

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
共同指導教授：張中和 博士
Advisor : Lu, Hsi-Chi, Ph.D.
Co-advisor : Chang, Chung-Ho, Ph. D.

白藜蘆醇對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化之調控機制
Regulatory Mechanism of the Differentiation of 3T3-L1
Preadipocytes by Resveratrol

研究生：王茹婕 撰
Graduate Student : Wang, Ju-Chieh

中華民國九十八年七月

July, 2008

謝誌

碩士學業的完成是承蒙多人的幫助，藉此僅表達我由衷的感謝。感謝恩師 盧錫祺博士與 張中和博士悉心的教誨，不論研究上或生活上皆給予許多幫助與關懷照料，僅此致上最由衷的敬意與謝意。

文稿初成，復蒙 顧野松博士、 陳春榮博士與 陳珠亮博士撥冗審閱及悉心指導，並惠賜許多寶貴建議與觀念，使論文更加完善，在此致上萬分感謝。

研究期間，特別感謝國家衛生研究院細胞及系統醫學研究所老年醫學組的大家。感激淑茸、惠玲、慧勤、貞仔、婉妤、本謙眾學長姊們和珮芸一年多來的包容，感謝大家對於實驗上的指導與協助、態度上的叮嚀與分享以及生活上的照顧與鼓勵是我能不斷成長的推手。

感謝系上許多老師們的期待，希望我沒讓你們感到失望。感謝東海實驗室的瓜哥、鈺玲、碗粿、老張、惠蘭、汝翔、心語、附偉、青蓉、庭儒、山熊與勝智等學長姐與學弟妹長期來的幫忙。感謝蔡老師家的琪雅，感謝妳這一年多不斷的付出。感謝你們的勉勵、關懷與扶持是我不可或缺的支持力。

感謝長久以來不斷支持與鼓勵我的家人，因為有你們經濟上的協助，使我能無後顧之憂，專注於實驗與論文之中。因為有你們為我堅強的後盾才能使我從疲憊、挫折與沮喪中再度堅持下去。

最後感謝許多來不及列出的人，感謝你們曾經的付出心力與關懷，有你們的參與才有這本論文的出現，對此致上我最深的謝意。曾有過的幫忙與照顧將永記於心，僅將這篇論文獻給所有關懷我的人，謝謝你們。

王茹婕 謹致於

東海大學食品科學研究所

中華民國九十八年七月十四日

目錄

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
文獻回顧.....	3
壹、脂肪組織.....	3
一、白色脂肪組織.....	3
二、褐色脂肪組織.....	4
三、脂肪組脂與肥胖及代謝性疾病.....	5
貳、研究模式.....	5
一、前驅脂肪細胞研究模式之細胞株.....	5
二、細胞培養.....	6
三、3T3-L1 前驅脂肪細胞分化之進程.....	6
參、轉錄因子介紹.....	10
一、PPAR 家族.....	10
二、C/EBP 家族.....	14
肆、多酚類化合物.....	20
一、多酚類化合物.....	20
二、白藜蘆醇的生物活性.....	21
三、參與白藜蘆醇調控脂肪細胞之傳訊分子.....	23
伍、研究目的.....	24
材料與方法.....	25
壹、材料.....	25
一、細胞株.....	25
二、抗體.....	25

貳、實驗方法	26
一、3T3-L1 前驅脂肪細胞 (preadipocyte) 之培養與繼代.....	26
二、脂肪細胞分化.....	26
三、細胞存活率測定 (MTT cell viability assay)	27
四、GPDH 活性分析.....	28
五、Oil Red O 染色法	28
六、半定量反轉錄聚合酶連鎖反應 (semiquantitative RT-PCR)	29
七、蛋白質分析.....	30
八、統計分析.....	31
結果.....	32
討論.....	41
結論.....	47
圖表.....	49
參考文獻.....	80

圖表目錄

圖 甲. 3T3-L1 前驅脂肪細胞之分化進程圖	7
圖 乙. 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化實驗之時程	27
圖 丙. 白藜蘆醇四種不同之添加時程.....	27
圖 丁. 白藜蘆醇藉由影響各轉錄因子而促進脂肪細胞分化.....	48
圖 1. 不同濃度之白藜蘆醇對 3T3-L1 前驅脂肪細胞之毒性分析	49
圖 2. 不同濃度之白藜蘆醇對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化之影響	50
圖 3. 不同濃度之白藜蘆醇對 3T3-L1 脂肪細胞之油滴生成	51
圖 4. 不同時段添加白藜蘆醇對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化之影響	53
圖 5. 分化初期 15 μ M 白藜蘆醇處理對 C/EBP β 基因表現之影響	54
圖 6. 分化初期 15 μ M 白藜蘆醇處理對 CHOP 基因表現之影響	55
圖 7. 15 μ M 白藜蘆醇處理對 PPAR γ 基因表現之影響	56
圖 8. 15 μ M 白藜蘆醇處理對 adiponectin 基因表現之影響	58
圖 9. 15 μ M 白藜蘆醇處理對 aP2 基因表現之影響.....	60
圖 10. 分化初期 15 μ M 白藜蘆醇處理對 C/EBP β 蛋白質表現之影響	62
圖 11. 分化初期 15 μ M 白藜蘆醇處理對 C/EBP δ 蛋白質表現之影響.....	64
圖 12. 15 μ M 白藜蘆醇處理對 C/EBP α 蛋白質表現之影響	66
圖 13. 15 μ M 白藜蘆醇處理對 PPAR γ 蛋白質表現之影響	68
圖 14. 分化初期 15 μ M 白藜蘆醇處理對 CHOP 蛋白質表現之影響	70
圖 15. 分化初期 15 μ M 白藜蘆醇處理對 AKT 表現之影響	72
圖 16. 分化初期 15 μ M 白藜蘆醇處理對 ERK1/2 表現之影響.....	74
表 1. 反轉錄 PCR 條件與配方	76
表 2. 各基因引子序列.....	77
表 3. 各基因 PCR 條件	78

摘要

白藜蘆醇廣泛存在於葡萄、莓果與花生等蔬果中。已知白藜蘆醇擁有許多生理活性，如抗氧化、抗老化和免疫調節活性等。脂肪組織可分泌多種因子與細胞激素，在能量平衡上扮演重要的角色。本論文探討白藜蘆醇對於 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化之影響及其機制。實驗結果發現早期 (day -1 到 day 2) 添加 15 μ M 白藜蘆醇能增加末端分化指標，如 GPDH 活性、油脂累積與脂肪結合蛋白 (aP2) 和脂泌素等基因表現。而 PPAR γ 與 C/EBP α 為脂肪分化之主要轉錄因子。發現添加 15 μ M 白藜蘆醇具有增加 PPAR γ 與 C/EBP β 之基因表現。而添加 15 μ M 白藜蘆醇可增加 PPAR γ 、C/EBP δ 與 C/EBP α 之蛋白質表現，而些微增加 C/EBP β 之表現。此外，已知 CHOP 可與 C/EBP β 結合而抑制脂肪新生作用，結果發現添加 15 μ M 白藜蘆醇可降低 CHOP 之基因與蛋白質之表現。另外，我們發現 ERK1/2 並不參與白藜蘆醇誘發脂肪細胞生成過程，而 AKT 則可能參與其中但其具體角色尚待釐清。這些結果顯示白藜蘆醇可藉由降低 CHOP 與增加 C/EBP β 、C/EBP δ 、C/EBP α 和 PPAR γ 而促進脂肪細胞中之脂肪新生作用。

Abstract

Resveratrol (trans-3,4',-5-trihydroxystilbene) is found in various vegetables and fruits, including grapes, berries and peanuts. Resveratrol exerts antioxidative, anti-aging and immunomodulatory activities. Adipose tissue plays an important role in energy homeostasis by secreting various factors and cytokines. We investigated the effect of resveratrol on 3T3-L1 preadipocyte differentiation and its underlying mechanism. Our results showed that resveratrol enhanced the induction of terminal differentiation markers such as glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity, lipid accumulation, and the mRNA expression of adipocyte fatty acid-binding protein (aP2) and adiponectin when 3T3-L1 cells were treated with 15 μ M resveratrol during the early period (from day -1 to day 2). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ and CCAATT enhancer binding proteins (C/EBP) α are master transcription factors of adipocyte differentiation. Resveratrol (15 μ M) treatment enhanced the mRNA expression of C/EBP β and PPAR γ , which are master transcription factors of adipocyte differentiation. 15 μ M Resveratrol treatment enhanced the protein expression of C/EBP δ , C/EBP α and PPAR γ , and slightly enhanced the expression of the active isoform of C/EBP β . On the other hand, 15 μ M resveratrol down-regulated the mRNA and protein expression of CHOP, which is known to prevent adipogenesis by directly binding to C/EBP β . We found AKT, but not ERK1/2, maybe play a part in resveratrol-induced adipogenesis, though its role is not clear. These results suggest that resveratrol may enhance adipogenesis of adipocytes via down-regulation of CHOP and up-regulation of C/EBP β , C/EBP δ , C/EBP α and PPAR γ .

文獻回顧

壹、脂肪組織 (adipose tissue)

脂肪組織具儲存及供應能量、維持體溫、保護臟器等功能，主要經由增殖 (hyperplasia) 與肥大 (hypertrophy) 等方式決定脂肪組織的大小。前者是使前驅脂肪細胞 (preadipocyte) 受到適當刺激後分化成具有功能之脂肪細胞，進而使脂肪細胞數目增加 (Caro et al., 1989)，後者是分化完全的脂肪細胞以三酸甘油酯的形式將脂質累積在細胞內，進而使脂肪細胞個體體積變大。在成長階段主要是透過增殖方式，而在性成熟後前驅脂肪細胞變成具完整功能的成熟脂肪細胞能力下降 (Vázquez-Vela et al., 2008)。在人體內前驅脂肪細胞分化成脂肪組織發生於胚胎晚期，多數前驅脂肪細胞分化發生於出生後，使新生兒更能有效吸收外界營養。所有物種皆具有分化前驅脂肪細胞的能力，其分化與否視生命中對脂肪儲存需求而異 (Ntambi and Kim, 2000)。

脂肪組織的功能可分成三類型：第一類為與脂質代謝有關，因其具有儲存三酸甘油酯 (triglycerides, TG) 及釋放脂肪酸 (fatty acid, FA) 有關。第二類為因脂肪組織可適當地代謝 TG 而釋放出甘油 (glycerol) 和 FAs，而甘油與 FAs 參與肝臟與其他組織的葡萄糖代謝。第三類為脂泌素之分泌，做為體內重要內分泌器官可活躍的參與許多代謝反應，因脂肪細胞可分泌脂泌素 (adipokines)，脂泌素包含具特殊生理功能的荷爾蒙、細胞激素和蛋白質，如瘦體素 (leptin)、抵抗素 (resistin) 及腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor, TNF α) 等而影響膽固醇代謝、免疫反應與凝血作用等。因脂肪組織具上述功能，故在脂肪細胞的發展與生長及個體能量平衡等生理過程扮演重要角色 (Vázquez-Vela et al., 2008)。

而脂肪包含白色組織 (White adipose tissue, WAT) 與褐色脂肪組織 (Brown adipose tissue, BAT)，依細胞結構、位置、顏色和功能性有區別，皆與能量利用有密切相關 (Vázquez-Vela et al., 2008; Jequier and Tappy, 1999)。因此在探討肥胖與代謝疾病之間的關聯時多會藉由針對脂肪細胞之分化來探討其機制。

一、白色脂肪組織

於許多物種中，例如人、豬、小鼠及大鼠，出生前白色細胞組織就已形成，

並於性成熟之後能仍具有產生新的脂肪細胞的能力。從各物種中分離出的前驅脂肪細胞於體外實驗中能具分化成成熟脂肪細胞。而餵食大鼠高能或高脂飼料時，脂肪細胞數目仍可增加 (Gregoire et al., 1998; Francine et al., 1998)，在嚴重肥胖的人也可發現此情形。

白色脂肪組織是能量的主要儲存場所，主要分布於腹部、大腿、臀部等皮下組織及內臟周圍，可略分為皮下脂肪組織 (subcutaneous adipose tissues)、內臟脂肪組織 (visceral adipose tissues)。白色脂肪細胞是一種存有大型脂肪滴 (lipid droplet) 的細胞，細胞內的細胞核與胞器都被脂肪滴壓迫到細胞的邊緣，其脂肪滴是由 TGs 形成，是能量儲存的主要位置。皮下脂肪組織在男女性上所佔比例不同，此類可幫助調控與維持體溫與隔熱。內臟脂肪組織則分布在器官空間間隙中用以固定器官位置，並可再細分成 mesenteric 和 omental 等。當發生能量需求時，如飢餓，白色脂肪組織內的脂解酵素會將所儲存的 TG 進行解脂作用 (lipolysis) 以提供 FA 給其他組織並產生能量，其中臀部與腹部的脂肪組織優先消耗，而分布於手腳的脂肪組織則較少消耗 (Vázquez-Vela et al., 2008)。

在已分化的脂肪細胞中，TG 的合成與脂解作用十分活躍，當合成作用大於脂解作用時則脂肪細胞個體體積增加，當合成作用小於脂解作用時則脂肪細胞個體體積減少。當脂肪組織的脂解作用進行時會產生游離脂肪酸 (free fatty acid) 與甘油，FA 可經再酯化 (re-esterified) 成三酸甘油酯並再次儲存，而甘油則因脂肪細胞無法直接利用此甘油因此將其自脂肪細胞中釋出，經循環系統送至肝臟，成為葡萄糖新生的原料 (Kishida et al., 2001)。

二、褐色脂肪組織

褐色脂肪組織是多胞性脂肪細胞內有許多小型油滴且擁有發達的胞器，如大量粒線體 (mitochondria) 可產熱，故可造成能量消耗與調節體溫，主要存在於頭、頸部位 (Vázquez-Vela et al., 2008; Rosen et al., 2000)。一般會冬眠的動物，體內的脂肪細胞以褐色脂肪細胞為主，冬眠期間褐色脂肪組織將三酸甘油酯轉換成熱能以維持冬眠動物之體溫，並為誘發其甦醒所必需 (Cannon and Nedergaard, 2004)。褐色脂肪組織亦存在於所有哺乳類體內，尤其是小型哺乳類動物。小型嚙齒動物和人類新生兒因表體積大易導致失溫，因此存在於體內之褐色脂肪組織可透過消耗熱能產生溫度以調整與維持體溫，但於孩童時期褐色脂肪組織即大量

消失，至成年階段似乎僅有極少數褐色脂肪組織能殘留且散布於白色脂肪組織中 (Cannon and Nedergaard, 2004; Vázquez-Vela et al., 2008)。褐色脂肪組織可藉由非耦合蛋白 1 (uncoupling protein 1, UCP1) 的特異性表現來幫助產熱 (Garled et al., 1998)。

三、脂肪組織與肥胖及代謝性疾病

肥胖在許多國家是很重要的公共衛生健康問題，且肥胖已被認為是動脈硬化、糖尿病、高血壓和高血脂等的主要危險因子之一。肥胖是起因自於脂肪細胞分化導致脂肪細胞 (fat cell) 數目極度失調有關，因過多脂肪細胞而最終導致肥胖。另外長期的肥胖也與多種癌症及免疫失控有關。在第二型糖尿病的病患中因長期肥胖而引起胰島素阻抗性 (obesity-linked insulin resistance) 的病例佔很高的比率 (Chandran et al., 2003)。許多動物實驗指出過度攝食與脂肪增加有關，且過多的脂肪組織會造成許多代謝疾病異常，如高血壓 (hypertension)、高血脂 (dyslipidemias)、高血糖及高胰島素等發生。而許多基因剔除 (KO) 與轉基因動物模式指出肥胖的發展是相當複雜的，因在此發展過程當中有許多基因，如轉錄因子、訊息傳遞因子、荷爾蒙與細胞激素的表現改變，這暗示肥胖會改變多種重要基因表現 (Vázquez-Vela et al., 2008)。因此透過了解分化過程將可應用於控制脂肪細胞數目 (adipocyte cell number) 及控制某些疾病發病進展 (Ntambi and Kim, 2000)。因此研究脂肪細胞的分化情形可能提供進一步了解各種成分藥物與肥胖之間的關聯性。

貳、研究模式

一、前驅脂肪細胞研究模式之細胞株

目前常利用前驅脂肪細胞 (preadipocyte) 分化成脂肪細胞 (adipocyte) 的體外研究模式提供研究脂肪細胞生成作用 (adipogenesis) 並能更加了解其過程中各分子所扮演角色 (Rosen et al., 2000)。可供研究用的前驅脂肪細胞株可分為兩類，一為多潛力幹細胞 (pluripotent fibroblasts) 其具有轉變成多種細胞型態 (cell types)，此類型包含有 10T1/2、Balb/c、3T3、RCJ3.1 和 CHEF/18 等，上述細胞

株可在藥物 5-azacytidine 處理下轉變成前趨脂肪細胞。以 10T1/2 為例，其分離自 C3H 品系的小鼠胚胎 (mouse embryos)，具轉變成 preadipocyte、premuscle 和 precartilage 組織的能力 (Ntambi and Kim, 2000)。另一類為 unipotent preadipocytes，此類型包含有 3T3-L1、3T3-F422A、O1771、TAI、1246 和 30A5 等，此類型細胞株已經決定轉變成前驅脂肪細胞及脂肪細胞，故此類型皆為研究前驅脂肪細胞轉變成脂肪細胞的理想材料。其中 3T3-L1 和 3T3-F422A 分離自 Swiss 品系 17 至 19 天的小鼠胚胎，是最廣泛使用於研究之細胞株 (Ntambi and Kim, 2000; Gregoire et al., 1998; Rosen et al., 2000)。因此本研究將以 3T3-L1 此細胞株為研究對象。

二、細胞培養

細胞培養是指從體內組織取出細胞，在體外藉由模擬體內之生理環境及提供細胞生長所需之營養，使其生長繁殖並維持其原有結構與功能的一種技術，此技術始於 1950 年代。有文獻表示，在生長階段的前驅脂肪細胞株與初代脂肪細胞在形態上皆與纖維母細胞相似，並於細胞長滿時以適當的處理誘發分化將導致細胞型態上明顯改變，前驅脂肪細胞將由細長的形態轉變成圓而立體，並開始累積油滴並逐漸具有成熟脂肪細胞的形態與生化特徵 (Cowherd et al., 1999)。

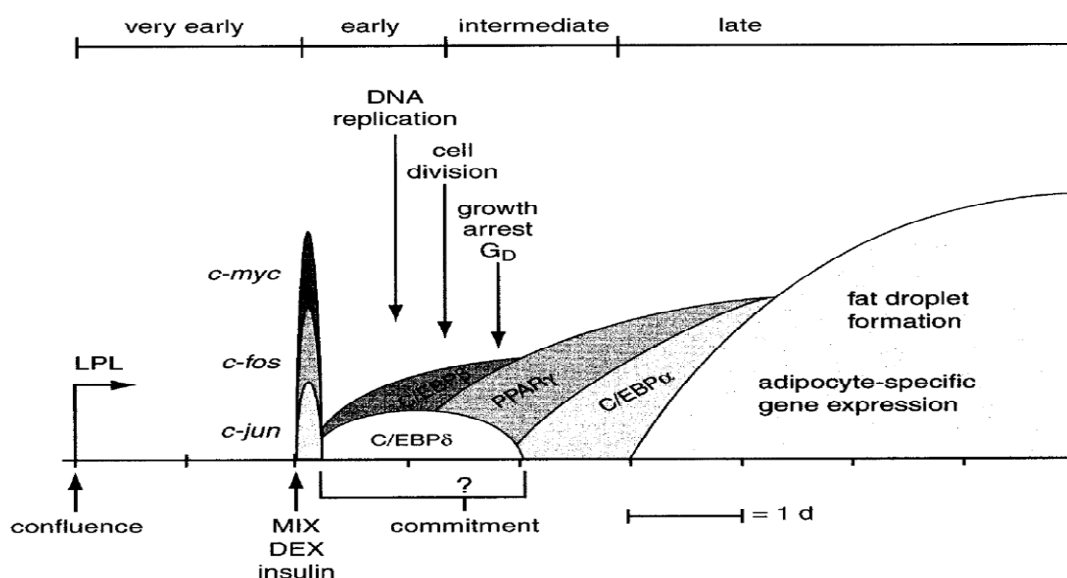
三、3T3-L1 前驅脂肪細胞分化之進程

在培養皿中 3T3-L1 前驅脂肪細胞生長至互相碰觸後即達到 confluent，此時細胞將不會再繼續分裂，此時可添加外源性分化試劑誘導其分化。此外源性分化試劑須含有可提高細胞內 cAMP level 的 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)，葡萄糖皮質素 (glucocorticoid)、胰島素 (insulin) 及胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的處理配方方可達最大效果。在前驅脂肪細胞中胰島素受體表現量很低，而類胰島素生長因子受體表現量高，其中胰島素經由與類胰島素生長因子 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) 受體 (receptor) 結合，並活化酪胺酸激酶 (tyrosine kinase)，進而激活絲裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 與胞外訊息調控激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 1 與 2 促使細胞擴增，且此刺激在前驅脂肪細胞分化成脂肪細胞過程中是必需的

(Ntambi and Kim, 2000; Gregoire et al., 1998)。Dexamethasone (DEX) 是個人工合成的增敏劑 (glucocorticoid agonist)，傳統上被用來與糖皮質素類固醇受體結合，可活化細胞內轉錄因子的活性，並調節細胞的分化。而 IBMX 是個 cAMP 磷雙酯酶 (cAMP-phosphodiesterase) 抑制劑，透過抑制磷雙酯酶來提升細胞內 cAMP 的量，故 IBMX 可用來刺激 cAMP-dependent protein kinase 途徑進而促進細胞的分化。故一般分化培養液含胰島素、DEX 和 IBMX 來誘導前驅脂肪細胞進行分化 (Ntambi and Kim, 2000)。

在分化成成熟的脂肪細胞之前，3T3-L1 前驅脂肪細胞會利用轉錄因子，前驅脂肪細胞因子 1 (pre-adipocyte factor-1, Pref-1) 來維持未分化狀態，只有在前驅脂肪細胞中大量表現，於分化中大量減少，而在成熟脂肪細胞中則偵測不到 (Gregoire et al., 1998)。整體上 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化過程可分成四個時期 (分化進程圖見圖甲)，分別為極早期 (very early stage)、早期 (early stage)、分化中期 (intermediate stage) 和分化末期 (late differentiation) 四種時期 (Gregoire et al., 1998; Ntambi and Kim, 2000)。

Progression of Preadipocyte Differentiation



Ntambi and Kim, 2000, J. Nutr. 130: 3122S-3126S

圖甲、3T3-L1 前驅脂肪細胞之分化進程圖。

1、極早期

在體外培養過程中，在長滿前細胞會持續分裂，當長滿時細胞會相互碰觸

而形成 confluence 而形成生長停滯，故又為生長停滯期 (growth arrest)，此時期前驅脂肪細胞因細胞間碰觸而誘發極早的脂肪細胞分化指標 (very early markers of adipocyte differentiation)，如 LPL (lipoprotein lipase) 和第六型膠原基因 (type VI collagen genes) 的表現 (Gregoire et al., 1998; Ntambi and Kim, 2000)。

2、 早期

在此期間前驅脂肪細胞經歷多次有絲分裂，而因分化培養液中有適當荷爾蒙媒介物 (hormonal agents) 可觸發一連串事件造成前驅脂肪細胞分化成成熟脂肪細胞，此時荷爾蒙媒介物會誘導生長停滯使前驅脂肪細胞同步進入細胞週期和並進入細胞擴充期，故又可稱荷爾蒙誘發及細胞擴充期 (mitotic clonal expansion, Tang and Lane, 2000)。分化中的前驅脂肪細胞經歷 postconfluent mitosis 和生長停滯，此時細胞最少經歷一次 DNA 複製和細胞分裂。

添加分化培養液約 1 小時後，則可觀察到一些早期反應基因 (early response gene)，如 c-fos、c-jun、junB、c-myc 和 CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBP) β 和 δ 表現，其中 fos 和 jun 並沒有直接參與到任何分化事件，而 c-myc 則參與啟動分化中前驅脂肪細胞的增殖作用 (mitogenesis)，但在分化中所扮演的角色卻未清楚釐清。在 Fretyag 等人在實驗中證實表現 c-myc oncogene 會阻礙細胞分化，但使用高度表現 c-myc antisense RNA 則會逆轉，這暗示 c-myc 可能是在生長停滯後直接再進入細胞週期並持續進行後續分化的調控點。c-fos、c-jun、junB 和 c-myc 的表現是短暫的，約在處理分化培養液後 2 至 6 小時消失 (Ntambi and Kim, 2000)。

分化培養液中所含的 DEX 和 IBMX 會分別刺激 C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) δ 和 β 表現 (Prusty et al., 2002; Rosen et al., 2000)，可誘導前驅脂肪細胞形成 cocktail 狀態，此過程可加快荷爾蒙所誘導刺激脂肪新生作用 (adipogenesis)，而 C/EBP β 和 δ 會更進一步引導出參與 adipogenesis 重要轉錄因子，如 ADD/SREBP-1c (adipocyte differentiation and determination factor1/sertrol regulation element binding protein-1c)、PPAR γ 和 C/EBP α 等 (Gregoire et al., 1998)。

3、 分化中期

在經歷過早期的細胞擴充後，於分化第二天細胞完成 postconfluent mitosis 並進入生長停滯，又稱 G_D。此次的細胞分裂被視為在分化過程中是必要步驟，因此時會將 DNA 雙股螺旋解開並允許轉錄因子接近基因上可調控成熟脂肪細胞

型態的調控反應位 (regulatory response elements)，經過此生長停滯後細胞繼續轉變成脂肪細胞 (Ntambi and Kim, 2000; Tang and Lane, 2000)。

經 C/EBP β 和 δ 引導出的 ADD/SREBP-1c (adipocyte differentiation and determination factor1/sertral regulation element binding protein-1c)、PPAR γ 和 C/EBP α 等會開始大量表現並會進一步引發脂肪細胞特異性基因的表現，如 aP2 (adipocyte protein 2)、ACS (acyl CoA synthase)、FATP-1 (fatty acid transport protein-1)、LPL、adipsin 和 Glut 4 (Gregoire et al., 1998; Cowherd et al., 1999; Talpur et al, 2001; Wise and Green., 1979)。前人文獻指出，在去除 DEX 和 IBMX 48 小時後，C/EBP δ 表現消失，而 C/EBP β 逐步減少，約至第八天 (Day 8) 表現消失 (Gregoire et al., 1998)。而受 C/EBP β 和 δ 所引發的 PPAR γ 於第二天 (Day 2) 表現，並於第三到第四天 (Day 3 ~ Day 4) 表現量最大。而 C/EBP α 則從分化前偵測不到，於第二天 (Day 2) 開始表現，並於第五天 (Day 5) 表現量最大 (Ntambi and Kim, 2000)。

4、分化末期

此時期之脂肪細胞逐漸轉變成成熟脂肪細胞，開始具有累積油滴等功能。且此時期脂肪細胞特異性基因會開始大量表現，並在形態上從原本類似纖維母細胞的前驅脂肪細胞隨著細胞骨架與細胞外間質的改變而逐漸變圓，並可見小油滴的生成並逐漸聚集成大油滴，在此時期也可偵測到 insulin-stimulated glucose uptake 現象發生，在刺激分化後第五天到第七天脂肪細胞獲得完整型態並具有許多酵素活性，如脂解作用 (lipolysis) 和脂質新生作用 (lipogenesis) (Vázquez-Vela et al., 2008; Gregoire et al., 1998)。在此時期與三酸甘油酯代謝相關的酵素、蛋白質與 mRNA，如 ATP citrate lyase, malic enzyme, acetyl-CoA carboxylase, stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1), glycerol-3-phosphate acyltransferase (GPAT), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) 和 fatty acid synthase (FAS) 等的表現量增加 10 到 100 倍。同時也增加葡萄糖轉運蛋白 (glucose transporter)、胰島素受體數量和胰島素敏感度。分化後期脂肪細胞開始分泌脂肪組織特殊產物 (adipose tissue-specific product)，如脂肪酸結合蛋白 (fatty acid binding protein, 又稱 aP2)、脂肪酸轉運蛋白 (fatty acid transporter, FAT/CD36)、脂泌素 (adiponectin) 和瘦體素 (leptin) 等 (Gregoire et al., 1998; Cowherd et al., 1999; Talpur et al, 2001; Wise and Green.,

1979)。

參、轉錄因子介紹

一、PPAR 家族

PPAR 家族屬於細胞核荷爾蒙受體超級家族 (nuclear hormone receptor superfamily) 之一 (Tontonoz et al., 1994)，是受配體調控的 (ligand-regulated) 轉錄因子，當受到配體刺激後可與 retinoid X receptor (RXR) 形成異型合子 (heterodimer) 再藉由結合在下游基因啟動子 (promoter) /加強子 (enhancer) PPAR 反應區 (PPAR response element, PPRE) 的特殊序列來控制基因表現 (Tontonoz et al. 1994; Albrektsen et al., 2002; Cowherd et al., 1999)。PPAR 在偵測脂質堆積與脂質代謝調控上扮演關鍵性角色。許多自然界物質可視為 PPAR 配體，如不飽和脂肪酸及其代謝物、花生四烯酸 (eicosanoids) 和前列腺素 (prostaglandins) (Bocher et al., 2002; Cowherd et al., 1999)；在人工合成配體上則有非固醇類抗發炎藥物與已證實為抗糖尿病藥物胰島素增敏劑 TZD (thiazolidinediones) (Cowherd et al., 1999)，因 TZD 具有促進脂肪細胞分化，藉由增加脂質儲存與增加第四型葡萄糖轉運蛋白和脂聯素 (adiponectin) 表現量而達到改善胰島素刺激葡萄糖攝入與降低胰島素阻抗等功能 (Vázquez-Vela et al., 2008; Cowherd et al., 1999)。在 Takamura 等人發現於 3T3-L1 與 3T3-F442A 前驅脂肪細胞分化中添加不同劑量的 TZD 可調節 PPAR γ 基因與蛋白質之表現並促進脂肪細胞之分化 (Takamura et al., 2001)。

1、PPAR 家族成員：

PPAR 次家族 (subfamily) 含有三個成員，分別為 PPAR α 、PPAR γ 和 PPAR δ (β)，各具有不同的組織分布與配體特異性 (Berger and Moller, 2002; Vázquez-Vela et al., 2008; Michalik and Wahli., 1999)。當有很強的 PPARs 活化者存在時，PPAR α 可能顯著誘導脂肪細胞的分化。在嚙齒動物中，PPAR α 在肝臟、腎臟與腸道中大量表現，PPAR α 的作用在於誘導與脂肪酸氧化相關基因的表現。在人類體內，PPAR α 在腎臟與肌肉中大量表現且對過氧化增殖劑 (peroxisome proliferator agents) 和饑餓很敏感 (Ricote et al., 1998; Berger and

Moller, 2002)。在 PPAR 次家族中僅 PPAR γ 具有脂肪專一性，可轉錄活化許多種基因表現 (Chawla and Lazar, 1994)。PPAR δ 在脂肪組織中也會高度表現，其表現似乎先於 PPAR γ ，在極早期分化時 PPAR δ 被正向調控，這暗示 PPAR δ 在脂肪細胞新生作用中扮演很重要的角色。在啮齒動物與人體中 PPAR δ 少量存在於各組織中，故並不具脂肪組織特異性 (Berger and Moller, 2002)。PPAR γ 目前已知具有控制發炎反應、調控細胞分裂與分化等細胞功能。其抑制發炎反應可經拮抗 activation protein 1 (AP1) 和 nuclear factor kappa B (NF κ B) 活性 (Ricote et al., 1998; Michalik and Wahli., 1999)。而當 PPAR γ 活化時，可藉由抑制細胞生長和促進細胞凋亡來防止多種癌症的生長，如結腸癌、攝護腺癌與乳癌 (Houston et al., 2003; Chinetti et al., 1998)。PPAR γ 在脂肪前驅細胞中表現量很低，但足夠誘發脂肪前驅細胞分化 (Tontonoz et al., 1994)，PPAR γ 是脂肪細胞新生作用的主要調控者且在脂肪組織發展上扮演著重要的角色 (Gregoire et al., 1998; Li and Lazar, 2002)。與控制脂肪酸產生有關的轉錄因子 ADD/SREBP-1c (adipocyte differentiation and determination factor / sterol regulatory element binding protein-1c) 亦為 PPAR γ 內源性配體。異位表現 ADD/SREBP-1 可藉由直接活化 PPAR γ 2與刺激 PPAR γ 配體的產生來促進非脂肪細胞轉變成脂肪細胞 (Hamm et al., 2001)。

2、 PPAR γ 異構形：

PPAR γ 具有兩種異構形，分別為 PPAR γ 1和 PPAR γ 2，兩者來自同一基因，利用不同的啟動子與剪接 (splicing) 形成兩種蛋白質 (Berger and Moller, 2002; Fajas et al., 1998; Hamm et al., 2001; Meirhaeghe et al., 2003)，因此 PPAR γ 1和 PPAR γ 2具有幾乎完全相同的 exon 序列，兩者差別在於 PPAR γ 2在N端多出30個胺基酸 (Tontonoz et al., 1994; Zhu et al., 1995)。在表現區域上兩者在脂肪組織中皆顯著地表現 (Gerhold et al., 2002)，然 PPAR γ 1另也表現在其他各組織中，如心、骨骼肌、結腸、大小腸、腎、胰與脾 (Berger and Moller, 2002; Fajas et al., 1998)。

PPAR γ 1與 PPAR γ 2皆能刺激脂肪細胞的分化，使其表現與成熟脂肪細胞相似的基因與胰島素反應。而以 PPAR γ 2有較高誘發脂肪細胞分化能力，在脂肪細胞分化過程中，PPAR γ 2扮演較重要性的角色 (Tontonoz et al., 1994; Muller et al., 2002)。3T3-L1 前驅脂肪細胞若缺乏 PPAR γ 時，其分化會受阻；而以反轉錄病毒轉殖 γ 1或 γ 2時，僅 γ 2組能恢復分化能力 (Ren et al., 2002)。

3、PPAR γ 生理功能：

PPAR γ 在生理功能上尚未完全明瞭，而已知 PPAR γ 具有調控多種基因表現，可分為幾個族群：

a、脂質代謝相關基因：

PPAR γ 具有調控 aP2、PEPCK、acyl-CoA 和 LPL 等基因的表現。在許多體內實驗中發現以 PPAR γ 增敏劑 (agonist) 可增加上述基因在白色脂肪組織中的表現。而這些基因的蛋白質功能分別為：aP2 為脂肪組織脂肪酸結合蛋白 (Berger and Moller, 2002; Tontonoz et al., 1994)。PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) 為甘油新生作用 (glyceroneogenesis) 途徑內的酵素 (Berger and Moller, 2002; Tontonoz et al., 1995)。acyl-CoA 合成酶則參與脂質新生或脂質分解作用 (Martin et al., 1998)。而 LPL (lipoprotein lipase) 則參與水解三酸甘油酯過程 (Schoonjans et al., 1995)。因此上述基因皆會影響白色脂肪細胞脂質代謝 (Berger and Moller, 2002)。

b、與脂肪組織脂質攝取相關基因：

PPAR γ 已被報導具有增加調控脂肪酸轉運蛋白 FATP-1 和 CD36 表現 (Martin et al., 1997)，影響白色脂肪組織的脂質攝入。但在肌肉組織中使用 PPAR γ 增敏劑則會降低 FATP-1 的基因表現 (Berger and Moller, 2002)。

c、與能量平衡相關基因：

在體內 (in vivo) 和體外 (in vitro) 實驗中發現在白色脂肪組織中利用 PPAR γ 增敏劑可增加粒線體解偶合蛋白 UCP-1、UCP-2 和 UCP-3 的表現，而在褐色脂肪組織中 UCP-1 基因表現也會增加 (Berger and Moller, 2002)。

d、與胰島素活性相關基因：

TNF α 可降低脂肪細胞中胰島素受體 (insulin receptor) 與 PPAR γ 的表現量並使脂肪細胞增加 FFA 釋放，而誘發胰島素抗性並減弱胰島素訊息傳遞效果。因此在肥胖的齧齒類動物中給予 PPAR γ 增敏劑可抑制 TNF α 表現而減少胰島素抵抗。在許多文獻中指出使用 PPAR γ 增敏劑可調控許多作用，如增加胰島素訊息傳遞機制中 IRS-2 及 IR 基因表現及與葡萄糖轉運有關的 c-CBL 及 Glut 4 表現 (Tamori et al., 2002)、增加抑制葡萄糖氧化能力的 PDK4 之表現和增加與肌肉或肝臟代謝能力有關的脂聯素 (adiponectin) 基因表現 (Berger and Moller, 2002)。

4、 PPAR γ 與脂肪細胞之分化：

不論體內或體外實驗皆指出 PPAR γ 與脂肪細胞脂分化的調控有密切關係 (Wu et al., 1999)。PPAR γ 為脂肪細胞分化上最主要的基因，為脂肪細胞發展過程中扮演相當重要的角色 (Ntambi et al., 2000; Li and Lazar, 2002; Vázquez-Vela et al., 2008; Gerhold et al., 2002)。PPAR γ 在前驅脂肪細胞中表現量很低，但在分化試劑與胰島素等刺激下立即大量表現。在3T3-L1 細胞分化過程中，於分化第二天即可很容易偵測到其表現量並在成熟脂肪細胞中獲得最大表現量 (Bocher et al., 2002)。在脂肪專一性 PPAR γ 基因缺失小鼠上發現會抑制前驅脂肪細胞轉變成成熟脂肪細胞，並造成脂質代謝障礙 (lipodystrophy) (Vázquez-Vela et al., 2008; Wu et al., 1999)。而在 PPAR γ 異型剔除小鼠體內成熟脂肪組織中的前驅脂肪細胞給予 TZD 發現可促進其分化，並增加脂肪細胞的數目 (Albrektesn et al., 2002)。在 1994 年 Tontonoz 等人以體內實驗及使用 3T3-L1 纖維母細胞進行體外實驗發現增加 PPAR γ 表現量始具有啟動脂質細胞新生作用之能力，這些實驗證實 PPAR γ 在脂肪細胞新生作用中是必須的 (Tontonoz et al. 1994)。

3T3-L1 前驅脂肪細胞在缺乏分化試劑時，利用異位表現或配位體活化 PPAR γ 可誘發脂肪細胞之分化 (Chawla and Lazar, 1994; Hamm et al., 2001)。當 C/EBP α 、C/EBP δ 結合上 PPAR γ 啟動子上的 C/EBP 調節區則可直接轉活化基因表現 (Hamm et al., 2001)。此外，PPAR γ 與 PPAR α 的轉活化效力也受與其他家族交互作用及磷酸化而影響 (Hansen et al., 2001)。在 2002 年 Prusty 等人指出，於 3T3-L1 脂肪前驅細胞添加蛋白質激酶 A (protein kinase A, PKA) 或 MEK/ERK1/2 促進劑，可增加 PPAR γ 的轉錄活性而促進脂肪細胞之分化 (Prusty et al., 2002)。在 2003 年 Watanabe 等人提出活化 MAPK 或 PI3K，則會抑制 PPAR γ 的轉錄活性而降低脂肪細胞分化 (Watanabe et al., 2003)。

5、 與脂肪細胞脂質堆積：

於完全成熟的脂肪細胞中 PPAR γ 調控許多與葡萄糖及脂質代謝相關的轉錄因子表現，而促進葡萄糖與脂肪酸的攝入 (Bocher et al., 2002)。若在完全成熟的脂肪細胞中抑制 PPAR γ 蛋白質表現，則細胞內的三酸甘油酯含量以及攝入脂肪酸速率降低，進而使細胞體積下降 (Tamori et al., 2002; Martin et al., 1997)。抑制 PPAR γ 表現也會降低與三酸甘油酯及脂肪酸代謝相關基因的表現，如 aP2、ACS、

LPL、脂肪酸轉運蛋白 (FABP)、荷爾蒙敏感性脂肪酶 (hormone-sensitive lipase, HSL) 等 (Tamori et al., 2002)。

二、C/EBP 家族

C/EBP 家族是第一個被證實在脂肪細胞分化上扮演重要角色的轉錄因子，也屬於 basic leucine zipper (bZIP) 家族之一，這類蛋白質可分為兩個主要區域：N 端區域具有轉錄或活化功能；而 C 端則具有形成二聚體及與 DNA 結合能力，其結合能力是先藉由 C 端的 leucine zipper 與其他 C/EBP 家族成員形成同型二聚體 (homodimer) 或異型二聚體 (heterodimer)，再以鹼性區 (basic region) 與核苷酸中特定序列結合來調控轉錄作用 (Hemati et al., 1997; Hamm et al., 2001)。

1、C/EBP 家族成員：

C/EBP 基因是由 Cao 等人所提出，共有 C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP γ 、C/EBP δ 、C/EBP ϵ 和 C/EBP ζ 六個成員。此家族成員於蛋白質結構的 C 端擁有相同的胺基酸序列，僅於 N 端少數相同 (Cao et al., 1991; Hemati et al., 1997)。其中最廣泛討論者為 C/EBP α 、C/EBP β 與 C/EBP δ 三個家族成員。

a、C/EBP α ：

C/EBP α 是 C/EBP 家族成員中第一個被發現者，其 mRNA 長度為 2.7 kb，轉譯時由於可從不同起始密碼子開始轉譯，因此可產生 42 與 30 kDa 的異構物 (Lekstrom-Himes and Xanthopoulos, 1998; Hemati et al., 1997)，兩者皆可轉活化及促進下游含有 C/EBP 結合位置的基因之表現 (Hemati et al., 1997)。30 kDa 者仍保有 C 端可形成二聚體與 DNA 結合之能力，但 N 端的轉活化能力不如 42kDa 者 (Lekstrom-Himes and Xanthopoulos, 1998)。脂肪細胞於進行脂質新生作用過程中發現會增加 p42/p30 比例 (Lin et al., 1993)。

C/EBP α 的表現很廣泛，主要分布在肝臟、脂肪組織、腸、肺臟、腎上腺、胎盤、卵巢以及周邊血液內的單核球細胞中，其中以脂肪組織與肝臟的表現量最高 (El-Jack et al., 1999)。C/EBP α 並不表現於分裂中的脂肪前驅細胞中，但在前驅脂肪細胞進行分化過程中表現開始表現，其表現時間點較 C/EBP β 與 C/EBP δ 晚，而在大多數脂肪細胞特異性基因轉錄開始之前，於結束 MCE (mitotic clonal expansion) 後的脂肪細胞中可偵測到大量 C/EBP α 表現 (Smyth et al., 1993)；

Gregoire et al., 1998; Lekstrom-Himes and Xanthopoulos, 1998)。

因 C/EBP α 為脂肪細胞分化轉錄因子，主要受分化試劑與胰島素所調控。在白色脂肪組織與 3T3-L1 脂肪細胞中，分化試劑中所添加的糖皮質醇 Dexamethasone 會抑制 C/EBP α 的轉錄 (MacDougald et al., 1994)。而胰島素可藉由三種途徑調控 C/EBP α 表現：抑制 C/EBP α 基因轉錄；快速將 C/EBP α 去磷酸化；誘發 LIP 以降低細胞核內 C/EBP α 與 DNA 結合 (MacDougald et al., 1995; Hemati et al., 1997)。C/EBP α 所涉及的訊息傳遞分子有磷酸肌醇 3 激酶

(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)、蛋白質磷酸酶 (protein phosphatase) 與激活絲裂原活化蛋白激酶/胞外訊息調控激酶 1/2 (mitogen-activated protein kinase/extracellular signal regulate protein kinases 1/2, MAPK/ERK1/2) (Prusty et al., 2002; Hemati et al., 1997)。在分化完全的 3T3-L1 脂肪細胞中添加胰島素或 IGF-1，可經由活化胰島素受體、PI3K、FRAP、蛋白質磷酸酶 (protein phosphatase) 1 與 2A 等一系列訊息傳遞途徑而刺激 C/EBP α 去磷酸化 (Hemati et al., 1997)，並經由活化 MAPK 訊息傳遞途徑降低 C/EBP α mRNA 與蛋白質表現，進而降低 Glut 4 轉錄 (Hemati et al., 1997)。由於 C/EBP α 啟動子上有 C/EBP 調控區因此可活化自己的轉錄 (Lekstrom-Himes and Xanthopoulos, 1998; Hemati et al., 1997)，而 C/EBP β 與 C/EBP δ 也具有調控 C/EBP α 表現之能力 (Hansen et al., 2001)。

在胰島素敏感性葡萄糖攝入中，C/EBP α 的持續性表現是必要的。若細胞中不表現 C/EBP α 則無胰島素敏感性攝入作用；若異位表現 C/EBP α 則恢復胰島素敏感性葡萄糖攝入作用 (El-Jack et al., 1999)。脂肪細胞中 Glut 4 的誘發也依賴 C/EBP α 的表現 (Hemati et al., 1997)，而在 Glut4 啟動子上也有 C/EBP 結合位 (Kaestner et al., 1990)，因此抑制 C/EBP α 會阻礙 Glut4 的表現並阻礙細胞質內三酸甘油酯的堆積 (Lin and Lane, 1992)。

b、C/EBP β ：

C/EBP β mRNA 由於起始密碼子的不同，可以產生至少四種以上的異構物，其分子量分別為 20、30、34 與 38 kDa (Yeh et al., 1995)，其中 34 kDa 由於具有轉活化肝臟基因表現的潛力，故又稱 liver-enriched transcriptional activator protein (LAP)；而 20 kDa 則具有抑制肝臟基因表現，故又稱 liver-enriched transcriptional inhibitor protein (LIP) (Descombes and Schibler, 1991; Hemati et al.,

1997; Hamm et al., 2001)。兩者不同之處在於 LIP 缺乏轉活化區域而僅具有 DNA 結合與 leucine zipper 區域，因此 LIP 可藉由與 LAP 形成異型二聚物而減弱 LAP 轉錄活性，扮演顯性負調節轉錄機制的角色 (Descombes and Schibler, 1991)。當異位表現 LIP，使 LAP/LIP 比值接近於 1 時則會阻礙前驅脂肪細胞之分化，因此 LIP/LAP 比例是決定 C/EBP β 整體功能的重要因子 (Yeh et al., 1995; Seagraves et al., 1998)。

C/EBP β 為非脂肪特異性蛋白，於肝臟、腸、肺臟與脂肪組織中其基本表現量最高，但於小鼠腎臟、心臟與脾臟也有表現 (Gregoire et al., 1998; Cao et al., 1991)。C/EBP β 在分裂中的前驅脂肪細胞中即大量表現⁶⁵，當細胞長滿後則表現量開始減少，而於加入分化試劑後重新表現，但直到 10~14 小時後始具有與 DNA 結合能力 (Ntambi and Kim, 2000; Tang and Lane, 1999; Tang et al., 2003; Tang and Lane, 2000)。C/EBP β 較晚擁有結合 DNA 活性可能有兩個機制：在分化初期 C/EBP β 需經次磷酸化作用 (hyperphosphorylation) 始具結合活性；C/EBP β 會短暫與 C/EBP 家族的 dominant-negative 成員之一的 CHOP-10 作用而形成異型二聚體，因此在分化過程當中 CHOP-10 可負向調控脂肪細胞之分化 (Gregoire et al., 1998; Ntambi and Kim, 2000; Li et al., 2006)。伴隨著獲得與 DNA 結合的活性，C/EBP β 會藉由結合著絲點的衛星 DNA (satellite DNA) 上的數個 C/EBP 結合位而移動至著絲點 (centromeres) (Tang and Lane, 1999; 2000)。C/EBP β 在移除 IBMX 與 DEX 後逐步減少。C/EBP β 在分化試劑添加後 4 小時大量表現，其高度表現會持續到 24 小時之後。之後 C/EBP β 表現量開始下降，至分化後期僅剩原來的 50% (Ntambi and Kim, 2000; Gregoire et al., 1998; Tang and Lane, 2000)。分化試劑中的 DEX 會短暫快速誘發 C/EBP δ 的表現。去除 DEX 48 小時後，C/EBP δ 表現消失 (Ntambi and Kim, 2000)。

在前驅脂肪細胞中加入 IBMX 可短暫快速誘發 C/EBP β 大量表現 (Ntambi and Kim, 2000; Cowherd et al., 1999; Gregoire et al., 1998)，並持續維持到 MCE 階段 (Yeh et al., 1995; Tang and Lane, 1999)；而胰島素可促進細胞核內 C/EBP β 與 DNA 結合能力 (MacDougald et al., 1995)。在早期分化過程中，C/EBP β 連續被 MAPK 與 GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β) 所磷酸化，其中 MAPK 先使 C/EBP β 上 Thr-188 磷酸化，隨後 GSK3 β 則磷酸化在 Ser-184 與 Thr-170 兩位點，

此時 C/EBP β 始具有轉錄活性 (Tang et al., 2005)。C/EBP β 與 C/EBP δ 為分化過程中第一個轉錄因子，可開起一連串轉錄因子之表現，故能加快荷爾蒙所誘發刺激脂肪細胞新生 (Tang et al., 2005)。

c、CHOP：

CHOP-10 (C/EBP homologous protein) 又稱 GADD153 (growth arrest and DNA damage 153) 與 Ddit3 (DNA damage inducible transcript 3)，CHOP 是內質網壓力 (endoplasmic reticulum stress, ER stress) 所誘發的轉錄因子 (Batchvarova et al., 1995)。在 ER 中鈣離子紊亂和蛋白質不正確的摺疊，導致細胞內質網內穩定態失衡而產生壓力稱之為 ER stress。CHOP-10 是 C/EBP 家族的 dominant-negative 成員之一，CHOP-10 的 C 端上包含一個 leucine zipper 區域，CHOP-10 可透過此區域與 C/EBP 家族中其他成員形成異型二聚體 (heterodimer)，在 DNA-binding 區域發生兩個 proline 和一個 glycine 之取代 (Li et al., 2006)。因此當 CHOP-10 與其他 C/EBP 家族成員形成異形二聚體時，無法與 C/EBP 上一致序列的結合位結合 (Batchvarova et al., 1995; Ariyama, 2007)，因此阻斷住 C/EBP 家族成員的 DNA 結合能力。CHOP-10 在生長停滯的前驅脂肪細胞中高度表現，於添加分化試劑後表現量降低 (Tang and Lane, 2000)。

2、 C/EBP 家族與脂肪細胞之分化

C/EBP 在許多細胞分化中扮演決定性角色，在脂肪細胞分化過程中 C/EBP 扮演調節的功能，能引發一連串轉錄因子的表現。在分化期間 C/EBP α 、C/EBP β 與 C/EBP δ 會結合上 DNA 特定的 CCAAT box 而建立與維持分化狀態 (Friedman and McKnight, 1990; Cao et al., 1991)。

a、C/EBP α ：

C/EBP α 是早期脂肪細胞分化的轉錄因子之一，在分化與脂質堆積上是很重要的調控者。C/EBP α 表現是受 C/EBP β 與 C/EBP δ 所誘發活化 (Hamm et al., 2001)。C/EBP α 具有抗有絲分裂能力，且於離開細胞週期之時表現 (Tang and Lane, 1999)，故可造成生長停滯並調節細胞分裂與分化 (Gregoire et al., 1998; Timchenko et al., 1997)。若過早表現 C/EBP α 則會阻礙 MCE 過程而導致阻礙脂肪細胞之分化 (Tang and Lane, 2000)。因抗有絲分裂能力在分化中很重要，故 C/EBP α 具有雙重角色：在促進脂肪細胞分化過程上終止 MCE，而繼續脂肪細胞

分化過程 (MacDougald et al. 1995; Tang and Lane, 1999); 另一部分則因 C/EBP α 可轉錄多種與脂肪型態有關基因, 故參與末期分化過程 (El-Jack et al., 1999)。

C/EBP α 較 PPAR γ 晚表現, 但早於許多和完全分化脂肪細胞型態有關的蛋白質 (Wu et al., 1998), 可轉活化自己、aP2、SCD1、Glut 4、 β 3-adrenergic receptor (β 3AR) 等基因的表現 (Kaestner et al., 1990; Tang et al., 1999; Cowherd et al., 1999)。抑制 C/EBP α 表現則會降低分化特異性基因, 如 aP2、Glut4 與 SCD1 表現, 而抑制分化與細胞質內三酸甘油酯堆積 (Cowherd et al., 1999; Lekstrom-Himes and Xanthopoulos, 1998; Lin and Lane, 1992)。

於 3T3-L1 前驅脂肪細胞 (具 PPAR γ) 中, 異位表現 C/EBP α 可於缺乏分化試劑情況下促進脂肪細胞分化 (Cowherd et al., 1999); 反之, 若抑制其表現則阻礙 3T3-L1 前驅脂肪細胞之分化 (Gregoire et al., 1998)。30 kDa 的 C/EBP α 亦具有促進轉錄的活性, 於 3T3-L1 前驅脂肪細胞中強力表現亦可誘發分化

(Lekstrom-Himes and Xanthopoulos, 1998)。PPAR γ 與 C/EBP α 皆可單獨或與其他許多蛋白質合作, 為維持分化末期脂肪細胞形態的重要基因 (Ntambi and Kim, 2000; El-Jack et al., 1999)。兩者分別維持脂質合成與脂質氧化平衡, 因此當此平衡喪失時肥胖與胰島素阻抗的風險將上升 (Vázquez-Vela et al., 2008)。

b、C/EBP β 與 C/EBP δ :

C/EBP β 與 C/EBP δ 扮演催化的角色, 可引發一連串基因表現, 為調節脂肪細胞分化上之轉錄因子 (Tang and Lane, 1999)。當脂肪細胞受到分化試劑 IBMX 與 Dex 誘發後 C/EBP β 與 C/EBP δ 立即表現 (約2小時後), 但此時不具有結合上 DNA 的活性因此無轉錄活化其他基因之能力, 隨後 (約14小時後) 才具有轉錄活化能力 (Tang and Lane, 1999; Tang et al., 2003; Tang et al., 2005), 始能誘發活化 C/EBP α 與 PPAR γ 表現 (Cao et al., 1991; Yeh et al., 1995), 最終繼續進行脂肪細胞的分化 (Zhang et al., 2004)。

於細胞擴充時期 C/EBP β 會與著絲點衛星 DNA 上的 C/EBP 調節區結合, 產生著絲點點狀核 (punctate nuclear of centromeres)。若抑制 C/EBP β 表現則會阻礙此現象, 並防止細胞進行細胞擴充 (Tang and Lane, 1999; Tang et al., 2003; Zhang et al., 2004)。脂肪細胞分化期間, C/EBP β 與 C/EBP δ 亦參與調控胰島素受體基質-2 (insulin receptor substrate-2; IRS-2) 與 Glut 4 的表現, 以及胰島素敏感性葡

葡萄糖攝入作用 (Yamamoto et al., 2002)。另外在前驅脂肪細胞中抑制 C/EBP β 活性或異位表現 LIP 使 LAP/LIP 比值接近於 1 時都會阻礙前驅脂肪細胞之分化 (Hamm et al., 2001)。

在 C/EBP β 剔除小鼠的胚纖維母細胞發現無法經歷細胞擴充與分化成脂肪細胞，但若在此細胞中強力表現 LAP 則可恢復細胞擴充，並表現脂肪細胞標幟基因、促進脂肪新生作用與脂質堆積 (Tang et al., 2003)。

c、CHOP：

在 1995 年 Batchvarova 等人提出表現 CHOP 會抑制脂肪新生作用，而異位調控 CHOP 會阻斷 C/EBP β 與 C/EBP α 結合 DNA 能力，使脂肪基因無法活化，而減弱脂肪細胞的形態 (phenotype) (Batchvarova et al., 1995)。

N-Acetyl-Leu-Leu-norleucine (ALLN) 是一種 calpain 蛋白質抑制劑，可誘發 CHOP 之表現。故於分化過程中添加 ALLN 則會藉由增加 CHOP 之表現而阻斷 C/EBP 結合 DNA 能力、抑制 MCE 和脂肪細胞脂分化 (Tang and Lane, 2000)。

在 MCE 期間 CHOP-10 表現量降低。在 2004 年 Carrière 等人提出粒線體活性氧化物產生會正向調控 CHOP-10 蛋白質量，CHOP-10 是個控制脂肪新生作用的抑制者，可負向調控脂肪細胞之分化。於低氧環境 (1% O₂) 發現能顯著增加粒線體活性氧化物 (ROS) 之產生、低氧誘發因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 和 CHOP-10 之表現以及抑制脂肪細胞之分化 (Carrière et al., 2004)。在 2006 年 Li 等人提出蛋白酶體抑制劑 Lactacystin 可藉由誘發 CHOP 表現而抑制 C/EBP β 與 DNA 的結合之能力，進而抑制 3T3-L1 脂肪細胞分化 (Li et al., 2006)。而 FBS 可不同程度地負向調控 CHOP-10，可使 C/EBP β 從 C/EBP β 與 CHOP-10 異型二聚體中釋放出來而使 C/EBP β 獲得結合上 DNA 的活性 (Huang et al., 2005)。許多 ER stress 誘發者如 thapsigargin、tunicamycin 和 cigarette smoke 皆可抑制脂肪新生作用 (Gotoh and Mori, 2006; Scheuner and Kaufman, 2008; Shimazawa et al., 2007)，其機制可能亦經誘發 CHOP-10 表現。

在正常的生理情況下，CHOP 表現量僅可勉強測得，但在當細胞內出現壓力時，如 DNA 受損、生長停滯和內質網壓力時，則會強烈誘發 CHOP 表現。在細胞凋亡前 CHOP 表現量會增加，而抑制 CHOP 表現則會阻礙細胞凋亡 (Ariyama et al., 2008)。

肆、多酚類化合物 (polyphenolic compounds) :

一、多酚類化合物 :

天然多酚化合物多存在於植物中，為植物的二次代謝產物，多與植物的風味、形態與非酵素性褐變有關，其特色為皆帶有苯酚之環狀結構。早期認為此結構易與營養素中之蛋白質與礦物質等結合，而造成其他營養素之吸收能力降低。但其結構所含之氫氧基亦使這類成份具有抗氧化及抗發炎的作用 (Yang et al., 2001)。多酚類化合物種類很多，結構各異，其生物利用率、抗氧化性及對人體的影響也有差異。研究發現可廣泛抑制許多癌細胞之生長或促進癌細胞凋亡，如乳癌、胃癌、皮膚癌、前列腺癌與大腸癌等 (Yang et al., 2000)。

多酚類物質按結構大致可分為類黃酮 (flavonoids) 與非類黃酮 (non-flavonoids)，而芪 (stilbenes)、酚酸 (phenolic acids) 和木酚素 (lignans) 皆屬非類黃酮 (Aherne and O'Brien, 2002)。

1、類黃酮 (flavonoids)

在人類飲食中含量最為豐富的多酚類化合物即為類黃酮又稱生物類黃酮 (bioflavonoids)，廣泛存於水果、蔬菜、茶和紅葡萄酒中 (Aherne and O'Brien, 2002)。而類黃酮又可細分成黃酮酚類 (flavonoles)、黃酮類 (flavones)、黃烷酮類 (flavanones)、黃烷醇類 (flavanols)、花青素類 (anthocyanidins) 和異黃酮類 (isoflavonoids) 等，共同特點是具有良好的抗氧化活性，能與維生素 C、E 和胡蘿蔔素等其他抗氧化物在體內一起發揮抗氧化功效，清除有害人體健康的自由基。其中黃酮與黃酮酚幾乎存於所有植物中 (Kuhnau, 1976)。其中黃酮酚類為最常見的類黃酮物質，如槲皮素 (quercetin)、芸香素 (rutin) 等，廣泛存在於蔬菜、水果、漿果類、茶類與紅酒中。黃酮類 (flavones) 又稱黃鹼素類，如木犀草素 (luteolin)、芹菜素 (apigenin)，於百里香和芹菜中含量豐富。黃烷酮類 (flavanones) 主要存於柑橘類水果，如橙皮苷 (hesperidin)、柚皮苷 (naringin)。黃烷醇類 (flavanols) 主要為兒茶素 (catechins)，綠茶中含量最豐富，而在紅茶中則因發酵之氧化破壞而減少一半。花青素類 (anthocyanidins) 存在於漿果、酒類與茶中，為植物中的主要色素，不同植物含量不一，例如

草莓約為 0.15 mg/g，櫻桃為 4.5 mg/g，紅酒含量則約 26 mg/L。異黃酮類 (isoflavonoids) 主要存在於大豆與豆類食品中，如染料木黃酮 (genistein) 和黃豆苷原 (daidzein)，目前已證明具有抗乳癌、抗發炎、降低心血管疾病和抗氧化的作用 (Kuhnau, 1976; Ashida et al., 2000; Middleton et al., 2000)。

2、非類黃酮 (non-flavonoids)

白藜蘆醇 (resveratrol) 又名葡萄紅醇或葡萄酚，近年來廣受到科學界關注，化學名稱為芪三酚。在葡萄、核果、紅酒和中藥虎杖 (Chen et al., 2001) 等中都含有此種成分。葡萄果實中的白藜蘆醇主要分佈於葡萄皮，其次為葡萄籽，透由酒精發酵而進入葡萄酒中，而紅酒含量較白酒多。在紅葡萄酒中的含量為一般水果的七倍以上，目前白藜蘆醇已經證實具有多種功效。

其他尚有咖啡酸 (caffeic acid)、阿魏酸 (ferulic acid)、沒食子酸 (gallic acid)、鞣花酸 (ellagic acid) 與水楊酸 (salicylic acid) 為常見的酚酸類物質。另外白藜蘆醇與木酚素 (lignans) 屬植物性雌激素，具抗氧化功能，有助於調節更年期症候群。

二、白藜蘆醇的生物活性：

白藜蘆醇存在有順式 (cis-) 和反式 (trans-) 兩種同分異構物，反式白藜蘆醇相對穩定的主要形式，在高 pH 和紫外線下可保護生物體，為植物性防禦素 (phytoalexins) (Soleas et al., 1997)。當植物受到外在環境傷害或病理刺激時，如微生物與病蟲害感染、動物傷害、UV 照射和暴露在臭氧環境等，可使白藜蘆醇合成酶 (resveratrol synthase) 活化而增加反式白藜蘆醇產量 (Romero-Pérez et al., 2001)，故能調節植物生理反應。目前白藜蘆醇有許多藥理活性，可分為下列幾點。

1、抗氧化

Resveratrol 為紅酒中具有抗氧化力的多酚類化合物，其抗氧化能力為維生素 E (vitamin E) 數十倍，可捕捉體內自由基與抑制 LDL 氧化，主要因其可提供氫原子以清除自由基 (free-radical scavenging)，故可降低脂質過氧化作用以及抑制血小板凝集 (Bertelli et al., 1995; Frémont et al., 2000)。在氧化能力而言，除

其本身環狀結構外，還帶有能提供電子之氫氧基，因此能終止如脂質、蛋白質或耗氧反應中電子傳遞鏈產生的自由基連鎖反應，而達到抗氧化之功效（Ross and Kasum, 2002）。其抗氧化能力與保護血管及抗發炎有關。

2、 抗發炎（anti-inflammatory activity）

Resveratrol 對動物細胞而言亦具有抗發炎的能力。而發炎現象的產生又與脂肪酸代謝產物有關，如花生四烯酸（arachidonic acid）為重要之代謝途徑，經由環氧酶（cyclooxygenase, COX）與過氧化酶的催化生成產物前列腺素（prostaglandins），而前列腺素則為發炎反應之前驅物。在體內與體外實驗中發現，resveratrol 具有抑制 COX 活性的能力，因此具有抗發炎之功效（Jang et al., 1997; Subbaramaiah et al., 1998）。

3、 預防心血管疾病

在 2002 年 Orallo 等人指出法國人在高脂飲食與長期飲用紅酒的生活型態之下其心血管疾病發生率較低（Orallo et al., 2002）。故長期適度的飲用紅酒可預防冠狀動脈心臟病（coronary heart disease, CHD），其機制有兩類型，第一類因具有抑制血小板凝集作用、釋放 NO (nitric oxide)，而調控血管舒張 (vasorelaxing activity) 與抑制血塊形成，故可減緩動脈粥樣硬化發生率。第二類因可協助膽固醇的新陳代謝，如 LDL (low-density lipoprotein) 與膽固醇氧化作用等，可減少血栓形成（Diaz et al., 1997; Frankel et al., 1993; Pace-Asciak et al., 1996; Yang et al., 2001）。

4、 抗腫瘤（anticancer activity）

在 1997 年 Jang 等人在動物實驗中發現，白藜蘆醇亦具抑制腫瘤發生之功效，可阻斷癌化過程中啟動期（initiation）、促進期（promotion）和演進期（progression）三種時期（Jang et al., 1997; Jang et al., 1997）。體內與體外實驗皆發現白藜蘆醇之抗癌能力與其抑制細胞週期進行機制有關（Wolter and Stein, 2002）。

5、 影響脂肪新生作用

1999 年 Lee-Currie 等人發現雌激素能影響脂肪細胞分化 (Lee-Currie et al., 1999)，而白藜蘆醇則被發現具有天然植物性雌激素之作用，因此近年來開始有人探討不同濃度白藜蘆醇對於脂肪細胞分化之影響。

文獻中指出添加高劑量（50~400 μM ）白藜蘆醇發現可減少 PPAR γ 和 C/EBP α 基因表現、增加 PPAR γ 降解、減少 PPAR γ 和 C/EBP α 轉錄活性與降低後期油滴累積和 GPDH 活性，因此能顯著降低 3T3-L1 脂肪新生作用，此劑量亦能誘發細胞凋亡（Floyd et al., 2008; Rayalam et al., 2008）。並進一步發現白藜蘆醇可經由增加 Sirt1 基因表現而抑制脂肪細胞分化（Picard et al., 2004; Bai et al., 2008）。

另外，亦有學者指出添加低劑量（12.5~25 μM ）白藜蘆醇僅可些微抑制或無明顯影響脂肪細胞分化。若合併使用其他低劑量之多酚類化合物，如槲皮素（quercetin）或金雀異黃素（genistein）等可明顯抑制脂肪細胞分化（Rayalam et al., 2007; Park et al., 2008; Yang et al., 2008）。

6、其他功效

白藜蘆醇與賀爾蒙有相似的生理特性，故為一種植物荷爾蒙（phyto-oestrogen）。因其具有擬雌性激素作用，可補充中年女性因雌激素降低而引起的更年期障礙，包括熱潮紅、心悸、盜汗、皮膚老化、失眠、焦慮等症狀（Gehm et al., 1997）。近年來許多研究指出由紅酒萃取出白藜蘆醇的化合物可延長酵母菌（Howitz et al., 2003）、果蠅與線蟲的壽命（Lastra and Villegas, 2007）。另外還有抗菌（antibacterial）、螯合銅離子（chelation of copper）與調節脂質代謝（modulation of lipid metabolism）等功效（Fremont et al., 2000）。

三、參與白藜蘆醇調控脂肪細胞之傳訊分子

1、PI3K/AKT 傳訊途徑：

PI3K及下游分子AKT（又稱蛋白質激酶B; protein kinase B, PKB）是膜受體信號向細胞內傳導的重要途徑之一，可調節細胞凋亡、生長、分化及一些重要基因的表現。AKT的表現對於脂肪細胞早期分化過程是必要的，Peng等人利用AKT1/AKT2剔除鼠的胚胎纖維母細胞（mouse embryo fibroblast）並以分化試劑誘導其分化，發現脂肪新生作用受阻，並減少PPAR γ 、C/EBP α 表現，但不會影響C/EBP β 、C/EBP δ 和CHOP-10表現（Peng et al., 2003）。在2003年Watanabe等人提出活化PI3K不會影響PPAR γ 表現，但會抑制PPAR γ 的轉錄活性，故能降低脂肪細胞分化（Watanabe et al., 2003）。

2、 MEK/ERK1/2 傳訊途徑：

MAPK 主要的傳訊途徑分別為 MEK/ERK1/2 與 c-Jun amino-terminal kinases (JNKs) 和 p38 MAPK，皆參與細胞生長、分化與凋亡等反應。在整個脂肪細胞分化進程當中，以 MEK/ERK1/2 影響層面最廣 (Bost et al., 2005)。MEK/ERK1/2 在調控脂肪新生作用上，於不同時期活化似乎有不同功能。於早期活化 MEK/ERK1/2 能促進前驅脂肪細胞分化，於後期活化 MEK/ERK1/2 則抑制前驅脂肪細胞分化。有些文獻指出於後期活化 MEK/ERK1/2 會使 PPAR γ 上 Ser112 位點磷酸化而封鎖住 PPAR γ 轉錄活性，故能抑制脂肪細胞分化 (Hu et al., 1996; Adams et al., 1997; Watanabe et al., 2003)。在 2002 年 Prusty 等人指出於早期 (在 PPAR γ 表現之前) 活化 MEK/ERK1/2 可增加 3T3-L1 分化過程中 PPAR γ 與 C/EBP α 基因表現而促進脂肪細胞分化。在 3T3-L1 脂肪前驅細胞添加 MEK/ERK1/2 促進劑，可增加 PPAR γ 的轉錄活性而促進脂肪細胞之分化 (Prusty et al., 2002)。有些文獻指出活化 MEK/ERK1/2 可使 C/EBP β 上 Thr188 位點磷酸化而增加 C/EBP α 表現，故能促進脂肪細胞分化 (Park et al., 2004; Tang et al., 2005)。

伍、研究目的

目前對白藜蘆醇的研究多集中在抗氧化、預防心血管疾病與抗腫瘤等功效，近年來亦發現其可延緩老化與影響脂肪細胞分化。其中在影響脂肪細胞之分化部分，大多使用高劑量的白藜蘆醇且添加之時機多在含有白藜蘆醇的環境下進行分化。但在正常生理環境下，體內存有尚未分化或即將進行分化之前驅脂肪細胞，為能更全面性討論白藜蘆醇對脂肪細胞分化之作用，故本論文利用廣泛用於研究脂肪細胞分化之 3T3-L1 細胞株為對象，探討不同時期與不同劑量添加之白藜蘆醇對脂肪細胞分化之影響，並釐清在此分化過程中轉錄因子之表現與早期訊息傳遞分子 AKT 與 ERK1/2 所扮演之角色。

材料與方法 (Materials and Methods)

壹、材料：

一、細胞株

3T3-L1 前驅脂肪細胞株 (3T3-L1 preadipocyte) 購買自新竹食品工業研究所菌種中心。

二、抗體

抗體名稱	廠商
β -Actin	Sigma A-5441
phospho-Akt (ser473)	Cell signaling 9271L
Akt	Cell signaling 4691
CHOP	Novus NB100-91777
C/EBP α	Santa Cruz sc-61
C/EBP β	Abcam Ab15050
C/EBP δ	Cell signaling 2318
phospho-ERK1/2 (thr202/tyr204)	Cell signaling 9101S
ERK1/2	Cell signaling 4695
GAPDH	Zymed 39-8600
PPAR γ	Cell signaling 2443

貳、實驗方法

一、3T3-L1 前驅脂肪細胞 (preadipocyte) 之培養與繼代：

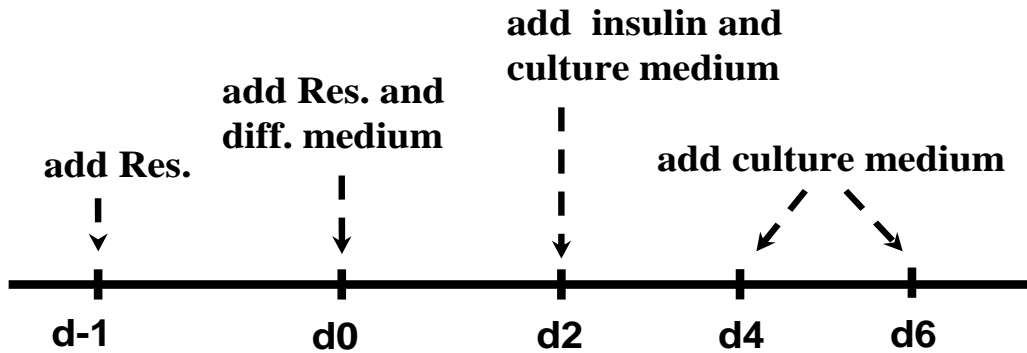
3T3-L1 前驅脂肪細胞平時培養於含有 10% 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)、3.7 g/L NaHCO₃、5.9575 g/L HEPES 與 100 U/ml penicillin / streptomycin 的 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 中，此培養用的培養液稱為 culture medium 簡稱 CM。一般繼代時，先將舊有的 CM 移除後以 1X phosphate buffer saline (PBS) 潤洗一次，加入適量 0.05% (w/v) Trypsin-1mM EDTA solution 培養於 37°C，讓其作用三至五分鐘即可將細胞從培養皿上分離下來，並加入適量的 CM 中和 trypsin-EDTA，後以 1000 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液後以新鮮 CM 復懸細胞。經計算細胞數後依所需量細胞加到含新鮮 CM 的培養皿中再放入培養箱，讓其在 5% CO₂，37°C 條件下培養生長。在 3T3-L1 preadipocytes 培養至單層 (monolayer) 後細胞會達到 confluent 狀態，於顯微鏡下可看到細胞約長至全滿，此時細胞數亦不會再增加。

二、脂肪細胞分化：

於細胞增殖至適當滿度時，將舊有 CM 移除，依不同實驗設計加入不同濃度或不同時期的白藜蘆醇。加藥 1 天後即可更換成分化試劑 (differentiation medium, 簡稱 DM)，其分化培養液內含有 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)、1 μM dexamethasone (DEX)、1.7 μM insulin、10%FBS、DMEM 與不同濃度之白藜蘆醇。分化實驗之時間軸見圖乙，定義進行分化當天定為 day 0，於 day -1 添加藥物，待二天 (day 2) 後，更換含有 1.7 μM insulin 的 CM 培養兩天至目標天數，期間每隔兩天再更換成新鮮 CM，直到目標天數時將細胞收集好後進行後續實驗，白藜蘆醇僅添加分化前 1 天到分化第 2 天 (day-1 ~ day 2)。定期更換 CM 是為了避免細胞代謝毒性物質累積過多。

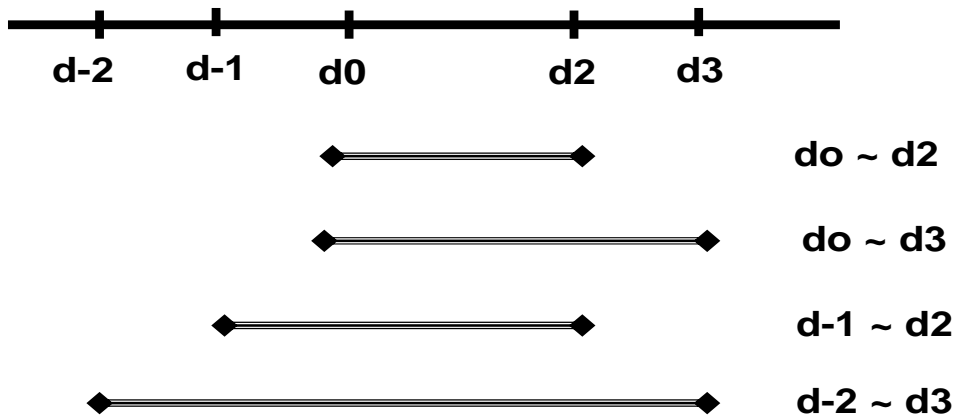
四種不同時期 (圖丙)，分別選用：於分化當天持續到分化第 2 天 (day 0 ~ day 2)；於分化當天持續到分化第 3 天 (day 0 ~ day 3)；於分化前 1 天持續到分化第 2 天 (day -1 ~ day 2)；於分化前 2 天持續添加到分化第 3 天 (day -2 ~ day 3)。

分化實驗之時間軸



圖乙、3T3-L1 前驅脂肪細胞分化實驗之時程。

四種添加白藜蘆醇時期



圖丙、白藜蘆醇四種不同之添加時程。

三、細胞存活率測定 (MTT cell viability assay)

利用活細胞粒線體中的琥珀酸去氫酶之作用，將 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 中 tetrazolium 物質 (黃色) 轉為藍紫色生成物 formazan 而堆積於細胞內，因此當細胞還原 MTT 能力越強，代表細胞粒線體活性越高，則表示活細胞數目越多。在加入 DMSO 溶解後，測定波長

540 nm 吸光值並定量，即可做為細胞存活率的指標。其方法如下，種適量細胞（ 10^4 cells / well）於 96 孔培養盤中培養隔夜，去除培養液後加入含有不同濃度之白藜蘆醇（5、10、15、20、25、30、35、40、45、50 μ M）及對照組 0.1% EtOH 之培養液，於 37°C 分別培養 24 及 48 小時後，去除培養液並以 1X PBS 潤洗一次，隨後再加入 20 μ l 之 5 mg/mL MTT 溶液，於 37°C 作用 2 小時後，吸除 MTT 溶液，再加入 50 μ l DMSO，於室溫輕搖反應 20 分鐘，使藍紫色結晶物溶出後讀取波長 570 nm 與 640 nm 吸收值，兩數據相減並除予對照組即可知不同濃度之白藜蘆醇對細胞生長抑制情形。

四、GPDH 活性分析

在脂肪合成過程中，磷酸甘油去氫酶（Glycerol-3-phosphate-dehydrogenase，簡稱GPDH）是三酸甘油酯合成的重要酵素。當脂肪細胞此脂肪合成酵素活性提高時，則三酸甘油酯即可以油滴方式儲存在細胞內，因此可用GPDH活性來當作脂肪分化過程中的標的因子。其方法如下，取分化第五天的3T3-L1脂肪細胞，去除培養液後以1X PBS潤洗2次，以300 μ l均質緩衝液（內含0.25 M sucrose、1 mM EDTA、5 mM Tris、1 mM DTT與0.1% Triton X -100）將細胞刮下並在冰上以均質機均質5次每次5秒，隨後在4°C下以12000 rpm離心10分鐘，取上清液到新的1.5 mL離心管中。取20 μ l樣品加入在30°C預溫過的UV-測量盤中，於測量前再與160 μ l反應試劑（內含125 mM Triethanolamine、3 mM EDTA、0.07% β -Me、0.22 mM β -NADH和8.23 mM DHAP）混合，讀取10分鐘內波長340 nm吸收值，每30秒讀取數值一次，由數值差距大小即可知GPDH活性。其運算公式為下：

$$\text{GPDH 活性 (U/}\mu\text{g)} = \Delta\text{OD}_{340}/\text{min} * 1.6077 / \text{protein conc. (}\mu\text{g/ml)}$$

五、Oil Red O 染色法：

取分化第六至八天的 3T3-L1 脂肪細胞，去除培養液後以 1X PBS 潤洗 2 次，隨後加入適當量的 4% formaldehyde 以固定細胞，經靜置 1 小時後吸起溶液丟棄。將配置好的 Oil-red O 溶液，染色 1 小時後去除染色液後以二次水潤洗細胞 1 次，隨後以 40% 酒精潤洗 1 次，再次去除液體後加入適量的二次水並移至顯微鏡下觀察與照相，在鏡檢下可看出分化後細胞有明顯紅色油滴球狀。隨後在室溫下添加 500 μ l 的 isopropanol，其目的是將染上的染劑給退染下來，搖晃 5 分鐘後

收集該溶液並讀取波長 510 nm 吸收值，與對照組相比即可知兩組脂肪細胞分化之差異。

六、半定量反轉錄聚合酶連鎖反應 (Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction, semi-quantitative RT-PCR):

1、萃取 total RNA :

將不同分化時間點的細胞培養液移除後，以冰的 1X PBS 潤洗兩次，再加入 500 μ l TRIzol reagent 左右搖晃使試劑均勻作用在細胞上，在冰上將細胞從培養皿中刮取下來收集細胞溶解物 (cell lysates) 置於 1.5 ml 的離心管中，於室溫作用 5 分鐘後，加入 100 μ l acid-phenol (pH 4.3) 後上下翻轉 15 秒並靜置於室溫下 2 分鐘，再加入 100 μ l chloroform 同樣上下翻轉 15 秒，隨後在 4 $^{\circ}$ C 下，以 12000 g 離心 20 分鐘。經離心後，其萃取物可分為三層，分別為上層的透明液體，此層內含細胞的 RNA，中層為白色膜狀層主要還有 genomic DNA，而下層為粉紅色液體，此層內含有細胞的蛋白及碎片。取上層的透明液體到新的 1.5ml 的離心管中，再分別加入 150 μ l chloroform 上下翻轉 15 秒，隨後在 4 $^{\circ}$ C 下以 12000 g 離心 20 分鐘，重複此步驟兩次以去除殘留的 phenol。將透明上清液取到新 1.5 ml 的離心管中加入 2 倍體積的絕對酒精 (absolute EtOH) 並於 -20 $^{\circ}$ C 下靜置數小時，隨後在 4 $^{\circ}$ C 下以 12000 g 離心 10 分鐘，將上清液移除留下呈現白色的 RNA pellet，再加入 1 ml 的 75% 酒精以 vortex 震盪數秒藉以清洗 RNA pellet。隨後在 4 $^{\circ}$ C 下以 12000 g 離心 5 分鐘，將上清液移除後倒扣 1.5 ml 離心管使多餘酒精揮發，待 RNA pellet 自然風乾後加入 50 μ l 的 diethylpyrocarbonate-H₂O (DEPC-H₂O)。再置於 60 $^{\circ}$ C 靜置 10 分鐘以幫助 total RNA 溶解於 DEPC-H₂O 中，藉由使用 ND1000 V3.0 spectrophotometer 測量 total RNA 濃度。取 1 μ g total RNA 跑 RNA 瓊脂凝膠電泳，以確認 RNA 萃取之品質與情況，將剩餘萃取出來的 total RNA 存放在 -80 $^{\circ}$ C 以備後續實驗用。

2、將 mRNA 反轉錄 (reverse transcription) 成 cDNA :

分別取 2 μ g 的 total RNA 並加入 0.5 μ g oligo-dT、5 ng/ml random 6-mer、10 mM dNTP 及適量的 DEPC-H₂O 在 65 $^{\circ}$ C 下作用 5 分鐘，隨後立即置於冰上超過 1 分鐘。再加入 5X reaction buffer、40 U/ μ l RNase Out、0.1 M DTT 和 200 U/ μ l SSIII

RTase 反轉錄酵素等使最後總體積為 20 μ l 並混合均勻（條件與配方見表 1），以 50 $^{\circ}$ C 下作用 1 小時後再以 70 $^{\circ}$ C 反應 15 分鐘的流程將 RNA 反轉錄成 cDNA，後者溫度能使反轉錄酵素活性喪失。反應完成後，cDNA 可置於 -20 $^{\circ}$ C 供後續實驗用。

3、聚合酶連鎖反應 (PCR)：

以 cDNA 作為模版 (template)，加入 5 U/ μ l Taq polymerase、10X reaction buffer、10 mM dNTP、0.5 μ M forward primer、0.5 μ M reverse primer（各引子序列見表 2）及適量的 ddH₂O 使最終體積為 25 μ l，並混合均勻即可置於聚合酶連鎖反應儀中進行反應，其各基因聚合酶連鎖反應條件請見表 3，待完成反應之後可將產物存放於 -20 $^{\circ}$ C。再利用 2% 瓊脂凝膠電泳 (agarose gel electrophoresis) 分析聚合酶連鎖反應產物，讓膠浸於 1X Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer 中以 100 伏特下進行電泳，待結束後以 ethidium bromide (EtBr) 染色，將其置於紫外光照相系統拍照，再以 ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics) 軟體分析，並以 18S 作為 internal control 進行定量分析。

七、蛋白質分析：

1、萃取 protein (compartmental protein extraction)：

將不同分化時間點的細胞培養液移除後，以冰的 1X PBS 潤洗兩次再加入適量的 RIPA lysis buffer (2% Triton X-100、300 mM NaCl、40 mM Na₂HPO₄、0.1 M NaF、2 mM Na₃VO₄、1 mM PMSF、0.8 μ M aprotinin 和 20 μ M leupeptin)，在冰上以刮刀將細胞從培養皿中刮取下來收集細胞溶解物 (cell lysates) 置於 1.5 ml 的離心管中，以 12000 rpm 離心 20 分鐘，將上清液取至另一 1.5 ml 離心管中，及完成樣品前處理，存放於 -80 $^{\circ}$ C 待進行蛋白質定量。

2、蛋白質定量：

本論文實驗使用 PIERCE 公司出產的 BCATM protein assay reagent 套組，採用 BCA (bicinchoninic acid) 方式定量蛋白質。其原理是當 BCA 以水溶性鈉鹽形式存在時，對 cuprous ion (Cu²⁺) 具靈敏、穩定且高專一性，因此在鹼性環境下，蛋白質會使雙價銅離子還原成單價亞銅離子 (Cu⁺)，再利用兩分子 BCA 試劑螯合亞銅離子使其呈現藍紫色，即可於波長 562 nm 下測量吸光值並計算蛋白

質濃度。因此，將適度稀釋過的待測物與各濃度之 BSA 標準品加入 96 孔盤中，並加入 200 μ l working solution (Reagent A : B = 50 : 1)，密封後置於 37°C 培養箱中避光反應 30 分鐘，隨後以波長 562 nm 分光光度機偵測，利用已知濃度的 BSA (bovine serum albumin) 作標準品曲線，即可推算 total protein 濃度。

3、西方點墨法之分析 (Western blot analysis) :

製備 5% stacking gel 與 10% 或 12% separating gel 進行 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)，將固定量的待測蛋白與 prestained protein marker 注入 stacking gel 的 well 中，先以 70 V 使待測蛋白跑至 stacking gel 與 separating gel 分界處後，再以 110 V 分離。待 marker 適當分離後利用兩種 transfer buffer，其一為利用 disodium tetraborate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) 以 200 mA 進行 14 小時，另一種為利用 10 mM Tris、100 mM glycine、10% methanol 及適量 ddH_2O 以 200 mA 進行 90 分鐘，此兩種方法皆將蛋白質轉印製 PVDF paper (immunobilon™-P transfer membrane, Millipore)。利用 5% 脫脂牛奶 (skim milk) 於室溫下作用 1 小時進行 blocking，再加入以 5% BSA 稀釋的 primary antibody 於室溫作用 1~3 小時或放置 4°C 作用 overnight。之後利用 PBST 或 TBST (內含 0.1% Tween-20) 清洗 3 次，每次 5~10 分鐘以清除非專一性的結合。再以 5% 脫脂牛奶配置 1 : 10000 的接有 horseradish peroxidase (HRP) 之 secondary antibody (Chemicon) 於室溫作用 1 小時後再以 PBST 或 TBST 清洗 3 次。最後利用 ECL system 作用於膜上 1 分鐘，於暗房中以 X 光片感光呈現影像並送入自動洗片機。

八、統計分析：

所有的實驗數據皆以平均值 \pm 標準誤 (means \pm SEM) 表示。實驗數據皆利用 SigmaPlot 9.0 之 unpaired t-test 進行統計分析，比較各處理組平均值間差異，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。

結果

不同濃度之白藜蘆醇對 3T3-L1 前驅脂肪細胞造成不同程度之毒性

為了解白藜蘆醇是否會對 3T3-L1 前驅脂肪細胞造成細胞毒性，於是在 3T3-L1 前驅脂肪細胞中添加不同濃度之白藜蘆醇，並在 37°C 培養 24 與 48 小時，最後以 MTT 進行細胞殘存率測試。其結果顯示(見圖 1)，培養 24 小時後 3T3-L1 前驅脂肪細胞在低劑量組 (0 μ M ~ 25 μ M) 並無明顯地死亡；而在高劑量組 (30 μ M ~ 50 μ M) 則有明顯死亡情形，由 30 μ M 到 50 μ M 之殘存率分別為控制組的 88%、89%、85%和 82%。培養 48 小時後 3T3-L1 前驅脂肪細胞中，在高於 20 μ M 白藜蘆醇即會明顯死亡，且較培養 24 小時殘存率下降，20 μ M 到 50 μ M 之殘存率分別為控制組的 90%、83%、76%、73%、74%和 70%。由此結果得知，白藜蘆醇對細胞之毒性除濃度效應之外尚還有時間效應。臨界濃度在 20 ~25 μ M 之間，且隨著共置時間增加，可耐受性濃度也趨下降。此結果是三次獨立實驗之平均值。

不同濃度之白藜蘆醇會促進 GPDH 活性

為了解白藜蘆醇是否會影響 3T3-L1 前驅脂肪細胞之分化，因此在 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化前即添加不同濃度之白藜蘆醇，並培養 24 小時後添加分化試劑刺激其分化，最後於分化第 5 天 (day 5) 以 GPDH 活性分析進行測定脂肪細胞分化情形。其結果顯示 (見圖 2)，在不同濃度下具有不同效果，如在低濃度 (3 μ M 和 5 μ M) 下白藜蘆醇並不會影響 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化；在 10 μ M、15 μ M 與 20 μ M 則顯著促進 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化，其分別為控制組的 1.6 倍、2.0 倍與 1.4 倍。因 15 μ M 白藜蘆醇有相對最大促分化效用，後續之分化相關分析皆以其做為試驗濃度。此結果是三次獨立實驗之平均值。

15 μ M 白藜蘆醇會促進細胞內脂肪滴形成與累積

為進一步評估白藜蘆醇促進 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化之作用，因此偵測分化後期之細胞內脂肪滴累積情形。於分化前一天 (day -1) 先添加入 15 μ M 白藜蘆醇，讓細胞先處於含有白藜蘆醇的環境中，經 37°C 培養 24 小時後，再添加含

有 15 μM 白藜蘆醇之分化試劑刺激分化 2 天 (day 2)，隨後更換含有胰島素之一般培養液，在實驗中僅在分化前一天到分化第 2 天 (day -1 ~ day 2) 添加白藜蘆醇，於分化第 6 天 (day 6) 進行 Oil Red O 染色，並隨後以異丙醇將染劑溶出。控制組為添加相同體積之酒精，此為白藜蘆醇的溶劑。圖 3(a) 為鏡檢下 (400X)，3T3-L1 脂肪細胞分化第 6 天控制組 (EtOH) 之脂肪滴；圖 3(b) 為鏡檢下 (400X)，3T3-L1 脂肪細胞分化第 6 天 15 μM 白藜蘆醇組之脂肪滴。以圖 3(a) 與圖 3(b) 相比較，發現添加 15 μM 白藜蘆醇組的脂肪滴較控制組累積多，且脂肪滴也較大。圖 3(c) 為 3T3-L1 脂肪細胞分化第 6 天進行 Oil Red O 染色，最後用異丙醇將染劑溶出，在波長 510nm 下測量吸光值。將控制組之吸光值定為 1，而 15 μM 白藜蘆醇組之吸光值則為控制組之 1.9 倍。由此實驗結果得知，添加 15 μM 白藜蘆醇組會顯著增加 3T3-L1 脂肪細胞之脂肪滴生成。

不同時期添加白藜蘆醇會對 3T3-L1 前驅脂肪細胞之分化有不同的影響

若干文獻指出添加低劑量之白藜蘆醇並無顯著影響 3T3-L1 前驅脂肪細胞之分化 (Rayalam et al., 2007; Park et al., 2008; Yang et al., 2008)，而添加高劑量之白藜蘆醇則具有抑制 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化之功效 (Floyd et al., 2008; Rayalam et al., 2008)，但這些文獻皆在刺激分化時才開始添加。為探討不同時期添加白藜蘆醇對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化之影響，本研究以四種不同時期添加 15 μM 和 40 μM 白藜蘆醇來刺激 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化，分別選用：於分化前 2 天持續添加 15 μM 和 40 μM 白藜蘆醇到分化第 3 天 (day -2 ~ day 3)；於分化前 1 天持續添加 15 μM 和 40 μM 白藜蘆醇到分化第 2 天 (day -1 ~ day 2)；於分化當天持續添加 15 μM 和 40 μM 白藜蘆醇到分化第 2 天 (day 0 ~ day 2)；於分化當天持續添加 15 μM 和 40 μM 白藜蘆醇到分化第 3 天 (day 0 ~ day 3)。最後於分化第 5 天 (day 5) 以 GPDH 活性分析進行測定脂肪細胞分化情形。其結果顯示 (見圖 4)，在不同時期添加 Res. 具有不同效果，如在分化前 (day -2 和 day -1) 即添加 15 μM Res. 則會明顯促進 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化，分別為各時期控制組的 1.42 倍和 1.63 倍；添加 40 μM 白藜蘆醇則會明顯抑制 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化，分別為各時期控制組 0.37 倍和 0.63 倍。在分化當天才添加 15 μM 白藜蘆醇不會促進 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化，分別為各時期控制組的 1.05 倍和 1.07 倍；

添加 40 μM 白藜蘆醇則會明顯抑制 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化，分別為各時期控制組的 0.63 倍和 0.60 倍。由此結果可知，在分化前即添加 15 μM 白藜蘆醇具有刺激 3T3-L1 前驅脂肪細胞之分化；而在分化劑添加時才添加者則不具有影響分化之能力。若在分化前與分化當天添加 40 μM 白藜蘆醇均會抑制 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化。之後實驗皆以分化前 1 天 (day -1) 到分化第 2 天 (day 2) 添加 15 μM 白藜蘆醇進行。此結果是三次獨立實驗之平均值。

添加 15 μM 白藜蘆醇能刺激前驅脂肪細胞分化之 C/EBP β 基因表現

為了解 15 μM 白藜蘆醇是否能誘發分化初期 C/EBP β 基因表現量，於分化前 1 天到分化第 1 天 (day -1 ~ day 1) 皆添加 15 μM 白藜蘆醇，收集未添加分化試劑 (0h) 和分化後 4、8、16 和 24 小時之細胞進行收取 total RNA 並以 qRT-PCR 偵測 C/EBP β 基因之表現。由其結果顯示 (見圖 5)，(a) 為 C/EBP β 與內部對照 18S 基因表現之 2% 瓊脂凝膠電泳之電泳圖；(b) 為基因表現之量化結果；(c) 為各時間點之倍數差異結果，圖中以各時間點之 EtOH 所測得之 C/EBP β 基因表現量定義為 1，可得各時間點之 EtOH 組與 15 μM 白藜蘆醇組兩組之間倍數改變。由圖 (a) 與 (b) 結果可知，在添加分化試劑之後，C/EBP β 之表現量開始些微增加，而在各時間點上有添加 15 μM 白藜蘆醇組別所誘發之 C/EBP β 基因表現較控制組 EtOH 組多，於分化 8 小時表現量達最高，EtOH 組與 15 μM Res. 組分別為 0.374 與 0.514。由圖 (c) 中知，添加分化試劑後 4、8、16 與 24 小時皆發現 15 μM Res. 組之 C/EBP β 基因表現量顯著高於 EtOH 組，其倍數差距逐漸增加，分別為 1.16 倍、1.37 倍、1.42 倍與 1.44 倍。

添加 15 μM 白藜蘆醇會抑制 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化之 CHOP 基因表現

已知指出 CHOP-10 是個控制脂肪新生作用的抑制者，可負向調控脂肪細胞之分化。為了解 15 μM 白藜蘆醇是否影響分化初期 CHOP 此一抑制脂肪分化基因表現量，於分化前 1 天到分化第 1 天 (day -1 ~ day 1) 皆添加 15 μM 白藜蘆醇，收集未添加分化試劑 (0h) 和分化後 4、8、16 和 24 小時之細胞進行萃取 total RNA，並以 qRT-PCR 偵測 CHOP 基因之表現。由其結果顯示 (見圖 6)，其中圖 6 (a) 為 CHOP 與 18S 內部對照基因表現之 2% 瓊脂凝膠電泳之電泳圖；(b) 為

基因表現之量化結果；(c) 為基因表現之量化結果，圖中以各時間點之 EtOH 所測得之 CHOP 基因表現量定義為 1，可得各時間點之 EtOH 組與 15 μ M 白藜蘆醇組兩組之間倍數改變。由圖 6 (a) 與 (b) 可知，無論 EtOH 組與 15 μ M 白藜蘆醇組，在未進行分化刺激前 CHOP 具有高度基因表現，分別為 0.288 與 0.303；而在添加分化試劑之後，無論 EtOH 組與 15 μ M 白藜蘆醇組其 CHOP 之表現量皆降低，於分化後 4 小時 EtOH 組與 15 μ M 白藜蘆醇組表現量分別為 0.097/與 0.089；於分化後 24 小時，EtOH 組中 CHOP 基因表現量大幅增加，而添加 15 μ M 白藜蘆醇組中 CHOP 基因表現量並無大幅增加，此時表現量分別為 0.250 與 0.121。而由圖 6 (c) 知，在未加分化試劑時，15 μ M 白藜蘆醇組的 CHOP 基因表現量較 EtOH 組高，此時 15 μ M 白藜蘆醇組為 EtOH 組的 1.06 倍。而在添加分化試劑後 16 與 24 小時皆發現 15 μ M 白藜蘆醇組之 CHOP 基因表現量顯著低於 EtOH 組，分別為 EtOH 組之 0.84 倍與 0.47 倍。

添加 15 μ M 白藜蘆醇會促進 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化之 PPAR γ 基因表現

為了解 15 μ M 白藜蘆醇是否經由刺激 PPAR γ 基因表現量而促進脂肪細胞之分化，因此測試分化過程中 PPAR γ mRNA 表現情形。在 day -1~day 2 分化期間添加 15 μ M 白藜蘆醇，收集 day 0 到 day 7 的 total RNA，並以 qRT-PCR 偵測 PPAR γ 之基因表現，結果見圖 7。其中 (a) 為 PPAR γ 與 18S 基因表現之 2%瓊脂凝膠電泳之電泳圖；(b) 為各時間基因表現之量化結果；(c) 為基因表現之倍數差異結果，圖中以各時間點之 EtOH 所測得之 PPAR γ 基因表現量定義為 1，可得各時間點之 EtOH 組與 15 μ M 白藜蘆醇組兩組之間倍數改變。由圖 7 (a) 與 (b) 中知，在分化過程中 PPAR γ 基因表現隨分化時間增加而增加，於分化第 5 天其表現量最高，此時 EtOH 組與 15 μ M 白藜蘆醇組分別為 0.273 與 0.354。比較發現添加 15 μ M 白藜蘆醇組能刺激更多之 PPAR γ 基因表現量，於分化第 2 天兩組間差異最大，此時 EtOH 組與 15 μ M 白藜蘆醇組分別為 0.170 與 0.300，但分化第 5 天後與 EtOH 組逐漸差距減小。而由圖 7 (c) 中知，在分化第 0 天與第 1 天時，15 μ M 白藜蘆醇組與 EtOH 組並無明顯差異，分別為 EtOH 組的 1.10 倍與 1.13 倍。在有添加 15 μ M 白藜蘆醇組別中，從第 2 天開始則較 EtOH 組偵測到較多的 PPAR γ 基因表現量，尤其在第 2 天到第 4 天兩組之間的 PPAR γ 基因表現量差別最大。從第 2 天開

始所刺激 PPAR γ 基因表現量分別為 EtOH 組的 1.75 倍、1.75 倍、1.67 倍、1.29 倍、1.33 倍和 1.25 倍。

添加 15 μ M 白藜蘆醇會促進分化後期之脂聯素基因表現

因前述實驗結果中已知 15 μ M 白藜蘆醇具有促進脂肪細胞分化，因此進一步探討 15 μ M 白藜蘆醇所促進之成熟脂肪細胞是否可增加脂聯素基因表現量，因此測試分化過程中 adiponectin 基因表現情形。因此在 day -1~ day 2 分化期間添加 15 μ M 白藜蘆醇，並收集 day 0 到 day 7 的 total RNA，並以 qRT-PCR 偵測 adiponectin 之基因表現。由其結果顯示（見圖 8），(a) 為 adiponectin 與 18S 基因表現之 2%瓊脂凝膠電泳之電泳圖；(b) 為基因表現之量化結果；(c) 為各時間點之倍數差異之結果。由圖 8 (a) 與 (b) 中知，在中後期始有 adiponectin 基因表現。添加 15 μ M 白藜蘆醇組在分化第 4 天即可明顯偵測到 adiponectin 基因表現量，此時 EtOH 組與 15 μ M 白藜蘆醇組表現量分別為 0.019 與 0.398，而此差異可持續到分化第 7 天，於分化第 6 天具有最大差異（0.278 與 0.765）。而由圖 8 (c) 中知，在分化第 0 天到第 2 天時，15 μ M 白藜蘆醇組與 EtOH 組並無明顯差異，於分化第 3 天始有顯著差異，其中分化第 4 天具有極顯著差異。從第 3 天開始分別為 EtOH 組的 2.72 倍、20.12 倍、2.89 倍、2.69 倍和 3.06 倍。

添加 15 μ M 白藜蘆醇會促進分化後期之 aP2 基因表現

目前已知 aP2 可受 PPAR γ 之調控，其屬於分化後期脂肪細胞分泌脂肪組織特殊產物。aP2 的蛋白質功能為脂肪酸結合蛋白，故屬於脂質代謝相關蛋白。因前述實驗結果中已知 15 μ M 白藜蘆醇具有促進 PPAR γ 之基因表現，因此進一步探討 15 μ M 白藜蘆醇是否可增加分化過程 aP2 基因表現量。在 day -1 到 day 2 期間添加 15 μ M 白藜蘆醇，並收集 day 0 到 day 7 的 total RNA，並以 qRT-PCR 偵測 aP2 之基因表現。由其結果顯示（見圖 9），其中 (a) 為 aP2 與 18S 基因表現之 2%瓊脂凝膠電泳之電泳圖；(b) 為基因表現之量化結果；(c) 為各時間點之倍數差異結果。由圖 9 (a) 與 (b) 中知於分化第 2 天 aP2 表現量開始增加，而有添加 15 μ M 白藜蘆醇組之 aP2 基因表現量也於第 2 天開始與 EtOH 組有顯著差異（分別為 0.388 與 0.498）此差異持續到分化第 7 天，於分化第 3 天具有最大

差異 (0.382 與 0.576)。而由圖 9 (c) 中知，在分化第 0 天與第 1 天時，15 μ M 白藜蘆醇組與 EtOH 組並無明顯差異，於分化第 2 天起分別為 EtOH 組的 1.31 倍、1.52 倍、1.21 倍、1.35 倍、1.43 倍和 1.36 倍。

分化初期 15 μ M 白藜蘆醇處理對 C/EBP β 之 LAP 與 LIP 蛋白質之表現

C/EBP β 有 LAP 與 LIP 等異構物，分別具有促進與抑制脂肪細胞分化之功能，因此 LAP/LIP 比例是決定 C/EBP β 整體功能的重要因子。為了解 15 μ M 白藜蘆醇是否經由刺激 C/EBP β 蛋白質表現量而促進脂肪細胞之分化，在 day -1~day 2 分化期間添加 15 μ M 白藜蘆醇，並收集 day 0 到 day 2 的蛋白質萃取物，並以西方點墨法偵測 C/EBP β 蛋白質之表現，並比較 LAP/LIP 之比值。圖 10 (a) 為 C/EBP β -LAP、C/EBP β -LIP 與內部對照組 GAPDH 蛋白質之表現；(b) 為各時間點之 LAP、LIP 與 LAP/LIP 蛋白質量化結果；(c) 為倍數差異結果。由圖 10 (a) 與 (b) 中知，在分化刺激後 2 小時 C/EBP β -LAP 表現量開始增加 (EtOH 組與 15 μ M 白藜蘆醇組分別為 0.087 與 0.763)，並持續到分化後 48 小時；C/EBP β -LIP 表現量遠低於 C/EBP β -LAP 表現量，於分化後 4 小時 EtOH 組較 15 μ M 白藜蘆醇組高 (分別為 0.056 與 0.032)。在分化 1 小時 15 μ M 白藜蘆醇組之 LAP/LIP 比值較 EtOH 組小 (EtOH 組與 15 μ M 白藜蘆醇組分別為 5.55 與 4.12)，但於分化後 2 小時比值最高且兩組之 LAP/LIP 比值相近 (EtOH 組與 15 μ M 白藜蘆醇組分別為 8.31 與 8.60)，而在分化 4 小時開始其比值皆降低 (EtOH 組與 15 μ M 白藜蘆醇組分別為 4.20 與 5.85)；於分化 4 到 48 小時，15 μ M 白藜蘆醇組之 LAP/LIP 比值會較 EtOH 組大。而由圖 10(c) 中知，在分化後 1 小時，15 μ M Res. 組的 LAP/LIP 之比值會低於 EtOH 組，此時 15 μ M 白藜蘆醇組為 EtOH 組的 0.87 倍。從第 2 小時候開始，15 μ M Res. 組的 LAP/LIP 之比值會略高於 EtOH 組，但皆無顯著差異，直到 48 小時 15 μ M 白藜蘆醇組會顯著高於 EtOH 組，此時為 EtOH 組的 1.61 倍。

分化初期 15 μ M 白藜蘆醇處理對 C/EBP δ 蛋白質之表現

與 C/EBP β 相關，C/EBP δ 是亦為調節脂肪細胞分化上必需之轉錄因子。day -1~day 2 分化期間添加 15 μ M 白藜蘆醇，並收集 day 0 到 day 2 的蛋白質萃取

物，並以西方點墨法偵測 C/EBP δ 蛋白質之表現。圖 11 (a) 為 C/EBP δ 與內部對照 GAPDH 蛋白質表現；(b) 為各時間點之蛋白質量化結果；(c) 為倍數差異結果。由圖 11 (a) 與 (b) 中知，在分化後 1 小時 C/EBP δ 表現量開始增加 (EtOH 組與 15 μ M 白藜蘆醇組分別為 0.720 與 0.791)，並於第 8 小時 (EtOH 組與 15 μ M 白藜蘆醇組分別為 0.224 與 0.427) 開始減少。其中從 1 小時到 24 小時，15 μ M 白藜蘆醇組所刺激 C/EBP δ 蛋白質表現皆高於 EtOH 組。而由圖 11 (c) 中知，在分化後 1 小時，15 μ M 白藜蘆醇組的 C/EBP δ 之比值會顯著高於 EtOH 組，此時 15 μ M 白藜蘆醇組分別為 EtOH 組的 1.11 倍、1.25 倍、1.25 倍、1.90 倍、1.63 倍與 1.60 倍。而在 48 小時 15 μ M 白藜蘆醇組則與 EtOH 組無明顯差異。

添加 15 μ M 白藜蘆醇會促進 C/EBP α 與 PPAR γ 蛋白質表現

於脂肪細胞分化過程中，C/EBP α 與 PPAR γ 這兩個轉錄因子會進一步引發脂肪細胞特異性基因的表現與維持分化末期脂肪細胞之型態，因此在前驅脂肪細胞分化上扮演重要的角色。在 day -1~ day 2 分化期間添加 15 μ M 白藜蘆醇，並收集 day 0 到 day 7 的蛋白質萃取物，並以西方點墨法偵測 C/EBP α 與 PPAR γ 蛋白質之表現，並以 β -actin 當作內部對照。

由圖 12 (a) 與 (b) 中知，在分化後 1 天 C/EBP α 表現量開始增加並持續到分化第 7 天，於分化第 3 天表現量達最大 (此時 EtOH 組與 15 μ M 白藜蘆醇組分別為 0.813 與 1.310) 隨後開始下降。其中從第 2 天到分化第 7 天，15 μ M 白藜蘆醇組所刺激 C/EBP α 蛋白質表現皆明顯高於 EtOH 組之 C/EBP α 表現，於分化第 5 天具有最大差異 (此時 EtOH 組與 15 μ M 白藜蘆醇組分別為 0.369 與 0.874)。而由圖 12 (c) 中知，在分化後 2 天，15 μ M 白藜蘆醇組所刺激的 C/EBP α 蛋白質表現會顯著高於 EtOH 組，此時 15 μ M 白藜蘆醇組分別為 EtOH 組的 1.10 倍、1.50 倍、2.11 倍、2.28 倍、2.39 倍、2.33 倍與 2.39 倍。

圖 13 (a) 與 (b) 知，在分化後 1 天 PPAR γ 表現量開始增加 (此時 EtOH 組與 15 μ M 白藜蘆醇組分別為 0.767 與 0.908)，並持續到分化第 7 天，於分化第 2 天表現量達最大 (此時 EtOH 組與 15 μ M 白藜蘆醇組分別為 0.906 與 1.517)。其中從分化第 2 天到分化第 7 天，15 μ M 白藜蘆醇組所刺激 PPAR γ 蛋白質表現皆高於 EtOH 組，以分化第 2 天具有最大差異。而由圖 13 (c) 中知，在分化第

1 天，15 μ M 白藜蘆醇組與 EtOH 組並無明顯差異，在第 2 天以後則開始有明顯差異，此時 15 μ M 白藜蘆醇組分別為 EtOH 組的 4.60 倍、3.53 倍、3.93 倍、4.52 倍、4.12 倍與 3.63 倍。

分化初期 15 μ M 白藜蘆醇處理對 CHOP 蛋白質之表現

文獻指出 CHOP-10 是個控制脂肪新生作用的抑制者，可負向調控脂肪細胞之分化 (Tang and Lane, 2000; Batchvarova et al., 1995; Ariyama, 2007)。為了解 15 μ M 白藜蘆醇是否影響分化初期 CHOP 此一抑制脂肪分化蛋白質表現量。在 day -1~ day 2 分化期間添加 15 μ M 白藜蘆醇，並收集 day 0 到 day 2 的蛋白質萃取物，並以西方點墨法偵測 CHOP 蛋白質之表現，並以 GAPDH 當作內部對照。其結果見圖 14，圖 14 (a) 為 CHOP 與內部對照 GAPDH 蛋白質之表現，圖中顯示在未添加分化試劑 (0h) 時 CHOP 有高度表現 (此時 EtOH 組與 15 μ M 白藜蘆醇組分別為 0.344 與 0.356)，分添加化試劑後其表現量降低 (分化後 1 小時其 EtOH 組與 15 μ M 白藜蘆醇組分別為 0.278 與 0.298) 並持續到分化後 48 小時。於分化後 48 小時發現添加白藜蘆醇組具有抑制 CHOP 蛋白質表現 (此時 EtOH 組與 15 μ M 白藜蘆醇組分別為 0.410 與 0.269)。而由圖 14 (c) 中知，於分化 24 小時內，15 μ M 白藜蘆醇組與 EtOH 組並無明顯差異，在分化後 48 小時添加白藜蘆醇組則有抑制 CHOP 蛋白質表現，此時 15 μ M 白藜蘆醇組分別為 EtOH 組的 0.59 倍。

添加 15 μ M 白藜蘆醇會改變 AKT 的磷酸化

PI3K/AKT 是膜受體信號向細胞內傳導的重要途徑之一，可調節細胞凋亡、生長、分化及一些重要基因的表現。已知在 3T3-L1 脂肪細胞中添加胰島素或 IGF-1，可經活化胰島素受體、PI3K 等訊息傳遞途徑而刺激 C/EBP α 去磷酸化。顯示 AKT 可能參與白藜蘆醇調控 3T3-L1 脂肪細胞分化過程，因此測試在分化過程 pAKT 與 AKT 之表現量。其結果見圖 15，圖 15 (a) 為 AKT 在 Ser473 位點磷酸化、total AKT 與內部對照 β -actin 蛋白質之表現；(b) 為 pAKT^{Ser473}、total AKT 與 AKT 活性 (pAKT / total AKT) 蛋白質表現之量化圖；(c) 為各時間點之倍數差異圖。由圖 15 (a) 與 (b) 結果得知，在分化初期 (day 0~ day 2) 中 AKT 磷酸化隨不同時間有些微變動。於分化前 pAKT 表現量很低 (此時 EtOH 組與

15 μM 白藜蘆醇組分別為 0.196 與 0.179)，於分化後 1 小時（此時 EtOH 組與 15 μM 白藜蘆醇組分別為 0.843 與 0.867）開始增加，並於分化後 16 小時開始下降（此時 EtOH 組與 15 μM 白藜蘆醇組分別為 0.423 與 0.530）。在 total AKT 部分，各時間點上並無明顯變化。在 AKT 活性（pAKT/total AKT 比值）部分，在未添加分化試劑之前活性較低，在添加分化試劑後 1 小時 AKT 活性增加（此時 EtOH 組與 15 μM 白藜蘆醇組比值分別為 0.914 與 1.030），於分化後 16 小時開始降低（此時 EtOH 組與 15 μM 白藜蘆醇組比值分別為 0.376 與 0.479）。由圖 15 (c) 結果得知在分化 0 與 4 小時，15 μM 白藜蘆醇組較 EtOH 組磷酸化表現低，分別為 EtOH 組的 0.84 倍與 0.86 倍。但在分化 16 與 48 小時 15 μM 白藜蘆醇組較 EtOH 組磷酸化高，分別為 EtOH 組的 1.25 倍與 1.26 倍。

添加 15 μM 白藜蘆醇並不會改變 ERK1/2 的磷酸化

在 3T3-L1 脂肪前驅細胞添加 MEK/ERK1/2 促進劑，可增加 PPAR γ 的轉錄活性而促進脂肪細胞之分化。在 2002 年 Prusty 等人指出活化 MEK/ERK 可增加 3T3-L1 分化過程 PPAR γ 和 C/EBP α 基因表現 (Prusty et al., 2002)。本研究中分別量測 ERK1/2 在 Thr202 與 Tyr204 位點磷酸化、total ERK1/2 與內部對照 GAPDH 蛋白質之表現。由圖 16 (a) 與 (b) 得知，在未添加分化試劑之前 pERK1/2 表現量較低（此時 EtOH 組與 15 μM 白藜蘆醇組分別為 0.603 與 0.607），於分化後 1 小時 pERK1/2 表現量增加（此時 EtOH 組與 15 μM 白藜蘆醇組分別為 1.711 與 1.091），於分化後 8 小時 pERK1/2 表現量降低（此時 EtOH 組與 15 μM 白藜蘆醇組分別為 0.622 與 0.670），於 48 小時又略為增加。在 total ERK1/2 部分，則無明顯差異。在 ERK1/2 活性（pERK1/2 / total ERK1/2）部分，於分化前其活性很低（此時 EtOH 組與 15 μM 白藜蘆醇組活性分別為 1.118 與 1.073），於分化後 1 小時活性增加並達最大值（此時 EtOH 組與 15 μM 白藜蘆醇組活性分別為 4.601 與 4.673），隨後降低，而 48 小時又略為增加。由圖 16 (c) 結果得知在分化過程當中，15 μM 白藜蘆醇組較 EtOH 組磷酸化比值並無一致性增減，相較 EtOH 組也無明顯差異。

討論

不同濃度之白藜蘆醇對 3T3-L1 前驅脂肪細胞造成不同程度之毒性

由圖 1 結果得知，高劑量（30 μM ~ 50 μM ）白藜蘆醇會對 3T3-L1 前驅脂肪細胞造成毒性而使細胞死亡，而低劑量（5 μM ~ 25 μM ）白藜蘆醇則因培養時間長短而有不同程度的存活率。前人研究指出，在培養 24 小時下，50 μM Res. 與控制組（0.2% DMSO）相比並無明顯差異，而 100 μM 白藜蘆醇下則顯著降低細胞存活率。在培養 48 小時下，低劑量（10 μM ~ 25 μM ）之白藜蘆醇並不會造成明顯的細胞死亡；而在高劑量（50 μM 與 100 μM ）白藜蘆醇則有明顯引起細胞死亡情形，並指出具有刺激細胞凋亡情形（Rayalam et al., 2008；Rayalam et al., 2007；Park et al., 2008）。本論文結果與前人結果有時間與濃度上略有差異，可能原因有四點，其一本論文測試時之 confluency 較前人研究為低，本研究在接近全滿時添加而前人則是全滿時添加。其二為前人所使用之細胞為成熟脂肪細胞（mature adipocyte）；而本論文則使用脂肪前驅細胞（preadipocyte）。其三為與前人使用 MTS 偵測細胞存活率，本論文實驗則使用 MTT 法偵測細胞存活率。其四為前人所使用之控制組為 0.2% (v/v) DMSO，而本實驗所使用之控制組 0.1% (v/v) EtOH。在本論文實驗條件下，15 ~ 20 μM 為可安全使用的最高濃度範圍。

不同濃度之白藜蘆醇對 3T3-L1 前驅脂肪細胞之分化有不同的影響

由圖 2 結果得知，10 μM 、15 μM 與 20 μM 白藜蘆醇具有顯著促進 GPDH 活性，這即表示這些濃度下白藜蘆醇能明顯促進 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化，尤其以 15 μM 白藜蘆醇具有最大促進效用；由圖 3 細胞內油滴生成與累積顯示 15 μM 白藜蘆醇可促進 3T3-L1 前驅脂肪細胞之分化。但有文獻指出，12.5 μM 白藜蘆醇並不影響脂肪細胞之細胞內油滴累積，25 μM Res. 則具有抑制細胞內油滴累積情形，而在 50 μM Res. 下則具有抑制脂肪細胞分化及分化過程中重要因子之表達（Park et al., 2008；Yang et al., 2008；Rayalam et al., 2008；Rayalam et al., 2007；Foldy et al., 2008）。本論文實驗結果在高濃度尚與前人研究結果相符，而在低濃度上則有所差異。比較前人結果之後發現，與前人結果有添加時間與濃度之差異，除濃度外，前人持續添加至分化後第 6 天（day 0 ~ day 6），本論文添加時間

僅到分化後第 2 天 (day -1 ~ day 2)。後續實驗將探討添加時間是否會影響脂肪細胞之分化。在 2008 年 Saito 等人利用偵測 GPDH 活性與 TG 含量方式發現添加 sakuranetin 具有刺激 3T3-L1 前驅脂肪細胞之分化 (Saito et al., 2008)，這表示並非所有類黃酮皆能抑制脂肪細胞分化。

不同時期添加白藜蘆醇會對 3T3-L1 前驅脂肪細胞之分化有不同的影響

因許多文獻指出，添加不同劑量之白藜蘆醇具有不同效果，在添加低劑量之白藜蘆醇 (12.5 μM) 並無顯著影響 3T3-L1 前驅脂肪細胞之分化 (Park et al., 2008; Yang et al., 2008; Rayalam et al., 2008; Rayalam et al., 2007)，而添加高劑量之白藜蘆醇 (25 μM ~ 50 μM) 則具有抑制 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化之功效。為探討是否因不同時間添加不同濃度之白藜蘆醇的確會對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化有影響，因此本實驗以四種不同時期添加 15 μM Res. 和 40 μM Res. 來刺激 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化。後面兩時期 (day 0 ~ day 2 和 day 0 ~ day 3) 是為模擬文獻，以確定與分化試劑一起添加對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化會後抑制，前兩時期 (day -2 ~ day 3; day -1 ~ day 2) 則為確定先讓細胞處於不同濃度之白藜蘆醇是否會與前者有不同反應。此外，在正常生理環境下，體內並非所有前驅脂肪細胞皆處於即將分化階段，選用四種時期探討白藜蘆醇對脂肪細胞分化之功效能更符合實際食用作用之模式。

從實驗結果顯示，在分化過程中才添加不同濃度之白藜蘆醇確是在低濃度下對不具有影響脂肪細胞分化，而在高濃度之白藜蘆醇則具有明顯抑制脂肪細胞分化，此結果與前人文獻結果相符。在分化前先添加低濃度之白藜蘆醇確實有促進脂肪細胞分化之作用，而在高濃度之白藜蘆醇亦有抑制分化效果。但由圖 1 中知高劑量的白藜蘆醇會造成細胞死亡，因此無法確定此時期的白藜蘆醇抑制分化是否因細胞死亡而造成分化情況下降或是高劑量白藜蘆醇本身所造成之影響。藉由模擬文獻方法證實，讓細胞先處於 15 μM 白藜蘆醇環境之下確實會造成促進脂肪細胞之分化。在 2001 年 Harmon 等人提出不同的多酚化合物對 3T3-L1 有不同脂肪新生作用與脂質分解作用 (Harmon et al., 2001)。在 2007 年 Rayalam 等人也提出，添加不同劑量與時期的多酚化合物可能對脂肪細胞分化有不同的反應 (Rayalam et al., 2007)。

添加 15 μ M 白藜蘆醇能刺激分化初期之 C/EBP β mRNA 表現，但其蛋白質表現上影響較晚

C/EBP β 是初期脂肪細胞分化的轉錄因子，可引發一連串基因表現，在脂肪細胞分化上扮演相當重要角色。而由圖5結果可知，從分化後4小時開始，15 μ M 白藜蘆醇具有顯著促進 C/EBP β mRNA 表現量，但 C/EBP β 是否具有轉活化下游其他因子能力，必須更進一步偵測 C/EBP β 蛋白質表現量與 C/EBP β 轉錄活性，因此再偵測 C/EBP β 蛋白質之表現。因 LAP/LIP 比例是決定 C/EBP β 整體功能的重要因子，因此在蛋白質層次上著重探討 LAP/LIP 之比值，當比值越大時 C/EBP β 促進分化活性越強，而比值越接近 1 則 C/EBP β 促進分化活性越弱。而由圖10結果可知，C/EBP β 蛋白質表現在分化後2小時即開始大量表現，且無論 15 μ M 白藜蘆醇組或 EtOH 組其 LAP/LIP 比值皆大於 1，這表示無論有無添加白藜蘆醇前驅脂肪細胞皆受分化試劑誘發分化。進一步探討各時間點之 EtOH 組與 15 μ M 白藜蘆醇組在 LAP/LIP 之倍數關係，我們將 EtOH 組之 LAP/LIP 比值定義為 1，發現在分化4小時以後 15 μ M 白藜蘆醇組之比值皆大於 1，這表示在分化過程當中 15 μ M 白藜蘆醇組所誘發之 C/EBP β 較 EtOH 具有更強刺激脂肪細胞之活性，但蛋白質之比值則於 48 小時始具有顯著差異。為何在 C/EBP β 基因表現中，15 μ M 白藜蘆醇組於 4 小時即顯著高於 EtOH 組（圖 5），而蛋白質則需到 48 小時才顯著（圖 10），其可能原因在於基因轉譯成蛋白質過程及蛋白質穩定（protein stability）上可能有發生尚未明瞭的事件。

分化過程中 15 μ M 白藜蘆醇處理會增加 C/EBP δ 與 C/EBP α 蛋白質之表現

C/EBP δ 是初期脂肪細胞分化的轉錄因子，扮演著催化與調控分化的角色，故在調節脂肪細胞分化上是必需的。C/EBP α 表現可受 C/EBP β 與 C/EBP δ 所誘發活化。因此通常利用 C/EBP α 表現增減來評估脂肪細胞分化情形。當增加 C/EBP α 表現時則會促進脂肪細胞分化，反之則會抑制分化。在許多文獻中發現當脂肪細胞分化受抑制時，其 C/EBP α 之表現也會降低。如在 Hirar 與 Rayalam 等人分別指出 activin A 與 25 μ M 白藜蘆醇會藉由抑制 C/EBP α 而抑制脂肪細胞分化情形（Hirar et al., 2005；Rayalam et al., 2008）。Fu 等人指出 adiponectin 則會藉由增加 C/EBP α 而促進脂肪細胞分化（Fu et al., 2005）。由圖11與圖12實驗結果得知，15

μM 白藜蘆醇具有促進分化過程中 C/EBP δ 與 C/EBP α 之表現量。C/EBP δ 與 C/EBP β 皆可調控 C/EBP α ，在總結上面結果發現，添加 15 μM 白藜蘆醇可能藉由增加分化早期（0~48 小時）之 C/EBP δ 與 C/EBP β 表現而大量誘發下游轉錄因子 C/EBP α 之表現，最後促進脂肪細胞分化。

添加 15 μM 白藜蘆醇會促進 PPAR γ 基因與蛋白質表現

不論體內或體外實驗皆指出具有脂肪專一性的 PPAR γ 與脂肪細胞脂分化的調控有密切關係，因其為脂肪細胞分化上最主要的基因，可轉錄活化許多種基因表現，故在脂肪細胞發展過程中扮演相當重要的角色。當增加 PPAR γ 表現時則會促進脂肪細胞分化，反之當減少 PPAR γ 表現實則會抑制分化。如 Saito 等人在 2009 與 2008 年分別提出 flavanone 與 sakuranetin 可藉由增加 PPAR γ 基因與蛋白質之表現而促進 3T3-L1 脂肪細胞分化 (Saito et al., 2009; Saito et al., 2008)。由圖 7 與圖 13 結果可知，15 μM Res. 會顯著增加分化後 2 天之 PPAR γ 基因與蛋白質之表現。此外由 C/EBP β 與 C/EBP δ 結果中發現，在分化早期（分化後 1~48 小時）之內，添加 15 μM Res. 皆能增加 C/EBP β 基因表現與蛋白質 LAP/LIP 倍數比與 C/EBP δ 蛋白質之表現。C/EBP β 與 C/EBP δ 可引發 PPAR γ 基因表現，因此可依據前面結果推測添加 15 μM Res. 藉由增加 C/EBP β 與 C/EBP δ 之表現而大幅增加 PPAR γ 表現量。

添加 15 μM 白藜蘆醇會促進分化後期之脂聯素與 aP2 基因表現

由圖 4 發現 15 μM 白藜蘆醇能促進脂肪分化，而由圖 7 與圖 13 發現 15 μM 白藜蘆醇具有促進 PPAR γ 之表現，故進一步探討是否會影響到下游分子之影響，為了解白藜蘆醇誘發的脂肪細胞是否能更有效調控血糖平衡與能量代謝，因此鎖定皆會受 PPAR γ 影響之 aP2 及脂聯素 (adiponectin) mRNA。由圖 8 與圖 9 得知，15 μM Res. 能促進分化中 3T3-L1 脂肪細胞之 adiponectin 與 aP2 mRNA 表現，此結果可能暗示 15 μM Res. 可藉由活化 PPAR γ 而提早與增加 adiponectin 與 aP2 mRNA 表現。此外在完全分化的脂肪細胞中 aP2 與 adiponectin 皆會大量表現，由圖 8 與圖 9 之結果也可再次證實添加 15 μM Res. 具有促進 3T3-L1 脂肪細胞分化與提早脂泌素 mRNA 表現之能力。由這個結果可推論，經 15 μM 白藜蘆醇所

誘發分化之脂肪細胞具有良好的調控血糖平衡與能量代謝之功能，這或許可以舒緩因肥胖而造成的許多代謝性疾病。

添加 15 μ M 白藜蘆醇會抑制分化初期之 CHOP 基因與蛋白質表現

CHOP-10 是 C/EBP 家族的 dominant-negative 調控者成員之一。在 1995 年 Batchvarova 等人提出表現 CHOP 藉由封鎖住 C/EBP β 與 C/EBP α 結合上 DNA 能力而有抑制脂肪新生作用。由圖 6 與圖 14 之結果可知，在未添加分化試劑之前，細胞處於生長抑制狀況，故可偵測到高度 CHOP mRNA 與蛋白質表現，而在添加分化試劑後其基因與蛋白質表現則迅速減少，而在分化後 24 到 48 小時又開始表現。此蛋白質結果與 Tang and Lane 等人在 2000 年所發表之結果相似。在 CHOP mRNA 表現部分，添加 15 μ M 白藜蘆醇組在分化後 16 小時開始顯著降低 CHOP mRNA 表現；在蛋白質部份則於分化後 24 小時才具有顯著降低 CHOP 蛋白質之表現。有許多證據顯示 CHOP 表現會影響到脂肪細胞之分化，在動物實驗方面，2007 年 Ariyama 等人指出，CHOP 基因缺陷鼠中會造成周邊脂肪組織增加而造成肥胖 (Ariyama et al., 2007)。在細胞培養方面，在 2008 年 Huang 等人指出，轉錄因子 YY1 可藉由抑制 CHOP-10 之表現而促進脂肪新生作用 (Huang et al., 2008)。Batchvarova 等人與 Li 等人在 1995 與 2006 年分別利用蛋白酶體抑制劑 ALLN 與 lactacystin 增加 CHOP 表現，其結果皆為抑制 3T3-L1 脂肪細胞分化 (Batchvarova et al., 1995; Li et al., 2006)。另一方面，2007 年 Ariyama 等人在動物中指出，在 *chop* (-/-) 鼠中 PPAR γ 基因表現較 *chop* (+/+) 高 (Ariyama et al., 2007)，故可推測 15 μ M 白藜蘆醇可能藉由抑制 CHOP 而增加 PPAR γ 基因表現最後促進脂肪細胞之分化。這些都證實誘發 CHOP 會抑制脂肪細胞之分化，反之若抑制 CHOP 表現則具有促進脂肪細胞之分化，而本實驗結果發現添加 15 μ M 白藜蘆醇可抑制 CHOP 基因與蛋白質之表現，故可推論添加 15 μ M 白藜蘆醇可能藉由抑制 CHOP 之表現而促進脂肪細胞分化。

添加 15 μ M 白藜蘆醇藉由擴大一連串轉錄因子活性而促進脂肪細胞分化

綜合以上結果，15 μ M 白藜蘆醇可經由一連串擴大轉錄因子活性而促進脂肪細胞分化。因實驗證實 15 μ M 白藜蘆醇藉稍微促進早期 (24 小時內) 轉錄因子 C/EBP β 、C/EBP δ mRNA 或蛋白質表現，而大幅增加 (day 2 後) C/EBP α 、

PPAR γ mRNA 或蛋白質表現，最後造成明顯促進脂肪細胞分化。同時 15 μ M 白藜蘆醇也可經抑制（48 小時內）CHOP mRNA 與蛋白質表現，進而可能影響 C/EBP β 、C/EBP α 轉錄活性而促進脂肪細胞之分化。在整個分化時間軸上，15 μ M 白藜蘆醇在分化最關鍵時期（48 小時內）透過基因與蛋白質來調控因子表現，使脂肪細胞內部開始朝向分化方向進行。

添加 15 μ M 白藜蘆醇會影響分化初期之 AKT 磷酸化，但不影響 ERK1/2 磷酸化

由上述結果已知 15 μ M Res. 具有促進脂肪細胞之分化並且具有增加轉錄因子表現之作用，因此進一步探討更早期訊息傳遞分子 AKT 與 ERK1/2 是否參與白藜蘆醇調控 3T3-L1 脂肪細胞之分化。由圖 15 與圖 16 結果得知，在分化初期（day 0 ~ day 2）AKT 與 ERK1/2 磷酸化程度隨時間增加。在許多文獻中指出，早期活化 AKT 與 ERK1/2 可藉由磷酸化 C/EBP β 或調控 PPAR γ 與 C/EBP α 表現而促進分化（Peng et al., 2003; Prusty et al., 2002; Park et al., 2004），故可推測此時期的增加可能參與促進脂肪分化。進一步比較各時間點之 15 μ M Res. 組與 EtOH 組之 AKT 磷酸化程度發現在不同時間點有所增減，而在 ERK1/2 磷酸化程度則發現兩者之間並無明顯差異。這表示添加 15 μ M Res. 會影響分化初期 AKT 磷酸化程度，但不影響 ERK1/2 磷酸化程度。因此再進一步縮短分化時間以其看到更大的差異，發現在更短時間（0 min~60 min）中 EtOH 與 15 μ M Res. 兩組間 AKT 並無更明顯的差別。這些結果顯示在白藜蘆醇調控 3T3-L1 脂肪細胞之分化中，AKT 可能扮演著尚未知的調控角色，因此未來必須要再進一步探討 AKT 與這些轉錄因子之間的關連才能更了解 AKT 所扮演的角色。

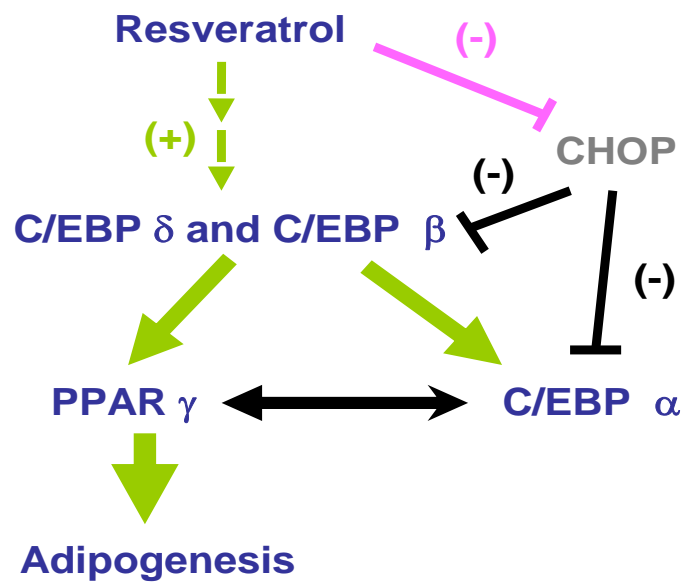
結論

白藜蘆醇廣泛存於多種植物中，具有許多生理活性功能。長期飲用紅酒能降低心血管疾病罹患率與肥胖，並有許多研究推測是紅酒中的白藜蘆醇所造成。目前已將白藜蘆醇當作保健食品。然並非所有體內前驅脂肪細胞皆處於即將分化階段，因此利用不同添加時期來評估白藜蘆醇對脂肪細胞分化之影響。由實驗結果可知低劑量之白藜蘆醇可促進脂肪細胞之分化，而高劑量之白藜蘆醇具有抑制脂肪細胞分化之功效，故添加時期的不同會對脂肪細胞之分化造成不同程度之影響。如於在分化前即添加白藜蘆醇低劑量能刺激脂肪細胞之分化，而高劑量則造成之分化情形較差，部份可歸因於高劑量之白藜蘆醇會造成細胞死亡而影響分化。若在分化試劑中才添加，低劑量對於脂肪分化無明顯之影響，而高劑量時則會抑制脂肪細胞分化。搭配細胞毒性試驗結果，可推測高劑量白藜蘆醇具有當作藥物之潛力，而低劑量適用於一般平日之保健。本論文研究選用分化前一天到分化第 2 天添加 15 μM 白藜蘆醇，由 Oil Red O 與 GPDH 活性分析此期間與此濃度具有最大之刺激脂肪細胞分化能力。隨後進行測量分化中基因與蛋白質之表現，以期了解 15 μM 白藜蘆醇如何促進脂肪細胞之分化。

由結果中發現，15 μM 白藜蘆醇可明顯促進 PPAR γ 、C/EBP β 、adiponectin 與 aP2 之基因表現，在蛋白質部分則能顯著促進 PPAR γ 、C/EBP α 、C/EBP δ 等蛋白質之表現。將結果整合以圖表示（圖丁），發現 15 μM 白藜蘆醇經影響各個轉錄因子而促進分化。在分化的時間軸上，於分化初期白藜蘆醇藉由輕微增加 C/EBP β 與 C/EBP δ 而增加誘發分化中期之 PPAR γ 與 C/EBP α 之表現最終促進分化。此外也發現，15 μM 白藜蘆醇可能藉由分化初期之抑制 CHOP 基因與蛋白質之表現，而影響 C/EBP β 與 C/EBP α 結合 DNA 活性，進而影響 PPAR γ 等其他轉錄因子，最終刺激 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化。因此在整個分化時間軸上，白藜蘆醇可藉由輕微影響早期因子一層一層擴大各因子轉錄活性，造成明顯脂肪細胞之分化。但在分化過程中偵測許多因子之基因表現，發現批次之間變異性很大，推測導因於其分化狀態不同。

進一步探討更早期之傳訊分子 AKT 與 ERK1/2 是否參與白藜蘆醇調控 3T3-L1 脂肪細胞分化過程時。發現 ERK1/2 可能並不直接參與 15 μM 白藜蘆醇

對 3T3-L1 脂肪細胞分化之調控。另一方面，15 μ M 白藜蘆醇的添加則能活化 AKT，故 AKT 可能參與其中調控白藜蘆醇所刺激脂肪細胞分化，但其調控角色尚不得而知。未來必須要再進一步探討 AKT 與下游轉錄因子表現之間的關連才能更了解 AKT 所扮演的角色。



圖丁、白藜蘆醇藉由影響各轉錄因子而促進脂肪細胞分化

圖表

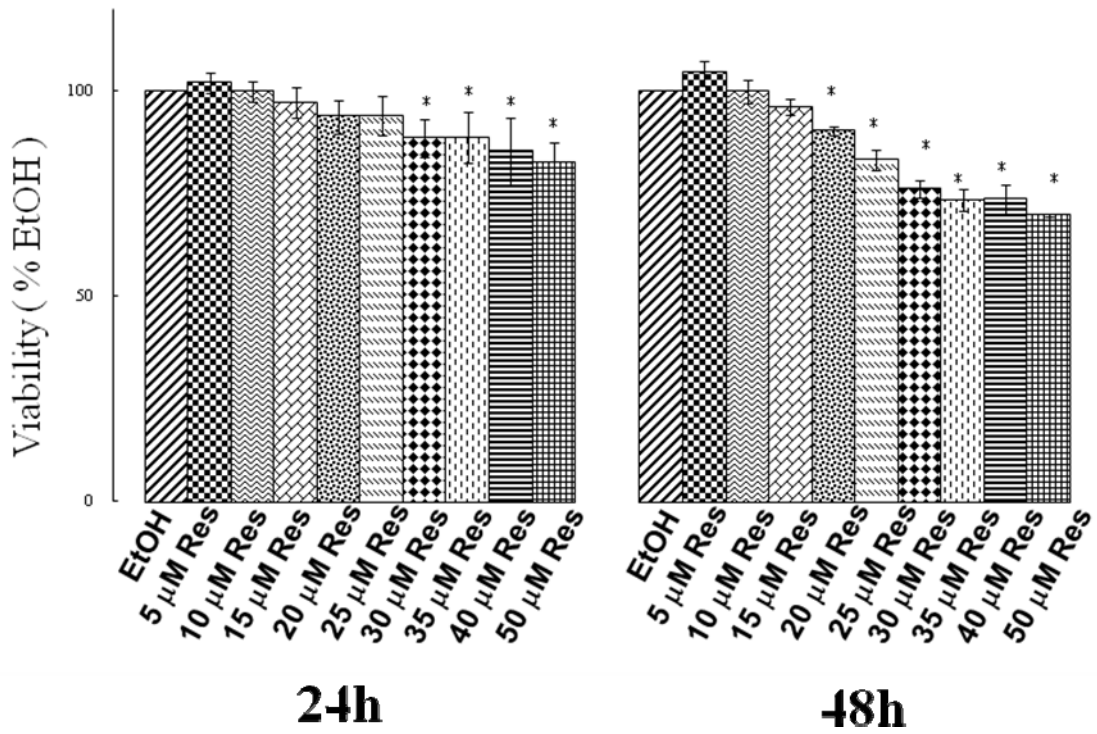


圖 1、不同濃度之白藜蘆醇對 3T3-L1 前驅脂肪細胞之毒性分析。3T3-L1 前驅脂肪細胞中添加不同濃度 (5 μM ~ 50 μM) 之 resveratrol，並在 37°C 培養 24 與 48 小時，最後以 MTT 進行細胞殘存率測試。其中 EtOH 是做為控制組，添加等同於最高劑量體積之 EtOH。圖表中*表示具有顯著差異 ($p < 0.05$)。

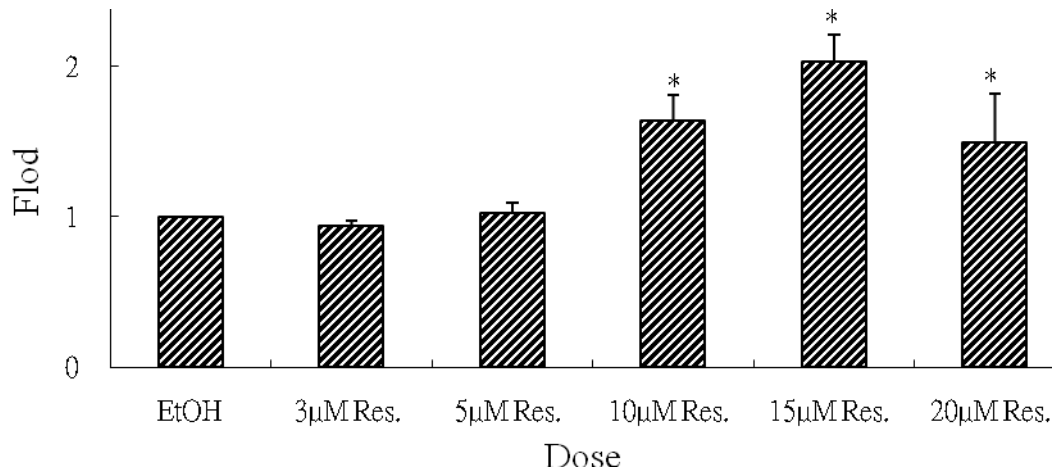
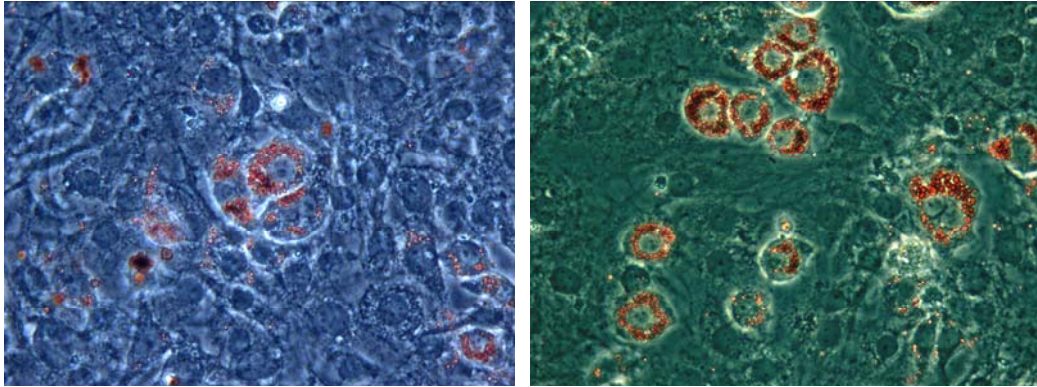
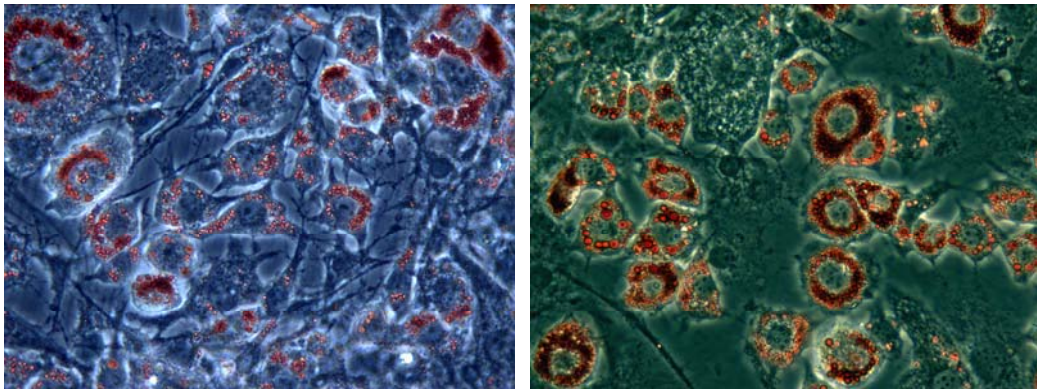


圖 2、不同濃度之白藜蘆醇對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化之影響。在 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化前即添加不同濃度之 resveratrol，並培養 24 小時後添加分化試劑刺激其分化，最後於分化第 5 天 (day 5) 以 GPDH 活性分析進行測定脂肪細胞分化情形。其中 EtOH 是做為控制組，添加等同於最高劑量體積之 0.1%(v/v)EtOH。圖表中*表示具有顯著差異 ($p < 0.05$)。

(a)



(b)



(c)

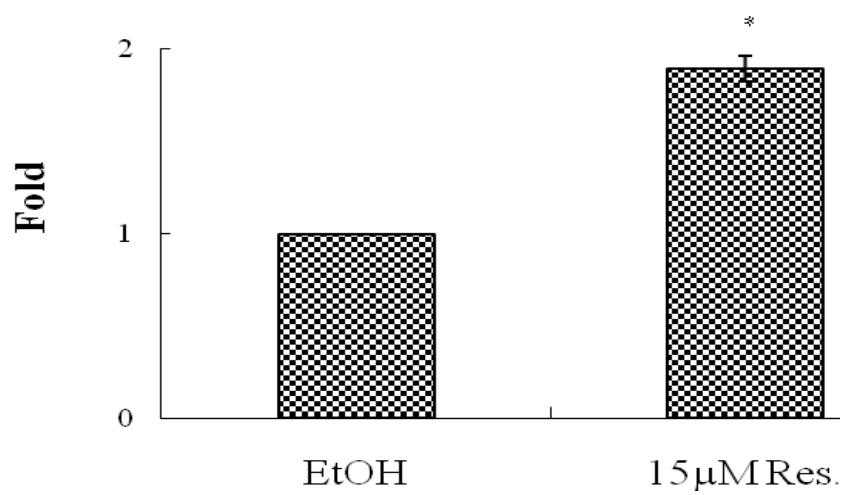


圖 3、不同濃度之白藜蘆醇對 3T3-L1 脂肪細胞之油滴生成。在 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化前即添加 15 μ M resveratrol，並培養 24 小時後添加分化試劑刺激其分

化，最後以 Oil Red O 染色法進行測定脂肪細胞分化情形。圖 3 (a) 為鏡檢下 (400X)，3T3-L1 脂肪細胞分化第 6 天控制組 (EtOH) 之脂肪滴；圖 3 (b) 為鏡檢下 (400X)，3T3-L1 脂肪細胞分化第 6 天 15 μ M Res. 組之脂肪滴圖；圖 3 (c) 為油滴累積之量化結果，分化第 6 天於波長 510 nm 下之吸光值，以 EtOH 組為 1。其中 EtOH 是做為控制組，添加等同於劑量體積之 EtOH。圖表中*表示具有顯著差異 ($p < 0.05$)。

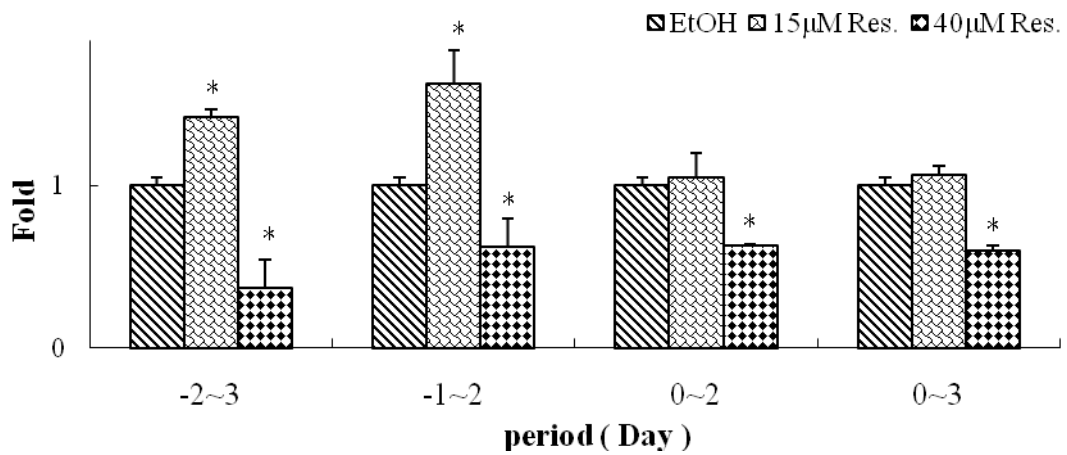


圖 4、不同時段添加白藜蘆醇對 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化之影響。在 3T3-L1 前驅脂肪細胞分化前即以四種不同時期添加 15 μM 和 40 μM resveratrol，最後於分化第 5 天 (day 5) 以 GPDH 活性分析進行測定脂肪細胞分化情形。其中 EtOH 是做為控制組，添加等同於最高劑量體積之 EtOH。圖表中*表示具有顯著差異 ($p < 0.05$)。

圖 5 (a)

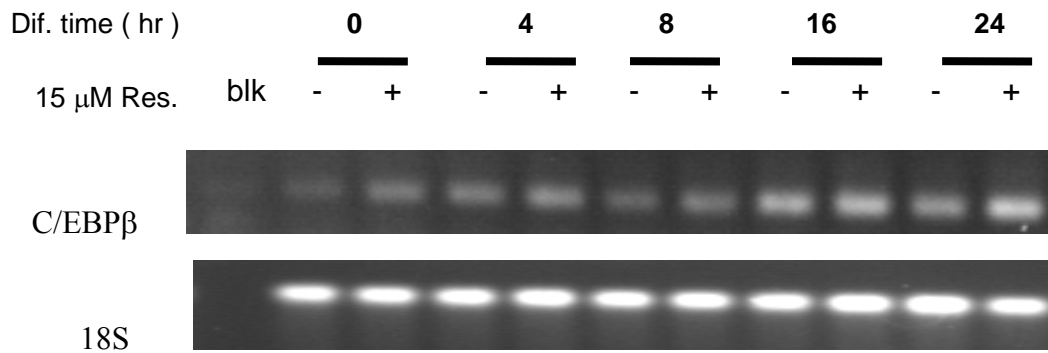


圖 5 (b)

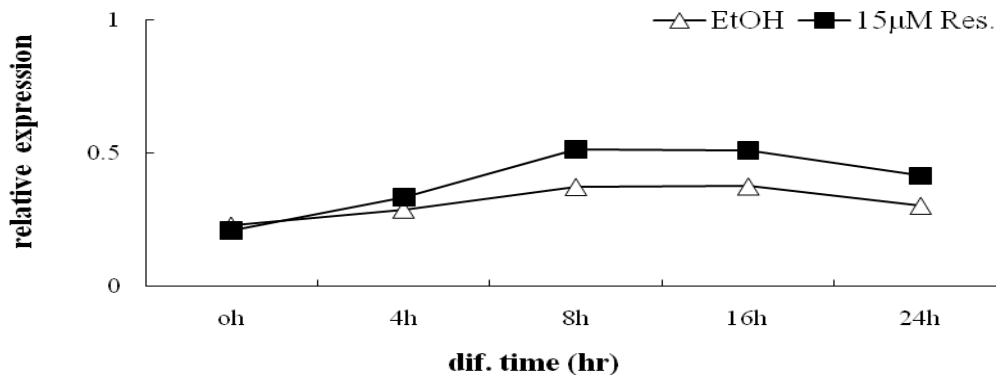


圖 5 (c)

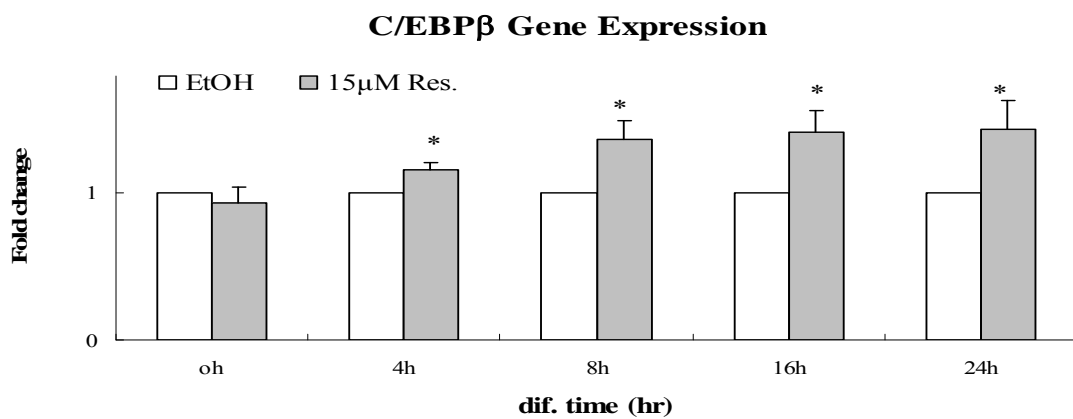


圖 5、分化初期 15 μ M 白藜蘆醇處理對 C/EBP β 基因表現之影響。(a) 為 C/EBP β 與內部對照 18S 基因表現之 2% 瓊脂凝膠電泳之電泳圖；(b) 為基因表現之量化結果；(c) 為各時間點之倍數差異結果，圖中柱狀圖為各時間點之 EtOH 組 (\square) 與 15 μ M Res. 組 (\blacksquare) 兩組之間倍數改變 (以各時間點之 EtOH 組定為 1)。圖表中 * 表示具有顯著差異 ($p < 0.05$)。

圖 6 (a)

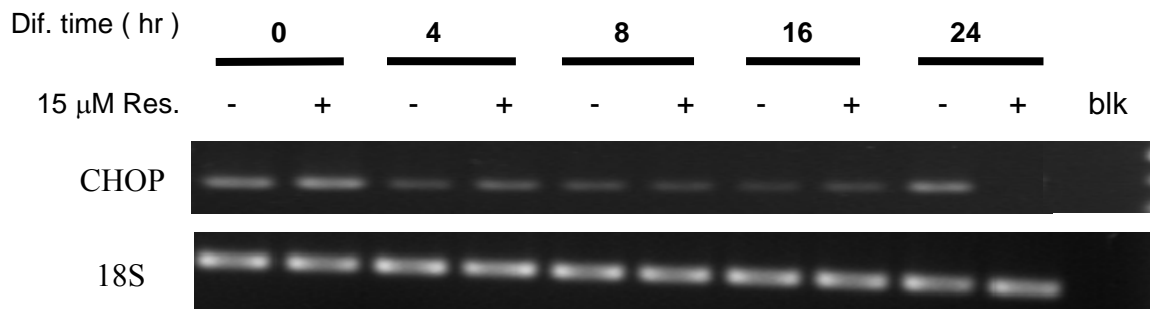


圖 6 (b)

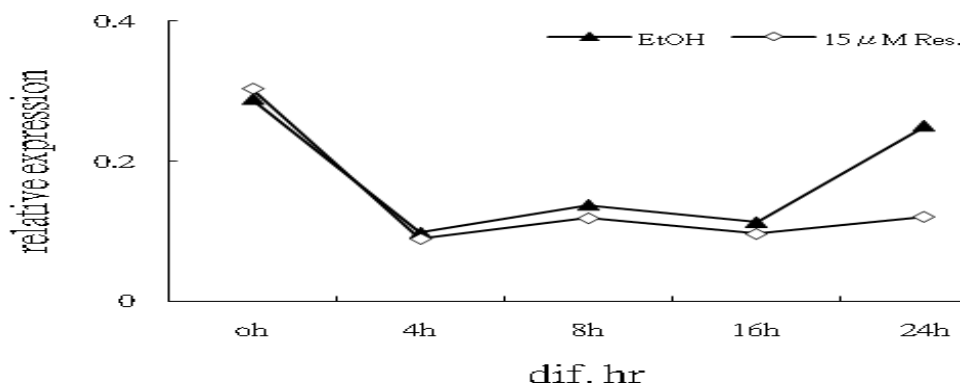


圖 6 (c)

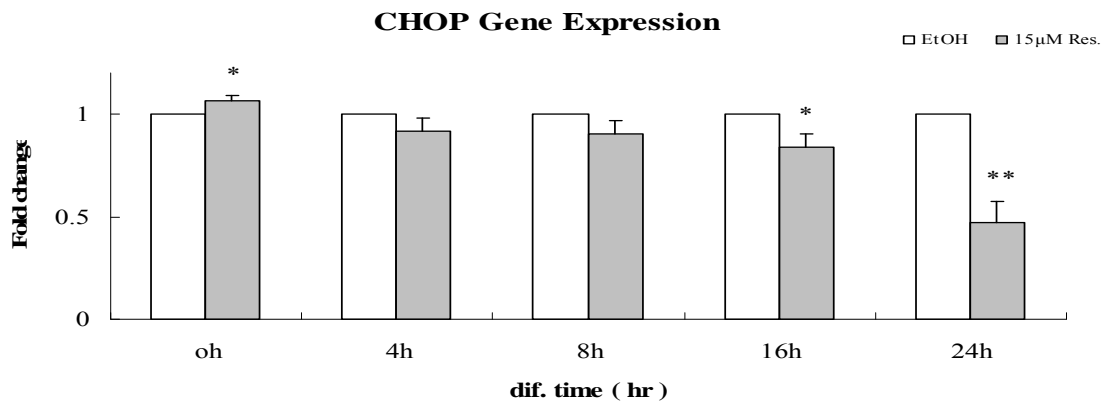


圖 6、分化初期 15 μ M 白藜蘆醇處理對 CHOP 基因表現之影響。(a) 為 CHOP 與內部對照 18S 基因表現之 2%瓊脂凝膠電泳之電泳圖；(b) 為基因表現之量化結果；(c) 為基因表現之量化結果，圖中柱狀圖表各時間點之 EtOH 組 (\square) 與 15 μ M Res. 組 (\blacksquare) 兩組之間倍數改變 (以各時間點之 EtOH 定為 1)。dif. time 為 differentiation time，圖表中*表示具有顯著差異 ($p < 0.05$)；**表示具有即顯著差異 ($p < 0.01$)。

圖 7 (a)

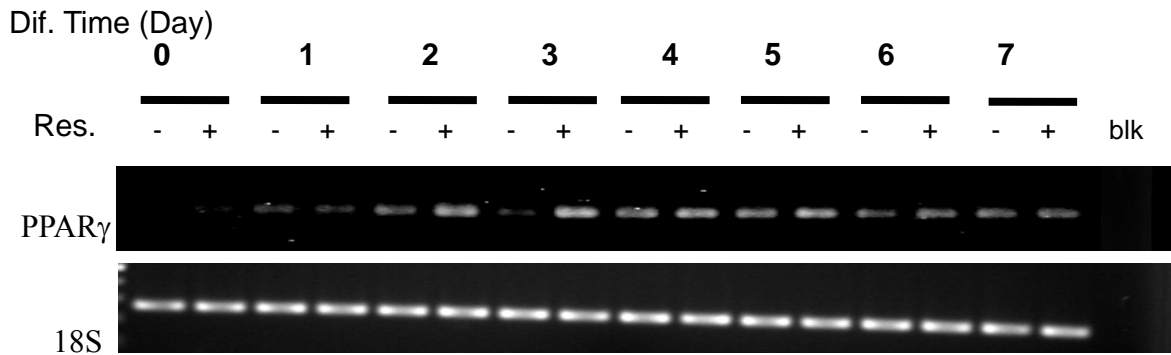


圖 7 (b)

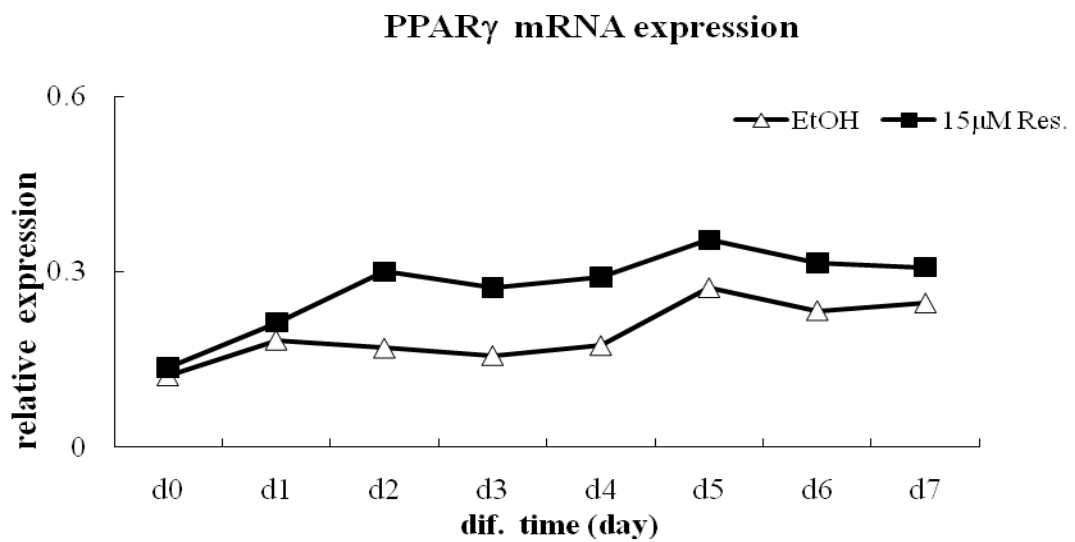


圖 7 (c)

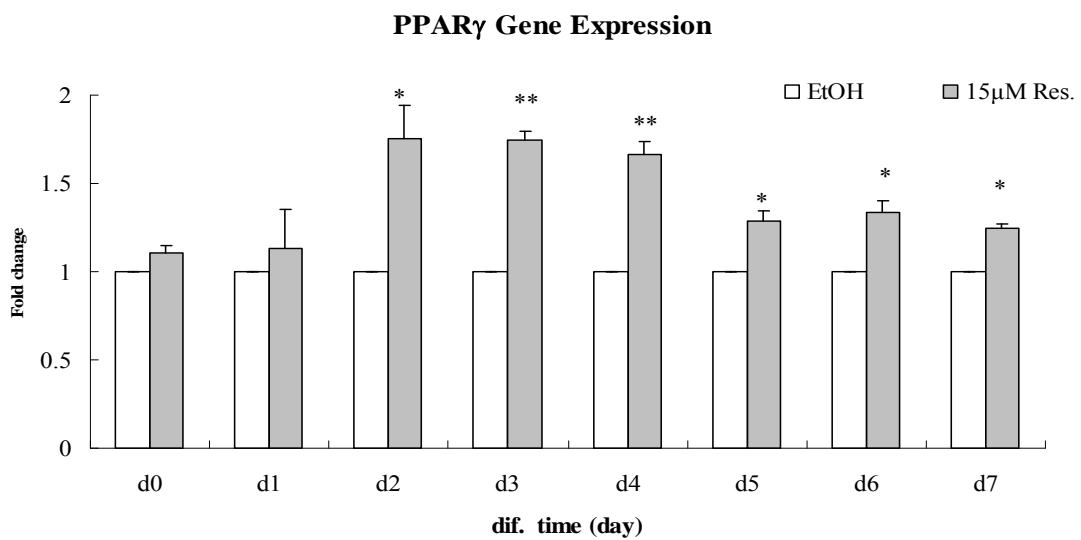


圖 7、15 μM 白藜蘆醇處理對 PPAR γ 基因表現之影響。在 day -1~ day 2 期間添加 15 μM 白藜蘆醇，並收集 day 0 到 day 7 的 total RNA，偵測 PPAR γ 之基因表現。其中 EtOH 是做為控制組，添加等同於最高劑量體積之 EtOH。(a) 為 PPAR γ 與 18S 基因表現之 2% 瓊脂凝膠電泳之電泳圖；(b) 為各時間基因表現之量化結果；(c) 為基因表現之倍數差異結果，圖中柱狀圖表各時間點之 EtOH 組 (\square) 與 15 μM Res. 組 (\blacksquare) 兩組之間倍數改變 (以各時間點之 EtOH 定為 1)。圖表中* 表示具有顯著差異 ($p < 0.05$)；** 表示具有即顯著差異 ($p < 0.01$)。

圖 8 (a)

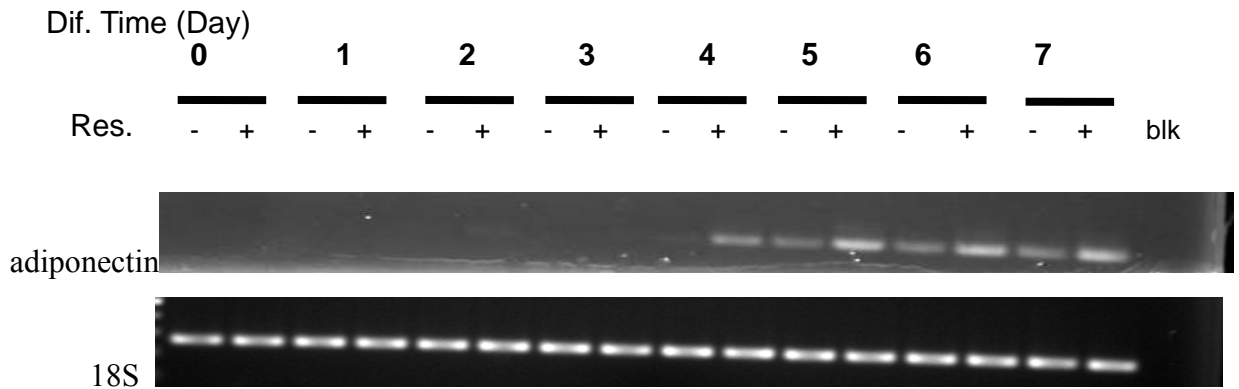


圖 8 (b)

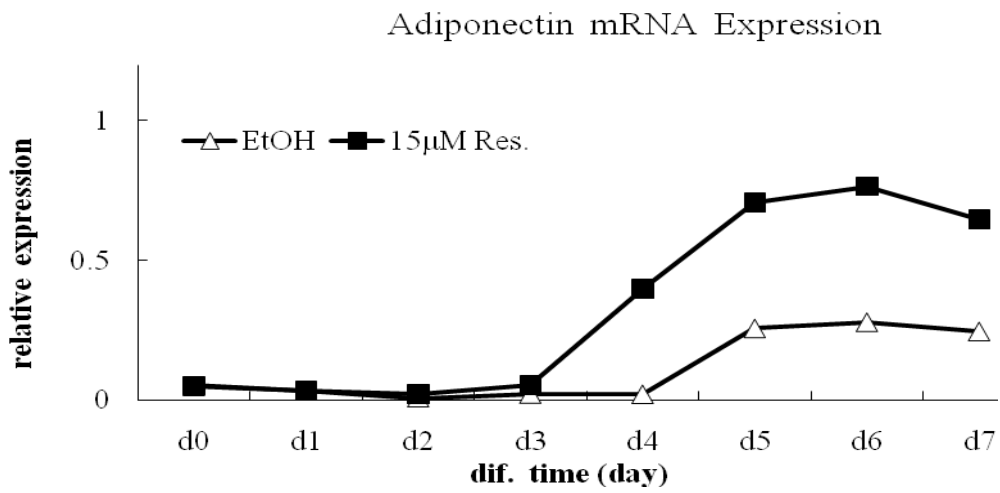


圖 8 (c)

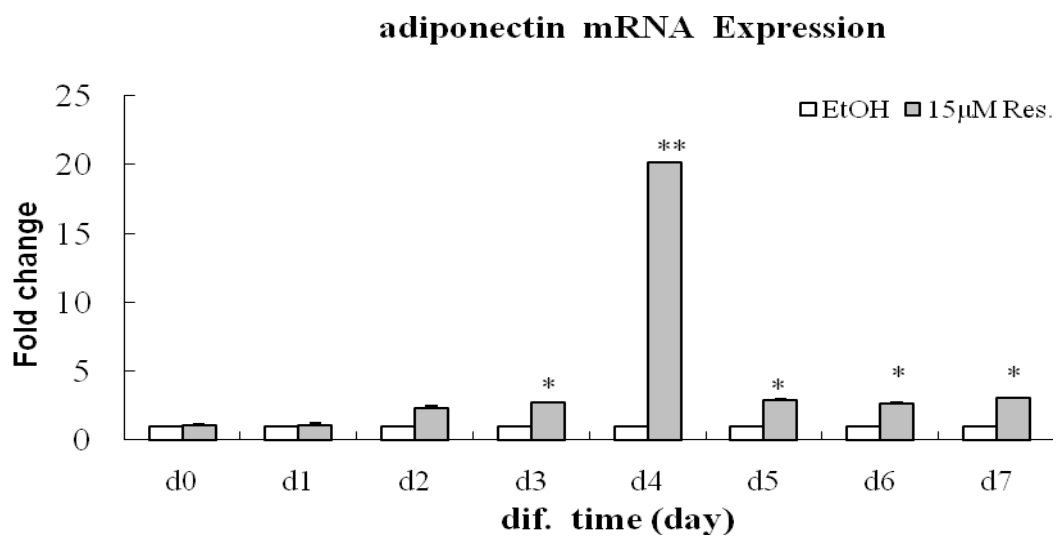


圖 8、15 μM 白藜蘆醇處理對 adiponectin 基因表現之影響。在 day -1~ day 2 期間添加 15 μM 白藜蘆醇，並收集 day 0 到 day 7 的 total RNA，偵測 adiponectin 之基因表現。其中 EtOH 是做為控制組，添加等同於最高劑量體積之 EtOH。(a) 為 adiponectin 與 18S 基因表現之 2%瓊脂凝膠電泳之電泳圖；(b) 為基因表現之量化結果；(c) 為各時間點之倍數差異之結果，圖中柱狀圖表各時間點之 EtOH 組 (\square) 與 15 μM Res. 組 (\blacksquare) 兩組之間倍數改變 (以各時間點之 EtOH 定為 1)。圖表中*表示具有顯著差異 ($p < 0.05$)；**表示具有即顯著差異 ($p < 0.01$)。

圖 9 (a)

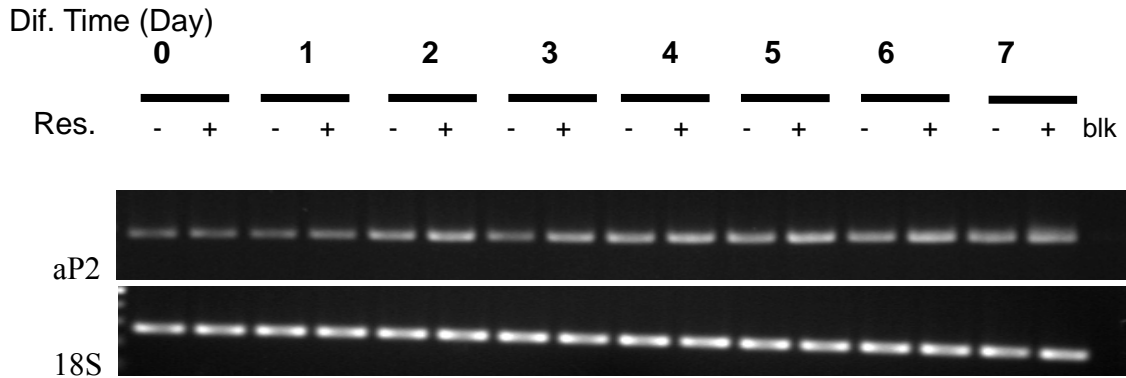


圖 9 (b)

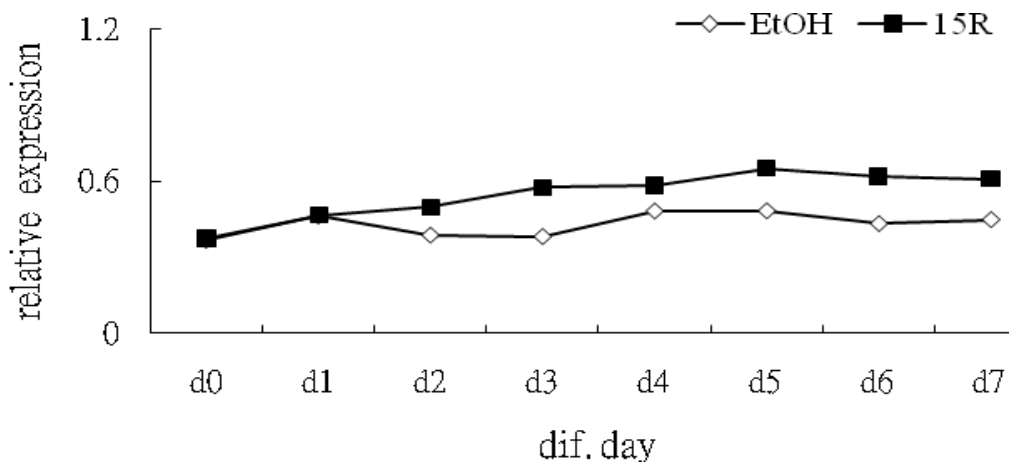


圖 9 (c)

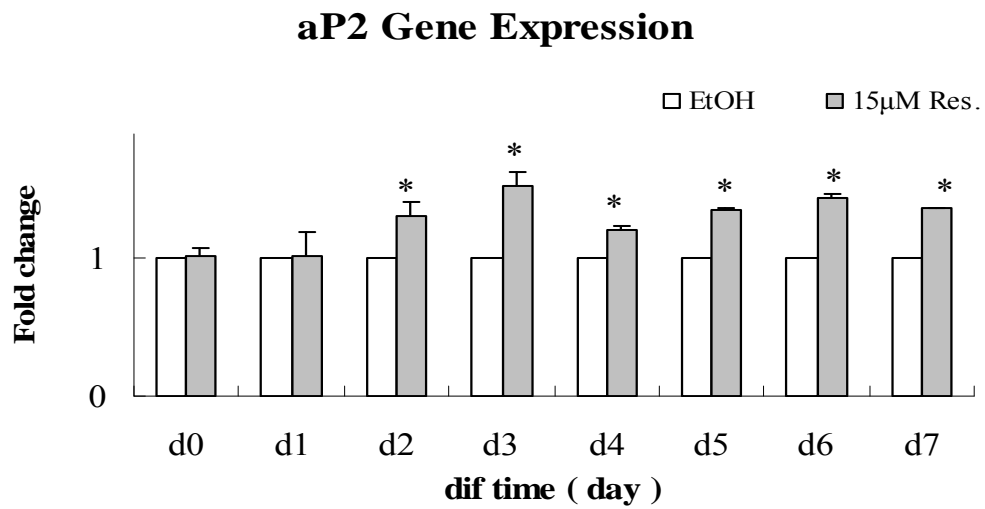


圖 9、15 μM 白藜蘆醇處理對 aP2 基因表現之影響。在 day -1~ day 2 期間添加 15 μM 白藜蘆醇，並收集 day 0 到 day 7 的 total RNA，偵測 aP2 之基因表現。其中 EtOH 是做為控制組，添加等同於最高劑量體積之 EtOH。(a) 為 aP2 與 18S 基因表現之 2%瓊脂凝膠電泳之電泳圖；(b) 為基因表現之量化結果；(c) 為各時間點之倍數差異結果，圖中柱狀圖表各時間點之 EtOH 組 (\square) 與 15 μM Res. 組 (\blacksquare) 兩組之間倍數改變 (以各時間點之 EtOH 定為 1)。圖表中*表示具有顯著差異 ($p < 0.05$)；**表示具有即顯著差異 ($p < 0.01$)。

圖 10 (a)

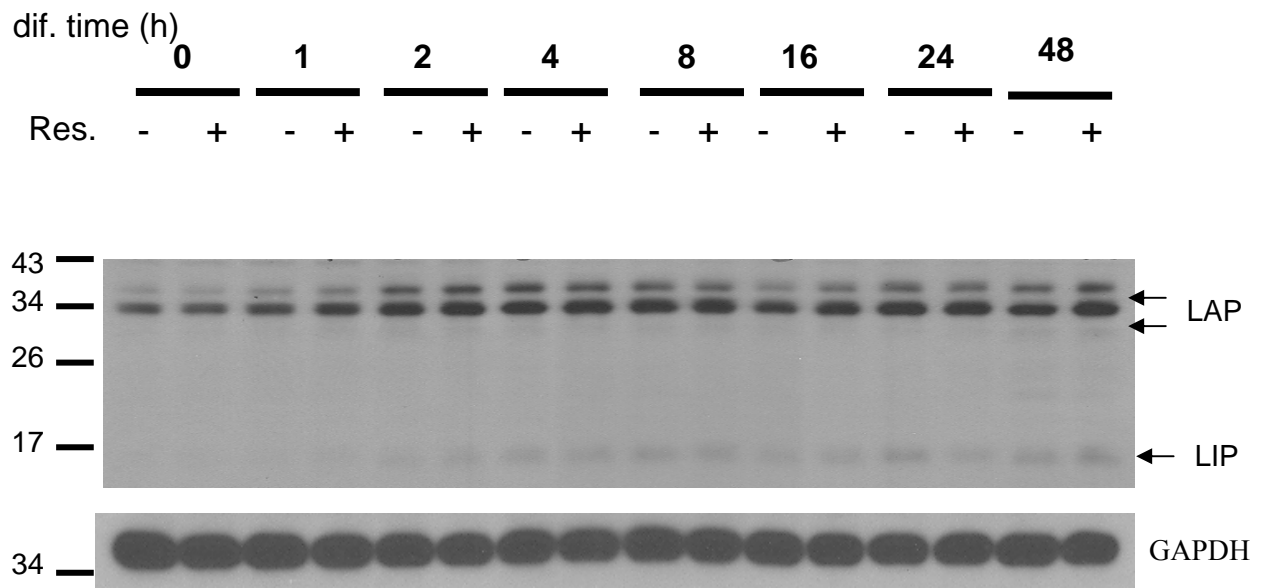
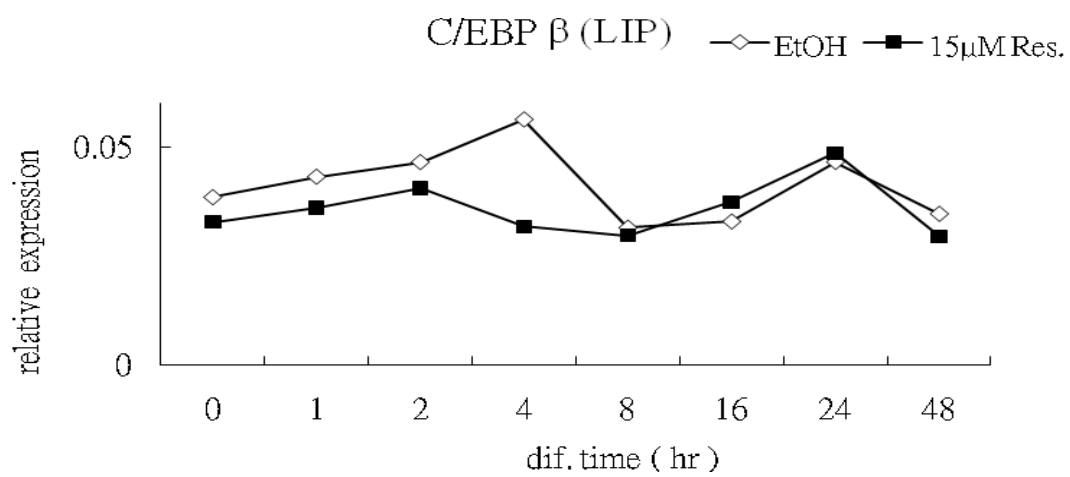
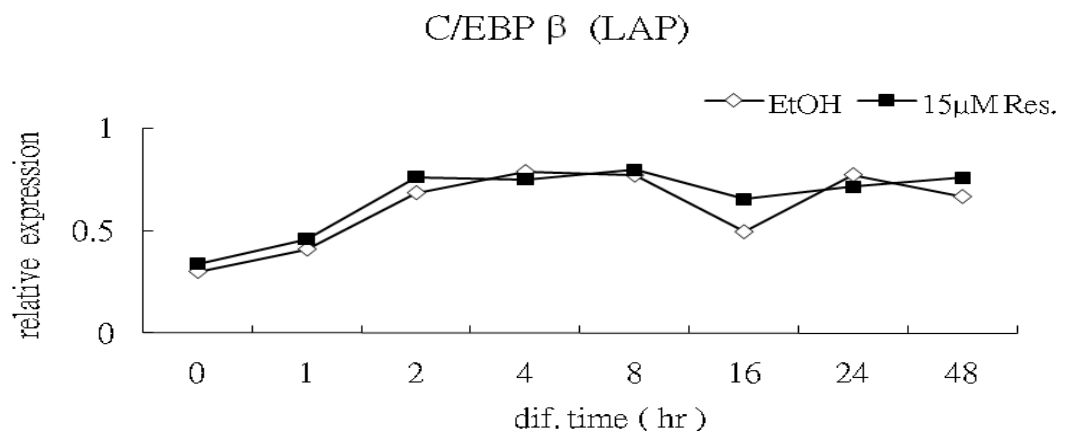


圖 10 (b)



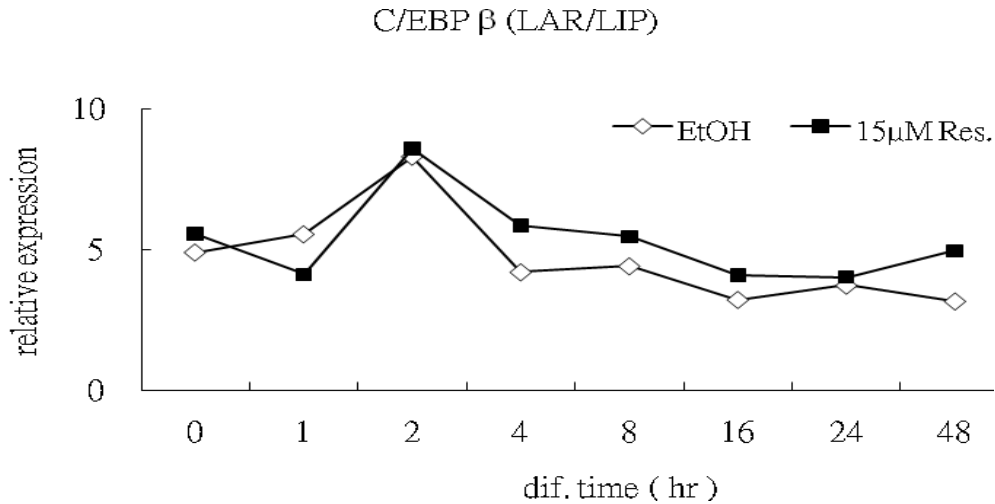


圖 10 (c)

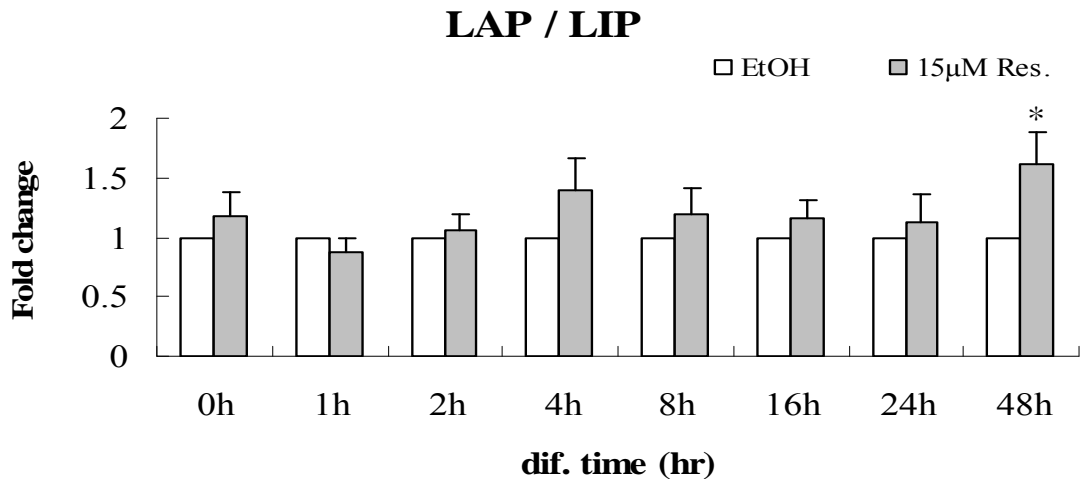


圖 10、分化初期 15 μ M 白藜蘆醇處理對脂肪細胞 C/EBP β 蛋白質表現之影響。在 day -1~ day 2 期間添加 15 μ M Resveratrol，並收集 day 0 到 day 2 的蛋白質，偵測 C/EBP β -LAP 與 C/EBP β -LIP 之基因表現。其中 EtOH 是做為控制組，添加等同於最高劑量體積之 EtOH。(a) 為 C/EBP β 與內部對照 GAPDH 蛋白質表現；(b) 為各時間點之 LAP、LIP 與 LAP/LIP 蛋白質質量化結果；(c) 為各時間點之倍數差異結果，圖中柱狀圖表各時間點之 EtOH 組 (□) 與 15 μ M Res.組 (■) 兩組之間倍數改變 (以各時間點之 EtOH 定為 1)。圖表中*表示具有顯著差異 ($p < 0.05$)。

圖 11 (a)

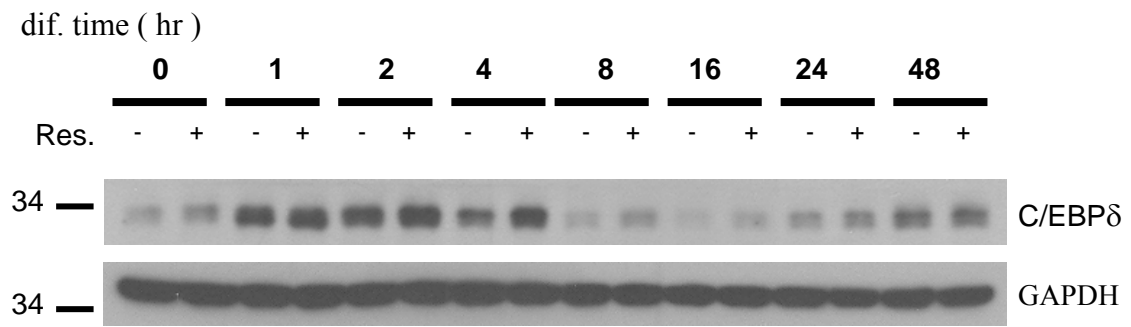


圖 11 (b)

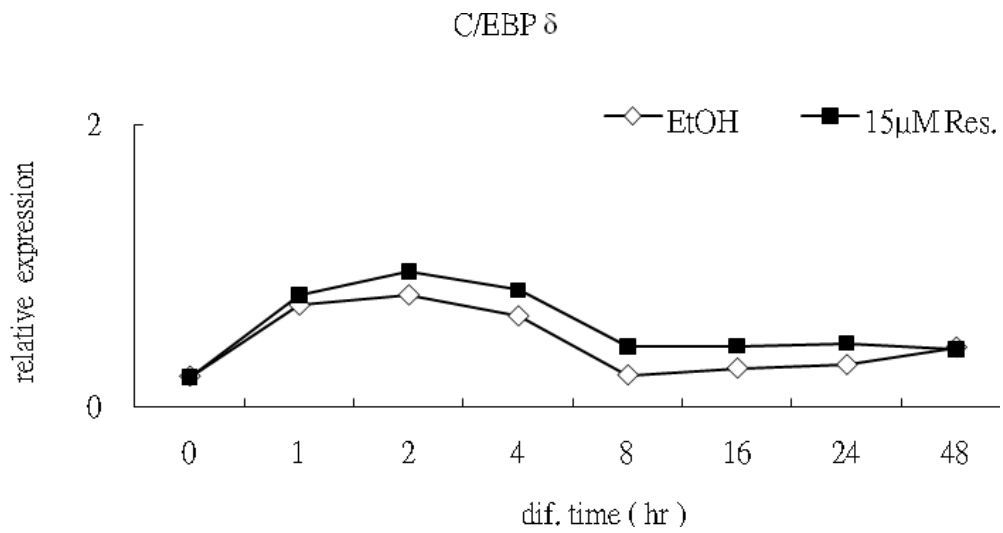


圖 11 (c)

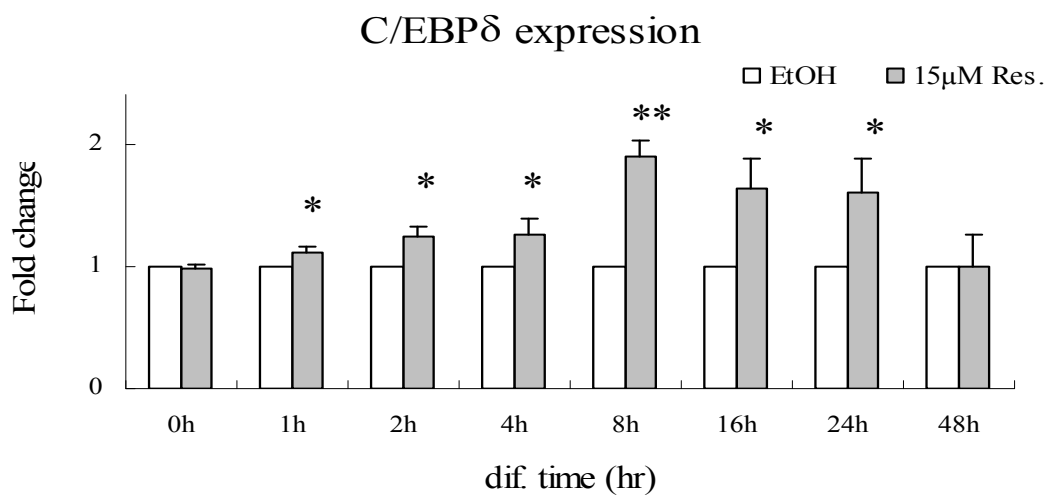


圖 11、分化初期 15 μ M 白藜蘆醇處理對 C/EBP δ 蛋白質表現之影響。在 day -1~ day 2 期間添加 15 μ M Resveratrol，並收集 day 0 到 day 2 的蛋白質，偵測 C/EBP δ 之基因表現。其中 EtOH 是做為控制組，添加等同於最高劑量體積之 EtOH。(a) 為 C/EBP δ 與內部對照 GAPDH 蛋白質表現；(b) 為各時間點之蛋白質量化結果；(c) 為各時間點之倍數差異結果，圖中柱狀圖表各時間點之 EtOH 組 (\square) 與 15 μ M Res.組 (\blacksquare) 兩組之間倍數改變 (以各時間點之 EtOH 定為 1)。圖表中* 表示具有顯著差異 ($p < 0.05$)；**表示具有即顯著差異 ($p < 0.01$)。

圖 12 (a)

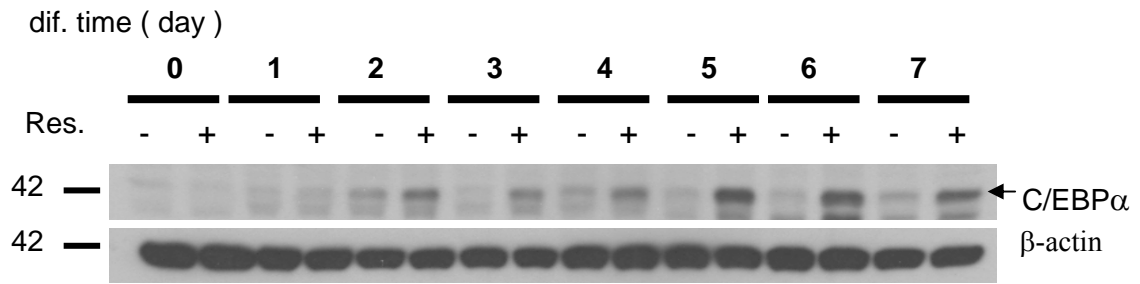


圖 12 (b)

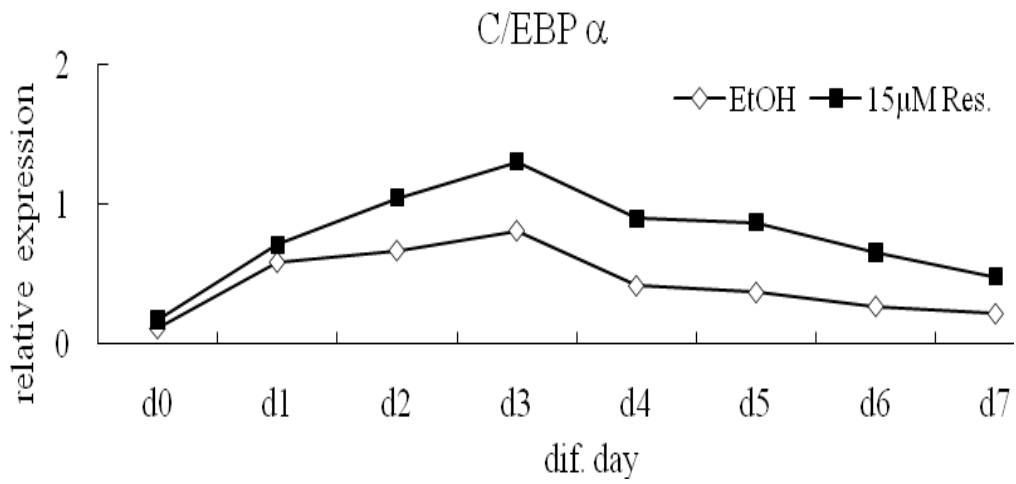


圖 12 (c)

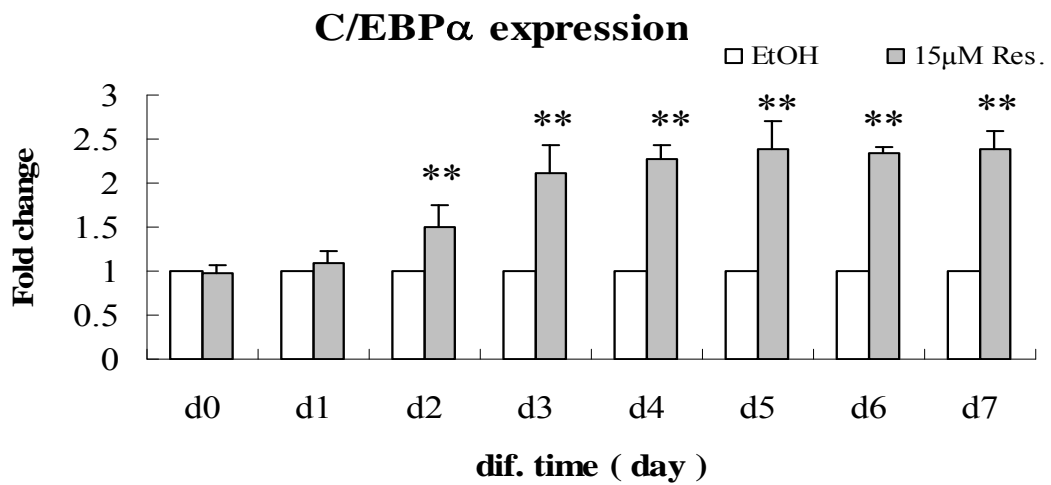


圖 12、分化初期 15 μ M 白藜蘆醇處理對 C/EBP α 蛋白質表現之影響。在 day -1~day 2 期間添加 15 μ M 白藜蘆醇，並收集 day 0 到 day 2 的蛋白質，偵測 C/EBP α 之基因表現。其中 EtOH 是做為控制組，添加等同於最高劑量體積之 EtOH。(a) 為 C/EBP α 與內部對照 β -actin 蛋白質表現；(b) 為蛋白質之量化結果；(c) 為各時間點之倍數差異結果，圖中柱狀圖表各時間點之 EtOH 組 (\square) 與 15 μ M Res. 組 (\blacksquare) 兩組之間倍數改變 (以各時間點之 EtOH 定為 1)。圖表中*表示具有顯著差異 ($p < 0.05$)；**表示具有即顯著差異 ($p < 0.01$)。

圖 13 (a)

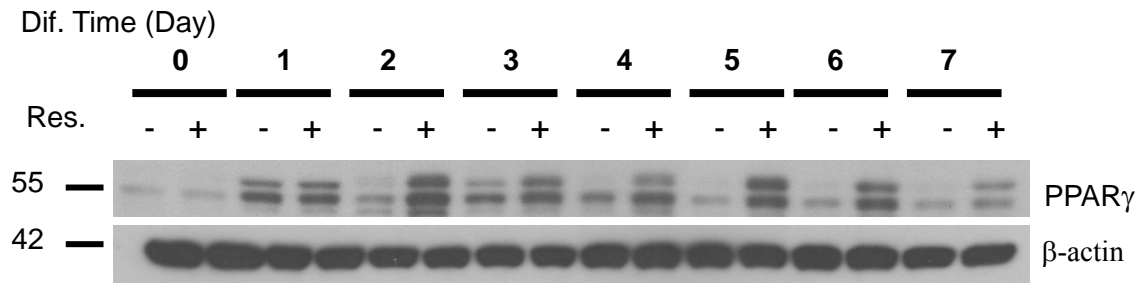


圖 13 (b)

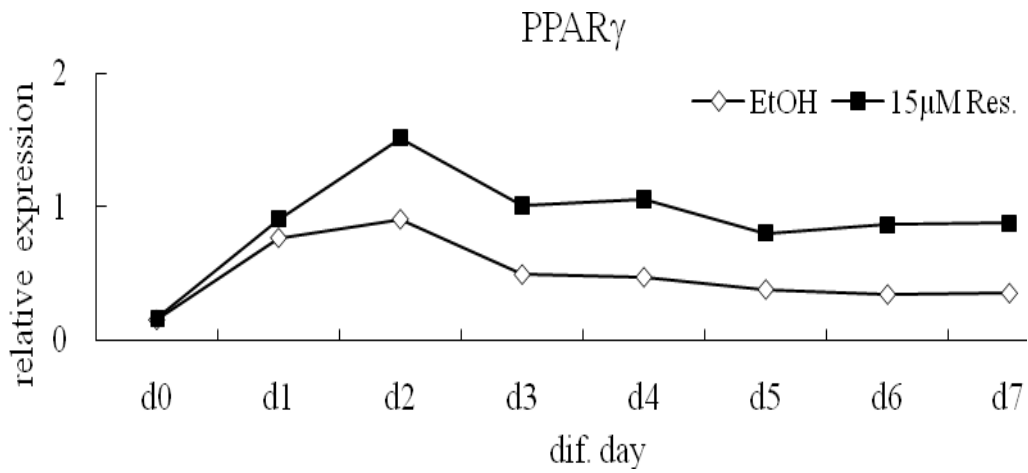


圖 13 (c)

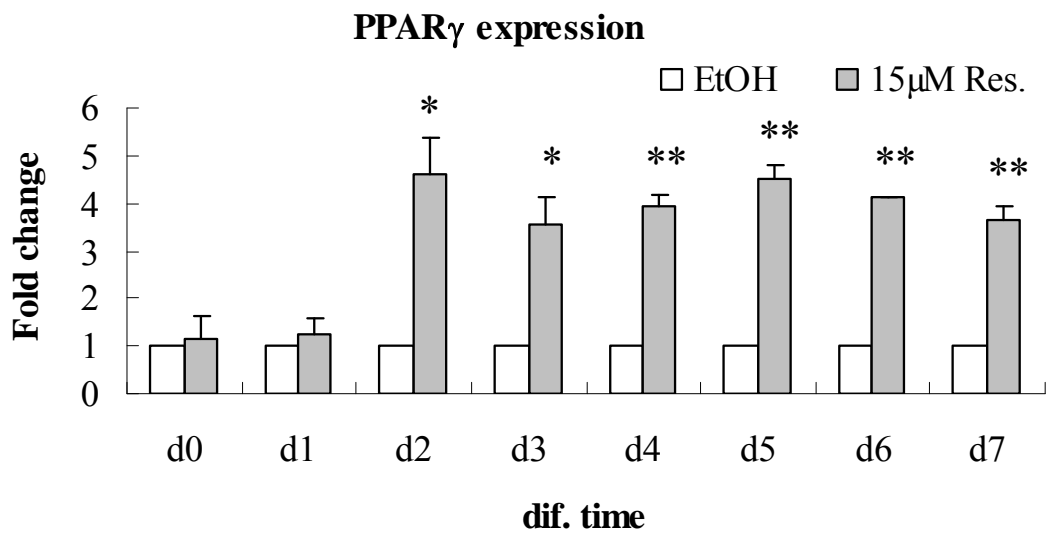


圖 13、15 μM 白藜蘆醇處理對 PPAR γ 蛋白質表現之影響。在 day -1~ day 2 期間添加 15 μM 白藜蘆醇，並收集 day 0 到 day 2 的蛋白質，偵測 PPAR γ 之蛋白質表現。其中 EtOH 是做為控制組，添加等同於最高劑量體積之 EtOH。(a) 為 PPAR γ 與內部對照 β -actin 蛋白質表現；(b) 為各時間點之蛋白質量化結果；(c) 為各時間點之倍數差異結果，圖中柱狀圖表各時間點之 EtOH 組 (\square) 與 15 μM Res. 組 (\blacksquare) 兩組之間倍數改變 (以各時間點之 EtOH 定為 1)。圖表中*表示具有顯著差異 ($p < 0.05$)；**表示具有即顯著差異 ($p < 0.01$)。

圖 14 (a)

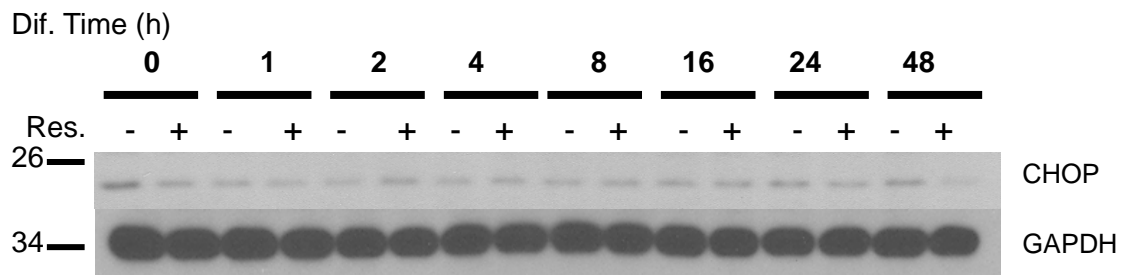


圖 14 (b)

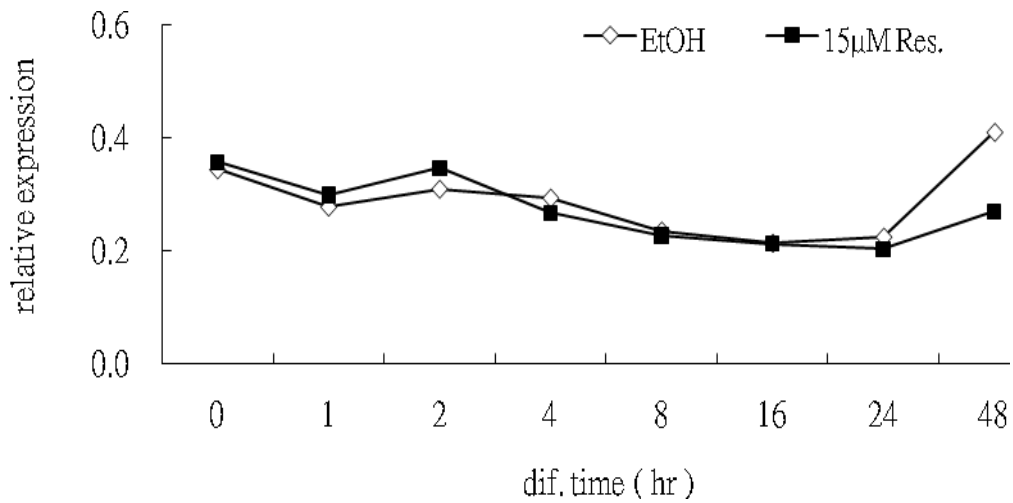


圖 14 (c)

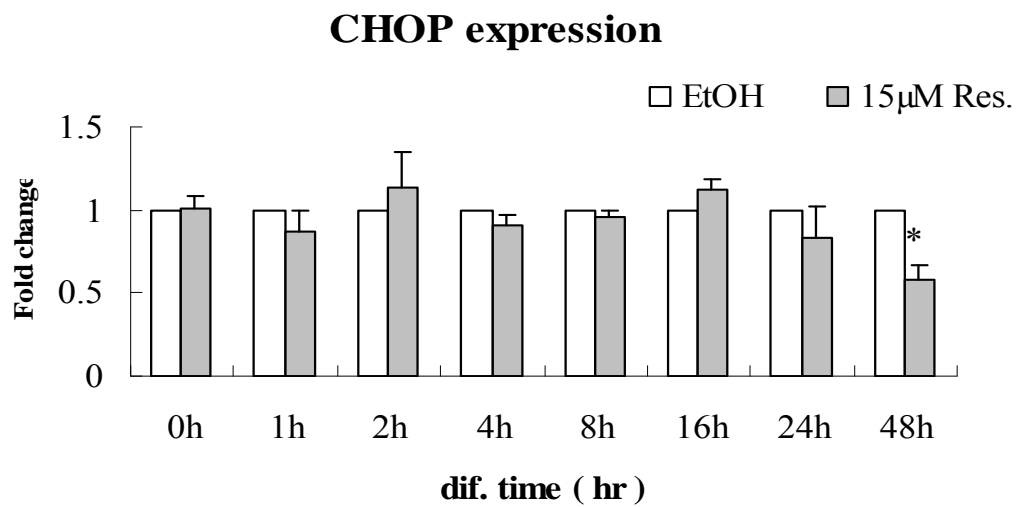


圖 14、15 μM 白藜蘆醇處理對 CHOP 蛋白質表現之影響。在 day -1~ day 2 期間添加 15 μM 白藜蘆醇，並收集 day 0 到 day 2 的蛋白質，偵測 CHOP 之蛋白質表現。其中 EtOH 是做為控制組，添加等同於最高劑量體積之 EtOH。(a) 為各時間點之 CHOP 與內部對照 GAPDH 蛋白質表現；(b) 為各時間點之蛋白質之量化結果；(c) 為各時間點之倍數差異結果，圖中柱狀圖表各時間點之 EtOH 組 (\square) 與 15 μM Res. 組 (\blacksquare) 兩組之間倍數改變 (以各時間點之 EtOH 定為 1)。圖表中 * 表示具有顯著差異 ($p < 0.05$)；** 表示具有即顯著差異 ($p < 0.01$)。

圖 15 (a)

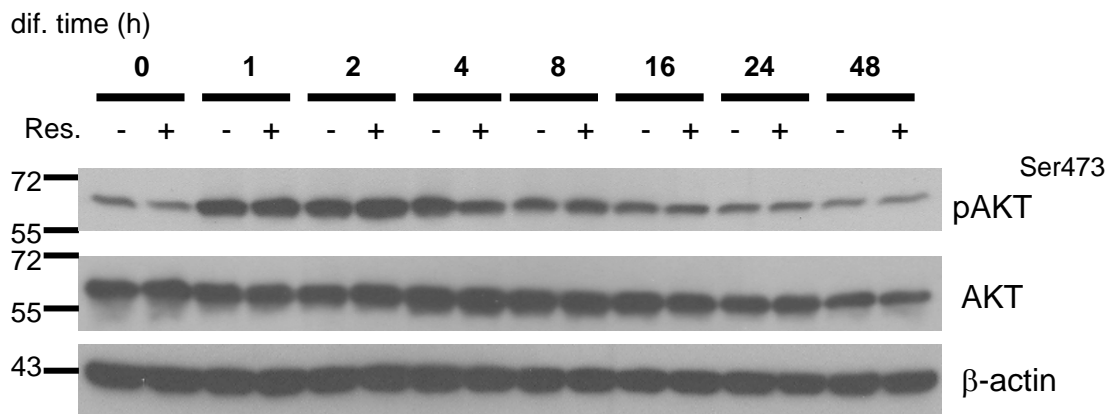
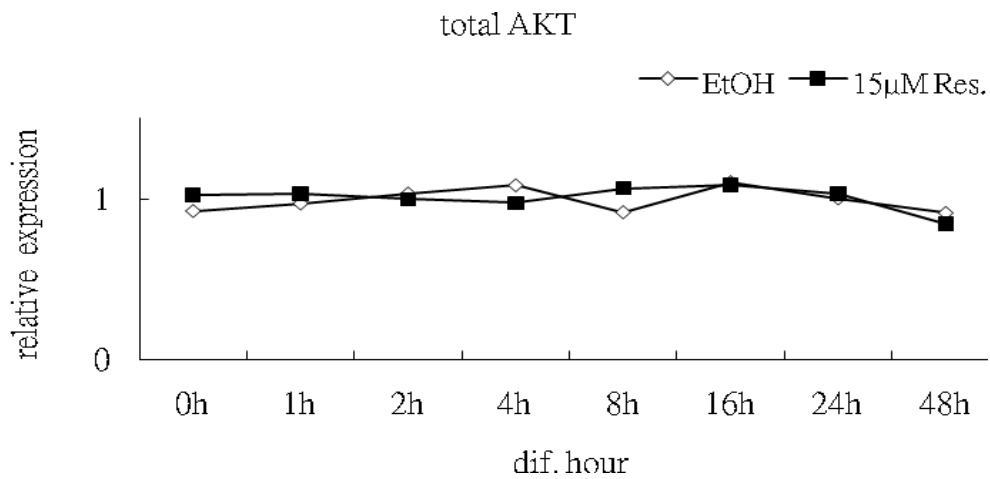
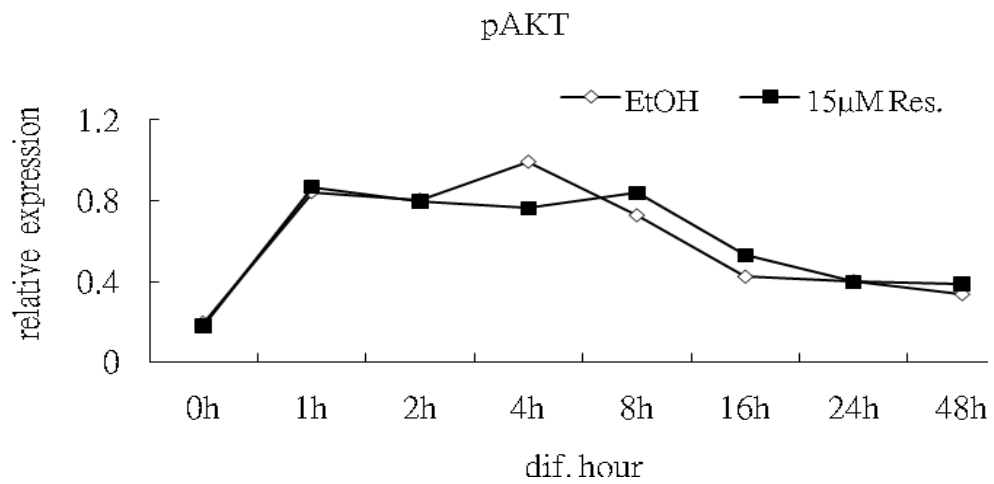


圖 15 (b)



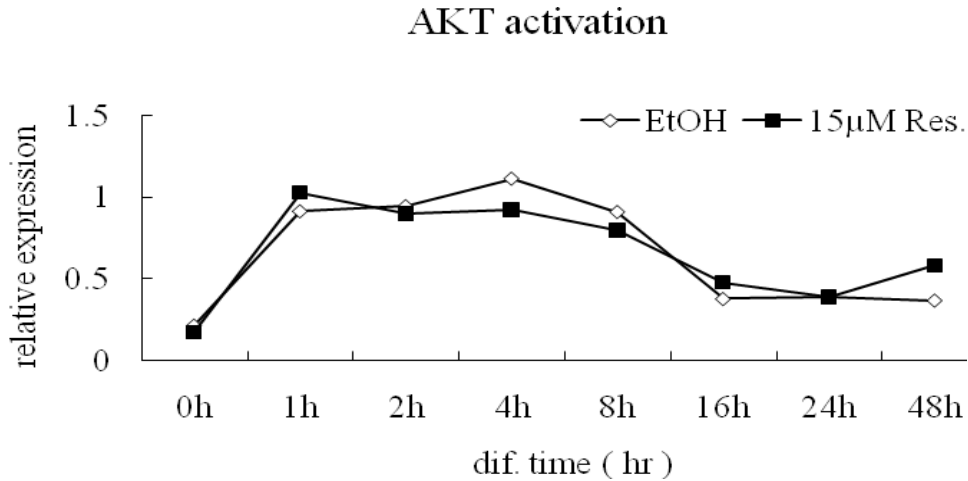


圖 15 (c)

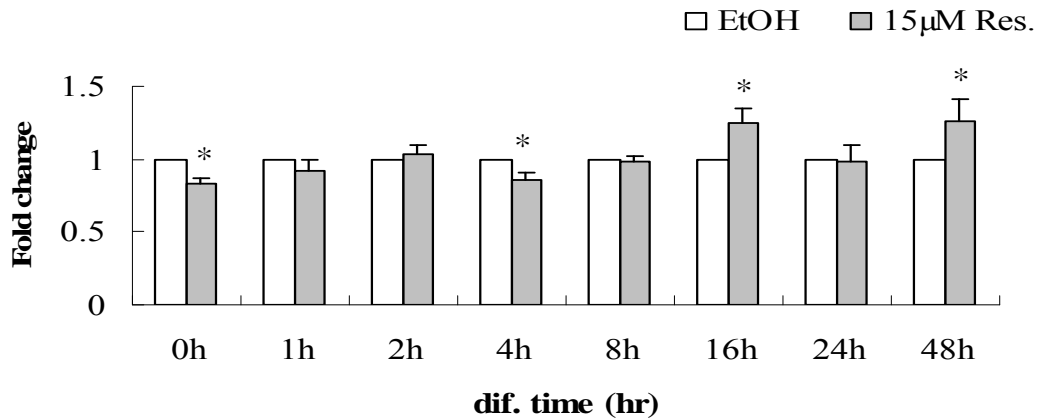


圖 15、分化初期 15 µM 白藜蘆醇處理對 AKT 活性之影響。在 day -1~ day 2 期間添加 15 µM 白藜蘆醇，並收集 day 0 到 day 2 的蛋白質，偵測 AKT 之表現。其中 EtOH 是做為控制組，添加等同於最高劑量體積之 EtOH。(a) 為 pAKT^{Ser473}、total AKT 與內部對照β-actin 蛋白質表現；(b) 為 pAKT^{Ser473}、total AKT 與 AKT 活性 (pAKT / total AKT) 蛋白質表現之量化圖；(c) 為各時間點之倍數差異結果，圖中柱狀圖表各時間點之 EtOH 組 (□) 與 15 µM Res. 組 (■) 兩組之間倍數改變 (以各時間點之 EtOH 定為 1)。圖表中*表示具有顯著差異 (p < 0.05)。

圖 16 (a)

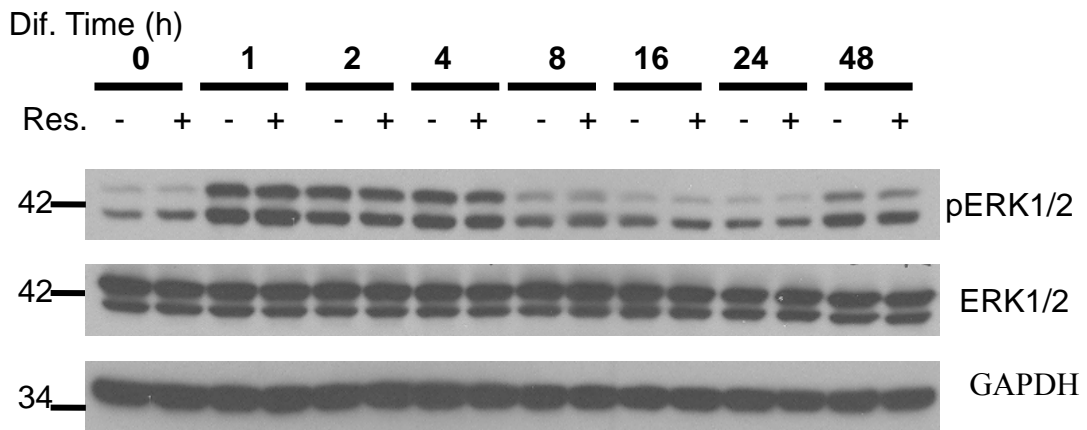
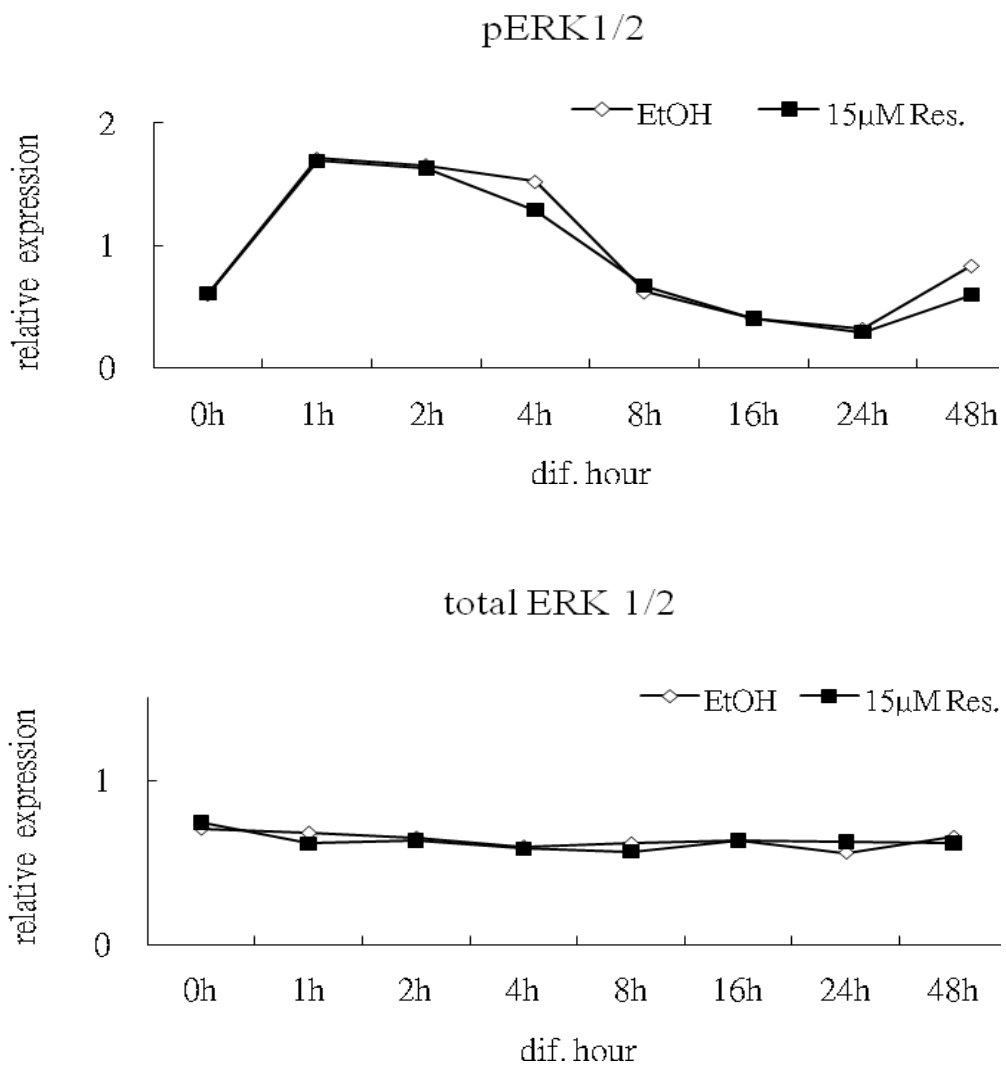


圖 16 (b)



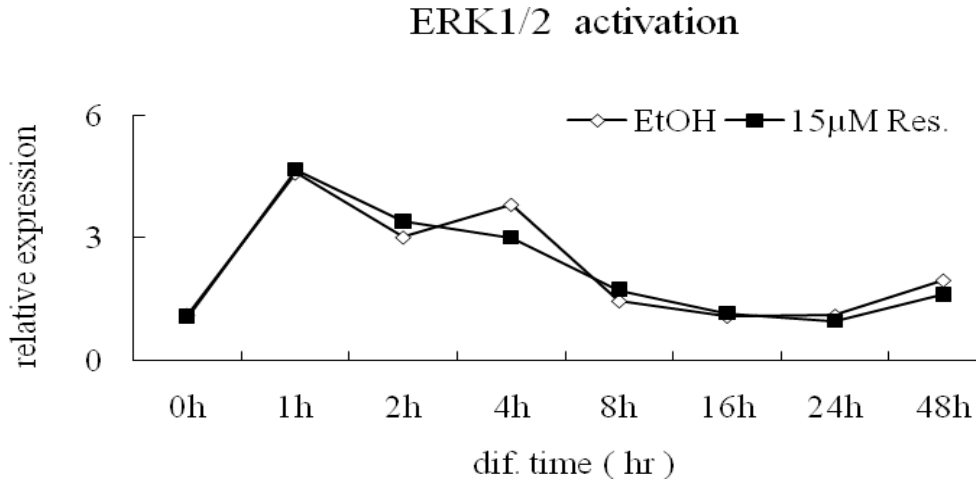


圖 16 (c)

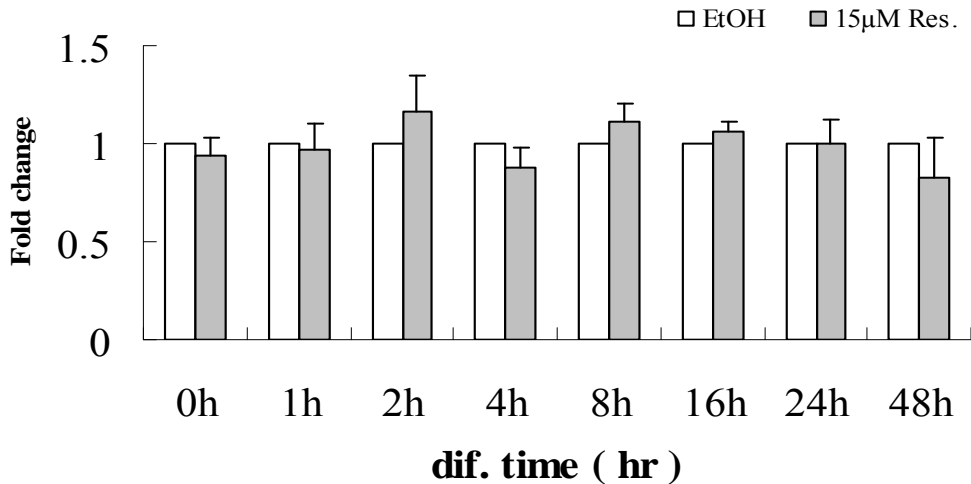
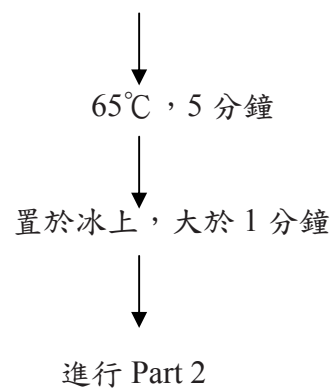


圖 16、分化初期 15 μM 白藜蘆醇處理對 ERK1/2 活性之影響。在 day -1~ day 2 期間添加 15 μM 白藜蘆醇，並收集 day 0 到 day 2 的蛋白質，偵測 ERK1/2 之表現。其中 EtOH 是做為控制組，添加等同於最高劑量體積之 EtOH。(a)為 pERK1/2^{Thr02/Tyr204}、ERK1/2 與內部對照 GAPDH 蛋白質表現；(b)為各時間點之 pERK1/2、total ERK1/2 與 ERK1/2 活性(pERK1/2 / total ERK1/2)蛋白質表現量化結果；(c)為各時間點之倍數差異結果，圖中柱狀圖表各時間點之 EtOH 組 (□) 與 15 μM Res. 組 (■) 兩組之間倍數改變 (以各時間點之 EtOH 定為 1)。圖表中*表示具有顯著差異 ($p < 0.05$)。

表 1. 反轉錄 PCR 條件與配方：

Part 1

萃取出 Total RNA	
0.5 μg oligo-dT	1 μl
5 ng/ml random 6-mer	0.4 μl
10 mM dNTP	1.5 μl
DEPC-H ₂ O	補體積至 13 μl
Vt	13 μl



Part 2

5X reaction buffer	4 μl
40 U/ μl RNase Out	1 μl
0.1 M DTT	1 μl
200 U/ μl SSIII RTase	0.8 μl
DEPC-H ₂ O	補體積至 20 μl
Vt	20 μl

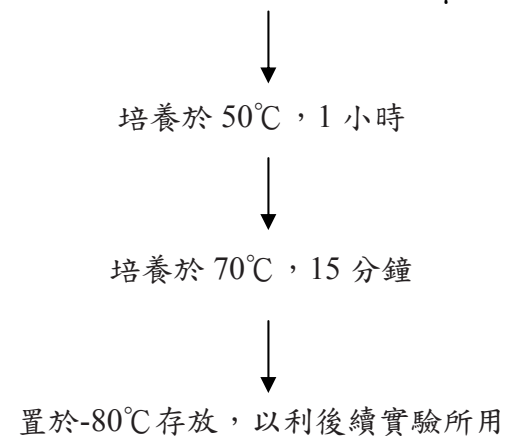


表 2. 基因引子序列：

基 因		序 列	產物大小
PPAR-γ	Peroxisome proliferator activated receptor - gamma	F : 5' AGGCCGAGAAGGAGAAGCTGTTG 3' R : 5' TGGCCACCTCTTTGCTCTGCTC 3'	276 bp
CEBP-β	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) - beta	F : 5' CCGCGCACCACGACTTCCTCTC 3' R : 5'CGCTCGCGCCGCATCTTGTA 3'	146 bp
adiponectin		F : 5' TGATGGCAGAGATGGCACTC 3' R : 5' TTCTCCAGGCTCTCCTTTCC 3'	154 bp
CHOP	C/EBP homologous protein	F : 5' TGGGGGCACCTATATCTCATCC 3' R : 5' AGCCCGCCGTGTGGTCTC 3'	370 bp
aP2	adipose protein 2/fatty acid-binding protein	F : 5' TCTCACCTGGAAGACAGCTCCTCCTCG 3' R : 5' TTCCATCCAGGCCTCTTCCTTTGGCTC 3'	463 bp
18S	Eukaryotic 18S rRNA	F : 5' GGGAGCCTGAGAAACGGC 3' R : 5'CCGCTCCCAAGATCCA ACTAC 3'	262 bp

表 3. 各基因 PCR 條件：

	PPARγ	C/EBPβ	adiponectin
10X dil. cDNA	1 μ l	1 μ l (1X cDNA)	1 μ l
10X Dream BF	2.5 μ l	2.5 μ l	2.5 μ l
10 μ M F	1 μ l	1 μ l	1 μ l
10 μ M R	1 μ l	1 μ l	1 μ l
10 mM dNTP	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l
5 U/ μ l Dream Taq	0.1 μ l	0.1 μ l	0.1 μ l
ddH ₂ O	18.9 μ l	18.9 μ l	18.9 μ l
total vol.	25 μ l	25 μ l	25 μ l
	CHOP-10	aP2	18S
10X dil. cDNA	1 μ l	1 μ l	1 μ l
10X Dream BF	2.5 μ l	2.5 μ l	2.5 μ l
10 μ M F	0.5 μ l	1 μ l	0.5 μ l
10 μ M R	0.5 μ l	1 μ l	0.5 μ l
10 mM dNTP	0.5 μ l	0.5 μ l	0.5 μ l
5 U/ml Dream Taq	0.1 μ l	0.1 μ l	0.5 μ l
ddH ₂ O	19.9 μ l	18.9 μ l	19.9 μ l
total vol.	25 μ l	25 μ l	25 μ l

PPARγ			C/EBPβ			adiponectin		
94 °C	2 min		95 °C	2 min		94 °C	2 min	
94 °C	30 sec	10 cycles	95 °C	30 sec	30 cycles	94 °C	30 sec	10 cycles
74 ~ 54 °C (-1 °C/cycle)	15 sec					74 ~ 54 °C (-1 °C/cycle)	15 sec	
72 °C	30 sec					72 °C	30 sec	
94 °C	30 sec	20 cycles	56.4 °C	30 sec	30 cycles	94 °C	30 sec	20 cycles
54 °C	15 sec		72 °C	30 sec		54 °C	15 sec	
72 °C	30 sec					72 °C	30 sec	
72 °C	10 min		72 °C	10 min		72 °C	10 min	

CHOP-10			aP2			18S						
95 °C	2 min		95 °C	2 min		95 °C	2 min					
95 °C	30 sec	10 cycles	95 °C	30 sec	30 cycles	95 °C	30 sec	20 cycles				
65 ~ 55 °C (-1 °C/cycle)	30 sec								56 °C	30 sec	55 °C	30 sec
72 °C	30 sec											
95 °C	30 sec	15 cycles	72 °C	30 sec	30 cycles	72 °C	30 sec	20 cycles				
55 °C	30 sec											
72 °C	30 sec											
72 °C	10 min		72 °C	10 min		72 °C	10 min					

參考資料

- Adams M, Reginato MJ, Shao D, Lazar MA, Chatterjee VK (1997) Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem* **272**(8): 5128-5132
- Aherne SA, O'Brien NM (2002) Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* **18**(1): 75-81
- Albrektsen T, Frederiksen KS, Holmes WE, Boel E, Taylor K, Fleckner J (2002) Novel genes regulated by the insulin sensitizer rosiglitazone during adipocyte differentiation. *Diabetes* **51**(4): 1042-1051
- Ariyama Y, Shimizu H, Satoh T, Tsuchiya T, Okada S, Oyadomari S, Mori M (2007) Chop-deficient mice showed increased adiposity but no glucose intolerance. *Obesity (Silver Spring)* **15**(7): 1647-1656
- Ariyama Y, Tanaka Y, Shimizu H, Shimomura K, Okada S, Saito T, Yamada E, Oyadomari S, Mori M (2008) The role of CHOP messenger RNA expression in the link between oxidative stress and apoptosis. *Metabolism* **57**(12): 1625-1635
- Ashida H, Fukuda I, Yamashita T, Kanazawa K (2000) Flavones and flavonols at dietary levels inhibit a transformation of aryl hydrocarbon receptor induced by dioxin. *FEBS Lett* **476**(3): 213-217
- Bai L, Pang WJ, Yang YJ, Yang GS (2008) Modulation of Sirt1 by resveratrol and nicotinamide alters proliferation and differentiation of pig preadipocytes. *Mol Cell Biochem* **307**(1-2): 129-140
- Batchvarova N, Wang XZ, Ron D (1995) Inhibition of adipogenesis by the stress-induced protein CHOP (Gadd153). *EMBO J* **14**(19): 4654-4661
- Berger J, Moller DE (2002) The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* **53**: 409-435
- Bertelli AA, Giovannini L, Giannessi D, Migliori M, Bernini W, Fregoni M, Bertelli A (1995) Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int J Tissue React* **17**(1): 1-3
- Bocher V, Pineda-Torra I, Fruchart JC, Staels B (2002) PPARs: transcription factors controlling lipid and lipoprotein metabolism. *Ann N Y Acad Sci* **967**: 7-18
- Bost F, Aouadi M, Caron L, Binetruy B (2005) The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity. *Biochimie* **87**(1): 51-56
- Cannon B, Nedergaard J (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* **84**(1): 277-359

- Cao Z, Umek RM, McKnight SL (1991) Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* **5**(9): 1538-1552
- Caro JF, Dohm LG, Pories WJ, Sinha MK (1989) Cellular alterations in liver, skeletal muscle, and adipose tissue responsible for insulin resistance in obesity and type II diabetes. *Diabetes Metab Rev* **5**(8): 665-689
- Carriere A, Carmona MC, Fernandez Y, Rigoulet M, Wenger RH, Penicaud L, Casteilla L (2004) Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect. *J Biol Chem* **279**(39): 40462-40469
- Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR (2003) Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* **26**(8): 2442-2450
- Chawla A, Lazar MA (1994) Peroxisome proliferator and retinoid signaling pathways co-regulate preadipocyte phenotype and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(5): 1786-1790
- Chen L, Han Y, Yang F, Zhang T (2001) High-speed counter-current chromatography separation and purification of resveratrol and piceid from *Polygonum cuspidatum*. *J Chromatogr A* **907**(1-2): 343-346
- Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B (1998) Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* **273**(40): 25573-25580
- Cowherd RM, Lyle RE, McGehee RE, Jr. (1999) Molecular regulation of adipocyte differentiation. *Semin Cell Dev Biol* **10**(1): 3-10
- Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF, Jr. (1997) Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* **337**(6): 408-416
- de la Lastra CA, Villegas I (2007) Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 5): 1156-1160
- Descombes P, Schibler U (1991) A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* **67**(3): 569-579
- El-Jack AK, Hamm JK, Pilch PF, Farmer SR (1999) Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPARgamma and C/EBPalpha. *J Biol Chem* **274**(12): 7946-7951
- Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J (1998) PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett* **438**(1-2): 55-60

- Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J (1998) Transcriptional control of adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **10**(2): 165-173
- Floyd ZE, Wang ZQ, Kilroy G, Cefalu WT (2008) Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma stability and transcriptional activity in adipocytes by resveratrol. *Metabolism* **57**(7 Suppl 1): S32-38
- Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* **341**(8843): 454-457
- Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE (1993) Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* **341**(8852): 1103-1104
- Fremont L (2000) Biological effects of resveratrol. *Life Sci* **66**(8): 663-673
- Friedman AD, McKnight SL (1990) Identification of two polypeptide segments of CCAAT/enhancer-binding protein required for transcriptional activation of the serum albumin gene. *Genes Dev* **4**(8): 1416-1426
- Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT (2005) Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res* **46**(7): 1369-1379
- Garlid KD, Jaburek M, Jezek P (1998) The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins. *FEBS Lett* **438**(1-2): 10-14
- Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, Jameson JL (1997) Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 14138-14143
- Gerhold DL, Liu F, Jiang G, Li Z, Xu J, Lu M, Sachs JR, Bagchi A, Fridman A, Holder DJ, Doebber TW, Berger J, Elbrecht A, Moller DE, Zhang BB (2002) Gene expression profile of adipocyte differentiation and its regulation by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists. *Endocrinology* **143**(6): 2106-2118
- Gotoh T, Mori M (2006) Nitric oxide and endoplasmic reticulum stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(7): 1439-1446
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS (1998) Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev* **78**(3): 783-809
- Hamm JK, Park BH, Farmer SR (2001) A role for C/EBPbeta in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* **276**(21): 18464-18471
- Hansen JB, Zhang H, Rasmussen TH, Petersen RK, Flindt EN, Kristiansen K (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)-mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling. *J Biol Chem* **276**(5): 3175-3182

- Harmon AW, Harp JB (2001) Differential effects of flavonoids on 3T3-L1 adipogenesis and lipolysis. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**(4): C807-813
- Hemati N, Ross SE, Erickson RL, Groblewski GE, MacDougald OA (1997) Signaling pathways through which insulin regulates CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBPalpha) phosphorylation and gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Correlation with GLUT4 gene expression. *J Biol Chem* **272**(41): 25913-25919
- Hirai S, Yamanaka M, Kawachi H, Matsui T, Yano H (2005) Activin A inhibits differentiation of 3T3-L1 preadipocyte. *Mol Cell Endocrinol* **232**(1-2): 21-26
- Houston KD, Copland JA, Broaddus RR, Gottardis MM, Fischer SM, Walker CL (2003) Inhibition of proliferation and estrogen receptor signaling by peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands in uterine leiomyoma. *Cancer Res* **63**(6): 1221-1227
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* **425**(6954): 191-196
- Hsu CL, Yen GC (2008) Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mol Nutr Food Res* **52**(1): 53-61
- Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM (1996) Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science* **274**(5295): 2100-2103
- Huang H, Lane MD, Tang QQ (2005) Effect of serum on the down-regulation of CHOP-10 during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **338**(2): 1185-1188
- Huang HY, Li X, Liu M, Song TJ, He Q, Ma CG, Tang QQ (2008) Transcription factor YY1 promotes adipogenesis via inhibiting CHOP-10 expression. *Biochem Biophys Res Commun* **375**(4): 496-500
- Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275**(5297): 218-220
- Jankun J, Selman SH, Swiercz R, Skrzypczak-Jankun E (1997) Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature* **387**(6633): 561
- Jequier E, Tappy L (1999) Regulation of body weight in humans. *Physiol Rev* **79**(2): 451-480
- Kaestner KH, Christy RJ, Lane MD (1990) Mouse insulin-responsive glucose transporter gene: characterization of the gene and trans-activation by the CCAAT/enhancer binding protein. *Proc Natl Acad Sci U SA* **87**(1): 251-255

- Kishida K, Shimomura I, Nishizawa H, Maeda N, Kuriyama H, Kondo H, Matsuda M, Nagaretani H, Ouchi N, Hotta K, Kihara S, Kadowaki T, Funahashi T, Matsuzawa Y (2001) Enhancement of the aquaporin adipose gene expression by a peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* **276**(51): 48572-48579
- Kuhnau J (1976) The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* **24**: 117-191
- Lea-Currie YR, Monroe D, McIntosh MK (1999) Dehydroepiandrosterone and related steroids alter 3T3-L1 preadipocyte proliferation and differentiation. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* **123**(1): 17-25
- Lekstrom-Himes J, Xanthopoulos KG (1998) Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem* **273**(44): 28545-28548
- Li X, Huang HY, Chen JG, Jiang L, Liu HL, Liu DG, Song TJ, He Q, Ma CG, Ma D, Song HY, Tang QQ (2006) Lactacystin inhibits 3T3-L1 adipocyte differentiation through induction of CHOP-10 expression. *Biochem Biophys Res Commun* **350**(1): 1-6
- Li Y, Lazar MA (2002) Differential gene regulation by PPARgamma agonist and constitutively active PPARgamma2. *Mol Endocrinol* **16**(5): 1040-1048
- Lin FT, MacDougald OA, Diehl AM, Lane MD (1993) A 30-kDa alternative translation product of the CCAAT/enhancer binding protein alpha message: transcriptional activator lacking antimitotic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(20): 9606-9610
- Lin FT, Lane MD (1992) Antisense CCAAT/enhancer-binding protein RNA suppresses coordinate gene expression and triglyceride accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Genes Dev* **6**(4): 533-544
- MacDougald OA, Cornelius P, Lin FT, Chen SS, Lane MD (1994) Glucocorticoids reciprocally regulate expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha and delta genes in 3T3-L1 adipocytes and white adipose tissue. *J Biol Chem* **269**(29): 19041-19047
- MacDougald OA, Cornelius P, Liu R, Lane MD (1995) Insulin regulates transcription of the CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) alpha, beta, and delta genes in fully-differentiated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* **270**(2): 647-654
- Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B, Auwerx J (1997) Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators. *J Biol Chem* **272**(45): 28210-28217
- Martin G, Schoonjans K, Staels B, Auwerx J (1998) PPARgamma activators improve glucose homeostasis by stimulating fatty acid uptake in the adipocytes. *Atherosclerosis* **137 Suppl**: S75-80

- Meirhaeghe A, Fajas L, Gouilleux F, Cottel D, Helbecque N, Auwerx J, Amouyel P (2003) A functional polymorphism in a STAT5B site of the human PPAR gamma 3 gene promoter affects height and lipid metabolism in a French population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**(2): 289-294
- Michalik L, Wahli W (1999) Peroxisome proliferator-activated receptors: three isotopes for a multitude of functions. *Curr Opin Biotechnol* **10**(6): 564-570
- Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* **52**(4): 673-751
- Mueller E, Drori S, Aiyer A, Yie J, Sarraf P, Chen H, Hauser S, Rosen ED, Ge K, Roeder RG, Spiegelman BM (2002) Genetic analysis of adipogenesis through peroxisome proliferator-activated receptor gamma isoforms. *J Biol Chem* **277**(44): 41925-41930
- Ntambi JM, Young-Cheul K (2000) Adipocyte differentiation and gene expression. *J Nutr* **130**(12): 3122S-3126S
- Orallo F, Alvarez E, Camina M, Leiro JM, Gomez E, Fernandez P (2002) The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol Pharmacol* **61**(2): 294-302
- Pace-Asciak CR, Rounova O, Hahn SE, Diamandis EP, Goldberg DM (1996) Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. *Clin Chim Acta* **246**(1-2): 163-182
- Park BH, Qiang L, Farmer SR (2004) Phosphorylation of C/EBPbeta at a consensus extracellular signal-regulated kinase/glycogen synthase kinase 3 site is required for the induction of adiponectin gene expression during the differentiation of mouse fibroblasts into adipocytes. *Mol Cell Biol* **24**(19): 8671-8680
- Park HJ, Yang JY, Ambati S, Della-Fera MA, Hausman DB, Rayalam S, Baile CA (2008) Combined effects of genistein, quercetin, and resveratrol in human and 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food* **11**(4): 773-783
- Peng XD, Xu PZ, Chen ML, Hahn-Windgassen A, Skeen J, Jacobs J, Sundararajan D, Chen WS, Crawford SE, Coleman KG, Hay N (2003) Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev* **17**(11): 1352-1365
- Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L (2004) Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* **429**(6993): 771-776
- Prusty D, Park BH, Davis KE, Farmer SR (2002) Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and C/EBPalpha

- gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* **277**(48): 46226-46232
- Rayalam S, Della-Fera MA, Yang JY, Park HJ, Ambati S, Baile CA (2007) Resveratrol potentiates genistein's antiadipogenic and proapoptotic effects in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr* **137**(12): 2668-2673
- Rayalam S, Yang JY, Ambati S, Della-Fera MA, Baile CA (2008) Resveratrol induces apoptosis and inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Phytother Res* **22**(10): 1367-1371
- Ren D, Collingwood TN, Rebar EJ, Wolffe AP, Camp HS (2002) PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis. *Genes Dev* **16**(1): 27-32
- Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK (1998) Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13): 7614-7619
- Romero-Perez AI, Lamuela-Raventos RM, Andres-Lacueva C, de La Torre-Boronat MC (2001) Method for the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in grape berry skins. Effect of powdery mildew on the stilbene content. *J Agric Food Chem* **49**(1): 210-215
- Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM (2000) Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* **14**(11): 1293-1307
- Ross JA, Kasum CM (2002) Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* **22**: 19-34
- Saito T, Abe D, Sekiya K (2008) Sakuranetin induces adipogenesis of 3T3-L1 cells through enhanced expression of PPARgamma2. *Biochem Biophys Res Commun* **372**(4): 835-839
- Saito T, Abe D, Sekiya K (2009) Flavanone exhibits PPARgamma ligand activity and enhances differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **380**(2): 281-285
- Scheuner D, Kaufman RJ (2008) The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. *Endocr Rev* **29**(3): 317-333
- Schoonjans K, Staels B, Auwerx J (1996) Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res* **37**(5): 907-925
- Seagroves TN, Krnacik S, Raught B, Gay J, Burgess-Beusse B, Darlington GJ, Rosen JM (1998) C/EBPbeta, but not C/EBPalpha, is essential for ductal morphogenesis, lobuloalveolar proliferation, and functional differentiation in

- the mouse mammary gland. *Genes Dev* **12**(12): 1917-1928
- Shimazawa M, Inokuchi Y, Ito Y, Murata H, Aihara M, Miura M, Araie M, Hara H (2007) Involvement of ER stress in retinal cell death. *Mol Vis* **13**: 578-587
- Smyth MJ, Sparks RL, Wharton W (1993) Preadipocyte cell lines: models of cellular proliferation and differentiation. *J Cell Sci* **106 (Pt 1)**: 1-9
- Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM (1997) Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem* **30**(2): 91-113
- Subbaramaiah K, Chung WJ, Michaluart P, Telang N, Tanabe T, Inoue H, Jang M, Pezzuto JM, Dannenberg AJ (1998) Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *J Biol Chem* **273**(34): 21875-21882
- Takamura T, Nohara E, Nagai Y, Kobayashi K (2001) Stage-specific effects of a thiazolidinedione on proliferation, differentiation and PPARgamma mRNA expression in 3T3-L1 adipocytes. *Eur J Pharmacol* **422**(1-3): 23-29
- Talpur NA, Echard BW, Manohar V, Preuss HG (2001) Influence of a combination of herbs on appetite suppression and weight loss in rats. *Diabetes Obes Metab* **3**(3): 181-185
- Tamori Y, Masugi J, Nishino N, Kasuga M (2002) Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* **51**(7): 2045-2055
- Tang QQ, Lane MD (1999) Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes Dev* **13**(17): 2231-2241
- Tang QQ, Jiang MS, Lane MD (1999) Repressive effect of Sp1 on the C/EBPalpha gene promoter: role in adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* **19**(7): 4855-4865
- Tang QQ, Lane MD (2000) Role of C/EBP homologous protein (CHOP-10) in the programmed activation of CCAAT/enhancer-binding protein-beta during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U SA* **97**(23): 12446-12450
- Tang QQ, Otto TC, Lane MD (2003) CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U SA* **100**(3): 850-855
- Tang QQ, Gronborg M, Huang H, Kim JW, Otto TC, Pandey A, Lane MD (2005) Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U SA* **102**(28): 9766-9771
- Timchenko NA, Harris TE, Wilde M, Bilyeu TA, Burgess-Beusse BL, Finegold MJ, Darlington GJ (1997) CCAAT/enhancer binding protein alpha regulates p21 protein and hepatocyte proliferation in newborn mice. *Mol Cell Biol*

17(12): 7353-7361

Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM (1995) PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* **15**(1): 351-357

Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* **79**(7): 1147-1156

Vazquez-Vela ME, Torres N, Tovar AR (2008) White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res* **39**(8): 715-728

Wallerath T, Deckert G, Ternes T, Anderson H, Li H, Witte K, Forstermann U (2002) Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **106**(13): 1652-1658

Watanabe M, Inukai K, Katagiri H, Awata T, Oka Y, Katayama S (2003) Regulation of PPAR gamma transcriptional activity in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **300**(2): 429-436

Williams SC, Cantwell CA, Johnson PF (1991) A family of C/EBP-related proteins capable of forming covalently linked leucine zipper dimers in vitro. *Genes Dev* **5**(9): 1553-1567

Wise LS, Green H (1979) Participation of one isozyme of cytosolic glycerophosphate dehydrogenase in the adipose conversion of 3T3 cells. *J Biol Chem* **254**(2): 273-275

Wolter F, Stein J (2002) Resveratrol enhances the differentiation induced by butyrate in caco-2 colon cancer cells. *J Nutr* **132**(7): 2082-2086

Wu JM, Wang ZR, Hsieh TC, Bruder JL, Zou JG, Huang YZ (2001) Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review). *Int J Mol Med* **8**(1): 3-17

Wu Z, Puigserver P, Spiegelman BM (1999) Transcriptional activation of adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **11**(6): 689-694

Wu Z, Xie Y, Morrison RF, Bucher NL, Farmer SR (1998) PPARgamma induces the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the absence of C/EBPalpha during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes. *J Clin Invest* **101**(1): 22-32

Yamamoto H, Kurebayashi S, Hirose T, Kouhara H, Kasayama S (2002) Reduced IRS-2 and GLUT4 expression in PPARgamma2-induced adipocytes derived from C/EBPbeta and C/EBPdelta-deficient mouse embryonic fibroblasts. *J Cell Sci* **115**(Pt 18): 3601-3607

Yamauchi T, Waki H, Kamon J, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Miki H, Kubota N, Terauchi Y, Tsuchida A, Tsuboyama-Kasaoka N, Yamauchi N,

- Ide T, Hori W, Kato S, Fukayama M, Akanuma Y, Ezaki O, Itai A, Nagai R, Kimura S, Tobe K, Kagechika H, Shudo K, Kadowaki T (2001) Inhibition of RXR and PPARgamma ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J Clin Invest* **108**(7): 1001-1013
- Yang CS, Chung JY, Yang G, Chhabra SK, Lee MJ (2000) Tea and tea polyphenols in cancer prevention. *J Nutr* **130**(2S Suppl): 472S-478S
- Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL (2001) Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* **21**: 381-406
- Yang JY, Della-Fera MA, Rayalam S, Ambati S, Hartzell DL, Park HJ, Baile CA (2008) Enhanced inhibition of adipogenesis and induction of apoptosis in 3T3-L1 adipocytes with combinations of resveratrol and quercetin. *Life Sci* **82**(19-20): 1032-1039
- Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL (1995) Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev* **9**(2): 168-181
- Zhang JW, Tang QQ, Vinson C, Lane MD (2004) Dominant-negative C/EBP disrupts mitotic clonal expansion and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci U SA* **101**(1): 43-47
- Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, Chen XN, Noya D, Rao MS, Reddy JK (1995) Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci U SA* **92**(17): 7921-7925