

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

## 大蒜精油及二烯丙基三硫化物對於胰島 bete 細胞株 HIT-T15 在正常血糖及高血糖下胰島素分泌功能之影響 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 95-2320-B-040-033-  
執行期間：95年08月01日至96年07月31日  
執行單位：中山醫學大學營養科學研究所

計畫主持人：劉承慈

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：許恬瑋、譚雅萍  
協同研究人員：沈立言、李宗貴

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

中華民國 96年10月31日

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

大蒜精油及二烯丙基三硫化物對於胰島 beta 細胞株

HIT-T15 在正常血糖及高血糖下胰島素分泌功能之影響

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：NSC 95-2320-B-040-033-

執行期間：九十五年八月一日至九十六年七月三十一日

計畫主持人：劉承慈

計畫參與人員：沈立言、李宗貴、許恬瑋、譚雅萍

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

執行單位：私立中山醫學大學營養科學研究所

中 華 民 國 九 十 六 年 十 月 三 十 一 日

## 中文摘要

血糖控制不良是糖尿病程進展的重要因素，高血糖之葡萄糖毒性會造成胰臟  $\beta$  細胞損傷，影響葡萄糖刺激之胰島素分泌(GSIS)功能。本實驗室過去研究發現，餵食大蒜精油(GO)及其有機含硫成分二烯丙基三硫化物 Diallyl trisulfide (DATS)可在 streptozotocin 誘發的糖尿病大鼠增加空腹及葡萄糖負荷後血中胰島素含量；本研究觀察在正常及高糖濃度下，GO 及 DATS 對於胰島  $\beta$  細胞株 HIT-T15 之 GSIS 功能之影響。實驗方法係將 HIT-T15 細胞培養於含有不同葡萄糖濃度(5.5、11.1、33.3 mM)之培養基中並加入不同濃度之 GO (1-10  $\mu$ g/ml)或 DATS (0.001-0.01 mM)，培養 24 小時後觀察細胞存活率、胰島素分泌量、ATP 含量及葡萄糖運輸動力學。此外，在高糖培養基的實驗中，亦觀察不同濃度之 GO 對於細胞抗氧化狀態之影響。結果發現，在正常培養基中添加 GO 不影響細胞存活率但顯著且呈劑量依賴性增加 GSIS (最大增加率達 33%)，且其效果與 glibenclamide 之作用相當；而細胞 ATP 含量及細胞葡萄糖運輸動力學研究結果顯示，GO 促進 GSIS 之作用至少有部分可由促進細胞攝取葡萄糖及產生 ATP 來解釋。另一方面，DATS 在不影響細胞存活率的最大劑量下可促進 GSIS 作用，並且增加細胞 ATP 含量及改善細胞葡萄糖運輸蛋白對於葡萄糖之親和力，但其效果不如 GO。此結果顯示，正常下 GO 僅部分透過其中所含之 DATS 促進胰島素分泌。在高葡萄糖濃度 (11.1、33.3 mM)培養條件下，細胞存活率並未受影響且並未顯著發生 apoptosis，但細胞 GSIS 顯著降低，伴隨細胞 ATP 含量降低且細胞最大攝取葡萄糖運輸速率亦下降。此外，高糖顯著增加細胞脂質過氧化程度並顯著降低細胞 SOD 活性影響，但是不影響總 GSH 含量或 GPx 與 GR 之活性。培養在高糖下之細胞可因添加 GO 而顯著增加細胞 GSIS 作用、ATP 含量並增加葡萄糖運輸蛋白對於葡萄糖之親合力，且 DATS 在高糖下對於胰島素分泌、ATP 含量或係葡萄糖運輸動力學之影響均與 GO 類似。而高糖下添加 GO 雖然增加細胞 SOD 活性，然而細胞脂質過氧化程度並未因而獲得改善。由本實驗結果可得知，HIT-T15 細胞不論培養於正常培養基或含高葡萄糖之培養基，GO 均呈現促進胰島素分泌之作用，且與增加細胞對於葡萄糖之利用及胞內 ATP 含量有關，但是與降低高糖所致之氧化傷害無關。而在高糖下 GO 促進胰島素分泌的作用中，DATS 為作用成分之一。

關鍵字：HIT-T15 細胞株、大蒜精油、二烯丙基三硫化物、胰島素、葡萄糖刺激之胰島素分泌作用(GSIS)

## 英文摘要

Poorly controlled blood glucose level has been recognized a major factor responsible for the progressing of diabetes. Glucose toxicity resulting from hyperglycemia adversely affects glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) from islet  $\beta$  cell. We previously reported that both garlic oil (GO) and its organosulfur compound diallyl trisulfide (DATS) improved plasma insulin level in diabetes. With an islet  $\beta$  cell line HIT-T15, the present study investigated the effect of GO and DATS on GSIS under normal- (5.5 mM glucose) and hyper-glycemic (11.1 or 33.3 mM glucose) condition. Cells were cultured in various concentrations of glucose with or without GO (1-10  $\mu$ g/ml) or DATS (0.001-0.01 mM) for 24h followed by the

determination of their validity, GSIS, cellular ATP content, and glucose transport kinetics. The effect of GO on oxidative condition of cells cultured under hyperglycemic condition was also investigated. When under normal condition, GO did not affect the validity while dose-dependently increased the GSIS to a level similar to that by glibenclamide. Studies on cellular ATP content and on glucose transport kinetics suggested that GO could improve GSIS through improving cellular glucose uptake and ATP production. Hyperglycemia affected neither the validity nor the apoptosis rate of cells while suppressed the GSIS and lowered cellular ATP content and the maximal glucose transport rate. Hyperglycemia also increased TBARS and decreased SOD activity in cells, although total GSH content, the activity of GPx and GR remained unaffected. GO reversed decreased GSIS and cellular ATP content in cells cultured under hyperglycemic condition, and improved Km of glucose transport in these cells. DATS showed similar effects on GSIS, cellular ATP and the kinetics of glucose transport to that of GO in cells cultured under both normal- and hyper-glycemic conditions. In addition, GO also improved SOD activity of cells cultured under hyperglycemic condition, however, did not ameliorate the increased TBARS in these cells. In conclusion, GO acutely improved GSIS in the  $\beta$  cell line HIT-T15 cultured in normal and in hyperglycemic conditions in associate with increased glucose utilization by these cells while not through its antioxidant effect. DATS is a major functional compound in GO for its insulin secretogogues effect.

Keywords: HIT-T15 cell line; Garlic oil; Diallyl trisulfide; Insulin; Glucose-stimulated insulin secretion (GSIS)

## 報告内容

## 一、前言

正常狀況下血液葡萄糖濃度仰賴代謝荷爾蒙調控組織與器官對於葡萄糖之利用及釋出，以維持血糖動態平衡，而胰島素是體內唯一可調降血糖之荷爾蒙。胰島素的分泌係受到血糖升高的刺激，然而若胰臟  $\beta$  細胞持續暴露於高糖環境，會導致  $\beta$  細胞分泌功能異常或死亡，這是糖尿病自然史及血糖控制不良患者病情惡化的主要原因。隨著  $\beta$  細胞逐漸失去生理功能，糖尿病患最終須完全仰賴胰島素控制血糖。過去研究指出高糖環境對胰臟  $\beta$  細胞產生之糖毒性，主要肇因於增加之細胞氧化壓力。具有抗氧化能力之大蒜用於醫療用途的歷史由來已久，而其抗糖尿病作用的科學證據，在過去數十年中已陸續被提出，但是其作用成分及作用機制卻仍缺乏系統性的探討。我們過去以 GO 及其有機含硫化物 DATS 灌食 STZ 誘發之糖尿病大鼠時，發現這些大蒜成分有效改善口服葡萄糖耐受性，並且發現其確實能在這些胰島  $\beta$  細胞受到部份破壞之大鼠，增加空腹及口服葡萄糖耐受性試驗中(代表 postprandial state)血液胰島素濃度。因此有必要釐清 GO 及 DATS 是否具有促進胰島素分泌的功能，並進一步了解 GO 及 DATS 是否能藉由抗氧化作用逆轉高糖相關之氧化壓力增加所致之  $\beta$  細胞流失而改善其胰島素分泌功能。此外，由於 GSIS 係  $\beta$  細胞受到葡萄糖刺激而釋放胰島素的過程，其主要涉及細胞對於胞外葡萄糖之攝取及 ATP 之產生；ATP 產量可影響 ATP 依賴型鉀離子通道活性，造成細胞膜電位改變而最終啟動胞內含胰島素之顆粒的釋放。我們過去的研究也發現 GO 可直接促進骨骼基葡萄糖代謝，因而本研究推論 GO 亦有可能藉由增加  $\beta$  細胞之葡萄糖代謝而促進 GSIS。

## 二、研究目的

本研究的目的係利用活體外培養之倉鼠胰島  $\beta$  細胞株 HIT-T15，觀察在不同糖濃度下，大蒜精油 (GO) 及其有機含硫成分二烯丙基三硫化物 (Diallyl trisulfide, DATS) 之促胰島素分泌活性及其與細胞葡萄糖利用率之關聯並觀察這些大蒜成分之抗氧化活性在其中所扮演的角色。

## 三、文獻探討

過去的研究指出急性增加血糖濃度不論在正常或糖尿病患均降低其抗氧化能力，而長期 type 1 與 type 2 糖尿病患抗氧化能力亦下降<sup>1-4</sup>。高血糖誘發氧化壓力是生物系統中 ROS 產生與抗氧化機制之間的失衡現象，此係 ROS 增加及細胞酵素性及非酵素性抗氧化作用下降的結果<sup>5,6</sup>。急性高血糖誘發 ROS 產生可透過：(1) 葡萄糖自氧化作用；(2) 多元醇途徑；(3) PKC 活化，其中高糖所促進之多元醇途徑增加 sorbitol 產生，消耗 NADPH 導致胞內 NADPH 下降，繼而影響 glutathione 由氧化態再生為還原態<sup>7,8</sup>；而慢性高血糖誘發 ROS 產生則可透過蛋白質糖化與 AGEs (advanced glycation end products) 形成<sup>8</sup>。

過去研究指出高糖環境對胰臟  $\beta$  細胞產生之糖毒性會造成葡萄糖刺激下之胰島素分泌 (glucose-stimulated insulin secretion, GSIS) 下降、抑制胰島素及 GLUT2 轉錄因子 PDX-1 表現、抑制糖解關鍵酵素 glucokinase 表現、增加對粒線體及 DNA 之氧化傷害、促細胞凋亡蛋白 NF- $\kappa$ B 表現增加等作用<sup>9,10</sup>。由

於高糖會增加胞內 ROS 蓄積，而  $\beta$  細胞之抗氧化酵素如 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, 及 catalase 含量低<sup>11</sup>，對於 ROS 之傷害敏感，因而有學者推論高葡萄糖濃度對於  $\beta$  細胞之上述毒性，主要肇因於增加之細胞氧化壓力。活體外試驗證實高葡萄糖濃度在  $\beta$  細胞可增加胞內氧化壓力<sup>12</sup>，且當  $\beta$  細胞急性暴露於  $H_2O_2$  所造成之氧化壓力，會減少胞內胰島素含量、細胞質中的 ATP、及伴隨引起 apoptosis<sup>13</sup>。目前所知 ROS 在  $\beta$ -cells 的直接作用標的之一可能是低親合性的葡萄糖磷酸化酵素 glucokinase，由於 glucokinase 之葡萄糖結合位置附近的 cysteine 殘基是酵素活性的關鍵位置<sup>14</sup>，而 ROS 易氧化這些殘基或致形成雙硫架橋導致酵素去活化作用，故會因而影響  $\beta$  細胞對於胞外 glucose 濃度的感受性而影響胰島素分泌作用。ROS 的其他標的是 NF $\kappa$ B，在  $\beta$  細胞這導致促發炎細胞激素 IL-1 $\beta$  及之 iNOS 表現<sup>15</sup>。IL-1 $\beta$  對於  $\beta$  細胞功能之影響則與 iNOS 之表現及 NO 產生有關；NO 或其衍生物 peroxynitriate 可透過抑制  $\beta$  細胞含有 [FeS] 之代謝酵素的活性，導致抑制粒腺體功能因而抑制葡萄糖誘發之胰島素分泌，若阻斷 NO 之形成則可保護不同的  $\beta$  cell 製備物免於 cytokine 誘發之抑制作用<sup>16</sup>。

大蒜在過去曾於挪威及中歐用做糖尿病醫療處方<sup>17</sup>。根據 Ryan 等人(2001)的報導，大蒜仍是目前最常被糖尿病患使用的替代療法之一<sup>18</sup>，且在近年名列義大利草藥專家建議的前五大利於血糖控制的藥草中<sup>19</sup>。大蒜及其成份在過去也已被證實具有許多生物學活性，包括許多與抗發炎有關的生物學活性；在活體可提供抗氧化<sup>20,21</sup>，且抑制在細菌內毒素誘發之 NF $\kappa$ B 活化及促發炎細胞激素表現<sup>22</sup>，近來，大蒜精油(garlic oil; GO)亦被顯示在 STZ-DM 大鼠降低氧化壓力<sup>23</sup>。我們過去曾觀察到 GO 在 STZ-DM 大鼠抗糖尿病作用：長期灌食 GO 可降低 STZ-DM 大鼠血清中游離脂肪酸及蛋白質糖化產物 fructosamine 含量，緩和空腹血糖之惡化，且在口服葡萄糖耐受性試驗中可改善血糖堆積及增加胰島素釋放，增進肌肉組織在胰島素存在下的葡萄糖利用率，改善胰島素耐受性且改善慢性腎臟併發症之發展<sup>24,25</sup>。由於氧化壓力增加及發炎作用被認為涉及  $\beta$ -cell 功能缺損，而在高血糖所致之 cytokine 產生至少有部分是續發於氧化壓力所致，因此本計畫申請人推論大蒜精油可能有部分透過其抗氧化作用及抑制高血糖下之促發炎細胞激素之產生而改善  $\beta$ -cell 功能。

此外，正常  $\beta$  細胞受到葡萄糖刺激而釋放胰島素的胞內代謝機制主要涉及在生理學葡萄糖濃度範圍存在下，細胞對於胞外葡萄糖濃度增加敏感而會增加對其攝取及氧化代謝並產生 ATP，ATP 產量繼而影響 ATP 依賴型鉀離子通道造成細胞膜電位改變而最終啟動胞內含胰島素之顆粒的釋放<sup>26</sup>。由於 HIT-T15 細胞株在活體外受葡萄糖刺激下產生胰島素時，胞內與胰島素釋放相關的代謝途徑與正常  $\beta$  細胞相同<sup>27</sup>，因而適用於本計畫之細胞實驗，觀察不同培養條件下葡萄糖利用率、ATP 含量及胰島素分泌量，以了解大蒜精油是否可透過影響  $\beta$  細胞對於葡萄糖的利用而影響細胞釋放胰島素。

#### 四、研究方法

##### (一) 大蒜精油製備及含硫成分分析

大蒜精油之製備如 Sheen et al. (1992)所述<sup>28</sup>。簡言之，將新鮮大蒜去皮破碎後立即利用蒸氣蒸餾技術收集其中揮發性精油衍生物；所收集的大蒜精油經分

析其中主要成份包括 38.6% diallyl disulfide(DADS), 30.8% diallyl trisulfide(DATS), 10.0% diallyl sulfide, diallyl sulfide (DAS), 及許多其他少量揮發性化合物。

## (二)HIT-T15 細胞株培養

HIT-T15 (代數=65)細胞株將購自新竹食工所菌種中心，並根據食品工業研究所菌種中心之建議並參考 Santerre et al. (1981)之方法進行<sup>27</sup>，細胞培養於 F-12K 培養液中，其中並含有 2 mM L-glutamine, 1.5 g/L sodium bicarbonate, 87.5%；經透析移除葡萄糖之馬血清 10%，FBS 2.5%及抗生素(100U/ml penicillin G與 100U/ml streptomycin)。細胞將培養於 T75 flask 並放置於 37°C 含 5% CO<sub>2</sub>之 37°C 二氧化碳培養箱中。實驗所用細胞繼代數將維持在 65+5 至 65+9 代間。將細胞在其上述培養液中培養 24h 後移除之，並以不含 glucose 之培養基沖洗細胞，然後置換成各種實驗條件(不同糖濃度及 GO/DATS 濃度)的培養基並繼續培養 24h 然後進行觀察。

## (三) 細胞存活率與 apoptosis

細胞存活率係利用 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide) assay kit 進行。Apoptosis 之快速偵測係利用 Roch 之 Cell Death ELISA<sup>PLUS</sup> 分析套組進行。

## (四) 細胞氧化壓力測定

脂質過氧化根據 Fraga 等人的方法測定 thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)<sup>29</sup>；由於脂質過氧化會產生 malondialdehyde (MDA)，MDA 在酸性環境可與二分子 thiobarbituric acid(TBA)產生縮合反應而生成 TBA chromagen，此為粉紅色物質在波長 515 nm 激發光作用下可於 555nm 測得螢光反應。另根據 Griffith (1980)所述方式<sup>30</sup>，利用酵素性還原(recycling)反應的方法，利用 glutathione reductase 於定量 GSH。細胞之 SOD, GRx 與 GR 活性分別利用商業分析套組根據製造商所述方法以上述 micro-plate reader 分析。

## (五)Glucose uptake 活性測定

利用 3-O-methyl-[U<sup>14</sup>C]-glucose 可被 glucose transporter uptake 但不会被磷酸化並進一步成為其他產物溢出細胞的特性，可 trace 細胞 uptake 葡萄糖的 apparent initial rate。本 glucose uptake rate 之測定係採用我們過去進行 L-arginine transport rate 之方法經修改後進行(黃國峰, 1998)<sup>31</sup>。簡言之，將細胞樣品 (2x10<sup>6</sup>/200 μl KRB) 於微量離心管中與以 3-O-methyl-[U<sup>14</sup>C]-glucose 標記之 glucose 0-100 mM 一起在 37°C 水浴中下培養 1 min。然後將取出細胞懸浮液鋪於含 silicone oil-layer 之離心管(1.5 mL 離心管中，底層加入 40 μl 20%蔗糖溶液，並於其上鋪一層 400 μl silicone oil 混合液)，經離心後，細胞沉澱於最下層而含有未被細胞攝取之 3-O-methyl-[U<sup>14</sup>C]-glucose 之培養液浮在上層，此時將離心管投入液態氮中冷凍，然後切下含有細胞沉澱物之管尖，以 0.1 N NaOH 溶胞後以 gamma counter 測其放射量，並以分析原液中每單位莫耳數 glucose 所相當之放射量，換算 glucose uptake rate，並以雙倒數圖計算 Km 與 Vmax。

## (六)轉錄因子 PDX-1 表現及 location 分析

由於 PDX-1 係胰島素轉錄因子，其表現量及在細胞核中的分布量與胰島素分泌能力有關，故本研究根據 Kawamori et al. (2003)之方法<sup>32</sup>，製備細胞核，

胞漿及全細胞萃取物，以 western blot 測定 PDX-1total 表現量及在細胞核與胞漿中分部的情形。

### (七)ATP 含量測定

細胞 ATP 含量之分析係以 0.1 N NaOH/0.5 mM EDTA 萃取細胞( $2 \times 10^6$  /30  $\mu$ l) 並在 60°C 放置 20 min。立即分析細胞萃取物或儲存於 -20°C。去的研究報告顯示在此條件下可穩定保存樣品中 ATP 含量長達 1 年<sup>33</sup>。ATP 含量之分析係以 luciferase 催化 ATP-依賴性 luciferin 氧化反應偶合之螢光反應商業分析套組，依生產商說明書進行。

### (八)統計分析

各組分析所得數據以平均值加減一個正副標準差(mean $\pm$ SD)表示，統計利用 SPSS 系統分析。相同糖濃度組及相同大蒜組間差異先以 one-way analysis of variance (ANOVA)分析(P<0.05)，再以 Tukey' s test 作事後檢定。不同糖濃度及不同大蒜組間差異則以 two-way analysis of variance (ANOVA)分析(P<0.05)。

## 五、結果與討論

### (一)在正常培養基中 GO 及 DATS 對於 HIT-T15 細胞之影響

為了瞭解在正常培養基中大蒜精油及其有機含硫成分 DATS 對於 HIT-T15 細胞的影響，本研究添加不同濃度之大蒜精油(0-100  $\mu$ g/ml)及 DATS (0-0.5 mM) 於細胞培養基中觀察其對於細胞之存活率及胰島素分泌量之影響，並且測定細胞 ATP 含量及葡萄糖運輸活性以釐清這些大蒜成分是否在 GSIS 機制中扮演一個調節的角色。

#### I、細胞存活率

將細胞在不同濃度 GO 及 DATS 存在下於正常培養基中(含 5.5 mM glucose) 培養 24 小時，以 MTT 試驗所得之結果示於圖一。由結果得知，當 GO 濃度增加至 10  $\mu$ g/ml 並不影響細胞存活率，但 GO 濃度由 50  $\mu$ g/ml 增加至 100  $\mu$ g/ml 細胞存活率呈劑量依賴性下降；DATS 組在 DATS 濃度達 0.01 mM 時未影響細胞存活率，但之後隨 DATS 濃度增加細胞存活率顯著遞減。故本研究以未影響細胞存活率之大蒜成分濃度範圍進行後續胰島  $\beta$  細胞功能之觀察。

#### II、細胞胰島素分泌量

將細胞培養於含 GO 或 DATS 之正常培養基濃度下 24 小時，清洗細胞後，以 5.5 mM 葡萄糖濃度刺激一小時，觀察細胞之胰島素分泌能力，結果示於圖二。由結果可知，細胞在正常培養基中，GO 濃度 1、10  $\mu$ g/ml 下與未添加大蒜成份者相較顯著增加細胞胰島素分泌量，且分泌量與先前 24 小時培養中添加濃度 10 mM glibenclamide 效果相當；DATS 在濃度為 0.001-0.01 mM 範圍內些微增加胰島素分泌量，且當 DATS 濃度達 0.01 mM 時與載劑處理組相較達統計學意義，但是其增加胰島素分泌的程度不如 GO。由以上結果可知，細胞在正常培養基中添加 GO 可促進其後細胞在基礎葡萄糖濃度下之胰島素分泌量，且 GO 促胰島素分泌作用有部分係透過其中所含的 DATS 達成。此結果相似於過去其他學者之發現<sup>34</sup>，將大蒜含硫成份 SACS 用於由正常大鼠取得之胰臟  $\beta$  細胞，顯示可增加細胞胰島素之分泌達類似 glibenclamide 之作用。

### III、細胞 ATP 含量

先前研究已知葡萄糖進入胞內經過糖解作用產生 ATP，增加 ATP/ADP 比例，導致細胞膜去極化、增加鈣離子流入及胰島素顆粒分泌作用，在 GSIS 過程中扮演重要角色<sup>26</sup>。因而本研究進一步測定胞內 ATP 含量，在細胞於正常培養基下培養 24 小時，觀察 GO 及 DATS 對於細胞 ATP 含量之影響，結果示於圖三；由結果可知，GO 與 DATS 均可劑量依賴性促進細胞 ATP 含量，此結果與其增加胰島素分泌量之結果一致。Uncoupling protein-2 (UCP-2) 蛋白位於細胞粒線體內膜，主要可去耦合粒線體磷酸化作用，使胞內能量轉為熱能散失，且減少胞內 ATP 合成，且過去研究已發現 UCP-2 蛋白過度表現會透過減少 ATP 合成來抑制 GSIS<sup>35</sup>，而 GO 與 DATS 促進 ATP 含量之機制是否透過抑制 UCP-2 蛋白表現有待未來進一步釐清。此外，細胞 ATP 含量的增加也可能與細胞增加對於葡萄糖利用有關，故本研究進一步觀察細胞葡萄糖運輸動力學。

### IV、細胞葡萄糖運輸動力學

由於細胞 ATP 含量增加可能與增加之葡萄糖 uptake 速率有關，因此本研究亦觀察了細胞於含有 GO 或 DATS 之正常培養基下培養 24 小時後之葡萄糖運輸速率，並將細胞在葡萄糖濃度 0-10 mM 範圍下所測得之葡萄糖運輸速率數據，利用 Lineweaver-Burk (double-reciprocal) 作圖法(圖四)求得運輸速率常數 Km 及最大運輸速率 Vmax 值，結果示於表一。HIT-T15 細胞葡萄糖運輸速 Km 值為  $2.4499 \pm 0.93$  mM，Vmax 值為  $2.1164 \pm 0.18$  nmole/mg protein/min。此 Km 值為 2.44 mM，此與過去其他學者的研究利用 HIT-T15 細胞株觀測葡萄糖運輸系統，在葡萄糖濃度 0.5-20 mM 範圍所測得之細胞 Km 值相似<sup>36</sup>。

$\beta$  細胞膜上葡萄糖運輸蛋白主要為 GLUT2，調控了葡萄糖 uptake 作用，亦為 GSIS 作用第一步驟，之後才進行葡萄糖磷酸化等代謝作用<sup>37</sup>。當運輸系統之 Km 值改變表示可能改變運輸系統之親和力，包括改變其立體結構、改變細胞膜內外之電位差等，而運輸系統之 Vmax 值改變則代表細胞膜上之運輸器數量、運輸蛋白表現或整體運輸效能改變。本研究發現，細胞於正常培養基下與 GO 或 DATS 共同培養 24 小時後，細胞 Km 值在 GO 濃度 1、5、10  $\mu$ g/ml 與 DATS 0.001、0.01 mM 時顯著降低，且 Vmax 值在 GO 濃度 1、5、10  $\mu$ g/ml 顯著高於控制組，DATS 在任何濃度均不影響細胞葡萄糖運輸作用之 Vmax 值。由此結果可推論，GO 及其 DATS 可透過改善細胞對於葡萄糖 uptake 作用來提升細胞對葡萄糖之敏感性，增加胞內 ATP 含量進而促進細胞胰島素分泌作用。

#### (二)高葡萄糖糖濃度對於 HIT-T15 細胞之影響及 GO 與 DATS 之作用

為瞭解高糖對於 HIT-T15 細胞株功能的影響並釐清 GO 及 DATS 在高糖下的作用，本研究接著觀察含不同葡萄糖濃度(5.5、11.1、33.3 mM)之培養液，對細胞存活率、胰島素分泌、ATP 含量及葡萄糖運輸速率之影響及 GO 與 DATS 之作用。

#### I、細胞存活率

在無大蒜精油成分存在下，將細胞培養在含不同葡萄糖濃度(5.5、11.1、33.3 mM)之培養液中 24 小時後，觀察這些糖濃度對細胞存活率之影響，結果發現隨著葡萄糖濃度增加，細胞存活率些微上升但並無統計意義(表二)，且細胞並未因高葡萄糖濃度而發生凋亡現象(data not shown)。過去其他學者的研究，利用胰臟  $\beta$  細胞株 MIN-6N8 培養於不同葡萄糖濃度(5.5、16、33、45 mM)中

4 天，發現當葡萄糖濃度為 33.3 及 45 mM 時細胞出現 DNA 斷裂現象，而培養於濃度 33.3 mM 之細胞在第二天才開始出現 DNA 斷裂現象，隨著培養時間越久，細胞凋亡程度呈現時間依賴性<sup>38,39</sup>。本研究未發現細胞存活率或 DNA 斷裂受到高糖影響，且細胞未因而發生凋亡現象，可能在高糖下培養 24 小時尚未足以造成上述影響。此外，在葡萄糖濃度 5.5-33.3 mM 培養條件下，GO 與 DATS 未顯著影響細胞存活率。且在 two-way ANOVA 分析中，大蒜精油及其有機含硫成份與葡萄糖間對於細胞存活率並沒有交互作用(表二)。

## II、細胞胰島素分泌量

將細胞在上述不同糖濃度下培養 24 小時後之細胞，進一步觀察其面對基礎血糖 (5.5 mM glucose) 或高糖 (11.1 mM glucose) 刺激下胰島素分泌狀況，結果示於圖五。由結果可發現，細胞分泌胰島素之葡萄糖反應不論是在基礎血糖或高血糖濃度之刺激下均顯著受到先前培養在高葡萄糖濃度下之影響，而會顯著減少胰島素之分泌量。此結果顯示即使在不影響細胞存活率之高糖培養條件下，細胞胰島素分泌功能仍會受損，與血糖控制不良之糖尿病患者所見之 $\beta$ 細胞功能衰退現象一致。

在不影響細胞存活率之情況下，GO 與 DATS 均呈劑量依賴性促進培養於高葡萄糖濃度下之細胞胰島素分泌量。Two-way ANOVA 分析顯示，GO 有顯著增加胰島素分泌作用，而葡萄糖則是顯著抑制胰島素分泌，且兩者間有顯著交互作用 ( $p < 0.01$ )，GO 具有回復胰島素分泌功能之作用，而 DATS 與葡萄糖間則無顯著交互作用(表三)。

## III、細胞 ATP 含量

觀察細胞在含不同葡萄糖濃度 (5.5、11.1、33.3 mM) 之培養基中 24 小時後，對細胞 ATP 含量之影響，發現先前培養於葡萄糖濃度 11.1 或 33.3 mM 之細胞 ATP 含量僅略低於先前培養於 glucose 濃度 5.5 mM 之細胞(表四)。而培養在含葡萄糖濃度 5.5 mM 培養基之細胞，於添加 GO 濃度 5、10  $\mu\text{g/ml}$  時，細胞 ATP 含量顯著高於未添加 GO 者；培養在含葡萄糖濃度 11.1 mM 培養基之細胞則隨著所添加 GO 濃度增加，細胞 ATP 含量越高；培養在含葡萄糖濃度 33.3 mM 培養基之細胞 GO 1  $\mu\text{g/ml}$  及 DATS 0.01 mM 存在之細胞 ATP 含量顯著增加(表四)。Two-way ANOVA 分析顯示，GO 處理有促進細胞 ATP 含量效果 ( $p < 0.05$ )，但 GO 與葡萄糖之間並無交互作用。

過去研究發現，高葡萄糖濃度下細胞 ATP 含量降低伴隨胰島素分泌減少、胰島素 mRNA 表現減少、 $\beta$  細胞增生反應喪失等作用<sup>38,40,41</sup>，本實驗結果在不影響細胞增生的條件下亦觀察到高葡萄糖濃度可減少 ATP 產生及胰島素分泌作用。過去的學者發現培養於高葡萄糖濃度 (16.7 mM) 之細胞，其 UCP-2 蛋白表現量顯著增加<sup>42</sup>，因而可解釋本研究在高糖所致之 ATP 含量下降之結果。此外，由於高糖濃度下亦造成 $\beta$ 細胞葡萄糖運輸蛋白 GLUT2 表現下降<sup>38</sup>，因而高糖所致之細胞 ATP 含量下降亦可能是由於葡萄糖運輸動力學受到高糖改變所致，故本研究進一步觀察高糖對於細胞葡萄糖運輸動力學之影響。

## IV、細胞葡萄糖運輸動力學

將細胞在含不同葡萄糖濃度 (5.5、11.1、33.3 mM) 之培養基中培養 24 小時後之葡萄糖運輸速率以 Lineweaver-Burk (double-reciprocal) 作圖法求得  $K_m$  及  $V_{max}$  值，結果示於表五。結果發現，隨著葡萄糖濃度增加，細胞  $K_m$  及  $V_{max}$

值均呈劑量依賴性下降。可能由於預先培養於高葡萄糖濃度 (11.1、33.3 mM) 細胞葡萄糖運輸蛋白量降低(反映於降低之  $V_{max}$  值),而使細胞代償性增加其對於葡萄糖親和力。在 GO 濃度 10  $\mu\text{g/ml}$  時細胞葡萄糖運輸蛋白之  $K_m$  值顯著下降,  $V_{max}$  值有顯著增加; DATS 濃度 0.001 時細胞葡萄糖運輸蛋白  $K_m$  些微下降,而  $V_{max}$  值在 DATS 濃度 0.001-0.001 mM 時均有顯著增加(表六)。

此結果顯示,高葡萄糖所致之細胞 ATP 含量及胰島素分泌量顯著下降,至少有部分可透過影響葡萄糖利用的機制造成,然而也不能排除高糖對於胰島素表現的影響而影響細胞胰島素分泌功能的可能性。而 GO 與 DATS 可逆轉高葡萄糖之作用;高糖對於細胞表現胰島素之影響及 GO 與 DATS 在細胞胰島素表現之作用有待進一步釐清。

#### V、脂質過氧化程度及抗氧化系統活性

已知糖尿病會在實驗動物降低胰臟內抗氧化酵素的活性,如:SOD、GPx、GR 和 catalase,及降低非酵素性抗氧化物質--glutathione 含量,並且會增加脂質過氧化程度<sup>43,44</sup>,本研究收集培養於不同葡萄糖濃度且有或無添加 GO 的培養基中培養 24 小時之細胞,分析其脂質過氧化程度、總 GSH 含量、SOD、GPx 與 GR 之活性,結果顯示於表七。本研究發現,高糖顯著增加細胞脂質過氧化程度並顯著降低細胞 SOD 活性影響,但是不影響總 GSH 含量或 GPx 與 GR 之活性。有學者指出 GSH 含量下降主要是因為脂質過氧化作用增加<sup>45</sup>,而若給予抗氧化劑則可能會因抑制脂質過氧化而回復 GSH 量進而達到保護作用<sup>46</sup>,而本研究結果發現高葡萄糖濃度在 $\beta$ 細胞雖然增加脂質過氧化程度,卻並不顯著改變其總 GSH 含量,相似的結果也呈現在 GR 與 GPx 活性上,即高糖並不影響此二酵素活性,推究其原因,有可能因為 $\beta$ 細胞原本就不表現高量的抗氧化酵素,因而缺乏此種保護性。相似地,因為 $\beta$ 細胞原本就不表現高量 SOD,這可解釋本研究雖然發現高糖下添加 GO 可增加細胞 SOD 活性,但是細胞脂質過氧化程度並未因而獲得改善。由此結果推測 GO 對於 $\beta$ 細胞直接抗氧化保護力不高,但是不能排除活體中 GO 在週邊的抗氧化保護力,對於降低 $\beta$ 細胞因糖尿病所致之氧化傷害所提供的益處。

過去有學者報導 SACS 在 alloxan 誘發之糖尿病大鼠具有促胰島素分泌之效果<sup>34</sup>;而每天餵食 STZ 誘發之糖尿病大鼠大蒜水萃物 (100 mg/kg) 亦可增加大鼠血漿胰島素含量<sup>47</sup>。我們研究室先前之 *in vivo* 實驗結果發現,大蒜精油在 STZ 誘發之糖尿病大鼠模式下,具有改善葡萄糖耐受性效果,且大蒜精油處理組其週邊血胰島素含量顯著高於載劑對照組,且其中 DATS 為其主要作用因子<sup>24</sup>,本實驗結果則發現,不論在正常或高葡萄糖濃度下,GO 與 DATS 均具有促胰島素分泌之作用。雖然本研究並未發現 GO 的抗氧化作用與其促胰島素分泌功能之關聯,但是卻提出了 GO 與 DATS 可能藉由增加細胞的葡萄糖利用率及增加胞內 ATP 含量而促進 $\beta$ 細胞之 GSIS。未來可進一步觀察 24 小時內大蒜精油成份在高糖作用下對於胰島素蛋白、葡萄糖運輸蛋白、UCP-2 蛋白之表現及相關轉錄因子如 PDX-1 之表現,釐清 GO 促胰島素分泌之其他機制。

#### 六、結論與建議

根據以上的結果,本研究所獲得的初步結論如下:

- (1) 在正常及高血糖濃度下 GO 可增加 HIT-T15 細胞之胰島素分泌能力;

- (2) 正常及高血糖濃度下 GO 增加 HIT-T15 細胞胰島素分泌能力的作用與胞內 ATP 含量的增加有關；
- (3) 正常及高血糖濃度下 GO 促進之 ATP 含量增加與其促進細胞葡萄糖運輸蛋白對於葡萄糖之親合力有關；
- (4) 高血糖增加 HIT-T15 細胞之脂質過氧化程度伴隨降低之 SOD 活性，並導致細胞胰島素分泌能力降低及細胞 ATP 含量之減少及葡萄糖運輸蛋白動力學之改變；
- (5) 高血糖濃度下 GO 促進之胰島素分泌能力與其抗氧化活性無關；
- (6) GO 增加 HIT-T15 細胞胰島素分泌之能力有部分來自於其中所含之 DATS。

根據本研究結果，本計畫主持人對於 GO 對於 $\beta$ 細胞作用未來研究方向的建議如下：

- (1) 胰島素分泌量的改變除了涉及細胞的分泌調控機制，亦會與細胞合成胰島素的調控有關，本研究的結果並無法釐清 GO 對於胰島素合成的影響，未來可進一步觀察
- (2)  $\beta$ 細胞 ATP 含量的改變除了涉及葡萄糖代謝外，尚與 UCP-2 蛋白之表現有關，未來需進一步釐清 GO 增加胞內 ATP 含量的主要機制為何
- (3) 由於 HIT-T15 細胞株的 glucokinase 為 constitutively expressed，故在本研究中並未發現其表現受到高糖濃度之影響，此觀察須以轉殖人類 glucokinase 基因之細胞進行，建立此研究模式為未來努力的方向之一
- (4) 高糖下 GO 對於葡萄糖運輸蛋白及相關轉錄因子如 PDX-1 之表現的影響尚待進一步釐清。
- (5) 由於糖尿病造成的 $\beta$ 細胞損害亦可來自於細胞長時間暴露於高血糖所致之糖化作用，其對細胞之毒性機制有部分與急性高血糖所致的毒性不同，故未來應進一步建立長時間葡萄糖毒性對於 $\beta$ 細胞功能影響的研究模式，以幫助了解 GO 對於長期糖尿病患 $\beta$ 細胞功能之影響。

## 七、計畫成果自評

過去我們的研究報告提出大蒜精油在糖尿病動物具有增加血中胰島素濃度的作用，其他學者則指出大蒜中的含硫成分可增加血中胰島素含量。然而除了有學者提出其中的含硫成分可增加胰島素半生期之外，並無研究觀察大蒜精油成分之促胰島素分泌作用，且目前並無科學上的證據加以證實大蒜增加胰島素半生期的確實機制。本研究結果的重要性係指出不論在正常或急性高糖下，GO 均可透過調控 $\beta$ 細胞的葡萄糖及能量代謝而促進其胰島素釋放，這反映出 GO 促進胰島素分泌的作用可能隨血糖的增加而增加，因而在空腹下致低血糖的危險性相對降低。本研究之結果足堪彌補先前我們在 STZ-DM 研究模式下，由於胰島 $\beta$ 細胞 mass 明顯萎縮，而無法由該模式明確闡述 GO 胰內作用的缺失，研究結果目前正撰寫成科學論文並將投稿至與天然植物藥理學作用相關之科學期刊。本研究的計畫達成率約在 95%，主要缺失係在研究後期，因培養細胞的環境遭到污染，尚未完成 PDX-1 觀察，目前正進行中，此外，因為此細胞株之 glucokinase 活性為 constitutive，非為誘發型，這可以解釋高葡萄糖濃度培養條件下，未發現細胞 glucokinase 表現量與正常葡萄糖濃度下之差異性。若欲

以此株細胞進行 *glukinase* 表現量的觀察，未來必須對該株細胞進行 *human glucokinase* 基因轉植，使本研究臻於完善。此項技術目前正商請大葉大學生科系李泰林博士之協助。

### 參考文獻

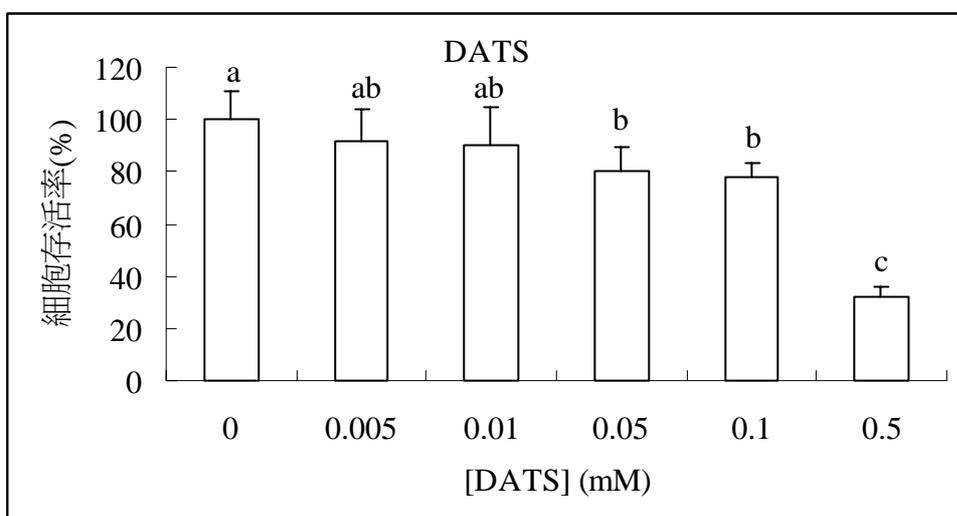
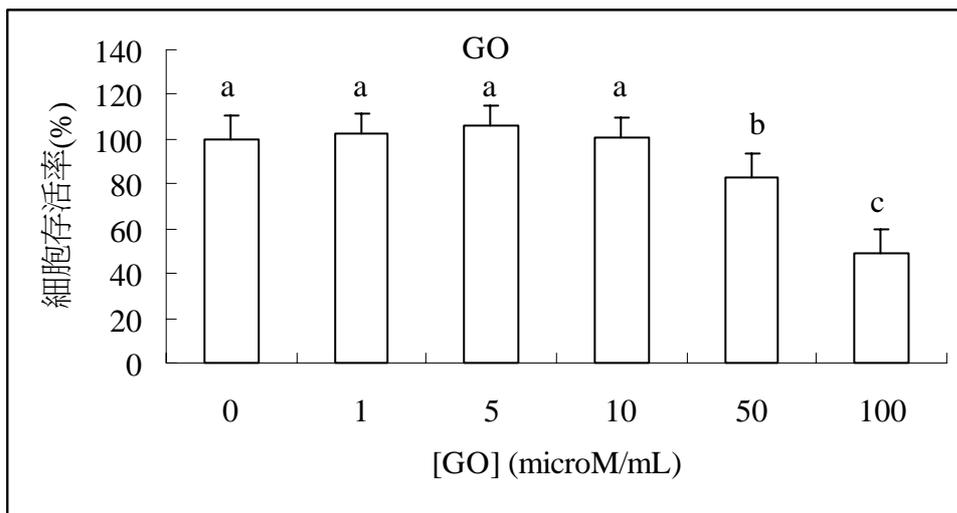
1. Ceriello A. 1997. Acute hyperglycaemia and oxidative stress generation. *Diabet Med.* 14, S45-S49.
2. Tsai EC, Hirsch IB and Brunzell JD. 1994. Lower plasma peroxy radical trapping capacity and higher susceptibility of LDL to oxidation in poorly controlled IDDM. *Diabetes* 43, 1010-1014.
3. Ceriello A, Bortolotti N and Falletti E. 1997. Total radical-trapping antioxidant parameter in non-insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Care* 20, 194-197.
4. Ceriello A, Bortolotti N and Crescentini A. 1998. Antioxidant defences are reduced during the oral glucose tolerance test in normal and non-insulin-dependent diabetic subjects. *Eur J Clin Invest* 28,329-333.
5. Catherwood MA, Powell LA, Anderson P, McMaster D, Sharpe PC and Trimble ER. 2002. Glucose-induced oxidative stress in mesangial cells. *Kidney Int.* 61, 599-608.
6. Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC and Delattre J. 2000. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab.* 26, 163-176.
7. Ceriello A. 2000. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism* 49, 27-29.
8. Bonnefont-Rousselot D. 2002. Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5, 561-568.
9. Maedler K, P. Sergeev F, Ris J, Oberholzer HI, et al. 2002. Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest* 110:851-60.
10. Kajimoto Y, Matsuoka T, Kaneto H, et al. 1999. Induction of glycation suppresses *glucokinase* gene expression in HIT-T15 cells. *Diabetologia* 42:1417-24.
11. Grankvist K, Marklund SL and Taljedal IB. 1981. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J* 199, 393-398.
12. Tanaka Y, Tran PO, Harmon J and Robertson RP. 2002. A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic  $\beta$ -cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 12363-12368.
13. Rasilainen S, Nieminen JM, Levonen A-L, Otonkoski T and Lapatto R. 2002. Dose-dependent cysteine-mediated protection of insulin-producing cells from damage by hydrogen peroxide. *Biochem Pharmacol* 63,1297-1304.
14. Tiedge M, Richter T and Lenzen S. 2000. Importance of cysteine residues for the

- stability and catalytic activity of human pancreatic beta cell glucokinase. *Arch Biochem Biophys* 375,251-260.
15. Maritim AC, Sanders RA and Watkins JB 3rd. 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Molecul Toxicol* 17, 24-38.
  16. McDaniel ML, Kwon G, Hill JR, Marshall CA and Corbett JA. 1996. Cytokines and nitric oxide in islet inflammation and diabetes. *Proc Soc Exp Biol Med* 211, 24-32.
  17. Mathew PT and Augusti KT. 1973. Studies on the effect of allicin (Diallyl Disulphide-oxide) on alloxan diabetes: Part I-Hypoglycaemic action & enhancement of serum insulin effect & glycogen synthesis. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 10, 209-212.
  18. Ryan EA, Pick ME and Marceau C. 2001. Use of alternative medicines in diabetes mellitus. *Diabetic med* 18, 242-245. (4)
  19. Cicero AF, Derosa G, Gaddi A. 2004 What do herbalists suggest to diabetic patients in order to improve glycemic control? Evaluation of scientific evidence and potential risks. *Acta Diabetol.* 41, 91-98.
  20. Phelps S and Harris WS. 1993. Garlic supplementation and lipoprotein oxidation susceptibility. *Lipids* 28, 475-477.
  21. Banerjee SK, Maulik M, Mancahanda SC, Dinda AK, Gupta SK and Maulik SK. 2002. Dose-dependent induction of endogenous antioxidants in rat heart by chronic administration of garlic. *Life Sci* 70, 1509-1518.
  22. Keiss HP, Dirsch VM, Hartung T, Haffner T, Trueman L, Auger J, Kahane R and Vollmar AM. 2003. Garlic (*Allium sativum* L.) modulates cytokine expression in lipopolysaccharide-activated human blood thereby inhibiting NF-kappaB activity. *J Nutr* 133, 2171-2175.
  23. Anwar MM and Meki A-R. 2003. Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. *Comp. Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 135, 539-547.
  24. Liu CT, Hse H, Lii CK, Chen PS, Sheen LY. 2005. Effects of garlic oil and diallyl trisulfide on glycemic control in diabetic rats. *European Journal of Pharmacology* 516, 165-173.
  25. Liu CT, Wong PL, Lii CK, Hse H, Sheen LY. 2005. Antidiabetic effect of garlic oil but not diallyl disulfide in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Food and Chemical Toxicology* 44,1377-1384.
  26. Tarasov A, Dusonchet J and Ashcroft F. 2004. Metabolic regulation of the pancreatic beta-cell ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel: a pas de deux. *Diabetes* 53 Suppl 3:S113-22.
  27. Santerre RF, Cook RA, Crisel RMD, et al. 1981. Insulin synthesis in a clonal cell line of simian virus 40-transformed hamster pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 4339-4346. (Santerre et al., 1981)
  28. Sheen LY, Lin SY and Tsai SJ. 1992. Odor Assessments for volatile compounds of garlic and ginger essential oils by sniffing method of gas chromatography. *J*

- Chinese Agric Chem Soc. 30,14.
29. Fraga CG, Leibovitz BE and Tappel AL. 1988. Lipid peroxidation measured as thiobarbituric acid-reactive substances in tissue slices: characterization and comparison with homogenates and microsomes. *Free Rad Biol Med* 4, 155-160.
  30. Griffith OW. 1980. Determination of glutthione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Ana Biochem* 106, 207-214.
  31. 黃國峰. 1998. 白芍對免疫功能之影響. 中山醫學大學營養科學研究所碩士論文.
  32. Kawamori D, Kajimoto Y, Kaneto H, et al. 2003. Oxidative stress induces nucleocytoplasmic translocation of pancreatic transcription factor FDX-1 through activation of c-Jun NH2-terminal kinase. *Diabetes* 52, 2896-2904.
  33. Ronner P, Friel E, Czerniawski K and Frankle S. 1999. Luminometric assays of ATP, phosphocreatine, and creatine for estimation of free ADP and free AMP. *Anal Biochem* 275, 208-216.
  34. Augusti KT and Sheela CG. 1996. Antiperoxide effect of S-allyl cysteine sulfoxide, an insulin secretagogue, in diabetic rats. *Experientia* 52, 115-120.
  35. Chan CB, De Leo D, Joseph JW, et al. 2001. Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes* 50:1302-10.
  36. Ashcroft SJ and Stubbs M. 1987. The glucose sensor in HIT cells is the glucose transporter. *FEBS Lett* 219:311-5.
  37. Thorens B, Deriaz N, Bosco D, et al. 1996. Protein kinase A-dependent phosphorylation of GLUT2 in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 271:8075-81.
  38. Kim WH, Lee JW, Suh YH, et al. 2005. Exposure to chronic high glucose induces beta-cell apoptosis through decreased interaction of glucokinase with mitochondria: downregulation of glucokinase in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 54:2602-11.
  39. Kaneto H, Fujii J, Myint T, et al. 1996. Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreatic beta-cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. *Biochem J* 320 ( Pt 3):855-63
  40. Robertson RP, Zhang HJ, Pyzdrowski KL and Walseth TF. 1992. Preservation of insulin mRNA levels and insulin secretion in HIT cells by avoidance of chronic exposure to high glucose concentrations. *J Clin Invest* 90:320-5.
  41. Jonas JC, Sharma A, Hasenkamp W, et al. 1999. Chronic hyperglycemia triggers loss of pancreatic beta cell differentiation in an animal model of diabetes. *J Biol Chem* 274:14112-21.
  42. Patane, G, Anello M, Piro S, et al. 2002. Role of ATP production and uncoupling protein-2 in the insulin secretory defect induced by chronic exposure to high glucose or free fatty acids and effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibition. *Diabetes* 51:2749-56.
  43. Yazdanparast R, Ardestani A and Jamshidi S. 2007. Experimental diabetes treated with *Achillea santolina*: effect on pancreatic oxidative parameters. *J*

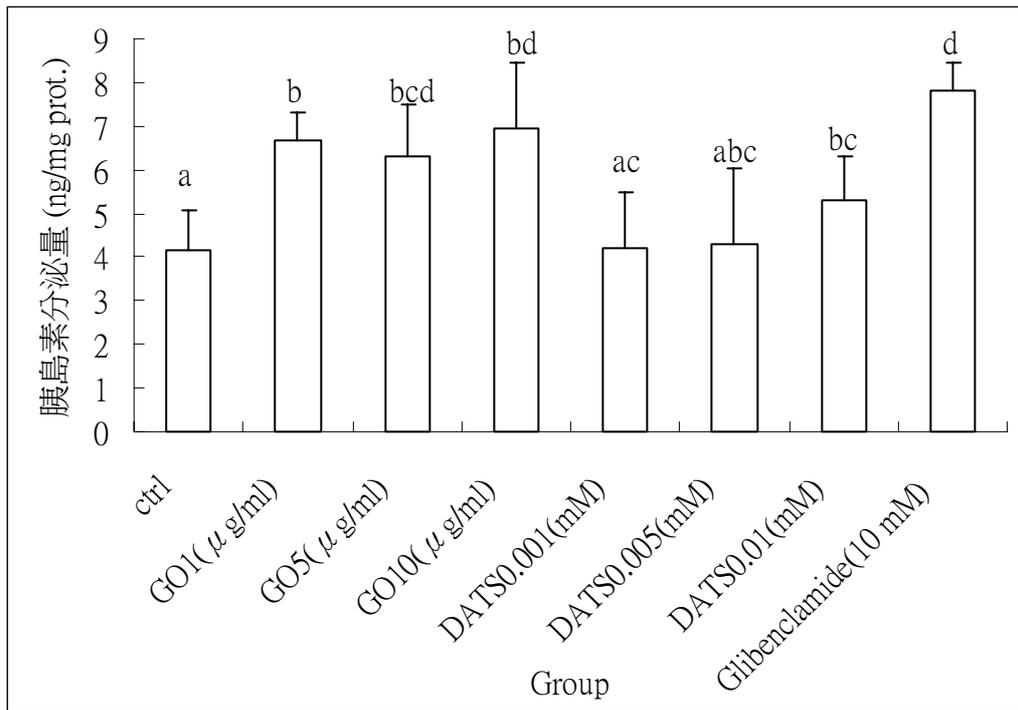
- Ethnopharmacol 112:13-18.
44. Anwer T, Sharma M, Pillai KK, et al. 2007. Protective effect of bezafibrate on streptozotocin-induced oxidative stress and toxicity in rats. *Toxicology* 229:165-172.
  45. Konukoglu D, Serin O, Kemerli DG, et al. 1998. A study on the carotid artery intima-media thickness and its association with lipid peroxidation. *Clin Chim Acta* 277:91-98.
  46. Chugh SN, Kakkar R, Kalra S and Sharma A. 1999. An evaluation of oxidative stress in diabetes mellitus during uncontrolled and controlled state and after vitamin E supplementation. *J Assoc Physicians India* 47: 380-383.
  47. Patumraj S, Tewit S, Amatyakul S, et al. 2000. Comparative effects of garlic and aspirin on diabetic cardiovascular complications. *Drug Deliv* 7:91-6.

## 附表與附圖



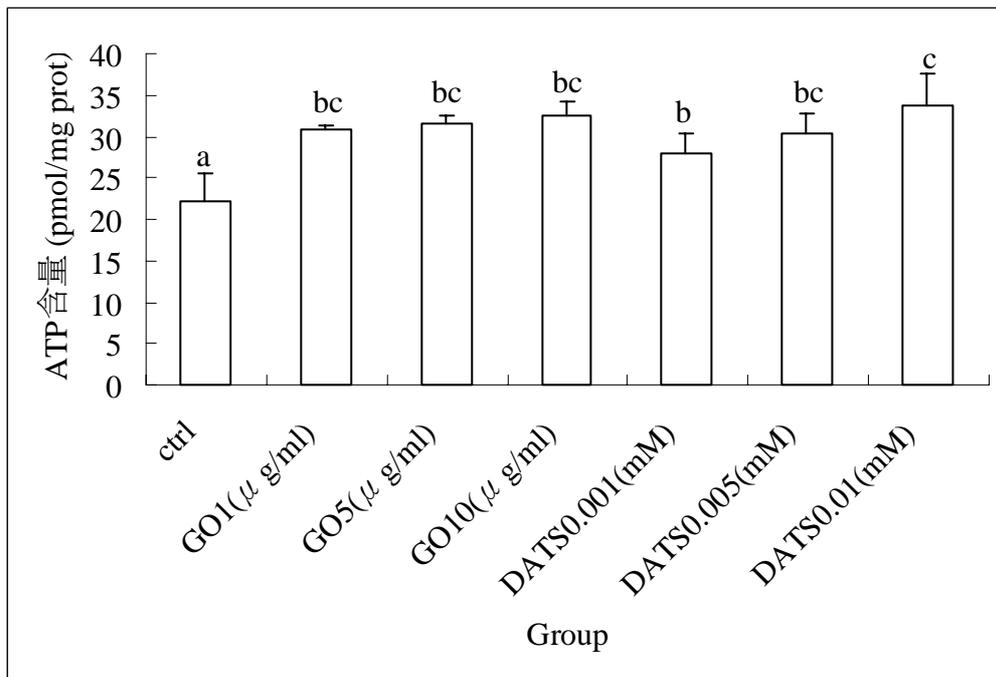
### 圖一、GO 及 DATS 對於 HIT-T15 細胞 MTT 之影響

以  $5 \times 10^4$  cells/well 細胞密度在正常培養基中添加不同大蒜成份培養 24 小時，然後利用 MTT 試驗觀察細胞存活率，結果以平均值 $\pm$ 標準差表示。濃度組間沒有相同 a、b、c 字母表示有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。



## 圖二、GO 及 DATS 對 HIT-T15 細胞之胰島素分泌量影響

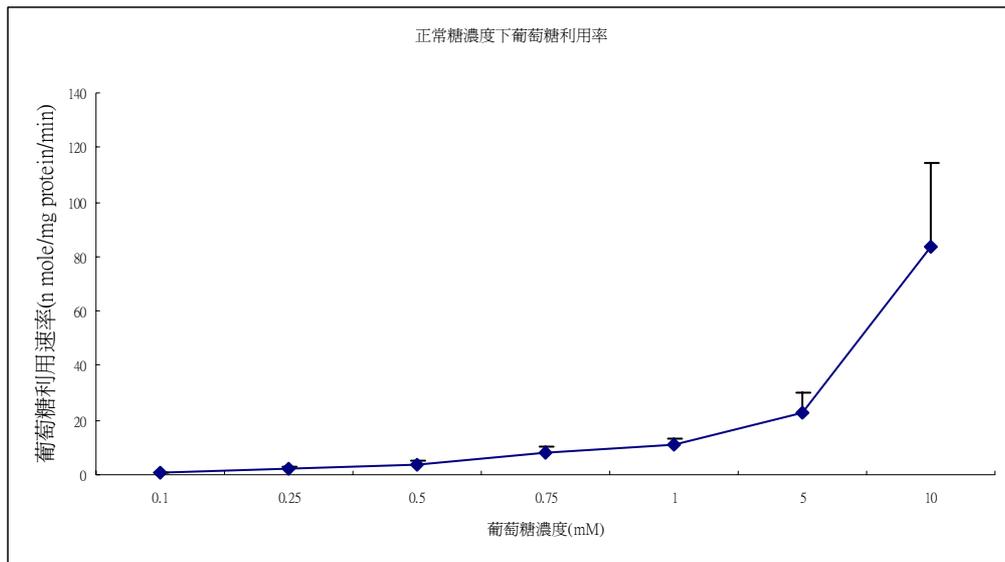
以  $5 \times 10^4$  cells/well 細胞密度在正常培養基中添加不同大蒜成份培養 24 小時後測定培養液中胰島素含量，結果以平均值 $\pm$ 標準差表示。濃度組間沒有相同 a、b、c、d 字母表示有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。



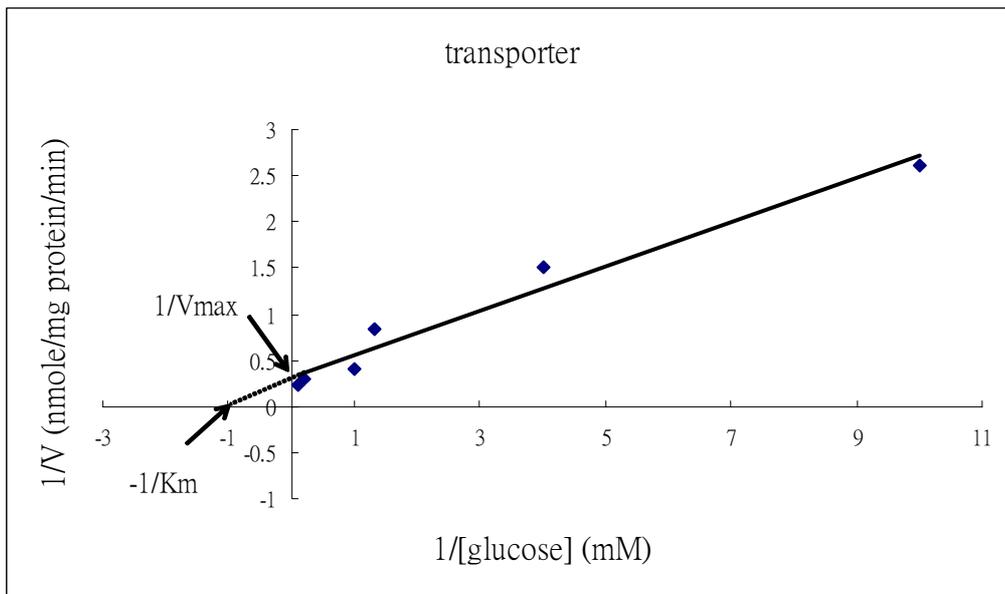
### 圖三、GO 及 DATS 對 HIT-T15 細胞之 ATP 含量影響

以  $1 \times 10^5$  cells/well 細胞密度在正常培養基中添加不同大蒜成份培養 24 小時後測定細胞中 ATP 含量，結果以平均值±標準差表示。濃度組間沒有相同 a、b、c 字母表示有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

(A)

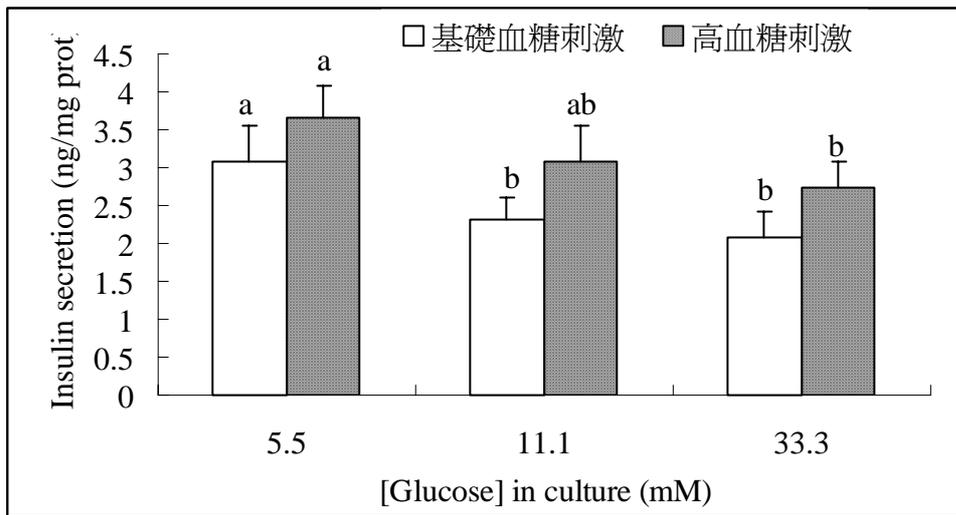


(B)



**圖四、正常糖濃度下 HIT-T15 細胞其葡萄糖運輸蛋白之葡萄糖運輸速率**

細胞於正常培養基中培養 24 小時後以 HBSS 清洗細胞後，觀察在葡萄糖濃度範圍 0.1-10 mM 時 HIT-T15 細胞之(A)葡萄糖運輸速率，結果以平均值±標準差表示，(B)利用 Lineweaver-Burk ( double-reciprocal ) 作圖法求得  $K_m$  及  $V_{max}$  值。



**圖五、不同糖濃度之培養條件對於葡萄糖刺激之 HIT-T15 細胞胰島素分泌量之影響**

以  $5 \times 10^4$  cells/well 細胞密度於含不同葡萄糖濃度(5.5、11.1、33.3 mM) 培養基中培養 24 小時後，以 HBSS 清洗細胞，給予基礎血糖( 5.5 mM glucose)或高血糖(11.1 mM glucose) 刺激 1 小時並測定細胞胰島素分泌量，結果以平均值 $\pm$ 標準差表示。相同刺激胰島素分泌之葡萄糖濃度組間沒有相同 a、b 字母表示有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

表一、GO 及 DATS 對培養於正常培養基之 HIT-T15 細胞其葡萄糖運輸器之 Km 與 Vmax 值之影響

Group	Glucose transport	
	Km (mM)	Vmax (nmol/mg prot/min)
Control	2.4499 ± 0.93 <sup>a</sup>	2.3164 ± 0.18 <sup>a</sup>
GO1 µg/ml	0.10038 ± 0.08 <sup>b</sup>	7.9239 ± 0.33 <sup>b</sup>
GO5 µg/ml	0.1795 ± 0.08 <sup>bc</sup>	7.189 ± 0.29 <sup>b</sup>
GO10 µg/ml	0.1568 ± 0.066 <sup>bc</sup>	4.284 ± 0.092 <sup>c</sup>
DATS 0.001 mM	1.88 ± 0.37 <sup>a</sup>	1.912 ± 0.13 <sup>a</sup>
DATS 0.005 mM	0.6476 ± 0.066 <sup>d</sup>	2.13 ± 0.012 <sup>a</sup>
DATS 0.01 mM	0.2924 ± 0.017 <sup>bcd</sup>	2.052 ± 0.049 <sup>a</sup>

細胞於正常培養基中添加不同大蒜成份培養 24 小時後，以 HBSS 清洗細胞，觀察在葡萄糖濃度範圍 0.1-10 mM 時 HIT-T15 細胞葡萄糖運輸速率，並利用 Lineweaver Burk 作圖法求得 Km 及 Vmax 值，結果以平均值±標準差表示，不同處理組間沒有 a、b、c、d 字母表示有顯著差異 (p<0.05)。

表二、GO 及 DATS 對於不同葡萄糖濃度下 HIT-T15 細胞存活率之影響

glucose	GO ( $\mu\text{g/ml}$ )	mean	SD	DATS (mM)	mean	SD
5.5	0	100 <sup>a</sup>	17.03	0	100 <sup>a</sup>	17.03
	1	118.85 <sup>b</sup>	17.17	0.001	118.94 <sup>ab</sup>	15.93
	5	123.87 <sup>b</sup>	9.36	0.005	117.43 <sup>ab</sup>	11.97
	10	120 <sup>b</sup>	18.98	0.01	113.54 <sup>ab</sup>	17.16
11.1	0	114.18	15.16	0	114.18	15.16
	1	110.49	17.35	0.001	110.84	18.19
	5	119.95	18.54	0.005	102.19	19.87
	10	111.37	10.2	0.01	103.63	18.04
33.3	0	111.52	19.13	0	111.52 <sup>a</sup>	19.13
	1	109.76	14.89	0.001	79.72 <sup>bc</sup>	14.15
	5	111.7	10.97	0.005	81.39 <sup>bc</sup>	14.59
	10	108.35	10.95	0.01	67.25 <sup>c</sup>	8.94
Two way ANOVA						
Glucose		NS				
GO		NS	DATS	NS		
Glucose	× GO	NS	Glucose	× DATS	NS	

以  $5 \times 10^4$  cells/well 細胞密度於不同葡萄糖濃度 (5.5、11.1、33.3 mM) 培養基中添加不同大蒜成份培養 24 小時後，利用 MTT 試驗觀察細胞存活率，結果以平均值±標準差表示。相同糖濃度組內不同大蒜濃度處理組間沒有相同 a、b、c 字母表示有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。不同糖濃度處理組與 GO 及 DATS 交互作用以 two way ANOVA 分析

表三、大蒜精油及其有機含硫成分在不同葡萄糖濃度下對 HIT-T15 細胞胰島素分泌量之影響

Glucose (mM)	GO (µg/ml)	Mean (ng insulin/ mg pt)	SD	DATS (mM)	Mean (ng insulin/ mg pt)	SD
5.5	0	3.1 <sup>a</sup>	0.65	0	3.1	0.65
	1	5.21 <sup>b</sup>	0.56	0.001	3.05	0.18
	5	4.71 <sup>b</sup>	1.11	0.005	3.27	0.65
	10	3.88 <sup>ab</sup>	0.32	0.01	3.55	0.13
11.1	0	2.08 <sup>a</sup>	0.33	0	2.08 <sup>a</sup>	0.33
	1	3.39 <sup>b</sup>	0.6	0.001	4.74 <sup>b</sup>	0.56
	5	3.95 <sup>b</sup>	0.56	0.005	3.99 <sup>b</sup>	0.42
	10	3.55 <sup>b</sup>	0.41	0.01	4.62 <sup>b</sup>	0.99
33.3	0	1.88 <sup>a</sup>	0.25	0	1.88 <sup>a</sup>	0.25
	1	4.89 <sup>b</sup>	0.65	0.001	3.92 <sup>b</sup>	0.81
	5	4.53 <sup>b</sup>	0.56	0.005	5.16 <sup>b</sup>	0.88
	10	5.56 <sup>b</sup>	0.4	0.01	4.55 <sup>b</sup>	1.12
Two way ANOVA						
Glucose		0.001				
GO		0.014		DATS		NS
Glucose × GO		0.001		Glucose × DATS		NS

以  $5 \times 10^4$  cells/well 細胞密度於不同葡萄糖濃度 (5.5、11.1、33.3 mM) 培養基中添加不同大蒜成份培養 24 小時後，以 HBSS 清洗細胞，給予基礎血糖 (5.5 mM, glucose) 刺激 1 小時並測定細胞胰島素分泌量，結果以平均值±標準差表示。相同糖濃度不同大蒜濃度處理組間沒有相同 a、b、c 字母表示有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。不同糖濃度處理組與 GO 及 DATS 交互作用以 two way ANOVA 分析。

表四、大蒜精油及其有機含硫成份在不同葡萄糖濃度下對 HIT-T15 細胞 ATP 含量之影響

Glucose (mM)	GO (µg/ml)	Mean (p mol/mg pt)	SD	DATS (mM)	Mean (p mol/mg pt)	SD
5.5	0	25.13 <sup>a</sup>	2.62	0	25.13 <sup>a</sup>	2.62
	1	28.35 <sup>a</sup>	1.64	0.001	27.96 <sup>b</sup>	0.37
	5	32.48 <sup>b</sup>	2.03	0.005	30.42 <sup>bc</sup>	1.81
	10	35.41 <sup>b</sup>	2.19	0.01	33.62 <sup>c</sup>	1.79
11.1	0	20.23 <sup>a</sup>	1.28	0	20.23	1.28
	1	31.29 <sup>bc</sup>	3.21	0.001	24.96	2.41
	5	27.38 <sup>b</sup>	1.17	0.005	24.46	5.93
	10	36.03 <sup>c</sup>	5.8	0.01	24.4	2.96
33.3	0	20.59 <sup>a</sup>	2.94	0	20.59 <sup>a</sup>	2.94
	1	31.15 <sup>b</sup>	3.75	0.001	17.63 <sup>a</sup>	2.6
	5	24.71 <sup>ac</sup>	3.27	0.005	23.16 <sup>ab</sup>	2.55
	10	28.23 <sup>bc</sup>	2.32	0.01	27.8 <sup>b</sup>	4.05

Two way ANOVA

Glucose NS

GO 0.038 DATS NS

Glucose × GO NS Glucose × DATS NS

以  $1 \times 10^5$  cells/ml 細胞密度於不同葡萄糖濃度 (5.5、11.1、33.3 mM) 培養基中培養 24 小時後測定細胞 ATP 含量，結果以平均值±標準差表示，相同糖濃度不同大蒜濃度處理組間沒有相同 a、b、c 字母表示有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

表五、培養於高糖濃度之 HIT-T15 細胞其葡萄糖運輸器之 Km 及 Vmax 值

Glucose transport		
	Km (mM)	Vmax (nmol/mg prot/min)
Glucose 5.5	2.467 ±0.080 <sup>a</sup>	2.893 ±0.081 <sup>a</sup>
Glucose 11.1	1.287 ±0.034 <sup>b</sup>	1.989 ±0.090 <sup>b</sup>
Glucose 33.3	1.317 ±0.050 <sup>b</sup>	1.366 ±0.074 <sup>c</sup>

細胞於不同葡萄糖濃度 (5.5、11.1、33.3 mM) 培養基中培養 24 小時後，以 HBSS 清洗細胞，觀察在葡萄糖濃度範圍 0.1-10 mM 時 HIT-T15 細胞葡萄糖運輸速率，並利用 Lineweaver Burk 作圖法求得 Km 及 Vmax 值，結果以平均值±標準差表示，組間沒有相同 a、b、c 字母表示有顯著差異(p<0.05)。

表六、添加 GO 及 DATS 對培養於高葡萄糖濃度(glucose 33.3 mM)之 HIT-T15 細胞其葡萄糖運輸器之 Km 及 Vmax 值之影響

	Glucose transporter	
	Km (mM)	Vmax (nmole/mg pt/min)
control	1.3172 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.366 ± 0.074 <sup>a</sup>
GO1 µg/ml	1.3948 ± 0.057 <sup>a</sup>	1.2977 ± 0.032 <sup>a</sup>
GO5 µg/ml	1.4743 ± 0.023 <sup>a</sup>	1.63 ± 0.041 <sup>b</sup>
GO 10 µg/ml	0.9676 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.8811 ± 0.078 <sup>c</sup>
DATS 0.001 mM	1.9849 ± 0.033 <sup>c</sup>	1.6737 ± 0.025 <sup>b</sup>
DATS 0.005 mM	1.533 ± 0.014 <sup>b</sup>	1.4568 ± 0.071 <sup>a</sup>
DATS 0.01 mM	1.1824 ± 0.042 <sup>a</sup>	1.7257 ± 0.054 <sup>d</sup>

細胞於葡萄糖濃度 33.3 mM 培養基中添加不同大蒜精油成份培養 24 小時後，以 HBSS 清洗細胞，觀察在葡萄糖濃度範圍 0.1-10 mM 時 HIT-T15 細胞葡萄糖運輸速率，並利用 Lineweaver-Burk 作圖法求得 Km 及 Vmax 值，結果以平均值±標準差表示，組間沒有相同 a、b、c、d、e 字母表示有顯著差異 (p<0.05)。

表七、添加 GO 對培養於高葡萄糖濃度之 HIT-T15 細胞脂質過氧化程度及抗氧化系統之影響

Glucose (mM)	GO ( $\mu\text{g/ml}$ )	TBARS (nmol/mg prot)	Total GSH (nmol/mg prot)	GPx (nmol NADPH/min/mg prot)	GR (nmol NADPH/min/mg prot)	SOD (U/mg prot)
5.5	0	0.342 $\pm$ 0.127 <sup>a</sup>	0.192 $\pm$ 0.075	142 $\pm$ 36	23.0 $\pm$ 9.6	0.0852 $\pm$ 0.0289 <sup>a</sup>
33.3	0	0.700 $\pm$ 0.275 <sup>b</sup>	0.230 $\pm$ 0.113	168 $\pm$ 42	31.6 $\pm$ 10.2	0.0324 $\pm$ 0.0150 <sup>b</sup>
	1	0.685 $\pm$ 0.326 <sup>b</sup>	0.227 $\pm$ 0.111	164 $\pm$ 57	31.5 $\pm$ 12.4	0.0425 $\pm$ 0.0212 <sup>c</sup>
	5	0.714 $\pm$ 0.237 <sup>b</sup>	0.235 $\pm$ 0.050	152 $\pm$ 66	27.6 $\pm$ 13.1	0.0542 $\pm$ 0.0103 <sup>ac</sup>
	10	0.856 $\pm$ 0.368 <sup>b</sup>	0.200 $\pm$ 0.036	180 $\pm$ 35	35.2 $\pm$ 12.8	0.0532 $\pm$ 0.0167 <sup>ac</sup>

細胞於葡萄糖濃度 5.5 mM 或 33.3 mM 且添加不同濃度 GO 之培養基中培養 24 小時後，收集細胞並進行各項分析，結果以平均值 $\pm$ 標準差表示，組間沒有相同 a、b、c 字母表示有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。