

# 科技部補助

## 大專學生研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\*  
\* 計 畫  
\* : 探討棉黃素保護胰島 beta 細胞免於氧化性損傷之作用 \*  
\* 名 稱  
\* \*\*\*\*\*

執行計畫學生： 謝毓庭  
學生計畫編號： MOST 105-2815-C-040-036-B  
研究期間： 105年07月01日至106年02月28日止，計8個月  
指導教授： 林慧萱

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系（所）

中華民國 106年03月30日

# 目錄

目錄.....	I
圖表目錄.....	II
摘要.....	1
第一章、研究動機研究問題.....	2
第二章、文獻回顧與探討.....	4
2.1 第二型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus).....	4
2.2 氧化壓力(Oxidative stress).....	4
2.2.1 活性氧物質(Reactive oxygen species, ROS).....	4
2.2.2 細胞凋亡(Apoptosis).....	5
2.2.3 細胞自噬(Autophagy).....	5
2.3 棉黃素(Gossypetin, GTIN).....	6
第三章、實驗架構與流程.....	8
第四章、研究方法與步驟.....	9
4.1 棉黃素(Gossypetin, GTIN)之製備.....	9
4.2 細胞培養(Cell culture).....	9
4.2.1 RIN-m5F細胞株.....	9
4.2.2 培養方式.....	9
4.3 細胞生長分析(Cell growth assay).....	9
4.4 葡萄糖刺激胰島素分泌試驗(Glucose-stimulated insulin secretion, GSIS).....	10
4.5 細胞凋亡分析試驗.....	11
4.5.1 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI stain).....	11
4.5.2 Annexin V-FITC apoptosis assay.....	11
4.6 細胞自噬分析試驗.....	12
4.6.1 酸性小囊定量分析試驗(Acidic vesicular organelles stain, AVO stain).....	12
4.6.2 流式細胞儀分析(Flow cytometry of analysis of LC3).....	13
4.7 西方點墨法(Western blotting).....	13
4.7.1 萃取蛋白及蛋白定量.....	13
4.7.2 Western blotting.....	14
4.8 統計分析.....	16
第五章、結果與討論.....	17
5.1 探討棉黃素對於H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 處理胰島β細胞之毒性及存活率之影響.....	17
5.2 探討棉黃素對於H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 處理胰島β細胞之胰島素分泌及氧化傷害之影響.....	17
5.3 探討棉黃素對於H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 調控胰島β細胞凋亡機制之影響.....	18
5.4 探討棉黃素對於H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 調控胰島β細胞自噬機制之影響.....	18
5.5 探討棉黃素對於H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 誘發胰島β細胞凋亡及自噬相關調控蛋白表現之影響.....	19
第六章、參考文獻.....	21
第七章、圖表.....	24

# 圖表目錄

附圖 1：研究動機.....	3
附表 1：separating gel 配方.....	15
附表 2：staging gel 配方.....	15
Figure 1：Effect of GTIN in combination with H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> on $\beta$ -cell viability .....	24
Figure 2：Effects of GTIN on insulin secretion of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -treated $\beta$ -cells.....	26
Figure 3：Effect of GTIN on apoptosis of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -treated pancreatic $\beta$ -cells.....	28
Figure 4：Effect of GTIN on autophagy of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -treated pancreatic $\beta$ -cell.....	30
Figure 5：Effect of GTIN on apoptosis and autophagy-related proteins in H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -treated $\beta$ -cells.....	33
Figure 6：GTIN protects pancreatic beta cells against oxidative injury.....	36

## 摘要

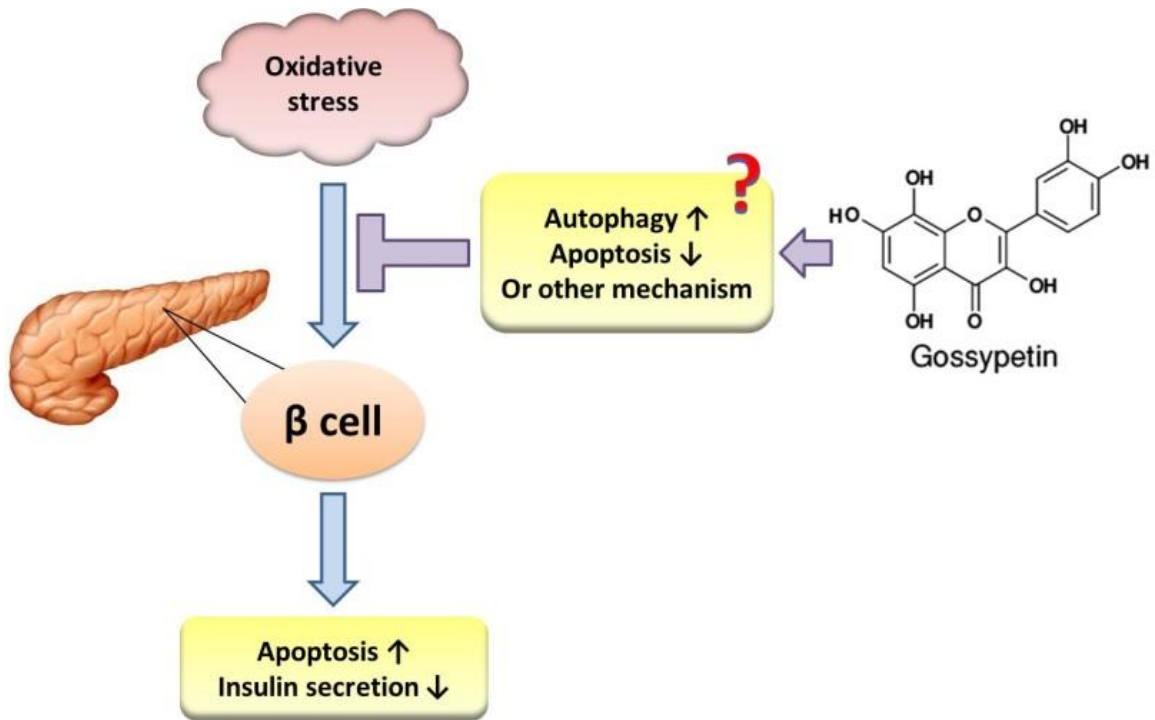
糖尿病為全世界盛行的代謝異常疾病，其中以第二型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2D)所占比例最高。近年來研究已指出氧化壓力(oxidative stress)是造成 T2D 的重要因素。且研究證實若能降低胰臟胰島  $\beta$  細胞的氧化壓力，則可順利改善 T2D 的病情。類黃酮(flavonoids)物質過去已知具有抗氧化(antioxidant)的功效。因此本計劃擬探討存在天然物中的六羥基黃酮(hexahydroxy flavone)--棉黃素(gossypetin, GTIN)是否具有保護胰島  $\beta$  細胞免於氧化性損傷之作用。因此以 GTIN 為材料，研究其對於胰島  $\beta$  細胞遭受過氧化物  $H_2O_2$  所造成之氧化性損傷的保護能力。首先篩選 GTIN 對於大鼠胰島  $\beta$  細胞(RIN-m5F 細胞株)之無毒性劑量，後續加入  $H_2O_2$  進行氧化性損傷為誘導模式。由細胞生長分析(cell growth assay)以及葡萄糖刺激胰島素分泌試驗(glucose-stimulated insulin secretion, GSIS)中可發現 GTIN 能有效保護  $\beta$  細胞存活及胰島素分泌。以流式細胞儀進行細胞週期分析(cell-cycle analysis)及細胞內活性氧物質(reactive oxygen species, ROS)含量測定證實 GTIN 具有抗細胞凋亡(apoptosis)作用及減少氧化傷害以保護經  $H_2O_2$  處理之  $\beta$  細胞。再以細胞凋亡分析及細胞自噬分析試驗發現 GTIN 可調控受氧化性損傷之  $\beta$  細胞凋亡及細胞自噬(autophagy)作用。最後以西方點墨法分析細胞內凋亡或自噬相關蛋白的表現。總結，GTIN 具有可保護胰島  $\beta$  細胞免於氧化性損傷之作用，透過降低氧化壓力達到改善 T2D 的功效。

關鍵字：第二型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2D)、氧化壓力(oxidative stress)、胰臟胰島  $\beta$  細胞、棉黃素(gossypetin, GTIN)、細胞凋亡(apoptosis)、細胞自噬(autophagy)。

## 第一章、研究動機研究問題

近年來第二型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2D)患者的人數逐漸攀升,若未經妥善的治療及長期監控,則可能會誘發許多嚴重的併發症。在 T2D 的相關用藥研究中,除了臨床試劑之外,也有許多天然物具有減緩 T2D 的功效,使用天然物的好處是副作用少且藥效溫和。進一步有研究顯示減緩 T2D 病情最根本的方式是降低胰臟胰島  $\beta$  細胞內的氧化壓力(oxidative stress),此時若採用具有抗氧化成分的天然物作治療應具有其可行性。過去研究亦指出類黃酮(flavonoids)為天然存在之抗氧化物質,已知具有抗過敏、抗發炎、抑制癌細胞生長、延緩腦力退化、保護血管內皮細胞等功效。因此本計畫擬採用六羥基黃酮(hexahydroxy flavone)--棉黃素(gossypetin, GTIN)為實驗材料,探討 GTIN 是否可保護胰島  $\beta$  細胞免於氧化性損傷之作用,透過降低其細胞凋亡(apoptosis)或增加保護性細胞自噬(autophagy)作用,以恢復胰島  $\beta$  細胞分泌胰島素的功能為本篇計畫的研究重點(附圖 1)。

附圖 1：研究動機



## 第二章、文獻回顧與探討

### 2.1. 第二型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus, T2D)

糖尿病是二十一世紀罹患率增加最快的慢性疾病，而當中的第二型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2D)又稱非胰島素依賴型糖尿病(noninsulin-dependent diabetes mellitus)更佔了糖尿病總案例中的 90% [1]。T2D 與第一型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1D)不同的是 T1D 為自體免疫破壞胰臟胰島  $\beta$  細胞，促使胰島素嚴重缺乏[2]；而 T2D 則是因為胰島細胞受損、細胞凋亡(apoptosis)造成胰島素阻抗(insulin resistance)或胰島素缺乏(insulin deficiency) [3]。而氧化壓力(oxidative stress)的刺激被證實與胰島素阻抗有很大的關聯[4]，且為導致 T2D 的主因[5]，也是目前被公認為糖尿病併發症的主要驅動力[6]，常見的併發症有冠狀動脈心臟疾病、腎病、視網膜病、下肢截肢、輕度認知障礙和癡呆等[7]。

### 2.2. 氧化壓力(Oxidative stress)

#### 2.2.1. 活性氧物質(Reactive oxygen species, ROS)

活性氧物質(Reactive oxygen species, ROS)為帶有不穩定電子的含氧自由基，包括超氧陰離子(superoxide anion,  $O_2 \cdot^-$ )、過氧亞硝酸陰離子(peroxynitrite anion,  $ONOO^-$ )、羥基自由基(hydroxyl radical,  $OH \cdot$ )及過氧化氫( $H_2O_2$ )。在正常細胞中，低濃度的 ROS 可活化訊息傳遞路徑，刺激細胞的增生與存活，但過量的 ROS 則會破壞細胞中的大分子且為不可逆之反應，造成細胞死亡[8]。許多研究證實，慢性高血糖會誘發氧化壓力，導致 ROS 的累積，進而對細胞造成傷害[9]。而動物實驗結果顯示，相較於其他器官，胰臟抗氧化酵素(例如 superoxide dismutase、glutathione peroxidase、catalase)的表現量特別低[10]。因此，ROS 易造成胰臟胰島  $\beta$  細胞中蛋白質、DNA 和脂質遭受破壞，促使胰島  $\beta$  細胞

衰竭(failure)或失去功能[11]。

### 2.2.2. 細胞凋亡(Apoptosis)

細胞凋亡(apoptosis)為生物演化中保留下來的一種導致細胞程序性死亡(programmed cell death)的調控機制，所以凋亡為細胞主動發起的死亡方式，於細胞死亡的過程中，凋亡之細胞會皺縮，細胞核中的 DNA 被降解，最終形成碎片的細胞被巨噬細胞(macrophage)清除。細胞凋亡主要可分為內在凋亡途徑(intrinsic apoptosis pathway)及外在凋亡途徑(extrinsic apoptosis pathway)。內在凋亡途徑主要受壓力刺激(例如內質網壓力、ROS 壓力)，使細胞色素 c (cytochrom c)從粒線體內釋放出來，而啟動一連串的凋亡反應，其中最主要的調控因子為 B 細胞淋巴瘤/白血病基因-2 (B cell lymphoma-2, Bcl-2)家族蛋白，目前已知 Bcl-2 家族有 18 個成員，依其功能可分為抑制細胞凋亡(如：Bcl-2、Bcl-XL、Mcl-1)以及促進細胞凋亡(如：Bad、Bak、Bax、Bid)兩類[12]。而外在凋亡途徑主要是活化死亡受體(death receptor)，例如 Fas 和 tumour necrosis factor receptors (TNFR)，啟動下游 Fas-associated death domain (FADD)蛋白，經過一連串反應後，活化 caspase-3 而誘發細胞凋亡[13]。在 T2D 研究中顯示造成細胞凋亡的一項因素為內質網壓力(endothelium reticulum stress, ER stress)，其機制為 islet amyloid polypeptide (IAPP)誘發  $\beta$  細胞產生凋亡[14]。而長期暴露在高糖環境中也會使胰島  $\beta$  細胞產生凋亡反應[15]。當胰島  $\beta$  細胞進入凋亡的階段時，將會導致胰島素分泌不足，進而造成 T2D [16]。

### 2.2.3. 細胞自噬(Autophagy)

細胞自噬是與溶酶體(lysosome)相關的系統，用來調節細胞蛋白和細胞胞器的總數[17]。細胞自噬與細胞凋亡的不同點是凋亡需要巨噬細



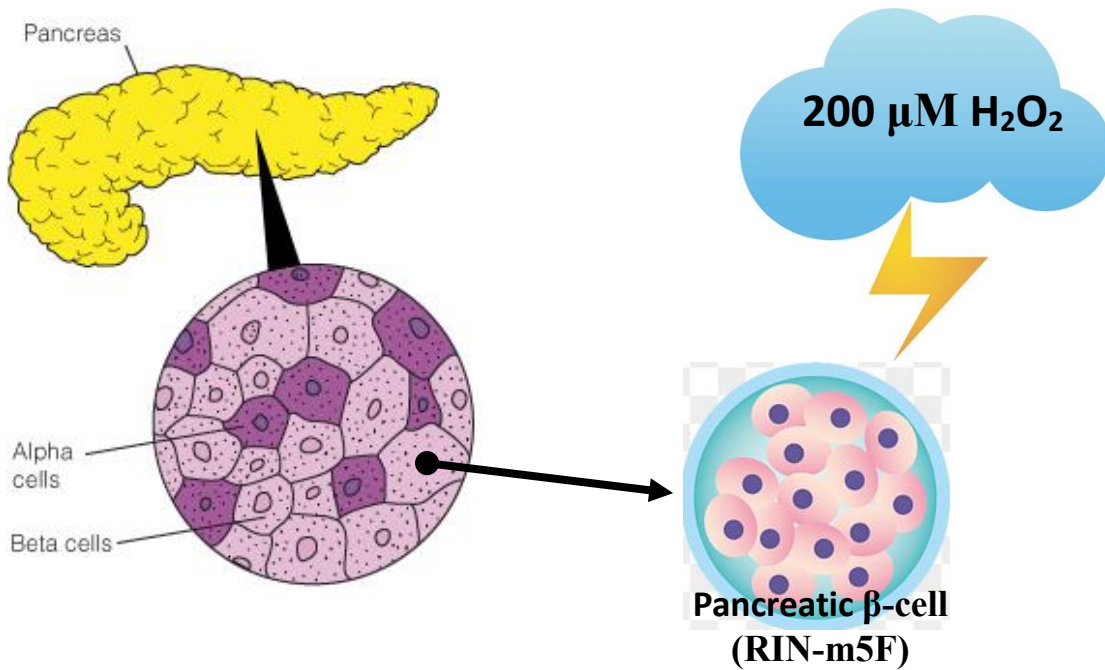
胞的幫忙，而細胞自噬則是會形成自噬體(*autophagosome*)直接與溶酶體結合，即可分解細胞。當細胞遭受壓力、有腫瘤細胞生成或遭受感染的情形下，細胞自噬作用會啟動[18]，其過程可分為自噬的誘導和自噬小體的核化(*nucleation*)，而 *Beclin1-VPS34* 複合物扮演非常重要的角色[19]，其中 *VPS34* 為哺乳類細胞中獨特的蛋白激酶 *class III phosphatidylinositol 3-kinase (class III PI3K)*。同時 *class III PI3K -Atg14L-Beclin1* 複合物也可促進自噬小體的產生並調節自噬小體核化。為了讓細胞質中欲降解的物質完全被包裹，需將細胞微管相關蛋白 1 輕鏈 3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3*)黏附到 *phosphatidylethanolamine (PE)*上並使其與 *Atg5* 及 *Atg12* 結合，並進一步讓 *Atg5-Atg12* 複合物與 *Atg6* 作用形成 *Atg5-Atg12-Atg6* 複合物，結合到自噬小體的膜上，接著即可與溶酶體結合形成自噬溶酶體(*autolysosome*)，最後被溶酶體中的酰胺化水解酶(*lysosomal hydrolases*)分解[20]，完成細胞自噬作用。有研究指出細胞自噬為保護細胞的一個過程，也是糖尿病的代謝及對內質網壓力反應中的重要調節器[21]。內質網壓力也可誘發細胞自噬作用，簡而言之，當細胞內質網壓力上升時，細胞自噬作用即會增加[22]。在糖尿病相關研究中，已證實 *Atg7* 為一與  $\beta$  細胞行自噬作用相關的基因，當 *Atg7* 基因未表現時，造成細胞自噬作用的缺失，促使  $\beta$  細胞數量和胰島素分泌量下降、以及細胞凋亡作用增加[23, 24]。

### 2.3. 棉黃素(*Gossypetin, GTIN*)

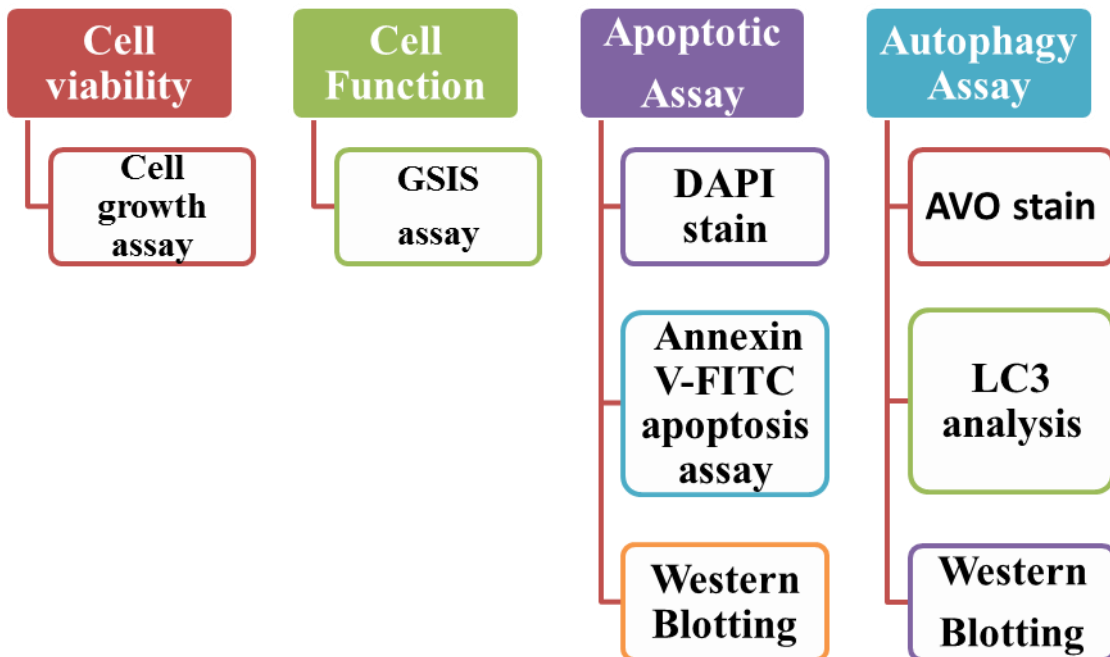
棉黃素(*gossypetin, GTIN*)別稱棉花皮素、3,5,7,8,3',4'-六羥基黃酮(3,5,7,8,3', 4'-hexahydroxy flavone)，屬於多酚化合物中的類黃酮(*flavonoids*)。GTIN 最初是從洛神花(*Hibiscus species*)中鑑定及分離出來的成份，目前已知存在許多天然植物(例如：棉花)當中。過去研究已證

實 GTIN 具有抑制發炎、癌症、血管生成等功效[25]，近年來研究亦顯示 GTIN 可抑制低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)氧化作用[26]及保護血管內皮細胞免於損傷[27]，進而延緩動脈粥狀硬化發生。因此我們擬進一步探討 GTIN 是否也具有保護胰臟胰島  $\beta$  細胞免於氧化損傷之作用。

### 第三章、實驗架構與流程



**Gossypetin (GTIN)**  
at 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, and 25  $\mu\text{M}$



## 第四章、研究方法與步驟

### 4.1. 棉黃素(Gossypetin, GTIN)之製備

棉黃素(gossypetin, GTIN)由 SIGMA 購入，呈粉末狀，將其溶於 dimethyl sulfoxide (DMSO) 中，配成 1 mM 的貯存溶液，其後需避光且保存於-20°C 的冰箱中。

### 4.2. 細胞培養(Cell culture)

#### 4.2.1. RIN-m5F 細胞株

此實驗採用大鼠胰臟胰島  $\beta$  細胞 RIN-m5F，此株細胞的來源為食品工業發展研究所菌種中心，型態上屬於上皮細胞，其會分泌製造 insulin 及 L-dopa-decarboxylase，但不會分泌 somatostatin。

#### 4.2.2. 細胞培養方式

##### 4.2.2.1. 細胞培養液

細胞培養液以 90% RPMI-1640 培養液為主(5.2 g/500 ml RPMI-1640)，再加上 10% fetal bovine serum (FBS) 作為增殖培養基。並外加 2.5 g/L glucose、2 g/L sodium bicarbonate、1.0 mM sodium pyruvate、1% penicillin/streptomycin、10 mM Hepes buffer，培養液 pH 值須控制在 7.2~7.3 之間。

##### 4.2.2.2. 細胞培養條件

將細胞解凍後，培養於 25 cm<sup>2</sup> Nunc™ Cell Culture Treated Flask (25T)，待其長滿後，將細胞移至 75 cm<sup>2</sup> Nunc™ Cell Culture Treated Flask (75T) 中繼代生長。培養過程中，須將細胞放置在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 的無菌恆溫培養箱中，約 2~3 天需更換一次培養液、6~8 天繼代細胞一次。

### 4.3. 細胞生長分析(Cell growth assay)

將已於 75T 生長數代且穩定的  $\beta$  細胞經過細胞計數(cell count)後，

以  $7.5 \times 10^5$  cell/per well 的數量將  $\beta$  細胞種植到 6-well 的培養基中，並放回  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  之無菌恆溫培養箱中，待細胞貼附及生長後，將原本正常的培養液(2-2-1 所述之細胞培養液)換成 starvation medium (不含  $10\% \text{FBS}$  之細胞培養液)，放入  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  之無菌恆溫培養箱中做飢餓處理，再於 24 小時之後將 starvation medium 換回正常培養液，並在每一個 well 中加入不同劑量之 GTIN ( $0$ 、 $0.1$ 、 $0.5$ 、 $1.0$ 、 $2.0$ 、 $5.0$ 、 $10.0$ 、 $25.0 \mu\text{M}$ )。如欲模擬細胞遭受氧化壓力的環境，則需額外加入  $200 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ，並置於  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  之無菌恆溫培養箱生長。24 小時後於每一個 well 加入  $500 \mu\text{L}$  的胰蛋白酶(trypsin)，靜置於  $37^\circ\text{C}$  之恆溫箱中反應 5 分鐘使細胞從培養基上脫落，再加入  $500 \mu\text{L}$  正常培養液中和胰蛋白酶活性即可將細胞收至微量離心管中，利用 trypan blue 做染色 (trypan blue 能將死亡的細胞染成藍紫色)，再利用計數盤分析細胞生長之情形。

#### **4.4. 葡萄糖刺激胰島素分泌試驗(Glucose-stimulated insulin secretion, GSIS)**

將已於 75T 生長數代且穩定的  $\beta$  細胞經過細胞計數後，以  $7.5 \times 10^5$  cell/per well 的數量將  $\beta$  細胞種植到 6-well 的培養基中，並放回  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  之無菌恆溫培養箱中，待細胞貼附及生長後，將原本正常的培養液換成 starvation medium，放入  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  之無菌恆溫培養箱中做飢餓處理，再於 24 小時之後將 starvation medium 換回正常培養液，接著在每一個 well 中加入  $200 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  模擬細胞在有氧化壓力下的環境，並處理不同劑量之 GTIN，將  $\beta$  細胞靜置於  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  之無菌恆溫培養箱使其生長。24 小時過後，移除舊的培養液，並利用 PBS 清洗細胞一至二次，再利用 KRBH 配置  $2.8 \text{mM}$  葡萄糖溶液(低糖)，於每

一 well 中加入 1 ml 的低糖葡萄糖溶液，並靜置於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之無菌恆溫培養箱反應一小時，收取上清液至 15 ml 離心管待測，再利用 KRBH 配製 16.7 mM 葡萄糖溶液(高糖)，於每一 well 中加入 1 ml 的高糖葡萄糖溶液，並靜置於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之無菌恆溫培養箱反應一小時，收取上清液至 15 ml 離心管待測，接著使用 mouse insulin kit 測在得分別在高糖與低糖的環境中胰島 β 細胞個別的胰島素分泌量。

#### 4.5. 細胞凋亡分析試驗

##### 4.5.1. 4',6-diamidino-2-phenylidole stain (DAPI stain)

將已於 75T 生長數代且穩定的 β 細胞經過細胞計數後，以  $7.5 \times 10^5$  cell/per well 的數量將 β 細胞種植到 6-well 的培養基中，並放回 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之無菌恆溫培養箱中，待細胞貼附及生長後，將原本正常的培養液換成 starvation medium，放入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之無菌恆溫培養箱中做飢餓處理，再於 24 小時之後將 starvation medium 換回正常培養液，並在每一個 well 中加入 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模擬細胞在有氧化壓力下的環境，並處理不同劑量之 GTIN 於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之無菌恆溫培養箱使其生長。24 小時後移除舊的培養液，並利用 PBS 清洗細胞 3 次，再於每一個 well 中加入 3 ml 4% para-formaldehyde 於室溫固定 30 分鐘(需避光)，固定完成後利用 PBS 清洗細胞 3 次。接著用 PBS 將原始濃度為 10mg/ml 之 DAPI 配成濃度為 100 μg/ml 的 DAPI，並於每一 well 中加入 3 ml 100 μg/ml 的 DAPI 進行染色(室溫 30 分鐘且須全程避光)，染色完成後利用 PBS 清洗細胞 3 次，並留 1 ml PBS 於 well 內，即可使用螢光顯微鏡做觀察。

##### 4.5.2. Annexin V-FITC apoptosis assay

將已於 75T 生長數代且穩定的 β 細胞經過細胞計數後，以  $7.5 \times 10^5$

cell/per well 的數量將  $\beta$  細胞種植到 6-well 的培養基中，並放回 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之無菌恆溫培養箱中，待細胞貼附及生長後，將原本正常的培養液換成 starvation medium，放入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之無菌恆溫培養箱中做飢餓處理，再於 24 小時之後將 starvation medium 換回正常培養液，並在每一個 well 中加入 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模擬細胞在有氧化壓力下的環境，並處理不同劑量之 GTIN 於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之無菌恆溫培養箱使其生長。24 小時後收細胞上清液至 15 cc 離心管，再利用 PBS 清洗細胞 3 次，加入每 well 500  $\mu$ L 的胰蛋白酶並放入 37°C 之恆溫箱中反應 5 分鐘使細胞從培養基上脫落，再加入 3 ml 正常培養液中和胰蛋白酶活性即可將細胞收至 15 ml 離心管中，使用 1000 rpm 離心 5 分鐘並移除上清液，再加入 3 ml PBS 清洗細胞，用 1000 rpm 離心 5 分鐘並移除上清液，重複上述步驟 3 次後，彈散細胞，於每個 condition 加入 400  $\mu$ L 培養液後抽出 200  $\mu$ L 細胞懸浮液置於 eppendorf 中，並使用 Muse® Annexin V and Dead Cell Assay Kit 之染劑(200  $\mu$ L)避光染色 20 分鐘後，即可利用流式細胞儀作分析。

#### **4.6. 細胞自噬分析試驗**

##### **4.6.1. 酸性小囊定量分析試驗(Acidic vesicular organelles stain, AVO stain)**

將已於 75T 生長數代且穩定的  $\beta$  細胞經過細胞計數後，以  $7.5 \times 10^5$  cell/per well 的數量將  $\beta$  細胞種植到 6-well 的培養基中，並放回 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之無菌恆溫培養箱中，待細胞貼附及生長後，將原本正常的培養液換成 starvation medium，放入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之無菌恆溫培養箱中做飢餓處理，再於 24 小時之後將 starvation medium 換回正常培養液，並在每一個 well 中加入 200  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模擬細胞在有氧化壓力下的環境，

並處理不同劑量之 GTIN 於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之無菌恆溫培養箱使其生長。24 小時後移除舊的培養液，並利用 PBS 清洗細胞 3 次。接著用 PBS 將原始濃度為 1 mg/ml 之 AVO 染劑稀釋成 1 µg/ml，並於每一 well 中加入 1 ml 1 µg/ml 之 AVO 染劑，室溫染 30 分鐘後(全程避光)，移除 AVO 染劑，再利用 PBS 清洗細胞 3 次，並留 1 ml PBS 於 well 內，即可使用螢光顯微鏡觀察實驗結果。

#### 4.6.2. Flow cytometry of analysis LC3

將已於 75T 生長數代且穩定的 β 細胞經過細胞計數後，以 7.5×10<sup>5</sup> cell/per well 的數量將 β 細胞種植到 6-well 的培養基中，並放回 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之無菌恆溫培養箱中，待細胞貼附及生長後，將原本正常的培養液換成 starvation medium，放入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之無菌恆溫培養箱中做飢餓處理，再於 24 小時之後將 starvation medium 換回正常培養液，接著在每一個 well 中加入 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 模擬細胞在有氧化壓力下的環境，並處理不同劑量之 GTIN，將 β 細胞靜置於 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之無菌恆溫培養箱使其生長。於 24 小時後，將上清液去除，並以 PBS 清洗細胞 2 次後即可收細胞至 eppendorf。利用 Muse™ Autophagy LC3-antibody based Kit 進行染色後，即可利用流式細胞儀分析結果。

#### 4.7. 西方點墨法(Western blotting)

##### 4.7.1. 萃取蛋白及蛋白定量

將已於 75T 生長數代且穩定的 β 細胞經過細胞計數後，以 7.5×10<sup>5</sup> cell/per well 的數量將 β 細胞種植到 6-well 的培養基中，並放回 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之無菌恆溫培養箱中，待細胞貼附及生長後，將原本正常的培養液換成 starvation medium，放入 37°C、5% CO<sub>2</sub> 之無菌恆溫培養箱中做飢餓處理，再於 24 小時之後將 starvation medium 換回正常培養液，



並在每一個 well 中加入 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  模擬細胞在有氧化壓力下的環境，並處理不同劑量之 GTIN 於  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  之無菌恆溫培養箱反應 24 小時。24 小時後於每一個 well 加入 500  $\mu\text{L}$  的胰蛋白酶並放入  $37^\circ\text{C}$  之恆溫箱中反應 5 分鐘使細胞從培養基上脫落，再加入 3 ml 正常培養液中和胰蛋白酶活性即可將細胞收至 15 ml 離心管中，使用 1000 rpm 離心 5 分鐘並移除上清液，再加入 3 ml PBS 清洗細胞，用 1000 rpm 離心 5 分鐘並移除上清液，重複上述步驟 3 次後，加入 RIPA buffer (0.1% Sodium dodecyl sulfate (SDS)、0.5% deoxycholic acid、1% NP-40、50 mM Tris-base、150 mM NaCl, pH= 7.5) 及蛋白酶抑制劑(100  $\mu\text{g}$  PMSF、170  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin、1 mM sodium orthovanadate) 並利用均質機破壞細胞，再用 12000 rpm 於  $4^\circ\text{C}$  離心 10 分鐘，最後收取上清液。利用 BCA protein assay kit (內有 A 試劑與 B 試劑，以 50:1 的比例配置，且須避光) 與蛋白質於  $37^\circ\text{C}$  恆溫箱反應 30 分鐘。即可利用全波長酵素免疫分析儀以 562 nm 測其 OD 值，以換算蛋白濃度。

#### 4.7.2. 西方點墨法(Western blotting)

將已定量的蛋白濃度調整一致，再以二次水把所有 sample 補至相同體積後，加入 5X loading dye (需佔每一個 sample 總體積的 20%)，放上加熱板以  $100^\circ\text{C}$  加熱 10 分鐘，破壞其蛋白質結構使之變性。接著將處理好的 sample loading 至已架好的聚丙烯醯胺凝膠(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 進行電泳，以 60V 電泳 3~4 小時，使不同分子量的蛋白質分開。再以 100V、80~120 分鐘將蛋白轉印到硝化纖維膜(Pure nitrocellulose blotting membrane)，轉印完成後用麗春紅進行染色，並裁剪出要觀察的蛋白分子量部分，再用 Tris-buffered saline (TBS) 將麗春紅的染色洗掉，加入用 TBS + tween 配置的 5% 脫脂牛奶於  $4^\circ\text{C}$  shaking 一小

時以除去非特異性鍵結，shaking 完成後，用 TBS + tween 清洗三次、每次 10 分鐘。接著加入一抗於 4°C shaking overnight。反應完成後，先用 TBS + tween 清洗三次、每次 10 分鐘，再加入相對應的二抗於 4°C 反應一小時，後使用 TBS + tween 清洗三次、每次 10 分鐘。最後將配好的 ECL (A 液:B 液=1:1) 加到硝化纖維膜上即可用冷光儀進行拍攝，拍攝完成後再利用分析軟體針對亮度的不同來定量蛋白質表現量。

### 附表 1：separating gel 配方

10 % separating gel (15 mL，兩片量)	
ddH <sub>2</sub> O	5.9 mL
30 % Acrylamide mix	5.0 mL
1.5M Tris-base (pH8.8)	3.8 mL
10 % SDS	0.15 mL
10 % APS	0.15 mL
TEMED	0.006 mL

### 附表 2：stacking gel 配方

Stacking gel (4 mL，兩片量)	
ddH <sub>2</sub> O	2.7 mL
30 % Acrylamide mix	0.67 mL
1.0 M Tris-base (pH6.8)	0.5 mL
10 % SDS	0.04 mL
10 % APS	0.04 mL
TEMED	0.004 mL

#### 4.8. 統計分析(Statistical analysis)

以 Sigma-Plot 軟體分析數據，mean  $\pm$  SD 表示。利用 t-test-Unpaired 來評估統計差異。以\*表示  $P < 0.05$ ，\*\*則表示  $P < 0.01$ 。

## 第五章、結果與討論

### 5.1. 探討棉黃素對於 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理胰島 β 細胞之毒性及存活率之影響

首先以不同濃度(0、0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、25.0 μM)之棉黃素(gossypetin, GTIN)處理胰島 β 細胞，於反應 24 小時後測試其對 β 細胞之毒性，再藉由顯微鏡進行細胞計數試驗來分析。實驗結果發現相較於對照組，加入高劑量 GTIN (10、25 μM)的組別其細胞存活率有明顯下降的趨勢(Fig. 1A)，顯示此兩劑量對胰島 β 細胞具有細胞毒性。接著再以 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 與低劑量的 GTIN (0、0.5、1.0、2.0、5.0 μM)合併處理胰島 β 細胞為試驗組，反應 24 小時後，透過觀察細胞型態後發現，僅加入 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的組別其細胞型態較對照組有明顯皺縮及破碎的現象。以細胞計數試驗並進行統計後發現，經 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理的誘導組其細胞數量減少約 60%，顯示 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可對細胞造成氧化性傷害，導致細胞存活率明顯下降。然而以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 合併處理 GTIN 的組別，其細胞型態較為完整且數量明顯比單獨處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的誘導組多，約可提升 25~30%的細胞存活率(Fig. 1B)。透過上述結果可發現 GTIN 具有保護 β 細胞免於 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所造成的氧化傷害，以維持細胞之存活率。

### 5.2. 探討棉黃素對於 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 處理胰島 β 細胞改變胰島素分泌之影響

此實驗以 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 合併對細胞無毒性劑量之 GTIN (0.5、1.0、2.0、5.0 μM) 處理胰島 β 細胞，於反應 24 小時後，依序使細胞暴露在低濃度葡萄糖(2.8 mM)及高濃度葡萄糖(16.7 mM)中，分析胰島 β 細胞在低糖與高糖的環境中胰島素分泌量的改變。實驗結果顯示，誘導組(僅以 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 做處理)無論在低糖或高糖的環境下，胰島素分泌量皆有 20% 以上的下降，顯示 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 會對細胞產生氧化壓力而

造成胰島  $\beta$  細胞分泌胰島素的活性降低。且無論在誘導組或實驗組中，高糖環境所分泌的胰島素絕大部分低於低糖環境，顯示高糖的環境也確實會對胰島  $\beta$  細胞造成更大的損傷。再者觀察於 GTIN 試驗組中，無論細胞處於低糖或高糖的環境下，其胰島素的分泌量皆比誘導組高(且高糖回升的量比低糖多)，顯示 GTIN 具有恢復胰島  $\beta$  細胞分泌胰島素活性的效果(Fig. 2)。

### 5.3. 探討棉黃素對於 $H_2O_2$ 調控胰島 $\beta$ 細胞凋亡機制之影響

接著同樣以  $200 \mu M H_2O_2$  合併對細胞無毒性劑量之 GTIN ( $0.5$ 、 $1.0$ 、 $2.0$ 、 $5.0 \mu M$ ) 處理胰島  $\beta$  細胞為實驗條件，經由細胞凋亡分析實驗(DAPI stain 與 Annexin V-FITC apoptosis assay)探討 GTIN 對於細胞凋亡(apoptosis)機制的調控。以螢光染劑 DAPI 針對細胞 DNA 進行染色並透過螢光顯微鏡觀察細胞可發現， $H_2O_2$  誘導組的細胞型態較對照組呈現皺縮且細胞數量明顯下降，而  $H_2O_2$  合併處理 GTIN 的組別，其細胞型態較為完整且數量明顯比誘導組多，此項結果與細胞生長分析相符。再透過紫外光激發後觀察細胞可發現，誘導組被 DAPI 濃染的細胞 DNA 數量明顯比對照組多，而以  $H_2O_2$  合併處理 GTIN 的組別，其 DNA 濃染比例相較誘導組明顯下降。此結果顯示，GTIN 能藉由抑制胰島  $\beta$  細胞凋亡現象來達到保護細胞之作用(Fig. 3A&B)。進一步以 Annexin V-FITC 雙染方法以染上細胞內膜的磷脂絲胺酸(phosphatidylserine, PS)，再經由流式細胞儀進行偵測。發現誘導組細胞 PS 染上 Annexin V-FITC 螢光的細胞數量較對照組多了 10%，顯示細胞凋亡的表現量明顯增加。而以  $H_2O_2$  合併處理 GTIN 的組別，其 Annexin V-FITC 陽性的細胞數量皆有下降的趨勢。再次驗證 GTIN 可保護胰島  $\beta$  細胞免於  $H_2O_2$  所造成的氧化傷害而引發的細胞凋亡(Fig. 3C)。

#### 5.4. 探討棉黃素對於 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 调控胰島 β 細胞自噬機制之影響

胰島 β 細胞以 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 合併對細胞無毒性劑量之 GTIN (0.5、1.0、2.0、5.0 μM) 處理後，經由細胞自噬分析實驗(Flow cytometry analysis of LC3)探討細胞是否有細胞自噬(autophagy)的表現。首先，利用螢光染劑 acridine orange 針對酸性小囊進行染色並透過螢光顯微鏡觀察細胞可發現，發現處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的誘導組與對照組相比之酸性小囊數量顯著增加，顯示氧化壓力的上升會誘導細胞內生性細胞自噬的作用，進而保護細胞免於 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 帶來的氧化傷害。而在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 合併處理 GTIN 的組別其酸性小囊數量與誘導組相比則有上升的趨勢(Fig. 4A&B)。接著透過 LC3 螢光抗體偵測細胞中 LC3 蛋白表現並以流式細胞儀進行分析其含量變化。此實驗結果初步發現誘導組之細胞 LC3 表現量只有些微增加；而合併處理 GTIN 之後則 LC3 表現量與誘導組相比也無明顯之差異(Fig. 4B)。因此，GTIN 是否能透過加強保護性細胞自噬作用來增加細胞存活仍需進一步實驗來驗證。

#### 5.5. 探討棉黃素對於 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 誘發胰島 β 細胞凋亡及自噬相關调控蛋白表現之影響

最後透過西方點墨法分析細胞蛋白表現以探討細胞凋亡及細胞自噬相關之分子機制。處理 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的組別與對照組相比其細胞中 pro-PARP-1 表現量明顯減少，而被切割過後的 active PARP-1 表現量相對增加約 1.6 倍；而合併處理 GTIN 與誘導組相比其 cleaved PARP-1 表現量則有下降的趨勢，且具濃度依賴性(Fig. 5A&B)。目前仍持續分析細胞凋亡相關蛋白：caspase-3、Bcl-2 family、Fas/Fas L、TNFR/TNF 等，以及細胞自噬相關蛋白：LC3、Beclin-1、class III PI3K、Atg5/12 等分子之表現。

目前研究證實 GTIN 能夠保護胰島 β 細胞使其氧化傷害的程度降

低，並釐清 GTIN 保護  $\beta$  細胞是藉由降低細胞凋亡之機制，進而提升胰島素分泌、及改善糖尿病中  $\beta$  細胞衰竭而造成高血糖的問題。進一步仍持續探討 GTIN 是否誘發保護性細胞自噬作用及其相關分子機制的調控，總結上述，我們將提出 GTIN 具有保護  $\beta$  細胞避免氧化傷害的作用。

## 第六章、参考文献

1. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 6th edn 2013.
2. Chatenoud L. World Diabetes Day: Perspectives on immunotherapy of Type 1 Diabetes. *Eur J Immunol.* 2015; 45(11): 2968-70.
3. Fatani SH, Babakr AT, NourEldin EM, Almarzouki AA. Lipid peroxidation is associated with poor control of type-2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr.* 2016.
4. Urakawa H, Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, Murashima S, Morioka K, Maruyama N, Kitagawa N, Tanaka T, Hori Y, Nakatani K, Yano Y, Adachi Y. Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88(10): 4673-6.
5. Tiganis T. Reactive oxygen species and insulin resistance: the good, the bad and the ugly. *Trends Pharmacol Sci.* 2011; 32(2): 82-9.
6. Kawahito S, Kitahata H, and Oshita S. Problems associated with glucose toxicity: role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World J Gastroenterol.* 2009; 15(33): 4137-42.
7. Groeneveld ON, Kappelle LJ, Biessels GJ. Potentials of incretin-based therapies in dementia and stroke in type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Investig.* 2016; 7(1): 5-16.
8. Lu J, Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. *Cancer Lett.* 2015; 356(2): 156-64.
9. Zheng S, Zhao M, Wu Y, Wang Z, Ren Y. Suppression of pancreatic beta cell apoptosis by Danzhi Jiangtang capsule contributes to the attenuation of type 1 diabetes in rats. *BMC Complement Altern Med.* 2016; 16(1): 31.
10. Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20(3): 463-6.
11. Karunakaran U, Park KG. A Systematic review of oxidative stress and safety of antioxidants in diabetes: focus on islets and their defense. *Diabetes Metab J.* 2013; 37(2): 106-12.
12. Baig S, Seevasant I, Mohamad J, Mukheem A, Huri HZ, Kamarul T. Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand? *Cell Death Dis.* 2016; 7: e2058.
13. Zou Y, Chen T, Han M, Wang, H, Yan W, Song G, Wu Z, Wang X, Zhu C, Luo X, Ning Q. Increased killing of liver NK cells by Fas/Fas ligand and NKG2D/NKG2D ligand contributes to hepatocyte necrosis in virus-induced liver



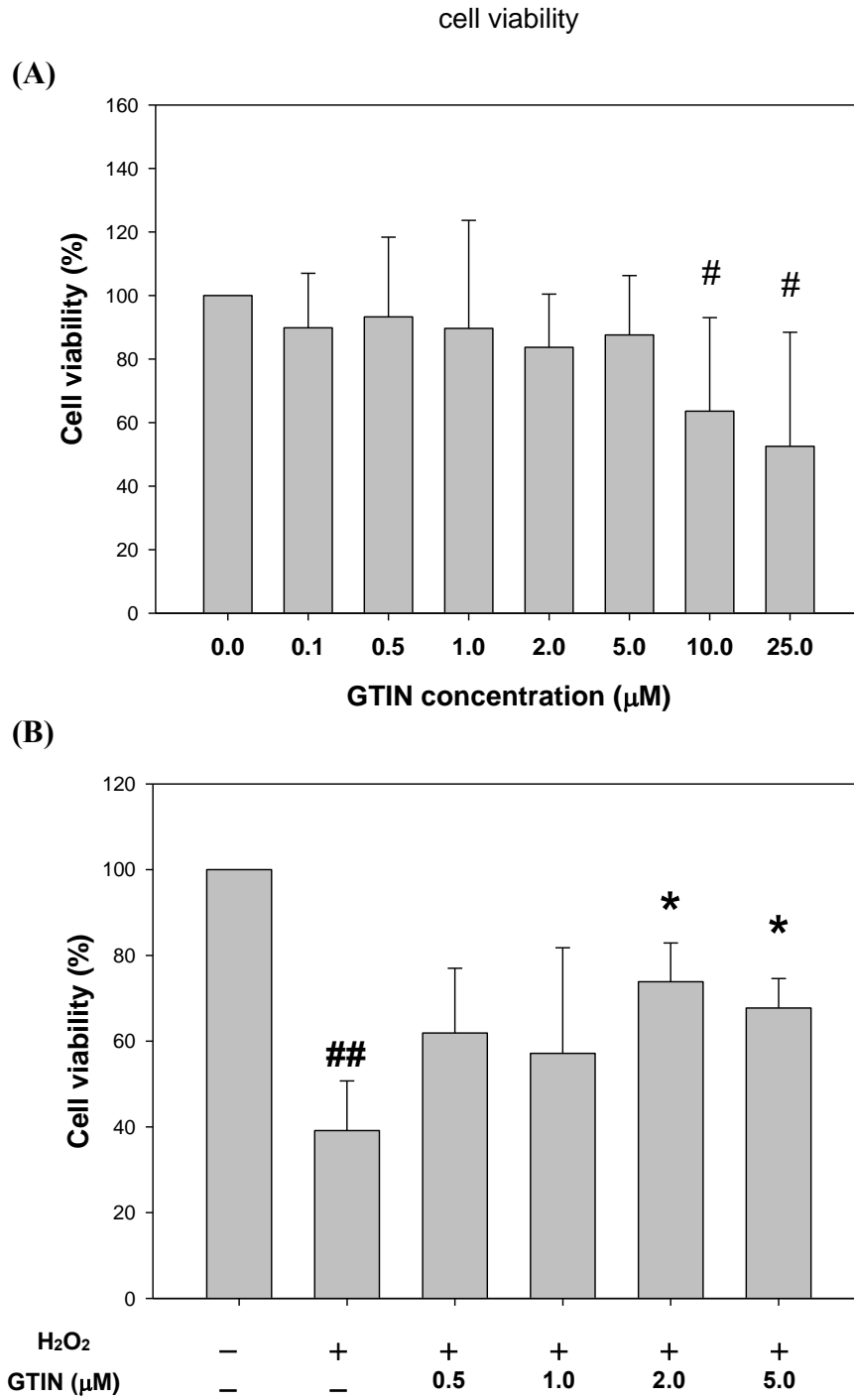
- failure. *J Immunol.* 2010; 184(1):466-75.
14. Huang CJ, Lin CY, Haataja L, Gurlo T, Butler AE, Rizza RA, Butler PC. High expression rates of human islet amyloid polypeptide induce endoplasmic reticulum stress mediated beta-cell apoptosis, a characteristic of humans with type 2 but not type 1 diabetes. *Diabetes.* 2007; 56(8): 2016-27.
  15. Alshatwi AA, Subash-Babu P. Aloe-Emodin Protects RIN-5F (Pancreatic  $\beta$ -cell) Cell from Glucotoxicity via Regulation of Pro-Inflammatory Cytokine and Downregulation of Bax and Caspase 3. *Biomol Ther (Seoul).* 2016; 24(1): 49-56.
  16. Guardado Mendoza R, Perego C, Finzi G, La Rosa S, Capella C, Jimenez-Ceja LM, Velloso LA, Saad MJ, Sessa F, Bertuzzi F, Moretti S, Dick EJ Jr, Davalli AM, Folli F. Delta cell death in the islet of Langerhans and the progression from normal glucose tolerance to type 2 diabetes in non-human primates (baboon, *Papio hamadryas*). *Diabetologia.* 2015; 58(8): 1814-26
  17. Yin J, Wang Y, Gu L, Fan N, Ma Y, Peng Y. Palmitate induces endoplasmic reticulum stress and autophagy in mature adipocytes: implications for apoptosis and inflammation. *Int J Mol Med.* 2015; 35(4): 932-40.
  18. Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013; 14(12): 759-74.
  19. Xu DQ, Wang Z, Wang CY, Zhang DY, Wan HD, Zhao ZL, Gu J, Zhang YX, Li ZG, Man KY, Pan Y, Wang ZF, Ke ZJ, Liu ZX, Liao LJ, Chen Y. PAQR3 controls autophagy by integrating AMPK signaling to enhance ATG14L-associated PI3K activity. *EMBO J.* 2016.
  20. Cheong H, Lu C, Lindsten T, Thompson CB. Therapeutic targets in cancer cell metabolism and autophagy. *Nat Biotechnol.* 2012; 30(7): 671-8
  21. Li H, Zhou B, Xu L, Liu J, Zang W, Wu S, Sun H. The reciprocal interaction between autophagic dysfunction and ER stress in adipose insulin resistance. *Cell Cycle.* 2014; 13(4): 565-79
  22. Hasnain SZ, Prins JB, McGuckin MA. Oxidative and endoplasmic reticulum stress in  $\beta$ -cell dysfunction in diabetes. *J Mol Endocrinol.* 2016; 56(2): 33-54.
  23. Ebato C, Uchida T, Arakawa M, Komatsu M, Ueno T, Komiya K, Azuma K, Hirose T, Tanaka K, Kominami E, Kawamori R, Fujitani Y, Watada H. Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab.* 2008; 8(4): 325-32
  24. Hwang WM, Bak DH, Kim DH, Hong JY, Han SY, Park KY, Lim K, Lim DM, Kang JG. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids May Attenuate Streptozotocin-Induced Pancreatic  $\beta$ -Cell Death via Autophagy Activation in Fat1 Transgenic Mice. *Endocrinol Metab (Seoul).* 2015; 30(4): 569-75
  25. Kunnumakkara AB, Nair AS, Ahn KS, Pandey MK, Yi Z, Liu M, Aggarwal BB.

Gossypin, a pentahydroxy glucosyl flavone, inhibits the transforming growth factor beta-activated kinase-1-mediated NF-kappaB activation pathway, leading to potentiation of apoptosis, suppression of invasion, and abrogation of osteoclastogenesis. *Blood*. 2007; 109(12): 5112-21.

26. Chen JH, Tsai CW, Wang CP, Lin HH. Anti-atherosclerotic potential of gossypetin via inhibiting LDL oxidation and foam cell formation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013; 272(2): 313-24.
27. Lin HH. In vitro and in vivo atheroprotective effects of gossypetin against endothelial cell injury by induction of autophagy. *Chemical Research in Toxicology*. 2015; 28, 202-85.

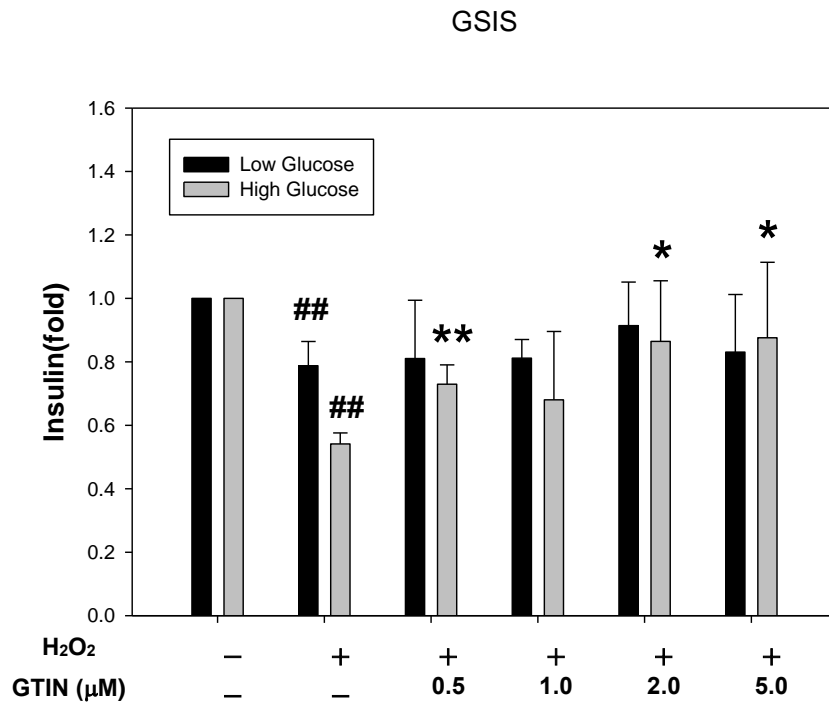
第七章、圖表

Fig. 1



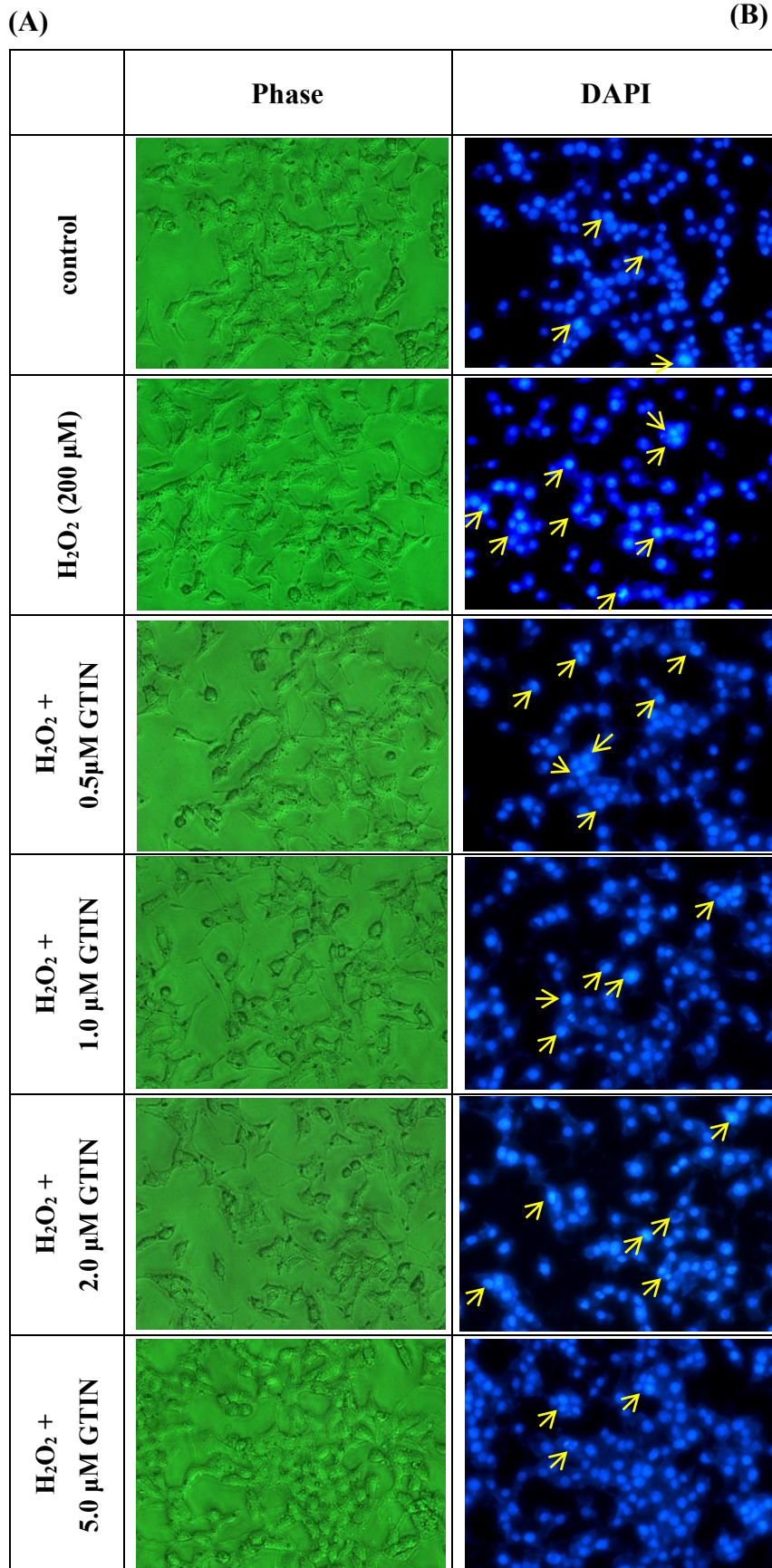
**Fig. 1. Effect of GTIN in presence or absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on  $\beta$ -cell viability.** (A)  $\beta$ -cells were treated with various concentrations of GTIN (0.1-25.0  $\mu$ M) for 24 h. (B)  $\beta$ -cells were treated with 200  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence or absence of indicated concentrations of GTIN (0.5, 1.0, 2.0 and 5.0  $\mu$ M) for 24 h. Cell viability was analyzed by cell counting assay. The results represent the average of three independent experiments  $\pm$  SD. #p < 0.05, ##p < 0.01, compared with control.\*p < 0.05, compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated group.

**Fig. 2**

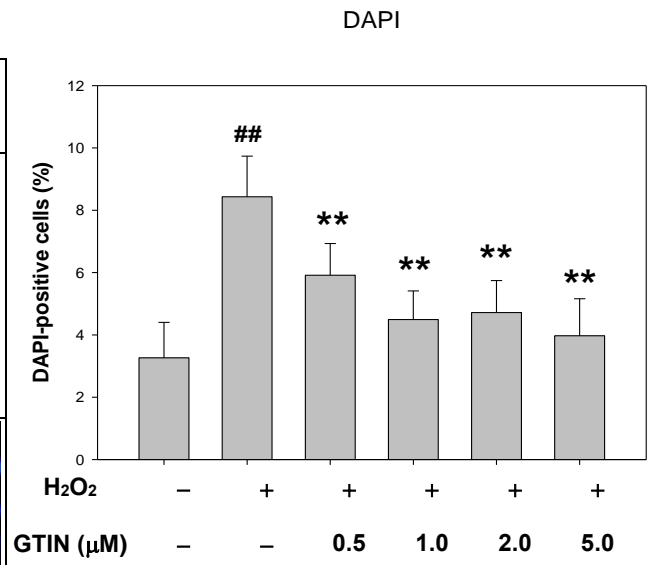


**Fig. 2. Effect of GTIN on insulin secretion in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated pancreatic  $\beta$  cells.**  $\beta$ -cells were treated with 200  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h in the presence or absence of indicated concentrations of GTIN (0.5, 1.0, 2.0 and 5.0  $\mu$ M). After the incubation, the insulin secretion was measured by the GSIS assay. The results represent the mean  $\pm$  SD (n = 3) from three independent experiments. ##p < 0.01, compared with control.\*p < 0.05, compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated group.

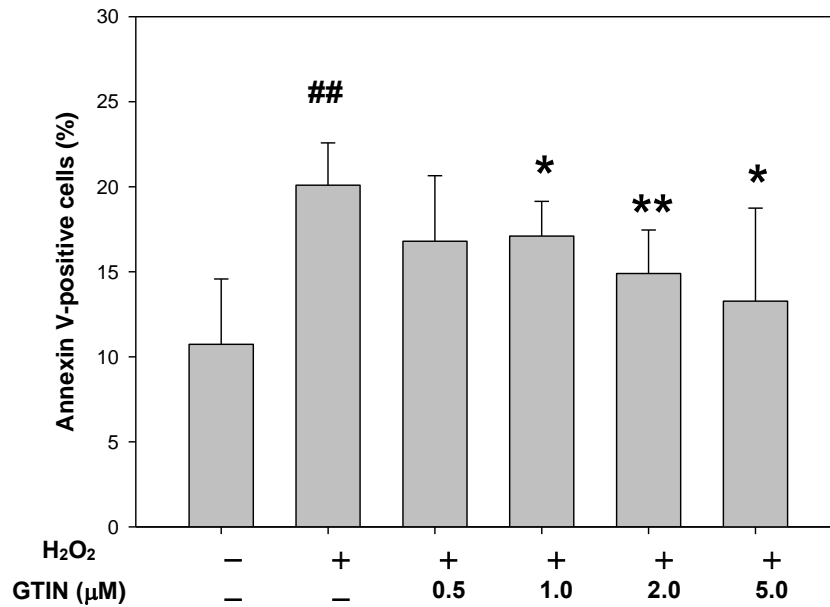
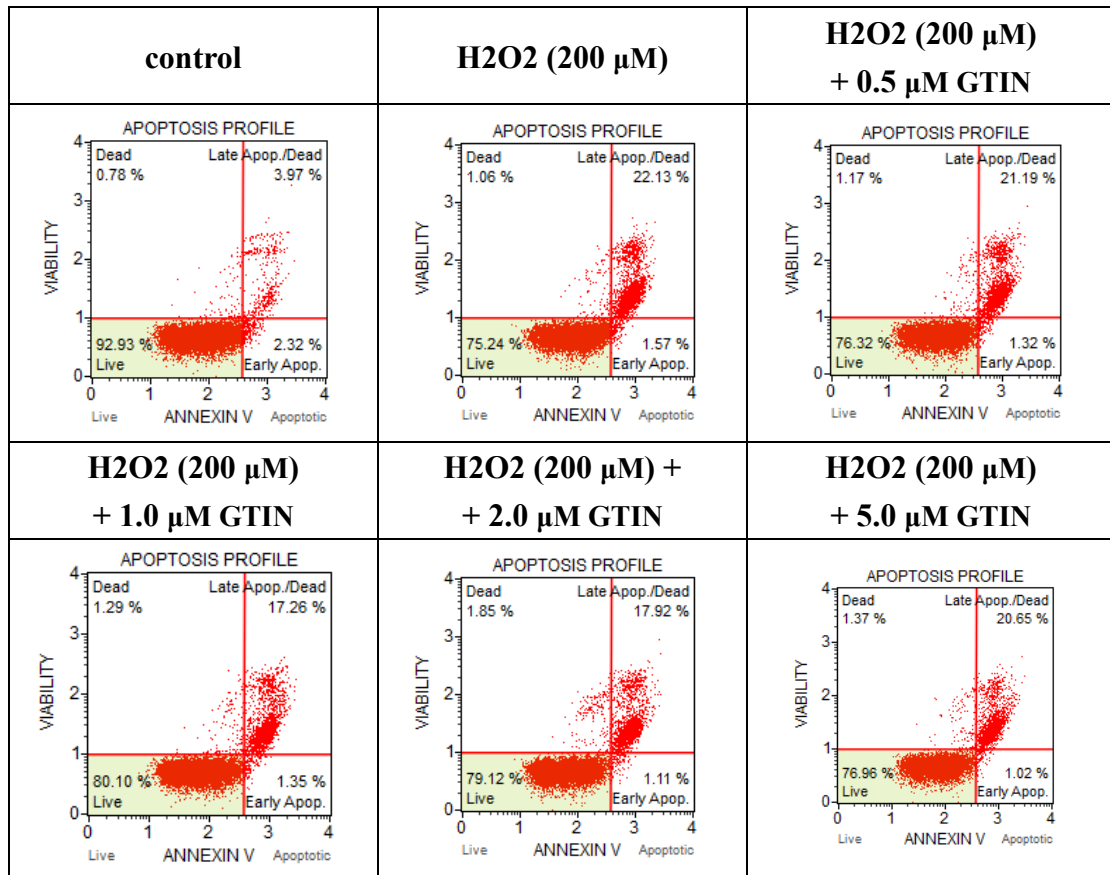
**Fig. 3**



**(B)**



(C)

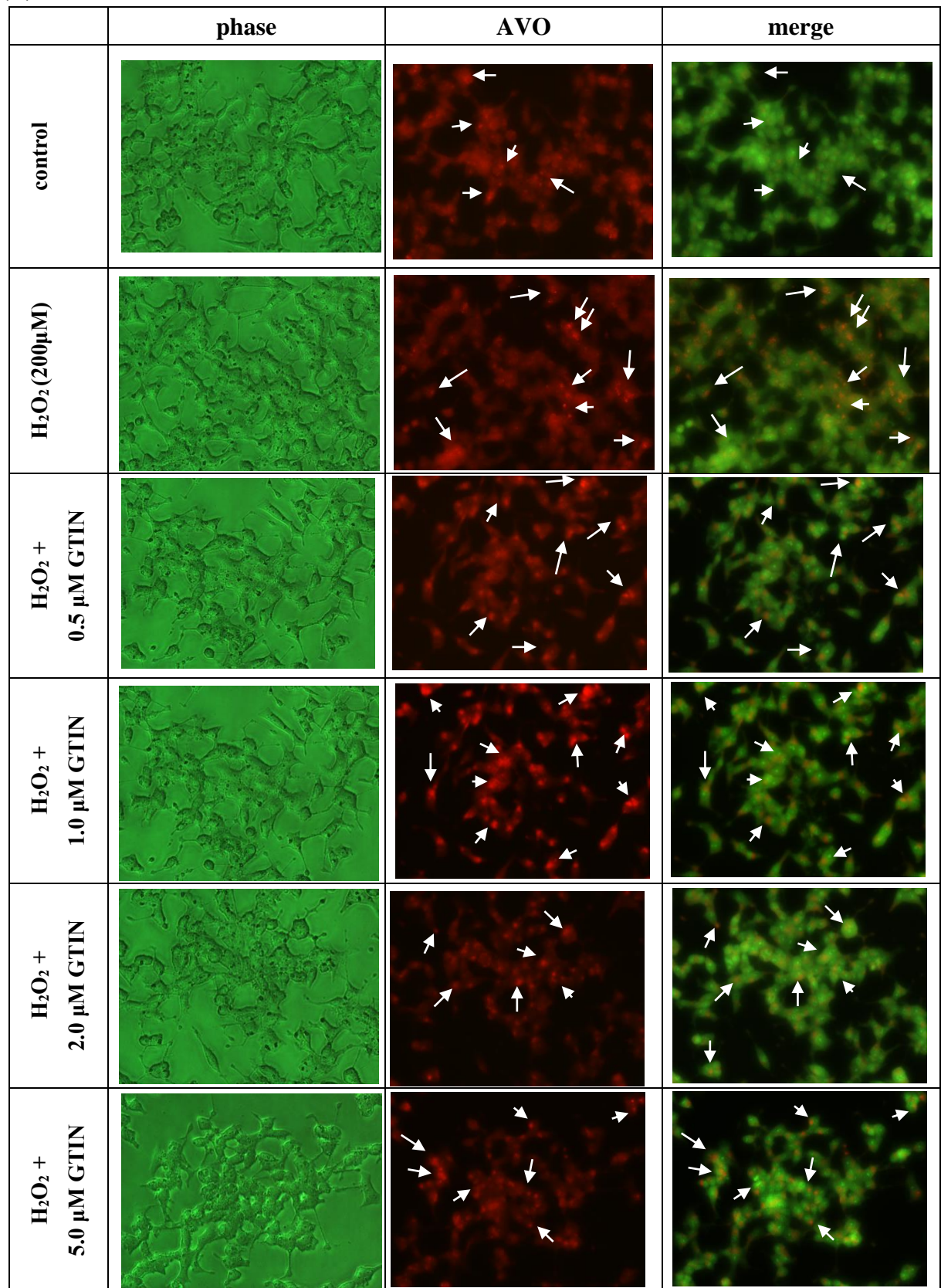


**Fig. 3. Effect of GTIN on apoptosis in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated pancreatic  $\beta$  cells.**  $\beta$ -cells were treated with 200  $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h in the presence or absence of indicated concentrations of GTIN (0.5, 1.0, 2.0 and 5.0  $\mu$ M). (A) The apoptotic cells were assayed by DAPI stain. Arrows indicate apoptotic cells. The panel shows the stained nuclei with DAPI solution were then photographed with a phase contrast microscope and fluorescent microscope using a blue filter (from left to right). (B) Apoptosis values were calculated as the percentage of DAPI against total cells. The quantitative data are represented as mean  $\pm$  SD (n=3) from three independent experiment. ## p < 0.01, compared with the control. \*\* p < 0.01 compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated group. (C) The cells were assayed with Annexin V-FITC apoptosis assay. Results are presented as histogram. The results represent the mean  $\pm$  SD (n =3) from three independent experiments. ##p < 0.01, compared with control. \*p < 0.05, compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated group.

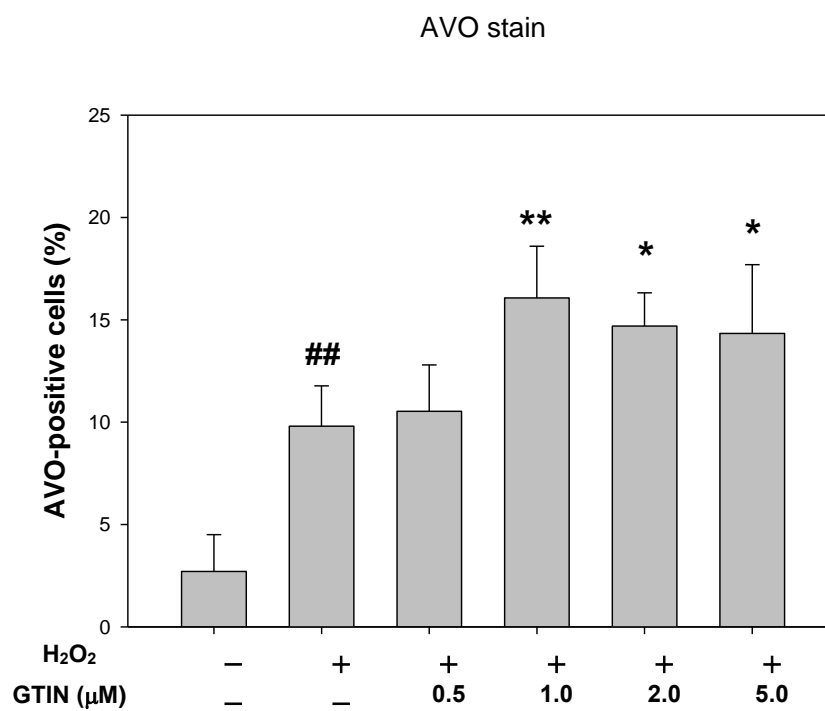


**Fig. 4**

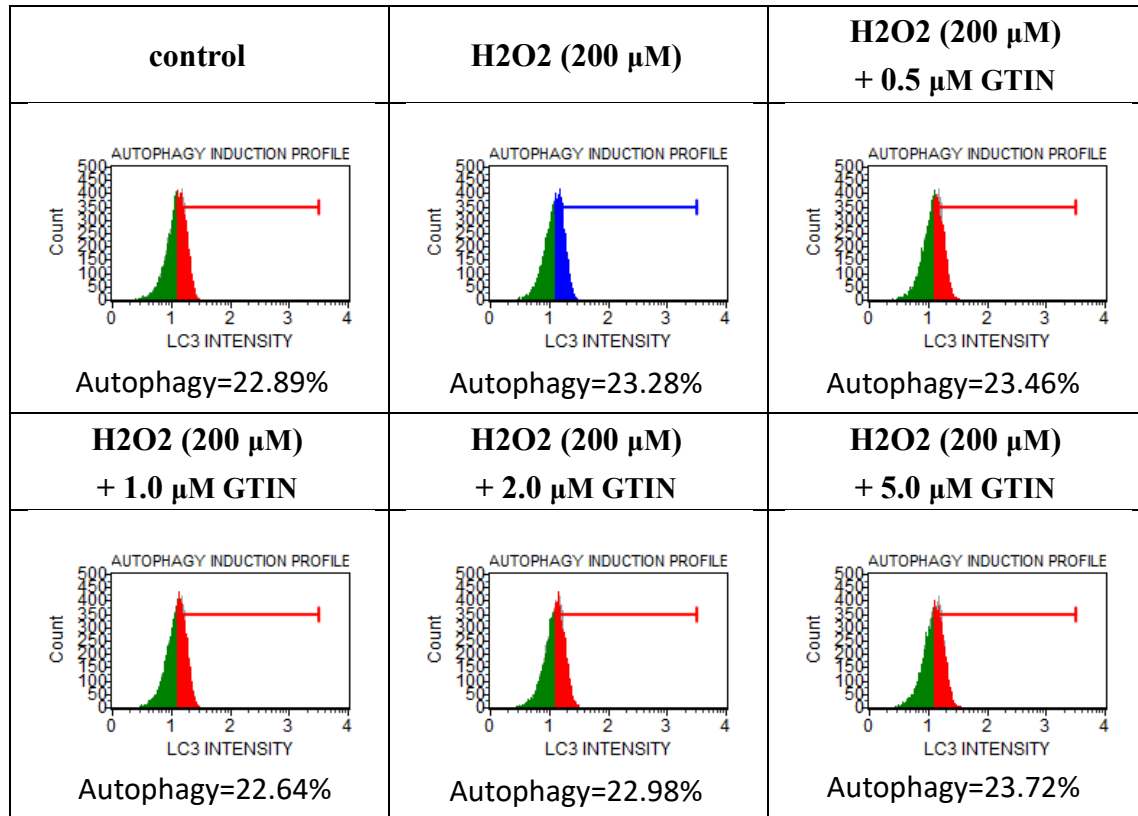
**(A)**



(B)

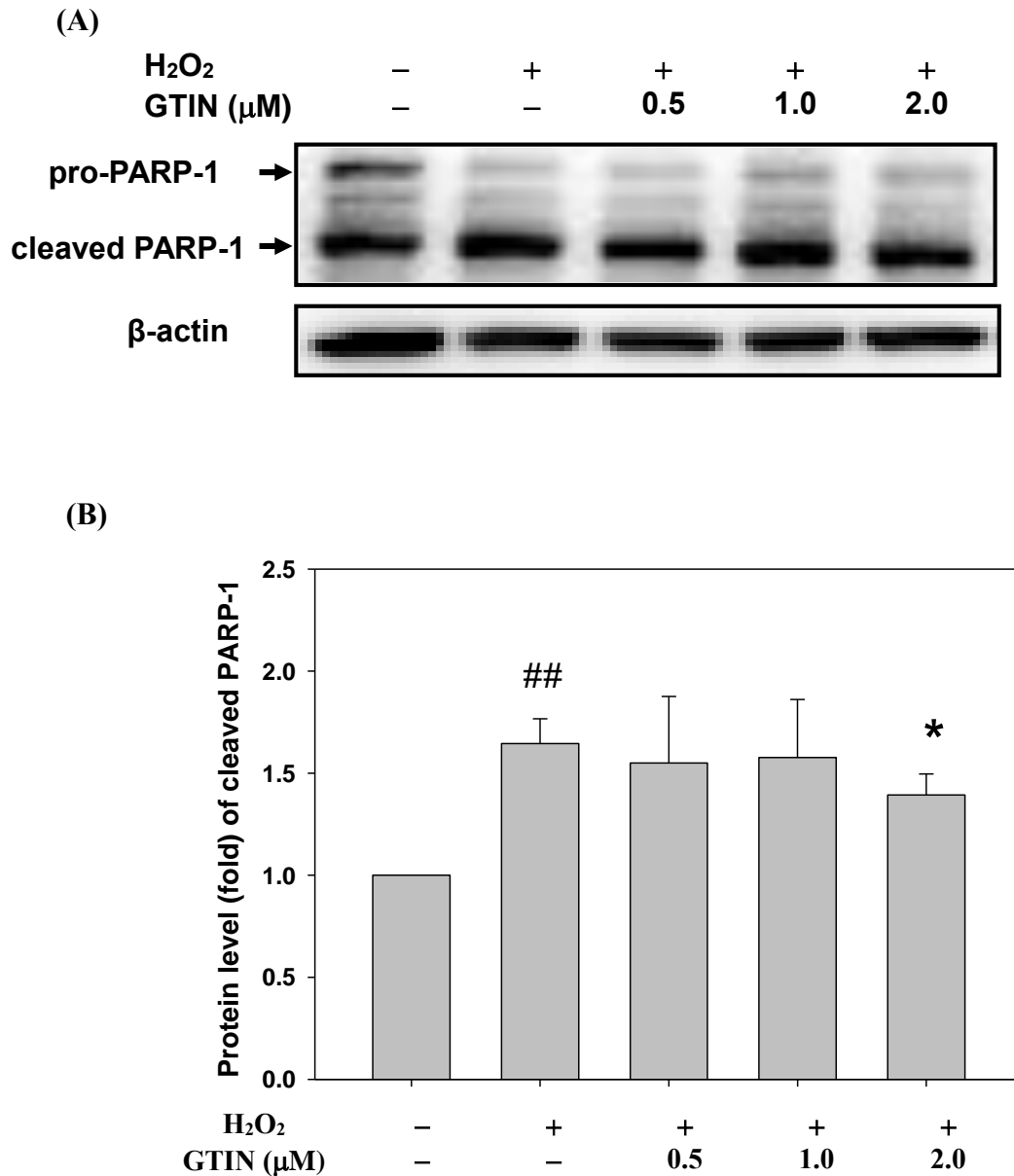


(C)



**Fig.4. Effect of gossypetin on autophagy in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated pancreatic β-cells.** β-cells were treated with 200 μM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h in the presence or absence of indicated concentrations of GTIN (0.5, 1.0, 2.0 and 5.0 μM). (A) Autophagic cells were assayed by acridine orange staining. Arrows indicated the autophagic cells. Panel shows phase contrast microscopy (left), acridine orange staining (middle), and merge image (right). (B) Autophagic values were calculated as the percentage of acridine orange against total cells. The quantitative data are represented as mean ± SD (n=3) from three independent experiment. ##p < 0.01, compared with the control. \*\*p < 0.01 compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated group. (C) β-cells were loaded with LC3 primary antibodies then conjugated with secondary antibodies labeled with FITC. After that washed and analyzed by flow cytometry. Results are presented as histogram overlay.

Fig. 5



**Fig. 5. Effect of GTIN on apoptotic signaling in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated pancreatic β-cells.** β-cells were treated with 200 μM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h in the presence or absence of indicated concentrations of GTIN (0.5, 1.0, and 2.0 μM) (A) The protein expression of PARP-1 was analyzed by Western blotting. β-actin served as an internal control. (B) The quantitative data of cleaved PARP-1 protein level are presented as mean ± SD (n = 3) from three independent experiments. <sup>##</sup>p < 0.01, compared with the control. <sup>\*\*</sup>p < 0.01 compared with the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated group.

Fig. 6

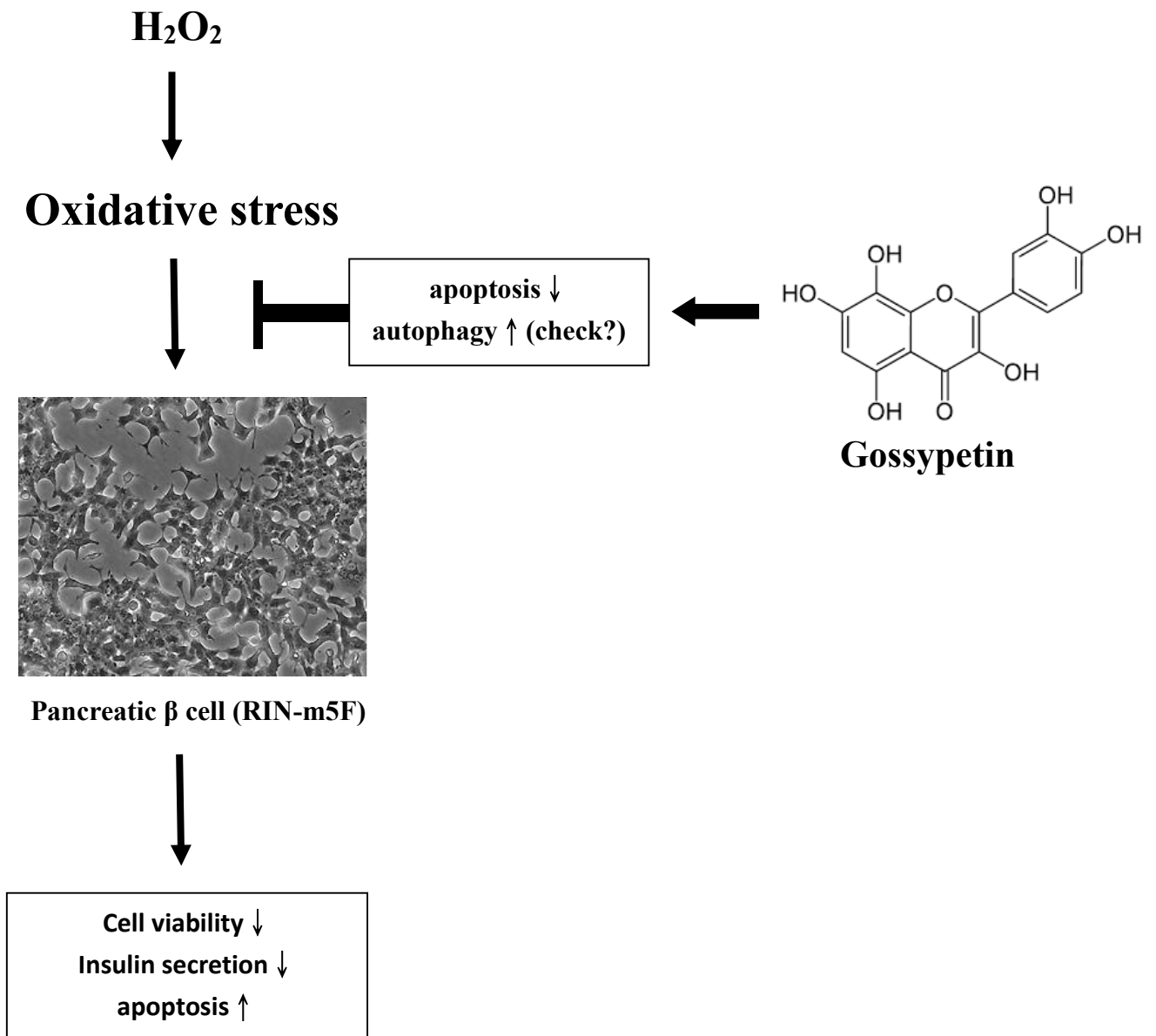


Fig. 6. GTIN protects pancreatic beta cells against oxidative injury.