

中國醫藥大學營養學系碩士班

碩士論文

特殊脂肪酸及天然抗氧化物  
對 3T3-L1 脂肪細胞生合成影響

**The adipogenic effect of uncommon fatty  
acids and natural antioxidants on 3T3-L1 cell**

指導教授：趙蓓敏 博士 (Pei-Min Chao,Ph.D.)

研究生：賴姿文 (Tzu-Wen Lai)

中華民國 96 年 7 月  
July,2007

## 目 錄

---

縮寫對照表 .....	I
摘要 .....	III
Abstract.....	IV
第一章 前言與研究目的 .....	1
第二章 文獻回顧 .....	2
一、 脂肪細胞生合成 (adipogenesis).....	2
1、 脂肪細胞分化之轉錄調控 (transcription cascade).....	3
2、 PPAR $\gamma$ 與脂肪細胞分化.....	4
二、 3T3-L1 介紹 .....	6
三、 食物成份與脂肪細胞生合成相關研究 .....	7
(一) 脂肪酸類 .....	7
1. 一般脂肪酸(Common fatty acids) .....	7
2. 特殊脂肪酸(Uncommon fatty acids) .....	8
(1) Conjugated linolenic acid .....	8
(2) Phytanic acid.....	9
(二) 天然抗氧化物 .....	10
1、 Epigallocatechin Gallate (EGCG) .....	10
2、 Procyanidins .....	12
3、 Curcumin .....	12
4、 Naringenin .....	13
5、 Ascorbic acid .....	14
6、 Resveratrol.....	14
7、 Apigenin .....	14

8、 Quercetin.....	15
9、 Genistein.....	15
第三章 材料與方法 .....	21
一、 實驗假說 .....	21
二、 實驗設計 .....	21
三、 細胞培養 .....	24
1、 細胞株 .....	24
2、 培養基組成與配製 .....	24
3、 細胞繼代培養 .....	24
四、 誘導 3T3-L1 脂肪細胞分化 .....	25
五、 各種測試物之處理 .....	27
六、 MTT 染色法細胞存活率測定 .....	30
七、 LDH 細胞毒性之測定 .....	31
八、 細胞內三酸甘油酯測定 .....	32
九、 細胞內 G3PDH 活性測定 .....	33
十、 Lowry's method 蛋白質濃度測定 .....	35
十一、 脂解速率測定 .....	37
十二、 油紅染色 Oil-Red O stain 測定 .....	38
十三、 細胞凋亡測定 .....	39
十四、 統計分析 .....	40
第四章 結果 .....	41
一、 實驗一：脂肪酸對 3T3-L1 脂肪細胞脂質生合成影響 .....	41
1、 測試各種溶劑及正對照 TZD 對 3T3-L1 脂肪細胞分化的影響 ...	41
2、 一般脂肪酸對 3T3-L1 脂肪細胞分化的影響 .....	41

3、特殊脂肪酸對 3T3-L1 脂肪細胞分化的影響 .....	41
(1) Uncommon fatty acids 對 3T3-L1 differentiation 之影響 .....	42
(2) Uncommon fatty acids 對 3T3-L1 前脂肪細胞 proliferation 之影響 .....	42
(3) Uncommon fatty acids 對 3T3-L1 已分化成熟脂肪細胞脂 質代謝之影響 .....	43
(4) <i>c9,t11,t13</i> CLN 對 3T3-L1 三階段 (preadipocyte proliferation、 differentiation、terminal differentiation) 細胞凋亡的影響 ...	43
二、實驗二：天然抗氧化物對 3T3-L1 脂肪細胞脂質生合成影響 .....	44
1、 Natural antioxidants 對 3T3-L1 脂肪細胞分化之影響 .....	44
2、 多酚類對 3T3-L1 前脂肪細胞 proliferation 之影響 .....	45
3、 多酚類對 3T3-L1 已分化成熟脂肪細胞脂質堆積之影響 .....	45
4、 curcumin 對 3T3-L1 三階段 (preadipocyte proliferation、 differentiation、terminal differentiation) 細胞凋亡的影響 .....	45
第五章 討論 .....	67
第六章 結論 .....	74
第七章 參考文獻 .....	76

## 表 目 錄

---

表 2-1 脂肪酸化學結構.....	17
表 2-2 天然抗氧化物化學結構.....	19



## 圖 目 錄

圖 2-1	脂肪細胞生合成 .....	2
圖 2-2	脂肪細胞分化過程 .....	3
圖 2-3	PPAR $\gamma$ 之活化與作用 .....	4
圖 3-1	preadipocyte proliferation 實驗流程 .....	28
圖 3-2	differentiation 實驗流程 .....	29
圖 3-3	terminal differentiation 實驗流程 .....	29
圖 4-1	各種溶劑及正對照 TZD 對 3T3-L1 脂肪細胞分化 ( 以細胞內 TG 堆積為指標 ) 的影響 .....	47
圖 4-2	一般脂肪酸對 3T3-L1 分化 ( 以細胞內 TG 堆積為指標 ) 的影響 .....	48
圖 4-3	特殊脂肪酸對 3T3-L1 分化 ( 以細胞內 TG 堆積為指標 ) 的影響 .....	49
圖 4-4	特殊脂肪酸對 3T3-L1 分化 ( 以 G3PDH 活性為指標 ) 的影響 .....	50
圖 4-5	顯微鏡下觀察特殊脂肪酸對 3T3-L1 分化的影響 .....	51
圖 4-6	油紅染色觀察特殊脂肪酸對 3T3-L1 分化的影響 .....	52
圖 4-7	特殊脂肪酸對 3T3-L1 前脂肪細胞存活的影响 .....	53
圖 4-8	特殊脂肪酸對 3T3-L1 前脂肪細胞之細胞毒性的影響 .....	54
圖 4-9	特殊脂肪酸對 3T3-L1 成熟脂肪細胞 TG 堆積的影響 .....	55
圖 4-10	特殊脂肪酸對 3T3-L1 成熟脂肪細胞 G3PDH 活性的影響 .....	56
圖 4-11	特殊脂肪酸對 3T3-L1 成熟脂肪細胞脂解的影響 .....	57
圖 4-12	c9,t11,t13-CLN 對 3T3-L1 各階段細胞凋亡的影響 .....	58
圖 4-13	天然抗氧化物對 3T3-L1 分化 ( 以細胞內 TG 堆積為指標 ) 的影響 .....	59
圖 4-14	多酚類對 3T3-L1 分化 ( 以 G3PDH 活性為指標 ) 的影響 .....	60

圖 4-15 顯微鏡下觀察多酚類對 3T3-L1 分化的影響.....	61
圖 4-16 油紅染色觀察多酚類對 3T3-L1 分化的影響.....	62
圖 4-17 多酚類對 3T3-L1 前脂肪細胞存活的影響.....	63
圖 4-18 多酚類對 3T3-L1 前脂肪細胞之細胞毒性的影響.....	64
圖 4-19 多酚類對 3T3-L1 成熟脂肪細胞 TG 堆積的影響.....	65
圖 4-20 curcumin 對 3T3-L1 各階段細胞凋亡的影響.....	66



## 縮 寫 對 照 表

縮 寫	全 名
<b>Abs EtOH</b>	Absolute ethanol
<b>ACO</b>	Acyl-CoA oxidase
<b>ADD1 / SREBP</b>	Adipocyte determination and differentiation factor 1 / Sterol regulatory element binding proteins
<b>AMPK</b>	AMP-activated protein kinase
<b>AOM</b>	Azoxymethane
<b>aP2</b>	Adipocyte specific fatty acid binding protein
<b>BAT</b>	Brown adipose tissue
<b>Cdk2</b>	Cyclin-dependent kinase 2
<b>C/EBP</b>	CCAAT / enhancer binding protein
<b>CLA</b>	Conjugated linoleic acid
<b>CLN</b>	Conjugated linolenic acid
<b>CPT</b>	Carnitine palmitoyltransferase
<b>DEX</b>	Dexamethasone
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide
<b>EGCG</b>	Epigallocatechin gallate
<b>ERK</b>	Extracellular signal-regulated kinase
<b>FAS</b>	Fatty acid synthase
<b>G3PDH</b>	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase
<b>GLUT4</b>	Glucose transporter 4
<b>HSL</b>	Hormone sensitive lipase



## 縮 寫 對 照 表

縮 寫	全 名
<b>IRS</b>	Insulin receptor substrates
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal kinase
<b>LPL</b>	Lipoprotein lipase
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated protein kinase
<b>MIX</b>	1-methyl-3-isobutylxanthine
<b>MUFA</b>	Monounsaturated fatty acid
<b>PA</b>	Phytanic acid
<b>PI3K</b>	Phosphoinositide-3 kinase
<b>PPAR</b>	Peroxisome proliferators activated receptor
<b>PUFA</b>	Polyunsaturated fatty acid
<b>SFA</b>	Saturated fatty acid
<b>STZ</b>	streptozotocin
<b>TZD</b>	Thiazolidinedione
<b>TG</b>	triglyceride
<b>UCP</b>	Uncoupling proteirin

## 特殊脂肪酸及天然抗氧化物對 3T3-L1 脂肪細胞生合成影響

### 摘要

肥胖是全球普遍之健康問題，從天然食物中尋找抗肥胖成分，不論在疾病預防及健康食品市場上均有其重要性。本研究旨在利用 3T3-L1 前脂肪細胞測試 2 種特殊脂肪酸及 5 種天然抗氧化物，對脂肪細胞生合成(adipogenesis)的影響，選擇的二種特殊脂肪酸為  $\alpha$ -eleostearic acid (*c9,t11,t13 conjugated linolenic acid*; *c9,t11,t13-CLN*) 及 phytanic acid (PA)，前者存在於苦瓜中，後者在反芻動物肉和乳汁中可發現，5 種多酚為 EGCG、curcumin、resveratrol、apigenin、genistein 存在天然蔬果。分別在 3T3-L1 adipogenesis 的三個階段：前脂肪細胞增生、分化及分化末期階段處理細胞，結果發現脂肪酸都具有促進 3T3-L1 分化的能力，但由於飽和程度不同，所以促分化能力也會有所不同，分別是 SFA < MUFA < PUFA；因此在特殊脂肪酸部分特別選用類似的脂肪酸作為對照。當 *c9,t11,t13-CLN* 與其對照(linolenic acid; C18:3) 相較，會顯著抑制前脂肪細胞增生；藉由細胞內 TG (triglyceride)、細胞內 G3PDH (glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 活性及油紅染色觀察，發現於分化階段 *c9,t11,t13-CLN* 會顯著抑制脂肪細胞分化；在分化末期階段會抑制脂質生合成；除了成熟脂肪細胞外 *c9,t11,t13-CLN* 於 100 $\mu$ M 會造成前脂肪細胞及分化階段細胞凋亡，顯示 *c9,t11,t13-CLN* 的抑制 3T3-L1 增生及分化作用與誘導細胞凋亡有關；PA 與其對照(palmitic acid; C16:0) 相較，在前脂肪細胞階段，不會造成細胞數目減少；在分化階段則會抑制脂肪細胞分化；在分化末期階段 PA 會抑制成熟脂肪細胞 lipogenesis。多酚類的部分與 vehicle control 相比較，發現測試的 5 種多酚類均會抑制增生且呈現 dose-response，其中 curcumin 於 50  $\mu$ M 會造成細胞毒性；分化階段除了 EGCG 以外另外 4 種多酚類都會明顯抑制 3T3-L1 分化；在成熟脂肪細胞階段，3 種多酚類(EGCG、Resveratrol、Genistein)會抑制細胞內 TG 堆積；除了前脂肪細胞外，curcumin 會造成分化階段及分化末期階段細胞凋亡，顯示 curcumin 抑制 3T3-L1 分化和抑制成熟脂肪細胞 TG 堆積與誘導細胞凋亡有關。由以上可知，特殊脂肪酸中 *c9,t11,t13-CLN* 與對照組(C18:3)相比，PA 與對照組(C16:0)相比，均會抑制脂肪細胞增生、分化、成熟脂肪細胞脂質生合成，而以 *c9,t11,t13-CLN* 效果最強；在多酚類當中則是以 Curcumin 之 anti-adipogenesis 效果最強，而這些成分具有抗肥胖潛力，值得日後進一步研究。

關鍵字： $\alpha$ -eleostearic acid、phytanic acid、adipogenesis

# The adipogenic effect of uncommon fatty acids and natural antioxidants on 3T3-L1 cell

Tzu-Wen Lai

## Abstract

Obesity is a worldwide health problem. It is important to find the compounds from food with anti-obesity effect for preventing obesity-related disease and developing functional food. In this study, we investigated the anti-adipogenic effect of two uncommon fatty acids and five natural antioxidants on preadipocyte cell line 3T3-L1. The uncommon fatty acids we chose are  $\alpha$ -eleostearic acid (*c9,t11,t13* conjugated linolenic acid; *c9,t11,t13*-CLN) and phytanic acid (PA). *c9,t11,t13*-CLN is enriched in bitter melon. Phytanic acid is abundant in ruminant meat and milk. The natural antioxidants we chose are including EGCG, curcumin, resveratrol, apigenin and genistein which are present in fresh vegetables and fruits. These compounds were incubated with 3T3-L1 at three different stages: preadipocyte proliferation, differentiation and terminal differentiation. Results show all common fatty acids could induce the differentiation of 3T3-L1. The potency of inducing adipocyte differentiation was as following, SFA < MUFA < PUFA. During the preadipocyte proliferation stage, *c9,t11,t13*-CLN reduced the cell number as compared with its control (linolenic acid; C18:3). Compared with C18:3, *c9,t11,t13*-CLN inhibited 3T3-L1 differentiation as indicated by cellular triglyceride, glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) activity and oil-red O staining. In terminal differentiation stage, *c9,t11,t13*-CLN reduced lipogenesis in mature adipocytes. *c9,t11,t13*-CLN induced apoptosis in the preadipocytes and differentiating adipocytes. Palmitic acid was used as a control group of PA. At preadipocyte proliferation stage, PA didn't decrease cell number as compared with its control. At differentiation stages, PA suppressed TG accumulation and G3PDH activity in differentiating adipocytes as compared with palmitic acid. The same result were observed by oil-red O staining. At terminal differentiation stages, PA reduced lipogenesis in mature adipocytes. When compared with their vehicle control, five polyphenols reduced the preadipocyte cell number during the proliferation stage, especially for curcumin. At differentiation stage, curcumin, resveratrol, apigenin and genistein resulted in an inhibition of adipocyte differentiation. At terminal differentiation stage, EGCG, resveratrol and genistein suppressed TG accumulation in mature adipocytes. Curcumin induced apoptosis in the differentiating and mature adipocytes. It is concluded that uncommon fatty acids *c9,t11,t13*-CLN and PA may exert its anti-obesity effect by inhibiting preadipocyte proliferation, differentiation and terminal differentiation. *c9,t11,t13*-CLN was more

potent than PA. Among the polyphenols we tested, curcumin was the most potent in anti-adipogenesis. Thus, these compounds merit further study for their action mechanism and their contribution in developing the health food for anti-obesity.

Key words :  $\alpha$ -eleostearic acid 、 phytanic acid 、 adipogenesis



## 第一章 前言與研究目的

肥胖已經成為全球性普遍之健康問題，近來也發現肥胖年齡層下降及兒童青少年階層肥胖比例有逐漸增加的趨勢(1-3)；可能與目前飲食逐漸西化、生活習慣的改變(如高能量飲食攝取增加、體能活動減少)有關。脂肪組織(adipose tissue)的形成和體內能量恆定調節有關，當能量過多時會導致脂肪細胞內三酸甘油酯貯存增加，事實上肥胖與脂肪細胞數目增加(hyperplasia)和脂肪細胞肥大(hypertrophy)均有關，肥胖也成為各種疾病，如高血壓、血脂異常、胰島素抗性、第2型糖尿病、癌症、心血管疾病、動脈粥狀硬化等危險因子(4)。

故此從天然食物中尋找抗肥胖成分，在全民健康疾病預防有其迫切性，在健康食品市場上也有廣大商機，目前市面上的抗肥胖相關保健食品，如藤黃果酸(Hydroxycitric acid; HCA)、共軛亞麻油酸(conjugated linoleic acid; CLA)以及中鏈脂肪酸(medium chain fatty acid)，均有許多研究證明其功能及作用機制。

本研究乃利用 3T3-L1 前脂肪細胞嘗試探討食物中存在的特殊脂肪酸及天然抗氧化物對脂肪細胞生合成(adipogenesis)的影響，以找出可能具有抗肥胖潛力之功能成分。

## 第二章 文獻回顧

## 一、脂肪細胞生合成 (Adipogenesis)

前脂肪細胞形成成熟脂肪細胞的過程稱之為脂肪細胞生合成 (adipogenesis)，adipogenesis 可分為三個階段，包括為前脂肪細胞增生階段 (preadipocyte proliferation)、分化階段 (differentiation) 及分化末期階段 (terminal differentiation)，分別說明如下：1) preadipocyte proliferation：前脂肪細胞 (preadipocyte) 會進行細胞的生長使細胞數目增加，長滿後就進入 mitotic clonal expansion 再進行 1-2 次的有絲分裂後，生長就會停止進入分化階段。2) differentiation：此時細胞型態有很大的改變，由紡錘型改變成圓球形，並且有三酸甘油酯 (triglyceride；TG) 開始產生，除了型態上的變化，基因表現也與前脂肪細胞大不相同，LPL (lipoprotein lipase) 可作為分化早期指標(5)，之後 C/EBPs (CCAAT / enhancer binding protein)和 PPAR  $\gamma$  (peroxisome proliferators activated receptor  $\gamma$ ) 表現漸增加(6)。3) terminal differentiation：分化末期不斷的 lipogenesis，促使 TG 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荷爾蒙，如 leptin、adiponectin 等(7)。其過程如下圖 2-1 所示。

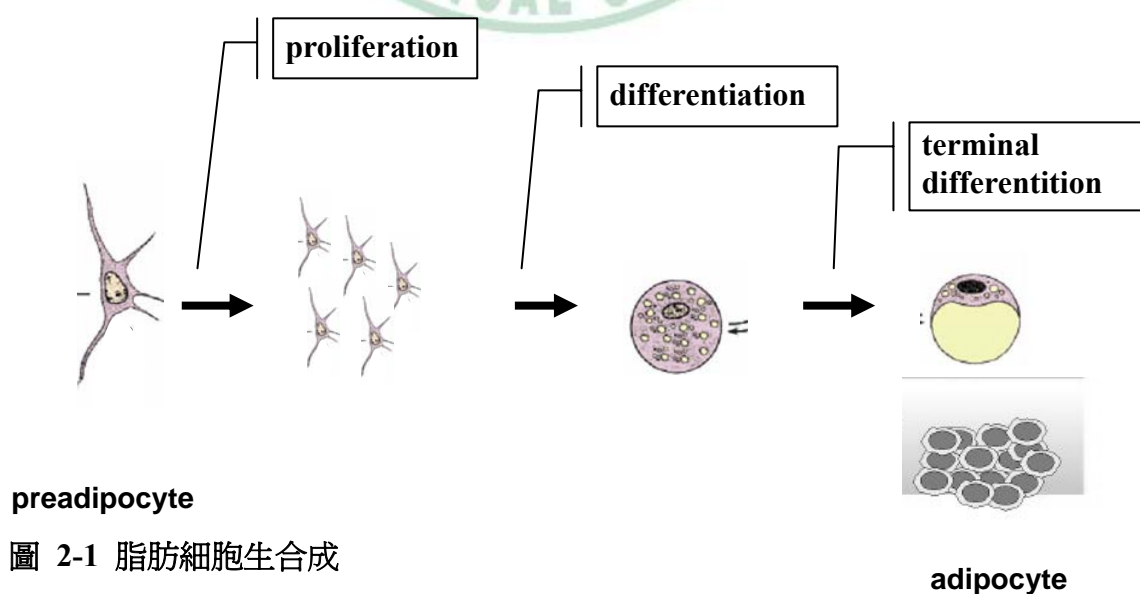


圖 2-1 脂肪細胞生合成

Fig 2-1 Adipogenesis

## 1、脂肪細胞分化之轉錄調控 (Transcription cascade)

前脂肪細胞分化為成熟脂肪細胞，是由數種轉錄因子參與調控，而這些轉錄因子也會相互作用形成 transcriptional factor cascade，參與因子包括 C/EBPs (CCAAT / enhancer binding protein)、ADD1/SREBP1 (adipocyte determination and differentiation factor 1 / sterol regulatory element binding proteins)、PPAR (peroxisome proliferators activated receptor)。分化起始是由 C/EBP  $\beta$  和 C/EBP  $\delta$  啟動，於初期分化二天在荷爾刺激下 C/EBP  $\beta$  和 C/EBP  $\delta$  會活化 PPAR  $\gamma$  (8)，ADD1/SREBP1c 產生 PPAR  $\gamma$  ligand 活化 PPAR  $\gamma$ ，之後 C/EBP  $\alpha$  與 PPAR  $\gamma$  間不斷的相互作用，並且共同啟動脂肪細胞特定基因表現，如 leptin、adiponectin、aP2 (adipocyte specific fatty acid binding protein 2)、resistin、lipoprotein lipase、adipsin 等基因轉錄，促使 TG 合成與堆積；而轉錄因子所調控脂肪細胞分化過程如圖 2-2 所示(7)。

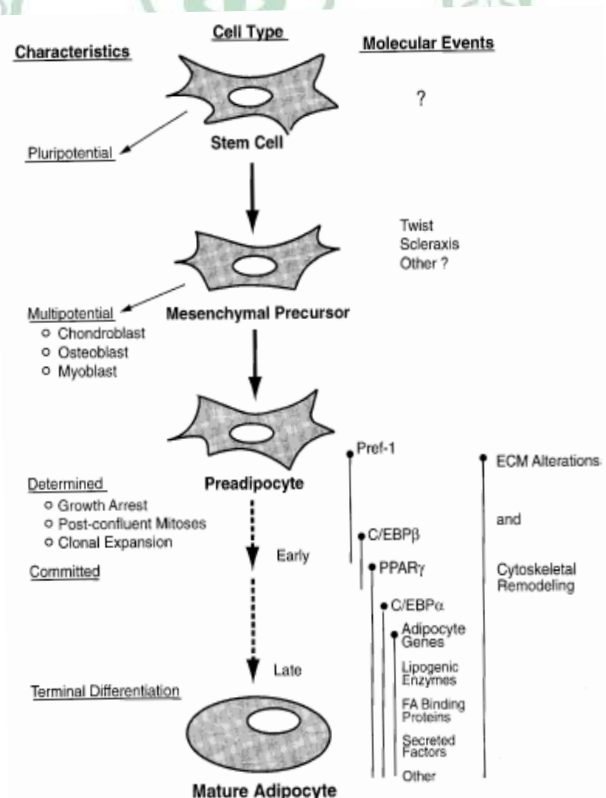
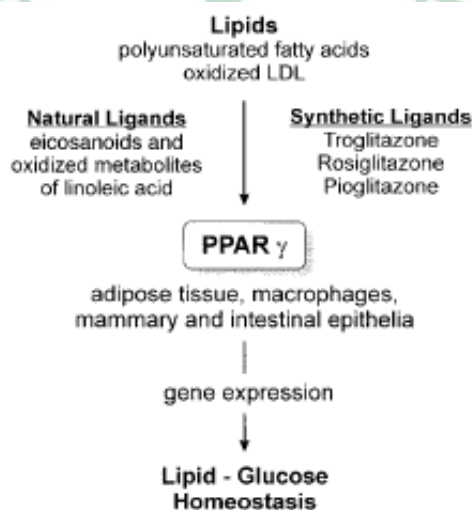


圖 2-2 脂肪細胞分化過程 (7)

Fig 2-2 Stages of adipocyte differentiation.

2、PPAR  $\gamma$  與脂肪細胞分化

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) 屬固醇類荷爾蒙核受器家族 (steroid hormone nuclear receptor family) 為一種轉錄因子，當與專一性 ligand 結合可誘發下游基因的轉錄反應，而早期 PPAR 被選殖出來時，發現可被各種過氧化體增生劑 (peroxisome proliferators;PP) 活化，而 PP 主要以各種 fibrates 類降血脂藥為主，如 clofibrate、ciprofibrate 等，Issemann 等學者於 1990 年發現 arachidonic acid 可活化 mPPAR，並誘發 PPAR 調節之基因轉錄，推測 eicosanoids 在 PPAR 傳訊中扮演重要角色(9)，Gottlicher 等學者也發現 C18:0、C18:1、C18:2、C18:3 等脂肪酸可活化 chimeric receptor 上的 rPPAR(10)，直到 Lehmann 證實治療糖尿病藥物 TZDs 可與 mPPAR  $\gamma$  結合，PPAR 才首次被認為是 ligand-activated transcription factor(11)，而 PPAR 具有三種 isoform 分別是 PPAR  $\alpha$ 、PPAR  $\beta$  和 PPAR  $\gamma$ ，其中 PPAR  $\gamma$  專一表現在脂肪組織，可受脂肪酸或藥物調控而影響脂質與葡萄糖代謝、脂肪細胞分化相關基因表現，說明如圖 2-3 (12)。

圖 2-3 PPAR  $\gamma$  之活化與作用 (11)Fig 2-3 The activation of PPAR  $\gamma$  and its action effect



PPAR  $\gamma$  最早是在哺乳動物中被發現(13)；Spiegelman 學者與其研究團隊也在脂肪細胞中發現脂肪細胞專一性之 PPAR  $\gamma$ ，並且發現 PPAR  $\gamma$  會大量表現在脂肪組織中且會於脂肪細胞生合成期間被誘導(14, 15)；Tontonoz 等學者將纖維母細胞利用 Retrovirus 異位表現 PPAR  $\gamma$  的 gain-of-function 方式，首次指出 PPAR  $\gamma$  在脂肪細胞生合成中扮演重要角色(16)。1999 年 Barak 及 Kubota 等學者利用基因剔除胚胎 PPAR  $\gamma$  的小鼠的模式，發現小鼠於胚胎 10-10.5 天期間由於胎盤不正常而導致胎死腹中(17, 18)。為了解決 PPAR  $\gamma^{-/-}$  embryo 無法存活的問題，Rosen 等學者利用 wild-type ES cells 與完全剔除 PPAR  $\gamma$  之 ES cells 製造出 chimeric mice (19)；Barak 等學者利用正常的 tetraploid cells 校正胎盤之缺失製造 chimeric embryo，解剖後發現沒有棕色或白色脂肪組織(17)，二個學者成功製造缺乏 PPAR  $\gamma$  小鼠，並證明 PPAR  $\gamma$  在脂肪組織形成之重要性。

之後 He 等學者利用 cre-loxp 技術產生 PPAR  $\gamma$  的 knockout mice，其皮下和副睪脂肪塊、血漿 leptin 和 adiponectin 會減少、血漿游離脂肪酸與三酸甘油酯會增加(20)；Zhang 等人選擇性破壞 PPAR  $\gamma_2$  發現會使小鼠腹膜後、腹股溝以及生殖器周邊脂肪減少(21)。

PPAR  $\gamma$  被認為是決定脂肪細胞分化重要因子，證據還包括 Lehmann 等學者發現高度專一性 PPAR  $\gamma$  ligand-抗糖尿病藥物 thiazolidinediones (TZDs)，可以促進脂肪細胞分化(11)，另一 PPAR  $\gamma$  之 ligand-BRL49653 也證實可促進鼠胚纖維母細胞 C3H10T1/2 分化為脂肪細胞(22)。

## 二、3T3-L1 介紹

近來前脂肪細胞株如 3T3-L1、3T3F442A(23)、Ob1771(24)以及初代培養前脂肪細胞 (stromal-vascular cell ; SV cell) 為研究脂肪細胞分化常用之體外模式，3T3-L1 及 3T3F442A 都來自於 Swiss 3T3 cell，而 Swiss 3T3 cell 是由 Green 等學者由小鼠胚胎纖維母細胞 (fibroblasts) cloning 出來具有高度分化為成熟脂肪細胞潛力的前脂肪細胞株(25)。

在 in vitro 模式為促使前脂肪細胞分化為脂肪細胞，常在細胞長滿後更換為分化培養基 (differentiation medium)，其中添加數種化學藥品或荷爾蒙，以促進分化發生，以下就這些成分說明：

### 1、dexamethasone (DEX)

dexamethasone (DEX) 屬於 glucocorticoids，Rubin 等學者利用 DEX 及 MIX (methylisobutylxanthine)作為 3T3-L1 cells 分化的 differentiation cocktail 成分(26)，DEX 可透過促使 C/EBP  $\beta$  和 C/EBP  $\delta$  形成 heterodimers，來活化 PPAR  $\gamma$  表現(8, 27)；另外在 PPAR  $\gamma$  和 C/EBP  $\alpha$  transfection 研究也發現 DEX 可誘導 preadipocyte 分化為 adipocyte(28)。

### 2、methylisobutylxanthine (MIX)

MIX 和 DEX 一樣都會促進脂肪細胞的分化作用，它是透過增加 C/EBP  $\beta$  表現，抑制 phosphodiesterase 及競爭抑制 A1 adenosine receptor，也透過阻斷 inhibitory regulatory protein G1 來刺激 adenylyl cyclase 活性，表示 MIX 可透過增加 cAMP 來促進分化(7)。

### 3、insulin

insulin 以促進 deoxyglucose uptake，並將 glucose 轉換成 CO<sub>2</sub> 及 lipid，另外由於 p38 mitogen activated protein kinase (MAPK) 可以促進 preadipocyte 自發性分化作

用(29)，加上 insulin 可以刺激 p38 MAPK 活性(30)，所以可以促進分化；而在分化後的第三或第四天起 insulin binding 活性會增加到 6-10 倍(26)。

#### 4、biotin

為脂肪酸合成過程中之關鍵酵素 ACC (acetyl-CoA carboxylase) 的 cofactor，故添加 biotin 可促進脂肪酸合成，促進分化作用。

### 三、食物成分與脂肪細胞生合成相關研究

#### (一) 脂肪酸類

##### 1、一般脂肪酸 (Common fatty acid)

Medium-chain triglycerides (MCT) 餵食動物會降低脂肪細胞數目及大小，因為 MCFA 可增加粒線體  $\beta$ -oxidation。另外給予大鼠 MCTs 會降低大鼠脂肪塊、向下調節 PPAR  $\gamma$ 、C/EBP  $\alpha$  及其下游基因，改善 insulin 敏感性及葡萄糖耐受性，類似的結果在以 MCFA 處理的 SV cell 中也發現，與 control 組 long-chain fatty acid (LCFA) 比較，MCFA 會降低 PPAR  $\gamma$  和 C/EBP  $\alpha$ ，在 3T3-L1 脂肪細胞上也可發現，C10:0 和 C18:1 比較，其促分化效果較差，且會抑制 3T3-L1 分化及成熟脂肪細胞的 lipogenesis(31)。

同樣是 SFA 的 C8:0 處理 3T3-L1 也會抑制 adipogenic gene，如 PPAR  $\gamma$ 、C/EBP  $\alpha$ 、SREBP-1c，抑制分化(32)；visfatin 為內臟脂肪分泌為類 insulin 蛋白質，C16:0 及 C18:1 會向下調節 3T3-L1 前脂肪及成熟脂肪細胞 visfatin mRNA 表現，降低 insulin 促進 glucose uptake 造成 insulin 阻抗(33)。

Amri 等學者以各種脂肪酸處理 Ob1771 脂肪細胞，發現脂肪酸皆會促進 aP2 gene 表現，且 LCFA ( $\geq$ C12) 如 C16:0、C18:0 比 SCFA 佳，也發現 PUFA (如 C18:3) 比 MUFA (如 C18:1) 好，SFA 最差(34)。

在 PUFA 的動物實驗證據，Xu 等學者則是給予大鼠魚油，發現 FAS mRNA 表現降低，ACO mRNA 表現增加(35)，降低脂肪組織及抑制 rodents

肥胖(36)；細胞實驗證據有 Hsu 等學者利用豬隻皮下脂肪作初代脂肪細胞培養，投予 PUFA 包括有 arachidonic acid (AA)、*c9,t11* conjugated linoleic acid (CLA)、Docosahexaenoic acid (DHA；C22:6)，發現都會增加 FAS、ADD1 mRNA 降解，降低 FAS、ADD1 mRNA 以及促進 ACO mRNA 表現，其中又以 DHA 100  $\mu$ M 效果最強(37)。另外以 DHA 50-200  $\mu$ M 處理 3T3-L1，發現會抑制 3T3-L1 分化，增加脂解作用(38)，同樣的若給予 *t10,c12* CLA 也會抑制 3T3-L1 分化(39)(40)。

## 2、特殊脂肪酸 (Uncommon fatty acid)

### (1) Conjugated linolenic acid

conjugated linolenic acid (CLN) 為 18 個碳含有 3 個共軛雙鍵的不飽和脂肪酸(結構請見表 2-1)，存在於特殊種籽油中，如苦瓜 (karela oil) 及桐油 (tung oil) 中含有 60-70% *c9,t11,t13* CLN ( $\alpha$ -eleostearic acid)，石榴油 (pomegranate seed oil) 中含 72% *c9,t11,c13* CLN (punicic acid)，樟樹籽油 (Catalpa seed oil) 含 31% *t9,t11,c13* CLN (catalpic acid)、金盞花籽油 (pot marigold seed oil) 含 33% *t8,t10,c12* CLN (calendic acid)(41)。

*c9,t11,c13* CLN 為苦瓜中主要且特殊的脂肪酸，在生理方面已證實具有抗癌、降血糖、降體脂等功能。在抗癌方面證據包括，Kohno 等學者給予 AOM (azoxymethane) 誘導大腸癌之大鼠富含 CLN 苦瓜籽油，發現 0.01-0.1% 苦瓜籽油可以增加大腸粘膜上的 PPAR  $\gamma$  protein，並且抑制 colon carcinogenesis(42, 43)；Yasui 等學者也證實苦瓜中 CLN 可以誘導人類大腸癌 Caco-2 細胞凋亡(41)。不只苦瓜中 CLN，石榴中的 CLN 也顯示抗癌功能，如 Kohno 等學者以 AOM 誘發大鼠大腸癌再給予富含 CLN 的石榴油萃製物 (Pomegranate seed oil；PGO)，發現 PGO 0.01%-0.1% 可抑制腫瘤數量及抑制 adenocarcinoma 發生(44)。

*c9,t11,c13*-CLN 降體脂之間接證據包括將苦瓜汁添加於飼料中，發現可透過增加肝及肌肉 CPT-1 (carnitine palmitoyltransferase 1) 和 acyl-CoA dehydrogenase 活性來增加脂肪酸氧化來降低體脂(45)，另外苦瓜具有降低高糖血症(46, 47)，Koba 等學者利用動物模式將 CLN 複合物 (conjugated diene 及 triene) 添加於飲食中，發現 CLN 可降低白色脂肪組織含量(48)。

此外 *c9,t11,c13*-CLN 在細胞實驗研究包括，Chao 等學者利用苦瓜萃取出物處理肝細胞 H4IIEC3，發現增加肝細胞中 ACO 活性及 mRNA 表現(49)，Chuang 等學者同樣利用肝細胞模式，發現苦瓜可透過活化肝臟 PPAR  $\alpha$ ，促進肝細胞中 ACO 活性及其 gene 表現的功能成分是苦瓜中的 *c9,t11,c13*-CLN(50)；Nishimura 等學者使用苦瓜萃取出物處理 3T3-L1 脂肪細胞，發現 200  $\mu$ M 會誘導 3T3-L1 preadipocyte 細胞凋亡(51)。

## (2) Phytanic acid

Phytanic acid (3,7,11,15-tetramethyl hexadecanoic acid ;  $C_{20}H_{40}O_2$ ) 為具有 4 個甲基的支鏈飽和脂肪酸 (結構請見表 2-1)，綠色植物中富含大量的 chlorophyll，含有 phytol (3,7,11,15-tetramethylhexadec-2-en-1-ol) 側鏈，經由反芻類動物瘤胃中之微生物可將葉綠素中一半的 phytol 釋出，並且代謝成 phytanic acid。因為人體無法將葉綠素中 phytol 釋出，經由放射性標定 chlorophyll 在人類及大鼠的消化道中消化程度實驗，發現食入的 chlorophyll 有 95% 以上會排出體外(52, 53)，所以透過外源性之飲食來源，如反芻類動物脂肪、魚類及乳製品，人類可能攝取到 phytanic acid，或者富含葉綠素食物經加工 (如醃處理) 可能會使葉綠素之酯鍵斷裂釋出 phytol，人吃入此類食品後經過體內氧化還原酶之作用轉成 phytanic acid (PA) (54)。

PA 經飲食進入體內必須經由過氧化小體進行  $\alpha$ -oxidation 生成 pristanic

acid (2,6,10,14-tetramethylpentadecanoic acid ;  $C_{19}H_{38}O_2$ )，再行  $\beta$ -oxidation 生成 propionyl-CoA ; phytanoyl-CoA hydroxylase (PAHX 或 PhyH) 是 phytanic acid 進行  $\alpha$ -oxidation 第一個酵素，患有 Refsum、過氧化小體合成缺陷、rhizomelic chondrodysplasia punctata type I 及 Zellweger syndrome (ZS) 的病人都缺乏此一酵素，造成 PA 累積(55)(56, 57)。

已知 PA 為 PPAR  $\alpha$  活化劑，會增加大鼠初代肝細胞中 GLUT1、GLUT2 mRNA 表現，增加 glucose uptake(58)。另外在脂肪細胞方面，pristanic acid 及 PA 二者，只有 PA 可促進 UCP-1 (uncoupling protein-1) gene 轉錄，促進棕色脂肪細胞分化(59)，並且共同作用誘導棕色脂肪細胞分化特定 gene 表現，如 aP2 (adipocyte lipid-binding protein)、LPL、GLUT4、cytochrome c oxidase subunit II 等(60)，活化 BAT (brown adipose tissue) 生熱作用。Schluter 等學者使用 3T3-L1 前脂肪實驗發現，與 vehicle control 相比，PA 可促細胞分化作用(61)。

## (二) 天然抗氧化物

### 1、 Epigallocatechin Gallate (EGCG) :

EGCG 茶中含量豐富 (結構請見表 2-2)，茶葉是來自於 *Camellia sinensis* 經由不同的製程，可分為未發酵的綠茶、半發酵的烏龍茶、包種茶，以及完全發酵的紅茶和普洱茶，而東方國家比較常飲用綠茶、烏龍茶和普洱茶，西方國家則是偏好紅茶(62, 63)。經由發酵過程會使茶葉中的成分改變，紅茶及普洱茶中的單體兒茶素減少，catechins 會經由多酚氧化酶形成 quinone，再濃縮形成聚合物 theaflavins 如 TF-1 (theaflavin)、TF-2a ( theaflavin-3-gallate) ， TF-2b (theaflavin-3'-gallate) 、 TF-3 ( theaflavin-3,3'-digallate)，和 thearubigins。(64)。兒茶素成分分析其中 (-)-epicatechin (EC)、(-)-epigallocatechin (EGC)、(-)-epigallocatechin gallate

(EGCG) 三種成分，在綠茶、烏龍茶含量高於紅茶和普洱茶(65)。

EGCG 生理功能相關研究包括有，綠茶兒茶素為 polyphenolic flavonoids 過去曾被稱為維生素 P，其特殊結構於 1952 年由 Roberts 等學者發現，是未發酵茶中主要的成分，綠茶中兒茶素以 EGCG 為主要活性成分，已被證實具有抗癌、抗氧化(66)、抗脂質過氧化能力(67, 68)，降低體重及體脂(69)(70)(71)，增加肝臟  $\beta$ -oxidation 活性增加脂質代謝(72)。

人體試驗方面 Nakagawa 等學者給予健康受試者綠茶萃取物錠(內含 525mg EGCG、17.5mgEGC)90 分鐘後，發現血漿 EGCG 及 EGC 濃度分別為 4.3、0.3  $\mu$ M(73)，另外口服綠茶萃取物 20mg / kg body weight 溶於 200mL 溫水，約 1 到 2 小時後，血中 EGCG、EGC、EC 濃度分別是 0.17  $\mu$ M、0.5  $\mu$ M、0.42  $\mu$ M (74)。

降體脂及血脂之動物實驗證據如下，在幾種不同茶中降低肥胖 SD 大鼠體重及降低血清三酸甘油酯方面，烏龍茶、普洱茶優於綠茶、紅茶，又以普洱茶最好，但降低膽固醇則是普洱茶、綠茶比烏龍茶、紅茶好(65)(75)；對於飲食誘導肥胖的 C57BL/6J mice，若是給予綠茶兒茶素搭配運動雙管齊下，對於降低體重、體脂(76)和增加肌肉脂肪酸氧化(77)，以及降低高胰島素血症及 hyperleptinemia 發展是有加成作用(76)。

細胞實驗證據包括有，Chiang 等學者之前證實給予大鼠普洱茶後，發現不僅降低體重及血脂，也抑制了肝臟 FAS (fatty acid synthase) 表現，所以作者投予普洱茶萃取物於肝細胞 HepG2 cell，發現普洱茶是透過 PI3K/Akt 及 JNK (c-Jun N-terminal Kinase) 路徑來抑制 FAS mRNA 及其蛋白質(75)；另外 Waltner 學者同樣使用肝細胞 H4 II EC3，投予 EGCG 發現會抑制 insulin 誘導的 IR (insulin receptor) 及 IRS-1 (insulin receptor substrate-1) 磷酸化作用(78)；除此之外也有學者將烏龍茶萃取物投予脂肪

細胞，發現茶中 caffeine 會增強脂肪細胞正腎上腺素作用，促進脂肪細胞脂解作用(79)；

此外 EGCG 會抑制 3T3-L1 細胞增生(80)，EGCG 100  $\mu$ M 會透過活化 AMPK (AMP-activated protein kinase) (81)和向下調節 resistin mRNA 表現來抑制 3T3-L1 adipocyte 分化(82) (83)，並且誘導成熟 3T3-L1 細胞之細胞凋亡(84)。

## 2、Procyanidins

原花青素 (Procyanidins) 廣泛地存於紅酒、葡萄、可可、蘋果中，是 flavonoids 的一種，由許多的 catechin 聚合形成 oligomeric form(結構請見表 2-2)，具有抗心血管疾病功能，近來也有和抗肥胖的相關研究。

其生理功能之動物實驗包括：給予大鼠口服 procyanidins 200 mg / kg BW，約 1 小時後在血中及肝臟中就可以偵測到體內 procyanidins 達最大濃度 14 mg / L(85)，而葡萄籽中的 procyanidins 可以改善糖尿病的氧化狀態(86-89)，由於 procyanidins 具有 insulinomimetic 活性，可經由 PI3K 及 p38MAPK 路徑並且增加 GLUT4 (glucose transporter-4) 轉位到膜上，促進葡萄糖汲取並傾向 glycerol 合成(90)，降低以 STZ 誘發糖尿病大鼠血糖，具有抗高血糖症功能(90)。

在細胞實驗證據包括有，Procyanidins 具有類似 TNF- $\alpha$  的功能，會向下調控 adipocyte marker 如 glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)、hormone sensitive lipase (HSL) 活性及 PPSR  $\gamma$  mRNA 表現(91)，抑制脂肪細胞分化(92)，另外也會增加 3T3-L1 脂肪細胞脂解速率(93)。

## 3、Curcumin

微黃色，常見薑科植物之薑黃 (*Curcuma longa* L.) 中 (結構請見表 2-2)，在亞洲地區屬於傳統醫療，用於治療發炎及其他疾病，市面薑黃粉



末每 100g 含有 2.71-5.18g curcuminoids，市售咖哩粉末每 100g 約含有 0.34-0.47g 薑黃粉末(94)。

在生理方面 curcumin 具有抗氧化(95, 96)、抗癌(97, 98)等功能，Asai 等學者於飼料中添加 1% curcumin 複合物給予 SD 大鼠，可降低體脂、肝脂、增加肝臟 ACO 活性，(99)，Nishiyama 等學者，給多 type2 DM KK-A<sup>y</sup> mice 0.1-0.5 g / 100 g diet 薑黃萃製物 4 週後可以降低血糖，薑黃酒精萃製物可促進人類脂肪細胞分化，另外在 GAL4-PPAR  $\gamma$  chimera assay 中發現薑黃萃製物 5  $\mu$ g / mL (約為 13.5  $\mu$ M) 為 PPAR  $\gamma$  ligand(100)。

#### 4、Naringenin

常見於柑橘類水果及葡萄柚中 (結構請見表 2-2)，在動物實驗方面 Lee 等學者以 naringenin (0.1%，wt/wt) 合併高脂飲食餵食大鼠，發現可降低餵食高脂飲食之大鼠血液及肝臟膽固醇(101)。

根據 1997 年美國農業部調查，個人每日柑橘類攝取量約為 68 g，而其中 59g 來自於果汁，每 100 g 葡萄柚約含有 78 mg naringenin；若食用一個中型葡萄柚相當於攝取 200 mg naringenin，血中濃度達 0.7-14.8  $\mu$ M(102)；在芬蘭 naringenin 攝取量約為 8.3 mg / day；Erlund 等學者以 HPLC 分析柑橘類及葡萄柚水果中 naringenin 含量，發現柑橘類水果中 naringenin 含量為 151  $\mu$ M (41 mg / L)，葡萄柚中 naringenin 含量為 1283  $\mu$ M (349 mg / L)，此外又將柑橘類及葡萄柚果汁給予健康受試者 8 mL / kg 每日給予一次，柑橘類及葡萄柚中 naringenin 在血液中濃度高峰分別為 0.6  $\pm$  0.4  $\mu$ M 和 6.0  $\pm$  5.4  $\mu$ M，若一次給予 20 oz (約 600 mL) 葡萄柚汁在人體血液中 naringenin 高峰為 6  $\mu$ M(102)。

接著 Erlund 等學者又以 6  $\mu$ M 處理成熟脂肪細胞，發現則可降低 insulin 刺激的 glucose uptake 作用，並且維持 24 小時(103)，另外 Harmon 等學者

使用 3T3-L1 脂肪細胞，投予 naringenin 100  $\mu$ M，發現可以抑制 3T3-L1 preconfluent preadipocyte 增生(104)。

#### 5、Ascorbic acid

為水溶性維生素 (結構請見表 2-2)，在細胞實驗相關研究包括有，Kawada 等學者投予 Ascorbic acid 10 - 200  $\mu$ M 於 3T3-L1，則細胞內 TG 含量增加，促進 3T3-L1 分化(105)，同樣 3T3-L1 為模式，給予 0.2 mM ascorbic acid phosphate 發現也會促進 3T3-L1 分化(106)。

由於治療 HIV 藥物 Nelfinavir 會造成 AIDS 病患產生 lipodystrophic syndrome，若合併給予 100mM ascorbate 及 Nelfinavir 於 3T3-F442A 脂肪細胞，則可改善 70%細胞壞死的情形(107)。

#### 6、Resveratrol

3,5,4'-trihydroxystibene 存在於葡萄皮、紅酒 (結構請見表 2-2)，在動物實驗相關研究包括有，給於高齡 (約 48 週齡大) C57BL/6NIA mice 餵食 22.4 mg / kg / day resveratrol，則可增加 insulin 敏感性、延長壽命改善健康 (108)。

在細胞實驗相關研究有，Picard 等學者發現 50  $\mu$ M resveratrol 可抑制 3T3-L1 成熟脂肪細胞 lipogenesis，增加脂解作用(109)；Backesjo 等學者發現 50  $\mu$ M resveratrol 可抑制 C3H10T1/2 間葉細胞形成的 adipocyte 中 PPAR  $\gamma$ ，活化 sirt1 阻斷 adipocyte 的發展(110)。

#### 7、Apigenin

芹菜配醣體，常見於荷蘭芹、甘菊、車前草等 (結構請見表 2-2)，生理實驗相關研究發現，若人體攝取富含 apigenin 的食物-川燙荷蘭芹 2 g (濃度約為 65.8  $\mu$ M) 72 小時後，血中 apigenin 濃度為 127 nM，而 24 小時後尿中濃度為 144 nM(111)。

動物實驗相關證據包括，Yano 等學者給予 C57BL/6N mice apigenin 則會抑制 Ig E 及發炎相關 cytokines，如 TNF $\alpha$  等(112)；給予 mice 高脂飲食誘導肥胖後，再給予 5%柳樹葉 (*Szlix matsudana Koidz*) 萃取出的多酚類化合物，其中包含有 apigenin-7-O-beta-D-glucopyranoside 可降低肝中總膽固醇，抑制小腸吸收脂質(113, 114)，增強脂肪細胞的脂解作用(113, 115)。

另外 apigenin 也會造成 2 種細胞之細胞凋亡證據如下，Chiang 等學者發現 apigenin 會經由 p53 路徑誘導 p21 表現，使細胞週期停滯於 G2/M 期，來使 Hep G2 cell 細胞凋亡(116)；在小鼠成骨細胞株 MC3T3-E1 細胞也是如此(117)。

#### 8、Quercetin

5,7,3',4'-hydroxyflavanol 常見於洋蔥、茶 (如蕎麥茶)、蘋果等食物中(結構請見表 2-2)，在初代脂肪細胞實驗相關研究包括，Shisheva 等學者使用大鼠初代脂肪細胞投予 47  $\mu$  M quercetin，發現可以抑制大鼠初代脂肪細胞約 50% lipogenesis 反應，110  $\mu$  M quercetin 則可抑制 100%(118)；10-250  $\mu$  M quercetin 可增強 epinephrine 誘發的脂解作用(119)，10-100  $\mu$  M quercetin 會抑制 glucose uptake(120)；另外 Kim 等學者則是使用了人類脂肪組織來源之初代細胞 (human adipose tissue-derived stromal cells；hADSC)，投予 2-10  $\mu$  M quercetin 後發現也會抑制增生，但促進分化作用(121)；此外在 3T3-L1 脂肪細胞方面，Hsu 等學者使用 50-200  $\mu$  M quercetin 發現 quercetin 會透過向下調節 PARP (Poly-ADP-ribose polymerase) 及 Bcl-2 蛋白質，增加 caspase-3、Bax 等蛋白質，來促進 preadipocyte apoptosis(122)。

#### 9、Genistein

常見於大豆 (結構請見表 2-2)，genistein 0.1-1 mM 可抑制大鼠初代脂肪細胞 lipogenesis (123)及抑制 leptin 分泌(124)，在 human primary bone

marrow stromal cells 方面，genistein 也會抑制 adipogenic differentiation(125)。

在 3T3-L1 脂肪細胞方面，100  $\mu$ M genistein 會抑制 preconfluent 及 mitotic clonal expansion 階段增生，抑制分化(126)並促進脂解作用(104)，抑制 glucose uptake(127)。

而若攝取含有高量 genistein (90 mg)，體內 genistein 濃度也只會有 0.6  $\mu$ M(128)。



表 2-1 脂 肪 酸 化 學 結 構

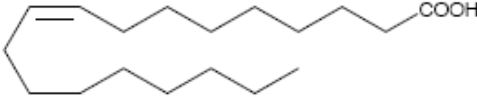
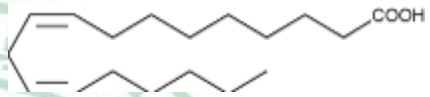
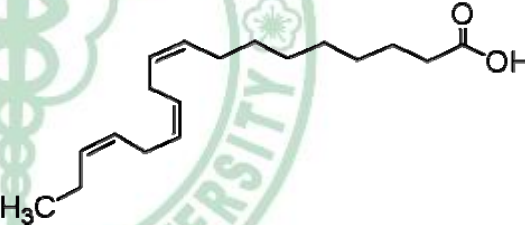

化 合 物	結 構
Oleic acid	
Linoleic acid	
$\alpha$ -Linolenic acid	
Stearic acid	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_2\text{COOH}$
Palmitic acid	

表 2-1 脂 肪 酸 化 學 結 構

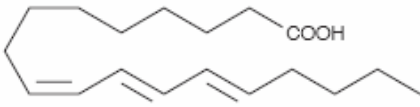
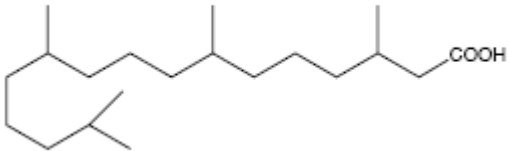
化 合 物	結 構
<i>c</i> 9, <i>t</i> 11, <i>t</i> 13-conjugated linolenic acid ( $\alpha$ -eleostearic acid ; 9 <i>Z</i> ,11 <i>E</i> ,13 <i>E</i> -octadecatrienoic acid ; <i>c</i> 9, <i>t</i> 11, <i>t</i> 13-CLN)	
Phytanic acid (PA)	

表 2-2 天然抗氧化物化學結構

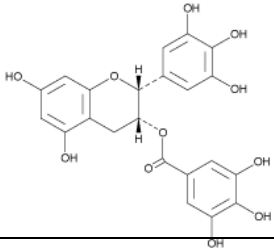
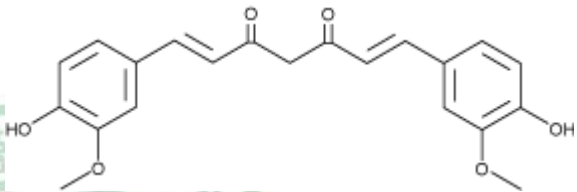
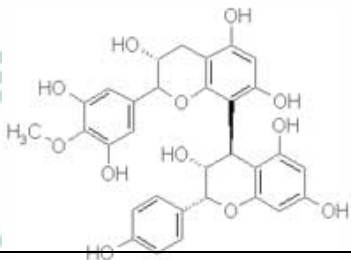
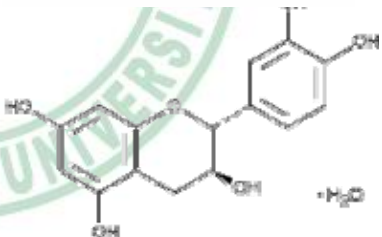
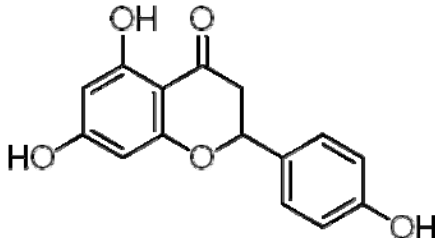
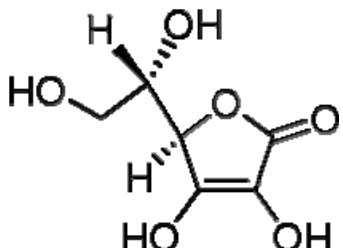
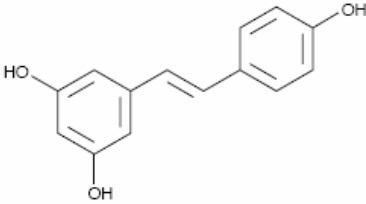
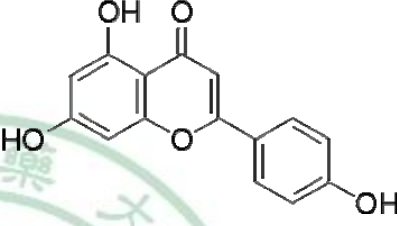
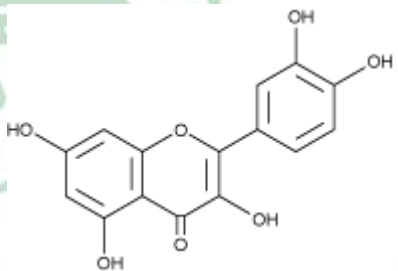
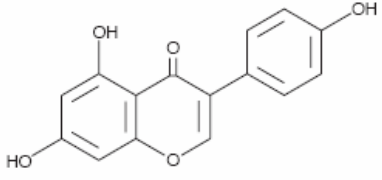
化合物	結構
Epigallocatechin gallate (EGCG)	
Curcumin	
Procyanidin	
catechin	
naringenin	
Ascorbic acid	

表 2-2 天然抗氧化物化學結構

化合物	結構
Resveratrol	
Apigenin	
Quercetin	
Genistein	



### 第三章 材料與方法

#### 一、實驗假說

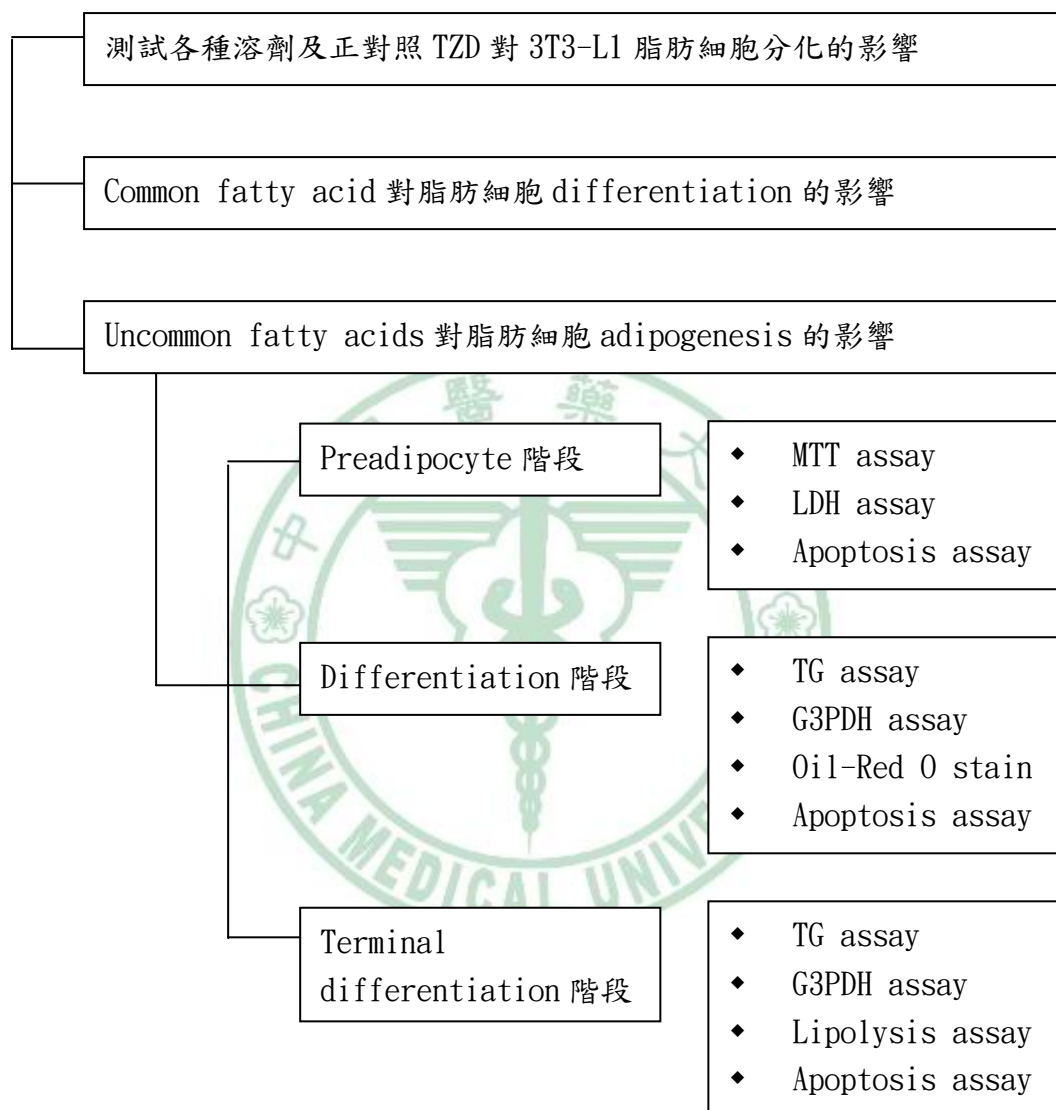
食物中特殊脂肪酸包括 *c9,t11,t13* conjugated linolenic acid ( $\alpha$ -eleostearic acid ; 9Z,11E,13E-octadecatrienoic acid ; CLN) 和 phytanic acid (PA)，以及天然抗氧化物中或許具有 anti-adipogenesis 功能之成份，可以抑制 3T3-L1 前脂肪細胞增生、分化及成熟脂肪細胞脂質堆積，或促進(前)脂肪細胞凋亡。

#### 二、實驗設計

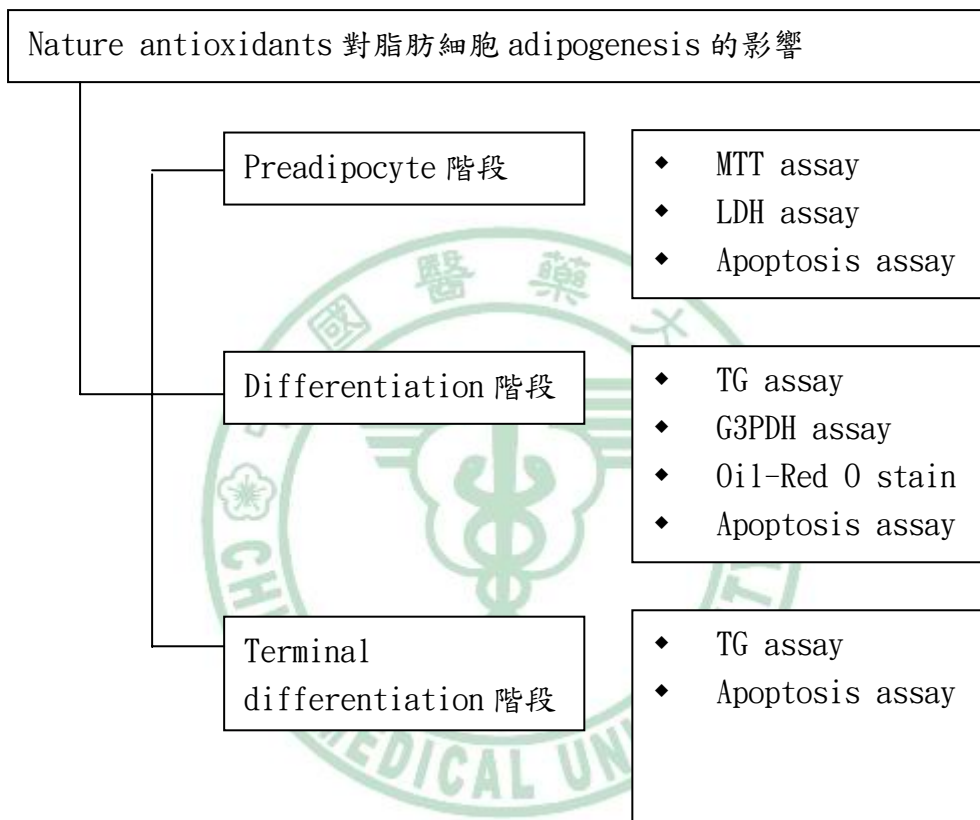
實驗可為二部分，第一部分為脂肪酸對 3T3-L1 脂肪細胞脂質生合成影響，第二部分為天然抗氧化物對 3T3-L1 脂肪細胞脂質生合成影響，說明如下：



第一部分：脂肪酸對 3T3-L1 脂肪細胞脂質生合成影響



第二部分：天然抗氧化物對 3T3-L1 脂肪細胞脂質合成影響



### 三、細胞培養

#### 1、細胞株

前脂肪細胞株 3T3-L1 購自食品工業發展研究所菌種中心/國家衛生研究院細胞庫，菌種中心編號 BCRC 60159，細胞株來源 ATCC CL-173，組織來源：Mouse embryo

#### 2、培養基組成與配製

先將 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco) 粉末溶解，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 1L 後以過濾膜 (0.22 $\mu$ m) 過濾。medium 為配好的 DMEM 再加入 10% Bovine serum (BS) (Gibco)、2% L-glutamine (Biological industries) 及 1x antibiotic-antimycotic (內含 penicillin G sodium、streptomycin sulfate、amphotericin B; Gibco)，此為 maintain medium (10%BS-DMEM)。

#### 3、細胞繼代培養

細胞解凍後以  $4 \times 10^5$  cells 接種於 75T flasks，並加入 20% BS-DMEM，待隔日細胞完全貼附後去除舊的 medium，加入新的 10% BS-DMEM，於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下培養，每 3-4 天進行繼代培養。

繼代培養時為待細胞約長滿 (約 90 % confluence)，移去培養基以 1X PBS 清洗細胞二次後，加入 1mL trypsin-EDTA 潤濕所有細胞後，放入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下作用約 8-10 分鐘後取出，加入 10% BS-DMEM 9mL 中和反應並使細胞脫落後，經由 trypan blue solution 染色，以細胞計數盤在倒立式顯微鏡下計數細胞數後，再將細胞種入新的 75T flask。解凍後細胞均進行繼代培養 2 代後才進行實驗，實驗使用的繼代數均控制於 p=U+8+11 至 p=U+8+13。

## 四、誘導 3T3-L1 脂肪細胞分化

根據許多文獻資料，以 3T3-L1 前脂肪細胞株建立脂肪細胞分化流程

## 1、藥品配製：

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

藥品	需要量	conc.
Dexamethasone (SIGMA D-4902)	0.098 g	0.25 M
DMSO	1 mL	
先將 0.098 g DEX powder 溶於 1 mL DMSO 中，即得 0.25 M DEX		

藥品	需要量	Stock conc.	Working conc.
0.25 M DEX	10 $\mu$ L	0.25 mM	0.25 $\mu$ M
DMSO	10 mL		
將 0.25 M DEX 以 DMSO 稀釋為 0.25 mM DEX，分裝於滅菌 eppendorf 中，貯於-20 $^{\circ}$ C			

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

藥品	需要量	Stock conc.	Working conc.
3-isobutyl-1-methyl-xanthine (SIGMA I5879-1G)	0.111 g	0.5 M	0.5 mM
DMSO	1 mL		
將 0.111 g MIX powder 溶於 1 mL DMSO 中，分裝於滅菌 eppendorf 中，貯於-20 $^{\circ}$ C			

(3) 100  $\mu$ g / mL Biotin : 1000x stock

藥品	需要量	Stock conc.	Working conc.
Biotin (SIGMA B-4501)	0.01 g	100 $\mu$ g / mL	0.1 $\mu$ g / mL
二次水	100 mL		
將 0.01 g biotin powder 溶於 100 mL 二次水中，以 0.2 $\mu$ m filter 過濾分裝於滅菌 eppendorf 中，貯於-20 $^{\circ}$ C			

## (4) 10 mg / mL Insulin : 1000x stock

藥品	需要量	Stock conc.	Working conc.
Insulin (SIGMA I6634)	0.1 g	10 mg / mL	10 $\mu$ g / mL
0.01N HCl	10 mL		
將 0.1 g insulin powder 溶於 10 mL 0.01N HCl 中，以 0.2 $\mu$ m filter 過濾分裝於滅菌 eppendorf 中，貯於-20 $^{\circ}$ C			

## 2、培養基：

在分化實驗中所使用的分化 medium 可分為以下二種

Differentiation medium I (DM I) : 10 % BS-DMEM 含 0.25  $\mu$  M DEX、0.5mM MIX、10  $\mu$  g/mL Insulin 及 0.1  $\mu$  g/mL Biotin

Differentiation medium II (DM II) : 10 % BS-DMEM 含 10  $\mu$  g/mL Insulin、0.1  $\mu$  g/mL Biotin

## 3、方法：

誘導分化的實驗，首先將細胞以  $2 \times 10^5$  cells/well 接種於 12-well plate 之後，待細胞長滿後再培養 2 天，就把 maintain medium 換成 DM I (內含 DEX、MIX、insulin、biotin)，培養 3 天去除舊的 medium 再換成 DM II (內含 insulin、biotin) 每 2 天更換 medium 至第 7 天。

而 terminal differentiation 實驗，則是將細胞接種於實驗所需的 plate 之後，待細胞長滿後再培養 2 天，就把 maintain medium 換成 DM I (內含 DEX、MIX、insulin、biotin) 額外加入 100  $\mu$  M linoleic acid，培養 3 天去除舊的 medium 再換成 DM II (內含 insulin、biotin)，此時仍然添加 linoleic acid 至第 7 天誘導細胞形成成熟脂肪細胞。

## 五、各種測試物之處理

## 1、測試物種類

## (1) 脂肪酸測試物：

Oleic acid	Cayman
Linoleic acid	Cayman
$\alpha$ -linolenic acid	Sigma
Palmitic acid	Cayman
Stearic acid	Sigma
<i>c</i> 9, <i>t</i> 11, <i>t</i> 13 conjugated linolenic acid (CLN)	Cayman
Phytanic acid (PA)	Cayman
脂肪酸測試物以絕對酒精配製成 100mM 之 stock solution 進行實驗，實驗組劑量為 10 $\mu$ M、50 $\mu$ M、100 $\mu$ M、200 $\mu$ M，vehicle control 為絕對酒精，劑量為 0.01%、0.05%、0.1%、0.2%	

## (2) 天然抗氧化物類測試物：

Epigallocatechin gallate	Cayman
Curcumin	Cayman
Catechin	Cayman
Naringenin	Sigma
Ascorbic acid	Sigma
Resveratrol	Cayman
Apigenin	Sigma
Quercetin	Cayman
Genistein	Cayman

天然抗氧物測試物以 DMSO 配製成 100mM 之 stock solution 進行實驗，實驗組劑量為 10  $\mu$ M、50  $\mu$ M、100  $\mu$ M，vehicle control 為 DMSO，劑量為 0.01%、0.05%、0.1%

2、前脂肪細胞增生實驗之測試物處理流程

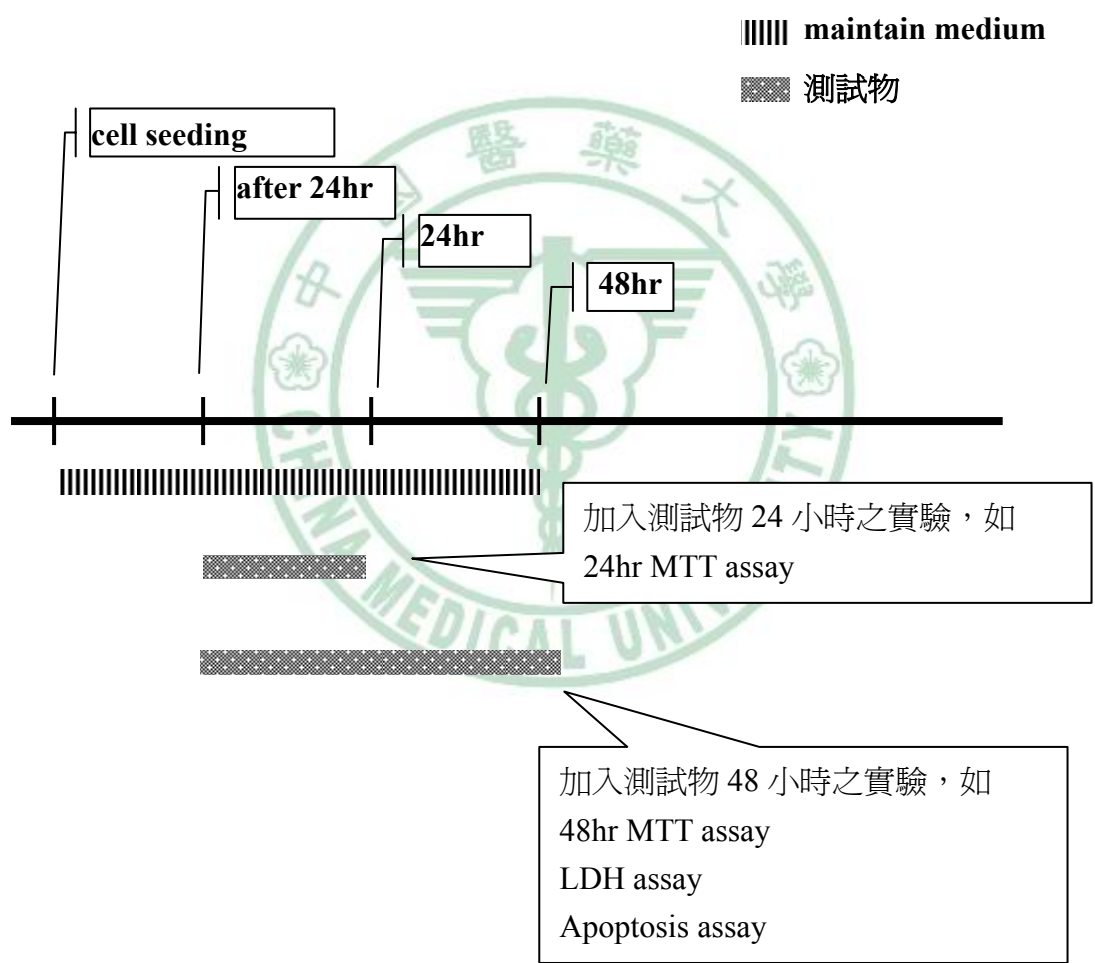


圖 3-1 前脂肪細胞增生實驗流程

Fig 3-1 stage of preadipocyte proliferation



3、differentiation 實驗之測試物處理流程

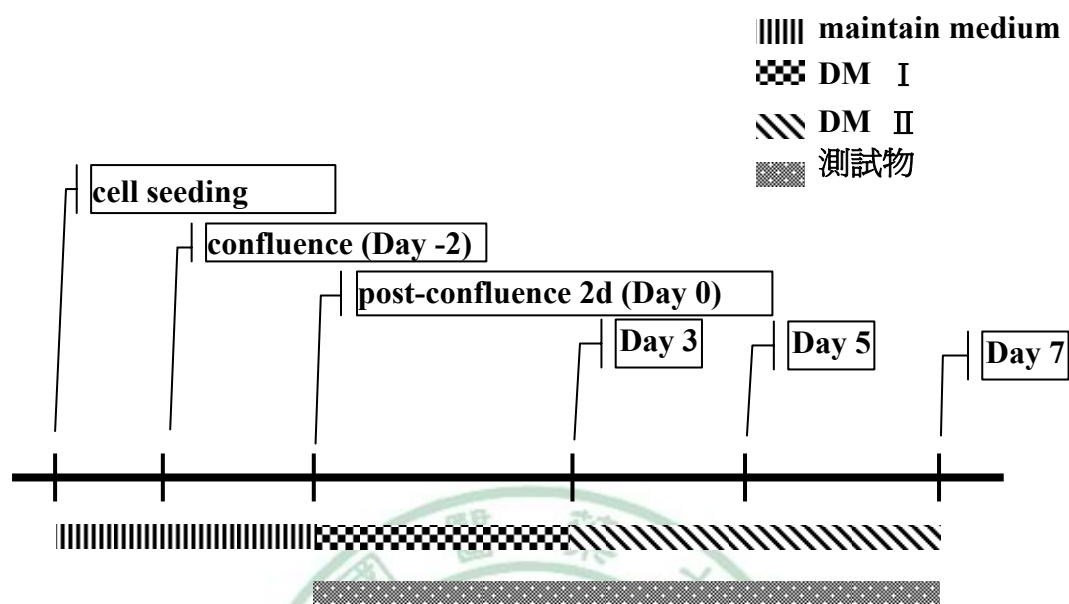


圖 3-2 分化實驗流程

Fig 3-2 stage of differentiation

4、terminal differentiation (mature adipocyte) 實驗之測試物處理流程

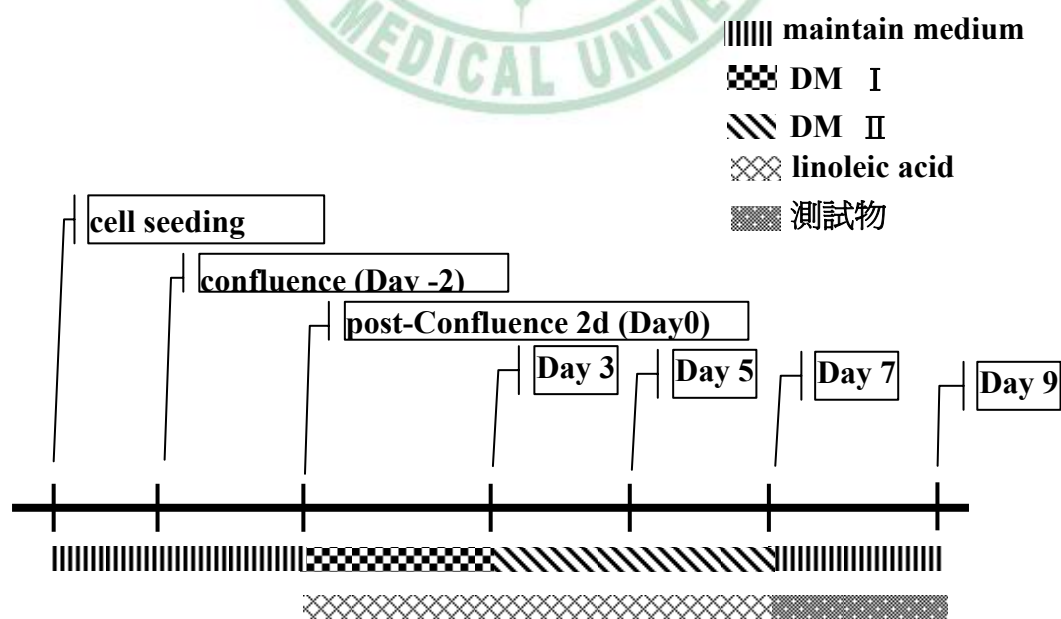


圖 3-3 分化末期實驗流程

Fig 3-3 stage of terminal differentiation

## 六、MTT 染色法細胞存活率測定

## 1、 原理：

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-y1]-2,5-diphenylterazolium bromide)是種活細胞染色法，活細胞粒線體內的 dehydrogenase 會將 MTT 之 tetrazolium ring 打斷形成 formazan，此時 MTT 由黃色轉變藍色，再用 acid isopropanol 將 formazan 溶出，測定 540nm 吸光值，判定細胞存活數。

## 2、 藥品配製：

## (1) MTT stock solution (5 mg / mL)

藥品	需要量
MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide) (USB 19265)	5mg
滅菌 1xPBS	1mL

將 MTT 粉末溶於滅菌的 1x PBS 中，再以 0.2  $\mu\text{m}$  filter 過濾。分裝於 eppendorf 中，貯存在 $-20^{\circ}\text{C}$

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

藥品	需要量
Isopropanol	
12 N HCl	1.6mL

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

## (3) 滅菌 1x PBS + MTT stock solution (當天配置)

藥品	需要量
滅菌 1x PBS	50 $\mu\text{L}$ / well

MTT stock solution

5  $\mu$ L / well

## 3、 方法：

在 96 well micro-plate 接種細胞 ( $1 \times 10^4$  cells / well)，待細胞趴附後加入脂肪酸標準品或多酚類標準品及其對應的 vehicle control，濃度為 10、50、100、200  $\mu$ M，培養 24 及 48 小時後進行 MTT 測定。測定當日吸除舊的 medium 後，以滅菌 1xPBS wash 後吸除，再加入 MTT solution 55  $\mu$ L / well 放入培養箱 37°C 反應 3 小時後，再加入 acidic isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol) 100  $\mu$ L / well，震盪 20 分鐘使染劑溶出後，以 ELISA 測定 540nm 吸光值。

## 4、 計算：

$$\text{Cell viability (\%)} = (\text{test sample} / \text{vehicle control}) \times 100\%$$

## 七、 LDH 細胞毒性之測定

## 1、 原理：

Lactate dehydrogenase(LDH)是一種穩定存在於各種細胞的酵素，所以若細胞受到傷害時，細胞膜破裂之後則 LDH 會釋放到 medium 中，測定 medium 中的 LDH 以表示 cytotoxicity 程度。

## 2、 藥品配製：

使用市售套組 BioVision LDH- Cytotoxicity assay kit II Cat.K313-500

## 3、 方法：

將細胞以  $1 \times 10^4$  cell/well 種於 96well-microplate 24 小時待細胞全部趴附後，換成各種不同實驗濃度 (10  $\mu$ M、50  $\mu$ M、100  $\mu$ M、200  $\mu$ M) 的各種測試物 100  $\mu$ L/well 培養 48 小時，溫和 shake 後離心 600xg 10min，將 medium 取到

ependorf，再從 eppendorf 取出 sample 10  $\mu$  L，並加入 100  $\mu$  L LDH reaction mix 後，室溫反應 30min 測 450nm 吸光。

#### 4、計算

$$\text{Cytotoxicity(\%)} = \frac{(\text{Test sample} - \text{Low control})}{(\text{High control} - \text{Low control})} \times 100$$

Hight control: 不以測試物處理之細胞，再以 lysis solution 處理之吸光值

Low control: 不以測試物處理之細胞之吸光值

### 八、細胞內三酸甘油酯測定

#### 1、原理：



測定 quinoneimine (紫紅色) 在 500nm 測定吸光值

#### 2、藥品配製：

採用市售試劑組 (RANDOX, Amtrim, UK)，將 Buffer 1 (含 pipes buffer pH7.6, 4-chlorophenol, magnesium-ions) 與 Enzyme reagent 2 (含 4-aminophenazone, ATP, lipase, glycerol-kinase, glycerol-3phosphate oxidase, peroxiase) 混合，配成反應試劑備用。

#### 3、方法：

吸除舊的 medium 後，緩緩加入 1mL 之 1x PBS 潤濕整個培養皿後吸除，重複二次，再以細胞刮勺將細胞刮下，加入適量 1xPBS 將細胞沖下，細胞液收集至 1mL eppendorf 中，以 100xg 離心 5 分鐘，小心去除上清液，加入 0.5mL

二次水打散 pellet 後，以 sonicator 打破細胞，儲存於-20°C。

取 4  $\mu$ L Sample 或 triglycerides standard 於 96 well micro-plate 中，加入 200  $\mu$ L 上述反應試劑，於室溫反應 10 分鐘，測 500nm 之吸光值。另做 Blank 及 triglycerides standard 作為對照，根據下列公式計算細胞內三酸甘油酯含量。

#### 4、計算

$$\text{Triglycerides (mg/mL)} = (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}} / A_{\text{standard}} - A_{\text{blank}}) \times 2 \text{ (mg/mL)}$$

### 九、細胞內 G3PDH 活性測定

#### 1、原理：

參考 Kozak & Jensen(1974)之方法。細胞質中的 G3PDH 為三酸甘油酯合成之指標酵素，催化反應如下：



#### 2、藥品配製：

##### (1) Extraction buffer

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

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

## (2) 前 Reaction buffer

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

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

## (3) 反應受質

NADH stock : 1000x stock

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

將 NADH powder 溶於 1 mL 的二次水中(微黃色)，分裝(100  $\mu$ L / tube)，  
儲存於-20°C

DHAP stock : 1000x stock

藥品	需要量	最終濃度
dihydroxyacetone phosphate (Sigma D-7137)	0.017g	200mM

將 DHAP powder 溶於 0.5 mL 的二次水中(無色透明)，分裝(100  $\mu$ L /  
tube)，儲存於-20°C

## (4) Reaction buffer

藥品	需要量
----	-----

前 Reaction buffer	1mL
NADH stock	1 $\mu$ L
DHAP stock	1 $\mu$ L
每次依照使用量新鮮配置	

### 3、方法：

吸除舊的 medium 後，緩緩加入 1mL 之 1x PBS 潤濕整個培養皿後吸除，重複二次，再以細胞刮勺將細胞刮下，加入適量 1xPBS 將細胞沖下，細胞液收集至 1mL eppendorf 中，以 100xg 離心 3 分鐘，小心去除上清液，加入適量冰的 extraction buffer 打散 pellet 後，冰浴 30 分鐘，每隔 5 分鐘 vortex 混勻反應後，再以 25000xg、4°C 離心 1 小時(Hitach CR21, rotor R21 A-39)，取出上清液至另一個 eppendorf，混勻後分裝凍於-80°C。

取適量 sample 加入 1mL Reaction buffer 於 cuvette 中，上下搖晃均勻後放入分光光度計(U-2000 spectrophotometer, Hitachi)，1mL reaction buffer 為空白組，測 340nm 吸光值，每個 sample 進行 5 分鐘，以下列公式計算下降速率，並以 Lowry's method 測量蛋白質濃度。

### 4、酵素活性計算：

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

比爾定律

$$A = \epsilon bc \quad (A : \text{吸光}; \epsilon : \text{消光係數}; b : \text{濾鏡 } 1\text{cm}; c : \text{濃度})$$

$$c = A / \epsilon b$$

$$\begin{aligned} \text{G3PDH 酵素活性}(\text{nmole} / \text{mg prot. min}) &= (\Delta A / \text{min} \div 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \\ &\div \mu\text{g protein} \times 10^6 \times (\text{reaction buffer vol.} + \text{sample vol.}) \end{aligned}$$

### 十、 Lowry's method 蛋白質濃度測定

## 1、 原理

biuret 法的延伸，當銅離子與胜鏈形成複合物後，可再與 Folin-Ciocalteu 試劑的 phosphomolybdic-phosphotungstate 作用產生藍色物質。

## 2、 藥品配製

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

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

將 0.5 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  溶於 80 mL 二次水，再加入 1.14 g 的  $\text{Na}_3\text{-citrate} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )，最後以二次水定量至 100 mL

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

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

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

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

取 1 mL Reagent A 加 50 mL Reagent B

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

藥品	需要量
Folin & Ciocalteu's phenol reagent	10mL



二次水	10mL
-----	------

取 10 mL Folin & Ciocalteu's phenol reagent 加 10 mL 二次水

Reagent C 和 Reagent D 每次依照使用量當日新鮮配置

### (2)Standard

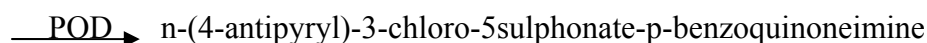
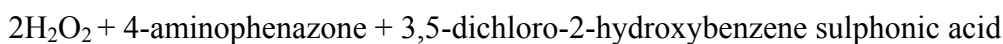
將 1mg BSA(Sigma)溶於 1mL 二次水中製成 1mg / mL stock，實驗時再  
再利用 stock 做不同濃度之系列稀釋

### 3、方法

sample 先以二次水稀釋 50 倍之後，取 30  $\mu$ L sample 或 standard 或二次水加入 96 well-microplate，加入 150  $\mu$ L reagent C 後於 microplate mixture vortex 上混勻反應 15 分鐘，再加入 20  $\mu$ L Reagent D 於 microplate mixture vortex 上混勻反應 30 分鐘。以 ELISA reader ( $\mu$ Quant)測 660nm 吸光值。再以標準曲線公式換算蛋白質濃度。

### 十一、脂解速率測定

#### 1、原理：



以測定甘油的釋出作為指標，根據原理測定 quinoneimine 在 520nm 吸光值

#### 2、藥品配製：

採用市售試劑組 (RANDOX, Amtrim, UK)，將 Buffer 1 (含 pipes buffer pH7.6, 3,5-dichloro-2-hydroxybenzene sulphonic acid, magnesium-ions) 15mL 與 Enzyme reagent 2 (含 4-aminophenazone, ATP, glycerol-kinase, glycerol-3-phosphate

oxidase, peroxiase, ascorbic acid oxidase)混合，配成反應試劑備用。

### 3、方法：

吸起舊的 medium 收集至 15mL 離心管中，以 1000xg 離心 5 分鐘，吸起上清液到另一個離心管，混勻後取出 1mL medium 至 eppendorf，再從 eppendorf 取出 100  $\mu$ L medium 至另一個 eppendorf 中，以 70°C 加熱 10 分鐘後冰浴，100xg 離心 30 秒，離心後取上清液，儲存於 -20°C 或進行實驗。

取 40  $\mu$ L sample 或 glycerol standard 於 96 well micro-plate 中，加入 200  $\mu$ L 上述反應試劑，於室溫反應 10 分鐘，測 500nm 之吸光值。另做 blank 及 glycerol standard 作為對照，根據下列公式計算細胞甘油含量。

### 4、計算：

Glycerol concentration ( $\mu$  mol / L) =  $(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}} / A_{\text{standard}} - A_{\text{blank}}) \times 100$  ( $\mu$  mol / L)

## 十二、油紅染色 Oil-Red O stain 測定

### 1、原理：

染脂肪細胞內的油滴

### 2、藥品配製：

油紅染劑是取 212 mg Oil-Red O 加入 60 mL isopropanol，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，放於 4°C overnight，最後再以 Whatman 3MM paper 過濾，貯存於 4°C。

10% formalin/PBS 是取 27.03 mL 37% formaldehyde solution + 72.97 mL PBS

### 3、方法：

吸除 medium，用 PBS(-)5mL 洗細胞兩次後加入 2 mL 10% formalin/PBS(-) 固定細胞 1 hr，再以 5mL dd-water 洗 3 次，加入 1.5 mL 油紅染劑（蓋過細胞層即可）染 10 min，吸除染劑，以 5mL dd-water 洗數次，室溫倒扣晾乾即可照相。

### 十三、細胞凋亡測定

#### 1、原理：

Formamide 是種溫和的 denaturing reagent，它只會對 apoptotic cells 的 DNA 變性，對 DNA 斷裂的細胞的 necrotic cell 或非 apoptosis cell 都不會作用。所以本實驗是利用 formamide 將 apoptotic cell 的 DNA 變性之後，再以單株抗體(標有過氧化酶的二抗)結合上已變性的 DNA(ssDNA)再偵測其吸光。

#### 2、藥品配製：

使用市售套組 BIOMOL, AK-120；ApoStrand™ ELISA Apoptosis Detection Kit

#### 3、方法：

由於實驗分成 proliferation、differentiation 及 mature adipocyte 三個階段，所以將細胞種於 96 well microplate 並依照三階段的流程，以測試物處理後，離心 200xg 5min 後去除 medium，加入 200  $\mu$  L Fixative 反應 30min 固定細胞，離心 200xg 5min 去除固定液後於 56°C oven 20min，再加入 50  $\mu$  L formamide 反應 10min，放入 56°C oven 30min 後，冷藏 5min，去除 formamide 加入 200  $\mu$  L blocking solution 反應 1 小時，去除 solution 加入抗體反應 30min，以 wash buffer 清洗後加入 peroxidase substrate 後反應 60min 測 405nm 吸光。

## 十四、統計分析

實驗結果均以平均值  $\pm$  標準差 (Mean  $\pm$  SD) 表示。數據之統計均須確定為常態分布，否則轉型為對數值 (Log)。數據以單向變方分析 (One way ANOVA) 檢定組間差異之顯著性，再以 Duncan's multiple range test 及 Dunnet's test 檢定，統計比較以  $p < 0.05$  為具有顯著之差異。統計分析係以 SAS 軟體(SAS 8.2, Cary, NC, USA)分析。



## 第四章 結果

### 一、實驗一 脂肪酸對 3T3-L1 脂肪細胞脂質生合成影響

#### 1、 測試各種溶劑及正對照 TZD 對 3T3-L1 脂肪細胞分化的影響

圖 4-1 各種溶劑及正對照 TZD 對 3T3-L1 前脂肪細胞分化的影響。為確認 3T3-L1 細胞分化流程是否成功，使用已知會促進脂肪細胞分化之 PPAR  $\gamma$  促進劑抗糖尿病藥物 TZD (BRL49653) 當成正對照，以細胞內 TG 堆積為指標，發現與未加任何促進劑的 blank 組相比較，TZD 促分化效果為 blank 組的 5.5 倍；另外又測試二種溶劑，分別為後續實驗中用來當作脂肪酸及天然抗氧化物之溶劑之 Abs EtOH (absolute ethanol) 與 DMSO 對 3T3-L1 分化的影響，同樣以細胞內 TG 堆積作為指標，發現二種溶劑添加量至 0.2% 均與 blank 組沒有差異。

#### 2、 一般脂肪酸對 3T3-L1 脂肪細胞分化的影響

圖 4-2 為以細胞內 TG 堆積為指標測定 common fatty acid 對 3T3-L1 脂肪細胞分化的影響。使用 common fatty acid 包括有 SFA (saturated fatty acid)- palmitic acid、stearic acid、MUFA (monounsaturated fatty acid)-oleic acid、PUFA (polyunsaturated fatty acid) - linoleic acid、linolenic acid，以 vehicle control 分化程度作為 100%，發現 5 種脂肪酸都會促進脂肪細胞分化，並且從 10-200  $\mu$ M 呈現良好 dose-response，而促進脂肪酸分化程度分別是 SFA 最低其次是 MUFA，促分化程度最好的是 PUFA ( $p < 0.05$ )。

#### 3、 特殊脂肪酸對 3T3-L1 脂肪細胞分化的影響

由於前述實驗發現脂肪酸均會促進脂肪細胞分化，因此在測試特殊脂肪酸 *c*9,*t*11,*t*13 conjugated linolenic fatty acid ( $\alpha$ -eleostearic acid；*c*9,*t*11,*t*13-CLN) 和 phytanic acid (PA) 對 3T3-L1 adipogenesis 影響時，決定選用同為 18 碳 3 個雙鍵的一般脂肪酸  $\alpha$ -linolenic acid 及 16 碳飽和的一般脂肪酸 palmitic acid，分別作為

*c9,t11,t13*-CLN 及 PA 之對照，探討二種特殊脂肪酸對 3T3-L1 前脂肪細胞增生、分化及成熟脂肪細胞脂質代謝之影響。

#### (1) Uncommon fatty acids 對 3T3-L1 differentiation 之影響

圖 4-3 為以 TG 堆積為指標，測試 uncommon fatty acids 對 3T3-L1 分化的影響。vehicle control 作為 100%，SFA-C16:0 與 PUFA- C18:3 比較，發現 C16:0 促進分化效果比 C18:3 差 ( $p < 0.05$ )；*c9,t11,t13*-CLN 及其對照組 C18:3 比較，*c9,t11,t13*-CLN 顯著抑制細胞內 TG 堆積 ( $p < 0.05$ )；PA 與其對照組 C16:0 比較，PA 亦顯著抑制細胞內 TG 堆積 ( $p < 0.05$ )。

圖 4-4 為以 G3PDH 活性作為指標，測試 uncommon fatty acids 對 3T3-L1 分化的影響。vehicle control 作為 100% 與細胞內 TG 堆積結果一致發現 18:3 > 16:0，且 *c9,t11,t13*-CLN 及其對照組 C18:3 比較，*c9,t11,t13*-CLN 顯著抑制細胞內 G3PDH 活性 ( $p < 0.05$ )；PA 與其對照組 C16:0 比較，PA 顯著抑制細胞內 G3PDH 活性 ( $p < 0.05$ )。

以顯微鏡觀察細胞型態可觀察到，3T3-L1 細胞進行分化實驗 7 天後細胞型態明顯改變，轉為圓型內蓄油滴，當 *c9,t11,t13*-CLN 及其對照組 C18:3 比較，*c9,t11,t13*-CLN 組油滴數目比較少；PA 與其對照組 C16:0 比較，PA 組油滴數目比較少，而且又以 C18:3 的油滴數目最多油滴最大，相對的，vehicle 細胞內油滴最少且最小 (圖 4-5)。

油紅染色可染細胞內 TG，更方便觀察細胞內油滴蓄積情形，亦可觀察到 *c9,t11,t13*-CLN 及其對照組 C18:3 比較，*c9,t11,t13*-CLN 抑制 TG 累積、油滴顯著比較少；PA 與其對照組 C16:0 比較，PA 抑制 TG 累積、油滴也是比較少 (圖 4-6)。

#### (2) Uncommon fatty acids 對 3T3-L1 前脂肪細胞 proliferation 之影響

圖 4-7 為以 MTT 活細胞存活率試驗測試各種 uncommon fatty acid 對長

滿前的前脂肪細胞階段 3T3-L1 細胞存活的影响。vehicle control 作為 100%，圖 4-7(A)可以得知在 24 小時給予測試物處理後，發現 *c9,t11,t13*-CLN 和 C16:0 於 200  $\mu$ M 時，才會明顯造成細胞數減少 ( $p < 0.05$ )；而在處理 48 小時後 (圖 4-7(B)) 抑制情形更明顯，*c9,t11,t13*-CLN 於 10  $\mu$ M 就開始抑制細胞增生 ( $p < 0.05$ )，而且有 dose-response；而 C16:0 於 200  $\mu$ M 才會顯著造成細胞數目減少 ( $p < 0.05$ )，相對的 C18:3 及 PA 到 200  $\mu$ M 均不會造成細胞數目減少。

由於觀察到 *c9,t11,t13*-CLN 及 C16:0 會造成細胞數減少，因此利用 LDH release assay 測試 uncommon fatty acid 處理 48 小時，對 3T3-L1 細胞毒性的影响 (圖 4-8)。發現 *c9,t11,t13*-CLN 於 10  $\mu$ M 就開始對細胞產生毒性 ( $p < 0.05$ )，C16:0 則是要在 200  $\mu$ M 時才會顯著造成細胞毒性 ( $p < 0.05$ )，而 C18:3 及 PA 即使在 200  $\mu$ M 也不會對細胞造成毒性。

### (3) Uncommon fatty acids 對 3T3-L1 已分化成熟脂肪細胞脂質代謝之影响

圖 4-9 為以 TG 堆積為指標，測試 uncommon fatty acids 對已分化 3T3-L1 成熟脂肪細胞 TG 蓄積的影响。先以 C18:2 及促分化劑誘導脂肪細胞完全分化，在顯微鏡下可見  $> 95\%$  分化率，此時移去 C18:2 改以不同測試物處理 48 小時。以 vehicle control 作為 100%，可發現 4 種脂肪酸均促進 TG 蓄積，*c9,t11,t13*-CLN 及其對照組 C18:3 比較，*c9,t11,t13*-CLN 抑制 TG 累積 ( $p < 0.05$ )；而 PA 與其對照組 C16:0 比較，PA 抑制 TG 累積 ( $p < 0.05$ )；另外又以細胞內 G3PDH 活性為指標，同樣發現 *c9,t11,t13*-CLN 抑制成熟脂肪細胞內 G3PDH 活性 ( $p < 0.05$ )，PA 則有抑制細胞內 G3PDH 活性的趨勢，但無統計上之差異 (圖 4-10)。在成熟脂肪細胞脂解方面和 C18:3 比較，*c9,t11,t13*-CLN 有抑制脂解作用 (圖 4-11)。

### (4) *c9,t11,t13*-CLN 對 3T3-L1 三階段 (preadipocyte proliferation、differentiation、terminal differentiation) 細胞凋亡的影响

由於前述實驗發現 *c9,t11,t13*-CLN 抑制 3T3-L1 增生、分化效果最明顯，因此針對 CLN 探討是否造成細胞凋亡，此外 *c9,t11,t13*-CLN 在前脂肪細胞階段於  $10\ \mu\text{M}$  即造成細胞數減少，在分化階段於  $100\ \mu\text{M}$  才會造成細胞數減少（細胞內蛋白質定量結果；結果未示），而在已分化成熟脂肪細胞處理  $100\ \mu\text{M}$  並不影響細胞數，因此在前脂肪細胞階段 *c9,t11,t13*-CLN 以  $10\ \mu\text{M}$ 、 $50\ \mu\text{M}$ 、 $100\ \mu\text{M}$  的劑量，分化階段和成熟脂肪細胞以  $100\ \mu\text{M}$  的劑量，分別測試 *c9,t11,t13*-CLN 對 3T3-L1 脂肪細胞細胞凋亡的影響，結果發現  $100\ \mu\text{M}$  *c9,t11,t13*-CLN 於 preadipocyte 階段及分化階段，都會造成 3T3-L1 細胞凋亡 ( $p < 0.05$ )，但 *c9,t11,t13*-CLN 不會造成成熟脂肪細胞細胞凋亡(圖 4-12)。

## 二、實驗二 天然抗氧化物對 3T3-L1 脂肪細胞脂質生合成影響

### 1、Natural antioxidants 對 3T3-L1 脂肪細胞分化之影響

圖 4-13 以細胞內 TG 堆積為指標，測試 9 種天然抗氧化物對 3T3-L1 脂肪細胞分化的影響。9 種天然抗氧化包括有 EGCG、curcumin、catechin、naringenin、ascorbic acid、resveratrol、apigenin、quercetin、genistein，vehicle control 為 DMSO，結果發現以 4 種天然抗氧化物 (curcumin、resveratrol、apigenin、genistein) 明顯抑制分化，因此之後選擇此 4 種加上文獻常被報導可抑制 3T3-L1 分化之 EGCG 做為後續實驗。

另外以細胞內 G3PDH 活性作為分化指標，測試 4 種多酚類 (curcumin、resveratrol、apigenin、genistein) 及 EGCG 在  $100\ \mu\text{M}$  實驗劑量下比較，vehicle control 分化程度當成 100%，結果發現除了 EGCG 之外其餘 4 種多酚類都會顯著抑制細胞內 G3PDH 活性，而且以 curcumin 最強 (圖 4-14)。

同樣地以顯微鏡觀察 4 種多酚類及 EGCG 進行 7 天分化實驗之細胞型態，與



vehicle control 比較，發現除了 EGCG 之外，其餘 4 組多酚類幾乎看不到細胞有油滴產生，curcumin 組細胞型態明顯的改變，與正常的 3T3-L1 型態不同 (圖 4-15)。再將各組細胞進行油紅染色，可觀察到 EGCG 油滴的數量和 vehicle 差不多，而其餘 4 組多酚類油滴數很少，且以 curcumin 為最少 (圖 4-16)。

## 2、多酚類對 3T3-L1 前脂肪細胞 proliferation 之影響

之後特別對分化實驗篩選出的 4 種多酚類及 EGCG 進行分析，測試對長滿前 preadipocyte 增生影響。以 5 種多酚類處理 24 小時後，可觀察到 5 種多酚類均會抑制細胞存活率且有 dose-response，其中以 curcumin 最為明顯，在  $50 \mu\text{M}$  顯著低於它組 ( $p < 0.05$ )；而在以 48 小時處理後，抑制效果更為顯著，同樣又以 curcumin 為最強，在  $50 \mu\text{M}$  處理下顯著低於它組 ( $p < 0.05$ ) (圖 4-17)。

另外以 LDH release assay 測試 5 種多酚類及 vehicle 對 3T3-L1 前脂肪細胞細胞毒性的影響，其中只有 curcumin 對 3T3-L1 前脂肪細胞產生細胞毒性，且於  $50 \mu\text{M}$  即會產生，並且呈現 dose-response (圖 4-18)。

## 3、多酚類對 3T3-L1 已分化成熟脂肪細胞脂質堆積之影響

使用 linoleic acid 促分化劑誘導 3T3-L1 形成成熟脂肪細胞後，再給予  $100 \mu\text{M}$  5 種多酚類及 vehicle 處理 48 小時，vehicle control 處理之 TG 程度當成 100%，發現抑制細胞內 TG 堆積以 EGCG、resveratrol、genistein 較明顯 ( $p < 0.05$ ) (圖 4-19)。

## 4、curcumin 對 3T3-L1 三階段 (preadipocyte proliferation、differentiation、terminal differentiation) 細胞凋亡的影響

由於前述實發現 curcumin 抑制 3T3-L1 增生、分化效果最明顯，因此針對 curcumin 探討是否造成細胞凋亡，此外 curcumin 在前脂肪細胞階段於  $50 \mu\text{M}$  即造成細胞數減少且具有細胞毒性，在分化階段於  $100 \mu\text{M}$  會造成細胞數目減少 (細胞內蛋白質定量結果；結果未示)，而在已分化成熟脂肪細胞處理  $100 \mu\text{M}$  並不影響細胞數，因此在前脂肪細胞階段 curcumin 以  $10 \mu\text{M}$ 、 $50 \mu\text{M}$ 、 $100 \mu\text{M}$  的劑量，分化

階段和成熟脂肪細胞以  $100 \mu\text{M}$  的劑量，分別測試 curcumin 對 3T3-L1 細胞凋亡的影響。結果發現  $100 \mu\text{M}$  curcumin 會於分化及成熟脂肪細胞階段對 3T3-L1 脂肪細胞造成細胞凋亡 ( $p < 0.05$ ) (圖 4-20)。



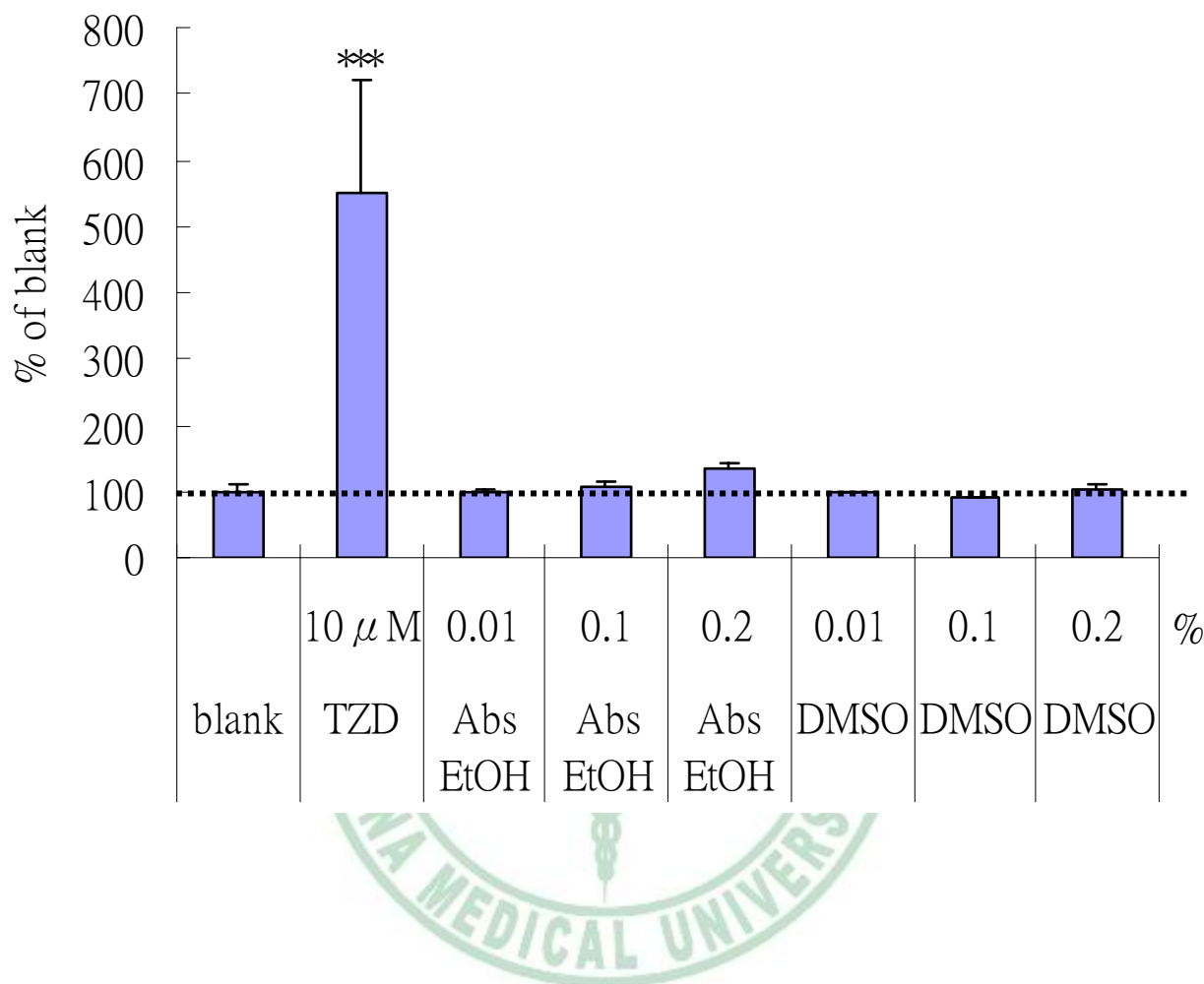


圖 4-1 各種溶劑及正對照TZD對3T3-L1前脂肪細胞分化（以細胞內TG堆積為指標）的影響

**Figure 4-1 Effect of solvent and positive control TZD (BRL49653) on differentiation of 3T3-L1. Cellular triglyceride (TG) was measured after the initiation of differentiation for 7d. Values are means $\pm$ S.D. (n=3). The significance of differences between the treatment (TZD, Abs EtOH, DMSO) and blank group was analyzed statistically by Dunnet's test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$ .**

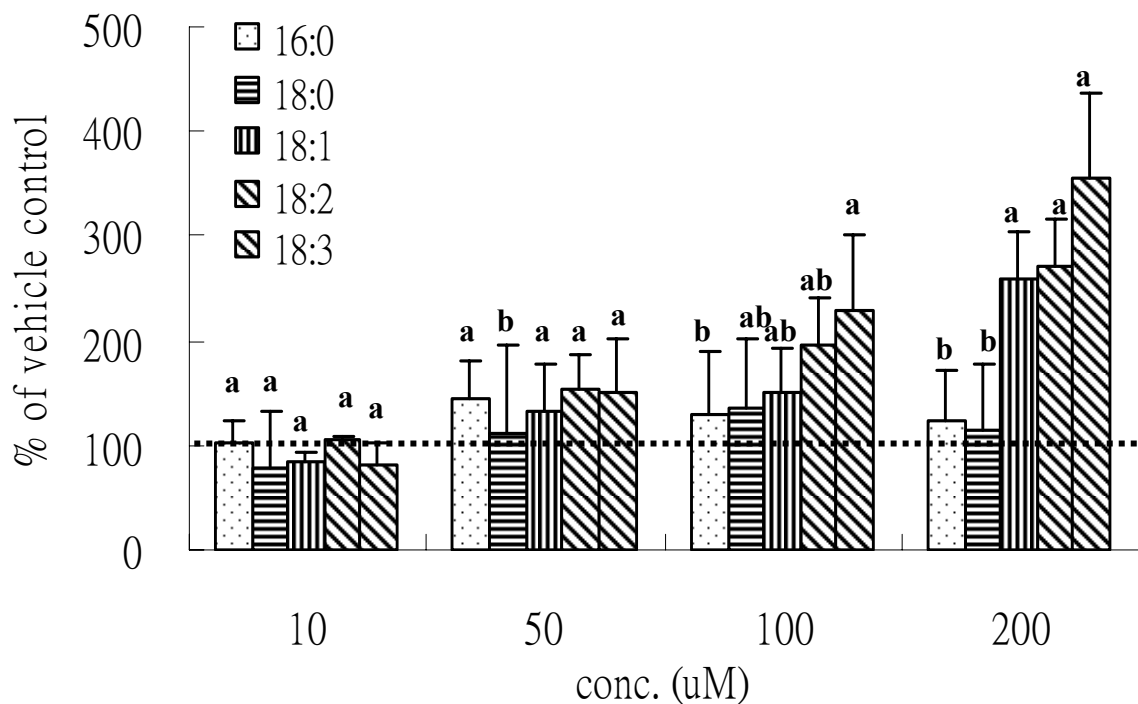


圖 4-2 一般脂肪酸對3T3-L1分化（以細胞內TG堆積為指標）的影響

**Figure 4-2 Effect of common fatty acids on differentiation of 3T3-L1. Cellular TG was measured after the initiation of differentiation for 7d. Values are means±S.D. (n=6). The significance of differences among the five groups (palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid and  $\alpha$ -linolenic acid) was analyzed statistically by Duncan's multiple range test. Values not sharing the same superscript letter in the same treating concentration are significantly different,  $p < 0.05$ .**

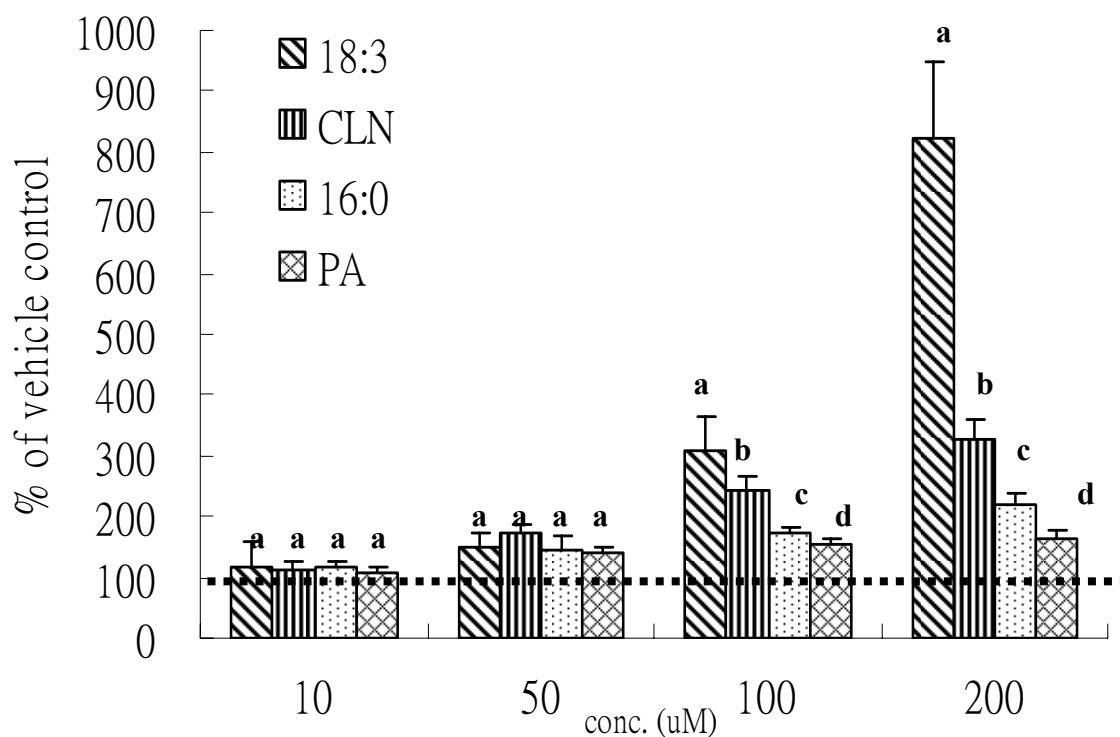


圖 4-3 特殊脂肪酸對3T3-L1分化 ( 以細胞內TG堆積為指標 ) 的影響

**Figure 4-3** Effect of uncommon fatty acids on differentiation of 3T3-L1. Cellular TG was measured after the initiation of differentiation for 7d. Values are means±S.D. (n=6). The significance of differences among the four groups ( linolenic acid, *c9,t11,t13* conjugated linolenic acid(CLN), palmitic acid and phytanic acid (PA) ) was analyzed statistically by Duncan's multiple range test. Values not sharing the same superscript letter in the same treating concentration are significantly different,  $p < 0.05$  .

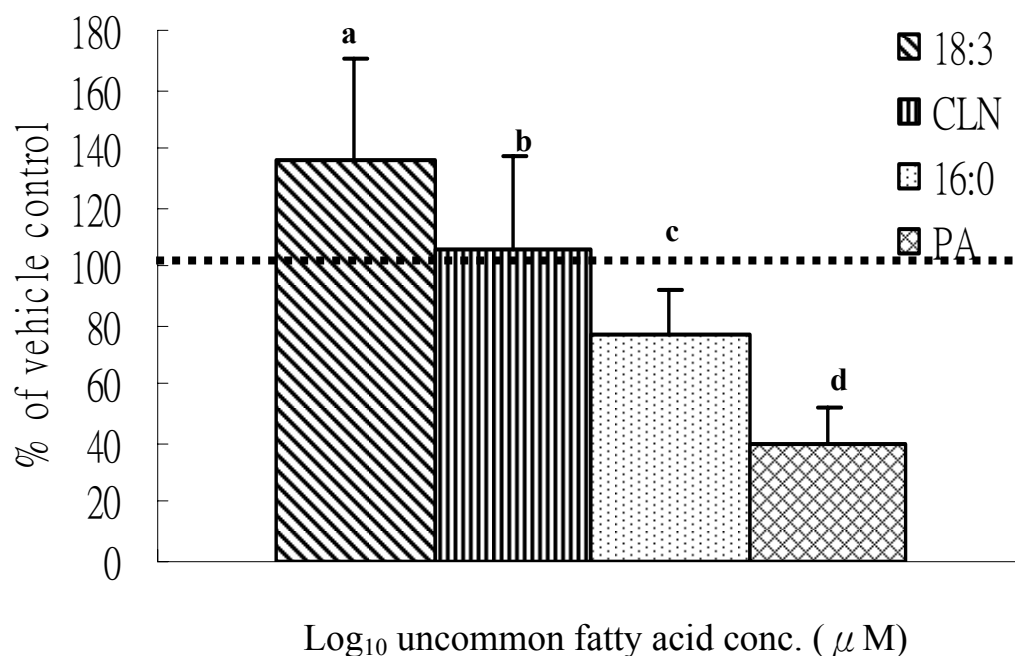


圖 4-4 特殊脂肪酸對3T3-L1分化 (以G3PDH活性為指標) 的影響

**Figure 4-4 Effect of uncommon fatty acids on differentiation of 3T3-L1. Cellular G3PDH activity was measured after the initiation of differentiation for 7d. Values are means±S.D. (n=6). The significance of differences among the four groups (linolenic acid, *c9,t11,t13* conjugated linolenic acid (CLN), palmitic acid and phytanic acid (PA)) was analyzed statistically by Duncan's multiple range test. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .**

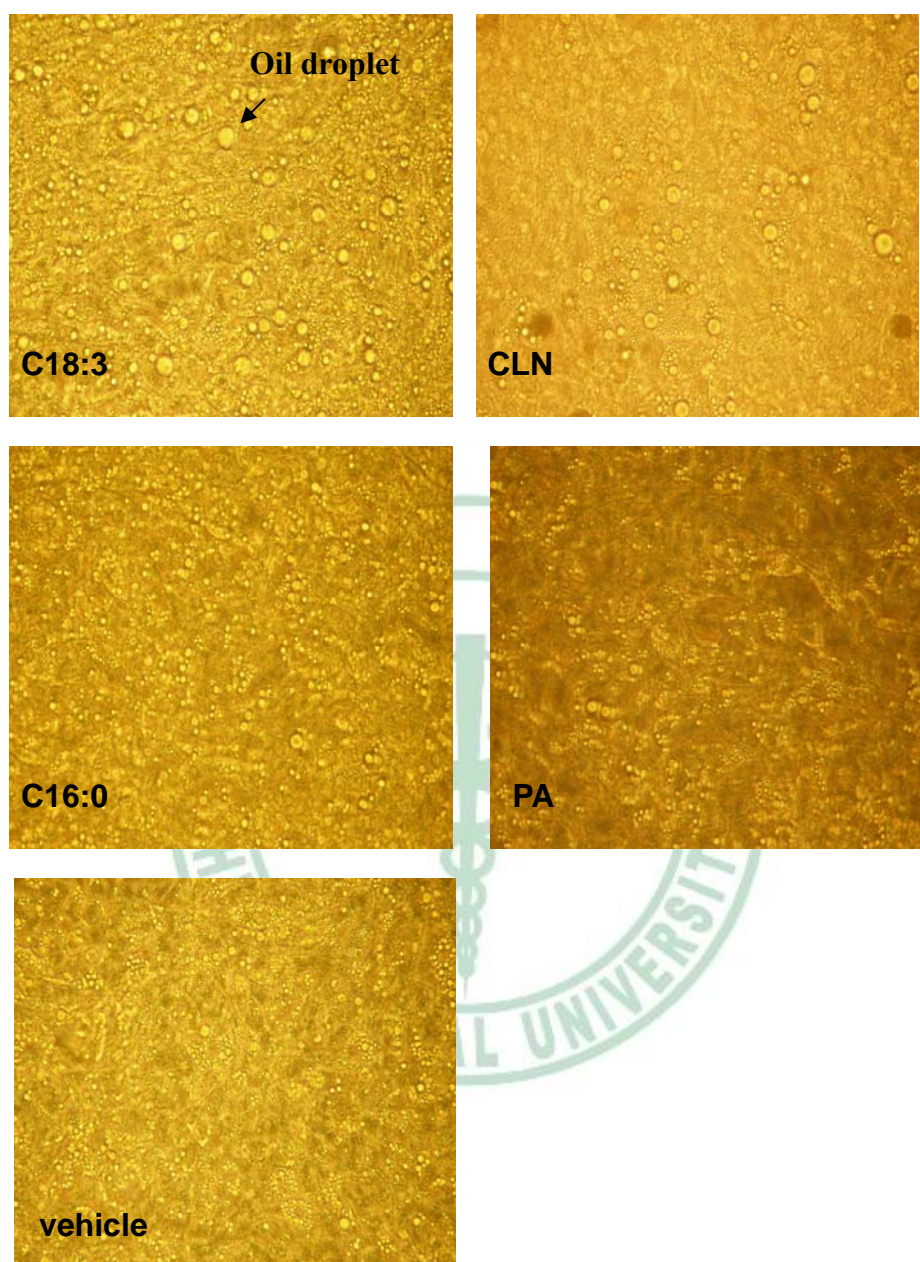


圖 4-5 顯微鏡下觀察特殊脂肪酸對3T3-L1分化的影響

Figure 4-5 Effect of uncommon fatty acids (100 $\mu$ M) on differentiation of 3T3-L1. Microscopic view at 100x magnification.

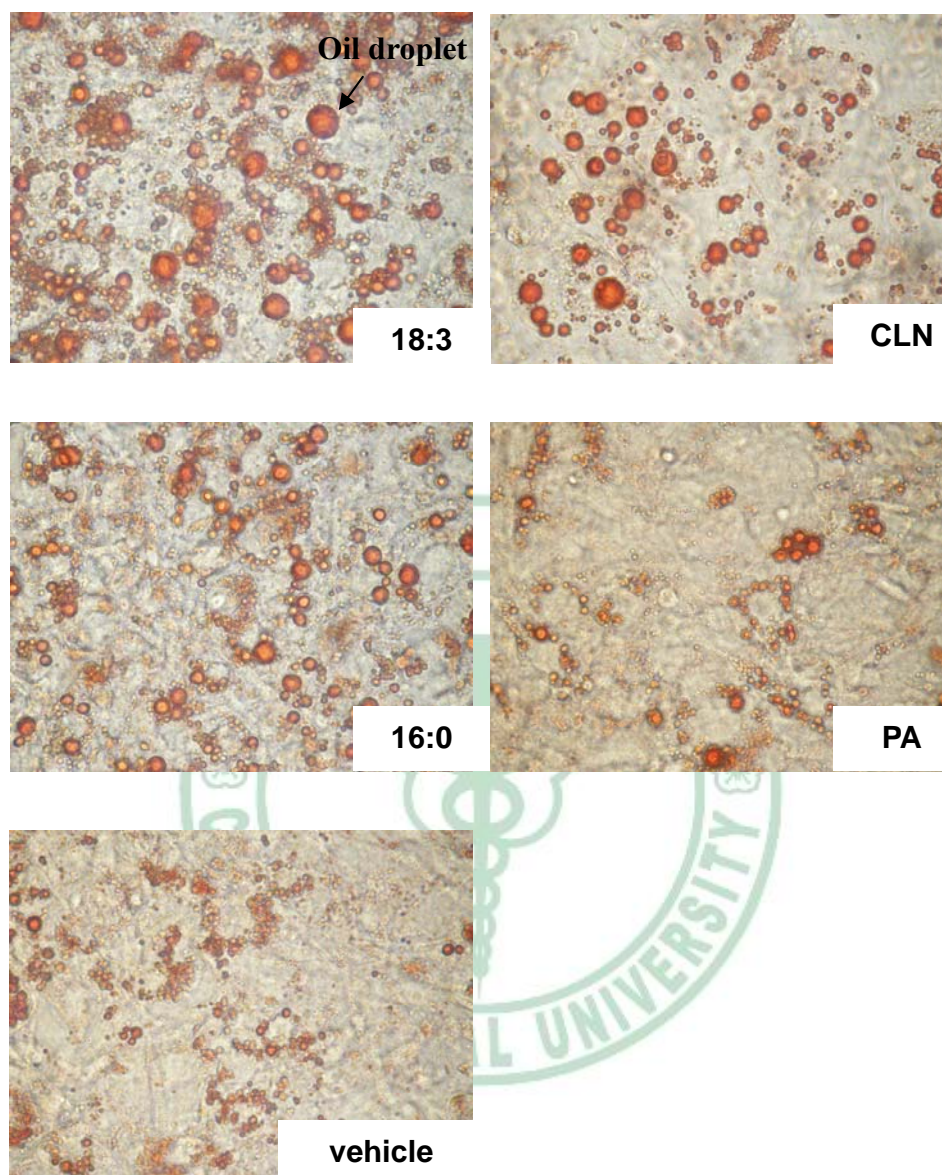


圖 4-6 油紅染色觀察特殊脂肪酸對3T3-L1分化的影響

**Figure 4-6 Effect of uncommon fatty acids (100 $\mu$ M) on differentiation of 3T3-L1. The cells were fixed with formaldehyde in PBS and fat droplets were stained by Oil-Red O dye staining. Microscopic view at 100x magnification differentiation**



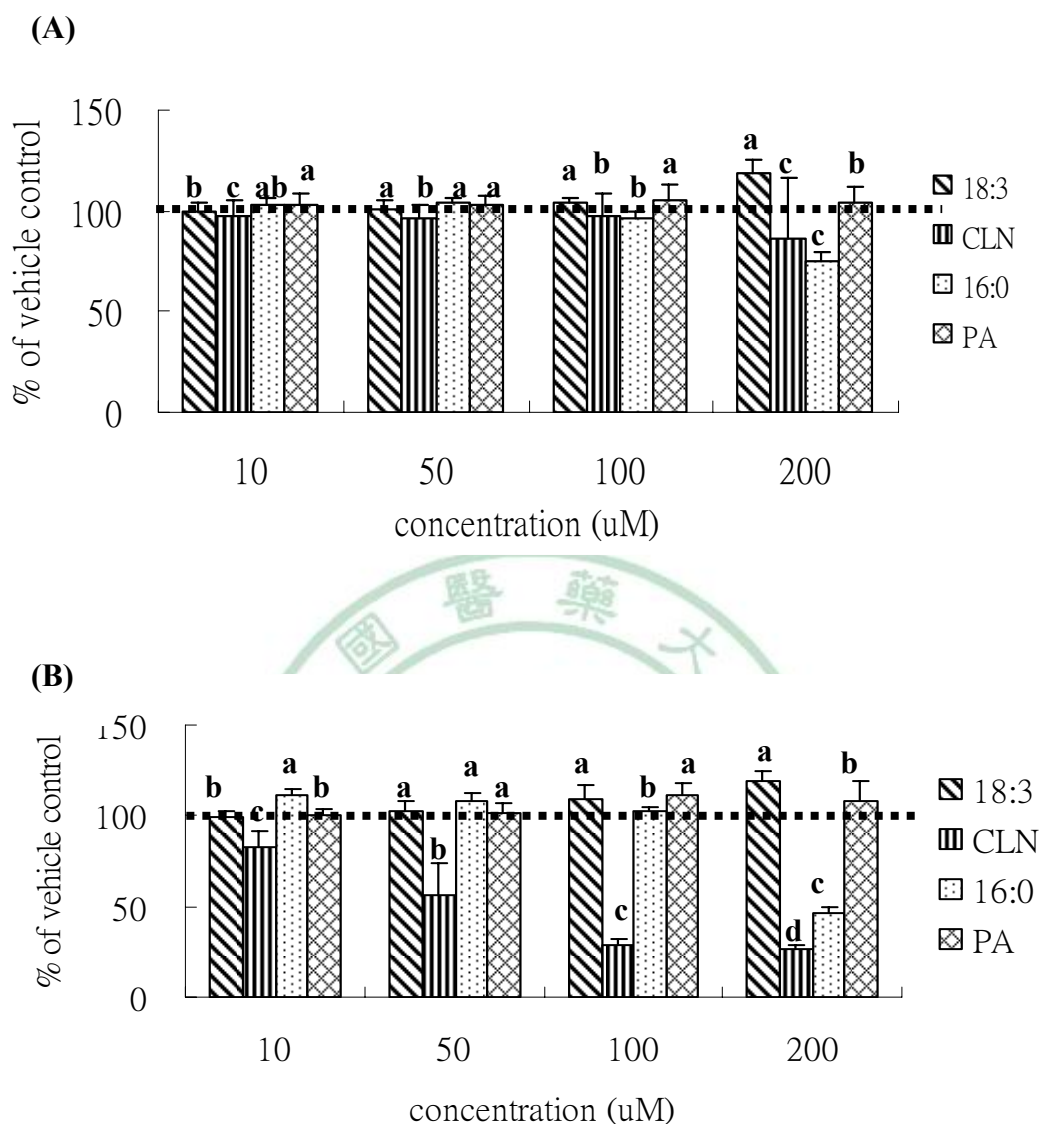


圖 4-7 特殊脂肪酸對3T3-L1前脂肪細胞存活的影响

**Figure 4-7 Effect of uncommon fatty acids on cell viability of 3T3-L1 preadipocyte. The MTT assay was performed after cells were treated with fatty acids or vehicle for 24(A) and 48(B)hr. Values are means±S.D. (n=6). The significance of differences among the four groups ( linolenic acid, c9,t11,t13 conjugated linolenic acid (CLN), palmitic acid and phytanic acid (PA) ) was analyzed statistically by Duncan's multiple range test. Values not sharing the same superscript letter in the same treating concentration are significantly different,  $p < 0.05$  .**

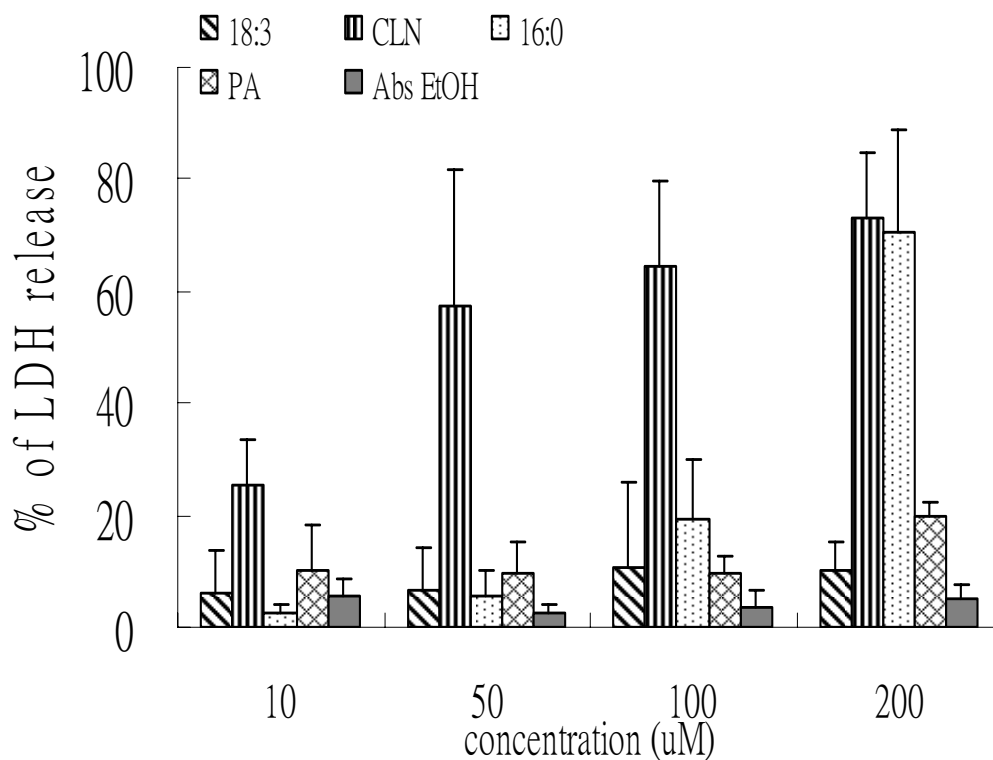


圖 4-8 特殊脂肪酸對3T3-L1前脂肪細胞之細胞毒性的影響

**Figure 4-8** Effect of uncommon fatty acids on cytotoxicity of 3T3-L1 preadipocyte. The LDH released into medium was measured after cells were treated with fatty acids or vehicle for 48hr. Values are means±S.D. (n=6). The significance of differences among the four groups ( linolenic acid, *c9,t11,t13* conjugated linolenic acid (CLN), palmitic acid and phytanic acid (PA) ) was analyzed statistically by Duncan's multiple range test. Values not sharing the same superscript letter in the same treating concentration are significantly different,  $p < 0.05$  .

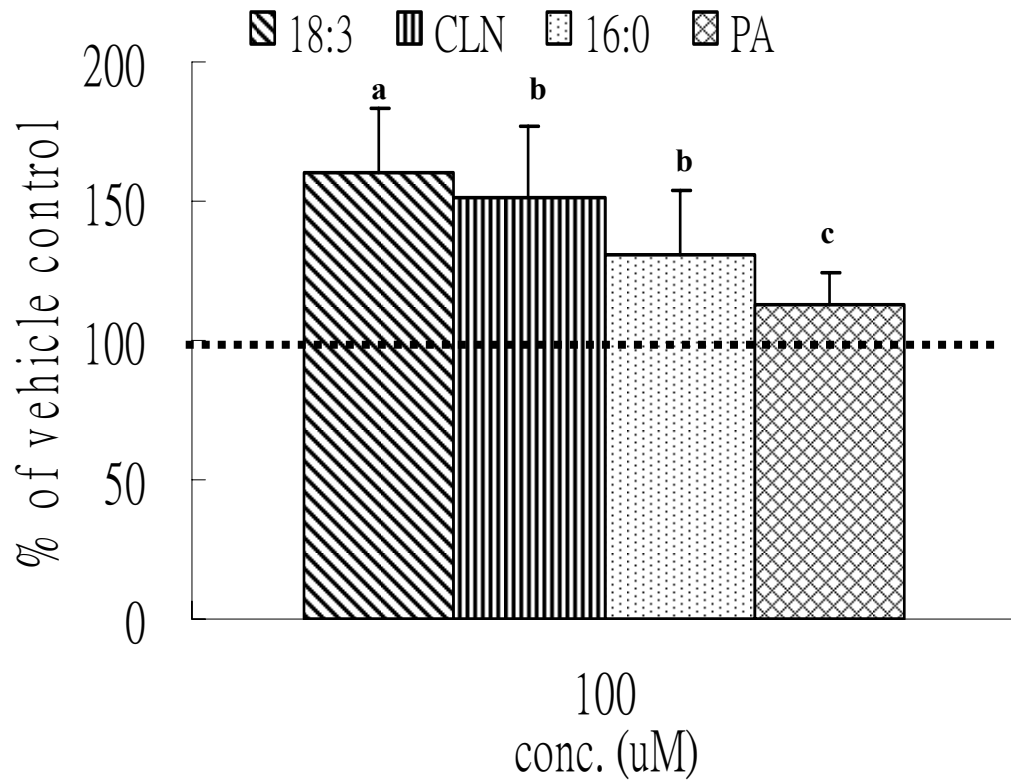


圖 4-9 特殊脂肪酸對3T3-L1成熟脂肪細胞TG堆積的影響

**Figure 4-9** Effect of uncommon fatty acids on TG accumulation in mature adipocytes. 3T3-L1 were induced to differentiate into mature adipocytes by 100 $\mu$ M linoleic acid for 7d, then treated with uncommon fatty acids or vehicle for 48hr. Values are means $\pm$ S.D. (n=6). The significance of differences among the four groups ( linolenic acid, *c9,t11,t13* conjugated linolenic acid (CLN), palmitic acid and phytanic acid (PA) ) was analyzed statistically by Duncan's multiple range test. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .

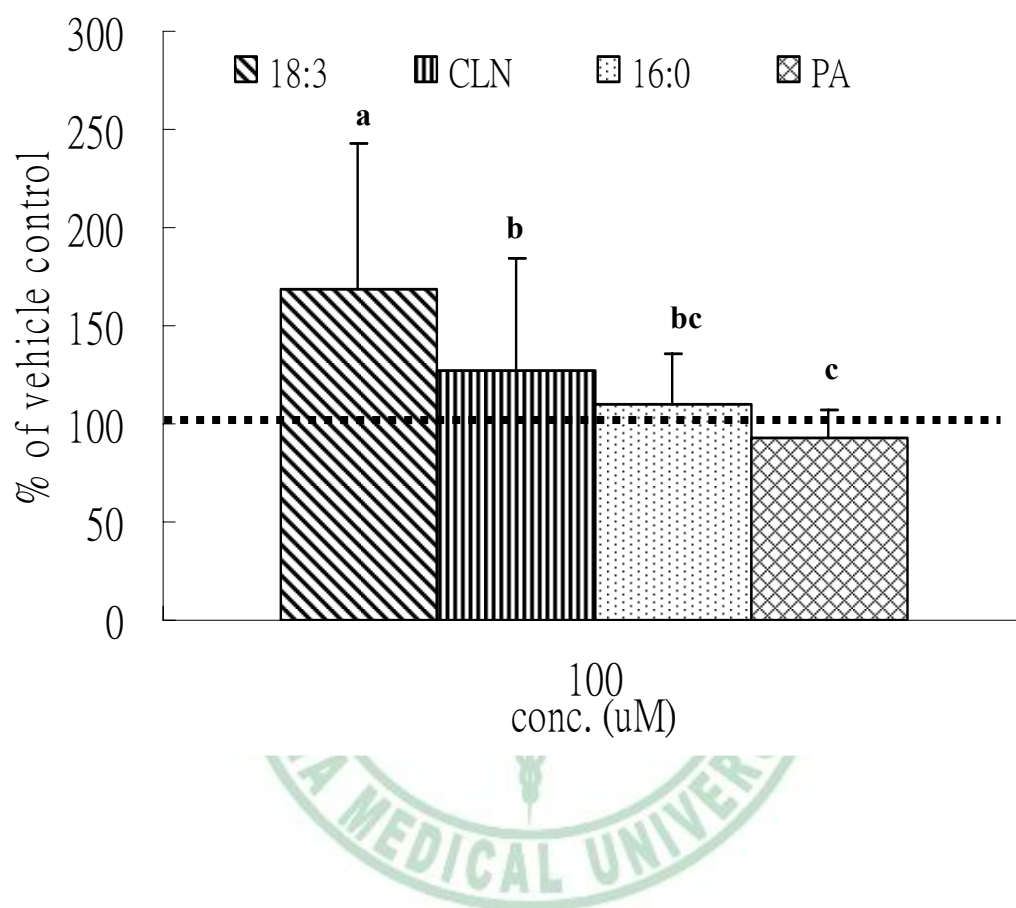


圖 4-10 特殊脂肪酸對3T3-L1成熟脂肪細胞G3PDH活性的影響

**Figure 4-10 Effect of uncommon fatty acids on G3PDH activity in mature adipocytes. 3T3-L1 were induced to differentiate into mature adipocytes by 100 $\mu$ M linoleic acid for 7d, then treated with specific fatty acids or vehicle for 48hr. Values are means $\pm$ S.D. (n=6).The significance of differences among the four groups ( linolenic acid, *c9,t11,t13* conjugated linolenic acid(CLN), palmitic acid and phytanic acid (PA) ) was analyzed statistically by Duncan's multiple range test. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$  .**

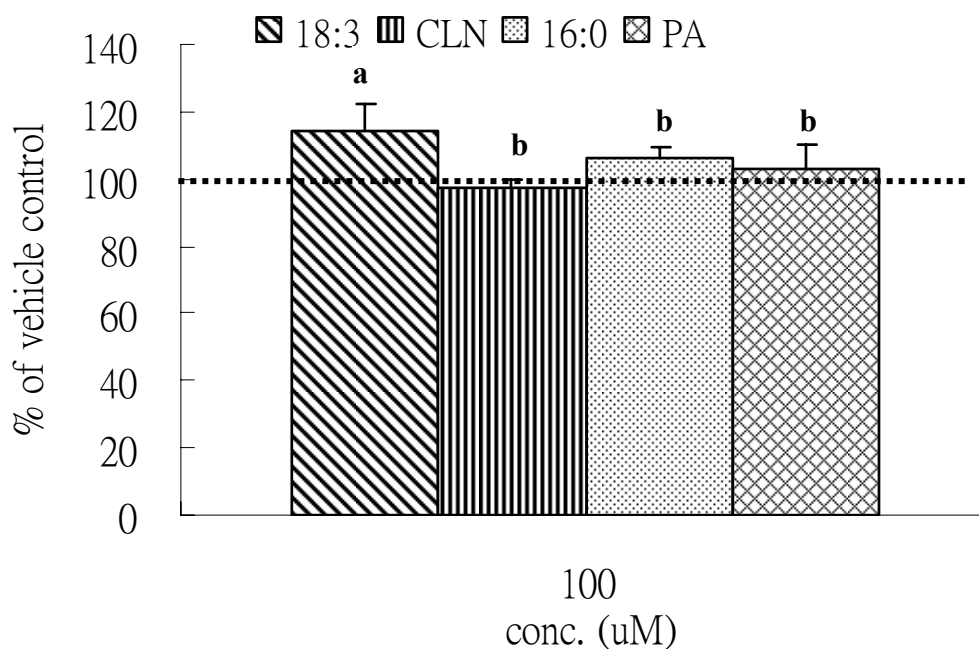


圖 4-11 特殊脂肪酸對3T3-L1成熟脂肪細胞脂解的影響

**Figure 4-11 Effect of uncommon fatty acids on lipolysis of mature adipocytes. 3T3-L1 were induced to differentiate into mature adipocytes by 100 $\mu$ M linoleic acid for 7d, then treated with uncommon fatty acids or vehicle for 48hr. Values are means $\pm$ S.D. (n=6). The significance of differences among the four groups ( linolenic acid, *c*9,*t*11,*t*13 conjugated linolenic acid(CLN), palmitic acid and phytanic acid (PA) ) was analyzed statistically by Duncan's multiple range test. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$  .**

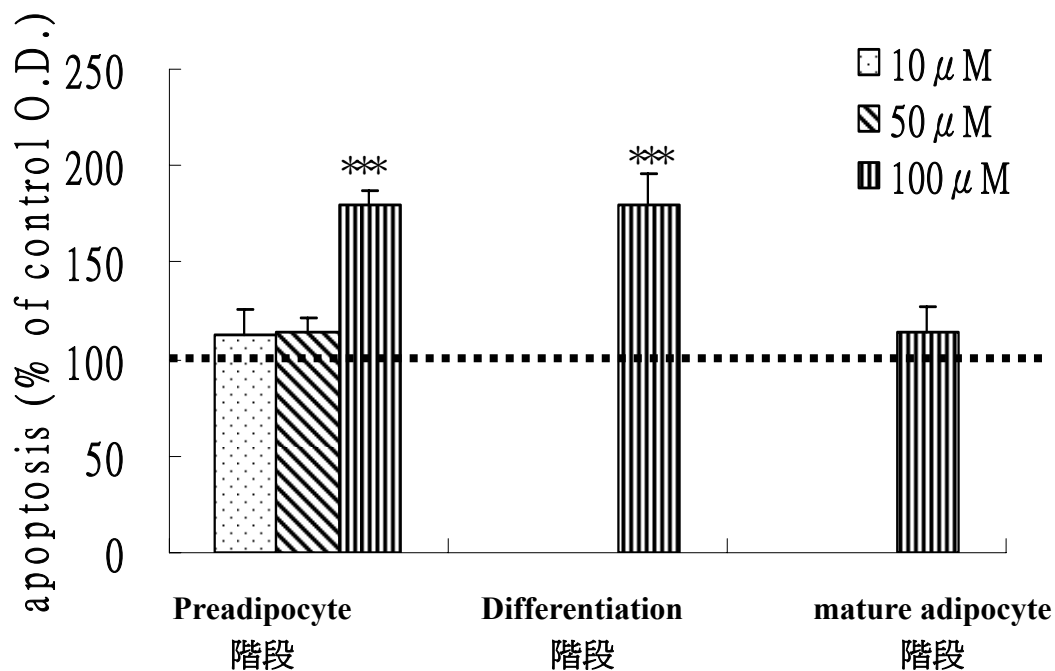


圖 4-12 *c9, t11, t13*-CLN對3T3-L1各階段細胞凋亡的影響

Figure 4-12 Effect of *c9, t11, t13* CLN on apoptosis of 3T3-L1 at 3 stages. Values are means $\pm$ S.D. (n=6). The significance of differences between the CLN and vehicle group was analyzed statistically by Dunnet's test. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$

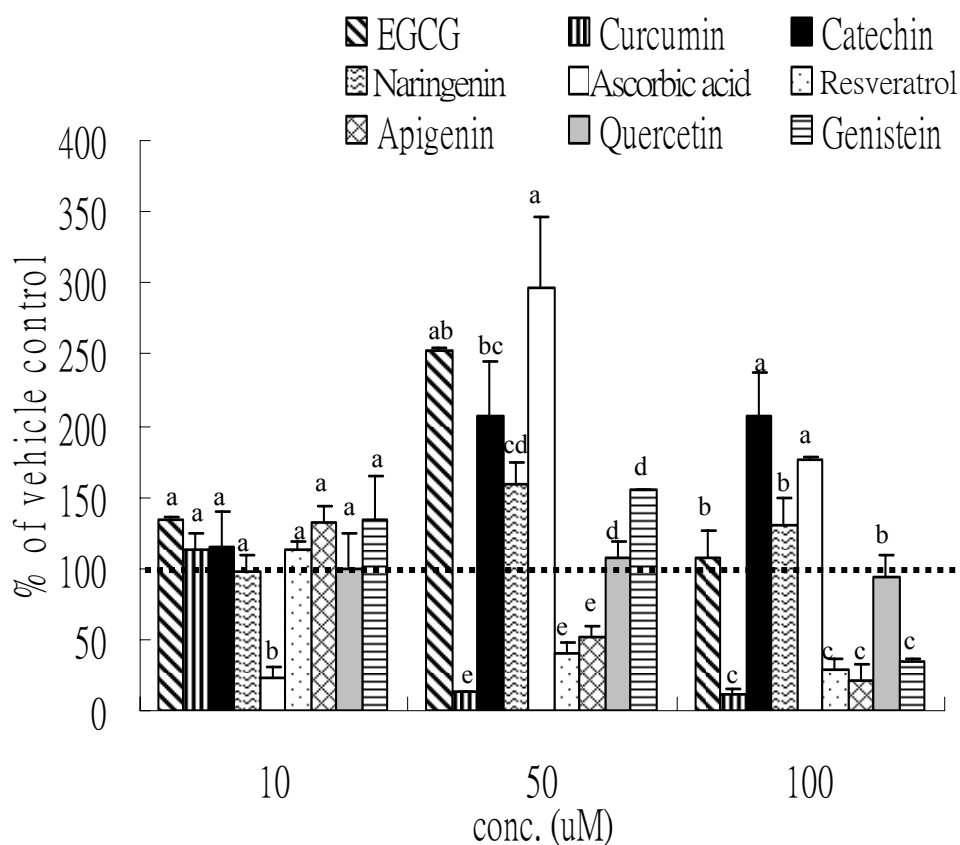


圖 4-13 天然抗氧化物對3T3-L1分化（以細胞內TG堆積為指標）的影響

**Figure 4-13** Effect of natural antioxidants on differentiation of 3T3-L1. Cellular TG was measured after the initiation of differentiation for 7d. Values are means±S.D. (n=6). The significance of differences among the nine groups ( epigallocatechin gallate(EGCG), curcumin, catechin, naringenin, ascorbic acid, resveratrol, apigenin, quercetin, genistein ) was analyzed statistically by Duncan's multiple range test. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$  .

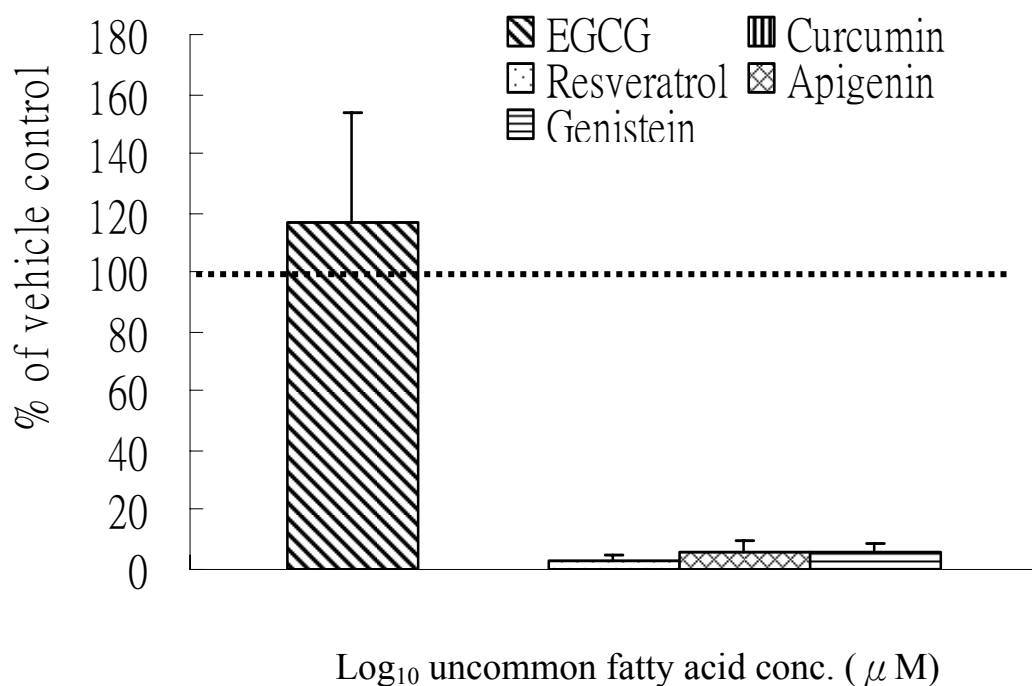


圖 4-14 多酚類對3T3-L1分化 (以G3PDH活性為指標) 的影響

**Figure 4-14** Effect of polyphenols on differentiation of 3T3-L1. Cellular G3PDH activity was measured after the initiation of differentiation for 7d. Values are means±S.D. (n=6). The significance of differences among the five groups ( epigallocatechin gallate(EGCG), curcumin, resveratrol, apigenin, genistein ) was analyzed statistically by Duncan's multiple range test. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$ .

The enzyme activity was 0.162% of control values in cultures containing 100μM curcumin.



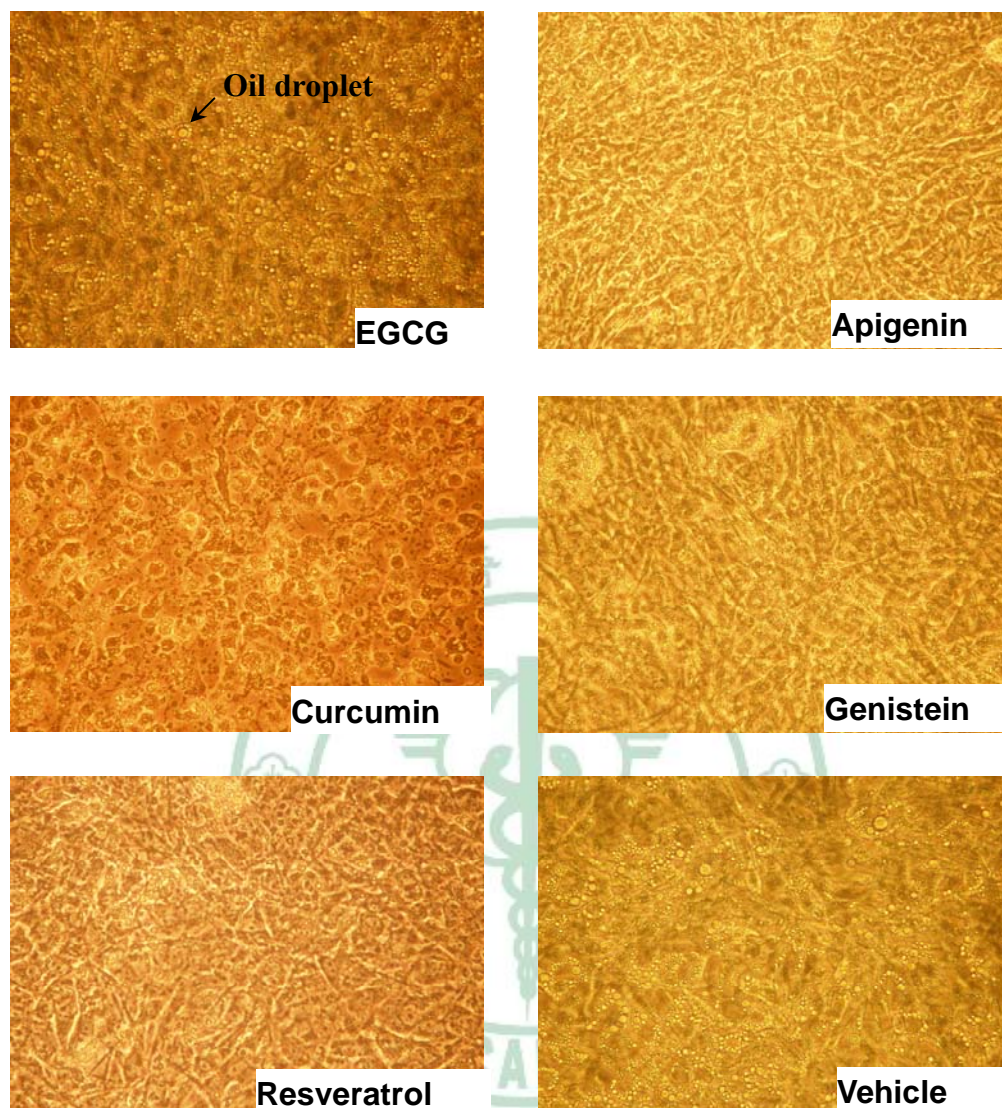


圖 4-15 顯微鏡下觀察多酚類對3T3-L1分化的影響

Figure 4-15 Effect of polyphenols (100 $\mu$ M) on differentiation of 3T3-L1. Microscopic view at 100x magnification.

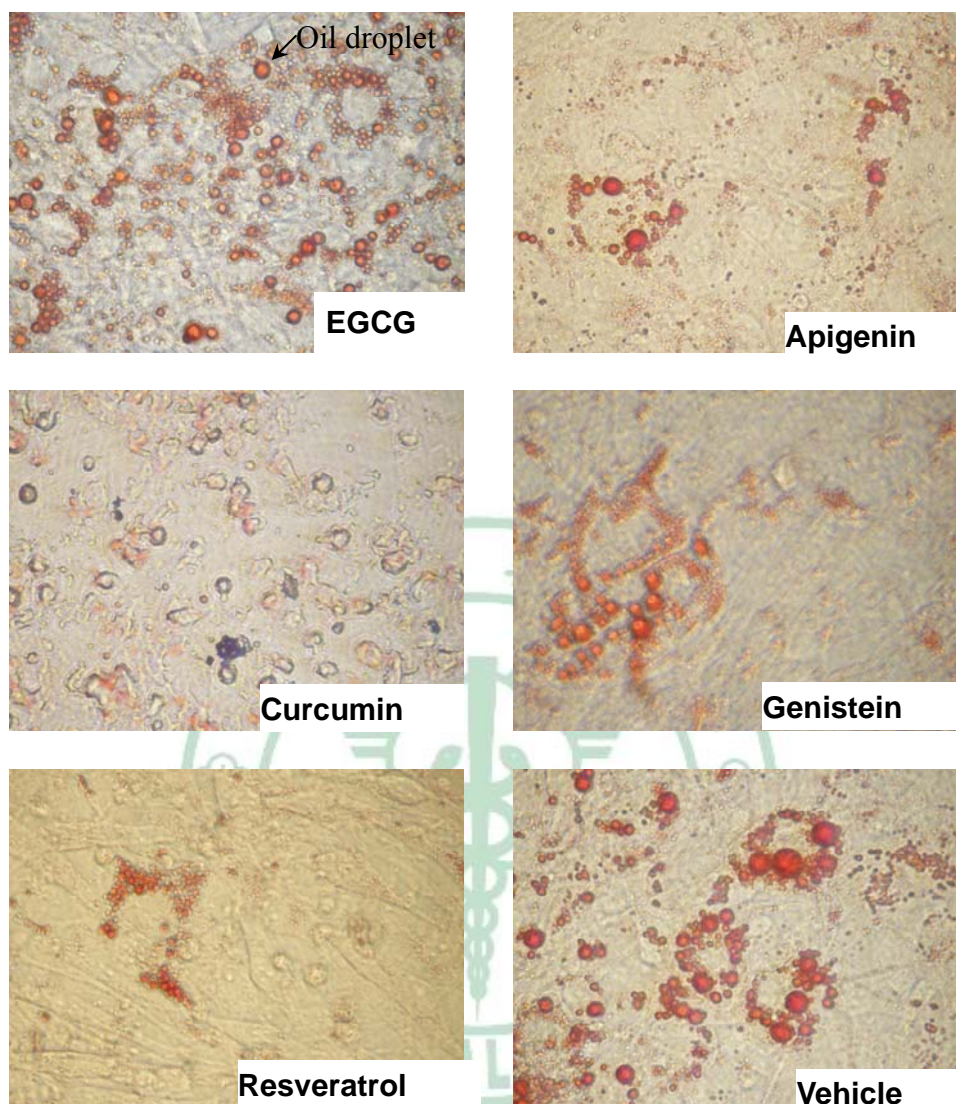
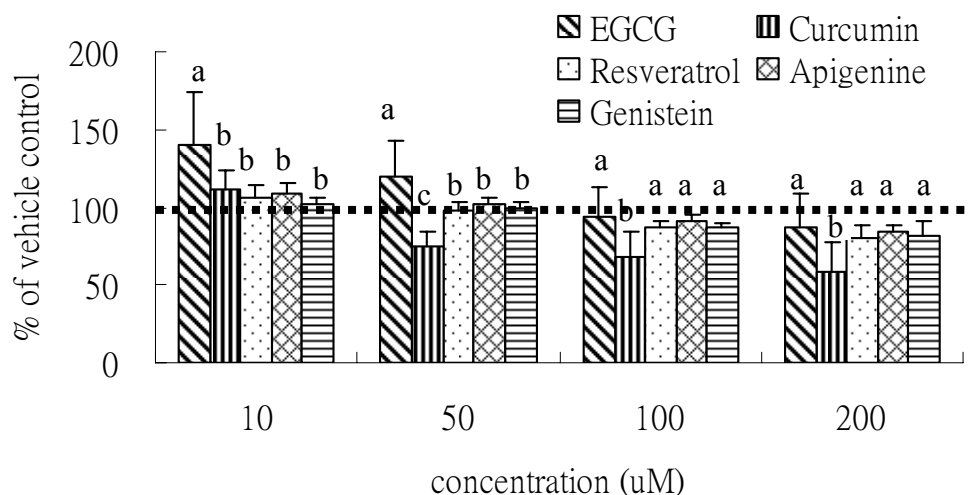


圖 4-16 油紅染色觀察多酚類對3T3-L1分化的影響

**Figure 4-16** Effect of polyphenols (100 $\mu$ M) on differentiation of 3T3-L1. The cells were fixed with formaldehyde in PBS and fat drops were stained by Oil-Red O dye staining. Microscopic view at 100x magnification differentiation of 3T3-L1.

(A)



(B)

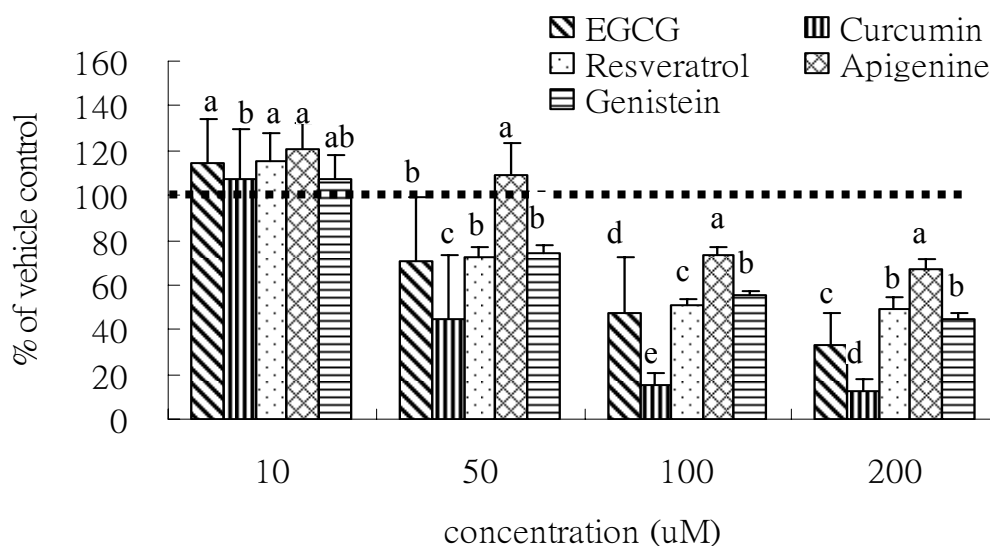


圖 4-17 多酚類對3T3-L1前脂肪細胞存活的影响

**Figure 4-17 Effect of polyphenols on cell viability of 3T3-L1 preadipocyte.** The MTT assay was performed after cells were treated with polyphenols or vehicle for 24(A) and 48(B)hr. Values are means±S.D. (n=6). The significance of differences among the five groups ( epigallocatechin gallate(EGCG), curcumin, resveratrol, apigenin, genistein ) was analyzed statistically by Duncan's multiple range test. Values not sharing the same superscript letter in the same treating concentration are significantly different,  $p < 0.05$  .

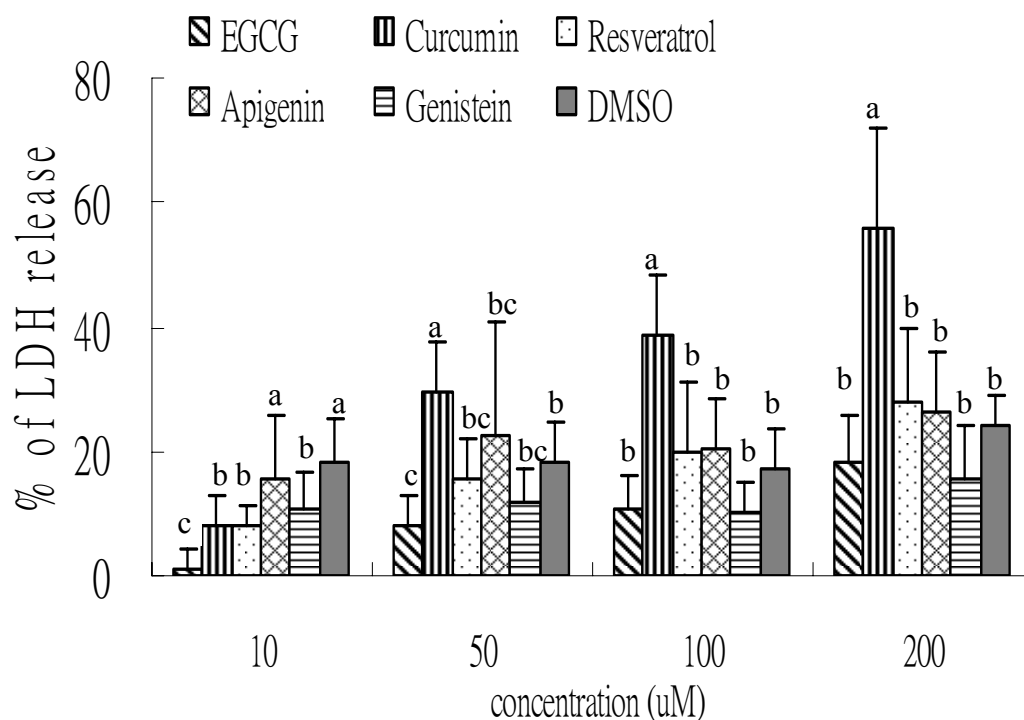


圖 4-18 多酚類對3T3-L1前脂肪細胞之細胞毒性的影響

**Figure 4-18 Effect of polyphenols on cytotoxicity of 3T3-L1 preadipocyte.** The LDH released into medium was measured after cells were treated with polyphenols or vehicle for 48hr. Values are means±S.D. (n=6). The significance of differences among the five groups ( epigallocatechin gallate(EGCG), curcumin, resveratrol, apigenin, genistein ) was analyzed statistically by Duncan's multiple range test. Values not sharing the same superscript letter in the same treating concentration are significantly different,  $p < 0.05$ .

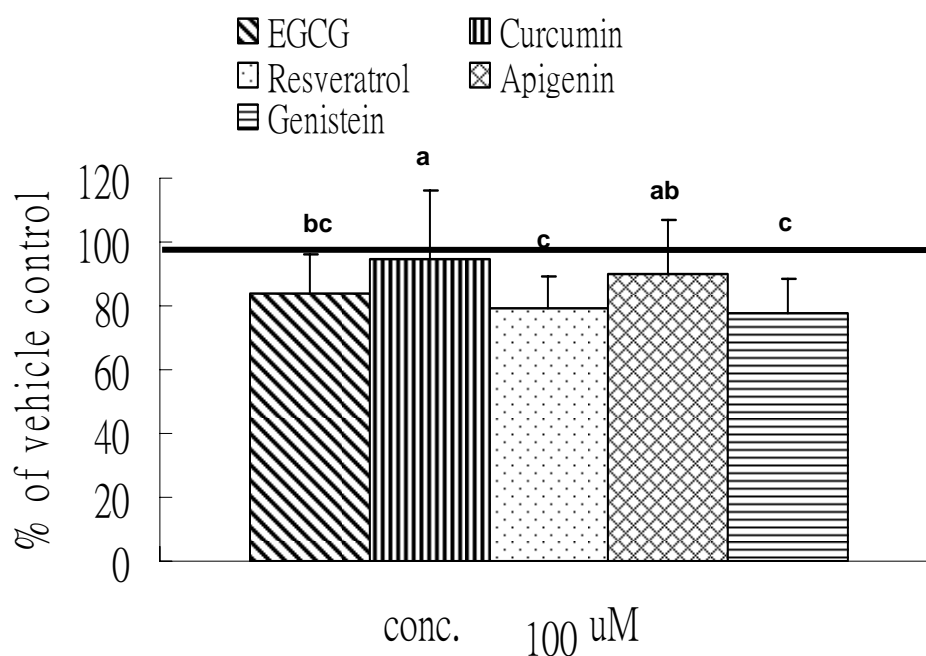


圖 4-19 多酚類對3T3-L1成熟脂肪細胞TG堆積的影響

**Figure 4-19** Effect of polyphenols on TG accumulation in mature adipocytes. 3T3-L1 were induced to differentiate into mature adipocytes by 100 $\mu$ M linoleic acid for 7d, then treated with polyphenols or vehicle for 48hr. Values are means $\pm$ S.D. (n=6).The significance of differences among the five groups ( epigallocatechin gallate(EGCG), curcumin, resveratrol, apigenin, genistein ) was analyzed statistically by Duncan's multiple range test. Values not sharing the same superscript letter are significantly different,  $p < 0.05$  .

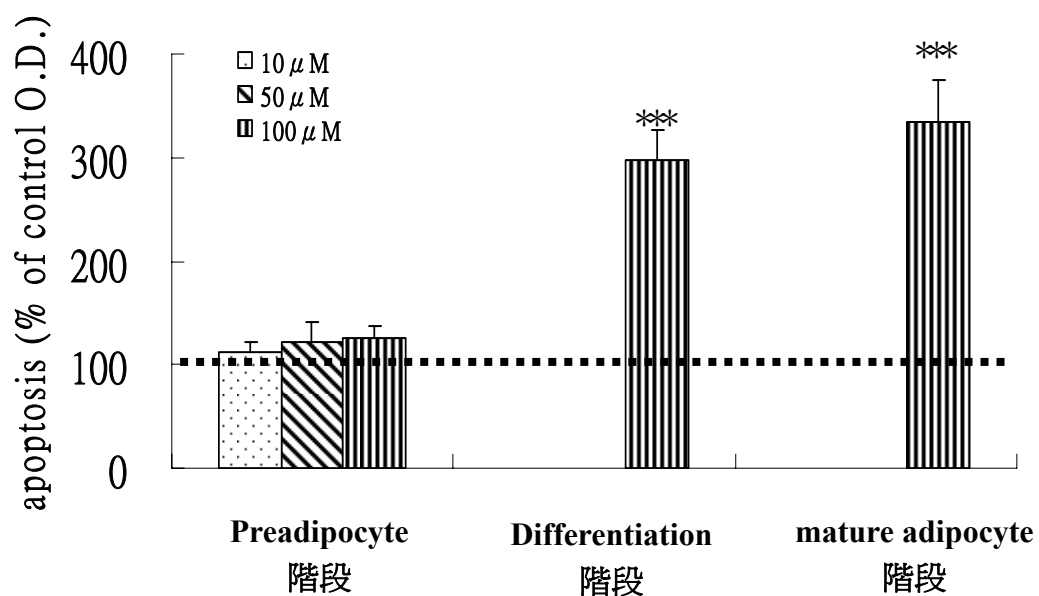


圖 4-20 curcumin對3T3-L1各階段細胞凋亡的影響

Figure 4-20 Effect of curcumin on apoptosis of 3T3-L1 at 3 stages. Values are means $\pm$ S.D. (n=6). The significance of differences between the curcumin and vehicle group was analyzed statistically by Dunnet's test. \*p<0.05, \*\*p<0.005, \*\*\*p<0.0005

## 第五章 討論

### 一、實驗一 脂肪酸對 3T3-L1 脂肪細胞 adipogenesis 的影響

#### 1、各種溶劑及正對照 TZD 對 3T3-L1 前脂肪細胞分化的影響

體外模式脂肪細胞相關研究常用的細胞有很多種，包括有細胞株如 3T3-L1、3T3F442A 及初代培養前脂肪細胞 (stromal-vascular cell; SV cell) 等，而我們在此選用了分化常用之細胞株 3T3-L1 preadipocyte celline，是因為 3T3-L1 是具有高度分化為成熟脂肪細胞潛力之前脂肪細胞株(23, 25)，因此能用來看出以測試物處理後對脂肪細胞 adipogenesis 的影響。

根據 Lehmann 等學者於 1995 年證實抗糖尿病藥物 TZDs 為 PPAR  $\gamma$  ligand 可促進脂肪細胞分化(11)，所以我們建立 3T3-L1 分化流程後，再用已知 PPAR  $\gamma$  促進劑 TZD (BRL 49653) 當作正對照，與未加任何分化促進劑的 blank 組相比，結果發現分化程度為 blank 組的 5.5 倍 (圖 4-1)，所以可以證實我們成功建立 3T3-L1 分化流程。由於我們後續實驗之脂肪酸及天然抗氧化物測試物之溶劑分別為 Abs EtOH 與 DMSO，所以我們針對這二種溶劑偵測對 3T3-L1 分化影響，結果發現即使在 0.2% 也不會影響分化。

而 3T3-L1 分化特徵包括有：1) 細胞型態上的改變、2) 油紅染色可染出脂肪細胞內的油滴、3) 細胞內 TG 堆積、4) 細胞內 G3PDH 酵素活性與脂肪細胞內特定基因表現增加等，所以之後我們以這些特徵做為指標。

#### 2、一般脂肪酸對 3T3-L1 脂肪細胞分化的影響

Han 等學者分別將 C8:0、C10:0 與 C18:1 處理 3T3-L1 脂肪細胞，發現和 C18:1 比較，C8:0 和 C10:0 都是呈現抑制分化、抑制成熟脂肪細胞 lipogenesis；另外 Amri 等學者，使用各種不同的脂肪酸處理 ob1771 脂肪細胞，發現脂肪酸促進分化程度

為 SFA(C16:0、C18:0)最差，其次 MUFA(C18:1)最好的為 PUFA(C18:3)，而我們以 SFA(C16:0、C18:0)、MUFA(C18:1)及 PUFA(C18:2、C18:3)處理 3T3-L1，以細胞內 TG 堆積為分化指標，發現測試的所有脂肪酸都會促進分化，但促進分化程度不同，分別是 SFA < MUFA < PUFA 這和文獻相同 (圖 4-2)。

### 3、特殊脂肪酸對脂肪細胞 adipogenesis 的影響

在特殊脂肪酸對 3T3-L1 之 adipogenesis 影響的實驗中，使用了 2 種特殊脂肪酸 *c9,t11,t13*- conjugated linolenic acid (*c9,t11,t13*-CLN) 和 phytanic acid (PA)及其各自的對照脂肪酸組分別是 C18:3 和 C16:0。

#### (1) 特殊脂肪酸--*c9,t11,t13*-CLN 對 3T3-L1 adipogenesis 的影響

1987 年由 Blankson 等學者首次發現之 Conjugated linoleic acid (CLA)，已知具有降體重(129)、降體脂(130)、抗癌(131, 132)等功能，在 3T3-L1 脂肪細胞實驗已知 CLA 可增加脂肪酸氧化(133, 134)、抑制增生(135, 136)、抑制分化(137)並且抑制 C/EBP  $\alpha$  (134)和 PPAR  $\gamma$  (138, 139)。CLN 與 CLA 是含有共軛雙鍵的脂肪酸；不同處為前者是 18:3 後者是 18:2，相較於 CLA，有關 CLN 對體脂生成影響所知甚少，相關研究包括動物實驗方面，Koba 等學者將 CLN 複合物 (含 conjugated diene 及 conjugated triene) 加入飼料中，餵食 SD 大鼠發現白色脂肪組織會減少(48)，而 *c9,t11,t13*-CLN 為苦瓜主要的脂肪酸成分，Chan 等學者將苦瓜汁用於動物模式中，發現苦瓜汁可透過增加肝及肌肉 CPT-1 及 acyl-CoA dehydrogenase 活性來增加脂肪酸氧化降低體脂(45)；Chuang 等學者利用 H4 II EC3 肝細胞模式加入苦瓜中萃出富含 *c9,t11,t13*-CLN 之區分物處理，發現可活化 PPAR  $\alpha$ ，促進 ACO 活性及其 gene 表現(50)。這些都間接證實 CLN 中的 *c9,t11,t13*-CLN 可能具有抗肥胖潛力，故此我們首次將純度 99% *c9,t11,t13*-CLN 藥品於 3T3-L1 脂肪細胞中實驗，想了解此種特殊脂肪酸是否可以抑制脂肪細



胞 adipogenesis。

首先關於脂肪酸測試劑量問題，實驗過程中發現不同階段之 3T3-L1 對 *c9,t11,t13*-CLN 有不同耐受性，preadipocyte 最敏感，低劑量 ( $10 \mu\text{M}$  *c9,t11,t13*-CLN) 處理 48hr 即造成細胞毒性，分化階段的 3T3-L1 對 *c9,t11,t13*-CLN 的耐受性稍提高，至  $100 \mu\text{M}$  才會有細胞數減少的情形 (蛋白質定量結果未示)，約減少 15-20%，但在成熟脂肪細胞對 CLN 有最高的耐受性，即使處理  $100 \mu\text{M}$  也不會造成細胞數減少。相對的其對照組 C18:3 即使在  $200 \mu\text{M}$ ，不論對 preadipocyte、differentiating adipocyte 或 mature adipocyte 都不會造成細胞數減少。

實驗結果顯示 *c9,t11,t13*-CLN 與其對照 C18:3 比較，在 preadipocyte proliferation 階段 *c9,t11,t13*-CLN 會抑制增生；在分化階段 *c9,t11,t13*-CLN 會抑制細胞內 TG 堆積 (圖 4-3)、抑制細胞內 G3PDH 活性 (圖 4-4)，加上以油紅染色的方式觀察細胞內油滴情形，發現 *c9,t11,t13*-CLN 比起對照組明顯油滴數目減少且油滴也較小 (圖 4-6)；在分化末期階段 CLN 會抑制細胞內 TG 堆積 (圖 4-9) 和抑制細胞內 G3PDH 活性 (圖 4-10)。除了成熟脂肪細胞外，*c9,t11,t13*-CLN 會造成前脂肪細胞階段及分化階段脂肪細胞之細胞凋亡。Nishimura 等學者將苦瓜中萃出 *c9,t11,t13*-CLN  $200 \mu\text{M}$  處理 3T3-L1，發現可以誘導前脂肪細胞細胞凋亡(51)，我們研究發現 *c9,t11,t13*-CLN 在  $100 \mu\text{M}$  會造成 preadipocyte 及 differentiation 階段細胞凋亡 (圖 4-12)，而劑量上比較低可能是因為我們使用的為純度 99% 藥品，Nishimura 學者使用的 CLN 為萃取物。

這些結果顯示 *c9,t11,t13*-CLN 會抑制 3T3-L1 前脂肪細胞增生、分化，此種抑制作用與促進細胞凋亡有關。除此外 *c9,t11,t13*-CLN 也會作用於成熟脂肪細胞，抑制 lipogenesis，其抗肥胖之潛力未來值得深入探討。

## (2) 特殊脂肪酸-PA 對 3T3-L1 adipogenesis 的影響

在 PA 方面曾有學者發現在白色、棕色脂肪、肝臟三種組織中，以棕色脂肪組織中 phytanoyl-CoA hydroxylase mRNA 表現最高，而 phytanoyl-CoA hydroxylase 與 phytanic acid 代謝有關；HIB-1B 棕色脂肪細胞株轉染 UCP1-CAT gene 也發現 5-20  $\mu$ M PA 會促進 UCP-1 gene 轉錄作用，促進棕色脂肪細胞分化而活化 BAT 生熱作用(59)，間接表示 PA 具有增加生熱作用，抗肥胖的潛力。

為了解 PA 是否也會影響脂肪細胞 adipogenesis，所以我們將 10-200  $\mu$ M PA 處理 3T3-L1，發現即使在 200  $\mu$ M PA 也不會造成前脂肪細胞之細胞毒性，在 100  $\mu$ M 濃度下也不會影響分化階段和成熟脂肪細胞數目。和對照組 C16:0 相比，在 preadipocyte proliferation 階段 PA 並不影響增生，在分化階段 PA 與 C16:0 相較為抑制分化，在分化末期階段與其對照組相比，PA 則會抑制成熟脂肪細胞 lipogenesis。

但是根據 Schluter 等學者以 80  $\mu$ M PA 處理誘導分化的 3T3-L1，得到結論 PA 會促進 3T3-L1 分化(61)，這是因為 Schluter 等學者的實驗是將 PA 與 vehicle control 相比，而如前所述我們發現所有的脂肪酸都會促進 3T3-L1 分化，因此當 PA 與 vehicle control 相比時，其分化程度是大於 100% (圖 4-3)，但當 PA 與同具有 16 個碳的飽和脂肪酸 C16:0 比較，則會發現 PA 促使 3T3-L1 分化能力小於 C16:0。

由以上可知，特殊脂肪酸 PA 並不影響前脂肪細胞增生，但會抑制 3T3-L1 分化及成熟脂肪細胞 lipogenesis，可能也具有抗肥胖潛力。

## 二、實驗二 天然抗氧化物對 3T3-L1 脂肪細胞 adipogenesis 的影響

### (1) 多酚類-EGCG 對 3T3-L1 adipogenesis 的影響

Hung 等學者證實 EGCG 會透過 ERK 和 Cdk2 路徑，使 3T3-L1 preadipocyte 細胞數目減少(80)，而我們的研究中也發現 EGCG 抑制前脂肪細胞增生 (圖 4-17)

且有 dose-response，和文獻相符合。

但是在誘導脂肪細胞分化的實驗中，Hwang 等學者發現 EGCG 與 vehicle control 相比，EGCG 透過 AMPK 路徑抑制脂肪細胞分化(81)；這和我們的結果不同，或許是因為 Hwang 學者將 3T3-L1 preadipocyte 先以 100  $\mu$  M EGCG 處理 30 分鐘後再換成分化 medium，而我們的實驗設計是於分化起始 (day0) 才將 EGCG 添加於分化 medium (DM I 及 DM II) 中處理細胞，可能 EGCG 抑制分化是作用在 preadipocyte 階段，因此我們對長滿後 2 天之細胞，處理 EGCG 並未觀察到抑制分化之結果。

在已分化的成熟脂肪細胞部分，Lin 等學者以 50-200  $\mu$  M 綠茶萃取物 EGCG 處理成熟脂肪細胞 3-4 天，發現 EGCG 可誘導成熟脂肪細胞細胞凋亡(84)，而我們並未測定 EGCG 是否造成細胞凋亡，但觀察到 EGCG 顯著抑制成熟脂肪細胞 TG 堆積 (圖 4-19)，這或許與 EGCG 誘導成熟脂肪細胞凋亡有關。

## (2) 多酚類-curcumin 對 3T3-L1 adipogenesis 的影響

根據文獻發現 Curcumin 與抗肥胖有相關性，證據包括有動物實驗發現，於飼料中添加 1% curcumin 複合物給予 SD 大鼠，可降低體脂、增加肝臟 ACO 活性(96)；另外也有學者以 GAL4-P PPAR  $\gamma$  chimera assay 中也發現 curcumin 為 PPAR  $\gamma$  ligand(100)；Nishiyama 等學者給予 type2 DM KK-A<sup>y</sup> mice 薑黃萃製物，包括酒精萃 0.2-1 g / 100g diet 及高劑量的正乙烷萃 0.5g / 100g diet，都發現可降低 type2 DM KK-A<sup>y</sup> mice 的血糖，其中酒精萃 2-20mg/L 會促進人類脂肪細胞分化作用(100)，這和我們的結果不同，可能是因為 Nishiyama 學者使用的為萃製物，而萃製物內含複合物，其中有的成分可能不只有 curcumin，而我們所使用的為純度 99% 的 curcumin 藥品，所以結果發現 curcumin 在 3T3-L1 中呈現 anti-adipogenesis；所以 curcumin 對脂肪細胞的影響為何，仍值得進一步探討。

有關測試劑量方面，發現 9 種抗氧化物在 100  $\mu$  M 濃度下與 vehicle control 相較，均不會顯著造成細胞數目顯著減少，只除了 curcumin，curcumin 約 50  $\mu$  M 即會造成 preadipocyte 細胞數明顯減少，100  $\mu$  M 會造成分化階段和成熟脂肪細胞數目減少(蛋白質定量結果未示)。

與脂肪酸不同的是多酚類並不會一律促進 3T3-L1 分化，因此本實驗結果多酚類均直接與其 vehicle control 相比較。結果發現所有多酚均會抑制前脂肪細胞之增生，尤其是 curcumin 最為顯著。在 differentiation 時 curcumin 會抑制細胞內 TG 堆積 (圖 4-13)、細胞 G3PDH 活性幾乎為零 (圖 4-14)、加上以油紅染色觀察油滴的情形，與 vehicle control 比較，幾乎看不到油滴 (圖 4-16)，在分化末期成熟脂肪細胞 TG 堆積 curcumin 並無顯著作用 (圖 4-19)。Curcumin 證實會造成分化階段與成熟脂肪細胞階段細胞凋亡 (圖 4-20)，但對前脂肪細胞毒性並非經由細胞凋亡。

以上結果顯示 curcumin 抑制前脂肪細胞增生、分化，後者作用與細胞凋亡有關。

### (3) 多酚類- resveratrol、apigenin、genistein 對 3T3-L1 adipogenesis 的影響

這些多酚類與抗肥胖相關研究，證據包括 50  $\mu$  M resveratrol 可抑制 3T3-L1 成熟脂肪細胞 lipogenesis，並增加脂解作用(109)，同樣劑量也可抑制 C3H10T1/2 間葉細胞形成 adipocyte(110)；apigenin 萃取物在動物實驗中可降低膽固醇、抑制脂質吸收、增加初代副羣脂肪細胞脂解作用(113, 115)；genistein 會降低 3T3-L1 preconfluent 及 mitotic clonal expansion 時細胞數目(126)，抑制 3T3-L1 分化，促進脂解作用(104)。

在我們的研究中發現 resveratrol、apigenin、genistein 在前脂肪細胞階段都會使 preadipocyte 細胞數減少 (圖 4-17) 但不會造成細胞毒性 (圖 4-17)；在

分化階段均會抑制細胞內 TG 堆積 (圖 4-13)、抑制 G3PDH 活性 (圖 4-14)、加上油紅染色觀察細胞內油滴情形，與 vehicle control 相比油滴明顯減少 (圖 4-16); 在分化末期階段 resveratrol 及 genistein 顯著抑制成熟脂肪細胞 TG 堆積，但 apigenin 並無顯著作用。

由以上可知除了已知的 EGCG 外，本實驗發現 curcumin、resveratrol、apigenin、genistein 均有 anti-adipogenesis 作用，不只抑制前脂肪細胞增生，並抑制脂肪細胞分化，其中 resveratrol 與 genistein 還會抑制成熟脂肪細胞 TG 堆積，其抗肥胖潛力值得研究。

另外由於 fatty acid synthase (FAS) 為脂肪酸合成的酵素，Li 等學者發現多酚類包括 resveratrol、apigenin、genistein、flavone 等都是 FAS 的抑制劑，而這些多酚類在結構上都具有相同之處，所以 Li 等學者推測只要具有以下 3 個條件，包括了 1) 具有 2 個 phenyl rings (A ring 和 B ring)，2) 在每個 rings 上具有各自的 OH group，3) 具有適當的酯鍵可連接 rings，若具有以上 3 個條件就可能抑制 FAS(140)，這或許可作為未來進一步研究多酚類 anti-adipogenesis 作為參考。

## 第六章 結論

由於肥胖造成的原因包括脂肪細胞數目增加 (hyperplasia)及脂肪細胞肥大 (hypertrophy)，所以若能藉由抑制脂肪細胞數目增加，或是抑制脂肪細胞分化，或是抑制成熟脂肪細胞脂質生合成，或許都能達到抗肥胖的目的。本研究利用 3T3-L1 嘗試探討特殊脂肪酸中 *c9,t11,t13*-CLN 和 PA 以及數種天然抗氧化物之 anti-adipogenesis 作用，其重要結果如下：

- 1、在特殊脂肪酸部分，*c9,t11,t13*-CLN 在前脂肪細胞階段，不但會降低前脂肪細胞數目，且於劑量  $10\ \mu\text{M}$  即對前脂肪細胞產生毒性；也會抑制分化階段及分化末期階段的細胞脂質生合成；除了成熟脂肪細胞之外， $100\ \mu\text{M}$  *c9,t11,t13*-CLN 會造成前脂肪細胞階段及分化階段細胞凋亡，顯示 *c9,t11,t13*-CLN 抑制分化和抑制 terminal differentiation 之作用和誘導細胞凋亡有關。
- 2、PA 對於前脂肪細胞不會造成毒性，也不會降低細胞數目；但會抑制脂肪細胞分化及抑制成熟脂肪細胞 lipogenesis
- 3、2 種特殊脂肪酸 *c9,t11,t13*-CLN 及 PA 皆會抑制分化及抑制成熟脂肪細胞 lipogenesis，而其中又以 *c9,t11,t13*-CLN 效果最強。
- 4、EGCG 在前脂肪細胞階段，會降低細胞數目但不會造成細胞毒性；也不會抑制分化，但會抑制成熟脂肪細胞 TG 堆積
- 5、Curcumin 在前脂肪細胞階段，會降低細胞數目且會造成細胞毒性；在分化階段會抑制分化；另外除了前脂肪細胞階段之外，Curcumin 會造成分化階段及成熟脂肪細胞階段細胞凋亡
- 6、resveratrol、apigenin、genistein 在前脂肪細胞階段，會降低細胞數目但不會造成細胞毒性；在分化階段 3 者均會抑制分化；在分化末期階段 resveratrol 和 genistein 會抑制成熟脂肪細胞 TG 堆積，但 apigenin 並無顯著作用

結果顯示，特殊脂肪酸中 *c9,t11,t13*-CLN 和 PA 均會抑制 3T3-L1、分化、成熟脂肪細胞 lipogenesis，其中又以 *c9,t11,t13*-CLN 效果最強。除了 EGCG 之外 curcumin、resveratrol、apigenin、genistein 均有 anti-adipogenesis 之功能，其中又以 curcumin 最強；而這些具有 anti-adipogenesis 功能成分，推測具有抗肥胖之潛力。未來可深入研究其作用機制，並在天然食材中找尋富含這些功能成分之食物，發展健康食品，應用於抗肥胖之上。



第七章 參考文獻

1. Hedley AA, Ogden CL, Johnson CL, Carroll MD, Curtin LR, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999-2002. JAMA. 2004 Jun 16;291(23):2847-50.
2. Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the united states, 1999-2004. JAMA. 2006 Apr 5;295(13):1549-55.
3. Wang Y, Monteiro C, Popkin BM. Trends of obesity and underweight in older children and adolescents in the united states, brazil, china, and russia. Am J Clin Nutr. 2002 Jun;75(6):971-7.
4. 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 Dec;84(6):1481-8.
5. Cryer A. Tissue lipoprotein lipase activity and its action in lipoprotein metabolism. Int J Biochem. 1981;13(5):525-41.
6. Brun RP, Kim JB, Hu E, Altiok S, Spiegelman BM. Adipocyte differentiation: A



- transcriptional regulatory cascade. *Curr Opin Cell Biol.* 1996 Dec;8(6):826-32.
7. Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* 1998 Jul;78(3):783-809.
8. 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 Aug;16(8):4128-36.
9. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 1990 Oct 18;347(6294):645-50.
10. Gottlicher M, Widmark E, Li Q, Gustafsson JA. Fatty acids activate a chimera of the clofibric acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 May 15;89(10):4653-7.
11. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem.* 1995 Jun 2;270(22):12953-6.
12. Morrison RF, Farmer SR. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte

differentiation. *J Nutr.* 2000 Dec;130(12):3116S-21S.

13. Chen F, Law SW, O'Malley BW. Identification of two mPPAR related receptors and evidence for the existence of five subfamily members. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 Oct 29;196(2):671-7.

14. 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 Aug;135(2):798-800.

15. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: Tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 1994 May 15;8(10):1224-34.

16. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 1994 Dec 30;79(7):1147-56.

17. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell.* 1999 Oct;4(4):585-95.

18. Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S,

Nakano R, Ishii C, et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte

hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell*. 1999 Oct;4(4):597-609.

19. Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell*. 1999 Oct;4(4):611-7.

20. He W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, Nelson M, Ong E, Olefsky JM, Evans RM. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Dec 23;100(26):15712-7.

21. Zhang J, Fu M, Cui T, Xiong C, Xu K, Zhong W, Xiao Y, Floyd D, Liang J, et al. Selective disruption of PPARgamma 2 impairs the development of adipose tissue and insulin sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 20;101(29):10703-8.

22. Edvardsson U, Bergstrom M, Alexandersson M, Bamberg K, Ljung B, Dahllof B. Rosiglitazone (BRL49653), a PPARgamma-selective agonist, causes peroxisome proliferator-like liver effects in obese mice. *J Lipid Res*. 1999 Jul;40(7):1177-84.

23. Green H, Kehinde O. Spontaneous heritable changes leading to increased adipose

conversion in 3T3 cells. *Cell*. 1976 Jan;7(1):105-13.

24. Negrel R, Grimaldi P, Ailhaud G. Establishment of preadipocyte clonal line from epididymal fat pad of ob/ob mouse that responds to insulin and to lipolytic hormones.

*Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978 Dec;75(12):6054-8.

25. Green H, Meuth M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*. 1974 Oct;3(2):127-33.

26. 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 Oct

25;253(20):7570-8.

27. Cao Z, Umek RM, McKnight SL. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev*. 1991 Sep;5(9):1538-52.

28. MacDougald OA, Cornelius P, Lin FT, Chen SS, Lane MD. Glucocorticoids reciprocally regulate expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha and delta genes in 3T3-L1 adipocytes and white adipose tissue. *J Biol Chem*. 1994 Jul

22;269(29):19041-7.

29. Engelman JA, Berg AH, Lewis RY, Lin A, Lisanti MP, Scherer PE. Constitutively active mitogen-activated protein kinase kinase 6 (MKK6) or salicylate induces spontaneous 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem.* 1999 Dec 10;274(50):35630-8.
30. 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 Apr 9;274(15):10071-8.
31. Han J, Hamilton JA, Kirkland JL, Corkey BE, Guo W. Medium-chain oil reduces fat mass and down-regulates expression of adipogenic genes in rats. *Obes Res.* 2003 Jun;11(6):734-44.
32. Han J, Farmer SR, Kirkland JL, Corkey BE, Yoon R, Pirtskhalava T, Ido Y, Guo W. Octanoate attenuates adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr.* 2002 May;132(5):904-10.
33. Wen Y, Wang HW, Wu J, Lu HL, Hu XF, Cianflone K. Effects of fatty acid regulation on visfatin gene expression in adipocytes. *Chin Med J (Engl).* 2006 Oct 20;119(20):1701-8.

34. Amri EZ, Bertrand B, Ailhaud G, Grimaldi P. Regulation of adipose cell differentiation. I. fatty acids are inducers of the aP2 gene expression. *J Lipid Res.* 1991 Sep;32(9):1449-56.
35. Xu J, Teran-Garcia M, Park JH, Nakamura MT, Clarke SD. Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating transcript decay. *J Biol Chem.* 2001 Mar 30;276(13):9800-7.
36. Madsen L, Petersen RK, Kristiansen K. Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. *Biochim Biophys Acta.* 2005 May 30;1740(2):266-86.
37. Hsu JM, Ding ST. Effect of polyunsaturated fatty acids on the expression of transcription factor adipocyte determination and differentiation-dependent factor 1 and of lipogenic and fatty acid oxidation enzymes in porcine differentiating adipocytes. *Br J Nutr.* 2003 Sep;90(3):507-13.
38. Kim HK, Della-Fera M, Lin J, Baile CA. Docosahexaenoic acid inhibits adipocyte differentiation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr.* 2006 Dec;136(12):2965-9.

39. Granlund L, Larsen LN, Nebb HI, Pedersen JI. Effects of structural changes of fatty acids on lipid accumulation in adipocytes and primary hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Feb 21;1687(1-3):23-30.
40. Kang K, Liu W, Albright KJ, Park Y, Pariza MW. Trans-10,cis-12 CLA inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreases PPAR gamma expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Apr 11;303(3):795-9.
41. Yasui Y, Hosokawa M, Sahara T, Suzuki R, Ohgiya S, Kohno H, Tanaka T, Miyashita K. Bitter melon seed fatty acid rich in 9c,11t,13t-conjugated linolenic acid induces apoptosis and up-regulates the GADD45, p53 and PPARgamma in human colon cancer caco-2 cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005 Aug;73(2):113-9.
42. Kohno H, Suzuki R, Noguchi R, Hosokawa M, Miyashita K, Tanaka T. Dietary conjugated linolenic acid inhibits azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci in rats. *Jpn J Cancer Res*. 2002 Feb;93(2):133-42.
43. Kohno H, Yasui Y, Suzuki R, Hosokawa M, Miyashita K, Tanaka T. Dietary seed oil rich in conjugated linolenic acid from bitter melon inhibits azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis through elevation of colonic PPARgamma expression and alteration of lipid composition. *Int J Cancer*. 2004 Jul 20;110(6):896-901.

44. Kohno H, Suzuki R, Yasui Y, Hosokawa M, Miyashita K, Tanaka T. Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Sci.* 2004 Jun;95(6):481-6.
45. Chan LL, Chen Q, Go AG, Lam EK, Li ET. Reduced adiposity in bitter melon (*Momordica charantia*)-fed rats is associated with increased lipid oxidative enzyme activities and uncoupling protein expression. *J Nutr.* 2005 Nov;135(11):2517-23.
46. Virdi J, Sivakami S, Shahani S, Suthar AC, Banavalikar MM, Biyani MK. Antihyperglycemic effects of three extracts from *Momordica charantia*. *J Ethnopharmacol.* 2003 Sep;88(1):107-11.
47. Vikrant V, Grover JK, Tandon N, Rathi SS, Gupta N. Treatment with extracts of *Momordica charantia* and *Eugenia jambolana* prevents hyperglycemia and hyperinsulinemia in fructose fed rats. *J Ethnopharmacol.* 2001 Jul;76(2):139-43.
48. Koba K, Akahoshi A, Yamasaki M, Tanaka K, Yamada K, Iwata T, Kamegai T, Tsutsumi K, Sugano M. Dietary conjugated linolenic acid in relation to CLA differently modifies body fat mass and serum and liver lipid levels in rats. *Lipids.* 2002 Apr;37(4):343-50.



49. Chao CY, Huang CJ. Bitter gourd (*Momordica charantia*) extract activates peroxisome proliferator-activated receptors and upregulates the expression of the acyl CoA oxidase gene in H4IIEC3 hepatoma cells. *J Biomed Sci.* 2003 Nov-Dec;10(6 Pt 2):782-91.
50. Chuang CY, Hsu C, Chao CY, Wein YS, Kuo YH, Huang CJ. Fractionation and identification of 9c, 11t, 13t-conjugated linolenic acid as an activator of PPAR $\alpha$  in bitter gourd (*Momordica charantia* L.). *J Biomed Sci.* 2006 Nov;13(6):763-72.
51. Nishimura K, Tsumagari H, Morioka A, Yamauchi Y, Miyashita K, Lu S, Jisaka M, Nagaya T, Yokota K. Regulation of apoptosis through arachidonate cascade in mammalian cells. *Appl Biochem Biotechnol.* 2002 Jul-Dec;102-103(1-6):239-50.
52. Baxter JH. Absorption of chlorophyll phytol in normal man and in patients with refsum's disease. *J Lipid Res.* 1968 Sep;9(5):636-41.
53. Baxter JH, Steinberg D, Mize CE, Avigan J. Absorption and metabolism of uniformly  $^{14}\text{C}$ -labeled phytol and phytanic acid by the intestine of the rat studied with thoracic duct cannulation. *Biochim Biophys Acta.* 1967 Apr 4;137(2):277-90.
54. van den Brink DM, Wanders RJ. Phytanic acid: Production from phytol, its breakdown and role in human disease. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Aug;63(15):1752-65.

55. Refsum S. Heredopathia atactica polyneurotiformis: Therapeutic and pathogenetic aspects. *Riv Patol Nerv Ment.* 1976 Jun;97(3):115-26.
56. Wanders RJ, Jansen GA, Skjeldal OH. Refsum disease, peroxisomes and phytanic acid oxidation: A review. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2001 Nov;60(11):1021-31.
57. Plant GR, Hansell DM, Gibberd FB, Sidey MC. Skeletal abnormalities in refsum's disease (heredopathia atactica polyneuritiformis). *Br J Radiol.* 1990 Jul;63(751):537-41.
58. Heim M, Johnson J, Boess F, Bendik I, Weber P, Hunziker W, Fluhmann B. Phytanic acid, a natural peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonist, regulates glucose metabolism in rat primary hepatocytes. *FASEB J.* 2002 May;16(7):718-20.
59. Schluter A, Giralt M, Iglesias R, Villarroya F. Phytanic acid, but not pristanic acid, mediates the positive effects of phytol derivatives on brown adipocyte differentiation. *FEBS Lett.* 2002 Apr 24;517(1-3):83-6.
60. Schluter A, Barbera MJ, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. Phytanic acid, a novel activator of uncoupling protein-1 gene transcription and brown adipocyte differentiation. *Biochem J.* 2002 Feb 15;362(Pt 1):61-9.
61. Schluter A, Yubero P, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. The chlorophyll-derived

metabolite phytanic acid induces white adipocyte differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002 Sep;26(9):1277-80.

62. Lin YS, Tsai YJ, Tsay JS, Lin JK. Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves. *J Agric Food Chem.* 2003 Mar 26;51(7):1864-73.

63. Crespy V, Williamson G. A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. *J Nutr.* 2004 Dec;134(12 Suppl):3431S-40S.

64. Lin JK, Lin-Shiau SY. Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols. *Mol Nutr Food Res.* 2006 Feb;50(2):211-7.

65. Kuo KL, Weng MS, Chiang CT, Tsai YJ, Lin-Shiau SY, Lin JK. Comparative studies on the hypolipidemic and growth suppressive effects of oolong, black, pu-erh, and green tea leaves in rats. *J Agric Food Chem.* 2005 Jan 26;53(2):480-9.

66. Mangiapane H, Thomson J, Salter A, Brown S, Bell GD, White DA. The inhibition of the oxidation of low density lipoprotein by (+)-catechin, a naturally occurring flavonoid. *Biochem Pharmacol.* 1992 Feb 4;43(3):445-50.

67. Esterbauer H, Jurgens G, Quehenberger O, Koller E. Autoxidation of human low density lipoprotein: Loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of

- aldehydes. *J Lipid Res.* 1987 May;28(5):495-509.
68. Bedwell S, Dean RT, Jessup W. The action of defined oxygen-centred free radicals on human low-density lipoprotein. *Biochem J.* 1989 Sep 15;262(3):707-12.
69. Kao YH, Hiipakka RA, Liao S. Modulation of endocrine systems and food intake by green tea epigallocatechin gallate. *Endocrinology.* 2000 Mar;141(3):980-7.
70. Sayama K, Lin S, Zheng G, Oguni I. Effects of green tea on growth, food utilization and lipid metabolism in mice. *In Vivo.* 2000 Jul-Aug;14(4):481-4.
71. Ashida H, Furuyashiki T, Nagayasu H, Bessho H, Sakakibara H, Hashimoto T, Kanazawa K. Anti-obesity actions of green tea: Possible involvements in modulation of the glucose uptake system and suppression of the adipogenesis-related transcription factors. *Biofactors.* 2004;22(1-4):135-40.
72. Murase T, Nagasawa A, Suzuki J, Hase T, Tokimitsu I. Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: Stimulation of lipid catabolism in the liver. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002 Nov;26(11):1459-64.
73. Nakagawa K, Okuda S, Miyazawa T. Dose-dependent incorporation of tea catechins, (-)-epigallocatechin-3-gallate and (-)-epigallocatechin, into human plasma. *Biosci*

Biotechnol Biochem. 1997 Dec;61(12):1981-5.

74. Lee MJ, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, Lambert G, Mohr S, Yang CS. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and

(-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: Formation of different metabolites and

individual variability. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Oct;11(10 Pt 1):1025-32.

75. Chiang CT, Weng MS, Lin-Shiau SY, Kuo KL, Tsai YJ, Lin JK. Pu-erh tea supplementation suppresses fatty acid synthase expression in the rat liver through downregulating akt and JNK signalings as demonstrated in human hepatoma HepG2 cells.

*Oncol Res.* 2005;16(3):119-28.

76. Murase T, Haramizu S, Shimotoyodome A, Tokimitsu I. Reduction of diet-induced obesity by a combination of tea-catechin intake and regular swimming. *Int J Obes (Lond).*

2006 Mar;30(3):561-8.

77. Shimotoyodome A, Haramizu S, Inaba M, Murase T, Tokimitsu I. Exercise and green tea extract stimulate fat oxidation and prevent obesity in mice. *Med Sci Sports Exerc.*

2005 Nov;37(11):1884-92.

78. Waltner-Law ME, Wang XL, Law BK, Hall RK, Nawano M, Granner DK.

Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production.

J Biol Chem. 2002 Sep 20;277(38):34933-40.

79. Han LK, Takaku T, Li J, Kimura Y, Okuda H. Anti-obesity action of oolong tea. Int J

Obes Relat Metab Disord. 1999 Jan;23(1):98-105.

80. Hung PF, Wu BT, Chen HC, Chen YH, Chen CL, Wu MH, Liu HC, Lee MJ, Kao YH.

Antimitogenic effect of green tea (-)-epigallocatechin gallate on 3T3-L1 preadipocytes

depends on the ERK and Cdk2 pathways. Am J Physiol Cell Physiol. 2005

May;288(5):C1094-108.

81. Hwang JT, Park IJ, Shin JI, Lee YK, Lee SK, Baik HW, Ha J, Park OJ. Genistein,

EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating

AMP-activated protein kinase. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Dec

16;338(2):694-9.

82. Liu HS, Chen YH, Hung PF, Kao YH. Inhibitory effect of green tea

(-)-epigallocatechin gallate on resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes depends on

the ERK pathway. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006 Feb;290(2):E273-81.

83. Wolfram S, Raederstorff D, Wang Y, Teixeira SR, Elste V, Weber P. TEAVIGO

(epigallocatechin gallate) supplementation prevents obesity in rodents by reducing adipose tissue mass. *Ann Nutr Metab.* 2005 Jan-Feb;49(1):54-63.

84. Lin J, Della-Fera MA, Baile CA. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. *Obes Res.* 2005 Jun;13(6):982-90.

85. Garcia-Ramirez B, Fernandez-Larrea J, Salvado MJ, Ardevol A, Arola L, Blade C. Tetramethylated dimeric procyanidins are detected in rat plasma and liver early after oral administration of synthetic oligomeric procyanidins. *J Agric Food Chem.* 2006 Apr 5;54(7):2543-51.

86. Ceriello A, Bortolotti N, Motz E, Lizzio S, Catone B, Assaloni R, Tonutti L, Taboga C. Red wine protects diabetic patients from meal-induced oxidative stress and thrombosis activation: A pleasant approach to the prevention of cardiovascular disease in diabetes. *Eur J Clin Invest.* 2001 Apr;31(4):322-8.

87. Caimi G, Carollo C, Lo Presti R. Diabetes mellitus: Oxidative stress and wine. *Curr Med Res Opin.* 2003;19(7):581-6.

88. Maritim A, Dene BA, Sanders RA, Watkins JB,3rd. Effects of pycnogenol treatment

on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol.*

2003;17(3):193-9.

89. Tulachan SS, Doi R, Kawaguchi Y, Tsuji S, Nakajima S, Masui T, Koizumi M,

Toyoda E, Mori T, et al. All-trans retinoic acid induces differentiation of ducts and

endocrine cells by mesenchymal/epithelial interactions in embryonic pancreas. *Diabetes.*

2003 Jan;52(1):76-84.

90. Pinent M, Blade MC, Salvado MJ, Arola L, Ardevol A. Metabolic fate of glucose on

3T3-L1 adipocytes treated with grape seed-derived procyanidin extract (GSPE).

comparison with the effects of insulin. *J Agric Food Chem.* 2005 Jul 27;53(15):5932-5.

91. Ardevol A, Blade C, Salvado MJ, Arola L. Changes in lipolysis and

hormone-sensitive lipase expression caused by procyanidins in 3T3-L1 adipocytes. *Int J*

*Obes Relat Metab Disord.* 2000 Mar;24(3):319-24.

92. Pinent M, Blade MC, Salvado MJ, Arola L, Hackl H, Quackenbush J, Trajanoski Z,

Ardevol A. Grape-seed derived procyanidins interfere with adipogenesis of 3T3-L1 cells

at the onset of differentiation. *Int J Obes (Lond).* 2005 Aug;29(8):934-41.

93. Pinent M, Blade MC, Salvado MJ, Arola L, Ardevol A. Intracellular mediators of



procyanidin-induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *J Agric Food Chem.* 2005 Jan 26;53(2):262-6.

94. Kamikura M, Tanaka K. Studies on intake of natural colors (I). determination and presumptive intake of curcumin. *Eisei Shikenjo Hokoku.* 1983;(101)(101):42-8.

95. Quiles JL, Aguilera C, Mesa MD, Ramirez-Tortosa MC, Baro L, Gil A. An ethanolic-aqueous extract of curcuma longa decreases the susceptibility of liver microsomes and mitochondria to lipid peroxidation in atherosclerotic rabbits. *Biofactors.* 1998;8(1-2):51-7.

96. Asai A, Nakagawa K, Miyazawa T. Antioxidative effects of turmeric, rosemary and capsicum extracts on membrane phospholipid peroxidation and liver lipid metabolism in mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1999 Dec;63(12):2118-22.

97. Samaha HS, Kelloff GJ, Steele V, Rao CV, Reddy BS. Modulation of apoptosis by sulindac, curcumin, phenylethyl-3-methylcaffeate, and 6-phenylhexyl isothiocyanate: Apoptotic index as a biomarker in colon cancer chemoprevention and promotion. *Cancer Res.* 1997 Apr 1;57(7):1301-5.

98. Huang MT, Lou YR, Ma W, Newmark HL, Reuhl KR, Conney AH. Inhibitory effects

of dietary curcumin on forestomach, duodenal, and colon carcinogenesis in mice. *Cancer Res.* 1994 Nov 15;54(22):5841-7.

99. Asai A, Miyazawa T. Dietary curcuminoids prevent high-fat diet-induced lipid accumulation in rat liver and epididymal adipose tissue. *J Nutr.* 2001 Nov;131(11):2932-5.

100. Nishiyama T, Mae T, Kishida H, Tsukagawa M, Mimaki Y, Kuroda M, Sashida Y, Takahashi K, Kawada T, et al. Curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*curcuma longa* L.) suppress an increase in blood glucose level in type 2 diabetic KK-ay mice. *J Agric Food Chem.* 2005 Feb 23;53(4):959-63.

101. Lee SH, Park YB, Bae KH, Bok SH, Kwon YK, Lee ES, Choi MS. Cholesterol-lowering activity of naringenin via inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and acyl coenzyme A:Cholesterol acyltransferase in rats. *Ann Nutr Metab.* 1999;43(3):173-80.

102. Erlund I, Meririnne E, Alfthan G, Aro A. Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *J Nutr.* 2001 Feb;131(2):235-41.

103. Harmon AW, Patel YM. Naringenin inhibits phosphoinositide 3-kinase activity and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 May 30;305(2):229-34.
104. Harmon AW, Harp JB. Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001 Apr;280(4):C807-13.
105. Kawada T, Aoki N, Kamei Y, Maeshige K, Nishiu S, Sugimoto E. Comparative investigation of vitamins and their analogues on terminal differentiation, from preadipocytes to adipocytes, of 3T3-L1 cells. *Comp Biochem Physiol A.* 1990;96(2):323-6.
106. Ono M, Aratani Y, Kitagawa I, Kitagawa Y. Ascorbic acid phosphate stimulates type IV collagen synthesis and accelerates adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Exp Cell Res.* 1990 Apr;187(2):309-14.
107. Vincent S, Tourniaire F, El Yazidi CM, Compe E, Manches O, Plannels R, Roche R. Nelfinavir induces necrosis of 3T3F44-2A adipocytes by oxidative stress. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2004 Dec 15;37(5):1556-62.
108. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard

- JS, Lopez-Lluch G, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 2006 Nov 16;444(7117):337-42.
109. Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature*. 2004 Jun 17;429(6993):771-6.
110. Backesjo CM, Li Y, Lindgren U, Haldosen LA. Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res*. 2006 Jul;21(7):993-1002.
111. Meyer H, Bolarinwa A, Wolfram G, Linseisen J. Bioavailability of apigenin from apiin-rich parsley in humans. *Ann Nutr Metab*. 2006;50(3):167-72.
112. Yano S, Umeda D, Maeda N, Fujimura Y, Yamada K, Tachibana H. Dietary apigenin suppresses IgE and inflammatory cytokines production in C57BL/6N mice. *J Agric Food Chem*. 2006 Jul 12;54(14):5203-7.
113. Han LK, Sumiyoshi M, Zhang J, Liu MX, Zhang XF, Zheng YN, Okuda H, Kimura Y. Anti-obesity action of salix matsudana leaves (part 1). anti-obesity action by polyphenols of salix matsudana in high fat-diet treated rodent animals. *Phytother Res*.

2003 Dec;17(10):1188-94.

114. Han LK, Sumiyoshi M, Zheng YN, Okuda H, Kimura Y. Anti-obesity action of salix matsudana leaves (part 2). isolation of anti-obesity effectors from polyphenol fractions of salix matsudana. *Phytother Res.* 2003 Dec;17(10):1195-8.

115. Zhang J, Zhang YN, Han LK. Studies on chemical constituents of leaves of salix matsudana koidz and their influence on lipolysis. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2000 Sep;25(9):538-41.

116. Chiang LC, Ng LT, Lin IC, Kuo PL, Lin CC. Anti-proliferative effect of apigenin and its apoptotic induction in human hep G2 cells. *Cancer Lett.* 2006 Jun 18;237(2):207-14.

117. Bandyopadhyay S, Lion JM, Mentaverri R, Ricupero DA, Kamel S, Romero JR, Chattopadhyay N. Attenuation of osteoclastogenesis and osteoclast function by apigenin. *Biochem Pharmacol.* 2006 Jul 14;72(2):184-97.

118. 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 Sep 1;31(34):8059-63.

119. Kuppusamy UR, Das NP. Potentiation of beta-adrenoceptor agonist-mediated lipolysis by quercetin and fisetin in isolated rat adipocytes. *Biochem Pharmacol.* 1994 Feb 9;47(3):521-9.
120. Strobel P, Allard C, Perez-Acle T, Calderon R, Aldunate R, Leighton F. Myricetin, quercetin and catechin-gallate inhibit glucose uptake in isolated rat adipocytes. *Biochem J.* 2005 Mar 15;386(Pt 3):471-8.
121. Kim YJ, Bae YC, Suh KT, Jung JS. Quercetin, a flavonoid, inhibits proliferation and increases osteogenic differentiation in human adipose stromal cells. *Biochem Pharmacol.* 2006 Nov 15;72(10):1268-78.
122. 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 Nov;50(11):1072-9.
123. Szkudelska K, Nogowski L, Szkudelski T. Genistein affects lipogenesis and lipolysis in isolated rat adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000 Dec 31;75(4-5):265-71.
124. Szkudelski T, Nogowski L, Pruszyńska-Oszmalek E, Kaczmarek P, Szkudelska K. Genistein restricts leptin secretion from rat adipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005

Aug;96(3-4):301-7.

125. Heim M, Frank O, Kampmann G, Sochocky N, Pennimpede T, Fuchs P, Hunziker W, Weber P, Martin I, Bendik I. The phytoestrogen genistein enhances osteogenesis and represses adipogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells.

Endocrinology. 2004 Feb;145(2):848-59.

126. Harmon AW, Patel YM, Harp JB. Genistein inhibits CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBPbeta) activity and 3T3-L1 adipogenesis by increasing C/EBP homologous protein expression. Biochem J. 2002 Oct 1;367(Pt 1):203-8.

127. Bazuine M, van den Broek PJ, Maassen JA. Genistein directly inhibits GLUT4-mediated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2005 Jan 14;326(2):511-4.

128. Van Patten CL, Olivotto IA, Chambers GK, Gelmon KA, Hislop TG, Templeton E, Wattie A, Prior JC. Effect of soy phytoestrogens on hot flashes in postmenopausal women with breast cancer: A randomized, controlled clinical trial. J Clin Oncol. 2002 Mar 15;20(6):1449-55.

129. Blankson H, Stakkestad JA, Fagertun H, Thom E, Wadstein J, Gudmundsen O.

Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. *J Nutr.*

2000 Dec;130(12):2943-8.

130. Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Tanemura K, Kim HJ, Tange T, Okuyama H,

Kasai M, Ikemoto S, Ezaki O. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose

tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes.* 2000

Sep;49(9):1534-42.

131. Ha YL, Grimm NK, Pariza MW. Anticarcinogens from fried ground beef:

Heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis.* 1987 Dec;8(12):1881-7.

132. Miglietta A, Bozzo F, Bocca C, Gabriel L, Trombetta A, Belotti S, Canuto RA.

Conjugated linoleic acid induces apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells through

ERK/MAPK signalling and mitochondrial pathway. *Cancer Lett.* 2006 Mar

28;234(2):149-57.

133. Park Y, Pariza MW. Lipoxygenase inhibitors inhibit heparin-releasable lipoprotein

lipase activity in 3T3-L1 adipocytes and enhance body fat reduction in mice by

conjugated linoleic acid. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Nov 30;1534(1):27-33.

134. Evans M, Lin X, Odle J, McIntosh M. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid



increases fatty acid oxidation in 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr.* 2002 Mar;132(3):450-5.

135. Brodie AE, Manning VA, Ferguson KR, Jewell DE, Hu CY. Conjugated linoleic acid inhibits differentiation of pre- and post- confluent 3T3-L1 preadipocytes but inhibits cell proliferation only in preconfluent cells. *J Nutr.* 1999 Mar;129(3):602-6.

136. Satory DL, Smith SB. Conjugated linoleic acid inhibits proliferation but stimulates lipid filling of murine 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr.* 1999 Jan;129(1):92-7.

137. Brown JM, Halvorsen YD, Lea-Currie YR, Geigerman C, McIntosh M. Trans-10, cis-12, but not cis-9, trans-11, conjugated linoleic acid attenuates lipogenesis in primary cultures of stromal vascular cells from human adipose tissue. *J Nutr.* 2001 Sep;131(9):2316-21.

138. Kang K, Liu W, Albright KJ, Park Y, Pariza MW. Trans-10,cis-12 CLA inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreases PPAR gamma expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Apr 11;303(3):795-9.

139. Brown JM, Boysen MS, Jensen SS, Morrison RF, Storkson J, Lea-Currie R, Pariza M, Mandrup S, McIntosh MK. Isomer-specific regulation of metabolism and PPARgamma signaling by CLA in human preadipocytes. *J Lipid Res.* 2003

Jul;44(7):1287-300.

140. Li BH, Ma XF, Wang Y, Tian WX. Structure-activity relationship of polyphenols that inhibit fatty acid synthase. *J Biochem (Tokyo)*. 2005 Dec;138(6):679-85.



## 謝 誌

終於到了寫謝誌的時候了，表示我的碩士論文已經完成，二年來的學習生涯也告一段落了，回首二年回憶點點滴滴總是令人懷念，謹利用此機會向曾經教導我、鼓勵我和幫助我的人，致上最深的謝意。

首先要感謝仔細批閱論文的口委老師：楊新玲教授、夏彩蘭副教授、黃惠玲助理教授以及我的指導教授趙蓓敏老師，謝謝你們指正我的論文並給我許多的寶貴意見。回想二年前我是個完全不懂實驗的學生，有幸進入到實驗室接受我的指導老師趙蓓敏老師指導，二年來悉心提教不厭其煩，除了在學習上給予指導外，也提供我許多寶貴意見，一路上緊緊的抓住我不讓我迷失方向，特別是老師還要兼顧家庭，很感謝。二年的學習做的不好，資質驚純的我沒能達到期許，真是汗顏，謝謝您的寬容。承蒙黃黃玲老師在我研一的時候，教導我細胞培養之技術，雖然你在我研二的時候已經轉任其他學校，但是您開朗及作研究的態度，都是我學習的榜樣。另外感謝黃俊瑩老師在接種細胞技巧上給予指導，讓我能突破困境。

還有研一時帶我作實驗的雅雯學姐，謝謝你的教導。還有我的同學美瑜、純慧、學弟妹金旺、姤君、怡君有了你們的陪伴，讓實驗室時時充滿笑聲，做起實驗來也特別起勁，另外感謝金旺在我實驗很忙很累的時候幫忙我洗試管，怡君及姤君在我實驗無法分身時支援我的 western 實驗，謝謝你們。

回想起二年來曾經摸著黑夜回家、也曾經天還沒亮就出門，心感研究不僅是一條無止境的學習路，也是一條寂寞的路，感謝我的家人，謝謝媽媽及小甄在生活上給予的關懷與經濟上給的支持，讓這個有點年紀還在求學的我能無後顧之憂完成我的碩士學業。

再次感謝參與這本論文所有的人，謝謝你們也祝福你們一切順利。

賴姿文 筆  
2007. 7. 28