

中國醫藥大學營養學系碩士班
碩士論文

補充生物素對第 2 型糖尿病 KK 小鼠骨骼肌及肝臟細胞中

Protein Kinase C ζ 與 Protein Kinase B

蛋白質表現與活化的影響

**Effect of Biotin on Protein Expression and Activation of
Protein Kinase C ζ and Protein Kinase B in Skeletal Muscle
and Liver Cells of Type 2 Diabetic KK Mice**

指導老師：張毓芬 博士 (Yu-Feng Chang, Ph. D)

研究生：蕭鈺瑾 (Yu-Chin Hsiao)

中華民國九十六年七月

July, 2007

目錄

目錄.....	I
圖次.....	IV
表次.....	VII
縮寫表.....	IX
中文摘要.....	XI
英文摘要.....	XIV
第一章、序言.....	1
第二章、文獻整理	
壹、糖尿病(Diabetes Millitus).....	4
貳、第 2 型糖尿病與胰島素阻抗性(Insulin resistance).....	10
參、胰島素阻抗性之生化機轉.....	12
肆、胰島素訊息傳遞機制.....	14
伍、Protein kinase C (PKC)之介紹.....	16
陸、Protein kinase B (PKB)之介紹.....	21
柒、生物素(Biotin).....	27
捌、本實驗室先前的結果.....	38
第三章、研究目的.....	46

第四章、材料與方法

壹、試驗材料.....	47
貳、試驗設計與分組.....	52
參、試驗流程.....	53

第五章、實驗結果

壹、生物素對骨骼肌細胞中胰島素訊息傳遞路徑中 PKC ζ 的蛋白質表現量的影響.....	65
貳、生物素對骨骼肌細胞中胰島素訊息傳遞路徑中 PKB(Akt)蛋白質表現量的影響.....	71
參、生物素對肝臟細胞中胰島素訊息傳遞路徑中 PKC ζ 的蛋白質表現量的影響.....	75
肆、生物素對肝臟細胞中胰島素訊息傳遞路徑中 PKB(Akt)蛋白質表現的影響.....	81

第六章、討論

壹、補充生物素對於空腹血糖、胰島素阻抗性、IRS-1/2、IRS-1/2 與 PI 3-kinase 連結與 GLUT4 蛋白質表現量的影響.....	85
---	----

貳、生物素對骨骼肌細胞中胰島素訊息傳遞路徑中 PKC ζ 的蛋白質表現量的影響.....	87
參、生物素對骨骼肌細胞中胰島素訊息傳遞路徑中 PKB(Akt)蛋白質表現量的影響.....	90
肆、生物素對肝臟組織中胰島素訊息傳遞路徑中 PKC ζ 的蛋白質表現量的影響.....	95
伍、生物素對肝臟組織中胰島素訊息傳遞路徑中 PKB(Akt) Ser473 與 Thr308 磷酸化的蛋白質表現量的影響.....	97
陸、生物素對肝臟組織中 PKC ζ 、PKB(Akt) Ser473 與 Thr308 調節部位磷酸化的胰島素訊息傳遞路徑.....	100
第七章、結論.....	102
第八章、參考文獻.....	104

圖次

圖 2.1、胰島素阻抗性影響體內代謝.....	13
圖 2.2、胰島素訊息傳遞路徑.....	14
圖 2.3、PKC 家族分類與結構.....	16
圖 2.4、aPKC 在醣類代謝中扮演的角色.....	17
圖 2.5、PKC ζ 活化機制.....	18
圖 2.6、Pkb(Akt) 異構物受絲胺酸(Ser)與酰胺酸(Thr)活化區.....	21
圖 2.7、PKB(Akt)異構物在各組織中的表現情形.....	22
圖 2.8、PKB(Akt)異構物的功能.....	22
圖 2.9、胰島素刺激 PKB(Akt)活化的路徑.....	24
圖 2.10、PKB(Akt)與葡萄糖代謝的關係.....	26
圖 2.11、生物素的結構.....	27
圖 2.12、生物素的體內代謝.....	29
圖 2.13、生物素代謝物.....	31
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， 骨骼肌細胞質中總 β -actin、PKC ζ 蛋白質表現 量.....	66

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， 骨骼肌細胞膜中總 β -actin、PKC ζ 蛋白質表現 量.....	68
圖 5.3、補充三組不同劑量的生物素 4 週後骨骼肌 PKC ζ 在細胞膜部位 與全細胞的蛋白質含量比值.....	70
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， 骨骼肌中總 β -actin、PKB(Akt) Ser473 調節部位磷酸化蛋白質表 現量.....	72
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， 骨骼肌中總 β -actin、PKB(Akt) Thr308 調節部位磷酸化蛋白質表 現量.....	74
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， 肝臟中細胞質中總 β -actin、PKC ζ 蛋白質表現量.....	76
圖 5.7、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， 肝臟細胞膜中總 β -actin、PKC ζ 蛋白質表現量.....	78
圖 5.8、三組不同劑量的生物素 4 週後肝臟中 PKC ζ 在細胞膜部位與全 細胞的蛋白質含量比值.....	80
圖 5.9、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，	

肝臟中總 β -actin、PKB(Akt) Ser473 調節部位磷酸化蛋白質表現量.....	82
圖 5.10、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，肝臟中總 β -actin、PKB(Akt) Thr308 調節部位磷酸化蛋白質表現量.....	84
圖 6.1、骨骼肌中胰島素胰島素傳遞路徑與其他可能調節因子的關係.....	92
圖 6.2、骨骼肌與脂肪組織受胰島素刺激後可能影響的訊息傳遞路徑.....	94
圖 6.3、肝臟組織受胰島素刺激後可能影響的訊息傳遞路徑.....	101
圖 7.1、生物素可能調節骨骼肌中胰島素阻抗的機轉假說.....	102
圖 7.2、生物素可能調節肝臟中胰島素阻抗的機轉假說.....	103

表次

表 2.1、糖尿病與葡萄糖不耐的診斷標準.....	6
表 2.2、糖尿病的分類.....	9
表 2.3、第 1 型糖尿病與第 2 型糖尿病的比較.....	9
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.....	39
表 2.5、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.....	41
表 4.1、Formulab Diet 5008.....	49
表 4.2、高脂高熱量(含 35.5% Lard)之飼料成分.....	49
表 4.3、高脂高熱量飼料之卡路里與三大營養素之比例.....	49
表 4.4、本試驗的處理方式與分組.....	52
表 4.5、均質液 Buffer A.....	54
表 4.6、均質液 Buffer B.....	55
表 4.7、均質液 Buffer C.....	56
表 4.8、均質液 Buffer D.....	57
表 4.9、蛋白質標準品樣品製備.....	58
表 4.10、膠體電泳下層膠與下層膠製備.....	59

表 4.11、4× sample buffer.....	60
表 4.12、Running gel buffer ; Stacking gel buffer.....	60
表 4.13、10× Running buffer.....	60
表 4.14、Transfer Buffer.....	62
表 4.15、PBS.....	62
表 4.16、Commassie brilliant blue R-250 染劑；去染劑.....	63
表 4.17、封片液.....	63



縮寫表

ADA : American Diabetes Association

IR : Insulin receptor

IRS : Insulin receptor substrate

PI 3Kinase : Phosphoinositide-3-kinase

GLUT4 : Glucose transporter 4

PKC : Protein kinase C

PKB : Protein kinase B

PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PIP3 : Phosphatidylinositol-3,4,5-P3

PDK-1 : Phosphoinositide-dependent kinase 1

PDK-2 : Phosphoinositide-dependent kinase 2

GSK-3 : Glycogen synthase kinase 3

FAS : Fatty acid synthase

PEPCK : Phosphoenolpyruvate carboxylase

G6Pase : Glucose-6-phosphatase

GK : Glucokinase

SREBP-1c : Sterol regulatory element-binding protein- 1c

BSA : Bovine serum albumin

SDS : Sodium dodecyl sulfate

APS : Ammonium persulfate

TEMED : N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine

PBS : Phosphate-Buffer Saline

PBS/Tween 20 : Phosphate-Buffer Saline-Tween 20

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA : ethylene glycol tetraacetic acid

PMSF : Phenylmethylsulfonyl fluorid

HEPES : N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]

$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$: Sodium pyrophosphate

Na_3VO_4 : Sodium orthovanadate

NaF : Sodium fluoride

NP-40 : Ninidet P-40

中文摘要

生物素(Biotin)屬於 B 群維生素的一種，為體內醣類、脂質、蛋白質和核酸的代謝過程中許多酶的輔助因子。本研究室先前的研究發現，生物素會影響體內葡萄糖的恆定與代謝，長期給予第 2 型糖尿病 KK 小鼠補充生物素可降低空腹血糖與胰島素阻抗性，且可顯著增加骨骼肌中 IRS-1/2、IRS-1/2 與 PI 3-kinase 連結、GLUT4 的表現與位移。過去研究指出，PKC ζ 與 PKB(Akt)參與骨骼肌中葡萄糖的運輸是藉由誘導胰島素所調節的 GLUT4 位移至細胞膜的作用來調節細胞對葡萄糖的汲取；肝臟中 PKB(Akt)與肝醣合成、醣質新生作用相關。因此本研究欲進一步探討在骨骼肌中生物素調節 GLUT4 的機制是否藉由 PKC ζ 或 PKB(Akt)路徑；同時探討肝臟中胰島素透過 PKC ζ 、PKB(Akt) Thr308 與 Ser473 調節部位磷酸化蛋白質的表現對於體內醣類與脂質的調節作用。持續 4 週給予第 2 型糖尿病雄性 KK 小鼠不同的生物素補充：生理水組(0 mg/kg/day)、3mg 組、6mg 組後，犧牲前再分別給予(4U/100g regular insulin)或不給予胰島素刺激，犧牲後取得組織樣品，以免疫墨點法分析組織中細胞質與細胞膜中 PKC ζ 的蛋白質表現與評估活化情形、PKB(Akt) Thr308 與 Ser473 調節部位磷酸化的蛋白質表現。

結果顯示，骨骼肌組織中，沒有胰島素刺激下，細胞質與細胞膜中 PKC ζ 表現量均以生物素補充組顯著高於生理水組，而當胰島素刺激後，細胞質中的 PKC ζ 表現量為生物素補充組大於生理水組，細胞膜則是小於生理水組。沒有胰島素刺激時，PKB(Akt) Ser 473 調節部位磷酸化蛋白質表現增加，推測在空腹的時候體內嘗試著合成肝醣及增加週邊組織對於血中葡萄糖的利用來降低血糖的濃度。PKB(Akt) Thr 308 調節部位磷酸化蛋白質表現依次減少，可能因為此時這個位置並沒有被活化的，且受到 PDK-1 影響的程度減少。胰島素刺激後，由 KK 糖尿病小鼠體內的 PKB(Akt) Ser 473 與 Thr 308 調節部位磷酸化蛋白質表現，推測可能是因為在給予生物素之後，PKB(Akt) Ser 473 調節骨骼肌葡萄糖汲取、利用的作用較長，而 PKB(Akt)Thr 308 調節部位可能因為與肝臟相同，較容易去磷酸化而導致反而表現量減少。由細胞膜 PKC ζ 表現量佔總量的比值來觀察 PKC ζ 活化的情況及 PKB(Akt) Thr308、Ser473 調節部位磷酸化蛋白質的表現，推斷給予生物素 3mg 四週後增加 GLUT4 位移的作用是經由 PKC ζ 所調節的；給予生物素 6mg 組雖然 PKC ζ 位移到細胞膜的活化作用是減少的，但是細胞質的蛋白質表現卻明顯的增加，細胞內總 PKC ζ 蛋白質較沒有胰島素刺激的生理水組增加，因此也有調節 GLUT4 位移的作用，但其機制可能還需進一步探討。

肝臟中 PKB(Akt) Thr308 與 Ser473 調節部位磷酸化蛋白質的表現方面，沒有胰島素刺激的三組中 PKB(Akt) Ser473 調節部位磷酸化蛋白質表現量推測在給予生物素補充之後，空腹時 PKB(Akt) Ser473 已經受到上游蛋白質分子調節的作用了。PKB(Akt) Thr308 調節部位磷酸化蛋白質表現方面，卻是 6mg 組最低，3mg 組次之，生理水組最高，可能表示了此時 PKB(Akt) Thr308 調節部位尚未被活化，也沒有催化下游蛋白質分子的能力。同組別中以胰島素刺激與否比較，發現生理水組、6mg 組有胰島素刺激的 PKB(Akt) Thr308 調節部位磷酸化蛋白質表現皆顯著低於沒有胰島素刺激，推測可能因為時間過久，導致其蛋白質已經去磷酸化了；3mg 組則去磷酸化過程較緩慢，所以表現量還是較沒有刺激時高。由此結果可得知，肝臟中 PKB(Akt)B 調節醣質新生作用是減少的，肝醣合成的作用則是增加的，但因 PKB(Akt) Thr308 調節部位產生去磷酸化的時間較快，所以在胰島素刺激 30 分鐘時，這些作用可能已經減弱了。

關鍵字：第 2 型糖尿病、生物素、Protein kinase C ζ (PKC ζ)、Protein kinase B(PKB)

Abstract

Biotin is one kind of B vitamins that is a cofactor of many enzymes in body. It plays an important role in metabolism of carbohydrate, protein, lipid, nucleic acid, especially in glucose homeostasis and metabolism. Our previous study has demonstrated that biotin supplement may lower the impaired fasting glucose and insulin resistance, and IRS-1/2, IRS-1/2 associated with PI 3-Kinase protein expression and GLUT4 protein translocation in skeletal muscle cells.

Some studies point out PKC ζ and PKB(Akt) involved in skeletal muscle glucose uptake by regulating GLUT4 translocation stimulated by insulin. In liver, PKB(Akt) is associated with glycogenesis and gluconeogenesis. Thus this study want to evaluate the effects of biotin on regulating GLUT4 translocation by PKC ζ or PKB(Akt) pathway in skeletal muscle and in liver cells. KK diabetic mice were given different dosage of biotin per day for four weeks, and before sacrificed, were separated into two groups by with or without insulin stimulation. After sacrificed, PKC ζ protein expression in cytosol and membrane in skeletal muscles cells and PKB(Akt) protein expression in skeletal muscles and livers cells were analyzed by immunoblotting.

The results showed that without insulin stimulated, biotin may increase both PKC ζ protein expression in cytosol and membrane of skeletal muscle cells. PKC ζ protein expression increase in cytosol but decrease in membrane when insulin stimulated. In no insulin treated group, PKB(Akt) Ser473 phosphorylation protein expression increased. These results suggested that in fasting condition skeletal muscles try to increase glycogen synthesis, so [peripheral](#) tissues make use of blood sugar to lower blood sugar levels, especially in 3mg biotin group. PKB (Akt) Thr308 phosphorylation protein expression is in turn decrease. The reason may contribute to that PKB(Akt) the protein is not activated or isn't stimulated by PDK-1. After stimulated by insulin, PKB(Akt) Ser473 phosphorylation protein also increased, but PKB(Akt) Thr308 phosphorylation protein decreased. We presumed biotin supplement may longer the action of PKB(Akt) Ser473 phosphorylation than PKB(Akt) Thr308. By evaluating PKC ζ protein expression in membrane fraction, we supposed the increase of GLUT4 translocation in 3mg group possibly through the PKC ζ pathway, not

PKB(Akt).

In liver cells, in the results of the PKB(Akt) Ser473 and Thr 308 phosphorylation protein expression without insulin stimulated, We supposed that PKB(Akt) Ser473 had already activated by upper molecules but not in PKB(Akt) Thr308. When insulin stimulated, by observing the protein expression, we find that PKB(Akt) Thr308 was activated in 3mg group. As result in this study, gluconeogenesis in liver may be diminished and glycogenesis may be enhanced. Because of PKB(Akt) Thr308 has faster dephosphorylation time, so the action may decline in 30 minutes.

Key word : type 2 diabetes · biotin · Protein kinase C ζ (PKC ζ) · Protein kinase B(PKB)



第一章 序言

台灣由於醫療的進步與公共衛生的改善，使得國人平均壽命延長，慢性疾病逐漸取代了過去的急性傳染性疾病，名列為國人十大死因。依據國內行政院衛生署統計，從民國七十六年以來，糖尿病一直高居國人十大死因第五名，而且更是十大死亡中，死亡率增加速度在過去二十年最快者；而糖尿病與其他十大死亡原因中之腦血管疾病、心臟血管疾病、腎臟疾病及高血壓息息相關，其嚴重性不可言喻(行政院衛生署，民國 90 年國人主要死因統計資料)。進一步利用複邏輯回歸統計分析台灣糖尿病之研究，發現糖尿病的發生與年齡、糖尿病家族史、BMI(或腰臀圍比值)、收縮壓(或高血壓)、體能活動、血中三酸甘油酯值有關：許多研究也顯示，容易罹患第 2 型糖尿病的危險因子主要為年齡的增加、全身性的肥胖、中心性肥胖及有糖尿病家族史等(Tai et al., 1987; Lin et al., 1993; Chou et al., 1994; Lu et al., 1998 ; Cockram et al., 1993 ; Pan et al., 1993 ; Dowse et al., 1991)。

胰島素對於餐後葡萄糖利用大約 75%發生在骨骼肌中(Klip and Paquet, 1990)，活化後的 PI 3Kinase 使得 GLUT4 位移至細胞膜上，持續的增加葡萄糖的轉運(Transport)至肌肉與脂肪細胞中。許多文獻指出，當 PI 3Kinase/PKB(Akt)路徑被活化後，PKB(Akt)會造成 GLUT4 調節的

葡萄糖汲取增加；此外，atypical PKC(aPKC)，如 PKC λ / ζ 也會增加 GLUT4 依賴性的葡萄糖汲取。相反的，若 PKC λ / ζ 突變而缺乏作用，則會抑制胰島素刺激 GLUT4 的轉位與葡萄糖的汲取(Kotani et al., 1998; Bandyopadhyay et al., 1999)，因此，推測 aPKC 對於骨骼肌與脂肪組織中胰島素調節的葡萄糖汲取作用上扮演重要的角色。

許多研究指出，在胰島素阻抗性的 Goto-Kakizaki 大鼠與第 2 型糖尿病病人的骨骼肌中，胰島素刺激的 PKB(Akt)磷酸化作用是受損的。胰島素阻抗性的人體(Rondinone et al., 1999)與齧齒類(Carvalho et al., 2000)的脂肪組織與齧齒類的骨骼肌管細胞中(Song et al., 1999)，PKB(Akt)對於胰島素反應的活化作用受損。GLUT4 轉運作用表現異常是與 PKB(Akt)磷酸化缺失有關(Carvalho et al., 2000; Tremblay et al., 2001)。當血糖濃度上升時，胰島素對於 PKB(Akt)的作用能力會受損；給予胰島素抗性的高血糖 Goto-Kakizaki 大鼠 phlorizin 治療，可降低實驗動物的血糖濃度，並可以使 PKB(Akt)磷酸化作用趨於正常(Krook et al., 1997)。也有研究指出，glucosamine 在骨骼肌中可抑制 GLUT4 位移是由於 PKB(Akt)上游的胰島素訊息傳遞路徑受損，並不是 PKB(Akt)本身(Kim et al., 1996)。

日本的研究人員研究生物素與第 2 型糖尿病患的血糖濃度時，發現高血糖濃度的人其血中生物素濃度都很低。18 名高血糖病患接受每天 9 毫克(9,000 微克)的生物素治療一個月之後，血糖濃度都降到將近原本的 45 % (Maebashi et al., 1993)。換言之，糖尿病患者體內的細胞對胰島素的效用較不敏感，會促使體內的血糖不斷升高而補充生物素能夠加強胰島素的敏感性。

本研究室先前的研究發現，長期給予第 2 型糖尿病 KK 小鼠補充生物素可降低空腹血糖及胰島素阻抗性，且可以增加骨骼肌中 IR 酪胺酸 960 磷酸化、提高 IRS-1 和 PI 3Kinase 相連結及增加 GLUT4 的表現與位移。本研究欲進一步探討生物素調節骨骼肌 GLUT4 的機制是否會藉由 PKC ζ 或 PKB(Akt) 的路徑。另外，本研究也探討在肝臟組織中，透過 PKC ζ 及 PKB(Akt) 的路徑對於體內醣類與脂質調節作用為何。

第二章 文獻整理

壹、糖尿病(Diabetes mellitus ; DM)

一、流行病學

在開發中以及新興工業化國家(如台灣)，糖尿病的發生率(incidence)及盛行率(prevalence)正在快速增加中。據估計，目前全球約有一億九千萬名糖尿病患者，至 2025 年世界衛生組織預估有三億三千萬名病患，其中絕大多數為第 2 型糖尿病(糖尿病防治手冊)。

Reaven 教授在 1988 年 Banting lecture 中所提出的高胰島素血症(hyperinsulinemia)與胰島素阻抗性(insulin resistance)有關(GM, 1988)。其可能的機轉是肥胖的個體對於胰島素刺激之葡萄糖汲取作用產生阻抗，因此造成血中胰島素濃度升高，進而加強肝臟合成極低密度脂蛋白(very-low-density lipoprotein)、三酸甘油酯(TG)，產生高三酸甘油酯血症；除此之外，血中胰島素濃度升高同時還會減少鈉離子排泄，引起鈉離子滯留，增加交感神經的活性，造成高血壓的產生(Flack and Sowers, 1991)。

二、病因、分類與診斷

A. 症狀

部分的糖尿病患者，在發病時會出現「三多」(多吃、多喝、多尿)、「一少」(體重減輕)的典型症狀。但是部分的病患在發病時沒有典型症狀，有些病患偶會因為皮膚搔癢、手腳麻木、傷口不易癒合等原因，經由驗血求證而被診斷出來。還有一些人是在做其他例行檢查時意外發現的。值得注意的是，無論國內外的大規模調查都顯示，幾乎近四成的病例，完全不知道自己已經罹患了糖尿病(undiagnosed diabetes)。

B. 診斷標準

目前診斷糖尿病，主要依據血糖值高低來判斷。根據 2004 美國糖尿病學會(American Diabetes Association；ADA, 2004)訂定的標準，

- I. 如符合以下任何一個條件，而且隔天再證實，即可診斷為糖尿病。
 - ✓ 有糖尿病的急性症狀(吃多，喝多、尿多、體重減輕)，並且隨機血漿葡萄糖濃度 $\geq 200\text{mg/dL}$ 。
 - ✓ 空腹至少 8 個小時，靜脈血漿葡萄糖 $\geq 126\text{mg/dL}$ 。
 - ✓ 75 公克口服耐糖試驗(OGTT)時，第 2 個小時血漿葡萄糖濃度 $\geq 200\text{mg/dL}$ 。

- II. 若空腹血漿糖值(fasting plasma glucose, FGP) $\geq 110\text{mg/dL}$ 且 $< 126\text{mg/dL}$ 時，空腹血糖偏高，稱為血糖恆定性受損的代謝狀態(impaired fasting glucose, IGF)。
- III. 當第 2 小時口服耐糖試驗值 $\geq 140\text{mg/dL}$ ，但 $< 200\text{mg/dL}$ 時，稱之為耐糖障礙(impaired glucose tolerance ; IGT)。

表 2.1、糖尿病與葡萄糖不耐的診斷標準

Table 2.1 Diagnosis of diabetes mellitus and glucose intolerance

Condition	Diagnostic criteria(mmol/L)	Diagnostic criteria (mg/dL)
Normal fasting plasma glucose	Below 6.1	Below 110
Impaired fasting glucose(IGF)	Equal or above 6.1 but below 7.0	Equal or above 110 but below 126
Impaired glucose tolerance(IGT)	Plasma glucose 2 h after 75 g load	Plasma glucose 2 h after 75 g load
	7.8 or above but below 11.1	140 or above but below 200
Diabetes mellitus*		
Criterion1	Random plasma glucose 11.1 or above**	Random plasma glucose 200 or above**
Criterion2	Fasting plasma glucose 7.0 or above	Fasting plasma glucose 126 or above
Criterion3	2 h value during OGTT 11.1 or above	2 h value during OGTT 200 or above

*If one of the criteria is fulfilled, diagnosis is provisional. The diagnosis needs to be confirmed next day using a different criterion.

**If accompanied by symptoms(polyuria, polydipsia, unexplained weight loss). These are the criteria proposed by the American Diabetes Association in 1997

C. 篩檢

血漿葡萄糖之測定為檢驗葡萄糖耐量的最好方法，但血糖值會受到飲食、身體狀況及檢驗特性(靜脈、微血管或動脈、全血或血漿等)之影響。雖然篩檢時可採用隨機、空腹或經葡萄糖負荷(即口服葡萄糖耐量試驗)後抽血來檢測血漿葡萄糖值，但以世界衛生組織之診斷標準值作為篩檢標準，比較三者之敏感度及特異度，以葡萄糖負荷後 2 小時之血糖最好(敏感度 > 90%，特異度約為 100%)，空腹血糖值次之。因此美國糖尿病學會建議篩檢方法最好使用檢測空腹血漿糖值。



D. 分類

1979 年美國國家衛生研究院(National Institute of Health)的糖尿病小組(National Diabetes Data Group)首先提出了現在通用的糖尿病分類與命名辦法 (Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. National diabetes data group. 1979)；在 1997 年，由於對糖尿病的病因及致病機轉有更進一步的認識，美國糖尿病協會(ADA)及世界衛生組織修改並訂定新的糖尿病分類方法。

I. 第 1 型糖尿病(Type 1 diabetes mellitus)

因自我免疫破壞 β 細胞，導致胰島素完全缺少，需依賴外來的胰島素預防酮酸中毒，並維持生命。任何年齡都可能發病，但大多數在 30 歲以前診斷出來。

II. 第 2 型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus)

診斷時經常沒有症狀，但多達 20% 的病人可能已經呈現終端器官的合併症(如視網膜病變、神經病變、腎病變等等)。內源性胰島素濃度可能是正常的、增加或減少；對外源性胰島素的需求不一定。耐糖障礙的初期，典型上出現胰島素阻抗性。包括以胰島素阻抗性為主，並伴有胰島素相對缺乏的病患，到主要以胰島素分泌不足合併胰島素阻抗性的病患。通常是在 30 歲以後被診斷出來，但在任何年齡都有可能發生，且青少年發病人數逐年漸增中。

III. 其他特異型糖尿病：包括 β 細胞功能的基因缺陷、胰島素作用的基因缺陷、外分泌胰臟的疾病、內分泌病變、藥物或化學物質引起、感染、不尋常形式的免疫媒介性的糖尿病、有時合併糖尿病的其他遺傳症候群等等。

IV. 妊娠糖尿病(Gestational diabetes mellitus, GDM)

在懷孕階段才首次發現罹患糖尿病。妊娠結束後改診斷分類為過去

耐糖異常(previous abnormality of glucose tolerance ; PreAGT)、第 1 型糖尿病、第 2 型糖尿病或耐糖障礙。發生妊娠性糖尿病後，將來發展為第 2 型糖尿病或成為罕見第 1 型糖尿病的危險性增加。

表 2.2、糖尿病的分類

Table 2.2. Classification of diabetes mellitus

Syndrome	Comments
Type 1	Autoimmune destruction of β -cells
Type 2	β -cells failure and insulin resistance
Other types	Genetic defects of β -cells (e.g. mutations of glucokinase gene). Rare insulin resistance syndromes. Diseases of exocrine pancreas. Endocrine diseases (acromegaly, Cushing's syndrome). Drugs and chemical-induced diabetes. Infections (e.g. mumps). Rare syndromes with the presence of antireceptor antibodies. Diabetes accompanying other genetic disease (e.g. Down syndrome)
Gestational diabetes	Any degree of glucose intolerance diagnosed in pregnancy

表 2.3、第 1 型糖尿病與第 2 型糖尿病的比較

Table 2.3 Comparison of Type 1 DM and Type 2 DM

	Type 1	Type 2
Onset	Usually below 20 years of age	Usually over 40 years of age
Insulin synthesis	Absent : immune destruction of β -cells	Preserved : combination of impaired β -cells function and insulin
Plasma insulin concentration	Low or absent	Low, normal or high
Genetic susceptibility	Yes, inheritance associated with HLA antigens	Not associated with HLA, important polygenic inheritance
Islet cell antibodies at diagnosis	Yes	No
Obesity	Uncommon	Common
Ketoacidosis	Yes	Possible after major stress

貳、第 2 型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus ; T2DM) 與胰島素阻抗性

第 2 型糖尿病與肥胖具有極高的相關聯性，第 2 型糖尿病的發生主要是由兩個基本的缺陷所造成，一個是胰島素阻抗性，另一個是胰島素分泌障礙。而胰島素阻抗性主要是在肝臟和週邊組織發現對胰島素生物活性的阻抗；對於第 2 型糖尿病的發生，胰島素產生阻抗比胰島素分泌障礙更重要。

儘管目前確切的致病基因仍尚未確認，但大家都認為第 2 型糖尿病有很強的遺傳性。從雙胞胎的研究、家族聚集現象及不同民族間的比較研究，都可以說明遺傳對第 2 型糖尿病的影響比第 1 型糖尿病重要。從同卵雙胞胎之研究，發現第 2 型糖尿病的一致性(concordance)高達 70-90%；若父母雙親皆患有第 2 型糖尿病，其兒女的罹病危險率甚至可高達 40%，而且許多第 2 型糖尿病病人的非罹病一等親，也會出現胰島素阻抗性。在諾魯人(Nauruans)、Pima 印地安人等第 2 型糖尿病盛行率很高的族群，第 2 型糖尿病的發生深受遺傳的左右，但遺傳因素與環境因素也可能相互作用。在丹麥的雙胞胎研究顯示，雙胞胎中罹患第 2 型糖尿病的出生體重較沒有第 2 型糖尿病的出生體重低(Poulsen et al., 1999)。許多學者(Tai, et al., 1987; Chou et al., 1992)在國人第 2 型糖尿

病之發生學研究中，也證實了第 2 型糖尿病的發生與糖尿病家族史、體型和年齡最有關聯，顯示遺傳和環境因素對國人第 2 型糖尿病發生之重要性與國外一致。

第 2 型糖尿病之發生是由於先天體質再加上後天因子，產生了高胰島素血症與胰島素阻抗性，再進一步造成葡萄糖耐受異常和糖尿病的發生。對處於高胰島素期的第 2 型糖尿病病人，運動可以降低血糖。因為運動可以提升胰島素的敏感度，而胰島素阻抗又是此類病人的主要症狀，因此大多數的糖尿病患規律運動確實可直接對抗第 2 型糖尿病的病生理生理機制，尤其就肥胖者而言，改善葡萄糖代謝的效益更顯著。



參、胰島素阻抗性之生化機轉

胰島素阻抗性在特定組織是很常見的病理狀態，會使組織對於血液中循環的胰島素利用失去反應，最後會造成胰島素失去對於供應正常葡萄糖與脂質穩定的作用(Eckel et al., 2005; Wang et al., 2004)。

胰島素阻抗性和許多疾病相關，包括肥胖(obesity)、代謝症候群(metabolic syndrome)、第2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus)、脂肪營養不良(lipodystrophies)、多纖維性卵巢症候群(polycystic ovary syndrome)及慢性發炎(chronic infection)。所有的疾病的盛行率約在10-25%左右(Ferrannini et al., 1997)。

高胰島素箝定試驗(hyperinsulinaemic euglycaemic clamp)為主要標準胰島素阻抗性程度的依據(DeFronzo et al., 1979)。造成胰島素阻抗性的病因包括遺傳性基因(genetic factors)、造成阻抗性的症狀(syndromic forms of insulin resistance)及環境因素包括食物攝取、活動度減少、老化、抽煙、給予的藥物(thiazide類的利尿劑、β腎上腺皮質阻斷劑、糖皮質激素)(Granberry and Fonseca, 1999)。其中最重要的因素是肥胖，肥胖通常是多基因型與環境因素的起源(Granberry and Fonseca, 1999; Cummings and Schwartz, 2003)。

胰島素阻抗通常發生在肌肉與脂肪組織中。肌肉是主要胰島素刺激後葡萄糖主要的利用器官，肥胖與第2型糖尿病的病人體內受胰島素刺激葡萄糖轉運至肌肉細胞內的作用是減少的。肌肉對於胰島素的阻抗性可能伴隨著胰島素對於其他組織正常或過度的作用，如增加肝臟的脂肪生成(高脂血症)、腎臟鈉與水的滯留(高血壓)、內皮與血管平滑肌過度敏感及增生(高血壓與動脈粥狀硬化)等。

第2型糖尿病的主要特徵是肌肉和脂肪組織對於胰島素敏感度下降，也就是胰島素對於葡萄糖的利用和代謝能力下降，因而導致胰島素阻抗性。骨骼肌是胰島素刺激汲取葡萄糖的主要標的組織，也是胰島素阻抗主要發生的所在，而骨骼肌發生胰島素阻抗的機制也備受注意。

Table 1. Metabolic sites of insulin resistance.

	Activator	Inhibitor
A. Insulin receptor		
B. Insulin signal transduction		
Insulin receptor	Insulin	
Proximal/downstream IR signalling event	Insulin	Fatty acid, TNF ↑ Glucose [†]
GLUT 4 vesicle trafficking, docking, fusion	Insulin	(fatty acid)
C. Carbohydrate metabolism		
1. Glycogen synthesis versus glycogenolysis:		
Glycogen synthase	(↑ Ins/Gluc or epi)	(↓ Ins/Gluc or epi)
Glycogen phosphorylase	(↓ Ins/Gluc or epi)	(↑ Ins/Gluc or epi)
2. Glycolysis		
Glucokinase	Insulin	Glucagon
Phosphofruktokinase	↑ F-2,6-P	↓ F-2,6-P
Pyruvate kinase	(↑ Ins/Gluc or epi)	(↓ Ins/Gluc or epi)
PEPCK	(↓ Ins/Gluc or epi)	(↑ Ins/gluc or epi)
3. Gluconeogenesis		
Pyruvate carboxylase	AcCoA (FA OX)	
PEPCK	(↓ Ins/Gluc or epi)	(↑ Ins/gluc or epi)
D. Lipid metabolism		
Hormone sensitive lipase	(↓ Ins/Gluc or epi)	(↑ Ins/Gluc or epi)
Lipoprotein lipase	Insulin	

IR, insulin receptor; Ins, insulin; Gluc, glucagon; epi, epinephrine; AcCoA, acetyl coenzyme A; FAOX, fatty acid oxidation; F-2,6-P, fructose 2, 6-diphosphate; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; GLUT4, glucose transporter 4.
[†]Hyperglycaemia can promote serine phosphorylation of the insulin receptor via a protein kinase C pathway.¹⁸

圖2.1、胰島素阻抗性影響體內代謝(M.Haque and A. J. Sanyal, 2002)

Fig 2.1 Insulin resistance in metabolism

肆、 胰島素訊息傳遞機制

胰島素接受器(IR)是異構四合體(heterotetramer)，其表現在肝臟、脂肪組織及骨骼肌細胞中。IR包含了細胞膜外的配體結合區及細胞膜內的酪胺酸激酶(tyrosine kinase)區域。當胰島素與接受器細胞外的部位結合之後會活化使自己特定區域的酪胺酸自體磷酸化(autophosphorylation)，並使胰島素接受器受質(IRS)1~4、IRS-5/DOK4、IRS-6/DOK5等酪胺酸磷酸化。這些受質磷酸化會引起下游3條不同的訊息蛋白路徑：PI 3-Kinase pathway、Cb1 associated protein (CAP)/Casstas B-lineage lymphoma (Cb1)/TC10 pathway、Mitogen-activated protein kinase (MAPK) dependent pathway(Pirola et al., 2004; Saltiel and Kahn, 2001)。

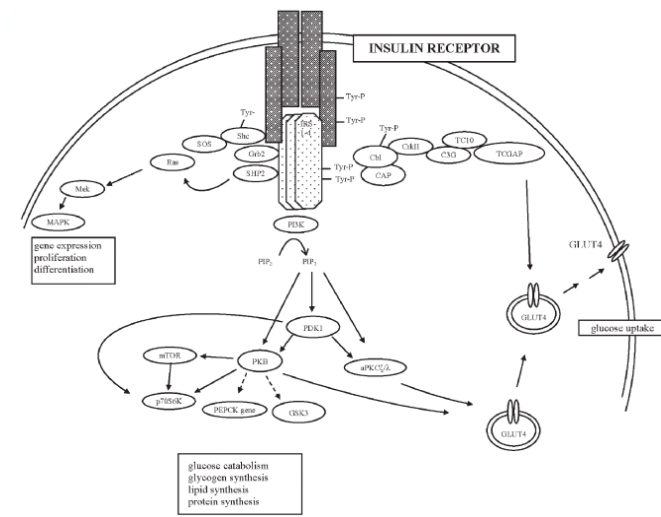


圖2.2、胰島素訊息傳遞路徑 (Mlinar et al. 2007)

Fig 2.2 Insulin signalling pathway

PI 3-Kinase依照不同的異構物(isoform)可分為3大家族，是調節胰島素作用的主要調控者，其中Class Ia被認為是主要胰島素訊息反應者，且會藉由產生PIP2與PIP3來活化PKB(Akt)、αPKC。PKB(Akt)的磷酸化不但會使GSK-3不活化，也會向上調控FAS基因、向下調節PEPCK 基因，這些基因主要共同調控GLUT4位移至細胞膜上(Pirola et al., 2004; Saltiel and Kahn, 2001)。

GLUT4 蛋白質為體內在飯後受胰島素調控來運送葡萄糖的主要管道。糖尿病病患高血糖的原因之一，已被證實為肌肉中 GLUT4 蛋白受胰島素支配吸收葡萄糖的能力衰減，使得葡萄糖滯留於血液中形成高血糖狀態。目前糖尿病研究，不斷在探討以各種方式提高胰島素支配 GLUT4 蛋白質的能力，或以基因治療法提高 GLUT4 基因的表現，藉以治療糖尿病。

伍、 Protein kinase C (PKC)之介紹

一、 PKC 家族

PKC 可分為 3 個亞族，分別為

- A. 傳統型(conventional type)： α 、 β I、 β II、 γ
- B. 新穎型(novel type)： δ 、 ϵ 、 η 、 θ 、 μ
- C. 非典型(atypical type)： ζ 、 λ 、 ι

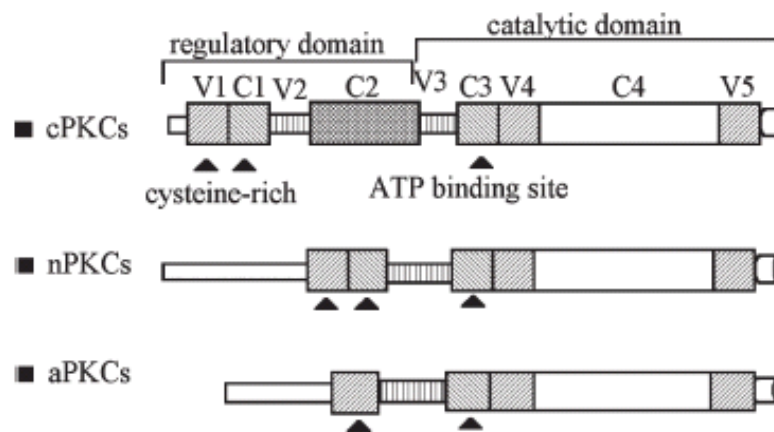


Fig. 1. The structure of PKCs.

圖2.3、PKC家族分類與結構(Liu et al., 2006)

Fig 2.3 PKC family

cPKC的結構中，N端有調節區域(C1、C2)，C端則有催化區域(C3、C4)。C1可和PMA/DAG結合，促進和細胞膜的結合。C2則參與了膜上的訊息傳導(與 Ca^{2+} 結合)。nPKC含有C1區域，缺乏C2區域，所以大部分受PMA/DAG而非受 Ca^{2+} 活化。aPKC缺乏 Ca^{2+} 敏感的C2區域，也不和PMA/DAG結合，是受刺激後產生磷酸化作用的

磷脂質 cofactor 個別活化。

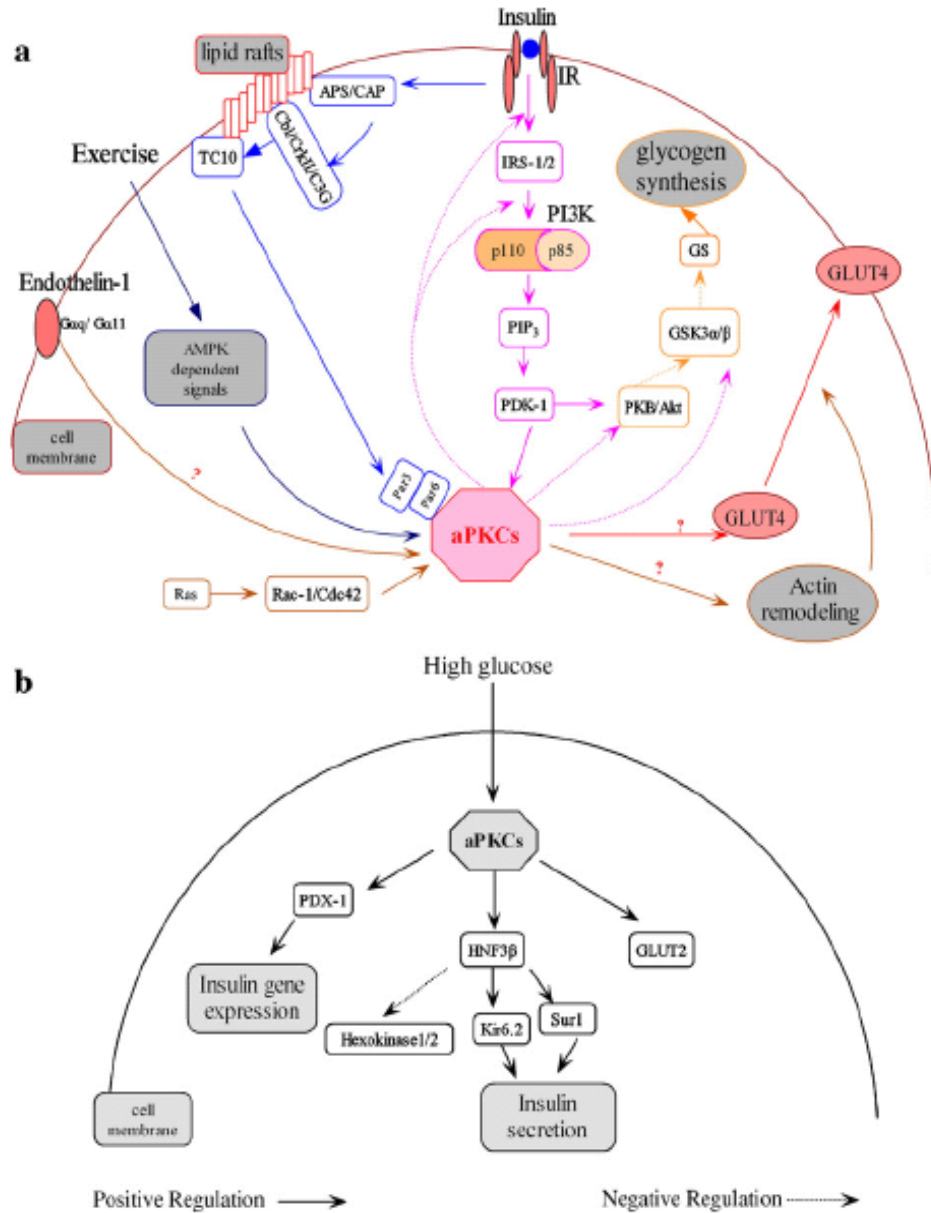


圖 2.4、aPKC 在醣類代謝中扮演的位罝 (Liu et al., 2006)

Fig 2.4 aPKC action in carbohydrate metabolism

二、PKC ζ 的活化

當胰島素刺激之後，胰島素會與細胞膜上 IR 相連接，刺激 IRS 蛋白的酪胺酸磷酸化，並與下游的 PI 3-Kinase 結合。PI 3-Kinase 與酪胺酸磷酸化的 IRS 結合之後，會產生 3'-phosphoinositides，其中的 PIP2 轉變成 PIP3，並且會吸引第二訊息傳遞者，PDK-1 至細胞膜，且會同時磷酸化 aPKC (Atypical protein kinase C)(Brazil and Hemmings, 2001; Kotani et al., 1998)。

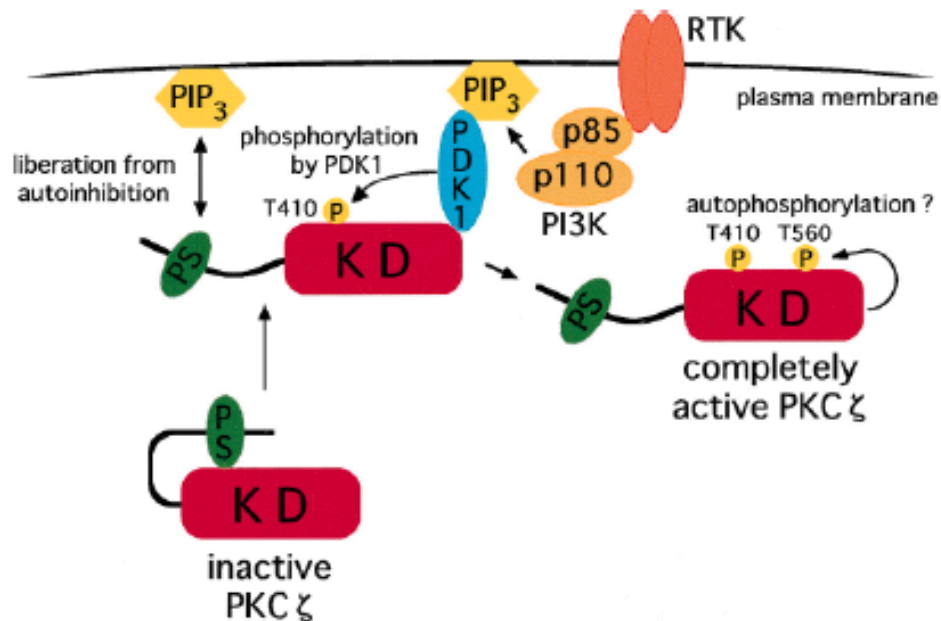


圖 2.5、PKC ζ 活化機制 (Takaaki and Kazuhiro, 2003)

Fig 2.5 PKC ζ activation mechanism

三、aPKC 正向調節葡萄糖運輸的胰島素訊息傳遞路徑

文獻指出，aPKCs在胰島素調節的GLUT4轉位到細胞膜、促進葡萄糖轉運的作用上扮演重要的角色(Watson et al., 2004)。有兩條主要的胰島素訊息傳遞路徑來調控GLUT4的轉位與葡萄糖的汲取：(1) IRS-PI 3-Kinase、(2) Cbl-TC10，而aPKCs則是這兩條路徑的下游交匯處(Kanzaki et al., 2004)。IRS-PI 3-Kinase路徑是胰島素透過與細胞膜上的IR結合，進而活化IR的 β -次單位、刺激IRS蛋白質的酪胺酸磷酸化，使得IRS能與PI 3-Kinase相連結(Corvera and Czech, 1998)。活化後的PI 3-Kinase進而磷酸化PIP2產生PIP3，同時吸引PDK-1至細胞膜上(Stokoe et al., 1998; Stephens et al., 1997)。aPKCs透過活化區的酪胺酸410/402磷酸化來與PDK-1結合(Chou et al., 1998; Le Good et al., 1998)。Cbl-TC10路徑則是胰島素與IR結合之後，刺激Cbl酪胺酸殘基磷酸化(Ribon and Saltiel, 1997)，進一步影響下游TC10、aPKCs的表現(Kanzaki et al., 2004)。

四、**aPKC 負向調節葡萄糖運輸的胰島素訊息傳遞路徑**

另一方面也有研究指出，aPKC對於胰島素訊息傳遞路徑上具有負向調控的作用。在大鼠肝腫瘤細胞(Fao cells、NIH-3T3IR cells)中，胰島素會瞬間(transiently)增加IRS的酪胺酸磷酸化，降低IRS-1與PI 3-Kinase的p85次單位結合的能力。當給予PI 3-Kinase的抑制劑(Wortmannin)後，代表抑制了胰島素訊息傳遞上游路徑，過多的PKC ζ 反而會抑制IRS-1的功能、減少IRS-1與PI 3-Kinase的連結，進而負回饋抑制PKC ζ (Liu et al., 2001; Ravichandran et al., 2001)。體外試驗中證實PKC ζ 透過IRS的絲胺酸磷酸化作用(如 Serine 570)來強烈的抑制IRS-1/PI 3-Kinase的連結(Sommerfeld et al., 2004)。另外，PKC ζ 也會磷酸化IRS-1的Ser318位置阻礙了IRS用PTB區域與IR結合的作用，顯著的降低IR與IRS-1的連接及胰島素誘導IRS-1酪胺酸磷酸化(Moeschel et al., 2004)。因此，aPKC會磷酸化IRS-1某些Ser/Thr區域，提供了PI 3-Kinase調節aPKC與胰島素誘導葡萄糖汲取的負回饋抑制機制。

陸、 Protein kinase B(PKB ; Akt)之介紹

一、 PKB (Akt)家族

PKB 又名 Akt 是可廣泛被接受器上酪胺酸激酶(tyrosine kinase)刺激的絲胺酸/酥胺酸激酶(serine/threonine kinase) ，其分子量為 60 kDa(Kroo et al., 1998) 。PKB(Akt)蛋白質的 N 端有 pleckstrin homology(PH)區域，而因催化區域與 PKA、PKC 結構高度相同，故又名 RAC(related to A and C)。

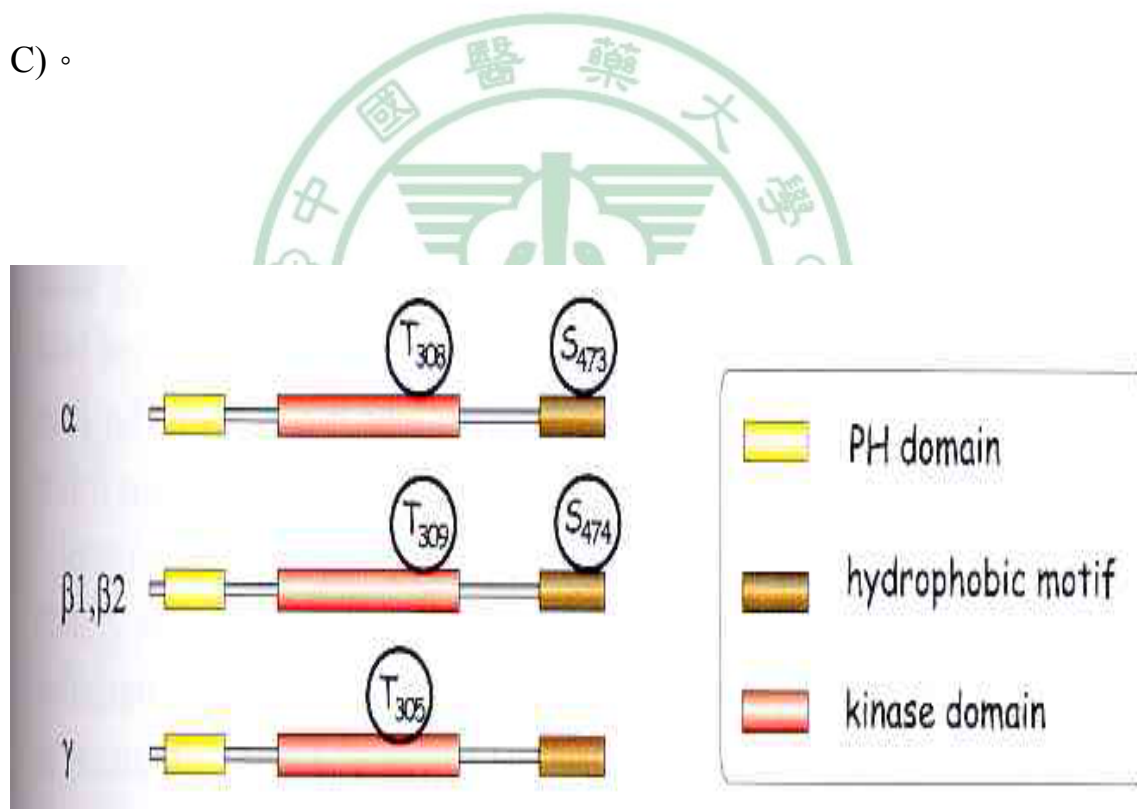



圖 2.6、Protein kinase B 異構物受絲胺酸(Ser)與酥胺酸(Thr)活化區

Fig 2.6 Ser and Thr activated site in PKB isoforms

	High expression levels	Low/ moderate expression level
<i>Akt 1</i>	Brain, heart, testis, thymus	Kidney, liver, spleen
<i>Akt 2</i>	Brown fat, cerebellum (Purkinje cells), heart, skeletal muscle	Brain, kidney, lung spleen, testis
<i>Akt 3</i>	Brain, testis	Heart, kidney, liver lung, skeletal muscle, spleen

圖 2.7、PKB 異構物在各組織中的表現情形(Zdychova and Komers, 2005)

Fig 2.7 PKB in tissues expression



Isoform	Function
PKB α /Akt1	Placental development and animal growth Adipogenesis
PKB β /Akt2	Glucose metabolism Adipogenesis and maintenance Animal growth
PKB γ /Akt3	Postnatal brain growth

圖 2.8、PKB 異構物的功能

Fig 2.8 Functions in PKB isoforms

二、 PKB(Akt)的活化

PKB(Akt)透過酪胺酸激酶接受器(tyrosine kinase receptors)調節而活化，如胰島素或某些生長因子的接受器。PKB(Akt)被視為是 PI 3-Kinase 的下游標的物，酪胺酸磷酸化的 IRS 會與 PI 3-Kinase 中含 SH2 區域的 p85 調節次單位結合而被活化，活化後的 PI 3-Kinase，其 p110 催化次單位則會磷酸化細胞膜上的 phosphatidylinositol (addition of phosphate)，產生 3'-phosphoinositides，其中的 PIP2 變成 PIP3。PKB(Akt)的 pleckstrin homology (PH)區域與 PIP3 有很強的親和力，促使 PKB(Akt)位移到細胞膜上(Bellacosa et al., 1998; Bottomley et al., 1998)。除此之外，PIP3 會吸引第二訊息傳遞者：PDK-1(Brazil and Hemmings, 2001)、PDK-2 (Kotani et al., 1998) 至細胞膜，且同時分別磷酸化 PKB(Akt)的酪胺酸 308(Thr308)(Alessi et al., 1997)、絲胺酸 473(Ser473)(Bellacosa et al., 1998)；PKB(Akt)的 T308 磷酸化對於 PKB(Akt)的活化是很必須的，然而 Ser473 磷酸化也會使 PKB(Akt)的活性增加到最大(Downward, 1998)。

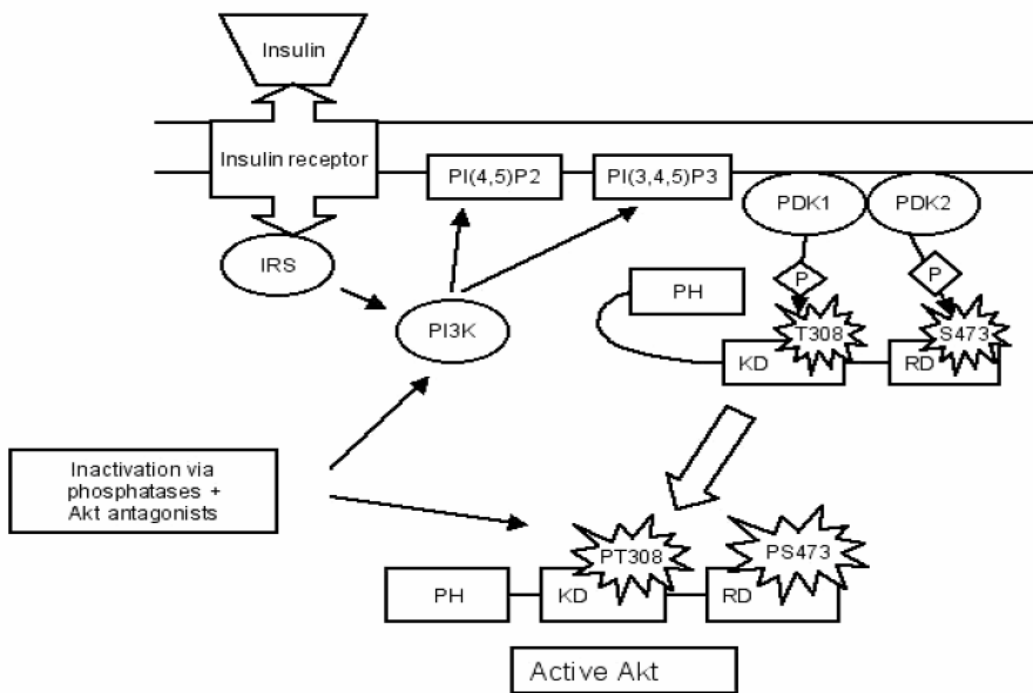


圖 2.9、胰島素刺激 PKB 活化的路徑(Zdychova, Komers, 2005)

Fig 2.9 Insulin stimulated PKB activated pathway

三、 PKB(Akt)與葡萄糖代謝

胰島素主要的作用是調節骨骼肌、脂肪組織、肝臟及其他組織對於葡萄糖的汲取與代謝，而PKB(Akt)在胰島素的生理功能上扮演重要的調節角色，因此PKB(Akt)的訊息傳遞主要影響葡萄糖代謝(Zdychova and Komers, 2005)。早期的研究發現PI 3-Kinase影響胰島素刺激的GLUT4由細胞質中小囊位移到細胞膜上(Frevert et al., 1998; Okada et al., 1994)，推測當胰島素刺激後，PKB(Akt)參與葡萄糖的代謝是透過PKB(Akt)誘導GLUT4位移作用(Kohn et al., 1996; Hajduch et al., 1998)，此位移作用會促進葡萄糖的汲取。

在沒有胰島素刺激時，PKB(Akt)存在於細胞質(cytoplasm)中，當受到胰島素刺激下，PKB(Akt)可能會與細胞膜上PIP2、PIP3結合(Vanhaesebroeck and Alessi, 2000; Kohn et al., 1996)，不但會與PDK-1、PDK-2共同位於細胞膜上，且會分別使PKB(Akt)的Thr308、Ser473這兩個主要調節部位因磷酸化而活化。

另外，PKB(Akt)也會透過絲胺酸磷酸化與不活化GSK-3來促進肝糖合成(glycogen synthesis)(Cross et al., 1995; Lawrence and Roach, 1997)、蛋白質合成(protein synthesis)、脂質生合成(lipogenesis)及抑制肝臟的糖質新生作用(hepatic gluconeogenesis)。

在高血糖的狀態下，PKB(Akt)的活性嚴重下降，雖然近端的 IR、IRS-1、IRS-2、PI 3-Kinase 是活化的。

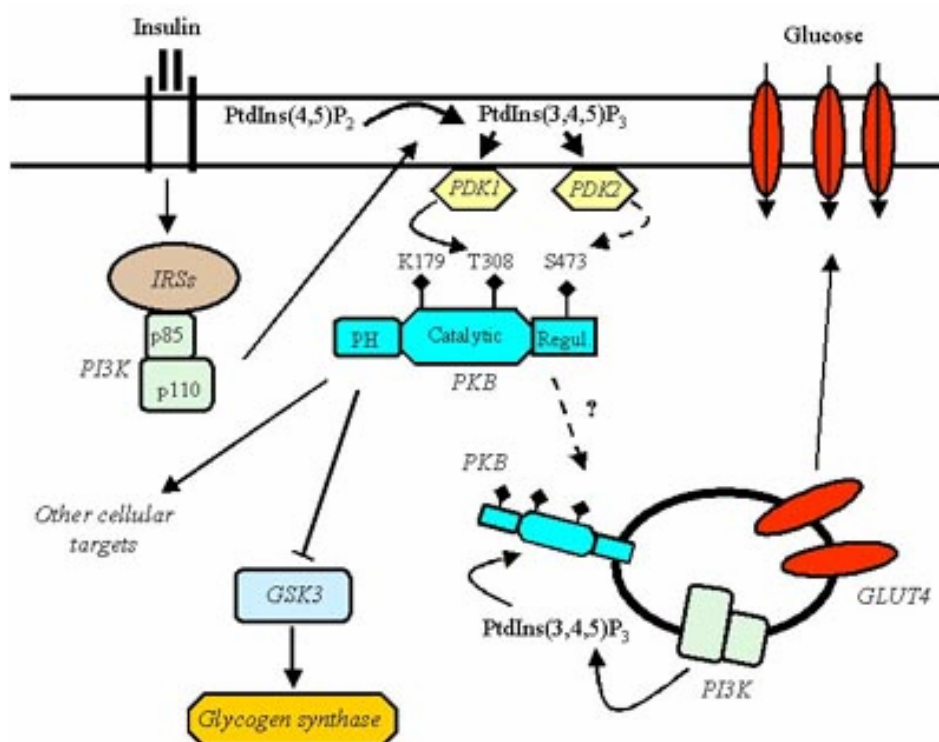


圖 2.10、PKB(Akt)與葡萄糖代謝的關係

Fig 2.10 PKB(Akt) and glucose metabolism

柒、 生物素(Biotin)

一、 簡介

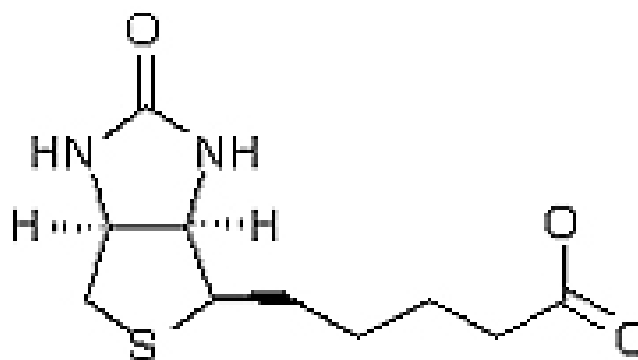


圖 2.11、生物素的結構

Fig 2.11 Structure of biotin

生物素的結構於 1936 年被確認，也在 1943 年在實驗室中被合成。於自然界的多種異構體中，只有右旋生物素(d-biotin) 才有功能及生物活性。生物素可溶於水，不溶於乙醇、乙醚、及氯仿。一般情況下，生物素是相當穩定的，只有在強酸、強鹼、甲醛及紫外線處理後才會被破壞。抗生物素蛋白 (avidin) 是生蛋清中的一種醣蛋白，它能與生物素結合，使其不能在腸道中吸收，但加熱處理後生物素却能夠重新被利用。

生物素含兩個環狀結構：ureido-group 及含硫的 tetrahydrothiophene，並有戊酸(valeric acid)側鏈。因為含有硫酚(Thiophene)的結構環，所以此種化學物質有八種同形異構物。在生物體

內，戊酸(又稱顯草酸；valeric acid)側鏈的羧基與酶蛋白質的離胺酸(lysine)上 ϵ -胺基(ϵ -amino group)以醯胺鍵共價結合，此生物素-離胺酸的結構被稱為生物胞素(biotin)。

生物素以微量的含量廣泛地存在於動物及植物的組織中，以游離態存在於水果、蔬菜、牛乳及米糠中，同時也以蛋白質結合態存在於肉類、蛋黃、植物種子及酵母菌中。主要的來源包括啤酒酵母菌、雞肝、串珠狀釀母、牛肝、美國乾酪、黃豆粉、米糠、麥麩、白米、小牛肝以及雞蛋。在酵母菌、肝、腎中含量尤其豐富，所以生物素的需要量很難去定量出來。在研究上發現食物中多餘的生物素會從尿中排出，同時腸道中的細菌亦會製造生物素出來。根據行政院衛生署於民國 91 年修訂的國人營養素攝取參考量(Dietary Reference Intake; DRIs)III，16 歲以上的健康成人每天的足夠攝取量(Adequate Intake; AI)為 30 μg 。

二、生理作用(消化、吸收、運輸、貯存、功用、作用機轉、代謝、排泄)

大部分食物中，生物素以結合蛋白質的型式存在，在腸胃道中先被蛋白酶及生物素酵素(biotinidase)分解，釋出生物素，才被人體小腸吸收。部分 biocytin 可直接被吸收，再經體內組織的 biotinidase 分解出生物素。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。

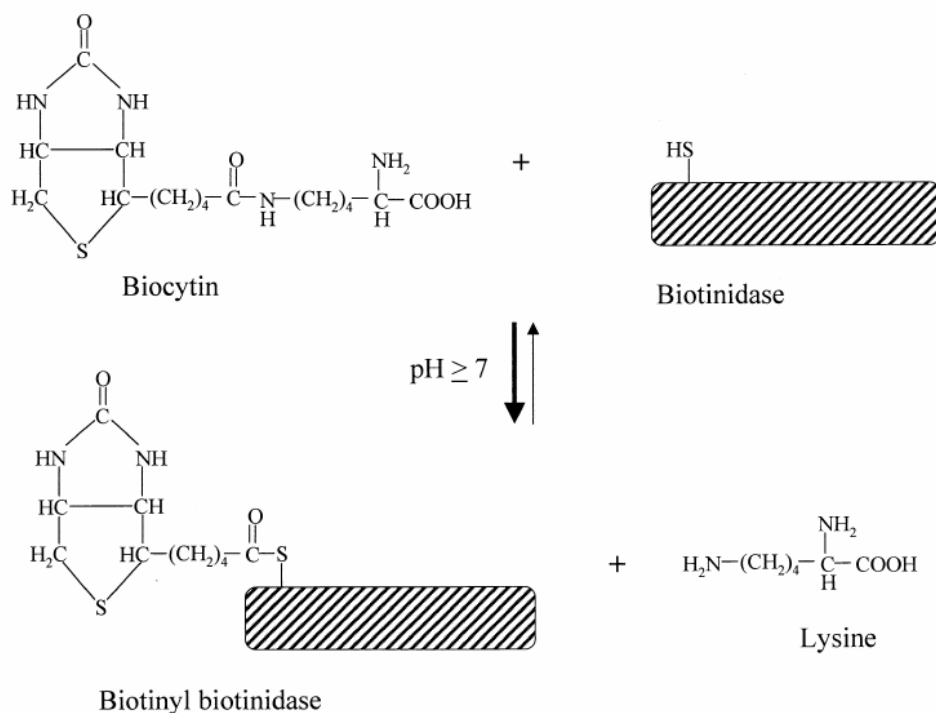


Fig. 3. Cleavage of biocytin (biotin-e-lysine) by biotinidase leads to the formation of a biotinyl-thioester intermediate (cysteine-bound biotin; biotinyl biotinidase) at or near the active site of biotinidase [74].

圖 2.12、生物素的體內代謝 (Rodriguez-Melendez and Zemleni, 2003)

Fig 2.12 Biotin in metabolism

天然的生物素以游離態(*free form*)或結合蛋白的形式存在，其中白蛋白、 α -、 β -與 γ -球蛋白都可與生物素結合。結合態的生物素需經腸道中生物素降解酶分解才能被動物利用，另外，*biotinidase* 也被認為參與血漿中生物素的轉運。生物素主要在小腸上段被吸收，結腸也可吸收一部分 (Marks,1979;Kopinski and Leibholz, 1985)。生物素吸收後分布於全身組織細胞，其中肝臟和腎臟的含量最高。哺乳動物一般不能降解生物素的結構，但可將其中一小部份轉化為硫化物。通過 β -氧化降解形成的雙降生物素連同未吸收的生物素從尿中排出 (McCormick 和 Olson, 1984)。

哺乳動物與微生物中生物素的代謝可分為兩條路徑：顯草酸 β -oxidation，產生 *bisnorbiotin*、*tetranorbiotin* 及相關的代謝產物 (Zempleni et al., 2001; McCormick and Wright, 1971; Kazarinoff et al., 1972; Lee et al., 1972; Zempleni et al., 1997)；及 heterocyclin ring 硫氧化 (*sulfur oxidation*)，產生 *biotin-l-sulfoxide*、*biotin-d-sulfoxide*、*biotin sulfone* (McCormick and Wright, 1971; Kazarinoff et al., 1972)。有研究顯示，生物素的代謝物在基因表現上可能含有與生物素相似的作用，若給予缺乏生物素的人類淋巴節細胞生物素的結構類似物 (*ureido protein portion*、*thiophane protion*)，發現會增加基因轉錄出 IL-2 及 IL-2 receptor

γ (Rodriguez-Melendez and Zemleni, 2003)。但生物素代謝物因為結構上顯草酸的改變反應此代謝物在與AMP結合時並不會活化，也不會與羧化酶結合，使羧化酶具活性(Knowles et al., 1989)。

游離態的生物素可直接由腎臟排出，除此之外，尿液中還發現 bisnorbiotin methyl ketone、biotin sulfone 及一些未被分解的 biocytin。

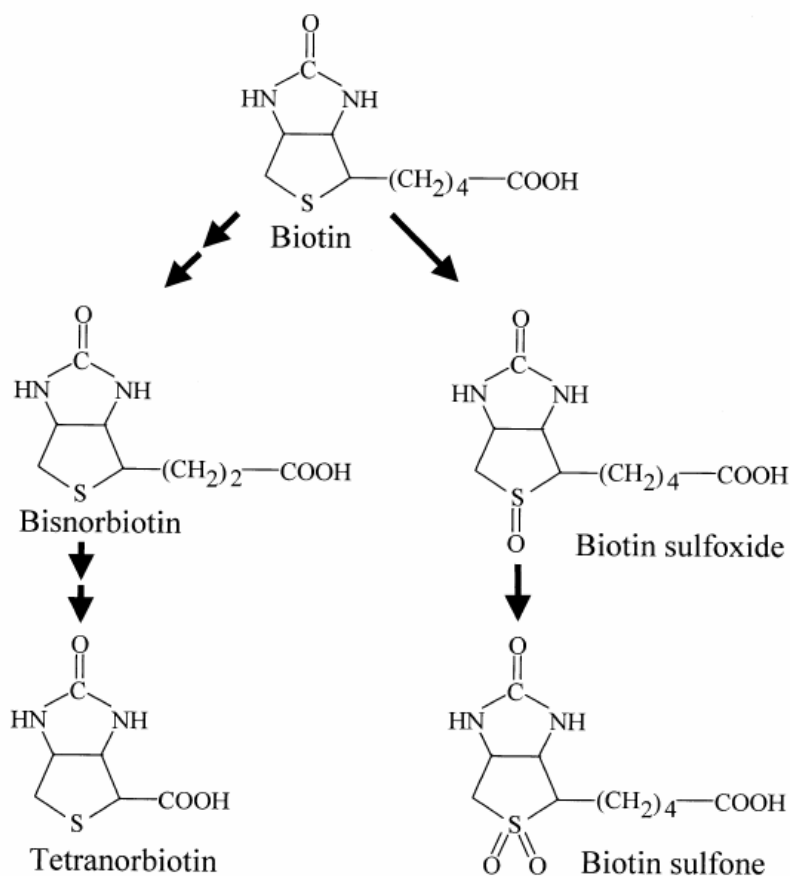


Fig. 6. Pathways of biotin catabolism.

圖 2.13、生物素代謝物 (Rocio Rodriguez-Melendez, Janos Zemleni, 2003)

Fig 2.13 Biotin metabolite

三、參與體內的營養素代謝

生物素為體內許多酶的輔助因子，在醣類、脂質、蛋白質和核酸的代謝過程中發揮重要作用。在哺乳動物中，生物素參與細胞內四種羧化酶(carboxylase)所催化的反應：乙醯輔酶 A 羧化酶(acetyl CoA carboxylase； α 、 β form)、丙酮酸羧化酶(pyruvate carboxylase)、丙醯輔酶 A 羧化酶(propionyl CoA carboxylase)、 β -甲基丁醯輔酶 A 羧化酶(β -methylcrotonyl CoA carboxylase；又稱 3-methylcrotonyl CoA carboxylase) (Zempleni et al.,2001)等，都依賴 ATP 和 Mg^{2+} 激活。其中丙酮酸羧化酶、丙醯輔酶 A 羧化酶及 β -甲基丁烯醯輔酶 A 羧化酶位於粒腺體，乙醯輔酶 A 羧化酶則存於粒腺體與細胞質。這些酵素所催化的反應是醣質新生、脂肪酸合成、胺基酸代謝等途徑的重要步驟，並參與 CO_2 的固定作用。

在醣類代謝中，生物素酶催化羧化和脫羧反應，是三羧酸循環(TCA cycle)的必需成分，並維持血糖穩定。生物素作為丙酮酸羧化酶的輔酶，催化丙酮酸(pyruvic acid)羧化生成草醯乙酸，並影響草醯琥珀酸轉化為 α -酮戊二酸，草查酸轉化為丙酮酸、琥珀酸與丙酮酸互變。

生物素作為乙醯輔酶 A 羧化酶的輔酶參與脂肪酸的合成。在脂肪酸要形成更長的鏈時，能將乙醯輔酶 A(acetyl Co-A)轉化成丙二醯輔酶 A

(malonyl Co-A)，而丙醯輔酶 A 羧化酶的輔酶，也是奇數碳脂肪酸 β -氧化的必需物質。此外，生物素還與乙醯膽鹼的合成和膽固醇的代謝有關。

在某些胺基酸降解作用中，當做轉羧基的作用(如白胺基酸及異白胺基酸)；鳥胺酸(ornithine)與 CO_2 來合成尿素(urea)時，可能形成瓜胺酸(citrulline)當做中間代謝物質；也可能參與嘌呤(purine)與嘧啶(pyrimidine)等的合成。因此生物素在蛋白質合成、胺基酸脫胺、嘌呤合成等代謝中起重要作用，為多種胺基酸轉移脫羧所必需 (Mcdowell,1989)。



四、影響基因轉錄作用

A. 葡萄糖代謝

生物素可能影響基因轉錄成葡萄糖激酶(GK)的表現。GK透過調節胰島素釋放和促進肝臟葡萄糖代謝的雙重作用機制來降低血糖。正常生理狀態下，當血糖超過正常血糖閾值時，肝臟可維持葡萄糖的平衡以使血糖恢復至正常範圍。GK為催化糖解的第一個關鍵酵素，能使葡萄糖轉變為6-磷酸葡萄糖，從而參與醣類代謝的各條途徑。因此，肝臟的GK在維持血糖穩定態中發揮着重要作用。

Dakshinamurti等學者在1968年發現生物素對生物素缺乏的大鼠體內葡萄糖代謝的影響(Dakshinamurti et al., 1968)並指出生物素缺乏的大鼠其葡萄糖耐受試驗曲線明顯的比沒有缺乏的大鼠高，認為此結果可能原因為造成肝臟中GK的活性降低(Dakshinamurti and Cheah-Tan, 1968)。研究顯示，生物素缺乏的大鼠肝臟中GK的活性降低了40-45%，當給予生物素之後則會回復正常值(Dakshinamurti and Cheah-Tan, 1968)。而相同的，對生物素缺乏的大鼠補充生物素，也會增加GK的rRNA、mRNA及蛋白質合成(Dakshinamurti and Litvak, 1970)。給予糖尿病大鼠補充生物素會抑制肝臟中PEPCK的mRNA相對於控制組減少了15%的表現(Dakshinamurti, 1994)。

生物素缺乏的大鼠肝臟 GK 活性明顯較低(Dakshinamurti and Cheah-Tan, 1968), 然而正常餵食的大鼠或不餵食生物素的大鼠藥理劑量的生物素提高 GK 的活性(Dakshinamurti and Cheah-Tan, 1968; Dakshinamurti et al., 1970; Editorial, 1970; Chauhan and Dakshinamurti, 1991; Hsieh and Mistry, 1992)。

生物素除了會刺激胰島素與胰臟的 GK 表現(expression), 並調節胰島素對於血糖濃度的改變(Romero-Navarro et al., 1999)外, 在肝臟胚細胞瘤(hepatoblastoma)HuH7 細胞中, IR 在轉錄後(posttranscriptional lever)也會受生物素所調節(De la Vega and Stockert, 2000), 這作用也需要 cGMP 訊息傳遞的活化。

B. 生物素依賴型羧化酶及全羧化酶合成酶

在羧化酶依賴型的代謝途徑上, 生物素的缺乏可能會造成細胞增生作用減慢(Dakshinamurti et al., 1985; Manthey et al., 2002)、免疫功能受損(Rabin, 1983; Ba'ez-Saldan~a et al., 1998)及胎兒發展異常(Petrelli et al., 1981; Watanabe, 1983; Watanabe et al., 1995; Zempleni and Mock, 2000)。

生物素依賴型的羧化酶催化了葡萄糖、胺基酸及脂肪酸代謝的重要步驟(Zempleni et al., 2001)。許多文獻指出，基因轉錄成生物素依賴型的羧化酶及全羧化酶合成酶的作用都需要生物素的參與。當大鼠生物素缺乏時，肝臟、腎臟、肌肉及大腦的mRNA轉錄成全羧化酶合成酶作用明顯較控制組減少，當給予生物素24小時之後，情況則有明顯的改善(Rodriguez-Melendez and Zempleni, 2001)。在人類的肝臟細胞株中也有相同的發現(Solorzano-Vargas and Pacheco-Alvarez, 2002)。

在ATP依賴型的反應中，受到全羧化酶合成酶的催化，生物素會附着在全羧化酶的離胺酸 ϵ -胺基區(Dakshinamurti, 1994)。當holocarboxylase降解後，會產生biotinyl peptides，這些胜肽會更進一步藉由biotinidase來降解釋出生物素，使生物素可以再次合成新的holocarboxylase(Wolf et al., 1985)。將人類肝臟細胞培養在不含有生物素的培養基15天，發現基因轉錄成乙醯輔酶A羧化酶(脂肪酸合成的限速酶)及丙醯輔酶A羧化酶(胺基酸及奇數脂肪酸的分解代謝所必需的)的作用較控制組降低了20%(Solorzano-Vargas and Pacheco-Alvarez, 2002)。Solorzano-Vargas等學者則認為全羧化酶合成酶依賴的訊息傳遞路徑會調節基因轉錄成生物素依賴型羧化酶的表現。

五、生物素與第 2 型糖尿病的關係

大鼠生物素的缺乏與口服葡萄糖耐受程度受損、降低體內葡萄糖的利用有關(Deodhar and Mistry, 1970; Dakshimamurti et al., 1968)。由探討第 2 型糖尿病人生物素的狀態(status)，研究發現體內的生物素濃度較控制組低(Maebashi et al., 1993)。

在糖尿病 KK 小鼠與 Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) 大鼠研究中，給予生物素會降低餐後血液葡萄糖濃度與改善葡萄糖耐受的程度(Reddi et al., 1988 ; Zhang et al., 1996)。日本的學者探討生物素與第 2 型糖尿病患的血糖濃度時，發現高血糖濃度者血中生物素的濃度都很低。18 名病患接受每天口服 9 mg 的生物素一個月之後，空腹血糖濃度約降低 45%(Maebashi et al., 1993)；另外給予第 2 型糖尿病病人每天 15 mg 生物素 28 天亦有降低葡萄糖與胰島素濃度的效果(Cristina Fernandez-Mejia et al. 2003)；除此之外，給予血液透析病人藥理劑量 (pharmacological doses) 的生物素也會改善其口服葡萄糖耐受試驗結果 (Koustikos et al., 1966)。

捌、本實驗室先前的結果

一、補充生物素對調控血糖的影響

1、空腹血糖

由本實驗室之前研究結果顯示，糖尿病 KK 小鼠在未補充生物素(0 週)時，生理水組、3mg 組、6mg 組的空腹血糖濃度並沒有顯著差異。但在補充生物素 2 週後，3mg 組雖然有下降的情形，但與補充前比較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)相比較其空腹血糖有顯著下降的情形($132.8 \pm 22.2 \text{mg/dl}$ ； $172.2 \pm 52.2 \text{mg/dl}$ ； $p < 0.05$)。KK 小鼠在補充生物素 4 週後，3mg 組和 6mg 組與生理水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 6mg 生物素 2 週或 4 週後，和補充生物素前(0 週)相比，已達到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，與補充前相比雖然有下降的現在，但沒有達到統計上的顯著差異。

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	169.2±29.1	157.0±23.4	174.8±46.8 ^a
3mg 組	172.5±37.0	145.8±47.0	147.4±40.6 ^b
6mg 組	172.7±52.2	132.8±22.2 *	135.1±30.6 ^{b*}

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

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

2、 胰島素阻抗性

以 HOMA 公式計算出胰島素阻抗性的數值(Matthews et al., 1985)；結果顯示，補充生物素 2 週之後，3mg 組和 6mg 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 4 週後，3mg 組和 6mg 組與生理水組相比都有下降，且達到統計上的顯著($p < 0.05$)。3mg 生物素補充 4 週後與補充前(0 週)時相比，也有顯著降低($p < 0.05$)；6mg 組雖然有下降，但沒有達到統計上的顯著差異。由以上的結果可知，補充生物素 4 週可改善第 2 型糖尿病 KK 小鼠的胰島素阻抗性。



表 2.5、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

Table 2.5 Insulin resistance in three biotin treatment groups at 0,2,4
week¹

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

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

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

二、生物素對骨骼肌中 IRS-1 蛋白質表現與 PI 3-Kinase 的連結

先前研究發現，在沒有胰島素刺激的情況下，生理水組的總 IRS-1 蛋白質表現量明顯低於補充生物素 3mg 與 6mg 組($p<0.05$)，但在 3mg 與 6mg 組之間，雖然沒有顯著的差異，但補充生物素 6mg 組其總 IRS-1 表現量有高於 3mg 組的趨勢。在胰島素刺激後，生理水組的總 IRS-1 蛋白質表現量顯著低於補充生物素 3mg 與 6mg 組，且補充生物素 6mg 其總 IRS-1 蛋白質表現量顯著高於 3mg 組($p<0.05$)，且補充生物素 6mg 可增加胰島素刺激下總 IRS-1 的表現量。

在 IRS-1 酪胺酸磷酸化(活化型 IRS-1)的蛋白質表現情形，發現在沒有胰島素時，生理水組的蛋白質表現量與 3mg、6mg 組之間沒有顯著的差異，但 3mg 組顯著高於 6mg 組($p<0.05$)。胰島素刺激後，生理水組的蛋白質表現量顯著低於 3mg、6mg 組($p<0.05$)，但 3mg 與 6mg 組之間沒有顯著性的差異；顯示補充生物素 6mg 在胰島素刺激下，其 IRS-1 酪胺酸磷酸化形式的蛋白質表現量顯著高於同組沒有胰島素的情況。

利用免疫沉澱法與免疫墨點法觀察到在 IRS-1 與 PI 3-Kinase 的連結中，沒有胰島素刺激時，蛋白質表現量以 6mg 組顯著高於 3mg 組，且 3mg 組高於生理水組($p < 0.05$)；在胰島素刺激後，IRS-1 與 PI 3-Kinase 的連結蛋白質表現量與沒有胰島素刺激的結果相同；同時生理水組與 3mg 組在胰島素刺激後，顯著高於同組沒有胰島素刺激的狀態。



三、生物素對骨骼肌中 IRS-2 的蛋白質表現與 PI

3-Kinase 的連結

先前研究顯示，在沒有胰島素刺激時，生理水組的總 IRS-2 蛋白質表現量顯著低於 3mg 組($p<0.05$)，而 3mg 組也顯著低於 6mg 組($p<0.05$)；在胰島素刺激後，IRS-2 蛋白質表現量也是以生理水組低於 3mg 組($p<0.05$)，3mg 組低於 6mg 組($p<0.05$)，同時 6mg 組的總 IRS-2 蛋白質表現量以刺激時顯著較沒刺激時高($p<0.05$)。

在 IRS-2 酪胺酸磷酸化(活化型 IRS-2)的蛋白質表現情形，發現在沒有胰島素刺激時，總 IRS-2 酪胺酸磷酸化形式的蛋白質表現量以 6mg 組最高、3mg 組次之而生理水組最低($p<0.05$)。在胰島素刺激之後，總 IRS-2 酪胺酸磷酸化形式的蛋白質表現量亦為 6mg 組最高、3mg 組次之而生理水組最低($p<0.05$)。

利用免疫沉澱法與免疫墨點法觀察到在 IRS-2 與 PI 3-Kinase 的連結中，沒有胰島素刺激時，生理水組的 PI 3-Kinase 蛋白質表現量以生理水組低於 3mg 組及 6mg 組，同時 6mg 組的蛋白質表現量顯著高於 3mg 組($p<0.05$)。胰島素刺激下，生理水組的 PI 3-Kinase 蛋白質表現量顯著低於補充生物素 6mg 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。

四、生物素對骨骼肌中 GLUT4 蛋白質表現及位移的影響

本研究室先前結果顯示，補充生物素 4 週之後骨骼肌細胞中，基礎狀態下，在漿膜部份 3mg 組的 GLUT4 蛋白質表現量顯著高於生理水組與 6mg 組，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 的表現量顯著較生理水組高($p<0.05$)；而 GLUT4 在 PM/(PM+LDM)蛋白質表現的比例，以此來判斷 GLUT4 位移的情況，在有胰島素刺激下，3mg 及 6mg 組與生理水組相比都有顯著較高($p<0.05$)。

由此結果推測，生物素補充 4 週後，且經由胰島素刺激，可增加 GLUT4 在漿膜的表現及 GLUT4 的位移作用。

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 小鼠補充生物素四週後，可顯著改善其空腹血糖、葡萄糖耐受性、胰島素阻抗性，並會增加骨骼肌細胞中 IRS-1/2、IRS-1/2 與 PI 3-kinase 相連結之蛋白質表現、GLUT4 的表現量與位移情形。因此本研究欲進一步探討給予不同劑量生物素對於第 2 型糖尿病 KK 小鼠骨骼肌與肝臟細胞中，影響 GLUT4 位移的分子路徑中 (1)PKC ζ 在細胞質與細胞膜的總蛋白表現，並評估其活化的情形；(2)PKB(Akt)在 Ser473 與 Thr308 調節部位磷酸化蛋白質的表現。希望藉此探討骨骼肌與肝臟細胞中 PKC ζ 與 PKB(Akt) Ser473 與 Thr308 調節部位磷酸化蛋白質所扮演的角色。

第四章 材料與方法

壹、 試驗材料

一、 試驗動物與飼養環境

1. 試驗動物模式

目前，糖尿病動物模式製備方法主要有：手術切除胰腺、化學藥物誘導、自發性糖尿病動物模式、基因轉殖動物等。KK/H1J 是具第 2 型糖尿病特徵之糖尿病小鼠，於 1944 年由 K. Kondo 所育成的近親品系小鼠，為一種輕度肥胖型第 2 型糖尿病動物。其雄性小鼠具有葡萄糖不耐症(glucose intolerance)、高胰島素血症(hyperinsulinemia)與胰島素阻抗性而有高血糖及高胰島素之症狀及遺傳性，一般多應用於非胰島素依賴型糖尿病的相關研究。

當雄性 KK 小鼠因老化或以高熱量飲食誘導後，會表現出與第 2 型糖尿病人相似的症狀(Ikeda, 1994；Lubec et al., 1997)。8 週齡前便會出現第 2 型糖尿病之症狀；KK 小鼠會有明顯的多食，從 5 週齡起，血糖、血胰島素水平逐步升高，至 5 月齡時體重可達 50 克，非空腹血糖常高於 17mmol/L，非空腹血中胰島素可達 1200 μ g/mL，1 歲齡時，多食、高血糖、高胰島素血症、

肥胖及肝臟對胰島素的敏感性可自發恢復正常，但糖尿病 KK 小鼠生命常明顯縮短。

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 8 週大的雄性 KK/H1J 小鼠，起始體重約 30 公克，先以 Formulab Diet 5008(其成份接近 The Jackson Laboratory 所使用之飼料 LabDiet 5K52)使其適應 2 週，再以高脂高热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 140mg/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核准。

2. 飼料與墊料

墊料為 Beta Chip 硬木墊料(美國 Northeaston Products Corp 製造)，並每週更換清理一次墊料。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 冰箱中，待餵食時再酌量取用，並詳細紀錄攝食情況。

墊料與飼料皆由雍力貿易股份有限公司代理購得。

3. 飼料成分

表 4.1、Formulab Diet 5008

Nutrients	Amount
Protein	23.5%
Fat	6.5%
Fiber	3.8%
Ash	6.8%
Physiological fuel value(Kcal/gm)	3.50
Biotin(ppm)	0.20

5008 飼料熱量：483.55Kcal/100g product

表 4.2、高脂高熱量(含 35.5% Lard)之飼料成分如下所示

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 4.3、高脂高熱量飼料之卡路里與三大營養素之比例

Calories provided by	
Protein(%)	16.3%
Fat(%)	66.6%
Carbohydrate(%)	17.1%

$$\begin{aligned} \text{Total Calories} &= 16.241 \times 4 + 66.629 \times 9 + 17.133 \times 4 \\ &= 733.157 \text{ Kcal/100g product} \end{aligned}$$

4. 飼養環境條件

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

5. 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，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至小鼠體內，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。

二、 試験材料

d-Biotin (Tanabe seipaku co., LTD, Japan)

Human Insulin ; Humulin[®] (Lilly France S.A., F67640 Fegersheim, France)

Anti-PKC ζ (Upstate Biotechnology)

Anti-phospho-Akt1/PKB α (Thr 308) (Upstate Biotechnology)

Anti-phospho-Akt1/PKB α (Ser 473) (Upstate Biotechnology)

β actin antibody (Chemicon ; Abcam)

HRP-Labeled Anti-Mouse IgG(Goat) (PerkinElmer[™] Life Sciences, Inc)

HRP-Labeled Anti-Rabbit IgG(Goat) (PerkinElmer[™] Life Sciences, Inc)

Western Lightning[™] Chemiluminescence Reagent Plus
(PerkinElmer[™] Life Sciences, Inc)



貳、 試驗設計與分組

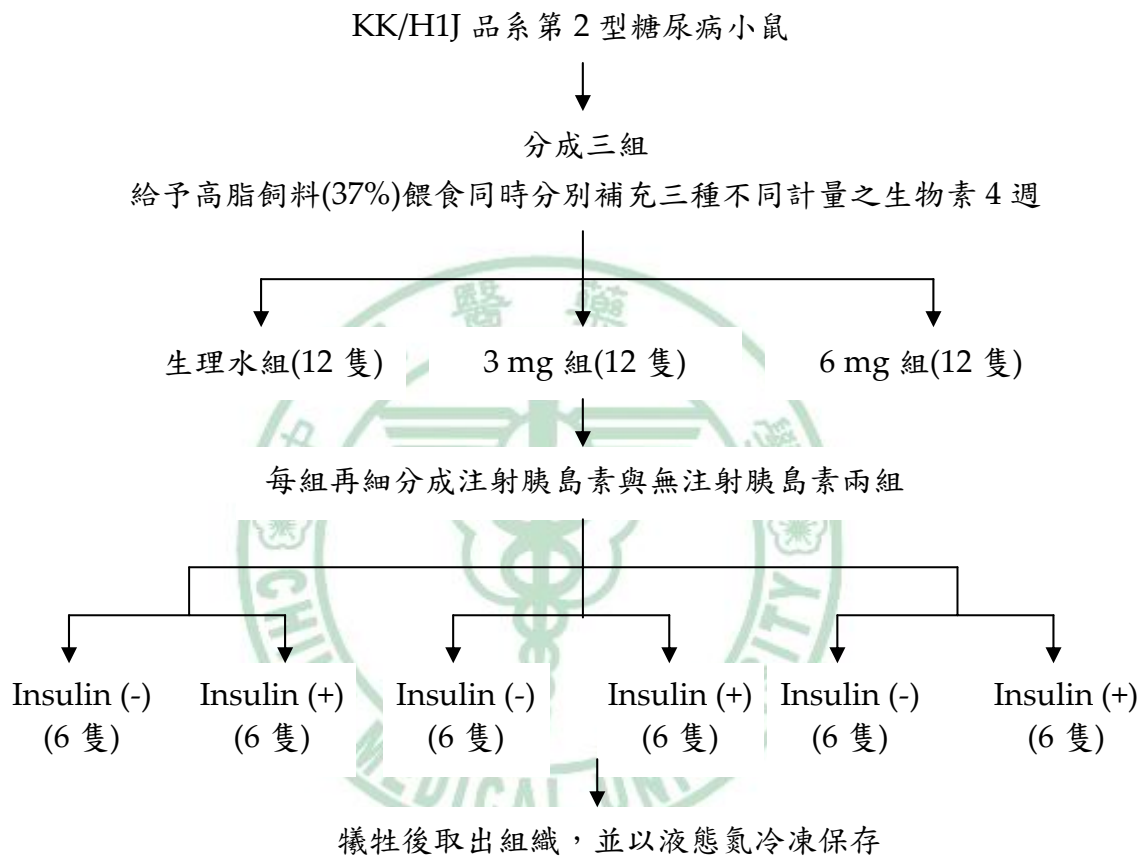
首先將已誘發出第 2 型糖尿病之小鼠，依照不同劑量的生物素分成三組：生理水組 0 mg/kg of body weight (生理水組)、3 mg 生物素補充組 3 mg/kg of body weight (3 mg 組)、6mg 生物素補充組 6 mg/kg of body weight (6 mg 組)。在第四週補充期結束後，分別進行兩種處理方式，其中胰島素刺激組在小鼠犧牲前 30 分鐘給予腹腔注射 4U/100g regular insulin 進行胰島素誘導試驗，非胰島素刺激組在犧牲前則不給予胰島素作為對照。

表 4.4、本試驗的處理方式與分組

生物素補充劑量 (mg/kg of body weight)	Insulin (-)	Insulin(+)
0 (生理水組) n=12	生理水組 (-) n=6	生理水組(+) n=6
3 (3 mg 組) n=12	3 mg 組(-) n=6	3 mg 組(+) n=6
6 (6 mg 組) n=12	6 mg 組(-) n=6	6 mg 組(+) n=6

參、 試驗流程

一、 製備組織樣品



二、 骨骼肌肉組織中 PKC ζ 的分析

1. 均質



2. 配方

表 4.5、均質液 Buffer A

成分	濃度
Tris (pH7.4)	20 mM
EDTA	10 mM
EGTA	2 mM
β -glycerophosphate	100 nM
Leupeptin	1 mg/ml
Aprotinin	0.1 mg/ml
Ovalbumin	0.1 mg/ml
PMSF	50 μ g

三、 骨骼肌中 PKB(Akt)的分析

1. 均質

肌肉組織與均質液以 50mg / 500 μ l BufferB 混合



在 4°C 下反應 1 小時



在 4°C 下，以 12000g 離心 10 分鐘



取上清液



進行免疫墨點法

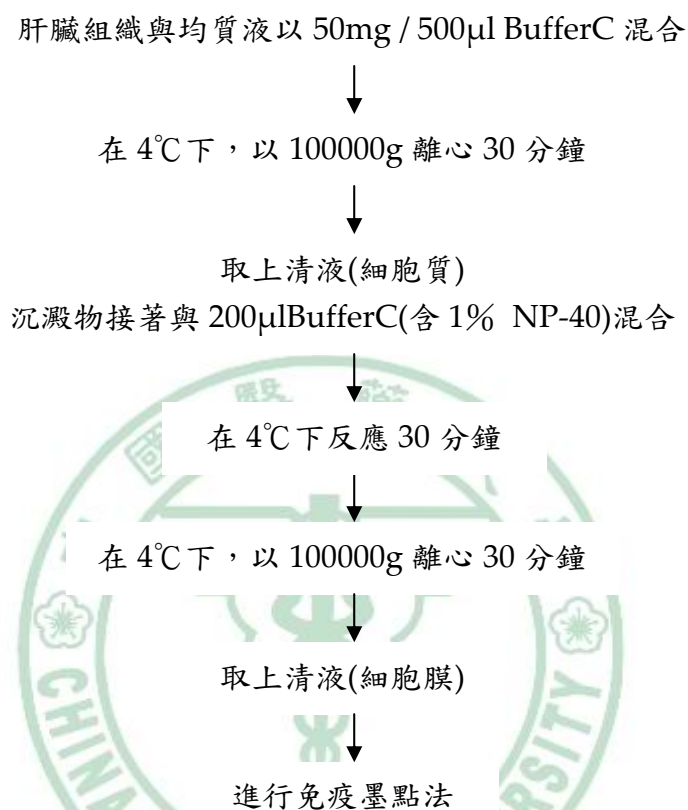
2. 配方

表 4.6、均質液 Buffer B

成分	濃度
HEPES	50 mM
NaCl	150 mM
Na ₄ P ₂ O ₇	10 mM
Na ₃ VO ₄	2 mM
NaF	10 mM
EDTA	2 mM
PMSF	2 nM
Leupeptin	5 μ g/ml
NP-40	1 %
Glycerol	10%

四、 肝臟中 PKC ζ 的分析

1. 均質



2. 配方

表 4.7、均質液 Buffer C

成分	濃度
Tris-HCl	20 mM
EDTA	2 mM
EGTA	2 mM
Leupeptin	20 μ g/ml
β -mercaptoethanol	6 mM
Aprotinin	4 μ g/ml

五、 肝臟中 PKB(Akt)的分析

1. 均質

肝臟組織與均質液以 50mg / 500 μ l BufferD 混合



在 4°C 下反應 1 小時



在 4°C 下，以 14000g 離心 30 分鐘



取上清液



進行免疫墨點法

2. 配方

表 4.8、均質液 Buffer D

成分	濃度
Na ₄ P ₂ O ₇	10 mM
Na ₃ VO ₄	2 mM
NaF	100 mM
EDTA	5 mM
PMSF	1 mM
Leupeptin	10 μ g/ml
NP-40	1%
Tris (pH7.4)	20 mM
Aprotinin	10 μ g/ml

六、蛋白質定量

表 4.9、蛋白質標準品樣品製備

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

1. 以BSA為蛋白質標準品，依照上表製作蛋白質標準樣品
2. 將配置好的蛋白質標準樣品用分光光度計，在吸光值(O.D.)
590 nm測定各蛋白質標準樣品吸光質的平均值
3. 畫出吸光質與標準樣品相關的檢量線，並求出曲線方程式及
 R^2 值
* R^2 值必須 ≥ 0.99 以上的準確度
4. 取10 μl sample + 790 μl ddH₂O + 200 μl dye reagent
5. 放入分光光度計測得O.D.值換，帶入趨勢方程式中，可得稀
釋後sample濃度
6. 乘上稀釋倍數，即是實際的sample濃度

七、 SDS-PAGE

表 4.10、膠體電泳下層膠與下層膠製備

	下層膠(10%)	上層膠 (4%)
Acrylamide / Bis (37.5 : 1)	2.475 ml	0.503 ml
Running gel buffer 1.5 M Tris-HCl pH = 8.8	2.5 ml	×
Stacking gel buffer 0.5 M Tris-HCl pH = 6.8	×	1.25 ml
10 % SDS	0.1 ml	50 μ l
dd H ₂ O	4.925 ml	3.167 ml
10 % APS	50 μ l	50 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l

依照上表依序配置下層膠與上層膠

↓
將鑄好的膠片放入電泳槽，加入 Running buffer

↓
marker(5 μ l)、positive control(15 μ l)、sample+sample
buffer(16 μ l)先以 95°C 加熱 5 分鐘

↓
將加熱好的 marker、positive control、sample+sample
buffer 加入樣品槽中

↓
以電壓 50V 跑 30 分鐘，再以電壓 150 V 跑 1 小時 40 分鐘

表 4.11、4× sample buffer

成分	最終濃度	初濃度	體積 (μl)
Tris-HCl	0.0625 M	0.5 M	125
Glycerol	10 %	100 %	100
SDS	2 %	10 %	200
2-Mercaptoethanol	5 %	100 %	50
Bromophenol blue	0.05 %	1 % (w/v)	50
加 ddH ₂ O 至 1000 μl			

表 4.12、Running gel buffer ; Stacking gel buffer

Running gel buffer		Stacking gel buffer	
Tris-base	27.23 g	Tris-base	6 g
ddH ₂ O	80 ml	ddH ₂ O	60 ml
以 6 N HCl 調整至 pH 8.8		以 6 N HCl 調整至 pH 6.8	
加 ddH ₂ O 至 150 ml		加 ddH ₂ O 至 100 ml	

表 4.13、10× Running buffer

成分	重量(g)
Tris-base	30.3
glycine	144.0
SDS	10.0
調整至 pH 8.3	
加 ddH ₂ O 至 1000 ml	

八、 西方點墨法(WESTERN BLOT)



表 4.14、Transfer Buffer

成分	重量
Tris	3.03g
Glycine	14.4g
Methanol	200ml
加 ddH ₂ O 至 1000 ml	

表 4.15、PBS

成分	重量(g)
NaCl	8.00
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	1.44
KCl	0.20
KH ₂ PO ₄	0.24
加 ddH ₂ O 至 1000 ml	

九、封片



表 4.16、commassie brilliant blue R-250 染劑；去染劑

commassie brilliant blue R-250 染劑		去染劑	
CBR	1.5 g	Acetic acid	210 ml
methanol	250 ml	methanol	300 ml
Acetic acid	50 ml	ddH ₂ O	4490 ml
ddH ₂ O	250 ml		

表4.17、封片液

成分	最終濃度	初濃度	體積
Glycerol	2 %	100 %	0.40 ml
95 % ethanol	30 %	95 %	6.31 ml
100 % acetic acid	10 %	100 %	2 .00ml
加ddH ₂ O至20 ml			

十、 統計分析

所有的結果均以 Mean±S.D.表示，並以變方分析(ANOVA/Duncan)或 Student *t*-test 檢定各種處理方式之間與不同試驗階段結果的顯著差異。所有數據以 SAS 統計軟體 (SAS for windows, version 8.1)進行統計分析，以 $p<0.05$ 表示有統計上的顯著性。



第五章 實驗結果

壹、 生物素對骨骼肌肉組織中胰島素訊息傳遞路徑 PKC ζ 的蛋白質表現量的影響

一、 細胞質中總 PKC ζ 蛋白質的表現量

本研究顯示，在沒有胰島素刺激的情況(基礎狀態)下，骨骼肌細胞質的 PKC ζ 蛋白質表現量以生理水組顯著低於補充生物素 6mg 組 ($p<0.05$)，雖然生理水組與 3mg 組之間沒有顯著的差異，但補充生物素 3mg 其骨骼肌細胞質的 PKC ζ 蛋白質表現量有高於生理水組的趨勢。在胰島素刺激之後，骨骼肌細胞質的 PKC ζ 蛋白質表現量也同樣的以生理水組顯著低於補充生物素 6mg 組 ($p<0.05$)，且補充生物素 3mg 其骨骼肌細胞質的 PKC ζ 蛋白質表現量有高於生理水組的趨勢。另外，生理水組的蛋白質表現量發現可增加胰島素刺激後 PKC ζ 蛋白質的表現。

A. IB : β -actin



B. IB : PKC ζ



C.

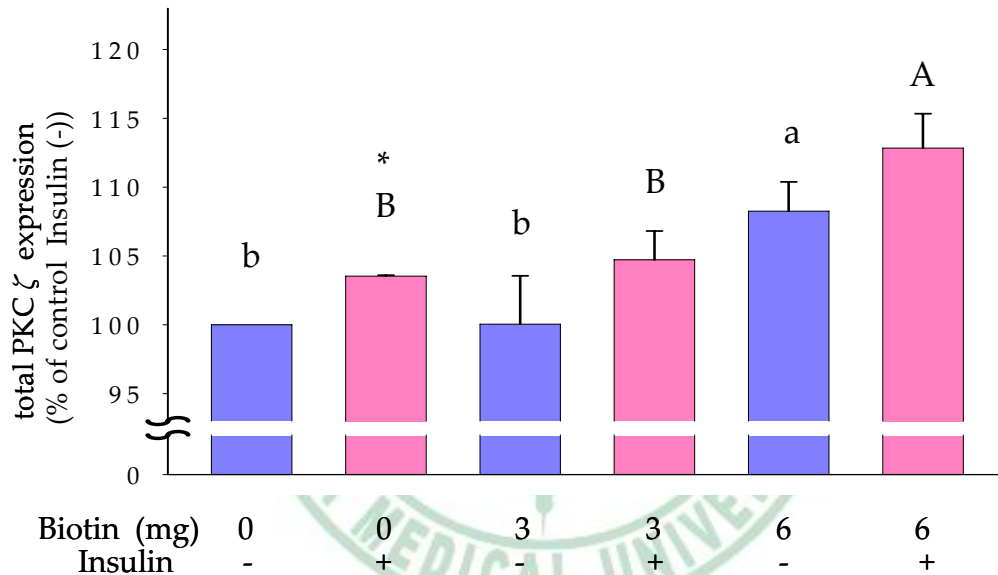


圖 5.1、三組不同劑量生物素補充 4 週後在基礎狀態或胰島素刺激下，骨骼肌細胞質中總 β -actin、PKC ζ 蛋白質表現量。A : β -actin 免疫墨點法的結果。B : PKC ζ 免疫墨點法的結果。C : 以 Alpha Innotec Corporation ChemiImager™ 440 定量的結果¹。

Fig 5.1 Cytosolic PKC ζ protein expression in skeletal muscle on basal or insulin-induced condition after 4 weeks with 0,3,6 mg biotin / kg of body weight supplementation. A : Immunoblot of β -actin protein. B : Immunoblot of PKC ζ protein. C : Quantification of protein expression by Alpha Innotec Corporation ChemiImager™ 440¹.

¹. Each value represents mean \pm S.D. Values with different letter in insulin(-) or (+) group are significantly different ($p < 0.05$).

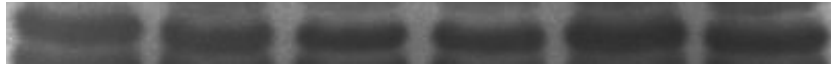
* mean is significantly different from their insulin(-) group ($p < 0.05$).

二、 細胞膜中總 PKC ζ 蛋白的表現量

本研究結果顯示，在沒有胰島素刺激(基礎狀態)時，生理水組的骨骼肌細胞膜 PKC ζ 蛋白質表現量顯著低於 3mg 組與 6mg 組，並且 6mg 組顯著高於 3mg 組($p < 0.05$)。然而在胰島素刺激之後，生理水組的細胞膜 PKC ζ 蛋白質表現則相反的顯著高於 3mg 組與 6mg 組，並且 6mg 組顯著低於 3mg 組($p < 0.05$)。另外，不管是否有給予生物素的補充，在胰島素的刺激之下，生理水組、3mg 組、6mg 組的細胞膜 PKC ζ 蛋白質表現量皆與沒有胰島素刺激時有顯著的差異($p < 0.05$)。



A. IB : β -actin



B. IB : PKC ζ

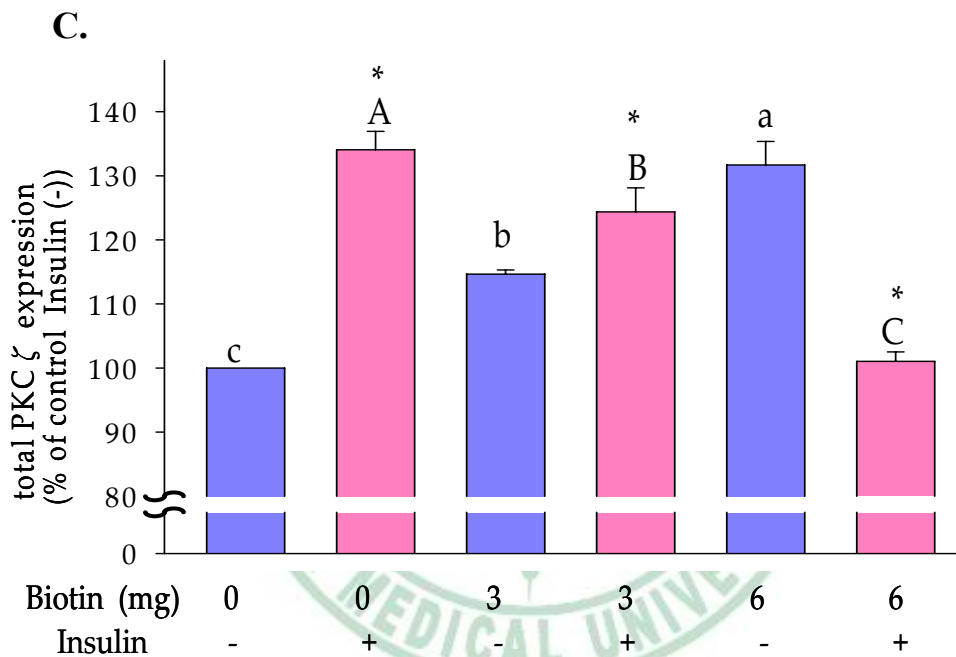


圖 5.2、三組不同劑量生物素補充 4 週後在基礎狀態或胰島素刺激下，骨骼肌細胞膜中總 β -actin、PKC ζ 蛋白質表現量。A： β -actin 免疫墨點法的結果。B：PKC ζ 免疫墨點法的結果。C：以 Alpha Innotec Corporation ChemiImager™ 440 定量的結果¹。

Fig 5.2 Membrane PKC ζ protein expression in skeletal muscle on basal or insulin-induced condition after 4 weeks with 0,3,6 mg biotin / kg of body weight supplementation. A : Immunoblot of β -actin protein. B : Immunoblot of PKC ζ protein. C : Quantification of protein expression by Alpha Innotec Corporation ChemiImager™ 4401¹.

¹ Each value represents mean \pm S.D. 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、 PKC ζ 蛋白的活化情形

將 PKC ζ 換算成細胞膜佔全細胞的百分比[(細胞膜/細胞質+細胞膜) $\times 100\%$]可以觀察到 PKC ζ 從細胞質中位移到細胞膜上的程度，具活化型態的 PKC ζ 必須先由細胞質位移到細胞膜，因為缺乏靈敏性高度分析 PKC ζ 活化的方法，測量細胞膜是最常被使用的方法。由結果顯示，沒有胰島素刺激時，骨骼肌中 6mg 組的 PKC ζ 從細胞質位移到細胞膜的比例顯著高於 3mg 組與生理水組，並且 3mg 組也顯著高於生理水組 ($p < 0.05$)。給予胰島素刺激後，骨骼肌中 PKC ζ 從細胞質位移到細胞膜的比例則相反的以生理水組顯著高於 3mg 組及 6mg 組 ($p < 0.05$)，雖然 3mg 組、6mg 組之間沒有顯著上的差異，但是 6mg 組 PKC ζ 活化情形則有較 3mg 組減少的趨勢。給予胰島素刺激後，生理水組 PKC ζ 活化情形較沒有刺激時增加，6mg 組則是減少，可以得知，本研究的生物素補充不會促進 PKC ζ 的活化。

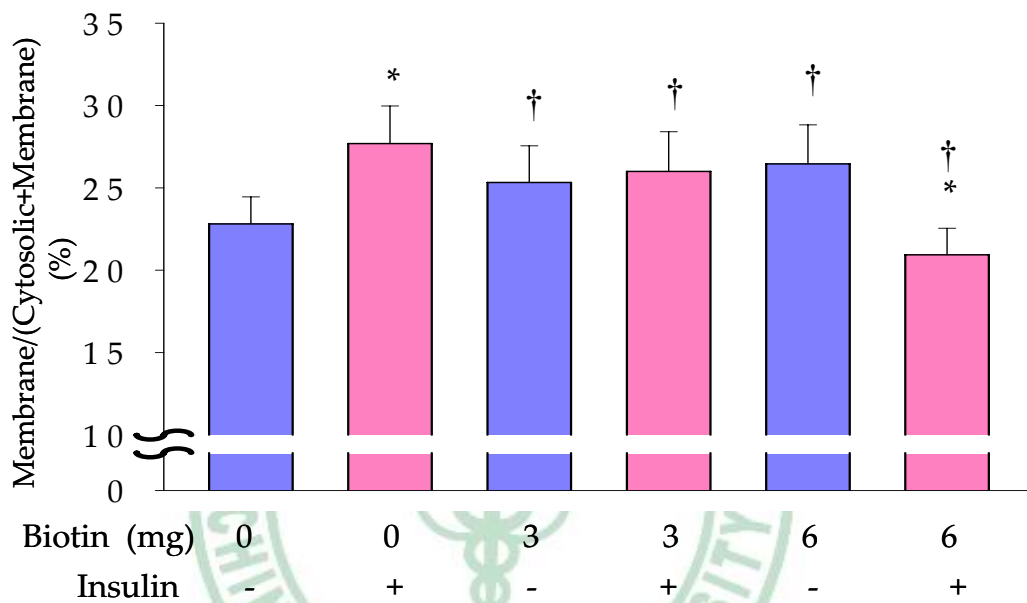


圖 5.3、補充三組不同劑量的生物素 4 週後骨骼肌 PKC ζ 在細胞膜部位與全細胞的蛋白質含量比值¹。

Fig 5.3 PKC ζ protein expression ratio between cytosol and membrane in skeletal muscle on basal or insulin-induced condition after 4 weeks with 0,3,6 mg biotin / kg of body weight supplementation¹.

¹ Each value represents mean \pm S.D.

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

† mean is significantly different from their Biotin (0mg) group ($p < 0.05$).

貳、 生物素對骨骼肌肉組織中胰島素訊息傳遞路徑 PKB(Akt)的蛋白質表現量的影響

一、 總 PKB(Akt) Ser473 調節部位磷酸化蛋白質的表現量

本實驗結果中，在沒有胰島素刺激時，PKB(Akt) Ser 473 調節部位磷酸化蛋白質表現增加，其中以 3mg 組效果最為明顯。胰島素刺激後，KK 糖尿病小鼠體內的 PKB(Akt) Ser 473 調節部位磷酸化蛋白質也是在 3mg 組最多，生理水組與 6mg 組依序次之。在同組間比較發現胰島素刺激 30 分鐘後，PKB(Akt) Ser473 調節部位磷酸化是增加的，與預期之結果相符合。



A、IB：β-actin



B、IB：PKB(Akt) Ser 473



C、

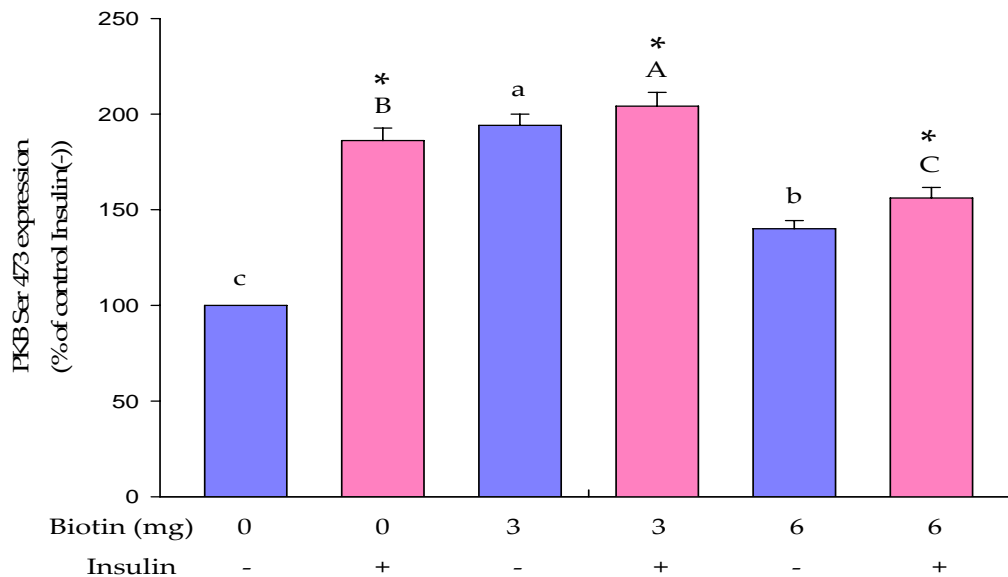


圖 5.4、三組不同劑量生物素補充 4 週後在基礎狀態或胰島素刺激下，骨骼肌中總 β-actin、PKB(Akt) Ser473 調節部位磷酸化蛋白質表現量。A：β-actin 免疫墨點法的結果。B：PKB(Akt) Ser473 免疫墨點法的結果。C：以 Alpha Innotec Corporation ChemiImager™ 440 定量的結果¹。

Fig 5.4 PKB(Akt) Ser473 phosphorylation protein expression in skeletal muscle on basal or insulin-induced condition after 4 weeks with 0,3,6 mg biotin / kg of body weight supplementation. A : Immunoblot of β-actin protein. B : Immunoblot of PKB(Akt) Ser473 phosphorylation protein. C : Quantification of protein expression by Alpha Innotec Corporation ChemiImager™ 440¹.

¹ Each value represents mean ± S.D. 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 PKB(Akt) Thr308 調節部位磷酸化蛋白的表現量

本研究結果顯示，沒有胰島素刺激時，PKB(Akt) Thr 308 調節部位磷酸化蛋白質以生理水組表現最多，3mg 組與 6mg 組依次減少。胰島素刺激後，PKB(Akt) Thr 308 調節部位磷酸化蛋白質表現也是顯著的依次序減少。在同組間比較發現胰島素刺激 30 分鐘後，PKB(Akt) Thr308 調節部位磷酸化的程度卻顯著性的下降，與 PKB(Akt) Ser473 調節部位磷酸化的結果剛好相反。



A. IB : β -actin



B. IB : PKB(Akt) Thr308

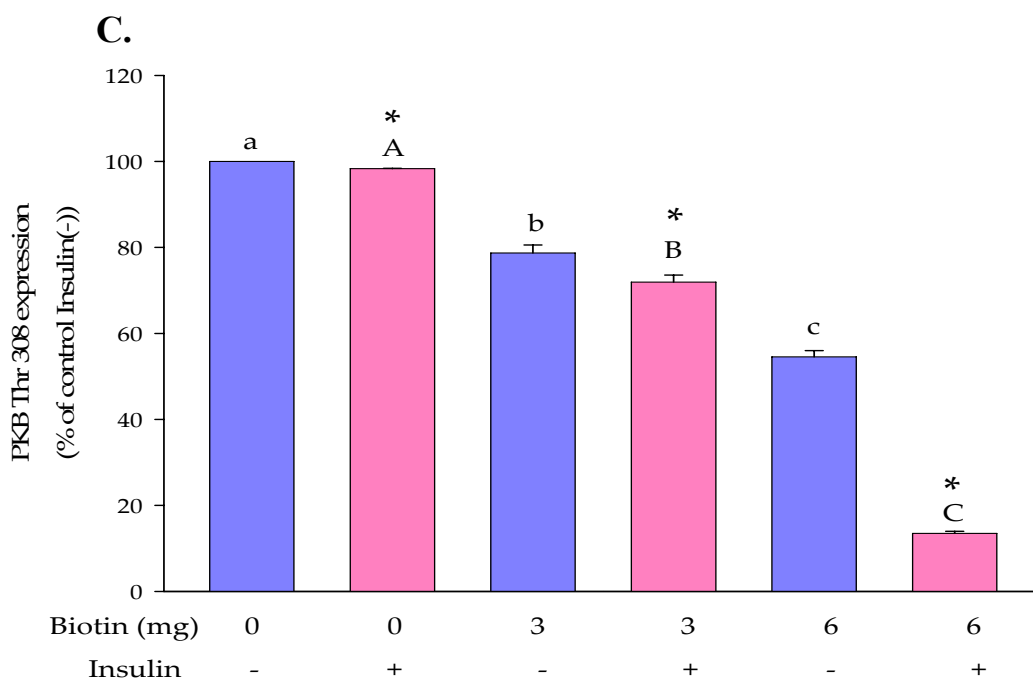


圖 5.5、三組不同劑量生物素補充 4 週後在基礎狀態或胰島素刺激下，骨骼肌中總 β -actin、PKB(Akt) Thr308 調節部位磷酸化蛋白質表現量。A： β -actin 免疫墨點法的結果。B：PKB(Akt) Thr308 免疫墨點法的結果。C：以 Alpha Innotec Corporation ChemiImagerTM 440 定量的結果¹。

Fig 5.5 PKB(Akt) Ser473 phosphorylation protein expression in skeletal muscle on basal or insulin-induced condition after 4 weeks with 0,3,6 mg biotin / kg of body weight supplementation. A : Immunoblot of β -actin protein. B : Immunoblot of PKB(Akt) Thr308 phosphorylation protein. C : Quantification of protein expression by Alpha Innotec Corporation ChemiImagerTM 440¹.

¹ Each value represents mean \pm S.D. Values with different letter in insulin(-) or (+) group are significantly different ($p < 0.05$).

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

參、 生物素對肝臟組織中胰島素訊息傳遞路徑 PKC ζ 的蛋白質表現量的影響

一、 細胞質中 PKC ζ 總蛋白的表現量

研究結果顯示，沒有胰島素刺激(基礎狀態)下，肝臟細胞質中 PKC ζ 總蛋白質表現量以生理水組顯著最多，其次為 6mg 組與 3mg 組 ($p < 0.05$)。在胰島素刺激後，發現其蛋白質總表現量為 3mg 組最多，而生理水組與 6mg 組表現量卻是不具有統計上的顯著差異。另外，在 3mg 組間以有無胰島素刺激相比，發現胰島素會增加細胞質中 PKC ζ 蛋白質總表現。



A. IB : β -actin



B. IB : PKC ζ



C.

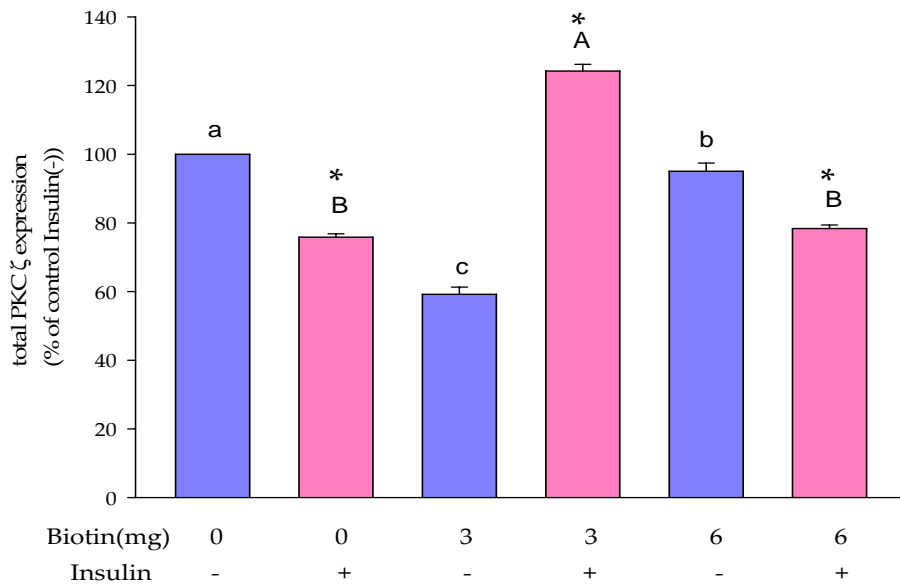


圖 5.6、三組不同劑量生物素補充 4 週後在基礎狀態或胰島素刺激下，肝臟中細胞質中總 β -actin、PKC ζ 蛋白質表現量。A： β -actin 免疫墨點法的結果。B：PKC ζ 免疫墨點法的結果。C：以 Alpha Innotech Corporation ChemiImagerTM440 定量的結果¹。

Fig 5.6 Cytosolic PKC ζ protein expression in liver on basal or insulin-induced condition after 4 weeks with 0,3,6 mg biotin / kg of body weight supplementation. A: Immunoblot of β -actin protein. B: Immunoblot of PKC ζ protein. C: Quantification of protein expression by Alpha Innotec Corporation ChemiImagerTM 440¹.

¹ Each value represents mean \pm S.D. 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、 細胞膜中總 PKC ζ 蛋白的表現量

由研究結果得知，沒有胰島素刺激(基礎狀態)情況下，肝臟細胞膜中 PKC ζ 蛋白質表現量顯著以 6mg 組最多($p < 0.05$)，而生理水組與 3mg 組蛋白質表現量則沒有顯著性的差異。當胰島素刺激後，也是以 6mg 組顯著表現量最多($p < 0.05$)，生理水組與 3mg 組蛋白質表現量則沒有顯著性的不同。此外，以同組之間有無胰島素刺激比較，發現胰島素刺激後會增加 PKC ζ 細胞膜的表現量。



A. IB : β -actin



B. IB : PKC ζ



C.

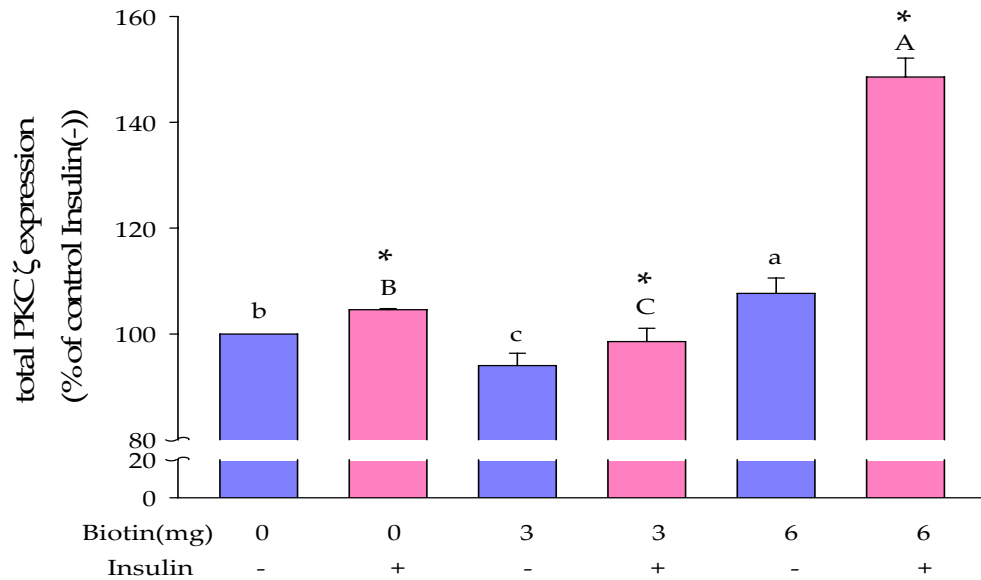


圖 5.7、三組不同劑量生物素補充 4 週後在基礎狀態或胰島素刺激下，肝臟細胞膜中總 β -actin、PKC ζ 蛋白質表現量。A : β -actin 免疫墨點法的結果。B : PKC ζ 免疫墨點法的結果。C : 以 Alpha Innotech Corporation ChemiImagerTM 440 定量的結果¹。

Fig 5.7 Membrane PKC ζ protein expression in liver on basal or insulin-induced condition after 4 weeks with 0,3,6 mg biotin / kg of body weight supplementation. A: Immunoblot of β -actin protein. B : Immunoblot of PKC ζ protein. C : Quantification of protein expression by Alpha Innotech Corporation ChemiImagerTM 440¹.

¹ Each value represents mean \pm S.D. 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、 PKC ζ 蛋白的活化情形

以細胞膜上蛋白質表現量和全細胞中 PKC ζ 蛋白質表現量的比值 $[(\text{細胞膜}/\text{細胞質}+\text{細胞膜})\times 100\%]$ 來評估 PKC ζ 活化的情形。結果顯示，沒有胰島素刺激時，3mg 組的 PKC ζ 活化的作用較好 ($p < 0.05$)，而當有胰島素刺激後，發現 PKC ζ 活化情形以 6mg 組作用顯著較好 ($p < 0.05$)；而同組織間比較則發現除了 3mg 組活化作用減少外，生理水組與 6mg 組都有顯著活化的作用 ($p < 0.05$)。



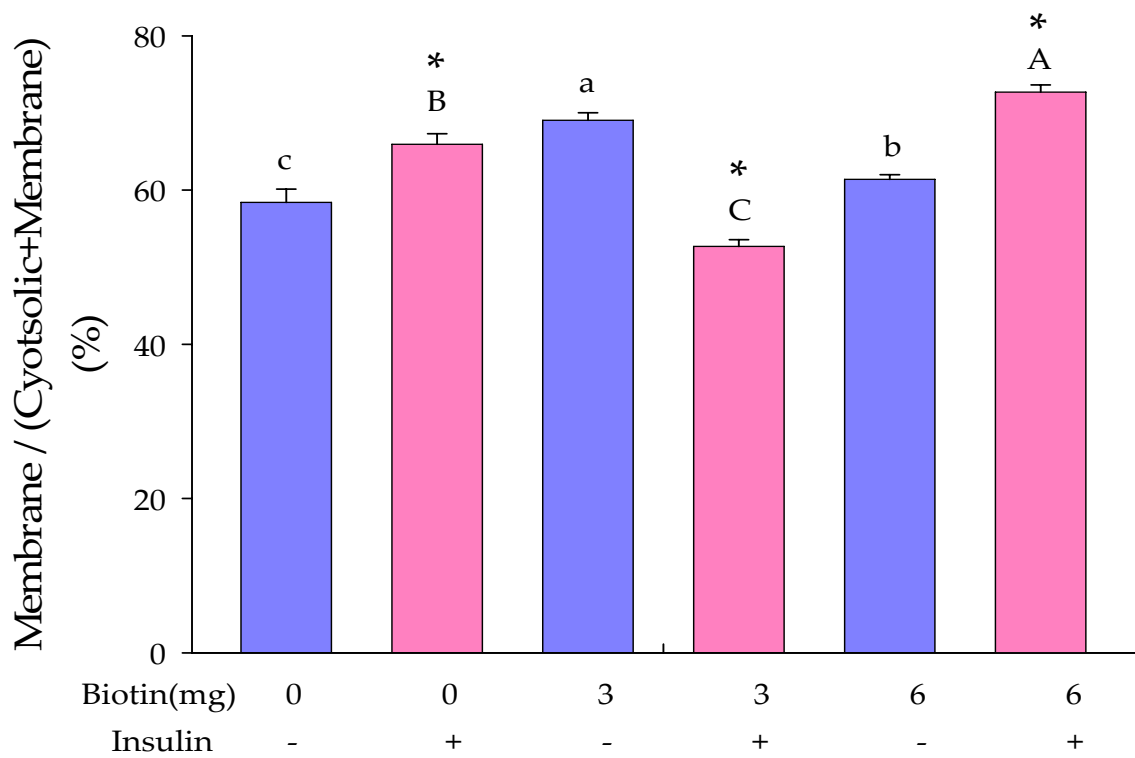


圖 5.8、三組不同劑量的生物素 4 週後肝臟中 PKC ζ 在細胞膜部位與全細胞的蛋白質含量比值¹。

Fig 5.8 PKC ζ protein expression ratio between cytosol and membrane in liver on basal or insulin-induced condition after 4 weeks with 0,3,6 mg biotin / kg of body weight supplementation¹.

¹ Each value represents mean \pm S.D. Values with different letter in insulin(-) or (+) group are significantly different ($p < 0.05$).

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

肆、生物素對肝臟組織中胰島素訊息傳遞路徑 PKB(Akt)的蛋白質表現量的影響

一、總 PKB(Akt) Ser473 調節部位磷酸化蛋白質的表現量

本研究結果顯示，在沒有胰島素刺激(基礎狀態)時，肝臟中 PKB(Akt) Ser473 調節部位總磷酸化蛋白質表現量以 3mg 組最多 ($p<0.05$)，同時 6mg 組又顯著高於生理水組($p<0.05$)。在胰島素刺激 30 分鐘後，發現肝臟中 PKB(Akt) Ser473 調節部位總磷酸化蛋白質卻是 3mg 組最少，生理水組最多 ($p<0.05$)。同組之間比較，也發現每組在胰島素刺激後，PKB(Akt) Ser473 調節部位總磷酸化蛋白質表現量皆是顯著增加的($p<0.05$)。



A. IB : β -actin



B. IB : PKB(Akt) Ser 473



C.

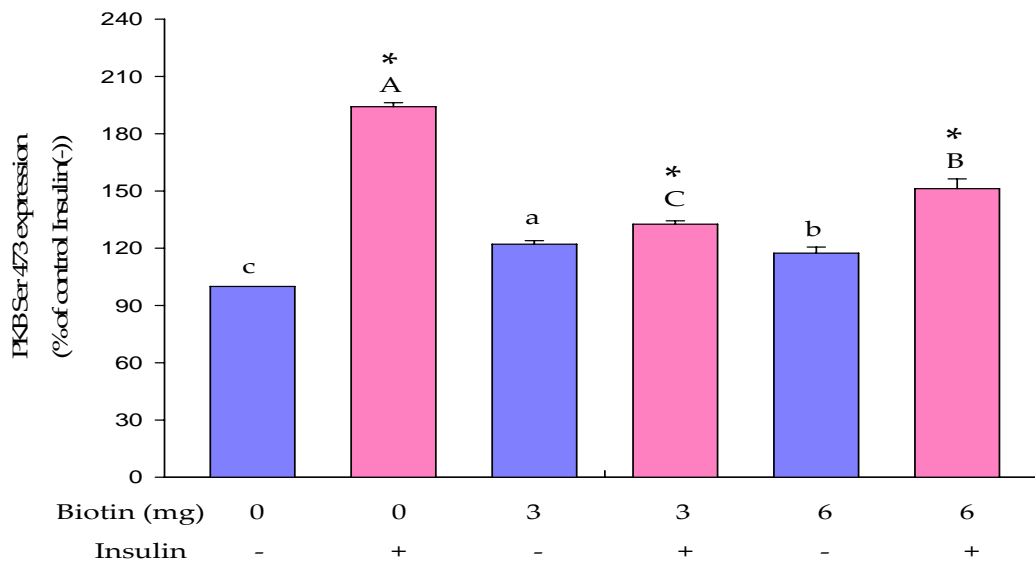


圖 5.9、三組不同劑量生物素補充 4 週後在基礎狀態或胰島素刺激下，肝臟中總 β -actin、PKB(Akt) Ser473 調節部位磷酸化蛋白質表現量。A： β -actin 免疫墨點法的結果。B：PKB(Akt) Ser473 免疫墨點法的結果。C：以 Alpha Innotec Corporation ChemiImagerTM 440 定量的結果¹。

Fig 5.9 PKB(Akt) Ser473 phosphorylation protein expression in liver on basal or insulin-induced condition after 4 weeks with 0,3,6 mg biotin / kg of body weight supplementation. A : Immunoblot of β -actin protein. B : Immunoblot of PKB(Akt) Ser473 phosphorylation protein. C : Quantification of protein expression by Alpha Innotec Corporation ChemiImagerTM 440¹.

¹ Each value represents mean \pm S.D. 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 PKB(Akt) Thr308 調節部位磷酸化蛋白的表現量

本研究結果顯示，在沒有胰島素刺激(基礎狀態)時，肝臟中總 PKB(Akt) T308 調節部位磷酸化蛋白質表現量以高到低排列為生理水組、3mg 組、6mg 組($p < 0.05$)。胰島素刺激後，總 PKB(Akt) T308 調節部位磷酸化蛋白質表現量在 3mg 組有顯著性的上升，但是 6mg 組則反而降低，甚至少於生理水組($p < 0.05$)。同組之間比較，也發現生理水組與 6mg 組在胰島素刺激後，總 PKB(Akt) T308 調節部位磷酸化蛋白質表現量是減少的，但是 3mg 組卻是相對增加的($p < 0.05$)。



A. IB : β -actin



B. IB : PKB(Akt) Thr308



C.

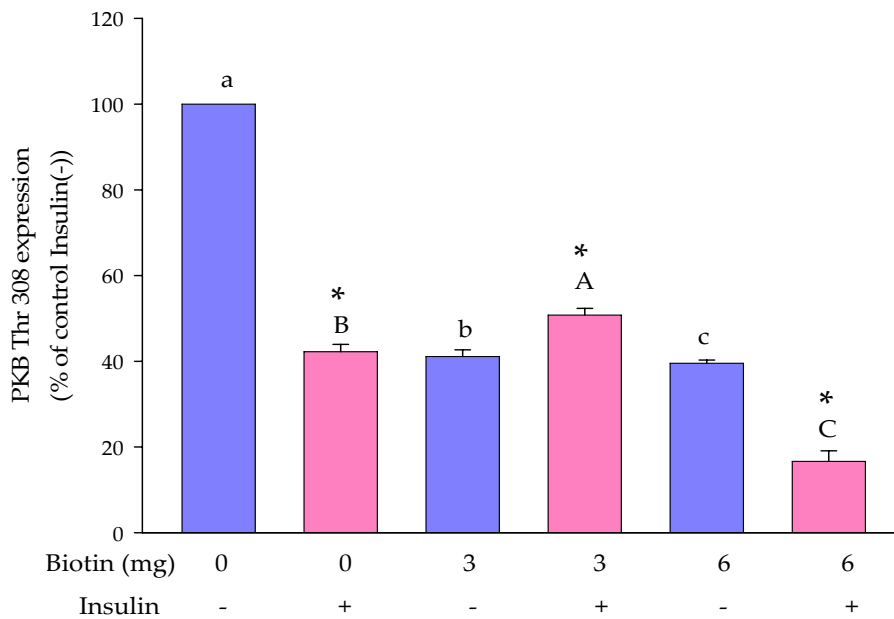


圖 5.10、三組不同劑量生物素補充 4 週後在基礎狀態或胰島素刺激下，肝臟中總 β -actin、PKB(Akt) Thr308 調節部位磷酸化蛋白質表現量。A： β -actin 免疫墨點法的結果。B：PKB(Akt) Thr308 免疫墨點法的結果。C：以 Alpha Innotech Corporation ChemiImagerTM 440 定量的結果¹。

Fig 5.10 PKB(Akt) Thr308 phosphorylation protein expression in liver on basal or insulin-induced condition after 4 weeks with 0,3,6 mg biotin / kg of body weight supplementation. A : Immunoblot of β -actin protein. B : Immunoblot of PKB(Akt) Thr308 phosphorylation protein. C : Quantification of protein expression by Alpha Innotech Corporation ChemiImagerTM 440¹.

¹ Each value represents mean \pm S.D. 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、胰島素阻抗性、 IRS-1/2、IRS-1/2 與 PI 3-Kinase 連結與 GLUT4 蛋白質表現量的影響

許多研究已發現補充生物素可以改善葡萄糖的代謝。口服或注射高劑量生物素顯示可以改善糖尿病 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。目前人體的臨床報告中，每天口服或血液透析 9-16mg 生物素並沒有副作用的產生。本研究所使用的雄性 KK/H1J 品系小鼠具有第 2 型糖尿病的遺傳特質，並容易以高脂飲食提早誘導出葡萄糖不耐、高胰島素血症與胰島素阻抗性等第 2 型糖尿病症狀的表現。

本研究室先前發現雄性 KK/H1J 品系小鼠未補充生物素前，生理水組、3mg 組、6mg 組的空腹血糖與胰島素阻抗性的程度是相似的，當給予了生物素 4 週之後，則發現空腹血糖與胰島素阻抗性都有顯著的較未給予生物素前低；另外結果也發現，生物素補充 4 週之後，3mg 組與 6mg 組的空腹血糖與胰島素阻抗性都顯著低於生理水組($p < 0.05$)，顯示了生物素對於第 2 型糖尿病 KK 小鼠的血糖調控是有幫助的。

在 PI 3-Kinase、IRS-1/2 蛋白質表現上，給予第 2 型糖尿病 KK 小鼠補充生物素 4 週之後，可增加胰島素上游訊息傳遞路徑分子蛋白 IRS-1/2 及其酪胺酸磷酸化的表現($p<0.05$)，推測生物素改善葡萄糖的調控可能是藉由向上游調節某些胰島素訊息傳遞路徑分子蛋白的表現所致。另外生物素補充 4 週後也可以顯著增加 IRS-1 及其與 PI 3-Kinase 相連結的蛋白質表現($p<0.05$)，IRS-2 及其與 PI 3-Kinase 相連結表現上結果則不如預期。

GLUT4 蛋白質的表現量顯示，補充生物素 4 週後，骨骼肌在沒有胰島素刺激時，3mg 組的 GLUT4 蛋白質在 PM 與 PM/(PM+LDM)比例都顯著較對照組高($p<0.05$)，但 6mg 組影響則較不顯著。胰島素刺激後，GLUT4 蛋白質在 PM 的表現量都較沒有胰島素刺激時多，6mg 組在 PM 的表現量顯著高於生理水組($p<0.05$)。

這些結果發現，生物素補充 4 週後胰島素可能透過增加 IRS-1 酪胺酸磷酸化(活化型 IRS-1)及 IRS-1 及其與 PI 3-Kinase 相連結來增加骨骼肌中 GLUT4 由細胞質位移到細胞膜的作用。

貳、 生物素對骨骼肌肉組織中胰島素訊息傳遞路徑中 PKC ζ 的蛋白質表現量的影響

第 2 型糖尿病患肌肉組織中胰島素阻抗性產生的主要病理原因被認為是胰島素所刺激的葡萄糖轉運作用發生異常，而 PKC 異構物參與了胰島素接受器的訊息傳遞(Heydrick et al., 1991 ; Considine and Caro, 1993 ; Shmueli et al.,1993)。有研究指出，PKC 異構物異常會降低胰島素接受器的訊息傳遞，也有研究顯示，aPKC 家族中，PKC ζ 與 PKC λ 可能也會改變胰島素誘導的葡萄糖轉運(KOTANI et al., 1998)。其中，當胰島素刺激後，PKC ζ 會被活化，並且轉運到細胞膜上，同時在轉運過程中也會與 GLUT4 相連接(Braiman et al.,2001)，參與胰島素誘導的 GLUT4 位移及葡萄糖運送的正向和負向調節(Liu et al., 2006)。

PKC ζ 是非典型亞族的一員，被認為在調控促進葡萄糖汲取的胰島素作用上扮演重要的角色(Bandyopadhyay et al., 1997 ; Standaert et al., 1999)。許多文獻指出，PKC ζ 在罹患第 2 型糖尿病患者的肌肉中表現量會下降(Kim et al.,2003 ; Vollenweider et al.,2002)。高脂飲食會使齧齒類動物骨骼肌中，胰島素刺激的 PI 3-Kinase(和 IRS-1 相連接)、PKB(Akt)2、aPKC 活性減少而使醣類的代謝受損，同時也會降低細胞膜上 GLUT4 的蛋白質濃度(Yaspelkis et al., 2001; Singh et al., 2003;

Tremblay et al., 2001; Krisan et al., 2004; Yasplkis et al., 2004)

利用高血糖箝定試驗(euglycemic/hyperinsulinemic clamp)發現，第2型糖尿病病人體內aPKC的活化是缺失的(Kim et al., 2003; Beeson et al., 2003)；其中aPKC家族中主要的成員，在第2型糖尿病骨骼肌中PKC ζ 蛋白質減少了35–40%(Kim et al., 2003; Beeson et al., 2003)，但mRNA的量則是增加的(Beeson et al., 2003)，而且aPKC蛋白的減少並不代表降低其酵素的活性(Beeson et al., 2003)。有研究以免疫沉澱法觀察到第2型糖尿病骨骼肌中aPKCs與PIP3的連結反應受損(Beeson et al., 2003)，因此aPKC活化作用受損可能有三個原因：(1)IRS-1/PI3K活化作用缺失、(2) aPKC對PIP3的反應受損、(3) PKC ζ 蛋白量減少。PKC ζ 在IGT與第2型糖尿病病人中也是有缺失的，在良好控制血糖後，PKC ζ 活化作用的缺失是恢復正常的(Beeson et al., 2003)。在尚未受損的糖尿病病人的細胞中PKC ζ 的缺失部份可歸因於上游的活化者，如IRS-1/PI 3-Kinase活化受損，而在糖尿病的狀態下對於PIP3的反應是不足的，說明了PIP3對PI 3-Kinase/PDK-1產生了影響，並直接使PKC ζ 的活化與活性調節受損。

第2型糖尿病Gotokakizaki rats比目魚肌(soleus muscle)的細胞膜上有較高的PKC ζ 蛋白質總量及活性，而細胞質中PKC ζ 的蛋白質與活性則是減少的，此顯示了PKC ζ 由細胞質位移至細胞膜的活化作用增加

(Avignon et al., 1996)。

在補充生物素 4 週結束後，三組不同劑量的生物素補充組的小鼠各取其骨骼肌之細胞質與細胞膜部位分析其 PKC ζ 的蛋白質含量。結果發現，在沒有胰島素刺激的情形下，給予 3mg 的生物素補充可以顯著增加細胞質與細胞膜中蛋白質量，在 6mg 組的蛋白質表現量也更為明顯較生理水組增加。胰島素刺激後，細胞質 PKC ζ 的蛋白質表現量為 6mg 組高於 3mg 組、3mg 組高於生理水組；細胞膜上 PKC ζ 的蛋白質表現量則與細胞質是相反的。

細胞質內的 PKC ζ 位移到細胞膜時為活化型態，經由 PKC ζ 在細胞膜與全細胞的蛋白質量比值[細胞膜/ (細胞質+細胞膜) $\times 100\%$]，可評估 PKC ζ 的活化情形。本研究得知，給予生物素 3mg 或 6mg 時，可以增加沒有胰島素刺激時的 PKC ζ 位移，但是當有胰島素刺激後，發現 PKC ζ 的位移程度似乎有減少的趨勢。

本實驗室先前對於 PKC 異構物的研究顯示，同為 aPKC 家族的 PKC λ 在沒有胰島素刺激時，不論是白肌細胞(white quadriceps)或紅肌細胞(red gastrocnemius)，由細胞膜位移到細胞質作用增加，此與本實驗結果相符合。

參、 生物素對骨骼肌肉組織中胰島素訊息傳遞路徑中 PKB(Akt)的蛋白質表現量的影響

許多文獻證明 PKB(Akt)訊息傳遞的缺失會發展出胰島素阻抗性(第 2 型糖尿病的生理特徵) (Zdychova and Komers, 2005)，其中又以 PKB(Akt2)為最重要。PKB(Akt2)-/-小鼠發展出輕度的高血糖與葡萄糖不耐受情形；骨骼肌的體外試驗中也發現有高胰島素與葡萄糖汲取作用受損(Cho et al., 2001)。另外過去的研究中，不論是正常者或是糖尿病患者骨骼肌之體外試驗(In vitro)所觀察到的結果並不一致。如在糖尿病病人肌肉與脂肪中發現 PKB(Akt)的功能是受損的(Krook et al., 1998; Rondinone et al., 1999)，在另外的研究中卻指出，儘管第 2 型糖尿病病人中肌肉的 PI 3-Kinase 活性下降，但是 PKB(Akt)的活性卻沒有受損(Kim et al., 1999)。這說明了細胞內只有少部分的 PI 3-Kinase 會完全作用在 PKB(Akt)中，在糖尿病病人體內 PKB(Akt)活性會上升還是減少，與糖尿病的形式與細胞類別有高度的關連(Zdychova and Komers, 2005)。有趣的是，人類骨骼肌體外試驗的控制組中發現三種不同異構物的 PKB(Akt)會被胰島素活化，然而卻只有 PKB α (Akt1)這種異構物在肥胖者、胰島素阻抗性的病人肌肉中才會被活化(Brozinick et al., 2003)。

本實驗結果中，在沒有胰島素刺激時，PKB(Akt) Ser 473 調節部位

磷酸化蛋白質表現增加，表示在空腹的時候體內嘗試著合成肝醣及增加週邊組織對於血中葡萄糖的利用來降低血糖的濃度，其中以 3mg 組效果最為明顯；而 6mg 組表現量降低，推測可能因為影響的程度較好，可能比較快磷酸化及之後的去磷酸化的作用。PKB(Akt) Thr 308 調節部位磷酸化蛋白質表現依次減少，可能因為此時這個位置並沒有被活化的，且受到 PDK-1 影響的程度減少。胰島素刺激後，KK 糖尿病小鼠體內的 PKB(Akt) Ser 473 調節部位磷酸化蛋白質也是在 3mg 組最多，生理水組與 6mg 組依序次之；PKB(Akt) Thr 308 調節部位磷酸化蛋白質表現卻是顯著的減少，推測可能是因為在給予生物素之後，PKB(Akt) Ser 473 調節部位調節骨骼肌葡萄糖汲取、利用的作用較長，而 PKB(Akt) Thr 308 調節部位可能因為與肝臟相同，較容易去磷酸化而導致反而表現量減少。

非肥胖自發性糖尿病大鼠(Goto-Kakizaki rat)體內胰島素刺激 PKB(Akt)較無糖尿病大鼠明顯降低。經由治療使血糖穩定後，再以胰島素刺激可使 PKB(Akt) kinase 修復至控制組的標準(Datta SR. et al. 1999)。在非肥胖第 2 型糖尿病動物模式，骨骼肌中胰島素刺激調節的 PKB(Akt) kinase 活性與葡萄糖轉運都有相似的降低。當非肥胖第 2 型糖尿病動物模式的血糖控制改善後，骨骼肌中胰島素刺激調節的

PKB(Akt) kinase 活性與葡萄糖轉運會回復正常。

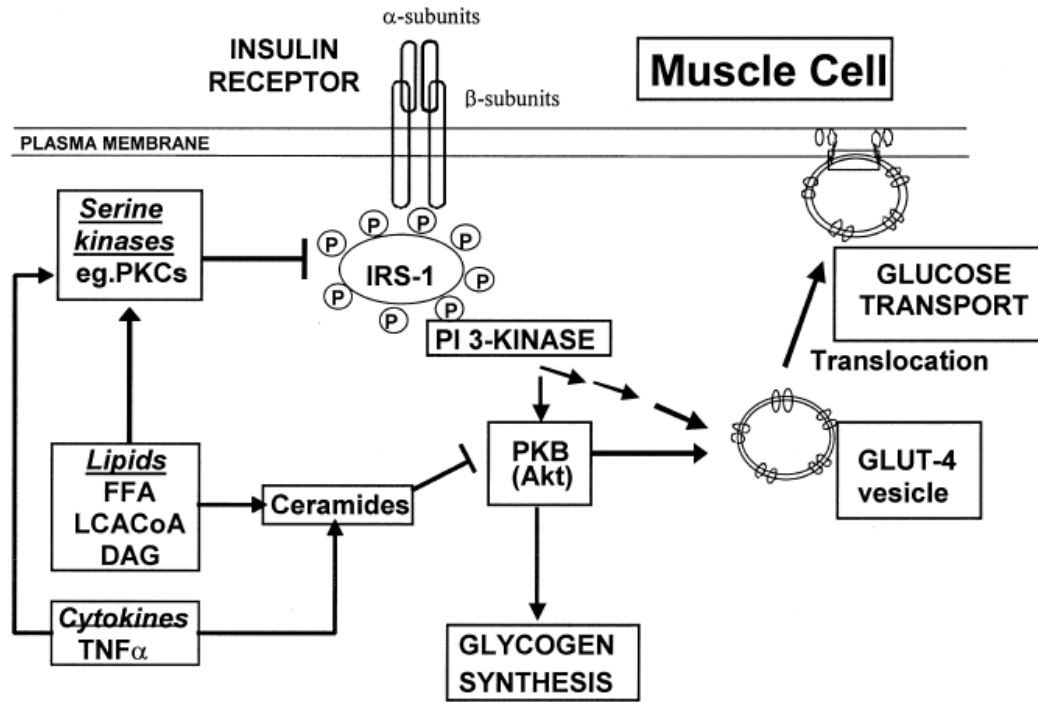


圖6.1、骨骼肌中胰島素胰島素傳遞路徑與其他可能調節因子的關係 (Jerry and Lesly, 2004)

Fig 6.1 Insulin signaling pathway in skeletal muscle and other regulated factor

儘管許多研究指出 PKB(Akt)上游的訊息傳遞路徑缺失，但胰島素對於 PKB(Akt)的活化作用仍是正常的。Kim 等(Kim et al., 1999)與 Storgaard 等(Storgaard et al., 2001)學者觀察到在第 2 型糖尿病與葡萄糖耐受異常的人，其骨骼肌胰島素誘導的 IRS 與 PI 3-Kinase 是受損的，但 PKB(Akt)的活化作用卻是正常。這個現象推測對於胰島素的刺激可能還有其他的激酶會活化 PKB(Akt)，aPKC 也參與了這過程(Zdychova

and Komers, 2005)。Meyer 等學者(Meyer et al., 2002)也發現第 2 型糖尿病高危險群與第 2 型糖尿病病患在正常血糖情況下，跟正常人比較，儘管糖尿病患及其親戚(relatives)的葡萄糖汲取作用減少，但胰島素刺激的 PKB(Akt)的活化與其上游的 IR 訊息傳遞分子並沒有差異。

PKB(Akt)在 Ser473 與 Thr308 調節部位磷酸化的順序是不同的，Toker and Newton 學者提出當受到刺激後，PKB(Akt)活化區結構受到遮蔽的作用降低使得 PDK-1 容易磷酸化其 Thr 308，使得 PKB(Akt)具有催化的能力，同時令 PKB(Akt) Ser473 調節部位的 hydrophobic phosphorylation motif(HM)自體磷酸化(Toker and Newton, 1999)；Scheid and Woodgett 學者卻提出了相反的看法，當刺激後 PI 3-Kinase 產生了 PIP3，會吸引 PDK-1 與在細胞質未活化的 PKB(Akt)至細胞膜，PKB(Akt)的 HM 會自體磷酸化或受 Ser473 kinase 磷酸化，這穩定且活化了 PDK-1，並接著活化 PKB(Akt) Thr308 調節部位及穩定了 PKB(Akt)的激酶區域，成為完全的活化態(Scheid and Woodgett, 2003)。同組間比較發現胰島素刺激 30 分鐘後，PKB(Akt) Thr308 調節部位磷酸化的程度似乎已經減少了，但 Ser473 調節部位磷酸化是繼續的，本實驗結果，較與 Toker and Newton 所推論的結果相符合，也證實 PKB(Akt)被活化的機制起始於 Thr 308 調節部位的磷酸化，隨後引發 Ser473 調節部位的

自體磷酸化。。

PKB(Akt)與 PKC ζ 都會受到 PDK1 影響而活化，給予 3mg 生物素補充四週後骨骼肌中受胰島素刺激調節 GLUT4 位移增加的可能機制是藉由 PKC ζ 所調節的，但是生物素 6mg 組中，雖然 PKC ζ 位移到細胞膜的活化作用是減少的，但是細胞質的蛋白質卻明顯的增加，細胞內總 PKC ζ 蛋白質較沒有胰島素刺激的生理水組增加，因此也有調節 GLUT4 位移的作用，但其機制可能還要進一步討論。

MUSCLE AND ADIPOCYTES

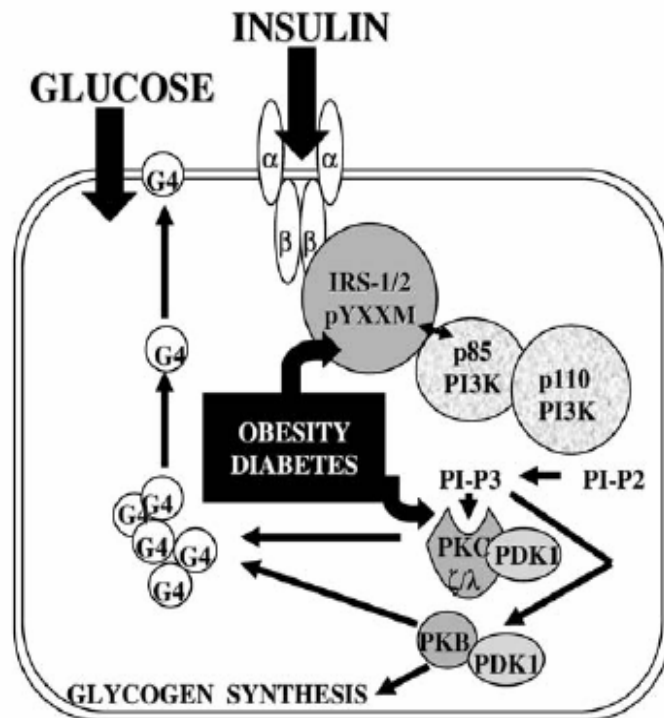


圖 6.2、骨骼肌與脂肪組織受胰島素刺激後可能影響的訊息傳遞路徑 (Farese et al., 2005)

Fig 6.2 Muscle and adipose tissues affected by insulin stimulated.

肆、 生物素對肝臟組織中胰島素訊息傳遞路徑中 PKC ζ 的蛋白質表現量的影響

有研究指出，第 2 型糖尿病病人肝臟中 PKC 異構物被刺激而活化 (Considine *et al.*, 1995)。學者證明，刺激 PKC 活性的能力增加的物質為脂肪酸及其代謝物 (Verkest *et al.*, 1988; Khan *et al.*, 1992)。在許多的研究中顯示，胰島素刺激肝臟中的 aPKC 訊息傳遞路徑的作用是透過增加 SREBP-1c 的表現。在調控肝臟脂質合成的酵素中，SREBP-1c 為酵素的調節因子。Shimomura 等學者指出，胰島素會增加 STZ 誘導的糖尿病大鼠肝臟中 SREBP-1c 之 mRNA 增加 (Shimomura *et al.*, 1999)；另外，當肥胖 (ob/ob) 小鼠長時間體內處於高胰島素濃度的狀態中，IRS-2 的 mRNA 會降低與持續增加 SREBP-1c mRNA 表現，同時合併有胰島素阻抗性與胰島素敏感的情形 (Shimomura *et al.*, 2000)。

許多的文獻指出，過多的 PKC 活性會減少胰島素的敏感度，同時伴隨著增加脂質生物利用能力 (lipid availability) (Considine *et al.* 1995, Qu *et al.* 1999, Itani *et al.* 2000)。這個情況會增加由脂質衍生出來的分子蛋白質，如 diacylglycerol (DAG) 或 ceramide，並活化了 PKC 家族 (Schmitz-Peiffer 2000)。

胰島素刺激後之肝臟細胞質 PKC ζ 蛋白質表現量趨勢並不如預期的以 6mg 組最多，但在細胞膜的 PKC ζ 蛋白質表現量在刺激 30 分鐘後卻有顯著增加的現象；若以 PKC ζ 在細胞膜與全細胞的蛋白質比值來評估 PKC ζ 的活化情形，則可發現生理水組與 6mg 組在胰島素刺激後有顯著的增加，推測胰島素刺激後 PKC ζ 的活化可能會增加了脂質的合成。



伍、 生物素對肝臟組織中胰島素訊息傳遞路徑中 PKB(Akt) Ser473 與 Thr308 調節部位磷酸化的蛋 白質表現量的影響

肝臟亦是調控葡萄糖的主要器官，PEPCK 是體內葡萄糖新生 (gluconeogenesis) 的速率限制酵素，可調控葡萄糖的形成 (Giffin et al., 1993)。PEPCK 基因的表現會受到許多荷爾蒙所調控而活化，包括了 glucagon、cAMP、glucocorticoid、甲狀腺荷爾蒙等。相反的，胰島素會藉由活化 PI3K 來抑制 PEPCK 活性，減少了其基因的表現 (Attwood et al., 1984; Hanson and Reshef, 1997)，因此在糖尿病老鼠的肝臟中 PEPCK 的基因會過度表現 (Consoli et al., 1989; Hofmann et al., 1995)。除此之外，也有研究顯示，以高脂飲食飼養 (59% fat) 三週後，Wistar 大鼠肝臟中，醣質新生作用的 G6Pase 的活性無法受胰島素調節而降低。在醣解作用 (glycolysis) 作用中的速率限制酵素 GK 活性減少，G6Pase/GK 比值相較於正常飲食的大鼠上升了 76%，顯示出高脂飲食的大鼠其肝臟較傾向於釋放葡萄糖與葡萄糖新生 (Oakes et al., 1997)。在 1999 年也有學者發現在糖尿病與禁食的動物發現 G6Pase 是會被活化的。(Nordlie et al., 1999 ; Chou and Mansfield, 1999)

當體內產生了胰島素阻抗性時，體內利用葡萄糖產生 ATP 的能力下降，此時第 2 型糖尿病病人肝臟會增加葡萄糖的產生，造成禁食時高血糖狀態，這可能是缺少兩種可以抑制醣質新生的酵素(PEPCK、G6Pase)的結果。有研究指出，胰島素的刺激會調節肝醣的合成主要是在轉錄(transcriptional)的階段(O'Brien and Granner, 1996; Hanson and Reshef, 1997)。另外研究顯示，胰島素在轉錄階段中會抑制這兩個酵素的表現，而這個過程會被 PKB(Akt)的活化作用而調節(Liao et al., 1998; Schmoll et al., 2000)。Farese 等學者在 2005 年的研究顯示，在肝臟組織中，進食後胰島素的增加，會刺激 PKB(Akt)蛋白質的活化，進而影響到肝臟中肝糖分解與醣質新生作用(Farese et al., 2005)。

PKB(Akt)結構中主要分為兩個區域，Thr308 位在催化區域，Ser473 則是在調節的區域。PKB(Akt) Thr308 調節部位會受到膜上 PDK-1 的影響而活化，催化下游的分子蛋白質，PKB(Akt) Ser473 調節部位則是會受到 PDK-2 的活化，調節了與上游分子之間的關係。本實驗結果中，沒有胰島素刺激的三組 PKB(Akt) Ser473 調節部位磷酸化蛋白質表現量以 3mg 組最多，依次是 6mg 組與生理水組；推測在給予生物素補充之後，空腹時 PKB(Akt) Ser473 調節部位已經有與上游分子蛋白質調節的作用了，其中以 3mg 組效果最好，6mg 組與生理水組依次次之。PKB(Akt)

Thr308 調節部位磷酸化表現方面，卻是 6mg 組最低，3mg 組次之，生理水組最高，可能表示了此時 PKB(Akt) Thr308 調節部位尚未被活化，也沒有催化下游分子蛋白的能力。胰島素刺激後，PKB(Akt) Ser473 調節部位在 3mg 組的蛋白質表現量最低，生理水組最高；PKB(Akt) Thr308 調節部位卻在 3mg 組的表現量最高，6mg 組最低。

有研究顯示，若正常雌性 SD 大鼠在隔夜禁食後給予胰島素刺激，其 PKB(Akt)在細胞質中表現量沒有改變，但是細胞膜的蛋白質表現量在 30 秒至 2 分鐘時達到最高，之後會漸漸恢復到正常(Balbis et al., 2000)。在細胞質與細胞膜方面，PKB(Akt) Ser473 與 PKB(Akt) Thr308 調節部位蛋白質磷酸化作用 30 秒的時候表現量最多，5 分鐘開始逐漸的減少，30 分鐘之後則已經完全去磷酸化了(Balbis et al., 2000)。本實驗結果中，同組別以胰島素刺激與否比較，發現生理水組、6mg 組有胰島素刺激的 PKB(Akt) Thr308 表現皆顯著低於沒有胰島素刺激，推測可能因為時間過久，導致其蛋白質已經去磷酸化了；3mg 組則去磷酸化過程較緩慢，所以表現量還是較沒有刺激時高。

陸、 生物素對肝臟組織中 PKC ζ 、PKB(Akt) Ser473 與 Thr308 調節部位磷酸化的胰島素訊息傳遞路徑

探討肝臟中 PKC ζ 與 PKB(Akt)在肝臟胰島素刺激後訊息傳遞中的角色時，發現 aPKC 主要為誘導 SREBP-1c 及肝臟脂質合成，PKB(Akt) 則調節肝糖的合成、醣解作用及葡萄糖的釋放。在 IRS-1 剔除的小鼠肝臟中，IRS-1 與 aPKC、PKB 之間的關係，發現 SREBP-1c 及肝臟脂質合成可能會維持(Matsumoto et al., 2003)，PKB(Akt)調節的功能，如肝糖的合成(Peak et al., 1998)、醣解作用(Lefebvre et al., 1996; Deprez et al., 1997)及葡萄糖的釋放(Schmoll et al. 2000)可能卻會降低，推測肝臟調節醣類代謝的主要分子蛋白質為 IRS-1 (Ueki et al, 2000)與 PKB (Cho et al., 2001)。

本研究結果中也顯示，當有胰島素刺激時 PKB(Akt) Ser473 調節部位磷酸化的表現量皆較沒刺激者顯著增加，推測肝臟中胰島素訊息傳遞路徑有增加肝糖合成的情形。另外在肝臟細胞膜 PKC ζ 總蛋白質表現量也發現，給予生物素對於胰島素刺激的 PKC ζ 活化至細胞膜的作用是有增加的，推測會增加脂質的合成，真正的路徑機轉則還需要更多的分子蛋白來證明。

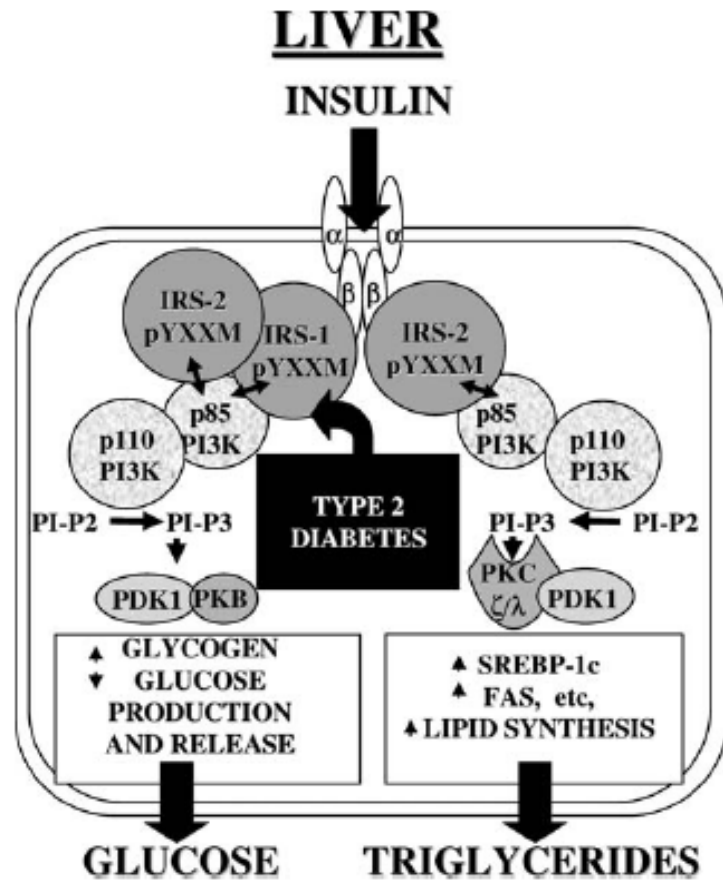


圖 6.3、肝臟組織受胰島素刺激後可能影響的訊息傳遞路徑 (Farese et al., 2005)

Fig 6.3 Liver tissues affected by insulin stimulated.

第七章 結論

由 PKC ζ 活化作用與 PKB(Akt) Ser473 與 Thr308 磷酸化蛋白質表現量結果推測，長期補充生物素，皆可能可以增加骨骼肌中胰島素訊息傳遞中受胰島素刺激調節 GLUT4 位移增加。但兩者對於 GLUT4 位移作用增加的調節時間點，可能還需要其他研究來探討。

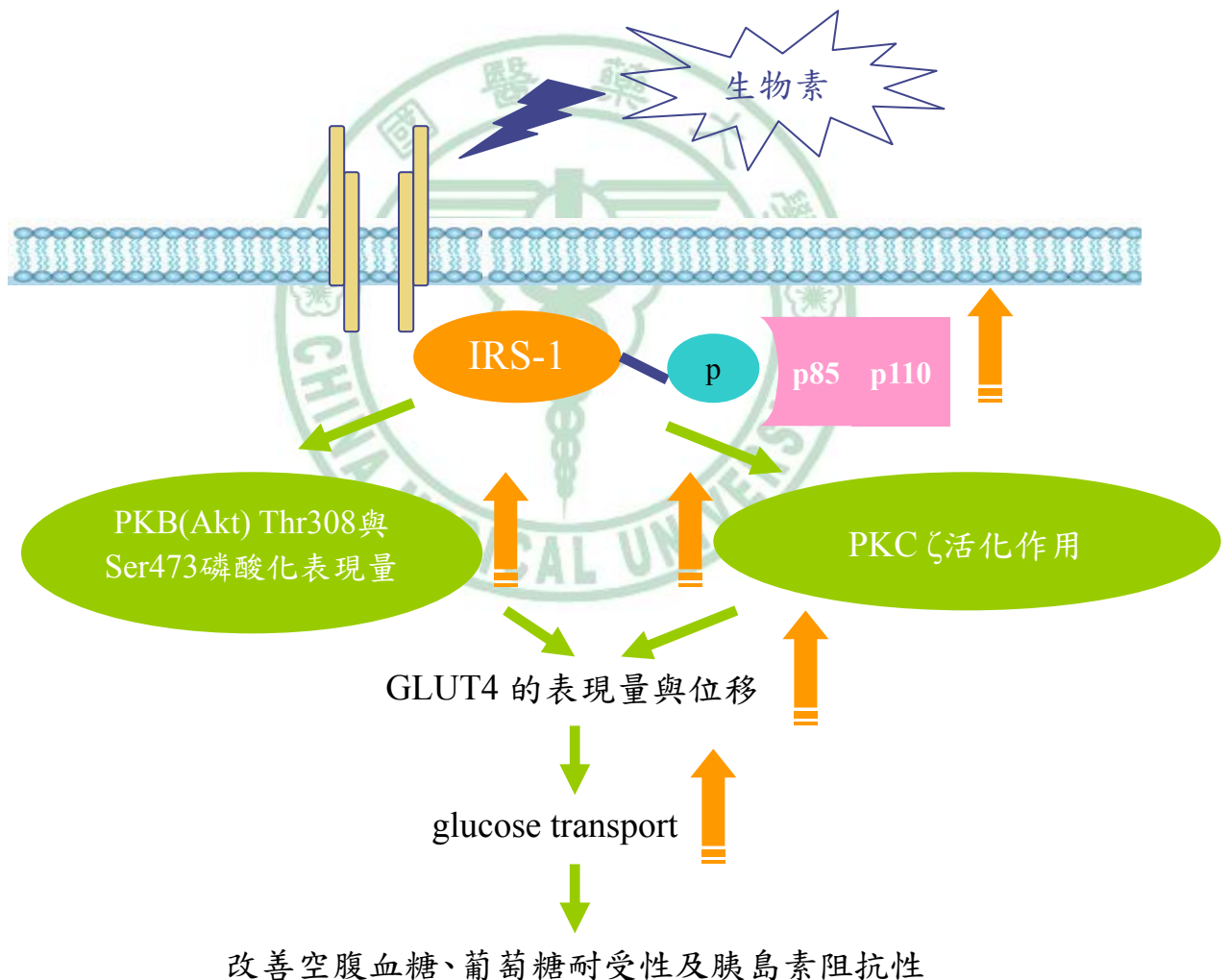


圖 7.1、生物素可能調節骨骼肌中胰島素阻抗的機轉假說

在肝臟組織中，長期給予補充生物素可經由 PKB(Akt)路徑可能增加使體內在胰島素刺激後對於葡萄糖的汲取，並增加肝糖的合成與減少醣質新生作用；另外胰島素刺激的 PKC ζ 路徑則可能會增加脂質的合成，但還需要更進一步的證據探討其調節作用。

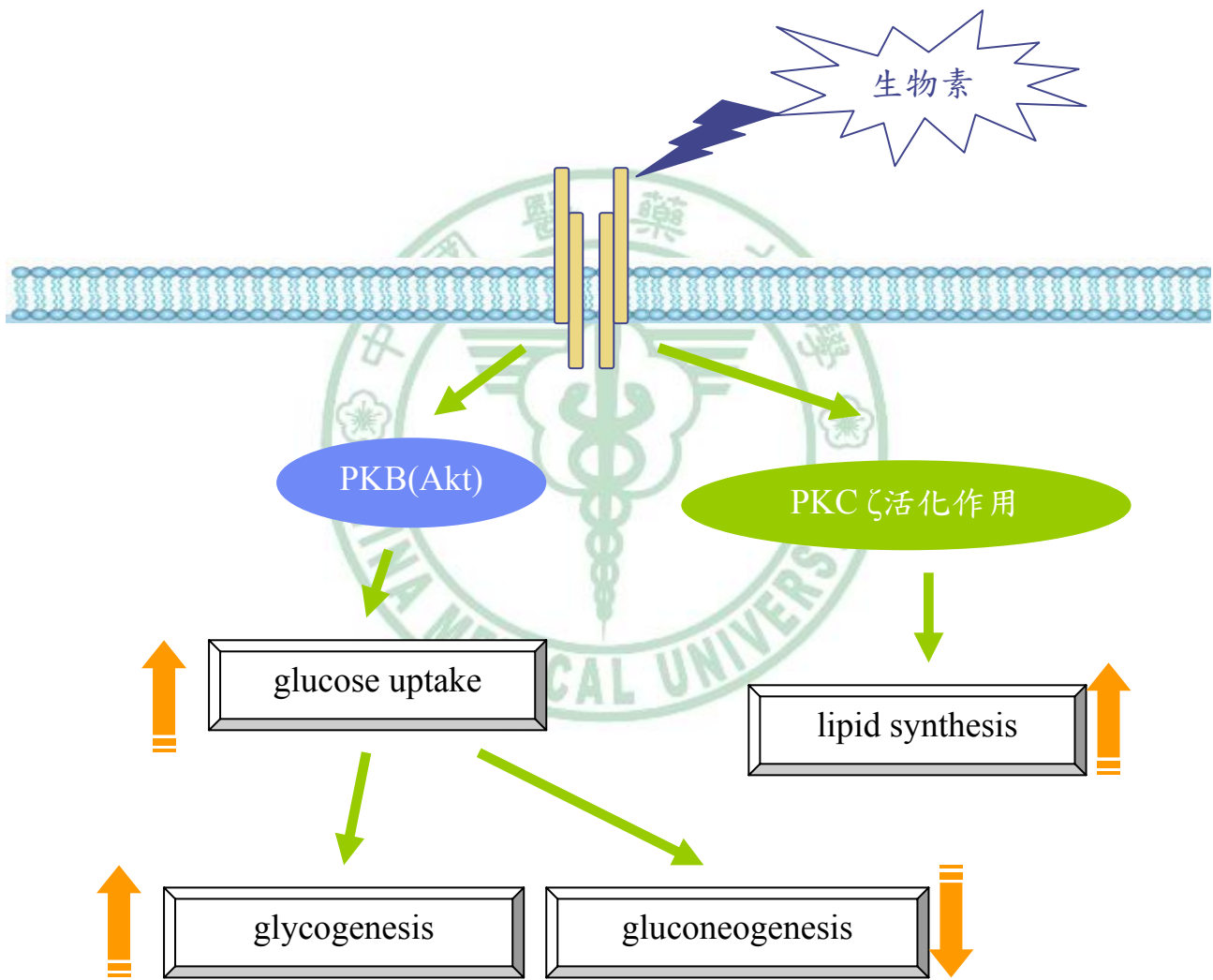


圖 7.2、生物素可能調節肝臟中胰島素阻抗的機轉假說

第八章 參考文獻

- Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. national diabetes data group. *Diabetes*. 1979 Dec;28(12):1039-57.
- Biotin and glucokinase in the diabetic rat. *Nutr Rev*. 1970 Sep;28(9):242-4.
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase α . *Curr Biol*. 1997 Apr 1;7(4):261-9.
- Attwood PV, Wallace JC, Keech DB. The carboxybiotin complex of pyruvate carboxylase. A kinetic analysis of the effects of Mg^{2+} ions on its stability and on its reaction with pyruvate. *Biochem J*. 1984 Apr 1;219(1):243-51.
- Avignon A, Yamada K, Zhou X, Spencer B, Cardona O, Saba-Siddique S, Galloway L, Standaert ML, Farese RV. Chronic activation of protein kinase C in soleus muscles and other tissues of insulin-resistant type II diabetic goto-kakizaki (GK), obese/aged, and obese/Zucker rats. A mechanism for inhibiting glycogen synthesis. *Diabetes*. 1996 Oct;45(10):1396-404.
- Baez-Saldana A, Diaz G, Espinoza B, Ortega E. Biotin deficiency induces changes in subpopulations of spleen lymphocytes in mice. *Am J Clin Nutr*. 1998 Mar;67(3):431-7.
- Baez-Saldana A, Zendejas-Ruiz I, Revilla-Monsalve C, Islas-Andrade S, Cardenas A, Rojas-Ochoa A, Vilches A, Fernandez-Mejia C. 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*. 2004 Feb;79(2):238-43.

- Balbis A, Baquiran G, Bergeron JJ, Posner BI. Compartmentalization and insulin-induced translocations of insulin receptor substrates, phosphatidylinositol 3-kinase, and protein kinase B in rat liver. *Endocrinology*. 2000 Nov;141(11):4041-9.
- Bandyopadhyay G, Standaert ML, Sajan MP, Karnitz LM, Cong L, Quon MJ, Farese RV. Dependence of insulin-stimulated glucose transporter 4 translocation on 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and its target threonine-410 in the activation loop of protein kinase C-zeta. *Mol Endocrinol*. 1999 Oct;13(10):1766-72.
- Bandyopadhyay G, Standaert ML, Zhao L, Yu B, Avignon A, Galloway L, Karnam P, Moscat J, Farese RV. Activation of protein kinase C (alpha, beta, and zeta) by insulin in 3T3/L1 cells. transfection studies suggest a role for PKC-zeta in glucose transport. *J Biol Chem*. 1997 Jan 24;272(4):2551-8.
- Beeson M, Sajan MP, Dizon M, Grebenev D, Gomez-Daspert J, Miura A, Kanoh Y, Powe J, Bandyopadhyay G, et al. Activation of protein kinase C-zeta by insulin and phosphatidylinositol-3,4,5-(PO4)₃ is defective in muscle in type 2 diabetes and impaired glucose tolerance: Amelioration by rosiglitazone and exercise. *Diabetes*. 2003 Aug;52(8):1926-34.
- Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, Datta K, Malstrom S, Stokoe D, McCormick F, Feng J, Tsichlis P. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: The role of the PH domain. *Oncogene*. 1998 Jul 23;17(3):313-25.
- Bergman RN. Non-esterified fatty acids and the liver: Why is insulin secreted into the portal vein? *Diabetologia*. 2000 Jul;43(7):946-52.
- Bottomley MJ, Salim K, Panayotou G. Phospholipid-binding protein domains. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Dec 8;1436(1-2):165-83.

- Bowman BAB, Russell RM, International Life Sciences Institute-Nutrition Foundation. Present knowledge in nutrition. ILSI Press, International Life Sciences Institute; 2001.
- Braiman L, Alt A, Kuroki T, Ohba M, Bak A, Tennenbaum T, Sampson SR. Activation of protein kinase C zeta induces serine phosphorylation of VAMP2 in the GLUT4 compartment and increases glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell Biol*. 2001 Nov;21(22):7852-61.
- Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: A hard akt to follow. *Trends Biochem Sci*. 2001 Nov;26(11):657-64.
- Brozinick JT, Jr, Roberts BR, Dohm GL. Defective signaling through akt-2 and -3 but not akt-1 in insulin-resistant human skeletal muscle: Potential role in insulin resistance. *Diabetes*. 2003 Apr;52(4):935-41.
- Carvalho E, Rondinone C, Smith U. Insulin resistance in fat cells from obese zucker rats--evidence for an impaired activation and translocation of protein kinase B and glucose transporter 4. *Mol Cell Biochem*. 2000 Mar;206(1-2):7-16.
- Chauhan J, Dakshinamurti K. Transcriptional regulation of the glucokinase gene by biotin in starved rats. *J Biol Chem*. 1991 Jun 5;266(16):10035-8.
- Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, 3rd, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science*. 2001 Jun 1;292(5522):1728-31.
- Chou MM, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee MH, Chen CS, Newton AC, Schaffhausen BS, Toker A. Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol*. 1998 Sep 24;8(19):1069-77.
- Chou P, Chen HH, Hsiao KJ. Community-based epidemiological study on diabetes in pu-li, taiwan. *Diabetes Care*. 1992 Jan;15(1):81-9.

- Chou P, Liao MJ, Kuo HS, Hsiao KJ, Tsai ST. A population survey on the prevalence of diabetes in kin-hu, kinmen. *Diabetes Care*. 1994 Sep;17(9):1055-8.
- Cockram CS, Woo J, Lau E, Chan JC, Chan AY, Lau J, Swaminathan R, Donnan SP. The prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance among hong kong chinese adults of working age. *Diabetes Res Clin Pract*. 1993 Jul;21(1):67-73.
- Considine RV, Caro JF. Protein kinase C: Mediator or inhibitor of insulin action? *J Cell Biochem*. 1993 May;52(1):8-13.
- Considine RV, Nyce MR, Allen LE, Morales LM, Triester S, Serrano J, Colberg J, Lanza-Jacoby S, Caro JF. Protein kinase C is increased in the liver of humans and rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus: An alteration not due to hyperglycemia. *J Clin Invest*. 1995 Jun;95(6):2938-44.
- Consoli A, Nurjhan N, Capani F, Gerich J. Predominant role of gluconeogenesis in increased hepatic glucose production in NIDDM. *Diabetes*. 1989 May;38(5):550-7.
- Corvera S, Czech MP. Direct targets of phosphoinositide 3-kinase products in membrane traffic and signal transduction. *Trends Cell Biol*. 1998 Nov;8(11):442-6.
- Cowan MJ, Wara DW, Packman S, Ammann AJ, Yoshino M, Sweetman L, Nyhan W. Multiple biotin-dependent carboxylase deficiencies associated with defects in T-cell and B-cell immunity. *Lancet*. 1979 Jul 21;2(8134):115-8.
- Crisp SE, Griffin JB, White BR, Toombs CF, Camporeale G, Said HM, Zempleni J. Biotin supply affects rates of cell proliferation, biotinylation of carboxylases and histones, and expression of the gene encoding the sodium-dependent multivitamin transporter in JAr choriocarcinoma cells. *Eur J Nutr*. 2004 Feb;43(1):23-31.

- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*. 1995 Dec 21-28;378(6559):785-9.
- Cummings DE, Schwartz MW. GENETICS AND PATHOPHYSIOLOGY OF HUMAN OBESITY. *Annu Rev Med*. 2003;54(1):453-71.
- Daitoku H, Yamagata K, Matsuzaki H, Hatta M, Fukamizu A. Regulation of PGC-1 promoter activity by protein kinase B and the forkhead transcription factor FKHR. *Diabetes*. 2003 Mar;52(3):642-9.
- Dakshinamurti K. Vitamin receptors: Vitamins as ligands in cell communication. Cambridge University Press; 1994.
- Dakshinamurti K, Chalifour L, Bhullar RP. Requirement for biotin and the function of biotin in cells in culture. *Ann N Y Acad Sci*. 1985;447:38-55.
- Dakshinamurti K, Cheah-Tan C. Liver glucokinase of the biotin deficient rat. *Can J Biochem*. 1968 Jan;46(1):75-80.
- Dakshinamurti K, Cheah-Tan C. Biotin-mediated synthesis of hepatic glucokinase in the rat. *Arch Biochem Biophys*. 1968 Sep 20;127(1):17-21.
- Dakshinamurti K, Litvak S. Biotin and protein synthesis in rat liver. *J Biol Chem*. 1970 Nov 10;245(21):5600-5.
- Dakshinamurti K, Modi VV, Mistry SP. Some aspects of carbohydrates metabolism in biotin-deficient rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1968 Feb;127(2):396-400.
- Dakshinamurti K, Tarrago-Litvak L, Hong HC. Biotin and glucose metabolism. *Can J Biochem*. 1970 Apr;48(4):493-500.
- De La Vega LA, Stockert RJ. Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000 Dec;279(6):C2037-42.

- DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: A method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol.* 1979 Sep;237(3):E214-23.
- Deodhar AD, Mistry SP. Regulation of glycolysis in biotin-deficient rat liver. *Life Sci II.* 1970 May 22;9(10):581-8.
- Depeint F, Bruce WR, Shangari N, Mehta R, O'Brien PJ. Mitochondrial function and toxicity: Role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism. *Chem Biol Interact.* 2006 Oct 27;163(1-2):94-112.
- Deprez J, Vertommen D, Alessi DR, Hue L, Rider MH. Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. *J Biol Chem.* 1997 Jul 11;272(28):17269-75.
- Downward J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol.* 1998 Apr;10(2):262-7.
- Dowse GK, Zimmet PZ, Gareeboo H, George K, Alberti MM, Tuomilehto J, Finch CF, Chitson P, Tulsidas H. Abdominal obesity and physical inactivity as risk factors for NIDDM and impaired glucose tolerance in indian, creole, and chinese mauritians. *Diabetes Care.* 1991 Apr;14(4):271-82.
- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet.* 2005 Apr 16-22;365(9468):1415-28.
- Farese RV, Sajan MP, Standaert ML. Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt): Actions and defects in obesity and type II diabetes. *Exp Biol Med (Maywood).* 2005 Oct;230(9):593-605.

- Ferrannini E, Natali A, Bell P, Cavallo-Perin P, Lalic N, Mingrone G. Insulin resistance and hypersecretion in obesity. european group for the study of insulin resistance (EGIR). *J Clin Invest.* 1997 Sep 1;100(5):1166-73.
- Flack JM, Sowers JR. Epidemiologic and clinical aspects of insulin resistance and hyperinsulinemia. *Am J Med.* 1991 Jul 18;91(1A):11S-21S.
- Frevert EU, Bjorbaek C, Venable CL, Keller SR, Kahn BB. Targeting of constitutively active phosphoinositide 3-kinase to GLUT4-containing vesicles in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 1998 Sep 25;273(39):25480-7.
- Giffin BF, Drake RL, Morris RE, Cardell RR. Hepatic lobular patterns of phosphoenolpyruvate carboxykinase, glycogen synthase, and glycogen phosphorylase in fasted and fed rats. *J Histochem Cytochem.* 1993 Dec;41(12):1849-62.
- GM R. Banting lecture 1988. role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 1988;37(12):1595-607.
- Granberry MC, Fonseca VA. Insulin resistance syndrome: Options for treatment. *South Med J.* 1999 Jan;92(1):2-15.
- Greenfield JR, Campbell LV. Insulin resistance and obesity. *Clin Dermatol.* 2004 Jul-Aug;22(4):289-95.
- Hajduch E, Darakhshan F, Hundal HS. Fructose uptake in rat adipocytes: GLUT5 expression and the effects of streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* 1998 Jul;41(7):821-8.
- Hanson RW, Reshef L. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem.* 1997;66:581-611.

- Herr HJ, Bernard JR, Reeder DW, Rivas DA, Limon JJ, Yaspelkis BB,3rd. Insulin-stimulated plasma membrane association and activation of Akt2, aPKC zeta and aPKC lambda in high fat fed rodent skeletal muscle. *J Physiol*. 2005 Jun 1;565(Pt 2):627-36.
- Heydrick SJ, Ruderman NB, Kurowski TG, Adams HB, Chen KS. Enhanced stimulation of diacylglycerol and lipid synthesis by insulin in denervated muscle. altered protein kinase C activity and possible link to insulin resistance. *Diabetes*. 1991 Dec;40(12):1707-11.
- Hirai T, Chida K. Protein kinase czeta (PKCzeta): Activation mechanisms and cellular functions. *J Biochem (Tokyo)*. 2003 Jan;133(1):1-7.
- Hofmann C, Lorenz K, Williams D, Palazuk BJ, Colca JR. Insulin sensitization in diabetic rat liver by an antihyperglycemic agent. *Metabolism*. 1995 Mar;44(3):384-9.
- Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest*. 2002 May;109(9):1125-31.
- Ikeda H. KK mouse. *Diabetes Res Clin Pract*. 1994 Oct;24 Suppl:S313-6.
- Itani SI, Zhou Q, Pories WJ, MacDonald KG, Dohm GL. Involvement of protein kinase C in human skeletal muscle insulin resistance and obesity. *Diabetes*. 2000 Aug;49(8):1353-8.
- Kanzaki M, Mora S, Hwang JB, Saltiel AR, Pessin JE. Atypical protein kinase C (PKCzeta/lambda) is a convergent downstream target of the insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and TC10 signaling pathways. *J Cell Biol*. 2004 Jan 19;164(2):279-90.
- Kazarinoff MN, Im WB, Roth JA, McCormick DB, Wright LD. Bacterial degradation of biotin. VI. isolation and identification of -hydroxy and -keto compounds. *J Biol Chem*. 1972 Jan 10;247(1):75-83.

- Kim Y, Kotani K, Ciaraldi T, Henry R, Kahn B. Insulin-stimulated PKC- ζ / λ activity is reduced and PDK-1 activity is normal in muscle of insulin-resistant humans. *Diabetes*. 2003;52:1935-42.
- Kim YB, Nikoulina SE, Ciaraldi TP, Henry RR, Kahn BB. Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 1999 Sep;104(6):733-41.
- Kim YB, Zhu JS, Zierath JR, Shen HQ, Baron AD, Kahn BB. Glucosamine infusion in rats rapidly impairs insulin stimulation of phosphoinositide 3-kinase but does not alter activation of Akt/protein kinase B in skeletal muscle. *Diabetes*. 1999 Feb;48(2):310-20.
- Klip A, Paquet MR. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care*. 1990 Mar;13(3):228-43.
- Knowles JR. The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem*. 1989;58:195-221.
- Kohn AD, Summers SA, Birnbaum MJ, Roth RA. Expression of a constitutively active akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem*. 1996 Dec 6;271(49):31372-8.
- Kopinski K, Leibholz E. Absorption of vitamins from the large intestine. *in vivo*. *Nutr Rep Int*. 1985;3:143-8.
- Kotani K, Ogawa W, Matsumoto M, Kitamura T, Sakaue H, Hino Y, Miyake K, Sano W, Akimoto K, et al. Requirement of atypical protein kinase clambda for insulin stimulation of glucose uptake but not for akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol*. 1998 Dec;18(12):6971-82.

- Koutsikos D, Fourtounas C, Kapetanaki A, Agroyannis B, Tzanatos H, Rammos G, Kopelias I, Bosiolis B, Bovoleti O, et al. Oral glucose tolerance test after high-dose i.v. biotin administration in normoglycemic hemodialysis patients. *Ren Fail.* 1996 Jan;18(1):131-7.
- Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ, Storlien LH. Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes.* 1991 Nov;40(11):1397-403.
- Krook A, Kawano Y, Song XM, Efendic S, Roth RA, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR. Improved glucose tolerance restores insulin-stimulated akt kinase activity and glucose transport in skeletal muscle from diabetic goto-kakizaki rats. *Diabetes.* 1997 Dec;46(12):2110-4.
- Krook A, Roth RA, Jiang XJ, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H. Insulin-stimulated akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes.* 1998 Aug;47(8):1281-6.
- Kumar M, Axelrod AE. Cellular antibody synthesis in thiamin, riboflavin, biotin and folic acid-deficient rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1978 Mar;157(3):421-3.
- Lawrence JC, Jr, Roach PJ. New insights into the role and mechanism of glycogen synthase activation by insulin. *Diabetes.* 1997 Apr;46(4):541-7.
- Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ. Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science.* 1998 Sep 25;281(5385):2042-5.
- Lee HM, Wright LD, McCormick DB. Metabolism of carbonyl-labeled 14 C-biotin in the rat. *J Nutr.* 1972 Nov;102(11):1453-63.
- Lefebvre V, Mechin MC, Louckx MP, Rider MH, Hue L. Signaling pathway involved in the activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by insulin. *J Biol Chem.* 1996 Sep 13;271(37):22289-92.

- LI HSIEH Y, MISTRY S. Effect of biotin on the regulation of glucokinase in the intact rat. *Nutrition research*(New York, NY). 1992;12(6):787-99.
- Liao J, Barthel A, Nakatani K, Roth RA. Activation of protein kinase B/Akt is sufficient to repress the glucocorticoid and cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *J Biol Chem*. 1998 Oct 16;273(42):27320-4.
- Lin JD, Shieh WB, Huang MJ, Huang HS. Diabetes mellitus and hypertension based on the family history and 2-h postprandial blood sugar in the ann-lo district (northern taiwan). *Diabetes Res Clin Pract*. 1993 Apr;20(1):75-85.
- Liu XJ, He AB, Chang YS, Fang FD. Atypical protein kinase C in glucose metabolism. *Cell Signal*. 2006 Dec;18(12):2071-6.
- Liu YF, Paz K, Herschkovitz A, Alt A, Tennenbaum T, Sampson SR, Ohba M, Kuroki T, LeRoith D, Zick Y. Insulin stimulates PKCzeta -mediated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1). A self-attenuated mechanism to negatively regulate the function of IRS proteins. *J Biol Chem*. 2001 Apr 27;276(17):14459-65.
- Lu FH, Yang YC, Wu JS, Wu CH, Chang CJ. A population-based study of the prevalence and associated factors of diabetes mellitus in southern taiwan. *Diabet Med*. 1998 Jul;15(7):564-72.
- Lubec B, Aufricht C, Amann G, Kitzmuller E, Hoyer H. Arginine reduces kidney collagen accumulation, cross-linking, lipid peroxidation, glycoxidation, kidney weight and albuminuria in the diabetic kk mouse. *Nephron*. 1997;75(2):213-8.
- MAEBASHI M, MAKINO Y, FURUKAWA Y, OHINATA K, KIMURA S, SATO T. Therapeutic evaluation of the effect of biotin on hyperglycemia in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 1993;14(3):211-8.

- Maeda Y, Kawata S, Inui Y, Fukuda K, Igura T, Matsuzawa Y. Biotin deficiency decreases ornithine transcarbamylase activity and mRNA in rat liver. *J Nutr.* 1996 Jan;126(1):61-6.
- Manthey KC, Griffin JB, Zempleni J. Biotin supply affects expression of biotin transporters, biotinylation of carboxylases and metabolism of interleukin-2 in jurkat cells. *J Nutr.* 2002 May;132(5):887-92.
- Matsumoto M, Ogawa W, Akimoto K, Inoue H, Miyake K, Furukawa K, Hayashi Y, Iguchi H, Matsuki Y, et al. PKC λ in liver mediates insulin-induced SREBP-1c expression and determines both hepatic lipid content and overall insulin sensitivity. *J Clin Invest.* 2003 Sep;112(6):935-44.
- McCormick D. Biotin. Olson RE. eds. present knowledge in nutrition 5th ed chap. The Nutrition Foundation Washington, DC. 1984;25:365-76.
- McCormick D, Wright L. The metabolism of biotin and analogues. *Metabolism of Vitamins and Trace Elements* (Florkin, M.& Stotz, EH, eds.). 1971:81-110.
- McDowell J. One strand in the private language argument. B.McGuinness et R.Haller (éds), Wittgenstein in Focus, Amsterdam: Rodopi. 1989:285-303.
- Meyer MM, Levin K, Grimmsmann T, Beck-Nielsen H, Klein HH. Insulin signalling in skeletal muscle of subjects with or without type II-diabetes and first degree relatives of patients with the disease. *Diabetologia.* 2002 Jun;45(6):813-22.
- Meyer MM, Levin K, Grimmsmann T, Perwitz N, Eirich A, Beck-Nielsen H, Klein HH. Troglitazone treatment increases protein kinase B phosphorylation in skeletal muscle of normoglycemic subjects at risk for the development of type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002 Sep;51(9):2691-7.

- Mlinar B, Marc J, Janez A, Pfeifer M. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clin Chim Acta*. 2007 Jan;375(1-2):20-35.
- Mock DM, Mock NI. Lymphocyte propionyl-CoA carboxylase is an early and sensitive indicator of biotin deficiency in rats, but urinary excretion of 3-hydroxypropionic acid is not. *J Nutr*. 2002 Jul;132(7):1945-50.
- Moeschel K, Beck A, Weigert C, Lammers R, Kalbacher H, Voelter W, Schleicher ED, Haring HU, Lehmann R. Protein kinase C-zeta-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*. 2004 Jun 11;279(24):25157-63.
- Mont MA, Jones LC, Einhorn TA, Hungerford DS, Reddi AH. Osteonecrosis of the femoral head. potential treatment with growth and differentiation factors. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 Oct;(355 Suppl)(355 Suppl):S314-35.
- Nordlie RC, Foster JD, Lange AJ. Regulation of glucose production by the liver. *Annu Rev Nutr*. 1999;19:379-406.
- Okada T, Kawano Y, Sakakibara T, Hazeki O, Ui M. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes. studies with a selective inhibitor wortmannin. *J Biol Chem*. 1994 Feb 4;269(5):3568-73.
- Pan XR, Hu YH, Li GW, Liu PA, Bennett PH, Howard BV. Impaired glucose tolerance and its relationship to ECG-indicated coronary heart disease and risk factors among chinese. da qing IGT and diabetes study. *Diabetes Care*. 1993 Jan;16(1):150-6.
- Peak M, Rochford JJ, Borthwick AC, Yeaman SJ, Agius L. Signalling pathways involved in the stimulation of glycogen synthesis by insulin in rat hepatocytes. *Diabetologia*. 1998 Jan;41(1):16-25.

- Petrelli F, Moretti P, Campanati G. Studies on the relationships between biotin and behaviour of B and T lymphocytes in the guinea-pig. *Experientia*. 1981 Nov 15;37(11):1204-6.
- Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E. Modulation of insulin action. *Diabetologia*. 2004 Feb;47(2):170-84.
- Poulsen P, Kyvik KO, Vaag A, Beck-Nielsen H. Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance--a population-based twin study. *Diabetologia*. 1999 Feb;42(2):139-45.
- Prasad PD, Ramamoorthy S, Leibach FH, Ganapathy V. Characterization of a sodium-dependent vitamin transporter mediating the uptake of pantothenate, biotin and lipoate in human placental choriocarcinoma cells. *Placenta*. 1997 Sep;18(7):527-33.
- Prasad PD, Wang H, Kekuda R, Fujita T, Fei YJ, Devoe LD, Leibach FH, Ganapathy V. Cloning and functional expression of a cDNA encoding a mammalian sodium-dependent vitamin transporter mediating the uptake of pantothenate, biotin, and lipoate. *J Biol Chem*. 1998 Mar 27;273(13):7501-6.
- PRUZANSKY J, AXELROD AE. Antibody production to diphtheria toxoid in vitamin deficiency states. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1955 Jun;89(2):323-5.
- Qu X, Seale JP, Donnelly R. Tissue and isoform-selective activation of protein kinase C in insulin-resistant obese Zucker rats - effects of feeding. *J Endocrinol*. 1999 Aug;162(2):207-14.
- Rabin BS. Inhibition of experimentally induced autoimmunity in rats by biotin deficiency. *J Nutr*. 1983 Nov;113(11):2316-22.

- Ravichandran LV, Esposito DL, Chen J, Quon MJ. Protein kinase C-zeta phosphorylates insulin receptor substrate-1 and impairs its ability to activate phosphatidylinositol 3-kinase in response to insulin. *J Biol Chem.* 2001 Feb 2;276(5):3543-9.
- Reddi A, DeAngelis B, Frank O, Lasker N, Baker H. Biotin supplementation improves glucose and insulin tolerances in genetically diabetic KK mice. *Life Sci.* 1988;42(13):1323-30.
- Ribon V, Saltiel AR. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J.* 1997 Jun 15;324 (Pt 3)(Pt 3):839-45.
- Rodriguez-Melendez R, Zempleni J. Regulation of gene expression by biotin(review). *J Nutr Biochem.* 2003;14(12):680-90.
- Rodriguez-Melendez R, Cano S, Mendez ST, Velazquez A. Biotin regulates the genetic expression of holocarboxylase synthetase and mitochondrial carboxylases in rats. *J Nutr.* 2001 Jul;131(7):1909-13.
- Rodriguez-Melendez R, Lewis B, McMahan RJ, Zempleni J. Diaminobiotin and desthiobiotin have biotin-like activities in jurkat cells. *J Nutr.* 2003 May;133(5):1259-64.
- Rodriguez-Melendez R, Perez-Andrade ME, Diaz A, Deolarte A, Camacho-Arroyo I, Ciceron I, Ibarra I, Velazquez A. Differential effects of biotin deficiency and replenishment on rat liver pyruvate and propionyl-CoA carboxylases and on their mRNAs. *Mol Genet Metab.* 1999 Jan;66(1):16-23.
- Romero-Navarro G, Cabrera-Valladares G, German MS, Matschinsky FM, Velazquez A, Wang J, Fernandez-Mejia C. Biotin regulation of pancreatic glucokinase and insulin in primary cultured rat islets and in biotin-deficient rats. *Endocrinology.* 1999 Oct;140(10):4595-600.

- Rondinone CM, Carvalho E, Wesslau C, Smith UP. Impaired glucose transport and protein kinase B activation by insulin, but not okadaic acid, in adipocytes from subjects with type II diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1999 Jul;42(7):819-25.
- Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001;414:799-806.
- Schmitz-Peiffer C. Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: Mechanisms induced by lipid oversupply. *Cell Signal*. 2000 Oct;12(9-10):583-94.
- Schmoll D, Walker KS, Alessi DR, Grempler R, Burchell A, Guo S, Walther R, Unterman TG. Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase balpha and the forkhead transcription factor FKHR. evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *J Biol Chem*. 2000 Nov 17;275(46):36324-33.
- Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE, Bashmakov Y, Brown MS, Goldstein JL. Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell*. 2000 Jul;6(1):77-86.
- Shmueli E, Alberti KG, Record CO. Diacylglycerol/protein kinase C signalling: A mechanism for insulin resistance? *J Intern Med*. 1993 Oct;234(4):397-400.
- Singh MK, Krisan AD, Crain AM, Collins DE, Yaspelkis BB. High-fat diet and leptin treatment alter skeletal muscle insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase activity and glucose transport. *Metab Clin Exp*. 2003;52(9):1196-205.

- Solorzano-Vargas RS, Pacheco-Alvarez D. Holocarboxylase synthetase is an obligate participant in biotin-mediated regulation of its own expression and of biotin-dependent carboxylases mRNA levels in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(8):5325.
- Sommerfeld MR, Metzger S, Stosik M, Tennagels N, Eckel J. In vitro phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by protein kinase C-zeta: Functional analysis and identification of novel phosphorylation sites. *Biochemistry*. 2004 May 18;43(19):5888-901.
- Song XM, Kawano Y, Krook A, Ryder JW, Efendic S, Roth RA, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR. Muscle fiber type-specific defects in insulin signal transduction to glucose transport in diabetic GK rats. *Diabetes*. 1999 Mar;48(3):664-70.
- Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the multiple risk factor intervention trial. *Diabetes Care*. 1993 Feb;16(2):434-44.
- Standaert ML, Bandyopadhyay G, Perez L, Price D, Galloway L, Poklepovic A, Sajan MP, Cenni V, Sirri A, et al. Insulin activates protein kinases C-zeta and C-lambda by an autophosphorylation-dependent mechanism and stimulates their translocation to GLUT4 vesicles and other membrane fractions in rat adipocytes. *J Biol Chem*. 1999 Sep 3;274(36):25308-16.
- Standaert ML, Galloway L, Karnam P, Bandyopadhyay G, Moscat J, Farese RV. 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*. 1997 Nov 28;272(48):30075-82.
- Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, McCormick F, et al. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science*. 1998 Jan 30;279(5351):710-4.

- Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, Holmes AB, McCormick F, Hawkins PT. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science*. 1997 Jul 25;277(5325):567-70.
- Storgaard H, Song XM, Jensen CB, Madsbad S, Bjornholm M, Vaag A, Zierath JR. Insulin signal transduction in skeletal muscle from glucose-intolerant relatives of type 2 diabetic patients [corrected]. *Diabetes*. 2001 Dec;50(12):2770-8.
- Tai TY, Yang CL, Chang CJ, Chang SM, Chen YH, Lin BJ, Ko LS, Chen MS, Chen CJ. Epidemiology of diabetes mellitus among adults in taiwan, R.O.C. *J Med Assoc Thai*. 1987 Mar;70 Suppl 2:42-8.
- Tai TY, Yang CL, Chang CJ, Chang SM, Chen YH, Lin BJ, Ko LS, Chen MS, Chen CJ. Epidemiology of diabetes mellitus in taiwan, R.O.C.--comparison between urban and rural areas. *J Med Assoc Thai*. 1987 Mar;70 Suppl 2:49-53.
- Tremblay F, Lavigne C, Jacques H, Marette A. Defective insulin-induced GLUT4 translocation in skeletal muscle of high fat-fed rats is associated with alterations in both Akt/protein kinase B and atypical protein kinase C (zeta/lambda) activities. *Diabetes*. 2001 Aug;50(8):1901-10.
- Ueki K, Yamauchi T, Tamemoto H, Tobe K, Yamamoto-Honda R, Kaburagi Y, Akanuma Y, Yazaki Y, Aizawa S, et al. Restored insulin-sensitivity in IRS-1-deficient mice treated by adenovirus-mediated gene therapy. *J Clin Invest*. 2000 May;105(10):1437-45.
- Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: More than just a road to PKB. *Biochem J*. 2000;346(Pt 3):561-76.
- Velazquez A, Teran M, Baez A, Gutierrez J, Rodriguez R. Biotin supplementation affects lymphocyte carboxylases and plasma biotin in severe protein-energy malnutrition. *Am J Clin Nutr*. 1995 Feb;61(2):385-91.

- Vollenweider P, Menard B, Nicod P. Insulin resistance, defective insulin receptor substrate 2-associated phosphatidylinositol-3' kinase activation, and impaired atypical protein kinase C (zeta/lambda) activation in myotubes from obese patients with impaired glucose tolerance. *Diabetes*. 2002 Apr;51(4):1052-9.
- Wang CC, Goalstone ML, Draznin B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes*. 2004 Nov;53(11):2735-40.
- Wang H, Huang W, Fei YJ, Xia H, Yang-Feng TL, Leibach FH, Devoe LD, Ganapathy V, Prasad PD. Human placental Na^+ -dependent multivitamin transporter. cloning, functional expression, gene structure, and chromosomal localization. *J Biol Chem*. 1999 May 21;274(21):14875-83.
- Watanabe T. Teratogenic effects of biotin deficiency in mice. *J Nutr*. 1983 Mar;113(3):574-81.
- Watanabe T, Dakshinamurti K, Persaud TV. Biotin influences palatal development of mouse embryos in organ culture. *J Nutr*. 1995 Aug;125(8):2114-21.
- Watson RT, Kanzaki M, Pessin JE. Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes. *Endocr Rev*. 2004 Apr;25(2):177-204.
- Wolf B, Heard GS, McVoy JR, Grier RE. Biotinidase deficiency. *Ann N Y Acad Sci*. 1985;447:252-62.
- Yaspelkis BB, 3rd, Davis JR, Saberi M, Smith TL, Jazayeri R, Singh M, Fernandez V, Trevino B, Chinookoswong N, et al. Leptin administration improves skeletal muscle insulin responsiveness in diet-induced insulin-resistant rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001 Jan;280(1):E130-42.

- Yaspelkis BB,3rd, Singh MK, Krisan AD, Collins DE, Kwong CC, Bernard JR, Crain AM. Chronic leptin treatment enhances insulin-stimulated glucose disposal in skeletal muscle of high-fat fed rodents. *Life Sci.* 2004 Feb 20;74(14):1801-16.
- Zdychova J, Komers R. Emerging role of akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications. *Physiol Res.* 2005;54(1):1-16.
- Zempleni J, Helm RM, Mock DM. In vivo biotin supplementation at a pharmacologic dose decreases proliferation rates of human peripheral blood mononuclear cells and cytokine release. *J Nutr.* 2001 May;131(5):1479-84.
- Zempleni J, McCormick DB, Mock DM. Identification of biotin sulfone, bisnorbiotin methyl ketone, and tetranorbiotin-1-sulfoxide in human urine. *Am J Clin Nutr.* 1997 Feb;65(2):508-11.
- Zempleni J, Mock DM. Marginal biotin deficiency is teratogenic. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000 Jan;223(1):14-21.
- Zhang H, Osada K, Maebashi M, Ito M, Komai M, Furukawa Y. 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).* 1996 Dec;42(6):517-26.
- Zhang H, Osada K, Sone H, Furukawa Y. Biotin administration improves the impaired glucose tolerance of streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1997 Jun;43(3):271-80.
- Ziegler EE, L... J... Filer. Present knowledge in nutrition. ILSI; 1996.