

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.

黃金銀耳酸性多醣於 C2C12 肌肉細胞中之葡萄糖恆定活性  
Glucose Homeostatic Activity of Glucuronoxylomannan  
Purified from *Tremella mesenterica* in C2C12 Myocytes.

研究生：黃鈺萍 撰  
Graduate Student : Huang, Yu-Ping

中華民國一〇一年十二月  
December, 2012

# 碩士論文指導教授推薦書

食品科學研究所科技組 黃鈺萍 君所提之論文

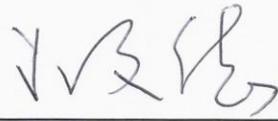
黃金銀耳酸性多醣於 C2C12 肌肉細胞中  
之葡萄糖恆定活性

Glucose Homeostatic Activity of Glucuronoxylomannan  
Purified from *Tremella mesenterica* in C2C12 Myocytes.

係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

食品科學研究所所長



指導教授：



中華民國一〇一年十二月十七日

# 碩士論文考試委員審定書

食品科學研究所科技組 黃鈺萍 君所提之論文

黃金銀耳酸性多醣於 C2C12 肌肉細胞中之  
葡萄糖恆定活性

Glucose Homeostatic Activity of Glucuronoxylomannan  
Purified from *Tremella mesenterica* in C2C12 Myocytes.

經本委員會審定通過，特此證明。

論文考試委員會

委員：

張春榮

台中榮總教學研究部 研究員

周文政

虎尾科技大學生物科技系 副教授

謝長奇

東海大學畜產與生物科技系 副教授

詹銘祺

東海大學食品科學系 助理教授

指導教授：詹銘祺

中華民國一〇一年十二月十七日

## 謝誌

研修碩士學位期間，承蒙恩師 盧錫祺博士於研究上給予悉心指導並時常關心我的健康，使論文得以順利完成。在論文撰寫期間，感謝恩師不厭其煩批改並給予建議，使得我能順利通過學位口試，師恩浩蕩，對恩師敬上最深的謝意。

論文口試期間，承蒙 陳春榮博士、周文敏博士及謝長奇博士，撥冗審查論文及詳加修正，並惠賜許多寶貴意見與指導，使本論文內容更為周詳，在此深表萬分感謝。特別感謝系上所有教授、助教及王姐，在大學與研究所期間的教導和幫助，奠定了我的基礎，並總是鼓勵與照顧我，使研究得以順利進行，由衷感謝。

在研究所期間，特別感謝本校畜產系 謝長奇博士慷慨借用儀器，對於實驗方法的協助與教導，特致萬分感謝。感謝本系 蔡正宗博士的教導與幫助，讓我獲益良多，由衷感謝。感謝 陳菀玲博士對我研究上的悉心教導、幫助以及關心，讓我成長不少，謝謝您。感謝茹婕、汝翔、青蓉、勝智、庭儒、佳華、希奇、怡樺、豪駿、芄萱、巧馨、瀟菽、冠閔等學長姐於實驗上的悉心指導與生活上的關心，總是給予支持與鼓勵，特別感謝青蓉學姐對我的照顧。謝謝希奇與佳華學姐你們對我的包容、照顧與關心，你們總是給我最大的支持與鼓勵，並陪伴著我與我分享許多的喜怒哀樂，能遇見你們，我真的很開心。感謝瑋翔對我的包容、支持與照顧，幫了我很多忙，讓我輕鬆許多，謝謝你。感謝惠旻、慈樺、彥蘋、欣怡、巧玲、玉卿一路的互相扶持、關心與打氣，總是讓我能很歡樂的繼續向前衝。謝謝同屆的朋友怡吩、昱仁、豐毓、哲暉、世浩、昭緯、宏仔、鈺欣及書平，謝謝你們平時的照顧與幫忙。謝謝昭伶、依旻、敏純、偉珊、昭蓁、怡任、健峰、儒碩你們的幫忙、陪伴與打氣，讓實驗室總是充滿笑聲。謝謝好友玥涵、鈞泐、采芬、滋文、鈺琇、俐雯及雅意你們的關心、陪伴與打氣，一直當我情緒的垃圾桶，讓我可以繼續努力。研究所期間得到許多人的幫助，無法一一詳列，在此謝謝你們的扶持、打氣和一路相挺。

最後，感謝我最親愛的爸爸、媽媽、姐姐及妹妹，給我最大的包容、支持、關心與鼓勵，讓我無後顧之憂下完成學業。將此論文獻給我最親愛的家人，一同分享我的成長與喜悅。

黃鈺萍 謹致於

東海大學食品科學研究所

中華民國一〇二年一月

## 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
1-2-1 糖尿病分類.....	4
1-2-2 糖尿病診斷.....	5
1-2-3 糖尿病治療.....	7
1-3 體內血糖恆定.....	8
1-3-1 胰島素分泌與其功能.....	8
1-3-2 肌肉與血糖恆定.....	10
1-3-3 胰島素阻抗.....	10
1-4 細胞層面之傳訊路徑.....	13
1-4-1 胰島素傳訊.....	13
1-4-2 脂聯素傳訊.....	16
1-4-3 肌肉中葡萄糖轉運與代謝.....	18
1-5 研究動機與實驗架構.....	19
二、材料與方法.....	22
2-1 實驗材料.....	22
2-1-1 黃金銀耳 <i>Tremella mesenterica</i> 酸性多醣(GXM).....	22
2-1-2 黃金銀耳酸性多醣之分子量測定.....	22
2-1-3 細胞培養.....	22
2-1-4 mRNA 表現量分析試劑.....	24
2-1-5 蛋白質分析.....	24
2-1-6 主要儀器及設備.....	25
2-2 實驗方法.....	26
2-2-1 黃金銀耳酸性多醣之分子量測定.....	26
2-2-2 細胞培養.....	26
2-2-3 細胞分化.....	27
2-2-4 誘導細胞產生胰島素阻抗.....	27
2-2-5 酸性多醣細胞毒性測試.....	27
2-2-6 葡萄糖擬似物 2-NBDG 帶入量分析.....	27
2-2-7 細胞 RNA 抽取與 cDNA 製備.....	28
2-2-8 同步定量聚合酶連鎖反應.....	28
2-2-9 蛋白質萃取.....	29
2-2-10 蛋白質定量.....	29

2-2-11 西方轉漬分析 .....	29
2-2-12 統計分析 .....	30
三、結果 .....	33
3-1 黃金銀耳酸性多醣分子量測定 .....	33
3-2 不同濃度之 GXM 對肌肉細胞 C2C12 毒性測試 .....	33
3-3 棕櫚酸誘導 C2C12 產生胰島素阻抗之濃度與時間測試 .....	34
3-3-1 棕櫚酸對 C2C12 毒性測試 .....	34
3-3-2 棕櫚酸對 C2C12 之葡萄糖擬似物 2-NBDG 帶入量之影響 .....	35
3-3-3 棕櫚酸對 C2C12 之 Akt (Ser <sup>473</sup> ) 磷酸化程度之影響 .....	36
3-4 不同濃度與時間之 GXM 對 C2C12 之影響 .....	38
3-4-1 正常態 C2C12 細胞葡萄糖擬似物 2-NBDG 帶入量 .....	38
3-4-2 Akt (Ser <sup>473</sup> ) 磷酸化程度 .....	38
3-4-3 阻抗態 C2C12 細胞葡萄糖擬似物 2-NBDG 帶入量 .....	41
3-5 細胞層面之傳訊路徑 .....	42
3-5-1 正常及阻抗狀態 C2C12 細胞之胰島素受體(IR) mRNA 相對表現量 .....	42
3-5-2 正常及阻抗態 C2C12 細胞之胰島素受體基質(IRS-1) mRNA 相對表現量 .....	46
3-5-3 正常及阻抗狀態 C2C12 細胞之脂聯素受體(AdipoR) mRNA 相對表現量 .....	50
3-5-4 正常及阻抗狀態 C2C12 細胞之六碳糖激酶(HK) mRNA 相對表現量 .....	58
3-5-5 正常及阻抗態 C2C12 細胞之胰島素受體(IR)蛋白質相對表現量 .....	62
3-5-6 正常及阻抗態 C2C12 細胞之胰島素受體基質(IRS-1)蛋白質相對表現量 .....	67
3-5-7 正常及阻抗態 C2C12 細胞之磷酸肌醇激酶(PI3-kinase)蛋白質相對表現量 .....	71
3-5-8 正常及阻抗態 C2C12 細胞之蛋白質激酶 B (PKB/Akt) 蛋白質相對表現量與其磷酸化程度 .....	75
3-5-9 正常及阻抗態 C2C12 細胞之腺苷單磷酸活化蛋白激酶(AMPK) 蛋白質相對表現量與其磷酸化程度 .....	88
四、討論 .....	101
4-1 酸性多醣分子量 .....	101
4-2 細胞層面傳訊路徑 .....	101
4-3 葡萄糖擬似物 2-NBDG 帶入量 .....	105
4-4 未來展望 .....	106
參考文獻 .....	109

## 圖目錄

圖一、黃金銀耳酸性多醣膠體滲透層析圖譜.....	33
圖二、不同濃度之黃金銀耳酸性多醣對肌肉細胞 C2C12 毒性測試.....	34
圖三、不同濃度棕櫚酸對 C2C12 細胞毒性測試.....	35
圖四、C2C12 與不同濃度棕櫚酸共置 12 與 16 小時之 2-NBDG 帶入量.....	36
圖五、C2C12 與不同濃度棕櫚酸共置 12 或 16 小時之 Akt 磷酸化程度.....	37
圖六、C2C12 與不同濃度 GXM 共置 12 或 24 小時之 2-NBDG 帶入量.....	39
圖七、C2C12 與不同濃度 GXM 共置 12 或 24 小時之 Akt 磷酸化程度.....	40
圖八、阻抗態 C2C12 與不同濃度 GXM 共置 24 小時之 2-NBDG 帶入量.....	41
圖九、正常態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間之 IR mRNA 相對表現量... .....	43
圖十、正常態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間並添加胰島素刺激之 IR mRNA 相對表現量.....	44
圖十一、阻抗態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間之 IR mRNA 相對表現量 .....	45
圖十二、阻抗態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間並添加胰島素刺激之 IR mRNA 相對表現量.....	46
圖十三、正常態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間之 IRS-1 mRNA 相對表現 量.....	47
圖十四、正常態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間並添加胰島素刺激之 IRS-1 mRNA 相對表現量.....	48
圖十五、阻抗態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間之 IRS-1 mRNA 相對表現 量.....	49
圖十六、阻抗態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間並添加胰島素刺激之 IRS-1 mRNA 相對表現量.....	50
圖十七、正常態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間之 AdipoR1 mRNA 相對 表現量.....	51
圖十八、正常態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間並添加胰島素刺激之 AdipoR1 mRNA 相對表現量.....	52
圖十九、阻抗態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間之 AdipoR1 mRNA 相對 表現量.....	53
圖二十、阻抗態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間並添加胰島素刺激之 AdipoR1 mRNA 相對表現量.....	54
圖二十一、正常態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間之 AdipoR2 mRNA 相 對表現量.....	55
圖二十二、正常態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間並添加胰島素刺激之 AdipoR2 mRNA 相對表現量.....	56
圖二十三、阻抗態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間之 AdipoR2 mRNA 相	

對表現量 .....	57
圖二十四、阻抗態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間並添加胰島素刺激之 AdipoR2 mRNA 相對表現量 .....	58
圖二十五、正常態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間之 HK mRNA 相對表現量 .....	59
圖二十六、正常態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間並添加胰島素刺激之 HK mRNA 相對表現量 .....	60
圖二十七、阻抗態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間之 HK mRNA 相對表現量 .....	61
圖二十八、阻抗態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間並添加胰島素刺激之 HK mRNA 相對表現量 .....	62
圖二十九、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 IR 蛋白質相對表現量 .....	63
圖三十、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 IR 蛋白質相對表現量 .....	64
圖三十一、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 IR 蛋白質相對表現量 .....	65
圖三十二、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 IR 蛋白質相對表現量 .....	66
圖三十三、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 IRS-1 蛋白質相對表現量 .....	68
圖三十四、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 IRS-1 蛋白質相對表現量 .....	69
圖三十五、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 IRS-1 蛋白質相對表現量 .....	70
圖三十六、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 IRS-1 蛋白質相對表現量 .....	71
圖三十七、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 PI3K 蛋白質相對表現量 .....	72
圖三十八、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 PI3K 蛋白質相對表現量 .....	73
圖三十九、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 PI3K 蛋白質相對表現量 .....	74
圖四十、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 PI3K 蛋白質相對表現量 .....	75
圖四十一、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 Akt 蛋白質相對表現量 .....	76
圖四十二、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之	

Akt 蛋白質相對表現量 .....	77
圖四十三、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 Akt 蛋白質相對表現量 .....	78
圖四十四、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 Akt 蛋白質相對表現量 .....	79
圖四十五、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 Akt (Ser <sup>473</sup> )蛋白質磷酸化相對量 .....	81
圖四十六、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 Akt (Ser <sup>473</sup> )蛋白質磷酸化相對量 .....	82
圖四十七、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 Akt (Ser <sup>473</sup> )蛋白質磷酸化相對量 .....	83
圖四十八、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 Akt (Ser <sup>473</sup> )蛋白質磷酸化相對量 .....	84
圖四十九、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 Akt 磷酸化程度 .....	85
圖五十、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 Akt 磷酸化程度 .....	86
圖五十一、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 Akt 磷酸化程度 .....	87
圖五十二、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 Akt 磷酸化程度 .....	88
圖五十三、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 AMPK 蛋白質相對表現量 .....	89
圖五十四、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 AMPK 蛋白質相對表現量 .....	90
圖五十五、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 AMPK 蛋白質相對表現量 .....	91
圖五十六、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 AMPK 蛋白質相對表現量 .....	92
圖五十七、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 AMPK (Thr <sup>172</sup> )蛋白質磷酸化相對量 .....	93
圖五十八、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 AMPK (Thr <sup>172</sup> )蛋白質磷酸化相對量 .....	94
圖五十九、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 AMPK (Thr <sup>172</sup> )蛋白質磷酸化相對量 .....	95
圖六十、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 AMPK (Thr <sup>172</sup> )蛋白質磷酸化相對量 .....	96
圖六十一、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 AMPK 磷酸化程	

度 .....	97
圖六十二、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 AMPK 磷酸化程度 .....	98
圖六十三、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 AMPK 磷酸化程 度 .....	99
圖六十四、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 AMPK 磷酸化程度 .....	100

## 附圖目錄

附圖一、黃金銀耳子實體.....	3
附圖二、 <i>Tremella mesenterica</i> CBS 101939 酸性多醣結構式 .....	4
附圖三、糖尿病與高危險群診斷標準.....	7
附圖四、維持血糖恆定之機制.....	8
附圖五、胰島素調控之代謝.....	10
附圖六、第二型糖尿病之病理進程.....	12
附圖七、利用游離脂肪酸誘導肌肉產生胰島素阻抗之機制之一.....	12
附圖八、利用游離脂肪酸誘導肌肉產生胰島素阻抗之機制之二.....	12
附圖九、胰島素傳訊.....	13
附圖十、AMPK 對於周邊組織臟器之影響.....	17
附圖十一、葡萄糖代謝路徑.....	18
附圖十二、酸性多醣影響分子路徑.....	20
附圖十三、實驗架構.....	21
附圖十四、2-NBDG 結構式.....	23
附圖十五、多醣分子量標準曲線.....	108

## 表、附表目錄

表一、各項傳訊標的因子總整理.....	107
附表一、糖化血色素與平均血糖值對照表.....	7
附表二、Akt 異構型之分佈與功能.....	16
附表三、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.....	31
附表四、實驗中使用之一級、二級抗體.....	32
附表五、葡聚糖標準品之滯留時間.....	108

## 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。糖尿病為多種成因之代謝異常所導致。由於潛藏的胰島素阻抗問題之未病群遠超過發病人數，如能協助增進敏感性可避免演進至疾病狀態。肌肉為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。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。為進一步以作用濃度及時間等各項參數探討酸性多醣體於正常及阻抗態細胞降血糖之機制，本研究將黃金銀耳酸性多醣(GXM)與 C2C12 細胞共置，分別在葡萄糖攝入及胰島素與脂聯素傳訊等層面進行觀察。結果顯示，以棕櫚酸誘導 C2C12 肌肉細胞產生胰島素阻抗，會降低葡萄糖擬似物 2-NBDG 帶入量及 Akt 磷酸化。黃金銀耳 GXM 之添加可明顯增加正常及阻抗細胞 2-NBDG 之帶入。同步定量 PCR 分析顯示 GXM 可在特定時間提升胰島素受體、第一型胰島素受體基質、脂聯素受體與六碳糖激酶之 mRNA 表現。GXM 並添加胰島素刺激可增加 AMPK 與 Akt 磷酸化，表示兩條路徑可互相增強以增加葡萄糖帶入。然而，胰島素受體、第一型胰島素受體基質等標的蛋白質在添加 GXM 作用後，與 mRNA 層次表現量存有時間差與總量的差異，此與兩層次表現差異、蛋白質分布與磷酸化等有關，而 GXM 對整體路徑之提升可能也需與其他周邊組織共同合作，有待後續分析來釐清。綜合以上結果，推測 GXM 可影響胰島素傳訊與 AMPK 之活性，以增加正常或阻抗細胞之葡萄糖帶入之能力。

## Abstract

The incidence of diabetes mellitus, a metabolic abnormality resulted from multiple causes, increases with the changing life style. People at pre-diabetic stage comprise an even larger population, often asymptomatic but with various levels of insulin resistance, which could be averted by insulin-sensitizing remedies before irreversible organ lesions. Skeletal muscle is a major site for glucose deposition, and the glucose uptake is mainly regulated by insulin. Previous studies showed that *T. mesenterica* can effectively enhance the insulin sensitivity, and ameliorate hyperglycemia in normal and diabetic rats. To further investigate the anti-hyperglycemic mechanisms of *T. mesenterica*, differentiated C2C12 murine myocytes were co-incubated with different concentrations of glucuronoxylomannan (GXM) from *T. mesenterica* for various durations, and glucose uptake, insulin and adiponectin signaling were monitored. The results show that treating C2C12 cells with palmitic acid significantly reduced the uptake of glucose analogue 2-NBDG, and the phosphorylation of Akt protein. GXM from *T. mesenterica* significantly enhanced 2-NBDG uptake by cells in normal or insulin resistant status. As revealed by Real-time PCR analysis the mRNA expressions of insulin receptor, insulin receptor substrate-1, adiponectin receptor and hexokinase were greatly upregulated in C2C12 cells after adding GXM. Coadministration of GXM and insulin increased the phosphorylation of AMPK and Akt proteins, indicating that the enhanced glucose uptake in C2C12 cells may be through the interplay of insulin and adiponectin signaling pathways. Effects of GXM on the protein expression of insulin receptor and insulin receptor substrate-1 did not coordinate with the mRNA expression. This discrepancy may attributed from different regulation of two levels, protein translocation, and the interactions of different tissues which were missing in the *in vitro* model. In conclusion, the antidiabetic activity of GXM at least in part, is contributed by promoting insulin signaling and phosphorylation of AMPK protein to enhance glucose uptake by cells in normal or insulin resistant status.

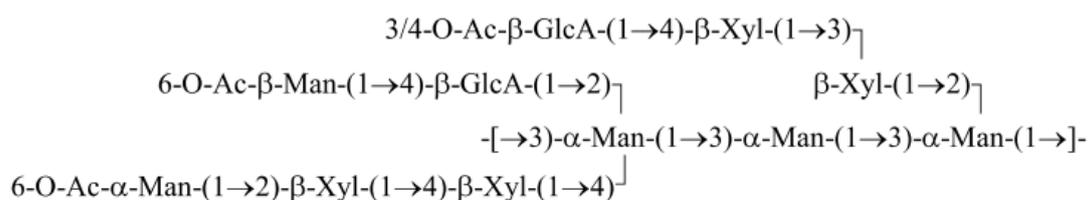
## 一、前言

### 1-1 黃金銀耳與其生理功效

黃金銀耳(*Tremella mesenterica*)為一類酵母菌真菌(yeast-like fungi)，屬真菌界(*Fungi*)、擔子菌門(*Basidiomycota*)、銀耳綱(*Tremellomycetes*)、銀耳目(*Tremellales*)、銀耳科(*Tremellaceae*)、銀耳屬(*Tremella*)之菌類，又稱巫婆的奶油(Witches butter)，常見於歐洲、美國與臺灣的高山上(De Baets and Vandamme, 2001)。由雙核菌絲體與子實體組成，其分生孢子呈單倍體酵母狀(Bandoni and Boekhout, 2011; 陳, 2008)，子實體外觀呈金黃色或橙黃色膠狀、具波浪狀不規則皺摺，因形狀類似腦部而有腦耳之稱(附圖一)。銀耳屬之菌類在亞洲地區常做為食材或天然藥材，根據《中國藥用真菌》與《本草綱目》記載，其對於支氣管炎、感冒咳嗽及高血壓的治療皆有顯著功效。目前銀耳屬功能性成份，以多醣體研究較多，其中酸性多醣 glucuronoxylomannan (GXM)證實具有抗腫瘤、降膽固醇、刺激免疫、抗輻射及抗發炎等功效(Reshetnikov *et al.*, 2000; Ukai *et al.*, 1972; Vinogradov *et al.*, 2004; Wasser, 2002)。黃金銀耳多醣體由 $\alpha$ -D-glucan 與酸性多醣組成(Bogaert *et al.*, 2009)，而酸性多醣佔子實體約 20%，結構以(1→3)-linked  $\alpha$ -D-mannose 為直鏈骨架，支鏈由 xylose、glucuronic acid 及 O-acetyl groups 組成，如附圖二所示(Vinogradov *et al.*, 2004)。研究證實黃金銀耳 GXM 具有調節類固醇合成(Chen *et al.*, 2006)、降血糖、調節免疫系統(Lo *et al.*, 2006; Wasser *et al.*, 2002)等功效。



附圖一、黃金銀耳子實體(王, 2007)。



附圖二、*Tremella mesenterica* CBS 101939 酸性多醣結構式(Vinogradov *et al.*, 2004)。

## 1-2 糖尿病

世界衛生組織與美國糖尿病協會將糖尿病(diabetes mellitus)定義為多成因之代謝異常疾病，主要是胰臟β細胞分泌胰島素不足，或胰島素功能缺失，亦或兩者皆存在，導致血液中的葡萄糖濃度無法降低，呈現長期及慢性的高血糖狀態，進而使身體組織對醣類、脂肪及蛋白質的代謝受到影響，症狀包括吃多、喝多、尿多和體重減輕等(American Diabetes Association, 2012)。隨著生活水準的提高及飲食改變，使罹患糖尿病的患者快速增加，根據世界衛生組織統計，目前全球已有 3.47 億人罹患糖尿病，並預估 2008 年至 2030 年因糖尿病死亡的病患會增加 66%，因此糖尿病患者的治療與血糖調控為一重要之課題。

### 1-2-1 糖尿病分類

根據美國糖尿病協會之報告，將糖尿病分為下列四型(American Diabetes Association, 2012)：

#### 1-2-1.1 第一型糖尿病

第一型糖尿病(Type 1 diabetes mellitus)又稱為胰島素依賴型糖尿病(Insulin-dependent diabetic mellitus, IDDM)，且因好發於兒童與青年，故可稱幼年型糖尿病(juvenile-onset diabetic mellitus)，其罹病原因可能為胰臟β細胞受自體免疫攻擊、基因的遺傳缺陷、環境因子及其他不明原因，造成體內胰島素不足或缺乏，使得血糖無法正常調控，需注射胰島素。糖尿病病患約 5~10% 為第一型糖尿病，且易有酮酸中毒(ketoacidosis)的併發症。

### 1-2-1.2 第二型糖尿病

第二型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus)為非胰島素依賴型糖尿病(non-insulin-dependent diabetic mellitus, NIDDM),佔整體糖尿病患人數約 90~95% ,此型病患仍可分泌胰島素,但因胰島素分泌不足或功能缺失,亦或肌肉、肝臟、脂肪組織等對胰島素敏感度下降,產生胰島素阻抗,導致組織無法有效利用葡萄糖,引起高血糖症狀。其成因複雜,目前研究推斷基因及環境因子,如長期缺乏活動或過度攝取能量等,與第二型糖尿病的成因相關。為降低血糖胰臟β細胞會分泌胰島素,促進肌肉、脂肪及肝臟等周邊組織帶入葡萄糖,當周邊組織對胰島素敏感性下降,會促使β細胞分泌更多胰島素來平衡血糖,最終會因過度分泌導致β細胞無法負荷,使胰島素分泌量下降,造成高血糖的情況,進而演變成胰島素阻抗,如此循環變成第二型糖尿病(Cheng and Fantus, 2005)。

### 1-2-1.3 其他特異型

其他特異型(other specific types of diabetes mellitus)可能為β細胞功能的基因缺陷(genetic defects of the β-cell)、胰島素作用的基因缺陷(genetic defects in insulin action)、外分泌胰臟疾病(diseases of the exocrine pancreas)、荷爾蒙等內分泌異常、一些基因疾病、藥物、化學物質或病毒感染引發的糖尿病。

### 1-2-1.4 妊娠糖尿病

婦女懷孕期間出現任何程度的葡萄糖耐受性異常稱為妊娠糖尿病(gestational diabetes mellitus, GDM),通常發生於 24~28 週,為懷孕期間體內荷爾蒙改變所引起,在懷孕過後即恢復正常。若懷孕前已診斷出糖尿病,則不屬此類。

## 1-2-2 糖尿病診斷

目前未懷孕之成人糖尿病診斷如符合以下其中一項即可視為罹患糖尿病(American Diabetes Association, 2012)：

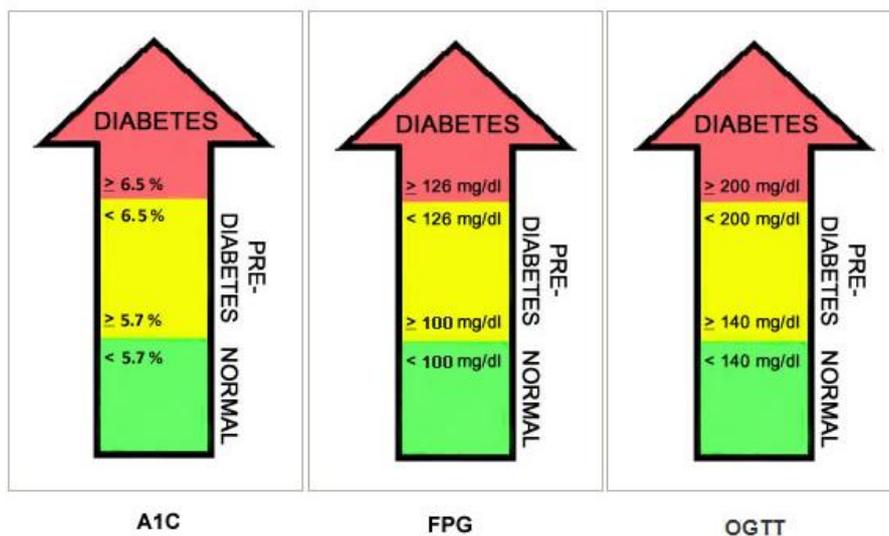
1. 糖化血色素(glycosylated hemoglobin)  $\geq 6.5\%$ 。又稱為 hemoglobin A1C (A1C)，因葡萄糖可結合至紅血球內的血色素，且不易脫落，故 A1C 值越高表示血糖濃度越高。因紅血球壽命約 120 天，故監測 2~3 個月的平均血糖狀況，可做為長期控制血糖的指標。未罹患糖尿病者 A1C 約 5%。A1C 百分比與平均血糖對照參見附表一。
2. 空腹血糖濃度(fasting plasma glucose, FPG)  $\geq 126$  mg/dl (7.0 mmol/l)。為空腹 8 小時之血糖濃度，正常應小於 100 mg/dl。
3. 口服葡萄糖耐受試驗(oral glucose tolerance test, OGTT)  $\geq 200$  mg/dl (11.1 mmol/l)。OGTT 亦稱為 2-h plasma glucose (2-h PG)，此試驗遵照世界衛生組織指示，給予試驗者於五分鐘內，喝完 75 公克無水葡萄糖溶於 300 mL 水中的葡萄糖溶液，在兩小時後血糖濃度  $\geq 200$  mg/dl，即可診斷為糖尿病。正常人之 OGTT 應小於 140 mg/dl。
4. 一天中任何時間的血糖值  $\geq 200$  mg/dl，並伴隨糖尿病之典型症狀，如吃多、喝多、尿多及體重減輕等，也可判定為糖尿病。

妊娠糖尿病的診斷為非糖尿病患者於懷孕 24~28 週時，FPG  $\geq 92$  mg/dl (5.1 mmol/l)、1-h PG  $\geq 180$  mg/dl (10.0 mmol/l) 或 2-h PG  $\geq 153$  mg/dl (8.5 mmol/l)，即為妊娠糖尿病。

血糖濃度如介於正常人與糖尿病患者之間者為糖尿病高危險群 (pre-diabetes)(詳見附圖三)，預估此族群的人數可能遠大於糖尿病患者人數，且無明顯病徵易被忽略，如能及時發現並做好血糖的控制，將能降低糖尿病發生率及預防併發症的出現。

附表一、糖化血色素與平均血糖值對照表(American Diabetes Association)。

糖化血色素(%)	平均血糖值(mg/dl)
6	126
6.5	140
7	154
7.5	169
8	183
8.5	197
9	212
9.5	226
10	240



附圖三、糖尿病與高危險群診斷標準(American Diabetes Association)。

### 1-2-3 糖尿病治療

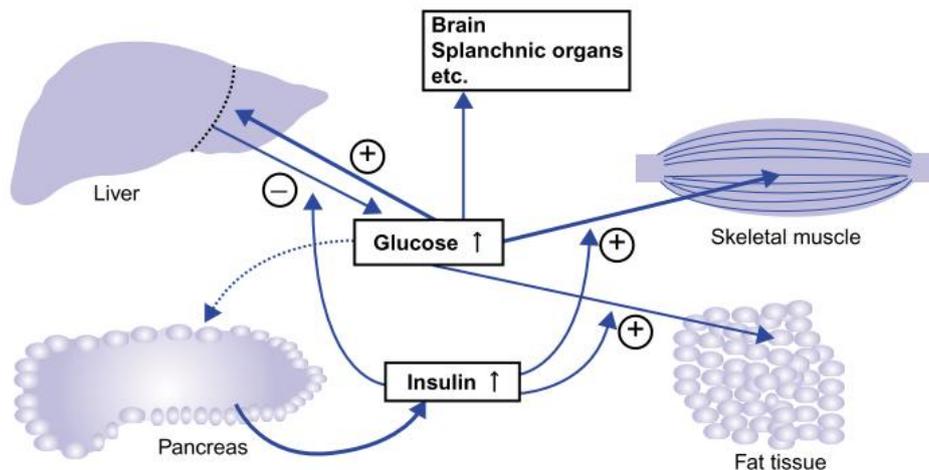
糖尿病患者因長期處於高血糖狀態下，產生過量的多元醇化合物或使大分子物質及組織蛋白被糖化與氧化，造成器官受損，尤其是腦部、眼睛、腎臟、神經系統、心血管等，產生腦中風、視網膜病變、高血壓、腎臟病變、神經受損、傷口不易癒合與末端組織壞死等嚴重的併發症(Brownlee, 2005)。而有效的控制血糖，

將可延緩併發症或預防糖尿病的發生。

目前糖尿病的治療方法以飲食控制、運動與藥物治療為主，而目前的糖尿病藥物大多都有嚴重程度不等的副作用，如：過敏、腸胃不適、肝臟損傷或增加心臟疾病之風險。因此，尋找無副作用的天然物質取代藥物的治療，提高胰島素的敏感性或更有效控制血糖，以期避免或延緩糖尿病及其併發症，將是現今研究的重要方向之一。而本研究也是以此目標做為努力方向。

### 1-3 體內血糖恆定

在飢餓或飽食狀態，人體血糖濃度會維持在 4~7 mM (Saltiel and Kahn, 2001)。而要維持體內血糖恆定除依賴胰臟 $\beta$ 細胞分泌胰島素外，還需受胰島素調控之周邊組織參與，即肌肉、脂肪與肝臟，如附圖四(Zierath and Kawano, 2003)。



附圖四、維持血糖恆定之機制(Zierath and Kawano, 2003)。

#### 1-3-1 胰島素分泌與其功能

胰島素由胰臟蘭氏小島(islets of Langerhans)之 $\beta$ 細胞所分泌，為一雙胜肽的荷爾蒙，由 21 個胺基酸的 A 鏈及 30 個胺基酸的 B 鏈以兩個雙硫鍵鍵結而成，分子量為 5802 Da，成熟的胰島素會以鋅離子配位的六聚體存於 $\beta$ 細胞囊泡中 (Dodson and Steiner, 1998; Wilcox, 2005)。

葡萄糖為刺激胰島素分泌之主要因素，而胺基酸、游離脂肪酸、乙醯膽鹼、

神經肽類物質(pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, PACAP)、腸泌素(glucose-dependent insulintropic polypeptide, GIP、glucagon-like peptide-1, GLP-1)或其他激素也會影響胰島素分泌。當血糖升高，葡萄糖進入 $\beta$ 細胞經代謝後產生ATP，進而關閉 $K^+$ -ATP通道，導致細胞膜去極化，活化 $Ca^{2+}$ 通道，使細胞內鈣離子濃度上升，促使胰島素分泌(Bratanova-Tochkova *et al.*, 2002)。

胰島素除調控血糖，也是體內調節醣類、蛋白質及脂質代謝的賀爾蒙之一(Dimitriadis *et al.*, 2011)(附圖五)：

#### 1. 醣類代謝

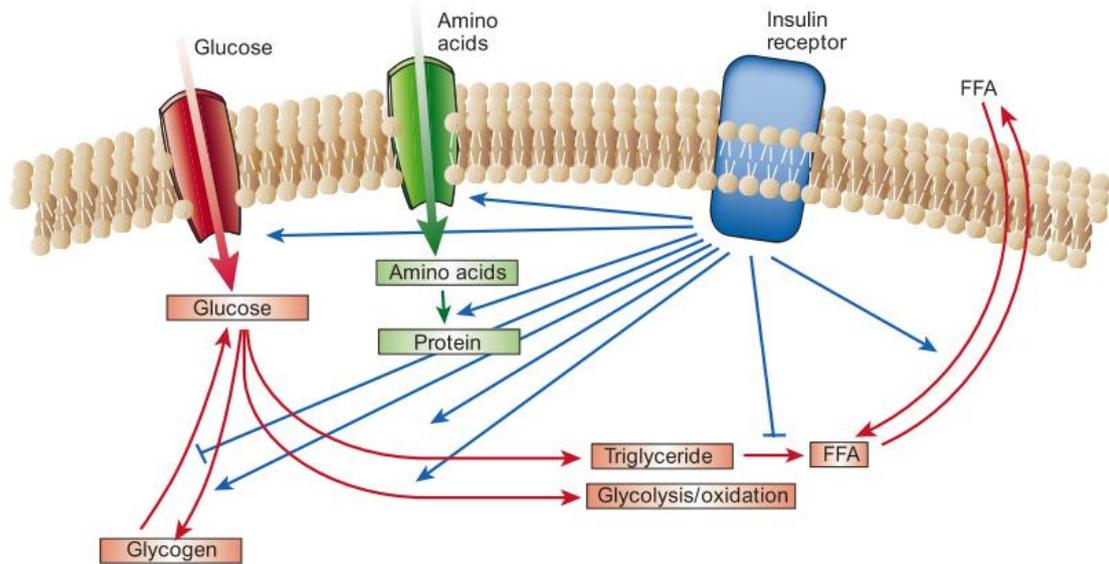
可促進肌肉與脂肪細胞的葡萄糖帶入，增加六碳糖激酶(hexokinase)與磷酸果糖激酶(6-phosphofructokinase)的活性，進行糖酵解作用(glycolysis)與肝醣合成，並抑制肝臟的糖質新生(gluconeogenesis)與肝醣分解(glycogenolysis)。

#### 2. 脂質代謝

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

#### 3. 蛋白質代謝

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



附圖五、胰島素調控之代謝(Saltiel and Kahn, 2001)。

### 1-3-2 肌肉與血糖恆定

肌肉為受胰島素調控的周邊組織中，最主要攝取葡萄糖的器官。在空腹時，腦與內臟利用大部份的葡萄糖，各別佔 50%與 25%，剩餘 25%主要由肌肉所使用；在飽食狀態下，肌肉組織所攝入的葡萄糖佔全身的 75%~90%，且能感應體內血糖濃度的變化以消耗葡萄糖。若肌肉攝取葡萄糖的機制無正常運作，會連帶影響到受胰島素調控之周邊組織對葡萄糖的帶入，且肌肉組織的胰島素阻抗被認為是導致第二型糖尿病中首要因子，由此可知肌肉在葡萄糖代謝上扮演重要角色 (Ryder *et al.*, 2001; Zierath and Kawano, 2003; Zierath *et al.*, 2000; Zierath and Wallberg-Henriksson, 2002)。胰島素對周邊組織攝入葡萄糖與代謝之調控皆須藉由細胞內的傳訊，當肌肉中胰島素傳訊受損會造成受胰島素刺激之葡萄糖轉運率降低(Ryder *et al.*, 2001)，故肌肉中胰島素傳訊之分子，其表現量下降或功能受損影響傳訊，皆可能造成第二型糖尿病。

### 1-3-3 胰島素阻抗

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

resistance)。胰島素阻抗為第二型糖尿病最早出現且持續的病徵，原因可分兩類，其一為遺傳因素(Genetic Predisposition)，指代謝酵素及胰島素傳訊分子的基因表現改變，其二為環境因素，包括年齡、壓力、運動量不足與飲食生活習慣等(附圖六)，造成正常胰島素濃度無法正常代謝導致高血糖或分泌更多的胰島素以達成身體正常時的代謝(Leahy, 2005; Saltiel and Kahn, 2001; Zierath *et al.*, 2000)。胰島素阻抗更是代謝症候群(metabolic syndrome, 如第二型糖尿病、心血管疾病)的致病病因(Lebovitz, 2001)。

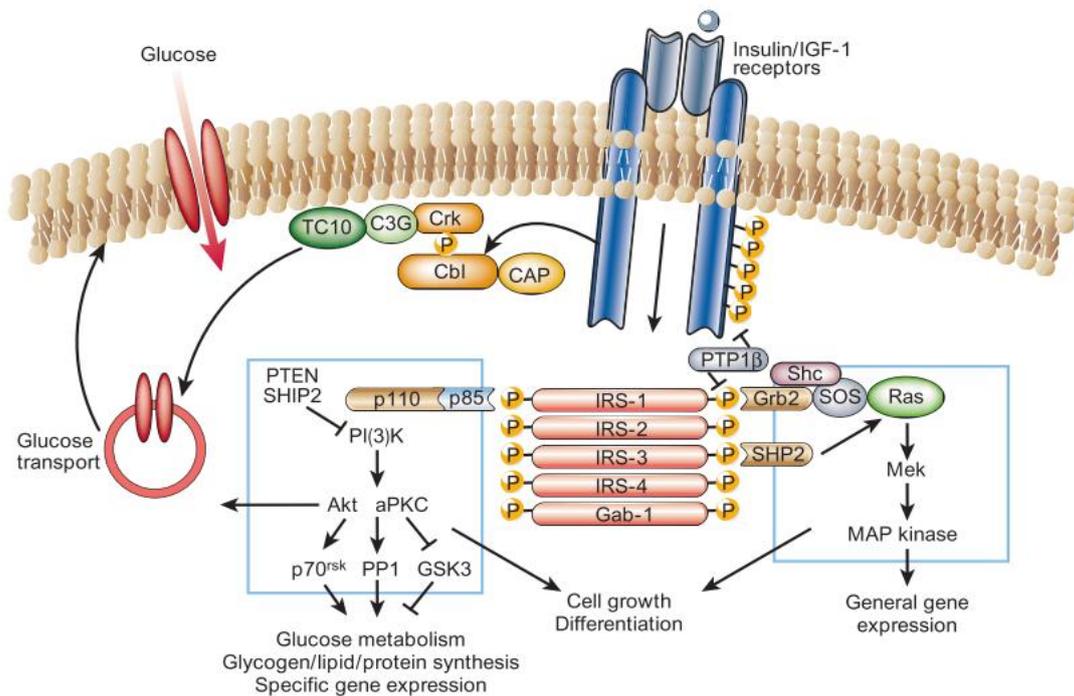
除了使用動物模式做為第二型糖尿病治療藥物的研究平台，三個受胰島素調控之臟器，即肌肉、肝臟與脂肪組織，其細胞也常被用來做為研究胰島素傳訊相關機制。細胞株需可模擬接近生理狀況的傳訊模式，如肌肉細胞C2C12與脂肪細胞3T3-L1等，常被用於研究體外細胞模式之傳訊。目前肌肉細胞誘導成胰島素阻抗之研究，大多使用脂肪酸來誘導胰島素阻抗，尤其是以棕櫚酸(palmitic acid)為大宗。近來許多研究證明，游離脂肪酸(free fatty acid, FFA)為造成胰島素阻抗之重要因子(Boden, 2001; Boden and Shulman, 2002; Groop *et al.*, 1989; Wilding, 2007)。游離脂肪酸可誘導肌肉細胞產生胰島素阻抗的原因可能為：游離脂肪酸的氧化會生成檸檬酸(citrate)與乙醯輔酶A (acetyl-CoA)，當氧化增加，會使粒線體中acetyl-CoA/CoA與NADH/NAD<sup>+</sup>比率升高進而抑制丙酮酸去氫酶(pyruvate dehydrogenase)，而citrate與acetyl-CoA的增加也會抑制phosphofructokinase，造成glucose-6-phosphate (G6P)的累積，而G6P會抑制hexokinase II (HK II)的活性，導致葡萄糖帶入降低與代謝受阻，如附圖七(Kovacs and Stumvoll, 2005; Randle *et al.*, 1963)。也有研究顯示，體內FFA濃度增加會降低第一型胰島素受體基質(Insulin receptor substrate-1, IRS-1)與磷脂肌醇-3-激酶(PI3 kinase, PI3K)的活性，因雙酸甘油酯(diacylglycerol)與腦醯胺(ceramide)會活化PKC $\theta$ ，使IRS-1的絲胺酸位點被磷酸化，導致下游PI3K傳訊降低，進而使葡萄糖帶入減少，詳見附圖八(Dresner *et al.*, 1999; Kovacs and Stumvoll, 2005; Shulman, 2000)。



## 1-4 細胞層面之傳訊路徑

### 1-4-1 胰島素傳訊

胰島素傳訊為一複雜的傳訊網路，胰島素藉由血液的運送，活化細胞膜上胰島素受體(Insulin receptor, IR)的 $\beta$ 次單元，並透過磷酸化胰島素受體基質(Insulin receptor substrate, IRS)家族，傳訊給磷脂肌醇-3-激酶(PI3 kinase, PI3K)，與 PI3K p85 次單元結合，使 PI3K 合成 PIP<sub>3</sub>，啟動下游蛋白質激酶 B (Protein kinase B, PKB, 又稱 Akt)的活性，帶動一連串的生長與代謝機制(附圖九)。



附圖九、胰島素傳訊(Saltiel and Kahn, 2001)。

#### 1. 胰島素受體(Insulin receptor, IR)

胰島素受體屬受體酪胺酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK)家族，為由兩個與細胞膜外之 $\alpha$ 次單元( $\alpha$ -subunits)與兩個穿膜 $\beta$ 次單元( $\beta$ -subunits)所組成之四聚體蛋白質。當血液中胰島素與 IR  $\alpha$ 次單元結合，活化 $\beta$ 次單元酪胺酸激酶，使其啟動自體磷酸化，並帶動下游的傳訊，如 IRS (Dipl-Pharm, 2005; Saini, 2010; Zierath and Kawano, 2003)。當 IR 無正常運作，會導致胰島素阻抗，進而引發肥胖及第二型糖尿病等(Accili *et al.*, 1996)。

## 2. 胰島素受體基質(Insulin receptor substrate, IRS)

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)，可被胰島素受體酪胺酸激酶磷酸化，並可提供具有SH2 (src homology 2)基團分子，如PI3K p85結合之停靠點(docking sites)，且含數個酪胺酸與絲胺酸磷酸化位(Dipl-Pharm, 2005; Gual *et al.*, 2005)，若降低IRS的酪胺酸磷酸化，會提高30%罹患第二型糖尿病的機率，如增加絲胺酸磷酸化，會降低胰島素作用的敏感度而減少傳訊(Sesti *et al.*, 2001; Smith, 2002)。

IRS家族中，IRS-1與IRS-2為胰島素受體基質家族中主要參與醣類代謝的調控，也是肌肉組織中參與胰島素作用之蛋白質(Karlsson and Zierath, 2007; White, 2002; Zierath *et al.*, 2000)，如將IRS-1或IRS-2的基因剔除皆會造成胰島素阻抗，而剔除IRS-2的基因更會導致胰臟 $\beta$ 細胞的受損，導致第二型糖尿病的產生(Bjornholm and Zierath, 2005; Saini, 2010; Tsuruzoe *et al.*, 2001; Yamauchi *et al.*, 1996)。但研究顯示，當IRS-1基因剔除或表現量降低時，會造成肌肉組織產生胰島素阻抗，降低葡萄糖的攝入及葡萄糖轉運蛋白的轉位(Huang *et al.*, 2005; Saltiel and Kahn, 2001; Sesti *et al.*, 2001; Yamauchi *et al.*, 1996)，而剔除IRS-2基因並不會影響到肌肉中葡萄糖的攝入(Huang *et al.*, 2005; Thirone *et al.*, 2006)。因此，在肌肉組織中IRS-1與IRS-2功能不相同，主要是以IRS-1做為調控葡萄糖轉運與代謝並非IRS-2 (Huang *et al.*, 2005; Krook *et al.*, 2000; Thirone *et al.*, 2006)。

## 3. 磷脂肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)

PI3K 家族中與胰島素調控最相關為 class 1a，具有調控單元 p85 與催化單元 p110，當 IRS 磷酸化後，p85 與 p110 形成之異二聚體(heterodimer)結合至 IRS 的對接位(docking site)，使之活化而產生 PIP<sub>3</sub> (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate)(Hu *et al.*, 1993; Saltiel and Kahn, 2001; Shepherd *et al.*, 1998)。接續傳訊給 PI3K/Akt 與 MAPK 兩條路徑，其中 PI3K/Akt 路徑為參與大多胰島

素引起之代謝調控，包含葡萄糖、蛋白質與脂質代謝等(Saltiel and Kahn, 2001)。研究顯示，抑制 PI3K 會造成肌肉細胞 GLUT4 的 mRNA 表現量下降，使蛋白質表現與葡萄糖攝入也受到影響而降低(Yeh *et al.*, 1995)。且 PI3K 突變或表現異常時，會導致血中胰島素濃度增加、葡萄糖耐受性異常及高血脂等，故 PI3K 為胰島素調控葡萄糖與脂肪代謝的一重要點(Miyake *et al.*, 2002)。

#### 4. 蛋白質激酶 B (Protein kinase B, PKB/Akt)

PI3K 活化後，會活化下游絲胺酸/酪胺酸激酶(serine/threonine kinase)，稱之蛋白質激酶(Protein kinase B, PKB)，又稱 Akt。依照 PH domain 的結構差異可分為 PKB $\alpha$ /Akt1、PKB $\beta$ /Akt2 及 PKB $\gamma$ /Akt3(Fayard *et al.*, 2010)，其分佈與功能列於附表二。Akt 磷酸化位點 threonine<sup>308</sup>(Thr<sup>308</sup>)為活化所需，另一磷酸化 serine<sup>473</sup>(Ser<sup>473</sup>)則可使 Akt 活性達到最大(Alessi *et al.*, 1996)。經基因剔除實驗證實，Akt1 缺失會影響胎盤的發育，而 Akt3 基因剔除會導致出生後的腦部大小與發展，甚至影響細胞的數量及大小，但兩者皆不會影響體內葡萄糖的恆定與代謝(Chen *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2001b; Easton *et al.*, 2005; Tschopp *et al.*, 2005)。如剔除 Akt2 基因，則會導致空腹高血糖、高胰島素血症、葡萄糖不耐受性與肌肉葡萄糖攝入受損等症狀(Cho *et al.*, 2001a; Garofalo *et al.*, 2003)。於受胰島素調控組織中，Akt1 與 Akt2 的數量較 Akt3 多(Masure *et al.*, 1999)，值得注意的是亦有研究顯示肌肉組織中，Akt1 可增加肝醣合成激酶(glycogen synthase kinase 3, GSK3)磷酸化使其活性降低，而 Akt2 可增加葡萄糖的帶入，兩者皆可使肝醣含量上升，若抑制 Akt2 蛋白質表現則會降低肝醣含量及葡萄糖的帶入量，故可知兩者於肌肉中扮演著不同的角色(Cleasby *et al.*, 2007)。Akt 更可藉由磷酸化下游基質 AS160 抑制其活性，增加 GLUT4 轉位至細胞膜上帶入葡萄糖(Dummler and Hemmings, 2007; Watson and Pessin, 2006)。

由上述可知胰島素傳訊中，IR、IRS-1、PI3K 及 Akt 任一傳訊分子的變化皆會影響肌肉的葡萄糖轉運及代謝，故針對這些分子來探討肌肉中胰島素傳訊的調

控(Taniguchi *et al.*, 2006)。

附表二、Akt 異構型之分佈與功能(Fayard *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2004)。

異構型	分佈	功能
PKB $\alpha$ /Akt1	遍佈各器官	胎盤發育、動物生長及脂肪合成
PKB $\beta$ /Akt2	對胰島素敏感之器官，如肌肉和脂肪	葡萄糖代謝、脂肪生成與維持及動物生長
PKB $\gamma$ /Akt3	腦部、睪丸	出生後的大腦發育

#### 1-4-2 脂聯素傳訊

脂肪組織在胰島素阻抗與第二型糖尿病形成所扮演角色為現今研究重點之一，其藉由分泌多種脂泌素(adipokine)，透過傳訊分子或影響周邊組織的胰島素敏感性進而調控血糖恆定(Kershaw and Flier, 2004; Schinner *et al.*, 2005)。而脂泌素之一的脂聯素(adiponectin)在肌肉組織中，可降低三酸甘油含量，使 PI3K 的活性與 GLUT4 轉位不被抑制，提升胰島素傳訊路徑的反應(Kadowaki and Yamauchi, 2005; Yamauchi *et al.*, 2001)，也可藉由活化腺苷單磷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)調控葡萄糖代謝與胰島素敏感性(Yamauchi *et al.*, 2002)。

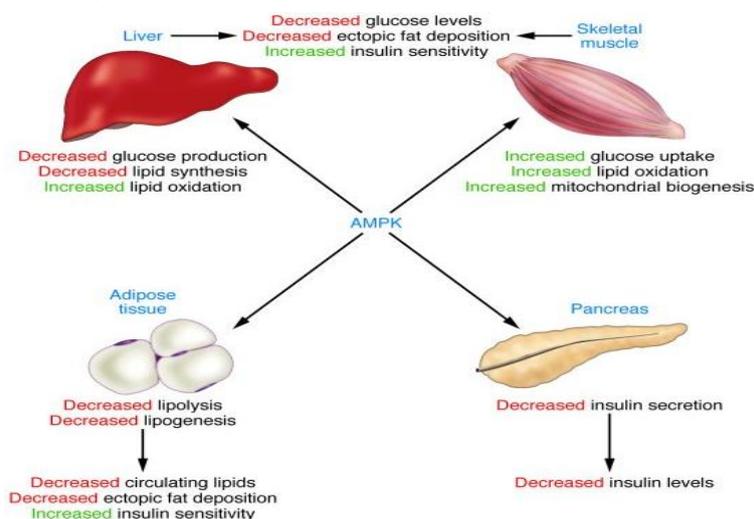
##### 1. 脂聯素受體(Adiponectin receptor, AdipoR)

脂聯素可透過第一型脂聯素受體(Adiponectin receptor 1, AdipoR1)與第二型脂聯素受體(Adiponectin receptor 2, AdipoR2)傳訊給細胞內 AMPK 與 PPAR $\alpha$ 以調控葡萄糖的代謝(Yamauchi *et al.*, 2007)。AdipoR1 廣泛存於各組織，而在肌肉組織中有大量表現，AdipoR2 主要表現於肝臟組織(Yamauchi *et al.*, 2003)。在動物實驗中發現，具有胰島素阻抗的小鼠中，肌肉與脂肪組織的 AdipoR1 與 AdipoR2 基因表現量均有顯著的下降，且肌肉中 AMPK 活性受到抑制(Tsuchida *et al.*, 2004a)。而 AdipoR1 基因缺失的小鼠會因 AMPK 的活性及 PPAR $\alpha$ 的表現降低，使得葡萄糖耐受性受損，相同的，AdipoR1 基因缺失也造成葡萄糖耐受性降低，

並降低 IR 的表現(Bjursell *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007)。Yamauchi 等人(2007)研究顯示，AdipoR1 與 AdipoR2 基因分別或同時剔除的小鼠皆會產生胰島素阻抗，並指出脂聯素透過 AdipoR1 活化 AMPK 與 AdipoR2 活化 PPAR $\alpha$ 以提高 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。

## 2. 腺苷單磷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)

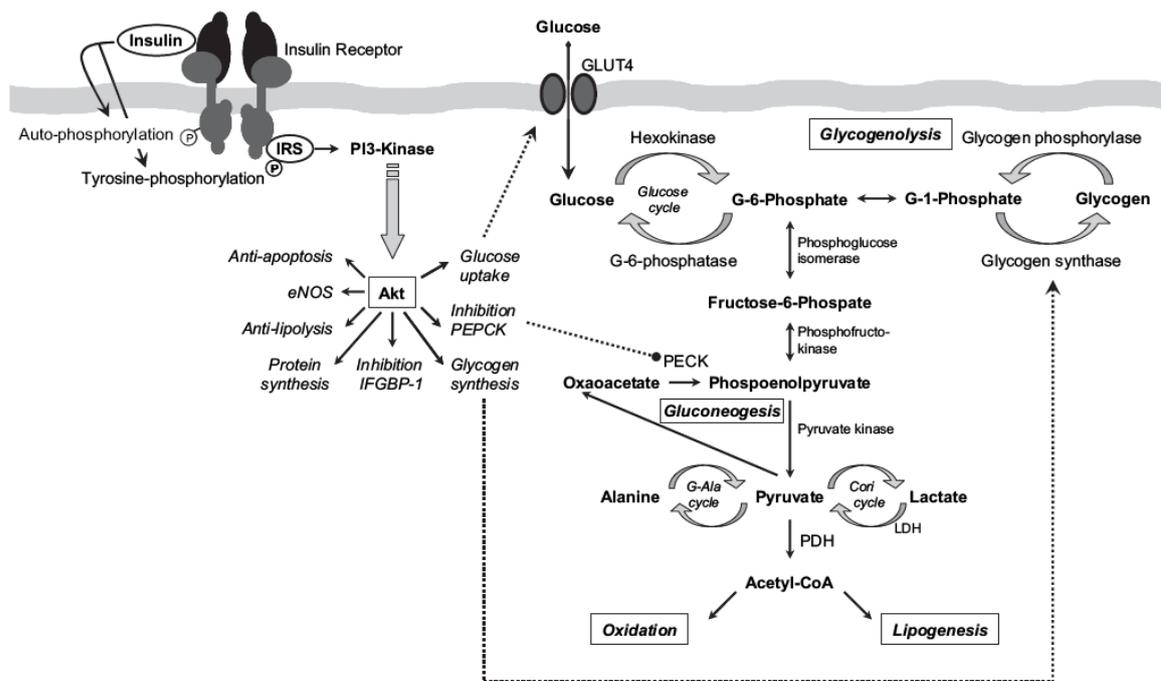
AMPK 由一個 $\alpha$ 催化次單元與 $\beta$ 、 $\gamma$ 兩個調控次單元所組成之三聚體(heterotrimer)，是個對能量敏感之激酶，可監控細胞內能量狀態的感應器，如細胞內 AMP/ATP 比例升高，也就是能源缺乏時，會使 AMPK threonine<sup>172</sup> (Thr<sup>172</sup>) 位點磷酸化而活化，因此促進 GLUT4 轉位至細胞膜上增加葡萄糖的帶入以利產生 ATP，並增加 ACC (acetyl-CoA carboxylase)磷酸化以抑制脂肪酸的生合成，降低肌肉中三酸甘油酯含量，促進脂肪氧化，而增加肌肉的胰島素敏感性(Carling, 2004; Long and Zierath, 2006; Yamauchi *et al.*, 2002)，如附圖十所示。研究指出若 AMPK 突變，會抑制脂聯素所介導的葡萄糖攝入、脂肪酸氧化等代謝反應，因此可知肌肉中脂聯素增加葡萄糖攝入主要透過 AMPK 的活化(Yamauchi *et al.*, 2002)，且 AMPK 能影響 IRS-1 與 PI3K 的活性(Tao *et al.*, 2010)。目前治療糖尿病藥物 metformin 與 thiazolidinedione 會活化 AMPK，也顯示 AMPK 於抗糖尿病作用中的重要性(Moller, 2001)。



附圖十、AMPK 對於周邊組織臟器之影響(Long and Zierath, 2006)。

### 1-4-3 肌肉中葡萄糖轉運與代謝

當葡萄糖經由葡萄糖轉運蛋白進入細胞後，進行糖酵解作用(glycolysis)會藉由六碳糖激酶(hexokinase)將葡萄糖磷酸化成 glucose-6-phosphate (G6P)，接著走入克氏循環/檸檬酸循環(Krebs cycle/Tricarboxylic acid cycle)、進行五碳糖磷酸路徑(pentose phosphate pathway)，或走向肝醣合成作用(glycogen synthesis)，詳見附圖十一。而 G6P 可促使肝醣合成酶(glycogen synthase, GS)構型改變，轉變為活化態 GS，促進肝醣合成。GS 為肝醣合成之主要酵素，其活性會受到肝醣合成酶激酶(glycogen synthase kinase 3, GSK3)磷酸化而被抑制。在胰島素刺激下，經由 Akt 可將 GSK3 磷酸化抑制活性，使 GS 不被磷酸化而具活性，促進肝醣合成(Bouskila *et al.*, 2008)。



附圖十一、葡萄糖代謝路徑(Van Cromphaut, 2009)。

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

葡萄糖轉運是葡萄糖攝入與葡萄糖代謝的速率限制步驟，由葡萄糖轉運蛋白家族所介導並受到高度的調控，現已發現的葡萄糖轉運蛋白有十三種，而表現於肌肉中的葡萄糖轉運蛋白以GLUT1與GLUT4兩者為主，GLUT1廣泛存於各組織中，介導基礎狀態的葡萄糖運送，而GLUT4負責胰島素刺激下的葡萄糖轉運，

且於細胞中的轉位與基因表現都受到調控(Bouché *et al.*, 2004; Huang and Czech, 2007; Ryder *et al.*, 2001)。於正常狀態，有90%的GLUT4會儲存於細胞質的小泡內，只有少部分在細胞膜上(Saltiel and Pessin, 2002)，當受到胰島素或脂聯素刺激、肌肉收縮等會促使GLUT4轉位至膜上將葡萄糖帶入細胞內(Ryder *et al.*, 2001; Thong, 2005)。研究指出，如增加GLUT4表現量，會促進胰島素刺激的葡萄糖帶入作用，並改善葡萄糖耐受性與胰島素敏感性(Tsao *et al.*, 1996)，反之，將GLUT4基因剔除則會降低其表現量減少，導致肌肉葡萄糖攝取降低，並造成高血糖及組織中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)。由此知GLUT4於葡萄糖代謝的重要性。

## 2. 六碳糖激酶(Hexokinase, HK)

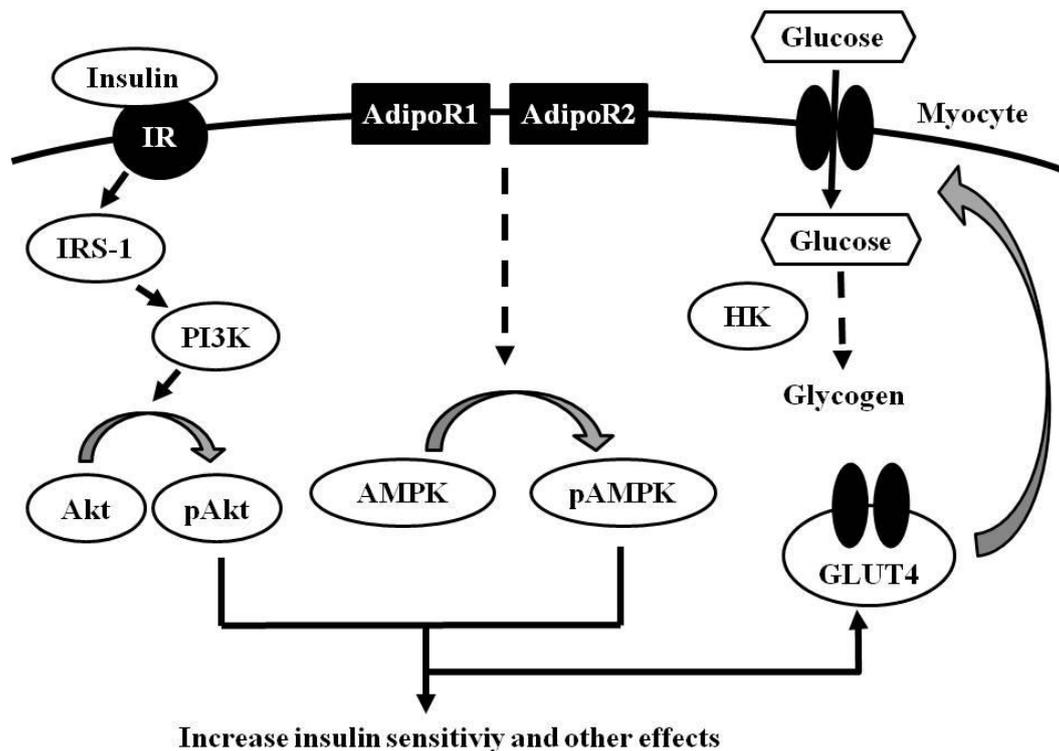
目前 HK 可分四類(I、II、III 及 IV)，存在於不同組織中，具有不同的調控性質。I~III 型具高度葡萄糖親和性， $K_m$  為  $10^{-6}$  至  $10^{-1}$  mM，第 IV 型又稱 glucokinase 為低親和型， $K_m$  約 6 至 15 mM(Bouché *et al.*, 2004)。HK II 最常存在於肌肉與脂肪組織的胞液(cytosolic)或粒線體中(Printz *et al.*, 1993; Ritov and Kelley, 2001)，會被 G6P 抑制，在肌肉組織的葡萄糖攝入佔有重要的地位(Chang *et al.*, 1996)。許多路徑皆可影響 HK II 的表現量，胰島素調控之 PI3K 路徑即為其一(Osawa *et al.*, 1996)，且胰島素可刺激肌肉中 HK II mRNA 的表現(Vogt *et al.*, 2000)。而葡萄糖轉運以及 HK II 的活性也被視為糖尿病的重要影響因子之一(Rothman *et al.*, 1995)。

### 1-5 研究動機與實驗架構

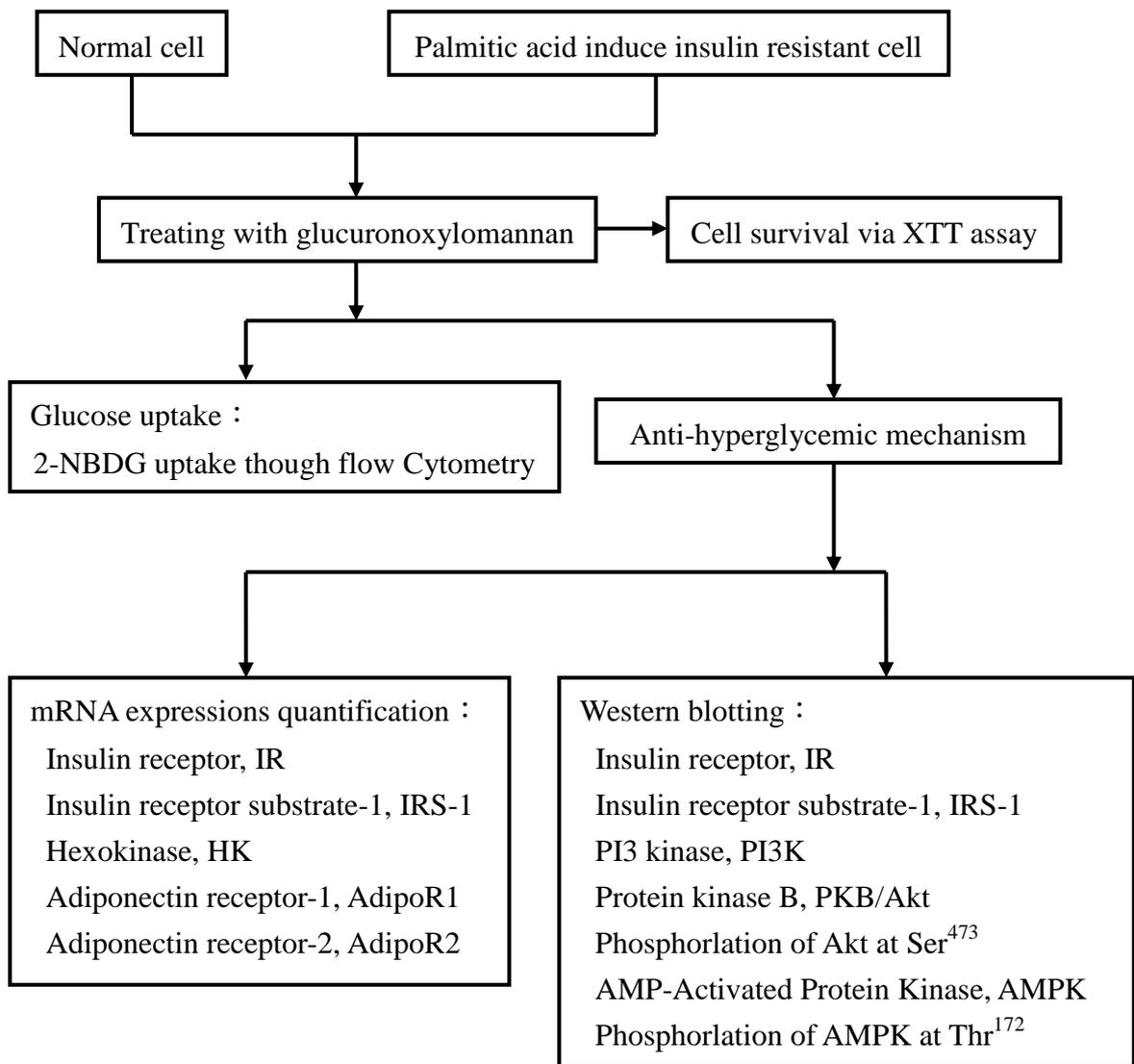
Lo 等人(2006)餵食正常及誘發葡萄糖耐受異常大鼠黃金銀耳之酸性多醣、黃金銀耳子實體、黃金銀耳人工菌株發酵菌絲體，觀察降血糖功效，發現黃金銀耳於動物實驗中具有降血糖之功效，且與酸性多醣成份較為相關。賴(2010)將前述研究之肌肉檢體與血清進行分析，證實黃金銀耳酸性多醣可增加脂聯素的分泌，

並且提升 AdipoR1、AdipoR2、IR、IRS-1 及 GLUT4 基因的轉錄和 IR、IRS-1 及 GLUT4 蛋白質的表現，推測其可增強肌肉組織中胰島素與脂聯素傳訊，以達保健與修復之功效。雖然動物與臨床試驗能提供活體的狀況，但變因的控制相對困難；而糖尿病的動物模式中，不論是基因突變或剔除等，都有相當程度的侷限性，且較無法模擬糖尿病前期的胰島素阻抗之狀態，因此可利用細胞模式深入研究於動物模式中所觀察到的血糖調控機制。

本研究將 C2C12 小鼠肌肉細胞分為正常與經棕櫚酸誘導成胰島素阻抗兩種分群，分別添加不同濃度黃金銀耳酸性多醣後進行葡萄糖擬似物攝入量分析，並進一步研究不同作用時間對於胰島素與脂聯素傳訊分子的影響，以期了解酸性多醣是否可促使肌肉細胞中傳訊路徑的活化，增加葡萄糖帶入量，提供評估其保健功效之參考。



附圖十二、酸性多醣影響分子路徑。



附圖十三、實驗架構。

## 二、材料與方法

### 2-1 實驗材料

#### 2-1-1 黃金銀耳 *Tremella mesenterica* 酸性多醣(GXM)

酸性多醣是以專利法(Patent No.: US 6,383,799, Date of Patent: May 7, 2002)純化,其純度可達99%。將GXM粉末溶於Phosphate buffered saline (PBS, 5.36 mM KCl、0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、4.17 mM NaHCO<sub>3</sub>、0.14 M NaCl 及 0.35 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2)中滅菌後,以DMEM培養基配製成200 ppm、400 ppm、800 ppm存於4°C冰箱備用。

#### 2-1-2 黃金銀耳酸性多醣之分子量測定

利用分析管柱為PolySep-SEC-P 5000 300×7.80 mm column購自Phenomenex (USA)。使用L-6000 pump與積分儀D-2500 chromatointegrator購自Hitachi (Japan)。偵測器RI-Detector 8110購自Bischoff (Germany)。標準品使用Pullulan購自Shodex (Japan)。

### 2-1-3 細胞培養

#### 2-1-3.1 細胞株

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

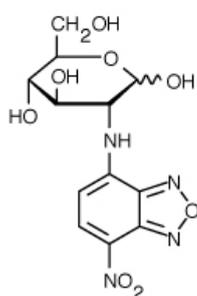
#### 2-1-3.2 培養基

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)粉末(Gibco, USA)以二次水攪拌至全溶後,添加1.5 g/L NaHCO<sub>3</sub> (OSAKA, Japan),調整pH值至7.2~7.4,經0.22 μm濾杯(Millipore, USA)過濾於血清瓶中,再添加10% FBS (Fetal Bovine Serum, Biological Industries 515269)做為生長培養基,或添加2% HS (Horse Serum,

Gibco 16050)做為分化培養基。

### 2-1-3.3 葡萄糖擬似物

2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG) 為一種葡萄糖擬似物，分子量為 342.26 (Yoshioka *et al.*, 1996)，結構式如附圖十四，購自 Invitrogen (OR, USA)。激發波長為 487 nm，於 542 nm 放出螢光。在避光環境下，以 PBS 配製濃度為 20 mM，儲存於-20°C 冰箱備用。



附圖十四、2-NBDG 結構式。

### 2-1-3.4 Propidium iodide

Propidium iodide (PI)為一種核酸染劑，購買自 Sigma (MO, USA)。其可嵌入細胞核 DNA 或 RNA 鹼基對中，於波長 488 nm 激發且在 562~588 nm 間釋放螢光。因細胞死亡會導致細胞膜破損，使 PI 可進入細胞與核酸嵌合，故可以此做為細胞凋亡或染色體受損之細胞的依據。

### 2-1-3.5 細胞培養其他藥品

Dimethyl sulfoxide、Palmitic acid 購自 Sigma (MO, USA)。Insulin、Trypsin-EDTA 及 L-Glutamine 均購自 Gibco (CA, USA)。Trypan blue 及 XTT reagent 購自 Biological Industries (Kibbutz, Israel)。Potassium phosphate 及 Sodium phosphate 購自 Mallinckrodt Baker (NJ, USA)。Sodium chloride 購自 Panreac Quimica Sa (Barcelona, Spain)。Bovine albumin 購自 MP Biomedicals (New

Zealand)。

#### 2-1-4 mRNA 表現量分析試劑

##### 2-1-4.1 RNA 抽取

GenePure RareRNA isolation reagent 購自真興實業有限公司(Taichung, Taiwan)。  
Chloroform、Absolute ethanol 購自 Panreac Quimca Sa (Barcelona, Spain)、  
Diethyl pyrocarbonate (DEPC) 購自 Sigma (MO, USA)。

##### 2-1-4.2 反轉錄 cDNA

SuperScript<sup>®</sup> III Reverse Transcriptase、Random Primers、RNAseOUT™、Oligo (dT) Primer、5X First-Strand Buffer 購自 Invitrogen (CA, USA)。

##### 2-1-4.3 PCR 與 Real-time quantitative PCR

Primer 購自生工有限公司(Taipei, Taiwan)、AmpliTaq Gold<sup>®</sup> PCR Master Mix 購自 Roche (Basel, Switzerland)、Maxima<sup>®</sup> SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 購自 Fermentas (USA)。

#### 2-1-5 蛋白質分析

##### 2-1-5.1 Cell lysis buffer

Tris 購自 Amresco (OH, USA)。  
Nonidet P-40 substitute (NP-40) 購自 USB (OH, USA)。  
Sodium chloride 購自 Panreac (Barcelona, Spain)。  
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、Sodium orthovanadate、Sodium fluoride、Phenylmethanesulfonyl fluoride、Protease Inhibitor Cocktail 購自 Sigma (MO, USA)。

##### 2-1-5.2 蛋白質定量試劑

BCA™ Protein Assay Kit 購自 Pierce Biotechnology (IL, USA)。

### 2-1-5.3 西方轉漬試劑

N,N,N,N,-Tetramethylethylenediamine (TEMED)、Ponceau S 購自 Sigma (MO, USA)◦Glycerol、Glycine 及 Tween-20 購自 Panreac Quimca Sa (Barcelona, Spain) ◦ Ammonium persulfate ultrapure (APS)、Dithiothreitol (DTT)及 Sodium phosphate monobasic, monohydrate 購自 GERBU (Gaiberg, Germany) ◦ Acryamide-bis solution 40%購自 SERVA (Germany)、Sodium tetraborate-10- hydrate 及 Sodium phosphate dibasic 購自 Merck (Darmstadt, Germany) ◦ Sodium dodecyl sulfate (SDS)購自 Bio-Rad (CA, USA) ◦ Methyl alcohol 及 Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris) 購自 Mallinckrodt Baker (NJ, USA) ◦ BlueRAY Prestained Protein Ladder 購自 GeneDireX (Bruges, Belgium) ◦ Blotting Paper 購自 Whatman plc. (Kent, UK) ◦ Polyvinylidene Fluoride (PVDF) Membranes 購自 Millipore (MA, USA) ◦ 水藍底片 購自 Midwest Scientific (St. Louis, USA) ◦ Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate 購自 Millipore (MA, USA) ◦ Developer and replenisher 及 Fixer and replenisher 購自 Eastman Kodak (NY, USA) ◦

### 2-1-6 主要儀器及設備

- (1) CO<sub>2</sub> 恆溫培養箱(型號 Forma310) (Thermo, USA)
- (2) 加熱恆溫循環槽(型號 WB212-B1) (Kansin , USA)
- (3) 血球計數器(Hemocytometer) (Superior, Bad Marienfeld, Germany)
- (4) 無菌操作台(Bellco, USA)
- (5) 倒立螢光顯微鏡(型號 IX-71) (Olympus, Japan)
- (6) 液態氮貯存桶(型號 LS-750) (Taylor-Wharton, Germany)
- (7) 震盪機 Vortex (型號 Vortex-2 genie) (Scientific Industries, USA)
- (8) 流式細胞儀(型號 FACScan) (Becton Dickinson, USA)
- (9) Real-time PCR (型號 ABI PRISM 7000) (Applied Biosystem, USA)

- (10) 乾浴槽(型號 MC-01S) (Major Science, Taiwan)
- (11) ELISA reader (型號 MRXII microplate reader, DYNEX USA)
- (12) 蛋白質電泳槽(型號 Mini-Protean III&IV) (Bio-Rad, USA)
- (13) 西方轉漬槽(型號 Criterion™ Blotter) (Bio-Rad, USA)
- (14) 電源供應器(型號 MP- 250N) (Major Science, Taiwan)
- (15) 桌上型離心機(型號 5415D) (Eppendorf, Germany)
- (16) 高速低溫離心機(型號 5810R) (Eppendorf, USA)
- (17) DNA Engine Thermal Cycler (型號 PTC-200) (MJ Research, Inc, USA)

## 2-2 實驗方法

### 2-2-1 黃金銀耳酸性多醣之分子量測定

酸性多醣之分子量參考呂等人(2001)之方法，利用膠體滲透層析法(gel permeation chromatography, GPC)測定。

取酸性多醣粉末溶於去離子水中，經適當稀釋與過濾後，取 20  $\mu$ L 濾液進行分子量分佈之分析，分析條件為：使用之分析管柱 PolySep-SEC-P 5000 300 $\times$ 7.80 mm column，將管柱溫度設置在 40 $^{\circ}$ C。移動相為去離子水，設定流速 0.8 mL/min，使用 L-6000 pump，並利用偵測器 RI-Detector 8110 與積分儀 D-2500 chromatointegrator 讀取數據。使用標準品 pullulan，其分子量分別為 48800、113000、210000、366000 及 805000 Daltons。

### 2-2-2 細胞培養

自液態氮桶中取出細胞凍存管，於 37 $^{\circ}$ C 水浴槽解凍後，移入無菌操作台內，將細胞懸浮液加於培養皿中，再緩慢加入培養基，混合均勻後，置於含 5% CO<sub>2</sub> 之 37 $^{\circ}$ C 培養箱，待細胞約 7~8 分滿時進行繼代培養。

細胞繼代與鋪盤為細胞生長至 7~8 分滿後，將其培養基吸除，以 PBS 清洗，加入 1x Trypsin-EDTA，於培養箱中作用，待細胞懸浮後，加入含血清培養基終

止 Trypsin-EDTA 作用，將細胞平均分配至培養皿中。

### 2-2-3 細胞分化

細胞計數後，以  $10^4$  cells/well 鋪至 24 孔盤或 6 cm dish 中，長至九分滿後，將培養基吸除，加入分化培養基，進行細胞分化，每 2 天更換一次培養基，待細胞分化至 80% 為肌管細胞，即可進行實驗。

### 2-2-4 誘導細胞產生胰島素阻抗

當細胞 80% 分化為肌管細胞時，將分化培養基更換為含 2% BSA 及 0.5 mM 或 0.75 mM Palmitic acid 之無血清培養基，與細胞共置 12 或 16 小時，再以葡萄糖擬似物 2-NBDG 帶入量及 phospho-Akt(Ser<sup>473</sup>) 表現量，判斷是否已誘導細胞產生胰島素阻抗。

### 2-2-5 酸性多醣細胞毒性測試

利用細胞粒線體中琥珀酸去氫酶(Succinate-tetrazolium reductase)將 XTT 試劑的 tetrazolium 環打斷，形成一橘紅色之 formazan 化合物，於波長 450~500 nm 測其吸光值，即可推算細胞存活率。

將細胞培養於 24 孔盤中，分化成肌管細胞後，添加不同濃度之酸性多醣共置 24 小時，移去培養基並以 PBS 潤洗後，加入 XTT 試劑 100  $\mu$ L (XTT reagent : activation reagent = 50 : 1) 於 37°C 反應 2 小時，偵測 450 nm 之吸光值，並扣除 595 nm 之背景值。

### 2-2-6 葡萄糖擬似物 2-NBDG 帶入量分析

葡萄糖擬似物帶入量分析方法參考於 Zou 等人(2005)。將細胞培養於 24 孔盤中，分化成肌管細胞後，分成正常細胞與胰島素阻抗組，添加不同濃度之酸性多醣 24 小時，移去培養基並以 PBS 潤洗後，加入 2-NBDG 作用 45 分鐘，胰島素組於反應完前 15 分鐘加入胰島素作用。之後使用 Trypsin 將細胞收於管中並添

加 PI，以流式細胞儀偵測葡萄糖擬似物之帶入量。

#### 2-2-7 細胞 RNA 抽取與 cDNA 製備

將 C2C12 細胞培養於 6 cm dish 中，分化成肌管細胞後，分成正常細胞與胰島素阻抗組，添加 400 ppm 酸性多醣於細胞中分別作用 15 分鐘、2 小時、4 小時、8 小時、16 小時、24 小時後，胰島素組於反應完前 15 分鐘加入胰島素作用後，以 PBS 潤洗，加入 1 mL RareRNA isolation reagent 於室溫下作用 3~5 分鐘，加入 300  $\mu$ L chloroform 混合均勻，置於冰上 5 分鐘後，於 12000 rpm 離心 5 分鐘。取上清液至 1.5 mL 微量離心管中，加入兩倍體積之絕對酒精混勻後離心，去除上清液得沉澱物，加入 1 mL 70% 酒精後離心，移除上清液並使沉澱物乾燥，再以 50  $\mu$ L DEPC-H<sub>2</sub>O 回溶，於 65°C 加熱 5 分鐘，置於 -80°C 凍箱備用。

反轉錄時，將 2  $\mu$ L RNA、9.6  $\mu$ L DEPC-H<sub>2</sub>O、0.5  $\mu$ L 0.3  $\mu$ g/ $\mu$ L random hexamer、0.5  $\mu$ L 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L oligo dT 及 0.4  $\mu$ L 25 mM dNTP 置入管中混合，再利用 DNA Engine Thermal Cycler 於 65°C 下加熱 5 分鐘後，立即降溫至 4°C 後置於冰上。加入 4  $\mu$ L 5x reaction buffer、1  $\mu$ L RNaseOUT inhibitor、1  $\mu$ L 10 mM DTT 及 1  $\mu$ L SuperScript III reverse transcriptase 於管內混勻，25°C 反應 5 分鐘後，加熱至 50°C 使酵素反應 60 分鐘，最後加熱至 70°C 作用 15 分鐘終止反應，即得產物 cDNA，存放於 -20°C 備用。

#### 2-2-8 同步定量聚合酶連鎖反應

同步定量聚合酶連鎖反應使用 Maxima<sup>®</sup> SYBR Green/ROX qPCR 2x Master Mix 於 ABI PRISM 7000 Sequence Detection System 進行 PCR 擴增及偵測。反應中使用的引子皆為生工有限公司所合成，其序列均列於附表三。將 2  $\mu$ L cDNA、10  $\mu$ L Maxima<sup>®</sup> SYBR Green/ROX qPCR 2x Master Mix 及 0.5  $\mu$ L 正反股引子與 7  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O，置於管內混合均勻，其總體積為 20  $\mu$ L。反應擴增循環為活化加熱 95°C、10 分鐘；95°C、30 秒，黏合溫度 30 秒（不同引子之黏合溫度列於附表三）。反應之最適條件均經聚合酶連鎖反應測試。於 72°C、30 秒擴增步驟偵測 SYBR

Green 螢光量，重複 40 循環後進行解離步驟，PCR 產物以解離曲線與 1.5% 的洋菜瓊脂膠電泳來確認為專一性產物。聚合酶鏈鎖反應的擴增過程中，反應溶液中的 SYBR Green I 會嵌入擴增中的雙股 DNA 內，因此擴增其間所偵測到的螢光量將與擴增中產物的量成正比，可對應反應起始的基因表現量。而基因的表現量將以通過閾值的循環數(Ct)推定。此實驗中使用 GAPDH 基因表現量作為內部對照，目標基因的相對表現量以公式  $2^{-\Delta Ct}$  (Livak and Schmittgen, 2001) 計算而得。

#### 2-2-9 蛋白質萃取

將 C2C12 細胞培養於 6 cm dish 中，分化成肌管細胞後，經不同條件處理後，移除培養基，以 PBS 潤洗，加入 150  $\mu$ L lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5、150 mM NaCl、1% NP-40、2 mM EDTA、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、10 mM NaF、2 mM PMSF)，使用刮勺刮取細胞並收集置於 1.5 mL 離心管後，於 4°C 以 13200rpm 離心 5 分鐘，所得上清液為細胞總蛋白質，存於 -20°C 備用。

#### 2-2-10 蛋白質定量

由 C2C12 細胞抽取之總蛋白質，使用 BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit 進行定量。將蛋白質適當稀釋後，取 10  $\mu$ L 稀釋樣品與 200  $\mu$ L 已混合之試劑(Reagent A : Reagent = 50 : 1)於 37°C 下避光反應 30 分鐘，偵測波長 562 nm 之吸光值，並以標準品 BSA 做標準曲線，以內差法估算肌肉細胞中總蛋白質濃度。

#### 2-2-11 西方轉漬分析

取 20 $\mu$ g 蛋白質樣品與 Sample buffer (Working : 0.3 mM Tris、1.5% SDS、150 mM  $\beta$ -Mercaptoerhanol、6.8% glycerol、0.013% bromophenol blue)混合均勻，95°C 加熱 5 分鐘後，於 Running buffer (192 mM glycine、24.8 mM Tris-base、0.1% SDS) 中，以 10% 的下層膠進行 SDS-PAGE，將蛋白質分離。隨後於 10 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  Transfer buffer 中，將電泳膠上蛋白質轉至 polyvinylidene fluoride (PVDF)膜上。

將膜置於 2~5% skim milk-PBST (140 mM NaCl、740  $\mu$ M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、9.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.1% Tween-20)或 2~5% BSA-PBST 中，以 100~150 rpm 震盪 1 小時後，加入可辨認目標蛋白質之一級抗體(附表四)，於室溫下震盪 2 小時。將膜以 PBST 漂洗 10~15 分鐘 3~5 次，再加入二級抗體於室溫下震盪 1 小時，再以 PBST 漂洗 3~5 次，最後於膜上加入 Chemiluminescent HRP Substrate 反應，經由水藍底片感光。底片經掃描後以軟體 AlphaDigiDoc Imaging System (Alpha Innotech Corporation, USA)進行定量。

#### 2-2-12 統計分析

實驗所得數據皆以平均值 $\pm$ 標準偏差(Means  $\pm$  SD)表示，利用 SAS 9.1 統計軟體(Statistical Analysis System, SAS Institute, Inc., USA)進行費雪爾氏 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。並使用 SigmaPlot 10.0 (Systat software, Inc., USA)軟體進行做圖。

附表三、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(5'→3')	產物大小 (Benoit <i>et al.</i> )	檢索號	黏合溫度(°C)	鎂離子濃(mM)
GAPDH	(F) 5'AACGACCCCTTCATTGAC 3' (R) 5'TCCACGACATACTCAGCAC 3'	191	M17701	52	3
Insulin receptor	(F) 5'GATTTCCCCAACGTCTCCTCT 3' (R) 5'TCAATGCGGTACCCAGTGAA3'	128	NM_017071	56	3
IRS-1	(F) 5'CAAGGAGGTCTGGCAGGTTA3' (R) 5'CCCACCTCGATGAAGAAGAA3'	198	NM_010570	55	3
Hexokinase	(F) 5'TGATCGCCTGCTTATTCACGG3' (R) 5'AACCGCCTAGAAATCTCCAGA3'	112	NM_013820	55	3
AdipoR1	(F) 5'AACGGGCCATCCATTTTTG3' (R) 5'TTAGCCGGGCTACATCAAGG3'	101	NM_028320	55	3
AdipoR2	(F) 5'GGAGTGTTTCGTGGGCTTAGG3' (R) 5'GCAGCTCCGGTGATATAGAGG3'	140	NM_197985	60	3

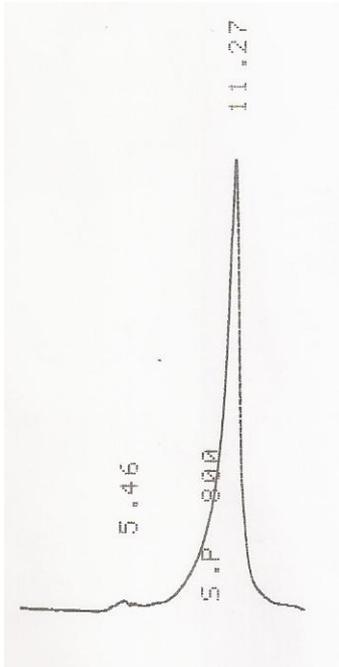
附表四、實驗中使用之一級、二級抗體。

抗體	廠牌	稀釋倍數	目錄編號
$\beta$ -actin	Novus	1:10000	NB600-501
Insulin receptor $\beta$	Millipore	1:1000	05-1104
IRS-1	Cell signaling	1:1000	3194
PI3 kinase p85	Cell signaling	1:1000	4257
Phospho-Akt (Ser473)	Cell signaling	1:1000	9271
Akt	Cell signaling	1:1000	9272
Phospho-AMPK $\alpha$ (Thr172)	Cell signaling	1:1000	2535
AMPK $\alpha$	Cell signaling	1:1000	2793
Goat-anti-mouse, (H+L), Peroxidase Conjugated	Pierce	1:7000	31430
Goat-anti-rabbit IgG HRP-linked	Santa Cruz	1:3000	SC-2004

### 三、結果

#### 3-1 黃金銀耳酸性多醣分子量測定

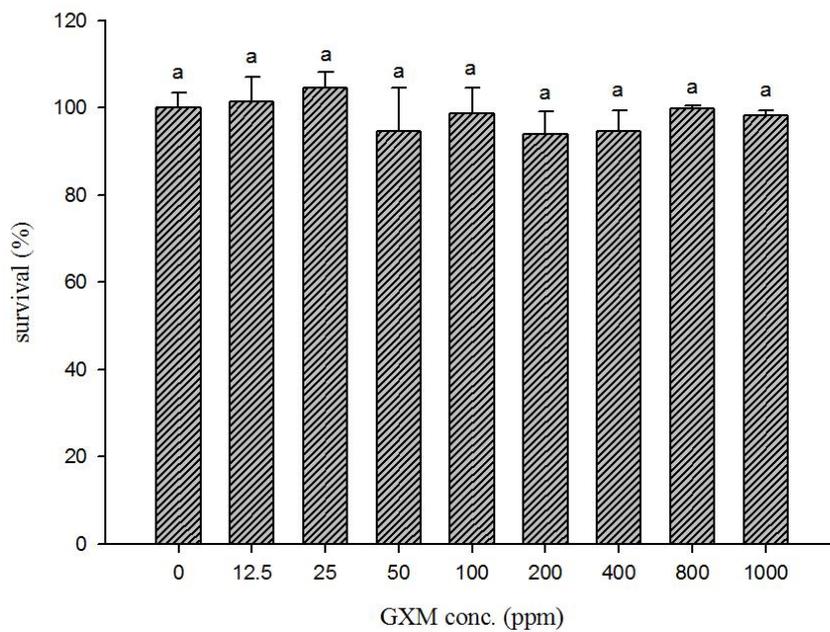
本研究所使用之黃金銀耳酸性多醣(GXM)純度可達 99%，經膠體滲透層析後，圖譜中呈現一主波峰與小波峰，滯留時間分別為 11.27 分鐘與 5.46 分鐘(圖一)，可證實純度很高。比對由不同分子量的葡聚糖(pullulan)標準品所做出之標準曲線後(附圖十五、附表五)，得知分子量粗略為 6.40 kDa 與 7929 kDa，以 6.40 kDa 者為酸性多醣的主要組成分。



圖一、黃金銀耳酸性多醣膠體滲透層析圖譜。

#### 3-2 不同濃度之 GXM 對肌肉細胞 C2C12 毒性測試

為了解黃金銀耳酸性多醣(GXM)對細胞是否有毒殺作用，因此將 12.5、25、50、100、200、400、800、1000 ppm 之 GXM 添加於肌肉細胞 C2C12 中，共置 24 小時後，以 XTT 試劑分析。由圖二顯示，所測濃度範圍中 GXM 對 C2C12 細胞並無明顯毒殺作用。本研究參考吳(2011)使用 200、400、800 ppm 進行後續分析，並據以測定不同時間對於 C2C12 細胞傳訊路徑的影響。



圖二、不同濃度之黃金銀耳酸性多醣對肌肉細胞 C2C12 毒性測試。

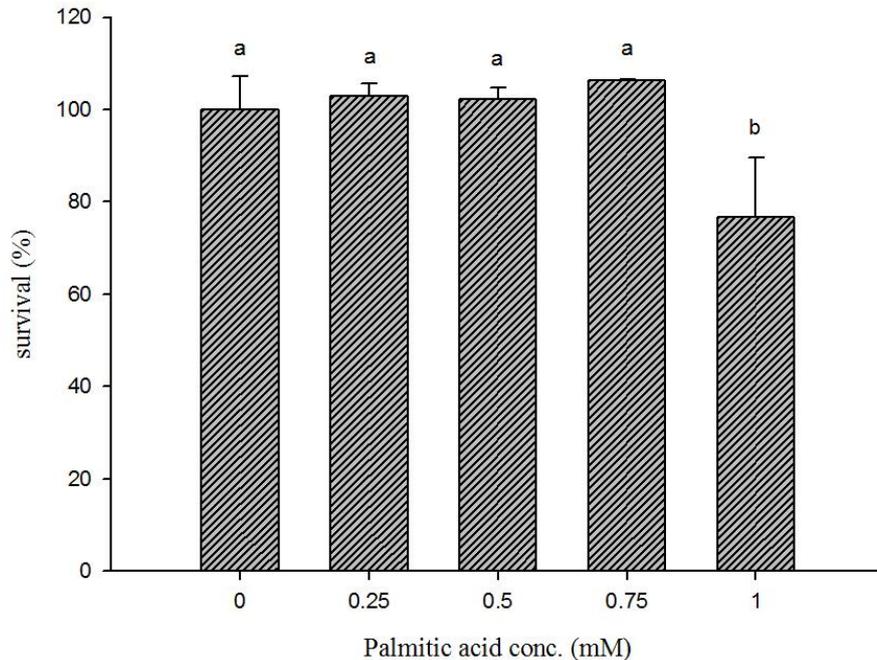
C2C12 細胞添加不同濃度黃金銀耳酸性多醣，於 37°C 共置 24 小時後，以 XTT 測試細胞存活率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。長條上小寫字母代表各統計分群。相同字母間無顯著差異(p<0.05)。

### 3-3 棕櫚酸誘導 C2C12 產生胰島素阻抗之濃度與時間測試

文獻指出棕櫚酸可誘導肌肉細胞產生胰島素阻抗，本研究使用 0.5 mM 與 0.75 mM 兩種濃度及 12 與 16 小時兩個與細胞共置之時間進行測試。首先測試棕櫚酸是否對 C2C12 有生長抑制或毒殺作用(簡稱毒性測試)，再經由葡萄糖擬似物 2-NBDG 帶入量與 Phospho-Akt (Ser<sup>473</sup>) / Akt 蛋白質相對表現量兩項試驗，得知棕櫚酸對 C2C12 細胞之影響。

#### 3-3-1 棕櫚酸對 C2C12 毒性測試

利用 0.25 mM、0.5 mM、0.75 mM 與 1.0 mM 四種濃度，與 C2C12 細胞共置 24 小時後，使用 XTT 分析棕櫚酸對細胞是否具毒殺作用。由圖三得知，0.25 ~ 0.75 mM 三個濃度對細胞無明顯毒性，1.0 mM 則對細胞有顯著的毒殺作用，故後續實驗以 0.5 mM 和 0.75 mM 兩個濃度進行時間的探討。

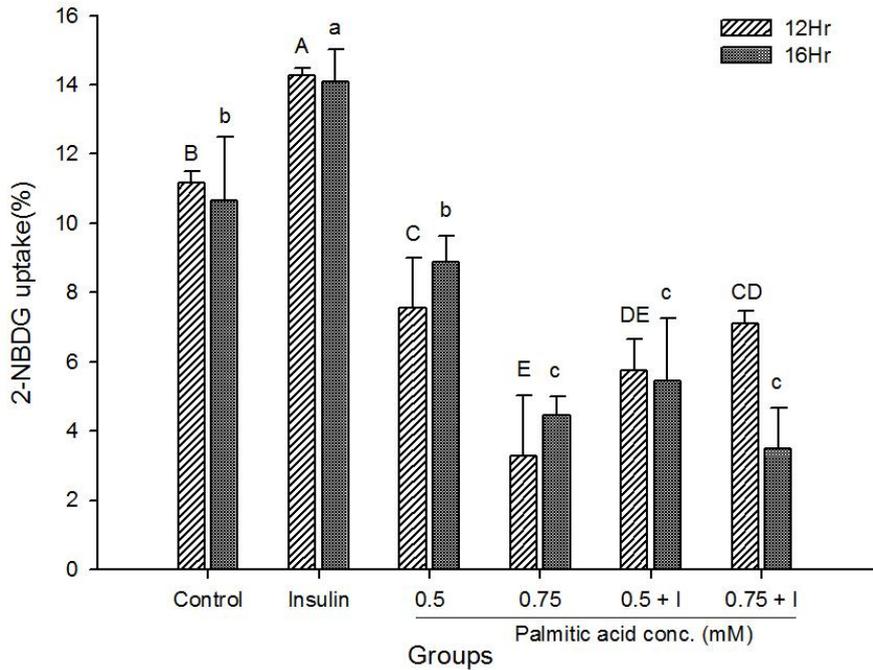


圖三、不同濃度棕櫚酸對 C2C12 細胞毒性測試。

C2C12 細胞添加 0.25 mM、0.5 mM、0.75 mM 與 1.0 mM 四種濃度棕櫚酸，在 37°C 培養 24 小時後，以 XTT 進行細胞存活率測試。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。a~b 之不同字母表示具顯著差異( $p < 0.05$ )。

### 3-3-2 棕櫚酸對 C2C12 之葡萄糖擬似物 2-NBDG 帶入量之影響

0.5 mM 與 0.75 mM 棕櫚酸確定對細胞無顯著生長抑制作用，利用此兩種濃度再分成 12 與 16 小時與細胞共置，檢測棕櫚酸是否影響細胞的葡萄糖擬似物 2-NBDG 帶入量。研究中進行胰島素刺激之組別，其胰島素使用之濃度與時間參考於 Kumar and Dey (2003) 與 Nedachi and Kanzaki (2006)。結果如圖四，12 小時胰島素能有效增加細胞的葡萄糖擬似物攝入量，由 11.17% 增至 14.27%。而添加兩種濃度之棕櫚酸組(0.5 group 與 0.75 group) 或添加棕櫚酸及胰島素組(0.5 + I group 或 0.75 + I group)，與控制組或胰島素組相比，皆有顯著下降趨勢，帶入量降低至 3~7%，但若合併添加胰島素則兩棕櫚酸濃度間並無顯著差異。細胞與棕櫚酸共置 16 小時的狀態下，相同地胰島素組也顯著增加細胞對 2-NBDG 的帶入量達 3.4%，添加棕櫚酸各組帶入量皆顯著下降為 3~9%，具劑量效應(dose effect)，惟其中 0.5 mM 棕櫚酸組與控制組並無統計上顯著差異。



圖四、C2C12 與不同濃度棕櫚酸共置 12 與 16 小時之 2-NBDG 帶入量。

細胞與 0.5 mM 或 0.75 mM 棕櫚酸於 37°C 共置 12 與 16 小時後，與 2-NBDG 反應 45 分鐘，添加胰島素的組別(I 表示 Insulin)在 30 分鐘時，加入 100 nM 胰島素刺激 15 分鐘，再以流式細胞儀進行螢光測定。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。

A~E 之不同字母表示細胞與棕櫚酸共置 12 小時之結果具顯著差異( $p < 0.05$ )。

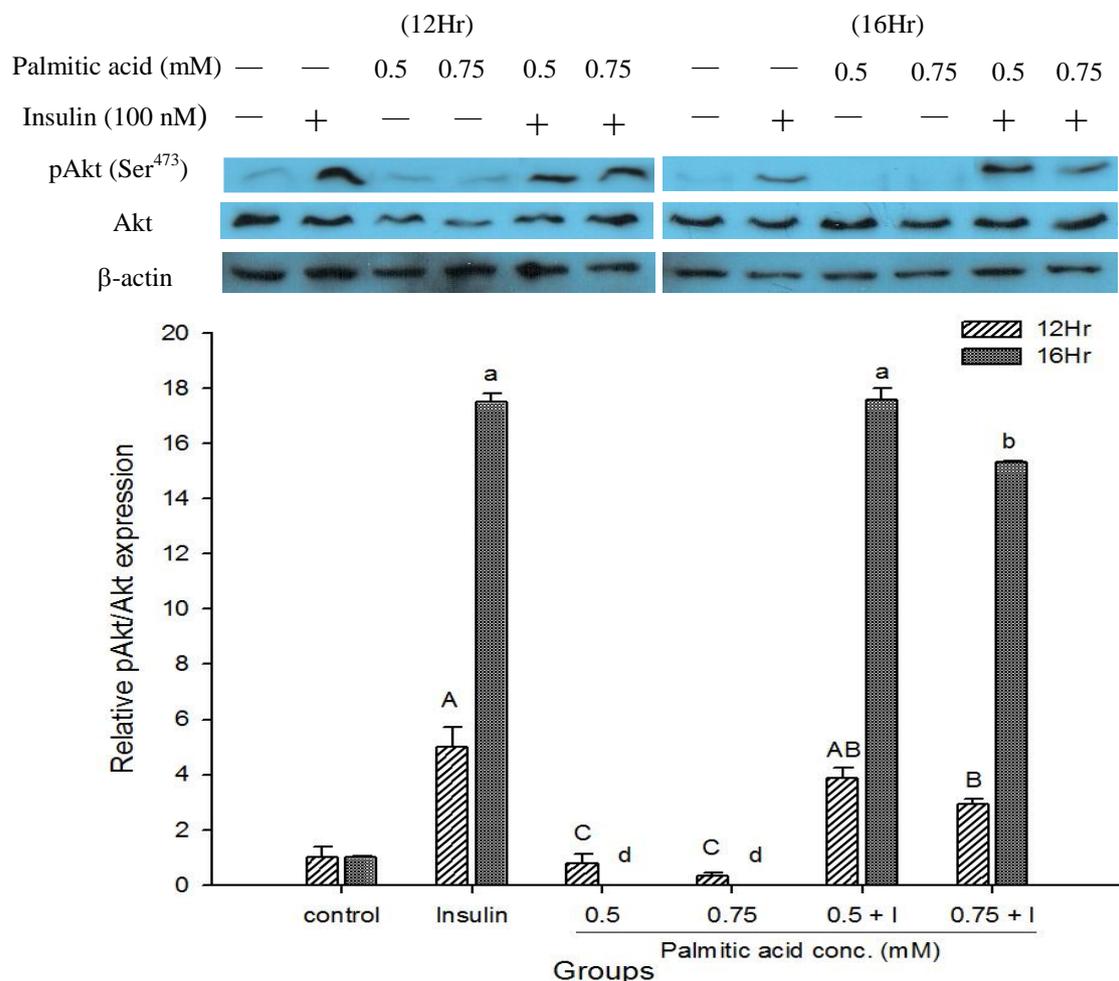
a~e 之不同字母表示細胞與棕櫚酸共置 16 小時之結果具顯著差異( $p < 0.05$ )。

### 3-3-3 棕櫚酸對 C2C12 之 Akt (Ser<sup>473</sup>)磷酸化程度之影響

細胞經由 0.5 mM 與 0.75 mM 棕櫚酸處理 12 或 16 小時後，2-NBDG 帶入量皆有所下降的趨勢，但使用 0.75 mM 棕櫚酸加胰島素與細胞培養 12 小時之 2-NBDG 帶入量比 0.5 mM 棕櫚酸加胰島素組高(圖四)，而在 16 小時之 0.5 mM 棕櫚酸組與控制組比，雖有下降但無顯著差異(圖四)，故再觀察棕櫚酸對細胞胰島素傳訊中 Akt (Ser<sup>473</sup>)的磷酸化程度之影響，以探討棕櫚酸誘導胰島素阻抗之成效。

圖五結果所示，胰島素可顯著增加 Akt 蛋白質的磷酸化，提高 Akt 的活性。從細胞與棕櫚酸共置 12 小時之結果得知，添加棕櫚酸或棕櫚酸及胰島素組與控制組相比，雖略微降低磷酸化但無顯著差異。與胰島素組相較，棕櫚酸或棕櫚酸加胰島素組顯著減少磷酸化程度達 84% 以上，且具劑量效應。當不同濃度棕櫚酸與細胞共置 16 小時後，0.5 mM 與 0.75 mM 棕櫚酸組無 Akt 磷酸化訊號。與胰島

素組相比，添加棕櫚酸及胰島素的組別其 Akt 磷酸化顯著下降 94%，由此可知，棕櫚酸與細胞共置 16 小時能有效抑制 Akt 的磷酸化。綜合圖四與圖五的結果推論出，以 0.75 mM 棕櫚酸與細胞共置 16 小時最能降低細胞葡萄糖擬似物的帶入與 Akt 的磷酸化，故後續使用此條件誘導細胞產生胰島素阻抗。



圖五、C2C12 與不同濃度棕櫚酸共置 12 或 16 小時之 Akt 磷酸化程度。

各組經不同處理後，抽取其蛋白質並定量，取 20  $\mu$ g 細胞蛋白質進行電泳及西方轉漬，分析 pAkt (Ser<sup>473</sup>) 的蛋白質相對於 Akt 表現量，並以  $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。將 pAkt (Ser<sup>473</sup>) 及 Akt 蛋白質表現量數據相除。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。

A~B 之不同字母表示細胞與棕櫚酸共置 12 小時之結果具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

a~c 之不同字母表示細胞與棕櫚酸共置 16 小時之結果具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

### 3-4 不同濃度與時間之 GXM 對 C2C12 之影響

#### 3-4-1 正常態 C2C12 細胞葡萄糖擬似物 2-NBDG 帶入量

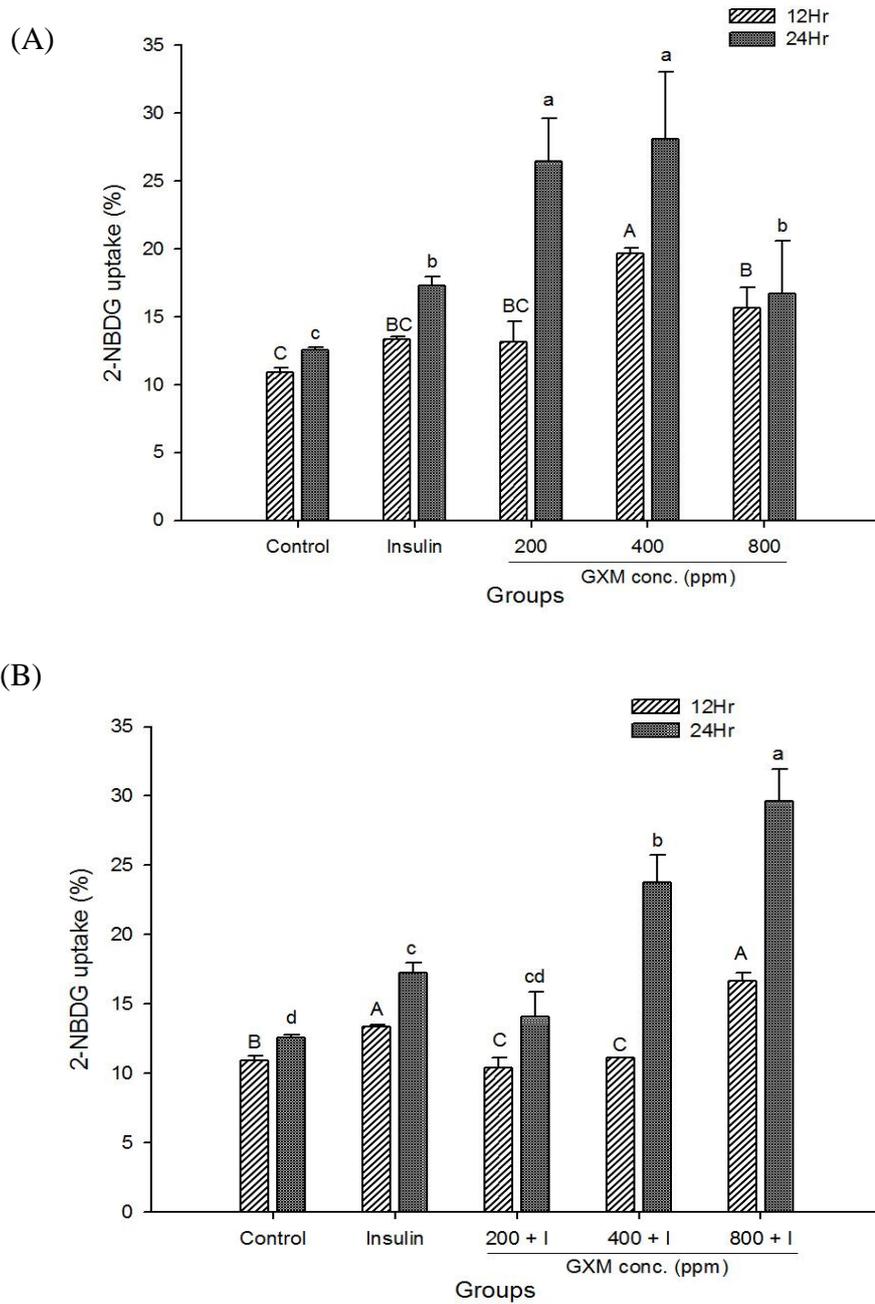
本研究將細胞添加 200 ppm、400 ppm 及 800 ppm 三種濃度之酸性多醣，探討對正常與阻抗細胞 2-NBDG 帶入量之影響。由圖六可知在添加後 12 小時即可顯著增加 2-NBDG 帶入細胞，與控制組相比，200 ppm、400 ppm 與 800 ppm GXM 使 2-NBDG 帶入量分別增為 1.2 倍、1.8 倍與 1.4 倍，合併添加胰島素時，僅 800 ppm GXM 顯著增加 5.7% 的帶入量，其餘兩組皆有小幅下降。與胰島素組相較，400 ppm、800 ppm 與 800 ppm 加胰島素組有上升的趨勢，約增加 2.3~6.3%，另三組處理則使帶入量下降。於 24 小時可發現加入酸性多醣無論是否添加胰島素，皆可提高 2-NBDG 的帶入量，與控制組或胰島素組相比，以 200 ppm、400 ppm、400 ppm 加胰島素與 800 ppm 加胰島素等四組的葡萄糖擬似物帶入量都顯著上升。

在 12 與 24 小時的共置後，GXM 對於無阻抗之 C2C12 細胞之 NBDG 帶入影響無劑量效應，800 ppm GXM 反使帶入量降低；而合併添加胰島素組時雖可見隨濃度而增加帶入，但 200 ppm 組仍較胰島素組低。

#### 3-4-2 Akt (Ser<sup>473</sup>)磷酸化程度

將細胞添加不同濃度 GXM 培養 12 與 24 小時後，檢測 Akt 蛋白質磷酸化程度(圖七)。無胰島素刺激下，Akt 磷酸化表現明顯較少，而加入胰島素則開啟胰島素傳訊路徑，促使 Akt 磷酸化而活化。細胞與 GXM 共置 12 及 24 小時後，因無加胰島素刺激與控制組均無顯著差異，800 ppm GXM 組甚至觀察不到 Akt 磷酸化訊號。合併添加胰島素時與控制組相比，除 200 ppm 外，其他濃度之 Akt 磷酸化程度皆明顯提升。經 12 小時處理，GXM 加胰島素組別無劑量效應，與胰島素組相較，只有 400 + I 組顯著增加 Akt 磷酸化；而延長至 24 小時雖可見劑量效應，但僅 800 + I 組與胰島素組有顯著差異。且由此圖可得知，GXM 對於胰島素傳訊路徑之效應會受作用時間影響，故合併圖六與圖七結果，選擇 400 ppm

GXM 做後續胰島素傳訊與脂聯素傳訊等路徑與時間之探討。

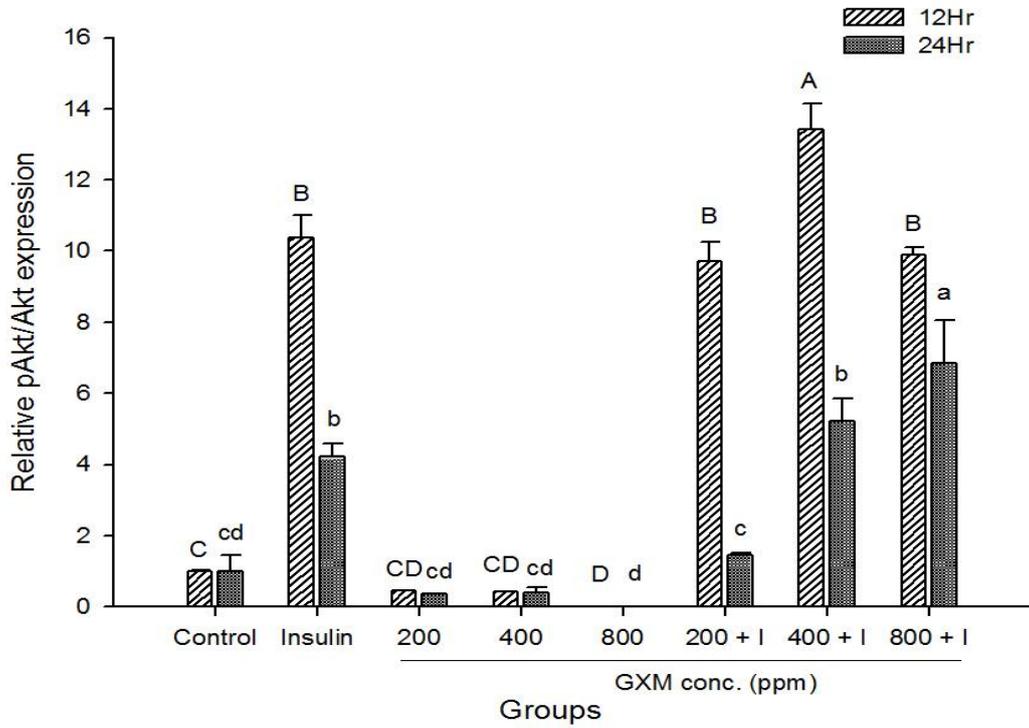
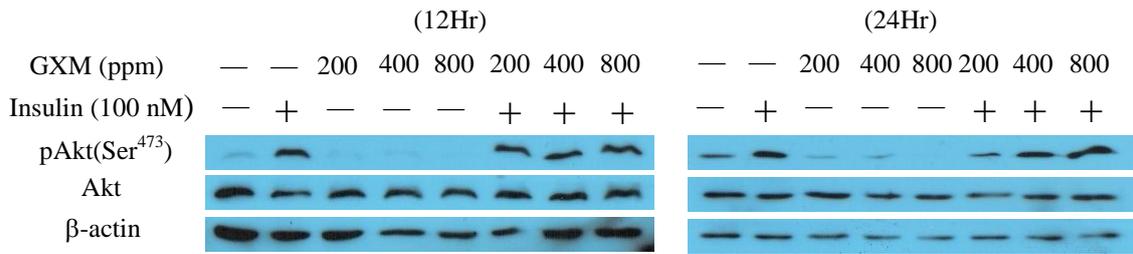


圖六、C2C12 與不同濃度 GXM 共置 12 或 24 小時之 2-NBDG 帶入量。

細胞與不同濃度 GXM 於 37°C 共置 12 與 24 小時後，與 2-NBDG 反應 45 分鐘，添加胰島素的組別(I 表示 Insulin)在 30 分鐘時，加入 100 nM 胰島素刺激 15 分鐘，再以流式細胞儀進行螢光測定。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。

A~C 之不同字母表示細胞與 GXM 共置 12 小時之結果具顯著差異(p<0.05)。

a~d 之不同字母表示細胞與 GXM 共置 24 小時之結果具顯著差異(p<0.05)。



圖七、C2C12 與不同濃度 GXM 共置 12 或 24 小時之 Akt 磷酸化程度。

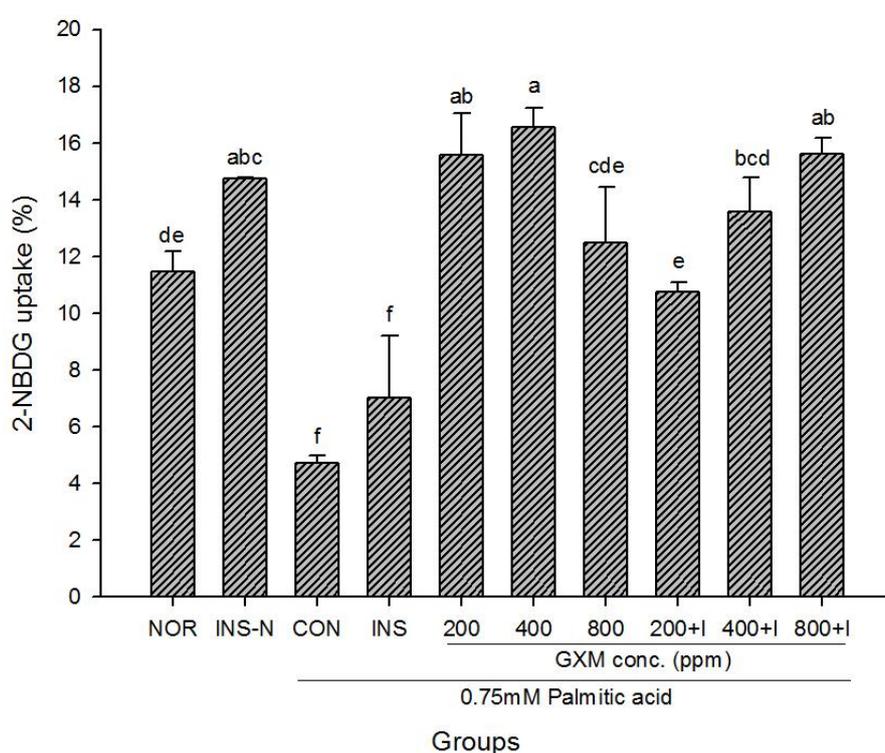
各組經不同處理後，抽取其蛋白質並定量，取 20 μg 細胞蛋白質進行電泳及西方轉漬，分析 pAkt (Ser<sup>473</sup>) 的蛋白質相對於 Akt 表現量，並以 β-actin 蛋白質表現量作為內部對照。將 pAkt (Ser<sup>473</sup>) 及 Akt 蛋白質表現量數據相除。各組之目標蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。

A~D 之不同字母表示細胞與 GXM 共置 12 小時之結果具顯著差異(p<0.05)。

a~d 之不同字母表示細胞與 GXM 共置 24 小時之結果具顯著差異(p<0.05)。

### 3-4-3 阻抗態 C2C12 細胞葡萄糖擬似物 2-NBDG 帶入量

將細胞以棕櫚酸誘導成胰島素阻抗後，分為不同濃度 GXM 單獨或合併胰島素處理 24 小時後，測試其 2-NBDG 帶入量。由圖八可知，阻抗態細胞之葡萄糖擬似物帶入量降低，而添加 GXM 或 GXM 合併胰島素刺激，皆可促使細胞帶入 2-NBDG 的能力回復到正常細胞的水準。GXM 合併添加胰島素組具劑量效應，但 200 與 400 ppm 無胰島素刺激之組別其葡萄糖擬似物帶入量較同濃度合併添加胰島素組多。



圖八、阻抗態 C2C12 與不同濃度 GXM 共置 24 小時之 2-NBDG 帶入量。

誘導成胰島素阻抗之細胞與不同濃度 GXM 於 37°C 共置 24 小時後，與 2-NBDG 反應 45 分鐘，添加胰島素的組別(I 與 INS 表示 Insulin)在 30 分鐘時，加入 100 nM 胰島素刺激 15 分鐘，再以流式細胞儀進行螢光測定。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。NOR 表正常細胞之控制組。INS-N 表正常細胞添加胰島素組。CON 表誘導成阻抗態細胞之控制組。INS 為誘導成阻抗態之細胞添加胰島素。a-f 之不同字母表示阻抗態細胞與 GXM 共置 24 小時之結果具顯著差異( $p < 0.05$ )。

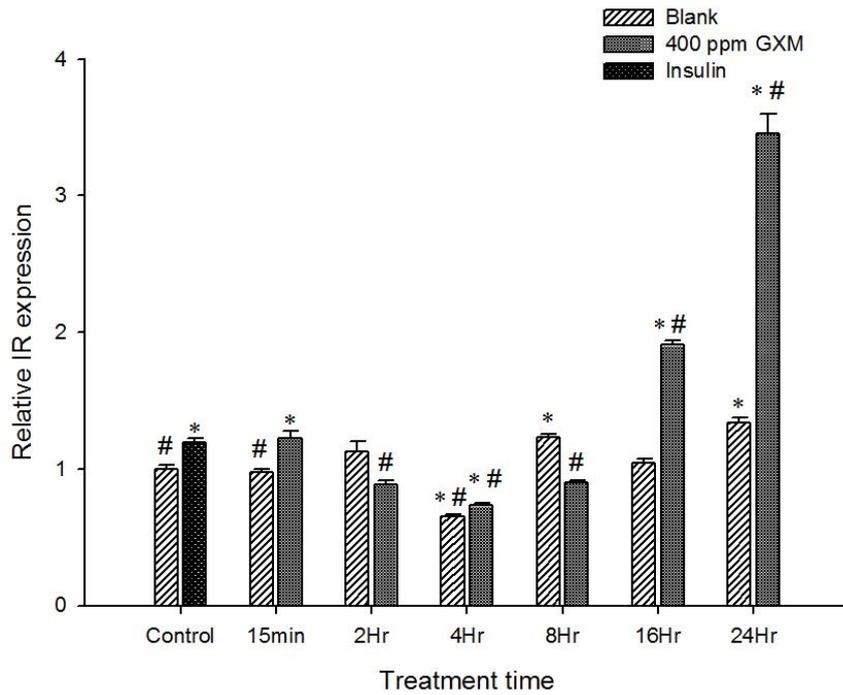
### 3-5 細胞層面之傳訊路徑

為追蹤酸性多醣對 C2C12 肌肉細胞中的傳訊路徑之影響，在添加 400 ppm GXM 處理正常與阻抗態細胞後，於不同時間點利用同步定量聚合酶鏈鎖反應與西方轉漬，偵測路徑中重要蛋白質 IR、PI3K、IRS-1、Akt、AMPK、HK、AdipoR1 與 AdipoR2 等基因 mRNA 或蛋白質表現量。

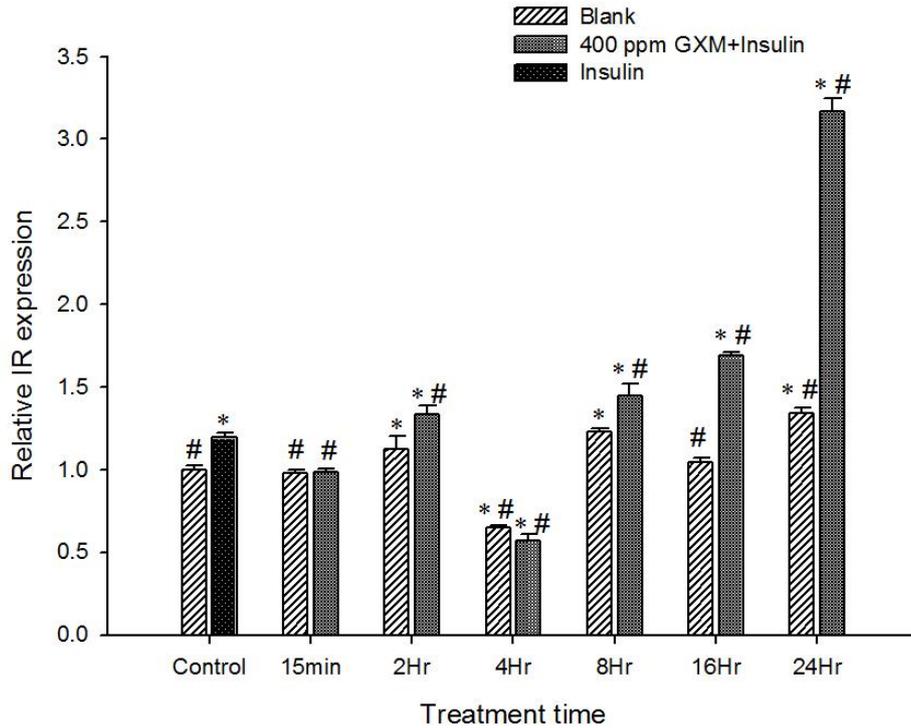
#### 3-5-1 正常及阻抗狀態 C2C12 細胞之胰島素受體(IR) mRNA 相對表現量

當正常態細胞添加 400 ppm GXM 後，在不同時間對 IR 基因轉錄量之影響如圖九所示。無任何添加的控制組在所觀察之 24 小時內，IR mRNA 表現量在 0.65 倍到 1.33 倍之間狹幅變化。GXM 之添加使 IR 表現在 15min、16Hr 與 24Hr 兩波段式顯著增為控制組之 1.22、1.91 與 3.46 倍。如與胰島素組相較，在 16Hr 與 24Hr 之表現量仍為其 1.60 與 2.89 倍，具顯著差異。添加 GXM 合併胰島素刺激下(圖十)同樣呈現兩波段式變化，與控制組或胰島素組相較，2Hr、8Hr、16Hr 與 24Hr 之 IR 基因表現皆顯著增加。與控制組相比，分別增為 1.33、1.45、1.69 與 3.17 倍；與胰島素組相比，則各增為 1.11、1.21、1.41 與 2.65 倍。

將細胞誘導阻抗後，IR 基因表現量會比正常細胞高，不論胰島素添加與否，控制組之 IR 表現量均隨時間先上升後下降(圖十一與圖十二)。GXM 之效應保持兩階段性，單獨添加 GXM 時在 15 分鐘即可增加 IR 表現，隨後些微降低，而在 16 與 24 小時則明顯增加其表現量，分別為阻抗態控制組之 2.30 與 6.08 倍。與阻抗態胰島素組相較，各增為 2.73 與 7.19 倍。GXM 合併添加胰島素在 15min 已顯著增加 IR 基因表現量，第一高峰出現於 2Hr (圖十二)，第二高峰則在 16 小時，與阻抗控制組或胰島素組比較，分別增為 6.23 與 7.38 倍。綜合圖十一與圖十二可知，阻抗態細胞單獨處理 GXM 或合併添加胰島素，IR 表現兩高峰出現時間略有差異，且合併胰島素刺激之效應較大。

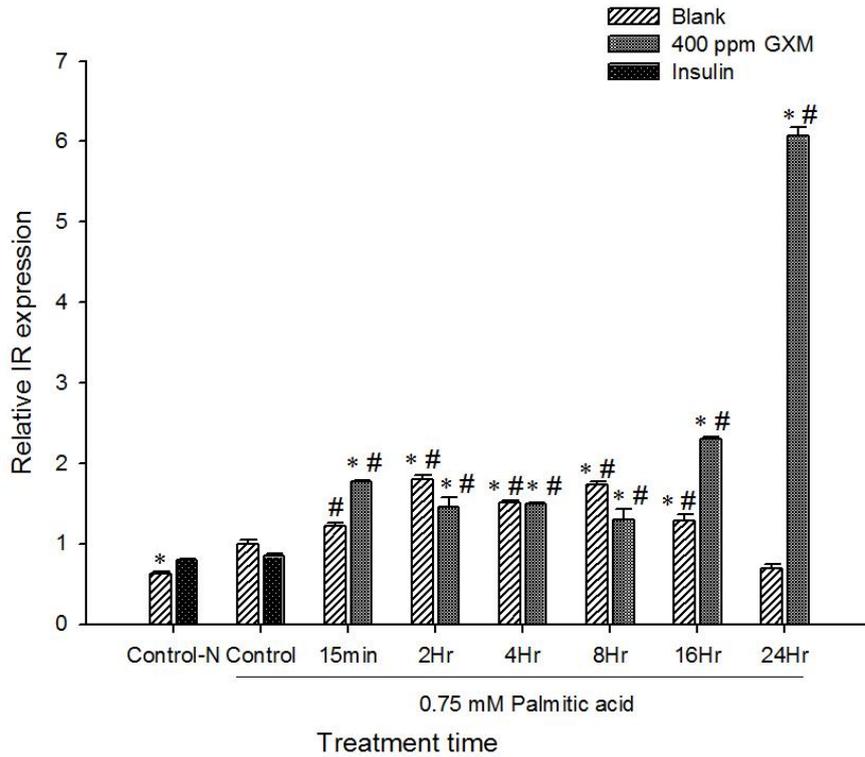


圖九、正常態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間之 IR mRNA 相對表現量。將細胞分化後，添加 400 ppm GXM，經不同共置時間，胰島素組於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。抽取 RNA 反轉錄為 cDNA，再以同步定量聚合酶連鎖反應測量其 IR mRNA 表現量，並使用 GAPDH mRNA 做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之 IR 基因表現量於校正後以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均重複兩次，並以洋菜瓊脂膠電泳確認反應產物之專一性。\*表示與控制組有顯著差異(p<0.05)。#表示與胰島素組具顯著差異(p<0.05)。

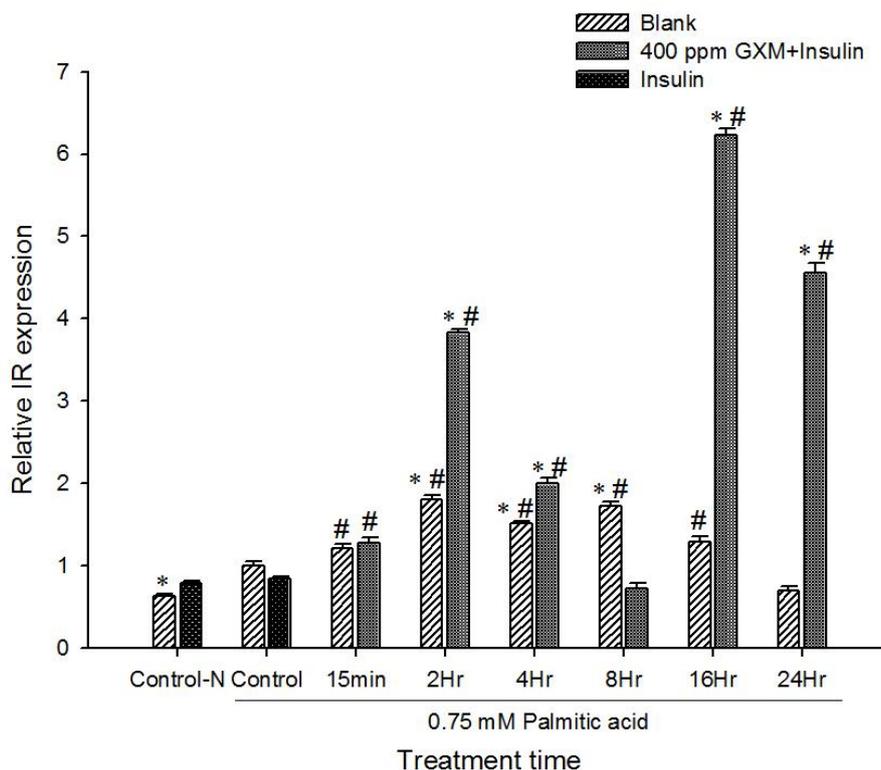


圖十、正常態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間並添加胰島素刺激之 IR mRNA 相對表現量。

將細胞分化後，添加 400 ppm GXM，經不同共置時間，添加胰島素之組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。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 做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之 IR 基因表現量於校正後以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均重複兩次，並以洋菜瓊脂膠電泳確認反應產物之專一性。\*表示與控制組有顯著差異( $p < 0.05$ )。#表示與胰島素組具顯著差異( $p < 0.05$ )。



圖十一、阻抗態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間之 IR mRNA 相對表現量。細胞分化後，以棕櫚酸誘導成阻抗態細胞，添加 400 ppm GXM，經不同共置時間，胰島素組於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。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 做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之 IR 基因表現量於校正後以相對表現量表示，再調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均重複兩次，並以洋菜瓊脂膠電泳確認反應產物之專一性。Control-N 表正常態細胞之控制組。\*表示與阻抗態控制組有顯著差異(p<0.05)。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異(p<0.05)。



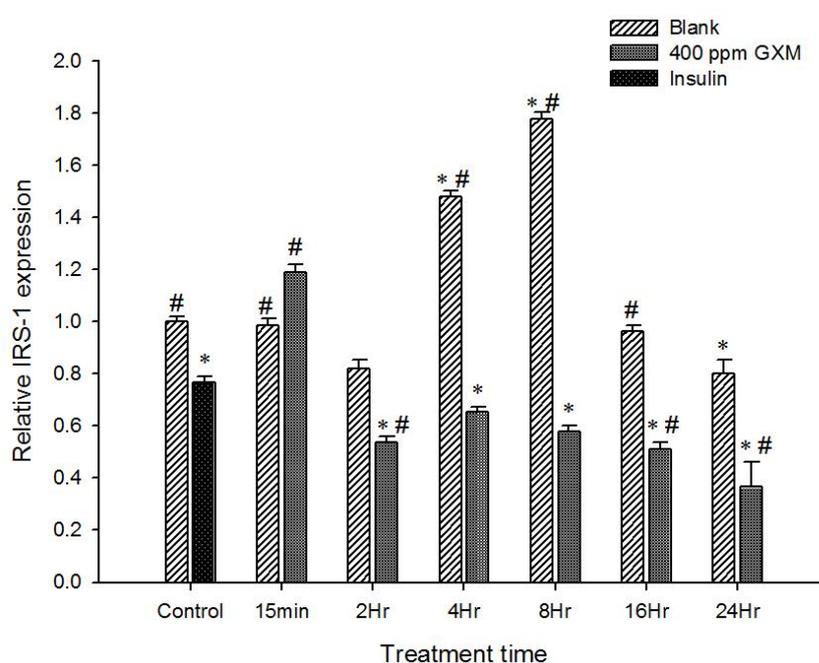
圖十二、阻抗態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間並添加胰島素刺激之 IR mRNA 相對表現量。

細胞分化後，以棕櫚酸誘導成阻抗態細胞，添加 400 ppm GXM，經不同共置時間，添加胰島素之組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。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 做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之 IR 基因表現量於校正後以相對表現量表示，再調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均重複兩次，並以洋菜瓊脂膠電泳確認反應產物之專一性。Control-N 表正常態細胞之控制組。\*表示與阻抗態控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異(p<0.05)。

### 3-5-2 正常及阻抗態 C2C12 細胞之胰島素受體基質(IRS-1) mRNA 相對表現量

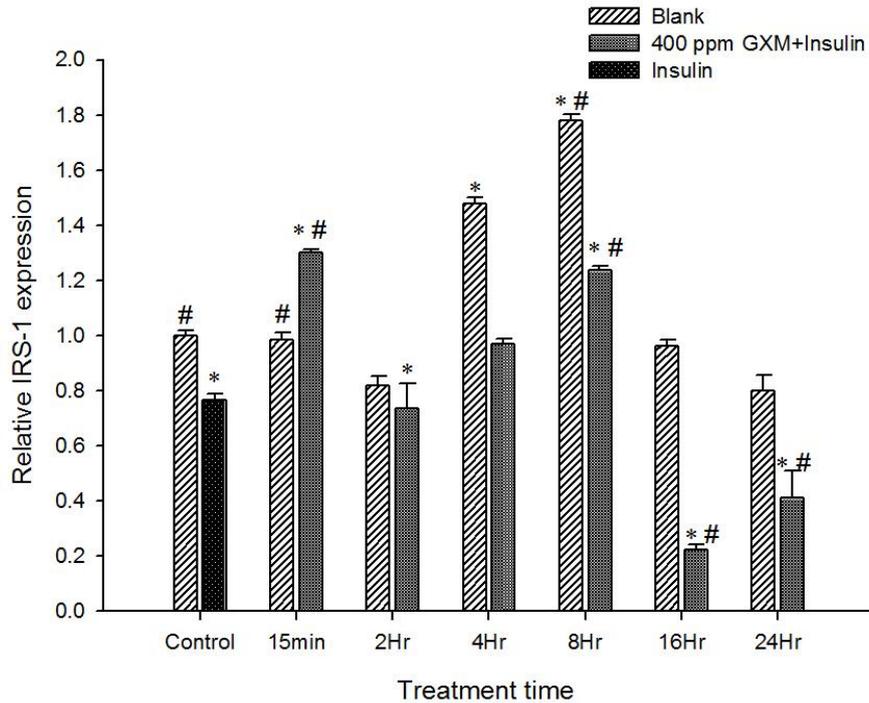
正常態細胞添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，對 IRS-1 基因表現量的影響如圖十三所示，控制組在 8 小時表現達到最高。添加 GXM 於 15 分鐘後小幅上升，而後則隨時間而漸減，與控制組相比，2、4、8、16 與 24Hr 分別下降 46%、34%、42%和 63%；而與胰島素組相比，2、16 與 24Hr 表現量分別下降 30%、33%與 52%。合併添加胰島素結果如圖十四，控制組同樣在 8 小時表現達最高，而 GXM 組之表現呈現 15 分鐘與 8 小時兩高峰，在 16Hr 與 24Hr 之 IRS-1 基因表現量較控制組下降 78%與 59%；與胰島素相較，在 15 分鐘與 8Hr 時可顯著增加 IRS-1 基因表現量達 1.70 與 1.61 倍，但在 16Hr 表現量反而下降 71%。

由圖十五可知阻抗細胞較正常狀態 IRS-1 mRNA 表現稍低，空白對照組在 2Hr、4Hr、8Hr 與 16Hr 之表現量顯著增加，而加入 GXM 在 15min、2Hr、4Hr 與 24Hr 共置後兩波段式顯著提升 IRS-1 基因表現量，與阻抗態控制組相較，分別增為 1.98、1.63、1.96 與 6.43 倍，與阻抗態胰島素組相比，15min、2Hr、4Hr 與 24Hr 表現量也顯著增加為 2.00、1.66、1.98 與 6.50 倍。當阻抗細胞加入 GXM 合併胰島素刺激後(圖十六)，可發現在 2Hr、4Hr、16Hr 及 24Hr 亦兩波段顯著提升 IRS-1 基因表現，與阻抗態控制組相比，各別增加 4.25、3.60、5.50 及 4.94 倍，與阻抗態胰島素組相較，則分別增加 4.29、3.34、5.55 與 4.99 倍。



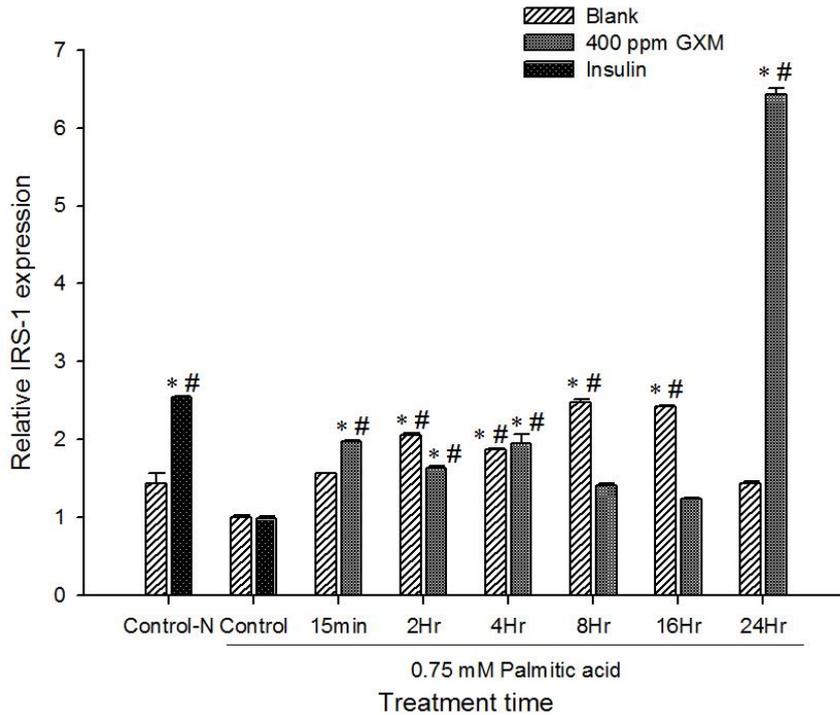
圖十三、正常態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間之 IRS-1 mRNA 相對表現量。

將細胞分化後，添加 400 ppm GXM，經不同共置時間，胰島素組於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。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 做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之 IRS-1 基因表現量於校正後以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均重複兩次，並以洋菜瓊脂膠電泳確認反應產物之專一性。\*表示與控制組有顯著差異(p<0.05)。#表示與胰島素組具顯著差異(p<0.05)。

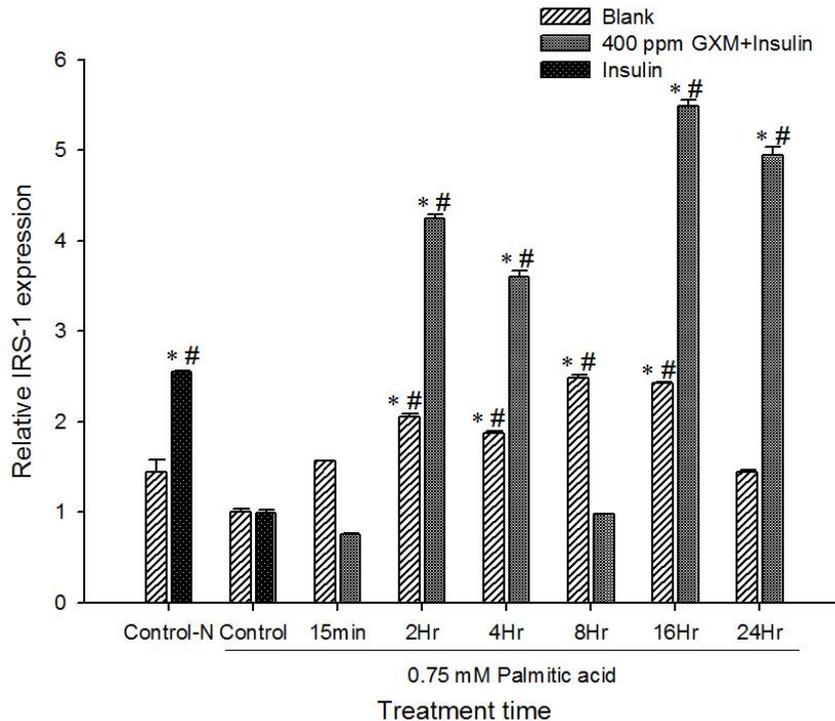


圖十四、正常態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間並添加胰島素刺激之 IRS-1 mRNA 相對表現量。

細胞分化後，添加 400 ppm GXM，經不同共置時間，添加胰島素之組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。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 做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之 IRS-1 基因表現量於校正後以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均重複兩次，並以洋菜瓊脂膠電泳確認反應產物之專一性。\*表示與控制組有顯著差異( $p < 0.05$ )。#表示與胰島素組具顯著差異( $p < 0.05$ )。



圖十五、阻抗態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間之 IRS-1 mRNA 相對表現量。細胞分化後，以棕櫚酸誘導成阻抗態細胞，添加 400 ppm GXM，經不同共置時間，胰島素組於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。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 做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之 IRS-1 基因表現量於校正後以相對表現量表示，再調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均重複兩次，並以洋菜瓊脂膠電泳確認反應產物之專一性。Control-N 表正常態細胞之控制組。\*表示與阻抗態控制組有顯著差異(p<0.05)。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異(p<0.05)。



圖十六、阻抗態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間並添加胰島素刺激之 IRS-1 mRNA 相對表現量。

細胞分化後，以棕櫚酸誘導成阻抗態細胞，添加 400 ppm GXM，經不同共置時間，添加胰島素之組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。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 做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之 IRS-1 基因表現量於校正後以相對表現量表示，再調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均重複兩次，並以洋菜瓊脂膠電泳確認反應產物之專一性。Control-N 表正常態細胞之控制組。\*表示與阻抗態控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異(p<0.05)。

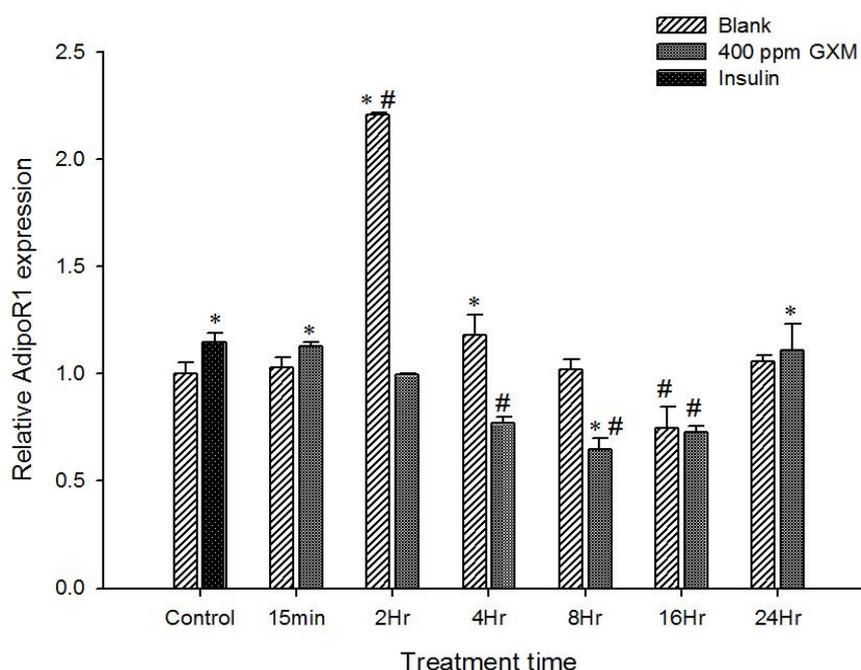
### 3-5-3 正常及阻抗狀態 C2C12 細胞之脂聯素受體(AdipoR) mRNA 相對表現量

#### (1) AdipoR1 mRNA 相對表現量

正常態 C2C12 肌肉細胞添加 400 ppm GXM，經不同共置時間後，AdipoR1 mRNA 相對表現量與控制組相比，15 分鐘與 24Hr 之表現量皆顯著提升，各增為 1.13 與 1.11 倍，而 4、8 與 16Hr 表現量則有下降之趨勢(圖十七)。添加 GXM 合併胰島素刺激之結果(圖十八)與單純添加 GXM 對 AdipoR1 基因表現量影響頗為相似，在 15min 有小幅上升後，隨時間延長而有下降趨勢，於 24Hr 顯著增加其基因表現量。

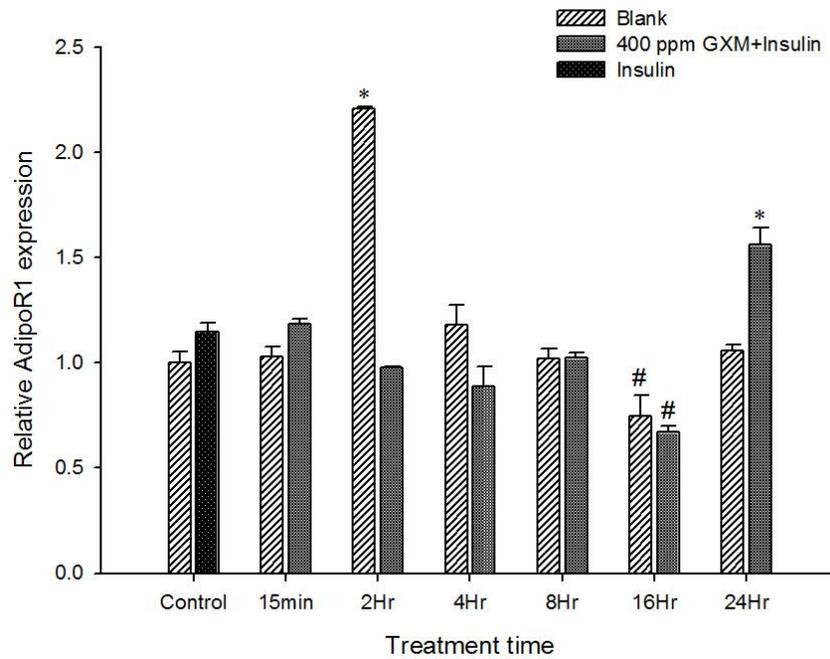
圖十九為阻抗細胞添加 400 ppm GXM 對 AdipoR1 基因表現量之影響，阻抗

控制組隨時間略有增加，而在 8 小時達到最高。與阻抗態控制組相比，GXM 的添加對 AdipoR1 mRNA 相對表現量於 15min、4Hr 與 24Hr 有顯著影響，分別下降 50%、42% 與 46%，與阻抗態胰島素組相較，於 8Hr 時表現量增為 1.34 倍。而 GXM 再添加胰島素刺激後，對 AdipoR1 基因表現量影響較大(圖二十)，於 2、4、8 及 16Hr 皆有顯著下降的趨向，與阻抗態控制組相比，各下降 65%、49%、31% 及 41%，與阻抗態胰島素組比，2Hr 基因表現量顯著降低為 53%。



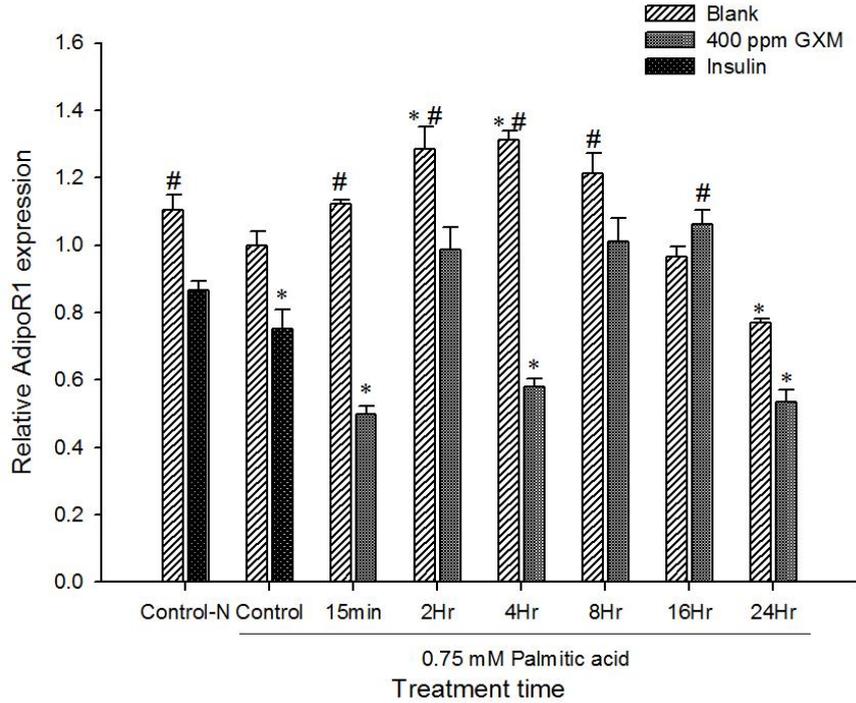
圖十七、正常態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間之 AdipoR1 mRNA 相對表現量。

細胞分化後，添加 400 ppm GXM，經不同共置時間，胰島素組於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。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 做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之 AdipoR1 基因表現量於校正後以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均重複兩次，並以洋菜瓊脂膠電泳確認反應產物之專一性。\*表示與控制組有顯著差異( $p < 0.05$ )。#表示與胰島素組具顯著差異( $p < 0.05$ )。



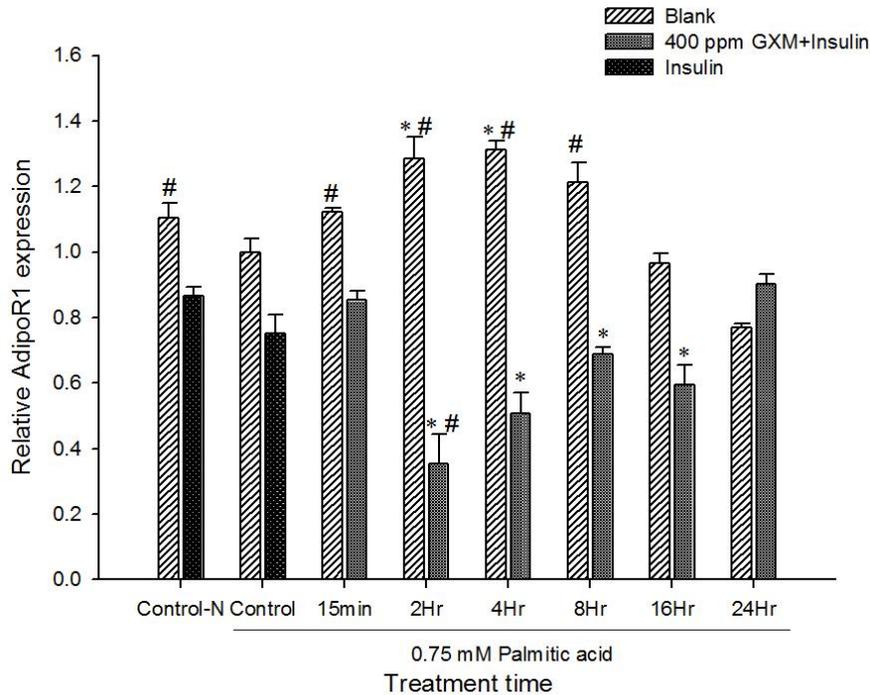
圖十八、正常態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間並添加胰島素刺激之 AdipoR1 mRNA 相對表現量。

細胞分化後，添加 400 ppm GXM，經不同共置時間，添加胰島素之組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。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 做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之 AdipoR1 基因表現量於校正後以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均重複兩次，並以洋菜瓊脂膠电泳確認反應產物之專一性。\*表示與控制組有顯著差異( $p < 0.05$ )。#表示與胰島素組具顯著差異( $p < 0.05$ )。



圖十九、阻抗態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間之 AdipoR1 mRNA 相對表現量。

將細胞分化後，以棕櫚酸誘導成阻抗態細胞，添加 400 ppm GXM，經不同共置時間，胰島素組於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。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 做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之 AdipoR1 基因表現量於校正後以相對表現量表示，再調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均重複兩次，並以洋菜瓊脂膠電泳確認反應產物之專一性。Control-N 表正常態細胞之控制組。\*表示與阻抗態控制組有顯著差異(p<0.05)。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異(p<0.05)。



圖二十、阻抗態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間並添加胰島素刺激之 AdipoR1 mRNA 相對表現量。

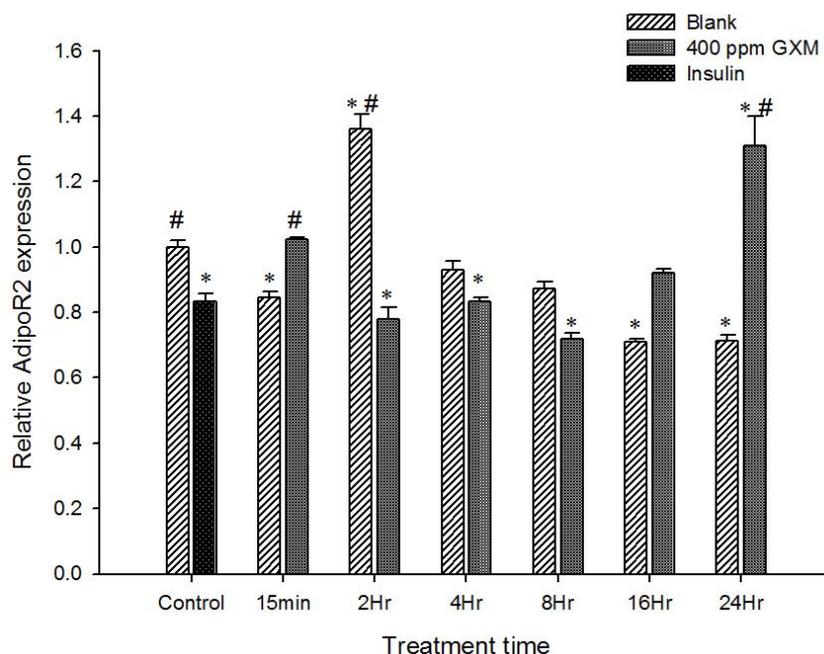
細胞分化後，以棕櫚酸誘導成阻抗態細胞，添加 400 ppm GXM，經不同共置時間，添加胰島素之組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。抽取 RNA 反轉錄為 cDNA，再以同步定量聚合酶連鎖反應測量其 AdipoR1 mRNA 表現量，並使用 GAPDH mRNA 做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之 AdipoR1 基因表現量於校正後以相對表現量表示，再調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均重複兩次，並以洋菜瓊脂膠電泳確認反應產物之專一性。Control-N 表正常態細胞之控制組。\*表示與阻抗態控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異(p<0.05)。

## (2) AdipoR2 mRNA 相對表現量

圖二十一為正常細胞添加 400 ppm GXM 對 AdipoR2 mRNA 相對表現量的影響，在 15 分鐘、16Hr 與 24Hr 兩波段式提升其表現量。添加 400 ppm GXM 合併胰島素刺激之結果如圖二十二，15 分鐘、2Hr 與 16Hr 皆可顯著增加 AdipoR2 基因表現量，與控制組相比，各增為 1.10、1.31 與 1.38 倍。與胰島素組相較，分別增為 1.32、1.57 與 1.65 倍。

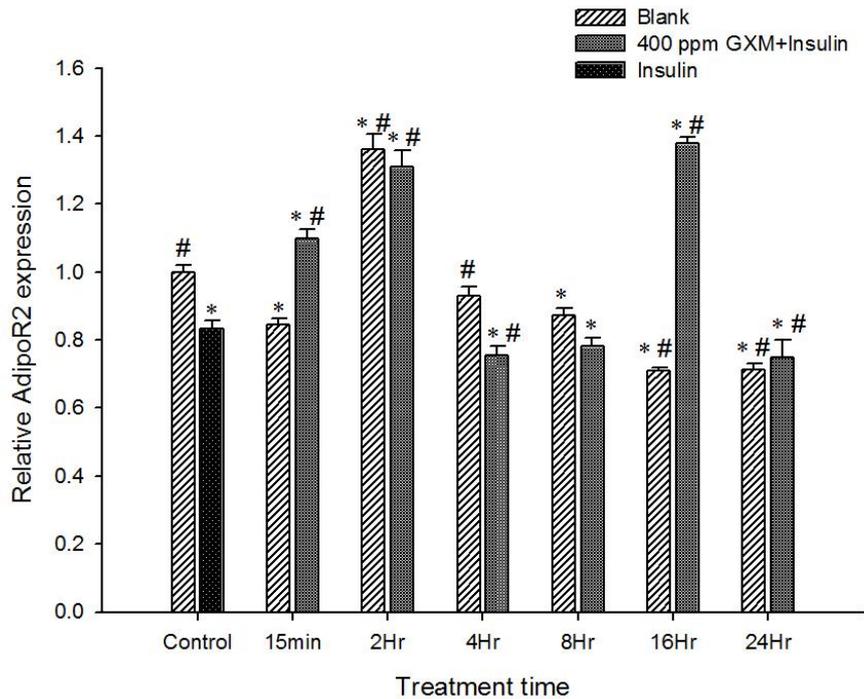
阻抗細胞添加 GXM 對 AdipoR2 基因表現量影響如圖二十三所示，阻抗細胞在 2、4 及 8Hr 之空白對照組表現量顯著上升。與各時間點之空白對照相比，添加 GXM 在 8Hr 內，無法增加 AdipoR2 基因表現，而 16Hr 及 24Hr 可顯著提升

AdipoR2 基因表現，與阻抗態控制組相比，分別增為 1.84 及 1.70 倍。與阻抗態胰島素組比，則增為 1.88 與 1.73 倍。而 GXM 合併胰島素刺激於 16Hr 與 24Hr 可顯著提升其表現量(圖二十四)，相較於阻抗態控制組，各別提升 1.96 與 1.26 倍。與阻抗態胰島素組相比，各增為 1.99 與 1.28 倍。



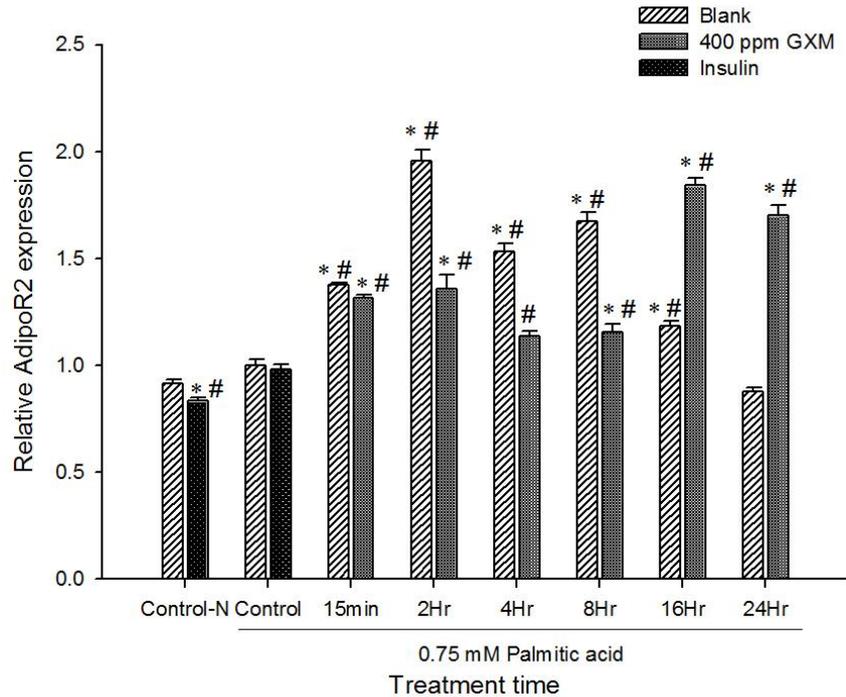
圖二十一、正常態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間之 AdipoR2 mRNA 相對表現量。

細胞分化後，添加 400 ppm GXM，經不同共置時間，胰島素組於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。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 做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之 AdipoR2 基因表現量於校正後以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均重複兩次，並以洋菜瓊脂膠電泳確認反應產物之專一性。\*表示與控制組有顯著差異(p<0.05)。#表示與胰島素組具顯著差異(p<0.05)。



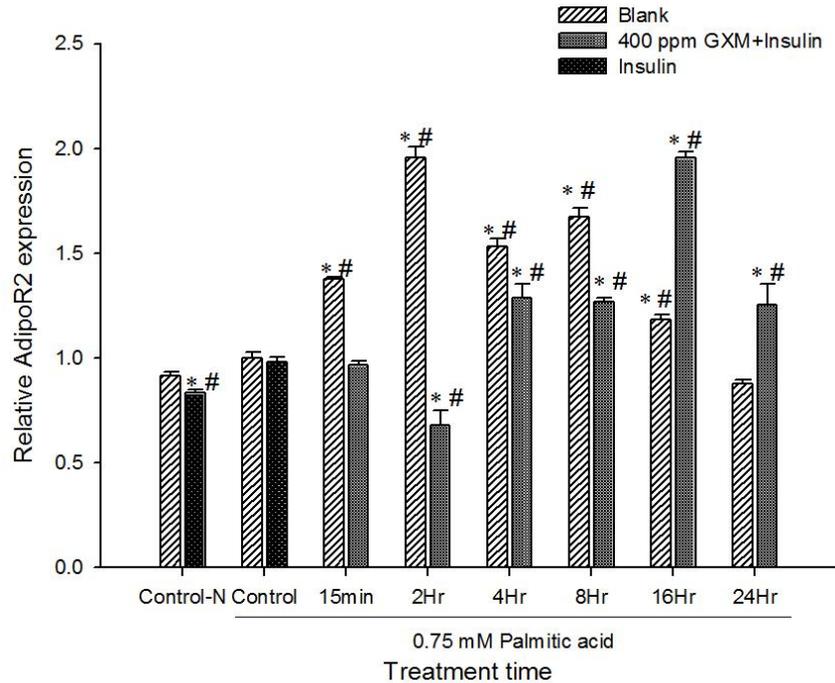
圖二十二、正常態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間並添加胰島素刺激之 AdipoR2 mRNA 相對表現量。

細胞分化後，添加 400 ppm GXM，經不同共置時間，添加胰島素之組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。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 做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之 AdipoR2 基因表現量於校正後以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均重複兩次，並以洋菜瓊脂膠電泳確認反應產物之專一性。\*表示與控制組有顯著差異(p<0.05)。#表示與胰島素組具顯著差異(p<0.05)。



圖二十三、阻抗態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間之 AdipoR2 mRNA 相對表現量。

細胞分化後，以棕櫚酸誘導成阻抗態細胞，添加 400 ppm GXM，經不同共置時間，胰島素組於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。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 做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之 AdipoR2 基因表現量於校正後以相對表現量表示，再調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均重複兩次，並以洋菜瓊脂膠電泳確認反應產物之專一性。Control-N 表正常態細胞之控制組。\*表示與阻抗態控制組有顯著差異(p<0.05)。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異(p<0.05)。



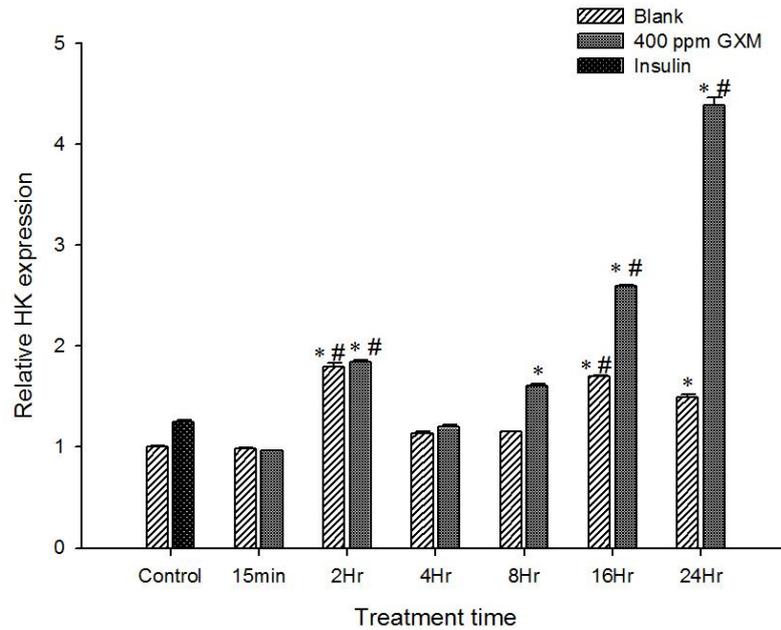
圖二十四、阻抗態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間並添加胰島素刺激之 AdipoR2 mRNA 相對表現量。

細胞分化後，以棕櫚酸誘導成阻抗態細胞，添加 400 ppm GXM，經不同共置時間，添加胰島素之組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。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 做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之 AdipoR2 基因表現量於校正後以相對表現量表示，再調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均重複兩次，並以洋菜瓊脂膠電泳確認反應產物之專一性。Control-N 表正常態細胞之控制組。\*表示與阻抗態控制組具顯著差異( $p < 0.05$ )。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異( $p < 0.05$ )。

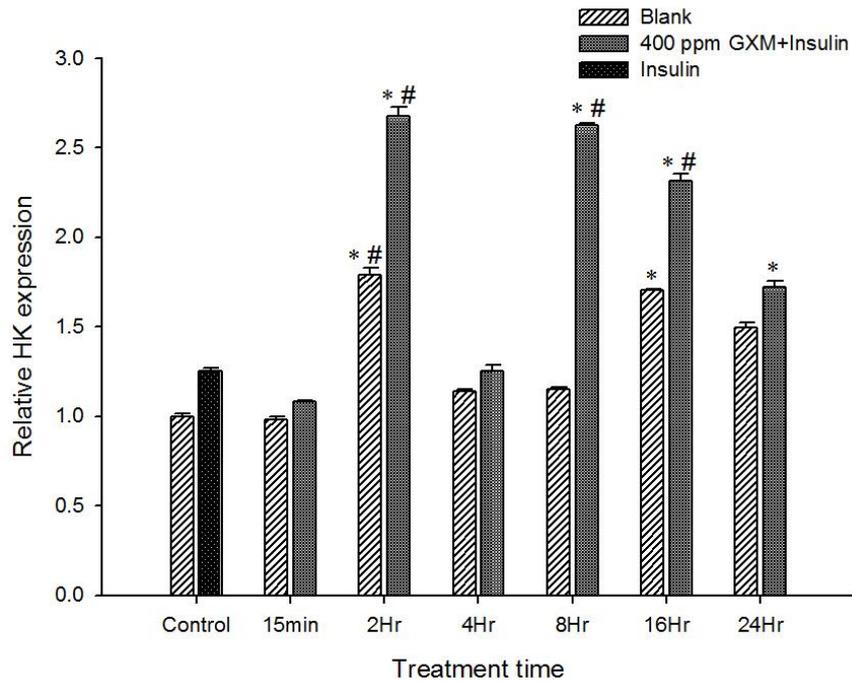
#### 3-5-4 正常及阻抗狀態 C2C12 細胞之六碳糖激酶(HK) mRNA 相對表現量

正常細胞添加 GXM 後(圖二十五)，HK 基因表現量於 2、8、16 及 24Hr 與控制組比有顯著上升之趨勢，各別增為 1.85、1.60、2.60 與 4.39 倍，而以胰島素組相比，2、16 及 24Hr 具顯著差異，表現量增為 1.48、2.08 及 3.51 倍。圖二十六為 GXM 合併添加胰島素刺激對 HK 基因表現之影響，相同地各時間點的加 GXM 及胰島素組其 HK 表現量會高於各時間之空白對照組，而 2、8、16 及 24Hr 之 HK 表現量具顯著上升，與控制組相較之下，各增加 2.67、2.62、2.32 及 1.72 倍。與胰島素組相比，2、8 及 16Hr 表現量具顯著上升，各增為 2.14、2.10 與 1.85 倍。

阻抗細胞加入 400 ppm GXM，對 HK mRNA 相對表現量影響如圖二十七，8Hr 與 16Hr 可顯著增加 HK 基因表現，與阻抗態控制組相比，分別增為 1.43 與 1.35 倍。與阻抗態胰島素相較，各增為 1.48 與 1.40 倍。圖二十八為阻抗細胞添加 GXM 合併胰島素刺激，需長時間共置才可顯著增加 HK 基因表現，24Hr 與阻抗態控制組或阻抗態胰島素組相比，增為 1.24 與 1.28 倍。

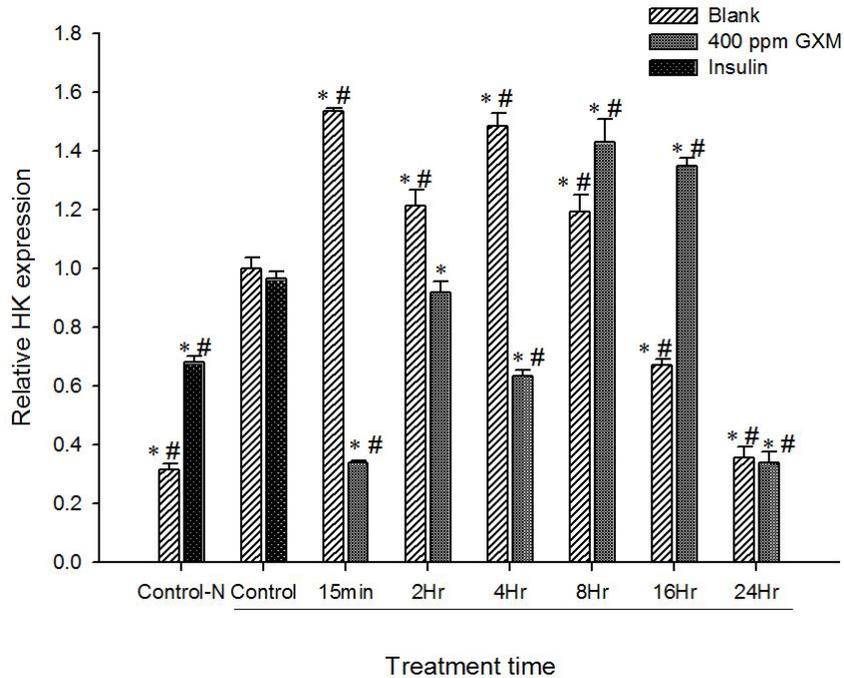


圖二十五、正常態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間之 HK mRNA 相對表現量。細胞分化後，添加 400 ppm GXM，經不同共置時間，胰島素組於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。抽取 RNA 反轉錄為 cDNA，再以同步定量聚合酶連鎖反應測量其 HK mRNA 表現量，並使用 GAPDH mRNA 做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之 HK 基因表現量於校正後以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均重複兩次，並以洋菜瓊脂膠電泳確認反應產物之專一性。\*表示與控制組有顯著差異(p<0.05)。#表示與胰島素組具顯著差異(p<0.05)。

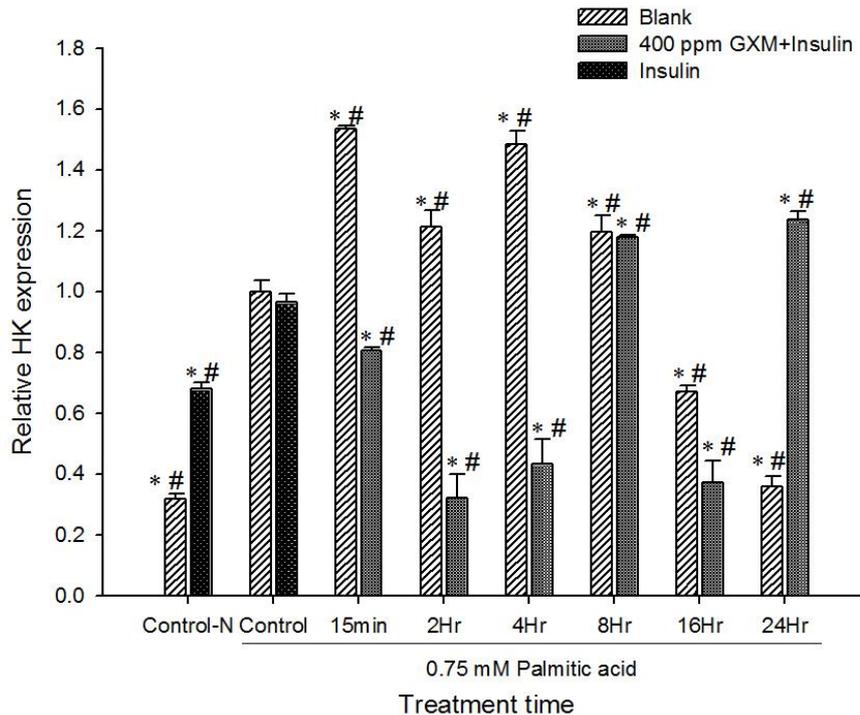


圖二十六、正常態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間並添加胰島素刺激之 HK mRNA 相對表現量。

細胞分化後，添加 400 ppm GXM，經不同共置時間，添加胰島素之組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。抽取 RNA 反轉錄為 cDNA，再以同步定量聚合酶連鎖反應測量其 HK mRNA 表現量，並使用 GAPDH mRNA 做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之 HK 基因表現量於校正後以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均重複兩次，並以洋菜瓊脂膠電泳確認反應產物之專一性。\*表示與控制組有顯著差異( $p < 0.05$ )。#表示與胰島素組具顯著差異( $p < 0.05$ )。



圖二十七、阻抗態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間之 HK mRNA 相對表現量。細胞分化後，以棕櫚酸誘導成阻抗態細胞，添加 400 ppm GXM，經不同共置時間，胰島素組於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。抽取 RNA 反轉錄為 cDNA，再以同步定量聚合酶連鎖反應測量其 HK mRNA 表現量，並使用 GAPDH mRNA 做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之 HK 基因表現量於校正後以相對表現量表示，再調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均重複兩次，並以洋菜瓊脂膠電泳確認反應產物之專一性。Control-N 表正常態細胞之控制組。\*表示與阻抗態控制組有顯著差異(p<0.05)。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異(p<0.05)。



圖二十八、阻抗態 C2C12 與 400 ppm GXM 共置不同時間並添加胰島素刺激之 HK mRNA 相對表現量。

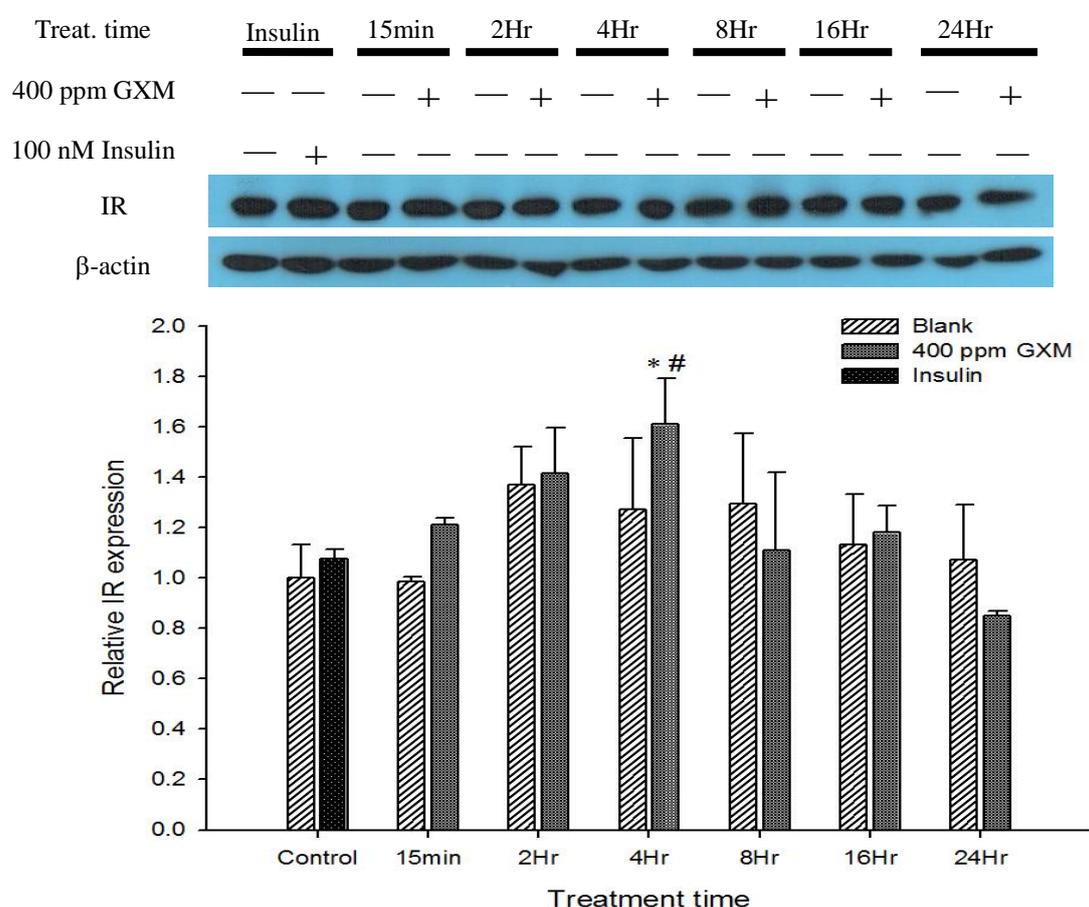
細胞分化後，以棕櫚酸誘導成阻抗態細胞，添加 400 ppm GXM，經不同共置時間，添加胰島素之組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。抽取 RNA 反轉錄為 cDNA，再以同步定量聚合酶連鎖反應測量其 HK mRNA 表現量，並使用 GAPDH mRNA 做為內部對照，校正檢體間之差異。各組之 HK 基因表現量於校正後以相對表現量表示，再調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均重複兩次，並以洋菜瓊脂膠電泳確認反應產物之專一性。Control-N 表正常態細胞之控制組。\*表示與阻抗態控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異(p<0.05)。

### 3-5-5 正常及阻抗態 C2C12 細胞之胰島素受體(IR)蛋白質相對表現量

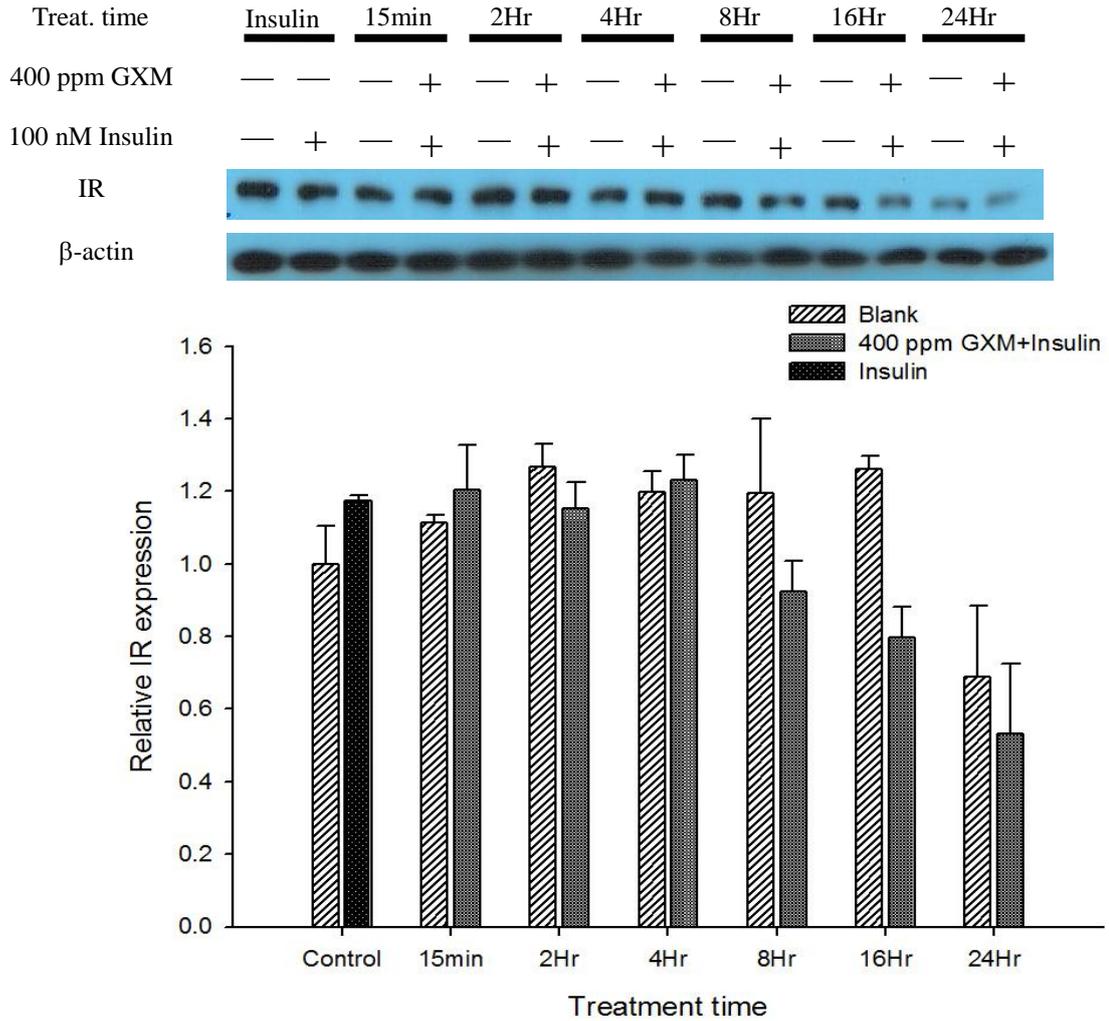
正常 C2C12 細胞添加 400 ppm GXM 經不同時間處理後，IR 蛋白質表現量由圖二十九可知，酸性多醣與細胞共置後，大致上未隨時間明顯影響 IR 表現，只有在 4Hr 時有顯著增加其表現量，與控制組或胰島素組相比，各增為 1.61 與 1.50 倍。而 GXM 與胰島素共同添加組(圖三十)，亦無明顯增加 IR 的表現量，在 24Hr 時則呈顯著下降，與控制組和胰島素組相較下，表現量下降 47% 與 55%。

由圖三十一可發現阻抗細胞的 IR 表現量會隨時間降低，GXM 與細胞共置 4Hr 內不會顯著影響 IR 表現量，而在 8Hr 後明顯降低了其表現量，與阻抗態控制組相比，8Hr、16Hr 與 24Hr 之表現量分別下降了 53%、74%、94%，與阻抗

細胞添加胰島素組相較，則分別下降了 47%、71%、93%。在這三個時間點之空白對照組之 IR 表現量隨時間而減少，添加 GXM 並沒有提昇表現量。在阻抗態細胞添加 GXM 合併胰島素刺激下(圖三十二)，只有 8Hr 時有顯著提升 IR 表現，與阻抗態控制組相比，增為 1.99 倍，與阻抗細胞添加胰島素組相較，增加 1.24 倍。而在 24Hr 添加 GXM 合併胰島素刺激後，與阻抗態控制組相較，表現量下降了 85%。

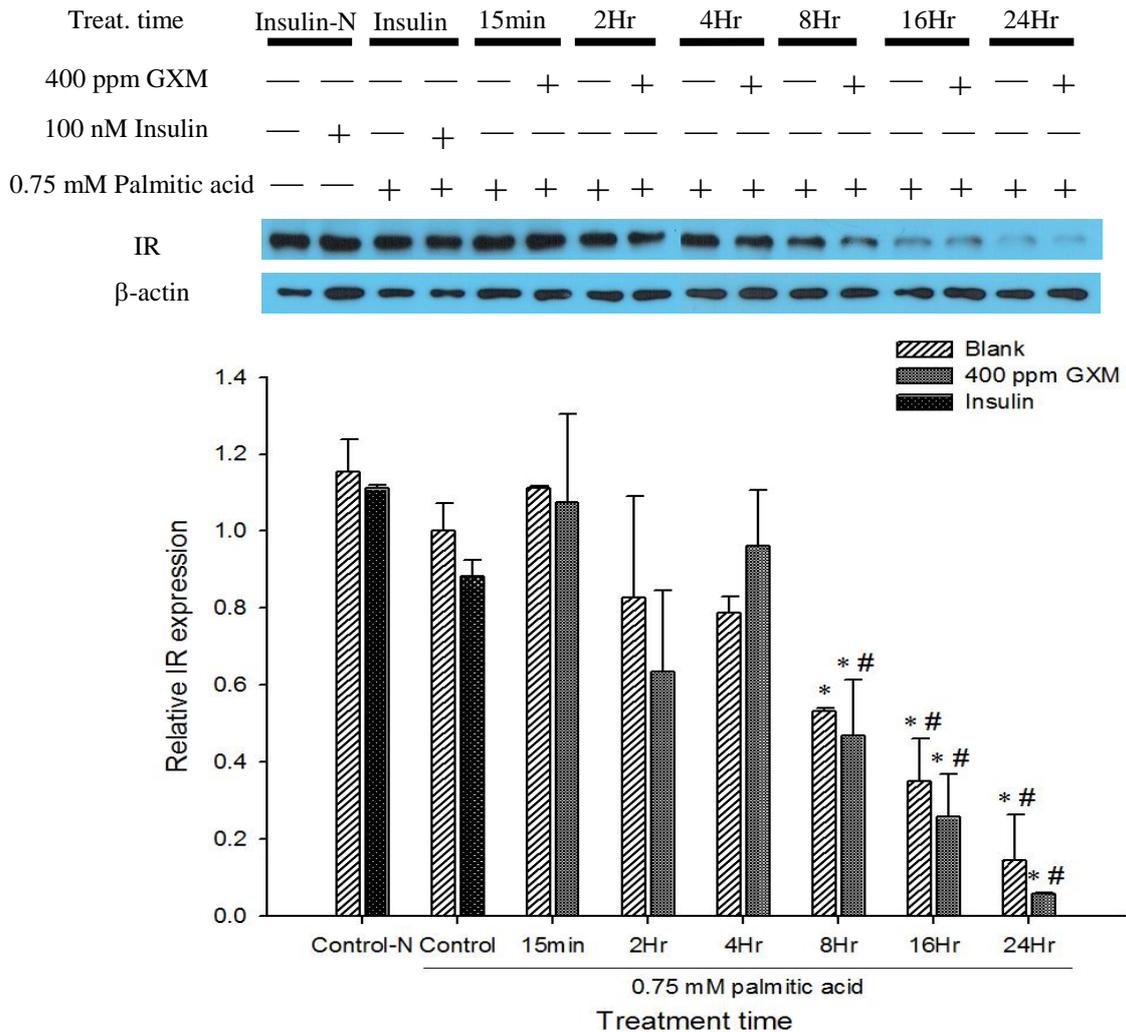


圖二十九、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 IR 蛋白質相對表現量。細胞添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，胰島素組於收細胞前 15 分鐘添加 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 IR 的蛋白質相對表現量，並以 $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 IR 蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與控制組具顯著差異( $p < 0.05$ )。#表示與胰島素組具顯著差異( $p < 0.05$ )。



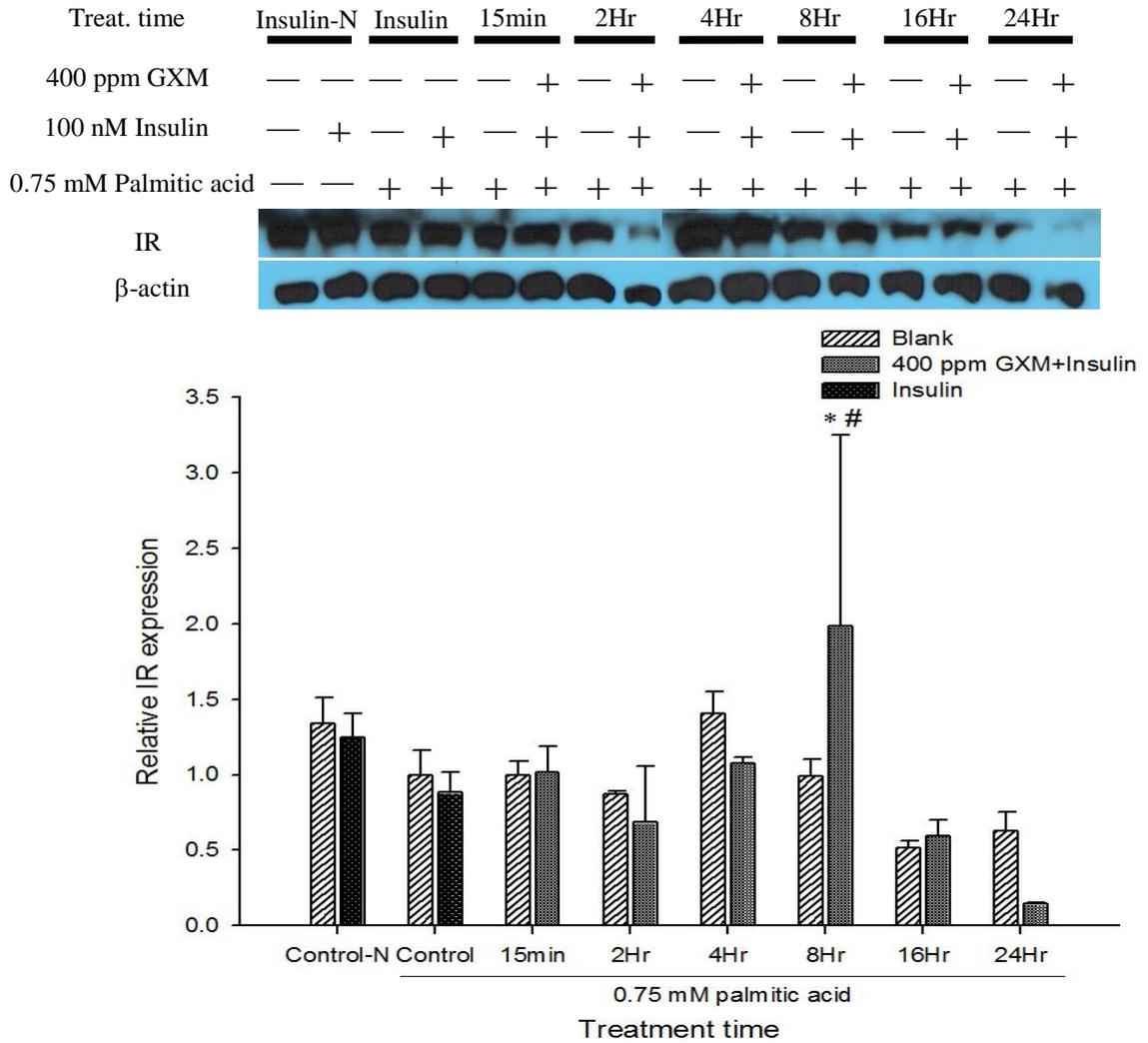
圖三十、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 IR 蛋白質相對表現量。

細胞添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 IR 的蛋白質相對表現量，並以  $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 IR 蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與控制組具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。#表示與胰島素組具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。



圖三十一、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 IR 蛋白質相對表現量。

細胞誘導成阻抗態後添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，胰島素組於收細胞前 15 分鐘添加 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 IR 的蛋白質相對表現量，並以 $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 IR 蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示，再調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與阻抗態控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異(p<0.05)。



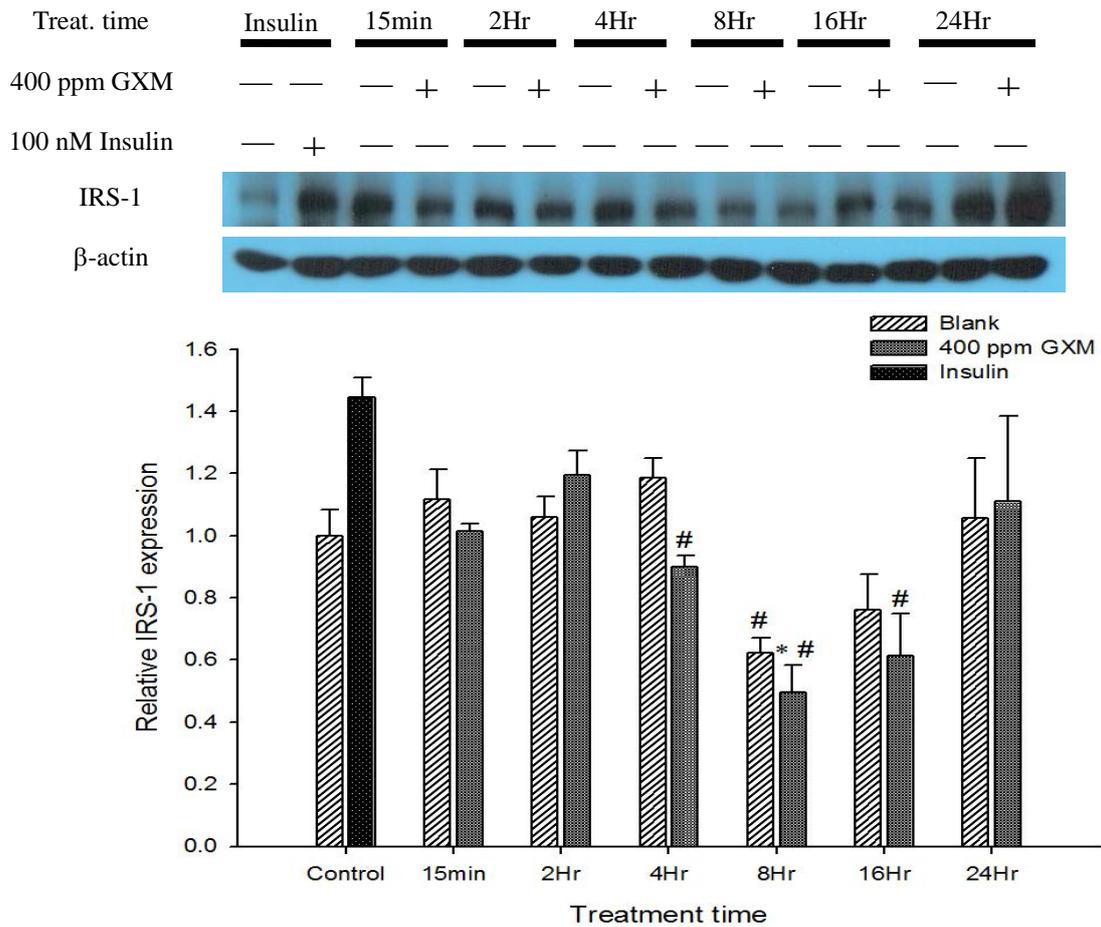
圖三十二、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 IR 蛋白質相對表現量。

細胞誘導成阻抗態後添加 400 ppm GXM 經不同共置時間，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 IR 蛋白質相對表現量，並以 $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 IR 蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示，並調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均取趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與阻抗態控制組具顯著差異( $p < 0.05$ )。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異( $p < 0.05$ )。

### 3-5-6 正常及阻抗態 C2C12 細胞之胰島素受體基質(IRS-1)蛋白質相對表現量

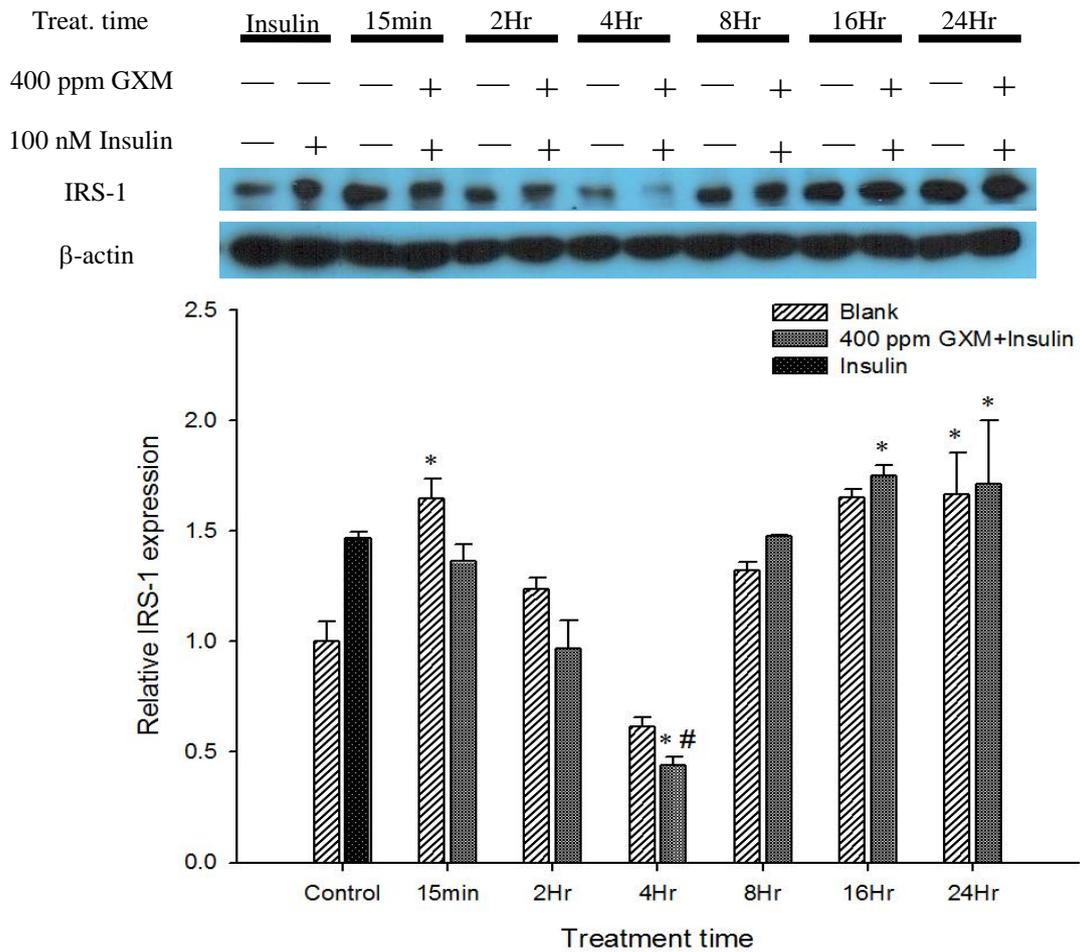
正常態 C2C12 添加 GXM 經不同共置時間後，IRS-1 蛋白質表現量結果如圖三十三所示，影響較顯著者為 4、8 及 16Hr，其他時間則無顯著差異，而此三個時間與胰島素組相比，分別下降了 38%、66% 及 46%。圖三十四為 GXM 合併添加胰島素刺激對 IRS-1 蛋白質表現量之結果，IRS-1 會隨時間下降，於 4Hr 顯著下降，與胰島素組相比下降 70%，而後時間延長，表現量隨之上升，16Hr 與 24Hr 與控制組相較，表現量增為 1.75 與 1.71 倍。

由圖三十五結果可知，當將細胞誘導成胰島素阻抗後，對照組與實驗組均會降低 IRS-1 蛋白質表現，與 IR 蛋白表現類似(圖三十一)。加入 GXM 經不同處理時間後，表現量在 4Hr 之後顯著逐步下降，24Hr 已無法偵測到表現，與阻抗態控制組相比，8Hr 與 16Hr 的 IRS-1 蛋白質表現量下降 65% 與 95%，與阻抗態胰島素組相較，4Hr、8Hr 及 16Hr 各別下降 49%、73% 及 96%。阻抗細胞添加 GXM 與胰島素共同刺激後，在 15min、2Hr、4Hr、8Hr、16Hr 及 24Hr 六個時間點的 IRS-1 蛋白質表現量皆顯著減少，與阻抗態控制組比，各降低 51%、32%、51%、86%、89% 與 92%，與阻抗態胰島素組相較，則各降低 56%、38%、55%、88%、90% 及 92%。GXM 合併添加胰島素刺激在 24Hr 之 IRS-1 蛋白質表現量，較單純添加 GXM 時高，亦較當時的空白對照組為高。



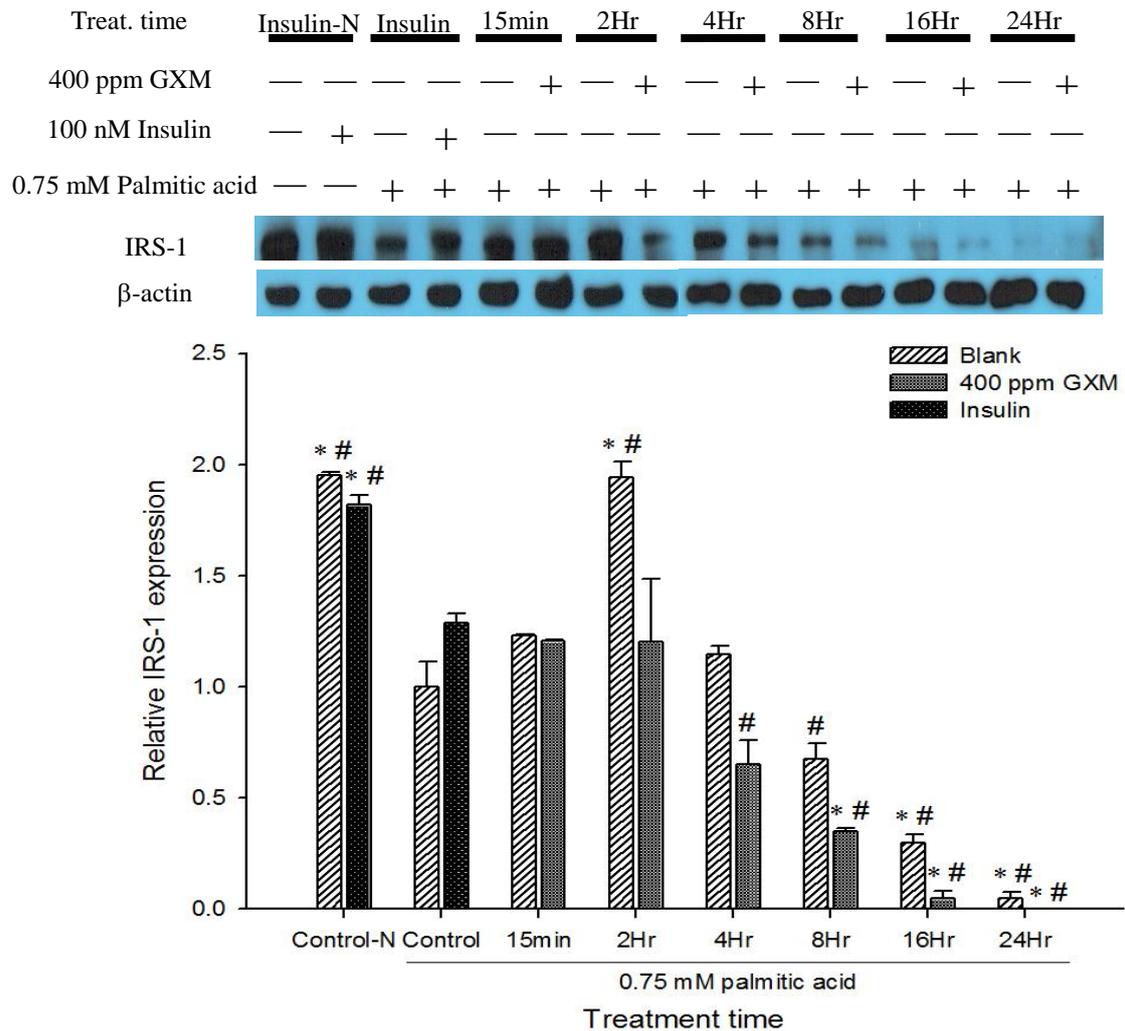
圖三十三、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 IRS-1 蛋白質相對表現量。

細胞添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，胰島素組於收細胞前 15 分鐘添加 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 IRS-1 的蛋白質相對表現量，並以 $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 IRS-1 蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與控制組具顯著差異( $p < 0.05$ )。#表示與胰島素組具顯著差異( $p < 0.05$ )。



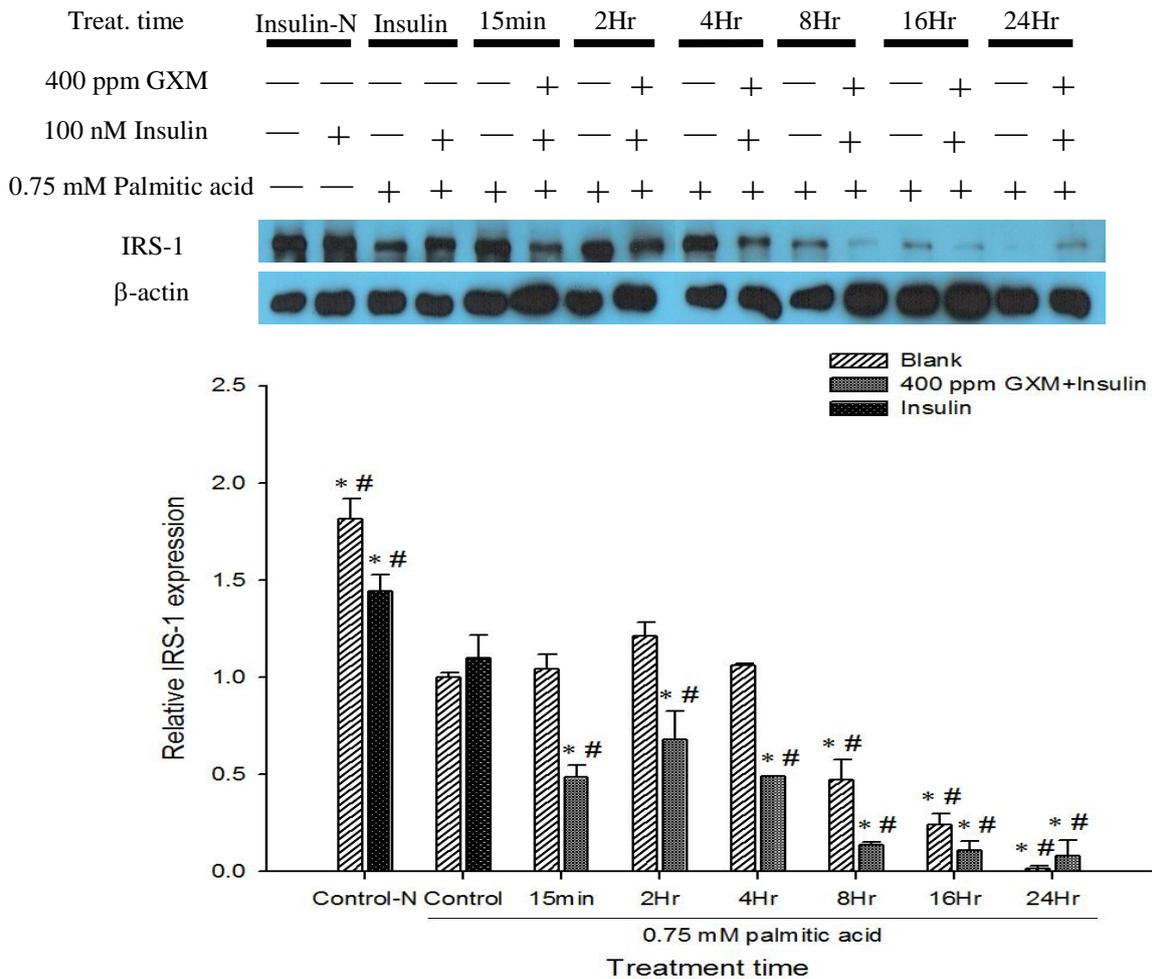
圖三十四、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 IRS-1 蛋白質相對表現量。

細胞添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 IRS-1 的蛋白質相對表現量，並以 $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 IRS-1 蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與控制組具顯著差異( $p < 0.05$ )。#表示與胰島素組具顯著差異( $p < 0.05$ )。



圖三十五、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 IRS-1 蛋白質相對表現量。

細胞誘導成阻抗態後添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，胰島素組於收細胞前 15 分鐘添加 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 IRS-1 的蛋白質相對表現量，並以 $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 IRS-1 蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示，再調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與阻抗態控制組具顯著差異( $p < 0.05$ )。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異( $p < 0.05$ )。



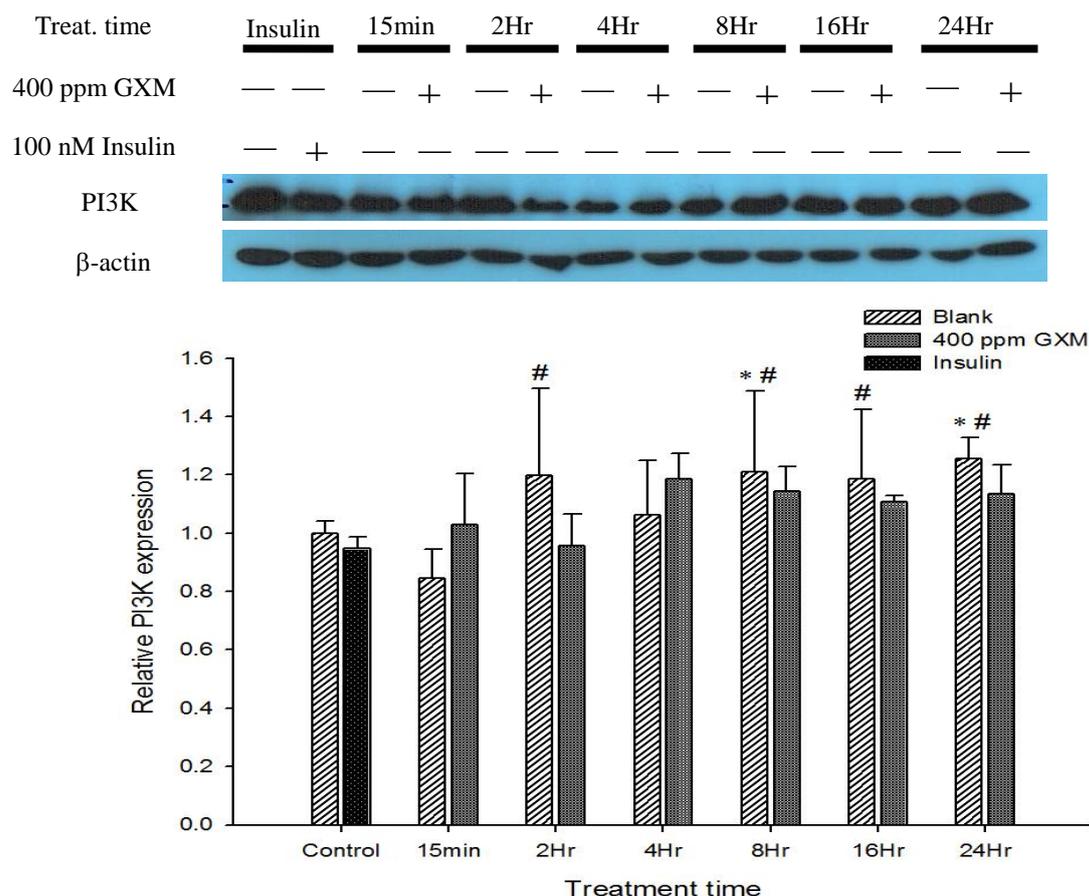
圖三十六、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 IRS-1 蛋白質相對表現量。

細胞誘導成阻抗態後添加 400 ppm GXM 經不同共置時間，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 IRS-1 蛋白質相對表現量，並以 $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 IRS-1 蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示，並調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均取趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與阻抗態控制組具顯著差異( $p < 0.05$ )。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異( $p < 0.05$ )。

### 3-5-7 正常及阻抗態 C2C12 細胞之磷酸肌醇激酶(PI3-kinase)蛋白質相對表現量

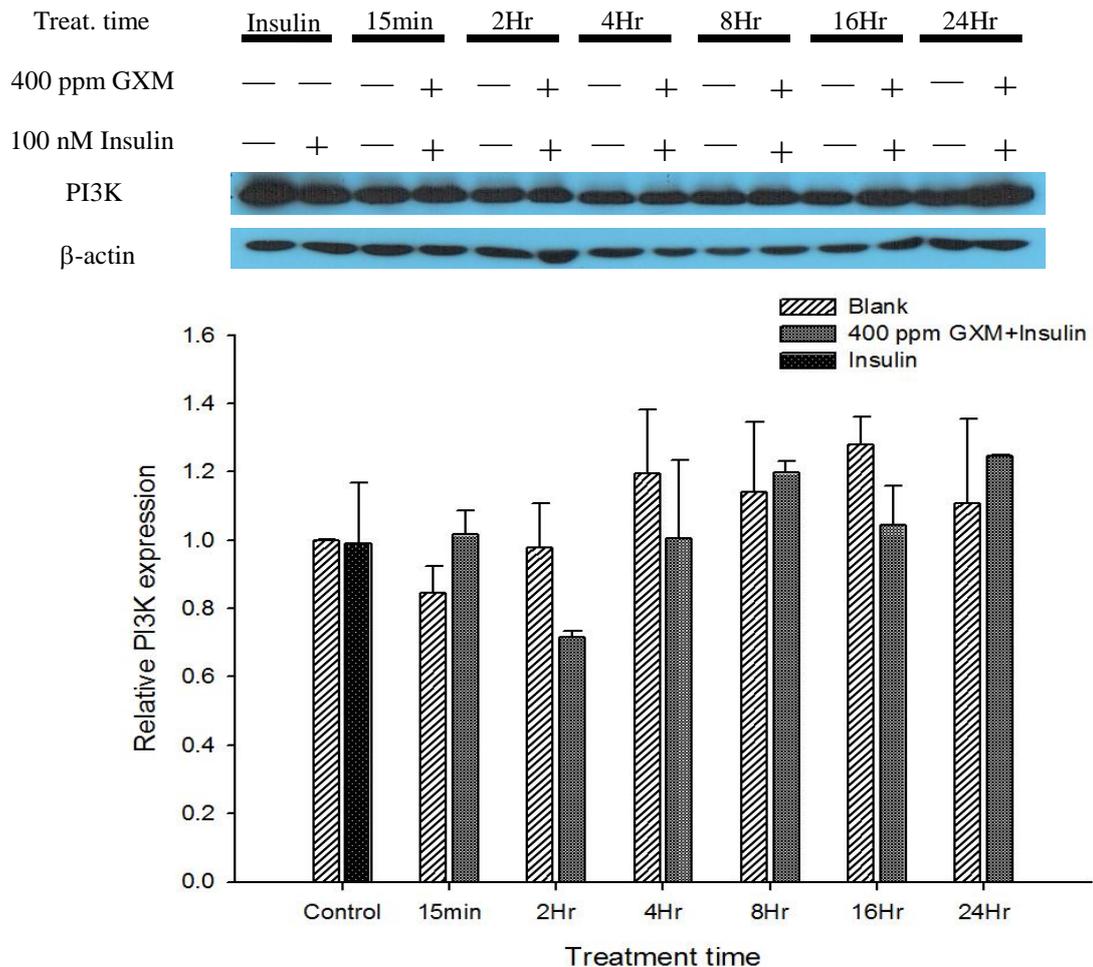
由圖三十七顯示，正常細胞添加 400 ppm GXM 後，PI3K 蛋白質表現僅於 4Hr 與胰島素組相比顯著增為 1.23 倍，而其他時間有些微增加，但無顯著差異。正常細胞若添加 GXM 並以胰島素刺激，與控制組和胰島素組相比，除 2Hr 表現量下降外，餘皆發現 PI3K 蛋白質表現量上升，但亦無顯著差異(圖三十八)。

細胞誘導成阻抗後，PI3K 蛋白質表現量與正常細胞(Control-N 組)並無明顯差異(圖三十九)，於 15min 時可顯著增加 PI3K 表現量，與阻抗態控制組或阻抗態胰島素組相比，分別增加 1.36 與 1.35 倍，而在 24Hr 處理後，下降了 33% 與 34%。圖四十為阻抗細胞添加 GXM 及胰島素共同刺激之 PI3K 蛋白質表現量，與阻抗態控制組或阻抗態胰島素組相比，皆無顯著增加 PI3K 蛋白表現，反而 2Hr、16Hr 及 24Hr，三個時間點的 PI3K 表現量顯著下降 30~32%。



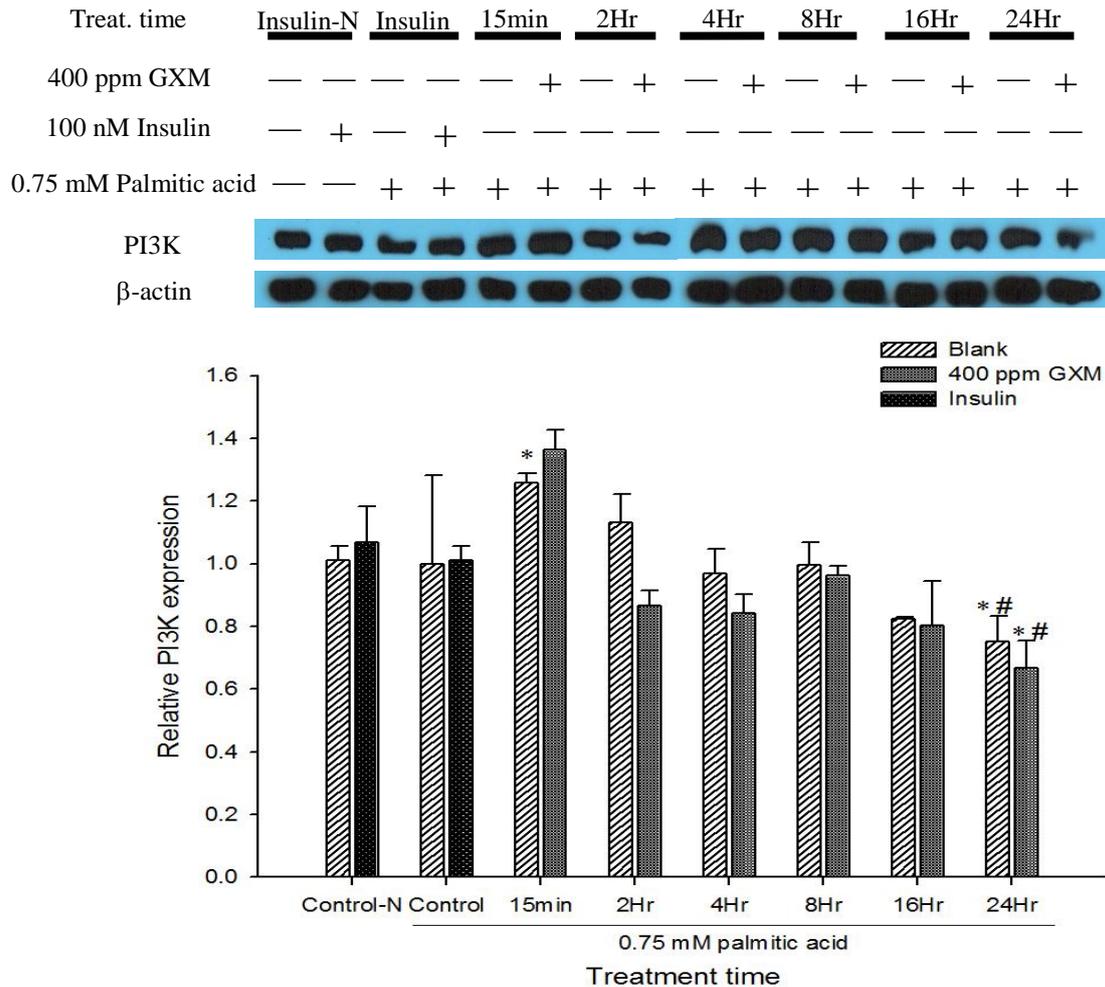
圖三十七、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 PI3K 蛋白質相對表現量。

細胞添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，胰島素組於收細胞前 15 分鐘添加 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 PI3K 的蛋白質相對表現量，並以  $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 PI3K 蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與胰島素組具顯著差異(p<0.05)。



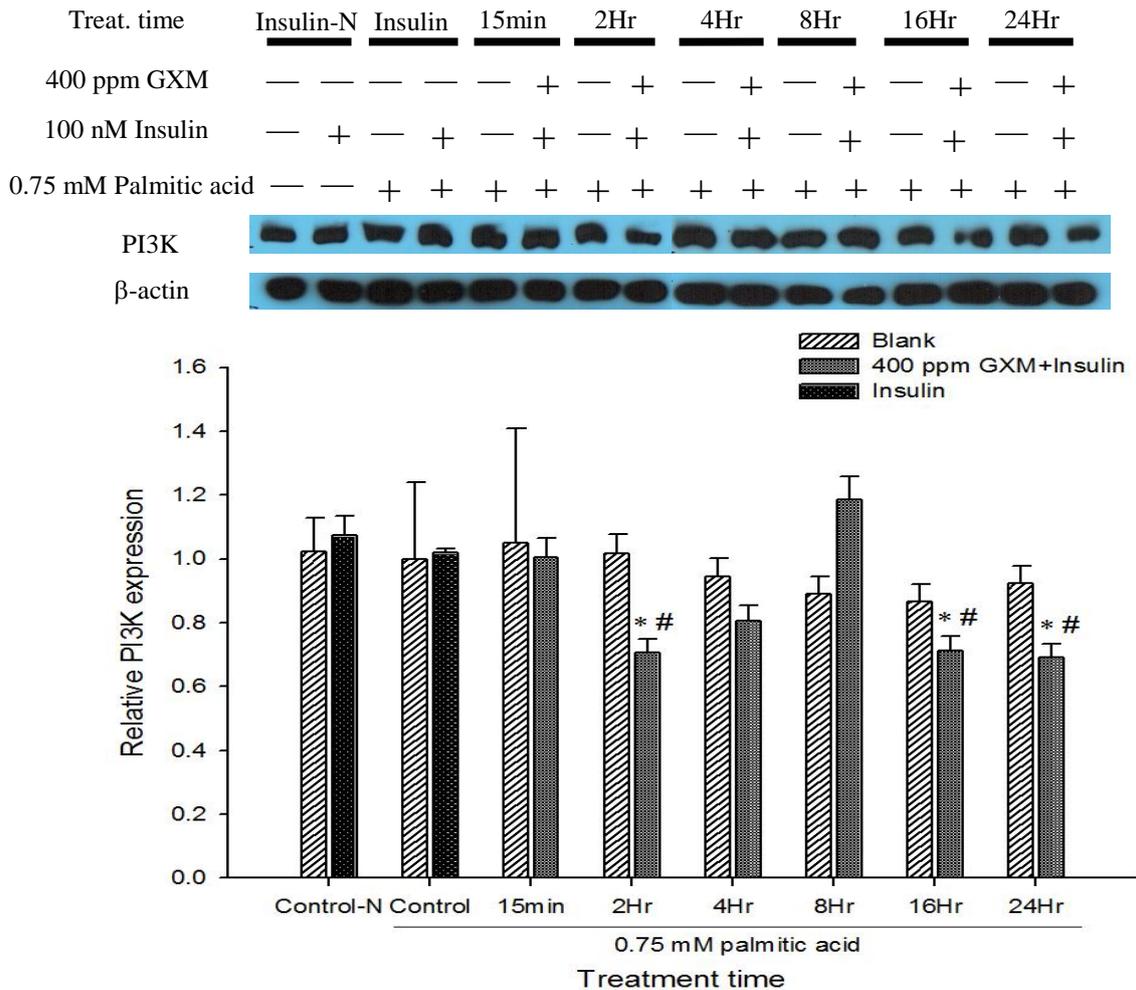
圖三十八、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 PI3K 蛋白質相對表現量。

細胞添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 PI3K 的蛋白質相對表現量，並以  $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 PI3K 蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與胰島素組具顯著差異(p<0.05)。



圖三十九、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 PI3K 蛋白質相對表現量。

細胞誘導成阻抗態後添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，胰島素組於收細胞前 15 分鐘添加 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 PI3K 的蛋白質相對表現量，並以 $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 PI3K 蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示，再調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與阻抗態控制組具顯著差異( $p < 0.05$ )。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異( $p < 0.05$ )。



圖四十、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 PI3K 蛋白質相對表現量。

細胞誘導成阻抗態後添加 400 ppm GXM 經不同共置時間，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 PI3K 蛋白質相對表現量，並以 $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 PI3K 蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示，並調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均取趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與阻抗態控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異(p<0.05)。

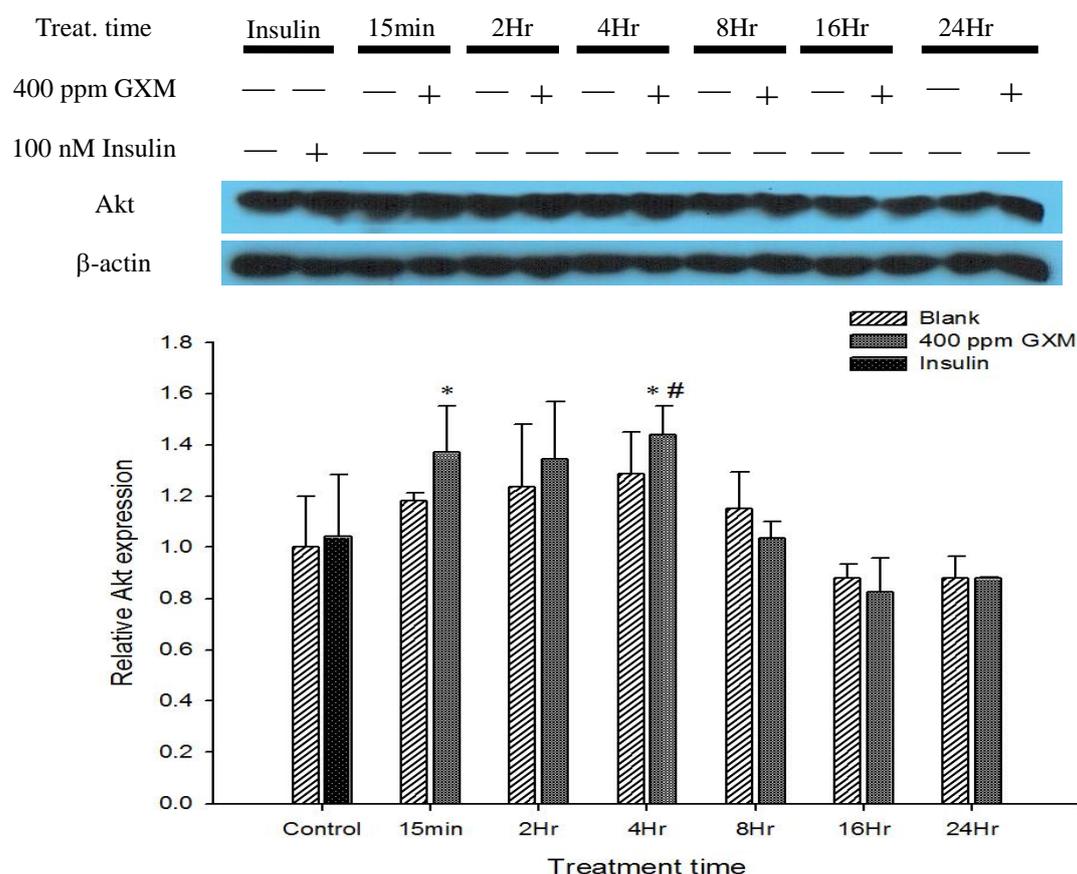
### 3-5-8 正常及阻抗態 C2C12 細胞之蛋白質激酶 B (PKB/Akt) 蛋白質相對表現量與其磷酸化程度

#### (1) Akt 蛋白質表現量

由圖四十一可得知，正常肌肉細胞 C2C12 加入 400 ppm GXM 經不同共置時間後，與控制組相比，在 15min 及 4Hr 時可顯著提升 Akt 蛋白質表現，分別增為 1.37 及 1.44 倍。與胰島素組相較，只有 4Hr 顯著增加 Akt 表現，增為 1.05 倍。

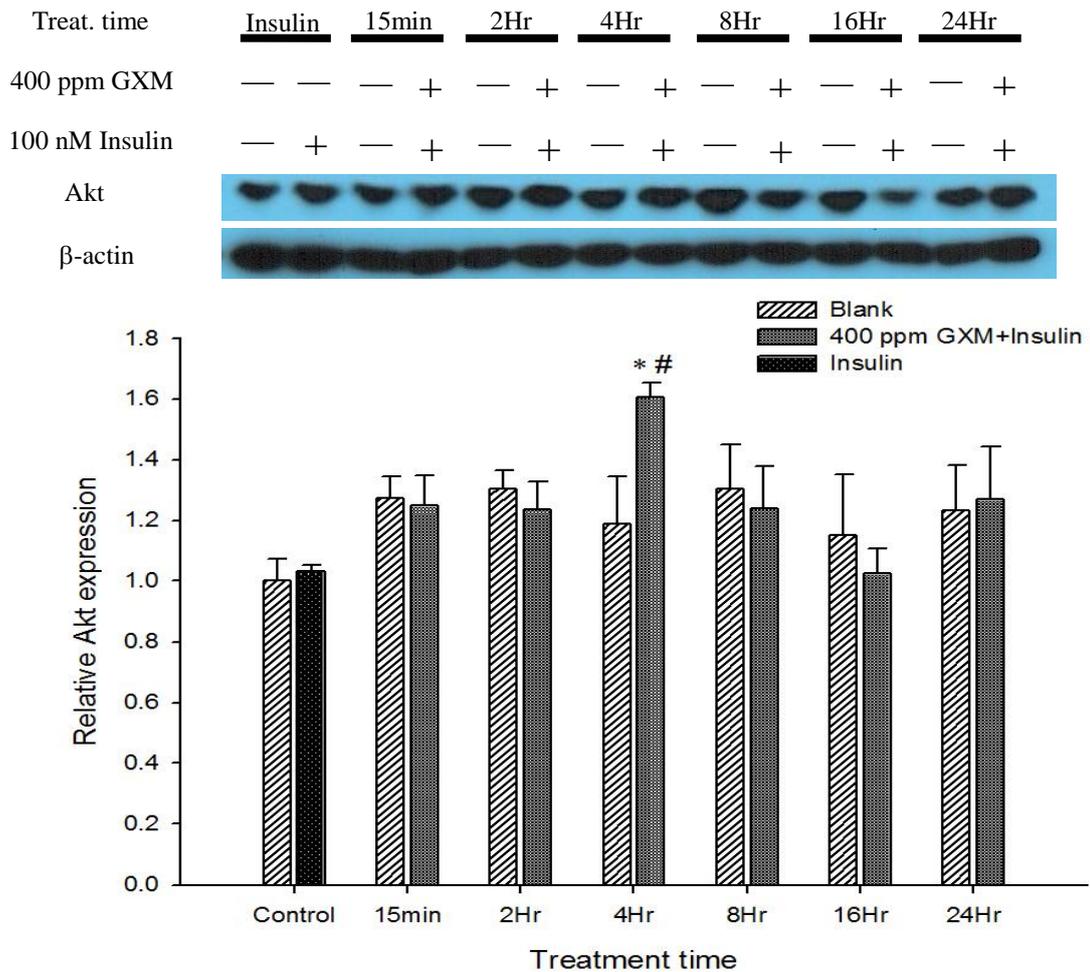
而後隨處理時間延長，Akt 蛋白質表現有下降趨向，但無顯著差異。400 ppm GXM 添加胰島素共同刺激(圖四十二)，皆可提高 Akt 蛋白表現，且於 4Hr 具顯著上升趨勢，與控制組或胰島素組相比，4Hr 其 Akt 表現量增為 1.61 及 1.56 倍。

將細胞誘導阻抗後，會些微降低 Akt 蛋白質表現，而不論是單一添加 400 ppm GXM (圖四十三)或是合併添加胰島素刺激(圖四十四)，對於 Akt 蛋白質的表現影響皆無顯著差異，但 GXM 合併添加胰島素刺激在不同時間點之 Akt 表現量變化較為平緩，單一添加 GXM 於不同時間點變化量較大。



圖四十一、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 Akt 蛋白質相對表現量。

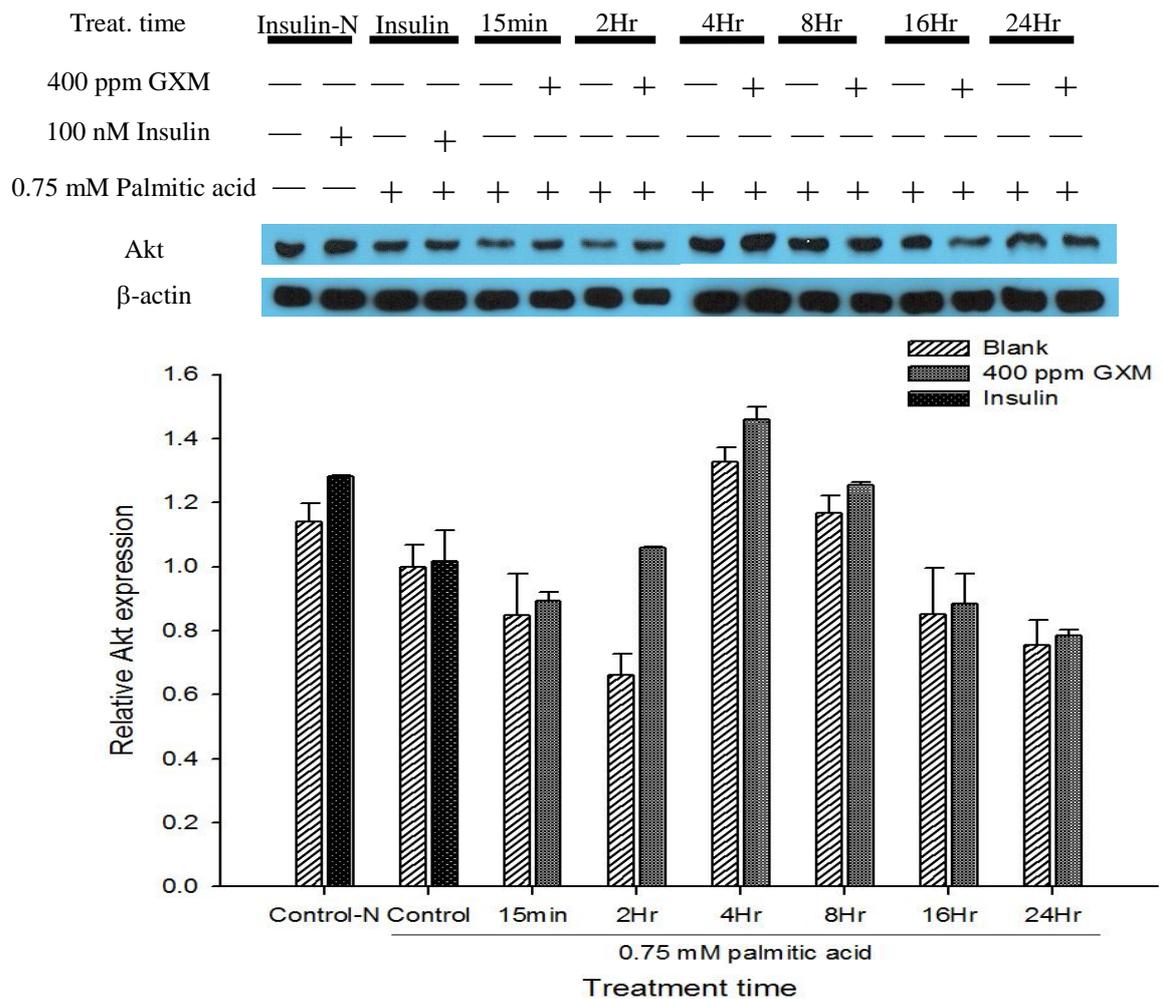
細胞添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 Akt 的蛋白質相對表現量，並以 $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 Akt 蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與胰島素組具顯著差異(p<0.05)。



圖四十二、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 Akt 蛋白質相對表現量。

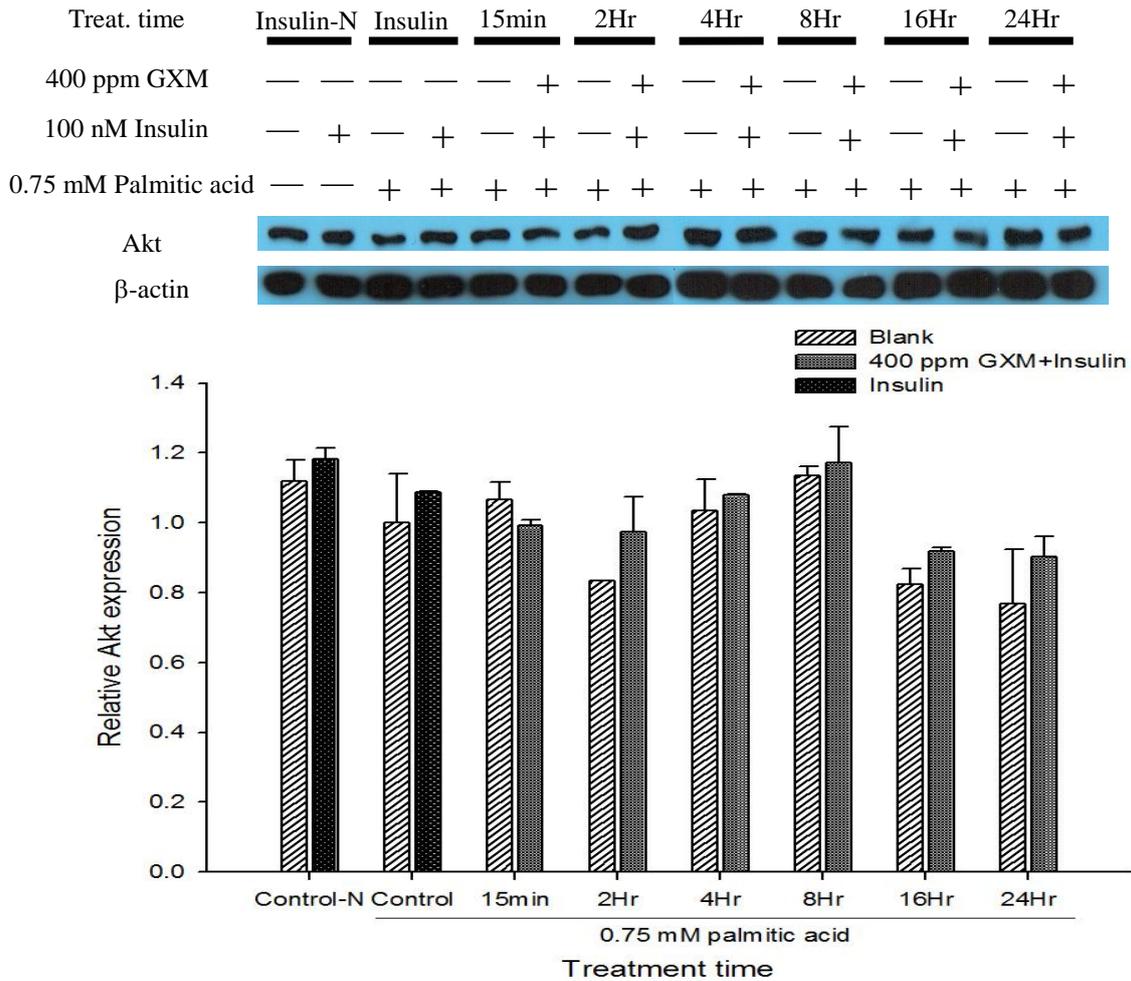
細胞添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 Akt 的蛋白質相對表現量，並以 $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 Akt 蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與控制組具顯著差異(p<0.05)。

#表示與胰島素組具顯著差異(p<0.05)。



圖四十三、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 Akt 蛋白質相對表現量。

細胞誘導成阻抗態後添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，胰島素組於收細胞前 15 分鐘添加 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 Akt 的蛋白質相對表現量，並以 $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 Akt 蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示，再調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與阻抗態控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異(p<0.05)。



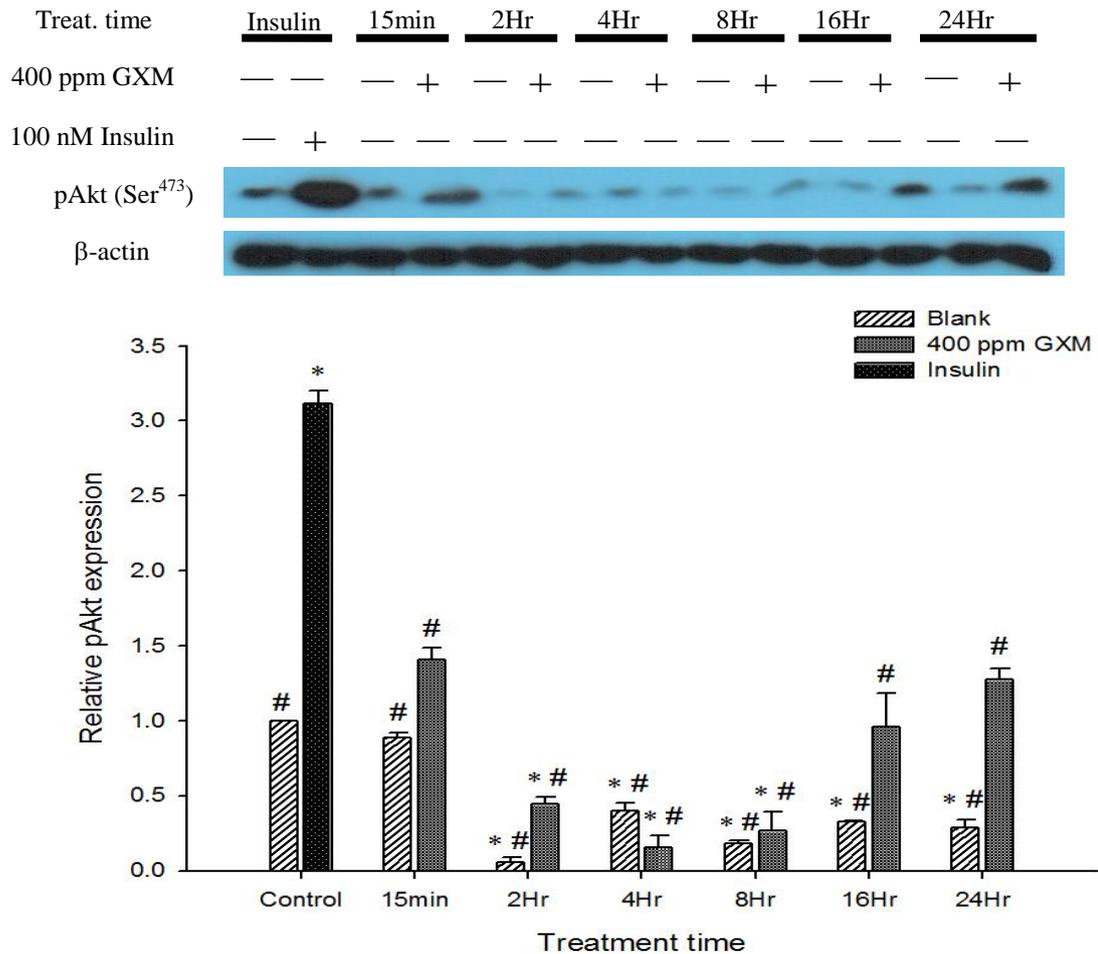
圖四十四、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 Akt 蛋白質相對表現量。

細胞誘導成阻抗態後添加 400 ppm GXM 經不同共置時間，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 Akt 蛋白質相對表現量，並以 $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 Akt 蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示，並調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均取趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與阻抗態控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異(p<0.05)。

## (2) Akt(Ser<sup>473</sup>)蛋白質磷酸化相對量

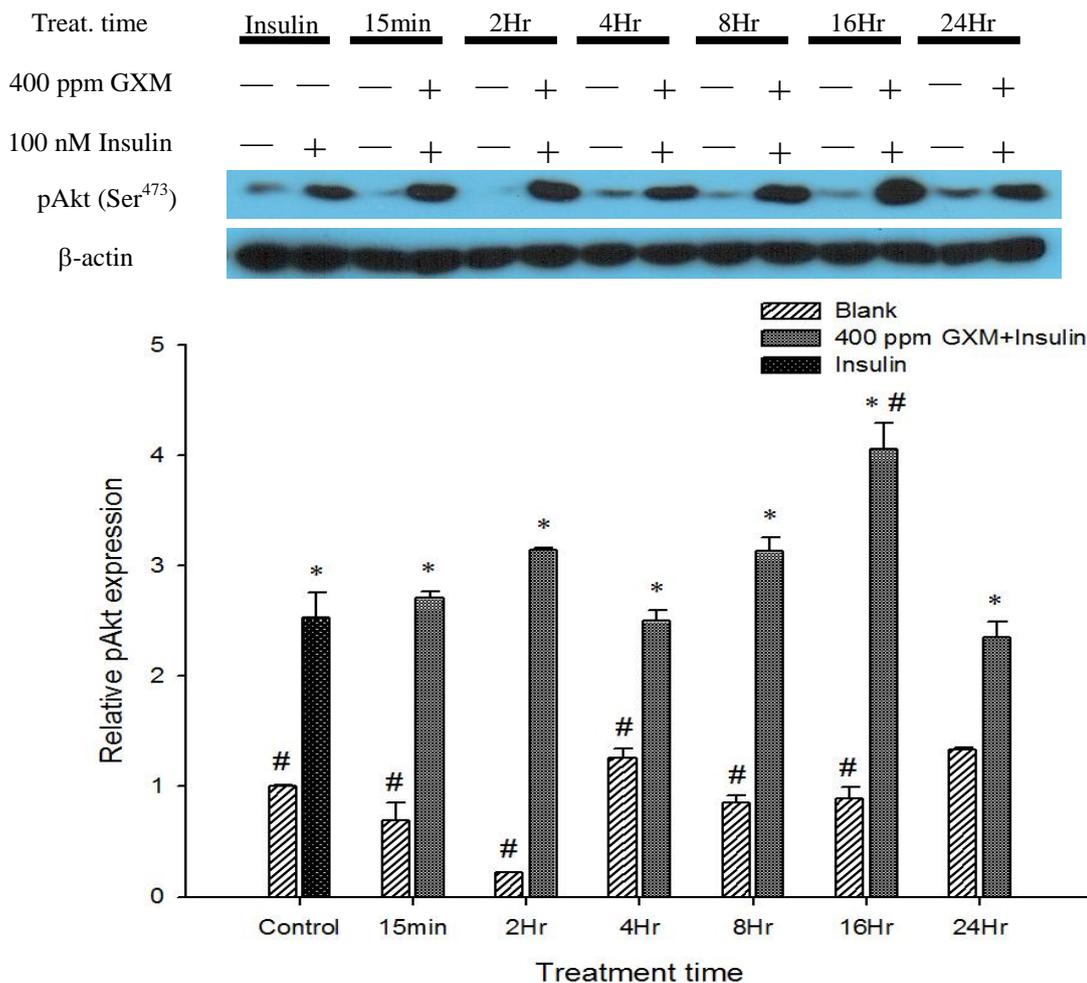
圖四十五為正常細胞添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 Akt 磷酸化結果，若無胰島素刺激，Akt 磷酸化會顯著降低，添加 GXM 於 15min、2Hr、8Hr、16Hr 及 24Hr 之 Akt 磷酸化皆顯著比各時間之空白控制組高，可得知 GXM 可促進正常細胞 Akt 磷酸化。而 GXM 合併添加胰島素刺激後(圖四十六)，Akt 磷酸化之程度較單純添加 GXM 組進一步大幅提昇。在各時間點之 Akt 磷酸化均較控制組及同時間之空白對照組顯著提升；若與胰島素剛添加時相較，亦有 16Hr 顯著將 Akt 磷酸化增為 1.6 倍。

將 C2C12 細胞利用棕櫚酸誘導胰島素抵抗後，發現會明顯抑制 Akt 磷酸化(抵抗態控制組)，如添加胰島素刺激，磷酸化也相對減少。添加 400 ppm GXM 於抵抗態細胞經不同處理時間後，並不能有效回復 Akt 磷酸化，且 4、8 與 16Hr 無偵測到磷酸化訊號(圖四十七)。若添加 GXM 與胰島素共同刺激(圖四十八)，於 15min、2Hr、4Hr 及 8Hr 則可提升 Akt 磷酸化，但無法使其回復到正常細胞狀態，與抵抗細胞胰島素組之 Akt 磷酸化程度差異不大，僅 4Hr 有顯著下降。而 16 與 24Hr 偵測不到磷酸化訊號。由圖四十五至圖四十八結果可知，正常肌肉細胞添加 GXM 合併胰島素刺激，對 Akt 磷酸化之增加具加成作用。



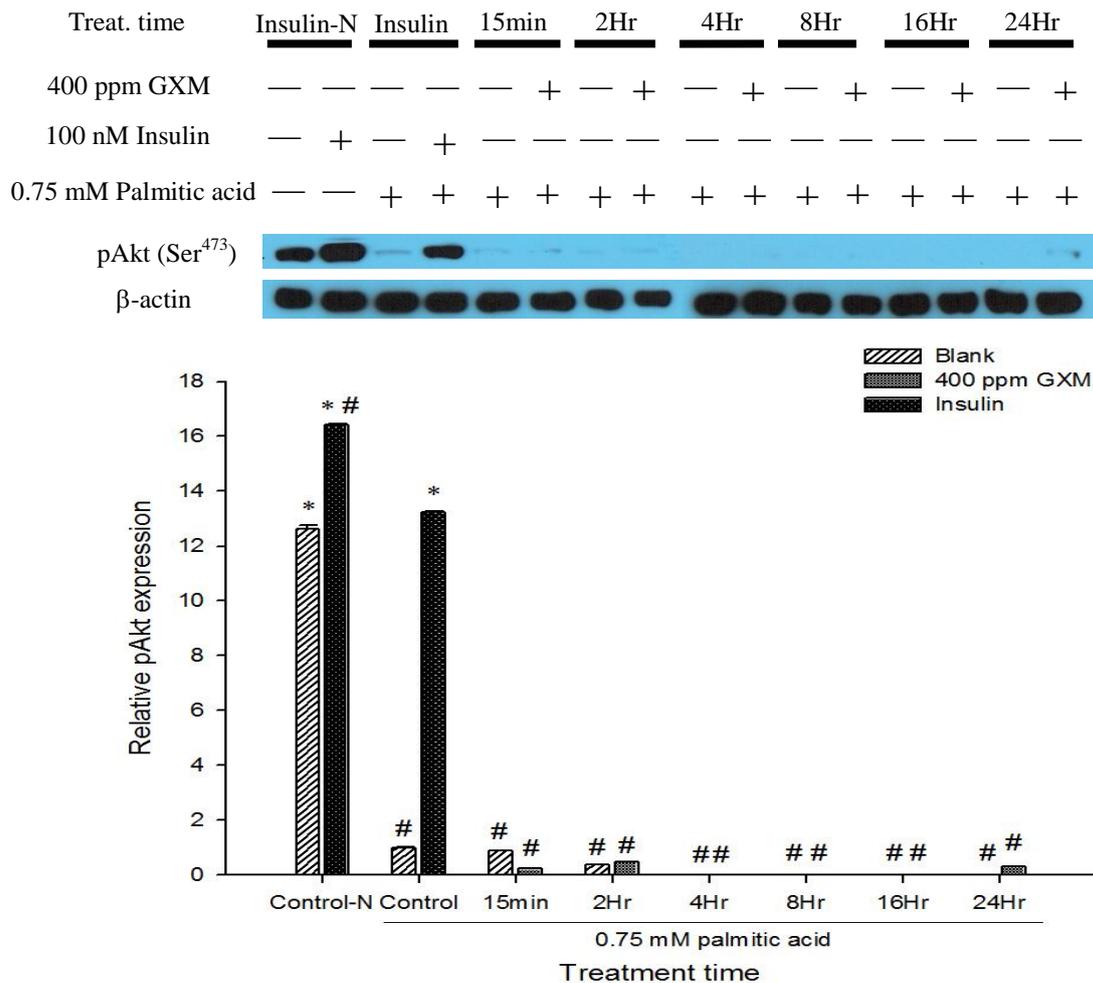
圖四十五、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 Akt (Ser<sup>473</sup>) 蛋白質磷酸化相對量。

細胞添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 pAkt (Ser<sup>473</sup>) 的蛋白質相對量，並以  $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 pAkt (Ser<sup>473</sup>) 蛋白質相對量於校正後，以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與控制組具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。#表示與胰島素組具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。



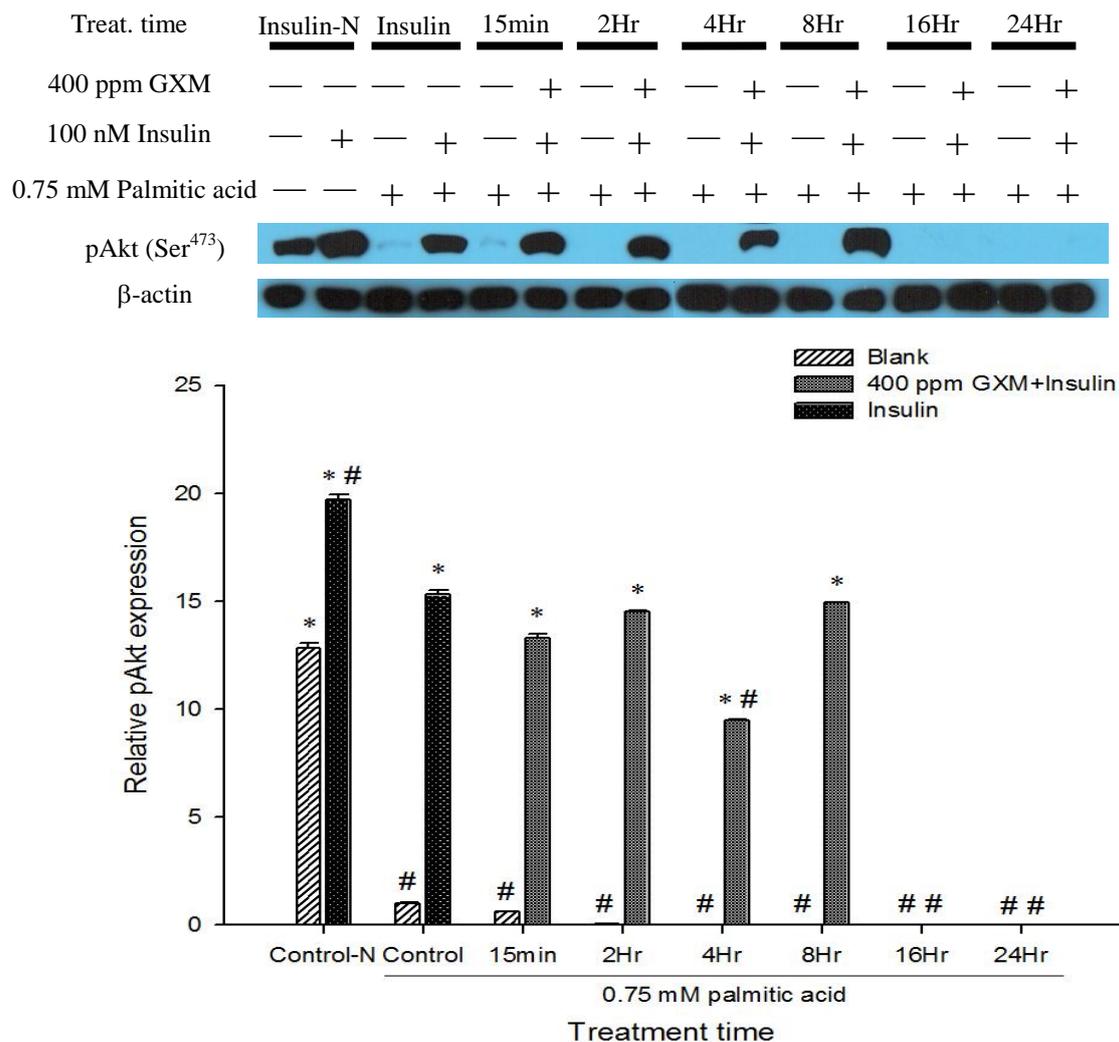
圖四十六、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 Akt (Ser<sup>473</sup>) 蛋白質磷酸化相對量。

細胞添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 Akt (Ser<sup>473</sup>) 蛋白質磷酸化相對表現量，並以  $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 Akt (Ser<sup>473</sup>) 蛋白質磷酸化相對表現量於校正後，以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與胰島素組具顯著差異(p<0.05)。



圖四十七、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 Akt (Ser<sup>473</sup>) 蛋白質磷酸化相對量。

細胞誘導成阻抗態後添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，胰島素組於收細胞前 15 分鐘添加 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 Akt (Ser<sup>473</sup>) 蛋白質磷酸化相對量，並以  $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 Akt (Ser<sup>473</sup>) 蛋白質磷酸化相對量於校正後，以相對表現量表示，再調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與阻抗態控制組具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。



圖四十八、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 Akt (Ser<sup>473</sup>) 蛋白質磷酸化相對量。

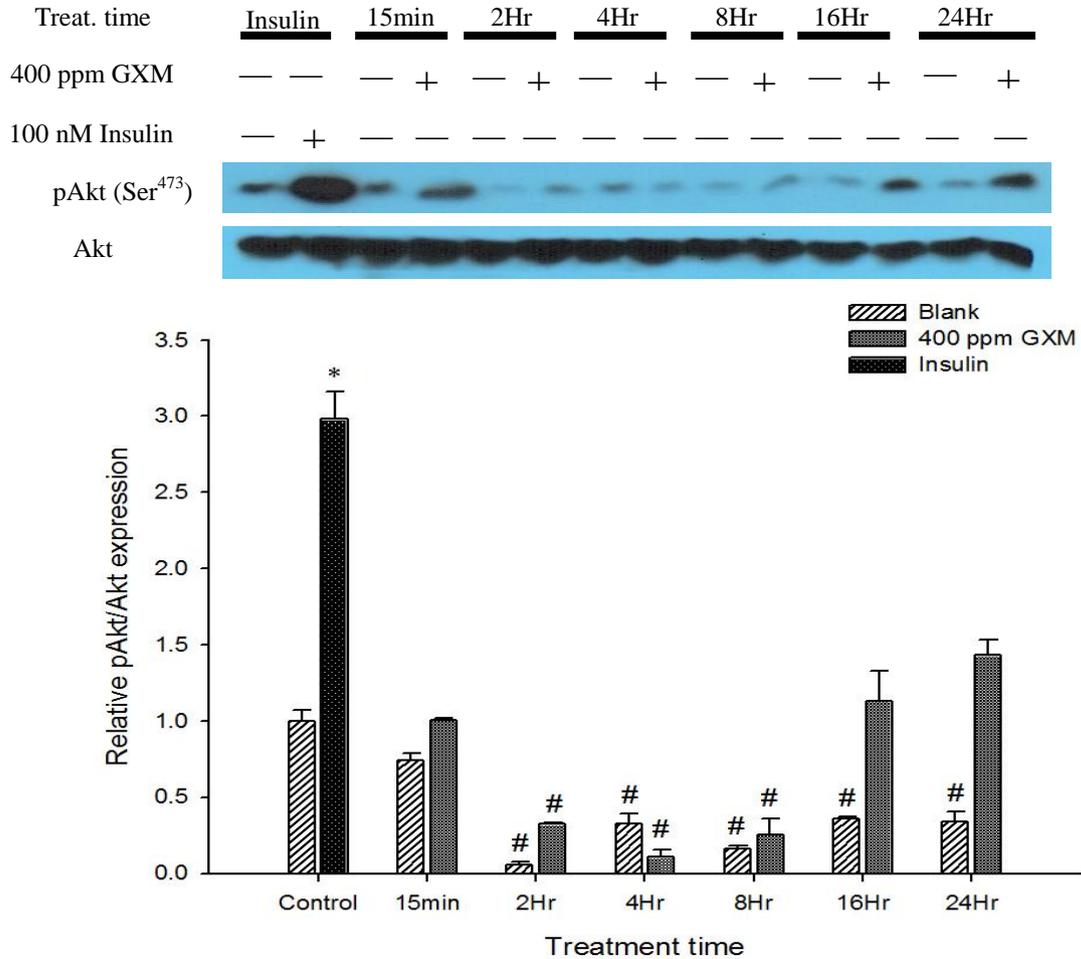
細胞誘導成阻抗態後添加 400 ppm GXM 經不同共置時間，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 Akt (Ser<sup>473</sup>) 蛋白質磷酸化相對量，並以  $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 Akt (Ser<sup>473</sup>) 蛋白質磷酸化相對量於校正後，以相對表現量表示，並調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均取趨勢相同之兩重複進行統計分析。\* 表示與阻抗態控制組具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。# 表示與阻抗態胰島素組具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

### (3) Akt 磷酸化程度

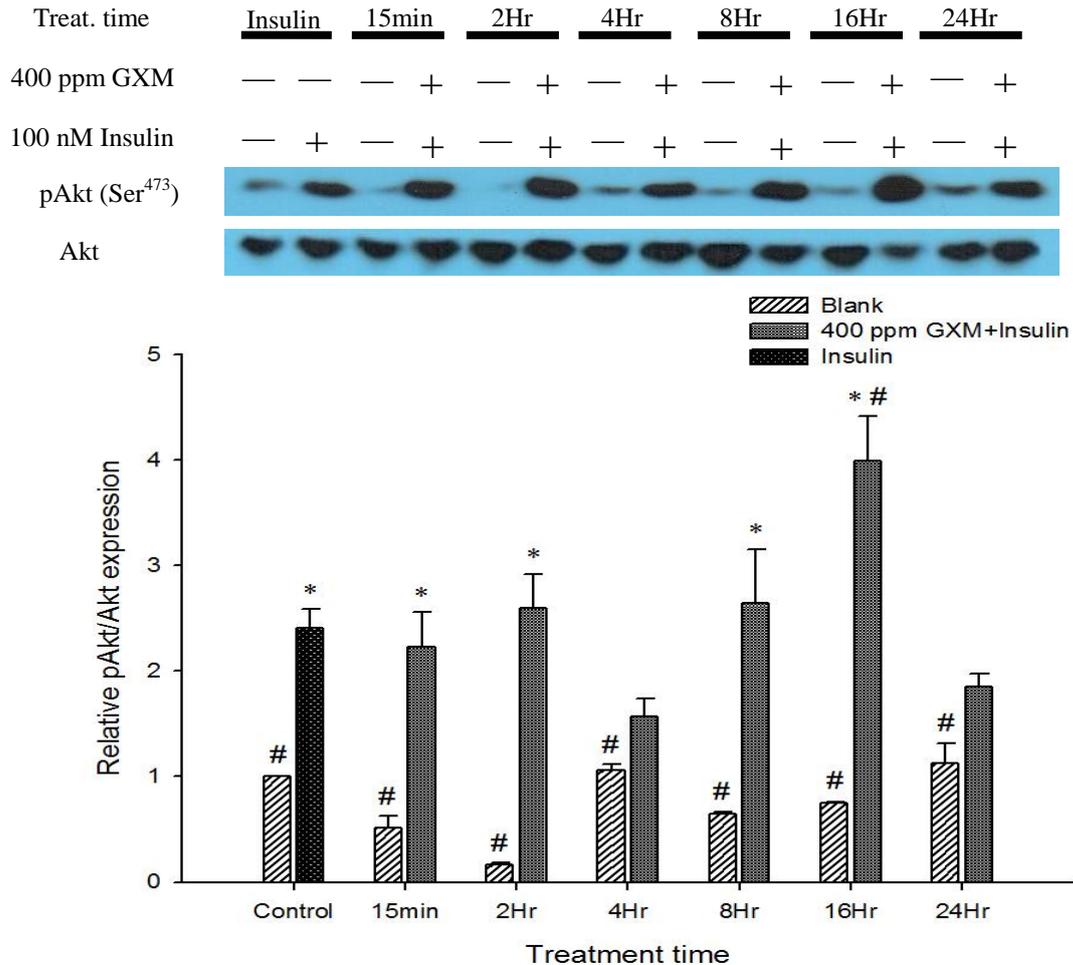
將上述(圖四十一至圖四十八) Akt 磷酸化與 Akt 蛋白質表現整理成 Akt 磷酸化程度 (pAkt/Akt)，由圖四十九可知，添加 GXM 並不會顯著提升 Akt 磷酸化程度。若合併添加胰島素刺激，則可提升磷酸化程度，且遠高於單一添加 GXM 之結果，而與控制組或胰島素組相比，16Hr 具顯著提高磷酸化程度，分別增為 3.99

及 1.79 倍(圖五十)。

由圖五十一可得知，阻抗細胞單獨加入 GXM 無法提高 Akt 磷酸化程度。而再添加胰島素刺激，可使磷酸化程度回復到正常態控制組水準(圖五十二)。

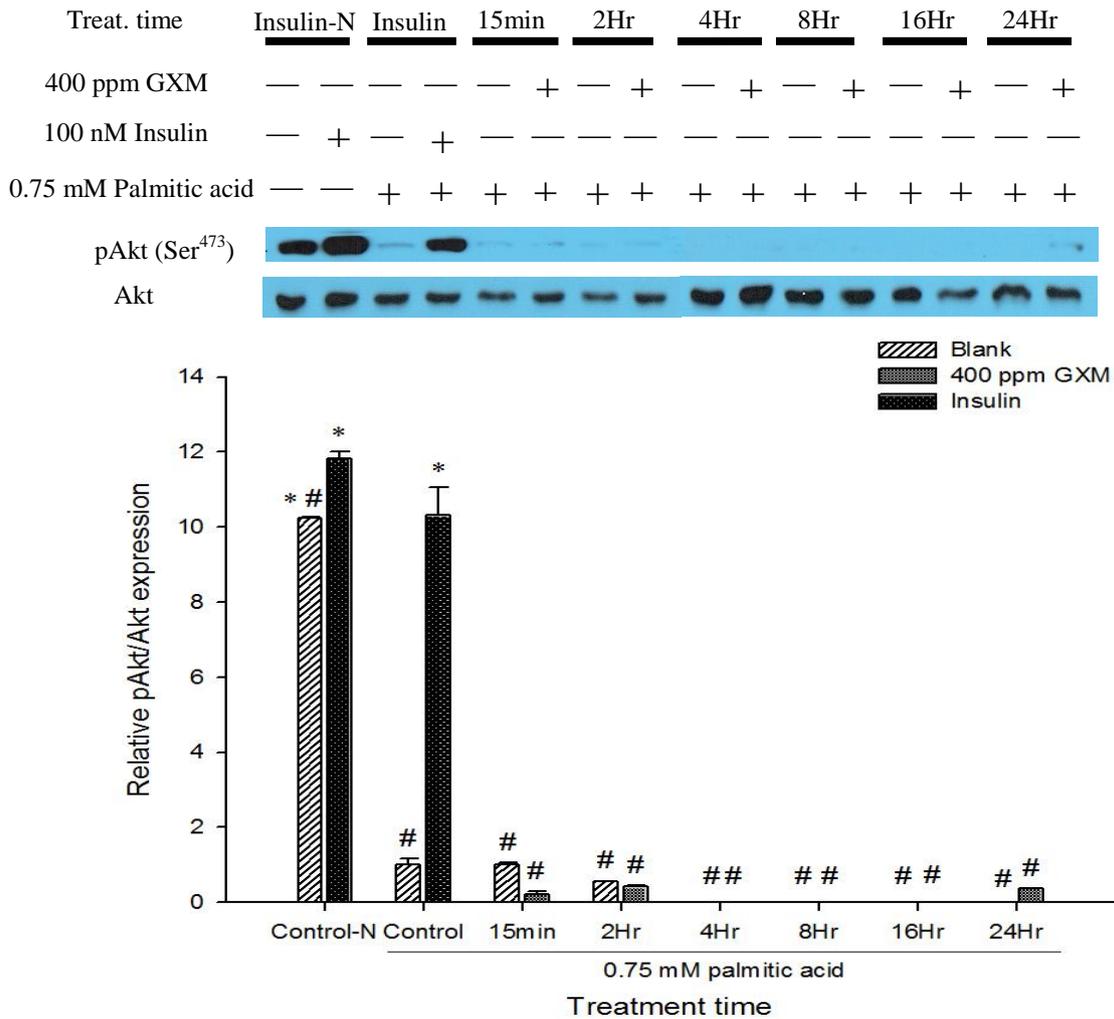


圖四十九、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 Akt 磷酸化程度。細胞添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 pAkt (Ser<sup>473</sup>) 的蛋白質相對於 Akt 表現量，並以  $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。將 pAkt (Ser<sup>473</sup>) 及 Akt 蛋白質表現量數據相除。各組之目標蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與胰島素組具顯著差異(p<0.05)。

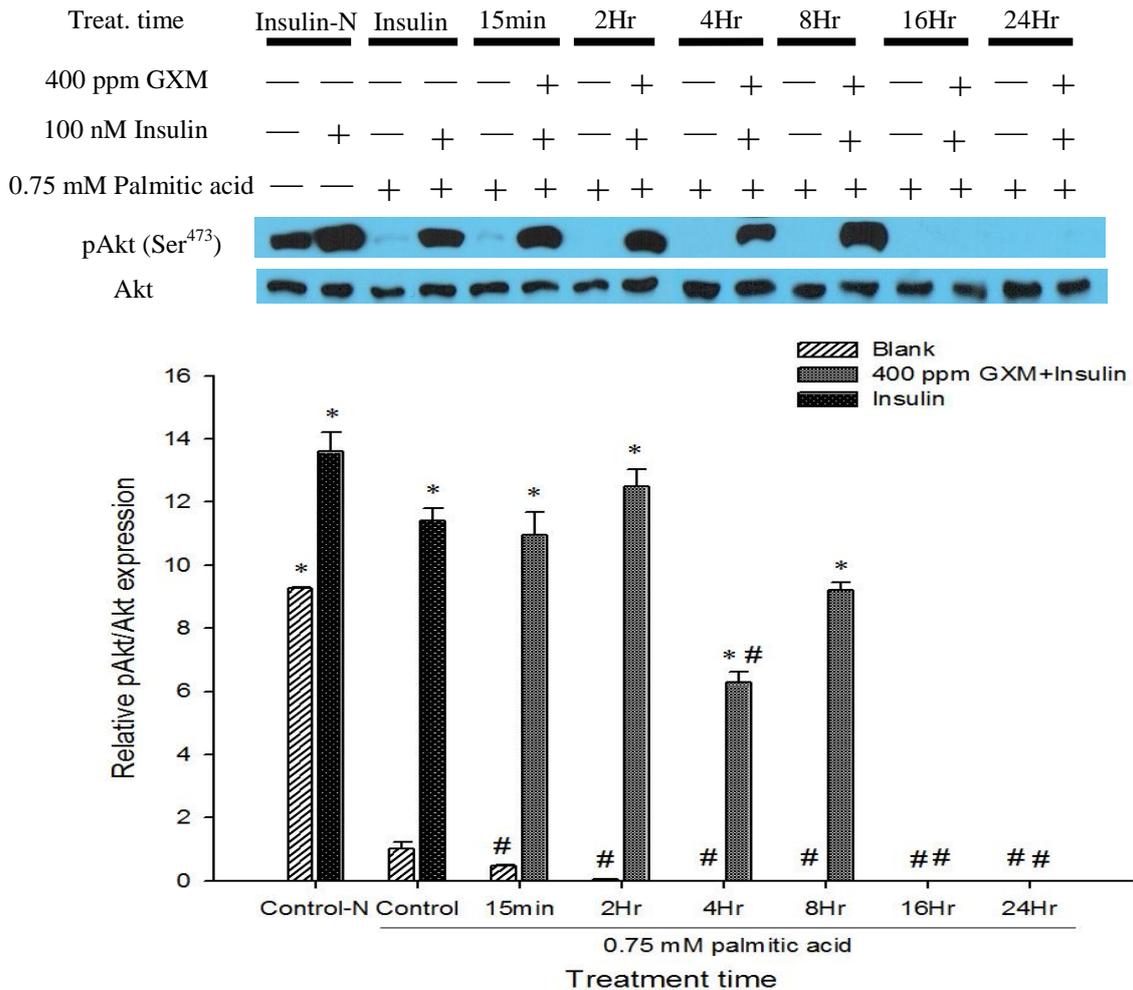


圖五十、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 Akt 磷酸化程度。

細胞添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 pAkt (Ser<sup>473</sup>) 的蛋白質相對於 Akt 表現量，並以  $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。將 pAkt (Ser<sup>473</sup>) 及 Akt 蛋白質表現量數據相除。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，再調整為控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與胰島素組具顯著差異(p<0.05)。



圖五十一、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 Akt 磷酸化程度。細胞誘導成阻抗態後添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，胰島素組於收細胞前 15 分鐘添加 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 pAkt (Ser<sup>473</sup>) 的蛋白質相對於 Akt 表現量，並以  $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。將 pAkt (Ser<sup>473</sup>) 及 Akt 蛋白質表現量數據相除。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，再調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與阻抗態控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異(p<0.05)。



圖五十二、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 Akt 磷酸化程度。

細胞誘導成阻抗態後添加 400 ppm GXM 經不同共置時間，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 pAkt (Ser<sup>473</sup>) 的蛋白質相對於 Akt 表現量，並以  $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。將 pAkt (Ser<sup>473</sup>) 及 Akt 蛋白質表現量數據相除。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，並調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均取趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與阻抗態控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異(p<0.05)。

### 3-5-9 正常及阻抗態 C2C12 細胞之腺苷單磷酸活化蛋白激酶(AMPK)蛋白質相

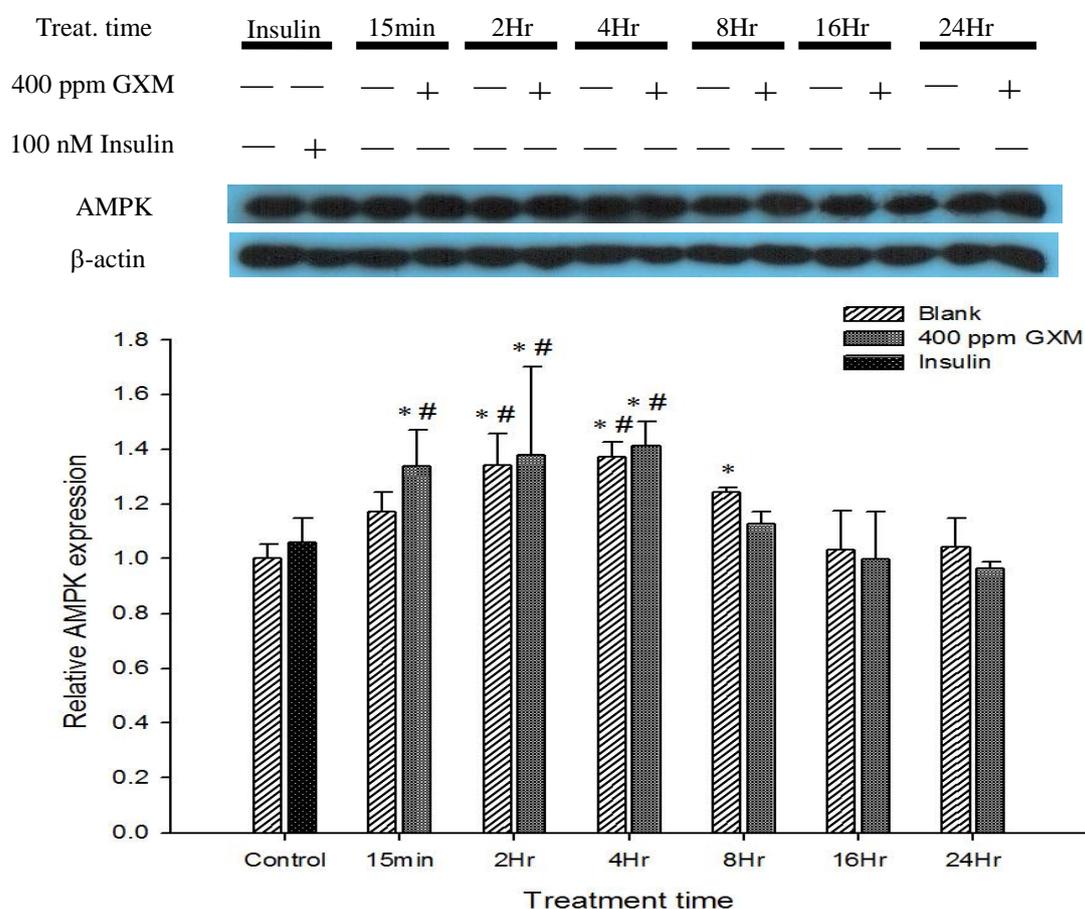
對表現量與其磷酸化程度

#### (1) AMPK 蛋白質表現量

正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 經不同處理時間之 AMPK 蛋白質表現量結果如圖五十三所示，在 15min、2Hr 及 4Hr 可顯著增加 AMPK 表現，與控制組

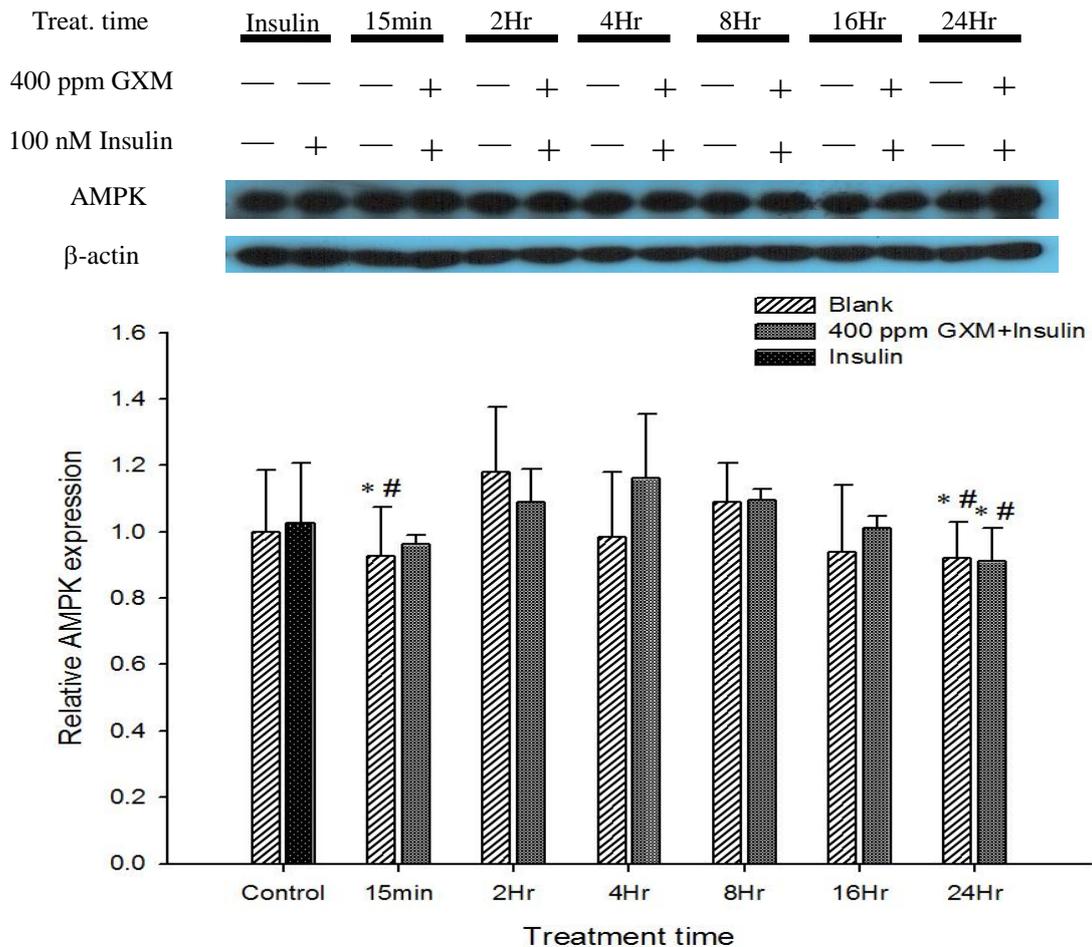
相比，15min 增為 1.34 倍，2Hr 增為 1.38 倍，4Hr 增為 1.41 倍。與胰島素組相較，則各增為 1.26、1.3 與 1.33 倍，其他時間則無顯著差異。若添加胰島素刺激，在 16Hr 內，AMPK 蛋白質表現量並無明顯改變，而 24Hr 之 AMPK 表現量則有顯著下降之趨勢(圖五十四)。

將細胞誘導阻抗後，AMPK 並無受到影響，其表現量與正常組相比無顯著差異，而添加 GXM 後，在 24Hr 時與阻抗態胰島素組相比下降了 43%(圖五十五)。而添加胰島素刺激處理亦是相同情況，於 24Hr 也有顯著下降趨勢，但在 4Hr 時與阻抗態控制組相較，AMPK 蛋白質表現增為 1.3 倍(圖五十六)。



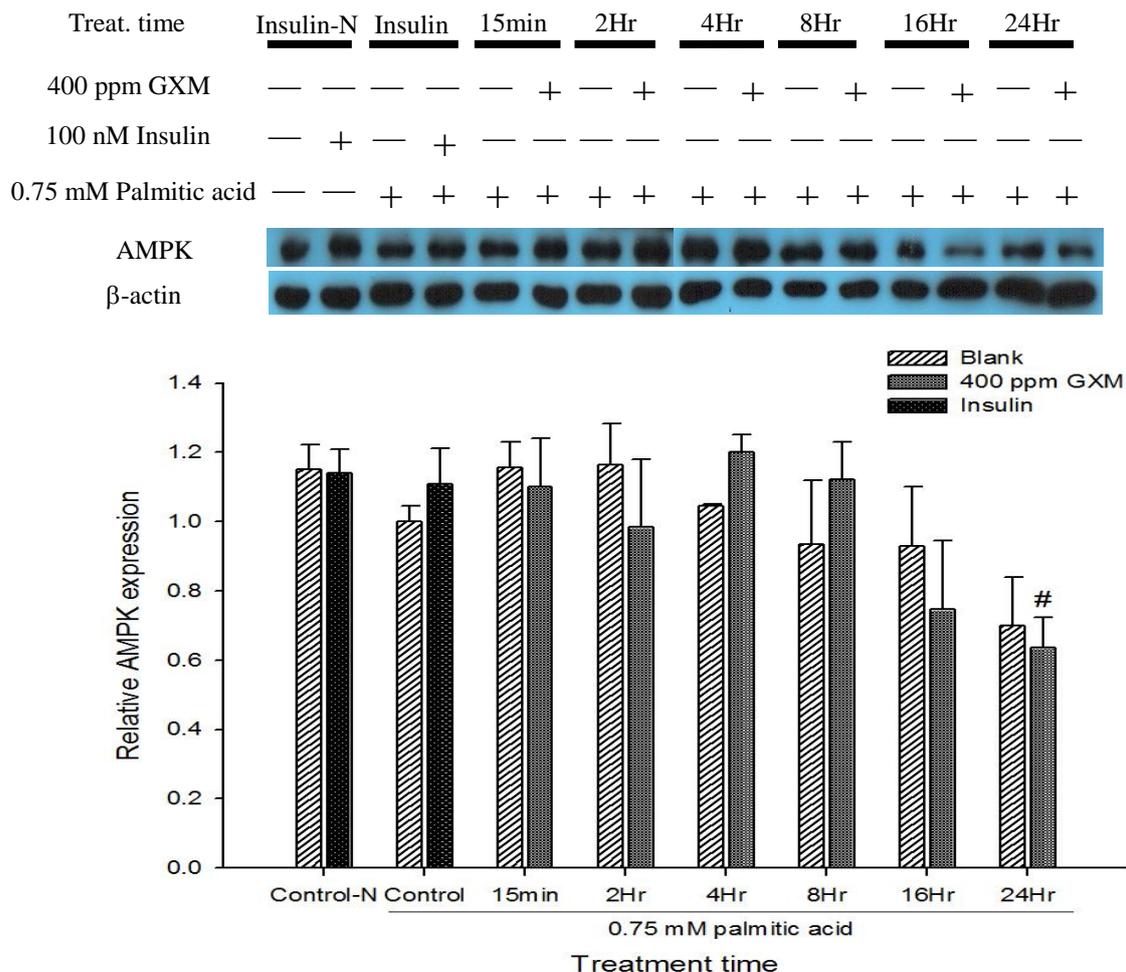
圖五十三、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 AMPK 蛋白質相對表現量。

細胞添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 AMPK 的蛋白質相對表現量，並以 $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 AMPK 蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與控制組具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。#表示與胰島素組具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。



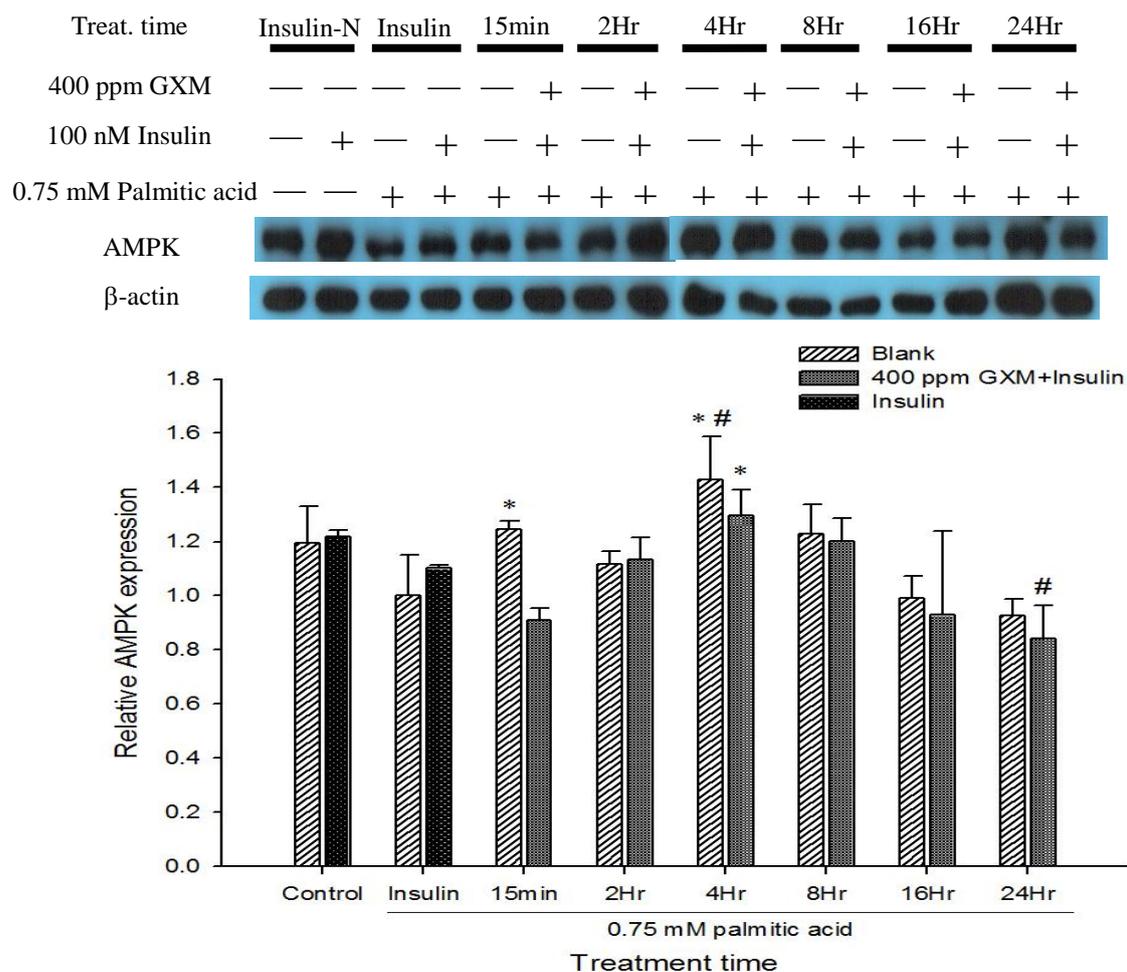
圖五十四、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 AMPK 蛋白質相對表現量。

細胞添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 AMPK 的蛋白質相對表現量，並以 $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 AMPK 蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與控制組具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。#表示與胰島素組具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。



圖五十五、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 AMPK 蛋白質相對表現量。

細胞誘導成阻抗態後添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，胰島素組於收細胞前 15 分鐘添加 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 AMPK 的蛋白質相對表現量，並以 $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 AMPK 蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示，再調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與阻抗態控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異(p<0.05)。



圖五十六、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 AMPK 蛋白質相對表現量。

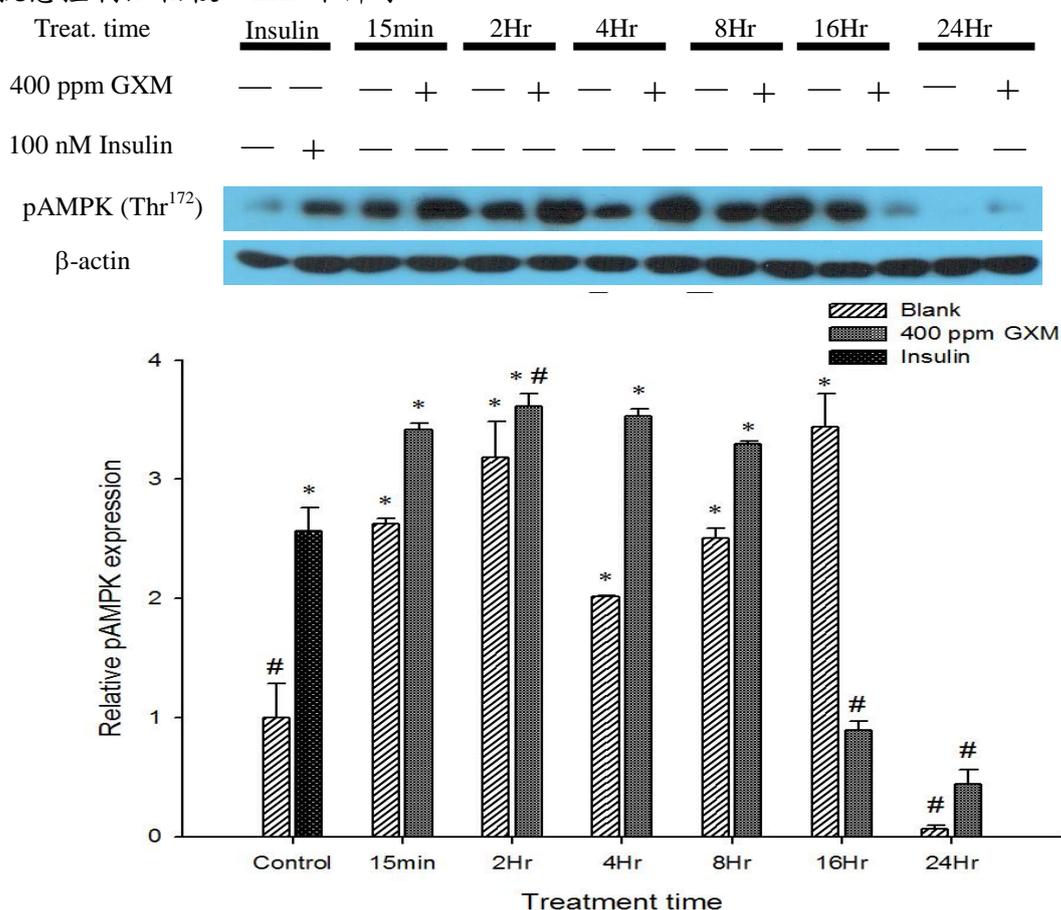
細胞誘導成阻抗態後添加 400 ppm GXM 經不同共置時間，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 AMPK 蛋白質相對表現量，並以 $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 AMPK 蛋白質相對表現量於校正後，以相對表現量表示，並調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均取趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與阻抗態控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異(p<0.05)。

## (2) AMPK(Thr<sup>172</sup>)蛋白質磷酸化相對量

由圖五十七所示，正常態細胞添加 GXM 後，在 15min、2Hr、4Hr 及 8Hr 皆可顯著提升 AMPK 磷酸化，與控制組相比，分別增加 2.41、2.61、2.53 及 2.3 倍。與胰島素相較，2Hr 磷酸化顯著增為 1.38 倍，但 16Hr 與 24Hr 則明顯下降了 65% 與 83%。而加入胰島素共同刺激之結果與其相似(圖五十八)，在 15min、2Hr、4Hr 及 8Hr 皆明顯增加 AMPK 磷酸化，與控制組相較，各別增加 3.21、2.41、

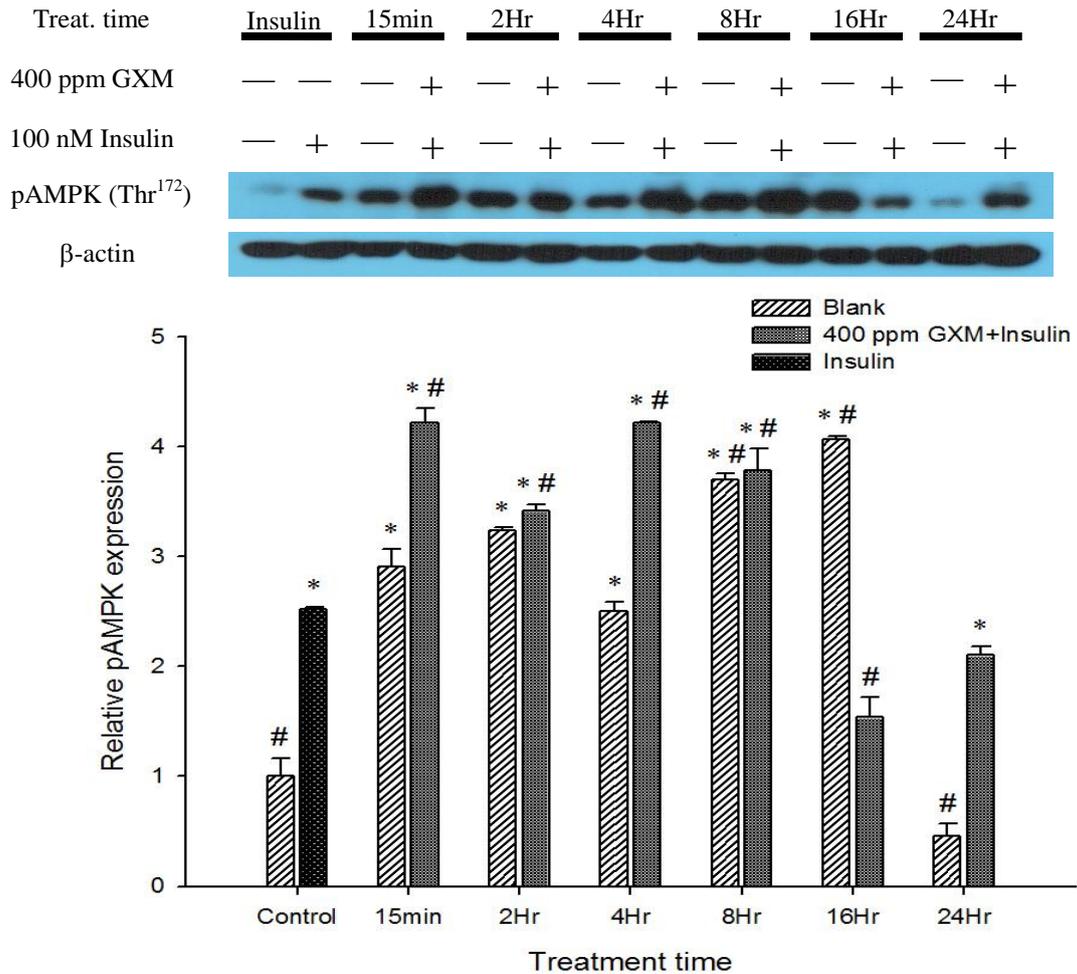
3.22 及 2.78 倍。於胰島素組相比，則分別增為 1.67、1.35、1.67 及 1.5 倍。而 16Hr 與 24Hr 的 AMPK 磷酸化亦是降低，但磷酸化程度高於控制組。

由圖五十九可知，細胞誘導成胰島素抵抗後，AMPK 磷酸化也會受到影響，但無顯著差異。15min、2Hr、8Hr 及 16Hr 的磷酸化雖有變化但無顯著，而 4Hr 與阻抗態控制組相比，AMPK 磷酸化有顯著增加的趨勢，增為 2.25 倍。24Hr 與阻抗態胰島素組比則具顯著下降 80%。圖六十為 GXM 合併添加胰島素刺激之結果，除 2Hr、4Hr 與 16Hr 有明顯變化外，其他時間點無顯著差異。與阻抗態控制組相比，4Hr 及 16Hr 明顯增加 AMPK 磷酸化，分別增為 2.09 與 2.4 倍。與阻抗態控制組相較，2Hr 下降了 60%。



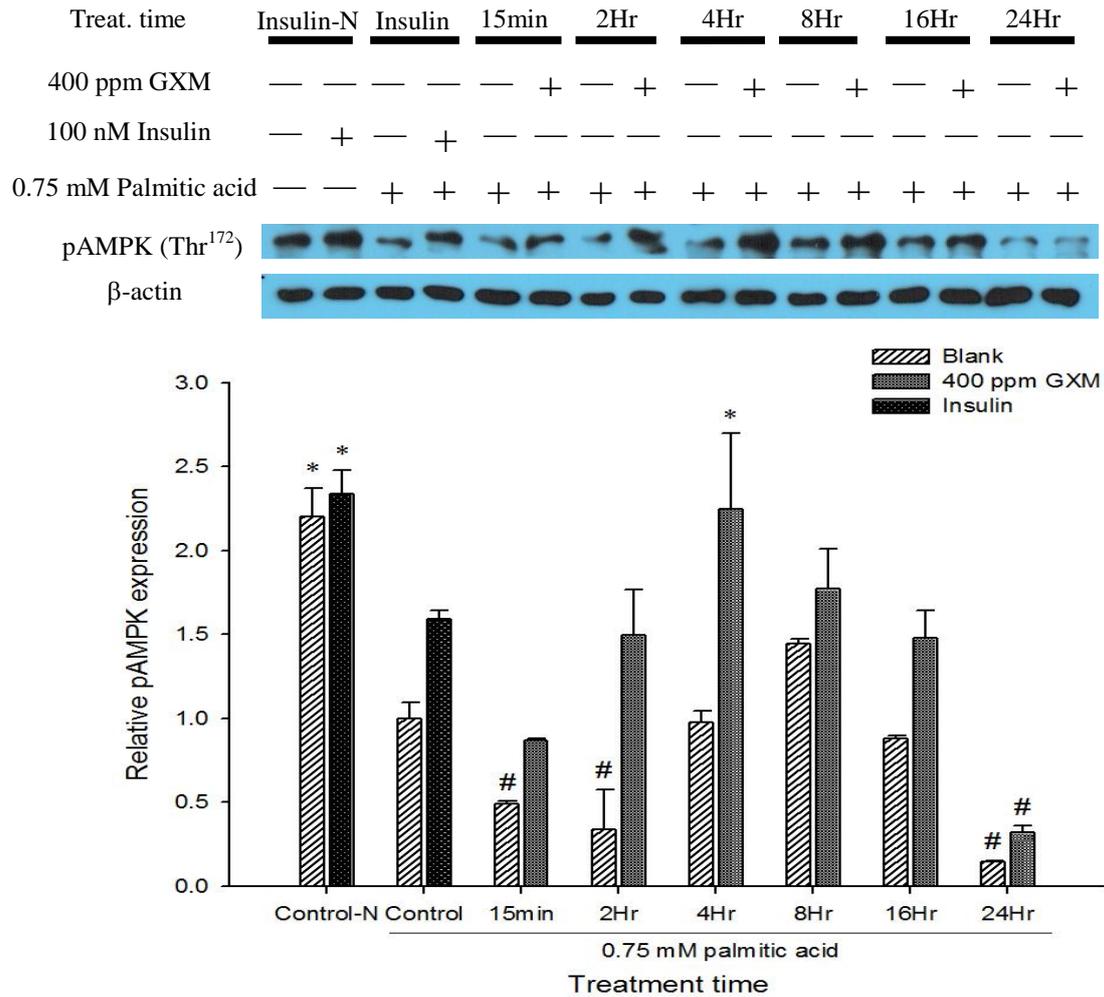
圖五十七、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 AMPK (Thr<sup>172</sup>) 蛋白質磷酸化相對量。

細胞添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 AMPK (Thr<sup>172</sup>) 蛋白質磷酸化相對量，並以  $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 AMPK (Thr<sup>172</sup>) 蛋白質磷酸化相對量於校正後，以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與控制組具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。#表示與胰島素組具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。



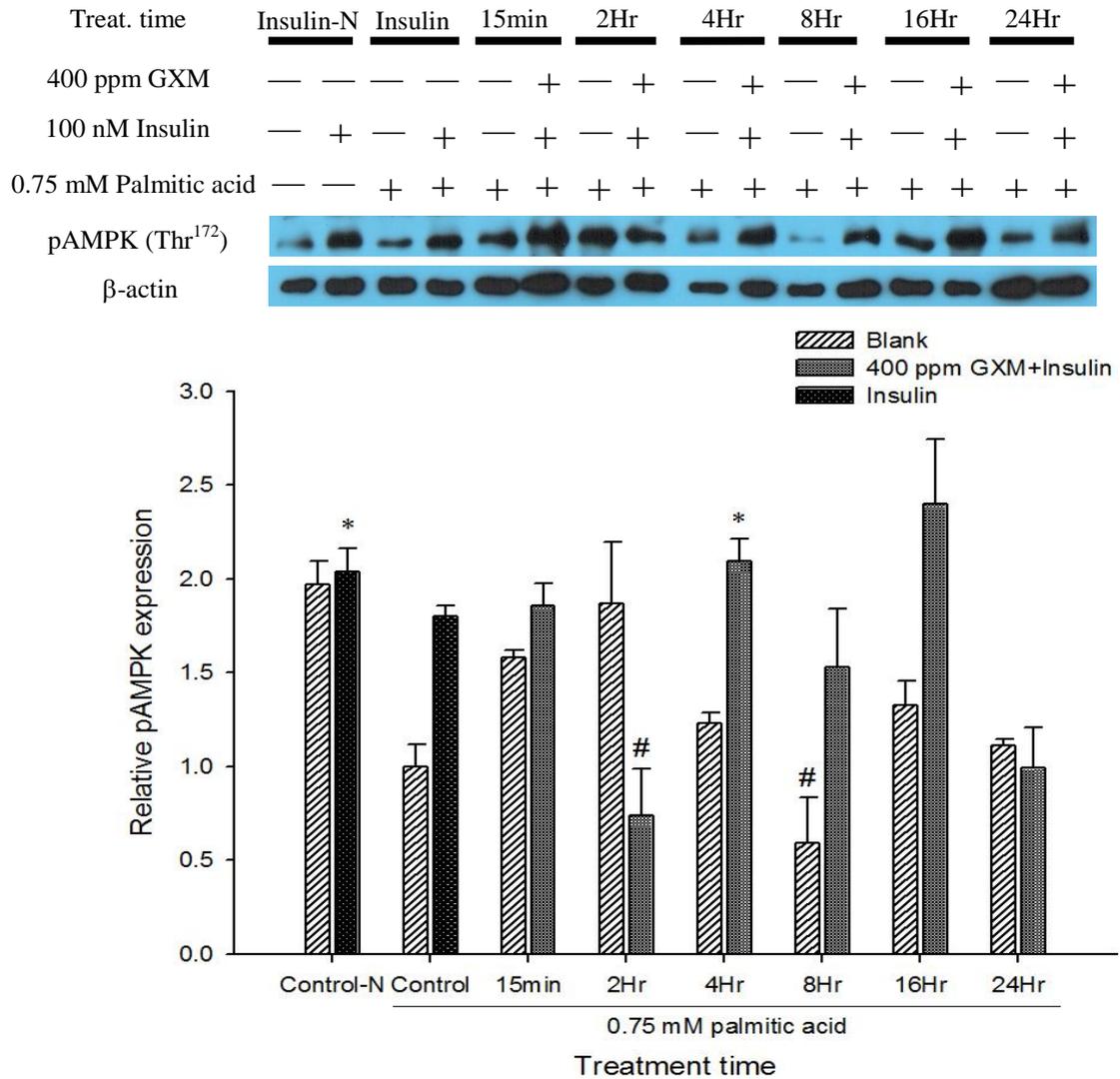
圖五十八、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 AMPK (Thr<sup>172</sup>) 蛋白質磷酸化相對量。

細胞添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 AMPK (Thr<sup>172</sup>) 蛋白質磷酸化相對量，並以  $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 AMPK (Thr<sup>172</sup>) 蛋白質磷酸化相對量於校正後，以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與胰島素組具顯著差異(p<0.05)。



圖五十九、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 AMPK (Thr<sup>172</sup>) 蛋白質磷酸化相對量。

細胞誘導成阻抗態後添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，胰島素組於收細胞前 15 分鐘添加 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 AMPK (Thr<sup>172</sup>) 蛋白質磷酸化相對量，並以  $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 AMPK (Thr<sup>172</sup>) 蛋白質磷酸化相對量於校正後，以相對表現量表示，再調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。  
\*表示與阻抗態控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異(p<0.05)。



圖六十、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 AMPK (Thr<sup>172</sup>) 蛋白質磷酸化相對量。

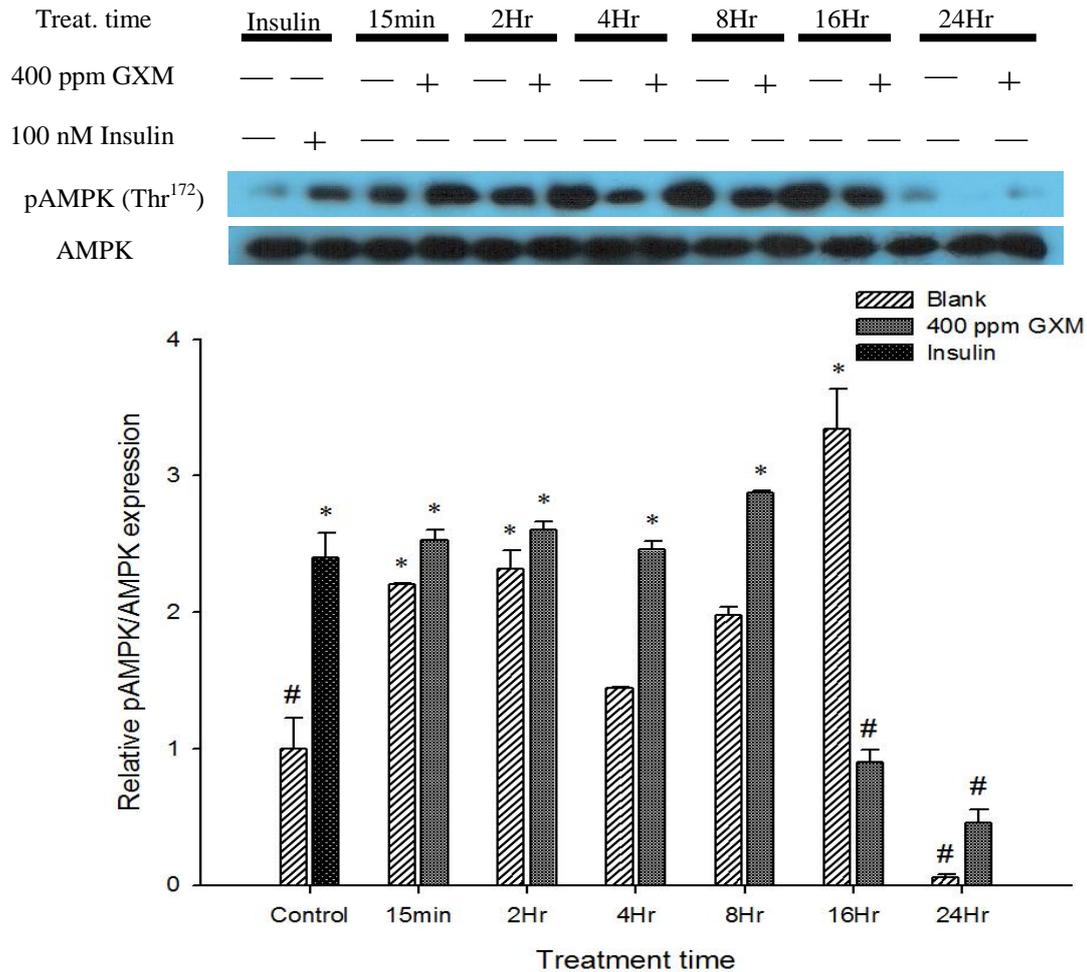
細胞誘導成阻抗態後添加 400 ppm GXM 經不同共置時間，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 AMPK (Thr<sup>172</sup>) 蛋白質磷酸化相對量，並以  $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。各組之 AMPK (Thr<sup>172</sup>) 蛋白質磷酸化相對量於校正後，以相對表現量表示，並調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均取趨勢相同之兩重複進行統計分析。  
\*表示與阻抗態控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異(p<0.05)。

### (3) AMPK 磷酸化程度

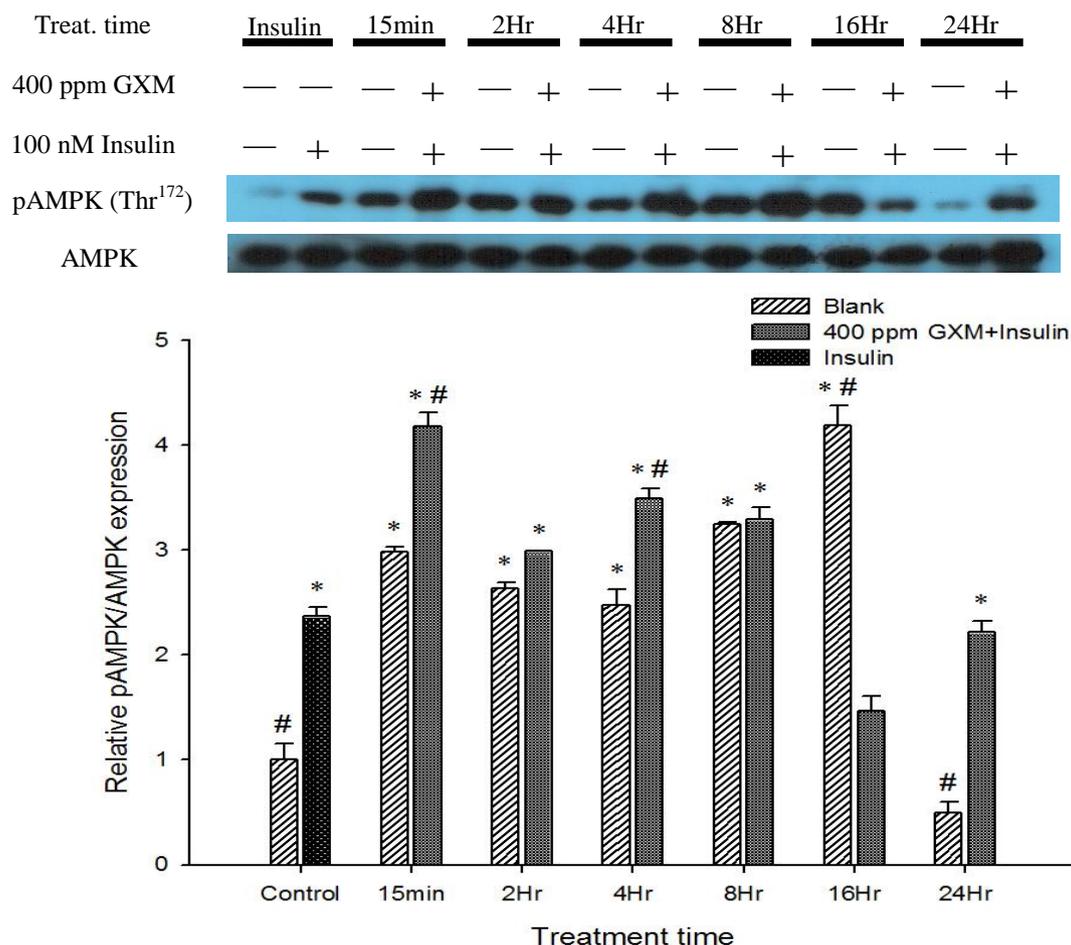
將圖五十三至圖六十之 AMPK 蛋白質表現與 AMPK 磷酸化整理成 AMPK 磷酸化程度(pAMPK/AMPK)。由圖六十一得知，正常態細胞加 GXM 後於 15min、2Hr、4Hr 及 8Hr 皆可顯著提升 AMPK 磷酸化程度，而 16Hr 與 24Hr 則有明顯下

降趨勢。由圖六十二所示，若合併添加胰島素刺激，則 15min、2Hr、4Hr、8Hr 及 24Hr 皆可增加 AMPK 磷酸化程度，16Hr 雖會減少磷酸化程度但無顯著差異。

圖六十三與圖六十四分別為阻抗態細胞添加 400 ppm GXM 與 GXM 合併胰島素刺激之 AMPK 磷酸化程度，兩種處理在不同時間皆會使 AMPK 磷酸化程度有所改變，但皆只有 16Hr 顯著增加 AMPK 磷酸化。

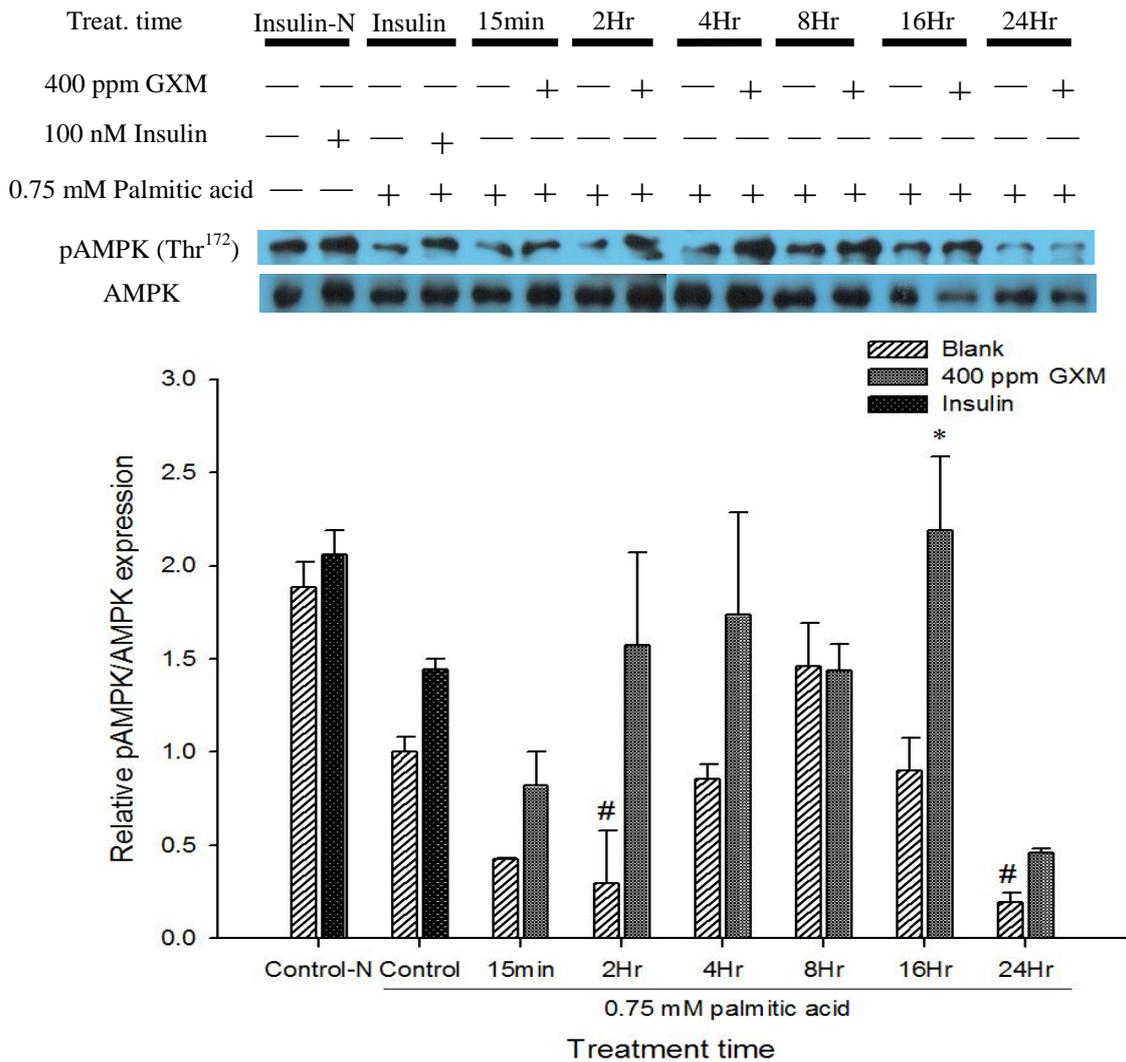


圖六十一、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 AMPK 磷酸化程度。細胞添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 pAMPK (Thr<sup>172</sup>) 的蛋白質相對於 AMPK 含量，並以  $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。將 pAMPK (Thr<sup>172</sup>) 及 AMPK 蛋白質量相除，各組校正後以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與胰島素組具顯著差異(p<0.05)。

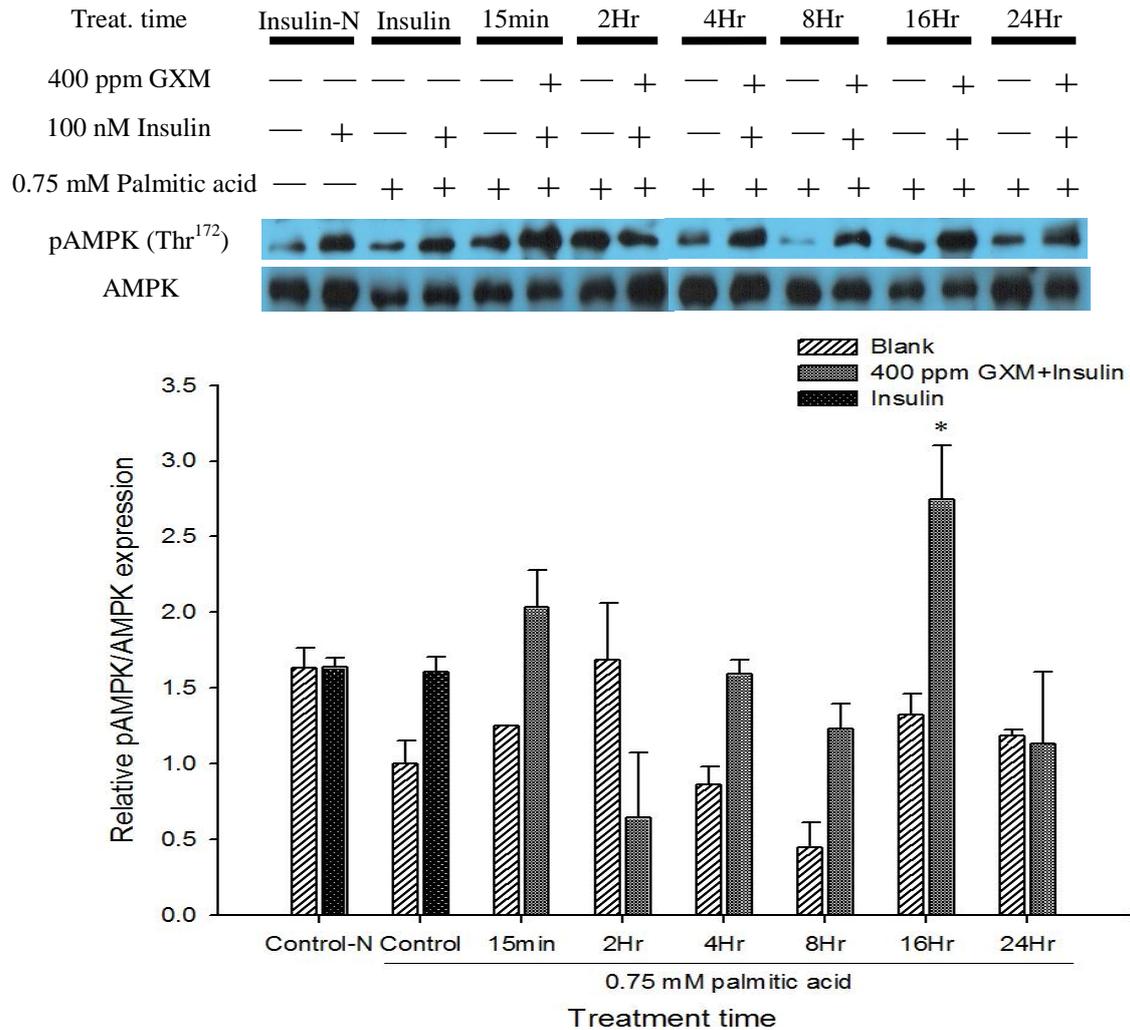


圖六十二、正常態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 AMPK 磷酸化程度。

細胞添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 pAMPK (Thr<sup>172</sup>) 的蛋白質相對於 AMPK 含量，並以  $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。將 pAMPK (Thr<sup>172</sup>) 及 AMPK 蛋白質量相除，各組校正後以相對表現量表示，再調整為控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與胰島素組具顯著差異(p<0.05)。



圖六十三、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間之 AMPK 磷酸化程度。細胞誘導成阻抗態後添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，胰島素組於收細胞前 15 分鐘添加 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 pAMPK (Thr<sup>172</sup>) 的蛋白質相對於 AMPK 含量，並以  $\beta$ -actin 蛋白質表現量做為內部對照。將 pAMPK (Thr<sup>172</sup>) 及 AMPK 蛋白質質量相除，各組校正後以相對表現量表示，再調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均取其趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與阻抗態控制組具顯著差異(p<0.05)。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異(p<0.05)。



圖六十四、阻抗態 C2C12 添加 400 ppm GXM 作用不同時間並添加胰島素刺激之 AMPK 磷酸化程度。

細胞誘導成阻抗態後添加 400 ppm GXM 經不同共置時間，添加胰島素組別於收細胞前 15 分鐘加入 100 nM 胰島素。取 20 $\mu$ g 蛋白質進行西方轉漬，分析 pAMPK (Thr<sup>172</sup>) 的蛋白質相對於 AMPK 含量，並以  $\beta$ -actin 蛋白質表現量作為內部對照。將 pAMPK (Thr<sup>172</sup>) 及 AMPK 蛋白質量相除，各組校正後以相對表現量表示，再調整為阻抗態控制組倍率。所有數值均取趨勢相同之兩重複進行統計分析。\*表示與阻抗態控制組具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。#表示與阻抗態胰島素組具顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

## 四、討論

### 4-1 酸性多醣分子量

本研究使用之樣品為黃金銀耳酸性多醣(GXM)，利用膠體滲透層析可得知其純度很高(圖一)，由一個主要波峰與一小波峰，分子量粗估為 6.40 kDa 與 7929 kDa，以 6.40 kDa 為酸性多醣的主要物質。目前有許多藥用蕈菇類已被證實具有降血糖、降膽固醇、刺激免疫及抗發炎等功效(Silva *et al.*, 2012)，子實體及多醣體萃取物為生理活性來源，其中多醣體的生理活性會受到構型、分支度、分子量等因子影響，尤其是 $\beta$ -glucan，而本篇研究使用之 GXM 結構為 $\alpha$ -D-mannose 為主要骨架，其為生理活性不受分子量影響(Wasser, 2002)。雖有文獻指出，多醣體分子量在 3~5 kDa 具降血糖功效，但有學者萃取出分子量為 15 kDa 及 1500 kDa 的多醣體，以動物模式證實可影響降血糖路徑之因子(Kiho *et al.*, 1995; Kiho *et al.*, 1992)。因此，為了解 GXM 對降血糖的影響，仍需以細胞或動物模式進行探討。

### 4-2 細胞層面傳訊路徑

經 STZ-NT 動物實驗證實(Lo *et al.*, 2006; 賴, 2010)，黃金銀耳可提升糖尿病大鼠周邊組織對胰島素的敏感性，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，以達到降低血糖維持血糖調控之效用。但受限於動物之糖尿病誘發模式有限，STZ 造成胰島細胞受損而降低胰島素分泌，無法完全模擬胰島素阻抗乃至於第二型糖尿病，對於解釋食藥品調節葡萄糖恆定上有所不足。細胞模式可模擬不同阻抗方式，並進行樣品濃度與時間動態之探討，故本研究將肌肉細胞以棕櫚酸誘導為胰島素阻抗，以期了解黃金銀耳酸性多醣是否可在此模式下改善胰島素阻抗，並探討相關的機制。

胰島素阻抗之成因除遺傳因素外，也會因環境因素而導致，隨著生活型態與飲食改變，長期攝取過多葡萄糖及油脂，最初會使身體分泌較多胰島素以應付額外需求，久而久之使得胰島素敏感性下降，血糖上升但無法有效利用，細胞轉由脂肪酸作為優先能量來源，造成體內游離脂肪酸與三酸甘油脂過多，干擾胰島素

傳訊，進而演變成胰島素阻抗。為模擬哺乳類動物之胰島素阻抗，本研究使用游離脂肪酸-棕櫚酸，誘導小鼠肌肉細胞產生胰島素阻抗，並以葡萄糖擬似物帶入量及 Akt 磷酸化之結果檢視之。由圖四與圖五可知，0.5 mM 或 0.75 mM 棕櫚酸不論是與細胞共置 12 或 16 小時，皆可降低 2-NBDG 帶入量及減少 Akt 磷酸化程度。已知過多的游離脂肪酸會造成 IRS-1 與 PI3K 的活性降低，減少下游傳訊，造成 GLUT4 轉位受到抑制，使葡萄糖帶入減少(Alkhateeb *et al.*, 2007; Shulman, 2000)，本研究中又發現以 0.75 mM 棕櫚酸與細胞共置 16 小時影響最為顯著，故以此做為誘導阻抗之方法。

為觀察胰島素及 AMPK 傳訊路徑中各關鍵分子含量及磷酸化活化等動態變化，本研究以固定濃度 400 ppm GXM 添加於細胞中，經不同時間點處理(15min、2Hr、4Hr、8Hr、16Hr 及 24Hr)，在正常態細胞 IR 基因層面(圖九、圖十)，可看出在 4Hr 時，mRNA 表現量會下降，但延長時間至 24Hr 則表現量明顯上升，比對 IR 蛋白質表現量(圖二十九、圖三十)，可發現在 4Hr 蛋白質表現量明顯上升，在 24Hr 則表現量下降。在阻抗細胞 IR 之基因表現，添加 GXM 作用後隨時間逐漸提升基因表現，在 24Hr 時最為顯著(圖十一)，但加入胰島素刺激則在 16Hr 就可明顯增加基因表現(圖十二)，而阻抗細胞 IR 蛋白質表現方面，加入 GXM 後，4Hr 內無顯著變化，8Hr 後顯著降低 IR 蛋白表現量(圖三十一)，而合併胰島素刺激下，8Hr 具顯著提升表現量，16Hr 後表現量下降，在 24Hr 時下降最多。由上述結果得知，GXM 確可影響 C2C12 細胞 IR 基因在轉錄及轉譯層次的表現，並在合併胰島素作用下增強效應，具有相輔助效果。然而 mRNA 與蛋白質表現量具時間落差，除部分來自轉錄與轉譯兩個層次的次序，另可能也涉及整體的調控作業，包含蛋白質降解、胞質至胞膜之轉位等。在上述 STZ 大鼠模式中，黃金銀耳酸性多醣餵食後，增加其肌肉細胞 IR 蛋白質表現量(賴，2010)。本次研究採用整體蛋白質為西方轉漬分析對象，未來如能以質膜分離方式分別分析，可進一步探究膜上 IR 蛋白質的動態變化。

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會造成肌肉組織產生胰島素阻抗，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(Huang *et al.*, 2005; Yamauchi *et al.*, 1996)。而研究結果顯示，正常細胞加入400 ppm GXM作用後，僅在15min時可提高mRNA表現量(圖十三)，但對其蛋白質無明顯提升表現量(圖三十三)，如加入胰島素共同刺激下，則在8Hr內皆可增加mRNA表現(圖十四)，蛋白質則需延長作用時間至16Hr後才有顯著增加表現(圖三十四)。阻抗細胞之IRS-1基因方面，加入400 ppm GXM後，可提升IRS-1 mRNA的表現量，以24Hr最為顯著(圖十五)。GXM合併胰島素刺激，則在2Hr後可維持且增加其基因表現(圖十六)。而與蛋白質表現量結果相比(圖三十五、圖三十六)，與IR結果相似，特別是阻抗細胞，顯示IR的表現調控與IRS-1具有連動性。同樣的，推測GXM可刺激肌肉細胞改變IRS-1基因表現，以因應所需之胰島素傳訊。

當 IRS 被磷酸化，會與 PI3K 結合，啟動下游 Akt 的活化及其磷酸化，產生一連串之代謝反應。當 PI3K 表現量異常將導致血液中胰島素濃度持續高漲、葡萄糖耐受性缺失及高血脂等症狀，肝醣、脂肪、蛋白質合成及基因表現調控皆會受到抑制，故可說 PI3K 為調控葡萄糖及脂肪代謝的一重要樞紐(Miyake *et al.*, 2002)。本研究結果指出，在正常細胞狀態，添加 400 ppm GXM 或合併胰島素刺激，PI3K 蛋白質表現量有增加趨勢(圖三十七、圖三十八)。而在阻抗態細胞方面，單一添加 GXM，在 15min 時可顯著增加 PI3K 蛋白質表現，但隨時間延長表現量有下降趨勢(圖三十九)，在合併添加胰島素刺激下，僅在 8Hr 可提升其表現量，但無顯著差異(圖四十)。由此可推估酸性多醣較可增加正常細胞 PI3K 蛋白質表現量，活化下游訊息傳遞。當然，蛋白質總表現量未必直接反應傳訊之活性，此部份之推論，仍有待磷酸化狀態的 IRS-1 及 PI3K 含量測定來做呼應。

Akt位於胰島素下游傳訊分子，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，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)。實驗結果顯示，正常細胞添加GXM或合併胰島素刺激，

於4Hr可提升Akt蛋白質表現(圖四十一、圖四十二)，阻抗細胞也於4Hr時有上升趨勢但無顯著差異(圖四十三、圖四十四)。Akt磷酸化方面，正常及阻抗細胞若只添加GXM而無添加胰島素刺激，其磷酸化程度不會高於胰島素組，甚至無Akt磷酸化(圖四十五、圖四十七)。加入胰島素刺激後，正常細胞之Akt磷酸化皆可顯著上升(圖四十六)，阻抗細胞在8Hr內也可增加磷酸化量(圖四十八)。正常細胞添加GXM與胰島素共同刺激下，可增加磷酸化量，但需較長時間才有協同作用，而阻抗細胞可增加Akt磷酸化。比較GXM合併胰島素及同時空白對照組的磷酸化程度可發現，GXM可有效提升磷酸化活化程度，對於胰島素具協同作用，應能有效促進下游之傳訊。

文獻指出脂聯素透過 AdipoR1 活化 AMPK 與 AdipoR2 活化 PPAR $\alpha$  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)。但因肌肉細胞不會釋放脂聯素，故改以檢測 GXM 是否可刺激脂聯素受體 mRNA 的表現，提高其蛋白質表現以利脂聯素傳訊。前人研究結果指出，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.*, 2004b)。而本研究結果顯示，正常肌肉細胞添加 400 ppm GXM 經不同共置時間後，不論是單一添加 GXM 或合併胰島素刺激，皆在 15 分鐘或延長共置時間，能顯著提升 AdipoR1 與 AdipoR2 基因表現量(圖十七、圖十八、圖二十一、圖二十二)。阻抗態細胞加入 400 ppm GXM 經不同時間共置後，僅於 8Hr 能明顯提升 AdipoR1 mRNA 表現量(圖十九)，而 AdipoR2 則可在 16Hr 後增加基因表現(圖二十三)。而添加胰島素合併刺激下，AdipoR1 與 AdipoR2 延長作用時間至 16Hr 或 24Hr 才可提升其 mRNA 表現(圖二十、圖二十四)。由此可知，GXM 對阻抗細胞之 AdipoR2 基因表現影響較大，推測其可增加基因表現以提升脂聯素傳訊，促使細胞帶入葡萄糖。

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，其可由運動、脂聯

素活化，增加細胞對胰島素敏感性(Tilg and Moschen, 2006)，顯示其於葡萄糖與脂質代謝中的重要性。由圖五十三與圖五十四可知，正常細胞之GXM的添加或合併胰島素刺激，皆可維持或增加AMPK蛋白質表現量，但時間越長會有下降的趨勢，而在阻抗細胞也具有相同狀況(圖五十五、圖五十六)。在AMPK磷酸化方面，正常細胞在添加GXM或合併胰島素刺激下，在8Hr內可增加AMPK磷酸化(圖五十七、圖五十八)。阻抗細胞AMPK的磷酸化會減少，加入GXM作用後僅於4Hr可顯著提升磷酸化(圖五十九)，而GXM合併胰島素刺激，則是在4Hr與16Hr兩個時間可提升AMPK磷酸化(圖六十)。AMPK磷酸化的提升，可刺激GLUT4轉位至細胞膜上，將胞外葡萄糖帶入細胞中，故推測GXM可刺激AMPK活化，促使GLUT4轉位至細胞膜上，但本次研究並未添加Adiponectin，因此推測GXM可能影響其它上游之傳訊分子促使AMPK活化，如增加AMP:ATP的比率、活化LKB1或CaMKK $\beta$  (Fogarty and Hardie, 2010; Gruzman *et al.*, 2009; Hawley *et al.*, 2005; Viollet *et al.*, 2009)。

葡萄糖經 GLUT4 進入細胞後，會由 HK II 磷酸化為 G6P，而後合成肝醣儲存於細胞中。許多路徑皆可影響 HK II 的表現量，胰島素調控之 PI3K 路徑即為其一(Osawa *et al.*, 1996)，且胰島素可刺激肌肉中 HK II mRNA 的表現(Vogt *et al.*, 2000)。而葡萄糖轉運以及 HK II 的活性也被視為糖尿病的重要影響因子之一(Rothman *et al.*, 1995)。由圖二十五與圖二十六得知，正常細胞添加 GXM 與合併胰島素刺激下，皆可刺激 HK II 的基因表現，而阻抗細胞則需延長作用時間方可刺激其基因表現(圖二十七、圖二十八)，故可推測 GXM 可提升 HK II mRNA 表現量，將細胞帶入之葡萄糖磷酸化，以利肝醣合成。

#### 4-3 葡萄糖擬似物 2-NBDG 帶入量

本研究使用 2-NBDG 葡萄糖擬似物進行細胞對葡萄糖帶入量之分析，已有文獻證實 2-NBDG 可被哺乳類動物之葡萄糖轉運蛋白運輸，如同葡萄糖，故可用來分析細胞之葡萄糖帶入，且利用螢光性分析敏度高，操作也較安全(Yoshioka

*et al.*, 1996)。由圖六與圖八可知，GXM 可顯著增加正常細胞對葡萄糖擬似物的帶入量，不論是與 GXM 共至 12 或 24 小時皆有此效果，且以 24 小時之帶入量較佳。GXM 濃度方面，合併添加胰島素組別具劑量效應，GXM 濃度越高 2-NBDG 攝入量越高，而單一添加 GXM 組別，以 400 ppm 對細胞之 2-NBDG 帶入量較佳。在阻抗細胞添加酸性多醣也可使 2-NBDG 帶入量回升至正常細胞狀態，而合併添加胰島素組別也具劑量效應，單一添加 GXM 相同以 400 ppm 對阻抗細胞之 2-NBDG 帶入量最佳。由此可知，GXM 可以增加正常肌肉細胞的葡萄糖帶入，對於阻抗細胞也可使其帶入量回復正常狀態。

#### 4-4 未來展望

本研究初步證實，黃金銀耳酸性多醣於肌肉細胞中，可增加葡萄糖擬似物攝入量，並刺激 IR、IRS-1、AdipoR2 與 HK 之基因表現，提升 AMPK 與 Akt 磷酸化增強傳訊，推測可協同提高 GLUT4 轉位，改善胰島素阻抗細胞之葡萄糖代謝調控。賴(2010)於動物模式中發現，餵食黃金銀耳可刺激糖尿病大鼠之脂聯素分泌與 IRS-1 蛋白質表現量增加，但在細胞模式中，阻抗細胞添加 GXM 後 IRS-1 蛋白質表現量並無增加趨勢，推測可能為培養基中葡萄糖含量已被代謝，不足以刺激細胞進行傳訊，亦或是因 GXM 為刺激脂肪細胞分泌脂聯素，進而增強肌肉細胞之胰島素與脂聯素傳訊，故為釐清 GXM 對細胞之血糖調控，可延伸至細胞共培養，提供細胞之對談，模擬體內血糖調控之環境。再者，也可進一步測定 IRS-1 酪胺酸磷酸化程度，觀察 GXM 是否可增加其活性，促進細胞傳訊至下游，並檢測 GLUT4 之轉位與肝醣含量，以更完整解釋酸性多醣如何影響肌肉細胞葡萄糖帶入與儲存以調節血糖。

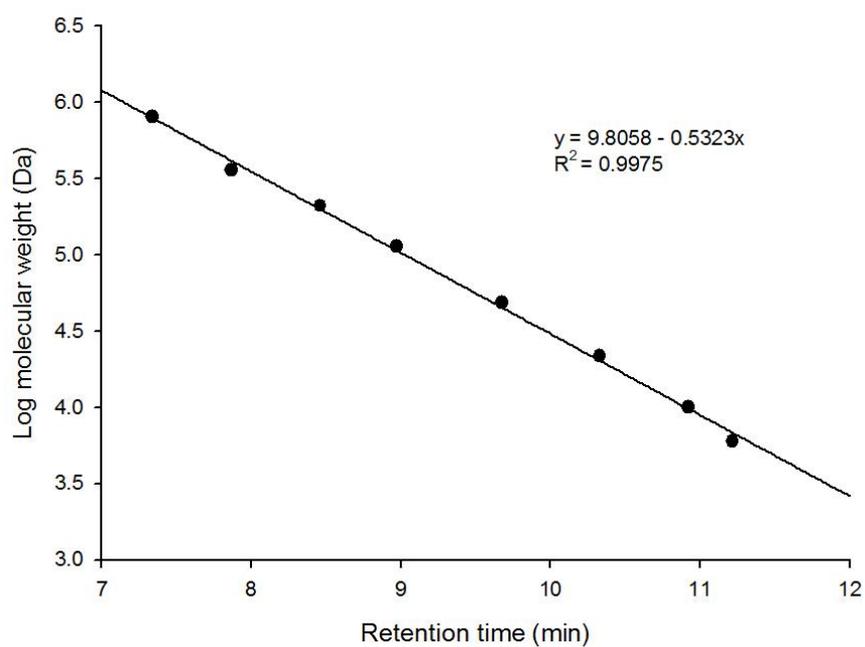
表一、各項傳訊標的因子總整理

	15min		2Hr		4Hr		8Hr		16Hr		24Hr	
	GXM	GXM+I	GXM	GXM+I	GXM	GXM+I	GXM	GXM+I	GXM	GXM+I	GXM	GXM+I
IR mRNA	↑ ↑	— ↑	↓ ↑	↑ ↑	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↑	↑ ↓	↑ ↑	↑ ↑	↑ ↑	↑ ↑
IR protein	↑ ↑	↑ ↑	↑ ↓	— ↓	↑ ↑	↑ ↑	↑ ↓	↓ ↑	↑ ↓	↓ ↓	↓ ↓	↓ ↓
IRS-1 mRNA	↑ ↑	↑ ↓	↓ ↑	↑ ↑	↓ ↑	↑ ↑	↓ ↑	↑ ↓	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↑
IRS-1 protein	— ↑	— ↓	↑ ↑	↓ ↓	↑ ↓	↓ ↓	↓ ↓	— ↓	↓ ↓	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓
PI3K protein	— ↑	— —	— ↓	↓ ↓	↑ ↓	— ↓	↑ ↓	↑ ↑	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓	↑ ↓
Akt 磷酸化程度	↓ ↓	— —	↓ ↓	↑ ↑	↓ ↓	↓ ↓	↓ ↓	↑ ↓	↓ ↓	↑ ↓	↓ ↓	↓ ↓
AMPK 磷酸化程度	↑ ↓	↑ ↑	↑ ↑	↑ ↓	↑ ↑	↑ —	↑ ↑	↑ ↓	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↓	— ↓
AdipoR1 mRNA	— ↓	↑ —	— —	↑ ↓	↓ ↓	— ↓	↓ ↑	— ↓	↓ ↑	↓ ↓	— ↓	↑ —
AdipoR2 mRNA	↑ ↑	↑ —	— ↑	↑ ↓	— ↑	↓ ↑	↓ ↑	↓ ↑	↑ ↑	↑ ↑	↑ ↑	↓ ↑
HK mRNA	↓ —	↓ ↑	↑ ↑	↑ —	— ↑	— ↑	↑ ↑	↑ ↑	↑ ↑	↑ —	↑ —	↑ ↑

正常細胞為白色箭頭 ↑      阻抗細胞為黑色箭頭 ↓      Insulin 表示為 I

附表五、葡聚糖標準品之滯留時間。

Molecular weight (M.W.) (KDa)	Retention time (min)	Log M.W.
6	11.22	3.77
10	10.92	4
21.7	10.33	4.33
48.8	9.68	4.68
113	8.97	5.05
210	8.46	5.32
366	7.87	5.56
805	7.34	5.90



附圖十五、多醣分子量標準曲線。

## 參考文獻

- 吳青蓉。2011。黃金銀耳酸性多醣對FL83B小鼠肝臟細胞具胰島素增敏功效。東海大學食品科學系碩士論文。
- 呂淑芳、宮昭雲、傅偉光。2001。靈芝中水溶性粗多醣分析方法之研究。臺灣農業化學與食品科學 **39**:153-161。
- 陳南吟。2008。浸液培養條件對黃金銀耳菌(*Tremellalesenterica*)形態、多醣體生成及其生物活性之影響。大葉大學生物產業科技學系博士論文。
- 賴惠蘭。2010。黃金銀耳於糖尿病大鼠模式肌肉中降血糖機制之探討。東海大學食品科學系碩士論文。
- 王也珍。黃金銀耳《數位典藏與數位學習聯合目錄》。2007。  
<http://catalog.digitalarchives.tw/item/00/43/b2/bb.html>
- Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, José PA, Taylor SI and Westphal H. 1996. Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat. Genet.* **12** 106-109.
- Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P and Hemmings BA. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* **15** 6541-6551.
- Alkhateeb H, Chabowski A, Glatz JFC, Luiken JFP and Bonen A. 2007. Two phases of palmitate-induced insulin resistance in skeletal muscle: impaired GLUT4 translocation is followed by a reduced GLUT4 intrinsic activity. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* **293** E783-E793.
- American Diabetes Association. 2012. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **35** S64-S71.
- American Diabetes Association. Estimated Average Glucose (eAG).  
<http://www.diabetes.org/living-with-diabetes/treatment-and-care/blood-glucose-control/estimated-average-glucose.html>
- American Diabetes Association. How to Tell if You Have Diabetes or Prediabetes.  
<http://www.diabetes.org/diabetes-basics/prevention/pre-diabetes/diagnosis.html>
- Bandoni RJ and Boekhout T. 2011. Chapter 132 - Tremella Persoon (1794). In "The Yeasts (Fifth Edition)". ed. (Ed.), pp. 1567-1590. Elsevier, London.
- Benoit SC, Kemp CJ, Elias CF, Abplanalp W, Herman JP, Migrenne S, Lefevre A-L, Cruciani-Guglielmacci C, Magnan C, Yu F, Niswender K, Irani BG, Holland WL and Clegg DJ. 2009. Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC- $\theta$  subcellular localization in rodents. *J. Clin. Invest.* **119** 2577-2589.
- Bjornholm M and Zierath JR. 2005. Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes. *Biochem. Soc. Trans.* **33**

354-357.

- Bjursell M, Ahnmark A, Bohlooly-Y M, William-Olsson L, Rhedin M, Peng X-R, Ploj K, Gerdin A-K, Arnerup G, Elmgren A, Berg A-L, Oscarsson J and Lindén D. 2007. Opposing Effects of Adiponectin Receptors 1 and 2 on Energy Metabolism. *Diabetes* **56** 583-593.
- Boden G. 2001. Free fatty acids-the link between obesity and insulin resistance. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists* **7** 44-51.
- Boden G and Shulman GI. 2002. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur. J. Clin. Invest.* **32 Suppl 3** 14-23.
- Bogaert IA, Maeseleire S and Vandamme E. 2009. Extracellular Polysaccharides Produced by Yeasts and Yeast-Like Fungi. In "Yeast Biotechnology: Diversity and Applications". ed. Satyanarayana T and Kunze G (Ed.), pp. 651-671. Springer Netherlands,
- Bouché C, Serdy S, Kahn CR and Goldfine AB. 2004. The Cellular Fate of Glucose and Its Relevance in Type 2 Diabetes. *Endocr. Rev.* **25** 807-830.
- Bouskila M, Hirshman MF, Jensen J, Goodyear LJ and Sakamoto K. 2008. Insulin promotes glycogen synthesis in the absence of GSK3 phosphorylation in skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* **294** E28-E35.
- Bratanova-Tochkova TK, Cheng H, Daniel S, Gunawardana S, Liu YJ, Mulvaney-Musa J, Schermerhorn T, Straub SG, Yajima H and Sharp GW. 2002. Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion. *Diabetes* **51 Suppl 1** S83-90.
- Brownlee M. 2005. The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism. *Diabetes* **54** 1615-1625.
- Carling D. 2004. The AMP-activated protein kinase cascade – a unifying system for energy control. *Trends Biochem. Sci.* **29** 18-24.
- Chang P-Y, Jensen J, Printz RL, Granner DK, Ivy JL and Moller DE. 1996. Overexpression of Hexokinase II in Transgenic Mice: EVIDENCE THAT INCREASED PHOSPHORYLATION AUGMENTS MUSCLE GLUCOSE UPTAKE. *J. Biol. Chem.* **271** 14834-14839.
- Chen WS, Xu P-Z, Gottlob K, Chen M-L, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T and Hay N. 2001. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the akt1 gene. *Genes Dev.* **15** 2203-2208.
- Chen Y-W, Lo H-C, Yang J-G, Chien C-H, Lee S-H, Tseng C-Y and Huang B-M.

2006. The regulatory mechanism of *Tremella mesenterica* on steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Life Sci.* **79** 584-590.
- Cheng AYY and Fantus IG. 2005. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Can. Med. Assoc. J.* **172** 213-226.
- Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, III, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI and Birnbaum MJ. 2001a. Insulin Resistance and a Diabetes Mellitus-Like Syndrome in Mice Lacking the Protein Kinase Akt2 (PKB $\beta$ ). *Science* **292** 1728-1731.
- Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F and Birnbaum MJ. 2001b. Akt1/PKB $\alpha$  Is Required for Normal Growth but Dispensable for Maintenance of Glucose Homeostasis in Mice. *J. Biol. Chem.* **276** 38349-38352.
- Cleasby ME, Reinten TA, Cooney GJ, James DE and Kraegen EW. 2007. Functional Studies of Akt Isoform Specificity in Skeletal Muscle in Vivo; Maintained Insulin Sensitivity Despite Reduced Insulin Receptor Substrate-1 Expression. *Mol. Endocrinol.* **21** 215-228.
- De Baets S and Vandamme EJ. 2001. Extracellular *Tremella* polysaccharides: structure, properties and applications. *Biotechnol. Lett.* **23** 1361-1366.
- Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E and Raptis SA. 2011. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **93** S52-S59.
- Dipl-Pharm SG. 2005. Tackling the insulin-signalling cascade. *Canadian Journal of Diabetes* **29** 239-245.
- Dodson G and Steiner D. 1998. The role of assembly in insulin's biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8** 189-194.
- Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, Slezak LA, Andersen DK, Hundal RS, Rothman DL, Petersen KF and Shulman GI. 1999. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J. Clin. Invest.* **103** 253-259.
- Dummler B and Hemmings B. 2007. Physiological roles of PKB/Akt isoforms in development and disease. *Biochem. Soc. Trans.* **35** 231-235.
- Easton RM, Cho H, Roovers K, Shineman DW, Mizrahi M, Forman MS, Lee VM-Y, Szabolcs M, de Jong R, Oltersdorf T, Ludwig T, Efstratiadis A and Birnbaum MJ. 2005. Role for Akt3/Protein Kinase B $\gamma$  in Attainment of Normal Brain Size. *Mol. Cell. Biol.* **25** 1869-1878.
- Fayard E, Xue G, Parcellier A, Bozulic L and Hemmings BA. 2010. Protein Kinase B (PKB/Akt), a Key Mediator of the PI3K Signaling Pathway. **346** 31-56.
- Fogarty S and Hardie DG. 2010. Development of protein kinase activators: AMPK as a target in metabolic disorders and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* **1804** 581-591.

- Garofalo RS, Orena SJ, Rafidi K, Torchia AJ, Stock JL, Hildebrandt AL, Coskran T, Black SC, Brees DJ, Wicks JR, McNeish JD and Coleman KG. 2003. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J. Clin. Invest.* **112** 197-208.
- Groop LC, Bonadonna RC, DelPrato S, Ratheiser K, Zyck K, Ferrannini E and DeFronzo RA. 1989. Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **84** 205-213.
- Gruzman A, Babai G and Sasson S. 2009. Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK) as a New Target for Antidiabetic Drugs: A Review on Metabolic, Pharmacological and Chemical Considerations. *The Review of Diabetic Studies* **6** 13-36.
- Gual P, Le Marchand-Brustel Y and Tanti J-F. 2005. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* **87** 99-109.
- Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, Frenguelli BG and Hardie DG. 2005. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* **2** 9-19.
- Hu P, Mondino A, Skolnik EY and Schlessinger J. 1993. Cloning of a novel, ubiquitously expressed human phosphatidylinositol 3-kinase and identification of its binding site on p85. *Mol. Cell. Biol.* **13** 7677-7688.
- Huang C, Thirone ACP, Huang X and 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.
- Huang S and Czech MP. 2007. The GLUT4 Glucose Transporter. *Cell Metabolism* **5** 237-252.
- Kadowaki T and Yamauchi T. 2005. Adiponectin and Adiponectin Receptors. *Endocr. Rev.* **26** 439-451.
- Karlsson HK and Zierath JR. 2007. Insulin signaling and glucose transport in insulin resistant human skeletal muscle. *Cell Biochem. Biophys.* **48** 103-113.
- Kershaw EE and Flier JS. 2004. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89** 2548-2556.
- 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** 1627-1629.
- Kiho T, Shiose Y, Nagai K and Ukai S. 1992. Polysaccharides in fungi. XXX. Antitumor and immunomodulating activities of two polysaccharides from the fruiting bodies of *Armillariella tabescens*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **40**

- 2110-2114.
- Kim JK, Zisman A, Fillmore JJ, Peroni OD, Kotani K, Perret P, Zong H, Dong J, Kahn CR, Kahn BB and Shulman GI. 2001. Glucose toxicity and the development of diabetes in mice with muscle-specific inactivation of GLUT4. *The Journal of Clinical Investigation* **108** 153-160.
- Kovacs P and Stumvoll M. 2005. Fatty acids and insulin resistance in muscle and liver. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **19** 625-635.
- Krook A, Björnholm M, Galuska D, Jiang XJ, Fahlman R, Myers MG, Wallberg-Henriksson H and Zierath JR. 2000. Characterization of signal transduction and glucose transport in skeletal muscle from type 2 diabetic patients. *Diabetes* **49** 284-292.
- Kumar N and Dey CS. 2003. Development of insulin resistance and reversal by thiazolidinediones in C2C12 skeletal muscle cells. *Biochem. Pharmacol.* **65** 249-257.
- Leahy JL. 2005. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Arch. Med. Res.* **36** 197-209.
- Lebovitz HE. 2001. Insulin resistance: definition and consequences. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **109 Suppl 2** S135-148.
- Liu Y, Michael MD, Kash S, Bensch WR, Monia BP, Murray SF, Otto KA, Syed SK, Bhanot S, Sloop KW, Sullivan JM and Reifel-Miller A. 2007. Deficiency of Adiponectin Receptor 2 Reduces Diet-Induced Insulin Resistance but Promotes Type 2 Diabetes. *Endocrinology* **148** 683-692.
- Livak KJ and Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* **25** 402-408.
- Lo H-C, Tsai F-A, Wasser SP, Yang J-G and Huang B-M. 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.
- Long YC and Zierath JR. 2006. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J. Clin. Invest.* **116** 1776.
- Masure S, Haefner B, Wesselink J-J, Hoefnagel E, Mortier E, Verhasselt P, Tuytelaars A, Gordon R and Richardson A. 1999. Molecular cloning, expression and characterization of the human serine/threonine kinase Akt-3. *Eur. J. Biochem.* **265** 353-360.
- Minokoshi Y, Kahn CR and 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.

- Miyake K, Ogawa W, Matsumoto M, Nakamura T, Sakaue H and Kasuga M. 2002. Hyperinsulinemia, glucose intolerance, and dyslipidemia induced by acute inhibition of phosphoinositide 3-kinase signaling in the liver. *The Journal of Clinical Investigation* **110** 1483-1491.
- Moller DE. 2001. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* **414** 821-827.
- Nedachi T and Kanzaki M. 2006. Regulation of glucose transporters by insulin and extracellular glucose in C2C12 myotubes. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* **291** E817-E828.
- Osawa H, Sutherland C, Robey RB, Printz RL and Granner DK. 1996. Analysis of the Signaling Pathway Involved in the Regulation of Hexokinase II Gene Transcription by Insulin. *J. Biol. Chem.* **271** 16690-16694.
- Printz RL, Koch S, Potter LR, O'Doherty RM, Tiesinga JJ, Moritz S and Granner DK. 1993. Hexokinase II mRNA and gene structure, regulation by insulin, and evolution. *J. Biol. Chem.* **268** 5209-5219.
- Randle PJ, Garland PB, Hales CN and Newsholme EA. 1963. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* **1** 785-789.
- Reagan-Shaw S, Nihal M and Ahmad N. 2007. Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal* **22** 659-661.
- Reshetnikov SV, Wasser SP, Nevo E, Duckman I and Tsukor K. 2000. Medicinal value of the genus *Tremella* Pers. (Heterobasidiomycetes) (review). *Int. J. Med. Mushrooms* **2** 169-193.
- Ritov VB and Kelley DE. 2001. Hexokinase Isozyme Distribution in Human Skeletal Muscle. *Diabetes* **50** 1253-1262.
- Rothman DL, Magnusson I, Cline G, Gerard D, Kahn CR, Shulman RG and Shulman GI. 1995. Decreased muscle glucose transport/phosphorylation is an early defect in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92** 983-987.
- Ryder JW, Chibalin AV and 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.
- Saini V. 2010. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes* **1** 68-75.
- Saltiel AR and Kahn CR. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414** 799-806.
- Saltiel AR and Pessin JE. 2002. Insulin signaling pathways in time and space. *Trends Cell Biol.* **12** 65-71.

- Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR and Barthel A. 2005. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabet. Med.* **22** 674-682.
- Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P and Lauro R. 2001. Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *The FASEB Journal* **15** 2099-2111.
- Shepherd PR, Withers DJ and Siddle K. 1998. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem. J.* **333** 471-490.
- Shulman GI. 2000. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **106** 171-176.
- Silva DD, Rapior S, Hyde KD and Bahkali AH. 2012. Medicinal mushrooms in prevention and control of diabetes mellitus. *Fungal Diversity* **56** 1-29.
- Smith U. 2002. Impaired ('diabetic') insulin signaling and action occur in fat cells long before glucose intolerance--is insulin resistance initiated in the adipose tissue? *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* **26** 897-904.
- Taniguchi CM, Emanuelli B and Kahn CR. 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7** 85-96.
- Tao R, Gong J, Luo X, Zang M, Guo W, Wen R and Luo Z. 2010. AMPK exerts dual regulatory effects on the PI3K pathway. *J Mol Signal* **5** 1-9.
- Thirone ACP, Huang C and Klip A. 2006. Tissue-specific roles of IRS proteins in insulin signaling and glucose transport. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **17** 72-78.
- Thong FSL. 2005. Turning Signals On and Off: GLUT4 Traffic in the Insulin-Signaling Highway. *Physiology* **20** 271-284.
- Tilg H and Moschen AR. 2006. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* **6** 772-783.
- Tsao TS, Burcelin R, Katz EB, Huang L and Charron MJ. 1996. Enhanced insulin action due to targeted GLUT4 overexpression exclusively in muscle. *Diabetes* **45** 28-36.
- Tschopp O, Yang Z-Z, Brodbeck D, Dummler BA, Hemmings-Mieszczak M, Watanabe T, Michaelis T, Frahm J and Hemmings BA. 2005. Essential role of protein kinase B $\gamma$  (PKB $\gamma$ /Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* **132** 2943-2954.
- 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 and Kadowaki T. 2004a. Insulin/Foxo1 Pathway Regulates Expression Levels of Adiponectin Receptors and Adiponectin

- Sensitivity. *J. Biol. Chem.* **279** 30817-30822.
- 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 and Kadowaki T. 2004b. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *The Journal of biological chemistry* **279** 30817-30822.
- Tsuruzoe K, Emkey R, Kriauciunas KM, Ueki K and Kahn CR. 2001. Insulin Receptor Substrate 3 (IRS-3) and IRS-4 Impair IRS-1- and IRS-2-Mediated Signaling. *Mol. Cell. Biol.* **21** 26-38.
- Ukai S, Hirose K, Kiho T, Hara C and Irikura T. 1972. Antitumor activity on sarcoma 180 of the polysaccharides from *Tremella fuciformis* Berk. *Chem. Pharm. Bull.* **20** 2293-2294.
- Van Cromphaut SJ. 2009. Hyperglycaemia as part of the stress response: the underlying mechanisms. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology* **23** 375-386.
- Vinogradov E, Petersen BO, Duus JØ and 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.
- Viollet B, Lantier L, Devin-Leclerc J, Hebrard S, Amouyal C, Mounier R, Foretz M and Andreelli F. 2009. Targeting the AMPK pathway for the treatment of Type 2 diabetes. *Front. Biosci.* **14** 3380-3400.
- Vogt C, Ardehali H, Iozzo P, Yki-Järvinen H, Koval J, Maezono K, Pendergrass M, Printz R, Granner D, DeFronzo R and Mandarino L. 2000. Regulation of hexokinase II expression in human skeletal muscle in vivo. *Metabolism* **49** 814-818.
- Wasser SP. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60** 258-274.
- Wasser SP, Elisashvili V and Tan K-K. 2002. Hypoglycemic, Interferonogenous, and Immunomodulatory Activity of Tremellastin from the Submerged Culture of *Tremella mesenterica* Retz.: Fr. (Heterobasidiomycetes). *Int. J. Med. Mushrooms* **4** 215-227.
- Watson RT and Pessin JE. 2006. Bridging the GAP between insulin signaling and GLUT4 translocation. *Trends Biochem. Sci.* **31** 215-222.
- White MF. 2002. IRS proteins and the common path to diabetes. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* **283** E413-E422.
- Wilcox G. 2005. Insulin and insulin resistance. *Clinical Biochemist Reviews* **26** 19.
- Wilding JP. 2007. The importance of free fatty acids in the development of Type 2

- diabetes. *Diabet. Med.* **24** 934-945.
- Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K and Tsunoda M. 2003. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* **423** 762-769.
- Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S and Ueki K. 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat. Med.* **8** 1288-1295.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K and Tsuboyama-Kasaoka N. 2001. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat. Med.* **7** 941-946.
- Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N and Kubota T. 2007. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat. Med.* **13** 332-339.
- 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 and 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.
- Yang Z, Tschopp O, Baudry A, Dummler B, Hynx D and Hemmings B. 2004. Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochem. Soc. Trans.* **32** 350-354.
- Yeh J-I, Gulve EA, Rameh L and Birnbaum MJ. 1995. The effects of wortmannin on rat skeletal muscle: Dissociation of signaling pathways for insulin- and contraction-activated hexose transport. *J. Biol. Chem.* **270** 2107-2111.
- Yoshioka K, Takahashi H, Homma T, Saito M, Oh K-B, Nemoto Y and Matsuoka H. 1996. A novel fluorescent derivative of glucose applicable to the assessment of glucose uptake activity of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1289** 5-9.
- Zierath JR and Kawano Y. 2003. The effect of hyperglycaemia on glucose disposal and insulin signal transduction in skeletal muscle. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **17** 385-398.
- Zierath JR, Krook A and Wallberg-Henriksson H. 2000. Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetologia* **43** 821-835.
- Zierath JR and Wallberg-Henriksson H. 2002. From receptor to effector: insulin signal transduction in skeletal muscle from type II diabetic patients. *Ann. N. Y. Acad.*

Sci. **967** 120-134.

- Zisman A, Peroni OD, Abel ED, Michael MD, Mauvais-Jarvis F, Lowell BB, Wojtaszewski JF, Hirshman MF, Virkamaki A, Goodyear LJ, Kahn CR and Kahn BB. 2000. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat. Med.* **6** 924-928.
- Zou C, Wang Y and Shen Z. 2005. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *J. Biochem. Biophys. Methods* **64** 207-215.