

東海大學食品科學系碩士班

**Master of Food Science**

**Tunghai University**

食品科技組

**Food Technology Section**

複合乳酸菌於胰島素阻抗小鼠之血糖調節活性

**Glucose Homeostatic Activity of Complex Lactic Acid Bacteria in  
Insulin Resistant Mice**

田奕葶

**Yi-Ting Tien**

指導教授：盧錫祺博士

**Advisor: Hsi-Chi Lu,, Ph.D.**

中華民國一零七年一月

**January, 2018**

## 碩士論文指導教授推薦書

食品科學系碩士班食品科技組 田奕葶 君所提之論文

複合乳酸菌於胰島素阻抗小鼠之血糖調節活性

Glucose Homeostatic Activity of Complex Lactic Acid  
Bacteria in Insulin Resistant Mice

係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

食品科學系系主任

徐謹堯

指導教授

李瑞祺

中華民國一〇七年一月八日

## 碩士論文考試委員審定書

食品科學系碩士班食品科技組 田奕葶 君所提之論文

複合乳酸菌於胰島素阻抗小鼠之血糖調節活性

Glucose Homeostatic Activity of Complex Lactic Acid  
Bacteria in Insulin Resistant Mice

經本委員會審定通過，特此證明。

論文考試委員會

委員：

唐揚祺

東海大學食品科學系 副教授

林長奇

東海大學畜產與生物科技學系 教授

蔡政志

弘光科技大學食品生物科技學系 特聘教授

呂光洲

中油煉製研究所生物科技事業中心 研究員

指導教授：

唐揚祺

中華民國一〇七年一月八日

## 致謝詞

首先誠摯的感謝指導教授 盧錫祺博士讓我進入他的實驗室學習，並在這兩年半悉心指導下使我能對分子生物這領域有深入的了解並得以完成這份論文。

論文口試期間，感謝 謝長奇、蔡政志、呂光洲博士擔任口委並仔細閱讀及詳細修正使本論文能更加完善，尤其感謝 謝長奇博士慷慨借用鼠房及儀器使研究期間實驗順利並將論文細節錯誤挑出。

研究期間特別感謝實驗室學長姐傅宥勝、姚佳伶、滕逸林在我碩一時傾囊相授他們所學的知識及實驗，奠定我後續獨立自主的能力，給予我在研究所很大的動力；感謝我的實驗夥伴劉羽庭在我入學到畢業期間和我一起水深火熱的帶實驗課、互相幫忙做實驗，在細胞室度過無數個辛苦的日子，誠摯希望你也能早日畢業，以後也能在職場一起打拼。感謝蘇鈺珊同學特地回來實驗室教導我實驗。感謝畜產系助理宜潔、欣君、芳毓、品慧在小鼠飼養及犧牲方面提供寶貴建議及協助；感謝畜產瓊瑛助教在帶領生技實驗的幫忙；感謝食科系辦助教淑瑜及怡君給予許多行政上的幫忙。感謝實驗室成員黃湘儀、黃思瀚、賴縈潔、白文慧、馮郁涵、張嘉軒與專題生張毓麟、曾宇婷、黃永鈞、洪國耀、何佳玲、郭至皓、許喻蓉、吳佩庭、吳芯蕾、曾怡嘉、陳敬文以及食科系的同學王仁宜、顏琤綾、詹佳純、施映竹、張文彥、郭芸禎、洪紹華、游佳茵在研究期間給予我論文及實驗上的協助及這些年的互相鼓勵和陪伴。

最後將此論文獻給我最愛的母親 田善美，獨自撫育我成長茁壯並接受我這幾年的任性，讓我得以順利就讀至此學位並一同分享我的成長及喜悅

田奕葶 謹致於  
東海大學食品科學研究所科技組  
中華民國一零七年一月八日

## 目錄

中文摘要.....	6
Abstract.....	7
第一章、文獻回顧.....	8
1-1 代謝症候群 (Metabolic syndrome, MetS).....	8
1-2 糖尿病 (Diabetes mellitus, DM).....	8
1-2-1 糖尿病主要類型.....	8
1-2-1.1 第一型糖尿病.....	8
1-2-1.2 第二型糖尿病.....	9
1-2-1.3 妊娠型糖尿病.....	9
1-2-1.4 其他特異型糖尿病.....	9
1-2-2 糖尿病的檢測.....	9
1-2-3 糖尿病的治療.....	10
1-2-3.1 磺醯尿素類 (sulfonylureas, SU).....	10
1-2-3.2 安息香酸衍生物 (Meglitinide).....	11
1-2-3.3 雙胍類 (Biguanides).....	11
1-2-3.4 $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制劑 (Glucosidase inhibitors).....	11
1-2-3.5 噻唑烷二酮類 (Thiazolidinedione, TZDs).....	11
1-3 脂肪肝.....	12
1-3-1 非酒精性脂肪肝 (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD).....	12
1-3-2 果糖於肝臟之代謝.....	12
1-4 體內血糖調控.....	14
1-5 胰島素傳訊.....	14
1-5-1 胰島素 (Insulin).....	16
1-5-2 胰島素受體 (Insulin receptor, IR).....	16
1-5-5 蛋白質激酶 B (Protein kinase B, PKB/Akt).....	16
1-5-6 磷酸腺苷激活蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK).....	16
1-5-7 磷酸烯醇丙酮酸羧化激酶 (Phosphoenolpyruvate carboxykinase, PEPCK).....	17
1-6 葡萄糖轉運與代謝.....	18

1-6-1 葡萄糖轉運蛋白 (Glucose transporter, GLUT).....	18
1-6-2 葡萄糖激酶 (Glucokinase, GCK).....	18
1-6-4 肝糖合成酶 (Glycogen sythase, GS).....	18
1-7 脂肪細胞產生之細胞激素.....	19
1-7-1 腫瘤壞死因子 $\alpha$ (Tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ).....	20
1-7-2 脂聯素 (Adiponectin).....	20
1-7-3 抗素 (Resistin).....	20
1-7-4 瘦素 (Leptin).....	20
1-8 益生菌.....	21
1-9 乳酸菌.....	22
1-9-1 特性與分類.....	22
1-9-2 生理功效.....	23
1-9-2.1 維持正常腸道菌相.....	23
1-9-2.2 具降低膽固醇功效.....	23
1-9-2.3 具有降低血壓的功效.....	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 試驗菌株來源.....	27
3-1-1.2 乳酸菌培養基.....	27
3-1-1.3 DNS 殘糖試驗藥品.....	27
3-1-2 細胞實驗.....	27
3-1-2.1 小鼠肝臟細胞株.....	27
3-1-2.2 小鼠脂肪細胞株.....	28
3-1-2.3 分化試劑.....	28
3-1-2.4 細胞培養其他藥品.....	28
3-1-3 動物實驗.....	29

3-1-3.1 動物模型 .....	29
3-1-3.2 飼養動物之相關用品 .....	29
3-1-4 肝醣分析 .....	29
3-1-5 蛋白質分析 .....	29
3-1-5.1 細胞裂解液 (Cell lysis buffer) .....	29
3-1-5.2 蛋白質定量試劑 .....	29
3-1-5.3 西方轉漬試劑 .....	30
3-1-6 mRNA 表現量分析 .....	30
3-1-7 主要儀器及設備 .....	30
3-2 實驗方法 .....	32
3-2-1 樣品製備 .....	32
3-2-2 抽取 Genomic DNA .....	32
3-2-3 聚合酶鏈鎖反應檢測(16s rDNA PCR) .....	32
3-2-4 DNA 定序(DNA sequencing) .....	33
3-2-5 乳酸菌計數 .....	33
3-2-6 乳酸菌培養液相關試驗 .....	33
3-2-6.1 培養液製備 .....	33
3-2-6.2 DNS (3,5-dinitrosalicylic)殘糖分析 .....	33
3-2-7 細胞培養及相關分析 .....	34
3-2-7.1 細胞培養與繼代 .....	34
3-2-7.2 細胞分化 .....	34
3-2-7.3 誘導脂肪細胞產生胰島素阻抗 .....	34
3-2-7.4 細胞增生性試驗 .....	34
3-2-8 動物實驗及相關測定 .....	35
3-2-8.1 實驗動物飼養與分組 .....	35
3-2-8.2 胰島素阻抗模型建立 .....	35
3-2-8.3 葡萄糖口服耐受測驗 (OGTT) .....	35
3-2-8.4 血清分離與分析項目 .....	35
3-2-8.5 肝臟病理分析項目 .....	36
3-2-8.6 肝臟蛋白分析 .....	37
3-2-8.7 肝臟與脂肪基因表現分析 .....	37
3-3 統計分析 .....	38

第四章、結果與討論.....	39
4-1 乳酸菌試驗.....	39
4-1-1 乳酸菌 DNA 聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 檢測.....	39
4-1-2 定序結果.....	39
4-1-3 乳酸菌最適生長天數評估.....	39
4-1-4 培養液相關試驗.....	39
4-1-4.1 DNS 殘糖分析試驗.....	39
4-2 複合乳酸菌發酵液對細胞之影響.....	40
4-2-1 小鼠肝臟細胞 FL83B.....	40
4-2-1.1 細胞存活率試驗.....	40
4-2-2 小鼠脂肪細胞 3T3-L1.....	40
4-2-2.1 細胞存活率試驗.....	40
4-3 複合乳酸菌對高糖高脂飲食誘導之糖尿病小鼠之影響.....	41
4-3-1 小鼠之體重、攝食與飲水量.....	41
4-3-2 小鼠之空腹血糖檢測及口服葡萄糖耐受性試驗.....	41
4-3-3 小鼠之肝臟、腎臟、脾臟、脂肪與腓腸肌重量.....	42
4-3-4 小鼠之血清生化數值.....	42
4-3-4.1 血清中游離脂肪酸、膽固醇與三酸甘油脂之含量.....	42
4-3-4.2 血清中高密度脂蛋白及低密度脂蛋白之含量.....	42
4-3-4.3 血清中血糖穩定與胰島素敏感性指標.....	42
4-3-複合乳酸菌對肝臟中肝糖含量之影響.....	43
4-3-6 複合乳酸菌對肝臟病理之影響.....	43
4-3-6.1 肝臟外觀病理型態之影響.....	43
4-3-6.2 肝臟蘇木紫與伊紅 (H&E stain) 染色.....	43
4-3-6.3 肝臟油紅 (Oil Red O stain) 染色.....	44
4-3-7 乳酸菌對胰島素傳訊之影響.....	44
4-3-7.1 腫瘤壞死因子 (TNF- $\alpha$ ) 基因相對表現量.....	44
4-3-7.2 脂聯素 (Adiponectin) 基因相對表現量.....	44
4-3-7.3 瘦素 (Leptin) 基因相對表現量.....	44
4-3-7.4 抗素 (Resistin) 基因相對表現量.....	45
4-3-7.5 乙醯輔酶 A 羧化酶 (ACC) 蛋白質相對表現量.....	45



4-3-7.6 肝醣合成酶 (GS)蛋白質相對表現量 .....	45
4-3-7.7 葡萄糖激酶 (GCK)蛋白質相對表現量 .....	45
4-3-7.8 磷酸烯醇丙酮酸羧化激酶 (PEPCK)蛋白質相對表現量 ....	46
4-3-7.9 磷酸腺苷激活蛋白激酶 (AMPK)蛋白質相對表現量 .....	46
4-3-7.10 蛋白質激酶 B (AKT)蛋白質相對表現量 .....	46
4-3-7.11 葡萄糖轉運蛋白 2 (GLUT2)蛋白質相對表現量 .....	46
4-4 討論 .....	84
第五章、附錄 .....	87
第六章、參考文獻 .....	90



## 表目錄

表一、乳酸菌定序結果.....	48
表二、乳酸菌菌數量計數.....	49
表三、乳酸菌上清液之殘糖量試驗.....	50
表四、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素抵抗小鼠體重變化量、攝食量、攝水量之影響.....	59
表五、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素抵抗小鼠中肝臟、脾臟、腎臟及腓腸肌重量之影響.....	60
表六、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素抵抗小鼠中腹脂、附睪脂及腎週脂重量之影響.....	61
表七、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素抵抗小鼠血清中游離脂肪酸、總膽固醇、總三酸甘油脂濃度之影響.....	62
表八、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素抵抗小鼠血清中高密度及低密度脂蛋白濃度之影響.....	63



## 圖目錄

圖一、抽取乳酸菌之基因體 DNA (GENOMIC DNA; GDNA)經核酸擴增後產物。.....	47
圖二、小鼠肝臟細胞 FL83B 與 F2-2、F7-3、F7-4 混合之發酵培養液共置下之增生活性.....	51
圖三、小鼠脂肪細胞 3T3-L1 與 F2-2、F7-3、F7-4 混合之發酵培養液共置下之增生活性.....	52
圖四、高脂高果糖誘導期間胰島素抵抗小鼠之體重變化.....	53
圖五、乳酸菌對高脂高果糖胰島素抵抗小鼠之體重變化.....	54
圖六、未以高脂高果糖誘導胰島素抵抗小鼠口服葡萄糖耐受性試驗及曲線下面積.....	55
圖七、高脂高果糖誘導九週胰島素抵抗小鼠口服葡萄糖耐受性試驗及曲線下面積.....	56
圖八、乳酸菌對高脂高果糖誘導胰島素抵抗小鼠口服葡萄糖耐受性試驗及曲線下面積之影響.....	57
圖九、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素抵抗小鼠血清血糖值之影響.....	64
圖十、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素抵抗小鼠血清果糖胺濃度之影響.....	65
圖十一、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素抵抗小鼠糖化血色素 (HbA1c)濃度之影響.....	66
圖十二、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素抵抗小鼠血清胰島素濃度之影響.....	67
圖十三、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素抵抗小鼠胰島素抵抗間接性指標 (HOMA-IR)之影響.....	68
圖十四、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素抵抗小鼠肝醣含量之影響.....	69
圖十五、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素抵抗小鼠肝臟外觀病理型態之影響.....	70
圖十六、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素抵抗小鼠肝臟蘇木紫與伊紅染色(100x)之影響.....	71
圖十七、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素抵抗小鼠肝臟油紅染色 (200x)之影響.....	72
圖十八、小鼠腹脂中腫瘤壞死因子 (TNF- $\alpha$ ) mRNA 之基因相對表現量.....	73
圖十九、小鼠腹脂中脂聯素 (ADIPONECTIN) mRNA 之基因相對表現量.....	74
圖二十、小鼠腹脂中瘦素 (LEPTIN) mRNA 之基因相對表現量.....	75
圖二十一、小鼠腹脂中抗素 (RESISTIN) mRNA 之基因相對表現量.....	76
圖二十二、肝臟中乙酰輔酶 A 羧化酶 (ACC)蛋白質相對表現量.....	77
圖二十三、肝臟中肝醣合成酶 (GS)蛋白質相對表現量.....	78
圖二十四、肝臟中葡萄糖激酶 (GCK)蛋白質相對表現量.....	79
圖二十五、肝臟中磷酸烯醇丙酮酸羧化激酶 (PEPCK)蛋白質相對表現量.....	80
圖二十六、肝臟中活化磷酸腺苷激活蛋白激酶 (AMPK)蛋白質相對表現量.....	81
圖二十七、肝臟中活化蛋白質激酶 B (AKT)蛋白質相對表現量.....	82
圖二十八、肝臟中葡萄糖轉運蛋白 2 (GLUT2)蛋白質相對表現量.....	83

## 附表目錄

附表一、糖尿病之診斷標準 (AMERICA DIABETES ASSOCIATION, 2017).....	10
附表二、益生菌菌種應具備之條件 (SAARELA ET AL., 2002) .....	21



## 附圖目錄

附圖 一、果糖與葡萄糖於肝臟之代謝路徑 (TAPPY & LÊ, 2010).....	13
附圖 二、果糖誘導胰島素抵抗潛在機制 (TAPPY & LÊ, 2010).....	13
附圖 三、血糖調控機制 ( <i>ENDOCRINE DISORDERS AND ENDOCRINE SURGERY, 2016</i> ) .....	14
附圖 四、胰島素傳訊路徑 ( <i>BIDDINGER &amp; KAHN, 2006</i> ) .....	15
附圖 五、肝臟糖解與糖質新生路徑 ( <i>SHOJI ET AL., 2012</i> ).....	17
附圖 六、肝糖合成路徑 ( <i>MOSTAFA I. WALY, 2013</i> ).....	19
附圖 七、人體腸胃道菌相分布圖 ( <i>HOLZAPFEL ET AL., 1998</i> ).....	23



## 附錄目錄

附錄 一、同步定量聚合酶連鎖反應中用於擴增腹脂基因之引子序列 .....	87
附錄 二、西方轉漬使用之一級、二級抗體 .....	88
附錄 三、本研究細胞傳訊路徑圖 .....	89



## 中文摘要

由於高糖高油脂飲食的盛行及久坐不動的習慣養成，使現代人多肥胖且高血糖等代謝症候群的流行率逐漸上升。市面上各種治療糖尿病的藥物都可能產生增重、腹脹、腹瀉等副作用。乳酸菌被認為是非常安全的菌種為最具代表性的腸內益生菌，許多相關研究指出乳酸菌具有延緩胰島素阻抗、發炎、腹脹、調降高血糖症、減少體脂等功效，但缺乏作用機制之探討，因此本研究主要藉用動物模式探討乳酸菌調控血糖代謝與改善胰島素阻抗之分子機制並評估其開發為產品之潛能。C57BL/6J 小鼠分四種處理方式：(1)正常組，攝取一般飼料與正常飲用水 (2)高脂誘導組，攝取高脂飼料及 30% 果糖水 (3)藥物組，同高脂誘導組之飲食並且管餵 40 mg/kg 糖尿病藥物 Acarbose (4)乳酸菌組，同高脂誘導組之飲食並且管餵不同劑量乳酸菌 ( $10^8$ - $10^{10}$  CFU/mouse)。實驗開始至第二型糖尿病模式建立後，始管餵給予乳酸菌。定期秤量體重並以尾部採血量測空腹血糖及進行葡萄糖耐受性試驗，小鼠犧牲後取其血液及相關臟器秤重並分析血清生化數值、組織化學染色、RT-PCR 及西方轉漬進行肝臟中基因表現之分析。結果顯示小鼠經複合乳酸菌餵食後，小鼠之腹脂、副睪脂及腎周脂減少，血清中游離脂肪酸 (FFA)、總膽固醇 (CHO)、總三酸甘油脂 (TG)、低密度脂蛋白 (LDL)、葡萄糖 (Glucose)、果糖胺 (Fructosamine)、糖化血色素 (HbA1c)、胰島素 (Insulin) 和胰島素阻抗指標 (HOMA-IR) 值有顯著降低，亦提升血清中高密度脂蛋白 (HDL) 的含量。在小鼠腹脂之脂泌素基因層面上，改善胰島素阻抗之瘦素 (Leptin) 和脂聯素 (Adiponectin) mRNA 表現量上升而促進胰島素阻抗之抗素 (Resistin) 和引起發炎反應之腫瘤壞死因子 (TNF- $\alpha$ ) 被抑制。在肝臟胰島素傳訊方面，餵食樣品後可增加傳訊分子 GS、GCK、AMPK、AKT 和 GLUT2 表現量，並抑制 PEPCK 及 ACC 的表現。此外，於肝臟組織病理切片的伊紅-蘇木紫染色 (HE stain) 和油紅染色 (Oil-red stain) 中可發現與高脂誘導組相比給予乳酸菌後能減少油滴堆積和細胞組織排列混亂的情形。綜合上述結果可知，經高脂誘導之第二型糖尿病小鼠餵食乳酸菌後可減緩體重的增加並藉由增加葡萄糖帶入量並減少糖質新生及脂肪的生成達到改善胰島素阻抗。由此可知此複方乳酸菌具有開發為調降血糖保健食品的潛能。

關鍵字：乳酸菌、胰島素阻抗、第二型糖尿病

## Abstract

With the developing habit of high-carbohydrate, high-fat diet and sedentary lifestyle, modern human often appears overweighted resulting increased prevalence of metabolic syndrome such as hyperglycemia. Antidiabetic medicines on market could cause side effects as weight gain, bloating and diarrhea. Lactic acid bacteria (LAB) is regarded as GRAS microorganism and representative probiotics in intestinal, research reports LABs have effects defer insulin resistance, inflammatory, bloating, modulate hyperglycemia and reduce body fat, but of all among there is lack of discussion of its mechanism. Therefore this study aim to investigate with animal model of LAB's effect on blood glucose metabolism regulation and molecular mechanism in improving insulin resistance and evaluate the potential to develop functional food.

C57BL/6J mice were divided into four treatment (1)Normal, consumed regular feed and water (2)High-fat diet, fed with 30% fructose water and 60% high fat chows (3)Drugs, oral gavage antidiabetic drug Acarbose (40 mg/kg) along with high- fat diet (4)LAB, oral gavage different dose of LAB ( $10^8$ - $10^{10}$  CFU/mouse) along with high-fat diet. Acarbose and LAB were gavage after type two diabetic model was set up. Body weight were measured weekly and blood sample collected from tail vein of the mice for fasting blood glucose analyze and OGTT. After mice sacrificed blood sample and organism were collected and weighted simultaneously. Serum biochemistry value, histochemical stain, RT-PCR and western blot were analyzed for molecular mechanism. Results shows after oral gavage LAB to mice, abdominal, epididymal and perirenal fat decreased, on the other hand concentration of FFA, CHO, TG, LDL, glucose, fructosamine, HbA1c, insulin and value of HOMA-IR in serum had significantly reduced whereas increased serum level of HDL. With gavage of LAB to mice, gene expression of adipokines in abdominal fat indicates elevated expression of leptin and adiponectin which ameliorate insulin resistance and suppression of resistin and TNF- $\alpha$ . Results shows improved expression of ACC, GS, GCK, AMPK, AKT and GLUT2 and suppression of ACC and PEPCK in liver insulin signaling. Furthermore histopathology result of HE stain and oil-red stain demonstrate decreased lipid droplet and arrangement of cells returned orderly. In summary, the present study shows that after induction to type 2 diabetes, mice fed with LAB retards weigh gain and improve insulin resistance by increase glucose uptake, restrain gluconeogenesis and lipogenesis. Thence has the potential to exploit as antihyperglycemia function food.



# 第一章、文獻回顧

## 1-1 代謝症候群 (Metabolic syndrome, MetS)

Metabolic syndrome 是一種造成心血管代謝異常的症狀，危險因子包含腹部肥胖、葡萄糖代謝異常、血脂異常及高血壓 (Kahn et al. 2005)。胰島素阻抗在代謝症候群扮演關鍵因子並為造成功能異常的主要原因 (DeFronzo and Ferrannini 1991; Ginsberg 2000)。2005 年國際糖尿病聯合會 (International Diabetes Federation) 公告，具有中廣型肥胖 (腰圍過大)，再加上以下標準其中兩種以上者，即被定義為有代謝症候群：1. 三酸甘油脂 (TG)  $\geq 150$  mg/dl；2. 男性高密度脂蛋白膽固醇 (HDL-C)  $< 40$  mg/dl、女性  $< 50$  mg/dl；3. 收縮血壓 (SBP)  $\geq 130$  mmHg/舒張血壓 (DBP)  $\geq 85$  mmHg；4. 空腹血糖 (FG)  $\geq 100$  mg/dl。

## 1-2 糖尿病 (Diabetes mellitus, DM)

糖尿病是一種慢性代謝疾病，因先天或後天體內的胰島素分泌不足或作用不良引起醣類、蛋白質及脂肪等營養素的代謝異常，使得血糖濃度上升造成體內輕微發炎形成糖尿病。而長期的高血糖與代謝不正常會影響身體大小血管與神經功能同時造成各式各樣的併發症，如高血壓、高血脂及心血管疾病等。吃多、喝多和尿多是糖尿病最常見的症狀，俗稱「三多」，其他症狀還有疲倦、視力模糊、陰道尿道感染、手腳麻木、四肢無力、體重減輕、傷口不易癒合等。糖尿病現分為四型，第一型糖尿病、第二型糖尿病、妊娠型及其他特異型糖尿病。

### 1-2-1 糖尿病主要類型

#### 1-2-1.1 第一型糖尿病

第一型糖尿病又稱胰島素依賴型糖尿病 (Insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM)，因遺傳、環境或自體免疫三者相互作用使體內胰島素合成細胞 ( $\beta$  細胞) 受損，無法分泌足夠胰島素，必須藉由人工注射胰島素的方式代謝體內體內的葡萄糖。儘管此類糖尿病常見於四至七歲兒及十至十四歲青年患者，但是也可能發生在任何年齡，在台灣，此類糖尿病的罹患率約占總糖尿病病例的 1-3%。

### 1-2-1.2 第二型糖尿病

第二型糖尿病為非胰島素依賴型糖尿病 (Non-Insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM)，其特性為病患之胰島素分泌功能及胰島素敏感性因體內高血糖而下降 (Stumvoll, Goldstein, and van Haeften 2005)。過多高能量飲食的攝取及久坐不動的生活作息是現在形成第二型糖尿病的主要因素 (Stefanov et al. 2012)。為降低血糖，胰臟蘭氏小島之 $\beta$ 細胞會分泌胰島素，促進肝臟、脂肪或骨骼肌等週邊組織攝入葡萄糖轉換成肝糖及脂肪儲存；當週邊組織對胰島素敏感性與葡萄糖的利用率下降，會促使 $\beta$ 細胞過度地分泌胰島素來平衡血糖，最終會因 $\beta$ 細胞無法負荷使胰島素分泌量下降，導致高血糖 (Cheng and Fantus 2005)。此糖尿病類型約占整體病患 90~95%，患者可藉由控制飲食、運動及口服降血糖藥物維持體內血糖平衡 (Prentki and Nolan 2006)。

### 1-2-1.3 妊娠型糖尿病

婦女懷孕期間 (24-28 週)其胰島素敏感性會因賀爾蒙分泌受影響且在懷孕晚期大幅降低 (Butte 2000; Di Cianni et al. 2003)。文獻指出胎盤分泌的激素是造成孕婦胰島素阻抗的主要原因，並會在產後快速復原 (Desoye, Hauguel-de Mouzon, and Shafirir 2003)。但若控制不當使大量葡萄糖透過胎盤將營養運輸給胎兒，會使胎兒之胰島細胞 ( $\beta$  cell)增生，胰島素分泌增加，過多的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)。

### 1-2-1.4 其他特異型糖尿病

其他特異型發病可能原因為 (1)胰島 $\beta$ 細胞基因的缺陷 (2)胰島素基因的缺陷 (3)胰臟外分泌的疾病：胰臟炎、受傷/胰臟切除、腫瘤、囊性纖維化 (4)內分泌疾病：庫欣氏症候群 (Cushing's syndrome)，肢端肥大症 (Acromegaly)，嗜鉻細胞瘤 (Pheochromocytoma)，甲狀腺亢進 (Hyperthyroidism)等 (5)藥物或化學試劑所誘發 (6)病毒感染 (7)罕見的免疫性疾病 (8)其他遺傳性症候群新觀的糖尿病

## 1-2-2 糖尿病的檢測

依據 2017 年美國糖尿病學會 (America Diabetes Association, ADA)所公布之方法，可藉由測量糖化血色素、空腹血糖 (Fasting Plasma Glucose, FPG)、口服葡萄糖耐受性試驗 (Oral Glucose Tolerance Test, OGTT)、及隨機血糖 (Random Plasma Glucose)四種不同方式來評估是否罹患糖尿病且其嚴重程度。如附表一

(America Diabetes Association, 2017)

附表 一、糖尿病之診斷標準 (America Diabetes Association, 2017)

	Normal	Prediabetes	Diabetes
<b>FPG</b>	<100 mg/dl (5.6 mmol/L)	100-125 mg/dl (5.6-6.9 mmol/L)	$\geq$ 126mg/dl (7.0 mmol/L)
<b>OGTT</b>	<140 mg/dl (7.8 mmol/L)	140-199 mg/dl (7.8-11.0 mmol/L)	$\geq$ 200 mg/dl (11.1 mmol/L)
<b>A1C</b>	<5-7% (39 mmol/mol)	5-7-6.4% (39-47 mmol/mol)	$\geq$ 6.5% (48 mmol/mol)
<b>RPG</b>			$\geq$ 200 mg/dl (11.1 mmol/L)

### 1-2-3 糖尿病的治療

糖尿病患者中，大約有九成的病人是罹患第 2 型糖尿病，第 2 型糖尿病人可以藉由改變生活型態及擬定飲食計畫包括：飲食遵守營養原則、體重控制、體能活動幫助下降血糖，但是大約只有一成的糖尿病患者可以不依賴藥物達到血糖控制目標。治療第 2 型糖尿病人的藥物，除了胰島素，還有五大類口服抗糖尿病藥物可以選擇。口服抗糖尿病藥物本身不是胰島素，而是藉著刺激  $\beta$  細胞分泌胰島素或延緩腸胃道對糖份的吸收，亦或增加身體對胰島素的敏感性等各種不同的機轉控制血糖濃度。

#### 1-2-3.1 磺醯尿素類 (sulfonylureas, SU)

磺醯尿素的藥物主要作用在刺激胰臟  $\beta$  細胞分泌更多的胰島素，常見的磺醯尿素的藥物包括：Glurenorm (糖瑞平)、Glidiab (泌樂得)、Diamicron (岱密克龍) Diabinese (特泌胰)、Euglucon (優爾康)、Amaryl (瑪爾胰)等。大部分藥物建議用餐前 30 分鐘服用，Amaryl 則可用餐前服用。磺醯尿素的最常見副作用為低血糖，尤其需注意老年人、肝腎功能不佳、酗酒、食慾不好及併用其他藥物時。磺醯尿素大部分在肝臟代謝，由腎臟及／或膽道排出，所以肝、腎功能嚴重不良不建議使用。腎臟功能受損時，藥物作用增強、時效延長，需多測血糖並調整藥量，減少低血糖發生的機會。

### 1-2-3.2 安息香酸衍生物 (Meglitinide)

Meglitinide 類的化學結構與磺醯尿素類藥物不同，但是效果相似，能夠快速、短效刺激胰島素分泌。如：NovoNorm (諾和隆)、Starlix (使糖立釋)。因為作用快速但是藥效短暫，因此都在用餐前立即服用，有助於控制餐後的高血糖。可能的副作用：Meglitinide 類的藥物也有低血糖的可能，但是因為只有在血糖濃度高的時候才會刺激胰島素分泌，因此低血糖的機率較低。

### 1-2-3.3 雙胍類 (Biguanides)

目前使用的藥物為 Metformin，主要作用為減少減少葡萄糖從腸道吸收與肝臟糖質新生作用，並增加細胞組織對胰島素的靈敏性，但不會增加胰島素之分泌。如：Loditon (伏糖錠)、Glucophage (每福敏)、Glibudon (泌樂寬)。主要的副作用包括腹脹、腹瀉、口中有金屬味，單獨用藥很少引起低血糖，通常與食物一起或餐後服用，以便減少消化道副作用。這些症狀往往只是暫時的，而且如果從小劑量開始隨餐飲一起服用，發生的機會就會少些。有充血性心臟衰竭、腎臟疾病使用雙胍類的藥物有可能使身體製造堆積乳酸，造成乳酸中毒，因此這類病人不宜使用雙胍類藥物。

### 1-2-3.4 $\alpha$ -葡萄糖甘酶抑制劑 (Glucosidase inhibitors)

代表藥物為 Acarbose，為最早上市藥物之一，其結構與葡萄糖相似，被歸類為競爭型抑制。主要作用為阻止雙醣類分解成腸道可吸收的單醣類，減緩醣類在小腸吸收。因此藥物需隨餐第一口食物服用。因為這類藥物的作用都在腸道，所以不良的副作用來自沒有消化的醣類造成的腹部脹氣、腹瀉等。 $\alpha$ -葡萄糖甘酶抑制劑單獨使用不會造成低血糖，但是合併使用刺激胰島素分泌的藥物如磺醯尿素類，而產生低血糖時，應該服用葡萄糖，而不是一般的蔗糖，才可以升高血糖，可以隨身準備葡萄糖錠、葡萄糖膠、葡萄糖粉或牛奶，不宜選擇一般的糖果或果汁等食物，因為  $\alpha$ -葡萄糖甘酶抑制劑會抑制這類糖分的分解吸收。

### 1-2-3.5 噻唑烷二酮類 (Thiazolidinedione, TZDs)

為胰島素增敏劑，主要作用是降低周邊組織與肝臟細胞對胰島素的阻抗性，改善胰島素敏感性。如：Avandia (梵帝雅)、Actos (愛妥糖)。可能的副作用有體重增加、水腫、腹瀉、頭痛等。曾出現少數肝中毒的症例報告，剛開始使用需追蹤肝功能，嚴重心衰竭的病人不建議使用。

## 1-3 脂肪肝

脂肪肝是由代謝，病毒，酒精和其他病因引起的常見病症，在病理學上叫做「肝細胞的脂肪變性」。正常的肝臟約有3~5%重量的脂肪，當脂肪超過這比例，表示有過多脂肪蓄積在肝臟內，就形成脂肪肝。脂肪肝可因過量喝酒導致的，稱為「酒精性脂肪肝疾病」，但越來越多的脂肪肝並不是因為過量喝酒引起的，所以被稱為「非酒精性脂肪肝疾病」(Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)。

### 1-3-1 非酒精性脂肪肝 (Non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)

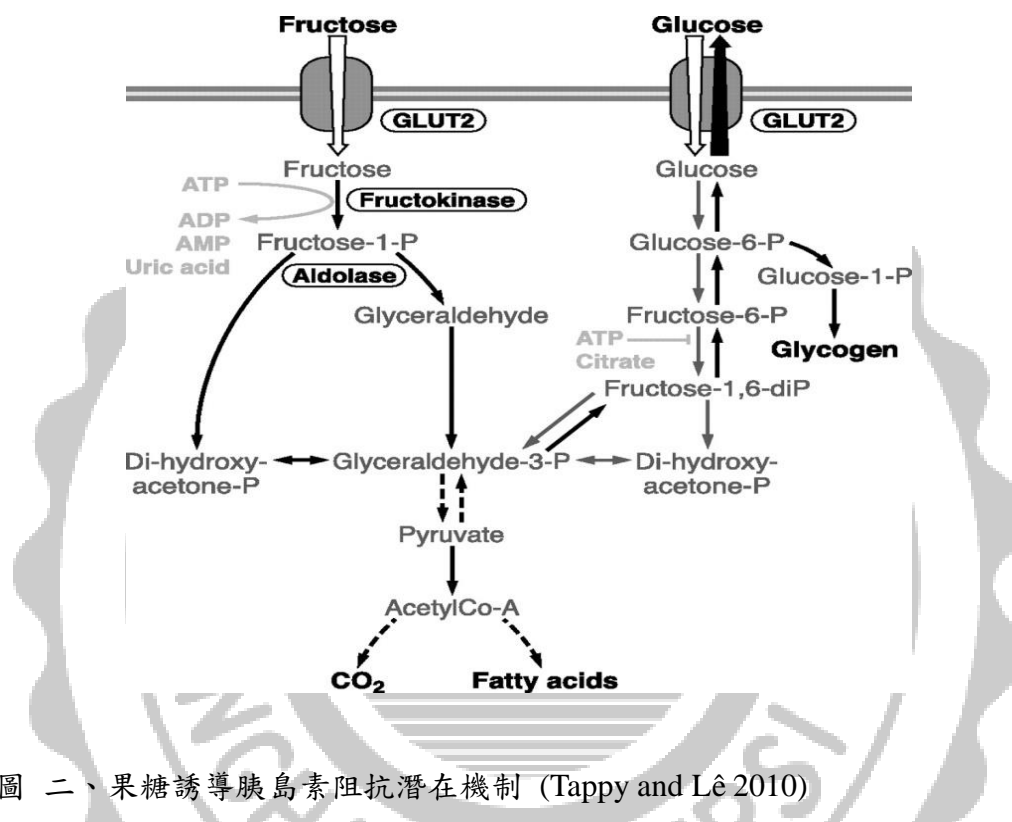
非酒精性脂肪肝疾病相當常見，而發病率在世界各地正不斷上升。非酒精性脂肪肝疾病可因多種會損壞肝臟的疾病引起，包括病毒性肝炎、自身免疫性肝炎、血色病、甲狀腺功能低下症等。不過 NAFLD 發病率的急劇上升主要是與二型糖尿病及肥胖症的增加有直接的關係 (Ballestri et al. 2016; Katsiki, Mikhailidis, and Mantzoros 2016)。第二型糖尿病及肥胖症在近幾十年在多個國家或地區民眾中的增加主要是城市化的生活引起飲食及運動習慣的改變。根據國際糖尿病聯盟的資料，糖尿病和糖尿前期的患者同時患有非酒精性脂肪肝疾病的比率都比其他人高，統計數字顯示百分之七十肥胖的二型糖尿病患者也同時患有脂肪肝 (International Diabetes Federation, 2016)。醫學界相信二型糖尿病及非酒精性脂肪肝疾病擁有共同的病因：身體的組織對胰島素的作用產生抗性、而胰臟的細胞不能有效分泌足夠的胰島素抗衡，因此導致身體內葡萄糖的新陳代謝出現障礙，這個異常的狀況是因基因及環境因素互相影響，最重要的環境因素是熱量的過量攝取及運動量的不足，兩者都會導致肥胖和對胰島素產生抗性。

### 1-3-2 果糖於肝臟之代謝

果糖是與脂質生成有高度關聯的糖類，對脂肪組織的代謝有深刻影響並與造成代謝症候群的因子相關 (Prince et al. 2017)。高度攝取來自蔗糖及高果糖玉米糖漿的果糖被認為是發展代謝症候群的促成因素 (Bray 2013)。葡萄糖是生物體內所有細胞的主要能量來源，在糖解過程中，進入細胞的葡萄糖會藉由葡萄糖激酶 (glucokinase) 磷酸化成 6-磷酸葡萄糖，再藉由 6-磷酸葡萄糖異構酶轉換為 6-磷酸果糖接著由磷酸果糖激酶-1 (PFK-1) 磷酸化成果糖-1,6-雙磷酸，而這階段會被三磷酸腺苷 (ATP) 及檸檬酸 (citrate) 負向調控及 AMP 和 ADP 正向調節。因此，葡萄糖分子的代謝會受到細胞內能量狀態的影響，有著嚴密的調控。相較之下，果糖分子經由果糖激酶 (fructokinase) 在肝臟中代謝，在此步驟中，果糖激酶並不受三磷酸腺苷調控，缺少類似葡萄糖分子代謝的負回饋機制。因此，果糖的代謝過程並無嚴密的調控機制，如附圖一 (Tappy and Lê 2010)，這也是為何攝取果

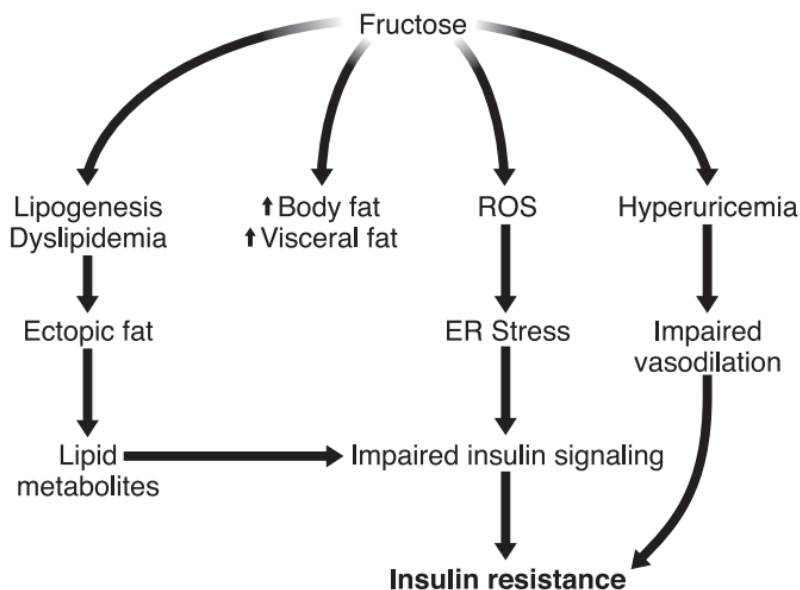
糖會造成不同於葡萄糖的代謝異常之關鍵 (Bruynseels et al. 1999; Cortez-Pinto et al. 1999)。同時果糖激酶本身活性高,使得果糖分子得以快速地代謝成下游產物,造成大量乳酸推積,也增加乙醯輔酶 A (Acetyl-CoA) 生成,加快三酸甘油酯生成並儲存於肝臟中,形成脂肪肝,如附圖二 (Tappy and Lê 2010)。綜合上述可知,果糖可用於動物試驗中,以長時間攝取造成脂肪肝,誘導胰島素阻抗生成。

附圖 一、果糖與葡萄糖於肝臟之代謝路徑 (Tappy and Lê 2010)



附圖 二、果糖誘導胰島素阻抗潛在機制 (Tappy and Lê 2010)

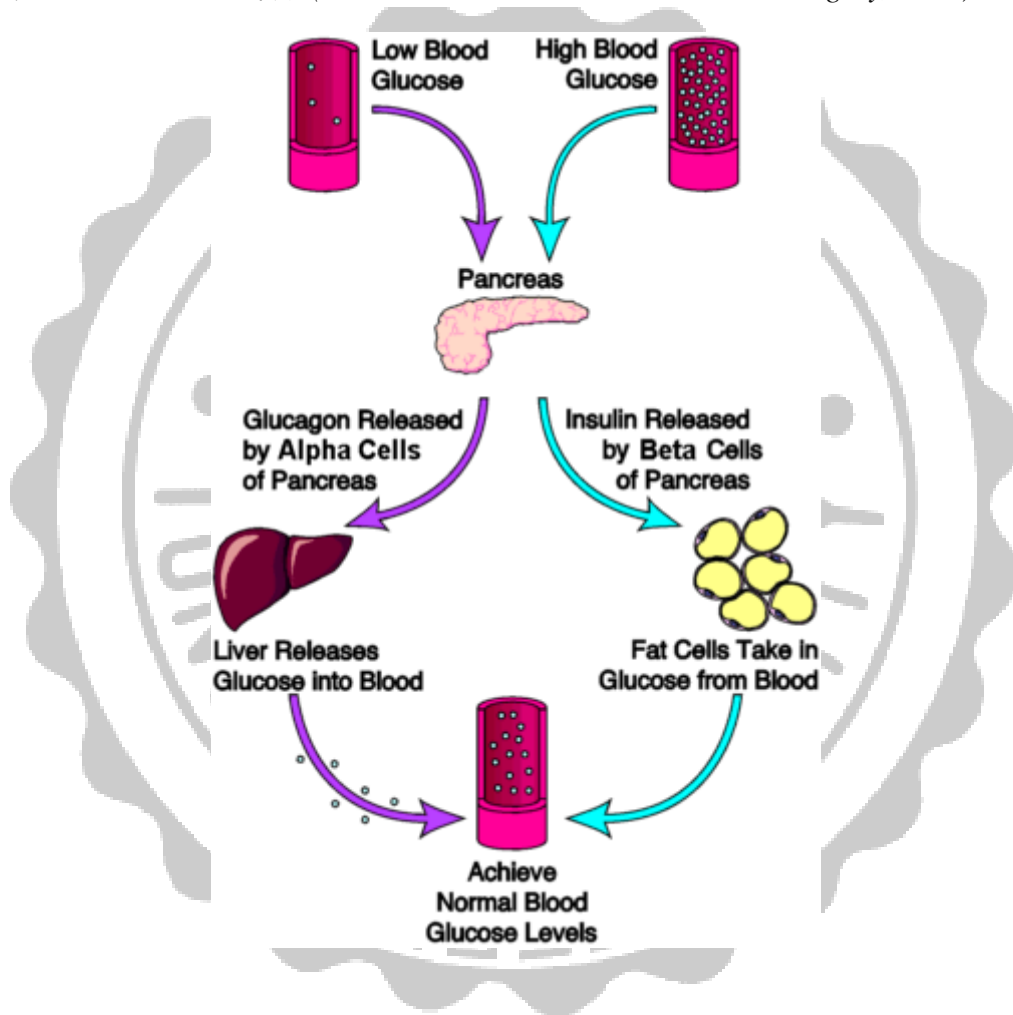
Potential mechanisms for fructose-induced insulin resistance



## 1-4 體內血糖調控

人體體內血糖在一般下皆會維持在 5~7 mM 之間，而血糖的調控除了胰臟分泌胰島素及升糖素之外，還需藉由胰島素調控周圍組織參與，如肝臟、肌肉、脂肪 (Zierath and Kawano 2003)，如附圖三 (Endocrine disorders and endocrine Surgery, 2016)。

附圖 三、血糖調控機制 (Endocrine disorders and endocrine Surgery, 2016)

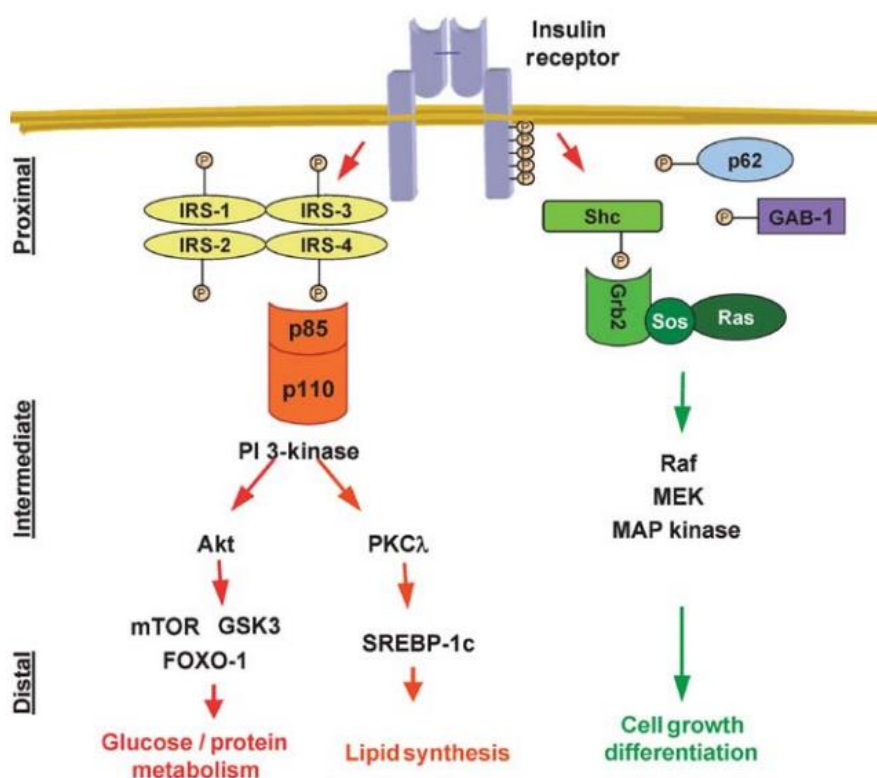


## 1-5 胰島素傳訊

胰島素傳訊分上游 (upstream)，與下游 (downstream)。胰島素信號的上游需要胰島素接受器 (insulin receptor)。包括兩個  $\alpha$  次單元與兩個  $\beta$  次單元， $\alpha$  次單元接受器在細胞外胰島素先與之結合，透過細胞膜後，再活化細胞內的  $\beta$  次單元，其含有 tyrosine kinase 成分，結合後的複體再進行一連串的分分子反應，即在 tyrosine 分子上面，產生磷酸化反應 (phosphorylation)。若在 COOH 端上的

tyrosine 產生磷酸化，則促進胰島素對細胞分裂的作用；在 kinase 內磷酸化，則有催化作用。Insulin receptor 基因在 tyrosine 分子上面產生磷酸化，才能表現其下游的認證角色；如果不在 tyrosine 分子上產生磷酸化，而在 serine/threonine 上產生磷酸化，長久之後，因 serine/threonine 過度磷酸化，胰島素濃度即便很高，也不會在 tyrosine 產生磷酸化，就是胰島素阻抗的結果。胰島素與胰島素接受器是胰島素信號傳導的上游，下游則與胰島素傳導器 (insulin transporter) 有關，與胰島素阻抗有關的胰島素傳導器是葡萄糖轉運蛋白 4 (glucose transporter 4, GLUT4)，缺乏 GLUT4，則葡萄糖的吸收不良，會產生胰島素阻抗 (Pessin and Saltiel 2000) 下游的認證功能之一是 PI-3-kinase (phosphatidylinositol-3-kinase) 的活化，胰島素刺激下，胰島素接受器使 PI-3-kinase 活化，GLUT4 由細胞內移至細胞膜，再帶著葡萄糖由細胞內排到細胞外。胰島素阻抗，缺少 PI-3-kinase 活化，葡萄糖耐受性便下降。PI-3-kinase 作用的下游之一是 protein kinase B (PKB，也稱 AKT)，使胰島素接受器在 serine/threonine 上面產生磷酸化，帶動後續一連串的生長與代謝機制，如附圖四 (Biddinger and Kahn 2006)。

附圖 四、胰島素傳訊路徑 (Biddinger and Kahn 2006)





### 1-5-1 胰島素 (Insulin)

胰島素是由胰臟蘭氏小島之  $\beta$  細胞所分泌為 A 和 B 鏈胜肽藉由雙硫酸鍵結形成，而葡萄糖的刺激為影響胰島素基因表現、轉錄穩定性和轉譯率的主要因素 (Baumgard, Hausman, and Fernandez 2016)，當血糖濃度上升時胰島素會促進葡萄糖攝入將葡萄糖以肝醣儲存於肝臟與肌肉或以脂質儲存於脂肪組織同時抑制其降解 (Klover and Mooney 2004)。

### 1-5-2 胰島素受體 (Insulin receptor, IR)

胰島素受體 (insulin receptor, IR) 屬於酪蛋白激酶家族 (tyrosine kinase) 的成員是一種穿膜的雙聚合體，每個單體經 IR 基因轉錄後選擇性剪接後形成兩種異構體：暴露於細胞膜外與胰島素結合的  $\alpha$  次單元和穿透於細胞膜外、細胞膜間及細胞膜內的  $\beta$  次單元 (Ullrich et al. 1985) 含有酪蛋白激酶結合區與調控區，活化之 IR- $\beta$  在自體磷酸化後會活化胞內之受質，如胰島素受體基質 (insulin receptor substrate, IRS) 家族 (Pessin and Saltiel 2000; White 1998)。

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

當胰島素與 IR 結合進行一系列傳訊時，其中與胰島素代謝相關的路徑為 PI3K/AKT 路徑。受活化之 IRS 會產生 binding site 結合並激活 PI3K，PI3K 下游信號分子 AKT 可被 PDK1 及 PDK2 磷酸化而激活為 PI3K 路徑之關鍵分子可產生多種生物學效應，如肝醣合成、蛋白合成、葡萄糖轉運等，並促進  $\beta$  細胞增殖、生長調節、增強  $\beta$  細胞抗凋亡功能及改善  $\beta$  細胞生存。Protein kinase B (PKB) 又稱 AKT，依 PH domain 結構的差異區分為三種異構型：AKT1、AKT2 及 AKT3，各有不同的分布和功能。經過基因剔除實驗證實 AKT2 的基因剔除造成葡萄糖耐受性缺失與高胰島素血症，因此 AKT2 為三種異構型中主要調控胰島素刺激的葡萄糖轉運作用 (Cho et al. 2001)。

### 1-5-6 磷酸腺苷激活蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK)

AMPK 含有三個主要部分： $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  三個次單元，其中  $\alpha$  和  $\beta$  有兩個異構體 ( $\alpha 1, \alpha 2, \beta 1$  和  $\beta 2$ ) 而  $\gamma$  有三個 ( $\gamma 1-\gamma 3$ )； $\alpha 2$  主要出現在心肌和骨骼肌， $\alpha 1$  則主要在胰島  $\beta$  細胞中 AMPK 中發現，然而在肝細胞的 AMPK 兩者出現的頻率是差不多的。AMPK 對葡萄糖攝入、脂肪酸氧化、脂質與三酸甘油酯合成、脂肪細胞進行脂肪分解、糖解反應等能量恆定具調解作用，AMPK 會因細胞內 AMP/ATP 比

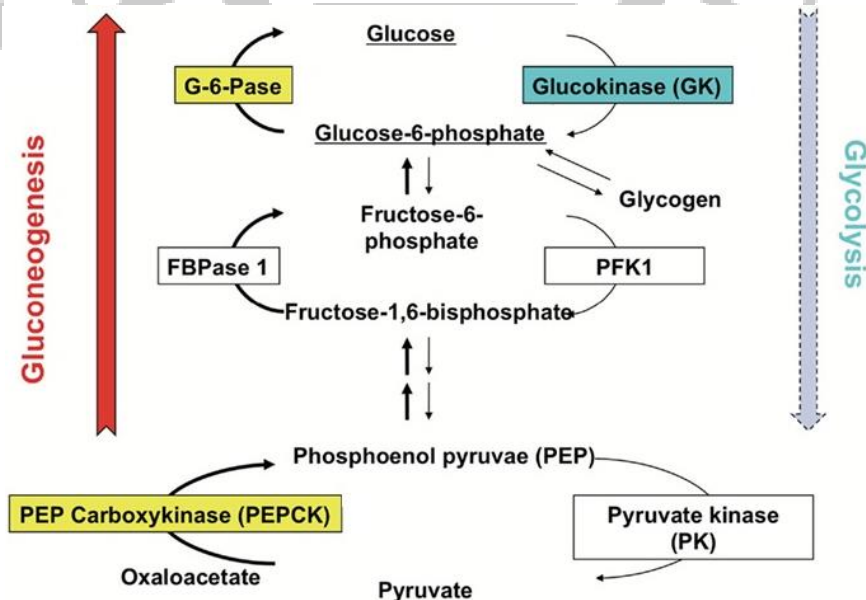
例升高而活化，活化後磷酸化下游基質啟動產生能量的路徑，如增加葡萄糖攝入與脂質氧化等並關閉消耗能量的路徑，包含合成葡萄糖與脂質等，進而達成回復能量平衡 (Cai *et al.* 2007)。代謝症候群的主要症狀就是胰島素阻抗、高胰島素血症、脂血症、高血及肥胖 (Guan 2004)，而造成原因往往就是能量失調使的許多酵素喪失功能，在大鼠實驗中餵食模擬活化 AMPK 能抑制 ACC 的活性改善胰島素抗性及肥胖症狀 (Horman *et al.* 2002)。

### 1-5-7 磷酸烯醇丙酮酸羧化激酶 (Phosphoenolpyruvate carboxykinase,

### PEPCK)

肝臟中葡萄糖糖質新生主要由 6-磷酸葡萄糖磷酸酶 (glucose 6-phosphatase, G6Pase)及 PEPCK 所調控，如附圖五 (Shoji, Deng, and Hotta 2012)，胰島素可以阻斷肝臟糖質新生及肝糖分解而抑制葡萄糖產出及釋放，其主要作用機制為藉由磷酸化及去磷酸化直接控制醣類代謝酵素的活性及調節肝臟糖質新生與肝糖分解相關酵素基因之表現 (Pilkis and Granner 1992)。胰島素可以抑制糖質新生酵素基因轉錄因子 Foxhead protein family (Fox)進而抑制糖質新生速率限制酵素 (rate-limiting enzyme) PEPCK 基因密碼的轉錄，降低肝臟葡萄糖的產出，維持血糖的恆定 (Schinner *et al.* 2005)。

附圖 五、肝臟糖解與糖質新生路徑 (Shoji, Deng, and Hotta 2012)



## 1-6 葡萄糖轉運與代謝

葡萄糖雖然可以藉由血管傳播到其他組織，仍需要先進入細胞，但葡萄糖屬於親水性無法直接透過磷脂質雙層，因此在哺乳類，葡萄糖是藉由葡萄糖轉運蛋白 (Glucose transporters, GLUTs) 進入細胞內 (Augustin 2010; Wilson-O'Brien, Patron, and Rogers 2010; Mueckler and Thorens 2013)。

### 1-6-1 葡萄糖轉運蛋白 (Glucose transporter, GLUT)

GLUTs 在不同組織有不同形式，如肝臟中以 GLUT2 為主，負責雙向運送葡萄糖 (Preitner et al. 2009)。GLUT1 廣泛存在各組織中於細胞膜上恆定表現介導基礎葡萄糖轉運；GLUT4 則大量表現於受胰島素調控之肌肉與脂肪組織中，且對胰島素濃度變化非常敏感，當胰島素大量增加時，GLUT4 會大量轉位置細胞膜上增加細胞對葡萄糖的利用與儲存，達到降血糖目的 (Herman and Kahn 2006; Huang and Czech 2007)。

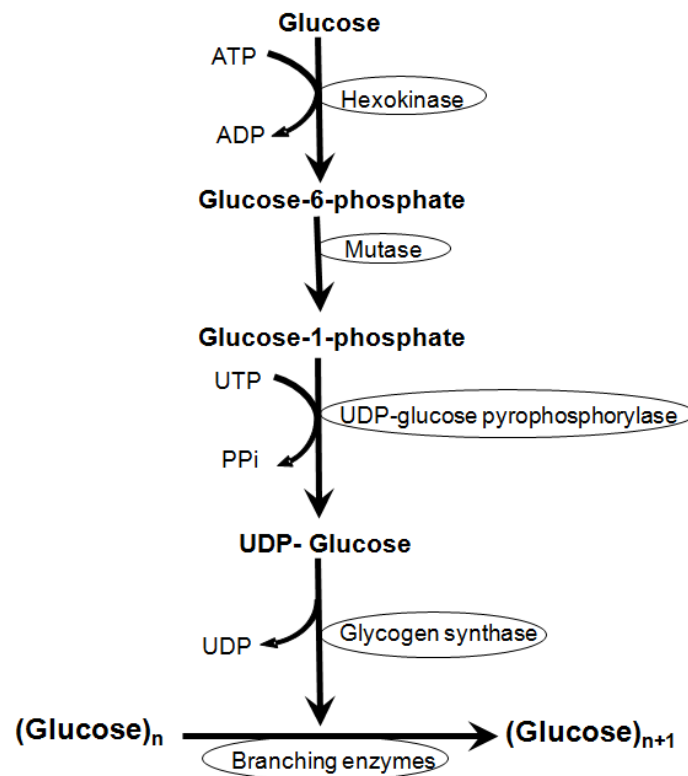
### 1-6-2 葡萄糖激酶 (Glucokinase, GCK)

六碳糖激酶 D (Hexokinase D) 又稱 Glucokinase (GCK)，存在於肝臟、 $\beta$  細胞中 (Cárdenas, Cornish-Bowden, and Ureta 1998; Wilson 2004)。當葡萄糖進入細胞後首先會被磷酸化在第六個碳原子上形成磷酸鹽酯，而在肝臟中葡萄糖磷酸化作用主要受 GCK 催化。此外 GCK 之  $K_m$  值較六碳糖激酶 (Hexokinase) 高，表示細胞內葡萄糖濃度明顯增加時能以較快的速率將葡萄糖形成磷酸鹽形式，藉此降低血糖濃度。

### 1-6-4 肝糖合成酶 (Glycogen synthase, GS)

GS 為肝糖合成的主要催化酵素，而肝糖合成酶的活性會受到肝糖合成激酶磷酸化 (Glycogen synthase kinase-3, GSK-3) 而被抑制。胰島素與其受器結合後經由一連串之磷酸化促進 PI3K 活性而抑制 GSK-3 及活化 protein phosphatase-1 (PP1)，進而促進 GS 活性進行肝糖之合成 (Cross et al. 1995)。肝糖合成路徑如附圖六所示 (Mostafa I. Waly, 2013)。

附圖 六、肝糖合成路徑 (Mostafa I. Waly, 2013)



### 1-6-7 乙醯輔酶 A 羧化酶 (Acetyl-CoA carboxylase, ACC)

ACC 可以在 biotin 的幫助下，催化 Acetyl-CoA 羧酸化而產生 malony-CoA (Cha *et al.* 2005)，接者再透過脂肪酸合成作用下合成長鏈脂肪酸；同時 malony-CoA 又可以透過抑制 carnitine palmitoyl-transferase-1 (CPT-1)來調控脂肪酸的  $\beta$ -氧化 (Manco, Calvani, and Mingrone 2004)，進而促進脂質的生成。文獻指出缺乏 ACC 的小鼠不管吃再多食物其脂肪酸  $\beta$ -氧化更積極且體重反而減少得更多 (Abu-Elheiga *et al.* 2001)，因此 ACC 活性的抑制可能對減肥或糖尿病有益處。

### 1-7 脂肪細胞產生之細胞激素

近年來發現第二型糖尿病所伴隨的周邊組織胰島素抵抗脂肪也涉及其中，脂肪組織不只儲存能量更是重要的內分泌器官，藉由分泌多種脂泌素 (adipokine) 調控全身代謝作用，影響參與葡萄糖與脂質代謝的分子而調控血糖恆定 (Kershaw and Flier 2004; Schinner *et al.* 2005)。

### 1-7-1 腫瘤壞死因子 $\alpha$ (Tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ )

TNF- $\alpha$  是分子量為 26 kDa 的細胞穿膜蛋白，會與細胞膜上兩個 TNF- $\alpha$  受器 p55 及 p75 結合引發 TNF- $\alpha$  之訊息傳遞。肝臟在高血糖及高血脂環境下易促進發炎激素的分泌如 TNF- $\alpha$  和 IL-6，而這些發炎激素會阻礙胰島素受體基質 1 (IRS-1) 和葡萄糖轉運蛋白 (GLUT) 的傳訊進而誘發胰島素阻抗。(Chen et al. 2017)。

### 1-7-2 脂聯素 (Adiponectin)

脂聯素在脂肪細胞中高度表現，大量存在人類血漿中佔血漿總蛋白質中的 0.01% 為血漿中第三大量賀爾蒙，具有抗發炎、抗動脈硬化與增強胰島素等生理活性 (Diez and Iglesias 2003)。有實驗發現在肥胖、胰島素阻抗與第二型糖尿病情況下血漿中脂聯素含量明顯減少，以及肥胖所引起的胰島素阻抗是因為其脂聯素減少而導致，若對此狀態補充脂聯素則可以改善胰島素阻抗的情形 (Berg et al. 2001; Fruebis et al. 2001; Yamauchi et al. 2001)。

### 1-7-3 抗素 (Resistin)

Resistin 是由脂肪細胞分泌由 94 個胺基酸組成之蛋白質，分子量 12 kDa，會降低葡萄糖耐受性及周邊組織之胰島素阻抗 (Rajala et al. 2004)。實驗證實，經過 Resistin 處理之肝細胞胰島素受器基因表現與肝糖合成酶活性均受到抑制 (Yang et al. 2009)。

### 1-7-4 瘦素 (Leptin)

Leptin 於 1994 年發現，在 2008 年觀察到可抑制升糖素的分泌 (Zhang et al. 1994)。將 Leptin 經皮下注射於第一型糖尿病鼠連續 12 天後，藉由降低升糖素作用可改善體內代謝異常，包括降低糖化血色素與血糖濃度、改善血糖提升幅度、減少脂肪生成相關酵素的表現、降低血脂含量等 (Wang et al. 2010)；將 Leptin 注入小鼠大腦腦室也可降低升糖素濃度。這些研究顯示 Leptin 的作用可經由下視丘的 Leptin 受體及抑制胰臟  $\alpha$  細胞的作用而達到降低升糖素的濃度 (Kalra 2009)，進而改善血糖。

## 1-8 益生菌

益生菌 (Probiotics) 為被證實對腸內有益的細菌，可以清除病原菌也能提升人體免疫能力。人體腸胃道內細菌種類超過 500 種。益生菌的定義是含有足量可以改變宿主胃腸道菌叢而產生有益健康效果的微生物 (Hill et al. 2014)，現今包含活菌、死菌及菌之分泌成分。其中乳酸桿菌或比菲德氏菌 (Bifidobacterium) 最被廣泛地使用 (Salminen et al. 1998)。研究證實其可以耐胃酸及酵素，容易附著在結腸黏膜及在腸道中繁殖 如附表二 (Saarela et al. 2002)。益生菌的作用機轉：藉由刺激乳酸導致腸道 pH 值下降，產生有助於更多有益微生物生長的產物以及提升宿主對病原體的免疫反應 (Fuller 1991; Ng et al. 2009)。

附表 二、益生菌菌種應具備之條件 (Saarela et al. 2002)

具備條件	目標與方法
菌株特性	來源安全；篩選自人類來源或食品之菌株。
耐酸性	具有耐酸及膽鹽特性。
吸附性與定殖能力	具有良好的腸道吸附性與定殖能力；使用各種實驗模式組如細胞培養、黏液、腸道片段等，進行吸附試驗與定殖研究。
競爭排除能力	具良好的競爭性，能夠有效排除並抑制病原菌的生長；進行體外與體內病原菌競爭力測試。
免疫調節功效	提升免疫調節能力；體外與人體測試。
安全性	對消費者無健康危害；產品上市前須經安全測試並於上市後持續監控。
加工特性	擁有良好的加工性，以及在儲存運銷期間菌株活性能夠維持如菌株穩定性、菌株對氧氣耐受性及大規模生產的適合性；針對各製程形成穩定性及活性評估。
官能品評	被消費者接受之產品；終產品之官能品評。
顧客的接受性	顧客的接受性；調查並依消費者喜好進行商品規劃。
健康功效	臨床試驗證實具健康功效；人體臨床試驗以確立特定功能與食品安全性。

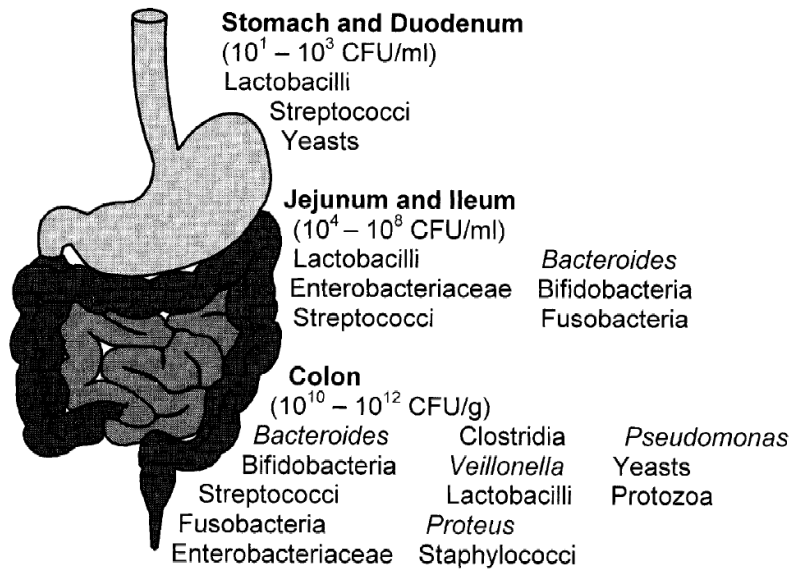
## 1-9 乳酸菌

乳酸菌為相當龐雜之菌群，為能利用碳水化合物進行發酵並產生大量乳酸之細菌的總稱。乳酸菌首被遊牧民族發覺為絕佳的營養補充品，同時是人體腸道中重要的益生菌，能排除及抑制病原菌的生長 (Ilose and Sozzi 1991)，減少病原菌產生危害物質所導致之健康不良影響，維持宿主腸道菌相平衡，形成生物膜 (biofilm) 達到屏障作用，且能分泌有機酸維持腸道酸性環境，促進腸道蠕動和增進鈣、鐵等營養素的吸收，刺激免疫反應 (Fukushima et al. 1998; Aattouri et al. 2002)，增加宿主抵抗力，並有助於抑制腫瘤的生長 (Gan et al. 1999)，同時也具降膽固醇 (Hosono 2000)、血壓及血糖 (Hung, Tseng, and Pan 2016) 的功效。

### 1-9-1 特性與分類

人體腸道微生物相十分複雜，如附圖七 (Holzapfel et al. 1998) 所示。小腸內菌數在  $10^4 \sim 10^8$  CFU/mL 之間，主要包括乳酸桿菌 (Lactobacillus)、腸內細菌科 (Enterobacteriaceae) 及鏈球菌群 (Streptococcus) 等兼性厭氧菌，以及其他的絕對厭氧菌，如類細菌屬 (Bacteroides)、雙歧桿菌 (Bifidobacteria) 及細梭菌 (Fusobacteria) 等。大腸菌數在  $10^{10} \sim 10^{12}$  CFU/mL 之間，絕對厭氧菌是優勢菌種，如類細菌屬、雙歧桿菌、梭狀芽孢桿菌屬 (Clostridia) 和細梭菌等，其他則由兼性厭氧菌如酵母菌 (Yeast)、鏈球菌群、腸內細菌科及乳酸桿菌等構成次要菌群。乳酸菌是益生菌中最重要的一群，當乳酸菌進入腸道後，可刺激腸道相關淋巴組織特異性與非特異性的免疫反應，效果會受到菌體定殖於腸腔時與淋巴組織接觸的程度影響。一般認為乳酸菌必須定殖於腸道並繁殖才具有效用，有些實驗顯示，停止攝食乳酸菌後，在幾週內乳酸菌便會消失，並不會持續存在於腸道內，但是短暫的定殖，還是有刺激腸道免疫系統的效果，尤其是對服用抗生素或腹瀉感染的病人，攝食乳酸菌後可幫助病人腸內菌叢的重建，而回復免疫系統的平衡。有研究指出，愈早攝食乳酸菌，愈有機會與宿主細胞上的接受器交互作用，在上皮細胞黏膜建立據點，成為共生的菌群。由於乳酸菌在腸道中扮演非常關鍵的角色，直接影響到人類的健康，因此乳酸菌產品或利用乳酸菌進行生物轉化的衍生性產品，已成為市場上的寵兒 (Guarner and Malagelada 2003; Holzapfel et al. 1998; Parvez et al. 2006; Saarela et al. 2002)。

附圖 七、人體腸胃道菌相分布圖 (Holzapfel et al. 1998)



## 1-9-2 生理功效

### 1-9-2.1 維持正常腸道菌相

腸道內的常駐菌扮演了排除外來病原菌的重要角色，藉由吸附於上皮細胞之上形成一道防止病原菌入侵的保護層，達到防護人體及阻斷有害菌群入侵的效果，其主要機制為：(1) 與外來病原菌競爭腸道內的營養基質；(2) 在腸道上皮細胞絨毛刷狀邊緣上，與外來病原菌競爭吸附位置；(3) 藉由腸道常駐菌代謝所產生的有機酸，或是具有益菌功能的高分子蛋白質-抑菌素等，達到抑制病原菌生長的目的 (Bengmark 2000)。

### 1-9-2.2 具降低膽固醇功效

(Akalin, Gönç, and Düzel 1997) 比較由 *Streptococcus thermophilus* 及 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. 發酵之一般 yogurt 與由 *Streptococcus thermophilus* 及 *Lactobacillus acidophilus* 發酵之 acidophilus yogurt 對老鼠血清中膽固醇之影響，發現由以上菌所發酵之 yogurt 均有降低老鼠血清膽固醇的能力，其中以 acidophilus yogurt 效果較佳。乳酸菌降低血清膽固醇的機制：(1) 吸附作用：有些乳酸菌會吸附腸內的膽固醇，避免其被吸收 (Grill et al. 2000)；(2) 去結合型之膽鹽與膽固醇共沉澱：人體內的膽固醇可由肝臟自行合成，也可由動物性食物中攝取。膽固醇的排泄作用途徑有二：膽鹽是膽固醇代謝過程中的水溶性產物，這些膽鹽於大腸中會被許多具有 bile salt hydrolase 的腸內菌如 *Lactobacillus*、*Bifidobacterium*、*Clostridium*、*Peptostreptococcus*、*Enterococcus* 和 *Bacteroid*，



將膽酸和膽固醇進行降解，與甘胺酸或牛磺酸形成去結合型之膽鹽，其水溶性較低，會與膽固醇形成共沉澱作用而排出，不僅能避免膽固醇被吸收，更能因膽鹽減少而加快膽固醇形成膽鹽的速率 (Klaver and Van Der Meer 1993)。經肝臟代謝形成膽酸，與甘胺酸或牛磺酸結合後可溶於水，再與鉀或鈉離子形成 glycocholates 或 taurocholates 等鹽類，經由糞便排出體外或形成 steroid hormone，再由 hormone 的代謝作用，由尿中排出體外，但此途徑只佔小部分。(Jin et al. 1998) 指出，乳酸菌對膽鹽具有去結合的活性，使膽固醇沉澱排出，此可能是乳酸菌能減少動物血液中膽固醇含量的原因之一；(3) 抑制膽固醇合成：發酵乳中存在一些有機酸如 uric acid、orotic acid 與 hydroxymethylglutaric acid，可降低參與膽固醇合成之酵素 hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (HMGCoA reductase) 的活性，因此具有降低膽固醇的作用 (Khedkar et al. 1993)

### 1-9-2.3 具有降低血壓的功效

乳酸菌發酵酸乳的降血壓機制，主要是其產物中含有可抑制 angiotensin I-converting enzyme (ACE)的成分。ACE 是一種位於細胞表面的膜糖蛋白，其羧端有一段疏水性胜肽嵌入細胞膜，使其整個具有活性的部位完全暴露在細胞膜外側，為一胞外酵素 (Hopper and Turner 1987)。ACE 在腎素-血管升壓素-皮質醛酮系統 (rennin-angiotensin-aldosterone system)中，是調控血壓的主要轉機。抑制 ACE 的活性，可有效降低血壓。高血壓的老鼠飼餵經乳酸菌發酵之牛奶，其血壓有降低之現象 (Nakamura et al. 1995)，而進行人體試驗也具有相同的功效。乳酸菌如 *L. helveticus* 在發酵過程中會分解乳蛋白而產生多種胜肽，其中 VPP (Val-Pro-Pro)與 IPP (Ile-Pro-Pro)可抑制血管收縮素轉換酵素 ACE 的活性。當高血壓患者飲用該乳酸菌後其血壓明顯較飲用前降低 (Jauhiainen et al. 2005))。

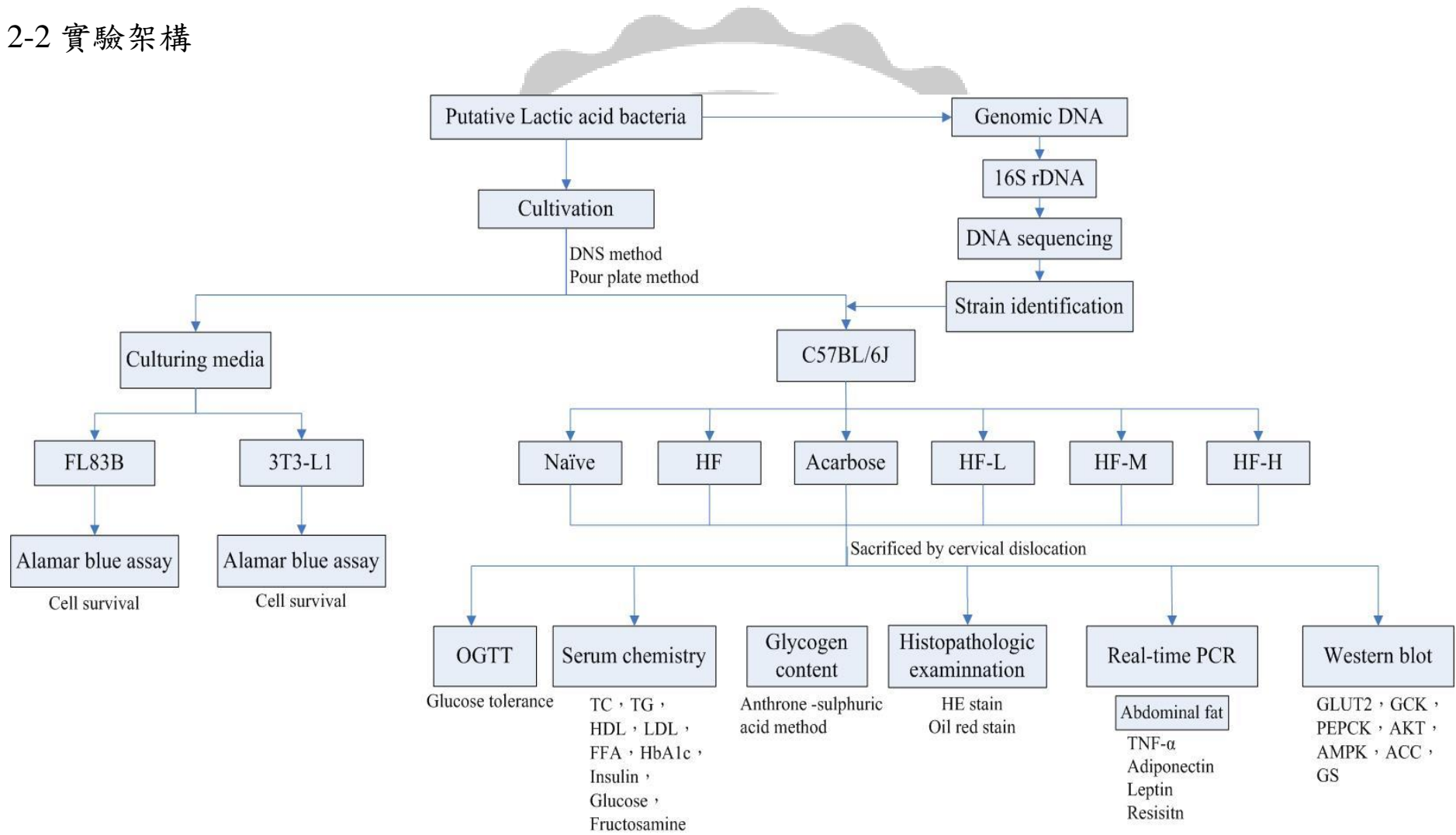
## 第二章、研究目的與實驗架構

### 2-1 研究目的

隨著現代人生活作息與飲食習慣的改變，高脂、高糖及高熱量食品垂手可得並且許多人漸漸養成久坐不動的習慣，造成包含糖尿病、大腸癌、高血脂、高血壓等代謝症候群的盛行率逐年增加。第二型糖尿病為目前主要的糖尿病類型，不但會影響體內葡萄糖代謝同時也會造成脂肪代謝及血脂體脂異常。許多相關研究指出乳酸菌具降血糖作用，但研究多觀察不同種類乳酸菌降血糖效果或乳酸菌對第二型糖尿病模型小鼠和糖尿病患者的腸道菌相影響為主，而探討乳酸菌對降血糖之機制研究則鮮少。因此本實驗探討由發酵食品篩選出複合乳酸菌對高脂高果糖誘導第二型糖尿病小鼠調控血糖代謝與改善胰島素阻抗之分子機制並評估其開發為產品之潛能。



## 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 試驗菌株來源

自發酵食品篩選之菌株，經初步鑑定及定序確認為乳酸菌，共 3 株。代號分別為 F7-4、F7-3、F2-2。

##### 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)。

##### 3-1-1.3 DNS 殘糖試驗藥品

Sodium sulfate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) 購自和光純藥工業株式會社 (Osaka, Japan)。3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)、酒石酸鉀鈉購自 Sigma (MO, USA)、Phenol 購自 Amresco (OH, USA)、氫氧化鈉購自聯工 (Taiwan)。

#### 3-1-2 細胞實驗

##### 3-1-2.1 小鼠肝臟細胞株

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 (Sigma, USA)。0.22 $\mu$ m 過濾杯購自騰達行 (Millipore, USA)。胎牛血清 (Foetal bovine serum ; FBS)購自永馥 (NQBB, Australia)。

### 3-1-2.2 小鼠脂肪細胞株

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 $\mu$ m 過濾杯 (Millipore, USA)。胎牛血清 (Foetal bovine serum ; FBS)購自永馥 (NQBB, Australia)。

### 3-1-2.3 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 $\mu$ L 絕對酒精, 再以絕對酒精 10 倍稀釋成濃度 250 $\mu$ 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, 以培養基稀釋至適當濃度。

### 3-1-2.4 細胞培養其他藥品

1. Trypsin-EDTA、L-glutamine 以上兩種皆購自 Gibco (CA, USA)
2. Trypan blue 購自 Biological Industries
3. Sodium chloride、Disodium hydrogen phosphate、Glycerol 購自 Panreac (Barcelona, Spain)
4. Potassium chloride 購自林純藥工業株式會社 (Osaka, Japan)
5. Sodium hydrogen carbonate 購自和光純藥工業株式會社 (Osaka, Japan)
6. Potassium dihydrogen phosphate 購自石津製藥株式會社 (Osaka, Japan)
7. Glucose 購自 Sigma (MO, USA)
8. AlamarBlue<sup>®</sup>購自 Invitrogen (CA, USA)

### 3-1-3 動物實驗

#### 3-1-3.1 動物模型

5 週齡 B6 雄性小黑鼠 (C57BL/6JNarl)，購自國家實驗動物中心 (National Laboratory Animal Center, Taipei, Taiwan)。

#### 3-1-3.2 飼養動物之相關用品

60% 實驗鼠高脂飼料購自鴻銘科技 (ResearchDiets, USA, # D12492)、LIGNOCEL 墊料購自捷懿企業 (JRS, Germany)、1 mL 針筒購自伸球企業 (Taiwan)、血糖機及血糖試紙購自生展生物科技 (Arkray, Japan)、75 % 豐年果糖購自裕軒食品材料行 (Taiwan)。

#### 3-1-4 肝醣分析

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

##### 3-1-5.1 細胞裂解液 (Cell lysis buffer)

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, Spain)
4. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、Sodium orthovanadate、Sodium fluoride、Phenylmethanesulfonyl fluoride、Protease Inhibitor Cocktail 以上四種藥劑皆購自 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 37%購自正茂 (Bio-rad, USA)。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、Immobilin™Western Chemiluminescent HRP Substrate 購自 Millipore (MA, USA)。

### 3-1-6 mRNA 表現量分析

RNA 萃取套組 RareRNA 購自真興實業 (GenePure, Taiwan)、cDNA 反轉錄套組 iScript™ cDNA Synthesis Kit 購自正茂 (Bio-rad, USA)、qPCR 套組 iQ™ SYBR® Green Supermix 購自正茂 (Bio-rad, USA)、ROX Reference Dye 購自量子 (Invitrogen, USA)、相關引子購自生工有限公司 (MDBio)。

### 3-1-7 主要儀器及設備

1. CO<sub>2</sub> 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 Ctiterion™ 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)





## 3-2 實驗方法

### 3-2-1 樣品製備

將乳酸菌接種至含 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 抽取 Genomic DNA

乳酸菌之 DNA 的抽取法, 為利用 Quick-DNA™ Fungal/Bacterial DNA Miniprep Kit (Zymo Research, USA) 進行製備。將  $10^9$  CFU/mL 菌落離心 (12000 rpm, 2 分鐘), 去上清液後以 200  $\mu$ L 1×PBS 覆溶菌體後取至 ZR BashingBeed™ Lysis tube 中, 加入 700  $\mu$ L Lysis Solution 至 tube 中並以最高轉速 vortex 5 分鐘。離心 (10000 xg, 1 分鐘), 取上清液 400  $\mu$ L 至 Zymo-spin IV™ Spin Filter 離心 (7000 xg, 1 分鐘) 並在 Collection tube 中收集濾液, 加入 1200  $\mu$ L Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer 於 Collection tube 與濾液混合, 分次取 800  $\mu$ L 混合液至 Zymo-Spin™ IIC Column 離心 (10000 xg, 1 分鐘) 後去除濾液並更換 Collection tube, 加入 200  $\mu$ L DNA Pre-Wash Buffer 至 Zymo-Spin™ IIC Column 離心 (10000 xg, 1 分鐘), 加入 500  $\mu$ L Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer 離心 (10000 xg, 1 分鐘), 將 Zymo-Spin™ IIC Column 移至新的 1.5 mL 離心管後加入 50  $\mu$ L DNA Elution Buffer 靜置 2 分鐘, 離心 (10000 xg, 30 秒) 析出 DNA, 保存離析的 DNA 於 -20°C。

### 3-2-3 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 (Castellanos et al., 1996; Matsuki et al., 1998, 1999, 2003; Tilsala-Timisjarvi and Alatosava, 2001), 在 0.2 mL 微量離心管先加入配製好的 PCR 反應液 19  $\mu$ L, 其組成份內含 0.5  $\mu$ L 之 200  $\mu$ M dNTP, 2.5  $\mu$ L 之 10x PCR buffer, 0.5  $\mu$ L 之 10 pmole (each) primers, 0.5  $\mu$ L 之 MgCl<sub>2</sub>, 0.1  $\mu$ L 之 Taq DNA polymerase 及無菌去離子水, 再加入 1  $\mu$ L 之目標菌體 genomic DNA。而後置入 PCR thermocycler (MJ PTC200) 進行反應。分析時取 5  $\mu$ L PCR 反應產物添加 MaestroSafe™ nucleic acid stains, 以 1.5% agarose 於 0.5 X TAE buffer 中進行電泳分析, 以 UV box 觀察後拍照。

### 3-2-4 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 TAagg AATCT TCCA ; Lac16S-R, Sequence 5'-3', CACCg CTACA CATgg AG。

### 3-2-5 乳酸菌計數

取菌保 10  $\mu$ L 接種至含 0.05% L-cysteine 之 4mL Lactobaccilli MRS 液態培養基 (DIFCO, Detroit, Michigan, USA), 以 37°C 靜置 20 小時進行一活, 接續取 100  $\mu$ L 菌液培養於 MRS broth 37°C 靜置 16-18 小時進行二活。將二活之菌液離心去除培養液, 以 PBS 清洗兩次後以 PBS 覆溶並分裝冷藏, 連續每日取一分裝管以無菌之 PBS 序列稀釋  $10^{-1}$  至  $10^{-8}$ , 取  $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  三管於含/不含難消化糊精之 MRS agar 培養 37°C 48 小時, 觀察其菌數。

### 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 4000 rpm 離心, 時間 20 分鐘, 再以 0.22  $\mu$ m filter 過濾後收取其培養液, 於 -20°C 保存備用。

#### 3-2-6.2 DNS (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, Kondratyeva, and Sinitsyn 2011)。取 1 mL 之乳酸菌培養液加入 1% B 液及 99% A 液震盪混合, 經 100°C 水浴 15 分鐘, 再加入 0.5 mL C 液震盪混勻, 置於 25°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 細胞培養與繼代

由液態氮桶中取出細胞之凍管，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，再加入解凍之細胞懸浮液，以八字形搖晃均勻，於 37°C 含 5% CO<sub>2</sub> 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。

#### 3-2-7.2 細胞分化

3T3-L1 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 0.25 μM、IBMX 0.5 μM、Insulin 0.58 μg/mL，放置兩天後換成只含 Insulin 5 μg/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。

#### 3-2-7.3 誘導脂肪細胞產生胰島素抵抗

將 3T3-L1 細胞培養至成熟脂肪細胞，加入 30mM Glucose 與處理細胞，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 細胞增生性試驗

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。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<sup>4</sup> 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 μL AlamarBlue (AlamarBlue:DMEM medium=1:10)，於 37°C 培養 24 小時，於 570 及 590nm 測其吸光值。

### 3-2-8 動物實驗及相關測定

#### 3-2-8.1 實驗動物飼養與分組

實驗動物皆採購自財團法人國家實驗動物中心 (National Laboratory Animal Center, NLAC, Taipei, Taiwan)，無特定病原之雄性 C57BL/6JNarl (B6) 品系之五週齡小鼠 50 隻，待適應一週後即開始進行試驗，依體重隨機分組至組間平均體重無顯著差異。

將小鼠依體重隨機分成 6 組：(1) 正常組 (Naive 組，n=8)，不經任何處理之組別；(2) 對照組 (High Fructose，n=7)，為果糖水誘導 8 週後管餵給予滅菌蒸餾水 10 ml/kg/day 之組別；(3) Acarbose 組 (藥物控制組，n=8)，為果糖水誘導 8 週後，管餵給予 Acarbose (40 mg/kg) 組別；(4) HF-L 組 (n=8)，為果糖水誘導 8 週後，管餵給予低劑量 ( $10^8$ CFU) 乳酸菌組別；(5) HF-M 組 (n=8)，為果糖水誘導 8 週後，管餵給予中劑量 ( $10^9$ CFU) 乳酸菌組別；(6) HF-H 組 (n=8)，為 30% 果糖水誘導 8 週後，管餵給予高劑量 ( $10^{10}$ CFU) 乳酸菌組別。飲水與飼料滅菌後任飼，並每週記錄其體重、飲水量、攝食量，給予小鼠光照循環 12 小時光照、12 小時黑暗。

#### 3-2-8.2 胰島素阻抗模型建立

將實驗動物預養一週後，除了 Naïve 組仍飲用蒸餾水與食用一般飼料，其餘組別均更換為 30% 高果糖溶液與高脂飼料餵食以誘導胰島素阻抗。

#### 3-2-8.3 葡萄糖口服耐受測驗 (OGTT)

將實驗動物於實驗前、中、後各做一次葡萄糖口服耐受試驗，確定實驗動物產生胰島素阻抗。實驗動物禁食 14-16 小時後，以尾部採血取得微量血液至血糖機空腹血糖，再以餵食管餵食葡萄糖溶液後，分別在 30、60、90、120 分鐘測其血糖值，計算曲面下面積，觀察胰島素阻抗的情況。

#### 3-2-8.4 血清分離與分析項目

藥物／乳酸菌管餵十六週後將小鼠禁食十四小時以 Isoflurane 麻醉，確認小鼠昏迷後以手術剪刀剪開左鎖骨下靜脈或動脈使用 1 mL 針筒收集血液，室溫靜

置 30 分鐘後以 10000 rpm 離心 10 分鐘取出血清保存於 -80°C，後續委託大華醫事檢驗所檢測血清中 TC、TG、FFA、HDL、LDL、Insulin、Glucose 及 HbA1c 含量。

### 3-2-8.5 肝臟病理分析項目

小鼠犧牲後，取其肝臟並以 PBS 沖洗後秤重，將多餘的結締組織去除，剪取最大葉之肝臟並分切兩半，一半浸泡於 10% 福馬林溶液中超過 24 小時使細胞形狀固定，再以蘇木紫-伊紅染色法 (Hematoxylin and eosin stain, H&E stain) 進行染色；另一半肝臟則先浸泡於 15% 蔗糖水 24 小時後移置 30% 蔗糖水再浸泡 24 小時，之後取出肝臟放置於鋁箔容器中，利用 O.C.T 冷凍包埋劑 (Sakura tissue-Tek, USA) 包埋後放置 -20°C 至完全凝固。待其凝固後進行冷凍切片 (10  $\mu$  m) 與油紅染色 (Oil-Red-O stain)，置於光學顯微鏡下觀察，評估肝臟組織細胞排列與脂肪空泡堆積的情況。

#### (1) 肝臟肝糖分析

秤取肝臟約 50 mg，加入 600  $\mu$ L 之 30% KOH 後，置於 95°C 水浴 20 分鐘，待冷卻後以 10000 rpm 離心 15 分鐘，取 0.5 mL 上清液加入含 2 mL 99% EtOH 之 15 mL 離心管中，充分混勻後放置室溫下過夜。隔夜後會有白色混合物，將試管於 4000 rpm 離心 30 分鐘，小心倒掉上清液並將試管倒置 10 分鐘。加入 1 mL ddH<sub>2</sub>O 溶解糖原，管底的糖原必須以震盪方式至完全溶解。

製作試劑空白和標準管：

試劑空白：取 1 mL ddH<sub>2</sub>O

標準管：取 1 mL 葡萄糖標準液

測定樣品糖原含量：

取 5 mL 0.1% anthron reagent 於各試管中後於水龍頭冷水下沖涼，待冷卻後將各試管浸於 85°C 水浴 15 分鐘，最後以分光光度計檢測波長 620 nm 下之吸光值。

#### (2) 肝臟組織 H&E 染色

經鴻銘科技有限公司將組織製作成蠟塊後，薄切製成組織切片，再以蘇木紫-伊紅染色法 (Hematoxylin and eosin stain, H&E stain) 進行染色。

#### (3) 肝臟組織 Oil Red O 染色

染色方法為將含肝臟切片之玻片浸泡於 60% isopropanol 10 分鐘，油紅 O

浸染 10 分鐘，60% isopropanol 退染 10 秒後以自來水沖洗多餘 isopropanol，最後以 60%Glycerol 水溶性膠片封膠，置於光學顯微鏡下觀察。

### 3-2-8.6 肝臟蛋白分析

#### (1) 蛋白質萃取

將存放於-80°C之肝臟取出，秤取約 40 mg 肝臟組織，加入 600  $\mu$ L Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl, pH7.5、150 mM NaCl、1% NP-40、2 mM EDTA、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、10 mM NaF、2 mM PMSF)利用均質棒將肝臟組織均質後離心 (12000rpm, 4°C, 20 分鐘)，取上清液並保存於-80°C備用。

#### (2) 蛋白質定量

使用市售試劑組 BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)定量小鼠肝臟抽取之總蛋白質。將蛋白質以 Lysis buffer 10 倍稀釋後取 10  $\mu$ L 稀釋蛋白質與 200  $\mu$ L 試劑 (Reagent A:B=50:1)混合均勻後，置於 37°C 下避光反應 30 分鐘，於波長 562nm 下測其吸光值。不同濃度標準品 BSA 製作標準曲線，估算肝臟中總蛋白濃度 ( $\mu$ g/mL)。

#### (3) 西方轉漬

取 20  $\mu$ g 蛋白質樣品與 Sample buffer (Working:0.3mM Tris、1.5% SDS、150mM  $\beta$ -Mercaptoerhanol、6.8% glycerol、0.013% bromophenol blue)混合均勻，於乾浴槽 95°C 加熱 5 分鐘，於 Running buffer (192mM glycine、24.8mM Tris-base、0.1% SDS) 中，以 10% 的下膠 SDS-PAGE 進行電泳，將蛋白質分離。隨後於 Tris-Glycine Transfer buffer (25mM Tris、200mM Glycine、20% Methanol)中，將電泳膠上蛋白質轉至 Polyvinylidene Fluoride (PVDF)膜上。將膜置於 2% BSA-1X TBST (20mM Tris, pH7.5、150mM NaCl、0.1% Tween-20)中，以 100~150rpm 震盪 1 小時，加入可辨認目標蛋白質之一級抗體 (in 2% BSA-1X TBST)，於室溫下震盪 2 小時。將膜以 TBST 漂洗 5 分鐘 3 次，再加入二級抗體 (in 2% BSA-1X TBST)於室溫下震盪 1 小時，以 TBST 漂洗 3 次，最後於膜上加入 Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Billerica, USA)反應，將膜置於 C-DiGit<sup>TM</sup> Blot Scanner (LI-COR, USA)掃描後定量。

### 3-2-8.7 肝臟與脂肪基因表現分析

#### (1) RNA 抽取與 cDNA 製備

使用市售之提取總量 RNA 試劑組 RareRNA (GenePure, Taiwan)。切取脂肪 50 mg 浸泡於 600  $\mu$ L RareRNA Reagent,以均質棒均質至沒有明顯脂肪團後於室溫靜置 3~5 分鐘，加入 300  $\mu$ L Chloroform,劇烈混合，放置冰中 5 分鐘後，離心 (12000rpm) 5 分鐘。

小心取出上清液到新的離心管中,再加入 2 倍量的酒精 (95%以上),混合均勻,離心 (12000rpm) 5 分鐘後,將上清液盡量去除乾淨,留下沉澱物。加入 70%的酒精 (1 mL) 清洗管壁,離心 (12000rpm) 5 分鐘後,將上清液盡量去除乾淨,留下沉澱物。加入 50  $\mu$ L 的 ddH<sub>2</sub>O 回溶並保存於-80°C 備用。

反轉錄時,使用市售反轉錄試劑套組 iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-rad, USA),將 2  $\mu$ L RNA、4  $\mu$ L iScript™ Reaction Mix、1  $\mu$ L iScript™ Reverse Transcriptase 及 13  $\mu$ L Nuclease-free H<sub>2</sub>O 至於 PCR 管中混合,再利用 DNA Engine Thermal Cycler 於 25 反應 5 分鐘後,加熱至 42°C 使酵素反應 30 分鐘,最後加熱至 85°C 作用 5 分鐘終止反應,即得產物 DNA,保存於-80°C 備用。

## (2) 同步定量聚合酶鏈鎖反應

將 2  $\mu$ L cDNA、5  $\mu$ L iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-rad, USA)、0.5  $\mu$ L 正反引子、0.2  $\mu$ L ROX Reference Dye (Invitrogen, USA) 及 1.8  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O,置於 PCR 八連排(Bio-rad, USA)混勻,使總體積為 10  $\mu$ L。反應擴增循環為活化加熱 95°C、3 分鐘;95°C、30 秒;不同黏合溫度 1 分鐘;72°C、45 秒擴增步驟偵測 SYBR Green 螢光量,重複 40 循環後進行解離步驟,PCR 產物以解離曲線與 1.5% 洋菜瓊脂膠电泳來確定是否為專一性產物。聚合酶鏈鎖反應的擴增過程中,反應溶液中的 SYBR Green 會嵌入雙股 DNA 內,因此擴增期間所偵測之螢光量將與擴增產物之量呈正比,可對應反應起始基因使用量。而基因的表現量將以通過閾值之循環數 (Ct 值) 推定,此實驗中所使用  $\beta$ -actin 基因表現量作為內部對照,目標基因的相對表現量以公式  $2^{-\Delta Ct}$  計算得知。

## 3-3 統計分析

本研究使用 SAS 9.3 統計軟體進行各數據統計分析。

單因子變異數分析 (one-way analysis of variance, One-Way ANOVA)

數據皆以 One-Way ANOVA 方法分析後,並以鄧肯多變域檢定法 (Duncan's multiple-range test) 進行事後檢定,比較組間之差異,並以不同小寫英文字母標記顯著差異之顯著性 ( $p < 0.05$ )。

## 第四章、結果與討論

### 4-1 乳酸菌試驗

#### 4-1-1 乳酸菌 DNA 聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 檢測

在大量培養產製乳酸菌以提供動物食用前，為確認菌種無誤，特由凍存管重新活化培養，抽取 gDNA 後以 PCR 擴增 16S rRNA 片段並委外定序。由圖一可見，F2-2、F7-3、F7-4 此三株菌株之 PCR 產物電泳後色帶位置接近預期產物 (341 bp)，且為單一色帶，顯示黏合效率與純度尚屬理想。若經十倍稀釋之菌株 DNA 於 PCR 產物電泳則觀察到多段色帶，代表模板濃度過低將造成 PCR 有較多不專一性產物。此三株菌株之擴增產物均委託源資公司進行定序。

#### 4-1-2 定序結果

經再次活化三種自發酵食品分離之 *Lactobacillus* spp. 菌株並擴增核酸定序後，將序列與基因庫 (Genbank) 進行比對，均與原本定序比對結果相符 (表一)。

#### 4-1-3 乳酸菌最適生長天數評估

為確保餵食乳酸菌期間所餵食的菌量維持在目標值，進行六日乳酸菌之連續培養並逐日塗盤計算菌落數。從表二之結果顯示，除不含糊精之 F2-2 外，F7-3、F7-4 於此六日內均保持在  $10^9$  CFU/mL，同時可看出乳酸菌 F2-2、F7-3、F7-4 在含 15% 異麥芽糊精的培養基可獲得較好的生長趨勢。

#### 4-1-4 培養液相關試驗

##### 4-1-4.1 DNS 殘糖分析試驗

過去研究發現，胞外及胞內多醣均可能對血糖發揮調控功效。本實驗中乳酸菌之餵食包含菌體與上清液，而為確保乳酸菌上清液所含的殘糖不致提供小鼠過



多糖份，影響血糖調節效果，乃利用 DNS 試劑進行乳酸菌培養液之殘糖測試。結果如表三顯示在研究中所採用之培養條件下三株乳酸菌上清液的殘糖量均不足以明顯影響小鼠血糖。

## 4-2 複合乳酸菌發酵液對細胞之影響

### 4-2-1 小鼠肝臟細胞 FL83B

#### 4-2-1.1 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。為了瞭解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 混合之發酵培養液稀釋至 200、400、800、1600ppm，分別添加於小鼠肝臟細胞 FL83B 作用 24 小時，並以 Alamar blue 試劑分析增生活性。結果顯示於圖二，三株菌株發酵培養液之四種濃度對細胞皆無毒殺作用。

### 4-2-2 小鼠脂肪細胞 3T3-L1

#### 4-2-2.1 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。為了瞭解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 混合之發酵培養液稀釋至 200、400、800、1600ppm，分別添加於小鼠脂肪細胞 3T3-L1 作用 24 小時，並以 Alamar blue 試劑分析增生活性。結果顯示於圖三，三株菌株發酵培養液之四種濃度對細胞皆無毒殺作用。

## 4-3 複合乳酸菌對高糖高脂飲食誘導之糖尿病小鼠之影響

### 4-3-1 小鼠之體重、攝食與飲水量

紀錄以高脂高果糖誘導誘導 12 週,並管餵給予乳酸菌與糖尿病藥物 16 週後體重、攝食與攝水量之影響。由圖八顯示從誘導第 3 週開始高脂誘導組與正常組即有顯著性差異且隨著週數的增加差異性逐漸增大,至誘導後 12 週平均體重差距已達 15 公克以上,約達 60%。在誘導後第 13 週開始對小鼠進行乳酸菌及對照藥物 acarbose 之餵食。圖九顯示餵菌/藥各組逐漸擴大體重與高脂誘導組之差距,其中以高劑量乳酸菌組控制體重效果最佳而 acarbose 次之,兩組皆與高脂誘導組具顯著性差異 ( $p < 0.05$ ),而低與中劑量乳酸菌則較不顯著。於表一顯示高脂誘導組與空白組相比其攝食量無顯著差異 ( $p > 0.05$ ),但空白組攝水量顯著高於高脂誘導組 ( $p < 0.05$ );空白組、HF 組、藥物組與乳酸菌餵食低、中、高劑量組於實驗前後體重增量分別為 7.25g、26.61g、20.99g、23.48g、26.48g 及 16.95g。由上述結果推論高脂與高果糖給予與體重變化有極大相關性,使小鼠能更接近設立第二型糖尿病模式,而藥物和乳酸菌組別與高脂誘導組相比攝食及攝水量均不受影響但有效抑制體重增加。

### 4-3-2 小鼠之空腹血糖檢測及口服葡萄糖耐受性試驗

在試驗前、誘導九週與餵菌/藥十三週時,將小鼠禁食十四小時並口服給予葡萄糖 (2.0g/kg)進行試驗,於給予葡萄糖前 (第 0 分鐘)與給予後的第 30、60、90、120 分鐘時,取小鼠尾部靜脈血液進行葡萄糖耐受性測驗,觀察各組在葡萄糖吸收 30 分鐘後產生高峰情形。小鼠口服葡萄糖耐受性試驗曲線如圖十、十一、十二之 (a)所示,而 (b)為其血糖值曲線下面積。由圖十顯示,高脂誘導組及空白組於未誘導前之葡萄糖耐受性與血糖曲線下面積無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。圖十一顯示高脂誘導組以高脂高果糖誘導九週後葡萄糖耐受性試驗各時間點血糖值均高於空白組且血糖曲線下面積顯著高於空白組 ( $p < 0.05$ ),顯示高血糖造型已建立。圖十二顯示在管餵藥物與乳酸菌十三週後其血糖曲線下面積與高脂誘導組相比均顯著性降低 ( $p < 0.05$ ),其中乳酸菌高劑量組與空白組在統計上無顯著

性差異 ( $p > 0.05$ )。由上述結果得知經由複合乳酸菌的給予可改善小鼠因高脂高糖誘導之血糖代謝異常症狀。

### 4-3-3 小鼠之肝臟、腎臟、脾臟、脂肪與腓腸肌重量

小鼠肝臟、腎臟、脾臟、脂肪與腓腸肌重量結果如表五、表六所示，在高脂高果糖誘導小鼠胰島素抵抗模式後，HF 組肝臟、腎臟、脾臟、脂肪重量均顯著高於空白組 ( $p < 0.05$ )；而與 HF 組相比藥物與乳酸菌組肝臟、腎臟、脾臟重量均顯著減少 ( $p < 0.05$ )，脂肪重量則為藥物組與乳酸菌高劑量組顯著減少 ( $p < 0.05$ )。腓腸肌重量六組均無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。由結果推論藥物與乳酸菌的給予能改善因高脂高果糖誘導而造成之肝臟、腎臟與脾臟腫大和脂肪堆積。

### 4-3-4 小鼠之血清生化數值

#### 4-3-4.1 血清中游離脂肪酸、膽固醇與三酸甘油脂之含量

藥物／乳酸菌管餵十六週後將小鼠禁食十四小時並犧牲取其血液進行血液中 FFA、CHO 和 TG 的濃度測定，結果如表七所示。HF 組血清中 FFA、CHO 和 TG 濃度均顯著高於空白組 ( $p < 0.05$ )；藥物和乳酸菌組與 HF 組相比血清中 FFA、CHO 和 TG 濃度均顯著降低 ( $p < 0.05$ )。由結果推論藥物與乳酸菌的給予能減緩血清中因高脂高果糖造成偏高的 FFA、CHO 和 TG 濃度。

#### 4-3-4.2 血清中高密度脂蛋白及低密度脂蛋白之含量

藥物／乳酸菌管餵十六週後將小鼠禁食十四小時並犧牲取其血液進行血液中 HDL 和 LDL 的濃度測定，結果如表八所示。HF 組血清中 HDL 和 LDL 濃度均與空白組有顯著差異；藥物和乳酸菌組與 HF 組相比除乳酸菌低劑量無差異，其他組別血清中 HDL 濃度顯著提升 ( $p < 0.05$ )，而藥物與乳酸菌組 LDL 濃度均顯著降低 ( $p < 0.05$ )。由結果推論藥物與乳酸菌的給予能改善血清中因高脂高果糖誘導引起的 HDL 和 LDL 代謝異常。

#### 4-3-4.3 血清中血糖穩定與胰島素敏感性指標

藥物／乳酸菌管餵十六週後將小鼠禁食十四小時並犧牲取其血液進行血液中葡萄糖 (Glucose)、果糖胺 (Fructosamine)、糖化血色素 (HbA1c) 和胰島素 (Insulin) 的濃度測定並計算胰島素對葡萄糖代謝反應敏感性之間接指標

(HOMA-IR)，結果如圖十三~圖十七所示。血中果糖胺濃度可反映 2-3 週內血液糖化程度，其不同於血糖值測定時易受多因素影響造成起伏變化，因此可用於臨床上診斷糖尿病方法之一；HbA1c 糖化血色素則可反映最近 2-3 個月狀況為血糖之穩定指標；HOMA-IR 值為利用休息狀態的空腹胰島素值及血糖值計算出胰島素抗性。HF 組血清中 Glucose、Fructosamine、HbA1c、Insulin 濃度和 HOMA-IR 值均顯著高於空白組 ( $p < 0.05$ )；藥物和乳酸菌組與 HF 組相比血清中 Glucose、Fructosamine、HbA1c、Insulin 濃度和 HOMA-IR 值均顯著降低 ( $p < 0.05$ )。由結果推論藥物與乳酸菌的給予能減緩血清中因高脂高果糖造成血糖代謝異常與胰島素阻抗症狀。

#### 4-3-複合乳酸菌對肝臟中肝醣含量之影響

藥物／乳酸菌管餵十六週後將小鼠禁食十四小時並犧牲取其肝臟以蔥酮硫酸法測定肝臟中肝醣含量，結果如圖十八所示。HF 組肝臟中肝醣含量顯著低於空白組 ( $p < 0.05$ )；藥物和乳酸菌組與 HF 組相比肝醣含量顯著提升 ( $p < 0.05$ )。由結果可知藉由藥物與乳酸菌的餵食可顯著改善因高脂高果糖飲食造成肝醣合成量減少情形。

#### 4-3-6 複合乳酸菌對肝臟病理之影響

##### 4-3-6.1 肝臟外觀病理型態之影響

藥物／乳酸菌管餵十六週後將小鼠禁食十四小時並犧牲取其肝臟拍照並觀察其外觀病理型態，結果如圖十九所示。經高脂高果糖誘導後的 HF 組肝臟外觀與空白組相比明顯肥大且呈乳白色，而空白組外觀則呈現較紅潤的顏色；藥物和乳酸菌組與高脂誘導組和空白組相比，藥物組和乳酸菌中、高劑量組外觀乳白色程度較 HF 組低且肝臟顏色介於空白組與 HF 組之間。由結果可看出藥物與乳酸菌的餵食能減少因高脂高果糖飲食造成肝臟脂肪的累積。

##### 4-3-6.2 肝臟蘇木紫與伊紅 (H&E stain) 染色

藥物／乳酸菌管餵十六週後將小鼠禁食十四小時並犧牲取其肝臟進行切片，再以蘇木紫與伊紅染色後拍照，結果如圖二十為肝臟 100 倍視野下照片，箭頭所指為肝臟中脂肪空泡。結果顯示與空白組相比經高脂高果糖誘導後的 HF 組肝臟中有許多大型脂肪空泡，這些空泡會使細胞核受到堆擠且組織細胞排列混亂；與 HF 組相比餵食乳酸菌組別脂肪空泡的大小、數量與細胞排列有改善的現象，尤以高劑量組最明顯。由上述可知乳酸菌的餵食可以抑制肝臟內脂肪空洞累積，改

善細胞排列不整齊的情形。

#### 4-3-6.3 肝臟油紅 (Oil Red O stain)染色

藥物／乳酸菌管餵十六週後將小鼠禁食十四小時並犧牲取其肝臟進行切片，再以油紅染色後拍照，結果如圖二十一為 200 倍視野下照片，紅色油滴為與油紅結合之中性脂肪。結果顯示與空白組相比經高脂高果糖誘導後的 HF 組肝臟中油滴累積程度嚴重，而在藥物與乳酸菌的給予後油滴減少尤以乳酸菌高劑量組為明顯。由上述可知乳酸菌的餵食可降低肝臟內油滴的累積。

#### 4-3-7 乳酸菌對胰島素傳訊之影響

藥物／乳酸菌管餵十六週後將小鼠禁食十四小時並犧牲取其腹部脂肪與肝分別抽取 mRNA 與蛋白質，利用 Real-Time PCR 偵測腹部脂肪中 TNF- $\alpha$ 、Adiponectin、Leptin 和 Resistin 基因表現量以及利用西方轉漬法偵測肝臟中 ACC、GS、GCK、PEPCK、AMPK、AKT 與 GLUT2 蛋白質表現量。

##### 4-3-7.1 腫瘤壞死因子 (TNF- $\alpha$ )基因相對表現量

圖二十二為腹脂中 TNF- $\alpha$  基因相對表現量結果。與空白組相比 HF 組 TNF- $\alpha$  基因相對表現量顯著提高 1.60 倍 ( $p < 0.05$ )，而在乳酸菌給予後低、中、高劑量分別比 HF 組減少 0.63、0.84 和 0.51 倍，其中低劑量與高劑量顯著比 HF 組低 ( $p < 0.05$ )且與空白組無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。由結果可知乳酸菌處理的組別可減少腹脂中 TNF- $\alpha$  之 mRNA 表現量且具劑量效應。

##### 4-3-7.2 脂聯素 (Adiponectin)基因相對表現量

圖二十三為腹脂中 Adiponectin 基因相對表現量結果。與空白組相比 HF 組 Adiponectin 基因相對表現量顯著減少 0.41 倍 ( $p < 0.05$ )，而在藥物與低、中、高劑量乳酸菌餵食後能提升 Adiponectin 基因相對表現量，與空白組相比分別為 1.28、0.56、0.83 及 1.16 倍，其中以藥物組及高劑量乳酸菌組與 HF 組相比顯著提升 ( $p < 0.05$ )且與空白組無顯著差異 ( $p > 0.05$ )。結果得知藥物與高劑量乳酸菌脂餵食能顯著提升腹脂 Adiponectin 之 mRNA 表現量。

##### 4-3-7.3 瘦素 (Leptin)基因相對表現量

圖二十四為腹脂中 Leptin 基因相對表現量結果。與空白組相比 HF 組 Leptin 基因相對表現量顯著減少 0.46 倍 ( $p < 0.05$ )，而在藥物與低、中、高劑量乳酸菌

餵食後均能顯著提升 Leptin 基因相對表現量 ( $p < 0.05$ )，與空白組相比分別為 1.98、1.66、1.66 及 1.38 倍。由結果得知給予藥物與乳酸菌處理組別均能顯著提升腹脂 Leptin 之 mRNA 表現量。

#### 4-3-7.4 抗素 (Resistin) 基因相對表現量

圖二十五為腹脂中 Resistin 基因相對表現量結果。與空白組相比 HF 組 Resistin 基因相對表現量顯著提高 1.52 倍 ( $p < 0.05$ )，而在藥物與低、中、高劑量乳酸菌給予後 Resistin 基因相對表現量與 HF 組相比顯著降低，分別為空白組 0.54、0.74、0.62 和 0.76 倍。結果得知經藥物與乳酸菌處理組別均能顯著降低腹脂 Resistin 之 mRNA 表現量。

#### 4-3-7.5 乙醯輔酶 A 羧化酶 (ACC) 蛋白質相對表現量

圖二十六為肝臟中 ACC 蛋白質相對表現量結果。HF 組肝臟中 ACC 蛋白質相對表現量顯著高於空白組 2.11 倍 ( $p < 0.05$ )，經由藥物與低、中、高劑量乳酸菌餵食後與 HF 組相比 ACC 蛋白質相對表現量均顯著下降 ( $p < 0.05$ )，分別為空白組 1.45、1.83、0.99 及 0.84 倍。由結果得知藥物與乳酸菌處理之組別能顯著降低 ACC 蛋白質於肝臟的表現進而減少肝臟中脂肪堆積，並且隨著乳酸菌劑量提升效果越顯著。

#### 4-3-7.6 肝糖合成酶 (GS) 蛋白質相對表現量

圖二十七為肝臟中 GS 蛋白質相對表現量結果。HF 組肝臟中 GS 蛋白質相對表現量顯著低於空白組 0.16 倍 ( $p < 0.05$ )，經由藥物與低、中、高劑量乳酸菌餵食後與 HF 組相比 GS 蛋白質相對表現量均顯著提升 ( $p < 0.05$ )，分別為空白組 0.74、0.83、0.53 及 0.41 倍。由結果得知藥物與乳酸菌處理之組別能顯著提升 GS 蛋白質於肝臟的表現。

#### 4-3-7.7 葡萄糖激酶 (GCK) 蛋白質相對表現量

圖二十八為肝臟中 GCK 蛋白質相對表現量結果。HF 組肝臟中 GCK 蛋白質相對表現量顯著低於空白組 0.78 倍 ( $p < 0.05$ )，經由藥物與低、中、高劑量乳酸菌餵食後與 HF 組相比 GCK 蛋白質相對表現量均顯著提升 ( $p < 0.05$ )，分別為空白組 1.33、1.27、0.96 及 0.94 倍。由結果得知藥物與乳酸菌處理之組別能均顯著提升 GCK 蛋白質於肝臟的表現以增加葡萄糖之有效利用。

#### 4-3-7.8 磷酸烯醇丙酮酸羧化激酶 (PEPCK)蛋白質相對表現量

圖二十九為肝臟中 PEPCK 蛋白質相對表現量結果。HF 組肝臟中 PEPCK 蛋白質相對表現量顯著高於空白組 1.30 倍 ( $p < 0.05$ )，經由藥物與低、中、高劑量乳酸菌餵食後與 HF 組相比 PEPCK 蛋白質相對表現量均顯著下降 ( $p < 0.05$ )，分別為空白組 0.59、0.43、0.35 及 0.36 倍。由結果得知藥物與乳酸菌處理之組別能顯著降低 PEPCK 蛋白質於肝臟的表現以減少肝臟中醣質新生情況。

#### 4-3-7.9 磷酸腺苷激活蛋白激酶 (AMPK)蛋白質相對表現量

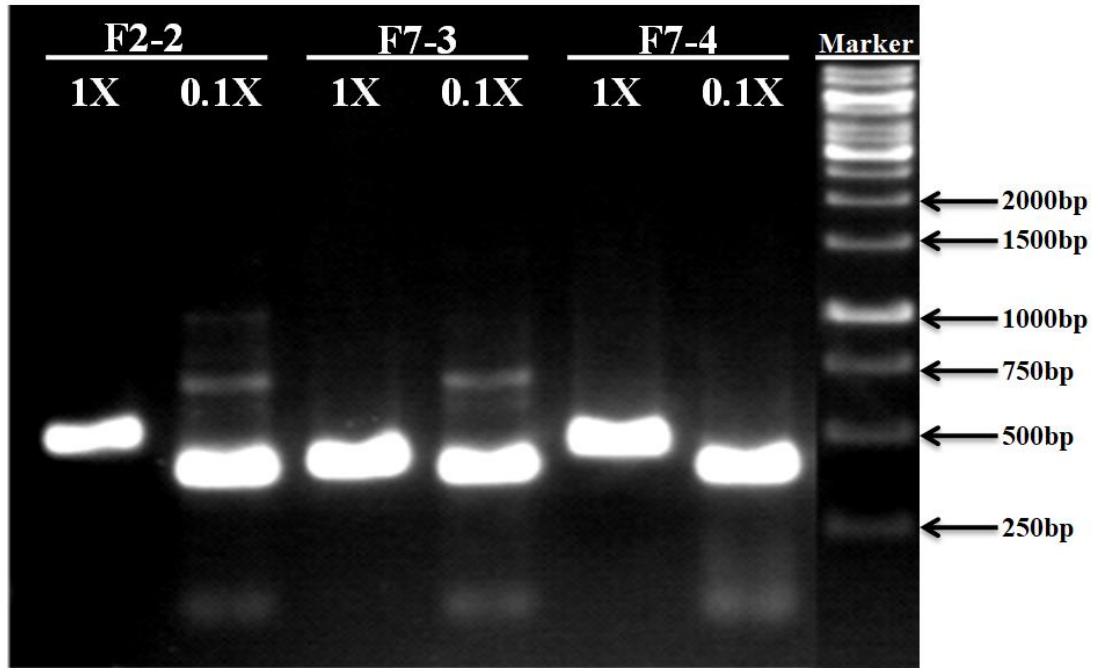
圖三十為肝臟中 AMPK 蛋白質相對表現量結果。HF 組肝臟中 AMPK 蛋白質相對表現量顯著低於空白組 0.90 倍 ( $p < 0.05$ )，經由藥物與高劑量乳酸菌餵食後與 HF 組相比 AMPK 蛋白質相對表現量顯著提升 ( $p < 0.05$ )，分別為空白組 1.08 及 1.01 倍。由結果得知藥物與乳酸菌處理之組別能提升 AMPK 蛋白質於肝臟的表現且以藥物與高劑量乳酸菌餵食效果為顯著。

#### 4-3-7.10 蛋白質激酶 B (AKT)蛋白質相對表現量

圖三十一為肝臟中 AKT 蛋白質相對表現量結果。HF 組肝臟中 AKT 蛋白質相對表現量顯著低於空白組 0.59 倍 ( $p < 0.05$ )，經由低、中、高劑量乳酸菌餵食後與 HF 組相比 AKT 蛋白質相對表現量均顯著提升 ( $p < 0.05$ )，分別為空白組 0.91、0.81 及 1.19 倍。由結果得知乳酸菌處理之組別能提升 AKT 蛋白質於肝臟的表現且以高劑量乳酸菌餵食效果最佳。

#### 4-3-7.11 葡萄糖轉運蛋白 2 (GLUT2)蛋白質相對表現量

圖三十二為肝臟中 GLUT2 蛋白質相對表現量結果。HF 組肝臟中 GLUT2 蛋白質相對表現量顯著低於空白組 0.65 倍 ( $p < 0.05$ )，經由藥物與低與高劑量乳酸菌餵食後與 HF 組相比 GLUT2 蛋白質相對表現量均顯著提升 ( $p < 0.05$ )，分別為空白組 0.81、0.95 及 0.84 倍。由結果得知藥物與乳酸菌處理之組別能提升 GLUT2 蛋白質於肝臟的表現以提升葡萄糖之帶入，且低劑量乳酸菌餵食效果最佳。



圖一、抽取乳酸菌之基因體 DNA (genomic DNA; gDNA) 經核酸擴增後產物。  
 Fig. 1. PCR amplification product of 16S rRNA from LAB extracted genomic DNA.

利用國外已發表文獻之引子組 (T. Rinttila et al., 2004)，在 0.2 mL 微量離心管先加入配製好的 PCR 反應液 19  $\mu$ L，其組成份內含 0.5  $\mu$ L 之 200  $\mu$ M dNTP，2.5  $\mu$ L 之 10X PCR buffer，0.5  $\mu$ L 之 10 pmole (each) primers，0.5  $\mu$ L 之  $MgCl_2$ ，0.1  $\mu$ L 之 Taq DNA polymerase 及無菌去離子水，再加入 1  $\mu$ L 之目標菌體 genomic DNA。而後置入 PCR thermocycler (MJ PTC200) 進行反應。分析時取 5  $\mu$ L PCR 反應產物添加 SafeDye，以 1.5% agarose 於 0.5 X TAE buffer 中進行電泳分析，以藍光觀察後拍照。



表 一、乳酸菌定序結果

Table 1. LAB sequencing result

Number	Name
F7-4	<i>Lactobacillus plantarum</i>
F7-3	<i>Lactobacillus brevis</i>
F2-2	<i>Lactobacillus brevis</i>

將三種自發酵食品分離之 *Lactobacillus* spp. 菌株並擴增核酸定序後，將序列與基因庫 (Genbank) 進行比對。



表二、乳酸菌菌數量計數

Table 2. LAB plate count

treat/days	Count (CFU/mL)					
	1	2	3	4	5	6
with 15% dextrin						
F2-2	1.69x10 <sup>9</sup>	1.78 x10 <sup>9</sup>	1.72 x10 <sup>9</sup>	1.26 x10 <sup>9</sup>	1.16 x10 <sup>9</sup>	2.31 x10 <sup>9*</sup>
F7-3	3.25x10 <sup>9</sup>	3.45 x10 <sup>9*</sup>	3.60 x10 <sup>9*</sup>	1.66 x10 <sup>9</sup>	1.91 x10 <sup>9*</sup>	4.40 x10 <sup>9*</sup>
F7-4	1.49x10 <sup>9*</sup>	2.24 x10 <sup>9</sup>	2.82 x10 <sup>9*</sup>	3.30 x10 <sup>9*</sup>	2.14x10 <sup>9*</sup>	2.16x10 <sup>9*</sup>
without 15% dextrin						
F2-2	1.54 x10 <sup>9</sup>	1.29 x10 <sup>9</sup>	1.30 x10 <sup>9</sup>	1.24 x10 <sup>9</sup>	8.60x10 <sup>8</sup>	9.65 x10 <sup>8</sup>
F7-3	2.95 x10 <sup>9</sup>	1.72 x10 <sup>9</sup>	1.61 x10 <sup>9</sup>	1.80 x10 <sup>9</sup>	1.34 x10 <sup>9</sup>	1.44 x10 <sup>9</sup>
F7-4	2.95 x10 <sup>9</sup>	1.98 x10 <sup>9</sup>	1.39 x10 <sup>9</sup>	1.69 x10 <sup>9</sup>	1.19 x10 <sup>9</sup>	1.22x10 <sup>9</sup>

取菌保 10 μL 接種至含 0.05% L-cysteine 之 4 mL Lactobaccilli MRS 液態培養基 (DIFCO, Detroit, Michigan, USA), 以 37°C 靜置 20 小時進行一活, 接續取 100 μL 菌液培養於 MRS broth 37°C 靜置 16-18 小時進行二活。將二活之菌液離心去除培養液, 以 PBS 清洗兩次後以 PBS 覆溶並分裝冷藏, 連續每日取一分裝管以無菌之 PBS 序列稀釋 10<sup>-1</sup> 至 10<sup>-8</sup>, 取 10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup> 三管於含/不含難消化糊精之 MRS agar 培養 37°C 48 小時, 觀察其菌數。數據以 SAS 9.3 統計軟體進行鄧肯新多變域分析後檢定, 所標示符號若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

\*表示與不含 15% 糊精培養下相比具顯著性差異。

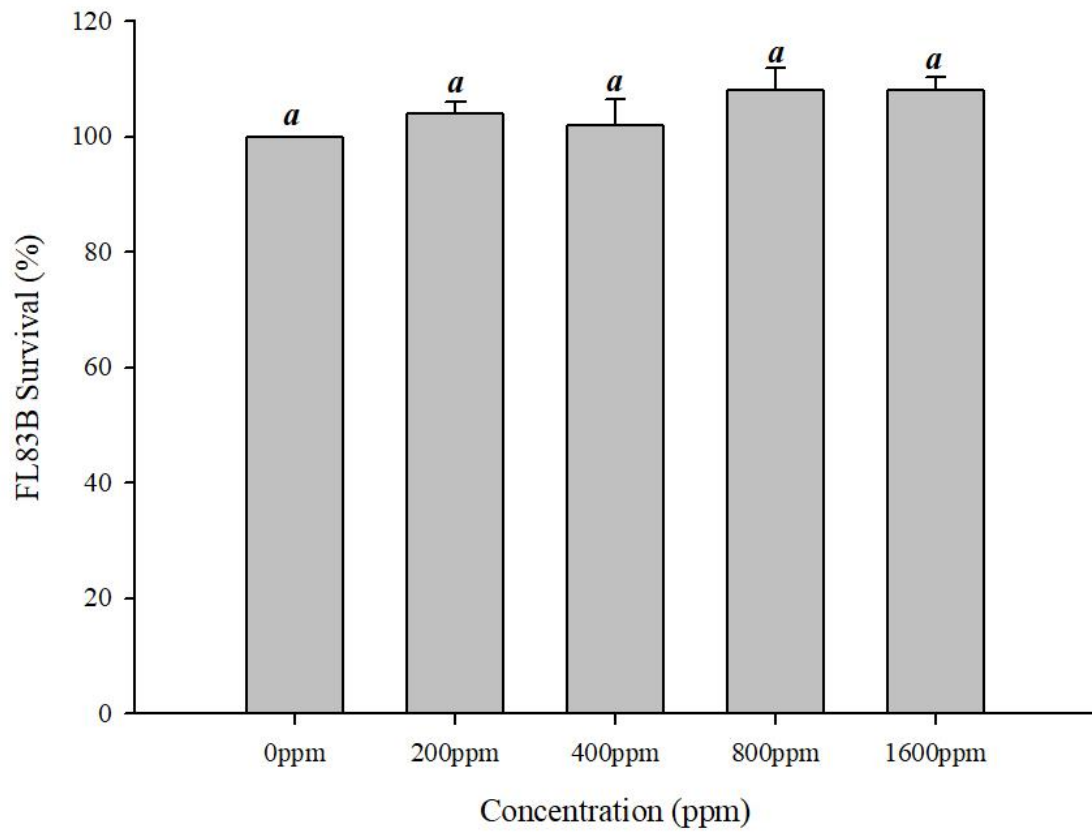
表 三、乳酸菌上清液之殘糖量試驗

Table 3. Residual sugar detection of LAB supernatant

LAB	residual sugar (mg/dl)
F7-4	3.88±0.76
F7-3	4.32±0.48
F2-2	4.30±0.22

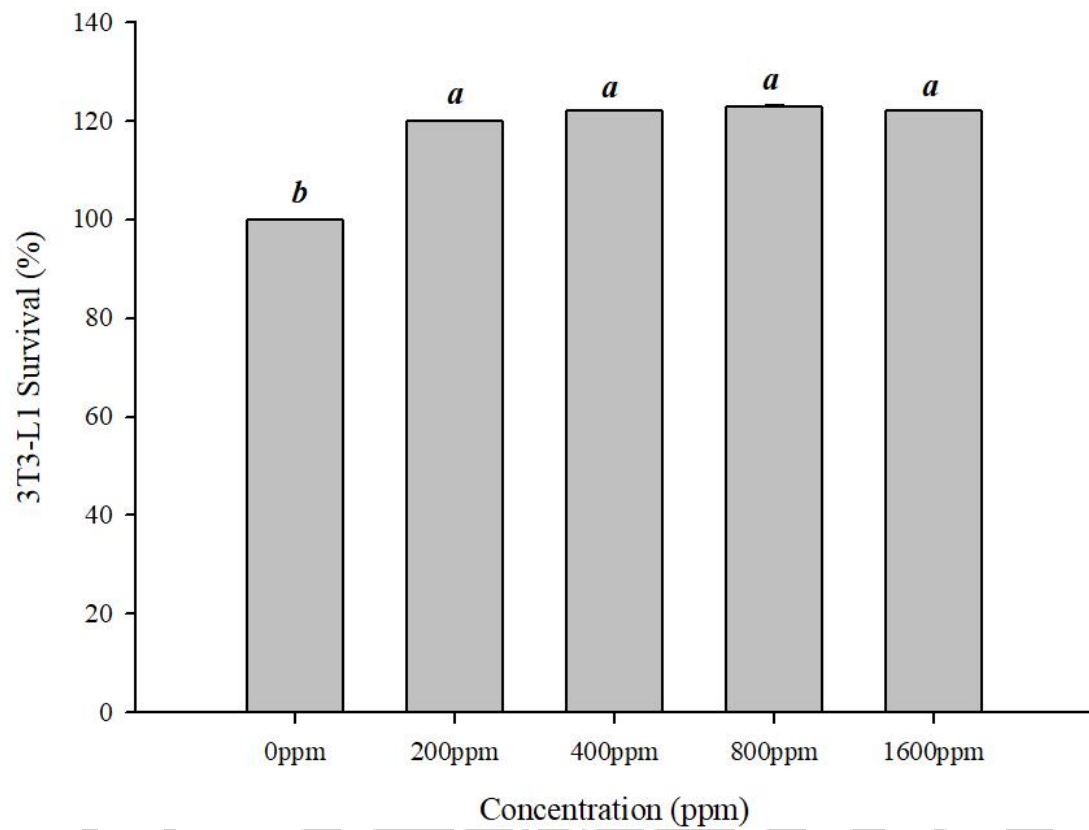
取 1 mL 之乳酸菌上清液加入 1% B 液 (5% Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)及 99% A 液 (1% DNS、1% NaOH 及 0.2% phenol 加 d.dH<sub>2</sub>O 定量至 100 mL)震盪混合,經 100°C 水浴 15 分鐘,再加入 0.5 mL C 液 (67 % 酒石酸鉀鈉)震盪混勻,置於 25°C 水浴 1 分鐘,於 575nm 下偵測其吸光值。MRS 培養基本身已含 2% glucose,而殘糖檢量線則以不同濃度的葡萄糖溶液為標準品,濃度分別為: 0、2、4、6、8、10 mg/mL,藉此標準曲線求得樣品中殘糖量。數據以平均值±標準差表示。





圖二、小鼠肝臟細胞 FL83B 與 F2-2、F7-3、F7-4 混合之發酵培養液共置下之增生活性

Fig. 2. Effects of survival in FL83B with different concentrations of LAB fermentation culture.



圖三、小鼠脂肪細胞 3T3-L1 與 F2-2、F7-3、F7-4 混合之發酵培養液共置下之增生活性

Fig. 3. Effects of different concentrations LAB fermentation broth on cell survival in 3T3-L1.

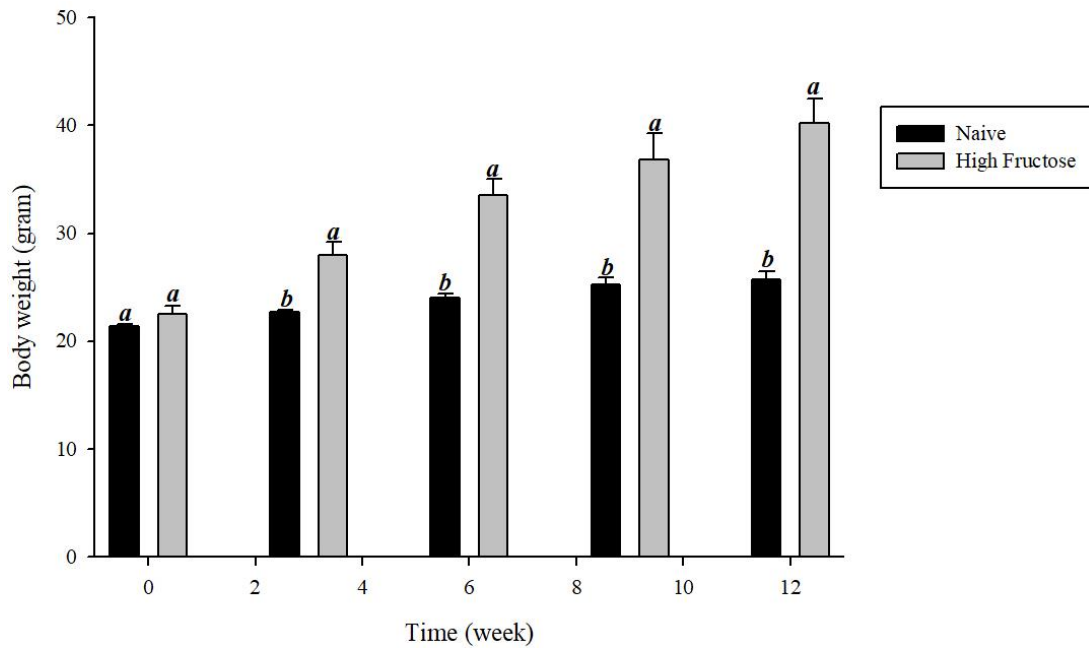


圖 四、高脂高果糖誘導期間胰島素阻抗小鼠之體重變化

Fig. 4. Effects of body weight in high fat and high fructose induced insulin resistance murine model.

在 12 週高脂高果糖誘導期間，紀錄小鼠之體重。空白組：Naive Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：High fructose Group，為以 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別。數據以平均值±標準差 (n = 8) 表示，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

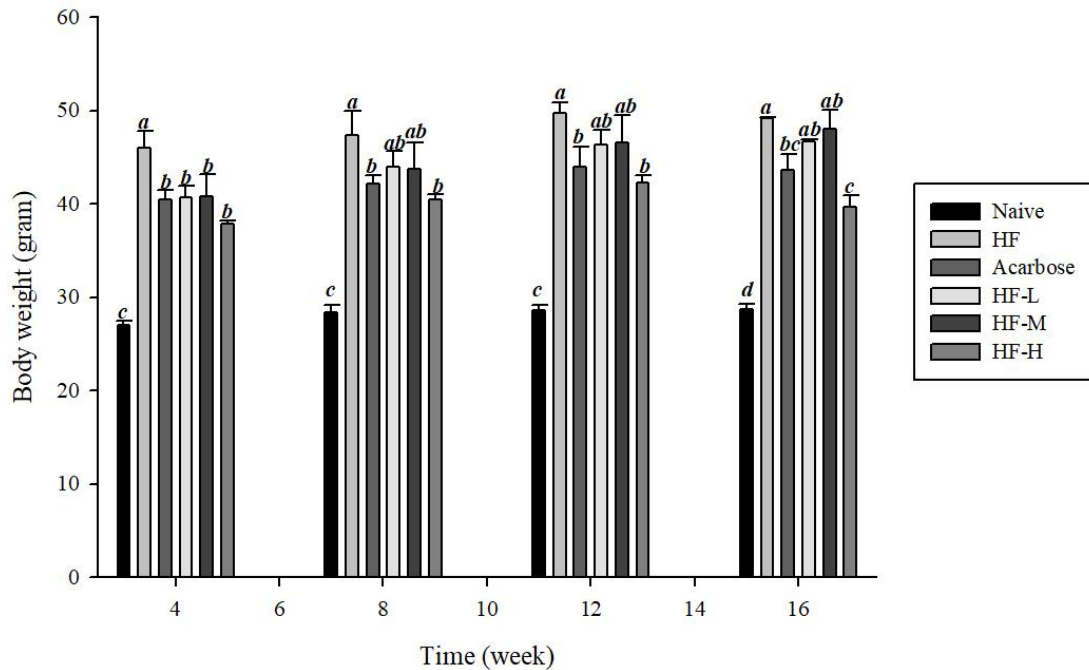
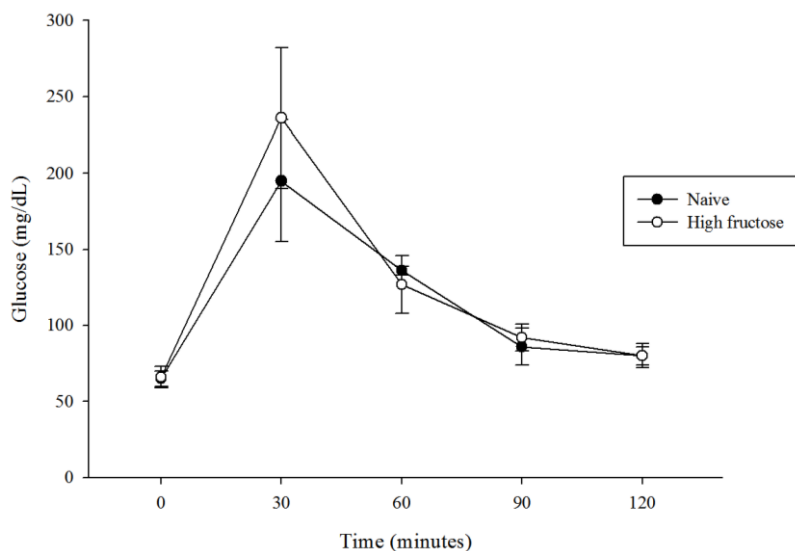


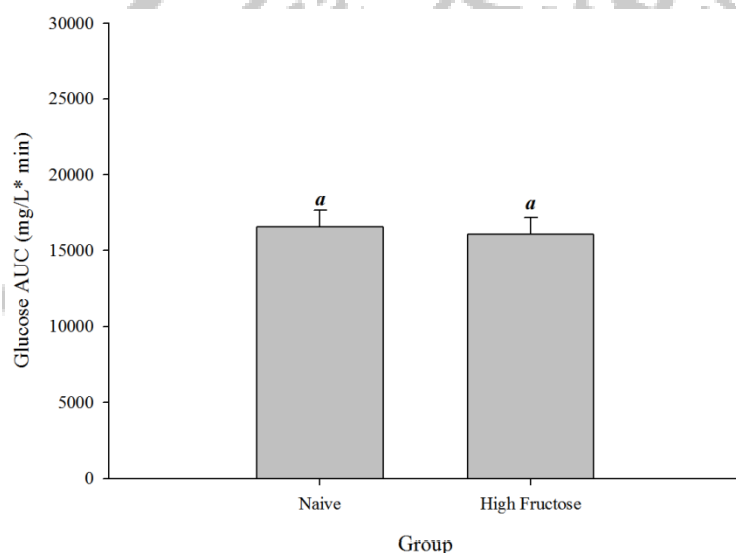
圖 五、乳酸菌對高脂高果糖胰島素阻抗小鼠之體重變化

Fig. 5. Effects of LAB on body weight in high fat and high fructose induced insulin resistance murine model.

在 16 週乳酸菌與藥物管餵期間，紀錄小鼠之體重。空白組：Naive Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 40 mg/kg/day 之 Acarbose 糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^8$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^9$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^{10}$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌。數據以平均值±標準差 (n = 8) 表示，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。



(a)



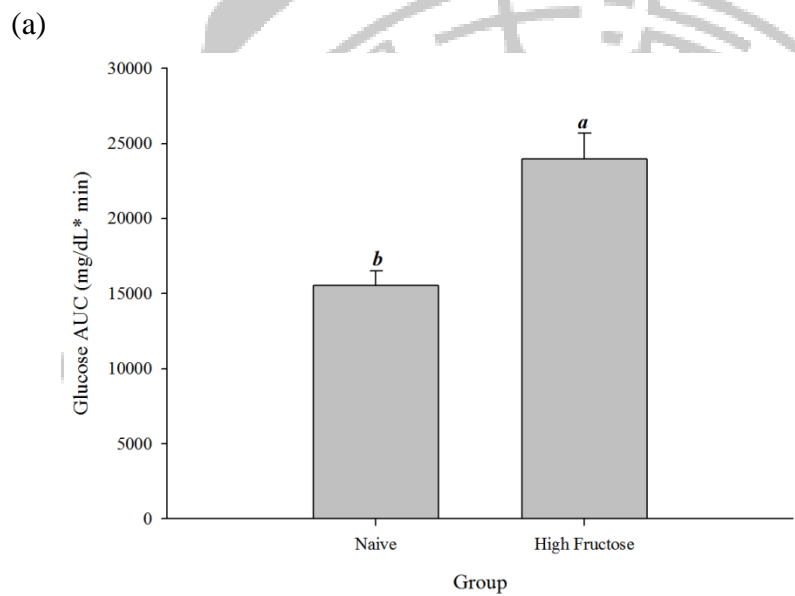
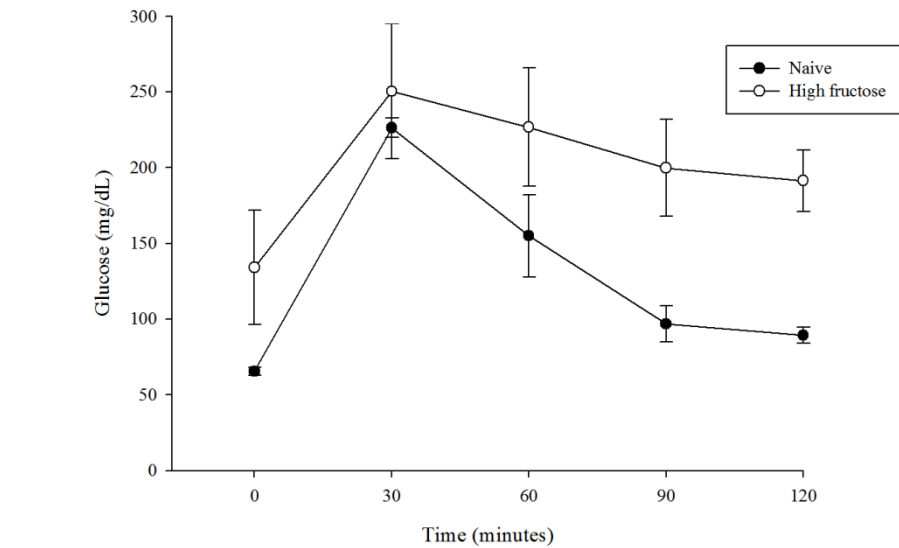
(b)

圖六、未以高脂高果糖誘導胰島素阻抗小鼠口服葡萄糖耐受性試驗及曲線下面積

Fig. 6. Oral glucose tolerance test (OGTT) and area under curve (AUC) of OGTT in Naïve and high fructose groups before high fat and high fructose diet.

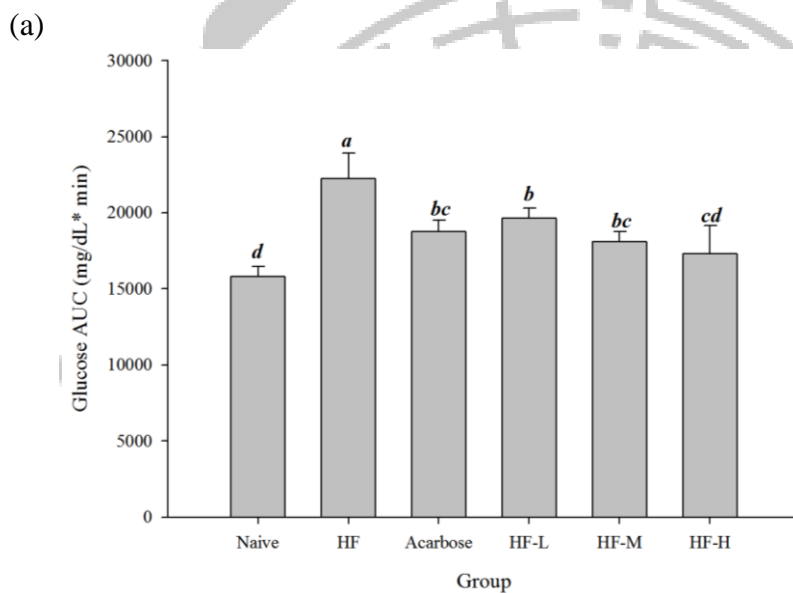
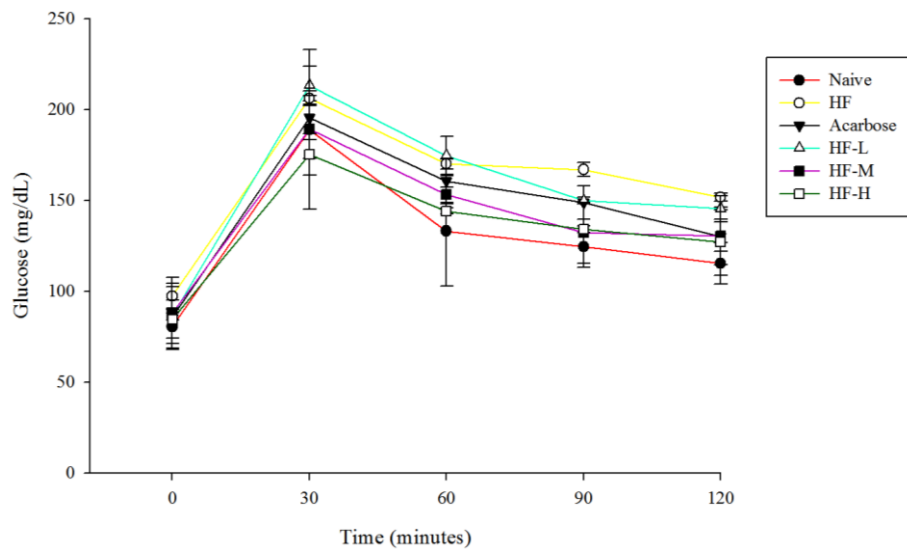
(a) 各組小鼠在試驗前空腹十四小時，管餵給予小鼠葡萄糖 (2.0 g/kg)進行口服葡萄糖耐受性試驗，以尾部採血於0、30、60、90、120分鐘時檢測小鼠之血糖值。  
 (b) 各組小鼠在試驗前空腹十四小時，管餵給予小鼠葡萄糖 (2.0 g/kg)進行口服葡萄糖耐受性試驗，並計算血糖值曲線下面積以量化方式呈現葡萄糖耐受性程度。空白組：Naïve Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：High fructose Group，為預計將以30%糖水與高脂飼料誘導之組別。數據以平均值±標準差 (n=8)表示，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。





(a) 圖 七、誘導九週胰島素阻抗小鼠口服葡萄糖耐受性試驗及曲線下面積  
 Fig. 7. Oral glucose tolerance test (OGTT) and area under curve (AUC) of OGTT in Naïve and high fructose groups after 8 weeks high fat and high fructose diet.

(a) 各組小鼠經高脂高果糖誘導九週後空腹十四小時，管餵給予小鼠葡萄糖 (2.0g/kg)進行口服葡萄糖耐受性試驗，以尾部採血於 0、30、60、90、120 分鐘時檢測小鼠之血糖值。(b) 各組小鼠經高脂高果糖誘導九週後空腹十四小時，管餵給予小鼠葡萄糖 (2.0 g/kg)進行口服葡萄糖耐受性試驗，並計算血糖值曲線下面積以量化方式呈現葡萄糖耐受性程度。空白組：Naïve Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：High fructose Group，為 30%糖水與高脂飼料誘導之組別。數據以平均值±標準差 (n=8)表示，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。



(b)

圖八、乳酸菌對高脂高果糖誘導胰島素阻抗小鼠口服葡萄糖耐受性試驗及曲線下面積之影響

Fig. 8. Effects of LAB on oral glucose tolerance test (OGTT) and area under curve (AUC) in high fructose and high fat diet induced insulin resistance murine model.

(a) 各組小鼠經乳酸菌餵食十三週後空腹十四小時，管餵給予小鼠葡萄糖 (2.0 g/kg)進行口服葡萄糖耐受性試驗，以尾部採血於0、30、60、90、120分鐘時檢測小鼠之血糖值。(b) 各組小鼠經乳酸菌餵食十三週後空腹十四小時，管餵給予小鼠葡萄糖 (2.0 g/kg)進行口服葡萄糖耐受性試驗，並計算血糖值曲線下面積以量化方式呈現葡萄糖耐受性程度。空白組：Naive Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為30%糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予40 mg/kg/day之Acarbose糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 $10^8$  CFU/mouse/day之複合乳酸

菌； HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為 30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^9$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為 30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^{10}$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌。數據以平均值±標準差 (n = 8)表示，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。



表 四、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素阻抗小鼠體重變化量、攝食量、攝水量之影響

Table 4. Effects of LAB on weight gain, food intake and fluid intake in high fructose and high fat diet induced insulin resistance murine model.

Group	Weight gain (g)	Food intake (g/day)	Fluid intake (mL/day)
Naïve	7.25±0.35 <sup>d</sup>	3.66±0.13 <sup>a</sup>	5.95±0.27 <sup>a</sup>
High fructose and high fat diet induced Insulin resistance murine model			
HF	26.61±0.48 <sup>a</sup>	3.41±0.15 <sup>a</sup>	5.86±0.66 <sup>b</sup>
Acarbose	20.99±2.28 <sup>b</sup>	2.94±0.31 <sup>a</sup>	4.91±0.01 <sup>b</sup>
HF-L	23.48±0.46 <sup>b</sup>	3.08±0.21 <sup>a</sup>	5.11±0.00 <sup>b</sup>
HF-M	26.48±0.64 <sup>a</sup>	3.25±0.68 <sup>a</sup>	5.07±0.07 <sup>b</sup>
HF-H	16.95±1.56 <sup>c</sup>	3.31±0.39 <sup>a</sup>	5.15±0.36 <sup>b</sup>

紀錄更換為 30% 高果糖水溶液後至犧牲前，每個禮拜體重與飲食水量，並計算各組總增重及每隻小鼠平均一天攝食與飲水量。空白組：Naïve Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 40 mg/kg/day 之 Acarbose 糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 10<sup>8</sup> CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 10<sup>9</sup> CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 10<sup>10</sup> CFU/mouse/day 之複合乳酸菌。數據以平均值±標準差 (n = 8) 表示，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 (p < 0.05)。

表 五、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素阻抗小鼠中肝臟、脾臟、腎臟及腓腸肌重量之影響

Table 5. Effects of LAB on weight of liver, spleen, kidney and gastrocnemius muscle in high fructose and high fat diet induced insulin resistance murine model.

Group	Liver	Spleen	Kidney	Gastrocnemius muscle
Naïve	1.20±0.12 <sup>d</sup>	0.08±0.01 <sup>c</sup>	0.37±0.03 <sup>c</sup>	0.14±0.05 <sup>a</sup>
High fructose and high fat diet induced Insulin resistance murine model				
HF	2.81±0.20 <sup>a</sup>	0.15±0.04 <sup>a</sup>	0.46±0.04 <sup>a</sup>	0.11±0.08 <sup>a</sup>
Acarbose	1.67±0.32 <sup>c</sup>	0.10±0.02 <sup>bc</sup>	0.40±0.04 <sup>bc</sup>	0.08±0.05 <sup>a</sup>
HF-L	2.18±0.38 <sup>b</sup>	0.11±0.01 <sup>b</sup>	0.41±0.02 <sup>b</sup>	0.15±0.09 <sup>a</sup>
HF-M	2.40±0.39 <sup>b</sup>	0.12±0.01 <sup>b</sup>	0.41±0.02 <sup>b</sup>	0.11±0.06 <sup>a</sup>
HF-H	1.64±0.33 <sup>c</sup>	0.11±0.03 <sup>b</sup>	0.40±0.03 <sup>bc</sup>	0.12±0.06 <sup>a</sup>

各組小鼠經十六週試驗後進行犧牲，採集其肝臟、脾臟、腎臟及腓腸肌以 PBS 沖洗後秤重並記錄。空白組：Naïve Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為 30%糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為 30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 40 mg/kg/day 之 Acarbose 糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為 30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 10<sup>8</sup> CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為 30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 10<sup>9</sup> CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為 30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 10<sup>10</sup> CFU/mouse/day 之複合乳酸菌。數據以平均值±標準差 (n = 8)表示，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 (p < 0.05)。

表六、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素阻抗小鼠中腹脂、附睪脂及腎週脂重量之影響

Table 6. Effects of LAB on weight of abdominal fat, epididymal fat and perirenal fat in high fructose and high fat diet induced insulin resistance murine model.

Group	Abdominal fat	Epididymal fat	Perirenal fat
Naïve	0.40±0.13 <sup>c</sup>	0.02±0.02 <sup>d</sup>	0.13±0.09 <sup>e</sup>
High fructose and high fat diet induced Insulin resistance murine model			
HF	1.42±0.18 <sup>a</sup>	0.48±0.13 <sup>a</sup>	1.37±0.15 <sup>a</sup>
Acarbose	1.21±0.17 <sup>b</sup>	0.26±0.09 <sup>c</sup>	1.03±0.22 <sup>c</sup>
HF-L	1.32±0.18 <sup>ab</sup>	0.42±0.10 <sup>ab</sup>	1.23±0.09 <sup>ab</sup>
HF-M	1.49±0.11 <sup>a</sup>	0.29±0.16 <sup>bc</sup>	1.07±0.13 <sup>bc</sup>
HF-H	1.20±0.17 <sup>b</sup>	0.32±0.07 <sup>bc</sup>	0.65±0.16 <sup>d</sup>

各組小鼠經十六週試驗後進行犧牲，採集其腹脂、附睪脂及腎週脂後秤重並記錄。空白組：Naïve Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為30%糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予40 mg/kg/day之Acarbose糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 $10^8$  CFU/mouse/day之複合乳酸菌；HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 $10^9$  CFU/mouse/day之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 $10^{10}$  CFU/mouse/day之複合乳酸菌。數據以平均值±標準差 (n = 8)表示，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

表 七、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素阻抗小鼠血清中游離脂肪酸、總膽固醇、總三酸甘油酯濃度之影響

Table 7. Effects of LAB on serum free fatty acid (FFA), cholesterol (CHO) and triglycerol (TG) in high fructose and high fat diet induced insulin resistance murine model.

Group	FFA (mmol/L)	CHO (mg/dL)	TG (mg/dL)
Naïve	0.32±0.03 <sup>d</sup>	146.14±20.14 <sup>bc</sup>	53.00±6.98 <sup>b</sup>
High fructose and high fat diet induced Insulin resistance murine model			
HF	0.53±0.06 <sup>a</sup>	190.00±9.90 <sup>a</sup>	63.50±6.24 <sup>a</sup>
Acarbose	0.35±0.03 <sup>d</sup>	146.75±15.65 <sup>bc</sup>	49.20±8.11 <sup>b</sup>
HF-L	0.40±0.04 <sup>c</sup>	155.00±6.06 <sup>bc</sup>	50.67±5.13 <sup>b</sup>
HF-M	0.37±0.02 <sup>cd</sup>	138.25±5.32 <sup>c</sup>	49.00±6.04 <sup>b</sup>
HF-H	0.48±0.01 <sup>b</sup>	165.00±20.66 <sup>b</sup>	50.80±3.56 <sup>b</sup>

各組小鼠經十六週試驗後空腹 14 小時進行犧牲採集血清，並測定血清中 FFA、CHO、TG 含量。空白組：Naïve Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為 30%糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為 30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 40 mg/kg/day 之 Acarbose 糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為 30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 10<sup>8</sup> CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為 30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 10<sup>9</sup> CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為 30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 10<sup>10</sup> CFU/mouse/day 之複合乳酸菌。數據以平均值±標準差 (n = 8)表示，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 (p < 0.05)。

表 八、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素阻抗小鼠血清中高密度及低密度脂蛋白濃度之影響

Table 8. Effects of LAB on serum high-density-lipoprotein (HDL) and low-density-lipoprotein (LDL) in high fructose and high fat diet induced insulin resistance murine model.

Group	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)
Naïve	76.00±1.41 <sup>a</sup>	35.00±2.31 <sup>b</sup>
High fructose and high fat diet induced Insulin resistance murine model		
HF	62.00±10.44 <sup>b</sup>	42.25±5.56 <sup>a</sup>
Acarbose	81.20±6.72 <sup>a</sup>	35.60±6.31 <sup>b</sup>
HF-L	71.00±4.97 <sup>ab</sup>	34.00±2.74 <sup>b</sup>
HF-M	82.75±10.59 <sup>a</sup>	34.67±4.46 <sup>b</sup>
HF-H	77.80±6.91 <sup>a</sup>	35.25±4.57 <sup>b</sup>

各組小鼠經十六週試驗後空腹 14 小時進行犧牲採集血清，並測定血清中 HDL 及 LDL 含量。空白組：Naïve Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為 30%糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為 30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 40 mg/kg/day 之 Acarbose 糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為 30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 10<sup>8</sup> CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為 30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 10<sup>9</sup> CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為 30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 10<sup>10</sup> CFU/mouse/day 之複合乳酸菌。數據以平均值±標準差 (n = 8) 表示，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 (p < 0.05)。



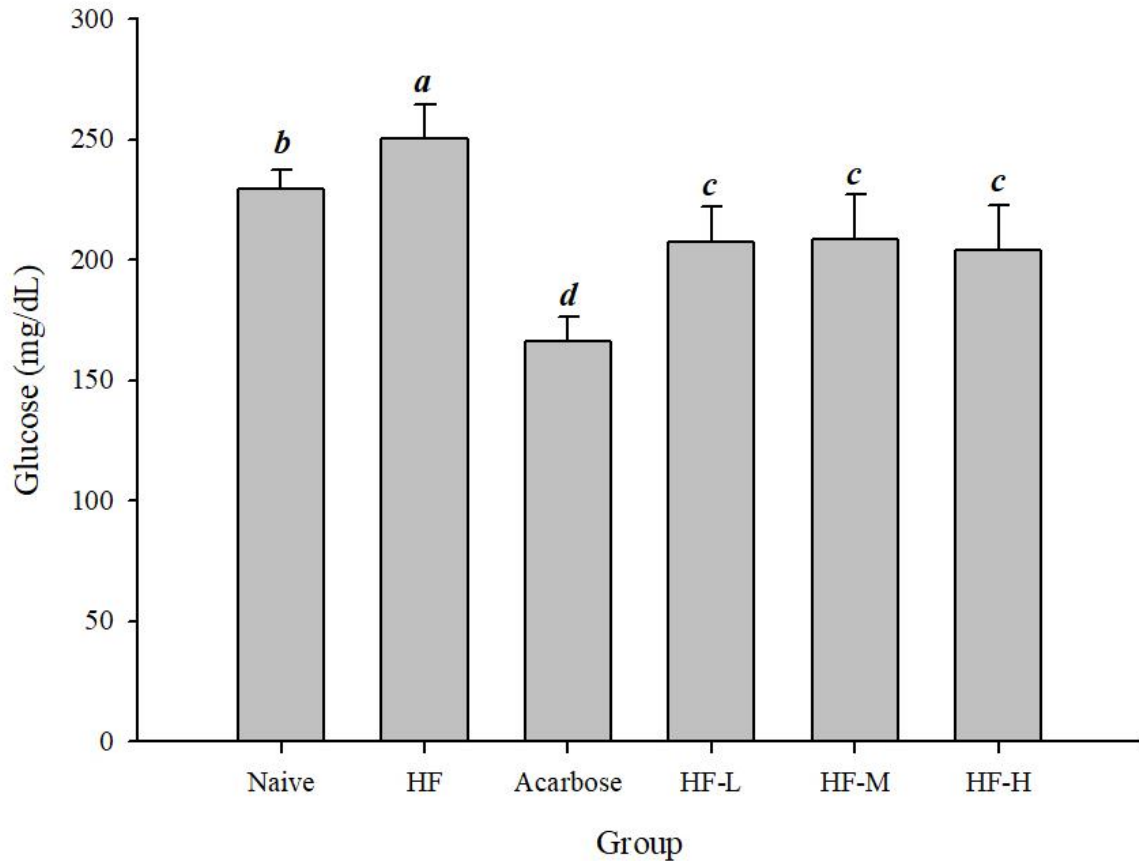


圖 九、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素阻抗小鼠血清血糖值之影響

Fig. 9. Effects of LAB on serum glucose content in high fructose and high fat diet induced insulin resistance murine model.

各組小鼠經十六週試驗後空腹 14 小時進行犧牲採集血清，並測定血清中葡萄糖含量。空白組：Naive Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 40 mg/kg/day 之 Acarbose 糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^8$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^9$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^{10}$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌。數據以平均值±標準差 (n=8) 表示，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

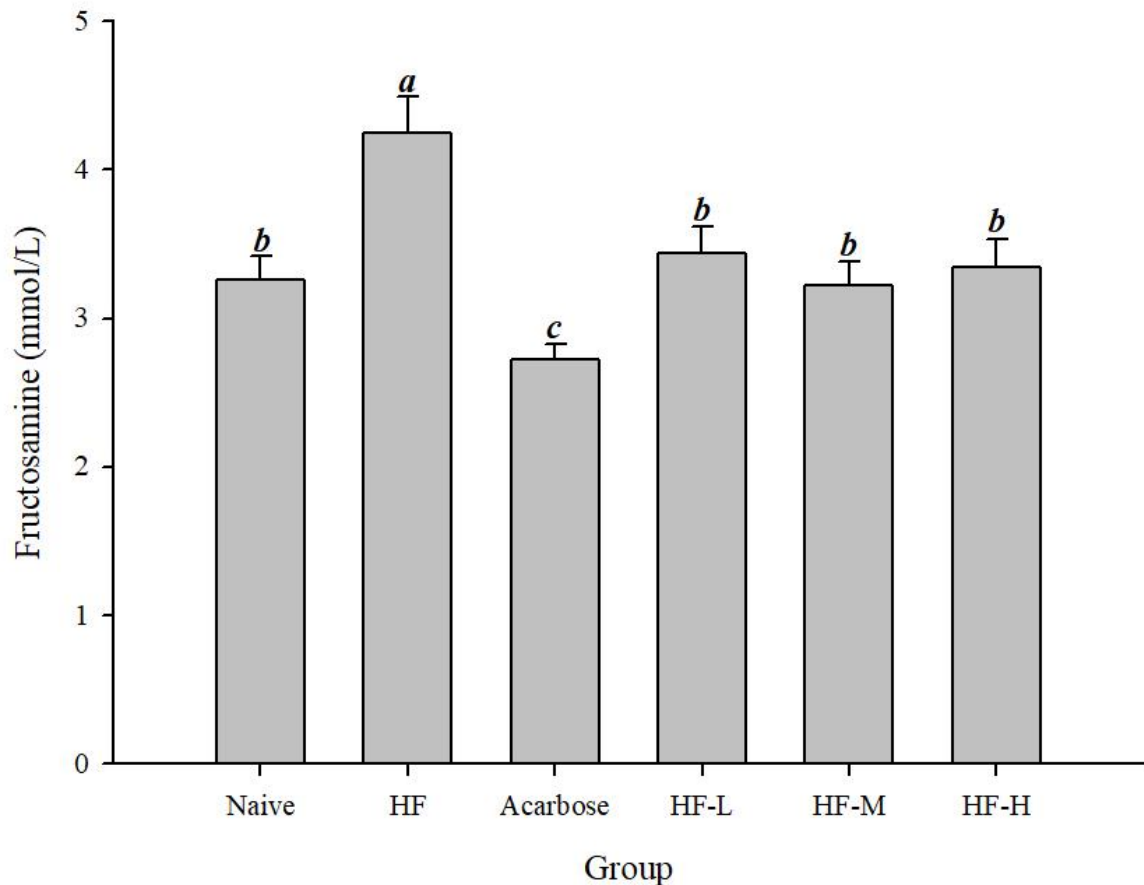


圖 十、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素阻抗小鼠血清果糖胺濃度之影響  
 Fig. 10. Effects of LAB on serum fructosamine concentration in high fructose and high fat diet induced insulin resistance murine model.

各組小鼠經十六週試驗後空腹 14 小時進行犧牲採集血清，並測定血清果糖胺中含量。空白組：Naive Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 40 mg/kg/day 之 Acarbose 糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^8$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^9$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^{10}$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌。數據以平均值±標準差 (n=8) 表示，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

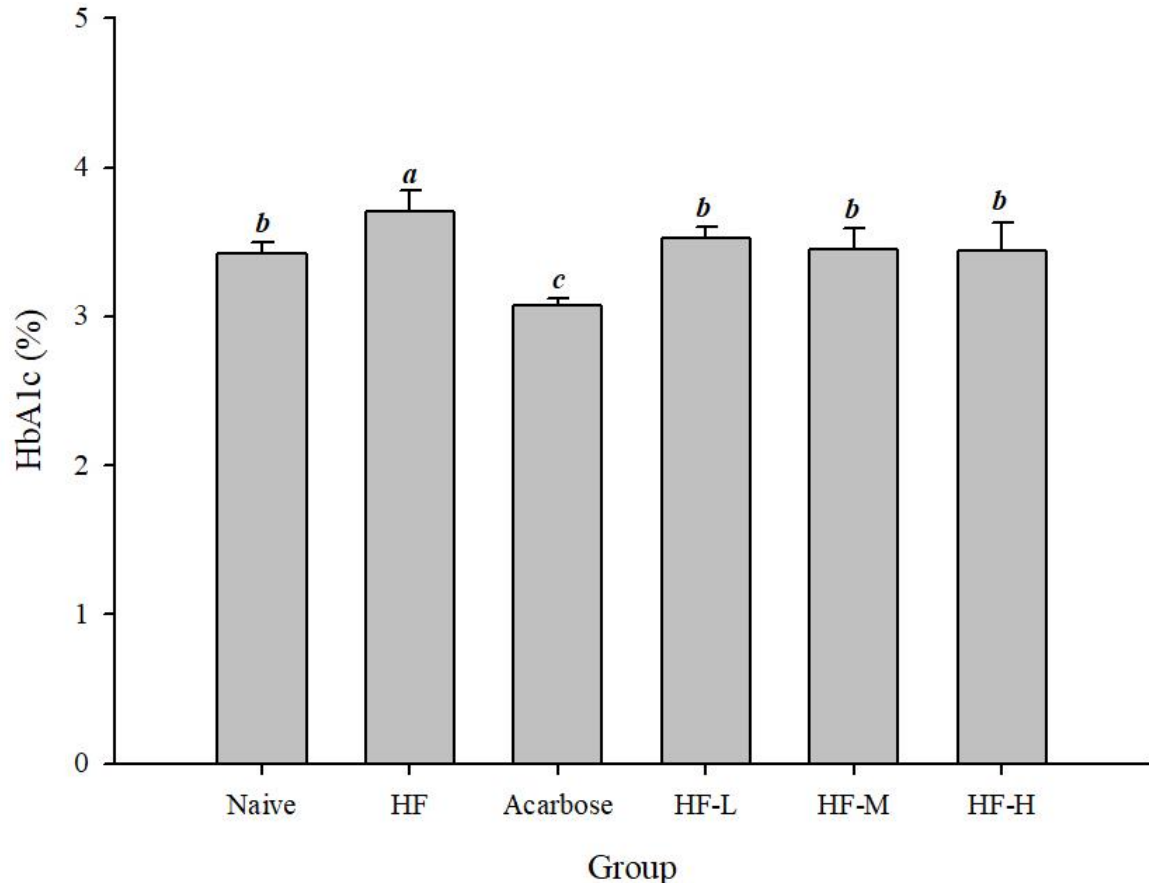


圖 十一、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素阻抗小鼠糖化血色素 (HbA1c)濃度之影響

Fig. 11. Effects of LAB on hemoglobin A1c (HbA1c) concentration in high fructose and high fat diet induced insulin resistance murine model.

各組小鼠經十六週試驗後空腹 14 小時進行犧牲採集血清，並測定血清中糖化血色素含量。空白組：Naive Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為 30%糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為 30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 40 mg/kg/day 之 Acarbose 糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為 30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^8$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為 30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^9$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為 30%糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^{10}$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌。數據以平均值±標準差 (n=8) 表示，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

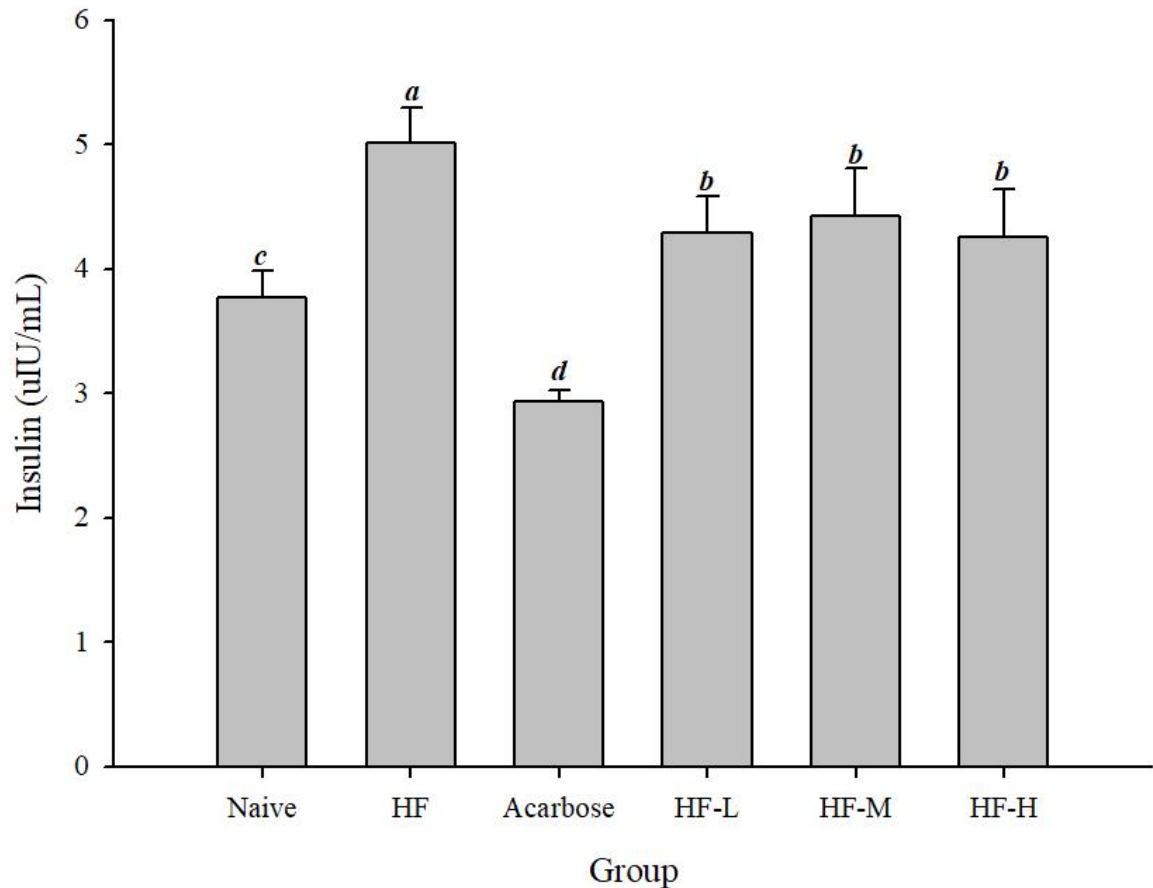


圖 十二、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素阻抗小鼠血清胰島素濃度之影響  
 Fig. 12. Effects of LAB on serum insulin concentration in high fructose and high fat diet induced insulin resistance murine model.

各組小鼠經十六週試驗後空腹 14 小時進行犧牲採集血清，並測定血清中胰島素含量。空白組：Naive Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 40 mg/kg/day 之 Acarbose 糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^8$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^9$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^{10}$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌。數據以平均值±標準差 (n=8) 表示，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

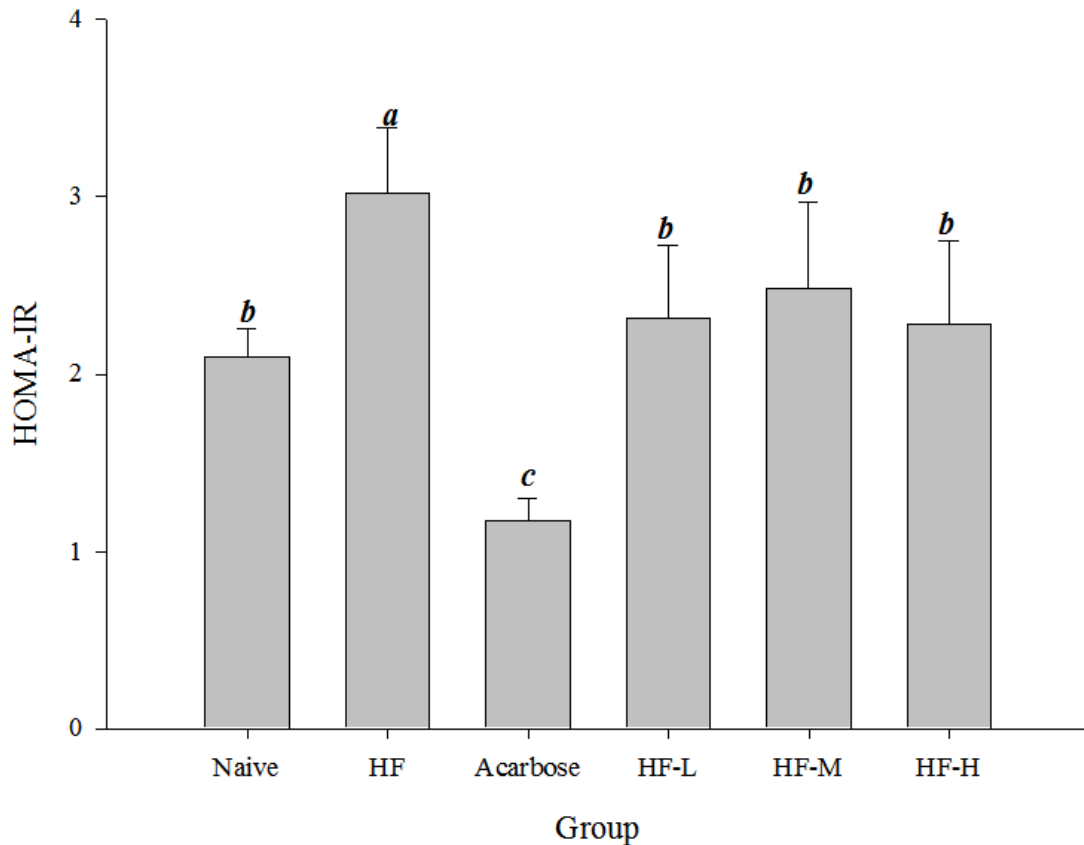


圖 十三、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素阻抗小鼠胰島素阻抗敏感度之間接性指標 (HOMA-IR) 之影響

Fig. 13. Effects of LAB on Homeostatic model assessment insulin resistance (HOMA-IR) in high fructose and high fat diet induced insulin resistance murine model.

各組小鼠經十六週試驗後空腹 14 小時進行犧牲採集血清，測定血清中葡萄糖及胰島素含量，並計算 HOMA-IR 值，公式為：空腹血清胰島素 ( $\mu\text{U/ml}$ )  $\times$  空腹血清葡萄糖 ( $\text{mmol/l}$ )/22.5。空白組：Naive Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 40 mg/kg/day 之 Acarbose 糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^8$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^9$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^{10}$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌。數據以平均值  $\pm$  標準差 ( $n = 8$ ) 表示，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

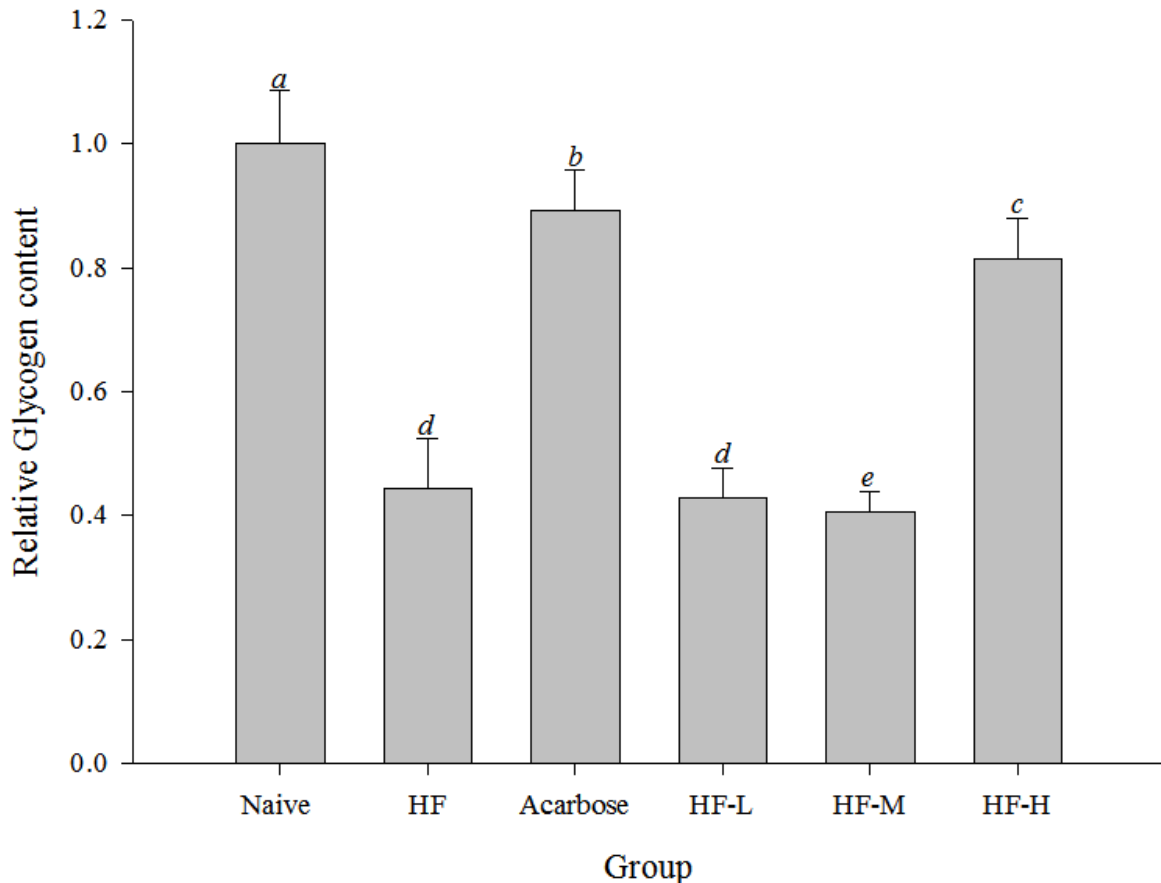


圖 十四、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素阻抗小鼠肝醣含量之影響

Fig. 14. Effects of LAB on glycogen content in high fructose and high fat diet induced insulin resistance murine model.

在各組小鼠犧牲後，取其肝臟抽取肝醣，並測定其含量。空白組：Naive Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 40 mg/kg/day 之 Acarbose 糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^8$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^9$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^{10}$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌。數據以平均值±標準差 (n = 8) 表示，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

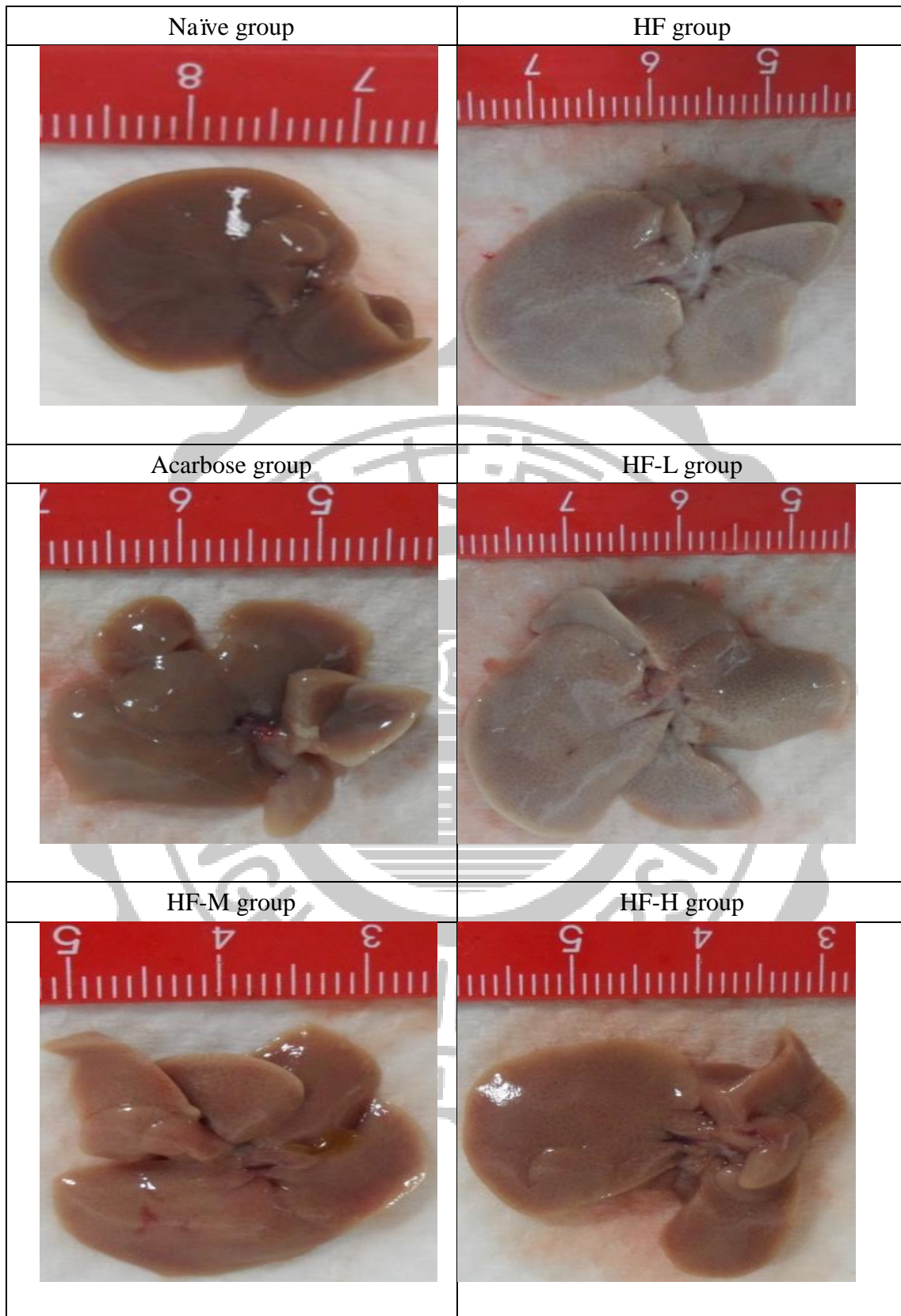


圖 十五、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素阻抗小鼠肝臟外觀病理型態之影響  
 Fig. 15. Effects of LAB on hepatic patterns in high fructose and high fat diet induced insulin resistance murine model.

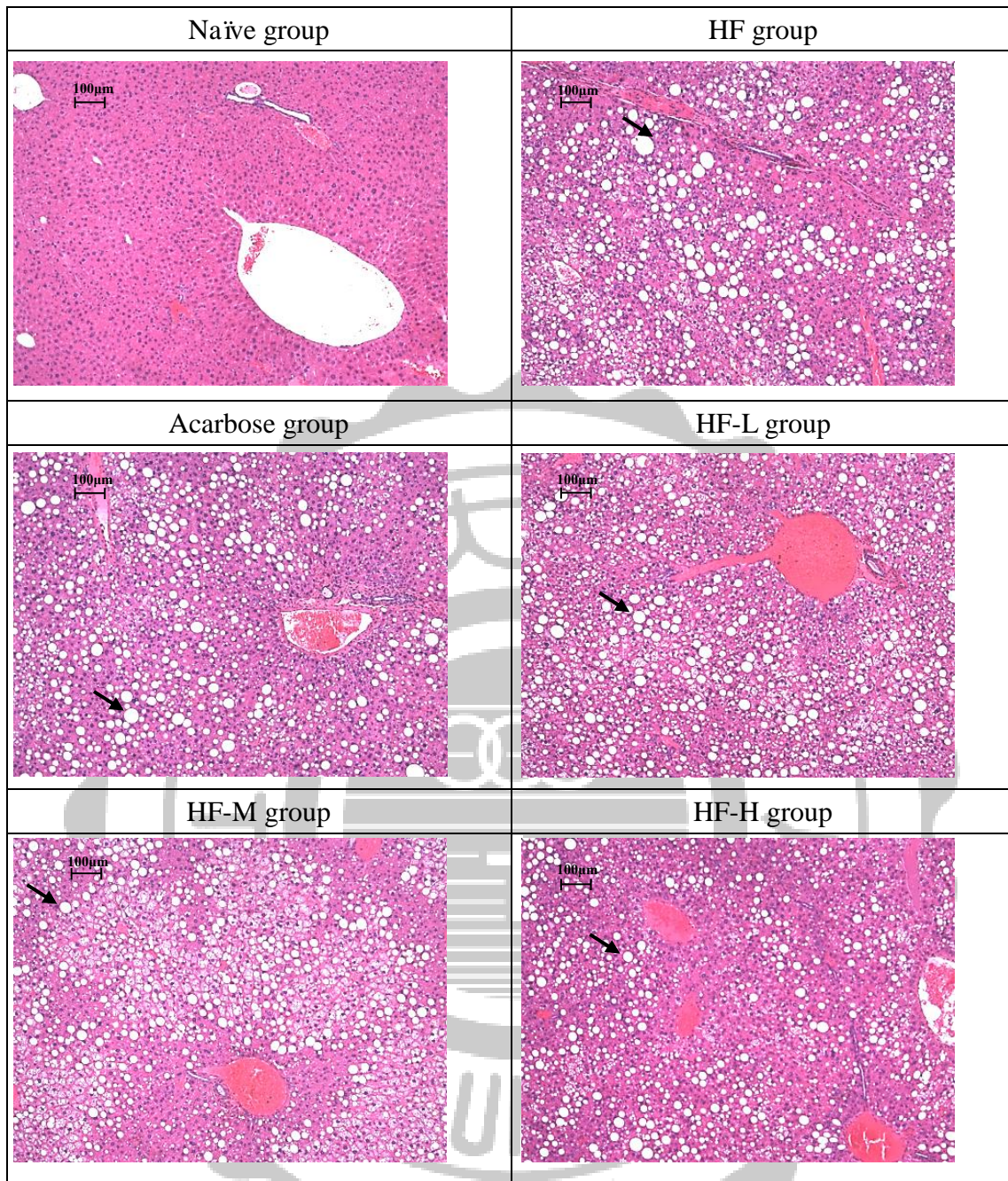


圖 十六、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素阻抗小鼠肝臟蘇木紫與伊紅染色 (100x)之影響

Fig. 16. Effects of LAB on hematoxylin and eosin stain of hepatic patterns (100x) in high fructose and high fat diet induced insulin resistance murine model.

\*箭號所指為肝臟中脂肪空泡



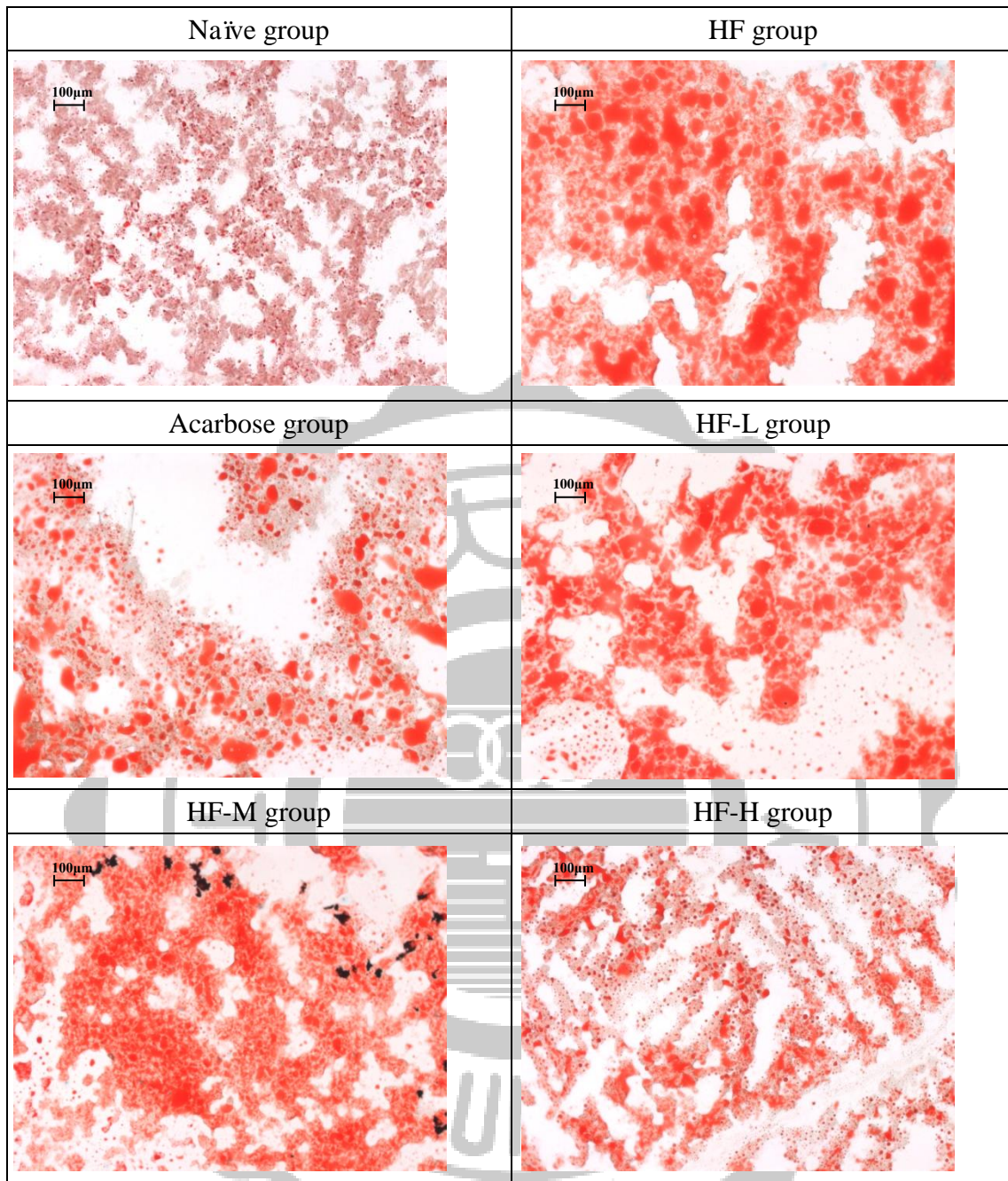


圖 十七、乳酸菌發酵液對高果糖誘導胰島素阻抗小鼠肝臟油紅染色 (200x) 之影響

Fig. 17. Effects of LAB on oil red stain of hepatic patterns (200x) in high fructose and high fat diet induced insulin resistance murine model.

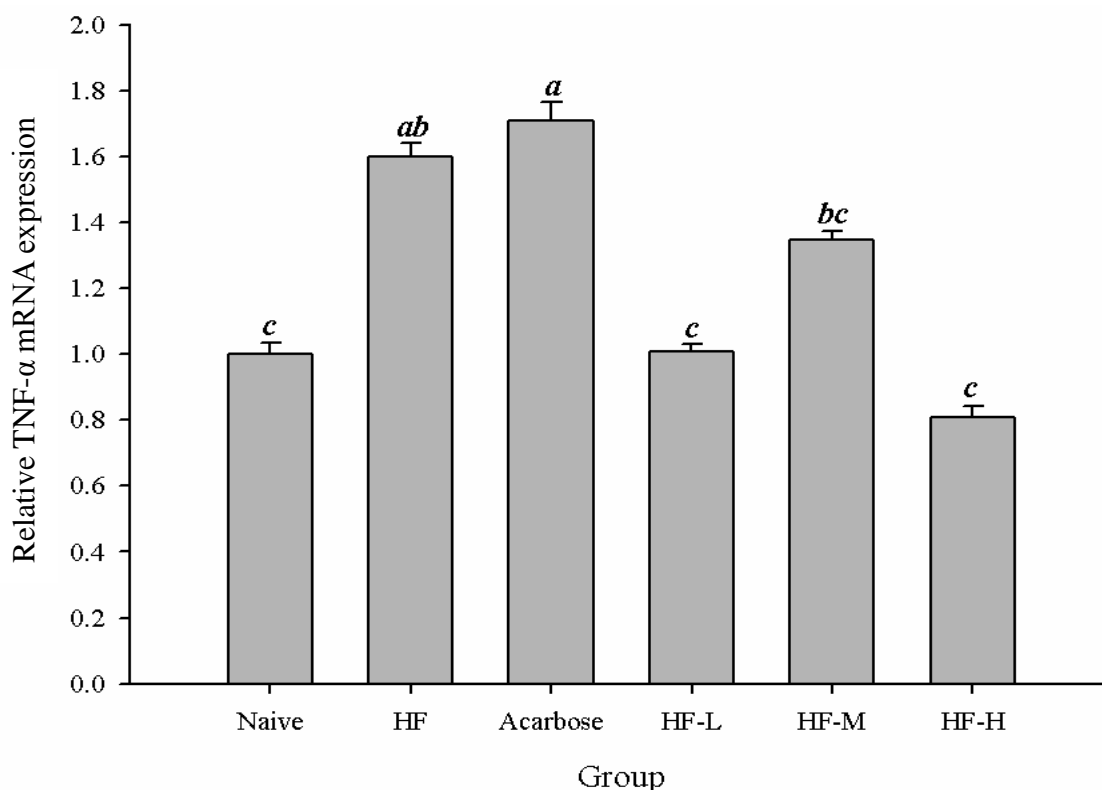


圖 十八、小鼠腹脂中腫瘤壞死因子 (TNF- $\alpha$ ) mRNA 之基因相對表現量  
 Fig. 18. Relative mRNA expression of Tumor necrosis factor alpha in abdominal fat.

各組別之小鼠犧牲後，取其腹脂抽取 RNA 反轉錄為 cDNA，再以同步定量聚合酶鏈鎖反應測量其目標基因 TNF- $\alpha$  mRNA 含量，並使用  $\beta$ -actin mRNA 含量作為內部對照，校正檢體之差異，校正後以相對表現量表示目標基因表現量。所有數值均重複兩次，並以 1.5% 的洋菜瓊脂膠確認同步定量聚合酶鏈鎖反應之產物為專一性產物。空白組：Naive Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 40 mg/kg/day 之 Acarbose 糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^8$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^9$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^{10}$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌。各組之目標基因表現於校正後，數據以平均相對量 $\pm$ 標準差 (n=8) 表示，所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

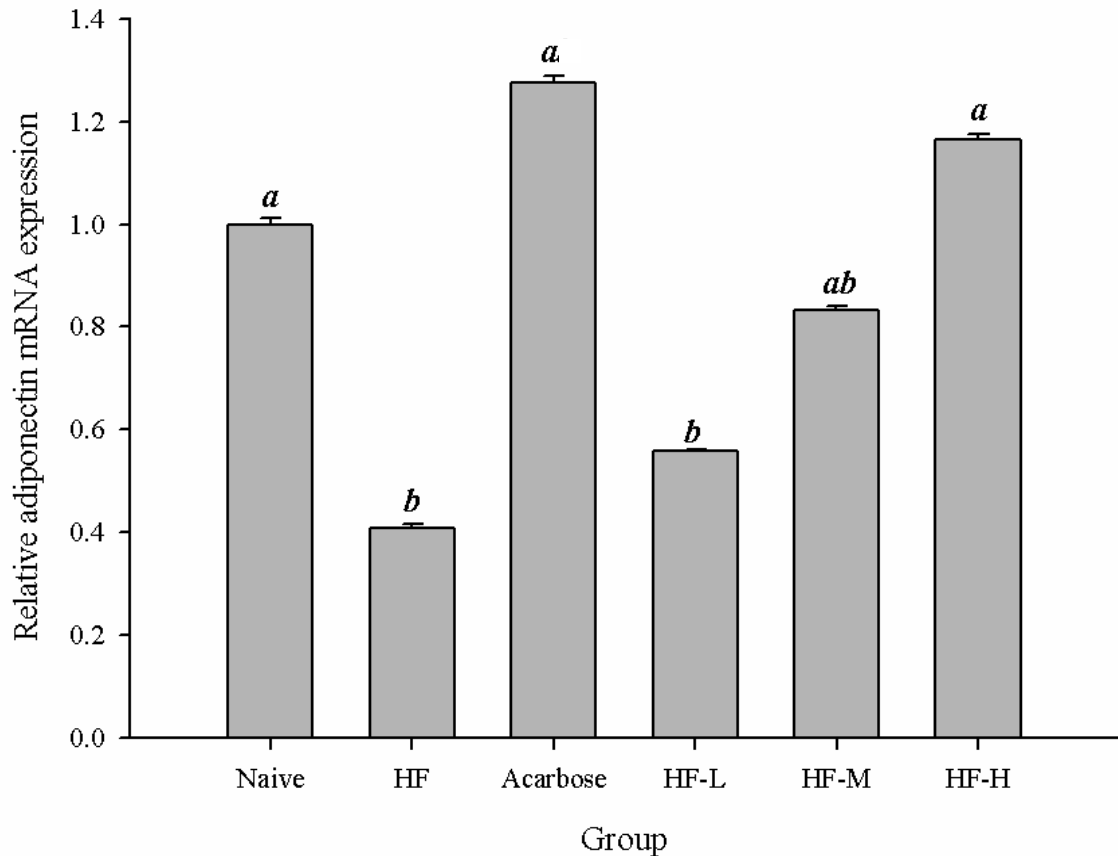
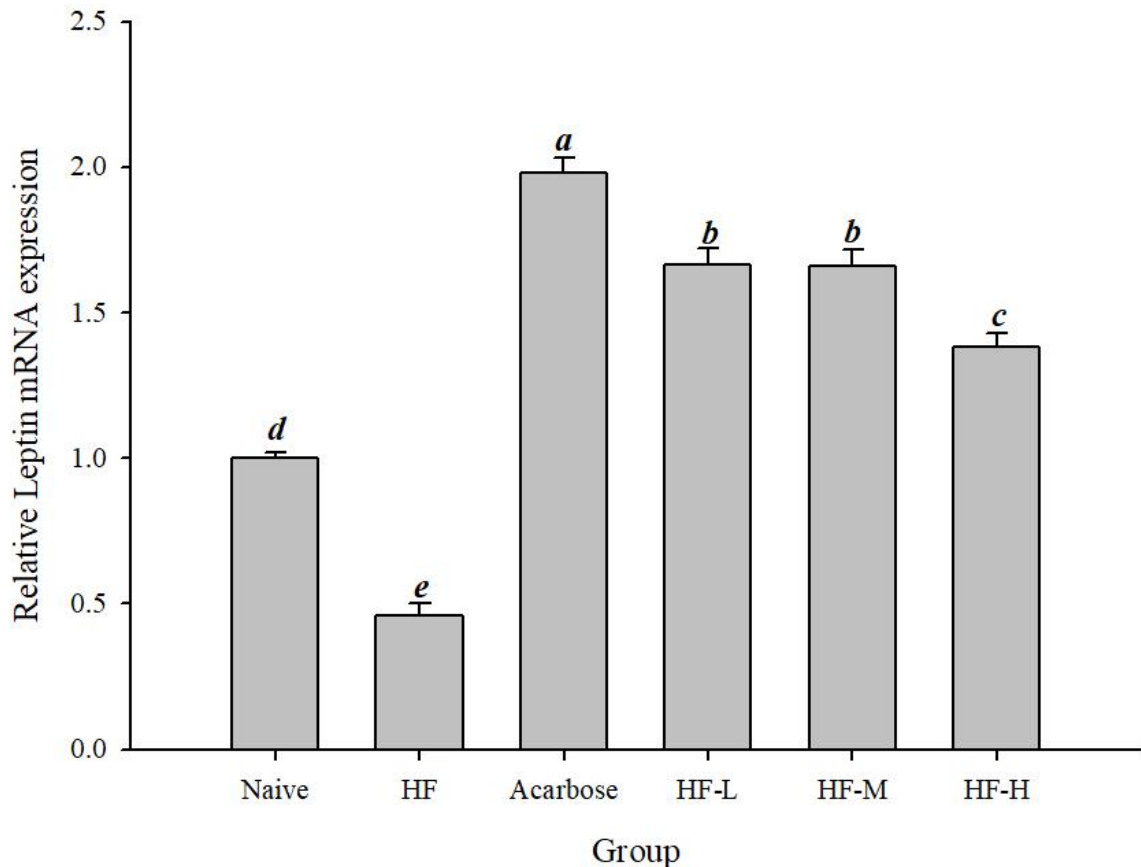


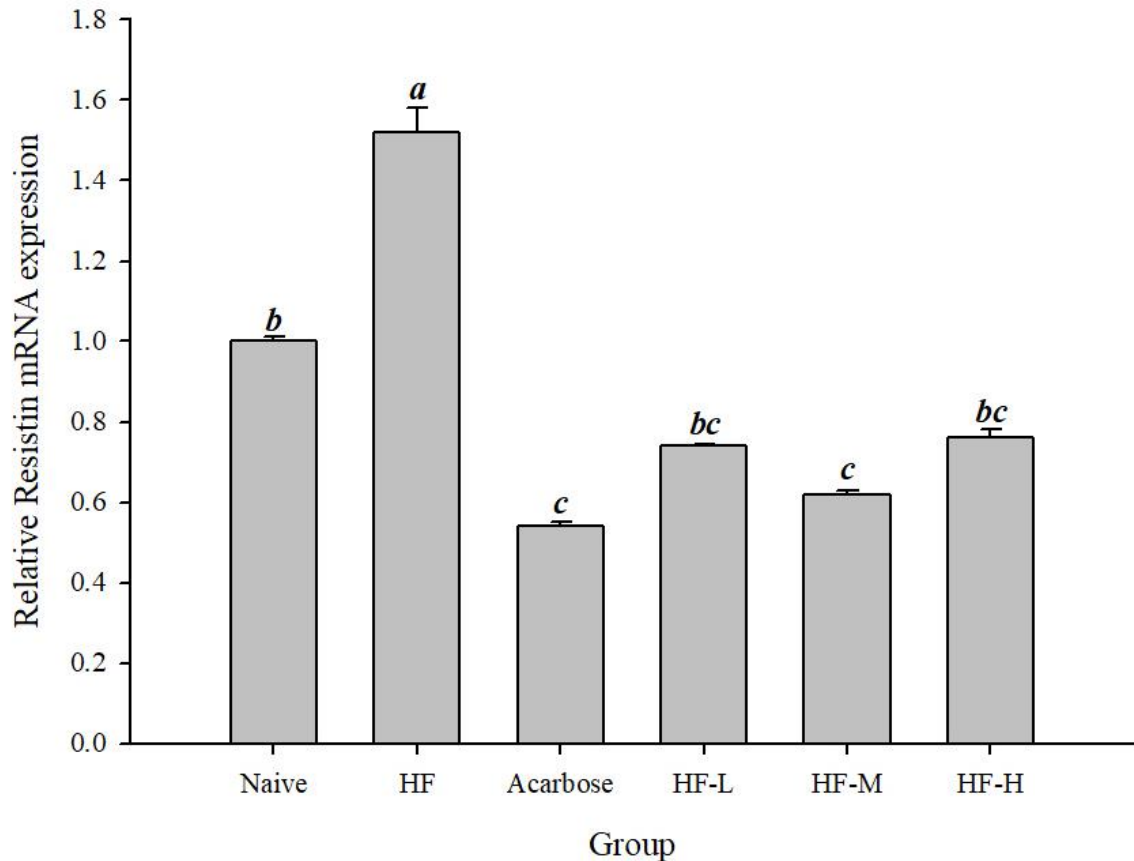
圖 十九、小鼠腹脂中脂聯素 (Adiponectin) mRNA 之基因相對表現量  
 Fig. 19. Relative mRNA expression of Adiponectin in abdominal fat.

各組別之小鼠犧牲後，取其腹脂抽取 RNA 反轉錄為 cDNA，再以同步定量聚合酶鏈鎖反應測量其目標基因 adiponectin mRNA 含量，並使用  $\beta$ -actin mRNA 含量作為內部對照，校正檢體之差異，校正後以相對表現量表示目標基因表現量。所有數值均重複兩次，並以 1.5% 的洋菜瓊脂膠確認同步定量聚合酶鏈鎖反應之產物為專一性產物。空白組：Naive Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 40 mg/kg/day 之 Acarbose 糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^8$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^9$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^{10}$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌。各組之目標基因表現於校正後，數據以平均相對量 $\pm$ 標準差 (n=8) 表示，所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。



圖二十、小鼠腹脂中瘦素 (Leptin) mRNA 之基因相對表現量  
 Fig. 20. Relative mRNA expression of Lepin in abdominal fat.

各組別之小鼠犧牲後，取其腹脂抽取 RNA 反轉錄為 cDNA，再以同步定量聚合酶鏈鎖反應測量其目標基因 Leptin mRNA 含量，並使用  $\beta$ -actin mRNA 含量作為內部對照，校正檢體之差異，校正後以相對表現量表示目標基因表現量。所有數值均重複兩次，並以 1.5% 的洋菜瓊脂膠確認同步定量聚合酶鏈鎖反應之產物為專一性產物。空白組：Naive Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 40 mg/kg/day 之 Acarbose 糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^8$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^9$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^{10}$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌。各組之目標基因表現於校正後，數據以平均相對量 $\pm$ 標準差 (n = 8) 表示，所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。



圖二十一、小鼠腹脂中抗素 (Resistin) mRNA 之基因相對表現量  
 Fig. 21. Relative mRNA expression of Resistin in abdominal fat.

各組別之小鼠犧牲後，取其腹脂抽取 RNA 反轉錄為 cDNA，再以同步定量聚合酶鏈鎖反應測量其目標基因 Resistin mRNA 含量，並使用  $\beta$ -actin mRNA 含量作為內部對照，校正檢體之差異，並以 1.5% 的洋菜瓊脂膠確認同步定量聚合酶鏈鎖反應之產物為專一性產物。空白組：Naive Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 40 mg/kg/day 之 Acarbose 糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^8$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^9$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^{10}$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌。各組之目標基因表現於校正後，數據以平均相對量 $\pm$ 標準差 (n=8) 表示，所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

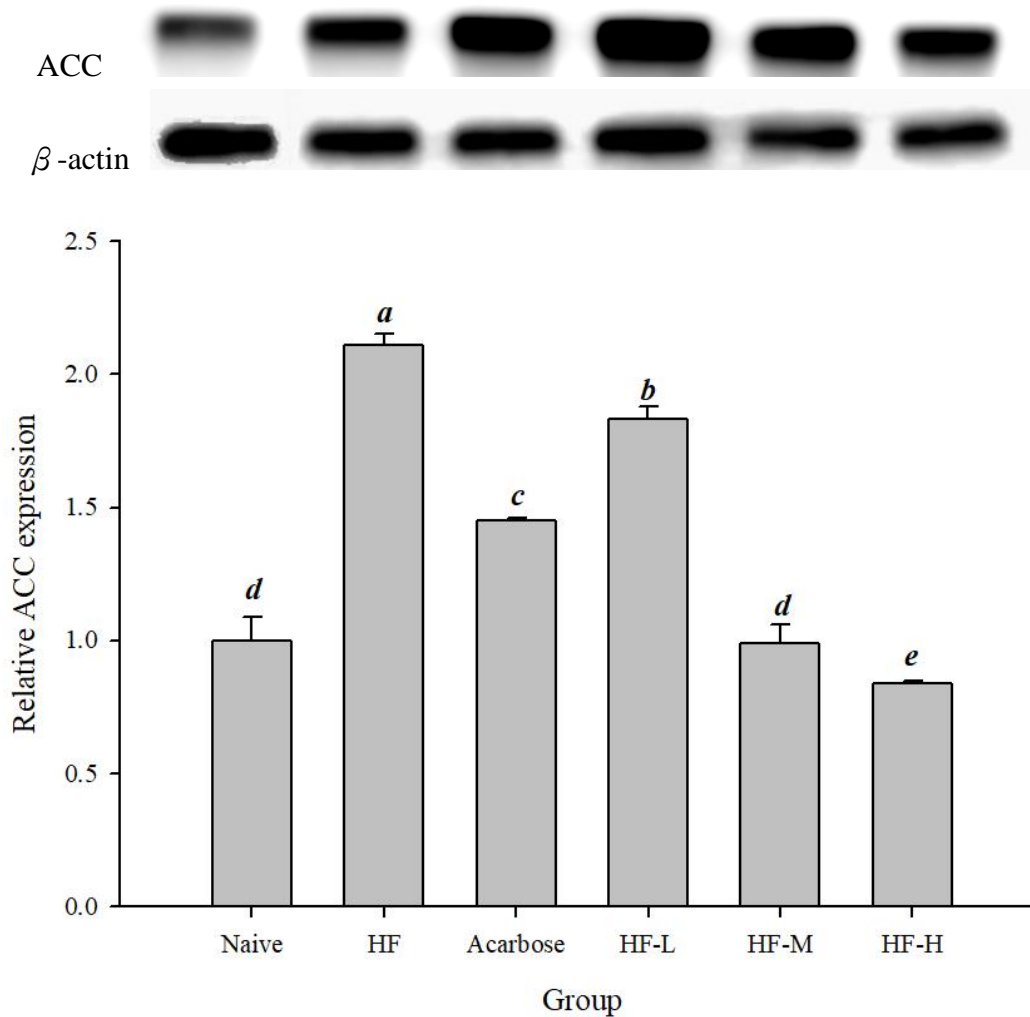
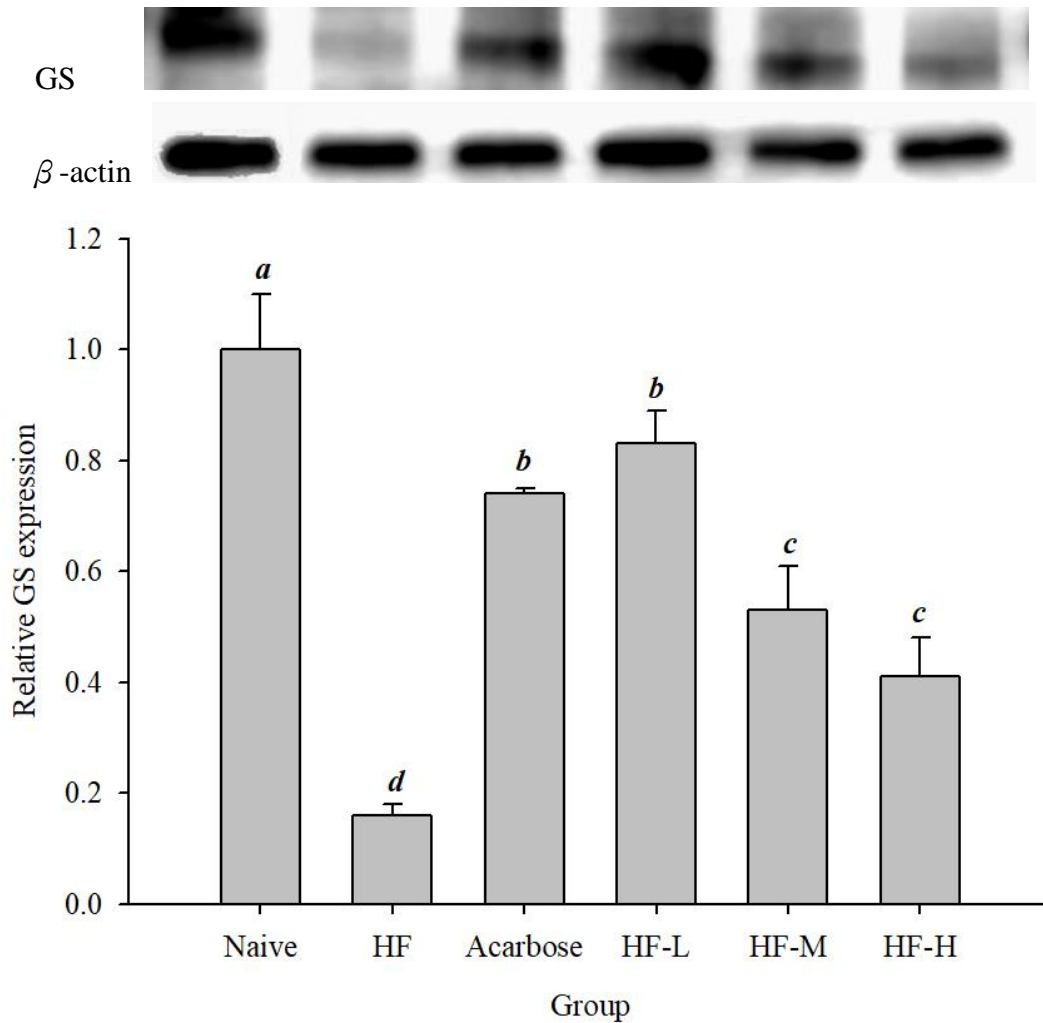


圖 二十二、肝臟中乙醯輔酶 A 羧化酶 (ACC) 蛋白質相對表現量

Fig. 22. Relative protein expression of Acetyl-CoA carboxylase in liver.

將肝臟蛋白質萃取後定量，取  $20 \mu\text{g}$  蛋白質進行西方轉漬法，分析 AKT 的蛋白質相對表現量，且以  $\beta$ -actin 蛋白質作為內部對照。空白組：Naive Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $40 \text{ mg/kg/day}$  之 Acarbose 糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^8$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^9$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^{10}$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌。數據以平均相對量 $\pm$ 標準差 ( $n = 8$ ) 表示，所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。



圖二十三、肝臟中肝糖合成酶 (GS) 蛋白質相對表現量

Fig. 23. Relative protein expression of Glycogen Synthase in liver.

將肝臟蛋白質萃取後定量，取  $20 \mu\text{g}$  蛋白質進行西方轉漬法，分析 AKT 的蛋白質相對表現量，且以  $\beta$ -actin 蛋白質作為內部對照。空白組：Naive Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $40 \text{ mg/kg/day}$  之 Acarbose 糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^8 \text{ CFU/mouse/day}$  之複合乳酸菌；HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^9 \text{ CFU/mouse/day}$  之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^{10} \text{ CFU/mouse/day}$  之複合乳酸菌。數據以平均相對量  $\pm$  標準差 ( $n = 8$ ) 表示，所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

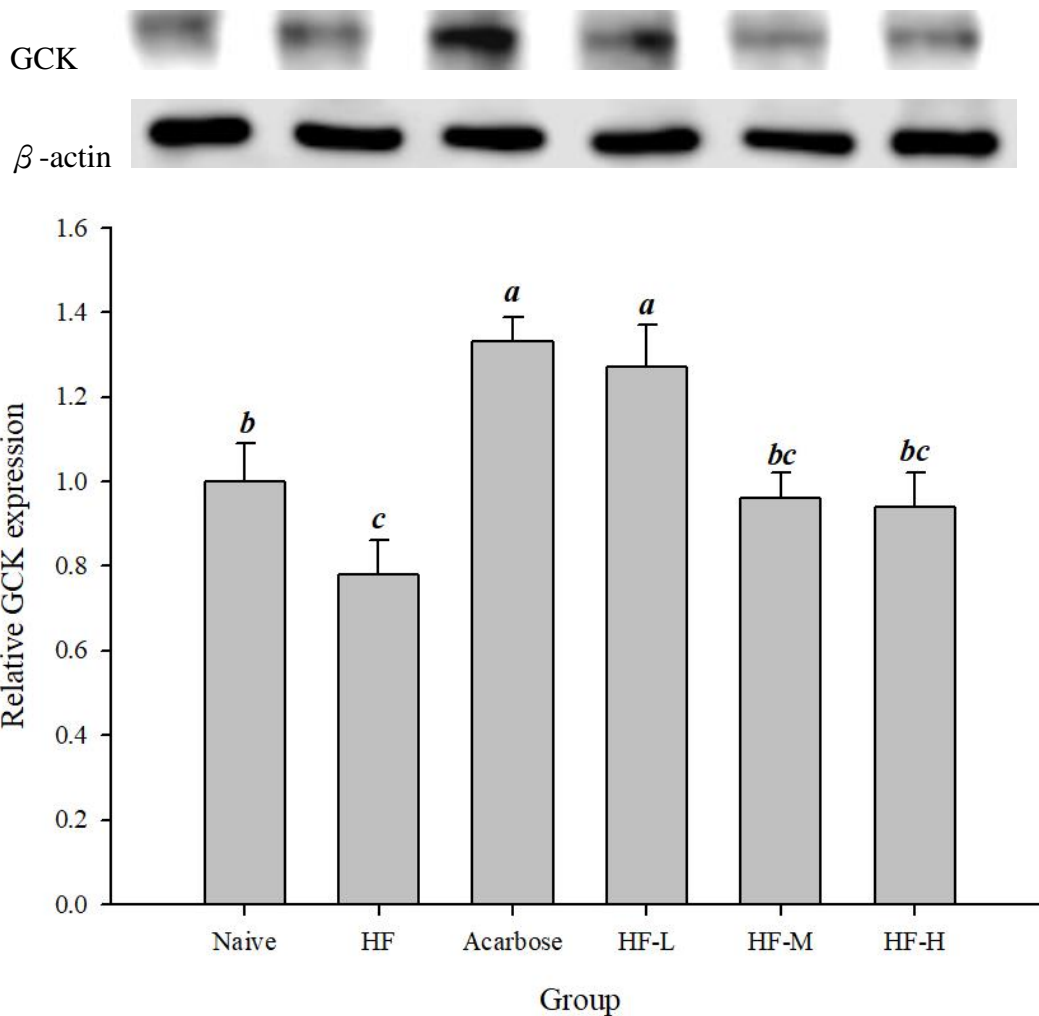


圖 二十四、肝臟中葡萄糖激酶 (GCK)蛋白質相對表現量

Fig. 24. Relative protein expression of Glucokinase in liver.

將肝臟蛋白質萃取後定量，取  $20 \mu\text{g}$  蛋白質進行西方轉漬法，分析 AKT 的蛋白質相對表現量，且以  $\beta$ -actin 蛋白質作為內部對照。空白組：Naive Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $40 \text{ mg/kg/day}$  之 Acarbose 糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^8$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^9$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^{10}$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌。數據以平均相對量 $\pm$ 標準差 ( $n = 8$ ) 表示，所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。



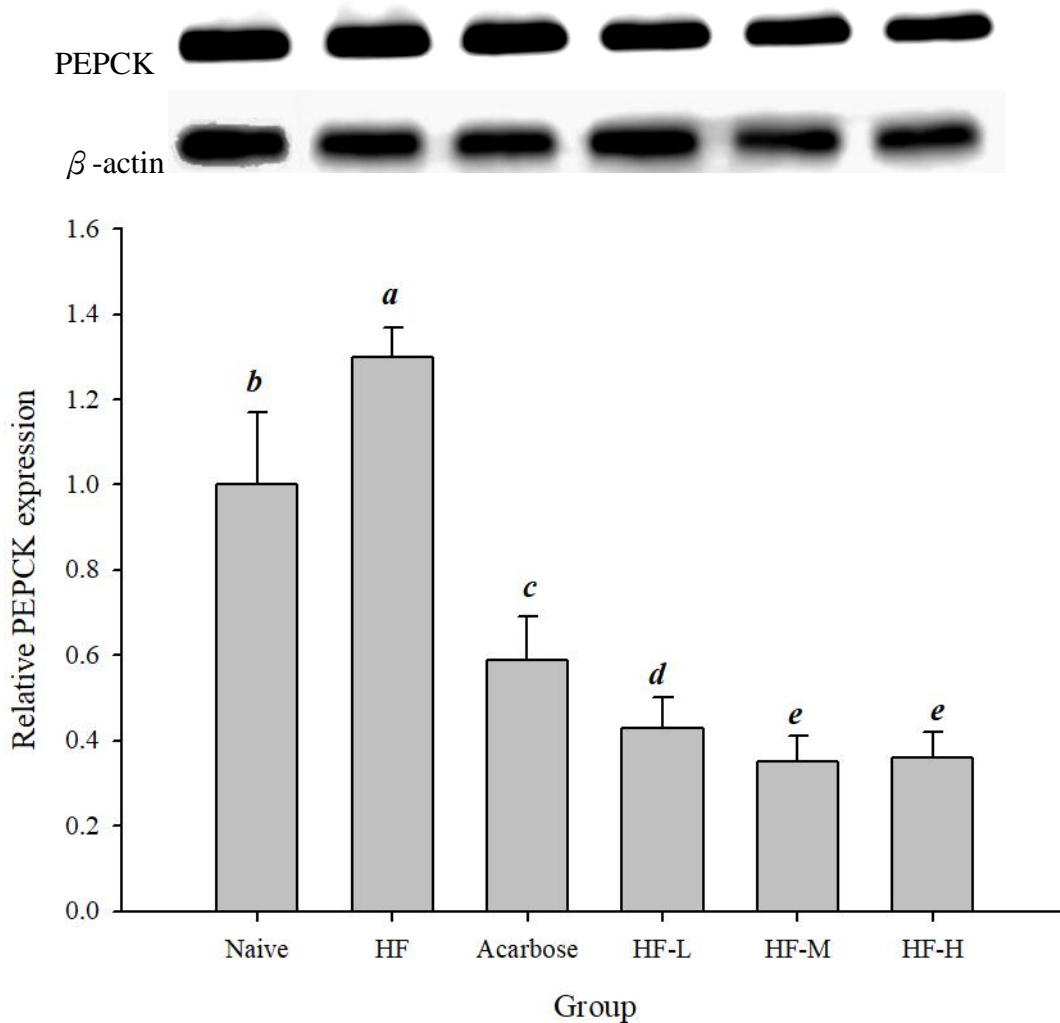


圖 二十五、肝臟中磷酸烯醇丙酮酸羧化激酶 (PEPCK) 蛋白質相對表現量  
 Fig. 25. Relative protein expression of Phosphoenolpyruvate carboxykinase in liver.

將肝臟蛋白質萃取後定量，取  $20 \mu\text{g}$  蛋白質進行西方轉漬法，分析 AKT 的蛋白質相對表現量，且以  $\beta$ -actin 蛋白質作為內部對照。空白組：Naive Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $40 \text{ mg/kg/day}$  之 Acarbose 糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^8$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^9$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^{10}$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌。數據以平均相對量 $\pm$ 標準差 ( $n = 8$ ) 表示，所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

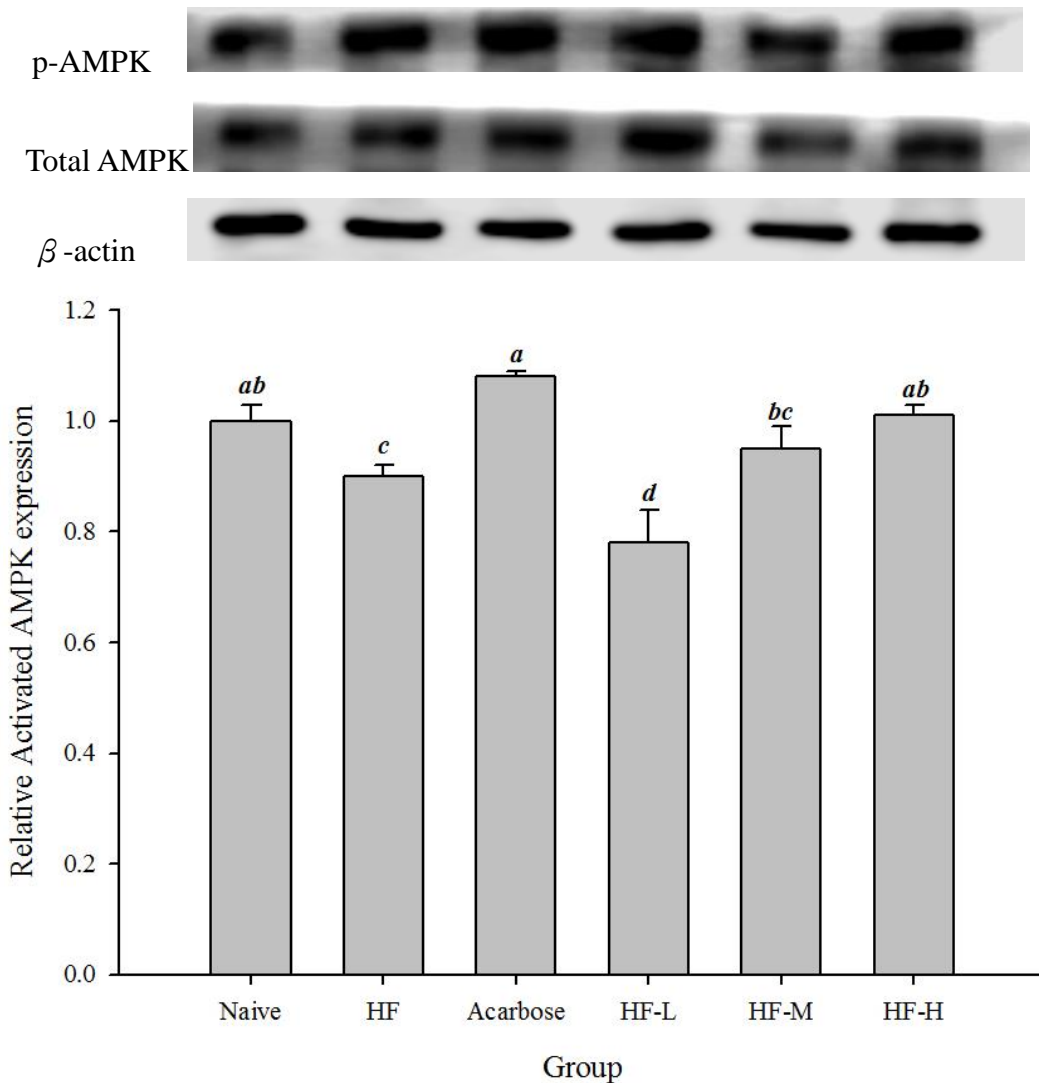


圖 二十六、肝臟中活化磷酸腺苷激活蛋白激酶 (AMPK) 蛋白質相對表現量  
 Fig. 26. Relative protein expression of AMP-activated protein kinase in liver.

將肝臟蛋白質萃取後定量，取 20  $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬法，分析 AKT 的蛋白質相對表現量，且以  $\beta$ -actin 蛋白質作為內部對照。空白組：Naive Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 40 mg/kg/day 之 Acarbose 糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^8$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^9$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^{10}$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌。數據以平均相對量  $\pm$  標準差 (n = 8) 表示，所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

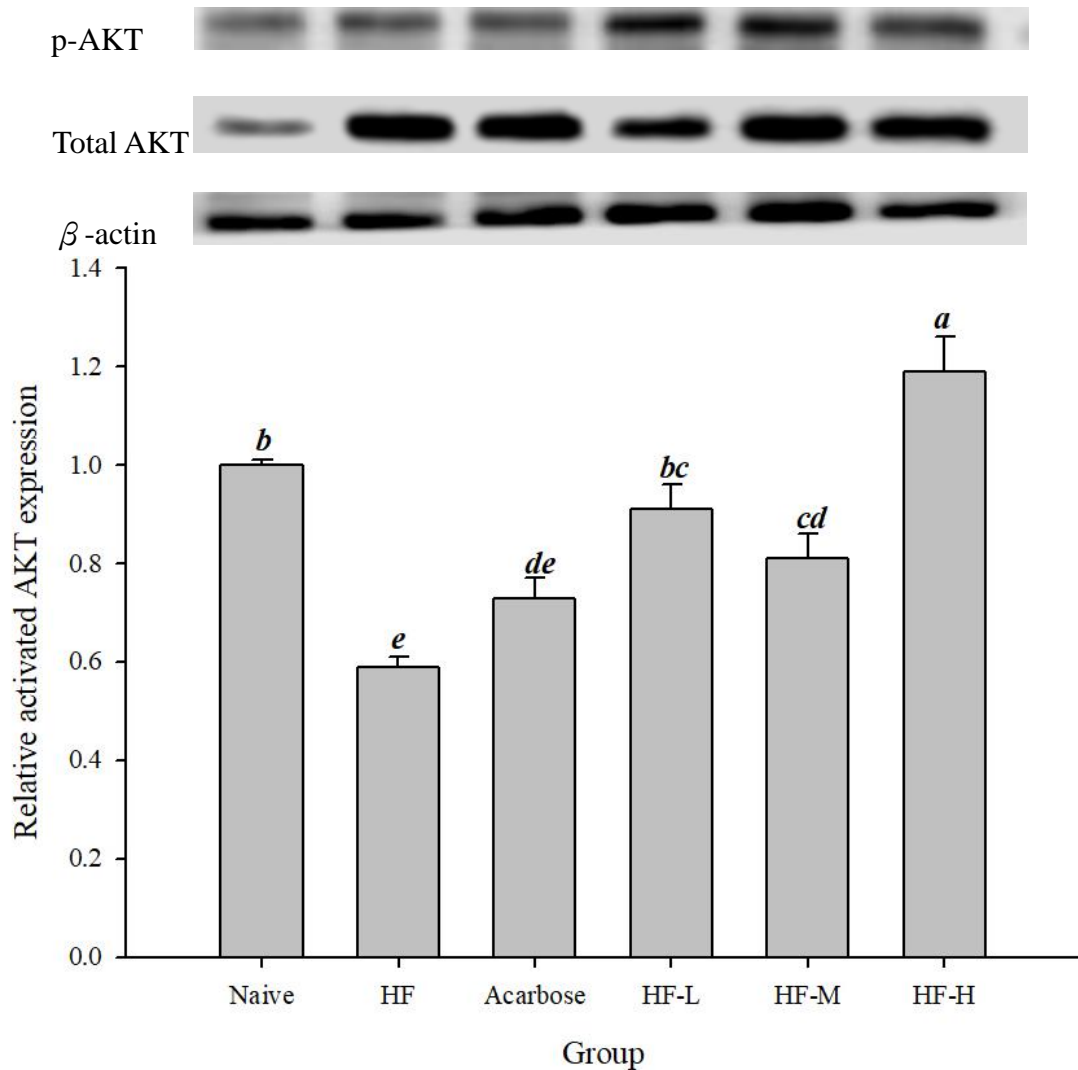
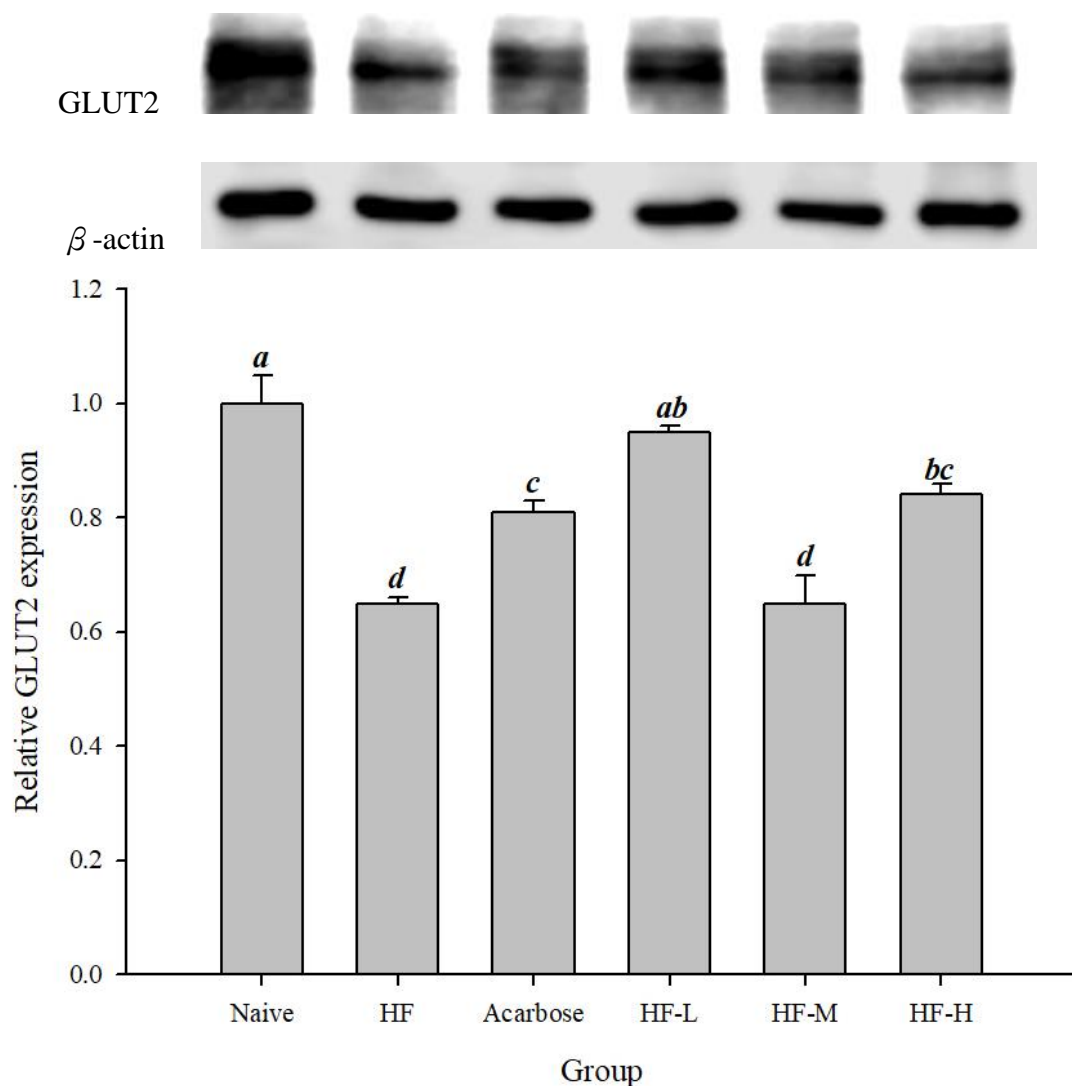


圖 二十七、肝臟中活化蛋白質激酶 B (AKT) 蛋白質相對表現量  
 Fig. 27. Relative protein expression of Protein kinase B in liver.

將肝臟蛋白質萃取後定量，取 20  $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬法，分析 AKT 的蛋白質相對表現量，且以  $\beta$ -actin 蛋白質作為內部對照。空白組：Naive Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 40 mg/kg/day 之 Acarbose 糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^8$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^9$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^{10}$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌。數據以平均相對量  $\pm$  標準差 (n = 8) 表示，所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。



圖二十八、肝臟中葡萄糖轉運蛋白 2 (GLUT2) 蛋白質相對表現量  
 Fig. 28. Relative protein expression of Glucose transportase 2 in liver.

將肝臟蛋白質萃取後定量，取 20  $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬法，分析 AKT 的蛋白質相對表現量，且以  $\beta$ -actin 蛋白質作為內部對照。空白組：Naive Group，不經任何處理之組別，為不進行誘導之組別；高脂誘導組：HF Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別；藥物對照組：Acarbose Group，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予 40 mg/kg/day 之 Acarbose 糖尿病藥物；HF-L：複合乳酸菌低劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^8$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-M：複合乳酸菌中劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^9$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌；HF-H：複合乳酸菌高劑量組，為 30% 糖水與高脂飼料誘導之組別，並管餵給予  $10^{10}$  CFU/mouse/day 之複合乳酸菌。數據以平均相對量 $\pm$ 標準差 (n = 8) 表示，所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析，以單因子變異數分析後進行鄧肯多變域檢定，各組別所標示之字母若不同則表示各組間具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

## 4-4 討論

在這美食爆炸的時代，現代人對食物的慾望不再僅止於填飽肚子同時也追求了味蕾的享受，但這享受的代價背後潛藏著由許多高糖高鹽高能量組成的負擔。隨著攝取高能量飲食的習慣，長期累積過多血糖會使身體產生胰島素阻抗的現象並容易引發如第二型糖尿病等代謝疾病，而現今糖尿病藥物已能有效減緩糖尿病的徵狀但時常伴隨著令人不適的副作用，如腹脹、腹痛、腹瀉或體重增重等現象。因此尋找能有效調降血糖同時不帶有副作用的原料為現今開發保健食品的趨勢之一。根據前人研究顯示，本實驗所使用複合乳酸菌在細胞實驗中具腸道吸附性、耐酸耐膽鹽、促進葡萄糖帶入及改善胰島素阻抗特性 (姚佳伶 2016; 滕逸林 2016)，本實驗利用 30% 果糖搭配高脂飼料誘導小鼠以模擬現今高能量飲食之模式，並管餵給予糖尿病藥物 Acarbose 與三種劑量複合乳酸菌以探討其調降血糖功效與機制，並評估此複方乳酸菌開發為保健食品之潛能。

研究指出利用果糖與高脂飼料誘導 C57BL/6J 小鼠均能建立第二型糖尿病模組，而將兩種因素搭配使用最能模擬現代的飲食習慣 (Panchal and Brown 2010)。從結果顯示，經過果糖與高脂飼料誘導之組別體重 (圖四) 及總血糖數值 (圖七.b) 均顯著性較正常組高，且其葡萄糖耐受性曲線 (圖七.a) 隨著時間高攀不下無法恢復到正常血糖值，由此可確定第二型糖尿病模組已設立成功。另外小鼠犧牲後取其脂肪及臟器秤重發現，高脂誘導組脂肪包含腹脂、副睪脂、腎週脂及肝臟、腎、脾臟等重量均顯著高於正常組 (表五、六)，相似於現代人高脂高糖飲食下形成之代謝症候群狀態。

肝臟為身體調控葡萄糖之最主要器官，當血液中葡萄糖含量過高時會增加胰島素的分泌以促進葡萄糖轉化並儲存於其他組織，如肝醣、肌肉和脂肪；反之若血液或組織缺乏能量時，會將儲存之肝醣藉由糖質新生重新生成葡萄糖以供使用。當血液中葡萄糖濃度過高時，胰島素會與其受體結合開啟傳訊帶動葡萄糖轉運蛋白 (GLUT) 使葡萄糖進入肝臟使用或儲存，其中在肝臟和胰臟  $\beta$  細胞中葡萄糖轉運蛋白以 GLUT2 為主，研究顯示在胰島素阻抗下 GLUT2 的活性會因胰島素傳訊不佳而下降 (Burcelin et al. 1992)。從結果圖二十三顯示，經過高脂誘導之小鼠 GLUT2 蛋白表現與正常組相比顯著性下降而經由藥物及乳酸菌餵食後 GLUT2 蛋白表現顯著性提升，由此可推測乳酸菌的給予能提升胰島素敏感性以促進 GLUT2 之活性。葡萄糖攝入肝臟時，需先被葡萄糖激酶 (GCK) 磷酸化以進行後續糖解反應，因此 GCK 蛋白之活性可作為肝臟帶入葡萄糖之參考；圖二十四中顯示高脂誘導組之 GCK 蛋白表現量與正常組相比顯著性下降，可認為是因為胰島素阻抗使葡萄糖攝入減少，而在藥物與乳酸菌給予組別發現 GCK 蛋白表現量顯著增加，說明乳酸菌的給予能促進血液中葡萄糖進入肝臟使用。當胰島素

與胰島素受體結合後會啟動一連串傳訊並激活蛋白質激酶 B (PKB, 又稱 AKT), AKT 會促進肝醣合成酶 (GS) 活性將葡萄糖儲存同時抑制糖質新生相關蛋白如 PEPCK 及脂肪生成相關蛋白 ACC 之活性; 圖二十三、二十七結果顯示經高脂誘導後肝臟中 AKT 及 GS 蛋白表現量與正常組相比顯著下降, 而在藥物與乳酸菌處理組別中 AKT 及 GS 表現量均顯著性提升, 表示藉由乳酸菌的給予能改善胰島素抵抗狀況並將血液中過多之葡萄糖帶入肝臟中儲存。圖二十二、二十五顯示高脂誘導組其 PEPCK 及 ACC 表現量與正常組相比顯著性提升, 而經藥物與乳酸菌處理組別顯著性下降, 表示乳酸菌的餵食可以減少肝臟葡萄糖釋出同時減少脂肪堆積。研究顯示肝臟中腺苷單磷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 被活化後可促進脂泌素分泌如脂聯素及瘦素以改善胰島素抵抗同時抑制 ACC 活性減少肝臟脂肪及膽固醇的合成也減緩肝臟糖質新生作用。圖二十六顯示與正常組相比, 高脂誘導組別 AMPK 表現量顯著性下降, 而在藥物與乳酸菌處理組別其 AMPK 表現顯著提升, 表示乳酸菌的給予能提升 AMPK 表現量並減緩胰島素抵抗現象以達到調控血糖平衡之作用。

為探討小鼠脂泌素基因表現, 於小鼠腹脂萃取其 RNA 進行定量分析。實驗發現於糖尿病小鼠皮下注射瘦素 (Leptin) 可以改善體內代謝如降低血糖及 HbA1c 濃度及降低脂肪生成酵素活性 (Wang *et al.* 2010); 脂聯素 (Adiponectin) 可改善胰島素抵抗及葡萄糖帶入並減少脂肪生成及糖質新生 (Phillips and Kung 2010); 研究發現體內腫瘤壞死因子 (TNF- $\alpha$ ) 及抗素 (Resistin) 濃度增加會增加內臟脂肪及脂肪發炎反應並提升胰島素抵抗的情形 (Wisse 2004)。由圖十九、二十顯示經高脂誘導組別其 Adiponectin 及 Leptin 表現量較正常組顯著降低, 而經藥物與乳酸菌餵食組別其 Adiponectin 及 Leptin 表現量顯著性提升; 在圖十八、二十一中高脂誘導組 Resistin 表現量顯著高於正常組, 經藥物與乳酸菌餵食後 Resistin 表現量顯著減少。在 TNF- $\alpha$  表現量的部分, 高脂誘導組之表現量顯著高於正常組且乳酸菌處理組別有顯著性減少, 但是藥物處理組則與高脂誘導組無顯著性差異, 推測可能為本實驗餵食劑量 (40 mg/kg) 不足以減少 TNF- $\alpha$  之濃度, 有研究使用劑量高達 500mg/kg 方有最大顯著差異 (Chen *et al.* 2015)。綜合上述結果可知, 乳酸菌的餵食可以藉由增加 Adiponectin 及 Leptin 表現並降低 TNF- $\alpha$  及 Resistin 表現量以減緩胰島素抵抗並減少脂肪生成, 改善血糖不平衡目的。

由小鼠肝臟蛋白質與腹脂脂泌素基因表現實驗結果可知, 藥物與乳酸菌之餵食能增進胰島素敏感性以改善胰島素抵抗, 促進葡萄糖帶入調節體內血糖; 從圖十三至圖十七中看到, 小鼠血清中空腹血糖及代表短期血糖狀況的果糖胺 (fructosamine) 和代表近期 2-3 月血糖狀況的糖化血色素 (HbA1c) 數值在給予藥物與乳酸菌後與高脂誘導組相比均顯著性下降; 在口服葡萄糖試驗中總血糖值觀察到乳酸菌的給予具劑量效應 (圖十二)。利用公式胰島素與空腹血糖乘積除與常數 22.5 可計算出胰島素抵抗係數 (HOMA-IR 值), HOMA-IR 值越高表示胰島

素阻抗狀態越嚴重 (Matthews et al. 1985)；由圖十七顯示，經高脂誘導組別其 HOMA-IR 值顯著高於正常組，經過藥物與乳酸菌處理組別 HOMA-IR 值則顯著性下降。

由前述細胞傳訊結果可知，乳酸菌餵食能減少內臟脂肪生成；於表五及表六顯示在給予藥物與乳酸菌後與高脂組相比能顯著減少體脂肪及臟器重量；圖十九至圖二十一中觀察到肝臟的病理型態在高脂誘導下小鼠肝臟具明顯脂肪肝且從切片染色結果觀察到其細胞組織含許多脂肪油滴被堆擠至排列不整，隨著乳酸菌給予劑量越高趨向恢復成如正常組之外觀，細胞組織中油滴亦隨劑量越高而漸少同時細胞間排列也趨整齊。血清中過多游離脂肪酸 (FFA)、三酸甘油酯 (TG) 及膽固醇 (TC) 會形成體內脂肪並造成細胞氧化壓力引起輕微發炎現象，促進胰島素阻抗；HDL 可將血液中過多膽固醇排出體外，而過量之 LDL 則會使膽固醇留在血管造成動脈硬化、心肌梗塞及中風等症狀；從結果表七及表八顯示，經高脂誘導後血清中 FFA、TG、TC 及 LDL 濃度顯著上升且 HDL 濃度顯著下降，而藥物與乳酸菌處理後血清中 FFA、TG、TC 及 LDL 濃度均顯著下降且 HDL 濃度顯著上升，由此可知乳酸菌之餵食可藉提升 HDL 濃度及調降 LDL 濃度以調解血中多餘 TG 及 TC。

現在市面上乳酸菌保健食品多用於整頓腸道菌相、降低體脂肪與總膽固醇為主，調降血糖為目的鮮少。而調降血糖之動物實驗多以 STZ 搭配高脂飲食誘導小鼠形成糖尿病，但這種以破壞胰島  $\beta$  細胞造成血糖失調的模式比較接近第一型糖尿病的成因而非現在多數的第二型糖尿病患者，因此本實驗高果糖搭配高脂飼料之誘導模式能有效模擬現代人飲食習慣從而去觀察乳酸菌調降血糖時之生理狀況，並從中研究調控之分子機制如附錄三。研究結果證實高果糖搭配高脂飼料誘導下會增加肝臟脂肪堆積情況並引起胰島素阻抗造成體內血糖過多，而乳酸菌之餵食可增加肝臟的 GLUT2、GCK、GS、活化 AKT、活化 AMPK 蛋白表現和降低 PEPC 及 ACC 蛋白表現達到提升胰島素傳訊作用，促進葡萄糖帶入並促使肝糖合成及抑制脂質合成及糖質新生，進而改善胰島素敏感性以調節血糖恆定。未來可進一步測定此複合乳酸菌其他生理功效如降高血脂及降高血壓效果，如此一來開發為保健食品會在市場上更具競爭力。

## 第五章、附錄

### 附錄 一、乳酸菌 PCR 檢測引子序列

基因名稱	序列 (5'→3')	產物大小
Lac16S	AGCAG TAGGG AATCT TCCA CACCG CTACA CATGG AG	341 bp

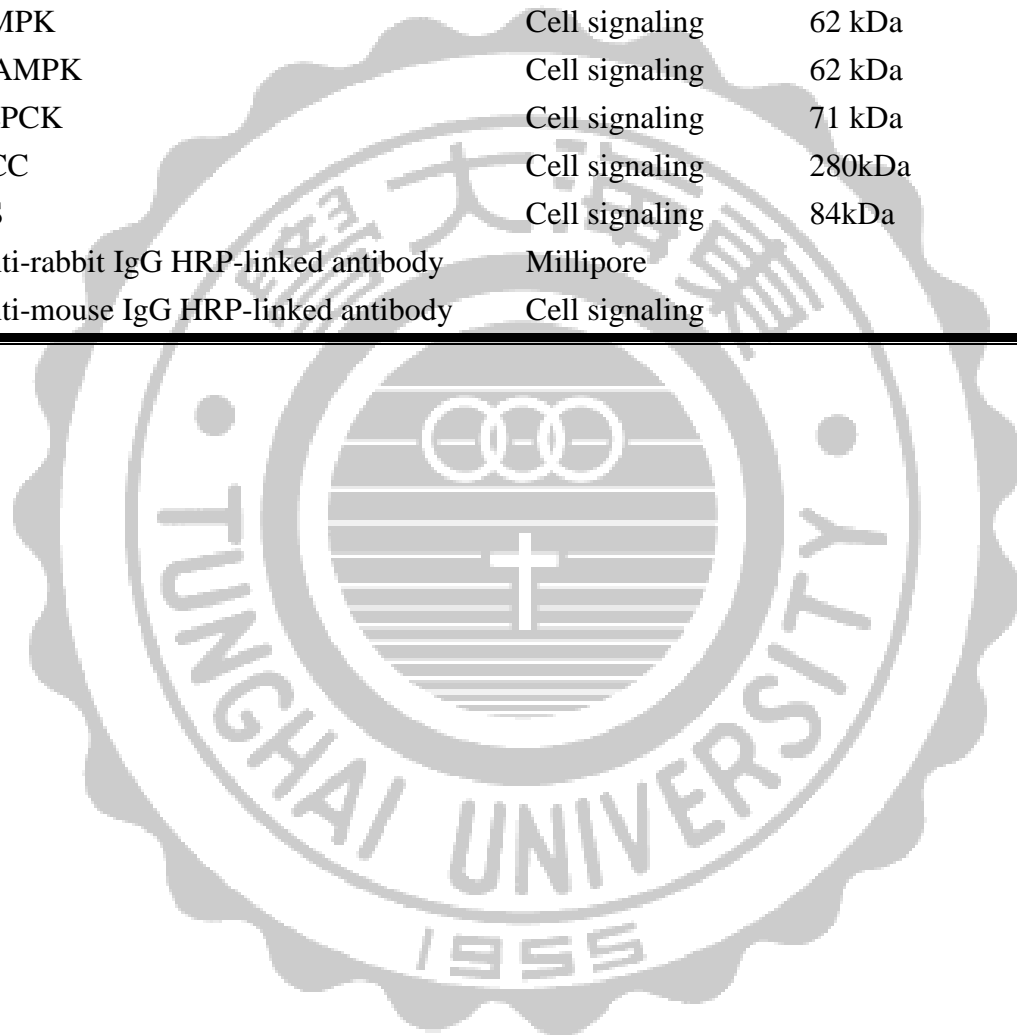
### 附錄 二、同步定量聚合酶連鎖反應中用於擴增腹脂基因之引子序列

基因名稱	序列 (5'→3')	產物大小
$\beta$ -actin	CAGCCAAGGACCCCGTCCTA GTGAAGACCAGGACCACCCC	231 bp
TNF- $\alpha$	CCACGCCCAGCACTTTTTGATTAC GTGCGACTGGCTGGACCTGAGAAC	500 bp
Adiponectin	AGCCTGGAGAAGCCGCTTAT TTGCAGTAGAACTTGCCAGTGC	151 bp
Resistin	GTACCCACGGGATGAAGAACC GCAGAGCCACAGGAGCAG	253 bp
Leptin	CACCAGGATCAATGACATTTC TGCCAGTGTCTGGTCCATCTTG	124 bp

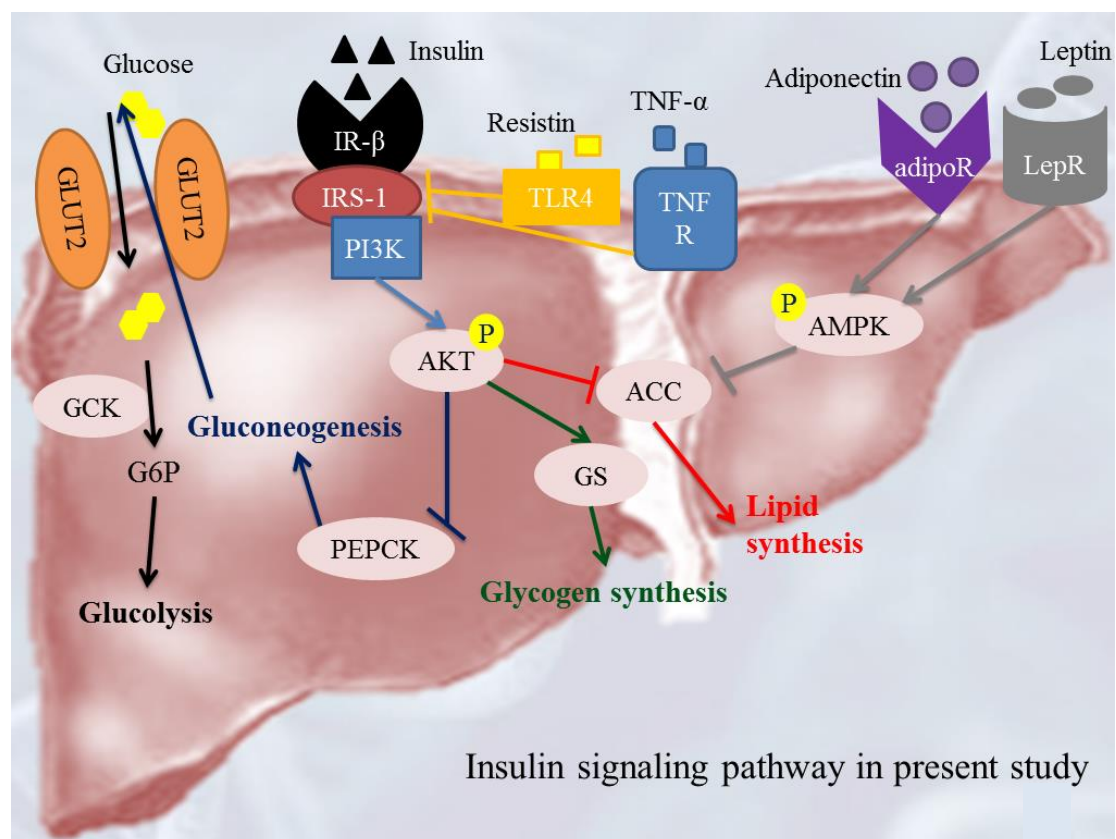


附錄 三、西方轉漬使用之一級、二級抗體

抗體	廠牌	分子量
$\beta$ -actin	novus	45kDa
GCK	Cell signaling	91kDa
Glut2	Millipore	50kDa
AKT	Cell signaling	60 kDa
p-AKT	Millipore	60kDa
AMPK	Cell signaling	62 kDa
p-AMPK	Cell signaling	62 kDa
PEPCK	Cell signaling	71 kDa
ACC	Cell signaling	280kDa
GS	Cell signaling	84kDa
Anti-rabbit IgG HRP-linked antibody	Millipore	
Anti-mouse IgG HRP-linked antibody	Cell signaling	



附錄 四、本研究細胞傳訊路徑圖



## 第六章、參考文獻

- Aattouri, Najat, Mohammed Bouras, Daniel Tome, Ascension Marcos, and Daniel Lemonnier. 2002. 'Oral ingestion of lactic-acid bacteria by rats increases lymphocyte proliferation and interferon- $\gamma$  production', *British Journal of Nutrition*, 87: 367-73.
- Abu-Elheiga, Lutfi, Martin M Matzuk, Khaled AH Abo-Hashema, and Salih J Wakil. 2001. 'Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2', *Science*, 291: 2613-16.
- Akalin, A Sibel, Siddik Göng, and Selmin Düzel. 1997. 'Influence of yogurt and acidophilus yogurt on serum cholesterol levels in mice', *Journal of Dairy Science*, 80: 2721-25.
- Augustin, Robert. 2010. 'The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all', *IUBMB life*, 62: 315-33.
- Ballestri, Stefano, Stefano Zona, Giovanni Targher, Dante Romagnoli, Enrica Baldelli, Fabio Nascimbeni, Alberto Roverato, Giovanni Guaraldi, and Amedeo Lonardo. 2016. 'Nonalcoholic fatty liver disease is associated with an almost twofold increased risk of incident type 2 diabetes and metabolic syndrome. Evidence from a systematic review and meta - analysis', *Journal of gastroenterology and hepatology*, 31: 936-44.
- Baumgard, LH, GJ Hausman, and MV Sanz Fernandez. 2016. 'Insulin: pancreatic secretion and adipocyte regulation', *Domestic animal endocrinology*, 54: 76-84.
- Bengmark, Stig. 2000. 'Colonic food: pre-and probiotics', *The American journal of gastroenterology*, 95: S5-S7.
- Berg, Anders H, Terry P Combs, Xueliang Du, Michael Brownlee, and Philipp E Scherer. 2001. 'The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action', *Nature medicine*, 7: 947-53.
- Biddinger, Sudha B, and C Ronald Kahn. 2006. 'From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes', *Annu. Rev. Physiol.*, 68: 123-58.
- Bray, George A. 2013. 'Energy and fructose from beverages sweetened with sugar or high-fructose corn syrup pose a health risk for some people', *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 4: 220-25.
- Bruynseels, K, Niki Bergans, Nanna Gillis, F Van Dorpen, P Van Hecke, Willy Stalmans, and Florent Vanstapel. 1999. 'On the inhibition of hepatic glycogenolysis by fructose. A 31P-NMR study in perfused rat liver using the fructose analogue 2, 5-anhydro-D-mannitol', *NMR in biomedicine*, 12: 145-56.

- Burcelin, R, MOHAMED Eddouks, J Kande, R Assan, and J Girard. 1992. 'Evidence that GLUT-2 mRNA and protein concentrations are decreased by hyperinsulinaemia and increased by hyperglycaemia in liver of diabetic rats', *Biochemical journal*, 288: 675-79.
- Butte, Nancy F. 2000. 'Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus', *The American journal of clinical nutrition*, 71: 1256s-61s.
- Cai, Fang, Armen V Gyulkhandanyan, Michael B Wheeler, and Denise D Belsham. 2007. 'Glucose regulates AMP-activated protein kinase activity and gene expression in clonal, hypothalamic neurons expressing proopiomelanocortin: additive effects of leptin or insulin', *Journal of Endocrinology*, 192: 605-14.
- Cha, Seung Hun, Zhiyuan Hu, Shigeru Chohnan, and M Daniel Lane. 2005. 'Inhibition of hypothalamic fatty acid synthase triggers rapid activation of fatty acid oxidation in skeletal muscle', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 14557-62.
- Chen, Fu-Chih, Kuo-Ping Shen, Jin-Bor Chen, Hui-Li Lin, Chi-Long Hao, Hsueh-Wei Yen, and Shyh-Yu Shaw. 2017. 'PGBR extract ameliorates TNF- $\alpha$  induced insulin resistance in hepatocytes', *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*.
- Chen, Hsin-Hua, Der-Yuan Chen, Ya-Hsuan Chao, Yi-Ming Chen, Chao-Liang Wu, Kuo-Lung Lai, Ching-Heng Lin, and Chi-Chen Lin. 2015. 'Acarbose Decreases the Rheumatoid Arthritis Risk of Diabetic Patients and Attenuates the Incidence and Severity of Collagen-induced Arthritis in Mice', *Scientific reports*, 5: 18288.
- Cheng, Alice YY, and I George Fantus. 2005. 'Effect of thiazolidinediones on lipid profile', *Canadian Medical Association Journal*, 173: 344-45.
- Cho, Han, James Mu, Jason K Kim, Joanne L Thorvaldsen, Qingwei Chu, E Bryan Crenshaw, Klaus H Kaestner, Marisa S Bartolomei, Gerald I Shulman, and Morris J Birnbaum. 2001. 'Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB $\beta$ )', *Science*, 292: 1728-31.
- Cárdenas, María Luz, Athel Cornish-Bowden, and Tito Ureta. 1998. 'Evolution and regulatory role of the hexokinases', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1401: 242-64.
- Cortez-Pinto, Helena, John Chatham, VP Chacko, Cheryl Arnold, Asif Rashid, and Anna Mae Diehl. 1999. 'Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study', *Jama*, 282: 1659-64.
- Cross, Darren AE, Dario R Alessi, Philip Cohen, Mirjana Andjelkovich, and Brian A Hemmings. 1995. 'Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin

- mediated by protein kinase B', *Nature*, 378: 785-89.
- DeFronzo, Ralph A, and Eleuterio Ferrannini. 1991. 'Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease', *Diabetes care*, 14: 173-94.
- Desoye, G, S Hauguel-de Mouzon, and E Shafrir. 2003. 'The placenta in diabetic pregnancy', *Textbook of Diabetes and Pregnancy. Hod M, Jovanovic L, DiRenzo GC, deLeiva A, Langer O, Eds. London, Dunitz M*: 126-47.
- Di Cianni, G, R Miccoli, L Volpe, C Lencioni, and S Del Prato. 2003. 'Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes', *Diabetes/metabolism research and reviews*, 19: 259-70.
- Diez, Juan J, and Pedro Iglesias. 2003. 'The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease', *European Journal of endocrinology*, 148: 293-300.
- Fruebis, Joachim, Tsu-Shuen Tsao, Sandrine Javorschi, Dana Ebbets-Reed, Mary Ruth S Erickson, Frances T Yen, Bernard E Bihain, and Harvey 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', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98: 2005-10.
- Fukushima, Yoichi, Yoichi Kawata, Hiroyoshi Hara, Atsushi Terada, and Tomotari Mitsuoka. 1998. 'Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children', *International journal of food microbiology*, 42: 39-44.
- Fuller, Roy. 1991. 'Probiotics in human medicine', *Gut*, 32: 439.
- Gan, YH, Y Zhang, HE Khoo, and K Esuvaranathan. 1999. 'Antitumour immunity of bacillus Calmette–Guerin and interferon alpha in murine bladder cancer', *European Journal of Cancer*, 35: 1123-29.
- Ginsberg, Henry N. 2000. 'Insulin resistance and cardiovascular disease', *Journal of Clinical Investigation*, 106: 453.
- Grill, JP, C Cayuela, JM Antoine, and F Schneider. 2000. 'Effects of Lactobacillus amylovorus and Bifidobacterium breve on cholesterol', *Letters in applied microbiology*, 31: 154-56.
- Guan, Youfei. 2004. 'Peroxisome proliferator-activated receptor family and its relationship to renal complications of the metabolic syndrome', *Journal of the American Society of Nephrology*, 15: 2801-15.
- Guarner, Francisco, and Juan-R Malagelada. 2003. 'Gut flora in health and disease', *The Lancet*, 361: 512-19.
- Gusakov, Alexander V., Elena G. Kondratyeva, and Arkady P. Sinitsyn. 2011. 'Comparison of Two Methods for Assaying Reducing Sugars in the

- Determination of Carbohydrase Activities', *International Journal of Analytical Chemistry*, 2011: 283658.
- Herman, Mark A, and Barbara B Kahn. 2006. 'Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony', *Journal of Clinical Investigation*, 116: 1767.
- Hill, Colin, Francisco Guarner, Gregor Reid, Glenn R Gibson, Daniel J Merenstein, Bruno Pot, Lorenzo Morelli, Roberto Berni Canani, Harry J Flint, and Seppo Salminen. 2014. 'Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic', *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 11: 506-14.
- Holzapfel, Wilhelm H, Petra Haberer, Johannes Snel, Ulrich Schillinger, and Jos HJ Huis in't Veld. 1998. 'Overview of gut flora and probiotics', *International journal of food microbiology*, 41: 85-101.
- Hopper, NM, and AJ Turner. 1987. 'Isolation of two differentially glycosylated forms of peptide-dipeptidase A (angiotensin-converting enzyme) from pig brain: a reevaluation of their role in neuropeptide metabolism', *Biochem. j*, 241: 625-33.
- Horman, Sandrine, Gareth J Browne, Ulrike Krause, Jigna V Patel, Didier Vertommen, Luc Bertrand, Alain Lavoinne, Louis Hue, Christopher G Proud, and Mark H Rider. 2002. 'Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis', *Current biology*, 12: 1419-23.
- Hosono, A. 2000. 'Effect of administration of *Lactobacillus gasseri* on serum lipids and fecal steroids in hypercholesterolemic rats', *Journal of Dairy Science*, 83: 1705-11.
- Huang, Shaohui, and Michael P Czech. 2007. 'The GLUT4 glucose transporter', *Cell metabolism*, 5: 237-52.
- Hung, Szu-Chi, Wei-Ting Tseng, and Tzu-Ming Pan. 2016. 'Lactobacillus paracasei subsp. paracasei NTU 101 ameliorates impaired glucose tolerance induced by a high-fat, high-fructose diet in Sprague-Dawley rats', *Journal of Functional Foods*, 24: 472-81.
- Ilose, S, and T Sozzi. 1991. 'Bifidobacteria colonization in diversely-fed newborn in fants', *Pediatr Med Chir*, 6: 395-400.
- Jauhiainen, Tiina, Heikki Vapaatalo, Tuija Poussa, Sinikka Kyrönpalo, Martin Rasmussen, and Riitta Korpela. 2005. 'Lactobacillus helveticus fermented milk lowers blood pressure in hypertensive subjects in 24-h ambulatory blood pressure measurement', *American Journal of Hypertension*, 18: 1600-05.

- Jin, LZ, YW Ho, N Abdullah, and S Jalaludin. 1998. 'Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing Lactobacillus cultures', *Poultry science*, 77: 1259-65.
- Kahn, Richard, John Buse, Ele Ferrannini, and Michael Stern. 2005. 'The metabolic syndrome: time for a critical appraisal', *Diabetologia*, 48: 1684-99.
- Kalra, Satya P. 2009. 'Central leptin gene therapy ameliorates diabetes type 1 and 2 through two independent hypothalamic relays; a benefit beyond weight and appetite regulation', *Peptides*, 30: 1957-63.
- Katsiki, Niki, Dimitri P Mikhailidis, and Christos S Mantzoros. 2016. 'Non-alcoholic fatty liver disease and dyslipidemia: an update', *Metabolism*, 65: 1109-23.
- Kershaw, Erin E, and Jeffrey S Flier. 2004. 'Adipose tissue as an endocrine organ', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 89: 2548-56.
- Khedkar, CD, RD Garge, JM Mantri, SA Kulkarni, and GD Khedkar. 1993. 'Effect of feeding acidophilus milk on serum cholesterol in human volunteers', *J Dairy Foods Home Sci*, 12: 33-8.
- Klaver, FA, and Roelof 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: 1120-24.
- Klover, Peter J, and Robert A Mooney. 2004. 'Hepatocytes: critical for glucose homeostasis', *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36: 753-58.
- Manco, Melania, Menotti Calvani, and Geltrude Mingrone. 2004. 'Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion', *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 6: 402-13.
- Matthews, DR, JP Hosker, AS Rudenski, BA Naylor, DF Treacher, and RC Turner. 1985. 'Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man', *Diabetologia*, 28: 412-19.
- Mueckler, Mike, and Bernard Thorens. 2013. 'The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters', *Molecular aspects of medicine*, 34: 121-38.
- Nakamura, Yasunori, Naoyuki Yamamoto, Kumi Sakai, and Toshiaki Takano. 1995. 'Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme', *Journal of Dairy Science*, 78: 1253-57.
- Ng, SC, AL Hart, MA Kamm, AJ Stagg, and SC Knight. 2009. 'Mechanisms of action of probiotics: recent advances', *Inflammatory bowel diseases*, 15: 300-10.
- Panchal, Sunil K, and Lindsay Brown. 2010. 'Rodent models for metabolic syndrome

- research', *BioMed Research International*, 2011.
- Parvez, S, Karim A Malik, S Ah Kang, and H-Y Kim. 2006. 'Probiotics and their fermented food products are beneficial for health', *Journal of applied microbiology*, 100: 1171-85.
- Pessin, Jeffrey E, and Alan R Saltiel. 2000. 'Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance', *Journal of Clinical Investigation*, 106: 165.
- Phillips, Susan A, and Jacqueline T Kung. 2010. 'Mechanisms of adiponectin regulation and use as a pharmacological target', *Current opinion in pharmacology*, 10: 676-83.
- Pilkis, Simon J, and DK Granner. 1992. 'Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis', *Annual review of physiology*, 54: 885-909.
- Preitner, Frédéric, Olivier Bonny, Alexandra Laverrière, Samuel Rotman, Dmitri Firsov, Anabela Da Costa, Salima Metref, and Bernard Thorens. 2009. 'Glut9 is a major regulator of urate homeostasis and its genetic inactivation induces hyperuricosuria and urate nephropathy', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106: 15501-06.
- Prentki, Marc, and Christopher J Nolan. 2006. 'Islet  $\beta$  cell failure in type 2 diabetes', *Journal of Clinical Investigation*, 116: 1802.
- Prince, Paula D, Yanina A Santander, Estefania M Gerez, Christian Höcht, Ariel H Polizio, Marcos A Mayer, Carlos A Taira, Cesar G Fraga, Monica Galleano, and Andrea Carranza. 2017. 'Fructose increases corticosterone production in association with NADPH metabolism alterations in rat epididymal white adipose tissue', *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 46: 109-16.
- Rajala, Michael W, Yong Qi, Hiral R Patel, Nobuhiko Takahashi, Ronadip Banerjee, Utpal B Pajvani, Madhur K Sinha, Ronald L Gingerich, Philipp E Scherer, and Rexford S Ahima. 2004. 'Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting', *Diabetes*, 53: 1671-79.
- Round, JA, P Jacklin, RB Fraser, RG Hughes, MA Muggleston, and RIG Holt. 2011. 'Screening for gestational diabetes mellitus: cost–utility of different screening strategies based on a woman's individual risk of disease', *Diabetologia*, 54: 256-63.
- Saarela, Maria, Liisa Lähteenmäki, R Crittenden, S Salminen, and T Mattila-Sandholm. 2002. 'Gut bacteria and health foods—the European perspective', *International journal of food microbiology*, 78: 99-117.
- Salminen, Seppo, Atte von Wright, Lorenzo Morelli, Philippe Marteau, Dominique Brassart, Willem M de Vos, Rangne Fondén, Maija Saxelin, Kevin Collins,



- and Gunnar Mogensen. 1998. 'Demonstration of safety of probiotics—a review', *International journal of food microbiology*, 44: 93-106.
- Schinner, S, WA Scherbaum, SR Bornstein, and A Barthel. 2005. 'Molecular mechanisms of insulin resistance', *Diabetic Medicine*, 22: 674-82.
- Shoji, Ikuo, Lin Deng, and Hak Hotta. 2012. 'Molecular mechanism of hepatitis C virus-induced glucose metabolic disorders', *Frontiers in microbiology*, 2: 278.
- Stefanov, Tsvetan, Theodora Temelkova-Kurktschiev, Carsta Koehler, Elena Henkel, Frank Schaper, and Markolf Hanefeld. 2012. 'Association of physical activity with insulin resistance, subclinical inflammation, coagulation, and fibrinolytic biomarkers among population at high risk for type 2 diabetes', *Folia medica*, 54: 32-39.
- Stumvoll, Michael, Barry J Goldstein, and Timon W van Haeften. 2005. 'Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy', *The Lancet*, 365: 1333-46.
- Tappy, Luc, and Kim-Anne Lê. 2010. 'Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity', *Physiological reviews*, 90: 23-46.
- Ullrich, Axel, JR Bell, Ellson Y Chen, R Herrera, LM Petruzzelli, Thomas J Dull, Alane Gray, LLYC Coussens, Y-C Liao, and Mason Tsubokawa. 1985. 'Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes', *Nature*, 313: 756-61.
- Wang, May-yun, Lijun Chen, Gregory O Clark, Young Lee, Robert D Stevens, Olga R Ilkayeva, Brett R Wenner, James R Bain, Maureen J Charron, and Christopher B Newgard. 2010. 'Leptin therapy in insulin-deficient type I diabetes', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 4813-19.
- White, Morris F. 1998. 'The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action', *Molecular and cellular biochemistry*, 182: 3-11.
- Wilson-O'Brien, Amy L, Nicola Patron, and Suzanne Rogers. 2010. 'Evolutionary ancestry and novel functions of the mammalian glucose transporter (GLUT) family', *BMC evolutionary biology*, 10: 152.
- Wilson, John E. 2004. 'The hexokinase gene family', *FRONTIERS IN DIABETES*, 16: 18-30.
- Wisse, Brent E. 2004. 'The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity', *Journal of the American society of nephrology*, 15: 2792-800.
- Yamauchi, Toshimasa, J Kamon, H Waki, Y Terauchi, N Kubota, K Hara, Y Mori, T Ide, K Murakami, and N Tsuboyama-Kasaoka. 2001. 'The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity', *Nature medicine*, 7: 941-46.
- Yang, Yang, Meifang Xiao, Yiqing Mao, Hui Li, Shuyong Zhao, Yi Gu, Rong Wang,

- Jianqiang Yu, Xuemei Zhang, and David M Irwin. 2009. 'Resistin and insulin resistance in hepatocytes: resistin disturbs glycogen metabolism at the protein level', *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 63: 366-74.
- Zhang, Yiyang, Ricardo Proenca, Margherita Maffei, Marisa Barone, Lori Leopold, and Jeffrey M Friedman. 1994. 'Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue', *Nature*, 372: 425-32.
- Zierath, Juleen R, and Yuichi Kawano. 2003. 'The effect of hyperglycaemia on glucose disposal and insulin signal transduction in skeletal muscle', *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 17: 385-98.
- 姚佳伶. 2016. '篩選對 3T3-L1 脂肪細胞具葡萄糖調節能力之乳酸菌'.
- 滕逸林. 2016. '篩選對 FL83B 小鼠肝細胞具葡萄糖調節能力之乳酸菌'.

