

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

冬蟲夏草調節血糖涉及之胰島素傳訊

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-029-004-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：東海大學食品科學系

計畫主持人：盧錫祺

共同主持人：羅慧珍

計畫參與人員：黃鈺玲、林雁中

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

冬蟲夏草調節血糖涉及之胰島素傳訊

Roles of hepatic insulin signaling in the anti-hyperglycemic activity of *Cordyceps sinensis*

計畫編號：NSC 94-2320-B-029-004-

執行期限：94 年 08 月 01 日至 95 年 07 月 31 日

主持人：盧錫祺 東海大學食品科學系 e-mail: hclu@thu.edu.tw

共同主持人：羅慧珍 長榮大學生物科技學系

計畫參與人員：黃鈺玲、林雁中

一、中文摘要

隨著飲食習慣及生活型態的改變，罹患糖尿病的人口數逐年增加。許多天然物質被證實具有降血糖的功效，而成為服用降血糖藥物或胰島素治療之外的另一個選擇，其中的多醣類物質為主要功能性成分。在先前的研究中發現，天然冬蟲夏草子實體、人工發酵菌絲體及發酵液都具有降低糖尿病大鼠高血糖的活性，但卻未改善胰島素分泌不足的缺失。為探究冬蟲夏草是否透過更有效率的胰島素傳訊，達到維持血糖穩定，本研究鎖定負責體內葡萄糖穩定的肝臟組織做分析。將雄性 Wistar 大鼠分別餵食天然蟲草(FB 組)、發酵菌絲體(MCS 組)、發酵液(BCS 組)、菌絲體發酵液混合物(XCS 組)或安慰劑(STZ 組)，兩週後以 streptozotocin 及 nicotinamide 注射誘發糖尿病，餵食安慰劑且未誘發糖尿病組為控制組(CON 組)，灌食冬蟲夏草四週後將大鼠犧牲。收集肝臟組織後，針對胰島素傳訊路徑中數個傳訊分子：胰島素受器(IR)、胰島素受器受質(IRS)、蛋白激酶 B 及影響葡萄糖進出細胞的關鍵：葡萄糖轉運蛋白(GLUT2)、葡萄糖激酶(GK)，利用反轉錄同步定量 PCR 及西方轉漬法做基因轉錄及蛋白質層次的分析。結果顯示，經誘發糖尿病後，大鼠的 IRS-1 及 GK 基因轉錄量皆較控制組高，而 GLUT2、IR、IRS-2 等基因表現則呈現下降的趨勢。餵食天然冬蟲夏草子實體(FB 組)，能使 GLUT2 基因提升至與控制組相當的程度。在餵食發酵蟲草時，糖尿病鼠的 IR 及 IRS-1 基因表現量皆有回復的趨勢。在蛋白質層次上，糖尿病顯著降低大鼠 IR、GLUT2、GK、IRS-1 等蛋白質的表現。在 IRS 下游的傳訊分子 Akt 及其磷酸化分子 pAkt 的表現量，在 STZ 組略低於控制組。餵食發酵產物後，糖尿病大鼠的 GLUT2、IRS-1、GK、Akt 及 pAkt 等蛋白質表現量有不同程度的提升，其中尤以餵食發酵液最為顯著。在葡萄糖磷酸化的效率上，餵食發酵菌絲體及發酵液能改善糖尿病誘發後 hexokinase 及 glucokinase 活性之降低。發酵蟲草對胰島素傳訊的影響似乎較天然蟲草明顯。綜合上述結果，推測冬蟲夏草可能透過更有效率的訊息傳遞(Akt 表現量)、增加葡萄糖磷酸化及轉運效率，進而達到調節高血糖之效果。欲進一步解答蟲草降低血糖機制，有賴同時探究包含肌肉與脂肪中其他拮抗與協同作用的代謝與傳訊路徑。本研究已初步協助建立篩檢機能性成份降血糖活性之平臺。

關鍵詞：冬蟲夏草、糖尿病、高血糖、葡萄糖轉運蛋白、葡萄糖激酶、胰島素受器、胰島素傳訊

Abstract

The incidence of diabetes increases with the changing life style. Many natural materials have been demonstrated to have anti-hyperglycemic activity for the polysaccharides. Previous study showed that both natural and cultured *Cordyceps sinensis* ameliorated hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats, though the impaired insulin secretion was not improved. To clarify whether *C. sinensis* ameliorates aberrant glucose homeostasis by more efficient insulin signaling in liver, we examined the expression of insulin signaling molecules including insulin receptor (IR), insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and substrate-2 (IRS-2) and protein kinase B (Akt), gate molecules glucokinase (GK) and glucose transporter 2 (GLUT2). After feeding with the fruiting body (FB group), cultured mycelia (MCS group) or broth (BCS group), or mixed mycelia and broth (XCS group) of *C. sinensis*, or the placebo (STZ group) for four weeks, male Wistar rats were injected with nicotinamide (NT) and streptozotocin to induce diabetes mellitus. In the non-diabetic control group (CON), saline replaced NT and STZ. Rats were sacrificed after treating with *Cordyceps* for additional four weeks, and the liver tissues were collected. Real-time PCR showed the transcriptions of *irs-1* and *gk* were increased and those of *glut2*, *ir*, and *irs-2* were decreased in all diabetes groups. Administration of fruiting body moderately attenuates *glut2* down-regulation, while cultured products significantly reverted *ir* and *irs-1* expression. As revealed by Western blotting, protein levels of all the examined genes were decreased in the STZ group. When treated with cultured *Cordyceps*, especially broth, GLUT2, IRS-1, GK, Akt and phospho-Akt protein levels significantly regained. The diabetes-induced decrease in the activities of glucokinase and hexokinase were attenuated by the administration of cultured *Cordyceps*. In general, cultured *Cordyceps* seemed to have more profound influence on insulin signaling. Our results indicated that *Cordyceps* might help in alleviating hyperglycemia through an increase of Akt and glucose transportation, and the activation of glucokinase and hexokinase. To further delineate the underlying mechanisms of the anti-diabetic activities of *Cordyceps*, more counter- or co-regulatory metabolic and signaling pathways in liver, muscle and adipose tissues await to be investigated. Nevertheless, this study has paved the road to establish a platform in screening functional ingredients for their potential anti-diabetic activities.

Keywords: *Cordyceps sinensis*, diabetes, hyperglycemia, glucose transporter, glucokinase, insulin receptor, insulin signalin

二、緣由與目的

冬蟲夏草是真菌 *Cordyceps sinensis* 寄生於蝙蝠蛾幼蟲體上的子座(子實體)與幼蟲屍體(蟲體)的複合物。天然生成的冬蟲夏草分為子實體及蟲體兩大部分，其內部皆由菌絲體所組成，且成份大致相同，僅子實體之灰份含量較蟲體部份高。細胞及動物實驗證實生藥材具抗癌、改善免疫功能、降血脂、增強腎功能及抗氧化等作用。近年各生技公司紛紛開發發酵真菌產製法，提供平價的替代品。然在種源、培養條件與技術尚未走向認證之前，仍有良莠不齊，有效成份不均等問題。不論天然藥材或人工發酵，都迫切需要功能認證的檢測平臺。

衛生署統計資料顯示，臺灣地區糖尿病罹患人數有日趨增加與年輕化趨勢。針對糖尿病之保健食品不斷推陳出新，其中許多天然物質所含的多醣類物質，如galactomannan等^(3,4)，於動物實驗中證實具有降血糖的效用，因為多醣類物質具有增加胰島素敏感度的效用，並可增加細胞利用醣類的效率^(3,7)。天然生成之冬蟲夏草具有高含量之多醣物質⁽¹⁰⁾，因此可能有助於減緩高血糖。此外，冬蟲夏草具有增進免疫及抗氧化的效用，可能有助於抑制病毒、藥物或其他因素引發之糖尿病。在許多動物實驗中streptozotocin (STZ)常被用來作為誘發糖尿病的化學物質，STZ專一破壞胰臟的 β -細胞，導致無法復原的纖維化，進而造成動物體內胰島素分泌不足⁽¹⁾。

羅慧珍博士在研究中⁽⁷⁾證實，採用Masiello等人的方法以nicotinamide及STZ，能成功在Wistar大鼠誘發糖尿病。而且餵食冬蟲夏草子實體之實驗組，發現有降低高血糖、減緩飲水量增加、以及改善生長遲緩現象之效果。實驗結果除顯示冬蟲夏草子實體而非蟲體，具有減緩STZ誘發高血糖之效果外，亦發現各組之間血清胰島素濃度無顯著差異。Kihō及Kamtchouing等人於動物實驗中證實多醣類物質具有增加胰島素敏感度的效用，並可增加細胞利用醣類的效率^(2,5)。推測冬蟲夏草子實體可能亦是藉由其多醣體之生理功效，增加細胞對葡萄糖的利用，而減緩STZ誘發高血糖之效果。接著在後續(NSC 90-2316-B-371-001)的研究羅進一步證實除了子實體外，冬蟲夏草之人工發酵菌絲體與發酵液均有改善高血糖之功效。胞內成份(菌絲體)與胞外分泌成份(發酵液)為何能都具有類似之效果，其有效成份為相同或是不同，也相當值得進一步探究。然而在自然條件下形成的冬蟲夏草生藥材與發酵技術大量製備之菌絲體是否具有相同之藥理療效，仍是目前所關注之焦點。

目前已知的葡萄糖調控，可區分為代謝型與胞膜/轉運調控兩大類型⁽⁶⁾。分化程度高的組織如肌肉、脂肪細胞等，代謝型調控並非葡萄糖調控之主角，而是藉由細胞膜上的訊息傳遞，以及轉運蛋白的供應來進行管制。92年度之計畫中，已針對上述肝臟中所參與之血糖控制機制進行探測性分析。結果顯示未餵食冬蟲夏草之糖尿病大鼠(STZ組)其胰島素接受器相對表現量(以 β -actin為內部對照)呈現下降，而在餵食冬蟲夏草後(FB, CC與CF)皆有回升，其中又以餵食子實體組(FB)以及合併子實體與蟲體(CF)組增加較為顯著。此與上述降血糖效果中子實體優於蟲體之結果一致。接受器僅為胰島素傳訊中第一個環節，要瞭解冬蟲夏草是否也經由肝細胞之胰島素傳訊達成血糖調控，我們進行下列延續探討：

1. 前人的研究指出，STZ 大鼠模式中肝臟與肌肉等其他組織之胰島素接受器之表現量會隨STZ處理而有不同的變化，可看出肝臟中的傳訊與其他組織有差異。再往下游，肝臟細胞內幾種與胰島素傳訊有關之分子出現磷酸化減少(IRS-1, IRS-2)，PI3K表現量則有增加等不同狀況，而這些現象，在不同的糖尿病動物模式也見到同樣趨勢。推測這些分子的計量平衡與磷酸化(以活化自己與下游分子)狀態，與胰島素之傳訊有直接之影響。冬蟲夏草之所以能部份回復血糖的恆定，有可能與改變這些分子在量上的相互關

係，以及磷酸化程度有關。本計畫中所探討的 IR、IRS-1 & IRS-2、PI3K、Akt/PKB 及它們的磷酸化狀態，能較完整釐清冬蟲夏草之調節血糖與這機制之關連。

2. 以胰島素接受器所介導之胰島素傳訊為焦點，初步探討其下游之受質(IRS-1, IRS-2)，扮演樞紐角色的 PI3K 以及直接與肝醣合成、GLUT 轉位有關之 Akt/PKB。由此可與同時進行之 GLUT2 表現量與葡萄糖激酶(Glucose Kinase; GK)活性等做關連性了解。此部份分析將包含 mRNA 與蛋白質兩表現層次與酵素活性之分析。
3. 比較之前先已誘發糖尿病之大鼠給予冬蟲夏草灌食(疾病療養模式)，與此次計畫中先餵食冬蟲夏草再誘發糖尿病(預防保健模式)。
4. 除使用上次使用具有明顯降血糖功效之天然子實體外，加入菌絲發酵產物(菌絲體、發酵液，以及兩者混合給予)，期望提供交叉比較之數據。

三、結果與討論

1. IR, IRS-1 與 IRS-2 mRNA 表現

與控制組相較，STZ/NT 誘發之糖尿病鼠肝臟之 IR 表現變少，而冬蟲夏草各種發酵成份之給予可完全回復之。子實體並無此種回復效應(圖一 A)。

IR 下游的兩種受質 IRS-1 與 IRS-2 分別被指出涉及與醣類及脂肪代謝之調控，其表現量因不同生理狀況而改變，也被認為與胰島素阻抗或糖尿病有關。糖尿病的誘發並未顯著影響 IRS-1 mRNA 表現，而冬蟲夏草各種發酵成份顯著提昇表現，特別是菌絲 MCS 組，子實體再次呈現與其他發酵成份不同的效應(圖一 B)。

相較之下，各組 IRS-2 表現於服食蟲草者有略降低表現趨勢，惟並無顯著差異(圖一 C)。此點呼應前人對於 IRS-1/IRS-2 不同調控對象之假設。

整體而言，蟲草成份對於胰島素接受器與下游 IRS-1 受質有誘導表現 mRNA 顯著效果。

2. GLUT2 與 GK 基因 mRNA 表現

由圖二(A)可見，STZ處理之各高血糖組於GLUT2 基因均有降低表現趨勢，特別在服食蟲草菌液BCS組為然，子實體則相較之下能對此降低略有緩解，再次呈現與其他發酵成份不同之走向。過去文獻曾指出，STZ誘發之糖尿病大鼠在飢餓狀態下GLUT2 mRNA表現增加，而於高血糖狀態下則為減少表現^{8,9}。在我們的模式中，雖然犧牲時血糖仍維持高濃度，但大鼠也經歷過夜之飢餓狀態，有可能飢餓與高血糖兩因素交互作用下，使我們觀察的GLUT2表現呈現降低；或者是我們所用較溫和的STZ/NT誘發模式造成此差異。

GK 表現在各組有較大歧異。STZ 處理造成表現量增加，而服食子實體、發酵菌絲體與綜合發酵成份 XCS 組均使表現量降回對照組水準，僅發酵液 BCS 組維持高表現(圖 2B)。肝臟中 GK 表現主要乃受胰島素調控，本研究中所呈現之高度變異性可歸因於 PCR 擴增條件並未達最佳化，使 GK PCR 產物雖然專一性相當高，然相對於 β -actin 之擴增不及千分之一。上一計畫中所使用引子對擴增率較佳，但也較有非專一性產物疑慮。更換 4 組不同引子對仍未能完全改善上述兩種問題，有待接續之努力。

3. IR, IRS-1, Akt 蛋白質表現與 Akt 之磷酸化

與 mRNA 表現相似，STZ 組 IR 蛋白質亦減少，MCS 有部分回復效果，而子實體同樣缺少回復效應。較意外的是發酵液 BCS 組與 XCS 綜合組顯著降低 IR 蛋白質(圖 3A)。BCS 與 XCS 組在蛋白質含量與 mRNA 之不同步，有可能是反映蛋白質原先持續存在與誘發表現兩種比例在各組不同，但確實原因與機制尚不明瞭。

STZ 糖尿病各組 IRS-1 蛋白量均較控制組低，餵食蟲草各組除發酵液 BCS 與控制組略近外，其餘回升並不明顯(圖 3B)。合併 mRNA 數據共同檢視，IRS-2 基因在 mRNA 與蛋白質兩種產物上呈現較一致性結果，蟲草之給予似乎能正向調昇 IRS-1 表現。過去文獻中對於 STZ 糖尿病大鼠 IRS 蛋白之表現有相當大的歧異性，此與誘發的 STZ 劑量、是否加入 NT、誘發時間有較大關聯。本研究中所觀察到糖尿病大鼠 STZ 組 IR 與 IRS 皆有緩和下降，即符合其中的溫和誘發狀態。而蟲草的改善高血糖功效，與 IRS-1 有正相關，部份也似可以 IR 表現解釋。

蛋白激酶 B (Akt)位於胰島素傳訊中的樞紐位置。由圖 4A 與 4B 顯示，STZ 組 Akt 蛋白量略降，而磷酸化程度則顯著較控制組降低。蟲草給予可調昇 Akt 蛋白量超過控制組，特別是發酵液 BCS 組，然而磷酸化程度則僅有 BCS 組有顯著提昇，其餘皆較控制組為低。由於 Akt 是一 Ser/Thr 激酶，它的磷酸化也代表 IRS 在 tyr 磷酸化的下降，間接導致胰島素阻抗。因此在此處，Akt 基礎表現量增加也許是蟲草對傳訊作用的一個起點，而究竟是否能最終改善胰島素阻抗來降低血糖，仍需靠分析研究如 PI3-K 等相關激酶之狀態來釐清。

4. GLUT2 與 GK 蛋白質表現

圖 5A 與 5B 皆顯示，GLUT2 此轉運蛋白與 GK 激酶在各組間並無顯著差異。雖然糖尿病各組 GLUT2 mRNA 層次表現較控制組為低，蛋白質層次則較不明顯。GLUT2 的 MCS 與 BCS 組，以及 GK 之 BCS 與 XCS 組可回復至控制組表現量。GLUT2 蛋白的增多是否增加葡萄糖的進入或移出，端視飢餓或高血糖哪個影響力較大。如能針對 GLUT2 進行葡萄糖結合之動力學分析，應可協助解答這個雙向問題。同樣，GK 的蛋白量數據也需合併下列活性分析共同檢視。

5. Glucokinase (GK)與 hexokinase (HK)活性

過去研究顯示，在飢餓或 STZ 誘發狀態，大鼠的 GK 與 HK 活性均會下降，其中 GK 受影響程度較大。本計畫所得結果中，GK 活性在 STZ 組略降，而蟲草各組在 FB 與 BCS 略升，MCS 與 XCS 與 STZ 略近，差異都不顯著(圖 6A)。在 HK 部份與控制組相較，STZ 與 FB 組略降，MCS 與 BCS 略升，而 XCS 則顯著增加活性。綜合而言，蟲草的給予可能透過增加的 GK 與 HK 活性產生加總影響，處理更多葡萄糖而對改善高血糖有所助益。

綜合以上結果，我們得到以下推論：

1. 不論是 mRNA 與蛋白質層次之表現，以及酵素活性與磷酸化分析，各項結果都指出，STZ/NT 模式，在肝臟中可造成 IR, IRS-1/IRS-2, Akt/pAkt, GLUT2, GK, HK 等各項血糖恆定機制受到影響而小幅或大幅下降，此與所高血糖應有直接關連。
2. 冬蟲夏草之給予，在發酵產物各組與天然子實體兩種來源分別有不同降低血糖作用。如發酵產物在 Akt, GLUT2, GK 與 HK 活性方面呈現向上調控，而子實體則在 Akt 與 GK 活性方面呈現其調節活性。亦即在降血糖功效上也許發酵產品可以獲致與天然藥材類同效果，然而卻可能透過不同調節路徑達成，此與其有效成份如多醣之組成與比例應有關聯。另外，由發酵菌絲體、菌液與合併給予三組之比較中也可看出，合併給予未必有加成或折衷效果，顯示胞內多醣與胞外多醣可能亦因組成與比例之差異而造成不完全類似之效應。

四、計畫成果自評

以上結果均經三次以上批次之實驗確認。計畫中克服多數關鍵處而能達成接近九成的達成率，僅有 IRS-2 之西方轉漬仍待第三次實驗確認。預計將另行補做 IR 與 IRS-1/IRS-2 磷酸化程度來驗證蛋白質表現與其訊息傳遞活性有何種相關性。結果中有若干不易解釋之處仍需確認，包括 GK RT-PCR 結果以及 IR 蛋白質表現量 BCS 與 XCS 兩組顯著低於其他各組。這些結果為首次對冬蟲夏草降血糖作用進行較深入之機制探討，在釐清上述疑點後，應能順利發表於專業期刊，且能延伸做為其他中草藥與機能性成份於降血糖功效方面之參考，具有學理與應用之雙向價值。

五、參考文獻

- [1] Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, and Renold AE. 1969. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *The Journal of Clinical Investigation*. 48, 2129-2139.
- [2] Kamtchouing P, Sokeng SD, Moundipa PF, Watcho P, Jatsa HB, and Lontsi D. 1998. Protective role of *anacardium occidentale* extract against streptozotocin-induced diabetes in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 62, 95-99.
- [3] Kiho T, Hui JI, Yamane A. and Ukai S. 1993. Polysaccharides in fungi. XXXII. Hypoglycemic activity and Chemical properties of a polysaccharides from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis*. *Biol. Pharm. Bull.* 16(12), 1291-1293.
- [4] Kiho T, Morimoto H, Sakushima M, Usui S, and 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(12), 1627-1629.
- [5] Kiho T, Itahashi S, Sakushima M, Matsunaga T, Usui S, Ukai S, Mori H, Sakamoto H, and Ishiguro Y. 1997. Polysaccharides in fungi. XXXVIII. Anti-diabetic activity and structural feature of a galactomannan elaborated by *Pestalotiopsis* species. *Pharmaceutical Society of Japan*. 20(2), 118-121.
- [6] Lange K. 2001. Regulation of glucose uptake in differentiated cells. *Frontiers in Biosci.* 6, 630-659.
- [7] Lo HC, Tu ST, Lin KC, Lin SC. 2004. The anti-hyperglycemic activity of the fruiting body of *Cordyceps* in diabetic rats induced by nicotinamide and streptozotocin. *Life Sci.* 74, 2897-2908.
- [8] Postic, C, Burcelin, R, Rencurel, F, Pegorier, JP, Loizeau, M, Girard, J, and Leturque, A. 1993. Evidence for a transient inhibitory effect of insulin on GLUT2 expression in the liver: studies in vivo and in vitro. *Biochem. J.* 293, 119-124.
- [9] Thorens, B, Flier, JS, Lodish, HF, Kahn, BB. 1990. Differential regulation of two glucose transporters in rat liver by fasting and refeeding and by diabetes and insulin treatment. *Diabetes* 39, 712-719.
- [10] 宋振玉. 1995. 中草藥現代研究(第一卷). 北京醫科大學、中國協和醫科大學聯合出版社. 北京. 100-101.

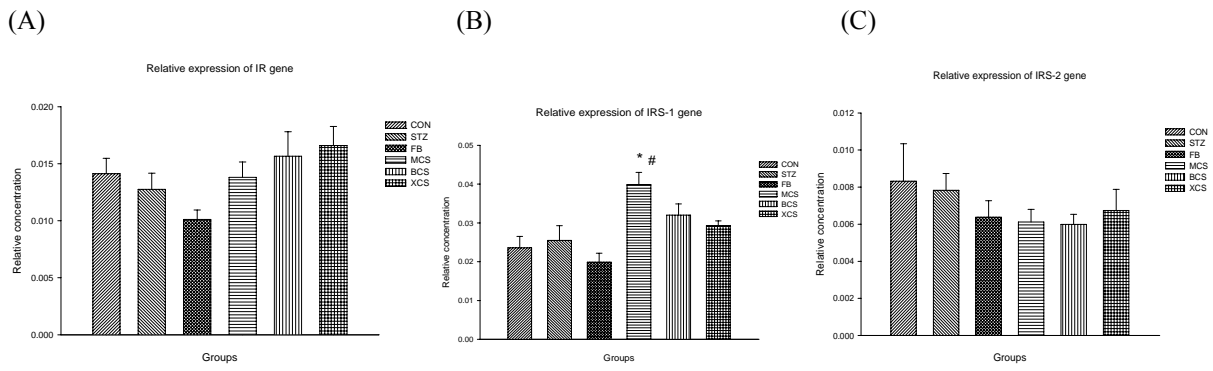


Figure 1. Relative mRNA expression of (A) insulin receptor gene (B) IRS-1 gene (C) IRS-2 gene.

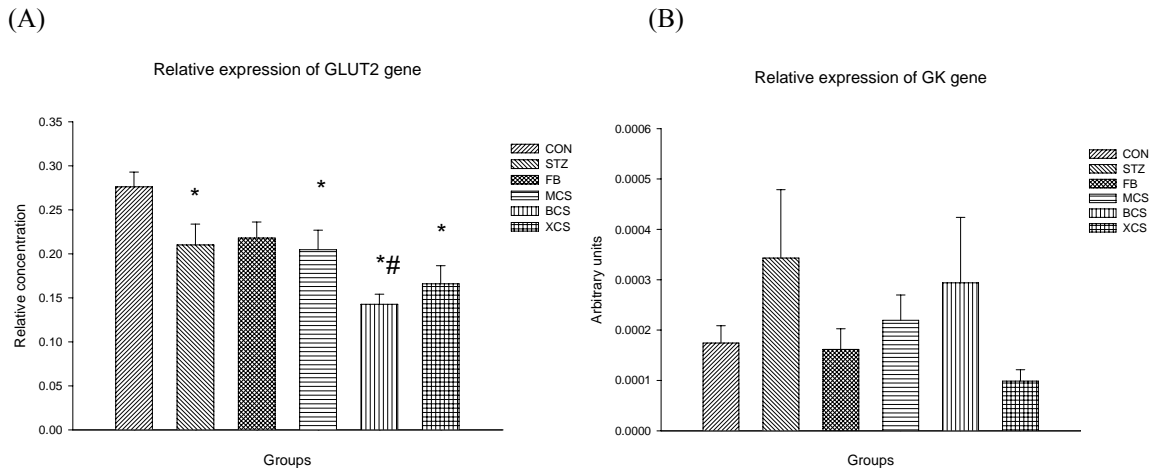


Figure 2. Relative mRNA expression of (A) glucose transporter 2 gene (B) glucokinase gene

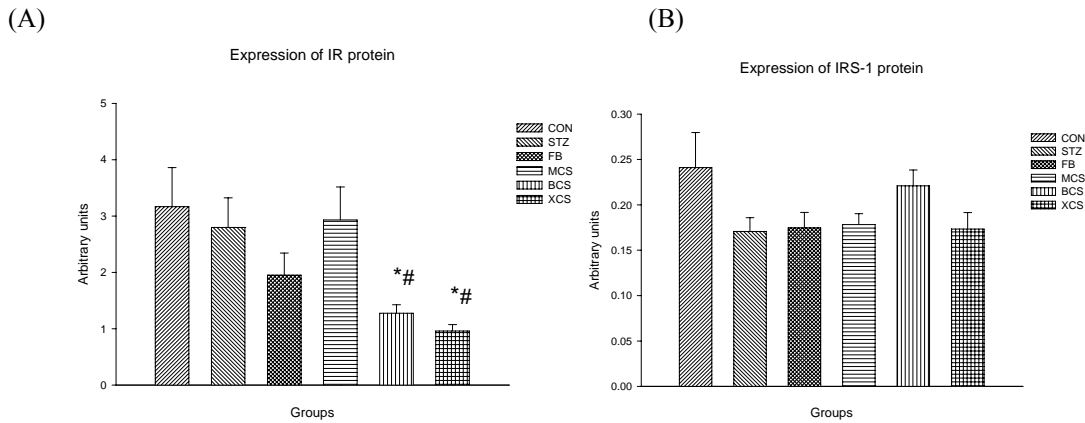


Figure 3. Relative protein expression of (A) insulin receptor gene (B) IRS-1 gene.

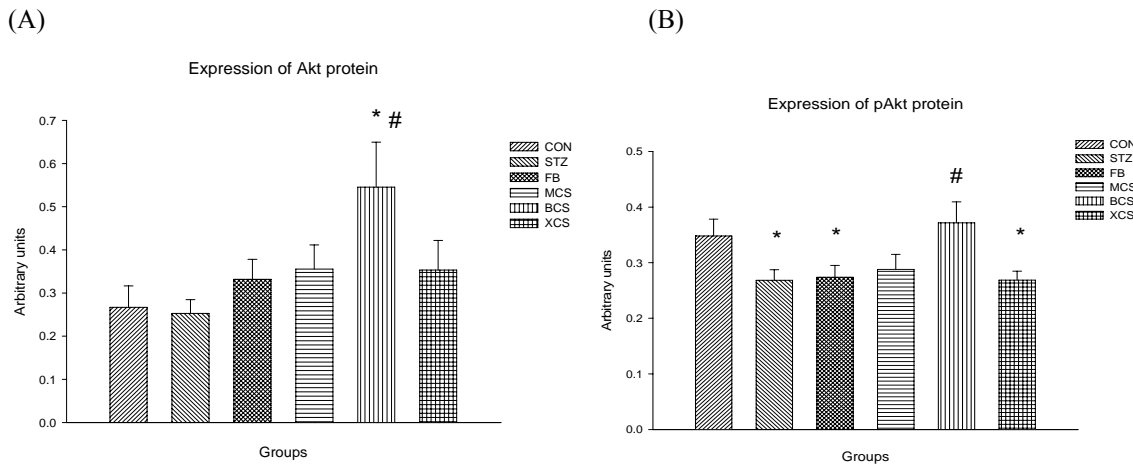


Figure 4. Relative protein expression of (A) Akt gene (B) phospho-Akt gene.

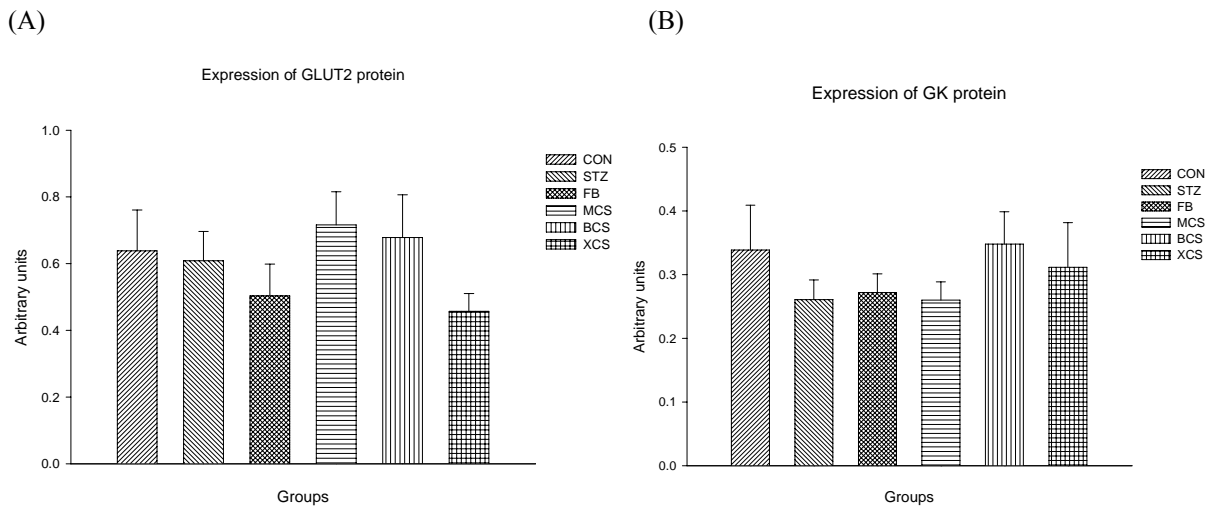


Figure 5. Relative protein expression of (A) glucose transporter 2 gene (B) glucokinase gene.

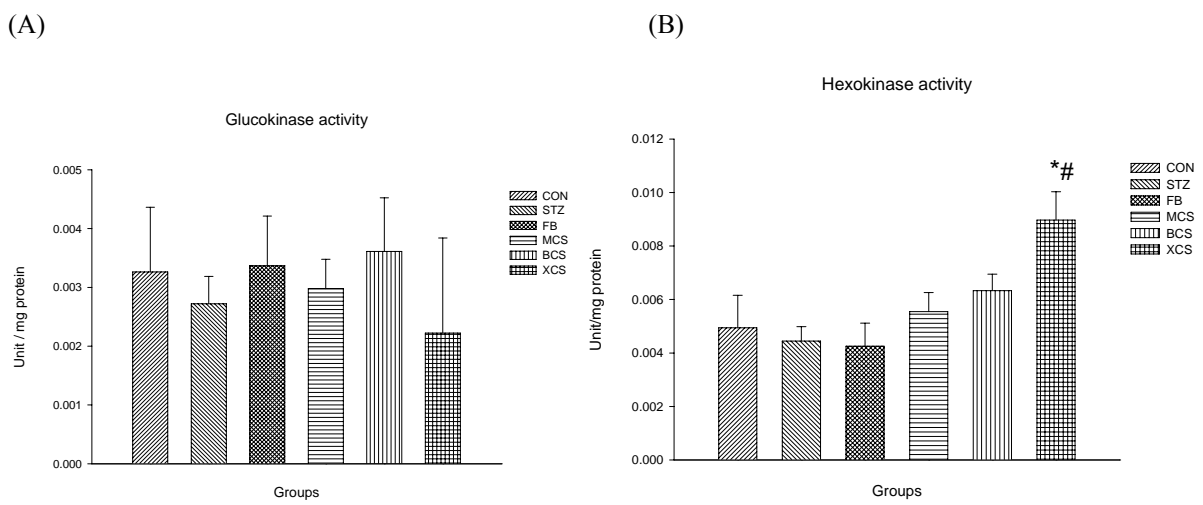


Figure 6. Specific activity of (A) glucokinase (B) hexokinase.