

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

| | |
|------------|---------------------------------------|
| 計 畫 名 稱 | ： 研究艾草萃取物具保護胰臟beta細胞免於凋亡及內質網 壓力之作用 |
|------------|---------------------------------------|

執行計畫學生：呂欣怡

學生計畫編號：MOST 107-2813-C-040-032-B

研究期間：107年07月01日至108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 108年03月27日

目錄

| | |
|--|----|
| 摘要..... | 2 |
| 第一章、研究動機研究問題..... | 4 |
| 第二章、文獻回顧與探討..... | 5 |
| 2.1. 第二型糖尿病(Type 2 diabetes mellitus, T2D)..... | 5 |
| 2.2. 氧化壓力(Oxidative stress)..... | 5 |
| 2.2.1. 活性氧物質(Reactive oxygen species, ROS)..... | 5 |
| 2.2.2. 內質網壓力(Endoplasmic reticulum stress, ER stress)..... | 6 |
| 2.2.3. 細胞凋亡(Apoptosis)..... | 7 |
| 2.3. 艾草萃取物(<i>Artemisia argyi</i> extracts, AAE)..... | 8 |
| 第三章、實驗架構..... | 10 |
| 第四章、研究方法及步驟..... | 11 |
| 4.1. 艾草萃取物(<i>Artemisia argyi</i> extracts, AAE)製備及成分分析..... | 11 |
| 4.1.1. AAE製備..... | 11 |
| 4.1.2. 總多酚含量測定(Total phenolic content assay)..... | 11 |
| 4.1.3. 總黃酮含量測定(Total flavonoid content assay)..... | 11 |
| 4.2. 細胞培養(Cell culture)..... | 12 |
| 4.2.1. 細胞株來源..... | 12 |
| 4.2.2. 細胞培養方式..... | 12 |
| 4.3. 細胞存活分析(Cell viability assay)..... | 13 |
| 4.3.1. 細胞計數(Cell counting)..... | 13 |
| 4.3.2. 細胞生長分析(Folw cytometry/ PI stain)..... | 14 |
| 4.4. 葡萄糖刺激胰島素分泌試驗(Glucose-stimulated insulin secretion, GSIS).14 | |
| 4.5. 細胞週期分析(Cell-cycle analysis)..... | 15 |
| 4.6. 細胞內ROS含量測定(ROS assay)..... | 15 |
| 4.7. 細胞凋亡分析(Annexin V assay)..... | 16 |
| 4.8. 西方墨點法(Western blotting)..... | 17 |
| 4.8.1. 萃取蛋白及蛋白定量(Protein quantification)..... | 17 |
| 4.8.2. 西方墨點法(Western blotting)..... | 18 |
| 4.9. 動物實驗(Aminal expriments)..... | 19 |
| 4.9.1. 動物品種及飼養方式..... | 19 |
| 4.9.2. 動物分組..... | 19 |
| 4.9.3. 蘇木精-伊紅染色(Hematoxylin and eosin, H&E stain)..... | 20 |
| 4.10. 統計分析(Statistical analysis)..... | 20 |
| 第五章、結果與討論..... | 22 |
| 5.1. 探討 AAE 之功能性成份..... | 22 |
| 5.2. 探討不同濃度 AAE 對於胰島 beta 細胞存活之影響..... | 22 |

| | |
|--|----|
| 5.3. 探討 AAE 對於 H ₂ O ₂ 抑制胰島 beta 細胞生長之影響..... | 22 |
| 5.4. 探討 AAE 對於 H ₂ O ₂ 抑制胰島 beta 細胞內胰島素分泌之影響..... | 23 |
| 5.5. 探討 AAE 對於 H ₂ O ₂ 調控胰島 beta 細胞生長週期及氧化傷害之影響..... | 23 |
| 5.6. 探討 AAE 對於 H ₂ O ₂ 誘導胰島 beta 細胞凋亡之影響..... | 24 |
| 5.7. 探討 AAE 對於 H ₂ O ₂ 抑制胰島 beta 細胞生長週期控蛋白表現之影響..... | 24 |
| 5.8. 探討 AAE 對於 H ₂ O ₂ 誘導胰島 beta 細胞內質網壓力之影響..... | 25 |
| 5.9. 探討 AAE 對於 HFD 合併 STZ 誘發糖尿病小鼠中胰臟組織型態之影響..... | 25 |
| 5.10. 總結..... | 26 |
| 第六章、參考文獻..... | 27 |
| 第七章、附圖..... | 31 |

摘要

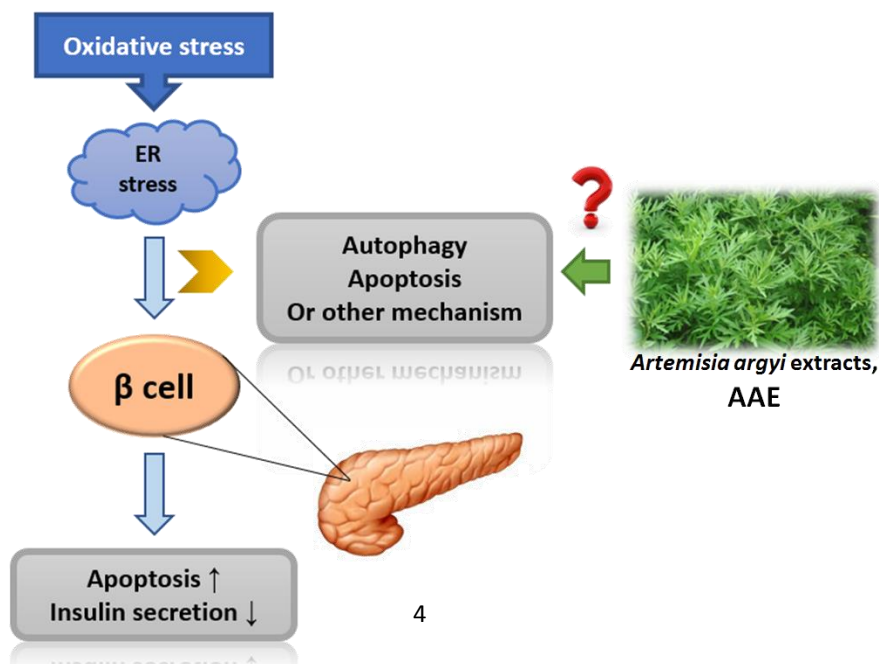
糖尿病為一種代謝疾病，其中第二型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2D) 是主要的糖尿病類型。近年來已知氧化壓力 (oxidative stress) 與造成 T2D 之間有重要相關性，而內質網在細胞面臨不正常環境與危害時，亦會產生內質網壓力 (endoplasmic reticulum stress, ER stress)，最終導致細胞凋亡 (apoptosis)。研究證實若能降低胰島 beta 細胞內的氧化壓力及 ER stress，便能順利改善 T2D。過去研究指出艾草 (*Artemisia argyi*) 具有多樣生化功效，包括抗菌、抗病毒和抗氧化作用。因此，本研究欲進一步探討艾草萃取物 (*A. argyi* extracts, AAE) 是否具有保護胰島 β 細胞免於氧化性損傷之作用。首先，證實 AAE 為富含多酚之萃取物，細胞實驗以過氧化物 (H_2O_2) 處理胰島 beta 細胞 (β -cells) RIN-5F 模擬氧化損傷之模式。結果發現 H_2O_2 抑制胰島 β 細胞生長及胰島素分泌下降；AAE 能有效保護 β 細胞存活及胰島素分泌。利用流式細胞儀分析細胞週期 (cell cycle)、活性氧物質 (reactive oxygen species, ROS) 含量和細胞凋亡則發現 AAE 對於 H_2O_2 誘發細胞凋亡的影響並不顯著；而 AAE 則能有效促進細胞週期 DNA 合成期 (S 期) 之表現並減少其氧化傷害。進一步透過西方點墨法分析發現 AAE 能夠促進增生蛋白 PCNA 和細胞週期調控分子 E2F1 表現量；而在 AAE 組別中 ER stress 相關蛋白也有下降之

趨勢。最後以高脂肪 (high fat diet, HFD) 飼料合併鏈佐黴素 (streptozotocin, STZ) 誘導 BALB/c 小鼠引發 T2D 模式，並餵食 AAE 作為試驗組，進行胰臟組織分析。H&E 切片染色結果發現，處理 AAE 能有效地減緩組織因氧化傷害產生的萎縮現象。總結，AAE 具有可保護胰島 β 細胞免於氧化性損傷之作用，透過促進細胞週期 S 期進行及降低 ER stress，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)、內質網壓力 (endoplasmic reticulum stress, ER stress)、細胞凋亡 (apoptosis)、胰島 β 細胞、艾草萃取物 (*Artemisia argyi* extracts, AAE)

第一章、研究動機與研究問題

近年來，第二型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2D)患者人數逐漸上升，但至今仍然只能延緩治療，而無有效根治的方法，且若未控制住病情則可能引發嚴重的併發症。於 T2D 的相關研究中，除了臨床用藥之外，也有許多天然藥物具有緩解 T2D 的功效，並且藥效比西藥溫和及副作用少。進一步研究顯示，氧化壓力(oxidative stress)會導致內質網壓力(endoplasmic reticulum stress, ER stress)的產生，而胰臟胰島 β 細胞對於 ER stress 的變化甚為敏感，可能進而導致細胞損傷或失去功能。過去研究顯示，艾草(*Artemisia argyi*)具有抗菌、抗病毒、平喘、利膽和抗氧化作用。因此，本計畫將進一步探討艾草萃取物(*A. argyi* extracts, AAE)是否具有能夠保護胰島 β 細胞免於氧化性損傷之作用，可能透過降低其 ER stress 及細胞凋亡(apoptosis)，以恢復胰島 β 細胞分泌胰島素的功能為本篇計畫的研究重點。



第二章、文獻回顧與探討

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

2.1.1. 定義

糖尿病是一種長期的代謝疾病，其中 T2D 又稱非胰島素依賴型糖尿病(noninsulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM)佔總體糖尿病患者 90% [1]。T2D 致病原因為胰島細胞受損，其中細胞凋亡(apoptosis)造成胰島素阻抗(insulin resistance)或胰島素缺乏(insulin deficiency) [2]；與第一型糖尿病(type 1 diabetes mellitus, T1D)不同之處在於 T1D 為一種自體免疫疾病，因破壞胰臟胰島 β 細胞，促使胰島素嚴重缺乏[3]。而研究證實氧化壓力(oxidative stress)和內質網壓力(endoplasmic reticulum stress, ER stress)的刺激與胰島素阻抗有很大的關聯[4]，且為造成 T2D 的重要因素[5]。糖尿病常見的併發症有冠狀動脈心臟疾病、下肢截肢、腎衰竭、視網膜病變[6]、輕度認知障礙，罹患失智症風險亦會增高[7]，也較易發生傷口感染[8]。

2.2. 氧化壓力(Oxidative stress)

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

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(hydrogen

peroxide, H_2O_2)。ROS 是正常氧代謝的副產物，並且在細胞內使信號傳導，刺激細胞的增生與存活，和保持機體恆常性起很大作用。但過高的 ROS 含量會對細胞和基因結構造成損壞，造成細胞死亡[9]。研究顯示，胰臟胰島 β 細胞抗氧化能力較弱，對自由基敏感而易被破壞進而減少胰島素分泌[10]。

2.2.2. 內質網壓力(Endoplasmic reticulum stress, ER stress)

內質網最主要的功能為幫助蛋白質摺疊成穩定的結構和分泌蛋白質[11]。當受到細胞內或胞外的刺激時，造成未折疊的蛋白質開始堆積在內質網，而導致此胞器之壓力，因而引發一連串稱為未折疊蛋白反應(unfolded protein response, UPR)來維持細胞內的恆定[12]。參與 UPR 的相關蛋白包括：轉錄因子-6 (activating transcription factor-6, ATF-6)、肌醇依賴蛋白 1 (inositol requiring enzyme 1, IRE-1) 和蛋白質激酶 RNA 類內質網激酶(protein kinase RNA like ER kinase, PERK) [13]。ATF-6 可當作一個轉錄因子(transcription factor)，當 ATF-6 蛋白分解進入細胞核後，使伴隨蛋白(chaperone)包含 GRP78-HSP70、GRP94-HSP90 的表現量上升，幫助不完全蛋白的折疊。IRE-1 磷酸化之後，活化其下游基因 X 盒子結合蛋白 1 (X-box binding protein 1, XBP-1)，進而控制脂質合成、內質網蛋白位移、幫助蛋白折疊以及內質網蛋白質降解(protein degradation)相關基因等；IRE-1

也會促使 JNK (c-Jun N-terminal kinase)磷酸化，進而導致細胞凋亡。PERK 可藉由自我磷酸化，形成同質複合體(homodimer)而活化，再磷酸化真核起始因子 2 (eukaryotic initiation factor 2, eIF2)，減緩轉譯作用，使新蛋白質無法合成，並刺激 C/EBP 同源蛋白(C/EBP-homologous protein, CHOP)生成。CHOP 是一種核蛋白，屬於 C/EBP (CAAT enhancer-binding protein)家族成員，當其表現量高時，會影響蛋白質摺疊，並引起細胞週期停滯及 DNA 損傷，促使細胞凋亡 [14]。

2.2.3. 細胞凋亡(Apoptosis)

凋亡是細胞主動結束生命的過程，一種導致細胞程序性死亡 (programmed cell death)的調控機制，在細胞凋亡過程中，細胞會皺縮，DNA 被核酸內切酶降解，最終形成碎片的細胞被巨噬細胞 (macrophage)清除。引起細胞凋亡的途徑主要分為外在路徑(extrinsic pathway)、內在路徑(intrinsic pathway) [15]。內在路徑依據是否有 caspases (cysteiny l aspartate-specific proteases)的參與，分為 caspase-dependent pathway 及 caspase-independent pathway；前者引起的細胞凋亡為 DNA 小片段斷裂(約 180-200 bp)，而後者引起的細胞凋亡為 DNA 大片段斷裂(約 300 bp) [16]。主要受壓力刺激(例如 ER stress、ROS 壓力)，使細胞色素 c (cytochrome c, Cyt 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/leukemia-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[17]。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[18]。研究顯示長期暴露在高糖環境中會使胰島 β 細胞產生細胞凋亡[19]。當胰島 β 細胞進入凋亡的階段時，會導致胰島素分泌不足，進而造成 T2D [20]。

2.3. 艾草萃取物(*Artemisia argyi* extracts, AAE)

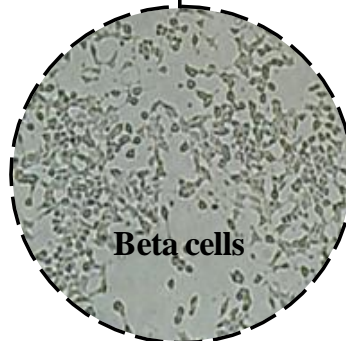
艾草又稱作艾葉、艾蓬、甜艾、香艾、艾蒿、灸草。現代醫學的藥理研究表明艾草是一種廣效抗菌和抗病毒的用藥，對於肺炎雙球菌、溶血性鏈球菌、流感病毒等都具有抑制和殺傷作用[21]，也對呼吸系統疾病有防治功效。中醫學上常以艾草入藥，有理氣血、暖子宮、祛寒濕的功能[22]。現代藥理發現，艾草營養價值高，且揮發油含量多，1,8-桉葉素(1,8-cineole)占 50% 以上，其他有 α -側柏酮(α -thujone)、倍半萜烯醇(sesquiterpenes)及其酯。風乾葉含礦物質 10.13%，脂肪 2.59%，蛋白質 25.85%，以及維生素 A、B1、B2、C

等[23,24]。艾草中含硒量很高，是公認抗癌植物蘆薈的 10 倍，也具有抗腫瘤和抗氧化的功效[25]。最近研究顯示，艾草萃取物應用於臨床 T2D 中表現出有效的降血糖作用[26]。綜合上述，艾草具有許多醫學功能，進而推論艾草是否也具有保護胰島 β 細胞免於氧化損傷之作用。

第三章、實驗架構



H₂O₂-induced cell model



1. Cell viability

- Cell counting
- Flow cytometry/PI stain

2. Cellular metabolism dysfunction

- Glucose-stimulated insulin secretion
- Cell-cycle analysis
- ROS assay
- Annexin V assay

3. Signal transduction assay

- Western blotting

4. Tissue sectioning

- H&E stain

第四章、研究方法及步驟

4.1. 艾草萃取物(*Artemisia argyi* extracts, AAE)製備及成分分析

4.1.1. AAE 製備

將艾草磨碎後，秤取 100 g 的艾草，加入 2 L distilled water，先以 100°C 煮沸之後轉小火煮一小時，重複三次，再將其放冷過濾，以冷凍乾燥製成粉末即為 AAE。

4.1.2. 總多酚含量測定(Total phenolic content assay)

測定多酚的含量，以 gallic acid (GA) (mg/kg) 為標準品 (standard)，甲醇溶解後分別取不同的量，以甲醇稀釋補足 1 ml 後，各加 0.5 ml 之 2 N Folin-Ciocalteu phenol reagent 後搖勻，再加 3 ml Na_2CO_3 (200 g/L) 搖勻，並於室溫靜置 15 分鐘後，加 5 或 10 ml 去離子水後搖勻，以 1250×g 離心 5 分鐘，在波長 725 nm 下測吸光值(甲醇歸零)，吸光值為縱座標，濃度為橫座標，得一標準曲線，並計算回歸方程式。樣品配置好濃度，取 0.1 ml 樣品加 0.9 ml 甲醇，以下步驟同標準品，按標準曲線項下測吸光值，依回歸方程式計算多酚的含量。

4.1.3. 總黃酮含量測定(Total flavonoid content assay)

測定黃酮的含量，以 rutin (mg/ml) 為標準品。甲醇溶解後分別取不同的體積，以 30% 乙醇稀釋並補足體積至 10 ml 搖勻。接著各

加 0.3 ml 之 1 M NaNO₃ 後搖勻，室溫靜置 6 分鐘。再加 0.3 ml 之 10% AlNO₃ 後搖勻，室溫靜置 6 分鐘。最後加入 4 ml 之 4% NaOH 溶液混合均勻，補 0.4 ml 去離子水至刻度，放置 15 分鐘。在波長 510 nm 下測吸光值(乙醇歸零)，吸光值為縱座標，濃度為橫座標，得一標準曲線。並計算回歸方程式。樣品泡好濃度，取 0.1 ml 樣品加 0.9 ml 甲醇，以下步驟同標準品，按標準曲線項下測吸光值，依回歸方程式計算黃酮的含量。

4.2. 細胞培養(Cell culture)

4.2.1. 細胞株來源

此實驗採用大鼠胰臟胰島 β 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

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% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)作為增值培養基。並外加 2.5 g/L glucose、2 g/L sodium bicarbonate、1.0 mM sodium piruvate、1% penicillin/ streptomycin、10 mM Hepes buffer，培養液 pH 值須控制在 7.2~7.3 之間。將細胞解凍後，培養於 25 cm² Nunc™ Cell Culture Treated Flask (25T)，待其長滿後，將細胞移至

75 cm² 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% CO₂ 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. 細胞存活分析(Cell growth assay)

4.31. 細胞計數(Cell counting)

將已於 75T 生長數代穩定的 β 細胞經過細胞計數(cell count)後，以 7.5×10^5 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% CO₂ 之無菌恆溫培養箱中，待細胞貼附及生長後，將原本正常的 RPMI-1640 培養液換成 starvation medium (不含 10% FBS 之細胞培養液)，放入 37°C、5% CO₂ 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 AAE (0、5、10、20、50、100 μM)。如欲模擬細胞遭受氧化壓力的環境，則需額外加入 200 μM H₂O₂，並置於 37°C、5% CO₂ 之無菌恆溫培養箱生長。24 小時後於每一個 well 加入 500 μL 的胰蛋白酶(trypsin)，靜置於 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 500 μL 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。

4.3.2. 細胞生長測試(Flow cytometry/ PI stain)

將已處理之 β 細胞於 24 小時過後，去除培養盤中的上清液，並將細胞收集於 1.5 mL eppendorf 中，再以 PI (propidium iodide) 染色並使用流式細胞儀(Flow cytometry) (Merck) 進行細胞計數。經處理後的細胞經 trypsin-EDTA 作用，並以培養液中沖洗下來，離心再收集細胞後，加入 1 mL PBS 潤洗，再次離心後加入 300 μ L PBS 混合均勻後，取 10 μ L PI 染劑(0.5 mg PI 粉末溶於 50 mL PBS)加入細胞均質液中，避光反應計時 5 分鐘後上機分析細胞存活變化。細胞存活測試利用 PI 染色並以 Flow cytometry 進行，PI 能染上死亡的細胞，但無法使具有完整細胞膜的活細胞染色，因此可測得訊號推算活細胞數。

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

將已處理之 β 細胞於 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 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% CO₂ 之無菌恆溫培養箱反應一小時，收取上清液至 1.5 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% CO₂ 之無菌恆

溫培養箱反應一小時，收取上清液至 1.5 ml 離心管待測，接著使用 Mouse Insulin kit 測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. 細胞週期分析(Cell-cycle analysis)

將已處理之 β 細胞於 24 小時後收取上清液至 15 ml 離心管，並利用 PBS 清洗細胞一次，再加入適量的胰蛋白酶靜置於 37°C 恆溫箱 5 分鐘，使細胞脫落後，加入 1~3 ml 正常培養液中和胰蛋白酶活性，並利用 1000 rpm 離心 5 分鐘再移除上清液，重複上述步驟二至三次後，於每個 15 ml 離心管加入 1 ml 70% 冰酒精並保存在 -20°C 固定 overnight (約 12 小時)，固定完成後，使用 1000 rpm 進行離心 5 分鐘並移除酒精，再加入 1~3 ml 的 PBS 清洗細胞並使用 1000 rpm 進行離心五分鐘，接著移除上清液，重複上述步驟二至三次後，於每一個樣品中加入 1 ml PI/Triton X-100 溶液(終濃度 PI= 20 ug/ml, Triton-X 100= 0.1%, RNase A= 0.2 mg/ml 室溫染 30 分鐘(需避光)，染色完成後即可利用流式細胞儀分析其細胞週期的變化。

4.6. 細胞內 ROS 含量測定(ROS assay)

將已處理之 β 細胞於 24 小時之後移除 starvation medium 並利用 PBS 清洗細胞一至二次，再於每一個 well 中加入 1 ml 利用正常培養液配置的 50 μ M dichlorofluorescein diacetate (DCFDA)，靜置於

37°C、5% CO₂ 之無菌恆溫培養箱中反應一小時，一小時後移除上清液且利用 PBS 清洗細胞一次，再於每一個 well 中加入正常培養液及 200 μM H₂O₂ 模擬細胞在有氧化壓力下的環境，並處理不同劑量之 AAE 靜置於 37°C、5% CO₂ 之無菌恆溫培養箱使其生長。24 小時後，於每一個 well 各加入 1 ml 胰蛋白酶，於 37°C 恆溫箱內反應 5 分鐘使細胞脫落，再加入 10 ml 正常培養液中和胰蛋白酶活性，並收至 15 ml 離心管，利用 1000 rpm 離心 5 分鐘，移除上清液，最後利用 PBS 清洗細胞 1~2 次，以流式細胞儀測定 DCF 螢光含量來求得細胞內 ROS 的含量。

4.7. 細胞凋亡分析(Annexin V assay)

細胞膜內的磷脂絲氨酸(phosphatidyl serine, PS)暴露到膜外，是細胞凋亡的早期變化之一。健康的細胞膜有不對稱性，PS 只存在胞膜內層而不外露。而凋亡細胞的早期變化是停止產能作用，因此無法維持不對稱性，使得磷脂絲氨酸外露。Annexin V-PE (phycoerythrin)是一種鈣依賴性的磷脂結合蛋白，它與 PS 具有高度親和力，可以作為檢測暴露在細胞膜表面 PS 的探針。7-AAD (7-amino-actinomycin D)是一種活性核酸染料，他不能通過正常細胞質，隨著細胞死亡，細胞質對 7-AAD 的通透性增加，進而結合細胞凋亡中的 DNA，因此可以區別正常細胞、壞死細胞及凋亡細胞。實

驗將已處理之 β 細胞於 24 小時後收取上清液至 15 ml 離心管，並利用 PBS 清洗細胞一次，再加入適量的胰蛋白酶靜置於 37°C 恆溫箱 5 分鐘，使細胞脫落後，加入 1~3 ml 正常培養液中和胰蛋白酶活性，並利用 1000 rpm 離心 5 分鐘再移除上清液，以 PBS 清洗細胞再吸收到 eppendorf 離心，最後抽出上清液。加入 0.5 μ L Annexin V 及 1 μ L 7-AAD 配置成的染劑，避光染 15 分鐘，即可以流式細胞儀進行分析。

4.8. 西方墨點法(Western blotting)

4.8.1. 萃取蛋白與蛋白定量(Protein quantification)

將已處理之 β 細胞於 24 小時後於每一個 well 加入 500 μ 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 1~3 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 1~3 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 2~3 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 μ g PMSF、170 μ g/ml leupeptin、1 mM sodium orthovanadate)並利用均質機破壞細胞，再用 12000 rpm 於 4°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°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。

4.8.2. 西方墨點法(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°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 60 V 電泳 3~4 小時，使不同分子量的蛋白質分開。再以 100 V、80~120 分鐘將蛋白轉印到硝化纖維膜(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°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 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。

4.9. 動物實驗(Animal experiment)

4.9.1. 動物品種及飼養方式

由國家衛生研究院(Nation Health Research Institutes, NHRI)實驗動物中心購入 54 隻 5 週齡雄性 BALB/c ByJNarl 小鼠，並且飼養於中山醫學大學實驗動物中心。環境條件為室溫控制在 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相對濕度控制在 $55 \pm 2\%$ 、自動空氣調節(換氣率 12 次/小時)、自動光照控制(12 小時晝夜輪替)，給予一般飼料(Lab diet #5001)與一般飲水適應一週。

4.9.2. 動物分組

將 54 隻 BALB/c ByJNarl 小鼠入室適應一週後，隨機分成 6 組，控制組與毒性組給予一般飼料，其餘給予高脂飼料(#58Y1)。餵食 3 週並確認體重達 25 g，在小鼠進食 4~6 小時後，以腹腔注射 200 μl 鏈佐黴素(streptozotocin, STZ) (40 mg/kg BW)，持續注射 5 天。STZ 誘發兩週後，由尾巴採血測血糖及口服葡萄糖耐受試驗(oral glucose tolerance test, OGTT)、測血壓和體重加以確認，與正常小鼠相比皆有顯著差異($p < 0.05$)，即代表 BALB/c 小鼠糖尿病模式誘發成功。確認誘發成功後隨機進行分組(9 隻/組)，並依照組別分別給予管餵 100 或 200 mg/kg AAE 作為試驗組，並與臨床降血脂脂

藥 simvastatin (200 mg/kg) 作為對照組，進行 6 週後犧牲，並取胰臟組織進行進一步分析。

4.9.2 蘇木精-伊紅染色(Hematoxylin and Eosin, H&E stain)

將小鼠取下的部分胰臟組織進行固定與包埋，並透過切片機裁切 5 μ M 的厚度置於玻片上備用。H&E 染色法是石蠟切片技術裡常用的染色法之一。蘇木精染劑為鹼性，主要使細胞核內的染色質與胞質內的核糖體著色；伊紅為酸性染料，主要使細胞質和細胞外基質中的成分著色。易於被鹼性或酸性染料著色的性質分別稱為嗜鹼性和嗜酸性，透過組織對各染料不同的結合程度，來分析組織結構變化，亦是形態學常用的染色方法。將切片加熱使組織更加貼合玻片，以 xylene 浸泡玻片 5 分鐘兩次，接著依序浸泡 100%酒精 5 分鐘、95%及 75%酒精 3 分鐘，最後以二次水浸泡 3 分鐘兩次來進行脫蠟。以蘇木精染色 3 分鐘後用流動的水沖洗 10 分鐘來去除多餘染劑。接著浸泡 95%酒精 3 分鐘。以伊紅染劑染色 1 分鐘，接著依序浸泡 95%酒精、100%酒精 1 分鐘並各重複 3 次，最後用 xylene 浸泡 1 分鐘重複兩次。待玻片風乾以阿拉伯膠進行封片，靜置 24 小時後即可使用顯微鏡拍照。

4.10. 統計分析(Statistical analysis)

以 SigmaPlot 10.0 程式軟體分析數據，而 mean \pm SD 表示各組實

驗數據，再利用 t-test -Unpaired 來評估各組別間之統計差異。並以*
表示 $P < 0.05$ ，**則表示 $P < 0.01$ ，代表各組之間有顯著差異。

第五章、結果與討論

5.1. 探討 AAE 之功能性成份

首先，進行艾草萃取物(*Artemisia argyi* extracts, AAE)之成份分析，利用 Folin-Ciocalteu 和 Jia 方法測定 AAE 的內含物質，其中總多酚(total polyphenol)的含量約有 $14.3 \pm 0.7\%$ ；而總黃酮(total flavonoid)約占 $26.9 \pm 3.2\%$ (Table 1)。上述成分鑑定試驗確認 AAE 為富含多酚之萃取物，又以黃酮類比例較多。

5.2. 探討不同濃度 AAE 對於胰島 beta 細胞存活之影響

以不同濃度的 AAE (0、5、10、20、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)處理胰島 β 細胞來測試其對細胞之毒性，並分別透過顯微鏡進行細胞計數(Cell counting)以及流式細胞儀(Flow cytometry/PI stain)來分析。兩種實驗方法皆發現，相較於對照組，加入高劑量 AAE (50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的組別其細胞之存活率有明顯抑制之趨勢(Fig. 1A)。因此，後續以無毒性之低劑量 AAE (10 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)探討對 β 細胞的保護作用。

5.3. 探討 AAE 對於 H_2O_2 抑制胰島 beta 細胞生長之影響

為模擬細胞遭受氧化壓力的環境，以胰島 β 細胞處理 200 μM H_2O_2 作為誘導組，再以 H_2O_2 與低劑量的 AAE (0、10、20 μM)合併處理 β 細胞則為試驗組，反應 24 小時後透過觀察細胞型態發現，加入 H_2O_2 的組別細胞皆明顯皺縮及有破碎的現象。接著透過細胞計數

試驗則發現，相較於對照組，經 H_2O_2 處理的誘導組其中細胞數量減少約 30%，顯示處理 H_2O_2 對細胞造成氧化傷害導致細胞存活率明顯下降。然而以 H_2O_2 合併處理 AAE 的組別細胞型態較為完整且數量明顯比誘導組多，約能提升 10~15% 的細胞存活率 (Fig. 1B)。根據上述結果可發現 AAE 具有保護 β 細胞免於 H_2O_2 所造成的氧化傷害，以維持細胞之存活率。

5.4. 探討 AAE 對於 H_2O_2 抑制胰島 beta 細胞內胰島素分泌之影響

後續實驗將 β 細胞以 H_2O_2 單獨及合併 AAE (10、20 μ M) 處理 24 小時後，藉由葡萄糖刺激胰島素分泌試驗 (glucose-stimulated insulin secretion, GSIS) 測定胰島素分泌量，由結果可以發現，以 H_2O_2 處理的誘導組在低糖及高糖環境下，胰島素分泌量分別下降約 1 及 2 μ g/L，顯示 H_2O_2 造成的氧化傷害使細胞的分泌功能減弱。然而以 H_2O_2 合併 AAE 處理的組別，在高糖環境下胰島素分泌量明顯恢復，大約提升至對照組的 90% (Fig. 2)。根據試驗結果可發現 AAE 能夠有效回復 H_2O_2 氧化傷害造成的胰島素分泌能力降低。

5.5. 探討 AAE 對於 H_2O_2 調控胰島 beta 細胞生長週期及氧化傷害之影響

藉由流式細胞儀 (flow cytometry) 分析細胞在各個生長週期的分布情形，可以發現以 H_2O_2 單獨處理之誘導組的細胞處於 DNA 合成

期(S phase)數量較少；而合併 AAE 處理之試驗組停留 S phase 的細胞數明顯上升，推論因為 H_2O_2 使細胞受到傷害，因而無法使細胞進入 S phase 進行 DNA 合成(Fig. 3A)。接著利用流式細胞儀分析 ROS 含量表現，從結果發現經 H_2O_2 誘導的組別其細胞內 ROS 含量上升約 20%，也代表細胞中氧化壓力上升；而合併 AAE 能有效抑制 ROS 的含量，且具有濃度依賴性效應(Fig. 3B)。因此推論 AAE 能藉由降低細胞中 ROS 含量，進而緩解氧化壓力，以及恢復細胞進入 S 期，以促進 DNA 合成並減少細胞的氧化性傷害。

5.6. 探討 AAE 對於 H_2O_2 誘導胰島 beta 細胞凋亡之影響

進一步，為分析 AAE 是否透過抑制細胞凋亡現象來達到保護細胞的目的，利用細胞凋亡之指標性染劑 Annexin V-PE 加上 7-AAD 對細胞進行染色並以流式細胞儀測定。實驗數據顯示，不論合併高或低劑量 AAE 處理的組別其細胞凋亡比例對比處理 H_2O_2 誘導組並無達到統計變化之趨勢(Fig. 4)，故推論 AAE 可能並非透過抑制細胞凋亡以達到保護細胞作用。

5.7. 探討 AAE 對於 H_2O_2 抑制胰島 beta 細胞生長週期控蛋白表現之影響

在分子機制的分析，為探討 β 細胞生合成相關蛋白表現，以 H_2O_2 單獨及合併 AAE 處理 24 小時，再以西方墨點法(Western

blotting)進行細胞週期 S 期調控蛋白表現量測定。從蛋白定量結果可以發現 AAE 試驗組與誘導組相比，增殖細胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)和轉錄因子 E2F1 蛋白表現量有增加的趨勢 (Fig. 5)，而週期素依賴性蛋白激酶(cyclin dependent kinase, cdk1)蛋白量變化並不顯著，此結果證實 AAE 能夠促進增生蛋白 PCNA 和細胞週期調控分子 E2F1 表現量，但對於 cdk1 仍需進一步探討其與之週期素(cyclins)交互作用的影響。

5.8. 探討 AAE 對於 H₂O₂ 誘導胰島 beta 細胞內質網壓力之影響

後續則分析細胞內質網壓力(endoplasmic reticulum stress, ER stress)相關分子機制，以 H₂O₂ 單獨及合併 AAE 處理的 β 細胞內 ER stress 蛋白(包含：ATF-6、XBP-1、PERK 和 CHOP)表現量有何改變。從實驗結果可以發現經 H₂O₂ 誘導組對比合併處理 AAE 試驗組，其中以 ER stress 上游蛋白 PERK、XBP-1、ATF-6 表現量明顯增加，並於 CHOP、XBP-1、ATF-6 等蛋白表現有因為加入 AAE 而減少的趨勢 (Fig. 6)。因此可以推論 AAE 具有能夠緩解 ER stress 的功效，然 AAE 對於這些調控蛋白磷酸化表現需進一步確認，目前研究仍持續進行中。

5.9. 探討 AAE 對於 HFD 合併 STZ 誘發糖尿病小鼠中胰臟組織型態之影響

動物實驗中，透過 H&E 染色分析胰臟組織中胰島面積。以高脂 (high fat diet, HFD) 合併 STZ 誘導組與對照組相比其胰臟組織中之胰島面積範圍減少；而以 AAE 及臨床藥物 simvastatin 處理的組別則有使胰島面積回復之趨勢(Fig. 7)。

5.10. 總結

由目前實驗結果可以發現，AAE 可能透過提升 β 細胞內 DNA 合成蛋白表現的增加來彌補受到氧化損傷的細胞，進而達到回復細胞的存活率。結果也顯示 AAE 雖然對於 H_2O_2 誘發 β 細胞凋亡的影響並不顯著；而其能改善細胞分泌胰島素的能力，並且能減少 H_2O_2 造成的氧化壓力，促使細胞內 ROS 含量下降，抑制 ER stress 以減緩產生的細胞受損(Fig. 8)。總結，我們提出艾草萃取物 AAE 具有保護胰島 β 細胞免於氧化性損傷之作用，透過降低氧化壓力及 ER stress 達到改善 T2D 的功效。

第六章、參考文獻

1. Melmed S, Polonsky, Kenneth S, Larsen, Reed P, Kronenberg, Henry M. Williams textbook of endocrinology 12th. 2005.
2. Lee H, Im SW, Jung CH, Jang YJ, Ha TY, Ahn J. Tyrosol, an olive oil polyphenol, inhibits ER stress-induced apoptosis in pancreatic β -cell through JNK signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Jan 15;469(3):748-52.
3. Handorf AM, Sollinger HW, Alam T. Insulin gene therapy for type 1 diabetes mellitus. *Exp Clin Transplant*. 2015 Apr.
4. Plaisance V, Brajkovic S, Tenenbaum M, Favre D, Ezanno H, Bonnefond A, Bonner C, Gmyr V, Kerr-Conte J, Gauthier BR, Widmann C, Waeber G, Pattou F, Froguel P, Abderrahmani A. Endoplasmic Reticulum Stress Links Oxidative Stress to Impaired Pancreatic Beta-Cell Function Caused by Human Oxidized LDL. *PLoS One*. 2016 Sep 16;11(9):e0163046.
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. Ripsin CM, Kang H, Urban RJ. Management of blood glucose in type 2 diabetes mellitus. *Am Fam Physician*. 2009 Jan 1;79(1):29-36.
7. Pasquier, F. Diabetes and cognitive impairment: how to evaluate the cognitive status?. *Diabetes Metab*. 2010 Oct.
8. Risérus U, Willett WC, Hu FB. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. *Prog Lipid Res*. 2009 Jan;48(1):44-51.
9. Lu J, Tan M, Cai Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism.

Cancer Lett. 2015 Jan 28.

10. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007. 39(1): 44-84.
11. Srinivasan S, Ohsugi M, Liu Z, Fatrai S, Bernal-Mizrachi E, Permutt MA. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis is partly mediated by reduced insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and increased glycogen synthase kinase-3beta in mouse insulinoma cells. *Diabetes.* 2005 Apr. 54(4):968-75.
12. Bernales S, Papa FR, Walter P. Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22:487-508. Review.
13. Sovolyova N, Healy S, Samali A, Logue SE. Stressed to death - mechanisms of ER stress-induced cell death. *Biol Chem.* 2014 Jan. 395(1):1-13.
14. Li Y, Guo Y, Tang J, Jiang J, Chen Z. New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2014 Aug;46(8):629-40.
15. Moffitt KL, Martin SL, Walker B. From sentencing to execution--the processes of apoptosis. *J Pharm Pharmacol.* 2010 May;62(5):547-62.
16. Wolf B.B., Green D.R.. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J. Biol. Chem.* 1999. 274: 20049-20052.
17. Cory S., Huang D.C., Adams J.M., The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis, *Oncogene.* 2003. 22: 8590–8607.
18. 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.
19. Alshatwi AA, Subash-Babu P. Aloe-Emodin Protects RIN-5F (Pancreatic β -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.
 20. 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 Aug;58(8):1814-26.
 21. Hu Y, Yang Y, Ning Y, Wang C, Tong Z. Facile preparation of *Artemisia argyi* oil-loaded antibacterial microcapsules by hydroxyapatite-stabilized Pickering emulsion templating. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013 Dec 1. 112: 96-102.
 22. Yun C, Jung Y, Chun W, Yang B, Ryu J, Lim C, Kim JH, Kim H, Cho SI, Anti-Inflammatory Effects of *Artemisia* Leaf Extract in Mice with Contact Dermatitis In Vitro and In Vivo. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:8027537.
 23. Huang HC, Wang HF, Yih KH, Chang LZ, Chang TM. Dual bioactivities of essential oil extracted from the leaves of *Artemisia argyi* as an antimelanogenic versus antioxidant agent and chemical composition analysis by GC/MS. *Int J Mol Sci.* 2012 Nov

12;13(11):14679-97.

24. Zhang WJ, You CX, Yang K, Chen R, Wang Y, Wu Y, Geng ZF, Chen HP, Jiang HY, Su Y, Lei N, Ma P, Du SS, Deng ZW. Bioactivity of essential oil of *Artemisia argyi* Lévl. et Van. and its main compounds against *Lasioderma serricorne*. *J Oleo Sci.* 2014;63(8):829-37.
25. Bao X, Yuan H, Wang C, Liu J, Lan M. Antitumor and immunomodulatory activities of a polysaccharide from *Artemisia argyi*. *Carbohydr Polym.* 2013 Oct 15;98(1):1236-43.
26. Sun X, Sun H, Zhang J, Ji X. *Artemisia* Extract Improves Insulin Sensitivity in Women With Gestational Diabetes Mellitus by Up-Regulating Adiponectin. *J Clin Pharmacol.* 2016 Dec;56(12):1550-1554.

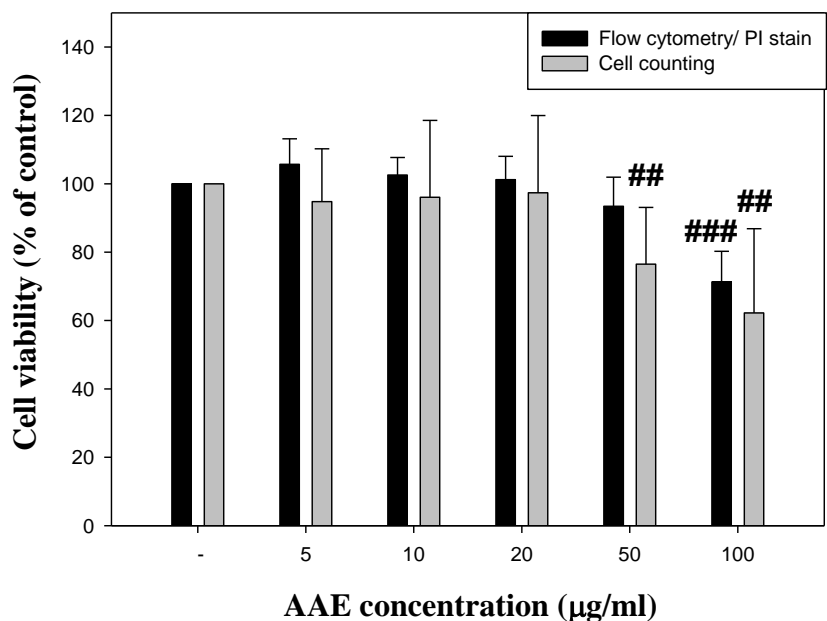
第七章、附圖

Table 1 – Composition of *Artemisia argyi* extracts (AAE)

| Composition | AAE |
|---|-------------|
| Total polyphenol (Folin-Ciocalteu method) | 14.3 ± 0.7% |
| Total flavonoid (Jia method) | 26.9 ± 3.2% |

Figure 1

(A)



(B)

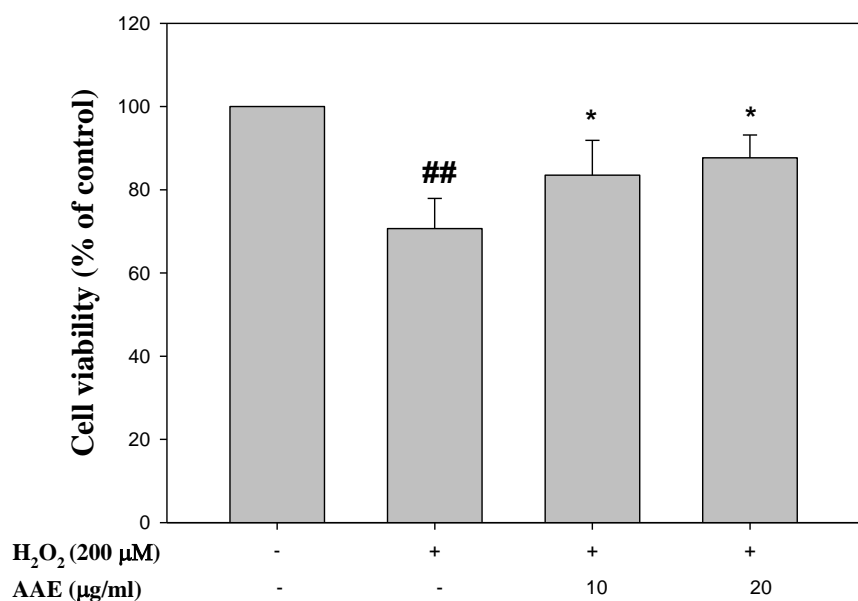


Fig. 1. Effect of AAE alone or in combination with H₂O₂ on β-cell viability. (A) β-cells were treated with various concentrations of AAE (0-100 µg/ml) for 24 h. (B) β-cells were treated with 200 µM H₂O₂ in the presence or absence of the indicated concentrations of AAE (10 and 20 µg/ml) for 24 h. Cell viability was analyzed by flow cytometry/PI stain or cell counting assay. The results represent the average of three independent experiments ± SD. #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with the control. *p < 0.05 compared with the H₂O₂ group.

Figure 2

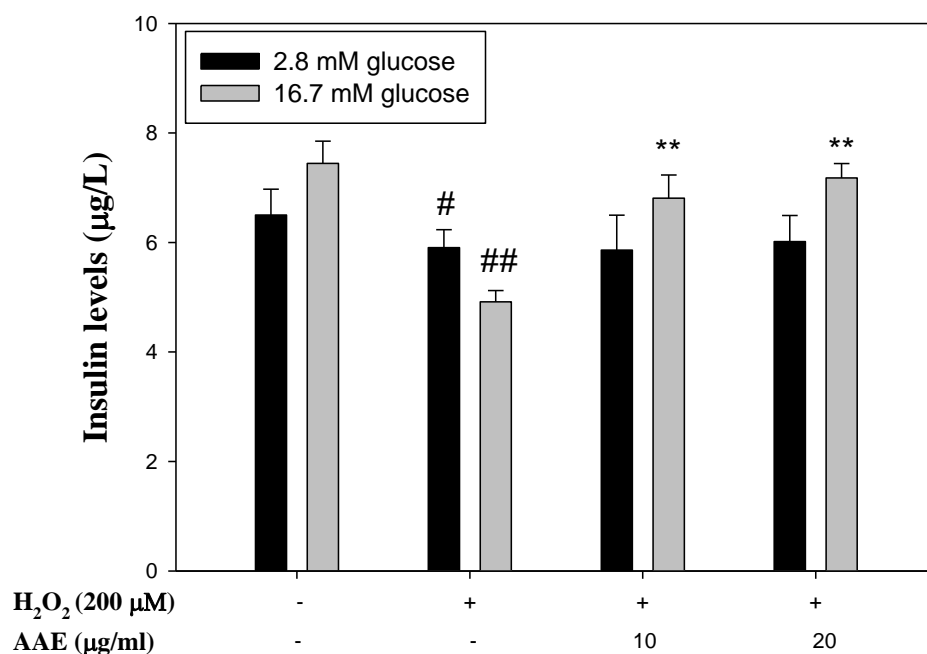


Fig. 2. Effect of AAE combined H₂O₂ on insulin secretion of β -cell. β -cells were treated with 200 μ M H₂O₂ in the presence or absence of the indicated concentrations of AAE (10 and 20 μ g/ml) for 24 h. The insulin secretion was assessed by measuring the GSIS. The results represent the means \pm SD of three repeats from three independent experiments. #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with the control. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the H₂O₂ group.

Figure 3

(A)

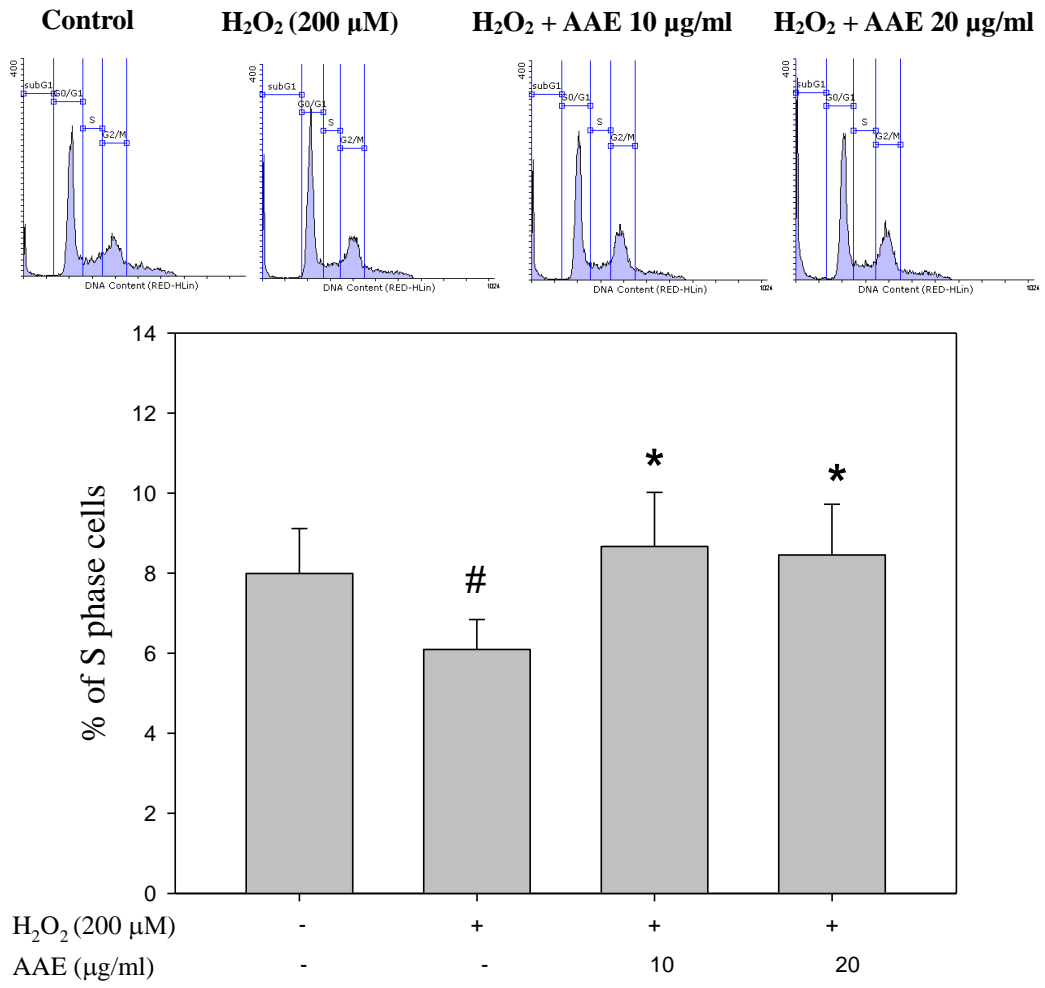


Figure 3

(B)

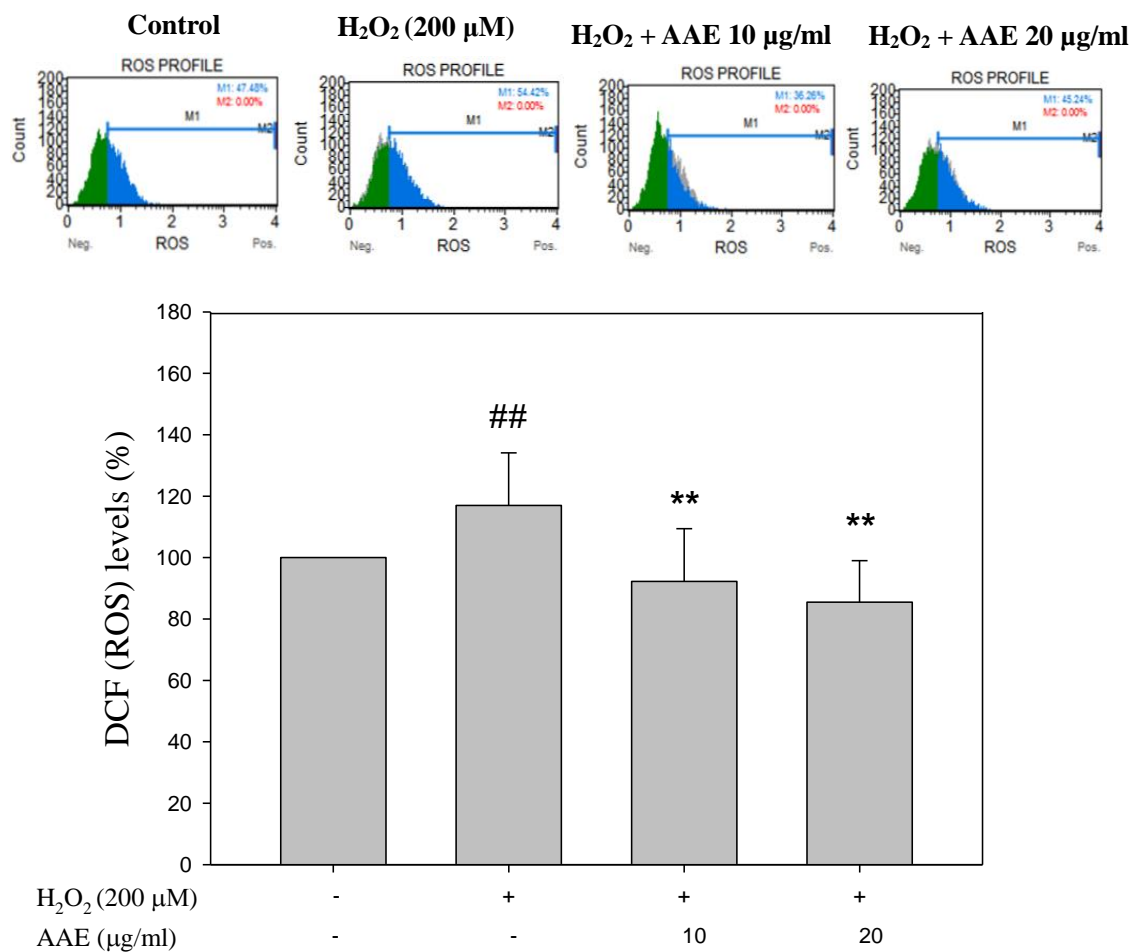


Fig. 3. Effect of AAE on H₂O₂-induced β -cell DNA synthesis and oxidative injury. β -cells were treated with 200 μ M H₂O₂ in the presence or absence of the indicated concentrations of AAE (10 and 20 μ g/ml) for 24 h. (A) The cell cycle distribution was analyzed using flow cytometry. The position of the S peak indicates DNA synthesis, and the subG1, G0/G1, and G2/M peaks are indicated. Quantitative assessment of the cell number percentage in the S phase was indicated by PI, and represents (B) The intracellular ROS level was assessed by measuring the H₂DCF-DA assay. The results represent as mean \pm SD (n = 3) of three independent experiments \pm SD. #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with the control. *p < 0.05, **p < 0.01 compared with the H₂O₂ group.

Figure 4

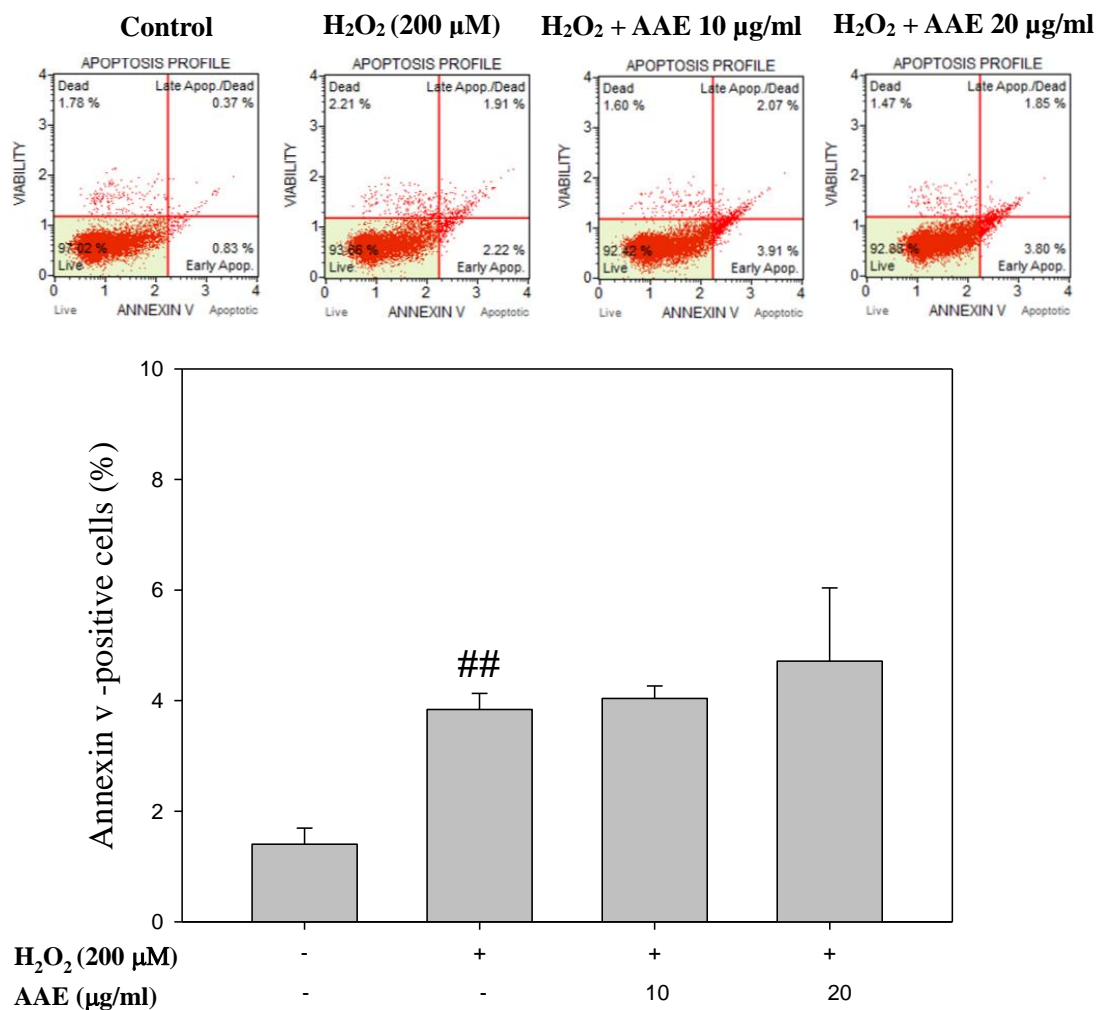


Fig. 4. Effect of AAE on H₂O₂-induced β-cell DNA apoptosis. β-cells were treated with 200 μM H₂O₂ in the presence or absence of various concentrations of AAE (10 and 20 μg/ml) for 24 h. Quantification of early and late apoptotic cells, and necrotic cells was analyzed by flow cytometry using annexin V staining. The proportion of annexin V-positive cells represents as mean ± SD (n = 3) of three independent experiments ± SD. #p < 0.05, ##p < 0.01 compared with the control.

Figure 5

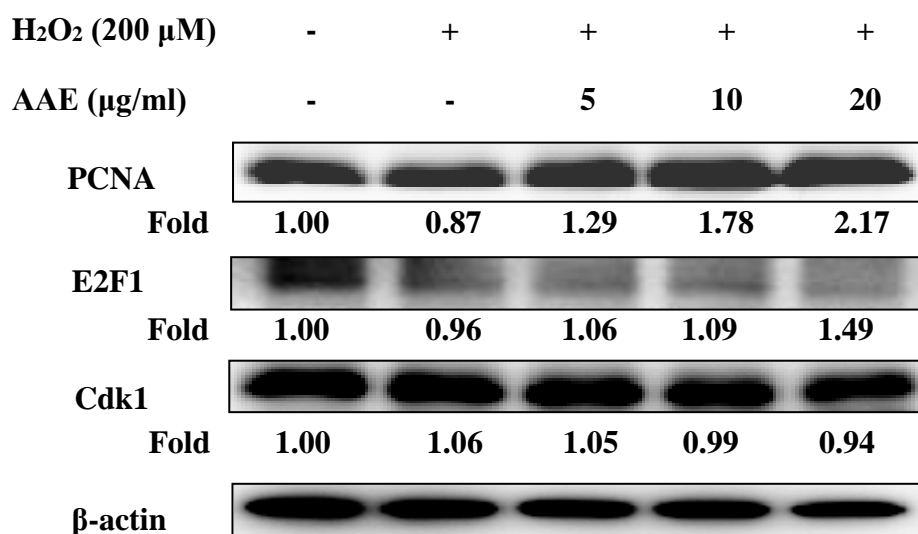


Fig. 5. Effect of AAE on S-phase regulatory proteins in H₂O₂-treated β-cells. β-cells were treated with 200 μM H₂O₂ in the presence or absence of the indicated concentrations of AAE (5, 10 and 20 μg/ml) for 24 h. The protein levels of PCNA, E2F1, and cdk1 were determined by Western blotting. β-actin served as an internal control. Determined expression of the protein was subsequently quantified by densitometric analysis with that of control being 1.00 fold, as shown just below the gel data. Results are representative of at least three independent experiments.

Figure 6

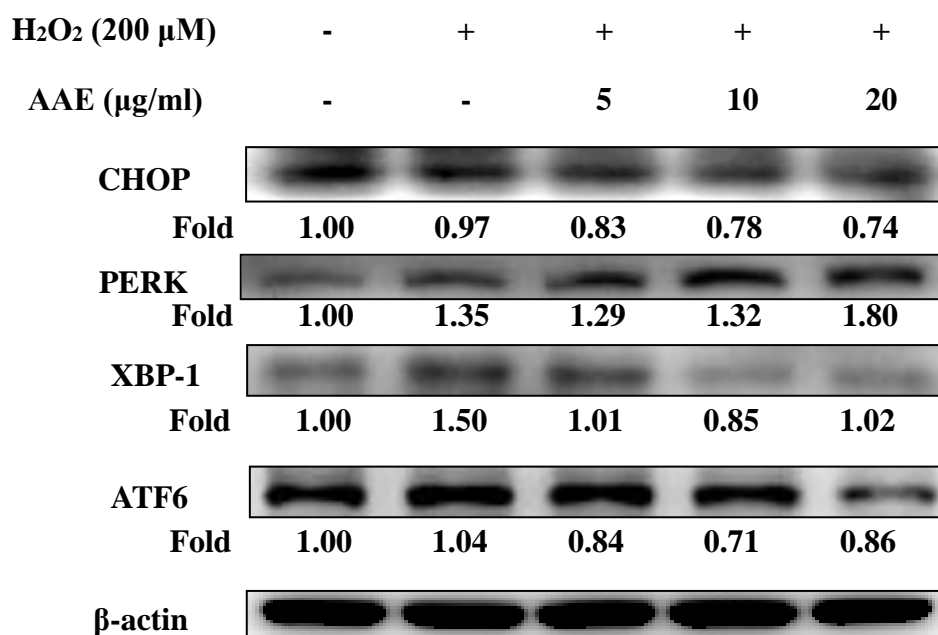


Fig. 6. Effect of AAE on ER stress in the H₂O₂-treated β-cell. β-cells were treated with 200 μM H₂O₂ in the presence or absence of various concentrations of AAE (5, 10 and 20 μg/ml) for 24 h. The protein levels of CHOP, PERK, XBP-1, and ATF6 were determined by Western blotting. β-actin served as an internal control. Determined expression of the protein was subsequently quantified by densitometric analysis with that of control being 1.00 fold, as shown just below the gel data. Results are representative of at least three independent experiments.

Figure 7

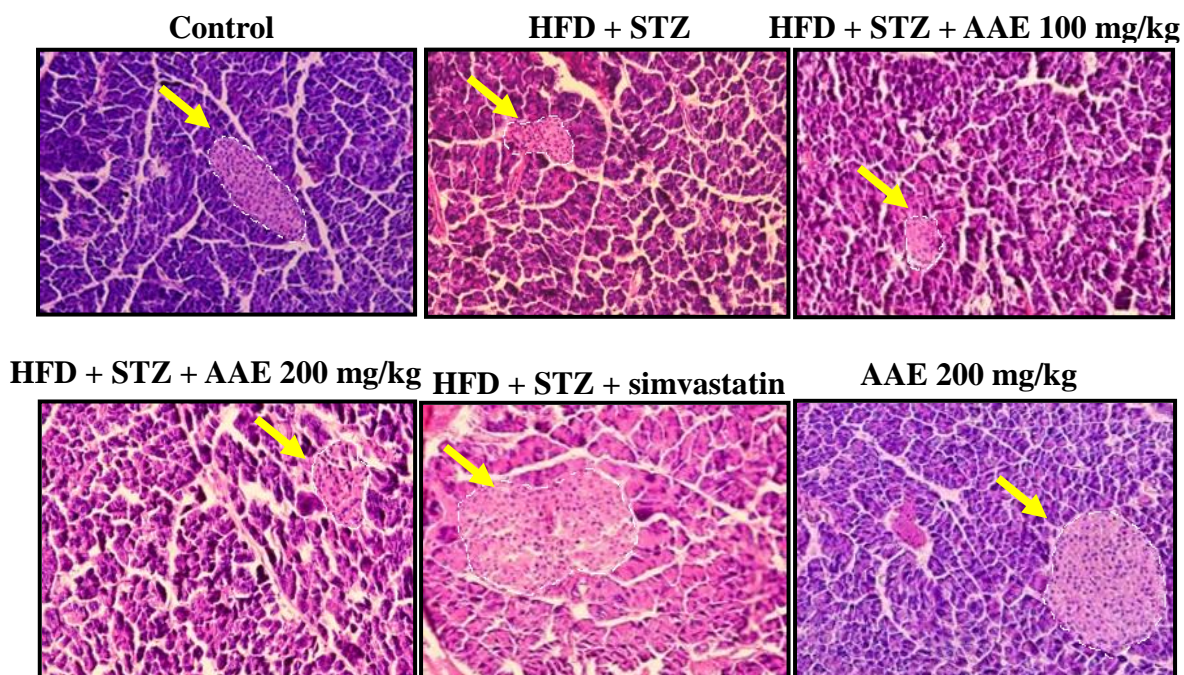


Fig. 7. Effect of AAE on pancreas histopathology in HFD combined with STZ treatment in mice. HFD combined STZ treatment-induced the diabetes of mice were treated with AAE (1% and 2%) or simvastatin (200 mg/kg) for 6 weeks. The mice were sacrificed after 6 weeks, and pancreas tissue was collected for analysis. Representative 200X images of pancreas section from different groups were stained with H&E to display the pancreas tissue architecture and the morphology of islets cells (arrows).

Figure 8

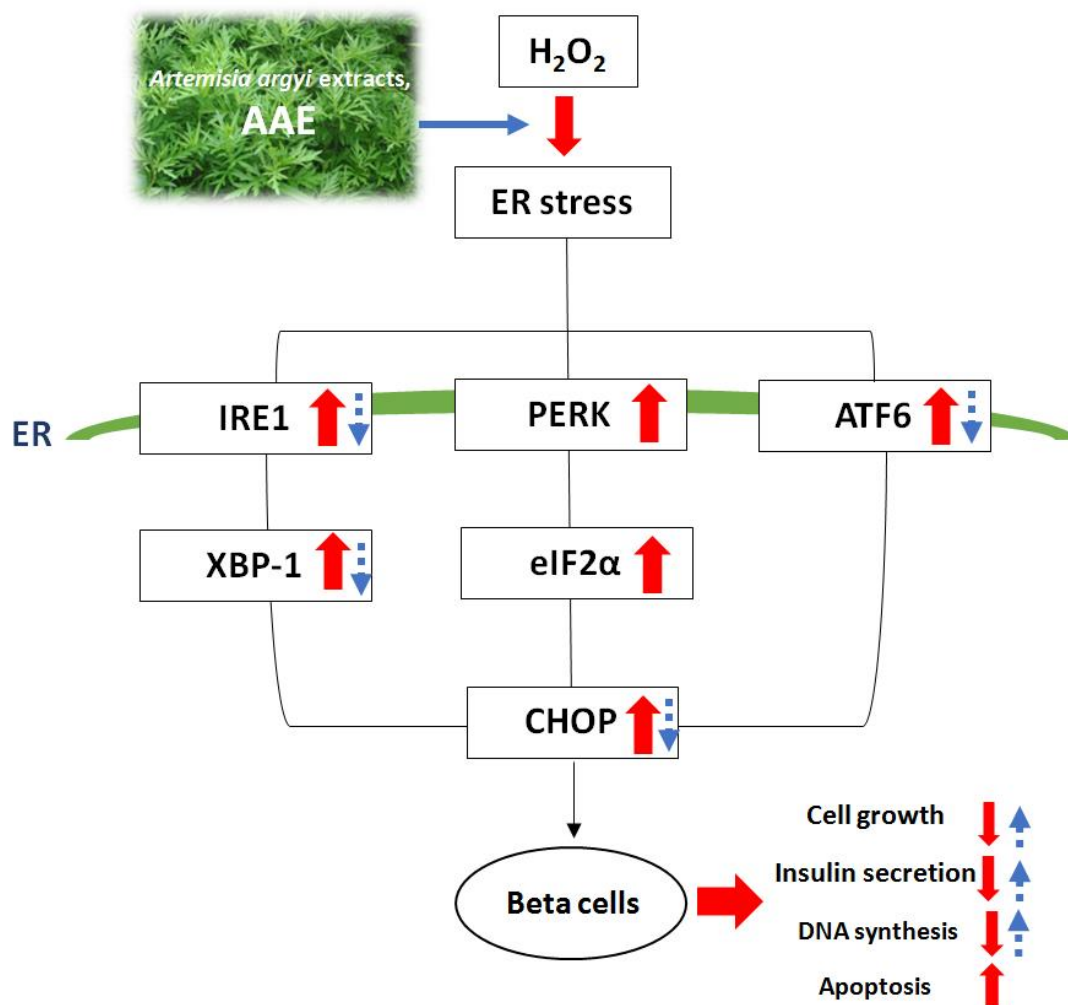


Fig. 8. Schematic representation of β -cells protective effect of AAE. H₂O₂ inhibits cell growth, insulin secretion, and DNA synthesis, as well as induces apoptosis through ER stress-mediated mechanisms in β -cells. AAE functions against H₂O₂ via the inactivation of XBP-1 and ATF-6 pathways that subsequently inhibited the β -cells injury. Red solid line arrows represented changes in response to H₂O₂; Blue dotted line arrows represented changes in H₂O₂-stimulated cells receiving AAE intervention.