

東海大學食品科學研究所

Graduate Institute of Food Science

TUNGHAI UNIVERSITY

食品科技組

Food Technology Section

碩士論文

Master thesis

指導教授：盧錫祺 博士

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

黃金銀耳於糖尿病大鼠模式肌肉中降血糖機制之探討

Studies on Mechanism of Anti-hyperglycemic Activity of

Tremella mesenterica Retz.:Fr. in Muscle of Diabetic Rats

研究生：賴惠蘭 撰

Graduate Student: Lai, Huei-Lan

中華民國九十九年一月

January, 2010

目錄

摘要.....	1
英文摘要.....	2
一、前言.....	3
1-1 黃金銀耳與其生理功效.....	3
1-2 糖尿病.....	4
1-3 肌肉組織與血糖恆定.....	6
1-4 胰島素傳訊.....	6
1-5 脂聯素傳訊.....	10
1-6 葡萄糖轉運.....	15
1-7 前驅實驗結果.....	16
1-8 研究目的.....	18
二、材料與方法.....	20
2-1 動物實驗.....	20
2-2 黃金銀耳子實體、人工菌株發酵菌絲體與純化多醣體製備.....	21
2-3 抽取 RNA.....	21
2-4 反轉錄.....	21
2-5 同步定量聚合酶連鎖反應.....	22
2-6 脂聯素酵素免疫連結分析.....	24
2-7 萃取肌肉細胞蛋白質.....	24
2-8 蛋白質定量.....	25
2-9 西方轉漬法.....	25
2-10 統計分析.....	28
三、結果.....	29
3-1 血清中脂聯素濃度.....	29
3-2 肌肉中脂聯素受體 (AdipoR1、AdipoR2) mRNA 相對表現量.....	31
3-3 肌肉中胰島素受體 (IR) 與胰島素受體基質 (IRS-1、IRS-2) mRNA 相對表現量.....	34
3-4 肌肉中胰島素傳訊分子的蛋白質相對表現量.....	38
3-5 肌肉中 AMP-activated protein kinase (AMPK) 蛋白質相對表現量.....	44
3-6 肌肉中葡萄糖轉運蛋白 (GLUT4) mRNA 與蛋白質相對表現量.....	46
四、討論.....	50
4-1 胰島素傳訊.....	50
4-2 脂聯素傳訊.....	52
4-3 總論.....	54
4-4 未來展望.....	57
附錄一、動物試驗的生化分析數據.....	58
附錄二、實驗中使用的化合物.....	61

附錄三、西方轉漬法結果底片.....	63
參考文獻.....	74

圖目錄

圖一、胰島素傳訊。.....	7
圖二、胰島素受體基質 (IRS) 蛋白質結構。.....	9
圖三、脂聯素的來源與結構。.....	12
圖四、脂聯素傳訊。.....	13
圖五、實驗架構。.....	18
圖六、大鼠於第 15 天血清中脂聯素的濃度。.....	29
圖七、脂聯素第一型受體的基因相對表現量。.....	32
圖八、脂聯素第二型受體的基因相對表現量。.....	33
圖九、胰島素受體的基因相對表現量。.....	34
圖十、胰島素受體基質 IRS-1 的基因相對表現量。.....	36
圖十一、胰島素受體基質 IRS-2 的基因相對表現量。.....	37
圖十二、細胞膜上胰島素受體的蛋白質相對表現量。.....	39
圖十三、胰島素受體基質 IRS-1 的蛋白質相對表現量。.....	41
圖十四、AKT 的蛋白質相對表現量。.....	43
圖十五、AMPK 的蛋白質相對表現量。.....	45
圖十六、第四型葡萄糖轉運蛋白的基因相對表現量。.....	46
圖十七、細胞膜上第四型葡萄糖轉運蛋白的蛋白質相對表現量。.....	48
圖十八、本研究結果之圖示。.....	56
附圖一、動物實驗設計流程。.....	58
附圖二：每週攝食量與飲水量。.....	58
附圖三：飯後兩小時血糖濃度。.....	59
附圖四：口服葡萄糖耐受測試(OGTT)。.....	59
附圖五：飯後 2 小時血清中胰島素濃度。.....	59
附圖六：OGTT 中血清胰島素濃度。.....	59
附圖七：胰臟中胰島素含量。.....	60

表目錄

表一、同步定量聚合酶連鎖反應中用於擴增肌肉基因的引子序列.....	23
表二、實驗中使用的抗體.....	27
附表一、黃金銀耳對大鼠血清中白蛋白、三酸甘油酯、BUN、GPT、葡萄糖胺濃度的影響	60

摘要

糖尿病是多種成因之代謝異常，由於潛藏的胰島素阻抗問題之未病群遠超過發病人數，如能於產生無可挽回的器官病變前有效改善高血糖狀態，將能大幅降低未來醫療照護負擔。於體內代謝血糖方面，肌肉為是周邊組織中最主要攝取葡萄糖的器官且也能感應體內血糖濃度的變化來消耗葡萄糖。關於血糖恆定之調控上，除了藉由胰島素傳訊外，由脂肪細胞所分泌的多種脂泌素如脂聯素(adiponectin)，亦具有調節胰島素敏感性的作用。黃金銀耳，是一種金黃色膠狀樣的可食用蘑菇，其子實體包含 20% 以上的酸性多醣體。於先前研究結果顯示，黃金銀耳可有效提升胰島素敏感度，且達到降血糖效用。推測黃金銀耳可能經由更有效率的胰島素傳訊或是經由其他傳訊，提高周邊組織的胰島素敏感性，達到血糖調降之目的。為了解黃金銀耳調控血糖的機制，本研究深入探討餵食黃金銀耳是否可活化胰島素與脂聯素傳訊路徑之傳訊分子。研究中使用酵素免疫連結法分析血清中脂聯素濃度，並利用反轉錄同步定量聚合酶連鎖反應於轉錄層次檢測基因表現量，另以西方轉漬法分析蛋白質之表現量。本研究中初步證實，餵食黃金銀耳能有效提高血清中脂聯素的分泌量，亦能提升骨骼肌中兩型脂聯素受體基因轉錄效率，以及增加脂聯素傳訊下游之 AMPK 蛋白質表現量，推論黃金銀耳可能透過增強骨骼肌中脂聯素傳訊進而調控血糖與提高胰島素敏感性。黃金銀耳之餵食雖對骨骼肌中胰島素受體的 mRNA 基因表現沒有影響，但於蛋白質表現上有顯著的提升；肌肉中第二型胰島素受體基質在餵食後雖沒有影響，但第一型胰島素受體基質無論於基因表現或蛋白質表現量上均受到提升；同時，Akt 蛋白質表現量亦顯著的增加。另外經黃金銀耳餵食後，第四型葡萄糖轉運蛋白基因轉錄效率與蛋白質表現均提高。推測黃金銀耳可能藉由增強肌肉細胞內胰島素與脂聯素傳訊，協同提高 GLUT4 表現與提高肌肉組織之胰島素敏感性，改善糖尿病大鼠模式中葡萄糖之代謝調控。

Abstract

Diabetes mellitus is the metabolic abnormality resulted from multiple causes, and the incidence of potent patients with insulin resistance is far more than that of the diabetes patients. It would be beneficial in reducing the cost of future medical care by improving the status of high blood sugar before irreversible organ lesions. Skeletal muscle is a major tissue for glucose consumption, and glucose uptake by the regulation of insulin. The regulation of blood sugar, in addition to insulin signaling, is also mediated by adiponectin, an adipokine secreted by adipocytes, and here by improve insulin sensitivity. *Tremella mesenterica*, a yellow brain jelly mushroom containing up to 20% of polysaccharide glucuronoxylomannan (GXM) in the fruiting bodies, is a edible, and medicinal mushroom. In the previous studies showed that *T. mesenterica* can effectively enhance the insulin sensitivity, and ameliorate hyperglycemia. It is deduced that *T. mesenterica* may improve insulin sensitivity through more effective insulin and adiponectin signalings, and thereby lead to a hypoglycemic effect. To clarify whether *T. mesenterica* could activate insulin and adiponectin signaling in the muscle, molecules involved in these two signalings pathway were investigated. Our results demonstrated that *T. mesenterica* increased the circulating adiponectin contents, the AdipoR1/AdipoR2 mRNA expression, and the AMPK protein expression. Adiponectin signaling might be enhanced in the muscle with *T. mesenterica* gavage. On the other hand, *T. mesenterica* enhanced the insulin receptor protein expression, improved IRS-1 mRNA expression and protein expression, increased the Akt protein expression, and enhanced insulin signaling in the muscle. In conclusion, the antidiabetic activity of *T. mesenterica* at least in part, is contributed by promoting GLUT4 expression and improving insulin sensitivity by strengthening insulin and adiponectin signaling.

一、前言

1-1 黃金銀耳與其生理功效

黃金銀耳，又稱黃花耳、金耳、膠耳等，因其形狀似人腦，亦稱為腦耳。黃金銀耳屬於擔子菌綱之銀耳科(*Tremalleceae*)，是一種可食用的黃色膠狀蘑菇，不但營養豐富，而且具有很高的保健和藥用價值，是一種珍貴的食、藥用菌(Reshetnikov et al., 2000)。外觀呈現獨特的橙黃色或金黃色，具有類似耳朵形狀的蘑菇，由子實體與菌絲體所組成。其子實體在腐木上單生或散生成似腦狀或重複花瓣形，大小為 1-5x1-4 公分(國立自然科學博物館，自然與人文數位博物館)；新鮮時呈現金黃色或橙黃色，乾後堅硬，浸泡後可恢復原狀；主要分布於中國的雲南、四川、湖南、甘肅。如同其他蕈菌產品，傳統天然的栽培方式耗時甚久，生產出來的子實體成份也因此難以掌控。現今多採用浸液培養(submerged culture)法，在控制條件下能更快速地由 *Tremella mesenterica* 生產成份穩定的子實體(De Baets et al., 2002; Khondkar et al., 2002; Reshetnikov et al., 2001)。根據《中國藥用真菌》記載，黃金銀耳性溫中帶寒，味甘，能化痰、止咳、定喘、調氣，平肝腸，主治肺熱、痰多，感冒咳嗽、氣喘、高血壓等(劉波，1978)；於食品以及天然藥材上具有廣泛藥用價值，例如刺激免疫、抗輻射、抗糖尿病，抗發炎、降血膽固醇、抗過敏等(Kiho et al., 1995; Khondkar et al., 2002; Vinogradov et al., 2004)。經實驗動物測試黃金銀耳具有降血糖之功效，故可作為糖尿病患者與其高危險族群的口服降血糖試劑或機能性食品(Lo et al., 2006)。而目前黃金銀耳的功能性成分以酸性多醣體 glucuronoxylomannan(GXM)的相關研究為主，黃金銀耳之 GXM 佔其子實體可達 20%。酸性多醣體由 1,3-linked α -D-mannose 為骨架，xylose 與 glucuronic acid 為支鏈而組成。研究證實其具有調節神經、荷爾蒙與免疫系統作用(Reshetnikov et al., 2000; Vinogradov et al., 2004)、調節類固醇生合成(Chen et al., 2006; Lo et al., 2005)、降血糖效果(Kiho et al., 1995, 2000, 2001; Lo et al., 2006)。

1-2 糖尿病

糖尿病(diabetes mellitus)，是一種多成因之代謝異常病變，其特徵為慢性及長期的血糖過高，身體組織細胞對醣類、脂肪及蛋白質的代謝均受到干擾，症狀包括吃多，喝多，尿多，體重減輕，疲倦和復發性感染。隨著生活水準不斷提高及飲食的精緻化，生活型態的改變與運動的缺乏，使得全球罹患糖尿病的比率快速增加(Amos, 1997; King 1998; Zimmet, 2000)；根據世界衛生組織的統計，目前全球已至少有 1.5 億人罹患糖尿病，預估到 2025 年，其罹患人數會增加一倍至 3 億人(Amos, 1997; King 1998; Zimmet, 2000)，其中大部分的患者可能是因為久坐的生活型態與肥胖而引發的第二型糖尿病病患(Zimmet, 1999)。國內近年來醫療水準的提升，轉為高齡化社會下，糖尿病盛行率持續攀升，死亡率更高居十大死因第四位，且有年輕化的趨勢(行政院衛生署 2006)。

糖尿病主要分成兩大類型，第一型為胰島素依賴型(Insulin-dependent diabetes mellitus, IDDM)、第二型為非胰島素依賴型(Non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM)。第一型糖尿病導因為自體免疫攻擊或遺傳缺陷導致胰島素分泌不足或缺乏。患者需要注射外源性的胰島素來控制體內的血糖以維持生命(Radermecker et al., 2003; Weintrob et al., 2004)。第二型糖尿病佔整體糖尿病人數的九成以上，最主要的原因即為胰島素阻抗與胰島素分泌異常。當體內肝臟、肌肉、脂肪等周邊組織對於胰島素的調控失去反應能力，無法正常吸收及代謝葡萄糖，稱為胰島素阻抗(insulin resistance)；胰島素是體內控制血糖恆定的重要激素，可以刺激細胞生長、分化及提升因脂肪、肝醣、蛋白質等合成作用所產生的養分於脂肪細胞、肝臟及肌肉組織中的儲存能力。但在胰島素阻抗的狀態，胰島素因無法使細胞攝入葡萄糖，長期的高血糖伴隨醣類、脂質與蛋白質代謝失調產生胰島素阻抗症候群(insulin resistance syndrome)，導致肥胖、高血壓、葡萄糖耐受性缺失、血脂異常等，長久下來會造成視網膜、腎、周邊與自律神經等病變及血管疾病(高血壓、心血管疾病、中風)等嚴重的併發症(Bate et al., 2003; Brownlee, 2005; Chelliah et al., 2004; Sudha, 2006)。十大死因中的腦血管疾病、心臟病疾病及高血壓

等，都與糖尿病息息相關。

胰島素阻抗是第二型糖尿病最早出現且一直持續的病徵(Kahn, 2003)，其主要成因可分成兩大類，基因易感受性(Genetic susceptibility)與環境因素(Environmental factors)，基因易感受性是指代謝酵素以及胰島素訊息傳遞分子的基因表現程度改變；而環境因素是包括飲食的組成及數量、不適當的運動量與生活習慣(促成肥胖)、年齡、壓力等(Zierath et al., 2000; Saltiel et al., 2001)；因而造成體內必須分泌較高胰島素濃度以達到正常的體內代謝反應或是一般正常的胰島素濃度無法完成正常代謝反應導致高血糖症狀(Elisabetta et al., 2005)。胰島素阻抗更是胰島素阻抗症候群(又稱代謝症候群，包括第二型糖尿病、心血管疾病、脂肪肝等)的致病因子，所以想要預防胰島素阻抗症候群，必須從防治高血糖著手。目前診斷糖尿病最有效的兩個方法為空腹血糖測試(Fasting Plasma Glucose Test, FPG)與口服葡萄糖耐受性測試(Oral Glucose Tolerance Test, OGTT) (American Diabetes Association, 2005)。測試時，空腹血糖值高於 126 mg/dl 或是口服葡萄糖耐受性測試 2 小時後的血糖值高於 200 mg/dl，即診斷為患有糖尿病。而血糖值介於正常人與糖尿病患者間(FPG, 100~125 mg/dl；OGTT, 140~199 mg/dl)，其為糖尿病的高危險群(pre-diabetes)。據估計這些潛在患者的人數可能遠多於糖尿病患者的人數，在此時多數的糖尿病併發症也慢慢的形成，但並沒有明顯的病徵，若能有效控制血糖將能降低罹患糖尿病及其併發症的風險(Zimmet, 1999)。

目前糖尿病的治療方法有三種，運動、飲食及藥物。有學者研究改變生活型態與藥物治療的治療效果，結果發現改變生活型態(改變飲食與運動)所帶來的治療成效較藥物治療有效(Larkin, 2001)；且藥物治療會對患者產生不同的副作用，例如低血糖或腹瀉等。所以目前糖尿病的治療仍以飲食控制、運動、減肥等非藥物治療為主，但仍需藉由藥物的幫助才能達到適度的血糖調控(Cheng and Fantus, 2005)。近年來針對調節血糖的保健食品不斷推陳出新，尋求無副作用的天然物質取代藥物的治療，來提高胰島素的敏感性，以期能夠避免糖尿病、延緩糖尿病的病程，或是更有效的控制血糖降低併發症發生的機率，將是現今研究努力的重

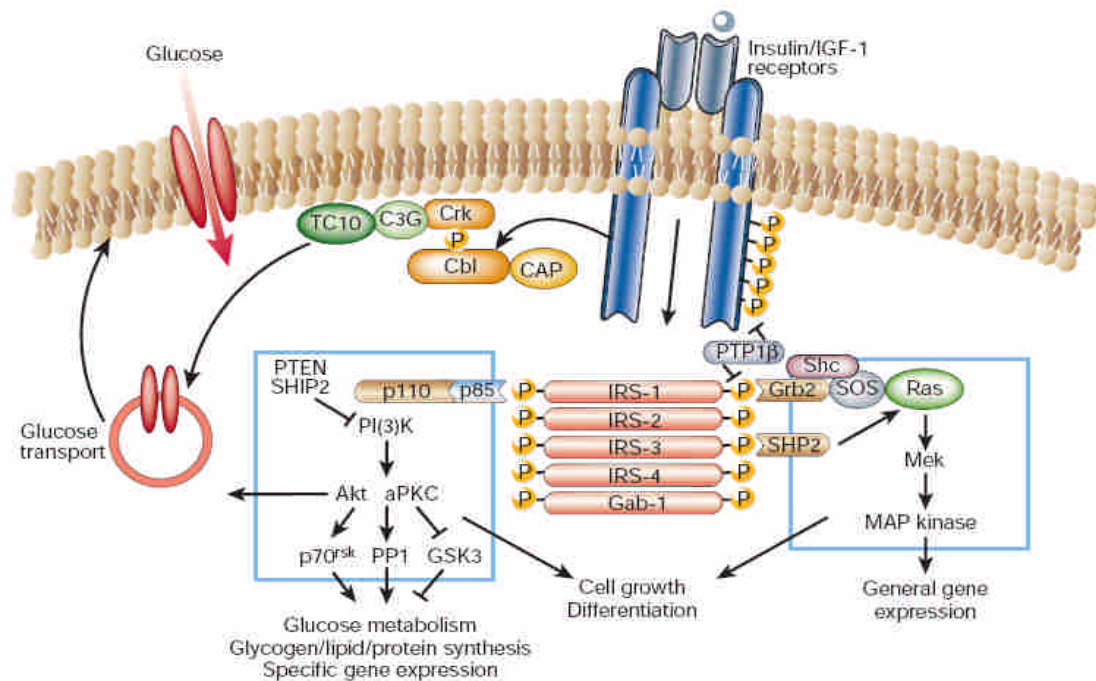
要方向。

1-3 肌肉組織與血糖恆定

體內的血糖恆定必須依賴胰臟 β 細胞分泌胰島素使內臟與肌肉等周邊組織攝入葡萄糖，並且抑制肝臟葡萄糖的產出。肌肉是周邊組織中最主要攝取葡萄糖的器官，且也能感應體內血糖濃度的變化來消耗葡萄糖。研究顯示，攝取的葡萄糖約有70~90%是由肌肉組織消耗，且在第二型糖尿病中肌肉也是第一個出現胰島素阻抗的器官(Martin et al., 1992; Zierath et al., 2000; Zierath et al., 2002; Zierath and Kawano, 2003)，由此可知肌肉在代謝上扮演著重要的角色。若肌肉攝取葡萄糖的機制無法正常運作，也會影響到受胰島素調控的周邊組織對於葡萄糖的攝入(Ryder et al., 2001; Zierath et al., 2000)，因此肌肉的胰島素阻抗被認為是導致全身葡萄糖代謝失常的重要因子，更是引發第二型糖尿病發生的病因(Ryder et al., 2001; Zierath and Kawano, 2003)。胰島素對於肌肉組織中葡萄糖轉運或其他代謝作用的影響，均必須藉由細胞內的傳訊路徑來達成。糖尿病患的研究中也證實，若肌肉中胰島素傳訊受損會造成胰島素刺激下的葡萄糖轉運速率降低(Ryder et al., 2001)。故肌肉組織的胰島素傳遞路徑中任何關鍵性分子，若其功能受損、表現量降低等影響其傳訊效果，均可能形成第二型糖尿病。

1-4 胰島素傳訊

胰島素透過傳訊分子相互作用，調控細胞中繁雜的代謝及生長反應，不只會增加蛋白質、脂質的合成，更能透過增加肌肉與脂肪組織攝入葡萄糖、抑制肝臟糖質新生、促進肝醣合成、抑制肝醣分解等作用來維持血糖的恆定(Saltiel and Kahn, 2001)(圖一)。胰島素訊息傳遞的觸發是開始於血液中的胰島素與細胞膜上胰島素受體(insulin receptor, IR)結合，然後胰島素受體啟動自體磷酸化，接著促使胰島素受體基質(IRS)家族、PI(3)K、PIP3-dependent protein kinase等下游傳遞訊息分子磷酸化活化，調控將葡萄糖攝入細胞中轉為肝醣、蛋白質、脂質等巨



圖一、胰島素傳訊。

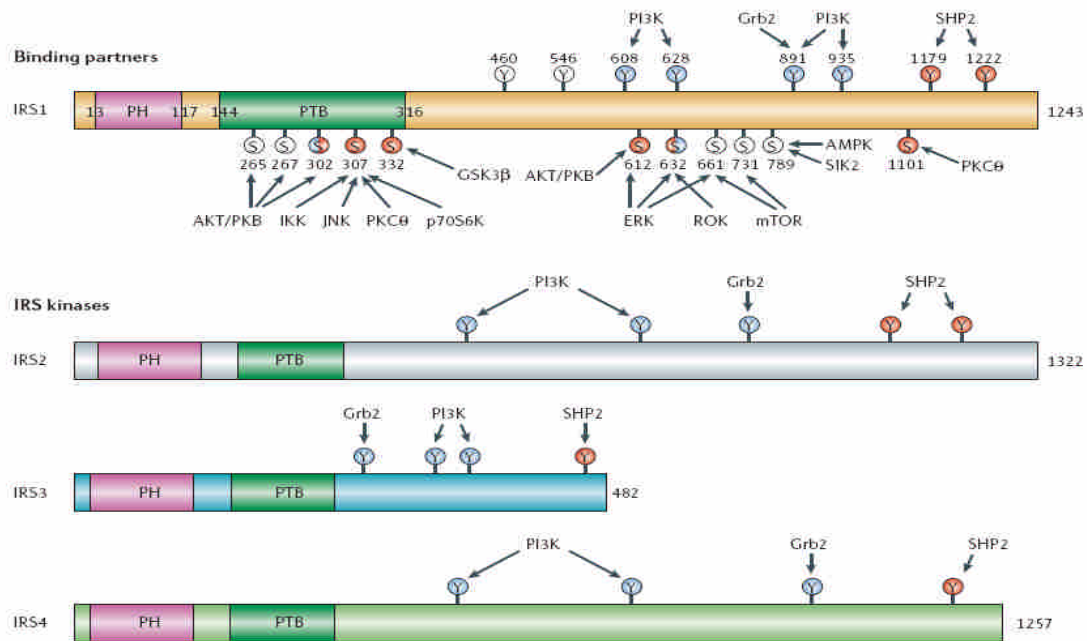
胰島素受體為酪胺酸磷酸化激酶，當胰島素與其結合後會啟動自體磷酸化，而後促使多種細胞內蛋白質的磷酸化，例如胰島素受體基質 (IRS) 家族、Shc 與 Cbl。於酪胺酸磷酸化後，這些蛋白質會透過 SH2 區域與傳訊分子結合，然後開啟一連串多變的訊息傳遞。包括活化 PI(3)K、PIP3-dependent protein kinase、ras 與 MAPK 傳訊路徑、Cbl/CAP 與活化 TC10。這些傳訊路徑會一起交互作用來調控葡萄糖轉運蛋白的轉位、蛋白質的合成、酵素的活化與去活化，以及基因的表現，進而調節葡萄糖、脂質與蛋白質代謝(Saltiel and Kahn, 2001)。

分子儲存之代謝作用(Saltiel and Kahn, 2001)。

胰島素受體是屬於 protein-tyrosine kinase (PTK) 家族的成員，是一種具酵素活性的雙聚合體，多肽鏈以雙硫鍵方式結合，每個多肽含有 α 次單元體 (extracellular domain) 與 β 次單元體 (transmembrane 及 intracellular domain)，其中 β 次單元體具有內在酪胺酸激酶 (tyrosine kinase) 活性。胰島素受體藉由胞外 α 次單元體與血液中的胰島素結合，進而促使 β 次單元體自體磷酸化，活化受體 β 次單元體上的酪胺酸激酶活性後 (Ablooglu and Kohanski, 2001; Baron et al., 1992;

Kasuga et al., 1982; Patti and Kahn, 1998)依序活化胞內 10 個以上的受質，如胰島素受體基質(insulin receptor substrate)家族、Shc 與 Cbl (Pessin and Saltiel, 2000; White, 1998)。研究證實，胰島素受體若無正常運作時，會導致整個傳訊路徑產生胰島素阻抗，因而引發肥胖、第二型糖尿病，甚至是死亡(Accili et al., 1996)。IRS-1、IRS-2、IRS-3 與 IRS-4 等 4 個屬於胰島素受體基質家族，其分子量介於 60kDa 至 180kDa 之間。胰島素受體基質家族皆含有一個 PH 區域 (pleckstrin-homology domain)、一個磷酸化酪胺酸結合區(phosphotyrosine-binding domain, PTB domain)，以及數個酪胺酸與絲胺酸磷酸化位，其中數個酪胺酸磷酸化位即為可接受胰島素受質酪胺酸激酶的磷酸化(圖二)。胰島素受體基質家族廣泛分布於不同的組織中，其分布量與所在位置也會隨著其不同組織而改變(Fantin et al., 1999; Inoue et al., 1998; Kaburagi et al., 2001; Kabuta et al., 2002; Lassak et al., 2002; Sciacchitano and Taylor, 1997; Taniguchi et al., 2006)。

胰島素受體基質家族中，IRS-1 與 IRS-2 是肌肉中參與胰島素作用主要的 2 個異構型(Zierath et al., 2000)，也有研究顯示此 2 個異構型為胰島素受體基質家族中主要參與調控醣類代謝的(White, 2002)。由基因剔除與基因轉殖等實驗證明，體內缺乏 IRS-1 會造成葡萄糖耐受性缺失，血漿中的三酸甘油脂增加，高血壓(Abe et al., 1998)，以及周邊組織尤其是肌肉與脂肪產生胰島素阻抗(Araki et al., 1994; Tamemoto et al., 1994; Yamauchi et al., 1996)。缺乏 IRS-2 則會導致肝臟胰島素阻抗與胰臟 β 細胞受損(Kubota et al., 2000; Previs et al., 2000; Withers et al., 1998)，以及特定影響胰島、腦、視網膜等組織(Saltiel and Kahn, 2001)。可以注意到的是當 IRS-1 基因剔除或表現量降低時主要會造成肌肉中的胰島素阻抗，降低第四型葡萄糖轉運蛋白 (GLUT4) 轉位，進而減少肌肉的葡萄糖攝入 (Araki et al., 1994; Huang et al., 2005; Yamauchi et al., 1996)。而 IRS-2 主要藉由活化 MAPK 來調控肝臟的脂質代謝，且在肌肉組織中，不論是由胰島素或是運動刺激均不影響其葡萄糖攝入(Higaki et al., 1999; Huang et al., 2005; Thirone et al., 2006)。因此，



圖二、胰島素受體基質 (IRS) 蛋白質結構。

胰島素受體基質家族中的 IRS-1、IRS-2、IRS-3 與 IRS-4 是四個異構物，其結構均具有一個 PH 區域 (pleckstrin-homology domain)、一個磷酸化酪胺酸結合區(phosphotyrosine-binding domain, PTB domain)，以及數個酪胺酸(Y)與絲胺酸(S)磷酸化位。圖上標示了被胰島素受體磷酸化的酪胺酸位置與結合到其下游的傳訊分子，同時也標示出絲胺酸磷酸化位置與其磷酸化的激酶 (Taniguchi et al., 2006)。

胰島素受體基質家族中主要是由 IRS-1 來調控肌肉中葡萄糖轉運與代謝的調控。雖在肝臟中 IRS-1 與 IRS-2 互有補償作用，但在肌肉中功能卻各不相同 (Taniguchi et al., 2005; Thirone et al., 2006)。

胰島素受體基質活化後，會提供具有 SH2 基團的分子如 PI3K 結合之 docking site 進而活化下游 PI3K/Akt 與 MAPK 兩個主要的傳訊路徑。其中 PI3K/Akt 路徑參與大多數由胰島素引起的代謝調控，包括蛋白質、脂質、肝醣合成，葡萄糖代謝，基因表現與細胞增生等 (Saltiel and Kahn, 2001)。PI3K(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3 kinase)包含 p85 調控單位與 p110 活性單位(Biddinger and Kahn, 2006; Saltiel and Kahn, 2001)，在肝醣、脂質、蛋白質合成等胰島素介導之代謝調控扮

演著重要的角色。PI3K 受到活化後，會活化下游的磷酸化激酶(serine/threonine kinase)，也稱為 protein kinase B (PKB)的 Akt。Akt 依 PH domain 結構的差異區分為三種異構型：Akt1、Akt2、Akt3，各具不同的分佈與功能；Akt1 遍佈於各個器官，Akt2 分布於胰臟 β 細胞、肌肉與褐色脂肪組織。Akt 可藉由磷酸化 glucogen synthase kinase-3 (GSK3) 抑制其活性，因而提高 glycogen synthase 活性，增加肝醣的合成；也可透過磷酸化轉錄因子 FOXO-1，抑制糖質新生速率限制步驟中的關鍵酵素 phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) 基因的轉錄，降低肝臟葡萄糖的產出，維持血糖的恆定(Schinner et al., 2005)；另外亦透過磷酸化抑制 AS160 (Akt substrate of 160 kDa)，增加 GLUT4 的轉位(Nakae et al., 2001; Saltiel and Kahn, 2001)。經由基因剔除實驗證實，Akt1 的缺失雖會影響生長，但不影響葡萄糖的體內平衡(Cho et al., 2001a)；相似的是 Akt3 的基因剔除實驗顯示其會影響大腦的大小，但亦不影響葡萄糖的代謝(Easton et al., 2005)。而 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(Cho et al., 2001b)。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(Cho et al., 2001b)，而 Akt1 與 Akt3 則是次要的(Cho et al., 2001a)。

胰島素傳訊途徑中，任一傳訊分子其基因表現量或活性的減少都會造成肌肉組織的葡萄糖轉運降低，造成胰島素阻抗。由上敘可知，胰島素受質、IRS-1/2 與 Akt 作用異常，會引發胰島素阻抗、影響葡萄糖的代謝等，因此本實驗將針對胰島素傳訊中 IR/IRS 與 Akt 這兩個重要的節點(node)，探討肌肉中胰島素傳訊的調控(Taniguchi et al., 2006)。

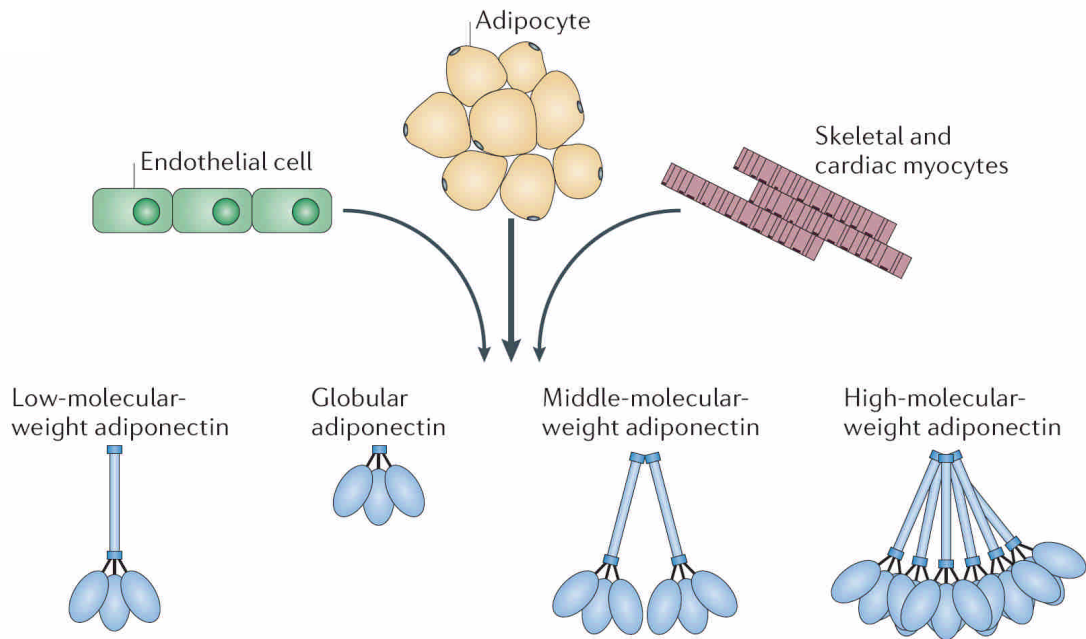
1-5 脂聯素傳訊

近年來發現第二型糖尿病所伴隨的周邊組織胰島素阻抗，脂肪也涉及其中，因此脂肪組織在胰島素阻抗及第二型糖尿病的形成中所扮演的角色逐漸的成為現今研究的重點。目前已由實驗了解，脂肪組織不只能儲存能量，更是重要的內

分泌器官，藉由分泌多種脂泌素 (adipokine) 調控全身代謝作用。脂泌素是一種細胞激素(cytokines)，主要由脂肪組織製造，但也可能由其他組織製造；透過傳訊間接或直接影響周邊組織的胰島素敏感性，並經影響參與葡萄糖與脂質代謝的分子而調控血糖恆定(Kershaw and Flier, 2004; Schinner et al., 2005)。

脂聯素(adiponectin)也稱為 Acrp30、apM1、GBP28 或是 adipoQ，是一個由 244 個胺基酸所組成的多肽，分子量約 30 kDa，主要由脂肪細胞所分泌，其他如骨骼肌、心肌以及內皮細胞也會分泌此激素 (Diez and Iglesias, 2003; Delaigle et al., 2004; Pineiro et al., 2005; Wolf et al., 2006)。脂聯素可分為球狀脂聯素(globular adiponectin)及全長脂聯素(full-length adiponectin)，其中全長脂聯素又因分子量不同分成低分子量(low-molecular-weight)、中分子量(middle-molecular-weight)、高分子量(high-molecular-weight)三種(Tilg and Moschen, 2006)(圖三)。高分子量與低分子量脂聯素經實驗證實與胰島素敏感性相關(Pajvani et al., 2004)，而中分子量脂聯素的作用為調控血漿中高分子量與低分子脂聯素的比例(Bobbert et al., 2005)。脂聯素在脂肪細胞中高度表現，大量存在人類血漿中，佔血漿總蛋白質中的 0.01 % (5-10 mg/ml)，為血漿中第三大量的荷爾蒙，具有抗發炎、抗動脈硬化與增強胰島素敏感性等生理活性，在最近的研究中備受矚目 (Diez and Iglesias, 2003)。

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的減少(Arita et al., 1999; Diez and Iglesias, 2003; Erding et al., 1996; Hug and Lodish, 2005; Kadowaki et al., 2006; Matsuzawa, 2006; Scherer, 2006)。以及肥胖所引起的胰島素阻抗是因為其脂聯素減少而導致，且若對此狀態補充脂聯素則可改善胰島素阻抗的情形(Berg et al., 2001; Fruebis et al., 2001; Yamauchi et al., 2001)。亦有研究指出當胰島素敏感性提高與體重減少時，會使脂聯素的合成增加(Milan et al., 2002; Yang et al., 2001)。在肌肉組織中，脂聯素可降低三酸甘油酯含量並且提升由胰島素刺激帶來的胰島素受體及胰島素受體基質酪胺酸磷酸化與 Akt 磷酸化反應(Yamauchi et al., 2001)；脂聯素也可藉由活化 AMP- activated



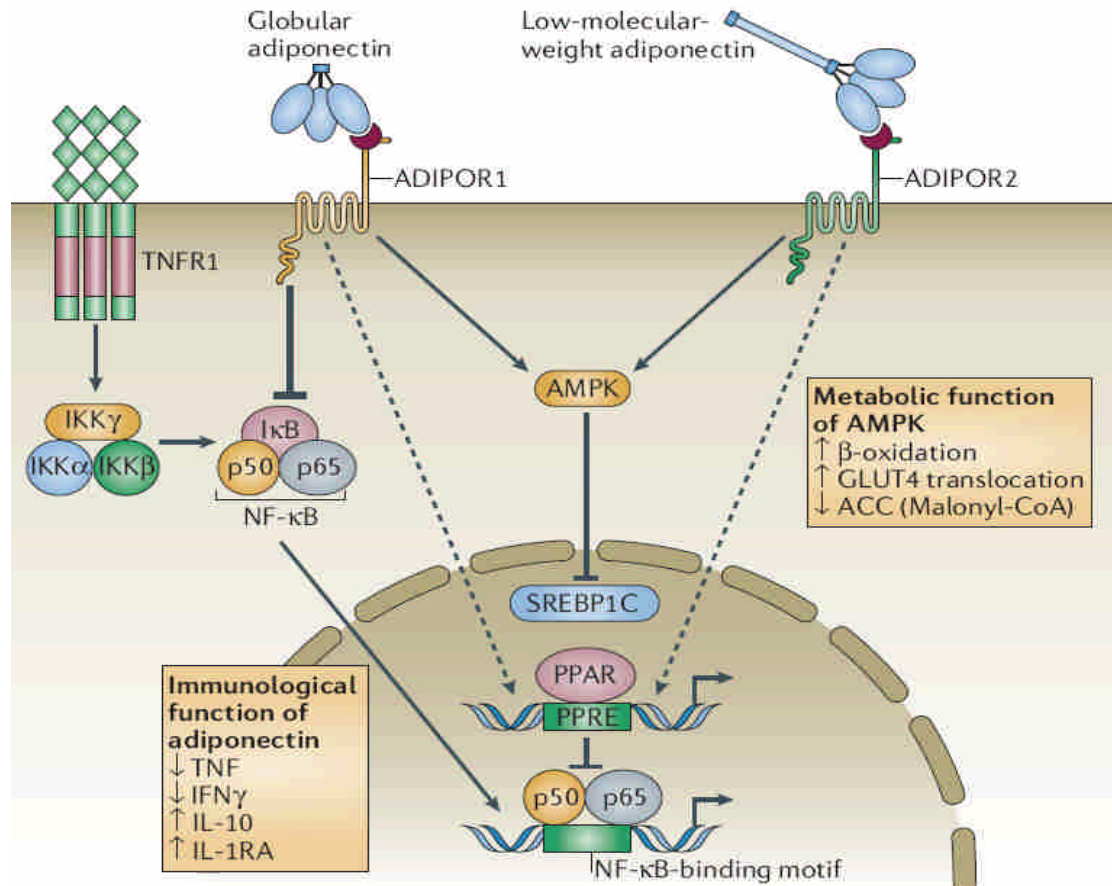
圖三、脂聯素的來源與結構。

脂聯素主要是由脂肪細胞所產生，但其他細胞，如骨骼肌、心肌與血管內皮細胞亦可生產這種脂肪激素。脂聯素存在的型式有全長式的三聚體(低分子量脂聯素)，以及球狀脂聯素；而全長式的三聚體可二聚化形成六聚體的形式(中分子量脂聯素)，而此六聚體在聚合化後可形成聚合物(高分子量脂聯素)(Tilg and Moschen, 2006)。

protein kinase (AMPK)來調控葡萄糖代謝與胰島素敏感性(Yamauchi et al., 2002)；另外亦發現脂聯素的濃度與血糖、胰島素、三酸甘油酯、身體質量指數呈反比；而與高密度脂蛋白、胰島素刺激下的葡萄糖處理呈正比。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的發生相關，顯示脂聯素在代謝上與胰島素阻抗形成過程中的重要性 (Diez and Iglesias, 2003)。目前已進一步的證實脂聯素對於胰島素敏感性的調控主要是透過，抑制糖質新生作用、活化 AMPK 與過氧化小體增生物活化接受器(peroxisome proliferator activated receptor alpha, PPAR α)來刺激脂肪酸氧化(Yamauchi et al.,2007)。

脂聯素主要透過兩個受體，第一型脂聯素受體(Adiponectin receptor 1，

AdipoR1)與第二型脂聯素受體(Adiponectin receptor 2, AdipoR2)，於細胞內透過包含 AMPK 與 PPAR α 的傳訊路徑調控周邊組織脂質與葡萄糖的代謝 (Kadowaki and Yamauchi, 2005; Yamauchi et al., 2002; Yamauchi et al., 2007) (圖四)。其中 AdipoR1 主要是對應球狀脂聯素，其廣泛存在於各組織，而大量表現於肌肉組織；AdipoR2 則對應兩種形式脂聯素，主要表現於肝臟 (Kadowaki et al., 2006;



圖四、脂聯素傳訊。

脂聯素與細胞上兩型受體 AdipoR1、AdipoR2 作用。脂聯素活化其兩型受體後，於細胞內刺激 PPAR α 、AMPK 與 p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK)。脂聯素調控數個促發炎與抗發炎細胞激素。縮寫：ACC, acetyl-CoA carboxylase；GLUT4, glucose transporter type 4；IKK, inhibitor of nuclear factor- κ B (I κ B) kinase；NF- κ B, nuclear factor- κ B；PPRE, peroxisome-proliferator response element；SREBP1C, sterol-regulatoryelement-binding protein 1C；TNFR, TNF(tumor necrosis factor) receptor (Tilg and Moschen, 2006)。

Yamauchi et al., 2003)。在具胰島素阻抗的 ob/ob 小鼠中，其肌肉與脂肪組織中 AdipoR1 與 AdipoR2 的基因表現量均有顯著的下降，推測 ob/ob 小鼠由於脂聯素受體表現量受到抑制而造成周邊組織的脂聯素阻抗 (Tsuchida et al., 2004)。因此肥胖除了會造成血漿中脂聯素濃度降低，同時也會降低脂聯素受體的表現量，減低脂聯素敏感性，最後導致胰島素阻抗。胰島素阻抗隨後又將引發高胰島素的狀態，且降低脂聯素受體表現量，形成惡性循環 (Kadowaki and Yamauchi, 2005; Tsuchida et al., 2004)。而脂聯素與其受體的傳訊路徑已在 2007 年 Yamauchi 等人進一步的研究證實，脂聯素透過 AdipoR1 活化 AMPK 與 AdipoR2 活化 PPAR α 來達到提高 GLUT4 轉位與葡萄糖攝入、脂肪酸攝入與氧化等作用調控胰島素敏感性(Yamauchi et al., 2007)。其中與本實驗探討之葡萄糖代謝相關者為 GLUT4 轉位與 AMPK 活化。

AMPK 是一個三聚體，由一個 α 催化次單元與 β 、 γ 兩個調控次單元所組成，被視為對代謝壓力的感應分子，對於主要調節能量恆定的組織發揮其管制作用，包含葡萄糖攝入、脂肪酸氧化、脂質與三酸甘油酯合成、脂肪細胞進行之脂肪分解、糖解反應等。AMPK 會因細胞內 AMP/ATP 比例升高或 Thr172 磷酸化而活化，活化後磷酸化下游基質啟動產生能量的路徑，如增加葡萄糖攝入與脂質氧化等，並關閉消耗能量的路徑，包含合成葡萄糖與脂質等，進而達成回復能量平衡 (Carling, 2004; Long and Zierath, 2006)。其中 Thr172 磷酸化為 AMPK 活化所必需，其磷酸化的程度與 AMPK 活性成正比(Carling, 2004)。抑制 AMPK 活性會造成胰島素敏感性受損，而脂泌素、運動與糖尿病治療藥物等使胰島素敏感性提高，亦能活化 AMPK，顯示其於抗糖尿病作用中的重要性 (Carling, 2004; Long and Zierath, 2006; Yamauchi et al., 2002)。研究顯示若 AMPK 突變後，會抑制脂聯素所進行的葡萄糖攝入、脂肪酸氧化等調控代謝作用(Yamauchi et al., 2002)，由此可知肌肉中脂聯素增加葡萄糖攝入的作用主要透過 AMPK 的活化，藉此脂聯素將經由與胰島素傳訊相互獨立的路徑，增加 GLUT4 的轉位與蛋白質表現量，並提高葡萄糖的攝入與氧化，因此增加葡萄糖的利用率而調降血糖(Long and

Zierath, 2006; Yamauchi et al., 2002; Yamauchi et al., 2003)。另一方面，AMPK 的活化將抑制 acetyl-CoA carboxylase 酵素活性，增加脂肪酸氧化，並抑制脂肪酸合成，降低肌肉中三酸甘油脂的含量，進而增加肌肉組織的胰島素敏感性 (Yamauchi et al., 2002)。肝臟組織中，脂聯素則透過刺激 AMPK 活化降低糖質新生過程中關鍵酵素 phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)與 glucose-6-phosphatase (G6Pase)基因表現量，抑制肝臟葡萄糖的產出(Lochhead et al., 2000; Yamauchi et al., 2002)。無論在主要調控血糖的肌肉或肝臟組織中，脂聯素、兩型脂聯素受體與 AMPK，均具有其重要性，因此也被視為目前第二型糖尿病治療方向之一。

1-6 葡萄糖轉運

具極性之葡萄糖進出肝臟、肌肉與脂肪細胞胞膜時，主要透過具有轉運功能之專一性轉運蛋白(Glucose transporters; GLUTs)。GLUTs 在不同的組織有不同形式，其家族在哺乳類目前至少已發現 13 種成員(isoforms) (Joost et al., 2002)，而肌肉中以 GLUT1 (glucose transporter 1)與 GLUT4 (glucose transporter 4)為其主要的葡萄糖轉運蛋白異構型。GLUT1 廣泛存於各組織中，於細胞膜上恆定表現，介導基礎葡萄糖轉運，在受到胰島素調控葡萄糖轉運的組織中屬於次要的葡萄糖轉運角色(Herman and Kahn, 2006)；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，其於細胞中的轉位與基因表現均受到調控(Herman and Kahn, 2006; Huang and Czech, 2007)。

正常狀況下，超過九成的 GLUT4 會儲存於細胞質的小泡內，當受到胰島素或肌肉收縮、脂聯素等刺激後便會轉位至細胞膜上，將葡萄糖帶入細胞中(Douen et al., 1990; Ryder et al., 2001; Thong et al., 2005)。胰島素透過增加 GLUT4 的轉位，並且也增加細胞膜上 GLUT4 的活性，來促使葡萄糖攝入量達到最大(Furtado et al., 2002)。雖然 GLUT4 轉位至細胞膜攝入葡萄糖之機制還無法完全明瞭，但已知與胰島素及脂聯素傳訊路徑確切相關(Thong et al., 2005)。

由全身性與肌肉 GLUT4 基因剔除的實驗結果中證實，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(Kim et al., 2001; Minokoshi et al., 2003; Zisman et al., 2000)；而若增加 GLUT4 表現量，可促進胰島素刺激的葡萄糖攝取作用，改善葡萄糖耐受性與胰島素敏感性(Leturque et al., 1996; Tsao et al., 1996)。由以上的結果中顯示，GLUT4 對葡萄糖與脂質代謝具有重要的影響。因此，無論是提高全身或肌肉中 GLUT4 的基因表現量或是使其轉位增加，均能增加胰島素的敏感性與周邊葡萄糖利用率，以維持血糖的恆定。

1-7 前驅實驗結果

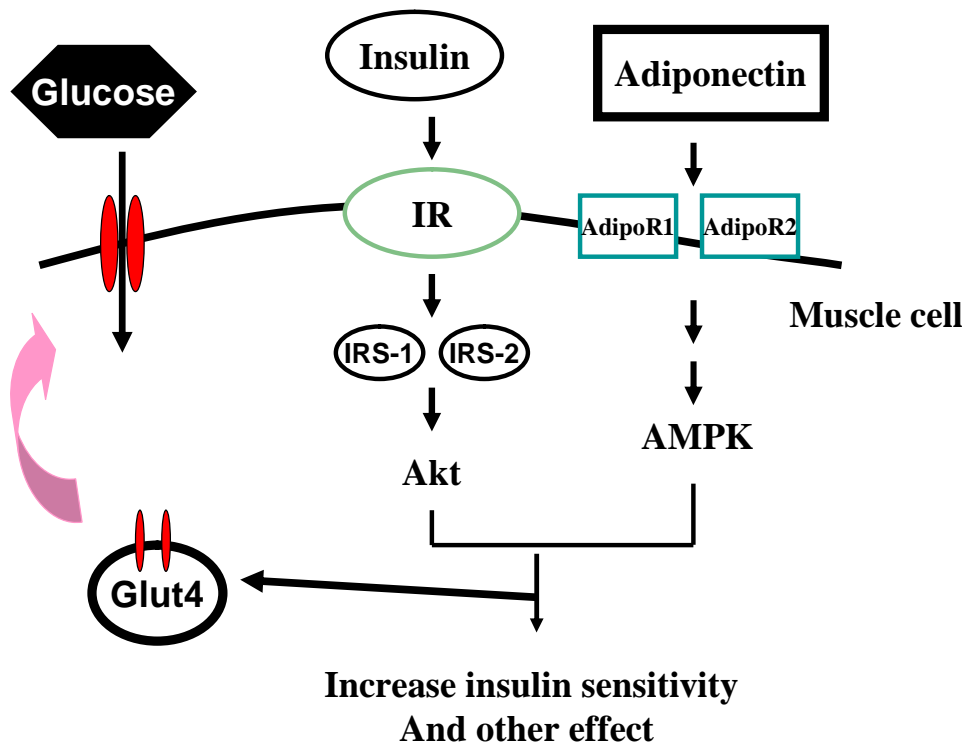
本實驗所分析之動物檢體來自於羅等人(Lo et al., 2006)之研究。實驗中分成正常模式以及使用以 streptozotocin (STZ)與 nicotinamide (NT)誘發的葡萄糖耐受異常大鼠動物模式(行政院衛生署健康食品之調節血糖功能評估方法)皆給予餵食黃金銀耳子實體(FB)、黃金銀耳人工菌株發酵菌絲體(CM)與由黃金銀耳純化之多醣體(GXM)來觀察其降血糖功效；實驗中加入正常模式下餵食黃金銀耳，主要是為了觀察非病態高血糖情況下黃金銀耳的保健功效。於其研究指出正常模式下，經餵食黃金銀耳後，並未改變其飼料與飲水攝取、體重，以及血液學分析數值(附圖二 a、附圖四 a、附圖五 a、附圖六 a、附表一)。而分析飯後血糖與血液中胰島素含量發現，餵食黃金銀耳後會明顯降低其胰島素分泌量，且不影響其血糖恆定能力，暗示黃金銀耳可提升胰島素敏感性(附圖三 a、附圖七 a)。另外葡萄糖耐受異常模式的大鼠如無服用黃金銀耳，其飲食與飲水量均有明顯增加，服用黃金銀耳不論是子實體、菌絲體或純化多醣體均能有效改善而回復接近正常(附圖二 b)。飯後血糖值方面，餵食黃金銀耳可顯著改善其高血糖狀況，使回復正常(附圖三 b)；經口服葡萄糖實驗，服用黃金銀耳能使高血糖狀況較快回復，顯示其可改善葡萄糖耐受性(附圖四 b)。而飯後或是口服葡萄糖實驗中，雖葡萄糖耐受異常模式其血清胰島素濃度皆顯著減少，黃金銀耳之餵食可回復部分胰島

素含量(附圖五 b、附圖六 b)。胰臟中胰島素含量方面，葡萄糖耐受異常模式僅有正常模式 20~40%，經餵食黃金銀耳後雖有些微回復卻無顯著差異；餵食黃金銀耳可回復葡萄糖耐受異常模式中的三酸甘油酯與葡萄糖胺(附表一)。

由餵食黃金銀耳後不論是飯後血糖、葡萄糖耐受、三酸甘油酯與果糖胺皆回復正常等特性，可看出黃金銀耳具有降血糖與降血脂活性。而由餵食純化多醣體之結果可發現，黃金銀耳的降血糖效果的確與其多醣體成份相關。因此推測，黃金銀耳的降血糖活性與改善糖尿病症狀的作用，並非透過提高胰島素分泌量，而可能是藉由提升周邊組織對於胰島素的敏感性，增強細胞中胰島素傳訊，促使細胞增加葡萄糖的攝入與利用，藉此以達到降低血糖維持血糖調控的效用。另外，由先前冬蟲夏草之結果，可預期黃金銀耳調控血糖亦將與脂聯素等調節胰島素敏感性機制有關，因此脂聯素傳訊亦將納入分析。推測黃金銀耳可能透過增強肌肉細胞內胰島素與脂聯素傳訊，協同提高 GLUT4 之轉位與胰島素敏感性，改善葡萄糖耐受異常大鼠模式肌肉中葡萄糖之代謝調控。

1-8 研究目的

本研究主要目的在於更進一步的了解黃金銀耳在肌肉組織中對血糖的調控機制。本實驗中除了探討黃金銀耳其調控血糖的機制，亦比較天然黃金銀耳子實體與人工發酵黃金銀耳發酵菌絲體其來源不同是否會影響其生理功效，另外加入黃金銀耳酸性多醣體組別，欲了解多醣體是否為黃金銀耳具降血糖的主要原因；實驗中鎖定胰島素傳訊與脂聯素傳訊路徑中的數個與調控葡萄糖代謝有關的關鍵分子(圖五)，測量其 mRNA 與蛋白質表現量，探討黃金銀耳的餵食是否藉由這兩條傳訊路徑的活化，進而增加葡萄糖轉運蛋白的表現與胰島素敏感性，促使肌肉組織的葡萄糖攝入提高，以達到降血糖的目的。



圖五、實驗架構。

本實驗中假設，餵食黃金銀耳在肌肉中透過活化胰島素傳訊與脂聯素傳訊，增加第四型葡萄糖轉運蛋白 (GLUT4) 之表現與胰島素敏感性。鎖定數個與葡萄糖代謝極為相關的分子，分析其 mRNA 與蛋白質表現量，以及分析葡萄糖轉運蛋白的表現量，探討黃金銀耳是否透過這兩條傳

訊路徑，增加胰島素敏感性與促使肌肉組織的葡萄糖攝入量提高，達到降血糖的效果。

二、材料與方法

2-1 動物實驗(Lo et al., 2006)

實驗中使用的雄性 Wistar 大鼠採購自台灣大學實驗動物中心(Animal Center of Taiwan University, Taiwan)體重約 200 g，個別飼養在不銹鋼的金屬籠子裡，從早上九點到下午五點無限制的供給飼料(AIN-76, ICN Biomedicals, USA)及飲水，環境溫度控制在 22°C，晝夜循環各 12 小時。其中飼料的組成成份為 21 % 蛋白質、67.4 % 碳水化合物與 11.6 % 脂質。等大鼠適應一週後，會禁食一晚，待實驗動物隨機分成兩大組，分別是 CON 及 STZ+NT。控制組(CON group)在腹腔與尾部注射生理食鹽水；而 STZ+NT 組先從腹腔注射 200 mg/kg nicotinamide (Sigma Chemical Co., USA) (溶解於生理食鹽水中)，15 分鐘後再由尾部靜脈注射 65 mg/kg streptozotocin (Sigma Chemical Co., USA) (溶解於 0.01 M pH 4.5 的 citric saline buffer)，誘發產生類似第二型糖尿病的症狀。Nicotinamide 與 streptozotocin 在注射前均先以 0.22 μ m 的過濾膜(Millex-GS, Millipore Co., Bedford, USA)過濾。等五天後(記為實驗之第 0 天)，CON 組與 STZ+NT 組各自隨機分成四組，CON、CFB、CCM、CTM 四組(n=10/group)與 NTZ、NFB、NCM、NTM 四組(n=12/group)。於每天早上 10 點各別灌食控制組(CON)與糖尿病組(NTZ)1g/(kg，大鼠體重)之安慰劑(含 22.7% 蛋白質、56% 碳水化合物與 16.3% 纖維素)，子實體組(CFB、NFB)則灌食 1g/(kg，大鼠體重)黃金銀耳子實體，發酵菌絲體組(CCM、NCM)灌食 1g/(kg，大鼠體重)人工菌株發酵菌絲體與多醣體組(CGX、NGX)灌食 1g/(kg，大鼠體重)純化多醣體。為了灌食方便，粉末的安慰劑、FB、CM、GXM 先與蒸餾水混合後再以灌食方式餵食。之後每天早上 10 點到下午 4 點間供給無限量的飼料與飲水，下午四點後僅供給飲水不再提供飼料。大鼠進行灌食兩週後(實驗之第 15 天)，將禁食一晚的大鼠麻醉後犧牲，血清及肝臟、肌肉、脂肪等臟器組織先置入液態氮中急速冷凍後轉移至 -80°C 凍箱凍存。(動物實驗的流程如附圖一所示)

2-2 黃金銀耳子實體、人工菌株發酵菌絲體與純化多醣體製備(Lo et al., 2006)

T. mesenterica Retz.: Fr. (CBS 101939)子實體取自以色列 *Quercus calliprinos* Webb 枯木。由子實體分離出擔孢子後使用深層培養，短時間內再接種 *T. mesenterica* 菌種，於 27 度下與 220 rpm 搖瓶培養。經深層發酵後於 4 度下 5000 rpm 離心 10 分鐘取得發酵菌絲體。酸性多醣體是由含有 Amberlite IR-120 (H⁺-form)、10% cetyl pyridinium chloride、10% NaCl、乙醇之玻璃管柱沉澱，純化出來。純化出 GXM 的實驗方法是採用專利法(Patent No.: US 6,383,799, Date of Patent: May 7, 2002)，由此法純化出的 GXM 純度達 99%。另外子實體與發酵菌絲體中所含的酸性多醣體各約為 20%與 50%。

2-3 抽取 RNA

將肌肉組織置於液態氮中，切取約 0.1g 後，置於含有 1 ml RareRNA (Gene-Pure 真興, Taiwan) 的圓底離心瓶中，置於冰上。使用均質機(ULTRA- TURRAX T10 basic, IKA-Labortechnik, Germany) 於冰上以中速均質 90 秒。在均質液中加入 200 μ l 的 acid-phenol (pH=4)，混合均勻後並低速離心，再加入 200 μ l 的 chloroform，混合均勻，於 4 $^{\circ}$ C 下以 12,000 rpm 離心 10 分鐘。離心後將上清液取出，再加入 300 μ l 的 chloroform，同樣混合均勻，4 $^{\circ}$ C 下以 12,000 rpm 離心 10 分鐘後，取出上清液，重複此步驟 2~3 次。之後在取出的上清液中加入 2 倍體積的絕對酒精，溫和混合後放置於-20 $^{\circ}$ C 下 2~3 小時。等待產生沉澱物後，在 4 $^{\circ}$ C 下以 12,000 rpm 離心 5 分鐘。離心後移除懸浮液，加入 180 μ l 70 %酒精來潤濕沉澱物。再以 8,000 rpm 在 4 $^{\circ}$ C 下離心 2 分鐘，移除懸浮液並使沉澱物乾燥。最後將 RNA 溶解在 150 μ l 的 DEPC 處理過的水中，以 65 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘以去除 DNase，分裝後儲存於-80 $^{\circ}$ C 凍箱備用。

2-4 反轉錄

使用 SuperScriptTM III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) 把 RNA 反轉錄

成互補的 DNA (cDNA)。取 2 μ L RNA 與 9 μ L DEPC- H_2O 、0.5 μ L 0.3 μ g/ μ L random hexamer、0.5 μ L 0.5 μ g/ μ l oligo dT (Fermentas, USA)，及 1 μ L 10 mM dNTP，加熱 65 $^{\circ}C$ 5 分鐘後，立即降溫至 4 $^{\circ}C$ 後放置在冰上。接下來，每一個樣品再加入 4 μ L 5X reaction buffer、1 μ L RNaseOUT inhibitor、1 μ l 10mM DTT，以及 1 μ L SuperScript III reverse transcriptase，於 25 $^{\circ}C$ 反應 5 分鐘後，再加熱至 50 $^{\circ}C$ 持續 60 分鐘使酵素反應，最後加熱至 70 $^{\circ}C$ 15 分鐘使酵素終止反應，即可得到終產物 cDNA，並儲存於 -20 $^{\circ}C$ 備用。

2-5 同步定量聚合酶連鎖反應 (real-time quantitative PCR analysis)

採用 Smart Quant Green Master Mix (Protech Technology Enterprise Co., Taiwan) 以 ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystem, USA) 來進行同步定量聚合酶連鎖反應。反應中所使用的引子皆由生工有限公司 (MDBio, Taiwan) 合成，所有的引子序列均列於表一。反應溶液中包含 1 μ L 肌肉組織的 cDNA、10 μ L Smart Quant Green Master Mix (含有 ROX reference dye 與 dUTP)、各 25 μ M 正反股引子與二次水，總體積為 20 μ L。反應擴增循環為活化加熱至 95 $^{\circ}C$ 2 分鐘後，以 95 $^{\circ}C$ 30 秒，黏合溫度 30 秒 (不同引子其不同黏合溫度列於表一)，72 $^{\circ}C$ 30 秒，共 40 個循環。反應條件均以聚合酶連鎖反應 (MJ PTC200 DNA Engine Thermal Cycler, MJ Research, Inc., USA) 最適化。反應後得到的產物藉由解離曲線及 1.5% 的洋菜瓊脂膠電泳雙重確認為專一性產物。因為聚合酶連鎖反應的擴增過程中，反應溶液裡的 SYBR Green I 會嵌入擴增中的雙股 DNA 內，所以在擴增其間偵測到的螢光量會與擴增中產物的量成正比，因此可對應於反應起始的基因表現量。而其基因的表現量則以通過閾值的循環數 (Ct) 來推定。肌肉中，因 β -actin 的表現量過高，所以改採用 GAPDH 的基因表現量做為內部對照 (reference gene) (Huggett et al., 2005; Piechaczyk et al., 1984)。所有基因的表現量均扣除其 GAPDH 的表現量後以相對表現量表示。目標基因的相對表現量以公式 $2^{-\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) 計算而得。

表一、同步定量聚合酶連鎖反應中用於擴增肌肉基因的引子序列

基因	序列	產物大小	檢索號	黏合溫度 (°C)	鎂離子濃 度 (mM)
AdipoR1	(F) 5' GGACTTGGCTTGAGTGGTGT 3' (R) 5' AGGAATCCGAGCAGCATAAA 3'	150 bp	BC061838	60	3
AdipoR2	(F) 5' GGCAGATAGGCTGGCTAATG 3' (R) 5' CACCAGCAACCACAAAGATG 3'	150 bp	XM232323	62	3
IRS1	(F) 5' CGGGCCCGGCGAGTTCTG 3' (R) 5' TTGGCTGGGCGGAGGATTGTTG 3'	196 bp	NM_012969	60	3
IRS2	(F) 5' CGCCATCGATGTGAGAGGTGAG 3' (R) 5' GCGTAGGTGCTGGCAGAGGGTAA 3'	192 bp	XM_573948	62	3
Insulin receptor	(F) 5' GACACTAGGCCATCCCGAAA 3' (R) 5' TCAATGCGGTACCCAGTGAA 3'	203 bp	NM_017071	60	3
GLUT4	(F) 5' TGGCATGGGTTTCCAGTATG 3' (R) 5' GGTTTCACCTCCTGCTCTAA 3'	185 bp	D28561	57	3
GAPDH	(F) 5' TGGTGGACCTCATGGCCTAC 3' (R) 5' CAGCAACTGAGGGCCTCTCT 3'	100 bp	M17701	60	3

2-6 脂聯素酵素免疫連結分析

實驗開始前將所有的試劑皆置於室溫中回溫，且將血清置於冰上解凍。實驗前先將 10X wash buffer 與 10X assay buffer 以二次水稀釋成一倍。接著配製標準品 QC1 及 QC2，加入定量去離子水後，序列稀釋成濃度 200、100、50、25、12.5、6.25 與 3.125 ng/ml。等血清解凍後，加入 assay buffer 將血清 250 倍稀釋後，依照廠商提的操作步驟進行測定(Linco Research, USA)。每 well 以 300 μ l 的 wash buffer 沖洗 96 孔盤 3 次。輕輕拍乾後，每 well 加入 80 μ l 的 assay running buffer。隨後於 blank 格中加入 20 μ l assay running buffer，其餘各加入 20 μ l 已稀釋的血清或 QC1、QC2，黏上封膜後以 400~500 rpm 的速度在室溫下震盪 2 小時。移除液體後，以 300 μ l/well 的 wash buffer 沖洗 3 次後，輕拍乾盤中的水分。接下來加入 100 μ l/well 的 detection antibody，黏回封膜後在室溫下以 400~500 rpm 的速度震盪 1 小時。再輕拍盤身移除液體，以 300 μ l/well 的 wash buffer 沖洗 96 孔盤 3 次。再加入 100 μ l/well 的 enzyme solution，黏回封膜後在室溫下震盪 30 分鐘。一樣的輕拍盤身去除液體，再以 300 μ l/well 的 wash buffer 沖洗 96 孔盤 3 次。加入 100 μ l/well 的 substrate solution，黏回封膜後震盪 5~25 分鐘。直到其變藍色 ($A_{370nm}=1.2\sim 1.8$) 後，加入 100 μ l/well 的 stop solution，以手搖晃使其混合均勻並停止呈色後，在 450 nm 下測其吸光值，並在扣除背景值 (595 nm 下的吸光值) 後，依標準曲線使用內插法推算血清中脂聯素的濃度。

2-7 萃取肌肉細胞蛋白質

使用蛋白質分離萃取套組(Compartmental Protein Extraction Kit, Chemicon international, USA)抽取蛋白質。其步驟參考套組內廠商的建議進行。所有溶液(buffer C、W、N、M)均需先預冷，並於 buffer C、buffer N 與 buffer M 中分別加入 1/50 體積的 50X PI (protein inhibitor)，置於冰上備用。

秤取約 0.1g 的腓腸肌，加入 300 μ l buffer C 於冰上以中速(速度 4)均質 20 秒 (ULTRA-TURRAX T10 basic, IKA-Labortechnik, Germany)數次，直到組織呈均勻

狀。其在 4 °C 下均勻混合 20 分鐘後，以 18,000 ×g 在 4 °C 離心 20 分鐘。取出上清液至新的離心管，此即為細胞質蛋白質。於剩下的沉澱物加入 400 µl buffer W，並重新懸浮沉澱物，4 °C 下均勻混合 5 分鐘，之後以 18,000 ×g 4 °C 離心 20 分鐘，移除上清液，再重複此步驟清洗沉澱物一次，來避免細胞質蛋白質交叉污染到其他部分的蛋白質抽取。接下來在沉澱物中加入 100 µl buffer N 以及重新懸浮沉澱物，於 4 °C 下均勻混合 20 分鐘，再以 18,000 ×g 4 °C 離心 20 分鐘，得到的上清液即為核蛋白質。以同樣的步驟加入 100 µl buffer M，其所獲得的上清液即是細胞膜蛋白質。

所抽取的蛋白質經蛋白質定量(Coomassie Plus™ - The Better Bradford Assay Reagent, Pierce, IL)後，儲存於- 80 °C 下備用。

2-8 蛋白質定量

由肌肉組織中所抽取的總蛋白質，使用蛋白質定量套組(Coomassie Plus™-The Better Bradford Assay Kit, Pierce Biotechnology, USA)進行定量。將肌肉組織蛋白質稀釋至適當的稀釋倍數後，取出 10 µl 蛋白質稀釋液與 300 µl 的試劑在室溫下避光反應 10 分鐘，測量在 595 nm 的吸光值(DYNEX MRXII microplate reader, Dynex, USA)。使用 BSA 做為標準品做出標準曲線，以內插法估算出其肌肉組織萃取液的總蛋白質濃度。

2-9 西方轉漬法

進行電泳前，肌肉組織蛋白質檢體先跟 sample buffer(最終濃度各為 58.3 mM pH6.8 Tris-HCl, 0.17 % SDS, 100.48 mM DTT, 6 % glycerol, 0.013 % bromophenol blue) 混合使其濃度稀釋至 30µg，於 95 °C 下加熱 5 分鐘。每個檢體取 50 µg 的蛋白質於緩衝液(192 mM glycine, 24.8 mM Tris-base, 10 % SDS)中以 7.5 或 10 % 的下層膠進行電泳(Mini- PROTEIN 3 electrophoresis cell system, BioRad, USA)分離蛋白質。之後使用 10 mM Na₂B₄O₇ 轉漬於 polyvinylidene fluoride (Millipore,

USA)膜上。將膜置於 2 %~5% skim milk-PBST (1.4M NaCl, 7.4 mM Na₂HPO₄, 92 mM NaH₂PO₄, 0.1 % Tween-20, pH 7.4)或 2 %~5% BSA-PBST 中以 100 rpm 震盪 1 小時，再使用一級抗體(表二)來辨識目標蛋白質，於室溫下震盪 2 小時。於 PBST 中漂洗膜 3 次後，將膜與二級抗體在室溫下震盪 1 小時。最後再於 PBST 中漂洗膜 3 次後，在膜上加入反應基質(Enhanced chemiluminescent substrate, Pierce Biotechnology, USA)，以 X 光底片(Molecular Technologies, USA)曝光，底片經由掃描後以軟體 AlphaDigiDoc imaging system (Alpha Innotech, USA)定量，並使用同一片膜重新辨識β-tubulin 作為內部對照，校正蛋白質取樣量。

表二、實驗中使用的抗體

抗體	廠牌	稀釋倍數	目錄編號
Insulin receptor β	Santa Cruz	1:700	SC-711
Anti- AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) α -pan	Upstate	1:1000	07-181
Anti- Phospho-AMPK α (Thr172)	Upstate	1:1000	07-681
β -tubulin	Santa Cruz	1:900	SC-5274
Akt	Cell signaling	1:1000	9272
Phospho-Akt	Cell signaling	1:1000	9271
Insulin receptor substrate - 1	Cell signaling	1:1000	2382
Glucose transporter 4 (GLUT4)	Chemicon	1:3000	AB1346
Goat-anti-mouse, (H+L), Peroxidase Conjugated	Pierce	1:7000	31430
goat-anti-rabbit IgG HRP-linked	Santa Cruz	1:3000	SC-2004

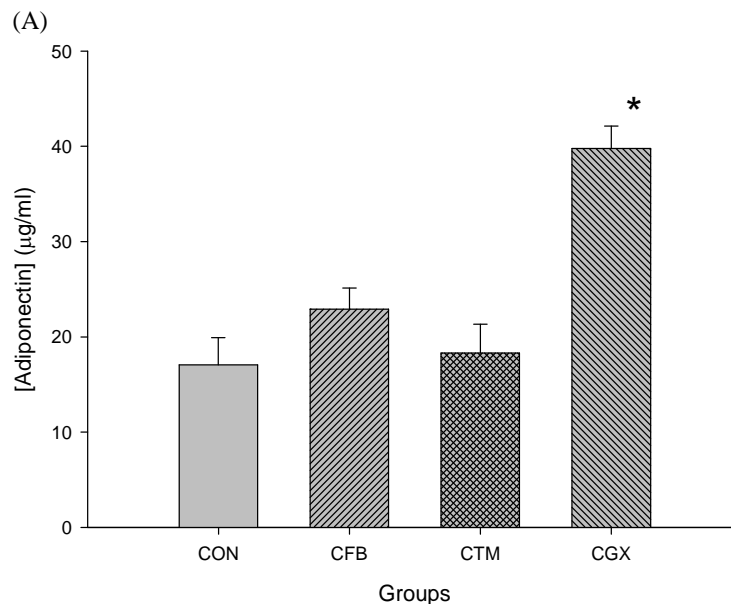
2-10 統計分析

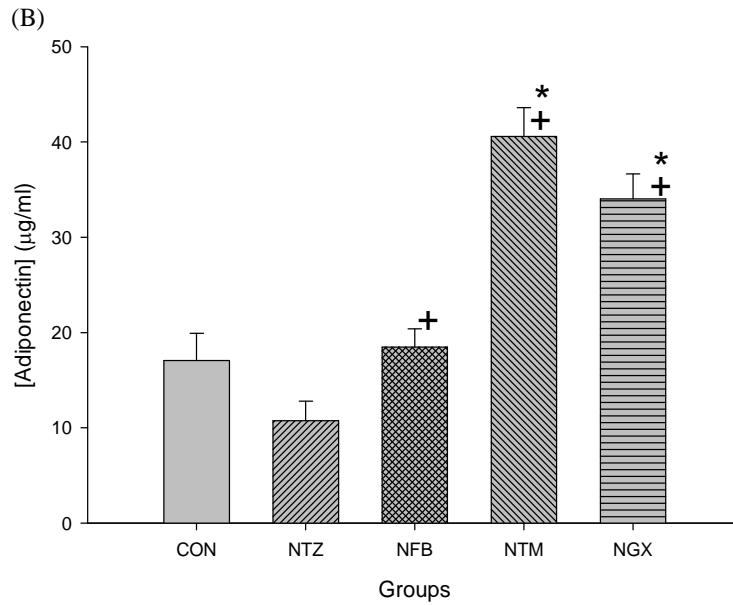
所有的實驗數據皆以平均值±標準誤(means±SEM)表示。所有組別的實驗數據皆利用 SAS 9.1 統計軟體(Statistical Analysis System, SAS Institute, Inc., USA)進行單因子變異分析(one-way ANOVA)及費雪爾氏 LSD (least significant difference)分析，當機率值小於 0.05 ($P < 0.05$)時顯示各組於統計上有顯著差異。使用 SigmaPlot 9.0 (Systat software, Inc., USA)做圖。

三、結果

3-1 血清中脂聯素濃度

於正常狀態下餵食黃金銀耳子實體(CFB group, $22.9 \pm 2.25 \mu\text{g/ml}$)及發酵菌絲體(CTM group, $18.33 \pm 3.01 \mu\text{g/ml}$)對其脂聯素濃度雖無任何影響,但餵食黃金銀耳多醣體後(CGX group, $39.79 \pm 2.35 \mu\text{g/ml}$)具顯著提升其脂聯素分泌量的效用(圖六 A)。STZ+NTZ 誘發的葡萄糖耐受異常大鼠血清中的脂聯素濃度(NTZ group, $10.76 \pm 2.03 \mu\text{g/ml}$)與正常狀態控制組大鼠血清中的脂聯素濃度(CON group, $17.05 \pm 2.85 \mu\text{g/ml}$)相較之下雖無顯著的差異,但 NTZ 組仍較 CON 組降低 36.9% (圖六 B)。葡萄糖耐受異常大鼠餵食黃金銀耳子實體(NFB group, $18.47 \pm 1.94 \mu\text{g/ml}$)可使其因葡萄糖耐受異常引起的脂聯素濃度降低情形回復至與正常濃度,餵食黃金銀耳發酵菌絲體(NTM group, $40.6 \pm 3.01 \mu\text{g/ml}$)及黃金銀耳多醣體(NGX group, $34.02 \pm 2.63 \mu\text{g/ml}$)均可顯著提升其血清中脂聯素濃度(圖六 B)。故正常狀態下餵食黃金銀耳多醣體可提升血清中的脂聯素濃度,而葡萄糖耐受異常狀態下會使脂聯素的分泌量些微下降,但餵食黃金銀耳子實體可回復其脂聯素分泌量,而餵食黃金銀耳發酵菌絲體與多醣體均可顯著提升血清中的脂聯素濃度至與正常狀態下餵食黃金銀耳多醣體組的脂聯素濃度相當。



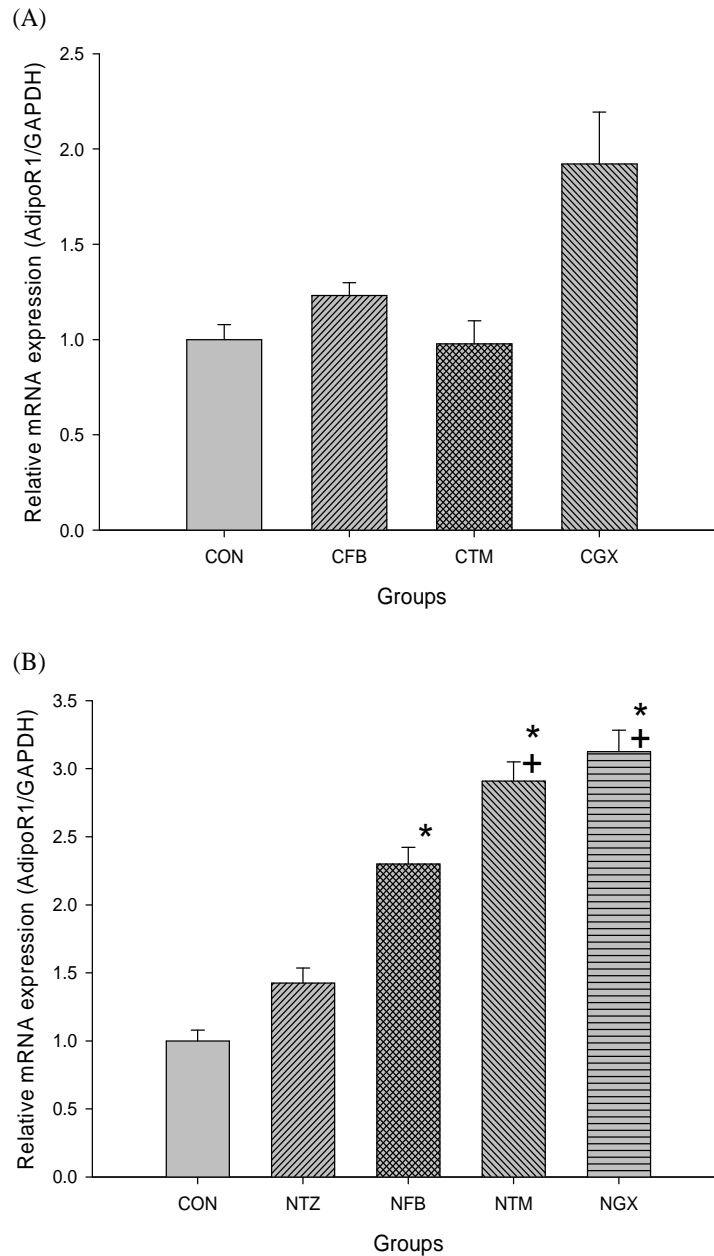


圖六、大鼠於第 15 天血清中脂聯素的濃度。

各組別之大鼠於第 15 天犧牲後取其血清，以酵素免疫連結分析套組 (Linco Research, USA) 量測脂聯素濃度。控制組 (CON group, n=4)、葡萄糖耐受異常組 (NTZ group, n=8)、子實體組 (CFB group, n=5; NFB group, n=8)、發酵菌絲體組 (CTM group, n=6; NTM group, n=9)，以及多醣體組 (CGX group, n=10; NGX group, n=11)。^{*}表示與控制組有顯著差異 (P<0.05)；⁺表示與糖尿病組有顯著差異 (P<0.05)。

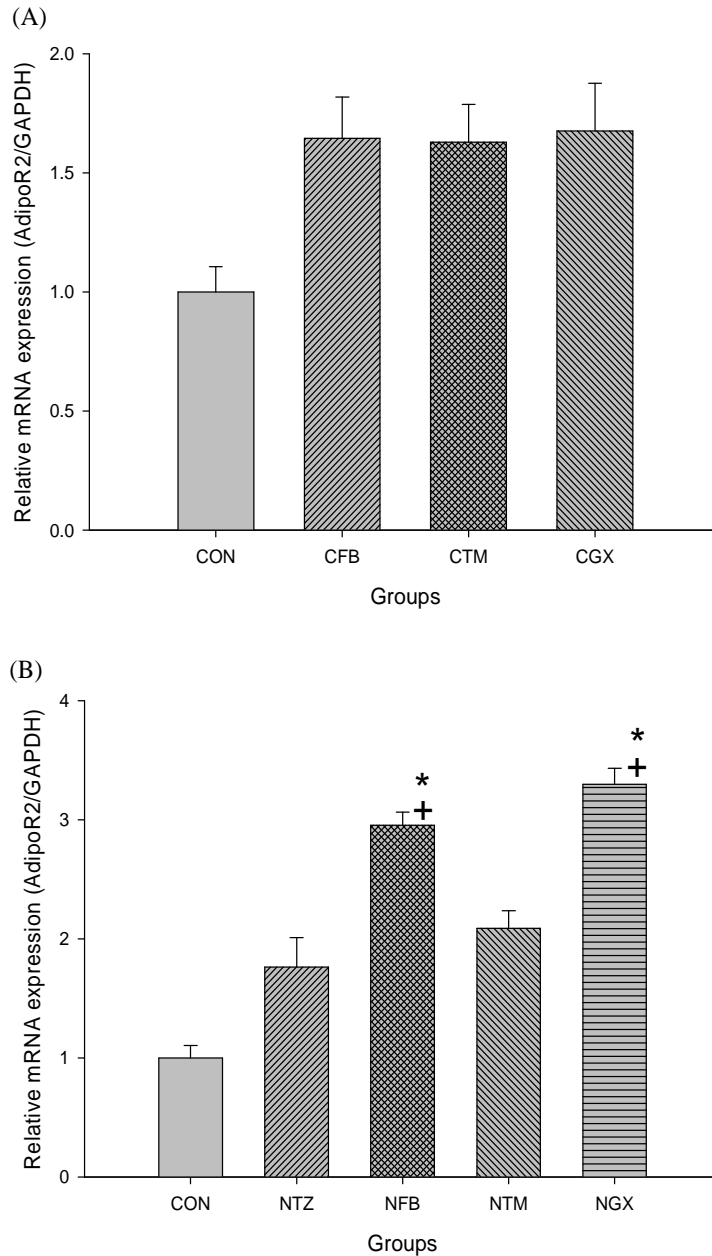
3-2 肌肉中脂聯素受體 (AdipoR1、AdipoR2) mRNA 相對表現量

黃金銀耳的餵食可提高脂聯素的分泌量，也許會接連影響脂聯素在膜上的脂聯素受體 AdipoR1、AdipoR2 表現。因此本實驗中以同步定量聚合酶鏈鎖反應，測量肌肉組織中此兩型受體的基因相對表現量。由圖七、圖八中可見，兩型脂聯素受體 AdipoR1、AdipoR2 在葡萄糖耐受異常狀態下其表現量均會較正常狀態下稍高(AdipoR1: CON group, 1 ± 0.08 ; NTZ group, 1.43 ± 0.11 ; AdipoR2: CON group, 1 ± 0.11 ; NTZ group, 1.76 ± 0.25) (圖七 B、圖八 B)。而兩型脂聯素受體在正常狀態下餵食黃金銀耳的各組中，AdipoR1 方面餵食多醣體可略微的提升其表現量，其他各組別表現量與控制組皆無顯著影響；AdipoR2 方面餵食黃金銀耳各組均有其表現量均有增加的趨勢，但未達顯著差異的效果(AdipoR1: CFB group, 1.23 ± 0.07 ; CTM group, 0.98 ± 0.12 ; CGX group, 1.92 ± 0.27 ; AdipoR2: CFB group, 1.65 ± 0.17 ; CTM group, 1.63 ± 0.16 ; CGX group, 1.68 ± 0.2) (圖七 A、圖八 A)。而由 STZ+NT 誘發糖尿病狀態下餵食黃金銀耳各組，其 AdipoR1、AdipoR2 表現量均有增加的趨勢，其中餵食子實體與多醣體可使兩型脂聯素受體均有顯著的提升，而餵食菌絲體則是可顯著提高 AdipoR1 mRNA 表現。(AdipoR1: NFB group, 2.3 ± 0.12 ; NTM group, 2.91 ± 0.14 ; NGX group, 3.13 ± 0.16 ; AdipoR2: NFB group, 2.95 ± 0.11 ; NTM group, 2.09 ± 0.15 ; NGX group, 3.3 ± 0.14) (圖七 B、圖八 B)。因此，雖然葡萄糖耐受異常狀態並不影響兩型脂聯素受體基因表現量，但於正常狀態下餵食黃金銀耳多醣體與控制組相比其 AdipoR1 的表現量受到略微提升，而 AdipoR2 方面餵食任何形式黃金銀耳雖可略微提升其表現量，但因其無顯著差異，故黃金銀耳餵食對於正常狀態下 AdipoR2 mRNA 表現無顯著影響；在葡萄糖耐受異常狀態下黃金銀耳的餵食，均可使肌肉中脂聯素受體 AdipoR1 與 AdipoR2 的 mRNA 表現量有顯著的提高。



圖七、脂聯素第一型受體的基因相對表現量。

各組別之大鼠於實驗第 15 天犧牲後，取其腓腸肌抽取 RNA 反轉錄為 cDNA，再以同步定量聚合酶連鎖反應測量其 AdipoR1 mRNA 表現量，並使用 GAPDH mRNA 表現量做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之目標基因表現量於校正後以相對表現量表示。所有數值均重複兩次，並以 dissociation protocol 及洋菜瓊脂膠电泳確認反應產物之專一性。控制組 (CON group, n=4)、葡萄糖耐受異常組 (NTZ group, n=8)、子實體組 (CFB group, n=5; NFB group, n=8)、發酵菌絲體組 (CTM group, n=6; NTM group, n=9)，以及多醣體組 (CGX group, n=10; NGX group, n=11)。*表示與控制組有顯著差異 (P<0.05); +表示與糖尿病組有顯著差異 (P<0.05)。

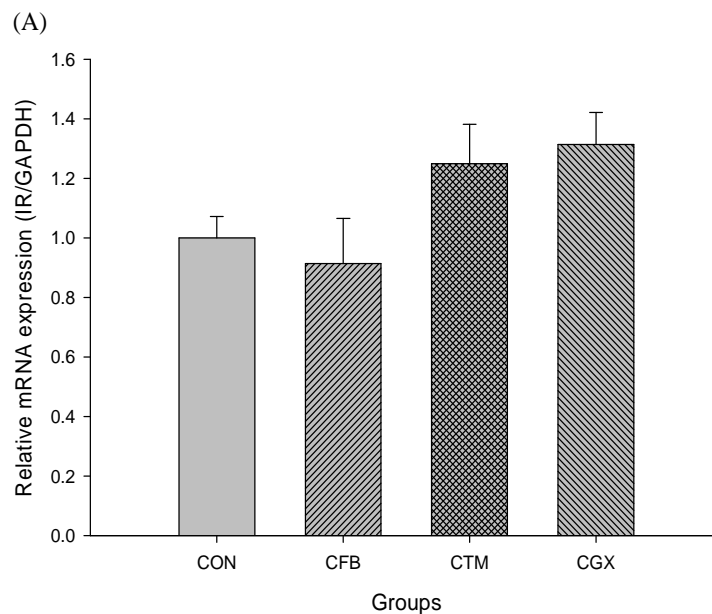


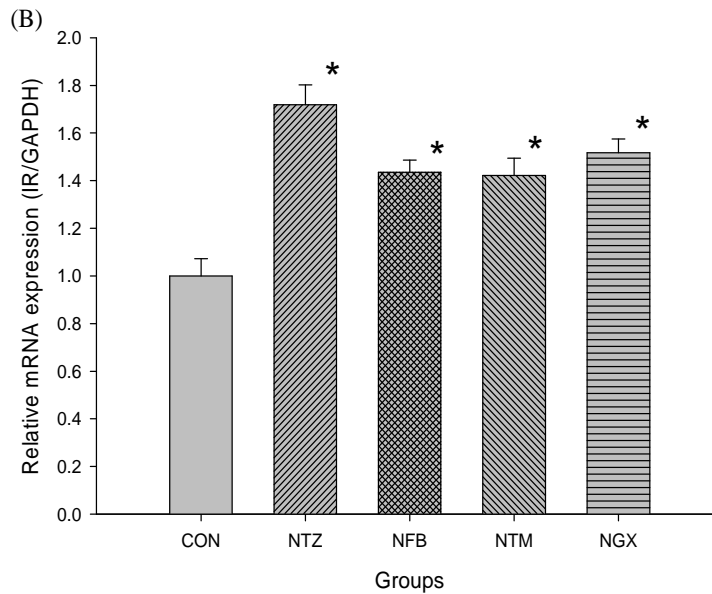
圖八、脂聯素第二型受體的基因相對表現量。

各組別之大鼠於實驗第 15 天犧牲後，取其腓腸肌抽取 RNA 反轉錄為 cDNA，再以同步定量聚合酶連鎖反應測量其 AdipoR2 mRNA 表現量，並使用 GAPDH mRNA 表現量做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之目標基因表現量於校正後以相對表現量表示。所有數值均重複兩次，並以 dissociation protocol 及洋菜瓊脂膠电泳確認反應產物之專一性。控制組 (CON group, n=4)、葡萄糖耐受異常組 (NTZ group, n=8)、子實體組 (CFB group, n=5; NFB group, n=8)、發酵菌絲體組 (CTM group, n=6; NTM group, n=9)，以及多醣體組 (CGX group, n=10; NGX group, n=11)。*表示與控制組有顯著差異 (P<0.05)；+表示與糖尿病組有顯著差異 (P<0.05)。

3-3 肌肉中胰島素受體 (IR) 與胰島素受體基質 (IRS-1、IRS-2) mRNA 相對表現量

為了解黃金銀耳是否透過肌肉的胰島素傳訊來達到調降血糖效果，因此亦使用同步定量聚合酶鏈鎖反應，測量各組別於肌肉組織中胰島素傳訊分子 mRNA 的相對表現量。結果顯示，胰島素受體基因的 mRNA 表現量未因 STZ+NT 誘發葡萄糖耐受異常而減少反而顯著的增高(CON group, 1 ± 0.07 ; NTZ group, 1.72 ± 0.08) (圖九 B)。正常大鼠經餵食黃金銀耳後，餵食發酵菌絲體與多醣體雖有略微提高，但未達顯著提高，因此餵食黃金銀耳對其胰島素受體基因表現量並無顯著的影響(CFB group, 0.91 ± 0.15 ; CTM group, 1.25 ± 0.13 ; CGX group, 1.31 ± 0.11) (圖九 A)；以 STZ+NT 誘發葡萄糖耐受異常大鼠經餵食黃金銀耳後，其 IR 基因表現量均與糖尿病狀態相似，相較於有明顯的提高；經餵食黃金銀耳後並無顯著的影響趨勢(NFB group, 1.44 ± 0.05 ; NTM group, 1.42 ± 0.07 ; NGX group, 1.52 ± 0.06)。由以上結果可得知，餵食黃金銀耳僅於正常狀態下有些微的影響。

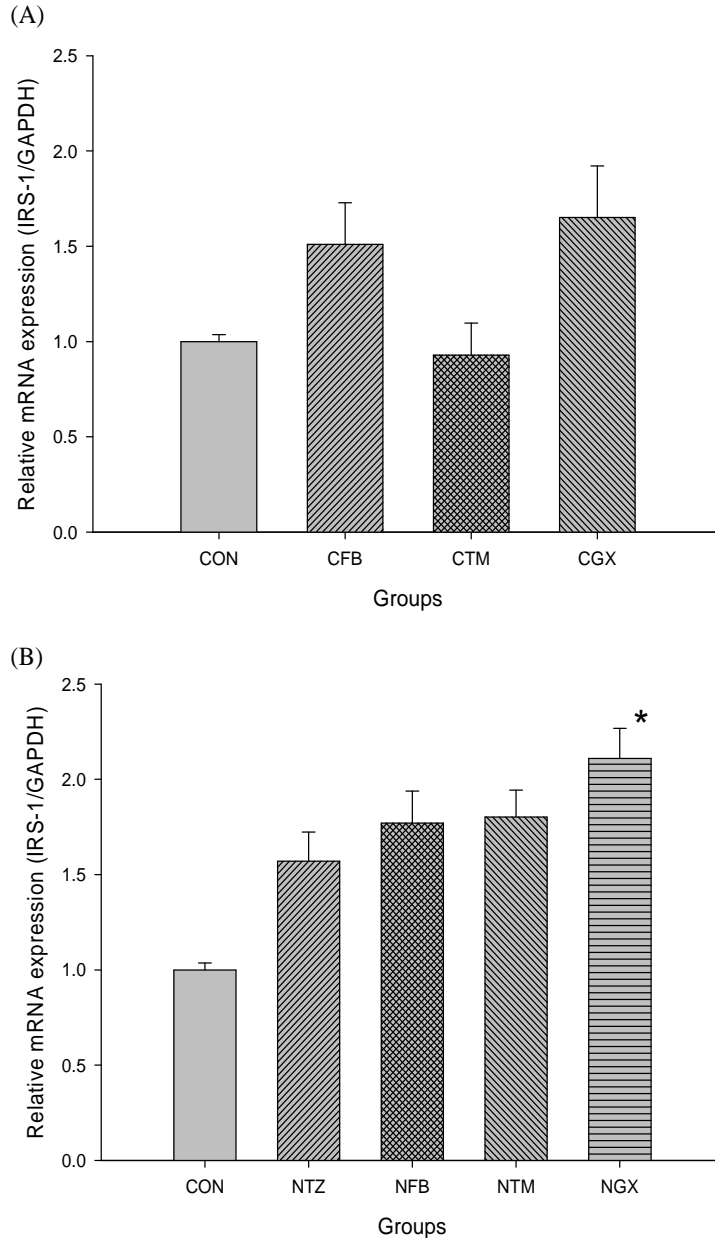




圖九、胰島素受體的基因相對表現量。

各組別之大鼠於實驗第 15 天犧牲後，取其腓腸肌抽取 RNA 反轉錄為 cDNA，再以同步定量聚合酶連鎖反應測量其 IR mRNA 表現量，並使用 GAPDH mRNA 表現量做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之目標基因表現量於校正後以相對表現量表示。所有數值均重複兩次，並以 dissociation protocol 及洋菜瓊脂膠電泳確認反應產物之專一性。控制組 (CON group, n=4)、葡萄糖耐受異常組 (NTZ group, n=8)、子實體組 (CFB group, n=5; NFB group, n=8)、發酵菌絲體組 (CTM group, n=6; NTM group, n=9)，以及多醣體組 (CGX group, n=10; NGX group, n=11)。*表示與控制組有顯著差異 (P<0.05)。

於胰島素傳訊中，胰島素受體的下游為胰島素受體基質。由圖十可得知，大鼠受 STZ+NT 誘發葡萄糖耐受異常後其胰島素受體基質 IRS-1 mRNA 表現量未因此而減少(CON group, 1 ± 0.04 ; NTZ group, 1.57 ± 0.15) (圖十 B)。而餵食黃金銀耳於正常大鼠並無顯著影響，但子實體組與多醣體組 IRS-1 基因表現皆有些微提升 (CFB group, 1.51 ± 0.22 ; CTM group, 0.93 ± 0.17 ; CGX group, 1.65 ± 0.27) (圖十 A)。而糖尿病大鼠餵食黃金銀耳後，其子實體組與發酵菌絲體組 (NFB group, 1.77 ± 0.17 ; NTM group, 1.8 ± 0.14) 僅有些微提升，多醣體組 (NGX group, 2.11 ± 0.16) 其 IRS-1 mRNA 表現量則有較明顯提高 (圖十 B)。因此，於葡萄糖耐受異常大鼠餵食黃金銀耳多醣體組可明顯提升 IRS-1 mRNA 表現量。

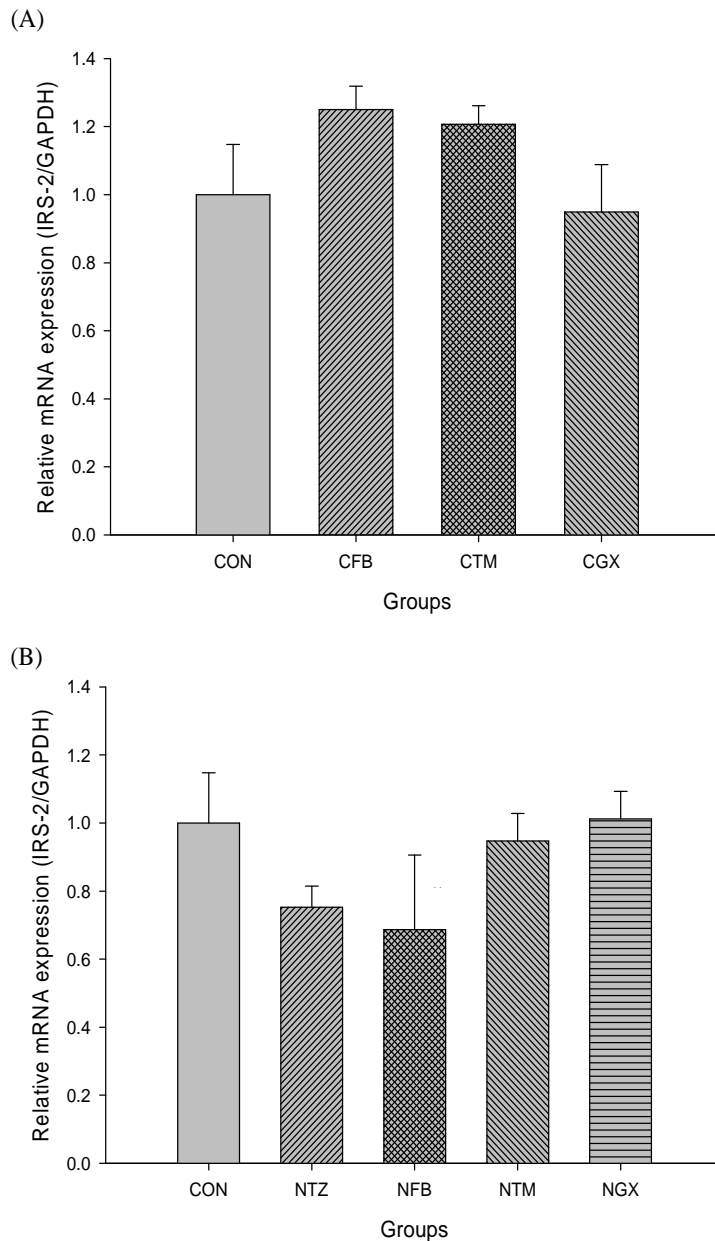


圖十、胰島素受體基質 IRS-1 的基因相對表現量。

各組別之大鼠於實驗第 15 天犧牲後，取其腓腸肌抽取 RNA 反轉錄為 cDNA，再以同步定量聚合酶連鎖反應測量其 IRS-1 mRNA 表現量，並使用 GAPDH mRNA 表現量做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之目標基因表現量於校正後以相對表現量表示。所有數值均重複兩次，並以 dissociation protocol 及洋菜瓊脂膠電泳確認反應產物之專一性。控制組 (CON group, n=4)、葡萄糖耐受異常組 (NTZ group, n=8)、子實體組 (CFB group, n=5; NFB group, n=8)、發酵菌絲體組 (CTM group, n=6; NTM group, n=9)，以及多醣體組 (CGX group, n=10; NGX group, n=11)。*表示與控制組有顯著差異 (P<0.05)。

在胰島素受體基質 IRS-2 mRNA 表現量方面，STZ+NT 誘發糖尿病使其表現量些微降低(CON group, 1 ± 0.15 ; NTZ group, 0.75 ± 0.06) (圖十一 B)。正常大鼠經黃

金銀耳餵食後各組的 IRS-2 基因表現皆與控制組無顯著差異(CFB group, 1.25 ± 0.07 ; CTM group, 1.21 ± 0.05 ; CGX group, 0.95 ± 0.14) (圖十一 A)。而葡萄糖耐受異常組，餵食子實體(NFB group, 0.67 ± 0.22)顯著降低其 IRS-2 mRNA 表現量，餵食發酵菌絲體(NTM group, 0.95 ± 0.08) 與多醣體(NGX group, 1.01 ± 0.08)均可使其表現量略微回升(圖十一 B)。因此，餵食黃金銀耳發酵菌絲體與多醣體可使因葡萄糖耐受異常而降低的胰島素受體基質 IRS-2 mRNA 表現量回復至正常狀態。



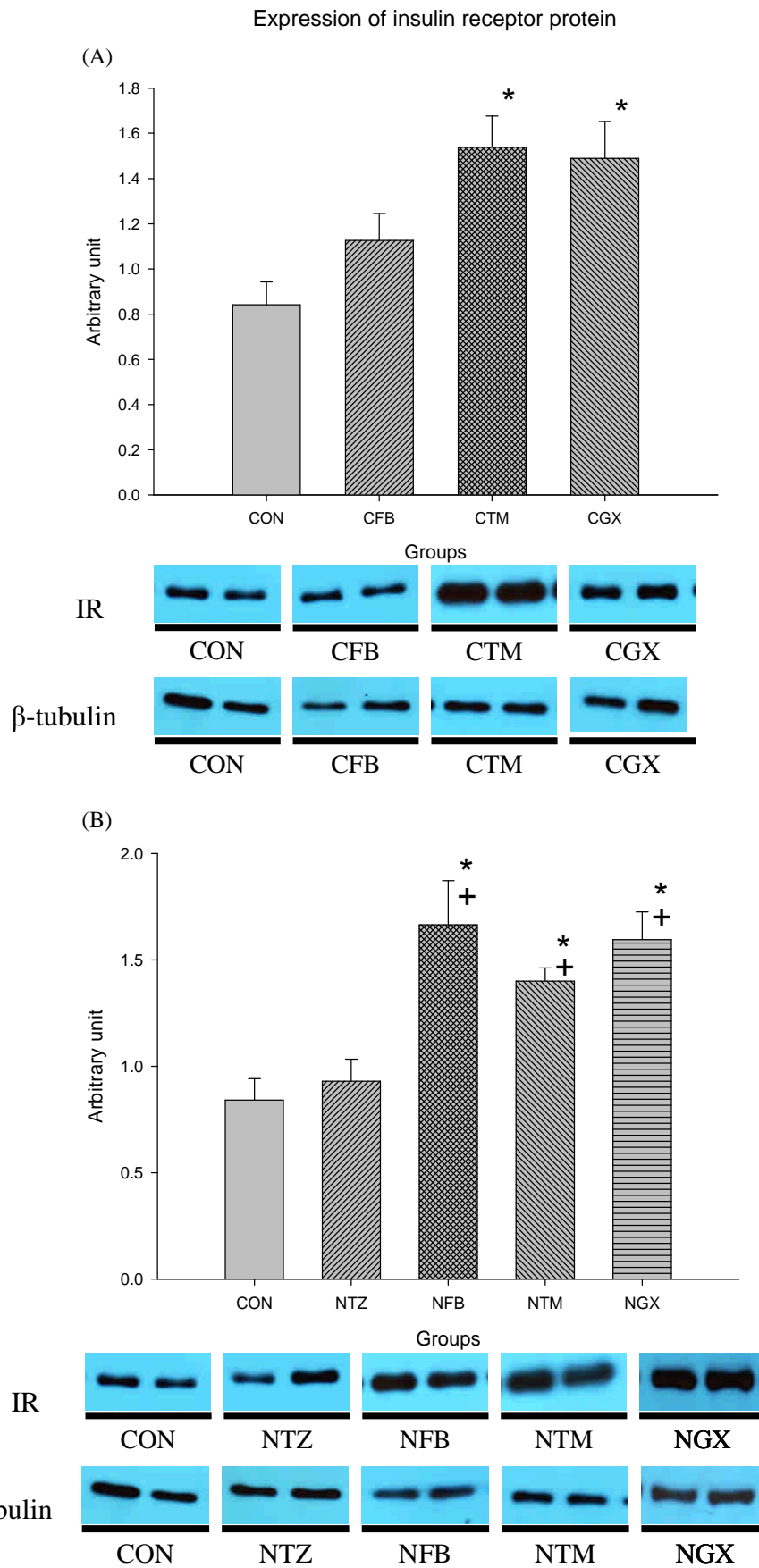
圖十一、胰島素受體基質 IRS-2 的基因相對表現量。

各組別之大鼠於實驗第 15 天犧牲後，取其腓腸肌抽取 RNA 反轉錄為 cDNA，再以同步定量聚合酶連鎖反應測量其 IRS-2 mRNA 表現量，並使用 GAPDH mRNA 表現量做為內部對照，校正檢

體間之差異。各組之目標基因表現量於校正後以相對表現量表示。所有數值均重複兩次，並以 dissociation protocol 及洋菜瓊脂膠電泳確認反應產物之專一性。控制組 (CON group, n=4)、葡萄糖耐受異常組 (NTZ group, n=8)、子實體組 (CFB group, n=5; NFB group, n=8)、發酵菌絲體組 (CTM group, n=6; NTM group, n=9)，以及多醣體組 (CGX group, n=10; NGX group, n=11)。*表示與控制組有顯著差異 (P<0.05)。

3-4 肌肉中胰島素傳訊分子的蛋白質相對表現量

使用蛋白質分離萃取套組依序抽取細胞質、細胞膜蛋白質後，以西方轉漬法測定胰島素傳訊中各傳訊分子的蛋白質表現量與其磷酸化狀態，反映轉譯與活化程度。結果顯示，經誘發葡萄糖耐受異常後不會影響其胰島素受體蛋白質表現量 (CON group, 0.84 ± 0.1 ; NTZ group, 0.93 ± 0.1) (圖十二 B)。正常大鼠餵食黃金銀耳各組於胰島素受體蛋白質表現均有提升 (CFB group, 1.13 ± 0.12 ; CTM group, 1.54 ± 0.14 ; CGX group, 1.49 ± 0.16) (圖十二 A)，其中餵食發酵菌絲體與多醣體於 IR mRNA 有提升其表現的趨勢 (圖九)，藉由西方轉漬法亦顯示有顯著提升其蛋白質表現的效用。葡萄糖耐受異常大鼠方面，經餵食黃金銀耳各組均有顯著上升的趨勢 (NTM group, 1.4 ± 0.06 ; NGX group, 1.59 ± 0.13 ; NFB group, 1.67 ± 0.21) (圖十二 B)。由以上結果可得，黃金銀耳之餵食無論在正常大鼠或葡萄糖耐受異常大鼠均具有提升胰島素受體蛋白質表現量的效果。



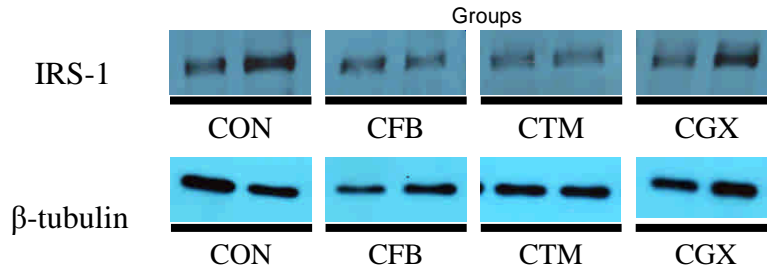
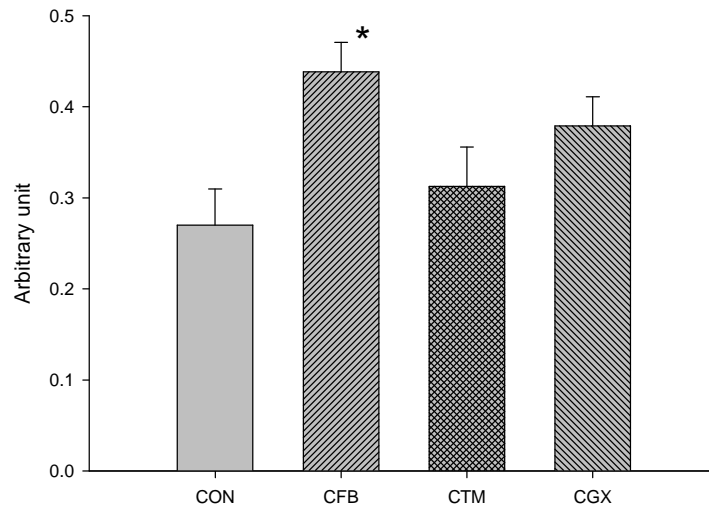
圖十二、細胞膜上胰島素受體的蛋白質相對表現量。

蛋白質抽取後定量，取 30 μg 細胞膜蛋白質進行西方轉漬法，分析胰島素受體的蛋白質相對表現量，且以 β -tubulin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之目標蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。控制組 (CON group, n=4)、葡萄糖耐受異常組 (NTZ group, n=8)、子實體組 (CFB group, n=5; NFB group, n=8)、發酵菌絲體組 (CTM group, n=6; NTM group, n=9)，以及多醣體組 (CGX group, n=10; NGX group, n=11)。*表示與控制組有顯著差異 ($P<0.05$); +表示糖尿病組與控制組之間有顯著差異 ($P<0.05$)。

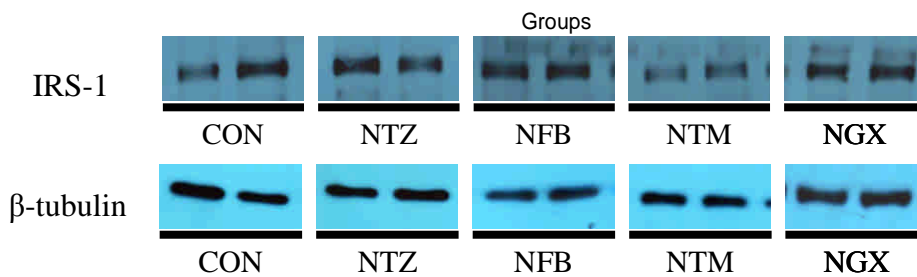
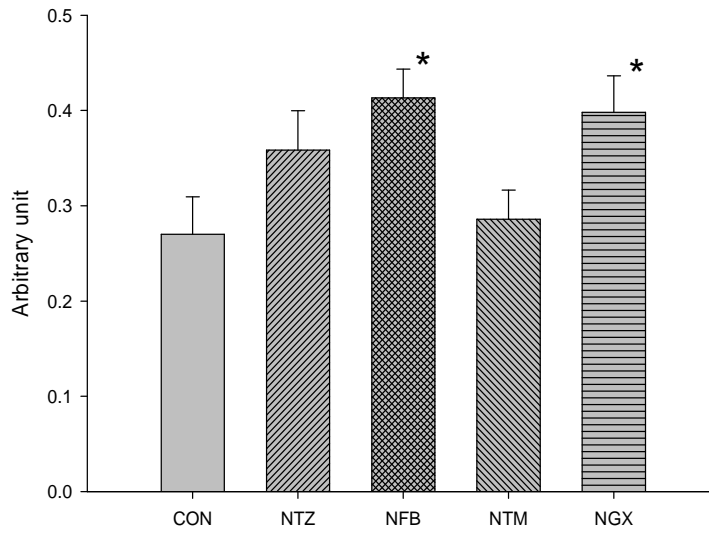
胰島素傳訊中，胰島素受體的下游為胰島素受體基質，受到胰島素磷酸化而活化。因 mRNA 結果顯示，IRS-2 基因轉錄並未有顯著的影響，故僅測 IRS-1 之蛋白質表現量。STZ+NT 誘發葡萄糖耐受異常大鼠其 IRS-1 蛋白質表現並無受到影響 (CON group, 0.27 ± 0.04 ; NTZ group, 0.36 ± 0.04) (圖十三 B)，而與 mRNA 表現量的結果一致，細胞質中 IRS-1 的蛋白質表現量在黃金銀耳餵食下各組間亦有提升的趨勢 (CFB group, 0.44 ± 0.03 ; CGX group, 0.38 ± 0.03 ; NFB group, 0.41 ± 0.03 ; NGX group, 0.4 ± 0.04) (圖十三 A、圖十三 B)，但餵食發酵菌絲體不論在正常或是葡萄糖耐受異常狀態下均無較顯著的影響 (CTM group, 0.31 ± 0.04 ; NTM group, 0.29 ± 0.03) (圖十三 A、圖十三 B)。因此餵食黃金銀耳子實體在正常與葡萄糖耐受異常狀態均可提升胰島素受體基質 IRS-1 之蛋白質表現，而多醣體組僅於葡萄糖耐受異常大鼠有增高 IRS-1 表現之趨勢。

Expression of Insulin receptor substrate 1 protein

(A)



(B)

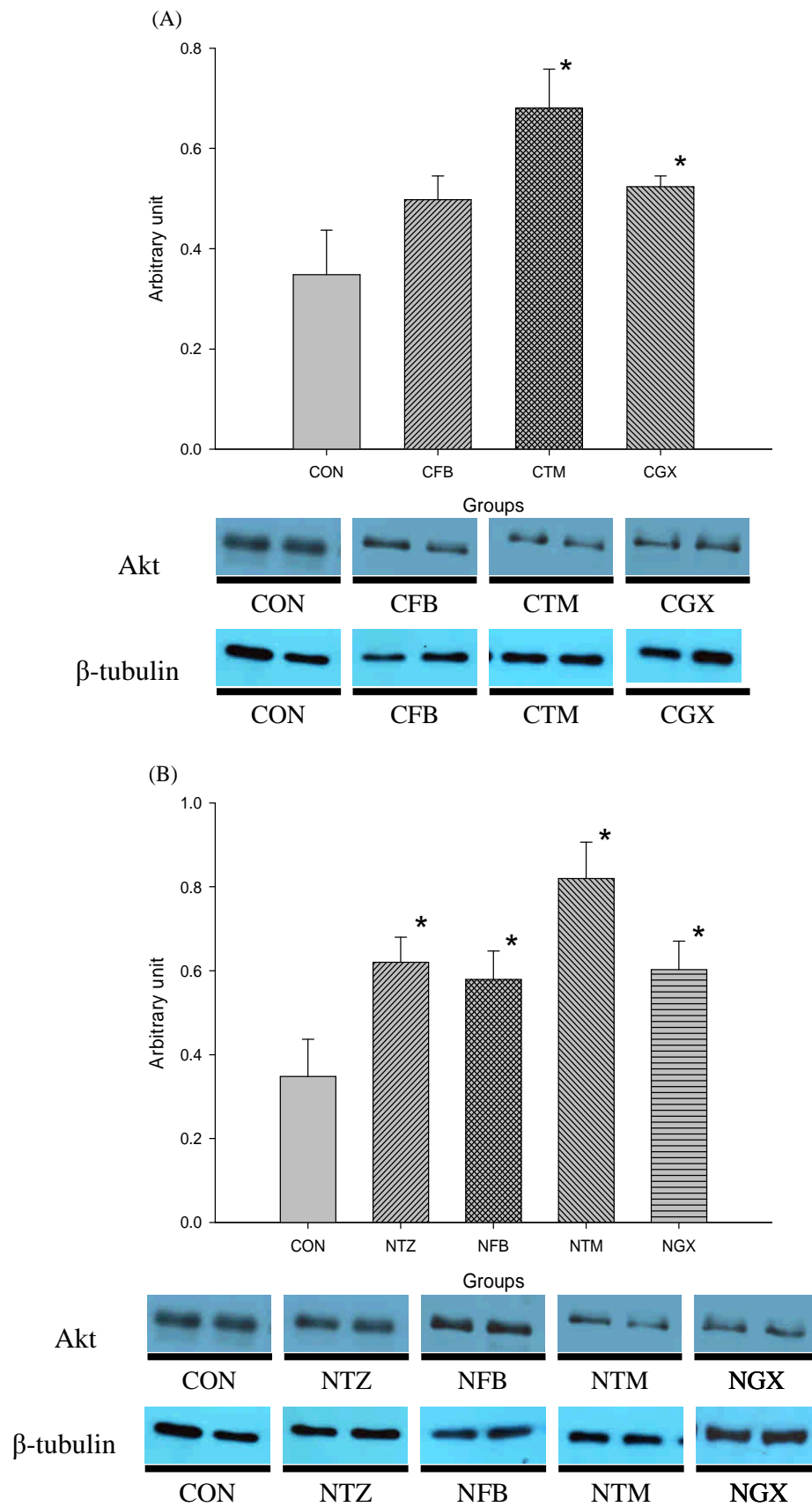


圖十三、胰島素受體基質 IRS-1 的蛋白質相對表現量。

蛋白質抽取後定量，取 30 μg 細胞質蛋白質進行西方轉漬法，分析胰島素受體基質 IRS-1 的蛋白質相對表現量，且以 $\beta\text{-tubulin}$ 蛋白質表現量作為內部對照。各組之目標蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。控制組 (CON group, n=4)、葡萄糖耐受異常組 (NTZ group, n=8)、子實體組 (CFB group, n=5; NFB group, n=8)、發酵菌絲體組 (CTM group, n=6; NTM group, n=9)，以及多醣體組 (CGX group, n=10; NGX group, n=11)。*表示與控制組有顯著差異 ($P<0.05$)。

胰島素傳訊可藉由胰島素受體基質磷酸化活化後，進而活化下游的 Akt，透過 Akt 的活化增加葡萄糖轉運蛋白的轉化，達到調控血糖的效用。由圖十四可知，餵食黃金銀耳可提高肌肉中 Akt 蛋白質表現量。葡萄糖耐受異常狀態下促使 Akt 產生代償作用，使其 Akt 蛋白質表現量較正常狀態顯著的提高了 (CON group, 0.35 ± 0.09 ; NTZ group, 0.62 ± 0.06) (圖十四 B)；正常大鼠餵食黃金銀耳後均有提高 Akt 蛋白質表現的趨勢 (CFB group, 0.5 ± 0.04 ; CTM group, 0.68 ± 0.08 ; CGX group, 0.52 ± 0.02)，其中發酵菌絲體以及多醣體的餵食可使其顯著的增加表現量 (圖十四 A)。而葡萄糖耐受異常大鼠餵食黃金銀耳並無顯著的影響，唯有餵食發酵菌絲體有些微的提升 (NFB group, 0.58 ± 0.06 ; NTM group, 0.82 ± 0.09 ; NGX group, 0.6 ± 0.07) (圖十四 B)。由此可知，於正常狀態下餵食黃金銀耳發酵菌絲體與多醣體可使 Akt 蛋白質表現量提高。

Expression of Akt protein



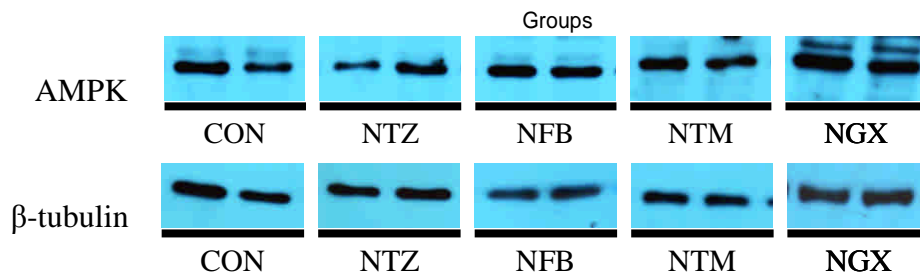
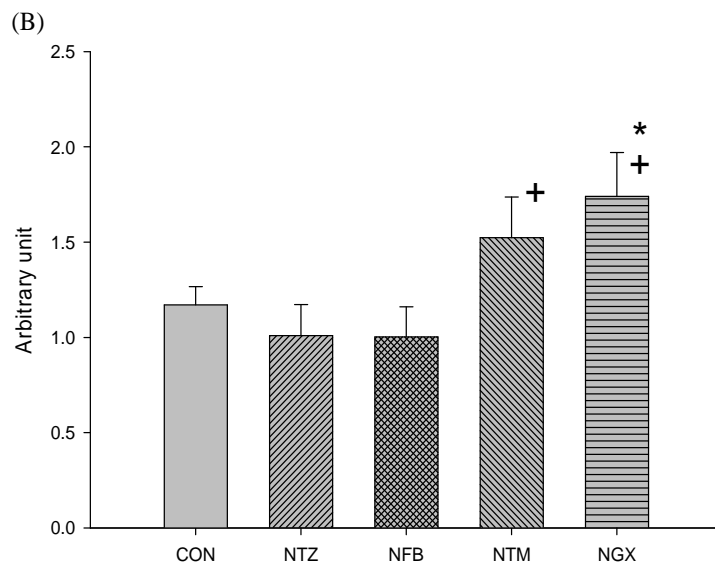
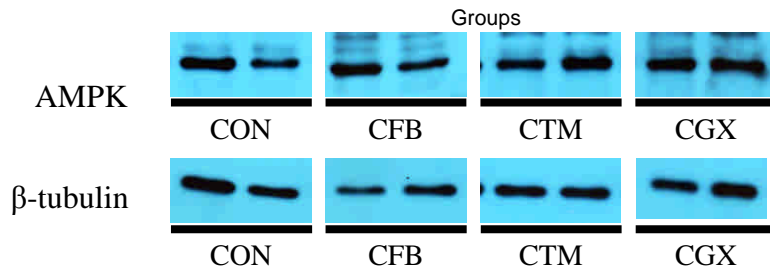
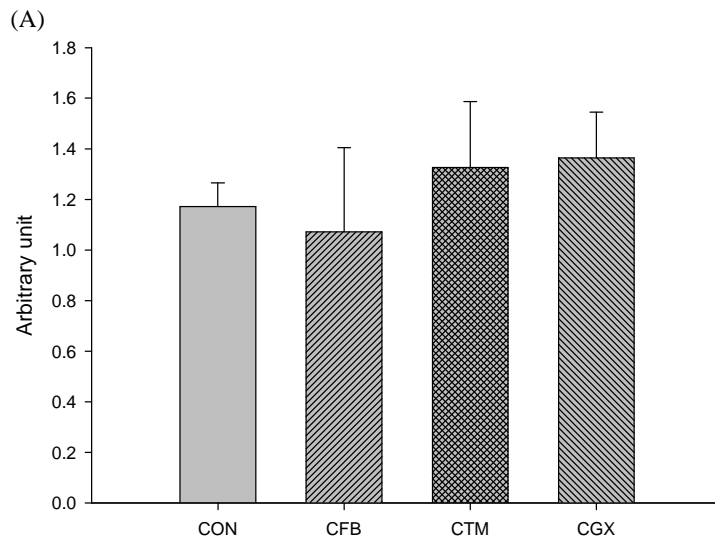
圖十四、Akt 的蛋白質相對表現量。

蛋白質抽取後定量，取 30 μg 細胞質蛋白質進行西方轉漬法，分析 Akt 的蛋白質相對表現量，且以 β -tubulin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之目標蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。控制組 (CON group, n=4)、葡萄糖耐受異常組 (NTZ group, n=8)、子實體組 (CFB group, n=5; NFB group, n=8)、發酵菌絲體組 (CTM group, n=6; NTM group, n=9)，以及多醣體組 (CGX group, n=10; NGX group, n=11)。*表示與控制組有顯著差異 ($P<0.05$)。

3-5 肌肉中 AMP-activated protein kinase (AMPK) 蛋白質相對表現量

脂聯素傳訊路徑雖仍未完全了解，但由文獻指出脂聯素會藉由活化細胞中的 AMPK 來達到調節血糖與協助胰島素所帶來的調控代謝作用。因此為更進一步明確脂聯素對肌肉細胞的影響，利用西方轉漬法測量細胞質中 AMPK 蛋白質的總量，以了解細胞中脂聯素傳訊的效果。誘發葡萄糖耐受異常後，AMPK 蛋白質表現量相對於控制組只有些微的下降，並未有明顯的影響 (圖十五 B) (CON group, 1.17 ± 0.13 ; NTZ group, 1.07 ± 0.16)。正常大鼠餵食黃金銀耳各組其 AMPK 蛋白質表現量並未有顯著的改變 (CFB group, 1.21 ± 0.37 ; CTM group, 1.5 ± 0.29 ; CGX group, 1.48 ± 0.19)，雖餵食發酵菌絲體與多醣體有些微上升，但未達顯著的提升 (圖十五 A)。葡萄糖耐受異常大鼠經餵食黃金銀耳子實體後 (NFB group, 1.03 ± 0.09)，對其 AMPK 蛋白質表現量沒有影響，但餵食發酵菌絲體 (NTM group, 1.64 ± 0.19) 與多醣體 (NGX group, 1.81 ± 0.23) 兩組則使肌肉中 AMPK 蛋白質表現量顯著的提升 (圖十五 B)。故，於葡萄糖耐受異常狀態下餵食黃金銀耳發酵菌絲體與多醣體可提高肌肉中 AMPK 蛋白質表現量。

Expression of AMPK protein

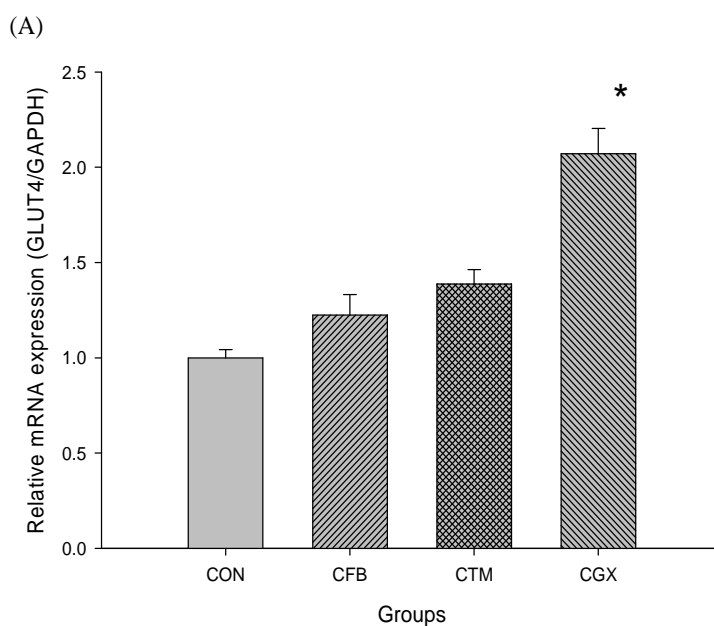


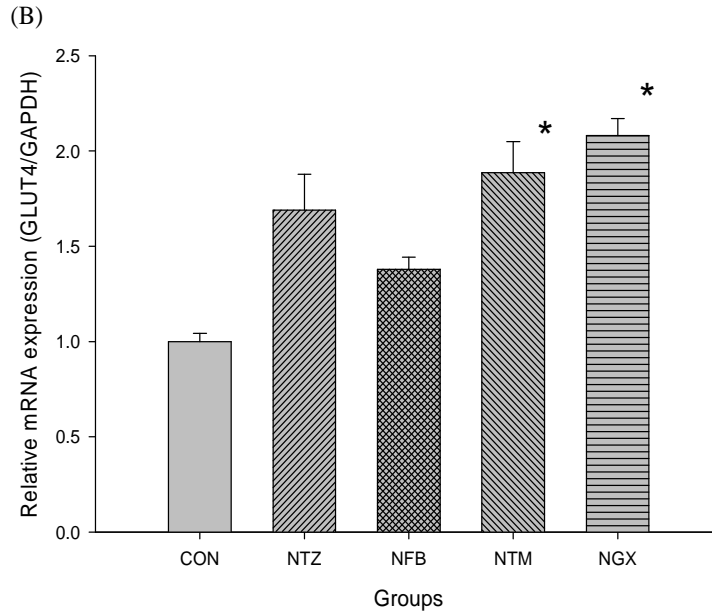
圖十五、AMPK 的蛋白質相對表現量。

蛋白質抽取後定量，取 30 μg 細胞質蛋白質進行西方轉漬法，分析 AMPK 的蛋白質相對表現量，且以 β -tubulin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之目標蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。控制組 (CON group, n=4)、葡萄糖耐受異常組 (NTZ group, n=8)、子實體組 (CFB group, n=5; NFB group, n=8)、發酵菌絲體組 (CTM group, n=6; NTM group, n=9)，以及多醣體組 (CGX group, n=10; NGX group, n=11)。*表示與控制組有顯著差異 ($P<0.05$); +表示糖尿病組與控制組之間有顯著差異 ($P<0.05$)。

3-6 肌肉中葡萄糖轉運蛋白 (GLUT4) mRNA 與蛋白質相對表現量

肌肉組織進行調降血糖作用主要是藉由胰島素刺激下透過葡萄糖轉運蛋白 GLUT4 來攝取葡萄糖進入細胞中。因此實驗中測量肌肉細胞中 GLUT4 mRNA 表現量及其蛋白質表現，以瞭解餵食黃金銀耳對於 GLUT4 表現的影響。GLUT4 mRNA 表現量方面，誘發葡萄糖耐受異常使其表現較控制組略微提升(CON group, 1.00 ± 0.4 ; NTZ group, 1.69 ± 0.19)(圖十六 B); 而正常大鼠餵食黃金銀耳後，各組的 GLUT4 mRNA 表現均有上升的趨勢(CFB group, 1.22 ± 0.11 ; CTM group, 1.39 ± 0.07 ; CGX group, 2.07 ± 0.13)，而餵食多醣體更有顯著的提高其表現量(圖十六 A); 葡萄糖耐受異常大鼠餵食子實體組其表現量些微的降低(NFB group, 1.38 ± 0.06)，發酵菌絲體組 NTM group, 1.89 ± 0.16)與多醣體組(NGX group, 2.08 ± 0.09)則有增加的趨勢(圖十六 B)。因此，正常大鼠餵食黃金銀耳多醣體有助於增加肌肉細胞中 GLUT4 mRNA 表現，而葡萄糖耐受異常大鼠餵食黃金銀耳發酵菌絲體與多醣體均可略微提升其 mRNA 表現量。



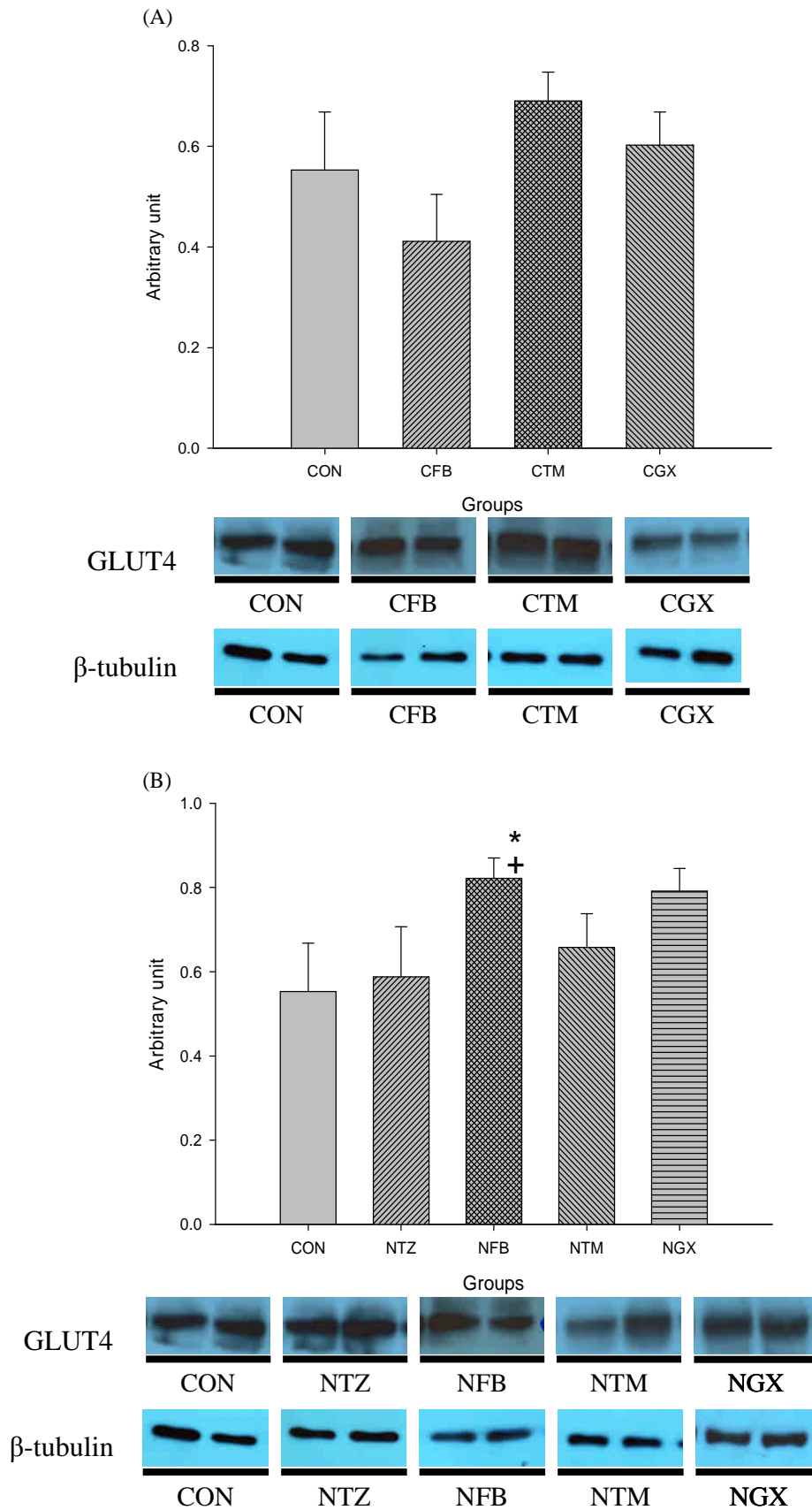


圖十六、第四型葡萄糖轉運蛋白的基因相對表現量。

各組別之大鼠於實驗第 15 天犧牲後，取其腓腸肌抽取 RNA 反轉錄為 cDNA，再以同步定量聚合酶連鎖反應測量其 GLUT4 mRNA 表現量，並使用 GAPDH mRNA 表現量做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之目標基因表現量於校正後以相對表現量表示。所有數值均重複兩次，並以 dissociation protocol 及洋菜瓊脂膠電泳確認反應產物之專一性。控制組 (CON group, n=4)、葡萄糖耐受異常組 (NTZ group, n=8)、子實體組 (CFB group, n=5; NFB group, n=8)、發酵菌絲體組 (CTM group, n=6; NTM group, n=9)，以及多醣體組 (CGX group, n=10; NGX group, n=11)。*表示與控制組有顯著差異 (P<0.05)。

由以上結果發現黃金銀耳之餵食可提升葡萄糖轉運蛋白的基因表現量，因此也嘗試去了解其於蛋白質表現量的影響。由圖十七可見，經 STZ+NT 誘發葡萄糖耐受異常後未影響其蛋白質表現 (CON group, 0.55 ± 0.12 ; NTZ group, 0.59 ± 0.12) (圖十七 B)。正常狀態下餵食黃金銀耳子實體 (CFB group, 0.41 ± 0.09) 使其表現量略微降低，而餵食發酵菌絲體與多醣體 (CTM group, 0.69 ± 0.06 ; CGX group, 0.6 ± 0.07) 則些微提升 GLUT4 蛋白質表現量，皆未達顯著差異 (圖十七 A)。而經誘發葡萄糖耐受異常後餵食黃金銀耳子實體 (NFB group, 0.82 ± 0.05) 使其表現量顯著提升，餵食發酵菌絲體與多醣體 (NTM group, 0.66 ± 0.08 ; NGX group, 0.79 ± 0.05) 則均無顯著的影響。因此推測黃金銀耳的餵食可提升葡萄糖轉運蛋白基因與蛋白質表現。

Expression of Glucose transporter 4 protein



圖十七、細胞質第四型葡萄糖轉運蛋白的蛋白質相對表現量。

蛋白質抽取後定量，取 50 μg 細胞膜蛋白質進行西方轉漬法，分析第四型葡萄糖轉運蛋白的蛋白質相對表現量，且以 β -tubulin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之目標蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。控制組 (CON group, n=4)、葡萄糖耐受異常組 (NTZ group, n=8)、子實體組 (CFB group, n=5; NFB group, n=8)、發酵菌絲體組 (CTM group, n=6; NTM group, n=9)，以及多醣體組 (CGX group, n=10; NGX group, n=11)。*表示與控制組有顯著差異 ($P<0.05$)；+表示糖尿病組與控制組之間有顯著差異 ($P<0.05$)。

四、討論

4-1 胰島素傳訊

本實驗中採用 streptozotocin 與 nicotinamide 誘發葡萄糖耐受異常之動物模式，僅部分破壞胰臟 β 細胞，使胰島素分泌不足造成高血糖，而胰臟仍保有少許分泌胰島素的功能，故較接近葡萄糖耐受異常的動物模式，仍無法完整解釋糖尿病此一成因極為複雜且多病症的疾病。由實驗結果了解，STZ+NT 誘發葡萄糖耐受異常後，其胰島素傳訊分子，如胰島素受體、胰島素受體基質 (IRS-1、IRS-2) 等，從 mRNA 表現量分析(圖九~圖十一)以及蛋白質表現量分析(圖十二~圖十四)中都顯示，肌肉中胰島素傳訊於葡萄糖耐受異常中僅些微受損。而前驅實驗中的動物試驗並無進行胰島素耐受性測試，因此無法得知動物模式是否具有胰島素阻抗，故本實驗中將以黃金銀耳降血糖效用為提高胰島素敏感性，而非改善胰島素阻抗。

動物實驗指出(Lo et al., 2006)，正常大鼠餵食黃金銀耳後經分析其飯後血糖與血液中胰島素含量發現，黃金銀耳可明顯降低其胰島素分泌量，且不影響血糖恆定能力，暗示黃金銀耳可提升胰島素敏感性(附圖三 a、附圖七 a)。葡萄糖耐受異常模式大鼠於飯後血糖值方面則有高血糖的現象，餵食黃金銀耳後可顯著改善其高血糖狀況，使回復正常(附圖三 b)；由口服葡萄糖實驗中可得，服用黃金銀耳能使高血糖狀況較快回復，顯示其可改善葡萄糖耐受性(附圖四 b)；而飯後或是口服葡萄糖實驗中，雖葡萄糖耐受異常模式其血清胰島素濃度皆顯著減少，黃金銀耳之餵食可回復部分胰島素含量(附圖五 b、附圖六 b)；胰臟中胰島素含量方面，葡萄糖耐受異常模式僅有正常模式 20~40%，經餵食黃金銀耳後雖有些微回覆卻無顯著差異；餵食黃金銀耳可回復葡萄糖耐受異常模式中的三酸甘油酯與葡萄糖胺(附表一)。由以上結果可了解，黃金銀耳雖無改善胰島素分泌量，但其透過提升胰島素敏感性，達到降血糖與降血脂效用，且實驗中亦發現黃金銀耳的降血糖效果的確與其多醣體成份相關。因此推測，黃金銀耳的降血糖活性與改善糖尿病症狀的作用，並非透過提高胰島素分泌量，而可能是藉由提升周邊組織對於胰島素的敏感性，增強細胞中胰島素傳訊，促使細胞增加葡萄糖的攝入與利用，藉此以達到降低血糖維持血糖調控的效用。胰島素降低血糖的效用主要是透過促進肌肉與脂肪組織攝入葡萄糖，而肌肉組織為體內攝入葡萄糖的首要組織，亦為胰島素介導下葡萄糖攝入受損的主要組織(Zierath et al., 2000; Zierath et al.,

2002; Zierath and Kawano, 2003)。因此可推測，動物實驗中黃金銀耳餵食所造成的血糖降低效果，可能是因為提高肌肉組織之胰島素敏感性，促使其攝入大量的葡萄糖。而肌肉組織主要透過胰島素刺激葡萄糖轉運蛋白 GLUT4 來攝入葡萄糖進細胞，實驗結果也進一步的了解黃金銀耳可提升第四型葡萄糖轉運蛋白 (GLUT4) 的表現(圖十六、圖十七)，印證之前推測黃金銀耳藉由促進肌肉細胞葡萄糖攝取而達到調降血糖的效用。

第四型葡萄糖轉運蛋白攝取葡萄糖的作用主要受到胰島素的調控。肌肉組織中胰島素受體於葡萄糖攝入的角色，由剔除肌肉中胰島素受體基因的小鼠，其由胰島素刺激的葡萄糖攝取顯著降低，以及會導致肌肉組織胰島素阻抗即可得知 (Bruning et al., 1998)。黃金銀耳之餵食於基因層面雖對胰島素受體基因轉錄效率於正常狀況下有些微提升，但並無顯著影響(圖九)，然而其於細胞膜上胰島素受體蛋白質表現量無論於葡萄糖耐受異常狀態或正常狀態下均有顯著提升之趨勢(圖十二)。故推論因胰島素受體於肌肉組織葡萄糖攝入佔重要角色，而 STZ+NT 誘發葡萄糖耐受異常後促使胰島素受體轉錄效率出現代償現象提高其表現量以補償因 STZ+NT 降低胰島素分泌量而減少的葡萄糖攝取狀況(附圖七 b)，但於蛋白質表現方面誘發葡萄糖耐受異常並不影響其 IR 蛋白質表現，且經黃金銀耳餵食後於正常大鼠與葡萄糖耐受異常大鼠均有顯著提升表現量之結果，故黃金銀耳之餵食的確有助於增加胰島素受體的表現。

胰島素傳訊中，胰島素受體磷酸化活化下游的胰島素受體基質。由基因剔除與基因轉殖等實驗證明，IRS-1 基因剔除或表現量降低時主要會造成肌肉中的胰島素阻抗，降低第四型葡萄糖轉運蛋白 (GLUT4) 轉位，進而減少肌肉的葡萄糖攝入 (Araki et al., 1994; Huang et al., 2005; Yamauchi et al., 1996)。而本實驗結果顯示，葡萄糖耐受異常大鼠的 IRS-1 基因與蛋白質表現均未受到影響，而基因層面得知經餵食黃金銀耳多醣體可促使其於 STZ+NT 狀態下表現提升(圖十)；於蛋白質表現方面，黃金銀耳子實體之餵食無論於正常大鼠或葡萄糖耐受異常大鼠均可有助於其蛋白質表現，另外於葡萄糖耐受異常狀態下餵食黃金銀耳多醣體亦有助於 IRS-1 蛋白質表現量的提高(圖十三)。由以上結果可推論，黃金銀耳可促使 IRS-1 基因與蛋白質表現量提高，進而提升胰島素敏感性及葡萄糖轉運蛋白 GLUT4 轉位以達到調降血糖的效用。第二型胰島素受體基質 IRS-2 已有文獻指出其與脂肪代謝較相關 (Taniguchi et al., 2005; Taniguchi et al., 2006)，亦有實驗證

實 IRS-2 於肌肉中並非胰島素介導葡萄糖攝入所需(Higaki et al., 1999)。因此可以解釋 IRS-2 轉錄效率上所觀察到的結果，其 mRNA 表現量經黃金銀耳餵食後並未影響其表現，且亦對血糖調控沒有影響(圖十一)；本研究主要探討黃金銀耳之餵食對於肌肉中調降血糖的機制，而 IRS-2 經文獻指出其於肌肉中的角色與脂肪代謝較為相關，故本實驗中並無對 IRS-2 蛋白質表現做進一步的了解。

胰島素傳訊中，胰島素受體基質活化後，進而活化 Akt。Akt 參與大多數由胰島素引起的代謝調控，包括蛋白質、脂質、肝醣合成，葡萄糖代謝，基因表現與細胞增生等 (Saltiel and Kahn, 2001)，為介導胰島素作用重要的媒介分子，已知 Akt 確實參與胰島素傳訊中對葡萄糖轉運的調控 (Schinner et al., 2005)。實驗結果中指出，餵食黃金銀耳確實會提高 Akt 蛋白質表現量 (圖十四)，於正常狀態中餵食發酵菌絲體與多醣體均可使 Akt 蛋白質表現量顯著提高，而葡萄糖耐受異常大鼠僅餵食黃金銀耳發酵菌絲體有助於 Akt 蛋白質表現量些微提升。因此推測黃金銀耳可促進正常大鼠中 Akt 蛋白質表現，增加其介導的葡萄糖轉運行為，進而調控血糖。

第四型葡萄糖轉運蛋白 GLUT4 為肌肉組織攝入葡萄糖主要的管制者，由實驗結果中也進一步支持前述兩傳訊路徑的改善將反應於第四型葡萄糖轉運蛋白 (GLUT4) 表現之假設。肌肉組織肌肉組織中 GLUT4 之基因轉錄與蛋白質表現上於葡萄糖耐受異常狀態下並未受到影響，但基因層面正常大鼠與葡萄糖耐受異常大鼠之多醣體組均有顯著提升；蛋白質層面則是誘發葡萄糖耐受異常後餵食黃金銀耳子實體有助於提升其表現量(圖十六、圖十七)。已有研究證實，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 (Kim et al., 2001; Minokoshi et al., 2003; Zisman et al., 2000)；而若增加 GLUT4 表現量，可促進胰島素刺激的葡萄糖攝取作用，改善葡萄糖耐受性與胰島素敏感性(Leturque et al., 1996; Tsao et al., 1996)。

由以上結果可推論，黃金銀耳不論於正常狀態或是葡萄糖耐受異常誘發狀態下，均可顯著提升胰島素傳訊分子的基因表現量進而促進第四型葡萄糖轉運蛋白基因表現以提高胰島素敏感性，達到調降血糖作用。

4-2 脂聯素傳訊

脂聯素可影響周邊組織的胰島素敏感性，並經影響參與葡萄糖與脂質代謝的

分子而調控血糖恆定(Kershaw and Flier, 2004; Schinner et al., 2005)。其促進肌肉與脂肪組織攝入葡萄糖，並抑制肝醣質新生作用釋出葡萄糖，因而有胰島素敏敏之效用。脂聯素分泌量的提高不只有助於胰島素敏感性，其抗發炎、抗動脈硬化以及第二型糖尿病之併發症亦有所幫助。諸多實驗指出，體內脂聯素濃度的增加確實與胰島素敏感性提升相關 (Fu et al., 2005)。而與其他研究相符，實驗中葡萄糖耐受異常大鼠血清中胰島素含量低於正常大鼠，再次證實高血糖狀態下會降低脂肪細胞脂聯素之分泌量。且正常大鼠餵食黃金銀耳多醣體可顯著提升其脂聯素濃度；葡萄糖耐受異常大鼠餵食黃金銀耳子實體可使使脂聯素濃度顯著回升，餵食發酵菌絲體與多醣體可顯著提升血清中脂聯素濃度(圖六)。有文獻指出脂聯素透過 AdipoR1 活化 AMPK 與 AdipoR2 活化 PPAR α 來達到提高 GLUT4 轉位與葡萄糖攝入、脂肪酸攝入與氧化等作用調控胰島素敏感性(Yamauchi et al.,2007)；研究證實脂聯素可透過活化骨骼肌中的 IRS-1 及其下由 PI3-kinase 提高葡萄糖攝取而增強骨骼肌中的胰島素敏感性(Maeda et al., 2002)。因而推論黃金銀耳可藉由提高脂聯素的分泌量，與胰島素協同增加肌肉細胞 GLUT-4 之轉位，也可能透過增強胰島素傳訊，提升肌肉等周邊組織對胰島素的敏感性，增加葡萄糖處理效率。

脂聯素主要透過兩個受體，第一型脂聯素受體(Adiponectin receptor 1，AdipoR1)與第二型脂聯素受體(Adiponectin receptor 2，AdipoR2)，於細胞內調控周邊組織脂質與葡萄糖的代謝 (Kadowaki and Yamauchi, 2005; Yamauchi et al., 2002; Yamauchi et al., 2007)。實驗結果顯示，脂聯素兩型受體的 mRNA 表現量皆未受到誘發葡萄糖耐受異常影響，而正常大鼠餵食黃金銀耳各組 AdipoR1、AdipoR2 雖有上升的趨勢，但無顯著差異(圖七、圖八)；誘發葡萄糖耐受異常後餵食黃金銀耳子實體與多醣體可使脂聯素兩型受體基因表現量均顯著提高，而發酵菌絲體組僅使 AdipoR1 mRNA 表現量顯著提升。前人研究結果指出，脂聯素受體 AdipoR1 與 AdipoR2 基因表現量提升，有助於增強其對血糖的調控行為 (Yamauchi et al.,2007)。亦有實驗結果指出，脂聯素受體 AdipoR1 與 AdipoR2 基因表現量的下降會造成結合於細胞膜上的脂聯素減少，亦即脂聯素受體的蛋白質表現量會隨著基因的表現量降低 (Tsuchida et al., 2004)。因此推測餵食黃金銀耳可提高脂聯素受體之蛋白質表現量，藉此增強肌肉細胞中的脂聯素傳訊。而 STZ 誘發高血糖與低胰島素狀態下，AdipoR1 與 AdipoR2 mRNA 表現會顯著提升，但在胰島素介導下可回復其 mRNA 表現量；且胰島素傳訊會透過抑制轉錄因子

Foxo1，抑制脂聯素受體轉錄而降低其 mRNA 表現量(Kadowaki and Yamauchi, 2005; Tsuchida et al., 2004)。本實驗中 STZ+NT 誘發葡萄糖耐受異常後兩型脂聯素受體 mRNA 表現量均有些微上升(圖七、圖八)，推測可能即源自於胰島素濃度的降低(附圖七)。

AMPK 被視為對代謝壓力的感應分子，參與增加葡萄糖轉運蛋白 GLUT4 轉位與抑制 acetyl CoA carboxylase 等數個脂聯素重要之生理作用，其活化可增加細胞對胰島素與 TZD 類藥物之敏感性 (Tilg and Moschen, 2006)。且運動、脂聯素與 TZD 類糖尿病治療藥物等能使胰島素敏感性提高亦能活化 AMPK，顯示其於葡萄糖與脂質代謝中的重要性。實驗結果得知，STZ+NT 誘發葡萄糖耐受異常大鼠中，其 AMPK 蛋白質表現量並無受到影響，經黃金銀耳餵食後，雖不影響其正常狀態下的表現，但於葡萄糖耐受異常狀態則發酵菌絲體組與多醣體組均顯著的提高其蛋白質表現量(圖十五)。其表現量的提高似乎與脂聯素分泌量(圖六)及第一型脂聯素受體 AdipoR1(圖七)有相同趨勢，均於葡萄糖耐受異常大鼠餵食黃金銀耳發酵菌絲體與多醣體有顯著提高的效用。前人研究結果，於脂聯素刺激下提高 AdipoR1 表現時，進而提升 AMPK 表現，因而達到調控血糖與提高胰島素敏感性之功用(Yamauchi et al.,2007)，此結果與本實驗所觀察到的現象相符合。綜合以上結果推測黃金銀耳能提高脂聯素的分泌量，於肌肉中藉由 AdipoR1 活化 AMPK 提高其活性，因而增加 GLUT4 表現與葡萄糖攝入量，提高肌肉細胞的胰島素敏感性。

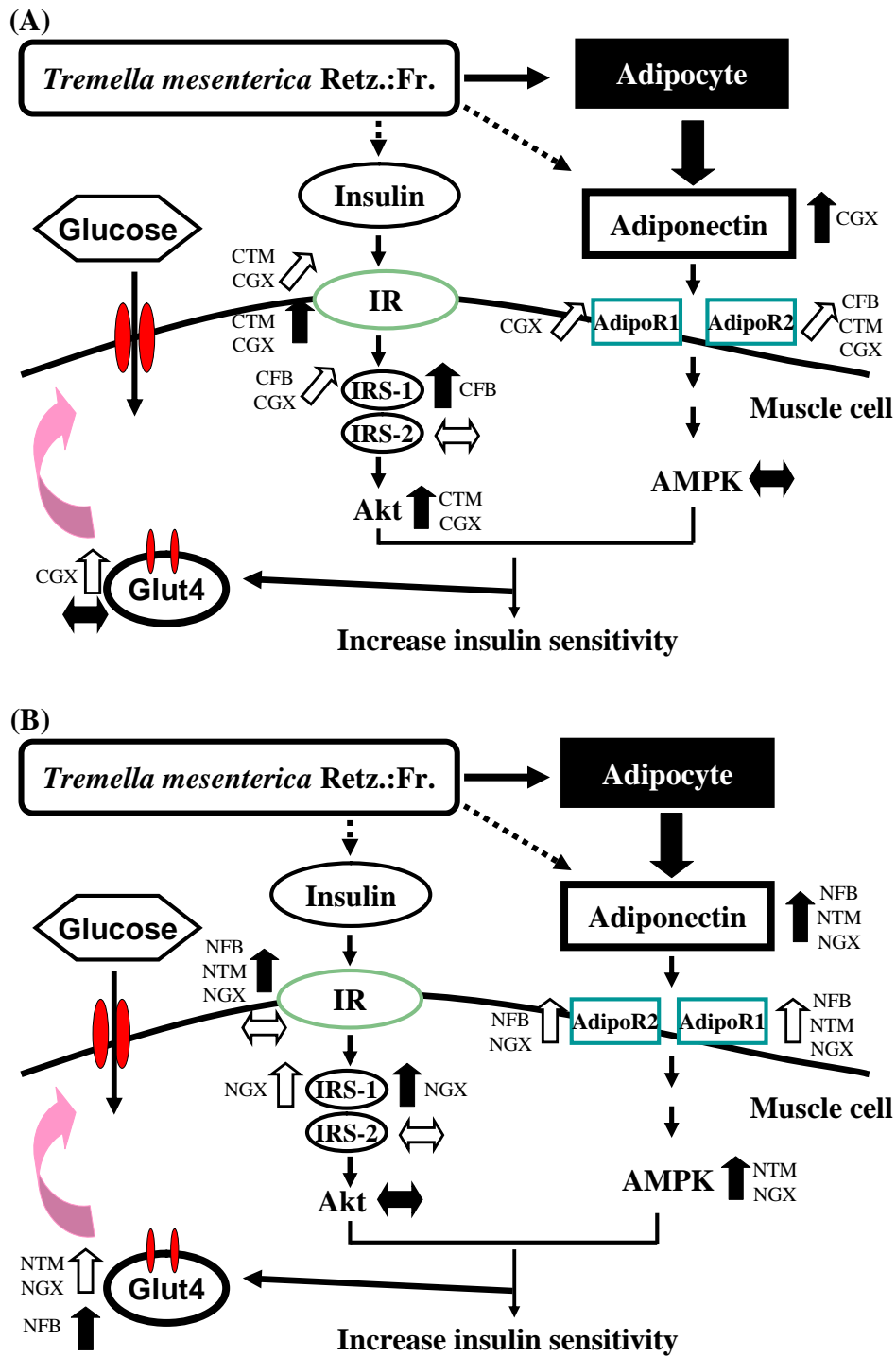
4-3 結論

由本實驗結果可發現(圖十八)，正常狀態下餵食黃金銀耳能提高血清中脂聯素濃度，於肌肉細胞中些微提升兩型脂聯素受體 mRNA 表現，但未影響 AMPK 蛋白質表現量；另外黃金銀耳亦能些微提升胰島素受體 mRNA 表現與顯著增加其蛋白質表現，且提高第一型胰島素受體基質基因轉錄效率與蛋白質表現量、增加 Akt 蛋白質表現量，增強肌肉細胞內胰島素傳訊(圖十八 A)。因此黃金銀耳於健康狀態時可能藉由增強肌肉細胞內胰島素訊息傳遞及些微的提升脂聯素傳訊，具有調節血糖之保健效用。STZ+ NT 誘發葡萄糖耐受異常狀態下，黃金銀耳可顯著增加血清中脂聯素的分泌量，並提高肌肉細胞上兩型脂聯素受體 mRNA 表現，進而增強 AMPK 的蛋白質表現，提高肌肉細胞內脂聯素傳訊；且雖無對

胰島素受體 mRNA 表現有影響而其蛋白質表現則顯著提升，並提高第一型胰島素受體基質基因轉錄效率與蛋白質表現量，但未影響下游 Akt 蛋白質表現量(圖十八 B)。故，黃金銀耳於葡萄糖耐受異常狀態時可能透過增強肌肉細胞內脂聯素傳訊與些微提高胰島素訊息傳遞，達到降血糖之修復效用。由以上結果可以推論黃金銀耳可能透過增強肌肉細胞內胰島素與脂聯素傳訊，協同提高 GLUT4 之表現，提高肌肉組織之胰島素敏感性，改善健康狀態或葡萄糖耐受異常大鼠中葡萄糖之代謝調控，達到其保健與修復之功效。

不同來源的黃金銀耳，子實體(FB)、發酵菌絲體(TM)、多醣體(GX)，雖於結果中顯示其於不同傳訊分子時具有不同的效用，偶爾能發揮效用提高傳訊分子表現，但有時卻又不影響傳訊分子作用。由整體來看，均具有改善糖尿病胰島素敏感性、提高葡萄糖耐受性、增強血糖調控等功效。其中以多醣體組能有效提升傳訊分子表現約八成，其比率較高，因此可推論多醣體的確為黃金銀耳內具調降血糖功能的機能性成分，但多醣體仍無法百分百的達到調控血糖效用需黃金銀耳其他成份相輔相成才能有效達到更有效的調降血糖功效。而人工發酵菌絲體含有 50% 多醣體較天然黃金銀耳子實體的 20% 高，但其提高傳訊分子表現的比率為五成多與子實體比率相當，於此可進一步的了解多醣體並非黃金銀耳唯一的降血糖機能性成份。故，黃金銀耳調控血糖功效乃因其含有多醣體與其他成份協同作用而達成。

本研究中增加正常大鼠餵食黃金銀耳不同來源之各組，為探討黃金銀耳保健之功效。實驗結果可了解，於不同傳訊分子黃金銀耳均扮演著不同角色，時而保健時而修復。由此可知，黃金銀耳不管是在發病前或葡萄糖耐受異常狀態時均具其調控血糖，與使胰島素增敏之功效。



圖十八、本研究結果之圖示。

(A)正常模式餵食黃金銀耳之成效；(B)糖尿病大鼠餵食黃金銀耳之效用。

符號說明：mRNA 表現量結果以白色箭號表示，蛋白質表現量結果以黑色箭頭表示。箭頭向上表示有顯著提升，箭頭向下則表示有顯著降低，斜向箭頭表示表現量無顯著差異但略有提升，而平向雙箭頭表示無顯著差異。

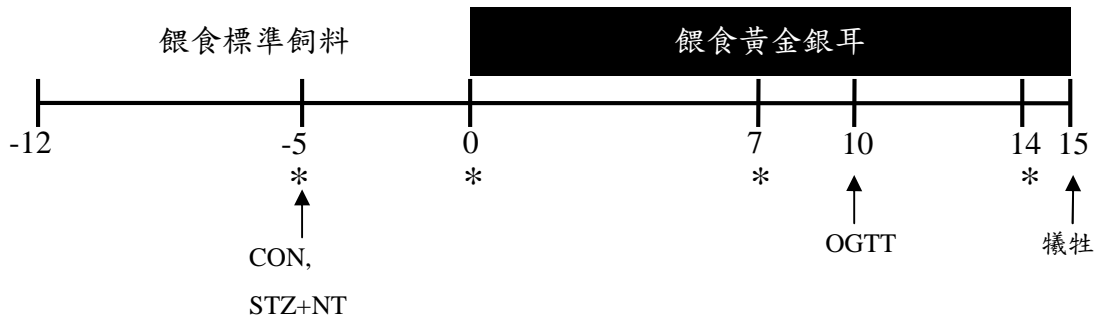
4-4 未來展望

黃金銀耳於肌肉組織中的胰島素與脂聯素傳訊路徑上可提高 Akt 與 AMPK 蛋白質表現，未來將藉由偵測其細胞質內 pAkt 與 pAMPK 的量，進一步了解黃金銀耳是否可透過活化 Akt 與 AMPK 來增強胰島素敏感性。於葡萄糖轉運方面，黃金銀耳之餵食使 GLUT4 無論於基因或蛋白質表現上均大為提升，因此將進一步探討 Glut4 於細胞膜上的表現量，了解其是否也能推動 GLUT4 之轉位，使肌肉組織的葡萄糖攝入提高，以達到降血糖的目的。

實驗結果顯示，脂聯素經黃金銀耳餵食後其分泌量顯著提高並與胰島素傳訊協同影響骨骼肌中的血糖攝取，指出於體內血糖恆定中脂肪組織具有重要的角色。脂肪組織可能除了藉由脂聯素也可能透過其他多種脂泌素於各周邊組織間協調血糖恆定之作用，故未來可進一步了解 leptin、resistin、visfatin 等與胰島素敏感性相關之脂泌素分泌量。另外黃金銀耳餵食後究竟是透過何種機制影響白色脂肪細胞，來提高脂聯素的分泌量，是否如同常見的糖尿病藥物 TZD 類藥物透過轉錄因子 PPAR 增加其基因的轉錄，此仍須深入探討黃金銀耳於脂肪組織內所造成的影響；或者黃金銀耳有可能影響到肌肉組織中脂聯素的分泌，故亦需對肌肉組織中脂聯素的分泌作深入的了解。

本模式僅能了解黃金銀耳於葡萄糖耐受異常狀態下的影響，為進一步探討其於胰島素阻抗時的效用，未來將藉由細胞模式來了解黃金銀耳是否可改善胰島素阻抗與提升胰島素敏感性。而動物實驗中僅可得知黃金銀耳長期性之效應，由細胞模式可觀察到餵食黃金銀耳之短期效用與傳訊分子磷酸化之動態變化，能更完整的解釋骨骼肌中黃金銀耳調降血糖功效之機制。

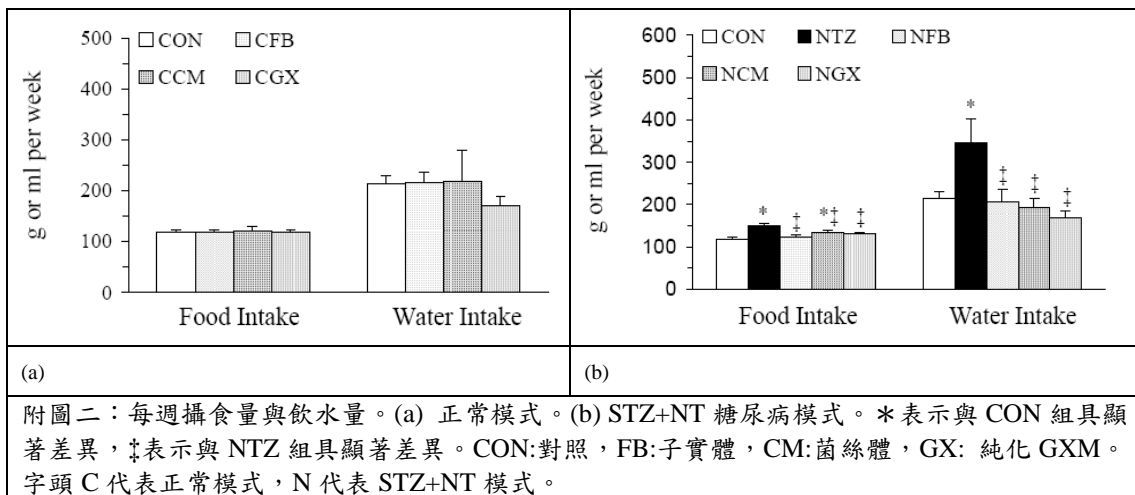
附錄一、動物試驗流程與生化分析數據 (Lo et al., 2006)

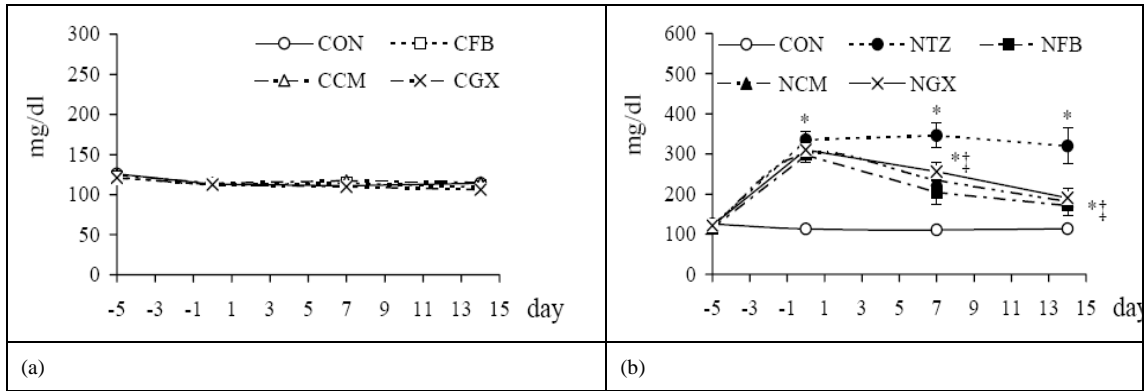


附圖一、動物實驗流程。

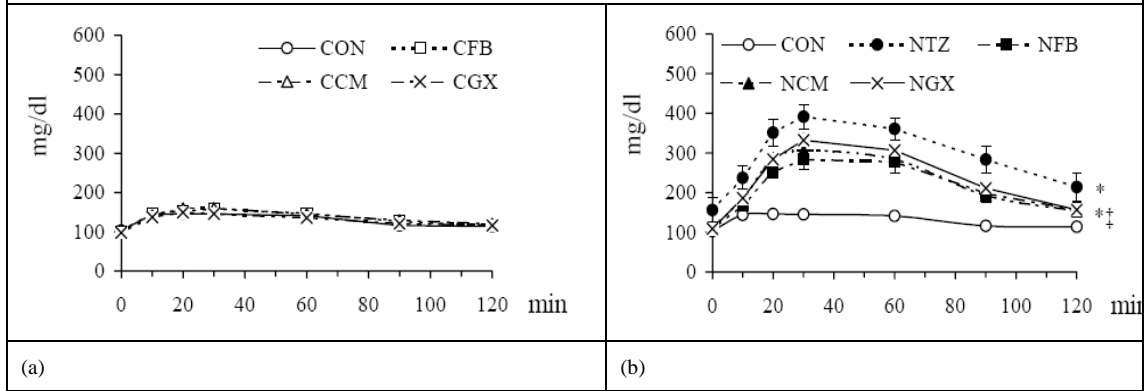
實驗期間，大鼠餵食的時間是由早上9點至下午5點。實驗開始前七天（第-12至-5天）為大鼠的適應期。*表示測量餐後2小時的血糖值及血胰島素；第-5天施打STZ + NT誘發糖尿病，OGTT (oral glucose tolerance test) 為口服葡萄糖耐受性測試。(Lo et al., 2006)

附圖二~七、(Lo et al., 2006)

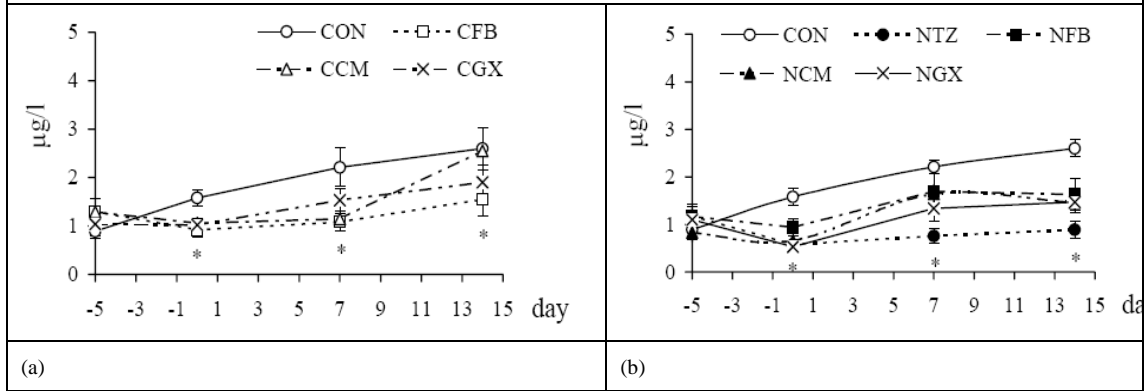




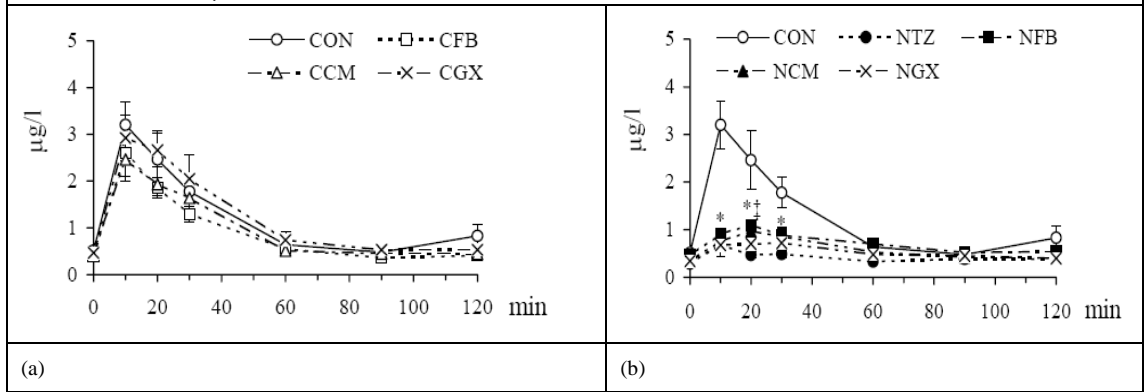
附圖三：飯後兩小時血糖濃度。(a) 正常模式。(b) STZ+NT 糖尿病模式。*表示與 CON 組具顯著差異，‡表示與 NTZ 組具顯著差異。第 0 天為餵食黃金銀耳開始日。



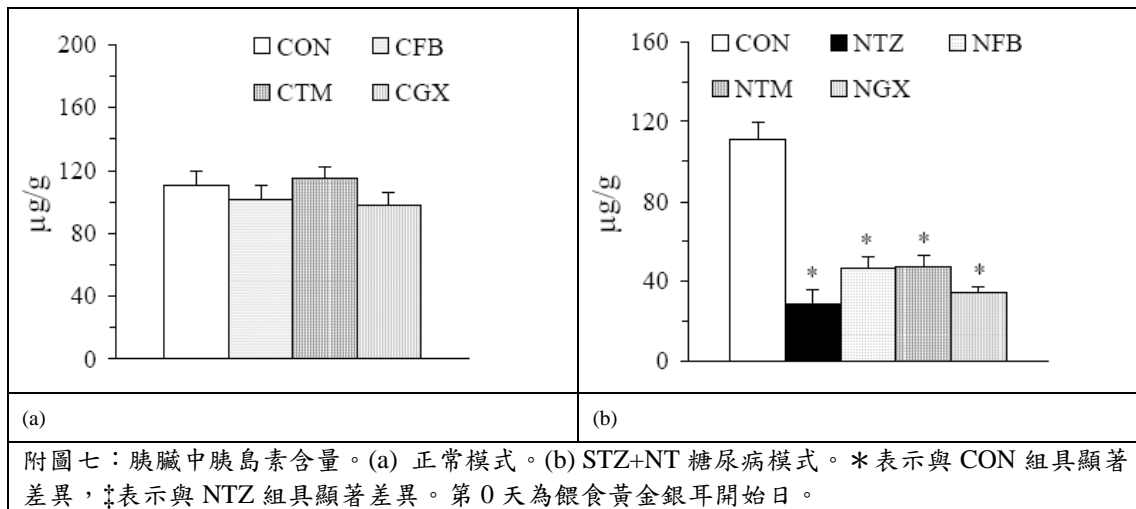
附圖四：口服葡萄糖耐受測試(OGTT)。(a) 正常模式。(b) STZ+NT 糖尿病模式。*表示與 CON 組具顯著差異，‡表示與 NTZ 組具顯著差異。第 0 天為餵食黃金銀耳開始日。



附圖五：飯後 2 小時血清中胰島素濃度。(a) 正常模式。(b) STZ+NT 糖尿病模式。*表示與 CON 組具顯著差異，‡表示與 NTZ 組具顯著差異。第 0 天為餵食黃金銀耳開始日。



附圖六：OGTT 中血清胰島素濃度。(a) 正常模式。(b) STZ+NT 糖尿病模式。*表示與 CON 組具顯著差異，‡表示與 NTZ 組具顯著差異。第 0 天為餵食黃金銀耳開始日。



附圖七：胰臟中胰島素含量。(a) 正常模式。(b) STZ+NT 糖尿病模式。*表示與 CON 組具顯著差異，‡表示與 NTZ 組具顯著差異。第 0 天為餵食黃金銀耳開始日。

附表一、黃金銀耳對大鼠血清中白蛋白、三酸甘油酯、BUN、GPT、葡萄糖胺濃度的影響

Table 1

Serum concentrations of albumin, triglyceride, BUN, GPT, and fructosamine in normal, STZ-NT, and STZ+NT rats

Group	Albumin (g/dl)	Triglyceride (mg/dl)	BUN (mg/dl)	GPT (U/l)	Fructosamine (mmol/l)
<i>Normal rats</i>					
CON	4.30±0.08	76.8±8.3	15.87±1.08	39.33±2.44	1.33±0.08
CFB	4.08±0.06	70.4±7.7	16.72±0.49	42.67±4.28	1.30±0.06
CCM	3.84±0.12*	62.5±10.1	16.55±0.96	50.10±6.55	1.32±0.05
CGX	4.40±0.11	62.5±6.5	14.79±0.48	57.40±5.66	1.34±0.08
<i>STZ-NT rats</i>					
STZ	3.64±0.05*	172.9±35.8*	35.24±2.66*	68.07±5.18*	2.12±0.04*
SFB	3.45±0.06* [†]	100.2±12.6* [†]	29.85±2.36*	72.09±11.86*	1.98±0.08*
SCM	3.52±0.06*	113.5±22.4* [†]	36.00±2.56*	68.53±8.40*	2.01±0.07*
<i>STZ+NT rats</i>					
NTZ	4.25±0.06	101.3±9.7*	17.95±0.91	50.13±2.39	1.76±0.11*
NFB	4.14±0.05*	78.4±9.1 [‡]	15.93±0.92	54.25±8.86	1.44±0.13 [‡]
NCM	3.99±0.06* [‡]	69.3±7.2 [‡]	16.38±0.91	40.11±1.24	1.56±0.06
NGX	4.11±0.03*	76.7±6.5 [‡]	17.15±0.92	44.82±2.05	1.36±0.11 [‡]

Values are means±SEM. BUN, blood urea nitrogen; GPT, glutamate-pyruvate transaminase. Values with symbol * are significantly different from that of the CON group, values in the SFB and SCM groups with symbol [†] are significantly different from that of the STZ group, and values in the NFB, NCM, and NGX groups with symbol [‡] are significantly different from that of the NTZ group at $P < 0.05$ by one-way ANOVA with the least significant difference.

附錄二、實驗中使用的化合物

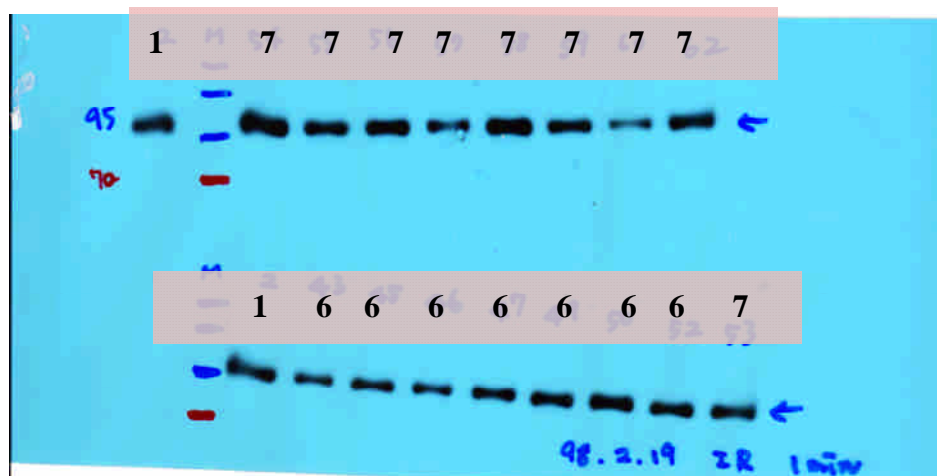
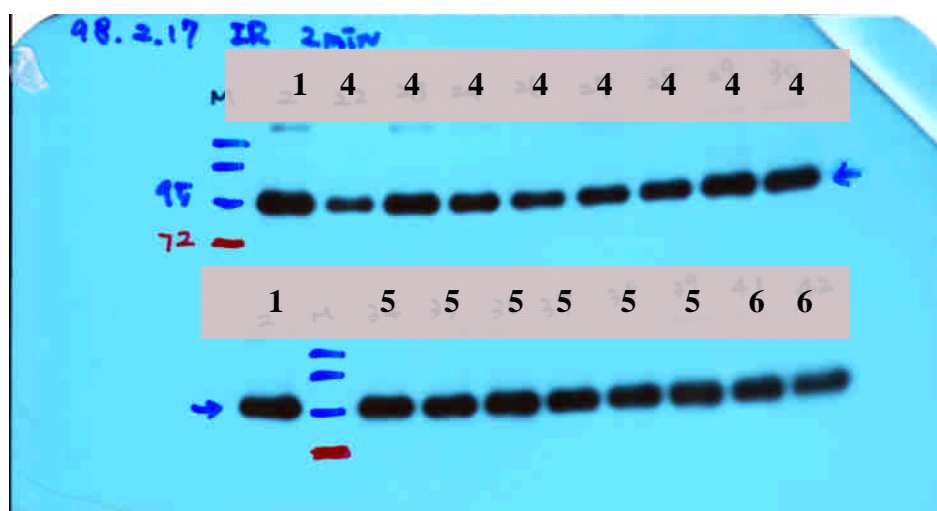
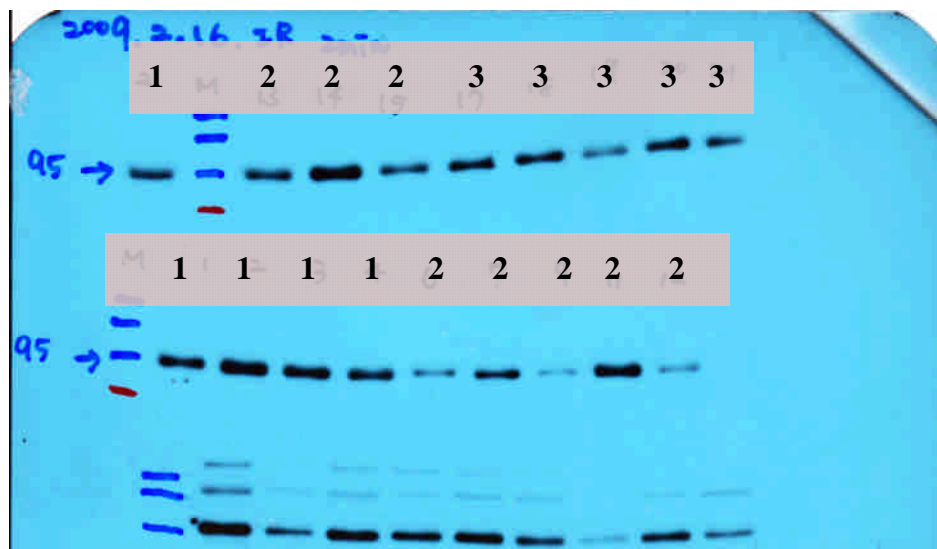
名稱	化學式/其他命名	使用實驗類別	品牌	目錄編號
Agarose LE	$(C_6H_{10}O_5 \cdot C_6H_8O_4)_n$	電泳	MDBio	
Acid-phenol	$C_6H_6O_6$	抽取 RNA	Amresco	0710
40 % Acrylamide/bis		SDS-PAGE	Gerbu	1139
Ammonium persulfate	$(NH_4)_2S_2O_8$	SDS-PAGE	Gerbu	1708
β -mercaptoethanol	HSC_2H_4OH	SDS-PAGE	Sigma	M-3148
Bromophenol blue	$C_{19}H_{10}O_5SBr$	SDS-PAGE	Sigma	B-0126
Chloroform	$CHCl_3$	抽取 RNA	Panreac	361252
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	抽取 RNA	Sigma	D-5758
Developer and fixer	Metol, hydroquinone	西方轉漬法	KodaK	190-0943,-1875
DTT	DL-Dithiothreitol	SDS-PAGE	Sigma	D-9779
Ethidium bromide	$C_{12}H_{20}BrN_3/EtBr$	電泳	Sigma	E-1510
Glycine	$C_2H_5NO_2$	SDS-PAGE	Sigma	G-8898
Glycerol	$C_3H_8O_3$	SDS-PAGE	WaKo	07200861
Potassium Dihydrogenphosphate	KH_2PO_4	西方轉漬法	Shimaku's	
Sodium chloride	$NaCl$	西方轉漬法	Panreac	121659

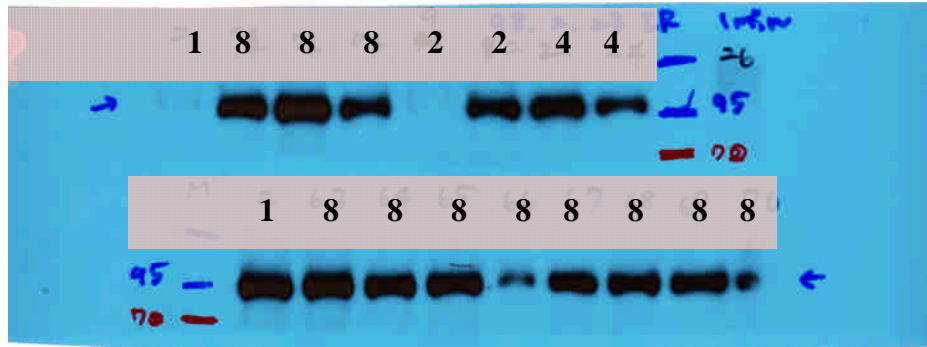
附錄二 (接續)、實驗中使用的化合物

名稱	化學式/其他命名	使用實驗類別	品牌	目錄編號
Sodium dodecyl sulfate	$C_{12}H_{25}OSO_3Na$	SDS-PAGE	Bio-Rad	161-01425
Sodium phosphate	Na_2HPO_4	西方轉漬法	Merck	106586
Sodium tetraborate	$Na_2B_4O_7$	西方轉漬法	Merck	106306
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine	SDS-PAGE	Sigma	T-9281
Tris	$NH_2C(H_2OH)$	西方轉漬法	USB	75825
Tween-20	$C_{58}H_{114}O_{26}$	西方轉漬法	Panreac	212312

附錄三、西方轉漬法結果底片

980216 insulin receptor





※ 1：控制組 (CON group)

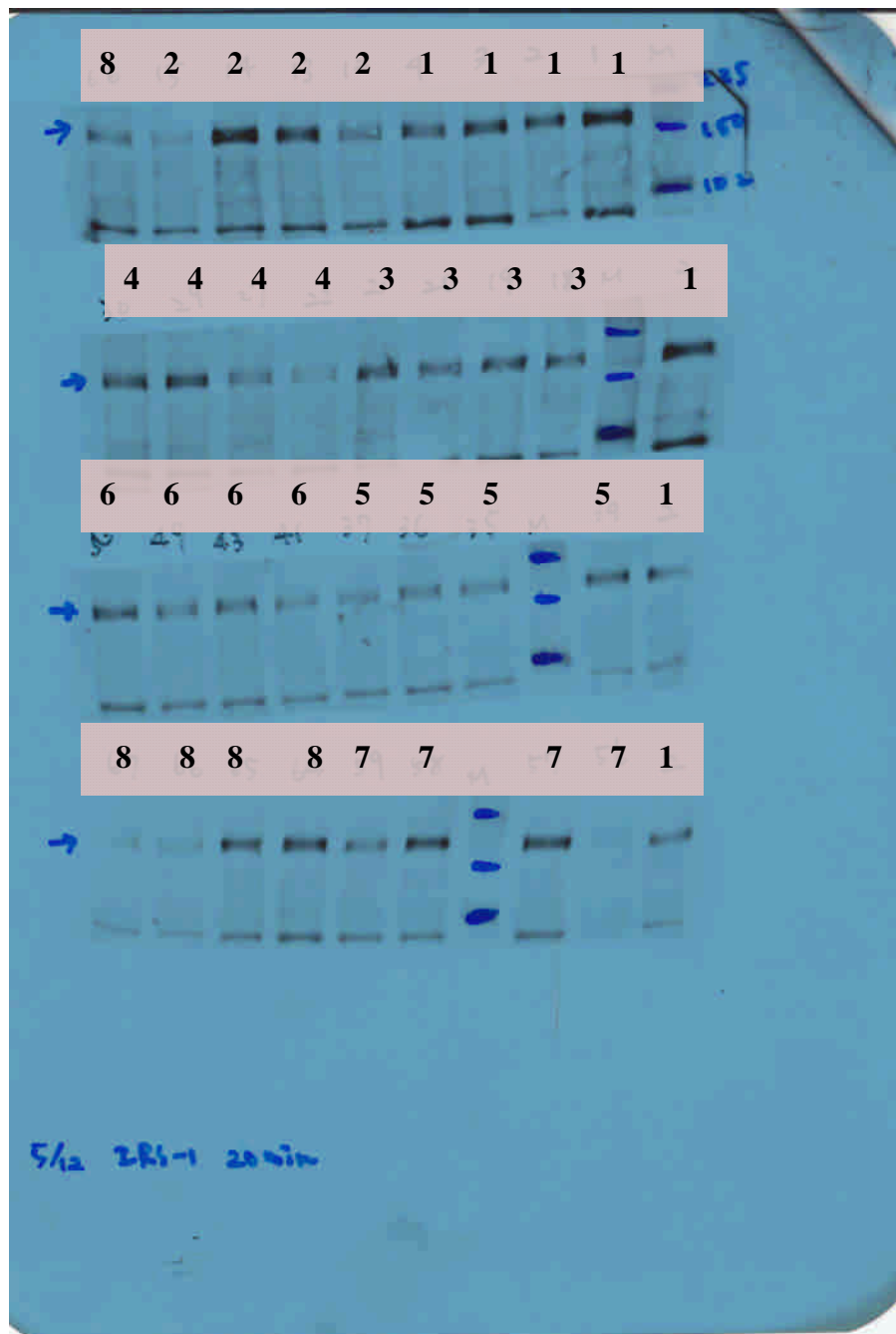
2：糖尿病組 (NTZ group)

3、4：子實體組 (CFB group、NFB group)

5、6：發酵菌絲體組 (CTM group、NTM group)

7、8：多醣體組 (CGX group、NGX group)

980512 insulin receptor substrate 1



※ 1：控制組 (CON group)

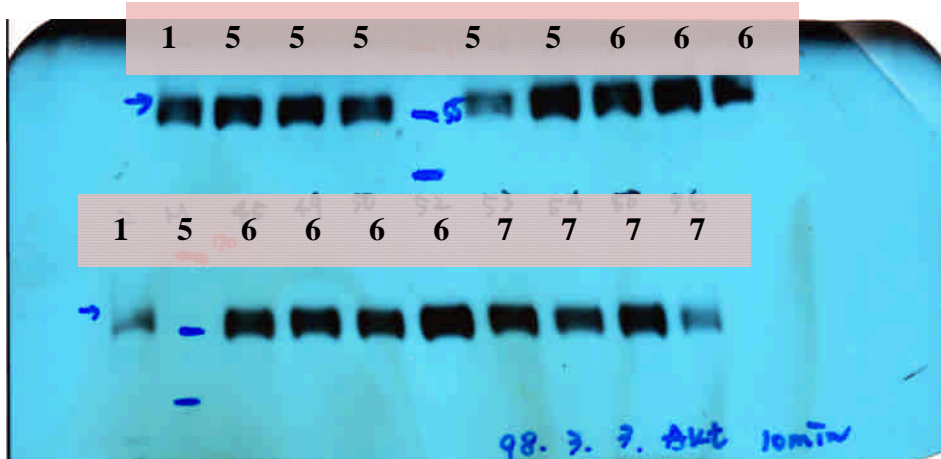
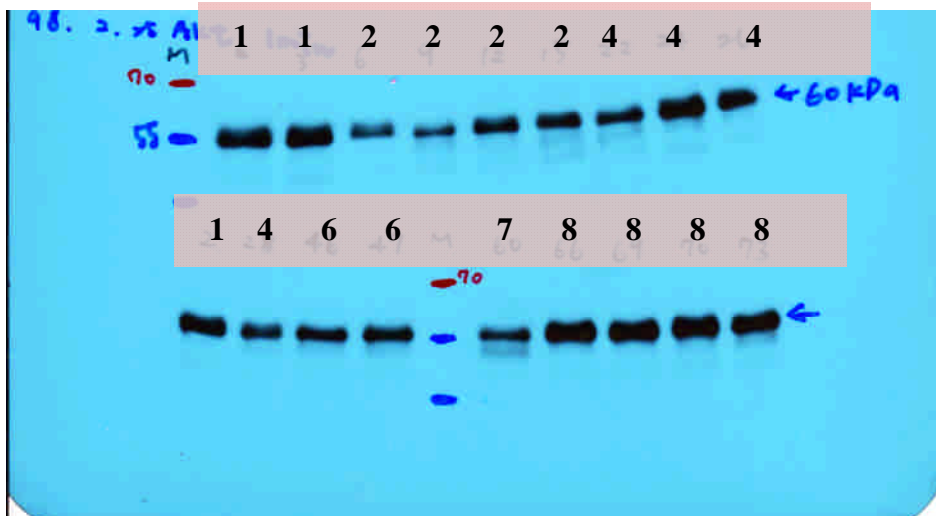
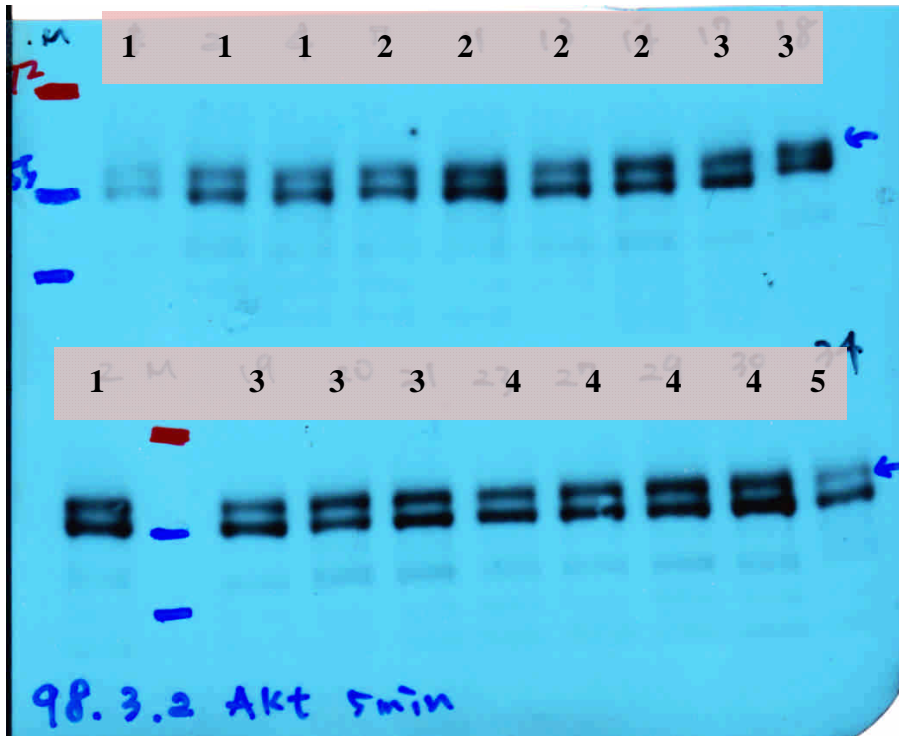
2：糖尿病組 (NTZ group)

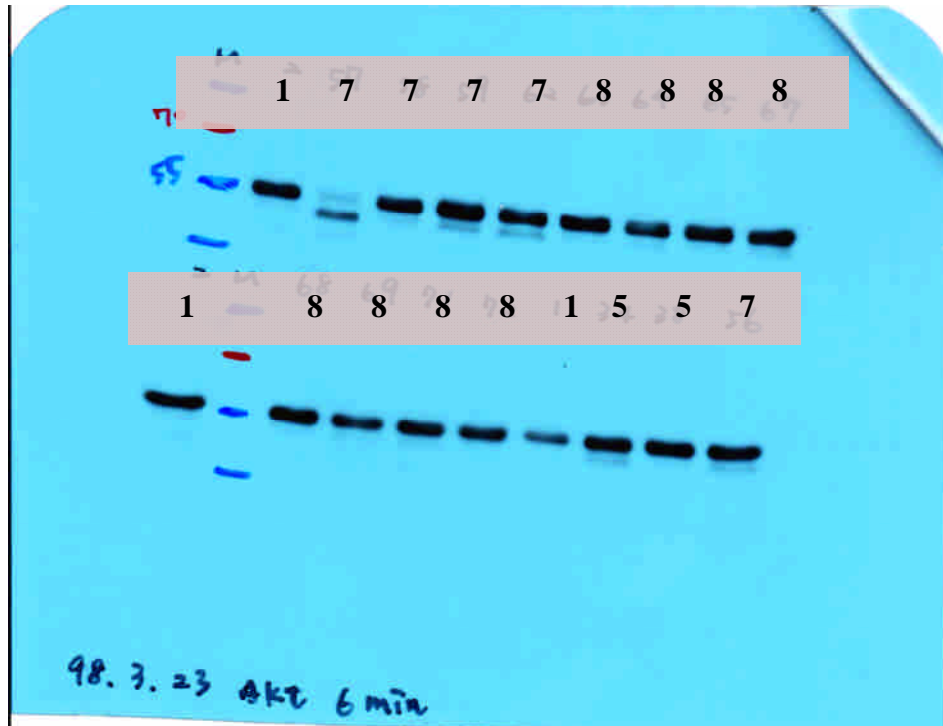
3、4：子實體組 (CFB group、NFB group)

5、6：發酵菌絲體組 (CTM group、NTM group)

7、8：多醣體組 (CGX group、NGX group)

980325 Akt





※ 1：控制組 (CON group)

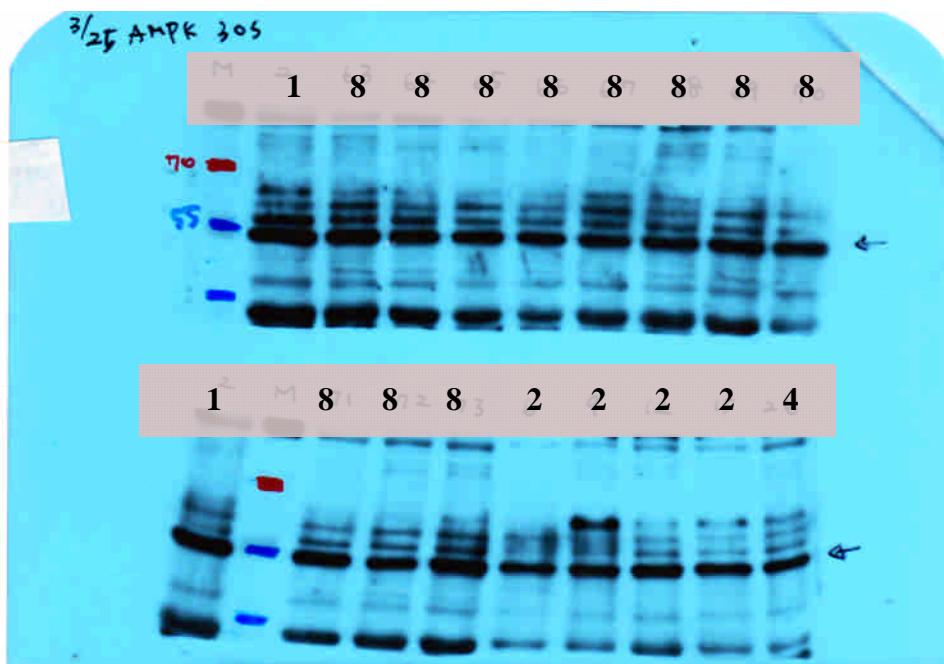
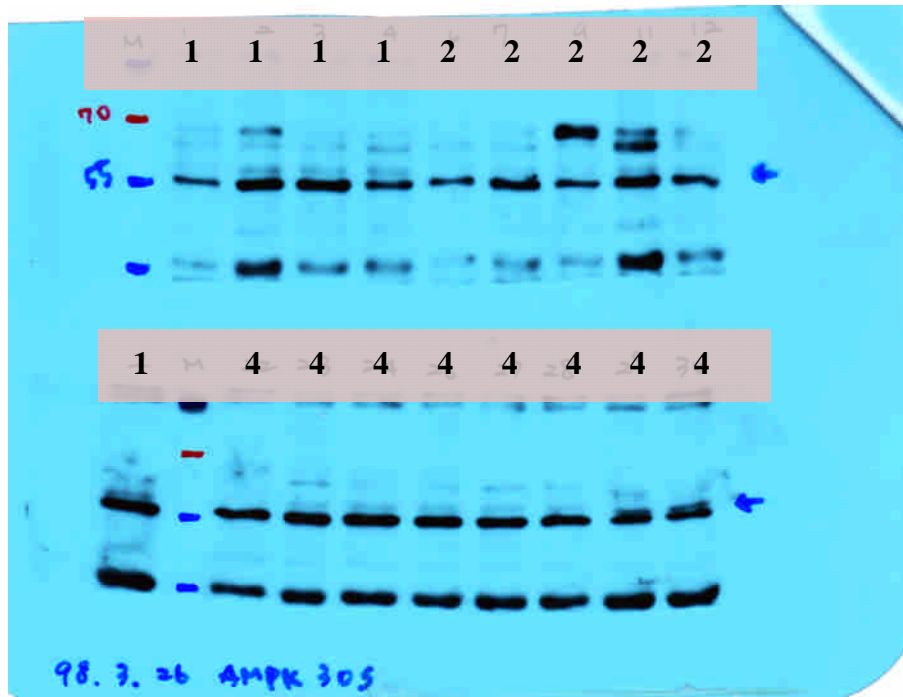
2：糖尿病組 (NTZ group)

3、4：子實體組 (CFB group、NFB group)

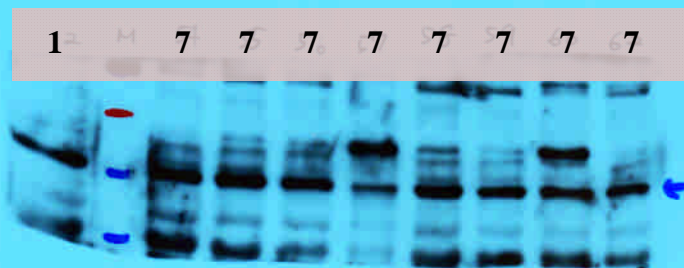
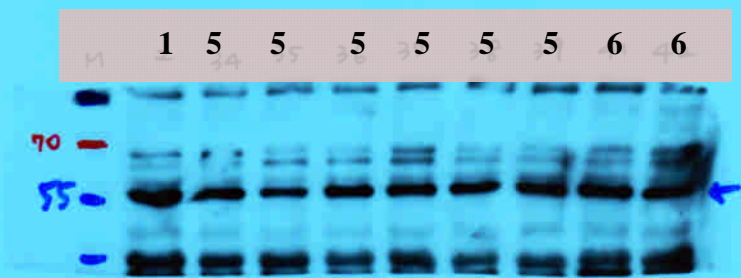
5、6：發酵菌絲體組 (CTM group、NTM group)

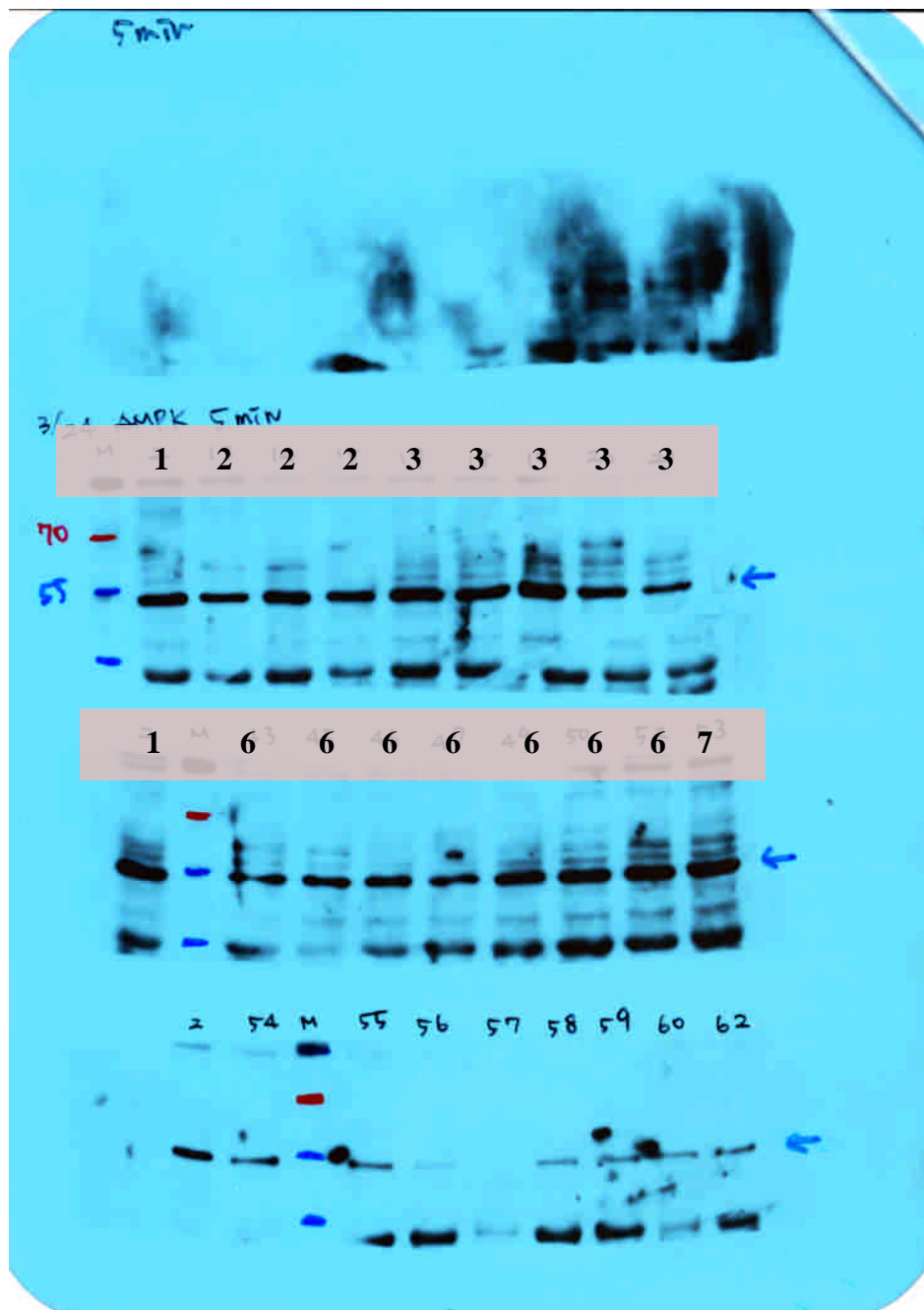
7、8：多醣體組 (CGX group、NGX group)

980326 AMPK



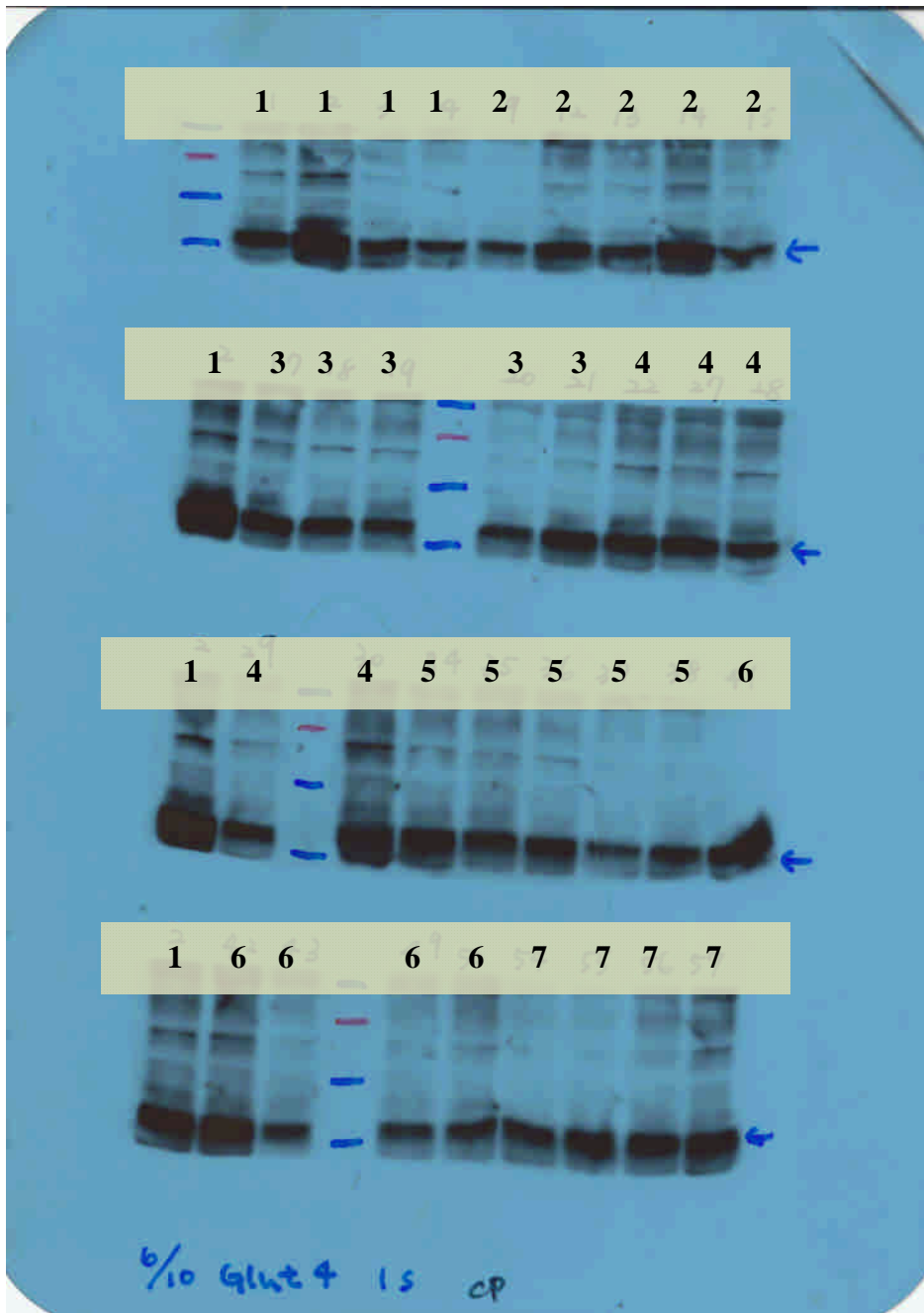
98. 3. 30 AMPK 30s

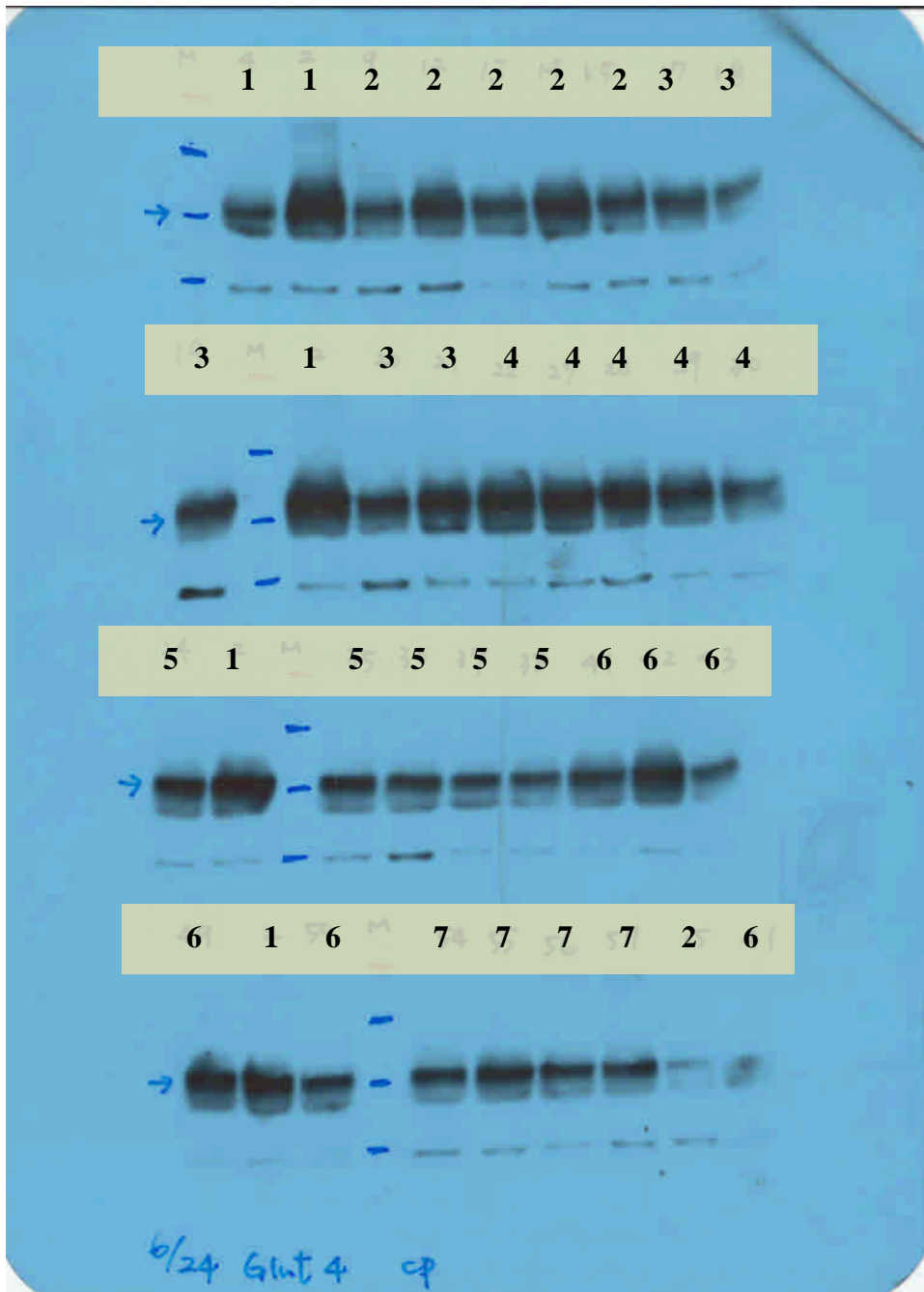


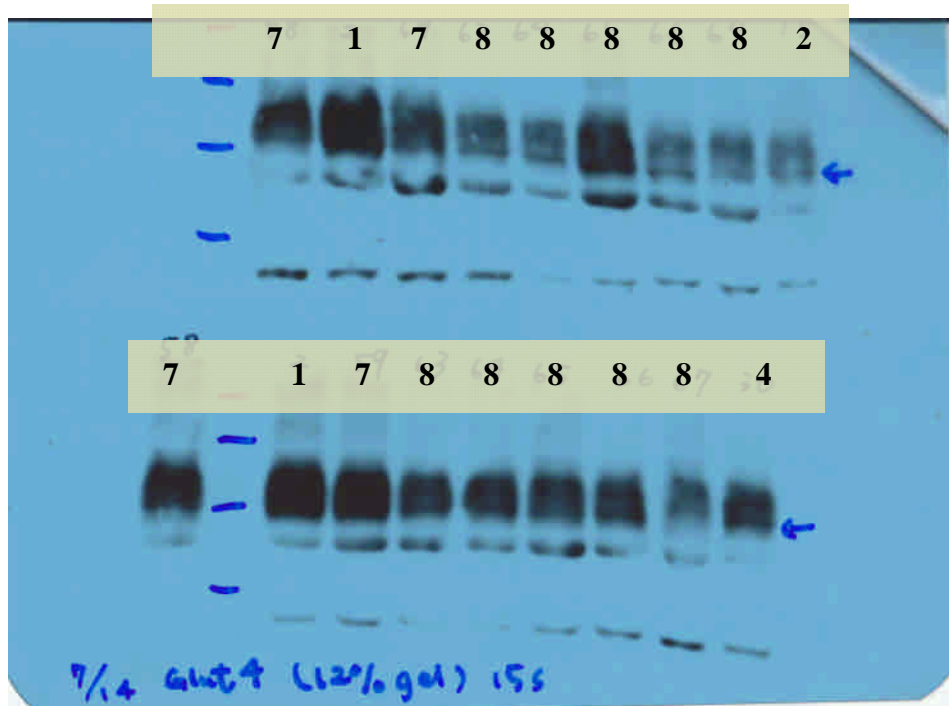


- ※ 1：控制組 (CON group)
- 2：糖尿病組 (NTZ group)
- 3、4：子實體組 (CFB group、NFB group)
- 5、6：發酵菌絲體組 (CTM group、NTM group)
- 7、8：多醣體組 (CGX group、NGX group)

980610 glucose transporter 4







- ※ 1：控制組 (CON group)
- 2：糖尿病組 (NTZ group)
- 3、4：子實體組 (CFB group、NFB group)
- 5、6：發酵菌絲體組 (CTM group、NTM group)
- 7、8：多醣體組 (CGX group、NGX group)

参考文献

1. Abe H, Yamada N, Kamata K, Kuwaki T, Shimada M, Osuga J, Shionoiri F, Yahagi N, Kadowaki T, Tamemoto H, Ishibashi S, Yazaki Y, Makuuchi M. 1998. Hypertension, hypertriglyceridemia, and impaired endothelium-dependent vascular relaxation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *J. Clin. Invest.* 101: 1784-1788.
2. Ablooglu AJ, Kohanski RA. 2001. Activation of the insulin receptor's kinase domain changes the rate-determining step of substrate phosphorylation. *Biochemistry.* 40: 504-513.
3. Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, José PA, Taylor SI, Westphal H. 1996. Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat. Genet.* 12: 106-109.
4. Amos AF, McCarty DJ, Zimmet P. 1997. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabetic Med.* 14: S1-S85.
5. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Brüning JC, Haag B 3rd, Johnson RS, Kahn CR. 1994. Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature.* 372: 186-190.
6. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. 1999. Paradoxical decrease of an adipospecific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257: 79-83.
7. Baron V, Kaliman P, Gautier N, Van Obberghen E. 1992. The insulin receptor activation process involves localized conformational changes. *J. Biol. Chem.* 267: 23290-23294.

8. Bate KL, Jerums G. 2003. 3: Preventing complications of diabetes. *Med. J. Aust.* 179: 498-503.
9. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. 2001. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat. Med.* 7: 947-953.
10. Biddinger SB, Kahn CR. 2006. From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annu. Rev. Physiol.* 68: 123-158.
11. Bobbert T, Rochlitz H, Wegewitz U, Akpulat S, Mai K, Weickert MO, Möhlig M, Pfeiffer AF, Spranger J. 2005. Changes of adiponectin oligomer composition by moderate weight reduction. *Diabetes.* 54: 2712-2719.
12. Brownlee M. 2005. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 54: 1615-1625.
13. Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR. 1998. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell.* 2: 559-569.
14. Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. 2005. Insulin Resistance: A Metabolic Pathway to Chronic Liver Disease. *Hepatology.* 42: 987-1000.
15. Carling, D. 2004. The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci.* 29: 18-24.
16. Chelliah A, Burge MR. 2004. Hypoglycaemia in elderly patients with diabetes mellitus: causes and strategies for prevention. *Drugs Aging.* 21: 511-30.
17. Chen YW, Lo HC, Yang JG, Chien CH, Lee SH, Tseng CY, Huang BM. 2006. The regulatory mechanism of *Tremella mesenterica* on steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Life Sci.* 79: 584-90.
18. Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ. 2001a. Akt1/PKB α is

- required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose. *J Biol Chem.* 276: 38349-38352.
19. Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB 3rd, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ. 2001b. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science.* 292: 1728-31.
 20. De Baets S, Du Laing S, Francois C, Vandamme EJ. 2002. Optimization of exopolysaccharide production by *Tremella mesenterica* NRRL Y-6158 through implementation of fed-batch fermentation. *J Industr Microbiol Biotechnol.* 29: 181-184.
 21. Delaigle AM, Jonas JC, Bauche IB, Cornu O, Brichard SM. 2004. Induction of adiponectin in skeletal muscle by inflammatory cytokines: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology.* 145: 5589-5597.
 22. Douen AG, Ramlal T, Rastogi S, Bilan PJ, Cartee GD, Vranic M, Holloszy JO, Klip A. 1990. Exercise induces recruitment of the "insulin-responsive glucose transporter". Evidence for distinct intracellular insulin- and exercise-recruitable transporter pools in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 265: 13427-13430.
 23. Diez JJ, Iglesias P. 2003. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol.* 148: 293-300.
 24. Easton RM, Cho H, Roovers K, Shineman DW, Mizrahi M, Forman MS, Lee VM, Szabolcs M, de Jong R, Oltersdorf T, Ludwig T, Efstratiadis A, Birnbaum MJ. 2005. Role for Akt3/protein kinase B γ in attainment of normal brain size. *Mol. Cell. Biol.* 25: 1869-78.
 25. Fantin VR, Lavan BE, Wang Q, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Keller SR, Lienhard GE. 1999. Cloning, tissue expression, and chromosomal location of the mouse insulin receptor substrate 4 gene. *Endocrinology.* 140: 1329-1337.

26. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF. 2001. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 2005-2010.
27. Furtado, L.M., Somwar, R., Sweeney, G., Niu, W., and Klip, A. 2002. Activation of the glucose transporter GLUT4 by insulin. *Biochem Cell Biol.* 80: 569-578.
28. Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT. 2005. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res.* 46: 1369-1379.
29. Higaki Y, Wojtaszewski JF, Hirshman MF, Withers DJ, Towery H, White MF, Goodyear LJ. 1999. Insulin receptor substrate-2 is not necessary for insulin- and exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 274: 20791-20795.
30. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. 1996. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J. Biol. Chem.* 271: 10697-10703.
31. Huang C, Thirone AC, Huang X, Klip A. 2005. Differential contribution of insulin receptor substrates 1 versus 2 to insulin signaling and glucose uptake in l6 myotubes. *J Biol Chem.* 280: 19426-19435.
32. Huang S, Czech MP. 2007. The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab.* 5: 237-252.
33. Hug C, Lodish HF. 2005. The role of the adipocyte hormone adiponectin in cardiovascular disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 129-134.
34. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 6: 279-284.
35. Inoue G, Cheatham B, Emkey R, Kahn CR. 1998. Dynamics of insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. Differential compartmentalization and trafficking of insulin

- receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *J. Biol. Chem.* 273: 11548-11555.
36. Joost HG, Bell GI, Best JD, Birnbaum MJ, Charron MJ, Chen YT, Doege H, James DE, Lodish HF, Moley KH, Moley JF, Mueckler M, Rogers S, Schürmann A, Seino S, Thorens B. 2002. Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282: E974-E976.
37. Kaburagi Y, Satoh S, Yamamoto-Honda R, Ito T, Ueki K, Akanuma Y, Sekihara H, Kimura S, Kadowaki T. 2001. Insulin-independent and wortmannin-resistant targeting of IRS-3 to the plasma membrane via its pleckstrin homology domain mediates a different interaction with the insulin receptor from that of IRS-1. *Diabetologia.* 44: 992-1004.
38. Kabuta T, Hakuno F, Asano T, Takahashi S. 2002. Insulin receptor substrate-3 functions as transcriptional activator in the nucleus. *J. Biol. Chem.* 277: 6846-51.
39. Kadowaki T, Yamauchi T. 2005. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 26: 439-451.
40. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. 2006. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 116: 1784-1792.
41. Kahn SE. 2003. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia.* 46: 3-19.
42. Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR. 1982. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science.* 215: 185-187.
43. Kershaw EE, Flier JS. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 89: 2548-2556.
44. Khondkar P, Aidoo KE, Tester RF. 2002. Sugar profile of extracellular polysaccharides from different *Tremella* species. *Int J Food Microbiol.* 79:

121-129.

45. Kiho T, Morimoto H, Sakushima M, Usui S, Ukai S. 1995. Polysaccharides in fungi. XXXV. Anti diabetic activity of an acidic polysaccharide from the fruiting bodies of *Tremella aurantia*. Biol Pharm Bull. 18: 1627-1629.
46. Kiho T, Merimoto H, Kobayashi T, Usui S, Ukai S, Aizawa K, Inakuma T. 2000. Effect of a polysaccharide (TAP) from the fruiting bodies of *Tremella aurantia* on glucose metabolism in mouse liver. Biosci Biotechnol Biochem. 64: 417-419.
47. Kiho T, Kochi M, Usui S, Hirano K, Aizawa K, Inakuma T. 2001. Antidiabetic effect of an acidic polysaccharide (TAP) from *Tremella aurantia* and its degradation product (TAP-H). Biol Pharm Bull. 24: 1400-1403.
48. Kim JK, Zisman A, Fillmore JJ, Peroni OD, Kotani K, Perret P, Zong H, Dong J, Kahn CR, Kahn BB, Shulman GI. 2001. Glucose toxicity and the development of diabetes in mice with muscle-specific inactivation of GLUT4. J Clin Invest. 108: 153-160.
49. King H, Aubert RE, Herman WH. 1998. Global burden of diabetes, 1995-2025. Prevalence, numerical estimates and projections. Diabetes Care. 21: 1414-1431.
50. Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, Tsubamoto Y, Komeda K, Nakano R, Miki H, Satoh S, Sekihara H, Sciacchitano S, Lesniak M, Aizawa S, Nagai R, Kimura S, Akanuma Y, Taylor SI, Kadowaki T. 2000. Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory β -cell hyperplasia. Diabetes. 49: 1880-1889.
51. Larkin M. 2001. Diet and exercise delay onset of type 2 diabetes, say US experts. Lancet 358: 565.
52. Lassak A, Del Valle L, Peruzzi F, Wang JY, Enam S, Croul S, Khalili K, Reiss K. 2002. Insulin receptor substrate 1 translocation to the nucleus by the human JC

- virus T-antigen. *J. Biol. Chem.* 277: 17231-17238.
53. Leturque A, Loizeau M, Vaulont S, Salminen M, and Girard J. 1996. Improvement of insulin action in diabetic transgenic mice selectively overexpressing GLUT4 in skeletal muscle. *Diabetes.* 45: 23–27.
54. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
55. Lo HC, Chen YW, Chien CH, Tseng CY, Kuo YM, Huang BM. 2005. Effects of *Tremella mesenterica* on steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Arch Androl.* 51: 285-294.
56. Lo HC, Tsai FA, Wasser SP, Yang JG, Huang BM. 2006. Effects of ingested fruiting bodies, submerged culture biomass, and acidic polysaccharide glucuronoxylomannan of *Tremella mesenterica* Retz.:Fr. on glycemic responses in normal and diabetic rats. *Life Sci.* 78: 1957-1966.
57. Lochhead PA, Salt IP, Walker KS, Hardie DG, Sutherland C. 2000. 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes.* 49: 896-903.
58. Long YC, Zierath JR. 2006. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest.* 116: 1776-1783.
59. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y. 2002. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med.* 8: 731-7.
60. Martin BC, Wjckabrsjk CR. 1992. Role of glucose and insulin resistance in

- development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet*. 340: 925-929.
61. Matsuzawa Y. 2006. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett*. 580: 2917-2921.
62. Milan G, Granzotto M, Scarda A, Calcagno A, Pagano C, Federspil G, Vettor R. 2002. Resistin and adiponectin expression in visceral fat of obese rats: effect of weight loss. *Obes. Res*. 10: 1095-1103.
63. Minokoshi Y, Kahn CR, Kahn BB. 2003. Tissue-specific ablation of the GLUT4 glucose transporter or the insulin receptor challenges assumptions about insulin action and glucose homeostasis. *J Biol Chem*. 278: 33609-33612.
64. Nakae J, Kitamura T, Silver DL, Accili D. 2001. The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J. Clin. Invest*. 108: 1359-1367.
65. Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP, Rajala MW, Doebber T, Berger JP, Wagner JA, Wu M, Knopps A, Xiang AH, Utzschneider KM, Kahn SE, Olefsky JM, Buchanan TA, Scherer PE. 2004. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J. Biol. Chem*. 279: 12152-12162.
66. Pan XR, Li GW, Hu YH, Wang JX, Yang WY, An ZX, Hu ZX, Lin J, Xiao JZ, Cao HB, Liu PA, Jiang XG, Jiang YY, Wang JP, Zheng H, Zhang H, Bennett PH, Howard BV. 1997. Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care*. 204: 537-544.
67. Patti ME, Kahn CR. 1998. The insulin receptor—a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol*. 9: 89-109.
68. Pessin JE, Saltiel AR. 2000. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J. Clin. Invest*. 106: 165-169.

69. Piechaczyk M, Blanchard JM, Marty L, Dani C, Panabieres F, El Sabouty S, Fort P, Jeanteur P. 1984. Post-transcriptional regulation of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase gene expression in rat tissues. *Nucleic Acids Res.* 12: 6951-6963.
70. Piñeiro R, Iglesias MJ, Gallego R, Raghay K, Eiras S, Rubio J, Diéguez C, Gualillo O, González-Juanatey JR, Lago F. 2005. Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett.* 579: 5163-5169.
71. Previs SF, Withers DJ, Ren JM, White MF, Shulman GI. 2000. Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. *J Biol Chem.* 275: 38990-38994.
72. Radermecker RP, Jandrain B, Paquot N, Philips JC, Contessi E, Lavigne M, Rinaldi AM, Scheen AJ. 2003. [Prevention of hypoglycemia in patients with type 1 diabetes]. *Rev. Med. Liege.* 58: 361-368.
73. Reaven GM. 1995. The fourth Musketeer—from Alexandre Dumas to Claude Bernard. *Diabetologia.* 38: 3-13.
74. Reshetnikov SV, Wasser SP, Nevo E, Duckman I, Tsukor K. 2000. Medicinal value of the genus *Tremella* Pers. (Heterobasidiomycetes). *Int J Med Mushr.* 2: 169-193.
75. Ryder JW, Chibalin AV, Zierath JR. 2001. Intracellular mechanisms underlying increases in glucose uptake in response to insulin or exercise in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 171: 249-257.
76. Saltiel AR, Khan CR. 2001. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 414: 799-806.
77. Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR, Barthel A. 2005. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabet Med.* 22: 674-682.
78. Scherer PE. 2006. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine

- organ. *Diabetes*. 55: 1537-1545.
79. Sciacchitano S, Taylor SI. 1997. Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of the mouse IRS-3 gene. *Endocrinology*. 138:4931-4940.
80. Spiegelman BM, Flier JS. 1996. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell*. 87: 377-389.
81. Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S, et al. 1994. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature*. 372: 182-186.
82. Taniguchi CM, Ueki K, Kahn R. 2005. Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. *J Clin Invest*. 115: 718-727.
83. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 7: 85-96.
84. Thirone AC, Huang C, Klip A. 2006. Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. *Trends Endocrinol Metab*. 17: 72-78.
85. Thong FS, Dugani CB, Klip A. 2005. Turning signals on and off: GLUT4 traffic in the insulin-signaling highway. *Physiology (Bethesda)*. 20: 271-284.
86. Tsao TS, Burcelin R, Katz EB, Huang L, Charron MJ. 1996. Enhanced insulin action due to targeted GLUT4 overexpression exclusively in muscle. *Diabetes*. 45: 28-36.
87. Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, Kamon J, Kobayashi M, Suzuki R, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Froguel P, Nakae J, Kasuga M, Accili D, Tobe K, Ueki K, Nagai R, Kadowaki T. 2004. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem*. 279: 30817-30822.
88. Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V,

- Uusitupa M; Finnish Diabetes Prevention Study Group. 2001. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N. Engl. J. Med.* 344: 1343-1350.
89. Vinogradov E, Petersen BO, Duus JO, Wasser S. 2004. The structure of the glucuronoxylomannan produced by culinary-medicinal yellow brain mushroom (*Tremella mesenterica* Ritz.:Fr., Heterobasidiomycetes) grown as one cell biomass in submerged culture. *Carbohydr Res.* 339: 1483-1489.
90. Weintrob N, Schechter A, Benzaquen H, Shalitin S, Lilos P, Galatzer A, Phillip M. 2004. Glycemic patterns detected by continuous subcutaneous glucose sensing in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus treated by multiple daily injections vs continuous subcutaneous insulin infusion. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 158: 677-684.
91. White MF. 1998. The insulin signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol and Cellular Biochem.* 182: 3-11.
92. White MF. 2002. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 283: E413-422.
93. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF. 1998. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature.* 391: 900-904.
94. Wolf AM, Wolf D, Avila MA, Moschen AR, Berasain C, Enrich B, Rumpold H, Tilg H. 2006. Up-regulation of the anti-inflammatory adipokine adiponectin in acute liver failure in mice. *J. Hepatol.* 44: 537-543.
95. Yamauchi T, Tobe K, Tamemoto H, Ueki K, Kaburagi Y, Yamamoto-Honda R, Takahashi Y, Yoshizawa F, Aizawa S, Akanuma Y, Sonenberg N, Yazaki Y, Kadowaki T. 1996. Insulin signalling and insulin actions in the muscles and livers of insulin-resistant, insulin receptor substrate 1-deficient mice. *Mol Cell Biol.* 16:

3074-3084.

96. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. 2001. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med.* 7: 941-946.
97. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 8: 1288-1295.
98. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. 2003. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature.* 423: 762-769.
99. Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T, Ito Y, Kamon J, Tsuchida A, Kumagai K, Kozono H, Hada Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Awazawa M, Takamoto I, Froguel P, Hara K, Tobe K, Nagai R, Ueki K, Kadowaki T. 2007. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med.* 13: 332-339.
100. Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM. 2001. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J. Clin. Endocrinol.*

- Metab. 86: 3815-3819.
101. Zierath JR, Krook A, Wallberg-Henriksson H. 2000. Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetologia*. 43: 821-835.
102. Zierath JR, Wallberg-Henriksson H. 2002. From receptor to effector: insulin signal transduction in skeletal muscle from type II diabetic patients. *Ann. NY Acad. Sci.* 967: 120-134.
103. Zierath JR, Kawano Y. 2003. The effect of hyperglycaemia on glucose disposal and insulin signal transduction in skeletal muscle. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 17: 385-398.
104. Zimmet PZ. 1999. Diabetes epidemiology as a trigger to diabetes research. *Diabetologia*. 42: 499-518.
105. Zimmet P. 2000. Globalization, coca-colonization and the chronic disease epidemic: can the doomsday scenario be averted? *J. Intern. Med.* 247: 301-310.
106. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 414: 782-787.
107. Zisman A, Peroni OD, Abel ED, Michael MD, Mauvais-Jarvis F, Lowell BB, Wojtaszewski JF, Hirshman MF, Virkamaki A, Goodyear LJ, Kahn CR, Kahn BB. 2000. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med.* 6: 924-928.
108. 國立自然科學博物館，自然與人文數位博物館
109. 劉波 中國藥用真菌 出版日期：1978年05月第1版