

中國醫藥大學營養學系碩士班

碩士論文

探討轉錄因子 HBP1 調控 3T3-L1 脂質生合成的角色

**The Role of HBP1 Specific Regulation
During Adipocyte Differentiation**

研究生：張豐姿 撰 Feng-Tzu Chang

指導教授：黃俊瑩博士 Chun-Yin Huang, Ph. D

中華民國九十八年七月

July, 2009

目錄

縮寫對照表.....	I
中文摘要.....	III
英文摘要.....	IV
第一章 前言.....	1
第二章 文獻探討.....	2
一、脂質生合成 (Adipogenesis)	2
二、3T3-L1 前脂肪細胞.....	3
三、脂肪分化轉錄因子和下游調控基因的介紹.....	5
四、HBP1 (HMG(High-mobility group)-Box Protein 1)	11
(一) HBP1 對細胞週期的調控.....	11
(二) HBP1 抑制 Wnt 訊息傳遞路徑.....	14
(三) HBP1 對細胞分化的調控.....	15
五、槲皮素 (Quercetin)	16
六、實驗目的.....	19
第三章 材料與方法.....	19
一、實驗設計.....	20
二、實驗藥品與儀器.....	21
三、細胞培養.....	25
四、細胞存活率 (Viability) 測定.....	28
五、油紅染色(Oil red O stain)	29
六、質體 (plasmid) 的製備.....	30

七、冷光酵素報導基因分析法.....	33
八、Transient HBP1 knockdown 之3T3-L1 細胞株	34
九、RNA 萃取分離--使用RNeasy [®] Mini Kit	37
十、RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR)--使用SuperScript [™] III One-Step RT-PCR System with Platinum [®] Taq DNA Polymerase Kit.....	38
十一、Quantitative -PCR(Quantitative Reverse Transcription-PCR)使用 Taq Man [®] One-Step RT-PCR Master Mix Reagents	40
十二、蛋白質萃取.....	41
十三、蛋白質定量	42
十四、Western blot.....	43
十五、流式細胞儀.....	47
十六、統計分析	49
第四章 結果.....	50
第五章 討論.....	80
第六章 結論.....	85
參考資料.....	86

圖目錄

圖 2-1 脂質生合成	3
圖 2-2 分化實驗流程	5
圖 2-3 脂質生合成過程	6
圖 2-4 脂質生合成的轉錄調控	6
圖 2-5 PPAR 之結構特徵.....	8
圖 2-6 PPAR 之基因轉錄作用機制.....	9
圖 2-7 HBP1 的結構圖	11
圖 2-8 HBP1 對細胞週期的調控	12
圖 2-9 p38 對 HBP1 的調控	13
圖 2-10 p38 對細胞凋亡的作用	14
圖 2-11 Wnt 訊息傳遞與 HBP1 的作用.....	15
圖 2-12 Quercetin 結構式	16
圖 3-1 RNAi 之作用原理.....	35
圖 4-1 HBP1 蛋白質在脂肪分化過程的表現	58
圖 4-2 HBP1 mRNA 在脂肪分化過程的表現.....	59
圖 4-3 Insulin 活化 HBP1 蛋白質的表現	60
圖 4-4 Insulin 誘發 HBP1 -2kb promoter 的活性	61
圖 4-5 HBP1 siRNA 影響 3T3-L1 細胞中 HBP1 蛋白質(A)、mRNA(B)的表現量.....	62
圖 4-6 HBP1 siRNA 對脂肪細胞分化之影響	63
圖 4-7 HBP1 siRNA 影響脂肪分化相關因子的表現	64
圖 4-8 HBP1 siRNA 對脂肪細胞 leptin 表現量之影響	65
圖 4-9 HBP1 siRNA 影響 MCE 期細胞週期的進行.....	66
圖 4-10 HBP1 siRNA 影響 MCE 期 C/EBP β 轉錄因子 mRNA 的表現.....	67

圖 4-11 HBP1 的起動子上兩個可能的 PPAR γ 連結位點	68
圖 4-12 PPAR γ 促進劑 TZD 對 HBP1 -2kb promoter 活性的影響.....	69
圖 4-13 PPAR γ 抑制劑 GW9662 對 HBP1 -2kb promoter 活性的影響.....	70
圖 4-14 PPAR γ 抑制劑 GW9662 對 HBP1 mRNA 表現之影響	71
圖 4-15 Quercetin 對 3T3-L1 細胞脂肪滴形成之影響	72
圖 4-16 Quercetin 影響 3T3-L1 脂肪細胞分化相關轉錄因子 PPAR γ 和特定 基因 aP2 的表現.....	73
圖 4-17 Quercetin 對 MCE 期 3T3-L1 細胞生長之影響.....	74
圖 4-18 Quercetin 影響 3T3-L1 前脂肪細胞 MCE 期細胞週期的進行.....	75
圖 4-19 Quercetin 影響 3T3-L1 MCE 期 C/EBP β 和 C/EBP δ mRNA 的表現	76
圖 4-20 Quercetin 對 3T3-L1 前脂肪細胞 HBP1 蛋白質表現之影響	77
圖 4-21 Quercetin 對 HBP1 -2kb promoter 活性之影響.....	78
圖 4-22 Quercetin 影響 MCE 期 HBP1 mRNA 的表現.....	79

表目錄

表一 槲皮素(queracetin) 化學性質.....17



縮寫對照表

縮寫	全名
ACC	Acetyl-CoA carboxylase
ADD1/SREBP1	Adipocyte differentiation factor 1/sterol regulatory element binding protein
aP2	Adipocyte Specific Fatty acid binding protein
AF-1	Activation fuction 1
AF-2	Activation fuction 2
C/EBPs	CCAAT/enhancer binding protein
CDK	Cyclin dependent kinase
DBD	DNA binding domain
DEX	Dexamethasone
Dsh	Dishevelled
DKK	Dickkopf
E2F	Early gene 2 factor
GPDH	Glycerophosphate dehydrogenase
HBP1	<u>H</u> MG(high-mobility group)- <u>B</u> ox <u>P</u> rotein <u>1</u>
IGF-1 receptor	Insulin-like growth factor receptor
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LBD	Ligand binding domain
LPL	Lipoprotein lipase
MCE	mitotic clonal expansion
MIX	Methylisobutylxanthine

pRb	Phospho Retinoblastoma
PPRE	Peroxisome proliferator responsive element
P38 MAPK	P38 mitogen activated protein kinase
PARP	Poly-ADP-ribose polymerase
p-ERK	Phospho-extracellular signal-related kinase
PPAR γ	Peroxisome proliferators-activated receptor γ
sFRPs	secreted Frizzled Related Proteins
TG	Triglyceride
TZDs	Thiazolidinediones



摘要

肥胖與許多慢性疾病的發生息息相關，防治肥胖的研究從未間斷，尤其，有關脂質生合成中關鍵標地的研究更顯重要。早期研究發現，轉錄因子HBP1的表現在脂肪細胞分化完成後有明顯增加，但其調控機制並未被探討。因此，我們想藉由此次的研究，探討HBP1在脂肪細胞分化過程的角色和相關調控機制。首先，DEX/MIX協同Insulin誘導3T3-L1前脂肪細胞分化為成熟脂肪細胞的8天過程中，HBP1的表現在分化初期2天的複製擴增(Mitotic Clonal Expansion, MCE)期無明顯改變，但在4到6天的分化後期 (terminal differentiation)，HBP1的表現明顯增加，結果顯示，HBP1在分化過程的不同階段可能有不同的功能，同時，insulin亦有誘發HBP1表現的能力。為了進一步瞭解 HBP1的階段性功能，在分化初期，我們利用槲皮素 (Quercetin) 誘發HBP1的表現增加，導致了複製擴增期的生長停滯於G1期，進而影響了脂肪細胞的最終分化，相對地，當HBP1的表現以HBP1siRNA降解時，促進了複製擴增期的細胞生長，表示HBP1在分化的複製擴增期有調控細胞週期進行的作用。有趣地是，HBP1 siRNA雖然加速分化前期的複製擴增，卻依然造成最終分化的不完全，表示HBP1在分化後期的增加表現是必要的，因此，我們假設HBP1可能是分化後期PPAR γ 的調控標地。當我們利用CHIP-Mapper搜尋時，發現HBP1的啟動子上有兩個可能的PPAR γ 連結點，尤其，PPAR γ 抑制劑GW9662不但抑制HBP1啟動子的活性，也抑制了HBP1 mRNA的表現，相對地，PPAR γ 活性促進劑TZD造成HBP1啟動子的活化。結論顯示，HBP1在脂質生合成過程中的複製擴增期和分化後期功能不同。我們希望此次的研究結果，可以支持HBP1在未來作為一個肥胖相關疾病重要指標和調控標地的可能性。

Abstract

Obesity is an epidemic problem in most societies around the world. The obesity-related study has become the important topics in nutrition research. One early study showed that the transcription factor HBP1 is highly expressed in the adipose tissue in rat, wherein the HBP1 mRNA is more abundant in the fully differentiated adipocytes than those of the undifferentiated ones. In the current study, we confirm the previous finding that HBP1 expression is not increased until the late stage of the 3T3-L1 adipocyte differentiation. These observations lead us to hypothesize that HBP1 may have stage-specific function during adipocyte differentiation. To test the hypothesis, in the early Mitotic Clonal Expansion (MCE) stage, we treated 3T3-L1 cells with quercetin to increase HBP1 expression, resulting in the growth arrest in G1 phase and consequent incompleteness of adipocytes differentiation. Oppositely, HBP1 siRNA which down-regulates HBP1 leads to accelerated cell growth with early appearance of G2/M phase in MCE. These results indicate that HBP1 is involved in cell cycle regulation in MCE phase. Interestingly, although HBP1 knockdown causes early MCE completion, the full adipogenesis process is impaired. This indicates that HBP1 activation during terminal differentiation stage is necessary for full adipogenesis. We further hypothesize that HBP1 is a potential target of PPAR γ function during terminal differentiation. First, the CHIP-Mapper search discovers 2 putative PPAR γ binding sites in HBP1 promoter. Moreover, GW9662 (PPAR γ antagonist) inhibits the activation of a -2kb HBP1 promoter and decreases HBP1 mRNA expression. Taken together, the results of the current study will further characterize HBP1 as a key marker of adipocyte differentiation, which may serve as a potential biological target in the intervention of obesity treatment.

第一章、前言

隨著工商業的發展，飲食精緻化走向，加上國人飲食習慣的改變，肥胖已是國人常見之健康問題，在九十六年國人的十大死因中，與肥胖相關疾病心臟疾病、腦血管疾病與糖尿病分別位居第二、三、四名^(1,2)，因此，肥胖的預防與治療將會是營養上不容忽視之重要課題。

同時，天然食品及其活性成分用來進行養生保健、預防疾病之觀念也愈來愈受到重視，許多體內 (*in vivo*) 和體外 (*in vitro*) 之研究亦證實，許多食物及其活性成分的確具有預防肥胖之功效⁽³⁾。Quercetin 又稱槲皮素，屬於天然化合物-類黃酮分子(flavonoid)，廣泛地分佈於植物界中，如日常食用之蔬菜、水果及綠茶等⁽⁴⁾，研究發現，Quercetin 具抑制脂肪分化的功效，然而關於 Quercetin 抑制脂肪分化的作用機轉尚不明確。

更重要的是，早期的研究發現 HBP1 的表現在脂肪分化後期明顯增加，但其扮演的角色並不清楚，因此，我們想藉由此次的研究來探討 HBP1 在脂肪細胞分化過程中的角色，以及 HBP1 參與 Quercetin 調控脂質生合成之重要機制，最終，希望我們的研究探討可以提供 HBP1 轉錄因子在未來肥胖的研究上作為一個重要指標或肥胖相關疾病重要標定的可能性。

第二章、文獻探討

一、脂質生合成 (Adipogenesis)

脂肪是哺乳動物體內儲存及供應能量的重要器官，過多的糖類和脂肪攝取，可以轉變合成為三酸甘油酯 (triglyceride, TG)，儲存於脂肪細胞中。而前脂肪細胞形成成熟脂肪細胞的過程稱之脂質生合成 (Adipogenesis)，此過程可分為三個階段，包括前脂肪細胞增生階段 (preadipocyte proliferation)、分化階段 (differentiation)和分化末期階段 (terminal differentiation)，分別說明如下：(i) 前脂肪細胞增生階段：前脂肪細胞進行細胞生長使細胞數目增加，當前脂肪細胞長滿形成 monolayer 後，細胞生長停滯，以 Insulin、Dexamethasone(DEX) 和 Methylisobutylxanthine(MIX) 刺激進入 mitotic clonal expansion (MCE)期，再進行 1~2 次的有絲分裂，之後細胞生長停止並開始進入分化階段，Entenmann 等學者指出，人類初代脂肪細胞不須經過細胞分裂即能完成脂肪分化，但在 3T3-L1 脂肪細胞分化過程則必須經過 MCE 期才能完成分化^(5, 6)。(ii)分化階段：當細胞受到誘發進行分化後，細胞型態開始改變，由紡錘型轉變成圓亮的油滴，並伴隨三酸甘油酯的生成，而 LPL (lipoprotein lipase)可作為分化早期的指標⁽⁷⁾，之後，C/EBPs (CCAAT/enhancer binding protein)和 PPAR γ (peroxisome proliferators activated receptor γ)表現增加⁽⁸⁾。(iii)分化末期階段：分化末期 TG 不斷的累積，使細胞內油滴變大，形成成熟脂肪細胞，而成熟脂肪細胞為內分泌器官，會分泌許多脂肪細胞特定之荷爾蒙，如 leptin、resistin 等蛋白質⁽⁹⁾。

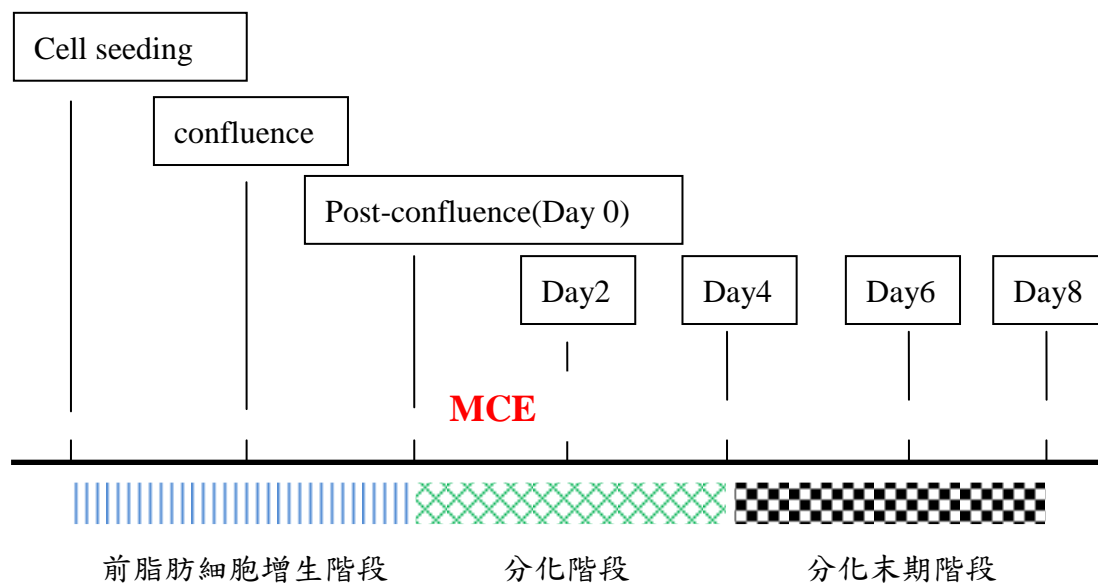


圖 2-1 脂質生合成

資料來源：(10)

二、3T3-L1 前脂肪細胞

近來研究指出，前脂肪細胞株如 3T3-L1、Ob1771、3T3-F422A⁽¹¹⁾和初代脂肪細胞等為研究脂肪細胞分化常用之體外模式，3T3-L1 在 1974 年由 Green 和 Kehinde 從 Swiss mouse embryo cloning 出來具高度分化為成熟脂肪細胞潛力的前脂肪細胞株⁽¹²⁾，這些細胞株在適當的刺激下會分化成脂肪細胞，並表現其生理功能，若將 3T3-L1 前脂肪細胞植入小鼠體內，此前脂肪細胞會自發行成脂肪細胞，且不易與小鼠原有的脂肪區別⁽¹³⁾。

典型的 in vitro 的分化模式中，當細胞在培養皿長滿單層後，更換培養液為添加數種化學藥品或荷爾蒙的分化培養基(differentiation medium)，以促進分化，分別如下說明：

(一) Dexamethasone(DEX)

DEX 為一種合成的 glucocorticoid agonist，會與 glucocorticoid receptor 作用，

促使 C/EBP β 和 C/EBP δ 形成 heterodimers，進而活化 PPAR γ 表現^(14, 15, 16)。

(二) Methylisobutylxanthine(MIX)

MIX 和 DEX 同樣具備促進脂肪細胞分化的作用，主要是透過增加 C/EBP β 表現，藉由抑制 c-AMP phosphodiesterase 及競爭抑制 A1 adenosine receptor，並透過阻斷 inhibitory regulatory protein G1 刺激 adenylyl cyclase 活性，以提高細胞內 cAMP 的含量⁽¹⁷⁾。

(三) Insulin

Insulin 主要是與 insulin-like growth factor receptor (IGF-1 receptor)作用，活化其傳遞路徑以達到脂肪細胞分化，亦可促進 deoxyglucose 汲取，將 glucose 轉換成 CO₂ 及 lipid，另外 p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) 可促進前脂肪細胞自發性分化作用⁽⁵⁾，加上 insulin 可以刺激 p38 MAPK 活性⁽¹⁸⁾，所以可以促進分化，同時在分化後的第三或第四天起 insulin binding 活性會增加 6-10 倍⁽¹⁹⁾。

(四) Biotin

Biotin 為脂肪酸合成之關鍵酵素 ACC (acetyl-CoA carboxylase) 的輔酶，進而促進脂肪酸合成。

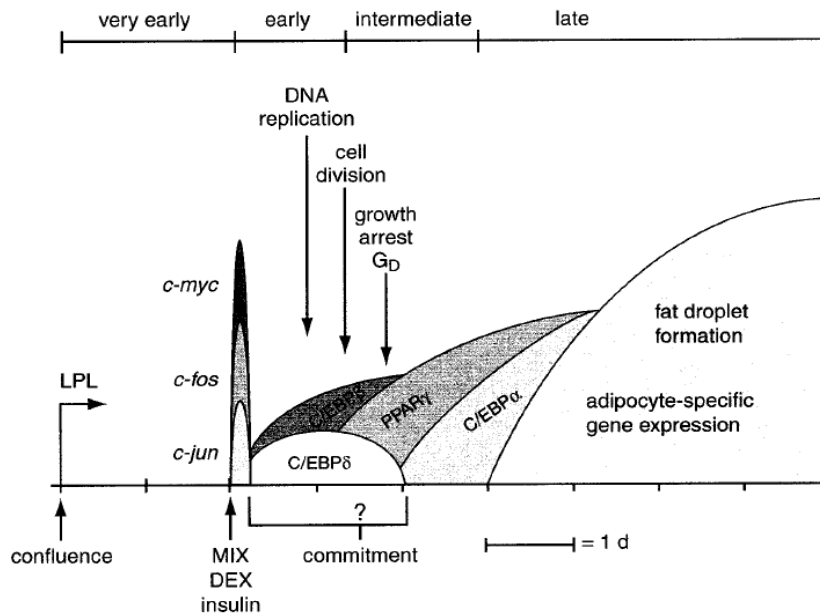


圖 2-3 脂質生合成過程

資料來源：(10)

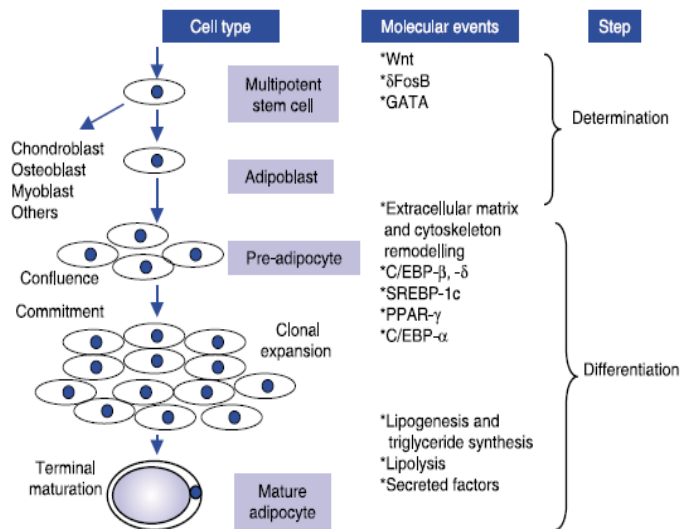


Figure 1. Adipocyte determination and differentiation. Reproduce 12 cm wide.

圖 2-4 脂質生合成的轉錄調控

資料來源：(25)

(一) 脂肪分化轉錄因子- C/EBPs(CCAAT/enhancer binding protein)

C/EBPs 為 basic leucine zipper 成員之一，包括了 C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ 等，最早於 1998 年，Landschulz 等學者在一些病毒的基因中 CCAAT 及相似結合的蛋白實驗中發現第一個成員 C/EBP α ，而 C/EBPs 家族可調節許多細胞中 mRNA 的轉錄作用，在脂肪細胞生合成過程中，C/EBPs 家族的表現深深影響脂肪細胞的發展。在 3T3-L1 前脂肪細胞誘導分化時，C/EBP β 和 C/EBP δ 是最早且短暫表現的基因，C/EBP α 則在分化後期被誘發出來，進而轉錄活化 Adipocyte specific gene 的啟動子⁽²⁶⁾。

在 Gain-of-function 的體外實驗研究中顯示，C/EBP β 在沒有分化劑荷爾蒙的催化下，異位表現的 C/EBP β 能夠誘發 3T3-L1 細胞的分化作用，但對 C/EBP δ 而言，仍需有促分化劑的存在⁽²⁷⁾。另外，近年來有一些轉錄因子可能與脂肪細胞生合成有關，但不像 PPAR γ 和 C/EBPs 為主要調控者，它們可能是做為脂肪細胞生合成某些層面的調節者，如 GATA 家族、FOXC2 和 LXR α 。

根據目前的研究發現，生長停滯的前脂肪細胞 3T3-L1 經由賀爾蒙刺激分化時會快速增加細胞中 C/EBP- β 的表現。然而，C/EBP β 與 DNA 結合的能力是出現在分化過程的 MCE 期，此時細胞進入細胞週期 S 期，由於，C/EBP β 在體外會受到氧化作用而促進與 DNA 結合的能力，所以，在脂質分化過程中，氧化還原態在 MCE 期及 C/EBP β 與 DNA 結合能力上扮演重要的角色。當 3T3L-1 受到 H₂O₂ 及賀爾蒙刺激時，PPAR γ 表現增加進而促進脂質分化，細胞週期從 S 期快速地進入 G2/M 期，同時，免疫螢光染色亦顯示，H₂O₂ 使得 C/EBP β 與其調控片段結合的現象提早出現，而給予抗氧化劑(50 μ M genistein、50 μ M resveratrol) 後，則會使細胞停留在細胞週期 S 期，進而抑制脂質生合成⁽²⁸⁾。

(二) 脂肪分化轉錄因子- PPAR (peroxisome proliferator activated receptor)

在 1990 年的一篇文獻回顧中有提到，Issemann 與 Green 利用固醇類荷爾蒙核受器 (steroid hormone nuclear receptor) 基因相似性質，自小鼠肝臟 cDNA library 選殖出與過氧化相關之 PPAR α ⁽²⁹⁾，並發現可促使過氧小體增生，故稱之為過氧化體增殖劑活化受器 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)。

目前，在不同之脊椎動物中已鑑定出 3 種不同型態之 PPAR，分別為 PPAR α (NR1C1)、PPAR δ/β (NR1C2) 和 PPAR γ (NR1C3)，此三種 PPAR isoforms 在結構和功能上有相似的特性，主要由四個 Functional domains 中的六個 Structural regions A/B、C、D 與 E/F 所組成，N 端的 A/B domains 為 PPAR 的可磷酸化區段 – independent activation function 1 (AF-1)⁽³⁰⁾；C domain /或 DNA binding domain (DBD) 為 PPAR 與目標基因啟動子上 peroxisome proliferator responsive element (PPRE) 結合^(31,32)；D site 為 Cofactors 的 Docking domain；E domain 或 Ligand binding domain (LBD) 則為對 Ligand 具專一性的連結區⁽³³⁾，而位在 E/F domain – independent activation function 2 (AF-2)具活化 PPAR，促進基因的轉錄⁽³⁴⁾。

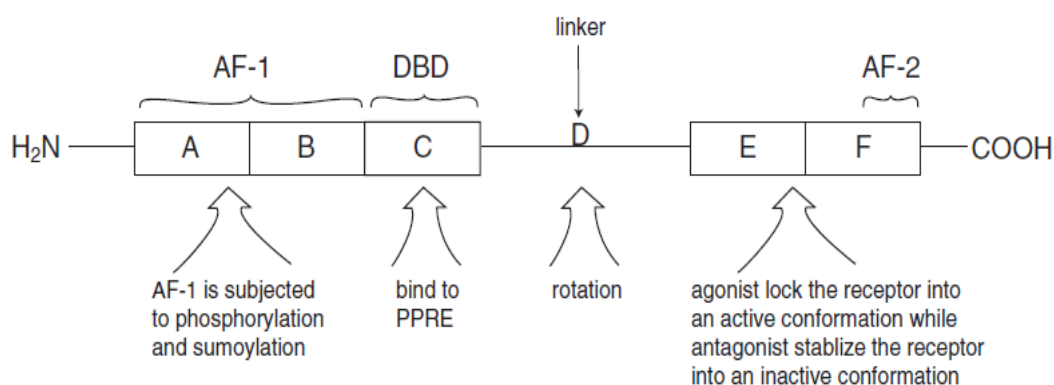


圖 2-5 PPAR 之結構特徵

資料來源：(35)

其中 PPAR 含三種 isoform 分別是 PPAR α 、PPAR β/δ 和 PPAR γ ，其中 PPAR γ 專一表現在脂肪組織，在 γ_1 、 γ_2 、 γ_3 三種不同的轉錄產物中，脂肪細胞主要表達為 PPAR γ_2 ⁽³⁶⁾，而 PPAR α 與 PPAR γ_1 主要表現於可代謝脂肪的組織，如肝、腎、心等，調控脂質相關代謝基因轉錄，另外，有研究指出，PPAR α 在血管內皮細胞、單核細胞與巨噬細胞亦有表現，而 PPAR δ 則分布於全身各組織。

臨床上治療糖尿病的藥物 Thiazolidinediones (TZDs) 類藥物，如 pioglitazone (Actos[®])、rosiglitazone (Avandia[®]) 等^(37, 38)，胰島素增敏劑 (agonist) 可經由活化 PPAR γ 來降低胰島素阻抗進而改善血糖。目前已知 TZDs 的作用標的在 PPAR γ 接受體，PPAR- γ 是細胞核內 PPARs 的一種接受器，含有接合子結合區 (ligand binding domain) 和輔助活化子接合區 (coactivator binding site)，與核內另一接受體 retinoid X receptor (RXR) 結合成異質雙合體 (heterodimer) 的結構，維持在不活化狀態，而當接合子與 PPAR- γ 接合，則促使構象變化 (conformational changes)，經由與特定基因對應的 DNA sequences 作用，調節基因轉錄表現⁽³⁹⁾。

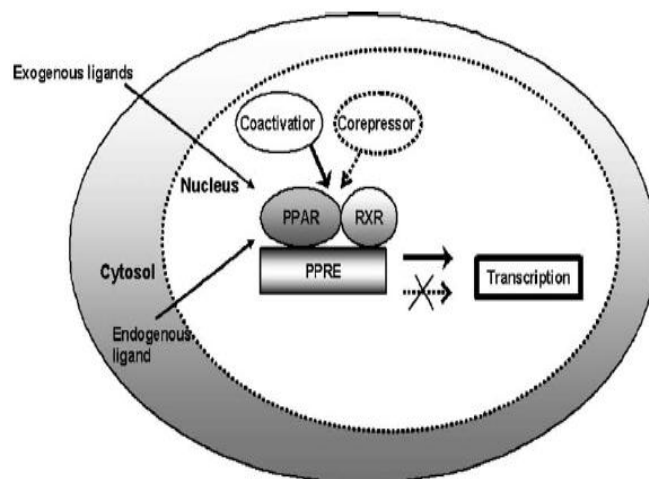


圖2-6 PPAR之基因轉錄作用機制

資料來源：(39)

研究指出，TZDs 會促進脂肪細胞分化，因此，在治療糖尿病、降血糖的同時，服用 TZDs 的病患易有體重增加的副作用^(40, 41, 42)，動物實驗證實，當老鼠脂肪不表達 PPAR γ 時，TZDs 降血糖的效果並不明顯，另一方面，與血糖調控相關的三大組織 - 肌肉和肝臟，若未表達 PPAR γ ，該動物仍有降血糖的功效^(43, 44)，由此得知，PPAR γ 為脂肪組織發展所必需。

(三) 下游調控基因- leptin 瘦體素

1994 年，Zhang 等學者在 *ob/ob* 肥胖小鼠上發現瘦體素(leptin)，leptin 主要在體內脂肪組織表現，由 167 個胺基酸所組成，分子量約 16 kDa 蛋白質⁽⁴⁵⁾。文獻指出，*ob/ob* 肥胖小鼠為 *ob* 基因發生突變，無法合成正常具有功能的瘦體素，導致肥胖，當給予 *ob/ob* 肥胖小鼠瘦體素後，它們的攝食量、體脂肪、高血糖和高胰島素血症有明顯改善的症狀^(46, 47, 48)，因此，瘦體素被認為是一個調脂因子 (lipostatic factor)⁽⁴⁸⁾。

另一方面，對人類而言，當脂肪細胞儲存過多的能量時，分泌大量的脂肪激素 (adipokines)⁽⁴⁹⁾，其中瘦體素主要作用為調控食慾，抑制神經勝肽 Y 和 AGRP 的活性，進而降低攝食量和促進能量消耗維持體脂肪的恆定，因此，脂肪組織不只是一個能量儲存的場所，更是調節能量代謝的重要調控因子。

更進一步地，Mac Djougald 等學者指出，胰島素和 leptin 的調控具相關性，在糖尿病老鼠的脂肪組織上施打 insulin，可促進 leptin mRNA 的表現⁽⁵⁰⁾。此外，有許多報告亦指出，大部分肥胖的人，血中 leptin 的濃度較高，表示肥胖呈現出 leptin 抗性階段，可能與第二型糖尿病有關或與胰島素訊息傳遞發生問題、leptin 受器出現問題具相關性⁽⁵¹⁾。

四、HBP1(HMG(Hihg-mobility group)-Box Protein 1)

HBP1 屬於HMG (high-mobility group) 家族的成員，為一轉錄因子，大小約513個胺基酸，其結構包含：

- HMG-box DNA 結合區 (HMG-box DNA binding domain)
- 抑制區 (repression domain)
- Rb 結合區 (Rb binding domain)
- p38 結合區 (p38 binding domain)

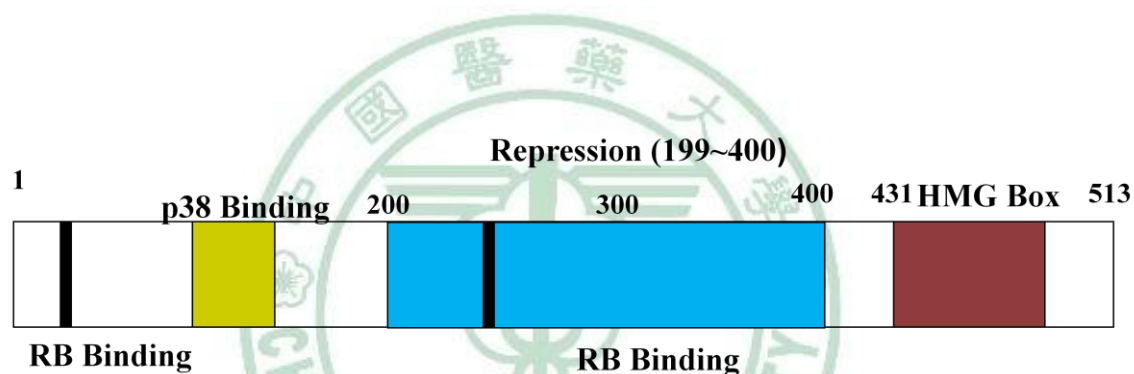


圖 2-7 HBP1 的結構圖

資料來源：(52)

HBP1 的生物功能近年來陸續地被發掘探討，HBP1 參與細胞生長的調控主要著重於 HBP1 抑制細胞週期進行以及 HBP1 調控肌肉細胞分化的角色。

(一) HBP1 對細胞週期的調控

HBP1 與 Rb 結合抑制細胞週期 G1 的進行

HBP1 影響細胞週期與 pRb (retinoblastoma, also called pocket protein) 對G1 期的調控功能相似。pRb 家族為細胞週期調控的核心之一，包括 pRb1/p110、

pRb2/p130 和p107 三個，它可以使細胞週期停滯於 G1期， pRb 及其他成員 p107 和p130 可分別與轉錄因子 E2F (early gene 2 factor) 結合而抑制 E2F的轉錄功能⁽⁵³⁾，當pRb 被cyclin 與CDK (cyclin dependent kinase)磷酸化後，Rb與E2F 分離，E2F 釋放而使細胞週期得以進行。研究證實，HBP1可和Rb家族成員中的 Rb與p130 作用，進而抑制細胞週期G1 期的進行^(53, 54, 55)。另外，早期研究指出，Rb⁽⁵⁶⁾、E2F⁽⁵⁷⁾和 CDK inhibitor⁽⁵⁸⁾ 與3T3-L1 細胞分化時生長停滯有所關聯。

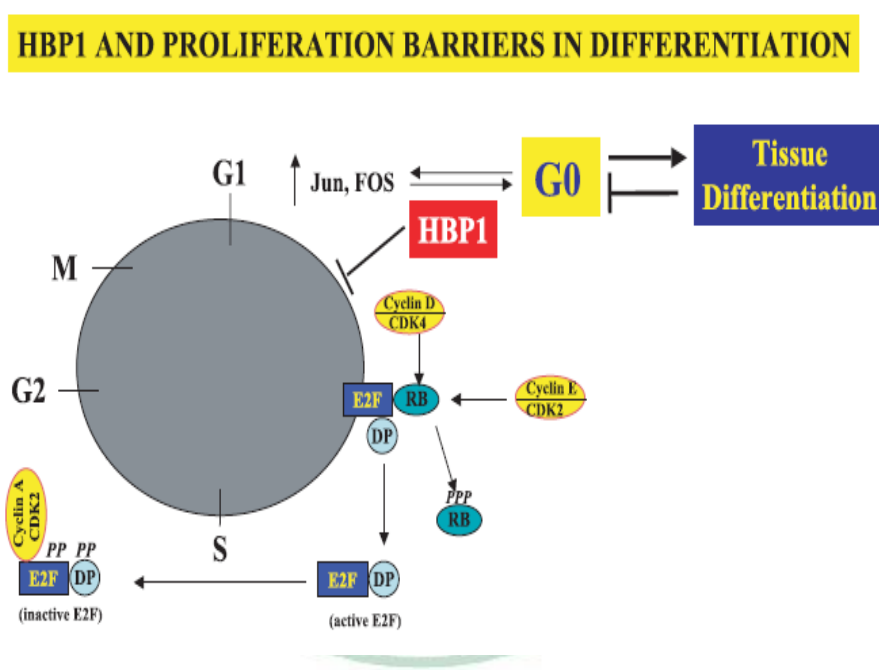


圖 2-8 HBP1 對細胞週期的調控

資料來源：(52)

HBP1 為p38 MAPK 路徑抑制細胞週期之直接作用目標

p38 MAPK 訊息傳遞路徑與細胞凋亡和細胞週期停滯有關，最近的研究顯示，p38 MAPK 可藉由直接磷酸化而穩定HBP1的表現，造成細胞週期停滯於G1期，而抑制乳癌細胞的生長。

綜觀，HBP1調解細胞週期的標的基因包括N-myc、c-myc 以及cyclin D1。在HBP1 過度表現的細胞中，可誘導細胞週期停滯在G1/S 期；而在肝細胞再生模式中，當基因轉植小鼠的肝臟 HBP1 表現增加時，能延遲G1期的發展。最後，最近的研究指出，p38 MAPK 調控HBP1 的蛋白表現，造成G1期的停滯⁽⁵²⁾。因此，在細胞及動物的細胞週期實驗確立了HBP1 在調控G1 期發展的角色，這樣的發現，也顯示出HBP1藉由抑制細胞週期的活化因子，進而抑制細胞增生。

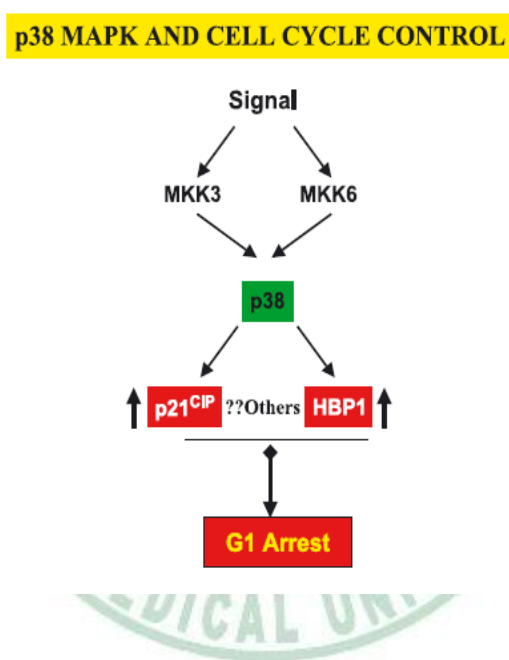


圖 2-9 p38 對 HBP1 的調控

資料來源：(52)

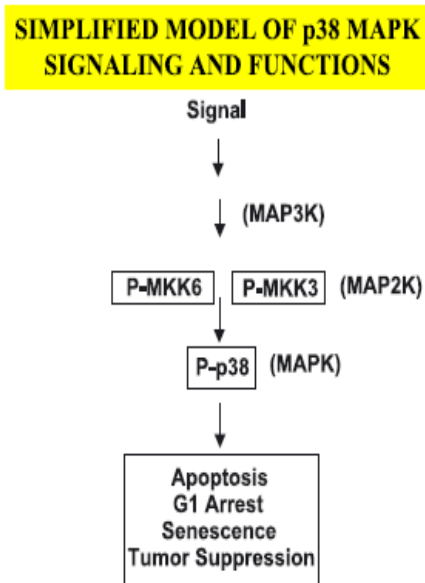


圖 2-10 p38 對細胞凋亡的作用

資料來源：(52)

(二) HBP1抑制Wnt 訊息傳遞路徑

Wnt 訊息傳遞路徑與腫瘤發生、癌症生成有密切的關係，近年來，Wnt 在代謝相關疾病（如脂質合成、糖尿病）的影響亦開始廣泛地被探討。典型的 Wnt 訊息傳遞路徑開始於 Wnt 蛋白質與細胞膜上的受體 Frizzled 及 LRP 結合形成複合體，並傳遞訊息到細胞質中使 Dishevelled (Dsh) 影響 APC、GSK-3 β 、Axin 三者無法和 β -catenin 形成複合體，使得 β -catenin 不被分解， β -catenin 進而轉移至細胞核進行調控下游基因的轉錄^(59,60,61)。同時，轉錄因子 HBP1 在細胞生長調控的研究上，發現可藉由與 β -catenin 競爭 Lef/Tcf 結合至 cyclin D1、c-myc 之啟動子(promoter)來抑制 Wnt 訊息傳遞路徑的基因活化作用。

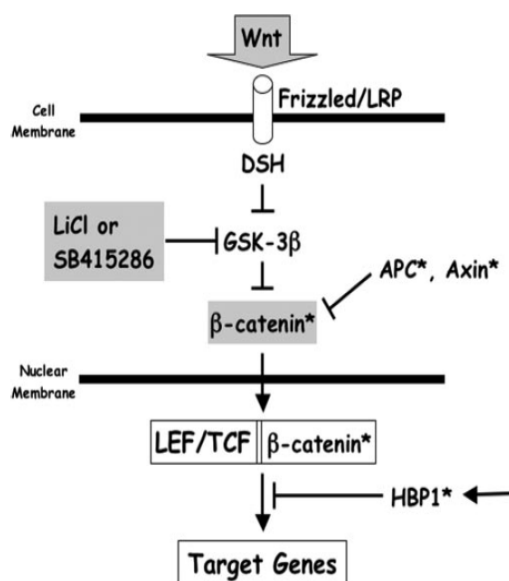


圖 2-11 Wnt 訊息傳遞與 HBP1 的作用

資料來源：(59)

(三) HBP1 對細胞分化的調控

HBP1 不但調節細胞週期的進行，而抑制細胞的增生。而且，在肌肉細胞 C2C12 中，細胞週期停滯的情況下，HBP1 的活化更會促使肌肉細胞的分化。此外，Lesage 等學者發現，在大鼠組織中，HBP1 mRNA 表現在脂肪組織、肺臟含量較多，另外，在 Ob1771 (preadipocyte) 和 C2C12 (muscle) 的分化過程中，HBP1 mRNA 的表現在分化的組別中顯著高於未分化的組別，同時，在 Ob1771 細胞分化後，隨著 insulin 濃度增加，HBP1 mRNA 的表現明顯增加⁽⁶²⁾，顯示 HBP1 參與了脂肪細胞分化的調控，但在脂肪細胞分化過程，HBP1 參與的機制尚不明確。

五、Quercetin 槲皮素

代謝症候群為心血管疾病及糖尿病等疾病的危險因子，症狀包括腹部脂肪堆積、動脈粥狀硬化、血脂異常、血壓增高、血糖升高等。雖然惡性腫瘤、心臟病、心血管疾病與糖尿病等慢性病發生機轉是多因的，但不可否認地，飲食因子是其中一個相當重要的因素，所以如何排除或減少飲食中與慢性病有關的危險因子或增加保護因子的攝食，也就成為預防這些疾病的最好方法。近年來，蔬菜及水果中的天然化學成分，比如：phenols, isoflavones, allium organosulfur compounds 及 indoles 等，無論在流行病學或臨床研究上，都顯示對人類疾病的產生具有不等程度的預防作用，同時也可達到改善體質、調節生理機能、增進健康之目的。

蔬果、穀類、豆類中含有許多抗氧化活性的物質，quercetin 是主要的類黃酮成分，常以配醣體的形式存在於多種的花、果實和葉子⁽⁶³⁾，亦存在於日常食用的蔬菜、水果中，如洋蔥、綠茶、蘋果和草莓⁽⁶⁴⁾，其在預防癌症、心血管疾病、體重控制、免疫調節等醫療效用亦受到相當之重視⁽⁶⁵⁾。

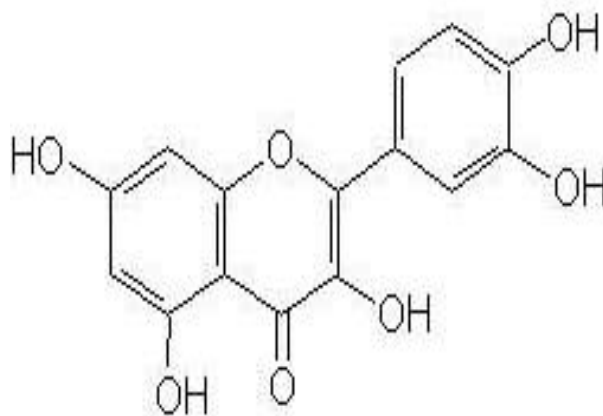


圖 2-12 quercetin 結構式

資料來源：(66)

學名	槲皮素(quercetin)
化學名	2-(3,4-Dihydroxyphenyl)- 3,5,7-trihydroxy-4H-1-Benzopyran-4-one- 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone
分子式及分子量	C ₁₅ H ₁₀ O ₇ ，分子量 302.23
物理及化學性質	1、於 314°C 被分解。 2、UV λ max (aLc)：258，375 nm。 3、含二分子水的黃色針狀結晶（稀醇）， 於 95-97°C 成無水化合物，可溶於冰醋酸， 鹼性溶液下呈黃色，幾乎不溶於水，醇性 溶液嚐起來有苦味。

表一 槲皮素(quercetin) 化學性質

資料來源：(66)

近年來，探討 quercetin 調控脂肪生合成之研究陸續出現，quercetin 影響脂質生合成之機制包括抑制脂肪於脂肪細胞堆積，Shisheva 等學者使用 47 μM quercetin 給予大鼠初代脂肪細胞，發現可以抑制初代脂肪細胞約 50% lipogenesis 反應，投予 110 μM quercetin 則可抑制 100%⁽⁶⁷⁾，此外，在 3T3-L1 前脂肪細胞，Hsu 等學者則認為 quercetin 抑制脂肪細胞分化可能與細胞凋亡 (apoptosis) 的調控有關，向下調控 PARP (Poly-ADP-ribose polymerase) 及 Bcl-2 蛋白質，增加 caspase-3、Bax 等蛋白質的表現，促進細胞凋亡⁽⁶⁸⁾。進一步地，最近的一篇研究指出，添加 10、50 及 100 μM 的 quercetin 促使 caspase-3、caspase-9 活性增加，導致成熟脂肪細胞凋亡比率增加，且隨著 quercetin 濃度的增加亦會降低脂肪細胞脂質生合成，並有效減少脂肪粒數目及大小，另外 quercetin 之添加亦會

降低 phospho-extracellular signal-related kinase (P-ERK)、c-Jun N-terminal kinase (JNK) 蛋白質之表現，顯示 quercetin 可經由 MAPK 訊息傳遞路徑造成脂肪細胞凋亡之發生，而降低脂肪細胞的分化⁽⁶⁹⁾。綜合以上所述，quercetin 可能抑制 3T3-L1 前脂肪細胞及脂肪細胞增生和脂質生合成，活化促細胞凋亡因子 (pro-apoptotic factor) — Bax、Bcl-X_S、Bad、aspase-3、caspase-9... 等之表現，增加 PARP 蛋白質斷裂現象；抑制抗細胞凋亡因子 Bcl-2 家族中 Bcl-2、Bcl-X_L... 等之表現所導致，造成細胞週期停滯及誘導細胞凋亡發生，預防脂質生合成。



實驗目的

許多研究曾指出 quercetin 富含於日常生活中蔬菜、水果中，具有抑制脂肪細胞分化之效用，而早期的研究發現 HBP1 的表現在脂肪分化後期明顯增加，然而關於其作用機轉之研究尚十分缺乏。因此，本實驗以 3T3-L1 前脂肪細胞株體外分化模式，探討 HBP1 在脂肪細胞分化過程中的角色，以及 HBP1 參與 quercetin 調控脂質生合成之重要機制。



第三章、材料與方法

一、實驗設計



二、實驗藥品與儀器

藥品：

名稱	廠牌	產地	貯存溫度
A			
Acrylamide	Genepure	USA	4°C
Agarose	AMRESCO®	USA	室溫
Ampicillin	Bio Basic Inc.	Canada	4°C
Ammonium Persulfate	J. T. Baker	USA	室溫
B			
β -mercaptoethanol	J. T. Baker	USA	室溫
Bovin Serum Albumin	USBiological	USA	4°C
Bromophenol Blue	Bio Basic Inc.	Canada	室溫
C			
chloroform	TEDIA	USA	室溫
D			
Deoxycholate	Sigma	US	室溫
DMSO	Sigma	US	室溫
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco	USA	4°C
Dexamethasone	Sigma	US	-20°C
Dual light	Applied Biosystems	USA	4°C
DNase I stock solution	Qiagen	Germany	-20°C

E

ECL	PerkinElmer	US	4°C
EcoR I	BioLabs	US	-20°C
EDTA	J. T. Baker	USA	室溫
Ethanol	東華化工	Taiwan	室溫
Etidium Bromide	Genepure	USA	4°C

F

Fetal Bovine Serum	Gibco	USA	-20°C
--------------------	-------	-----	-------

G

Glycine	USBiological	USA	室溫
---------	--------------	-----	----

H

Hind III	Biolabs	US	-20°C
----------	---------	----	-------

I

Isopropanol	Sigma	US	室溫
Insulin	Sigma	US	-20°C
3-isobutyl-1-methyl-xanthine	Sigma	US	-20°C

L

L-Glutamine	Gibco	USA	-20°C
Luria Bertani medium	Himedia	India	室溫
Luria Bertani Agar	Himedia	India	室溫
Lipofectamine TM 2000	Invitrogen	USA	4°C
Lipofectamine TM RNAi	Invitrogen	USA	4°C

MAX

N

NaCl	AMRESCO®	USA	室溫
10x NEBuffer EcoR I	Biolabs	US	-20°C

O

OPTI-MEM®	Gibco	USA	4°C
Oil red O	Sigma	US	室溫

P

10x PBS	UniRegion	USA	室溫
	Bio-Tech		
Penicillin/Streptomycin	Gibco	USA	-20°C
Phosphatase Inhibitors Cocktail	Sigma	US	-20°C
Polybrene	Sigma	US	-20°C
Protease Inhibitors Cocktail	Sigma	US	-20°C
Protein Assay Dye Reagent	Bio Rad	CA	4°C

S

SDS	Merck	Germany	室溫
Sodium Bicarbonate	Sigma	US	室溫
SUPERase-In	Ambion	USA	-20°C

T

50x TAE	UniRegion	USA	室溫
	Bio-Tech		
TEMED	J. T. Baker	USA	室溫
Tris-base	USBiological	USA	室溫

I

TRIzol [®]	Invitrogen	USA	4°C
Triton X-100	J. T. Baker	USA	室溫
Trypsin	Gibco	USA	-20°C
Tween 20	Showa	Japan	室溫

儀器：

名稱	廠牌
倒立式顯微鏡	Olympus
離心機	Sigma
微量離心機	DENVILLE
iCycler	BioRad
Multimage [™] Light Cabinet	Alpha Innotech Corporation
Mulpid [®] -2 plus electrophoresis	ADVANCE
CLC-110 chemiluminescence detector	TOHOKU
CLC-10 CL counter	TOHOKU
PowerPac [™] Basic Power Supply	BioRad
Thermo Scientific NanoDrop 1000	Thermo
Spectrophotometer	
Mini Trans-Blot [®] Electrophoretic	BioRad
Transfer Cell	

三、細胞培養

資料來源：10

(一) 細胞株

3T3-L1前脂肪細胞株：購自ATCC® Catalog NO. CL-173TM，組織來源：小鼠纖維母細胞。

HEK-293T人類胚胎腎臟上皮細胞株，由賴志河老師實驗室機構所贈。

(二) 試劑配置

DMEM (high glucose)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 粉末溶於800 ml 的無菌水中，加入1.5 g Sodium Bicarbonate (Sigma)，再以1N HCl 調整pH值為7.1~7.2之間，定量1 L後以過濾膜 (0.22 μ m) 過濾，加入 10%Bovine serum (3T3-L1 cell) /Fetal Bovine Serum (293T cell)、2% L-Glutamine 與1% Antibiotic Antimycotic，而成為最終之細胞培養液。

1X磷酸緩衝液(Phosphate-buffer saline ; PBS)

以10X PBS (UniRegion Bio-Tech)以滅菌水稀釋為 1X PBS，經 121°C、30分鐘高壓滅菌後使用並存放於室溫備用。

(三) 繼代培養 (Subculture)

細胞長滿後，將培養皿中之培養液吸除後，加入 10 ml 滅過菌之PBS 清洗後，吸除PBS並加入trypsin 1 ml 溶液後，放入37°C培養箱中反應5 分鐘，於倒立顯微鏡下觀看細胞是否全數脫落。確定細胞完全脫落後，加入10 ml 培養液以抑制 trypsin 的活性，並將細胞液取出放入15 ml 離心管中，以1000 rpm 速度離心5 分鐘後，吸除上清液，加入適量的培養液將細胞打散後，依比例稀釋分至裝有培養液之培養皿中，置於37°C、5% CO₂之培養箱內培養。

(四) 細胞冷凍

細胞長滿時，將培養皿中之培養液吸除後，加入 10 ml 滅過菌之PBS 清洗後，小心地吸除。加入1 ml trypsin 溶液後，放入37°C培養箱中反應5 分鐘，於倒立顯微鏡下觀看細胞是否全數脫落。確定細胞完全脫落後，加入10 ml 培養液以抑制trypsin 的活性，並將細胞液取出放入15 ml 離心管中，以1000 rpm 速度離心5 分鐘後，吸除上清液，每管加入3ml 含有5% DMSO 的培養液，分裝1 ml 至冷凍保存管中，放入4°C 冰箱裡10 分鐘後，移至-20°C放置30 分鐘後，放到-80 °C中24 小時，最後移至液態氮筒中保存。

(五) 細胞分化

3T3-L1 前脂肪細胞培養confluents的單層(monolayer)後，兩天後即 Day 0時，加入分化的培養液0.25 μ M Dexamethasone/0.25 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine/10 μ g/mL insulin 於 high glucose DMEM 培養兩天，每兩天更換 10 μ g/mL Insulin / 100 μ g/mL Biotin 培養液，持續培養至分化第八天，細胞即慢慢分化完成，隨著脂肪細胞的分化，於顯微鏡下觀察，細胞由紡錘狀變為球形，細胞內會堆積許多圓亮的脂肪滴。

藥品配置

1、0.25mM Dexamethasone(DEX)：1000x stock

藥品	需要量	conc.
Dexamethasone(Sigma)	0.098g	0.25M
DMSO	1 mL	
先將0.098 g DEX power 溶於 1 mL DMSO中，即為0.25M		

藥品	需要量	Stock conc.	conc.
0.25M DEX	10 μ l	0.25 mM	0.25 μ M
DMSO	10 mL		
先將0.25M DEX以DMSO 稀釋為0.25 mM DEX，分裝於滅菌 eppendorf中，貯存於-20°C。			

2、0.5 M 3-isobutyl-1-methyl-xanthine(MIX) : 1000x stock

藥品	需要量	Stock conc.	conc.
3-isobutyl-1-methyl-xanthine(MIX) (Sigma)	0.111g	0.25 M	0.25 mM
DMSO	1 mL		
先將0.111g MIX power 溶於 1 mL DMSO中，分裝於滅菌 eppendorf中，貯存於-20°C。			

3、100 μ g/ mL Biotin : 1000x stock

藥品	需要量	Stock conc.	conc.
Biotin(Sigma)	0.01 g	100 μ g/ mL	0.1 μ g/ mL
二次水	100 mL		
先將0.01g biotin power 溶於 100 mL二次水中，以0.2 μ m filter過濾分裝於 eppendorf中，貯存於-20°C。			

4、10 mg/ mL Insulin : 1000x stock

藥品	需要量	Stock conc.	conc.
Insulin(Sigma)	0.1 g	10 mg/ mL	10 μ g/ mL
0.01N HCl	10 mL		

先將0.01g biotin power 溶於 10 mL 0.01N HCl 中，以0.2 μ m filter過濾分裝於 eppendorf中，貯存於-20 $^{\circ}$ C。

四、細胞存活率 (Viability) 測定

資料來源：70

(一) 原理

正常細胞由於細胞膜完整，遇到加入 trypan blue 染劑時，則不會被染色，呈現亮點為活細胞；反之，死細胞或是受損的細胞則因細胞膜通透性已被破壞，染劑可進入細胞內加以染色，成為藍色細胞。

(二) 實驗步驟

藥品配置

100 mM Quercetin

分子量為 338.26，取 2.96 g 之 Quercetin (sigma)，移至無菌操作台，加入 10 ml DMSO，以 0.22 μ m 的濾膜過濾後放置 -20 $^{\circ}$ C 儲存。

實驗步驟

在 6 孔盤中種下 5×10^5 顆的 3T3-L1 細胞，等至細胞貼附長滿後二天時 (MCE期)，加入 10、50 和 100 μ M 不同濃度的 quercetin 處理 48 小時，將細胞以 trypsin-EDTA 打下後，取細胞懸浮液中的 50 μ l 再加上 100 μ l 的 trypan blue，混合均勻後，以血球計數器來計算未被染色的 3T3-L1 細胞數目。

細胞計數

將細胞懸浮液與 trypan blue 按比例體積混合，取出 20 μl 混合液注入血球計數盤凹槽中，於倒立式顯微鏡下觀察計數。計算計數盤中上下共十大方格中細胞總數後除以十，乘以稀釋倍數，最後再乘以 10^4 (血球計數盤每一方格的體積為 10^{-1} mm^3)，及為每毫升中細胞懸浮液之細胞數。

五、油紅染色(Oil red O stain)

資料來源：71

(一) 原理

染脂肪細胞內油滴的生成。

(二) 實驗步驟

藥品配置

取 Oil-red O 212 mg 加入 isopropanol 60 mL 中，蓋上蓋子，stir at 4°C overnight，以 Whatman 3MM paper 過濾，過濾後 Oil-Red O solution : dd water = 3 : 2 混勻後， 4°C overnight，最後再以 Whatman 3MM paper 過濾， 4°C 待使用。10% formalin/PBS 是取 27.3 mL 37% formaldehyde solution + 72.97 mL PBS。

細胞染色

將分化至第八天的 3T3-L1 脂肪細胞，吸除培養液，以 PBS 潤洗兩次，加入 2 mL 的 10% formalin/PBS 固定細胞一小時，再以 dd water 清洗數次，加入 1.5 mL Oil-red O (蓋過細胞即可) 染 10 min，吸除染劑，以 dd water 清洗數次，室溫倒扣晾乾於顯微鏡下即可照相。

六、質體 (plasmid) 的製備

資料來源：72

(一) 原理

質體 DNA 為獨立於染色體DNA外的環狀小分子DNA，通常只有數千個鹽基對 (bp)，具有自行複製的能力，因此，在生物技術應用上，質體DNA常被用來作為載體以選殖特定的DNA以及表現特定的蛋白質用。抽取質體DNA的方法有很多種，其中「鹼性溶解法」最常用的方法，此方法效率高、價廉、簡單為。其原理是利用鹼處理質體DNA和染色體DNA，使兩者雙股打開呈單股狀態，再加入酸中和鹼使得單股DNA回復成為雙股DNA。細菌以NaOH及SDS分解，並使蛋白質及DNA變性，之後以酸中和。因此，小分子質體DNA在中和後恢復原態，但大部份的細菌染色體DNA則無法完全復原而與SDS-K⁺所形成之複合物一起沉澱下，可以離心去除，而上清液中所含的質體則可以酒精或異丙醇(isopropanol)使之沉澱。此外，將分離下來的質體，以不同限制酵素作用，經電泳分離DNA片段後，比較各DNA片段之分子量，檢定質體之正確性。

使用的質體 (乾燥)

Name	Relevant characteristics
PGL3-HBP1-LUC	transient overexpressing HBP1
RSV- β -gal (Rous sarcoma virus β -galactosidase)	internal vector control

質體來源：Dr. Yee Lab 機構.

(二) 實驗步驟

轉型 (Transformation)

將 DH5 α competent cells (ECOS 101 ; Yeastern Biotech) 自 -80°C 取出後回

溫，取 33 μ l 至 eppendorf 中，加入 3 μ l 質體DNA (取決於濃度) 後置於冰上10 分鐘後，將含有質體DNA 及competent cells 之 eppendorf 放入42°C 水浴45 秒，此時勿晃動，Heat shock 後立即放回冰上2 分鐘。接著，加入300 μ l 之Luria Bertani medium，放入37°C 培養箱，以100 rpm 速度震盪培養1 小時，取200 μ l 混合液均勻塗抹在含特定抗生素的 Luria Bertani Agar 上，置於37°C 培養箱24 小時。

挑選菌落

以滅菌過的牙籤或無菌tip輕輕挑起培養皿上單一菌落，連同牙籤或無菌的tip一起放入含有50 μ g/ml 之Ampicillin 之Luria Bertani medium 的培養管中，再度放入37°C 培養箱，以200 rpm 速度震盪培養24 小時。

質體小量製備--使用QIAGEN® Plasmid Mini Kit (QIAGEN)

將上述培養 24 小時之菌體離心15 分鐘 (6000g, 4°C) 後，將上清液倒掉，加入 300 μ l Buffer P1 後震盪均勻後，加入300 μ l Buffer P2，上下搖勻4~6 次後，置於室溫下5 分鐘，接著加入300 μ l Buffer P3，混勻後放置冰上5 分鐘後，離心10 分鐘 (最大速度, 4°C)，保留上清液。QIAGEN-tip 20 先以1 ml Buffer QBT 通過column 之後，再加入前述之上清液，待其全部通過column 後，以2 ml Buffer QC清洗2 次，接著再以0.8 ml Buffer QF 將DNA elute 至eppendorf 中，加入0.56 ml isopropanol 後離心30 分鐘 (13000 rpm, 4°C)。之後，小心地將上清液抽掉，以1 ml 70%酒精清洗，離心10 分鐘 (10000 rpm, 4°C)，將上清液抽掉，剩餘的DNA pellet 使其乾燥5~10 分鐘後，以50 μ l 二次水將其溶解，保存於-20°C。

質體鑑定--以限制酶切割

EcoR I digestion :

Component	Volume
Plasmid DNA	15 μ l
10x NEBuffer EcoR I	5 μ l
EcoR I (BioLabs)	0.5 μ l
ddH ₂ O	X μ l
total volume	to 50 μ l

DNA電泳分析

酶切反應物於 37°C 水浴反應 24 小時後，每管加入 6 X 的 DNA loading dye 混合均勻，注入含有 Ethidium bromide 之 1% agarose 之膠片中，將膠片置於電泳槽中，於電泳槽中以 100 伏特進行電泳，以 Multimage™ Light Cabinet 分析影像並儲存。

質體大量製備--使用 QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN)

將上述質體鑑定正確之小量質體，放入含有 Ampicillin 之 LB 培養液 300 ml 培養 overnight，離心 15 分鐘 (6000 g, 4°C) 後，將上清液倒掉，加入 10 ml Buffer P1 後震盪均勻後，加入 10 ml Buffer P2，上下搖勻 4~6 次後，置於室溫下 5 分鐘，接著加入 10 ml Buffer P3，混勻後放置冰上 20 分鐘後，離心 30 分鐘 (最大速度，4°C)，保留上清液。QIAGEN-tip 500 先以 10 ml Buffer QBT 通過 column 之後，再加入前述之上清液，待其全部通過 column 後，以 30 ml Buffer QC 清洗 2 次，接著再以 15 ml Buffer QF 將 DNA elute 至 eppendorf 中，加入 10.5 ml 之 isopropanol 後離心 30 分鐘 (13000 rpm, 4°C)。之後，小心地將上清液抽掉，以 5 ml 70% 酒精清洗，離心 10 分鐘 (10000 rpm, 4°C)，將上清液抽掉，剩餘的 DNA

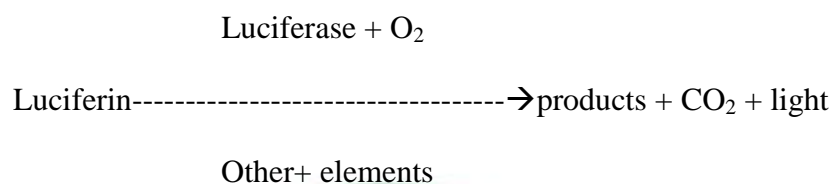
pellet使其乾燥5~10 分鐘後，以200~300 μ l 二次水將其溶解，保存於-20°C。

七、冷光酵素報導基因分析法--Luciferase Gene Reporter Assay

資料來源：73

(一) 原理

生物發光現象是 Luciferin 在 Luciferase 的催化下進行氧化反應所產生。



(二) 實驗步驟

轉染

以 lipofectamineTM 2000 轉染 0.4 μ g HBP1 -2kb promoter 和 0.2 μ g RSV- β -gal (internal control) 質體至培養於 24 well 每一孔盤中的 293T 細胞，24 小時後，給予不同濃度的 insulin、TZD 和 GW9662 24 小時後，以 luminometer 分析 Luciferase 活性。

打破細胞

使用 4°C 的 PBS 清洗細胞兩次，加入含有 DTT 的 Lysis buffer (DTT final 0.5mM)，24 well 每一個 well 25 μ l，在搖晃機上搖 30 分鐘（冰上），將細胞放置 eppendorf，以 11800 rpm，離心 2 分鐘，將上清液放置新的 eppendorf，放到 -80°C 冰箱中保存備用。

分析

加入 12.5 μ l 的 buffer A 至每一 well，將 2-10 μ l (5 μ l) 的 test sample 加入至 well，等待 10 分鐘，等待的時間配置 bufferB，稀釋 galacton-plus substrate 至 bufferB (1:100)，加入 buffer B，每個 well 加入 50 μ l，測量 Luciferase。放置室溫 30 分鐘，加入 50 μ l Accelerator II，等 1-2sec，立刻測量 β -galactosidase。

八、Transient HBP1 knockdown 之3T3-L1 細胞株

資料來源：74

(一) RNA干擾術(RNA interference ; RNAi)

背景

RNAi 最早於1990 年時被發現，植物學家 Jorgensen 等將查爾酮合酶 (chalcone synthase) 的基因置於一個 promoter 後面，於矮牽牛花中，希望藉由增加一套基因使花色更鮮豔，結果發現不但多一套的基因沒有表現，原本存在的那一套基因反而失去功能而出現白花，當時稱此現象為「共同抑制 (co-suppression)」。1995年，Guo 和Kemphues 利用反義股RNA (anti-sense RNA) 阻斷了*parf-1* 肌肉蛋白的表現，同時，在對照組實驗中，發現 sense RNA 亦可抑制*parf-1*的表現。1998 年，Fire 與Mello 在線蟲(*Caenorhabditis elegans*) 上也發現這種RNA 干擾現象，並首度被稱為RNAi。直到2001 年初，Thomas Tuschl 證明了在哺乳動物細胞中，亦可以使用RNAi 來抑制特定基因的表現，因此RNAi 技術也由植物延伸到了哺乳類動物，對於其機制也有了更深入的了解。

原理

RNAi 是利用細胞內的雙股RNA 所引發的基因沈默作用。長鏈的雙股RNA 先經由Dicer (一種RNase) 將其切割成多個小段，每段約19~25nt，稱為小干擾RNA(small interfering RNA)，也就是所謂的siRNA。siRNA 會被細胞質中的核糖核酸誘導沉默複合體 (RNA-induced silencing complex ; RISC) 辨識並結合，使雙股的siRNA解開，形成sense 與antisense 兩個單股的RNA，並將其中的正義股 (sense) 分解，保留反義股 (antisense)。而保留的反義股則會引導RISC結合至互補的 mRNA上，之後，mRNA會被RISC切斷進而降解，使其無法轉譯成蛋白質，因此，目標基因遭到抑制並失去功能。

應用

RNAi 技術的應用相當廣泛，在疾病治療應用上，許多疾病的發生是因為特定基因表現異常或過度表現，我們可以依所需來關閉非必要或致病基因的功能，以抑制這些異常或過度活化的基因。理論上說，若能關閉致病基因的表達，則很多疾病將被治癒。因此，利用RNAi 技術可應用於抑制病毒感染與複製能力、對抗癌症、心血管與腦血管疾病、糖尿病...等各種疾病的新療法。

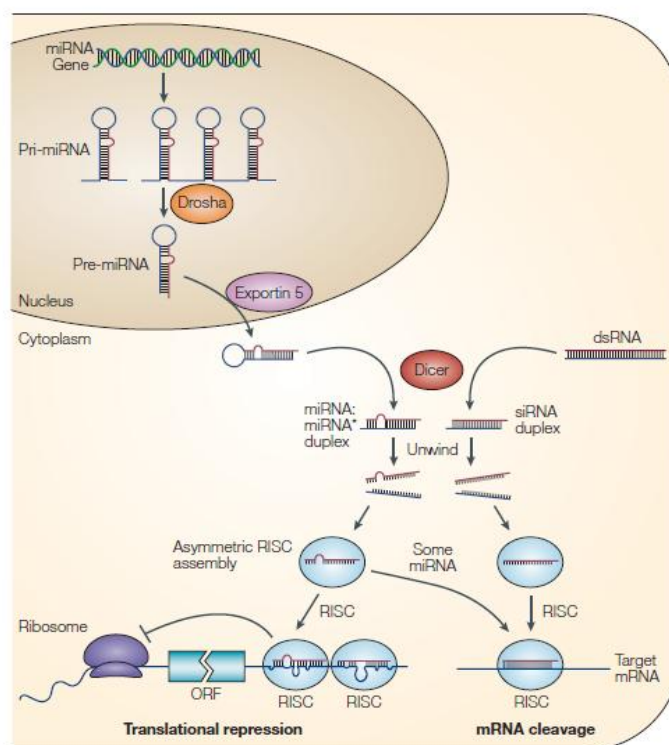


圖3-1 RNAi 之作用原理

資料來源：(75)

(二) 使用的siRNA

Stealth™ RNAi Negative Universal Control Duplexes Lot. 130942A01做為控制組

Mouse HBP1 siRNA購自 Thermo SCIENIFIC，其target Sequence如下：

TARGETplus SMARTpool L-054764-01-0005，Mouse HBP1，NM_153198，5 nmol

ON-T TARGETplus SMARTpool siRNA J-054764-09，HBP1

Target Sequence：AAUAAAGGUUGGUCGUCAU

ON-T TARGETplus SMARTpool siRNA J-054764-10，HBP1

Target Sequence：CCUCAGAUAUACCGGAAAA

ON-T TARGETplus SMARTpool siRNA J-054764-11，HBP1

Target Sequence：GGUCAAGAGUUUUCGGGAU

ON-T TARGETplus SMARTpool siRNA J-054764-12，HBP1

Target Sequence：CUGAAAGGCACGCGGCUGU

(三) 實驗步驟

轉染至3T3-L1細胞

將3T3-L1細胞培養至10 cm 培養皿中，待長滿後進行繼代培養2~3次，進行實驗。將100 nM siRNA與serum free medium(Opti-MEM®)混合，加入RNAi duplex-Lipofectamine™ RNAi/MAX反應10-20分鐘後，進行Reverse Transfection，接著加入500 μl含有400,000顆3T3-L1細胞於3.5 cm 培養皿，置於37°C、5% CO₂之培養箱內培養，待細胞長滿後即可移至6 well培養皿進行分化和並抽取RNA和蛋白質以做鑑定。

九、RNA萃取分離--使用RNeasy® Mini Kit (QIAGEN)

資料來源：76

(一) 原理

RNA抽取原理，是以Chomczynski和Sacchi 之單一步驟抽取RNA方法修改而成，以高濃度之guanidine salts及urea等變性劑，使細胞溶解，並破壞胞器所釋放之RNase的活性，所得之細胞溶解液再以酸性之phenol/chloroform萃取，分成兩層，DNA及蛋白質會在有機層或介面層，而RNA在水層，如此可有效分離出RNA。將萃取得之total RNA以isopropanol沉澱，並溶於RNase-free的水中即可。

(二) 實驗步驟

細胞先用PBS清洗一次後，加入1 ml TRIzol®，以pipet 來回吸放數次，將細胞沖下並打破，將TRIzol®細胞液移至15ml離心管，放置-80°C冰箱待後面分析使用，自-80°C冰箱拿出後，立即快速將細胞液37°C水浴回溫，加入400 μ l chloroform震盪均勻後，放置室溫2-3分鐘，使蛋白質變性，再以12000 g、4°C離心15分鐘，取上層水層至另一ependorf，在加入600 μ l 70% DEPC-Alcohol後混勻，使RNA沉澱，取700 μ l 至RNeasy spin column(放在2 ml collection tube 上) 後離心15秒 (10000 rpm)，將下層的液體倒掉後，再將剩下的700 μ l 至RNeasy spin column 後離心15 秒 (10000 rpm)，將下層的液體倒掉，加入350 μ l RW1，離心15 秒 (10000 rpm) 後將下層的液體倒掉，加入10 μ l DNase I stock solution至70 μ l Buffer RDD(Qiagen supplied with RNase-free DNase set)至RNeasy spin column膜上，放置室溫15分鐘，再加入350 μ l RW1離心15 秒 (10000 rpm)，加入500 μ l RPE，離心15 秒 (10000 rpm)，將下層液體倒掉後，再加入一次RPE，離心2分鐘 (10000 rpm)，將column 放到空的2 ml collection tube 裡，離心1 分鐘 (13000rpm)，接著換到含有SUPERase-In(RNase inhibitor) 1.5 ml collection tube，加入30 μ l RNase-free water，於室溫下靜置1分鐘，離心1 分鐘(10000 rpm)，再

加入一次20 μ l RNase-free water，室溫下靜置1分鐘並離心1 分鐘 (10000 rpm) 後，即可將RNA 放到-80°C 冰箱中保存。取2 μ l 的RNA以Thermo Scientific NanoDrop 1000 Spectrophotometer測A260/A280的比值及RNA濃度，RNA溶液在260 nm下吸光值為1.0時濃度相當於40 μ g/ml，A260/A280的比值為1.8-2.0為佳。

十、RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR)--使用SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase Kit (Invitrogen)

資料來源：77

(一) 原理

RT-PCR (Reverse Transcriptase PCR，反轉錄酶PCR)，其原理是將一段待測的RNA序列經反轉錄酶的作用轉錄成cDNA，再利用PCR技術將基因片段以幾何級數倍增的方式增加到數十萬倍，所形成的PCR基因產物經一種叫 Ethidium bromide 的化學物質作用，利用其會與DNA嵌合，經紫外燈照射時會發出肉眼可見的螢光，即在電泳膠片上會呈現具有特定分子量的PCR基因片段的產物。

(二) 實驗步驟

Reaction set up：

Component	Volume
2x Reaction Mix	12.5 μ l
Template RNA (1 μ g)	X μ l
Sense primer (10 μ M)	0.5 μ l
Anti-sense primer (10 μ M)	0.5 μ l
SuperScript™ III RT/Platinum® Taq Mix	0.5 μ l
DEPC-water	to 25 μ l

Reaction protocol :

Temperature	Time	Cycle
cDNA synthesis		
55°C	30 min	1
Denaturation		
94°C	2 min	1
PCR amplification		
94°C	15 s	
55°C	40 s	40
68°C	45 s	
Final extension		
68°C	5 min	1
4°C	∞	

將 RNA、primer 與試劑混合後，放入PCR 專用之小管中，放入iCycler，設定上述之反應條件即可。反應完成後，每管加入6 倍之DNA loading dye，再以含有0.26%之EtBr 之1% Agarose 跑膠，並以Multimage™ Light Cabinet 分析影像並儲存。

The primer sequence and products size for PCR experiment

mRNA		Primer sequence	length (bp)
18S	Forward	5'-GGGAGCCTGAGAAACGGC-3'	262bp
	Reverse	5'-CCGCTCCCAAGATCCAACACTAC-3'	
HBP1	Forward	5'-ACTCCTGTGATGAGCACATGGA-3'	501bp
	Reverse	5'-AGCAGTGCCAAATGGTGGAT-3'	
PPAR- γ	Forward	5'-TTTTCAAGGGTGCCAGTTTC-3'	198 bp
	Reverse	5'-AATCCTTGGCCCTCTGAGAT-3'	
CEBP/ α	Forward	5'- GAACAGCAACGAGTACCGGGTA-3'	225 bp
	Reverse	5'- GCCATGGCCTTGACCAAGGAG-3'	
C/EBP β	Forward	5'- GCAAGAGCCGCGACAAG-3'	154bp
	Reverse	5'- GGCTCGGGCAGCTGCTT-3'	
C/EBP δ	Forward	5'- AAAGTGCAGGCTTGTGGACT-3'	87bp
	Reverse	5'- TTACTIONACTGCCCACCTGT-3'	
aP2	Forward	5'-AAGACAGCTCCTCCTCGAAGGTT-3'	183 bp
	Reverse	5'-GCGTAAATGGGGATTTGGTCACCA-3'	

十一、Quantitative -PCR(Quantitative Reverse Transcription-PCR)使用 Taq Man[®] One-Step RT-PCR Master Mix Reagents (Roche)

資料來源：78

(一) 原理

Quantitative RT-PCR(即時螢光定量 PCR) 其原理為在 PCR 反應系統中，加入螢光基團，利用螢光信號積累即時監測整個 PCR 過程，最後以標準曲線對未知的樣品進行定量分析的方法。Ct 值的含義是 C 為 Cycle，t 代表 threshold，每個

反應管內的螢光信號到達設定的閾值時所經歷的 cycle 數，因此，即時螢光定量 PCR 是一種採用外標準曲線定量的方法。

(二) 實驗步驟

Reaction set up :

Component	Volume
TaqMan [®] 2X Universal PCR Master Mix	20 μ l
40X MultiScribe [™] and RNase Inhibitor Mix	1 μ l
25X primer & probe	1.6 μ l
RNA (60 ng)	X μ l
DEPC-H ₂ O	to 40 μ l

將 RNA、primer 與試劑混合後，放入 real time PCR 96 well 專用之小管中，放入 Applied Biosystems PRISM[®] 7900HT，上機，設定所需之反應條件即可。

十二、蛋白質萃取

(一) 原理

利用細胞刮除法使細胞破裂並使用 RIPA 裂解液讓細胞快速裂解，使蛋白溶解變性並抑制蛋白酶的活性使蛋白穩定，再利用超高速離心，取上清液蒐集總蛋白。

(二) 實驗步驟

藥品配置

RIPA buffer :

Component	Concentration
NaCl	150mM
Tris buffer	10mM
EDTA	5mM
SDS	0.1%
Triton X-100	1%
Deoxycholate	1%

細胞以 PBS 清洗過後，加入適量的 RIPA buffer (含 1 : 100 protease inhibitors cocktail 與 phosphatase inhibitors cocktail)，以細胞刮杓將細胞刮下，放至 eppendorf，置於冰上 30 分鐘，將細胞打破，以 11800 rpm 轉速離心 30 分鐘，取上清液，放到 -80°C 冰箱中保存備用。

十三、蛋白質定量

資料來源：79

(一) 原理

蛋白質染劑可與蛋白質結合形成藍色複合物，並可於 595nm 測得此複合物之吸光值。藉由 BSA 標準品所形成的定量標準曲線，即可換算出待測樣品的蛋白質濃度。

(二) 實驗步驟

藥品配置

Standard :

Concentration	BSA	二次水	protein assay dye(BIO-RAD)
0 $\mu\text{g/ml}$	0 μl	800 μl	200 μl
2 $\mu\text{g/ml}$	20 μl	780 μl	200 μl
4 $\mu\text{g/ml}$	40 μl	760 μl	200 μl
6 $\mu\text{g/ml}$	60 μl	740 μl	200 μl
8 $\mu\text{g/ml}$	80 μl	720 μl	200 μl
10 $\mu\text{g/ml}$	100 μl	700 μl	200 μl
total volume			1 ml

標準品 BSA 以上述濃度作標準曲線，加入 200 μl protein assay dye (BIO-RAD)，以達總體積 1 ml 震盪均勻靜置 5 分鐘，以 595 nm 波長測其吸光值以 595 nm 的吸光值，作成標準線，分析最佳標準迴歸直線，求出此線的方程式(此直線的迴歸分析結果之 $R^2 > 0.998$ 時，此直線方程式的值使可相信)。將樣品取 1 μl 的待測蛋白質溶液加入 799 μl 二次水，再加入 200 μl protein assay dye (BIO-RAD)，震盪均勻靜置 5 分鐘，測其吸光值再以樣品所測得 OD 值之結果，帶入方程式即可求得蛋白質濃度。

十四、Western blot

(一) 原理

西方墨點法是利用抗體和抗原專一性地結合，去標定電泳膠上的特定蛋白質，而探針是一級抗體(Primary antibody)，顯色用標記的二級抗體(Secondary antibody)。SDS 是介面活性劑，可使蛋白質變性，在分子表面均勻佈上一層負電荷，利用由稀到濃的膠體配合梯度電泳，分離蛋白質，分子量越小的就跑的越

下面，經過 SDS-PAGE 分離的蛋白質樣品，轉移到固相載體(PVDF)，固相載體以非共價鍵形式吸附蛋白質，保持電泳分離的多勝類型及生物活性不變，以固相載體上的蛋白質作為抗原，與對應的一級抗體發生免疫反應，再與酶或同位素標記的二級抗體反應，最後經過顯色或顯影檢測電泳分離的蛋白成分表現。

(二) 實驗步驟

藥品配置

4X Lower Tris :

Component	Concentration
Tris-base (1.5M)	36.34 g
SDS (0.4%)	0.8 g
ddH ₂ O	X ml
pH	8.8
total volume	200 ml

4X Upper Tris :

Component	Concentration
Tris-base (0.5 M)	12.11 g
SDS(0.4 %)	0.8 g
ddH ₂ O	X ml
pH	6.8
total volume	200 ml

APS (0.1g/ ml)

Component	Concentration
Ammonium persulfate (10 %)	1 g
ddH ₂ O	X ml
total volume	10 ml

Running and stacking

Stock solutions	8%Resolving gel	10%Resolving gel	4%stacking gel
40%Acrylamide	1.6 ml	2 ml	0.39 ml
Upper Tris(4X)			1 ml
Lower Tris(4X)	2.00 ml	2 ml	
Water	4.4 ml	4 ml	2.6 ml
APS (10%)	40 μ l	40 μ l	40 μ l
TEMED	4 μ l	4 μ l	4 μ l
total volume			8.044 ml

跑膠(SDS-PAGE)

10X Running buffer :

Component	Concentration
Tris-base (0.25 M)	30.3 g
Glycine (1.9 M)	144 g
SDS (1 %)	10 g
ddH ₂ O	X ml
pH	8.6
total volume	1000 ml

轉印

10X transfer buffer :

Component	Concentration
Tris-base (0.25 M)	30 g
Glycine (1.9 M)	144 g
ddH ₂ O	X ml
pH	8.3
total volume	1000 ml

免疫染色

10X Tris-base buffer saline :

Component	Concentration
Tris-base (0.2 M)	0.2 M
Glycine (1.4 M)	80 g
ddH ₂ O	X ml
pH	7.6
total volume	1000 ml

TBS/T :

Component	Concentration
10X TBS	100 ml
Tween 20 (0.1%)	1ml
ddH ₂ O	900 ml
total volume	1000ml

實驗步驟

膠體的配製依蛋白質分子量的大小而決定配製成 8、10 % 的 SDS-PAGE。待鑄好的 SDS-PAGE 組合放置電泳槽中，倒入適量的 1× running buffer。將製備好的蛋白樣品以及標準品小心加入於固定於垂直電泳槽內的 stacking gel 的 well 內，以避免 sample 溢出，先以 90 伏特電壓跑 4 % stacking gel，20 分鐘後，調整電壓至 100 - 120 伏特，約跑 2 - 3 小時，即完成蛋白分離。

轉印時，先將 PVDF 膜與 3M 濾紙裁剪與膠片大小相同。將轉漬夾打開後，黑色面朝下，依序放上海棉墊、濾紙、SDS-PAGE gel、PVDF 膜 (先用 100% 甲醇濕潤 2 分鐘、再放於 transfer buffer 中浸潤)、濾紙，最後放上一片海棉墊，確定其緊密貼合後，將轉印夾慢慢地合起來，放到轉印槽中，倒入 1× transfer buffer，以 400 mA 電流轉印 1 - 2 小時，使蛋白質轉印到 PVDF 膜上。

轉印完成的 PVDF 膜以 5% 脫脂牛奶 (以 TBS/T 配製) 搖晃 1 小時進行 blocking 後，以 TBS/T 清洗 5 分鐘 3 次後，加入適當稀釋倍數之一級抗體反應 overnight。將一級抗體以 TBS/T 清洗 5 分鐘 3 次後，依不同的一級抗體，加入特異作用的二級抗體反應 1 小時，再以 TBS/T 清洗 5 分鐘 3 次，以感光試劑 Western lightening chemiluminescence reagent plus 進行呈色反應，利用 LAS-4000 mini FUJIFILM 冷光影像系統分析。

十五、流式細胞儀

資料來源：28

(一) 原理

細胞週期大致可分為四個不同時期，G1 phase、S phase、G2 phase 和 M phase。每個時期的 DNA 含量會因為功能作用不同而有所差異，一般來說，G2 期為 G1 期的兩倍，則 S 期則基於兩者之間。因此可以利用細胞中的 DNA 含量來決定週期，利用螢光物質來標示 DNA，之後再利用 FACS (fluorescence-activator cell sorter)

進行 DNA 含量分析。

(二) 實驗步驟

試劑配置

Component	Stock solution	Final solution	volume
Propidium iodide	100 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	250 μl
TritonX-100	10 %	1 %	50 μl
RNase A	100 mg/ml	100 $\mu\text{g/ml}$	0.5 μl
PBS	-	-	199.5 μl
total volume			500 μl

固定細胞

移去培養基，以 PBS 細胞清洗一次，Trypsin 打下來，加入 5 ml 細胞培養液將細胞收集在 15 ml 離心管中離心，1500 rpm，10min，倒掉上清液，將細胞完全彈散後加入 10ml PBS 清洗，離心 1500rpm，10min，倒掉上清液，將細胞完全彈散，加入 3ml 冰的 90% Methanol，進行細胞固定(以 Shake 3 速度震盪，將酒精緩慢滴入)，固定完成後放置-20°C 冰箱。

流式細胞儀分析

隔天，將 sample 從冰箱取出後離心，1500rpm，10min，去除上清液，不用彈散(因為用酒精固定後細胞很脆弱)，加入 10ml PBS 清洗離心(延管壁緩緩加入)，1500 rpm，10min，去除上清液，將細胞完全彈散，在每個離心管中加入 300~500 μl 的 PI 染劑(視細胞數目增減)，用 1ml pipette 在 15ml 離心管中抽吸數次，將細胞用絹布製的篩子過濾到 FAS 管中，避光至於冰上反應 30min，以流式細胞儀進行

樣品分析(每秒不超過 300 顆細胞，每個數據收集 10000 顆細胞)，數據以 Modfit LT 軟體進行分析。

十六、統計分析

實驗結果均以平均值 \pm 標準差 (Mean \pm SD) 表示，利用 Student's t test 或 Duncan's multiple range test 比較組間差異。所有數據通過常態分佈檢定，否則轉型為對數值 (Log)。統計分析以 SAS 套裝軟體 (version 9.0, SAS institute, Cary, NC) 分析，統計比較以 $p < 0.05$ 為具有顯著之差異。



第四章、結果

一、HBP1 在脂肪細胞分化過程的表現

(一) 脂肪細胞分化後期 HBP1 表現明顯增加

典型的 *in vitro* 脂肪分化模式中，前脂肪細胞株如 3T3-L1、Ob1771、3T3-F422A 和初代脂肪細胞為常用的細胞，其中，3T3-L1 在 1974 年由 Green 和 Kehinde 由 Swiss mouse embryo cloning 出來，具高度分化為成熟脂肪細胞潛力的前脂肪細胞株，當以 DEX/MIX 協同 Insulin 誘導時，3T3-L1 將分化為成熟脂肪細胞，也是我們此次研究所選用的實驗細胞模式。

3T3-L1 細胞分化的特徵包括：1) 細胞型態由紡錘型變為球形，2) 細胞內 TG 的堆積，油紅染色可染出脂肪細胞內的油滴、3) 脂肪細胞分化特定基因的表現增加，例如 PPAR γ 、C/EBP α 和 aP2 等。這些改變將是我們用來檢測脂肪細胞分化重要的指標。

為了觀察 HBP1 在脂肪細胞分化過程中所扮演的角色，首先，我們檢視 HBP1 的表現是否隨著分化過程的進行而有所改變。當我們依照標準分化流程以 MDI 刺激 3T3-L1 前脂肪細胞後、於分化第 0、2、4、6 和 8 天分別收集其蛋白和 total RNA，並以 western blot 和 RT-PCR 觀察 HBP1 變化。圖 4-1 和 4-2 指出，在 3T3-L1 前脂肪細胞分化為成熟脂肪細胞的 8 天過程中，HBP1 蛋白的表現在分化初期 2 天無明顯改變，但是，在第 4 到第 6 天，HBP1 的表現明顯增加。結果顯示，HBP1 在分化過程前期的 MCE 期無增加現象，一直到分化後期，HBP1 的表現才增加，表示著，HBP1 在脂肪分化過程的不同階段可能有不同的功能。

(二) Insulin 誘導 HBP1 的表現

由於 HBP1 在分化第四天的表現量增加，加上之前的研究發現，在成熟的大鼠脂肪細胞，insulin 增加了 HBP1mRNA 的表現，因此，我們假設，可能是 insulin 在分化後期誘導了 HBP1 表現。於是，我們在 3T3-L1 post-confluence 時，給予 DEX/MIX 二天後，分別給予 5 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 、20 $\mu\text{g/ml}$ 、30 $\mu\text{g/ml}$ 和 40 $\mu\text{g/ml}$ 不同濃度的 insulin 48 小時後，以 Western blot 分析 HBP1 的蛋白表現量。結果顯示，insulin 隨著濃度的增加，HBP1 蛋白的表現也隨之增加 (圖 4-3)。此結果表示，insulin 具活化 HBP1 的能力，也可能是 HBP1 於 3T3-L1 分化後期增加的主要原因。

由於 insulin 的給予增加了 HBP1 蛋白的表現，我們推測，insulin 可能藉由活化 HBP1 的 promoter 增加 HBP1 的表現。因此，我們運用冷光酵素報導基因分析法(Luciferase Gene Reporter Assay) 檢視其可能性，首先，我們轉染 0.4 μg 連接 HBP1 -2kb promoter 的 luciferase 基因的載體和 0.2 μg RSV- β -gal (internal control) 質體至 24-well 的 HEK-293T 細胞，24 小時後，加入 0~20 $\mu\text{g/ml}$ 不同濃度 insulin，24 小時後，收集 cell lysate，以 luminometer 分析 luciferase 和 β -gal 活性，圖 4-4 結果顯示，insulin 明顯誘導 HBP1 -2kb promoter 的活性。證實了我們的假設；insulin 透過活化 HBP1 啟動子而增加 HBP1 蛋白的表現量。

二、HBP1 的表現量影響脂肪細胞分化過程

(一) HBP1 reduction 造成脂肪細胞分化不完全

既然 HBP1 的含量隨著脂肪細胞分化的進行而有所改變，表示，HBP1 具調控脂肪分化的潛在功能。為了驗證此假設，我們運用 RNA 干擾技術降低 3T3-L1 細胞內 HBP1 的含量，觀察脂質生合成是否受到影響。首先，我們利用 western blot 和 RT-PCR 確認 HBP1 專一的 siRNA 的確降解 3T3-L1 細胞中 HBP1 蛋白質和 mRNA 的表現(圖 4-5)。接著，我們分別給予 DEX/MIX 協同 Insulin 誘導控制組和 HBP1 siRNA 3T3-L1 細胞分化為成熟脂肪細胞，於分化第八天，分別以 RT-PCR 分析 PPAR γ 、C/EBP α 和 aP2 mRNA 的表現、real time PCR 分析 leptin mRNA 含量和油紅染色觀察細胞內油滴的生成。圖 4-6 的結果為顯微鏡下觀察脂肪細胞型態的改變情形；HBP1 siRNA 組的細胞在分化實驗八天後，圓形型態細胞明顯低於控制組，同樣地，圓形細胞內油滴的油紅染色，HBP1 siRNA 細胞明顯低於控制組。當我們進一步比較成熟脂質生合成的指標基因 PPAR γ 、C/EBP α 和 aP2 的表現時，其 mRNA 的含量，HBP1 siRNA 組明顯低於控制組 (圖 4-7)，leptin mRNA 的含量也具有相同的結果(圖 4-8)。此結果顯示，HBP1 表現量減少導致了脂肪分化不完全，表示，HBP1 具調控脂質生合成的生理功能，但其調控機制需進一步探討。

(二) 於 MCE 期，HBP1 reduction 促進細胞週期進行和增加 CEBP/ β 和 CEBP/ δ 轉錄因子的表現

3T3-L1 脂肪細胞分化過程，依生理現象的不同，可簡單分為細胞繼續增生的 MCE 期和細胞型態改變的分化後期。由以上結果得知，HBP1 的含量在這兩期是不一樣的，表示，HBP1 在分化不同階段可能有不同的生理功能。雖然，我們以 RNA 干擾技術降低細胞內 HBP1 的含量後，造成脂肪細胞分化的不完全，但此結果並未解答 HBP1 在分化過程中的確實角色。為了進一步了解 HBP1 可能的階段性生物功能，我們分別觀察它的表現量在 MCE 和分化後期的影響。

首先，我們觀察 HBP1 在 MCE 期的角色。有關 HBP1 生物功能探討的文獻指出，HBP1 的主要生理角色是負責細胞週期 G1 期的調控；過多的 HBP1 表現導致乳癌細胞週期停滯於 G1 期，而且，我們也發現，HBP1 的含量於 MCE 期(0 到 2 天)並無增加的現象，所以，我們假設，HBP1 具調控 MCE 期細胞增生的功能，換言之，HBP1 的表現量降低將使 MCE 期的細胞增生速度變快，伴隨著相關基因的提早出現。結果如預期地，當我們給予 HBP1 siRNA 的 3T3-L1 細胞 MDI 分化劑 4 小時後，以流式細胞儀偵測細胞週期的進行，發現，HBP1 siRNA 組相較於控制組，明顯出現較多的 G2/M 期細胞分佈(圖 4-9)，表示 HBP1 knockdown 造成較快的細胞週期進行，G2/M 期的較早出現。同樣地，HBP1 siRNA 也造成較高的 MCE 期相關分化基因 C/EBP β 和 C/EBP δ 表現(圖 4-10)。由此實驗得知，HBP1 在 MCE 期的生理功能，如一般地，調控細胞週期和細胞增生。值得探討的是，較快的 MCE 期細胞增生，應該有助 3T3-L1 脂肪細胞分化的完成，但是，HBP1 knockdown 雖然出現 MCE 期細胞週期的促進，卻導致最終分化的不完全。為追尋答案，我們進而探究 HBP1 在分化後期的角色。

(三) 於分化後期，HBP1 可能是 PPAR γ 的調控標地

PPAR γ 是分化後期重要的調節轉錄因子，通常在 3T3-L1 分化的第 4 天，表現明顯增加，這與我們觀察到的 HBP1 表現相似(圖 4-1 和 4-2)，因此，我們懷疑，PPAR γ 和 HBP1 之間可能出現相互調節的功能。當我們進行 CHIP-Mapper (<http://mapper.chip.org/>) 搜尋時發現，HBP1 啟動子上 -274~-258 和 -688~-660 位置有可能的 PPAR- γ 連結處 (圖 4-11)。是故，我們假設，HBP1 可能是 PPAR γ 調節脂質生合成的下游調控基因。實驗設計，我們選擇 PPAR γ 的活性促進劑和抑制劑，藉著對 PPAR γ 的活性調控，觀察是否影響 HBP1 的基因表現。首先，我們選擇 PPAR γ 的活性促進劑 TZD，於 HEK293T 細胞中，利用報導基因分析法觀察 TZD 對 HBP1 -2kb promoter 的影響。我們以 lipofectamine™ 2000 分別轉染 0.4 μ g HBP1-2kb promoter 和 0.2 μ g RSV- β -gal 到每一 24-well 的 293T 細胞，24 小時後，給予 5 至 30 μ M 的 TZD 24 小時，以 luminometer 分析 Luciferase 的活性，結果顯示，30 μ M TZD 具誘導 HBP1 -2kb promoter 的活性(圖 4-12)，另外，我們亦使用 PPAR γ 的活性抑制劑，此結果顯示，隨著 GW9662 濃度的增加顯著下降(圖 4-13)。接著，我們於 MDI 刺激 3T3-L1 細胞分化後第四天後，給予 5 和 30 μ M 的 GW9662 48 小時，以 RT-PCR 檢測 HBP1 mRNA 表現量，同樣地，結果顯示，GW9662 明顯減低 HBP1 mRNA 的表現 (圖 4-14)。此結果表示，當 PPAR γ 的活性被 GW9662 抑制時，HBP1 的啟動子活性受到抑制，造成 HBP1 mRNA 的表現量下降。這也間接證明了，HBP1 可能是 PPAR γ 的下游調控基因。這也提供了我們間接的解釋，當 HBP1 siRNA 降解 HBP1 的情況下，分化後期 PPAR γ 無法有效促進 HBP1 的活化，導致 HBP1 siRNA 造成 3T3-L1 分化的不完全。

三、Quercetin 促進分化初期 HBP1 的表現，抑制 MCE 期，進而抑制脂肪細胞分化

(一) Quercetin 抑制 3T3-L1 脂肪細胞分化

尋找有效抑制脂質生合成的自然食物成分，一直是肥胖研究與臨床防治上不變的重要課題。其中，最近研究發現，quercetin 能抑制 3T3-L1 脂肪細胞分化和促進成熟脂肪細胞的凋亡，顯示，quercetin 會是一個臨床上治療肥胖和相關代謝症候群的成分，為了更深入了解其作用機制，我們探討 HBP1 是否參與 quercetin 抑制脂肪細胞分化的作用。

首先，我們確認 quercetin 抑制 3T3-L1 脂肪細胞的分化。分化程序開始，我們將不同濃度的 quercetin 與 MDI 分化劑一同給予長滿兩天後的 3T3-L1 細胞，培養兩天後，更換培養液並重新加入 quercetin，於分化第八天後，進行油紅染色觀察 quercetin 是否抑制 3T3-L1 脂肪滴生成。由結果可得知 (圖 4-15)，在加入 10~100 μ M Quercetin 後，顯微鏡下觀察到細胞型態為細長或多角狀，脂肪油滴變少，效果則以高濃度 100 μ M quercetin 最為明顯。顯示，quercetin 確實降低脂肪細胞分化程度。已知脂肪細胞在分化過程中，數種的關鍵轉錄因子參與調控，於是，我們進一步檢測此相關因子的表現，以確證 quercetin 所抑制的脂肪分化。同樣地，3T3-L1 細胞以 10 至 100 μ M quercetin 與分化劑同時加入培養後，以 DMSO 做為對照組，萃取分化第八天細胞之 total RNA，利用 RT-PCR 檢測 PPAR γ 和 aP2 mRNA 的表現，結果顯示，quercetin 抑制轉錄因子 PPAR γ 和 aP2 mRNA 的表現呈現劑量效應；隨著 quercetin 濃度的增加，PPAR γ 和 aP2 mRNA 表現量隨之下降(圖 4-16)。因此，我們確認 quercetin 抑制了 3T3-L1 脂肪細胞的分化。

(二) Quercetin 造成 3T3-L1 MCE 期細胞週期停滯

最近的研究指出， H_2O_2 促使 3T3-L1 MCE 期細胞週期的進行，進而促進脂質合成，而當給予 resveratrol 和 genistein 則導致 MCE 期細胞週期停滯和分化不完全，因此，我們想觀察 quercetin 是否造成 3T3-L1 MCE 期細胞週期停滯，進而抑制脂肪細胞分化。首先，我們觀察 quercetin 影響 MCE 期細胞生長的情形，如上述相同之實驗程序，在 quercetin 和分化劑處理後兩天，即 MCE 期結束後，計算細胞數以比較 quercetin 是否影響 MCE 期細胞的生長，結果如圖 4-17 所示，quercetin 顯著減少 MCE 期 3T3-L1 的細胞數目。接著，我們進一步探究 quercetin 造成的 MCE 細胞數目減少，是透過對細胞生長的抑制，抑或是細胞凋亡的促進。於是，我們以 PI 染色配合流式細胞儀分析 MCE 期的細胞週期，圖 4-18 結果明顯指出， $50 \mu M$ quercetin 促使細胞週期停滯於 S 期，而 $100 \mu M$ quercetin 則明顯造成 G1 期的相對細胞分佈數目增加，伴隨著 G2/M 期相對細胞數目的減少，表示著，quercetin 導致 MCE 期細胞週期停滯於 G1 期。同時，quercetin 並未造成 MCE 期細胞的凋亡（流式細胞儀未偵測到凋亡細胞）。當進一步確認 quercetin 造成 MCE 期不完全時，我們檢測此期的相關活化因子 C/EBP β 和 C/EBP δ 的表現，結果證實，quercetin 的確明顯造成 C/EBP β 和 C/EBP δ mRNA 的表現下降(圖 4-19)。可見，quercetin 造成了 MCE 期細胞生長停滯，細胞增生不完全(細胞數目減少)，而這可能是 quercetin 抑制脂質合成重要因素之一。

(三) Quercetin 促進分化初期 HBP1 的活化

先前 HBP1 調控 MCE 期的實驗結果推測，假若，HBP1 的表現在分化初期增加，將可能造成細胞週期進行的停滯，進而影響分化的完整。加上，quercetin 也造成 MCE 期細胞生長停滯於 G1，我們假設，quercetin 具活化分化初期 HBP1 的功能。首先，我們檢測 quercetin 是否增加 3T3-L1 前脂肪細胞 HBP1 的表現，給予 3T3-L1 前脂肪細胞 10 至 200 μ M quercetin 48 小時後，結果發現，quercetin 隨著劑量的增加顯著誘導 HBP1 蛋白質的表現 (圖 4-20)，我們緊接著試驗，quercetin 增加 HBP1 的表現是否透過對 HBP1 啟動子的活化，在轉染 0.4 μ g HBP1 -2kb promoter 和 0.2 μ g RSV- β -gal (internal control) 質體至 HEK-293T 細胞 24 小時後，給予不同濃度的 quercetin 24 小時，以 luminometer 分析 Luciferase 活性，圖 4-21 結果顯示，quercetin 隨著劑量的增加顯著誘導 HBP1 -2kb promoter 的活性。表示，quercetin 透過對 HBP1 啟動子的活化而增加其表現。

最後，我們觀察 MCE 期，當 quercetin 造成細胞週期停滯時，是否伴隨著 HBP1 的表現增加。顯然地，如圖 4-22 所示，100 μ M quercetin 增加了 3T3-L1 MCE 期(0 到 2 天) HBP1 mRNA 的表現。表示，HBP1 可能是 quercetin 造成 MCE 期細胞週期停滯的調控標地。

綜合以上結果顯示，quercetin 活化 MCE 期 HBP1 mRNA 表現，並促使 MCE 期細胞週期生長停滯於 G1，伴隨著轉錄因子 C/EBP β 和 C/EBP δ mRNA 的表現降低，而抑制脂肪細胞分化。

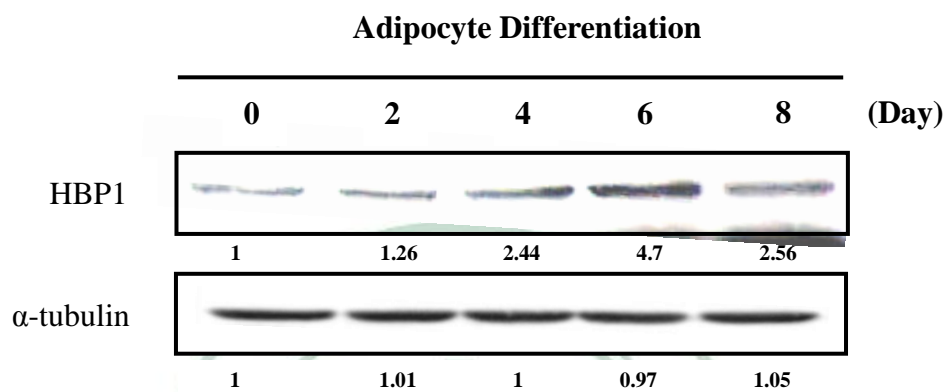


圖 4-1 HBP1 蛋白質在脂肪分化過程的表現。培養 3T3-L1 細胞，於 post-confluence 加入分化劑，以西方墨點法分析不同分化天數 HBP1 蛋白質的表現，實驗至少重複二次。

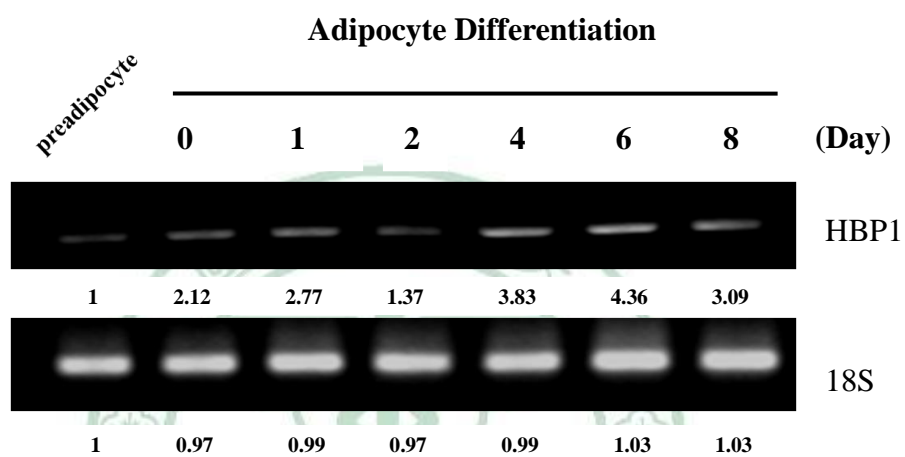


圖 4-2 HBP1 mRNA 在脂肪分化過程的表現。培養 3T3-L1 細胞，於 post-confluence 加入分化劑，以 RT-PCR 分析不同分化天數 HBP1mRNA 的表現，n=3。

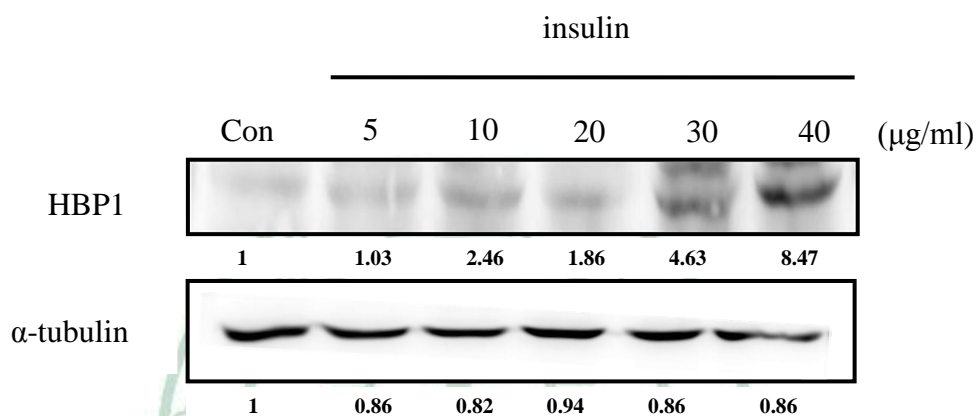


圖 4-3 Insulin 活化 HBP1 蛋白質的表現。在分化的 MCE 期加入 DEX/MIX 48 小時後，給予 5 至 40 $\mu\text{g/ml}$ 不同濃度的 insulin 48 小時後，利用西方墨點法分析 HBP1 蛋白質的表現，實驗至少重複二次。

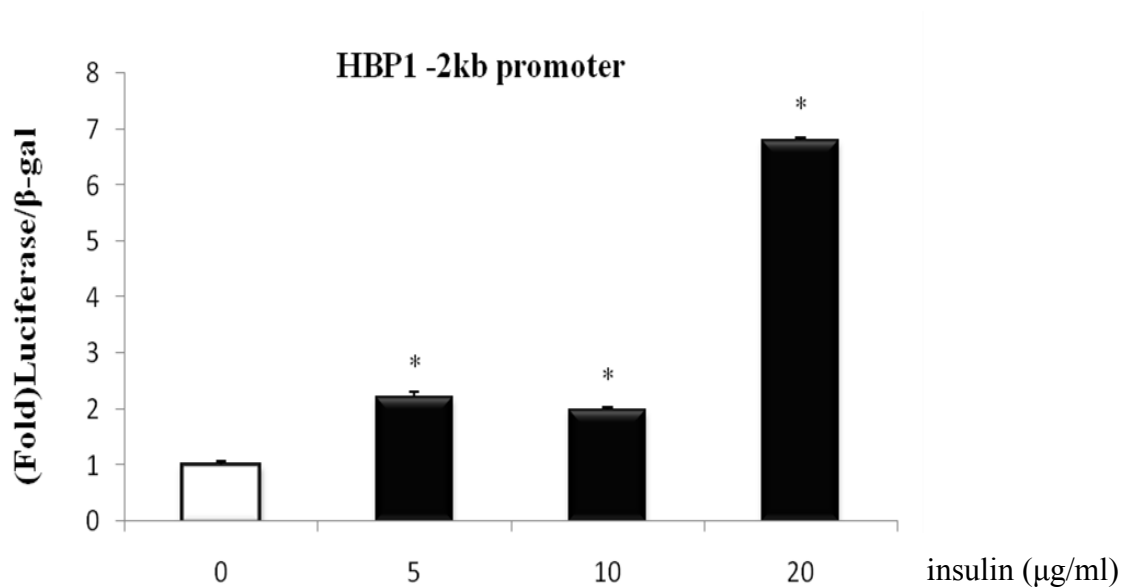


圖 4-4 Insulin 誘發 HBP1-2kb promoter 的活性。在 24 well 293T 細胞中，利用報導基因分析法觀察 insulin 對 HBP1 -2kb promoter 的影響，以 lipofectamineTM 2000 分別轉染 0.4 μg HBP1-2kb promoter 及 0.2 μg RSV-β-gal，轉染 24 小時後，給予 5 至 20 μg/ml 的 insulin 24 小時後，以 luminometer 分析 Luciferase 的活性。數據結果以 mean ± SD 值表示，* $p < 0.05$ v.s. control，實驗至少重複二次。

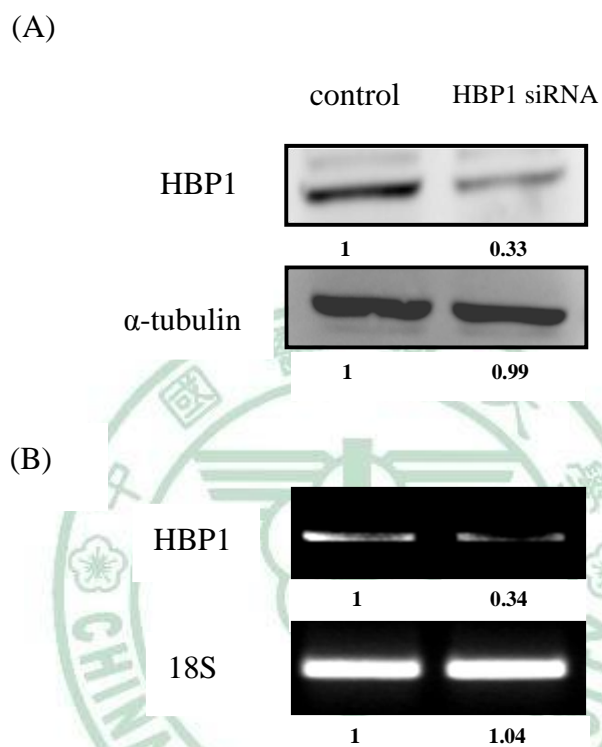


圖 4-5 HBP1 siRNA 影響 3T3-L1 細胞中 HBP1 蛋白質(A)和 mRNA(B)的表現量。

利用 RNA 干擾術將細胞中之 HBP1 knockdown 之後，以 western blot 和 RT-PCR 來觀察蛋白質和 mRNA 的表現，以空的載體轉染之細胞當作控制組，

α -tubulin、18S 為 internal control，n=4。

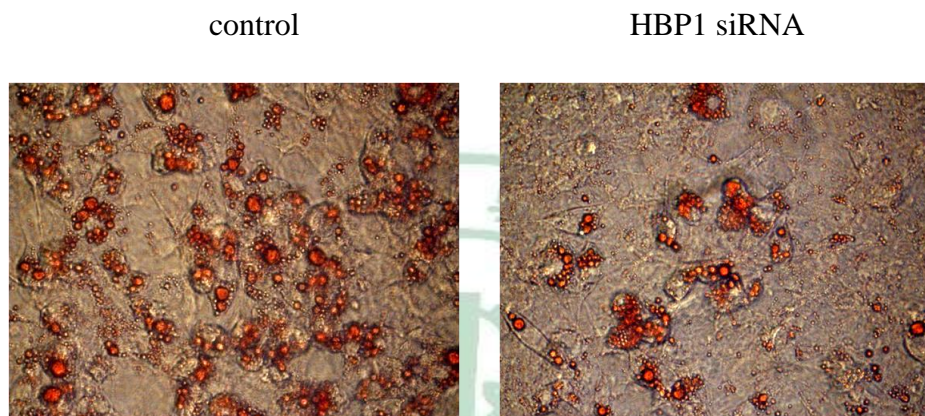


圖 4-6 HBP1 siRNA 對脂肪細胞分化之影響。給予 DEX/MIX 協同 insulin 誘導控制組和 HBP1 knockdown 3T3-L1 細胞分化為成熟脂肪細胞，分化八天後，以油紅染色觀察細胞內脂肪滴生成的現象。放大倍率 400X。

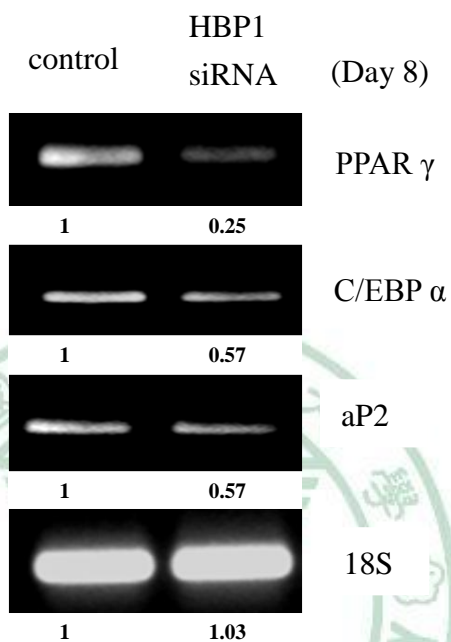


圖 4-7 HBP1 siRNA 影響脂肪分化相關因子的表現。給予 DEX/MIX 協同 insulin 誘導控制組和 HBP1 knockdown 3T3-L1 細胞分化為成熟脂肪細胞，以 RT-PCR 分析 PPAR γ 、C/EBP α 和 aP2 mRNA 的表現，實驗至少重複二次。

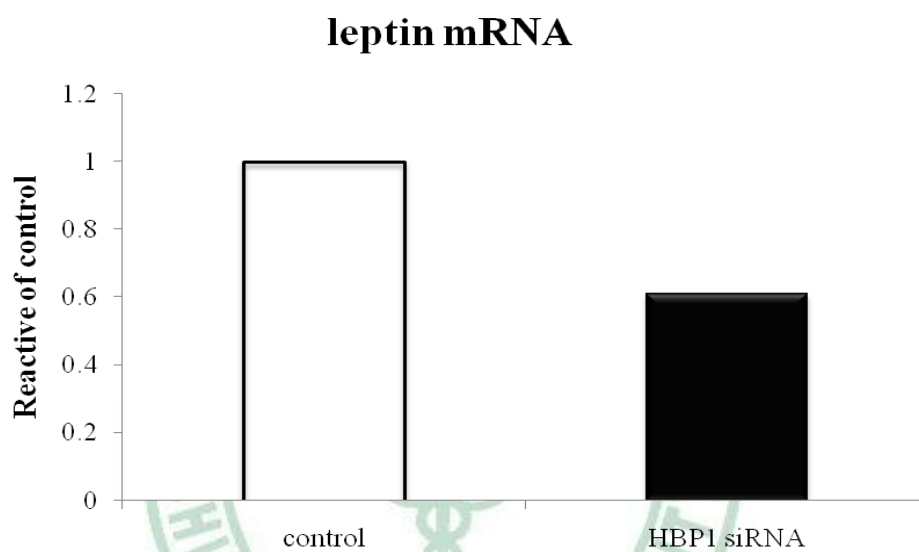


圖 4-8 HBP1 siRNA 對脂肪細胞 leptin 表現量之影響。以 DEX/MIX 協同 insulin 誘導控制組和 HBP1 knockdown 3T3-L1 細胞分化為成熟脂肪細胞後，以 real time-PCR 分析 leptin mRNA 的含量，實驗至少重複二次。

Cell cycle progression during MCE
(4 hour after MDI treatment)

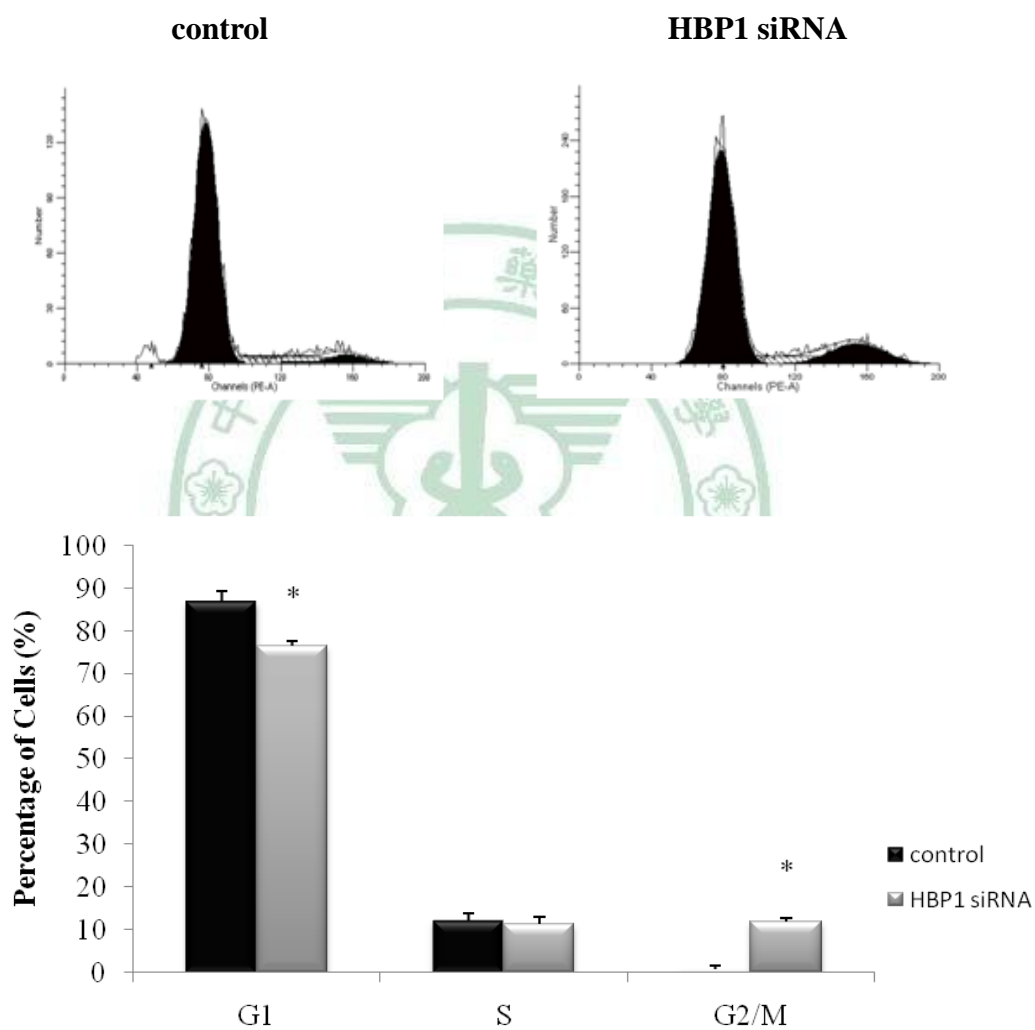


圖 4-9 HBP1siRNA 影響 MCE 期細胞週期的進行。以 PI 染色配合流式細胞儀偵測 3T3-L1 控制組和 HBP1 knockdown MCE 期 4 小時細胞週期分佈情形。數據結果以 mean \pm SD 值表示，n=3，* p <0.05 v.s. control。

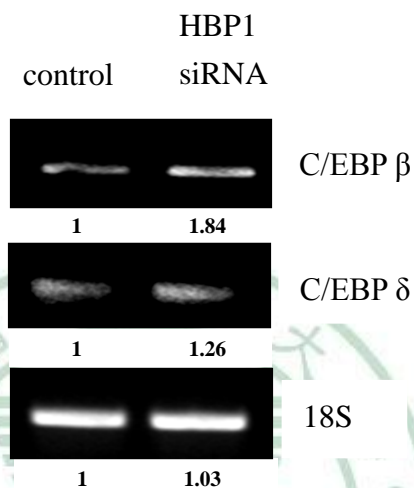


圖 4-10 HBP1 siRNA 影響 MCE 期 C/EBP β 轉錄因子 mRNA 的表現。以 RNA 干擾技術將 3T3-L1 細胞中之 HBP1 knockdown 之後，利用 RT-PCR 觀察在 HBP1 表現降低與控制組細胞中 C/EBP β 和 C/EBP δ 轉錄因子的表現，實驗至少重複二次。

。

2 putative PPAR γ binding sites

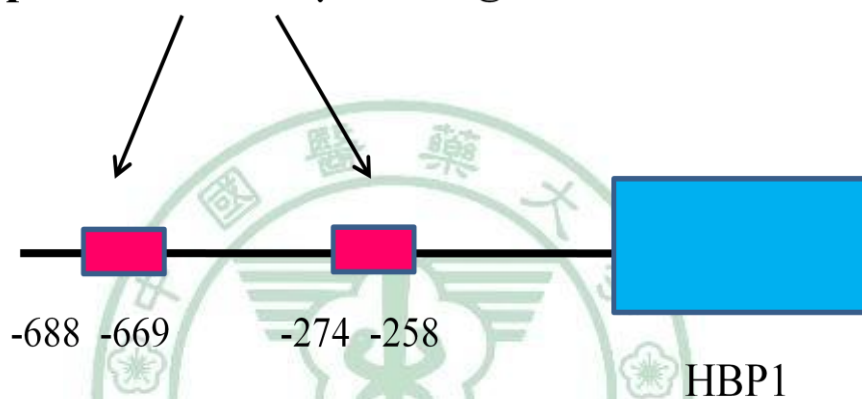


圖 4-11 HBP1 的啟動子上兩個可能的 PPAR γ 連結位點。CHIP-Mapper 搜尋發現，HBP1 啟動子上 -274~-258 和 -688~-660，有可能之 PPAR- γ 連結處。

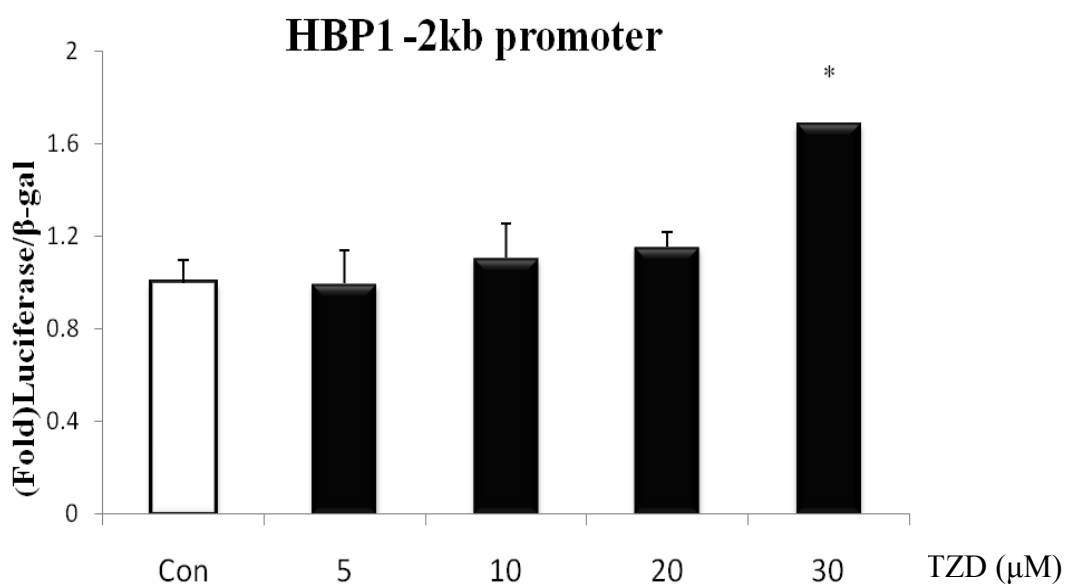


圖 4-12 PPAR γ 促進劑 TZD 對 HBP1-2kb promoter 活性的影響。在 24 well 293T 細胞中，利用報導基因分析法觀察對 HBP1 -2kb promoter 的影響，以 lipofectamineTM 2000 分別轉染 0.4 μ g HBP1-2kb promoter 及 0.2 μ g RSV- β -gal，轉染 24 小時後，給予 5 至 30 μ M 的 TZD 24 小時後，以 luminometer 分析 Luciferase 的活性。數據結果以 mean \pm SD 值表示，n=3，* p <0.05 v.s. control。

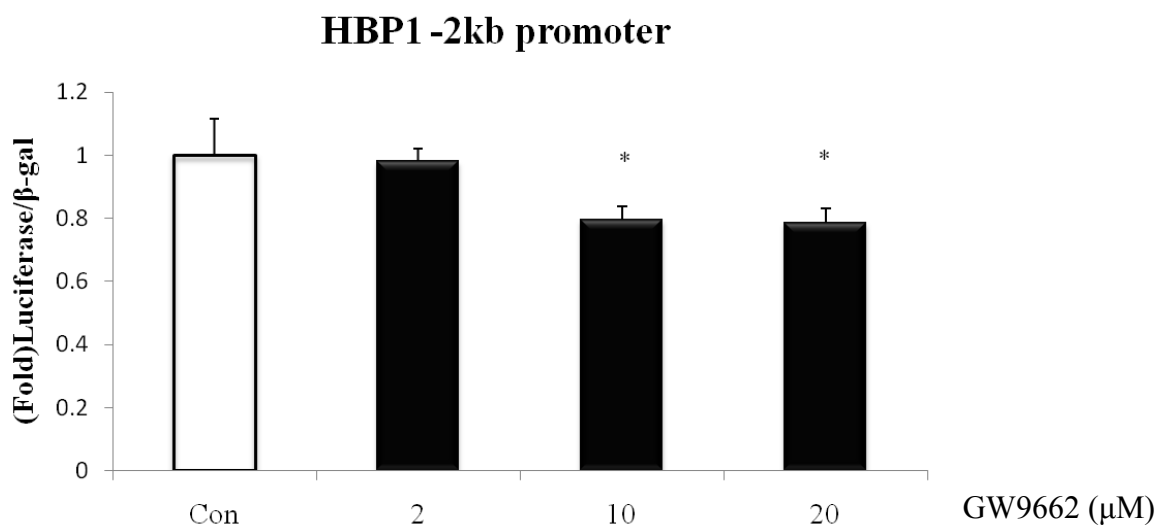


圖 4-13 PPAR γ 抑制劑 GW9662 對 HBP1-2kb promoter 活性的影響。在 24 well 293T 細胞中，利用報導基因分析法觀察 GW9662 對 HBP1 -2kb promoter 的影響，以 lipofectamineTM 2000 分別轉染 0.4 μ g HBP1-2kb promoter 及 0.2 μ g RSV- β -gal，轉染 24 小時後，給予 5 至 20 μ M 的 GW9662 24 小時後，以 luminometer 分析 Luciferase 的活性。數據結果以 mean \pm SD 值表示，n=3，* (p 為 0.059) v.s.control。

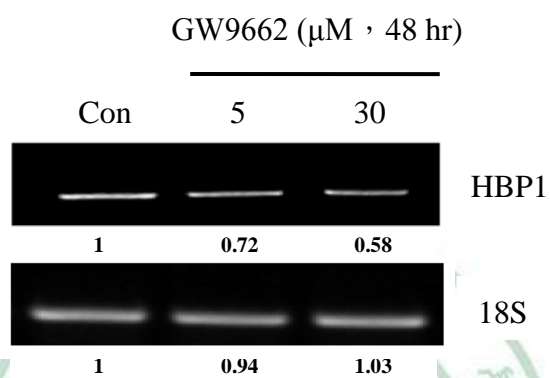


圖 4-14 PPAR γ 抑制劑 GW9662 對 HBP1 mRNA 表現之影響。以 DEX/MIX 協同 insulin 處理 3T3-L1 細胞，於分化天數第四天給予 5 和 30 μM GW9662 48 小時，觀察 HBP1 mRNA 的表現，實驗至少重複二次。

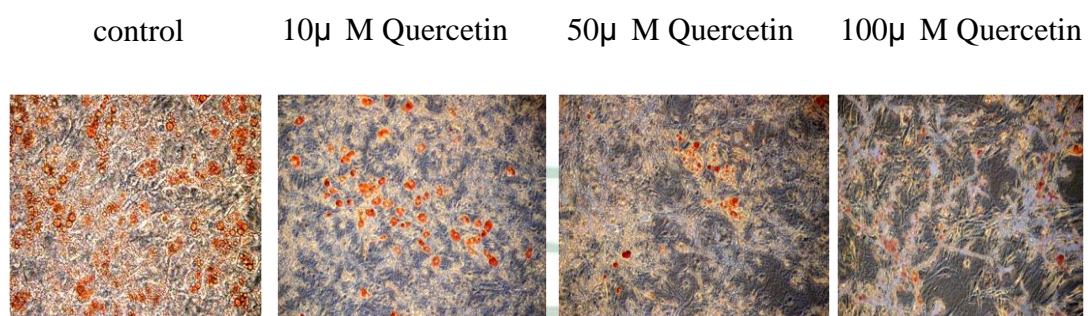


圖 4-15 Quercetin 對 3T3-L1 細胞脂肪滴形成之影響。實驗中將不同濃度的 quercetin 與分化藥劑一同加入進行培養細胞，更換培養液時，亦重新加入 quercetin，於分化第八天後進行油紅染色，觀察 quercetin 是否抑制 3T3-L1 脂肪細胞脂肪滴生成。放大倍率 400X。

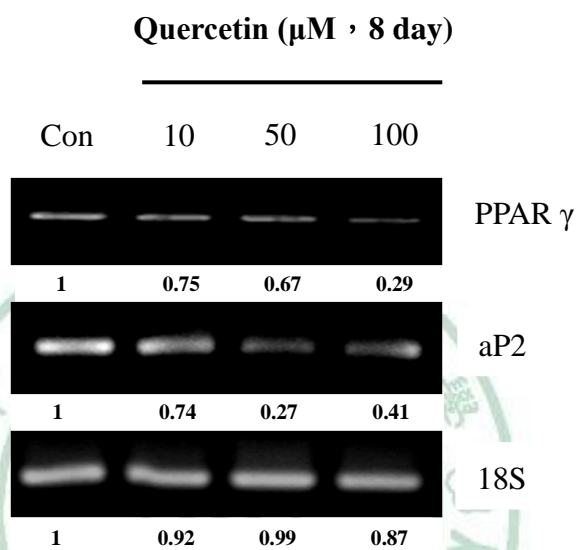


圖 4-16 Quercetin 影響 3T3-L1 脂肪細胞分化相關轉錄因子 PPAR γ 和特定基因 aP2 的表現。實驗中將不同濃度的 quercetin 與分化藥劑一同加入進行培養細胞，更換培養液時，亦重新加入 quercetin，於分化第八天後，抽取 RNA，觀察 quercetin 是否抑制 PPAR γ 和 aP2 mRNA 的表現，實驗至少重複二次。

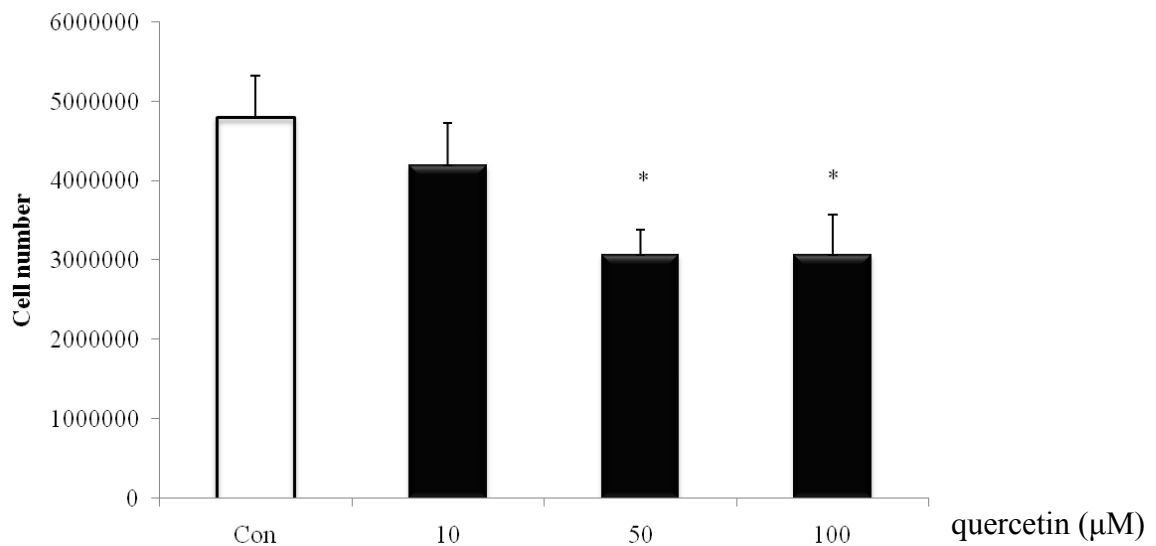


圖 4-17 Quercetin 對 MCE 期 3T3-L1 細胞生長之影響。以 quercetin 和分化劑處理後兩天，即 MCE 期結束後，計算細胞數以比較 quercetin 是否影響 MCE 期細胞的生長，結果以 mean \pm SD 值表示，n=3，* $p < 0.05$ v.s.control。

Cell cycle progression during MCE
(24 hour after MDI treatment)

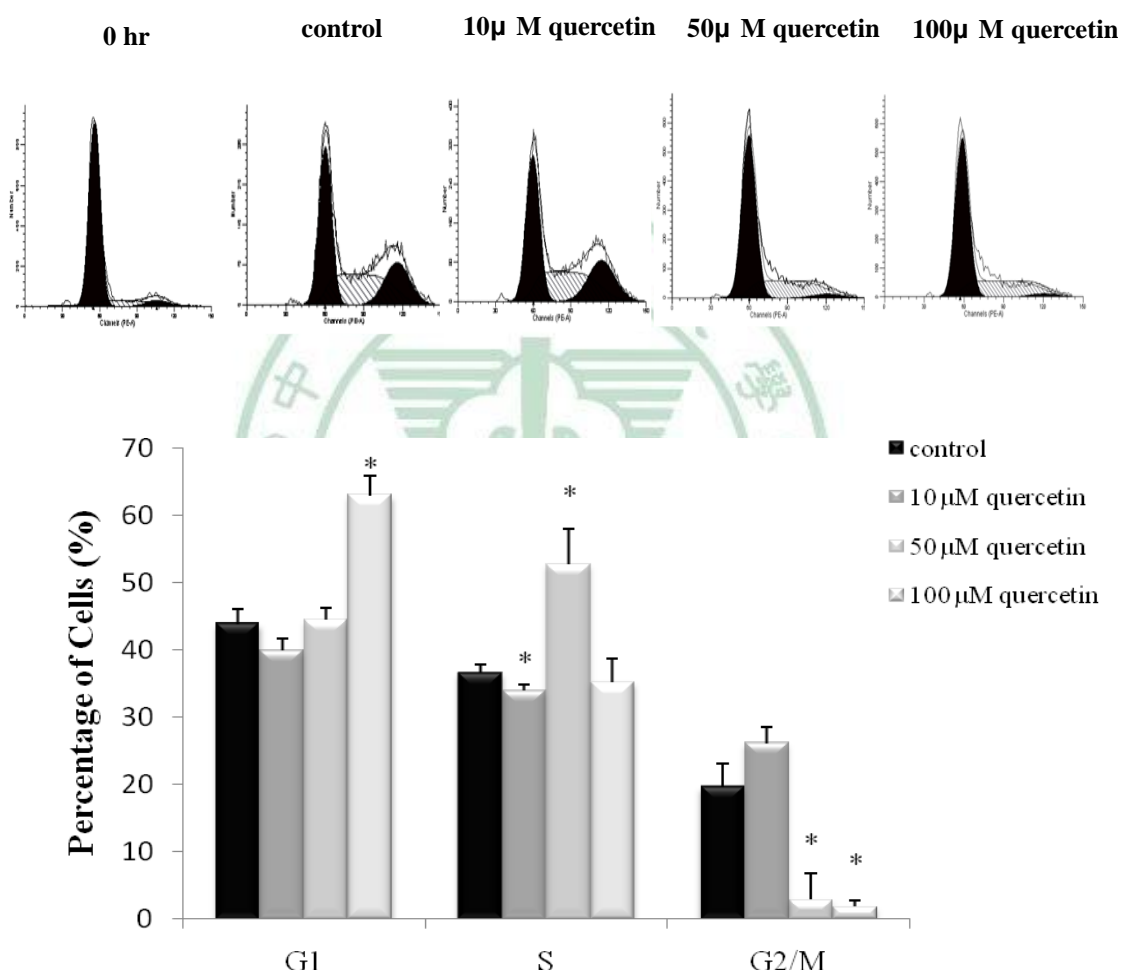


圖 4-18 Quercetin 影響 3T3-L1 前脂肪細胞 MCE 期細胞週期的進行。以 PI 染色配合流式細胞儀偵測以不同濃度 quercetin 處理 3T3-L1 MCE 期 24 小時後細胞週期停滯情形。數據結果以 mean ± SD 值表示，n=3，* $p < 0.05$ v.s. control。

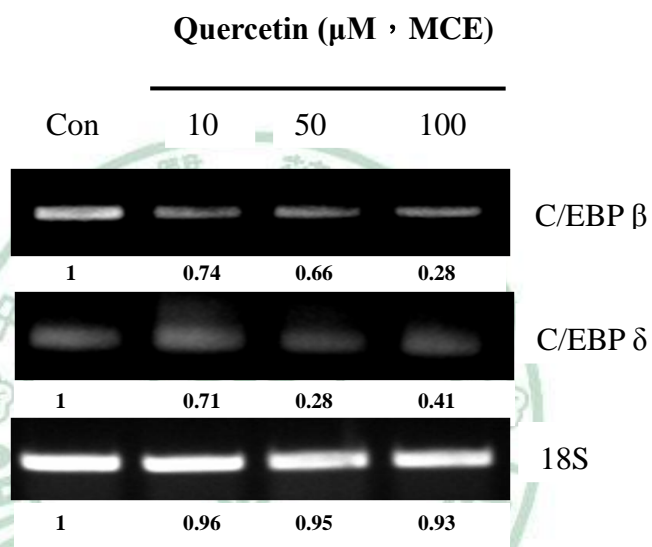


圖 4-19 Quercetin 影響 3T3-L1 MCE 期 C/EBP β 和 C/EBP δ mRNA 的表現。
實驗中將不同濃度的 quercetin 與分化藥劑一同加入進行培養細胞 48 小時，以 RT-PCR 觀察 MCE 期 C/EBP β 和 C/EBP δ mRNA 的表現，實驗至少重複二次。

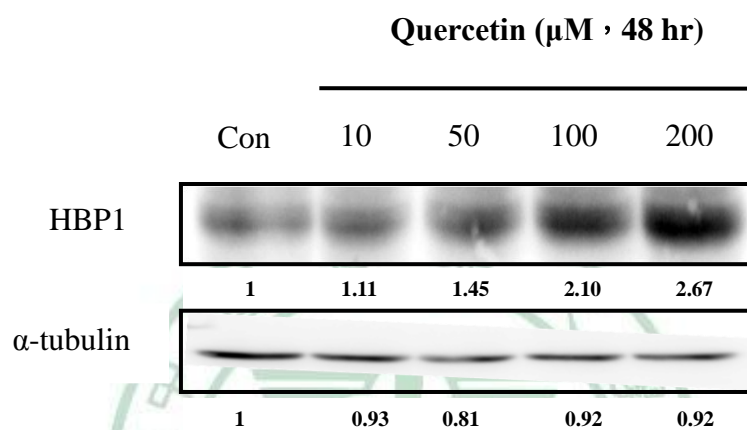


圖 4-20 Quercetin 對 3T3-L1 前脂肪細胞 HBP1 蛋白質表現之影響。細胞分別以 10 至 200 μM quercetin 處理 48 小時後，利用西方墨點法分析 HBP1 蛋白的表現，實驗至少重複二次。

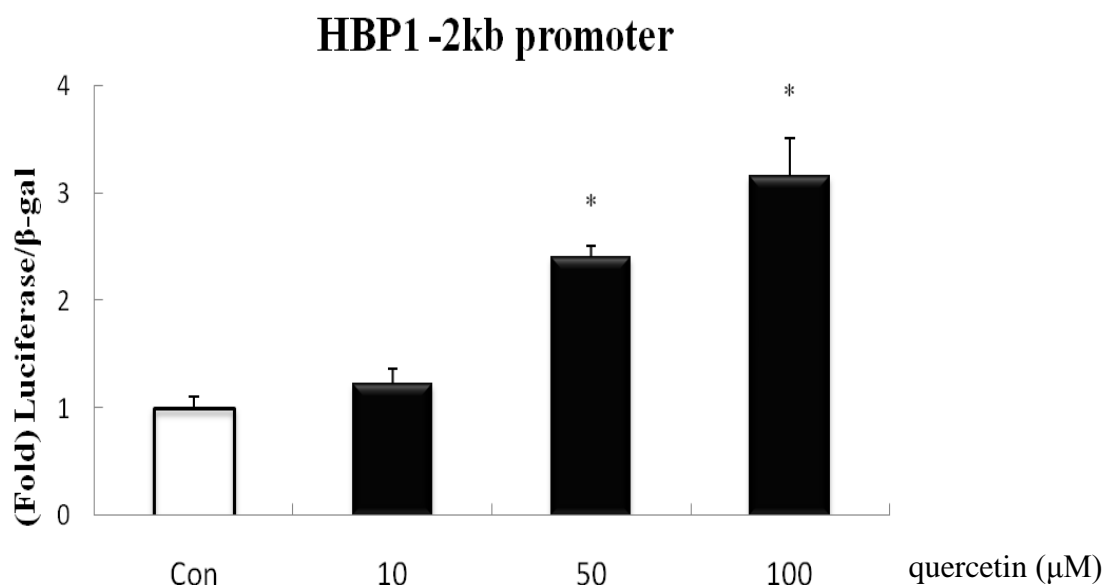


圖 4-21 Quercetin 對 HBP1-2kb promoter 活性之影響。在 24 well 293T 細胞中，利用報導基因分析法觀察 quercetin 對 HBP1 -2kb promoter 的影響，以 lipofectamine™ 2000 分別轉染 0.4 μg HBP1-2kb promoter 及 0.2 μg RSV-β-gal，轉染 24 小時後，給予 10 至 100 μM 的 quercetin，24 小時後，以 luminometer 分析 Luciferase 的活性。數據結果以 mean ± SD 值表示，n=3，* $p < 0.05$ v.s. control。

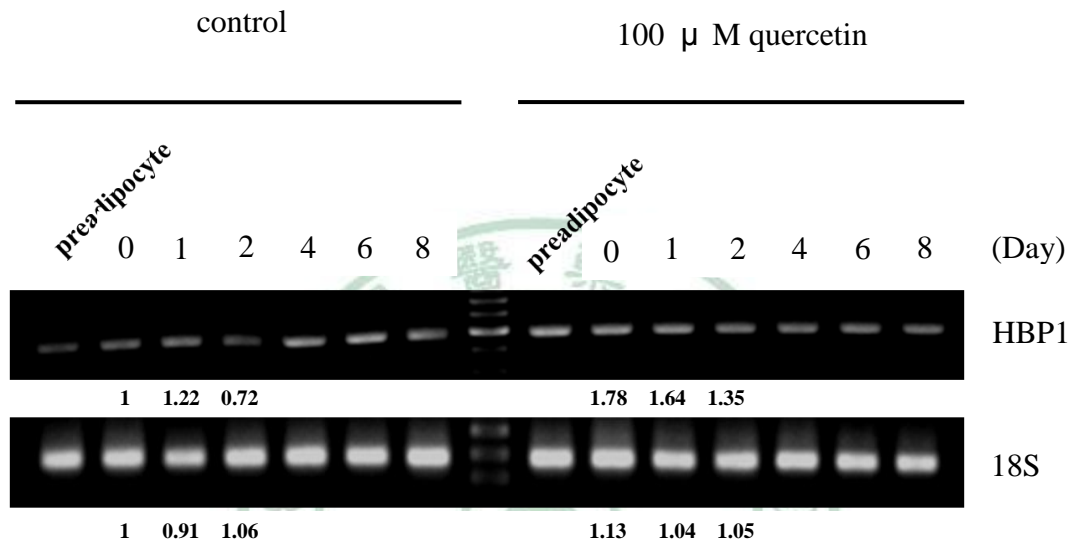


圖 4-22 Quercetin 影響 MCE 期 HBP1 mRNA 的表現。在 3T3-L1 前脂肪細胞給予 100 μ M quercetin 誘導 HBP1 的表現，以 RT-PCR 觀察控制組與給予 100 μ M quercetin MCE 期 HBP1 mRNA 的表現，n=3。

第五章、討論

肥胖、胰島素阻抗(insulin resistance)及第二型糖尿病已成為現代廣泛的代謝性疾病，第二型糖尿病因胰島素分泌不足和胰島素阻抗造成醣類代謝異常、脂肪組織過多，而脂肪組織過多與許多慢性疾病的發生有關，如癌症、高血壓、動脈硬化等心血管疾病，危害人體健康。因此研究調控脂肪細胞分化的因子、脂肪組織接受胰島素刺激後反應改變的原因是目前課不容緩的重要課題。

體外模式脂肪細胞相關研究常用的細胞有很多種，包括有 3T3-L1、3T3F442A 及初代前脂肪細胞株等，本實驗利用 3T3-L1 前脂肪細胞株，在添加 insulin、DEX 和 MIX 等荷爾蒙和化學藥品分化培養基下，分化成脂肪細胞，過程中 C/EBP β 和 C/EBP δ 首先短暫大量的表現，進而啟動 PPAR γ 與 C/EBP α 的表現，其中，PPAR γ 在脂肪細胞分化的過程中的角色極具關鍵性，在脂肪分化期，受到賀爾蒙刺激與 PPAR ligand 的結合，經由一連串的訊息傳遞後，完成脂肪細胞的分化⁽⁶⁸⁾。在這眾多轉錄因子交互調節下的脂肪細胞分化，將多增加一個轉錄因子-- HBP1。

轉錄抑制因子HBP1的生物功能近年來陸續地被發掘探討，HBP1的活化與細胞生長停滯和細胞分化有關。在肌肉細胞 C2C12 生長停滯的情況下，HBP1 的活化更會促使肌肉細胞的分化，除了肌細胞之外，Lesage 等學者於1994年發現，在大鼠組織中，HBP1 mRNA表現在脂肪組織含量多，而且，HBP1 mRNA 的表現在分化的細胞顯著高於未分化的細胞，同時，insulin 活化成熟Ob1771脂肪細胞 HBP1的表現⁽⁶²⁾，可見，HBP1不但可以調控細胞週期的進行，抑制細胞增生，同時參與了細胞分化的調控，尤其，在脂肪細胞分化過程中，HBP1 參與的機轉一直以來尚不清楚，所以，本實驗是首次探討 HBP1 在脂肪細胞分化過

程角色的研究。

本實驗結果顯示，在 3T3-L1 前脂肪細胞分化為成熟脂肪細胞的 8 天過程中，HBP1 的蛋白表現在分化初期 2 天的 MCE 期無明顯改變，但在 4 到 6 天的分化後期，HBP1 的表現明顯增加，顯示，HBP1 在分化過程的前期和後期有不同的功能。

由先前的研究指出，insulin 活化成熟 Ob1771 脂肪細胞 HBP1 的表現，在本實驗結果亦證實，insulin 藉由活化 HBP1 啟動子增加 HBP1 蛋白的表現。雖然如此，但在分化天數第 0 天時，加入 insulin、DEX、MIX 三種不同促分化劑於 MCE 期，HBP1 的表現卻未明顯增加，或許，與 PPAR γ 轉錄因子的調控具相關性或與 DEX、MIX 促使分化的機轉有關，但其調控機制仍需進一步探討。

既然 HBP1 的含量隨著脂肪分化過程有所改變，表示，HBP1 具調控脂肪細胞分化的潛在功能，因此，我們以 RNA 干擾技術降低 3T3-L1 細胞 HBP1，觀察 MCE 期 C/EBP β 和 C/EBP δ 轉錄因子表現，實驗結果顯示，HBP1 knockdown 造成 MCE 期 C/EBP β 和 C/EBP δ 轉錄因子表現增加，同時，流式細胞儀分析細胞週期的進行，發現 HBP1 表現降低加速細胞週期的進行，由此推論，HBP1 在 MCE 期的表現沒有增加主要是為了讓細胞週期得以順利完成，為進入分化期作準備。

雖然如此，但促進 MCE 期快速完成的 HBP1 knockdown 卻導致 3T3-L1 脂肪細胞分化不完全，顯示 HBP1 在分化後期表現增加的重要性；HBP1 可能是 PPAR γ 的下游基因。我們的實驗結果證實了此假設，CHIP-Mapper 搜尋發現，HBP1 啟動子上-274~-258 和-688~-660 處，有可能的 PPAR γ 連結處。同時，

luciferase reporter assay 報導基因結果顯示，TZD (PPAR- γ 活性促進劑) 可以誘導 HBP1 -2kb promoter 的活性，相對地，GW9662 (PPAR- γ 活性抑制劑) 抑制了 HBP1 -2kb promoter 的活性。尤其，在 3T3-L1 分化天數第四天時，GW9662 明顯抑制 HBP1 mRNA 的表現，再加上，具活化 PPAR γ 作用的 insulin，同樣於本實驗中證實可以活化 HBP1 promoter 和增加蛋白質的表現。在在顯示，PPAR γ 具調控 HBP1 表現的作用。

轉錄因子 PPAR γ -RXR 複合體，與特定的目標基因上 PPRE (PPAR response element) 序列結合，進而活化下游基因的表現，例如 PEPCK (Phosphoenolpyruvate carboxykinase) 和 FATP (fatty acid transport protein)。PPRE 的序列為 (AGGTCA-N-AGGTCA)，目前已知的 PPAR 目標基因約有 20 幾個⁽⁸¹⁾，或許，HBP1 可能是另一個 PPAR γ 的目標基因。臨床上治療糖尿病的藥物 Thiazolidinediones (TZDs) 類藥物可經由活化 PPAR γ 來降低胰島素阻抗進而改善血糖，或許，HBP1 的調節可應用於未來治療代謝症候群與糖尿病患者上。

為了進一步確認 HBP1 是 PPAR γ 的活化標的基因，定序出 HBP1 啟動子上的 PPRE 位置將課不容緩，另外，亦可使用染色質免疫沉澱法 chromatin immunoprecipitation assay (CHIP) 證明在細胞內中 PPAR γ 與 內生性 HBP1 啟動子的交互結合作用，同時，在細胞外試驗中，利用電泳層析分析實驗方法 (Electrophoretic Mobility Shift Assays, EMSA)，分析 PPAR γ 蛋白是否與特定序列的 HBP1 啟動子結合，更直接地，我們可利用 PPAR γ siRNA 將脂肪細胞的 PPAR γ 降解，如此一來，如果 PPAR γ 直接調控 HBP1 promoter，PPAR γ siRNA 將造成 HBP1 的表現下降。

近年來，蔬菜及水果中的天然化學成分 (photochemical)，無論在流行病學

或臨床研究上，都顯示對人類疾病的產生具有不等程度的預防作用，同時也可達到改善體質、調節生理機能、增進健康之目的。最近研究指出，quercetin 是主要的類黃酮成分，常以配醣體的形式存在於多種的花、果實和葉子，存在於日常食用的蔬菜、水果中，如洋蔥、綠茶、蘋果和草莓中，其在體重控制等醫療效用受到相當之重視。quercetin 调控脂肪細胞的研究指出，quercetin 抑制 3T3-L1 脂肪細胞分化可能與細胞凋亡 (apoptosis) 的调控有關，向下调控 PARP (Poly-ADP-ribose polymerase) 及 Bcl-2 蛋白質，增加 caspase-3、Bax 等蛋白質的表現，促進細胞凋亡⁽⁶⁸⁾。同樣地，最近的一篇研究指出，添加 10、50 及 100 μM 的 quercetin 促使 caspase-3、caspase-9 活性增加，導致 3T3-L1 成熟脂肪細胞凋亡比率增加，並降低脂肪細胞脂質合成，有效減少脂肪粒數目及大小，另外，quercetin 之添加亦會降低 phospho-extracellular signal-related kinase (P-ERK)、c-Jun N-terminal kinase (JNK) 蛋白質之表現，顯示 quercetin 可經由 MAPK 訊息傳遞路徑造成脂肪細胞凋亡之發生，而降低脂肪細胞的分化。最近的研究亦發現， H_2O_2 促使 3T3-L1 MCE 期細胞週期的進行，進而促進脂質合成，而當給予抗氧化劑(50 μM genistein、50 μM resveratrol)後則導致 MCE 期細胞週期停滯和分化不完全，因此，我們觀察 quercetin 是否造成 3T3-L1 MCE 期細胞週期停滯，進而抑制脂肪細胞分化。如預期地，本實驗結果提供了 quercetin 抑制脂肪細胞分化的另一個機制，那就是，quercetin 促使 MCE 期細胞週期停滯於 G1 的作用，進而抑制脂質合成。

同時，quercetin 也活化 MCE 期 HBP1 mRNA 表現，報導基因分析發現，quercetin 也具有活化 HBP1 -2kb promoter 的能力，進而促使 MCE 期細胞週期生長停滯，導致轉錄因子 CEBP/ β 和 C/EBP δ mRNA 的表現下降，進而抑制脂肪細胞分化。

最後，為了進一步驗證 HBP1 在脂肪分化所扮演的生理功能，在未來研究上，將建立穩定表現 HBP1 Knockdown 的前脂肪細胞老鼠模式，此實驗結果，將強力背書 HBP1 為脂質生合成之一重要指標，也為 HBP1 將來成為防治肥胖的潛在標的基因之可行性提供了有力的分生證據。



第六章、結論

本篇研究的主要目的在探討 HBP1 在脂肪細胞分化過程中的角色，以及 HBP1 參與 quercetin 調控脂質生合成的機制，得到的重要結果如下：

一、HBP1 在 3T3-L1 脂質生合成過程中具階段性的功能。

(一) MCE 期：

HBP1 的表現在分化初期 2 天的 MCE 期無明顯增加，HBP1 在此期增加將抑制細胞增生，而造成 MCE 不完全。

(二) Terminal Differentiation 期：

相對地，HBP1 在分化後期的表現增加是最終分化所必須的，尤其，HBP1 可能是 PPAR γ 調控脂質生合成的下游基因。結論顯示，HBP1 在脂質生合成過程的 MCE 期和 terminal differentiation 期有不同的生理功能。

二、quercetin 具活化 HBP1，抑制 MCE 期和脂肪細胞分化的作用。

quercetin 活化 MCE 期 HBP1 mRNA 表現，造成 MCE 期細胞週期生長停滯於 G1，伴隨著轉錄因子 CEBP/ β 和 C/EBP δ mRNA 的表現下降，抑制脂肪細胞分化。

最終，希望我們的研究探討可以提供 HBP1 轉錄因子在未來肥胖的研究上作為一個重要指標或肥胖相關疾病重要標定的可能性。

參考資料

1. <http://www.doh.gov.tw/statistic/index.htm> 參考衛生署統計重要指標
2. Rosell M, Hakansson NN, Wolk A. Association between dairy food consumption and weight change over 9 y in 19,352 perimenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2006 ;84(6):1481-8.
3. Moldes M, Zuo Y, Morrison RF, Silva D, Park BH, Liu J, Farmer, SR, Peroxisome-proliferator-activated receptor c suppresses Wnt/b-catenin signalling during adipogenesis, *Biochem. J.* 2003;607–613.
4. Park HJ, Yang JY, Ambati S, Della-Fera MA, Hausman DB, Rayalam S, Baile CA. Combined effects of genistein, quercetin, and resveratrol in human and 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food.* 2008 ;11(4):773-83.
5. Entenmann G, and Hauner H. Relationship between replication and differentiation in culture human adipocyte precursor cells. *Am. J. Physiol. Cell physiol.* 1996; 270:c110-c1016.
6. Tang QQ, Otto TC, and Lane MD. CCAAT/enhancer-binding protein β is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Pnas.* 2003; 100: 850-855.
7. Cryer A. Tissue lipoprotein lipase activity and its action in lipoprotein metabolism. *Int J Biochem.* 1981;13(5):525-41.

8. Brun RP, Kim JB, Hu E, Altiock S, Spiegelman BM. Adipocyte differentiation: A transcriptional regulatory cascade. *Curr Opin Cell Biol.* 1996 ;8(6):826-32.
9. Zhidan W, Pere P , and Bruce MS. Transcriptional activation of adipogenesis. *Curr. Opin. Cell boil.* 1999;11:689-694.
10. Jame MN, and Kim YC. Symposium : Adipocyte function, differentiation and metabolism. *J. Nutr.* 2000;132:904-910.
11. Green H, and Kehinde O. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell.* 1976;7(1): 105-113.
12. Green H, and Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell.* 1974; 3(2): 127-133.
13. Green H, and Kehinde O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell.* 1975; 5(1): 19-27.
14. Green H, and Kehinde O. Formation of normally differentiated subcutaneous fat pads by an established preadipose cell line. *J. Cell Physio.* 1979;1101:169-171.
15. Wu Z, Bucher NL, Farmer SR. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol Cell Biol.* 1996 ;16(8):4128-36.

16. Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.* 1991;5(9):1538-52.
17. Joyner JM, Hutley LJ, Cameron DP. Glucocorticoid receptors in human preadipocytes: Regional and gender differences. *J Endocrinol.* 2000;166:145-52.
18. Gregoire FM, Smas CM, Sul Hs. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* 1998 ;78(3):783-809.
19. Sweeney G, Somwar R, Ramlal T, Volchuk A, Ueyama A, Klip A. An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase prevents insulin-stimulated glucose transport but not glucose transporter translocation in 3T3-L1 adipocytes and L6 myotubes. *J Biol Chem.* 1999 ;274(15):10071-8.
20. Rubin CS, Hirsch A, Fung C, Rosen OM. Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *J Biol Chem.*1978;253 (20):7570-8.
21. Fajas L, Fruchart JC, and Auwerx J. Transcriptional control of adipogenesis. *Curr. Opin. Cell biology.* 1998;10:165-173.
22. Yeh WC, Cao Z, Classon M, and McKnight SL. Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev.*1995;9 (2): 168-181.

23. Wu Z, Xie Y, Morrison RF, Bucher NL, and Farmer SR. PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *J Clin Invest.* 1998; 101(1): 22-32.
24. Gregoire FM, Smas CM, Sul Hs. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* 1998 ;78(3):783-809.
25. Bruno F. Adipogenesis: cellular and molecular aspects . 2005;19(4):483-499.
26. Darlington GJ, Ross SE, MacDougald OA. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 1998;273:30057-60.
27. Feve B. Adipogenesis: Cellular and molecular aspects. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism.* 2005;19:483-99.
28. Lee H, Lee YJ, Choi H, Ko EH, and Kim JW. REACTIVE OXYGEN SPECIES FACILITATE ADIPOCYTE DIFFERENTIATION BY ACCELERATING MITOTIC CLONAL EXPANSION. *J Biol Chem.* 2009;284(16):10601-10609.
29. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 1990;347:645-50.
30. Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbaek C, Vidal-Puig AJ, Flier JS. Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). differential activity of

PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J Biol Chem.*
1997;272:20230-5.

31. Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signaling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature.* 1992;358:771-4.

32. Schoonjans K, Staels B, and Auwerx J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J. Lipid Res.* 1996; 37;907-925.

33. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med.* 2002;53:409-35.

34. Gearing KL, Gottlicher M, Teboul M, Widmark E, Gustafsson JA. Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:1440-4.

35. Guo L, Tabrizchi R. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a drug target in the pathogenesis of insulin resistance. *Pharmacol Ther.* 2006;111:145-73.

36. Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: Adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology.* 1994;135(2):798-800 .

37. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, and Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 1995;270(22): 12953-12956.
38. Staels B, and Fruchart JC. 2005. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes*; 54(8): 2460-2470.
39. Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research*. 2005;51:85-94.A
40. Kletzien RF, Clarke SD, and Ulrich RG. Enhancement of adipocyte differentiation by an insulin-sensitizing agent. *Mol Pharmacol*. 1992;41(2): 393-398.
41. Sandouk T, Reda D, and Hofmann C. Antidiabetic agent pioglitazone enhances adipocyte differentiation of 3T3-F442A cells. *Am J Physiol* .1993;264(6 Pt 1): C1600-1608.
42. Tontonoz P, Hu E, and Spiegelman BM. Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev*. 1995;5(5): 571-576.
43. Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, Yim SH, Gavrilova O, Ward JM, Brewer B Jr, Reitman ML, and Gonzalez FJ Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J Clin Invest*. 2003; 111(5): 737-747.

44. Norris AW, Chen L, Fisher SJ, Szanto I, Ristow M, Jozsi AC, Hirshman MF, Rosen ED, Goodyear LJ, Gonzalez FJ, Spiegelman BM, and Kahn CR. Muscle-specific PPARgamma-deficient mice develop increased adiposity and insulin resistance but respond to thiazolidinediones. *J Clin Invest.* 2003;112(4): 608-618.
45. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372:425-32.
46. Lonnqvist F, Arner P, Nordfors L, Schalling M. Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nat Med.* 1995;1:950-3.
47. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: Evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science.* 1995;269:546-9.
48. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature.* 1998; 395: 763-70.
49. Monzillo LU, Hamdy O, Horton ES, Ledbury S, Mullooly C, and Jarema C, et al. Effect of Lifestyle Modification on Adipokine Levels in Obese Subjects with Insulin Resistance, *Obesity Reseach.* 2003;11(9),1048-1054.
50. MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, and Lane MD. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. 1995;92: 9034-9037.

51. Fruhbeck G, Salvador J. Role of adipocytokines in metabolism and disease. *Nutr Res.* 2004;24:803-26.
52. Yee AS, Paulson EK, McDevitt MA, Rieger-Christ K, Summerhayes I, Berasi SP, Kim J, Huang CY, Zhang X. The HBP1 transcriptional repressor and p38 MAP kinase: Unlikely partners in G1 regulation and tumor suppression. *Gene.* 2004; 336(1):1-13.
53. Classon M, Salama S, Gorka C, Mulloy R, Braun P, Harlow E. Combinatorial roles for pRB, p107, and p130 in E2F-mediated cell cycle control. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 ;97(20): 10820-5.
54. Sekkali B, Szabat E, Ktistaki E, Tolaini M, Roderick K, Harker N, Patel A, Williams K, Norton T, Kioussis D. Human high mobility group box transcription factor 1 affects thymocyte development and transgene variegation. *J Immunol,* 2005;175(8):5203-12.
55. Shisheva A, Shechter Y. Quercetin selectively inhibits insulin receptor function in vitro and the bioresponses of insulin and insulinomimetic agents in rat adipocytes. *Biochemistry.* 1992 ;31(34):8059-63.
56. Higgins C, Chatterjee S, and Cherington V. The block of adipocyte differentiation by a C-terminally truncated, but not by full-length, simian virus 40 large tumor antigen is dependent on an intact retinoblastoma susceptibility protein family

binding domain. *J Virol* . 1996;70(2): 745-752.

57. Altiook S, Xu M, and Spiegelman BM. PPARgamma induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. *Genes* 1997 ;11(15): 1987-1998.
58. Morrison R F, and Farmer SR. Role of PPARgamma in regulating a cascade expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p18(INK4c) and p21 (Waf1/Cip1), during adipogenesis. *J Biol Chem*. 1999b; 274(24):17088-17097.
59. Kim J, Zhang X, Rieger-Christ KM, Summerhayes IC, Wazer DE, Paulson KE, Yee AS. Suppression of wnt signaling by the green tea compound (-)-epigallocatechin 3-gallate (EGCG) in invasive breast cancer cells. requirement of the transcriptional repressor HBP1. *J Biol Chem*. 2006;281(16):10865-75.
60. Logan C.Y.,Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease.*Annu.Rev.Cell Biol*.2004;20: 781-810.
61. M. Moldes, Y. Zuo, R.F. Morrison, D. Silva, B.H. Park, J. Liu, S.R.Farmer, Peroxisome-proliferator-activated receptor c suppresses Wnt/b-catenin signalling during adipogenesis, *Biochem. J*. 2003;607–613.
62. Florian L, Hugnot JP, Amri EZ, Grimaldi P, Barhanin J, Lazdunski M. Expression cloning in K⁺ transport defective yeast and distribution of HBP1, a new putative HMG transcriptional regulator. *Nucleic Acids Research*. 1994 ; 22(18):3685-88.
63. Hertog MGL, and Hollman PCH. Potential health effects of the dietary flavonol

quercetin. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1996, 50: 63-71.

64. Frankel EN, German JB, Parks E, and Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet.* 1993; 341: 454-457.
65. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 2000;14:1293-1307.
66. Underhill, *Can. J. Biochem. Physiol.* 1957, 35:219.
67. Shisheva A, Shechter Y. Quercetin selectively inhibits insulin receptor function in vitro and the bioresponses of insulin and insulinomimetic agents in rat adipocytes. *Biochemistry.* 1992 ;31(34):8059-63.
68. Hsu CL, Yen GC. Induction of cell apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes by flavonoids is associated with their antioxidant activity. *Mol Nutr Food Res.* 2006 ;50(11):1072-9.69.
69. Jiyun A, Lee A, Kim S, Park J, Ha T. The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2008;373:545-549.
70. Lee Y.T., Don M.J., Hung P.S., Shen Y.C., Lo Y.S., Chang K.W., Chen C.F., Ho L.K. Cytotoxicity of phenolic acid phenethyl esters on oral cancer cells. *Cancer letters.* 2005;23(1): 19-25.

71. Tang Q.Q., Otto T. C., and Lane M.D. CCAAT_enhancer-binding protein is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. PNAS . 2003 ;100(3)850-855.
72. Chang G.N., Chen E.S., Ho K.C. Molecular Cloning and Expression of a Phase I Flagellin Gene from Salmonella enterica serovar Choleraesuis. Taiwania. 2007;52(3): 201-209.
73. Hollenberg A.N., etal. Functional antagonism between CCAAT/enhancer binding protein- α and Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ on the Leptin Promoter. J Biol Chem. 1997;272(8):5283-5290.
74. Gotoh C., etal. The regulation of adipogenesis through GPR120. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2007;354:591-597.
75. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. Nature Reviews Genetics. 2004 ;5(7):522-31.
76. Tzamelis I, Fang H., Ollero M., Shi H., Hamm JK., Kievit P. Hollenberg A.N., and Flier J.S. Regulated Production of a Peroxisome Proliferator-activated Receptor Ligand during an Early Phase of Adipocyte Differentiation in 3T3-L1 Adipocytes. J Biol Chem. 2004;279(34):36093-36102.
77. Wittwer C.T.,Herrmann M.G.,Moss A .A.,and Rasmussen R.P., Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. BioTechniques .

1997;22(1):130-1,134-8.

78. Constantinos C., et al . The Wnt antagonist Dickkopf-1 and its receptors are coordinately regulated during early human adipogenesis. *Journal of Cell Science*. 2006; 119: 2613-2620.
79. Pan C., Yan M., Yao J., Xu J., Long Z., Huang H., Liu Q. Aurora kinase small molecule inhibitor destroys mitotic spindle, suppresses cell growth, and induces apoptosis in oral squamous cancer cells. *Oral oncology*. 2008;44(7): 639-645.
80. Chang M.C., Chan C.P., Wang Y.J., Lee P.H., Chen L.I., Tsai Y.L., Lin B.R., Wang Y.L., Jeng J.H. Induction of necrosis and apoptosis to KB cancer cells by sanguinarine is associated with reactive oxygen species production and mitochondrial membrane depolarization. *Toxicology and applied pharmacology*. 218(2): 143-151. 2007.
81. Zhidan W, Pere P, and Bruce MS. Transcriptional activation of adipogenesis. *Curr Opin cell boil*. 1999;11:689-694.

謝 誌

感謝上天，使我如此地幸福。

台中、中國醫藥大學、黃俊瑩老師實驗室是個充滿幸福和快樂的地方，佇立在 16 樓高處實驗室，回想二年的研究生活，心中充滿感動的淚水和綻放的笑容。感謝黃俊瑩老師，耐心、仔細教導我這個資質駑鈍、神經慢一拍的學生，在您的提攜教導下，逐漸了解並明瞭您那”黃氏幽默”和”認真而專注的研究態度”，論文初稿完成，承蒙老師多次的校閱斧正，衷心感謝；謝謝口委陳玉華教授和趙蓓敏副教授仔細審閱我的論文，使論文的內容更加完備，並謝謝趙老師平日在實驗上的建議和幫助，提供我許多寶貴的意見。

二年的研究生活，感謝小孟學姐在實驗技術上的傳承和指導；感謝前毅學弟和珮璇學妹在研究上的幫忙和生活上的照顧，使我的論文口試得以順利進行，「實驗室有你們真好」，歡笑一籬筐，呀比；感謝筱琪、亞帆這些好同學一起陪我走完研究所的困難路程，真的很開心能和你們一起在中國醫大的兩年研究生活，因為有你們的支持和鼓勵，讓我在遇到實驗低潮時能努力克服，有你們在的地方，實驗室就充滿歡樂。

也要感謝文彥學長提供實驗上及研究生活上寶貴的意見以及陳永閻老師、阿達學長、碧晃學姐生活上悉心照顧；謝謝涵、玥、嗲、至、京等好友，謝謝你們忍受我這兩年來的疏於連絡，但感情一樣好；謝謝瀚堂在我初進實驗室時消除我的緊張和不安，使我更加地成長、懂事；謝謝義在我研究生生活中不斷的為我加油和打氣，謝謝。

最後，謝謝爸爸、媽媽為我付出的心力和關心，讓我無後顧之憂完成我的碩士學業，寶貝女兒好愛你們，在此以小小的成果與你們分享。感謝上天。

張豐姿謹誌於

中國醫藥大學營養學系碩士班

中華民國九十八年七月