

東海大學食品科學研究所  
Graduate Institute of Food Science  
Tunghai University

食品科技組  
Food Technology Section

碩士論文  
Master Thesis

指導教授:江文德 博士  
Advisor: Wen-Dee Chiang Ph.D.

珍珠番石榴葉超音波輔助乙醇萃取物對於 3T3-L1 細胞  
調節脂質代謝及胰島素阻抗之機制

Mechanism of ultrasound-assisted ethanol extracts from  
*Psidium guajava* leaves for regulation of lipid metabolism and  
insulin resistance in 3T3-L1 cells

研究生:顏琤綾 撰

Graduate Student: Zheng-Ling Yan

中華民國一百零七年七月

July,2018

# 目 錄

壹、 前言.....	1
貳、 文獻回顧.....	4
一、 番石榴.....	4
(一) 番石榴介紹.....	4
(二) 番石榴品種.....	4
(三) 番石榴葉之生理活性.....	5
二、 肥胖與代謝症候群.....	6
三、 糖尿病治療.....	11
(一) 胰島素分泌促進劑(insulin secretagogues).....	11
(二) 雙胍類(Biguanides,BG).....	11
(三) Glitazones(Thiazolidinediones).....	12
(四) $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制劑( $\alpha$ -glucosidase inhibitor).....	12
四、 胰島素與血糖恆定.....	12
五、 胰島素阻抗.....	14
六、 胰島素.....	14
(一) 胰島素簡介.....	14

(二) 胰島素分泌 .....	15
(三) 胰島素作用 .....	15
(四) 胰島素細胞層面傳訊路徑 .....	16
(五) 胰島素與醣類代謝 .....	17
七、 脂肪組織 .....	18
(一) 白色脂肪組織 .....	18
(二) 棕色脂肪組織 .....	19
八、 脂肪細胞之研究 .....	19
(一) 體內模式 .....	20
(二) 體外模式 .....	20
(三) 脂質合成 .....	23
(四) 脂肪分解 .....	24
九、 抑制脂質新生轉錄因子 .....	25
(一) CCAAT/增強子結合蛋白(CCAAT/enhancer binding protein; C/EBPs)	25
(二) 過氧小體增值活化受體(Peroxisome proliferator-activated receptor; PPARs) .....	27

(三) 脂肪分化決定因子-1/固醇調節元素結合蛋白-1(adipocyte determination and differentiation-dependent factor-1/sterol regulatory element-binding protein-1;ADD1/SREBP-1).....	29
十、 促進脂肪分解酵素 .....	29
(一) 荷爾蒙敏感性脂解酶 (Hormone-sensitive lipase ;HSL).....	30
(二) 三酸甘油酯脂解酶(Adipose triglyceride lipase;ATGL) .....	30
(三) 瘦素(Leptin).....	32
(四) 脂肪激素(Visfatin).....	33
(五) 脂聯素(Adiponectin).....	34
十一、 調控血糖之轉錄因子 .....	34
(一) 胰島素受體(IRS1) .....	35
(二) 磷脂酰肌醇 3-激酶(Phosphoinositide 3-kinase ;PI3K) .....	36
(三) 絲氨酸/蘇氨酸蛋白激酶(AKT).....	36
(四) 葡萄糖載體蛋白 4(GLUT4) .....	37
十二、 研究探討路徑 .....	39
十三、 研究架構.....	40
參、 材料與方法 .....	41

一、 實驗材料.....	41
(一) 原料來源.....	41
(二) 細胞培養.....	41
(三) 細胞存活率試驗.....	41
(四) 細胞分化.....	42
(五) 丙三醇釋放量及三酸甘油酯含量測定.....	42
(六) Oil-red O 染色.....	42
(七) 胰島素阻抗誘導.....	42
(八) 葡萄糖擬似物攝入量試驗.....	42
(九) 蛋白質定量.....	42
(十) 西方轉漬法.....	43
二、 實驗方法.....	44
(一) 細胞培養.....	44
(二) 細胞存活率試驗.....	44
(三) 細胞分化.....	44
(四) 胰島素阻抗誘導.....	45
(五) 丙三醇釋放量及三酸甘油酯殘留量測定.....	45

(六) Oil-red O 染色.....	47
(七) 葡萄糖擬似物攝入量試驗.....	47
(八) 蛋白質定量.....	48
(九) 西方轉漬法.....	48
肆、 結果與討論.....	50
一、 番石榴葉萃取物對 3T3-L1 細胞株存活率之影響.....	50
二、 番石榴葉萃取物對 3T3-L1 前脂肪細胞抑制脂質新生之影響.....	50
三、 番石榴葉萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞及其胰島素抵抗細胞促進脂肪分解之影響.....	54
四、 番石榴葉萃取物對高糖誘導胰島素抵抗 3T3-L1 脂肪細胞之改善機制探討.....	60
伍、 結論.....	69
陸、 參考文獻.....	70
柒、 附錄.....	74
附錄五、 槲皮素之標準品曲線圖.....	77

## 圖目錄

圖一、胰島素與血糖恆定 .....	13
圖二、抑制脂質新生路徑 .....	25
圖三、促進脂肪分解路徑 .....	29
圖四、胰島素阻抗路徑 .....	35
圖五、番石榴葉乙醇萃取物濃度對 3T3-L1 前脂肪細胞細胞存活率之影響.....	51
圖六、番石榴葉萃取物添加量及添加方式對對 3T3-L1 前脂肪細胞中丙三醇釋 放量及三酸甘油酯殘留量之影響.....	53
圖七、番石榴葉萃取物添加量及添加方式對 3T3-L1 前脂肪細胞中抑制脂質新 生的傳訊蛋白質表現量之影響.....	56
圖八、番石榴葉萃取物添加量對 3T3-L1 脂肪細胞中丙三醇釋放量及三酸甘油 酯殘留量之影響.....	57
圖九、番石榴葉萃取物添加量高葡萄糖誘導胰島素阻抗對 3T3-L1 脂肪細胞中 丙三醇釋放量及三酸甘油酯殘留量之影響.....	59
圖十、番石榴葉萃取物添加量 3T3-L1 脂肪細胞中傳訊蛋白質表現量之影響.	62
圖十一、番石榴葉萃取物添加量對 3T3-L1 脂肪細胞葡萄糖攝取量之影響.....	64
圖十二、番石榴葉萃取物添加量對高葡萄糖誘導胰島素阻抗 3T3-L1 脂肪細胞 葡萄糖攝取量之影響.....	65
圖十三、番石榴葉萃取物添加量對高葡萄糖誘導胰島素阻抗 3T3-L1 脂肪細胞 傳訊蛋白質表現量之影響.....	68

# 摘要

本研究以超音波輔助 25% 乙醇萃取番石榴葉來製備萃取物 GvEx，並探討 GvEx 在 3T3-L1 細胞中抑制脂質新生、促進脂肪分解及改善胰島素阻抗的可能機制。首先在抑制脂質新生方面，不論何種添加方式，隨著 GvEx 添加量增加，3T3-L1 前脂肪細胞中丙三醇釋放量 (Glycerol release, GR) 顯著上升，三酸甘油酯殘留量 (Triglyceride residual, TR) 則顯著下降，Oil-red O 染色隨著 GvEx 添加量的增加，油滴量顯著減少，因此添加 100-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GvEx 具有抑制脂質新生的效果，其抑制機制是經由降低 SREBP1c、PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$  及 C/EBP $\beta$  等轉錄因子蛋白質表現量。其次，在促進脂肪分解方面，添加 100-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GvEx，均可使 3T3-L1 脂肪細胞及其胰島素阻抗細胞，表現出促脂解的作用，隨著 GvEx 添加量的增加，脂肪細胞中的三酸甘油酯脂解酶 (ATGL)、荷爾蒙敏感性脂解酶 (HSL) 及磷酸化 HSL (p-HSL) 的蛋白質表現量均隨之增加。最後，在改善胰島素阻抗方面，脂肪細胞經高葡萄糖誘導產生胰島素阻抗後，不論在有無高糖的環境下，添加 100-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GvEx，隨著添加量的增加，其 2-NBDG 攝入量均隨之增加，而且 IRS 1、PI3K、AKT、p-IRS 1、p-AKT 及 GLUT4 等有助於葡萄糖攝入量的蛋白質表現量均隨之增加，如此可改善胰島素阻抗的現象。



# Abstract

In this study, the extract GvEx was prepared by ultrasound-assisted 25% ethanol extraction of guava leaves, and the signaling protein expressions of GvEx in anti-lipogenesis, stimulating lipolysis and improving insulin resistance in 3T3-L1 cells were investigated. First of all, in anti-lipogenesis, increase of GvEx concentration resulted in significant increase of glycerol release ( GR ) and significant decrease of triglyceride residual ( TR ) in 3T3-L1 preadipocytes. Bases on Oil-red O staining, the amount of oil droplets decreased as the amount of GvEx increased. Addition of 100-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GvEx showed the effect of anti-lipogenesis. Its inhibitory mechanism is through reducing the protein expression of transcription factors such as SREBP1c, PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  and C/EBP $\beta$ . Secondly, in the lipolysis, the addition of 100-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GvEx resulted in stimulating lipolysis for both 3T3-L1 adipocytes and their insulin resistance cells. Increasing addition of GvEx, protein expression of adipose triglyceride lipase ( ATGL ) , hormone-sensitive lipase ( HSL ) and phosphorylated HSL ( p-HSL ) increased in adipocytes respectively. Finally, In improving insulin resistance, 3T3-L1 adipocytes was induced by high glucose concentrance to cause insulin resistance. Regardless of the presence of high glucose concentrance, adding 100-400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GvEx increased the uptake of 2-NBDG for insulin resistance. Furthermore, with the increase of adding GvEx, protein expression of IRS 1, PI3K, AKT, p-IRS 1, p-AKT, and GLUT4 increased

Increase of these beneficial factors for glucose uptake might result in ameliorating insliun resistance.



# 壹、前言

現在人的飲食習慣及生活作息改變，高糖、高脂及高熱量食品隨處可見，且因長時間的久坐不動的習慣易造成代謝症候群的產生，會增加心血管疾病及第二型糖尿病等慢性疾病的危險性，且會造成其死亡率上升(Fu, Luo, Luo, & Garvey, 2006)。肥胖主要的原因是因為過多的脂肪組織及脂肪堆積，脂肪組織的大小是取決於脂肪細胞數目及體積，當生物的能量吸收大於消耗時，多餘的能量會轉換成三酸甘油酯並儲存於脂肪組織當中，肥胖與人類許多代謝疾病相關，如糖尿病、高血壓、心血管疾病及粥狀動脈硬化等，由於動物模式較為複雜(Cheng, Shen, & Wu, 2009)，因此許多研究皆採用 3T3-L1 前脂肪細胞分化成成熟脂肪細胞的過程來探討脂質新生、脂肪代謝、糖尿病與肥胖間的關係(Awazawa et al., 2011)。

脂質新生部分，脂肪細胞分化早期至少有兩種轉錄因子被誘發表現，PPAR $\gamma$  為脂肪細胞主要的特異基因，在脂肪細胞中有其微量的表現，受到荷爾蒙誘發分化後，PPAR $\gamma$  表現量迅速增加，尤其是在分化第二天表現量明顯增加，且在成熟細胞中表現量達到最高(Brasaemle, 2010)，而 C/EBP $\beta$  與 C/EBP $\delta$  在 PPAR $\gamma$  開始大量表現時會有短暫性的增加，其在分化早期治中期時下降，且同時誘發 PPAR $\gamma$  與 C/EBP $\alpha$  表現，接著 PPAR $\gamma$  與 C/EBP $\alpha$  開始調控下游分化及代謝的轉錄基因，使得細胞開始堆積脂質並表現脂肪細胞的特徵，若在誘發分化時添加了番石榴葉萃取物抑制其轉錄因子的誘發則可以抑制脂質新生(Liu, Wang, Huang, Lu, & Chiang, 2015)。

脂肪代謝部分，經由三個酵素所催化連續反應所完成，分別為三酸甘油酯脂解酶 (ATGL)、荷爾蒙敏感性脂解酶 (HSL) 與單酸甘油酯脂解酶 (MGL) (Lamming & Sabatini, 2013)，此三種酵素依序作用之下可以將三酸甘油酯分解成丙三醇與脂肪酸。在脂解酶的活性探討中，HSL 具有分解三酸甘油酯與雙酸甘油酯的活性，但對於雙酸甘油酯的分解作用遠高於三酸甘油酯，ATGL 控制大部分的三酸甘油酯的分解作用，為細胞中分解三酸甘油酯以促使 HSL 分解雙酸甘油酯，若提高 ATGL 的表現量則會促進脂肪酸及丙三醇的釋放，故添加番石榴萃取物可提高 ATGL 的表現量來促進脂肪分解 (Singh et al., 2013)。

胰島素阻抗部分，主要由 2 個  $\alpha$  亞基和 2 個  $\beta$  亞基通過二硫鍵連接，當胰島素與受體的  $\alpha$  亞基結合並改變  $\beta$  亞基的構型時，自磷酸化反應會被活化並使得  $\beta$  亞基上特異性位點的酪胺酸殘基磷酸化，自磷酸化反應同時也會將 IRS1 上具有重要作用的十幾個酪胺酸殘基 K 磷酸化，被磷酸化的 IRS1 能夠結合並活化下游的訊息傳遞 (Rudich, Kanety, & Bashan, 2007)。而 PI3K 磷酸化後進一步活化蛋白質基酶 B 上 AKT 磷酸化，蛋白質基酶 B 為一個負責調控胰島素信號的代謝轉錄因子，能促進葡萄糖攝入量 (Yoshitomi, Guo, Liu, & Gao, 2012)。GLUT4 為一個脂肪細胞的轉運蛋白，在高葡萄糖的環境下會抑制胰島素相關的轉錄因子表現量及磷酸化，而產生胰島素阻抗現象，故在高葡萄糖情況下添加番石榴萃取物活化胰島素相關的表現量及磷酸化來達到改善胰島素阻抗的現象 (Sanchez-Gurmaches, Hung, & Guertin, 2016)。

番石榴(*Psidium guajava* L.)為桃金娘科 Myrtaceae，番石榴屬 *Psidium* 常綠果樹植物，屬於灌木或小喬木，俗稱拔番石榴子、那拔，因其來自國外，故名為番石榴(謝，2005)。番石榴著名的生理活性有包括抗菌、抗腹瀉、清除自由基及抗氧化、抗腫瘤活性及抗癌細胞生長、抗發炎、保肝作用及降血糖作用。然而用番石榴葉萃取物同時探討抑制脂質新生、促進脂肪分解及胰島素阻抗之機制研究，以了解其相關的研究鮮少，因此本實驗探討超音波輔助乙醇萃取番石榴葉所得萃取物對抑制脂質新生、促進脂肪分解及胰島素阻抗調控抗機制之影響。



## 貳、 文獻回顧

### 一、 番石榴

#### (一)番石榴介紹

番石榴 (*Psidium guajava L.*) 為桃金娘科 Myrtaceae，番石榴屬 *Psidium* 常綠果樹植物，屬於灌木或小喬木，俗稱拔番石榴子、那拔，因其來自國外，故名為番石榴，原產於中美洲從墨西哥到南美洲北部，由西班牙人傳至歐洲再傳到中國大陸 (謝，2005)。主要分布在亞熱帶及熱帶地區，耐旱且可以生長在潮濕或乾燥的氣候，在海拔 0—2740 公尺，喜歡年降水量 1000—20000 公厘，且排水系統良好的地方，夏季平均氣溫低於 15°C 時會死亡，無法容忍白天激烈的酷熱，只能容忍輕霜，喜歡充足的陽光，但在半遮蔭環境下也能生長，一年四季都可收成，以九月至十一月為盛產期，為重要的熱帶水果之一。番石榴果實含較高的維生素 A、C、纖維質及磷、鉀、鈣等微量元素，爽脆甘甜、高纖及熱量低，通常用於沙拉或甜點 (行政院農委會年報，2011)。

#### (二)番石榴品種

番石榴約 300 年前引進台灣，由日本人三宅勉及石田昌在民國四年開始引進爪哇白肉及黃肉種，之後由美國、中國、印度、泰國、巴拿馬等國家引進許多的品種 (行政院農委會年報，2011)，栽種品種幾經演替，從野生的在來種，歷經中山月芭樂、梨仔芭樂、白芭樂等，台灣於 40 年代即有紅肉土芭樂，因品種不佳故無大量生產，近年來因重視養生的人口增多，經品種改良



與技術改善一直到民國八十一年高雄縣大社鄉終於選育出新品種「珍珠芭樂」。台灣番石榴可全年生產，其中以9月至隔年2月品質最為穩定，種植面積7千餘公頃，產地主要集中於高雄、台南、彰化、屏東等縣，年產值21億元。番石榴品種可分為更年性與非更年性果實，更年性果實在其果實後熟的階段會有明顯的呼吸高峰，乙烯處理後會加速後熟的速度，而非更年性果實則與更年性果實相反，後熟階段無明顯高峰期，乙烯處理會造成呼吸率短暫升高但很快又恢復原本狀態，更年性品種包括白拔、大蒂頭、土芭樂、中山月拔及宜蘭紅肉拔，至於非更年性品種包括泰國拔、珍珠拔、水晶拔、帝王拔及彩虹拔（行政院農委會年報，2011）。

### (三)番石榴葉之生理活性

番石榴較為著名的生理活性有七種(1) 抗菌：可抑制大腸桿菌、金黃色葡萄球菌、腸炎沙門氏菌、志賀氏菌、蠟樣芽孢桿菌、假單綠膿桿菌、變形桿菌及變形鏈球菌。(2) 抗腹瀉：研究顯示 0.2 g/kg 番石榴可抑制 65% 小腸蠕動，因番石榴葉萃取物中的 Quercetin-3-arabinoside 及 Quercetin 可增加迴腸張力，且甲醇萃取物對猴子輪狀病毒脫水性腹瀉部分也具有 93.8 % 抑制能力 (Gutierrez, Mitchell, & Solis, 2008)。(3) 清除自由基及抗氧化：由酚類所提供具有非常強的抗氧化活性，其中以 ferulic acid 及 gallic acid 為主要物質 (Liu et al., 2015)。(4) 抗腫瘤活性及抗癌細胞生長：可抑制前列腺細胞及胃癌細胞的生長，其中以正己烷抑制前列腺癌細胞及氯仿萃取物抑制人類胃癌細胞效果最佳，且番石榴葉萃取出精油可減少人類白血病細胞及口腔癌的生長

(Farmer, 2008)。(5) 抗發炎：可抑制巨噬細胞由 LPS 所誘導的發炎反應，主要是因為番石榴葉萃取物含有豐富的萜類及酚類化合物(Gonzales & Orlando, 2007)。(6) 保肝作用：研究顯示番石榴葉之水、乙醇及丙酮萃取物可有效保護酒精所引起的肝損傷，且水萃取物 500 mg/kg 可保護由四氯化碳所誘導的肝損傷(Abdullahi & Jeschke, 2016)。(7) 降血糖作用：研究指出番石榴葉可抑制  $\alpha$ -glucosidase 及  $\alpha$ -amylase 酵素的能力，以減緩醣類吸收達到調降血糖的效果，在細胞方面，番石榴葉可有效提升肝細胞的葡萄糖攝入量，目前認為有效的化合物為槲皮素、單寧酸、黃酮類、五環三萜類化合物及 guajaverin(Zechner et al., 2012)。

## 二、 肥胖與代謝症候群

代謝症候群是描述心血管疾病數個危險因子聚集的現象，雖然目前尚未完全了解其致病機轉，但是很顯然是胰島素阻抗所致。代謝症候群的危險因子有很多，如性別、年齡、種族、生活型態、肥胖及遺傳等。許多研究指出代謝症候群會增加心血管疾病及第二型糖尿病等慢性疾病的危險性，且會造成其死亡率上升，世界各國代謝症候群盛行率持續上升中，已成為重要的公共衛生議題(Hsu & Yen, 2007)，因此及早預防新陳代謝症候群的發生是有其必要性。這些危險因子與台灣十大死因榜中腦血管疾病、心臟病、糖尿病、高血壓性疾病密切相關。代謝症候群判定標準為 (1) 腹部肥胖：(腰圍：男性  $\geq$  90 cm、女性  $\geq$  80 cm)。(2) 高血壓：收縮血壓 (SBP)  $\geq$  130 mmHg/舒張血壓 (DBP)  $\geq$  85 mmHg。(3) 高血糖：空腹血糖值 (FG)  $\geq$  100



mg/dl。(4) 高密度酯蛋白膽固醇 (HDL-C)：男性 $< 40$  mg/dl、女性 $< 50$  mg/dl。(5) 高三酸甘油酯 (TG)  $\geq 150$  mg/dl。以上五項組成因子中符合三項以上即可判定為受測人具有代謝症候群。

肥胖的健康危害是 21 世紀全球性公共衛生議題的主要論點，每年至少有 280 萬人死亡可歸於超重或肥胖。肥胖曾被視為高收入國家的問題，而現在低收入和中等收入國家也廣泛存在這問題。2016 年 18 歲及以上的成年人中逾 19 億人超重，其中超過 6.5 億人肥胖(Lago, Gomez, Gomez-Reino, Dieguez, & Gualillo, 2009)。根據世界衛生組織 (WHO) 的定義，BMI 在  $25 \text{ kg/m}^2$  以上為過重， $30 \text{ kg/m}^2$  以上為肥胖。而亞太地區則根據 International Obesity Task Force (IOTF) 的建議，BMI 在  $23 \text{ kg/m}^2$  以上為過重， $25 \text{ kg/m}^2$  以上為肥胖。在台灣，則以 BMI 在  $24 \text{ kg/m}^2$  以上為過重， $27 \text{ kg/m}^2$  以上為肥胖，另外，由於各種證據顯示中央肥胖與各種肥胖相關疾病的關係更為密切，IOTF 與台灣皆建議在亞太地區以女性腰圍 80 公分、男性腰圍 90 公分作為中央型肥胖的判定。肥胖本身即與糖尿病產生了密切的關係，目前世界上有 4.25 億人患有糖尿病，由聯合國人口司估計在 2045 年 20-79 歲將有 6.29 億人糖尿病患者，其中包括診斷和未確診的糖尿病(Hsu & Yen, 2007)。

根據膽固醇和三酸甘油酯的高低組合不同可將高脂血症分為五型高脂蛋白血症。五型中的任何一型脂蛋白代謝異常都會導致某種特定脂蛋白升高。通過判斷哪一種脂蛋白的升高，就可以診斷是哪一種類型的高脂蛋白血症 (Gallant, Odei-Addo, Frost, & Levendal, 2009)。

### (1) I 型高脂蛋白血症

又稱「高乳糜微粒血症」，主要是空腹血漿中存在的乳糜微粒濃度增高所致。測定血脂主要是三酸甘油酯水平升高，而其他脂蛋白基本正常。

### (2) II 型高脂蛋白血症

此型在臨床上最為常見，是與動脈粥樣硬化密切相關的一型，II 型引起低密度脂蛋白（LDL）增高，LDL 以正常速度產生，但由於細胞表面 LDL 受體數減少，引起 LDL 的血漿清除率下降，導致其在血液中堆積。

- IIa 型高脂蛋白血症：血漿中 LDL 水平單純性增加，血脂只有膽固醇水平升高，三酸甘油酯水平則正常，可繼發於庫欣綜合徵、甲狀腺功能減退症、神經性厭食、應用糖皮質激素、腎病綜合徵、原發性肝癌和糖尿病等。
- II b 型高脂蛋白血症：血漿中 VLDL 和 LDL 水平均有增加，測定血脂則膽固醇和三酸甘油酯水平均有增加，此型臨床上相當常見，可繼發於糖尿病、肝病、甲狀腺功能減退症、腎臟疾病、吸收不良、肥胖和酒精中毒。亦可受糖皮質激素和雄性激素的影響。

### (3) III 型高脂蛋白血症

又稱「家族性異常 Ia-脂蛋白血症」，此型在臨床上很少見，主要是由於血漿中乳糜微粒殘粒和 VLDL 殘粒水平增加，血漿中膽固醇和三酸甘油酯濃度均明顯升高，且兩者升高的程度大致相當，III 型高脂蛋白血症可繼發於單

克隆免疫球蛋白病、原發性澱粉樣變、系統性紅斑狼瘡、甲狀腺功能減退症。

#### (4)IV 型高脂蛋白血症

又稱「高前 $\beta$ -脂蛋白血症」此型的發生率低於II型，但仍很常見，多於20歲後發病，可為家族性，但更多的還是屬於後天因素，IV型的最主要特徵是VLDL升高，由於VLDL是肝內合成的三酸甘油酯和膽固醇的主要載體，因此引起三酸甘油酯的升高，有時也可引起膽固醇水平的升高，主要是由血漿三酸甘油酯水平升高的程度而定，IV型高脂蛋白血症可繼發於肥胖、慢性腎功能衰竭、腎病綜合徵、糖尿病、甲狀腺功能減退症和過量飲酒等。

#### (5)V 型高脂蛋白血症

空腹時血漿中乳糜微粒和VLDL水平均升高，血漿三酸甘油酯和膽固醇水平均升高，但以三酸甘油酯升高為主，本型是I、IV混合型，可同時兼有兩型的特徵，V型高脂蛋白血症繼發於糖尿病、酒精中毒、口服避孕藥、糖原累積症和腎病綜合徵。

代謝症候群是描述心血管疾病數個危險因子聚集的現象，雖然目前尚未完全了解其致病機轉，但是很顯然是胰島素抵抗所致。代謝症候群的危險因子有很多，如性別、年齡、種族、生活型態、肥胖及遺傳等。許多研究指出代謝症候群會增加心血管疾病及第二型糖尿病等慢性疾病的危險性，且會造成其死亡率上升，世界各國代謝症候群盛行率持續上升中，已成為重要的公共衛生議題，因此及早預防新陳代謝症候群的發生是有其必要性(Shimoyama et

al., 2006) ，這些危險因子與台灣十大死因榜中腦血管疾病、心臟病、糖尿病、高血壓性疾病密切相關。代謝症候群判定標準為 (1) 腹部肥胖：(腰圍：男性 $\geq 90$  cm、女性 $\geq 80$  cm)。(2) 高血壓：收縮血壓 (SBP)  $\geq 130$  mmHg/舒張血壓 (DBP)  $\geq 85$  mmHg。(3) 高血糖：空腹血糖值 (FG)  $\geq 100$  mg/dl。(4) 高密度脂蛋白膽固醇 (HDL-C)：男性 $< 40$  mg/dl、女性 $< 50$  mg/dl。(5) 高三酸甘油酯 (TG)  $\geq 150$  mg/dl。以上五項組成因子中符合三項以上即可判定為受測人具有代謝症候群。

肥胖的健康危害是 21 世紀全球性公共衛生議題的主要論點，每年至少有 280 萬人死亡可歸於超重或肥胖。肥胖曾被視為高收入國家的問題，而現在低收入和中等收入國家也廣泛存在這問題(Shimoyama et al., 2006)。2016 年 18 歲及以上的成年人中逾 19 億人超重，其中超過 6.5 億人肥胖。根據世界衛生組織 (WHO)的定義，BMI 在  $25 \text{ kg/m}^2$  以上為過重， $30 \text{ kg/m}^2$  以上為肥胖。而亞太地區則根據 International Obesity Task Force (IOTF)的建議，BMI 在  $23 \text{ kg/m}^2$  以上為過重， $25 \text{ kg/m}^2$  以上為肥胖。在台灣，則以 BMI 在  $24 \text{ kg/m}^2$  以上為過重， $27 \text{ kg/m}^2$  以上為肥胖，另外，由於各種證據顯示中央肥胖與各種肥胖相關疾病的關係更為密切，IOTF 與台灣皆建議在亞太地區以女性腰圍 80 公分、男性腰圍 90 公分作為中央型肥胖的判定。肥胖本身即與糖尿病產生了密切的關係，目前世界上有 4.25 億人患有糖尿病，由聯合國人口司估計在 2045 年 20-79 歲將有 6.29 億人糖尿病患者，其中包括診斷和未確診的糖尿病。



### 三、 糖尿病治療

#### (一)胰島素分泌促進劑(insulin secretagogues)

##### 1. 磺醯尿素(sulfonylureas, SU):

主要作用在磺醯尿素接受器，以增加胰島素之分泌。磺醯尿素大部份在肝臟代謝，其代謝產物效力大為減弱，並且和其他未經代謝轉變的藥物一起由腎臟或膽道排出，因此肝、腎功能衰退的人，使用磺醯尿素時會出現磺醯尿素作用增強、時效延長的現象，須要特別小心，如果使用這類藥物，應減少劑量、多測血糖以減少低血糖發生的機率發生。磺醯尿素的不良反應以體重增加及低血糖最為常見，對老年人、腎功能不全或食無定時者更是危險。對磺胺製劑過敏、懷孕和手術後尚未能正常進食者不應使用磺醯尿素(Farmer, 2008)。

##### 2. Glinides(又稱 Meglitinides 類似物):

主要之作用機轉為刺激細胞之磺醯尿素接受器，藉以促進胰島素分泌；吸收快且作用時間短，服藥後 10-15 分鐘開始作用，在一小時內達到最高濃度，適合用來治療飯後血糖高，作用中以乳酸中毒致命性較高，因此對有乳酸血症傾向之病人為禁忌，例如有肺、心、肝或腎病之病人，年老患者及酗酒者對此藥物過敏之病人亦不宜使用(Lefterova & Lazar, 2009)。

#### (二)雙胍類(Biguanides,BG)

主要作用為減少肝臟之葡萄糖新生作用，但不會增加胰島素之分泌。BG 異於 SU 者在於它本身不會刺激胰島素之分泌，而主要是促進細胞對葡萄糖之利用，不會引起低血糖反應(Giralt & Villarroya, 2012)。

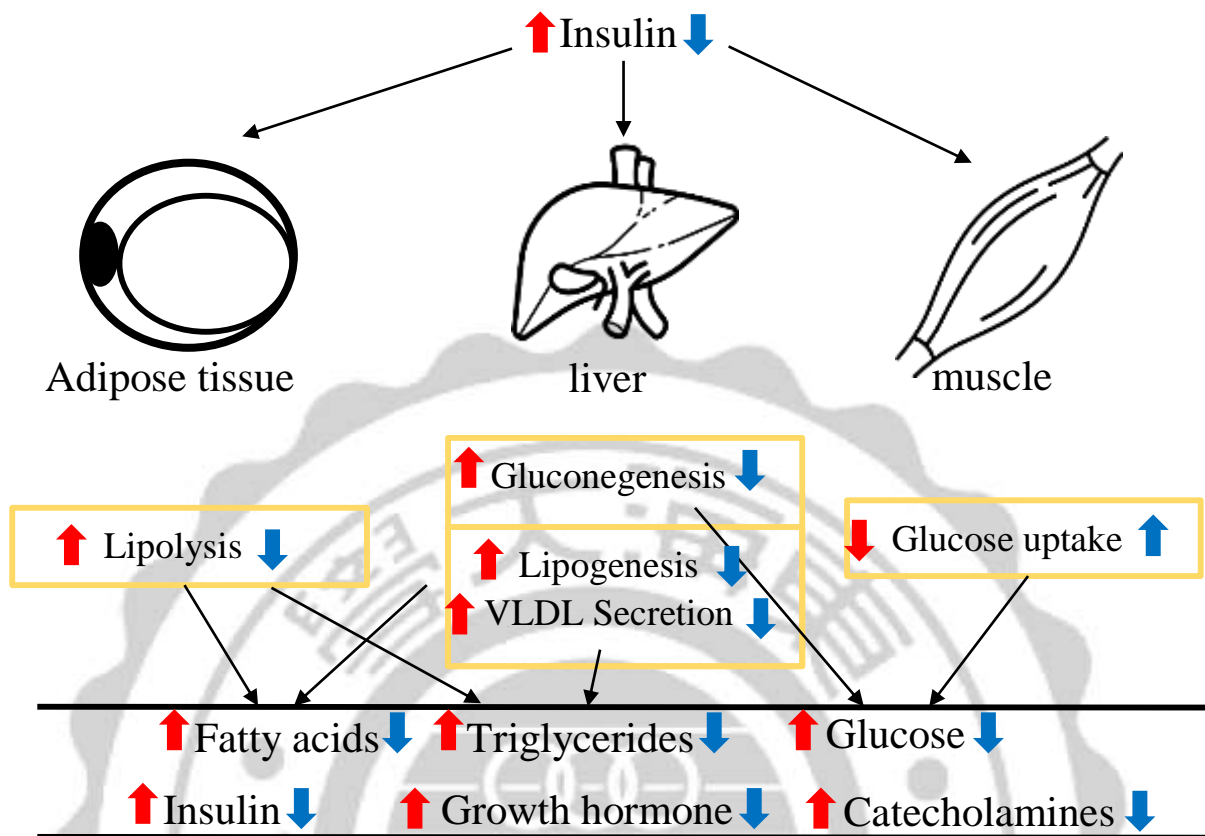
### (三) Glitazones(Thiazolidinediones)

作用機轉為活化 peroxisome proliferative-activated receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ )，影響葡萄糖及脂質之基因轉錄而增強周邊組織增加胰島素之敏感度，並抑制肝臟醣質新生(gluconeogenesis)，降低空腹血糖及血中胰島素濃度，副作用有體重增加、水腫、腹瀉、頭痛等，且部份活化 PPAR $\alpha$ ，具類似 Fibrate 類藥物之降血脂作用(Langin, 2011)。

### (四) $\alpha$ -葡萄糖甘酶抑制劑( $\alpha$ -glucosidase inhibitor)

主要之作用機轉為抑制澱粉及雙醣類之分解，延緩葡萄糖的吸收，可降低飯後血糖、胰島素濃度，甚至空腹血糖。該藥物不被腸胃道吸收，副作用為脹氣、腹瀉，服用  $\alpha$ -glucosidase inhibitor 的病人如果出現低血糖，治療時必須使用葡萄糖或牛奶，但不能使用蔗糖，因 lactase 不受抑制，但 sucrase 會受抑制。研究指出葡萄糖耐量異常患者服用 acarbose，可減低其轉變為第 2 型糖尿病的機率(Morigny, Houssier, Mouisel, & Langin, 2016)。

## 四、 胰島素與血糖恆定



圖一、胰島素與血糖恆定

人體血液濃度在飢餓或飽食狀態下維持在 4-7mM，主要的葡萄糖消耗為肌肉跟肝臟，脂肪細胞則相對而言較少。其恆定如圖一主要是依賴胰臟β細胞分泌胰島素外還需與脂肪、肝臟及肌肉三個胰島素作用的重要下游臟器參與。此三種細胞上皆有胰島素的接受器，當胰島素與接受器結合後便會產生一系列的訊息傳導及一連串的磷酸化反應，使得細胞質內的葡萄糖轉運蛋白轉為至細胞膜上，並將葡萄糖攝入至細胞中，經研究顯示，胰島素所誘導的轉為葡萄糖轉運蛋白中主要是 GLUT1 及 GLUT4。其中肥胖是導致胰島素阻抗的主要原因，肥胖相關的阻抗形成於肌肉、肝臟及脂肪組織均會發生。如圖，當胰島素上升時，脂肪細胞脂質分解作用上升、肝臟細胞糖異生作用上

升及極低密度脂蛋白上升與肌肉細胞葡萄糖攝取下降，造成血液內生長激素、兒茶酚胺、三酸甘油酯、脂肪酸及葡萄糖皆上升，若胰島素下降則其現象相反。

## 五、 胰島素阻抗

胰島素阻抗最主要的因素是循環中有過多的游離脂肪酸存在，血液中過多的葡萄糖與游離脂肪酸導致胰臟分泌更多的胰島素；同時，游離脂肪酸也引起一聯串的發炎反應，作用在脂肪組織、肌肉與肝臟，最後造成胰島素阻抗 (Arner & Langin, 2014)。正因為過多脂肪組織產生游離脂肪酸造成了胰島素阻抗及代謝症候群，胰島素阻抗是指脂肪細胞、肌肉細胞和肝細胞對正常濃度的胰島素產生反應不足的現象，亦即這些細胞需要更高的胰島素濃度才能對胰島素產生反應。在脂肪細胞內，胰島素阻抗會導致儲存中的三酸甘油酯被水解，進而提高血漿內游離脂肪酸的含量，經由血液運送到肝臟與肌肉組織。在肝臟中會造成葡萄糖與三酸甘油酯增加；在肌肉中會抑制胰島素調節細胞對葡萄糖的攝取與利用的作用，降低胰島素敏感性進而增加三酸甘油酯堆積 (Titchenell, Lazar, & Birnbaum, 2017)。血液循環中葡萄糖與游離脂肪酸增加會刺激胰臟分泌更多胰島素而造成血中胰島素濃度升高(hyperinsulinemia)，減低週邊組織胰島素敏感性，導致葡萄糖攝入量及利用率降低，持續惡化成為無法復原的第二型糖尿病。

## 六、 胰島素

### (一)胰島素簡介



人類的胰島素基因位在第十一號染色體短臂上，在轉錄出分子量為 11,500 Da 的胰島素前趨分子後，胰島素前趨分子經由酵素切割而形成前胰島素，前胰島素再次透過酵素的辨認經過切割後會轉變成胰島素，人體胰島素分子量為 6000 Da，而胰島素具有 51 個胺基酸主要是由 21 個胺基酸所組成 A 鏈以及由 30 個胺基酸所組成 B 鏈組成並以雙硫鍵相連而成(Caselli, 2014)，而經切割後游離的 C 鏈則可以反映出具有活性之胰島素數量，最終被腎臟代謝，於具有活性之胰島素最後被胰臟蘭氏小島上  $\beta$  細胞分泌到血液中。相反的，胰臟蘭氏小島上  $\alpha$  細胞分泌昇糖素可以促進肝糖分解成葡萄糖使血糖升高，簡單說，胰島素的作用是促進能量儲存、降低血糖及刺激細胞生長和分化(Reilly & Sattiel, 2015)。

## (二)胰島素分泌

血糖上升時會刺激胰臟  $\beta$  細胞膜上的轉運蛋白 GLUT4，經由代謝後產生 ATP，當 ATP/ADP 比值提高則會使鉀離子通道關閉，此時胞內鉀離子濃度上升導致細胞膜去極化，誘發對膜電位敏感的鈣離子通道打開讓胞外鈣離子進入，促進細胞內行顆粒性外吐作用，GLUT4 由細胞移至細胞膜使葡萄糖由胞內排除至胞外。

## (三)胰島素作用

食物進入人體經消化後會釋放出能量，此能量的運用儲存皆是利用體內的新陳代謝系統所調控，在調節系統中，脂質、蛋白質及醣類代謝皆息息相關，而其中胰島素是調節此三者代謝的重要角色之一。1.醣類代謝 (1)增加肝

糖合成、(2)抑制肝醣分解、(3)促進葡萄糖分解及(4)抑制糖質新生，2.蛋白質代謝，3.脂質代謝(1)脂質分解及(2)促進脂肪合(Kusminski & Scherer, 2012)。

脂質代謝部分分為脂質分解及促進脂肪合成，首先脂肪分解是胰島素對脂質組織的調控主要抑制脂解酶的活性，減少三酸甘油酯分解成甘油及游離脂肪酸，降低血漿中的游離脂肪酸含量進而降低脂解作用。接著脂肪合成是胰島素會增加乙醯輔酶 A 羧化酶等活性，除了促進脂肪酸的合成也增加丙酮酸基酶的活性，使磷酸甘油生成增加進而促成脂肪合成(Sanchez-Gurmaches & Guertin, 2014)

當胰島素缺乏時葡萄糖無法被細胞所利用，生物體能量則改由脂肪提供，脂肪合成減少及脂肪分解增加則會導致血脂濃度增高，血液中的游離脂肪酸、三酸甘油脂及磷脂質都會增加，而脂肪酸被送至肝臟進行氧化，使乙醯輔酶 A 大量產生，造成酮體增多引起酮酸中毒、昏迷或死亡(Zou, Wang, & Shen, 2005)。

#### (四)胰島素細胞層面傳訊路徑

胰島素標的細胞為脂肪細胞、肌肉細胞及肝細胞，此三種細胞皆有胰島素接受器，當胰島素與胰島素接受器結合後便會活化  $\beta$  次單位的 tyrosine phosphorylation 產生一連串的磷酸化反應及訊息，使細胞質內的葡萄糖轉運蛋白轉位至細胞膜上，而將葡萄糖攝入至細胞中。經研究指出，胰島素所誘導的轉位葡萄糖轉運蛋白主要是 GLUT1 及 GLUT4，而脂肪細胞及肌肉細胞的葡萄糖攝入是由 GLUT4 所負責(Morigny et al., 2016)。研究發現 TNF- $\alpha$  會減

少胰島素受器於細胞膜聚集、胰島素受器結合、干擾胰島素受器基質及降低 3T3-L1 細胞內 GLUT4 蛋白質含量，降地血糖藥物 TZDs 可增進胰島素受器與胰島素受器基質的磷酸化及 PI3K 的活化，有效改善 TNF- $\alpha$  所引起的胰島素傳遞損傷，結果推測發現 GLUT4 降低可能是造成脂肪細胞胰島素阻抗的原因。

#### (五)胰島素與醣類代謝

胰島素在細胞膜上與 IRS-1 結合後經由訊息傳遞可促進細胞膜中葡萄糖轉運蛋白移至細胞膜以幫助葡萄糖攝取。對醣類代謝影響可分為四個方面。(1) 增加肝糖合成：可促進 glycogen synthase 及 glucokinase 等酶活性，增進肝糖合成(Sanchez-Gurmaches et al., 2016)。(2) 抑制肝糖分解：抑制 glycogen synthase 及 glucokinase 等酶以減少肝糖分解產生葡萄糖，若胰島素不足則會造成醣類代謝失衡導致高糖症(Vinayagam & Xu, 2015)。(3) 促進葡萄糖分解：促進 6-phosphofructo-2-kinase 及 pyruvate dehydrogenase 等酶活性達到目的。(4) 抑制糖質新生：抑制 fructose 1,6-diphosphatase 及 phosphoenolpyruvate carboxylase 等酶達到抑制(Ramage et al., 2016)。

胰島素可由影響胰島素受器間的傳遞訊息而調控葡萄糖的釋放與合成，在肝糖合成調節部分，當細胞外六碳糖激酶或葡萄糖激酶會將葡萄糖磷酸化產生 Glc-6-P 促使肝糖合成酶構型改變造成異構活化，進而容易被蛋白質磷酸酶去磷酸轉變成活化態，胰島素會促進葡萄糖轉運及肝糖合成而增加細胞內肝糖的累積。肝糖合成酶為肝糖合成的重要催化酶，然而肝糖合成酶的活性



會受到肝醣合成激酶磷酸化所抑制。胰島素在肝臟中可藉由磷酸化抑制 GSK-3 及 PKA 和提高 PP1 活性，導致肝糖生成速率提高促成肝醣合成，進而促進葡萄糖轉運增加葡萄糖攝入。葡萄糖分解與醣質新生部分，胰島素可阻斷肝醣分解抑制葡萄糖的釋放及產生和肝臟醣質新生，其作用激刺是藉由去磷酸化及磷酸化直接調控醣類代謝酵素的活性和調節肝臟醣質新生及肝醣分解相關酵素基因的表現。胰島素可抑制醣質新生酵素轉錄因子 HNF4-與 FOX 進而抑制醣質新生速率限制酶 PEPCK 基因的轉錄(Reilly & Saltiel, 2015)。此外，胰島素可以降締其他醣質新生相關酵素 G-6-Pase 及 F-1,6-Pase 基因的轉錄，增加醣解酵素及脂質生成作用，因此，胰島素可減少肝臟中葡萄糖的產生進而促進葡萄糖的利用減少葡萄糖的釋放(Rudich et al., 2007)。

## 七、 脂肪組織

脂肪組織是一種特殊結締組織，普遍分布於生物體各處，其主要由內皮細胞、無油滴堆積的前脂肪細胞及充滿油滴的成熟脂肪細胞所組成，脂肪細胞生長包括脂肪細胞增殖以及脂肪細胞肥大，初期脂肪細胞增加主要是由前脂肪細胞增殖所造成，中期當體內攝取過多的能量則會以三酸甘油酯之形式堆積於脂肪細胞中，使脂肪細胞的體積增大，若此時再過度攝取能量，脂肪細胞的體積增加便會刺激前脂肪細胞增生(Lamming & Sabatini, 2013)。一旦脂肪細胞數目增加則不會再減少，只能單靠調節脂肪細胞大小以影響脂肪組織生長(Ahmadian, Wang, & Sul, 2010)。

### (一) 白色脂肪組織

許多物種出生前即已形成白色脂肪組織，並於成熟後仍有能力產生新的脂肪細胞。隨著年紀的增長，白色脂肪組織含量會慢慢增加。白色脂肪組織為能量的儲存場所，主要分布於動物的腹部、臀部、大腿及內臟。在營養充足的環境下，脂肪組織會將能量以三酸甘油酯的形式儲存；當運動物體飢餓及缺乏養分時，白色脂肪組織內儲存的三酸甘油酯會進行脂解作用，提供動物體所缺乏的能量(Lafontan, 2014)。

## (二)棕色脂肪組織

在小型的哺乳類及冬眠動物中，棕色脂肪組織具有重要的調節功能，為主要的能量來源。人類在出生前雖具有棕色脂肪組織，但成長過程中則會逐漸變為具儲存能量功能的白色脂肪組織，成年階段僅有極少數的棕色脂肪組織殘留並分布於白色脂肪組織中。棕色脂肪組織與白色脂肪組織具有相反的功能，白色脂肪組織能累積能量(Mueller, 2014)，而棕色脂肪組織則是消耗能量，具有熱生成的作用。熱的產生是透過活化非偶合蛋白-1(uncoupling protein 1；UCP1)將脂肪酸轉換為熱的形式，ATP合成中的氧化磷酸化作用與作為熱量消耗的能量分開促進陰離子從內腺體向外腺體膜的轉移以及質子從外線向內腺體膜的返迴轉移。UCP1只存在於棕色脂肪組織中，為一種粒腺體蛋白質，可調控動物體內熱的生成及能量的平衡(Harwood, 2012)。在生理上，棕色脂肪組織可作為禦寒作用，以維持冬眠動物的體溫，而小型哺乳類或剛出生的嬰兒亦使用此方法維持體溫。

## 八、脂肪細胞之研究

## (一) 體內模式

是指利用人類以外的動物進行科學實驗，以驗證個別因素對接受測試的動物在生理或行為上的影響，並與同種類之生物在自然環境下的狀態進行比對。雖然動物體內器官構造與人體相似能代表人體的生理型態，但動物體也較為複雜會受到外在生存環境影響，體內細胞表亦會有各種激素的交互作用，其生理環境變化複雜無法單純探討及個別處理對目標細胞的影響及機制，所以研究樣品對目標細胞的作用大多採用體外細胞培養(Mueller, 2014)。

## (二) 體外模式

體外細胞培養是指從體內組織取出細胞，在體外藉由模擬生物體內的生理環境，利用培養基提供細胞生長所需的養分，使其生長並維持原有的結構。而培養中的細胞可單純的研究單因素或多因素下之影響，但細胞在體外環境下有侷限，使細胞型態未能完全與體內細胞相同(Gallant et al., 2009)。本研究以 3T3-L1 前脂肪細胞作為研究目標細胞，故將進行大量擴增培養以利進行實驗之需要，目前用於體外的前脂肪細胞分為量大類：第一類為纖維母細胞，具有轉變多種細胞之能力，多應用於研究纖維母細胞分化成不同功能之機制，代表細胞為 CHEH/18、10T1/2 及 RCJ3.1。第二類為前脂肪細胞，經誘發後可分化為成熟脂肪細胞，代表細胞為 3T3-L1 及 3T3-F422A(Lamming & Sabatini, 2013)。

### 1. 3T3-L1 前脂肪細胞株

3T3-L1 為前脂肪細胞目前最常用來研究脂肪細胞生長與代謝的細胞株，分離自老鼠胚胎細胞，此具有分裂能力的 3T3-L1 纖維母細胞經過單株劃分出具有分化為脂肪細胞能力的前脂肪細胞株，在其培養過程中可發現細胞在分裂及增生階段會隨著細胞質增長而變的細長，外型與纖維母細胞相似 (Lefterova & Lazar, 2009)。

## 2. 前脂肪細胞的分化

當細胞間生長至互觸達到長滿時會產生接觸性生長抑制，使細胞週期進入 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期而停止生長，一般狀態下 3T3-L1 前脂肪細胞會自動分化成成熟的脂肪細胞，但由於過程中需要一個月，為縮減實驗並控制時間，利用分化試劑加速誘導分化。分化試劑為 Dexamethasone(DEX)、3-methyl-isobutylxanthine (IBMX)與 Insulin 三者混合而成，DEX 是一種合成且可促進體內脂肪形成的糖皮質激素增敏劑，可與糖皮質受體結合活化細胞內轉錄因子 C/EBP $\beta$  達到誘導細胞分化效果，其在體外和鼠體內均廣泛用作生脂誘導劑，若此水平的高則會促進了人類內臟脂肪組織的擴張(Fu et al., 2006)。IBMX 為非特異性 cAMP 和 cGMP 抑製劑，會造成 cAMP 濃度提高，並經由 Camp-dependent protein kinase 途徑活化 C/EBP $\delta$  而誘導細胞分化(Wallberg-Henriksson & Zierath, 2009)。Insulin 在脂肪組織能抑制細胞內脂解酶的作用，進而抑制儲存的三酸甘油酯分解以及增加葡萄糖的運輸(Samuel & Shulman, 2012)。

生長停止期



細胞分化前先讓細胞增生至滿盤，藉由細胞間互觸而產生接觸性抑制作用，此時細胞會停滯在 G0/G1 期，並會誘發極早期脂肪細胞分化指標 LPL 和第六型膠原基因的表現(Richard & Stephens, 2011)。

#### 早期及中期的分化基因表現

3T3-L1 前脂肪細胞經由分化試劑誘導分化後，便重新進入細胞週期的複製擴增，經誘導一小時後初期的轉錄因子 C/EBP $\beta$  及 C/EBP $\delta$  即開始表現，DEX 及 IBMX 分別誘導 C/EBP $\beta$  及 C/EBP $\delta$  的表現並刺激脂質新生作用，這兩個因子均被認定為脂肪細胞分化的主要因子，且會繼續往下誘導下游因子 PPAR $\gamma$  與 C/EBP $\alpha$  的表現，脂肪細胞分化決定因子-1 固醇調節元素結合蛋白 (ADD1/SREBP1) 也會啟動內生性的 PPAR $\gamma$  配體，藉此活化 PPAR $\gamma$ (Sell, Dietze-Schroeder, & Eckel, 2006)。

在經歷過早期的細胞複製增生後，分化第二天細胞再進入生長停滯為 G<sub>D</sub> 期，此時 DNA 雙股螺旋打開使轉錄因子可以調控成熟脂肪細胞型態的調控反應位而後離開細胞週期。由 C/EBP $\beta$  及 C/EBP $\delta$  誘導的 PPAR $\gamma$  與 C/EBP $\alpha$  表現量會大幅提升，完全停止細胞增生並活化脂肪細胞形態特徵相關的基因，而當 PPAR $\gamma$  與 C/EBP $\alpha$  啟動後，C/EBP $\beta$  及 C/EBP $\delta$  表現逐漸減弱(Olarescu & Bollerslev, 2016)。

#### 分化末期及分化中止

受到 PPAR $\gamma$  與 C/EBP $\alpha$  啟動的特異性基因開始大量表現而進入分化末期，外觀型態上從原本紡錘狀隨細胞骨架及細胞外間質改變而形成圓且立體的类型



態，可觀察到油滴的累積且逐漸轉變成熟脂肪細胞。此時細胞對胰島素的刺激較為敏感，且多種脂質新生及脂解作用的 mRNA、protein 及 enzyme 開始表現(Glass & Olefsky, 2012)。

### (三) 脂質合成

一般生物在攝取過多能量例如碳水化合物、脂肪酸與蛋白質時，會將其轉化為脂肪的形式儲存於體內，而此轉化作用則為脂質生成作用，是動物體合成脂肪酸與三酸甘油脂的主要途徑。脂肪細胞是具有合成生物體所需之脂肪酸的功能(Kanzaki & Pessin, 2003)，其主要途徑為透過粒線體中的丙酮酸(pyruvate) 養化成為乙醯輔酶 A (Acetyl-CoA) 之後與草醯乙酸 (oxaloacetate) 形成檸檬酸(citrate)，在經 ATP 檸檬酸裂解酶 (ATP-citrate lyase) 分解為乙醯輔酶 A 與草醯乙酸。接著乙醯輔酶 A 再經由乙醯輔酶 A 羧化酶 (acetyl-CoA lyase) 羧化成為丙二醯輔酶 A (malonyl-CoA)，最後形成棕櫚酸。而棕櫚酸可與脂肪酸合成酶 (fatty acid synthesis ; FAS) 作用將生物體內脂肪酸透過反覆延長與去飽和作用，形成長鏈或是不飽和脂肪酸。(Chaves, Frasson, & Kawashita, 2011)

三酸甘油脂是由三分子的脂肪酸與一分子的甘油所組成，為脂肪細胞主要儲存油滴的形式。但因為動物體內缺乏甘油激酶 (glycerol kinase ; Gylk)，無法直接將甘油合成三酸甘油脂。故脂肪細胞則是間接以糖解作用的中間產物，二羥丙酮磷酸 (dihydroxyacetone phosphate ; DHAP) 作為前驅物與甘油三磷酸去氫酶 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase ; GPDH) 反應，得到甘油-

3-磷酸 (glycerol-3-phosphate, G3P)；脂肪酸加上 ATP 與 CoA，經由醯基-CoA 合成酶 (acyl-CoA synthase, ACS) 而活化形成兩分子的醯基-CoA (acyl-CoA)；兩分子之醯基-CoA 與甘油-3-磷酸作用形成 1, 2-二醯基甘油磷酸 (1, 2-diaclyglycerol phosphate)，而另一分子的醯基-CoA 會與二醯甘油醯基轉移酶 (diaclyglycerol acyltransferase) 作用下再與 1, 2-二醯基甘油磷酸形成三酸甘油酯 (Lafontan, 2014)。

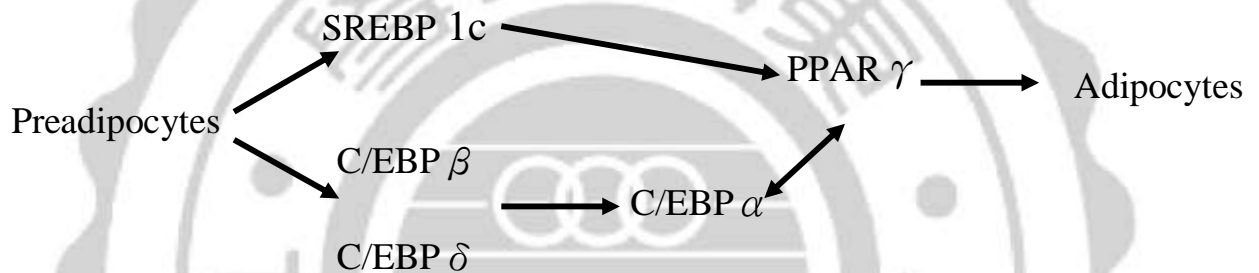
#### (四) 脂肪分解

脂質分解作用為動物體內三酸甘油酯的水解作用，此作用會釋出三分子的脂肪酸與一分子的甘油；而脂質分解作用可以受到動物體內的兩種激素的催化而進行反應，例如激素敏感性脂肪分解酶 (hormone-sensitive lipase；HSL) 與單酸甘油酯脂肪分解酶 (monoglyceride lipase)，HSL 具有可以直接催化三酸甘油酯水解反應的能力，其活化作用途徑大致如下：動物體內內密素透過誘發細胞膜上的  $\beta$ -adrenergic receptor，使得  $\beta$ -adrenergic receptor 透過刺激 G protein 的方式間接活化腺苷酸環化酶(adenylate cyclase)，而腺苷酸環化酶 (adenylate cyclase) 可以將 ATP 轉化為 cAMP，透過影響蛋白質激酶 A (protein kinase A) 的方式將激素敏感性脂肪分解酶磷酸化，磷酸化的激素敏感性脂肪分解酶會被運送至油滴當中水解三酸甘油酯；單酸甘油酯則是透過單酸甘油酯脂肪分解酶進行水解(Mueller, 2014)。值得一提的是，脂肪細胞中三酸甘油酯的水解是由三個連續性的酵素催化反應所完成的，分別為三酸甘油酯水解酶(adipose triglyceride lipase)催化三酸甘油酯水解、激素敏感性脂肪

分解酶(hormone-sensitive lipase,HSL)-催化二酸甘油酯水解以及單酸甘油酯脂肪分解酶 (monoglyceride lipase)-催化單酸甘油酯水解。

脂質分解後所產生的游離脂肪酸會進入血漿中與白蛋白 (albumin)結合，此化合物為脂肪酸氧化與脂質代謝之主要能量來源，經由血液運送至各組織後會受到組織細胞中的輔酶 A 活化成為酯醯輔酶 A (fatty acyl CoA)，在與肉鹼 (carnitine) 結合進入粒線體中的  $\beta$ -氧化作用 ( $\beta$ -oxidation) 反應。

### 九、抑制脂質新生轉錄因子



圖二、抑制脂質新生路徑

#### (一)CCAAT/增強子結合蛋白(CCAAT/enhancer binding protein; C/EBPs)

CCAAT/增強子結合蛋白(CCAAT/enhancer binding protein; C/EBPs)最初是由大鼠肝臟發現，因能與啟動子的 CCAAT 區及病毒增強子結合而命名，是具有 leucine zipper motif 的 DNA 結合蛋白超級家族(super family)的轉錄因子。此類蛋白質可分為兩區域，N 端(N-terminal)具有轉錄活化功能，C 端(C-terminal)則具形成二聚體及與 DNA 結合能力。其調控轉錄作用是先藉由 C 端的 leucine zipper 與其他 C/EBPs 形成同型二聚體(homodimer)或異形二聚體(heterodimer)後，basic region 再與核苷酸中特定序列結合即可進行調控。目前

為止，已知 C/EBPs 包含 C/EBP $\alpha$ 、C/EBP $\beta$ 、C/EBP $\gamma$ 、C/EBP $\delta$ 、C/EBP $\epsilon$  及 C/EBP $\zeta$ (Zechner et al., 2012)。

### 1. C/EBP $\alpha$ 功能

C/EBP $\alpha$  是 C/EBPs 第一個被發現的轉錄因子，可生產兩種異構物，分子量分別為 42 kDa 及 30 kDa。C/EBP $\alpha$  主要表現於肝臟、脂肪組織、腎上腺、腸道、肺臟及單核細胞等，又以肝臟及脂肪組織最具表現量。在脂肪細胞中的最大表現量時間點是在 MCE 結束後的分化期(Gutierrez et al., 2008)。

C/EBP $\alpha$  在脂肪細胞分化時受到 C/EBP $\beta$  及 C/EBP $\delta$  調控，且 C/EBP $\alpha$  啟動子上有 C/EBP 調控區及結合為因此可自行活化其轉錄活性。其表現量會在誘導後其與脂肪細胞形態特徵相關的基因表現。

### 2. C/EBP $\beta$ 功能

C/EBP $\beta$  具至少三種異構物，常見為 38 kDa (LAP\*)、35 kDa (LAP)及 20 kDa (LIP)，細胞中主要存在的是 LAP 及 LIP 兩種。其主要表現於肝臟、脂肪組織、腸道、肺臟、脾臟及白血球細胞等(El-Abhar & Schaalan, 2014)。當前脂肪細胞受到荷爾蒙誘導進入 MCE 後，其表現量會大幅提升，當細胞 MCE 之後再進入生長停滯期(G<sub>D</sub>期) 期表現量即大幅下降。在前脂肪細胞中加入 IBMX 可快速誘發 C/EBP $\beta$  並可維持至 MCE，而胰島素可促使 C/EBP $\beta$  與 DNA 的結合能力。C/EBP $\beta$  先被 MAPK (mitogen-activated)即 GSK3 (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ) 磷酸化後，此時才具有與 DNA 結合即轉錄活性，並開啟後續一連串轉錄因子表現，刺激脂質新生(Cheng et al., 2009)。



### 3. C/EBPs 對脂肪細胞分化之影響

已有文獻證實 C/EBPs 可調控脂肪細胞分化。細胞添加外源性分化試劑，可使生長停滯(G0/G1)之脂肪細胞在進入細胞週期進行分化，此時 C/EBP $\beta$  及 C/EBP $\delta$  被誘發表現(Gonzales & Orlando, 2007)。C/EBP $\beta$  及 C/EBP $\delta$  再活化 C/EBP $\alpha$  與 PPAR $\gamma$ ，C/EBP $\alpha$  與 PPAR $\gamma$  具抗有絲分裂能力，使細胞再脫離細胞週期並誘發後續的脂肪細胞特異基因表現。也有文獻指出 C/EBPs 對脂肪細胞分化的重要性。若在前脂肪細胞添加 C/EBP $\alpha$  之反義 RNA(antisense)則會抑制脂肪細胞的分化，顯示 C/EBP $\alpha$  的確是脂肪細胞分化必需之轉錄因子。若纖維母細胞缺乏 C/EBP $\beta$  及 C/EBP $\delta$  將無法進入由分化試劑誘發的分化(Lamming & Sabatini, 2013)。

#### (二)過氧小體增值活化受體(Peroxisome proliferator-activated receptor; PPARs)

PPAR 為細胞核荷爾蒙受體超級家族(nuclear hormone receptor superfamily)之一，藉由配體(ligand)調控活化的轉錄因子。PPARs 結構上主要有三功能區，一為 N 端，此區在長度與胺基酸序列上各 PPARs 有很大差異，此區包含 AF-1(activation function-1)可受磷酸化且調節受體活性;二為 DNA 結合區，此區有兩個蛋白質結構，且具高度胺基酸保留序列;三為 C 端，包含 AF-2(activation function-2)配體解與此區結合(Ikeda, Tsuchiya, Hama, Kajimoto, & Kogure, 2013; Jang, 2016a)。PPAR 與配體結合在與 retinoid X receptor (RXR)形成異質二聚體(heterodimer)，再與下游基因 DNA 上的啟動子/加強子(enhancer)PPAR 反應區(PPAR response element ; PPRE)結合來活化多種基因。

與調節細胞生長、分化、脂肪代謝即能量恆定等生理活性有關。PPARs 的配體包含多元不飽和脂肪酸即其代謝物、胰島素敏感劑 (thiazolidinedione;TZD)、荷爾蒙等(Ahmadian et al., 2010)。

PPARs 在脂質堆積與代謝具關鍵角色，PPARs 包含三種異構物，分別為 PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta$ ( $\delta$ )及 PPAR $\gamma$ ，各具不同分布部位及配體結合特異性。PPAR $\alpha$  於肝臟、腸道、心肌及腎臟高度表現; PPAR $\beta$  則各組織皆可發現，其主要為誘導脂肪酸氧化相關基因的表現。PPAR $\gamma$  又因啟動因子差別在區分為  $\gamma$ 1、 $\gamma$ 2、 $\gamma$ 3 及  $\gamma$ 4，其中 PPAR $\gamma$ 3 及 PPAR $\gamma$ 4 mRNA 皆轉譯出與 PPAR $\gamma$ 1 相同的蛋白質產物。PPAR $\gamma$ 1 及 PPAR $\gamma$ 2 在脂肪組織皆有表現。PPAR $\gamma$ 1 及 PPAR $\gamma$ 2 皆能刺激脂肪細胞的分化，但以 PPAR $\gamma$ 2 具較高誘導脂肪細胞的分化能力。PPAR $\gamma$  的功能可調控(Carmean, Cohen, & Brady, 2014) (1)脂質代謝累積:PPAR $\gamma$  除對脂肪細胞分化有影響外也對脂質代謝累積扮演重要腳色，在成熟脂肪細胞中 PPAR $\gamma$  調控脂質代謝及葡萄糖先關轉錄因子，促使脂肪酸及葡萄糖攝入，若抑制 PPAR $\gamma$  表現則三酸甘油脂的累積量降低及細胞大小縮小(Farmer, 2006)。(2)細胞增生:當 PPAR $\gamma$  活化時，抑制細胞週期轉錄因子細胞週期蛋白或 DNA 結合活性來影響細胞增生，此外，PPAR $\gamma$  也會誘發細胞自我凋亡(Lefterova & Lazar, 2009)。(3)細胞分化:在細胞分化的前期，無論體內或體外皆可指出 PPAR $\gamma$  為 P 調控分化的重要轉錄因子，PPAR $\gamma$  在分化試劑及胰島素誘導下開始大量表現，PPAR $\gamma$  的表現會誘發細胞生長停滯且啟動前脂肪細胞開始分化(Sanchez-Gurmaches & Guertin, 2014)。(4)免疫反應:在單核球分化為

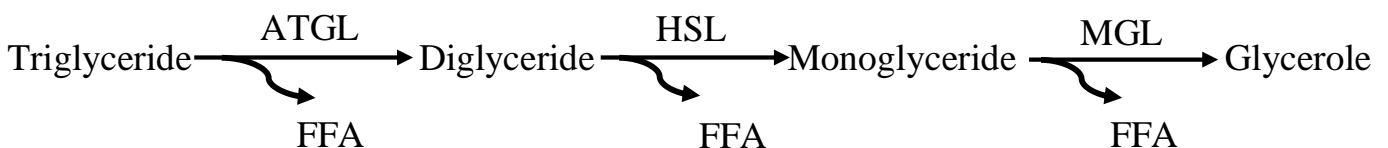
巨噬細胞期間 PPAR $\gamma$  會被誘發，若以脂多醣體誘發引起發炎反應也會使 PPAR $\gamma$  表現提高。

(三)脂肪分化決定因子-1/固醇調節元素結合蛋白-1(adipocyte determination and differentiation-dependent factor-1/sterol regulatory element-binding protein-1;ADD1/SREBP-1)

在人類子宮頸癌細胞 Cdna 中發現有三種 SREBP 家族的基因會與 SRE 結合，分別命名為 SREBP-1、SREBP1c 及 SREBP2，SREBP 經轉一后許與內直往結合形成膜結核型 SREBP，在經剪切才釋出轉錄活化片段，SREBP1c 主要分布在肝臟、腎上腺及脂肪組織中，並在脂肪酸合成及脂肪細胞分化過程上具重要腳色(Morral, 2003)。

在 3T3-L1 脂肪細胞分化中 ADD/SREBP-1 的表現受胰島素調控，其表現量會隨分化時間增加而延長，活化 PPAR $\gamma$  促成脂肪細胞分化機制外也會啟動內生性的 PPAR $\gamma$  配體，若在 3T3L1 脂肪細胞中存在 ADD/SREBP-1c 不能顯著表現的突變株則會降地脂肪細胞的分化程度，相對的，若外加 ADD/SREBP-1c 蛋白則會刺激細胞加速脂肪細胞分化速率。研究指出 ADD/SREBP-1c 會合成許多內生性 PPAR $\gamma$  配體結合性物質則導致活化 PPAR $\gamma$ ，若使用藥物處理 SREBP1 表現其再給予胰島素便會恢復正常值(Rosen & Spiegelman, 2006)。

#### 十、 促進脂肪分解酵素



圖三、促進脂肪分解路徑

### (一) 荷爾蒙敏感性脂解酶 (Hormone-sensitive lipase ;HSL)

在早期 HSL 就已經被認為是白色脂肪組織之中脂肪分解最為重要的酵素。HSL 除了水解三酸甘油酯外，也可水解膽固醇酯 (cholesteryl ester)、維生素 A 醇紫酯 (retiny ester)、類固醇酯 (steroid ester) 與 p-硝基酯 (p-nitrophenyl ester)。多項實驗已證明 HSL 於脂肪細胞的功能，3T3-F442A 脂肪細胞中過量表現 HSL，會使細胞無法累積三酸甘油酯(Sanchez-Gurmaches & Guertin, 2014);另外，HSL 基因剔除小鼠林的脂肪細胞研究中，雖仍有基礎的脂質分解作用，但荷爾蒙所刺激的脂解作用效果則明顯地被抑制(Wang et al.,2001)。HSL 可受多種荷爾蒙活化，如兒茶酚胺類、促腎上腺皮質素 (ACTH) 及升糖素 (glucagon) 皆可活化 HSL 促進脂解作用。其調控路徑為，荷爾蒙與細胞表面上的  $\beta$ -腎上腺素受體結合，再經由細胞內刺激型 G 蛋白 (guanine nucleotide-binding regulatory proteins, G protein) 活化腺苷酸環化酶(adenylate cyclase)，活化後的腺苷酸環化酶則催化 ATP 產生 Camp，使細胞中 Camp 濃度提升，最後活化 PKA，PKA 的活化可使 HSL 磷酸化並往脂肪油滴表面移動(translocation)。相反的，胰島素具有抗荷爾蒙刺激脂肪分解的能力，經由活化磷酸二酯酶 3B(Phosphodiesterase 3B)進一步降低細胞內 Camp 的濃度，進而抑制 HSL 的磷酸化作用，降低脂解作用的活性(Park et al., 2014)。

### (二) 三酸甘油酯脂解酶(Adipose triglyceride lipase;ATGL)



ATGL 為今年來才被學者發現的脂解酶，ATGL 為脂肪細胞中三酸甘油酯的關鍵脂解酶。HSL 基因剔除(HSL-knock out)的小鼠中，三酸甘油酯仍會被分解，而造成雙酸甘油酯的累積，此結果顯示脂肪分解酵素不只 HSL 的作用而已，進而發現 ATGL。ATGL 不只存在於脂肪細胞，也存在心肌細胞、第 I 纖維骨骼肌、副睪組織、巨噬細胞、肝臟組織以及其他類型的細胞(Bates, Kulkarni, Seifert, & Myers, 2005)。相較於其他組織，ATGL 在脂肪組織中有很高的表現量，在脂肪細胞分化期間，其 ATGL 表現量會顯著的提升。於脂肪細胞中的 ATGL 能分解三酸甘油酯產生雙酸甘油酯與游離脂肪酸，其對三酸甘油酯作用的活性高於雙酸甘油酯將近 10 倍(Feve, 2005)，由此可知 ATGL 堆三酸甘油酯具高度的分解作用，如果抑制了 ATGL 活性則會嚴重抑制細胞中的脂解作用。此外，ATGL 具有磷脂酶與醯基轉移酶的活性，但對於其他脂質受質，如膽固醇酯與視酯並無水解的活性。

ATGL 調控機制的研究中，一種活性蛋白(coactivators): $\alpha/\beta$  hydrolase domain 288 containing protein 5, ABHD5; 也稱為 comparative gene 289 identification-58(CGI-58)會刺激 ATGL 的活性。在 CGI-58 存在下，大鼠的 ATGL 提升 20 倍以上的活性，人類的 ATGL 在人類的 CGI-58 存在下也會提升將近 5 倍的活性。此活性蛋白並不是偶然發現的，因許多作用於油滴上的 TG 分解酶，如脂蛋白分解酶與胰脂酶都具有活性蛋白(apolipoprotein-CII 與 co-lipase)，然而 CGI-58 對 ATGL 的正確調控機制至今仍未明瞭(Chaves et al., 2011)。

目前已有許多研究透過偵測丙三醇釋放量來探討機能性成分或物質的添加對促進脂肪細胞脂解作用的影響因為此本研究利用 3T3-L1 脂肪細胞培養液中的丙三醇釋放量為指標，探討芭樂葉萃取物的添加對細胞脂解作用的影響，並以細胞中的三酸甘油酯殘留量作進一步的確認，當丙三醇釋放量高，相對於較低的三酸甘油酯殘留量，可說明細胞質中的三酸甘油酯確實被分解成丙三醇與游離脂肪酸，並釋放到細胞外(El-Abhar & Schaalán, 2014)。

### (三) 瘦素(Leptin)

瘦素是於 1994 年 Friedman 所領導的研究小組首先在 ob/ob (先天肥胖)小鼠身上發現一種由 ob 基因控制合成的蛋白質，他們將此種蛋白質稱之為 Leptin，其於動物體中參與攝食、脂肪儲存、能量的代謝等作用，是由脂肪細胞分泌的生理調節機素之一(Farmer, 2006)。而於 ob/ob 小鼠實驗中發現，此種小鼠較體重正常的小鼠缺乏 Leptin；而 db/db 小鼠（另一種缺乏 Leptin 受體的小鼠）體內 Leptin 的量卻是過高的；因此由上述兩個文獻實驗也說明了此基因的表現量與脂肪細胞中脂質含量為正比的關係。在結構方面，Leptin 有許多可與脂肪細胞分化相關因子結合的調節區，於細胞分化時會透過與 C/EBP、PPAR $\gamma$  與 SREBP1 的結合使得 Leptin 啟動子活化。於作用路徑方面，Leptin 由脂肪細胞分泌後，會透過血液作用於下視丘中樞神經系統(Ikeda et al., 2013)，研究顯示 leptin 可透過減少神經肽 NPY 的合成而抑制食慾。文獻指出，不論是 ob/ob (先天肥胖)或是 db/db (缺乏 Leptin 受體)小鼠，皆有肥胖以及糖尿病的症狀(Jang, 2016b)，但如果直接對 ob/ob 小鼠腦腔注射 leptin

則可以降低小鼠體重與糖尿病的症狀。而在活化方面，Leptin 除了可以透過啟動子與脂肪細胞分化相關因子 C/EBP、PPAR $\gamma$  與 SREBP1 而活化之外，其實也受生物能量攝取的影響，比方說：於禁食狀態下，生物體 Lpetin 基因表現量會下降以外，其血液中的 Leptin 含量亦會下降；反之，生物體內的 Leptin 含量也會因為攝食、或是胰島素影響而提高。

#### (四) 脂肪激素(Visfatin)

Visfatin 是新發現的脂肪細胞激素，最早是由 Samal 等人於 1994 年發現，利用血液裡活化淋巴球互補去氧核酸庫所找到的新激素，具有具有類似胰島素的作用，可降低血液中葡萄糖的含量、刺激葡萄糖代謝及促進脂肪細胞內脂質的聚集與合成。研究指出肥胖與第二型糖尿病病人血液中 Visfatin 濃度高於一般健康人，且 Visfatin 濃度高對於糖尿病大合併血管併發症的影響相對較大，此外，研究發現 Visfatin 濃度與腰臀比有具有正相關。(Lago et al., 2009)

在實驗中發現 Visfatin 會刺激 IRS-1 及 PI3-Kinase 之酪胺酸磷酸化和 AKT 及 MAPK 之絲氨酸磷酸化活化胰島素受體的作用，相較於只添加 Visfatin 或 insulin，同時添加 Visfatin 或 insulin 於細胞更能有效活化 PI3-Kinase 路徑的活性，顯示 Visfatin 不和 insulin 競爭結合胰島素受體，亦不會與 IGF-IR 結合，說明此兩種蛋白分子分別結合到胰島素受體的不同點。結果顯示 Visfatin 是位於細胞質中而非細胞膜、液泡、粒線體或細胞核，且 Visfatin 釋放不須透過囊泡故推測 Visfatin 是透過非傳統路徑釋放而分泌到細胞外，且顯示 Visfatin 加

入 3T3-L1 脂肪細胞會增加對葡萄糖的攝入量，若在缺氧、缺培養液及飢餓狀態下，粒線體內 Visfatin 濃度會上升保護細胞避免死亡(Lee et al., 2016)。

#### (五) 脂聯素(Adiponectin)

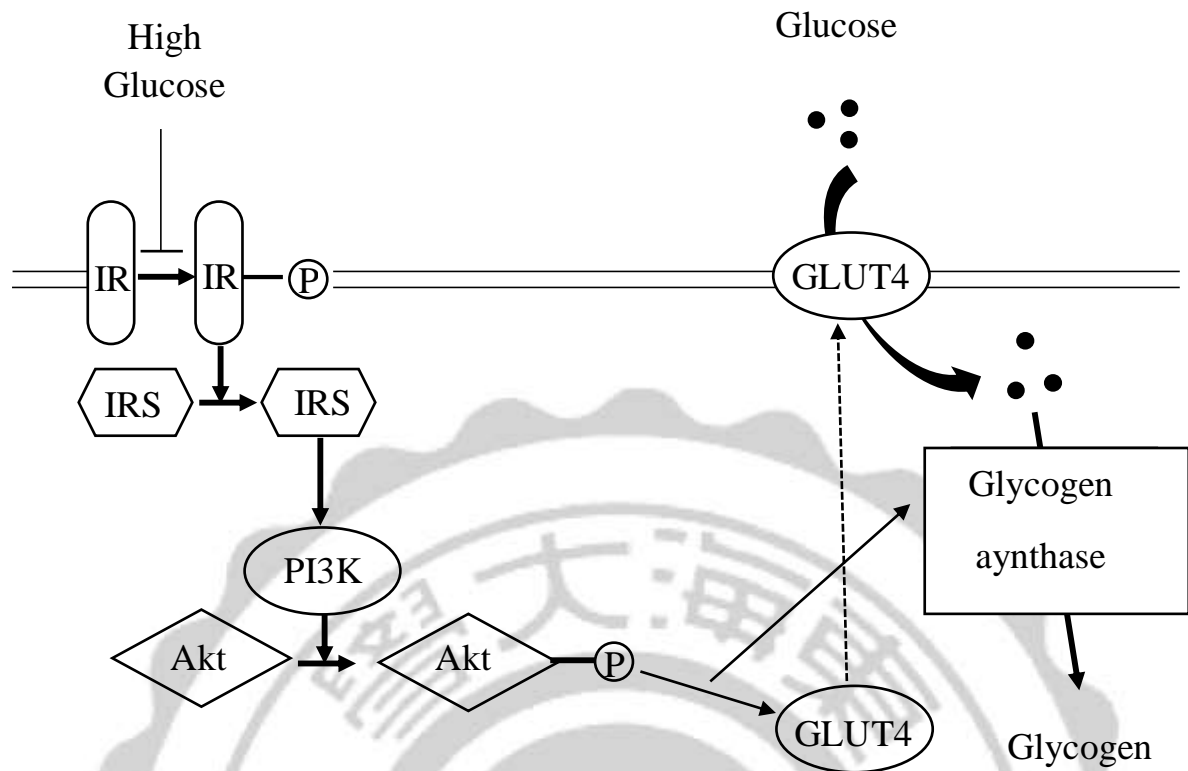
脂聯素也稱為 Acrp30、apM1、GBP28 或是 adipoQ，是一種由脂肪細胞所分泌的蛋白激素，屬脂泌素之一，其表現可作為脂肪細胞分化成熟度的重要指標。有許多研究指出，脂聯素具有抗發炎、抗糖尿病、增加胰島素敏感性與抗動脈硬化等生理活性(Ikeda et al., 2013)。

脂聯素會受到許多因子的調節，實驗顯示脂肪細胞分化期間期表現量增加，若添加胰島素也會刺激其分泌，脂聯素的分泌也受到 PPAR $\gamma$  影響，若使用藥物來促進 PPAR $\gamma$  表現來改善糖尿病及胰島素阻抗性，則脂聯素基因表現及分泌也會提升(Gustafson, Hedjazifar, Gogg, Hammarstedt, & Smith, 2015)。

由實驗發現在肥胖、胰島素阻抗與第二型糖尿病狀況下，血漿中的脂聯素明顯減少，但若補充脂聯素則可改善這些情況。也發現脂聯素的濃度與血糖、胰島素及三酸甘油酯含量成反比，且低脂聯素濃度與肥胖、胰島素阻抗、第二型糖尿病以及心血管疾病等地發生呈正相關，均指出脂聯素在肥胖、代謝及胰島素抗性形成過程的重要性(Gustafson et al., 2015; Kanzaki & Pessin, 2003; Langin & Arner, 2006; Lee et al., 2016)。

#### 十一、 調控血糖之轉錄因子





圖四、胰島素阻抗路徑

(一)胰島素受體(IRS1)

目前已知胰島素受體受質家族中共有六種，分別為 IRS-1、IRS-2、IRS-3、IRS-4、IRS5/DOK-4 及 IRS6-6/DOS-5，分別存在不同組織中並有不同功能，其可提供具有 SH2 基團的分子，如 PI3K (p85 調控部份)結合之對接位。由基因剔除實驗發現，單一缺乏 IRS-1 會造成葡萄糖耐受性缺失，血漿中三酸甘油酯增加以及週邊組織尤其是脂肪與肌肉產生胰島素阻抗；而 IRS-2 缺乏則特定影響胰島、腦、視網膜等組織，若同時剔除 IRS-1 與 IRS-2 則會導致肝臟與周邊組織胰島素阻抗(Tontonoz & Spiegelman, 2008)。在重要標的器官中，調控血糖主要為 IRS-1 及 IRS-2 兩種。抑制此兩種傳訊分子的表現分別會對肝臟中葡萄糖及脂質代謝產生衝擊，在不同組織之間(肝臟、

肌肉、脂肪)胰島素傳訊路徑的代償機制亦存在，互相協同以維持血糖恆定  
脂酰肌醇 3-激酶(PI3K) (Zou et al., 2005)

## (二) 磷脂酰肌醇 3-激酶(Phosphoinositide 3-kinase ;PI3K)

胰島素受體受質活化後，可活化 PI3K/Akt 路徑，此路徑參與由胰島素引起的代謝調控。PI3K 共可分為三類：class 1a、class 1b 及 class 2。其中主要和胰島素所調控的葡萄糖代謝相關的是 class 1a。PI3K 為一種異二聚體(heterodimer)，包含 p85 (85 KDa)調控單元及 p110 (110 KDa)的活性單元所組成，在胰島素訊息傳遞中扮演重要角色，促使下游 serine/threonine kinase 的 Akt 活化。而當 PI3K 作用受阻，包括胰島素刺激葡萄糖吸收、肝醣、脂肪、蛋白質合成及基因表現調控皆會受到抑制(van Dam, Kooijman, Schilperoort, Rensen, & Boon, 2015)。

## (三) 絲氨酸/蘇氨酸蛋白激酶(AKT)

Protein kinase B 又稱為 Akt，本身亦為激酶，接受 PI3K 所控制之 PDK1 活化。目前 Akt 依 Pleckstrin homology (PH domain)結構的差異區分為三種異構型(isoform)，分別為 Akt1、Akt2 及 Akt3，存在於大腦、心臟、肝臟及肌肉等不同的組織中，有著不同的功用。Akt 分子上 Thr308 及 Ser473 兩個磷酸化的位置負責接受及傳遞訊息。Akt 能透過磷酸化 GSK3 (glycogen synthase kinase 3)促進肝醣合成，亦參與 GLUT 轉位至胞膜。Akt 的活化會影響細胞增生、蛋白質合成、一氧化氮合成及葡萄糖代謝等生理功能。在 Akt2 的基因剔除造成葡萄糖耐受性缺失與高胰島素血症，且也會使肌肉中胰島素

刺激葡萄糖攝取的作用受損及降低胰島素促進肝臟葡萄糖釋出的能力，因此 Akt2 為三種異構型中主要調控由胰島素刺激的葡萄糖轉運作用，而 Akt1 與 Akt3 則是次要的(Sanchez-Gurmaches et al., 2016)。

#### (四)葡萄糖載體蛋白 4(GLUT4)

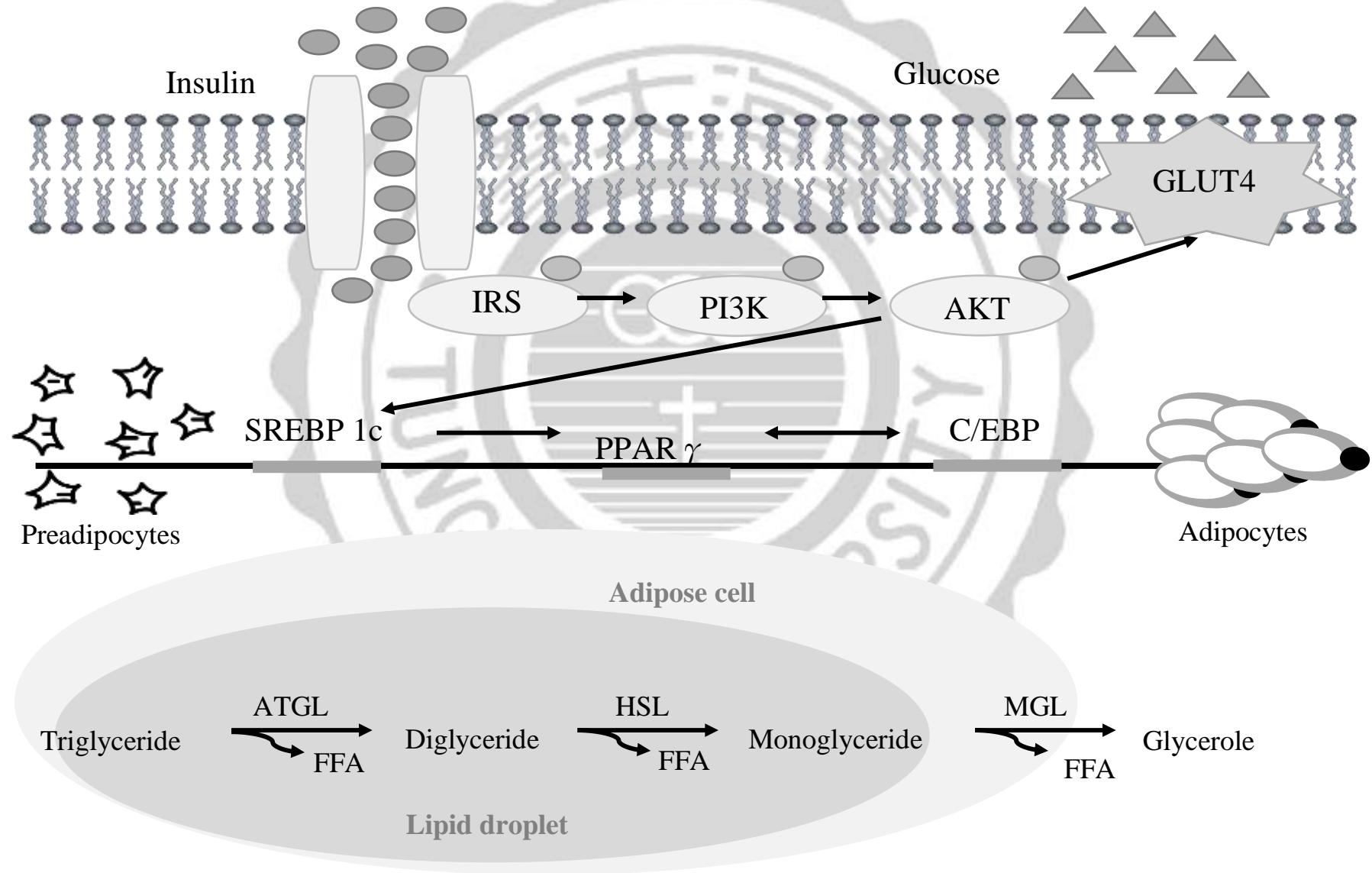
具極性之葡萄糖進出肝臟、肌肉與脂肪細胞之細胞膜時，主要透過具有轉運功能之專一性轉運蛋白(Glucose transporters, GLUTs) (Singh et al., 2013)。目前 GLUTs 家族在哺乳類中發現至少有十四種的異構型(isoform)。這些轉運蛋白分佈在不同組織中其具有不同功能。其中有些異構型具有轉位(translocation)的能力，例如 GLUT2 與 GLUT4，GLUT2 存在於肝臟、腎臟及胰臟中，其葡萄糖轉運活性會隨著胞內或胞外葡萄糖濃度增加而上升，被視為細胞之葡萄糖感應器。GLUT4 則大量表現於受胰島素調控的肌肉與脂肪組織中，負責胰島素刺激下的葡萄糖轉運。正常狀況下，超過九成的 GLUT4 會儲存於細胞質的小泡內，受到外來刺激如胰島素傳導或肌肉收縮、脂聯素後便會轉位至細胞膜上，開啟葡萄糖傳訊，把葡萄糖帶入細胞中(Morigny et al., 2016)。目前已知胰島素傳導可通過兩條通路：IRS/PI3K 與 RAS-MAPK 途徑，但前者為主要途徑。由全身性與肌肉 GLUT4 基因剔除實驗結果中證實，GLUT4 表現量減少除了降低肌肉的葡萄糖攝入，並造成高血糖及肌肉與脂肪組織中產生嚴重的胰島素阻抗與葡萄糖耐受性缺失；而若增加 GLUT4 表現量可促進胰島素刺激的葡萄糖攝取作用，增加胰島素敏感性，近來發現特別是



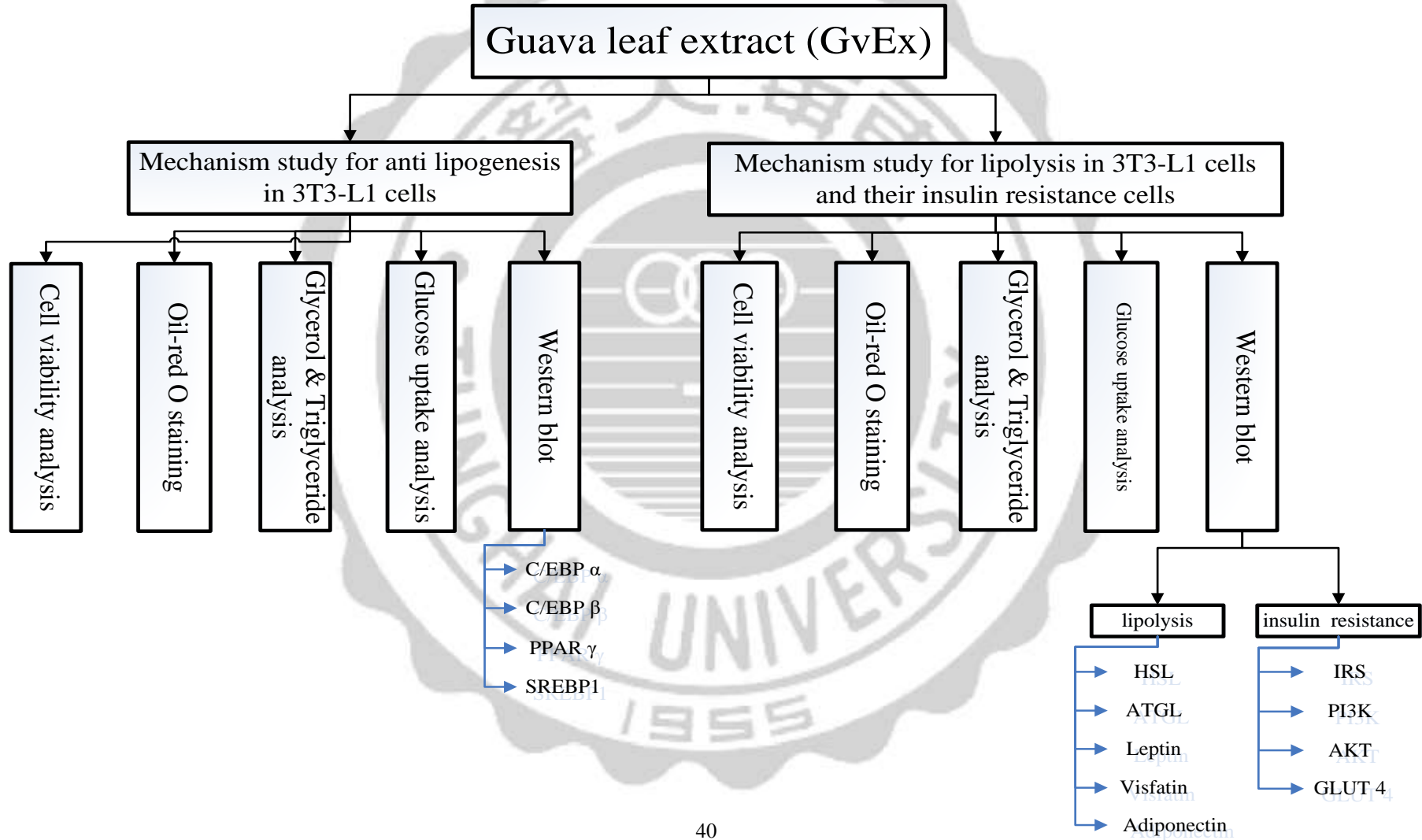
在胰島素阻抗下骨骼肌中，GLUT4 表現是藉由 AMPK 激活轉位至細胞膜上  
(Arner & Langin, 2014)。



十二、研究探討路徑



### 十三、 研究架構



# 參、材料與方法

## 一、實驗材料

### (一)原料來源

芭樂葉萃取物(*Psidium guajava* L. leaves)購自漢馨科技有限公司(Taipei, Taiwan), 萃取條件固液比 1:12.1, 溫度 59.8°C, 時間 5.1 分鐘。

### (二)細胞培養

1. 3T3-L1 前脂肪細胞 (BCRC Number : 60159)小鼠脂肪細胞株購自食品工業發展研究所 (Hsinchu, Taiwan)
2. Dulbecco's modified eagle dedium 粉末(low glucose) 購自 Gibco (NY, USA)
3. Fetal bovine serum (FBS 10437) 購自 Gibco (NY, USA)
4. Penicillin Streptomycin 購自 Gibco (NY, USA)
5. Potassium chloride 購自 Sigma-Aldrich (St.Louis, Mo, USA)
6. Potassium dihydrogen phosphate 購自 Sigma-Aldrich (St.Louis, Mo, USA)
7. Sodium chloride 購自 Sigma-Aldrich (St.Louis, Mo, USA)
8. Sodium hydrogen carbonate 購自 Sigma-Aldrich (St.Louis, Mo, USA)
9. Sodium phosphate dibasic 購自 J.T.Baker (PA, USA)
10. Trypsin-EDTA 購自 Gibco (NY, USA)

### (三)細胞存活率試驗

1. Alamar blue® 購自 Bio-Rad (CA, USA)

#### (四)細胞分化

1. Dexamethasone 購自 Sigma-Aldrich ( St.Louis,Mo, USA )
2. Insulin,human Recombinant Zinc(4 mg/mL)購自 Gibco ( NY, USA )
3. 1-Methyl-3-(2-methylpropyl)-7H-purine-2,6-dione 購自 Sigma-Aldrich ( St.Louis,Mo, USA )

#### (五)丙三醇釋放量及三酸甘油酯含量測定

1. GY105 , 購自 Radox ( Antrim,United Kingdom )
2. TR213 , 購自 Radox ( Antrim,United Kingdom )

#### (六)Oil-red O 染色

1. Ethanol 購自 Sigma-Aldrich ( St.Louis,Mo, USA )
2. Oil-red O 購自 Sigma-Aldrich ( St.Louis,Mo, USA )
3. Paraformaldehyde 購自 Sigma-Aldrich ( St.Louis,Mo, USA )

#### (七)胰島素阻抗誘導

1. Glucose 購自 Sigma-Aldrich ( St.Louis,Mo, USA )

#### (八)葡萄糖擬似物攝入量試驗

1. Glucose 購自 Sigma-Aldrich ( St.Louis,Mo, USA )
2. 2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-y1)Amino)-2-Deoxyglucose (2-NBDG)  
購自 Invitrogen (OR,USA)

#### (九)蛋白質定量

1. BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit 購自 Pierce biotechnology ( IL, USA )



2. Bovine serum albumin 購自 Gibco (NY, USA)

(十) 西方轉漬法

1. Acrylamide-bis solution 40% 購自 SERVA (BW,DE)

2. Aminopropyltriethoxysilane (APS) 購自 GERBU (Gaiberg,DE)

3. N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine (TEMED) 購自 Alfa Aesar  
(Lancashire,UK)

4. Tris-base 購自 J.T.Baker® (PA, USA)

5. Tween-20 購自 Panreac Quimca Sa (Barcelona,ES)

6. Immobilon™western chemiluminescent HRP Substrate 購自  
Merk(Darmstadt,DE)

7. Glycine 購自 J.T.Baker® (PA, USA)

8. Glycerol 購自 Panreac Quimca Sa (Barcelona,ES)

9. Hydrochloric acid 購自 36.5%~38% 購自 聯工化學(Hsinchu,Taiwan)

10. Hydrogen chloride 購自 Sigma-Aldrich (St.Louis,Mo, USA)

11. Polyethylene glycol sorbitan monolaurate 購自 Sigma-Aldrich (St.Louis,Mo,  
USA)

12. Polyvinylidene fluoride (PVDF) Membranes 購自 Milipore (MA,USA)

13. Sodium chloride 購自 Sigma-Aldrich (St.Louis,Mo, USA)

14. Sodium dodecyl sulphate (SDS) 購自 Sigma-Aldrich (St.Louis,Mo, USA)

15. Sodium tetraborate decahydrate 購自 Merk(Darmstadt,DE)

16. BlueRAY prestained protein ladder 購自 GeneDireX (Bruges, Belgium)

17. Blotting paper 購自 Whatman plc. (Kent, UK)

## 二、實驗方法

### (一) 細胞培養

本研究使用第 N+11 代 3T3-L1 前脂肪細胞，依據實驗之需求鋪入  $1 \times 10^5$ 、 $4 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^4$  和  $5 \times 10^3$  cell/well 於直徑 10cm、6well、24well 及 96well 培養盤中。培養基含有 1.5g/L  $\text{NaHCO}_3$  及 10% FBS 之 DMEM，培養環境為  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ ，每兩天更換一次培養基，細胞約長 8~9 分滿時進行拆盤，大量擴增以利實驗進行。

### (二) 細胞存活率試驗

進行細胞鋪盤生長一天，第二天後加入樣品進行反應一天，將樣品吸出洗淨後加入 1:10 的 Alamar blue:medium 進行反應四小時，透過螢光偵測或者是吸光值 570nm 下可記錄反映結果，可以反應細胞或微生物對氧分子的消耗，因而被用於觀察細胞的代謝。

$$\text{percentage reduction of alamar blue} = (S^x - S^{\text{control}}) / (S^{100\% \text{ reduced}} - S^{\text{control}})$$

### (三) 細胞分化

待細胞長滿盤養盤平面後進行分化，分化方式參考 Kim 等人(2006)之方法並進行修飾，當細胞長滿培養盤平面為分化第 0 天，此時加入分化試劑至 DMEM 中，並稱之為分化培養基(Differentiation medium, DM)以促使細胞開始分化，外源性試劑包含  $5\mu\text{M}$  Insulin、 $0.25\mu\text{M}$  DEX 及  $0.5\text{mM}$  IBMX; 分化第

2 天利用 PBS(5.36mM KCl, 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.17 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.14 mM NaCl, 0.35 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)清洗細胞更換含有 5μM Insulin 之 DMEM(Culture medium, CM), 每兩天以 CM 更換一次培養基至第 8 天, 於第 8 天更換含有 芭樂葉萃取物之 DMEM, 於第 10 天以 PBS 清洗細胞後完成。

#### (四)胰島素阻抗誘導

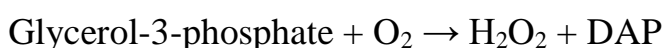
當細胞生長密度生長到 7~8 分滿的時候, 更換不含有 FBS 的培養基培養 24hr, 之後將細胞繼續培養在不含 FBS 的培養基中並額外添加 60mM 的葡萄糖到培養基中, 繼續培養 24hr 以誘導胰島素阻抗的發生。

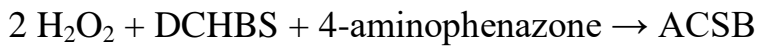
#### (五)丙三醇釋放量及三酸甘油酯殘留量測定

收集分化 3T3-L1 細胞培養基裝入 1.5mL 離心管中檢測細胞中丙三醇釋放量。去除已分化 3T3-L1 細胞培養基以 PBS 清洗細胞, 加入 800μL 之 Lysis buffer, 將細胞破碎後, 使用刮勺刮取細胞並收集於 1.5mL 離心管中, 在 4°C 下以 12000rpm 離心 20min, 收集上清液以檢測細胞中三酸甘油酯殘留量。

##### 1. 丙三醇釋放量

脂肪細胞內的三酸甘油酯經由脂解酶作用後產生丙三醇是放置細胞外, 丙三醇釋放量大小可評估脂解作用的程度, 本實驗使用試劑組(GY105, Randox)測定培養液中丙三醇濃度。將 30μL 細胞培養液與 1mL 檢測試劑, 37°C 下反應 5min,





DAP : Dihydroxyacetone-phosphate

GK : Glycerol kinase

GPO : Glycerol phosphate oxidase

POD : Peroxidase

DCHBS : 3,5-dichloro-2-hydroxybenzene sulphonic acid

ACSB : n-(4-antipyryl)-3-chloro-5-sulphonic-p-benzoquinoneimine

Sample – Sample blank =  $\Delta$ Sample

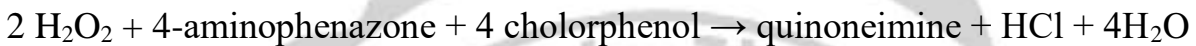
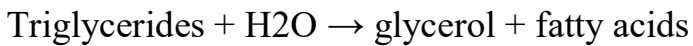
Standard – Standard blank =  $\Delta$ Standard

$$\text{Glycerol Concentration} \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{l}} \right) = \frac{\Delta \text{ Sample}}{\Delta \text{ Standard}} * \text{Standard Concentration}$$

## 2. 三酸甘油酯殘留量

實驗中利用 TG 試劑組(TR213, Randox)檢測脂肪細胞中三酸甘油酯之殘留量。三酸甘油酯含量測定原理為套組之反應試劑中所含之脂解酶(Lipase)會將細胞上清液中之三酸甘油酯分解成甘油與游離脂肪酸，而甘油則會被甘油激酶(Glycerol kinase)磷酸化為 Glycerol-3-phosphate(G-3-P)，G-3-P 接著被甘油-3-磷酸氧化酶(Glycerol phosphate oxidase)轉化為 Dihydroxyacetone phosphate(DHAP)及過氧化氫(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)，再經由過氧化氫酶(Peroxidase)反應呈紫紅色之 Quinonemine 橙色物質，其在 500nm 下有最大吸光值，偵測此化合物即可推算出脂肪細胞中三酸甘油酯之殘留量。測定步驟為取 10 $\mu$ L 樣品加入 1mL 反應試劑(R1a, Reagent buffer; R1b, Enzyme reagent, 兩者充分混合)後

迅速避光，並於 37°C 反應 5min，反應完畢後立即於冰上中止反應並避光，於 500nm 偵測吸光值並在 1hr 內偵測完畢。



$$\begin{aligned} \text{Triglyceride concentration} &= \frac{\text{Sample}}{\text{Standard}} * \text{Standard conc.} \left( \frac{\text{mmol}}{\text{l}} \right) \\ &= \frac{\text{Sample}}{\text{Standard}} * \text{Standard conc.} \left( \frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right) \end{aligned}$$

#### (六) Oil-red O 染色

去除已分化 3T3-L1 細胞培養基，以細胞緩衝液 PBS 輕輕潤洗細胞三次，加入適量的 5% Paraformaldehyde 或 3.7% 甲醛靜置一小時以固定細胞，先準備 Oil-Red O stock solution，再配製成 working solution，潤洗後的細胞加入適量的油紅染劑進行染色，時間一小時，去除染色液，以 40% 乙醇漂洗一次後加入適量去離子水即可於顯微鏡下觀察照相。

#### (七) 葡萄糖擬似物攝入量試驗

將細胞以每孔  $1 \times 10^4$  cell 的數量種入 24well 培養盤內，於攝氏 37°C 的培養箱中貼附培養後，加入不同濃度的番石榴葉萃取物與細胞共同培養 30min。

去除上清液並且加入 5 $\mu$ g/mL 的胰島素(Gibco, Life Technology, Grand

Island, NY) 培養 10min 後加入 100 $\mu$ g/mL 的螢光標定葡萄糖擬似物(2-NBDG;

Invitrogen, Life Technology, Grand Island, NY) 於攝氏 37°C 避光培養



50min。移除上清液並用 PBS 清洗 3 次，用 lysis buffer 將細胞切下並將其懸浮於 PBS 中。放入螢光分光光度計(TECAN, Salzburg, Austria)測定，條件為激發光波長 465nm 和放射光 540nm 以偵測螢光強度並計算葡萄糖攝入量比例。相對葡萄糖攝入比例(%)=(處理組/控制組)\*100%

#### (八)蛋白質定量

利用 BCA Kit 檢測細胞中蛋白質濃度，先將 BCA Kit 試劑 A 與試劑 B 以 50:1 比例混合成反應試劑，分別加入蛋白質濃度標準品 BSA(0-2000 $\mu$ g/mL)或細胞破碎上清液 10 $\mu$ L，再加入 200 $\mu$ L 反應試劑均勻混合 37 $^{\circ}$ C 下作用 30 min，使用 ELISA reader 以波長 570nm 檢測其吸光值，利用 BSA 濃度所得之標準曲線計算細胞中的蛋白質濃度。

#### (九)西方轉漬法

取蛋白質濃度 10 $\mu$ L 的細胞破碎上清液與樣品緩衝液混合，在 95 $^{\circ}$ C 下加熱 5min 使其變性，以 10%SDS-PAGE 進行電泳將蛋白質分離，為了使蛋白質能讓抗體進行專一性的結合，分離後利用 Trans buffer (Tris-Bis 25 mM 及 Glycine 190mM) 使用電流將蛋白質在 250v/200mA/4 $^{\circ}$ C/14hr 下轉漬於 polyvinylidene fluoride, PVDF (Millipore, Inc., USA) 膜上。將膜置於 2%BSA/TBST (Tris-HCl 200mM、NaCl 1.5M 及 1% tween-20) 以 150rpm 震盪 1hr 進行 Blocking，由於抗體以及目標蛋白都屬於蛋白質，因此都會殘留在轉漬膜上，因此利用別的蛋白將膜上孔洞填滿，避免沒有結合目標蛋白的抗體殘留在轉漬膜上，再以一級抗體辨識目標蛋白質，於室溫下震盪 2hr 或 4 $^{\circ}$ C

overnight，於 TBST 中漂洗 3 次後加入二級抗體，在室溫下震盪 1hr。最後再以 TBST 中漂洗 3 次於膜上加入 chemiluminescent HRP Substrate 反應，使用冷光儀偵測蛋白質表現量強度。



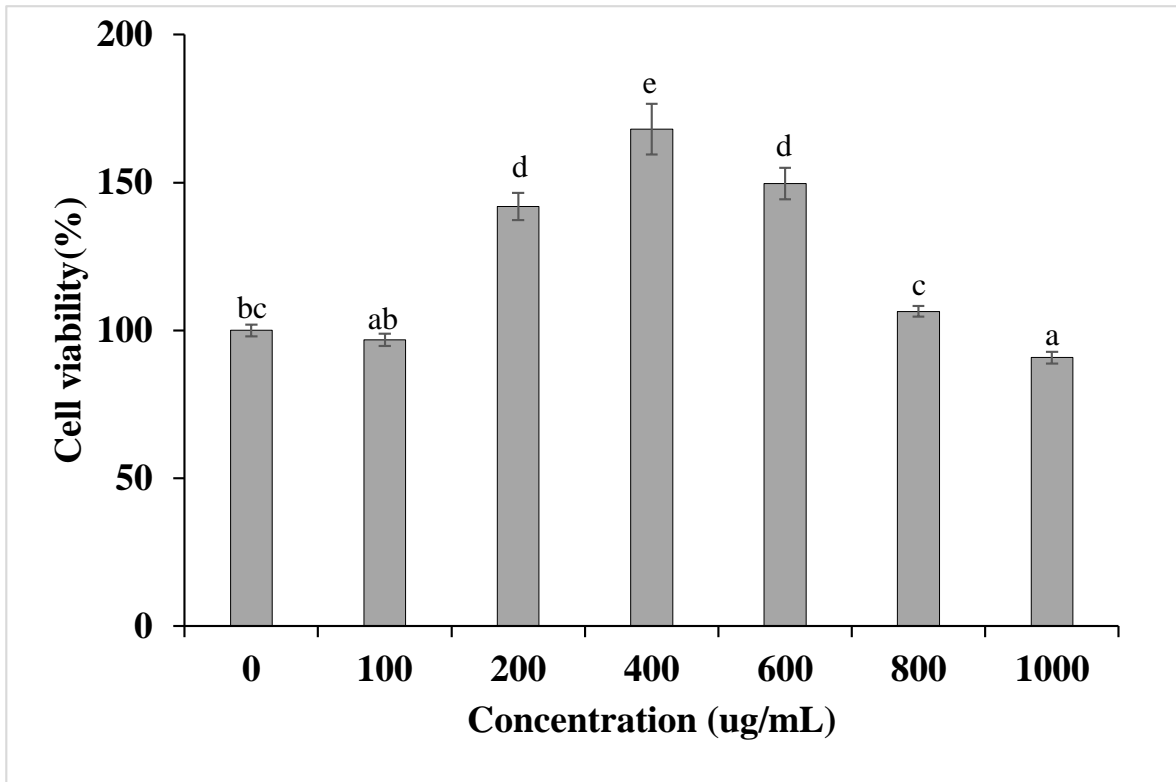
## 肆、 結果與討論

### 一、 番石榴葉萃取物對 3T3-L1 細胞株存活率之影響

本研究室利用超音波輔助 0-75% 乙醇(EtOH)萃取番石榴葉，所得萃取物中，已知以 25%EtOH 萃取物(GvEx)含有最佳總酚含量、總類黃酮含量、抗氧化能力、抑制  $\alpha$ -amylase 活性及抑制  $\alpha$ -glucoside 活性等組合。因此本研究首現需了解此萃取物不會造成細胞毒性的濃度範圍;圖五為探討 25%EtOH 濃度對 3T3-L1 前脂肪細胞存活率之影響。結果顯示添加 GvEx 1000 $\mu$ g/mL 以內均無細胞毒性，其中添加 400 $\mu$ g/mL 存活率最高可達 168%，不但沒有造成細胞死亡還可以幫助其生長。因此後續探討 GvEx 的濃度效應時採用不會造成細胞毒性的濃度，以添加 100-400 $\mu$ g/mL 為原則。

### 二、 番石榴葉萃取物對 3T3-L1 前脂肪細胞抑制脂質新生之影響

本研究中利用三酸甘油酯(TG)試劑組(TR213, Randox)檢測前脂肪細胞分化過程中 TG 殘留量(Triglyceride residual,TR)及利用 (GY) 試劑組(GY105, Randox)測定細胞釋放到培養液中丙三醇釋放量(Glycerol releas,GR)。Control 組為前脂肪細胞分化過程中從未添加任何 GvEx，StageI則是在分化第 0 天加分化試劑同時加入 GvEx 一次，StageII為除了第 0 天添加 GvEx 之外，後續分化 6 天裡每隔 2 天換液時與 insulin 一併加入 GvEx，前後添加共 4 次。此二種添加方式的設計為觀察兩者之間會不會因為持續的添加而更有效抑制脂質新生，



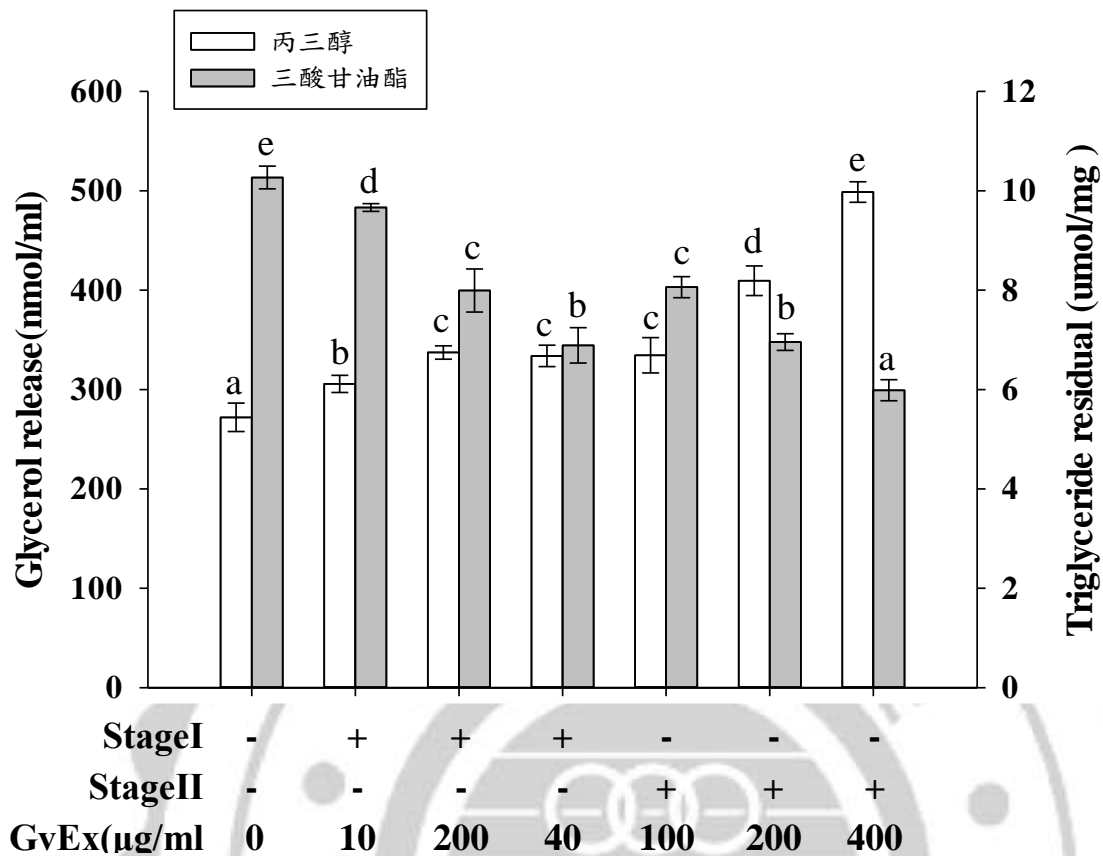
圖五、番石榴葉乙醇萃取物濃度對 3T3-L1 前脂肪細胞細胞存活率之影響

Fig. 5. Effect of guava leaves extract concentration cell viability of 3T3-L1 preadipocytes. Bar represent mean  $\pm$  SD , Bar represent mean  $\pm$  SD , n=3. Means with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

即抑制細胞的分化。圖六為探討番石榴葉萃取物添加量及添加方式對 3T3-L1 前脂肪細胞中丙三醇釋放量及三酸甘油酯殘留量之影響，不論何種添加方式，隨著 GvEx 添加量增加，GR 顯著上升，TR 則顯著下降，均代表抑制脂質新生的活性隨著 GvEx 添加量增加而增加。而 Stage I 及 Stage II 比較時，可以發現 Stage II 相較於 Stage I 有較高的 GR 及較低的 TR，可見在分化過程中持續添加 GvEx 有助於抑制脂質新生。不論哪一個添加方式，隨著 GvEx 添加量增加，GR 顯著上升，TR 則顯著下降，均代表抑制脂質新生的活性隨著 GvEx 添加量增加而增加量，再次證明持續添加 GvEx 相較於一次添加更有抑制脂質新生的效果。

3T3-L1 前脂肪細胞於分化期間會逐漸促進脂質新生，首先 ADD/SREBP-1 的表現受胰島素調控，使其表現量會隨分化時間增加而延長，進而活化 PPAR $\gamma$  促成脂肪細胞分化外也會啟動內生性的 PPAR $\gamma$  配體(Ali, Hochfeld, Myburgh, & Pepper, 2013)，PPAR $\gamma$  為脂肪細胞主要的特異基因，受到荷爾蒙誘發分化後，PPAR $\gamma$  表現量迅速增加，在成熟細胞中表現量達到最高，C/EBP $\beta$  在 PPAR $\gamma$  開始大量表現時會有短暫性的增加，而在分化早期至中期時下降，且同時誘發 PPAR $\gamma$  與 C/EBP $\alpha$  表現，接著 PPAR $\gamma$  與 C/EBP $\alpha$  開始調控下游分化及代謝的轉錄基因，使得細胞細胞開始堆積脂質並表現脂肪細胞的特徵(Jang, 2016a; Lehrke & Lazar, 2005; Zhou, Peng, & Jiang, 2014)。若在





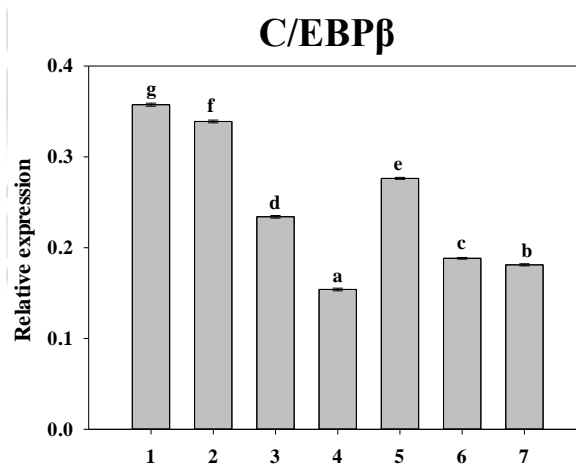
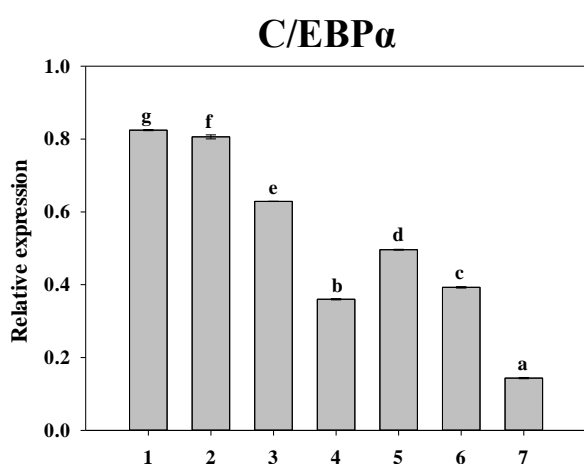
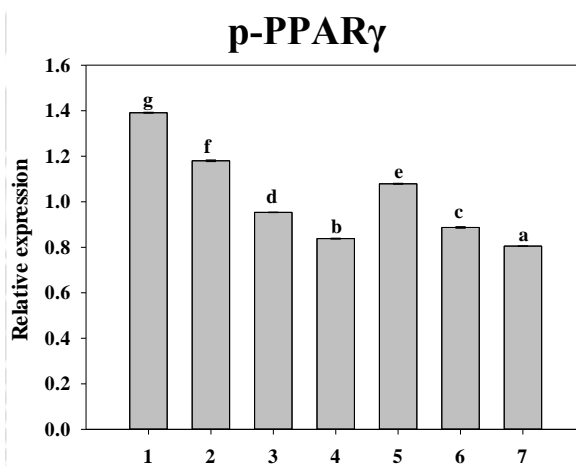
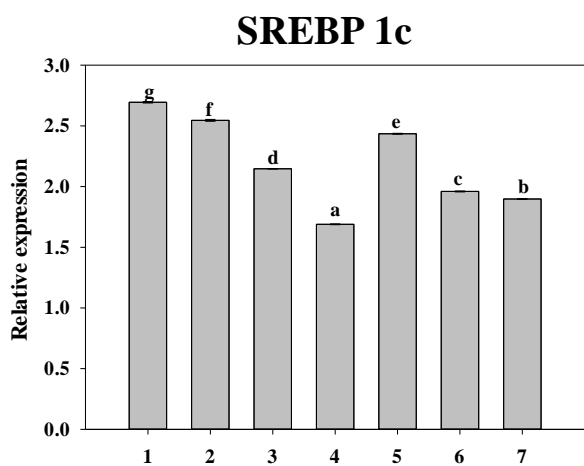
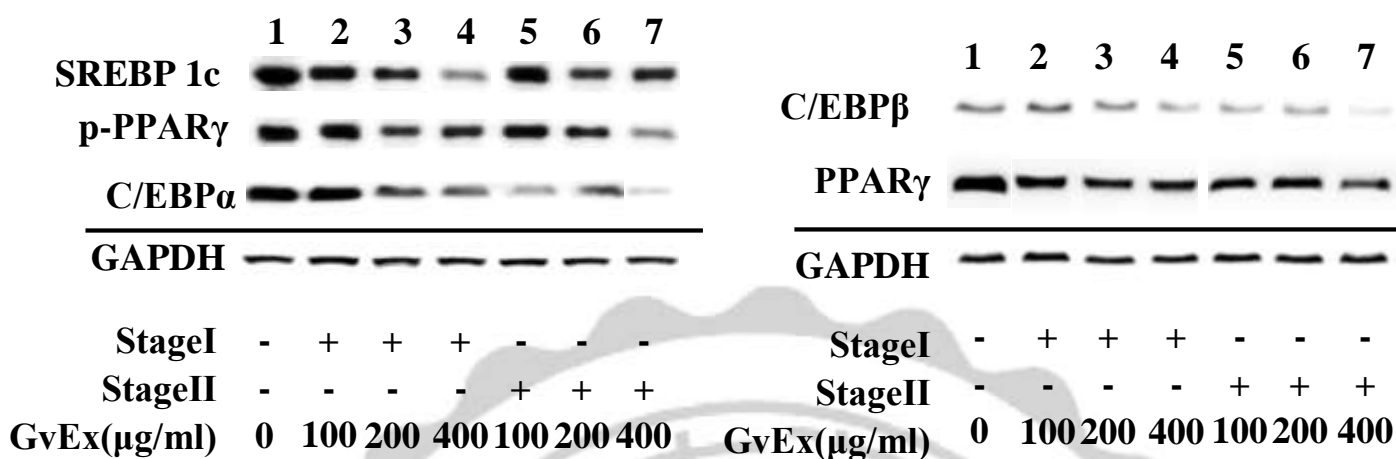
圖六、番石榴葉萃取物添加量及添加方式對對 3T3-L1 前脂肪細胞中丙三醇釋放量及三酸甘油酯殘留量之影響

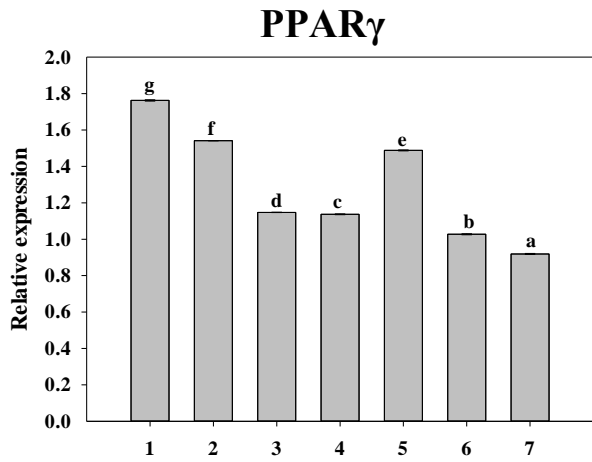
Fig. 6. Effect of guava leaves to concentration and different adding stage on glycerol release (GR) and triglyceride residual (TR) in 3T3-L1 preadipocytes. Bar represent mean  $\pm$  SD , n=3. Means with different letters are significantly different in GR and TR respectively (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

誘發分化時添加了番石榴葉萃取物抑制這些轉錄因子的誘發則可以抑制脂質新生。前述實驗結果指出 GvEx 添加 100-400 $\mu$ g/mL 具有抑制 3T3-L1 前脂肪細胞脂質新生的作用，因此進一步探討其可能調控的途程，圖七為探討 GvEx 添加量及添加方式對 3T3-L1 前脂肪細胞中傳訊蛋白質表現量之影響；結果顯示，GvEx 不論是何種添加方式，其 SREBP 1c、PPAR $\gamma$ 、p-PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$  及 C/EBP $\beta$  等蛋白質表現量，隨著 GvEx 添加量的上升均顯著提升抑制的效果，其中前四個蛋白質表現量無論 GvEx 添加量為何，Stage I 抑制能力均顯著小於 Stage II，至於 C/EBP $\beta$  表現量除了添加 400 $\mu$ g/mL GvEx 抑制能力是 Stage II 大於 Stage I 之外，添加 100-200 $\mu$ g/mL GvEx 仍然是 Stage I 抑制能力顯著小於 Stage II。綜合以上結果可得知，於 3T3-L1 前脂肪細胞分化期間添加 100-400 $\mu$ g/mL GvEx 具有抑制脂質新生的效果，其抑制機制為降低 SREBP 1c、PPAR $\gamma$ 、p-PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$  及 C/EBP $\beta$  等轉錄因子的蛋白質表現量，且連續添加 GvEx 的效果顯著高於添加一次的 GvEx。

### 三、番石榴葉萃取物對 3T3-L1 脂肪細胞及其胰島素抵抗細胞促進脂肪分解之影響

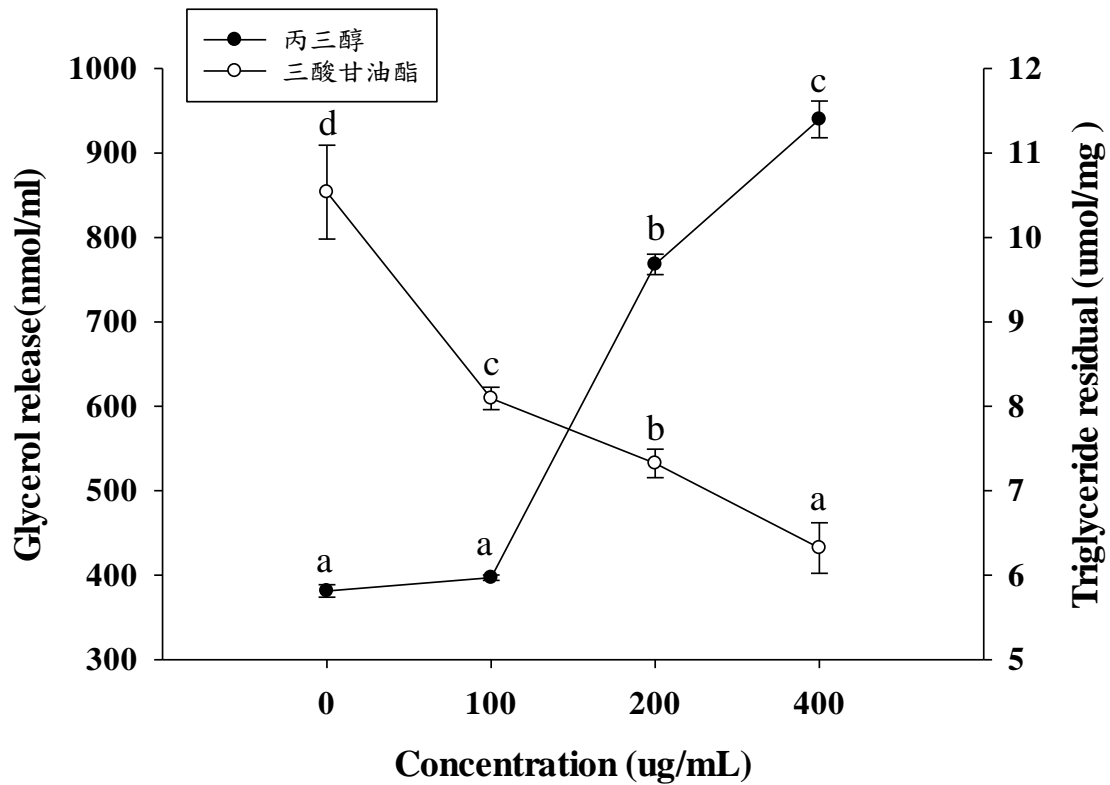
在脂肪細胞分化後期，細胞會分化至無法恢復的程度，從原本型態類似纖維母細胞的前脂肪細胞，隨著細胞骨架與細胞外間質的改變而變圓，並開始累積油滴。圖八為探討番石榴葉萃取物添加量對 3T3-L1 脂肪細胞中丙三醇釋





圖七、番石榴葉萃取物添加量及添加方式對 3T3-L1 前脂肪細胞中抑制脂質新生的傳訊蛋白質表現量之影響

Fig. 7. Effect of guava leaves extract concentration and adding stages on signaling protein expression in 3T3-L1 preadipocytes.

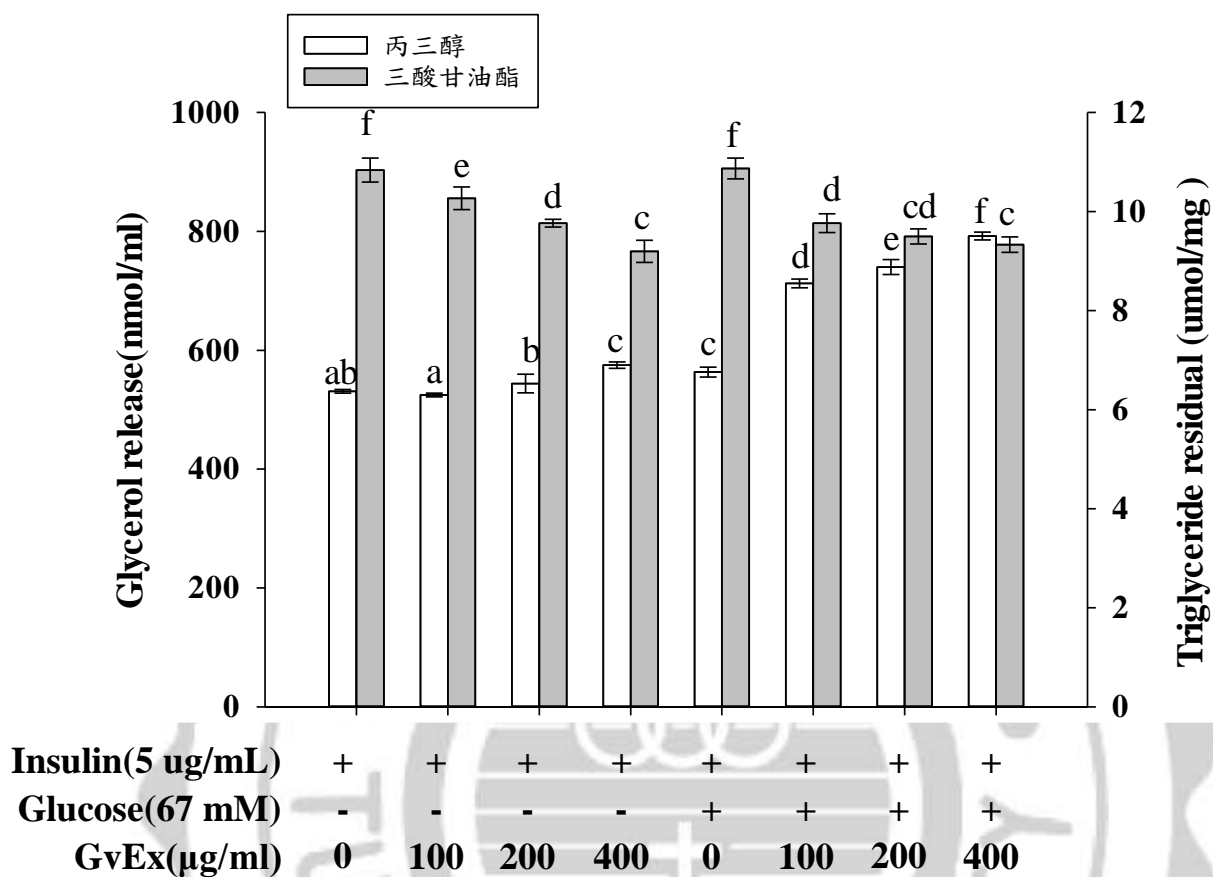


圖八、番石榴葉萃取物添加量對 3T3-L1 脂肪細胞中丙三醇釋放量及三酸甘油酯殘留量之影響

Fig. 8. Effect of guava leaves concentration on glycerol release (GR) and triglyceride residual (TR) in 3T3-L1 adipocytes. Means with different letters are significantly different in GR and TR respectively ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



放量及三酸甘油酯殘留量之影響，結果顯示，添加量越高 GR 顯著隨之升高，而 TR 則隨之顯著下降，GR 顯著地從 381.3 nmol/mL 提升至 939.9 nmol/mL，而 TR 則顯著從 10.53 nmol/mL 降至 6.32 nmol/mL，兩者均表示 GvEx 具有促進脂肪細胞分解的活性，且隨著添加量的增加，促進脂肪分解的效果越好。圖九為探討番石榴葉萃取物改善高糖誘導胰島素抵抗 3T3-L1 脂肪細胞中丙三醇釋放量及三酸甘油酯殘留量之影響，結果顯示，添加量越高 GR 顯著隨之升高，而 TR 顯著從 10.83 nmol/mL 降至 9.33 nmol/mL，兩者均表示 GvEx 對胰島素抵抗的脂肪細胞具有促進脂肪分解的作用，且隨著添加量的增加，促進脂肪分解的效果越好。因此，進一步探討 GvEx 是透過哪些脂肪酶的表現量增加來促進脂肪分解；3T3-L1 脂肪細胞促進脂肪分解是經由三個酵素所催化連續反應所完成，分別為三酸甘油酯脂解酶(ATGL)、荷爾蒙敏感性脂解酶(HSL)與單酸甘油酯脂解酶(MGL)，此三種酵素依序作用之下可以將三酸甘油酯分解成丙三醇與脂肪酸。在脂解酶中，HSL 具有分解三酸甘油酯與雙酸甘油酯的活性，ATGL 控制大部分的三酸甘油酯的分解作用，為細胞中分解三酸甘油酯以促使 HSL 分解雙酸甘油酯，若提高 ATGL 的表現量則會促進脂肪酸及丙三醇的釋放(Park et al., 2014)。此外，Adiponectin 是一種由脂肪細胞所分泌的蛋白激素，屬脂泌素之一，其表現可作為脂肪細胞分化成熟度的重要指標，此激素與血糖、胰島素及三酸甘油酯含量成反比(Sanchez-Gurmaches & Guertin, 2014)。Leptin 則與 Adiponectin 相反，Leptin 有許多



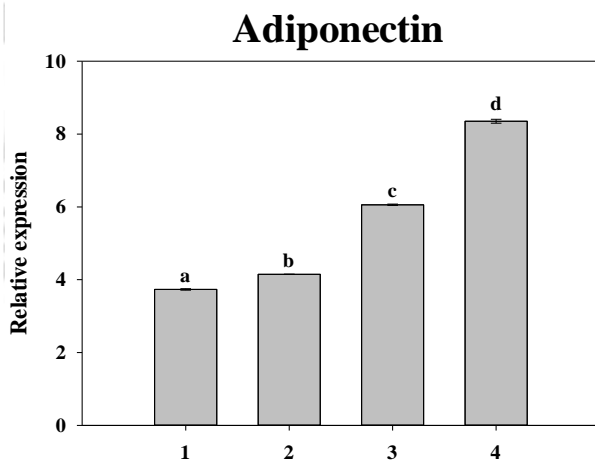
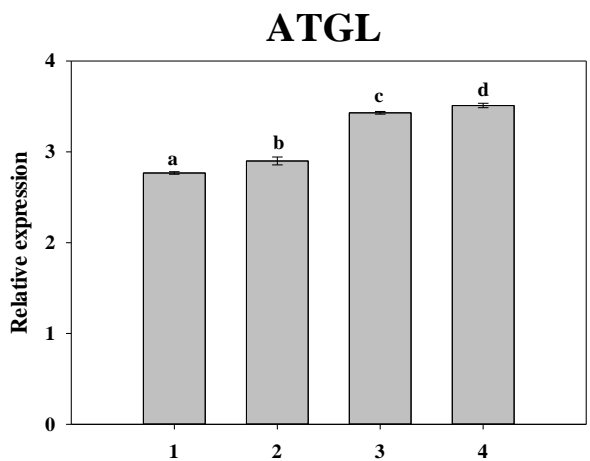
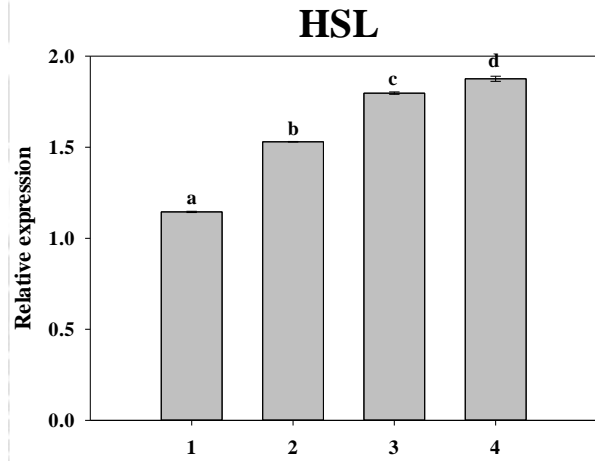
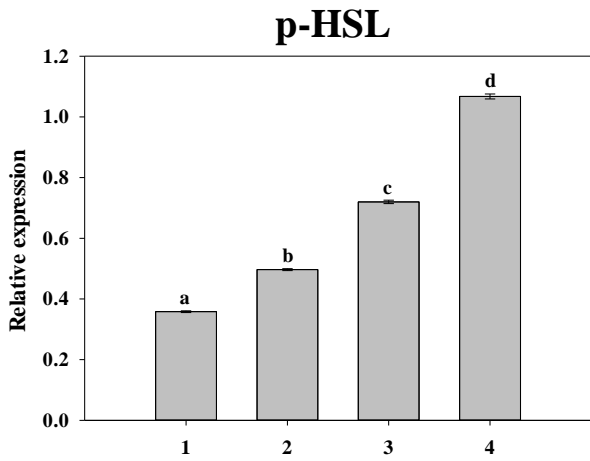
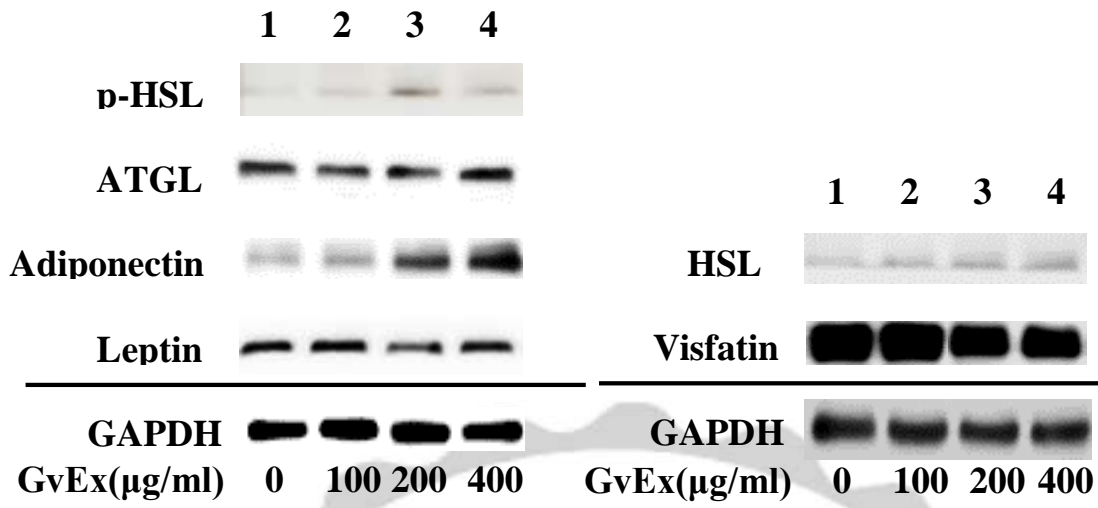
圖九、番石榴葉萃取物添加量高葡萄糖誘導胰島素阻抗對 3T3-L1 脂肪細胞中丙三醇釋放量及三酸甘油酯殘留量之影響

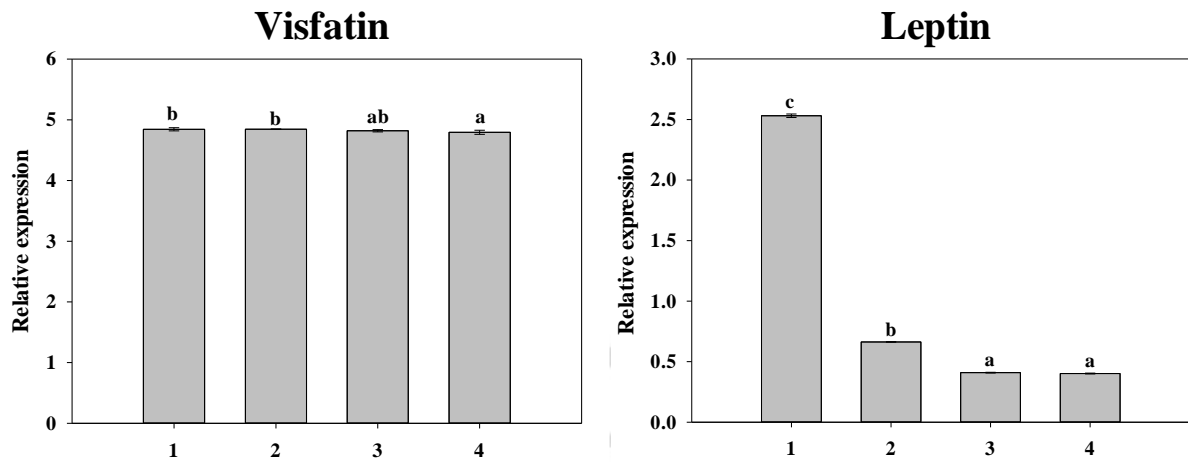
Fig. 9. Effect of guava leaves to concentration and high-glucose induced on glycerol release (GY) and triglyceride residual (TR) in 3T3-L1 adipocytes. Bar represent mean  $\pm$  SD , n=3. Means with different letters are significantly different in GR and TR respectively ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

可與脂肪細胞分化相關因子結合的調節區，於細胞分化時會透過與 C/EBP、PPAR $\gamma$  與 SREBP1 的結合使得 Leptin 啟動子活化，若此激素增加則代表脂肪生成增加(Lee et al., 2016)。Visfatin 是新發現的脂肪細胞激素，具有具有類似胰島素的作用，可降低血液中葡萄糖的含量、刺激葡萄糖代謝及促進脂肪細胞脂質的聚集與合成(Sanchez-Gurmaches & Guertin, 2014)。圖十為番石榴葉萃取物添加量對 3T3-L1 細胞中傳訊蛋白素表現量之影響，結果顯示，隨著 GvEx 添加量從 100 增加到 400 $\mu$ g/mL，p-HSL、HSL 及 ATGL 的酵素表現量均顯著增加，此為 GvEx 添加量增加而顯著隨之下降，代表脂肪生成降低，Adiponectin 表現量亦隨著 GvEx 添加量增加而增加，代表成熟脂肪細胞可正常運作，GvEx 則對 Visfatin 表現量沒有任何影響。

#### 四、番石榴葉萃取物對高糖誘導胰島素抵抗 3T3-L1 脂肪細胞之改善機制探討

酚類化合物廣泛分布於植物中，番石榴葉已經證實具有抗高血糖的效果，當中主要的活性成分為槲黃素。而咖啡酸近年來也著重於研究抗糖尿病或抗高血糖，此物質可以促進轉運蛋白的表現，而達到降低血液中的葡萄糖含量效果(Gutierrez et al., 2008)。2-NBDG 為螢光標定的葡萄糖擬似物，常用於代表葡萄糖攝入量的測定(Liu et al., 2015)。活化葡萄糖攝入量為降低血糖的重要機制，因此我們使用此方法來評估番石榴葉萃取物降血糖的功效，番石榴萃





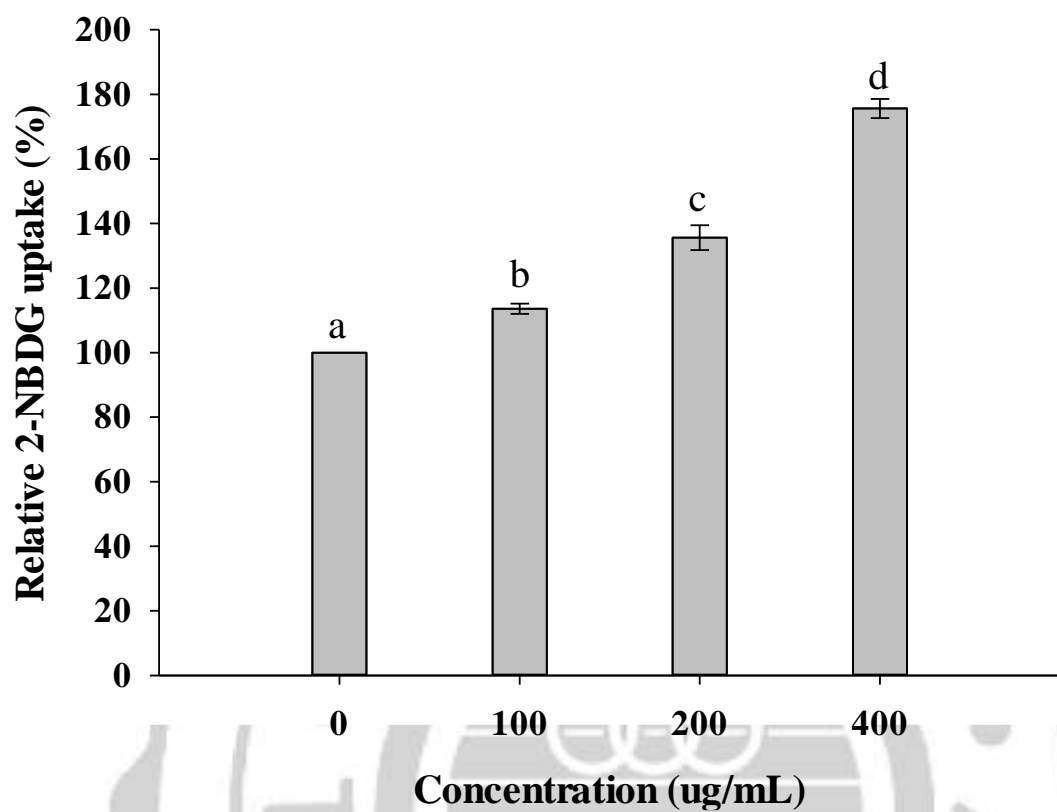
圖十、番石榴葉萃取物添加量 3T3-L1 脂肪細胞中傳訊蛋白質表現量之影響

Fig. 10. Effect of guava leaves extract concentration on signaling protein expression in 3T3-L1 adipocytes.



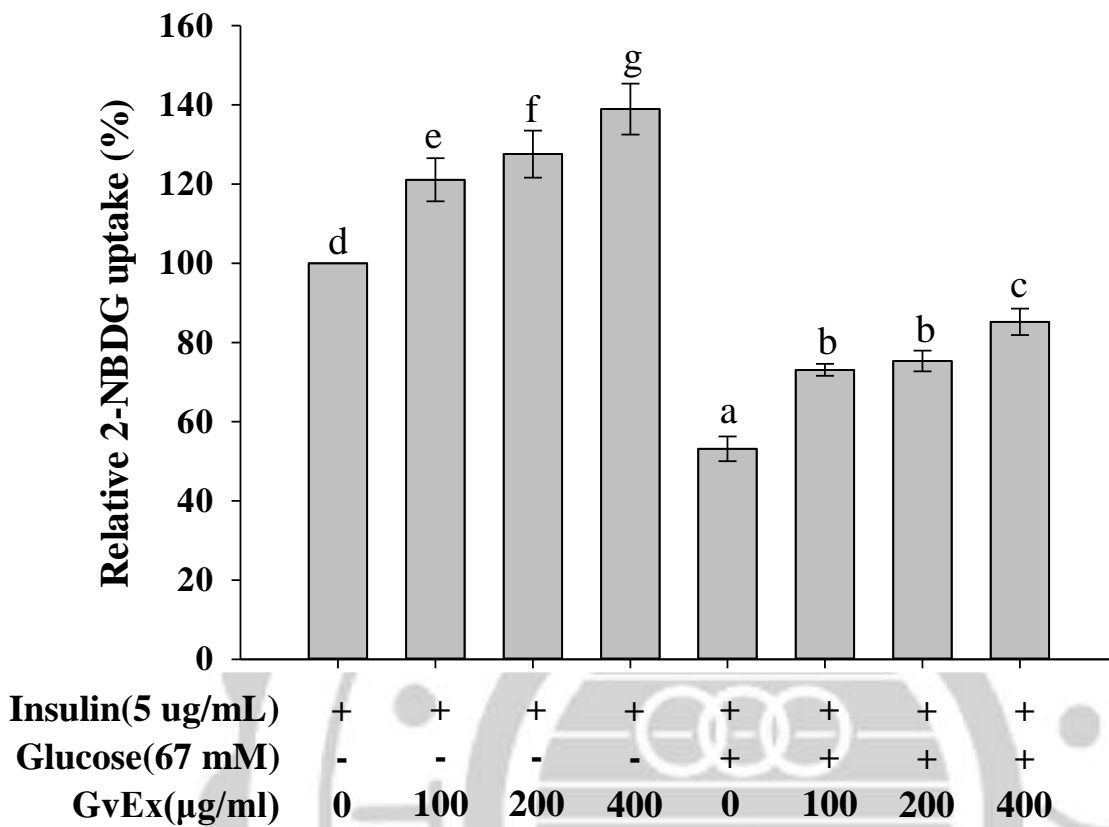


取物中含有多酚類的咖啡酸及綠原酸，植物中多酚類的咖啡酸及綠原酸具有增加高葡萄糖誘導胰島素阻抗的葡萄糖攝入量，被認為具有抗糖尿病的潛力 (Cheng et al., 2009)。圖十一為探討番石榴葉萃取物添加量對 3T3-L1 脂肪細胞葡萄糖攝入量之影響，隨著添加量增加，2-NBDG 攝入量也隨之顯著上升，當添加量為 400 $\mu$ g/mL 時，其攝入提升至 175%，證明添加番石榴葉可有效提升葡萄糖攝入量。圖十二為探討番石榴葉萃取物添加量對胰島素阻抗脂肪細胞中葡萄糖攝入量之影響；結果指出未持續添加高葡萄糖濃度的組別，當 GvEx 添加量從 100 提升至 400 $\mu$ g/mL 時，其 2-NBDG 攝入量也顯著提升從 121% 至 139%。其次，持續添加高葡萄糖組別使得胰島素阻抗細胞的攝入量從 100% 降至 53.1%，當添加 100-400 $\mu$ g/mL GvEx 時可使其 2-NBDG 攝入量進一步從 53.1% 提升至 85.3%。綜合以上結果得知，GvEx 的添加對胰島素阻抗的脂肪細胞而言，無論在有無高糖的環境下，對於 2-NBDG 的攝入量均有正向的關聯性，隨著 GvEx 添加量的增加，其 2-NBDG 攝入量均隨之增加，均可改善胰島素阻抗細胞增加對葡萄糖的攝入量。最後利用西方墨點法探討 GvEx 可改善胰島素阻抗細胞增加葡萄糖攝取量的可能機制，IRS1 上具有重要作用的十幾個酪胺酸殘基 K 磷酸化，被磷酸化的 IRS1 能夠結合並活化下游的訊息傳遞。而 PI3K 磷酸化後可進一步活化蛋白質基酶 B 上 AKT 磷酸化，能促進葡萄糖攝入量。GLUT4 為一個脂肪細胞的轉運蛋白，在高葡萄糖



圖十一、番石榴葉萃取物添加量對 3T3-L1 脂肪細胞葡萄糖攝取量之影響

Fig. 11 Effect of guava leaves extract concentration on relative 2-NBDG uptake in 3T3-L1 adipocytes. Bar represent mean  $\pm$  SD, n=3. Mean with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

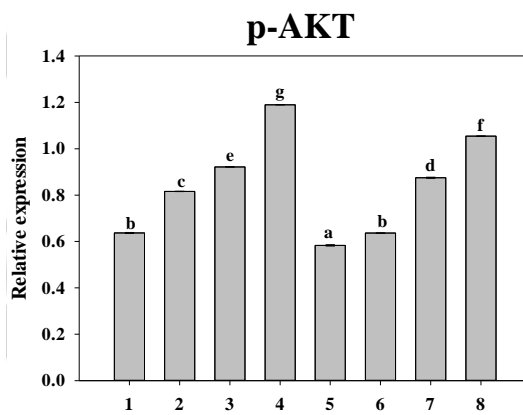
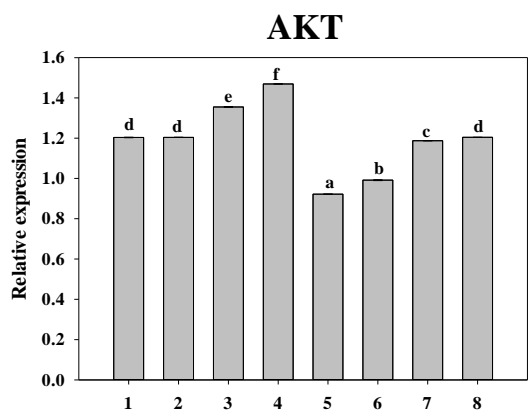
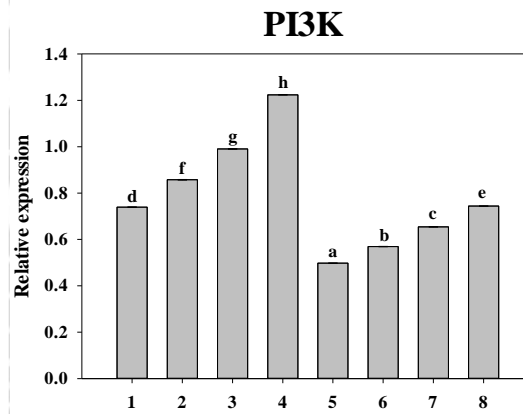
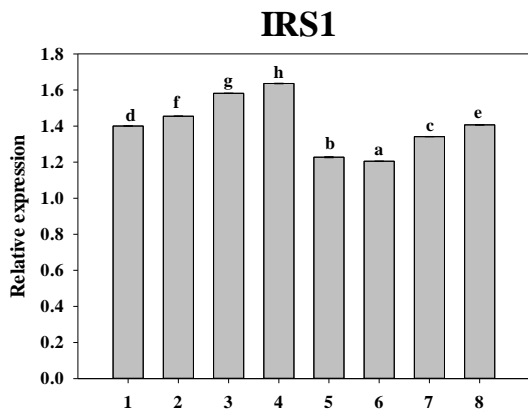
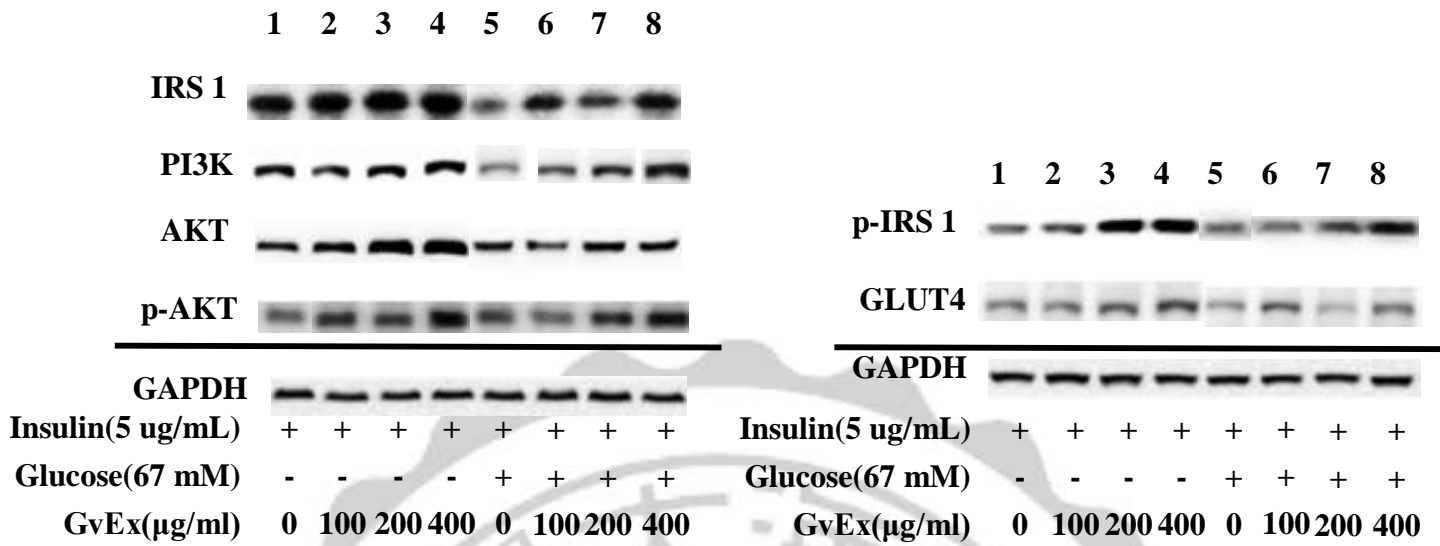


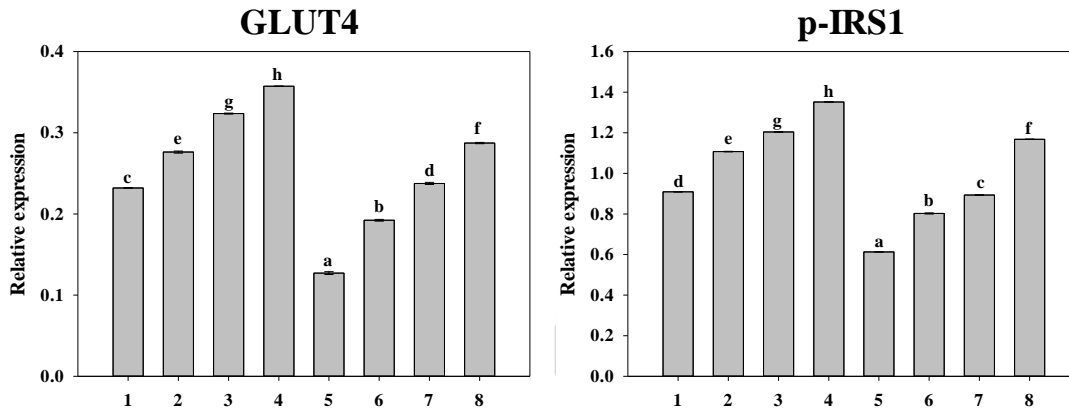
圖十二、番石榴葉萃取物添加量對高葡萄糖誘導胰島素抵抗 3T3-L1 脂肪細胞葡萄糖攝取量之影響

Fig. 12. Effect of guava leaves extract concentration in high-glucose-induced insulin resistance on relative 2-NBDG uptake 3T3-L1 adipocytes. Bar represent mean  $\pm$  SD, n=3. Mean with different letters are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

的環境下會抑制胰島素相關的轉錄因子表現量及磷酸化，而產生胰島素阻抗現象(Morigny et al., 2016)，故在高葡萄糖情況下添加番石榴萃取物是否可活化胰島素相關傳訊蛋白質的表現量及磷酸化來達到改善胰島素阻抗的現象，需進一步進行探討。圖十三 GvEx 添加量對高葡萄糖誘導胰島素阻抗 3T3-L1 脂肪細胞中傳訊蛋白質表現量之影響;不論有無持續添加高糖度濃度，隨著 GvEx 添加量的增加，IRS1、PI3K、AKT、GLUT4、p-IRS1、p-AKT 及 p-PI3K 等蛋白質表現量均隨著顯著增加 ( $p < 0.05$ ).這些蛋白質表現量增加代表著細胞對葡萄糖攝入量會提升。







圖十三、番石榴葉萃取物添加量對高葡萄糖誘導胰島素阻抗 3T3-L1 脂肪細胞傳訊蛋白質表現量之影響

Fig. 13. Effect of guava leaves extract concentration on signaling protein expression in high-glucose-induced insulin resistance 3T3-L1 adipocytes. Bar represent mean  $\pm$  SD, n=3. Mean with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.



## 伍、 結論

本研究結果顯示，在三酸甘油酯殘留量方面，隨著 GvEx 添加量從 100 增加到 400 $\mu$ g/mL 對於抑制脂質新生、促進脂肪分解及改善胰島素抵抗其 TR 皆有顯著下降，而 GR 也顯著上升。可見添加番石榴葉能有效抑制前脂肪細胞脂肪生成及促進成熟脂肪細胞脂肪分解。其次，在葡萄糖攝入量方面，添加 GvEx 可有效提升正常脂肪細胞及胰島素抵抗細胞的葡萄糖攝入量。根據西方轉漬法分析，添加 GvEx 可降低前脂肪細胞中 SREBP 1c、PPAR $\gamma$ 、p-PPAR $\gamma$ 、C/EBP $\alpha$  及 C/EBP $\beta$  等轉錄因子的蛋白質表現量，且連續添加 GvEx 的效果顯著高於添加一次的 GvEx，皆具有抑制脂質新生的效果。此外，添加 GvEx 可使成熟脂肪細胞中 p-HSL、HSL 及 ATGL 的酵素表現量均顯著增加，代表分解增加。最後添加 GvEx 可使胰島素抵抗細胞中 IRS1、PI3K、AKT、GLUT4、p-IRS1、p-AKT 及 p-PI3K 等蛋白質表現量均顯著增加，均可改善胰島素抵抗細胞增加對葡萄糖的攝入量。本研究已初步了解 GvEx 抗可脂質新生、促進脂肪分解及改善胰島素抵抗作用等機制，未來進一步利用 GvEx 開發成保健或健康食品。

## 陸、 參考文獻

- 行政院農委會 (2011) 2011 年農業統計年報
- 謝鴻業 (2005) 番石榴保護-作物簡介。植物保護圖鑑系列。
- Abdullahi, A., & Jeschke, M. G. (2016). White Adipose Tissue Browning: A Double-edged Sword. *Trends Endocrinol Metab*, 27(8), 542-552.
- Ahmadian, M., Wang, Y., & Sul, H. S. (2010). Lipolysis in adipocytes. *Int J Biochem Cell Biol*, 42(5), 555-559.
- Ali, A. T., Hochfeld, W. E., Myburgh, R., & Pepper, M. S. (2013). Adipocyte and adipogenesis. *Eur J Cell Biol*, 92(6-7), 229-236.
- Arner, P., & Langin, D. (2014). Lipolysis in lipid turnover, cancer cachexia, and obesity-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*, 25(5), 255-262.
- Awazawa, M., Ueki, K., Inabe, K., Yamauchi, T., Kubota, N., Kaneko, K., et al. (2011). Adiponectin enhances insulin sensitivity by increasing hepatic IRS-2 expression via a macrophage-derived IL-6-dependent pathway. *Cell Metab*, 13(4), 401-412.
- Bates, S. H., Kulkarni, R. N., Seifert, M., & Myers, M. G., Jr. (2005). Roles for leptin receptor/STAT3-dependent and -independent signals in the regulation of glucose homeostasis. *Cell Metab*, 1(3), 169-178.
- Brasaemle, D. L. (2010). Lipolysis control: the plot thickens. *Cell Metab*, 11(3), 173-174.
- Carmean, C. M., Cohen, R. N., & Brady, M. J. (2014). Systemic regulation of adipose metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 1842(3), 424-430.
- Caselli, C. (2014). Role of adiponectin system in insulin resistance. *Mol Genet Metab*, 113(3), 155-160.
- Chaves, V. E., Frasson, D., & Kawashita, N. H. (2011). Several agents and pathways regulate lipolysis in adipocytes. *Biochimie*, 93(10), 1631-1640.
- Cheng, F. C., Shen, S. C., & Wu, J. S. (2009). Effect of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extract on glucose uptake in rat hepatocytes. *J Food Sci*, 74(5), H132-138.
- El-Abhar, H. S., & Schaalán, M. F. (2014). Phytotherapy in diabetes: Review on potential mechanistic perspectives. *World J Diabetes*, 5(2), 176-197.
- Farmer, S. R. (2006). Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab*, 4(4), 263-273.
- Farmer, S. R. (2008). Molecular determinants of brown adipocyte formation and function. *Genes Dev*, 22(10), 1269-1275.
- Fève, B. (2005). Adipogenesis: cellular and molecular aspects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 19(4), 483-499.
- Fu, Y., Luo, L., Luo, N., & Garvey, W. T. (2006). Proinflammatory cytokine production and insulin sensitivity regulated by overexpression of resistin in 3T3-L1 adipocytes. *Nutr Metab (Lond)*, 3, 28.

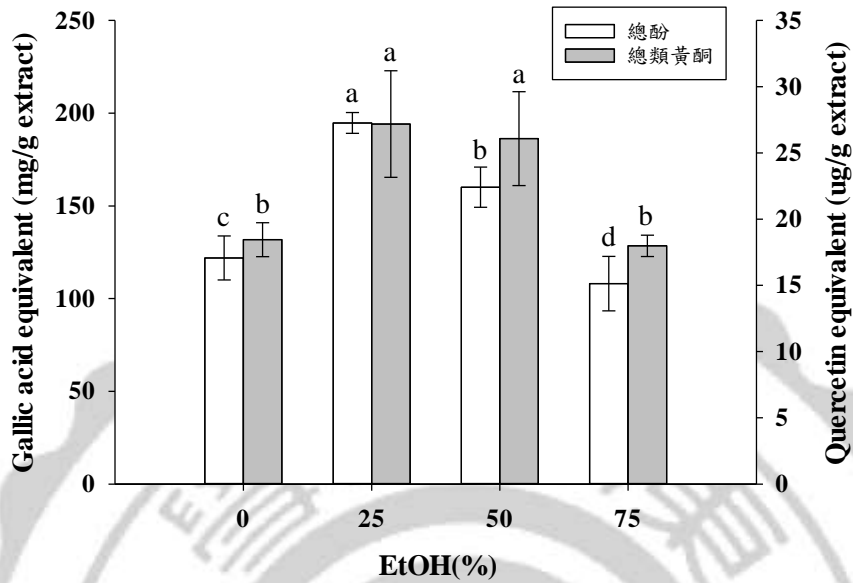
- Gallant, M., Odei-Addo, F., Frost, C. L., & Levendal, R. A. (2009). Biological effects of THC and a lipophilic cannabis extract on normal and insulin resistant 3T3-L1 adipocytes. *Phytomedicine*, *16*(10), 942-949.
- Giralt, A., & Villarroya, F. (2012). SIRT3, a pivotal actor in mitochondrial functions: metabolism, cell death and aging. *Biochem J*, *444*(1), 1-10.
- Glass, C. K., & Olefsky, J. M. (2012). Inflammation and lipid signaling in the etiology of insulin resistance. *Cell Metab*, *15*(5), 635-645.
- Gonzales, A. M., & Orlando, R. A. (2007). Role of adipocyte-derived lipoprotein lipase in adipocyte hypertrophy. *Nutr Metab (Lond)*, *4*, 22.
- Gustafson, B., Hedjazifar, S., Gogg, S., Hammarstedt, A., & Smith, U. (2015). Insulin resistance and impaired adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab*, *26*(4), 193-200.
- Gutierrez, R. M., Mitchell, S., & Solis, R. V. (2008). Psidium guajava: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol*, *117*(1), 1-27.
- Harwood, H. J., Jr. (2012). The adipocyte as an endocrine organ in the regulation of metabolic homeostasis. *Neuropharmacology*, *63*(1), 57-75.
- Hsu, C. L., & Yen, G. C. (2007). Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats. *Br J Nutr*, *98*(4), 727-735.
- Ikeda, Y., Tsuchiya, H., Hama, S., Kajimoto, K., & Kogure, K. (2013). Resistin affects lipid metabolism during adipocyte maturation of 3T3-L1 cells. *FEBS J*, *280*(22), 5884-5895.
- Jang, B. C. (2016a). Artesunate inhibits adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by reducing the expression and/or phosphorylation levels of C/EBP-alpha, PPAR-gamma, FAS, perilipin A, and STAT-3. *Biochem Biophys Res Commun*, *474*(1), 220-225.
- Jang, B. C. (2016b). Tetrandrine has anti-adipogenic effect on 3T3-L1 preadipocytes through the reduced expression and/or phosphorylation levels of C/EBP-alpha, PPAR-gamma, FAS, perilipin A, and STAT-3. *Biochem Biophys Res Commun*, *476*(4), 481-486.
- Kanzaki, M., & Pessin, J. E. (2003). Insulin Signaling: GLUT4 Vesicles Exit via the Exocyst. *Current Biology*, *13*(14), R574-R576.
- Kusminski, C. M., & Scherer, P. E. (2012). Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab*, *23*(9), 435-443.
- Lafontan, M. (2014). Adipose tissue and adipocyte dysregulation. *Diabetes Metab*, *40*(1), 16-28.
- Lago, F., Gomez, R., Gomez-Reino, J. J., Dieguez, C., & Gualillo, O. (2009). Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. *Trends Biochem Sci*, *34*(10), 500-510.
- Lamming, D. W., & Sabatini, D. M. (2013). A Central role for mTOR in lipid homeostasis. *Cell Metab*, *18*(4), 465-469.
- Langin, D. (2011). In and out: adipose tissue lipid turnover in obesity and dyslipidemia. *Cell Metab*, *14*(5), 569-570.

- Langin, D., & Arner, P. (2006). Importance of TNFalpha and neutral lipases in human adipose tissue lipolysis. *Trends Endocrinol Metab*, 17(8), 314-320.
- Lee, B. C., Kim, M. S., Pae, M., Yamamoto, Y., Eberle, D., Shimada, T., et al. (2016). Adipose Natural Killer Cells Regulate Adipose Tissue Macrophages to Promote Insulin Resistance in Obesity. *Cell Metab*, 23(4), 685-698.
- Lefterova, M. I., & Lazar, M. A. (2009). New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol Metab*, 20(3), 107-114.
- Lehrke, M., & Lazar, M. A. (2005). The many faces of PPARgamma. *Cell*, 123(6), 993-999.
- Liu, C.-W., Wang, Y.-C., Huang, C.-Y., Lu, H.-C., & Chiang, W.-D. (2015). Optimization Extraction Conditions with Ultrasound for Anti-hyperglycemic Activities from *Psidium guajava* Leaf. *Food Science and Technology Research*, 21(4), 615-621.
- Morigny, P., Houssier, M., Mouisel, E., & Langin, D. (2016). Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie*, 125, 259-266.
- Morral, N. (2003). Novel targets and therapeutic strategies for type 2 diabetes. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 14(4), 169-175.
- Mueller, E. (2014). Understanding the variegation of fat: novel regulators of adipocyte differentiation and fat tissue biology. *Biochim Biophys Acta*, 1842(3), 352-357.
- Olarescu, N. C., & Bollerslev, J. (2016). The Impact of Adipose Tissue on Insulin Resistance in Acromegaly. *Trends Endocrinol Metab*, 27(4), 226-237.
- Park, Y. K., Lee, T. Y., Choi, J. S., Hong, V. S., Lee, J., Park, J. W., et al. (2014). Inhibition of adipogenesis and leptin production in 3T3-L1 adipocytes by a derivative of meridianin C. *Biochem Biophys Res Commun*, 452(4), 1078-1083.
- Ramage, L. E., Akyol, M., Fletcher, A. M., Forsythe, J., Nixon, M., Carter, R. N., et al. (2016). Glucocorticoids Acutely Increase Brown Adipose Tissue Activity in Humans, Revealing Species-Specific Differences in UCP-1 Regulation. *Cell Metab*, 24(1), 130-141.
- Reilly, S. M., & Saltiel, A. R. (2015). A futile approach to fighting obesity? *Cell*, 163(3), 539-540.
- Richard, A. J., & Stephens, J. M. (2011). Emerging roles of JAK-STAT signaling pathways in adipocytes. *Trends Endocrinol Metab*, 22(8), 325-332.
- Rosen, E. D., & Spiegelman, B. M. (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature*, 444(7121), 847-853.
- Rudich, A., Kanety, H., & Bashan, N. (2007). Adipose stress-sensing kinases: linking obesity to malfunction. *Trends Endocrinol Metab*, 18(8), 291-299.
- Samuel, V. T., & Shulman, G. I. (2012). Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell*, 148(5), 852-871.
- Sanchez-Gurmaches, J., & Guertin, D. A. (2014). Adipocyte lineages: tracing back the origins of fat. *Biochim Biophys Acta*, 1842(3), 340-351.

- Sanchez-Gurmaches, J., Hung, C. M., & Guertin, D. A. (2016). Emerging Complexities in Adipocyte Origins and Identity. *Trends Cell Biol*, 26(5), 313-326.
- Sell, H., Dietze-Schroeder, D., & Eckel, J. (2006). The adipocyte-myocyte axis in insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*, 17(10), 416-422.
- Shimoyama, T., Yamaguchi, S., Takahashi, K., Katsuta, H., Ito, E., Seki, H., et al. (2006). Gliclazide protects 3T3L1 adipocytes against insulin resistance induced by hydrogen peroxide with restoration of GLUT4 translocation. *Metabolism*, 55(6), 722-730.
- Singh, R., De Aguiar, R. B., Naik, S., Mani, S., Ostadsharif, K., Wencker, D., et al. (2013). LRP6 enhances glucose metabolism by promoting TCF7L2-dependent insulin receptor expression and IGF receptor stabilization in humans. *Cell Metab*, 17(2), 197-209.
- Titchenell, P. M., Lazar, M. A., & Birnbaum, M. J. (2017). Unraveling the Regulation of Hepatic Metabolism by Insulin. *Trends Endocrinol Metab*, 28(7), 497-505.
- Tontonoz, P., & Spiegelman, B. M. (2008). Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem*, 77, 289-312.
- van Dam, A. D., Kooijman, S., Schilperoort, M., Rensen, P. C., & Boon, M. R. (2015). Regulation of brown fat by AMP-activated protein kinase. *Trends Mol Med*, 21(9), 571-579.
- Vinayagam, R., & Xu, B. (2015). Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. *Nutr Metab (Lond)*, 12, 60.
- Wallberg-Henriksson, H., & Zierath, J. R. (2009). A new twist on brown fat metabolism. *Cell*, 137(1), 22-24.
- 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. *Nutr Metab (Lond)*, 9, 13.
- Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T. O., Kohlwein, S. D., Haemmerle, G., Lass, A., et al. (2012). FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab*, 15(3), 279-291.
- Zhou, Y., Peng, J., & Jiang, S. (2014). Role of histone acetyltransferases and histone deacetylases in adipocyte differentiation and adipogenesis. *Eur J Cell Biol*, 93(4), 170-177.
- Zou, C., Wang, Y., & Shen, Z. (2005). 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *J Biochem Biophys Methods*, 64(3), 207-215.

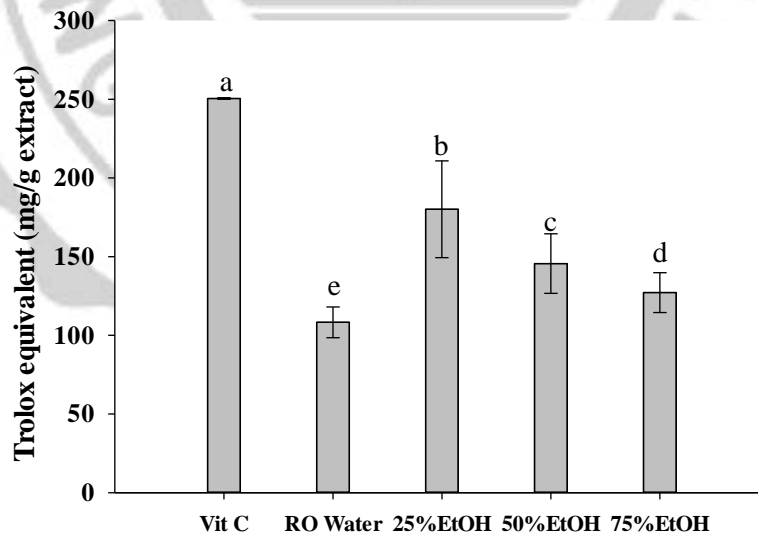


## 柒、 附錄



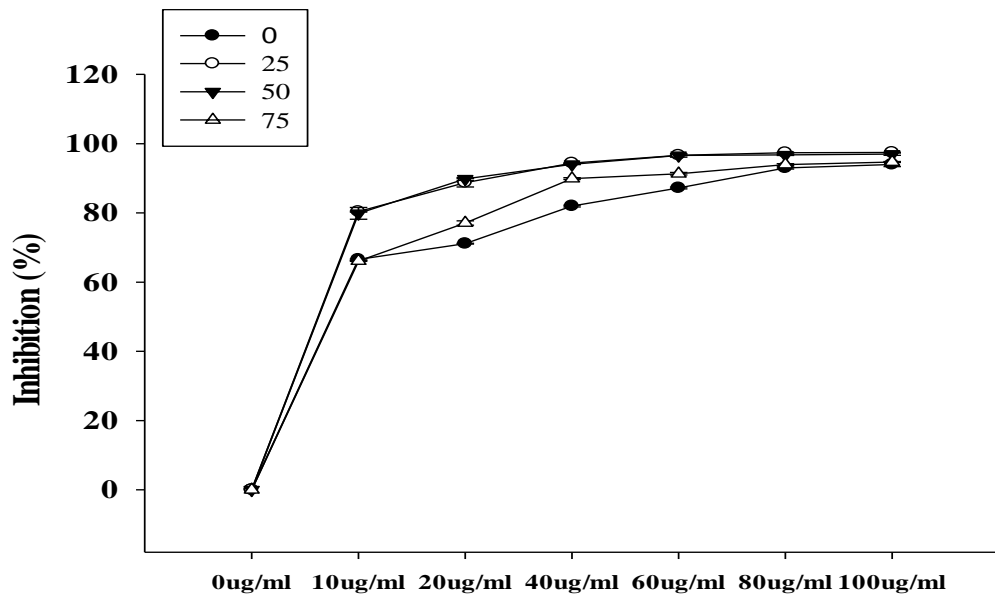
附錄一、 芭樂葉乙醇萃取濃度對其總酚及總類黃酮之影響

Appendix 1. Effect of guava leaves extract concentration on total flavonoids in terms of gallic acid equivalent and total phenolics in terms of quercetin equivalent



附錄二、 芭樂葉乙醇萃取濃度對其抗氧化當量之影響

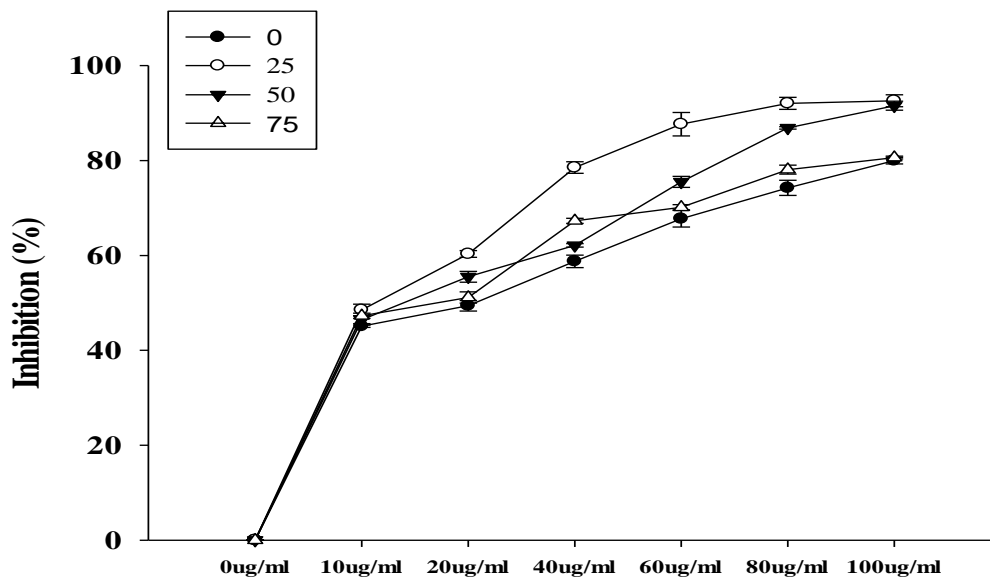
Appendix 2. Effect of guava leaves extract concentration on trolox equivalent



	0	25	50	75
	EtOH (%)			
blank	0.00 <sup>Ag</sup>	0.00 <sup>Ae</sup>	0.00 <sup>Ae</sup>	0.00 <sup>Ag</sup>
10 $\mu$ g/ml	66.57 <sup>Bf</sup>	80.41 <sup>Ad</sup>	79.87 <sup>Ad</sup>	66.13 <sup>Bf</sup>
20 $\mu$ g/ml	71.13 <sup>Ce</sup>	88.75 <sup>Ac</sup>	89.82 <sup>Ac</sup>	77.08 <sup>Be</sup>
40 $\mu$ g/ml	81.99 <sup>Dd</sup>	94.39 <sup>Ab</sup>	94.03 <sup>Bb</sup>	89.93 <sup>Cd</sup>
60 $\mu$ g/ml	87.21 <sup>Cc</sup>	96.66 <sup>Aa</sup>	96.61 <sup>Aa</sup>	91.33 <sup>Bc</sup>
80 $\mu$ g/ml	92.99 <sup>Db</sup>	97.39 <sup>Aa</sup>	96.76 <sup>Ba</sup>	93.96 <sup>Cb</sup>
100 $\mu$ g/ml	94.01 <sup>Ba</sup>	97.49 <sup>Aa</sup>	97.00 <sup>Aa</sup>	94.71 <sup>Ba</sup>

附錄三、芭樂葉乙醇萃取濃度及其萃取物濃度對抑制  $\alpha$ -amylase 之影響

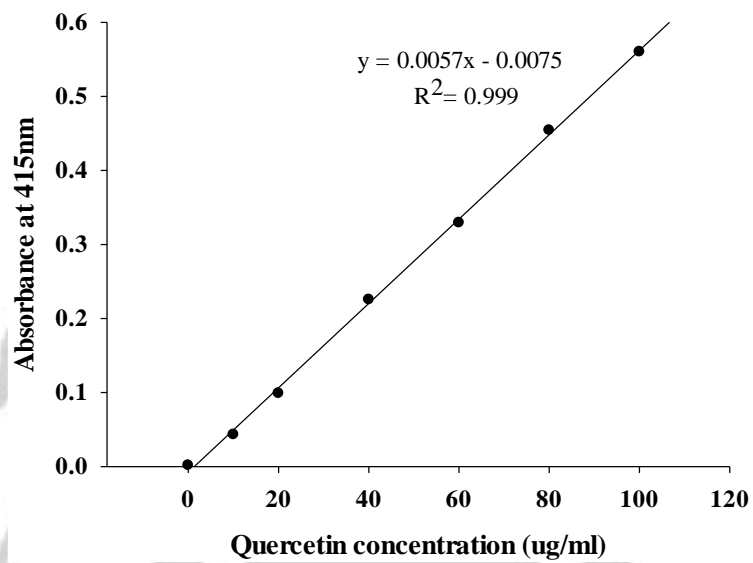
Appendix 3. Effect of guava leaves extract concentration on  $\alpha$ -amylase inhibitory activity



	0	25	50	75
	EtOH (%)			
<b>blank</b>	0.00 <sup>Ag</sup>	0.00 <sup>Af</sup>	0.00 <sup>Ag</sup>	0.00 <sup>Ag</sup>
<b>10µg/ml</b>	45.10 <sup>Cf</sup>	48.53 <sup>Ae</sup>	46.47 <sup>BCf</sup>	47.30 <sup>ABf</sup>
<b>20µg/ml</b>	49.43 <sup>Ce</sup>	60.33 <sup>Ad</sup>	55.52 <sup>Be</sup>	51.16 <sup>Ce</sup>
<b>40µg/ml</b>	58.77 <sup>Dd</sup>	78.53 <sup>Ac</sup>	62.14 <sup>Cd</sup>	67.30 <sup>Bd</sup>
<b>60µg/ml</b>	67.76 <sup>Cc</sup>	87.67 <sup>Ab</sup>	75.52 <sup>Bc</sup>	70.16 <sup>Cc</sup>
<b>80µg/ml</b>	74.25 <sup>Db</sup>	92.07 <sup>Aa</sup>	86.88 <sup>Bb</sup>	78.10 <sup>Cb</sup>
<b>100µg/ml</b>	80.00 <sup>Ba</sup>	92.60 <sup>Aa</sup>	91.56 <sup>Aa</sup>	80.63 <sup>Ba</sup>

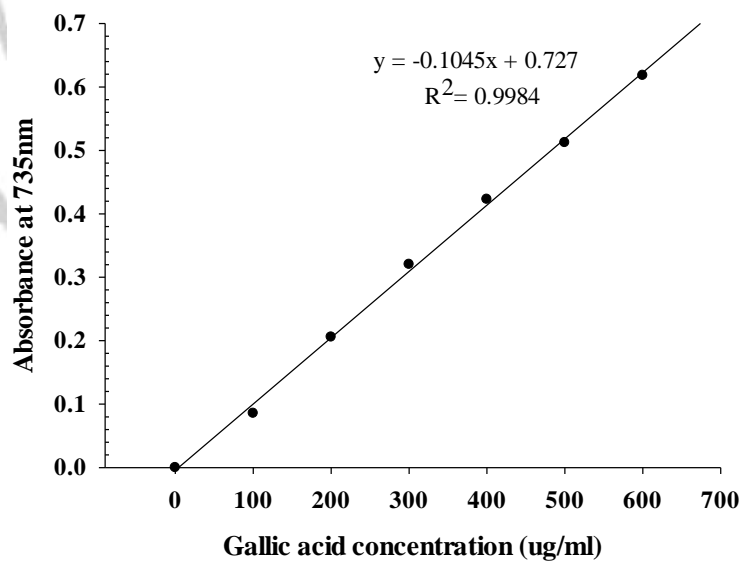
附錄四、芭樂葉乙醇萃取濃度及其萃取物濃度對抑制  $\alpha$ -glucosidase 之影響

Appendix 4. Effect of guava leaves extract concentration on  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity



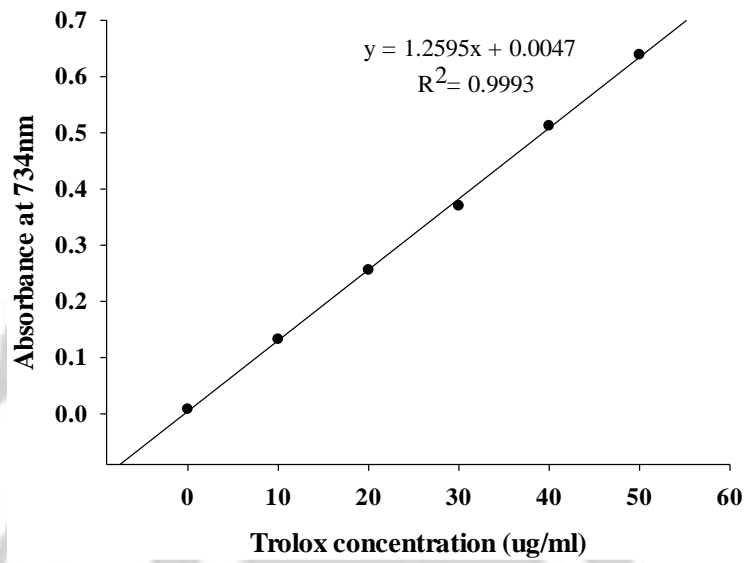
附錄五、槲皮素之標準品曲線圖

Appendix 5. Standard curve of quercetin



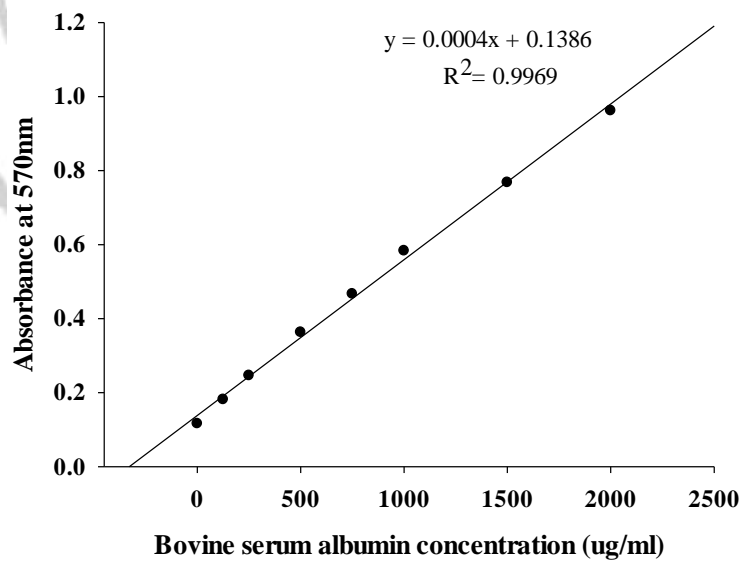
附錄六、沒食子酸之標準品曲線圖

Appendix 6. Standard curve of gallic acid



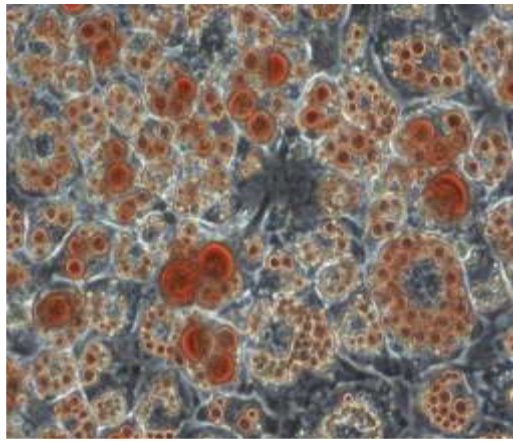
附錄七、水溶性維生素 E 之標準品曲線圖

Appendix 7. Standard curve of trolox

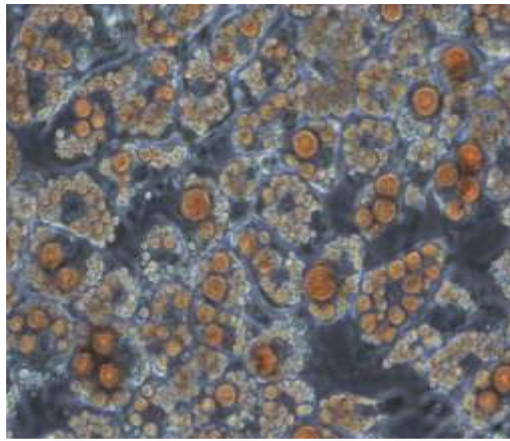


附錄八、牛血清白蛋白之標準品曲線圖

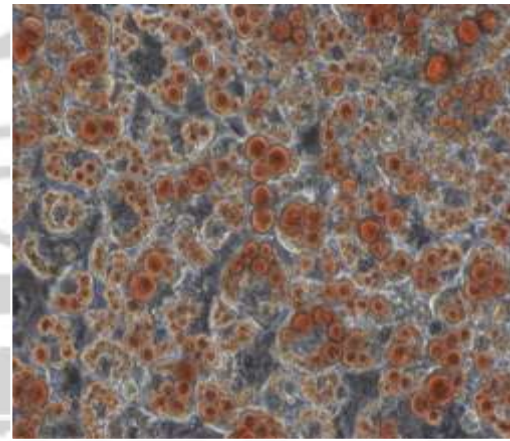
Appendix 8. Standard curve of bovine serum albumin



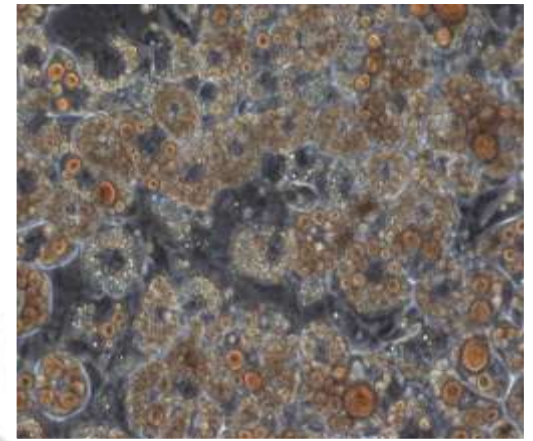
Control



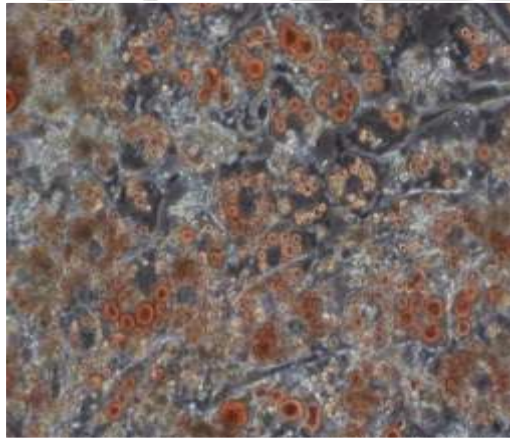
Stage I 100  $\mu$ g/mL



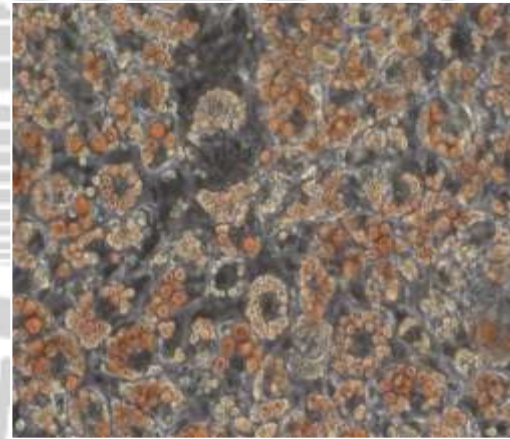
Stage I 200  $\mu$ g/mL



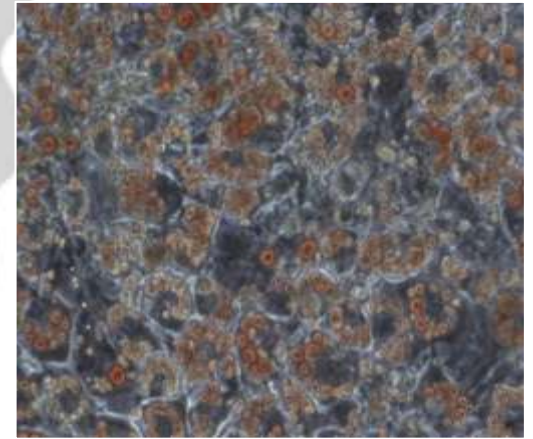
Stage I 400  $\mu$ g/mL



Stage II 100  $\mu$ g/mL



Stage II 200  $\mu$ g/mL

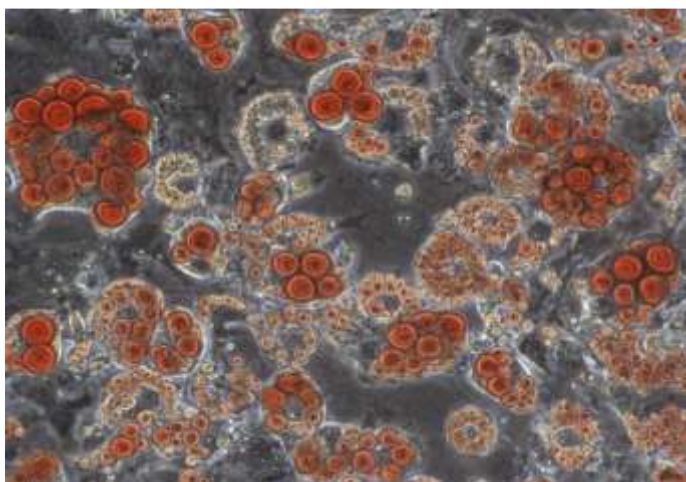


Stage II 400  $\mu$ g/mL

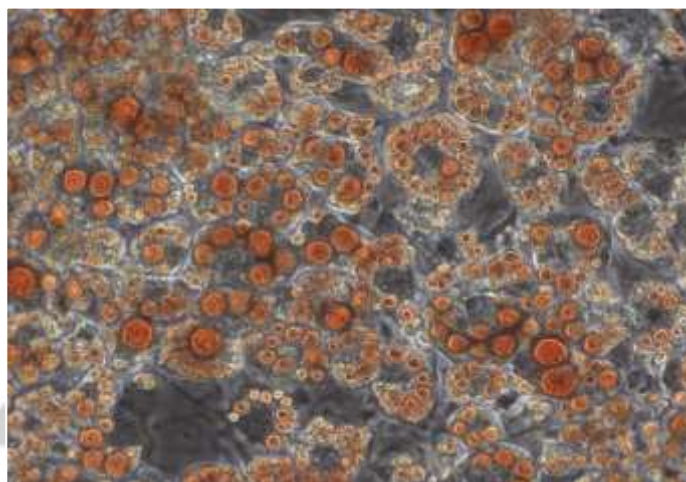
附錄九、番石榴葉萃取物添加量及添加方式對 3T3-L1 前脂肪細胞中油紅染色之影響

Appendix 9. Effect of guava leaves extract concentration and different adding methods on oil-red O in 3T3-L1 preadipocytes.

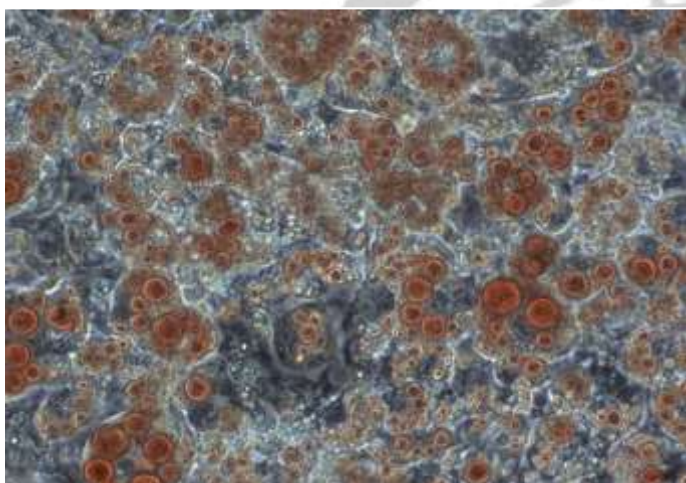




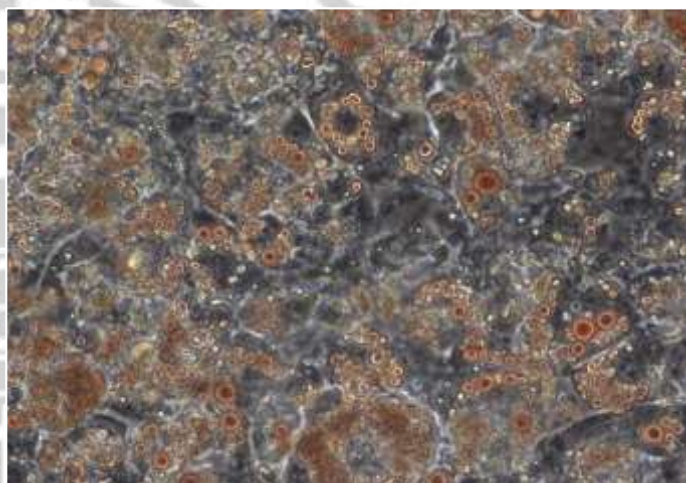
Control



100  $\mu$ g/mL



200  $\mu$ g/mL

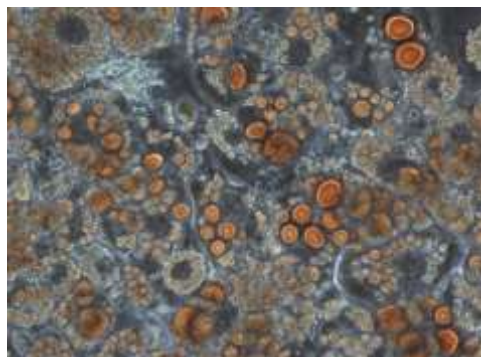


400  $\mu$ g/mL

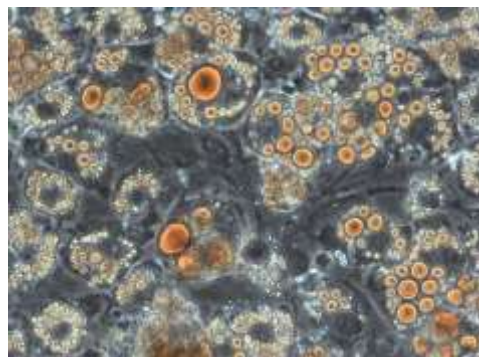
附錄十、番石榴葉萃取物添加量對 3T3-L1 脂肪細胞中油紅染色之影響

Appendix 10. Effect of guava leaves extract concentration on oil-red O in 3T3-L1 adipocytes.

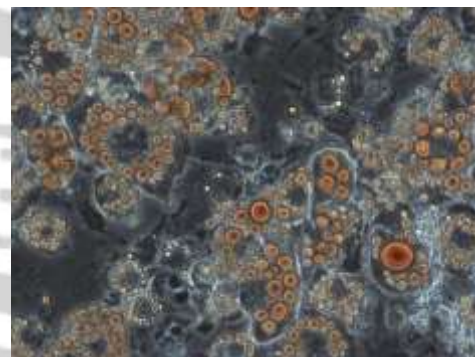




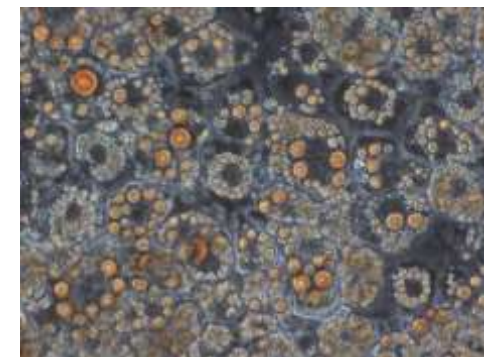
0  $\mu\text{g/mL}$



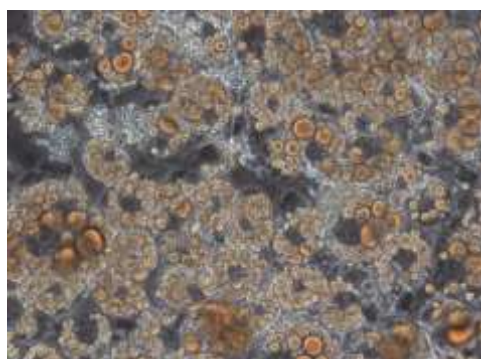
100  $\mu\text{g/mL}$



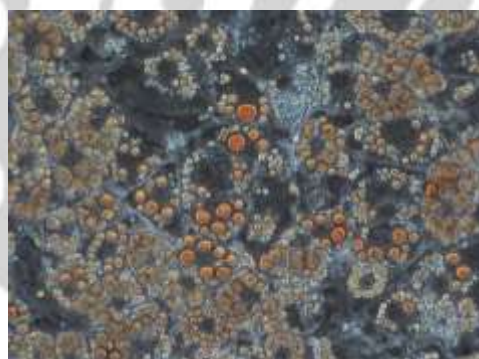
200  $\mu\text{g/mL}$



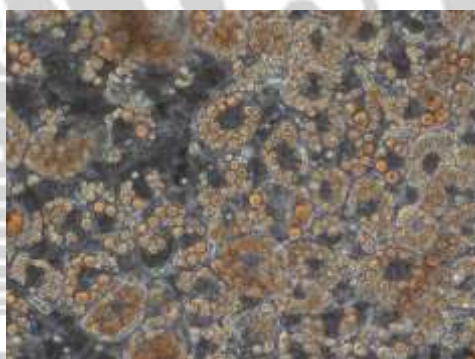
400  $\mu\text{g/mL}$



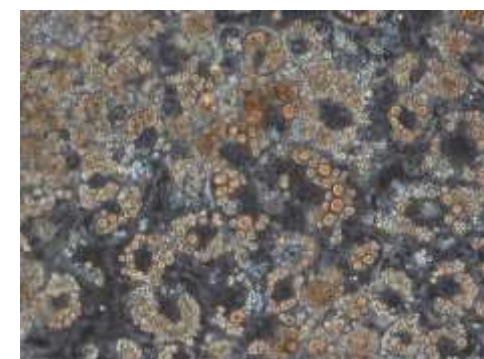
高葡萄糖組 GvEx 0  $\mu\text{g/mL}$



高葡萄糖組 GvEx 100  $\mu\text{g/mL}$



高葡萄糖組 GvEx 200  $\mu\text{g/mL}$



高葡萄糖組 GvEx 400  $\mu\text{g/mL}$

附錄十一、番石榴葉萃取物添加量對高葡萄糖誘導胰島素阻抗 3T3-L1 脂肪細胞中油紅染色之影響

Appendix 11. Effect of guava leaves extract concentration on oil-red O in high-glucose-induced insulin resistance 3T3-L1 adipocytes.