

東海大學食品科學研究所

Graduate Institute of Food Science

TUNGHAI UNIVERSITY

食品科技組

Food Technology Section

碩士論文

Master thesis

指導教授：盧錫祺博士

Advisor : Hsi-Chi Lu, Ph.D.

篩選對 FL83B 小鼠肝細胞具葡萄糖調節能力之乳酸菌

**Screening of Lactic Acid Bacteria with Glucose Homeostatic Effects
in FL83B Hepatocytes**

研究生：滕逸林撰

Graduate Student : Yi-Lin Teng

中華民國一〇五年六月

June,2016

目錄

摘要.....	1
Abstract.....	2
第一章、文獻回顧.....	3
1-1 糖尿病.....	3
1-1-1 糖尿病 (Diabetes mellitus, DM).....	3
1-1-2 糖尿病分類.....	3
1-1-2.1 第一型糖尿病 (Type 1 diabetes mellitus).....	3
1-1-2.2 第二型糖尿病 (Type 2 diabetes mellitus).....	3
1-1-2.3 其他特異型糖尿病(Other specific types of diabetes mellitus).....	4
1-1-2.4 妊娠型糖尿病(Gestational diabetes mellitus).....	4
1-1-3 糖尿病診斷標準.....	4
1-1-4 糖尿病之治療.....	5
1-1-5 口服降血糖藥物.....	6
1-1-5.1 雙胍類(Biguanide).....	6
1-1-5.2 磺胺脲類(Sulfonylurea).....	6
1-1-5.3 非磺胺脲類(Non-Sulfonylureas).....	6
1-1-5.4 Thiazolidinedione 類衍生物(TZD).....	6
1-1-5.5 α -Glucosidase 抑制劑.....	6
1-1-5.6 類昇糖素胜肽(Glucagon-like peptide 1, GLP-1).....	7
1-1-5.7 二肽基肽酶-4 抑制劑(DPP-4 inhibitors).....	7
1-1-6 醣解酵素.....	8
1-1-6.1 α -amylase.....	8
1-1-6.2 α -glucosidase.....	8
1-1-6.3 醣解酵素抑制劑.....	8
1-1-7 體內血糖之恆定.....	9
1-1-8 胰島素(Insulin).....	10
1-1-8.1 胰島素之結構.....	10
1-1-8.2 胰島素之作用.....	10
1-1-8.3 胰島素阻抗.....	11
1-1-9 胰島素細胞層面之傳訊路徑.....	12
1-1-9.1 胰島素受體(Insulin receptor, IR).....	13
1-1-9.2 胰島素受體基質((Insulin receptor substrate, IRS).....	13
1-1-9.3 磷脂肌醇-3-激酶(Phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K).....	13
1-1-9.4 蛋白質激酶 B (Protein kinase B, PKB/Akt).....	13
1-1-9.5 磷酸腺苷激活蛋白激酶 (AMP-actived protein kinase, AMPK).....	15

1-1-10 胰島素與醣類代謝.....	16
1-1-10.1 肝臟中葡萄糖代謝之調控.....	16
1-1-10.2 肝醣合成之調節.....	16
1-1-10.3 糖質新生作用與葡萄糖分解.....	16
1-1-11 以高糖誘導胰島素阻抗之小鼠肝臟細胞模式.....	17
1-2 益生菌.....	19
1-2-1 益生菌之定義.....	19
1-2-2 益生菌之應用.....	19
1-3 乳酸菌.....	21
1-3-1 乳酸菌基本特性.....	21
1-3-2 乳酸菌分類.....	21
1-3-3 乳酸菌之生理功效.....	22
1-3-3.1 維持腸道菌叢平衡與抑制病原菌.....	22
1-3-3.2 免疫調節作用.....	22
1-3-3.3 降低血液中膽固醇含量.....	23
1-3-3.4 調節血壓.....	23
1-3-3.5 降低腫瘤生成.....	24
第二章、研究目的與實驗架構.....	25
2-1 研究目的.....	25
2-2 實驗架構.....	26
第三章、材料與方法.....	27
3-1 實驗材料.....	27
3-1-1 乳酸菌實驗.....	27
3-1-1.1 試驗菌株.....	27
3-1-1.2 乳酸菌培養基.....	27
3-1-1.3 乳酸菌試驗之相關藥品.....	27
3-1-2 細胞實驗.....	27
3-1-2.1 小鼠細胞株.....	27
3-1-2.2 人類細胞株.....	27
3-1-2.3 細胞培養.....	28
3-1-2.4 細胞培養其他藥品.....	28
3-1-3 流式細胞儀分析藥品.....	28
3-1-3.1 葡萄糖擬似物.....	28
3-1-3.2 Propidium iodide.....	28
3-1-4 肝醣分析藥品.....	28
3-1-5 蛋白質分析試劑.....	28
3-1-5.1 cell lysis buffer.....	28
3-1-5.2 蛋白質定量試劑.....	29

3-1-5.3 西方轉漬試劑.....	29
3-1-6 主要儀器及設備.....	29
3-2 實驗方法.....	29
3-2-1 菌株分離及保存.....	29
3-2-2 乳酸菌初步篩選及鑑定.....	30
3-2-2.1 觸酶試驗.....	30
3-2-2.2 革蘭氏染色.....	30
3-2-2.3 凝乳試驗.....	30
3-2-2.4 耐酸耐膽鹽試驗.....	30
3-2-2.5 吸附 Caco-2 腸道上皮細胞試驗.....	30
3-2-2.6 Genomic DNA 萃取.....	31
3-2-2.7 聚合酶鏈鎖反應檢測(16S rDNA PCR).....	31
3-2-2.8 DNA 定序.....	31
3-2-3 乳酸菌培養液相關試驗.....	31
3-2-3.1 培養液製備.....	31
3-2-3.2 DNS(3,5-dinitro-salicylic acid)殘糖分析.....	32
3-2-3.3 α -amylase 酵素活性抑制能力測定.....	32
3-2-3.4 α -glucosidase 酵素活性抑制能力測定.....	32
3-2-4 細胞培養及其相關分析.....	32
3-2-4.1 細胞培養與繼代.....	32
3-2-4.2 誘導 FL83B 細胞產生胰島素阻抗.....	33
3-2-4.3 細胞增生活性測試.....	33
3-2-5 葡萄糖擬似物 2-NBDG 帶入量分析.....	33
3-2-6 肝醣表現量.....	33
3-2-7 蛋白質表現分析.....	34
3-2-7.1 蛋白質萃取.....	34
3-2-7.2 蛋白質定量.....	34
3-2-7.3 西方轉漬分析.....	34
3-3 統計分析.....	34
第四章、結果與討論.....	35
4-1 乳酸菌實驗.....	35
4-1-1 乳酸菌初步篩選與定序.....	35
4-1-2 乳酸菌吸附 Caco-2 腸道上皮細胞之能力.....	35
4-1-3 乳酸菌耐酸耐膽鹽之特性.....	36
4-1-4 乳酸菌培養液之醣解酵素抑制活性.....	36
4-1-5 乳酸菌之殘糖分析.....	37
4-2 乳酸菌對 FL83B 肝細胞之調節血糖作用.....	37
4-2-1 不同濃度乳酸菌培養液對 FL83B 肝細胞增生活性試驗.....	37

4-2-2 乳酸菌培養液對 FL83B 細胞之 2-NBDG 帶入量影響	37
4-2-3 乳酸菌培養液對 FL83B 細胞之肝醣合成影響.....	38
4-2-4 乳酸菌培養液對 FL83B 細胞傳訊蛋白質表現量之影響.....	39
4-3 結論與未來展望	40
4-3-1 結論.....	40
4-3-2 未來展望.....	41
第五章、附錄.....	70
附錄一、吸附 Caco-2 腸道上皮細胞試驗.....	70
附錄二、西方轉漬使用之一級、二級抗體.....	71
第六章、參考文獻.....	72



圖目錄

圖一、FL83B 肝細胞與 F2-2 培養液共置下之增生活性.....	50
圖二、FL83B 肝細胞與 F7-3 培養液共置下之增生活性.....	50
圖三、FL83B 肝細胞與 F7-4 培養液共置下之增生活性.....	51
圖四、FL83B 肝細胞與 F8-2 培養液共置下之增生活性.....	51
圖五、FL83B 肝細胞與 F8-6 培養液共置下之增生活性.....	52
圖六、FL83B 肝細胞與 H1-4 培養液共置下之增生活性.....	52
圖七、FL83B 肝細胞與 J1-3 培養液共置下之增生活性.....	53
圖八、FL83B 肝細胞與 J1-4 培養液共置下之增生活性.....	53
圖九、FL83B 肝細胞與 B10-7 培養液共置下之增生活性.....	54
圖十、正常態 FL83B 肝細胞與 F2-2 培養液共置下之葡萄糖擬似物帶入量.....	55
圖十一、阻抗態 FL83B 肝細胞與 F2-2 培養液共置下之葡萄糖擬似物帶入量.....	55
圖十二、正常態 FL83B 肝細胞與 F7-3 培養液共置下之葡萄糖擬似物帶入量.....	56
圖十三、阻抗態 FL83B 肝細胞與 F7-3 培養液共置下之葡萄糖擬似物帶入量.....	56
圖十四、正常態 FL83B 肝細胞與 F7-4 培養液共置下之葡萄糖擬似物帶入量.....	57
圖十五、阻抗態 FL83B 肝細胞與 F7-4 培養液共置下之葡萄糖擬似物帶入量.....	57
圖十六、正常態 FL83B 肝細胞與 F2-2 培養液共置下之肝醣合成量.....	58
圖十七、阻抗態 FL83B 肝細胞與 F2-2 培養液共置下之肝醣合成量.....	58
圖十八、正常態 FL83B 肝細胞與 F7-3 培養液共置下之肝醣合成量.....	59
圖十九、阻抗態 FL83B 肝細胞與 F7-3 培養液共置下之肝醣合成量.....	59
圖二十、正常態 FL83B 肝細胞與 F7-4 培養液共置下之肝醣合成量.....	60
圖二十一、阻抗態 FL83B 肝細胞與 F7-4 培養液共置下之肝醣合成量.....	60
圖二十二、FL83B 肝細胞與 F2-2 培養液共置下之 AKT 蛋白質相對量.....	61
圖二十三、FL83B 肝細胞與 F2-2 培養液共置下之 pAKT 蛋白質相對量.....	62
圖二十四、FL83B 肝細胞與 F2-2 培養液共置下之 AKT 蛋白質磷酸化程度.....	63
圖二十五、FL83B 肝細胞與 F7-3 培養液共置下之 AKT 蛋白質相對量.....	64
圖二十六、FL83B 肝細胞與 F7-3 培養液共置下之 pAKT 蛋白質相對量.....	65
圖二十七、FL83B 肝細胞與 F7-3 培養液共置下之 AKT 蛋白質磷酸化程度.....	66
圖二十八、FL83B 肝細胞與 F7-4 培養液共置下之 AKT 蛋白質相對量.....	67
圖二十九、FL83B 肝細胞與 F7-4 培養液共置下之 pAKT 蛋白質相對量.....	68
圖三十、FL83B 肝細胞與 F7-4 培養液共置下之 AKT 蛋白質磷酸化程度.....	69

表目錄

表一、篩選自發酵食品之 17 種乳酸菌特性.....	42
表二、篩選自傳統蔬菜之 14 種乳酸菌特性.....	43
表三、篩選自嬰幼兒糞便之 16 種乳酸菌特性.....	44
表四、經酸(pH 2.0)處理後膽鹽對乳酸菌(發酵食品)之生長影響.....	45
表五、經酸(pH 2.0)處理後膽鹽對乳酸菌(蔬菜)之生長影響.....	46
表六、經酸(pH 2.0)處理後膽鹽對乳酸菌(嬰幼兒糞便)之生長影響.....	47
表七、乳酸菌培養液對 α -amylase 及 α -glucosidase 之抑制能力測定	48
表八、一般培養條件下乳酸菌培養液之殘糖量.....	49



附圖目錄

附圖一、糖尿病血糖失衡之不同階段	4
附圖二、參與第二型糖尿病發病機制之器官系統及口服降血糖藥物作用部位	7
附圖三、Acarbose 之基本結構	9
附圖四、維持血糖恆定之機制	9
附圖五、胰島素結構	10
附圖六、胰島素之代謝調控	11
附圖七、(a)胰島素於正常狀態調控血糖平衡 (b)胰島素阻抗狀態之現象	12
附圖八、胰島素傳訊	12
附圖九、胰島素刺激 PKB 活化之路徑.....	14
附圖十、AMPK 傳訊之激素調節	15
附圖十一、肝臟細胞內葡萄糖代謝之調控	17
附圖十二、高糖誘導阻斷胰島素傳訊之可能機制	18
附圖十三、益生菌相關之健康功效	20
附圖十四、乳酸菌代謝途徑	21
附圖十五、人體胃腸道之菌相分佈	22



附表目錄

附表一、糖尿病之診斷標準.....	5
附表二、糖化血色素與平均血糖值之對照.....	5
附表三、口服降血糖藥物之臨床療效.....	8
附表四、Akt 異構型之分佈與功能.....	14
附表五、應用於益生菌產品之微生物.....	19



摘要

糖尿病罹患人口數逐年攀升，為國人十大死因之一，其與生活型態的改變、缺乏運動及飲食不當等因素息息相關。研究亦顯示維持腸道菌相之平衡能減少第二型糖尿病發生機會，乳酸菌為益生菌中最重要的一群，文獻已證實乳酸菌本身或其發酵產品具有調節免疫功能、調節血壓、血糖、血脂及改善肥胖等生理活性，然而以乳酸菌做為調節血糖功效之產品者甚少，因此本研究欲探討由受篩選之乳酸菌株具備之益生菌特性，並深入了解其於體外維持葡萄糖恆定之機制與影響。由發酵食品、蔬菜及嬰幼兒糞便分離出之菌株，經觸酶活性、革蘭氏染色及凝乳試驗初步確判定為乳酸菌後，抽取其 Genomic DNA 並定序以確認菌種，並評估受菌株之腸道吸附能力與耐酸耐膽鹽能力。定序結果顯示這些乳酸菌分離株多為 *Lactobacillus* 及 *Weissella* 屬。進一步測定各菌株維持葡萄糖恆定能力，顯示有多株乳酸菌培養液可顯著抑制醣解酵素 α -葡萄糖苷酶活性，最高達 90%。於與 FL83B 小鼠肝細胞共置試驗中證實，9 株乳酸菌之培養液對細胞增生活性均無抑制。葡萄糖擬似物帶入量分析結果顯示細胞與樣品共置 12 小時及 24 小時之帶入量較佳，因此後續皆針對此兩個時間點進行探討。不論於正常或是高糖誘導阻抗模式，乳酸菌培養液均有提高 FL83B 細胞中之肝醣合成量之趨勢。以西方轉漬探討細胞層面之胰島素傳訊時，發現於特定濃度之下乳酸菌培養液可提升 FL83B 細胞 AKT 磷酸化活化程度。綜合上述結果推論，本研究所分離之乳酸菌培養液對於肝細胞產生各層面之調節作用，進而協助維持葡萄糖恆定。

關鍵字：乳酸菌、FL83B 肝細胞、葡萄糖帶入、胰島素阻抗

Abstract

With the increasing patient population year by year, diabetes mellitus has become one of top ten leading causes of death in Taiwan. The risk is closely related to factors such as changes of lifestyle, lack of exercise and improper diet. Studies also show that maintaining the balance of microbiota in intestinal can reduce the incidence of type 2 diabetes mellitus, whereas lactic acid bacteria (LAB) are the most important species. Literatures have proved LAB or its fermented products have physiological activities in modulating immune system function, blood pressure, blood sugar, lipid and improving fatness. However, few LAB products with blood sugar regulation activity are available, thus the aims of this study are to investigate the probiotics characteristics of the isolated LAB, and to understand their *in vitro* mechanism and impact on glucose homeostasis. LAB strains isolated from fermented foods, vegetables and infant feces were preliminarily verified by their catalase activities, Gram staining and curd tests. After further typing by genomic DNA sequencing, the intestinal epithelial cell adhesion, acid tolerance and bile salts tolerance of the isolated strains were evaluated. The sequencing results indicated these isolated LAB strains were mostly *Lactobacillus* and *Weissella spp.*. With further detection in preserving glucose homeostasis, many LAB strains have revealed notable inhibition in α -glucosidase activity with their culturing media up to 90%. The results confirmed that none of 9 LAB strains have shown proliferation inhibition when murine FL83B hepatocytes were treated with their culturing media. Glucose analogues (NBDG) intake analyses revealed that FL83B hepatocytes treated for 12 and 24 hours with culturing media have shown efficient intakes, therefore all subsequent assessments were performed at these two time points. Treatments with LAB culturing media have enhanced the glycogen syntheses in FL83B cells under both normal and high glucose-induced resistance conditions. Under certain concentration of LAB culturing media, improved phosphorylation of AKT in murine FL83B hepatocytes when probing insulin signaling by Western blotting. The activation extents were elevated with the treatments of LAB culturing media as shown in cellular insulin signaling investigations analyzed with Western blots of AKT phosphorylation. To sum up the results mentioned above, the culturing media of the isolated LAB's in this study have imposed regulation effects on hepatocyte FL83B at all levels in turn to maintain the glucose homeostasis.

Keywords : Lactic acid bacteria, FL83B hepatocytes, Glucose uptake, Insulin resistance

第一章、文獻回顧

1-1 糖尿病

1-1-1 糖尿病 (Diabetes mellitus, DM)

糖尿病為全球性的健康問題，其罹病人口有逐年攀升之趨勢。糖尿病是一類慢性代謝異常疾病，主因為胰臟β細胞之胰島素分泌不足或功能不全，對醣類的利用能力下降，導致血液中的葡萄糖濃度持續偏高，造成後續相關併發症的產生。罹患糖尿病的風險因素包括缺乏均衡飲食、不適當的生活方式、過重及腸道缺乏益生菌等，吃多、喝多、尿多、體重減輕及視力模糊等為糖尿病的主要症狀。

1-1-2 糖尿病分類

目前依病因將糖尿病分為四型，分別是第一型糖尿病、第二型糖尿病、其他特異型糖尿病以及妊娠型糖尿病(American Diabetes 2015)。附圖一顯示各類型糖尿病血糖失衡之病程。

1-1-2.1 第一型糖尿病 (Type 1 diabetes mellitus)

第一型糖尿病患者占整體糖尿病患人數約 5~10%，又稱為胰島素依賴型糖尿病(insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM)及幼年型糖尿病(juvenile-onset diabetes)，起因可能為自體免疫系統破壞了胰臟β細胞的功能、基因遺傳缺陷、環境因素等交互作用，使胰島素無法正常分泌，造成血糖無法維持恆定，必須依賴注射胰島素來調節血糖，而此類型患者也易引起酮酸中毒(diabetic ketoacidosis)併發症。

1-1-2.2 第二型糖尿病 (Type 2 diabetes mellitus)

第二型糖尿病占整體糖尿病患人數約 90~95%，又稱為非胰島素依賴型糖尿病(non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM)，其特徵為胰島素阻抗、血脂異常及高血糖症等(Goldberg 2001; Wild, et al. 2004)。其中，胰島素阻抗是第二型糖尿病的主要病徵及發病前兆，其成因與周邊組織—例如肝臟、肌肉及脂肪等對胰島素敏感度下降，導致組織無法有效帶入葡萄糖，進而引起高血糖症狀有關(Reaven 2005, Petersen and Shulman 2006)。此病形成原因較為複雜，目前尚無明確的成因，年齡、肥胖及缺乏運動等皆有可能增加罹病風險。此類型的患者大部分屬於肥胖體型，因肥胖本身也會造成某種程度上的胰島素抵抗，而胰島素抵抗可以透過減重及降血糖藥物的治療，維持血糖恆定(American Diabetes 2010)。

1-1-2.3 其他特異型糖尿病(Other specific types of diabetes mellitus)

造成其它特異型糖尿病的可能原因為β細胞功能之基因缺陷、胰島素作用之基因缺陷、內分泌異常、胰臟外分泌系統疾病、病毒感染及藥物或化學物質誘導所致(American Diabetes 2015)。

1-1-2.4 妊娠型糖尿病(Gestational diabetes mellitus)

此類型糖尿病是指婦女在懷孕時期出現的糖尿病症狀，通常發生在懷孕的第24-28週，為孕婦體內賀爾蒙的變化所引起，但懷孕後期症狀會隨之消失。若於懷孕前即患有糖尿病，則不屬於此類型。

Types	Stages	Normoglycemia	Hyperglycemia			
		Normal glucose regulation	Impaired Glucose Tolerance or Impaired Fasting Glucose (Pre-Diabetes)	Diabetes Mellitus		
				Not insulin requiring	Insulin requiring for control	Insulin requiring for survival
Type 1*		←	→	→	→	→
Type 2		←	→	→	→	
Other Specific Types**		←	→	→	→	
Gestational Diabetes **		←	→			

附圖一、糖尿病血糖失衡之不同階段

(American Diabetes 2010)

1-1-3 糖尿病診斷標準

目前糖尿病可以依據糖化血色素(glycosylated hemoglobin, A1C)、空腹血糖測試(Fasting Plasma Glucose Test, FPG)、口服葡萄糖耐受性測試(Oral Glucose Tolerance Test, OGTT)及隨機血糖值(Random Plasma Glucose Test, RPGT)等四種不同方式進行診斷(American Diabetes 2015)。糖化血色素高於或等於 6.5%，空腹血糖值高於或等於 126 mg/dL，口服葡萄糖耐受性測試兩小時後之血糖值高於 200 mg/dL 及隨機血糖值高於或等於 200 mg/dL 時，即診斷為患有糖尿病(如附表一所示)。而糖尿病高危險群之診斷標準為 FPG 血糖值介於 100 至 125mg/dL，OGTT 血糖值介於 140 至 199 mg/dL，A1C 介於 5.7 至 6.4%，若屬這類型的潛在患者應即早防治，以降低罹患糖尿病的風險及其併發症的出現。A1C%與平均血糖之對照如附表二所示。

1-1-4 糖尿病之治療

糖尿病之嚴重性在於其會引發多項併發症，提高死亡之風險，因此，維持血糖之平衡對於糖尿病的防治極為重要。現今糖尿病的治療方式主要為飲食控制、運動及藥物治療。藥物治療包括了胰島素之注射以及口服降血糖藥物。然而藥物治療多伴隨著不同程度的副作用，如腸胃不適、肝損傷與過敏等較為常見。因此，為改善藥物造成之後續問題，具有調節血糖能力之天然物質逐漸受到重視，也是目前研究的重要方向與目標。

附表一、糖尿病之診斷標準

A1C \geq 6.5%. The test should be performed in a laboratory using a method that is NGSP certified and standardized to the DCCT assay.*

OR

FPG \geq 126 mg/dL (7.0 mmol/L). Fasting is defined as no caloric intake for at least 8 h.*

OR

2-h PG \geq 200 mg/dL (11.1 mmol/L) during an OGTT. The test should be performed as described by the WHO, using a glucose load containing the equivalent of 75 g anhydrous glucose dissolved in water.*

OR

In a patient with classic symptoms of hyperglycemia or hyperglycemic crisis, a random plasma glucose \geq 200 mg/dL (11.1 mmol/L).

*In the absence of unequivocal hyperglycemia, results should be confirmed by repeat testing.

(American Diabetes 2015)

附表二、糖化血色素與平均血糖值之對照

A1C(%)	Mean plasma glucose	
	mg/dL	mmol/L
6	126	7.0
7	154	8.6
8	183	10.2
9	212	11.8
10	240	13.4
11	269	14.9
12	298	16.5

(American Diabetes 2015)

1-1-5 口服降血糖藥物

飲食及運動對於第二型糖尿病患者是首要治療方式，但若藉由此方式控制三個月後，血糖仍無法達到理想水平，則需要藥物的介入治療。除了胰島素之外，口服降血糖藥物(Oral hypoglycemic agent, OHA)是第二型糖尿病患者的另一選擇(見附圖二)，能單獨使用或與其它口服降血糖藥或胰島素合併使用(Cheng and Fantus 2005)。其對於降低血糖之臨床療效如附表三所示。

1-1-5.1 雙胍類(Biguanide)

此類常用藥物為 metformin，主要機制為抑制肝臟葡萄糖的糖質新生作用，增加肝臟與肌肉組織對胰島素的敏感性，非直接刺激胰島素分泌，一開始使用會發生胃腸不適情形。

1-1-5.2 磺胺脲類(Sulfonylurea)

此類型藥物主要作用為提高胰臟 β 細胞對葡萄糖之敏感度，進而促進胰島素分泌，目前臨床上所使用之抗高血糖藥劑多為此類。常見的磺胺脲類藥物包括 Glimepiride、Glipizide、Glyburide 及 Gliclazide 等，而此類藥物必須在 β 細胞仍有分泌胰島素功能時才有作用。副作用則以低血糖及體重增加最為常見。

1-1-5.3 非磺胺脲類(Non-Sulfonylureas)

為 Meglitinide 類似物，分為 repaglinide 與 nateglinide 兩種，作用機制與磺胺脲類藥物類似，能刺激胰臟 β 細胞分泌胰島素。不同於常用的磺胺脲類藥物，此類藥物作用時間與半衰期很短(Luna and Feinglos 2001)，適合用來治療餐後高血糖，但亦有體重增加與血糖過低之風險。

1-1-5.4 Thiazolidinedione 類衍生物(TZD)

此類藥物又稱胰島素增敏劑(Insulin sensitizer)，主要作用為活化細胞核表面接受器過氧化體增生活化接受器(peroxisome proliferative-activated receptor- γ , PPAR- γ)，增加肝臟、骨骼肌、脂肪組織對胰島素的敏感性，使空腹血糖及血中胰島素濃度降低。腹瀉、水腫、體重增加及心臟衰竭皆為此藥物之副作用。

1-1-5.5 α -Glucosidase 抑制劑

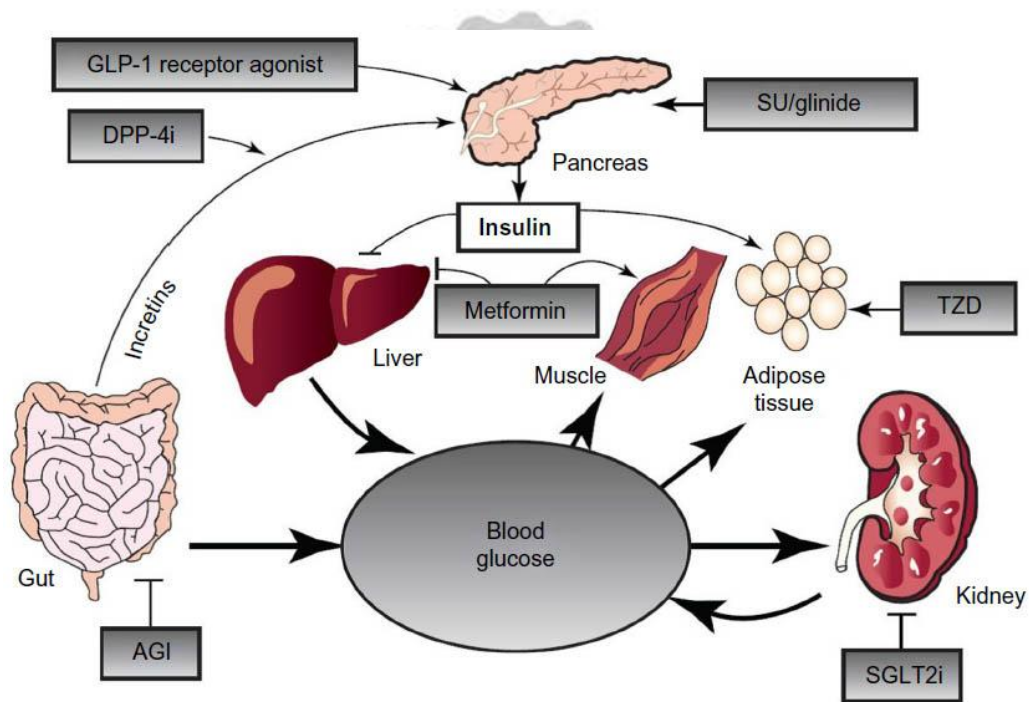
此類藥物之機制為抑制醣解素的作用，延遲腸道對醣類的吸收，以改善餐後血糖之高峰。常用藥物為 acarbose、voglibose 及 miglitol，能透過競爭性結合來抑制 α -Glucosidase 酵素活性(Derosa and Maffioli 2012)。這類藥物常見的副作用包括脹氣、腹瀉及腹痛。

1-1-5.6 類昇糖素胜肽(Glucagon-like peptide 1, GLP-1)

GLP-1 為人體內最主要的腸泌素(cretin)，屬腸道賀爾蒙，由迴腸及部分大腸所分泌。GLP-1 會經由食物刺激而分泌，依血中葡萄糖濃度上升之程度，促進胰臟β細胞分泌胰島素並抑制α細胞昇糖素之分泌，藉此調節血中葡萄糖恆定，維持血中葡萄糖濃度在正常範圍(呂, 2011)。此類藥物如 liraglutide，副作用包括腹瀉、嘔吐及頭暈等，且有引起急性胰臟炎之風險。

1-1-5.7 二肽基肽酶-4 抑制劑(DPP-4 inhibitors)

DPP-4 抑制劑能藉由減少腸泌素 GLP-1 被 DPP-4 分解破壞，延長其作用時間，改善胰島素敏感性。常見藥物如 Sitagliptin 及 Vildagliptin 等，副作用除噁心、嘔吐及腹瀉之外，亦有文獻指出此類藥物可能引起嚴重的關節疼痛(Sasaki, et al. 2010; Yokota and Igaki 2012)。



Abbreviations: AGI, α -glucosidase inhibitor ; DPP-4i, dipeptidyl peptidase-4 inhibitor ; GLP-1, glucagon-like peptide-1 ; SGLT2i, sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor ; SU, sulfonylurea ; TZD, thiazolidinedione

附圖二、參與第二型糖尿病發病機制之器官系統及口服降血糖藥物作用部位 (Bailey 2011)

附表三、口服降血糖藥物之臨床療效

<i>Class of hypoglycemic agents</i>	<i>Reduction in HbA_{1c} (%)</i>	<i>Reduction in FPG (mg per dL [mmol per L])</i>
Sulfonylureas	0.8 to 2.0	60 to 70 [3.3 to 3.9]
Meglitinides	0.5 to 2.0	65 to 75 [3.6 to 4.2]
Biguanides	1.5 to 2.0	50 to 70 [2.8 to 3.9]
Thiazolidinediones	0.5 to 1.5	25 to 50 [1.4 to 2.8]
Alpha-glucosidase inhibitors	0.7 to 1.0	35 to 40 [1.9 to 2.2]

HbA_{1c} = glycosylated hemoglobin A_{1c}; FPG = fasting plasma glucose.

(Luna and Feinglos 2001)

1-1-6 醣解酵素

醣類進入消化系統後首先由唾液、胃液或胰臟之 α -amylase 將多醣分解為寡醣或雙醣，進入小腸後則由位於小腸刷狀緣之 α -glucosidase 負責將寡糖及雙醣分解為單醣如葡萄糖，以此形式被人體吸收與利用(Sales, et al. 2012)。

1-1-6.1 α -amylase

α -amylase (EC 3.2.1.1) 是胰臟與唾液腺主要分泌的產物之一，於微生物、植物及高等動物發揮醣類消化之作用(Kandra 2003)。 α -amylase 為內切型酵素，水解寡醣或多醣的 α -D-(1,4)glucosidic bonds，產物為糊精及寡糖(van der Maarel, et al. 2002)。而抑制 α -amylase 活性則能減緩大分子醣類於體內之分解與吸收(Aquino, et al. 2003)。

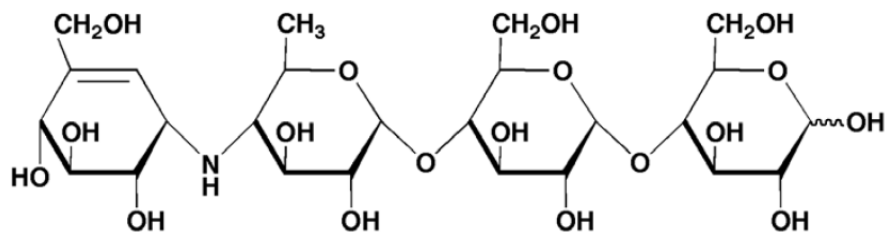
1-1-6.2 α -glucosidase

α -glucosidase (EC 3.2.1.20) 屬外切型酵素，位於小腸刷狀緣，是醣類消化之重要酵素，主要作用將寡醣及雙醣分解為單醣，也參與各種代謝異常與其他疾病，如糖尿病及癌症等(Lee and Lee 2001)。抑制 α -glucosidase 活性則能延緩醣類消化及防止過多的葡萄糖被吸收，有效改善餐後高血糖症(Panwar, et al. 2014)。

1-1-6.3 醣解酵素抑制劑

醣解酵素抑制劑常被用於治療第二型糖尿病，其能透過延緩醣類之消化，預防過多葡萄糖集中於腸道前端分解與吸收，以維持血糖恆定。常用之醣解酵素抑制劑如acarbose，是大麥穀類藉微生物(*Actinoplanes utahensis*) 發酵過程中所產生的一種寡糖(oligosaccharide)(Schwientek, et al. 2012)，結構如附圖三所示。研究已

證實其能有效調控糖尿病患者餐後葡萄糖之吸收(Creutzfeldt 1999)。但此藥物常引起消化道不適之副作用，原因為藥物作用於腸道，而未被消化或吸收的醣類受到腸道內細菌發酵所導致。近年來有文獻指出以乳酸菌菌體或其水解物具有抑制 α -glucosidase活性之能力以且幾乎無副作用，被視為有潛力的天然醣解酵素抑制劑(Ramchandran and Shah 2008; Panwar, et al. 2014)。

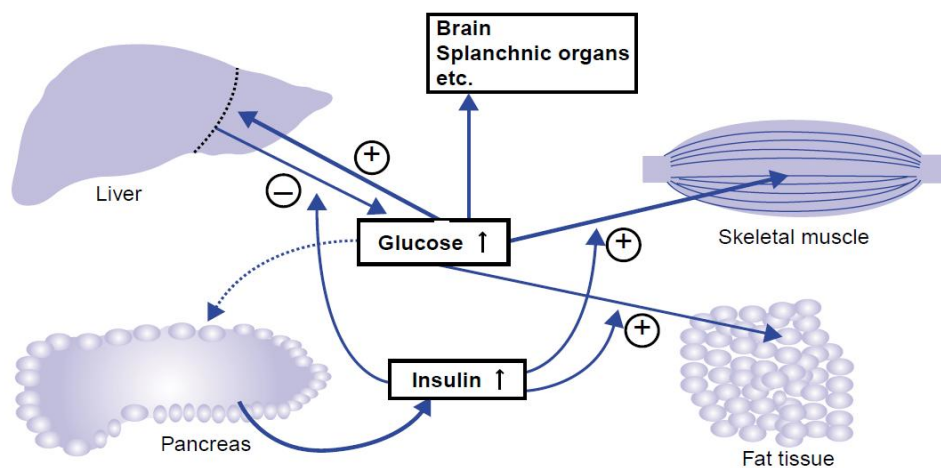


附圖三、Acarbose 之基本結構

(Kuriyama, et al. 2008)

1-1-7 體內血糖之恆定

不論是飽食或空腹狀態下，正常人體血液中之葡萄糖濃度皆維持於4~7mM之間(Saltiel and Kahn 2001)。而體內血糖恆定之維持需要胰臟 β 細胞分泌的胰島素以及受胰島素調控的周邊組織如肝臟、肌肉與脂肪的參與(Zierath and Kawano 2003)。



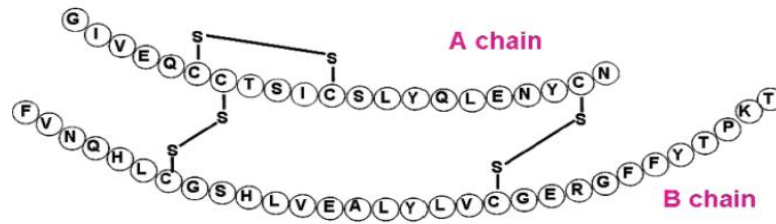
附圖四、維持血糖恆定之機制

(Zierath and Kawano 2003)

1-1-8 胰島素(Insulin)

1-1-8.1 胰島素之結構

人體胰島素為胰臟蘭氏小島所分泌之激素，主要是兩條胜肽藉由兩個雙硫鍵相連結所組成，分別是 21 個胺基酸的 A 鏈及 30 個胺基酸的 B 鏈，其分子量為 6000Da，具有高度調節葡萄糖之能力(Wilcox 2005)。



	A8	A9	A10	B30
Human	Thr	Ser	Ile	Thr
Porcine	Thr	Ser	Ile	Ala
Bovine	Ala	Ser	Val	Ala
Sheep	Ala	Gly	Val	Ala

附圖五、胰島素結構



(Mayer, Zhang et al. 2007)

1-1-8.2 胰島素之作用

胰島素是體內調節代謝之重要激素，參與醣類、蛋白質與脂質合成代謝(附圖六)，其作用包括：

(1) 抑制糖質新生(Glyconeogenesis)

根據 Collier 等學者指出，胰島素傳訊能抑制醣質新生路徑之關鍵酵素磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK)及葡萄糖-6-磷酸酶(glucose-6-phosphatase, G6Pase)基因轉錄，減少葡萄糖生成(Collier and Scott 2004)。

(2) 增加肝醣合成(Glycogen synthesis)及抑制分解(Glycogenolysis)

肝醣含量能反映其合成與分解雙向路徑之平衡點。胰島素能促進葡萄糖激酶(glucokinase)及肝醣合成酶(glycogen synthase)之酵素活性，進而提高肝醣合成。另一方面，胰島素也能抑制肝醣磷酸化酶(glycogen phosphorylase)及葡萄糖-6-磷酸酶等酵素活性，以減少肝醣分解。

(3) 促進葡萄糖吸收分解

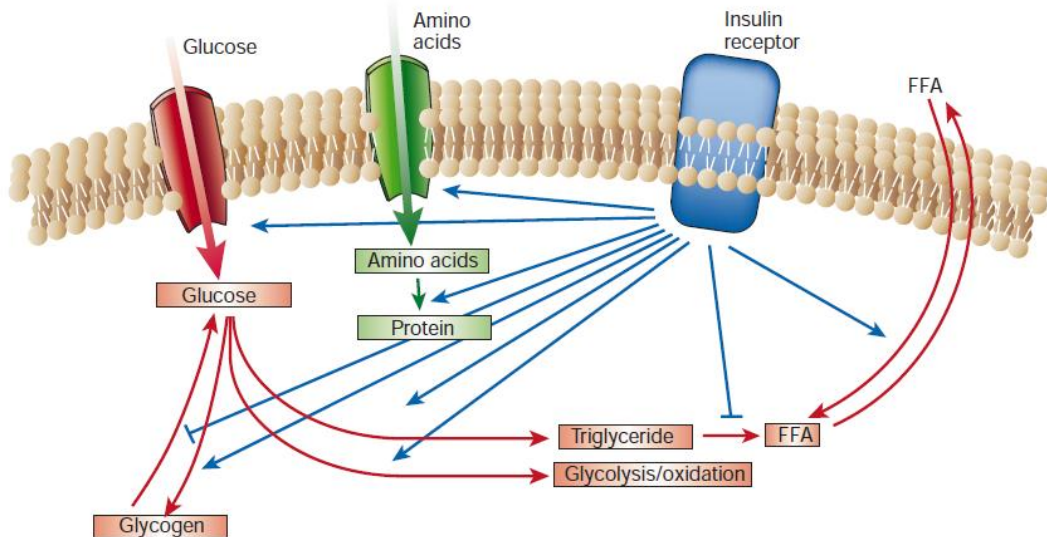
胰島素主要作用於肝臟、肌肉以及脂肪細胞，增加其對於葡萄糖之吸收，而在胰島素刺激下，又以肌肉為消耗最多葡萄糖之組織(Shulman 2000)。

(4) 抑制脂質分解(Lipolysis)及促進脂肪合成(Lipogenesis)

胰島素透過抑制脂解酶(lipase)的活性，降低脂解作用(lipolysis)。此外，胰島素也透過增加乙醯輔酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase)的活性，促進脂肪酸合成，同時也增加丙酮酸激酶(pyruvate kinase)之活性，提高磷酸甘油(phosphoglycerol)的含量，促進脂肪合成。

(5) 促進蛋白質合成

胰島素能加速細胞帶入胺基酸，進而增加蛋白質的合成，亦能減少肌肉中蛋白質之降解與減少尿素的形成(Dimitriadis, et al. 2011)。

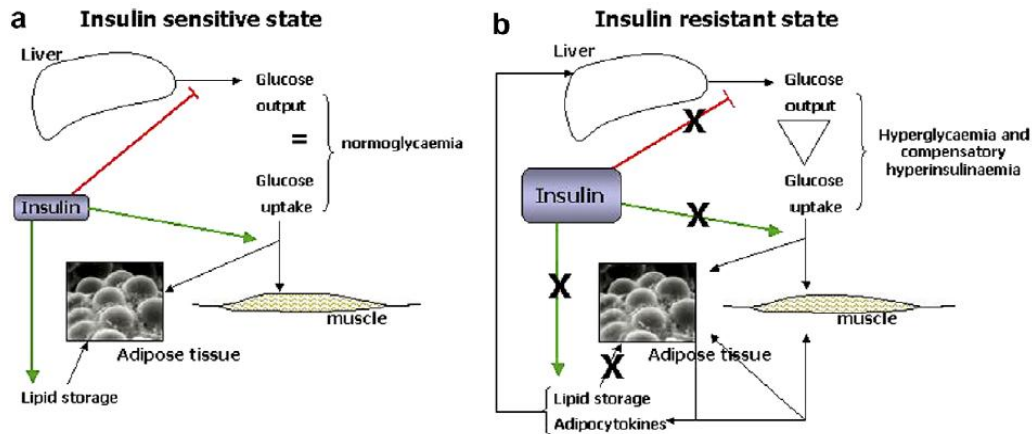


附圖六、胰島素之代謝調控

(Saltiel and Kahn 2001)

1-1-8.3 胰島素阻抗

在胰島素的作用下，人體肝臟、肌肉及脂肪等周邊組織，對胰島素的敏感度下降，無法維持體內葡萄糖之恆定無法維持，此現象即為胰島素阻抗(Leclercq, et al. 2007)，見附圖七。胰島素阻抗為代謝異常之表徵，包括肥胖與葡萄糖耐受性異常等，並且會朝向第二型糖尿病發展(Elliott, et al. 2002)。而胰島素阻抗通常存在於糖尿病發病前，係由遺傳、年齡及肥胖等多種因素影響，因此被視為罹患第二型糖尿病前之重要指標。

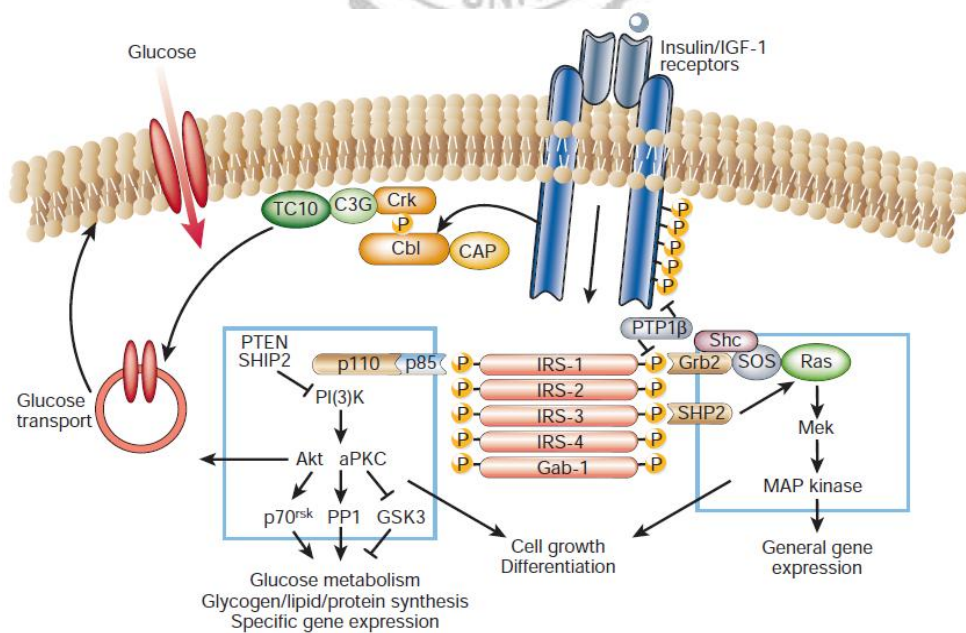


附圖七、(a)胰島素於正常狀態調控血糖平衡 (b)胰島素阻抗狀態之現象

(Leclercq, et al. 2007)

1-1-9 胰島素細胞層面之傳訊路徑

胰島素透過血液的運送，和細胞膜上之胰島素受體(Insulin receptor, IR)之 α 次單元結合後，將其膜上之 β 次單元活化，藉此磷酸化胰島素受體基質(Insulin receptor substrate, IRS)家族，傳訊給磷脂肌醇-3-激酶(PI3 kinase, PI3K)，與 PI3Kp85 次單元結合並合成 PIP₃，接著活化下游 Akt (亦稱 Protein kinase B, PKB)，調控細胞中葡萄糖、脂質和蛋白質之一連串之代謝及生長反應(Saltiel and Kahn 2001)。



附圖八、胰島素傳訊

(Saltiel and Kahn 2001)

1-1-9.1 胰島素受體(Insulin receptor, IR)

胰島素受體是由兩個位於細胞膜外的 α 次單元(α -subunits)及兩個穿插於細胞膜上的 β 次單元(β -subunits)所組成之四聚體醣蛋白，屬受體酪胺酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)家族。當胰島素與 IR 之 α 次單元結合後其構型改變，使 β 次單元酪胺酸激酶活化並啟動其自體磷酸化，促進下游分子之傳訊(Butler and LeRoith 2001)。而當 IR 作用異常時，會產生胰島素阻抗的現象。

1-1-9.2 胰島素受體基質(Insulin receptor substrate, IRS)

胰島素受體基質分為 IRS-1、IRS-2、IRS-3 及 IRS-4 四類，可提供-SH₂ 基團的分子結合，如 PI3K (p85 調控區)結合之對接位。其中以 IRS-1 及 IRS-2 與醣類之調控較具相關性，由動物實驗中發現，剔除 IRS-1 基因之小鼠會出現發育遲緩、周邊組織產生胰島素阻抗以及葡萄糖耐受性異常之情形(Araki, et al. 1994; Tamemoto, et al. 1994)。而剔除 IRS-2 基因之小鼠亦會導致其肝臟與周邊組織產生胰島素阻抗，胰島、視網膜及腦之生長發生缺陷(Withers, et al. 1998; Kido, et al. 2000)。IRS-1 及 IRS-2 於肝臟中之傳訊若受到抑制，會對其葡萄糖與脂質代謝產生影響，且兩者間存在代償機制，當 IRS-1 表現異常時，IRS-2 則會提高其傳訊效率以補償傳訊降低之情形(Taniguchi, et al. 2005)。此胰島素傳訊之代償機制亦存在於肝臟、肌肉及脂肪組織之間，藉此調控以維持血糖的恆定(Fisher and Kahn 2003)。

1-1-9.3 磷脂肌醇-3-激酶(Phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)

PI3K 是由調控單元 p85 及活性單元 p110 所組成，分子量分別為 85 及 110kD，為一種異二聚體(heterodimer)。PI3K 共可分為 class 1a、class 1b 及 class 2 三類，與胰島素調控之葡萄糖代謝最具相關性的為 class 1a。PI3K 於胰島素傳訊中之活化可形成 PIP3，亦能傳遞多種訊息，促進下游兩條路徑 Akt 與 AMPK (AMP-activated protein kinase)之傳訊(Lietzke, et al. 2000; Saltiel and Kahn 2001)。研究發現當 PI3K 作用異常時，會影響葡萄糖、脂質及蛋白質之代謝與基因表現調控(Cichy, et al. 1998)。顯示其為胰島素調控代謝路徑上之關鍵角色。

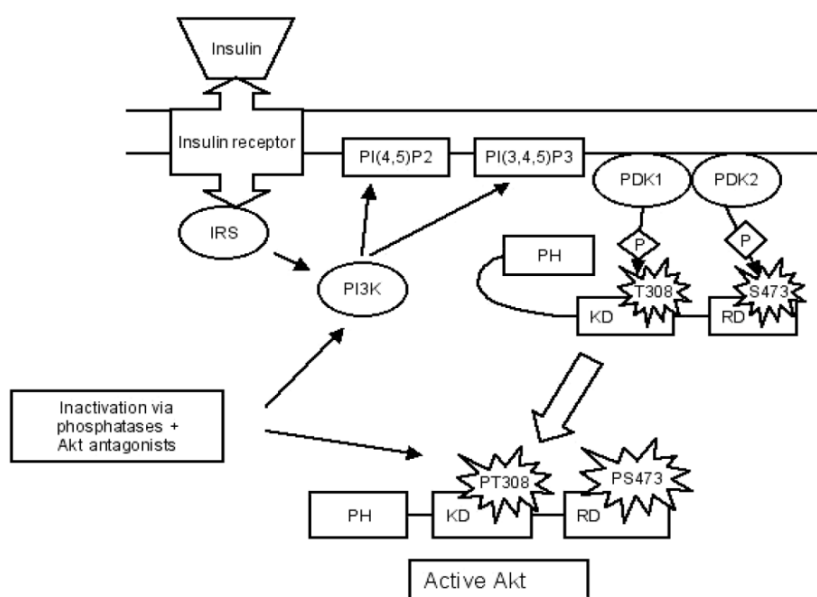
1-1-9.4 蛋白質激酶 B (Protein kinase B, PKB/Akt)

蛋白質激酶 B (Protein kinase B)又稱 Akt，其分子量為 60kDa。Akt 之異構型分為三類，分佈於不同組織中且具有不同作用。第一類為 Akt1，主要存在於大腦、心臟及胸腺；第二類為 Akt2，存於棕色脂肪組織、小腦及骨骼肌；第三類為 Akt3，存在於大腦和胸腺(Zdychova and Komers 2005)。活化態 Akt 可參與體內代謝之生理功能，例如細胞增生、葡萄糖代謝及蛋白質合成。Akt 分子上接受與傳遞訊息之磷酸化位點為 threonine³⁰⁸ 與 serine⁴⁷³。經實驗證實，剔除小鼠身上之 Akt2 基因，會出現高血糖症及胰島素阻抗等類糖尿病之症狀，顯示 Akt 為維持體內正常血糖恆定之重要基因(Cho, et al. 2001; Garofalo, et al. 2003)。

附表四、Akt 異構型之分佈與功能

Isoform	High expression levels	Function
PKB α /Akt1	Brain, heart, testis, thymus	Placental development and animal growth Adipogenesis
PKB β /Akt2	Brown fat, cerebellum(Purkinje cells), heart, skeletal muscle	Glucose metabolism Adipogenesis and maintenance Animal growth
PKB γ /Akt3	Brain, testis	Postnatal brain growth

(Zdychova and Komers 2005)

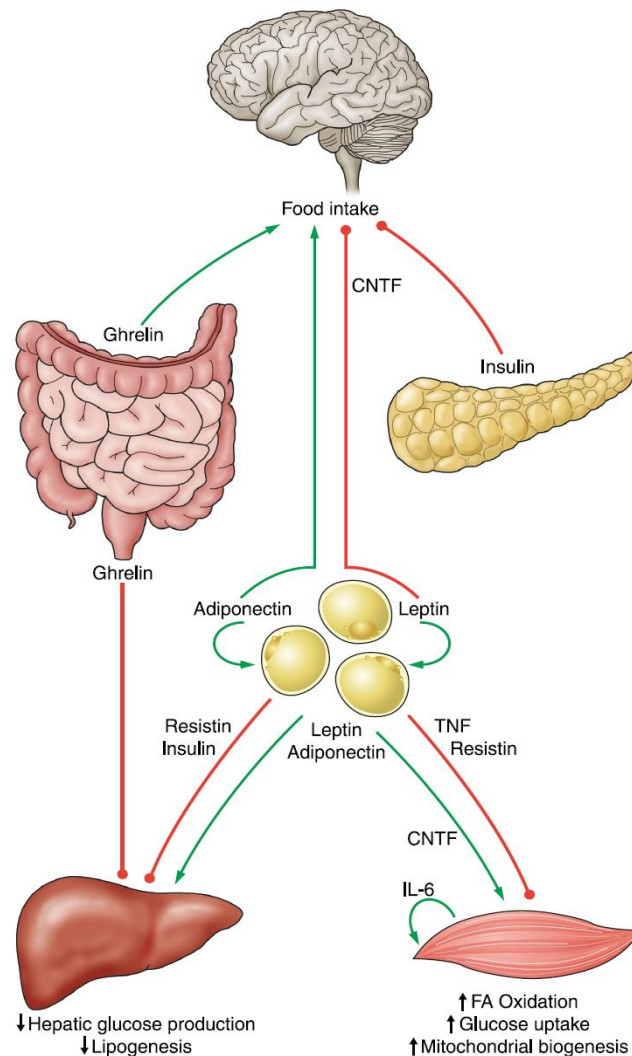


附圖九、胰島素刺激 PKB 活化之路徑

(Zdychova and Komers 2005)

1-1-9.5 磷酸腺苷激活蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK)

磷酸腺苷激活蛋白激酶(AMPK)是人體內之關鍵調控蛋白，在哺乳類動物的組織中，AMPK 是由 α 、 β 及 γ 三個次單元所組成之異源三聚體(heterotrimer)，而每個次單元又具有兩個或多個異構型(Hardie and Sakamoto 2006)。AMPK 能監控細胞內 AMP/ATP 之狀態，當缺乏能量時，AMP/ATP 比例升高，活化 AMPK threonine172(Thr172)位點，使葡萄糖轉運蛋白 4(Glucose transporter 4, GLUT4)轉位至膜上，促進葡萄糖帶入產生 ATP 並增加 acetyl-CoA carboxylase 磷酸化，減少脂肪酸合成及肌肉組織中三酸甘油酯含量，並能提高肌肉組織對胰島素的敏感性(Carling 2004)。目前使用之降血糖藥物如 Metformin 之作用機制即為活化 AMPK，能促進 GLUT4 轉位以利組織帶入葡萄糖，顯示 AMPK 為人體中重要的調控代謝開關(Moller 2001)。



附圖十、AMPK 傳訊之激素調節

(Steinberg and Kemp 2009)

1-1-10 胰島素與醣類代謝

1-1-10.1 肝臟中葡萄糖代謝之調控

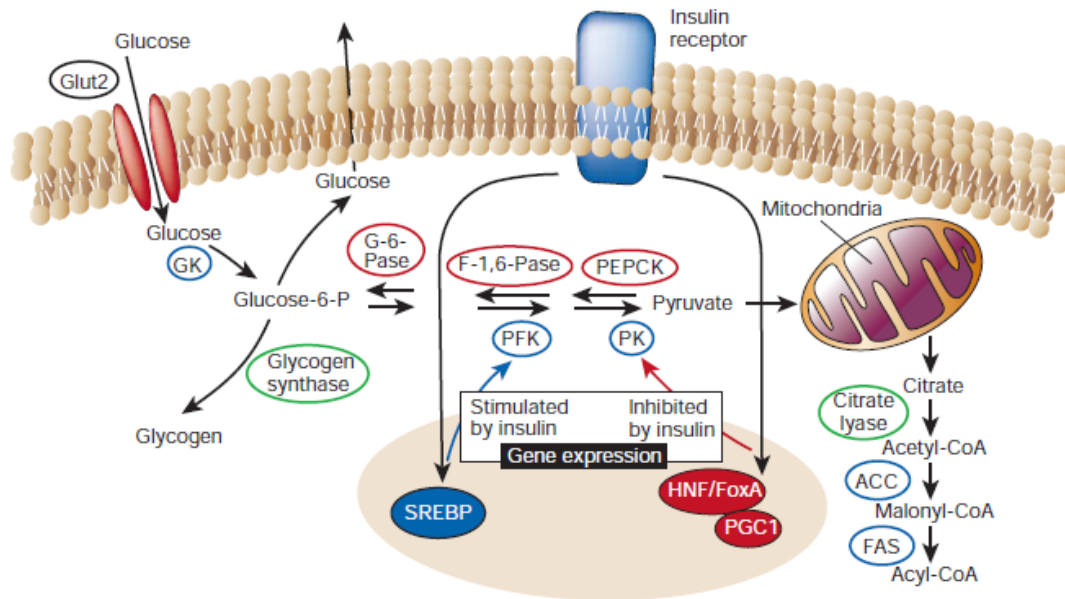
體內胰臟 β 細胞分泌之胰島素可使周邊組織帶入葡萄糖，進而維持血液中葡萄糖恆定。肝臟是維持血糖恆定之重要組織，藉由帶入或釋出葡萄糖來調控血糖的平衡，被視為葡萄糖之感應器(Glucose sensor)。當血糖處於低濃度時，主要是消耗腦與內臟之葡萄糖，其餘則提供肌肉利用，且此時肝臟會進行肝醣分解與糖質新生作用以維持正常血糖；當血糖處於高濃度時，主要消耗葡萄糖的組織為肝臟與肌肉，肝臟會將過多的葡萄糖帶入組織中並減少糖質新生，藉此回復血糖恆定(Nordlie, et al. 1999; Zierath and Kawano 2003)。此外，研究顯示於高血糖環境下會促進 GLUT2 的基因表現，於高胰島素環境下則相反(Saltiel and Kahn 2001)。

1-1-10.2 肝醣合成之調節

藉由轉運蛋白促使葡萄糖進入肝臟及肌肉細胞後，開始進行糖解作用，並藉由 Glucokinase 或 Hexokinase 磷酸化成 G6P，接著進行克氏循環/檸檬酸循環 (Krebs cycle/Tricarboxylic acid cycle)、五碳糖磷酸路徑(Pentose phosphate pathway) 或肝醣合成(Glycogen synthesis)。文獻指出，G6P 可改變肝醣合成酶(Glycogen synthase, GS)之構型且轉變成活化態 GS，其為肝醣合成之主要催化酵素。在胰島素的刺激下，PI3 Kinase 之下游激酶 PKB(Akt)及 aPKC 會透過磷酸化來活化肝醣合成激酶(Glycogen synthase kinase 3, GSK3)，進而增加 GS 活性並促進肝醣合成(Cross, et al. 1995; Ferrer, et al. 2003; Yang, et al. 2004)。

1-1-10.3 糖質新生作用與葡萄糖分解

肝臟組織維持血糖恆定之機制為利用本身具有之 G6Pase 轉換糖質新生產物 G6P 成葡萄糖並釋放至胞外。且肝臟糖質新生作用所生成之葡萄糖會受到胰島素的刺激而被影響。胰島素可透過磷酸化和去磷酸化直接調控醣類代謝之酵素活性、糖質新生與肝醣分解相關酵素基因表現，因而抑制葡萄糖之生成(Pilkis and Granner 1992)。研究指出，PEPCK 與 G6Pase 為糖質新生路徑之關鍵酵素，可藉由胰島素傳訊而抑制基因轉錄，減少葡萄糖生成(Collier and Scott 2004)。



附圖十一、肝臟細胞內葡萄糖代謝之調控

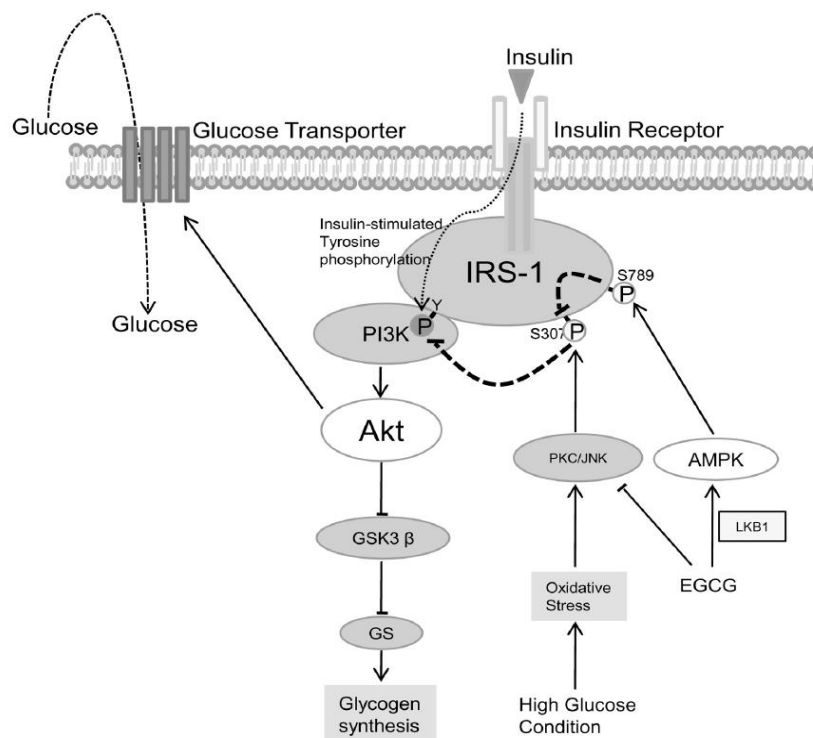
(Saltiel and Kahn 2001)

1-1-11 以高糖誘導胰島素阻抗之小鼠肝臟細胞模式

糖尿病為全身性代謝疾病，其成因錯綜複雜，主要原因為體內長期處於高血糖狀態，使醣類代謝之器官機能產生障礙，其併發症常出現之部位包括腦部、腎臟、眼部、神經系統、心臟及足部，造成腦中風、腎病變、視網膜病變、自主及周邊神經傷害及末端組織壞死等(Brownlee 2005)。研究指出，高糖或後期糖化終產物等具有糖毒性之物質會誘導血液中之單核球或巨噬細胞而活化腫瘤壞死因子 α (TNF- α)及介白素-1 β (IL-1 β)等促發炎因子，亦會導致體內產生過多的自由基，提高糖尿病發生的機率(Yan, et al. 1994; Ceriello 2003)。高糖環境亦會減弱胰島素之傳訊，因胞內產生活性氧並累積，形成氧化壓力而活化 PKC 與 JNK，促使 IRS 磷酸化(Ser307)，減少 IRS-1 酪胺酸磷酸化，抑制 IRS-1 結合至 IR 所導致(Lin and Lin 2008)。

肝臟、肌肉及脂肪組織為胰島素作用的下游臟器，用以維持體內血糖恆定，因此常以其細胞做為體外試驗研究之誘導模式。而肝細胞對於體內醣類之調控極為重要，可對葡萄糖進行吸收與釋放之代謝作用。肝細胞當中，小鼠肝臟細胞 FL83B 為一便利研究血糖調控之平台，其不需經分化即具有胰島素敏感性，並能合成及儲存肝醣。研究發現：以 TNF- α 誘導 FL83B 細胞，能使其產生胰島素阻抗，並隨 TNF- α 濃度增加而減少葡萄糖之帶入量(Cheng, et al. 2008)，另一研究以同一模式誘導，發現加入有效成分酚酸後能提高胰島素傳訊相關蛋白質，如 IR、PI3K、GS 及 GLUT2 的表現，促進葡萄糖帶入(Huang, et al. 2009)。亦有研究分

別以 33 與 30mM 葡萄糖誘導人類肝癌細胞 HepG2 產生胰島素阻抗，於胰島素刺激下，高糖誘導組與控制組相比，其 Akt 磷酸化表現下降，添加有效成分 EGCG 及菊糖後則顯著提高其表現量(Lin and Lin 2008; Yun, et al. 2009)。經上述研究顯示，可利用高糖誘導肝細胞成胰島素阻抗細胞之模式，探討樣品對於血糖調節之能力。



附圖十二、高糖誘導阻斷胰島素傳訊之可能機制

(Lin and Lin 2008)

1-2 益生菌

1-2-1 益生菌之定義

益生菌為活體微生物，當給予充足數量時，對宿主健康具有正面效益 (FAO/WHO, 2002)。但近年來許多研究發現除益生菌活菌本身之外，其死菌體、菌體萃取物與代謝產物，也具有促進宿主健康之功效，因此亦將其歸類為益生菌的範疇。益生菌應源自於宿主、屬非致病性微生物及不具有傳染性之耐抗生素基因等安全特性(Saarela, et al. 2000)。除安全性之外，益生菌株的選擇及發展為機能性食品應考慮之條件包括：

- (1) 抵抗胃酸及膽鹽之能力。
- (2) 良好的腸道吸附性及定殖能力。
- (3) 抑制病原菌的生長之優異的競爭能力。
- (4) 促進免疫調節能力。
- (5) 臨床證實具有健康之功效。
- (6) 儲存穩定性及良好的加工特性。

(Saarela, et al. 2002)

1-2-2 益生菌之應用

現今越來越多益生菌被利用作為食品之機能性成分，特別是乳製品如優格及其他發酵乳類產品。許多文獻已證實益生菌對代謝性疾病之正面效益，包括改善高血脂症、糖尿病與肥胖等，其相關功效如附圖十二所示。因此，而益生菌的應用範圍已擴大至食品與藥品，被廣泛使用於醫療治療製劑或添加至食品中做為輔助補充品(Aggarwal, et al. 2013)。附表五為益生菌產品中常見之菌株，其中以乳酸菌為主要來源。

附表五、應用於益生菌產品之微生物

<i>Lactobacillus</i> species	<i>Bifidobacterium</i> species	Other LAB	Non-lactics
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Ent. faecalis</i> ^a	<i>Bacillus cereus</i> ('toyoi') ^{a,d}
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> ('Nissle 1917') ^d
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactoc. lactis</i> ^c	
<i>L. gallinarum</i> ^a	<i>B. breve</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i> ^c	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ^{a,d}
<i>L. gasseri</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Ped. acidilactici</i> ^c	
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. lactis</i> ^b	<i>Sporolactobacillus inulinus</i> ^a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ('boulardii') ^d
<i>(L. paracasei)</i>	<i>B. longum</i>	<i>Strep. thermophilus</i>	
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

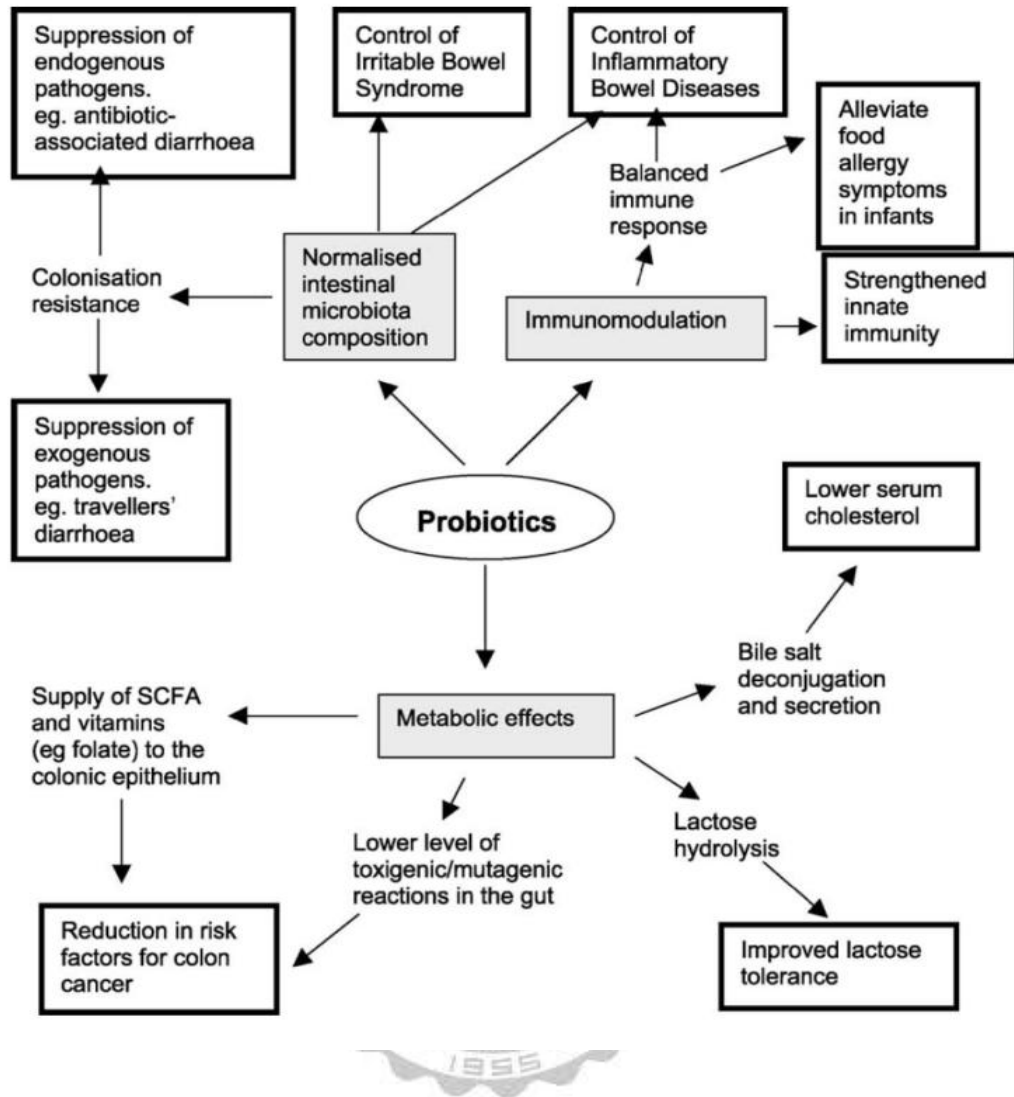
^aMainly used for animals.

^bProbably synonymous with *B. animalis*.

^cLittle known about probiotic properties.

^dMainly as pharmaceutical preparations.

(Holzapfel, et al. 1998)



附圖十三、益生菌相關之健康功效

(Saarela, et al. 2002)

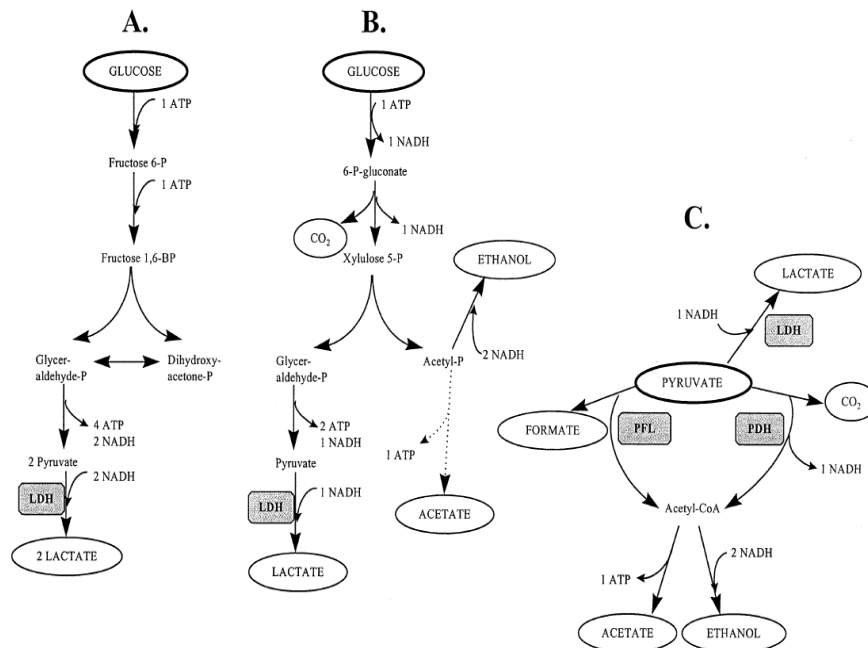
1-3 乳酸菌

1-3-1 乳酸菌基本特性

乳酸菌(Lactic acid bacteria, LAB)是指能夠代謝醣類，並產生多量乳酸之細菌，對營養需求較為嚴苛，需有醣類、胺基酸及多種生長素才能維持生長。乳酸菌常存在於人體、動物消化道與自然環境中，為重要之益生菌，被認為是安全菌種 (GRAS, generally regarded as safe)。乳酸菌屬兼性厭氧菌，多為革蘭氏陽性菌，無運動性，型態為桿菌或球菌且通常缺乏觸酶(Catalase)及細胞色素(Cytochrome)。

1-3-2 乳酸菌分類

乳酸菌依型態分類，可分為桿菌、球菌及其他菌屬，桿菌屬如 *Lactobacillus* 及 *Bifidobacterium*，球菌屬如 *Lactococcus*。乳酸菌依其發酵最終產物及代謝途徑的不同，分為同型發酵 (Homofermentation)、異型發酵 (Heterofermentation) 及混合酸發酵 (Mixed acid fermentation) 三類(附圖十三)。同型發酵乳酸菌經糖解作用能產生約 90~100% 的乳酸，*Lactobacillus acidophilus*、*Lactobacillus bulgarius*、*Lactobacillus delbrueckii*、*Streptococcus thermophilus* 及 *Enterococcus faecium* 通常為此種發酵類型。異型發酵乳酸菌除了產生約 50% 乳酸之外，亦產生醋酸、乙醇、二氧化碳及其它產物，*Bifidobacterium breve*、*Bifidobacterium longum*、*Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus rhamnosus* 及 *Lactobacillus plantarum* 則屬於此種發酵類型(Bucke 2004)。



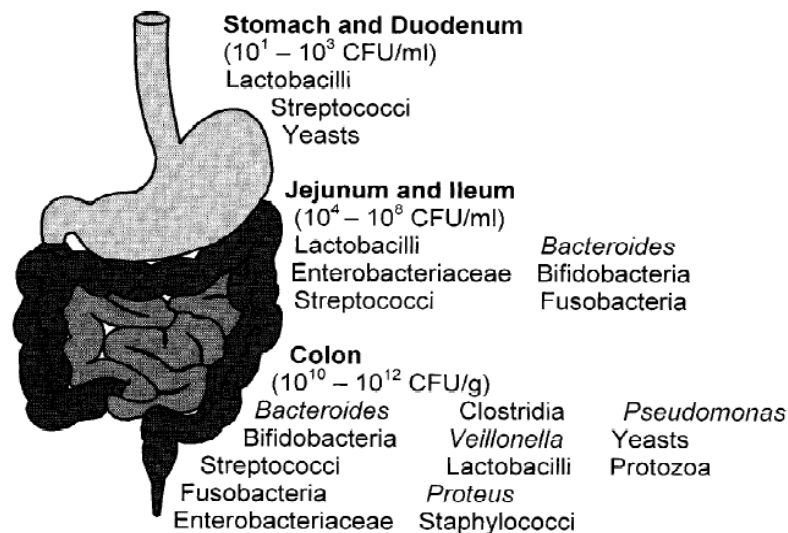
附圖十四、乳酸菌代謝途徑

(A)同型發酵 (B)異型發酵 (C)混合酸發酵(Hofvendahl and Hahn-Hagerdal 2000)

1-3-3 乳酸菌之生理功效

1-3-3.1 維持腸道菌叢平衡與抑制病原菌

人體胃腸道中含有多種不同特性之細菌，包含有益菌及病原菌，若腸道中有益菌占多數則能維持人體健康。此外，根據胃腸道之不同部位其菌相分佈及數量皆有差異(附圖十四)。由於胃部受胃酸影響，pH 值為 2.5~3.5 之間，破壞了大部分的微生物生長，菌數約為 $10^1 \sim 10^3$ CFU/mL，優勢菌種多屬革蘭氏陽性菌，如乳酸桿菌(*Lactobacilli*)及鏈球菌群(*Streptococci*)。而接近胃腸道末端，除了乳酸菌雙歧桿菌(*Bifidobacteria*)的數量增加之外，也出現革蘭氏陰性兼性好氧菌，如腸內細菌科(*Enterobacteriaceae*)及絕對厭氧菌如類細菌屬(*Bacteroides*)等族群(Holzapel, Haberer et al. 1998)，菌相較為豐富多元。這些腸內菌群中又以乳酸菌最為重要，其能透過三種機制達到抑制病原菌之效果：(1)與病原菌競爭腸道上皮細胞刷狀緣上之吸附位置；(2)於腸道內與病原菌競爭營養物質；(3)利用乳酸菌之代謝產物如過氧化氫、細菌素及有機酸等，達到抑菌效果(陳等, 2007)。



附圖十五、人體胃腸道之菌相分佈

(Holzapfel, et al. 1998)

1-3-3.2 免疫調節作用

益生菌常可以發揮其調節宿主之免疫反應，係因其存在於腸道中，且能定殖於腸壁細胞。而益生菌在免疫調節功能中具有多種作用，除能透過第一型輔助型 T 細胞(Type 1 T helper cells, Th1 cells)促使體異性免疫反應、增加 IgA 的分泌，亦可藉由 Th2 cells 調控細胞毒性 T 細胞(cytotoxic T cells)，促使細胞性免疫反應(Bengmark, et al. 2001)。此外，乳酸菌屬於革蘭氏陽性菌，其刺激產生之細胞激

素為介白素 12 (Interleukin 12, IL-12)與干擾素 γ (Interferon, IFN- γ)，較偏向 Th1 的免疫反應(Haller, et al. 2000)。而免疫調節作用包括強化免疫系統及減緩過敏現象等功能；在強化免疫系統方面，有文獻指出餵食 BALB/c 小鼠多種 *Lactobacilli* 後能提高其先天及後天性免疫反應，刺激淋巴細胞釋放促炎細胞因子 (proinflammatory cytokines)TNF- α 、IFN- γ 及 IL-12(Perdigon, et al. 1999)。亦有體外試驗研究證實乳酸菌胞外多醣能誘導細胞產生 IL-6、TNF- α 及 IL-1 β ，具有免疫調節之作用(Liu, et al. 2011)。在減緩過敏現象方面，有文獻指出乳酸菌具有水解食物過敏原及維持腸道黏膜屏障的能力，進而降低過敏原的吸收，幫助改善過敏發炎反應(Kirjavainen, et al. 2002) (林 2004)。而乳酸菌之死菌、活菌及發酵食品等不同型態的產品，經動物實驗證實也具有抗過敏之功效(Sashihara, et al. 2006; Enomoto, et al. 2009)。

1-3-3.3 降低血液中膽固醇含量

膽固醇是細胞膜及細胞脂蛋白的重要組成分，也是膽鹽、膽酸和各種固醇類賀爾蒙的前驅物，若血清中含有過量的膽固醇則容易發生動脈硬化之疾病。乳酸菌能透過增加膽固醇排出量與干擾腸道膽固醇之吸收等作用降低膽固醇，其機制包括：(1)乳酸菌具有膽鹽水解酵素可產生去結合型態的膽鹽，使膽固醇與其發生共沉澱作用，而達到降低膽固醇的功效(Klaver and van der Meer 1993)，且乳酸菌在可耐受的膽鹽濃度範圍內，其降低膽固醇的能力與環境中膽鹽的量成正相關(Tahri, et al. 1997)。(2)乳酸菌細胞膜可鍵結膽固醇，將吸附的膽固醇代謝成細胞所需的物質，其中又以乳酸桿菌的降膽固醇的成效較佳(Grill, et al. 2000)。(3)益生菌在代謝過程中可產生乳酸及醋酸等有機酸，可抑制膽固醇合成途徑中最主要的酵素羥甲基戊二酸單醯輔酶 A 還原酶(3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase, HMG-CoA reductase)的活性，進一步抑制膽固醇的合成。研究指出以 *L. acidophilus*(ATCC 43121)餵食高膽固醇血症之 Sprague-Dawley(SD)大鼠，可有效降低大鼠血液中 25%的總膽固醇含量，作用機制為產生去結合型膽鹽，促進膽固醇排出(Park, et al. 2007)。另有研究指出以 *Lactobacillus plantarum* 及 *Lactobacillus fermentum* 餵食高膽固醇飲食誘導之大鼠，能降低其血清中膽固醇、LDL-C 及 Triglyceride 含量(Xie, et al. 2011)。

1-3-3.4 調節血壓

腎素-血管收縮素-醛固酮系統(Renin-Angiotensin-Aldosterone System, RAAS)是調控人體血壓的主要機制，而乳酸菌具有完整之蛋白分解系統，其發酵產物中含有可抑制血管收縮素轉換酶(Angiotensin I-converting enzyme)的成分，能減少第二型血管收縮素(Angiotensin-II)的形成，達到降血壓的效果。乳酸菌發酵所生成之物質如 γ -aminobutyric acid (GABA)為血管收縮素轉換酶抑制劑(Angiotensin I-converting enzyme inhibitors, ACEI)，能預防高血壓的發生(Yamakoshi, et al. 2007)。Fuglsang 等學者(2002)研究指出以 *Lactobacillus helveticus* 發酵乳餵食原

發性高血壓大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)，能抑制第二型血管收縮素(Angiotensin-II)之轉換，有效降低血壓(Fuglsang, et al. 2002)。亦有體外試驗結果指出以 *Lactococcus lactis* 發酵之牛乳具有血管收縮素轉換酶抑制活性(Rodriguez-Figueroa, et al. 2010)。而發酵乳中最具抑制 ACE 活性之兩種短鏈胜肽為 Val-Pro-Pro 與 Ile-Pro-Pro(Seppo, et al. 2003)。

1-3-3.5 降低腫瘤生成

飲食習慣與腸道內菌相之形成關係密切，腸道中之有害菌會生成 β -glucuronidase、nitroreductase 及 azoreductase，這類酵素會催化致癌原(procarcinogens)轉換為致癌物(carcinogen)，而乳酸菌代謝作用所產生的乳酸及醋酸等有機酸能抑制其轉換，減少對大腸的致癌性(Goldin and Gorbach 1984)。亦有臨床試驗研究結果指出，增加發酵乳的攝取量可能降低罹患大腸癌之風險(Kampman, et al. 1994)。Ling 等學者研究發現受試者連續食用四週含有 *Lactobacillus* strain GG 之乳製品，糞便中之致癌酵素活性顯著降低(Ling, et al. 1994)，顯示乳酸菌能改變腸道環境且對宿主健康有益。因此，透過乳酸菌對腸道菌相的改變能影響腫瘤的生成，且不同乳酸菌株其抗腫瘤生成之作用機制亦有不同(Rafter 2002)。

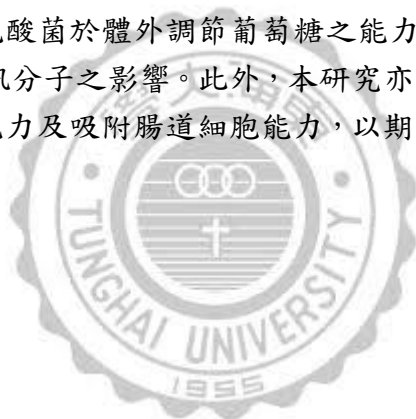


第二章、研究目的與實驗架構

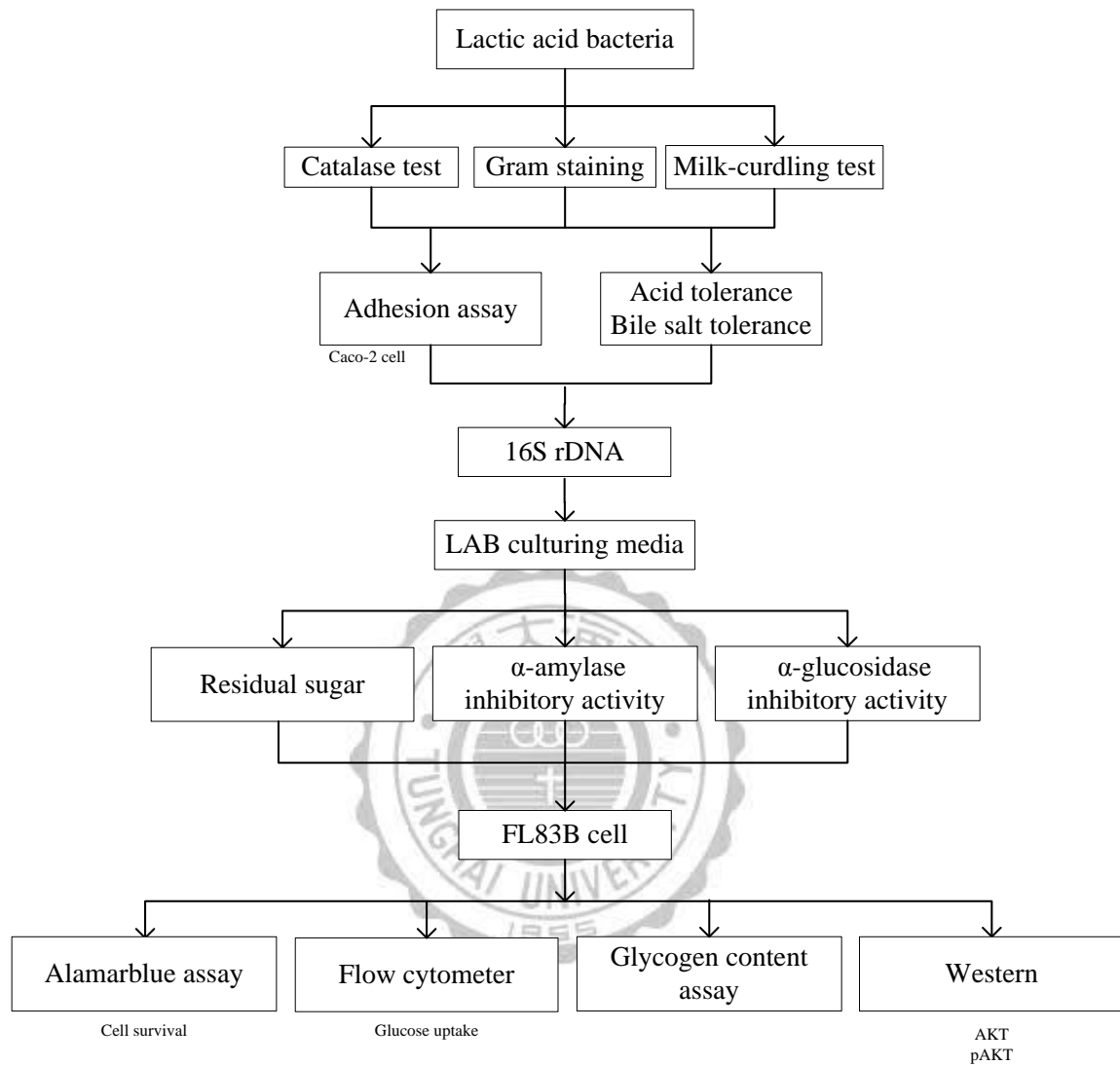
2-1 研究目的

糖尿病為全球性日益嚴重的健康問題，成人中約有一成罹患第二型糖尿病，其相關之胰島素阻抗及高血糖症更是造成其他代謝疾病之危險因子，顯示血糖的調控已然成為重要課題。乳酸菌為人體胃腸道中重要之微生物群，常作為益生菌被應用於食品中，許多文獻指出，乳酸菌及其發酵產品對代謝疾病具有正面效益，如調節血壓、血糖、血脂及改善肥胖等(Fuglsang, et al. 2002; Lee, et al. 2006; Yadav, et al. 2007; Xie, et al. 2011)。於體外實驗中亦證實其具抑制醣解酵素活性之能力，因副作用少且有廣效性，被視為優於藥物治療之天然抑制劑(Ramchandran and Shah 2008, Panwar, et al. 2014)。

目前我國通過健康食品認證之乳酸菌產品，功效多集中於胃腸功能改善及免疫功能調節，針對調節血糖功效者甚少。因此，本研究以醣解酵素 α -amylase 及 α -glucosidase 酵素活性抑制能力測定以及 FL83B 肝細胞之葡萄糖帶入及肝醣合成量分析，探討受篩選乳酸菌於體外調節葡萄糖之能力，並透過西方轉漬法瞭解乳酸菌樣品對胰島素傳訊分子之影響。此外，本研究亦評估受篩選菌株之益生菌特性，包括耐酸耐膽鹽能力及吸附腸道細胞能力，以期篩選出具保健功效之乳酸菌。



2-2 實驗架構



第三章、材料與方法

3-1 實驗材料

3-1-1 乳酸菌實驗

3-1-1.1 試驗菌株

分別由植物性及動物性來源篩選試驗菌株。植物性來源為臺中市建國傳統市場收集之數種發酵食品及自家耕種無農藥新鮮蔬菜。動物性來源為嬰幼兒糞便，取自彰化市彰化基督教醫院附設幼兒園，隨機挑選十名健康嬰幼兒，其年齡為一歲以下和一至三歲各5名。

3-1-1.2 乳酸菌培養基

Lactobacilli MRS broth 購自 DIFCO (DM, USA)。L-cysteine 購自 Sigma(MO, USA)。Agar 購自 Difco(MI, USA)。

3-1-1.3 乳酸菌試驗之相關藥品

H₂O₂ 購自九仁製藥(Nantou, Taiwan)。革蘭氏染色組(Rapid Gram Stain)購自三市儀器(Taichung, Taiwan)。HCl、NaOH 購自聯工化學廠股份有限公司(Taipei, Taiwan)。Phenol 購自 Amresco(OH, USA)。Sodium sulfate(Na₂SO₄)購自和光純藥工業株式會社(Osaka, Japan)。Bile salts、3,5-dinitrosalicylic acid(DNS)、酒石酸鉀鈉、 α -amylase 及 α -glucosidase 購自 Sigma(MO,USA)。

3-1-2 細胞實驗

3-1-2.1 小鼠細胞株

小鼠肝臟細胞株 FL83B cell (BCRC 60325, mouse hepatocyte cell)。購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(Bioresource Collection and Research Center, Hsinchu, Taiwan)。屬貼附型細胞。

3-1-2.2 人類細胞株

人類大腸腺癌細胞株 C2BBel (BCRC 60182, Human colon adenocarcinoma, clone of Caco-2)。購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(Bioresource Collection and Research Center, Hsinchu, Taiwan)。具有正常腸道上皮細胞之黏膜與型態。

3-1-2.3 細胞培養

F12K (Kaighn's modification of Ham's F12 medium)購自友和貿易股份有限公司(USA)。DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)購自 Gibco (CA, USA)。胎牛血清(Fetal bovine serum; FBS)購自 Gibco(CA, USA)。0.22 μ m 過濾杯(Millipore, USA)。

3-1-2.4 細胞培養其他藥品

Insulin、Trypsin-EDTA 購自 Gibco(CA, USA)。Trypsin blue 購自 Biological Industries (Kibbutz, Israel)。Glucose 購自 Sigma(MO, USA)。AlamarBlue® 購自 Invertrogen(CA, USA)。Sodium chloride、Disodium hydrogen phosphate 購自 Panreac(Barcelona, Spain)。Potassium chloride 購自林純藥工業株式會社(Osaka, Japan)。Sodium hydrogen carbonate 購自和光純藥工業株式會社(Osaka, Japan)。Potassium dihydrogen phosphate 購自石津製藥株式會社(Osaka, Japan)。

3-1-3 流式細胞儀分析藥品

3-1-3.1 葡萄糖擬似物

2-[N-(nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose, 2-NBDG 為葡萄糖擬似物，購自 Invitrogen(OR, USA)。

3-1-3.2 Propidium iodide

PI(Propidium iodide)購自 Sigma(MO, USA)。

3-1-4 肝醣分析藥品

Anthrone 購自 Sigma(MO, USA)。硫酸購自聯工化學廠股份有限公司(Taipei, Taiwan)。Potassium hydroxide 購自林純藥工業株式會社(Osaka, Japan)。

3-1-5 蛋白質分析試劑

3-1-5.1 cell lysis buffer

Sodium chloride 購自 Panreac (Barcelona, Spain)。Tris 購自 Amresco (OH, USA)。Nonidet P-40 substitute(NP-40)購自 USB (OH, USA)。

Ethylenediaminetetraaceticacid(EDTA)、Phenylmethanesulfonyl fluoride、Sodium fluoride、Sodium orthovanadate、Protease Inhibitor Cocktail 購自 Sigma (MO, USA)。

3-1-5.2 蛋白質定量試劑

BCA™ Protein Assay Kit 購自 Thermo(USA)。

3-1-5.3 西方轉漬試劑

N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine(TEMED)、Ponceau S 購自 Sigma (MO, USA)。Glycine、Glycerol 及 Tween-20 購自 Panreac Quimica Sa(Barcelona, Spain)。Ammonium persulfate(APS)、Dithiothreitol(DTT)及 Sodium phosphate monobasic、monohydrate 購自 GERBU(Gaiberg, Germany)。Acryamide-bis solution 40% 購自 SERVA(Germany)。Sodium tetraborate-10-hydrate、Sodium phosphate dibasic 購自 Merck(Darmstadt, Germany)。Sodium dodecyl sulfate(SDS)購自 Bio-Rad(CA, USA)。Methyl alcohol 及 Tris(hydroxymethyl)aminomethane 購自 Mallinckrodt Baker(NJ, USA)。BlueRAY Prestained Protein Ladder 購自 GeneDireX(Bruges, Belgium)。Blotting Paper 購自 Whatman plc.(Kent, UK)。Polyvinylidene Fluoride (PVDF) Membrane、Immoblin™Western Chemiluminescent HRP Substrate 購自 Millipore(MA, USA)。

3-1-6 主要儀器及設備

CO₂ 恆溫培養箱(型號 Forma310) (Thermo, USA)、加熱恆溫循環槽(型號 WB212-B1) (Kansin, USA)、血球計數器(Hemocytometer)(Superior, Bad Marienfeld)、無菌操作台(Bellco, USA)、倒立螢光顯微鏡(型號 IX-71) (Olympus, Japan)、液態氮儲存桶(型號 LS-750) (Taylor-Wharton, Germany)、分光光度計 (Thermo, USA)、震盪機(型號 Vortex-2 genie) (Scientific Industries, USA)、桌上型離心機(型號 5415D) (Eppendorf, Germany)、乾浴槽(型號 MC-01S) (Major Science, Taiwan)、蛋白質電泳槽(型號 MiNi-Protein) (Bio-Rad, USA)、西方轉漬槽(型號 Criterion™ Blotter) (Bio-Rad, USA)、電源供應器(型號 MP-250N) (Major science, Taiwan)、高速低溫離心機(型號 5810R) (Eppendorf, USA)、流式細胞儀(型號 FACScan)(Becton Dickinson, USA)。

3-2 實驗方法

3-2-1 菌株分離及保存

取植物性培養液及糞便稀釋液分別接種至含 0.05% L-cysteine 之 Lactobacilli MRS 液態培養基，於 37°C 靜置 20 小時進行活化。取活化之菌液進行四區畫線分離出單一菌落後，於 MRS broth 中再次活化，並重複上述分離步驟兩次，以分離出單一菌株。純化後之菌株保存於含 15% 甘油之 MRS broth，於 -70°C 冷凍保存。

3-2-2 乳酸菌初步篩選及鑑定

3-2-2.1 觸酶試驗

微生物行有氧呼吸時，會產生對自身有毒害之 H_2O_2 ，好氧細菌會利用觸酶來分解 H_2O_2 ， H_2O_2 分解過程會產生 O_2 ，而有氣泡產生。乳酸菌缺乏觸酶，因此不會產生氣泡。37°C 培養 24 小時之菌液塗抹於載玻片上，滴上 3% 過氧化氫，若有氣泡產生為正反應(+)，無氣泡產生則為負反應(-)。

3-2-2.2 革蘭氏染色

利用細胞構造之不同而能否保留染劑之特性來鑑別革蘭氏陽性菌與陰性菌。取 37°C 培養 24 小時之菌液塗抹於載玻片上，熱固定後備用。加數滴結晶紫(crystal violet)染色 1 分鐘，以二次蒸餾水洗去染料，再加 iodine solution 固定 1 分鐘後，以 95% 乙醇脫色，最後再以 safranin 覆染 45 秒，利用光學顯微鏡觀察結果。革蘭氏陽性(+)菌染色後呈藍紫色，革蘭氏陰性(-)菌染色後呈紅色。

3-2-2.3 凝乳試驗

取 100 μ L 隔夜培養之菌液加入至 5mL 10% 脫脂牛奶中，37°C 培養 24 小時後觀察是否有凝乳反應，藉此判斷是否具有產酸之特性。

3-2-2.4 耐酸耐膽鹽試驗

取 1mL 培養菌液 (10^8 cfu/mL) 加入經 0.1 N HCl 調至 pH 2.0 之磷酸鹽緩衝溶液，培養 37°C 至 3 小時。培養後經序列稀釋，以傾倒法培養於 MRS agar 上，計數存活的乳酸菌數(Gomez Zavaglia, Kociubinski et al. 1998)。將經耐酸試驗存活之乳酸菌，以轉速 5,000 rpm 離心 5 分鐘後，以 1× PBS 緩衝溶液清洗，然後，將乳酸菌移至 9 ml 含 0.3% 膽鹽溶液中培養 0、1.5 和 3 小時，培養後經序列稀釋，傾倒法培養於 MRS agar 計數存活的乳酸菌數(Gilliland and Walker 1990)。

3-2-2.5 吸附 Caco-2 腸道上皮細胞試驗

取 24-well multidish plate，每個 well 放入一片蓋玻片。移除培養皿倒掉舊的培養液，以 1× PBS 清洗兩次後移除，加入 1ml Trypsin 進行消化，輕拍培養皿數下，使細胞懸浮。加入 40 mL 新鮮 DMEM 培養液搖勻後，計數細胞數約 10^5 CFU/mL，每個 well 加入 0.5mL 細胞懸浮液，於 37°C、5% CO_2 氣體培養，使細胞分裂生長附著蓋玻片。再將舊培養液吸出，以 1× PBS 清洗兩次，加入 0.5 mL 新鮮細胞培養液 (不含 penicillin-streptomycin) 及 100 μ L 乳酸菌菌液，於 37°C、5% CO_2 氣體培養 2 小時。吸出舊培養液，以 1× PBS 清洗三次。加入 200 μ L 10% formalin 固定 30 分鐘，使菌體和細胞固定於 well 內蓋玻片上。以 pipet 吸出 formalin，以 1× PBS 清洗三次。加入 200 μ L 經濾紙粗過濾的 crystal violet 染色，在 24-well multidish plate 外包一層鋁箔紙，以 100rpm 轉速搖晃染色 5 分鐘，1×

PBS 清洗去除多餘染劑。以鑷子取出蓋玻片放置載玻片上，利用倒立式螢光顯微鏡觀察，並計數吸附於細胞上之乳酸菌數(Gopal, et al. 2001)。

3-2-2.6 Genomic DNA 萃取

乳酸菌 DNA 之萃取為利用 ZR Fungal/Bacterial DNA Miniprep™ 商業套組進行製備。將 1mL10⁹ CFU/ mL 菌液以 12,000 rpm 轉速離心 2 分鐘，去除培養液後並留下菌體。以 200μL 1×PBS 復懸菌體於 ZR BashingBead™ Lysis Tube 中，接著加入 750μL Lysis Solution 震盪 5 分鐘以破壞細胞壁。震盪後以 13,200 rpm 轉速離心 1 分鐘，取 400μL 培養液至 Zymo-Spin™ IV Spin Filter 中，並以 7,000 rpm 轉速離心 1 分鐘，於 Collection Tube 中加入 1200μL Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer 均勻混合後，取 800μL 前述混合液至 Zymo-Spin™ IIC Column 以 13,200 rpm 轉速離心 1 分鐘後去除濾液，並重複上述步驟。加入 200μL DNA Pre-wash Buffer 至 Column，以 13,200 rpm 轉速離心 1 分鐘後去濾液，再加入 500μL Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer 至 Column，以 13,200 rpm 轉速離心 1 分鐘，將 Column 放置於新的 1.5mL Tube，加入 50μL DNA Elution Buffer 於薄膜上浸潤 DNA，停留 1 至 5 分鐘後，以 13,200 rpm 轉速離心 30 秒析出 DNA，於-20°C 保存備用。

3-2-2.7 聚合酶鏈鎖反應檢測(16S rDNA PCR)

利用國外已發表文獻之引子組(Rinttila, et al. 2004)，在 0.2 mL 微量離心管先加入配製好的 PCR 反應液 19μL，其組成份內含 0.5μL 之 200 μM dNTP (N=A, T, G, C)、2.5μL 之 10x PCR buffer、3μL 之 MgCl₂、0.5μL 之 10 pmole (each) primers(5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3'；5'-CACCGCTACACATGGAG-3')，0.1μL 之 Taq DNA polymerase 及 11.9μL 無菌去離子水，再加入 1μL 之目標菌體 genomic DNA。而後置於 PCR thermocycler 進行反應。分析時取 5μL PCR 反應產物，以 1.5% agarose gel 於 0.5 × TAE buffer 中進行電泳分析，以 UV box 觀察後拍照。

3-2-2.8 DNA 定序

上述所有的 PCR 產物委託源資國際生物科技公司(Taipei, Taiwan, R.O.C.)進行定序。

3-2-3 乳酸菌培養液相關試驗

3-2-3.1 培養液製備

將二次活化之乳酸菌液以 4,000 rpm 轉速離心 20 分鐘，並以 0.22μm filter 過濾收取培養液，於-20°C 保存備用。

3-2-3.2 DNS(3,5-dinitro-salicylic acid)殘糖分析

葡萄糖具還原力，可使鹼性溶液中黃色之雙硝基水楊酸(DNS)還原成深色之3-胺基,5-硝基水楊酸，其產物安定且在 575nm 有最大吸光值(Gusakov, et al. 2011)。取 1mL 之乳酸菌培養液加入 1% B 液(5% Na₂SO₄)及 99% A 液(1% DNS、1% NaOH 及 0.2% phenol 加 d.dH₂O 定量至 100 mL)震盪混合，經 100°C 水浴 15 分鐘，再加入 0.5mL C 液(67% 酒石酸鉀鈉)震盪混勻，置於 25°C 水浴 1 分鐘，於 575nm 下偵測其吸光值。MRS 培養基本身已含 2% glucose，而殘糖檢量線則以不同濃度的葡萄糖溶液為標準品，濃度分別為: 0、2、4、6、8、10mg/mL，藉此標準曲線求得樣品中殘糖量。

3-2-3.3 α -amylase 酵素活性抑制能力測定

α -amylase 活性測定乃利用二硝基水楊酸(3,5-dinitrosalicylic acid; DNS)具氧化力之特性，將具有游離或游離趨勢含醛或酮基之碳水化合物在鹼性溶液下有還原的能力而進行反應，取 40 μ L 樣品加入 160 μ L 去離子水，隨後加入 0.5%(w/v)之澱粉溶液 400 μ L，以及 200 μ L(30U/mL)酵素液，於 25°C 下反應 3 分鐘後，自此混合液中取出 200 μ L 至新的 1.5mL 離心管中，加入溶於 5.31M 酒石酸鉀鈉溶液的 DNS 呈色溶液 100 μ L 後，於 85°C 水浴 15 分鐘，再加入 900 μ L 去離子水，以分光光度計檢測波長 540nm 下之吸光值。

3-2-3.4 α -glucosidase 酵素活性抑制能力測定

取 α -glucosidase (10⁷ units/mg)溶於 0.1M PBS 使最終濃度為 1U/mL。取 100 μ L 樣品，加入 20 μ L 酵素液，以及 380 μ L 0.53M 4-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (p-NPG)，於 37°C 下反應 20 分鐘後，加入 500 μ L 0.1M Na₂CO₃ 混合均勻，使酵素失活而中止反應，以分光光度計檢測波長 400nm 下之吸光值。

3-2-4 細胞培養及其相關分析

3-2-4.1 細胞培養與繼代

自液態氮桶取出 FL83B 肝細胞凍管，於 37°C 水浴槽中盡速解凍，移至無菌操作台內。於 10 cm dish 中加入 10mL 培養基，並加入已解凍之 FL83B 細胞懸浮液，均勻混合後，置於 37°C 含 5% CO₂ 之培養箱中，待細胞生長約七至八分滿時，再進行繼代培養。

細胞生長約七至八分滿時，去除培養基，以 PBS 潤洗兩次，加入 1 \times Trypsin-EDTA，於培養箱中作用約 5 分鐘，待細胞浮起後，加入兩倍體積之培養基終止 Trypsin-EDTA 作用，再將細胞懸浮液平均分配至新的培養皿中，置於培養箱中培養。

3-2-4.2 誘導 FL83B 細胞產生胰島素阻抗

將細胞培養至八分滿，更換不含 FBS 之培養基培養 24 小時，再更換為含有 60mM 葡萄糖之培養基，培養 24 小時。利用流式細胞儀偵測葡萄糖擬似物 2-NBDG 帶入量(詳見 3-2-5)，以判斷是否誘導細胞產生胰島素阻抗。經上述處理後的細胞，在下列內文中，稱為胰島素阻抗組。

3-2-4.3 細胞增生活性測試

利用活細胞會將 AlamarBlue 試劑中的 Resazurin 經還原反應，形成粉紅色之 Resorufin 化合物。於波長 550 及 590 nm 下測其吸光值，即可推算細胞增生活性。將細胞培養於 96 孔盤中(10^4 cells/well)，添加不同濃度之乳酸菌培養液共置 24 小時，移除培養基並以 PBS 潤洗，每孔加入 100 μ L AlamarBlue (AlamarBlue : F12K medium = 1 : 10)，於 37°C 反應 24 小時，於 550 及 590nm 下測其吸光值。

3-2-5 葡萄糖擬似物 2-NBDG 帶入量分析

2-NBDG (2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose)，為一種葡萄糖修飾物，分子量為 342.26。可於波長 487 nm 受到激發，於 542 nm 放出螢光。在避光環境下以 PBS 配製濃度為 20 mM，儲存於 -20°C 冰箱備用。於 12 孔盤中種適量細胞 (10^5 cells/well) 進行培養，分為正常組及阻抗組，並添加不同濃度之乳酸菌培養液共置 4、12 及 24 小時，移除培養基並以 PBS 潤洗，加入含有 20 μ M 2-NBDG 之培養基作用 1 小時，胰島素組則加入含有 2-NBDG 及胰島素(0.862 μ M)之培養基作用 1 小時。將培養基移除後，以 PBS 潤洗，再以 1 \times Trypsin-EDTA 收集細胞於流式管中，加入以 PBS 稀釋至 10%之 PI，並以流式細胞儀檢測 2-NBDG 之帶入量。

3-2-6 肝醣表現量

將細胞培養於 6 cm dish 中，分為正常組及阻抗組，並添加不同濃度之乳酸菌培養液共置 12 及 24 小時，然後，移除培養基並以 PBS 潤洗，加入 500 μ L Trypsin 將細胞收集至離心管，再加入 900 μ L PBS 稀釋 Trypsin，於 4°C 以 5,000rpm 轉速離心 3 分鐘，移除含有 Trypsin 之培養液後，將細胞凍存於 -20°C 備用。以 500 μ L PBS 將 pellet 復溶，加入 500 μ L 30% KOH 混合均勻，99°C 水浴 20 分鐘，置於室溫下待冷卻，加入三倍體積 95% 乙醇，於 -20°C 下放置 16 小時後，於 4°C 以 4,000rpm 轉速離心 15 分鐘，移除上清液，置於烘箱烘乾 pellet，以 500 μ L 二次水回溶，加入現配之 0.2% anthrone reagent，99°C 水浴 20 分鐘後，於波長 620 nm 下測其吸光值(Templeton 1961)。

3-2-7 蛋白質表現分析

3-2-7.1 蛋白質萃取

將細胞培養於 6 孔盤中，分為正常組及阻抗組，並添加不同濃度之乳酸菌培養液共置 24 小時，移除培養基並以 PBS 潤洗，加入 300 μ L lysis buffer，以刮勺將細胞刮下，收集於 1.5mL 離心管中，於 4 $^{\circ}$ C 以 12,000rpm 轉速離心 20 分鐘，收取培養液即為細胞總蛋白質，存於 -20 $^{\circ}$ C 備用。

3-2-7.2 蛋白質定量

利用 BCATM Protein Assay Kit 定量 FL83B 細胞抽取之總蛋白質。將蛋白質以 lysis buffer 適當稀釋後，取 10 μ L 稀釋蛋白質與 200 μ L 試劑(Reagent A : B=50:1) 混合均勻後，置於 37 $^{\circ}$ C 下避光反應 30 分鐘，於波長 562 nm 下測其吸光值。以不同濃度標準品 BSA 製作標準曲線，估算細胞中總蛋白濃度(μ g/mL)。

3-2-7.3 西方轉漬分析

取 20 μ g 蛋白質樣品與 Sample buffer (Working : 0.3mM Tris、1.5% SDS、150mM β -Mercaptoerhanol、6.8% glycerol、0.013% bromophenol blue)混合均勻，於乾浴槽 95 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘，於 Running buffer(192mM glycine、24.8mM Tris-base、0.1% SDS)中，以 10%、12% 的下膠 SDS-PAGE 進行電泳，將蛋白質分離。隨後於 10mM Na₂B₄O₇ Transfer buffer 中，將電泳膠上蛋白質轉至 Polyvinylidene Fluoride (PVDF) 膜上。將膜置於 2~5% skim milk-1X PBST(140mM NaCl、740 μ M Na₂HPO₄、9.2 mM NaH₂PO₄、0.1% Tween-20)或 2~5% BSA -PBST 中，以 100~150rpm 震盪 1 小時，加入可辨認目標蛋白質之一級抗體，於室溫下震盪 2 小時。將膜以 PBST 漂洗 15 分鐘 3 次，再加入二級抗體 (in 2~5% skim milk-1X PBST) 於室溫下震盪 1 小時，以 1X PBST 漂洗 3 次，最後於膜上加入 Chemiluminescent HRP Substrate 反應，將膜置於 C-DiGitTM Blot Scanner(LI-COR, USA)掃描後定量。抗體資訊列於附錄二。

3-3 統計分析

實驗所得數據接以平均值 \pm 標準差 (Means \pm SD) 表示，利用 SAS 9.3 統計軟體 (Statistical Analysis System, SAS Institute, Inc., USA) 進行鄧氏新多變域測驗法 (Duncan's New Multiple Range Test) 分析，當機率值小於 0.05 ($p < 0.05$) 時顯示各組統計上具顯著差異，並使用 SigmaPlot 10.0 (Systat software, Inc., USA) 軟體進行作圖。

第四章、結果與討論

4-1 乳酸菌實驗

4-1-1 乳酸菌初步篩選與定序

分別取發酵食品浸泡汁液、新鮮蔬菜之汁液與糞便稀釋液培養於 MRS 液態培養基，以四區畫線培養分離出單一菌落，並從其中挑選菌落進行觸酶、凝乳、革蘭氏染色試驗。初步篩選結果共 47 株菌株具有乳酸菌之基本特性，接續抽取其 Genomic DNA 進行定序，結果於表一至表三中所示。大部分菌株為 *Lactobacillus* 及 *Weissella* 屬，皆為觸酶試驗呈陰性反應、凝乳試驗及革蘭氏染色呈陽性反應之菌株，且型態均屬桿菌。

4-1-2 乳酸菌吸附 Caco-2 腸道上皮細胞之能力

腸道上皮細胞是宿主抵抗外來物侵入之天然屏障，菌株為避免因腸道蠕動被排出體外，會吸附至腸道細胞，亦能減少病原菌之吸附及促進宿主免疫功能，因此吸附能力可作為益生菌之篩選條件之一(Li, et al. 2008)。本研究利用人類腸道細胞株 Caco-2 進行試驗，其具有成熟腸道細胞之特性，包括刷狀緣微絨毛和頂端之水解酶，被認為是便利的腸道細胞模式(Hauri, et al. 1985)。文獻指出，每個細胞吸附 15 個菌體以上，便認為此菌體具有吸附能力(Pedersen and Tannock 1989)。試驗結果由表一至表三所示，平均每個細胞吸附 10 個菌體以上之菌株共有 10 株，平均每個細胞吸附 20 個菌體以上之菌株共有 7 株。其中以嬰幼兒糞便來源之菌株吸附能力最佳，平均每個細胞可吸附約 3 至 39 個菌體，吸附能力最佳之菌株為 *Weissella* sp.(B1-7)；其次為發酵食品來源之菌株，平均每個細胞可吸附約 1 至 22 個菌體，吸附能力最佳之菌株為 *Lactobacillus fermentum*(F8-4)；蔬菜來源之菌株吸附能力普遍較不理想，平均每個細胞可吸附約 2 至 17 個菌體，吸附能力最佳之菌株為 *Weissella cibaria*(E1-1)。研究指出疏水性作用、脂壁酸(Lipoteichoic acids, LTA)、凝集素(Lectins)及胞外多醣(Exopolysaccharides, EPA)為乳酸菌吸附至上皮細胞之因子。將乳酸菌 *Lactobacillus johnsonii* 細胞壁表面或其培養液之 LTA 純化或分離後，發現對細胞株之吸附作用呈濃度依賴性(Granato, et al. 1999)。而通常附著於菌株細胞表面或分泌至胞外培養基中的胞外多醣，將其純化後吸附作用顯著降低，乳酸菌經胰蛋白酶處理後也會影響其吸附能力，顯示吸附能力可能與蛋白質具相關性(Sun, et al. 2007)。

4-1-3 乳酸菌耐酸耐膽鹽之特性

抵抗胃酸及膽鹽能力被認為是益生菌應具備的條件之一，因其為能否於消化道中生存之關鍵(Saarela, et al. 2002)。本研究利用體外磷酸鹽溶液系統，使乳酸菌存在 pH 2.0 的環境下 3 hr 後，進行乳酸菌的耐膽鹽試驗，以 MRS-bile broth (0.3% oxgallbile) 分析乳酸菌對膽鹽的耐受性。試驗結果由表四至表六所示，發酵食品來源之乳酸菌經酸處理三小時後，共有 14 株菌其菌數量與未經處理時之菌數相比較無顯著差異，分別是 F1-3、F2-2、F3-1、F3-3、F7-1、F7-3、F7-4、F8-2、F8-4、F8-6、F9-1、F9-2、F9-3 及 F9-4，顯示其具有耐酸之特性。經 pH 2.0 酸處理 3 小時後之菌株加入膽鹽溶液中培養 3 小時，發現除 F9-2 之外，其餘 13 株菌株之存活菌數皆有所提升。蔬菜來源之乳酸菌經酸處理三小時後，有 8 株菌之存活菌數與未經處理時相比無顯著差異，分別是 E1-1、E2-3、G1-3、H1-1、H1-2、H1-5、J1-1 及 J1-2，其中 G1-3、H1-2、H1-5 及 J1-2 之菌數量於膽鹽溶液中培養三小時後則顯著提升。嬰幼兒糞便來源之 B1-7、B2-1、B2-2、B3-1、B3-5、B4-1、B4-8 及 B10-7 此 8 株乳酸菌經酸與膽鹽處理後其菌數量皆與 0 小時相比無顯著差異，具有酸及膽鹽之耐受性。文獻指出益生菌於不同酸鹼值環境中之存活菌數會隨著酸鹼值下降及時間增加而遞減(Wang, et al. 1999)，且大部分益生菌之耐膽鹽性較耐酸性佳(Favaro-Trindade and Grosso 2002)。本研究之試驗結果亦有觀察至此現象，某些菌株之菌數量經酸及膽鹽處理三小時後大約下降一次方左右。而益生菌之功效也會因菌株不同而有差異，因此選擇適合的菌株是預防或治療特定疾病之重要關鍵(Shida and Nanno 2008)。

4-1-4 乳酸菌培養液之醣解酵素抑制活性

餐後高血糖是造成糖尿病血管病變的主要危險因素，抑制醣解酵素 α -amylase 及 α -glucosidase 之活性可延緩醣類的消化，使腸道對葡萄糖的吸收減緩，是預防餐後高血糖的有效方式(Panwar, et al. 2014)。過去許多文獻曾利用植物萃取物評估其對醣解酵素的抑制能力(Hansawasdi, et al. 2000)，而益生菌於此方面尚有許多研究空間，因此本研究欲探討受篩選菌株對醣解酵素之抑制功效。本試驗使用之標準品為降血糖藥物 acarbose，其對 α -amylase 之抑制率為 2%，對 α -glucosidase 之抑制率為 49%。結果由表七所示，乳酸菌培養液對 α -amylase 之抑制效果均不理想，對 α -glucosidase 之抑制率最高則可達 90% 以上。有文獻由嬰兒糞便中篩選出乳酸菌，發現其萃取物對於 α -glucosidase 的抑制率最高約為 89% (Panwar, et al. 2014)，與本試驗結果相近。此外，亦有文獻指出以番石榴乾燥葉萃取液測其對 α -glucosidase 之抑制活性，結果顯示抑制率達 77% (蔡等, 2007)，由表七結果顯示樣品 F2-2、F3-2、F7-3、F7-4、F8-1、F8-2、F8-4、F8-6、E2-1、H1-2、H1-4、H2-1、J1-3、J1-4、B2-2、B4-1、B4-4、B4-8、B10-6、B10-7 對 α -glucosidase 有接近或超過 70% 之抑制率且高於控制組。而綜合評估吸附能力及耐酸耐膽鹽試驗之結果後從其中挑選出具備多種益生菌特性之菌株，故後續則以 F2-2、F7-3、

F7-4、F8-2、F8-6、H1-4、J1-3、J1-4及B10-7此9個樣品進行實驗。

4-1-5 乳酸菌之殘糖分析

殘糖量分析是透過葡萄糖具還原力之特性，使鹼性溶液中黃色之雙硝基水楊酸(DNS)還原成深色之3-胺基,5-硝基水楊酸，並於575nm有最大吸光值(Gusakov, et al. 2011)。結果由表八所示，F2-2之殘糖含量最高，J1-4之殘糖量最低，平均殘糖含量介於6.8至10.88mg/mL之間。此數值與本研究室過去曾分析過之乳酸菌培養液殘糖量介於0.7~1.5 mg/mL相較，顯著高出許多。由使用濃度200~1600ppm推估，進行細胞試驗時，最多提高培養基葡萄糖濃度介於0.38~3至0.6~4.8 mM，比照正常F12K培養基葡萄糖濃度為7 mM，阻抗組高糖配方葡萄糖濃度為67 mM，最高濃度1600 ppm 乳酸菌培養液之添加會對最終葡萄糖濃度有近50%增加(正常組)。

4-2 乳酸菌對FL83B肝細胞之調節血糖作用

4-2-1 不同濃度乳酸菌培養液對FL83B肝細胞增生活性試驗

為了解乳酸菌培養液是否會對細胞造成毒殺或促進增生作用，本研究利用Alamar Blue試劑分析其增生活性，將樣品F2-2、F7-3、F7-4、F8-2、F8-6、H1-4、J1-3、J1-4及B10-7之培養液稀釋為200、400、800及1600ppm，並分別添加於FL83B細胞中作用24小時。結果由圖一至圖九所示，九株乳酸菌之培養液於各個濃度下之增生活性均與Control組無顯著差異，顯示樣品對細胞增生活性均無抑制。因此，後續則利用200、400、800及1600ppm此四個濃度之培養液進行實驗，探討其對FL83B細胞之葡萄糖擬似物帶入量的影響。

4-2-2 乳酸菌培養液對FL83B細胞之2-NBDG帶入量影響

本研究使用2-NBDG螢光葡萄糖擬似物進行細胞對葡萄糖帶入量分析，文獻證實其為有效之分析方法，2-NBDG可如同葡萄糖般被葡萄糖轉運蛋白運輸且不被代謝分解，並可利用流式細胞儀分析葡萄糖帶入能力(Yoshioka, et al. 1996)。試驗前經預實驗測得九株乳酸菌與細胞共置24小時之2-NBDG帶入量，結果顯示以F2-2、F7-3及F7-4帶入能力較為理想，因此本試驗進一步以此三株乳酸菌分析其與FL83B細胞共置4、12及24小時之2-NBDG帶入量，阻抗態細胞則先以60mM Glucose誘導後再行實驗。試驗結果顯示於圖十至圖十五，正常態細胞與樣品F2-2共置24小時之2-NBDG帶入量和Control相比無顯著差異(圖十)，阻抗態細胞與樣品F2-2共置12小時之2-NBDG帶入量和Control相比顯著增加0.1-1.1倍(圖十一)。正常態細胞與樣品F7-3和F7-4共置12及24小時之2-NBDG帶入量和Control相比皆降低約0.3-0.4倍(圖十二、圖十四)，於阻抗態下較具有顯著功效，不太符合期望。阻抗態細胞與樣品F7-3共置24小時之2-NBDG帶入

量和 Control 相比顯著提高 1.1-3.13 倍(圖十三)。阻抗態細胞與樣品 F7-4 共置 24 小時之 2-NBDG 帶入量和 Control 相比顯著增加 0.8-3.1 倍(圖十五)。整體之帶入量結果顯示，與樣品共置 4 小時之帶入量顯著低於 Control 組，以加樣 12 小時及 24 小時之帶入量較為理想，因此後續分析將針對與樣品共置 12 小時及 24 小時深入探討。

4-2-3 乳酸菌培養液對 FL83B 細胞之肝醣合成影響

肝醣含量能反映肝醣合成與分解雙向路徑之平衡點。若肝醣含量提升，可推測肝醣合成量大於分解量，以促進葡萄糖帶入細胞內合成肝醣並降低血糖。本試驗將不同濃度之培養液與正常及阻抗態細胞分別共置 12 與 24 小時，收下細胞萃取肝醣，添加胰島素組別則於收細胞前 10 分鐘加入 100nM 胰島素後再收下，並以蔥酮試劑進行測定。圖十六中不同濃度 F2-2 之培養液與正常態 FL83B 細胞共置 12 小時後，各濃度之肝醣合成相對量均低於 Control 未加樣組別，而添加胰島素後，樣品濃度 800ppm、1600ppm 之肝醣合成相對量與胰島素組相比顯著提高。F2-2 之培養液與正常態 FL83B 細胞共置 24 小時後，亦以添加樣品濃度 800ppm 之肝醣合成相對量最高。圖十八中 F7-3 培養液與正常態 FL83B 細胞中共置 12 小時後，添加樣品濃度 400ppm 及 800ppm 之肝醣合成相對量較 Control 顯著提升，而添加胰島素後，只有最高濃度樣品能提升肝醣之合成，其餘濃度則與胰島素組無顯著差異。F7-3 之培養液與正常態 FL83B 細胞共置 24 小時後，添加 200、400 及 800ppm 之樣品濃度皆能顯著提升肝醣合成相對量(1.19、1.21 及 0.7 倍)。圖二十中 F7-4 培養液與正常態 FL83B 細胞中共置 12 小時後，合併添加胰島素之 200、400、800 及 1600ppm 樣品，皆顯著提升肝醣合成，於細胞中共置 24 小時則無明顯提高肝醣含量之現象。

於細胞中添加 60mM 葡萄糖溶液並共置 24 小時誘導細胞產生胰島素阻抗，再添加不同濃度乳酸菌培養液與細胞分別共置 12 與 24 小時後，進行肝醣含量測定。圖十七中 F2-2 之培養液與阻抗態 FL83B 細胞共置 12 小時後，樣品濃度 400 ppm 之添加下，有最高之肝醣合成相對量。而添加胰島素後，加樣之組別其肝醣合成相對量皆低於胰島素組，共置 24 小時之情況下亦有此趨勢。圖十九中 F7-3 之培養液與阻抗態 FL83B 細胞共置 12 小時後，添加樣品 200、400 及 800ppm 之組別皆能提升肝醣合成，此趨勢與阻抗態細胞之 2-NBDG 帶入量相符，與細胞共置 24 小時後則以 200ppm 之濃度顯著提升肝醣合成。圖二十一中 F7-4 之培養液與阻抗態 FL83B 細胞共置 12 小時後，四個濃度樣品之添加皆可顯著提升肝醣合成，於 400ppm 樣品添加下有最高之肝醣合成，此趨勢與 2-NBDG 於阻抗態細胞之帶入量相近，兩者結果互相呼應。共置 24 小時後，無論有無胰島素的協同作用下，添加 1600ppm 濃度之樣品皆能顯著提高肝醣之合成。文獻指出，當血糖濃度上升，胰島素會促進肝臟細胞將葡萄糖帶入細胞中，合成肝醣儲存使血糖下降(Samuel and Shulman 2012)。由圖十六至二十一所示，大部分樣品於阻抗細胞之添加下才具有與葡萄糖擬似物 2-NBDG 帶入量相近之趨勢，添加胰島素後

也非均能提高肝醣合成，只於特定濃度下才能增加其合成，造成此現象之因素可能與細胞內之調控機制相互抑制有關。於試驗結果中亦發現於阻抗態細胞中，共置 24 小時之肝醣含量皆低於 12 小時，由試驗方法中推測，可能為添加高濃度葡萄糖誘導細胞產生胰島素阻抗前先使細胞飢餓 24 小時之緣故，在此過程中消耗肝醣所致。

4-2-4 乳酸菌培養液對 FL83B 細胞傳訊蛋白質表現量之影響

肝臟為維持葡萄糖恆定之主要調控者，當肝細胞的胰島素敏感性下降時，會造成肝醣合成、糖質新生或脂質代謝失調，高血糖、胰島素阻抗及高血脂症等問題隨之而來(Schattenberg and Schuchmann 2009)。AKT(PKB)為胰島素傳訊路徑之下游分子，於胰島素之代謝調控中扮演重要角色，對於葡萄糖代謝、肝醣、蛋白質及脂質合成等皆具影響。

圖二十二(A)所示，正常態細胞添加不同濃度之 F2-2 乳酸菌培養液共置 12 及 24 小時，結果顯示共置 12 小時其 AKT 相對表現量較 24 小時高，其於 AKT 磷酸化亦有相同趨勢。添加 F2-2 高濃度 1600ppm 之培養液於正常細胞中，可顯著提升 AKT 表現量。添加胰島素作用後，1600ppm 培養液相較胰島素組有顯著提升。圖二十二(B)所示，於阻抗態下，共置 12 小時之 AKT 表現量皆較 24 小時高，但不論是共置 12 或 24 小時，添加樣品皆不會增加 AKT 表現。圖二十三(A)顯示，無胰島素刺激下，AKT 磷酸化顯著較低，添加 1600ppm 於正常細胞中共置 12 及 24 小時，皆可提升 AKT 磷酸化程度。合併添加胰島素作用後，亦為最高濃度之培養液磷酸化程度最高。圖二十三(B)中，於阻抗態下，添加樣品組與 Control 相比皆無顯著差異，合併胰島素作用之 800ppm 培養液共置 12 小時，能顯著提高 AKT 磷酸化。將上述 AKT 相關分子以磷酸化程度(pAKT/AKT)做整理，由圖二十四(A)所示，添加樣品並不會顯著提升正常態細胞之 AKT 磷酸化程度，24 小時作用時間，800ppm 合併胰島素組較具有磷酸化效果，顯著高於胰島素組。圖二十四(B)可得知，阻抗態細胞單獨加入樣品較無法顯著提高 AKT 磷酸化程度，加入胰島素刺激，800 及 1600ppm 共置 12 小時之磷酸化程度具顯著差異。

圖二十五(A)所示，於正常態細胞合併添加胰島素之不同濃度 F7-3 乳酸菌培養液共置 12 小時，發現隨濃度上升其 AKT 表現量也隨之提高，顯示 200ppm 至 1600ppm 間具有劑量效應。24 小時作用時間，四個濃度樣品組之 AKT 表現量與 Control 相比皆顯著上升。圖二十五(B)中，添加樣品無顯著增加阻抗態細胞之 AKT 表現，於特定濃度才有提升效果，且不具劑量效應。AKT 經由被磷酸化將訊息向下游傳遞，而 AKT 被磷酸化比例越高代表訊息傳遞越強烈。圖二十六(A)顯示，共置 12 及 24 小時之合併胰島素組別皆能促進正常細胞 AKT 磷酸化，與 Control 相比具顯著差異。於圖二十六(B)阻抗態細胞中，合併胰島素後，添加 800ppm 之 F7-3 培養液共置 12 小時能有效提高 AKT 磷酸化表現。將上述 AKT 相關分子以磷酸化程度(pAKT/AKT)做整理，由圖二十七(A)所示，正常態細胞中，

在作用 24 小時後，800 及 1600ppm 合併胰島素之組別磷酸化比例皆顯著上升。圖二十七(B)阻抗態細胞中，12 小時作用時間，200、400 及 800ppm 合併胰島素組之磷酸化比例皆顯著高於胰島素組。

圖二十八(A)所示，正常態細胞添加不同濃度之 F7-4 乳酸菌培養液共置 12 小時，對 AKT 表現量影響較顯著者為添加 1600ppm 之組別，與 Control 相比顯著提高。與細胞共置 24 小時後，200 及 1600ppm 合併胰島素之組別能增加 AKT 的表現量。圖二十八(B)阻抗細胞中，僅有少數濃度能提升 AKT 表現量，其餘皆無顯著差異，整體而言以共置 12 小時之表現量較高，與正常態細胞之趨勢相同。圖二十九(A)顯示，不論是與正常態細胞共置 12 或 24 小時，合併添加胰島素之四個濃度組別其 AKT 磷酸化程度皆有上升之趨勢，12 小時之 pAKT 表現量則具有劑量效應。圖二十九(B)阻抗態細胞為 12 小時之磷酸化程度較高，與正常細胞趨勢相同，其中 400 及 800ppm 與胰島素共同作用下，磷酸化效果較為顯著。整體而言，pAKT 在胰島素的刺激下含量才可提升，單獨添加乳酸菌培養液較無法提升 AKT 磷酸化。將上述 AKT 相關分子以磷酸化程度(pAKT/AKT)做整理，由圖三十所示，正常態細胞中，作用時間 12 小時後，未添加胰島素之組別其磷酸化比例皆顯著下降，作用時間 24 小時後，則以合併添加胰島素之 800ppm 組顯著提高磷酸化比例。於阻抗態細胞中，不論是作用 12 或 24 小時，樣品組之磷酸化比例皆屬下降之趨勢，無法提高 AKT 磷酸化程度。文獻指出，AKT 透過磷酸化抑制下游 GSK3 β 的表現，使 GS 不被磷酸化而具活性，促進肝醣合成作用(Cross, et al. 1995)，並會增加 GLUT4 轉位至細胞膜上，提高細胞對葡萄糖之帶入。AKT 及其磷酸化表現量提高亦會抑制 FoxO1 表現並減少 PEPCK 活性，因而降低糖質新生作用以維持血糖(Scheid and Woodgett 2001; Kitamura 2013)。由結果中發現，400 至 1600ppm 與胰島素協同作用之 F7-4 培養液，於 12 小時作用時間下，AKT 磷酸化程度顯著提升，其肝醣合成亦顯著增加，推測可能透過此胰島素傳訊路徑來提升肝醣合成作用，藉此達到葡萄糖調控的效果。以添加胰島素而言，阻抗態細胞於胰島素傳訊路徑上當培養液與胰島素共同作用時，效果反而不如單獨使用胰島素組(圖二十五 B)，原因可能為在胞外或胞內兩者互相作用所致。於胞外時培養液中之物質與胰島素直接結合或與胰島素競爭其受體，使傳訊減弱，於胞內時則因培養液所誘導之傳訊與胰島素訊息傳遞產生拮抗作用所造成，而上述推測之作用機制可進一步透過實驗證實。

4-3 結論與未來展望

4-3-1 結論

1. 本研究篩選之菌株均為觸酶陰性反應、凝乳陽性反應及革蘭氏陽性菌。多為 *Lactobacillus* 屬及 *Weissella* 屬。
2. 綜合吸附、耐酸耐膽鹽試驗及醣解酵素抑制試驗之結果挑選出具備多種益生

菌特性之菌株，故選定 F2-2、F7-3、F7-4、F8-2、F8-6、H1-4、J1-3、J1-4 及 B10-7 此 9 個樣品進行後續實驗。

3. 經 Alamar Blue 細胞增生活性試驗結果，乳酸菌 F2-2、F7-3、F7-4、F8-2、F8-6、H1-4、J1-3、J1-4 及 B10-7 培養液均對 FL83B 小鼠肝細胞無毒殺作用。
4. 流式細胞儀細胞分析試驗中結果顯示，F2-2、F7-3、F7-4 之 12 小時及 24 小時之葡萄糖擬似物 2-NBDG 帶入量較佳，故後續分析均對此三株菌株之 12 小時及 24 小時進行探討。
5. 肝醣合成試驗方面，不論於正常或是阻抗細胞，乳酸菌培養液均有提高 FL83B 細胞中之肝醣合成量之趨勢。
6. 胰島素傳訊部分，FL83B 細胞與乳酸菌培養液共置後可提升 AKT 磷酸化傳訊，改善胰島素阻抗態細胞之葡萄糖代謝調控。
7. 綜合本研究結果，F2-2、F7-3 及 F7-4 乳酸菌培養液皆具有良好的耐酸耐膽鹽能力及醣解酵素抑制活性，其中 F2-2 兼具腸道上皮細胞吸附能力，F7-3 及 F7-4 則有較理想之葡萄糖帶入與肝醣合成能力，顯示此三株菌可能是透過不同的作用機制以達到調節葡萄糖恆定之功效。

4-3-2 未來展望

經本研究試驗結果證實，乳酸菌培養液於 FL83B 肝細胞模式中，有增加葡萄糖擬似物 2-NBDG 及肝醣之合成量之趨勢，並於特定濃度可提升 AKT 磷酸化之表現增強傳訊，調控細胞中之葡萄糖代謝。後續研究可進一步探討其他傳訊分子如 IR、IRS、PI3K、AMPK 及 pAMPK 之表現，釐清乳酸菌於體外維持葡萄糖恆定之機制。未來若能透過動物實驗證實，將可更瞭解此乳酸菌株於體內之血糖調控機制。

表一、篩選自發酵食品之 17 種乳酸菌特性

Number	Name	Catalase test	Milk-curdling test	Gram stain	Adhesion(counts/cell)
F1-3	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(-)	(+)	(+)	10.4±1.8 ^c
F2-2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(-)	(+)	(+)	20.3±2.3 ^b
F3-1	<i>Weissella sp.</i>	(-)	(+)	(+)	5.3±1.0 ^{de}
F3-2	<i>Weissella cibaria</i>	(-)	(+)	(+)	1.5±0.6 ^{fg}
F3-3	<i>Weissella sp.</i>	(-)	(+)	(+)	2.8±1.3 ^{efg}
F7-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(-)	(+)	(+)	3.3±1.2 ^{def}
F7-3	<i>Lactobacillus brevis</i>	(-)	(+)	(+)	0 ^g
F7-4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(-)	(+)	(+)	2.5±0.6 ^{efg}
F8-1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(-)	(+)	(+)	6.0±1.8 ^d
F8-2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(-)	(+)	(+)	3.2±1.3 ^{ef}
F8-4	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(-)	(+)	(+)	22.9±3.4 ^a
F8-6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(-)	(+)	(+)	3.5±0.7 ^{def}
F9-1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(-)	(+)	(+)	1.7±0.6 ^{fg}
F9-2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(-)	(+)	(+)	2.8±1.3 ^{efg}
F9-3	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(-)	(+)	(+)	0 ^g
F9-4	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(-)	(+)	(+)	8.8±1.6 ^c
F11-1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(-)	(+)	(+)	9.9±2.3 ^c

表二、篩選自傳統蔬菜之 14 種乳酸菌特性

Number	Name	Catalase test	Milk-curdling test	Gram stain	Adhesion(counts/cell)
D1-1	<i>Weissella cibaria</i>	(-)	(+)	(+)	0 ^c
E1-1	<i>Weissella cibaria</i>	(-)	(+)	(+)	17.9±2.3 ^a
E2-1	<i>Weissella cibaria</i>	(-)	(+)	(+)	0 ^c
E2-3	<i>Weissella cibaria</i>	(-)	(+)	(+)	0 ^c
G1-3	<i>Weissella cibaria</i>	(-)	(+)	(+)	0 ^c
H1-1	<i>Bacillus megaterium</i>	(-)	(+)	(+)	0 ^c
H1-2	<i>Bacillus megaterium</i>	(-)	(+)	(+)	0 ^c
H1-4	<i>Bacillus sp.</i>	(-)	(+)	(+)	2.5±0.7 ^b
H1-5	<i>Bacillus megaterium</i>	(-)	(+)	(+)	0 ^c
H2-1	<i>Bacillus megaterium</i>	(-)	(+)	(+)	0 ^c
J1-1	<i>Weissella cibaria</i>	(-)	(+)	(+)	0 ^c
J1-2	<i>Weissella cibaria</i>	(-)	(+)	(+)	0 ^c
J1-3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	(-)	(+)	(+)	0 ^c
J1-4	<i>Weissella confusa</i>	(-)	(+)	(+)	0 ^c

小寫字母為組間顯著差異(p<0.05)

表三、篩選自嬰幼兒糞便之 16 種乳酸菌特性

Number	Name	Catalase test	Milk-curdling test	Gram stain	Adhesion(counts/cell)
B1-7	<i>Weissella sp.</i>	(-)	(+)	(+)	39.5±2.9 ^a
B2-1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(-)	(+)	(+)	28.7±2.8 ^b
B2-2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(-)	(+)	(+)	8.9±1.0 ^e
B2-3	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(-)	(+)	(+)	27.0±2.7 ^b
B3-1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(-)	(+)	(+)	19.8±2.7 ^d
B3-4	<i>Lactobacillus fermentum</i>	(-)	(+)	(+)	23±2.4 ^c
B3-5	<i>Weissella sp.</i>	(-)	(+)	(+)	7.9±1.5 ^{ef}
B3-6	<i>Weissella sp.</i>	(-)	(+)	(+)	3.5±0.7 ^{ghi}
B3-7	<i>Weissella sp.</i>	(-)	(+)	(+)	3.7±1.5 ^{ghi}
B4-1	<i>Weissella sp.</i>	(-)	(+)	(+)	3.0±1.0 ^{hi}
B4-4	<i>Weissella sp.</i>	(-)	(+)	(+)	5.6±1.0 ^{fgh}
B4-5	<i>Weissella sp.</i>	(-)	(+)	(+)	2.5±0.7 ⁱ
B4-6	<i>Weissella sp.</i>	(-)	(+)	(+)	26.7±2.2 ^b
B4-7	<i>Weissella sp.</i>	(-)	(+)	(+)	5.7±1.5 ^{fgh}
B4-8	<i>Weissella sp.</i>	(-)	(+)	(+)	6.0±0.8 ^{fg}
B10-7	<i>Weissella sp.</i>	(-)	(+)	(+)	5.9±1.8 ^{fgh}

表四、經酸(pH 2.0)處理後膽鹽對乳酸菌(發酵食品)之生長影響

Number	Acid tolerance			Bile salt tolerance		
	0hr	1.5hr	3hr	0hr	1.5hr	3hr
F1-3	9.1±0.1 ^{bc}	8.5±0.1 ^c	8.0±0.0 ^c	10.2±0.0 ^a	9.3±0.0 ^b	9.3±0.0 ^b
F2-2	8.1±0.1 ^c	6.5±0.2 ^c	6.5±0.5 ^c	9.8±0.0 ^a	9.5±0.1 ^b	9.4±0.0 ^b
F3-1	6.7±0.2 ^{ab}	6.5±0.1 ^b	6.6±0.0 ^b	7.1±0.2 ^a	6.8±0.1 ^{ab}	6.7±0.2 ^{ab}
F3-2	6.8±0.1 ^b	6.4±0.1 ^c	6.2±0.2 ^c	7.6±0.0 ^a	6.7±0.2 ^{bc}	6.5±0.2 ^{bc}
F3-3	6.6±0.3 ^d	6.5±0.3 ^d	6.3±0.3 ^d	8.2±0.0 ^a	8.1±0.0 ^b	8.0±0.1 ^c
F7-1	7.5±0.2 ^c	6.7±0.3 ^c	6.4±0.1 ^c	8.8±0.0 ^b	8.9±0.0 ^a	8.8±0.04 ^b
F7-3	7.9±0.1 ^c	6.9±0.3 ^c	6.4±0.1 ^c	9.4±0.0 ^a	9.3±0.0 ^b	9.2±0.2 ^b
F7-4	7.7±0.1 ^c	6.4±0.4 ^c	6.4±0.1 ^c	9.4±0.1 ^b	9.5±0.0 ^{ab}	9.6±0.1 ^a
F8-1	7.3±0.1 ^a	6.7±0.1 ^{bc}	6.2±0.2 ^c	7.0±0.1 ^{abc}	7.2±0.4 ^{ab}	6.8±0.1 ^{bc}
F8-2	6.6±0.1 ^b	6.7±0.4 ^b	6.4±0.1 ^b	9.5±0.1 ^a	9.5±0.0 ^a	9.5±0.0 ^a
F8-4	7.4±0.1 ^c	6.7±0.2 ^c	6.5±0.6 ^c	9.3±0.1 ^a	9.3±0.0 ^a	9.1±0.0 ^b
F8-6	7.7±0.2 ^d	6.6±0.0 ^d	6.4±0.1 ^d	8.7±0.1 ^a	8.5±0.0 ^b	8.3±0.0 ^c
F9-1	7.3±0.1 ^d	6.7±0.0 ^d	6.4±0.1 ^d	9.1±0.1 ^a	8.6±0.0 ^b	8.4±0.0 ^c
F9-2	7.4±0.4 ^{cd}	6.3±0.3 ^d	6.2±0.2 ^d	8.1±0.1 ^c	8.4±0.1 ^b	8.8±0.0 ^a
F9-3	6.7±0.1 ^b	6.6±0.3 ^b	6.4±0.4 ^b	8.1±0.1 ^a	8.0±0.0 ^a	8.1±0.0 ^a
F9-4	6.5±0.5 ^c	6.5±0.2 ^c	6.3±0.3 ^c	8.7±0.0 ^a	8.8±0.1 ^a	8.6±0.0 ^b
F11-1	10.2±0.1 ^a	10.1±0.0 ^b	9.6±0.1 ^c	9.3±0.0 ^d	9.6±0.0 ^c	9.3±0.0 ^d

表五、經酸(pH 2.0)處理後膽鹽對乳酸菌(蔬菜)之生長影響

Number	Acid tolerance			Bile salt tolerance		
	0hr	1.5hr	3hr	0hr	1.5hr	3hr
D1-1	9.6±0.0 ^a	8.1±0.0 ^c	7.8±0.0 ^c	9.6±0.1 ^a	9.4±0.0 ^b	9.5±0.1 ^a
E1-1	7.2±0.2 ^{abc}	7.5±0.2 ^{ab}	7.6±0.2 ^a	7.6±0.2 ^a	6.5±0.1 ^{cb}	6.2±0.2 ^c
E2-1	8.7±0.1 ^a	6.3±0.3 ^b	6.2±0.2 ^b	6.2±0.2 ^{ab}	6.4±0.1 ^b	6.2±0.2 ^b
E2-3	5.4±0.1 ^a	5.2±0.2 ^a	5.0±0.0 ^a	5.5±0.3 ^a	5.5±0.3 ^a	5.6±0.3 ^a
G1-3	6.5±0.5 ^b	5.4±0.1 ^b	5.2±0.2 ^b	9.0±0.0 ^a	9.1±0.2 ^a	8.9±0.1 ^a
H1-1	6.5±0.6 ^a	5.7±0.1 ^a	5.2±0.2 ^a	6.3±0.1 ^a	6.6±0.0 ^a	6.4±0.1 ^a
H1-2	6.9±0.1 ^d	5.5±0.5 ^d	5.2±0.2 ^d	9.4±0.0 ^c	9.5±0.0 ^b	9.6±0.0 ^a
H1-4	7.7±0.7 ^a	5.4±0.1 ^b	4.2±0.2 ^b	7.7±0.0 ^a	7.5±0.0 ^{ab}	6.5±0.1 ^{ab}
H1-5	7.5±0.5 ^b	5.2±0.2 ^b	4.2±0.2 ^b	8.5±0.3 ^a	8.5±0.2 ^a	8.0±0.0 ^a
H2-1	7.3±0.3 ^a	5.2±0.2 ^b	4.8±0.1 ^b	5.7±0.4 ^b	5.5±0.6 ^b	5.3±0.3 ^b
J1-1	5.5±0.5 ^b	4.6±0.2 ^b	4.2±0.2 ^b	8.5±0.2 ^a	8.4±0.2 ^a	8.1±0.5 ^{ab}
J1-2	8.5±0.1 ^c	8.3±0.0 ^c	8.3±0.2 ^c	8.3±0.0 ^c	9.0±0.0 ^b	9.6±0.1 ^a
J1-3	7.2±0.2 ^a	7.3±0.0 ^a	5.3±0.3 ^b	5.6±0.2 ^b	6.1±0.2 ^b	6.2±0.1 ^b
J1-4	7.2±0.2 ^a	5.3±0.3 ^c	5.2±0.2 ^b	5.5±0.3 ^b	5.7±0.1 ^b	5.7±0.4 ^b

小寫字母為各菌株存活菌數之顯著差異(p<0.05)

表六、經酸(pH 2.0)處理後膽鹽對乳酸菌(嬰幼兒糞便)之生長影響

Number	Acid tolerance			Bile salt tolerance		
	0hr	1.5hr	3hr	0hr	1.5hr	3hr
B1-7	6.9±0.1 ^c	6.2±0.2 ^c	6.3±0.0 ^c	9.0±0.0 ^a	8.8±0.0 ^b	6.4±0.1 ^c
B2-1	9.2±0.1 ^a	8.6±0.0 ^a	8.1±0.0 ^a	9.6±0.1 ^a	9.2±0.0 ^a	8.9±0.1 ^a
B2-2	6.4±0.1 ^a	6.2±0.2 ^a	6.2±0.2 ^a	6.5±0.3 ^a	6.3±0.3 ^a	6.3±0.3 ^a
B2-3	10.2±0.0 ^a	8.8±0.1 ^b	7.5±0.0 ^b	8.6±0.1 ^b	8.1±0.1 ^b	8.2±0.0 ^b
B3-1	7.9±0.0 ^c	7.0±0.1 ^c	6.2±0.2 ^c	9.1±0.0 ^a	8.9±0.0 ^b	8.9±0.1 ^b
B3-4	9.2±0.0 ^{ab}	8.5±0.0 ^c	7.9±0.0 ^c	9.8±0.0 ^a	9.1±0.0 ^b	9.1±0.0 ^b
B3-5	6.5±0.2 ^b	6.3±0.3 ^b	6.2±0.2 ^b	8.5±0.0 ^a	6.7±0.1 ^b	6.5±0.2 ^b
B3-6	8.5±0.2 ^b	6.4±0.1 ^c	6.2±0.2 ^c	9.2±0.1 ^a	8.6±0.0 ^b	8.4±0.1 ^b
B3-7	10.3±0.0 ^a	7.4±0.1 ^b	6.6±0.2 ^b	9.2±0.0 ^b	8.6±0.1 ^b	7.9±0.6 ^b
B4-1	8.8±0.1 ^b	8.7±0.0 ^b	8.7±0.1 ^b	8.71±0.1 ^b	8.8±0.1 ^b	9.3±0.1 ^a
B4-4	9.8±0.1 ^a	8.8±0.1 ^c	8.7±0.1 ^c	8.5±0.0 ^c	8.9±0.1 ^c	9.4±0.0 ^b
B4-5	9.5±0.1 ^a	8.9±0.0 ^b	6.6±0.2 ^c	6.4±0.1 ^c	6.2±0.2 ^c	6.1±0.2 ^c
B4-6	9.4±0.0 ^a	8.4±0.4 ^{bc}	7.2±0.2 ^c	8.6±0.2 ^b	8.2±0.0 ^{bc}	8.2±0.1 ^c
B4-7	8.1±0.1 ^a	7.7±0.1 ^b	7.2±0.2 ^c	6.9±0.2 ^c	6.7±0.3 ^c	6.6±0.4 ^c
B4-8	6.2±0.2 ^b	5.3±0.3 ^b	4.2±0.2 ^b	8.1±0.0 ^a	5.4±0.1 ^b	5.3±0.3 ^b
B10-7	7.4±0.4 ^{ab}	6.8±0.1 ^b	6.4±0.1 ^b	7.7±0.2 ^a	7.7±0.1 ^a	6.7±0.1 ^b

小寫字母為各菌株存活菌數之顯著差異(p<0.05)

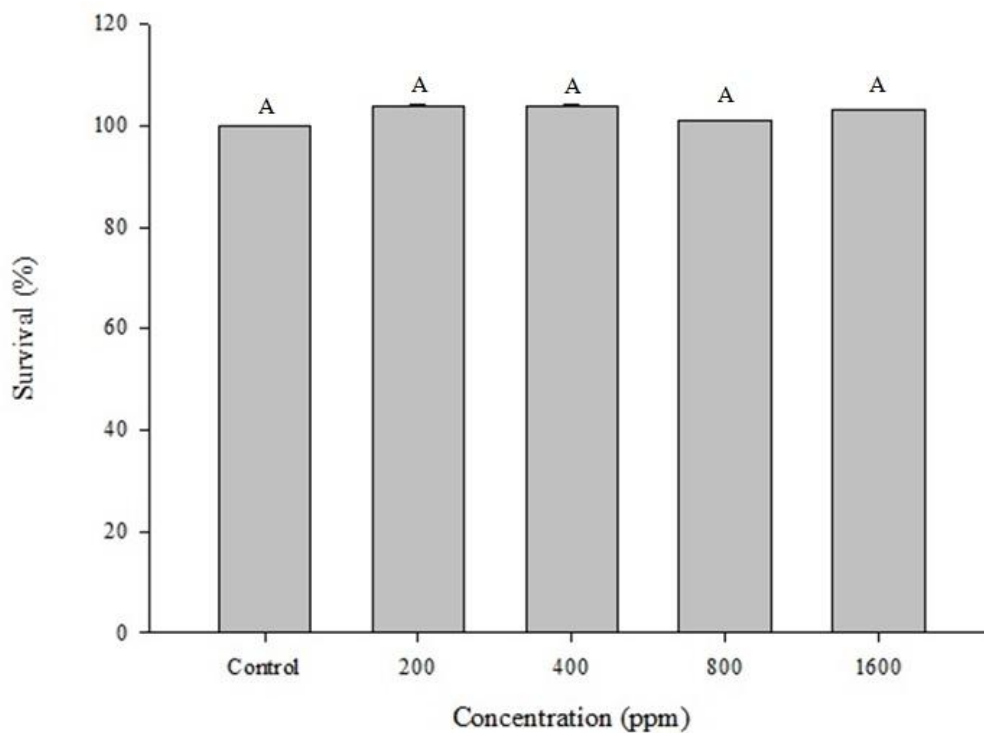
表七、乳酸菌培養液對 α -amylase 及 α -glucosidase 之抑制能力測定

Number	inhibition		Number	inhibition		Number	inhibition	
	α -glucosidase	α -amylase		α -glucosidase	α -amylase		α -glucosidase	α -amylase
F1-3	42%	-36%	F11-1	43%	-35%	B 2-1	48%	-3%
F2-2	70%	-5%	D1-1	56%	-52%	B 2-2	66%	-83%
F3-1	46%	-41%	E1-1	52%	-38%	B 2-3	42%	-31%
F3-2	68%	-48%	E2-1	66%	-70%	B 3-1	47%	-40%
F3-3	40%	-45%	E2-3	44%	-47%	B 3-4	47%	-29%
F7-1	8%	-37%	G1-3	42%	-48%	B 3-5	60%	-5%
F7-3	79%	-47%	H1-1	46%	-35%	B 3-6	48%	-33%
F7-4	64%	-50%	H1-2	64%	-54%	B 3-7	51%	-22%
F8-1	73%	-43%	H1-4	85%	-37%	B 4-1	67%	-28%
F8-2	89%	-47%	H1-5	43%	-27%	B 4-4	69%	-64%
F8-4	91%	-49%	H2-1	90%	-33%	B 4-5	57%	-36%
F8-6	88%	-46%	J1-1	34%	-39%	B 4-6	57%	-22%
F9-1	37%	-37%	J1-2	61%	-53%	B 4-7	59%	-23%
F9-2	32%	-35%	J1-3	74%	-39%	B 4-8	66%	-57%
F9-3	42%	-46%	J1-4	73%	-43%	B 10-6	65%	-19%
F9-4	60%	-24%	B1-7	55%	-30%	B 10-7	73%	-34%

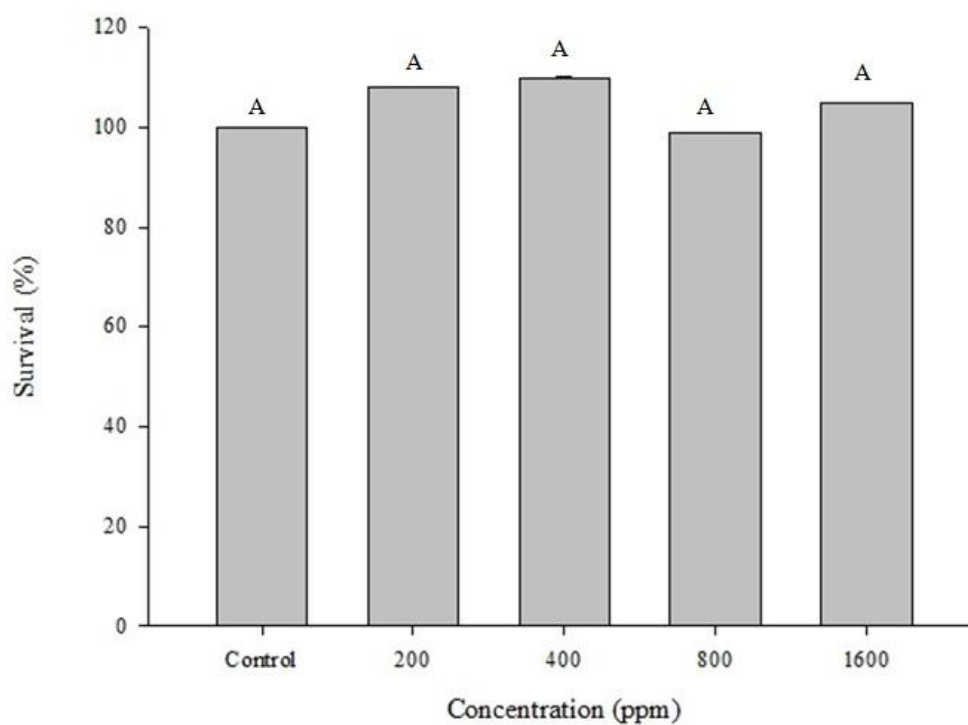
表八、一般培養條件下乳酸菌培養液之殘糖量

Number	Residual suger (mg/mL)	Number	Residual suger (mg/mL)
MRS	5.87±0.42	F8-6	6.87±0.11
F2-2	10.88±2.06	H1-4	7.14±0.4
F7-3	7.62±0.48	J1-3	7.2±0.31
F7-4	7.76±0.84	J1-4	6.8±0.24
F8-2	8.12±0.82	B10-7	6.85±0.25

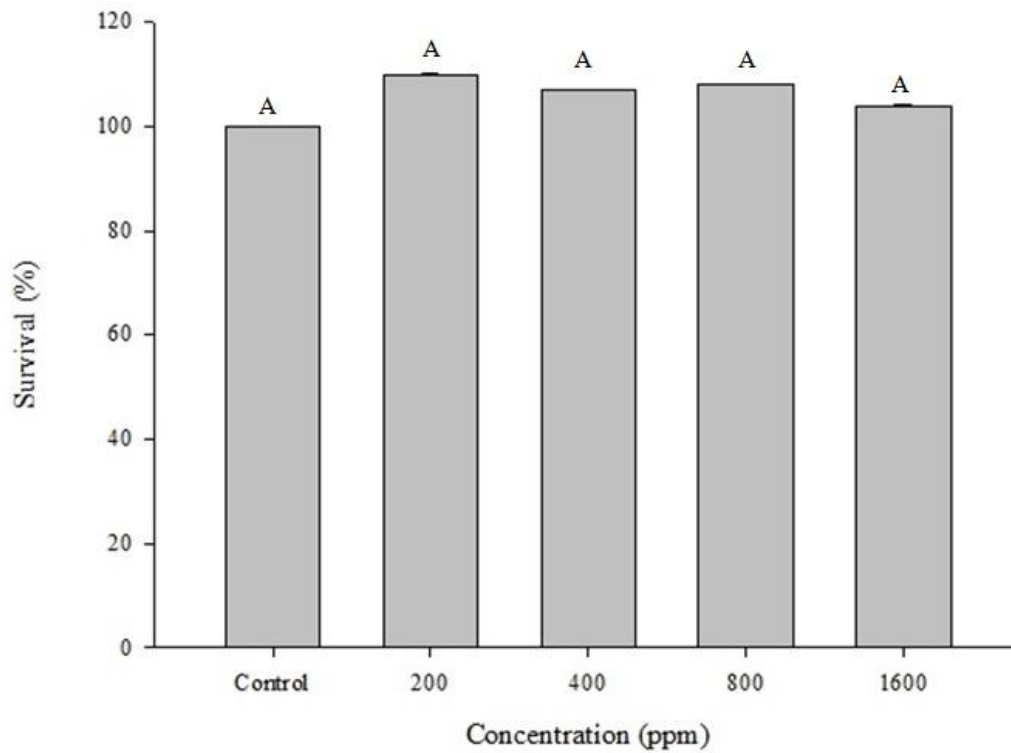




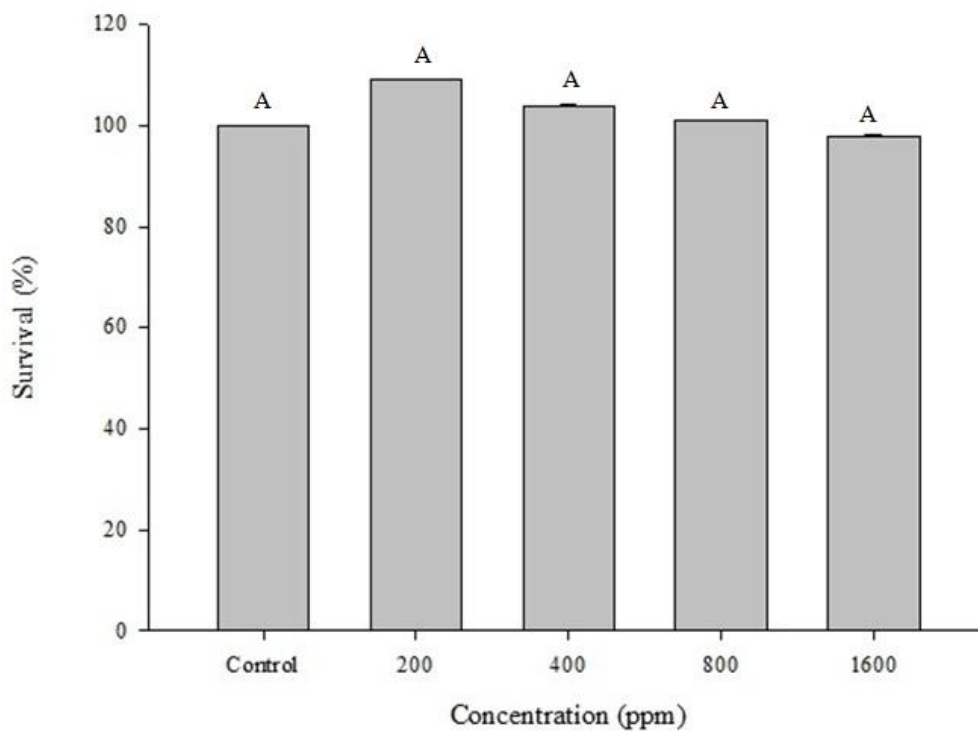
圖一、FL83B 肝細胞與 F2-2 培養液共置下之增生活性
大寫字母代表各統計分群。無相同字母組間具顯著差異($p < 0.05$)。



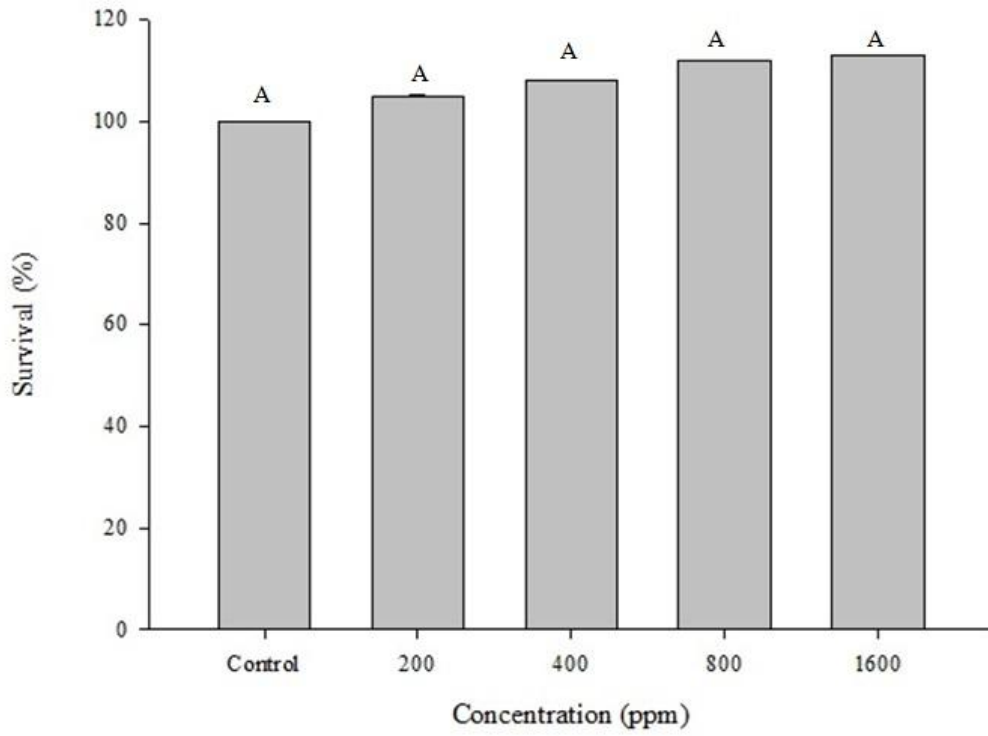
圖二、FL83B 肝細胞與 F7-3 培養液共置下之增生活性
大寫字母代表各統計分群。無相同字母組間具顯著差異($p < 0.05$)。



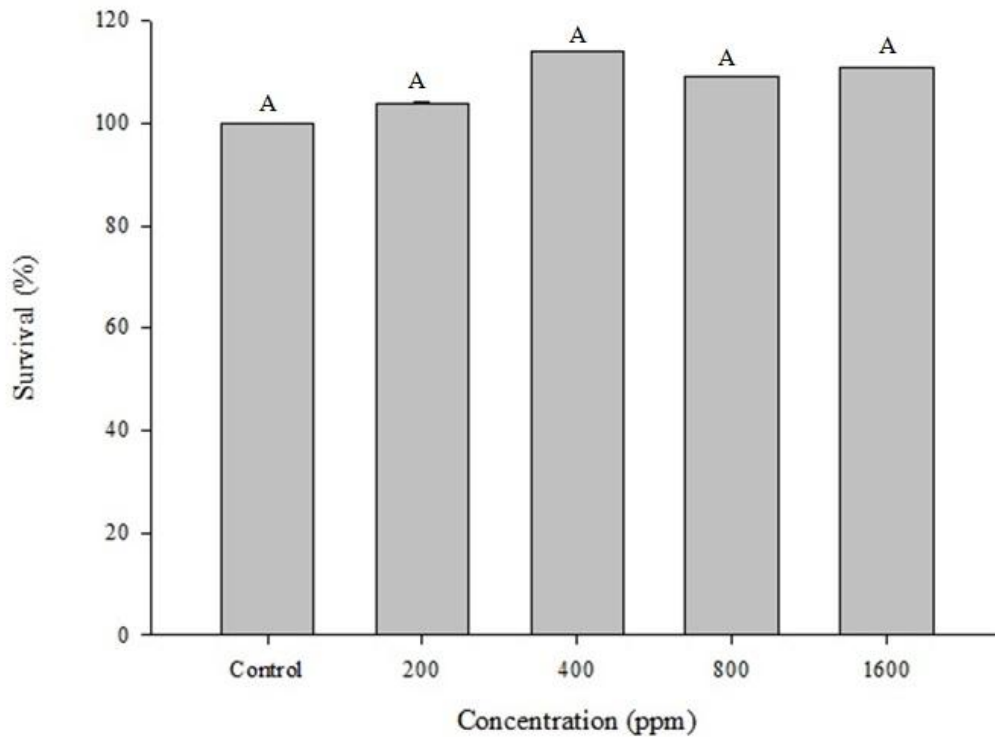
圖三、FL83B 肝細胞與 F7-4 培養液共置下之增生活性
大寫字母代表各統計分群。無相同字母組間具顯著差異($p < 0.05$)。



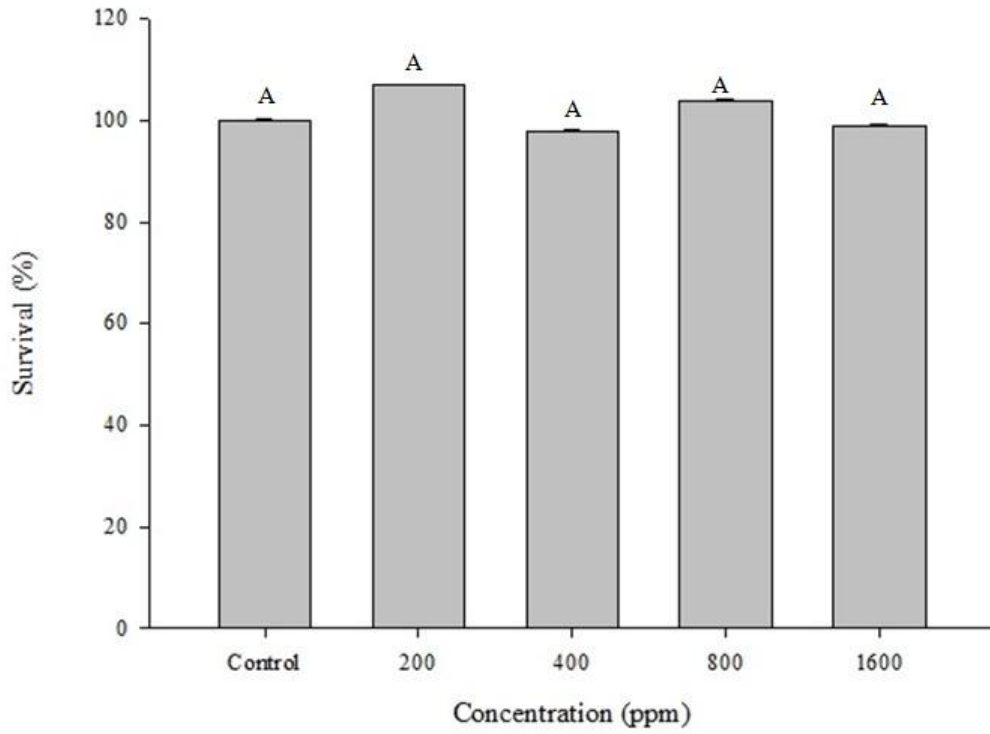
圖四、FL83B 肝細胞與 F8-2 培養液共置下之增生活性
大寫字母代表各統計分群。無相同字母組間具顯著差異($p < 0.05$)。



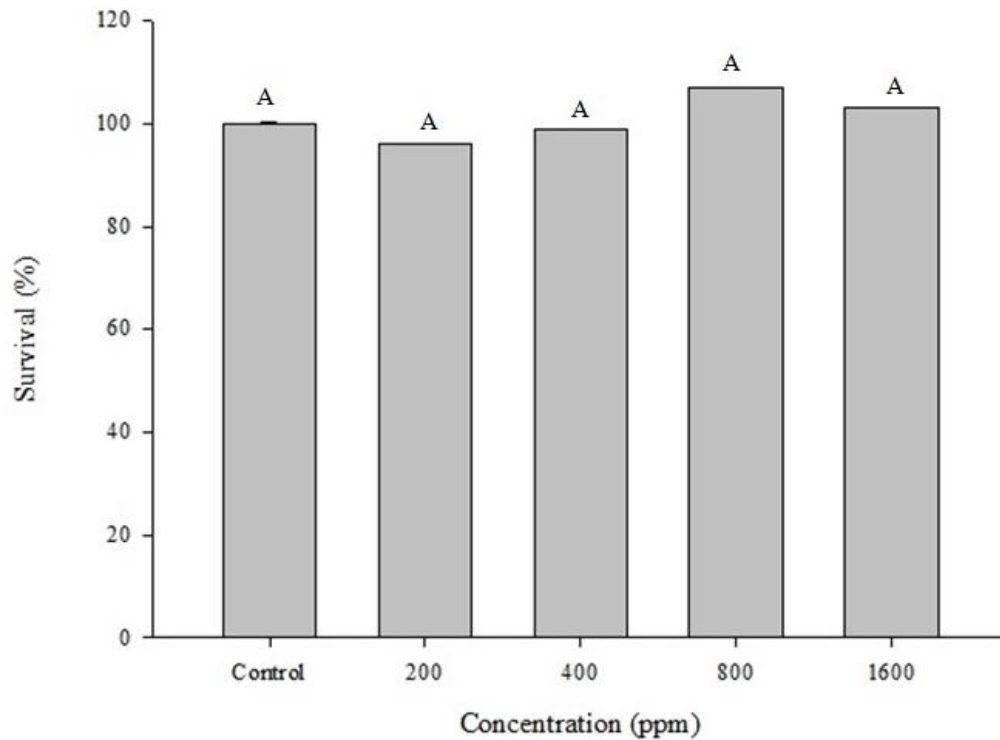
圖五、FL83B 肝細胞與 F8-6 培養液共置下之增生活性
大寫字母代表各統計分群。無相同字母組間具顯著差異($p < 0.05$)。



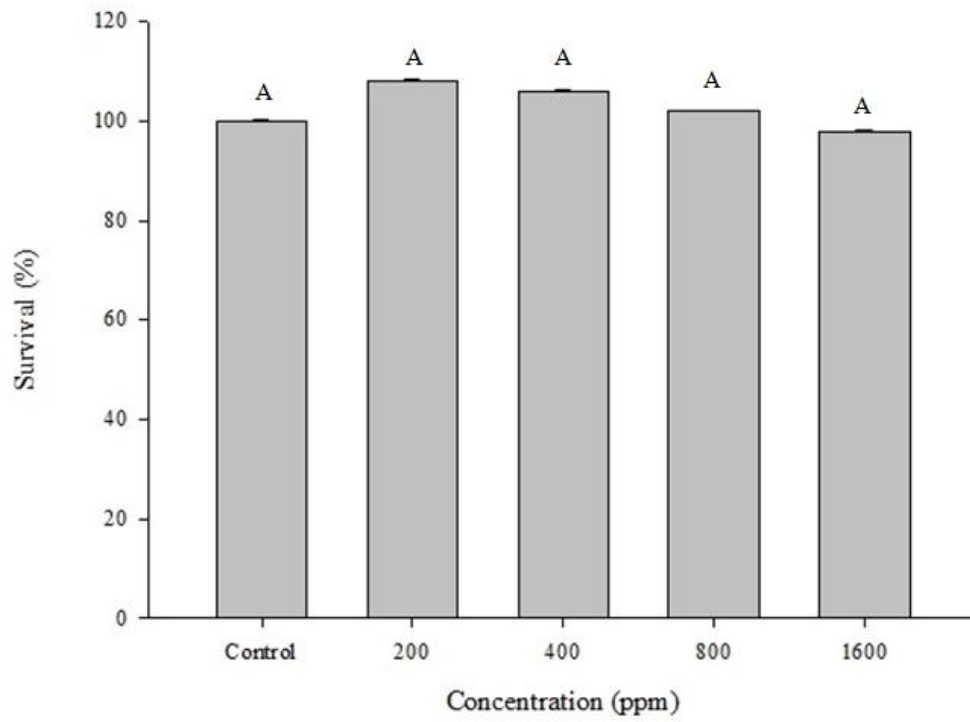
圖六、FL83B 肝細胞與 H1-4 培養液共置下之增生活性
大寫字母代表各統計分群。無相同字母組間具顯著差異($p < 0.05$)。



圖七、FL83B 肝細胞與 J1-3 培養液共置下之增生活性
大寫字母代表各統計分群。無相同字母組間具顯著差異($p < 0.05$)。

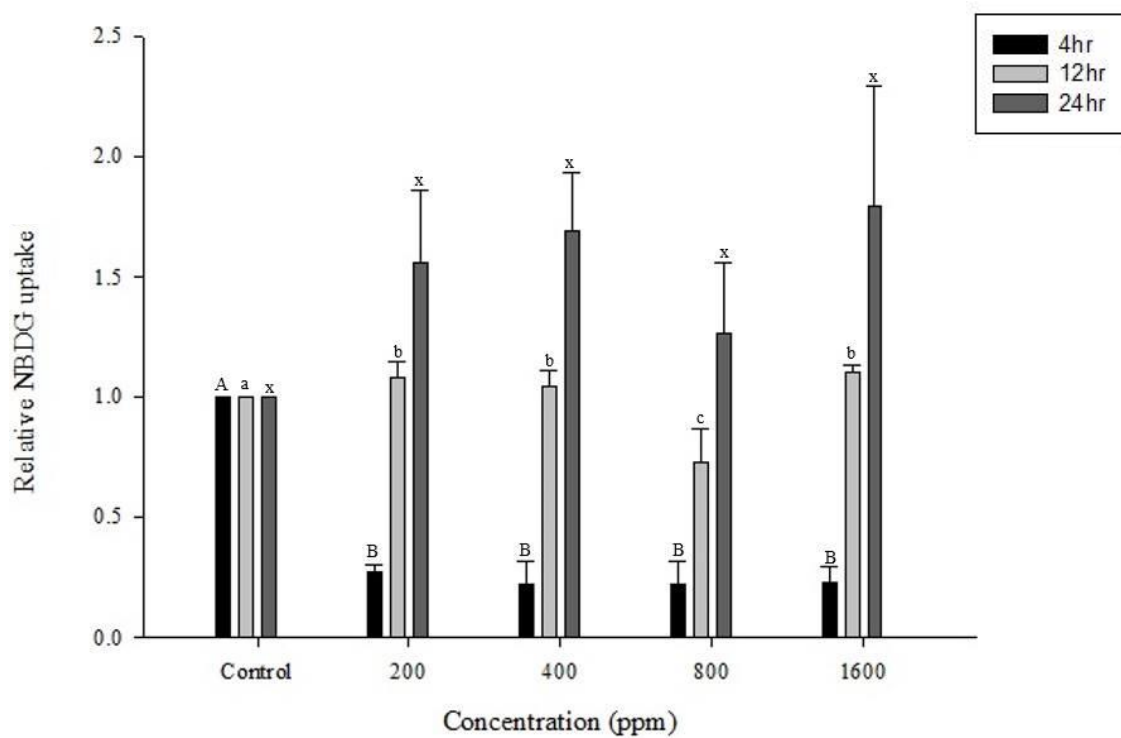


圖八、FL83B 肝細胞與 J1-4 培養液共置下之增生活性
大寫字母代表各統計分群。無相同字母組間具顯著差異($p < 0.05$)。

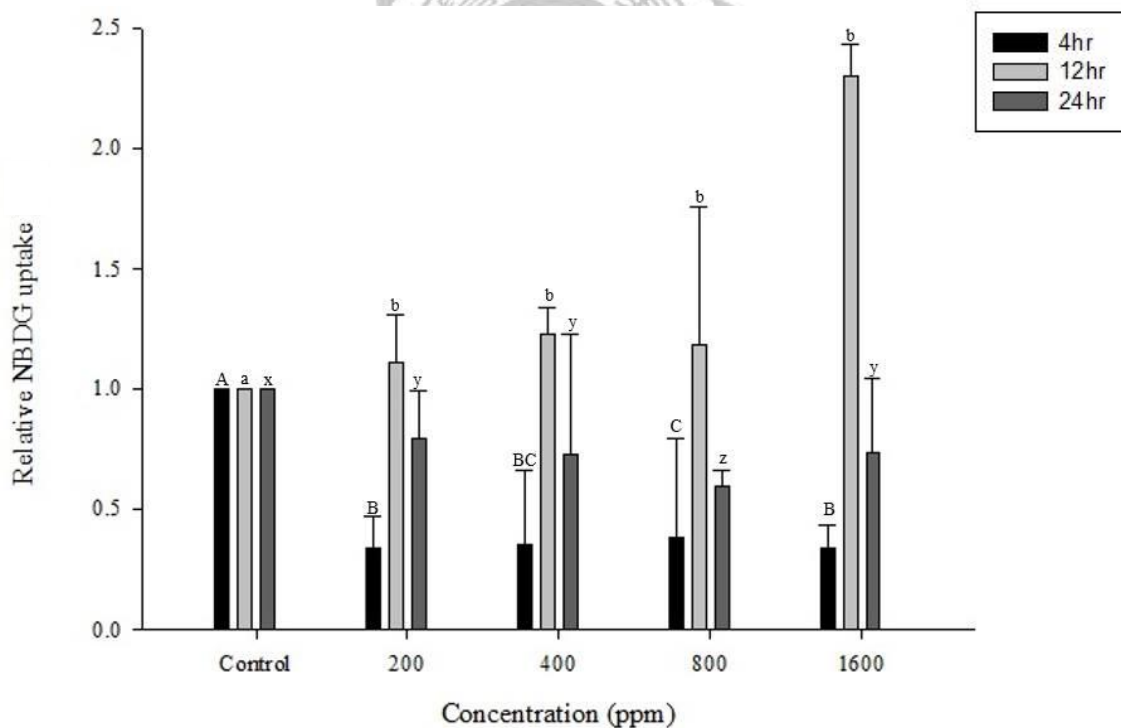


圖九、FL83B 肝細胞與 B10-7 培養液共置下之增生活性
大寫字母代表各統計分群。無相同字母組間具顯著差異($p < 0.05$)。



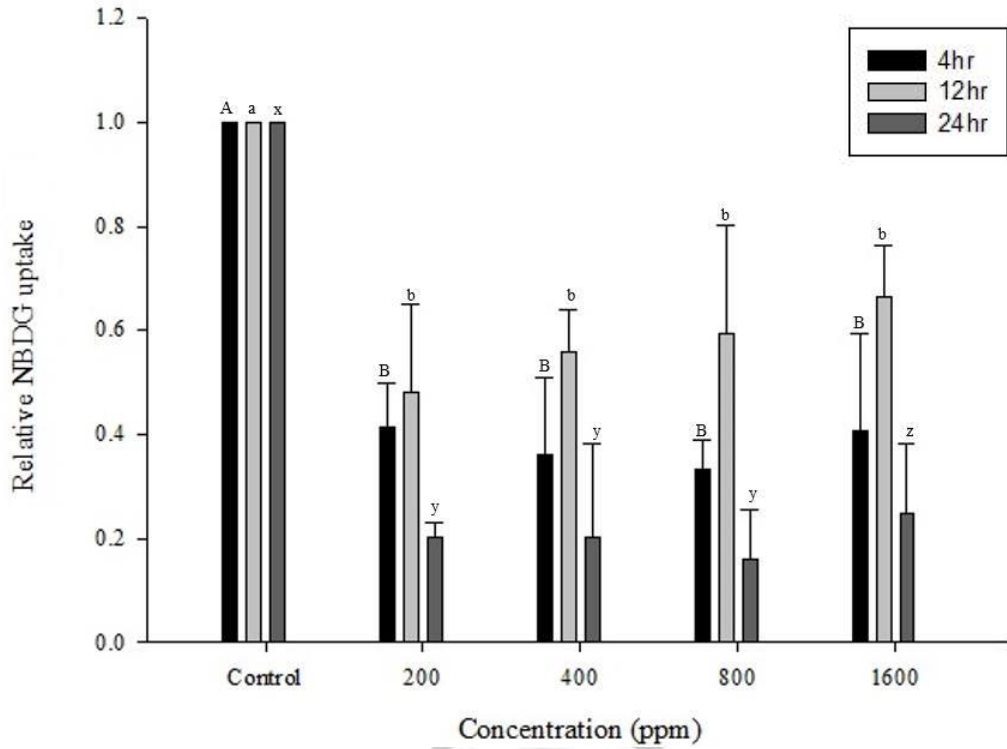


圖十、正常態 FL83B 肝細胞與 F2-2 培養液共置下之葡萄糖擬似物帶入量

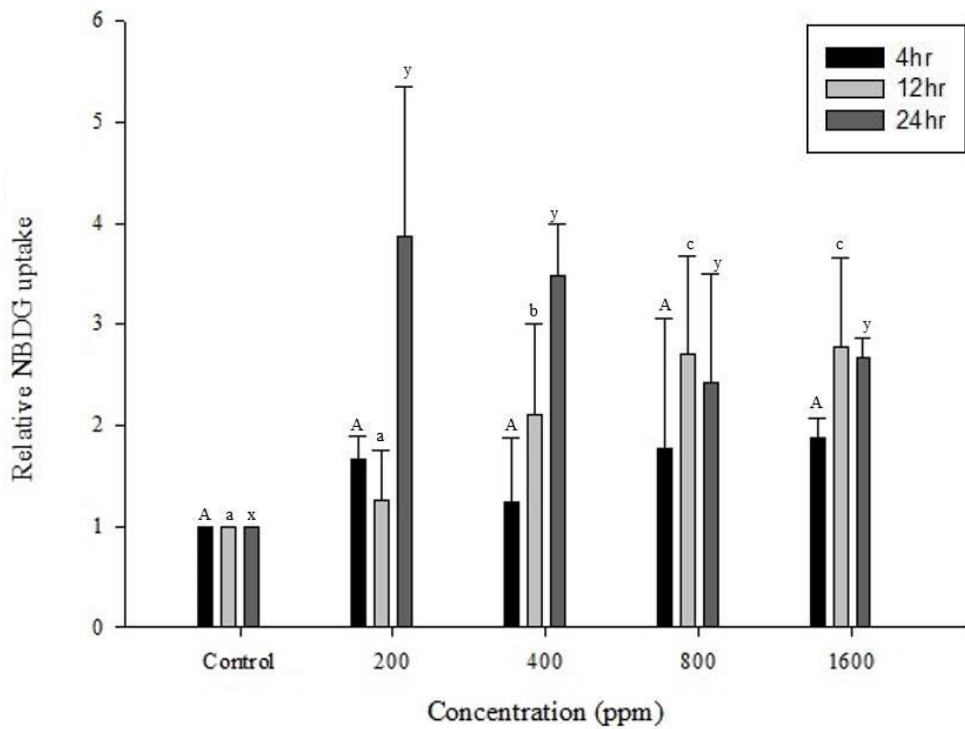


圖十一、阻抗態 FL83B 肝細胞與 F2-2 培養液共置下之葡萄糖擬似物帶入量

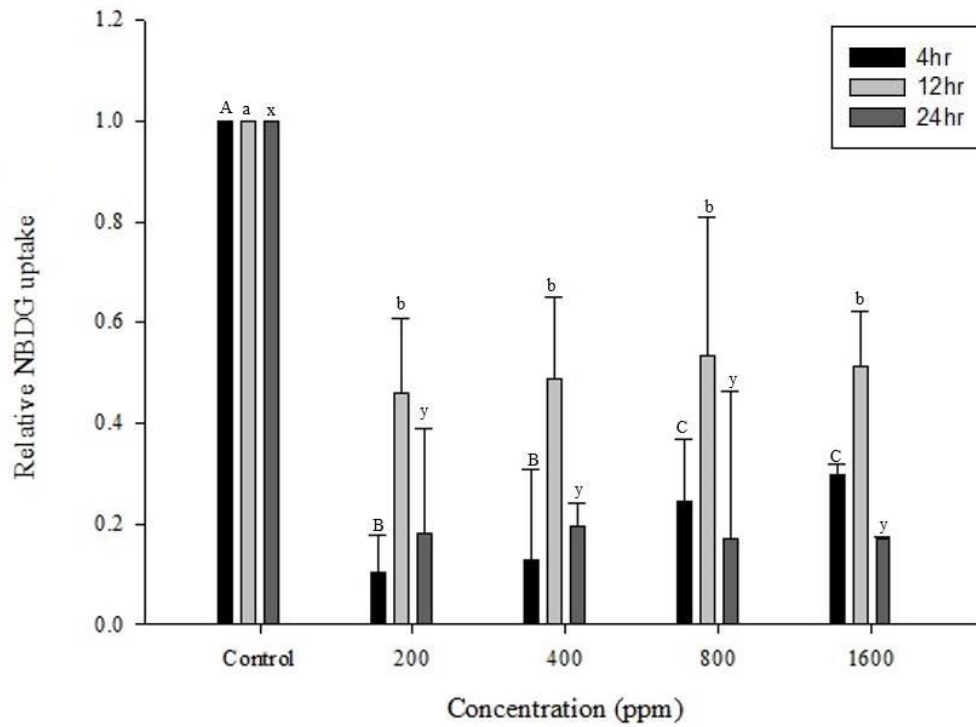
大寫字母表示與不同濃度樣品與細胞共置 4 小時之對照有顯著差異($p < 0.05$)。小寫字母表示與不同濃度樣品與細胞共置 12 小時之對照有顯著差異($p < 0.05$)。小寫 xyz 表示與不同濃度樣品與細胞共置 24 小時之對照有顯著差異($p < 0.05$)。



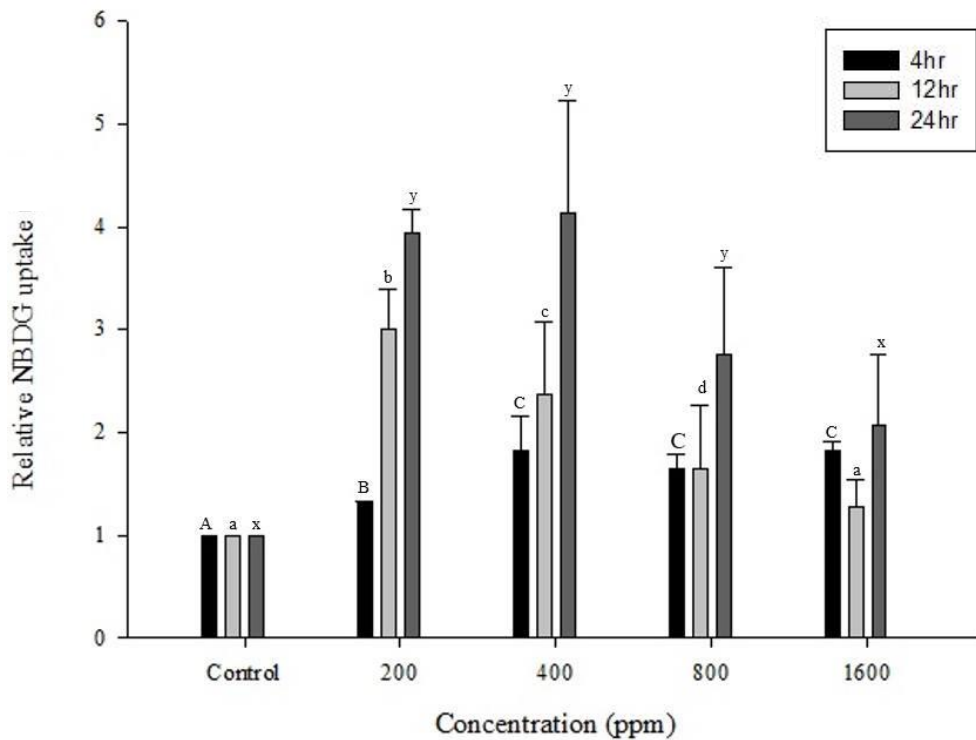
圖十二、正常態 FL83B 肝細胞與 F7-3 培養液共置下之葡萄糖擬似物帶入量



圖十三、阻抗態 FL83B 肝細胞與 F7-3 培養液共置下之葡萄糖擬似物帶入量
 大寫字母表示與不同濃度樣品與細胞共置 4 小時之對照有顯著差異($p < 0.05$)。小寫字母表示與不同濃度樣品與細胞共置 12 小時之對照有顯著差異($p < 0.05$)。小寫 xyz 表示與不同濃度樣品與細胞共置 24 小時之對照有顯著差異($p < 0.05$)。

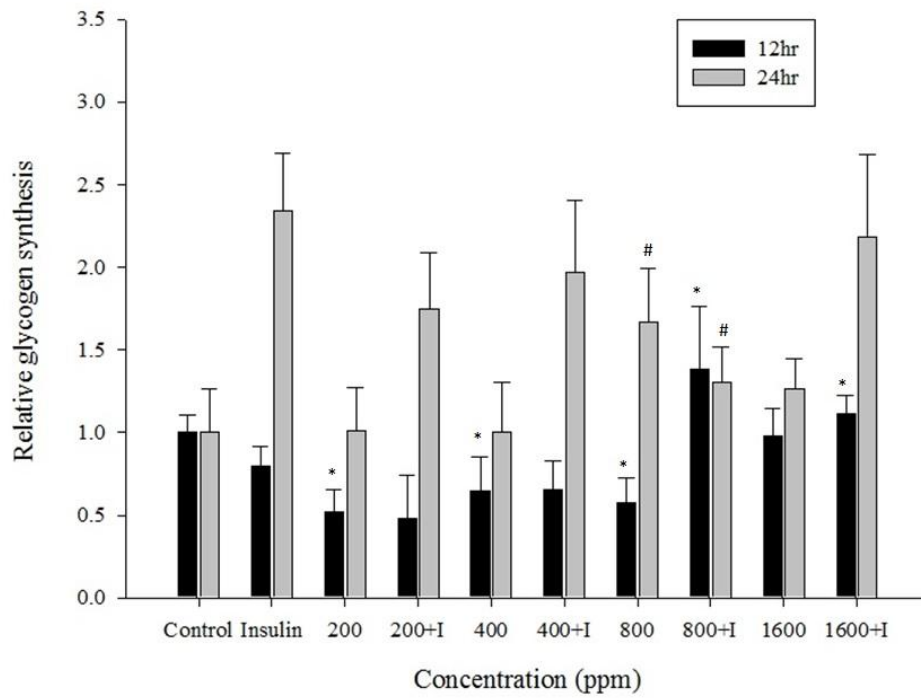


圖十四、正常態 FL83B 肝細胞與 F7-4 培養液共置下之葡萄糖擬似物帶入量

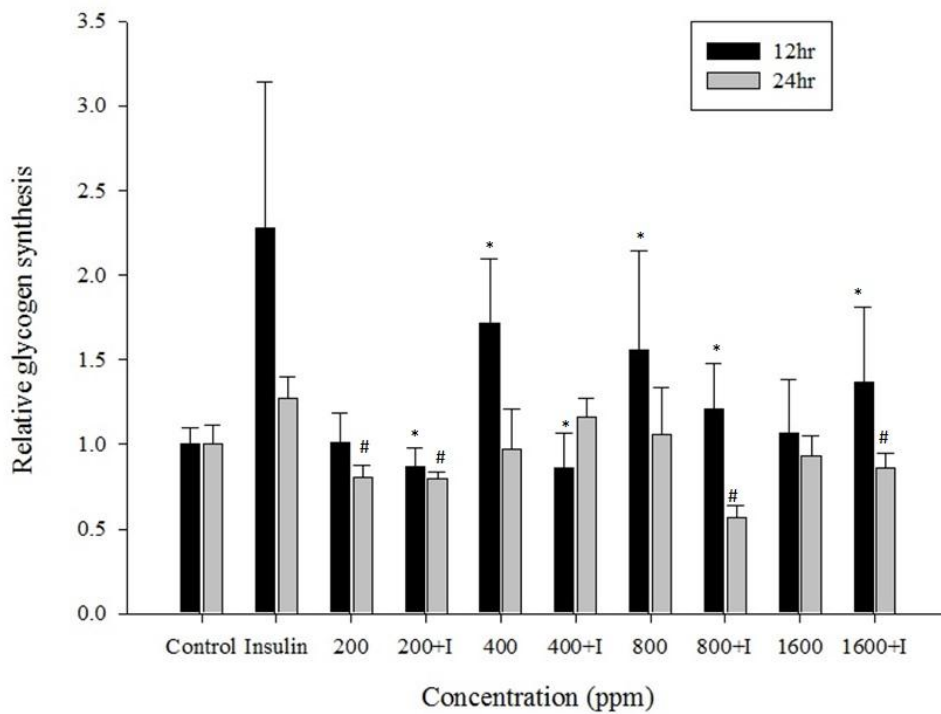


圖十五、阻抗態 FL83B 肝細胞與 F7-4 培養液共置下之葡萄糖擬似物帶入量

大寫字母表示與不同濃度樣品與細胞共置 4 小時之對照有顯著差異($p < 0.05$)。小寫字母表示與不同濃度樣品與細胞共置 12 小時之對照有顯著差異($p < 0.05$)。小寫 xyz 表示與不同濃度樣品與細胞共置 24 小時之對照有顯著差異($p < 0.05$)。

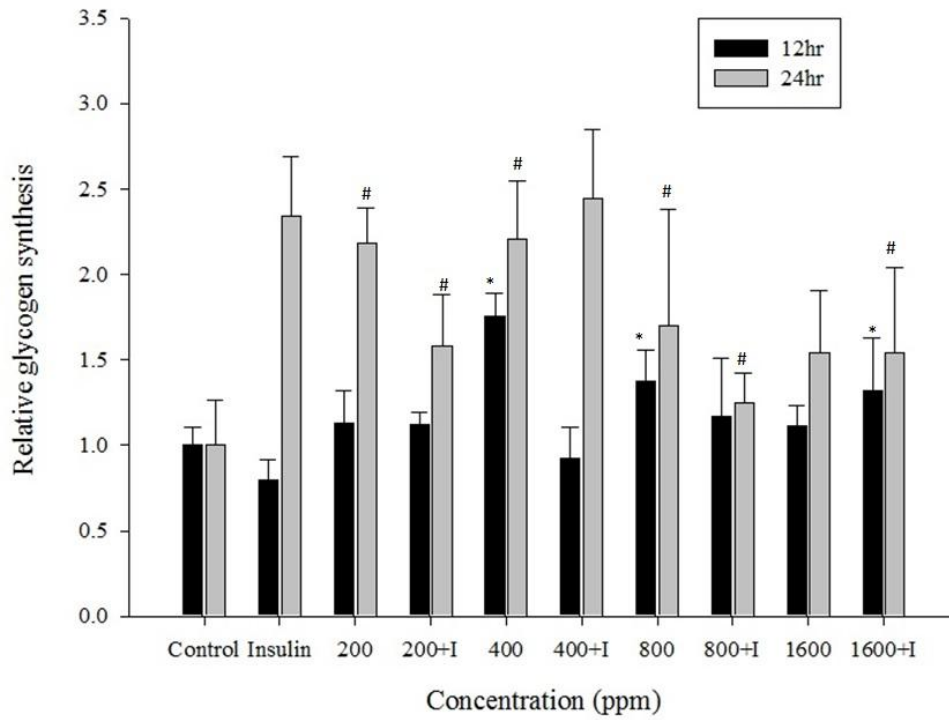


圖十六、正常態 FL83B 肝細胞與 F2-2 培養液共置下之肝醣合成量

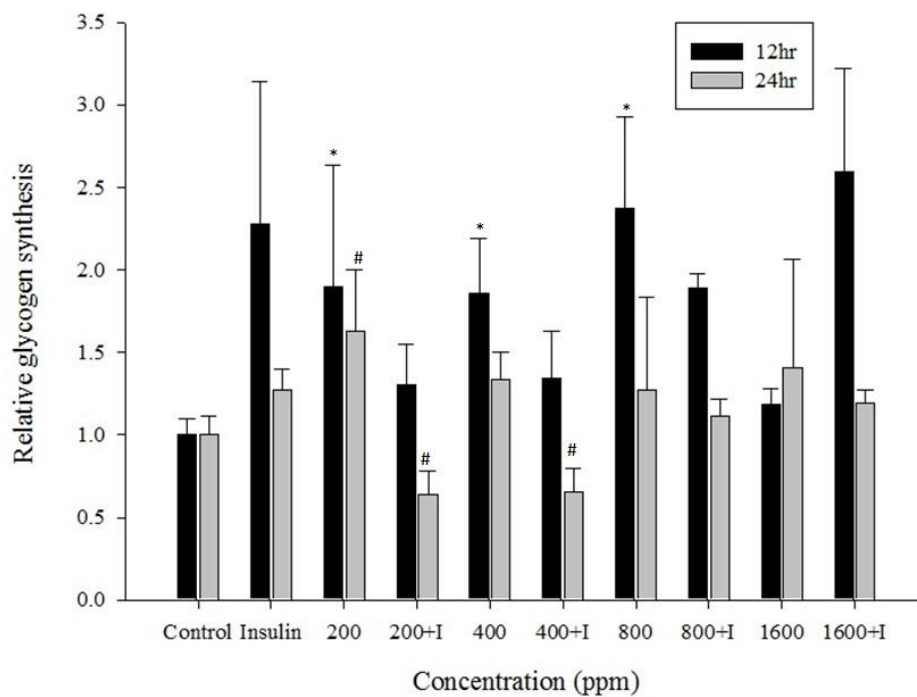


圖十七、阻抗態 FL83B 肝細胞與 F2-2 培養液共置下之肝醣合成量

*表示樣品細胞共置 12 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異($p < 0.05$)。#表示樣品細胞共置 24 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異($p < 0.05$)。

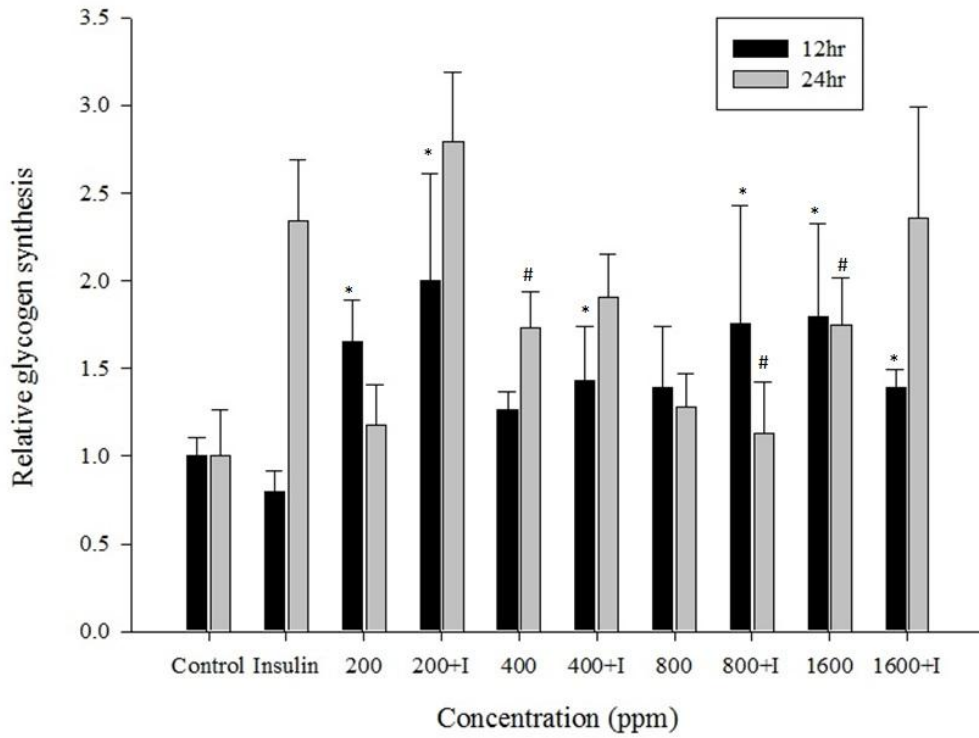


圖十八、正常態 FL83B 肝細胞與 F7-3 培養液共置下之肝醣合成量

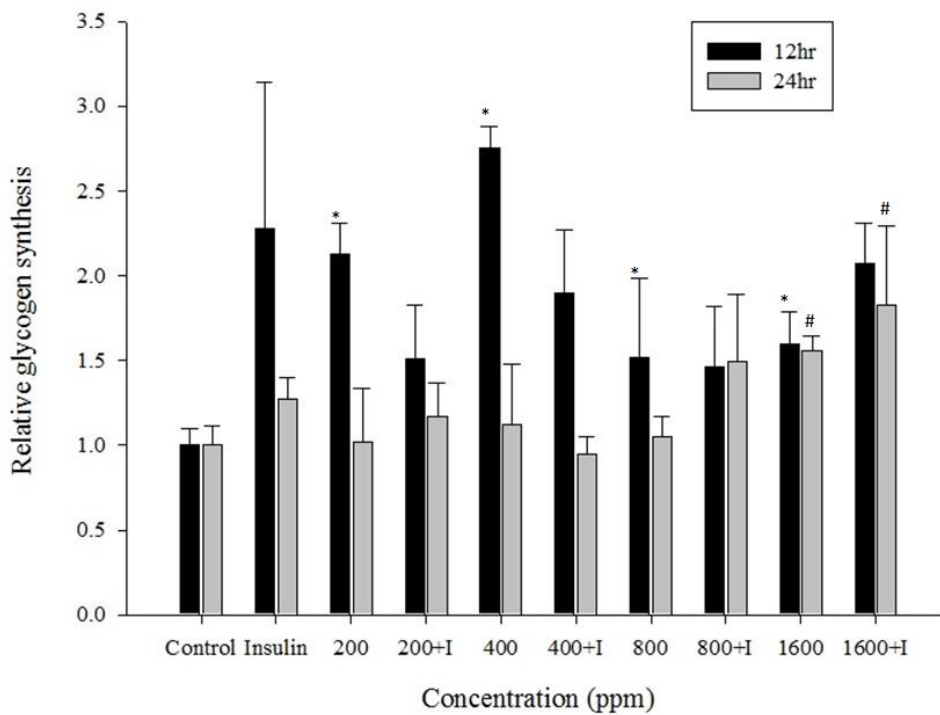


圖十九、阻抗態 FL83B 肝細胞與 F7-3 培養液共置下之肝醣合成量

*表示樣品細胞共置 12 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異($p < 0.05$)。#表示樣品細胞共置 24 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異($p < 0.05$)。



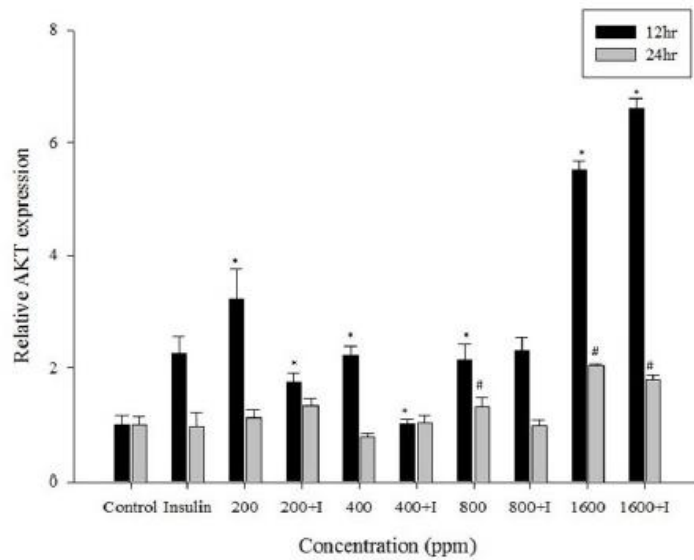
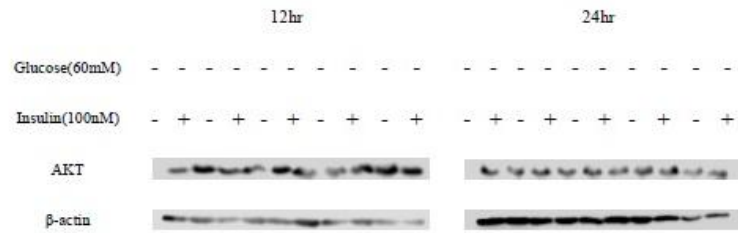
圖二十、正常態 FL83B 肝細胞與 F7-4 培養液共置下之肝醣合成量



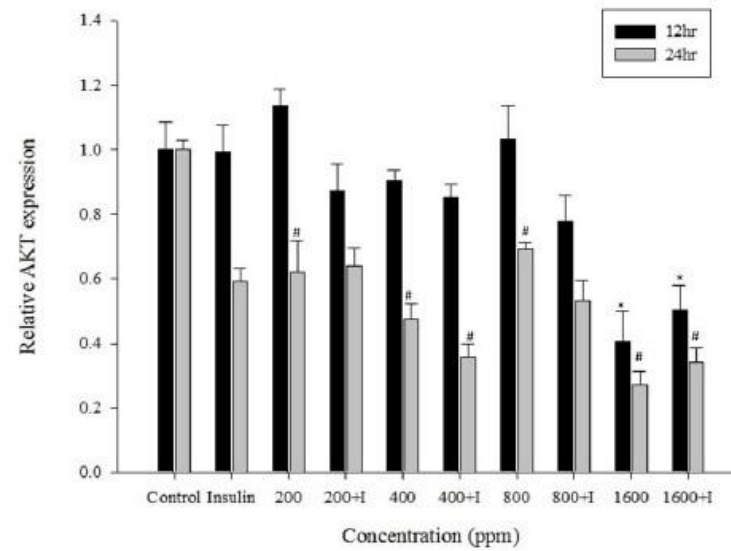
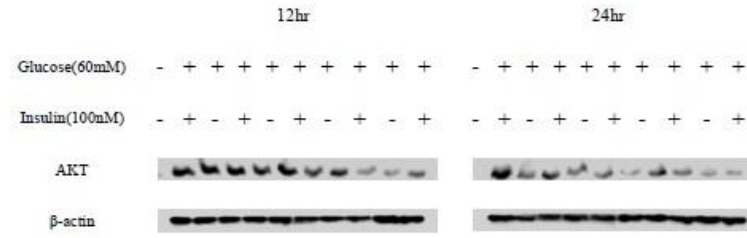
圖二十一、阻抗態 FL83B 肝細胞與 F7-4 培養液共置下之肝醣合成量

*表示樣品細胞共置 12 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異($p < 0.05$)。#表示樣品細胞共置 24 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異($p < 0.05$)。

(A)Normal



(B)Resistance

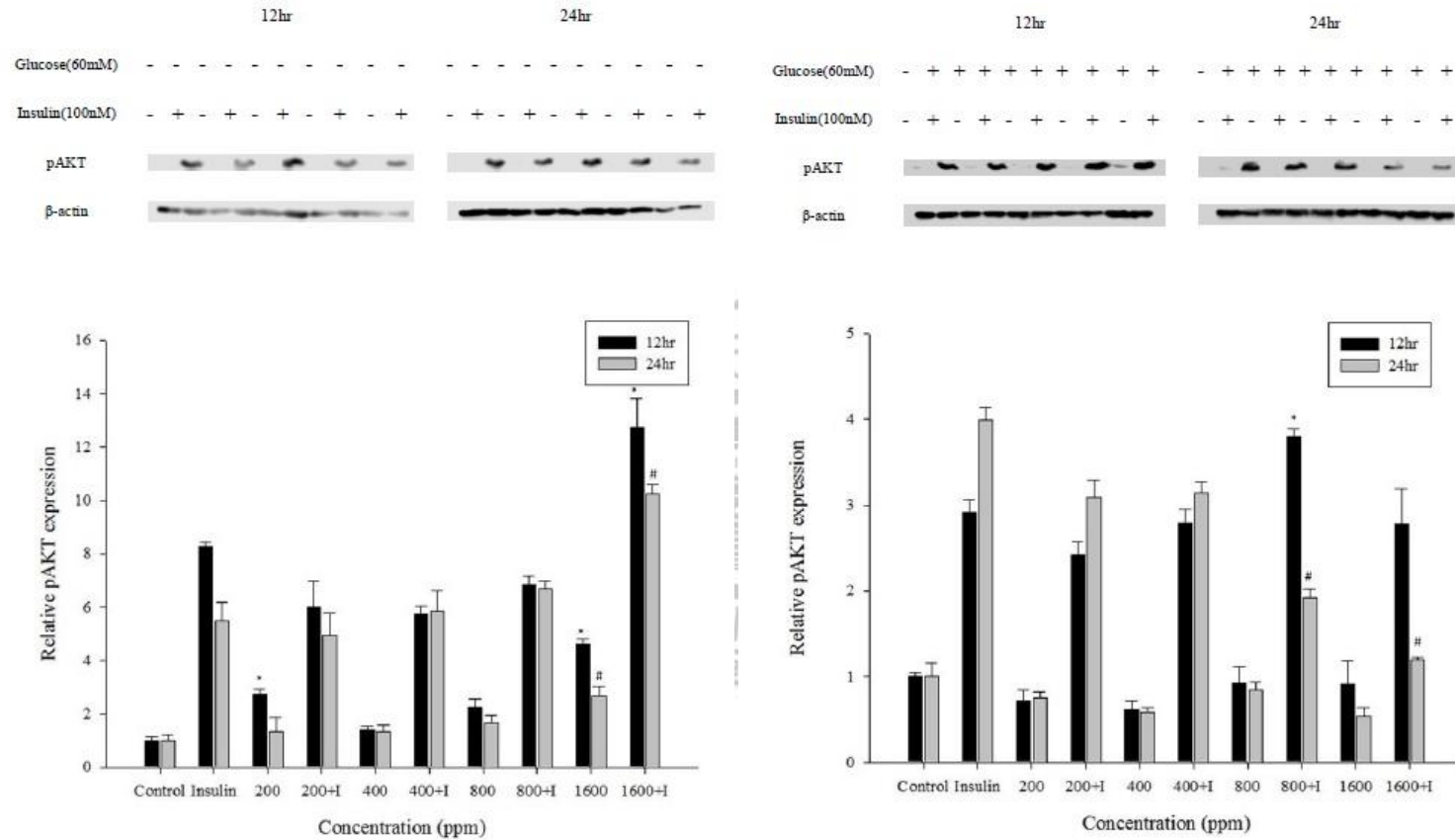


圖二十二、FL83B 肝細胞與 F2-2 培養液共置下之 AKT 蛋白質相對量

*表示樣品細胞共置 12 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異(p < 0.05)。#表示樣品細胞共置 24 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異(p < 0.05)。

(A) Normal

(B) Resistance

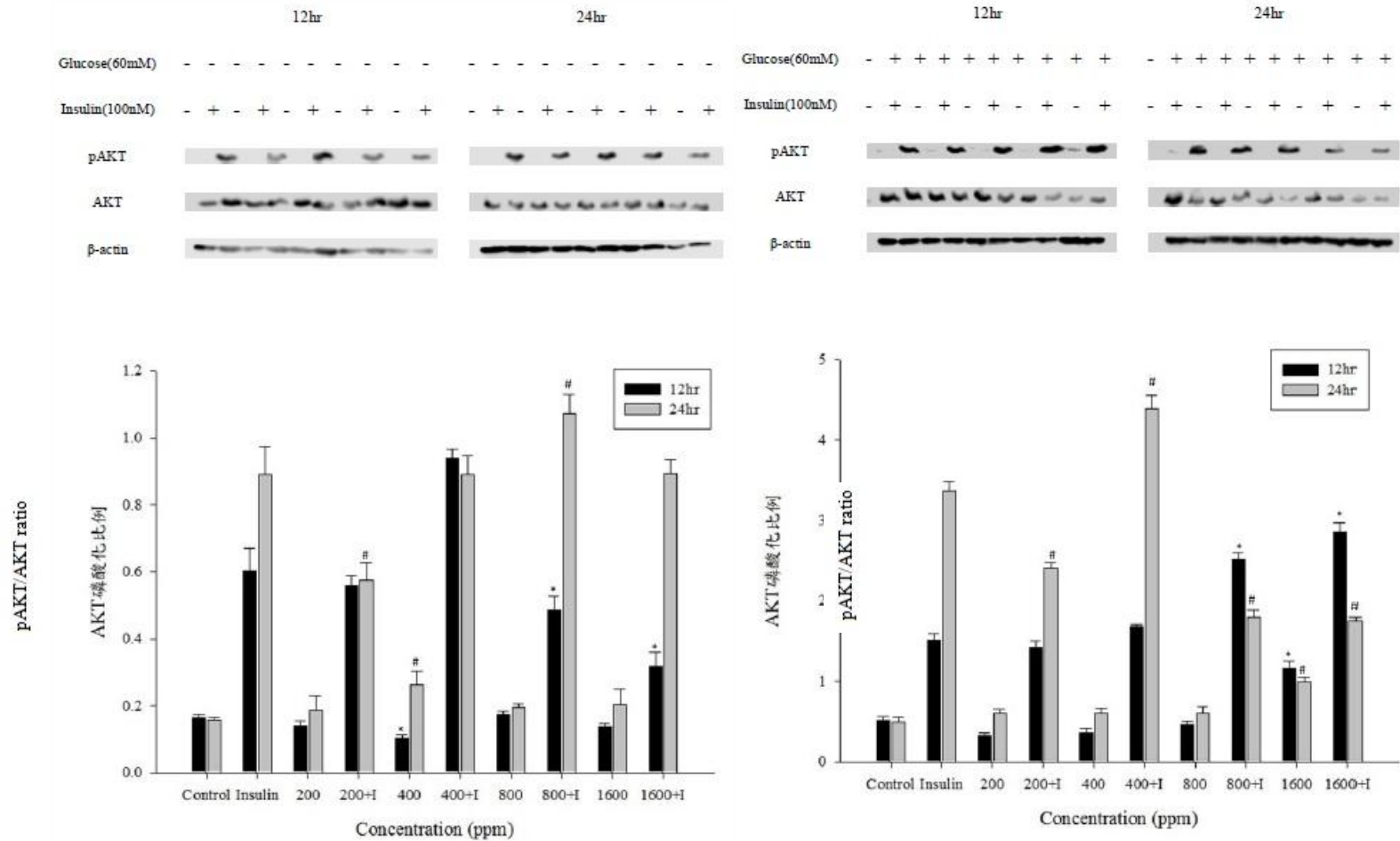


圖二十三、FL83B 肝細胞與 F2-2 培養液共置下之 pAKT 蛋白質相對量

*表示樣品細胞共置 12 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異($p < 0.05$)。#表示樣品細胞共置 24 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異($p < 0.05$)。

(A) Normal

(B) Resistance

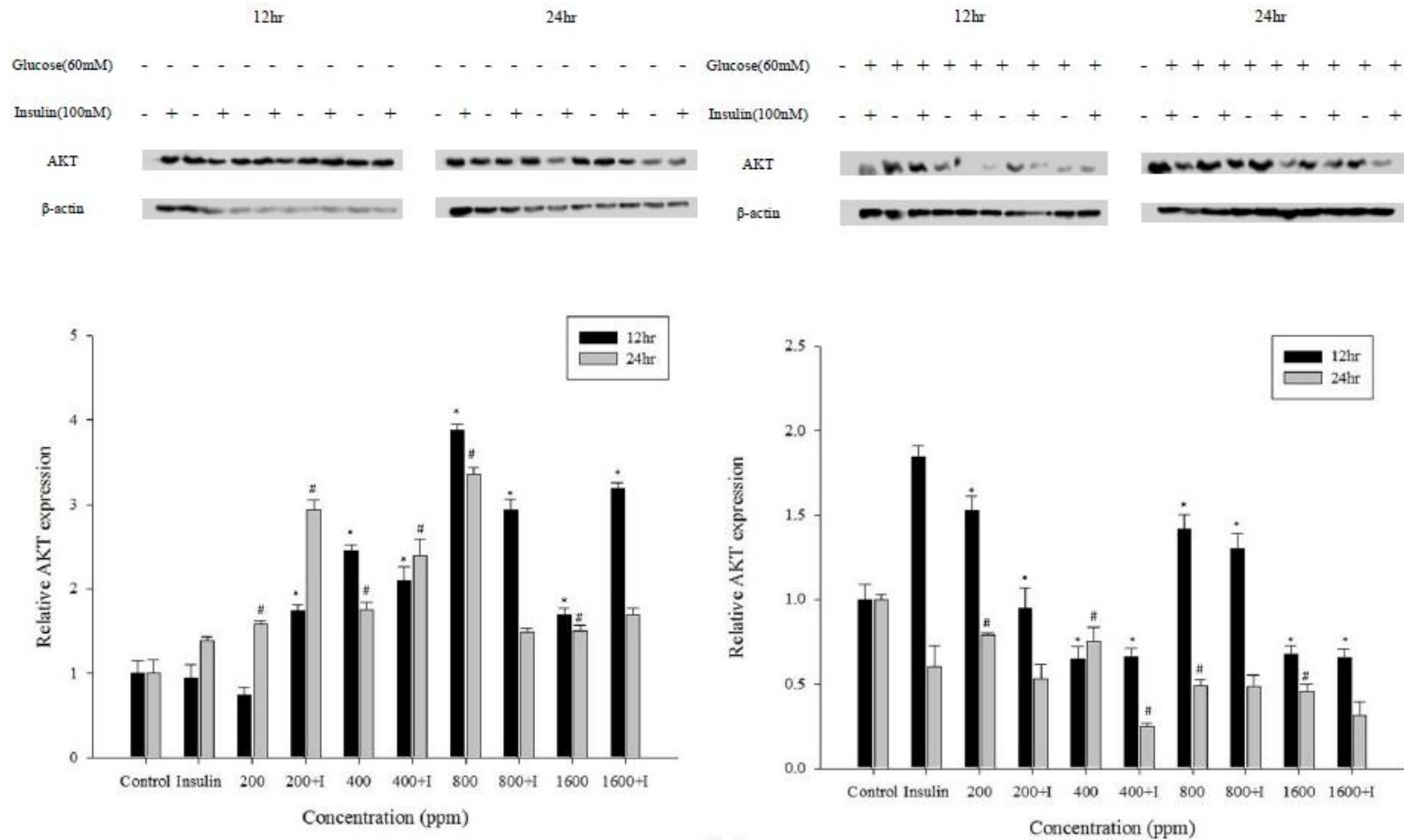


圖二十四、FL83B 肝細胞與 F2-2 培養液共置下之 AKT 蛋白質磷酸化程度

*表示樣品細胞共置 12 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異($p < 0.05$)。#表示樣品細胞共置 24 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異($p < 0.05$)。

(A) Normal

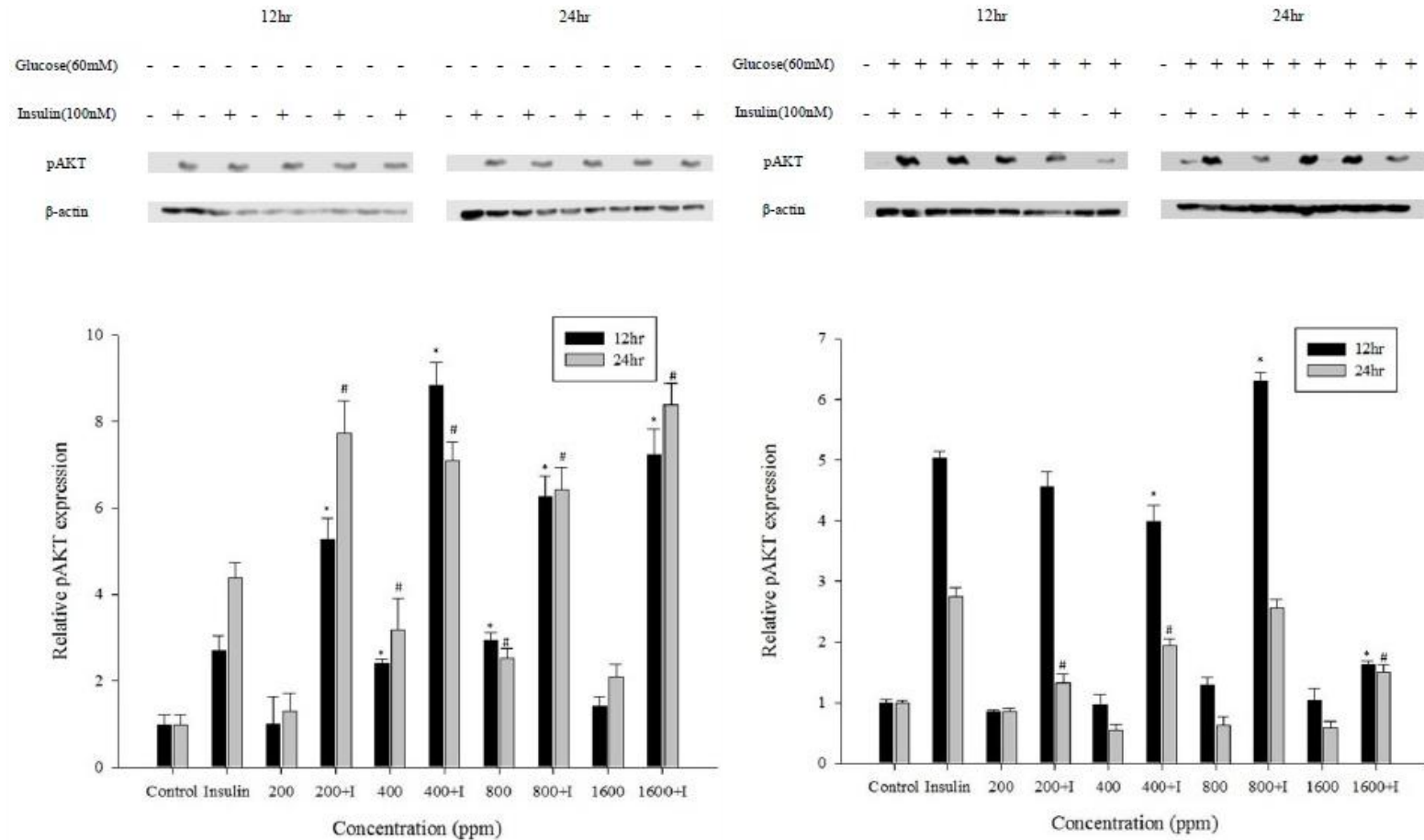
(B) Resistance



圖二十五、FL83B 肝細胞與 F7-3 培養液共置下之 AKT 蛋白質相對量

*表示樣品細胞共置 12 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異($p < 0.05$)。#表示樣品細胞共置 24 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異($p < 0.05$)。

(A)Normal(B)Resistance

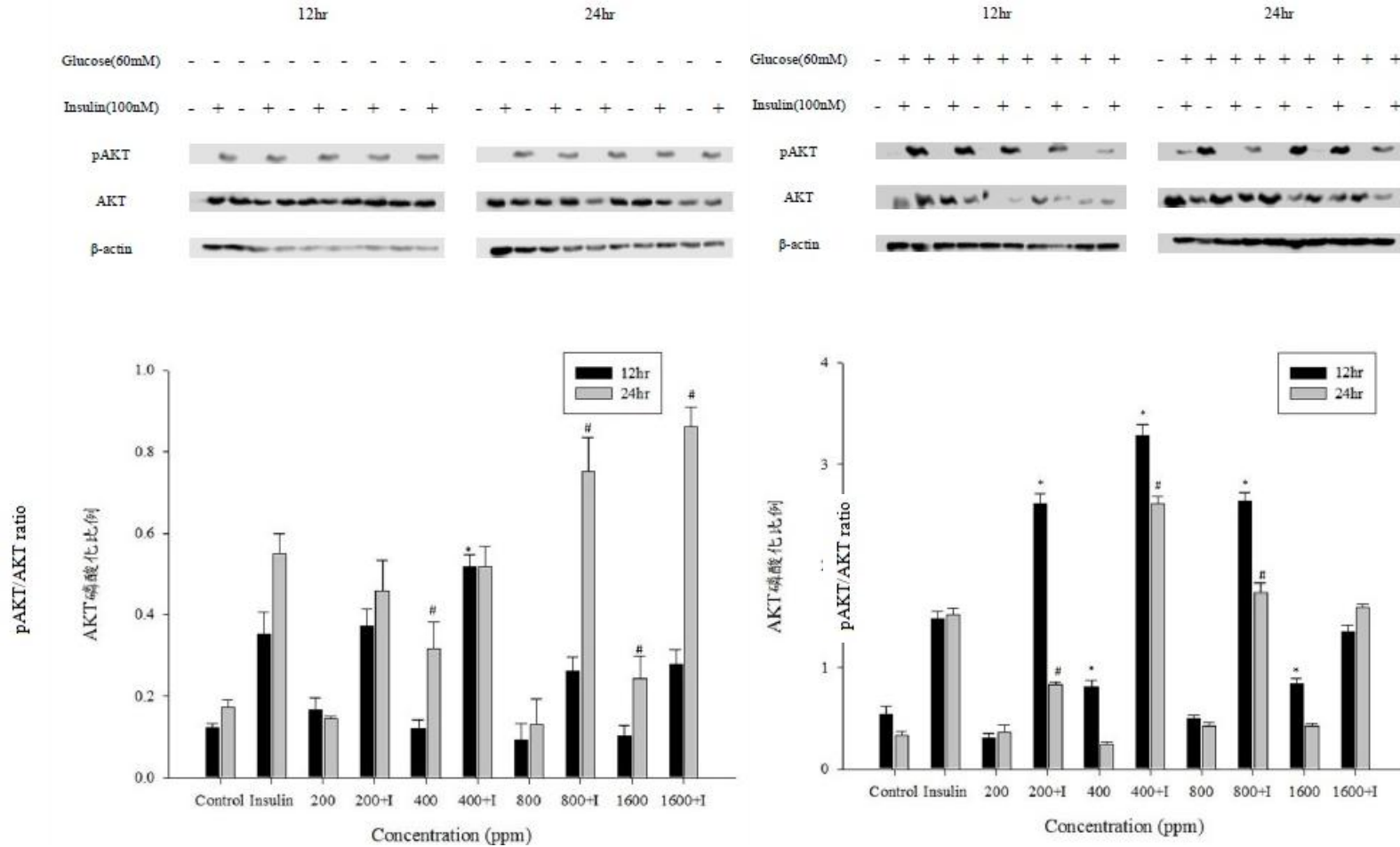


圖二十六、FL83B 肝細胞與 F7-3 培養液共置下之 pAKT 蛋白質相對量

*表示樣品細胞共置 12 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異($p < 0.05$)。#表示樣品細胞共置 24 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異($p < 0.05$)。

(A) Normal

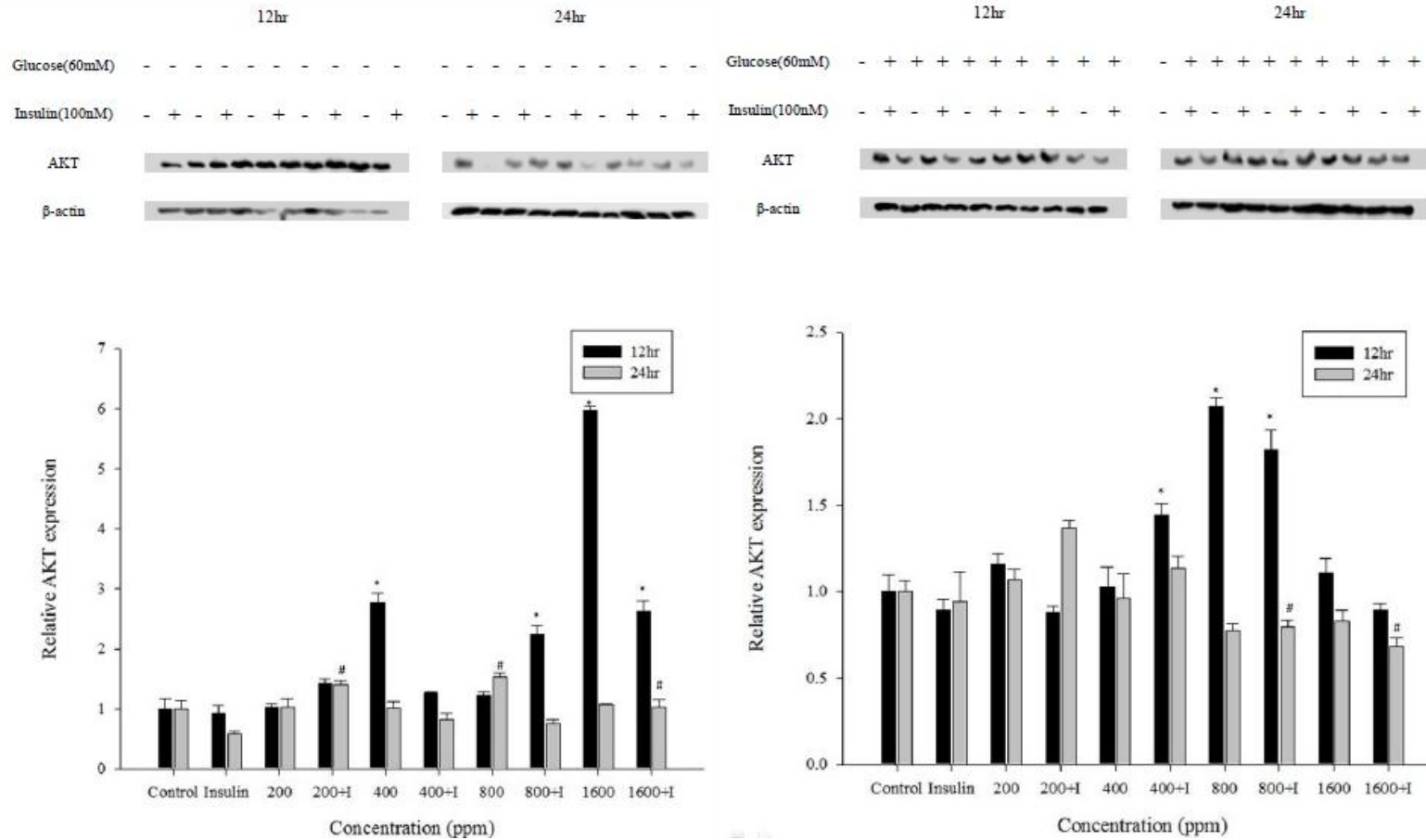
(B) Resistance



圖二十七、FL83B 肝細胞與 F7-3 培養液共置下之 AKT 蛋白質磷酸化程度

*表示樣品細胞共置 12 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異($p < 0.05$)。#表示樣品細胞共置 24 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異($p < 0.05$)。

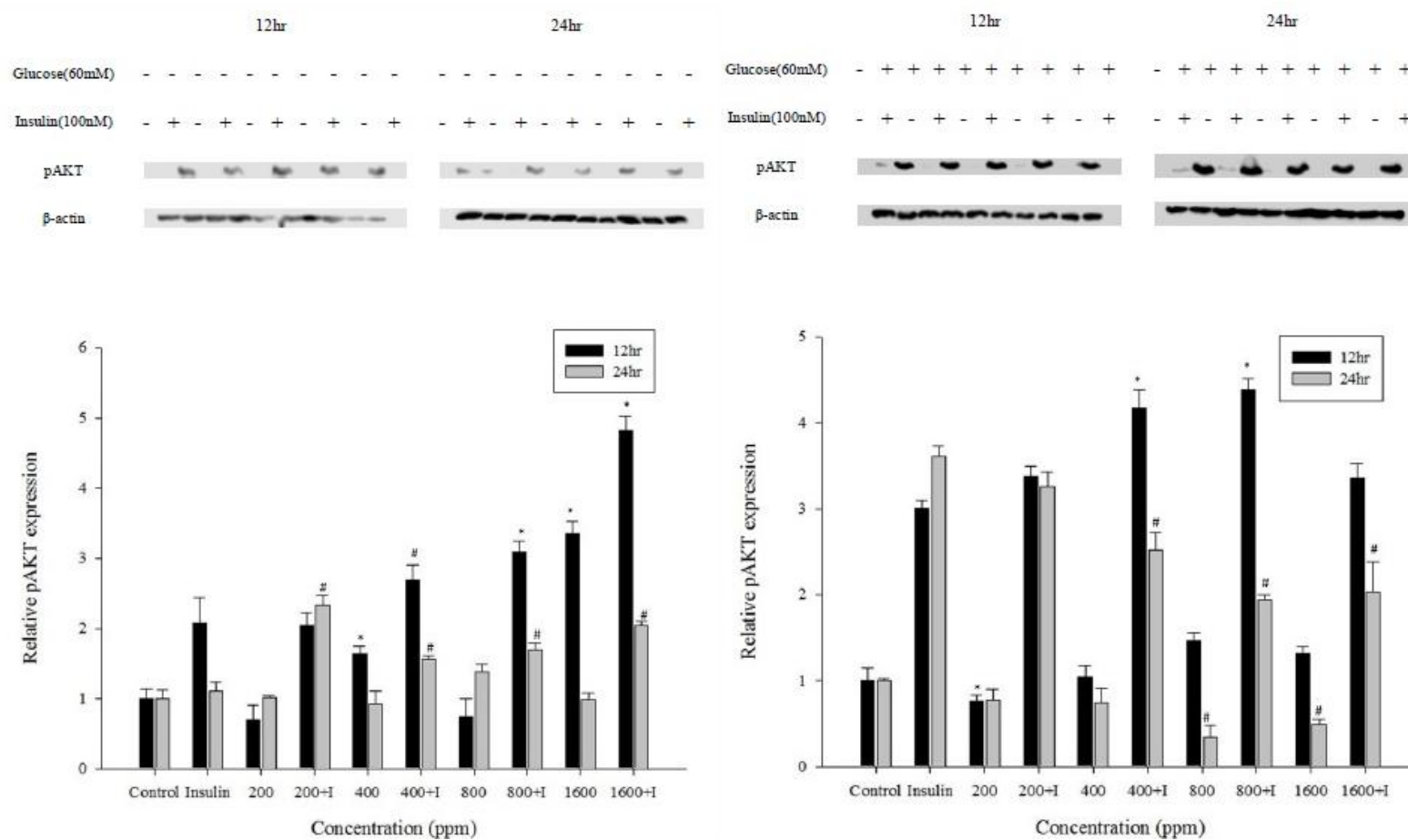
(A)Normal(B)Resistance



圖二十八、FL83B 肝細胞與 F7-4 培養液共置下之 AKT 蛋白質相對量

*表示樣品細胞共置 12 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異($p < 0.05$)。#表示樣品細胞共置 24 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異($p < 0.05$)。

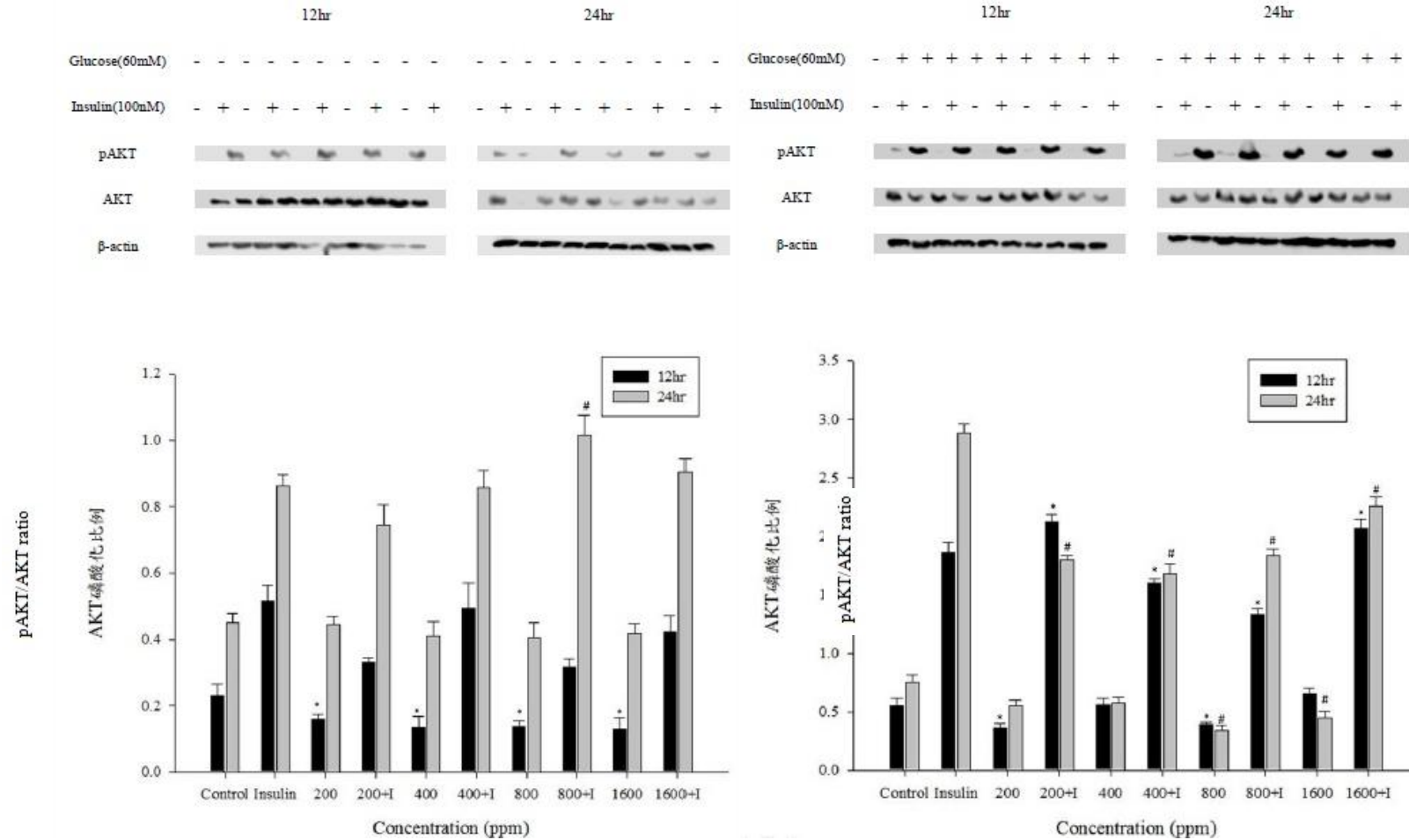
(A)Normal(B)Resistance



圖二十九、FL83B 肝細胞與 F7-4 培養液共置下之 pAKT 蛋白質相對量

*表示樣品細胞共置 12 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異($p < 0.05$)。#表示樣品細胞共置 24 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異($p < 0.05$)。

(A)Normal(B)Resistance



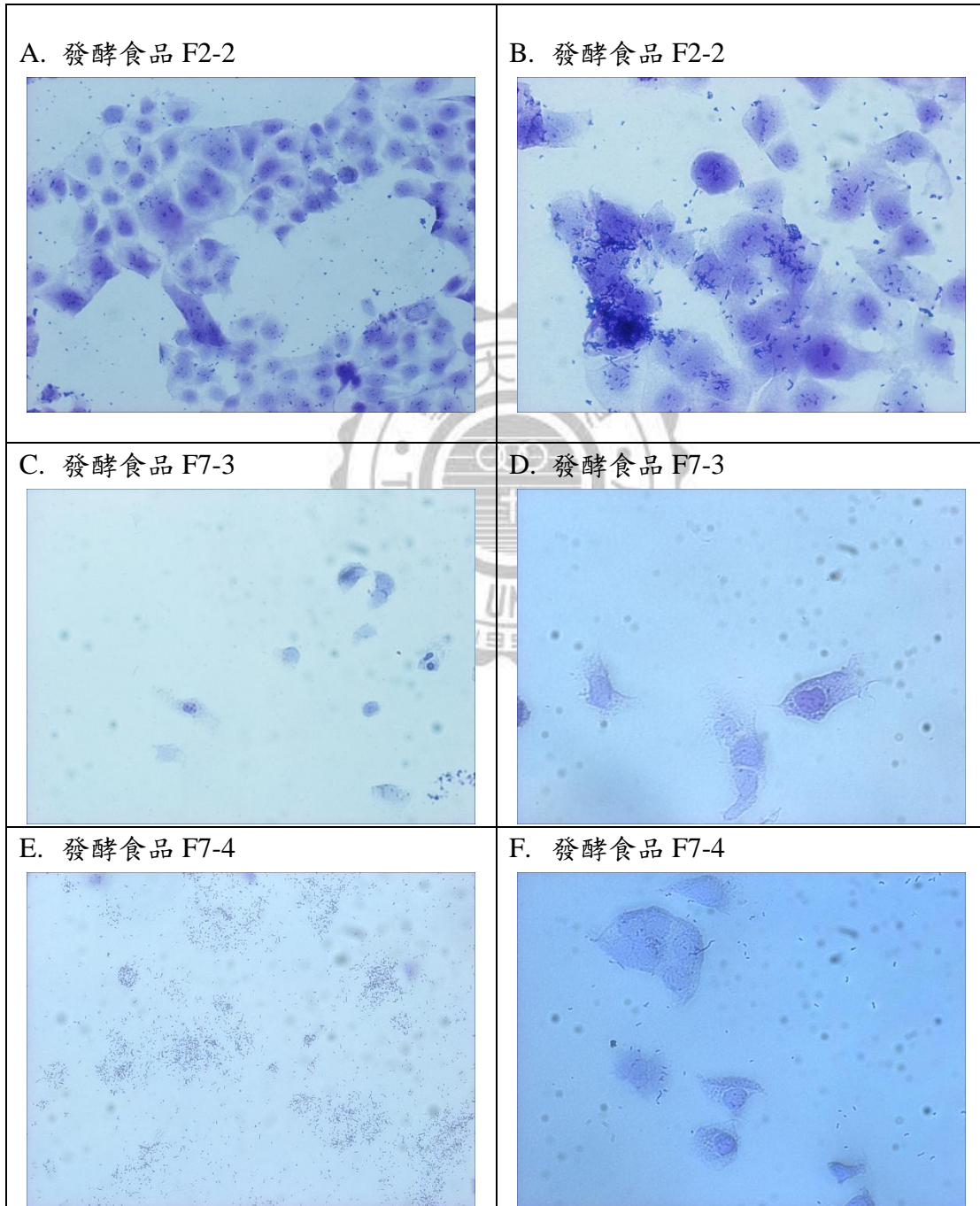
圖三十、FL83B 肝細胞與 F7-4 培養液共置下之 AKT 蛋白質磷酸化程度

*表示樣品細胞共置 12 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異($p < 0.05$)。#表示樣品細胞共置 24 小時各自與控制組及胰島素組之顯著差異($p < 0.05$)

第五章、附錄

附錄一、吸附 Caco-2 腸道上皮細胞試驗

左欄為 100x 放大，右欄為 200x 放大



附錄二、西方轉漬使用之一級、二級抗體

抗體	廠牌	分子量	稀釋倍數	目錄編號
β -actin	Cell signaling	45kDa	1 : 10000	4970
AKT	Cell signaling	60kDa	1 : 1000	4691
pAKT	Cell signaling	60kDa	1 : 1000	9271
Anti-rabbit IgG HRP-linked antibody	Cell signaling		1 : 3000	7074P
Anti-mouse IgG HRP-linked antibody	Cell signaling		1 : 3000	7076



第六章、參考文獻

呂金盈。2011。腸泌素在第二型糖尿病藥物治療的角色。臺大醫院檢驗醫學部暨內科部內分泌新陳代謝科。內科學誌。22：401~408。

林富美。2004。乳酸菌與免疫調節作用。食品工業。36(3)：16-26。

陳慶源、黃崇真、邱雪惠、廖啟成。2007。乳酸菌之保健功效與產品開發。食品生技。11：60-68。

蔡明綺、樊謙騰、陳鏡潭。2007。番石榴(*Psidium guajava* Linn.)乾燥葉、葉芯、果實水萃液及日本市售番石榴葉飲料之 α -葡萄糖苷酶、 α -澱粉酶抑制活性及活性氧清除能力。臺灣農業化學與食品科學。45 (2)：76-83。

Aggarwal, J., G. Swami and M. Kumar (2013). "Probiotics and their Effects on Metabolic Diseases: An Update." J Clin Diagn Res7(1): 173-177.

American Diabetes, A. (2010). "Diagnosis and classification of diabetes mellitus." Diabetes Care33 Suppl 1: S62-69.

American Diabetes, A. (2015). "(2) Classification and diagnosis of diabetes." Diabetes Care38 Suppl: S8-S16.

Aquino, A. C., J. A. Jorge, H. F. Terenzi and M. L. Polizeli (2003). "Studies on a thermostable alpha-amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*." Appl Microbiol Biotechnol61(4): 323-328.

Araki, E., M. A. Lipes, M. E. Patti, J. C. Bruning, B. Haag, 3rd, R. S. Johnson and C. R. Kahn (1994). "Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene." Nature372(6502): 186-190.

Bailey, C. J. (2011). "Renal glucose reabsorption inhibitors to treat diabetes." Trends Pharmacol Sci32(2): 63-71.

Bengmark, S., A. Garcia de Lorenzo and J. M. Culebras (2001). "Use of pro-, pre- and synbiotics in the ICU--future options." Nutr Hosp16(6): 239-256.

Brownlee, M. (2005). "The Pathobiology of Diabetic Complications." Diabetes**54**(6): 1615-1625.

Bucke, C. (2004). "Microbial biotechnology—principles and applications. Edited by Lee Yuan Kun, World Scientific, New Jersey, London, Singapore, Hong Kong, 2003, xxi + 724 pp, ISBN 981 238 322 3; 981 238 323 9 (paperback)." Journal of Chemical Technology & Biotechnology**79**(6): 671-671.

Butler, A. A. and D. LeRoith (2001). "Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the *igf1* and *igf1r* genes and their roles in insulin-like growth factor physiology." Endocrinology**142**(5): 1685-1688.

Carling, D. (2004). "The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control." Trends Biochem Sci**29**(1): 18-24.

Ceriello, A. (2003). "New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy." Diabetes Care**26**(5): 1589-1596.

Cheng, A. Y. and I. G. Fantus (2005). "Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus." CMAJ**172**(2): 213-226.

Cheng, H. L., H. K. Huang, C. I. Chang, C. P. Tsai and C. H. Chou (2008). "A cell-based screening identifies compounds from the stem of *Momordica charantia* that overcome insulin resistance and activate AMP-activated protein kinase." J Agric Food Chem**56**(16): 6835-6843.

Cho, H., J. Mu, J. K. Kim, J. L. Thorvaldsen, Q. Chu, E. B. Crenshaw, 3rd, K. H. Kaestner, M. S. Bartolomei, G. I. Shulman and M. J. Birnbaum (2001). "Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)." Science**292**(5522): 1728-1731.

Cichy, S. B., S. Uddin, A. Danilkovich, S. Guo, A. Klippel and T. G. Unterman (1998). "Protein kinase B/Akt mediates effects of insulin on hepatic insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression through a conserved insulin response sequence." J Biol Chem**273**(11): 6482-6487.

Collier, J. J. and D. K. Scott (2004). "Sweet changes: glucose homeostasis can be altered by manipulating genes controlling hepatic glucose metabolism." Mol

Endocrinol**18**(5): 1051-1063.

Creutzfeldt, W. (1999). "Effects of the alpha-glucosidase inhibitor acarbose on the development of long-term complications in diabetic animals: pathophysiological and therapeutic implications." Diabetes Metab Res Rev**15**(4): 289-296.

Cross, D. A., D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich and B. A. Hemmings (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." Nature**378**(6559): 785-789.

Derosa, G. and P. Maffioli (2012). "alpha-Glucosidase inhibitors and their use in clinical practice." Arch Med Sci**8**(5): 899-906.

Dimitriadis, G., P. Mitrou, V. Lambadiari, E. Maratou and S. A. Raptis (2011). "Insulin effects in muscle and adipose tissue." Diabetes Res Clin Pract**93 Suppl 1**: S52-59.

Elliott, S. S., N. L. Keim, J. S. Stern, K. Teff and P. J. Havel (2002). "Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome." Am J Clin Nutr**76**(5): 911-922.

Enomoto, M., S. Noguchi, M. Hattori, H. Sugiyama, Y. Suzuki, A. Hanaoka, S. Okada and T. Yoshida (2009). "Oral administration of *Lactobacillus plantarum* NRIC0380 suppresses IgE production and induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) cells in vivo." Biosci Biotechnol Biochem**73**(2): 457-460.

Favaro-Trindade, C. S. and C. R. Grosso (2002). "Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile." J Microencapsul**19**(4): 485-494.

Ferrer, J. C., C. Favre, R. R. Gomis, J. M. Fernandez-Novell, M. Garcia-Rocha, N. de la Iglesia, E. Cid and J. J. Guinovart (2003). "Control of glycogen deposition." FEBS Lett**546**(1): 127-132.

Fisher, S. J. and C. R. Kahn (2003). "Insulin signaling is required for insulin's direct and indirect action on hepatic glucose production." Journal of Clinical Investigation**111**(4): 463-468.

Fuglsang, A., D. Nilsson and N. C. B. Nyborg (2002). "Cardiovascular Effects of Fermented Milk Containing Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors Evaluated in

Permanently Catheterized, Spontaneously Hypertensive Rats." Applied and Environmental Microbiology**68**(7): 3566-3569.

Garofalo, R. S., S. J. Orena, K. Rafidi, A. J. Torchia, J. L. Stock, A. L. Hildebrandt, T. Coskran, S. C. Black, D. J. Brees, J. R. Wicks, J. D. McNeish and K. G. Coleman (2003). "Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB β ." Journal of Clinical Investigation**112**(2): 197-208.

Gilliland, S. E. and D. K. Walker (1990). "Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans." J Dairy Sci**73**(4): 905-911.

Goldberg, I. J. (2001). "Clinical review 124: Diabetic dyslipidemia: causes and consequences." J Clin Endocrinol Metab**86**(3): 965-971.

Goldin, B. R. and S. L. Gorbach (1984). "The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity." Am J Clin Nutr**39**(5): 756-761.

Gomez Zavaglia, A., G. Kociubinski, P. Perez and G. De Antoni (1998). "Isolation and characterization of *Bifidobacterium* strains for probiotic formulation." J Food Prot**61**(7): 865-873.

Gopal, P. K., J. Prasad, J. Smart and H. S. Gill (2001). "In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*." Int J Food Microbiol**67**(3): 207-216.

Granato, D., F. Perotti, I. Masserey, M. Rouvet, M. Golliard, A. Servin and D. Brassart (1999). "Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells." Appl Environ Microbiol**65**(3): 1071-1077.

Grill, J. P., C. Cayuela, J. M. Antoine and F. Schneider (2000). "Effects of *Lactobacillus amylovorus* and *Bifidobacterium breve* on cholesterol." Lett Appl Microbiol**31**(2): 154-156.

Gusakov, A. V., E. G. Kondratyeva and A. P. Sinitsyn (2011). "Comparison of Two

Methods for Assaying Reducing Sugars in the Determination of Carbohydrase Activities." International Journal of Analytical Chemistry**2011**: 283658.

Haller, D., S. Blum, C. Bode, W. P. Hammes and E. J. Schiffrin (2000). "Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nonpathogenic bacteria in vitro: evidence of NK cells as primary targets." Infect Immun**68**(2): 752-759.

Hansawasdi, C., J. Kawabata and T. Kasai (2000). "Alpha-amylase inhibitors from roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) tea." Biosci Biotechnol Biochem**64**(5): 1041-1043.
Hardie, D. G. and K. Sakamoto (2006). "AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle." Physiology (Bethesda)**21**: 48-60.

Hauri, H. P., E. E. Sterchi, D. Bienz, J. A. Fransen and A. Marxer (1985). "Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells." J Cell Biol**101**(3): 838-851.

Hofvendahl, K. and B. Hahn-Hagerdal (2000). "Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources(1)." Enzyme Microb Technol**26**(2-4): 87-107.

Holzappel, W. H., P. Haberer, J. Snel, U. Schillinger and J. H. Huis in't Veld (1998). "Overview of gut flora and probiotics." Int J Food Microbiol**41**(2): 85-101.

Huang, D. W., S. C. Shen and J. S. Wu (2009). "Effects of caffeic acid and cinnamic acid on glucose uptake in insulin-resistant mouse hepatocytes." J Agric Food Chem**57**(17): 7687-7692.

Kampman, E., R. A. Goldbohm, P. A. van den Brandt and P. van 't Veer (1994). "Fermented dairy products, calcium, and colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study." Cancer Res**54**(12): 3186-3190.

Kandra, L. (2003). " α -Amylases of medical and industrial importance." Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**666-667**: 487-498.

Kido, Y., D. J. Burks, D. Withers, J. C. Bruning, C. R. Kahn, M. F. White and D. Accili (2000). "Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2." J Clin Invest**105**(2): 199-205.

Kirjavainen, P. V., T. Arvola, S. J. Salminen and E. Isolauri (2002). "Aberrant

composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning?" Gut**51**(1): 51-55.

Kitamura, T. (2013). "The role of FOXO1 in beta-cell failure and type 2 diabetes mellitus." Nat Rev Endocrinol**9**(10): 615-623.

Klaver, F. A. and R. van der Meer (1993). "The assumed assimilation of cholesterol by Lactobacilli and Bifidobacterium bifidum is due to their bile salt-deconjugating activity." Applied and Environmental Microbiology**59**(4): 1120-1124.

Kuriyama, C., O. Kamiyama, K. Ikeda, F. Sanae, A. Kato, I. Adachi, T. Imahori, H. Takahata, T. Okamoto and N. Asano (2008). "In vitro inhibition of glycogen-degrading enzymes and glycosidases by six-membered sugar mimics and their evaluation in cell cultures." Bioorg Med Chem**16**(15): 7330-7336.

Leclercq, I. A., A. Da Silva Morais, B. Schroyen, N. Van Hul and A. Geerts (2007). "Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences." J Hepatol**47**(1): 142-156.

Lee, D. S. and S. H. Lee (2001). "Genistein, a soy isoflavone, is a potent alpha-glucosidase inhibitor." FEBS Lett**501**(1): 84-86.

Lee, H. Y., J. H. Park, S. H. Seok, M. W. Baek, D. J. Kim, K. E. Lee, K. S. Paek, Y. Lee and J. H. Park (2006). "Human originated bacteria, Lactobacillus rhamnosus PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice." Biochim Biophys Acta**1761**(7): 736-744.

Li, X. J., L. Y. Yue, X. F. Guan and S. Y. Qiao (2008). "The adhesion of putative probiotic lactobacilli to cultured epithelial cells and porcine intestinal mucus." J Appl Microbiol**104**(4): 1082-1091.

Lietzke, S. E., S. Bose, T. Cronin, J. Klarlund, A. Chawla, M. P. Czech and D. G. Lambright (2000). "Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains." Mol Cell**6**(2): 385-394.

Lin, C. L. and J. K. Lin (2008). "Epigallocatechin gallate (EGCG) attenuates high glucose-induced insulin signaling blockade in human hepG2 hepatoma cells." Mol Nutr Food Res**52**(8): 930-939.

- Ling, W. H., R. Korpela, H. Mykkanen, S. Salminen and O. Hanninen (1994). "Lactobacillus strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults." J Nutr**124**(1): 18-23.
- Liu, C. F., K. C. Tseng, S. S. Chiang, B. H. Lee, W. H. Hsu and T. M. Pan (2011). "Immunomodulatory and antioxidant potential of Lactobacillus exopolysaccharides." J Sci Food Agric**91**(12): 2284-2291.
- Luna, B. and M. N. Feinglos (2001). "Oral agents in the management of type 2 diabetes mellitus." Am Fam Physician**63**(9): 1747-1756.
- Mayer, J. P., F. Zhang and R. D. DiMarchi (2007). "Insulin structure and function." Biopolymers**88**(5): 687-713.
- Moller, D. E. (2001). "New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome." Nature**414**(6865): 821-827.
- Nordlie, R. C., J. D. Foster and A. J. Lange (1999). "Regulation of glucose production by the liver." Annu Rev Nutr**19**: 379-406.
- Panwar, H., D. Calderwood, I. R. Grant, S. Grover and B. D. Green (2014). "Lactobacillus strains isolated from infant faeces possess potent inhibitory activity against intestinal alpha- and beta-glucosidases suggesting anti-diabetic potential." Eur J Nutr**53**(7): 1465-1474.
- Park, Y. H., J. G. Kim, Y. W. Shin, S. H. Kim and K. Y. Whang (2007). "Effect of dietary inclusion of Lactobacillus acidophilus ATCC 43121 on cholesterol metabolism in rats." J Microbiol Biotechnol**17**(4): 655-662.
- Pedersen, K. and G. W. Tannock (1989). "Colonization of the porcine gastrointestinal tract by lactobacilli." Appl Environ Microbiol**55**(2): 279-283.
- Perdigon, G., E. Vintini, S. Alvarez, M. Medina and M. Medici (1999). "Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria." J Dairy Sci**82**(6): 1108-1114.
- Petersen, K. F. and G. I. Shulman (2006). "Etiology of insulin resistance." Am J Med**119**(5 Suppl 1): S10-16.

Pilkis, S. J. and D. K. Granner (1992). "Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis." Annu Rev Physiol**54**: 885-909.

Rafter, J. (2002). "Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective." Br J Nutr**88 Suppl 1**: S89-94.

Ramchandran, L. and N. P. Shah (2008). "Proteolytic profiles and angiotensin-I converting enzyme and alpha-glucosidase inhibitory activities of selected lactic acid bacteria." J Food Sci**73**(2): M75-81.

Reaven, G. M. (2005). "Why Syndrome X? From Harold Himsworth to the insulin resistance syndrome." Cell Metab**1**(1): 9-14.

Rinttila, T., A. Kassinen, E. Malinen, L. Krogus and A. Palva (2004). "Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR." J Appl Microbiol**97**(6): 1166-1177.

Rodriguez-Figueroa, J. C., R. Reyes-Diaz, A. F. Gonzalez-Cordova, R. Troncoso-Rojas, I. Vargas-Arispuro and B. Vallejo-Cordoba (2010).

"Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of milk fermented by wild and industrial *Lactococcus lactis* strains." J Dairy Sci**93**(11): 5032-5038.

Saarela, M., L. Lähteenmäki, R. Crittenden, S. Salminen and T. Mattila-Sandholm (2002). "Gut bacteria and health foods—the European perspective." International Journal of Food Microbiology**78**(1–2): 99-117.

Saarela, M., G. Mogensen, R. Fonden, J. Matto and T. Mattila-Sandholm (2000). "Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties." J Biotechnol**84**(3): 197-215.

Sales, P. M., P. M. Souza, L. A. Simeoni and D. Silveira (2012). "alpha-Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source." J Pharm Pharm Sci**15**(1): 141-183.

Saltiel, A. R. and C. R. Kahn (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." Nature**414**(6865): 799-806.

Samuel, V. T. and G. I. Shulman (2012). "Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links." Cell**148**(5): 852-871.

Sasaki, T., Y. Hiki, S. Nagumo, R. Ikeda, H. Kimura, K. Yamashiro, A. Gojo, T. Saito, Y. Tomita and K. Utsunomiya (2010). "Acute onset of rheumatoid arthritis associated with administration of a dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor to patients with diabetes mellitus." Diabetology International**1**(2): 90-92.

Sashihara, T., N. Sueki and S. Ikegami (2006). "An analysis of the effectiveness of heat-killed lactic acid bacteria in alleviating allergic diseases." J Dairy Sci**89**(8): 2846-2855.

Schattenberg, J. M. and M. Schuchmann (2009). "Diabetes and apoptosis: liver." Apoptosis**14**(12): 1459-1471.

Scheid, M. P. and J. R. Woodgett (2001). "PKB/AKT: functional insights from genetic models." Nat Rev Mol Cell Biol**2**(10): 760-768.

Schwientek, P., R. Szczepanowski, C. Ruckert, J. Kalinowski, A. Klein, K. Selber, U. F. Wehmeier, J. Stoye and A. Puhler (2012). "The complete genome sequence of the acarbose producer *Actinoplanes* sp. SE50/110." BMC Genomics**13**: 112.

Seppo, L., T. Jauhiainen, T. Poussa and R. Korpela (2003). "A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects." Am J Clin Nutr**77**(2): 326-330.

Shida, K. and M. Nanno (2008). "Probiotics and immunology: separating the wheat from the chaff." Trends Immunol**29**(11): 565-573.

Shulman, G. I. (2000). "Cellular mechanisms of insulin resistance." J Clin Invest**106**(2): 171-176.

Steinberg, G. R. and B. E. Kemp (2009). "AMPK in Health and Disease." Physiol Rev**89**(3): 1025-1078.

Sun, J., G. W. Le, Y. H. Shi and G. W. Su (2007). "Factors involved in binding of *Lactobacillus plantarum* Lp6 to rat small intestinal mucus." Lett Appl Microbiol**44**(1): 79-85.

Tahri, K., J. P. Grill and F. Schneider (1997). "Involvement of trihydroxyconjugated bile salts in cholesterol assimilation by bifidobacteria." Curr Microbiol**34**(2): 79-84.

Tamemoto, H., T. Kadowaki, K. Tobe, T. Yagi, H. Sakura, T. Hayakawa, Y. Terauchi, K. Ueki, Y. Kaburagi, S. Satoh and et al. (1994). "Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1." Nature**372**(6502): 182-186.

Taniguchi, C. M., K. Ueki and C. R. Kahn (2005). "Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism." Journal of Clinical Investigation**115**(3): 718-727.

Templeton, M. (1961). "Microdetermination of glycogen with anthrone reagent." J Histochem Cytochem**9**: 670-672.

van der Maarel, M. J., B. van der Veen, J. C. Uitdehaag, H. Leemhuis and L. Dijkhuizen (2002). "Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family." J Biotechnol**94**(2): 137-155.

Wang, X., I. L. Brown, A. J. Evans and P. L. Conway (1999). "The protective effects of high amylose maize (amylomaize) starch granules on the survival of Bifidobacterium spp. in the mouse intestinal tract." J Appl Microbiol**87**(5): 631-639.

Wilcox, G. (2005). "Insulin and Insulin Resistance." Clinical Biochemist Reviews**26**(2): 19-39.

Wild, S., G. Roglic, A. Green, R. Sicree and H. King (2004). "Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030." Diabetes Care**27**(5): 1047-1053.

Withers, D. J., J. S. Gutierrez, H. Towery, D. J. Burks, J. M. Ren, S. Previs, Y. Zhang, D. Bernal, S. Pons, G. I. Shulman, S. Bonner-Weir and M. F. White (1998). "Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice." Nature**391**(6670): 900-904.

Xie, N., Y. Cui, Y. N. Yin, X. Zhao, J. W. Yang, Z. G. Wang, N. Fu, Y. Tang, X. H. Wang, X. W. Liu, C. L. Wang and F. G. Lu (2011). "Effects of two Lactobacillus strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a high-cholesterol diet." BMC Complement Altern Med**11**: 53.

Yadav, H., S. Jain and P. R. Sinha (2007). "Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats." Nutrition**23**(1): 62-68.

Yamakoshi, J., S. Fukuda, T. Satoh, R. Tsuji, M. Saito, A. Obata, A. Matsuyama, M. Kikuchi and T. Kawasaki (2007). "Antihypertensive and natriuretic effects of less-sodium soy sauce containing gamma-aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats." Biosci Biotechnol Biochem**71**(1): 165-173.

Yan, S. D., A. M. Schmidt, G. M. Anderson, J. Zhang, J. Brett, Y. S. Zou, D. Pinsky and D. Stern (1994). "Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins." J Biol Chem**269**(13): 9889-9897.

Yang, Z. Z., O. Tschopp, A. Baudry, B. Dummler, D. Hynx and B. A. Hemmings (2004). "Physiological functions of protein kinase B/Akt." Biochem Soc Trans**32**(Pt 2): 350-354.

Yokota, K. and N. Igaki (2012). "Sitagliptin (DPP-4 Inhibitor)-induced Rheumatoid Arthritis in Type 2 Diabetes Mellitus: A Case Report." Internal Medicine**51**(15): 2041-2044.

Yoshioka, K., H. Takahashi, T. Homma, M. Saito, K. B. Oh, Y. Nemoto and H. Matsuoka (1996). "A novel fluorescent derivative of glucose applicable to the assessment of glucose uptake activity of *Escherichia coli*." Biochim Biophys Acta**1289**(1): 5-9.

Yun, H., J. H. Lee, C. E. Park, M. J. Kim, B. I. Min, H. Bae, W. Choe, I. Kang, S. S. Kim and J. Ha (2009). "Inulin increases glucose transport in C2C12 myotubes and HepG2 cells via activation of AMP-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways." J Med Food**12**(5): 1023-1028.

Zdychova, J. and R. Komers (2005). "Emerging role of Akt kinase/protein kinase B signaling in pathophysiology of diabetes and its complications." Physiol Res**54**(1): 1-16.

Zierath, J. R. and Y. Kawano (2003). "The effect of hyperglycaemia on glucose disposal and insulin signal transduction in skeletal muscle." Best Practice & Research

Clinical Endocrinology & Metabolism17(3): 385-398.

