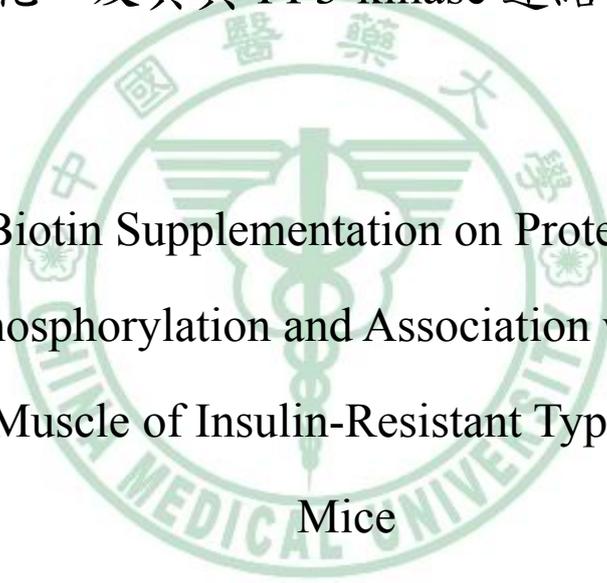


中國醫藥大學營養學系碩士班

碩士論文

補充生物素對產生胰島素阻抗性的第 2 型糖尿病 KK
小鼠骨骼肌中 IRS-1、IRS-2 的蛋白質表現與酪胺酸磷
酸化，及其與 PI 3-kinase 連結的影響

Effect of Biotin Supplementation on Protein Expression,
Tyrosine Phosphorylation and Association with PI 3-kinase
in Skeletal Muscle of Insulin-Resistant Type 2 Diabetic KK
Mice



指導教授：張毓芬 博士 (Yu-Feng Chang, Ph. D.)

研究生：呂蘭英 (Lan-Ying Lu) 撰

中華民國九十五年七月

July, 2006

目錄

目錄.....	I
圖次.....	V
表次.....	VII
縮寫表.....	IX
中文摘要.....	X
英文摘要.....	X III
第一章、緒言.....	1
第二章、文獻整理.....	3
壹、糖尿病.....	3
一、糖尿病.....	3
二、糖尿病的分類.....	4
三、糖尿病的診斷標準.....	6
四、第 2 型糖尿病與胰島素阻抗性.....	9
貳、胰島素訊息傳導.....	11
一、簡介胰島素.....	11
二、胰島素訊息傳遞路徑.....	12
三、PI 3-kinase pathway 的胰島素訊息傳遞路徑.....	16

四、胰島素訊息傳導與胰島素阻抗性的關係.....	24
參、簡介生物素.....	26
一、生物素.....	26
二、生物素對於代謝的影響.....	31
三、生物素對於葡萄糖代謝於基因層面的影響.....	33
四、生物素對於糖尿病模式之葡萄糖代謝的影響.....	35
肆、本研究室先前的結果.....	38
一、補充生物素對調控血糖的影響.....	38
二、生物素對骨骼肌中 GLUT4 蛋白質表現及位移的影響....	44
第三章、研究目的.....	47
第四章、材料與方法.....	48
壹、試驗動物與飼養條件.....	48
一、試驗動物模式.....	48
二、飼料與墊料.....	50
三、飼料成分.....	50
四、飼養環境條件.....	52
五、生物素的補充.....	52
貳、試驗設計與分組.....	53

參、試驗流程.....	55
肆、測試項目.....	56
一、空腹血糖值之測定.....	56
二、腹腔葡萄糖耐受性試驗.....	56
三、血清胰島素濃度.....	57
四、胰島素阻抗性.....	57
五、骨骼肌中總 IRS-1、IRS-2；IRS-1、IRS-2 酪胺酸磷酸化 形式及與其相連結的 PI 3-kinase 之蛋白質表現 量.....	58
伍、統計分析.....	72
第五章、結果.....	73
補充生物素對於骨骼肌中胰島素訊息傳遞上游路徑蛋白質表 現的影響.....	73
一、總 IRS-1 蛋白質表現量.....	73
二、總 IRS-2 蛋白質表現量.....	75
三、IRS-1 酪胺酸磷酸化型式的蛋白質表現量.....	77
四、IRS-2 酪胺酸磷酸化型式的蛋白質表現量.....	79
五、與 IRS-1 相連結的 PI 3-kinase 蛋白質表現量.....	81

六、與 IRS-2 相連結的 PI 3-kinase 蛋白質表現量.....	83
第六章、討論.....	85
壹、補充生物素對於空腹血糖、葡萄糖耐受性及胰島素抵抗性的影響.....	85
貳、補充生物素對胰島素訊息傳遞上游路徑的影響.....	88
一、生物素對胰島素訊息傳遞路徑上游中 IRS-1、IRS-2 的影響.....	88
二、生物素對胰島素訊息傳遞路徑中與 IRS-1、IRS-2 相連結的 PI 3-kinase 之影響.....	92
第七章、結論.....	94
第八章、參考文獻.....	96

圖次

圖 2-1、胰島素訊息傳遞路徑.....	15
圖 2-2、胰島素訊息傳遞中 IRS-1 主要參與途徑.....	20
圖 2-3、PI 3-kinase 調節 GLUT 4 囊泡的外釋作用.....	23
圖 2-4、哺乳類動物體內生物素循環.....	27
圖 2-5、生物素的結構.....	28
圖 3-1、本研究試驗流程圖.....	45
圖 5-1、三組不同劑量的生物素補充 4 週後其基礎狀態或胰島素刺激下， 骨骼肌中總 IRS-1 蛋白質表現量。A：西方墨點法的結果。B： 以 Alpha Innotech Coraration ChemiImager™ 440 進行定量的結 果.....	74
圖 5-2、三組不同劑量的生物素補充 4 週後其基礎狀態或胰島素刺激下， 骨骼肌中總 IRS-2 蛋白質表現量。A：西方墨點法的結果。B： 以 Alpha Innotech Coraration ChemiImager™ 440 進行定量的結 果.....	76

圖 5-3、三組不同劑量的生物素補充 4 週後其基礎狀態或胰島素刺激下， 骨骼肌中 IRS-1 酪胺酸磷酸化型式蛋白質表現量。A：西方墨 點法的結果。B：以 Alpha Innotech Coraration ChemiImager™440 進行定量的結果.....	78
圖 5-4、三組不同劑量的生物素補充 4 週後其基礎狀態或胰島素刺激下， 骨骼肌中 IRS-2 酪胺酸磷酸化型式蛋白質表現量。A：西方墨 點法的結果。B：以 Alpha Innotech Coraration ChemiImager™440 進行定量的結果.....	80
圖 5-5、三組不同劑量的生物素補充 4 週後其基礎狀態或胰島素刺激下， 骨骼肌中與 IRS-1 連結的 PI 3-kinase 蛋白質表現量。A：西方 墨點法的結果。B：以 Alpha Innotech Coraration ChemiImager™ 440 進行定量的結果.....	82
圖 5-5、三組不同劑量的生物素補充 4 週後其基礎狀態或胰島素刺激下， 骨骼肌中與 IRS-2 連結的 PI 3-kinase 蛋白質表現量。A：西方 墨點法的結果。B：以 Alpha Innotech Coraration ChemiImager™ 440 進行定量的結果.....	84
圖 7-1、生物素可能調節胰島素阻抗的機轉假說.....	95

表次

表 2-1、糖尿病的診斷方法.....	7
表 2-2、葡萄糖耐受程度分類.....	8
表 2-3、第 2 型糖尿病危險因子.....	9
表 2-4、三組不同劑量的生物素補充組在補充第 0、2、4 週後之空腹血 糖值.....	39
表 2-5、三組不同劑量的生物素補充組補充 4 週後之葡萄糖耐受性試驗 結果.....	41
表 2-6、三組不同劑量的生物素補充組在補充 0、2、4 週後之胰島素阻 抗性結果.....	43
表 2-7、三組不同劑量生物素補充組在補充 4 週後骨骼肌細胞漿膜 GLUT4 的蛋白質表現量.....	45
表 2-8、三組不同劑量生物素補充組在補充 4 週後骨骼肌細胞中 GLUT4 在漿膜部位的比例.....	46
表 4-1、高脂高熱量飼料成分.....	51
表 4-2、高脂高熱量飼料之卡路里與三大營養素之比例.....	51
表 4-3、本試驗的處理方式與分組.....	53
表 4-4、蛋白質標準品樣品製備.....	59

表 4-5、膠體電泳 (SDS PAGE) 下層膠和上層膠製備.....	64
表 4-6、10x Running Buffer 配製.....	65
表 4-7、4x Sample Buffer (SDS Reducing Buffer) 配製.....	65
表 4-8、1xTransfer buffer 配製.....	67
表 4-9、TBS 配製.....	67
表 4-11、Coomassie brilliant blue R-250 配製.....	71
表 4-12、Destaining solution (SDS-PAGE 去染劑) 配製.....	71
表 6-1、與 IRS-1 磷酸化相關的激酶及其對 IRS-1 且/或胰島素訊息傳遞 的影響.....	89



縮寫表

ADA : the American Diabetes Association
AI : adequate intakes
BSA : bovine serum albumin
DRIs : dietary reference intakes
ECLIA : electrochemiluminescence immunoassay
FFA : free fatty acid
GDM : gestational diabetes
GLUT4 : glucose transporter 4
Grb2 : growth factor bound-2
GTT : glucose tolerance test
HCS : holocarboxylase synthetase
HOMA : homeostasis model assessment
IGT : impaired glucose tolerance
IR : insulin receptor
IRS : insulin receptor substrate
IRS-1 : insulin receptor substrate-1
IRS-2 : insulin receptor substrate-2
IRS-3 : insulin receptor substrate-3
IRS-4 : insulin receptor substrate-4
OGTT : oral glucose tolerance test
TBS : tris-base buffer saline
PBST : phosphate buffer saline-Tween 20
PDK : phosphoinositide-dependent kinase
PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase
PKC : protein kinase C
PTB : phosphotyrosine binding
PTPase : protein tyrosine phosphatase
RTKs : receptor tyrosine kinases
SDS : sodium dodecyl sulfate
SH2 : src-homology 2
Tris : Tris (hydroxymethyl) –aminomethane
TEMED : N,N,N',N''-Tetramethylene diamine

中文摘要

本研究室先前的研究發現，長期給予第 2 型糖尿病 KK 小鼠補充生物素可改善空腹血糖、葡萄糖耐受異常和胰島素阻抗性，並且可顯著增加骨骼肌細胞中中葡萄糖轉運蛋白 4(GLUT4)的表現量和位移情形。胰島素阻抗性主要發生在骨骼肌，近年有很多研究在探討胰島素訊息傳導和胰島素阻抗性的關係。過去研究認為，初步胰島素訊息傳導的改變是構成胰島素阻抗的重要因素。所以本研究欲進一步探討補充生物素對改善骨骼肌中葡萄糖轉運是否經由影響胰島素傳導路徑中 IRS-1 (Insulin receptor substrate-1)、IRS-2(Insulin receptor substrate-2) 的蛋白質表現與酪胺酸磷酸化(tyrosine phosphorylation)，及其與 PI 3-kinase (Phosphatidylinositol 3-kinase) 連結的影響。第 2 型糖尿病雄性 KK 小鼠先以高脂飲食誘導糖尿病症狀後，分別給予不同劑量的生物素補充(生理水、3mg 或 6 mg 生物素/Kg of body wt/day)，為期四週。補充期結束時，胰島素誘導組在犧牲前 30 分鐘給予腹膜內注射 4U/100g regular insulin。犧牲後取得骨骼肌樣品，以免疫沉澱法和免疫墨點法分析 IRS-1，2、IRS-1，2 tyrosine phosphorylation 及與 IRS 連結的 PI 3-kinase 蛋白質表現量。結果

顯示，在沒有胰島素的刺激下，3mg 和 6mg 的生物素組，骨骼肌中 IRS-1 與 IRS-2 的蛋白質總表現量均顯著高於生理水組，但 IRS-1 的總蛋白質表現量 3mg 和 6mg 組之間沒有顯著差異，IRS-2 則以 6mg 組顯著高於 3mg 組；而有胰島素刺激下，IRS-1 與 IRS-2 的總蛋白質表現以 6mg 組最高，3mg 組次之，生理水組最低，其中只有 6mg 組在有或無胰島素情況之間有顯著性差異。在沒有胰島素刺激的情況下(即為基礎狀態下)，生理水組的 IRS-1 酪胺酸磷酸化型式的蛋白質和補充生物素 3mg 組和 6mg 組之間沒有顯著差異，但補充生物素 3mg 組比 6mg 組較高 ($p<0.05$)；然而在有胰島素的刺激之下，生理水組顯著低於補充生物素 3mg 及 6mg 組 ($p<0.05$)，但補充生物素 6mg 和 3mg 組之間沒有顯著差異。IRS-2 酪胺酸磷酸化型式的蛋白質表現量在沒有胰島素刺激的情況下為 6mg 組最高、3mg 組次之而生理水組最低 ($p<0.05$)；然而在有胰島素的刺激之下，其蛋白質表現量亦為補充生物素 6mg 組最高、3mg 組次之而生理水組最低($p<0.05$)。與 IRS-1 連結的 PI 3-kinase 之蛋白質表現，在有或沒有胰島素刺激下，都是 6mg 組最高，3mg 組次之，生理水組最低，其中生理水組和 3mg 組在有或無胰島素情況之間有顯著性差異。與 IRS-2

連結的 PI 3-kinase 之蛋白質表現，在沒有胰島素的刺激下，6mg 組顯著高於生理水組但與 3mg 組沒有顯著差異；在有胰島素刺激下 6mg 組顯著高於生理水組。由本研究結果推論，補充生物素可經由增加骨骼肌細胞中 IRS-1 與 IRS-2 的蛋白質表現量及與 IRS-1、IRS-2 連結的 PI 3-kinase 蛋白質表現量，而改善了骨骼肌細胞對葡萄糖的利用。

關鍵字：生物素、IRS-1 (Insulin receptor substrate-1)、IRS-2 (Insulin receptor substrate-2)、PI 3-kinase (Phosphatidylinositol 3-kinase)



Abstract

Our previous study has demonstrated that biotin supplement action may improve impaired fasting glucose and insulin resistance in type 2 diabetes KK mice and may increase GLUT4 protein expression and translocation in skeletal muscle cells to investigate whether biotin supplementation may increase insulin receptor substrate-1 (IRS-1), insulin receptor substrate-2 (IRS-2), IRS-1 tyrosine phosphorylation, IRS-2 tyrosine phosphorylation and their association with phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) in skeletal muscle cells of type 2 diabetic syndromes and then were given 0 mg (control group), 3mg or 6mg biotin/kg of body wt per day 4 weeks. Before sacrificed, some mice were injected insulin for acute insulin stimulation study. The mice were sacrificed and skeletal muscles were isolated to analysis IRS-1, IRS-2 and IRS-1(or IRS-2) tyrosine phosphorylation, IRS-1(or IRS-2) associated PI 3-kinase protein expression by immunoprecipitation and/or immunoblotting.

There was a significant upregulation in basal or insulin-induced IRS-1, IRS-2, IRS-2 tyrosine phosphorylation and IRS-1-associated PI 3-kinase protein expression in both two biotin supplementation groups. Only 6mg biotin supplementation group has significant higher IRS-2-associated PI 3-kinase protein expression than control group. These data support the hypothesis that biotin supplementations enhance basal and insulin induced protein expressions of IRS-1, IRS-2, IRS-1 tyrosine phosphorylation, IRS-2 tyrosine phosphorylation and their association with PI 3-kinase in skeletal muscle.

Keywords: biotin, IRS-1, IRS-2, IRS-1 tyrosine phosphorylation, IRS-2 tyrosine phosphorylation PI 3-kinase



第一章 緒言

由於醫藥的發達，公共衛生亦受到重視，傳染性疾病已逐漸的減少，但相對的長期慢性病，如心血管疾病、癌症和糖尿病卻急速增加。對現代人而言，糖尿病為常見的文明病，由於外食頻率增加與飲食的精緻化，再加上缺乏運動，使得罹患糖尿病的危險率大幅增加 (Ledwing et al., 2002)。全球糖尿病的人數逐年遞增，根據民國 93 年行政院衛生署所公佈的十大死因，糖尿病已高居第 4 位，且第 2 型糖尿病患者約佔總糖尿病人數的 90-95%。因此，我們需正視其嚴重性，並尋求解決的方法。

在許多第 2 型糖尿病的患者或動物模式中發現，其血清生物素的濃度低於健康者 (Maebashi et al., 1993)，並且由許多活體及體外試驗發現，生物素會影響和調控葡萄糖的代謝與利用 (Cristina, 2005)。所以近年來已有許多研究證實，給予生物素可改善糖尿病患者其空腹血糖質與葡萄糖耐受性 (Koustikos et al., 1966; Coggeshall et al., 1985; Maebashi et al., 1993)。但國內尚缺乏研究探討生物素對於改善第 2 型糖尿病於分子層面的影響。

胰島素阻抗性為第 2 型糖尿病的主要特徵，而導致胰島素阻抗性的原因為周邊組織（肌肉與脂肪組織）對正常濃度的胰島素反應能力下降（即敏感度下降），經長時間的累積而成。幾乎所有第 2 型糖尿病人都具有顯著的胰島素阻抗性（Delemarre, 2003）。

本研究室近年來致力於探討生物素對調節第 2 型糖尿病的作用機制，並發現補充生物素可改善第 2 型糖尿病患者與小鼠的空腹血糖、葡萄糖耐受性與胰島素阻抗性。也進一步發現，補充生物素可增加其葡萄糖轉運蛋白 4（GLUT4）於肌肉細胞的表現量及位移情形。因此，本研究將探討補充不同劑量的生物素是否對胰島素訊息傳遞上游路徑中一些相關蛋白質有影響。

第二章 文獻整理

壹、糖尿病

一、糖尿病

糖尿病是一種代謝方面的疾病，其會因缺乏胰島素的分泌、胰島素的作用力或是兩者皆缺乏的情況下，而產生高糖血症。慢性高糖血症會造成細胞長期的損害、功能喪失和多種器官的衰退，特別是眼睛、腎臟、神經、心臟和血管。

高糖血症所表現的特徵包括多尿、劇渴、體重減輕、有時會食慾過盛和視力模糊。慢性高糖血症會伴隨生長受損，對感染敏感等。對於沒有控制的高糖血症患者，急性期會有酮酸血症（ketoacidosis）或非酮性高滲透壓性症候群（nonketotic hyperosmolar syndrome）。

長期糖尿病的併發症包括：視網膜病變而可能導致失明；腎病變而導致腎衰竭；週邊神經病變而有雙足潰爛、切除的危險；自主神經病變會導致腸胃道、泌尿生殖、心血管和性功能失調。糖尿病患者，發生動脈粥狀硬化的心血管疾病、週邊動脈和腦血管疾病的機率會增加，並且，也常發現高血壓和血脂肪代謝異常的現象（American Diabetes Association, 2004）。

二、糖尿病的分類

依據美國 the American Dietetic Association (ADA) 的最新分類標準 (ADA, 2004)，糖尿病主要分為以下幾種類型：

(I) 第 1 型糖尿病： β 細胞的破壞，通常會有胰島素的缺乏。可能是因為免疫或是自發性的疾病。

(II) 第 2 型糖尿病：大多因為胰島素阻抗性 (Insulin resistance)，通常發病為成人、肥胖者。

(III) 其他特殊型：

(A) β 細胞的基因缺陷

(B) 胰島素作用的基因缺陷

(C) 胰臟外分泌的疾病

(D) 內分泌的疾病

(E) 化學或藥物引起

(F) 感染

(G) 不常見的免疫調節的糖尿病

(H) 其他基因症狀偶發伴隨糖尿病發生

(IV) 妊娠糖尿病 (GDM)。

糖尿病在國內躍居國人十大死因第 4 位（行政院衛生署，2004），而且第 2 型糖尿病約佔總糖尿病人數的 90-95%以上。由於生活與飲食型態的改變，全球糖尿病患者已有逐年增加的趨勢，因此，我們需要正視其嚴重性並尋求解決的方法。



三、糖尿病的診斷標準

一般人的空腹血糖大約在 90mg/dl 左右，飯後血糖短暫上升，但很少超過 140mg/dl。糖尿病的診斷有以下兩種基準：一、任何時間血糖超過 200mg/dl 且有糖尿病多喝、多尿、體重下降等症狀並配合測量空腹血糖或口服葡萄糖耐量試驗 (OGTT)；二、空腹 8 小時以上血糖 ≥ 126 mg/dl，並於不同天次測得此結果兩次或兩次以上（見表 2-1）。

口服葡萄糖耐量試驗 (OGTT) 可用於配合檢測，但無法單獨當作指標，其為試驗後兩小時血糖 ≥ 200 mg/dl。所謂口服葡萄糖耐量試驗 (OGTT)，則為五分鐘內成人喝 250-300 毫升 75 公克葡萄糖溶液，兒童則每公斤體重 1.75 公克（最多 75 公克），檢驗空腹、30 分、60 分、90 分、120 鐘的血糖 (ADA, 2004)。

表 2-1、糖尿病的診斷標準 (ADA, 2004)

Table 2-1. Criteria for the diagnosis of diabetes mellitus

<p>一. 已出現糖尿病症狀—典型症狀包括：多尿、多喝、體重下降，同時任一時間點測得任意血漿葡萄糖濃度(Random plasma glucose) \geq 200 mg/dl (\geq 11.1 mmol/l)，並配合測量空腹血糖或口服葡萄糖耐量試驗作確認。</p>
<p>二. 空腹 8 小時以上血糖(Fasting plasma glucose) \geq 126 mg/dl (\geq 7.0 mmol/l)，並於異日測得此結果兩次或兩次以上(不同天次)。</p>

口服葡萄糖耐量試驗 (OGTT) 後二小時血糖 \geq 200 mg/dl (\geq 11.1 mmol/l) 的結果可搭配作確認(無法單獨當作指標)。

如果空腹血糖低於 126 mg/dl、高於 100 mg/l，則為空腹血糖異常 (IFG)；若口服耐糖試驗 (OGTT) 後兩小時血糖介於 140-199mg/dl，則為葡萄糖耐性異常 (impaired glucose tolerance, IGT) (見表 2-2)。若是有空腹血糖異常或葡萄糖耐性異常，可預測未來數年後會發展成糖尿病，需要積極改變生活方式 (如運動、不喝含糖飲料等) 來延緩發展成糖尿病。

表 2-2、葡萄糖耐受程度分類 (ADA, 2004)

Table 2-2. Classification of glucose tolerance

空腹血糖	口服葡萄糖耐量試驗 (OGTT) 後兩小時血糖
正常： < 100 mg/dl (<5.6 mmol/l)	正常： < 140 mg/dl (<7.8 mmol/l)
空腹血糖異常： ≥ 100 mg/dl (≥5.6 mmol/l) 並 <126 mg/dl (<7.0 mmol/l)	葡萄糖耐受異常： ≥ 140 mg/dl (≥7.8 mmol/l) 並 <200 mg/dl (<11.1 mmol/l)
糖尿病： ≥ 126 mg/dl (≥7.0 mmol/l)	糖尿病： ≥ 200 mg/dl (≥11.1 mmol/l)

四、第 2 型糖尿病與胰島素阻抗性

所有糖尿病中，第 2 型糖尿病約佔 90-95%，過去被稱為非胰島素依賴型的糖尿病（non-insulin-dependent diabetes）或成年型糖尿病（adult-onset diabetes）（ADA，1997），其所指的是個體有胰島素阻抗性（insulin resistance）並且常有相對性的胰島素缺乏。此種型態的糖尿病危險因子包括年紀大於 45 歲，體重過重或有糖尿病家族史等，所以盡量避免危險因子或許可避免第 2 型糖尿病的發生。第 2 型糖尿病的危險因子如下表（ADA, 2004）。

表2-3、第2型糖尿病危險因子（ADA, 2004）

Table 2-3. Risk factors for type 2 diabetes

Age ≥ 45 years
Overweight (BMI ≥ 25 kg/m ² *)
Family history of diabetes (i.e., parents or siblings with diabetes)
Habitual physical inactivity
Race/ethnicity (e.g., African-Americans, Hispanic-Americans, Native Americans, Asian-Americans, and Pacific Islanders)
Previously identified IFG or IGT
History of GDM or delivery of a baby weighing >9 lbs
Hypertension ($\geq 140/90$ mmHg in adults)
HDL cholesterol ≤ 35 mg/dl (0.90 mmol/l) and/or a triglyceride level ≥ 250 mg/dl (2.82 mmol/l)
Polycystic ovary syndrome
History of vascular disease

*May not be correct for all ethnic groups.

第 2 型糖尿病的主要特徵是肌肉和脂肪組織對於胰島素的敏感性下降，因而導致胰島素阻抗性（insulin resistance），經長時間累積，才會發展成糖尿病（Alzaid, 1996; Gerich, 1999; kitt and gerald, 2002; Balabolkin and Klebanova, 2003; Hellman, 2003）。幾乎所有的第 2 型糖尿病人都有明顯的胰島素阻抗性，且大多為肥胖者（Renders et al., 2003）。

當產生了胰島素阻抗性之後，對於葡萄糖的利用和代謝能力的下降（Schmitz-Peiffer, 1997），常使血中葡萄糖濃度高於正常的範圍，而此時會造成胰島素補償性的分泌。經長期累積，形成分泌系統的障礙，導致血中胰島素濃度偏高，而產生高胰島素血症（hyperinsulinemia）。然而骨骼肌（skeletal muscle）與脂肪組織（adipose tissue）是主要進行胰島素刺激葡萄糖利用的標的組織（Cortright et al., 2000）。因此，此兩種周邊組織對葡萄糖利用的能力是調控血糖的重要關鍵。

貳、胰島素訊息傳導 (Insulin signaling pathway)

一、簡介胰島素

胰臟含有三種不同型態的內分泌細胞，此三種細胞所分泌的物質對於體內醣類代謝具有高度的調控能力，而胰島素是由胰臟的蘭氏小島 β 細胞分泌， β 細胞所合成的胰島素，是目前已知最有效的同化激素，正常人每天可以分泌 20~25 單位的胰島素進入血液中，促進碳水化合物、脂肪和蛋白質的合成和貯存，並能進一步抑制其分解。胰島素除了可以調控醣類的代謝之外，還可以影響細胞的增殖、存活和基因的表現等。



二、胰島素訊息傳導路徑

血液循環中的胰島素，運送到標的組織（肌肉或是脂肪組織）與細胞膜上的胰島素接受器（insulin receptor, IR）結合，但是胰島素並沒有進入細胞中。胰島素接受器 insulin receptor（IR）是屬於 ligand-activated receptor tyrosine kinases（RTKs）家族的一員（LE et al., 2002），具有內在（intrinsic）酪胺酸激酶（tyrosine kinase）的活性。在結構上是由兩個在胞外的 α 次單位和兩個穿膜（transmembrane）的 β 次單位以雙硫鍵（disulfide bound）鍵結所構成（Kahn and White, 1988; Yarden and Ullrich, 1988; Van, 1994）。當胰島素此配子（ligand）接上胰島素接受器（IR）的 α 次單位後，會改變其構型，而刺激 β 次單位的內在酪胺酸激酶的活性，而導致 β 次單位上多個位置的自體磷酸化（tyrosine autophosphorylation）而成活化型式（Baron et al., 1990, 1992; Kaliman et al., 1992; Lebrun et al., 1993; Van, 1994）。目前已有許多研究顯示，IR 的酪胺酸激酶的活性與自體磷酸化對其生物活性與作用極為重要（Yarden and Ullrich, 1988; Van, 1994）。

當 IR 自體磷酸化而活化後，便會吸引其受質與之相連接，並有一些分子對接蛋白 (docking protein) 產生，因此造成一連串的信號傳遞 (Gregory et al., 2004)。並且藉由不同的受質相結合而產生不同下游的訊息傳遞途徑 (signaling pathway)。因此活化型的 IR，會吸引受質相連，並使其磷酸化，主要受質包含：

(1) IRS (insulin receptor substrate) 胰島素接受器受質：為一種親水性 (hydrophilic) 的蛋白質，其結構上為在胺基端 (amino terminus) 有保護作用的 pleckstrin homology (PH) domain，並且鄰接著 phosphotyrosine binding (PTB) domain (Sun et al., 1991; Dhe-Paganon et al., 1999; Klaus et al., 2004;)。在哺乳類動物體內發現 4 種以上 IRSs family 成員，較普遍的為 IRS-1、IRS-2、IRS-3 及 IRS-4 (Tatsup et al., 2003)。

(2) Shc (Src homology collagen): Shc 有三種，其中分子量各為 46KDa、52KDa 及 66KDa。他們皆由 NH₂ 端的 PTB domain、中段與膠原蛋白 (collagen) 的 $\alpha 1$ chain 相似且富含甘胺酸 (glycine) / 脯胺酸 (proline) 的區域、以及 COOH 端的 SH2 domain 所組成。

(3) APS [adaptor protein with a PH (pleckstrin homology) and SH2 (Src

homology 2) domain]：為一些小的承接蛋白 (adaptor protein)，並且其結構含 PH、SH2 domain (Marchand-Brustel et al., 2003)。

這些蛋白質磷酸化後，便可連接下游的效應分子 (effector molecules)，而活化不同的下游路徑 (Marchand-Brustel et al., 2003)。

在胰島素的刺激下，胰島素接受器會和不同的受質相連接，而引發三種不同的活化路徑，包括 (1) RAS/MAP kinase Pathway：藉由活化其他蛋白質，包括：RAS、MAP kinase 等，進而增加某些醣類代謝酵素的基因轉錄或細胞的生長；(2) T10 Pathway：根據研究指出，此路徑可促使葡萄糖的轉運。(3) PI 3-kinase Pathway：胰島素刺激葡萄糖轉運和肝醣合成的作用路徑，起始是藉由胰島素與胰島素接受器 (IR) 的結合，促使 IR 的 tyrosine residue 行自體磷酸化而後被活化，活化的 IR 再與胰島素接受器受質 (IRSs) 結合，使 IRSs 的 tyrosine residue 被磷酸化而後活化。活化的 IRS 使 PI 3-kinase 磷酸化後，PI 3-kinase 進而刺激細胞中包裹葡萄糖轉運蛋白 4 (GLUT4) 的小囊 (visicle) 迅速位移至細胞膜上，瞬間增加細胞對葡萄糖的汲取與利用 (White and Yenush, 1998; Withers and White, 2000)。所以 PI 3-kinase Pathway 為胰島素對血糖調節的主要路徑。

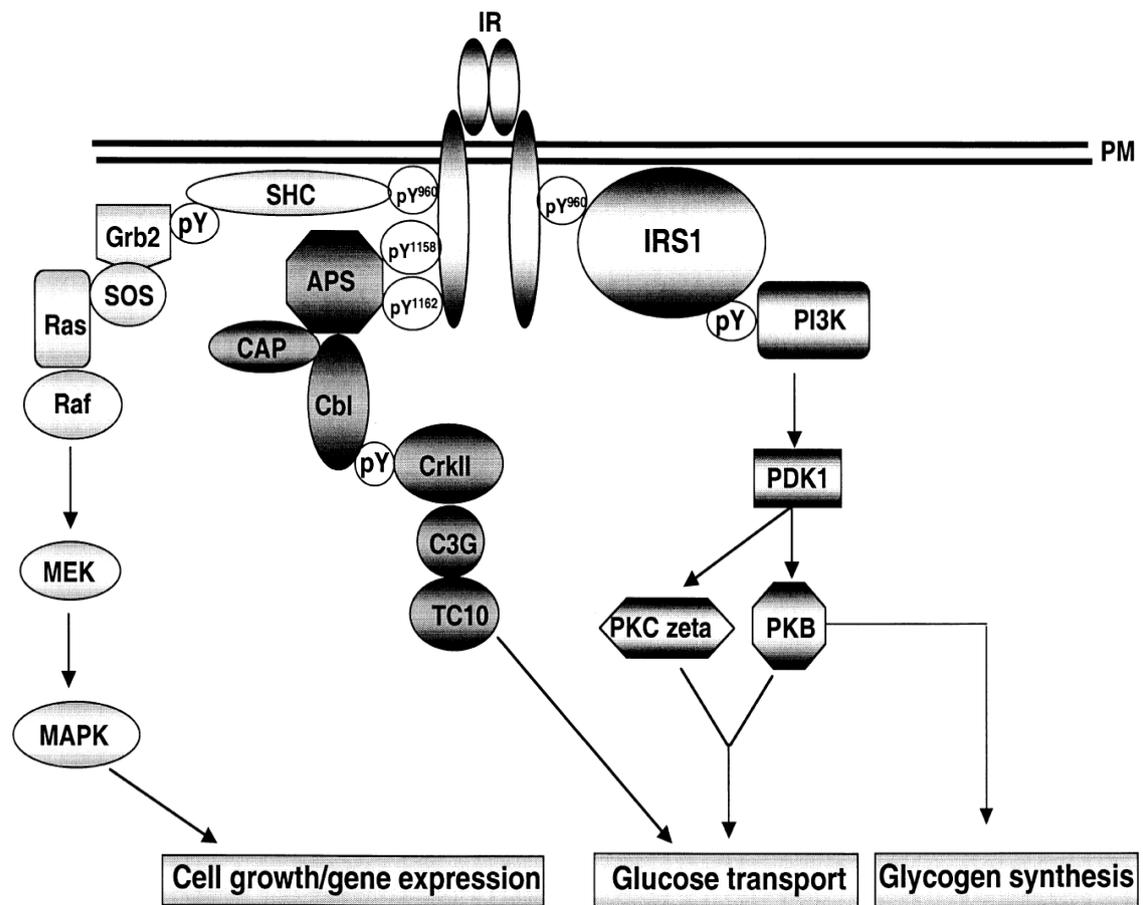


圖 2-1、胰島素訊息傳遞路徑 (Marchand-Brustel et al., 2003)

Fig 2-1. Insulin signalling pathway

三、PI 3-kinase pathway 的胰島素訊息傳遞路徑

許多研究顯示，PI 3-Kinase pathway 可調節醣類代謝和細胞生長與基因表現等，並發現當其過度反應時和癌症是相關的，但當其有缺陷時，則和第 2 型糖尿病相關，於是此途徑被認為可能可提供糖尿病介入治療的新方法 (Lewis, 2002)。以下介紹此路徑中一些相關蛋白質。

A、IRS proteins 胰島素接受器受質

IRS proteins 廣泛存在於體內，目前已被發現主要的異構型為 IRS-1~4。IRS-1，主要分布於脂肪和骨骼肌細胞中；IRS-2 亦廣泛分布於體內，但主要分布於骨骼肌和肝臟；IRS-3 的 mRNA 被發現表現於脂肪組織、肝臟、肺臟、卵巢、心臟等器官；IRS-4 的 mRNA 很微量，表現在腦下垂體、胸腺、纖維母細胞等 (Lavan et al., 1997; Giorgio et al., 2001)。

在 PI 3-kinase pathway 中，首先，在胰島素的刺激下，因 IR 的活化而使 IRS protein 的酪胺酸殘基 (tyrosine residues) 磷酸化，進而吸引

許多包含 SH2 domain protein (Src-homology 2 domain protein) 與之相連接，包括 PI 3-kinase (phosphatidylinositol 3-kinase)、Grb2 (growth factor bound-2) (Holgado et al., 1996)、SHPTP2、Nck 等，進一步促進了葡萄糖汲取與肝糖的合成。由於 IRS-1 與 IRS-2 皆存於骨骼肌細胞內，並且骨骼肌為胰島素作用的主要組織 (DeFronzo et al., 1981; James et al., 1986)，所以 IRS-1 與 IRS-2 被認為在骨骼肌細胞中的胰島素訊息傳遞扮演重要的角色 (Takehide et al., 1997)。

許多研究指出，酪胺酸磷酸化 (tyrosine phosphorylation) 型式的 IRS-1 與 IRS-2 蛋白質表現量及與其相連結的 PI 3-kinase 活性下降，可被用來證明胰島素阻抗的發生與否 (Soll et al., 1975; Saad et al., 1992, 1993; Buren et al., 2002)。

有研究發現，在缺乏 Grb 14 的雄性小鼠和野生型相比，可改善葡萄糖的恆定以及葡萄糖的汲取，並發現在缺乏 Grb 14 的雄性小鼠肝臟中，酪胺酸磷酸化型式的 IRS-1 及與其相連結的 PI 3-kinase 蛋白質表現量有顯著的上升，在骨骼肌中，亦發現 IRS-1 酪胺酸磷酸化型式的蛋白質表現量顯著增加。於是作者推測缺乏 Grb 14 的雄性小鼠可增加葡萄糖的汲取，是因為增加了酪胺酸磷酸化型式的 IRS-1 表現量而造成的 (Gregory

et al., 2004)。

在人體試驗中，服用 Metformin 與 Rosiglitazone 此兩種糖尿病藥物，將影響第 2 型糖尿病病人的葡萄糖汲取並檢測胰島素訊息傳遞中 IRS-1 酪胺酸磷酸化型式的蛋白質及與 IRS-1 連結的 PI 3-kinase 活性與 Akt Ser⁴⁷³ 的磷酸化，以了解更多糖尿病藥物的作用機制(Hakan et al., 2005)。

此外，許多體外及活體試驗證明，IRS-1 其多處的 serine/threonine phosphorylation 將抑制 tyrosine phosphorylation，進而阻斷胰島素訊息的傳遞 (Kellerer et al., 1998; Liu et al., 2001; Qiao et al., 1999; Ravichandran et al., 2001)。因此許多研究探討 IRS-1 多處的 serine phosphorylation 是否會影響胰島素阻抗的發生。Klaus 等人 (2004) 發現，protein kinase C- ζ 將誘使 IRS-1 serine³¹⁸ phosphorylation 而減弱了 IRS-1 的 tyrosine phosphorylation，及影響 IR 與 IRS-1 之間的連結。Guilherme 等人則於 2004 年，以手術方式使 Wistar 大鼠出現敗血症的症狀，之後每 6 小時給予一次 42mg/kg 的水楊酸或生理食鹽水，持續 2 天，結果發現，給予水楊酸組，其肌肉與脂肪組織 IRS-1 的 serine³⁰⁷ phosphorylation 有下降的現象，並且 IR、IRS-1、IRS-1 酪胺酸磷酸化型式的蛋白質及與 IRS-1

相連結的 PI 3-kinase 和生理水組相比，蛋白質表現量有恢復的現象，因此推測，若給予阿斯匹靈（水楊酸）治療敗血症病患，可能可以改善由敗血症誘導的胰島素阻抗性（Guilherme et al., 2004）。



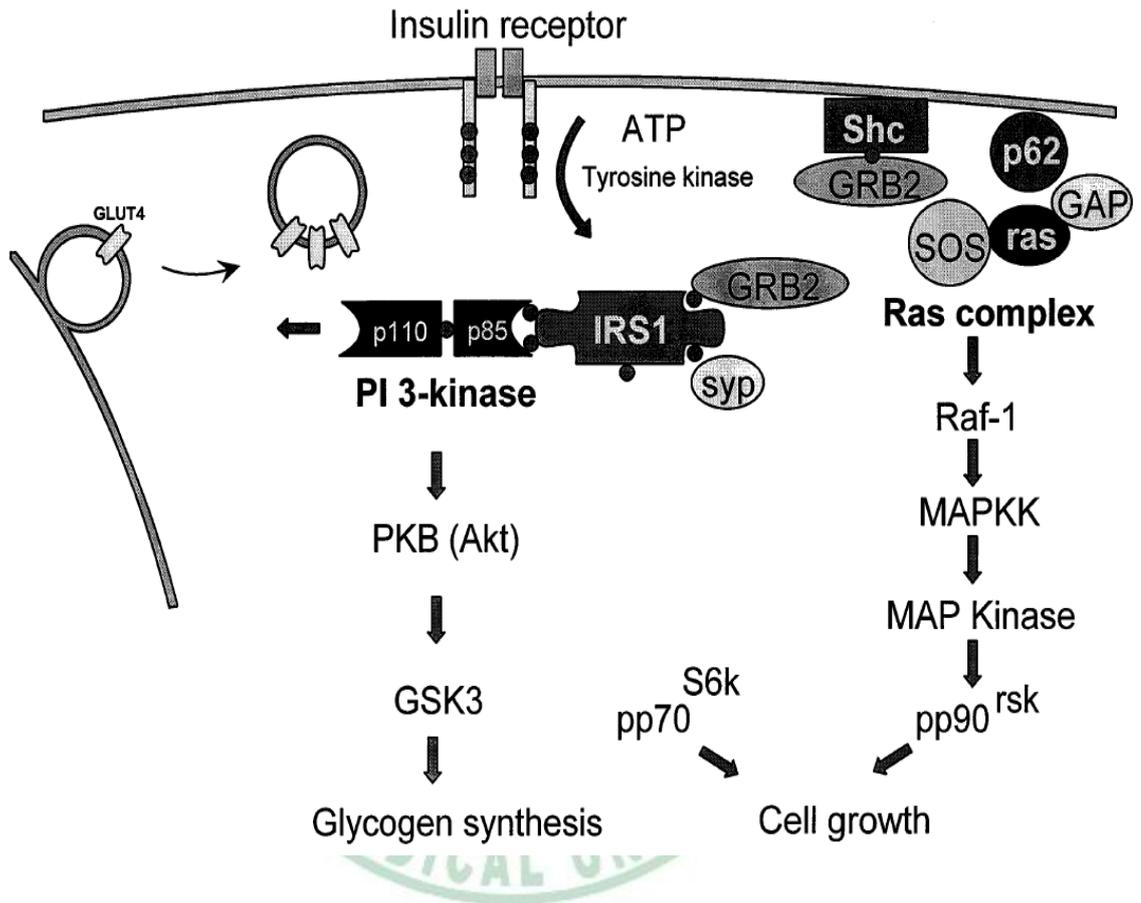


圖2-2、胰島素訊息傳遞中IRS-1主要參與途徑(Holman and Kasuga, 1997)

B、PI 3-kinase (phosphatidylinositol 3-kinase)

受胰島素刺激而活化的 PI 3-kinase 與葡萄糖的轉運、接受體的內吞 (endocytosis) 及胞飲作用 (pinocytosis)、基因的表達和細胞的增殖有關 (Cheatham, 1994; Jhun, 1994; Joly, 1994; Kotani, 1995)。PI 3-kinase 為一個 heterodimer，其結構上由一個 85-kDa 的調節次單位 (p85) 與一個 110-kDa 催化次單位 (p110) 所組成，兩個次單位間由 SH2 (Src-homology 2) 與 iSH2 (inter-SH2 domain) 連結。而 p85 次單位亦以 SH2 domain 與上游酪胺酸磷酸化型式的 IRS 相連結 (Stuart et al., 1996)，而使胰島素訊息傳遞下去。

PI 3-kinase 的作用是將細胞膜上的 inositides 磷酸化導致 phosphoinositide-dependent kinase (PDK) 的活化，而 PDKs 又會去刺激多種的絲胺酸/蘇胺酸激酶 (serine-threonine kinases)，包括了 p70^{s6k}、Akt (或 PKB) 及兩個 PKC isoform，PKC_ξ 和 PKC_λ (Bandyopadhyay, 1997; Calera, 1998; Cong, 1997; Kotani, 1998)。此外，PI 3-kinase 也會與 p21^{ras}、Rac 和 Rab4 等 GTP-binding protein 結合並刺激他們的活性。p21^{ras}、Rac

和 Rab4 與細胞生長、調控肌動蛋白 (actin) 的結構及細胞內泡囊的運送有關 (Cheatham and Cormont, 1995; Cormont et al., 1996; Tolias et al., 1995)。

目前已知 PI 3-kinase 的活化對葡萄糖轉運蛋白 4 (GLUT4) 的位移是必需的 (Czech and Corvera, 1999; Calera et al., 1998)，GLUT4 位移到細胞膜，便可增加汲取葡萄糖入細胞內的速度，進而調節血糖。Stuart 等人 (1996) 發現，在脂肪細胞中，PI 3-kinase 的活化若充足便可調節 GLUT4 的移位，若在細胞中加入 PI 3-kinase 的抑制劑 wortmannin，會顯著降低 GLUT4 從細胞質位移到漿膜。但此兩者間的詳細機制仍未完全清楚，之前有研究推論可能是藉由活化下游的 Akt/protein kinase B 和 PKC ζ/λ ，而促使含有 GLUT4 的小囊可以位移至細胞膜 (Kohn et al., 1996; Malepillil et al., 2005)。

另一方面，也有研究指出，PI 3-kinase 可促進含 GLUT4 的小囊與其他蛋白的對接 (docking) 和融合 (fusion)，因而促使含 GLUT4 小囊的外釋作用，使其位移到細胞膜並融合釋出，進而調節細胞葡萄糖的汲取 (Holman and Kasuga, 1997)。

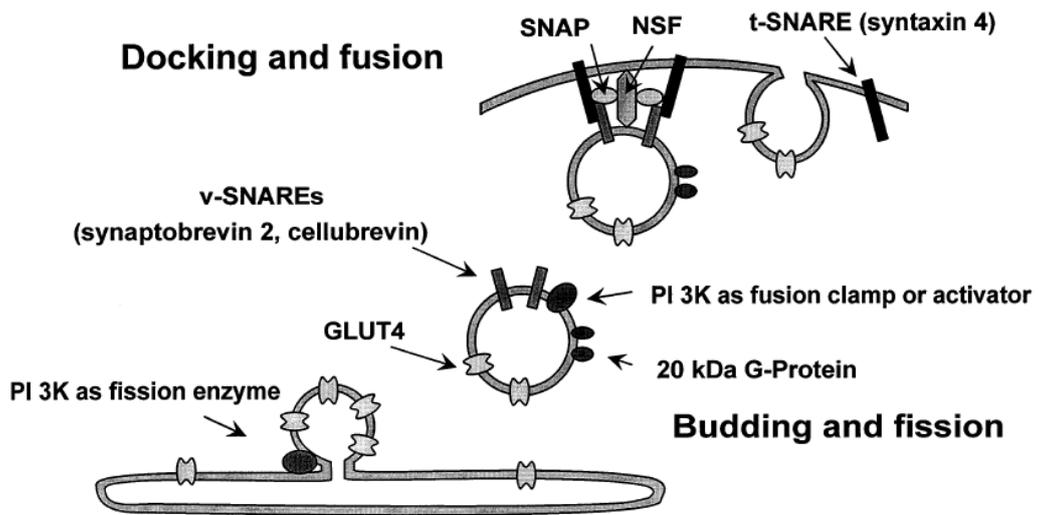


圖 2-3、PI 3-kinase 調節 GLUT4 囊泡的外釋作用 (Holman and Kasuga, 1997)

Fig.2-3. Regulation of GLUT4 vesicle exocytosis by PI 3-kinase.

四、胰島素訊息傳導與胰島素阻抗的關係

近年有很多研究在探討胰島素訊息傳導和胰島素阻抗性的關係。過去研究認為，初步胰島素訊息傳導的改變是很多胰島素阻抗情形的重要構成因素 (Fernanda et al., 2001)。胰島素阻抗是第 2 型糖尿病主要的特徵。而胰島素阻抗發生的原因，是由於周邊標的組織（尤其為肌肉組織），在正常的胰島素濃度下，對胰島素產生適當反應的能力降低所導致的。近來的研究利用核磁共振光譜學的技術，發現肌肉細胞內葡萄糖轉運的缺陷，將成為胰島素調節葡萄糖汲取到肌肉的速率控制步驟。這些葡萄糖運送活性的改變，可能是肌肉細胞內脂肪酸代謝不良所造成的結果。脂肪酸藉由活化絲胺酸激酶的連續效應 (serine kinase cascade) 而導致胰島素刺激的胰島素接受器受質 (IRS-1) 其酪胺酸的磷酸化減少，同時使與 IRS-1 相連結的 PI 3-kinase 活性下降，然而這些步驟均為胰島素刺激葡萄糖運送到肌肉的必要步驟。

正常的情況下，胰島素結合到標的組織細胞的胰島素接受器後，在細胞內會引發一連串事件，來促進細胞內葡萄糖運送及代謝 (Braunwald

et al., 2001; Morris et al., 1994)。在正常的胰島素濃度下，如果周邊標的組織對胰島素沒有適當反應的能力，會形成稱為胰島素阻抗。而為了維持正常的血糖範圍，胰臟藉由增加胰島素分泌的量來造成補償作用。這種補償作用持續一段時間之後，會減少葡萄糖耐受性，發展出高胰島素血液濃度而導致胰島素阻抗增加，最後導致胰臟 β 細胞衰弱而減少了胰島素的分泌。臨床上的第2型糖尿病、胰島素阻抗和 β 細胞功能減少，經常同時存在發生（Braunwald et al., 2001; DeFronzo et al., 1992）。

已有研究指出，胰島素刺激下，胰島素傳遞路經中 IR 以下的蛋白質表現量，可用於暗示胰島素阻抗的發生（Fernanda et al., 2001）。胰島素的訊息傳遞機制非常複雜，機轉中只要有一處出了問題，就會使整個胰島素的訊息傳遞中斷或是減弱。因此若能使訊號繼續傳遞或恢復已減弱的胰島素傳遞訊號，或許可改善胰島素阻抗性而改善血糖的調控。

參、生物素

一、簡介生物素

生物素，為一種水溶性的維生素，對活體而言為一必須的營養素，因為其為羧化反應（carboxylation）和去羧反應（decarboxylation）中酵素的輔因子（Diana et al., 2002; Alfonso, 2005）。經過演化後，真核生物的器官已失去合成生物素的能力，所以需要透過飲食來達身體對此種維生素的需求，但由於自然界中生物素的含量是很微量的，為了補救這個問題，哺乳動物體內發展出一複雜的機制即為 biotin cycle，使生物素達最有效的利用（Diana et al., 2002; Alfonso, 2005）。

biotin cycle：主要由 3 種不同的蛋白質所表現。

(1) 在肝細胞中，biotin cycle 第一個蛋白質為 sodium-dependent multivitamin transporter，其負責運輸生物素穿過細胞膜。

(2) 第二步驟由 holocarboxylase synthetase (HCS) 所催化，其負責將 biotin 轉換成 biotinyl-5'-ATP (B-AMP)。

(3) 最後由 biotinidase 負責將 biotin 由 biocytin (biotin-lysine) 或 biotinylated peptide 釋出 (Wolf, 2001; Pacheco et al., 2002; Stanley et al., 2002; Baur et al., 2002)。

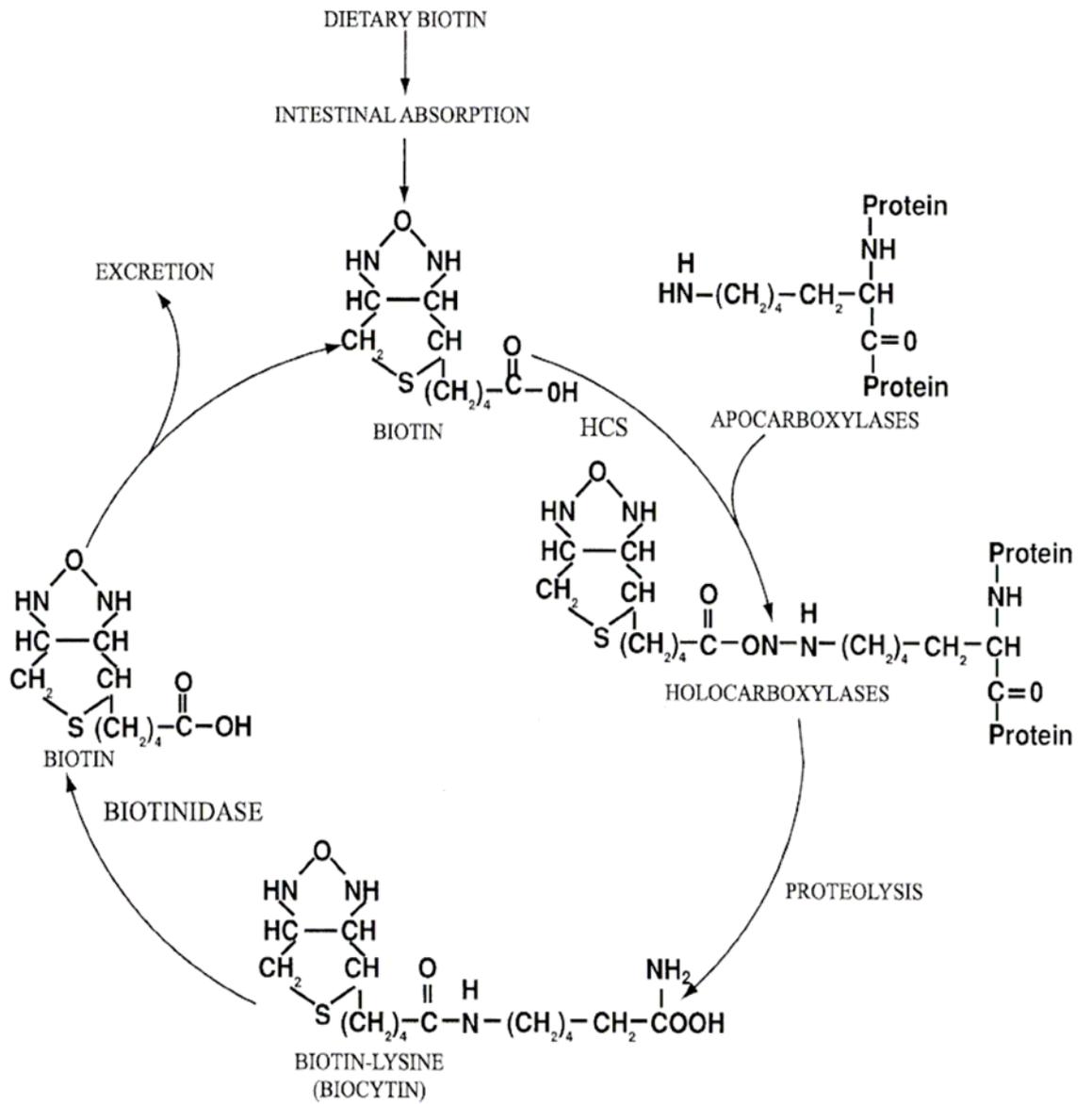


圖 2-4、哺乳類動物體內生物素循環 (Diana et al., 2002)

Fig 2-4. Biotin cycle in mammals.

生物素的化學式為 $C_{10}H_{16}O_3N_2S$ ，生物素的化學結構於 1940 年代由 Kogl 及 du Vigneaud 同時訂出，結構中含有三個不對稱碳原子，因此有八種光學異構物，其中只有 d (+) -biotin 存在自然界中，而且具有生理活性。由飲食中攝取的生物素形式是與蛋白質結合的 biocytin (inactive form)，其為 biotin 和 lysine 所結合的型式，部分 biocytin 可直接被吸收，再經體內組織的 biotinidase 分解釋出生物素。小腸吸收主要部位在近端-十二指腸及空腸，吸收模式主要靠細胞膜上傳輸蛋白轉運，高濃度時則部分以被動擴散方式吸收。目前對生物素的生物可利用率 (bioavailability) 了解不多，不過穀物中的生物素利用率似較差。腸道中大腸菌落合成的生物素被吸收的量非常有限，對人體的攝取貢獻不大。

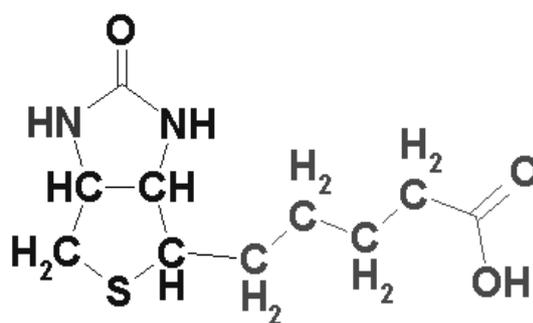


圖 2-5、生物素的結構

Fig 2-5. The structure of biotin.

在生物素的生物利用率(bioavailability)方面,1993年 Frigg 等人(Frigg et al., 1993)以12隻一歲大的小牛每日補充20 mg 生物素,為期4個月後,發現其平均生物可利用率為48%。但在1997年有學者指出,由於生物體內消化系統或腸內微生物菌叢的不同,以動物模式觀察愛人體中生物素的生物可利用率是較不準確的。而後在1999年的人體試驗,6位健康受試者每天隨機口服0.5 mg、2 mg、20 mg 或靜脈注射5 mg 的d-生物素補充劑量,發現即使給予劑量很高,生物素的生物可利用率仍可達100%(Janos and Donald, 1999)。雖然之前有研究指出生物素的生物可利用率約為24-58%(Bitsch et al., 1989; Clevidence et al., 1988),但作者認為若能將高劑量的生物素分次攝取,即可提高生物可利用率(Janos and Donald, 1999)。

在生物素的半生期(half-life)方面,Bitsch 等人(Bitsch et al., 1989)在1989年的人體試驗中,受試者先口服300 μ g/day 的生物素(沒說明生物素型式)一週,再口服900 μ g/day 的生物素一週,發現血漿中生物素的 elimination half life 為一小時又50分鐘。Frigg 等人則發現小牛的生物素半生期約為5-18小時(Frigg et al., 1993)。在2005年有研究以測量健康受試者尿液中 biotin/creatinine ratio,以檢測生物素的半生期,發現

單次口服 biotin 其 elimination half life 為 30-40 小時，而在尿液中的排泄量約需 70 小時才恢復基準質。

現今市售的單一生物素補充劑，每錠大約含 200-2500 μg 不等的生物素(沒標明型式)，其強調之商品功能包括 1.防止白髮；2.禿頭的預防治療；3.緩和肌肉的痛楚；4.減輕濕疹、皮膚炎；5. 幫助吸附放射性物質和重金屬，並予以排除；6. 緩解糖尿病症狀等。

根據民 91 年行政院衛生署修定的國人膳食營養素參考攝取量(DRIs, Dietary Reference Intakes)中，對健康的成人建議生物素足夠攝取量(AI, Adequate Intakes)為 30 $\mu\text{g}/\text{day}$ (行政院衛生署，2002)。健康者很少有生物素缺乏的現象，因為生物素廣泛存在於各種食物中，如蛋黃、肝臟、菠菜、酵母等含量都很豐富，只有大量食用生蛋白或是長期靜脈營養且沒有補充生物素才會造成缺乏。生物素攝取不足時，血液及尿液中生物素含量減少，各羧化酶的活性也降低。臨床缺乏症狀包括皮膚炎、脫毛、末梢感覺異常及中樞神經損害，有些患者有精神症狀如憂鬱、幻想、幻聽、嗜睡等，且會導致葡萄糖的代謝異常 (Bhagaran et al., 1965)，嬰兒則有成長遲緩現象，目前則尚未發現高劑量生物素會造成毒性。

二、生物素對代謝的影響

生物素作用為羧化反應 (carboxylation reaction) 中酵素的輔因子 (cofactor)，在人體中就有 5 種需要生物素的羧化酶 (carboxylase)：其中 propionyl-CoA carboxylase (PCC)、 β -methylcrotonyl - CoA carboxylase (MC)、pyruvate carboxylase (PC) 位於細胞膜；其餘兩種型態的 acetyl-CoA carboxylase (ACC) 則存於粒線體與細胞質。這些酵素主要催化的反應包括醣質新生、脂肪酸代謝和胺基酸的異化作用。因此，生物素在維持代謝的恆定上扮演重要的角色 (Diana et al., 2002)。

許多研究指出，缺乏生物素，將會改變醣類和脂質的代謝。脂質代謝方面，在動物或是人體試驗均指出，缺乏生物素會導致脂肪酸的代謝異常，且會改變組織中脂肪酸的組成 (Kramer et al., 1984; Mock et al., 1988)。餵食老鼠缺乏生物素的飼料 4 週後，血漿與組織中脂肪酸的組成即開始產生異常變化，並造成血漿中游離脂肪酸 (free fatty acids, FFAs) 的濃度上升 (Mock et al., 1988)；而血漿中游離脂肪酸的濃度上升會減少胰島素所刺激的葡萄糖代謝作用 (Boden et al., 2001)。進一步有研究發現，注射 100mg 的生物素 30 分鐘後可顯著降低血脂質 (Steigerwal and Bohele et al., 1960)，並給予有心血管高脂血症的病人每日 5mg 生物素，

持續 4 周，則可降低高膽固醇血症 (Dukusova and Krivoruchenko, 1972)。

在醣類代謝方面，許多研究指出，某些維生素會影響醣類的代謝。維生素 A、D、C 會影響胰島素的分泌 (Norman, 1980; Carlberg, 1999; Paolisso, 1994; Driscoll, 1997; Wu-Wong et al., 2004; Hinds et al., 2004)，然而於一體外試驗中發現，眾多 B 群維生素 (包括 B1、B2、B6、B12、菸鹼酸、泛酸、葉酸和生物素) 中，只有生物素 (Biotin) 具有顯著促進胰島素分泌的作用 (Hideyuki, 2000)。



三、生物素對於葡萄糖代謝於基因層面的影響

目前有越來越多的研究顯示，Vitamin 調節的影響已達可調控基因的表現了 (Carlberg C, 1999 ; Dakshinamurti and Chauhan, 1994 ;)。其中，生物素對基因層面的影響為活化有利於降低血糖的因子 (insulin、insulin receptor、pancreatic and hepatic glucokinase)，並會降低肝中 phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCK) 的表現，PEPCK 為糖質新生路徑中的關鍵酵素，會刺激肝臟產生葡萄糖。

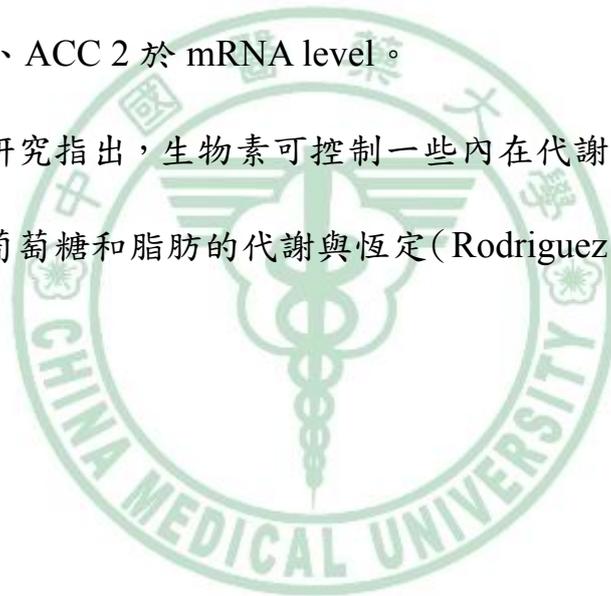
早在 1968 年已發現生物素會影響醣類代謝，以 biotin-deficient rat 作為動物模式，發現這種動物模式其葡萄糖耐受性顯著較差，之後深入研究發現生物素對以下葡萄糖代謝於基因層面的影響結果 (Rodriguez et al., 2001; Solorzano et al., 2002; Rodriguez and Zemleni, 2003)：

1. biotin 會增加 hepatic glucokinase gene 的轉錄 (transcription)。
2. biotin 缺乏會降低 pancreatic glucokinase 的活性和 mRNA 的量。
3. biotin 會調節 insulin receptor 的表現於後轉錄階段

(posttranscriptional level)，但這種作用需 cGMP signal cascade 活化協助。

4. biotin 可降低肝中 PEPCK 的表現量。
5. biotin 因其為 carboxylase 的輔基，所以可有效的調節一些酵素的活性，例如（1）pyruvate carboxylase (PC)：此為糖質新生的中樞酵素（2）acetyl-Co A carboxylase 1 and 2 (ACC 1、ACC 2)：此兩酵素可調節脂肪酸的合成和氧化。
6. biotin 影響 pyruvate carboxylase 於 posttranscriptional level，影響 ACC 1、ACC 2 於 mRNA level。

已有許多研究指出，生物素可控制一些內在代謝基因的表現，因此，生物素可影響葡萄糖和脂肪的代謝與恆定 (Rodriguez et al., 2002; Cristina, 2005)。



四、生物素對於糖尿病模式之葡萄糖代謝的影響

許多生理上的症狀，將會改變體內生物素的狀態，而在懷孕、老年人和運動員體內，易發現生物素的濃度下降，並且在糖尿病的患者身上，亦可見生物素狀態的改變，Maebashi 等人（1993）發現，第 2 型糖尿病患者，其血清生物素濃度明顯較健康控制組低（Coggeshall et al., 1985；Maebashi et al., 1993）。並且有研究指出，血清生物素和禁食血糖濃度，呈現負相關（Coggeshall et al., 1985）。此外，缺乏生物素已被認為會減弱大鼠口服葡萄糖耐受性並且會降低大鼠對葡萄糖的利用（Dakshinamurti et al., 1968；Deodar and Mistry, 1970）。

生物素會影響葡萄糖的恆定。過去研究發現，經由餵食生蛋白誘發缺乏生物素的大鼠，其葡萄糖耐受性和血漿胰島素濃度比攝取足夠生物素的大鼠來得低（Masaru, 1993）。然而也有文獻指出，胰島素分泌降低的生物素缺乏大鼠，經由給予生物素（1mg/kg of wt）後可明顯改善胰島素的分泌（Furukawa, 1995）。第 2 型糖尿病大鼠和生物素缺乏的大鼠體內的醣類代謝，有很多相似之處（Hideyuki et al., 2000）。之後進一步發現第 2 型糖尿病受試者的血清生物素濃度有較低的現象（Saldana et al.,

2004)。補充生物素後會使第 2 型糖尿病人血漿葡萄糖和血清丙酮酸和乳酸的濃度下降，顯示生物素會增加對葡萄糖的利用，但在此研究中並沒有發現生物素具有增加胰島素分泌的作用 (Masaru, 1993)。由生物素誘導增加葡萄糖所刺激的胰島素分泌的研究中發現，灌注液中的生物素濃度和胰島素的反應有很高的相關性，因此也有學者認為生物素可促進葡萄糖刺激的胰島素分泌作用 (Sone et al., 2000)。Reddi 等人 (1988) 指出，給予先天性糖尿病 KK 小鼠補充 10 週 2mg/kg of body wt 或 4mg/kg of body wt 的生物素，可以降低其餐後血糖值、增加葡萄糖耐受性與內生性胰島素的感受性。

人體試驗方面也顯示，生物素可改善葡萄糖耐受性。給予第 1 型糖尿病藥物劑量的生物素，在沒有使用胰島素治療的情況下可以降低空腹血糖值 (Coggeshall, 1985)。另一人體試驗則給予第 1 型糖尿病人治療劑量 (16mg/day) 的生物素 1 週後，顯示可以降低病人血漿中的葡萄糖濃度，使高血糖現象獲得改善 (Masaru, 1993)。有學者指出，高劑量的生物素 (每天口服 3mg 三次) 能改善第 2 型糖尿病受試者的空腹血糖控制 (McCarty, 1999)。另一研究指出，第 2 型糖尿病人每日口服生物素 9mg/day 一個月，則降低了 45% 空腹高血糖濃度。並有研究指出，給予

第 2 型糖尿病病人每日口服生物素 15mg/day 28 天，可降低血糖值和胰島素濃度 (Cristina et al., 2003)。Lymphocyte 中 propionyl-CoA carboxylase (PCC) 的活性被認為比血漿中 PCC 活性更能精確反應生物素的濃度。在此篇研究中，給予 15mg/day 的生物素，來觀察比較有糖尿病的病人和沒有糖尿病的病人，在 lymphocyte 中 PC、PCC、ACC 活性的差異和改變。結果發現經過 28 天的治療後，在兩組皆發現 biotin 增加了 PCC、ACC 活性約 100%，增加 PC 活性約 200%。但在此篇中，有糖尿病的病人和沒有的人之間，是沒有顯著差異的 (Baez et al., 2004)。然而目前國內外仍缺乏研究探討給予生物素對改善第 2 型糖尿病人葡萄糖利用於分子層面的作用機制。



肆、本研究室先前的結果

一、補充生物素對調控血糖的影響

A、空腹血糖

由本研究室之前研究結果顯示，在未補充生物素（0 週）時，對照組(即生理水組)、3mg 和 6mg 組的空腹血糖濃度並無顯著差異。但 KK 小鼠在補充生物素兩週後，3mg 組雖然有下降的情形，但與補充前沒有達到統計上的顯著差異，然而 6mg 組與補充生物素前（0 週）相比其空腹血糖有顯著下降的情形（ $132.8 \pm 22.2 \text{mg/dl}$ ； $172.7 \pm 52.2 \text{mg/dl}$ ； $p < 0.05$ ）。KK 小鼠在補充生物素四週之後，3mg 和 6mg 組與對照組相比其空腹血糖都有顯著下降（ $147.4 \pm 40.6 \text{mg/dl}$ ； $135.1 \pm 30.6 \text{mg/dl}$ ）， $p < 0.05$ ；同時發現補充 6 mg 生物素 2 週或 4 週後，和補充生物素前（0 週）相比，已達顯著降低空腹血糖值的效果（ $135.1 \pm 30.6 \text{mg/dl}$ ； $172.7 \pm 52.2 \text{mg/dl}$ ； $p < 0.05$ ），3mg 生物素補充組在補充 2 週和 4 週後，與 0 週時相比雖然有下降的現象，但沒有達到統計上的顯著。

表 2-4、三組不同劑量的生物素補充組在補充 0、2、4 週後之空腹血糖
值¹

Table 2-4. The fasting blood glucose value in three biotin treatment groups at 0, 2, 4 weeks¹

Group \ Time	Fasting blood glucose (mg/dl)		
	0wk	2wk	4wk
Control ²	169.2±29.1	157.0±23.4	174.8±46.8 ^a
3mg ³	172.5±37.0	145.8±47.0	147.4±40.6 ^b
6mg ⁴	172.7±52.2	132.8±22.2*	135.1±30.6 ^{b*}

¹Each value represents mean ± SD. Values with different letter in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

²Control : 0 mg Biotin/kg of body weight.

³3mg : 3 mg Biotin /kg of body weight.

⁴6mg : 6 mg Biotin /kg of body weight.

*mean is significantly different from 0 wk ($p < 0.05$).

B、腹腔葡萄糖耐受性試驗

在腹腔葡萄糖耐受性試驗方面，由本研究室之前的研究結果顯示，對照組、3 mg 和 6 mg 組在未補充生素前（0 週），三組的葡萄糖耐受性試驗結果在每個測定時間點並無顯著差異。在生物素補充 2 週之後，3 mg 組與生理水組相比在第 30 及 60 分鐘時，其血糖值有下降趨勢，但均沒有達到統計上的顯著差異；6 mg 組在試驗第 60、90、120 分鐘與生理水組相比其血糖值有顯著較低 ($p < 0.05$)，但 3 mg 組和 6 mg 組相比則沒有顯著差異。而在生物素補充四週之後，3 mg 組在試驗第 0、30、60、90、120 分鐘與生理水組相比均顯著較低 ($p < 0.05$)；6 mg 組與生理水組相比也顯著較低 ($p < 0.05$)。由這些結果得知，補充生物素可改善 KK 小鼠葡萄糖耐受性，進而降低葡萄糖耐受性試驗中血糖值的變化。

表 2-5、三組不同劑量的生物素補充組補充四週後之腹腔葡萄糖耐受性

試驗結果 (ipGTT) ¹

Table 2-5. Intraperitoneal glucose tolerance tests in three biotin treatment groups at 4 weeks ¹

Group/Time	ipGTT				
	0min	30min	60min	90min	120min
Control ²	174.8±46.8 ^a	327.7±124.6 ^a	401.7±100.6 ^a	533.2±82.0 ^a	538.5±101.8 ^a
3mg ³	147.4±40.6 ^b	240.3±80.7 ^b	405.3±118.9 ^a	471.5±139.8 ^b	454.3±143.3 ^b
6mg ⁴	135.1±30.6 ^b	270.3±111.4 ^b	350.4±117.8 ^b	403.3±130.7 ^b	427.8±135.3 ^b

¹Each value represents mean ± SD.

^{2,3,4}Same as in table 5-1.

Values with different letter in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

C、胰島素阻抗性

此數據為本研究室之前的結果，以 HOMA 公式算出胰島素阻抗性的數值 (Matthews et al., 1985)；結果顯示，補充生物素兩週之後，3 mg 組和 6 mg 組與生理水組相比雖有下降，但沒達到統計上的顯著。補充生物素四週之後，3 mg 組和 6 mg 組與生理水組相比都有下降，且達到統計上的顯著 ($p < 0.05$)。3 mg 生物素補充四週後與補充前 (0 週) 時相比，也有顯著降低 ($p < 0.05$)；6 mg 組雖然有下降，但沒有達到統計上的顯著差異，本研究室推測可能是由於 SD 值太大所致。由以上的結果可知，補充生物素四週可改善第 2 型糖尿病 KK 小鼠的善胰島素阻抗性 (圖 2-6)。

表 2-6、三組不同劑量的生物素補充組在補充 0、2、4 週後之胰島素阻
抗性結果¹

Fig. 2-6. Insulin resistance in three biotin treatment groups at 0,2,4 week¹

Time Group	Insulin Resistance		
	0wk	2wk	4wk
Control ²	0.059±0.039	0.048±0.015	0.056±0.020 ^a
3mg ³	0.056±0.023	0.040±0.017	0.038±0.010 ^{b*}
6mg ⁴	0.051±0.017	0.044±0.018	0.039±0.011 ^b

¹Each value represents mean ± SD. Values with different letter in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

^{2,3,4} Same as in table 5-1

*mean is significantly different from 0 wk ($p < 0.05$).

二、生物素對骨骼肌中 GLUT4 蛋白質表現及位移的影響

本研究室之前的結果顯示，補充生物素四週之後骨骼肌細胞中，基礎狀態下，在漿膜部分 3mg 組的 GLUT4 蛋白質表現量顯著高於對照組與 6mg 組($p < 0.05$)，但 6mg 組卻低於生理水組。在胰島素刺激後，GLUT4 蛋白質在 PM 部分的表現量都有增加，6mg 組在 PM 的表現量顯著較對照組高 ($p < 0.05$) (表 2-7)；而 GLUT4 在 PM/(PM+LDM)蛋白質表現的比例，以此來判斷 GLUT4 位移的情形，在有胰島素刺激下，3mg 及 6mg 組與對照組相比都有顯著較高 ($p < 0.05$)，如表 2-8 所示。

由此結果推測，生物素補充四週後，且經由胰島素刺激後，可增加 GLUT4 在漿膜的表現以及 GLUT4 的位移作用 (表 2-8)。

表 2-7、三組不同劑量生物素補充組在補充四週後骨骼肌細胞漿膜 GLUT4 的蛋白質表現量¹

Table 2-7. GLUT4 protein expression in the plasma membrane (PM) from red gastrocnemius muscle cell of three biotin treatment groups at 4 weeks¹

	Control ²	3mg ³	6mg ⁴
Insulin (-)	0.91±0.041	1.26±0.25*	0.81±0.15 [#]
Insulin (+)	0.89±0.21	1.04±0.19	1.29±0.29* ⁺

¹ Each value represents mean ± SD.

^{2, 3, 4} Same as in table 5-1.

* mean is significantly different from control group ($p < 0.05$).

⁺ mean is significantly different from insulin (-) group ($p < 0.05$).

[#] mean is significantly different from 3 mg group ($p < 0.05$).

表 2-8、三組不同劑量生物素補充組在補充四週後骨骼肌細胞中 GLUT4 在漿膜部位的比例¹

Table 2-8. GLUT4 expression ratio of plasma membrane (PM) to low density microsomal (LDM) fraction from red gastrocnemius muscle after 4 weeks of biotin supplementation¹

	Control ²	3mg ³	6mg ⁴
PM/(PM+LDM)			
Insulin (-)	0.42±0.07	0.56±0.05*	0.43±0.05 [#]
Insulin (+)	0.42±0.03	0.65±0.05* ⁺	0.72±0.03* ⁺

¹Each value represents mean ± SD.

^{2,3,4} Same as in table 5-1.

*mean is significantly different from control group ($p < 0.05$).

⁺ mean is significantly different from insulin (-) group ($p < 0.05$).

[#] mean is significantly different from 3 mg group ($p < 0.05$).

第三章 研究目的

本研究室先前的研究發現，給予第 2 型糖尿病 KK 小鼠生物素四週後，可顯著改善其空腹血糖、葡萄糖耐受性及胰島素阻抗性，並會增加骨骼肌細胞中 GLUT4 的表現量及位移情形。因此本研究欲進一步了解給予不同劑量的生物素對第 2 型糖尿病 KK 小鼠骨骼肌，其胰島素訊息傳遞上游路徑中 (1) IRS-1、IRS-2 的總蛋白質表現；(2) 酪胺酸磷酸化型式的 IRS-1、IRS-2 蛋白質表現；(3) 與 IRS-1、IRS-2 連結的 PI 3-kinase 蛋白質表現。希望能由此試驗結果，進一步了解生物素對於調節 GLUT4 的上游機制及改善第 2 型糖尿病胰島素阻抗於分子層面的機制。

第四章 材料與方法

壹、試驗動物與飼養環境

一、試驗動物模式

1957 年日本學者 Kondo 等人，以日本小鼠發展出來 KK 品系小鼠，可作為第 2 型糖尿病研究之試驗動物模式 (Kondo et al., 1957)。此種雄性 KK 品系小鼠具有葡萄糖不耐症 (glucose intolerance)、高胰島素血症 (hyperinsulinemia)、與胰島素阻抗性的表徵和遺傳特性。雄性 KK 小鼠不只會因老化，亦可由高熱量飲食誘導後，表現出與第 2 型糖尿病人相似的症狀 (Ikeda, 1994; Lubec et al., 1997)。因此，雄性 KK 小鼠是作為探討第 2 型糖尿病之胰島素阻抗性與機制的良好動物模式。依據健康食品之「調節血糖功能評估方法」修正草案的糖尿病試驗動物模式中，KK 品系小鼠屬於遺傳性自發高血糖動物模式，試驗時並無特別界定血糖變異之空腹血糖值標準，若是由化學藥物所誘導的糖尿病試驗動物模式，則其空腹血糖值需達或超過 13 mM (230 +10 mg /dl) 時，方才視為有糖尿病(行政院衛生署，2006)。

本研究由樂斯科生物科技股份有限公司代理進口（主要購自美國 The Jackson Laboratory）36 隻八週大的雄性 KK/HIJ 小鼠，起始體重約 30 公克，先以 Formulab Diet 5008（其成分接近 The Jackson Laboratory 所使用之餵養飼料 LabDiet 5K52）使其適應 2 週，再以高脂高熱量的飲食餵食使其誘發出第 2 型糖尿病症狀，再經由空腹血糖高於 140 mg/dl 之標準作為判定中度血糖異常，隨後進行分組飼養。

本研究計畫之動物試驗內容已獲中國醫藥大學實驗動物委員會之核准。



二、飼料與墊料

墊料為 Beta Chip 硬木墊料（美國 Northeaston Products Corp 製造）每週更換清理一次。高脂飼料是 MILab Diet（美國 PMI 牌實驗動物飼料），飼料購得後存放於 4°C 冰箱，待餵食時再酌量取用，並詳細紀錄攝食情況。皆由雍力貿易股份有限公司代理購得。

三、飼料成分

a) 高脂高熱量（含 35.5% Lard）之飼料成分如表 4-1 所示，並計算其卡路里與三大營養素之比例，如表 4-2。

表 4-1、高脂高熱量飼料成分

Nutrients	Amount
Protein	20.4%
Fat	37.2%
Fiber	4.5%
Ash	6.3%
Physiological fuel value (Kcal/gm)	5.03
Biotin (ppm)	0.20

表 4-2、高脂高熱量飼料之卡路里與三大營養素之比例

Calrles Provided by	
Protein	16.3%
Fat	66.6%
Carbohydrates	17.1%

$$\text{Total Calories} = 16.241 \times 4 + 66.629 \times 9 + 17.133 \times 4$$

$$= 733.157 \text{ Kcal/100g product}$$

四、飼養環境條件

飼養於環境溫度 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，濕度 $60\pm 5\%$ ，光暗循環各 12 小時，並給予自由進食飼料與去離子水。

五、生物素的補充

本研究所使用的生物素是白色粉末狀結晶的 d-Biotin (Tanabe seipaku co., LTD, Japan)，待需要時依不同劑量溶於生理食鹽水備用。

生物素的補充方式是先將生物素溶於 0.9% 的生理食鹽水 (saline) 後，再以腹腔注射的方式給予到小鼠體內，每週六天，為期四週。Control 組是給予等體積且不含生物素的 0.9% 生理食鹽水當作對照組。

貳、試驗設計與分組

首先將小鼠誘發出第 2 型糖尿病，隨後分成三組，分別補充不同劑量的生物素，分別為 (1) 生理水組：為 0 mg/kg of body weight (control)；(2) 3 mg 生物素補充組：為 3 mg/kg of body weight (3 mg biotin)；(3) 6 mg 生物素補充組：為 6 mg/kg of body weight (6 mg biotin)。分別在進入試驗前及第二週、第四週進行空腹血糖測試、腹腔葡萄糖耐受性試驗 (intraperitoneal glucose tolerance test, ipGTT) 和血清胰島素濃度測定。並於第四週補充期結束後犧牲小鼠，在犧牲前每組再分成兩組處理方式，其中一組在小鼠犧牲前 30 分鐘給予腹腔注射 4 U/100 g regular insulin 進行胰島素誘導試驗，另一組則不給與胰島素作為對照，因此共有六種處理方式，如表 4-3 所示。

表 4-3、本試驗的處理方式與分組

生物素補充劑量 (mg/kg of body weight/day)	Insulin (-)	Insulin (+)
0 (control) n=12	Control (-) n=6	Control (+) n=6
3 (3mg Biotin) n=12	3 mg Biotin (-) n=6	3 mg Biotin (+) n=6
6 (6mg Biotin) n=12	6 mg Biotin (-) n=6	6 mg Biotin (+) n=6

將上述各組小鼠犧牲後分離取出骨骼肌 (skeletal muscle)，進行測定骨骼肌中總 IRS-1、IRS-2；IRS-1、IRS-2 酪氨酸磷酸化型式及和其相連結的 PI 3-kinase 蛋白質表現量。



參、試驗流程

36 隻第 2 型糖尿病雄性 KK/H1J 品系小鼠餵食高熱量飼料 (37%fat)，自由進食飼料及去離子水，經空腹血糖測試來評估是否已誘發第 2 型糖尿病



分成三組,分別補充三種不同劑量之生物素,同時配合高熱量飼料 (37%fat) 餵食四週,分別測試補充前及補充後第二、第四週空腹血糖與血清胰島素濃度

CB (12 隻) (0 mg/Kg BW)	MB (12 隻) (3 mg/kg BW)	HB (12 隻) (6 mg/Kg BW)
---------------------------	---------------------------	---------------------------



補充結束後,各組分成兩種犧牲方式【insulin (+) 表犧牲前 30 分鐘注射胰島素】

insulin (-) (6 隻)	insulin (+) (6 隻)	insulin (-) (6 隻)	insulin (+) (6 隻)	insulin (-) (6 隻)	insulin (+) (6 隻)
----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------

分離取出骨骼肌



均質



以免疫沉澱法與/或免疫墨點法測定 IRS-1, IRS-2 和其酪胺酸磷酸化型式的蛋白質表現情形,及分別與 IRS-1, IRS-2 相連結 PI 3-kinase 的蛋白質表現



差異性之統計分析與理論假設的檢驗

圖 4-1、本研究試驗流程

Fig 4-1. The experiment flow chart of this study.

肆、測試項目

一、空腹血糖值之測定

測定前一晚先將小鼠的飼料移走，使其禁食 12-14 小時之後，經由斷尾法自尾巴採集血液，利用 standard glucose oxidase 原理 (Reddi et al., 1988) 以血糖計 Glucometer Elite^R 測試血糖值 (Bayer, Japan)，此時所測定的血糖濃度即為空腹血糖值。

二、腹腔葡萄糖耐受性試驗

進行葡萄糖耐受性試驗前，先將小鼠的飼料移走，使其禁食 12-14 小時後，經斷尾法由尾巴採集血液，測量血漿葡萄糖濃度，再經由腹腔注射給予葡萄糖溶液 (1.0 g glucose/kg of body weight)，之後在第 0、30、60、90 及 120 分鐘測定血漿葡萄糖濃度。

三、血清胰島素濃度

小鼠禁食 12-14 小時之後，經由尾巴靜脈採集血液，在 4°C 下離心 3000 rpm 10 分鐘，取上清液即血清的部分，注入新的微量離心管中約 200 μ l，並置於 -80°C 下儲存，待要分析時再取出，胰島素是以胰島素檢測用試劑套組（Roche Elecsys 1010/2010/Modular Analytics E170）依據 electrochemiluminescence immunoassay（ECLIA）的方法測定。

四、胰島素阻抗性

胰島素阻抗性（insulin resistance, IR）是依據下列方程式（Matthews et al., 1985）來做評估

Insulin resistance（HOMA IR）

$$= \left[\text{Fasting insulin} \left(\mu \text{IU/l} \right) \times \text{fasting glucose} \left(\text{mmol/l} \right) \right] / 22.5$$

五、骨骼肌中總 IRS-1、IRS-2；IRS-1、IRS-2 酪胺酸磷酸化型式及其相連結的 PI 3-kinase 之蛋白質表現量

A、骨骼肌肉組織樣本製備

小鼠犧牲後，自小鼠取出骨骼肌，以液態氮快速冷凍，隨後儲存於 -70°C 。分析時秤取 0.5g 的肌肉切細，並加入 4 ml buffer A (250 mM sucrose, 20 mM hepes, 1 mM EDTA)，使用均質機 Polytron PT20 以最快速進行 30 秒，然後在 4°C 下離心 15000 g，20min。取出上清液並加入 KCl 使其濃度達 0.8 mM，再以 200000 g 超高速離心一個半小時，之後再將沉澱物 (pellet) 回溶於 100 μl buffer B (20 mM hepes, 1 mM EDTA)，並進行蛋白質濃度測定後，儲存於 -70°C ，直到分析。

B、蛋白質濃度測定

以 BSA (Bovine serum albumin) 為蛋白質標準品並製作標準品濃度曲線，並以 Bio-Rad 公司的 Dye reagent 染劑反應，再由 O.D 590 nm 的吸光值，求算出骨骼肌樣品的蛋白質濃度。

(1) 蛋白質標準品檢量線製作：

以 BSA (Bovine serum albumin) 為蛋白質標準品，依照表 4-4 製作蛋白質標準品樣品。

再將配製好的蛋白質標準品樣品用分光光度計 (Hitachi U-2000 Spectrophotometer)，在 O.D 590nm 測定各蛋白質標準品吸光值之平均值。以蛋白質標準品吸光值與濃度畫出標準品檢量線，並求出趨勢線方程式及 R 值。(R 值必須在 0.99 以上之準確度，否則需重新製作檢量線)。

表 4-4、蛋白質標準品樣品製備

組成 \ 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	0	2	4	6	8	10
1 mg/ml BSA (μl)	0	2	4	6	8	10
DDW (μl)	800	798	796	794	792	790
Dye reagent 染劑 (μl)	200					
總體積皆為 1000 μl (1 ml)						

(2) 樣品蛋白質定量：

蛋白質樣品稀釋 20 倍後取 $5\ \mu\text{l}$ 稀釋後的骨骼肌樣品與 $795\ \mu\text{l}$ 的二次水混合，再加入 $200\ \mu\text{l}$ 的 Dye reagent 染劑 (Bio-Rad, Protein Assay, US)，混勻 5 分鐘後將樣品放入分光光度計，在 O.D 590 nm 測定其吸光值。將樣品吸光值平均值代入趨勢線方程式，則可以算出稀釋後樣品之蛋白質濃度，最後再乘上稀釋倍數並換算單位後，即可求得實際蛋白質樣品濃度。



C、骨骼肌中 IRS-1、IRS-2 總蛋白質表現量

分別取等總蛋白質量的本試驗 6 組骨骼肌樣品，以免疫墨點法，進行 IRS-1、IRS-2 總蛋白質表現量的測定。免疫墨點法詳細步驟於後面介紹。

D、骨骼肌中 IRS-1、IRS-2 酪胺酸磷酸化型式的蛋白質表現測定

將 6 組的骨骼肌樣品，在相同的總蛋白質含量下，以 anti-phosphotyrosine (4G10) 的一抗進行免疫沉澱法，將所有酪胺酸磷酸化型式的蛋白質沉澱後，再利用 IRS-1、IRS-2 的抗體進行免疫墨點法以測量骨骼肌中 IRS-1、IRS-2 酪胺酸磷酸化型式的蛋白質表現量。

E、骨骼肌中與 IRS-1、IRS-2 相連結的 PI 3-kinase 蛋白質表現測定

以 TBS 調整 6 組骨骼肌樣品，使其內約含等量的 total IRS-1 或 IRS-2 蛋白質經由免疫墨點法作確認，再分別以 IRS-1、IRS-2 抗體經由免疫沉澱法將所有 IRS-1、IRS-2 的蛋白質沉澱後，再利用 PI 3-kinase 的抗體進行免疫墨點法以測量骨骼肌中與 IRS-1、IRS-2 相連結的 PI 3-kinase 蛋白質表現量。

F、免疫沉澱法

將計算好濃度的骨骼肌樣品加入 TBS 使其總體積為 500 μ l 後，再加入適當的一抗 (IRS-1, IRS-2, 4G10)，於 4 $^{\circ}$ C 下反應 over night。之後再加入已處理過的 Protein A beads Slurry (Upstate Biotechnology) 於 4 $^{\circ}$ C 反應 2 小時。之後以 10000 g，30 sec 離心，去除上清液，再以 1000 μ l TBS 洗 3 次後，加入 30 μ l 的 2 \times Laemmli sample buffer (含 100 mM DTT)，於 100 $^{\circ}$ C 下煮 10 分鐘，使 Protein A 和抗體所接的蛋白質分離。之後再以 10000 g 進行 5 分鐘離心，取上清液，再進行免疫墨點法。



G、免疫墨點法

(1) 膠體電泳 (SDS-PAGE)

先配製 8% SDS-PAGE 的下層膠 (Separation gel) 和上層膠 (Stacking gel)，將配置好的下層膠注入鑄膠台後，加入異丙酮去除氣泡並壓平下層膠之上緣，等約 30 分鐘待膠體凝固，倒掉異丙酮，用二次水沖洗後，將上層膠注入後插入樣本槽梳子到未凝固的膠體中，避免氣泡出現於 wells 下緣。等待約 30 分鐘上層膠凝固後拔出樣品槽梳子，並以二次水小心沖洗樣本槽內避免雜質殘留。將鑄好的膠放入電泳槽中，加入 1x Running Buffer 500 ml。Running Buffer 需注滿內槽且外槽之量需蓋過最下面導電用之白金線，樣本槽也需注滿 Running Buffer 且不可有氣泡。用塑膠滴管以抽吸方式去除膠體下緣殘留的氣泡。將樣本與 4x 樣品緩衝液 (Sample Buffer) 混合後 (體積比為 3:1)，經加熱 95°C，5 分鐘。4x Sample Buffer 的配製如表 4-9，配製好的 Sample buffer 儲存於 4°C 備用。取出 5 μ l 分子量標準品 (MagicMark™ XP Western Protein Standard) 和配製好的樣品由左至右分別注入樣品槽中。本次所使用的分子量標準品 (marker) 可與多種二抗相結合，可與呈色劑結合而發冷光，所以可經由壓片得知不同分子量蛋白質的分佈。將注入好樣品的膠體，以 100V，120 分鐘或 150 分鐘進行電泳。

表 4-5、膠體電泳 8% SDS-PAGE 下層膠和上層膠製備

組成	下層膠 (8% Separation gel)	上層膠 (4% Stacking gel)
(a) Acrylamide/Bis (37.5:1)	2ml	0.503ml
(b) Running gel buffer 1.5M Tris-HCl pH=8.8	2.5ml	×
(c) Stacking gel buffer 0.5M Tris-HCl pH=6.8	×	1.25ml
(d) 10% SDS (Sodium dodecyl sulfate)	100 μ l	50 μ l
(e) ddH ₂ O	5.35ml	3.167ml
(f) TEMED	5 μ l	5 μ l
(g) 10% APS (ammonium persulfite)	50 μ l	50 μ l
Total	10ml	5ml

表 4-6、10x Running Buffer 配製

組成	重量 (g)
Tris	30.3
Glycine	144
SDS	10
加 DDW 到 1L	

表 4-7、4x Sample Buffer (SDS Reducing Buffer) 配製

藥品名	μ l
0.5M Tris-HCl pH=6.8	125
Glycerol	100
10% (w/v) SDS	200
2-Mercaptoethanol	50
0.5% (w/v) bromophenol blue	50
DDW	475
總體積 1ml	

(2) 西方點墨法 (Western Blotting)

1. 轉漬步驟：

將轉漬夾打開後黑色朝下放，取出一片海綿墊片浸泡轉漬緩衝液 (Transfer Buffer) 後放於其上，並依序在海綿片上放上 3M 濾紙、SDS-PAGE gel、PVDF 轉漬膜 (先用 100% 甲醇潤濕)、3M 濾紙，最後再放上一片海綿墊片後夾上轉漬夾 (夾層中間切勿有氣泡)，形成類似三明治夾層的構造。

將轉漬夾放入電泳槽中後放入冰盒並加滿轉漬緩衝液 (Transfer Buffer)。於電泳槽外圍放入足夠的冰塊，使整個系統保持低溫狀態。以 100V，3 小時為電泳條件，進行蛋白質轉漬步驟。緊接將轉漬膜以 5% 脫脂奶 [溶於 0.1% TBS/Tween (TBST) 中] 進行 blocking 步驟，以室溫 1 小時為條件搖盪進行。取出轉漬膜後以 TBST 清洗 5 分鐘共 2 次。TBS 配製如表 4-10，配製好儲存於 4°C，且調整其至 pH=7.4 備用。加入一級抗體 (Alpha Diagnostic International)，以 4°C 浸至隔夜。隔天以 TBST 清洗 2 次，每次 5 分鐘。之後加入 5ml 的二級抗體 (PerkinElmer Life Sciences, Inc) 以 TBST 稀釋，於室溫下搖盪進行 1 小時，最後以 TBST 清洗 2 次，每次 5 分鐘。

表 4-8、1x Transfer Buffer 配製

組成	重量 (g)
Tris	3.03
Glycine	14.4
並加入 methanol 200 μ l，再加 DDW 到 1L	

表 4-9、TBS 配製

組成	重量 (g)
NaCl	1.37M
Tris base	200mM
PH 7.6	

2. 抗體的製備：

一級抗體

Anti-IRS1; Anti-IRS2; Anti-Phosphotyrosine, clone 4G10; Anti-PI3-Kinase p85, N-SH2, clone UB93-3 (Upstate Biotechnology)

Buffer：TBS 含 1% 脫脂奶

Western Blotting 時使用濃度：IRS-1 為 $1 \mu\text{g/ml}$

IRS-2 為 1：500

PI 3-kinase 為 1：200

二級抗體

Anti-Rabbit IgG (Goat), Anti-Mouse IgG, HRP-Labeled (PerkinElmer Life Sciences, Inc)

Membrane Immunoassays：1:5000

Western Blotting 時使用的方式為 $1 \mu\text{l}$ 二抗 + 10ml TBS + 1%脫脂奶

3. 壓片步驟：(暗室中進行)

將轉漬膜浸泡於 ECL (PerkinElmer Life Sciences, Inc) 試劑之混合液 (每瓶各取 500 μ l 等比例混合) 中反應 2 分鐘。以封口袋平整包覆好轉漬膜並正面朝上放置於壓片卡匣 (Cassette) 內，再用膠帶固定好。以 Kodak 軟片進行壓片，感光時間依轉漬膜螢光亮度決定時間長短，平均約 20 分鐘。感光完成後放入顯影劑進行顯影步驟，再以清水沖洗後放入定影劑中，待底片轉成透明後，再以清水沖洗，底片經晾乾後以分析軟體 (Alpha Innotech Corporation, MultiImage™ Light Cabinet) 進行影像分析。再經由電腦分析軟體 (Alpha Innotech Corporation, MultiImage™ Light Cabinet) 定量蛋白質。



H、SDS-PAGE gel 的保存

跑完電泳或轉漬完的膠片 (SDS-PAGE gel) 先浸置於 Coomassie brilliant blue R-250 中染色 10 分鐘,再以 Destaining solution 進行去染 1-2 天, Coomassie brilliant blue R-250 配製如表 4-11, Destaining solution 配製如表 4-12, 配製好儲存於室溫備用。去染後的膠片以 2% Glycerol 溶液浸置隔夜,再以封片液與玻璃紙進行封片,待乾後即可保存。



表 4-10、Coomassie brilliant blue R-250 配製

組成	重量 (g or ml)
CBR sigma B-0149	1.5
Methanol	250
Acetic acid	50
DDW	250

表 4-11、Destaining solution (SDS-PAGE 去染劑) 配製

組成	容量 (ml)
Methanol	300
Acetic acid	210
加 DDW 到 3L	

伍、統計分析

本研究所有的結果均以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示，以 SAS 統計套裝軟體 (SAS for windows, version 8.1) 進行統計分析

以變方分析 (ANOVA/ Duncan)、Student's *t* test 檢定各種處理方式之間及不同試驗階段所得結果的顯著差異，以 $p < 0.05$ 表示有統計上的顯著性。



第五章 結果

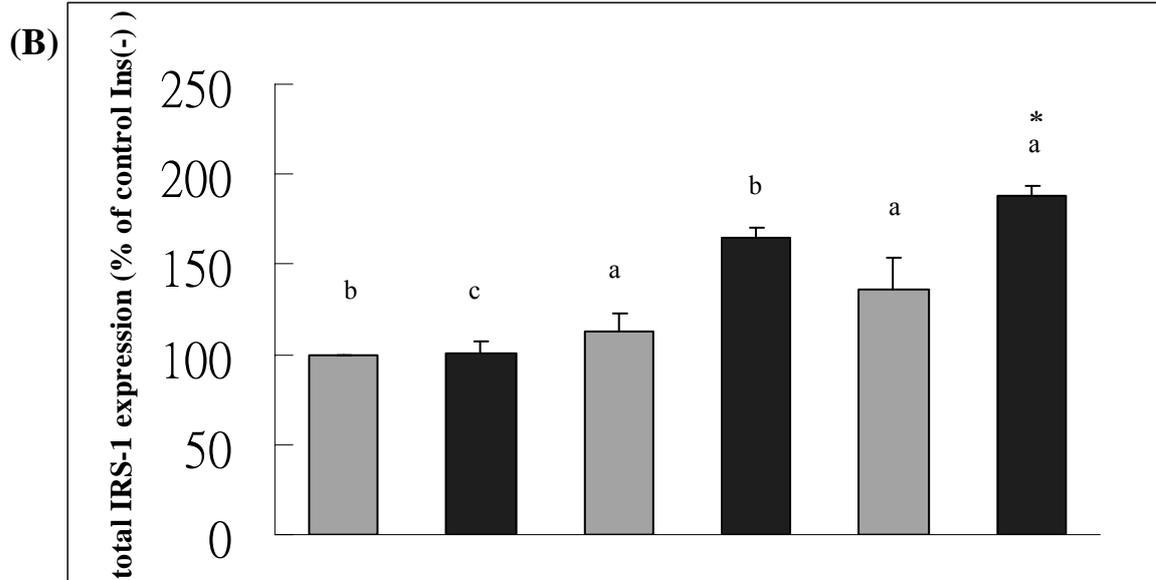
生物素對骨骼肌中胰島素訊息傳遞上游路徑的蛋白質表現量之影響

一、總 IRS-1 蛋白質表現量

本研究結果顯示，在沒有胰島素刺激的情況下(即為基礎狀態下)，生理水組的 total IRS-1 表現量明顯低於補充生物素 3 mg 及 6 mg 組 ($p<0.05$)。但在 3 mg 及 6 mg 組之間，雖沒有顯著的差異，但補充生物素 6 mg 其 total IRS-1 表現量有高於 3 mg 組的趨勢。然而在有胰島素的刺激之下，生理水組的 total IRS-1 表現量顯著低於補充生物素 3 mg 及 6 mg 組，並且補充生物素 6 mg 其 total IRS-1 表現量顯著高於 3 mg 組 ($p<0.05$)。且補充生物素 6 mg 組可增加胰島素刺激下，total IRS-1 蛋白質的表現量 (圖 5-1)。

Total IRS-1 protein expression

(A) IB: IRS-1



Biotin (mg)	0	0	3	3	6	6
Insulin	-	+	-	+	-	+

圖 5-1、三組不同劑量生物素補充 4 週後在基礎狀態或胰島素刺激下，骨骼肌細胞中總 IRS-1 蛋白質表現量。A：免疫墨點法的結果。B：以 Alpha Innotech Coraration ChemiImager™ 440 定量的結果¹。Fig. 5-1. Total IRS-1 protein expression in skeletal muscle cells on basal or insulin-induced condition after 4 weeks with 0,3,6 mg biotin/kg of BW supplementation. A : Immunoblot of total IRS-1 protein . B : Quantification of protein expression by Alpha Innotech Coraration ChemiImager™ 440¹. ¹ The values are calculated by percentage of control, ins (-), and expressed as mean ± SD. Values with different letter in insulin (-) or (+) group are significantly different ($p < 0.05$). *mean is significantly different from their insulin (-) group ($p < 0.05$).

二、總 IRS-2 蛋白質表現量

本研究結果顯示，在沒有胰島素刺激的情況下(即為基礎狀態下)，生理水組的 total IRS-2 表現量明顯低於補充生物素 3 mg 及 6 mg 組，並且 6 mg 組顯著高於 3 mg 組($p<0.05$)。然而在有胰島素的刺激之下，生理水組的 total IRS-2 表現量顯著低於補充生物素 3 mg 及 6 mg 組，並且 6 mg 生物素補充組的 total IRS-2 表現量顯著高於 3 mg 組($p<0.05$)。補充生物素 6 mg 組在有胰島素刺激後，其 total IRS-2 的蛋白質表現量顯著高於沒有胰島素刺激的情況($p<0.05$) (圖 5-2)。

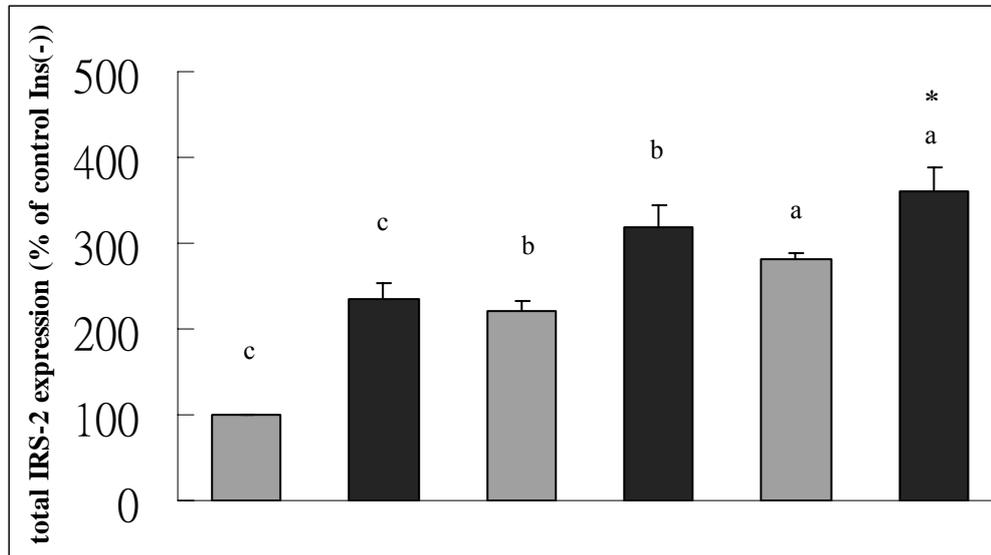


Total IRS-2 protein expression

(A) IB: IRS-2



(B)



Biotin (mg)	0	0	3	3	6	6
Insulin	-	+	-	+	-	+

圖 5-2、三組不同劑量生物素補充 4 週後在基礎狀態或胰島素刺激下，骨骼肌細胞中總 IRS-2 蛋白質表現量。A：免疫墨點法的結果。B：以 Alpha Innotech Coraration ChemiImager™ 440 定量的結果¹。Fig. 5-2. Total IRS-2 protein expression in skeletal muscle cells on basal or insulin-induced condition after 4 weeks with 0,3,6 mg biotin/kg of BW supplementation. A : Immunoblot of total IRS-2 protein . B : Quantification of protein expression by Alpha Innotech Coraration ChemiImager™ 440¹. ¹ The values are calculated by percentage of control, ins (-), and expressed as mean ± SD. Values with different letter in insulin (-) or (+) group are significantly different ($p < 0.05$). *mean is significantly different from their insulin (-) group ($p < 0.05$).

三、IRS-1 酪胺酸磷酸化型式的蛋白質表現量

利用免疫沉澱法和免疫墨點法，比較各組在相同總蛋白質濃度時，其 IRS-1 酪胺酸磷酸化此種活化型 IRS-1 的蛋白質表現情形。在沒有胰島素刺激的情況下(即為基礎狀態下)，生理水組的 IRS-1 酪胺酸磷酸化型式的蛋白質表現量分別和補充生物素 3mg 組和 6mg 組之間沒有顯著差異，但補充生物素 3mg 組比 6mg 組較高 ($p<0.05$)。然而在有胰島素的刺激之下，生理水組的 IRS-1 酪胺酸磷酸化型式的蛋白質表現情形顯著低於補充生物素 3mg 及 6mg 組 ($p<0.05$)，但兩生物素組之間沒有顯著差異。補充生物素 6 mg 組在有胰島素刺激下，其 IRS-1 酪胺酸磷酸化型式的蛋白質表現量顯著高於基礎狀態下($p<0.05$) (圖 5-3)。

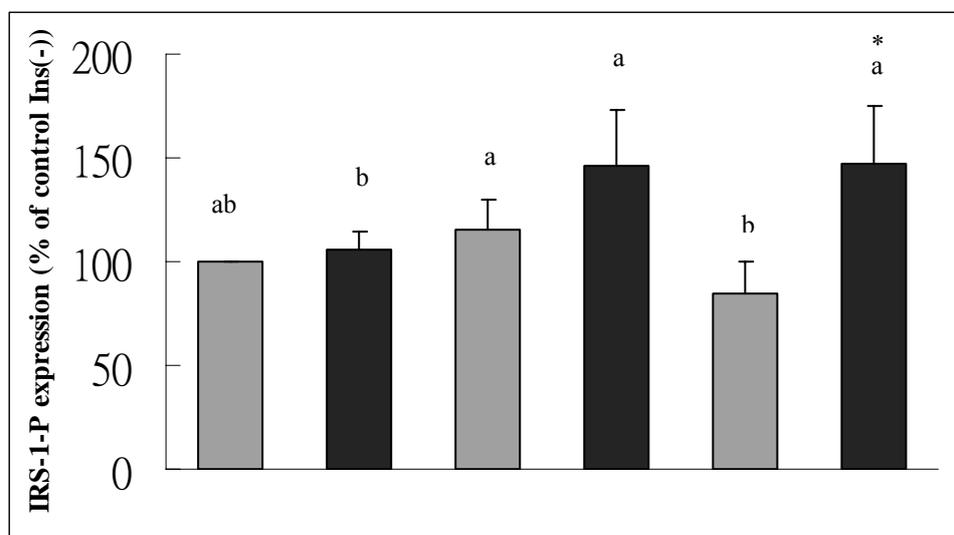
IRS-1 tyrosine phosphorylation protein expression

(A) IP : pY



IB : IRS-1

(B)



Biotin (mg)	0	0	3	3	6	6
Insulin	-	+	-	+	-	+

圖 5-3、三組不同劑量生物素補充 4 週後在基礎狀態或胰島素刺激下，骨骼肌細胞中 IRS-1 酪胺酸磷酸化型式的蛋白質表現量。A：免疫墨點法的結果。B：以 Alpha Innotech Coraration ChemiImager™ 440 定量的結果¹。Fig. 5-3. IRS-1 tyrosine phosphorylation protein expression in skeletal muscle cells on basal or insulin-induced condition after 4 weeks with 0,3,6 mg biotin/kg of BW supplementation. A : Immunoblot of IRS-1 tyrosine phosphorylation protein. B : Quantification of protein expression by Alpha Innotech Coraration ChemiImager™ 440¹. ¹ The values are calculated by percentage of control, ins (-), and expressed as mean ± SD. Values with different letter in insulin (-) or (+) group are significantly different ($p < 0.05$).

四、IRS-2 酪胺酸磷酸化型式的蛋白質表現量

同樣利用免疫沉澱法和免疫墨點法，比較各組在相同總蛋白質濃度的情況下，其 IRS-2 酪胺酸磷酸化此種活化型 IRS-2 的蛋白質表現情形。在沒有胰島素刺激的情況下(即為基礎狀態下)，其 IRS-2 酪胺酸磷酸化型式的蛋白質表現量為 6mg 組最高、3mg 組次之而生理水組最低 ($p<0.05$)。然而在胰島素刺激後，其 IRS-2 酪胺酸磷酸化型式的蛋白質表現量亦為補充生物素 6mg 組最高、3mg 組次之而生理水組最低 ($p<0.05$) (圖 5-4)。



IRS-2 tyrosine phosphorylation protein expression

(A) IP : pY



IB : IRS-2

(B)

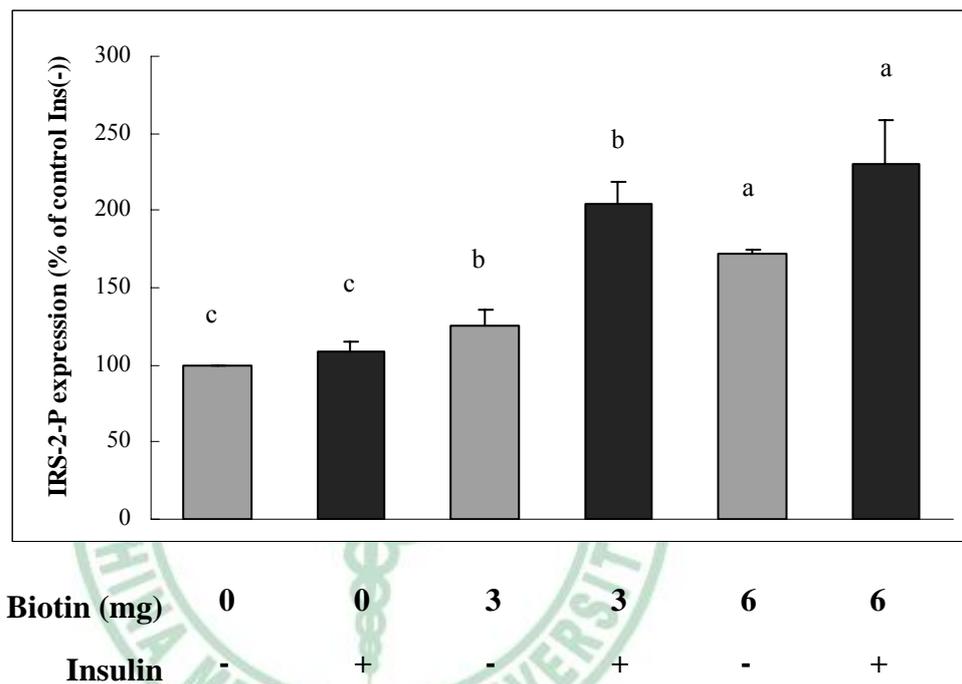


圖 5-4、三組不同劑量生物素補充 4 週後在基礎狀態或胰島素刺激下，骨骼肌細胞中 IRS-2 酪氨酸磷酸化型式的蛋白質表現量。A：免疫墨點法的結果。B：以 Alpha Innotech Cororation ChemiImagerTM 440 定量的結果¹。Fig. 5-4. IRS-2 tyrosine phosphorylation protein expression in skeletal muscle cells on basal or insulin-induced condition after 4 weeks with 0,3,6 mg biotin/kg of BW supplementation. A : Immunoblot of IRS-2 tyrosine phosphorylation protein. B : Quantification of protein expression by Alpha Innotech Cororation ChemiImagerTM 440¹. ¹ The values are calculated by percentage of control, ins (-), and expressed as mean \pm SD. Values with different letter in insulin (-) or (+) group are significantly different ($p < 0.05$).

五、與 IRS-1 相連結之 PI 3-kinase 的蛋白質表現量

利用免疫沉澱法和免役墨點法，比較各組合相似 IRS-1 蛋白質表現量的樣品中，與 IRS-1 相連結之 PI 3-kinase 的蛋白質表現量。在沒有胰島素刺激的情況下(即為基礎狀態下)，生理水組的 PI 3-kinase 的蛋白質表現量顯著低於補充生物素 3 mg 及 6 mg 組，且 6 mg 生物素補充組其 PI 3-kinase 的蛋白質表現量顯著高於 3 mg 組($p < 0.05$)。然而在有胰島素的刺激之下，生理水組的 PI 3-kinase 的蛋白質表現量顯著低於補充生物素 3 mg 及 6 mg 組，並且補充生物素 6 mg 組其 PI 3-kinase 的蛋白質表現量顯著高於 3 mg 組($p < 0.05$)。生理水組和 3 mg 生物素補充組均顯示在有胰島素刺激下，其 PI 3-kinase 的蛋白質表現量顯著高於沒有胰島素刺激的情況($p < 0.05$)，結果如圖 5-5 所示。

IRS-1 associated PI 3-kinase protein expression

(A) IP,IB: IRS-1



IP: IRS-1,IB: PI 3-k



(B)

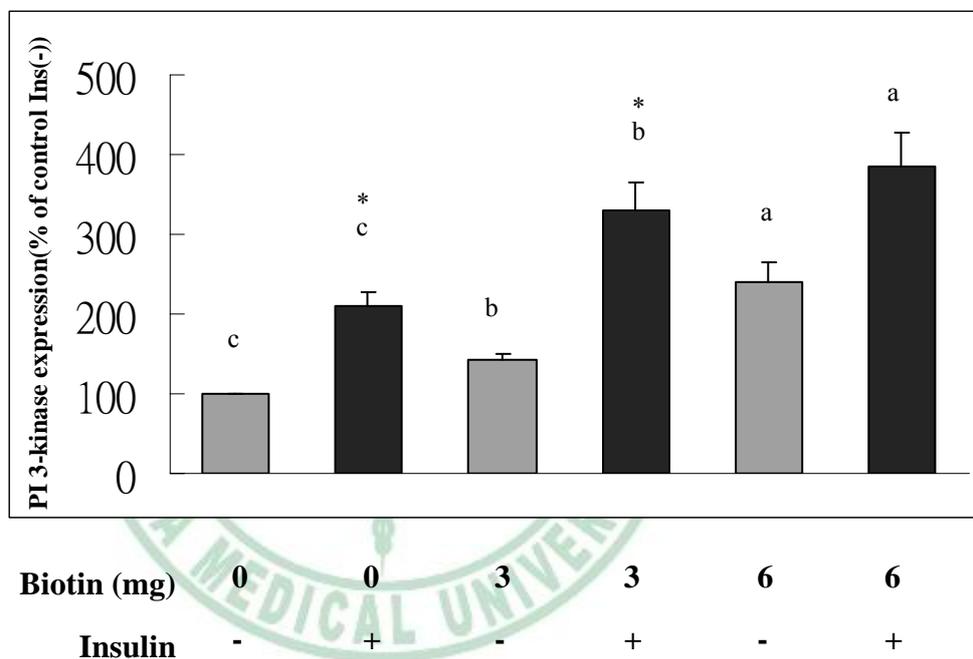


圖 5-5、三組不同劑量生物素補充 4 週後在基礎狀態或胰島素刺激下，骨骼肌細胞中與 IRS-1 連結的 PI 3-kinase 蛋白質表現量。A: 免疫墨點法的結果。B: 以 Alpha Innotech Coraration ChemiImager™ 440 定量的結果¹。Fig. 5-5. IRS-1 associated PI 3-kinase protein expression in skeletal muscle cells on basal or insulin-induced condition after 4 weeks with 0,3,6 mg biotin/kg of BW supplementation. A : Immunoblot of IRS-1 associated PI 3-kinase protein . B : Quantification of protein expression by Alpha Innotech Coraration ChemiImager™ 440¹. ¹ The values are calculated by percentage of control, ins (-), and expressed as mean ± SD. Values with different letter in insulin (-) or (+) group are significantly different ($p < 0.05$). *mean is significantly different from their insulin (-) group ($p < 0.05$).

六、與 IRS-2 相連結之 PI 3-kinase 的蛋白質表現量

利用免疫沉澱法和免役墨點法，比較各組含相似 IRS-2 蛋白質表現量的樣品中，與 IRS-2 相連結之 PI 3-kinase 的蛋白質表現量。在沒有胰島素刺激的情況下(即為基礎狀態下)，生理水組的 PI 3-kinase 的蛋白質表現量顯著低於補充生物素 3 mg 及 6 mg 組，且補充生物素 6 mg 其 PI 3-kinase 的蛋白質表現量顯著高於 3 mg 組($p<0.05$)。在有胰島素的刺激之下，生理水組的 PI 3-kinase 的蛋白質表現量顯著低於補充生物素 6 mg 組($p<0.05$)，然而各補充組均未顯示出胰島素刺激 PI 3-kinase 的蛋白質表現量增加的作用(圖 5-6)。

IRS-2 associated PI 3-kinase protein expression

(A) IP:IB: IRS-2



IP: IRS-2, IB: PI 3-k



(B)

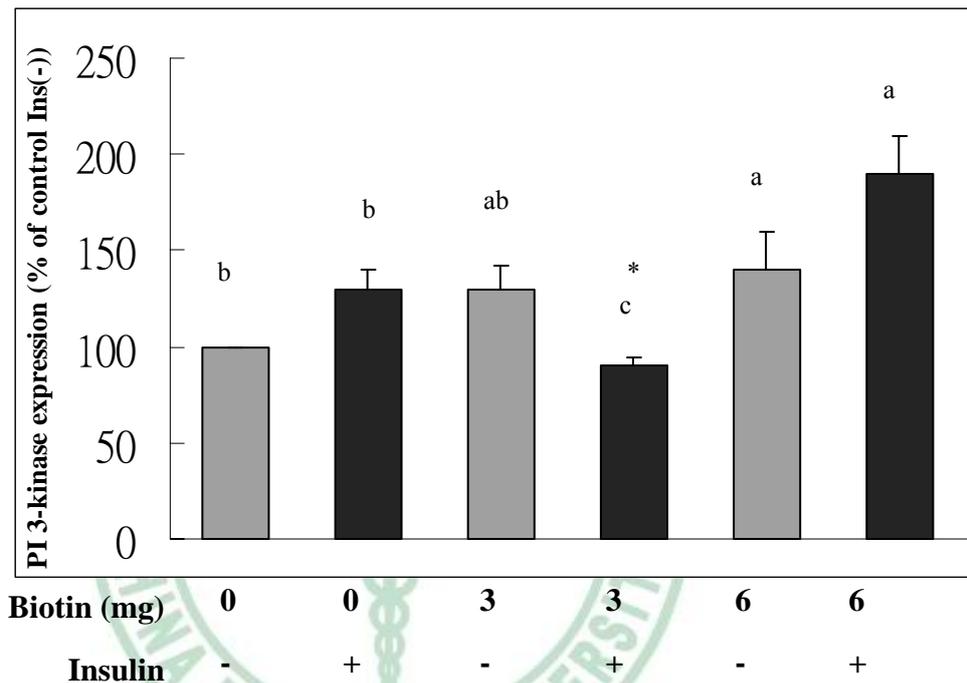


圖 5-6、三組不同劑量生物素補充 4 週後在基礎狀態或胰島素刺激下，骨骼肌細胞中與 IRS-2 連結的 PI 3-kinase 蛋白質表現量。A: 免疫墨點法的結果。B: 以 Alpha Innotech Coraration ChemiImager™ 440 定量的結果¹。Fig. 5-6. IRS-2 associated PI 3-kinase protein expression in skeletal muscle cells on basal or insulin-induced condition after 4 weeks with 0,3,6 mg biotin/kg of BW supplementation. A : Immunoblot of IRS-2 associated PI 3-kinase protein . B : Quantification of protein expression by Alpha Innotech Coraration ChemiImager™ 440¹. ¹ The values are calculated by percentage of control, ins (-), and expressed as mean ± SD. Values with different letter in insulin (-) or (+) group are significantly different ($p < 0.05$). *mean is significantly different from their insulin (-) group ($p < 0.05$).

第六章 討論

壹、補充生物素對於空腹血糖、葡萄糖耐受性、胰島素阻抗性及 GLUT4 的影響

許多研究已發現補充生物素可以改善葡萄糖代謝。口服或注射高劑量生物素已顯示可改善糖尿病 KK 小鼠(Reddi et al., 1988)、STZ 糖尿病大鼠(Zhang et al., 1997)及 OLETF 大鼠(Zhang et al., 1996)的葡萄糖耐受性。而目前人體的臨床報告中，口服或血液透析 9-16 mg/daily 生物素並沒有副作用的產生。先前有臨床研究將生物素口服劑量提高到 200 mg/daily，也沒有出現任何副作用 (Mock et al., 1996; Yoshikawa et al., 2002)。本研究所使用的雄性 KK/H1J 品系小鼠具有第 2 型糖尿病之特徵，如葡萄糖不耐症(glucose intolerance)、高胰島素血症(hyperinsulinemia)與胰島素阻抗性的遺傳性質。這樣的症狀可以經由高脂飲食提早誘發出來，

本研究室先前的研究結果發現，雄性 KK/H1J 品系小鼠在生物素未補充前，對照組、3mg 和 6mg 補充組在葡萄糖耐受性試驗的結果並無顯著差異。補充生物素兩週之後，3mg 組與對照組的葡萄糖耐受性沒有顯

著差異；然而 6mg 組第 60、90、120 分鐘之血糖濃度則顯著低於對照組 ($p < 0.05$)。在補充生物素四週後，3mg 組與 6mg 組的血糖濃度值在第 0、30、60、90 與 120 分鐘與對照組比較均顯著較低 ($p < 0.05$)。

由這些結果得知，補充生物素可改善 KK 小鼠對葡萄糖的耐受性。上述結果中，生物素 6mg 補充組雖然有顯著改善葡萄糖耐受性，然而 3mg 補充組卻沒有顯著差異，本研究室推測可能是因為補充劑量較少或是補充期不夠長，所以 60 分鐘後血糖下降的趨勢沒有很明顯。

在胰島素阻抗性方面，本研究室之前的結果與 Reddi 等人在 1988 年所得到的結果相似，補充生物素 3mg 或 6mg 四週之後，胰島素阻抗性有顯著下降 ($p < 0.05$)。而研究結果顯示，補充生物素可降低空腹血糖值，且 3mg 與 6mg 補充四週後均有達統計上的顯著，此顯示生物素對於第 2 型糖尿病 KK 小鼠的血糖調控是有幫助的，但需長期補充(四週以上)。

本研究室之前的研究發現，補充 3 mg 與 6 mg 生物素四週後，可分別顯著增加基礎狀態或胰島素誘導後骨骼肌細胞漿膜 (PM) 部位的 GLUT4 表現量及 GLUT4 在漿膜 (PM) 部位的比例。由此推論補充生

物素主要是增加骨骼肌細胞基礎狀態與胰島素誘導後的 GLUT4 位移作用，藉以增加漿膜 (PM) 部分的表現量而改善胰島素阻抗性，但對骨骼肌細胞 GLUT4 的蛋白質總量並沒有影響。因此本研究進一步探討生物素降低空腹血糖、改善葡萄糖耐受性、下降胰島素阻抗性及增加葡萄糖轉運的可能機制。



貳、補充生物素對胰島素訊息傳遞上游路徑的影響

一、生物素對胰島素訊息傳遞上游路徑中 IRS-1、IRS-2 的影響

在細胞的分子機制層面，胰島素的作用，是個複雜的網狀系統，可由不同的路徑和不同型式的關鍵酵素所調控表現出。由活體試驗與細胞試驗顯示，IRS-1 對代謝最大的影響在於調節脂肪和肌肉組織中胰島素的訊號傳遞，而 IRS-2 主要影響肝臟和肌肉組織 (Bruning et al., 1998 ; Kulkarni et al., 1999 ; Tamemoto et al., 1994)。

首先，在細胞內的層面，會出現大量的胰島素接受器的受質 IRS-1~IRS-4、Shc 和 Gab-1 等，皆會受 insulin receptor tyrosine kinase 作用而使其酪胺酸磷酸化，除了 Shc 之外，其他的受質磷酸化的部位可同時與許多 src homology 2(SH2)訊號蛋白交互作用。SH2 訊號蛋白包括 adaptor molecular Grb-2 和 PI 3-kinase 的調節單位(P85)等 (Skolnik et al., 1993; Cheatham and Kahn, 1995; Sugimoto et al., 1994)。

有研究指出，當 IRS-1 或 IRS-2 其 serine phosphorylation 後，會進行

另一項訊息傳遞，將迴饋抑制其 tyrosine phosphorylation，使得胰島素訊息傳遞路徑之 PI 3-kinase pathway 無法順利進行，而可能導致胰島素阻抗性。

表 6-1、與 IRS-1 磷酸化相關的激酶及其對 IRS-1 且/或胰島素訊息傳遞的影響

Table 6-1. Kinases implicated in IRS-1 phosphorylation and the effect on IRS-1 and/or insulin signalling

Phosphorylated residue	Kinase	Effect of phosphorylation on IRS-1/insulin signalling
Ser302	S6K	Decreased InR-IRS-1 interaction
Ser302, Ser307	JNK?	Decreased InR-IRS-1 interaction
Ser307	JNK	Decreased IRS-1 P-tyrosine Decreased IRS-1-associated PI3K
Human Ser307, Ser323, Ser574 (≡rat Ser302, Ser318, Ser570)	PKC δ	Decreased IRS-1 P-tyrosine
Ser307 and others	IKK1, IKK2	Unclear
Ser307	?	Increased IRS-1 degradation
Ser789	SIK2	Unclear
Ser789	AMPK	Increased IRS-1-associated PI3K activity
Serine?	GSK3	InR RTK inhibited
Human Ser1101 (≡rat Ser1000)	PKC θ	?
Ser612	Unknown PMA-activated kinase	Decreased IRS-1 P-tyrosine by PMA
Peptide including Ser612	ERK2	Decreased IRS-1-PI3K interaction
Human Ser636, Ser639 (≡rat Ser632, Ser635)	Rapamycin-sensitive kinase(s)	Correlates with insulin resistance
Serine/threonine Ser318	PKC ζ	Decreased IRS-1-associated P-tyrosine and interaction with the InR Decreased IRS-1-associated PI3K activity

許多研究都希望藉由增加胰島素訊息傳遞路徑的分子蛋白表現，進而改善胰島素阻抗性。Takehide 等人發現，給予 SD 大鼠飲食中 8% NaCl 的高鹽飲食，會增加其肌肉和肝臟中 IR β 、IRS-1 phosphotyrosine 和 IRS-2 phosphotyrosine 的蛋白質表現(Takehide et al., 2001)。近年流行的綠茶也有研究指出，正常動物模式中長期飲用綠茶可降低 SD 大鼠血漿三酸甘油酯濃度及增加胰島素敏感性，並由實驗結果推測，增加胰島素敏感性可能與酪胺酸磷酸化的 IR、IRS-1 和 GLUT4 的表現量增加有關(吳, 2003)。此外，在基因層面的研究方面，Loredana 等人發現，Estradiol (E2) 可增加乳癌細胞中 IRS-1 的基因表現，並增強了胰島素的訊息傳遞(Loredana et al., 2001)。Büren 等人則是發現在初代培養的大鼠脂肪細胞給予 Dexamethasone 將會減少 IRS-1、PI 3-kinase 與 PKB (protein kinase B)，而損害了胰島素訊息的傳遞和葡萄糖的轉運 (Büren et al., 2002)。

本研究的結果顯示，給予第 2 型糖尿病 KK 小鼠補充生物素 4 週後，可增加胰島素上游訊息傳遞路徑分子蛋白 IRS-1, IRS-2, PI 3-kinase 的表現，因此推測生物素可改善葡萄糖的調控，可能是藉由向上調節某些胰島素訊息傳遞路徑分子蛋白的表現所致。

雖然研究指出，IRS-1 與 IRS-2 的結構與功能性相似(Sun et al., 1995)，但近來有研究發現兩者間功能上仍有不同，有研究指出，IRS-2 對胰臟的 β 細胞，有促進其分泌胰島素的作用，Takehide 等人於 1997 年發現，骨骼肌細胞在相同胰島素濃度刺激下，IRS-2 去磷酸化(dephosphorylation) 的速度比 IRS-1 迅速，IRS-2 在胰島素刺激後會迅速去磷酸化，而 IRS-1 的磷酸化則可持續 60 分鐘以上 (Takehide et al., 1997) ，由於本研究室給予小鼠胰島素 30 分鐘的刺激，才進行犧牲，而取出骨骼肌，因此推測可能是因為此原因而 IRS-2 已有部分去磷酸化現象，而導致蛋白質表現很微弱，但由於每組的胰島素刺激時間相同，所以在相同條件下，或許仍能從結果中互相比較而得知不同的生物素補充組之間 IRS-2 酪胺酸磷酸化型式的蛋白質表現量。

二、生物素對胰島素傳遞路徑中與 IRS-1、IRS-2 連結的 PI 3-kinase 之影響

幾乎所有的有胰島素阻抗的動物模式或人體，其胰島素誘導的 PI 3-kinase 的活性有缺陷的情形(Takehide et al., 2001)。研究指出，肥胖的第 2 型糖尿病人骨骼肌中，受胰島素刺激的 PI 3-kinase 活性有受損的情形(Cusi et al., 2000)，而非肥胖的第 2 型糖尿病人骨骼肌中，也有相同的情況(Bjornholm et al., 2000)。

研究指出，IRS-1 對 PI 3-kinase 活化的作用比 IRS-2 強很多；並且和 IRS-1 相比，IRS-2 去磷酸化速度較快，活化 PI 3-kinase 較短暫(Smith-Hall et al., 1997; Inoue., 1998)。Takehide 等人發現，在骨骼肌細胞中，在相同胰島素濃度刺激下，IRS-2 去磷酸化(dephosphorylation) 的速度非常迅速而導致與 IRS-2 相連結的 PI 3-kinase 的活化也變得短暫(Takehide et al., 1997)，本研究結果中，補充生物素 3 mg 組其與 IRS-2 連結的 PI 3-kinase 的蛋白質表現量並不如預期，推測是由於此原因所致，但仍需進一步探討。

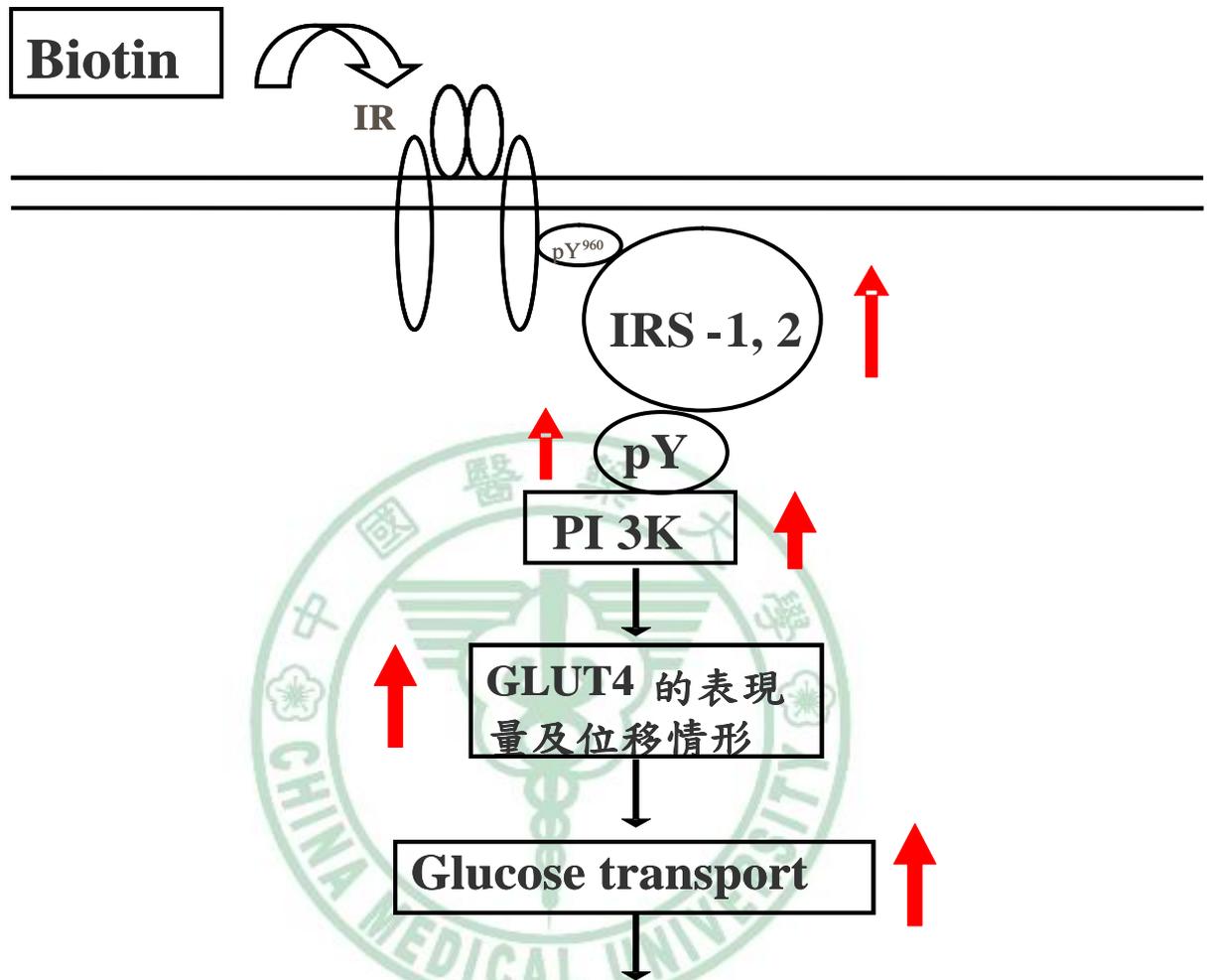
然而本研究著重探討和 IRS-1、IRS-2 連結的 PI 3-kinase 的蛋白質表現，來證實生物素可促使胰島素訊息順利傳遞，而達调控葡萄糖的作用。往後可進一步的探討胰島素訊息傳遞路徑的其他蛋白質，以進一步瞭解生物素影響胰島素訊息傳遞的詳細機轉。



第七章 結論

長期補充生物素，可能可增加胰島素訊息傳遞上游路徑中的蛋白質 IRS-1、IRS-2、其酪胺酸磷酸化的活化型式及與其相連結的 PI 3-kinase 蛋白質表現量，此可能是生物素增加骨骼肌中葡萄糖轉運蛋白 4 (GLUT4) 的位移、促使葡萄糖的汲取，進而改善空腹血糖和胰島素阻抗性的機制之一，希望藉由此結果，能進一步瞭解生物素對葡萄糖代謝的調控機制。





改善空腹血糖、葡萄糖耐受性及胰島素阻抗性

圖、7-1 生物素可能調節胰島素阻抗的機轉假說

第八章 參考文獻

行政院衛生署，(2002)。國人膳食營養素參考攝取量。

行政院衛生署，(2004)。台灣地區縣市死因統計結果。

行政院衛生署，(2006)。健康食品之調節血糖功能評估方法修正草案。

吳亮宜，(2003)。茶對血糖及胰島素敏感性之影響。國立台灣食品技術研究所博士論文。

Alfonso Leo'n-Del-Ri'ot (2005) Biotin-dependent regulation of gene expression in human cells *B Journal of Nutritional Biochemistry* .16 : 432– 434

Alzaid, A. A. (1996) Insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. A review. *Acta Diabetol* 33: 87-99.

American Diabetes Association: (2004) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 27: S5-10

American Diabetes Association: (1997) Tests of glycemia in diabetes (Position Statement). *Diabetes Care* 20: S18-20

Arteaga Llona, A. (1993) Insulin resistance. *Rev Med Chil* 121: 197-8.

Baur B, Suormala T, Baumgartner ER. (2002) Biocytin and biotin uptake into NB2a neuroblastoma and C6 astrocytoma cells. *Brain Res.* 925 (2):111 –21.

Báez-Saldaña, A., Zendejas-Ruiz, I., Revilla-Monsalve, C., Islas-Andrade, S., Cárdenas, A., Rojas-Ochoa, A., Vilches, A. and Fernandez-Mejia C. (2004) Effects of biotin on pyruvate carboxylase, acetyl-CoA carboxylase, propionyl-CoA carboxylase, and markers for glucose and lipid homeostasis in type 2 diabetic patients and nondiabetic subjects. *Am J Clin Nutr* 79: 238-43.

- Balabolkin, M.I. and Klebanova, E.M. (2003) Role of insulin resistance in pathogenesis of type 2 diabetes. *Ter Arkh* 75: 72-7.
- Bandyopadhyay G, Standaert ML, Galloway L, Moscat J, Farese RV. (1997) Evidence for involvement of PKC-zeta and non involvement of diacylglycerol-sensitive PKCs in insulin-stimulated glucose transport in L6 myotubes. *Endocrinology* 138:4721-31
- Baron V, Gautier N, Komoriya A, Hainaut P, Scimeca JC, Mervie M et al. (1990) insulin binding to its receptor induces a conformational change in the receptor C-terminus. *Biochemistry* 29:4634-41
- Baron V, Kaliman P, Gautier N, Van Obberghen E. (1992) the insulin receptor activation process involves localized conformational changes. *J Biol Chem* 267:23290-4
- Blok, J., Gibbs, E.M., Lienhard, G.E., Slot, J.W. and Geuze, H.J. (1988) Insulin-induced translocation of glucose transporters from post-Golgi compartments to the plasma membrane of 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Biol.* 106: 69-76.
- Boden, G., Lebed, B., Schatz, M., Homko, C. and Lemieux S. (2001) Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects. *Diabetes* 50: 1612-7.
- Büren, J., Liu, H.X., Jensen, J. and Eriksson, J.W. (2002) Dexamethasone impairs insulin signaling and glucose transport by depletion of insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B in primary cultured rat adipocytes. *Eur J Endocrinol.* 146: 419-429.
- Calera MR, Martinez C, Liu H, Jack AK, Birnbaum MJ, Pilch PF. (1998) Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. *J Biol Chem.* 273:7201-4
- Carlberg C. (1999) Lipid soluble vitamins in gene regulation. *Biofactors.* 10:91-7.

- Cheatham B, Kahn CR.(1995) Insulin action and the insulin signaling network. *Endo Rev* 16:117-42
- Cheatham B, Vlahos CJ, Cheatham L, Wang L, Blenis J, Kahn CR. (1994) Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 S6 kinase, DNA synthesis and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 14:4902-11
- Coggeshall, J.C., Heggers, J.P., Robson, M.C., and Baker, H.(1985) Biotin status and plasma glucose in diabetics. *Ann. NY Acad. Sci.*, 447: 389-392.
- Cong LN, Chen H, Li Y, Zhou L, McGibbon MA, Taylor SI, Quon MJ.(1997) Physiological role of Akt in insulin-stimulated translocation of GLUT4 in transfected rat adipose cells. *Mol Endocrinol* 11:1881-90
- Cormont M, Van Obberghen E, Zerial M, Le Marchand-Brusrel Y. (1996) Insulin induces a change in Rab5 subcellular localization in adipocytes independently of phosphatidylinositol-3 kinase activation. *Endocrinology* 137:3408-15
- Cortright, R.N., Azevedo, J.L., Jr., Zhou, Q., Sinha, M., Pories, W.J., Itani, S.I., and Lynis Dohm G. (2000) Protein kinase C modulates insulin action in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E553-62.
- Cristina Fernandez-Mejia T (2005) Pharmacological effects of biotin. *Journal of Nutritional Biochemistry* . 16:424– 427
- Cristina Fernandez-Mejia C, Zendejas-Ruiz I, Revilla Monsalve C, Islas-Andrade S, Ba'ez-Saldana A, Cardenas A, et al. (2003) Biotin treatment increases insulin sensitivity in type 2 diabetics. *American Diabetes Association 63rd Scientific Sessions. Diabetes*.52(Suppl):A459.
- Dakshimamurti K, Modi VV, Mistry SP. (1968) Some aspects of carbohydrates metabolism in biotin-deficient rats. *Proc Soc Exp Biol Med* .127:396– 400.

Dakshinamurti K, Chauhan J. (1994) Biotin-binding proteins. In: Dakshinamurti B K, editor. Vitamin receptors: vitamins as ligands in cell communication, vol. 1. Cambridge University Press. p. 200–49.

DeFronzo, R.A. (1988) The triumvirate: β -cell, muscle, liver; a collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 37: 667-87.

Diana Pacheco-Alvarez, R. Sergio Solórzano-Vargas and Alfonso León Del Río .(2002) Biotin in Metabolism and Its Relationship to Human Disease. *Archives of Medical Research* 33 439–447

Driscoll, H.K., Adkins, C.D., Chertow, T.E., Cordle, M.B., Matthews, K.A. and Chertow, B.S. (1997) Vitamin A stimulation of insulin secretion. *Pancreas* 15: 69-77.

Furukawa, M., Nobusawa, R., Shibata, H., Eto, Y. and Kojima, I. (1995) Initiation of insulin secretion in glucose-free medium by activin A. *Mol Cell Endocrinol* 113: 83-7.

Garvey, T.W. (1992) Glucose transport and NIDDM. *Diabetes Care*. 15: 396-417.

G.D. Holman, M. Kasuga (1997) From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport. *Diabetologia* 40: 991–1003

Gerich, J. E. (1999) Is insulin resistance the principal cause of type 2 diabetes? *Diabetes Obes Metab* 1: 257-63.

Gregory J Cooney, Ruth J Lyons, A Jayne Crew, Thomas E Jensen, Juan Carlos Molero, Christopher J Mitchell, Trevor J Biden, Christopher J Ormandy, David E James and Roger J Daly. (2004) Improved glucose homeostasis and enhanced insulin signalling in Grb14-deficient mice. *The EMBO* 23, 582–593

- Guilherme C. Barreiro, Raphael R. Prattali, Caio T. Caliseo, Felipe Y. Fugiwara, Mirian Ueno, Patr_icia O. Prada, L_icio A. Velloso, Mario J.A. Saad, and Jos_e B.C. Carvalheira* (2004) Aspirin inhibits serine phosphorylation of IRS-1 in muscle and adipose tissue of septic rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320: 992–997
- Hakan K.R. Karlsson, Kirsti Hallsten, Marie Bjornholm, Hiroki Tsuchida, Alexander V. Chibalin, Kirsi A. Virtanen, Ollj. Heinonen, Fredrik Lonnqvist, Pirjo Nuutila, and Juleen R.Zierath. (2005) Effects of metformion and rosiglitazone treatment on insulin signaling and glucose uptake in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes* 54:1459-1467
- Hellman, R. (2003) Insulin resistance syndrome and type 2 diabetes. *Endocr Pract* 9: 73-7.
- Hideyuki, S., M. I., Shimizu, M., Sasaki, Y., Komai, M. and Furukawa, Y. (2000) Characteristics of the biotin enhancement of glucose-induced insulin release in pancreatic islet the rat. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 550-554.
- Hinds TS, West WL, Knight EM. (1997) Carotenoids and retinoids: a review of research, clinical, and public health applications. *J Clin Pharmacol.* 37:551–8. Wu-Wong JR, Tian J, Goltzman D. (2004) Vitamin D analogs as therapeutic agents: a clinical study update. *Curr Opin Investig Drugs.* 5:320– 6.
- Holgado-Madruga M, Emler DR, Moscatello DK, Godwin AK, Wong AJ. A (1996) Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signaling. *Nature*; 379:560-4
- Joly M, Kaziauskas A, Fay FS, Corvera S. (1994) Disruption of PDGF receptor trafficking by mutation of its PI3-kinase binding site. *Science* .263:684-7

- Jhun BH, Rose DW, Seely BL, Rameh L, Cantley L, Saltiel AR, Olefsky JM. (1994) Microinjection of the SH2 domain of the 85-kD subunit of PI3-kinase inhibits insulin-induced DNA synthesis and c-fos expression. *Mol Cell Biol*.14:7466-75
- Kahn CR, White MF. (1988) The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. *J Clin Invest* 82:1151-6
- Kaliman P, Baron V, Gautier N, Van Obberghen E. (1992) Antipeptide antibody to the insulin-like growth factor- I receptor sequence 1232-1246 inhibits the receptor kinase activity. *J Biol Chem* 267:10645-51
- Kelley, D.E., Reilly, J.P., Veneman, T. and Mandarino, L.J. (1990) Effects of insulin on skeletal muscle glucose storage, oxidation, and glycolysis in humans. *Am J Physiol* 258: E923-9.
- Klaus Moeschel, Alexander Beck, Cora Weigert, Reiner Lammers, Hubert Kalbacher, Wolfgang Voelter, Erwin D. Schleicher, Hans-Ulrich Haering, and Rainer Lehmann (2004) Protein Kinase C- ζ -induced Phosphorylation of Ser318 in Insulin Receptor Substrate-1 (IRS-1) Attenuates the Interaction with the Insulin Receptor and the Tyrosine Phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem* 279:25157-63
- Kotani K, Carozzi AJ, Sakaue H, Hara K, Robinson LJ, Clark SF, Yonezawa K, James DE, Kasuga M.(1995) Requirement for PI3-kinase in insulin-stimulated GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 209:343-8
- Kotani K, Hara K, Yonezawa K, Kasuga M. (1995) PI3-kinase as an upstream regulator of the small GTP-binding protein Rac in the insulin signaling of membrane ruffling. *Biochem Biophys Res Commun*. 208:985-90
- Kotani K, Ogawa W, Matsumoto M, Kitamura T, Sakaue H, Hino Y, Miyake K, Sano W, Akimoto K, Ohno S, Kasuga M. (1998) Requirement of atypical PKC lambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* 18:6971-82

Koustikos D, Fourtounas C, Kapetanaki A, Agroyannis B, Tzanatos H, Rammos G, et al. (1966) Oral glucose test after high-dose i.v. biotin administration in normoglycemic hemodialysis patients. *Ren Fail*:18:131– 7.

Kramer, T.R. and Briske-Anderson, M. (1984) Effects of biotin deficiency on polyunsaturated fatty acid metabolism in rats. *J Nutr* 114: 2047-52.

Lavan BE, Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, Lienhard GE. (1997) A novel 160-kD phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 272:21404-7

Lebrun C, Baron V, Kaliman P, Gautier N, Dolais-Kitabgi J, Taylao S et al. (1993) *J Biol Chem* 268:11272-7

Loredana Mauro, Michele Salerno, Maria Luisa Panno, Dina Bellizzi, Diego Sisci, Antonella Miglietta, Eva Surmacz, and Sebastiano Ando (2001) Estradiol Increases IRS-1 Gene Expression and Insulin Signaling in Breast Cancer Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **288**, 685–689

Makino, Y., Maebashi, M., Furukawa, Y. and Sato, T. (1985) Biotin therapy. *HifukaMOOK* 2: 237-244.

Maebash, M., Y. M., Furukawa, Y., Ohinata, K., Kimura, S. and Sato, T. (1993) Therapeutic evaluation of effect of biotin on hyperglycemia in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *J. clin. Biochem. Nutr.* 14: 211-218.

Matthews, D.R. and Hosker, J.P. (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412-9.

McCarty, M.F. (1999) High-dose biotin, an inducer of glucokinase expression, may synergize with chromium picolinate to enable a definitive nutritional therapy for type 2 diabetes. *Med Hypotheses* 52: 401-6.

- Mock, D.M., Johnson, S.B. and Holman, R.T. (1988) Effects of biotin deficiency on serum fatty acid composition: evidence for abnormalities in humans. *J Nutr* 118: 342-8.
- Mock, D.M., Mock, N.I., Johnson, S.B. and Holman, R.T. (1988) Effects of biotin deficiency on plasma and tissue fatty acid composition: evidence for abnormalities in rats. *Pediatr Res* 24: 396-403.
- Norman, A.W., Frankel, J.B., A. M. and Grodsky, G.M. (1980) Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin. *Science* 209: 823-5.
- Pacheco-Alvarez D, Solorzano-Vargas RS, Del Rio AL. (2002) Biotin in metabolism and its relationship to human disease. *Arch Med Res*.33(5):439– 47
- Paolisso, G., D'Amore, A., Balbi, V., Volpe, C., Galzerano, D., Giugliano, D., Sgambato, S. (1994) Vitamin C affects glucose homeostasis in healthy subjects and in non-insulin-dependent diabetics. *Am. J. Phys.* 266: E261-268.
- Pessin, J.E. and Saltiel, A.R. (2000) Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 165-9.
- Petersen, K.F. and Shulman, G.I. (2002) Pathogenesis of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 90(suppl): 11G-18G.
- Reddi, A., DeAngelis, B., Frank, O., Lasker, N and Baker, H. (1988) Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice. *Life Sci.* 42: 1323-30.
- Pellicci G, Lanfrancone L, Grignani F, McGlade J, Cavallo F, Forni G et al. (1992) A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* 70:93-104

- Renders, C.M., Delemarre-van de Waal, H.A., Dekker, J.M. and Hirasing, R.A. (2003) Insulin resistance and diabetes type 2 in overweight children. *Ned Tijdschr Geneeskd* 147: 2060-3.
- Robert T. Davidson, Edward B. Arias, and Gregory D. Cartee.(2002) Calorie restriction increases muscle insulin action but not IRS-1-, IRS-2-, or phosphotyrosine-PI 3-kinase
Am J Physiol Endocrinol Metab 282: E270–E276
- Rodriguez-Melendez R, Zempleni J. (2003) Regulation of gene expression by biotin. *J Nutr Biochem.* 14:680–90.
- Rodriguez-Melendez R, Cano S, Mendez ST, Velazquez A. (2001) Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats. *J Nutr.*131:1909– 13.
- Saad, M.J.A., Araki, E., Miralpeix, M., Rothenberg, P.L., White, M.F., Kahn, C.R., (1992) Regulation of insulin receptor substrate 1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 90, 1839–1849.
- Shepherd, P.R. and Kahn, B.B. (1999) Glucose transporters and insulin action-implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med* 341: 248-57.
- Standaert ML, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscat J, Farese RV. (1997) Protein kinase C-zeta as a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase during insulin stimulation in rat adipocytes. Potential role in glucose transport. *J Biol Chem.* 272:30075-82
- Solorzano-Vargas S, Pacheco-Alvarez D, Leon-Del-Rio A. (2002)Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*99:5325– 30.

- Shulman, G. I. (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 171-6.
- Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA et al. (1991) Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 352:73-7
- Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG, Glasheen E et al.(1995) Role of IRS-2 in insulin and cytokine signaling. *Nature* 377:173-7
- Sone, H., Ito, M., Shimizu, M., Sasaki, Y., Komai, M. and Furukawa, Y. (2000) Characteristics of the biotin enhancement of glucose-induced insulin release in pancreatic islets of the rat. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 550-4.
- Takayama, S., Kahn, C.R., Kubo, K. and Foley, J.E. (1988) Alterations in insulin receptor autophosphorylation in insulin resistance: correlation with altered sensitivity to glucose transport and antilipolysis to insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 66: 992-9.
- Takehide Ogihara, Bo-Chul Shin, Motonobu Anai, Hideki Katagiri, Kouichi Inukai, Makoto Funaki, Yasushi Fukushima, Hisamitsu Ishihara, Kuniaki Takata, Masatoshi Kikuchi, Yoshio Yazaki, Yoshitomo Oka, and Tomoichiro Asano.(1997) Insulin Receptor Substrate (IRS)-2 Is Dephosphorylated More Rapidly than IRS-1 via Its Association with Phosphatidylinositol 3-Kinase in Skeletal Muscle Cells. *J Biol Chem*:272,12868-12873
- Takehide Ogihara, Tomoichiro Asano, Katsuyuki Ando, Yuko Chiba, Nobuo Sekine, Hideyuki Sakoda, Motonobu Anai, Yukiko Onishi, Midori Fujishiro, Hiraku Ono, Nobuhiro Shojima, Kouichi Inukai, Yasushi Fukushima, Masatoshi Kikuchi, and Toshiro Fujita.(2001) Insulin Resistance With Enhanced Insulin Signaling in High-Salt Diet–Fed Rats. *Diabetes* 50:573
- Tartare S, Mothe I, Kowalski-Chauvel A, Breittmayer JP, Ballotti R, Van Obberghen E. Signal transduction by a chimeric insulin-like growth factor- I (IGF- I) receptor having the carboxyl-terminal domain of the insulin receptor. *J Biol Chem* 269:11449-55

- Tolias KF, Cantley LC, Carpenter CL. (1995) Rho family GTPases bind to phosphatidylinositide kinases. *J Biol Chem* 270:17656-9
- Uehara, M. and Fujigaki, T. (1980) Glucose tolerance in pustulosis palmaris et plantaris. *Arch Dermatol* 116: 1275-6.
- Van Obberahen E.(1994) Signaling through the insulin receptor and the insulin-like growth factor- I receptor. *Diabetologia* 37 (Suppl. 2):S25-34
- Virkamäki A, Ueki K & Kahn CR(1999)Protein–protein interactions in insulin signalling and the molecular mechanism of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 103 931–943.
- Vela'zquez A, Tera'n M, Ba'ez A, Gutierrez J, Rodri'guez R. (1995) Biotin supplementation affects lymphocyte carboxylases and plasma biotin in severe protein-energy malnutrition. *Am J Clin Nutr.*61:385– 91.
- Watanabe T, Endo A. (1990) Teratogenic effects of maternal biotin deficiency on mouse embryos examined at midgestation. *Teratology.* 42:295– 300.
- Watanabe T. (1996) Morphological and biochemical effects of excessive amounts of biotin on embryonic development in mice. *Experientia.* 52:149–54.
- White MF & Kahn CR (1994) The insulin signalling system. *J Biol Chem:*269 1–4.
- Wolf B. Disorders of biotin metabolism. In: Scriver C, William S, Valle D, editors. (2001) *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* McGraw-Hill Professional. p. 3935– 62.
- Yamauchi, T., Tobe, K., Tamemoto, H., Ueki, K., Kaburagi, Y., Yamamoto-Honda, R., Takahashi, Y., Yoshizawa, F., Aizawa, S., Akanuma, Y., Sonenberg, N., Yazaki, Y., Kadowaki, T., (1996) Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Mol. Cell Biol.* 16, 3074–3084.

Yarden Y, Ullrich A. (1988) Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 57:443-78

Y. Le Marchand-Brustel, P. Gual, T. Grémeaux, T. Gonzalez, R. Barrès and J.-F. Tanti. (2003) Fatty acid-induced insulin resistance: role of insulin receptor substrate 1 serine phosphorylation in the retroregulation of insulin signaling. *Biochemical Society Transactions* 31:1152

Yoshikawa, H., Tajiri, Y., Sako, Y., Hashimoto, T., Umeda, F. and Nawata, H. (2002) Effects of biotin on glucotoxicity or lipotoxicity in rat pancreatic islets. *Metabolism* 51: 163-8.

Zhang, H., Osada, K., Maebashi, M., Ito, M., Komai, M. and Furukawa, Y. (1996) A high biotin diet improves the impaired glucose tolerance of long-term spontaneously hyperglycemic rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 42: 517-26.

