科技部補助專題研究計畫成果報告
期末報告

開發鯽魚複方製劑為抗高脂飲食引發代謝症候群之研究
研究成果報告(精簡版)

計 畫 類 別 ：個別型計畫
計 畫 編 號 ：NSC 102-2622-B-040-002-CC3
執 行 期 間 ：102 年 06 月 01 日至 103 年 05 月 31 日
執 行 單 位 ：中山醫學大學營養學系（所）

計畫主持人：陳璟賢
共同主持人：徐成金
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：蕭亭萱
碩士班研究生-兼任助理人員：李亞樺

處 理 方 式 ：
1.公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，研究成果報告(精簡版)2 年後可公開查詢
2.「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否
3.「本報告」是否建議提供政府單位施政參考：是，衛福部

中 華 民 國 103 年 08 月 19 日

中 文 摘 要 ： 代謝症候群(metabolism syndrome)是一種包含肥胖、血壓偏高、血糖偏高以及血脂異常等多項危險因子綜合表現的臨床徵候，伴隨著這些危險因子的增加，罹患心血管疾病、糖尿病和脂肪肝也相對提升。這三個代謝性疾病已被證明可用飲食來控制，因此利用健康食品來預防或改善代謝症候群應有其發展的可行性。鯽魚複方製劑(Carassius auratus complex formula，CACF)是以鯽魚與山藥、枸杞、熟地黃等中藥熬製而成的傳統中藥配方，在中國已應用於治療糖尿病。本實驗分別利用氧化壓力 H2O2 引發胰島 beta 細胞衰竭之細胞模式，以及高脂飲食(high fat diet，HFD)合併 streptozotocin (STZ)誘發代謝症候群之動物模式，分析 CACF 對於代謝症候群之影響。在細胞實驗中發現，CACF 經由增加 PI3K、NF-kB 與 IRS-2 等蛋白表現，保護大鼠胰島β細胞瘤細胞(RIN-m5F)對抗 H2O2 刺激下所導致細胞凋亡(apoptosis)和活性氧(reactive oxygen species，ROS)的產生。CACF 也能夠促使 RIN-m5F 細胞胰島素分泌逐漸回升，且增加胰島素分泌相關基因(包含 PDX-1、GK、GLUT-2 與 IRS-2)表現。在動物實驗中，評估代謝症候群症狀方面以體重、腹部脂肪堆積及副睪脂肪含量作為肥胖指標；以血糖、血清胰島素、HOMA-IR 及 OGTT 血糖變化評估是否胰島素阻抗；以及分析血清中發炎激素及脂肪細胞激素濃度；另測量肝臟抗氧化相關指標(TBARS、GSH、GPx)，並以 H&E 染色觀察肝臟和腎臟當中異常組織型態變化。結果顯示 CACF 試驗組之動物胰島素阻抗表現比 HFD 合併 STZ 誘導組減少許多；並發現 CACF 可抑制由 HFD 合併 STZ 所誘導血清中 TNF-α、IL-6 及 leptin 之分泌量。隨著 CACF 處理劑量增加對於各組織脂質過氧化表現、肝臟脂肪堆積、腎臟發炎細胞浸潤及蛋白尿現象也都有減緩之趨勢。由以上實驗結果顯示，CACF 具有保護胰島β細胞衰竭作用、以及極佳的降血脂、抗氧化和抗發炎活性，並能抑制代謝症侯群之表徵。

中文關鍵詞： 代謝症候群、鯽魚複方製劑、胰島β細胞、細胞凋亡、抗氧化、胰島素阻抗、降血脂、抗發炎

英 文 摘 要 ： Metabolic syndrome is characterized by obesity, hypertension, hyperglycemia and dyslipidemia as well as a cluster of risk factors. Along with these risk factors rising, the probability of suffering from cardiovascular disease, diabetes and fatty liver would be increased. Carassius auratus complex formula (CACF), including Carassius auratus, Rhizoma dioscoreae, Lycium chinense, and Rehmannia glutinosa

Libosch, is a combination prescription of traditional Chinese medicine, which always has been used to treat diabetes in ancient China. Thus, this study aimed to study the effect of CACF on anti-metabolic syndrome. In vitro study, CACF improved the survival of RIN-m5F, an insulin-producing cell line derived from rat insulinoma tissue, from H2O2-induced viability loss. In addition, H2O2-induced the occurrence of apoptosis and the production of reactive oxygen species (ROS) were reduced by CACF. Molecular data showed that protective effect of CACF might be mediated via up-regulation of PI3K, NF-kB and IRS-2. CACF also reversed insulin secretion, and increased the mRNA levels of insulin secretion-related genes, including PDX-1, GK, GLUT-2 and IRS-2. In vivo study, the mice were fed high fat diet (HFD) combined streptozotocin (STZ) supplemented with CACF (30 mg/kg and 150 mg/kg) for 8 weeks. To analyze metabolic syndrome, body weight and epididmyal fat accumulation were used as indicators of obesity. Fasting serum glucose, insulin, HOMA-IR, and oral glucose tolerance (OGTT) were used as indicators of insulin resistance. For exploring the possible mechanism for diet-induced metabolic syndrome, adipocytokines (leptin and adiponectin) and proinflammatory factors (TNF-α and IL-6) were measured in serum, as well as the presence of fat droplets and peri-portal fibrosis in liver was examined histologically. Feeding CACF to mice significantly reduced these hallmarks of metabolic syndrome induced by HFD combined STZ treatment. CACF improved metabolic syndrome in vivo via possessing hypoglycemic, hypolipidemic, antioxidant and anti-inflammatory activities. These results suggested that CACF potentially could be developed as an anti-metabolic syndrome agent and deserve further investigation.

英文關鍵詞： metabolic syndrome, Carassius auratus complex formula, insulin-producing cell line, apoptosis, insulin resistance, hypoglycemic, hypolipidemic, antioxidant, anti-inflammatory

科技部補助產學合作研究計畫成果精簡(進度)報告

計畫名稱：開發鯽魚複方製劑為抗高脂飲食引發代謝症候群之研究

計畫類別：□ 先導型　　□ 開發型　　■ 技術及知識應用型

計畫編號：NSC102－2622－B －040－002－CC3

執行期間：　102 年　6 月　1 日 至　103 年　5 月　31 日

執行單位：中山醫學大學 營養學系(所)

計畫主持人：陳璟賢

共同主持人：徐成金

計畫參與人員：李亞樺、蕭亭萱

研究摘要（500 字以內）：代謝症候群(metabolism syndrome)是一種包含肥胖、血壓偏高、血糖偏高以及血脂異常等多項危險因子綜合表現的臨床徵候，這代謝性疾病已被證明可用飲食來控制，因此利用健康食品來預防或改善代謝症候群應有其發展的可行性。鯽魚複方製劑(Carassius auratus complex formula，CACF)是以鯽魚與山藥、枸杞、熟地黃等中藥熬製而成的傳統中藥配方，在中國已應用於治療糖尿病。本實驗分別利用氧化壓力 H_2O_2 引發胰島β細胞衰竭之細胞模式，以及高脂飲食(high fat diet，HFD)合併 streptozotocin (STZ)誘發代謝症候群之動物模式，分析 CACF 對於代謝症候群之影響。在細胞實驗中發現，CACF 經由增加 PI3K、NF-κB 與 IRS-2 等蛋白表現，保護大鼠胰島β細胞瘤細胞(RIN-m5F)對抗 H_2O_2 刺激下所導致細胞凋亡(apoptosis)。CACF 也能夠促使 RIN-m5F 細胞胰島素分泌逐漸回升，且增加胰島素分泌相關基因(包含 PDX-1、GK、GLUT-2 與 IRS-2)表現。在動物實驗，CACF 試驗組之動物胰島素阻抗表現比 HFD 合併 STZ 誘導組減少許多；並發現 CACF 可抑制由 HFD 合併 STZ 所誘導血清中 TNF-α、IL-6 及 leptin 之分泌量。隨著 CACF 處理劑量增加對於各組織脂質過氧化表現、肝臟脂肪堆積、腎臟發炎細胞浸潤及蛋白尿現象也都有減緩之趨勢。由以上實驗結果顯示，CACF 具有保護胰島β細胞衰竭作用、以及降血脂、抗氧化和抗發炎活性，並能抑制代謝症候群之表徵。

人才培育成果說明：本計畫執行期間，共 3 位碩士級學生、2 位大學部學生參與協助研究進行，並於執行期限內完成體外細胞實驗與體內動物實驗之研究分析，對於代謝症候群的研究背景與研究方法均得到良好教育與訓練。

技術研發成果說明：本研究計畫成果與萃取技術已進行技術轉移，將有助於鯽魚複方製

品農漁業產業推廣與相關保健產品的開發。經由本研究成果繼續規劃進入人體試驗，強化臨床效果。

技術特點說明：1. 鯽魚複方製劑改善代謝症候群；2. 鯽魚複方製劑降血糖、抑制胰島素阻抗作用；3. 鯽魚複方製劑增加胰島素敏感性以及保護胰臟β-細胞作用。

可利用之產業及可開發之產品：。因此經由本次研究證實鯽魚複方製劑可改善第 1 型及第 2 型糖尿病，並且提出具有保護胰臟 β-細胞的作用。本研究利用高脂及高熱量飲食模式誘發代謝症候群的發生來進一步觀察鯽魚複方製劑可以有效降低腹部肥胖及代謝症候群的相關指標以達到進一步預防第 2 型糖尿病等併發症的發生。經由本研究開發鯽魚複方製劑為具有多重有效成份，可抑制代謝症候群多項危險因子的單一健康食品，也可以作為預防或輔助治療代謝症候群保健食品開發研究之參考。

推廣及運用的價值：代謝症候群在全世界有急速增加的趨勢，代謝症候群會導致糖尿病、心腦血管疾病、肝腎相關疾病等盛行率攀升，除減低危險因子外，若能將鯽魚複方製劑開發為具預防或改善代謝症候群之健康食品，對於減低國家醫療負擔、提昇農業價值、發展食品生技產業等都具有相當貢獻。本研究建立高脂肪誘導代謝症候群之實驗動物模式作為探討代謝症候群致病成因之平台，可應用為將來發展預防及改善代謝症候群保健食品開發之研究，在學術研究上有貢獻。

處理方式：

1. 立即公開
   (依規定，精簡報告係可供科技部立即公開之資料，並以 4 至 10 頁為原則，如有圖片或照片請以附加檔案上傳，如因涉及專利、技術移轉案或其他智慧財產權、影響公序良俗或政治社會安定等，而不宜對外公開者，請勿將其列入精簡報告)
2. **本研究是否有嚴重損及公共利益之發現：■否 □是**
3. **本報告是否建議提供政府單位參考 □否 ■是， 衛福部（請列舉提供之單位；本部不經審議，依勾選逕予轉送。）**

中　華　民　國　103 年　8 月　31 日

前言、

一、 代謝症候群（Metabolism syndrome）

代謝症候群是一種包含肥胖、血壓偏高、血糖偏高以及血脂代謝異常等多項危險因子綜合表現的臨床徵候，伴隨著這些危險因子的增加，罹患心血管疾病（cardiovascular diaease）、糖尿病（diabetes mellitus, DM）和脂肪肝（fatty liver）也相對提升。在 1980 年代，對於這種結合心血管疾病和代謝失常的症候群有〝X 症候群（X syndrome）〞和〝胰島素抗性症候群（insulin resistance syndrome）〞等不同的名稱(1, 2)。於 1998 年，世界衛生組織（WHO）率先提出代謝症候群的定義，認為胰島素阻抗（insulin resistance）是該病症最重要的指標，另外合併以下指標兩項及以上者，即為代謝症候群；這些指標包括肥胖（男性腰臀比大於 0.9，女性腰臀比大於 0.85；或 BMI 在 30 以上者）；血壓大於 140/90 mmHg)；脂質代謝異常〔三酸甘油酯（triglycerides, TG）大於 150 mg/dL 或高密度脂蛋白（high density lipoprotein, HDL）過低：男性低於 35 mg/dL，女性低於 45 mg/dL〕；微蛋白尿(3)。國內現行代謝症候群之判定標準（依據 2007 年衛生署國民健康局公告版）共列腰圍、血壓、空腹血糖濃度、三酸甘油酯及高密度脂蛋白膽固醇等 5 項危險因子，符合其中 3 項即認定為代謝症候群患者。據當年度台灣地區高血壓（hypertensin）、高血糖（hyperglycemia）、高血脂（hyperlipidemia）之追蹤調查研究顯示：國人代謝症候群盛行率：20 歲以上為 19.7%（男 20.3%，女 19.3%），且隨年齡上升而有增加的趨勢。代謝症候群的危險性來自於它與第 2 型糖尿病及心血管疾病發生的危險因子具高度關聯性，而胰島素阻抗及第 2 型糖尿病又會加速粥狀動脈硬化（atherosclerosis）發生，因而目前備受醫學界矚目。研究指出，患有代謝症候群之非糖尿病患者日後罹患第 2 型糖尿病的機率較正常人增加 4 倍，罹患心血管疾病的危險性則增加 30% (4)。代謝症候群的形成機制雖未完全釐清，但主要因素在於肥胖與胰島素阻抗，而產生葡萄糖及脂肪代謝的異常，進而衍生出上述各種疾病。一般認為胰島素阻抗是所有症狀之間的共同連結因子，故目前研究多著重在阻抗的發生與血糖的恆定及心血管疾病發展間的關係。此外，脂質異常（lipid disorder）及發炎現象也被認為是導致代謝症候群的主要機制之一(5, 6)。代謝症候群的成因可能與先天遺傳及人口學等生物因素有關，但最重要的還是不活動或少活動生活型態、肥胖人口增加、生活壓力及其他不良健康行為等因素所造成。在治療代謝症候群相關疾病之藥品方面，如 statin 等具有 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-Coenzyme A (CoA) reductase 抑制作用之藥物常被用於降低患者血清中膽固醇(7)；而可增加高密度脂蛋白膽固醇之 niacin 皆為目前治療及研究之主流(8)。但目前這類上市藥物具有體重增加，肝毒性和心臟衰竭等副作用，因此開發有效且安全以防治代謝症候群的天然食材備受重視。綜合上述，代謝症候群的成因主要由胰島素阻抗、脂質異常及動脈粥狀硬化所組成。其中胰島素阻抗是代謝症候群的初期症徵，也被認為是第 2 型糖尿病發生的前兆。

1.1. 胰島素阻抗（insulin resistance）

胰島素（insulin）是由胰臟蘭氏小島中的β-細胞所產生的蛋白質。胰島素參與體內許多重要的恆定，其中最重要的角色之一就是調節葡萄糖的恆定（glucose homeostasis）。當血漿中葡萄糖濃度上昇時，就會刺激胰島素分泌以增加細胞及周邊組織對葡萄糖的攝取、增加肝醣的合成、抑制肝醣分解及糖質新生作用，最後使血糖恢復至正常範圍。第 2 型糖尿病則肇因於肌肉組織、脂肪組織、肝臟等對胰島素失去正常的敏感性，也就是對正常濃度的胰島素的反應降低，導致這些組織該進行的降血糖活動效率不彰，血糖濃度因此偏高。這個對胰島素失去敏感性的現象，稱為胰島素阻抗(9)。胰島素是靠著活化細胞中的上述一系列生化反應來產生降血糖的效果，這一系列的生化反應稱為胰島素訊息傳遞路徑。而發炎性的細胞激素 IL-1β（interleukin-1 beta）、IL-6 及 TNFα（tumor necrosis factor-alpha）在誘導細胞發炎時，也抑制了胰島素訊息傳遞路徑中的生化反應。因此發炎性細胞激素對肝臟、肌肉及脂肪組織的刺激，阻斷了胰島素活化胰島素訊息傳遞路徑的能力，使細胞失去對胰島素的敏感性，這就是胰島素抗性的禍首。更廣義而言，周邊胰島素阻抗是指體內的目標細胞對於胰島素有一個不正常較低的反應，而胰島素的阻抗也包含了血漿中有較高的胰島素濃度及高三酸油酯血症(10)。在評估代謝症候群症狀方面以體重及腹部脂肪堆積作為肥胖（特別是中央型肥胖）指標；以血糖、血清胰島素、口服葡萄糖耐受試驗（Oral Glucose Tolerance Test, OGTT）及胰島素耐量試驗（insulin tolerance test, ITT）血糖變化以評估是否胰島素阻抗；

並量測血脂質（TG 及 total cholesterol, TC）及血壓。胰島素阻抗的出現是第 2 型糖尿病發生的前兆；隨著病程演進，其胰島素分泌逐漸降低，最後可能會出現胰臟β-細胞衰竭（β- cell failure）。所以在胰島素抗性發展的初期，若能及早發現並積極治療，將有助於避免代謝症候群以及第 2 型糖尿病的形成。

二、 抗代謝症候群機制

2.1. 調節胰島素訊息傳遞路徑（Regulation of insulin signaling）

胰島素阻抗被認為是形成代謝症候群的主要機制，因此能增進胰島素敏感之物質將有機會預防或改善代謝症候群。胰島素致敏物具有調節胰島素訊息傳遞路徑（insulin signaling）之活性(11)。此胰島素訊息傳遞路徑起始於胰島素作用於細胞膜上的胰島素受器（insulin receptor）。胰島素受器廣泛分佈於脊椎動物的細胞上，但依細胞種類不同而有數量上的差異(12)。此受器由膜內及膜外兩部分組成，膜外是由 2 個含有胰島素結合位（binding site）的α次單元構成；而膜內則包含 2 個穿膜結構及具有酪胺酸蛋白激酶（tyrosine protein kinase）活性的β次單元構成。酪胺酸蛋白激酶的活性對胰島素的作用扮演關鍵角色。先前研究發現，當缺乏胰島素受器的老鼠會在出生後極短的時間內死亡，而在人類身上則可存活一段時間但仍會伴隨有嚴重的生長遲滯及糖尿病發生(13,14)。因此胰島素受器的完整性對胰島素訊息路徑的活化佔有重要的影響力。當胰島素接上其受器之後，會活化酪胺酸蛋白激酶的活性造成自己本身β次單元的自磷酸化（auto-phosphorylation），之後進而磷酸化胰島素接受器受質-1（insulin receptor substrate, IRS）蛋白，而 IRS 也扮演重要的平台以提供胰島素受器及其下游訊息路徑分子之間的溝通橋樑。到目前為止，研究發現哺乳動物中具有 IRS-1~4 四種蛋白。IRS-1 主要與體細胞的生長及對肌肉和脂肪組織的胰島素作用有關(15)。IRS-2 則是與胰臟β-細胞的存活與生長有關及對肝臟、大腦生長、生殖系統和食物攝取的情況下胰島素的作用有關(15, 16)。另外 IRS-3 及 IRS-4 則主要表現在脂肪組織及神經內分泌組織中且其功能方尚待更多的實驗證實。而以基因剔除（gene knockout）的方式之實驗中發現 IRS-1 及 IRS-2 與訊息路徑之活化有關。在 IRS-1 缺乏的小鼠身上，發現小鼠會在胚胎及出生之後發生明顯的生長缺陷；但是儘管有胰島素抗性的發生，IRS-1 缺乏的小鼠卻不會發展成糖尿病，因其體內可藉由代償性的增加胰島素的分泌(17)。相反地，如果阻斷了 IRS-2 則會導致小鼠嚴重的糖尿病，並且使公的小鼠在幼年時期即死亡(18)。在利用血糖鉗定術（euglycemic-hyperinsulinemic clamp）的實驗中發現缺乏 IRS-1 及 IRS-2 的小鼠身上，IRS-2 在肝臟、肌肉和脂肪組織扮演多樣角色，而 IRS-1 的代謝調節功能則侷限於在骨骼肌上(19)。因此 IRS-2 在胰島素阻抗的發生及胰臟β-細胞的功能不良上扮演關鍵角色，也將會是測量上的一個重要指標。而在胰島素活化訊息路徑中，IRS 蛋白位於較早的階段；所以在胰島素刺激後，透過 IRS 蛋白進而活化路徑下游的訊息分子；其中包括 PI3K（phosphatidylinositol 3-kinase）、PKB（Protein kinase B）/Akt 及 MAPK（mitogen-activated protein kinases）等。在胰島素刺激下，透過 PI3K 途徑可藉由增加葡萄糖運輸蛋白（glucose transporter, GLUT4 和 GLUT1）的表現及細胞內的轉位來增加骨骼肌及脂肪組織中對葡萄糖的利用率，以達到降低血糖的目的(20)。而在胰臟β-細胞中，PI3K/Akt 路徑的活化則可促進β-細胞的存活及生長(21)。

2.2. 抗氧化及抗發炎作用（Antioxidant and anti-inflammation）

由於氧化壓力（oxidative stress）與許多疾病的發展有關，目前認為氧化壓力影響胰島素功能的機制之一，原因可能在於自由基（reactive oxygen species, ROS）的產生改變了細胞膜的結構與流動性(22, 23)，特別是胰臟β細胞，因為β細胞比其他組織細胞對於自由基更敏感，容易受到攻擊而導致胰島素分泌受損(24)。研究亦指出當胰島素代謝不平衡時，可能造成血中游離脂肪酸濃度升高，而當脂肪酸濃度超過肝臟代謝能力時，會造成體內脂質的堆積增加，並促進體內脂質過氧化物和 ROS 產生，而造成氧化壓力上升，血脂異常等負面的影響。血液中有過多的游離脂肪酸也會影響胰島素的訊號傳遞，更加重胰島素阻抗(25)。這些 ROS 主要源自於脂肪組織會分泌許多具生物活性的特異蛋白質，稱之為脂肪細胞激素（adipocytokines）(26)。脂肪細胞激素包含有 adiponectin、TNF-α 及 leptin 等。在基因缺陷肥胖鼠 obese KKAy mice 也可觀察到隨著體重的增加，氧化壓力也隨之上升，可能負責產生過氧化物質的 NADPH 氧化酶（NADPH oxidase）過量表現、以及抗氧化酵素的活性降低有關。以氧化劑 H2O2 處理脂肪細胞 3T3-L1 發現會使細胞激素的表現失調，包括降低 adiponectin 及 PPAR-γ mRNA，及增加 IL-6 及 MCP-1 mRNA。

若培養液中同時添加抗氧化劑 N-acetylcysteine，則可回復這些細胞激素表現異常的現象。此抗氧化劑也可修正因 TNF-α 誘發所造成的 3T3-L1 脂肪細胞激素 IL-6、IL-1β分泌增加及 adiponectin 分泌減少的異常情況。N-acetylcysteine 透過抑制轉錄因子 NF-κB 的活化，使得這些脂肪細胞激素的分泌能朝向對健康有正面影響的方向(40)。綜合上述，腹部脂肪組織的發炎反應與氧化壓力，使得脂肪細胞激素分泌異常（增加前發炎細胞激素，而降低 adiponectin 的分泌），是造成胰島素阻抗的關鍵病理過程。因此，透過飲食攝取豐富的抗氧化及抗發炎物質，減輕因肥胖引起的氧化壓力與發炎反應，修正細胞激素分泌異常的狀況，應可改善胰島素阻抗作用，作為預防代謝症候群發生的可行的飲食保健策略。目前研究已顯示於飲食中多攝取抗氧化物質有助於預防代謝症候群，進而降低心血管疾病的發生(27)。許多新近研究提出 PPARγ 拮抗劑具有成為胰島素致敏物及抗發炎藥物的潛能。而一些 n-3 不飽和脂肪酸及食物成分則已經被證實可藉由活化 PPARγ 來改善胰島素的敏感性(28)。綜合上述得知，具有抗氧化且抗發炎等功效的天然物可能具有改善代謝症候群之功效，然研究至今，開發改善代謝症候群之天然物質仍缺乏，且其機制仍在探討中。

三、鯽魚複方製劑過去研究

本實驗室先前已完成的動物實驗中發現鯽魚複方製劑對STZ誘發第1型糖尿病小鼠的高血糖具有下降的作用。而在以 STZ 誘發之第 2 型糖尿病模式中，鯽魚複方製劑對第 2 型糖尿病所造成的胰島素阻抗及葡萄糖耐受不良也具有改善的情形。因此本次研究之重點是想要更進一步瞭解鯽魚複方製劑對改善第 1 型及第 2 型糖尿病的機轉及其所影響之相關路徑活化情形。故我們假設胰臟β-細胞的失效將會導致第 2 型糖尿病的發生，所以我們將以不同的胰臟β-細胞(胰島素分泌型細胞(INS-1)及人類胰臟細胞株 PANC1)為研究模式並作為對照，觀察當胰臟β-細胞處於高糖及高氧化壓力的環境下，β-細胞的凋亡(apoptosis)情形是否因此增加導致β-細胞的存活下降、降低β-細胞的質量使得胰島素分泌量下降無法發揮正常功能。另外其相關轉錄因子 NF-κB 及 PI 3-kinase 路徑的活化是否受到影響將一併討論。當在此不利的生理壓力條件下，於細胞培養液中添加鯽魚複方製劑共同培養或預培養之後，是否可下降胰臟β-細胞凋亡的作用的發生及對胰臟β-細胞具有保護的作用。更進一步觀察，目前許多研究指出代謝症候群(metabolic syndrome)可能會導致第 2 型糖尿病與心血管疾病的發生。代謝症候群指的是一群與心血管及代謝相關的危險因子的集合症狀，其包括：高血糖（hyperglycemia）、血脂異常（dyslipidemia）、血壓昇高（elevation of blood pressure）、腹部肥胖(abdominal obesity)及胰島素阻抗(insulin resistance)等症狀。因此血脂的控制不良、過多的游離脂肪酸產生、胰島素阻抗的發生都會加速第 2 型糖尿病的發生。故我們假設是否能透過對於代謝症候群的早期有效預防而達到延緩及預防第 2 型糖尿病的發生的作用。

研究目的、

先前的研究已知鯽魚複方製劑對第 1 及第 2 型糖尿病具有保護的作用，包括：

1. 鯽魚複方製劑具有幫助對於第 1 型糖尿病老鼠血糖控制的效果。
2. 在血脂部分，鯽魚複方製劑顯示對於正常老鼠與誘發第 1 型及第 2 型糖尿病鼠的血清中 TG 均有下降作用。
3. 鯽魚複方製劑對於體內的抗氧化環境有實質的幫助，不僅對血漿中的 TBAR 值(代表氧化壓力)有下降作用，且對於肝臟中的抗氧化酵素活性也具有節省作用(sparing)，可減少其活性受損下降。
4. 鯽魚複方製劑對於腎臟中的醛糖還原酶具有下降作用，有助於延緩腎臟中糖尿病併發症的發生。

此外，從我們的預實驗中也發現餵食誘發肥胖小鼠鯽魚複方製劑後，也可以有效下降肝臟中 TG 的堆積、副睪脂肪重和胰島素阻抗指數。因此我們推測鯽魚複方製劑中所含有的成分可能對於胰臟β-細胞具有保護的作用及抗代謝症候群的效應，將進一步研究證實。

因此本計畫的目標就是要瞭解其機轉，包括其相關轉錄因子 NF-κB 及 PI 3-kinase 路徑的活化是否受到影響及在高脂飲食下抗代謝症候群的效應，將進一步討論之。並且透過良利生物科技有限公司所提供之鯽魚複方製劑產品，將有助於使鯽魚水萃物之標準化，有利於實驗之進行。

研究方法、

一、細胞實驗

本研究的第一部份就是想要進一步證實鯽魚複方製劑對改善第 1 型及第 2 型糖尿病的機轉及其相關路徑之活化情形。故我們假設胰臟β-細胞的失效將會導致糖尿病的發生，所以我們將以不同的胰臟β-細胞(PANC1、INS-1)為研究模式並作為對照，觀察鯽魚複方製劑對改善人類及大鼠的胰臟β-細胞的作用是否一致及對於葡萄糖刺激下胰島素的分泌作用的恢復情形。同時也將觀察當胰臟β-細胞處於高糖(16.7 or 33.3 mM)(29)及高氧化壓力(H2O2)的環境下，β-細胞的凋亡(apoptosis)情形是否因此增加導致β-細胞的存活下降、降低β-細胞的質量使得胰島素分泌量下降無法發揮正常功能。另外其相關轉錄因子 NF-κB 及 PI 3-kinase 路徑的活化是否受到影響將一併討論。所以在此不利的生理壓力下，於細胞培養液中添加鯽魚複方製劑共同培養或預培養之後，是否可下降胰臟β-細胞凋亡的作用的發生及對胰臟β-細胞具有保護的作用，而同時在胰島素的作用上，是否也也可以透過對 IRS-2 途徑的改善作用來達成。

§ 測定之項目

1. 胰臟β-細胞存活分析(MTT assay)
2. 胰島素的釋放及含量測試(GSIS)
3. 偵測胰臟β-細胞內 ROS 的形成
4. 胰臟β-細胞 IRS-2 及 PI-3 Kinase 之測定
5. 轉錄因子 NF-κB 活化測試。
6. 胰臟β-細胞胰島素分泌相關基因(PDX-1、GK、GLUT-2、IRS-2)表現。

二、動物實驗

先前研究指出代謝症候群最終會導致第2型糖尿病與心血管疾病的發生(30)。所以站在預防的觀點，如果能有效預防代謝症候群的發生，是否也能有效延緩及預防第 2 型糖尿病與心血管疾病的發生。在目前許多對抗代謝症候群的策略是透過有效降低代謝的壓力（包括：高血糖及胰島素阻抗）來達到對代謝症候群的緩解作用。而在先前本實驗室以 STZ 誘發糖尿病小鼠的模式中，已發現飲食中添加了鯽魚複方製劑可以有效下降血漿中 TG 的含量，並使得胰島素的敏感性增加。而飲食中添加了鯽魚複方製劑也可以幫助糖尿病小鼠的血糖控制及改善血脂的控制不良。因此假設鯽魚複方製劑中是否可能含有可活化過氧化小體增生活化受器（PPAR）的成分（ligands），來使得促進體內脂質的代謝利用，進而達到降血脂及降血糖的效果，但此推論仍需進一步的實驗加以證實。而且在我們的預實驗中也發現，以高脂飲食誘發肥胖老鼠中，其肝臟中 TG 合成有明顯增加、副睪脂肪之形成量亦明顯增加，而胰島素阻抗指數也明顯上昇，但在餵食鯽魚複方製劑 4 週後有明顯緩解的趨勢(preliminary data Figure.1-3)。因此其所帶動之體內的變化相當值得我們進一步深入探討。所以本次研究之另外一個重點就是想要利用高脂飲食模式誘發代謝症候群的發生來進一步觀察鯽魚複方製劑是否可以透過活化體內 PPAR 相關的路徑來促使體內脂質的代謝利用，並可以有效降低腹部肥胖以達到進一步預防第 2 型糖尿病及心血管疾病等慢性併發症的發生。而且實驗中將以 PPAR 相關的促效劑（agonist）- thiazolidinediones(TZD) or rosiglitazone 作為對照組來證實 PPAR 相關的路徑的活化情形是否參與其中。另一方面，在代謝過程中，脂肪組織與細胞會分泌一些活性分子包括 leptin、adiponectin、resistin 等用以幫助調節食物攝取、胰島素敏感、能量代謝及血管系統中的微環境。而另外也有一些分子如：tumor necrosis factor alpha (TNF-a)、interleukin-6 (IL-6)及 monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)則與肥胖所導致的發炎與致病過程有關。在 Kadowaki et al.,2006 的研究中指出，adiponectin 可能可以藉由提高骨骼肌中 IRS-1 的表現來促進胰島素敏感的敏感性(31)。流行病學的研究亦指出 adiponectin 其血漿濃度在肥胖、第二型糖尿病、心血管疾病、血脂異常、高血壓以及代謝症候群患者都有明顯較低的現象，顯示 adiponectin 在人體的能量代謝上扮演重要角色，將進一步探討(32)。而 leptin 的生理角色則是與中樞神經系統的溝通有關，缺乏 leptin 將會導致食慾增加及進食量的增加，導致病態型肥胖的發生(33)。先前研究也指出 resistin 可能與體內脂肪含量增加所導致的胰島素阻抗有關(34)。目前許多抗慢性病的策略就是利用存在於植物或中草藥中的植物化學成分(phytochemicals)作為抗慢性發炎的治療方針(35,36)。所以在本研究中的第 2 部份將進一步探討由脂肪組織所分泌的相關激素 leptin、adiponectin、resistin 所扮演的角色及其在高脂飲食下的變化及影響，是否可以作為治療或預防代謝症候群發生的途徑，且透過鯽魚複方製劑的給予是否可以下降或回復高脂飲食所

造成的不良影響。

§ 研究方法

本研究將以 60%高脂飲食餵食 Balb/c 小鼠經 8 週後誘導其肥胖，並產生代謝症候群的症狀。再分別餵食鯽魚複方製劑及 Statin 降膽固醇藥物經 8 週後觀察其下降或回復高脂飲食所造成的不良影響（治療作用）。另一組則是將 Balb/c 小白鼠餵食高脂飲食同時合併鯽魚複方製劑經 8 週後，觀察高脂飲食合併餵食鯽魚複方製劑對於預防高脂飲食造成肥胖之作用（預防作用）。

§ 測定之項目

1. 小鼠飲食量、飲水量及體重變化。
2. 小鼠體內臟器重及內臟脂肪重量。
3. 小鼠血中之血糖值、Insulin 含量
4. 採用 Matthews 等人於 1985 年提出以 HOMA-IR 的方法，利用空腹血糖值、胰島素值導入數學公式，來間接定義量化胰島素阻抗性，數值越大代表胰島素阻抗性越大。
5. 小鼠葡萄糖耐量測試(OGTT)。
6. 小鼠血中及肝臟中 TG(三酸甘油脂)、TC(總膽固醇)、LDL(低密度脂蛋白)及 HDL(高密度脂蛋白)的含量。
7. 小鼠體內的總抗氧化能力測試。
8. 小鼠血中 leptin、adiponectin 的含量
9. 小鼠脂肪組織中發炎指標（TNF-α、IL-6）測試。
10. 小鼠肝臟及脂肪組織中 PPAR 活化的情形。

結果討論：

本實驗為主要探討複方鯽魚萃取物對代謝症候群小鼠的影響。複方鯽魚萃取物是以鯽魚、山藥、枸杞、地黃等中藥材燉煮濃縮製造而成。在先前的研究中，指出中草藥中的山藥可以改善胰島素抗性(37)，枸杞中的多醣成份可抗氧化(38)，而地黃可對減緩高血糖的狀況(39)。因此，本研究先由細胞實驗切入，在 H_2O_2 刺激下，觀察鯽魚萃取物(CACF)對於老鼠胰島 β 細胞瘤細胞(RIN-m5F)之存活與生長影響，證實鯽魚萃取物(CACF)具有保護胰島 β 細胞之潛力(Fig.1A)，是經由保護胰島 β 細胞對抗 H_2O_2 刺激下所導致細胞凋亡(Fig.1B) ，進一步分析分子機制發現，鯽魚萃取物(CACF)保護胰島 β 細胞對抗 H_2O_2 刺激下所導致細胞凋亡可能是經由增加 PI3K 、NF-κB 與 IRS-2 的蛋白表現活化細胞存活路徑(Fig.3)。由 Fig.2 結果發現，鯽魚萃取物(CACF)能使胰島素分泌逐漸回升，證明鯽魚萃取物可能經由保護胰島 β 細胞使胰島素分泌增加，進一步利用 Real-time PCR 方法，分析與胰島素分泌有關的基因，包含 PDX-1、GK、GLUT-2 與 IRS-2 基因表現。由 Fig.4 結果發現，加入鯽魚萃取物(CACF)後有不同程度增加 PDX-1、GK、GLUT-2 與 IRS-2 基因表現情形。證實鯽魚萃取物(CACF)具有增加胰島 β 細胞 PDX-1、GK、GLUT-2 與 IRS-2 基因表現來增加胰島素分泌與血糖的調控。

根據 Stolar 等人研究指出良好的血糖控制可延緩糖尿病併發症的發生(43), 在餵食複方鯽魚萃取物後，血糖有顯著下降 (Fig.5)。本實驗參考 Matthews 等人提出以 HOMA-IR 來測量胰島素阻抗的方法(42)。HOMA-IR 應用在在糖尿病或非糖病族群呈現與胰島素阻抗正相關(44-47), 值越高代表胰島素阻抗程度也越高，在我們的實驗結果中發現在給予複方鯽魚萃取物的組別中 HOMA-IR 有顯著的下降 (Fig.5), 表示複方鯽魚萃取物可減少胰島素的抗性及減少代謝症候群發生的機率。

TZD 這類藥物被稱為胰島素致敏劑(Insulin Sensitizers)其可藉由活化細胞核表面的 PPARγ 接受器，增加脂肪細胞攝入游離脂肪酸及肌肉細胞攝入葡萄糖，改善胰島素阻抗的情形，增加血糖的穩定性，在先前的研究也指出 TZD 藥物主要活化 PPARγ 使血糖較為穩定(48)，在我們的實驗結果中也發現在有添加複方鯽魚萃取物組別中的肝臟及脂肪細胞中 PPARγ 的量雖然沒有到顯著差異，但有增加的趨勢 (Fig.6, 7)。PPARγ 除了可以增加血糖的穩定外，在其他的研究中也指出 PPARγ 可以抑制發炎因子的產生(如：TNF-α、IL-1β、IL-6)進而抑制發炎反應(49)。先前的研究也指出 PPARα 可保護肝臟免受肥胖引起的發炎疾病(50)，在肝及脂肪組織 Westren blot 的結果中可看到雖然未達顯著差異，但 PPAR 的量皆

有增加 (Fig.6, 7)。PPARγ及 PPARα兩者皆可抑制發炎的現象，對照發炎因子的結果可看到血清的 TNF-α在添加複方鯽魚萃取物後都有下降的趨勢，其中在高劑量複方鯽魚萃取物中是有顯著的下降，在血清的 IL-1β雖然沒有顯著差異，但在高、低劑量中都有下降的趨勢，在血清 IL-6 的結果中，低劑量有顯著差異(Fig.8)。

在本實驗結果中可推斷在餵食鯽魚萃取物可降低體內發炎因(TNF-α、IL-1β、IL-6)的增加，減緩了發炎狀況而使胰島素的敏感性增加，進而減少胰島素的抗性，緩和糖尿病患者的高血糖狀況，增加血糖的穩定性。

參考文獻、

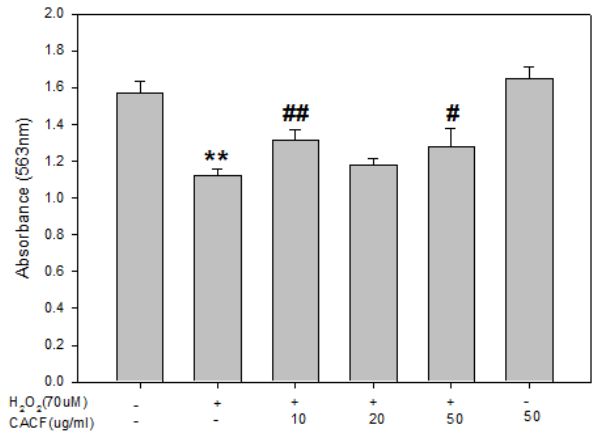
1. Gluckman PD, Hanson MA. Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. Pediatr Res. 56, 311-7, 2004.
2. Reaven GM, Chen YD. Role of insulin in regulation of lipoprotein metabolism in diabetes. Diabetes Metab Rev. 4, 639-52, 1998.
3. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus, provisional report of a WHO consultation. Diabet Med. 15, 539-53, 1998
4. Nabel EG. Cardiovascular disease. N Engl J Med. 349, 60-72, 2003.
5. Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM. NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalenceof coronary heart disease among NHANES III participantsage 50 years and older. Diabetes. 52, 1210 -4, 2003.
6. Grundy SM, Brewer HB Jr., Cleeman JI. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 24, e13-8, 2004.
7. Kumai T, Matsumoto N, Koitabashi Y, Takeba Y, Oonuma S, Sekine S et al. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors: candidate mechanisms for anti-lipid deposition in blood vessels. Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents. 3, 195-201, 2005.
8. MacKay D, Hathcock J, Guarneri E. Niacin: chemical forms, bioavailability, and health effects. Nutr Rev. 70, 357-66, 2012.
9. Kahn SE, Prigeon RL, Schwartz RS, Fujimoto WY, Knopp RH, Brunzell JD et al. Obesity, body fat distribution, insulin sensitivity and Islet beta-cell function as explanations for metabolic diversity. J Nutr. 131, 354S-360S, 2001.
10. DeFronzo RA. Insulin resistance: a multifaceted syndrome Responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and Atherosclerosis. Neth J Med. 50, 191-7, 1997.
11. Withers DJ, White M. Perspective: the insulin signaling system – a common link in the pathogenesis of type 2 diabetes. Endocrinology. 141, 1917-21, 2000.
12. White MF. The insulin signaling system and the IRS proteins. Diabetologia. 40, S2-S17, 1997.
13. Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P et al. Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. Nat Genet. 12, 106-9, 1996.
14. Jospe N, Kaplowitz PB, Furlanetto RW. Homozygous nonsense mutation in the insulin receptor gene of a patient with severe congenital insulin resistance: leprechaunism and the role of the insulin-like growth factor receptor. Clin Endocrinol. 45, 229-35, 1996.
15. Kido Y, Burks DJ, Withers D, Bruning JC, Kahn CR, White MF et al. Tissue-specific insulin resistance in mice with mutations in the insulin receptor, IRS-1, and IRS-2. J Clin Invest. 105, 199-205, 2000.
16. Rother KI, Imai Y, Caruso M, Beguinot F, Formisano P, Accili D. Evidence that IRS-2 phosphorylation is required for insulin action in hepatocytes. J Biol Chem. 273, 7491-7, 1998.
17. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B, Johnson RS et al. Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. Nature. 372, 186-90, 1994.
18. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. Nature. 391, 900-4, 1998.
19. Previs SF, Withers DJ, Ren JM, White MF, Shulman GI. Contrasting effects of IRS-1 versus IRS-2 gene disruption on carbohydrate and lipid metabolism in vivo. J Biol Chem. 275, 38990-4, 2000.
20. Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim Y-B, Boss O, Hadro E et al. Adipose - selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. Nature. 409, 729-33, 2001.
21. Tuttle RL, Gill NS, Pugh W, Lee JP, Koeberlein B, Furth EE et al. Regulation of pancreatic beta-cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBalpha. Nat Med. 7, 1133-7, 2001.
22. Mezei O, Banz WJ, Steger RW, Peluso MR, Winters TA, Shay N. Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. J Nut.133, 1238-43, 2003.
23. Paolisso G, Giugliano D. Oxidative stress and insulin action: is there a relationship ? Diabetologia 39, 357–63, 1996.
24. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells . Diabetes 46, 1733-42, 1997.

25. Scott MG, Brewer HB, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome Report of the national heart, lung and blood institute/American heart association conference on scientificissues related definition . Circulation 109, 433-38, 2004.
26. Matsuzawa Y. White adipose tissue and cardiovascular disease. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 19, 637-47, 2005.
27. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Das UN, Skoumas Y, Stefanadis C. The implications of anthropometric, inflammatory and glycaemic control indices in the epidemiology of the metabolic syndrome given by different definitions: a classification analysis. Diabetes Obes Metab. 9, 660-8, 2007.
28. Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, Najima Y, Nakakuki M, Nagai R et al. Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. Hepatology. 38, 1529-39, 2003.
29. Donath MY, Ehses JA, Maedler K, Schumann DM, Ellingsgaard H, Eppler E, and Reinecke M. Mechanisms of β-cell death in type 2 diabetes. Diabetes. 54,S108-S113, 2005.
30. Vergès B. Lipid modification in type 2 diabetes: the role of LDL and HDL. Fund Clin Pharmacol. 23,681-5, 2009.
31. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K. and Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. J Clin Invest. 116,1784-92, 2006.
32. Matsuawa Y. Adiponectin: indentification, physiology and clinical relevance in metabolic and vascular disease. Atheroscler. Suppl. 6,7-14, 2004.
33. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. Nature 387,903-8, 1997.
34. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. Nature 409, 307-12, 2001.
35. Habtemariam S. Antiinflammatory activity of the antirheumatic herbal drug, gravel root (Eupatorium purpureum): further biological activities and constituents. Phytother. Res. 15, 687-90, 2001.
36. Gescher, A. Polyphenolic phytochemicals versus nonsteroidal anti-inflammatory drugs: which are better cancer chemopreventive agents? J. Chemother. 16, 3-6, 2004.
37. X. Gao, B. Li, H. Jiang, F. Liu, D. Xu, and Z. Liu, Dioscorea opposita reverses dexamethasone induced insulin resistance, Fitoterapia, 78, 12–15, 2007.
38. C.L.Lin,C.C.Wang, S. C. Chang, B. S. Inbaraj, and B.H.Chen,Antioxidative activity of polysaccharide fractions isolated from Lycium barbarum Linnaeus, International Journal of Biological Macromolecules, 45, 146–151, 2009.
39. W.-J. Huang, H.-S. Niu, M.-H. Lin, J.-T. Cheng, and F.-L. Hsu,Antihyperglycemic effect of catalpol in streptozotocin-induced diabetic rats, Journal of Natural Products, 73, 1170–1172, 2010.
40. Araki S, Dobashi K, Kubo K, Yamamoto Y, Asayama K, Shirahata A. N-acetylcysteine attenuates TNF-alpha induced changes in secretion of interleukin-6, plasminogen activator inhibitor-1 and adiponectin from 3T3-L1 adipocytes. Life Sci. 79, 2405-2412, 2006.
41. "Standards of medical care in diabetes" Diabetes Care . 2013
42. D R Mattherrs, J P Hosker, A S Rudenski, B A Naylor, D F Treacher, R C Turner," Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man." Diabetologia,vol.28(7) 412-419, 1985
43. M Stolar, "Glycemic control and complications in type 2 diabetes mellitus."Am J Med,vol.123(3) s3-11,2010
44. E Bonora, G Targher, M Alberiche, "Homesostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity " Diabetes care, vol.23(1) 57-63, 2000
45. A Katsuki, Y Sumida, E C Gabazza, "Homeostasis model assessment is a reliable indicator of insulin restance during follow-up of patients with type 2 diabetes." Diabetes Care vol.24,2001
46. H E Resnick, K Jones, G Ruotolo, "Insulin resistance,the metabolic syndrome,and risk of incident cardiovascular disease in nondiabetic american indians."Diabetes Care vol.26 861-867,2003
47. J B Meigs,P W Wilson,D M Nathan, R B D'Agostino,K Williams,S M Haffner,"Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in the san antonio Heart and Framingham Offspring Studies."Diabetes vol.52, 2160-2167, 2003
48. J M Lehmann, L B Moore, T A Smith-Oliver, W O Wilkison, T M Willson, S A Kliewer,"An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma(PPAR gamma)." J Biol Chem. 207(22) 12953-12956, 1995
49. C Jiang, A T Ting B Seed,"PPAR-γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines." Nature. vol.391 82-86, 1998
50. R Stienstra ,S Mandard, D Patsouris, C Maass, S Kersten, M Muller, "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha protects against obesity-induced hepatic inflammation." Endocrinology.vol.148 2753-2763, 2007

附圖

Fig.1

(A)



(B)

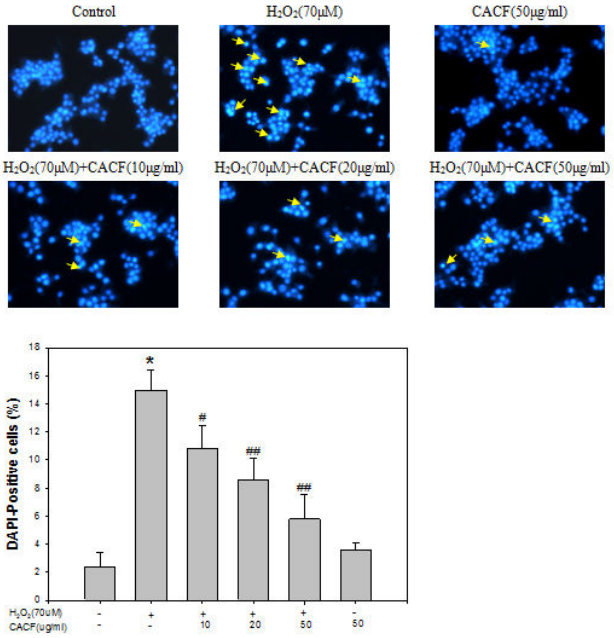


Fig. 1. Efects of Carassius auratus complex formula (CACF) on RIN-m5F cell viability. RIN-m5F cell were treated with various concentrations (0-50 ug/ml) of CACF combine H_2O_2 (70uM) for 24h. (A) Cell viability was analyzed by MTT assay. (B) The apoptotic cells were assayed by DAPI stain. The arrow indicated apoptotic cells. The results were represented the mean±S.D. of three independent experiments and the significant diference was established at *p<0.05, **p<0.01 compared with the control, ##p<0.05. #p<0.01 compared with the H_2O_2 alone.

Fig.2

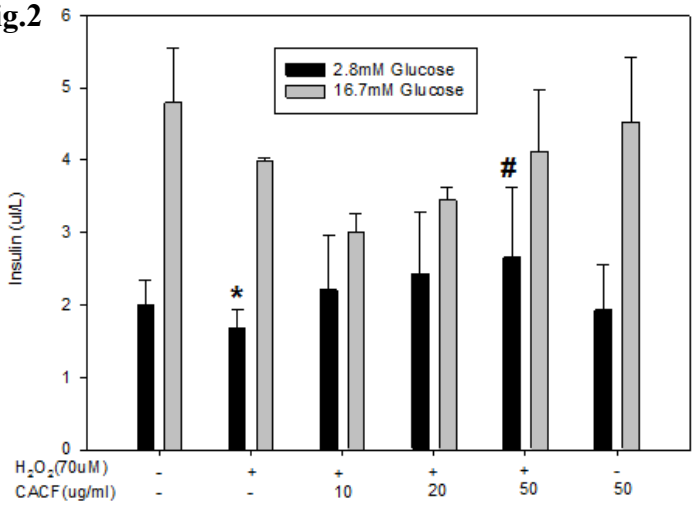


Fig. 2. Efects of Carassius auratus complex formula (CACF) on RIN-m5F cell glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). RIN-m5F cell were treated with various concentrations (0-50 ug/ml) of CACF combine H_2O_2 (70uM) for 24h. Then, RIN-m5F cells were stimulated with low (2.8 mM) and high (16.7 mM) glucose in Krebs Ringer buffer for 1h, collation the buffer to exam insulin secretion. The results were represented the mean±S.D. of three independent experiments and the significant diference was established at *p<0.05, **p<0.01 compared with the control, ##p<0.05. #p<0.01 compared with the H_2O_2 alone.

Fig.3

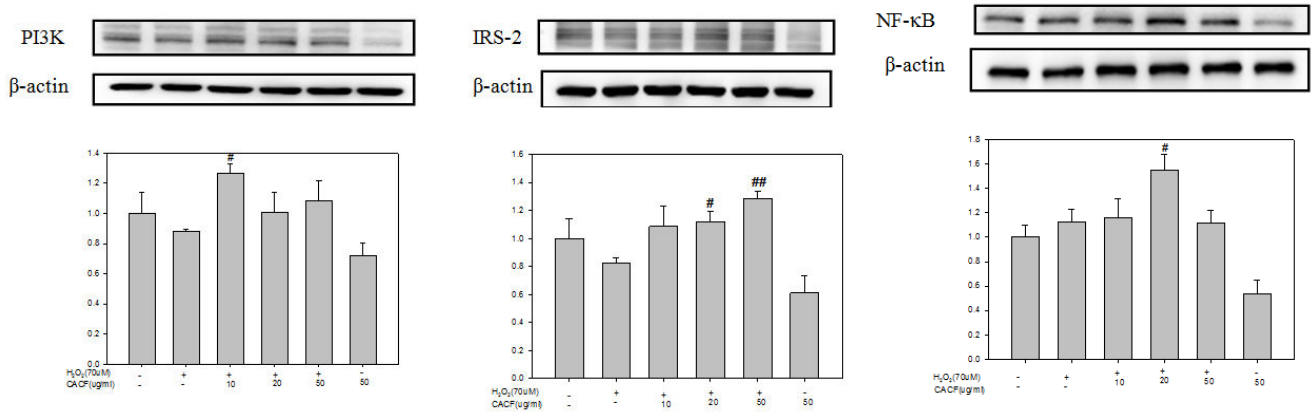


Fig. 3 .Efects of Carassius auratus complex formula (CACF) on H_2O_2-induced PI-3 Kinase, IRS-2, NF-κB protein expression in RIN-m5F cell. Cells were stimulated with/without H_2O_2 (70uM) combine with various concentrations of CACF (0-50ug/ml) for 24h. PI-3 Kinase, IRS-2, NF-κB protein expression were analyzed by Western blot. The results were represented the mean±S.D. of three independent experiments and the significant difference was established at ##p<0.05. #p<0.01 compared with the H_2O_2 alone.

Fig.4

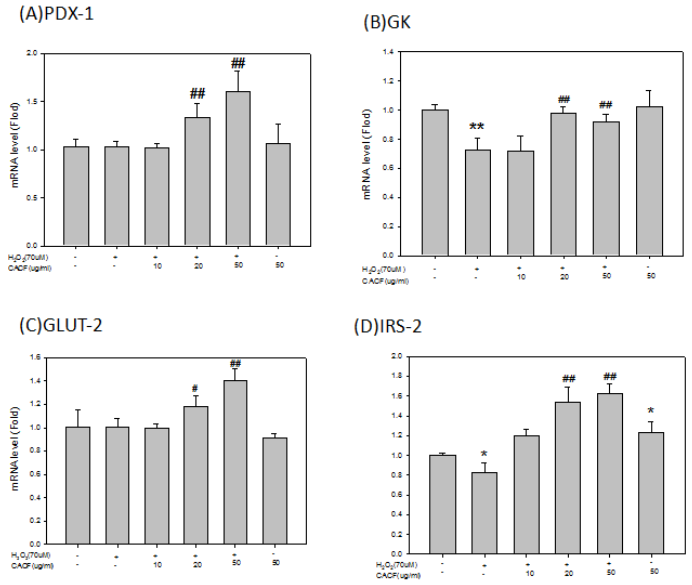


Fig. 4. Efects of Carassius auratus complex formula (CACF) on H_2O_2-induced PDX-1, GK, GLUT-2, IRS-2 mRNA level in RIN-m5F cell. Real-time quantitative RT-PCR analysis of mRNA levels of PDX-1(A), GK(B), GLUT-2 (C), IRS-2(D) in cells were stimulated with/without H_2O_2 (70uM) combine with various concentrations of CACF (0-50ug/ml) for 24h. The results were represented the mean±S.D. of two independent experiments and the significant diference was established at *p<0.05, **p<0.01 compared with the control, ##p<0.05. #p<0.01 compared with the H_2O_2 alone.

Fig.5

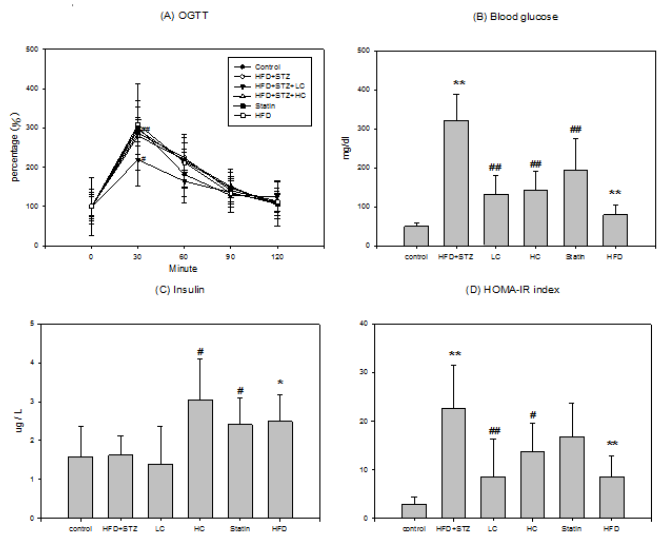


Fig. 5. Effect of CACF on metabolism syndromes after HFD combined STZ treatment in mice. HFD combined STZ treatment-induced the metabolism syndrome of mice were treated with CACF (low dose/LC 30mg/kg and high dose/HC 150mg/kg) or statin for 8 weeks. On week 8, Serum oral glucose tolerance test (OGTT)(A), blood glucose(B), insulin(C) and Homeostatic Model Assessment Index-Insulin Resistance (HOMA-IR)(D) were detected. HOMA-IR was calculated by the fasting plasma glucose and insulin levels. The quantitative data are presented as mean ± SD (n =10) from three independent experiments. #p< 0.05, ##p< 0.01 compared with the control group. *p< 0.05, **p< 0.01 compared with the group of HFD plus STZ.

Fig.6

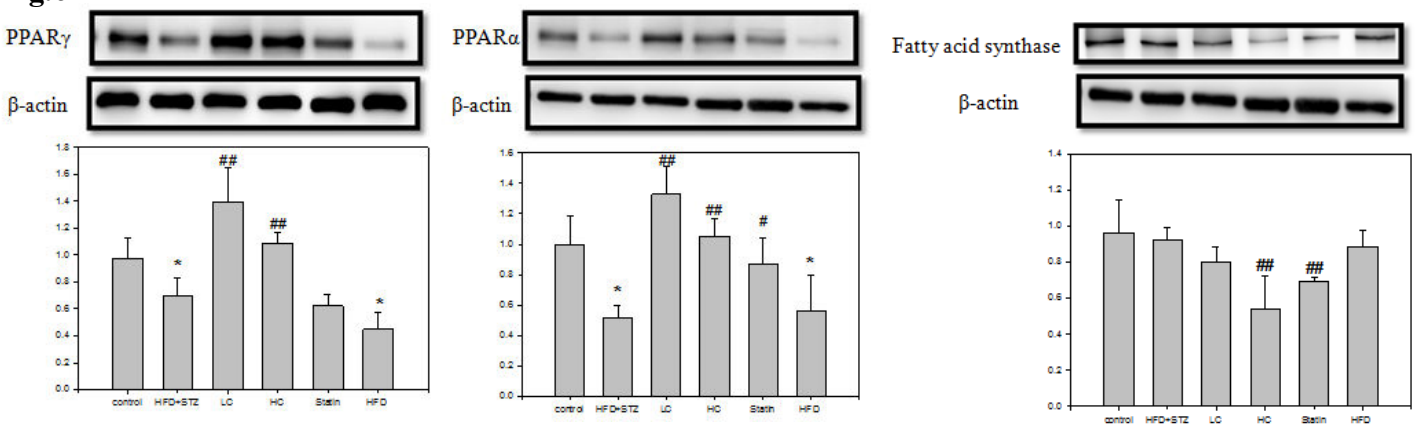


Fig. 6. Effect of CACF on lipid regulatory proteins in epididymal fat tissue after HFD combined STZ treatment in mice. HFD combined STZ treatment-induced the metabolism syndrome of mice were treated with CACF (low dose/LC 30mg/kg and high dose/HC 150mg/kg) or statin for 8 weeks. The mice were sacrificed after 8 weeks, and epididymal fat tissue protein were collected and analyzed by SDS-PAGE and, subsequently, immunoblotted with antibodies against PPARγ, PPARα, Fatty acid synthase, and β-actin that served as an internal control. The quantitative data were presented as means±S.D. of three repeats from one independent experiment. P<0.05.*P<0.05, **P<0.01 compared with the control group. P<0.05.#P<0.05, ##P<0.01 compared with the induced group.

Fig.7

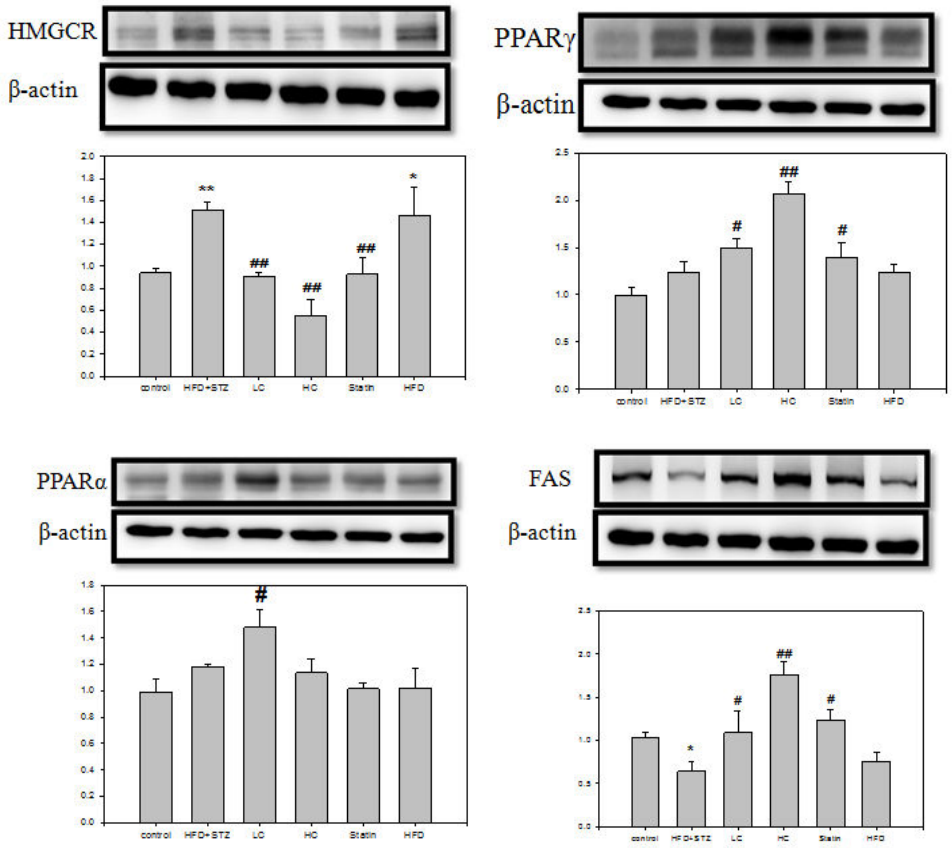


Fig. 7. Effect of CACF on lipid regulatory proteins in liver tissue after HFD combined STZ treatment in mice. HFD combined STZ treatment-induced the metabolism syndrome of mice were treated with CACF (low dose/LC 30mg/kg and high dose/HC 150mg/kg) or statin for 8 weeks. The mice were sacrificed after 8 weeks, and liver tissue protein were collected and analyzed by SDS-PAGE and, subsequently, immunoblotted with antibodies against HMGCR, PPARγ, PPARα, Fatty acid synthase, and β-actin that served as an internal control. The quantitative data were presented as means±S.D. of three repeats from one independent experiment. P<0.05.*P<0.05, **P<0.01 compared with the control group. P<0.05.#P<0.05, ##P<0.01 compared with the induced group.

Fig.8

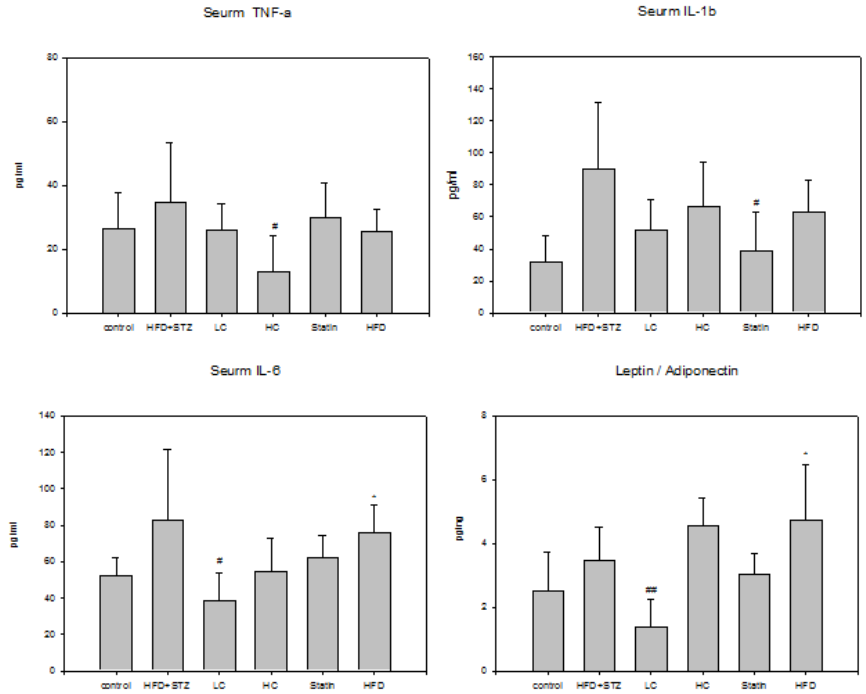


Fig. 8. Effect of CACF on serum cytokines level after HFD combined STZ treatment in mice. HFD combined STZ treatment-induced the metabolism syndrome of mice were treated with CACF (low dose/LC 30mg/kg and high dose/HC 150mg/kg) or statin for 8 weeks. The mice were sacrificed after 8 weeks, and serum was collected for analysis. Serum TNF-α, IL-1β, IL-6 levels, and leptin and adiponectin ratio were detected by ELISA assays. The quantitative data are presented as mean ± SD (n =10) from three independent experiments. #p< 0.05 compared with the control group. *p< 0.05, **p< 0.01 compared with the group of HFD plus STZ.

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2013/07/19

科技部補助計畫	計畫名稱: 開發鯽魚複方製劑為抗高脂飲食引發代謝症候群之研究		
	計畫主持人: 陳璟賢		
	計畫編號: 102-2622-B-040-002-CC3　　學門領域: 保健營養		
研發成果名稱	(中文) 開發鯽魚複方製劑為抗高脂飲食引發代謝症候群之研究		
	(英文)		
成果歸屬機構	中山醫學大學	發明人 (創作人)	陳璟賢
技術說明	(中文) 1.鯽魚複方製劑改善第1 型及第2 型糖尿病的機轉及其對NF-κB 及PI 3-kinase 相關路徑之影響。 2.鯽魚複方製劑對胰臟β-細胞的保護作用(降低胰臟β-細胞的凋亡)。 3.鯽魚複方製劑透過活化PPAR 路徑來促使體內脂質的代謝利用。 4.鯽魚複方製劑可以有效降低代謝症候群老鼠的腹部肥胖及改善代謝症候群的相關指標，以達到進一步預防第2 型糖尿病等併發症的發生。 本計劃研究之成果若確認鯽魚複方製劑具有降血糖、降血脂、抑制胰島素阻抗、排除肝臟脂肪 堆積等作用，將提供臨床代謝症候群或代謝疾病（糖尿病、脂肪肝、心血管疾病）患者新的治 療方向。		
	(英文) 1.Crucian carp compound to improve type 1 and 2 diabetes and its mechanism. 2.Crucian carp compound on pancreatic β-cell protective effect (decreased pancreatic β-cell apoptosis). 3.Crucian carp compound induce lipid metabolism through the activation of PPAR. 4.Crucian carp compound can effectively reduce metabolic syndrome and abdominal obesity in mice improved metabolic syndrome related indicators in order to achieve further prevention of type 2 diabetes and other complications.		
產業別	研究發展服務		
技術/產品應用範圍	醫療輔助性保健食品		
技術移轉可行性及預期效益	在先前本實驗室以STZ 誘發糖尿病小鼠的模式中，已發現飲食中添加了鯽魚複方製劑可以有效下降血漿中TG 的含量，並使得胰島素的敏感性增加。而飲食中添加了鯽魚複方製劑也可以幫助糖尿病小鼠的血糖控制及改善血脂的控制不良。因此預期可達成技術移轉及相關效益		

註：本項研發成果若尚未申請專利，請勿揭露可申請專利之主要內容。

102 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：陳璟賢	計畫編號：102-2622-B-040-002-CC3
計畫名稱：開發鯽魚複方製劑為抗高脂飲食引發代謝症候群之研究	

成果項目			量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）
			實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數(含實際已達成數)	本計畫實際貢獻百分比		
國內	論文著作	期刊論文	0	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	1	1	100%		
		研討會論文	0	1	100%		
		專書	0	1	100%		
	專利	申請中件數	0	1	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	1	1	100%	件	
		權利金	81	81	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	2	2	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	1	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)	經由本次研究證實鯽魚複方製劑可改善第 1 型及第 2 型糖尿病，並且提出具有保護胰臟β-細胞的作用。本研究利用高脂及高熱量飲食模式誘發代謝症候群的發生來進一步觀察鯽魚複方製劑可以有效降低腹部肥胖及代謝症候群的相關指標以達到進一步預防第 2 型糖尿病等併發症的發生。代謝症候群在全世界有急速增加的趨勢，代謝症候群會導致糖尿病、心腦血管疾病、肝腎相關疾病等盛行率攀升，除減低危險因子外，若能將鯽魚複方製劑開發為具預防或改善代謝症候群之健康食品，對於減低國家醫療負擔、提昇農業價值、發展食品生技產業等都具有相當貢獻。本研究計畫成果與萃取技術已進行技術轉移，將有助於鯽魚複方製品農漁業產業推廣與相關保健產品的開發。經由本研究成果繼續規劃進入人體試驗，強化臨床效果。本研究建立高脂肪誘導代謝症候群之實驗動物模式作為探討代謝症候群致病成因之平台，可應用為將來發展預防及改善代謝症候群保健食品開發之研究，在學術研究上有貢獻。本研究開發鯽魚複方製劑為具有多重有效成份，可抑制代謝症候群多項危險因子的單一健康食品，也可以作為預防或輔助治療代謝症候群保健食品開發研究之參考。

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科教處計畫加填項目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與（閱聽）人數	0	

本產學合作計畫研發成果及績效達成情形自評表

成果項目		本產學合作計畫**預估**研究成果及績效指標 （作為本計畫後續管考之參據）	計畫達成情形
技術移轉		預計技轉授權 1 項	完成技轉授權 1 項
專利	國內	預估 1 件	提出申請 0 件，獲得 0 件
	國外	預估 0 件	提出申請 0 件，獲得 0 件
人才培育		博士 0人，畢業任職於業界0人	博士 0人，畢業任職於業界0人
		碩士 2人，畢業任職於業界2人	碩士 2人，畢業任職於業界2人
		其他 0人，畢業任職於業界0人	其他 0人，畢業任職於業界0人
論文著作	國內	期刊論文 1 件	發表期刊論文 1 件
		研討會論文 3 件	發表研討會論文 1 件
		SCI論文 0 件	發表SCI論文 0 件
		專書 0 件	完成專書 1 件
		技術報告 1 件	完成技術報告 1 件
	國外	期刊論文 1 件	發表期刊論文 1 件
		學術論文 0 件	發表學術論文 0 件
		研討會論文 0 件	發表研討會論文 0 件
		SCI/SSCI論文 1 件	發表SCI/SSCI論文 1 件
		專書 0 件	完成專書 0 件
		技術報告 0 件	完成技術報告 0 件
其他協助產業發展之具體績效		新公司或衍生公司 0 家	設立新公司或衍生公司(名稱)：

計畫產出成果簡述：請以文字敘述計畫非量化產出之技術應用具體效益。（限 600 字以內）	經由本次研究證實鯽魚複方製劑可改善第 1 型及第 2 型糖尿病，並且提出具有保護胰臟 β-細胞的作用。本研究利用高脂及高熱量飲食模式誘發代謝症候群的發生來進一步觀察鯽魚複方製劑可以有效降低腹部肥胖及代謝症候群的相關指標以達到進一步預防第 2 型糖尿病等併發症的發生。代謝症候群在全世界有急速增加的趨勢，代謝症候群會導致糖尿病、心腦血管疾病、肝腎相關疾病等盛行率攀升，除減低危險因子外，若能將鯽魚複方製劑開發為具預防或改善代謝症候群之健康食品，對於減低國家醫療負擔、提昇農業價值、發展食品生技產業等都具有相當貢獻。本研究計畫成果與萃取技術已進行技術轉移，將有助於鯽魚複方製品農漁業產業推廣與相關保健產品的開發。經由本研究成果繼續規劃進入人體試驗，強化臨床效果。本研究建立高脂肪誘導代謝症候群之實驗動物模式作為探討代謝症候群致病成因之平台，可應用為將來發展預防及改善代謝症候群保健食品開發之研究，在學術研究上有貢獻。本研究開發鯽魚複方製劑為具有多重有效成份，可抑制代謝症候群多項危險因子的單一健康食品，也可以作為預防或輔助治療代謝症候群保健食品開發研究之參考。