

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

大蒜精油在 streptozotocin 誘發之糖尿病大鼠降血糖機制
之探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2320-B-040-035-

執行期間：94年08月01日至95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：李宗貴、沈立言、王奕雯、譚雅萍

報告類型：精簡報告

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 95 年 10 月 31 日

中文摘要

急性慢性高血糖均可導致患者體內氧化壓力升高及促發炎細胞激素產生，繼而影響胰島素標的組織之胰島素敏感性及 β 細胞胰島素分泌功能，且甚至影響 β 細胞存活。由於過去已知大蒜在其他研究模式中具有抗氧化、抑制促發炎細胞激素及抑制 iNOS 表現之生物學活性。本研究推論，大蒜精油可透過這些機制達成其抗糖尿病的作用。本研究利用 STZ(65mg/kg)誘發之 DM 大鼠進行 *in vivo* 的研究模式驗證大蒜精油(GO)之抗糖尿病作用的劑量反應及此作用與 GO 改善氧化壓力或促發炎細胞激素及其中介物 NO 之產生之間的關聯。將糖尿病大鼠隔日胃灌 GO (10, 50 或 100 mg/kg bw)，或載劑玉米油三週而控制組大鼠則僅灌食玉米油。結果顯示 STZ-DM 造成胰島細胞損壞及週邊胰島素阻抗性且伴隨週邊循環與骨骼肌脂質過氧化程度之增加及系統之輕微發炎作用，而 GO 劑量依賴性增加基礎胰島素濃度並改善以 homeostasis model 分析及在 ITT 時 first order 血糖下降速率常數之胰島素阻抗性指數且改善口服葡萄糖耐受性，伴隨增加之血漿 GSH 含量，GR 活性及骨骼肌 GPx 活性，及降低之血漿及骨骼肌 TBARS 值，但不影響血漿中促發炎細胞激素含量。上述作用在 100 mg/kg GO 劑量下有統計意義 ($P < 0.05$)。組織化學及組織免疫學觀察發現，GO 在劑量 100 mg/kg 時增加 DM 大鼠之胰島 mass 及胰島 beta 細胞數目，且逆轉因 DM 所致之骨骼肌肝醣含量下降，且後者伴隨降低之 HNE 含量。根據本研究結果可知：大蒜精油改善 DM 口服葡萄糖耐受性，與增加之空腹胰島素分泌及週邊胰島素敏感性有關而這些作用至少有部分是透過 GO 的抗氧化作用達成。

關鍵字：大鼠 大蒜精油 抗氧化 骨骼肌 胰臟 streptozotcin

英文摘要

Both acute and chronic hyperglycemia have been reported to result in increased oxidative stress and the generation of proinflammatory cytokines in the body. Subsequently, these molecules affect the sensitivity of insulin target tissues to insulin and also affect the secretory function of β -cells and even affect the surviving of these cells. It has been demonstrated that garlic processes antioxidant effect and is able to inhibit the generation of proinflammatory cytokines and iNOS expression in certain experimental model. We proposed that garlic oil acts as hypoglycemic agent via these mechanisms. The present study used an STZ-induced DM model in rats to investigate dose-dependent anti-diabetic effect of garlic oil and its association with oxidative stress and proinflammatory cytokines production and the mediator. Diabetic rats received by gavage garlic oil (10, 50, 100 mg/kg body weight) or corn oil every other day for 3 weeks. Control rats received corn oil only. The STZ-DM showed damaged islet cell and increased insulin resistance in accompany with increased lipid peroxidation in peripheral circulation and skeletal muscle. The levels proinflammatory cytokines were also slightly increased. GO dose-dependently increased basal insulin level and improved insulin resistance index as assessed by

homeostasis model assessment and the first order rate constant for glucose disappearance and improved oral glucose tolerance. These effects of garlic oil were associated with increased plasma GSH level, GR activity in plasma and GPx activity in skeletal muscle in accompany with decreased TBARS in plasma and in skeletal muscle. Nevertheless, GO did not affect plasma level of proinflammatory cytokines. These effects of GO were significant at the dose of 100 mg/kg ($P<0.05$). Histochemical and histoimmunological study demonstrated that GO at dose of 100 mg/kg increased islet mass and islet beta numbers in DM rats and reverse decreased muscle glycogen level in DM. The latter effect was associated with decreased HNE content in the tissue. The results of the present study provide evidence that antidiabetic effect of garlic oil is at least partially via its antioxidative effect.

Keywords: rat; garlic oil; antioxidation; skeletal muscle; pancreas; streptozotcin

報告内容

一、前言

在 type 2 糖尿病患由於口服降血糖藥磺醯尿素類及雙胍類藥物未能有效控制血糖，且隨著患者疾病進行出現失效狀況，而均不能將血糖濃度降低至正常範圍，或回復正常血糖恆定型態。且這些藥物之使胰島素療法因為在 type 2 糖尿病患需使用 overvigorous 劑量治療，可能導致增加 atherogenesis 及 hypoglycemia 之風險¹，使得近年來許多抗糖尿病的傳統療法用於替代或補充療法重新引起注意。世界衛生組織糖尿病專家會議所列出的建議之一是“應該進一步觀察傳統之糖尿病療法”更刺激新一波對於傳統療法的研究²。在這些天然療法中，大蒜曾於挪威及中歐用做糖尿病醫療處方³。根據 Ryan 等人(2001)的報導，現今仍有三分之一的糖尿病患採用替代療法，其中大蒜是最常被使用的方法⁴。另一報導則顯示大蒜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⁵。然而關於大蒜降血糖作用的研究報告數量遠少於其在抗腫瘤及抗血管粥狀硬化方面者，且關於大蒜抗糖尿病作用機制之報導亦不多見。目前關於大蒜抗糖尿病作用的研究所獲得的結果並不一致，且由於不同研究採用各式各樣的大蒜製備物，因而研究結果之間無法做比較或相互討論，可能也是導致至今無法定論大蒜抗糖尿病作用及其機制的主因。我們過去曾觀察到大蒜精油(garlic oil; GO)在 STZ-DM 大鼠抗糖尿病作用^{6,7}，本研究欲進一步探討 GO 之降血糖作用機制。

二、研究目的

本計畫申請人在過去雖然已報導大蒜精油及其功能性成分之抗糖尿病作用及其與改善胰島素分泌及週邊胰島素阻抗性之間的關聯，但是進一步的機制有待釐清，且過去的研究尚缺乏大蒜精油劑量依賴性作用之證據，難免有所缺憾。本研究綜合其他學者所提出糖尿病進行機制與高血糖造成之氧化壓力及發炎作用之關係，及已知之大蒜精油生物學活性，本計畫申請人在本研究的目的是針對 GO 對於葡萄糖耐受性，週邊胰島素阻抗性及胰島素產生之影響與系統或局部氧化壓力及促發炎細胞激素含量之間的關係進行劑量反應之觀察，此係利用 STZ 糖尿病大鼠進行之 *in vivo* 研究。

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⁸⁻¹¹。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^{12,13}。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^{14,15}；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¹⁵。研究證據也顯示，急性高葡萄糖造成 ROS(reactive oxygen species)之產生可進一步增加血漿中 IL-1 及 TNF- α 之濃度^{16,17}。這可能是由於增加的氧化壓力可在許多細胞活化轉錄因子如 NFkB 或 AP-1，因而導致細胞表現促發炎細胞激素，且會伴隨 iNOS 之表現及大量 NO 產生而進一步惡化氧化壓力¹⁸。而在長期慢性高血糖下，AGEs 的形成

亦可透過刺激發炎細胞而產生促發炎細胞激素¹⁹，在 STZ-DM 大鼠利用 aminoguanidine 阻斷 AGEs 產生可顯著抑制周邊 IL-1 β 及 TNF- α 之上升²⁰。

氧化壓力對於胰島素敏感性的影響在過去已有學者以臨床或動物實驗加以呈現：在有胰島素阻抗及/或糖尿病患處以抗氧化劑 vitamin C, lipoic acid(LA), vitamin E, 及 glutathione 都可改善患者胰島素敏感性²¹⁻²⁴；而在胰島素阻抗性 Zucker 大鼠投予 vit E 或 LA 亦增加其胰島素敏感性²⁵。在 *ex vivo* 的研究發現，不論急性或慢性投用 LA 於具有胰島素阻抗性之 Zucker 大鼠，都明顯改善其骨骼肌在活體外胰島素刺激下之葡萄糖利用率²⁶。在分子學層次的研究發現，氧化壓力造成活化多重 serine kinase cascades，其干擾許多胰島素信號途徑中的分子，包括胰島素受體(IR)及(IRS)家族之蛋白質，減少其 tyrosine 磷酸化程度，導致損害胰島素作用²⁷。氧化壓力除了擾亂胰島素信息分子之磷酸化作用外，亦會透過氧化活性位置具有 cysteine 殘基的酵素而影響標的細胞對於葡萄糖的利用，e.g. protein tyrosine phosphatases (PTPases)之 cystein 殘基被氧化後失去活性而造成胰島素阻抗性²⁷。而促發炎細胞激素影響胰島素敏感性的證據包括：在 IL-1 β /TNF- α 誘發之急性發炎反應模式中，骨骼肌攝取葡萄糖之胰島素反應降低^{28,29}，且在出現胰島素阻抗個體之血漿中及胰島素的標的組織包括骨骼肌都可測得增加之 TNF- α ³⁰。在活體外，將脂肪細胞(3T3-L1 細胞株及初代人類脂肪細胞)直接暴露於 TNF- α 可抑制胰島素刺激之葡萄糖攝取^{31,32}。促發炎細胞激素影響胰島素敏感性之可能胞內機制是，其可抑制胰島素中介之胰島素受體及 IRS-1 之 tyrosine 磷酸化作用，因而抑制其 kinase 活性及胰島素下游信息 PI₃ 之活化，或其下游應被活化之 kinase 而造成胰島素作用損害³³。此外，在促發炎細胞激素 TNF- α , IFN- γ 及 IL-1 β 在骨骼肌中亦可藉由活化 NF κ B 及其後之 iNOS 表現，進而抑制胰島素之作用³⁴⁻³⁶。

由於 β 細胞之抗氧化酵素如 superoxide dismutase, glutathione peroxidase, 及 catalase 含量低³⁷，故對於 ROS 之傷害敏感。而高葡萄糖濃度經活體外試驗證實在 β 細胞可增加胞內氧化壓力³⁸。在活體內高葡萄糖所致之 ROS 及其衍生物增加亦可來自 β 細胞以外的細胞，而 β 細胞急性暴露於 H₂O₂ 所造成之氧化壓力，可減少胞內胰島素含量，細胞質中的 ATP、及伴隨引起 apoptosis³⁹。目前所知 ROS 在 β -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⁴⁰，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 β 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 κ B，在 β 細胞這導致促發炎細胞激素 IL-1 β 及之 iNOS 表現¹⁸。來自胰島內生性的 IL-1 β 亦可在受到 TNF- α 的作用下產生，且其對於 β 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 β 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 β cell 製備物免於 cytokine 誘發之抑制作用⁴¹。

大蒜及其成份在過去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^{42,43}，且抑制在細菌內毒素誘發之 NF κ B 活化及促發炎細胞激素表現⁴⁴，近來，大蒜精油(garlic oil; GO)亦被顯示在 STZ-DM 大鼠降低氧化壓力⁴⁵。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^{6,7}。由於氧化壓力增加及發炎作用被認為涉及 β -cell 功能缺損及周邊胰島素阻抗性，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的抗糖尿病作用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產生達成。過去其他學者的研究並未觀察 GO 對於胰臟及骨骼肌局部的氧化壓力及促發炎細胞激素含量之影響，故本研究加以探討。

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⁴⁶。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)動物處理及樣品收集

實驗動物五週齡(體重 120-140 g)之雄性 Wistar 大鼠購自國家實驗研究院國家實驗動物繁殖暨研究中心。實驗初期隨機分為控制組 8 隻及糖尿病組 32 隻。糖尿病之誘發係在動物空腹一夜後，由尾部靜脈注 streptozotocin (65 mg/kg)，控制組則注射載劑(citrate buffer, pH 4.2)。飼育期間予動物自由取食及飲水且每隔一週定時由尾靜脈抽血測量基礎血糖值(禁食 10-14h)並做出曲線。

在誘發後第十天進行胰島素耐受性測試(insulin-tolerance test; ITT)如我們過去所述，由腹腔注射胰島素 bolus (1 U/kg body wt human regular insulin) 在注射前(0)及注射後 5, 10, 15, 30, 60, 90, 及 120 min 自尾靜脈抽血(ref)。經一週回復期之後進行口服葡萄糖耐受性測試(oral glucose tolerance test; OGTT) 如我們過去所述，經口灌食 10% (w/v)葡萄糖溶液(1 g/kg body wt)。然後在開始灌食後第三週使動物隔夜空腹後以二氧化碳窒息犧牲由門靜脈收集血液，並取出胰臟及骨骼肌 soleus muscle。視不同分析的需要，血液樣品以抗凝血劑 heparin/EDTA 處理後離心(500 × g)10 min，取得血漿儲存於-20°C 備用於生化分析。胰臟及骨骼肌分別針對不同實驗項目處理如下。

(三)生化分析

血液樣品分析:葡萄糖分析先將血清樣品以 5% (v/v) HClO₄ 去蛋白然後以 Bergmeyer (1974)方法分析。血漿中胰島素, nitrate/nitrite, IL-1 β 及 TNF- α 分別以 rat insulin enzyme-linked immunosorbent assay kit (Mercodia, Uppsala, Sweden), nitrate/nitrite kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), rat TNF- α , IL-1 β , 及 IL-6 enzyme-linked immunosorbent assay kit (Biosource International, Inc., Camarillo, CA)根據製造商所述方法以 micro-plate reader (VersaMax; Molecular Devices Ltd., Sunnyvale, CA)分析。測得之空腹血糖及胰島素度利用 homeostasis model assessment (HOMA-IR), 以如下公式分析週邊胰島素阻抗性指數(insulin-resistance index)⁴⁷: 空腹血糖(mg/dl) x 空腹血漿胰島素(μ U/ml)/405。

血漿及骨骼肌中的抗氧化物質 GSH 含量, 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, 而脂質過氧化程度則係將血漿或骨骼肌均質液根據 Fraga 等人的方法測定 thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)⁴⁸。

(四)組織學研究

於犧牲動物時取出胰臟, 然後以 10% formalin 固定, 以石臘包埋, 並切片依序脫臘、覆水後進行以下組織化學及組織免疫學染色並以光學顯微鏡進行觀察。

(1) 胰臟 Aldehyde Fuchsin staining

Aldehyde Fuchsin 染劑可選擇性染色胰臟β細胞顆粒, 為廣為利用的胰臟染色法, 用以觀察β細胞 mass。將載有切片之玻片浸在 Lugol's iodine 中 10-60 min, 然後在 sodium bisulfite 中脫色, 沖洗後以 70%乙醇脫水, 然後浸在 aldehyde fuchsin (1g fuchsin 溶於 200 ml 70%乙醇+2 ml HCl+2 mL paraldehyde) 溶液中, 沖洗後以 Gill's hematosylin 做背景染色。

(2) 骨骼肌 Periodic Acid Schiff (PAS) staining

此方法係用以偵測組織中的肝醣, 如 liver, cardiac and skeletal muscle on formalin-fixed 且經石臘包埋的組織切片, 也可用於冷凍切片。肝醣會被染成紫色, 而細胞核會染成藍色。切片置於於 0.5% periodic acid solution 中氧化 5 min, 以 dd water 沖洗後放置於 Schiff reagent for 15 min, 然後以微溫自來水沖洗 5 min, 最後置入 Mayer's hematoxylin solution counterstain 1 min, 以自來水沖洗 5 min 後脫水封片。

(3) 胰臟及骨骼肌 HNE-modified 蛋白質染色

HNE 組織免疫染色係利用兔子抗 HNE 單株抗體進行, 二抗係聯結 horseradish peroxidase 並以 DAB peroxidase 受質進行呈色反應。

(五)統計分析

各組分析所得數據以平均值加減一個正負標準差(mean±SD)表示, 統計利用 SPSS 系統分析。控制組與糖尿病組組間之差異以 Independent-Sample T test 分析。糖尿病各組間差異先以 one-way analysis of variance (ANOVA)分析($P < 0.05$), 再以 Tukey's test 進行事後檢定。

五、結果與討論

(一) 動物特徵

以 STZ 誘發糖尿病造成大鼠體重增加速率降低, 攝食量及飲水量增加, 排尿量亦隨之增加, 此外空腹血糖值明顯上升伴隨顯著降低之空腹胰島素濃度(表一)。跟據 Matthews 等人的方法, 本研究估算了恒定狀態下之胰島素敏感性 (HOMA-IR), 結果顯示 STZ 大鼠在糖尿病誘發的期間內已發展出胰島素阻抗性, 此結果與我們先前研究的結果一致⁶。本研究發現以大蒜精油(10-100 mg/kg bw) 餵食糖尿病大鼠些微降低其體重增加速率但未達統計學意義。隨餵食 GO 劑量之增加, 糖尿病大鼠之攝食量, 飲水量及排尿量均呈現劑量依賴性的降低且排尿量之下降於 GO 劑量在 100 mg/kg bw 時達到統計學的意義。此結果與我們先前的報導相似⁶。大蒜精油並未顯著影響空腹血糖值, 但卻呈劑量依賴性地增加空腹胰島素濃度及恒定狀態下之胰島素敏感性, 且此二作用在 GO 劑量達 100 mg/kg

達統計學意義(表一)。由於過去其他學者提出高血糖所造成之氧化壓力增加與此疾病之進行有關,此包括胰臟胰島素分泌能力及週邊胰島素敏感性。因此,本研究進一步針對 STZ-DM 大鼠週邊循環、胰臟及胰島素主要調節標的--骨骼肌,之氧化壓力進行觀察。其中系統氧化壓力係針對血漿 GSH 含量, GR 與 GPx 活性與 TBARS 分析加以進行,而肌肉除上述分析項目外,亦進行組織免疫染色,針對 HNE 觀察。胰臟則以 HNE 之組織免疫學染色觀察。

(二) 口服葡萄糖耐受試驗與胰島素耐受試驗

口服葡萄糖耐受試驗之結果,係以經口之葡萄糖負荷後 180 分鐘的曲線下面積計算單位時間葡萄糖累積速率後呈現於圖一。結果顯示,糖尿病大鼠對於此葡萄糖負荷顯著無法耐受,而 GO 在劑量 10 與 50 mg/kg bw 時雖有降低累積血糖量之趨勢,但並無統計學上的意義。而僅在 100 mg/kg bw 劑量下達到顯著改善耐受性的效果,此與我們過去的發現一致⁶。胰島素耐受試驗的結果顯示於圖二。投予動物胰島素之後糖尿病大鼠之血糖變化顯示顯著低於控制組者。血糖降低的最大值在各組均出現於給予胰島素後 90 分鐘,此時控制組大鼠血糖下降百分比為 34.9%而載劑處理之糖尿病大鼠血糖下降百分比為 16.0%($P < 0.05$)。此外,計算投用胰島素後所造成之血糖 first order 下降速率取得之胰島素受性係數 K_{177} 顯示在糖尿病大鼠顯著低於控制組,此結果亦確認大鼠發展出胰島素阻抗性。在給予胰島素後 90 分鐘,血糖下降的百分比在 G010, G050, G0100 組依序分別為 32%, 34%, 31%且其間無顯著差異,但均顯著高於載劑組血糖降低的程度(圖一),而當進一步以 K_{177} 分析胰島素敏感性時,所有 GO 處理組均顯示顯著改善之,且此作用為 GO 劑量依賴性。

(三) 氧化壓力及發炎狀態

在血漿抗氧化物質含量與脂質過氧化程度之觀察發現雖然 STZ 並未改變血漿 GSH 總含量,但 GO 在糖尿病大鼠劑量依賴性增加其含量,此與過去其他學者在正常大鼠的研究結果相符合。GPx 活性不論在載劑或 GO 處理的糖尿病大鼠與控制組相較雖未明顯改變但 GR 活性在糖尿病些微上升而在 GO 處理組則呈顯著且劑量依賴性增加,由 TBARS 的結果可知糖尿病增加 GR 可能是由於氧化壓力上升所誘發,然而 GO 處理的糖尿病大鼠卻至少有部份可因更為增加的 GR 活性而使得其系統脂肪質過氧化程度降至接近正常(表一)。系統發炎作用指標以血漿 TNF- α 與 IL-1 β 含量分析之結果顯示,與控制組相較糖尿病顯著增加其含量,但增加的程度遠小於我們過去發現其在一般急性系統性發炎反應中血漿含量⁴⁹,在此種相對低濃度下之促發炎細胞激素存在下之生理學意義值得進一步釐清。此外,GO 不論在何種劑量下,均未影響此二細胞激素的血漿濃度,對照於已發展出之胰島素組抗性,此結果顯示在本研究模式下,胰島素阻抗性可能與發炎作用較無關,但與氧化壓力有關,且 GO 改善胰島素阻抗性的作用可能亦非透過降低發炎作用達成。

在骨骼肌抗氧化物質含量與脂質過氧化程度之觀察結果顯示總 GSH 含量及 GR 活性在不不論在載劑或 GO 處理的糖尿病大鼠與控制組相較均未明顯改變,而 GO 劑量依賴性增加 GPx 活性且在 GO 劑量達 50 mg/kg 時與載劑組相較已有統計學意義。DM 大鼠骨骼肌 TBARS 值則因灌食 GO 而下降且在 GO 劑量達 100 mg/kg 時達統計學意義。

(四) 組織化學分析

本研究利用 HE 染色觀察胰島大小，並利用可選擇性染色胰臟β細胞顆粒之 Aldehyde Fuchsin 染劑觀察β細胞 mass. 結果顯示於圖三. HE 染色結果發現 STZ-DM 大鼠胰島 mass 在犧牲時，其胰島直徑顯著小於正常大鼠，且切面面積少於正常大鼠的 1/4. GO 餵食組中僅劑量在 100 mg/kg 時有較明顯的改善胰島 mass. 而若進一步計數 aldehyde fuchsin 染色結果中(圖四)，胰島中的紫色顆粒則發現β細胞 mass 在 STZ 大鼠約殘存 5-10%，此與過去其他學者之發現一致. 而 GO 在劑量 100 mg/kg 時，呈現顯著改善之β細胞 mass. 此種改善作用不能排除兩種原因，其一為 GO 在此劑量下可延緩 time-dependent 的 glucose-toxicity 所導致之持續性胰島組織衰退，其二為 GO 可直接促進胰島細胞之再生. GO 在此二方面的作用，目前我們正以胰島細胞株 HIT-T15 的活體外研究釐清中. 本研究另外利用骨骼肌 Periodic Acid Schiff (PAS) staining 偵測組織中的肝醣(圖五呈現紫色部分)，結果顯示，STZ-DM 降低組織中肝醣含量，此結果與先前其他研究者此可能由於 STZ-DM 大鼠嚴重缺乏胰島素且胰島敏感性下降在骨骼肌主要影響的代謝作用為肝醣合成所致. GO 在劑量 100 mg/kg 改善肝醣含量，由前面表一及圖二的結果可知與增加胰島素分泌及改善胰島素敏感性主要與改善胰島素促進之肝醣合成有關(Liu et al., 2005)，且由於 STZ-DM 大鼠之胰島素分泌能力在餵食 100 mg/kg GO 後僅自 0.112 ng/ml 增加至 0.377ng/ml，雖說增加了將近 3.4 倍，但仍遠低於控制組大鼠者，而由肌肉肝醣染色 intensity 的情形來看(雖尚待軟體之定量分析)，GO 在 STZ-DM 大鼠改善血糖的主要角色應是以改善胰島素敏感性為主.

(五) 免疫組織學分析

HNE(4-hydroxynonenal)是為多元不飽和脂肪酸的主要氧化終產物之一. 其可修飾蛋白質 lysine 殘基造成蛋白質的氧化傷害. 在糖尿病狀態下組織中其含量與病情的進展有關，例如在腎臟病變中，腎組織 HNE 含量隨病變之進行而增加(ref). 本研究發現 STZ-DM 在骨骼肌及胰臟中其含量明顯增加(圖六及七中棕色部分)，此結果與表二及表三中 STZ-DM 使系統/肌肉之氧化壓力生化分析結果相符合. 而 GO 餵食糖尿病大鼠在劑量 100 mg/kg 時顯示明顯減少 HNE 之作用，此與生化值相符. 由於糖尿病大鼠之胰島組織組分部區域較稀疏，用於 HNE 染色之切片中均未發現胰島組織故 loss sample，目前正在重新切片染色中.

(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)STZ-DM 造成胰島細胞損壞及週邊胰島素阻抗性且伴隨週邊循環與骨骼肌脂質過氧化程度之增加但是並未伴隨系統之發炎作用.
- (2)大蒜精油在劑量 100 mg/kg 時顯著增加空腹胰島素分泌此係伴隨胰島 mass 及胰島 beta 細胞數量之增加，而這些作用顯示與降低週邊循環之氧化傷害有關.
- (3)大蒜精油在劑量 100 mg/kg 時顯著增加週邊胰島素敏感性，伴隨增加之肌肉肝醣儲存，且顯示與降低之骨骼肌氧化傷害關.
- (4)大蒜改善胰島素阻抗性及胰島素分泌量之作用與其增加口服葡萄糖耐受性的結果一致.
- (5)上述大蒜精油的作用在本研究中均顯示劑量依賴性.

根據本研究結果，本計畫主持人對於 GO 的抗糖尿病作用為來研究方向的建議如下：

- (1) 因 STZ 破壞大部份的胰島 beta 細胞，故此 DM 模式不利於研究 GO 促胰島素分泌作用在其抗糖尿病作用上所扮演的角色，未來應以其他 DM 模式測試，e. g. 胰島功能尚佳的高血糖模式觀察之。
- (2) 大蒜產品已被廣用於 DM 病患做為補充療法，根據本研究及相關研究的結果，顯示其也許透過改善胰島素阻抗性而會與胰島素或其他胰內作用藥物同時使用時或與促胰島素敏感性藥物同時使用時因其促進內生性胰島素分泌而有相乘效果造成患者低血糖的危險，本計畫主持人目前正計劃進一步加以評估此種作用。

六、計畫成果自評

雖然過去有研究報告提出大蒜精油在抗糖尿病之作用，然而文獻中對於大蒜精油降低血糖之機制尚未見系統性的探討。本研究的重要性係提出 GO 透過抗氧化作用促進糖尿病大鼠之血糖控制且骨骼肌及胰島均為其作用標的，而且可能與促發炎細胞激素調控無關。本研究之缺失及需補強處在於：(1) STZ-DM 研究模式下，由於胰島明顯萎縮，造成大大降低胰臟 mass 中胰島所佔組織比例，使得對於胰臟進行的生化分析，並不足以代表胰島的狀態，故本研究中未進行生化分析，僅以組織學觀察其氧化壓力指數，而即使如此，也出現 DM 組切片中找不到胰島的狀況，目前正在補此 data 而另外進行中的補強方式即是以胰島細胞株 HIT-T15 在活體外進行 GO 對於胰島 beta 細胞在高糖下之作用觀察氧化壓力在其中的角色；(2) 組織學觀察結果需更專業的判讀，目前正與彰化基督教病理科黃宏仁醫師合作近期將配合定量軟體的使用預計將使目前的組織學 data 呈現更客觀的判斷。

七、參考文獻

1. Bailey CJ and Day C. 1989. Traditional plant medicines as treatments of diabetes. *Diabetes care* 12, 553-564.
2. WHO Expert Committee: Diabetes Mellitus. 2nd rep. Geneva, World Health Org. 1980 (Tech. Rep. Ser. 646).”
3. Mathew PT and Augusti KT. 1973. Studies on the effect oa allicin (Diallyl Disulphide-oxide) on alloxan diabetes: Part I-Hypoglycaemic action & enhancementof serum insulin effect & glycogen synthesis. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 10, 209-212.
4. Ryan EA, Pick ME and Marceau C. 2001. Use of alternative medicines in diabetes mellitus. *Diabetic med* 18, 242-245.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
 8. Ceriello A. 1997. Acute hyperglycaemia and oxidative stress generation. *Diabet Med.* 14, S45-S49.
 9. 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. *Diabet* 43, 1010-1014.
 10. Ceriello A, Bortolotti N and Falletti E. 1997. Total radical-trapping antioxidant parameter in non-insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Care* 20, 194-197.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. Ceriello A. 2000. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism* 49, 27-29.
 15. Bonnefont-Rousselot D. 2002. Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5, 561-568.
 16. Ling PR, Mueller C, Smith Rjand Bistrián BR. 2003. Hyperglycemia induced by glucose infusion causes hepatic oxidative stress and systemic inflammation, but not STAT3 or MAP kinase activation in liver in rats. *Metab Clin Exp* 52, 868-874.
 17. Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, Quagliaro L, Ceriello A and Giugliano D. 2002. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation* 106, 2067-2072.
 18. Maritim AC, Sanders RA and Watkins JB 3rd. 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Molecul Toxicol* 17, 24-38.
 19. Baynes JW and Thorpe SR. 1999. Perspectives in diabetes: role of oxidative stress in diabetic complications-a new perspective on an old paradigm.
 20. El-Sewedy MM, El-Swefy SE, Ameen RS and Hashem RM. 2002. Effect of AGE receptor blocker and/or anti-inflammatory coadministration in relation to glycation, oxidative stress and cytokine production in STZ diabetic rats. *Pharmacol Res* 45, 391-398.
 21. Jacob S, Ruus P, Hermann R, Tritschler HJ, Maerker E, Renn W, Augustin HJ, Dietze GJ and Rett K. 1999. Oral administration of RAC- α -lipoic acid modulates insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled pilot trial. *Free Radical Biol Med* 27, 309-314.

22. Hirai N, Kawano H, Hirashima O, Motoyama T, Moriyama Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Ogawa H, Nakao K and Yasue H. 2000. Insulin resistance and endothelial dysfunction in smokers: effects of vitamin C. *Am J Physiol* 279, H1172-H1178.
23. Caballero B. 1993. Vitamin E improves the action of insulin. *Nutr Rev* 51, 339-340.
24. Paolisso G, Di Maro G, Pizza G and D'Onofrio F. 1992. Plasma GSH/GSSG affects glucose homeostasis in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetes. *Am J Physiol* 263, E435-E440.
25. Laight DW, Desai KM, Gopaul NK, Anggard EE and Carrier MJ. 1999. F2-isoprostane evidence of oxidant stress in the insulin resistant, obese Zucker rat: effects of vitamin E. *Eur J Pharmacol* 377,89-92.
26. Jacob S, Streeper RS, Fogt DL, Hokama JY, Tritschler HJ, Dietze GJ and Henriksen EJ. 1996. The antioxidant alpha-lipoic acid enhances insulin-stimulated glucose metabolism in insulin-resistant rat skeletal muscle. *Diabetes* 45, 1024-1029.
27. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA and Grodsky GM. 2002. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocrine Rev* 23, 599-622.
28. Kapur S, Bedard S and Marcotte B. 1997. Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. *Diabetes* 46, 1691-1700.
29. Ling PR, Bistrain BR, Mendez B and Istfan NW. 1994. Effects of systemic infusions of endotoxin, tumor necrosis factor, and interleukin-1 on glucose metabolism in the rat: relationship to endogenous glucose production and peripheral tissue glucose uptake. *Metabolism* 43, 279-284.
30. Saghizadeh M, Ong JM and Garvey WT. 1996. The expression of TNF- α by human muscle: relationship to insulin resistance. *J Clin Invest* 97, 1111-1116.
31. Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN and Spiegelman BM. 1994. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 4854-4858.
32. Teruel T, Hernandez R and Lorenzo M. 2001. Ceramide mediates insulin resistance by tumor necrosis factor- α in brown adipocytes by maintaining Akt in an inactive dephosphorylated state. *Diabetes* 50, 2563-2571.
33. Marette A. 2002. Mediators of cytokine-induced insulin resistance in obesity and other inflammatory settings. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5, 377-383.
34. Ladner KJ, Caligiuri MA and Guttridge DC. 2003. Tumor necrosis factor-regulated biphasic activation of NF- κ B is required for cytokine-induced loss of skeletal muscle gene products. *J Biol Chem* 278, 2294-2303.
35. Adams V, Nehrhoff B, Spate U, Linke A, Schulze PC, Baur A, Gielen S, Hambrecht R and Schuler G. 2002. Induction of iNOS expression in skeletal muscle by IL-1 β and NF κ B activation: an in vitro and in vivo study.

- Cardiovascular Res 54, 95-104.
36. Torres SH, De Sanctis JB, de L Briceno M, Hernandez N and Finol HJ. 2004. Inflammation and nitric oxide production in skeletal muscle of type 2 diabetic patients. *J Endocrinol* 181, 419-427.
 37. 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.
 38. Tanaka Y, Tran PO, Harmon J and Robertson RP. 2002. A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic β -cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 12363-12368.
 39. 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.
 40. 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.
 41. 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.
 42. Phelps S and Harris WS. 1993. Garlic supplementation and lipoprotein oxidation susceptibility. *Lipids* 28, 475-477.
 43. 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.
 44. 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.
 45. 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.
 46. Tannous M, Amin R, Popoff MR, Fiorentini C and Kowluru A. 2001. Positive modulation by Ras of interleukin-1 β -mediated nitric oxide generation in insulin-secreting clonal β (HIT-T-15) cells. *Biochem Pharmacol* 62, 1459.
 47. Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., Turner, R.C., 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 412-419.
 48. 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.
 49. Chiang YH, Jen LN, Su HY, Lii CK, Sheen LY, Liu CT. 2005. Effects of garlic oil

and two of its major organosulfur compounds, diallyl disulfide and diallyl trisulfide, on intestinal damage in rats injected with endotoxin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 213,46-54.

附表與附圖

表一、正常及以不同大蒜精油劑量處理之糖尿病大鼠之體重、攝食量、飲水量、排尿量、空腹血糖、空腹血中胰島素濃度及 HOMA-IR

Table 1. Growth characteristics; plasma concentrations of glucose, insulin and the HOMA-IR^a of control rats or streptozotocin-induced diabetic rats who did or did not receive garlic oil^b

	Control	DM	DM+10 mg/kg GO	DM+50 mg/kg GO	DM+100 mg/kg GO
Body weight gain (g)	130.9±27.4	80.7±26.0*	57.4±38.3	40.2±44.0	61.1±29.5
Food intake (g/24h)	26.8±4.6	32.7±2.8*	33.5±3.1	31.0±6.6	27.5±3.7
Water intake (ml/24h)	49.5±12.1	120.1±13.9*	135.4±29.8	133.5±25.7	99.1±26.2
Urine excretion (ml/24h)	16.4±3.5	107.0±15.4* ^c	113.3±27.7 ^c	105.5±17.4 ^c	73.5±19.7 ^d
Plasma glucose (mg/dl)	105±12	222±18*	203±16	215±21	201±13
Plasma insulin (ng/ml)	1.625±0.351	0.112±0.026* ^c	0.104±0.025 ^c	0.120±0.046 ^c	0.377±0.103 ^d
HOMA-IR	10.07±1.42	1.47±0.31* ^c	1.42±0.43 ^c	1.33±0.65 ^c	4.45±0.62 ^d

^aThe insulin resistance index as assessed by homeostasis model assessment.

^bValues are the mean ± S.D. for six rats per group.

*Significant difference between the control group and the DM group ($P < 0.05$).

^{cd}DM groups that do not share a letter are significantly different ($P < 0.05$).

表二、不同劑量大蒜精油處理對於糖尿病大鼠血漿抗氧化物、脂質過氧化物、nitrate/nitrite 及促發炎細胞激素含量之影響

Table 2. Effect of treatment of STZ-diabetic rats with various doses of garlic oil on GSH concentration, activity of GPx and GR, lipid peroxidation level, nitrate/nitrite concentration and proinflammatory cytokines in plasmas^a

	Control ^b	DM	DM+10 mg/kg GO	DM+50 mg/kg GO	DM+100 mg/kg GO
GSH (nmol/mg protein)	0.046±0.008	0.043±0.012 ^c	0.054±0.017 ^{cd}	0.075±0.023 ^{cd}	0.104±0.031 ^d
GPx (μmol NADPH/min/mg protein)	41.4±5.2	46.0±4.4	43.44±6.5	36.1±4.6	37.5±5.6
GR (μmol NADPH/min/mg protein)	2.53±0.43	3.07±0.30	3.35±0.24	4.04±0.24	4.99±0.51
TBARS (nmol/mg protein)	1.75±0.58	2.95±0.63 ^{*c}	1.86±0.42 ^{cd}	1.78±0.37 ^d	1.64±0.46 ^d
NO mg/l	1.12± 0.43	18.5±5.3 [*]	21.2±6.7	17.3±3.1	13.8±4.1
IL-1 beta (pg/ml)	120±41	167±47 [*]	172±45	148±53	165±40
TNF-alpha (pg/ml)	90±21	200±82 [*]	142±42	153±68	145±58

^aValues are the mean ± S.D. for six rats per group.

^bRats injected with citrate buffer and treated with corn oil.

^{*}Significant difference between the control group and the DM group ($P < 0.05$).

^{cd}DM groups that do not share a letter are significantly different ($P < 0.05$).

表三、不同劑量大蒜精油處理對於糖尿大鼠骨骼肌抗氧化物及脂質過氧化物含量之影響

Table 2. Effect of garlic oil on GSH concentration, activity of GPx and GR and lipid peroxidation in skeletal muscle from control rats or streptozotocin-induced diabetic rats who did or did not receive garlic oil^a

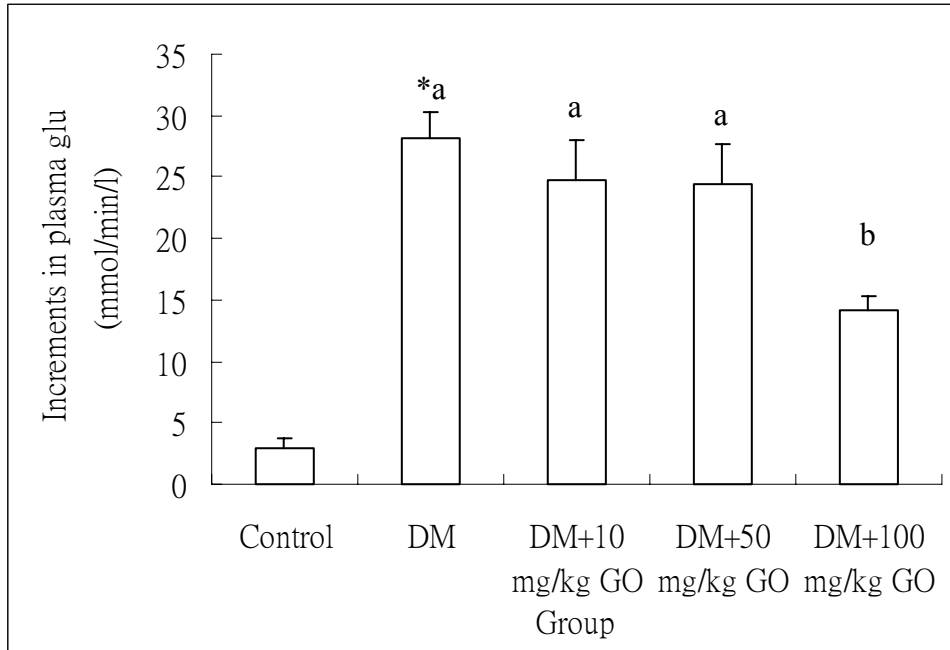
	Control ^b	DM	DM+10 mg/kg GO	DM+50 mg/kg GO	DM+100 mg/kg GO
GSH (nmol/mg protein)	4.42±0.37	4.40±0.74	3.97±0.46	3.76±0.51	4.98±1.28
GR (nmol NADPH/min/mg protein)	13.5±1.5	15.8±3.3	19.9±4.8	15.1±2.9	14.7±1.0
GPx (nmol NADPH/min/mg protein)	255.8±20.5	284.3±24.3 ^{cd}	264.4±33.4 ^c	345.6±41.5 ^{de}	390.0±45.1 ^e
TBARS (nmol/mg protein)	0.411±0.052	0.647±0.074 ^{*,c}	0.636±0.116 ^{cd}	0.627±0.097 ^{cd}	0.516±0.067 ^d

^aValues are the mean ± S.D. for six rats per group.

^bRats injected with citrate buffer and treated with corn oil.

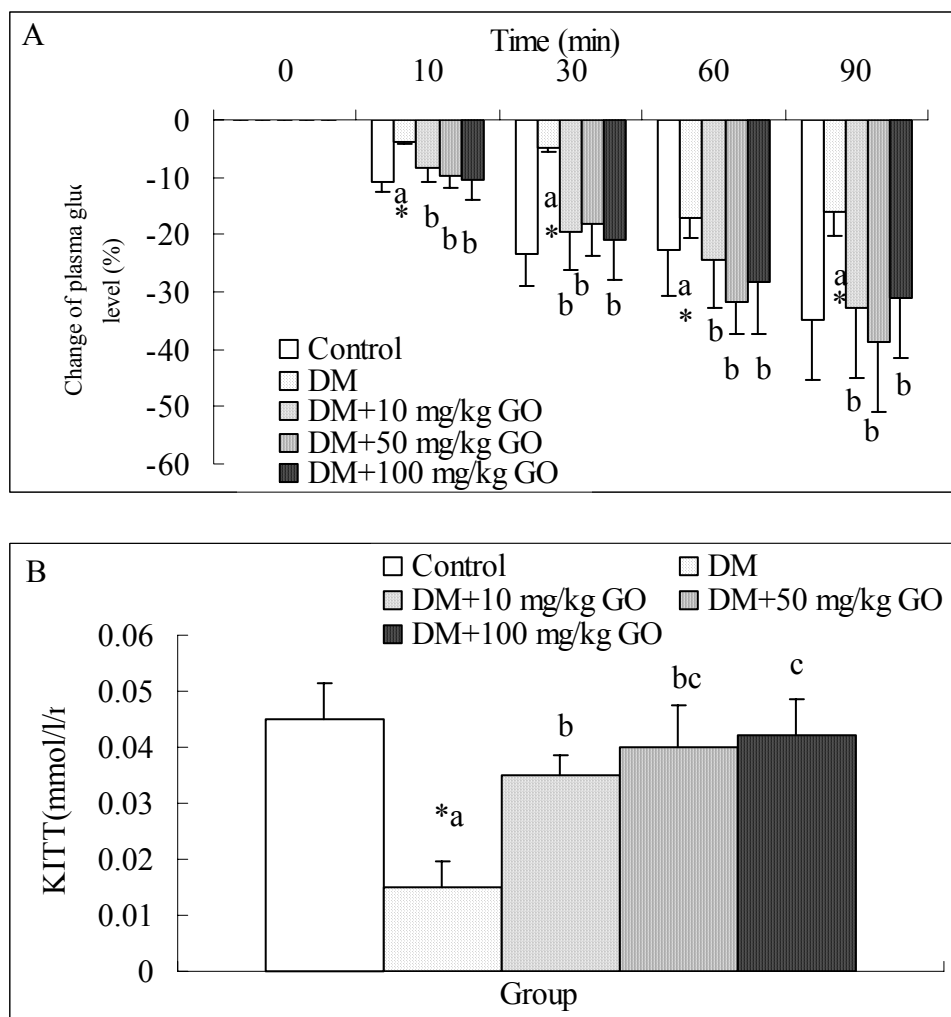
*Significant difference between the control group and the DM group ($P < 0.05$).

^{cd}DM groups that do not share a letter are significantly different ($P < 0.05$).



圖一、不同劑量大蒜精油處理對於糖尿病大鼠於葡萄糖負荷後三小時內平均血漿葡萄糖累積速率之影響

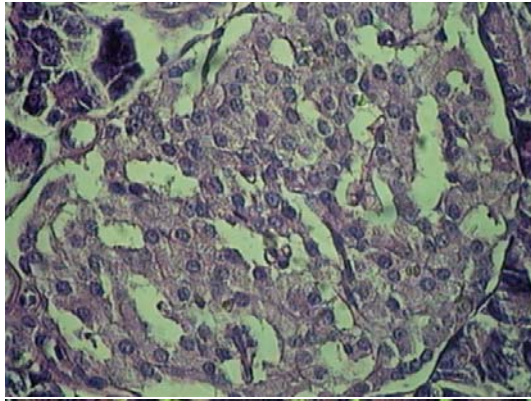
Figure 1. Effect of treatment of streptozotocin-induced diabetic rats with various doses of garlic oil on the increment in plasma glucose. A glucose bolus (1 g/kg body weight) was administered orally on day 17 after the induction of diabetes. Glucose was measured in plasma samples from the tail vein. Data are means±S.D. for six rats per group. *Significant difference between the control group and the DM group ($P<0.05$). ^{ab}DM groups that do not share a letter are significantly different ($P<0.05$).



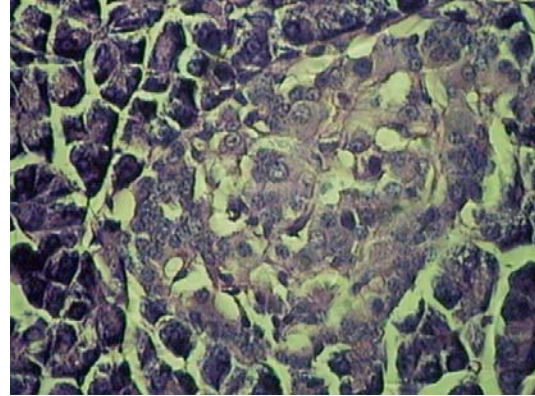
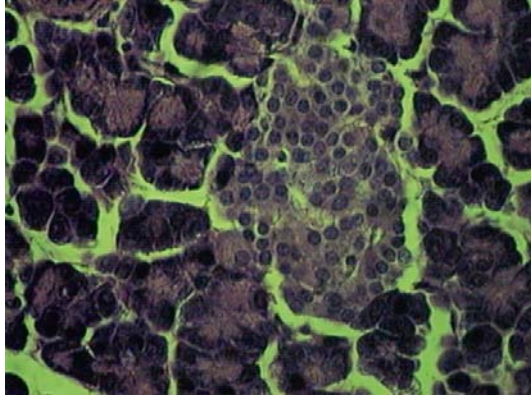
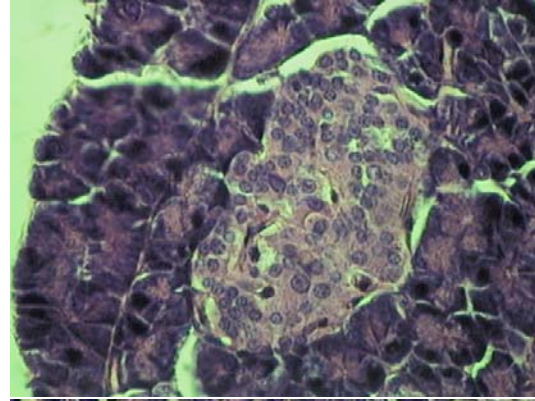
圖二、不同劑量大蒜精油處理對於糖尿病大鼠於胰島素耐受性之影響

Figure 2. Effect of treatment of streptozotocin-induced diabetic rats with various doses of garlic oil on the decay in plasma glucose concentrations in response to a bolus injection of insulin as a function of time (A) and the first order rate constant for the disappearance rate of glucose in plasma (K_{ITT}) after the insulin bolus (B). An insulin bolus (1 U/kg body weight) was administered intraperitoneally on day 10 after the induction of diabetes. The change in plasma glucose concentrations is presented as the percentage of the glucose value at time zero. Data are means \pm S.D. for six rats per group. *Significant difference between the control group and the DM group ($P < 0.05$).^{abc}DM groups that do not share a letter are significantly different ($P < 0.05$).

Control



DM



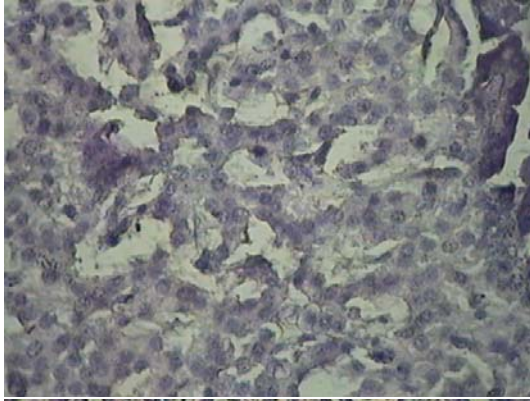
DM+10 mg/kg GO

DM+100 mg/kg GO

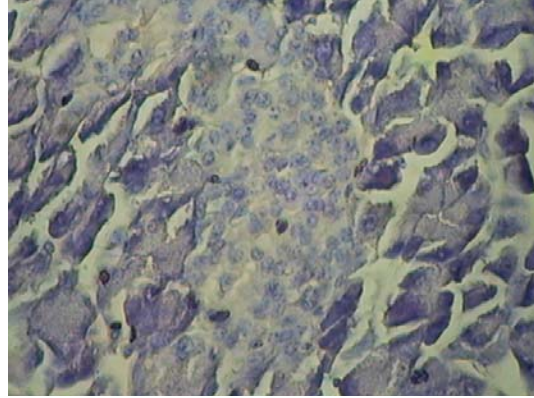
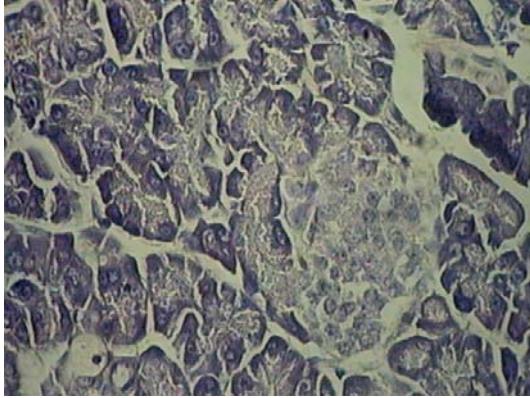
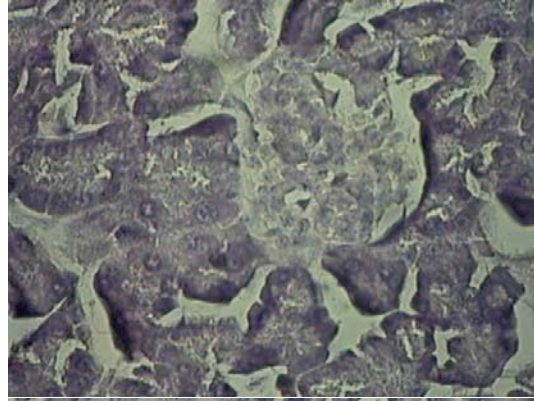
圖三、不同劑量大蒜精油處理之 STZ-糖尿病大鼠胰島組織 HE 染色結果(400x)

Figure 3. HE-staining of pancreas islet from control rats or streptozotocin-induced diabetic rats who did or did not receive garlic oil.

Control



DM



DM+10 mg/kg GO

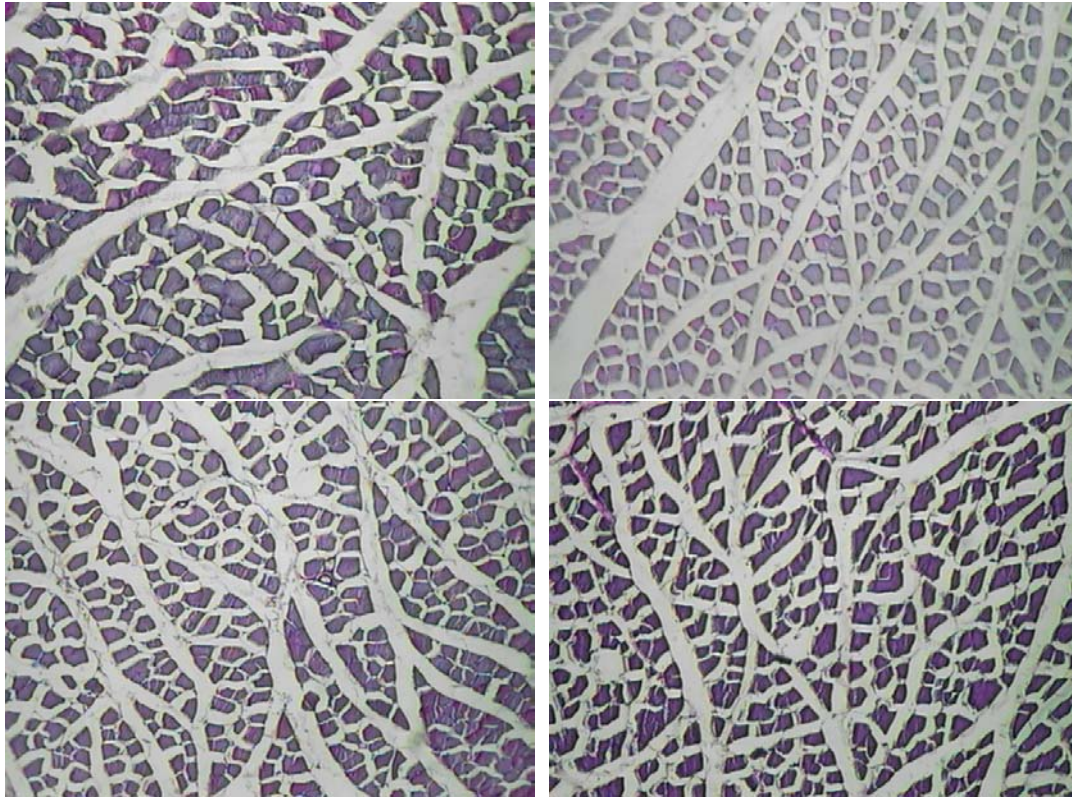
DM+100 mg/kg GO

圖四、不同劑量大蒜精油處理之 STZ-糖尿病大鼠胰島 beta 細胞 Aldehyde Fuchsin 染色結果(400x)

Figure 4. Aldehyde Fuchsin-staining of pancreas islet beta cell from control rats or streptozotocin-induced diabetic rats who did or did not receive garlic oil.

Control

DM

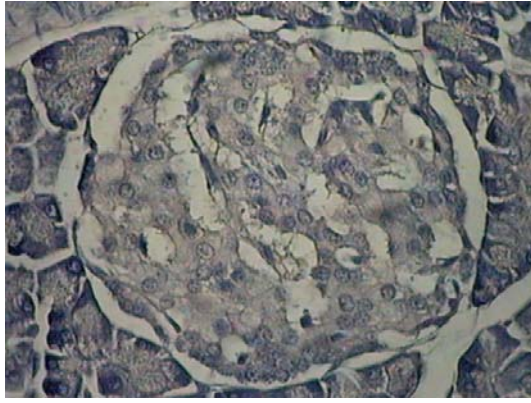


DM+10 mg/kg GO

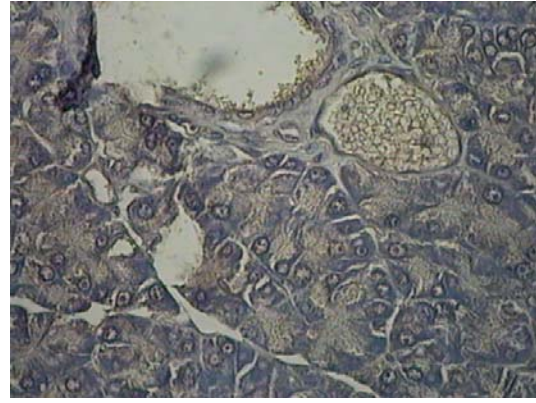
DM+100 mg/kg GO

圖五、不同劑量大蒜精油處理之 STZ-糖尿病大鼠骨骼肌(Gastroc) Periodic Acid Schiff (PAS)染色結果(400x).

Figure 5. Periodic Acid Schiff (PAS)-staining of pancreas islet beta cell from control rats or streptozotocin-induced diabetic rats who did or did not receive garlic oil



Control pancreas

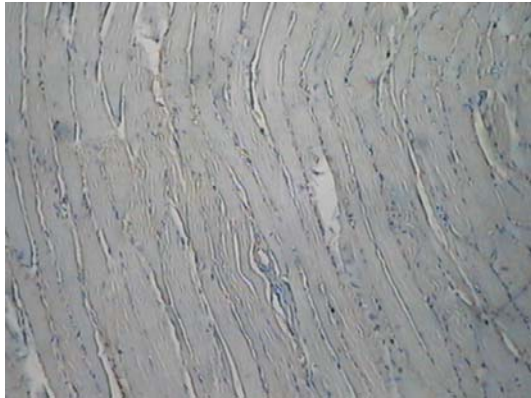


DM pancreas

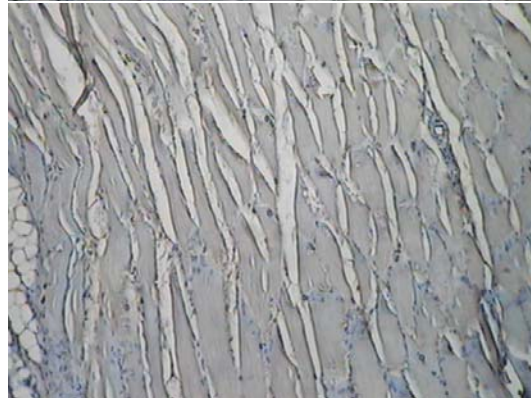
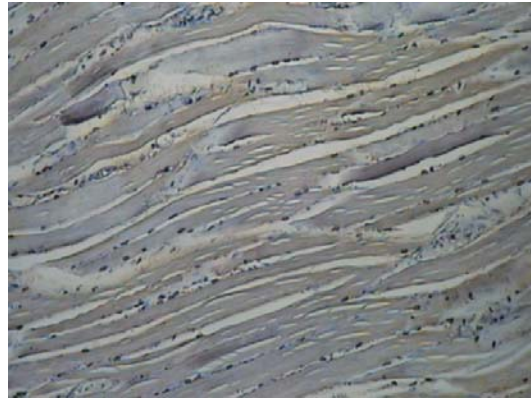
圖六、STZ-糖尿病大鼠胰島 HNE 免疫組織染色結果(400x)

Figure 7. HNE immunostaining of pancreas islet from control rats or streptozotocin-induced diabetic rats for.

Control



DM



DM+10 mg/kg GO

DM+100 mg/kg GO

圖七、不同劑量大蒜精油處理之 STZ-糖尿病大鼠骨骼肌(soleus) HNE 免疫組織染色結果(400x)

Figure 7. HNE immunostaining of soleus muscle from control rats or streptozotocin-induced diabetic rats who did or did not receive garlic oil.