

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 3T3-L1 脂肪細胞具葡萄糖調節能力之乳酸菌
**Screening of Lactic Acid Bacteria with Glucose Homeostatic Effects
in 3T3-L1 Adipocytes**

研究生：姚佳伶撰

Graduate Student : Chia-Ling Yao

中華民國一〇五年六月

June,2016

目錄

中文摘要.....	1
Abstract.....	2
第一章、文獻回顧.....	3
1-1 益生菌	3
1-2 乳酸菌	3
1-2-1 特性及分類.....	3
1-2-2 生理功效.....	4
1-2-2.1 維持腸道菌叢平衡.....	4
1-2-2.2 降低血液中膽固醇含量.....	5
1-2-2.3 降低血壓.....	5
1-2-3 代謝特性.....	6
1-3 糖尿病	7
1-3-1 糖尿病主要類型.....	7
1-3-1.1 第一型糖尿病(Type 1 diabetes mellitus).....	7
1-3-1.2 第二型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus).....	8
1-3-1.3 妊娠糖尿病(Gestational diabetes mellitus, GDM).....	8
1-3-1.4 其他特異型糖尿病(Other specific types of diabetes).....	8
1-3-2 糖尿病診斷.....	9
1-3-3 糖尿病治療.....	10
1-3-3.1 葡萄糖甘酶抑制劑(glucosidase inhibitors).....	10
1-3-3.2 雙胍類(biguanides).....	10
1-3-3.3 磺胺類(sulfonylureas).....	10
1-3-3.4 非磺胺類(Non-sulfonylureas).....	10
1-3-3.5 胰島素增敏劑(Insulin sensitizers).....	10
1-3-3.6 Glucagon-like peptide (GLP-1)類似物.....	11
1-3-2 代謝症候群與脂肪組織關係.....	12
1-4 研究模式	13
1-4-1 脂肪組織(Adipose tissue).....	13
1-4-1.1 白色脂肪組織.....	13
1-4-1.2 褐色脂肪組織.....	13
1-4-2 前驅脂肪細胞研究模式之細胞株.....	14
1-4-3 前驅脂肪細胞 3T3-L1 分化.....	14
1-5 胰島素傳訊路徑	16
1-5-1 蛋白質激酶 B(Protein kinase B, PKB/AKT).....	16
1-5-2 磷酸腺苷激活蛋白激酶(AMP-actived protein kinase, AMPK).....	17

1-6 細胞激素與胰島素阻抗關聯性	19
1-6-1 細胞激素介紹	21
1-6-1.1 脂聯素(Adiponectin)	21
1-6-1.2 抗素(Resistin)	21
1-6-1.3 腫瘤壞死因子(TNF-alpha).....	21
1-7 高糖與高胰島素誘發胰島素阻抗模式之機制	22
1-7-1 胰島素阻抗.....	22
1-7-2 高糖誘發胰島素阻抗.....	22
第二章、研究目的與實驗架構.....	23
2-1 研究目的	23
2-2 實驗架構	24
第三章、材料與方法.....	25
3-1 實驗材料	25
3-1-1 乳酸菌試驗.....	25
3-1-1.1 試驗菌株來源.....	25
3-1-1.2 乳酸菌培養基.....	25
3-1-2 細胞試驗.....	25
3-1-2.1 小鼠脂肪細胞株 3T3-L1.....	25
3-1-2.2 人體結腸腺癌細胞 Caco-2	25
3-1-2.3 小鼠肝臟細胞 FL83B.....	26
3-1-3.1 分化試劑.....	26
3-1-3.2 油紅染色.....	26
3-1-4 細胞培養其他藥品.....	26
3-1-5 ELISA Kit.....	26
3-1-6 蛋白質分析試劑.....	27
3-1-6.1 細胞裂解液.....	27
3-1-6.2 定量試劑.....	27
3-1-7 主要儀器及設備.....	27
3-2 實驗方法	28
3-2-1 樣品製備.....	28
3-2-2 初步篩選.....	28
3-2-2.1 觸媒試驗(Catalase test)	28
3-2-2.2 格蘭氏染色(Gram Staining).....	28
3-2-2.3 凝乳試驗(resazurin-rennet test).....	28
3-2-2.4 耐酸耐膽鹽試驗(Acid and Bile Resistant)	28
3-2-2.5 吸附 Caco-2 腸道上皮細胞試驗(Caco-2 Adsorption Test) ..	29
3-2-3 抽取 Genomic DNA.....	29
3-2-4 聚合酶鏈鎖反應檢測(16S rDNA PCR).....	29

3-2-5 DNA 定序(DNA Sequencing)	30
3-2-6 乳酸菌培養液相關試驗	30
3-2-6.1 培養液製備	30
3-2-6.2 測定 α -澱粉酵素(α -amylase)	30
3-2-6.3 測定 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase).....	30
3-2-6.4DNS(3,5-dinitrosalicylic)殘糖分析	30
3-2-7 細胞培養及相關分析	31
3-2-7.1 細胞培養、繼代及分化.....	31
3-2-7.2 油紅染色	31
3-2-7.3 誘導脂肪細胞產生胰島素阻抗.....	31
3-2-7.4 細胞存活率試驗	32
3-2-7.5 葡萄糖擬似物 2-NBDG 帶入量分析	32
3-2-7.6 ELISA.....	32
3-2-7.7 脂肪細胞之蛋白質萃取.....	33
3-2-7.8 蛋白質定量	33
3-2-7.9 西方轉漬法	33
3-3 統計分析	33
第四章、結果與討論.....	34
4-1 乳酸菌試驗	34
4-1-1 乳酸菌篩選定序.....	34
4-1-1.1 篩選及定序.....	34
4-1-1.2 吸附試驗.....	34
4-1-1.3 耐酸耐膽鹽試驗.....	35
4-1-2 培養液相關試驗.....	35
4-1-2.1 醣解酵素抑制能力	35
4-1-2.2DNS 殘糖分析試驗.....	36
4-2 細胞模式	36
4-2-1 肝細胞 FL83B.....	36
4-2-2 脂肪細胞 3T3-L1.....	37
4-2-2.1 不同濃度培養液對脂肪細胞 3T3-L1 增生活性試驗.....	37
4-2-2.2 不同濃度培養液對脂肪細胞 3T3-L1 細胞激素之含量.....	37
4-2-2.3 不同濃度培養液對脂肪細胞 3T3-L1 之蛋白質表現.....	39
4-3 結論與未來展望	40
4-3-1 結論	40
4-3-2 未來展望.....	40
第五章、附錄.....	75
附錄一、吸附 Caco-2 腸道上皮細胞試驗.....	75
附錄二、西方轉漬使用之一級、二級抗體.....	76



圖目錄

圖一、正常態 FL83B 肝細胞與 F2-2 培養液共置下之葡萄糖疑似物帶入量	49
圖二、阻抗態 FL83B 肝細胞與 F2-2 培養液共置下之葡萄糖疑似物帶入量	49
圖三、正常態 FL83B 肝細胞與 F7-3 培養液共置下之葡萄糖疑似物帶入量	50
圖四、阻抗態 FL83B 肝細胞與 F7-3 培養液共置下之葡萄糖疑似物帶入量	50
圖五、正常態 FL83B 肝細胞與 F7-4 培養液共置下之葡萄糖疑似物帶入量	51
圖六、阻抗態 FL83B 肝細胞與 F7-4 培養液共置下之葡萄糖疑似物帶入量	51
圖七、3T3-L1 脂肪細胞與 F2-2 培養液共置下之增生活性	52
圖八、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-3 培養液共置下之增生活性	52
圖九、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-4 培養液共置下之增生活性	53
圖十、3T3-L1 脂肪細胞與 F2-2 培養液共置下之脂聯素(adiponectin)分泌	54
圖十一、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-3 培養液共置下之脂聯素(adiponectin)分泌	55
圖十二、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-4 培養液共置下之脂聯素(adiponectin)分泌	56
圖十三、3T3-L1 脂肪細胞與 F2-2 培養液共置下之抗素(resistin)分泌	57
圖十四、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-3 培養液共置下之抗素(resistin)分泌	58
圖十五、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-4 培養液共置下之抗素(resistin)分泌	59
圖十六、3T3-L1 脂肪細胞與 F2-2 培養液共置下之瘦素(leptin)分泌.....	60
圖十七、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-3 培養液共置下之瘦素(leptin)分泌.....	61
圖十八、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-4 培養液共置下之瘦素(leptin)分泌.....	62
圖十九、3T3-L1 脂肪細胞與 F2-2 培養液共置下之腫瘤壞死因子(TNF- alpha)分泌	63
圖二十、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-3 培養液共置下之腫瘤壞死因子(TNF- alpha)分泌	64
圖二十一、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-4 培養液共置下之腫瘤壞死因子(TNF- alpha)分泌	65
圖二十二、3T3-L1 脂肪細胞與 F2-2 培養液共置下之 AKT 蛋白質相對量	66
圖二十三、3T3-L1 脂肪細胞與 F2-2 培養液共置下之 pAKT 蛋白質相對量	67
圖二十四、3T3-L1 脂肪細胞與 F2-2 培養液共置下之 AKT 蛋白質磷酸化程度	68
圖二十五、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-3 培養液共置下之 AKT 蛋白質相對量	69
圖二十六、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-3 培養液共置下之 pAKT 蛋白質相對量	70
圖二十七、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-3 培養液共置下之 AKT 蛋白質磷酸化程度	71
圖二十八、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-4 培養液共置下之 AKT 蛋白質相對量	72
圖二十九、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-4 培養液共置下之 pAKT 蛋白質相對量	73
圖三十、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-4 培養液共置下之 AKT 蛋白質磷酸化程度	74

表目錄

表一、篩選自發酵食品之 17 種乳酸菌特性	41
表二、篩選自傳統蔬菜之 14 種乳酸菌特性	42
表三、篩選自嬰幼兒糞便之 16 種乳酸菌特性	43
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	44
表五、經酸(pH 2.0)處理後膽鹽對乳酸菌(傳統蔬菜)之生長影響	45
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	46
表七、乳酸菌培養液對 α -amylase 及 α -glucosidase 之抑制能力測定	47
表八、一般培養條件下乳酸菌培養液之殘糖量	48



附圖目錄

附圖一、於人體中微生物分布圖	5
附圖二、乳酸菌之代謝途徑	6
附圖三、第一型糖尿病之病程變化	8
附圖四、美國糖尿病協會之診斷標準	9
附圖五、第二型糖尿病之藥物與器官之間的關係	11
附圖六、人體內維持血糖恆定相關週邊組織	12
附圖七、3T3-L1 前驅脂肪細胞之分化圖	15
附圖八、胰島素相關調控	16
附圖九、AMPK 三種亞型之結構及調節位點	18
附圖十、AMPK 對周邊組織之效應	18
附圖十一、肥胖造成脂肪激素分泌之改變	19
附圖十二、脂肪組織與胰島素阻抗相關之細胞激素	20



附表目錄

附表一、市售產品中常見乳酸菌菌株.....4
附表二、Akt 各異構型於不同組織之表現情況.....17



中文摘要

隨著飲食生活型態的改變，糖尿病等慢性病的盛行率逐年增加。第二型又稱非胰島素依賴型為主要的糖尿病類型，不僅影響葡萄糖之代謝，同時也造成呈現於血脂體脂之脂質代謝異常。乳酸菌普遍存在於動物腸道、發酵食品及自然環境中，已知腸道中乳酸菌影響宿主代謝，具有調節血糖血脂之能力。本研究篩選具維繫葡萄糖恆定能力之乳酸菌，並以體外細胞模式探討其培養液是否在共置培養下影響 3T3-L1 脂肪細胞分泌能調節胰島素敏感性之脂泌素。各菌株分離自發酵食品、蔬菜及嬰幼兒糞便後，以革蘭氏染色、觸酶活性、凝乳能力、腸道細胞吸附、耐酸耐膽鹽等試驗進行初步篩選。其中 66 株可能為乳酸菌者抽取其 Genomic DNA 進行 16S rDNA PCR 及定序，以確認菌種分類，證實多為乳酸桿菌及魏斯氏菌屬。多數分離株對 α -澱粉酶抑制能力不佳，而 19 株菌株則可有效抑制 α -葡萄糖苷酶活性。進一步以 FL83B 小鼠肝細胞評估乳酸菌發酵液促進葡萄糖擬似物帶入細胞能力，發現其中 3 株對胰島素阻抗有較佳改善能力。將分化後 3T3-L1 脂肪細胞誘導阻抗並添加 3 株乳酸菌上清液共置後，酵素抑制免疫分析法結果顯示隨著上清液濃度增加，細胞分泌之抗素及腫瘤壞死因子減少而脂聯素及瘦素則呈增加。西方轉漬結果亦顯示脂肪細胞之 AKT 表現量及其磷酸程度均於與乳酸菌上清液共置後增加。綜合上述結果推論，此乳酸菌上清液可增加葡萄糖攝入並調節胰島素傳訊及細胞激素進而產生調節葡萄糖及脂質代謝之作用。

關鍵字：乳酸菌、脂肪細胞、胰島素阻抗、脂泌素

Abstract

With dietary and lifestyle changes, the prevalence of chronic diseases such as diabetes mellitus increase year after year. Type 2 diabetes, also known as non-insulin dependent diabetes, not only affects glucose metabolism but also results in abnormal lipometabolism. Lactic acid bacteria (LAB) are generally found in guts, fermented food products and natural environment. Previous studies have shown that LAB affect host metabolism and regulate blood sugar along with serum lipid. The aim of this study was to isolate LAB strains with the ability to maintain glucose homeostasis and investigate in an in vitro cell model if the coincubation of their culture media may regulate the secretion of adipokines relating to insulin sensitivity from 3T3-L1 adipocytes. After isolated from fermental food, vegatebles or infant feces, all isolates were subjected to a series of screening tests including Gram staining, catalase activity, curding ability, adhesion to gut epithelial cells, acid and bile salts tolerance. Genomic DNA were extracted from 66 candidate LAB strains, then 16S rDNA gene segments were amplified by PCR and sequenced to reveal that most of our isolated strains are classified as *Lactobacillus* or *Weissella* spp. While generally lacking α -amylase inhibition ability, culture media of 19 strains did effectively suppress the activity of α -glucosidase. To further evaluate whether the fermentation products could promote insulin sensitivity by glucose uptake, the importation of a glucose analogues, NBDG, into murine FL83B hepatocytes was monitored, and top 3 LAB strains were selected for successive assays. Culture media of 3 LAB strains were added to differentiated 3T3-L1 adipocytes after an induction of insulin-resistant by high concentration of glucose. As shown in ELISA, when the concentrations of added media raised, the secretion of resistin and TNF- α decreased, whereas adiponectin and leptin increased. Western blot analysis further revealed that the co-culture with LAB fermentation broths might enhance the expression and phosphorylation activation of AKT in adipocytes. In conclusion, our results indicate that the fermentation products of LAB could enhance the intake of glucose, improve insulin sensitivity through regulated insulin signaling and adipokine secretions, and thereby facilitate the control of glucose and lipid metabolism.

Keyword: Lactic acid bacteria, 3T3-L1 adipocyte, Insulin resistance, Adipokine

第一章、文獻回顧

1-1 益生菌

益生菌(Probiotics)為活的微生物，當給予的量達到一定時，能為宿主產生益菌，並增強宿主本身之健康益處(Health and Bacteria 2001)。益生菌必須來自於宿主本身且由健康宿主腸道中分離出之菌株並不具有傳染性之抗生素基因。益生菌之特性為：通過宿主消化道後還可存活並吸附於腸上皮細胞，於長時間儲存時也可保持一定之活性，並改變宿主腸道內微生物菌相(Klein, *et al.* 1998)。益生菌最具代表之菌屬為 *Lactobacillus* 和 *Bifidobacterium*(Aggarwal, *et al.* 2013)。

1-2 乳酸菌

乳酸菌為可利用碳水化合物產生大量乳酸代謝物之細菌，被歸類為安全菌種(GRAS, generally regarded as safe)，是腸內有益菌之最佳代表。過去，乳酸菌之相關性食品非常普遍，例如：發酵乳製品、穀物酒製品或是奶酪(Joosten, *et al.* 2006)；現今乳酸菌之應用不局限於相關性食品，更廣泛地應用於醫療輔助用品，例如：下痢、整腸劑，或是畜牧飼養上，例如：將菌種與飼料混合，利用菌種之特性來降低抗生素使用過量之情形(Guerra, *et al.* 2007)。

1-2-1 特性及分類

乳酸菌是一種兼性厭氧菌，除了作為能量之碳水化合物外，乳酸菌還要各種胺基酸、礦物質、維生素才可生長。適合乳酸菌生長得環境分成兩個來源，第一來源為動物來源，例如：乳汁、糞便、陰道、消化道；第二來源為植物來源，例如：花蜜、植物表面、樹液等部位。

此特性為格蘭氏陽性菌、無運動性、缺乏觸媒、一般適合生長溫度範圍為 30-37°C、兼性厭氧或耐氧，一般情況可於有氧環境生長，如果於無氧環境下會生長的較佳、最適 pH 值為 5.5-6.5 之間、僅少數具有芽孢及莢膜、依最終產物及發酵方式不同可分為同型發酵或異型發酵兩種(Karin Hofvendahl 2000; Parvez, *et al.* 2006; Reddy, *et al.* 2008)。常用乳酸菌株如附表一所示。

附表一、市售產品中常見乳酸菌菌株

<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp.
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Ent. faecalis</i>	<i>S. cremoris</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Ent. faecium</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. (<i>bulgaricus</i>)	<i>B. animalis</i>		<i>S. diacetylactis</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. infantis</i>		<i>S. intermedius</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. lactis</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. brevis</i>			

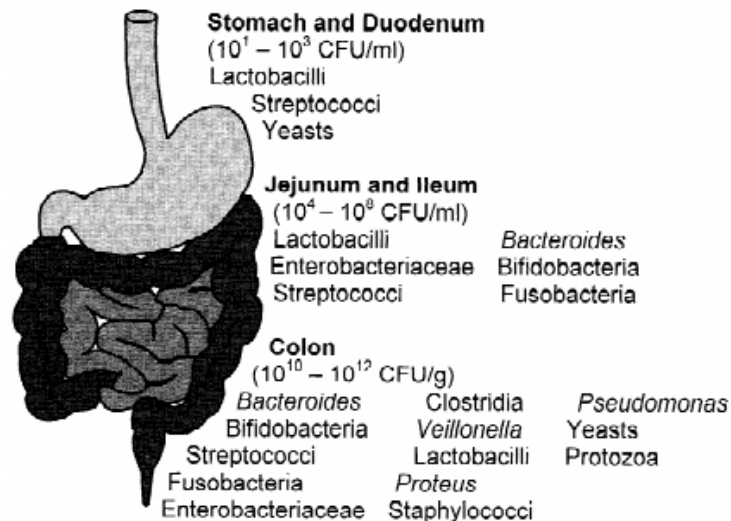
(Parvez, et al. 2006)

1-2-2 生理功效

1-2-2.1 維持腸道菌叢平衡

人體內之消化道菌叢非常複雜，其中包含病原菌及益生菌，如病原菌之數量於腸胃道中大於益生菌數量，則使人體健康狀況下降。人體腸胃道中之菌叢分布數量及情形如附圖一所示。

許多微生物會受到低 pH 值的傷害，所以於胃部中之菌叢後到胃酸影響，菌叢以 *Lactobacillus*、Yeasts 為主，菌數約為 10^1 至 10^3 CFU/mL；於小腸中之刺激的腸液，例如：膽汁或胰液，會使微生物受到些許破壞，菌叢以 *Lactobacillus*、*Enterobacterium*、Yeasts 為主，菌數約為 10^2 至 10^5 CFU/mL；人體中大腸之菌相相對於其他消化道而言其菌相及菌數量皆於最複雜及最多，菌叢以 *Bacteroides*、*Bifidobacterium*、*Closterdium*、*Enterobacterium* 等為主(附圖一)。這些腸內菌叢之分布可分成三種類型，第一種為游離型，此型會於體內中停留較短時間；第二型為與腸內容物顆粒結外型，此型菌株還有酵素，可消化結合顆粒以利於宿主；第三型為與腸壁組織結外型，此型菌株可防止病原菌定殖於腸道且如有大量乳酸菌可與腸壁形成生物膜造成屏障作用可防止病原菌靠近上皮細胞，具有抑制外來微生物之增殖。



附圖一、於人體中微生物分布圖

(Holzapfel, *et al.* 1998)

1-2-2.2 降低血液中膽固醇含量

肝臟合成膽固醇，經不同脂蛋白途徑送回肝臟再利用或是代謝出身體。膽固醇為多種物質之前身，例如：膽鹽、膽酸或是其他固醇類賀爾蒙，如身體血管中有過多之膽固醇容易造成冠狀動脈粥狀硬化之現象。

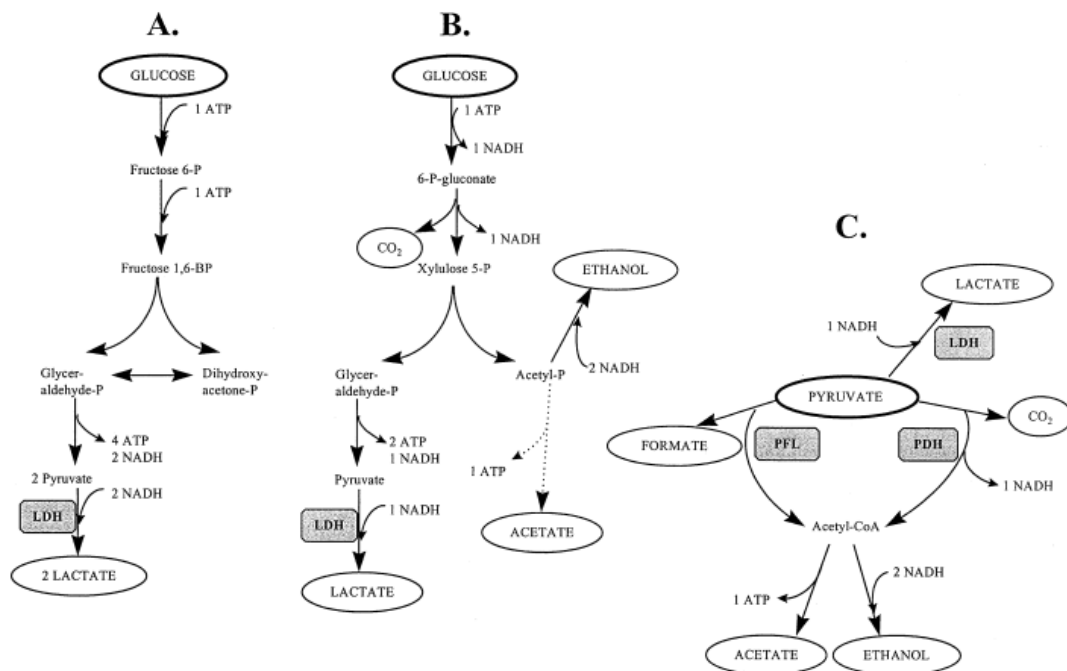
許多文獻指出，發酵乳具有可降低血清中膽固醇之含量，此作用有幾種機制，機制一為降低膽固醇吸收，膽固醇之排泄是經由肝臟代謝成膽酸，與胺基酸及離子結合形成鹽類，再由糞便排出體外，且膽固醇謝過程中會產生水溶性膽鹽，這些水溶性膽鹽會與具膽鹽水解酵素之菌株作用，形成非結合型膽鹽也可稱去結合型膽鹽，此物質為親油性，藉此得以與膽固醇產生共沉澱作用而排出，可降低膽固醇再次被吸收也可提升膽固醇轉化成膽鹽之速率；機制二為抑制膽固醇生合成，腸道中之菌叢將為吸收之碳稅化合物及內源性多糖進行發酵，產生短鏈脂肪酸，此物質可抑制 HMG-CoA(3-hydroxy-3-methylglutary-CoA) reductase 活性，若此酵素被抑制就可抑制膽固醇之合成；機制三為直接合成，菌株直接吸附腸內之膽固醇而使其膽固醇較不被腸道吸收，得以降低膽固醇含量(Kimoto, *et al.* 2002; Kumar, *et al.* 2012)。

1-2-2.3 降低血壓

乳酸菌於代謝中會產生乳酸，此物質可降低腸道中 pH 值，增加腸道蠕動改善便秘並抑制腸道中之毒物生成，達到預防大腸癌之功效，且代謝時所產生之丁酸維持結腸細胞之作用(Ziemer and Gibson 1998)。發酵乳酸菌之產物可抑制 Angiotensin I-converting enzyme(ACE)活性，此酵素為調控血壓之主要物質(Lye, *et al.* 2009)。

1-2-3 代謝特性

乳酸菌之代謝途徑及產物可分成三種，第一種為同型發酵 (Homofermentation)，經糖解作用 (Embden–Meyerhof–Parnas pathway) 將碳水化合物降解成丙酮酸再還原成乳酸之最終產物，例如：*Lactobacillus*、*Streptococcus* 和 *Pediococcus*，其中一些乳酸菌因碳源的不同導致裂解之丙酮酸是由 pyruvate formate lyase (PFL) 進行代謝而產生 formate and acetyl-CoA 之最終產物；第二種為異型發酵 (Heterofermentation)，將碳水化合物透過磷酸轉化酶作用產生乙醇、乙酸及二氧化碳之最終產物；第三種為混合酸發酵 (mixed acid fermentation) (附圖二)。



附圖二、乳酸菌之代謝途徑

A.同型發酵、B.異型發酵、C.混合酸發酵

(Karin Hofvendahl 2000)

1-3 糖尿病

現今人們飲食越來越精緻，因為飲食關係導致提高了文明病的發生率，例如：肥胖、高血脂、高血壓、糖尿病及心血管疾病等慢性病，雖然無顯著病徵但卻有群聚發生之現象，統稱代謝症候群(metabolic syndromes)。根據行政院衛生署近十年之統計結果顯示，糖尿病為國人前十大死因之一，併發症會有高血壓、腎病變、冠心病、視網膜病變、神經病變等。

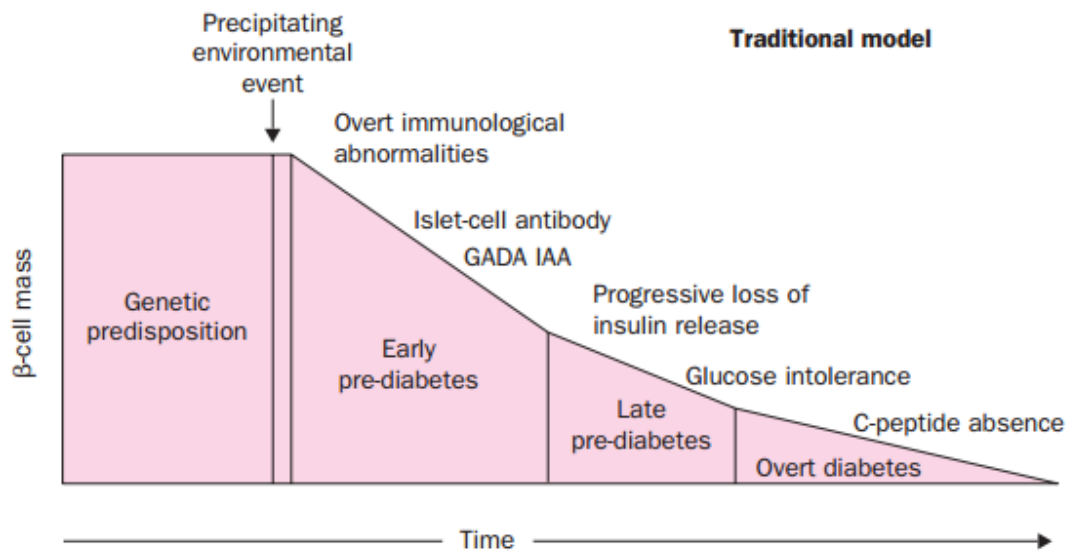
世界衛生組織與美國糖尿病協會將糖尿病(Diabetes mellitus)定義為多病因之代謝異常疾病，主要是胰島細胞又稱 β 細胞分泌之胰島素不足或是功能作用發生阻抗現象，葡萄糖不易進入細胞內，導致血中葡萄糖濃度過高，長期下來會使身體組織對碳稅化合物、蛋白質及脂肪的代謝受到影響，其典型症狀為吃多、喝多、尿多及體重減輕(American Diabetes 2016)。

1-3-1 糖尿病主要類型

糖尿病目前分成主要四型：第一型糖尿病、第二型糖尿病、妊娠糖尿病及其他特異型，其中以第二型糖尿病之疾病特徵與本研究較為相關。

1-3-1.1 第一型糖尿病(Type 1 diabetes mellitus)

此型糖尿病又稱胰島素依賴型，好發年齡為兒童或青少年，主要原因為自體免疫引起，使其胰臟中之胰島細胞(β 細胞)受到破壞，導致胰臟無法自動分泌胰島素造成體內血糖失去平衡，第一臨床表現除了高血糖外也可能出現酮酸血症(diabetic ketoacidosis)，通常此類型患者治療方法必須注射胰島素，其患者占我國所有糖尿病患者中的百分之一左右(Ziegler and Nepom 2010)。此型病程可大致分成四期：基因易感期(Genetic predisposition)、早期、晚期、糖尿病(附圖三)。



附圖三、第一型糖尿病之病程變化

(Atkinson and Eisenbarth 2001)

1-3-1.2 第二型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus)

此型糖尿病又稱非胰島素依賴型，好發年齡多為 30-40 歲以後，隨年齡增長發生率上升，是現今最為普遍之類型，此型患者占台灣地區罹患糖尿病人口 40 歲以上人口約 6%，65 歲以上約占 10%，且病例數隨年持續增加。此型患者自體可分泌胰島素，其自體組織例如：肌肉、肝臟及脂肪，對胰島素敏感性下降，導致細胞無法帶入葡萄糖，使胰島細胞(β 細胞)過度分泌胰島素並衰竭，最後造成血液中葡萄糖濃度上升，如此循環演變成第二型糖尿病(Cheng and Fantus 2005)。

1-3-1.3 妊娠糖尿病(Gestational diabetes mellitus, GDM)

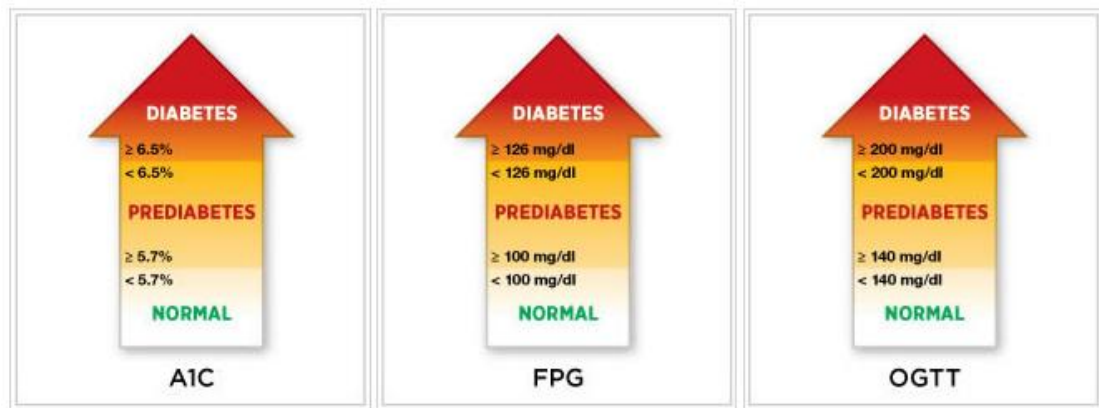
於妊娠階段(24-28 週)因賀爾蒙分泌使葡萄糖耐受性異常稱妊娠糖尿病。在妊娠中之孕婦約有 2% 的人會罹患此型，但控制恰當生產後糖尿病就會消失，但據估計，此型患者中約有 60% 會於 15 年後得到第二型糖尿病。如控制不當大量葡萄糖透過胎盤將營養運輸致胎兒，會使胎兒之胰島細胞(β 細胞)增生，胰島素分泌增加，過多之胰島素會造成胎兒內臟及身體脂肪增加導致新生兒變成巨嬰(Round, *et al.* 2011)。

1-3-1.4 其他特異型糖尿病(Other specific types of diabetes)

此型患者號發年齡不一，罹患原因多種，例如：胰島細胞(β 細胞)或作用胰島素功能基因病變、賀爾蒙等分泌異常，且藥物、化學物質、病毒感染都可能造成此型。

1-3-2 糖尿病診斷

目前之診斷方法有三種，第一種為糖化血色素(Glycosylated hemoglobin, HbA1c 或 A1C)，指血液中之紅血球含有血色素，當葡萄糖進入血液後會和血紅素結合且不易脫落，且紅血球壽命約三個月，可反映體內最近 2-3 個月之血糖情況。美國糖尿病協會提出 HbA1c 大於等於 6.5% 即可視為罹患糖尿病之標準。第二種為空腹血糖濃度(Fasting plasma glucose, FPG)，空腹 8-10 小時後測其血糖值，正常範圍應小於 100mg/dl，若高於等於 126mg/dl 則視為糖尿病。第三種為口服葡萄糖耐受性試驗(oral glucose tolerance test, OGTT)，此試驗於空腹 8-10 小時後喝下含有 75g 葡萄糖溶液 300 毫升，兩個小時後 OGTT 之正常範圍應小於 140mg/dl，如大於等於 200mg/dl 即可診斷為糖尿病(附圖四)。



附圖四、美國糖尿病協會之診斷標準

(American Diabetes 2016)

1-3-3 糖尿病治療

糖尿病治療方式基本上以控制飲食、運動減肥等物理治療為主，有些則需借助藥物治療來達到正常血糖之調控。第一型患者透過注射胰島素來進行治療；第二型則是使用口服藥物或依照自身情況注射胰島素另外也會加上食物的消化吸收來調節。現今第二型糖尿病之藥物機制約有四種，分別是抑制肝臟糖質新生、增加胰島素的分泌、延遲腸碳水化合物的吸收、增加脂肪攝取游離脂肪酸增加胰島素敏感性(附圖五)。

1-3-3.1 葡萄糖甘酶抑制劑(glucosidase inhibitors)

代表藥物為 Acrose，此藥物是最早上市藥物之一，此藥物結構與碳水化合物相似，被歸類為競爭型抑制。作用於小腸前端刷狀絨毛將寡糖及雙糖分解成易消化之單糖，延緩前端腸道吸收碳水化合物，使餐後血糖上升平緩，進而降低餐後血糖值(Cheng and Fantus 2005)。於臨床研究了解，此藥物可使血中糖化血色素(Glycosylated hemoglobin, HbA1c 或 A1C)降低 0.5 至 1.0 百分比(Lebovitz 1997)。

1-3-3.2 雙胍類(biguanides)

代表藥物為 Metformin，主要抑制肝臟糖質新生，減少葡萄糖從肝臟釋出，促使細胞內之葡萄糖轉運蛋白 GLUT4 轉為至細胞表面參與葡萄糖運輸，提升肌肉組織對糖的攝取。其副作用多為胃腸道相關症狀，如腹部不適，厭食，腹脹，腹瀉。

1-3-3.3 磺酸脲類(sulfonylureas)

提升 β 細胞表面的受體結合，使細胞膜上之鉀離子通道關閉，使鉀離子聚集於胞內，使細胞膜去極化，鈣離子通道打開，讓鈣離子流入導致微管收縮促使胰島素從囊泡中進行胞吐作用，並增加 β 細胞對葡萄糖敏感性而使胰島素分泌但不會刺激胰島素合成。其副作用為低血糖症及增加體重。

1-3-3.4 非磺酸脲類(Non-sulfonylureas)

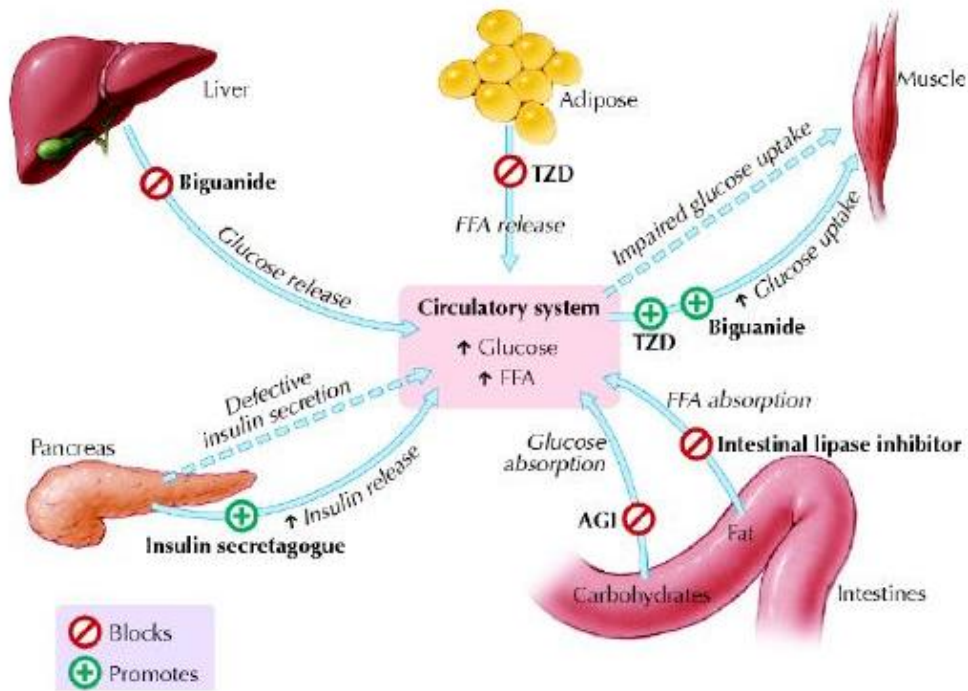
此類與磺酸脲類差異微受體結合位置不同，且此類必須有葡萄糖才可發揮作用，此型作用快半衰期長，適合用餐不固定之患者。其副作用為腸胃不適及暫時性視覺障礙。

1-3-3.5 胰島素增敏劑(Insulin sensitizers)

代表藥物為 TZD 類，主要可促進細胞內之 PPAR- α 之活性，增加細胞上之 GLUT 1 和 GLUT 4 作用，進而提升葡萄糖轉入，此現象於脂肪細胞中有極高表現。其副作用為體重增加，浮腫，貧血，肺水腫和充血性心臟衰竭。

1-3-3.6 Glucagon-like peptide (GLP-1)類似物

GLP-1 為小腸分泌的胜肽賀爾蒙，其主要作用可在血糖提昇時促進胰島素分泌來抑制食慾減緩胃排空作用。內生性 GLP-1 容易在體內容易被 DPP4-I 降解，此時可使用 DPP4-I 抑制劑來延長 GLP-1 之作用時間。

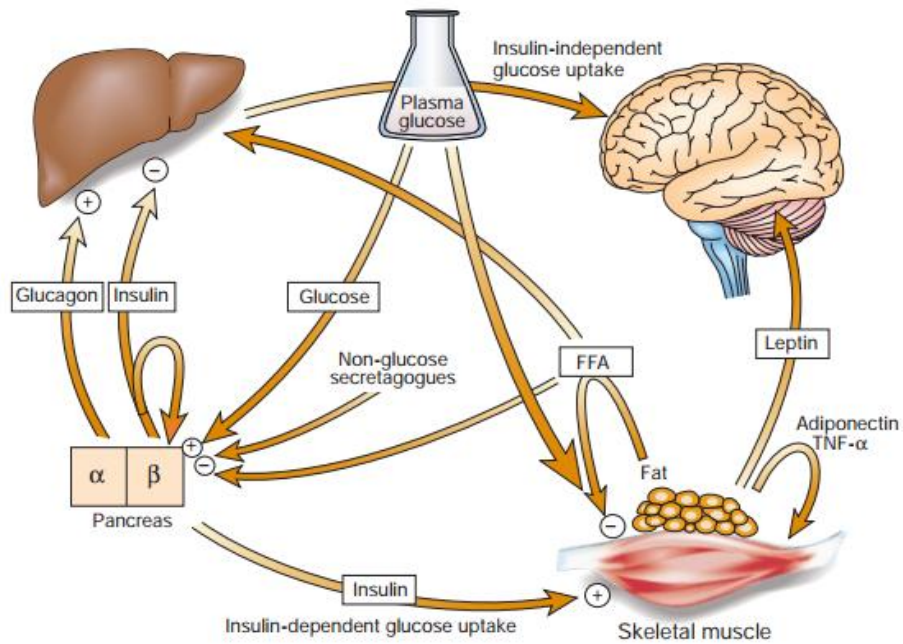


附圖五、第二型糖尿病之藥物與器官之間的關係

(Cheng and Fantus 2005)

1-3-2 代謝症候群與脂肪組織關係

如今的社會開始講究起健康這一議題，所以肥胖經常被討論。長期的肥胖會引發許多代謝性異常疾病，例如：血脂異常、高血壓、血糖耐受異常、高胰島素血症及第二型糖尿病的發展有關(Eikelis, *et al.* 2003)。脂肪組織的過度累積會產生許多脂肪酸，使骨骼肌、脂肪還有肝臟產生胰島素抵抗現象。脂肪組織在代謝中扮演著重要的角色，可藉由胰島細胞(β 細胞)分泌胰島素來降低肌肉對葡萄糖的攝取，並增加肝臟利用葡萄糖產生游離脂肪酸。另外脂肪組織也會分泌“脂肪細胞激素”，例如：脂聯素(Adiponectin)、抗素(Resistin)、腫瘤壞死因子(TNF- α)，增加周邊組織對胰島素的敏感性及攝入(附圖六)。本論文之細胞試驗將選用脂肪細胞當作平台，期望可更加了解本實驗樣品和胰島素抵抗的相關性。



附圖六、人體內維持血糖恆定相關週邊組織

(Saltiel and Kahn 2001)

1-4 研究模式

1-4-1 脂肪組織(Adipose tissue)

脂肪組織主要是由脂肪細胞(adipocyte)構成的，可維持能量平衡、保護臟器等，此細胞之大小由增殖(hyperplasia)與肥大(hypertrophy)等方式決定(Rosen, *et al.* 2000)。而脂肪組織可分成兩種，第一種是白色脂肪組織(White adipose tissue, WAT)，第二種是褐色脂肪組織(Brown adipos tissue, BAT)，可依照顏色、生長位置及細胞結構做區分，此兩種脂肪組織都和能量代謝息息相關。

1-4-1.1 白色脂肪組織

白色脂肪組織的分布非常廣，在許多物種中都可發現，例如：哺乳類動物，且此組織會於胚胎時期開始形成，並於成人時期後還可產生新細胞之能力。由物種中分離出之前驅脂肪細胞可利用體外試驗將其分化成成熟脂肪細胞，於體內試驗中可發現餵食大鼠高脂肪飼料可增加老鼠體內脂肪數量，於較肥胖之人體也可觀察到此現象，故此脂肪之體積及重量可作為肥胖之指標。

此組織易儲存於腹部、大腿、臀部、臟器周圍或是皮下組織，主要功用為儲存能量，當能量攝取過剩時將會儲存三酸甘油酯(Triglyceride, TG)，其油脂為組成白色脂肪組織之一的大型脂肪滴(lipid droplet)之原料(Gregoire, *et al.* 1998)；當能量不足時，身體之脂解酵素會進行脂解作用(lipolysis)，將提供身體其他組織之能量來源，其中會最先消耗臀部及腹部的脂肪組織，身體四肢則較少(Vazquez-Vela, *et al.* 2008)。

分化中之脂肪組織除了會分泌細胞激素外也可進行三酸甘油酯之合成脂解作用，當脂解作用大於合成時此細胞之個體體積會減少，反之其增加。進行脂解作用時會產生游離脂肪酸和甘油，脂肪細胞無法再次利用甘油，因此會透過循環送至肝臟成為葡萄糖新生之原料(Kishida, *et al.* 2001)。

1-4-1.2 褐色脂肪組織

此脂肪組織多存在於冬眠之哺乳動物中之上半身，體內之三酸甘油酯會轉化成能量來維持自體體溫(Cannon and Nedergaard 2004)。褐色脂肪也會存在於哺乳動物，特別是小型動物。人類嬰幼兒和啮齒動物因體表容易造成失溫的情況，所以此組織會消耗熱能使體內溫度保持，在幼童時期此組織會大量消失，成人時期也只能在白色脂肪組織中存在極少數褐色組織(Winzell and Ahren 2004)。於脂肪氧化過程中可藉非耦合蛋白 1(Uncoupling protein 1,UCP1)以熱能形式釋放熱能，提供身體所需(Klingenberg and Huang 1999)。

1-4-2 前驅脂肪細胞研究模式之細胞株

現階段有許多體外細胞生成之研究模式文獻會利用前驅脂肪細胞 (preadipocyte) 分化成成熟脂肪細胞 (adipocyte) (Rosen, *et al.* 2000)。研究用之前驅脂肪細胞分成兩種，第一種為多潛力細胞可分化成多種細胞型態，例如：CHEF/18、10T1/2、Balb/c、3T3 和 RCJ3.1，可使用藥物 5-azacytidine 將細胞轉化成前驅脂肪細胞 (preadipocyte) 或是前肌肉細胞 (premytocyte) 和前軟骨細胞 (prechondrocyte) (Hasty, *et al.* 1993)；第二種為確定轉變成前驅或是成熟脂肪細胞，例如：3T3-L1、3T3-FA22A、O1771 和 TAI1246 及 30A05 等，此種類為研究前驅和成熟脂肪細胞之理想材料。最被廣泛使用之細胞株，例如：3T3-L1 和 3T3-F422A 細胞株，皆分離自 Swiss 品系之 17-19 天小鼠胚胎 (Gregoire, *et al.* 1998)。本研究將以 3T3-L1 細胞株為研究平台。

1-4-3 前驅脂肪細胞 3T3-L1 分化

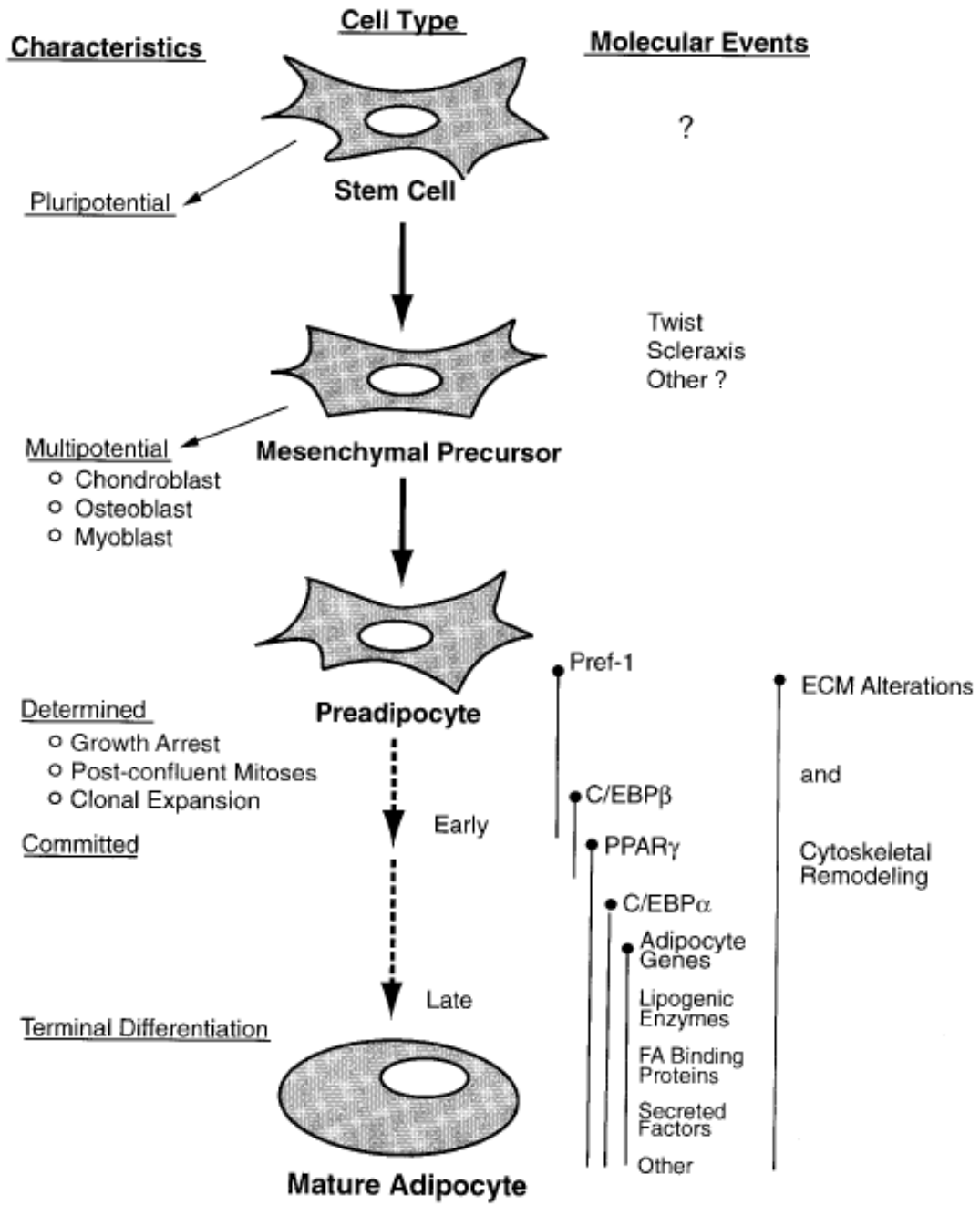
於培養皿中之前驅脂肪細胞將分裂至互相碰觸就停止分裂，接著加入外源性分化試劑刺激細胞分化，分別為 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)、Dexamethasone (DEX) 及胰島素 (Insulin)。

IBMX 是 cAMP 磷雙脂酶 (cAMP phosphodiesterase) 和 cGMP 磷雙脂酶 (cGMP phosphodiesterase) 抑制劑，經由抑制劑作用增加細胞中 cAMP 含量，並活化 cAMP - dependent protein kinase 路徑誘導細胞分化 (Hauner 1990)。

DEX 是一種人工合成之糖皮質激素 (glucocorticoid) 當作增敏劑使用，可調控細胞內之轉錄因子並活化 Glucocorticoid receptor 誘導 C/EBP δ 表現，並減少脂質生成之 pref-1 表現。

Insulin 經由類胰島素生長因子受體 (Insulin-like grown factor receptor, IGF-1 receptor) 結合活化酪胺酸激酶 (tyrosine kinase) 並激活撕裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和胞外訊息調控激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 1 或 2 使細胞增生 (Gregoire, *et al.* 1998)。

整體來說，3T3-L1 前驅脂肪細胞分化過程可分成四個時期，極早期、早期、分化中期最後為分化末期 (附圖七)。

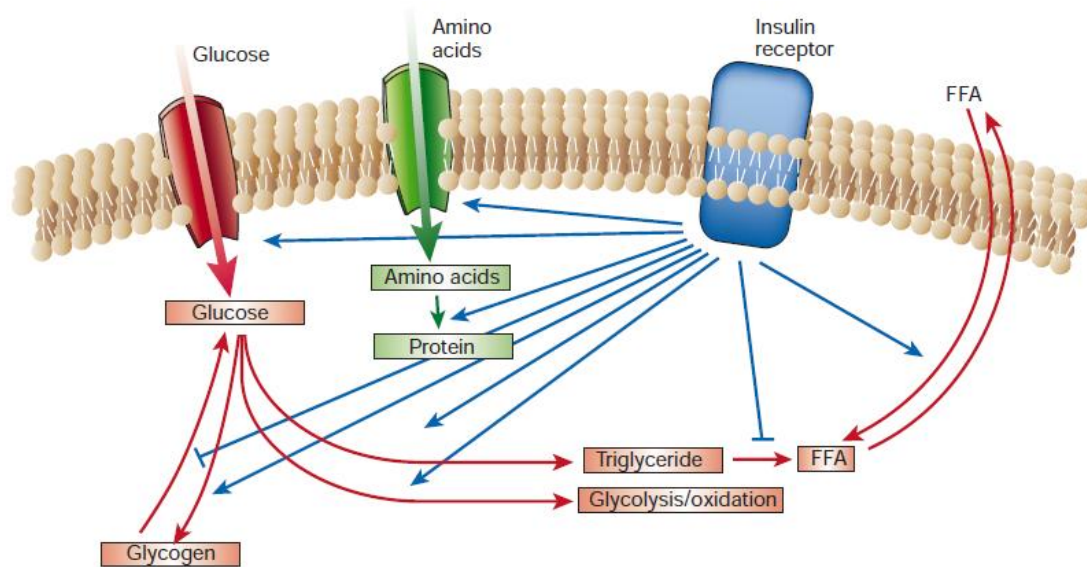


附圖七、3T3-L1 前驅脂肪細胞之分化圖

(Gregoire, *et al.* 1998)

1-5 胰島素傳訊路徑

脂肪組織在人體中除了保護臟器、維持能量生理功能外在體內葡萄糖調控中也占了重要角色。在進食一段時間後，血中葡萄糖濃度會提升(5mM)，使胰島素分泌進而調控細胞中葡萄糖、脂質和蛋白質(附圖八)。



附圖八、胰島素相關調控

(Saltiel and Kahn 2001)

1-5-1 蛋白質激酶 B(Protein kinase B, PKB/AKT)

蛋白質激酶 B 又稱 Akt，有三種異構型，Akt1 主要存在於大腦、心臟胸腺、Akt2 存於棕色脂肪組織和小腦及骨骼肌、Akt3 則是大腦和胸腺(Zdychova and Komers 2005)。

活化之 Akt 可參與細胞增生、蛋白質合成及葡萄糖調控之功能。肌肉組織中的胰島素會使葡萄糖攝取功能低下而影響到肝臟代謝葡萄糖之能力，此現象主要存在於 Akt2，因此 Akt2 是主要調控胰島素和葡萄糖之異構型(Cho, *et al.* 2001)。

附表二、Akt 各異構型於不同組織之表現情況

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

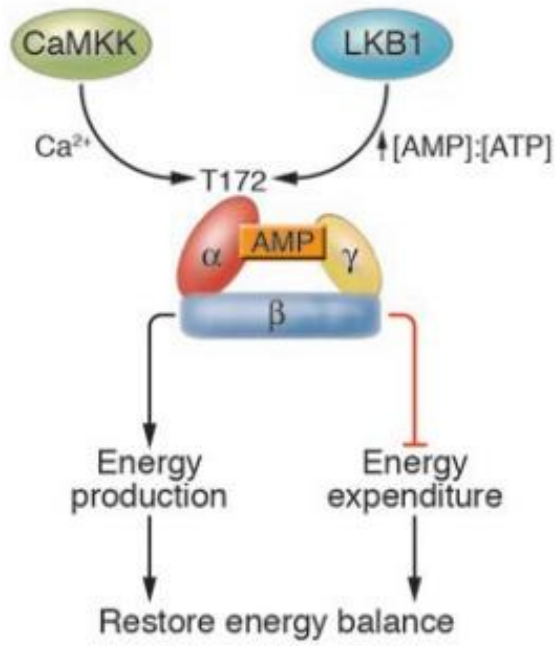
(Zdychova and Komers 2005)

1-5-2 磷酸腺苷激活蛋白激酶(AMP-actived protein kinase, AMPK)

AMPK 是調節體內生理激活酵素之一，於細胞中是以異源三聚體蛋白的形式存在，由 α 、 β 、 γ 三種次單元組成(附圖九)， β 和 γ 次單元上之 CaMKK 和 LKB 可透過細胞中之鈣離子和 AMP/ATP 比值來活化 AMPK，且 AMPK 通過激活產生能量，例如：脂質氧化和葡萄糖攝取，同時抑制那些消耗能量，例如：蛋白質合成維持能量平衡(Woods, *et al.* 1996)。

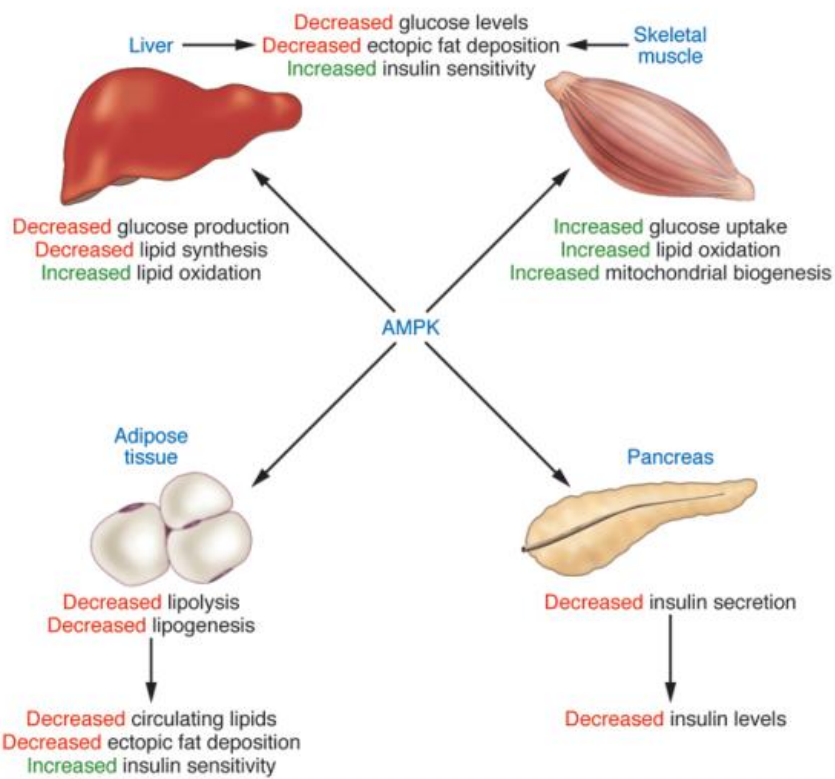
AMPK α 2 催化亞基會表現於肌肉細胞， α 1 及 α 2 都會表現於肝臟細胞， α 1 催化亞基是於脂肪細胞中表現較多且被認為主要 AMPK 活性位置(Lihn, *et al.* 2004)，它可調控細胞內之能量代謝，如細胞內此激酶比例提升的同時代表能量缺乏，進而活化 AMPK thierine¹⁷² (Thr¹⁷²)位點磷酸化，促使 GLUT4 之葡萄糖轉位置細胞膜並增加 ACC 磷酸化來抑制脂肪酸合成、促進脂肪氧化降低三酸甘油脂。瘦素可活化此激酶來刺激肌肉和肝臟脂質氧化(Minokoshi, *et al.* 2002)，脂聯素可提升肌肉葡萄糖利用也可增加胰島素敏感性和肌肉肝臟脂肪酸的氧化作用(Fruebis, *et al.* 2001)。

3T3-L1 脂肪細胞加入 AICA 刺激 AMPK 之葡萄糖傳訊，由附圖十可了解 AMPK 對周圍組織之調節作用。抑制 AMPK 活性會使胰島素敏感性下降且脂聯素和糖尿病藥物則可提高此激酶活性也可活化，顯示其抗葡萄糖調控之重要性(Yamauchi *et al.*,2002)，因此被廣泛認為是可治療第二型糖尿病之標靶。



附圖九、AMPK 三種亞型之結構及調節位點

(Long and Zierath 2006)

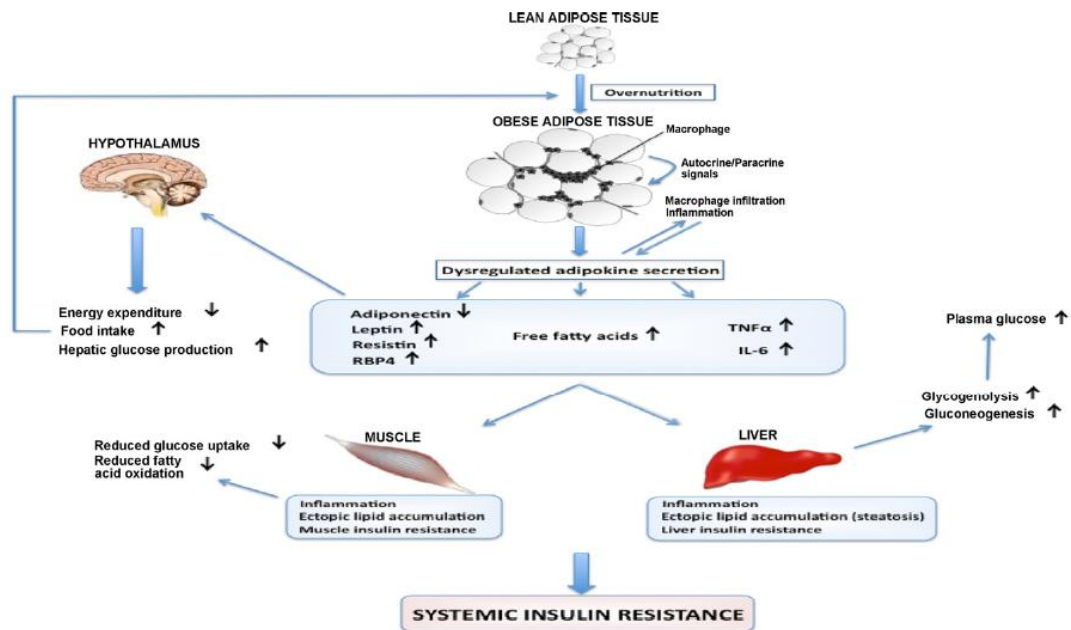


附圖十、AMPK 對周邊組織之效應

(Long and Zierath 2006)

1-6 細胞激素與胰島素抵抗關聯性

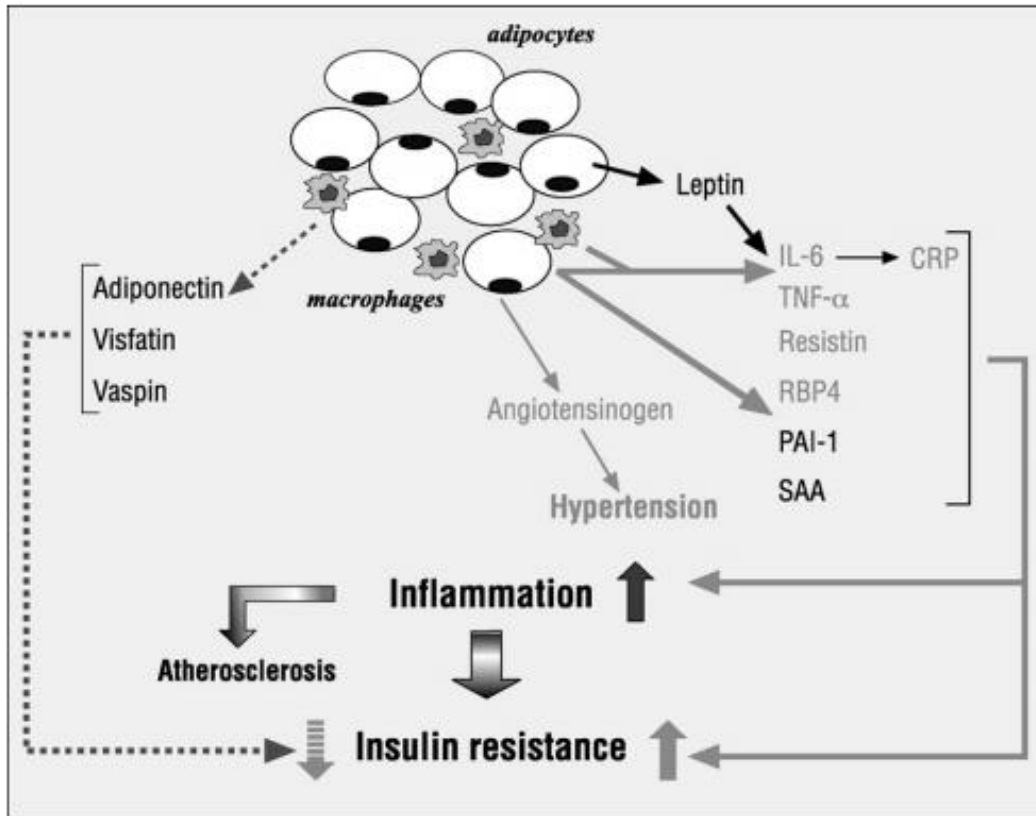
在第二型糖尿病中有絕大多數之患者因長期肥胖造成胰島素抵抗 (Chandran, *et al.* 2003)且過多的脂肪加上不當之飲食、運動習慣，通常會伴隨著心血管疾病或是其他慢性病。由附圖十一可了解肥胖對脂肪細胞之細胞激素之影響，生理上會因為激素改變而先影響到下視丘使食慾提升、降低耗能，讓肌肉及肝臟對胰島素敏感性降低。於動物實驗中得知，過度攝食會造成脂肪增加並造成許多代謝疾病，例如：高血糖、高血脂、高血壓。



附圖十一、肥胖造成脂肪激素分泌之改變

(Galic, *et al.* 2010)

一直以來，脂肪細胞之生理功能一直被認為只能存放脂肪，近年來發現脂肪細胞也可分泌出許多激素，並可調節能量代謝，例如：脂聯素(Adiponectin)或抗素(Resistin)(Kim and Moustaid-Moussa 2000)。成熟脂肪細胞會分泌許多細胞激素，例如：脂聯素(Adiponectin)、抗素(Resistin)、瘦素(Leptin)、腫瘤壞死因子(TNF- α)等(Fasshauer and Paschke 2003)(附圖十二)。



附圖十二、脂肪組織與胰島素阻抗相關之細胞激素

(Antuna-Puente, *et al.* 2008)

)



1-6-1 細胞激素介紹

1-6-1.1 脂聯素(Adiponectin)

脂聯素是由脂肪組織所分泌，是此細胞中最高濃度之蛋白質。它主要存在於血清中，以三聚體、六聚體和高分子聚合體的形式儲存。因脂聯素有特定球形 C 尾端之片段(globular C-terminal fragment)可提升胰島素敏感性，這功能來自此激素可增加肌肉內脂肪酸氧化所致，另外，此激素也可抑制乙醯輔酶 A 脫羧酶(acetyl coenzyme A carboxylase,ACC)使腺苷酸單磷酸激酶(adenosine monophosphate kinase,AMPK)活化，使肝臟中糖質新生之酵素降低(Yamauchi, *et al.* 2002)。

1-6-1.2 抗素(Resistin)

抗素是由脂肪細胞分泌，94 個胺基酸組成之蛋白質，分子量 12kDa，它可增加周遭組織胰島素阻抗也可降低葡萄糖耐受性(Rajala, *et al.* 2004)。於齧齒動物誘導肥胖時，血清中此激素含量提升但會抑制肝臟中 AMPK 活性(Rajala, *et al.* 2004)。其他研究說明，餵食人工合成之激素會降低脂肪細胞對葡萄糖攝取提升胰島素阻抗之作用(Steppan, *et al.* 2001)。

1-6-1.3 腫瘤壞死因子(TNF-alpha)

TNF- alpha 主要由巨噬細胞和淋巴細胞所產生的促炎性細胞因子。相對於人類來說齧齒動物之脂肪細胞會產生較高濃度之腫瘤壞死因子(TNF- alpha)，但 TNF- alpha 可透過血管細胞粘附分子誘導血管平滑肌使內皮血管舒張，造成動脈粥樣硬化。在齧齒動物誘導肥胖中，可降低此激素濃度進而改善周遭組織對胰島素之作用。

1-7 高糖與高胰島素誘發胰島素阻抗模式之機制

1-7-1 胰島素阻抗

臨床上對胰島素阻抗之定義為一定濃度之胰島素所引起不正常之血糖狀況。主要是因為體內有許多游離脂肪酸，當增加脂肪組織時會製造出需多游離脂肪酸，利用血液運輸到肝臟和肌肉組織。血中之葡萄糖及游離脂肪酸濃度過高會刺胰臟分泌胰島素，使胰島素濃度升高並降低周邊組織之胰島素敏感性及葡萄糖帶入之利用率(Gavin, *et al.* 1974; Vuorinen-Markkola, *et al.* 1992)，如持續惡化將到制無法復原之第二型糖尿病。

1-7-2 高糖誘發胰島素阻抗

糖尿病之成因錯綜複雜，其併發症多為長期處於高血糖之情況下，使有關醣類代謝之器官受損。文獻指出因身體組織長期處於高糖狀態下易活化一系列促發炎因子例如腫瘤壞死因子(TNF- α)，而釋放大量之發炎物質(Yan, *et al.* 1994)。

體內的糖濃度過高容易生成自由基或是會消耗體內之抗氧化因子也會使蛋白質產生糖化作用造成細胞傷害而此作用也會產生大量自由基，在惡性循環下最後將造成不可逆之併發症(Ceriello 2003)。

體外研究可發現，針對脂肪細胞來說高糖之環境並不會引發胰島素阻抗之現象，必須伴隨高胰島素才會造成胰島素阻抗，並會顯著降低胰島素傳訊路徑之 p-AKT(Ser⁴⁷³)之表現量(Buren, *et al.* 2003)。故本實驗將以高糖及高胰島素環境與成熟脂肪細胞共置一天，使細胞成為阻抗態細胞。

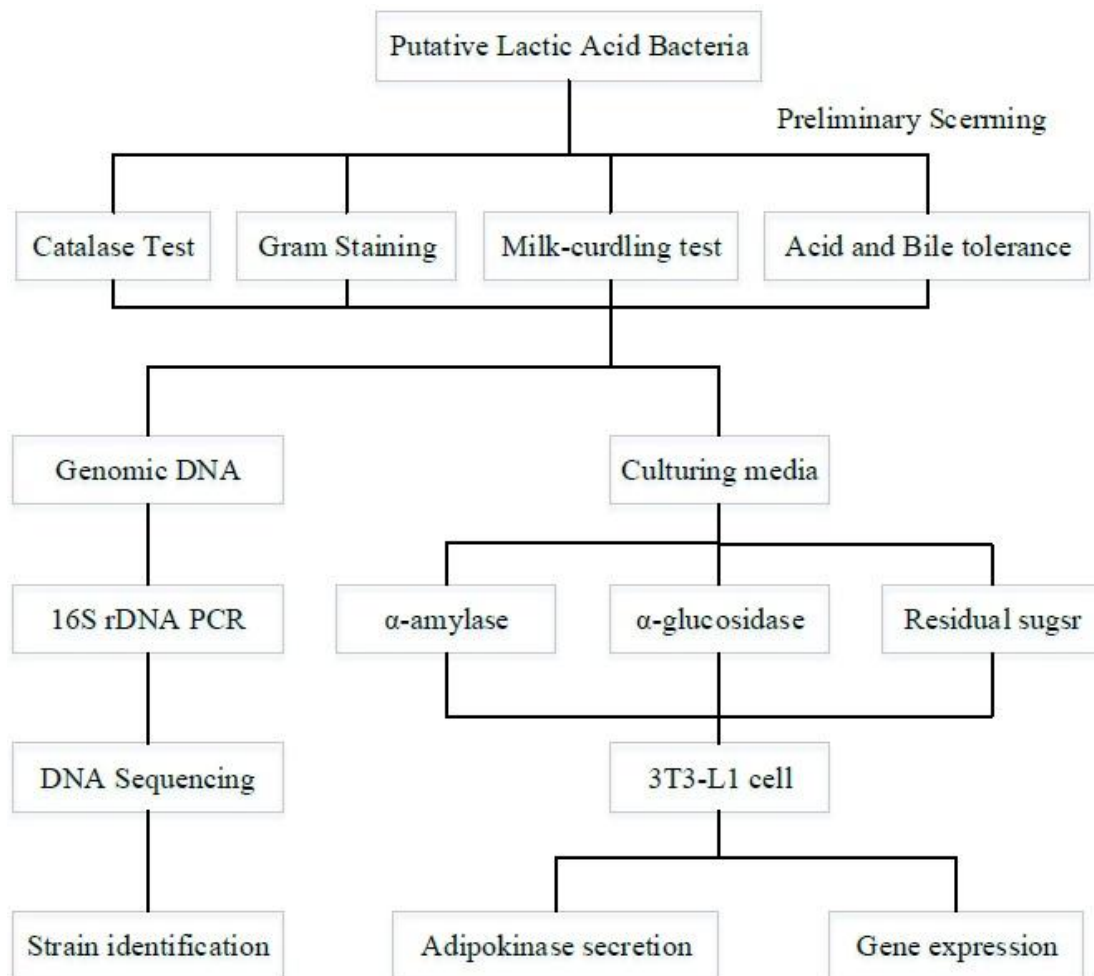
第二章、研究目的與實驗架構

2-1 研究目的

隨著飲食生活型態的改變，包括糖尿病之各種慢性病的盛行率逐年增加。第二型又稱非胰島素依賴型為主要的糖尿病類型，不但會影響體內葡萄糖之代謝，同時也造成脂肪代謝及血脂體脂異常。乳酸菌普遍存在於人體及動物腸道和自然環境中，已知腸道中乳酸菌影響宿主代謝，具有調節血糖血脂之能力。因胰島素作用和肝臟、肌肉、脂肪之葡萄糖調控機制環環相扣，本實驗第一階段將使用小鼠肝細胞 FL83B 誘導阻抗後添加乳酸菌發酵上清液進行葡萄糖帶入量分析，接著第二階段使用小鼠脂肪細胞 3T3-L1 接續探討高糖及高胰島素誘導阻抗後，添加乳酸菌發酵上清液進行共培養，以收集共培養之細胞上清液測量細胞激素分泌狀況，後續使用西方轉漬分析分析胰島素傳訊分子，以了解此樣品於脂肪細胞中有無調節葡萄糖恆定之功效。



2-2 實驗架構



第三章、材料與方法

3-1 實驗材料

3-1-1 乳酸菌試驗

3-1-1.1 試驗菌株來源

乳酸菌菌株分別取自植物性及動物性來源。植物性來源乃由臺中市建國傳統市場收集數種發酵食品及自家耕種無農藥之新鮮蔬菜。發酵食品包括竹筍、酸菜、醃鳳梨、豆腐乳、酸白菜、米醬、韓式泡菜、破布子、雪裡紅、筍片、臭豆腐。蔬菜有泡菜、菠菜、芋白菜、油菜、韭菜、大陸妹。動物性來源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-cystein 購自 Sigma(MO, USA)及 Agar 購自 Difco (MI,USA)。

3-1-2 細胞試驗

3-1-2.1 小鼠脂肪細胞株 3T3-L1

小鼠前驅脂肪細胞株 3T3-L1(mouse adipocyte cell; BCRC number: 60159)，屬貼附型細胞，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 Reserch Center, Hsinchu, Taiwan)。

3T3-L1 細胞株之培養基為 DMEM-low glucose(Dulbecco's Modified Eagle Medium)購自 Gibco(CA, USA)(Cat. No. 31600-026)。0.22 μ m 過濾杯(Millipore, USA)。胎牛血清(Foetal bovine serum; FBS)購自 Gibco(CA, USA)。

3-1-2.2 人體結腸腺癌細胞 Caco-2

人類直腸癌細胞 C2BBel 細胞株(Caco-2)，(human colon adenocarcinoma cell; BCRC number: 60182)，屬貼附型細胞，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 Reserch Center, Hsinchu, Taiwan)。

Caco-2 細胞株之培養基為 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)購自 Gibco(CA, USA)。0.22 μ m 過濾杯(Millipore, USA)。胎牛血清(Foetal bovine serum; FBS)購自 Gibco(CA, USA)。

3-1-2.3 小鼠肝臟細胞 FL83B

小鼠肝臟細胞 FL83B 細胞株，(mouse hepatocyte cell; BCRC number: 60325)，屬貼附型細胞，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 Reserch Center, Hsinchu, Taiwan)。

FL83B 細胞株之培養基為 F12K (Kaighn's modification of Ham's F12 medium) 購自友和 (USA)。0.22 μ m 過濾杯購自騰達行 (Millipore, USA)。胎牛血清 (Foetal bovine serum; FBS) 購自 Gibco (CA, USA)。

3-1-3.1 分化試劑

DEX (L-Dexamrthasone) 購自 Sigma (MO, USA)，分子量 394.46 Dalton，將 1 mg 粉末溶於 1019.21 μ L 絕對酒精，再以絕對酒精 10 倍稀釋成濃度 250 μ M，存放於 -20 $^{\circ}$ C 備用。

IBMX (3-Isobutyl-1-methyl-xanthine) 購自 Sigma (MO, USA)，分子量 222.25 Dalton，將 100mg 粉末溶於 10 mL 絕對酒精，再以絕對酒精 9 倍稀釋成濃度 5 mM，存放於 -20 $^{\circ}$ C 備用。

Insulin 購自 Gibco (CA, USA)，溶液濃度 4mg/mL，分子量 5800 Da，分裝成小容量保存於 -20 $^{\circ}$ C 備用，添加至細胞時，以培養基稀釋至 100 nM。

3-1-3.2 油紅染色

Oil Red O、Dextrin、Paraformaldehyde 三者皆購自 Sigma (MO, USA)。

3-1-4 細胞培養其他藥品

1. Trypsin-EDTA、L-glutamine 以上兩種皆購自 Gibco (CA, USA)
2. Pen-Strep solution 購自 Biological Industries
3. Trypan blue 購自 Biological Industries
4. Sodium chloride、Disodium hydrogen phosphate、Glycerol 購自 Panreac (Barcelona, Spain)
5. Porassium chloride 購自 林純藥工業株式會社 (Osaka, Japan)
6. Sodium hydrogen carbonate 購自 和光純藥工業株式會社 (Osaka, Japan)
7. Potassium dihydrogen phosphate 購自 石津製藥株式會社 (Osaka, Japan)
8. Glucose 購自 Sigma (MO, USA)
9. AlamarBlue[®] 購自 Invitrogen (CA, USA)
10. 2-NBDG 購自 Invitrogen (OR, USA)
11. Propidium iodide (PI) 購自 (MO, USA)

3-1-5 ELISA Kit

DuoSet ELISA Development Kit (R&D Systems, Inc)，使用抗體為

Adiponectin、Resistin、Leptin、TNF- α 。

3-1-6 蛋白質分析試劑

3-1-6.1 細胞裂解液

1. Tris 購自 Amresco (OH,USA)
2. Nonidet P-40 substitute(NP-40)購自 USB (OH, USA)
3. Sodium chloride 購自 Panreac(Barcelona, Sprin)
4. Ethylenediaminetetraaceticacid (EDTA)、Sodium orthovanadate、Sodium flouride、Phenylmethanesulfonyl flouride、Protease Inhibitor Cocktail 以上四種藥劑皆購自 Sigma (MO, USA)。

3-1-6.2 定量試劑

BCATM Portein Assay Kit 購自 Thermo (USA)。

3-1-7 主要儀器及設備

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

3-2 實驗方法

3-2-1 樣品製備

將發酵液及糞便稀釋液接種至含 0.05% L-cysteine 之 Lactobacilli MRS 液態培養基 (DIFCO, Detroit, Michigan, USA)，以 37°C 靜置 20 小時進行活化。接續進行四區畫線以分離出單一菌落，於 MRS broth 中再次活化，並重複上述單離步驟兩次，以確保分離出單一菌株。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 初步篩選

3-2-2.1 觸媒試驗(Catalase test)

當微生物行有氧呼吸時，會產生過氧化氫有毒物質，微生物本身為延續是否為乳酸菌。使用滴管取一滴 3% H₂O₂ 溶液於載玻片上，接著用微量滴定管取培養 24 小時之菌液滴於雙氧水溶液中，觀察是否會產氣泡，若產氣泡則為正反應 (+)，反之則為負反應 (-)。

3-2-2.2 格蘭氏染色(Gram Staining)

利用革蘭氏陰性菌及陽性菌之細胞組成不同之特性來染色。取培養 24 小時之菌液塗抹於載玻片上，並以無菌水稀釋後過火熱固定，加入 Crystal violet 染色五秒，隨後用 Iodine solution 染色五秒，以 Decolorizer 脫色十到二十秒，再以 Safranin 復染五秒，最後經鏡檢觀察為陽性或陰性菌。

3-2-2.3 凝乳試驗(resazurin-rennet test)

利用乳酸菌產乳酸及醋酸之特性，取培養 24 小時之菌液 100 μL 至 10% 脫脂牛乳中培養 24 小時，觀察是否有凝乳反應，依照凝乳效果分為 -、+。

3-2-2.4 耐酸耐膽鹽試驗(Acid and Bile Resistant)

1000 μL 培養之乳酸菌液 (10⁸ cfu/mL) 加入經 0.1 N HCl 調至 pH 2.0 和 3.0 之磷酸鹽緩衝溶液，並且培養在 37°C 至 3 小時。乳酸菌液加入相同條件之 pH 7.0 磷酸鹽緩衝溶液作為控制組。培養後經系列稀釋，傾倒法培養於 MRS agar 計數存活的乳酸菌數(Gomez Zavaglia, *et al.* 1998)。將經耐酸試驗存活之乳酸菌，經離心 (5,000 rpm) 5 分鐘後，以緩衝溶液清洗，將乳酸菌移至 9 ml 含 (或不含) 0.3% 膽鹽 (oxgall bile, Sigma)(Gilliland and Walker 1990) 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。

3-2-2.5 吸附 Caco-2 腸道上皮細胞試驗(Caco-2 Adsorption Test)

Caco-2 細胞培養基為 Eagle's minimal essential (MEM) 外加 Eagle's balanced salt solution (BSS) (GIBCO)、20% FBS 和 50 unit/ml Penicillin-Streptomycin，經 21 天分化繼代培養後開始進行實驗。取 24-well multidish plate，每個 well 放入一片蓋玻片。將培養皿倒掉舊的培養液，以 1× PBS buffer 清洗兩次後倒掉，加入 1% trypsin/ EDTA 約 1ml 進行消化，輕拍角形培養皿數下，使細胞懸浮。加入 40 mL 新鮮 MEM (Caco-2) 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、CO₂ 氣體培養，使細胞能夠分裂生長附著蓋玻片。再將舊培養液吸出，1× PBS buffer 清洗兩次，洗淨舊的培養液和去除未附著之細胞。加入 0.5 mL 新鮮細胞培養液（不含 penicillin-streptomycin），以及 100μL 乳酸菌菌液，於 37°C、CO₂ 氣體培養 2 小時。吸出舊培養液，1× PBS buffer 清洗三次。加入 10% formalin 200 μL 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，1× PBS buffer 清洗三次。加入經濾紙粗過濾的 crystal violet 200μL 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 buffer 清洗去除多餘染劑。以鑷子取出蓋玻片放置載玻片上，以倒立式螢光顯微鏡觀察，並且計數細胞上乳酸菌數(Gopal, *et al.* 2001)。

3-2-3 抽取 Genomic DNA

gDNA 利用 ZR Fungal/Bacterial DNA Miniprep System 商業套組進行製備。將 10^9 CFU/ mL 菌液離心 (13,200rpm, 2 分鐘)，去上清液後並留下菌體。以 200μL 1×PBS 復懸菌體於 ZR BashingBead™ Lysis Tube 中，接著加入 750μL Lysis Solution 並進行震盪 5 分鐘以破壞細胞壁。反應後離心(13,200rpm, 1 分鐘)取上清液 400μL 至 Zymo-Spin™ IV Spin Filter 並離心(13,200rpm, 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 Colume 離心 (13,200rpm, 1 分鐘)去除濾液，並重複上述步驟。加入 200μL DNA Pre-wash Buffer 至 Column 離心 (13,200rpm, 1 分鐘)，去濾液再加入 500μL Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer 至 Column 離心 (13,200rpm, 1 分鐘)，將 Column 放置新的 1.5-mL Tube，加入 50μL DNA Elution Buffer 於薄膜上浸潤 DNA，停留 1-5 分鐘後，離心(13,200rpm, 30 秒)析出 DNA，保存溶出的 DNA 於 -20°C。

3-2-4 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，0.5μL 之 10 pmole (each) primers，0.5μL 之 MgCl₂，0.1μL 之 Taq DNA polymerase 及無菌去離子水，再加入 1μL 之目標菌

體 genomic DNA。而後置入 PCR thermocycler 進行反應。分析時取 5 μ L PCR 反應產物，以 1.5% agarose 於 0.5 \times TAE buffer 中進行電泳分析，以 UV box 觀察後拍照。

3-2-5 DNA 定序(DNA Sequencing)

將委託源資生物技術公司進行定序。Lac16S-F, Sequence 5'-3', AgCAG TAGgg AATCT TCCA ; Lac16S-R, Sequence 5'-3', CACCg CTACA CATgg AG。

3-2-6 乳酸菌培養液相關試驗

3-2-6.1 培養液製備

將二活之乳酸菌液以 4000rpm 離心，時間 20 分鐘，再以 0.22 μ m filter 過濾後收取其培養液，於-20 $^{\circ}$ C 保存備用。

3-2-6.2 測定 α -澱粉酵素(α -amylase)

利用 DNS 具氧化力之特性，將具有游離或游離趨勢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，再加入 0.5%(w/v)之澱粉溶液 400 μ L，以及 200 μ L(30U/mL)酵素液，於 25 $^{\circ}$ C 下反應 3 分鐘後，後續將此混和液中取出 200 μ L 至新的 1.5mL 離心管中，加入溶於 5.31M 酒石酸鉀鈉溶液的二硝基水楊酸呈色溶液 (3,5-dinitrosalicylic,DNS)100 μ L 後，於 85 $^{\circ}$ 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 下知吸光值。控制組則以 0.1M PBS 取代樣品。而背景組則只有樣品之吸光值。

3-2-6.3 測定 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase)

取 α -glucosidase(10^7 unit/mg)溶於 0.1M PBS， α -glucosidase 活性為 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 $^{\circ}$ 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。控制組則以 0.1M PBS(pH6.8)取代樣品。而背景組則只有樣品之吸光值。

3-2-6.4DNS(3,5-dinitrosalicylic)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 液及 99% A 液震盪混合，經 100 $^{\circ}$ C 水浴 15 分鐘，再加入 0.5mL C 液震盪混勻，置於 25 $^{\circ}$ C 水浴 1 分鐘，於 575nm 下偵測其光值。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。

3-2-7 細胞培養及相關分析

3-2-7.1 細胞培養、繼代及分化

由液態氮桶中取出 3T3-L1 脂肪細胞之凍管，置於 37°C 水浴 3 分鐘快速解凍。先於 10 cm dish 中加入 10 mL 培養基，再加入解凍之 3T3-L1 細胞懸浮液，以八字形搖晃均勻，於 37°C 含 5% CO₂ 之培養箱中，培養 2 天後待細胞生長約 7-8 分滿，再進行繼代培養。

細胞於培養皿中長至九分滿左右，將其培養基吸除，以 PBS 清洗兩次，加入 1x Trypsin-EDTA 1mL，於培養箱靜置約 4 分鐘待細胞於盤底被切起，以兩倍體積之培養基終止 Trypsin-EDTA 作用，接續將細胞懸浮液平均分配至新的培養皿，放置於培養箱中培養。

細胞鋪於培養皿上生長至全滿後，將換成分化培養液，以培養基配成分化濃度，DEX 0.25μM、IBMX 0.5 μM、Insulin 0.58μg/mL，放置兩天後換成只含 Insulin 5μg/mL 之培養基，每兩天更換一次培養液，分化 10 天後為成熟脂肪細胞。

3-2-7.2 油紅染色

將 3T3-L1 前驅脂肪細胞加入分化試劑培養 10 天成為成熟脂肪細胞。吸除培養基後用 PBS 清洗兩次細胞，加入 5% paraformaldehyde/PBS 放置一小時，用以固定細胞，接著去除 5% paraformaldehyde/PBS，加入 0.5% Oil Red O 避光放置一小時，去除 0.5% Oil Red O 後緩慢加入 40% ethanol 清洗細胞，最後加入 dd H₂O 於顯微鏡下觀察並拍照。

3-2-7.3 誘導脂肪細胞產生胰島素阻抗

將 3T3-L1 細胞培養至成熟脂肪細胞，加入 30mM Glucose 與 100nM Insulin 共同處理細胞，培養 24 小時，去除培養基以 1xPBS 潤洗兩次，最後加入不同濃度(1600ppm、800ppm、400ppm、200ppm)之樣品，此樣品於當日加樣前使用不含 FBS 之培養液稀釋。

FL83B 細胞培養 2 天至細胞約 9 分滿，加入 60mM Glucose 與 100nM Insulin 共同處理細胞，培養 24 小時，去除培養基以 1xPBS 潤洗兩次，最後加入不同濃度(1600ppm、800ppm、400ppm、200ppm)之樣品，此樣品於當日加樣前使用不含 FBS 之培養液稀釋。

3-2-7.4 細胞存活率試驗

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 575 及 595nm 下測其吸光值。即可推算細胞增生活性。

將細胞養於 96 孔盤中(10^4 cell/well)，添加不同濃度之乳酸菌上清液共置 24 小時，移除培養基以 PBS 潤洗，每孔加入 100 μ L AlamarBlue(AlamarBlue:DMED medium=1:10)，於 37°C 培養 24 小時，於 570 及 590nm 測其吸光值。

3-2-7.5 葡萄糖擬似物 2-NBDG 帶入量分析

葡萄糖擬似物帶入量分析參考於 Zou 等人(2005)。將 FL83B 小鼠肝細胞培養於 12 孔盤中(10^5 cell/well)，分成正常態及阻抗態，再添加不同之乳酸菌培養液共置 4、12、24 小時，去除培養基並以 PBS 潤洗，加入含有 20 μ m 2-NBDG 之培養基作用一小時，胰島素組則添加含有 2-NBDG 及胰島素之培養基共置一小時。再以 1X trypsin-EDTA 將細胞收於劉世冠中，添加 10% PI 後以流式細胞儀偵測葡萄糖擬似物帶入量。

3-2-7.6 ELISA

將 3T3-L1 細胞培養於 12 孔盤中，並分化生長至成熟脂肪細胞，將細胞分成正常組與阻抗阻，再添加不同濃度之樣品共置 12、24 小時，於 12 小時時取 200 μ L 離心 12000rpm、25 分鐘、4°C，收集培養液備用，後續再將其細胞置於培養箱中培養至 24 小時再收集其培養液離心 12000rpm、25 分鐘、4°C。測定各細胞激素之濃度。

將抗體(Capture antibody)以試劑組織稀釋液稀釋後，取 100 μ L 抗體嵌入 ELISA 培養盤上(NUNC, LabPlanet, a division of OpticsPlanet, Inc., USA)，放置 4°C 下靜置隔夜(14-16 小時)。隔日以清洗液 PBST(0.05% Tween 20 In Phosphate buffer saline, PBST)清洗 3 次後加入 200 μ L 之稀釋液(Reagent diluent)於室溫下靜置 1 小時，接著清洗 2 次步驟次。加入 100 μ L 樣品(以使用稀釋液將樣品 10 被稀釋)及細胞激素之標準液(標準液以序列稀釋之方法稀釋後再進行添加)後，於室溫培養 2 小時，接續清洗清洗 3 次。加入 100 μ L 之偵測抗體(Detection antibody)後，室溫靜置 2 小時，接著清洗步驟清洗 3 次。加入 100 μ L Avidin-HRP 於室溫作用 20 分鐘(此步驟開始後續皆需避光)，接續清洗清洗 2 次，再加入 100 μ L Substrate solution(TMB)為受質，與 Avidin-31 HRP 反應後呈色(應為藍綠色)。最後，加入 50 μ L 之 2N 硫酸終止反應(此時呈色為黃色)。酵素反應之呈色以吸光值 450 nm 測定，以檢量線之迴歸方程式算出樣品中抗體濃度。

本試驗使用之抗體為 Adiponectin、Resistin、Letin、TNF- α 。

3-2-7.7 脂肪細胞之蛋白質萃取

將 3T3-L1 細胞培養於 6 孔盤中，並分化生長至成熟脂肪細胞，將細胞分成正常組與抗拒組，再添加不同濃度之樣品共置 24 小時，移除培養基前加入含有 100nM 胰島素作用 15 分鐘，再移去培養基以 PBS 潤洗加入 200 μ L Lysis buffer 將細胞破碎，將 6 孔盤放置於 4 $^{\circ}$ C、10 分鐘，接著再放置於 -20 $^{\circ}$ C、20 分鐘，接著使用刮勺收集細胞並放置於 1.5 毫升離心管中，離心 12000rpm、25 分鐘、4 $^{\circ}$ C，收集培養液(細胞蛋白質)，存放於 -20 $^{\circ}$ C 備用。

3-2-7.8 蛋白質定量

將脂肪細胞所收取之蛋白，利用商業套組 BCATM Protein Assay Kit 進行定量。取 10 μ L 樣品(已使用 Lysis buffer 10 倍稀釋)與 200 μ L 試劑(Reagent A:B=50:1)混合均勻，於 30 $^{\circ}$ C 下反應 30 分鐘，以波長 570nm 下偵測其吸光值，由 BCA 標準品中得到標準取線即可估算細胞中總蛋白濃度(μ g/mL)。

3-2-7.9 西方轉漬法

取 20 μ g 蛋白質樣品與 Sample buffer 混合均勻，95 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘使蛋白變性，於 Running buffer 中，以 10%、12% 的下層膠進行 SDS-PAGE，將蛋白質分離。

隨後於 10mM Na₂B₄O₇ Transfer buffer 中，將電泳膠上蛋白質轉置 Polyvinylidene fluoride(PVDF)膜上。將膜置於 2~5% skim milk-PBST 或 2 至 5% BSA-PBST 中，以 100~150rpm 震盪 1 小時，加入可辨識目標蛋白之一抗(AKT、pAKT)，於室溫下震盪 2 小時。將膜以 PBST 漂洗 15 分鐘 3 次，再加入二抗於室溫下震盪 1 小時，再以 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。

3-3 統計分析

實驗所得以平均值 \pm 標準偏差(Mean \pm SD)表示，使用 SAS 9.3 統計軟體進行鄧式新多變域測驗法分析來評估數據間的差異性， $p < 0.05$ 表示各組於統計上有顯著差異，並使用 SigmaPlot 10.0(Systat softear, USA)軟體進行作圖。

第四章、結果與討論

4-1 乳酸菌試驗

4-1-1 乳酸菌篩選定序

4-1-1.1 篩選及定序

將發酵食品、蔬菜、嬰幼兒糞便稀釋液培養於 MRS 後，經劃線培養出單一菌落，利用外觀觀察來挑選較符合乳酸菌特徵之菌落進行繁複之產酸及耐性試驗前，上述分離株先以觸酶試驗、革蘭氏染色及凝乳試驗初步判定是否可能為乳酸菌，結果由表一至表三顯示。經定序得知大多屬於 *Lactobacillus* 屬及 *Weissella* 屬，觸媒陰性、凝乳及格蘭氏陽性菌。

4-1-1.2 吸附試驗

腸胃道之腸道上皮細胞提供宿主抵禦外來物之天然屏障，當菌株進入腸道後，避免因腸道蠕動被排出體外，便吸附至上皮細胞，且可保持腸道菌叢平衡，減少病原菌侵入和吸附，也可促進宿主免疫功能，因此吸附能力可做為篩選有益於宿主之一生菌條件之一(Li, *et al.* 2008)。本實驗利用 Caco-2 細胞株進行乳酸菌吸附試驗，文獻提出每個細胞吸附 15 個菌體以上，此菌體被認定具有吸附能力(Pedersen and Tannock 1989)。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。當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，吸附性最佳之菌株為 *Weissella* sp. B1-7，每個細胞平均可吸附約 39 個菌體；發酵食品來源之菌株吸附能力其次，平均每個細胞可吸附約 1 至 22 個菌體，吸附性最佳之菌株為 *Lactobacillus fermentum* F8-4，每個細胞平均可吸附約 22 個菌體；蔬菜來源之菌株吸附能力則較不理想平均每個細胞可吸附約 2 至 17 個菌體，吸附性最佳之菌株為 *Weissella cibaria* E1-1，每個細胞平均可吸附約 17 個菌體。目前研究指出乳酸菌吸附至上皮細胞之因子包含疏水性作用、脂壁酸(Lipoteichoic acids, LTA)、凝集素(Lectins)及胞外多醣(Exopolysaccharides, EPA)等。胞外多醣通常附著於細胞表面或是分泌至胞外培養基中，有文獻學者指出，將 *L.plantarum* 菌株細胞表面胞外多醣純化後，其吸附作用顯著降低，也發現乳酸菌經胰蛋白酶處理後期吸附能力也有所影響(Sun, *et al.* 2007)。

4-1-1.3 耐酸耐膽鹽試驗

益生菌之特性其一為通過宿主消化道後還可存活並吸附於腸上皮細胞 (Klein, *et al.* 1998)，因此有文獻指出認為耐膽鹽的特性是乳酸菌能否為在腸道中生存的必備條件(Gilliland 1989)。本試驗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。有文獻指出益生菌在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 Favaro-Trindade 等學者亦指出大部分益生菌耐膽鹽性較耐酸性強(Gilliland and Walker 1990)，於本研究試驗結果也有相同趨勢。

4-1-2 培養液相關試驗

4-1-2.1 醣解酵素抑制能力

抑制醣解酵素 α -glucosidase 及 α -amylase 可減緩碳水化合物水解成葡萄糖之速度，並延緩腸道對葡萄糖之吸收，維持飯後血糖之恆定(Fred-Jaiyesimi, *et al.* 2009; McCue and Shetty 2004)。此酵素抑制測定之標準品為 acarbose，對於 α -amylase 之抑制率為 2%、 α -glucosidase 之抑制率則為 49%。結果由表七所示，乳酸菌培養上清液抑制 α -amylase 之效果均不理想，而有文獻指出番石榴對 α -glucosidase 之抑制率高達 77%(蔡等., 2007)，因此本研究將篩選出 α -glucosidase 抑制率 70% 以上之菌株，由表七 α -glucosidase 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 有接近或超過 70% 之抑制率而顯著高於控制組。綜合吸附及耐酸耐膽鹽試驗之結果挑選出具備多種益生菌特性之菌株，故選定樣品 F2-2、F7-3、F7-4、F8-2、F8-6、H1-4、J1-3、J1-4、B10-7 此 9 個樣品進行後續實驗。

4-1-2.2DNS 殘糖分析試驗

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)。此結果由表八所示，殘糖含量介於 6.8 至 10.88mg/mL，以 F2-2 之殘糖含量最高，J1-4 之殘糖量最低。此數值與本研究室過去曾分析過之乳酸菌發酵液殘糖量介於 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 細胞模式

4-2-1 肝細胞 FL83B

4-2-1.1 不同濃度培養液對肝細胞 FL83B 葡萄糖擬似物帶入量試驗

血中葡萄糖濃度過高時，細胞無法接收胰島素傳訊，將葡萄糖帶入細胞儲存，如細胞長期浸潤高張溶液中會產生胰島素阻抗之狀態。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，其優點為可以偵測單一活細胞的葡萄糖攝入量，較放射線標定法靈敏且安全。文獻證實 2-NBDG 可如同葡萄糖擬似物進行細胞對葡萄糖轉運蛋白運輸且不被代謝分解，將可用使用流式細胞儀測定螢光來分析葡萄糖帶入能力，故此方法為有效分析方法(Yoshioka, *et al.* 1996)。此試驗結果顯示於圖一至圖六，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，與樣品 F2-2 共置 12 小時之 200、400、1600ppm 有顯著提升 2-NBDG 帶入量(圖一)，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 相比接顯著降低約 0.3-0.4 倍(圖三、圖五)；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(圖二)，阻抗態細胞與樣品 F7-3 共置 24 小時之 2-NBDG 帶入量和 Control 相比顯著增加 1.1-3.13 倍(圖四)，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(圖六)。總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，而 12 小時及 24 小時之帶入量較佳，故後續分析均針對共置 12 小時及 24 小時深入探討。有文獻指出，紅麴代謝產物可提升 FL83B 肝細胞對 2-NBDG 帶入量，延緩胰島素阻抗是透過提升 IRS-2 及 AKT 磷酸化讓 GLUT 2 表現量增加(潘等, 2011)；白蓮苦瓜果實、種子、莖材萃取物於脂肪細胞共置，經由葡萄糖帶入試驗中得知，樣品結果與陽性對照組 50 μ M 之 troglitazone(為胰島素增敏劑，臨床上用以治療胰島素抗性)的效果相似，故此樣品具有促進胰島素抗性細胞葡萄糖吸收能力，經上述文獻得知，如增加 2-NBDG 帶入量可影響到後續胰島素

傳訊並延緩胰島素阻抗，因此本研究將由肝細胞 FL83B 之 2-NBDG 帶入量試驗篩選出之菌株接續脂肪細胞 3T3-L1 模式探討其改善葡萄糖恆定之機制。

4-2-2 脂肪細胞 3T3-L1

4-2-2.1 不同濃度培養液對脂肪細胞 3T3-L1 增生活性試驗

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。為了瞭解篩選之乳酸菌株發酵培養液對是否對細胞有毒或促進作用，因此將 F2-2、F7-3、F7-4 之發酵培養液稀釋至 200、400、800、1600ppm，分別添加於脂肪細胞 3T3-L1 作用 24 小時，並以 Alamar blue 試劑分析增生活性。結果顯示於圖七至圖九，三株菌株發酵培養液之四種濃度對細胞皆無毒殺作用。接下來實驗將以 200、400、800、1600ppm 繼續探討。

4-2-2.2 不同濃度培養液對脂肪細胞 3T3-L1 細胞激素之含量

Adiponectin 是由脂肪組織分泌，是人體血液中富含豐富之蛋白質之一(Hu, *et al.* 1996)，脂聯素是一個內生性的胰島素敏感增強劑，並發現血清中脂聯素含量減少與第二型糖尿病發生有關，其可能原因高分子量型式 HME 減少(Kobayashi *et al.*,2004)。Resistin 是新發現由脂肪細胞專門分泌的蛋白質，研究證實對造成肥胖之胰島素阻抗扮演著顯著角色(Steppan, *et al.* 2001)。最近發現，在體內抗素會抑制肝臟和肌肉之 AMPK 活性(Banerjee, *et al.* 2004)。Leptin 是連接脂肪細胞與下視丘中心，調節能量消耗，因為瘦素可抑制 NPY 產生和分泌，NPY 可強烈促進食慾，顯示瘦素可抑制食慾(Stephens, *et al.* 1995)，抑制脂肪生成。瘦素可降低肝臟中累積之脂肪，增加胰島素敏感性和血管生成活性。研究指出肥胖者之瘦素表現和分泌會增加，身體脂肪的囤積與血中瘦素濃度有很強的相關性。

正常態細胞添加不同濃度乳酸菌培養液共置 12 小時和 24 小時之胰島素 Control 組，於脂聯素部分可發現大多數樣品濃度和胰島素 Control 相比無顯差，其中以 F2-2 和 F7-3 之 200ppm、1600ppm 有顯著下降而 F7-4 之 400ppm、800ppm 則有顯著上升(圖十 A、圖十一 A、圖十二 A)；於 Resistin 部分可發現共置 24 小時之 400ppm 和胰島素 Control 相比皆有顯著提升，共置 12 小時之樣品 F2-2 200、1600ppm 及 F7-3 200ppm 和 F7-4 800ppm 組別和胰島素 Control 相比有顯著下降(圖十三 A、圖十四 A、圖十五 A)；於 Leptin 部分可發現樣品 F2-2、F7-3、F7-4 與細胞共置 24 小時之 400、800ppm 有顯著提升，於 12 小時則無顯著差異(圖十六 A、圖十七 A、圖十八 A)；於 TNF- α 部分可發現，與樣品 F2-2、F7-3、F7-4 共置 24 小時，此細胞激素分泌量與樣品濃度呈劑量效應，當濃度處於 1600ppm 時與胰島素 Control 相比則無顯著提升。

阻抗態細胞添加不同濃度乳酸菌培養液共置 12 小時和 24 小時，於脂聯素部分可發現共置 24 小時樣品 F2-2、F7-3 之 200、400pm 和樣品 F7-4 之 200、

800、1600ppm 皆有顯著提升(圖十 B、圖十一 B、圖十二 B)；於 Resistin 部分可發現共置 12 小時後(圖十三 B、圖十四 B、圖十五 B)，隨著樣品濃度增加，Resistin 濃度有下降趨勢但與胰島素 Control 相比無差異，共置 24 小時之樣品 F2-2 及 F7-4 之分泌量無劑量效應，樣品 F7-3 則隨著樣品濃度增加 Resistin 分泌量則有顯著下降之趨勢；於 Leptin 部分共置 12 小時及 24 小時之三總樣品濃度和分泌量無劑量效應，但可發現共置 24 小時之樣品 F2-2 400、800ppm 及 F7-4 400ppm 有顯著提升，而樣品 F2-2 200、1600ppm 和 F7-3 400、800ppm 及 F7-4 200、800ppm 和胰島素 Control 相比則無顯著差異(圖十六 B、圖十七 B、圖十八 B)；於 TNF- α 部分發現，樣品 F2-2 使此激素分泌增加而樣品 F7-3 200、400、800、1600ppm 及 F7-4 200、800、1600ppm 與胰島素 Control 相比則無顯著差異。

由阻抗態細胞中可觀察，添加樣品 F2-2 及 F7-3 之 800、1600ppm 反而使脂聯素分泌量下降，於抗素部份分泌量也提升，其中也發現，樣品 F2-2、F7-3 及 F7-4 之 AKT 蛋白質表現量與脂聯素有相同趨勢，推測原因脂聯素可能與 AKT 有相關聯，並間接提升細胞中 AKT 或 AMPK 活化，此推測之確定路徑需要再行研究確認。雖然細胞層次上添加乳酸菌培養液反而降低脂聯素但不代表於動物活體模式中也是此情況。研究室前人發現經黃金銀耳酸性多醣餵食 STZ 糖尿病大鼠其血清脂聯素濃度顯著增加(賴, 2010)。另一相似狀況則是將糖尿病藥物 metformin 運用在 3T3-L1 細胞中，發現可使 AMPK 活化但卻可降低脂聯素之分泌及表面(Huypens, *et al.* 2005)，將此藥物給予第二型糖尿病患者後並未發現血清中之脂聯素濃度改變(Phillips, *et al.* 2003; Richardson, *et al.* 2006)。對於瘦素，在成熟脂肪細胞加入本實驗樣品後，其分泌量大多無顯著增加或下降，推測原因可能為本實驗樣品可能對瘦素的最高影響作用時間並分 12 小時或是 24 小時，所以在此量時間點下觀察有較多之無變化或是乳酸菌培養液對於脂肪細胞較無刺激分泌作用，最後可能原因為在體內受素是連接脂肪組織與下視丘中心(Stephens, *et al.* 1995)，脂肪分泌受素多寡受其外來組織訊號影響，在體外單獨測試脂肪細胞較難觀察其增加或下降。針對數據中脂肪細胞與乳酸菌培養液共置後 TNF- α 分泌增加提出另一分項討論，不管正常態或阻抗態細胞添加其樣品後 TNF- α 分泌量大多有顯著性上升，其中以樣品 F2-2 之阻抗態細胞之各濃度為顯著增加。脂肪細胞在體中扮演許多角色，可以儲存能量、分泌細胞激素及帶入血中葡萄糖影響身體代謝(Fasshauer and Paschke 2003; Kim and Moustaid-Moussa 2000)，在測試 3T3-L1 細胞時，不同之分化方式會影響到後續細胞傳訊之角色，文獻中提及巨噬細胞分為 M1 及 M2 兩型，兩者細胞表面受體不同所以分泌之物質亦不相同，所影響神經細胞分化情況也不相同((Mokarram, *et al.* 2012)，其最終改善胰島素阻抗這些推測都有待進一步之實驗證實。

4-2-2.3 不同濃度培養液對脂肪細胞 3T3-L1 之蛋白質表現

AKT 被視為是胰島素傳訊路徑之下游目標基因，於胰島素之生理功能上扮演重要調節角色，主要會影響葡萄糖代謝(Zdychova and Komers 2005)。AKT 透過絲氨酸磷酸化與不活化 GSK-3 來促進甘醣合成(Cross, *et al.* 1995)、脂質合成及增加葡萄糖轉運蛋白(Glut 4)轉位至膜上增加細胞帶入葡萄糖能力。

於阻抗態細胞之磷酸化 AKT 結果顯示若無胰島素物刺激，各組別 Ser⁴⁷³之磷酸化，而以胰島素刺激後發現樣品 F2-2 與細胞共置 24 小時之胰島素組磷酸化效果有顯著提升約一倍之效果(圖 23B)，樣品 F7-3 及 F7-4 指細胞共置之 12 小時及 24 小時間並無相關聯，但可發現 24 小時之組別隨著濃度增加磷酸化表現量也有提升(圖 26B、圖 29B)。由此結果得知，乳酸菌培養液要在與胰島素同作用下才能將 AKT 磷酸化。

正常態細胞加入樣品 F2-2 各濃度後共置 12 及 24 小時，由圖 22A 得知，共置 12 小時之 AKT 基因表現量比 24 小時高，此現在於圖 23A 磷酸化 AKT 中也發現同樣趨勢，而樣品 F7-4 則為共置 24 小時之 AKT 及磷酸化 AKT 之表現量較佳，樣品 F7-3 則無一定之表現(圖 25A)。

將上述 AKT 相關分子以磷酸化程度(pAKT-Ser473/AKT)作整理，正常態細胞經胰島素刺激後，樣品 F2-2 之 AKT 磷酸化程度在作用 12 小時或 24 小時與胰島素控制組相比無劑量效應(圖 24A)，樣品 F7-3 則發現作用 12 小時之組別與胰島素控制組相比皆有顯著提升但於 24 小時則相反(圖 27A)，樣品 F7-4 之 12 小時之磷酸化比例皆比 24 小時佳(圖 30A)；阻抗態細胞經胰島素刺激後，樣品 F2-2 之 AKT 磷酸化程度在作用 24 小時後 800、1600ppm 有顯著增加磷酸化比例(圖 24B)，樣品 F7-3 發現作用 12 小時之磷酸化比例比 24 小時佳反之樣品 F7-4 則是作用 24 小時之磷酸化比例比 12 小時佳且隨劑量增加磷酸化比例有隨之增加之劑量效應(圖 27B、圖 30B)。

在本研究模式中，胰島素傳訊路徑中正常與阻抗態細胞之 pAKT 表現含量相似，值得討論的是磷酸化比例有較多之顯著差異。就添加胰島素而言，阻抗態細胞在胰島素傳訊路徑上當乳酸菌培養液與胰島素共同作用時，效果有時反而不如單獨使用胰島素組 F2-25 12 小時(圖 22B)、F7-3 之 24 小時 800、1600ppm (圖 25B)、F7-4 之 12 及 24 小時(圖 28B)，推測原因可能在胞外或胞內兩者互相作用所致。在胞外時乳酸菌培養液直接結合胰島素或者與胰島素競爭胰島素受體使傳訊下降，或是乳酸菌培養液所誘導之傳訊在胞內與胰島素訊息傳遞產生拮抗作用，導致觀察到之乳酸菌培養液在胰島素傳訊路徑上並未有增加現象，這些推測都需要進一步實驗才能證實。幾篇前人文獻提到，AMPK 及胰島素傳訊路徑有關係，文獻中說明 AICAR 活化 AMPK 增加葡萄糖帶入而不依靠胰島素傳訊路徑(Sakoda, *et al.* 2002; Salt, *et al.* 2000)，於 2003 年文章中更進一步試驗添加 AICAR 活化 AMPK 後會抑制胰島素刺激葡萄糖帶入，顯示在脂肪中兩者路徑可能為互相抑制的，而此現象在肌肉中則不同，AMPK 傳訊及胰島素傳訊對於增加細胞帶入葡萄糖是互相增強作(Hayashi, *et al.* 1998; Winder and

Hardie 1999)，顯示這兩條傳訊路徑也具有組織特異性。

4-3 結論與未來展望

4-3-1 結論

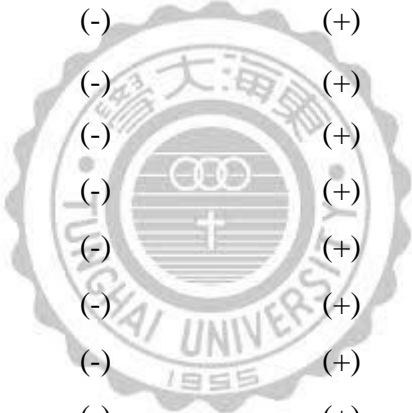
1. 此次篩選之菌株均為 *Lactobacillus* 屬及 *Weissella* 屬，觸媒陰性、凝乳及格蘭氏陽性菌。
2. 綜合吸附及耐酸耐膽鹽試驗之結果挑選出具備多種益生菌特性之菌株，故選定樣品 F2-2、F7-3、F7-4、F8-2、F8-6、H1-4、J1-3、J1-4、B10-7 此 9 個樣品進行後續實驗。
3. 流式細胞儀細胞分析試驗中結果顯示，F2-2、F7-3、F7-4 之 12 小時及 24 小時之帶入量較佳，故後續分析均針對此三株菌株之 12 小時及 24 小時深入探討。
4. 經 Alamar Blue 試劑俄式結果，乳酸菌上清液 F2-2、F7-3 及 F7-4 對正常脂肪細胞均無明顯毒殺作用。
5. 細胞激素方面，抗素及 TNF- α 隨著濃度增加有下降趨勢，且脂聯素及瘦素也有上升之現象。
6. 胰島素傳訊部分，與乳酸菌培養液共置後可提升 AKT 磷酸化傳訊，改善胰島素抵抗態細胞之葡萄糖代謝之調控。

4-3-2 未來展望

本研究初步發現，乳酸菌培養液為 3T3-L1 脂肪細胞可調控細胞激素並提升 AKT 磷酸化增強傳訊，改善細胞之葡萄糖調控，進而間接降低罹患第二型糖尿病以及罹癌風險。若能以乳酸菌菌體或菌粉及多醣來探討脂肪細胞與葡萄糖調控相關機制定能更完整了解細胞模式之調控路徑。未來也可進一步測定更多 mRNA 及蛋白質之胰島素傳訊基因，藉此深入了解脂肪細胞中葡萄糖代謝，以更完整詮釋此乳酸菌培養液影響葡萄糖之機制。

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>Weissella cibaria</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(Log cfu/mL)

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(傳統蔬菜)之生長影響(Log cfu/mL)

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±0.1 ^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(Log cfu/mL)

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)

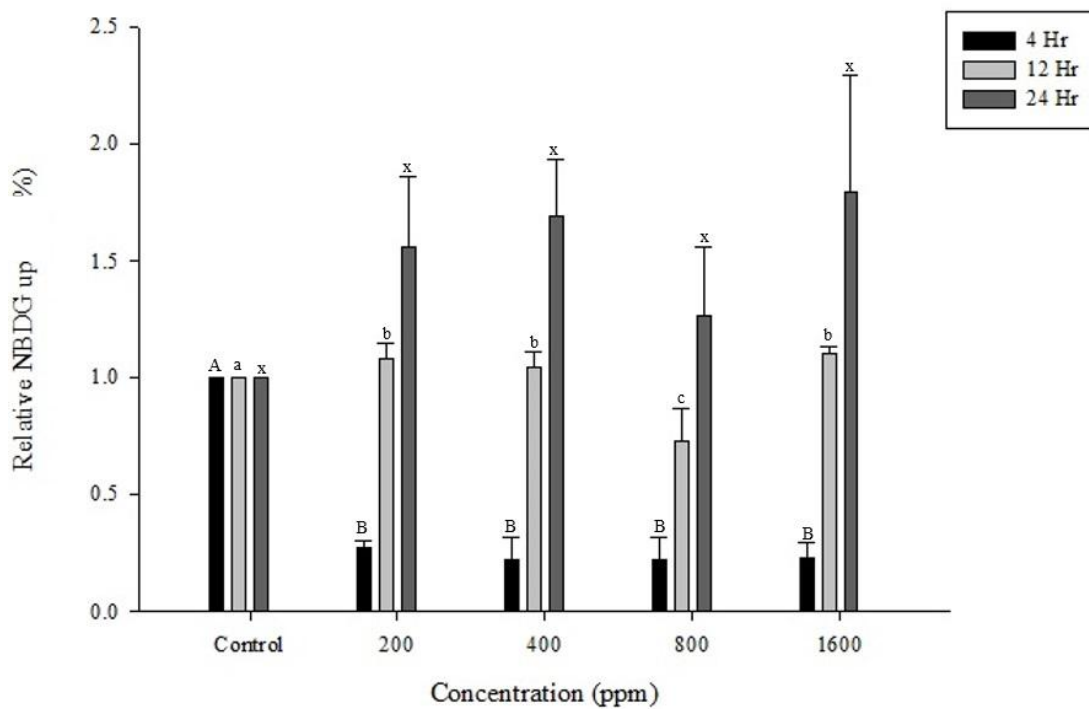
表七、乳酸菌培養液對 α -amylase 及 α -glucosidase 之抑制能力測定

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%

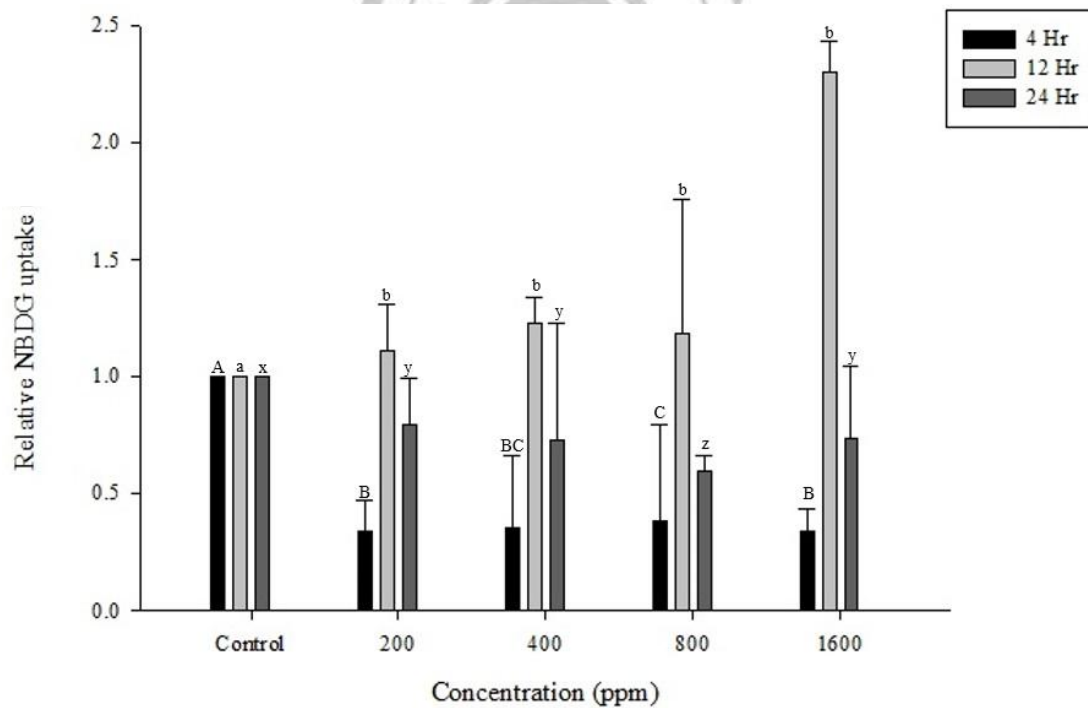
表八、一般培養條件下乳酸菌培養液之殘糖量

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



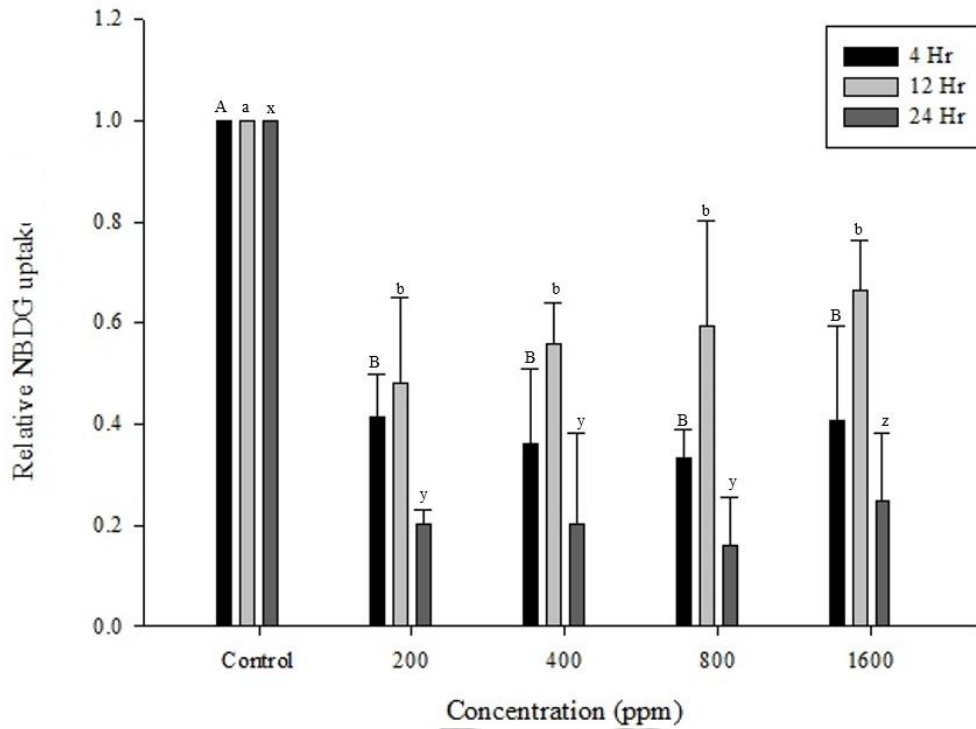


圖一、正常態 FL83B 肝細胞與 F2-2 培養液共置下之葡萄糖擬似物帶入量

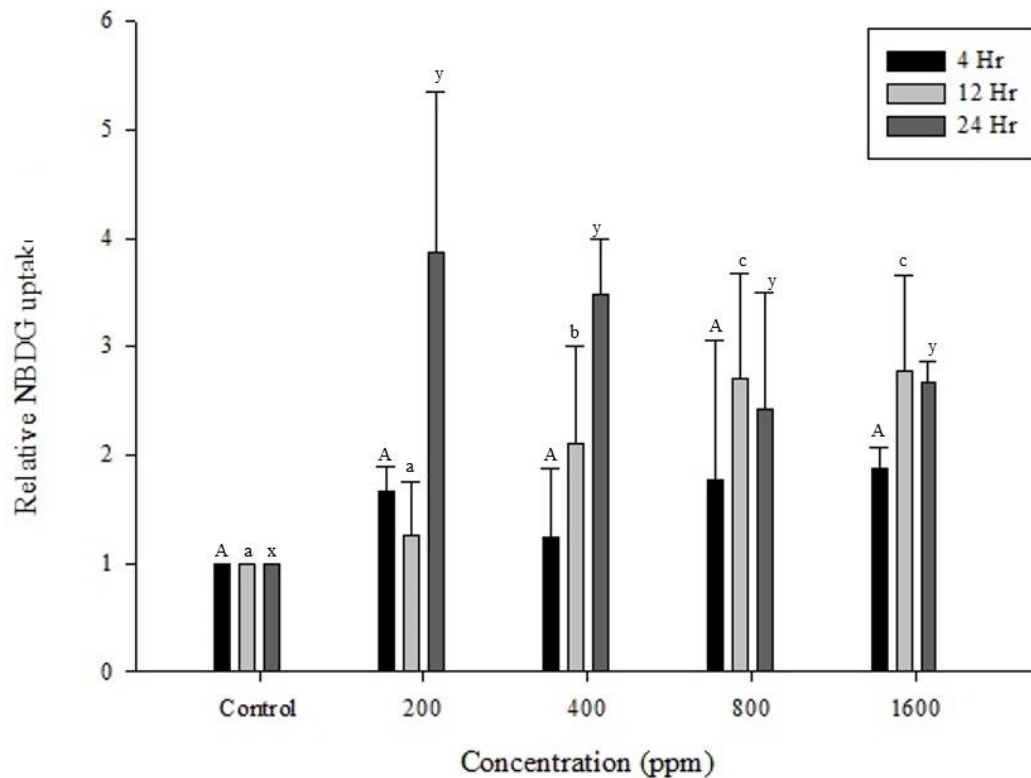


圖二、阻抗態 FL83B 肝細胞與 F2-2 培養液共置下之葡萄糖擬似物帶入量

大寫字母表示與不同濃度樣品與細胞共置四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八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十二小時之對照有顯著差異($p < 0.05$)。

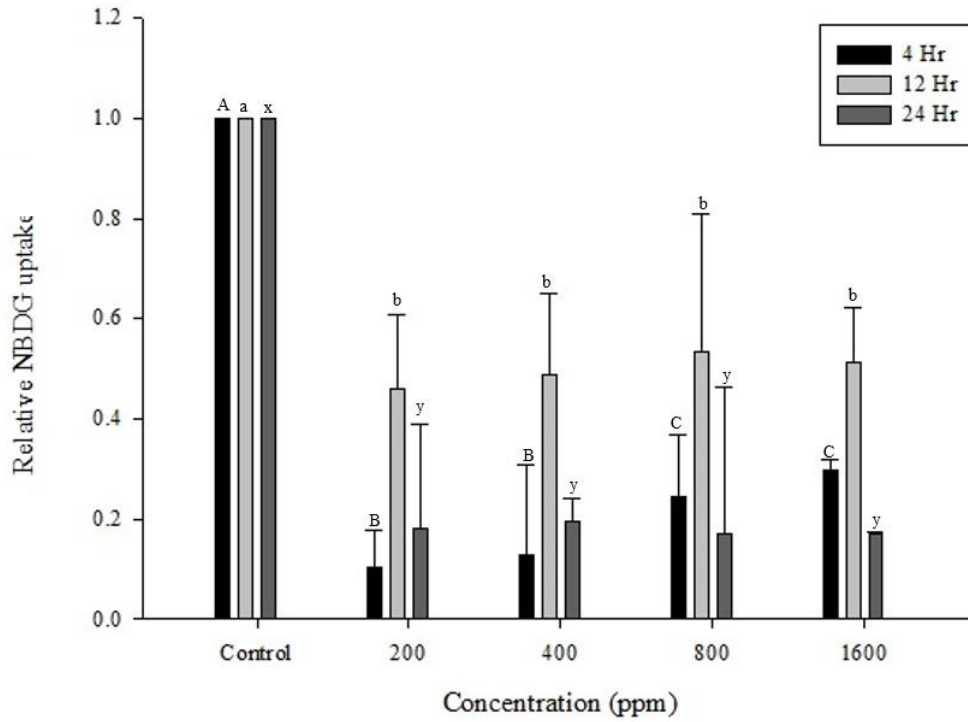


圖三、正常態 FL83B 肝細胞與 F7-3 培養液共置下之葡萄糖擬似物帶入量

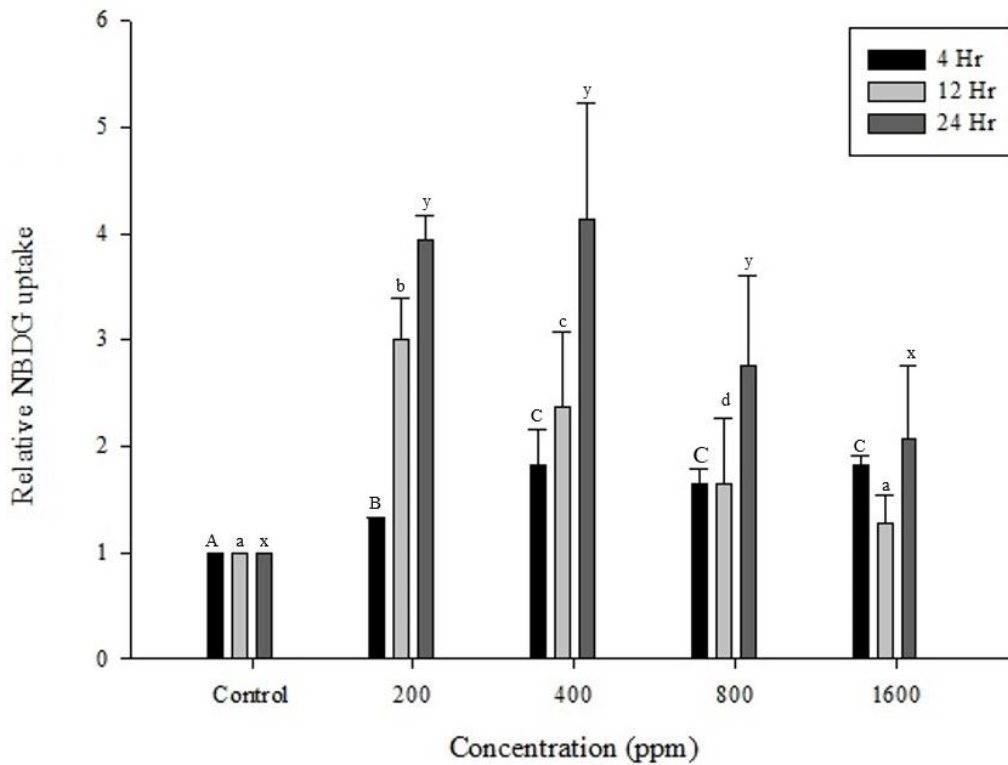


圖四、阻抗態 FL83B 肝細胞與 F7-3 培養液共置下之葡萄糖擬似物帶入量

大寫字母表示與不同濃度樣品與細胞共置四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八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十二小時之對照有顯著差異($p < 0.05$)。

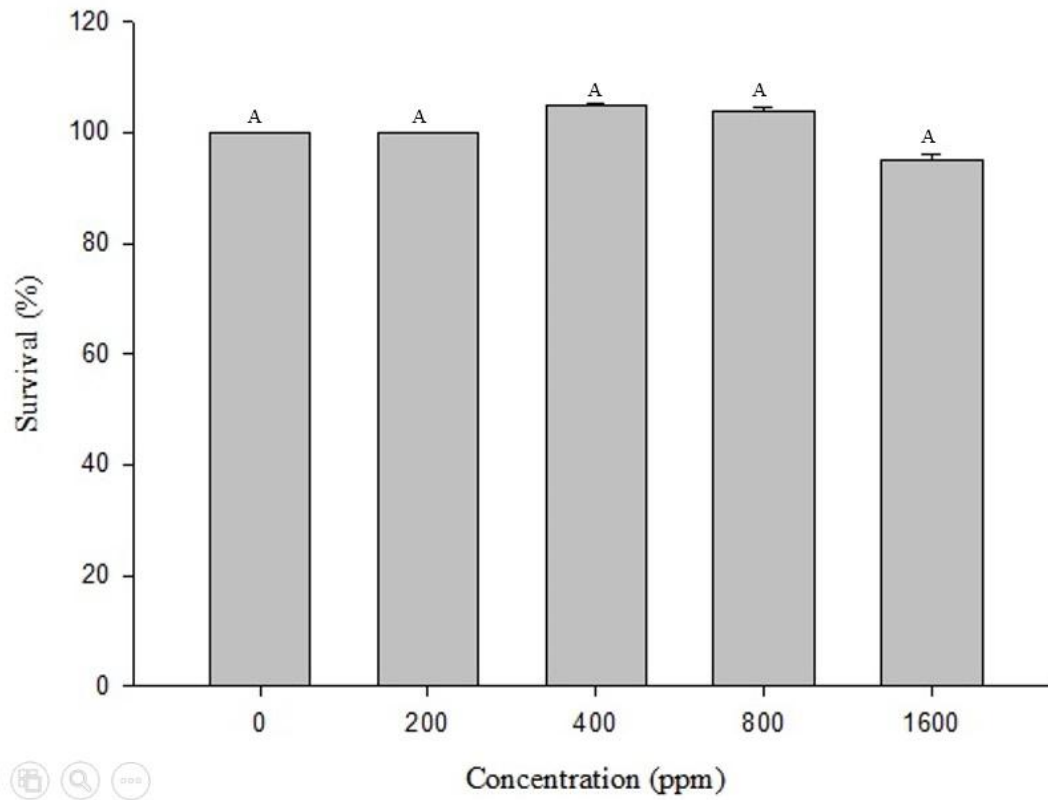


圖五、正常態 FL83B 肝細胞與 F7-4 培養液共置下之葡萄糖擬似物帶入量

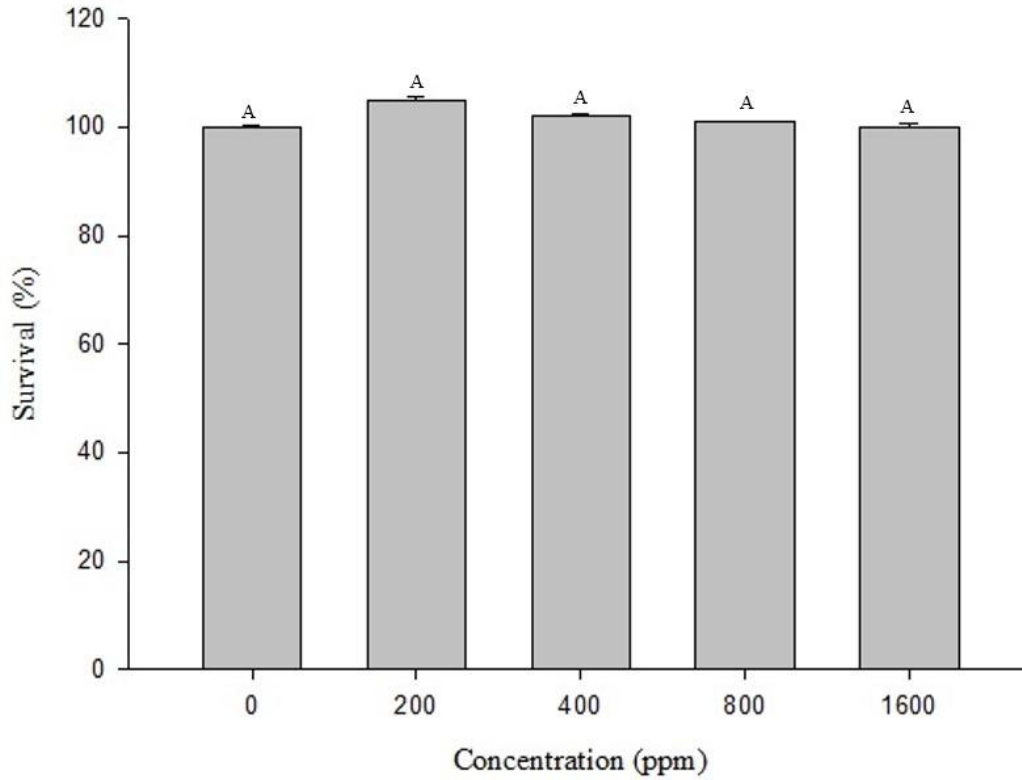


圖六、阻抗態 FL83B 肝細胞與 F7-4 培養液共置下之葡萄糖擬似物帶入量

大寫字母表示與不同濃度樣品與細胞共置四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八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十二小時之對照有顯著差異($p < 0.05$)。

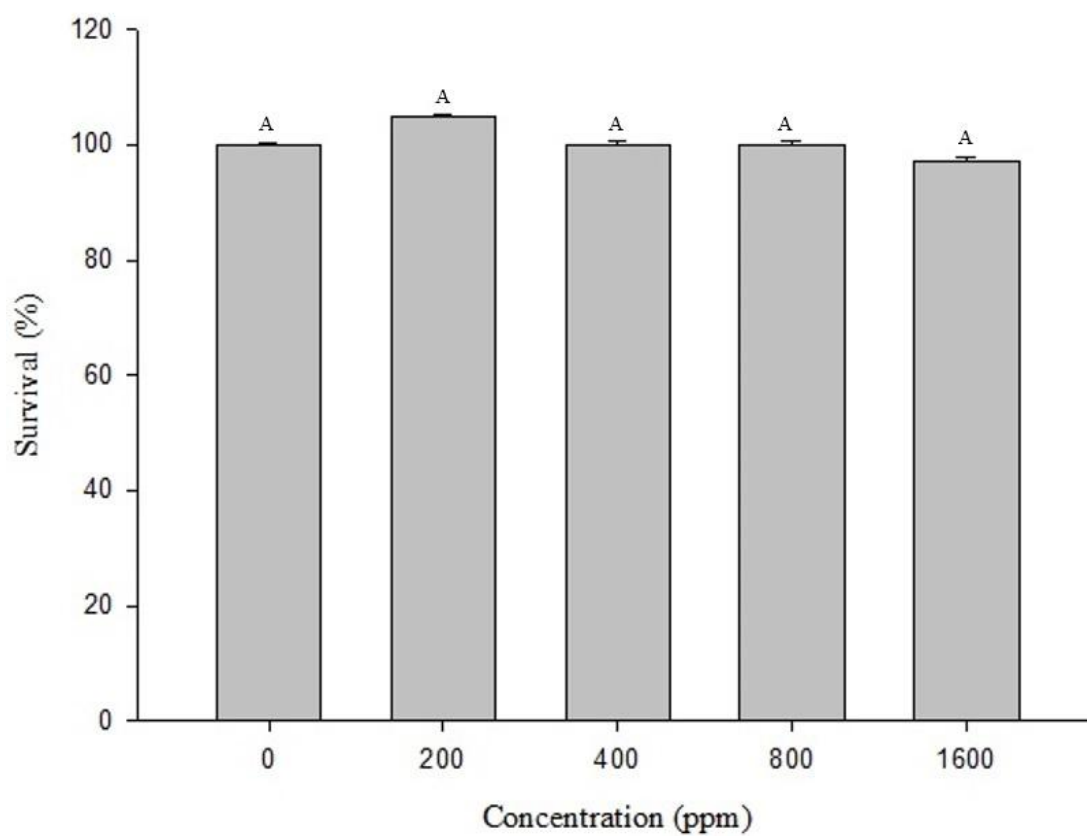


圖七、3T3-L1 脂肪細胞與 F2-2 培養液共置下之增生活性



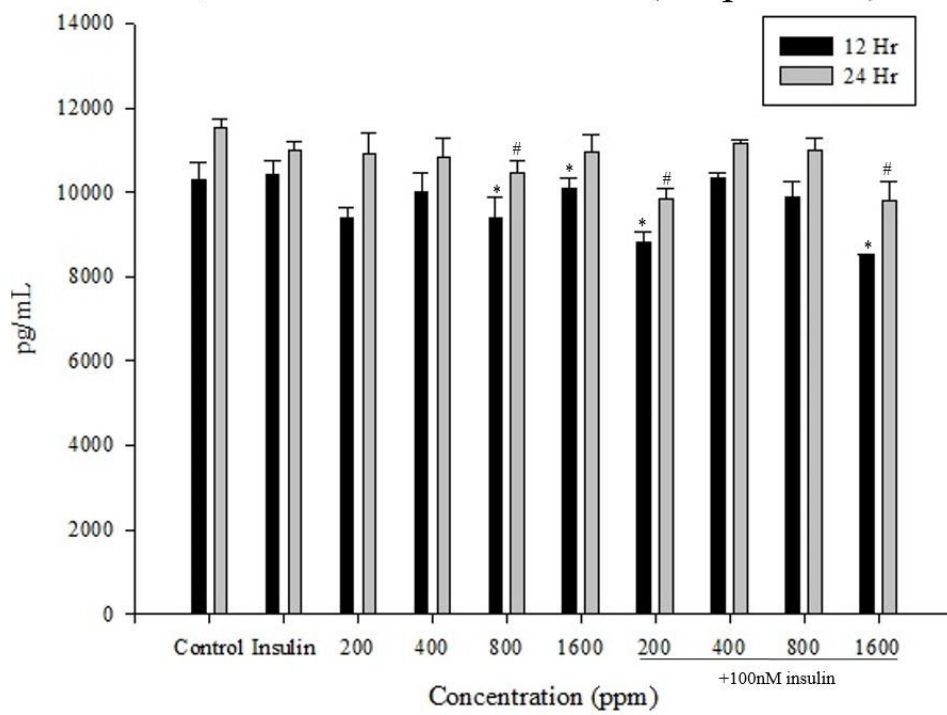
圖八、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-3 培養液共置下之增生活性

大寫字母代表各統計分群。無相同字母組兼具顯著差異($p < 0.05$)。

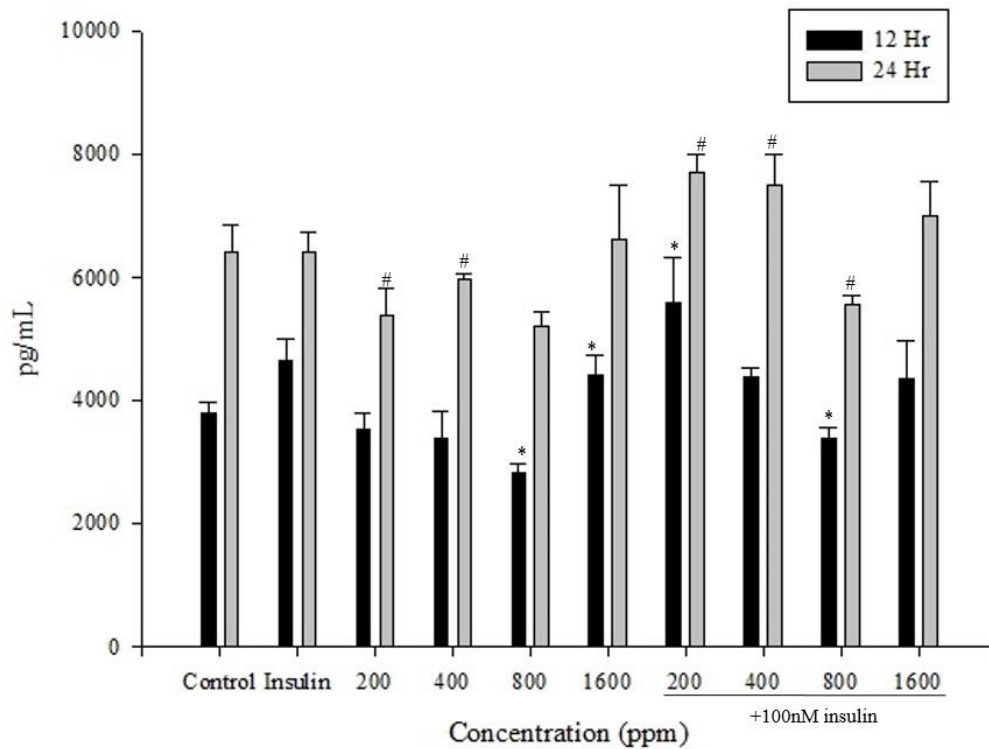


圖九、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-4 培養液共置下之增生活性
大寫字母代表各統計分群。無相同字母組兼具顯著差異($p < 0.05$)。

(A) Normal



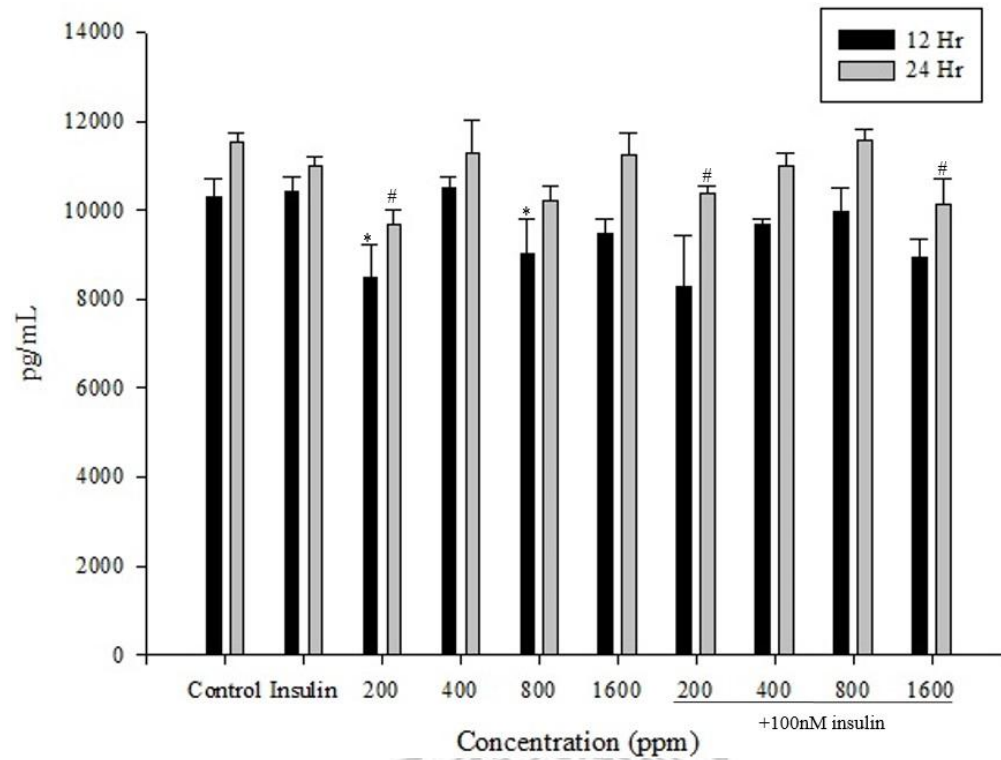
(B) Resistance



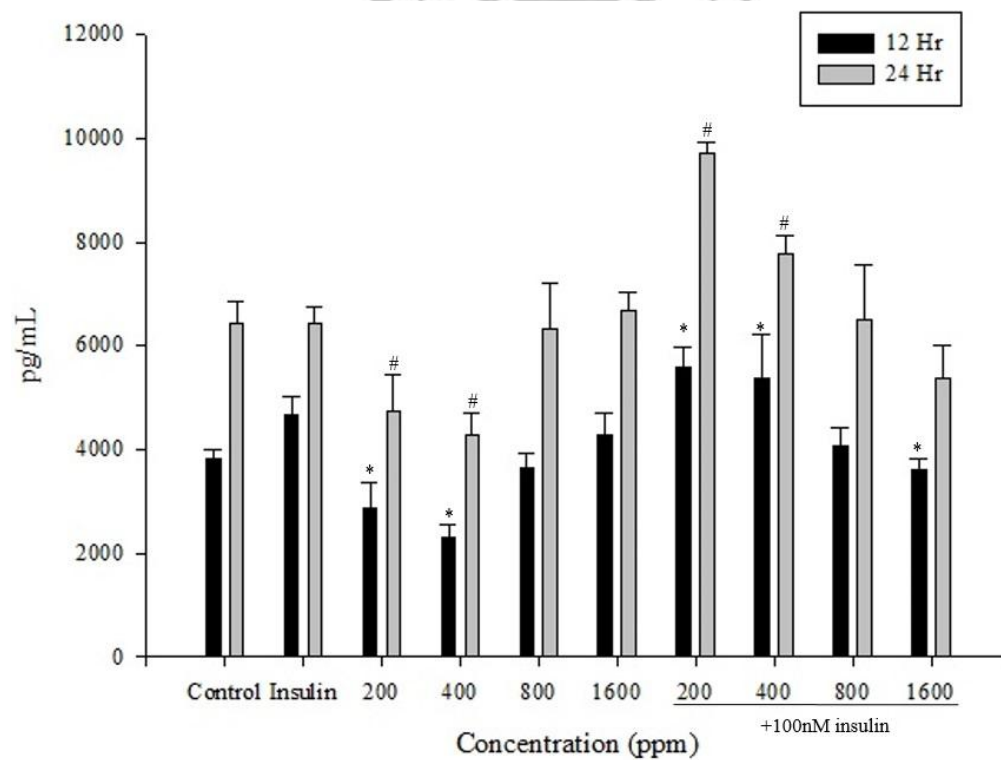
圖十、3T3-L1 脂肪細胞與 F2-2 培養液共置下之脂聯素(adiponectin)分泌

*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



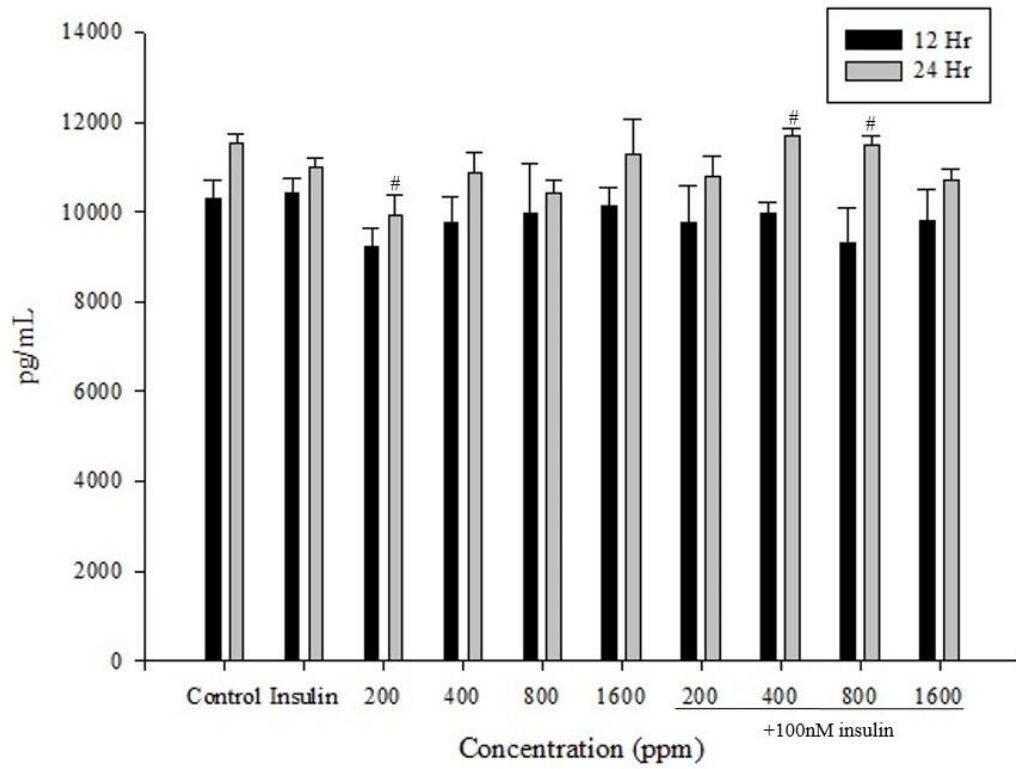
(B) Resistant



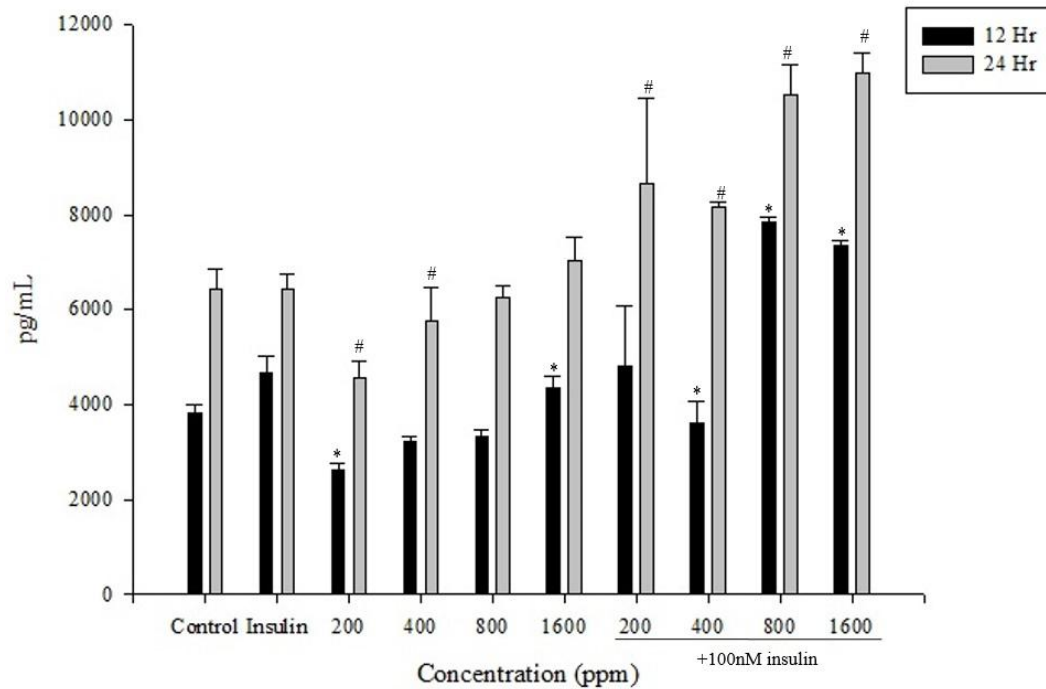
圖十一、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-3 培養液共置下之脂聯素(adiponectin)分泌

*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



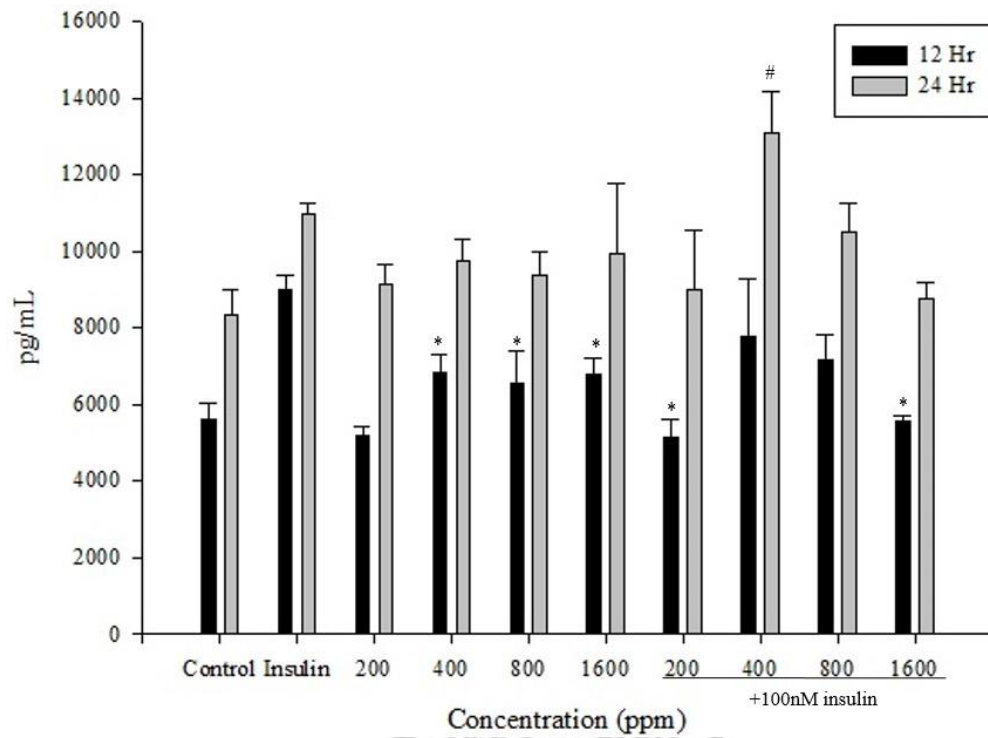
(B) Resistant



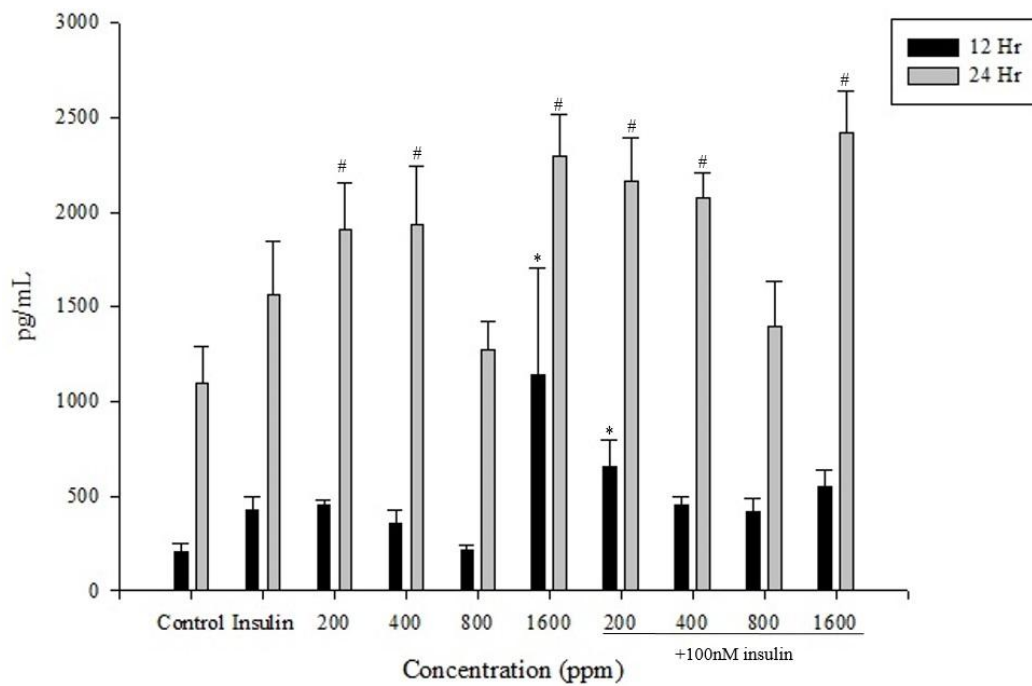
圖十二、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-4 培養液共置下之脂聯素(adiponectin)分泌

*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



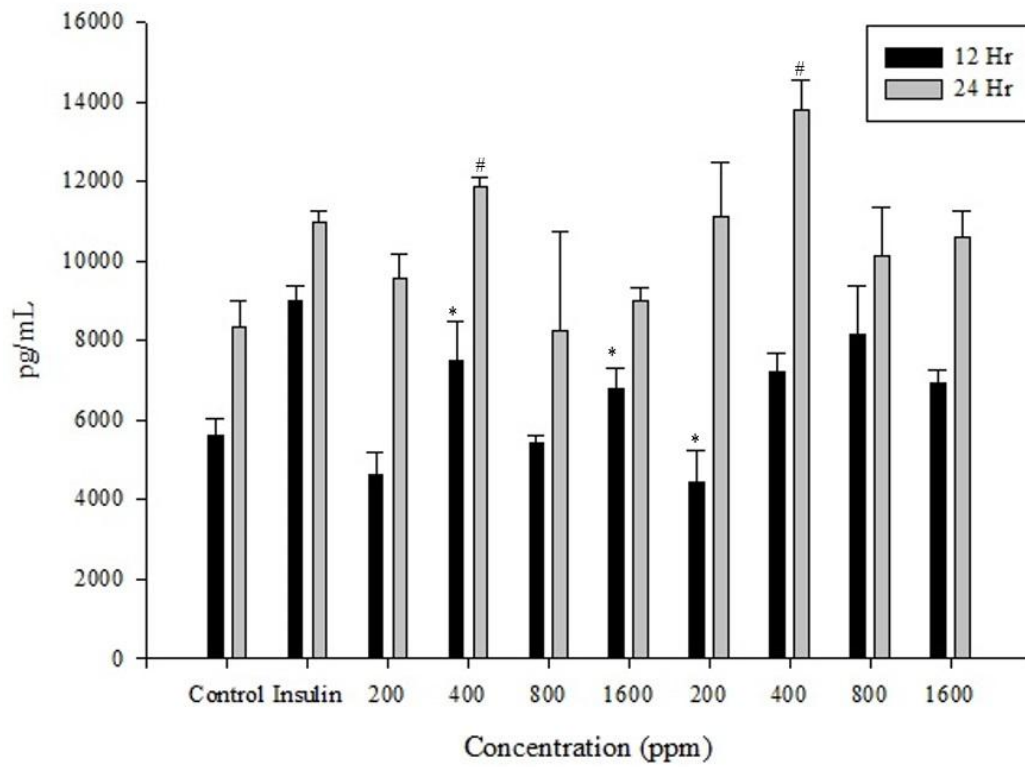
(B) Resistant



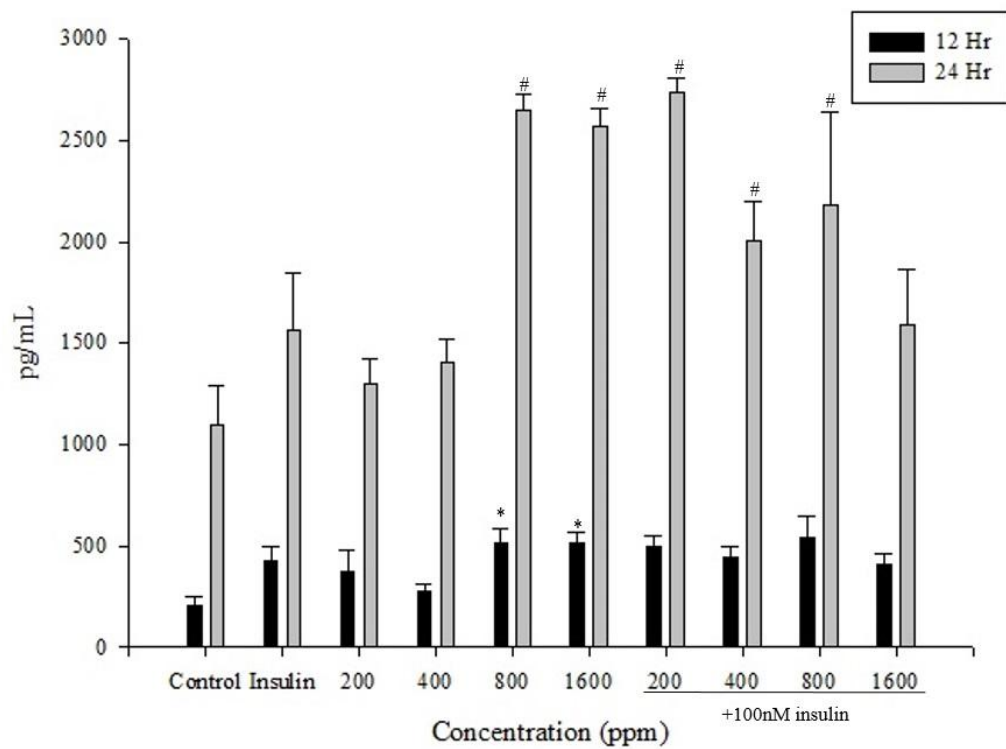
圖十三、3T3-L1 脂肪細胞與 F2-2 培養液共置下之抗素(resistin)分泌

*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



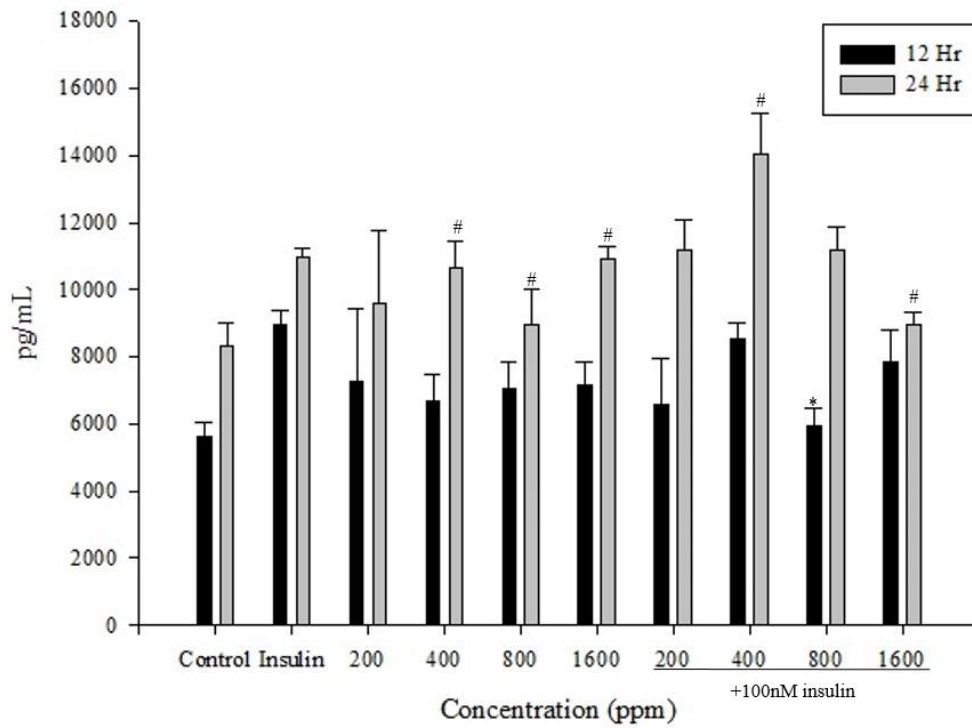
(B) Resistant



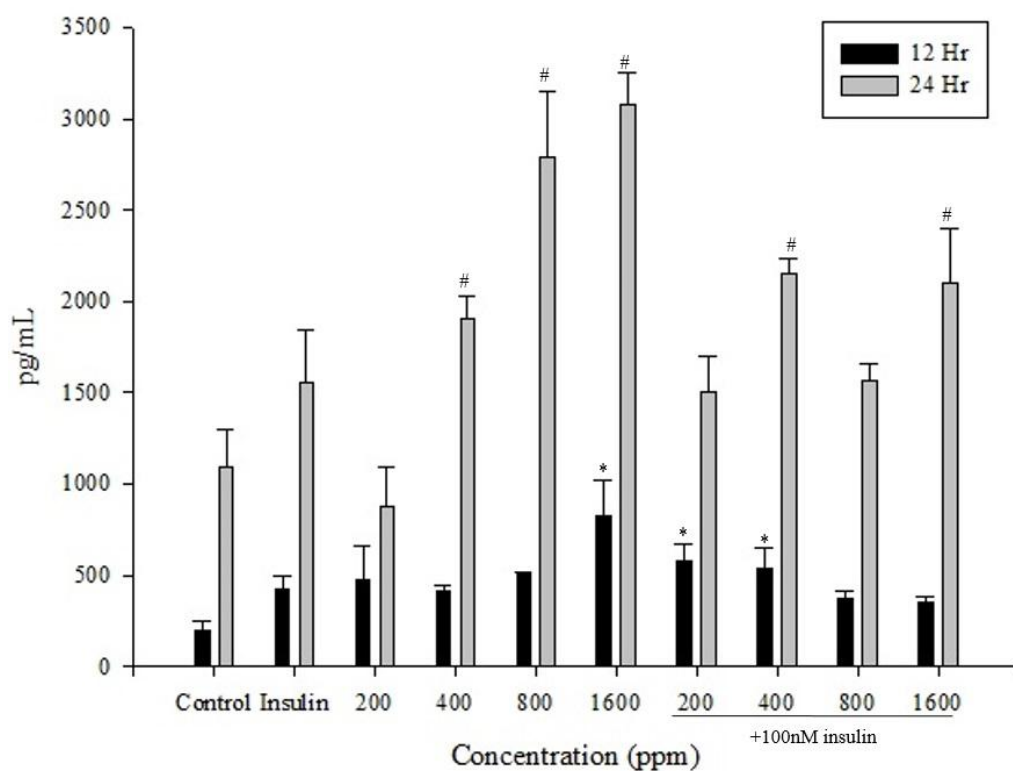
圖十四、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-3 培養液共置下之抗素(resistin)分泌

*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



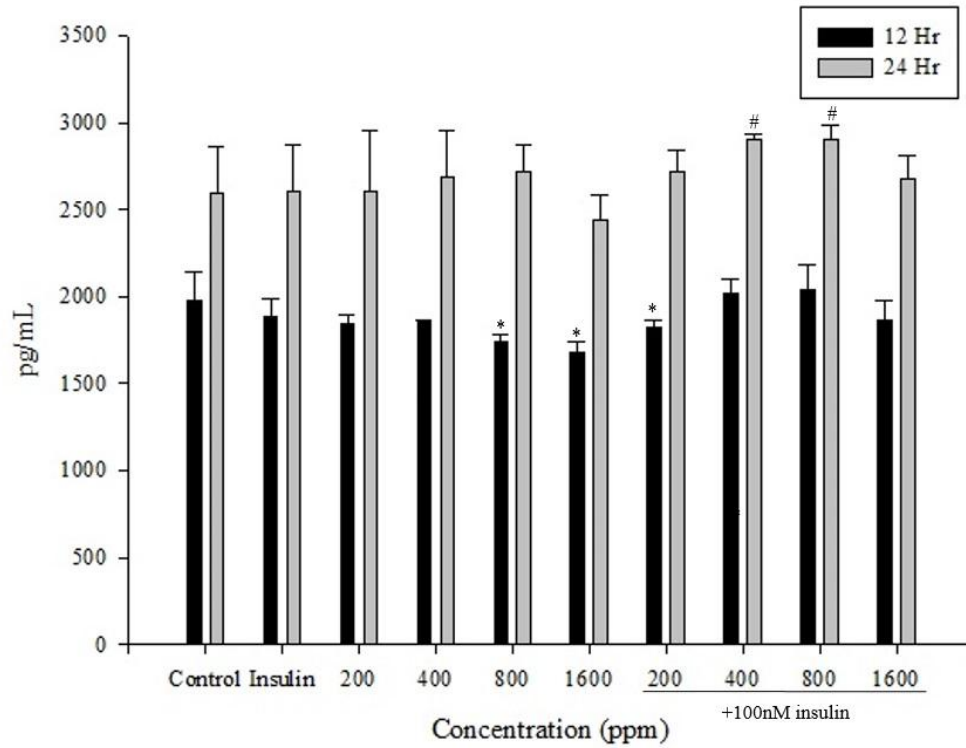
(B) Resistant



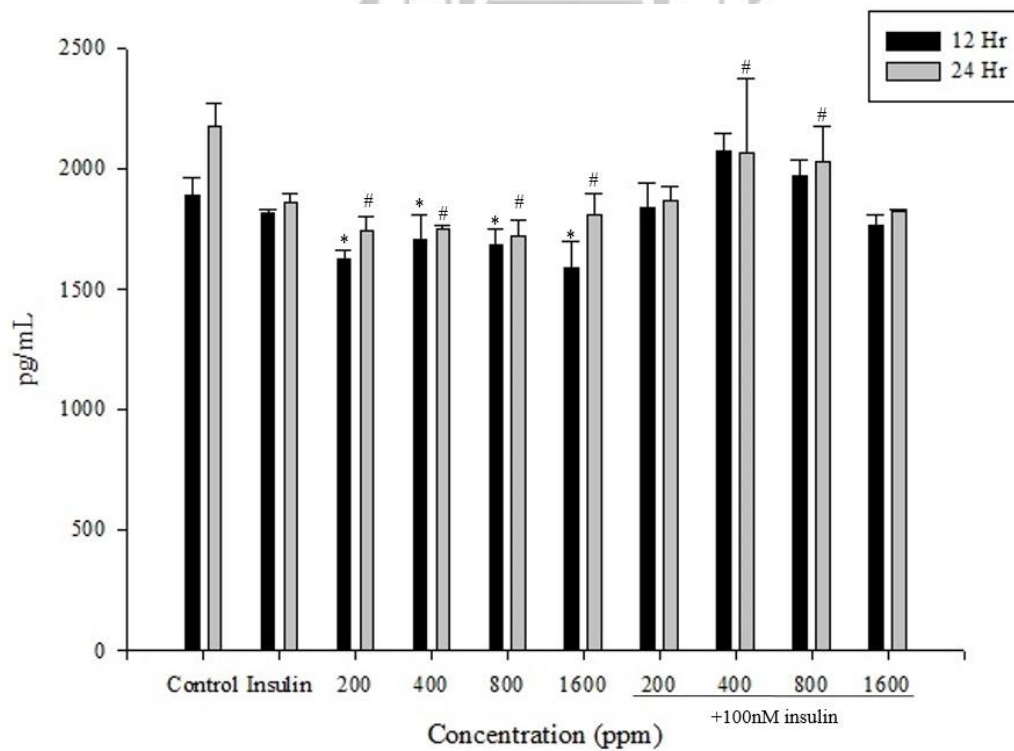
圖十五、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-4 培養液共置下之抗素(resistin)分泌

*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



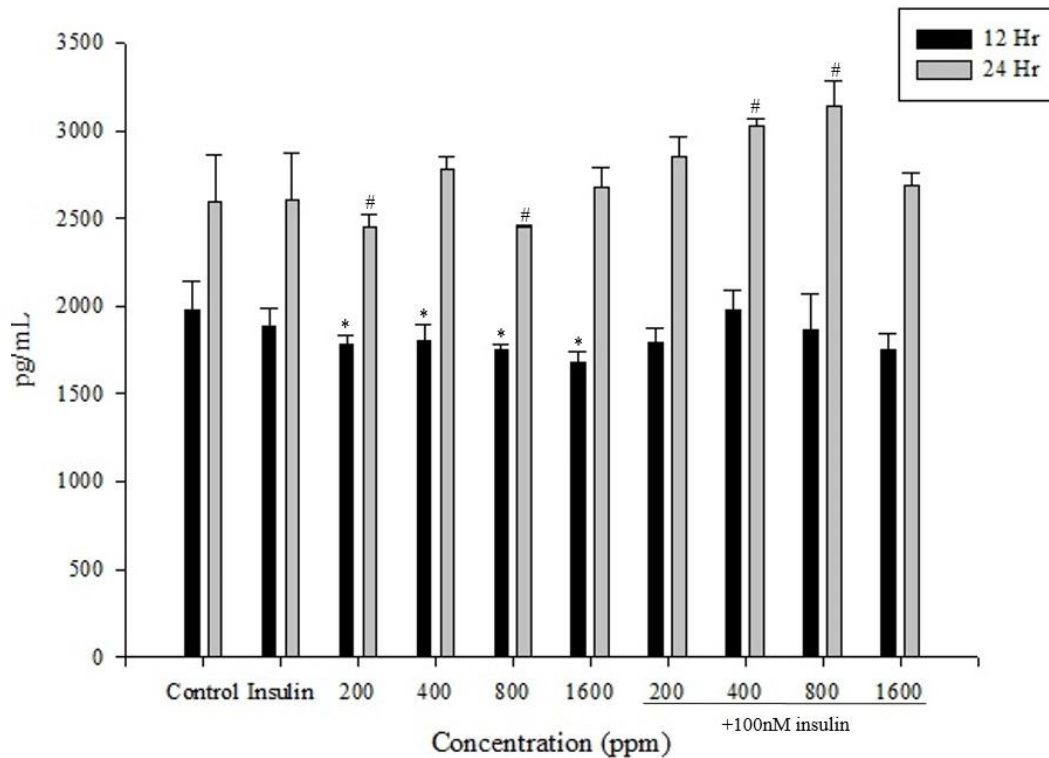
(B) Resistant



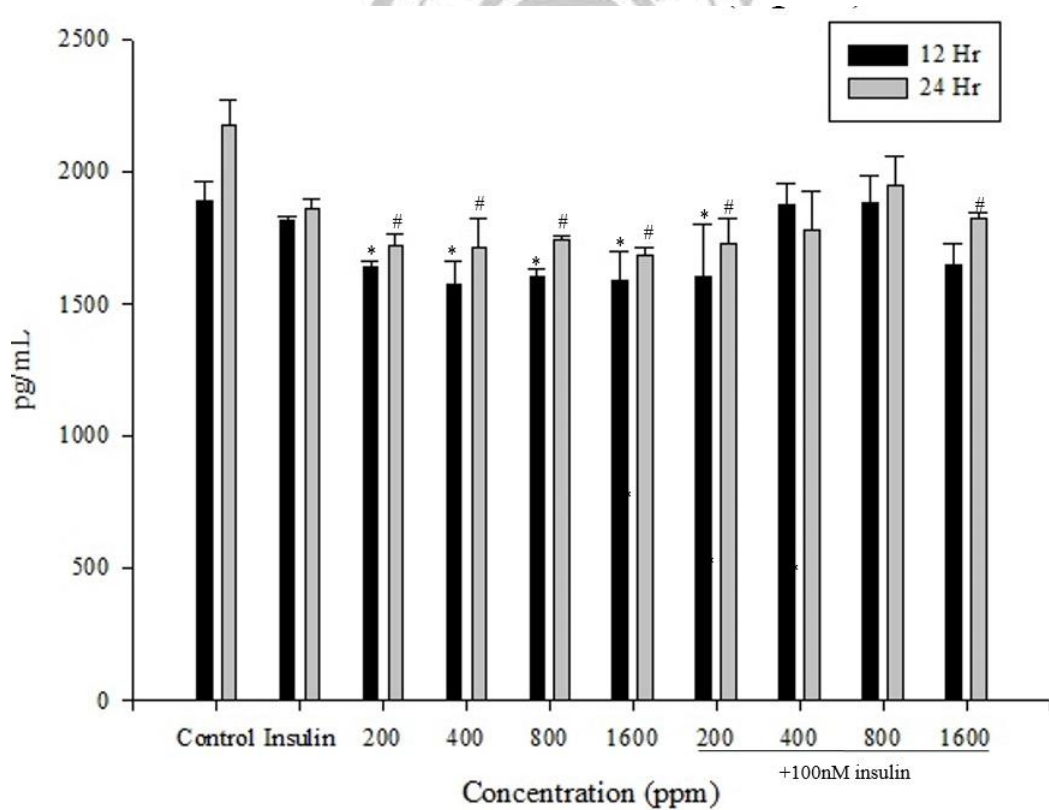
圖十六、3T3-L1 脂肪細胞與 F2-2 培養液共置下之瘦素(leptin)分泌

*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



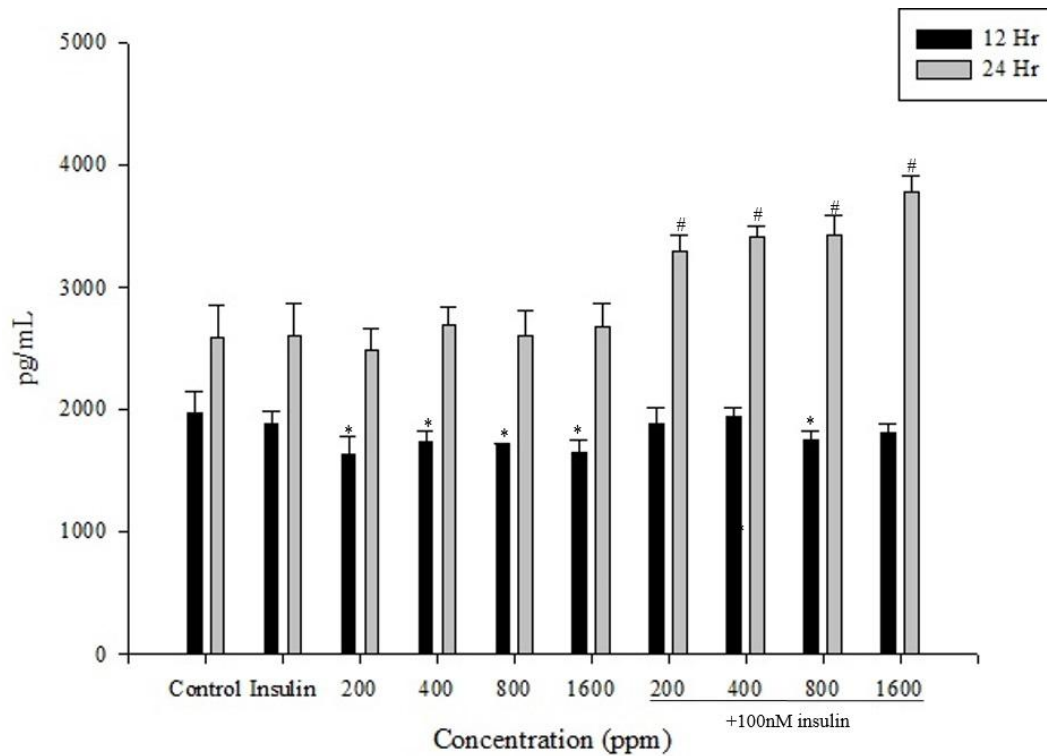
(B) Resistant



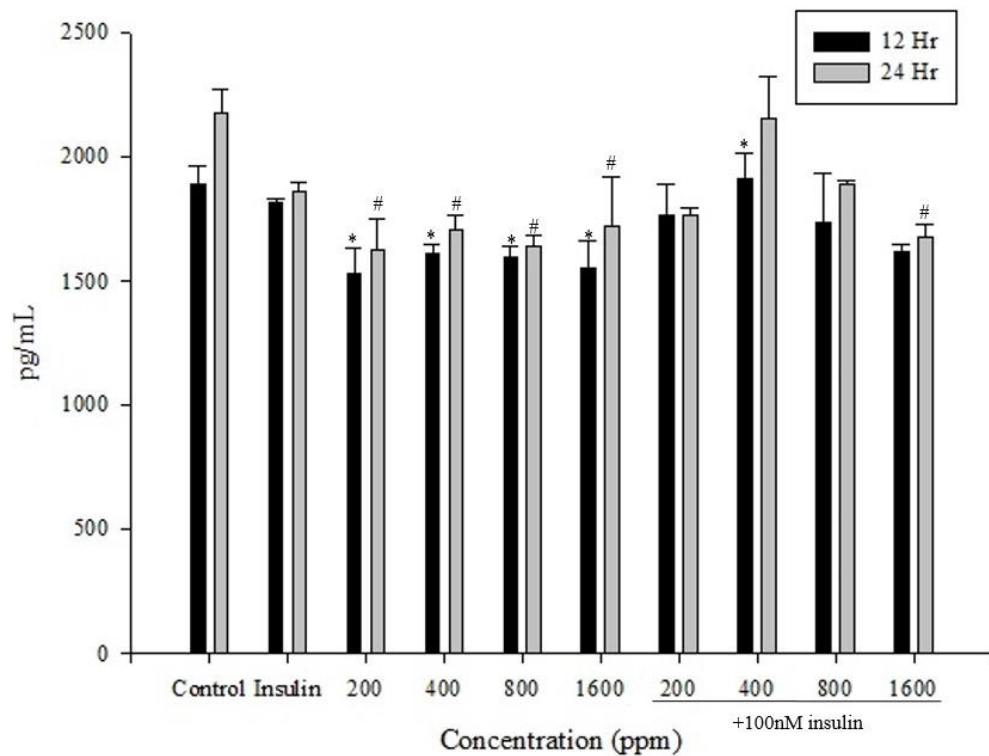
圖十七、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-3 培養液共置下之瘦素(leptin)分泌

*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



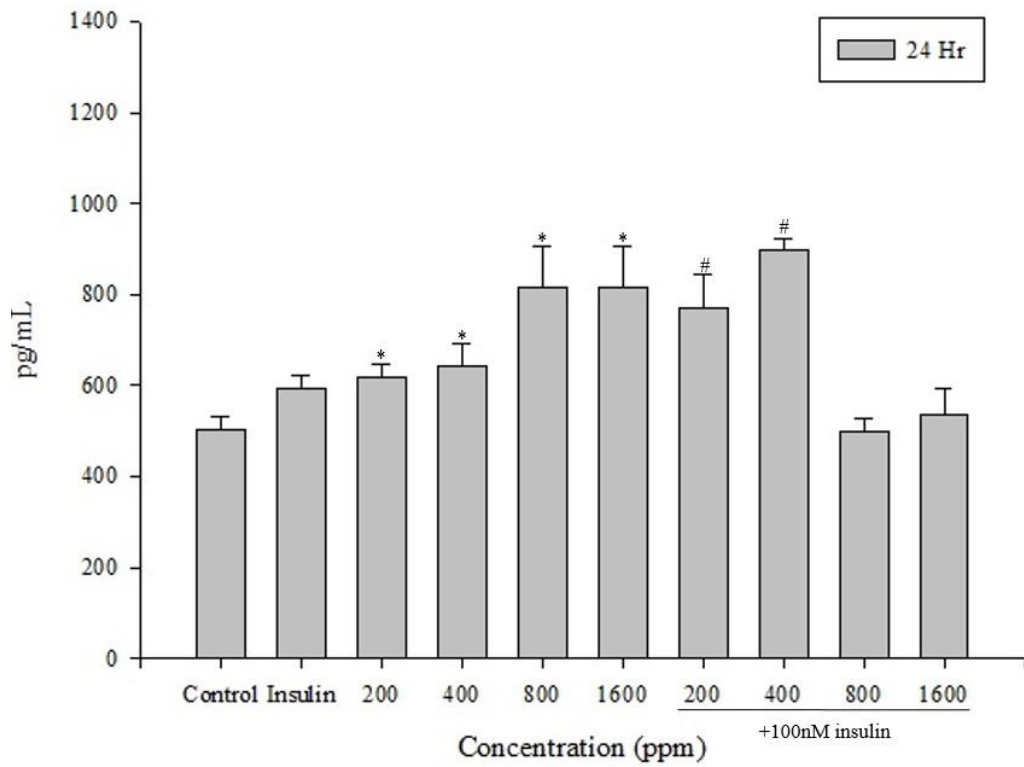
(B) Resistant



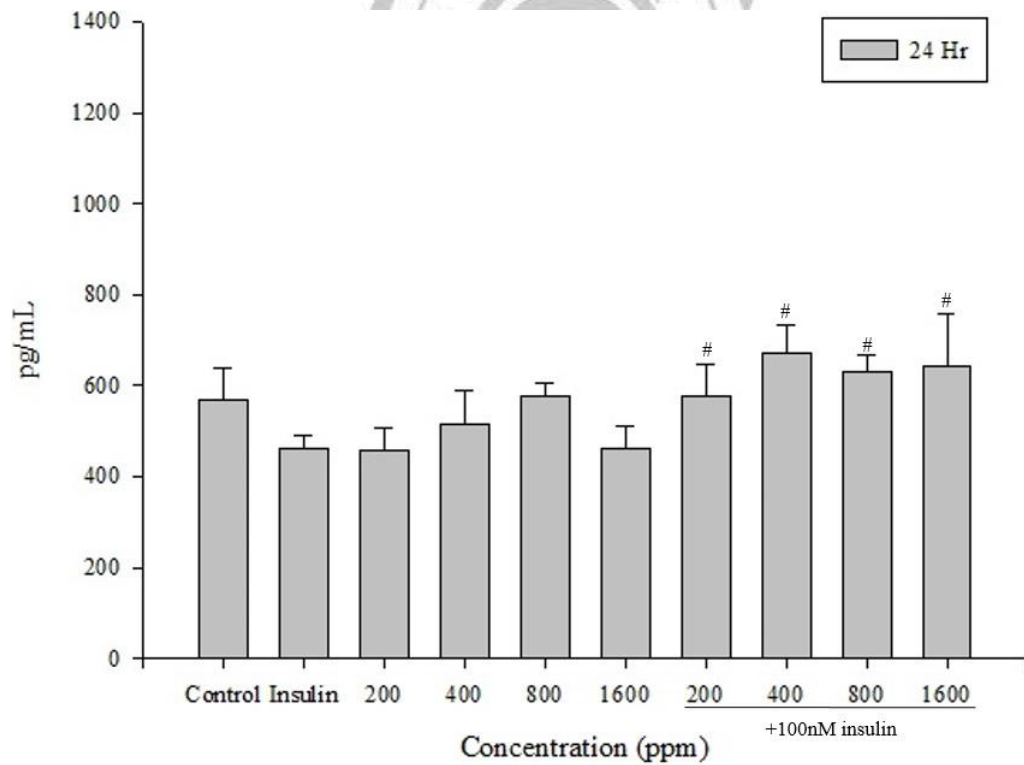
圖十八、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-4 培養液共置下之瘦素(leptin)分泌

*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



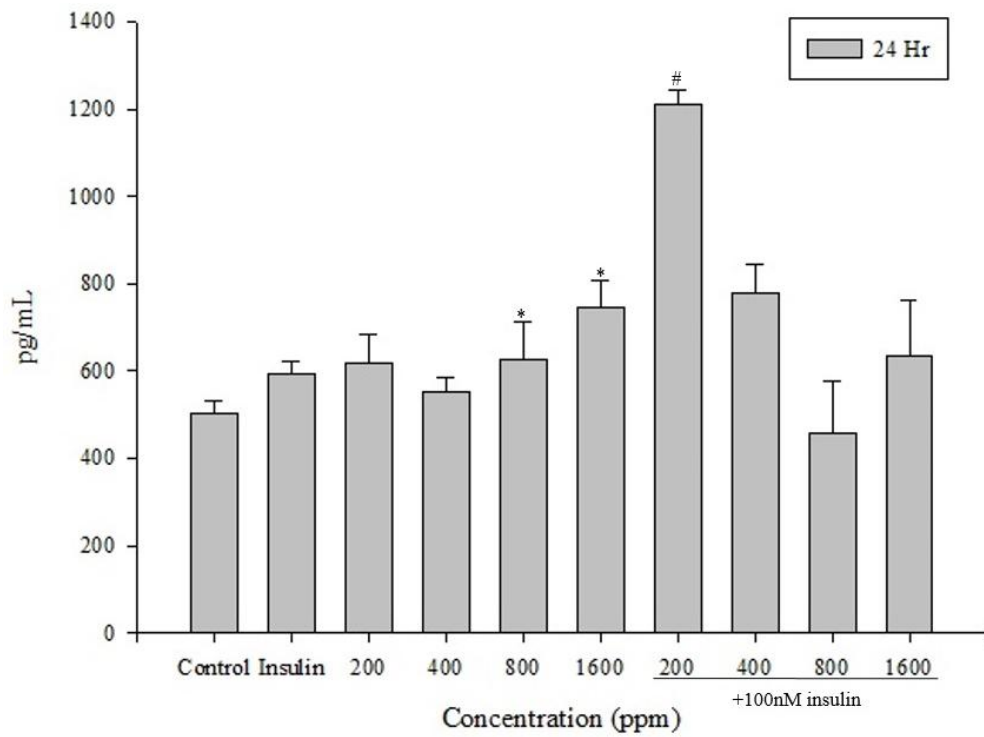
(B) Resistant



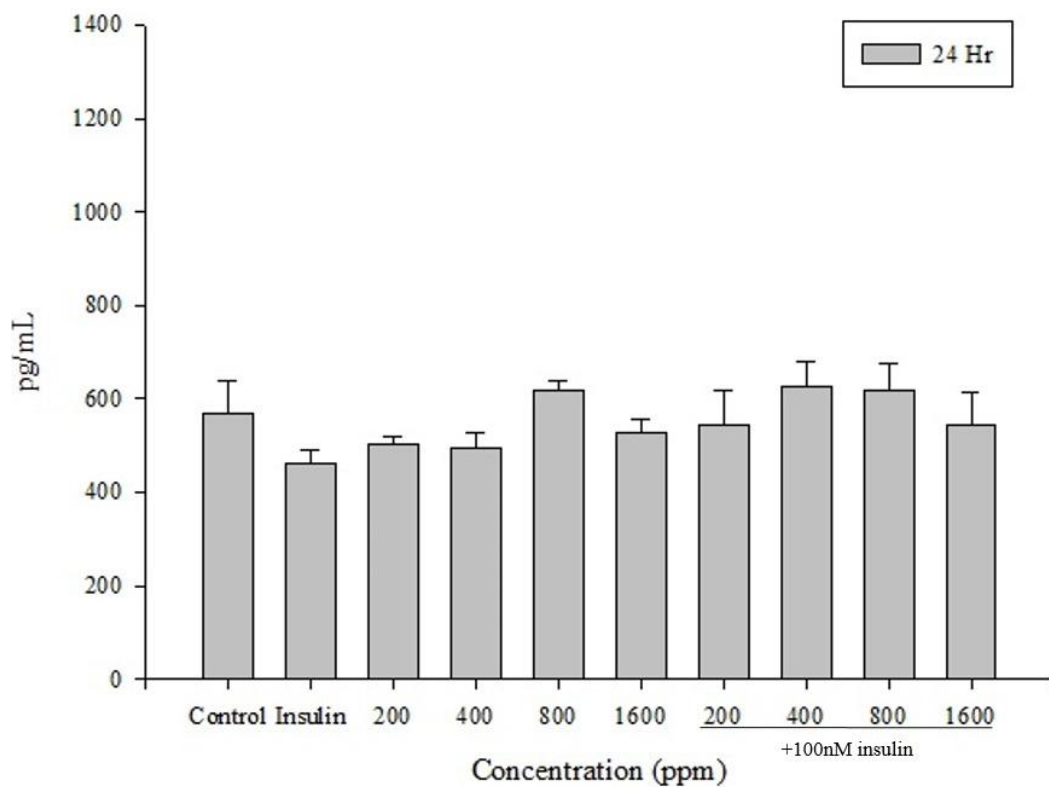
圖十九、3T3-L1 脂肪細胞與 F2-2 培養液共置下之腫瘤壞死因子(TNF- alpha)分泌

*表示與控制組有顯著差異($p < 0.05$)。#表示與胰島素組有顯著差異($p < 0.05$)。

(A)Normal



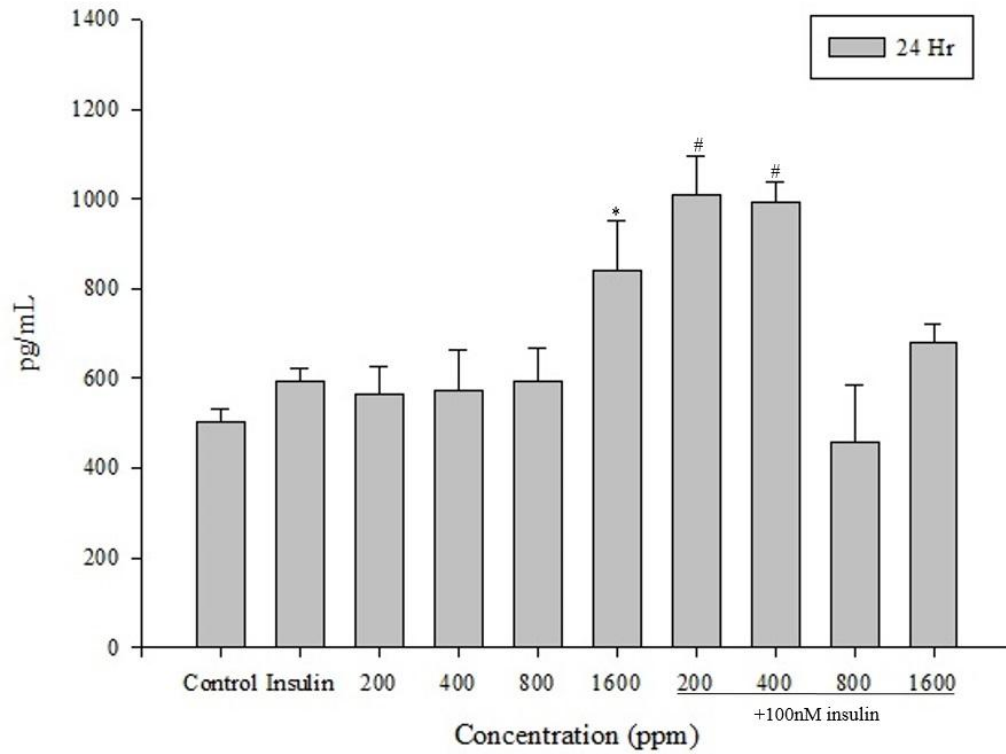
(B)Resistant



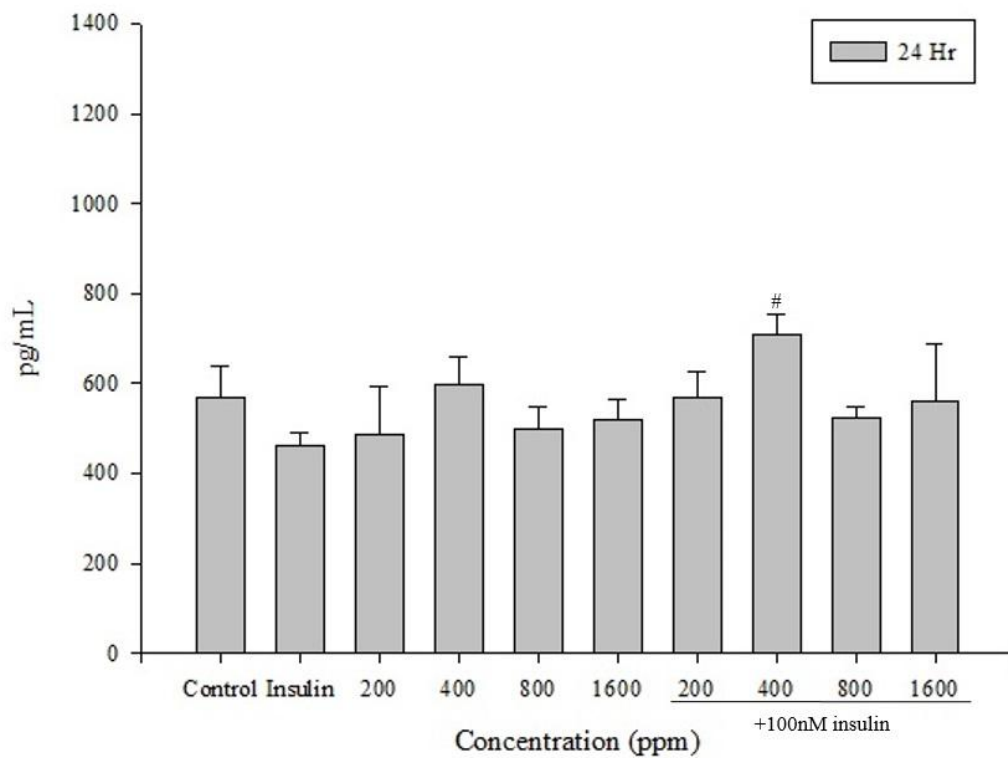
圖二十、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-3 培養液共置下之腫瘤壞死因子(TNF- alpha)分泌

*表示與控制組有顯著差異($p < 0.05$)。#表示與胰島素組有顯著差異($p < 0.05$)。

(A)Normal



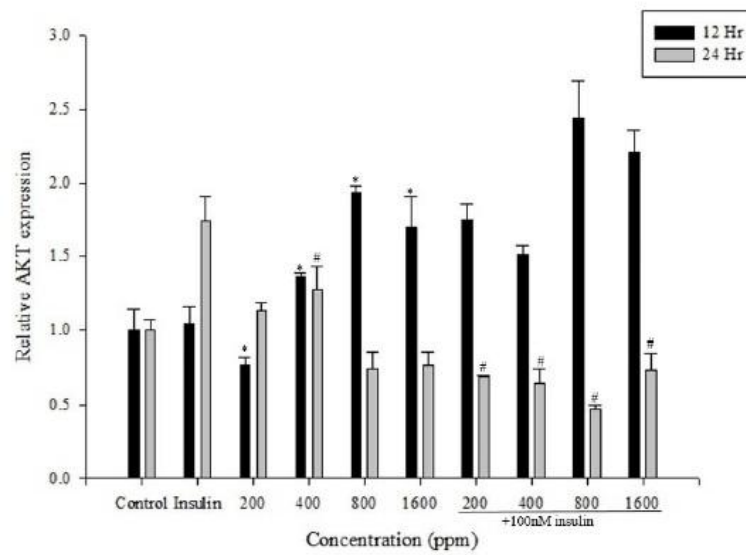
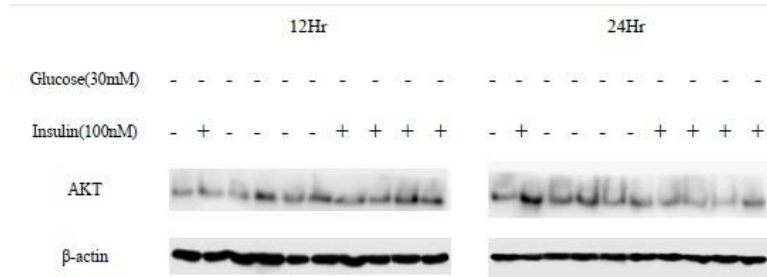
(B)Resistant



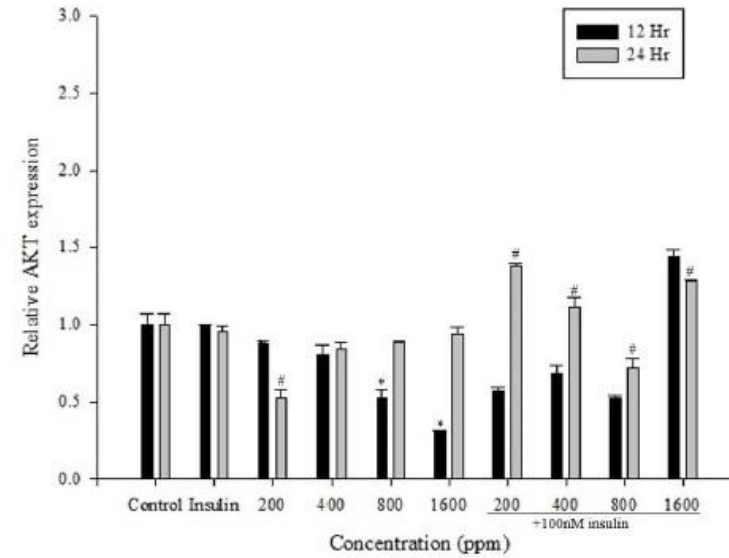
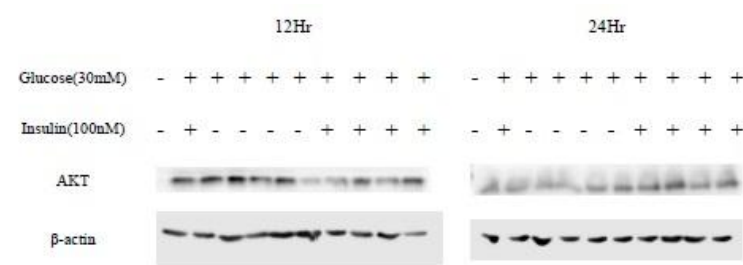
圖二十一、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-4 培養液共置下之腫瘤壞死因子(TNF- alpha)分泌

*表示與控制組有顯著差異($p < 0.05$)。#表示與胰島素組有顯著差異($p < 0.05$)。

(A) Normal



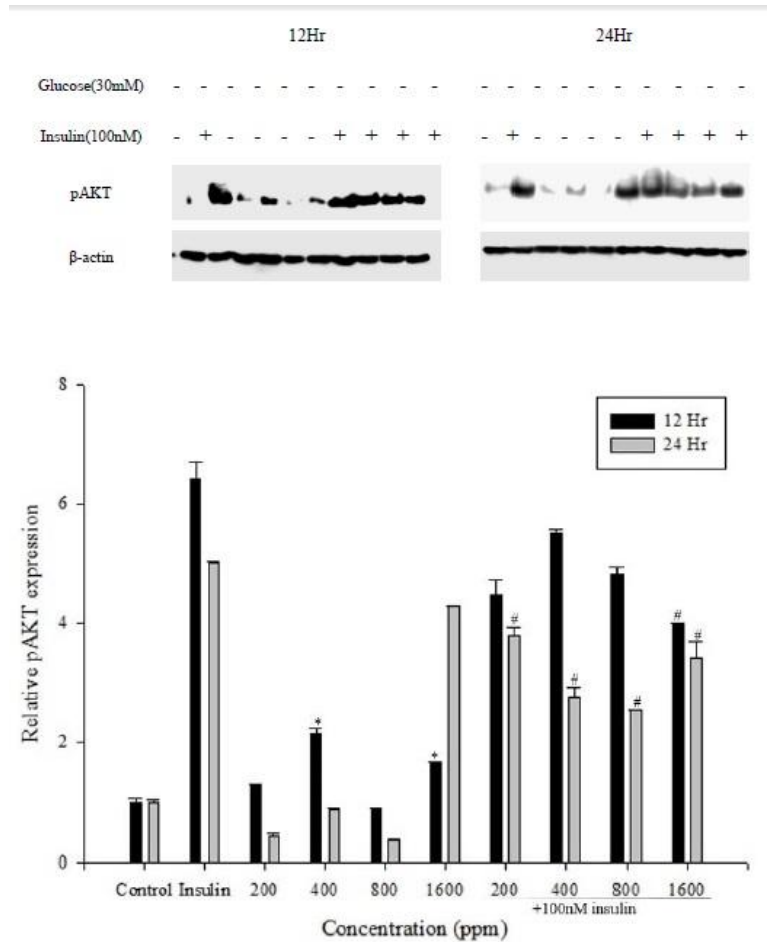
(B) Resistant



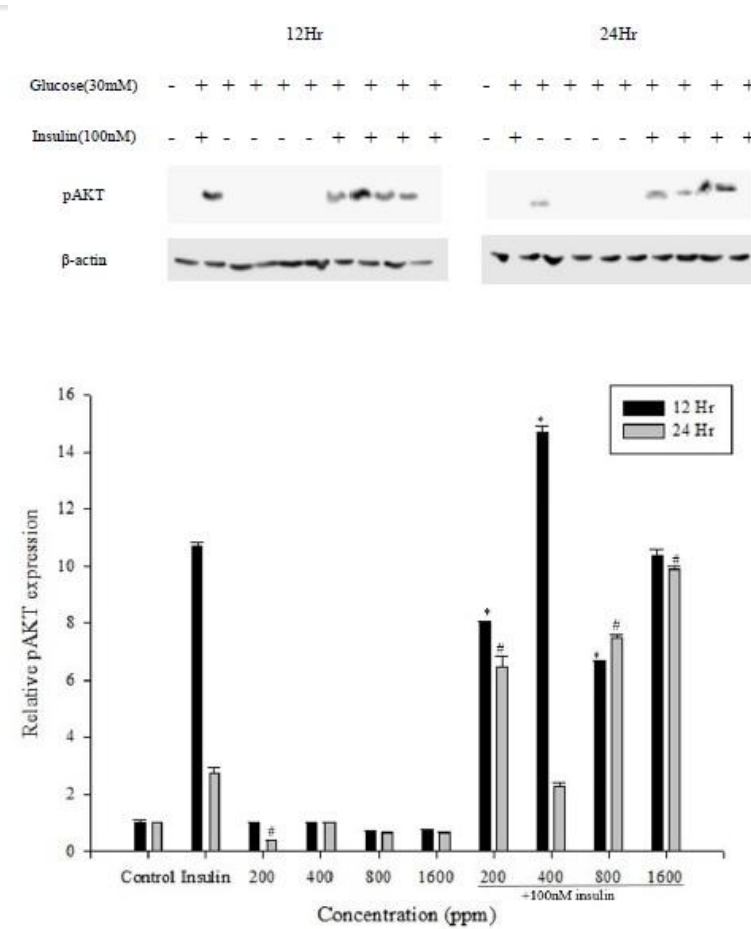
圖二十二、3T3-L1 脂肪細胞與 F2-2 培養液共置下之 AKT 蛋白質相對量

*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



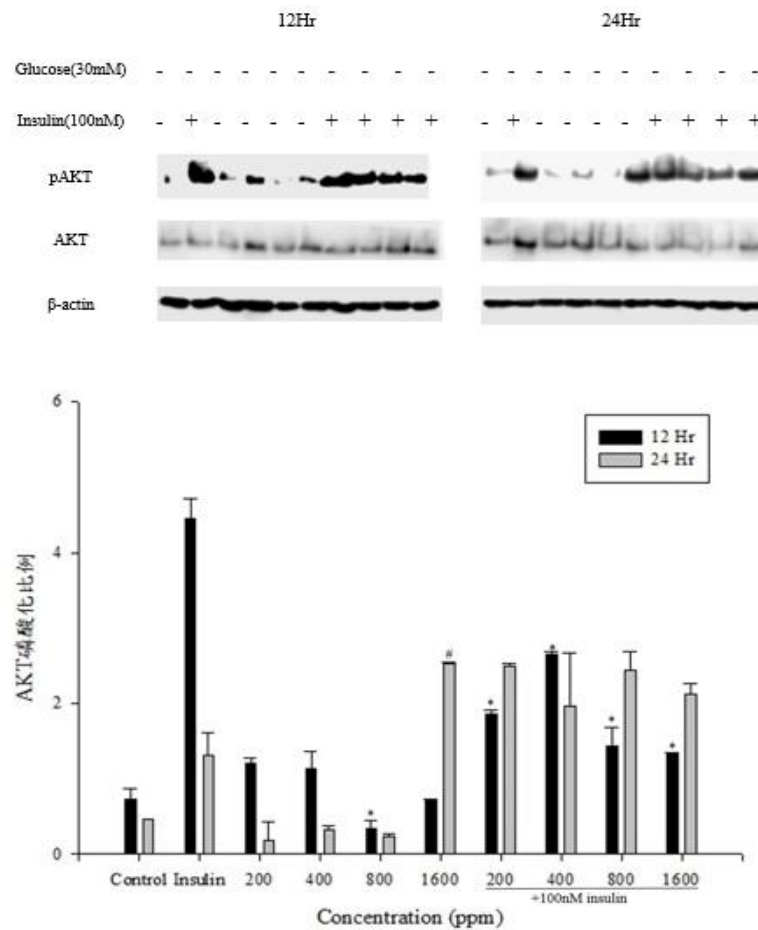
(B)Resistant



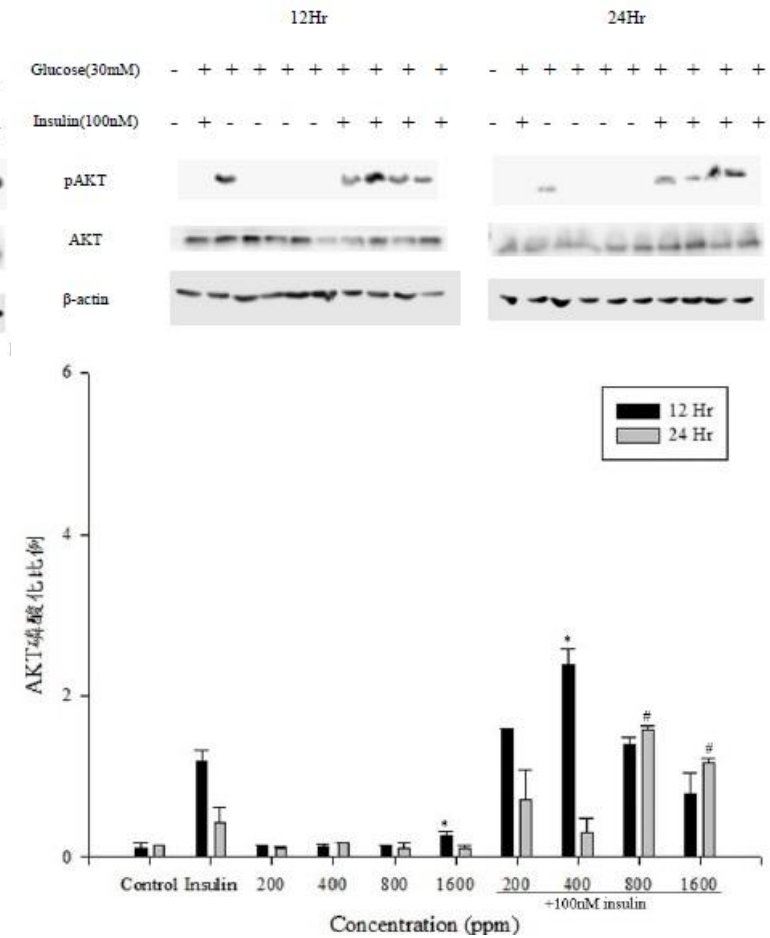
圖二十三、3T3-L1 脂肪細胞與 F2-2 培養液共置下之 pAKT 蛋白質相對量

*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



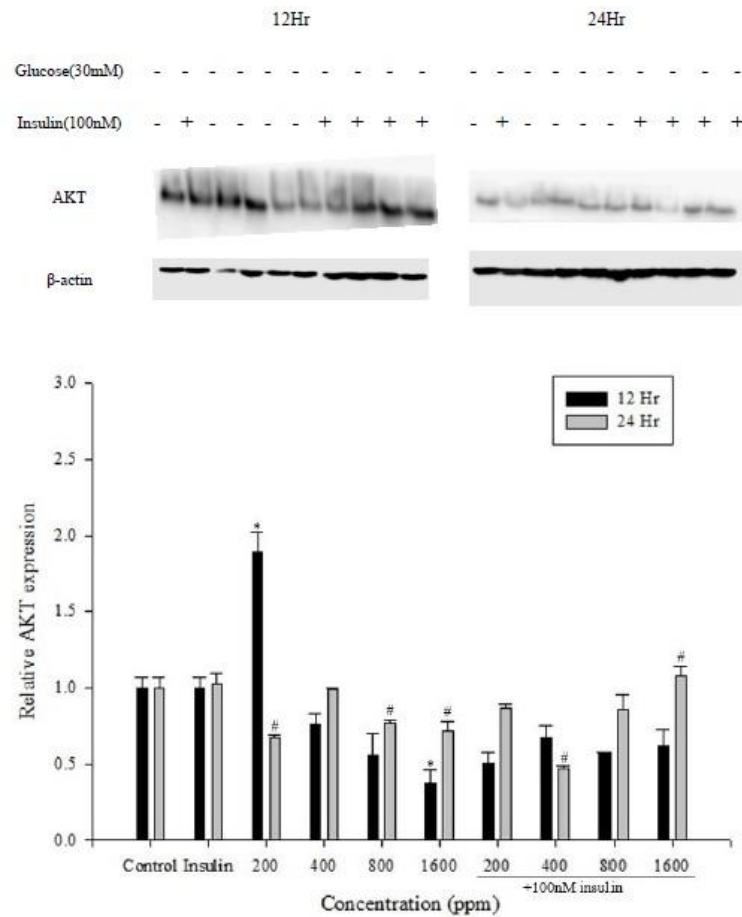
(B) Resistant



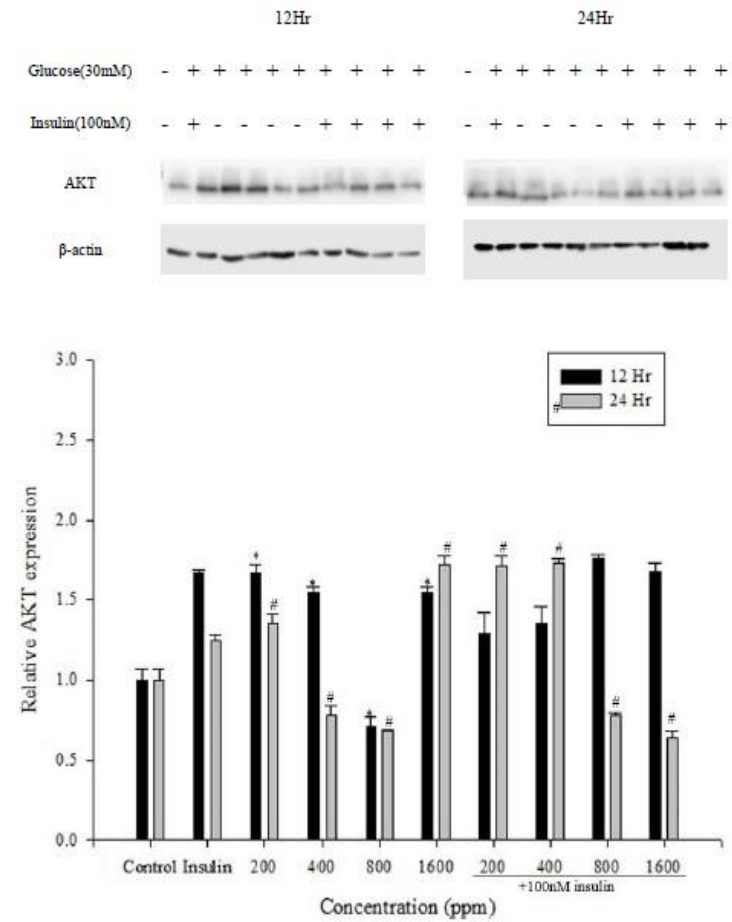
圖二十四、3T3-L1 脂肪細胞與 F2-2 培養液共置下之 AKT 蛋白質磷酸化程度

*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



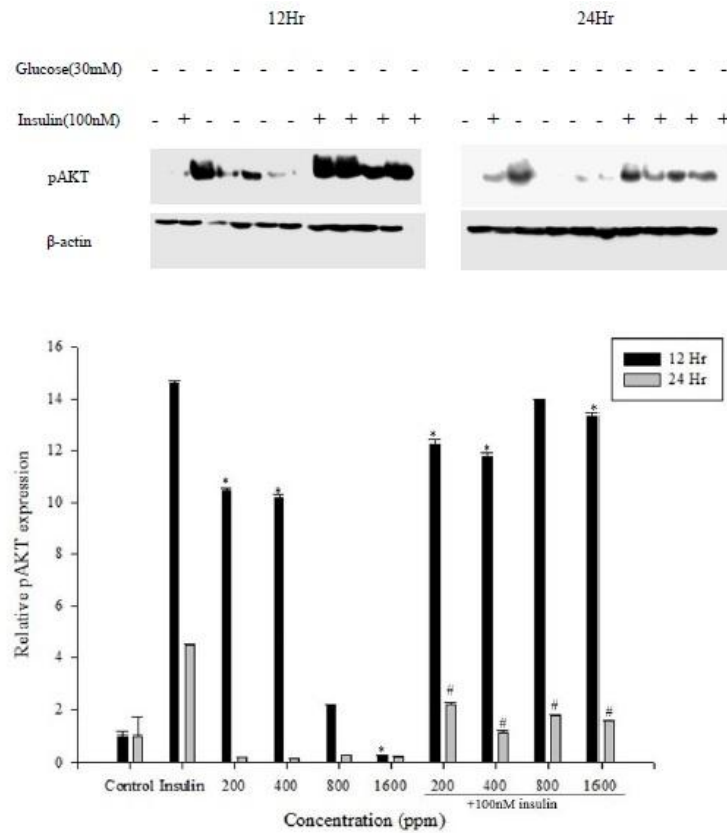
(B) Resistant



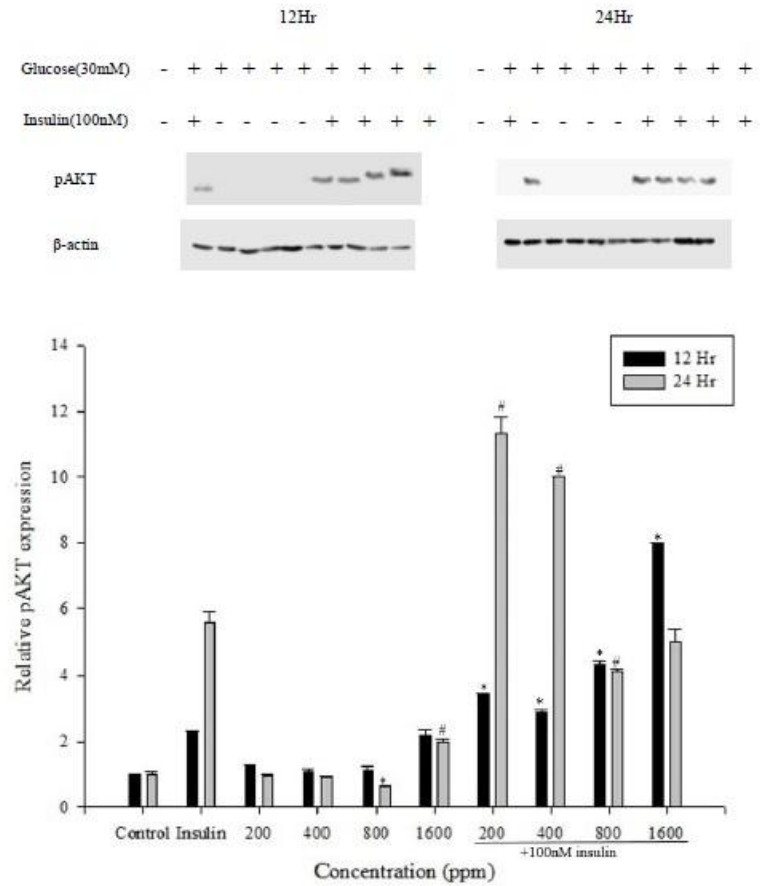
圖二十五、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-3 培養液共置下之 AKT 蛋白質相對量

*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



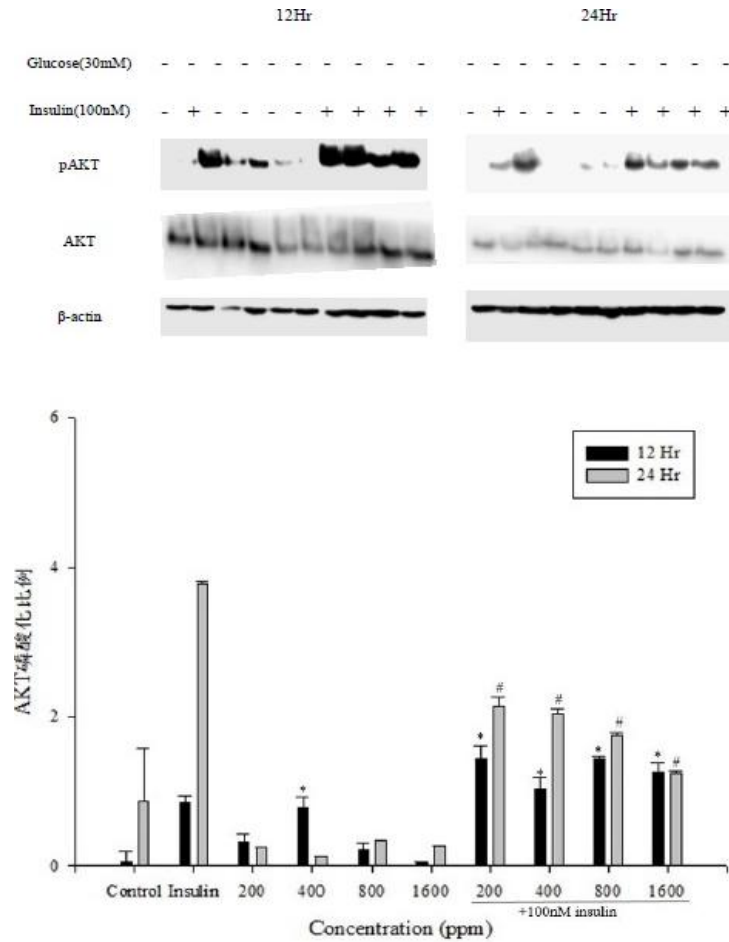
(B) Resistant



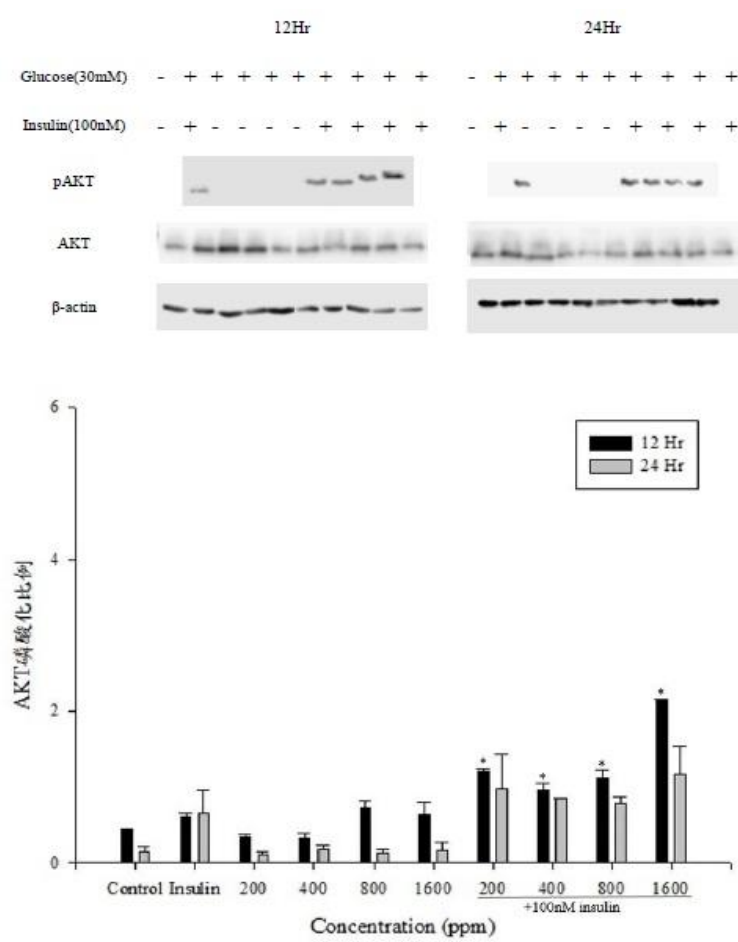
圖二十六、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-3 培養液共置下之 pAKT 蛋白質相對量

*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



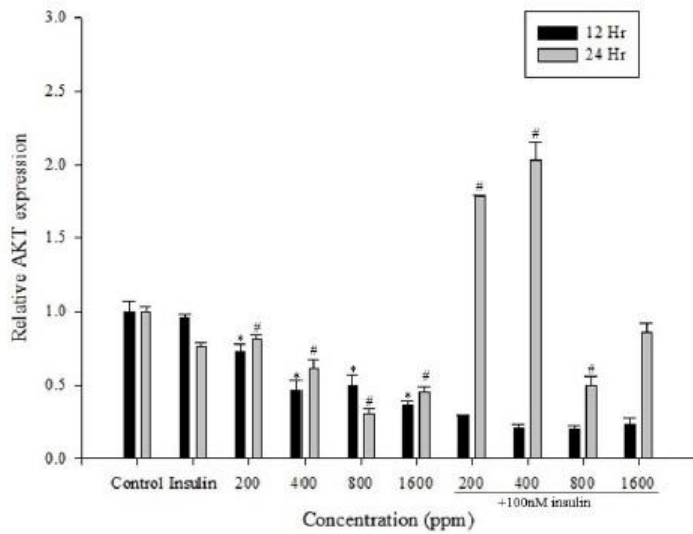
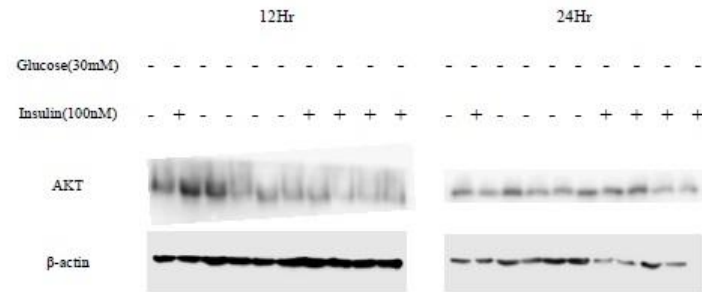
(B) Resistant



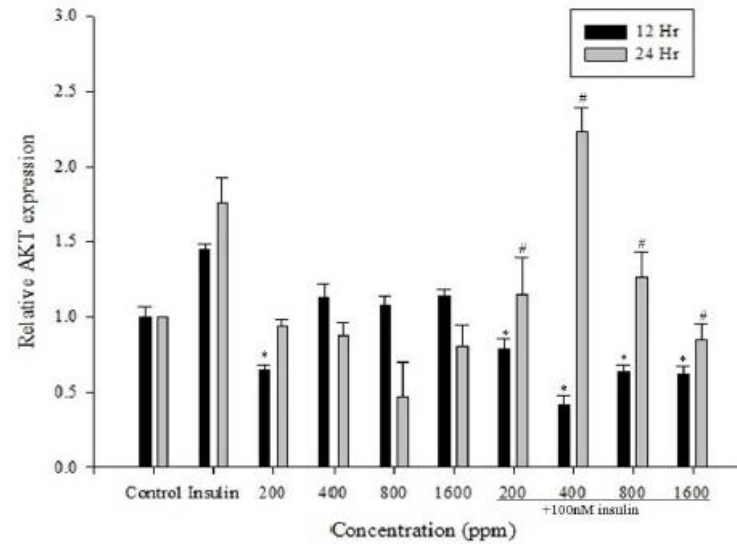
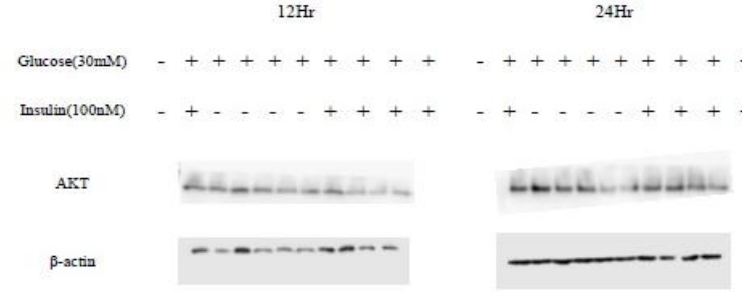
圖二十七、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-3 培養液共置下之 AKT 蛋白質磷酸化程度

*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



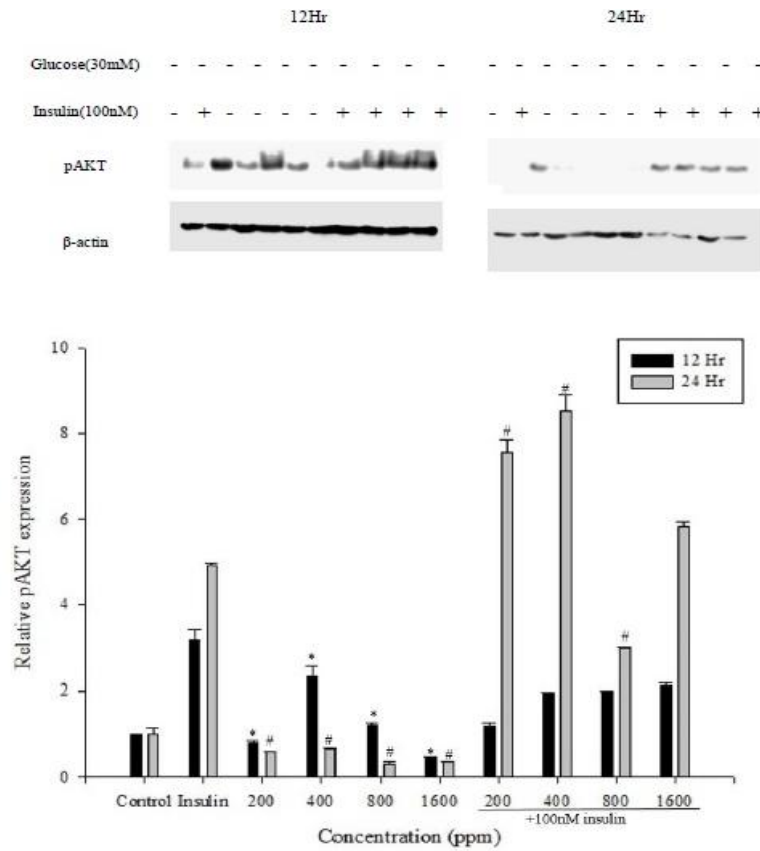
(B) Resistant



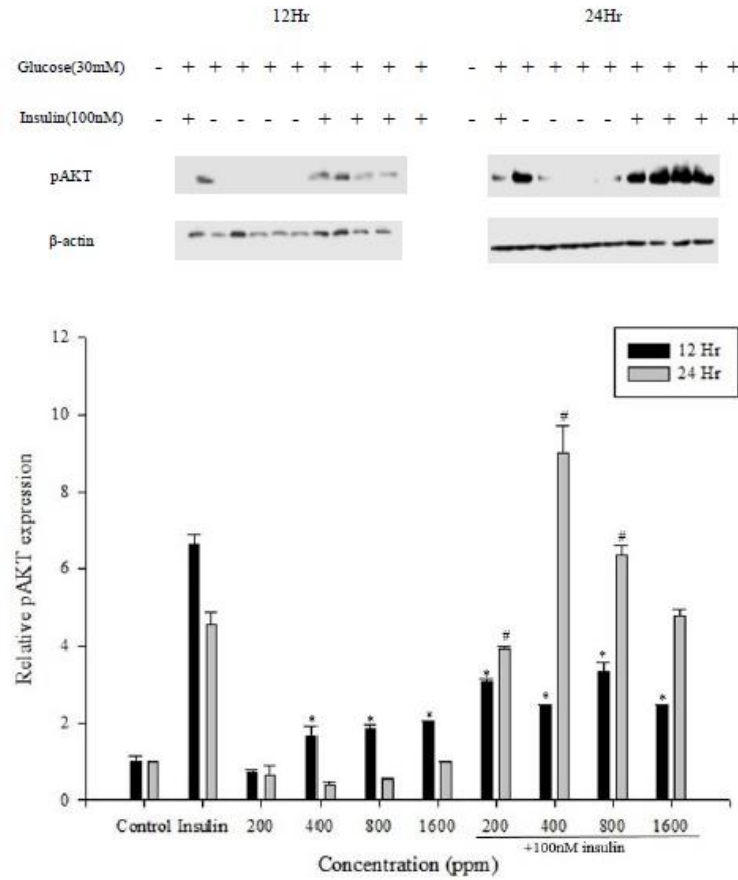
圖二十八、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-4 培養液共置下之 AKT 蛋白質相對量

*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



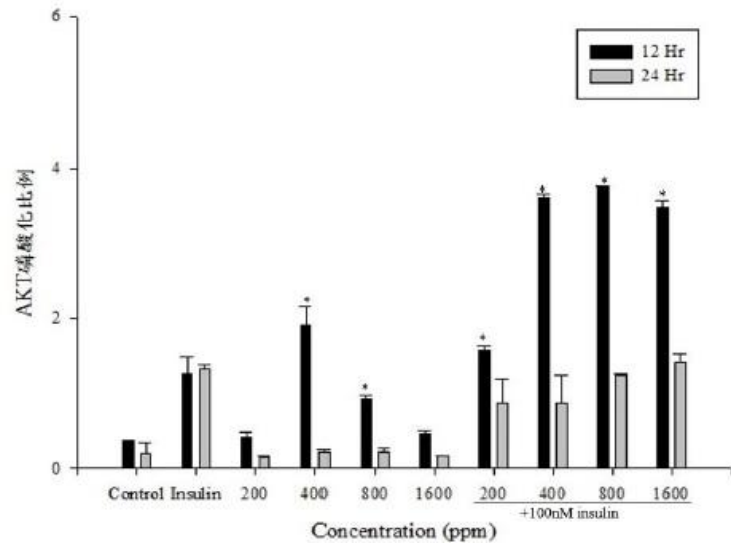
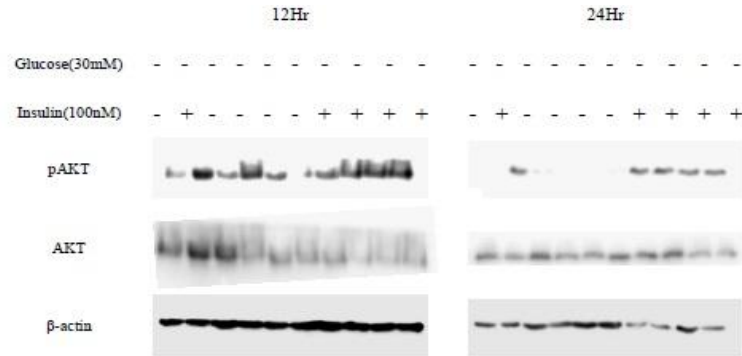
(B) Resistant



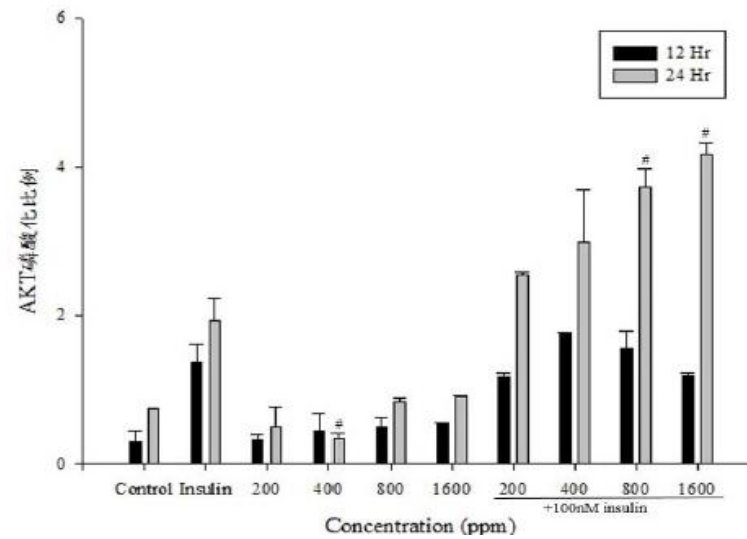
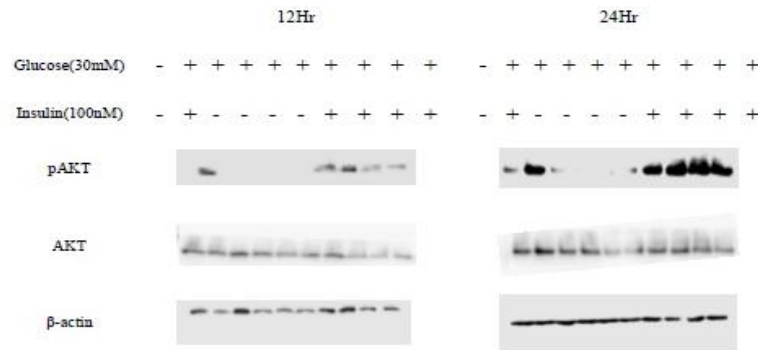
圖二十九、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-4 培養液共置下之 pAKT 蛋白質相對量

*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) Resistant



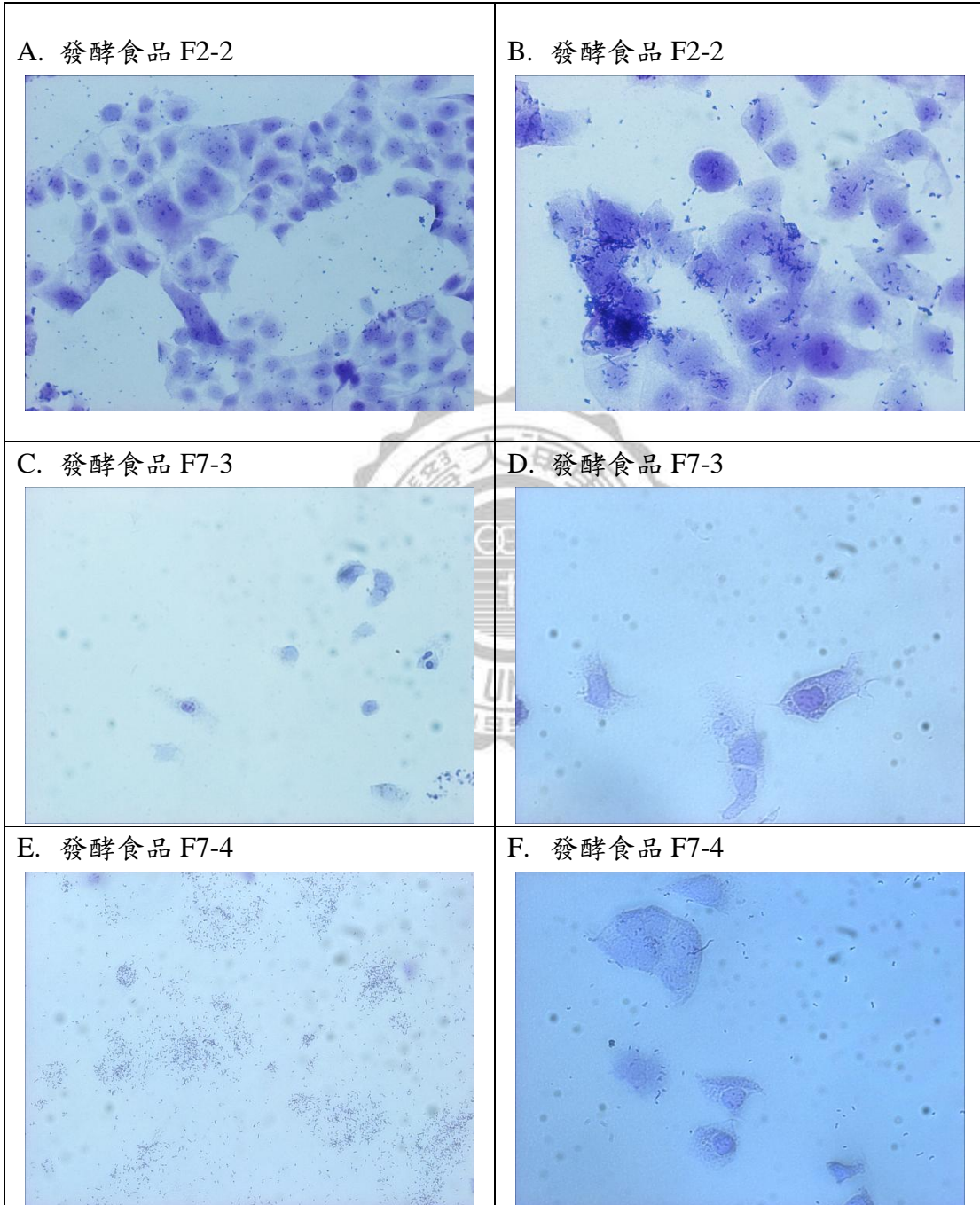
圖三十、3T3-L1 脂肪細胞與 F7-4 培養液共置下之 AKT 蛋白質磷酸化程度

*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

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 -澱粉醇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.

張郁瑩;李保宏;黃韜;潘子明.(2011). 紅麴代謝產物(monacolin K)對肝細胞胰島素阻抗之改善效應.臺灣農業化學與食品科學. 49(2): 82-88

賴蕙蘭 (2010).黃金銀耳於糖尿病大鼠模式依肉中降血糖機制之探討. 東海大學食品科學研究所. 碩士論文 29-57

王茹婕 (2009).白藜蘆醇對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化之調控機制. 東海大學食品科學研究所. 碩士論文 6-9

徐鈺欣 (2012).黃金銀耳多醣體調節 3T3-L1 小鼠脂肪細胞之胰島素傳訊及細胞激素分泌. 東海大學食品科學研究所. 碩士論文 58-99

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. (2016). "2. Classification and Diagnosis of Diabetes." Diabetes Care39 Suppl 1: S13-22.

Antuna-Puente, B., B. Feve, S. Fellahi and J. P. Bastard (2008). "Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity." Diabetes Metab34(1): 2-11.

Atkinson, M. A. and G. S. Eisenbarth (2001). "Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment." The Lancet358(9277): 221-229.

Banerjee, R. R., S. M. Rangwala, J. S. Shapiro, A. S. Rich, B. Rhoades, Y. Qi, J. Wang, M. W. Rajala, A. Pocai, P. E. Scherer, C. M. Steppan, R. S. Ahima, S. Obici, L. Rossetti and M. A. Lazar (2004). "Regulation of fasted blood glucose by resistin." Science303(5661): 1195-1198.

Buren, J., H. X. Liu, J. Lauritz and J. W. Eriksson (2003). "High glucose and insulin in combination cause insulin receptor substrate-1 and -2 depletion and protein kinase

B desensitisation in primary cultured rat adipocytes: possible implications for insulin resistance in type 2 diabetes." Eur J Endocrinol**148**(1): 157-167.

Cannon, B. and J. Nedergaard (2004). "Brown adipose tissue: function and physiological significance." Physiol Rev**84**(1): 277-359.

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

Chandran, M., S. A. Phillips, T. Ciaraldi and R. R. Henry (2003). "Adiponectin: More Than Just Another Fat Cell Hormone?" Diabetes Care**26**(8): 2442-2450.

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

Cho, H., J. L. Thorvaldsen, Q. Chu, F. Feng and M. J. Birnbaum (2001). "Akt1/PKB α is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice." J Biol Chem**276**(42): 38349-38352.

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.

Eikelis, N., M. Schlaich, A. Aggarwal, D. Kaye and M. Esler (2003). "Interactions between leptin and the human sympathetic nervous system." Hypertension**41**(5): 1072-1079.

Fasshauer, M. and R. Paschke (2003). "Regulation of adipocytokines and insulin resistance." Diabetologia**46**(12): 1594-1603.

Fred-Jaiyesimi, A., A. Kio and W. Richard (2009). " α -Amylase inhibitory effect of 3 β -olean-12-en-3-yl (9Z)-hexadec-9-enoate isolated from *Spondias mombin* leaf." Food Chemistry**116**(1): 285-288.

Fruebis, J., T. S. Tsao, S. Javorschi, D. Ebbets-Reed, M. R. Erickson, F. T. Yen, B. E. Bihain and H. F. Lodish (2001). "Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice." Proc Natl Acad Sci U S A**98**(4): 2005-2010.

Galic, S., J. S. Oakhill and G. R. Steinberg (2010). "Adipose tissue as an endocrine organ." Mol Cell Endocrinol**316**(2): 129-139.

Gavin, J. R., 3rd, J. Roth, D. M. Neville, Jr., P. de Meyts and D. N. Buell (1974). "Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations: a direct demonstration in cell culture." Proc Natl Acad Sci U S A**71**(1): 84-88.

Gilliland, S. E. (1989). "Acidophilus milk products: a review of potential benefits to consumers." J Dairy Sci**72**(10): 2483-2494.

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.

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.

Gregoire, F. M., C. M. Smas and H. S. Sul (1998). "Understanding Adipocyte Differentiation." Physiological Reviews**78**(3): 783-809.

Guerra, N. P., P. F. Bernárdez, J. Méndez, P. Cachaldora and L. Pastrana Castro (2007). "Production of four potentially probiotic lactic acid bacteria and their evaluation as feed additives for weaned piglets." Animal Feed Science and Technology**134**(1-2): 89-107.

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.

Hasty, P., A. Bradley, J. H. Morris, D. G. Edmondson, J. M. Venuti, E. N. Olson and W. H. Klein (1993). "Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted

mutation in the myogenin gene." Nature**364**(6437): 501-506.

Hauner, H. (1990). "Complete adipose differentiation of 3T3 L1 cells in a chemically defined medium: comparison to serum-containing culture conditions." Endocrinology**127**(2): 865-872.

Hayashi, T., M. F. Hirshman, E. J. Kurth, W. W. Winder and L. J. Goodyear (1998). "Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport." Diabetes**47**(8): 1369-1373.

Health, E. C. o. E. o. and N. P. o. P. i. F. i. P. M. w. L. L. A. Bacteria (2001). Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria: Report of a Joint FAO WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, American Córdoba Park Hotel, Córdoba, Argentina, 1 - 4 October 2001.

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.

Hu, E., P. Liang and B. M. Spiegelman (1996). "AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity." J Biol Chem**271**(18): 10697-10703.

Huypens, P., E. Quartier, D. Pipeleers and M. Van de Castele (2005). "Metformin reduces adiponectin protein expression and release in 3T3-L1 adipocytes involving activation of AMP activated protein kinase." Eur J Pharmacol**518**(2-3): 90-95.

Joosten, H., E. Bidlas and N. Garofalo (2006). "Salmonella detection in probiotic products." Int J Food Microbiol**110**(1): 104-107.

Karin Hofvendahl, B. H. H. (2000). "Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources." Enzyme and Microbial Technology (26): 87-107.

Kim, S. and N. Moustaid-Moussa (2000). "Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte." J Nutr**130**(12): 3110s-3115s.

Kimoto, H., S. Ohmomo and T. Okamoto (2002). "Cholesterol removal from media

by lactococci." J Dairy Sci**85**(12): 3182-3188.

Kishida, K., I. Shimomura, H. Kondo, H. Kuriyama, Y. Makino, H. Nishizawa, N. Maeda, M. Matsuda, N. Ouchi, S. Kihara, Y. Kurachi, T. Funahashi and Y. Matsuzawa (2001). "Genomic structure and insulin-mediated repression of the aquaporin adipose (AQPap), adipose-specific glycerol channel." J Biol Chem**276**(39): 36251-36260.

Klein, G., A. Pack, C. Bonaparte and G. Reuter (1998). "Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria." Int J Food Microbiol**41**(2): 103-125.

Klingenberg, M. and S. G. Huang (1999). "Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue." Biochim Biophys Acta**1415**(2): 271-296.

Kumar, M., R. Nagpal, R. Kumar, R. Hemalatha, V. Verma, A. Kumar, C. Chakraborty, B. Singh, F. Marotta, S. Jain and H. Yadav (2012). "Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases." Exp Diabetes Res**2012**: 902917.

Lebovitz, H. E. (1997). "alpha-Glucosidase inhibitors." Endocrinol Metab Clin North Am**26**(3): 539-551.

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.

Lihn, A. S., N. Jessen, S. B. Pedersen, S. Lund and B. Richelsen (2004). "AICAR stimulates adiponectin and inhibits cytokines in adipose tissue." Biochem Biophys Res Commun**316**(3): 853-858.

Long, Y. C. and J. R. Zierath (2006). "AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation." J Clin Invest**116**(7): 1776-1783.

Lye, H. S., C. Y. Kuan, J. A. Ewe, W. Y. Fung and M. T. Liong (2009). "The improvement of hypertension by probiotics: effects on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens." Int J Mol Sci**10**(9): 3755-3775.

McCue, P. P. and K. Shetty (2004). "Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase in vitro." Asia Pac J Clin Nutr**13**(1): 101-106.

Minokoshi, Y., Y. B. Kim, O. D. Peroni, L. G. Fryer, C. Muller, D. Carling and B. B. Kahn (2002). "Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." Nature**415**(6869): 339-343.

Mokarram, N., A. Merchant, V. Mukhatyar, G. Patel and R. V. Bellamkonda (2012). "Effect of modulating macrophage phenotype on peripheral nerve repair." Biomaterials**33**(34): 8793-8801.

Parvez, S., K. A. Malik, S. Ah Kang and H. Y. Kim (2006). "Probiotics and their fermented food products are beneficial for health." J Appl Microbiol**100**(6): 1171-1185.

Pedersen, K. and G. W. Tannock (1989). "Colonization of the Porcine Gastrointestinal Tract by Lactobacilli." Applied and Environmental Microbiology**55**(2): 279-283.

Phillips, S. A., T. P. Ciaraldi, A. P. Kong, R. Bandukwala, V. Aroda, L. Carter, S. Baxi, S. R. Mudaliar and R. R. Henry (2003). "Modulation of circulating and adipose tissue adiponectin levels by antidiabetic therapy." Diabetes**52**(3): 667-674.

Rajala, M. W., Y. Qi, H. R. Patel, N. Takahashi, R. Banerjee, U. B. Pajvani, M. K. Sinha, R. L. Gingerich, P. E. Scherer and R. S. Ahima (2004). "Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting." Diabetes**53**(7): 1671-1679.

Reddy, G., M. Altaf, B. J. Naveena, M. Venkateshwar and E. V. Kumar (2008). "Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - a review." Biotechnol Adv**26**(1): 22-34.

Richardson, H., S. C. Campbell, S. A. Smith and W. M. Macfarlane (2006). "Effects of rosiglitazone and metformin on pancreatic beta cell gene expression." Diabetologia**49**(4): 685-696.

Rinttila, T., A. Kassinen, E. Malinen, L. Krogius 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.

Rosen, E. D., C. J. Walkey, P. Puigserver and B. M. Spiegelman (2000).

"Transcriptional regulation of adipogenesis." Genes Dev**14**(11): 1293-1307.

Round, J. A., P. Jacklin, R. B. Fraser, R. G. Hughes, M. A. Muggleston and R. I. Holt (2011). "Screening for gestational diabetes mellitus: cost-utility of different screening strategies based on a woman's individual risk of disease." Diabetologia**54**(2): 256-263.

Sakoda, H., T. Ogihara, M. Anai, M. Fujishiro, H. Ono, Y. Onishi, H. Katagiri, M. Abe, Y. Fukushima, N. Shojima, K. Inukai, M. Kikuchi, Y. Oka and T. Asano (2002). "Activation of AMPK is essential for AICAR-induced glucose uptake by skeletal muscle but not adipocytes." Am J Physiol Endocrinol Metab**282**(6): E1239-1244.

Salt, I. P., J. M. Connell and G. W. Gould (2000). "5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) inhibits insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes." Diabetes**49**(10): 1649-1656.

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

Stephens, T. W., M. Basinski, P. K. Bristow, J. M. Bue-Valleskey, S. G. Burgett, L. Craft, J. Hale, J. Hoffmann, H. M. Hsiung, A. Kriauciunas and et al. (1995). "The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product." Nature**377**(6549): 530-532.

Steppan, C. M., S. T. Bailey, S. Bhat, E. J. Brown, R. R. Banerjee, C. M. Wright, H. R. Patel, R. S. Ahima and M. A. Lazar (2001). "The hormone resistin links obesity to diabetes." Nature**409**(6818): 307-312.

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.

Vazquez-Vela, M. E., N. Torres and A. R. Tovar (2008). "White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity." Arch Med Res**39**(8): 715-728.

Vuorinen-Markkola, H., V. A. Koivisto and H. Yki-Jarvinen (1992). "Mechanisms of hyperglycemia-induced insulin resistance in whole body and skeletal muscle of type I diabetic patients." Diabetes**41**(5): 571-580.

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.

Winder, W. W. and D. G. Hardie (1999). "AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes." Am J Physiol**277**(1 Pt 1): E1-10.

Winzell, M. S. and B. Ahren (2004). "The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes." Diabetes**53 Suppl 3**: S215-219.

Woods, A., I. Salt, J. Scott, D. G. Hardie and D. Carling (1996). "The alpha1 and alpha2 isoforms of the AMP-activated protein kinase have similar activities in rat liver but exhibit differences in substrate specificity in vitro." FEBS Lett**397**(2-3): 347-351.

Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki, S. Uchida, S. Yamashita, M. Noda, S. Kita, K. Ueki, K. Eto, Y. Akanuma, P. Froguel, F. Foufelle, P. Ferre, D. Carling, S. Kimura, R. Nagai, B. B. Kahn and T. Kadowaki (2002). "Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." Nat Med**8**(11): 1288-1295.

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.

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*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**1289**(1): 5-9.

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.

Ziegler, A.-G. and G. T. Nepom (2010). "Prediction and Pathogenesis in Type 1 Diabetes." Immunity**32**(4): 468-478.

Ziemer, C. J. and G. R. Gibson (1998). "An Overview of Probiotics, Prebiotics and Synbiotics in the Functional Food Concept: Perspectives and Future Strategies." International Dairy Journal**8**(5): 473-479.

