

中國醫藥大學營養學系碩士班

碩士論文

建立驗證調節脂肪酸代謝之細胞模式與  
改善動物代謝症候群模式

**Establishing the in vitro and in vivo models for  
testing the fatty acid metabolic regulatory effect  
and anti-metabolic syndrome function**

研究生：林毓舜 撰 Yu-Shun Lin

指導教授：趙蓓敏 博士 Pei - Min Chao, Ph. D

中華民國九十八年七月

July , 2009

## 目錄

縮寫對照表.....	I
組別縮寫對照表.....	III
摘要.....	IV
Abstract.....	VI
第一章 前言.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
一、代謝症候群.....	2
(一) 代謝症候群定義.....	2
(二) 判定標準.....	2
(三) 代謝症候群發生原因.....	6
(四) 代謝症候群治療方式.....	7
二、乙醯輔酶A 化酶.....	8
(一) 何謂 Acetyl-CoenzymeA carboxylase.....	8
(二) ACC 調控.....	10
1. 異位調節.....	10
2. 共價修飾.....	11
(三) 抑制 ACC 可改善代謝症候群之相關研究.....	12
三、高糖飲食誘發代謝症候群.....	13
(一) 高糖 (蔗糖) 飲食引發代謝症候群之動物模式.....	13
(二) 高糖誘發肝脂堆積及胰島素抵抗之細胞模式.....	14
(三) 肝臟中脂質生合成相關轉錄因子.....	15
1. Liver X receptors.....	15

2. Carbohydrate responsive element binding protein.....	16
3. Sterol regulatory element binding protein-1c.....	17
(四) 蔗糖誘發脂質新生 ( <i>de novo</i> lipogenesis) 之生化與分子機制.....	19
(五) Microsomal triglyceride transfer protein 與三酸甘油酯分泌.....	21
四、紅雞屎藤.....	23
第三章 材料與方法.....	25
實驗一.....	27
實驗二.....	28
(一) 細胞培養.....	30
(二) ACC 活性分析.....	30
(三) FAS 活性分析.....	34
(四) 培養基中 ApoB 含量測定.....	39
(五) 細胞內 MTTP mRNA 表現量分析.....	39
(六) 動物飼養.....	39
(七) 動物犧牲與樣品收集.....	39
(八) 三酸甘油酯含量測定.....	40
(九) 膽固醇含量測定.....	40
(十) 肝臟、肌肉脂質均質液製備.....	41
(十一) 肝臟、肌肉三酸甘油酯含量測定.....	41
(十二) 肝臟、肌肉膽固醇含量測定.....	41
(十三) 全血葡萄糖含量測定.....	42
(十四) 口服葡萄糖耐受測試 Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) .....	42
(十五) 胰島素耐受測試 Insulin Tolerance Test (ITT) .....	43
(十六) 禁食血清胰島素含量測定.....	43
(十七) 禁食血清瘦素含量測定.....	44

(十八) 尿酸測定.....	46
(十九) 西方點墨法(Western blot)分析肝臟、肌肉和脂肪組織 PTPIB 蛋白質表現.....	46
(二十) 脂肪組織切片.....	47
(二十一) 脂肪組織中 TNF- $\alpha$ 量測定.....	48
(二十二) 大鼠血壓測定.....	49
(二十三) 統計分析.....	49
<b>第四章 結果.....</b>	<b>50</b>
<b>第五章 討論.....</b>	<b>84</b>
<b>第六章 結論.....</b>	<b>97</b>
<b>第七章 參考文獻.....</b>	<b>99</b>



## 表 目 錄

---

表 2-1	台灣代謝症候群之判定標準.....	4
表 2-2	台灣代謝症候群及組成因子盛行率.....	5
表 2-3	95 年國人代謝症候群相關疾病醫療費用.....	6
表 4-1	Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之體重及白色脂肪量.....	59
表 4-2	Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之血液生化質.....	60
表 5-1	大鼠給予紅雞屎藤 4 週後之結果統整.....	93



## 圖 目 錄

圖2-1	參與ACC催化反應的兩個步驟.....	9
圖2-2	TOFA 結構.....	13
圖2-3	T0901317之結構圖.....	16
圖2-4	GW3965之結構圖.....	16
圖3-1	本論文實驗研究大綱.....	26
圖3-2	細胞給予紅雞屎藤酒精萃之實驗流程.....	27
圖3-3	大鼠實驗流程.....	29
圖 4-1	葡萄糖刺激肝細胞 HepG2 之 ACC 活性.....	61
圖 4-2	葡萄糖刺激肝細胞 HepG2 之 FAS 活性.....	62
圖 4-3	葡萄糖刺激肝細胞 HepG2 之細胞內 TG 含量.....	63
圖 4-4	葡萄糖刺激肝細胞 HepG2 之 apoB 分泌.....	64
圖 4-5	紅雞屎藤酒精萃給予高葡萄糖刺激肝細胞 HepG2 之 ACC 活性.....	65
圖 4-6	紅雞屎藤酒精萃給予高葡萄糖刺激肝細胞 HepG2 之 FAS 活性.....	66
圖 4-7	紅雞屎藤酒精萃給予高葡萄糖刺激肝細胞 HepG2 之細胞內 TG 含量.....	67
圖 4-8	紅雞屎藤酒精萃給予高葡萄糖刺激肝細胞 HepG2 之細胞內 <i>MTTP</i> mRNA 表現.....	68
圖 4-9	Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之收縮壓和舒張壓.....	69
圖 4-10	Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之葡萄糖耐量試驗 (A) 和葡萄糖曲 線下面積 (B) .....	70
圖 4-11	Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之胰島素耐量試驗 (A) 和葡萄糖曲 線下面積 (B) .....	71
圖 4-12	Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之肝臟及肌肉三酸甘油酯含量.....	72
圖 4-13	Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之肝臟中膽固醇含量.....	73

圖 4-14	Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之腹膜後脂肪組織切片與脂肪細胞平均直徑.....	74
圖 4-15	Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之禁食血清 Leptin.....	75
圖 4-16	Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之腹膜後脂肪組織中 TNF- $\alpha$ 含量.....	76
圖 4-17	Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之肝臟 ACC 活性.....	77
圖 4-18	Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之肝臟 FAS 活性.....	78
圖 4-19	以 Western blot 分析大鼠餵食蔗糖水 5 個月之肝臟 PTP1B 蛋白質表現量.....	79
圖 4-20	以 Western blot 分析大鼠餵食蔗糖水 5 個月之肌肉 PTP1B 蛋白質表現量.....	80
圖 4-21	以 Western blot 分析大鼠餵食蔗糖水 5 個月之脂肪組織 PTP1B 蛋白質表現量.....	81
圖 4-22	Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃 2 小時後之肝臟 ACC 活性.....	82
圖 4-23	Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃 2 小時後之肝臟 FAS 活性.....	83
圖 5-1	糖水模式誘發代謝症候群之可能分子機制.....	88



縮寫對照表

縮 寫	全 名
ACC	Acetyl - CoA carboxylase
AMPK	AMP - activated protein kinase
ABC	ATP-binding cassette transporters
ApoB <sub>48</sub>	Apolipoprotein B <sub>48</sub>
ApoB <sub>100</sub>	Apolipoprotein B <sub>100</sub>
bHLH	basic helix-loop-helix
BC	Biotin carboxylase
BP	Blood pressure
CT	Carboxyltransferase
CYP7a1	Cholesterol 7- $\alpha$ -hydroxylase
ChoRE	Carbohydrate response element
ChREBP	Carbohydrate response element binding protein
CPT - 1	Carnitine palmitoyltransferase - 1
Evolv-6	Long chain fatty acid elongase
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
FAS	Fatty acid synthase
HDL	High density lipoprotein
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
IDF	International Diabetes Federation
IL-6	Interleukin -6
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IR	Insulin receptor
IRS	Insulin receptor substrate
IRE	Insulin response element
LXRs	Liver X receptors

<b>LXREs</b>	<b>LXR response elements</b>
<b>LDL</b>	<b>Low density lipoprotein</b>
<b>MTTP</b>	<b>Microsomal triglyceride transfer protein</b>
<b>NCEP - ATP - III</b>	<b>National Cholesterol Education Program –Adult Treatment Panel – III</b>
<b>PKA</b>	<b>Protein kinase A</b>
<b>PTP1B</b>	<b>Protein tyrosine phosphatase 1B</b>
<b>PDI</b>	<b>Protein disulfide isomerase</b>
<b>PP2A</b>	<b>Protein phosphatase 2 A</b>
<b>RXR</b>	<b>Retinoid X receptor</b>
<b>SCD1</b>	<b>Stearoyl - CoA desaturase 1</b>
<b>SREBP-1c S</b>	<b>Sterol regulatory element binding protein-1c</b>
<b>SRE</b>	<b>Sterol responsive element</b>
<b>SCAP</b>	<b>SREBP cleavage-activating protein</b>
<b>TOFA</b>	<b>5-(Tetradecyloxy)-2-furancarboxylic acid</b>
<b>UCP2</b>	<b>Uncoupling protein 2</b>
<b>UCP3</b>	<b>Uncoupling protein 3</b>
<b>VLDL</b>	<b>Very low density lipoprotein</b>



組別縮寫對照表

縮	寫	全	名
SW		Chow diet+30% sucrose containing water	
SWL		Chow diet+30% sucrose containing water+94 mg EP/ kg 大鼠體重	
SWM		Chow diet+30% sucrose containing water+188 mg EP/ kg 大鼠體重	
SWH		Chow diet+30% sucrose containing water+470 mg EP/ kg 大鼠體重	



# 建立驗證調節脂肪酸代謝之細胞模式與改善動物代謝症候群模式

中國醫藥大學營養學系碩士班 林毓舜

## 摘要

代謝症候群(Metabolic syndrome)其盛行率在全球日益增加，其中發生原因之一為過多脂質堆積於組織中。理論上促進脂肪酸氧化或抑制脂肪酸合成應可有效降低代謝症候群危險。已知 acetyl-CoA carboxylase (ACC) 是脂肪酸合成關鍵酵素，許多研究已證實利用基因轉殖抑制 ACC 表現或使用 ACC 抑制劑之藥物均可有效改善代謝症候群。

本實驗室之前自鼠肝成功分離 ACC 酵素，利用此平台篩選具有 ACC 活性抑制功效之中草藥，其中發現紅雞屎藤(*P. hypoleucum Ohwi*)酒精萃有最強的抑制 ACC 活性功效( $IC_{50}=0.029$  mg / ml)，因此本論文目標為建立細胞與動物模式驗證紅雞屎藤酒精萃功效。因紅雞屎藤酒精萃已知含有 ACC 活性抑制物，故在細胞與動物模式上如能誘發出 ACC 活性並促進脂質新生 (*de novo lipogenesis*) 反應，再投予紅雞屎藤酒精萃應可觀察到最佳功效。

在細胞實驗方面，利用 HepG2 人類肝癌細胞株，給予高糖培養液刺激細胞中 ACC 活性，發現在給予高糖 12 小時後可顯著增加 ACC 活性和增加細胞內三酸甘油酯含量，增加細胞內脂質生合成並增加細胞 apoB 分泌，在此條件下預先以高糖培養 6 小時後再給予紅雞屎藤酒精萃不同濃度 (0.145 mg / mL 和 0.0725 mg / mL) 4 小時，可有效抑制 ACC 和 FAS 活性，細胞內三酸甘油酯含量與極低密度膽固醇分泌有關蛋白 Microsomal triglyceride transfer protein(MTTP)之表現亦顯著降低。

動物實驗中，以四週齡公 Wistar 大鼠分為對照及誘發組，均餵以 chow diet 但飲水分別為 plain water 及 30% 蔗糖水，實驗給予 20 週糖水後即誘發肥胖、高胰島素血症、高血壓及高三酸甘油酯血症、葡萄糖不耐和胰島素阻抗等症狀，顯示糖水

誘發大鼠體內脂質新生反應。誘發組再分別不給予或給予紅雞屎藤酒精萃三種不同劑量 (94, 188, 469 mg / kg) 管餵 4 週，結果發現給予低劑量紅雞屎藤酒精萃可有效抑制肝臟中 ACC 活性，藉由抑制 ACC 活性減少脂肪酸生成，進一步改善脂肪組織肥大、高胰島素血症、高三酸甘油酯血症、葡萄糖不耐和胰島素阻抗等代謝症候群之功效。

本實驗成功建立用以評估 ACC 活性篩選平台之細胞和動物模式，並驗證紅雞屎藤確實具有抗代謝症候群生理功效，值得開發。

關鍵詞：代謝症候群、acetyl-CoA carboxylase、脂質新生、紅雞屎藤酒精萃



# **Establishing the in vitro and in vivo models for testing the fatty acid metabolic regulatory effect and anti-metabolic syndrome function**

**Yu-Shun Lin**

## **Abstract**

Metabolic syndrome is a global healthy problem with a soaring morbidity. Abnormal fatty acid metabolism and tissue fat burden may lie at the core of this disease. Modulation of fatty acid metabolism, either by stimulating fatty acid oxidation or inhibiting fatty acid synthesis, is therefore been suggested as a potential treatment for obesity and metabolic disorders. Acetyl-coenzyme A carboxylase (ACC) plays a crucial role in fatty acid metabolism, and its inhibition had been shown to be an effective approach for treating metabolic syndrome.

In our previous study, partially purified ACC from rat liver was used to screen herbs commonly used in Taiwanese folk medicine for ACC inhibitory effects. An ethanol extract of *Polygonum hypoleucum Ohwi* (EP), the Taiwan tuber fleece flower, was found to have the highest inhibitory activity (half-maximal inhibitory concentration = 30 µg/mL). Therefore, this study was aimed at establishing the in vitro and in vivo models for testing compounds with fatty acid metabolic regulatory effect and anti-metabolic syndrome function. For this purpose, the cellular and animal models with induced *de novo* lipogenesis was needed for testing the physiological benefits of EP with ACC inhibitory activity.

Induction of ACC activity in HepG2 cells was successfully achieved by incubating the cells with high glucose (30 mM) for 12 hours. At this time point, the TG content and apoB secretion of the high glucose-stimulated cells were also significantly increased compared with the low-glucose control. To test if EP had an inhibitory effect on lipogenesis, cells were stimulated with high glucose for 12 hours;

and 2 doses (0.0725 and 0.145 mg/mL, i.e. 2.5- and 5-fold higher respectively than the  $IC_{50}$ ) of EP were added at 6 hours of high-glucose stimulation. As a result, the EP treated cells had significantly lower ACC and FAS activities, TG content and MTTP mRNA levels than their corresponding vehicle controls at 4 hr of EP treatment.

In animal model, Wistar rats given a chow diet were divided into a control group (C) and an inducing group given, respectively, plain water or 30% sucrose water (SW) to drink ad libitum. After 20 weeks, rats with syndromes like obesity, hyperinsulinemia, hypertension, hypertriglyceridemia, glucose intolerance and insulin resistance were successfully induced by sucrose water drinking. Thereafter, rats in the inducing group were subdivided into 4 groups, without (SW) or with supplementation of EP at 94 ( SWL ), 188 ( SWM ) and 469 (SWH) mg/ kg body weight dosages for 4 wk. Results showed the SWL group had a significant reduction in ACC activity in liver, accompanied with the most striking improving effects on alleviating the symptoms associated with metabolic syndrome.

In conclusion, we had successfully established the in vitro and in vivo models for testing compounds with fatty acid metabolic regulatory effect and anti-metabolic syndrome function in this study. By using high glucose-stimulated HepG2 cells and sucrose drinking water-treated animals, *P. hypoleucum Ohwi*, a Chinese herb, is shown to be effective in alleviating the metabolic syndrome, a function which is worthy to be further explored.

## 第一章 前言

代謝症候群 (Metabolic syndrome) 意指肥胖、血脂紊亂、高血糖和高血壓等多種特徵同時存在一個人身上，已成為世界性重要的公共衛生問題，且是第 2 型糖尿病和心血管疾病之危險因子。在台灣罹患代謝症候群人數有逐年增加趨勢，已造就國家醫療成本的龐大支出。若能有效開發出預防或抗代謝症候群之藥品、保健食品，將有助於降低罹患代謝症候群人數。

Acetyl-CoA carboxylase (ACC) 為體內 *de novo* lipogenesis 之重要關鍵酵素，調控脂肪酸生合成。其產物 malonyl - CoA 為肝臟中合成三酸甘油酯的原料外，亦能調控脂肪酸氧化酵素 Carnitin palmitoyltransferase - 1 (CPT - 1)，抑制其活性降低脂肪酸氧化。若是過多脂肪酸合成造成脂肪酸溢流到其他非脂肪組織，造成 lipotoxicity。因此，若能有效抑制 ACC 活性，即可抑制脂肪酸生合成和/或促進脂肪酸氧化，也許能降低組織中三酸甘油酯堆積導致肥胖和代謝症候群的發生。

本實驗室先前研究發現，紅雞屎藤中草藥具有抑制 ACC 活性之功效，因此將進一步應用於細胞和動物實驗上，驗證紅雞屎藤之抗代謝症候群之功效，首要之務即是建立適合細胞和動物實驗，以方便、科學化評估紅雞屎藤之有效性。

## 第二章 文獻回顧

### 一、 代謝症候群 (Metabolic syndrome)

#### (一) 代謝症候群定義

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數命名為 Syndrome X，並指出代謝症候群主因是與胰島素抗性有關(1)。

#### (二) 判定標準

根據2001美國國家膽固醇教育計畫 National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel - III (NCEP - ATP - III) 主要針對心血管疾病的危險所建立的判斷標準，建立造成代謝症候群五種危險因子：(I) 腹部肥胖，男性腰圍大於 102 cm 和女性腰圍大於 88 cm；(II) 血中三酸甘油酯濃度大於 150 mg / dl；(III) 高密度脂蛋白 - 膽固醇 (HDL - Cholesterol) 濃度，男性小於 40 mg / dl 和女性小於 50 mg / dl；(IV) 血壓超過 135 / 85 mmHg；(V) 禁食血糖濃度大於 110 mg / dl。NCEP 判定須符合五項因子的其中三項以上即認為有代謝症候群且增加罹患心血管

疾病的風險(2)。在美國成年人罹患代謝症候群比率為24%。且已知與動脈硬化及T2DM患者死亡率增加有正相關(3, 4)。

在2004年，International Diabetes Federation (IDF) 建立出適用於任何國家的判斷標準。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、血壓增加、proinflammatory state 和 prothrombotic state。目前 IDF 在2005年又建立了最新的判斷標準，特別強調中央型肥胖是判定代謝症候群的必要條件，再加上高三酸甘油酯、低的高密度脂蛋白、高血壓、高空腹血糖，四項中兩項。而中央型肥胖的判定則是依各民族自訂之標準(5)。

依我國行政院衛生署國民健康局在2006年對代謝症候群的判定標準建議採94年美國NECP-ATP-III的診斷標準，並將空腹血糖向下修正，於96年1月18日公告，即以下5項危險因子中，若包含3項或以上者可判定為代謝症候群。

表 2-1 台灣代謝症候群之判定標準

危險因子	異常值
腹部肥胖(Central obesity)	腰圍 (waist) : 男性 $\geq 90$ cm 女性 $\geq 80$ cm
血壓(BP)上升	SBP $\geq 130$ mmHg / DBP $\geq 85$ mmHg
高密度脂蛋白膽固醇(HDL-C)過低	男性 $< 40$ mg/dl 女性 $< 50$ mg/dl
空腹血糖值(Fasting glucose)上升	FG $\geq 100$ mg/dl
三酸甘油酯(Triglyceride)上升	TG $\geq 150$ mg/dl

備註：上項危險因子中「血壓上升」、「空腹血糖值上升」之判定，包括依醫師處方使用降血壓或降血糖等藥品(中、草藥除外)，血壓或血糖之檢驗值正常者。

在盛行率方面，國民健康局 91 年三高(高血壓、高血糖、高血脂)調查研究顯示，國人代謝症候群盛行率：15 歲以上為 14.99% (男 16.9%，女 13.8%)，且隨年齡上升而有增加的趨勢，見表 2-1 所示。又據衛生署統計顯示，代謝症候群所衍生之腦血管疾病、心臟病、糖尿病、高血壓等慢性疾病，皆年居台灣十大死因榜中，此現象也造就了國家對於醫療保健費用龐大的支出，見表 2-2 所示。因此如何預防代謝症候群已成為我國及世界之新興重要公共衛生議題。

表 2-2 台灣代謝症候群及組成因子盛行率

		91*年三高盛行率調查		
		男	女	合計
代謝症候群*		16.9%	13.8%	14.99%
組成因子	高血壓(15 歲)	24.9%	18.2%	21.38%
	高三酸甘油酯	20.3%	11.3%	15.6%
	高低密度膽固醇	6.5%	6.3%	6.4%
	高血糖(19 歲↑)	8.8%	7.2%	8.0%
	高血糖(45 歲↑)	15.5%	14.0%	
	高血糖(65 歲↑)	18.8 %	22.8%	
	糖尿病前期	3.2%	3.2%	3.2%
	高膽固醇	10.8%	10.9%	10.9%

資料來源：行政院衛生署國民健康局

表 2-3 95年國人代謝症候群相關疾病醫療費用

項目	就診人數 (萬)	住診費用 (千點數)
糖尿病	120.2	14,003,298
高血壓	258.0	15,769,193
心臟病	133.6	17,811,943
腦中風	52.8	12,628,941
小計	564.6	60,213,375
癌症	39.6	30,983,734
代謝症候群/癌症		1.94

資料來源：衛生署95年全民健康保險醫療統計年報

### (三) 代謝症候群發生原因

代謝症候群發生原因，主要由於現代人飲食和生活型態改變有關。隨著飲食西化，飲食偏向過度精緻化的糖類食品、含糖飲料、高油飲食等，並缺乏運動進而產生肥胖。脂肪組織為調節身體熱量平衡之重要組織，今若攝取過多的熱量，過多的熱量會以脂肪形式儲存在白色脂肪組織中。長期熱量攝取過多，產生過多脂肪造成脂肪細胞肥大並且脂肪組織無法負荷過多脂肪，轉而將多餘的脂肪酸堆積流向其他非脂肪組織，如：肝臟、肌肉和胰臟。而這樣的過程稱之為 lipotoxicity，造成身體各組織對胰島素產生抗性、減少胰島素分泌、第 2 型糖尿病、心血管疾病接踵而來

(6)。另種理論認為肥大的脂肪細胞也會釋出不利胰島素傳訊之脂肪細胞激素如：resistin、plasminogen activator inhibitor I、Interleukin-6 (IL-6)、Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )及 free fatty acids 等，加重胰島素阻抗(7)。

#### (四) 代謝症候群治療方式

由 NCEP 建議預防代謝症候群的目標鎖定在飲食與運動，有研究顯示飲食控制和增加活動量可降低體重、促進全身氧化代謝和降低胰島素阻抗(2)。近年來有學者提出調節脂肪酸代謝對改善肥胖和代謝症候群是具有潛力的對策(8)。在肥胖者中發現脂肪組織增加的原因可能來自於體內增加 *de novo* lipogenesis 和降低 fatty acid oxidation。因“lipotoxicity”導致體內發生 Non - alcoholic steatohepatitis、dyslipidemia 和 insulin resistance。所以與脂質代謝相關的重要調控酵素成為治療代謝症候群的研究焦點之一。例如抑制脂質生合成關鍵酵素 acetyl - CoA carboxylase (ACC)可能有助於抗肥胖與代謝症候群。

在藥物治療方面已證實亦有針對不同的代謝紊亂給予治療藥物，例如 Statins 治療高膽固醇血症、Fibrates 和 Niacin 治療 Hypertriglyceridemia 與 hypoalphalipoproteinemia、Angiotensin - converting enzyme inhibitors 治療高血壓、Aspirin 治療 Hypercoagulability、Biguanides 和 Glitazones 治療高血糖(9)。但少有藥物能同時解決以上多種問題。

## 二、 乙醯輔酶A 化酶 (Acetyl-CoenzymeA carboxylase)

### (一) 何謂 Acetyl-CoenzymeA carboxylase (ACC)

在 1958 年由 Salih 等人發現 ACC 是屬於 Biotin - dependent enzyme，其結構與催化受質能力有關(10, 11)。ACC(EC 6.4.1.2)對脂質貯存和所有能量代謝有強力的影響，ACC 為催化細胞質中脂質生合成的關鍵步驟 (Rate limiting reaction)之羧化反應，將受質 acetyl - CoA 反應生成產物 malonyl - CoA，而 malonyl - CoA 是 Fatty acid synthase (FAS) 必需受質也是脂肪酸鏈延長的原料，特別在脂肪、肝臟和泌乳腺；同時亦為粒線體中脂肪酸氧化作用的抑制者。

ACC 所催化的反應為 ACC 由 holo - carboxylase synthetase 將 apo - ACC 結構 lysine residue 上  $\epsilon$  - amino group 與 biotin 共價鍵結，又 biotin 稱為羧基的 carrier。ACC 有兩個催化步驟：(I)需要 ATP 參與提供能量於 biotin ureido ring 上的 N1 分子，藉由 biotin carboxylase (BC)催化下提供 bicarbonate 進行羧基的轉移，形成 carboxy - biotinyl - ACC。(II)將羧基自 biotin 轉移至 acetyl - CoA，形成產物 malonyl - CoA(12)，此步驟則不需能量參與反應。因此 ACC 催化反應整個過程需要兩個酵素的參與，biotin carboxylase(BC)、carboxyltransferase(CT)，如圖 2 - 1 所示(13)。

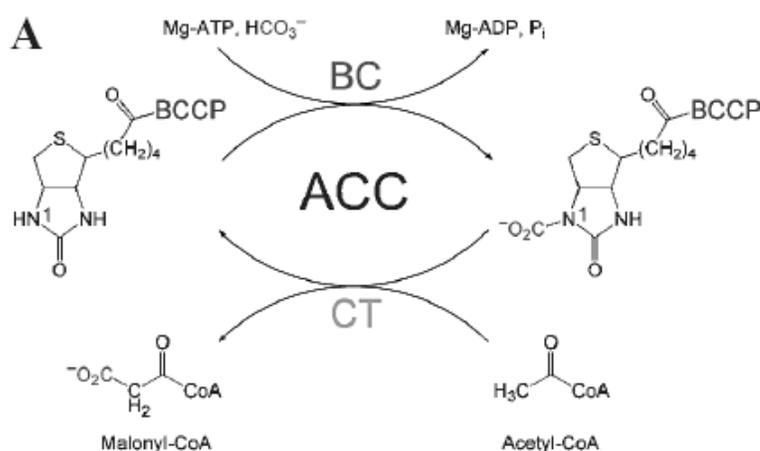


圖2-1 參與ACC催化反應的兩個步驟

資料來源：Tong ., 2005 (13)

在人類與其他哺乳動物中 ACC 具有兩種 isoforms，分別為 ACC1 和 ACC2。ACC1 又稱為 ACC $\alpha$ 。ACC1 gene 定位於人類染色體 17(14)。發現 lipogenic tissue (肝臟、脂肪組織、泌乳腺體) 有大量 ACC1 表現，其存在於細胞質中，分子量為 265 kDa，主要生理功能角色為長鏈脂肪酸生合成的速率決定步驟之催化者(15)(16)(17)。ACC2 又稱為 ACC $\beta$ 。ACC2 gene 定位於人類染色體 12 (18)。ACC2 主要表現在 oxidative tissue(心臟、骨骼肌、肝臟)，分子量為 280 kDa，結構與 ACC1 不同處是 ACC2 N 端(疏水端)具有胺基酸延長的序列(超過 114 胺基酸)，最前面的 20 個胺基酸可通透粒線體膜，而產物 malonyl - CoA 為粒線體膜上調控脂肪酸氧化之酵素 carnitine palmitoyltransferase - I(CPT - 1)的異位抑制劑(allosteric inhibitor)，進而抑制脂肪酸氧化作用(33)。相較於 ACC1，ACC2 具有與 ATP 和 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>較低的 K<sub>m</sub>，與 acetyl - CoA 則有較高的 K<sub>m</sub>(19)(20)。

## (二) ACC 調控

在不同的生理狀況下 ACC 的半衰期為 1 至 3 天，其濃度並不會迅速的顯著改變(21)。但仍受到營養狀況與荷爾蒙調控 ACC 基因表現。短時間 ACC 活性的調控是經由異位調節和共價修飾（磷酸化與去磷酸化）所調控。

### 1. 異位調節

ACCs 活性會受到正回饋 feedforward 和負回饋 feedback 調控作用。Citrate 對哺乳動物 ACCs 為正回饋的異位活化調控者，且 Citrate 是 ACC 受質 acetyl - CoA 之前驅物，在粒線體形成的 acetyl - CoA，與 oxaloacetate 共同反應形成 citrate，其催化酵素為 tricarboxylic acid cycle 中的 citrate synthase。過多的 citrate 會通過粒線體，出現在細胞質中，藉由 ATP - citrate lyase 轉生成 acetyl - CoA。因此 citrate 也是 acetyl - CoA 從粒線體轉運至細胞質中的決定者。細胞內的 citrate 生理濃度範圍約在 0.1 ~ 1 mM，活化 ACC 的  $K_a$  約為 2 mM。而 citrate 調控 ACC 是透過改變 ACC 的原始結構，促進 ACC 聚合作用表現為活化態，增加 ACC 的活性(22)。不只是 citrate 會促進 ACC 聚合作用，像其他離子包括 isocitrate、malonate、sulfate 和 phosphate 也會促進 ACC 聚合增加其活性。

Long - chain acyl - CoA esters 為 ACC 活性之負回饋抑制者，會促進 ACC 聚合物的分離恢復成原始構型。16 碳或以上的飽和或不飽和 fatty acyl - CoA 之  $K_i$  範圍在 1 ~ 150 nM(23)。此抑制作用可經由缺乏 stearoyl - CoA desaturase 1(SCD1)的 mice 試驗來解釋，SCD1 為產生不飽和脂肪酸的酵素(24)。SCD1 的缺乏會產生比正常情形下更大量的飽和 long - chain acyl - CoAs 而導致 ACCs 抑制作用和提高脂肪

酸氧化(25)。在 SCD - 1 缺乏小鼠 AMP - activated protein kinase (AMPK) 的刺激也扮演了代謝上的重要角色(25)。

## 2. 共價修飾

ACCs 活性也受到共價修飾的調控，特別是 critical Ser residues 的磷酸化作用(16)。AMPK 是在生理環境下可磷酸化 ACCs 的關鍵酵素，AMPK 是與各種壓力訊息傳導和運動的反應之主要與調節代謝有關的酵素(26)。活化 AMPK 會調控相當多的催化酵素活性和細胞內磷酸化反應，最後都是導致 ATP - consuming pathways 被抑制和活化 ATP - producing pathways。於是 AMPK 磷酸化 ACCs 藉此降低酵素的  $V_{max}$  和 citrate 敏感性，達到顯著抑制酵素活性。而 AMPK 磷酸化位置包括 ACC1 的 Ser<sup>79</sup>、Ser<sup>1200</sup>、Ser<sup>1215</sup> 和 ACC2 的 Ser<sup>218</sup>。ACC1 Ser<sup>79</sup> 相當於 ACC2 Ser<sup>218</sup> 皆位於 BC domain 之前，這兩個位置若發生磷酸化作用則能足夠抑制 ACCs 活性，ACC2 則缺乏與 ACC1 Ser<sup>1200</sup> 和 Ser<sup>1215</sup> 相同的磷酸化位置。

除了 AMPK 外，Protein kinase A (PKA) 也會磷酸化 ACC1 Ser<sup>79</sup>、Ser<sup>1200</sup> 和 ACC2，降低 ACC 的活性，但此機制還尚未被證實(16, 17)。

### (三) 抑制 ACC 可改善代謝症候群之相關研究

Acetyl - CoA carboxylase(ACCs)在人類和大部分的有機生物體為脂肪酸代謝的重要角色。在抑制 ACC 的藥物發展作為治療各種疾病的目標，包括糖尿病、肥胖、癌症和細菌感染已相當令人重視。抑制 ACC 也抑制脂質生合成(肝臟、脂肪組織)同時也刺激氧化組織(肝臟、心臟、骨骼肌)脂肪酸氧化。提供了一個引人注意的改善代謝症候群之相關模式。以下為抑制 ACC 運用在改善心血管疾病有關的危險因子(例如肥胖、糖尿病、胰島素阻抗、代謝症候群)之相關文獻報告

利用 ACC2 cDNA probe 分離出 ACC2 genomic clone，以胚胎幹細胞建構一段 ACC2 突變的對偶基因，也就是在 ACC2 序列上的 biotin binding site 以 hypoxanthine phosphorylribosyltransferase (HPRT)取代，經同質互換後，目標剔除 ACC2 基因表現。此方法可降低由高脂或高糖飲食誘導肥胖和 Type 2 DM 的小鼠肝臟脂質含量和胰島素阻抗之現象(27)(28)，提高肝臟和骨骼肌脂肪酸氧化、心臟和脂肪組織 uncoupling protein(UCP2)、骨骼肌 uncoupling protein 3 (UCP3)濃度，增加能量消耗(28)、減少體重、血糖、組織肝糖含量。

有學者也嘗試將動物體內 ACC1 knockout，但卻發現剔除 ACC1 後的小鼠無法正常生長，胎死於母體腹中(29)。

TOFA 為類似長鏈脂肪酸的藥物，當 TOFA 在肝臟微粒體中轉生成為 ToFyl - CoA 則能抑制 ACC 活性(30)，在肝細胞(31)或動物模式(87-89)中發現可降低脂肪酸合成與三酸甘油酯分泌、降低血膽固醇與三酸甘油酯(31)(32)、降低體重(33)。

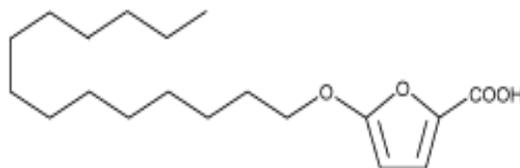


圖 2-2 TOFA 結構

### 三、 高糖飲食誘發代謝症候群

#### (一) 高糖（蔗糖）飲食引發代謝症候群之動物模式

在建立代謝症候群動物模式上，給予齧齒類動物高油或高糖(包括蔗糖或果糖)飲食是常用方法，相較於高脂飲食穩定誘發動物肥胖及胰島素阻抗，文獻顯示高糖飲食誘發效果不一。有研究指出若不提高飼料油脂比例，僅以蔗糖置換同等量澱粉給予 C57BL/6J 小鼠，無法有效誘發代謝症候群現象(34, 35)。Sumiyoshi 等人給予 C57BL/6J 小鼠 50%蔗糖添加於飼料中（為期 55 週），無法誘發小鼠肥胖與體脂增加(34)。El Hafidi et al (2001) 利用 30%蔗糖水成功誘發 Wistar rats 代謝症候群(36)，之後此模式之應用可見於數篇文獻(37)。他們發現持續給予 Wistar 大鼠蔗糖水 39 週後，會出現肥胖、高血糖、高胰島素血症與高三酸甘油酯血症，並且出現葡萄糖不耐與胰島素阻抗現象之代謝症候群相關症狀(37)；給予糖水動物雖然固體飼料攝取減少，總熱量攝取卻大幅增加。此結果顯示高糖來自固體食物或液體飲料會有不同效果，事實證明蔗糖給予的形式（固體或液體）會影響誘發效果，當熱量以液體形式供應引起的代償反應(抑制食慾)效果較差(38)，因此蔗糖取代飼料中澱粉通常無法有效提高動物熱量攝取，但以糖水供應時則會造成熱量攝取失控。糖水模式類似於人類過度攝取含糖飲料，造就營養素缺乏但熱量過剩之營養狀態。

## (二) 高糖誘發肝脂堆積及胰島素抵抗之細胞模式

在誘發肝脂堆積及胰島素抵抗之肝細胞模式方面，Zang 等人於 2004 年發表 (39)，利用人類肝癌細胞 HepG2，給予 24 小時高糖濃度培養液（葡萄糖濃度為 30 mM）後，再給予胰島素一起培養，發現細胞給予高糖濃度培養液，會減弱胰島素所誘發之胰島素訊息傳遞路徑，其中又以胰島素訊息傳遞路徑中 Akt 磷酸化減少有很大關係，已知 Akt 為胰島素訊息傳遞中胰島素接受器之下游蛋白，負責細胞對於葡萄糖攝取之調控(39)。給予高濃度葡萄糖刺激下不僅阻礙胰島素訊息傳遞，同時發現，細胞給予高濃度葡萄糖刺激下，細胞內 AMPK 磷酸化減少，造成細胞中 ACC 磷酸化減少，細胞傾向脂質生合成反應，使細胞中三酸甘油酯大量產生。

根據以上細胞和動物實驗可知，持續給予高糖下，會使肝細胞產生胰島素抵抗，減弱胰島素功能，造成細胞對於葡萄糖攝取困難，便形成高血糖，而過高的血糖一再刺激胰臟分泌大量胰島素，造成了高胰島素血症進一步加重胰島素抵抗現象。同時，給予高糖會增加肝細胞大量合成脂肪酸，過多脂肪酸形成便引發高三酸甘油酯血症。而脂肪酸儲存在脂肪細胞內，造成肥胖、體脂肪增加和脂肪細胞肥大。過多脂肪酸若是溢流到其他組織，如：肝臟、肌肉、胰臟等非脂肪組織中，造成 lipotoxicity 現象，進一步加重胰島素抵抗。此外，脂肪細胞肥大也會分泌不利健康的脂肪細胞激素，更不利於胰島素訊息之傳遞。種種現象的累積，便形成現代文明病-代謝症候群。

### (三) 肝臟中脂質合成相關轉錄因子

#### 1. Liver X receptors (LXRs)

在1994年於大鼠肝臟中發現 Liver X receptors (LXRs) 為 ligand-activated 轉錄因子，屬於核受器的一種(40)(41)。LXRs 包含 LXR $\alpha$ (NR1H3)和 LXR $\beta$ (NR1H2) 兩種異構物，此兩異構物被辨識在它們的配位子結合區和 DNA 結合區將近有 78% 胺基酸序列相同(42)。LXR $\alpha$  主要表現在肝臟、脂肪組織、脾臟、小腸、腎臟和肺臟中，相反的 LXR $\beta$  卻在身體各部組織都會表現(40)(41)。

LXRs 最初因它在自然界中的配位子並沒有被發現，故被視為一種 orphan nuclear receptor，直到近年才被發現(42)。當細胞中有 LXRs 配位子出現時，便會活化 LXRs，此時會與 retinoid X receptor (RXR) 結合形成 heterodimers，進入細胞核中結合至含有 LXR response elements (LXREs) 之 promoter regions(43)。LXREs 是由六個核苷酸 (AGGTCA) 重複兩次，其中間夾雜四個隨機的核苷酸所形成之特定序列(43)。

研究發現，LXR之內生性配位子大多為一些氧化固醇類，其中又以下列氧化固醇類活化LXR最為強烈。22(R)-hydroxycholesterol和20(S)-hydroxycholesterol屬於固醇類賀爾蒙之中間代謝物，24(S)-hydroxycholesterol產生於大腦，是血清中氧化固醇最主要的形式。24(S),25-epoxycholesterol大量存在於肝臟中(44-47)。大部分的氧化固醇對LXRs之親和力皆差不多，但5,6-24(S),25-diepoxycholesterol和6 $\alpha$ -hydroxy bile acids這兩種氧化固醇只專一性接合至LXR $\alpha$ (48)。除了天然的配位子外，也開發合成出人工LXRs配位子T0901317和GW3965這兩種藥物(49, 50)。

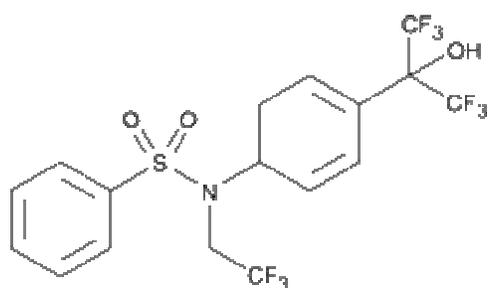


圖2-3 T0901317之結構圖

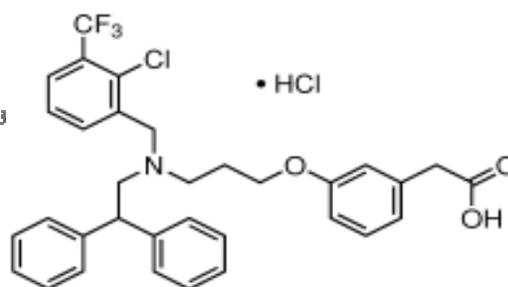


圖2-4 GW3965之結構圖

近年來研究發現，LXR在膽固醇、脂質和糖類代謝上扮演重要的角色。在膽固醇代謝上，LXR為調控體內膽固醇之恆定，在剔除小鼠LXR基因後，餵予高膽固醇飲食發現，與正常小鼠相比，LXR缺乏小鼠會造成肝藏中膽固醇堆積、肝腫大和高膽固醇血症(51)。研究發現LXR調控膽酸合成之速率限制酵素cholesterol 7- $\alpha$ -hydroxylase (CYP7a1)，此酵素為膽固醇代謝成膽酸之重要酵素，若將LXR剔除後，會造成無法增加CYP7a1合成，因而使膽固醇代謝為膽酸減少，阻礙膽固醇的排出(52)。此外，LXR也會促進膽酸排出，藉由調控ATP-binding cassette transporters (ABC) 酵素，此酵素功用為加速膽酸被運往膽囊(53, 54)。由此可知，LXR對於膽固醇之代謝扮演重要角色。

## 2. Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP)

在2001年Uyeda等人(55)利用質譜儀發現Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP)的存在，ChREBP構造為basic helix-loop-helix (bHLH) 為一種核受器，分子量大約為100 kDa。ChREBP主要表現在與脂質生合成相關組織中，如：肝臟、小腸、腎臟和白色、棕色脂肪組織。

ChREBP為主要調控葡萄糖代謝之轉錄因子。在剔除*ChREBP*基因小鼠，給予正常飲食下，剔除基因小鼠出現肝臟中肝糖負荷過多、脂肪組織過小和減少血清中游離脂肪酸含量，除了醣類和脂質代謝出現異常，並有胰島素和葡萄糖不耐的現象(56)。抑制*ob/ob*小鼠中ChREBP表現，則有助於減少肝脂堆積和增加肝臟、肌肉和脂肪組織對於胰島素敏感性，有助於改善葡萄糖不耐、高血酯症、高血糖和高胰島素血症，有助於改善代謝症候群(57)。由相關研究顯示，ChREBP對於發展肥胖和第2型糖尿病過程中，扮演舉足輕重的角色。

ChREBP活化會被葡萄糖所刺激，而被昇糖激素所抑制。葡萄糖代謝物會促進ChREBP轉位至細胞核中，而昇糖激素反而會抑制此情況發生。Uyeda等人研究發現(55)，ChREBP上有三個磷酸化位點，分別是Ser 196、Ser 568和Thr 666。當葡萄糖代謝經由五碳糖代謝路徑，由葡萄糖形成xylulose 5-phosphate，xylulose 5-phosphate會進一步活化protein phosphatase 2 A (PP2A)使PP2A將Ser 196上磷酸化給去除，進入細胞核中。在進入細胞核後再被PP2A將剩餘磷酸根給去除，露出DNA結合區域，進一步結合到含有carbohydrate response element (ChoRE)之promoter位置。含有ChoRE序列皆主要為調控葡萄糖糖解和脂質生合成代謝之相關酵素，如：L-type pyruvate kinase、ACC、FAS和stearoyl-CoA desaturase，促進脂質生合成。

### 3. Sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c)

SREBPs為協助控制細胞中*de novo* lipogenesis狀態之重要轉錄因子，負責調控細胞中和細胞膜上脂質的多寡(58-60)。SREBPs其結構為basic helix-loop-helix (bHLH)為一種核受器。SREBPs家族中包含SREBP-1a、SREBP-1c和SREBP-2

三種異構物，分別由 *SREBF-1* 和 *SREBF-2* 兩個基因所轉譯出來。而 SREBPs 的表現會因組織的不同而表現在特定組織中(61-63)，SREBP-1c 會表現於飽食後的肝臟中；SREBP-1a 和 SREBP-2 並沒有特定表現的組織，在全身組織中皆會表現。而 SREBP-1a 和 SREBP-1c 蛋白，負責調控單元不飽和和多元不飽和脂肪酸合成相關酵素之基因表現(61-63)，其中 SREBP-1c 會促進脂質生合成相關酵素 ACC、FAS、long chain fatty acid elongase (Evolv-6) 和 stearoyl-CoA desaturase 1 之基因表現。

SREBPs與代謝症候群的發展有著重要角色。利用 *SREBP-1a* transgenic/*LDL receptor* KO小鼠和 *ob/ob LDL receptor* KO小鼠顯示，會造成高血脂症別是高三酸甘油酯血症，並會阻礙apoB脂蛋白清除能力(64, 65)。SREBP-1c調控肝臟中脂質生合成，與三酸甘油酯合成和極低密度脂蛋白的產生有著很大的關係，在利用 *SREBP-1c* 過度表現之小鼠，出現血清中VLDL脂蛋白含量增加和HDL脂蛋白含量減少(66)。

SREBP由內質網中被合成後，便停留在內質網膜上等待活化訊號出現。而 SREBPs的活化過程包含了調節膜上蛋白質的裂解、轉位至細胞核和保持SREBPs的穩定性。SREBP合成完畢後，其調節SREBP活性的次單位-SREBP cleavage-activating protein (SCAP)結合在SREBP後面，用以感應細胞內膽固醇多寡，此時SREBPs為不活化態。當有活化訊息產生時，如：細胞中膽固醇減少或有胰島素存在下，SCAP-SREBP complex會藉由Sar 1（一個小的GTP結合蛋白）作用招喚其他vesicular transport coat proteins-Sec23和Sec24，幫助SCAP-SREBP complex轉位至高基氏體上，隨後會在高基氏體膜上藉由Site-1 proteases和Site-2 proteases作用下，便形成活化態的nSREBP，進入細胞核中，結合至含有sterol responsive element (SRE) 的目標基因上，促進其轉錄活性(67)。

#### (四) 蔗糖誘發脂質新生 (*de novo lipogenesis*) 之生化與分子機制

蔗糖組成是由一分子葡萄糖與一分子果糖所形成。當攝取糖水(蔗糖)時,蔗糖會在小腸內分解形成葡萄糖與果糖,再分別吸收進入血液中,經由肝門靜脈流入肝臟,肝臟會調節血液中葡萄糖與果糖濃度,將葡萄糖與果糖進一步合成脂質,並將合成的脂質包裹於極低密度膽固醇(VLDL)從肝臟分泌出,藉以提供身體其他組織利用,過多的脂質將貯存在脂肪組織中,以供日後能量所需。

葡萄糖在肝臟中藉由醣解反應形成acetyl-CoA,進一步藉由ACC、FAS合成脂肪酸,此一連串由醣轉變成脂質步驟被稱為脂質新生(*de novo lipogenesis*)。另一方面,葡萄糖會促進胰臟分泌胰島素,加速脂質新生。而果糖代謝對於葡萄糖和脂質代謝有很重要的影響,果糖進入肝細胞後,經由果糖激酶(fructokinase)磷酸化形成fructose-1-phosphate後,藉由aldolase B作用下裂解成glyceraldehyde和dihydroxyacetone phosphate直接進入醣解反應。相反的肝臟中葡萄糖代謝受到肝臟中肝糖、citrate和ATP濃度所影響,進而抑制了phosphofructokinase減慢醣解反應。但果糖代謝不受到phosphofructokinase所影響,因此果糖代謝跳過醣解反應之限制步驟,因此果糖相較於葡萄糖代謝較快,更有利於脂質合成(68)。

就分子機制層面,Mitro等人於2007年(69)研究發現,葡萄糖和其代謝物glucose 6-phosphate可直接接合到LXRs之ligand binding domain上,促進LXRs轉位活性,由細胞質中轉位到細胞核中結合到LXREs上,由此可知葡萄糖和其代謝物glucose 6-phosphate為LXRs之促進子。文獻指出,ChREBP和SREBP-1c兩個葡萄糖代謝和脂質代謝調控之重要轉錄因子,其promoter regions中含有LXREs序列(70, 71)。餵予小鼠LXR之促進劑-T0901317其肝臟中SREBP-1基因表現大量增

加，同樣將 LXR 之促進劑-T0901317 餵予 LXR 基因剔除小鼠，則 SREBP-1 基因表現相對減少，此外利用 electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 實驗證明，LXR 確實會結合至 *SREBP-1* 之 promoter regions，促進 SREBP-1 之 mRNA 表現(71)。同樣地，餵予小鼠 LXR 之促進劑-T0901317 其肝臟中 ChREBP 基因表現大量增加，再將 LXR 之促進劑-T0901317 餵予 LXR 基因剔除小鼠，則 ChREBP 基因表現相對減少，利用 EMSA 實驗證明，LXR 確實會結合至 *ChREBP* 之 promoter regions，促進 ChREBP 之 mRNA 表現(70)。

由此可知，給予高葡萄糖刺激下，葡萄糖結合至 LXRs 上促進 LXRs 之活性，促使 LXRs 會由細胞質中轉位至細胞核中，結合至含有 LXREs 序列上，增加 *ChREBP* 和 *SREBP-1c* 基因之轉錄活性，大量表現 mRNA。同時，葡萄糖代謝中間物 xylulose 5-phosphate 可活化 PP2A，將 ChREBP 去磷酸化轉位至細胞核中，促進葡萄糖代謝和脂質生合成相關基因之轉錄活性(55)。此外，葡萄糖會促使胰臟分泌胰島素，已知胰島素可促進 SREBP-1 由內質網裂解，形成活化態的 SREBP-1 進入細胞核中，促進了脂質生合成相關基因表現。

研究指出，過度表現 protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) 也會造成細胞中脂質生合成增加(72)。PTP1B 顧名思義為負責去除細胞蛋白質中 tyrosine 磷酸化之去磷解酶。PTP1B 為第一個發現的 tyrosine phosphatase，由 435 個胺基酸所組成，蛋白質 N 端部分為蛋白質活性區域，C 端部位鑲嵌在內質網上，使 PTP1B 固定位於內質網上(73, 74)。文獻指出，PTP1B 與胰島素訊息傳遞調控有很大關係，當胰島素接合至胰島素接受器 (Insulin receptor; IR) 上，使 IR 上 tyrosine 位點自體磷酸化並接著磷酸化胰島素接受器受質 (Insulin receptor substrate; IRS)，觸發下游訊息蛋白磷酸化。當胰島素移去後，IR 上 tyrosine 磷酸化位點會藉由 PTP1B 給去磷

酸化，避免細胞內磷酸化持續進行(75)。因此，PTP1B 對於胰島素敏感性有著重要的影響性，Rondinone 等人(76)利用 *PTP1B* 剔除基因 *ob/ob* 小鼠顯示具有較好胰島素敏感性和血糖值。

Shimizu 等人(72)於 2003 年指出，大鼠給予果糖後可促使肝臟中 PTP1B 大量表現，透過 PP2A 與 AP2 活化而促進 SREBP-1 基因表現。另外，果糖會活化 PP2A(72)(55)，研究指出，活化 PP2A 可將 AMP-activated protein kinase (AMPK) 去磷酸化使其失去活性，無法磷酸化 ACC，進一步促進 ACC 活性，增加脂質生合(39)。由此可知，給予蔗糖水後，不僅會促進脂質生合成相關基因表現，也可促進脂質生合成酵素活性，增加脂質生合成。

#### (五) Microsomal triglyceride transfer protein (MTTP) 與三酸甘油酯分泌

三酸甘油酯分泌主要藉由兩個重要脂蛋白所攜帶。其一是從小腸所分泌之乳糜微粒，其蛋白主要為 Apolipoprotein B<sub>48</sub> (ApoB<sub>48</sub>)，乳糜微粒中三酸甘油酯來源是飲食中之油脂經由小腸消化吸收後，藉由 ApoB<sub>48</sub> 攜帶出小腸進入血液中循環。另外一種由肝臟分泌之極低密度脂蛋白 (Very low density lipoprotein; VLDL)，其蛋白主要為 Apolipoprotein B<sub>100</sub> (ApoB<sub>100</sub>) 所組成，VLDL 為肝臟分泌三酸甘油酯至血液供給身體所需之重要形式。

而 MTTP 是負責將三酸甘油酯包裹進 ApoB 脂蛋白並促進脂蛋白分泌之重要蛋白質。MTTP 位於內質網上具有中性脂肪轉移活性，其僅表現於會分泌 ApoB 脂蛋白器官，也就是肝臟和小腸(77)。MTTP 是由兩個次單位所組成，小次單位由 55 kDa 蛋白所組成，為蛋白質雙硫異構酶 (Protein disulfide isomerase; PDI) 但並不具有

任何活性功能。另外，大次單位由 97 kDa 蛋白所組成，此段多肽是唯具有脂質結合和轉移功能(78)。當 ApoB 脂蛋白轉移到內質網上，其脂蛋白 N 端蛋白與內質網結合並擷取一些中性脂肪形成核心部位 (Nucleation sites)，核心部位會聚集與三酸甘油酯合成相關酵素。若細胞內大量合成三酸甘油酯，豐富了內質網膜上脂質超過核心部位中脂質含量，在這情況下，MTTP 就扮演了將膜上脂質轉移到核心部位，幫助 ApoB 脂蛋白分泌(79)。

MTTP 表現受到許多轉錄因子所調控，其基因啟動子包含 insulin response elements (IREs) 和 sterol response elements (SREs) 這兩段負向調節序列，因此 SREBP 蛋白會結合到此段基因序列上並抑制轉錄，減少 MTTP 表現(80-82)。另外，在 *MTTP* 啟動子近端基因序列中包含 HNF1 (HNF1)、LRH-1、HNF4 $\alpha$  (HNF4) 結合區域，屬於 DR1 element，也會受 PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$ 、FOXA2 和 COUP-TF II 三個轉錄因子所影響(80-83)。研究顯示，若大量表現以上轉錄因子，同樣的促進 *MTTP* 轉錄，但大量表現 COUP-TF II 此轉錄因子卻是抑制 *MTTP* 轉錄，顯示 COUP-TF II 為抑制 MTTP 轉錄活性之轉錄因子(84)。在 *hnf4* 基因剔除小鼠肝臟中並無 MTTP 基因表現，顯示 HNF4 $\alpha$  對於 MTTP 表現扮演重要角色。

#### 四、紅雞屎藤 (*Polygonum hypoleucum Ohwi*)

關於本次實驗所用的紅雞屎藤，為台灣何首烏在植物分類學上屬於蓼科 (Polygonaceae) 蓼屬 (*Polygonum*)，在民間又被稱為紅雞屎藤，原產地為台灣特有種，分佈於台灣全島中低海拔山區常見，多生長於路邊及林緣，多年生纏繞藤本，葉互生，葉片卵狀長橢圓形，葉背帶紫紅色，夏秋開花為細小白花。台灣何首烏在用藥上其根及藤可用來鎮咳、祛風、祛痰、治感冒咳嗽，風濕，葉可治感冒及外敷刀傷(85)。

對於紅雞屎藤的科學研究並不多，主要為抗癌和抗發炎。將紅雞屎藤區分物 (emodin、emodin 1-O- $\beta$ -D-glucoside、physcion、physcion 1-O- $\beta$ -D-glucoside) 測試不同癌細胞株 (K562、Raji、Vero、Calu-1、HeLa、Wish cell)，發現 emodin 最具抑制癌細胞增生能力(86)。紅雞屎藤除抗癌外，也會影響免疫系統降低發炎反應(87)。紅雞屎藤酒精粗萃 25 g/mL 可抑制由 interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和 interleukin-6 (IL-6) 所誘發人類腎臟間質細胞增生，另外也會抑制 IL-1 $\beta$  和 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的 mRNA 表現和分泌，減少腎絲球發炎(88)。進一步給予紅雞屎藤區分物，發現以 emodin 效果最佳。此外 emodin (IC<sub>50</sub>=11.2 $\mu$ M) 給予人類 T-淋巴細胞 (human T lymphocytes) 具有抑制增生，減少 cytokine 分泌等抗發炎的效果(89)。

先前本實驗室建立 ACC 活性平台篩選具有抗代謝症候群潛能之中草藥，發現紅雞屎藤具有良好抑制 ACC 活性之功效 ( $IC_{50}=0.029 \text{ mg / mL}$ )。利用 C57BL/6J 小鼠給予高油飲食 20 週後再給予紅雞屎藤酸性酒精萃 (1500 mg / Kg 小鼠體重) 5 週，發現具有降低高血脂、高胰島素血症、改善葡萄糖不耐和增加胰島素敏感性 (90)，由此開發出紅雞屎藤抗代謝症候群之潛力。



### 第三章 材料與方法

本實驗可分為兩大項，內容大綱可見圖 3-1 所示。實驗一目的在建立誘發細胞中 ACC 活性，以模擬飲食方式，採取高葡萄糖培養基誘發肝細胞 ACC 活性，因不知給予高葡萄糖培養基 ACC 活性是在哪個時間會被誘發，於是再給予高葡萄糖培養基後每 6 小時追蹤 ACC 活性，若成功以高葡萄糖培養基誘發 ACC 活性再進一步給予紅雞屎藤酒精萃驗證是否具有抑制 ACC 活性。

實驗二利用 Wistar 大鼠給予 30% 蔗糖水誘發大鼠肝臟 ACC 活性和代謝症候群，給予大鼠 30% 蔗糖水 20 週應可成功誘發代謝症候群後再給予三種不同濃度，低劑量 (SWL; 1 倍人體劑量) 為 94 mg / kg 大鼠體重；中劑量 (SWM; 2 倍人體劑量) 為 188 mg / kg 大鼠體重；高劑量 (SWH; 5 倍人體劑量) 為 470 mg / kg 大鼠體重。測試是否具有抑制 ACC 活性和改善代謝症候群症狀。

此外也設計一個短期實驗，先將大鼠禁食 48 小時後，再給予飼料和蔗糖水 12 小時，大鼠飽食後馬上管餵約人體 10 倍劑量 (188 mg EP/Kg 大鼠) 紅雞屎藤酒精萃，約 2 小時後犧牲取其肝臟測定 ACC 和 FAS 活性。



圖 3-1 本論文實驗研究大綱

## 實驗一 建立適合細胞實驗模式，再給予紅雞屎藤萃製物驗證是否具有抑制 ACC 活性

本實驗利用 HepG2 肝細胞給予高葡萄糖培養基 (30 mM glucose) 刺激肝細胞 ACC 活性，細胞平時培養於低葡萄糖培養基 (5.5 mM glucose)，待 70% confluent 更換為不含血清培養液，培養隔夜後轉換為高糖濃度(30 mM Glucose)培養液 24 hr，每 6 小時收集細胞測試細胞中 ACC 活性。



若成功建立上述高葡萄糖培養基所之誘發 ACC 活性模式，首先利用高葡萄糖培養基刺激細胞後，約在給予高葡萄糖培養基第 6 小時給予兩種不同濃度之紅雞屎藤酒精萃：0.145 mg / mL(相當於 5 倍  $IC_{50}$ )和 0.0725 mg / mL 相當於(2.5 倍  $IC_{50}$ )，每 2 小時收集細胞，共 6 小時。

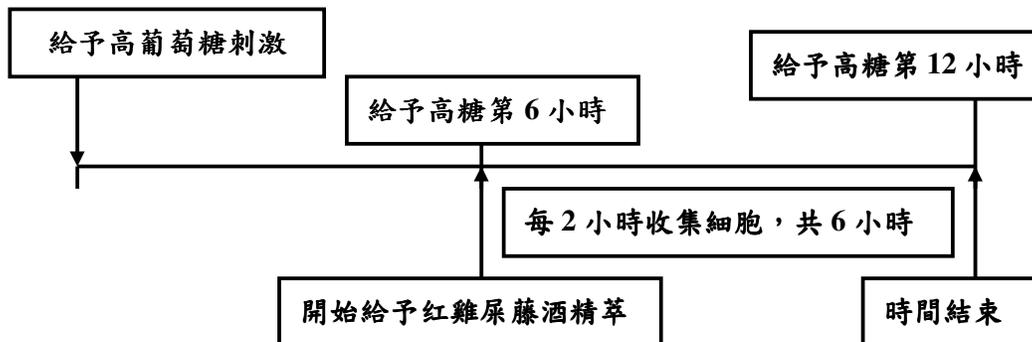


圖 3-2 細胞給予紅雞屎藤酒精萃之實驗流程

## 實驗二 建立適合動物實驗模式，再給予紅雞屎藤萃製物驗證是否具有改善代謝症候群

### (1) 長期大鼠實驗

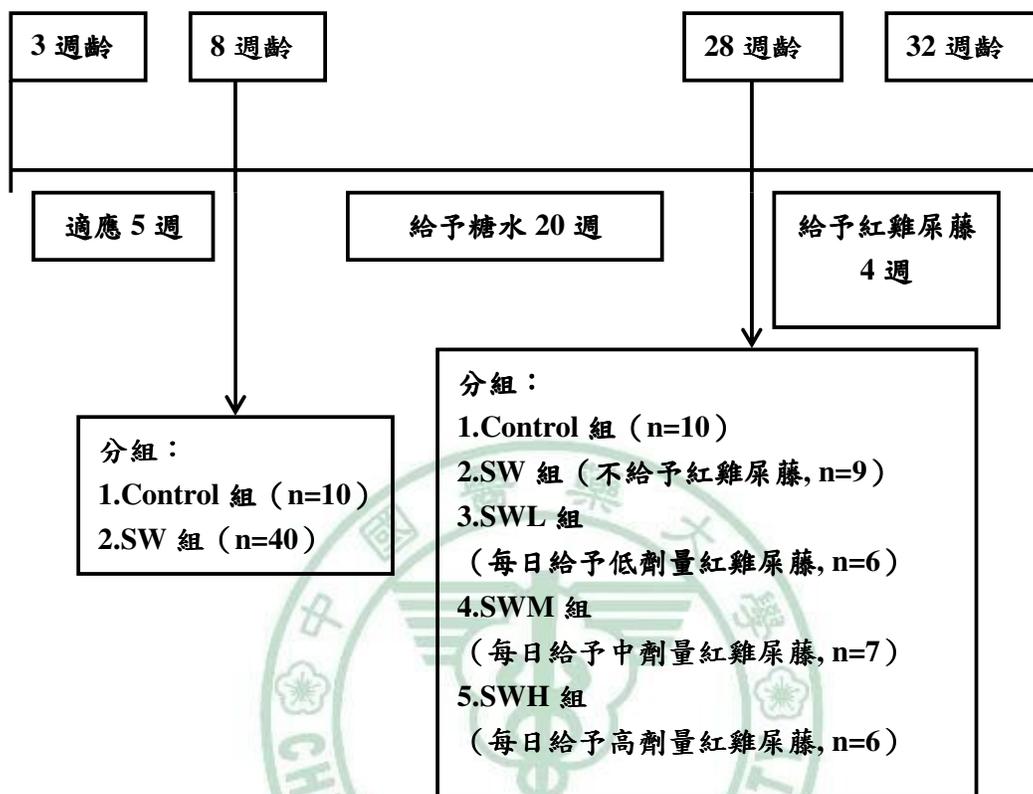
實驗動物採用 3 週齡雄性大鼠(Wistar)，購自國家動物中心共 50 隻。所有老鼠先適應 5 週，再依據體重區分出 low gainer(亦即不易胖體質者)給予正常飲食飲水，作為 LF 組( chow diet + plane water ; n=10)，其餘大鼠 (n=40) 分為誘發組餵予 30%蔗糖水和 chow diet，給予 20 週後再將誘發組分為下列四組：SW 組 (不給予紅雞屎藤酒精萃；n=9)；低劑量 (SWL；1 倍人體劑量；n=6) 為 94 mg / kg 大鼠體重；中劑量(SWM；2 倍人體劑量；n=7)為 188 mg / kg 大鼠體重；高劑量(SWH；5 倍人體劑量；n=6) 為 470 mg / kg 大鼠體重。本實驗配置三種不同濃度 (SWL 為 94 mg / 5 mL；SWM 為 188 mg / 5 mL；SWH 為 469 mg / 5 mL)，紅雞屎藤酒精萃依所需劑量管餵大鼠 4 週。

受試動物飼養於標準規格塑膠籠，由本校動物中心提供，動物房溫度維持室溫 21 ~ 23°C，光照及黑暗各 12 小時( 08 : 00 - 20 : 00 為光照期，其餘為黑暗期 )。大鼠每 2 隻養在一籠，採自由攝食，糖水飲用量每隔 2 ~ 3 天記錄一次，chow diet 攝取量 1 個禮拜記錄一次，並且每週記錄體重。

### (2) 短期大鼠實驗

在短期實驗中，欲了解紅雞屎藤酒精萃是否具有有效抑制短期所誘發 ACC 活性，使用約 13 週大之大鼠，控制組 10 隻和實驗組 10 隻大鼠。先將大鼠禁食 48 小時後再給予低油飲食和蔗糖水 12 小時，於大鼠飽食階段給予 10 倍劑量紅雞屎藤酒精萃 (188 mg EP/Kg 大鼠) 2 小時後犧牲取其肝臟測定 ACC 和 FAS 活性。

大鼠長期實驗流程：



大鼠短期實驗流程：

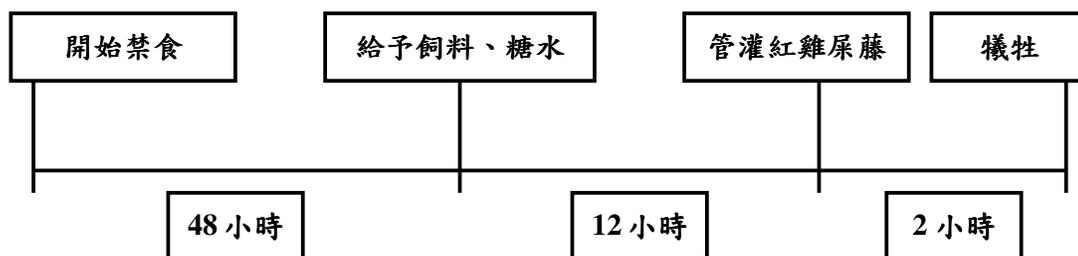


圖 3-3 大鼠實驗流程

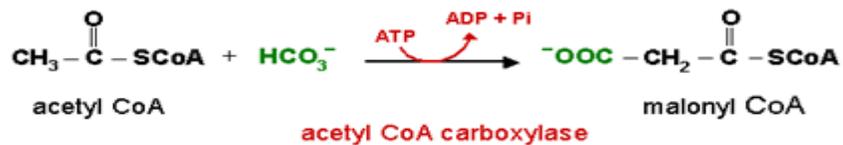
## (1) 細胞培養

HepG2 (BCRC60025)購自生資中心，medium 組成為 DMEM(Gibco；含 10 mL L-Glutamine, Biological industries；1× Antibiotic-Antimycotic, Gibco) 含 10% 胎牛血清 (Fetal bovine serum；FBS)，培養於 37°C、5% CO<sub>2</sub>，3-4 天繼代培養一次。

細胞平時培養於含 5.5 mM glucose 之 DMEM，當誘發 ACC 活性時先更換不含血清之低糖培養基培養隔夜後，再轉換為高糖(30 mM Glucose)培養基每 6 小時收集細胞，收集至 24 hr。收集之細胞液利用 Bio-Rad 定量蛋白質濃度。

## (2) ACC 活性分析

原理



採用 <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> - fixation isotope method，參考 Tanabe 等人(1981)方法。提供 acetyl - CoA 及 H<sub>2</sub><sup>14</sup>CO<sub>3</sub> 等受質，酵素反應後加酸使多餘 H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 揮發，測定殘餘物放射性強度即可換算酵素活性。

## 藥品配製

## 50 mM Tris – HCL (pH 7.5)

藥品	需要量	最終濃度
Tris - HCL (Merck)	7.88 g	50 mM

將 7.88 g Tris - HCL 溶於 800 mL 二次水中，調整 pH 7.5，以二次水定量至 1 L，儲存於 4°C。

## Potassium citrate 100X stock

藥品	需要量	最終濃度
Potassium citrate	3.24 g	1M

將 3.24 g Potassium citrate 取至 15 mL 離心管中，溶於 8 mL 二次水中，再以二次水定量至 10 mL，儲存於 -20°C。

MgCl<sub>2</sub> 100X stock

藥品	需要量	最終濃度
MgCl <sub>2</sub>	2.03 g	1M

將 2.03 g MgCl<sub>2</sub> 取至 15 mL 離心管中，溶於 8 mL 二次水中，再以二次水定量至 10 mL，儲存於 -20°C。

## Mixture reagent

藥品	需要量	最終濃度
50 mM Tris-HCL	20 mL	50 mM
Potassium citrate 100X stock	200 $\mu$ L	10 mM
MgCl <sub>2</sub> 100X stock	200 $\mu$ L	10 mM
Reduced Glutathion (Sigma)	23 mg	3.75 mM
Bovine serum albumin (Sigma)	15 mg	0.75 mg / mL

將上述藥品溶解混勻後，貯存於  $-20^{\circ}\text{C}$ 。使用前  $37^{\circ}\text{C}$  回溫。

NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> (0.26  $\mu$ Ci /  $\mu$ mol) 10X stock

藥品	比活性	放射強度	需要量	最終濃度
NaH <sup>14</sup> CO <sub>3</sub> , 1 mL (柏森)	10 $\mu$ g / $\mu$ Ci	20 $\mu$ Ci		75 mM
NaHCO <sub>3</sub> (Sigma)			6.1 mg	

每次使用前將每瓶含有 200  $\mu$ g NaHCO<sub>3</sub>，1 mL 的 NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> 安瓶瓶蓋小心打開，全部取至 eppendorf，再加入 6.1 mg NaHCO<sub>3</sub> 粉末，混合均勻，立即使用，若尚有未使用完的 isotope 則儲存在  $4^{\circ}\text{C}$ 。

## Adenosine 5'- triphosphate (ATP) 50 X stock

藥品	需要量	最終濃度
ATP (Sigma)	1.05 g	190.5 mM

取 1.05 g ATP 粉末至 15 mL 離心管中，以 10 mL 二次水溶解均勻，分裝後儲存於  $-20^{\circ}\text{C}$ 。

## Acetyl - CoA 100X stock

藥品	需要量	最終濃度
Acetyl - CoA (Sigma)	10 mg	12.5 mM

將整瓶含 10 mg Acetyl - CoA 粉末直接加入 984  $\mu$ L 二次水溶解均勻，分裝後儲存於  $-20^{\circ}\text{C}$ 。

## 反應受質

藥品	需要量	最終濃度
ATP 50 X stock	10 $\mu$ L	3.75 mM
Acetyl - CoA 100X stock	5 $\mu$ L	0.125 mM
$\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (0.26 $\mu\text{Ci} / \mu\text{mol}$ ) 10X stock	50 $\mu$ L	7.5 mM

若測定 ACC 純化步驟之樣品活性則將上述三種藥品依序加入每管酵素樣品中。若食材以 96 well 篩選則以上三種反應受質以 2 : 1 : 10 體積比事先加在一管 eppendorf (體積可高估實際用量) 備用。

## HCl

藥品	需要量	最終濃度
12N HCl	42 mL	5N

取 42 mL 市售 12N HCl 緩緩加入 40 mL 二次水，混勻後定量至 100 mL，室溫儲存。

## 方法

取約 100  $\mu$ L 細胞均質液與 450  $\mu$ L mixture reagent 於  $37^{\circ}\text{C}$  下培養反應 30 分鐘，再個別添加反應受質(ATP、Acetyl - CoA、 $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ )混勻後，於  $37^{\circ}\text{C}$  反應 10 分鐘。加入 125  $\mu$ L 5N HCl 終止反應，以 1500 g 離心 10 分鐘，以除去不溶性物質。取上

清液至 counting vial 中，在 60°C 下以氮氣將游離的 CO<sub>2</sub> 揮發吹乾，置於 hood 中 overnight。隔天每管酵素液以 600 μL 二次水回溶，添加閃爍計數液(Perkin Elmer ULTIMA GOLD) 稍加搖勻後，以閃爍計數儀偵測<sup>14</sup>C 放射性強度。為計算比活性，同時需定量蛋白質，蛋白質定量以 Bio – Rad Protein assay 進行，配製不同濃度 BSA 作標準品。

酵素比活性計算：1 Unit ACC 活性定義為每分鐘酵素反應產生 1 μmol malonyl – CoA 所需要的酵素活性。使用的放射性<sup>14</sup>C 濃度為 0.26 μCi / μmol，在反應 10 分鐘之後能產生 1.6 Dpm / nmol malonyl – CoA (1Ci = 3.7 × 10<sup>10</sup> Bq; 1Bq = 1 / 60 Dpm)，也就是相當於需要 1.6 Dpm / nmol ACC 來反應，因此藉由閃爍計數儀偵測到的放射性強度(Dpm)除以蛋白質數毫克及 0.0016(Dpm) 就得到了 ACC 比活性 (μU / mg protein)。

### (3) FAS 活性分析

#### 原理

採用 Linn et al 方法(16):FAS 反應消耗 NADPH，細胞萃取液與受質培養(90 mM phosphate buffer pH7 含 0.18 mM EDTA、0.1 mM acetyl-CoA、0.2 mM NADPH 與 0.2 mM malonyl-CoA)，追蹤 OD<sub>340</sub> 吸光值下降速率，換算為 FAS 比活性。

## 藥品配製

## 500 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)

藥品	需要量	最終濃度
$K_2HPO_4$ (Fw=174.18)	52.254 g	300 mM
$KH_2PO_4$ (Fw=136.09)	27.218 g	200 mM

將上述藥品溶於 800 mL 的二次水，調整 pH 值至 7.0，再以二次水定量至 1 L，儲於 4°C

## Acetyl-CoA 1000× stock

藥品	需要量	最終濃度
Acetyl-CoA (Fw=809.6)	25 mg	33 mM

將整瓶含 Acetyl-CoA 粉末直接加入 935.74  $\mu$ L 的二次水溶解均勻，再分裝儲於 20°C

## Malonyl-CoA 1000× stock

藥品	需要量	最終濃度
Malonyl-CoA (Fw=853.58)	25 mg	100 mM

將整瓶含 Malonyl-CoA 粉末直接加入 292.88  $\mu$ L 的二次水溶解均勻，再分裝儲於 -20°C

## NADPH 1000× stock

藥品	需要量	最終濃度
NADPH (Fw=833.35)	100 mg	100 mM

將整瓶含 NADPH 粉末直接加入 1199.97  $\mu$ L 的二次水溶解均勻，再分裝儲於  $-20^{\circ}\text{C}$

## EDTA · 2Na 1000× stock (pH 7.0)

藥品	需要量	最終濃度
EDTA · 2Na (Fw=372.24)	372.2 mg	1 M

將秤好之 EDTA · 2Na 粉末直接加入 1 mL 的二次水溶解均勻，再分裝儲於  $-20^{\circ}\text{C}$

 $\beta$ -mercaptoethanol 1000× stock

藥品	需要量	最終濃度
$\beta$ -mercaptoethanol (14M、Fw=78.13、1 L=1.12 kg)	71.42 $\mu$ L	1 M

將  $\beta$ -mercaptoethanol 加入 928.58 mL 的二次水溶解均勻，再分裝儲於  $-20^{\circ}\text{C}$

## Reagent buffer A (含 Malonyl-CoA)

藥品	需要量	最終濃度
500 mM potassium phosphate buffer	1 mL	500 mM
Acetyl-CoA 1000× stock	1 $\mu$ L	33 $\mu$ M
Malonyl-CoA 1000× stock	1 $\mu$ L	100 $\mu$ M
NADPH 1000× stock	1 $\mu$ L	100 $\mu$ M
EDTA 1000× stock	1 $\mu$ L	1 mM
$\beta$ -mercaptoethanol 1000× stock	1 $\mu$ L	1 mM

使用前將上述之藥品加入 potassium phosphate buffer，反應前將 Reagent buffer 至

於 30°C 水浴下培養

#### Reagent buffer B (不含 Malonyl-CoA)

藥品	需要量	最終濃度
500 mM potassium phosphate buffer	1 mL	500 mM
Acetyl-CoA 1000× stock	1 μL	33 μM
NADPH 1000× stock	1 μL	100 μM
EDTA 1000× stock	1 μL	1 mM
β-mercaptoethanol 1000× stock	1 μL	1 mM

使用前將上述之藥品加入 potassium phosphate buffer，反應前將 Reagent buffer 置於 30°C 水浴下培養

#### 方法

利用分光光度計(Hitachi G2000)設定追蹤波長為 340 nm，每 30 秒掃描一次，共記錄 5 分鐘。首先將蛋白質均質液放置 37°C 水浴 15 分鐘以上，而 Reagent buffer A, B 置於 30°C 下。sample cuvette 為 1 mL Reagent buffer A (含 Malonyl-CoA) 加入 100 μg 之蛋白質均質液；reference cuvette 則是 1 mL Reagent buffer B (不含 Malonyl-CoA) 加入 100 μg 之蛋白質均質液。搖晃均勻後即開始追蹤 5 min 內 OD<sub>340</sub> 下降速度

**FAS 活性計算：**

定義：1 unit of FAS activity：在一分鐘之下合成 1 nmole 的 palmitic acid 所需酵素量（合成 1 nmole 的 palmitic acid 需要 14 nmole 的 NADPH）

Specific activity: Units/mg protein

NADPH 消光係數：0.00622 $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

**計算：**

1. 找出有直線關係的時間點

2. 由吸光度換算有多少  $\mu\text{M}$  的 NADPH 被消耗（必須換算成每一分鐘）：

$$\Rightarrow \frac{|\text{前時間點吸光度} - \text{後時間點吸光度}|}{0.00622 \div \text{相差幾分鐘}} = \text{每分鐘消耗多少 } \mu\text{M} \text{ 的 NADPH}$$

3. 換算成多少 nmole 的 NADPH 被消耗

$\Rightarrow$  每分鐘消耗多少  $\mu\text{M}$  的 NADPH  $\times$  體積 (1 mL) = 每分鐘消耗多少 nmole 的 NADPH

4. 已知合成 1 nmole 的 palmitic acid 需要 14 nmole 的 NADPH，故除以 14

$$\Rightarrow \frac{\text{每分鐘消耗多少 nmole 的 NADPH}}{14} = \text{每分鐘合成多少 nmole 的 palmitic acid}$$

5. 換算成 Specific activity

$$\Rightarrow \frac{\text{每分鐘合成多少 nmole 的 palmitic acid}}{\text{反應加入的蛋白質毫克數 (mg)}}$$

#### (4) 培養基中 ApoB 含量測定

收集培養基後再以市售套組 (Cayman) 測定。

#### (5) 細胞內 MTTP mRNA 表現量分析

利用市售套組 (Qiagen) 依據其參考說明抽取細胞中 RNA，再利用 real-time PCR 方式測定細胞中 MTTP mRNA 表現量。

#### (6) 動物飼養

受試動物飼養於標準規格塑膠籠，由本校動物中心提供，動物房溫度維持室溫 21 ~ 23°C，光照及黑暗各 12 小時( 08 : 00 – 20 : 00 為光照期，其餘為黑暗期 )。大鼠每 2 隻養在一籠，採自由攝食，糖水飲用量每隔 2 ~ 3 天記錄一次，chow diet 攝取量 1 個禮拜記錄一次，並且每週記錄體重。

#### (7) 動物犧牲與樣品收集

動物在犧牲前予以禁食隔夜(16 小時)，先用 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，並迅速取出組織包括肝臟、腹膜後脂肪 (Retroperitoneal fat, RE)及腹睪脂 (Epididymal fat, EP)、皮下脂肪、左右小腿腓腸肌、腎臟、睪丸等，秤重記錄後立即投入液態氮中，部分保存於-80°C，供日後 RNA 之抽取及分析。其餘取下後，以 Saline 清洗瀆乾後秤重裝入封口袋中，保存於-20°C，供日後脂質分析。RE 剪下約 0.5cm<sup>3</sup> 泡在 10% 甲醛中，以供日後切片用。

## (8) 三酸甘油酯含量測定

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  $\mu$ L 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。

計算：

$$\text{三酸甘油酯濃度(mmol/L)} = \frac{\Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{standard}}} \times \text{Standard 濃度(2.29 mmol/L)}$$

## (9) 膽固醇含量測定

方法：

採用市售試劑組(RANDOX CH 201, Amtrim, UK)。取4  $\mu$ L Samples或Cholesterol standard (200 mg / dL)於96孔透明盤中，加入200  $\mu$ L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  $\mu$ L二次水加200  $\mu$ L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。

計算：

$$\text{膽固醇濃度(mmol/L)} = \frac{\Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{standard}}} \times \text{Standard 濃度(5.17 mmol/L)}$$

## (10) 肝臟、肌肉脂質均質液製備

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。

方法：

採 Folch 等學者(1957)之方法((94))。取 0.2 g 組織並記錄實際稱取量。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。

## (11) 肝臟、肌肉三酸甘油酯含量測定

分析原理同血清三酸甘油酯之分析。取 100  $\mu$ L 均質液在玻璃試管中，置於通風櫥使有機溶劑完全揮發，加入 reagent 後，室溫下反應 10 分鐘，以 1 mL reagent 作為 blank，使用分光光度計於 60 分鐘內測 500 nm 之 O.D 值，計算三酸甘油酯濃度。

## (12) 肝臟、肌肉膽固醇含量測定

分析原理同血清三酸甘油酯之分析。取 200  $\mu$ L 均質液在玻璃試管中，再加入 10  $\mu$ L Triton X-100，置於通風櫥使有機溶劑完全揮發，再加入 reagent 後，室溫下反應 10 分鐘，以 1 mL reagent 作為 blank，使用分光光度計於 60 分鐘內測 500 nm 之 O.D 值，計算膽固醇濃度

## (13) 全血葡萄糖含量測定

方法：

採用市售試劑組(RANDOX GL2623, Amtrim, UK)取 4  $\mu$ L Samples 或 Glucose standard (5.55 mmol/L)於 96 孔透明盤中，加入 200  $\mu$ L 反應試劑(含 Phosphate buffer pH 7、MOPS buffer pH 7、4 - aminophenazone、Phenol、Peroxidase、glucose oxidase)，混合均勻後，在室溫下反應 25 分鐘，以 4  $\mu$ L 二次水加 200  $\mu$ L 反應試劑做為 Blank，測定 500 nm 之吸光值，即可得樣品血清之葡萄糖含量。

計算

$$\text{Glucose conc. (mmol/L)} = \frac{\text{A sample}}{\text{A standard}} \times \text{Standard 濃度 (5.55 mmol/L)}$$

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

藥品配製：

## Glucose solution

## 1. 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。

劑量給予

1.5g / kg body weight

方法：

動物在給予紅雞屎藤酒精萃 4 週後進行口服葡萄糖耐受測試，於採血前將老鼠禁

食 12-14hr。先採集 0 分鐘血液，給糖後，再採集 30、60、90、120 分鐘之血液，隨後 24hr 內用市售試劑組測量各時間點血清葡萄糖濃度值。

#### (15) 胰島素耐受測試 Insulin Tolerance Test (ITT)

藥品配製：

藥品	最終濃度
Human insulin (Actrapid <sup>®</sup> HM) 100 U / mL	0.1 (mU / $\mu$ L)

劑量給予

0.75 U / kg body weight

方法：

採血前不需禁食，於採血前一天秤量體重並計算每隻大鼠給予劑量，先採集 0 分鐘血液，腹腔注射胰島素後，再採集 5、10、30、60 分鐘之血液，隨後 24hr 內用市售試劑組測量各時間點血清葡萄糖濃度值。

#### (16) 禁食血清胰島素含量測定

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)。將專一性的 Monoclonal mouse anti-rat insulin antibodies 事先塗在 Microplate 上，當 Standards、Blank 和 Samples 注入 well 中，Mouse insulin 會和 Immobilized antibody 結合，洗去沒有結合的物質，再加入對 Mouse 專一性的 biotinylated polyclonal antibodies 到 Well 中，接著 wash 第二次，再加入 horseradish peroxidase，接著洗去移除掉未結合的 enzyme conjugates，再加入受質溶液

(Substrate solution) 到 Well 中反應呈色。酵素反應後，加入強酸終止反應，讀取其吸光質即可套入標準曲線換算出 insulin 濃度。

#### 方法

大、小鼠尾部取得之全血以 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 (LINCO Rat / Mouse insulin ELISA kit)。以二次水將 Wash buffer concentrate 製備成 Wash buffer。其它試劑市售套組皆配好可直接使用。Well 中先以 300 µL 的 Wash buffer 清洗 3 次。加入 10 µL 的 Assay buffer 到 blank 和 sample 的 well 中，接著加入 10 µL Matrix solution 到 Blank、Standard 和 Quality control 1、2 的 Well 中。將 10 µL 的 Standard、Blank、Quality control 1、2、Sample 加入到每一個 Well 中，再加入 Detection antibody。貼上膠膜於室溫下搖晃反應 2 小時。吸出 Well 中的溶液以 300 µL 的 Wash buffer 清洗 3 次。加入 100 µL 的 Enzyme solution 到每一個 Well 中，貼上新的膠膜於室溫下搖晃反應 30 分鐘。吸出 Well 中的溶液以 300 µL 的 Wash buffer 清洗 6 次。加入 100 µL 的 Substrate solution (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) 到每一個 well 中，於室溫下避光反應 15 分鐘。加入 100 µL 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 Insulin 濃度。

#### (17) 禁食血清瘦素含量測定

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 Goat anti-mouse leptin 事先塗在 Microplate 上，加入 Block buffer 降低非專一性的抗體結合。當 Standards、Blank 和 Samples 注入 well 中，Goat anti-mouse leptin 會和 Immobilized antibody 結合，之後洗去沒有結合的受質，再

加入 biotinylated goat anti-mouse leptin 到 Well 中，接著洗去移除掉未結合的 biotinylated goat anti-mouse leptin，加入 Streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase (Streptavidin-HRP) 洗去移除掉未結合的 Streptavidin-HRP，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 Leptin 結合量的比例。

方法：

大鼠腹腔採血取得之全血以 3,000  $\times$ g、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 Leptin)。PBS 和 Capture antibody 混勻即得 goat anti-mouse leptin。Reagent diluent 與 Detection antibody 混勻而得 biotinylated goat anti-mouse leptin。Tween 20 加入 PBS 製備成 Wash buffer。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 100  $\mu$ L 的 Standard 或 Sample 加入到每一個 Well 中 (已 coating 好 Goat anti-mouse leptin)，貼上膠膜於室溫下搖晃反應 2 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 biotinylated goat anti-mouse leptin 到每一個 Well 中，貼上新的膠膜於室溫下搖晃反應 2 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 Streptavidin-HRP 到每一個 well 中，貼上新的膠膜於室溫下避光反應 20 分鐘。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，貼上新的膠膜於室溫下避光反應 20 分鐘。加入 50  $\mu$ L 的 Stop solution (含 sulfuric acid) 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 Leptin 濃度。

## (18) 尿酸測定

方法：

採用市售試劑組(RANDOX UA 1613, Amtrim, UK)。取 4  $\mu$ L Samples 或 uric acid standard ( 595  $\mu$ mol / L )，4  $\mu$ L 二次水做為 Blank，於 96 孔透明盤中加入 200 $\mu$ L Reagent，，在 20-25 $^{\circ}$ C 反應 15 分鐘，15 分鐘內測量 520 nm 之吸光值，即可得樣品血清尿酸之含量。

## 3. 計算

$$\text{尿酸濃度(mg/dL)} = \frac{\Delta A_{\text{sample}}}{\Delta A_{\text{standard}}} \times \text{Standard 濃度 ( 595 } \mu\text{mol / L )}$$

## (19) 西方點墨法(Western blot)分析肝臟、肌肉和脂肪組織 PTP1B 蛋白質表現

肝臟、肌肉和脂肪組織蛋白質萃取與定量

肝臟、肌肉和脂肪組織利用 RIPA buffer 均質後，再以 Bio-Rad 測定蛋白質濃度。

## PTP1B 蛋白質含量

以西方點墨法(Western blot)檢定 PTP1B，將均質液蛋白質定量為 50 $\mu$ g 以 10%SDS-PAGE 進行蛋白質電泳，接著蛋白質轉印後 PVDF 膜以 Ponceau S solution (Sigma, USA) 染色，檢驗蛋白質是否轉印成功。使用 PTP1B 一抗 (Rabbit polyclonal anti-PTP1B; 稀釋 1:500)(Millipure, USA) 及結合 HRP 之二抗(donkey anti – rabbit IgG; 稀釋 1:10000)(Amersham Biosciences,)，利用呈色劑 Immobilon

Western Chemiluminescent HRP Substrate (Amersham Biosciences, USA) 偵測細胞質與細胞核的分子量。

#### (20) 脂肪組織切片

委託中興大學動物疾病診斷中心幫忙脂肪組織切片。

#### 脂肪細胞計數

每組隨機選取 3 隻已浸泡於固定液中的大鼠 RE 做為檢體，每個檢體製作 5 片切片，用顯微鏡 (Olympus) 放大 100 倍觀察切片，以照相機 (Diagnostic) 將所得影像拍攝下來，再利用影像處理系統 (Spot advanced) 在每個切片上圈選 3 個不同區塊，計數細胞數目。

#### 脂肪細胞平均直徑計算

$$\text{平均細胞面積}(\mu\text{m}^2) = \text{選取面積}(\mu\text{m}^2) / \text{細胞數目}$$

$$\text{直徑}(\mu\text{m}) = \left[ \sqrt{(\text{平均細胞面積} / 3.14)} \right] \times 2$$

(21) 脂肪組織中 TNF- $\alpha$  量測定

## 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 Goat anti-mouse TNF- $\alpha$  事先塗在 Microplate 上，加入 Block buffer 降低非專一性的抗體結合。當 Standards、Blank 和 Samples 注入 well 中，Goat anti-mouse TNF- $\alpha$  會和 Immobilized antibody 結合，之後洗去沒有結合的受質，再加入 biotinylated goat anti-mouse TNF- $\alpha$  到 Well 中，接著洗去移除掉未結合的 biotinylated goat anti-mouse TNF- $\alpha$ ，加入 Streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase (Streptavidin-HRP) 洗去移除掉未結合的 Streptavidin-HRP，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 TNF- $\alpha$  結合量的比例。

## 方法：

脂肪組織約 0.2 g 大小利用 RIPA buffer 均質後分裝後置於 -80 °C 保存，以供日後分析，以 Bio-Rad 方式測定蛋白質濃度。採用市售試劑組 (eBioscience Systems Mouse Leptin)  $\cdot$  PBS 和 Capture antibody 混勻即得 goat anti-mouse TNF- $\alpha$   $\cdot$  Reagent diluent 與 Detection antibody 混勻而得 biotinylated goat anti-mouse leptin  $\cdot$  Tween 20 加入 PBS 製備成 Wash buffer。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 100  $\mu$ L 的 Standard 或 Sample 加入到每一個 Well 中 (已 coating 好 Goat anti-mouse TNF- $\alpha$ )，貼上膠膜於室溫下搖晃反應 2 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 biotinylated goat anti-mouse TNF- $\alpha$  到每一個 Well 中，貼上新的膠膜於室溫下搖晃反應 2 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 Streptavidin-HRP 到每一個 well 中，貼上新的膠膜於室溫下避光反應 20 分鐘。吸出 Well 中的溶液以 400  $\mu$ L 的 Wash

buffer 清洗 5 次。加入 100  $\mu\text{L}$  的 Substrate solution 到每一個 well 中，貼上新的膠膜於室溫下避光反應 20 分鐘。加入 50  $\mu\text{L}$  的 Stop solution(含 sulfuric acid)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 TNF- $\alpha$  濃度。

#### (22) 大鼠血壓測定

利用血壓機 (BP 200 ; Risitech Systems, Apex, NC, USA) 測量大鼠尾巴動脈，紀錄尾巴血壓。

#### (23) 統計分析

實驗結果以 mean  $\pm$  SD 表示，利用 Student's t test 或 Duncan's multiple range test 比較組間差異。所有數據通過常態分佈檢定，若非常態則轉為對數值。統計分析以 SAS (version 9.0, SAS institute, Cary, NC) 套裝軟體進行，當  $p < 0.05$  是為顯著差異。



## 第四章 結果

### 一、 建立高糖誘發 ACC 之細胞模式

利用含有高葡萄糖之培養基 (30 mM glucose) 給予肝細胞後，測試是否誘發脂質合成相關酵素活性。

#### (一) 高葡萄糖刺激對於 ACC 活性之影響

為了建立高葡萄糖誘發 HepG2 肝細胞 ACC 活性模式，在高葡萄糖刺激下每 6 小時追蹤肝細胞 ACC 活性至 24 小時。結果顯示控制組 (對照組) ACC 活性保持平穩並無任何改變；以高葡萄糖刺激後，ACC 活性隨之增加，在 12 小時活性達到最高，隨之下降。在第 12 小時高糖與控制組 ACC 活性達顯著差異 ( $P<0.05$ ) (圖 4-1)

#### (二) 高葡萄糖刺激對於 FAS 活性之影響

高葡萄糖不只誘發 HepG2 肝細胞 ACC 活性，在 FAS 活性方面，相較於控制組之 FAS 活性保持平穩，高葡萄糖亦刺激肝細胞 FAS 活性，隨時間增加，FAS 活性在第 18 和 24 小時達到最高 (圖 4-2)。高葡萄糖與控制組在第 18 和 24 小時 FAS 活性達顯著差異 ( $P<0.05$ )

### (三) 高葡萄糖刺激對於細胞內 TG 含量之影響

為了解高葡萄糖是否增加細胞中三酸甘油酯堆積，測定細胞中 TG 含量。在控制組，細胞中三酸甘油酯含量保持平穩；相較於控制組，高葡萄糖亦刺激細胞中三酸甘油酯堆積，隨時間而增加，在第 6 和 12 小時達最高，而在第 12 小時與控制組相比達顯著性差異 ( $P < 0.05$ ) (圖 4-3)

### (四) 高葡萄糖刺激對於細胞 ApoB 脂蛋白分泌之影響

若高葡萄糖可刺激細胞內脂質生合成，使三酸甘油酯合成增加，推測應會增加細胞 ApoB 脂蛋白分泌，亦即 VLDL 分泌增加，於是進一步檢測培養基中 ApoB 脂蛋白含量。由圖 4-4 結果顯示，控制組培養基 ApoB 脂蛋白含量保持平穩並無任何改變，高葡萄糖組培養基 ApoB 脂蛋白含量隨時間增加，在第 12、18 和 24 小時與控制組相比達顯著性差異 ( $P < 0.05$ ) (圖 4-4)

## 二、 應用高糖誘發肝細胞 ACC 模式驗證紅雞屎藤酒精萃功效

由於 ACC 活性平台篩出紅雞屎藤酒精萃可抑制 ACC 活性，以下利用已建立之高糖誘發 ACC 細胞模式，給予不同濃度之紅雞屎藤酒精萃，對於肝細胞 ACC 和 FAS 活性與細胞內 TG 含量之影響

### (一) 紅雞屎藤酒精萃對於 ACC 活性之影響

利用建立之細胞模式，在高葡萄糖刺激第 6 小時開始給予兩種不同劑量之紅雞屎藤 (0.145 mg/mL 和 0.0725 mg/mL；相當於 5 倍  $IC_{50}$  和 2.5 倍  $IC_{50}$ )，檢測細胞中 ACC 活性。由圖 4-5 顯示給予高葡萄糖刺激後再給予紅雞屎藤酒精萃，高劑量組與其 vehicle control 相比第 4 小時和第 6 小時 (亦即高糖刺激 10 和 12 小時) 下 ACC 活性達顯著性下降 ( $P < 0.001$ )；低劑量組與其 vehicle control 相比，在第 4 小時 (亦即高糖刺激 10 小時) 下 ACC 活性達顯著性下降 ( $P < 0.05$ )。

### (二) 紅雞屎藤酒精萃對於 FAS 活性之影響

同樣利用建立之細胞模式，在高葡萄糖刺激第 6 小時開始給予兩種不同劑量之紅雞屎藤 (0.145 mg/mL 和 0.0725 mg/mL；相當於 5 倍  $IC_{50}$  和 2.5 倍  $IC_{50}$ )，檢測細胞中 FAS 活性。由圖 4-6 顯示給予高葡萄糖刺激後再給予紅雞屎藤酒精萃，高劑量組與其 vehicle control 相比第 4 小時和第 6 小時 (亦即高葡萄糖刺激 10 和 12 小時) 下 FAS 活性達顯著性下降 ( $P < 0.001$ )；低劑量組與其 vehicle control 相比，在第 4 小時 (亦即高葡萄糖刺激 10 小時) 下 FAS 活性達顯著性下降 ( $P < 0.05$ )。

### (三) 紅雞屎藤酒精萃對於細胞內 TG 含量之影響

同樣利用此模式，在高葡萄糖刺激第 6 小時開始給予兩種不同劑量之紅雞屎藤 (0.145 mg/mL 和 0.0725 mg/mL；相當於 5 倍  $IC_{50}$  和 2.5 倍  $IC_{50}$ )，檢測細胞內 TG 含量。由圖 4-7 顯示給予高葡萄糖刺激後再給予紅雞屎藤酒精萃，高劑量組與其 vehicle control 相比，在第 4 小時和第 6 小時 (亦即高葡萄糖刺激 10 和 12 小時) 下細胞內 TG 含量達顯著性下降 ( $P < 0.001$ )；而低劑量組與其 vehicle control 相比，在第 4 小時 (亦即高葡萄糖刺激 10 小時)，細胞內 TG 含量有下降趨勢但無顯著性差異 ( $P = 0.4520$ )。

### (四) 紅雞屎藤酒精萃對於細胞內 *MTTP* mRNA 之影響

給予兩種不同劑量之紅雞屎藤酒精萃 (0.145 mg/mL 和 0.0725 mg/mL；相當於 5 倍  $IC_{50}$  和 2.5 倍  $IC_{50}$ ) 利用 real-time PCR 檢測細胞內 *MTTP* mRNA 之改變。由結果顯示 (圖 4-8)，在給予紅雞屎藤酒精萃第 4 和 6 個小時，不論是高或低劑量組，細胞內 *MTTP* mRNA 表現量皆顯著低於其控制組 ( $P < 0.05$ )。

### 三、 應用代謝症候群動物模式驗證紅雞屎藤酒精萃生理功效

#### (一) 糖水誘發 Wistar rats 代謝症候群

本實驗以 30% 蔗糖水 (SW) 誘發 Wistar 大鼠代謝症候群，相較於 plain water (C) 正常對照組，經過 20 週的糖水誘發下，SW 組之體重和白色脂肪包括 Retroperitoneal fat、Epididymal fat 和 Inguinal fat 均顯著高於 C 組 (分別  $P < 0.0001$ , SW vs. C; 表 4-1)，為 C 組之 3~5 倍；血漿 TG 和胰島素亦顯著升高 ( $P < 0.05$ , SW vs. C; 表 4-2)，禁食血糖和尿酸有高於 C 組趨勢，但和血漿膽固醇相同與 C 組並無顯著差異 (表 4-2)。血壓方面 SW 組收縮壓顯著高於 C 組 ( $P < 0.05$ , SW vs. C; 圖 4-9)，舒張壓雖有升高趨勢但未達統計差異 (圖 4-9)。有關葡萄糖耐受性 (圖 4-10) 及胰島素敏感性方面 (圖 4-11)，OGTT 2 小時和 ITT 1 小時內，SW 組血糖普遍高於 C 組，計算 OGTT 之血糖變化曲線下面積 (AUC<sub>glc</sub>) SW 組顯著高於 C 組 ( $P < 0.05$ , SW vs. C; 圖 4-10)，至於 ITT 之 AUC<sub>glc</sub>，SW 組有高於 C 組趨勢但無顯著差異 (圖 4-11)。由以上結果可知，糖水作為飲水可成功誘發代謝症候群，包括肥胖、高三酸甘油酯症、高胰島素血症、高血壓和葡萄糖不耐。

糖水誘發代謝症候群可能是增加組織中脂質蓄積或肥大的脂肪細胞釋出不利之 adipocytokines，因此測定肝臟中 TG 和 TC 含量，結果顯示 SW 組有較高傾向 (圖 4-12 和圖 4-13)，肌肉中 TG 也有較高傾向 (圖 4-12)，但均與 C 組未達統計差異；SW 組脂肪細胞肥大之證據可見圖 4-14，脂肪細胞直徑顯著高於 C 組 ( $P < 0.05$ , SW vs. C)；脂肪細胞激素方面，血液中 leptin 濃度 SW 組顯著高於 C 組 ( $P < 0.05$ , SW vs. C)，為 C 組之 6 倍 (圖 4-15)，脂肪組織中 TNF- $\alpha$  濃度則見 SW 組顯著高於 C 組 ( $P < 0.05$ , SW vs. C)，為 C 組 2 倍以上 (圖 4-16)。為確定糖水模式是否涉及誘

發肝臟 *de novo* lipogenesis，測定肝均質液 ACC (圖 4-17) 和 FAS 活性 (圖 4-18)，SW 組 ACC 和 FAS 活性均顯著高於 C 組 (ACC 活性,  $P < 0.05$ ; FAS 活性,  $P < 0.05$ )，顯示肝臟 *de novo* lipogenesis 確實因糖水給食而增加。

本實驗室先前研究顯示糖水誘發 Wistar 大鼠代謝症候群之分子機制涉及 SREBP-1c 與 ChREBP 位移細胞核增加(陳 2007)，為進一步探討糖水模式對 PTP1B 活化，利用 immunoblotting 偵測 C 組與 SW 組肝臟、肌肉與脂肪組織 PTP1B 蛋白質量，結果顯示大鼠給予蔗糖水 20 週後，糖水組肝臟中 PTP1B 蛋白質表現量顯著高於控制組 ( $P < 0.05$ ; 圖 4-19)；在肌肉中糖水組 PTP1B 蛋白質表現量有增加傾向但無顯著差異 (圖 4-20)；而脂肪組織 PTP1B 蛋白質量，糖水組相較於控制組有減少趨勢但無顯著差異 (圖 4-21)。

## (二) 紅雞屎藤酒精萃對代謝症候群大鼠體重、體脂肪及血清生化值之影響

紅雞屎藤酒精萃給予代謝症候群大鼠 4 週可減少體重，其中低劑量組 (SWL) 效果最顯著，與 SW 組有顯著差異 ( $P < 0.05$ ; 表 4-1)，但仍高於 C 組。糖水誘發體脂肪 retroperitoneal fat、epididymal fat 和 inguinal fat 堆積可因補充紅雞屎藤酒精萃而降低，亦以 SWL 效果最好，與 SW 相比有顯著降低，但仍高於 C 組 ( $P < 0.05$ ; 表 4-1)。記錄其每天平均飼料攝食量和糖水飲水量，SW 組與給予三種不同濃度紅雞屎藤組相比並無顯著差異 (結果並未顯示) (飼料攝取量：SW 15.5 g / 一天 / 隻大鼠；SWL 15.3 g / 一天 / 隻大鼠；SWM 18.5 g / 一天 / 隻大鼠；SWH 16.4 g / 一天 / 隻大鼠、 $P = 0.4691$ ；糖水飲水量 SW 61.8 mL / 一天 / 隻大鼠；SWL 61.6 mL / 一天 / 隻大鼠；SWM 63.7 mL / 一天 / 隻大鼠；SWH 65.8 mL / 一天 / 隻大鼠、 $P = 0.9869$ )。

由於糖水並沒有顯著誘發高血糖，因此補充紅雞屎藤酒精萃也不影響禁食血糖值，其中高劑量雞屎藤組 (SWH) 血糖反而高於 C 組 (表 4-2)。給予三種紅雞屎藤酒精萃劑量 (SWL、SWM 和 SWH) 均有效降低 SW 組誘發之高三酸甘油酯血症，血清 TG 均降至如同 C 組 (表 4-2)；糖水雖然沒有顯著影響血清 TC，但 SWL 之血清 TC 顯著低於 SW 與 C 組 ( $P < 0.05$ )，而 SWM 與 SWH 也有降低趨勢；糖水可誘發高胰島素血症，給予紅雞屎藤酒精萃皆有效降低血清胰島素之升高，在 SWL 和 SWH 組的血清胰島素濃度均顯著低於 SW 組 ( $P < 0.05$ ；表 4-2)，與 C 組無差異。雖糖水無誘發出高尿酸血症，給予紅雞屎藤酒精萃之血清尿酸皆顯著低於 SW 組 ( $P < 0.05$ ；表 4-2)，與 C 組無差異。

### (三) 紅雞屎藤酒精萃對代謝症候群大鼠血壓之影響

糖水可誘發大鼠高血壓之產生，紅雞屎藤酒精萃給予代謝症候群大鼠 4 週後，測量收縮壓和舒張壓。收縮壓部分，SWL 組與 SW 組相比有下降趨勢但未達顯著差異，SWM 和 SWH 組與 SW 組相比並無顯著性差異 (圖 4-9)；舒張壓方面，亦以 SWL 組與 SW 組相比有顯著性降低 ( $P < 0.05$ ；圖 4-9)，與 C 組相近，但 SWM 和 SWH 組與 SW 組相比並無顯著性差異。

### (四) 紅雞屎藤酒精萃對代謝症候群大鼠胰島素敏感性之影響

紅雞屎藤酒精萃給予代謝症候群大鼠 4 週後，進行 OGTT 和實驗 ITT。由圖 4-10 OGTT 結果顯示，給予大鼠葡萄糖後，血清中血糖在第 60 分鐘時，SWL 和 SWM 組相較於 SW 組有顯著性的下降 ( $P < 0.05$ )，在第 120 分鐘時三種不同劑量之紅雞

尿藤組相較於 SW 組皆有顯著性的下降 ( $P < 0.05$ )。計算 AUC<sub>glc</sub> 結果顯示 SWL 顯著低於 SW ( $P < 0.05$ )，恢復如 C 組一樣；而 SWM 與 SWH 也有低於 SW 趨勢，但未達統計差異 (圖 4-10)。

由圖 4-11 ITT 結果顯示，在注射胰島素後第 5 分鐘和第 10 分鐘，SWL 和 SWM 組血清中血糖值相較於 SW 組有顯著性下降 ( $P < 0.05$ )，但在 SWH 組第 5、10、30 和 60 分鐘血糖值相較於 SW 組皆無顯著性差異 (圖 4-11)。計算 AUC<sub>glc</sub> 結果顯示，SWL 和 SWM 組皆顯著低於 SW 組 ( $P < 0.05$ )，但 SWH 組其 AUC<sub>glc</sub> 與 SW 組相比無顯著性下降 (圖 4-11)。

#### (五) 紅雞屎藤酒精萃對代謝症候群大鼠肝臟、肌肉脂質堆積之影響

在肝臟與肌肉 TG 方面，紅雞屎藤酒精萃給予並無降低肝臟與肌肉 TG 含量 (圖 4-12)；在肝臟 TC 方面，給予紅雞屎藤酒精萃與 SW 相比並無下降肝臟 TC 含量，其中 SWL 甚至高於 C 組 ( $P < 0.05$ ；圖 4-13)。

#### (六) 紅雞屎藤酒精萃對代謝症候群大鼠脂肪細胞大小及脂肪細胞激素之影響

犧牲取其腹膜後脂肪組織，觀察腹膜後脂肪組織切片，測量脂肪細胞大小。由圖 4-14 照片顯示，給予三種不同劑量之紅雞屎藤酒精萃可改善糖水誘發之脂肪細胞肥大情形，進一步計算脂肪細胞平均直徑，三種不同劑量之紅雞屎藤酒精萃其脂肪細胞平均直徑均顯著小於 SW 組 ( $P < 0.05$ )，其中以 SWM 組抑制脂肪細胞肥大最有效果。

三組紅雞屎藤組之血清 leptin 濃度相較於 SW 組皆顯著降低 ( $P < 0.05$ ; 圖 4-15), 又以 SWL 組下降血清 leptin 幅度最為大, 接近於 C 組, 而 SWM 與 SWH 仍高於 C 組。給予紅雞屎藤酒精萃其脂肪組織 TNF- $\alpha$  濃度, 與 SW 組相比以 SWL 具有顯著性降低 ( $P < 0.05$ ; 圖 4-16), 其值與 C 組相當; SWM 與 SWH 組則有下降趨勢但無顯著性差異。

#### (七) 紅雞屎藤酒精萃對代謝症候群大鼠肝臟 ACC 和 FAS 活性之影響

已知糖水可誘發肝臟中 ACC 和 FAS 活性, 大鼠給予紅雞屎藤測其肝臟 ACC 和 FAS 活性, 由圖 4-17 結果顯示, SWL 組之 ACC 活性顯著低於 SW ( $P < 0.05$ ), 其值與 C 組接近; SWM 和 SWH 組肝臟中 ACC 活性並無抑制, 與 SW 組無差異。測其肝臟中 FAS 活性, 由圖 4-18 結果顯示, 給予紅雞屎藤酒精萃並無法抑制 FAS 活性, 與 SW 組相當, SWH 組之 FAS 活性最高。

#### (八) 短期給予紅雞屎藤酒精萃對於大鼠肝臟 ACC 和 FAS 活性之影響

先將大鼠禁食 48 小時後再給予低油飲食和蔗糖水 12 小時, 於大鼠飽食階段管餵 10 倍劑量紅雞屎藤酒精萃 (188 mg EP/Kg 大鼠) 2 小時後立即犧牲取肝, 測試 ACC 和 FAS 活性。結果顯示, 短期給予紅雞屎藤酒精萃對於 ACC 活性與控制組相比有下降趨勢但未達顯著差異 (圖 4-22); FAS 活性結果顯示給予紅雞屎藤酒精萃並不影響 FAS 活性, 反而有增加趨勢 (圖 4-23)。

表 4-1 Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之體重及白色脂肪量

Table 4-1 The final body weight and adipose tissue weight of rats fed the experimental diets for 4 wk.

	Control	SW	SWL	SWM	SWH
Initial body weight(g)	479.66±29.89 <sup>a</sup>	719.16±76.62 <sup>b</sup>	719.67±85.78 <sup>b</sup>	715.27±81.73	724.27±67.01 <sup>b</sup>
Final body weight(g)	469.04±32.34 <sup>c</sup>	714.49±87.27 <sup>a</sup>	619.53±68.80 <sup>b</sup>	642.83±49.23 <sup>ab</sup>	667.97±86.81 <sup>ab</sup>
Retroperitoneal fat(g)	7.33±3.73 <sup>c</sup>	35.79±12.73 <sup>a</sup>	23.84±11.92 <sup>b</sup>	29.16±9.02 <sup>ab</sup>	31.10±13.77 <sup>ab</sup>
Retroperitoneal fat weight/final body weight×100%	1.47±0.65 <sup>c</sup>	4.90±1.33 <sup>a</sup>	3.26±1.29 <sup>b</sup>	4.48±1.21 <sup>ab</sup>	4.53±1.32 <sup>ab</sup>
Epididymal fat(g)	7.39±1.98 <sup>c</sup>	20.52±4.59 <sup>a</sup>	14.28±3.63 <sup>b</sup>	18.43±4.98 <sup>ab</sup>	22.51±9.42 <sup>a</sup>
Epididymal fat weight/final body weight×100%	1.48±0.34 <sup>c</sup>	2.94±0.39 <sup>a</sup>	2.20±0.36 <sup>b</sup>	2.83±0.64 <sup>ab</sup>	3.30±1.04 <sup>a</sup>
Inguinal fat(g)	3.72±1.25 <sup>c</sup>	16.58±8.69 <sup>a</sup>	8.89±4.23 <sup>b</sup>	18.27±14.66 <sup>ab</sup>	10.11±5.68 <sup>ab</sup>
Inguinal fat weight/final body weight×100%	0.74±0.22 <sup>b</sup>	2.27±1.00 <sup>a</sup>	1.41±0.61 <sup>ab</sup>	1.96±0.98 <sup>ab</sup>	1.45±0.60 <sup>ab</sup>

<sup>1</sup>Initial body weight : at 28 week (n=10 for control , n=9 for SW , n=6 for SWL , n=7 for SWM , n=6 for SWH ,)

<sup>2</sup>Final body weight : at 32 week (n=10 for control , n=9 for SW , n=6 for SWL , n=7 for SWM , n=6 for SWH ,)

<sup>3</sup>The values are the mean ± SD (n=10 for control , n=9 for SW , n=6 for SWL , n=7 for SWM , n=6 for SWH ,). The significance of differences among groups was analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values for which the groups do not share a letter are significantly different ( $P<0.05$ ).

表 4-2 Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之血液生化質

Table 4-2 The fasting serum levels of rats fed the experimental diets for 4 wk.

	Serum glucose (mmol / L)	Serum TG (mmol / L)	Serum TC (mmol / L)	Serum insulin (pmol / L)	Serum UA (mmol / L)
Control	2.67±0.49 <sup>b</sup>	1.31±0.29 <sup>b</sup>	2.41±0.53 <sup>a</sup>	0.54±0.14 <sup>b</sup>	0.38±0.09 <sup>ab</sup>
SW	3.70±0.73 <sup>ab</sup>	2.06±0.77 <sup>a</sup>	2.32±0.52 <sup>a</sup>	1.28±0.70 <sup>a</sup>	0.48±0.15 <sup>a</sup>
SWL	3.70±1.10 <sup>ab</sup>	1.31±0.40 <sup>b</sup>	1.77±0.31 <sup>b</sup>	0.70±0.13 <sup>b</sup>	0.34±0.08 <sup>b</sup>
SWM	3.44±1.19 <sup>ab</sup>	1.31±0.22 <sup>b</sup>	2.03±0.37 <sup>ab</sup>	1.03±0.62 <sup>ab</sup>	0.33±0.05 <sup>b</sup>
SWH	4.18±0.70 <sup>a</sup>	1.44±0.66 <sup>b</sup>	1.98±0.21 <sup>ab</sup>	0.62±0.12 <sup>b</sup>	0.31±0.10 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> The values are the mean ± SD (n=10 for control , n=9 for SW , n=6 for SWL , n=7 for SWM , n=6 for SWH , ). The significance of differences among groups was analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values for which the groups do not share a letter are significantly different ( $P<0.05$ ).

<sup>2</sup> TG : triacylglycerol ; TC : total cholesterol ; UA : Uric acid

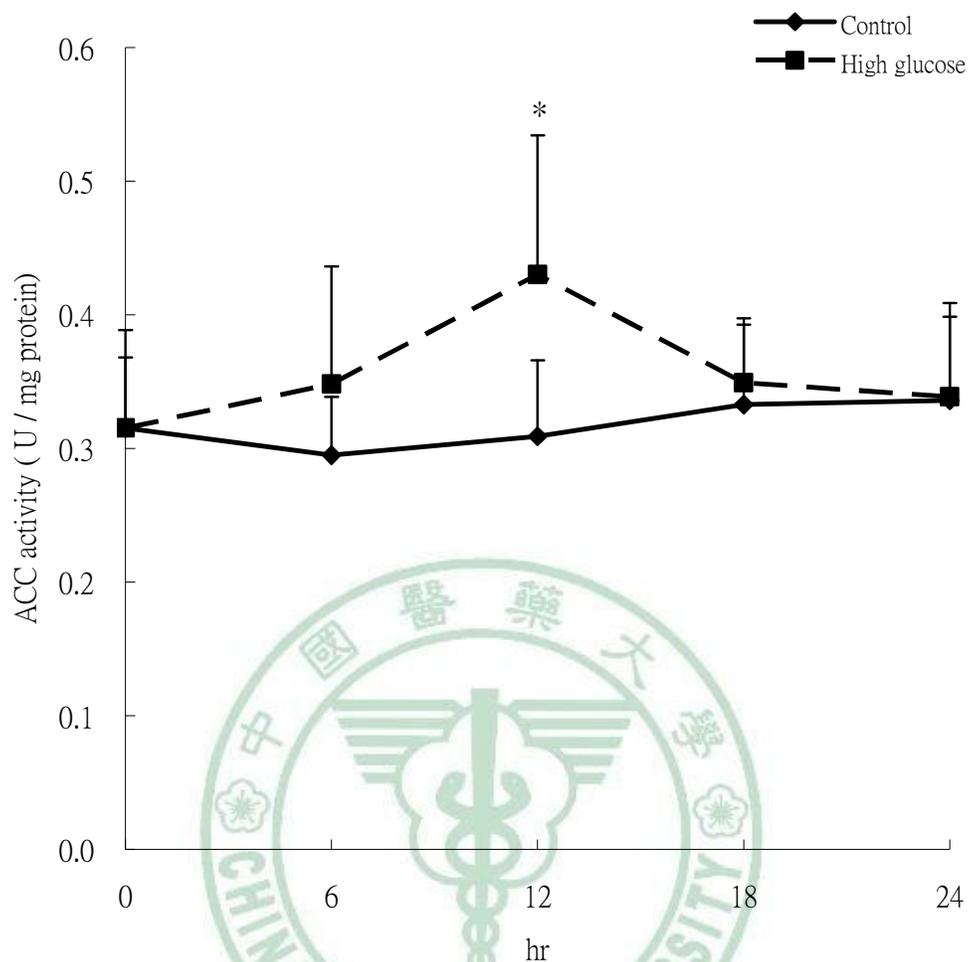


圖 4-1 葡萄糖刺激肝細胞 HepG2 之 ACC 活性

**Figure 4-1 Induction of acetyl-CoA carboxylase (ACC) activity in HepG2 cells by high glucose. ACC activity was measured in cells incubated in high glucose (30 mM) or low glucose (5 mM; control) medium over 24 hr. The values are the mean  $\pm$  SD (n = 3). The significance of differences between groups (i.e. high glucose vs. low glucose) was analyzed using Student's t test. \* $P < 0.05$ .**

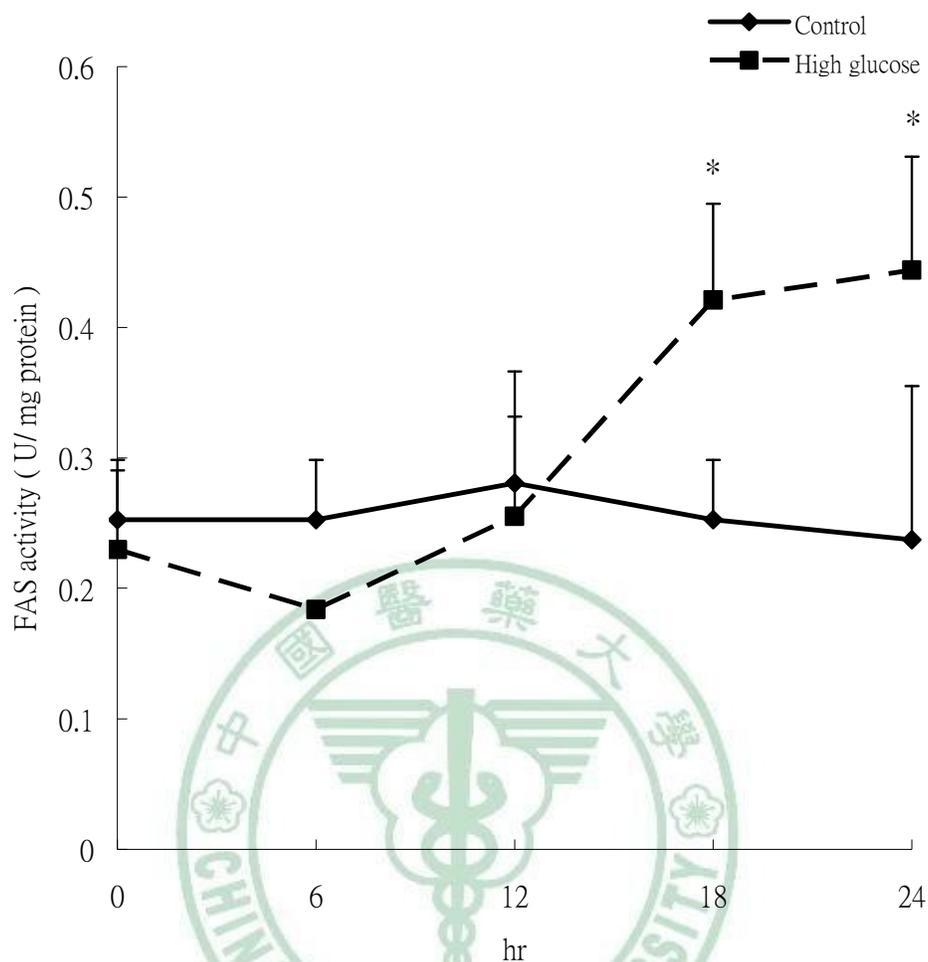


圖 4-2 葡萄糖刺激肝細胞 HepG2 之 FAS 活性

**Figure 4-2 Induction of fatty acid synthase (FAS) activity in HepG2 cells by high glucose. FAS activity was measured in cells incubated in high glucose (30 mM) or low glucose (5 mM; control) medium over 24 hr. The values are the mean  $\pm$  SD (n = 3). The significance of differences between groups (i.e. high glucose vs. low glucose) was analyzed using Student's t test. \* $P < 0.05$ .**

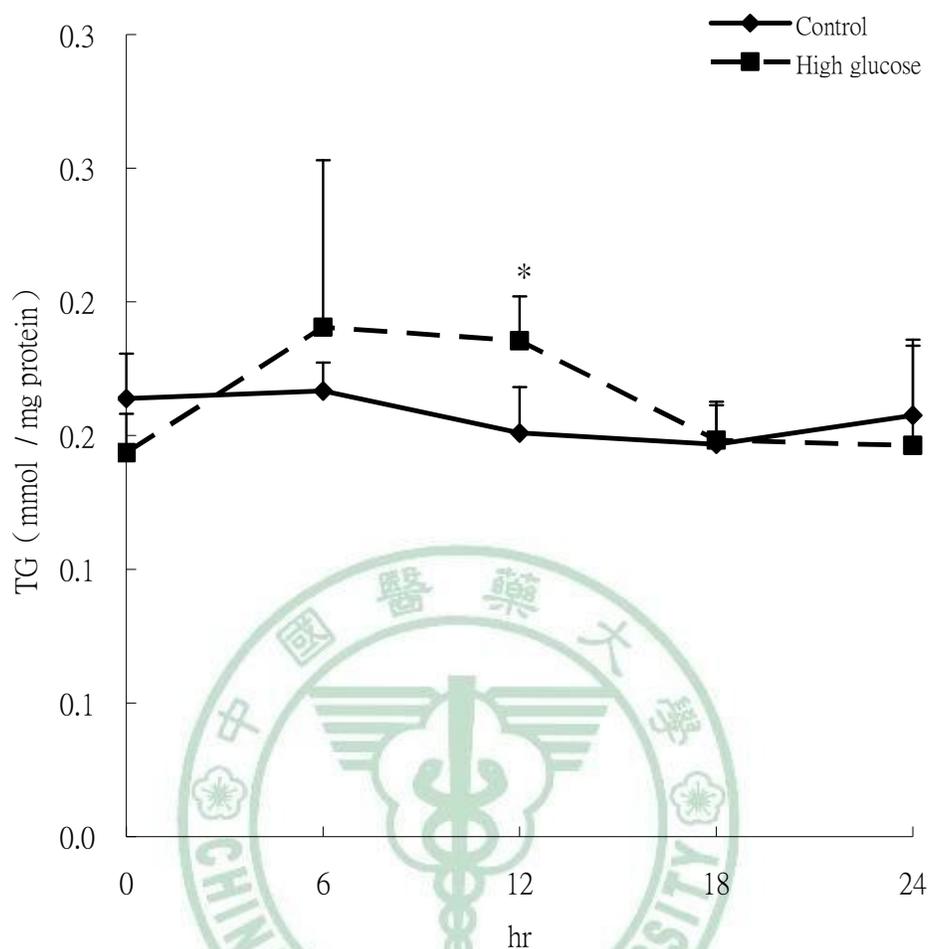


圖 4-3 葡萄糖刺激肝細胞 HepG2 之細胞內 TG 含量

Figure 4-3 Induction of tryacylglycerol (TG) content in HepG2 cells by high glucose. TG content was measured in cells incubated in high glucose (30 mM) or low glucose (5 mM; control) medium over 24 hr. The values are the mean  $\pm$  SD (n = 3). The significance of differences between groups (i.e. high glucose vs. low glucose) was analyzed using Student's t test. \* $P < 0.05$ .

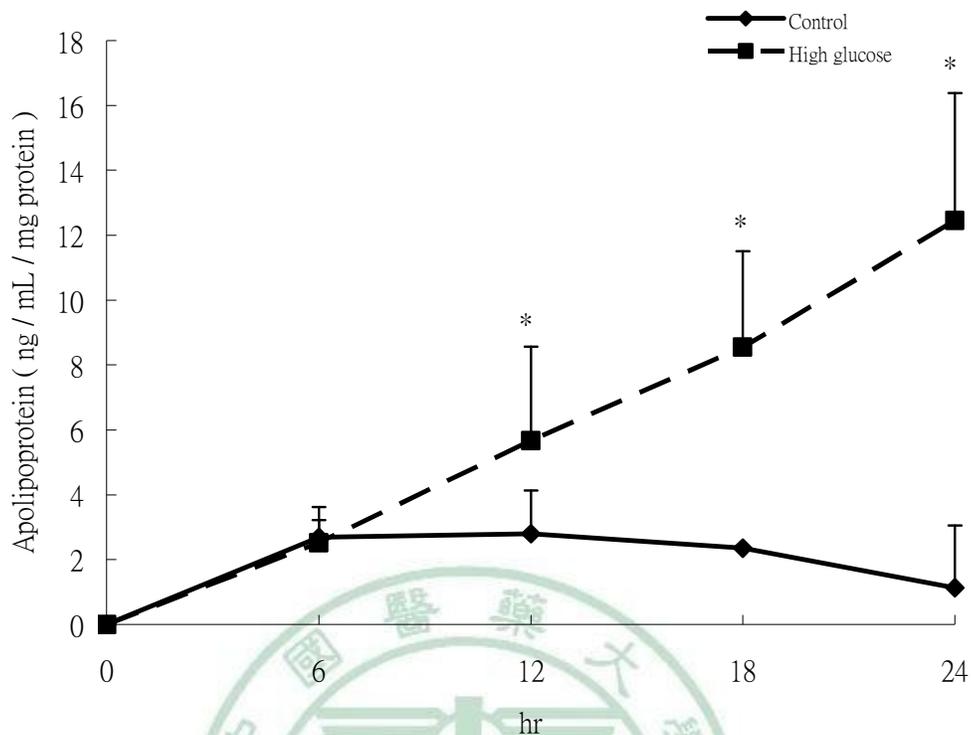


圖 4-4 葡萄糖刺激肝細胞 HepG2 之 apoB 分泌

Figure 4-4 Induction of apolipoprotein (apoB) secretion from HepG2 cells by high glucose. apoB content was measured in medium of cells incubated in high glucose (30 mM) or low glucose (5 mM; control) over 24 hr. The values are the mean  $\pm$  SD (n = 8). The significance of differences between groups (i.e. high glucose vs. low glucose) was analyzed using Student's t test. \* $P < 0.05$ .

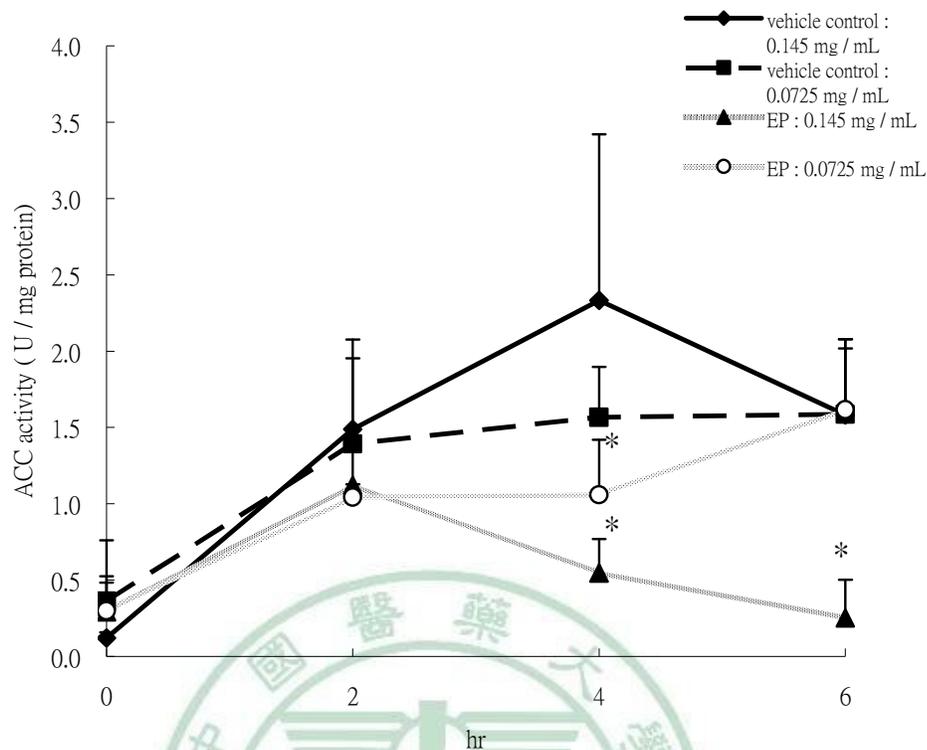


圖 4-5 紅雞屎藤酒精萃給予高葡萄糖刺激肝細胞 HepG2 之 ACC 活性

Figure 4-5 The ACC of high glucose-stimulated HepG2 cells treated with vehicle or ethanol extract of *P. hypoleucum Ohwi* (EP) for 6 hr (see below). Cells were stimulated with high glucose for 12 hr and two concentrations of EP (0.0725 and 0.145 mg/mL) were added at 6 h of high glucose stimulation, then ACC activity was measured every 2 hr for 6 hr. The values are the mean  $\pm$  SD (n = 3). The significance of differences between groups (ie, control or EP vs the corresponding vehicle control) was analyzed using Student t test. \* $P < 0.05$ .

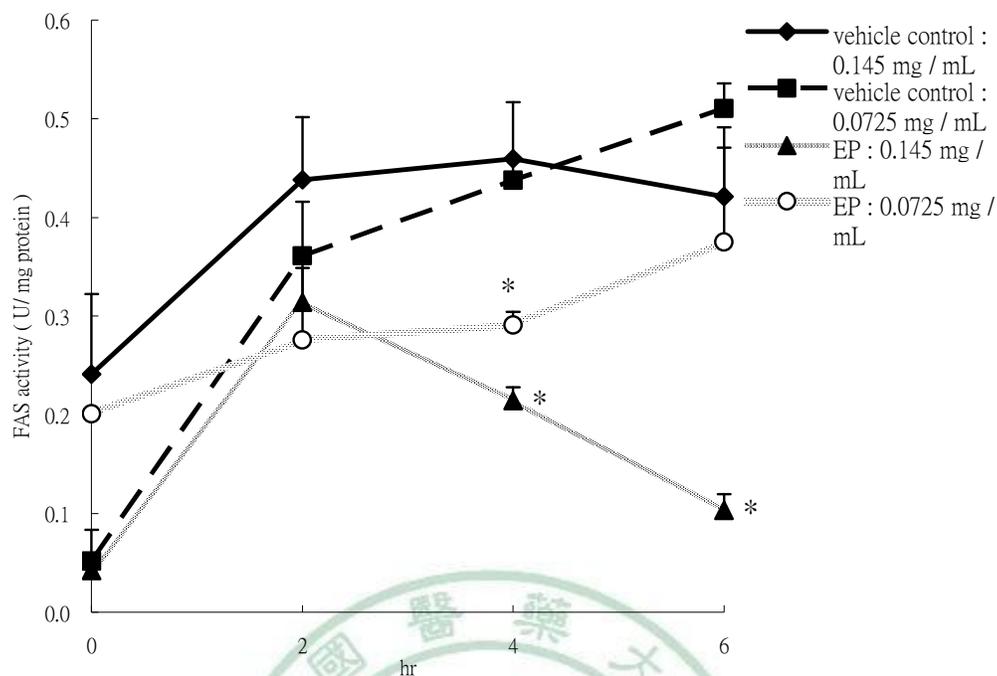


圖 4-6 紅雞屎藤酒精萃給予高葡萄糖刺激肝細胞 HepG2 之 FAS 活性

Figure 4-6 The FAS of high glucose-stimulated HepG2 cells treated with vehicle or ethanol extract of *P. hypoleucum Ohwi* (EP) for 6 hr (see below). Cells were stimulated with high glucose for 12 hr and two concentrations of EP (0.0725 and 0.145 mg/mL) were added at 6 h of high glucose stimulation, then FAS activity was measured every 2 hr for 6 hr. The values are the mean  $\pm$  SD (n = 3). The significance of differences between groups (ie, control or EP vs the corresponding vehicle control) was analyzed using Student t test. \* $P < 0.05$ .

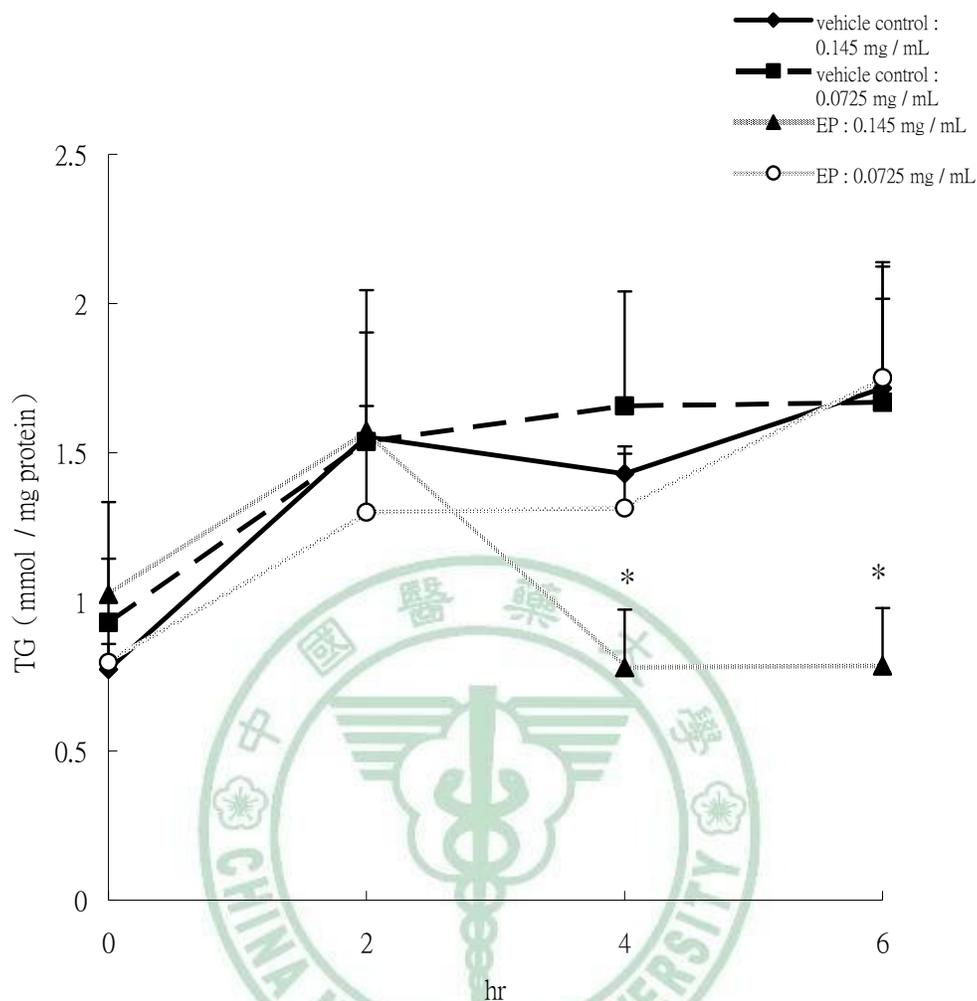


圖 4-7 紅雞屎藤酒精萃給予高葡萄糖刺激肝細胞 HepG2 之細胞內 TG 含量

Figure 4-7 The TG content of high glucose-stimulated HepG2 cells treated with vehicle or ethanol extract of *P. hypoleucum Ohwi* (EP) for 6 hr (see below). Cells were stimulated with high glucose for 12 hr and two concentrations of EP (0.0725 and 0.145 mg/mL) were added at 6 h of high glucose stimulation, then TG content was measured every 2 hr for 6 hr. The values are the mean  $\pm$  SD (n = 3). The significance of differences between groups (ie, control or EP vs the corresponding vehicle control) was analyzed using Student t test. \* $P < 0.05$ .

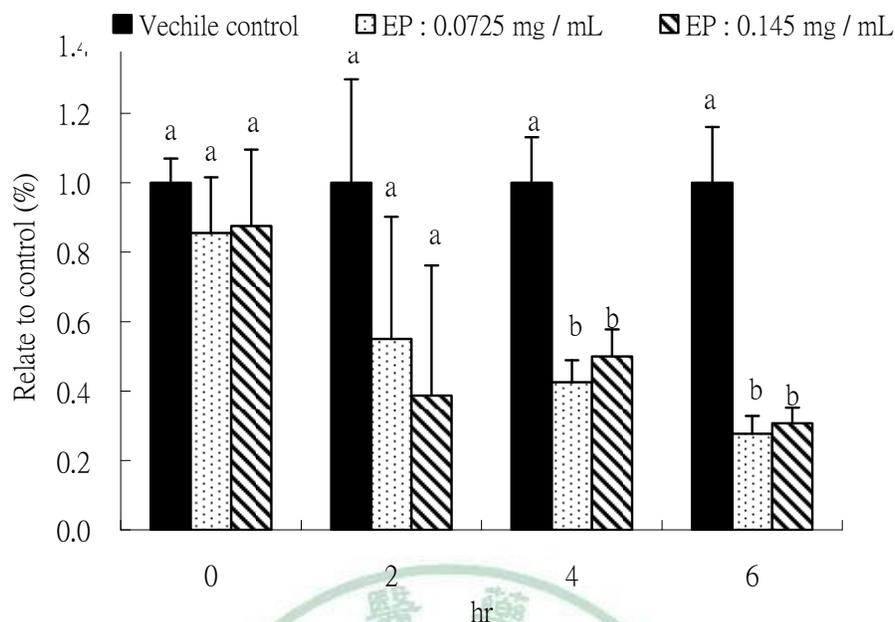


圖 4-8 紅雞屎藤酒精萃給予高葡萄糖刺激肝細胞 HepG2 之細胞內 *MTTP* mRNA 表現

Figure 4-8 The *MTTP* mRNA levels of high glucose-stimulated HepG2 cells treated with vehicle or ethanol extract of *P. hypoleucum Ohwi* (EP) for 6 hr (see below). The *P. hypoleucum Ohwi* (EP) dissolved in d.d. water. Cells were stimulated with high glucose for 12 hr and two concentrations of EP (0.0725 and 0.145 mg/mL) were added at 6 h of high glucose stimulation, then *MTTP* mRNA was measured every 2 hr for 6 hr. The values are the mean  $\pm$  SD (n = 3). The significance of differences among groups was analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values for which groups do not share a letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

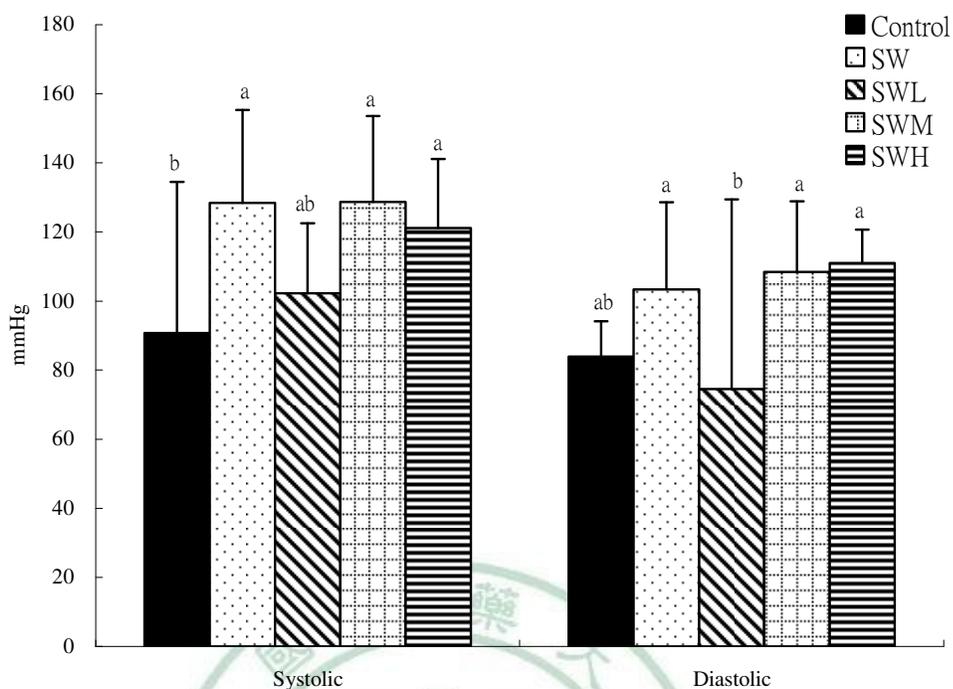


圖 4-9 Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之收縮壓和舒張壓

Figure 4-9 Blood pressure of rats fed the experimental diets for 4 wk ).The values are the mean  $\pm$  SD (n=10 for control , n=9 for SW , n=6 for SWL , n=7 for SWM , n=6 for SWH) . The significance of differences among groups was analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values for which groups do not share a letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

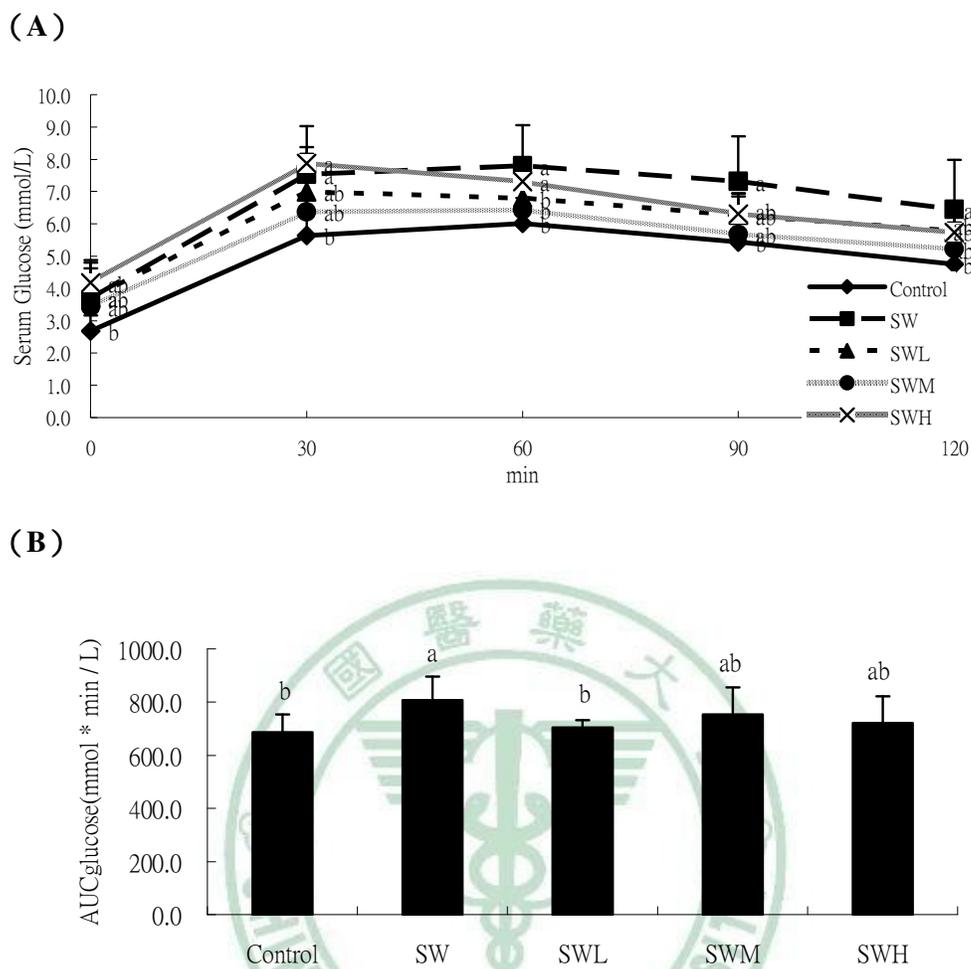
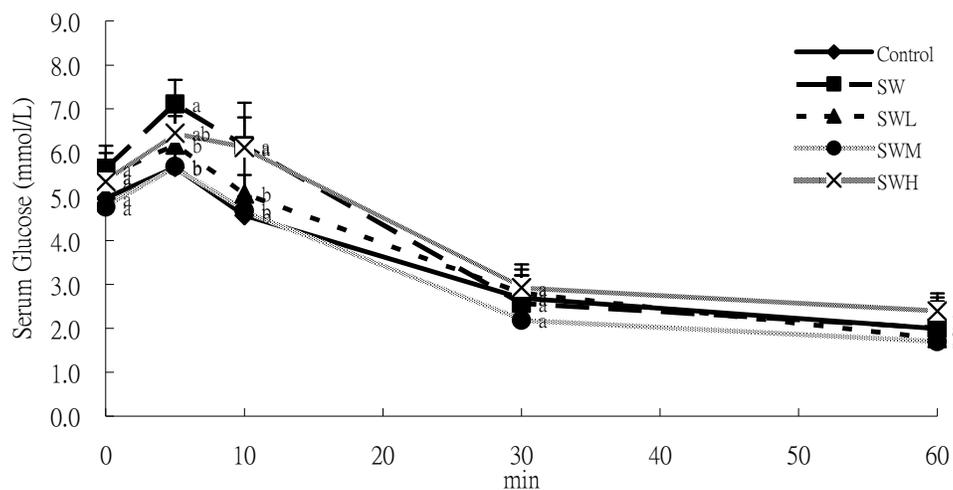


圖 4-10 Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之葡萄糖耐量試驗 (A) 和葡萄糖曲線下面積 (B)

Figure 4-10 Oral glucose tolerance tests (OGTT) performed on rats fed the experimental diets for 4 wk (A). The area under the curve for glucose ( $AUC_{glu}$ ) over 2 h is shown in (B). The values are the mean  $\pm$  SD ( $n=10$  for control,  $n=9$  for SW,  $n=6$  for SWL,  $n=7$  for SWM,  $n=6$  for SWH). The significance of differences among groups was analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values for which groups do not share a letter are significantly different ( $P<0.05$ ).

(A)



(B)

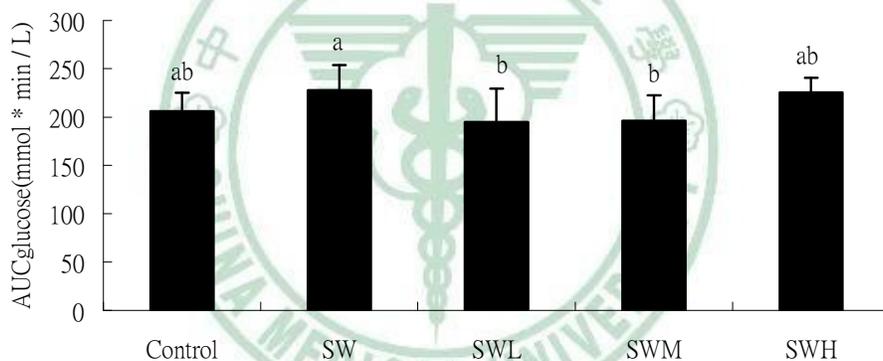


圖 4-11 Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之胰島素耐量試驗 (A) 和葡萄糖曲線下面積 (B)

Figure 4-11 Insulin tolerance tests (ITT) performed on rats fed the experimental diets for 4 wk (A). The area under the curve for glucose ( $AUC_{glu}$ ) over 1 h is shown in (B). The values are the mean  $\pm$  SD ( $n=10$  for control,  $n=9$  for SW,  $n=6$  for SWL,  $n=7$  for SWM,  $n=6$  for SWH). The significance of differences among groups was analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values for which groups do not share a letter are significantly different ( $P<0.05$ ).

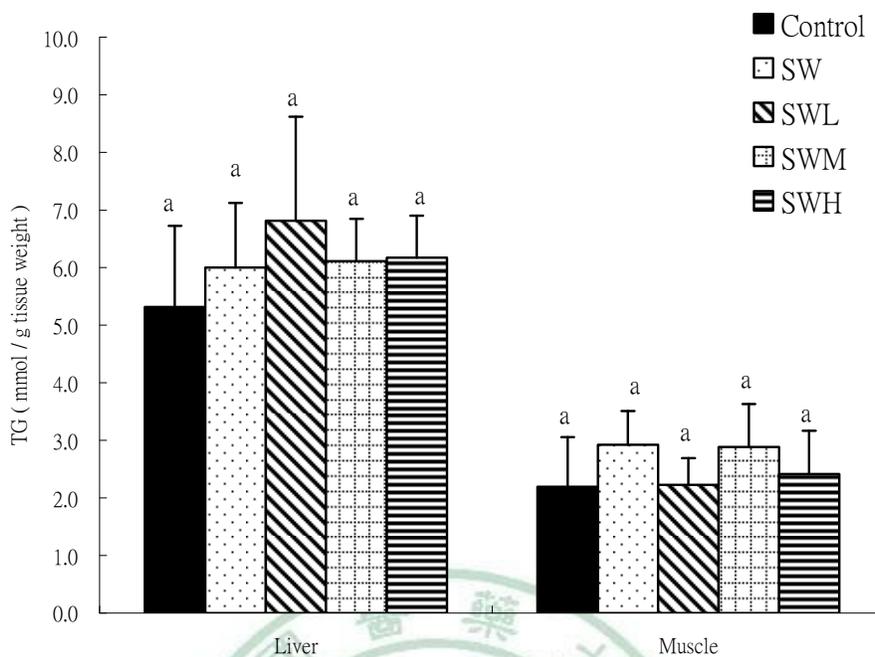


圖 4-12 Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之肝臟及肌肉三酸甘油酯含量

Figure 4-12 The TG content in liver and muscle of rats fed the experimental diets for 4 wk. The values are the mean  $\pm$  SD (n=10 for control , n=9 for SW , n=6 for SWL , n=7 for SWM , n=6 for SWH). The significance of differences among groups was analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values for which groups do not share a letter are significantly different ( $P<0.05$ ).

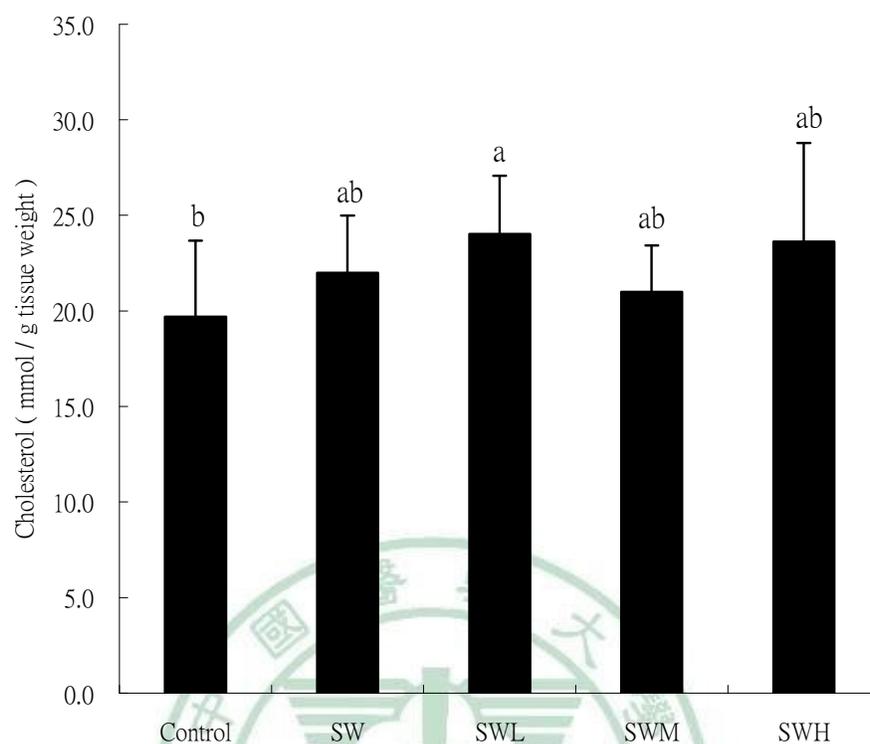


圖 4-13 Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之肝臟中膽固醇含量

Figure 4-13 The TC content in liver of rats fed the experimental diets for 4 wk.

The values are the mean  $\pm$  SD (n=10 for control , n=9 for SW , n=6 for SWL , n=7 for SWM , n=6 for SWH). The significance of differences among groups was analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values for which groups do not share a letter are significantly different ( $P<0.05$ ).

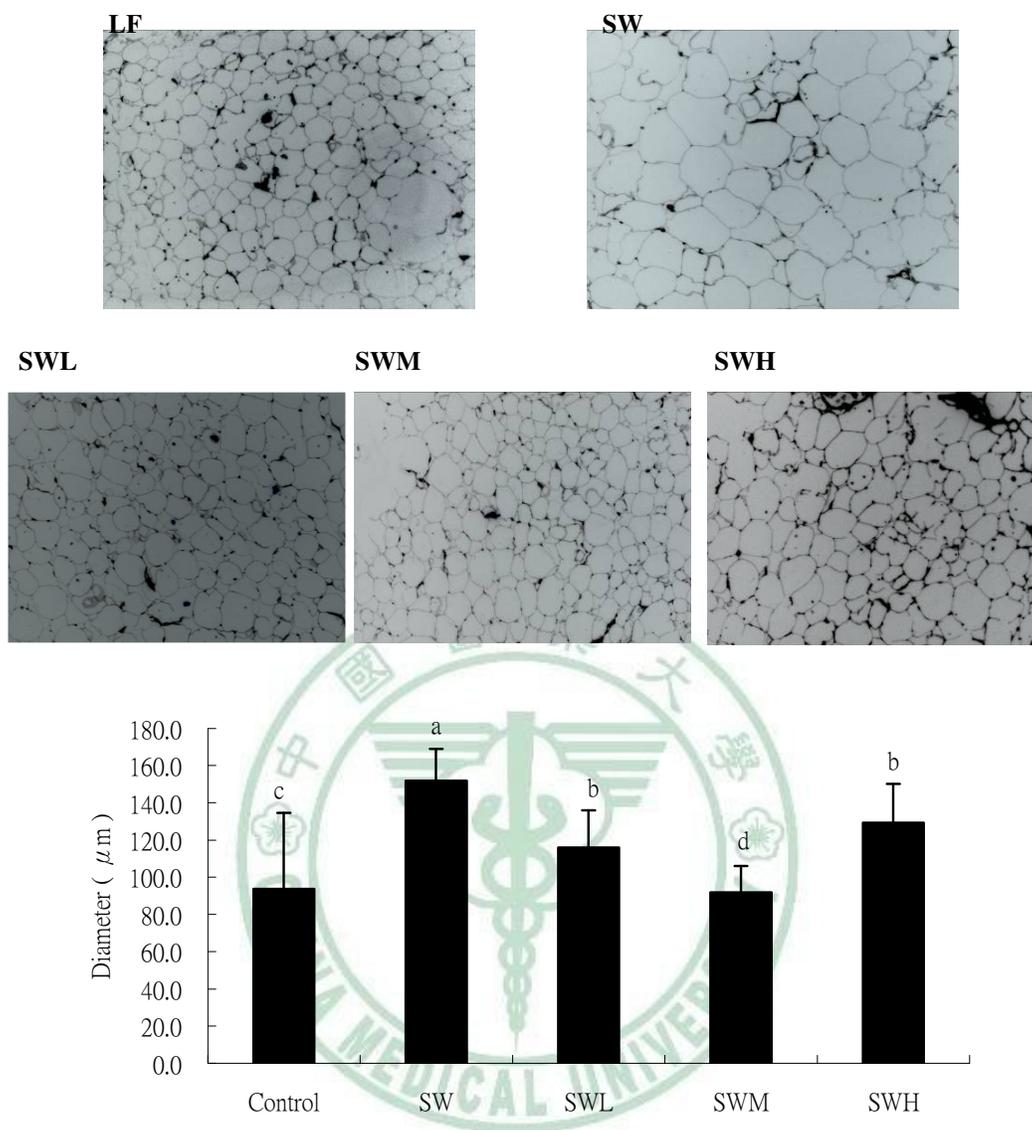


圖 4-14 Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之腹膜後脂肪組織切片與脂肪細胞平均直徑

Figure 4-14 Average diameter of adipocyte in retroperitoneal fat of rats fed the experimental diets for 4 wk. The values are the mean  $\pm$  SD (n=10 for control , n=9 for SW , n=6 for SWL , n=7 for SWM , n=6 for SWH). The significance of differences among groups was analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values for which groups do not share a letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

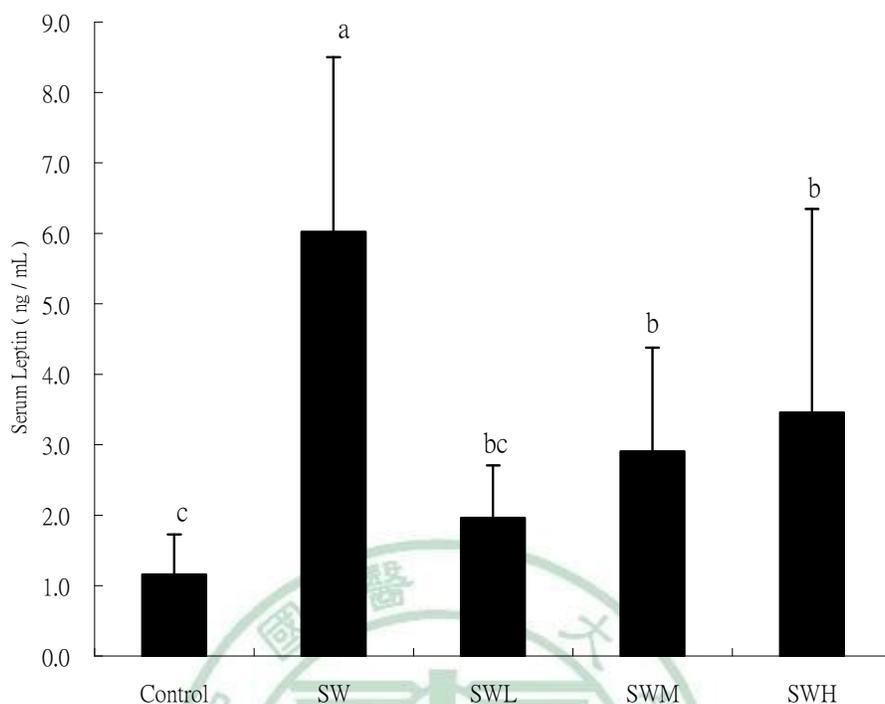


圖 4-15 Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之禁食血清 Leptin

Figure 4-15 The fasting serum leptin levels of rats fed the experimental diets for 4 wk. The values are the mean  $\pm$  SD (n=10 for control , n=9 for SW , n=6 for SWL , n=7 for SWM , n=6 for SWH). The significance of differences among groups was analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values for which groups do not share a letter are significantly different ( $P<0.05$ ).

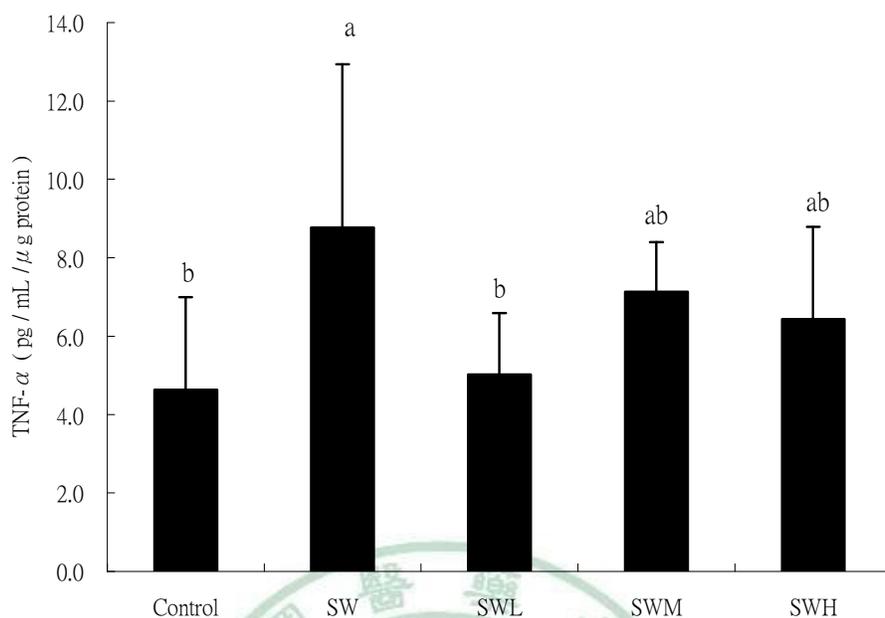


圖 4-16 Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之腹單脂組織中 TNF- $\alpha$  含量

Figure 4-16 The TNF- $\alpha$  levels in epididymal fat of rats fed the experimental diets for 4 wk. The values are the mean  $\pm$  SD (n=10 for control, n=9 for SW, n=6 for SWL, n=7 for SWM, n=6 for SWH). The significance of differences among groups was analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values for which groups do not share a letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

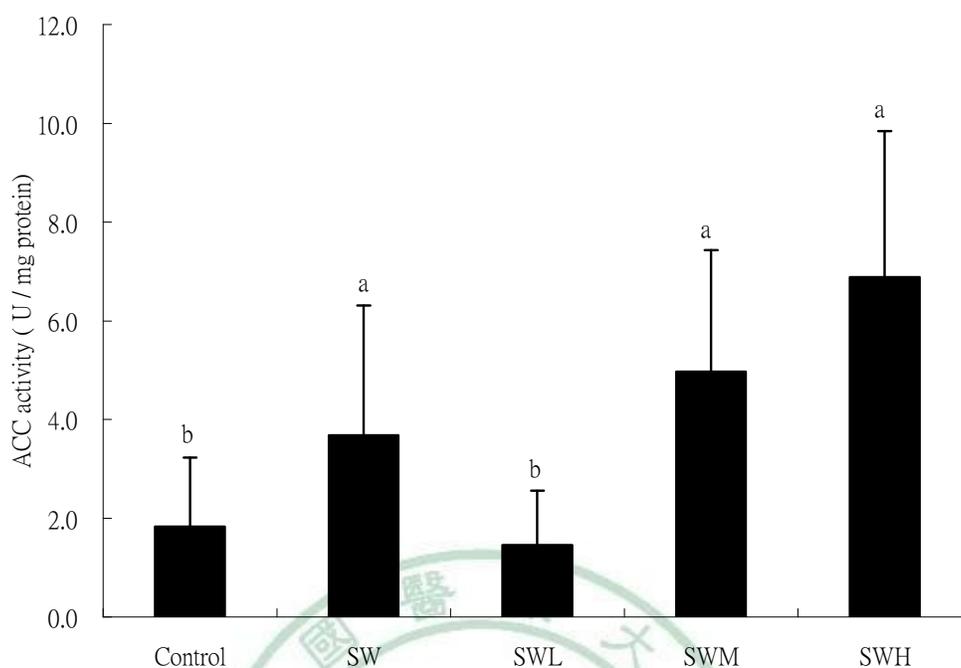


圖 4-17 Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之肝臟 ACC 活性

Figure 4-17 Induction of acetyl-CoA carboxylase (ACC) activity in rats fed the experimental diets for 4 wk. The values are the mean  $\pm$  SD (n=10 for control , n=9 for SW , n=6 for SWL , n=7 for SWM , n=6 for SWH). The significance of differences among groups was analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values for which groups do not share a letter are significantly different ( $P<0.05$ ).

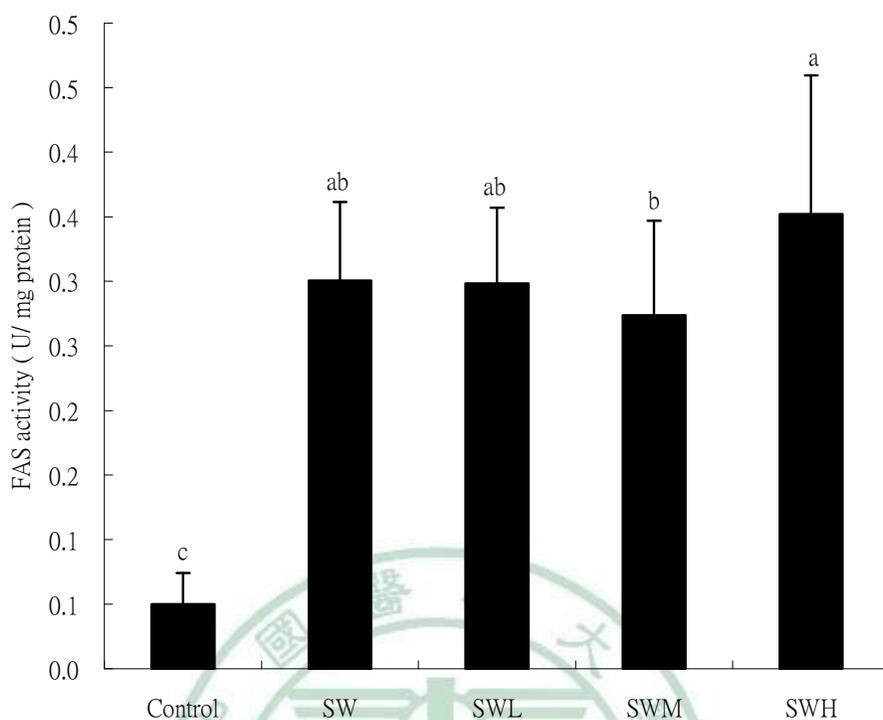


圖 4-18 Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃四週之肝臟 FAS 活性

Figure 4-18 Induction of fatty acid synthase (FAS) activity in rats fed the experimental diets for 4 wk. The values are the mean  $\pm$  SD (n=10 for control , n=9 for SW , n=6 for SWL , n=7 for SWM , n=6 for SWH). The significance of differences among groups was analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values for which groups do not share a letter are significantly different ( $P<0.05$ ).

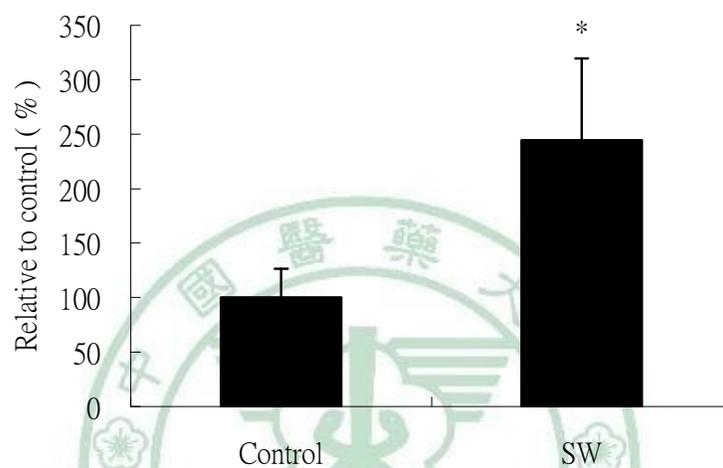
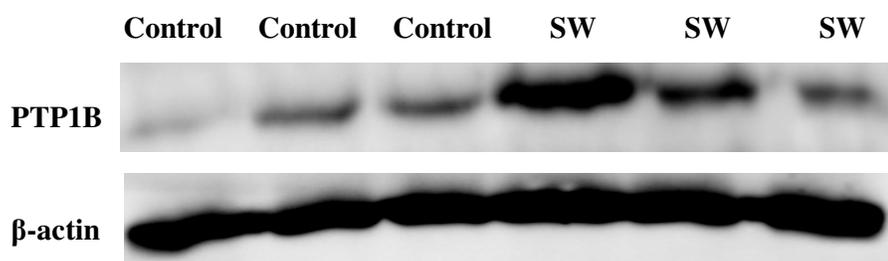


圖 4-19 以 Western blot 分析大鼠餵食蔗糖水 5 個月之肝臟 PTP1B 蛋白質表現量

Figure 4-19 Western blot analysis of PTP1B protein (50 kDa) in the liver of rats fed experimental diets for 5 months. The values are the mean  $\pm$  SD (n=10 for control, n=9 for SW). The significance of differences between groups was analyzed using Student's t test. \* $P$ <0.05.

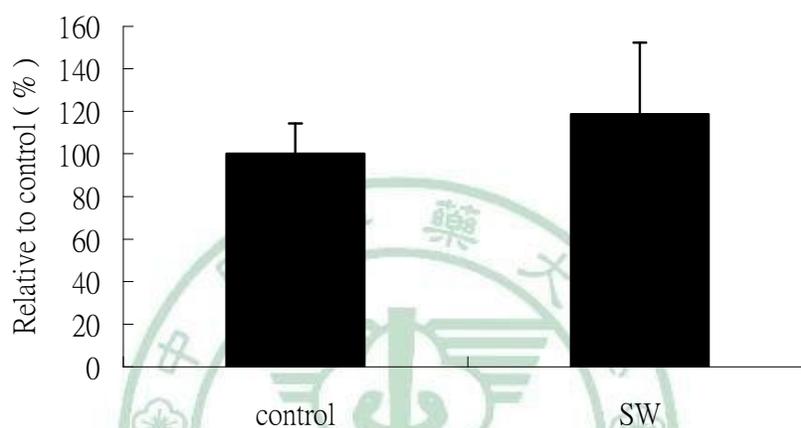
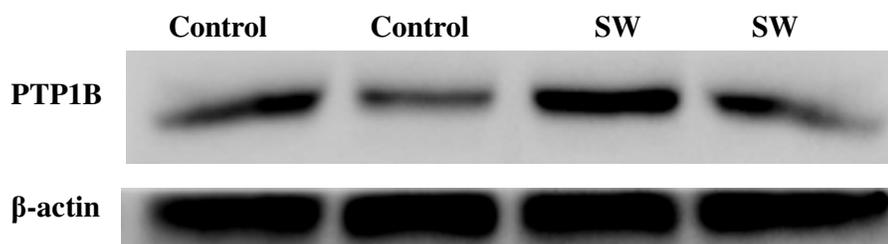


圖 4-20 以 Western blot 分析大鼠餵食蔗糖水 5 個月之肌肉 PTP1B 蛋白質表現量

Figure 4-20 Western blot analysis of PTP1B protein (50 kDa) in the muscle of rats fed experimental diets for 5 months. The values are the mean  $\pm$  SD (n=10 for control, n=9 for SW) The significance of differences between groups was analyzed using Student's t test. \* $P < 0.05$ .

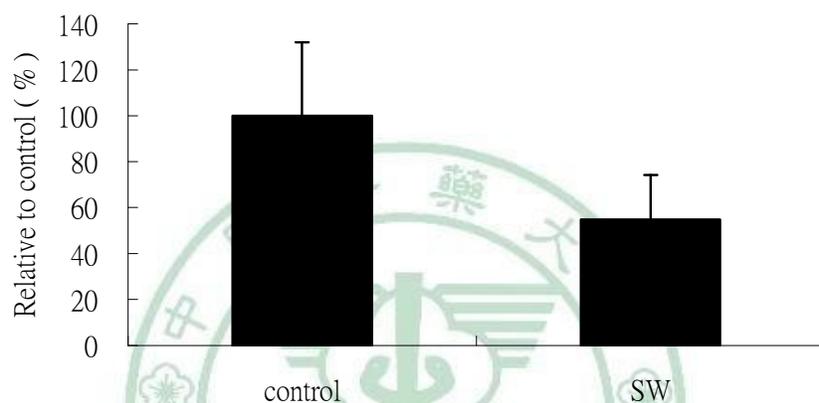
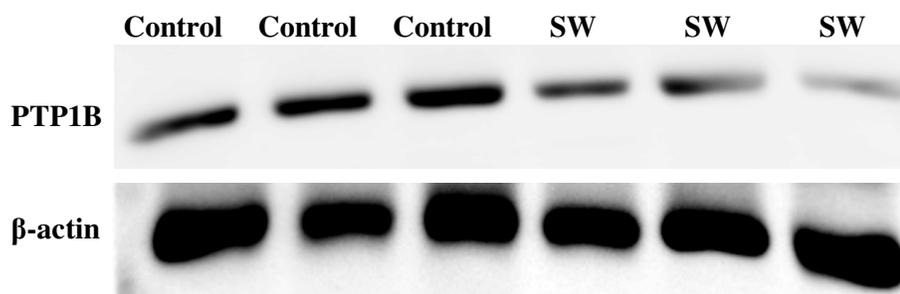


圖 4-21 以 Western blot 分析大鼠餵食蔗糖水 5 個月之脂肪組織 PTP1B 蛋白質表現量

Figure 4-21 Western blot analysis of PTP1B protein (50 kDa) in the adipose tissue of rats fed experimental diets for 5 months. The values are the mean  $\pm$  SD (n=10 for control, n=9 for SW) The significance of differences between groups was analyzed using Student's t test. \* $P$ <0.05.

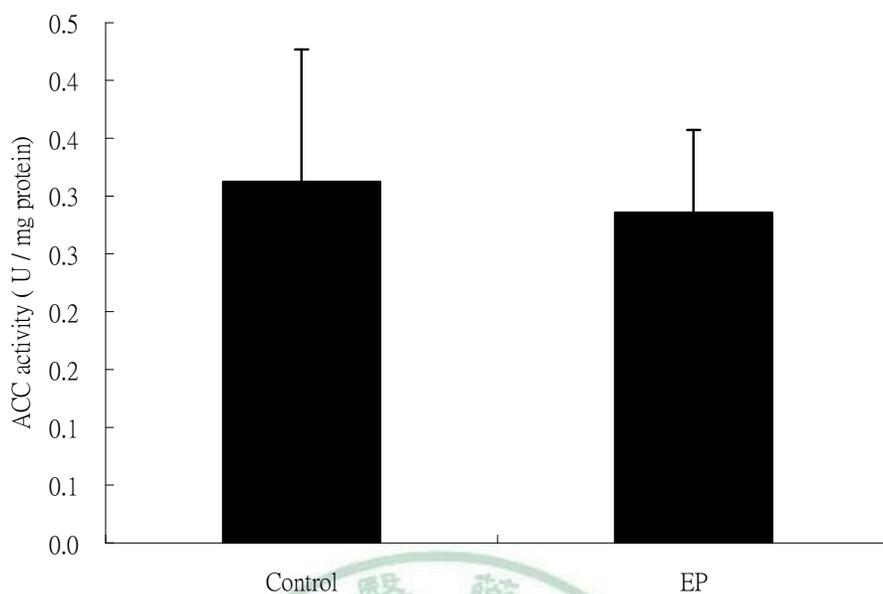


圖 4-22 Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃 2 小時後之肝臟 ACC 活性

Figure 4-22 Induction of acetyl-CoA carboxylase (ACC) activity in rats fed the experimental diets for 2 hr. The values are the mean  $\pm$  SD (n=10 for control , n=10 for EP ). The significance of differences among groups was analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values for which groups do not share a letter are significantly different ( $P<0.05$ ).

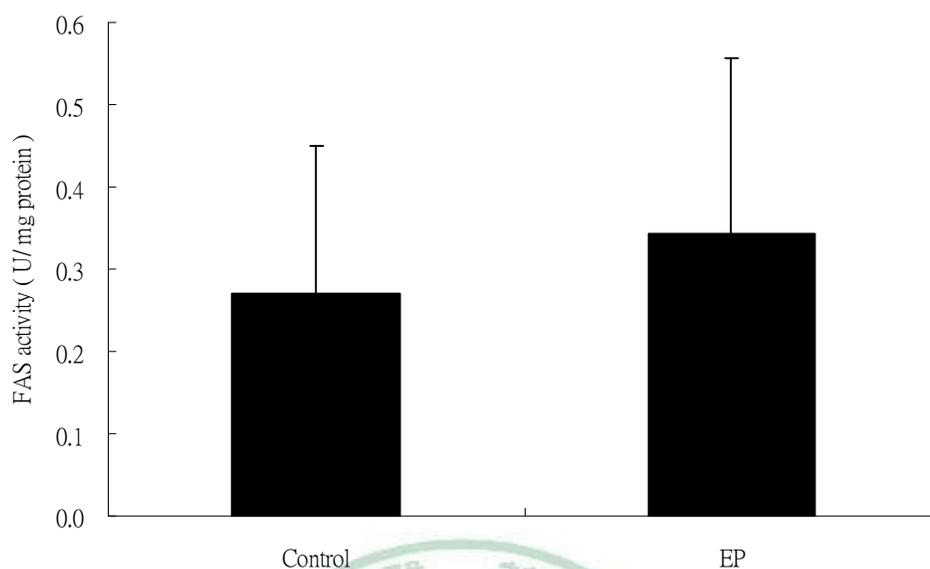


圖 4-23 Wistar 大鼠餵食紅雞屎藤酒精萃 2 小時後之肝臟 FAS 活性

Figure 4-23 Induction of fatty acid synthase (FAS) activity in rats fed the experimental diets for 2 hr. The values are the mean  $\pm$  SD (n=10 for control , n=10 for EP ). The significance of differences among groups was analyzed by one-way ANOVA and Duncan's multiple range test. Values for which groups do not share a letter are significantly different ( $P<0.05$ ).

## 第五章 討論

### 一、以高糖誘發 ACC 之細胞模式和糖水誘發大鼠代謝症候群

#### (1) 以高糖誘發 ACC 之細胞模式

以高葡萄糖刺激肝細胞，預期可增加肝細胞脂質生合成，由本實驗結果可知給予高葡萄糖 12 小時後確實可增加 HepG2 細胞 ACC 活性、FAS 活性，進一步造成 TG 堆積增加，MTTP 表現增加及促進 ApoB 分泌。Zang 等人(39)利用高葡萄糖刺激肝細胞 HepG2，發現給予高葡萄糖後可抑制 AMPK 活性，造成 ACC 磷酸化減少，促進 ACC 活性，增加脂肪酸合成。另一方面，Zang 的研究也證實給予高葡萄糖後細胞對於胰島素敏感性降低，抑制胰島素訊息傳遞，造成胰島素阻抗之現象。由此可知，本實驗建立之高葡萄糖刺激肝細胞模式不但可增加細胞內脂質生合成狀態、富含 TG 脂蛋白分泌，且可能造成肝細胞胰島素阻抗。

#### (2) 高糖誘發大鼠代謝症候群

本實驗室先前嘗試比較 30%蔗糖飲水與含 30%奶油之高脂飲食，在 Wistar rats 及 C57BL/6J mice 誘發代謝症候群效果(陳姪君論文)(91)，結果顯示 Wistar rats 對蔗糖水較敏感，而 C57BL/6J mice 則對高脂飲食誘發代謝症候群較敏感，可見不同的動物品系(基因背景)適合不同的飲食誘導方式。在動物實驗結果，Wistar 大鼠以 30%蔗糖水作為飲水給予 20 週後，與控制組相比出現肥胖、體脂肪堆積、葡萄糖不耐、胰島素阻抗、高胰島素血症、高三酸甘油酯血症和高血壓等代謝症候群症狀，這與 Aguilera 等人於 2004 年首度報告 30%蔗糖水投予

Wistar rats 21 週，成功誘發肥胖、高血壓、高胰島素血症、高三酸甘油酯血症、高游離脂肪酸血症、高膽固醇血症之結果相符(92)。本實驗之所以利用蔗糖水誘發代謝症候群，目的為欲誘發出 *de novo* lipogenesis 狀態，再加上本實驗室先前陳氏研究指出，Wistar 大鼠給予 30% 蔗糖水 20 週，可顯著提升肝臟 ACC 活性。我們推測在此條件下給予 ACC 抑制物（紅雞屎藤），應為展現其生理功效之最佳模式。

本實驗結果顯示餵予 Wistar 大鼠 30% 蔗糖水與控制組相較，肝臟中 ACC 和 FAS 酵素活性顯著增加，造成肝脂堆積及高三酸甘油酯血症。已知蔗糖在經由消化道消化、吸收後，會以葡萄糖和果糖形式進入血液中供給細胞所需。給予糖水之大鼠其肝臟中 ACC、FAS 活性顯著性增加，推測其間分子機制乃因肝臟中葡萄糖活化 LXR，進而促進 SREBP-1c 和 ChREBP 轉錄因子表現，進而促進糖解（glucokinase, pyruvate kinase）及脂質生合成酵素（ACC、FAS 等）基因表現(61-63)。而葡萄糖促進胰島素分泌，胰島素也會藉由活化 SREBP-1c 促進脂質生合成。此外，葡萄糖也可藉由代謝物 X-5-P 活化 PP2A 酵素，促進 ChREBP 轉位進入細胞核和促進 SREBP-1c 之基因表現，使得肝細胞中大量表現脂質生合成相關酵素(72)(55)。活化 PP2A 酵素也會造成 AMPK 酵素去磷酸化失去活性，進而無法磷酸化 ACC 酵素，增加 ACC 酵素活性。可知糖水餵食大鼠可透過以上機制，促進 *de novo* lipogenesis。本實驗室先前已證實糖水給食 Wistar rats 其肝臟 SREBP 及 ChREBP 轉位至細胞核增加（陳 2008; paper in submit）。

本實驗並觀察到給予大鼠蔗糖水後，在肝臟和肌肉中 PTP1B 表現量增加，但脂肪組織 PTP1B 減少。根據前人報告果糖會促進肝臟中 PTP1B 酵素大量表現(72)，使肝臟出現胰島素阻抗現象，在此與本實驗所觀察肝臟中 PTP1B 表現量增加現象相符，推測肝臟應也出現胰島素阻抗現象。Delibegovic 等人(93)利用專一性在肌肉中 PTP1B 基因剔除小鼠給予高脂飲食 18 週發現，在基因剔除小鼠

可降低肥胖、高血糖、高胰島素血症、增加胰島素敏感性並增加肌肉擷取葡萄糖能力；近年來研究發現，給予肌肉細胞 TNF- $\alpha$  會顯著增加肌肉細胞中 PTP1B 表現(94)。本實驗給予大鼠蔗糖水出現全身性胰島素抵抗現象和脂肪組織中 TNF- $\alpha$  濃度增加，同時檢測肌肉 PTP1B 在糖水組表現量有增加趨勢，推測糖水可促進肌肉中 PTP1B 表現，其中可能是藉由 TNF- $\alpha$  所活化，而造成胰島素抵抗減少葡萄糖擷取。相較於肌肉和肝臟，文獻指出將脂肪組織中 PTP1B 基因剔除小鼠其降低胰島素抵抗和增加葡萄糖擷取能力並不影響，且對於胰島素所誘發胰島素接受器磷酸化並不受改變(95)。本實驗結果顯示在脂肪組織中 PTP1B 表現與控制組相比並無顯著增加，相反有減少趨勢，目前並無相關文獻指出蔗糖水是如何影響脂肪組織中 PTP1B 表現，就本實驗結果，蔗糖水並無誘發脂肪組織 PTP1B 表現之傾向與肌肉和肝臟不同，推測 PTP1B 在脂肪組織中的表現並不受蔗糖水所影響，對於脂肪組織是否有胰島素抵抗現象，應進一步測試胰島素訊息傳遞相關蛋白之影響。PTP1B 酵素活性與胰島素訊息傳遞密切相關，PTP1B 酵素藉由去磷酸化 IR 與 IRS-1，會阻斷肝臟和肌肉中胰島素訊息傳遞，造成胰島素抵抗現象(75)。PTP1B 酵素也可藉由去磷酸而活化 PP2A 酵素，加重脂質生合成(72)，此外也有報導 PTP1B 酵素可抑制 ER-60 表現，使 apoB 降解減少，活化 MTPP 表現(96)，造成肝臟中 VLDL 合成加快，釋出更多 VLDL，造成高三酸甘油酯血症。

除此之外，PTP1B 增加亦與 leptin resistance 有關。當 leptin 與 leptin 接受器 (leptin receptor ; LRb) 結合時即會活化下游受質 Janus kinase 2 (Jak2)，此 Jak2 為一種 tyrosine kinase，當 Jak2 活化後除了會自體磷酸化外，也會磷酸化 LRb 跟 IR 上 Tyr 位點，幫助胰島素訊息傳遞作用(97, 98)。先前研究指出，PTP1B 會負向調控 leptin 訊息傳遞路徑，將 Jak2 去磷酸化造成 Jak2 失去活性(99)。本實驗觀察到給予蔗糖水可誘發肝臟和肌肉 PTP1B 表現，除造成胰島素抵抗外，或許也造成 leptin 抵抗現象，加重胰島素抵抗及肥胖現象。

脂肪細胞肥大也會加重胰島素阻抗現象(100)，由切片結果顯示給予大鼠蔗糖水後，大鼠脂肪細胞平均大小皆比控制組大，有脂肪細胞肥大現象，且血液中 leptin 濃度和脂肪組織中 TNF- $\alpha$  濃度皆顯著高於控制組。脂肪細胞肥大會造成脂肪細胞分泌過多不利健康之脂肪細胞激素，如：leptin、resistin、TNF- $\alpha$  等。Leptin 分泌過多造成 hyperleptinemia，長期下來細胞對 leptin 敏感性降低形成 leptin 阻抗，造成胰島素阻抗(101-103)。脂肪細胞中過多的 TNF- $\alpha$  會干擾胰島素訊息傳遞，使胰島素接受器或胰島素接受器受質上酪氨酸磷酸化減弱，導致胰島素阻抗(104)。

在肝臟和肌肉中三酸甘油酯堆積現象，與組織胰島素敏感性有很大關係(105, 106)。由於飲食關係造成的肥胖使得脂質代謝異常，過多脂質溢流到其他非脂肪組織中貯存，而造成 lipotoxicity 現象，而造成肝臟和肌肉胰島素阻抗現象。肝臟和肌肉中若是過量堆積三酸甘油酯，三酸甘油酯進一步代謝形成 diacylglycerol (DG) 和 ceramide 造成胰島素訊息傳遞受阻(107)。本實驗中，大鼠給予蔗糖水 20 週後，肝臟和肌肉中 TG 堆積有增加趨勢，但與 C 組未達顯著差異，先前陳氏則觀察到糖水組肝臟 TG 顯著增加。不論陳氏(91)與本實驗均觀察到給予蔗糖水大鼠發生全身性葡萄糖不耐和胰島素阻抗，由於肝臟 TG 堆積可能因 VLDL 輸出增加而不易觀察到，檢測 DG 和 ceramide 或許是組織脂質堆積更好指標。

葡萄糖和果糖在進入肝臟經由醱解反應代謝形成 acetyl-CoA，acetyl-CoA 經由 citrate 形式自粒線體轉運至細胞質可進一步藉由 ACC、FAS 形成脂肪酸外，acetyl-CoA 也可藉由 HMG-CoA reductase 等酵素作為膽固醇合成原料。因此，增加單醱類攝取除了會增加三酸甘油酯外，也可能增加內生性膽固醇合成。本實驗大鼠給予蔗糖水 20 週，肝臟膽固醇有增加趨勢，陳氏(91)則觀察到糖水組血膽固醇有上升趨勢，肝臟膽固醇顯著增加。蔗糖水給食對內生性膽固醇合成及代

謝所知不多。將是有趣值得探討議題。

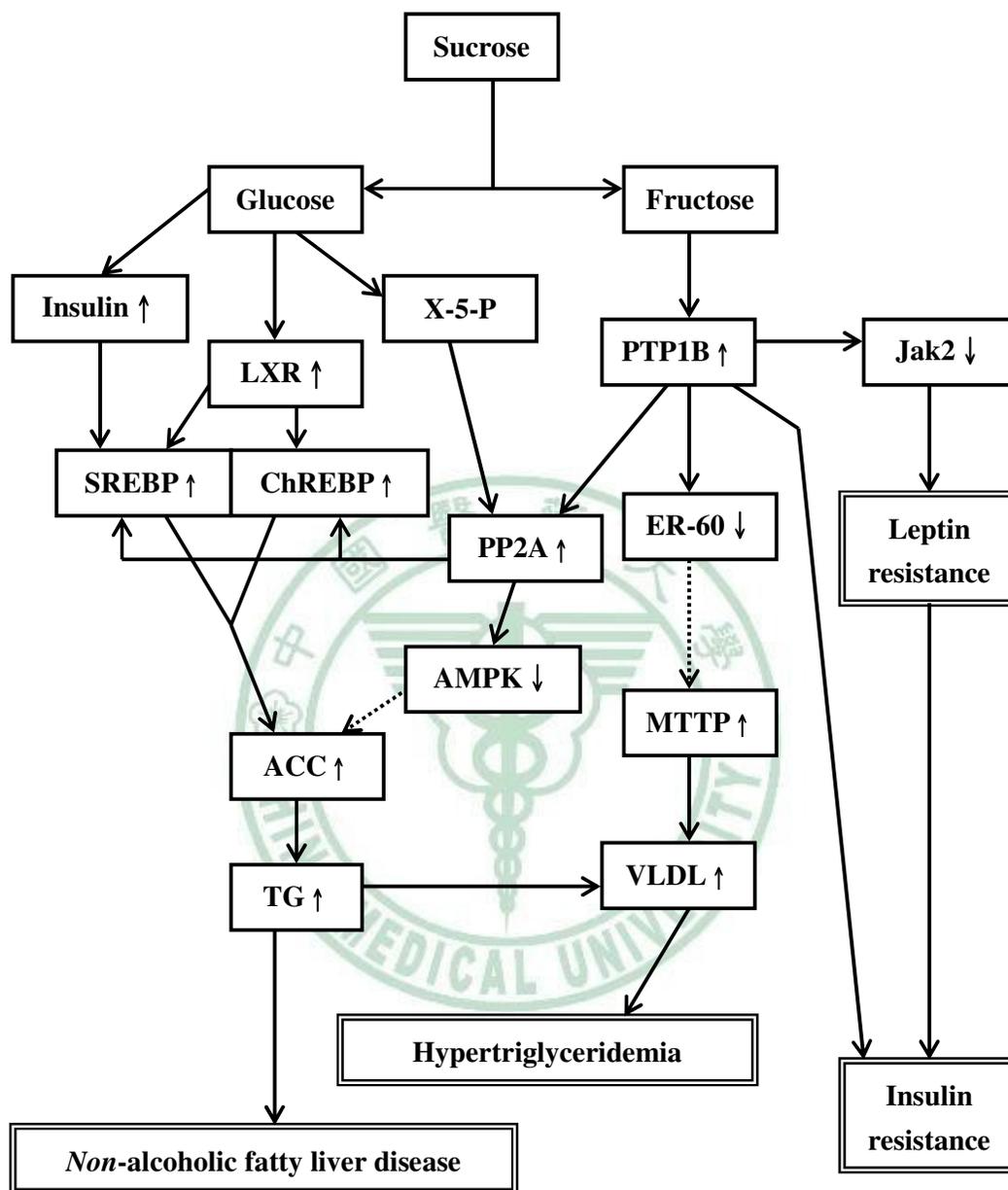


圖 5-1 糖水模式誘發代謝症候群之可能分子機制

## 二、以建立之細胞及動物模式驗證紅雞屎藤酒精萃功效

本實驗室張氏自鼠肝純化出 ACC 酵素直接與中草藥粗萃培養(108)，發現在數種中草藥中紅雞屎藤酒精萃具有最佳抑制 ACC 活性效果，張氏曾以高脂飲食誘發 C57BL/6J mice 代謝症候群投以紅雞屎藤酒精萃，雖然也觀察到降低體重、降低血清中高葡萄糖血症、高胰島素血症、高血酯症、高 leptin 血症和改善葡萄糖不耐、增加胰島素敏感性功效，但體脂並未降低，且使用劑量高達 1500 mg / Kg body weight(張 2007; metabolism 2009)。基於我們推測不同測試物依照其作用機制應選擇不同飲食誘發肥胖及代謝症候群模式（高脂或高糖）之理由(例如高脂飲食適用於測試腸道 lipase inhibitors 或 fatty acid  $\beta$ -oxidation agonists，相對 ACC inhibitors 應適用於高糖誘發 *de novo* lipogenesis 模式)，因此本實驗試圖建立誘發 *de novo* lipogenesis 導致代謝紊亂之肝細胞及動物代謝症候群模式，再給予紅雞屎藤酒精萃，以合理劑量進行測試。

### (1) 紅雞屎藤酒精萃改善高糖刺激肝細胞脂質堆積及脂蛋白分泌

細胞給予高糖刺激下觀察到刺激後第 6 到 12 小時之間，ACC 活性和細胞內 TG 含量增加，而在第 12 小時之後 ACC 活性和細胞內 TG 含量隨之下降，推測在給予高糖刺激後第 6 到第 12 小時之間細胞中 *de novo* lipogenesis 狀態最為旺盛。考量驗證紅雞屎藤酒精萃在細胞中抑制 ACC 活性之功效並抑制 *de novo* lipogenesis，應在細胞內 *de novo* lipogenesis 狀態最為旺盛時間下給予，因此，我們設計首先以高糖刺激肝細胞 6 小時，再額外給予紅雞屎藤酒精萃 6 小時，於高糖刺激的 6-12 小時（亦即紅雞屎藤處理 0-6 小時）密集追蹤酵素活性。

結果觀察到控制組（高糖刺激但無紅雞屎藤處理; vehicle control）之 ACC

活性與細胞內 TG 含量於高糖刺激第 10 小時達到最高、FAS 活性在第 12 小時達最高，此結果與先前觀察大致符合。相較於 vehicle controls，給予兩種濃度紅雞屎藤酒精萃處理之細胞，可觀察到 ACC、FAS 活性和細胞中 TG 含量降低，不管是高濃度或低濃度紅雞屎藤酒精萃在處理第 4 小時(亦即高糖刺激第 10 小時，*de novo* lipogenesis 最旺盛時)與 vehicle controls 有顯著差異，且高濃度抑制效果優於低濃度。

本細胞實驗使用兩種濃度紅雞屎藤酒精萃，分別為 0.145 mg / mL(相當於 5 倍  $IC_{50}$ )和 0.0725 mg / mL 相當於(2.5 倍  $IC_{50}$ )。此濃度設計是根據紅雞屎藤酒精萃抑制 ACC 活性之  $IC_{50}$  (0.029 mg / mL)，考量應用於細胞必須穿透細胞膜障礙，所需濃度勢必大於所觀察之  $IC_{50}$ ，但若給予濃度過高可能造成細胞毒性影響結果判讀，因此選定 5 倍  $IC_{50}$  和 2.5 倍  $IC_{50}$ ，雖本次實驗並未測試細胞生存率，但由顯微鏡直接觀察細胞形態和蛋白質濃度測定(結果未示)，處理濃度並不影響細胞存活。此外觀察到低劑量紅雞屎藤酒精萃在第 6 小時其 ACC、FAS 活性和細胞中 TG 含量恢復與控制組相同，推測也許是紅雞屎藤酒精萃劑量較低，在細胞中已被代謝完畢故失去抑制效果，相反高劑量紅雞屎藤酒精萃在第 6 小時仍持續抑制。

同時檢測紅雞屎藤酒精萃處理細胞 *MTTP* 之表現量以代表 VLDL 分泌，結果顯示在給予紅雞屎藤酒精萃第 4 和 6 小時下，細胞中 *MTTP* mRNA 量顯著減少。由此推測，紅雞屎藤酒精萃在肝細胞抑制高糖誘發 ACC 活性，減少 malonyl-CoA 產生，malonyl-CoA 一方面是 FAS 合成脂肪酸之重要受質，因此減少 FAS 酵素活性，另方面也是 CPT-I inhibitor，因此促進脂肪酸氧化；再加上所觀察到 *MTTP* 表現降低，可知紅雞屎藤酒精萃不但有效降低肝脂堆積，亦有效減少 VLDL 輸出。

## (2) 紅雞屎藤酒精萃改善糖水誘發大鼠代謝症候群之功效

大鼠先以 20 週糖水誘發代謝症候群，再以不同劑量之紅雞屎藤酒精萃管餵大鼠 4 週。在此決定紅雞屎藤給予劑量是依據食工所預定人體使用劑量。紅雞屎藤酒精萃出物粉末填充於膠囊約 0.45 g / 顆膠囊為一個單位，人體 1 倍建議劑量為兩顆膠囊也就是說約 0.9 g / 一天。此人體劑量換算為大鼠劑量，約低劑量 (SWL; 1 倍人體劑量) 為 94 mg / kg 大鼠體重；中劑量 (SWM; 2 倍人體劑量) 為 188 mg / kg 大鼠體重；高劑量 (SWH; 5 倍人體劑量) 為 470 mg / kg 大鼠體重。本實驗配置三種不同濃度 (SWL 為 94 mg / 5 mL ; SWM 為 188 mg / 5 mL ; SWH 為 469 mg / 5 mL) 紅雞屎藤酒精萃依所需劑量管餵大鼠 4 週，並不會因濃度過高而造成大鼠死亡或減少攝食量 (結果未示)。

結果顯示糖水誘發大鼠肥胖後給予三種不同劑量之紅雞屎藤酒精萃，發現低劑量組可有效降低肥胖和體脂肪堆積，中、高劑量組也有改善肥胖和體脂肪堆積的傾向，但效果較不明顯；而在血液生化值中，三種不同劑量之紅雞屎藤酒精萃皆有降低血清中三酸甘油酯和高胰島素血症之功效；在血壓方面，大鼠給予低劑量紅雞屎藤酒精萃顯著降低高血壓現象，中和高劑量組效果較不明顯；在 OGTT 結果顯示低劑量紅雞屎藤酒精萃組明顯改善葡萄糖耐受性，ITT 結果顯示低劑量和中劑量紅雞屎藤酒精萃組明顯改善胰島素敏感性；在三種不同劑量之紅雞屎藤酒精萃都有改善脂肪組織肥大，減少血液中 leptin 濃度和脂肪組織中 TNF- $\alpha$  濃度，其中亦以低濃度紅雞屎藤酒精萃效果最佳；測試肝臟中 ACC 活性結果，以低劑量紅雞屎藤酒精萃抑制 ACC 活性效果最佳。綜合以上之結果不難發現，三種不同劑量之紅雞屎藤酒精萃中以低劑量紅雞屎藤酒精萃在改善動物代謝症候群症狀效果最佳。

本實驗觀察到低劑量紅雞屎藤能夠有效改善動物代謝症候群症狀與低劑量紅雞屎藤抑制肝臟 ACC 活性效果最佳之結果一致，可支持紅雞屎藤抗代謝症候群功效確實與抑制 ACC 有關。至於為何本次動物實驗未觀察到劑量反應關係，推測可能原因為使用之紅雞屎藤酒精萃為粗萃，並非單一純品，粗萃中也許亦含有 ACC inhibitor 之拮抗劑，低劑量下拮抗劑作用不明顯，但高劑量下就中和了 ACC inhibitor 之作用，故在高劑量下反而沒有達到過期之結果。紅雞屎藤酒精萃可能是藉由抑制肝臟中 ACC 活性，減少脂肪酸生合成，增加脂肪酸氧化，此外我們也不能排除紅雞屎藤酒精萃作用於腸道抑制脂質吸收之可能性。雖然在此動物實驗並未觀察到 FAS 活性下降，但在細胞實驗中給予紅雞屎藤酒精萃卻可有效抑制 FAS 活性，推測在細胞實驗中給予紅雞屎藤酒精萃時間較短，能夠觀察到抑制 ACC 活性後 FAS 活性跟著被抑制，但動物實驗進行時間較長，也許與動物的調適反應或與其他代謝相關荷爾蒙作用有關。給予三種不同劑量之紅雞屎藤酒精萃都具有降低血清高三酸甘油酯血症效果，有效降低血清中三酸甘油酯含量可減少脂肪細胞肥大現象，避免肥胖產生。

研究指出，減少脂肪細胞肥大可有效降低不利健康之脂肪細胞激素分泌，如：leptin、TNF- $\alpha$ 、resistin 等(102)，由實驗結果顯示三種不同劑量之紅雞屎藤酒精萃都可減少脂肪細胞肥大和降低血清中 leptin 濃度，但以低劑量紅雞屎藤酒精萃降低血清中 leptin 濃度和脂肪組織中 TNF- $\alpha$  濃度效果最為顯著，因此減少了不利健康之脂肪細胞激素分泌，可進一步增加全身性胰島素敏感性和降低葡萄糖不耐現象，此與本實驗結果中低劑量紅雞屎藤酒精萃改善葡萄糖不耐和增加全身性胰島素敏感性相符。此外不利健康之脂肪細胞激素分泌，亦會加重高血壓之形成，研究指出高 leptin 血症會藉由影響交感神經系統進而增加血壓，另外 TNF- $\alpha$ 、resistin 和 IL-6 的增加也會促進高血壓之形成(109)，實驗結果顯示低劑量紅雞屎藤酒精萃可有效改善高血壓，推測原因為降低體重、血清中 leptin 和脂肪組織中 TNF- $\alpha$  濃度而改善高血壓現象。由此可知低劑量紅雞屎藤酒精萃會藉

由抑制脂質生合成，減少不利健康之脂肪細胞激素分泌達到改善代謝症候群之功效。

表 5-1 大鼠給予紅雞屎藤 4 週後之結果統整

	低劑量組	中劑量組	高劑量組
肥胖和 體脂肪堆積	↓↓↓	↓	↓
三酸甘油酯	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
高胰島素血症	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
血壓	↓↓↓	—	—
OGTT	↓↓↓	—	—
ITT	↓↓↓	↓↓↓	—
脂肪組織肥大	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
血液中 leptin 濃度	↓↓↓	↓↓	↓↓
脂肪組織中 TNF- $\alpha$ 濃度	↓↓↓	↓	↓
ACC 活性	↓↓↓	—	—

### (3) 短期給予紅雞屎藤酒精萃對於肝臟中 ACC 活性之影響

由於動物長期餵食實驗可能受體內調適反映影響，因此我們也試圖建立短期餵食模式以評估 ACC inhibitor 功效。將大鼠禁食 48 小時後再給予低油飲食和蔗糖水 12 小時，於大鼠飽食階段給予 10 倍劑量紅雞屎藤酒精萃 (188 mg EP/Kg 大鼠) 2 小時後犧牲取其肝臟，驗證紅雞屎藤酒精萃抑制 ACC 活性功效在此模式是否能呈現。決定使用 10 倍劑量乃是基於短期實驗希望立即有效看到功能；選定 2 小時間隔，是考量藥物約在服用後 2 小時內，在血液中達到最大濃度。結果顯示急性給予紅雞屎藤酒精萃大鼠肝臟 ACC 和 FAS 活性並無顯著差異。推測失敗原因可能是選定的 2 小時時間點不恰當，紅雞屎藤酒精萃尚未進入肝臟發揮作用；也可能與使用劑量過高有關，因為長期實驗顯示高劑量並無功效。欲建立短期模式實驗條件須再摸索。

### 三、紅雞屎藤酒精萃其他可能作用機制探討

雖然紅雞屎藤酒精萃是從 ACC 活性篩選平台脫穎而出，以 allosteric regulator 角色抑制 ACC 活性無庸置疑，但以下其它可能性也不能排除。

紅雞屎藤酒精萃製物可能藉由活化 AMPK，促進 ACC 磷酸化，而降低 ACC 活性。有文獻指出(16)ACC 活性除受 allosteric regulator 調節外，也受到 AMPK 磷酸化所影響。利用高油飲食誘發小鼠代謝症候群，再給予小鼠 AMPK 活化劑-AICAR，可有效抑制 ACC，降低脂肪酸合成，增加脂肪酸氧化，具有降低肥胖改善代謝症候群功效(110)。

另外紅雞屎藤酒精萃也可能影響 ACC 蛋白質表現量。ACC 蛋白質表現主要受 LXR、SREBP-1c 和 ChREBP 轉錄因子所調控，文獻指出給予高糖刺激後，會促進 LXR、SREBP-1c 和 ChREBP 轉錄因子表現和增加轉錄活性，加快脂質生成相關基因表現(42)(55, 59)。基因剔除小鼠發現，分別將 LXR、SREBP-1c 和 ChREBP 轉錄因子基因剔除，再給予高油或高糖飲食，可有效降低高油飲食所誘發之肥胖，減少脂肪酸合成相關基因表現，抑制脂質合成，有效改善代謝症候群。而紅雞屎藤酒精萃製物也可能含有 LXR、SREBP-1c 和 ChREBP 之 antagonist，藉由抑制 ACC 基因表現而導致 ACC 活性降低。



綜合以上可知紅雞屎藤酒精萃應用於糖水誘發大鼠代謝症候群模式藉由抑制肝臟中 ACC 活性之功效達到降低體重和體脂、降低血液高三酸甘油酯血症、高胰島素血症和高 leptin 血症、改善葡萄糖不耐和增加胰島素敏感性、降低高血壓發生、減少脂肪細胞肥大和脂肪組織中 TNF- $\alpha$  濃度。相較於高脂誘發小鼠代謝症候群模式，紅雞屎藤雖也有降低體重、降低血液高三酸甘油酯血症、高胰島素血症和高 leptin 血症、改善葡萄糖不耐和增加胰島素敏感性，但 ACC 活性並未被顯著抑制且無降體脂效果，再加上使用劑量高達 1500 mg/kg，糖水模式可以合理劑量(94 mg / kg)觀察到更好效果。因此日後欲探討 ACC inhibitor 改善代謝症候群之效果，本實驗結果支持高糖誘發 *de novo* lipogenesis 為合適之動物及細胞模式。



## 第六章 結論

本論文研究目的在於建立細胞和動物誘發 ACC 活性和促進脂質生合成模式，進一步利用此模式驗證由抑制 ACC 活性篩選平台篩出之紅雞屎藤酒精萃，是否在細胞和動物中具有抑制 ACC 活性和抑制脂質生合成，達到改善代謝症候群之效果。此研究成果不僅有助於代謝症候群動物模式應用於保健食品之開發，也對未來紅雞屎藤開發於保健食品有重要貢獻。所得到之重要結果如下：

- (1) 建立葡萄糖誘發肝細胞內 ACC 活性和脂質生合成細胞模式方面，在給予高葡萄糖刺激第 12 小時，ACC 活性和細胞內三酸甘油酯顯著性增加且促進肝細胞分泌脂蛋白，而在第 18 小時 FAS 活性顯著性增加。由此可知給予高葡萄糖刺激可成功促進細胞中 ACC 活性和脂質生合成。
- (2) 驗證紅雞屎藤酒精萃對抗高葡萄糖誘發肝細胞內 ACC 活性和脂質生合成方面，先以高糖刺激肝細胞 6 小時後再給予兩種不同濃度：0.145 mg / mL (相當於 5 倍  $IC_{50}$ ) 和 0.0725 mg / mL 相當於 (2.5 倍  $IC_{50}$ ) 紅雞屎藤酒精萃 4 小時，細胞內 ACC、FAS 活性顯著抑制、三酸甘油酯顯著減少、*MTTP* mRNA 表現下降，此結果顯示紅雞屎藤酒精萃可有效抑制肝細胞脂質生合成及分泌，驗證紅雞屎藤酒精萃在細胞實驗中之有效性。
- (3) 建立蔗糖水誘發大鼠 *de novo* lipogenesis 和代謝症候群方面，給予大鼠 30% 蔗糖水為期 20 週後，可誘發出腹部肥胖、高血壓、高三酸甘油酯血症和胰島素阻抗等代謝症候群症狀。檢測肝臟中 ACC 活性，顯示蔗糖水可促進肝臟中 ACC 活性誘發體內脂質新生。

- (4) 蔗糖水誘發大鼠肥胖和代謝症候群，與脂肪細胞肥大使之血液中出现高浓度 leptin 和脂肪組織中高 TNF- $\alpha$  浓度有關，此兩細胞激素加重胰島素抵抗。此外，糖水也會促進肝臟和肌肉中 PTP1B 之表現，抑制胰島素訊息傳遞加重胰島素抵抗。
- (5) 紅雞屎藤對抗動物代謝症候群方面，利用建立之蔗糖水誘發大鼠肥胖和代謝症候群模式，再給予三種不同劑量低劑量(1 倍人體劑量；為 94 mg / kg 大鼠體重)；中劑量(2 倍人體劑量；為 188 mg / kg 大鼠體重)；高劑量(5 倍人體劑量；為 470 mg / kg 大鼠體重)，紅雞屎藤酒精萃依所需劑量管餵大鼠 4 週。結果顯示以低劑量紅雞屎藤酒精萃抑制 ACC 活性和改善代謝症候群之功效最佳，其它劑量也有改善代謝症候群之趨勢。驗證紅雞屎藤酒精萃確實可藉由抑制 ACC 活性，達到改善代謝症候群之功效。

由以上結果得知，本實驗成功建立用以評估 ACC 活性篩選平台之細胞和動物模式，利用高糖誘發細胞和動物中脂質生合成狀態，再給予平台篩出物紅雞屎藤，可有效改善因高糖所誘發之代謝症候群多種症狀，可見紅雞屎藤具有抗代謝症候群生理功效，值得開發。在未來應用方面，此高糖模式之建立將有助於未來抗代謝症候群保健食品之開發。

第七章 参考文献

1. Reaven GM. Banting lecture 1988. role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988 Dec;37(12):1595-607.
2. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: Findings from the third national health and nutrition examination survey. *JAMA*. 2002 Jan 16;287(3):356-9.
3. 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 Apr;24(4):683-9.
4. Trevisan M, Liu J, Bahsas FB, Menotti A. Syndrome X and mortality: A population-based study. risk factor and life expectancy research group. *Am J Epidemiol*. 1998 Nov 15;148(10):958-66.
5. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A consensus statement from the international diabetes federation. *Diabet Med*. 2006 May;23(5):469-80.

6. Molavi B, Rasouli N, Kern PA. The prevention and treatment of metabolic syndrome and high-risk obesity. *Curr Opin Cardiol.* 2006 Sep;21(5):479-85.
7. Garg A. Adipose tissue dysfunction in obesity and lipodystrophy. *Clin Cornerstone.* 2006;8 Suppl 4:S7-S13.
8. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: Findings from the third national health and nutrition examination survey. *JAMA.* 2002 Jan 16;287(3):356-9.
9. Sherwin RS, Anderson RM, Buse JB, Chin MH, Eddy D, Fradkin J, Ganiats TG, Ginsberg H, Kahn R, et al. The prevention or delay of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2003 Jan;26 Suppl 1:S62-9.
10. Gibson DM, Titchener EB, Wakil SJ. Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. V. bicarbonate requirement for the synthesis of long-chain fatty acids. *Biochim Biophys Acta.* 1958 Nov;30(2):376-83.
11. Jitrapakdee S, Wallace JC. The biotin enzyme family: Conserved structural motifs and domain rearrangements. *Curr Protein Pept Sci.* 2003 Jun;4(3):217-29.

12. Lane MD, Moss J, Polakis SE. Acetyl coenzyme A carboxylase. *Curr Top Cell Regul.* 1974;8(0):139-95.
13. Tong L. Acetyl-coenzyme A carboxylase: Crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cell Mol Life Sci.* 2005 Aug;62(16):1784-803.
14. Abu-Elheiga L, Jayakumar A, Baldini A, Chirala SS, Wakil SJ. Human acetyl-CoA carboxylase: Characterization, molecular cloning, and evidence for two isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Apr 25;92(9):4011-5.
15. Wakil SJ, Stoops JK, Joshi VC. Fatty acid synthesis and its regulation. *Annu Rev Biochem.* 1983;52:537-79.
16. Munday MR. Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans.* 2002 Nov;30(Pt 6):1059-64.
17. Barber MC, Price NT, Travers MT. Structure and regulation of acetyl-CoA carboxylase genes of metazoa. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Mar 21;1733(1):1-28.
18. Abu-Elheiga L, Almarza-Ortega DB, Baldini A, Wakil SJ. Human acetyl-CoA carboxylase 2. molecular cloning, characterization, chromosomal

- mapping, and evidence for two isoforms. *J Biol Chem.* 1997 Apr 18;272(16):10669-77.
19. Trumble GE, Smith MA, Winder WW. Purification and characterization of rat skeletal muscle acetyl-CoA carboxylase. *Eur J Biochem.* 1995 Jul 1;231(1):192-8.
20. Bianchi A, Evans JL, Iverson AJ, Nordlund AC, Watts TD, Witters LA. Identification of an isozymic form of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem.* 1990 Jan 25;265(3):1502-9.
21. Nakanishi S, Numa S. Purification of rat liver acetyl coenzyme A carboxylase and immunochemical studies on its synthesis and degradation. *Eur J Biochem.* 1970 Sep;16(1):161-73.
22. Munday MR, Campbell DG, Carling D, Hardie DG. Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase. *Eur J Biochem.* 1988 Aug 1;175(2):331-8.
23. Nikawa J, Tanabe T, Ogiwara H, Shiba T, Numa S. Inhibitory effects of long-chain acyl coenzyme A analogues on rat liver acetyl coenzyme A carboxylase. *FEBS Lett.* 1979 Jun 15;102(2):223-6.

24. Ntambi JM, Miyazaki M. Regulation of stearyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog Lipid Res.* 2004 Mar;43(2):91-104.

25. Foster DW. The role of the carnitine system in human metabolism. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Nov;1033:1-16.

26. Hardie DG, Pan DA. Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochem Soc Trans.* 2002 Nov;30(Pt 6):1064-70.

27. Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KA, Wakil SJ. Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science.* 2001 Mar 30;291(5513):2613-6.

28. Abu-Elheiga L, Oh W, Kordari P, Wakil SJ. Acetyl-CoA carboxylase 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by high-fat/high-carbohydrate diets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 2;100(18):10207-12.

29. Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Kordari P, Oh W, Shaikenov T, Gu Z, Wakil SJ. Mutant mice lacking acetyl-CoA carboxylase 1 are embryonically lethal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Aug 23;102(34):12011-6.

30. McCune SA, Harris RA. Mechanism responsible for 5-(tetradecyloxy)-2-furoic acid inhibition of hepatic lipogenesis. *J Biol Chem.* 1979 Oct 25;254(20):10095-101.
31. Arbeeny CM, Meyers DS, Bergquist KE, Gregg RE. Inhibition of fatty acid synthesis decreases very low density lipoprotein secretion in the hamster. *J Lipid Res.* 1992 Jun;33(6):843-51.
32. Parker RA, Kariya T, Grisar JM, Petrow V. 5-(tetradecyloxy)-2-furancarboxylic acid and related hypolipidemic fatty acid-like alkyloxyarylcarboxylic acids. *J Med Chem.* 1977 Jun;20(6):781-91.
33. Triscari J, Sullivan AC. Anti-obesity activity of a novel lipid synthesis inhibitor. *Int J Obes.* 1984;8 Suppl 1:227-39.
34. Sumiyoshi M, Sakanaka M, Kimura Y. Chronic intake of high-fat and high-sucrose diets differentially affects glucose intolerance in mice. *J Nutr.* 2006 Mar;136(3):582-7.
35. Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J, Sutherland A, Petro AE, Opara EC, Kuhn CM, Rebuffe-Scrive M. Differential effects of fat and sucrose on the development

of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism*. 1995

May;44(5):645-51.

36. Kawasaki T, Kashiwabara A, Sakai T, Igarashi K, Ogata N, Watanabe H,

Ichiyanagi K, Yamanouchi T. Long-term sucrose-drinking causes increased

body weight and glucose intolerance in normal male rats. *Br J Nutr*. 2005

May;93(5):613-8.

37. Kawasaki T, Kashiwabara A, Sakai T, Igarashi K, Ogata N, Watanabe H,

Ichiyanagi K, Yamanouchi T. Long-term sucrose-drinking causes increased

body weight and glucose intolerance in normal male rats. *Br J Nutr*. 2005

May;93(5):613-8.

38. DiMeglio DP, Mattes RD. Liquid versus solid carbohydrate: Effects on food

intake and body weight. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000 Jun;24(6):794-800.

39. Zang M, Zuccollo A, Hou X, Nagata D, Walsh K, Herscovitz H, Brecher P,

Ruderman NB, Cohen RA. AMP-activated protein kinase is required for the

lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. *J Biol*

*Chem*. 2004 Nov 12;279(46):47898-905.

40. Apfel R, Benbrook D, Lernhardt E, Ortiz MA, Salbert G, Pfahl M. A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol Cell Biol.* 1994 Oct;14(10):7025-35.
41. Song C, Kokontis JM, Hiipakka RA, Liao S. Ubiquitous receptor: A receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Nov 8;91(23):10809-13.
42. Ulven SM, Dalen KT, Gustafsson JA, Nebb HI. LXR is crucial in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2005 Jul;73(1):59-63.
43. 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 May 1;9(9):1033-45.
44. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, et al. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem.* 1997 Feb 7;272(6):3137-40.

45. Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ, Mangelsdorf DJ. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jan 5;96(1):266-71.
46. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature*. 1996 Oct 24;383(6602):728-31.
47. Bjorkhem I, Meaney S, Diczfalusy U. Oxysterols in human circulation: Which role do they have? *Curr Opin Lipidol*. 2002 Jun;13(3):247-53.
48. Mitro N, Mak PA, Vargas L, Godio C, Hampton E, Molteni V, Kreuzsch A, Saez E. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature*. 2007 Jan 11;445(7124):219-23.
49. Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, et al. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev*. 2000 Nov 15;14(22):2831-8.
50. Collins JL, Fivush AM, Watson MA, Galardi CM, Lewis MC, Moore LB, Parks DJ, Wilson JG, Tippin TK, et al. Identification of a nonsteroidal liver X

receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *J Med Chem.* 2002 May 9;45(10):1963-6.

51. Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM, Hammer RE, Mangelsdorf DJ. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell.* 1998 May 29;93(5):693-704.

52. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, et al. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem.* 1997 Feb 7;272(6):3137-40.

53. Yu L, York J, von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J Biol Chem.* 2003 May 2;278(18):15565-70.

54. Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H, Mangelsdorf DJ. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem.* 2002 May 24;277(21):18793-800.

55. Uyeda K, Yamashita H, Kawaguchi T. Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): A key regulator of glucose metabolism and fat storage. *Biochem Pharmacol.* 2002 Jun 15;63(12):2075-80.
56. Iizuka K, Bruick RK, Liang G, Horton JD, Uyeda K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 May 11;101(19):7281-6.
57. Dentin R, Benhamed F, Hainault I, Fauveau V, Foufelle F, Dyck JR, Girard J, Postic C. Liver-specific inhibition of ChREBP improves hepatic steatosis and insulin resistance in ob/ob mice. *Diabetes.* 2006 Aug;55(8):2159-70.
58. Bengoechea-Alonso MT, Ericsson J. SREBP in signal transduction: Cholesterol metabolism and beyond. *Curr Opin Cell Biol.* 2007 Apr;19(2):215-22.
59. Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Fofelle F. SREBP transcription factors: Master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie.* 2004 Nov;86(11):839-48.
60. Ferre P, Fofelle F. SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: Clinical perspective. *Horm Res.* 2007;68(2):72-82.

61. Espenshade PJ. SREBPs: Sterol-regulated transcription factors. *J Cell Sci.* 2006 Mar 15;119(Pt 6):973-6.
62. Espenshade PJ, Hughes AL. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. *Annu Rev Genet.* 2007;41:401-27.
63. Osborne TF. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): Key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J Biol Chem.* 2000 Oct 20;275(42):32379-82.
64. Horton JD, Shimano H, Hamilton RL, Brown MS, Goldstein JL. Disruption of LDL receptor gene in transgenic SREBP-1a mice unmasks hyperlipidemia resulting from production of lipid-rich VLDL. *J Clin Invest.* 1999 Apr;103(7):1067-76.
65. Hasty AH, Shimano H, Osuga J, Namatame I, Takahashi A, Yahagi N, Perrey S, Iizuka Y, Tamura Y, et al. Severe hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, and atherosclerosis in mice lacking both leptin and the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.* 2001 Oct 5;276(40):37402-8.
66. Shimano H. SREBP-1c and TFE3, energy transcription factors that regulate hepatic insulin signaling. *J Mol Med.* 2007 May;85(5):437-44.

67. Sun LP, Li L, Goldstein JL, Brown MS. Insig required for sterol-mediated inhibition of Scap/SREBP binding to COPII proteins in vitro. *J Biol Chem.* 2005 Jul 15;280(28):26483-90.
68. Mayes PA. Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr.* 1993 Nov;58(5 Suppl):754S-65S.
69. Mitro N, Mak PA, Vargas L, Godio C, Hampton E, Molteni V, Kreuzsch A, Saez E. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature.* 2007 Jan 11;445(7124):219-23.
70. Cha JY, Repa JJ. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. the carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem.* 2007 Jan 5;282(1):743-51.
71. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.* 2000 Nov 15;14(22):2819-30.
72. Shimizu S, Ugi S, Maegawa H, Egawa K, Nishio Y, Yoshizaki T, Shi K, Nagai Y, Morino K, et al. Protein-tyrosine phosphatase 1B as new activator for hepatic

lipogenesis via sterol regulatory element-binding protein-1 gene expression. *J Biol Chem.* 2003 Oct 31;278(44):43095-101.

73. Woodford-Thomas TA, Rhodes JD, Dixon JE. Expression of a protein tyrosine phosphatase in normal and v-src-transformed mouse 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol.* 1992 Apr;117(2):401-14.

74. Frangioni JV, Beahm PH, Shifrin V, Jost CA, Neel BG. The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmic reticulum via its 35 amino acid C-terminal sequence. *Cell.* 1992 Feb 7;68(3):545-60.

75. Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: From genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 Nov;7(11):833-46.

76. Rondinone CM, Trevillyan JM, Clampit J, Gum RJ, Berg C, Kroeger P, Frost L, Zinker BA, Reilly R, et al. Protein tyrosine phosphatase 1B reduction regulates adiposity and expression of genes involved in lipogenesis. *Diabetes.* 2002 Aug;51(8):2405-11.

77. Wetterau JR, Zilversmit DB. Localization of intracellular triacylglycerol and cholesteryl ester transfer activity in rat tissues. *Biochim Biophys Acta*. 1986 Feb 28;875(3):610-7.
78. Wetterau JR, Combs KA, Spinner SN, Joiner BJ. Protein disulfide isomerase is a component of the microsomal triglyceride transfer protein complex. *J Biol Chem*. 1990 Jun 15;265(17):9800-7.
79. Alexander CA, Hamilton RL, Havel RJ. Subcellular localization of B apoprotein of plasma lipoproteins in rat liver. *J Cell Biol*. 1976 May;69(2):241-63.
80. Lin MC, Arbeeny C, Bergquist K, Kienzle B, Gordon DA, Wetterau JR. Cloning and regulation of hamster microsomal triglyceride transfer protein. the regulation is independent from that of other hepatic and intestinal proteins which participate in the transport of fatty acids and triglycerides. *J Biol Chem*. 1994 Nov 18;269(46):29138-45.
81. Hirokane H, Nakahara M, Tachibana S, Shimizu M, Sato R. Bile acid reduces the secretion of very low density lipoprotein by repressing microsomal triglyceride transfer protein gene expression mediated by hepatocyte nuclear factor-4. *J Biol Chem*. 2004 Oct 29;279(44):45685-92.

82. Kang S, Spann NJ, Hui TY, Davis RA. ARP-1/COUP-TF II determines hepatoma phenotype by acting as both a transcriptional repressor of microsomal triglyceride transfer protein and an inducer of CYP7A1. *J Biol Chem.* 2003 Aug 15;278(33):30478-86.

83. Hagan DL, Kienzle B, Jamil H, Hariharan N. Transcriptional regulation of human and hamster microsomal triglyceride transfer protein genes. cell type-specific expression and response to metabolic regulators. *J Biol Chem.* 1994 Nov 18;269(46):28737-44.

84. Hayhurst GP, Lee YH, Lambert G, Ward JM, Gonzalez FJ. Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol.* 2001 Feb;21(4):1393-403.

85. [Http://www.hljh.tcc.edu.tw/teach/](http://www.hljh.tcc.edu.tw/teach/). 臺灣藥用植物資源名錄 行政院衛生署中醫藥委員會 編.

86. Kuo YC, Sun CM, Ou JC, Tsai WJ. A tumor cell growth inhibitor from *Polygonum hypoleucum* Ohwi. *Life Sci.* 1997;61(23):2335-44.

87. Kuo YC, Tsai WJ, Meng HC, Chen WP, Yang LY, Lin CY. Immune responses in human mesangial cells regulated by emodin from polygonum hypoleucum ohwi. *Life Sci.* 2001 Feb 2;68(11):1271-86.
88. Kuo YC, Sun CM, Tsai WJ, Ou JC, Chen WP, Lin CY. Chinese herbs as modulators of human mesangial cell proliferation: Preliminary studies. *J Lab Clin Med.* 1998 Jul;132(1):76-85.
89. Kuo YC, Meng HC, Tsai WJ. Regulation of cell proliferation, inflammatory cytokine production and calcium mobilization in primary human T lymphocytes by emodin from polygonum hypoleucum ohwi. *Inflamm Res.* 2001 Feb;50(2):73-82.
90. Chen CH, Chang MY, Lin YS, Lin DG, Chen SW, Chao PM. A herbal extract with acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitory activity and its potential for treating metabolic syndrome. *Metabolism.* 2009 Jun 4.  
doi:10.1016/j.metabol.2009.04.012
91. 陳姘君. 高油飲食或糖水誘發代謝症候群之作用及機制探討. 中國醫藥大學營養所碩士論文. 2008.

92. Aguilera AA, Diaz GH, Barcelata ML, Guerrero OA, Ros RM. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor-alpha in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *J Nutr Biochem.* 2004 Jun;15(6):350-7.

93. Aguilera AA, Diaz GH, Barcelata ML, Guerrero OA, Ros RM. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor-alpha in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *J Nutr Biochem.* 2004 Jun;15(6):350-7.

94. Nieto-Vazquez I, Fernandez-Veledo S, de Alvaro C, Rondinone CM, Valverde AM, Lorenzo M. Protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient myocytes show increased insulin sensitivity and protection against tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance. *Diabetes.* 2007 Feb;56(2):404-13.

95. Klamann LD, Boss O, Peroni OD, Kim JK, Martino JL, Zabolotny JM, Moghal N, Lubkin M, Kim YB, et al. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. *Mol Cell Biol.* 2000 Aug;20(15):5479-89.

96. Taghibiglou C, Rashid-Kolvear F, Van Iderstine SC, Le-Tien H, Fantus IG, Lewis GF, Adeli K. Hepatic very low density lipoprotein-ApoB overproduction is associated with attenuated hepatic insulin signaling and overexpression of

- protein-tyrosine phosphatase 1B in a fructose-fed hamster model of insulin resistance. *J Biol Chem.* 2002 Jan 4;277(1):793-803.
97. Kaszubska W, Falls HD, Schaefer VG, Haasch D, Frost L, Hessler P, Kroeger PE, White DW, Jirousek MR, Trevillyan JM. Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line. *Mol Cell Endocrinol.* 2002 Sep 30;195(1-2):109-18.
98. Lund IK, Hansen JA, Andersen HS, Moller NP, Billestrup N. Mechanism of protein tyrosine phosphatase 1B-mediated inhibition of leptin signalling. *J Mol Endocrinol.* 2005 Apr;34(2):339-51.
99. Zabolotny JM, Bence-Hanulec KK, Stricker-Krongrad A, Haj F, Wang Y, Minokoshi Y, Kim YB, Elmquist JK, Tartaglia LA, et al. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. *Dev Cell.* 2002 Apr;2(4):489-95.
100. Garg A. Adipose tissue dysfunction in obesity and lipodystrophy. *Clin Cornerstone.* 2006;8 Suppl 4:S7-S13.
101. Kieffer TJ, Habener JF. The adipoinsular axis: Effects of leptin on pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000 Jan;278(1):E1-E14.

102. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jun;89(6):2548-56.
103. Faraj M, Lu HL, Cianflone K. Diabetes, lipids, and adipocyte secretagogues. *Biochem Cell Biol.* 2004 Feb;82(1):170-90.
104. Peraldi P, Hotamisligil GS, Buurman WA, White MF, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J Biol Chem.* 1996 May 31;271(22):13018-22.
105. Kelley DE, Goodpaster B, Wing RR, Simoneau JA. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol.* 1999 Dec;277(6 Pt 1):E1130-41.
106. Kelley DE, Goodpaster BH, Storlien L. Muscle triglyceride and insulin resistance. *Annu Rev Nutr.* 2002;22:325-46.
107. Turinsky J, O'Sullivan DM, Bayly BP. 1,2-diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo. *J Biol Chem.* 1990 Oct 5;265(28):16880-5.

108. 張美瑜. 建立調節脂肪酸代謝機能成分之篩選平台並應用於抗代謝症候群.

中國醫藥大學營養所碩士論文. 2007.

109. Considine RV. Human leptin: An adipocyte hormone with weight-regulatory and endocrine functions. *Semin Vasc Med.* 2005

Feb;5(1):15-24.

110. Fan X, Ding Y, Brown S, Zhou L, Shaw M, Vella MC, Cheng H, McNay EC,

Sherwin RS, McCrimmon RJ. Hypothalamic AMP-activated protein kinase activation with AICAR amplifies counterregulatory responses to hypoglycemia

in a rodent model of type 1 diabetes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*

2009 Jun;296(6):R1702-8.

