

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

珍珠番石榴葉超音波輔助乙醇萃取物改善 C2C12 細胞

胰島素阻抗之機制

Mechanism of ultrasound-assisted ethanol extracts from *Psidium guajava* leaves for ameliorating insulin-resistance C2C12 cells

詹嘉鈴

Chia-Ling Chan

指導教授：江文德 博士

Advisor : Wen-Dee Chiang, Ph.D.

中華民國一百零七年六月

June, 2018

謝誌

三年的研究所學習過程在此將劃下句點，心中有歡笑也有淚水，途中經歷過多少次的實驗失敗，卻又能在一次次挫折中克服並且累積經驗，正因為有這些考驗才能使我成長，很感謝研修碩士學位的這段期間幫助和給我支持鼓勵的您們，有您們才有今日的我。

感謝恩師 江文德 博士在實驗室不時給予我關懷，對於實驗、報告上的細心指導，百忙之中仍花許多時間與學生討論，實驗若遇困難也不厭其煩地給予我建議，一路上的照顧及指導，學生會永遠銘記於心，因為有您的付出，才能使學生完成今日的研究，真的很感謝您與您相處的時光學生畢生難忘。

文稿初成，承蒙蔡正宗老師、蘇正德老師與林世斌老師，繁忙中撥空對學生論文詳加審閱並斧正缺失，且於口試時給予高度的肯定，給學生寶貴的建議與指導使得本論文更趨完整，在此致上衷心之謝意。

另外，更要感謝系上所有的老師，助教和系辦 王琴助理於實驗上的協助，以及學長姐明興、有容、佑星、筑盈、秉叡、萬宇、子閔、巧玲、鈺萍、慈樺、敏純及景文的關懷與照顧，共同砥礪的同窗及學弟妹上詠、映竹、琿綾、羽庭、芸禎、佳茵、維智、仁宜、文彥、宜榛、仲雯、皓元、昱均、承彥及琮霖等人，謝謝你們跟我一起分享研究所生活中的喜怒哀樂，陪我度過無數個實驗不如意的夜晚，讓我的研究所生涯充滿了歡樂與笑聲，對你們心中只有萬分的感謝與祝福，希望你們盡快能朝自己的夢想前進。

最後要感謝我的家人給予的支持、關心與鼓勵，讓我無後顧之憂的完成學業，是我最溫暖的避風港，你們的支持與體諒是推動我完成學業的動力。將此論文獻給我最親愛的家人，願家人與我一起分享這份喜悅與榮耀。

學生 詹佳純 謹致於

東海大學食品科學研究所

食品化學暨食品分析實驗室

中華民國一百零七年六月

目錄

目錄.....	I
圖目錄.....	IV
表目錄.....	VI
摘要.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
壹、前言.....	1
貳、文獻回顧.....	4
一、番石榴葉.....	4
(一) 番石榴葉機能性成分.....	5
(二) 番石榴葉生理活性.....	8
二、萃取方法比較.....	12
三、高血糖與活性氧之關聯性.....	14
(一) 自由基與活性氧.....	15
(二) 高血糖誘導活性氧之生成機制.....	15
(三) 抗氧化系統.....	18
(四) 抗氧化成分與糖尿病.....	19
四、高血糖與醣解酵素之關聯性.....	19
(一) α -澱粉酶 (α -amylase).....	20
(二) α -葡萄糖苷酶 (α -glucosidase).....	21
(三) 醣解酵素活性抑制對高血糖症狀之改善.....	21
五、體內血糖恆定.....	23
(一) 胰島素分泌與其功能.....	23

(二) 肌肉與血糖恆定.....	26
(三) 胰島素阻抗 (Insulin resistance).....	27
(四) 肌肉中的胰島素阻抗.....	28
六、肌肉細胞層面之作用途徑.....	30
(一) 胰島素受體(Insulin receptor, IR).....	31
(二) 胰島素受體基質 (Insulin receptor substrate, IRS).....	32
(三) 磷脂肌醇-3-激酶 (Phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K).....	33
(四) 蛋白質激酶 B (Protein kinase B, PKB/Akt).....	34
(五) AMP 活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK).....	36
(六) 葡萄糖轉運蛋白 (Glucose transporter, GLUT).....	37
參、材料與方法.....	40
一、實驗材料.....	40
(一) 原料來源.....	40
(二) 活性成分含量分析之試藥.....	40
(三) 抗氧化試驗之試藥.....	40
(四) 調節血糖相關酵素試驗之試藥.....	41
(五) 細胞株.....	41
(六) 細胞培養及其他試藥.....	42
(七) 細胞內葡萄糖攝入試驗之試藥.....	42
(八) 蛋白質分析之試藥.....	43
(九) 西方轉漬之試藥.....	43
二、實驗方法.....	45
(一) 實驗流程.....	45
(二) 實驗方法.....	46
(三) 統計分析.....	55

肆、結果與討論	56
一、乙醇萃取濃度對萃取物中總酚和總類黃酮含量之影響	56
二、乙醇萃取濃度對萃取物中抗氧化力之影響	58
三、乙醇萃取濃度對萃取物中抑制醣解酵素活性之影響	61
四、GLE25 濃度對 C2C12 細胞存活率之影響	64
五、棕櫚酸濃度及誘導時間對 C2C12 細胞產生胰島素阻抗之影響	64
六、GLE25 濃度對胰島素阻抗 C2C12 細胞之 2NBDG 調控之影響	69
七、GLE25 (200 ppm) 對 C2C12 細胞其胰島素相關傳訊因子的影響	72
伍、結論	78
陸、附錄	80
參考資料	82

圖目錄

圖一、	超氧陰離子 $O_2^{\cdot-}$ 導致糖尿病高血糖併發症之機制.....	17
圖二、	維持血糖恆定之周邊組織.....	23
圖三、	胰島素劑量與反應曲線.....	28
圖四、	肌肉中脂肪酸誘導的胰島素抵抗的潛在機制.....	29
圖五、	胰島素在肌肉細胞中作用途徑.....	30
圖六、	Insulin receptor 結構.....	31
圖七、	IRS 蛋白家族相互作用的區域.....	32
圖八、	PI3K 家族分類.....	34
圖九、	PKB/Akt 家族結構.....	35
圖十、	AMPK 在控制全身能量代謝中的作用.....	37
圖十一、	胰島素刺激的 GLUT4 到細胞膜中融合位點的機制.....	39
圖十二、	實驗流程圖.....	45
圖十三、	2-NBDG 結構式.....	52
圖十四、	乙醇萃取濃度對番石榴葉萃取物中總酚及總類黃酮含量之影響.....	57
圖十五、	乙醇萃取濃度和番石榴葉萃取物劑量對抗氧化能力之影響.....	59
圖十六、	乙醇萃取濃度對番石榴葉萃取物抑制 α -amylase 及 α -glucosidase 之影響以 IC ₅₀ 表示.....	63

圖十七、GLE25 濃度對小鼠肌肉細胞 C2C12 存活率之影響	65
圖十八、棕櫚酸濃度對小鼠肌肉細胞 C2C12 存活率之影響	67
圖十九、在 C2C12 細胞中 0.75 mM 棕櫚酸誘導時間和胰島素添加對其相對 2NBDG 攝入量之影響	68
圖二十、GLE25 濃度在 (A) 正常態 (B) 阻抗態 C2C12 細胞中處理 30 min 後對 2NBDG 攝入量之影響	70
圖二十一、濃度 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GLE25 對 C2C12 細胞其胰島素相關傳訊因子的影響	73
圖二十二、番石榴葉萃取物於棕櫚酸誘導的胰島素阻抗 C2C12 細胞中調控胰島素 相關訊息傳遞之示意圖.....	77

表目錄

表一、番石榴中酚酸化合物.....	6
表二、番石榴葉中分離出的類黃酮類化合物.....	7
表三、番石榴葉中的類異戊二烯.....	8
表四、超音波萃取法與現今常用的萃取方法的優缺點比較.....	13
表五、活性氧物質 (ROS)分類.....	15
表六、Akt 異構型之分佈與功能。.....	36
表七、實驗中使用之一級、二級抗體。.....	55

摘要

本研究將番石榴葉以快速且低耗能的超音波輔助 0、25、50 及 75% 乙醇進行萃取，分別以 GLE0、GLE25、GLE50 及 GLE75 表示。首先比較各萃取物的抗氧化性及抑制醣解酵素之作用。結果顯示，四種萃取物的總類黃酮含量 (Total flavonoid content, TFC) 以 GLE50 最高，可達 35.1 mg quercetin equivalent/g extract，而總酚含量 (Total phenolic content, TPC) 以 GLE25 最高，可達 254.3 mg gallic acid equivalent/g extract，但 GLE25 及 GLE50 兩者之間的 TFC 及 TPC 均無顯著差異 ($p < 0.01$)。清除自由基能力以 Trolox equivalent (TE) 表示，TE 越高其總抗氧化能力 (TE antioxidant capacity, TEAC) 越高，其中以 GLE25 效果最佳，可達 59.1 $\mu\text{g TE/mL}$ ，其次為 GLE50 的 49.2 $\mu\text{g TE/mL}$ 。至於還原力也是以 GLE25 最高，可達 113.1 $\mu\text{g AAE/mL}$ ，其次為 GLE50 的 110.5 $\mu\text{g ascorbic acid equivalent/mL}$ 。至於抑制 α -glucosidase 及 α -amylase 的結果指出 GLE25 及 GLE50 均具有最高的抑制作用。綜合以上結果，GLE25 被篩選作為後續 C2C12 細胞調節血中葡萄糖之機制探討。依據細胞毒性試驗結果顯示，小於 300 $\mu\text{g/mL}$ 的 GLE25 對 C2C12 細胞不具毒性，最後探討 200 $\mu\text{g/mL}$ GLE25 對棕櫚酸誘導胰島素阻抗 C2C12 細胞中葡萄糖調節的影響，結果指出 GLE25 於胰島素傳遞路徑中可活化 IRS1/PI3K/Akt，增加葡萄糖的攝入作用，且亦能活化 AMP-dependent/activated protein kinase (AMPK) 抑制 Acetyl-CoA carboxylase (ACC) 進而促進游離脂肪酸的氧化，釋放大量的能量提供細胞使用，降低脂肪酸的儲存，進而能改善游離脂肪酸誘導的胰島素阻抗情形。

Abstract

Gjuava leaves extracts (GLE) were prepared by ultrasound-assisted extraction with 0, 25, 50, and 75% ethanol and denoted as GLE0, GLE25, GLE50 and GLE75, respectively. At first, antioxidant activity and glycolytic activity inhibition of the extracts were compared. The results showed that GLE50 had the highest total flavonoid content (TFC) up to 35.1 mg QE/g extract among four extracts, where as GLE25 had the highest total phenolic content (TPC) up to 254.3 mg GAE /g extract. However there were no significant difference in the TFC and TPC between GLE25 and GLE50 ($p > 0.01$). The free radical scavenging capacity was expressed as trolox equivalent (TE). TE is proportional to total antioxidant capacity (TEAC). GLE25 showed the highest TEAC, reaching 59.1 $\mu\text{g TE/mL}$, followed by GLE50 with 49.2 $\mu\text{g TE/mL}$. GLE25 also had the highest reducing power reaching 113.1 $\mu\text{g ascorbic acid equivalent/mL}$, followed by GLE50 with 110.5 $\mu\text{g AAE/mL}$. Furthermore, GLE25 and GLE50 also showed the highest inhibitory effect of α -glucosidase and α -amylase. According to the above results, GLE25 was selected to study regulation mechanism of blood glucose in C2C12 cells. Based on cytotoxicity test, GLE25 less than 300 $\mu\text{g/mL}$ was no toxicity to C2C12 cells. Finally, the effect of 200 $\mu\text{g/mL}$ GLE25 on glucose regulation in palmitate-induced insulin resistance C2C12 cells was investigated. The results indicated that GLE25 could activate the increase of IRS1/PI3K/Akt resulted in glucose uptake in the insulin delivery pathway. GLE25 also activated AMPK to inhibit ACC, thereby promoting the oxidation of free fatty acids, releasing a large amount of energy to provide cells for use, reducing the storage of fatty acids, and improving the insulin resistance induced by free fatty acids.

壹、前言

番石榴為現今常見的經濟水果之一，根據行政院農委會 106 年的統計資料顯示，番石榴收穫面積為 7,185 公頃，全年總產量為 18 萬 4,767 公噸 (蔡等, 2017)，其中以珍珠番石榴為最大宗，在種植過程中因需提升番石榴品質而修剪枝葉，造成大量的副產物產生，若將番石榴葉再利用，可增加農民之收益，增加番石榴樹之附加價值。番石榴葉的成分複雜，富含許多多酚化合物，以酚類中的酚酸、類黃酮、單寧類以及類異戊二烯為其主要的成分 (Metwally *et al.*, 2011; Shruthi *et al.*, 2013)。目前已被證實的生理活性包括抗腹瀉 (Morales *et al.*, 1994)、抗菌 (Nair & Chanda, 2007)、保肝作用 (Roy *et al.*, 2006)、抗氧化及清除自由基 (Metwally *et al.*, 2011; Shruthi *et al.*, 2013)、抗癌細胞生長及抗腫瘤活性 (Joseph *et al.*, 2010)、降血糖作用 (Wang *et al.*, 2010) 及抗發炎效果 (Qa'dan *et al.*, 2005) 等。

植物萃取物的活性成分含量、萃取溶劑及其萃取的方法有很大的關係。Qian & Nihorimbere (2004) 及 Tachakittirungrod *et al.*, (2007) 皆指出番石榴葉中大部分活性成分的極性都低於水，因此本篇使用乙醇萃取番石榴葉，並且探討最適乙醇濃度對提升其活性成分之影響。萃取時使用熱迴流、索式以及浸漬法為普遍常用的方法，但這些方法都需要數十個小時至數天的萃取時間，過程更是耗費大量的能源及有機溶劑。然而超音波萃取可在幾秒鐘或幾

分鐘內進行多次的萃取，並且具有再現性，不但降低加工成本，亦簡化加工的操作與處理，甚至提高最終產品的純度、改良有機溶劑萃取的缺點以及減少處理時間與溶劑使用量，亦可於低溫下操作，解決熱水萃取時高溫所造成的成份熱損失，也可以避免低沸點物質揮發，保持較佳的活性物質與風味 (Chemat *et al.*, 2011)。

體內高血糖狀態會誘發活性氧化物質 (Reactive oxygen species, ROS) 的生成，當處在高血糖環境中，血管內皮細胞中粒腺體過度生成的超氧陰離子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 是導致糖尿病併發症的主要原因之一，粒腺體蛋白質會被醣化作用而進一步激發 $O_2^{\cdot-}$ 的形成。因此，即使高血糖的環境被改善或正常化後，先前經過醣化作用的粒腺體依然會產生過多的 $O_2^{\cdot-}$ ，持續導致糖尿病併發症致病的進展。所以透過減低醣化反應作用的角度來抑制氧化壓力的發生，才能夠保護細胞及組織免受傷害 (Brownlee, 2001)。食物中的澱粉分別經由唾腺與胰臟分泌的澱粉酶先行消化分解成較小分子，最後再經由小腸上皮細胞所分泌的葡萄糖苷酶水解成葡萄糖，才能被人體吸收及利用，進而促使血糖上升，而組織的胰島素阻抗導致血糖過高，進而造成許多身體系統損害，因此可利用抑制醣解酵素 α -澱粉酶 (α -amylase) 及 α -葡萄糖苷酶 (α -glucosidase) 延緩葡萄糖吸收，以利降低餐後高血糖之現象 (Vadivelan *et al.*, 2018)。許多研究指出，多酚類化合物是為優良的抗氧化劑，且對於 α -amylase

與 α -glucosidase 的抑制作用及胰島素阻抗具有良好之效果，因此降低胰島素阻抗達到血糖調控是為一條重要的途徑 (Labuza & Dugan, 1971; Shahidi *et al.*, 1992; Proença *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017)。

肌肉、肝臟及脂肪組脂為受胰島素調控的周邊組織，尤其以肌肉為其主要攝取葡萄糖的組織，所攝入的葡萄糖佔全身的 75-90%，當肌肉中胰島素傳訊受損會造成受胰島素刺激之葡萄糖轉運率降低 (J.W. *et al.*, 2001; Workeneh & Bajaj, 2013)，故肌肉中胰島素傳訊之分子，其表現量下降或功能受損影響傳訊，皆可能造成高血糖。因此為了提升番石榴葉副產物的利用價值，本研究將探討超音波輔助不同乙醇濃度萃取番石榴葉所得萃取物，對其抗氧化性及抑制醣解酵素之影響，並分別探討此萃取物對正常及誘導胰島素阻抗之肌肉細胞 C2C12 中血糖調控的機制。

貳、文獻回顧

一、番石榴葉

番石榴樹 (*Psidium guajava* Linn.) 為桃金娘科 (Myrtaceae) 植物，生長於熱帶及亞熱帶的國家，為多年生常綠灌木或喬木 (Deguchi & Miyazaki, 2010)。原產於中美洲墨西哥到南美洲北部，後來被引入到世界各地的熱帶和亞熱帶地區取果實用來食用，其果實在臺灣又稱芭樂，為現今常見的經濟水果之一，在臺灣主要分布於高雄、臺南、彰化及屏東等縣市。目前臺灣所擁有的番石榴品種達 16 種，其品種可分為更年性與非更年性，更年性果實為果實在後熟階段時會有明顯的呼吸高峰，而非更年性果實則與其相反。根據行政院農委會 106 年的統計資料顯示，106 年番石榴收穫面積為 7,185 公頃，全年總產量為 18 萬 4,767 公噸 (蔡等, 2017)，其中又以非更年性的珍珠番石榴為最大宗。

番石榴具周年開花結實及於新梢開花結實之特性，一般於春季萌發新芽，農民為了矮化植株及降低養分消耗以利提高產量及品質，故時常修剪樹型。然而修剪下來的枝葉，若可將其再利用，亦可增加農民之收益，增加番石榴樹之附加價值。

(一) 番石榴葉機能性成分

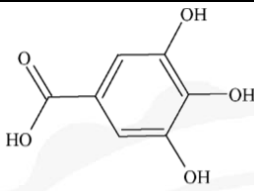
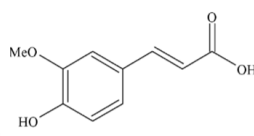
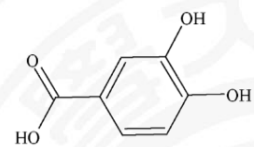
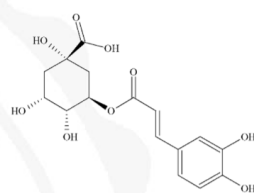
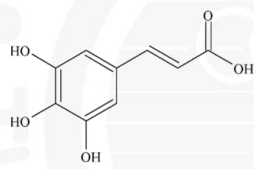
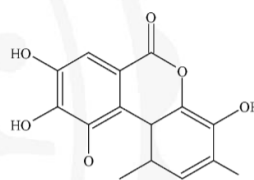
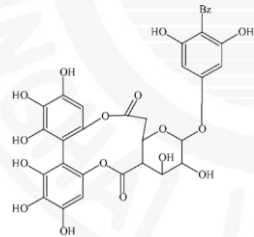
番石榴葉 (*P. guajava* leaves; GL) 的成分複雜，富含桉葉油醇 (cineol)、單寧類 (tannins) 及三萜 (triterpenes) 的精油成分 (Shruthi *et al.*, 2013)，且內含許多酚類化合物 (Polyphenols) 廣泛存在於植物中，由植物的光合作用所固定之碳約 20% 進入苯丙烷途徑 (Phenylpropanoid pathway) 生成天然存在的酚類物質，推估其二次代謝物達 10 至 20 萬種 (Pereira *et al.*, 2009)，主要目的在於讓植物能呈現多彩的顏色，並分泌一些物質以抵禦外敵，保護植物免於遭受各種蟲害傳染病及避免植物光合作用過程中受到紫外線傷害，也因此造就出許多生物活性，包括抗氧化、抑制脂質過氧化、降低心血管疾病的發生、抑制癌症作用、類似雌激素的作用等 (白芝綺, 2009)。而 GL 其中以酚類 (Phenolic) 中的酚酸 (Phenolic acid)、類黃酮 (Flavonoids) 和單寧類 (Tannins) 以及類異戊二烯 (Isoprenoids) 為其主要的成分 (Gutiérrez *et al.*, 2008; Metwally *et al.*, 2011; Shruthi *et al.*, 2013)。

GL 中的酚酸以沒食子酸 (Gallic acid)、兒茶酸 (Protocatechuic acid)、咖啡酸 (Caffeic acid)、阿魏酸 (Ferulic acid)、綠原酸 (Chlorogenic acid)、土耳其鞣酸 (Ellagic acid) 及 Guavin B 存在於 GL 中，其結構以表一呈現；而類黃酮化合物多以槲皮素—配糖體存在，以及其他類黃酮化合物 (表二)；單寧類則以 Amritoside (ellagic acid 4-gentiobioside)、Guavin、Isostrictinin、Strictinin、

Pedunculagin 及(+)-gallocatechin 存在於 GL 中；而類異戊二烯又分為單萜類 (Monoterpenes) 及萜類化合物 (Terpenoids) 存在 GL 中 (表三)。

表一、番石榴中酚酸化合物

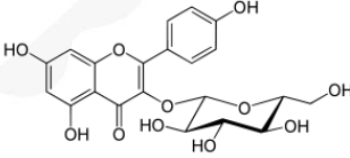
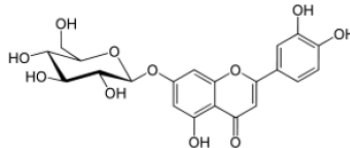
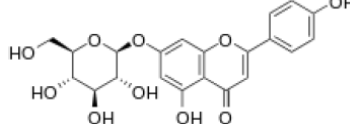
Table 1. Phenolic acid compounds isolated from *Psidium guayava* L.

Phenolic acid	Structure	Phenolic acid	Structure
Gallic acid		Ferulic acid	
Protocatechuic acid		Chlorogenic acid	
Caffeic acid		Ellagic acid	
Guavin B			

(Gutiérrez et al., 2008)

表二、番石榴葉中分離出的類黃酮類化合物

Table 2. Flavonoids isolated from *Psidium guayava* L.

Flavonols	Flavonoids-glycosides	Structure
	Avicularin	R ₁ : L-arabinofuranoside
	Quercetin 3-O-L-arabinofuranoside	R ₂ : H
	Guaijaverin	R ₁ : α-L-arabinopyranoside
	Quercetin 3-O-α-L-arabinopyranoside	R ₂ : H
	Isoquercetin	R ₁ : β-D-glucoside
	Quercetin 3-O-β-D-glucoside	R ₂ : H
	Hyperin	R ₁ : β-D-galactoside
	Quercetin 3-O-β-D-galactoside	R ₂ : H
	Quercitrin	R ₁ : β-L-rhamnoside
	Quercetin 3-O-β-L-rhamnoside	R ₂ : H
	Quercetin 3-O-β-D arabinopyranoside	R ₁ : β-D arabinopyranoside R ₂ : H
	Quercetin 3-O-gentiobioside	R ₁ : gentiobioside R ₂ : H
	Quercetin 4'-glucuronoide	R ₁ : H R ₂ : glucuronoide
	Morin	
	Morin-3-O-α-L-lyxopyranoside	R ₁ : α-L-lyxopyranoside
	Morin-3-O-α-L-arabinopyranoside	R ₁ : α-L-arabinopyranoside
	Kæ mpferol	
	Kæ mpferol-3-glucoside	
	Luteolin	
	Luteolin-7-O-glucoside	
	Apigenin	
	Apigenin-7-O-glucoside	

(Metwally et al., 2011)

表三、番石榴葉中的類異戊二烯

Table 3. Isoprenoids from *Psidium guayava* L.

Monoterpenes		Terpenoids
Caryophyllene oxide	β -bisabolene	Guavanoic acid
β -selinene	β -sesquiphellandrene	Guavacoumaric acid
1,8-cineole	β -bisabolol	Guajanoic acid
α -pinene	aromadendrene	Ursolic acid
myrcene	α -and β -selinene	2 α -hydroxyursolic acid
δ -elemene	caryophellene epoxide	Maslinic acid
d-limonene	caryophylladienol	Asiatic acid
caryophyllene	(E)-nerolidol	Jacoumaric acid
linalool	Selin-11-en-4-alpha-ol	Isoneriucoumaric acid
	eugenol	Guajavanoic acid
ethyl 2-methyl-thiazolidine-4-(R)-carboxylate		Guajavolide
Me 2-methylthiazolidine-4-(R)-carboxylate		Guavenoic acid

(Metwally et al., 2011)

(二) 番石榴葉生理活性

1. 抗腹瀉

Lutterodt (1992) 利用大鼠的小腸推進率作為評估抗腹瀉之能力，結果顯示透過 0.2 g/kg 番石榴葉的作用可抑制 65% 之小腸推進率，且 Gonçalves *et al.*, (2005) 發現番石榴葉甲醇萃取物對猴子輪狀病毒脫水性腹瀉具有 93.8% 抑制能力，而 Palombo (2006) 指出在多酚類化合物中 Flavonoids 及 Tannins 透過增加結腸的水分及電解質的再吸收進而減緩腹瀉，且 Quercetin 可以使腸道內平滑肌鬆弛 (Morales *et al.*, 1994)。

2. 抗菌

Nair and Chanda (2007) 使用甲醇、丙酮及 N, N-dimethylformamide 萃取番石榴葉，針對 91 種重要的臨床微生物菌株進行抗菌試驗。其中三種萃取物對於總革蘭氏陰性細菌菌株的抑制能力具有 76.36%，對於大腸桿菌、克雷伯菌屬、假單胞菌屬及變形桿菌分別具有 93.75%、83.33%、73.68% 及 66.66%，且對於真菌具有 31.25-56.25%，但對於麴菌屬以及革蘭氏陰性細菌的鼠傷寒沙門氏桿菌屬、檸檬酸桿菌屬及產鹼桿菌屬並無抑制作用；其抗菌能力是因番石榴葉中的總類黃酮，而且以 guajaverine 和 psydolic acid 為主 (Shruthi *et al.*, 2013)。總類黃酮抑制能力可能是由於它們在細胞外和可溶性蛋白質形成複合物並與細菌細胞壁結合達到抑菌的目的 (Cowan, 1999)。

3. 保肝作用

肝硬化目前還無法清楚知道其病因，而氧化損傷是導致肝損傷的機制之一，特別是在酒精性和中毒性肝病。番石榴葉水萃取物 500 mg/kg 的濃度可保護大鼠經由四氯化碳所誘導之肝損傷作用 (K Roy *et al.*, 2006)，此外 Saber *et al.*, (2018) 指出番石榴葉以及其奈米脂質體顯著改善乙醯胺苯酚誘導的大鼠肝毒性；而因現代人的飲食以及生活習慣，罹患脂肪肝的人數亦逐漸攀升，Yoshitomi *et al.*, (2012) 使用具有代謝症候群之大鼠 (SHRSP/ZF) 餵食番石榴葉 6 周，發現番石榴葉顯著的降低肝臟內三酸甘油酯含量，並且觀察到其

脂滴形成的降低，此外亦能顯著降低血液中 GOT 和 GPT，因此提出番石榴葉具有改善因脂肪積聚所造成肝組織損傷。

4. 抗氧化及清除自由基

番石榴葉具有非常強的抗氧化活性，與其成分中含有許多抗氧化成份有關；其中以酚酸 (Phenolic acid)、類黃酮類 (Flavonoids) 和單寧類 (Tannins) 以及類異戊二烯 (Isoprenoids) 為其主要的成分 (Gutiérrez *et al.*, 2008; Metwally *et al.*, 2011; Shruthi *et al.*, 2013)。

5. 抗癌細胞生長及抗腫瘤活性

16 種泰國藥用植物中以番石榴葉精油具有最高抗口腔上皮癌細胞 (KB) 以及鼠白血病細胞 (P388) 增值的作用 (Manosroi *et al.*, 2006)。番石榴葉亦具有子宮頸癌細胞凋亡的作用 (Joseph *et al.*, 2010)；也有許多文獻指出番石榴葉可以抑制前列腺癌細胞 DU 145 (江健銓, 2015)、前列腺癌細胞 PC-3 (Ryu *et al.*, 2012)、人類胃癌細胞 (SNU-16)、人類肝癌細胞 (HepG2)、人類子宮癌細胞 (HeLa)、人類血癌細胞 (U937) (Moon *et al.*, 2011)、肺癌細胞 (Im *et al.*, 2012) 及大腸癌細胞 (HT-29) 等 (Lee & Park, 2010)，如此顯示番石榴葉具有開發為新的化療藥物來源做為抑制腫瘤及癌細胞生長的潛力。

6. 降血糖作用

自古以來番石榴葉及其果實為民間盛行之降血糖藥材，許多研究陸續證

實其體外、細胞、動物及人體的功效。在體外試驗方面，番石榴葉萃取物可抑制 α -amylase 及 α -glucosidase 酵素的能力，以延緩醣類的吸收進一步達到降血糖的效果，已純化出七種具有較高抑制酵素能力之化合物，分別為 quercetin、kaempferol、guaijaverin、avicularin、myricetin、hyperin 及 apigenin 等物質 (Wang *et al.*, 2010)。在細胞模式方面，超音波輔助萃取的番石榴葉水萃取物可改善胰島素阻抗的小鼠肝臟細胞 (FL83B) 中葡萄糖攝入量以及其醣原的累積 (Liu *et al.*, 2015)。而以第二型糖尿病大鼠探討番石榴葉乙醇萃取物對其低血糖以及醣代謝途徑之影響，發現番石榴葉萃取物具有改善第二型糖尿病小鼠的作用 (Chuan *et al.*, 2008)。此外以代謝症候群之大鼠 (SHRSP/ZF) 餵食番石榴葉 6 周，通過調節胰島素相關訊號改善大鼠骨骼肌中的葡萄糖代謝和胰島素敏感性 (Guo *et al.*, 2013)；在人體試驗方面，番石榴葉水萃取物被證實可降低人體餐後的血糖值，在日本也已通過當地特定用保健食品認證 (Deguchi *et al.*, 1998)。目前認為可能有效的化合物為丹寧酸、黃酮類、槲皮素、guaijaverin、五環三萜類化合物和其他化學成分 (Ojewole, 2005)。

7. 抗發炎效果

番石榴葉之萃取物因其含豐富之酚類及萜類物質，在世界各地的國家為常見之治療炎症疾病之藥物，研究指出番石榴葉萃取物有益於治療瘡瘡

(Qa'dan *et al.*, 2005), 可有效的抑制由白蛋白及鹿角菜膠所誘發之大鼠腳水腫的現象 (Ojewole, 2006), 以及其保留發酵液可抑制由 LPS 所誘導之巨噬細胞發炎 (Soo-Youn *et al.*, 2008)。

二、萃取方法比較

植物萃取物的活性成分含量主要和其萃取的方法有關。熱迴流、索式以及浸漬法為普遍常用的萃取方法，但這些方法都需要數十個小時至數天的萃取時間，且其過程更是會耗費大量的能源並使用大量的有機溶劑，容易對環境造成傷害，因此近年來一些對環境友善的萃取方法已經被開發且逐漸的普及使用於植化素的萃取應用，超音波萃取即為其中的一種，可在幾秒鐘或幾分鐘內進行多次的萃取，且有再現性，不但降低加工成本，亦簡化加工的操作與處理，更甚至提高最終產品的純度，並且改良有機溶劑萃取的缺點，可減少處理時間與溶劑使用量，且無溶劑回收問題，亦可於低溫下操作，解決熱水萃取時高溫所造成的熱損失，也可以避免低沸點物質揮發，保持較佳的活性物質與風味 (Chemat *et al.*, 2011)。另外，超音波的頻率高、波長短、穿透力強，因此可使萃取液充分與萃取物接觸，可提高萃取效率。其原理主要是利用音波在萃取溶液中傳導時，縱波會推動介質使溶液中的壓力產生變化，而產生極多的真空微小氣泡，當氣泡受壓後會隨即產生爆破，稱為空穴效應 (cavitation effect)，這些爆破的真空氣泡會產生強大的衝擊力，使細胞

破裂，而能將細胞中的成份分離出來，達到萃取的效果 (Chemat *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2018)。

由於過去的研究多以熱水或有機溶劑提取的方法進行番石榴葉萃取物降血糖能力的評估，尚無研究針對超音波技術提取之番石榴葉萃取物進行降血糖功效的探討。因此本研究目的為利用超音波輔助不同濃度乙醇，進行番石榴葉萃取，以獲得萃取物具有最高量的總多酚化合物及最高的醣解酵素抑制活性，並探討此萃取物於肌肉細胞中改善胰島素阻抗的功效與相關作用機制。

表四、超音波萃取法與現今常用的萃取方法的優缺點比較

Table 4. Comparison of advantages and disadvantages between ultrasonic extraction and commonly used extraction methods

	Ultrasound	Heat reflux	Soxhlet	Supercritical fluid	Steam distillation
Time-consuming	Save time	Waste time	Waste time	Save time	Waste time
Energy-consuming	Save energy	Waste energy	Waste energy	Waste energy	Waste energy
Safety of process	Secure	Intense heat	Flammable	High pressure	Intenes heat
Safety of extracts	Secure	Secure	Residual solvents	Secure	Secure
Applications	Widely used	Heat-sensitive component is limited	Residual solvents does not apply to food	Costly	Heat-sensitive component is limited

(劉景文, 2016)

三、高血糖與活性氧之關聯性

高血糖引起葡萄糖的氧化、蛋白酶糖基化及脂肪代謝異常等，是體內活性氧化物質 (Reactive oxygen species, ROS) 增加的主要原因，同時一些抗氧化酵素的活性也明顯的降低，使糖尿病患者體內存在一定程度的氧化反應。氧化反應會使組織對胰島素敏感性下降，造成葡萄糖的利用降低；此外，氧化反應還會促使胰臟 β 細胞凋亡，導致細胞數目減少，降低胰島素的合成與分泌，使糖在體內的代謝異常 (Green *et al.*, 2004)。

當血糖及胰島素濃度增加時，會直接刺激體內自由基的生成及降低抗氧化的能力，而這些自由基經由不同的途徑生成不同種類的自由基，包括：

1. 經由 Nicotine adenine dinucleotide phosphate (NAD(P)H) oxidase 生成的超氧化物 (Superoxide anion radical, $O_2^{\cdot -}$) (Li *et al.*, 2003)。
2. 葡萄糖氧化反應產生的氫氧自由基 (Hydroxy radical, $\cdot OH$) (Robertson *et al.*, 2003)。
3. 經由一氧化氮合成酶 (Nitric oxide synthase, NOSs) 所產生的一氧化氮 (NO) 和過氧亞硝基陰離子 ($ONOO^-$) (Hink *et al.*, 2001)。

胰臟中的 β 細胞抗氧化能力較弱，對自由基相當敏感且容易被破壞進而減少胰島素的分泌，反而更加重糖尿病的病情，高血糖誘發自由基的生成及降低抗氧化的能力，而自由基破壞 β 細胞分泌胰島素的功能及增加高血糖併

發症發生的機率。

(一) 自由基與活性氧

ROS 為人體內氧化代謝過程及自然防禦系統中所產生具有高度活性的物質。ROS 又分為含氧自由基 (Free radical) 及含氧非自由基 (表五)，而自由基定義為具獨立不成對電子的原子、分子或離子，因其性質活潑，極易與附近的分子產生反應，抓取其電子，自身成為穩定的配對狀態釋放出能量，使該分子產生新的不穩定自由基，引起連鎖反應，因此造成生物體嚴重生理衰老和病理變化 (Li *et al.*, 2018)。

表五、活性氧物質 (ROS)分類

Table 5. Sorting of Reactive Oxygen Species

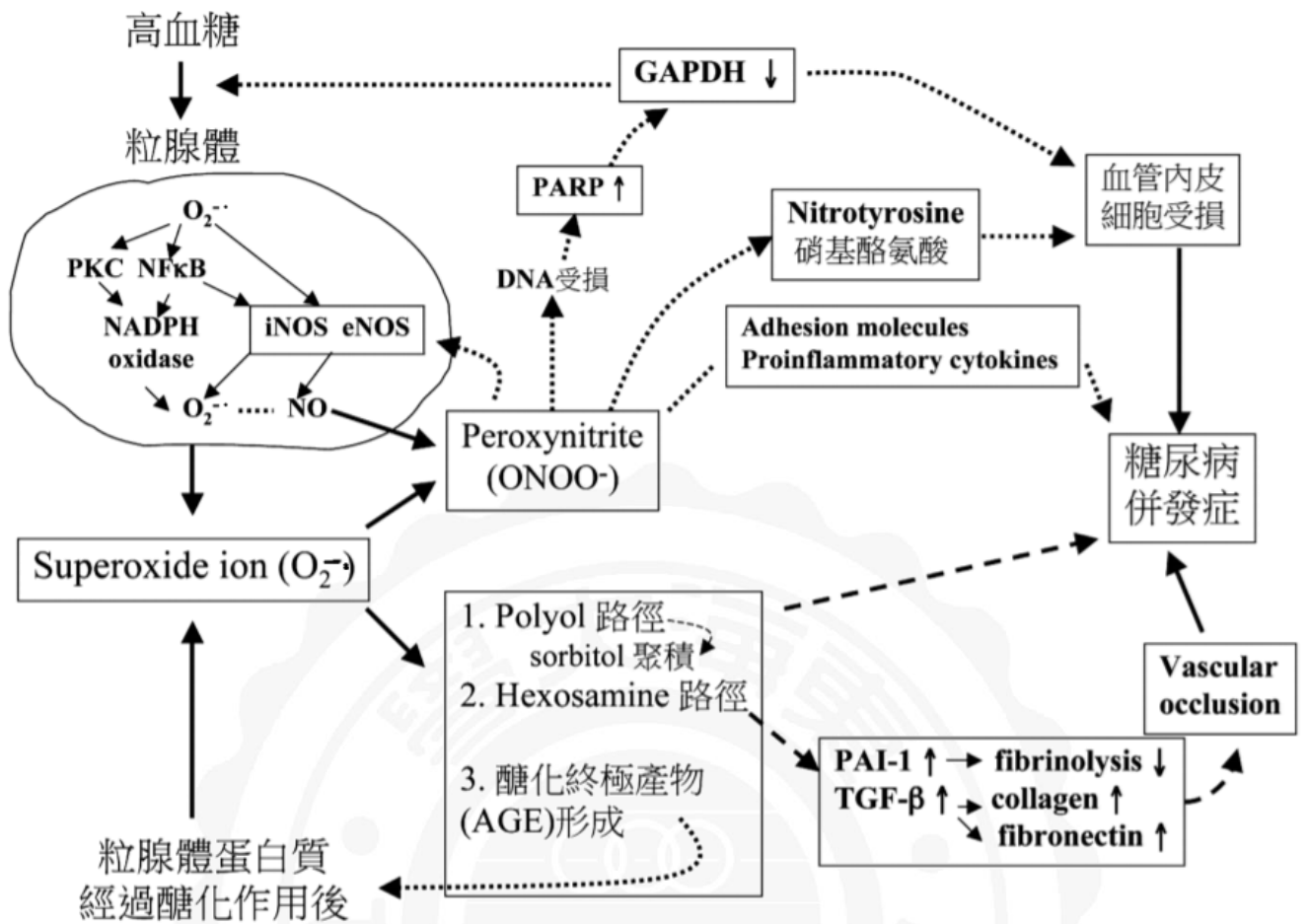
Radicals		Non-Radicals	
$O_2^{\cdot -}$	Superoxide anion radical	H_2O_2	Hydrogen Peroxide
$\cdot OH$	Hydroxyl radical	$HOCl$	Hypochlorous acid
ROO^{\cdot}	Peroxyl radical	O_3	Ozone
RO^{\cdot}	Alkoxyl radical	1O_2	Singlet oxygen
HO_2^{\cdot}	Hydroperoxyl	$ONOO^{\cdot}$	Peroxynitrite
$\cdot NO$	Nitric oxide		

(二) 高血糖誘導活性氧之生成機制

指出當處在高血糖環境中，血管內皮細胞中的粒腺體 (Mitochondria) 過度生成的 superoxide 陰離子是導致高血糖的原因 (Brownlee, 2001)，更進一步指出四個可能導致糖尿病高血糖併發症的致病機制 (圖一)：

1. 增加的多元醇 (Polyol) 路徑流動
2. 過多的醣化終產物 (Advanced glycation end-product, AGE) 物質形成
3. 蛋白質激酶 C (Protein kinase C, PKC) 的活化
4. 增加的 Hexosamine 路徑流動等。

而這四條導致高血糖併發症的致病機制源頭為超氧陰離子自由基，且會抑制細胞內葡萄糖代謝路徑中的 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 活性， $O_2^{\cdot-}$ 會和 NO (nitric oxide) 反應形成 peroxynitrite (ONOO⁻)，進一步傷害 DNA 以及藉由硝基酪氨酸 (Nitrotyrosine) 等中間產物引發細胞的受損。而 Hexosamine 路徑也會藉由 PAI-1 和 TGF- β 之增加而促進血管阻塞，同時在高血糖的環境下，粒腺體蛋白質會被醣化作用而進一步激發 $O_2^{\cdot-}$ 的形成。因此，即使高血糖的環境已經被改善或正常化後，先前經過醣化作用後的粒腺體依然會產生過多的 $O_2^{\cdot-}$ ，持續導致高血糖致病機制過程的進展。



(吳崇榮，2009)

圖一、超氧陰離子 $O_2^{\cdot-}$ 導致糖尿病高血糖併發症之機制

Fig 1. Mechanism of superoxide anion $O_2^{\cdot-}$ causing diabetic hyperglycemia complications

(三) 抗氧化系統

不同的抗氧化劑展現的抗氧化特性皆有不同，大至可分為下列四種：

1. 自由基清除劑 (Free radical scavenger)

此類抗氧化劑主要為酚類化合物，藉由提供電子或氫原子給自由基，而本身的苯環結構上的不成對電子會轉移而形成穩定的共振結構，由於此類抗氧化劑主要是針對連鎖反應中的增殖步驟 (propagation)，所以屬於一級抗氧化劑 (primary antioxidants) (Labuza & Dugan, 1971; Shahidi *et al.*, 1992)。

2. 還原劑或氧清除劑 (Oxygen scavenger)

主要在於捕捉氧原子，提供還原狀態的環境或還原已氧化的過氧化物，減緩氧化進行，如核黃素 (riboflavin) 及抗壞血酸等 (拱玉郎，1997)。

3. 金屬螯合劑 (Metal chelator)

此類物質本身不具抗氧化功能，但因其結構上有一個未共用的電子對，能夠螯合促氧化過渡金屬，形成穩定的化合物而抑制油脂的自氧化反應及延緩氧化反應之進行，如檸檬酸、聚磷酸鹽及EDTA等，可輔助抗氧化劑，使其效果更佳 (Kochhar & Rossell, 1990)。

4. 單重態氧抑制劑 (Singlet oxygen inhibitor)

此類抑制劑能吸收光敏劑所釋放的過多能量，使單重態氧恢復成反應性

較低的三重態氧型態，如 β -carotene 和 triethylamine (Kellogg & Fridovich, 1975)。

(四) 抗氧化成分與糖尿病

長期處於高血糖狀態會與游離脂肪酸誘發前部分所提起的四種高血糖誘導ROS生成機制，所以透過減低醣化反應作用的角度來抑制氧化壓力的發生，能夠保護細胞及組織免受傷害。而四種ROS生成機制的根源均因為粒線體中 $O_2^{\cdot -}$ 增加，因此預防粒線體的氧化壓力損傷也被認為是治療高血糖的目標之一 (Evans *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2016)。

由於主要分泌胰島素的胰 β 細胞內抗氧化酵素含量較低，對於高血糖所引發之ROS也較為敏感，因此會影響胰 β 細胞調控胰島素基因之表現而導致其分泌胰島素失常。人體的細胞雖然易受ROS攻擊，但可透過體內的抗氧化酵素超氧化物歧化酶 (Superoxidase dismutase, SOD)、過氧化氫酶 (Catalase) 及麩胱甘肽過氧化酵素 (Glutathione peroxidase, GPX) 等防禦系統來清除 (Evans *et al.*, 2003)。現今許多研究也陸續以植物中的抗氧化成分，如類黃酮、酚酸等，致力於高血糖之治療，且具有良好之效果。

四、高血糖與醣解酵素之關聯性

食物中的澱粉分別經由唾腺與胰臟分泌的澱粉酶先行消化分解成較小分子，最後再經由小腸上皮細胞所分泌的葡萄糖苷酶水解成葡萄糖，才能被

人體吸收及利用，進而促使血糖上升，而高血糖因胰島素分泌不足或組織的胰島素阻抗等原因導致血糖過高，進而造成許多身體系統損害，因此可利用抑制醣解酵素 α -澱粉酶 (α -amylase) 及 α -葡萄糖苷酶 (α -glucosidase) 延緩葡萄糖吸收，以利降低餐後高血糖之現象 (Vadivelan *et al.*, 2018)。

醣解酵素分為四種，分別為內澱粉酵素 (Endoamylases)、外澱粉酵素 (Exoamylases)，去支酵素 (Debranching enzymes) 和轉移酵素 (Transferases)。(Sivaramakrishnan *et al.*, 2006)

1. 內澱粉酵素切割內部 α -1,4 鍵，使其產生 α -首旋異構物 (α -anomeric)。
2. 外澱粉酵素切割外部葡萄糖殘基的 α -1,4 或 α -1,6 鍵，使其產生 α -或 β -變旋異構物。
3. 去支酵素切割 α -1,6 鍵，而留下直鏈多醣。
4. 轉移酵素切割輔酶的 α -1,4 糖苷鍵並將輔酶的一部分轉移至糖苷受體，從而形成新的糖苷鍵。

(一) α -澱粉酶 (α -amylase)

α -amylase (α -(1,4)-D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) 為內切型醣解酵素，屬於糖苷水解酶類酶家族 13 (GH-13)，可將多醣之 α -1,4-O-glycosidic bonds 催化水解成還原糖，並保留 α -anomeric，多數的 α -amylase 為金屬酵素 (Metalloenzymes)，需透過鈣離子 (Ca^{2+}) 維持其活性、結構完整性及穩定性。

α -amylase 廣泛於存在哺乳動物的唾液及胰液中以及植物組織及微生物當中 (Sindhu *et al.*, 2017)。

(二) α -葡萄糖苷酶 (α -glucosidase)

α -glucosidase (α -D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.20) 屬外切型醣解酵素，主要存在於小腸上皮細胞表面的絨毛刷緣 (Brush border) 中，可將多醣經由此酵素催化並釋放非還原端的 D-葡萄糖，其包括 glucoamylase、sucrase、maltase 及 isomaltase 等酵素，若 α -glucosidase 的活性過高會促使小腸對葡萄糖的吸收，進而造成高血糖，另外 α -glucosidase 也被證實與許多疾病有相關，它與 I 型和 IV 型膠原蛋白會透過細胞相互作用參與腫瘤轉移 (Zheng *et al.*, 2018)、 α -glucosidase 的抑制可以降低 DM 患者腦血管病變 (Patel, 2016) 和結直腸癌 (Tseng *et al.*, 2015) 的風險以及龐貝氏病 (Pompe disease) 為體染色體隱性疾病會影響 α -glucosidase (Chan *et al.*, 2017)。

(三) 醣解酵素活性抑制對高血醣症狀之改善

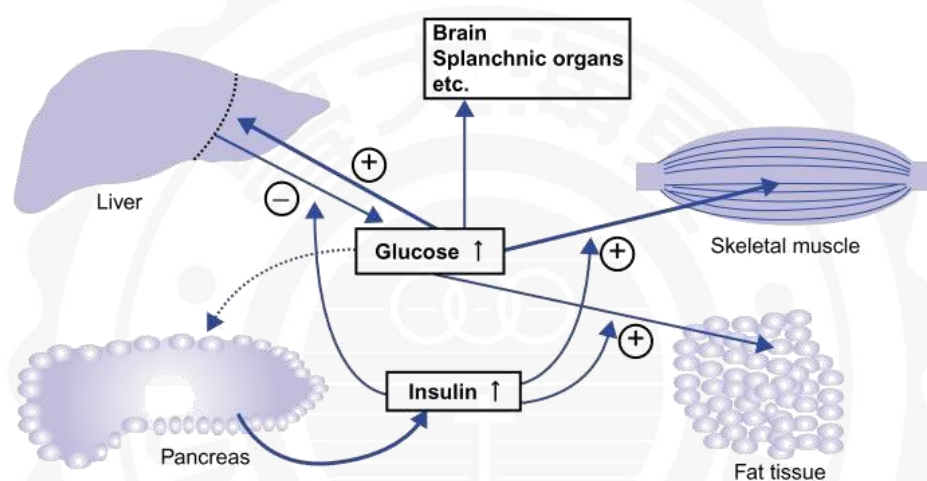
醣解酵素 α -amylase 及 α -glucosidase 抑制劑，可降低多醣水解成葡萄糖之速度，進而降低人體對葡萄糖的吸收，以減緩飯後高血糖，維持血糖穩定。目前臨床上應用之 α -glucosidase inhibitor 有 Acarbose 及 Voglibose 等藥物，兩者均與 α -glucosidase 具有很高的親和力，會與食物中之多醣類相互競爭 α -glucosidase，進而抑制小腸內多醣類的水解，延緩單醣產生，有效降低飯後血

糖及胰島素濃度，但也因為如此導致腸道中食物的消化吸收受到延遲，一部分未被消化完全的食物到達結腸，引發腸道菌的產氣發酵，引起病患腹脹不適、頻頻排氣、腹瀉、腹鳴等腸胃不適之副作用。

據研究指出，類黃酮化合物與酚類化合物對 α -amylase 與 α -glucosidase 具抑制作用。羥基 (hydroxyl group, -OH) 的位置與數量為其抑制 α -glucosidase 之關鍵 (Proença *et al.*, 2017)。此外，-OH 與羧酸 (carboxylic acid groups, -COOH) 會與 α -amylase 的色胺酸殘基 (Trp residues) 形成強的氫鍵相互作用，其 Trp residues 周圍環境極性細小的改變都有可能對 Ca^{2+} 活性結合位點形成穩定性，以此抑制 α -amylase 的活性 (Wu *et al.*, 2017)。

五、體內血糖恆定

在人體中，無論是在飢餓或飽食的狀態下，人體血糖濃度應維持在 4-7 mmol/L，在進食一到兩個小時後升高，而在睡眠結束後降到最低。要維持體內血糖恆定除依賴胰臟細胞分泌胰島素外，還需受胰島素調控之周邊組織參與，即肌肉、脂肪與肝臟，如附圖二 (Zierath & Kawano, 2003)。



圖二、維持血糖恆定之周邊組織

Fig 2. Maintaining constant blood sugar in peripheral organization

(一) 胰島素分泌與其功能

胰臟又稱為胰腺，具有外分泌及內分泌功能的腺體，外分泌功能主要由腺泡連通腸腔的導管組成，負責合成、儲存及分泌消化酵素，例如胰腺酶 (Pancreatic lipase)、澱粉酶 (Amylase)、磷脂酶 (Phospholipase) 及核酸酶 (Nucleases) 等，並且經導管進入十二指腸；內分泌由胰島所組成；胰島分泌胰島素、胰高血糖素、胰多肽和生長抑制素等激素。胰島素、胰高血糖素對

維持血糖水平有十分重要的作用 (Jouvet & Estall, 2017)。

胰腺的內分泌功能約佔其總質量的 2%，由胰臟蘭氏小島 (islets of Langerhans) 組成，包含 5 種不同的細胞類型： α -、 β -、 δ -、 ϵ -及 γ (Pancreatic polypeptide, PP) 細胞 (Kojima *et al.*, 2007)。

1. β -細胞：分泌澱粉素 (Amylin)、C-peptide 和胰島素，降低血糖，促進肝糖原的合成等作用。
2. α -細胞：分泌升糖素 (Glucagon)，可以促進肝糖原分解，使血糖升高。
3. δ -細胞：分泌生長抑制素 (Somatostatin)，當血中葡萄糖或胺基酸濃度高時， δ -細胞便會釋出，於內分泌方面抑制升糖素、胰島素、生長激素和甲狀腺素的分泌，而外分泌方面則減緩腸道運動以增加營養素吸收的時間。
4. ϵ -細胞：分泌類生長激素 (Ghrelin) 釋放肽。
5. γ (PP) 細胞產生胰腺多肽，其在胰腺內局部起作用以自動調節內分泌功能並調節胃腸分泌。

胰島素和升糖素是胰腺分泌的主要激素，它們在調節葡萄糖穩態中起關鍵的拮抗作用。 β -細胞因高血糖而分泌胰島素釋放至血液中，並且與受體結合以促進葡萄糖攝取和儲存，尤其在肝臟、肌肉和脂肪細胞含量特別高 (Jouvet & Estall, 2017)。

胰島素為 51 個胺基酸組合而成，分為 21 個胺基酸的 A 鏈及 30 個胺基

酸的 B 鏈並以 A 鏈及 B 鏈內兩個半胱胺酸（位於 A7 與 B7、A20 與 B19）之巰基互相結合而形成 2 個雙硫鍵鍵結，分子量為 5808 Da，成熟的胰島素會以鋅離子配位的二聚體存於細胞中 (Hossain & Bathgate, 2018)。

葡萄糖為刺激胰島素分泌之主要因子，而胺基酸、游離脂肪酸、乙醯膽鹼、神經肽類物質、腸泌素或其他激素也會影響胰島素分泌。在健康的個體中，葡萄糖通過葡萄糖轉運蛋白 (GLUT2) 促進擴散進入 β -細胞。葡萄糖被細胞攝取後，經葡萄糖激酶 (Glucokinase) 催化產生 glucose-6-phosphate，過程中被代謝產生丙酮酸 (Pyruvate)、NADH 及 ATP。在線粒體中，Pyruvate 和 NADH 通過 Tricarboxylic acid (TCA) cycle 和氧化磷酸化 (Oxidative phosphorylation) 促進 ATP 的產生，而 ATP 的增加會導致 K^+ -ATP 通道的關閉，進而促使細胞膜去極化，活化 Ca^{2+} 通道，使細胞內鈣離子濃度上升，促使胰島素分泌 (Mitsuhsa *et al.*, 2013)。

胰島素除調控血糖，也是體內調節醣類、蛋白質及脂質代謝的賀爾蒙之一 (Dimitriadis *et al.*, 2011)：

1. 醣類代謝

促進肌肉與脂肪細胞的葡萄糖攝取，進而增加六碳糖激酶 (Hexokinase) 與 6-phosphofructokinase 的活性，進行糖酵解 (Glycolysis) 與肝醣合成，並抑制糖質新生 (Gluconeogenesis) 與肝醣分解 (Glycogenolysis)。

2. 脂質代謝

降低脂肪組織的脂解作用 (Lipolysis) 及肌肉與肝臟中的脂肪酸氧化。促進組織帶入血中的三酸甘油酯，降低血中脂肪酸的濃度，並刺激組織中的脂肪酸與三酸甘油酯合成。可增加肝臟中極低密度脂蛋白及膽固醇合成。

3. 蛋白質代謝

增加胺基酸帶入組織中，促進蛋白質的合成，並降低肌肉中的蛋白質降解以及減少尿素 (Urea) 的形成。

(二) 肌肉與血糖恆定

肌肉、肝臟及脂肪組織為受胰島素調控的周邊組織，尤其以肌肉為其主要攝取葡萄糖的組織，在空腹時，腦與內臟利用大部份的葡萄糖，各別佔 50% 與 25%，剩餘 25% 主要由肌肉所使用；在飽食狀態下，肌肉組織所攝入的葡萄糖佔全身的 75-90%，且能感應體內血糖濃度的變化以消耗葡萄糖，倘若血液中葡萄糖濃度並沒有隨著血中胰島素濃度升高而下降，那便是組織具有胰島素阻抗及胰島素敏感性低下，胰島素對周邊組織攝入葡萄糖與代謝之調控皆須藉由細胞內的傳訊，當肌肉中胰島素傳訊受損會造成受胰島素刺激之葡萄糖轉運率降低 (J.W. *et al.*, 2001; Workeneh & Bajaj, 2013)，故肌肉中胰島素傳訊之分子，其表現量下降或功能受損影響傳訊，皆可能造成高血糖。

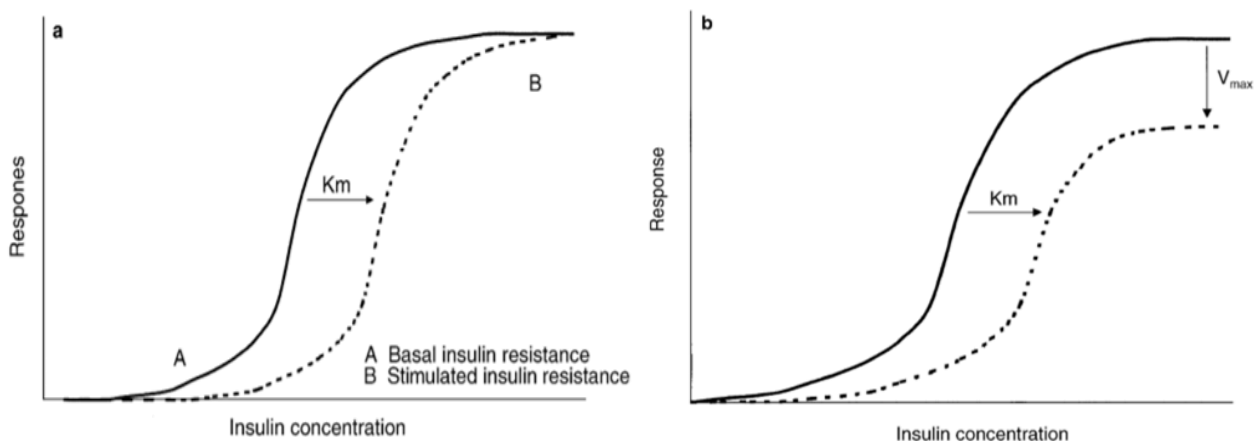
(三) 胰島素阻抗 (Insulin resistance)

體內受胰島素調控之周邊組織，如肌肉、肝臟及脂肪，對胰島素的調控失去反應能力，造成葡萄糖的吸收與代謝無法正常運作，稱之胰島素阻抗。

胰島素阻抗發生的原因主要分為四個部分，敘述如下：

1. 因生理反應而導致，例如在懷孕和青春期而發生胰島素阻抗。
2. 因疾病而導致。
3. 作為主要現象出現，再促使其他疾病產生。
4. 特定基因缺陷，如胰島素受體突變。

胰島素阻抗除了導致高血糖外，亦會引發高血壓、血脂異常、高尿酸血症及肥胖等，為代謝症候群 (Metabolic syndrome)、T2D、心血管疾病的致病病因。當胰島素產生的濃度低於正常的生物反應時，便會改變胰島素作用劑量與反應曲線的差異 (圖三)，實線為正常的胰島素敏感性狀態，而虛線則是胰島素阻抗狀態，在胰島素阻抗時 Insulin/glucose 作用曲線會向右移動，代表為達所需作用的效應，其 Insulin 濃度上升，即為 K_m 值增加 (圖三 a)，這也代表無論給予任何濃度的胰島素，能促使葡萄糖與組織作用下降，即為 V_{max} 值下降 (圖三 b)。(M. & R., 2002)。



(M. & R., 2002)

圖三、胰島素劑量與反應曲線

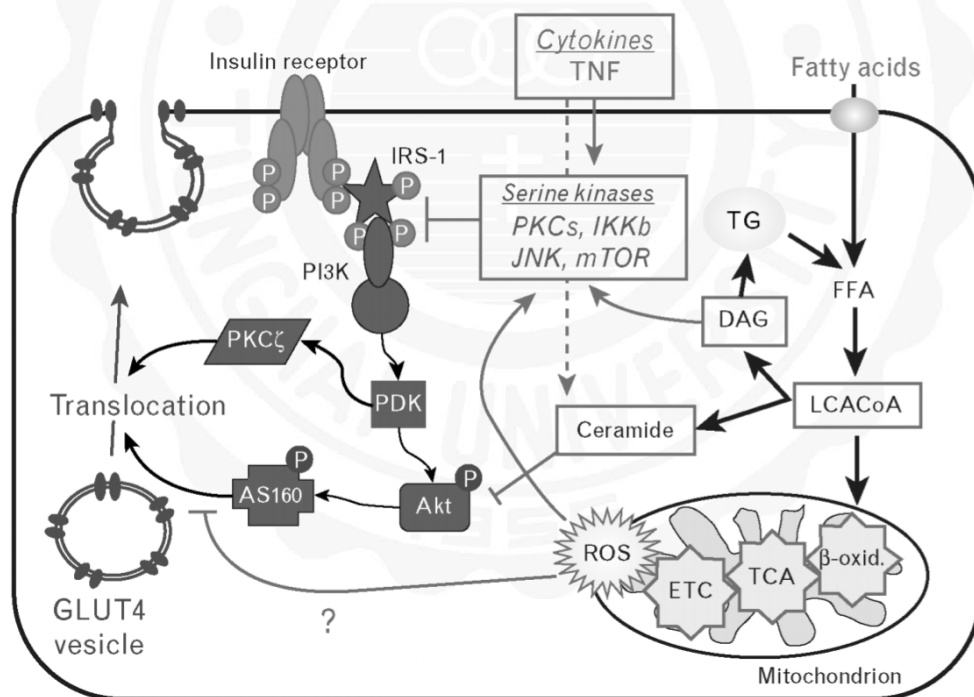
Fig 3. Insulin dose-response curve

(四) 肌肉中的胰島素阻抗

現今除了使用動物模式誘導胰島素阻抗產生高血糖的治療研究平台，還有三個受胰島素調控之臟器，即肌肉、肝臟與脂肪組織也常被用來做為研究胰島素傳訊相關機制。細胞株需可模擬接近生理狀況的傳訊模式，如肌肉細胞 C2C12 與脂肪細胞 3T3-L1 等常被用於研究體外細胞模式之傳訊。目前肌肉細胞誘導成胰島素阻抗之研究，大多使用脂肪酸來誘導胰島素阻抗，尤其是以棕櫚酸 (Palmitic acid) 為大宗。近來許多研究證明，游離脂肪酸 (Free fatty acid, FFA) 為造成胰島素阻抗之重要因子之一 (黃鈺萍，2012; Rachek, 2014; Patel, 2016 ;Chen *et al.*, 2018)。

脂肪酸過多會導致肌肉細胞內脂質 (Intramyocellular lipid) 的累積，例如 Diacylglycerol (DAG) 及 Ceramides。DAG 會激活 Serine kinases 使其磷酸化

並且降低 Insulin receptor substrate 1 (IRS-1)的表現量；Ceramide 會抑制胰島素途徑的 Akt 表現量，並且增生脂肪酸或釋放鞘磷脂 (Sphingolipids) 刺激細胞激素 (cytokines)，例如腫瘤壞死因子 Tumour necrosis factor (TNF)，而 TNF 和其他與脂肪積累相關的細胞因子也可以通過發炎的途徑直接激活 Serine kinases；也會透過粒線體中 tricarboxylic acid (TCA) cycle 和 electron transport chain (ETC)，使過量的脂肪酸氧化導致脂肪酸代謝物和 ROS 的增加，可激活細胞內 Stress kinases，但可能會抑制胰島素途徑 Akt 和 AS160 下游的蛋白質表現量，進而導致 GLUT4 轉移至細胞膜上 (圖四) (Rachek, 2014)。

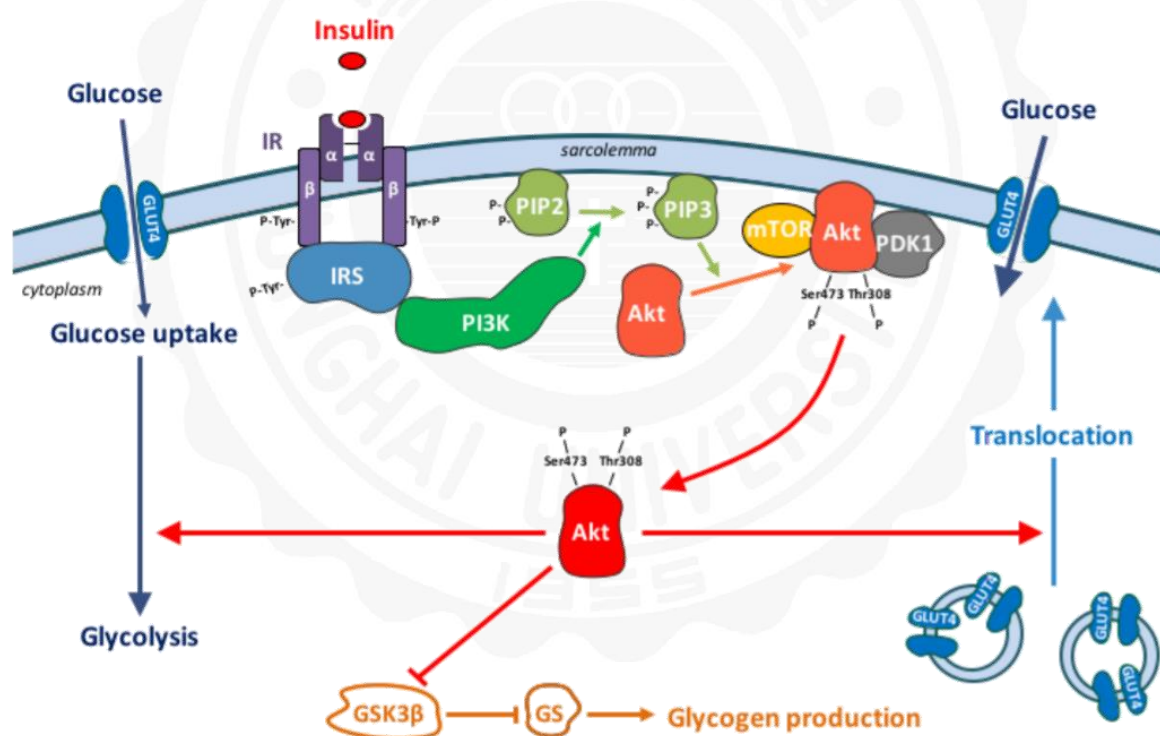


圖四、肌肉中脂肪酸誘導的胰島素抵抗的潛在機制

Fig 4. Potential mechanisms of fatty acid-induced insulin resistance in muscle

六、肌肉細胞層面之作用途徑

當胰臟 β -細胞因高血糖而釋放胰島素至血液中，且與肌肉細胞膜上胰島素受體 (Insulin receptor, IR) 的 β 次單元結合，並透過磷酸化胰島素受體基質 (Insulin receptor substrate, IRS) 家族，傳訊給磷脂肌醇-3-激酶 (PI3 kinase, PI3K)，與 PI3K p85 次單元結合，使 PI3K 合成 PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate)，啟動下游蛋白質激酶 B (Protein kinase B, PKB, 又稱 Akt) 的活性，帶動一連串的生長與代謝機制 (圖五)。

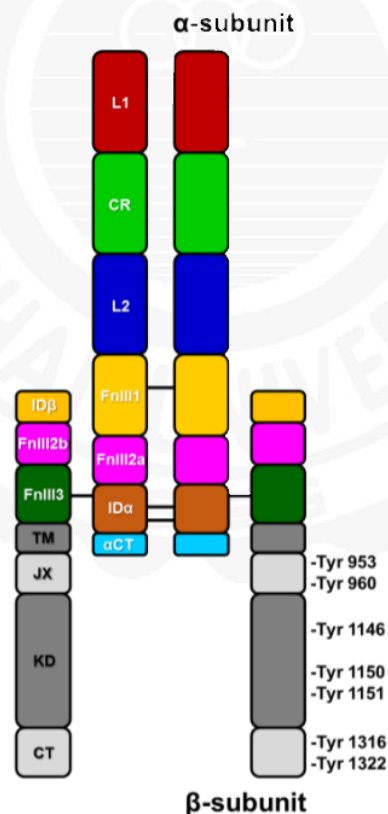


(Boulinguez *et al.*, 2017)

圖五、胰島素在肌肉細胞中作用途徑
Fig 5. insulin signaling in skeletal muscle

(一) 胰島素受體(Insulin receptor, IR)

胰島素受體屬受體酪胺酸激酶 (Receptor tyrosine kinase, RTK) 家族，由兩個與細胞膜外之 α 次單元 (α -subunits) 與兩個穿膜 β 次單元 (β -subunits) 所組成之四聚體蛋白質， α -subunits 與 β -subunits 間以雙硫鍵連接 (圖六) (Youngren, 2007)。當血液中胰島素與 IR α 次單元結合，活化 β 次單元的 JX，促使 Tyr 953 與 Tyr 960 啟動自體磷酸化，並帶動下游的傳訊，如 Tyr 960 會與 IRS 結合使其磷酸化 (He *et al.*, 1995)。當 IR 無正常運作，會導致胰島素阻抗，進而引發肥胖及高血糖等 (Accili *et al.*, 1996)。

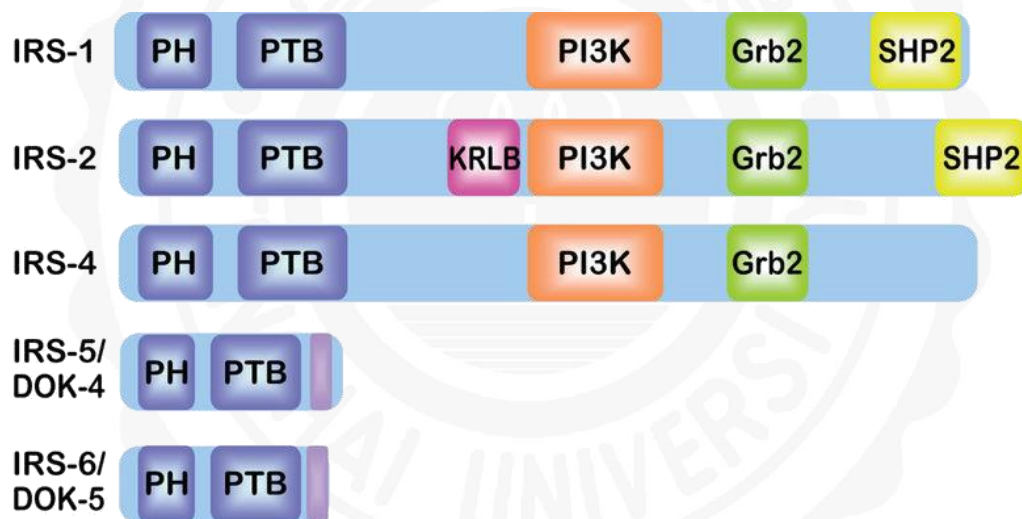


圖六、Insulin receptor 結構

Fig 6. Structure of the insulin receptor

(二) 胰島素受體基質 (Insulin receptor substrate, IRS)

IRS 為細胞質轉接蛋白，皆含有一個 PH 區域 (Pleckstrin homology domain) 以及一個磷酸化 Tyr 結合區 (Phosphotyrosine-binding domain, PTB domain) 會被 IR 的 Tyr 960 磷酸化如 PI3K p85 結合之停靠點，且含數個 Tyr 與 Ser 磷酸化位點 (White *et al.*, 1985; Posner, 2017)，若降低 IRS 的 Tyr 磷酸化，會提高 30% 高血糖的機率，如增加 Ser 磷酸化，會降低胰島素作用的敏感度而減少傳訊 (Sesti *et al.*, 2001)。



圖七、IRS 蛋白家族相互作用的區域

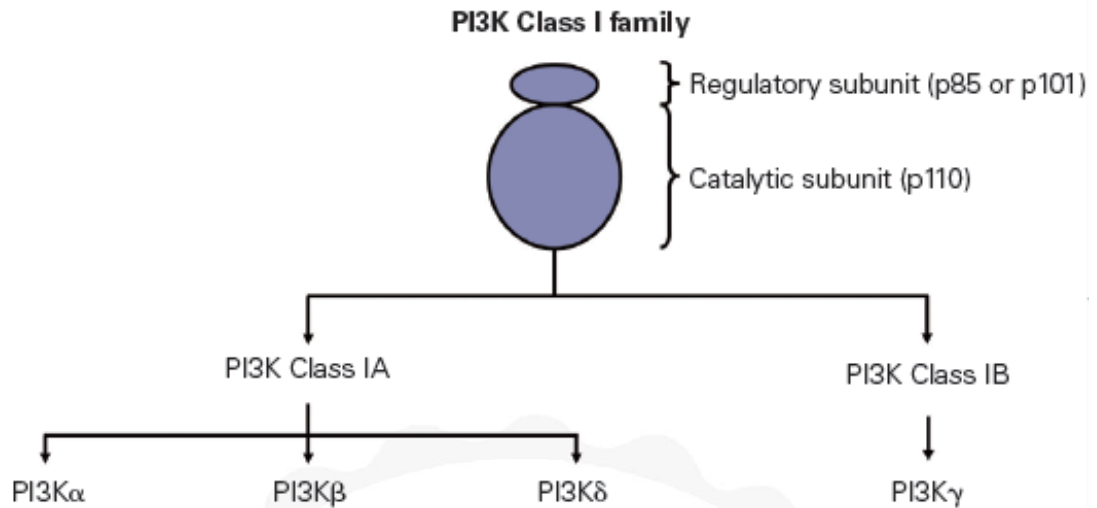
Fig 7. Schematic of the IRS protein family

IRS 家族中以 IRS-1 與 IRS-2 為胰島素受體基質家族中主要參與醣類代謝的調控，也是肌肉組織中參與胰島素作用之蛋白質，如果 IRS-1 表現量降低時，會造成肌肉組織產生胰島素阻抗，降低葡萄糖的攝入及葡萄糖轉運蛋白的轉位，但剔除 IRS-2 基因並不會影響到肌肉中葡萄糖的攝入 (Huang *et*

al.,2005; Posner, 2017)。因此在肌肉組織中 IRS-1 與 IRS-2 功能不相同，主要是以 IRS-1 做為調控葡萄糖轉運與代謝並非 IRS-2。

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

PI3K 家族具有調控亞基 p85 與催化亞基 p110，可分為三類 (I、II 及 III)，其中 I 類又分為由 Tyrosine kinases 激活的 Class IA 與由 G protein-coupled receptors 激活的 Class IB，而與胰島素調控最相關為 Class IA，且 Class IA 又分為 α 、 β 、 δ (圖八)，PI3K α 會與 IRS 磷酸化後，p85 與 p110 形成之異二聚體 (Heterodimer) 結合至 IRS 的對接位，使之活化而產生 PIP₃ (Greenwell *et al.*, 2017; Matheny *et al.*, 2017)。PIP₃ 會接續傳訊給 PI3K/Akt 與 MAPK 兩條路徑，其中 PI3K/Akt 路徑為參與多數胰島素引起之代謝調控，包含葡萄糖、蛋白質與脂質代謝等。研究顯示，抑制 PI3K 會造成肌肉細胞 GLUT4 的 mRNA 表現量下降，使蛋白質表現與葡萄糖攝入也受到影響而降低 (Yeh *et al.*, 1995)。且 PI3K 突變或表現異常時，會導致血中胰島素濃度增加、葡萄糖耐受性異常及高血脂等，故 PI3K 為胰島素調控葡萄糖與脂肪代謝的重要因子 (Miyake *et al.*, 2002)。



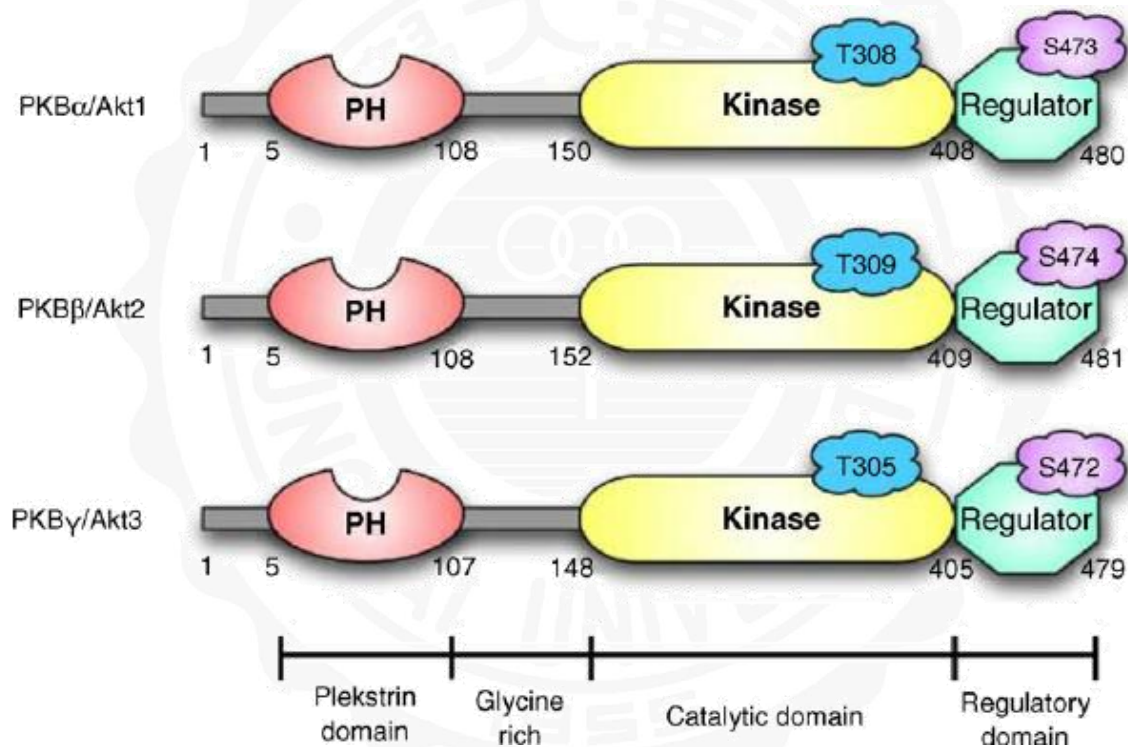
圖八、PI3K 家族分類

Fig 8. Organization of the Class I PI3K family

(四) 蛋白質激酶 B (Protein kinase B, PKB/Akt)

PI3K 活化後會活化下游 Serine/Threonine kinase，稱之蛋白質激酶 B (Protein kinase B, PKB)，又稱 Akt。依照 PH domain 的結構差異可分為 PKB α /Akt1、PKB β /Akt2 及 PKB γ /Akt3 (圖九)，其分佈與功能列於附表六 (Alessi *et al.*, 1996)。Akt 磷酸化位點 threonine³⁰⁸ (Thr³⁰⁸) 為活化所需，另一磷酸化 serine⁴⁷³ (Ser⁴⁷³) 則可使 Akt 活性達到最大 (Kim *et al.*, 2005; Elghazi *et al.*, 2006)。經研究證明，Akt1 缺失會影響胎盤的發育，而去除 Akt3 基因會影響出生後的腦部大小與發展，甚至影響細胞的數量及大小，但兩者皆不會影響體內葡萄糖的恆定與代謝；如果去除 Akt2 基因，則會導致空腹高血糖、高胰島素血症、葡萄糖不耐受性與肌肉葡萄糖攝入受損等症狀，且於受胰島素調控組織中，Akt1 與 Akt2 的數量較 Akt3 多 (Cho *et al.*, 2001)。亦有研究顯示肌

肉組織中，Akt1 可增加肝醣合成激酶 (Glycogen synthase kinase 3, GSK3) 磷酸化使其活性降低，而 Akt2 可增加葡萄糖的攝入，兩者皆可使肝醣含量上升，若抑制 Akt2 蛋白質表現則會降低肝醣含量及葡萄糖的攝入量，故兩者於肌肉中扮演著不同的角色 (Cleasby *et al.*,2007)。Akt 更可藉由磷酸化下游基質 AS160 抑制其活性，增加 GLUT4 轉位至細胞膜上帶入葡萄糖 (Dummler & Hemmings, 2007)。



(Elghazi *et al.*, 2006)

圖九、PKB/Akt 家族結構

Fig 9. Structure of PKB/Akt family

表六、Akt 異構型之分佈與功能。

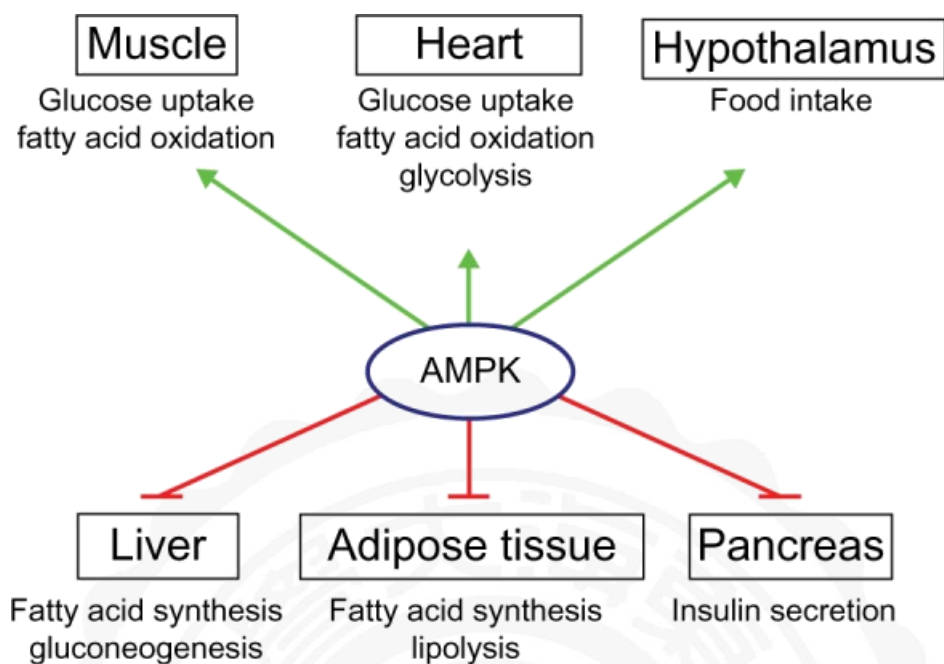
Table 6. Distribution and Function of Akt Heterotypes

Heterotypes	Distribution	Function
PKB α /Akt1	All of organs	Placental development、animal growth and fat synthesis
PKB β /Akt2	Insulin-sensitive organs such as muscle and fat	Glucose metabolism、lipogenesis and maintenance and animal growth
PKB γ /Akt3	Brain and Testis	Brain development

(五) AMP 活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK)

AMPK 為一種 serine/threonine kinase，由一個 α 催化亞基與 β 及 γ 兩個調控亞基所組成之三聚體 (Heterotrimer)， α 亞基含有激酶結構， β 亞基含有糖原結合結構， γ 亞基含有腺嘌呤核苷酸結合結構 (Matheny *et al.*, 2017)。是一種對能量敏感之激酶，可監控細胞內能量狀態的感應器，如細胞內 AMP/ATP 比例升高，也就是能源缺乏時，會使 AMPK threonine¹⁷²(Thr¹⁷²) 位點磷酸化而活化，因此促進 GLUT4 轉位至細胞膜上增加葡萄糖的帶入以利產生 ATP，並增加 ACC (acetyl-CoA carboxylase) 磷酸化以抑制脂肪酸的生合成，降低肌肉中三酸甘油脂含量，促進脂肪氧化，而增加肌肉的胰島素敏感性 (Chen *et al.*, 2003)，如附圖十所示。研究指出若 AMPK 突變，會抑制脂聯素所介導的葡萄糖攝入、脂肪酸氧化等代謝反應，由此可知肌肉中脂聯素增加葡萄糖攝入主要透過 AMPK 的活化，且 AMPK 能影響 IRS-1 與 PI3K 的活

性 (Coughlan *et al.*, 2014)。



(Coughlan *et al.*, 2014)

圖十、AMPK 在控制全身能量代謝中的作用

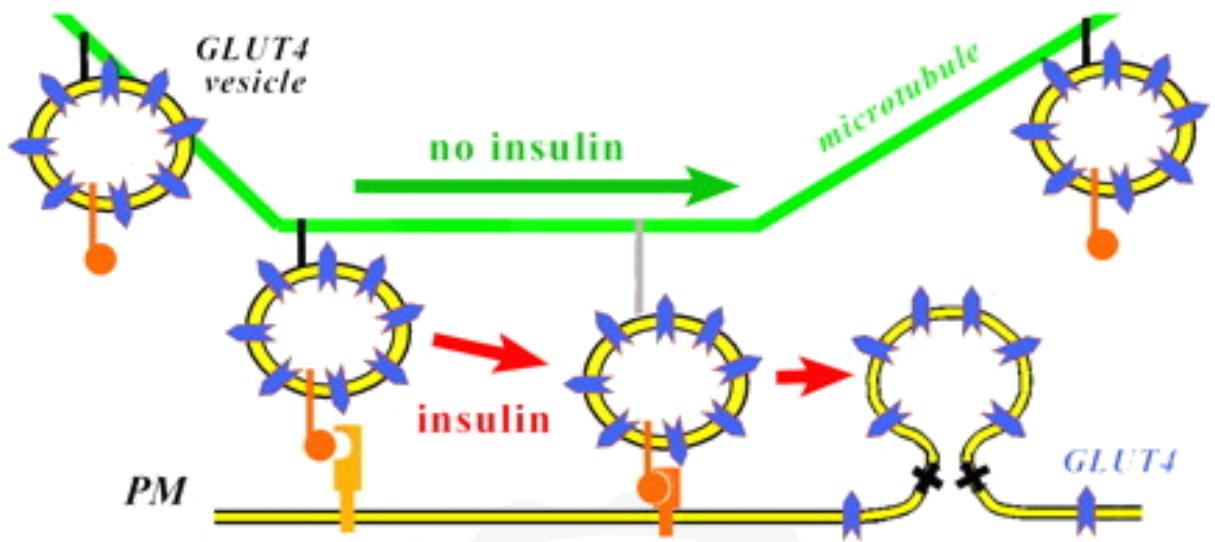
Fig 10. Roles of AMPK in the control of whole-body energy metabolism

(六) 葡萄糖轉運蛋白 (Glucose transporter, GLUT)

GLUT 可分為 I、II 及 III 三類。I 類以 GLUT1 至 GLUT4 表示，分別為：

1. GLUT1 由激素如甲狀腺激素控制的葡萄糖的雙向轉運有關。
2. GLUT2 主要在胰臟、肝臟及腎臟的 β 細胞中作用。
3. GLUT3 主要存在於大腦中。它對葡萄糖具有高親和力，這與將葡萄糖轉移到具有更高葡萄糖需求的細胞中的功能一致。
4. GLUT4 是在心臟、骨骼肌、脂肪組織和腦中的葡萄糖轉運蛋白。它存在於細胞質中的囊泡，在胰島素的作用下它會從細胞質轉移到質膜。

而 II 類為 GLUT5、GLUT7、GLUT9 和 GLUT11，主要是位於小腸細胞、
睪丸和腎臟的果糖轉運蛋白；III 類則為 GLUT6、GLUT8、GLUT10、GLUT12
和 GLUT13 (HMIT)，其轉運蛋白中的糖基化位點位於環 9 上，與其位於環 1
上的 I 類和 II 類轉運蛋白不同 (Navale & Paranjape, 2016)。肌肉中的葡萄糖
轉運蛋白以 GLUT1 與 GLUT4 兩者為主，GLUT1 廣泛存於各組織中，介導
基礎狀態的葡萄糖運送，而 GLUT4 負責胰島素刺激下的葡萄糖轉運，且於
細胞中的轉位與基因表現都受到調控。於正常狀態，有 90% 的 GLUT4 會儲存
於細胞質的小泡內，只有少部分在細胞膜上，當受到胰島素或脂聯素刺激、肌
肉收縮等會促使 GLUT4 轉位至膜上將葡萄糖帶入細胞內 (Zisman *et al.*,
2000)。且正常的狀態下，大部分 GLUT4 位於微管上的囊泡中，囊泡沿著微
管通過細胞膜上的融合位點，透過胰島素刺激細胞內 GLUT4 到第一個遇到
的融合位點與細胞膜融合在一起。研究指出，如增加 GLUT4 表現量，會促
進胰島素刺激的葡萄糖攝入作用，並改善葡萄糖耐受性與胰島素敏感性，反
之，將 GLUT4 基因剔除則會降低其表現量，導致肌肉葡萄糖攝取降低，並造
成高血糖及組織中胰島素抵抗與葡萄糖耐受性缺失，由此知 GLUT4 於葡萄
糖代謝的重要性 (Zisman *et al.*, 2000; Lizunov *et al.*, 2005; Navale & Paranjape,
2016)。



(Lizunov *et al.*, 2005)

圖十一、胰島素刺激的 GLUT4 到細胞膜中融合位點的機制

Fig 11. Mechanism of insulin-stimulated recruitment of GLUT4 vesicles to fusion sites in the PM

參、材料與方法

一、 實驗材料

(一) 原料來源

本試驗樣品為珍珠番石榴葉來自於彰化菁芩農場 (田中, 台灣), 主要採集可見花苞階段的葉子。

(二) 活性成分含量分析之試藥

1. 2,6-dichlorophenol Indophenol (DCPIP)、Ascorbic acid、Folin-Ciocalteu's phenol reagent (2N)、Gallic acid、Metaphosphoric Acid (HPO_3)、Quercetin、Sodium carbonate (Na_2CO_3) 及 Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3) 皆購自 Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA)。
2. Aluminium nitrate ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) 及 Potassium acetate (CH_3COOK) 皆購自 J.T.Baker[®] (PA, USA)。
3. Acetic acid (CH_3COOH) $\geq 99.0\%$ 購自聯工化學 (Hsinchu, Taiwan)。

(三) 抗氧化試驗之試藥

1. 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)、6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2,2 carboxylic acid (Trolox)、Ascorbic acid、Hydrogen peroxide (H_2O_2)、Peroxidase from horseradish、Potassium chloride (KCl)、

Potassium hexacyanoferrate(III) $K_3[Fe(CN)_6]$ 、Sodium chloride (NaCl)、Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$) 及 Trichloroacetic acid 皆購自 Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA)。

2. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) 及 Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4) 皆購自 J.T.Baker[®] (PA, USA)。
3. Iron(III) chloride ($FeCl_3$) $\geq 98.0\%$ 購自 Alfa Aesar (Lancashire, UK)。

(四) 調節血糖相關酵素試驗之試藥

1. 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)、 α -amylase (1663 U/mg protein)、 α -glucosidase (86 U/mg protein)、Acarbose、p-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (p-NPG)、Potato starch、Sodium carbonate (Na_2CO_3)、Sodium hydroxide (NaOH) 及 Sodium potassium tartrate tetrahydrate 皆購自 Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA)。
2. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) 及 Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4) 皆購自 J.T.Baker[®] (PA, USA)。

(五) 細胞株

小鼠肌肉細胞株 C2C12 cell line (Mouse myoblast ; BCRC number 60083) , 購自生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, Hsinchu, Taiwan)。

(六) 細胞培養及其他試藥

1. Dimethyl sulfoxide、Palmitic acid、Potassium chloride (KCl)、Sodium chloride (NaCl)、Sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3) 及 Sodium potassium tartrate tetrahydrate 皆購自 Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA)。
2. Bovine serum albumin、Dulbecco's modified eagle's medium 粉末 (high glucose)、Fetal bovine serum (10437)、Horse serum (16050)、Insulin, human Recombinant Zinc (4 mg/mL) 及 Trypsin-EDTA 購自 Gibco (NY, USA)。
3. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) 及 Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4) 皆購自 J.T.Baker[®] (PA, USA)。
4. Alamar Blue[®] 購自 Bio-Rad (CA, USA)。
5. Trypan blue 購自 Biological Industries (IL, USA)。

(七) 細胞內葡萄糖攝入試驗之試藥

1. 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose (2-NBDG) 購自 Invitrogen (OR, USA)。
2. Insulin, human Recombinant Zinc (4 mg/mL) 及 Trypsin-EDTA 購自 Gibco (NY, USA)。

(八) 蛋白質分析之試藥

1. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、Protease inhibitor cocktail 及 Sodium chloride (NaCl) 皆購自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。
2. Phosphatase inhibitor cocktail Set V (50X) 及 Protease inhibitor cocktail Set III 皆購自 Millipore (CA, USA)
3. BCATM Protein Assay Kit 購自 Pierce Biotechnology (IL, USA)。
4. Hydrochloric acid (HCl) 36.5%~38% 購自 聯工化學 (Hsinchu, Taiwan)。
5. Nonidet P-40 substitute (NP-40) 購自 USB (OH, USA)。
6. Tris-base 購自 J.T.Baker[®] (PA, USA)。

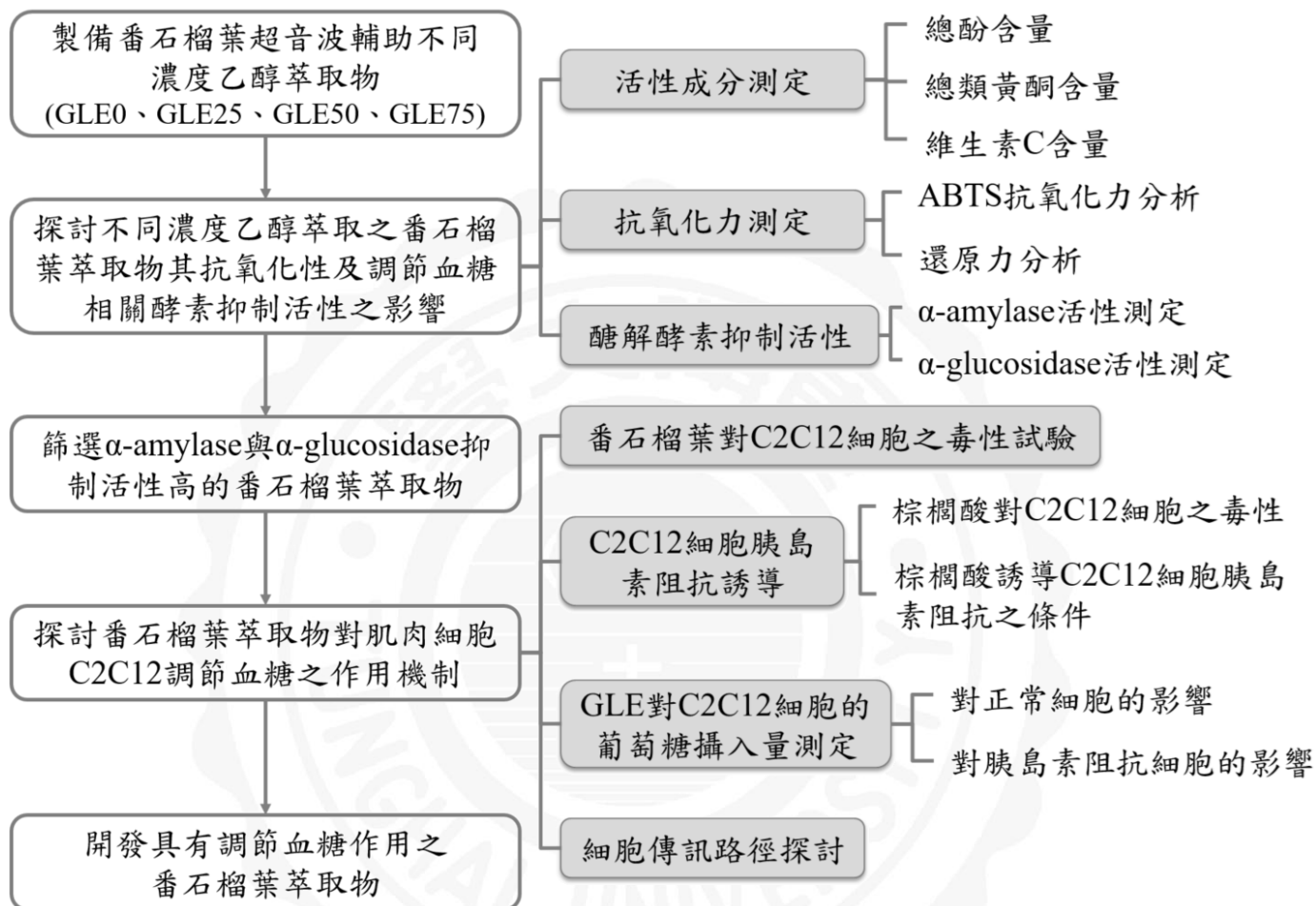
(九) 西方轉漬之試藥

1. Sodium chloride (NaCl) 及 Sodium dodecyl sulfate (SDS) 皆購自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。
2. ImmobilonTM western chemiluminescent HRP substrate 及 Sodium tetraborate decahydrate (Na₂B₄O₇) 皆購自 Merck (Darmstadt, DE)。
3. Bløk Noise Cancelling Reagents 及 Polyvinylidene Fluoride (PVDF) Membranes 皆購自 Millipore (MA, USA)。
4. N,N,N,N,-Tetramethylethylenediamine (TEMED) 購自 Alfa Aesar (Lancashire, UK)。

5. Glycine 及 Tris-base 皆購自 J.T.Baker[®] (PA, USA)。
6. Glycerol 及 Tween-20 皆購自 Panreac Quimca Sa (Barcelona, ES)。
7. Hydrochloric acid (HCl) 36.5%~38% 購自 聯工化學 (Hsinchu, Taiwan)。
8. Acryamide-bis solution 40% 購自 SERVA (BW, DE)。
9. Ammonium persulfate ultrapure (APS) 購自 GERBU (Gaiberg, DE)。
10. Bovine serum albumin 購自 Gibco (NY, USA)。
11. Methyl alcohol 購自 Mallinckrodt Baker (NJ, USA)。
12. BlueRAY prestained protein ladder 購自 GeneDireX (Bruges, Belgium)。
13. Blotting paper 購自 Whatman plc. (Kent, UK)。

二、實驗方法

(一) 實驗流程



圖十二、實驗流程圖

Fig 12. Experimental flow chart.

(二) 實驗方法

1. 番石榴葉乙醇萃取物製備

採集的番石榴葉原料以水洗淨並瀝乾後，於 50°C 的烘箱中隔夜烘乾。乾燥後的原料以粉碎機粉碎且須通過 100 網目之篩網的粉碎葉子，參考 Liu *et al.*, (2015) 的超音波萃取方法，以固液比 1:12 分別加入純水、25% 乙醇、50% 乙醇及 75% 乙醇，在 60°C、避光的條件下將超音波的頻率設定在 15 kHz (BRANSON, Danbury, CT, USA) 5 min 完成萃取，並且使用真空濃縮機濃縮後於凍乾機進行凍乾形成粉末，分別以 GLE0、GLE25、GLE50 以及 GLE75 作為成品標示保存於攝氏-20°C 供後續實驗分析使用。

2. 總酚含量 (Total phenolic content, TPC) 測定

Folin-Ciocalteu's phenol reagent 與 TPC 之 OH 基進行反應，將產生由黃變藍之顏色變化，於波長 735 nm 具有最大吸光值，當吸光值越高代表所含 TPC 含量越多，以沒食子酸 (Gallic acid) 作為標準品製作標準曲線 (附錄一)，單位以 mg gallic acid equivalent/g extract 表示。

參照 Julkunen-Titto (1985) 之方法，分別取 50 μ L 樣品或不同濃度標準品 Gallic acid 與 1 mL H₂O 及 500 μ L Folin-Ciocalteu's phenol reagent 混合均勻，再加入 2.5 mL 之 20% Na₂CO₃ 溶液反應，於避光、室溫下靜置 20 min，以分光光度計檢測波長 735 nm 下之吸光值。

3. 總類黃酮含量測定 (Total flavonoid content, TFC) 測定

TFC 於鹼性環境下可與硝酸鋁形成穩定的黃色錯合物，並且於波長 415 nm 具有最大吸光值，當吸光值越高代表所含 TFC 含量越多，以槲皮素 (Quercetin) 作為標準品製作標準曲線 (附錄二)，單位以 mg quercetin equivalent/g extract 表示。

參照 Sarikurkcu (2008) 之方法，將 250 μL 樣品或不同濃度之 Quercetin 標準品，加入 10 % 硝酸鋁及 1 M 醋酸鉀各 50 μL ，再加入 1.4 mL 去離子水混合均勻，於避光、室溫下反應 40 min，以分光光度計檢測波長 415 nm 下之吸光值。

4. Trolox 當量抗氧化能力 (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) 測定

Horseshoe peroxidase 催化 H_2O_2 及 ABTS 反應形成 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ，此為穩定的藍綠色自由基物質，於波長 734 nm 有最大吸光值。若樣品具有抗氧化能力時，則能減少 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 形成量，導致吸光值下降，吸光值愈低，代表樣品之抗氧化能力愈強。

Trolox 是一種強抗氧化劑，許多文獻已證實具有良好之抗氧化力，因此以 trolox 作為評估抗氧化能力的標準，計算樣品的自由基清除能力相當於多少 trolox 當量 ($\mu\text{g trolox equivalent/mg extract}$)，即為樣品之 TEAC。

參照 Miller (1993) 及 Arnao (1996) 等人之方法加以修飾，將 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)、peroxidase 與 H_2O_2 混合均勻，使其最終系統濃度分別為 100 μM 、4.4 unit/mL 與 50 μM ，於 30°C 下避光反應 1 h，可形成穩定的藍綠色 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ，再分別加入 250 μL 樣品 (mg/mL) 及不同濃度之 trolox，混合均勻並於避光、室溫下反應 10 min，以分光光度計檢測波長 734 nm 下之吸光值，製作標準曲線 (附錄三)，以換算樣品之相對 trolox 當量。

5. 還原力分析 (Reducing power)

赤血鹽 ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) 會被抗氧化劑還原成黃血鹽 ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$)，而黃血鹽再與 Fe^{3+} 作用形成普魯士藍，於波長 700 nm 下具有最高的吸光值。若樣品具有抗氧化能力時，可還原赤血鹽並增加普魯士藍的形成，吸光值愈高，代表樣品之還原能力愈強。其反應式如下：

參照 Oyaizu (1986) 之方法加以修飾。分別將 250 μL 樣品或不同濃度維生素 C 溶液與 250 μL 的 0.2 M PBS (pH6.6) 及 250 μL 的 1% 鐵氰化鉀溶液混合均勻，且將混合液置於 50°C 反應 30 min。反應完成之後，加入 250 μL 的 10% 三氯乙酸，混合均勻，以 12298 x g 的條件離心 3 min。取 0.5 mL 的上清溶液與 0.5 mL 的去離子水和 0.1 mL 的 1% 三氯化鐵均勻混合，於室溫中靜置 10 min，以分光光度計測量波長 700 nm 的吸光值，製作標準曲線 (附

錄四),以換算樣品中相對之維生素 C 的當量,以 $\mu\text{g ascorbic acid equivalent/mg extract}$ 表示。

6. α -amylase 抑制能力分析 (α -Amylase inhibitory activities)

澱粉經 α -amylase 水解釋放游離醛或酮基之碳水化合物,在鹼性溶液下具有還原力之特性,能將具有氧化力的 DNS 還原成 3-Amino-5-nitrosalicylic acid,產生由黃變為橘紅之顏色變化,於波長 540 nm 下具有最高的吸光值。吸光值愈低,代表樣品之抑制 α -amylase 能力愈強。

取 α -amylase 溶於 0.02 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 6.9) 中,配製成最終酵素活性為 5U/mL 的酵素溶液。取 100 μL 的酵素液加入 100 μL 的樣品液中,混合均勻後於 37°C 中預反應 10 min。加入 800 μL 的 1 % starch solution 均勻混合,於 37°C 中反應 3 min。反應完成後,再加入 200 μL 的 5% dinitrosalicylic acid 試劑,混合均勻後於 90°C 反應 10 min 使酵素失活而中止反應,冷卻至室溫,以分光光度計測波長 540 nm 下的吸光值,此為實驗組之吸光值。控制組則以 100 μL 0.02 M PBS 取代樣品。換算樣品抑制 α -amylase 50%之濃度,以 IC_{50} 表示。正控制組使用 Acarbose,為一種治療第二型糖尿病的藥物,可抑制醣解酵素的作用,減緩飯後高血糖 (Zhang *et al.*, 2017)。

7. α -glucosidase 抑制能力分析 (α -Glucosidase inhibitory activities)

α -glucosidase 可將無色的 P-NPG 水解成黃色的 P-NP 與 glucuronic acid,

因此產生由無色轉變為黃色之顏色變化，並且在波長 400 nm 時具有最大的吸光值，若樣品具有抑制 α -glucosidase 能力時，則能減少 P-NP 形成量，導致吸光值下降，當吸光值愈低，代表樣品之抑制能力越強。

參考 Adam (2010) 之方法並稍加修飾，取 5 mL 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 及 0.2 mL 3 mM GSH (L-glutathione reduced)、0.2 mL α -glucosidase 酵素液 (0.15 U/mL) 均勻混合，於 37°C 下反應 5 min 後添加 0.5 mL 0.3 mM 的受質 4-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside (p-NPG) 溶液與 1 mL 待測樣品，再次於 37°C 下反應 20 min 後，從混合液取 2 mL 再加入到含 8 mL 100 mM Na₂CO₃ 溶液充分混合，使酵素失活終止其反應，以分光光度計測其在 400 nm 下的吸光值，以 IC₅₀ 表示。正控制組使用 Acarbose。

8. 細胞培養

自液態氮桶中取出細胞凍存管，於 37°C 水浴槽解凍後，移入無菌操作台內，將細胞懸浮液加於培養皿中，再緩慢加入培養基，混合均勻後，置於含 5% CO₂ 之 37°C 培養箱，待細胞生長至 7-8 分滿時進行繼代培養。

細胞繼代與鋪盤為細胞生長至 7~8 分滿後，將其培養基吸除，並以 PBS 清洗後，加入 1x Trypsin-EDTA 於培養箱中作用，待細胞懸浮後，加入含血清以培養基終止 Trypsin-EDTA 作用，並將此細胞平均分配至培養皿中。

9. 細胞分化

細胞計數後，以 10^4 cells/well 種至 24 孔盤或 6 孔盤中及以 5000 cells/well 鋪至 96 孔盤中，培養至九分滿後，將培養基吸除，加入含分化試劑之培養基，進行細胞分化，每 2 天更換一次培養基，待細胞分化至 80% 為肌管細胞，即可進行實驗。

10. 誘導細胞產生胰島素阻抗

當細胞 80% 分化為肌管細胞時，將分化培養基更換為含 2% BSA 及 0.75 mM palmitic acid 之無血清培養基，與細胞共置 16 h，再以葡萄糖擬似物 2-NBDG 攝入量，判斷是否已誘導細胞產生胰島素阻抗。

11. 細胞存活率之測定

Alamar blue 為一個用於分析試劑或成分對於細胞存活率的標準呈色方法。細胞主要代謝途徑都涉及氧化還原反應，其中活細胞的粒線體中 NADH/NAD⁺ 為細胞主要代謝控制因子。Alamar blue 於氧化狀態下呈現紫藍色無螢光性，而在還原狀態下，轉變為呈粉紅或紅色螢光的還原產物，因此氧化狀態下的 alamar blue 被代謝時產生的 NADH 還原成粉紅或紅色螢光的還原產物，並且在波長 570 nm 時具有最大的吸光值，當吸光值越高，代表細胞活性越強。

將細胞以每孔 5×10^3 cell 的數量種入 96 孔無菌培養盤中，待其分化成

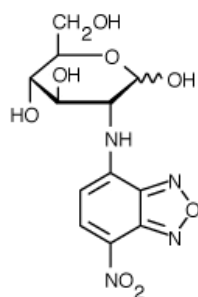
肌管細胞後，添加不同濃度的 GLE 與細胞共同培養 24 h，移除上清液並用 PBS 清洗 2 次後，加入使用 DMEM 稀釋 50X 的 alamar blue[®] 於 37°C 避光培養 1.5-3 h，以分光光度計測其在 570 nm 下的吸光值，以存活率表示。

$$\text{存活率 (\%)} = \left(\frac{\text{處理組吸光值}}{\text{控制組吸光值}} \right) \times 100$$

12. 葡萄糖攝入試驗

2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-amino]-2-deoxy-D-glucose

(2NBDG) 為一種葡萄糖擬似物，分子量為 342.26，結構式如圖十三，其激發波長為 465 nm，激發後於 540 nm 放出螢光。將細胞處在飢餓的環境下與樣品共同培養，而後添加 2NBDG 使細胞食用帶入胞內，而後利用螢光儀測量胞內 2NBD 含量。



圖十三、2-NBDG 結構式

Fig 13. 2-NBDG Structure

將細胞以每孔 5×10^3 cell 的數量種入 96 孔無菌培養盤中，待其分化成肌管細胞後，分為正常細胞組、正常細胞添加胰島素阻 (5 $\mu\text{g/mL}$)、胰島素阻

抗組及胰島素阻抗添加胰島素組，而後添加不同濃度之 GLE25 與各組細胞共同培養 30 min，以及 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之 GLE25 與細胞共同培養 30、60、90 及 120 min，之後加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的螢光標記 2-NBDG 於 37°C 避光培養 50 min。移除上清液並用 PBS 清洗 3 次後，用 1x Trypsin-EDTA 將細胞切下並將其懸浮於 PBS 中。將螢光分光光度計 (TECAN, Salzburg, Austria) 設定激發光波長為 465 nm 和放射光波長為 540 nm 以偵測螢光強度並計算葡萄糖相對攝入百分率。

$$\text{相對葡萄糖攝入 (\%)} = \left(\frac{\text{處理組螢光強度}}{\text{控制組螢光強度}} \right) \times 100$$

13. 蛋白質萃取

將 C2C12 細胞培養於 6 well 或 10 cm dish 中，分化成肌管細胞後，待其分化成肌管細胞後，分為正常細胞組、正常細胞添加胰島素組 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、胰島素阻抗組及胰島素阻抗添加胰島素組，而後添加 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之 GLE25 與細胞共同培養 24 h。移除上清液並用 PBS 清洗 2 次後，加入 300 μL Lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5、150 mM NaCl、1% NP-40、2 mM EDTA、Phosphatase Inhibitor Cocktail Set V (50X) 及 Protease Inhibitor Cocktail Set III)，使用刮勺刮取細胞並收集，於 4°C 以 13200rpm 離心 20 min，所得上清液為細胞總蛋白質，存於 -20°C 備用。

14. 蛋白質定量

由 C2C12 細胞抽取之總蛋白質，使用 BCA™ Protein Assay Kit 進行定量。將蛋白質適當稀釋後，取 10 μ L 與 200 μ L 已混合之試劑 (Reagent A : Reagent=50 : 1) 於 37°C 下避光反應 30 min，偵測波長 570 nm 之吸光值，並以標準品 BSA 做為標準曲線，使用內差法估算肌肉細胞中總蛋白質濃度。

15. 西方轉漬分析

取 20 μ g 蛋白質樣品與 Lysis buffer 及 1X Dye 混合均勻，於 95°C 加熱 5 min 後，在 Running buffer (192 mM glycine、24.8 mM Tris-base 及 0.1% SDS) 中，以 8% 的下層膠進行 SDS-PAGE，使蛋白質分離；而後於 10 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ Transfer buffer 中，將電泳膠上蛋白質轉漬至 Polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上。將膜置於 2% BSA-TBST (20 mM Tris-base、150 mM NaCl 及 0.1% Tween-20) 或 Block Noise Cancelling Reagents 中，以 100-150 rpm 震盪 1 h 後，加入可辨認目標蛋白質之一級抗體 (表七)，於室溫下震盪 2 h 而後至於 4°C Overnight；而後將帶有一級抗體蛋白的 PVDF 膜以 TBST 漂洗 3~5 次，每次 5 min，再加入二級抗體 (表七) 於室溫下震盪 1 h，再以 TBST 漂洗 3~5 次，每次 5 min，最後於膜上加入 Chemiluminescent HRP Substrate 反應，經由 LI-COR, Inc. Odyssey® Fc 掃描後以 Image Studio software 進行定量。

(三) 統計分析

所有實驗結果以三重複之平均值±標準差表示。統計分析以 ANOVA 判定有無差異性，再以 Duncan's multiple range test 檢定兩兩之間是否有顯著差異，當 $p < 0.05$ 於統計上認定有顯著差異。

表七、實驗中使用之一級、二級抗體。

Table 7. Primary antibody and secondary antibody used in the experiment

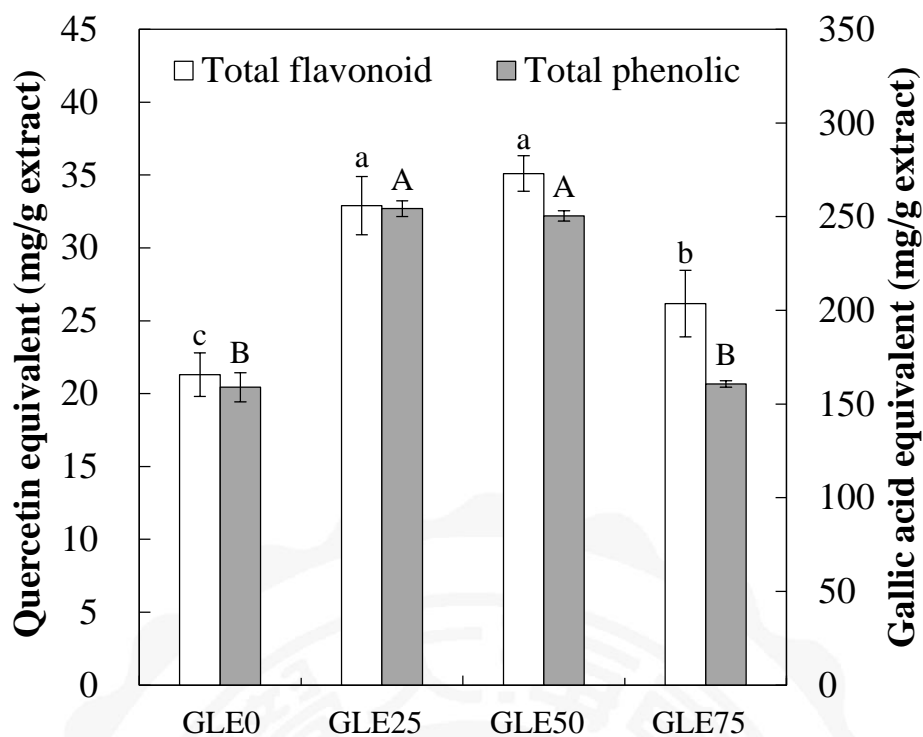
抗體	廠牌	稀釋倍數	目錄編號
p-ACC (Ser 79)	Merck Millipore	1:1000	07-303
p-AMPK α (Thr172)	Merck Millipore	1:500	07-626
GAPDH	Merck Millipore	1:1000	MAB374
GLUT4	Merck Millipore	1:1000	07-1404
GT X MS	Merck Millipore	1:10000	AP124P
GT X Rb	Merck Millipore	1:10000	AP132P
p-IRS-1	Merck Millipore	1:1000	05-1087
p-PI3K	Merck Millipore	1:2000	MABS831
PKB/Akt α -p (Ser 473)	Merck Millipore	1:1000	05-669

肆、結果與討論

一、乙醇萃取濃度對萃取物中總酚和總類黃酮含量之影響

本試驗所採用之樣品為來自於彰化菁芬農場（田中，台灣）之可見花苞階段的珍珠番石榴葉，歷經洗淨、烘乾、粉碎後，以固液比 1:12 分別加入不同濃度的乙醇（GLE0、GLE25、GLE50 及 GLE75），在 60°C、15 kHz 的超音波頻率下萃取 5 min，再凍乾成粉末，以此萃取物比較其中的總酚及總類黃酮含量。結果顯示，四種萃取物中總類黃酮含量介於 21.3-35.1 mg QE/g extract，而總酚含量，則介於 158.9-254.3 mg GAE /g extract（圖十四），隨著乙醇濃度的增加均有先增後減的趨勢，其中 GLE25 及 GLE50 的總類黃酮及總酚含量均顯著高於 GLE0 及 GLE75，分別為 32.9 與 35.1 mg QE/g extract 以及 254.3 與 250.3 mg GAE/g extract，然而 GLE25 及 GLE50 之間的總酚及總類黃酮含量並無顯著差異。

Qian & Nihorimbere (2004) 使用水以及 50% 乙醇萃取番石榴葉發現乙醇萃取之番石榴葉其中酚含量顯著高於水萃取，而 Tachakittirungrod *et al.*, (2007) 先以 95% EtOH 浸漬萃取 48 hr 而後再使用甲醇等有機溶劑二次萃取 48 h，發現其甲醇萃取之總酚含量顯著高於其他有機溶劑萃取，這表示番石榴葉中的活性成分的極性低於水。Nantitanon *et al.*, (2010) 指出植物之化學成分組成會受到品種、土壤、環境等變化而有所不同，



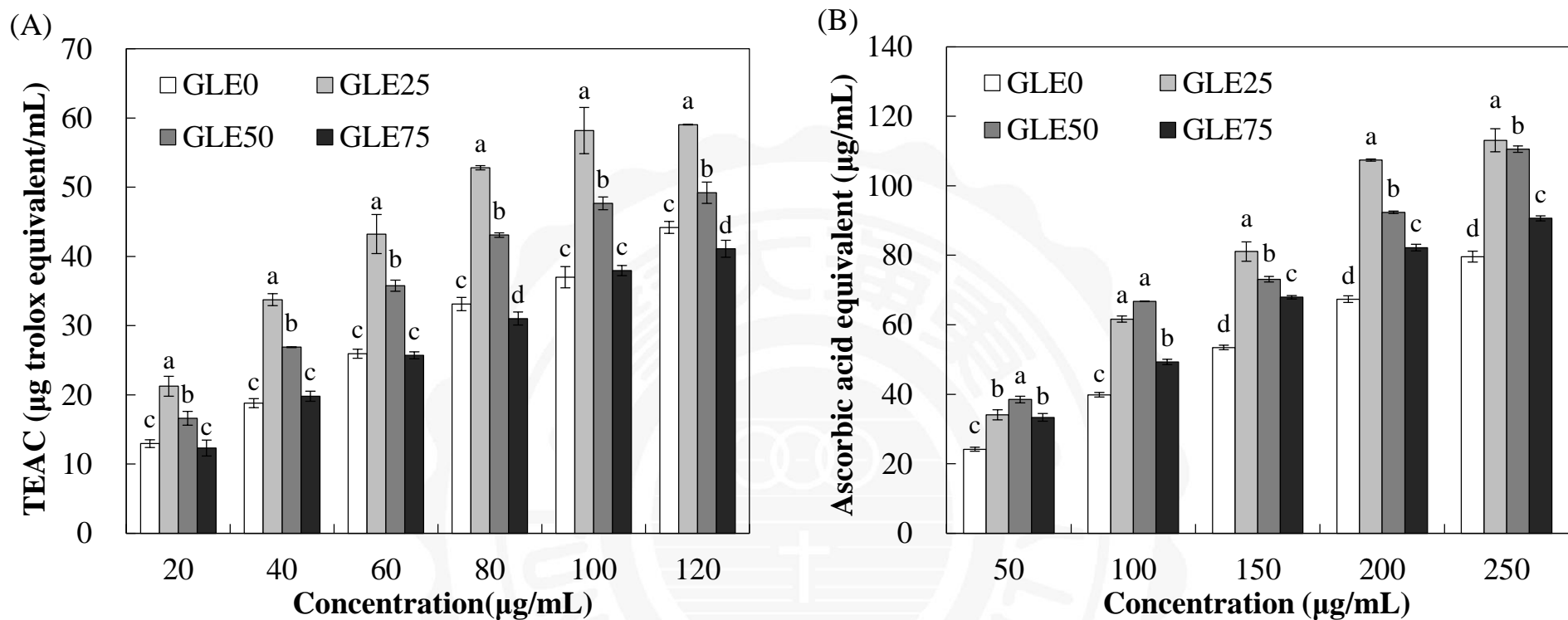
圖十四、乙醇萃取濃度對番石榴葉萃取物中總酚及總類黃酮含量之影響

Fig 14. Effects of ethanol extraction concentration of GLEs on their total phenolic and total flavonoid content. Bar represent mean \pm SD, n=3. Mean with different letters are significantly different ($p < 0.01$) by Duncan's multiple range test. Different capital letters and small letters represent a significant different within total phenolic and total flavonoid content, respectively.

也會受到採收季節與品種等因素影響，在其研究中使用不同時間採收的番石榴葉其總酚含量以分支頂端的葉子為最多；亦提出萃取方法也可能影響總酚的含量，分別使用浸漬 24 h 水萃取、攪拌 24 h 水萃取、超音波輔助乙醇萃取三次及索式輔助乙醇萃取 4 h，發現超音波輔助乙醇萃取三次的總酚含量為四種萃取方法中最高，為 136.02 mg GAE/g extract，而本研究利用超音波輔助 25-50% 乙醇萃取可得較高的總酚含量達 250.3-254.3 mg GEA/g extract。可能原因為超音波的頻率高、波長短且穿透力強，使萃取液能充分與萃取物接觸，可提高萃取效率 (Chemat *et al.*, 2011)。以上結果指出番石榴葉以 25-50% 乙醇輔以超音波之低耗能、低成本及高回收之萃取，可獲得最多的總酚和總類黃酮含量。

二、乙醇萃取濃度對萃取物中抗氧化力之影響

番石榴葉內含許多酚類化合物，這些化合物的相互作用有助於總體抗氧化活性之表現 (Pinelo *et al.*, 2004)。酚類化合物，藉由提供電子或氫原子給自由基，而本身的苯環結構上的不成對電子會轉移而形成穩定的共振結構，主要是針對連鎖反應中的增殖步驟，而具有還原能力之化合物主要在於捕捉氧原子，提供還原狀態的環境或還原已氧化的過氧化物，減緩氧化進行。因此，本研究使用兩種不同的抗氧化作用機制進行探討，分別為測量天然抗氧化劑清除自由基的能力以 TEAC 表示及總還原能力測定，以 AEE 表示。



圖十五、乙醇萃取濃度和番石榴葉萃取物劑量對抗氧化能力之影響

Fig 15. Effects of ethanol extraction concentration of GLE and its dosage on Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). (A) Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). (B) Reducing power. Bar represent mean \pm SD, n=3. Mean with different letters are significantly different ($p < 0.01$) by Duncan's multiple range test.

圖十五 A 為 TEAC 測定，以 Trolox 當量表示，當量越高代表抗氧化能力越強。結果顯示，隨著濃度的增加，所有萃取物的清除自由基能力也隨著增加，其中以 GLE25 效果最佳可達 59.1 $\mu\text{g TE/mL}$ ，其次為 GLE50 的 49.2 $\mu\text{g TE/mL}$ ，而 GLE0 與 GLE75 的清除自由基能力皆最低。當添加 20-120 $\mu\text{g/mL GLE25}$ 時，其自由基清除能力相當於 21.3-59.1 $\mu\text{g TE/mL}$ ，而 GLE50 則是 16.6-49.2 $\mu\text{g TE/mL}$ 。圖十五 B 為還原力測定，以 Ascorbic acid 當量表示，其還原能力與 TEAC 的趨勢相同，均為 GLE25 效果最佳，可達 113.1 $\mu\text{g AAE/mL}$ ，其次為 GLE50 (110.5 $\mu\text{g AAE/mL}$)，而 GLE0 與 GLE75 的還原力皆為最低；當添加 50-250 $\mu\text{g/mL GLE25}$ 時，其還原力相當於 34.1-113.1 $\mu\text{g AAE/mL}$ ，而 GLE50 則是 38.5-110.5 $\mu\text{g AAE/mL}$ 。番石榴葉萃取物的 TEAC 與還原力並無相關性 ($R^2=0.61$, $p<0.78$)，這表示每個萃取物部份中所存在的抗氧化成分具有不同的作用，此結果與 Tachakittirungrod *et al.*, (2007) 的結果一致。

Nantitanon *et al.*, (2010) 使用沸水煮沸芭樂葉 30 sec 後，再用冰水浸泡 15 min，所得之葉片進行 50°C、20 min 乾燥後磨粉，並且再以四種不同萃取方法進行萃取，發現乙醇超音波萃取 10 min 其 TEAC 效果最佳，可達 15.06 mM TE/mg extract，與本研究 GLE0 的 14.48 mM TE/mg extract 的結果相近，但與 GLE25 的 20.28 mM TE/mg extract 卻相差 1.3 倍。Tachakittirungrod *et al.*,

(2007) 使用不同極性的有機溶劑，分別為甲醇、乙醇、丁醇、乙酸乙酯及己烷，於室溫下萃取番石榴葉 48 h x 3 次，發現乙醇萃取物的清除自由基能力最高達 4.91 mM TE/mg extract，其次為甲醇的 3.78 mM TE/mg extract，而己烷萃取效率最低低於 1.06 mM TE/mg extract；其中乙醇萃取物的清除自由基能力低於本研究 2.5-4.3 倍。Liu *et al.*, (2014) 使用超音波水萃取番石榴葉，當使用萃取物 62.5 µg/mL 時，其還原力為 29.03 µg AAE/mL，而本研究使用 50 µg/mL 的 GLE0 時，就具有較高的還原力，可達 38.5 µg AAE/mL。

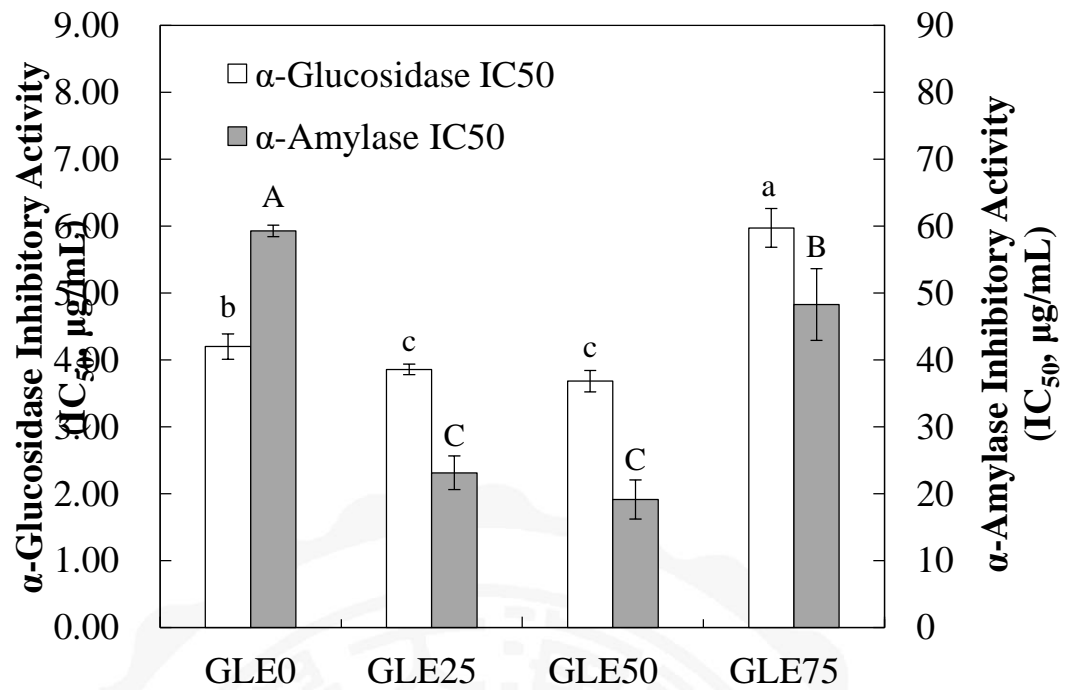
酚類化合物為天然的抗氧化劑，提供電子或氫原子給自由基使其穩定，並且本身的苯環結構上會形成穩定的共振結構，亦會還原已氧化的過氧化物 (江佩錚，2007)。由圖十四指出，GLE25 及 GLE50 得較高的總酚及總類黃酮含量，且圖十五表示 GLE25 的抗氧化效果最佳，其次為 GLE50。Suntornsuk, *et al.*, (2002) 指出番石榴葉內含 Vitamin C，為水溶性的物質，亦是已知的抗氧化劑，已被證實在許多代謝過程中為輔助因子的作用，可消除有害的自由基 (Zhao *et al.*, 2018)。由此推論 GLE25 的 Vitamin C 含量會多於 GLE50，因此抗氧化力以 GLE25 效果為最佳。

三、乙醇萃取濃度對萃取物中抑制醣解酵素活性之影響

醣解酵素 α -amylase 及 α -glucosidase 抑制劑，可降低多醣水解成葡萄糖之速度，進而降低人體對葡萄糖的吸收，以減緩飯後高血糖達到維持血糖穩

定。許多研究指出，多酚化合物對 α -amylase 與 α -glucosidase 具抑制作用 (Shobana *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2017)。而本實驗以超音波輔助乙醇萃取之番石榴葉萃取物含有高量的總多酚類化合物，應具有抑制高血糖的潛力。因此首先進行醣解酵素抑制力之測定，並探討不同濃度乙醇萃取對醣解酵素抑制能力之影響，以及比較活性成分與醣解酵素抑制能力之關聯性。

圖十六為乙醇萃取濃度對番石榴葉萃取物抑制 α -amylase 及 α -glucosidase 之影響， IC_{50} 值越低代表抑制效果越強。結果顯示，番石榴葉萃取物的 α -amylase 抑制活性 IC_{50} 值介於 19.16-59.29 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之間，顯著低於正控制組糖尿病藥物 Acarbose 的 IC_{50} 88.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，而其中又以 GLE25 與 GLE50 具有較佳的抑制效果，其 IC_{50} 分別為 23.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 與 19.16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，兩者均顯著低於 GLE0 及 GLE75 的 IC_{50} 。而番石榴葉萃取物的 α -glucosidase IC_{50} 值介於 3.68-5.97 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之間，皆顯著低於 Acarbose 的 IC_{50} 952.64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，而其中又以 GLE25 與 GLE50 具有較佳的抑制效果，其 IC_{50} 分別為 3.86 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 與 3.68 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，兩者均顯著低於 GLE0 及 GLE75 的 IC_{50} 。Liu *et al.* (2014) 使用超音波水萃取番石榴葉試驗 α -amylase 與 α -glucosidase 其 IC_{50} 分別為 50.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 34.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；Wang *et al.* (2018) 將番石榴葉經微生物發酵後以 80% 甲醇萃取，其 α -glucosidase 的 IC_{50} 為 19.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，與本研究的結果相比，其



圖十六、乙醇萃取濃度對番石榴葉萃取物抑制 α -amylase 及 α -glucosidase 之影響以 IC₅₀ 表示

Fig 16. Effect of ethanol extraction concentration of GLEs on their α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities in terms of IC₅₀. Bar represent mean \pm SD, n=3. Mean with different letters are significantly different ($p < 0.01$) by Duncan's multiple range test; $p < 0.01$ as compared with the GLE0, GLE25, GLE50 and GLE75. Different capital letters and small letters represent a significant different within α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities, respectively.

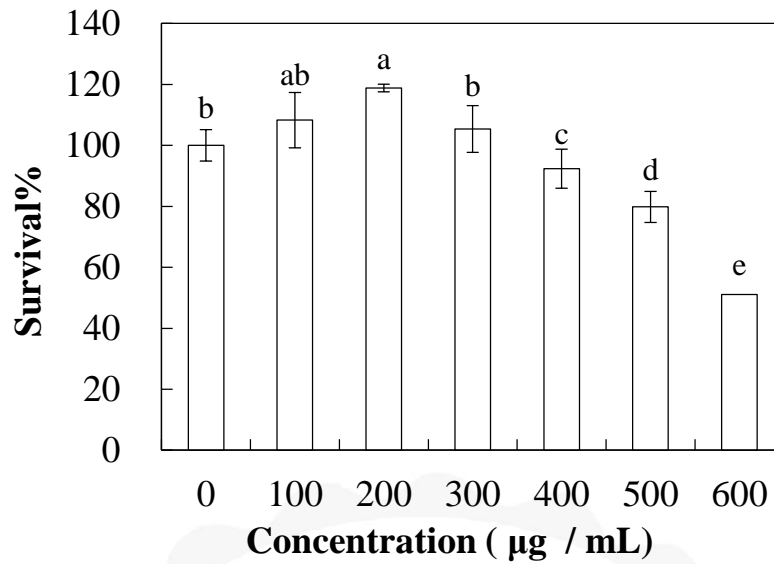
IC₅₀均較高。因此本研究以 25-50% 乙醇輔以超音波萃取所得萃取物，對抑制糖解酵素活性具有較佳的效果，有潛力取代 Acarbose 作為抗高血醣作用的天然萃取物。

四、GLE25 濃度對 C2C12 細胞存活率之影響

根據前述總酚含量、總類黃酮含量及抑制糖解酵素測定結果指出 GLE25 及 GLE50 具有較佳的效果，且於總抗氧化能力以 GLE25 具有最好的作用，因此後續選用 GLE25 來進行 C2C12 細胞調節血糖途徑的探討；首先必須測定 GLE25 的劑量對 C2C12 細胞存活率之影響，以確定 GLE25 不具毒性的濃度範圍。結果如圖十七，以 100-600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GLE25 處理 C2C12 細胞 24 h 後測定細胞存活率，當添加 100-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GLE25 時，對細胞不會造成毒性，其存活率均大於 100%，但添加濃度大於 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時細胞存活率開始顯著下降，因此後續試驗將以低於 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GLE25 探討 C2C12 細胞調節血糖途徑。

五、棕櫚酸濃度及誘導時間對 C2C12 細胞產生胰島素阻抗之影響

許多研究指出棕櫚酸可誘導 C2C12 細胞產生胰島素阻抗 (Insulin resistant) (Talbot *et al.*, 2014; Kwak *et al.*, 2016; Abu & Tan, 2017)。游離脂肪酸若長期以高劑量的狀態存在於細胞中，游離脂肪酸氧化會生成檸檬酸(Citrate)



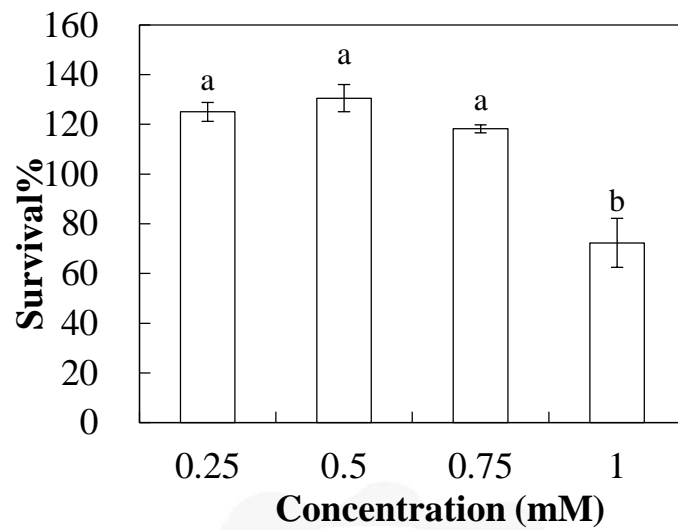
圖十七、GLE25 濃度對小鼠肌肉細胞 C2C12 存活率之影響

Fig 17. Effect of GLE25 concentration on the survival of C2C12 cells. Bar represent mean \pm SD, n=3. Mean with different letters are significantly different ($p < 0.01$) by Duncan's multiple range test.

與乙醯輔酶 A (acetyl-CoA)，進而抑制丙酮酸去氫酶 (Pyruvate dehydrogenase) 及抑制 Hexokinase II (HK II) 的活性，且游離脂肪酸亦會活化 PKC θ ，使 IRS1 的 Ser307 位點磷酸化 (Kovacs & Stumvoll, 2005)，導致使 Insulin 作用途徑受到阻抗，包含 Akt 及 GLUT4 的活性降低，葡萄糖攝入量下降 (Bhattacharya *et al.*, 2007; Glatz *et al.*, 2010)。本研究先以 0.25、0.5、0.75 及 1 Mm 棕櫚酸，分別處理 C2C12 細胞 24 h 後測定細胞之存活率，以確定棕櫚酸不具毒性的濃度範圍，並選擇其中一個濃度探討棕櫚酸誘導時間 (2、12、16 及 24 h) 對 C2C12 細胞產生胰島素阻抗的影響。

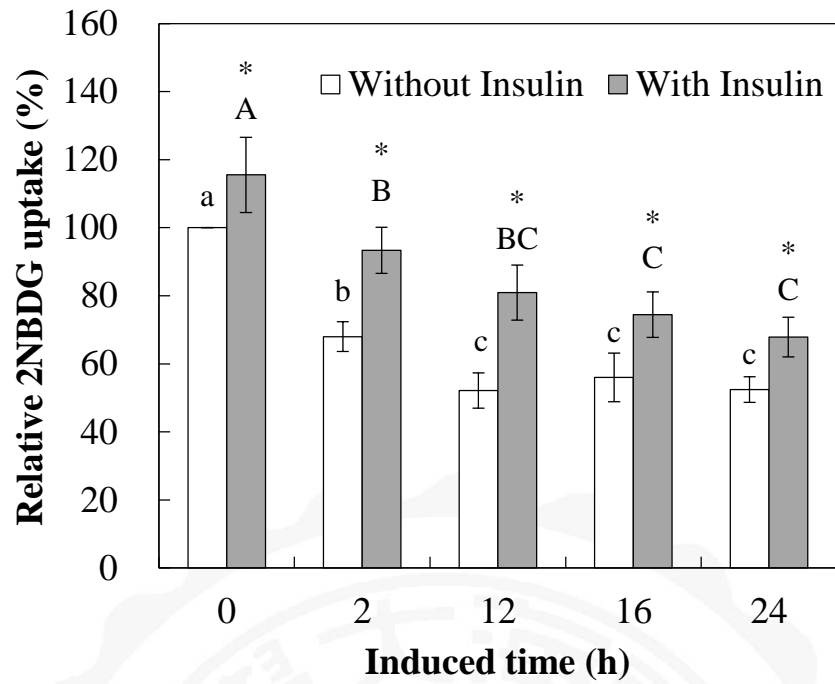
圖十八為棕櫚酸濃度對小鼠肌肉細胞 C2C12 存活率之影響。結果顯示，棕櫚酸在濃度 1 mM 時存活率降為 72.33%，顯著抑制 C2C12 細胞生長，而 0.25-0.75 mM 對細胞均無毒殺作用，由於文獻均以 0.75 mM 進行細胞 Insulin resistant 的誘導 (Labuza & Dugan, 1971; 黃鈺萍, 2012; Talbot *et al.*, 2014; Kwak *et al.*, 2016; Abu & Tan, 2017)，因此後續試驗採用 0.75 mM 的棕櫚酸進行不同誘導時間對 C2C12 細胞 Insulin resistant 之影響，其中分為無 Insulin 組及添加 5 μ g/mL Insulin 治療組，其 Insulin 使用濃度參考黃鈺萍 (2012) 及 Liu *et al.* (2015) 之研究。

圖十九為 0.75 mM 棕櫚酸誘導時間及胰島素添加對相對 2NBDG 攝入量之影響。結果顯示不論是否添加 Insulin 的組別，經 2 h 以上的誘導，其葡萄



圖十八、棕櫚酸濃度對小鼠肌肉細胞 C2C12 存活率之影響

Fig 18. Effect of palmitic acid concentration on the survival of C2C12 cells. Bar represent mean \pm SD, n=3. Mean with different letters are significantly different ($p < 0.01$) by Duncan's multiple range test.



圖十九、在 C2C12 細胞中 0.75 mM 棕櫚酸誘導時間和胰島素添加對其相對 2NBDG 攝入量之影響

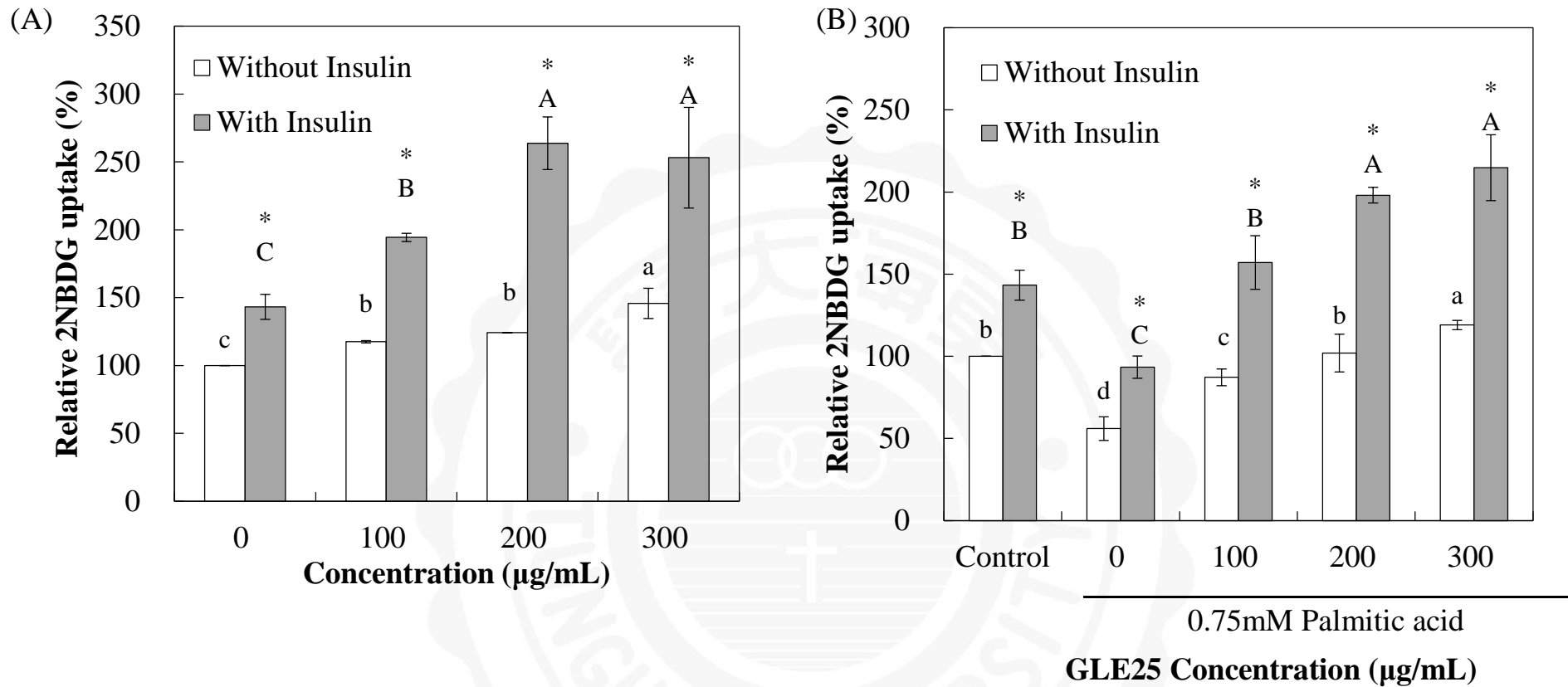
Fig 19. Effect of induced time with 0.75 mM palmitic acid and insulin added on relative 2NBDG uptake in C2C12 cells. Bar represent mean \pm SD, n=3. Mean with different letters are significantly different ($p < 0.01$) by Duncan's multiple range test. Different capital letters and small letters represent a significant different within. With or without insulin added (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectively. * $p < 0.01$ as compared to without insulin added

糖擬似物 2NBDG 攝入量均顯著下降，代表添加 2 h 即可誘導 C2C12 細胞產生 Insulin resistant。其次，以棕櫚酸誘導 12 h 及無添加 Insulin 時相對 2NBDG 可下降至 52.2-56.0%。添加 Insulin 時誘導前後的細胞均可顯著提升葡萄糖攝入量，然而誘導 2-12 h 後產生 Insulin resistant 的 C2C12 細胞即使添加 Insulin 其相對 2NBDG 攝入量也顯著低於正常組。Mazibuko *et al.* (2013)、Talbot *et al.* (2014) 及 Abu and Tan (2017) 均在其研究中採用 0.75 mM 的棕櫚酸誘導 16 h 使細胞產生 Insulin resistant，本研究的結果亦指出 0.75 mM 棕櫚酸不會造成 C2C12 細胞的毒殺，可在 2-24 h 誘導 C2C12 細胞產生 Insulin resistant，為了有利於與文獻結果進行比較，亦採用 0.75 mM 棕櫚酸及誘導 16 h 的條件。

六、GLE25 濃度對胰島素阻抗 C2C12 細胞之 2NBDG 調控之影響

當血液中葡萄糖含量過高時，便會釋放胰島素促進血液中葡萄糖下降，若是血液中葡萄糖濃度並沒有隨著血中胰島素濃度升高而下降，便是組織具有 Insulin resistant，除了導致高血糖外，亦會引發高血壓、血脂異常、高尿酸血症及肥胖等。本研究以螢光標定的葡萄糖類似物 2-NBDG 探討 GLE25 對正常態及阻抗態之小鼠肌肉細胞 C2C12 中葡萄糖攝入量之影響。

圖二十為添加不同濃度的 GLE25 在正常態與阻抗態 C2C12 細胞處理 30 min 後對相對 2NBDG 攝入量之影響。分別添加 0-300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之 GLE25，其中分為無 Insulin 組及添加 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Insulin 治療組，不論為正常態亦或是阻抗



圖二十、GLE25 濃度在 (A) 正常態 (B) 阻抗態 C2C12 細胞中處理 30 min 後對 2NBDG 攝入量之影響

Fig 20. Effects of GLE25 concentration on relative 2-NBDG uptake in C2C12 cells after 30 min treatment. (A) normal cells. (B) insulin-resistant cells. Bar represent mean \pm SD, n=3. Mean with different letters are significantly different ($p < 0.01$) by Duncan's multiple range. Different capital letters and small letters represent a significant different within treated with or without insulin (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectively. * $p < 0.01$ as compared to without insulin.

態細胞，其無 Insulin 組及添加 Insulin 治療組，兩組之間相比其相對 2NBDG 攝入量均有顯著差異。有添加 Insulin 的攝入量均高於無添加 Insulin 的 1.4 倍。圖二十 A 為正常態之細胞，隨著 GLE25 的濃度上升其葡萄糖攝入量顯著上升 ($p < 0.01$)；其中無 Insulin 組添加 GLE25 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時其葡萄糖攝入量為最高與控制組比較提升 43.3% 的攝入量；而 Insulin 治療組添加 GLE25 時攝入量亦與其添加濃度成正比，然而當濃度大於 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時，其葡萄糖攝入量已達平穩均無顯著差異。

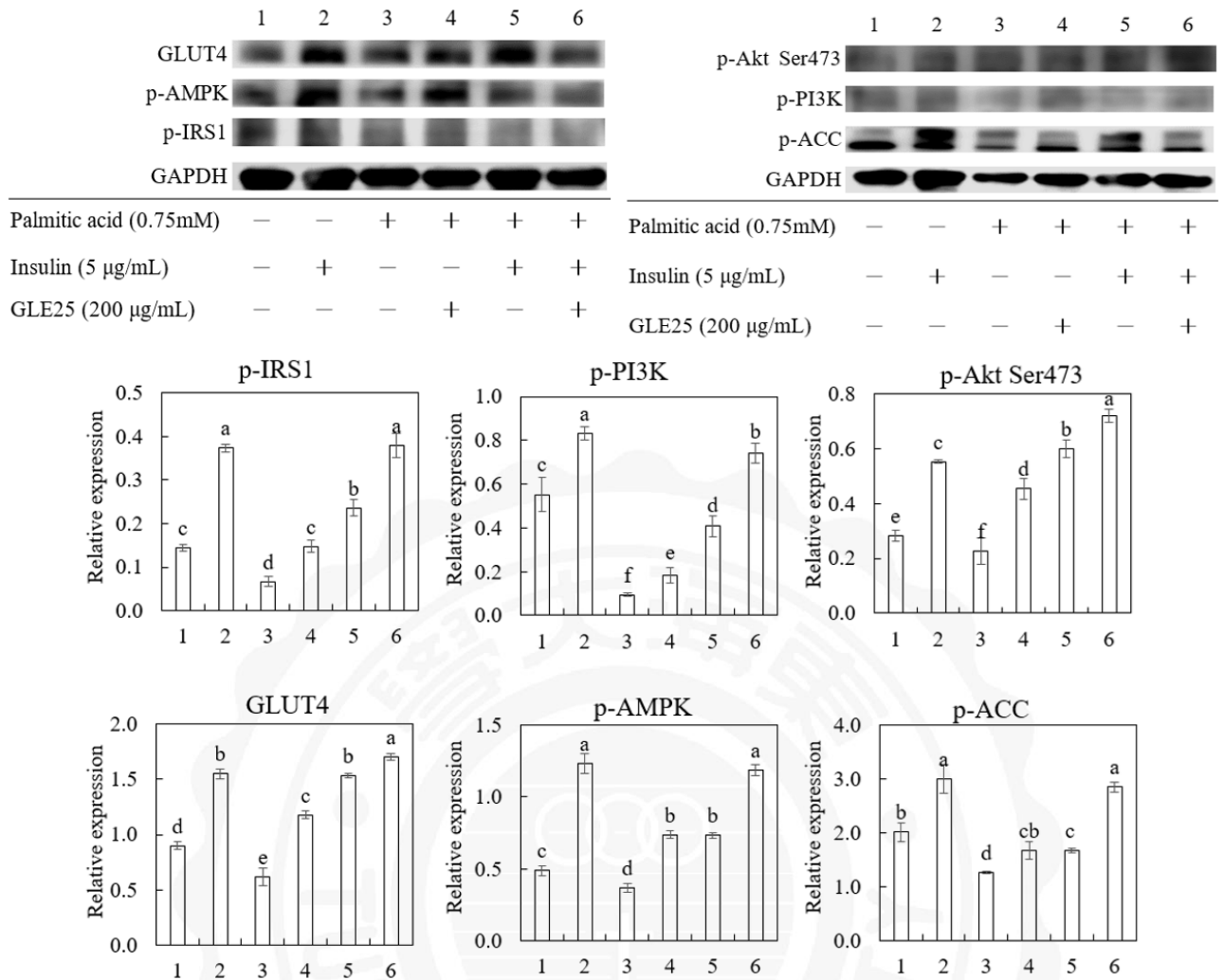
圖二十 B 為阻抗態之細胞，與正常態細胞有著相同的趨勢，於無 Insulin 組添加 GLE25 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時可恢復至 Control 細胞一樣，而添加 GLE25 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時與控制組比較可顯著提升 1.2 倍的攝入量；且添加 Insulin 治療後，對於葡萄糖攝入量皆具有加乘作用。當添加 GLE25 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時其攝入量已和控制組之間無顯著差異，達治療效果。當 GLE25 添加 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 時其攝入量均達最高，但兩者間無顯著差異。

Chuan *et al.* (2008) 研究番石榴葉水萃物對於低劑量 STZ 合併菸鹼醯胺誘導的第二型糖尿病鼠的降血糖效果。結果顯示，大鼠灌食番石榴葉之水或乙醇萃出物 (400 mg/kg) 六週後，血液中的葡萄糖濃度顯著地降低。Guo *et al.* (2013) 使用 70% 乙醇進行索式萃取三次，每次 2 h 所得其萃取出物以 (2g GLE/kg) 餵食 SHRSP/ZF 大鼠 6 周，探討番石榴葉在肌肉細胞中改善代謝症

候群的效果。結果顯示，番石榴葉萃取物並無法改變空腹血糖和胰島素，但在口服葡萄糖耐受試驗 (Oral Glucose Tolerance Test, OGTT) 中發現於 60 及 120 min 可以顯著的降低其血糖值，也降低胰島素阻抗。誘導胰島素阻抗的 C57BL/6J 小鼠餵食番石榴葉萃取物 10 周後，發現餵食番石榴葉萃取物對高果糖高脂飲食誘導的胰島素阻抗老鼠在空腹下血清中葡萄糖的濃度沒有顯著的影響，但可以有效地降低其血清中胰島素的濃度，顯著的提高胰島素的敏感性，改善胰島素阻抗的情況 (劉景文，2016)。由於本研究 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GLE25 便具有最佳的改善胰島素阻抗細胞的葡萄糖攝入能力，因此以此濃度作為後續實驗的條件，探討添加 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GLE25 對其胰島素相關傳訊因子的影響。

七、GLE25 (200 ppm) 對 C2C12 細胞其胰島素相關傳訊因子的影響

胰島素是胰腺分泌的主要激素，當胰臟 β -細胞因高血糖而釋放胰島素至血液中，與肌肉細胞膜上 Insulin receptor 的 β 次單元結合，並透過 IRS1 的 Tyr 位點磷酸化傳訊給 PI3K，再與 PI3K p85 次單元結合，使 PI3K 合成 PIP₃，啟動下游蛋白 Akt 的活性，使其 Ser473 位點磷酸化，促使 GLUT4 轉位至膜上將葡萄糖帶入細胞內 (Jouvet & Estall, 2017)。而 AMPK 是一種對能量敏感之激酶，可監控細胞內能量狀態的感應器，如細胞內 AMP/ATP 比例升高，也就是能源缺乏時，會使 AMPK Thr127 位點磷酸化而活化，促進 GLUT4 轉



圖二十一、濃度 200 µg/mL GLE25 對 C2C12 細胞其胰島素相關傳訊因子的影響

Fig 21. Effects of 200 µg/mL GLE25 on insulin-related signaling factors in C2C12 cells. Cells were incubated with or without palmitic acid (0.75 mM) for 16 h, transferred to incubation with or without GLE25 (200 µg/mL) for 24 h, and then incubated with or without insulin (5 µg/mL) for an additional 24 h. The relative expression of p-IRS , p-PI3K, p-Akt Ser473, GLUT4, p-AMPK and p-ACC in each treatment group were calculated using GAPDH as the standard. 1:control cells, 2: 5 µg/mL insulin treated control cells, 3: insulin-resistant cells, 4: 200 µg/mL GLE25 treated insulin-resistant cells, 5: 5 µg/mL insulin treated insulin-resistant cells, 6: 200 µg/mL GLE25 and 5 µg/mL insulin treated insulin-resistant cells. Bar represent mean±SD, n=3. Mean with different letters are significantly different (p<0.01) by Duncan's multiple range.

位至細胞膜上增加葡萄糖的帶入以利產生 ATP，並抑制脂肪酸的生合成，降低肌肉中三酸甘油酯含量，促進脂肪氧化，而增加肌肉的胰島素敏感性 (Chen *et al.*, 2003)。細胞暴露於游離脂肪酸的環境下會抑制胰島素相關傳導蛋白的表現量或是磷酸化，包括 IRS1、PI3K、Akt、AMPK 及 GLUT4，而產生胰島素阻抗現象，而活化 AMPK 下游蛋白 ACC 會造成脂肪酸合成，使脂肪酸堆積於肌肉中，繼續攻擊細胞造成惡性循環。因此本研究針對以上蛋白表現量探討添加濃度 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GLE25 對 C2C12 細胞其胰島素相關傳訊因子的影響。

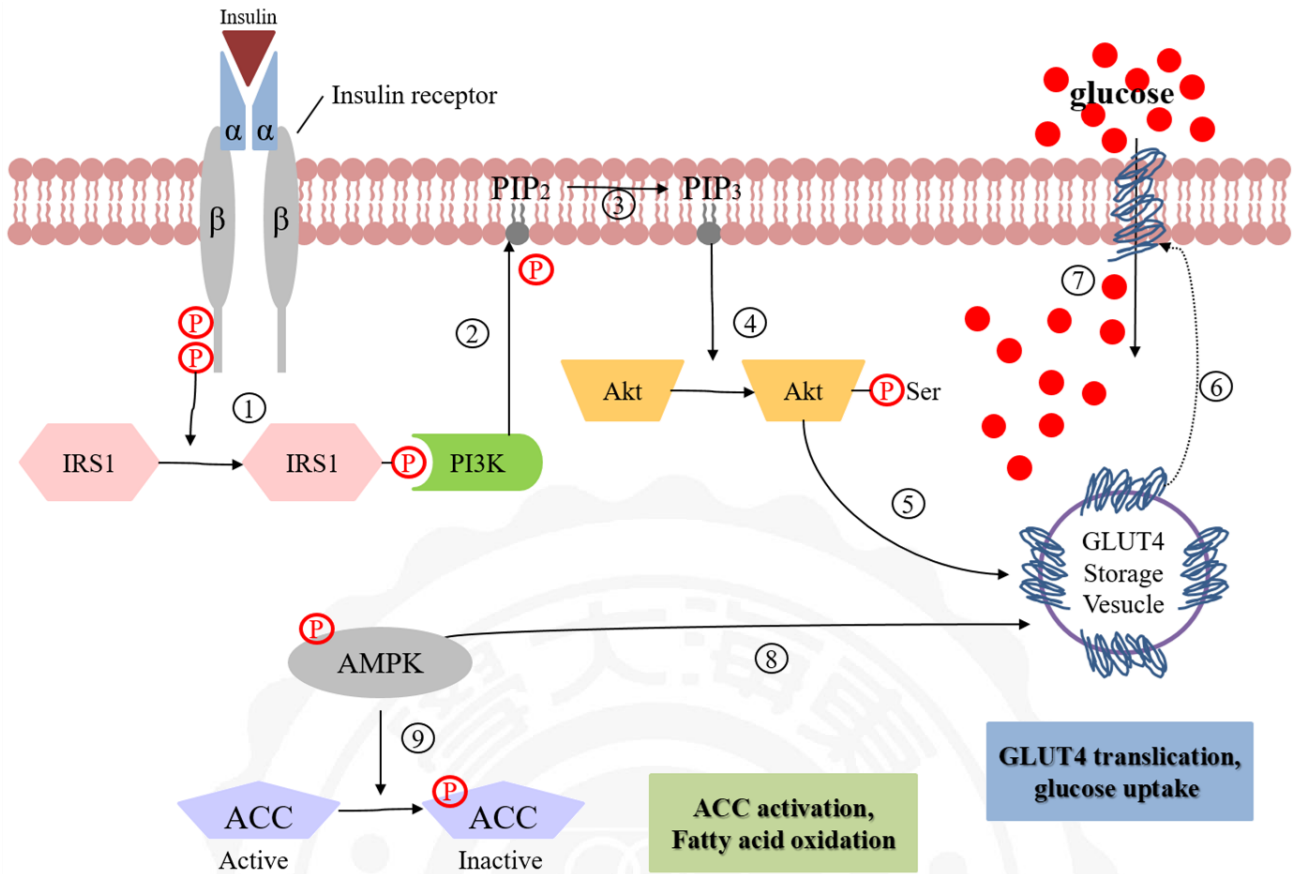
圖二十一為 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GLE25 對 C2C12 細胞其胰島素相關傳訊因子的影響。分為正常態細胞及阻抗態細胞，其中正常態細胞分為無添加及添加 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Insulin 治療組，而阻抗態細胞分為無添加、添加 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GLE25、添加 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Insulin 治療組及兩者共同添加作用的治療組。結果顯示，正常態細胞經添加 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Insulin 後，蛋白表現量均顯著上升 38-66%；阻抗態細胞因受 0.75 mM 棕櫚酸誘導胰島素阻抗，其 p-IRS1、p-PI3K、p-Akt Ser473、GLUT4、p-AMPK 及 ACC 蛋白表現量均顯著低於正常態細胞，其中 p-IRS1/p-PI3K/p-Akt Ser473 的抑制率均高達 46-80%，且 GLUT4 的抑制率則為 69%，而 p-AMPK/p-ACC 則為抑制 63-76%；單獨添加 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GLE25 時，其蛋白質表現量均顯著上升，雖然 p-IRS1/p-PI3K/p-Akt Ser473 的表現量與正常態

細胞相較具顯著差異，並無恢復至與正常態一樣，但因 p-AMPK/p-ACC 的表現量亦有顯著提升，而 p-AMPK 會促使 GLUT4 轉位至細胞膜，因此 GLUT4 恢復至與正常態細胞無顯著差異；200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GLE25 與 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Insulin 兩者共同添加時均能顯著提升蛋白質的表現量，且與單獨添加 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Insulin 治療組相較具顯著差異，表示 GLE25 與 Insulin 有加乘作用，顯示番石榴葉萃取物可以增強胰島素的作用及促進胰島素的訊息傳遞路徑。根據以上結果，番石榴葉萃取物可以藉由活化 p-IRS1/ p-PI3K / p-Akt Ser 473 胰島素傳遞路徑，增加葡萄糖的攝入作用，且亦能活化 AMPK 抑制 ACC 進而促進游離脂肪酸的氧化，釋放大量的能量提供細胞使用，降低脂肪酸的儲存，而能改善游離脂肪酸誘導的胰島素阻抗情形（圖二十二）。

Guo *et al.* (2013) 使用 SHRSP.Z-Lep^{rfa}/Izm (SHRSP/ZF) 大鼠，自發性葡萄糖耐受不良以及胰島素阻抗的代謝症候群實驗動物模式。給予六週大的 SHRSP/ZF 老鼠每天 2g/kg 的番石榴葉 70% EtOH，為期六週。結果發現，其 p-IRS1、PI3K、p-Akt、p-AMPK 及 GLUT4 均有顯著上升，同時，餵食番石榴葉萃取物也顯著的降低了動物的體重。劉景文 (2016) 利用高果糖高脂飲食誘導雄性 C57BL/6J 小鼠產生胰島素阻抗後，使用水萃取番石榴葉萃取物，分別餵食低劑量 (50 mg/kg)、中劑量 (150 mg/kg) 和高劑量 (450 mg/kg) 的番石榴葉萃取物，結果發現可以促進 p-Akt、p-AMPK 及 GLUT4 的表現量。

根據文獻以及我們的研究結果指出，番石榴葉萃取物可以有效地改善由飲食誘發或是自發性的肥胖及胰島素抵抗鼠的胰島素抵抗情形，由此可知，番石榴葉萃取物可以提升胰島素的訊息傳遞路徑的作用，並且促進脂肪酸氧化，降低脂肪酸的儲存。





圖二十二、番石榴葉萃取物於棕櫚酸誘導的胰島素阻抗 C2C12 細胞中調控胰島素相關訊息傳遞之示意圖

Fig 22. Schematic diagram of guava leaf extract regulating insulin-related signaling in palmitate-induced insulin resistance in C2C12 cells.

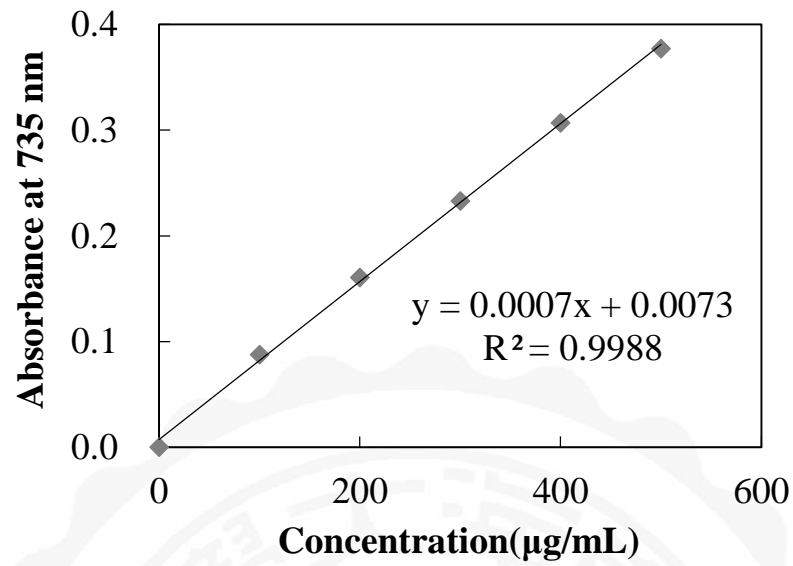
伍、結論

本研究主要使用超音波輔助不同濃度乙醇萃取番石榴葉以獲得最高的總酚含量、總類黃酮含量、抗氧化力及抑制醣解酵素活性的萃取物，探討於肌肉細胞中改善胰島素阻抗的最適濃度及相關作用機制。結果顯示四個不同乙醇濃度的萃取物以 GLE25 及 GLE50 所含 TFC 及 TPC 含量最高，對於清除自由基能力及還原力均以 GLE25 效果最佳，最高可達 59.1 $\mu\text{g TE/mL}$ 及 113.1 $\mu\text{g AAE/mL}$ ，其次則為 GLE50。GLE25 及 GLE50 對於醣解酵素 α -amylase 與 α -glucosidase 的抑制作用均顯著優於正控制組 Acarbose，其抑制活性 IC_{50} 值介於 19.16-59.29 $\mu\text{g/mL}$ 及 3.68-5.97 $\mu\text{g/ml}$ 之間，由以上結果得知，GLE25 及 GLE50 具有較佳的 TFC、TPC 及抑制醣解酵素效果，而總抗氧化能力則以 GLE25 最高，因此後續選用 GLE25 來進行 C2C12 細胞調節血糖途徑的探討。於調節血糖途徑的探討前須先測定 GLE25 的劑量對 C2C12 細胞存活率之影響，以確定 GLE25 不具毒性的濃度範圍。當添加 GLE25 濃度大於 400 $\mu\text{g/mL}$ 時細胞存活率開始顯著下降，但於 100-300 $\mu\text{g/mL}$ 時對細胞不會造成毒性，因此將以低於 300 $\mu\text{g/mL}$ GLE25 探討 C2C12 細胞調節血糖途徑。於途徑探討中先以螢光標定的 2-NBDG 探討 GLE25 對葡萄糖攝入量之影響，而後探討其對胰島素相關傳訊因子的影響。於葡萄糖攝入量試驗中 200 $\mu\text{g/mL}$ GLE25 便具有最佳的改善胰島素阻抗細胞的葡萄糖攝入能力，

其次對於胰島素相關傳訊因子的測定結果指出 GLE25 可活化 IRS1/PI3KAkt，增加葡萄糖的攝入作用，且亦能活化 AMPK 抑制 ACC 進而促進游離脂肪酸的氧化，釋放大量的能量提供細胞使用，降低脂肪酸的儲存，而能改善游離脂肪酸誘導的胰島素阻抗情形。

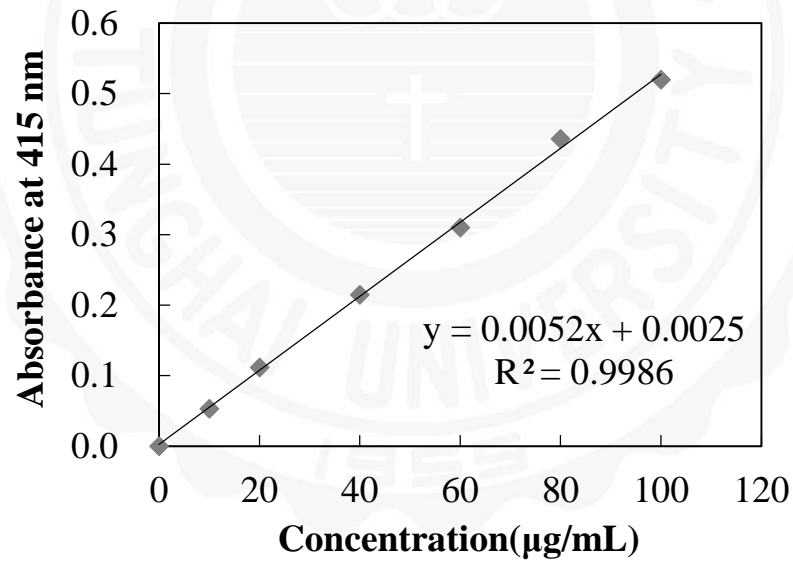
綜合以上結果指出本研究利用不同濃度乙醇輔以超音波萃取可使番石榴葉機能性成分更有效率的溶出，並且促進番石榴葉資源的再利用，提升經濟價值，更期盼此萃取物提供一般人及胰島素阻抗狀態之患者對於高血糖的預防和保健需求。

陸、附錄



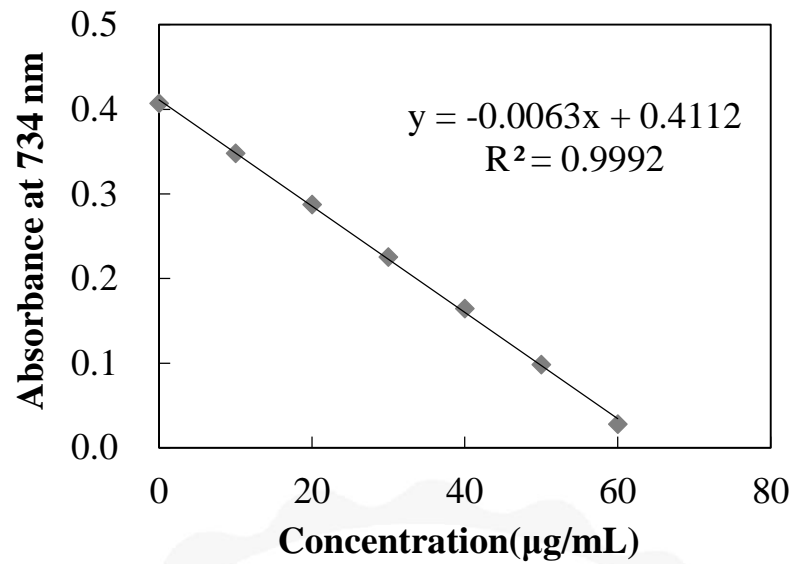
附錄一、沒食子酸 (Gallic acid) 之標準曲線圖。

Appendix 1. Standard curve of gallic acid.



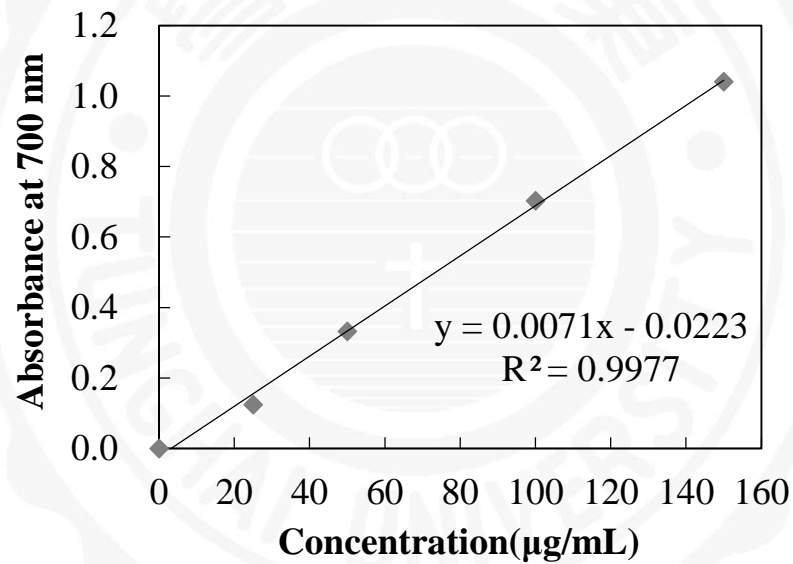
附錄二、槲皮素 (Quercetin) 之標準曲線圖。

Appendix 1. Standard curve of quercetin.



附錄三、Trolox 之標準曲線圖。

Appendix 1. Standard curve of trolox.



附錄四、Ascorbic acid 之標準曲線圖。

Appendix 1. Standard curve of ascorbic acid.

參考資料

- 白芝綺 (2009)。植物多酚抗氧化之功能。大葉大學生物產業科技學系碩士在職專班。
- 江佩錚 (2007)。不同成熟度金柑抗氧化活性及其有效成分之研究。國立宜蘭大學食品科學系碩士班。
- 江健銓 (2015)。芭樂萃取物抑制三陰性乳癌細胞生長與誘發凋亡之探討。中國醫藥大學癌症生物學研究所碩士班。
- 吳崇榮 (2009)。新陳代謝記憶：糖尿病治療的新挑戰。內科學誌，20，220-225。
- 拱玉郎 (1997)。天然抗氧化劑發展近況。食品工業，29 (3)，29-37。
- 黃鈺萍 (2012)。黃金銀耳酸性多醣於 C2C12 肌肉細胞中之葡萄糖恆定活性。東海大學食品科學系碩士班。
- 劉景文 (2016)。具調節血糖活性之番石榴葉萃取物最適化超音波輔助萃取條件及其調節血糖機制之探討。東海大學畜產與生物科技學系博士班。
- 蔡謹如、黃建嚴、陳欣宜 (2017)。《農業情報》106 年 7 月生產預測。農政與農情，301。
- Abu Bakar, M. H., & Tan, J. S. (2017). Improvement of mitochondrial function by celastrol in palmitate-treated C2C12 myotubes via activation of PI3K-Akt signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 903-912.
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., et al. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *The EMBO Journal*, 15(23), 6541-6551.
- Bhattacharya, S., Dey, D., & Roy, S. S. (2007). Molecular mechanism of insulin resistance. *J Biosci*, 32(2), 405-413.
- Boulinguez, A., Staels, B., Duez, H., & Lancel, S. (2017). Mitochondria and endoplasmic reticulum: Targets for a better insulin sensitivity in skeletal muscle? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(9), 901-916.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414, 813.
- Chan, J., Desai, A. K., Kazi, Z. B., Corey, K., Austin, S., Hobson-Webb, L. D., et al. (2017). The emerging phenotype of late-onset Pompe disease: A systematic literature review. *Molecular Genetics and Metabolism*, 120(3), 163-172.
- Chemat, F., Zill e, H., & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835.

- Chen, J.-W., Kong, Z.-L., Tsai, M.-L., Lo, C.-Y., Ho, C.-T., & Lai, C.-S. (2018). Tetrahydrocurcumin ameliorates free fatty acid-induced hepatic steatosis and improves insulin resistance in HepG2 cells. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26 (3), 1075-1085.
- Chen, Z. P., Stephens, T. J., Murthy, S., Canny, B. J., Hargreaves, M., Witters, L. A., et al. (2003). Effect of exercise intensity on skeletal muscle AMPK signaling in humans. *Diabetes*, 52(9), 2205-2212.
- Cho, H., Thorvaldsen, J. L., Chu, Q., Feng, F., & Birnbaum, M. J. (2001). Akt1/PKB α is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem*, 276(42), 38349-38352.
- Cleasby, M. E., Reinten, T. A., Cooney, G. J., James, D. E., & Kraegen, E. W. (2007). Functional studies of Akt isoform specificity in skeletal muscle in vivo; maintained insulin sensitivity despite reduced insulin receptor substrate-1 expression. *Mol Endocrinol*, 21(1), 215-228.
- Coughlan, K. A., Valentine, R. J., Ruderman, N. B., & Saha, A. K. (2014). AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes? *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, 7, 241-253.
- Cowan, M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
- Deguchi, Y., & Miyazaki, K. (2010). Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effects of guava leaf extract. *Nutrition & Metabolism* 7(9).
- Deguchi, Y., Osada, K., Uchida, K., Kimura, H., Yoshikawa, M., Kudo, T., et al. (1998). Effects of Extract of Guava Leaves on the Development of Diabetes in the db/db Mouse and on the Postprandial Blood Glucose of Human Subjects. *Nippon Nōgeikagaku Kaishi*, 72(8), 923-931.
- Dimitriadis, G., Mitrou, P., Lambadiari, V., Maratou, E., & Raptis, S. A. (2011). Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 93, S52-S59.
- Dong, K., Ni, H., Wu, M., Tang, Z., Halim, M., & Shi, D. (2016). ROS-mediated glucose metabolic reprogram induces insulin resistance in type 2 diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 476(4), 204-211.
- Dummler, B., & Hemmings, B. A. (2007). Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochem Soc Trans*, 35(Pt 2), 231-235.
- Elghazi, L., Balcázar, N., & Bernal-Mizrachi, E. (2006). Emerging role of protein kinase B/Akt signaling in pancreatic beta-cell mass and function (Vol. 38).
- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., & Grodsky, G. M. (2003). Are Oxidative Stress-Activated Signaling Pathways Mediators of Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction?

- Diabetes, 52(1), 1-8.
- Glatz, J. F., Luiken, J. J., & Bonen, A. (2010). Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. *Physiol Rev*, 90(1), 367-417.
- Gonçalves, J. L. S., Lopes, R. C., Oliveira, D. B., Costa, S. S., Miranda, M. M. F. S., Romanos, M. T. V., et al. (2005). In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(3), 403-407.
- Green, K., Brand, M. D., & Murphy, M. P. (2004). Prevention of Mitochondrial Oxidative Damage as a Therapeutic Strategy in Diabetes. *Diabetes*, 53(suppl 1), S110-S118.
- Greenwell, I. B., Ip, A., & Cohen, J. B. (2017). PI3K Inhibitors: Understanding Toxicity Mechanisms and Management. *Oncology (Williston Park)*, 31(11), 821-828.
- Guo, X., Yoshitomi, H., Gao, M., Qin, L., Duan, Y., Sun, W., et al. (2013). Guava leaf extracts promote glucose metabolism in SHRSP.Z-Lep^{rfa}/Izm rats by improving insulin resistance in skeletal muscle. [journal article]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 52.
- Gutiérrez, R. M. P., Mitchell, S., & Solis, R. V. (2008). *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 117(1), 1-27.
- He, W., O'Neill, T. J., & Gustafson, T. A. (1995). Distinct modes of interaction of SHC and insulin receptor substrate-1 with the insulin receptor NPEY region via non-SH2 domains. *J Biol Chem*, 270(40), 23258-23262.
- Hink, U., Li, H., Mollnau, H., Oelze, M., Matheis, E., Hartmann, M., et al. (2001). Mechanisms Underlying Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Circulation Research*, 88(2), e14-e22.
- Hossain, M. A., & Bathgate, R. A. D. (2018). Challenges in the design of insulin and relaxin/insulin-like peptide mimetics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(10), 2827-2841.
- Huang, C., Thirone, A. C., Huang, X., & Klip, A. (2005). Differential contribution of insulin receptor substrates 1 versus 2 to insulin signaling and glucose uptake in I6 myotubes. *J Biol Chem*, 280(19), 19426-19435.
- Im, I., Park, K.-R., Kim, S.-M., Kim, C., Ha Park, J., Nam, D., et al. (2012). The Butanol Fraction of Guava (*Psidium cattleianum* Sabine) Leaf Extract Suppresses MMP-2 and MMP-9 Expression and Activity Through the Suppression of the ERK1/2 MAPK Signaling Pathway (Vol. 64).
- J.W., R., A.V., C., & J.R., Z. (2001). Intracellular mechanisms underlying increases in glucose uptake in response to insulin or exercise in skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica*, 171(3), 249-257.
- Joseph, B., Priya, M., Mary Helen, P. A., & Sujatha, S. (2010). Bio-active compounds in essential oil

- and its effects of antimicrobial, cytotoxic activity from the *Psidium Guajava* (L.) Leaf (Vol. 9).
- Jouvet, N., & Estall, J. (2017). *The Pancreas: Bandmaster of Glucose Homeostasis* (Vol. 360).
- K Roy, C., Kamath, J., & Asad, M. (2006). Hepatoprotective activity of *Psidium guajava* Linn. leaf extract (Vol. 44).
- Kellogg, E. W., 3rd, & Fridovich, I. (1975). Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J Biol Chem*, 250(22), 8812-8817.
- Kim, D., C Dan, H., Park, S., Yang, L., Liu, Q., Kaneko, S., et al. (2005). AKT/PKB signaling mechanisms in cancer and chemoresistance (Vol. 10).
- Kim, H. K., Kim, Y. H., Kim, Y. E., Jung, S. K., Lee, N. H., & Song, K.-M. (2018). Effects of salts on ultrasonic extraction of protein from porcine myocardium. *Food and Bioprocess Processing*, 108, 12-17.
- Kochhar, S., & B. Rossell, J. (1990). *Detection, Estimation and Evaluation of Antioxidants in Food Systems*.
- Kojima, S., Ueno, N., Asakawa, A., Sagiya, K., Naruo, T., Mizuno, S., et al. (2007). A role for pancreatic polypeptide in feeding and body weight regulation. *Peptides*, 28(2), 459-463.
- Kovacs, P., & Stumvoll, M. (2005). Fatty acids and insulin resistance in muscle and liver. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 19(4), 625-635.
- Kwak, H. J., Choi, H.-E., Jang, J., Park, S. K., Bae, Y.-A., & Cheon, H. G. (2016). Bortezomib attenuates palmitic acid-induced ER stress, inflammation and insulin resistance in myotubes via AMPK dependent mechanism. *Cellular Signalling*, 28(8), 788-797.
- Labuza, T. P., & Dugan, L. R. (1971). Kinetics of lipid oxidation in foods. *C R C Critical Reviews in Food Technology*, 2(3), 355-405.
- Lee, S.-B., & Park, H.-R. (2010). Anticancer activity of guava (*Psidium guajava* L.) branch extracts against HT-29 human colon cancer cells (Vol. 4).
- Li, J., Li, Z., Yang, Y., Kong, B., & Wang, C. (2018). Laboratory study on the inhibitory effect of free radical scavenger on coal spontaneous combustion. *Fuel Processing Technology*, 171, 350-360.
- Li, J. M., & Shah, A. M. (2003). ROS Generation by Nonphagocytic NADPH Oxidase: Potential Relevance in Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(90003), 221S-226.
- Liu, C.-W., Wang, Y.-C., Hsieh, C.-C., Lu, H.-C., & Chiang, W.-D. (2015). Guava (*Psidium guajava* Linn.) leaf extract promotes glucose uptake and glycogen accumulation by modulating the insulin signaling pathway in high-glucose-induced insulin-resistant mouse FL83B cells. *Process Biochemistry*, 50(7), 1128-1135.

- Liu, C.-W., Wang, Y.-C., Lu, H.-C., & Chiang, W.-D. (2014). Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for total phenols with anti-hyperglycemic activity from *Psidium guajava* leaves. *Process Biochemistry*, 49(10), 1601-1605.
- Lizunov, V. A., Matsumoto, H., Zimmerberg, J., Cushman, S. W., & Frolov, V. A. (2005). Insulin stimulates the halting, tethering, and fusion of mobile GLUT4 vesicles in rat adipose cells. *The Journal of Cell Biology*, 169(3), 481-489.
- Lutterodt, G. D. (1992). Inhibition of microlax-induced experimental diarrhoea with narcotic-like extracts of *Psidium guajava* leaf in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 37(2), 151-157.
- M Pereira, D., Valentão, P., Pereira, J., & Andrade, P. (2009). *Phenolics: From Chemistry to Biology* (Vol. 14).
- M., W. T., & R., M. D. (2002). The assessment of insulin resistance in man. *Diabetic Medicine*, 19(7), 527-534.
- Manosroi, J., Dhumtanom, P., & Manosroi, A. (2006). Anti-proliferative activity of essential oil extracted from Thai medicinal plants on KB and P388 cell lines. *Cancer Letters*, 235(1), 114-120.
- Matheny, R. W., Abdalla, M. N., Geddis, A. V., Leandry, L. A., & Lynch, C. M. (2017). Skeletal muscle PI3K p110 β regulates expression of AMP-activated protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 482(4), 1420-1426.
- Mazibuko, S. E., Muller, C. J. F., Joubert, E., de Beer, D., Johnson, R., Opoku, A. R., et al. (2013). Amelioration of palmitate-induced insulin resistance in C2C12 muscle cells by rooibos (*Aspalathus linearis*). *Phytomedicine*, 20(10), 813-819.
- Metwally, A. M., Omar, A. A., Ghazy, N. M., Harraz, F. M., & El Sohafy, S. M. (2011). Monograph of *Psidium guajava* L. leaves. *Pharmacognosy Journal*, 3(21), 89-104.
- Mitsuhsa, K., Masahiro, T., Hiroaki, I., & Yoshihiko, S. (2013). Glucose-stimulated insulin secretion: A newer perspective. *Journal of Diabetes Investigation*, 4(6), 511-516.
- Miyake, K., Ogawa, W., Matsumoto, M., Nakamura, T., Sakaue, H., & Kasuga, M. (2002). Hyperinsulinemia, glucose intolerance, and dyslipidemia induced by acute inhibition of phosphoinositide 3-kinase signaling in the liver. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(10), 1483-1491.
- Moon, J. Y., Mosaddik, A., Kim, H., Cho, M., Choi, H.-K., Kim, Y. S., et al. (2011). The chloroform fraction of guava (*Psidium cattleianum* Sabine) leaf extract inhibits human gastric cancer cell proliferation via induction of apoptosis. *Food Chemistry*, 125(2), 369-375.
- Morales, M., Tortoriello, J., Meckes, M., Paz, D., & Lozoya, X. (1994). Calcium-antagonist effect of

- quercetin and its relation with spasmolytic properties of *Psidium guajava* L (Vol. 25).
- Nair, R., & Chanda, S. (2007). In-vitro antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaf extracts against clinically important pathogenic microbial strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 452-458.
- Nantitanon, W., Yotsawimonwat, S., & Okonogi, S. (2010). Factors influencing antioxidant activities and total phenolic content of guava leaf extract. *LWT - Food Science and Technology*, 43(7), 1095-1103.
- Navale, A. M., & Paranjape, A. N. (2016). Glucose transporters: physiological and pathological roles. *Biophysical Reviews*, 8(1), 5-9.
- Ojewole, J. A. O. (2005). Hypoglycemic and hypotensive effects of *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae) leaf aqueous extract (Vol. 27).
- Ojewole, J. A. O. (2006). Anti-inflammatory and Analgesic effects of *Psidium guajava* Linn.(Myrtaceae) leaf aqueous extract in rats and mice (Vol. 28).
- Palombo, E. A. (2006). Phytochemicals from traditional medicinal plants used in the treatment of diarrhoea: modes of action and effects on intestinal function. *Phytotherapy Research*, 20(9), 717-724.
- Patel, S. S. (2016). Cerebrovascular Complications of Diabetes: Alpha Glucosidase Inhibitor as Potential Therapy. *Horm Metab Res*, 48(02), 83-91.
- Pinelo, M., Manzocco, L., Nuñez, M. J., & Nicoli, M. C. (2004). Interaction among Phenols in Food Fortification: Negative Synergism on Antioxidant Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1177-1180.
- Posner, B. I. (2017). Insulin Signalling: The Inside Story. *Canadian journal of diabetes*, 41(1), 108-113.
- Proença, C., Freitas, M., Ribeiro, D., Oliveira, E. F. T., Sousa, J. L. C., Tomé, S. M., et al. (2017). α -Glucosidase inhibition by flavonoids: an in vitro and in silico structure–activity relationship study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 1216-1228.
- Qa'dan, F., Thewaini, A.-J., Ali, D. A., Afifi, R., Elkhawad, A., & Matalka, K. Z. (2005). The Antimicrobial Activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* Leaf Extracts to Acne-Developing Organisms. *The American Journal of Chinese Medicine*, 33(02), 197-204.
- Qian, H., & Nihorimbere, V. (2004). Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. *J Zhejiang Univ Sci*, 5(6), 676-683.
- Rachek, L. I. (2014). Chapter Eight - Free Fatty Acids and Skeletal Muscle Insulin Resistance. In Y.-X. Tao (Ed.), *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 121, pp. 267-292):

Academic Press.

- Robertson, R. P., Harmon, J., Tran, P. O., Tanaka, Y., & Takahashi, H. (2003). Glucose Toxicity in β -Cells: Type 2 Diabetes, Good Radicals Gone Bad, and the Glutathione Connection. *Diabetes*, 52(3), 581-587.
- Ryu, N. H., Park, K.-R., Kim, S.-M., Yun, H.-M., Nam, D., Lee, S.-G., et al. (2012). A Hexane Fraction of Guava Leaves (*Psidium guajava* L.) Induces Anticancer Activity by Suppressing AKT/Mammalian Target of Rapamycin/Ribosomal p70 S6 Kinase in Human Prostate Cancer Cells. *Journal of Medicinal Food*, 15(3), 231-241.
- Saber, F. R., Abdelbary, G. A., Salama, M. M., Saleh, D. O., Fathy, M. M., & Soliman, F. M. (2018). UPLC/QTOF/MS profiling of two *Psidium* species and the in-vivo hepatoprotective activity of their nano-formulated liposomes. *Food Research International*, 105, 1029-1038.
- Sesti, G., Federici, M., Hribal, M. L., Lauro, D., Sbraccia, P., & Lauro, R. (2001). Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *Faseb j*, 15(12), 2099-2111.
- Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(1), 67-103.
- Shobana, S., Sreerama, Y. N., & Malleshi, N. G. (2009). Composition and enzyme inhibitory properties of finger millet (*Eleusine coracana* L.) seed coat phenolics: Mode of inhibition of α -glucosidase and pancreatic amylase. *Food Chemistry*, 115(4), 1268-1273.
- Shruthi, S. D., Roshan, A., Timilsina, S. S., & Sunita, S. (2013). A REVIEW ON THE MEDICINAL PLANT *PSIDIUM GUAJAVA* LINN. (MYRTACEAE). *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 3(2), 162-168.
- Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2017). 1 - α -Amylases Current Developments in Biotechnology and Bioengineering (pp. 3-24): Elsevier.
- Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K. M., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2006). α -Amylases from microbial sources - An overview on recent developments. [Review]. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 173-184.
- Soo-Youn, C., Joon-Ho, H., Soo-Young, P., Yeong-Jun, J., Hee-Chul, K., Sang-Wook, M., et al. (2008). Fermented guava leaf extract inhibits LPS-induced COX-2 and iNOS expression in Mouse macrophage cells by inhibition of transcription factor NF- κ B. *Phytotherapy Research*, 22(8), 1030-1034.
- Suntornsuk, L., Gritsanapun, W., Nilkamhank, S., & Paochom, A. (2002). Quantitation of vitamin C content in herbal juice using direct titration. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical*

- Analysis, 28(5), 849-855.
- Szu-Chuan, S., Fang-Chi, C., & Ning-Jung, W. (2008). Effect of guava (*Psidium guajava* Linn.) leaf soluble solids on glucose metabolism in type 2 diabetic rats. *Phytotherapy Research*, 22(11), 1458-1464.
- Tachakittirungrod, S., Okonogi, S., & Chowwanapoonpohn, S. (2007). Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. *Food Chemistry*, 103(2), 381-388.
- Talbot, N. A., Wheeler-Jones, C. P., & Cleasby, M. E. (2014). Palmitoleic acid prevents palmitic acid-induced macrophage activation and consequent p38 MAPK-mediated skeletal muscle insulin resistance. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 393(1), 129-142.
- Tseng, Y. H., Tsan, Y. T., Chan, W. C., Sheu, W. H. H., & Chen, P. C. (2015). Use of an α -Glucosidase inhibitor and the risk of colorectal cancer in patients with Diabetes: A Nationwide, Population-Based cohort study. [Article]. *Diabetes Care*, 38(11), 2068-2074.
- Vadivelan, R., Gopala Krishnan, R., & Kannan, R. (2018). Antidiabetic potential of *Asparagus racemosus* Willd leaf extracts through inhibition of α -amylase and α -glucosidase. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*.
- Wang, H., Du, Y.-J., & Song, H.-C. (2010). α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of guava leaves. *Food Chemistry*, 123(1), 6-13.
- Wang, L., Luo, Y., Wu, Y., Liu, Y., & Wu, Z. (2018). Fermentation and complex enzyme hydrolysis for improving the total soluble phenolic contents, flavonoid aglycones contents and bio-activities of guava leaves tea. *Food Chemistry*, 264, 189-198.
- White, M. F., Maron, R., & Kahn, C. R. (1985). Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells. *Nature*, 318(6042), 183-186.
- Workeneh, B., & Bajaj, M. (2013). The regulation of muscle protein turnover in diabetes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(10), 2239-2244.
- Wu, S., Lai, M., Luo, J., Pan, J., Zhang, L.-M., & Yang, L. (2017). Interactions between α -amylase and an acidic branched polysaccharide from green tea. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 669-678.
- Yeh, J. I., Gulve, E. A., Rameh, L., & Birnbaum, M. J. (1995). The effects of wortmannin on rat skeletal muscle. Dissociation of signaling pathways for insulin- and contraction-activated hexose transport. *J Biol Chem*, 270(5), 2107-2111.
- Yoshitomi, H., Guo, X., Liu, T., & Gao, M. (2012). Guava leaf extracts alleviate fatty liver via expression of adiponectin receptors in SHRSP.Z-Leprfa/Izm rats (Vol. 9).

- Youngren, J. F. (2007). Regulation of insulin receptor function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(7), 873.
- Zhang, B.-w., Xing, Y., Wen, C., Yu, X.-x., Sun, W.-l., Xiu, Z.-l., et al. (2017). Pentacyclic triterpenes as α -glucosidase and α -amylase inhibitors: Structure-activity relationships and the synergism with acarbose. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(22), 5065-5070.
- Zhao, C.-N., Li, Y., Meng, X., Li, S., Liu, Q., Tang, G.-Y., et al. (2018). Insight into the roles of vitamins C and D against cancer: Myth or truth? *Cancer Letters*, 431, 161-170.
- Zheng, L., Lee, J., Yue, L.-M., Lim, G. T., Yang, J.-M., Ye, Z.-M., et al. (2018). Inhibitory effect of pyrogallol on α -glucosidase: Integrating docking simulations with inhibition kinetics. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112, 686-693.
- Zierath, J. R., & Kawano, Y. (2003). The effect of hyperglycaemia on glucose disposal and insulin signal transduction in skeletal muscle. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 17(3), 385-398.
- Zisman, A., Peroni, O. D., Abel, E. D., Michael, M. D., Mauvais-Jarvis, F., Lowell, B. B., et al. (2000). Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med*, 6(8), 924-928.