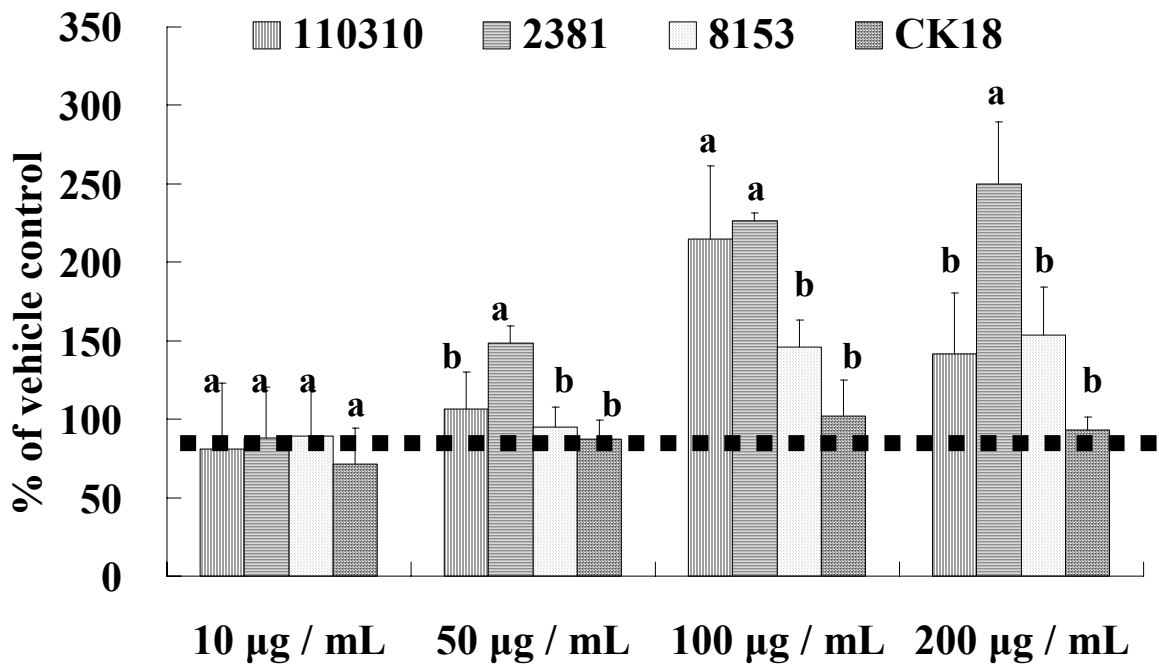
Fig. 1 - 3 Effect of TZD (BRL 49653) on 3T3 - L1 preadipocytes proliferation. The 3T3 - L1 preadipocytes were treated with TZD (BRL 49653) for 24 and 48 hours. The proliferation rate was determined by MTT and compared with vehicle control.





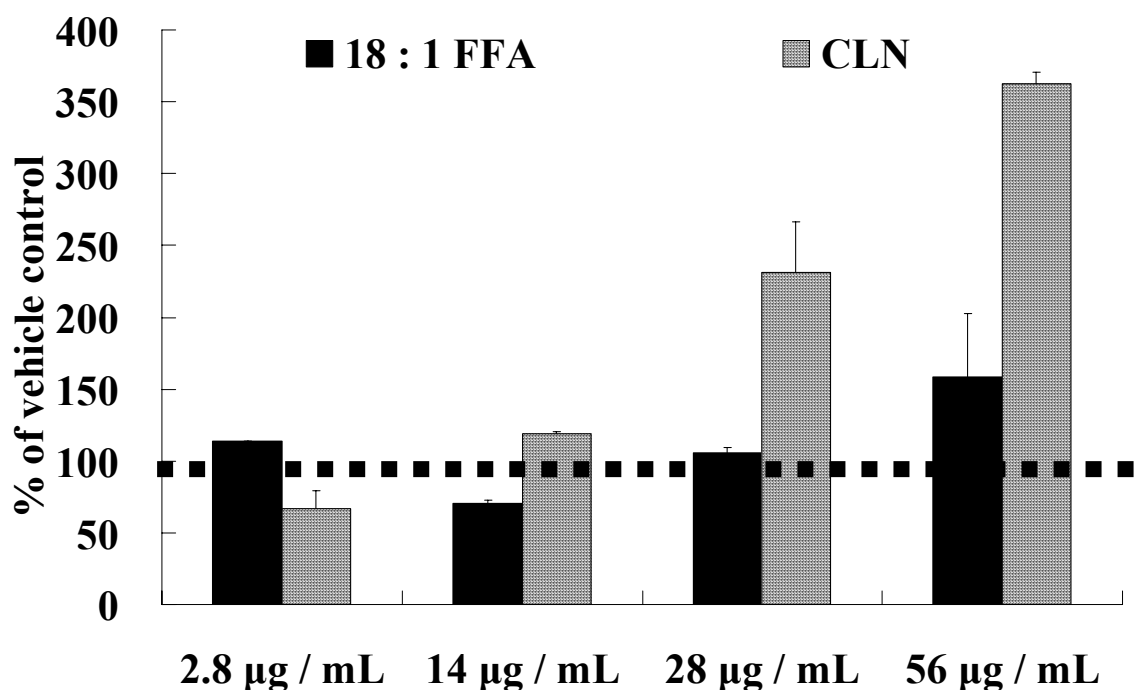
附圖 1 - 4 四種山苦瓜品種乙酸乙酯萃物處理 7 天對 3T3 - L1 前脂肪細胞分化之影響

Fig. 1 - 4 Effect of EA extracts from four of species wild bitter melon on 3T3 - L1 preadipocytes differentiation. The 3T3 - L1 preadipocytes were treated with various concentration of EA extracts from wild bitter melon for 7 days. The differentiation was determined by intracellular triglycerides content and results were expressed as % of vehicle control. The significance of difference among four species of wild bitter melon in the same treated concentration were analysed by one-way ANOVA and Duncan's Multiple Range test. Values not sharing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).



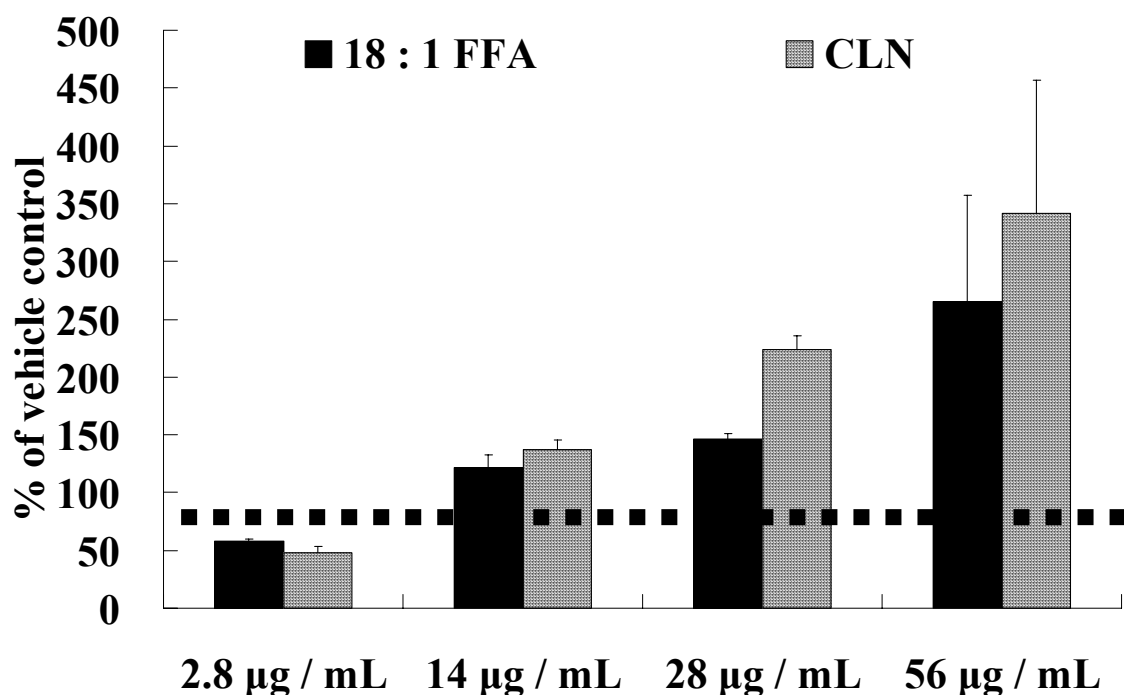
附圖 1 - 5 四種山苦瓜品種乙酸乙酯萃物處理 11 天對 3T3 - L1 前脂肪細胞分化之影響

Fig. 1 - 5 Effect of EA extracts from four of species wild bitter melon on 3T3 - L1 preadipocytes differentiation. The 3T3 - L1 preadipocytes were treated with various concentration of EA extracts from wild bitter melon for 11 days. The differentiation was determined by intracellular triglycerides content and results were expressed as % of vehicle control. The significance of difference among four species of wild bitter melon in the same treated concentration were analysed by one-way ANOVA and Duncan's Multiple Range test. Values not sharing the same superscript letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).



附圖 1 - 6 18 : 1 游離脂肪酸與 Conjugated linolenic acid (CLN)脂肪酸處理 7 天對 3T3 - L1 前脂肪細胞分化之影響

Fig. 1 - 6 Effect of 18 : 1 free fatty acid and Conjugated linolenic acid (CLN) fatty acid on 3T3 - L1 preadipocytes differentiation. The 3T3 - L1 preadipocytes were treated with 18 : 1 free fatty acid and Conjugated linolenic acid (CLN) fatty acid for 7 days. The differentiation was determined by intracellular triglycerides content and results were expressed as % of vehicle control.



附圖 1 - 7 18 : 1 游離脂肪酸與 Conjugated linolenic acid (CLN)脂肪酸處理 11 天對 3T3 - L1 前脂肪細胞分化之影響

Fig. 1 - 7 Effect of 18 : 1 free fatty acid and Conjugated linolenic acid (CLN) fatty acid on 3T3 - L1 preadipocytes differentiation. The 3T3 - L1 preadipocytes were treated with 18 : 1 free fatty acid and Conjugated linolenic acid (CLN) fatty acid for 11 days. The differentiation was determined by intracellular triglycerides content and results were expressed as % of vehicle control.

#### 四、 討論

在比較五種山苦瓜品種乙酸乙酯萃物對 3T3 - L1 前脂肪細胞增生之影響的結果顯示(附圖 1 - 1 和 1 - 2)。與 Vehicle control 相較下山苦瓜乙酸乙酯萃物可促進前脂肪細胞增生，而五種山苦瓜品種乙酸乙酯萃物在促進前脂肪細胞增生效果為 2381 > HM18 > 110310 / K922 > 8153。無論在 Dose - response (10, 50, 100, 200  $\mu\text{g} / \text{mL}$ )或 Time - course (24 和 48 小時)均有相似的結果。

在比較四種山苦瓜品種乙酸乙酯萃物(因 K922 用盡，另外 HM18 以 CK18 代替)對 3T3 - L1 前脂肪細胞分化之影響的結果顯示(附圖 1 - 4 和 1 - 5)，以細胞內三酸甘油酯堆積作為 3T3 - L1 前脂肪細胞分化之指標。與 Vehicle control 相較下山苦瓜乙酸乙酯萃物也可促進前脂肪細胞分化，而四種山苦瓜品種乙酸乙酯萃物在促進前脂肪細胞分化效果則為 2381 > 110310 > 8153 > CK18。無論在 Dose - response (10, 50, 100, 200  $\mu\text{g} / \text{mL}$ )或 Time - course (7 和 11 天)均有相似的結果。

徐等人曾比較五種山苦瓜乙酸乙酯萃物(110310、2381、8153、HM18 和 K922)在轉活化實驗中對 PPAR $\gamma$  活化效果，發現 2381 > HM18 > 110310 / K922 > 8153。我們在 3T3 - L1 前脂肪細胞分化僅測試四種山苦瓜乙酸乙酯萃物，發現與轉活化試驗一致的是 2381 也有最強的促進分化效果，8153 有較弱的促進分化效果。有趣的是，轉活化實驗結果與 3T3 - L1 前脂肪細胞增生結果完全相同(附圖 1 - 1 和 1 - 2)。

影響脂肪組織大小因素包括細胞增生(Proliferation)、凋亡(Apoptosis)、分化(Differentiation)與脂質充填(Lipid filling)；肥胖包括脂肪細胞數目增加(Hyperplasia)，或變得肥大(Hypertrophy)。可能原因包括促進前脂肪細胞增生及分化，例如 TZD 已知促進前脂肪細胞增生也促進分化(364)，並伴隨肥胖之副作用(240)。BRL 49653 是 TZD 的一種且已知是 PPAR $\gamma$  ligands，在本實驗中當作正對照組。我們的實驗結果也證實 BRL 49653 可促進 3T3 - L1 前脂肪細胞增生(附圖 1 - 3)。另外，我們以 10  $\mu\text{M}$  BRL 49653 處理長滿後 3T3 - L1 前脂肪細胞至長滿後第 9 天，以 G3PDH 酵素活性做分化指標，發現 BRL 49653 組與 Vehicle control 相較 G3PDH 酵素活性增加約 12 倍(結果未示)，表示 TZD 的確有明顯促進前脂肪細胞分化的效果。

山苦瓜乙酸乙酯萃物含有脂溶性成分包括三酸甘油酯或游離脂肪酸，可能是這些脂溶性物質促進 3T3 - L1 前脂肪細胞增生與分化。從 TZD 的結果到我們山苦瓜乙酸乙酯萃物之結果，此 3T3 - L1 前脂肪細胞增生與分化的模式似乎可有效反映 PPAR $\gamma$  活化結果，或許我們可就此推論在改善胰島素敏感性方面，2381 效果最好而 8153 最差，但是否也代表了 2381 較不利而 8153 較有利於降體脂，可能言之過早。

Adiponectin 是脂肪細胞所分泌的脂肪細胞激素，已知 TZD 會刺激 Adiponectin 的分泌來增加胰島素敏感性。我們此次並未測定四種山苦瓜乙酸乙酯萃物對 3T3 - L1 脂肪細胞 Adiponectin 分泌之影響，但本實驗室在預備實驗中觀察到 Adiponectin 分泌與 3T3 - L1 脂肪細胞分化程度有良好相關，因此預估在促進 Adiponectin 分泌及改善胰島素敏感性上，2381 品種效果最好。

我們的研究假設是苦瓜既可同時活化 PPAR $\alpha$  和 PPAR $\gamma$ ，因此可應用於治療或預防代謝症候群。理論上苦瓜可作用於脂肪細胞，活化 PPAR $\gamma$  促進 Adiponectin 合成與分泌，改善胰島素敏感性；同時作用於肝細胞，活化 PPAR $\alpha$  促進脂肪酸氧化代謝，減少三酸甘油酯在脂肪細胞堆積的機會。就如 Chao 等人以苦瓜乙酸乙酯萃物培養肝癌細胞株 H4IIEC3，證明可促進 PPAR $\alpha$  下游基因 ACO 活性以及 ACO 和 FABP mRNA 表現。也許在預測降體脂功能上不能單以 3T3 - L1 前脂肪細胞作預估模式，應輔以肝細胞 PPAR $\alpha$  活化結果。因此未來我們打算在 H4IIEC3 細胞培養投以四種山苦瓜乙酸乙酯萃物，來探討四種品種促進肝細胞脂肪酸氧化程度是否也與 PPAR $\alpha$  轉活化結果一致。

在前面第五章的討論中，我們提到苦瓜中的 CLN 與 Phytanic acid 可能是苦瓜改善代謝症候群功能成分，且 CLN 可能轉變為 CLA。因此，一些關於 CLA 與 Phytanic acid 對脂肪細胞影響的文獻如下述。

關於 CLA 的報告有研究顯示 CLA 降低 3T3 - L1 前脂肪細胞的增生與分化是造成 In vivo lipodystrophy 的原因(207, 208)。但 McNeel 與 Mersmann 探討 CLA 對分離自豬含有前脂肪細胞之 SV cells 的細胞增生與分化的研究，發現了 CLA 是促進前脂肪細胞的增生。此結果與在 3T3 - L1 前脂肪細胞的結果不同，其表示可能是因為使用初代前脂肪細胞與細胞株的不同，或是物種之間的差異而造成不同的結果(365)。另外，也有研究指出 CLA 降低 SD 大鼠脂肪組織的作用，是減小脂肪細胞的大小更勝於降低脂肪細胞的數目，其發現這些大鼠有較多比例的小脂肪細胞而較少比例的大脂肪細胞(366, 367)。另外在 Phytanic acid 方面，Schluter 等人以 Phytanic acid 處理 3T3 - L1 前脂肪細胞與 Primary human preadipocytes，發現這些細胞有脂質堆積以及有分化指標基因 aP2 的表現，表示 Phytanic acid 可誘導白色脂肪細胞的分化(362)。在我們的實驗結果也發現了 CLN 脂肪酸比起 18 : 1 游離脂肪酸，有較強的促進脂肪細胞分化效果。

總言之，目前結果顯示 3T3 - L1 前脂肪細胞增生與分化實驗模式，可反映 PPAR $\gamma$  活化效果。但要用以預估體內降體脂功能成份可能還須輔以肝細胞模式，或者未來可嘗試以餵食苦瓜鼠血清來培養 3T3 - L1 前脂肪細胞。