

科技部補助

大專學生研究計畫研究成果報告

* *****
* 計 畫
* : 蓮蓬萃取物抑制胰島素阻抗之研究
* 名 稱
* *****

執行計畫學生： 陳亮好
學生計畫編號： MOST 106-2813-C-040-044-B
研究期間： 106年07月01日至107年02月28日止，計8個月
指導教授： 陳璟賢

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： 中山醫學大學營養學系（所）

中華民國 107年03月27日

目錄

摘要.....	3
第一章、 研究動機和研究問題.....	5
第二章、 文獻回顧與探討.....	6
2.1 第二型糖尿病(Diabetes mellitus type2 , T2D).....	6
2.2 胰島素阻抗(Insulin resistance).....	7
2.2.1 Insulin-receptor substrate protein (IRS-1).....	7
2.2.2 PI3K/Akt pathway.....	8
2.2.3 AMP-activated protein kinase (AMPK).....	8
2.2.4 Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β).....	8
2.3 蓮蓬(Lotus seedpod).....	9
第三章、 實驗架構.....	11
第四章、 研究方法及步驟.....	12
4.1 蓮蓬萃取物(Lotus seedpod extract , LSE)製備及成分分析.....	12
4.1.1 LSE 之製備.....	12
4.1.2 總多酚含量測定(Total phenolic content assay).....	12
4.1.3 總黃酮含量測定(Total flavonoid content assay).....	12
4.1.4 總花青素含量測定(Total anthocyanin content assay).....	13
4.2 細胞培養(Cell culture).....	14
4.2.1 細胞培養條件.....	14
4.2.2 細胞加藥處理.....	14
4.2.3 細胞存活分析(Cell viability assay).....	15
4.3 油紅 O 染色(Oil Red O staining).....	15
4.4 西方墨點法(Western blotting).....	16
4.4.1 蛋白萃取與定量.....	16
4.4.2 Western blotting.....	16
4.5 免疫沉澱(immunoprecipitation , IP).....	17
4.6 肝醣合成分析(Glycogen synthesis assay).....	18
4.7 葡萄糖攝取分析(Glucose uptake assay).....	18
4.8 統計分析	18
第五章、 結果與討論.....	20
5.1 探討蓮蓬萃取物之成份功能性成份.....	20
5.2 探討以不同濃度的 LSE 單獨或合併油酸處理對 HepG2 細胞存活之影響.....	20
5.3 探討 LSE 對油酸誘導 HepG2 細胞內脂質堆積之影響.....	21

5.4 探討 LSE 對於油酸誘導 HepG2 細胞內胰島素訊息傳遞因子 IRS-1 磷酸化表現之影響.....	21
5.5 探討 LSE 對油酸誘導的 HepG2 細胞內能量代謝調控因子 AMPK 之影響.....	22
5.6 總結.....	22
第六章、 參考文獻.....	24
第七章、 附圖(表).....	27

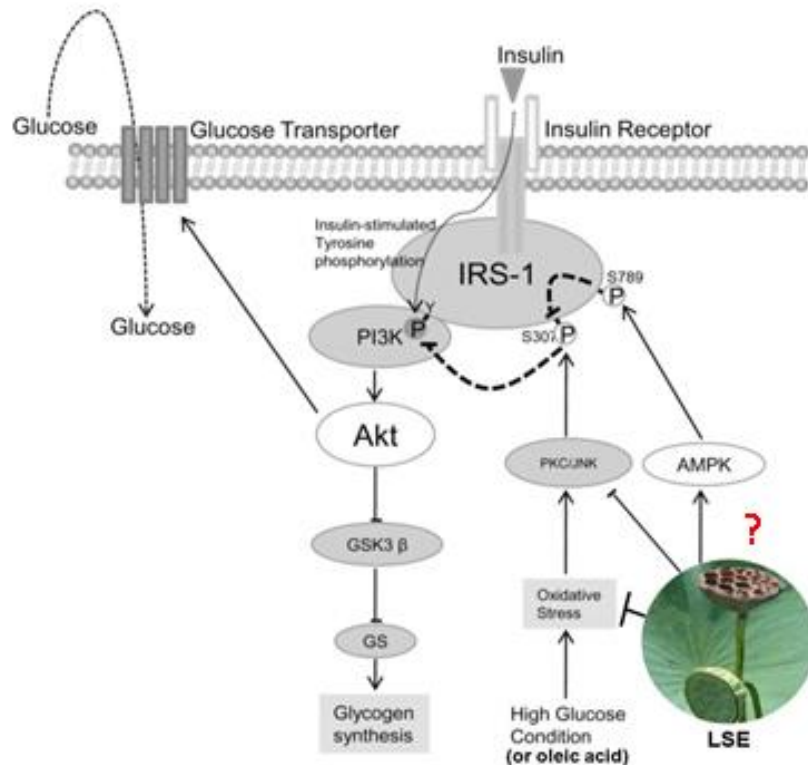
摘要

第二型糖尿病(diabetes mellitus type2, T2D)是嚴重影響國人健康的疾病之一，T2D 主要病因為胰島素阻抗(insulin resistance)，因此近年來尋求天然萃取物來改善胰島素阻抗已成為 T2D 研究的重點。蓮蓬(lotus seedpod)為蓮的花托，已知其中含有原花青素(procyanidins)成份，先前的研究顯示此原花青素具有抗氧化、降血糖及增加胰島素敏感度等功效，因此本研究主題欲進一步探討蓮蓬萃取物(lotus seedpod extract, LSE)是否具改善肝細胞胰島素阻抗之作用。實驗以油酸(oleic acid, OA)處理人類肝細胞 HepG2 為誘導模式，初步結果發現 LSE 無細胞毒性之劑量可降低 OA 所誘導 HepG2 細胞內脂肪堆積。後續在探討 LSE 對於胰島素阻抗是否具有改善作用及釐清其分子機制中，首先分析細胞內胰島素訊息傳遞因子 IRS-1 磷酸化表現，LSE 能抑制 OA 所誘導之 pSer³⁰⁷-IRS-1 表現情形；並具有增加 pTyr-IRS-1 及 p-AMPK 兩者表現量，目前也持續利用 Glycogen synthesis assay 和 Glucose uptake assay 分析 LSE 是否具改善 OA 誘導細胞肝糖合成及葡萄糖吸收異常作用。經由上述模式，提出 LSE 具有能夠調控 AMPK/IRS-1 訊息路徑，達到抑制胰島素阻抗及有效代謝糖類的效果，進而增加細胞葡萄糖吸收和肝糖的合成。總結，我們可推論蓮蓬具有抗 T2D 之潛力。

關鍵字：第二型糖尿病(diabetes mellitus type2，T2D)、胰島素阻抗
(insulin resistance)、蓮蓬萃取物(lotus seedpod extract，LSE)、人類肝
細胞 HepG2

第一章、研究動機和研究問題

全世界 46 億的成年人口中，2015 年最新統計有 4.15 億人口罹患糖尿病，國際糖尿病聯盟還推測 2020 年罹患人數可能到達 6.42 億。近年來，罹患糖尿病的年齡層逐漸下降，據估計全球每年約有 490 萬人死於糖尿病，相當於每 6 秒就有一人死於糖尿病[1]，因此糖尿病之預防醫學成為目前熱門的研究主題。植物蓮利用價值高，過去研究顯示蓮的花托部位-蓮蓬(lotus seedpod)富含原花青素(procyanidins) [2]，原花青素已知具有抗氧化、降血糖及增加胰島素活性等功效[3]。因此，本文欲探進一步討蓮蓬萃取物(lotus seedpod extract, LSE)是否能夠有效的抑制胰島素阻抗作用，期許對於糖尿病及相關代謝疾病保健能有所裨益。



2.1 第二型糖尿病(Diabetes mellitus type2, T2D)

糖尿病的類型分為第一型和二型，兩者之間的區別在於 T2D 中胰腺仍然產生胰島素，但細胞無法非常有效地使用胰島素；在 T1D 中，則由於產生胰島素的 β 細胞的自身免疫破壞，胰腺無法產生胰島素[4]。當組織細胞無法使用胰島素的情況，稱之為胰島素阻抗(insulin resistance)。起初，胰腺需要額外的胰島素來彌補組織的需求，但是隨著時間的推移，胰腺不能分泌足夠的胰島素來保持血糖正常濃度，因而糖在血液中累積，造成高血糖[5]。臨床上常出現的經典症狀包含多尿、多飲、多食和體重減輕、模糊的視野、下肢感覺異常、酵母感染等[6]。通常一些因素的組合引起 T2D，包括：(i)基因。研究發現了不同的 DNA 位點，影響體內如何產生胰島素。(ii)體重。現今 T2D 影響兒童和青少年以及成年人，主要是因為兒童肥胖。(iii)代謝症候群。患有胰島素阻抗的患者通常具有代謝異常狀況，包括高血糖，圍繞腰部的額外脂肪，高血壓，高膽固醇和甘油三酯。(iv)受損的胰島 β 細胞，如果使 β 細胞在錯誤的時間分泌錯誤量的胰島素，將無法順利降血糖；反之，高血糖也可以損害這些細胞。(v)肝臟過多的葡萄糖。當血糖濃度過低時，肝臟會釋出葡萄糖升高。通常正常肝臟會慢下來將葡萄糖以肝糖的形式儲存，胰島素阻抗的患者則喪失此代謝調控機制。(vi)細胞之間的通信不良。細胞發送錯誤的信號或不正確

地接收消息，當這些問題影響細胞如何製造和使用胰島素或葡萄糖時，連鎖反應可導致糖尿病[7]。

2.2 胰島素阻抗(Insulin resistance)

胰島素阻抗是體內細胞對胰島素的影響產生抵抗的病症，換言之，對給予定量的胰島素的正常反應減少，因此需要更高濃度的胰島素（內源性）或當通過注射（外源性）施用胰島素時發生[8]。而胰島素阻抗可以成為糖尿病前期和 T2D 的標誌[9]。胰島素阻抗的綜合徵實際上構成廣泛的臨床症狀，其包括肥胖、葡萄糖不耐受、糖尿病和代謝症候群，這些疾病與各種內分泌、代謝、免疫和遺傳病症有關[10]。胰島素阻抗通常與以下條件相關：感染或嚴重病、肥胖、懷孕、類固醇使用和與其他藥物和壓力等，也通常伴隨 T2D、脂肪肝、動脈硬化、皮膚損傷、婦女生殖異常、高濃度雄性激素、生殖異常等疾病出現[11]。雖然胰島素阻抗的確切原因尚未完全了解，有研究認為胰島素阻抗和體重過重、身體不活動有相當大的關係，一些研究表明，腹部脂肪會產生激素和其他可導致嚴重健康問題的物質，除了胰島素阻抗，還包含高血壓、膽固醇失衡和心血管疾病[12]。進一步，許多研究顯示在胰島素阻抗的訊息路徑中，有許多重要的調控分子參與，如下所述：

2.2.1 Insulin-receptor substrate protein (IRS-1)

IRS1 蛋白質分子量為 160-185 kDa，在胰島素調控細胞活動中扮

演不可或缺的角色。帶有 IRS1 基因相關突變的人會對胰島素產生抵抗，因而導致血糖無法降低，人體便不得不分泌大量額外的胰島素，結果可能導致心血管疾病和代謝症候群等症狀[13]。在 T2D 的細胞內胰島素傳訊路徑中 IRS-1 失常，導致絲胺酸(serine)位點磷酸化，造成肝醣合成酶(glycogen synthase)異常，進而無法作用。

2.2.2 PI3K/Akt pathway

PI3K/Akt pathway 是刺激細胞反應中的主要信號轉導因子，在胰島素刺激時，作為 IRS-1 之下游基因。在 T2D 中，當 IRS-1 受到高糖刺激時會導致絲氨酸磷酸化，進而抑制下游分子 PI3K/Akt 活化[14]。

2.2.3 AMP-activated protein kinase (AMPK)

AMPK 為保持細胞內能量平衡的細胞內能量傳感器，調節全身能量代謝[15]。AMPK 由兩個 α 亞單位($\alpha1$ 、 $\alpha2$)、兩個 β 亞單位($\beta1$ 、 $\beta2$)和 3 個 γ 亞單位($\gamma1$ 、 $\gamma2$ 、 $\gamma3$)構成的異三聚體，其中 α 亞基起催化作用， β 和 γ 亞基在維持三聚體穩定性和特異性。其中 AMPK α 亞基第 172 位絲氨酸的磷酸化是維持其活性所必需，且只有 AMPK $\alpha2$ 的活性才與胰島素敏感性相關聯[16]。在正常人中，當人體感到飢餓或是運動時，就能促進 AMPK 的活化，提高細胞利用葡萄糖，但在糖尿病的患者中，一直處在高糖分的環境中造成了胰島素抵抗，反而降低 AMPK 的活化。

2.2.4 Glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β)

GSK-3 β 最早被發現是肝醣代謝作用的調控者，目前更是已知其對許多生物功能有著重要的調控角色，包括控制蛋白質生合成、細胞增生、細胞分化、細胞移動以及細胞凋亡(apoptosis)。當細胞受到胰島素刺激之後，造成細胞內肝醣合成量增加，起因 GSK-3 β 受到上游蛋白質 Akt 作用而失去活性，促使肝醣合成酶沒有被 GSK-3 β 磷酸化而保持其活性[17]。

2.3. 蓮蓬(Lotus seedpod)

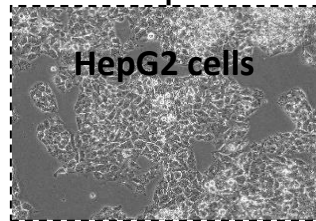
蓮蓬味苦性澀溫，自古即被用來行氣除脹、益補脾胃、止血化瘀、清熱、降肝火及止血的功效，中藥應用蓮蓬煮茶可預防糖尿病。過去研究顯示蓮蓬原花青素(procyanidins of lotus seedpod, LSPCs)具有抗氧化以及免疫調節之活性。LSPCs 可清除氧的自由基並增強抗氧化酵素之作用，因此對於治療認知功能障礙引起的阿茲海默症能發揮顯著的功效[18]。過去研究顯示蓮蓬萃取物(lotus seedpod extract, LSE)可由腸道菌群代謝成為具有抗氧化活性的各種多酚(polyphenol)化合物，在小鼠動物實驗中發現 LSE 可轉變為 8 種主要代謝物。進一步研究 LSE 及其代謝物的抗糖化活性，結果 LSE 和比其他代謝物具有更強的抗糖化作用，與其羰基清除活性和抗氧化能力呈正相關[19]。此外，有研究表明 LSE 可促進胰臟 β -細胞存活及具有調控血糖作用[20]。另有研究證實在牛血清白蛋白葡萄糖模型(bovine serum albumin

(BSA)-glucose model) 中 LSE 的抗糖化活性，並且在糖基化期間也可以有效地保護 BSA 的二級結構[21]，顯示 LSE 具有開發為改善 T2D 之化學預防物質的潛力。

第三章、實驗架構



OA-induced cell model



- 1. Cell viability analysis**
 - Cell counting
- 2. Cellular metabolism dysfunction**
 - Oil red O stain
 - Glycogen synthesis assay
 - Glucose uptake assay
- 3. Signal transduction assay**
 - Western blotting
 - Immunoprecipitation

第四章、研究方法及步驟

4.1. 蓮蓬萃取物(lotus seedpod extract, LSE)製備及成分分析

4.1.1. LSE 之製備

秤取乾燥的蓮蓬 100 g，加入 4 L distilled water，以 100°C 煮 2 小時，待冷卻後將其過濾，後將濾液進行冷凍乾燥，所得的粉末即為蓮蓬粗萃取物，最後再進行冷凍乾燥使其為粉末。

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

測定酚的含量，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 2N Folin-Ciocalteu phenol reagent 後搖勻，再加 3 ml Na₂CO₃ (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 1M NaNO₃ 後搖勻，室溫靜置 6 分鐘。再加 0.3 ml 之 10%

AINO3 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。

4.1.4. 總花青素含量測定(Total anthocyanin content assay)

花青素通常微弱酸性，在酸性環境下可以形成穩定的 flavylium 陽離子構造。本次實驗採用 Fuleki 和 Francis 的酸鹼度差額法，精確定量待測樣品，得體積 V，並從中吸取 2 ml 試樣，經適當稀釋以濃鹽酸或氫氧化鈉溶液調 pH，使一份 pH 為 1.0，另一份 pH4.5。兩份稀釋液分別以分光光度計測其在 520 nm 的吸光值，得 A1 (pH 1.0 者) 與 A2 (pH 4.5 者)，再以下列公式計算每 100 克水果中所含總花青素毫克數。

總花青素含量(mg 花青素/100 mg 萃取物):

$$\frac{(A_1 - A_2) \times F \times MW \times V \times 100}{\epsilon \times \omega}$$

MW: 花青素分子量以 delphinidin-3-diglycoside 之分子量 518.5 計算

V: 總抽出液體積(mL)

F: 稀釋倍數

ϵ : 花青素之莫耳吸光係數(Molecular extinction coefficient)，以 delphinidin-3-diglycoside 在含 0.1% 鹽酸的甲醇溶液之吸光係數 ϵ 值 301.6 計算。

ω : 水果總重(g)

4.2. 細胞培養(Cell culture)

4.2.1. 細胞培養條件

實驗以人類肝臟細胞 HepG2 作為實驗材料，以 MEM (minimum essential medium eagle)培養基進行培養。MEM 中另外添加 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、2 mM L-glutamine、2.2 g/L sodium bicarbonate、0.1 mM non-essential amino acids (NEAA)以及 1.0 mM sodium pyruvate 共同培養。繼代解凍後將細胞置於 5% CO₂ 之 37°C 無菌恆溫培養箱中培養，每兩天換一次培養液，並在無菌環境下操作。

4.2.2 細胞加藥處理

將細胞培養於 6-well 中，待細胞貼壁、型態完全後，以 PBS 潤洗細胞後加入 starvation medium (不含有 10% FBS 的培養液)，再放回 5% CO₂ 之 37°C 無菌恆溫培養箱中培養。待 24 小時後，將培養液換回添加 10% FBS 的 medium，加入 0.6 mM 油酸(oleic acid, OA)，OA

必須先和 BSA (bovine serum albumin)混合，再分別加入不同劑量的 LSE 萃取物，於 5% CO₂ 之 37°C 無菌恆溫培養箱中培養 24 小時。

4.2.3. 細胞存活分析(Cell viability assay)

在無菌操作下，將以 LSE 萃取物處理之細胞去除舊 medium 並加入適量的胰蛋白酶(trypsin)，於 37°C 的溫箱中反應 10 分鐘，將細胞打下，再加入適量 medium 終止 trypsin 的反應；以 trypan blue 染色，用細胞計數盤進行計數。

4.3. 油紅 O 染色(Oil Red O staining)

Oil red O 為一種蘇丹染劑，對於脂肪有強烈親和力，能在中性脂肪中溶解使之呈色，藉由染色後的紅色表現進行分析得知細胞內脂質之含量，因此 Oil red O 為良好脂溶性染劑。將 Oil red O 粉末溶於異丙醇配成 5 mg/ml 之原液，再加入二次水將之稀釋 1.5 倍，之後以 0.22 μm 的過濾膜過濾溶劑。將細胞以 PBS 潤洗 2 次，加入 10% paraformaldehyde 在 37°C 的溫箱中固定 30 分鐘，之後加入過濾過之 Oil red O 染劑於室溫下反應 15 分鐘使細胞呈色，再以 PBS 洗去多餘染劑，最後以倒立式顯微鏡進行觀察並拍照記錄，觀察結束立即以異丙醇將染劑溶下，並將各組別溶下之染劑分別吸取 1 ml 置入 96 孔盤中，再以 ELISA reader 檢測波長 492 nm 之吸光值，比較脂質染色訊號強弱。

4.4. 西方墨點法(Western blotting)

4.4.1. 蛋白萃取與定量

培養細胞於 10 公分 dish 中，待細胞貼壁型態完全後，以 PBS 潤洗細胞後加入 starvation medium，24 小時後加入 0.6 mM 油酸及分別加入不同劑量的 LSE 萃取物培養 24 小時。去除舊的 medium 並加入適量的 trypsin，於 37°C 的溫箱中反應 10 分鐘，將細胞打下並以 1000 rpm 離心 5 分鐘，移去上清液。再加入 1 ml PBS 打散細胞，再以 1000 rpm 離心 5 分鐘後移去上清液，此步驟重複兩次。加入 RIPA buffer (150 mM NaCl、1% NP-40、0.5 % deoxycholic acid、0.1% SDS、100 µg PMSF、170 µg/ml leupeptin)。以均質機破壞細胞後，於 4°C、12000 rpm 下離心 10 分鐘，保留上清液。利用 BCA protein assay kit 定量，以 562 nm 測定吸光值並換算蛋白濃度，調整蛋白量。

4.4.2. Western blotting

以定量出的蛋白濃度調整蛋白，將所需的蛋白濃度調整至一致，以二次水補至相同體積後再加入 loading dye，將所配置的 sample 以加熱器用 100°C 加熱 10 分鐘使其變性。將樣本離心，以 8% 聚丙烯醯胺凝膠(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)進行電泳，條件為 70 伏特的電壓電泳約三小時，依其分子量不同而分離。將海綿、兩片濾紙、8% 聚丙烯醯胺凝膠、硝化纖維膜、兩片濾紙、海綿等依順

序夾好，再將夾子放置於轉置槽中，以電壓 100 伏特 100 分鐘使蛋白轉印到硝化纖維膜上。將轉印完成的硝化纖維膜以麗春紅紅染，裁剪所需的蛋白部分，再以 TBS (tris-buffered saline)將紅染清洗掉。接著浸泡在 5%的脫脂牛奶中浸泡一個小時，再以含 10% tween 的 TBS 清洗三次，每次十分鐘。加入一抗於 4°C 下反應 overnight 後，再以含 10% tween 的 TBS 清洗三次，每次十分鐘，之後加入對應的二級抗體反應一小時，再以含 10% tween 的 TBS 清洗三次，每次十分鐘。將顯影劑 ECL 加在硝化纖維膜上，用冷光儀拍攝，最後以分析軟體透過深淺不同來定量蛋白質表現情形。

4.5. 免疫沉澱(Immunoprecipitation, IP)

將收下的細胞溶解，以 12000 rpm 離心 20 分鐘，將每樣檢體蛋白質定量為 500 μg ，以 RIPA buffer (150 mM NaCl、1% NP-40、0.5% deoxycholic acid、0.1% SDS、50 mM tris-base)補至 200 μL ，再加入 2 μL 抗體 IRS-1，放置 4°C 冰箱內反應 1~1.5 小時或是隔夜。取出後將其加入 35 μL beads (protein A beads)在放入 4°C 冰箱內反應 4 小時，接著以 10000 rpm 離心 5 分鐘(須保持低溫)除去上清液，再以 500 μL RIPA buffer 清洗，繼續離心除去上清液，除去上清液後加入 30 μL 2 倍 dye 後加熱 100°C，3 分鐘後取出後放置冰上冷卻，再以 10000 rpm 離心 5 分鐘，取藍色上清液放置新的離心管，處理完後的檢體，接著

進行西方點墨法分析。

4.6. 肝醣合成分析(Glycogen synthesis assay)

將處理後的細胞以 trypsin 將細胞打下，以 1000 rpm 離心去除上清液。留下的細胞加入 200 μ L RIPA buffer 放置震盪器一小時，打破細胞。將取得的檢體放置加熱器上 100 $^{\circ}$ C、5 分鐘，並通過 10 kDa Spin column 去除細胞碎片，以 13000 rpm 離心 5 分鐘。每管檢體抽出 50 μ L 加入 96 孔盤，並加入 2 μ L Hydrolysis Enzyme Mix，室溫下 30 分鐘，然後加入 Development buffer 46 μ L、Development Enzyme Mix 2 μ L、OxiRed Probe 2 μ L，室溫下放置避光處 30 分鐘，最後以 OD570 測得吸光值。

4.7. 葡萄糖攝取分析(Glucose uptake assay)

將處理後的細胞以 trypsin 將細胞打下，以 1000 rpm 離心去除上清液。留下的細胞加入 50 μ L Glucose assay buffer (含 0.1% SDS) 放置震盪器一小時，打破細胞，並通過 10 kDa Spin column 離心 10000 rpm 去除細胞碎片，取出 30 μ L 檢體以 Glucose assay buffer 補至 50 μ L，並加入 96 孔盤中，再加入 46 μ L Glucose assay buffer、2 μ L Glucose probe、2 μ L Glucose Enzyme Mix，避光下放置 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱中 30 分鐘，以 OD570 測得吸光值。

4.8. 統計分析

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

第五章、結果與討論

5.1 探討蓮蓬萃取物之成份功能性成份

首先，進行蓮蓬萃取物(lotus seedpod extract, LSE)之成份分析，利用 Folin-Ciocalteu、Jia 方法測定 LSE 成份中約莫佔 $29.6 \pm 9.0\%$ 總多酚含量(Table 1)；總黃酮(total flavonoid)約有 $85.7 \pm 3.2\%$ 。而花青素之純度測定是採用 Fuleki 和 Francis 的酸鹼度差額法，由分光光度計分析 LSE 之吸光值再經公式換算。而換算出所萃取出 LSE 的花青素純度約有 $6.3 \pm 2.8\%$ 。上述成份鑑定試驗確認 LSE 為富含多酚之物質，尤其以黃酮類最多。

5.2 探討以不同濃度的 LSE 單獨或合併油酸處理對於 HepG2 細胞存活之影響

實驗以 0.6 mM 油酸(oleic acid, OA)處理人類肝細胞 HepG2 為細胞誘導模式，探討 LSE 對於胰島素阻抗是否具有改善作用及釐清其調控分子機制。首先，利用不同濃度 LSE (0.1-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)處理 HepG2 細胞，觀察 LSE 對細胞存活之影響。由細胞計數結果可知，在 24 小時 LSE 之處理下，隨著 LSE 的劑量增加到 50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 會對 HepG2 細胞之生長產生抑制作用(Fig. 1)，所以篩選 LSE 劑量 $< 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 作為後續探討其對於肝細胞胰島素阻抗之影響。同樣地，利用 0.6 mM OA 合併不同劑量的 LSE (1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 和 5 $\mu\text{g}/\text{mg}$)處理 HepG2 細胞，由細胞

計數進行生長分析，結果得知兩劑量皆是對細胞生長較無毒性之濃度範圍。

5.3 探討 LSE 對於油酸誘導 HepG2 細胞內脂質堆積之影響

為確認 0.6 mM OA 能誘導 HepG2 細胞內脂質堆積（其為肝臟代謝異常表現之一），再合併不同濃度 LSE (1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 和 5 $\mu\text{g}/\text{mg}$) 共同培養 24 小時，探討 LSE 是否具有抑制其脂質堆積之作用。實驗利用 Oil red O 染色，在單純以 OA 誘導的組別中顯示 HepG2 細胞內出現紅色油滴堆積情形(Fig. 2A)，且收取染劑進行量化的結果也呈現明顯上升(Fig. 2B)；而在 OA 合併加入不同濃度的 LSE 處理的情況下，可觀察到細胞內紅色油滴堆積情形減少(Fig. 2A)，且量化的結果也明顯下降(Fig. 2B)，因此推論 LSE 能有效降低 OA 誘導肝細胞內脂質堆積的情形。

5.4 探討 LSE 對於油酸誘導 HepG2 細胞內胰島素訊息傳遞因子 IRS-1 磷酸化表現之影響

進一步，以免疫沉澱法及西方墨點法探討細胞內胰島訊息傳遞因子 IRS-1 磷酸化的表現情形。由實驗結果得知，相對於控制組，OA 誘導組中 IRS-1 與磷酸化酪胺酸結合量較為減少，代表 IRS-1 的酪胺酸磷酸化(pTyr-IRS-1)表現下降；而有加入 LSE 處理的組別中，其兩者結合的表現量有增加的趨勢(Fig. 3A)。相反地，OA 誘導組中 IRS-1

的絲胺酸磷酸化(pSer³⁰⁷-IRS-1)表現量相較控制組有增加的情形；而在高劑量 LSE (5µg/mg)試驗組別中，其 pSer³⁰⁷-IRS-1 表現量顯著減少 (Fig. 3B)，量化的結果也顯示上述的趨勢表現(Fig. 3C)。

5.5 探討 LSE 對油酸誘導的 HepG2 細胞內能量代謝調控因子 AMPK 之影響

AMPK 是在細胞內部感應細胞能量代謝並維持其恆定性之重要調控因子，後續以西方墨點法探討 AMPK 蛋白與磷酸化的表現情形。實驗結果發現 OA 誘導組的 p-AMPK 與 AMPK 的比值相較於對照組有些微下降的情形，而 LSE 試驗組與誘導組相比之比值則有提升(Fig. 4A)，且量化結果與此相符合(Fig. 4B)，因此推斷 LSE 可能藉由促使 AMPK 磷酸化表現增加，以影響後續參與胰島素調控與脂質代謝路徑相關分子之表現。

5.6 總結

由目前初步實驗結果發現，LSE 可能藉由增加細胞中 p-AMPK 表現來促使 IRS-1 酪胺酸磷酸化提升，並同時具有抑制 OA 所誘發 Ser³⁰⁷IRS-1 表現之情形，進而達到抑制肝細胞內脂質堆積、胰島素阻抗或其他代謝異常之可能性。因此，LSE 對於肝糖生成、葡萄糖攝取及其分子調控路徑之影響尚未釐清，目前仍持續進行上述相關分析。由於本次實驗為細胞內試驗，若欲進一步了解 LSE 對於活體之影響

力，必須加以動物實驗做為未來研究的進程。總結，根據目前的實驗結果，我們提出 LSE 具有抑制肝細胞胰島素阻抗之潛力。

第六章、參考文獻

1. IDF Diabetes Atlas Seventh Edition 2015.
2. Xiao JS, Xie BJ, Cao YP, Wu H, Sun ZD, Xiao D. Characterization of oligomeric procyanidins and identification of quercetin glucuronide from lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) seedpod. *J Agric Food Chem.* 2012;60:2825-9.
3. Xu J, Rong S, Xie B, Sun Z, Zhang L, Wu H, Yao P, Hao L, Liu L. Procyanidins extracted from the lotus seedpod ameliorate age-related antioxidant deficit in aged rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2010 Mar;65(3):236-41.
4. 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.* 1998 Jul;15(7):539-53.
5. Asha Jayakumar. Greenspan's Basic and Clinical Endocrinology Chapter 17: Pancreatic hormones & diabetes mellitus. *Yale J Biol Med.* 2012 Dec; 85(4): 559.
6. Park S, Rhee SY, Jeong SJ, Kim K, Chon S, Yu SY, Woo JT. Features of Long-Standing Korean Type 2 Diabetes Mellitus Patients with Diabetic Retinopathy: A Study Based on Standardized Clinical Data. *Diabetes Metab J.* 2017 Oct;41(5):393-404. doi: 10.4093/dmj.2017.41.5.393.
7. Chen CC, Liu K, Hsu CC, Chang HY, Chung HC, Liu JS, Liu YH, Tsai TL, Liaw WJ, Lin IC, Wu HW, Juan CC, Chiu HC, Lee MM, Hsiung CA. Healthy lifestyle and normal waist circumference are

associated with a lower 5-year risk of type 2 diabetes in middle-aged and elderly individuals: Results from the healthy aging longitudinal study in Taiwan (HALST). *Medicine (Baltimore)*. 2017 Feb;96(6):e6025.

8. Tamires M. Zanotto, Paula G.F. Quaresma, Dioze Guadagnini, Lais Weissmann, Andressa C. Santos, Juliana F. Vecina, Kelly Calisto, Andrey Santos, Patrícia O. Prada, Mario J.A. Saad. Blocking iNOS and endoplasmic reticulum stress synergistically improves insulin resistance in mice. Volume 6, Issue 2, February 2017, Pages 206-18.
9. Caprio S, Perry R, Kursawe R. Adolescent Obesity and Insulin Resistance: Roles of Ectopic Fat Accumulation and Adipose Inflammation. *Gastroenterology*. 2017 Feb 9. pii: S0016-5085(17)30144-0.
10. Shun CB, Donaghue KC, Phelan H, Twigg SM, Craig ME. Thyroid autoimmunity in Type 1 diabetes: systematic review and meta-analysis. *Diabet Med*. 2014 Feb;31(2):126-35.
11. Rao G. Insulin resistance syndrome. *American Family Physician* 2001, 63(6):1159-63, 1165-6.
12. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease. 2009
13. Trombetta M, Dauriz M, Bonetti S, Travia D, Boselli L, Santi L, Bonora E, Bonadonna RC. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. Is common genetic variation at IRS1, ENPP1 and TRIB3 loci associated with cardiometabolic phenotypes in type 2 diabetes? An exploratory

- analysis of the Verona Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Study (VNDS) 5. 2016 Mar;26(3):232-8.
14. Tan Li and Guanyu Wang. Int J Mol Sci. Computer-aided targeting of the PI3K/Akt/mTOR pathway: toxicity reduction and therapeutic opportunities. 2014 Oct;15(10):18856-91.
 15. Carling D. Trends Biochem Sci. The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. 2004 Jan;29(1):18-24.
 16. Woods A, Vertommen D, Neumann D, Turk R, Bayliss J, Schlattner U, Wallimann T, Carling D, Rider MH. Identification of phosphorylation sites in AMP-activated protein kinase (AMPK) for upstream AMPK kinases and study of their roles by site-directed mutagenesis. J Biol Chem. 2003 Aug 1;278(31):28434-42. Epub 2003 May 21.
 17. 陳昶翰，洪純隆，洪義人。分子選擇殖與特性化兩個新的肝醣合成激酶 3 β 相關蛋白 Human Dynamin-like、Human Ninein，高雄醫學大學，醫學研究所，博士論文。
 18. Xu J, Rong S, Xie B, Sun Z, Zhang L, Wu H, Yao P, Zhang X, Zhang Y, Liu L. Rejuvenation of antioxidant and cholinergic systems contributes to the effect of procyanidins extracted from the lotus seedpod ameliorating memory impairment. Eur Neuropsychopharmacol. 2009 Dec;19(12):851-60.

第七章、附圖(表)

Table 1 – Composition of the lotus seedpod extract (LSE)

Composition	LSE (%)
Total polyphenol (Folin-Ciocalteu method)	29.6 ± 9.0
Total flavonoid (Jia method)	85.7 ± 3.2
Total anthocyanin (Fuleki and Francis method)	6.3 ± 2.8

Fig. 1

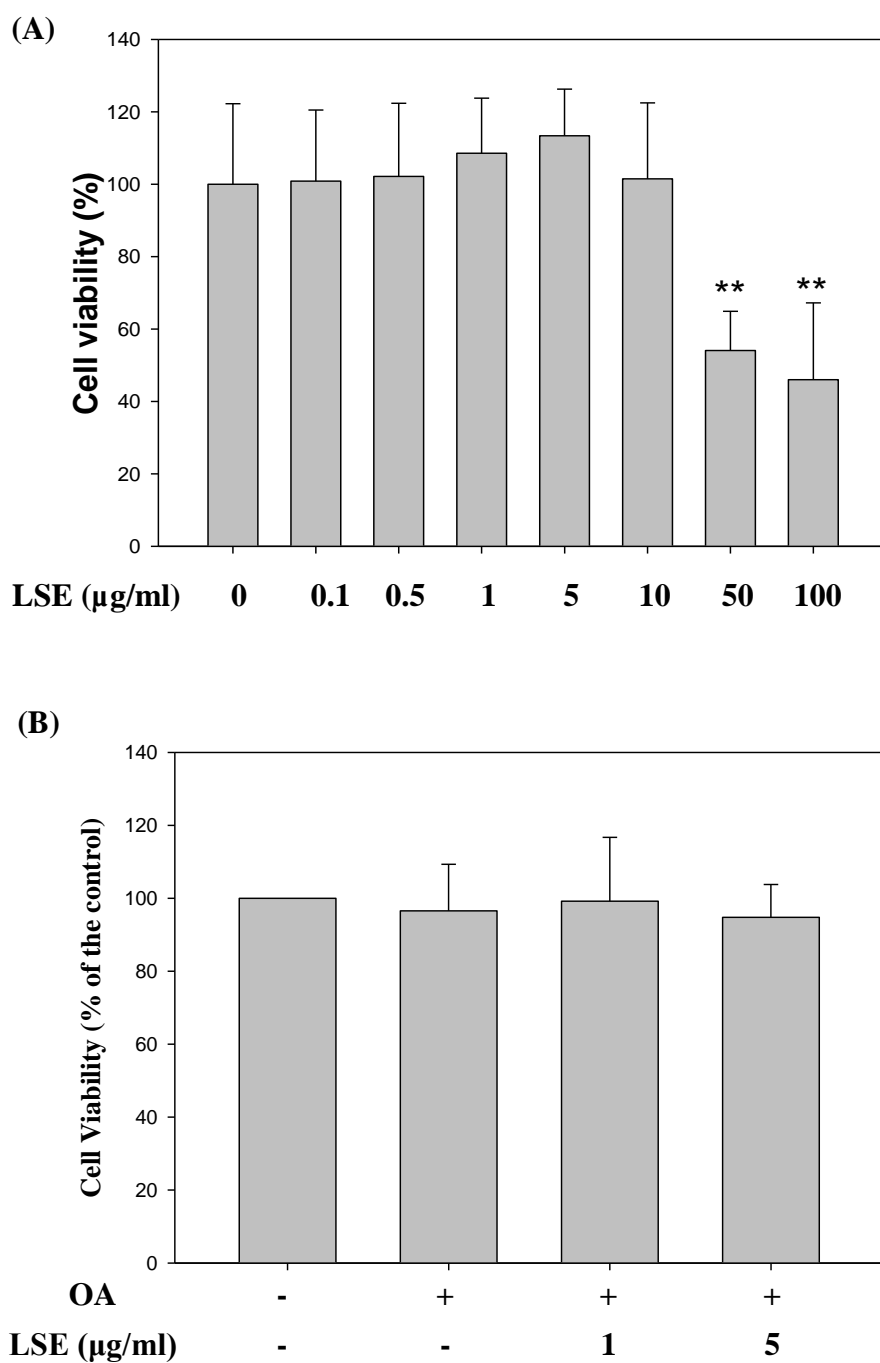
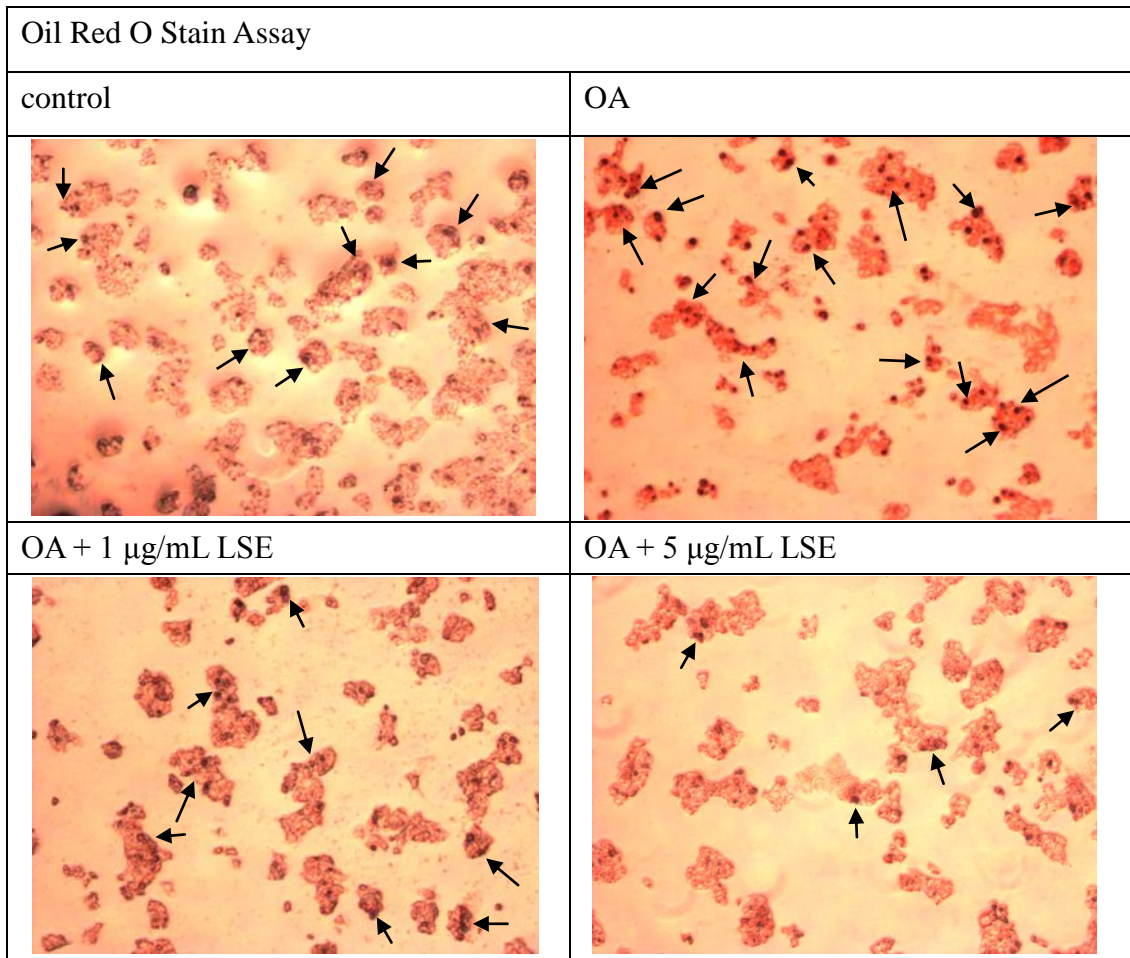


Fig. 1. Effect of LSE and/or OA on HepG2 cell viability. (A) HepG2 cells were treated with various concentrations of LSE (0.1-100 µg/ml) for 24 h. (B) HepG2 cells were treated with 0.6 mM of OA in the presence or absence of indicated concentrations of LSE (5 and 10 µg/ml) for 24 h. Cell viability was analyzed by cell counting assay. The results represent the average of three independent experiments ± SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control.

Fig. 2

(A)



(B)

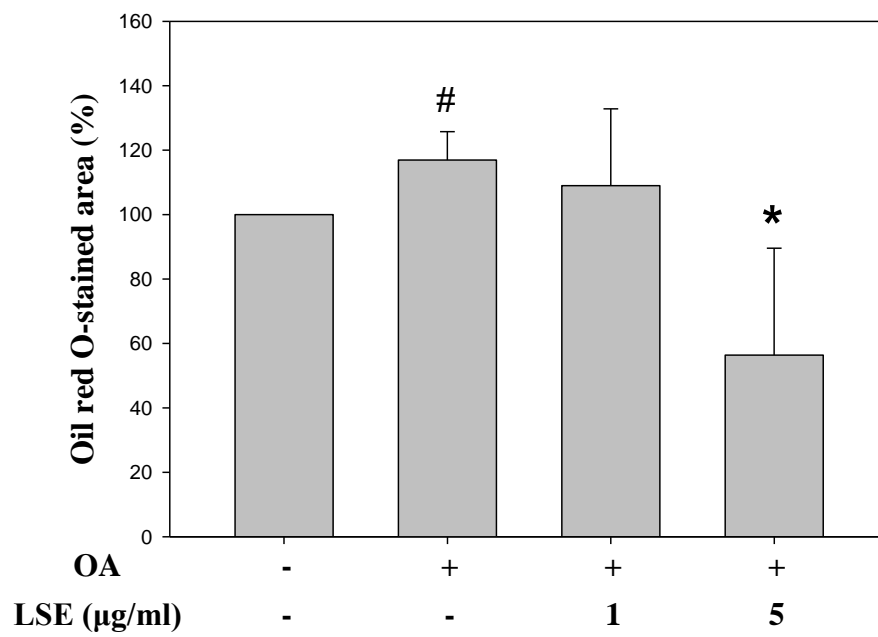
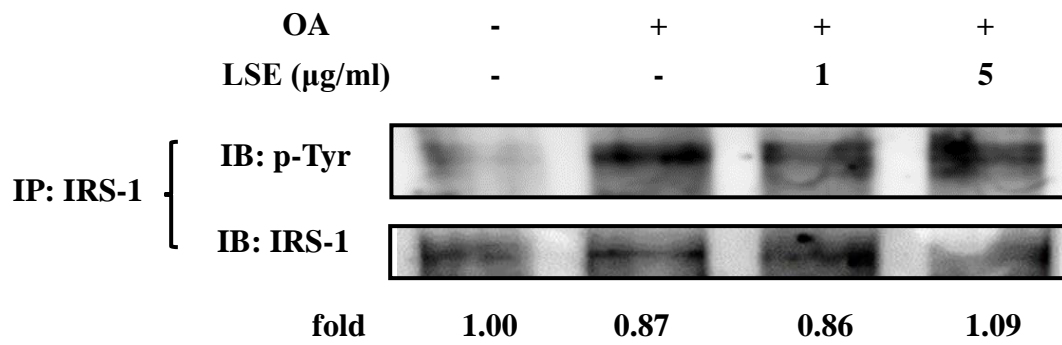


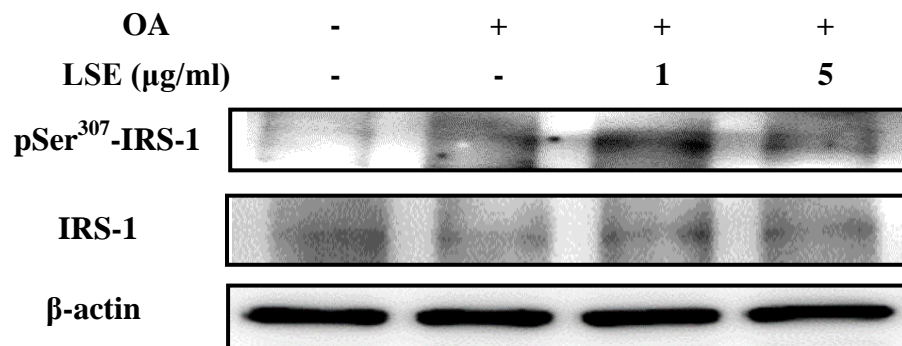
Fig. 2. Effect of LSE on the OA-induced lipid accumulation in HepG2 cells. (A) HepG2 cells were treated with 0.6 mM of OA in the presence or absence of indicated concentrations of LSE (1 and 5 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h. After the incubation, the cells were stained with Oil Red O and then observed under the microscope (400 x). The red droplets accumulated in the cells were indicated as the stained lipid. (B) Adding 1 mL of isopropanol to the stained culture dish, the extracted dye was diluted 5x in ddH₂O, and then its absorbance was monitored at 492 nm. The quantitative data are presented as means \pm SD of three repeats from three independent study. # $p < 0.05$ compared with the control. * $p < 0.05$ compared with the OA-treated group.

Fig. 3

(A)



(B)



(C)

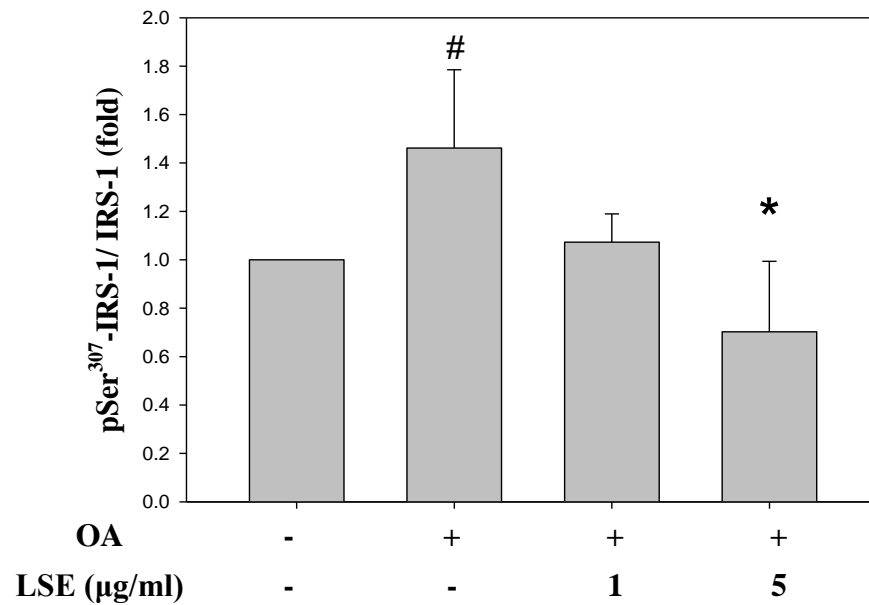
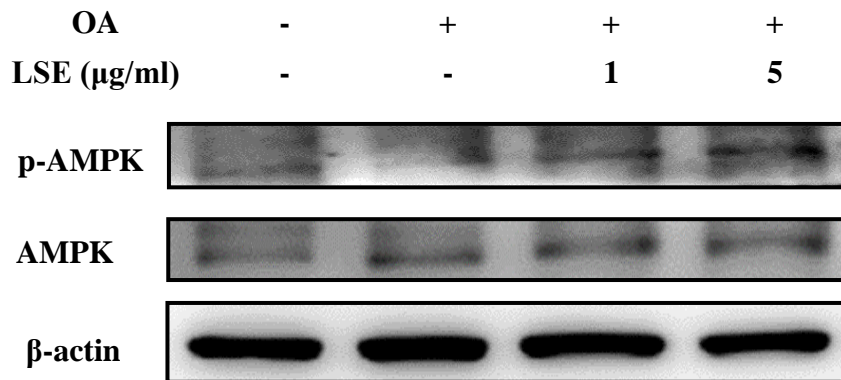


Fig. 3. Effect of LSE on insulin signaling in the OA-treated HepG2 cells. HepG2 cells were treated with 0.6 mM of OA in the presence or absence of indicated concentrations of LSE (1 and 5 μ g/ml) for 24 h. (A) Cell extracts were immunoprecipitated with an IRS antibody. The precipitated complexes were examined for immunoblotting using pTyr or IRS-1 antibodies. 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. (B) The protein levels of pSer³⁰⁷-IRS-1 and IRS were determined by Western blotting. β -actin served as an internal control. (C) The quantitative data are presented as means \pm SD of three repeats from three independent study. # $p < 0.05$ compared with the control. * $p < 0.05$ compared with the OA-treated group.

Fig. 4

(A)



(B)

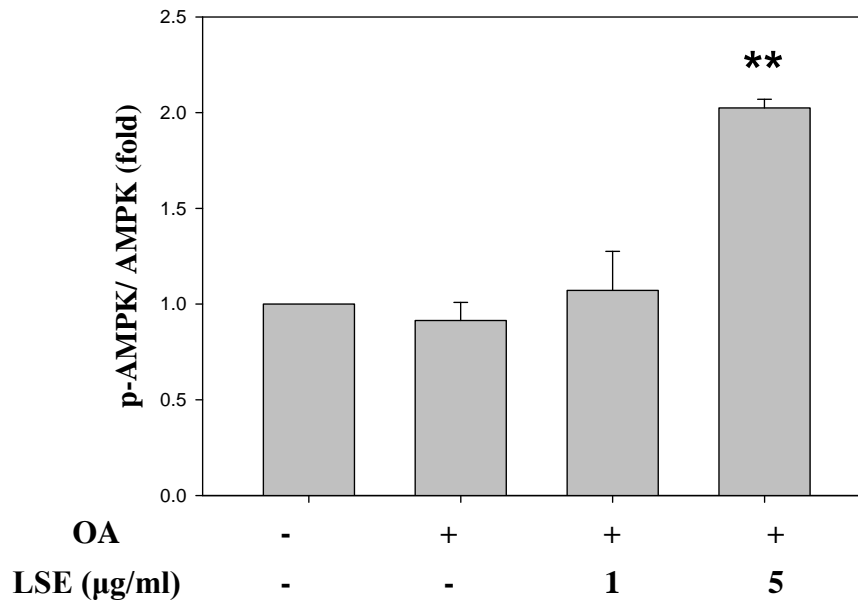


Fig. 4. Effect of LSE on insulin resistance-related protein in the OA-treated HepG2 cells. HepG2 cells were treated with 0.6 mM of OA in the presence or absence of indicated concentrations of LSE (1 and 5 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h. (A) The protein levels of p-AMPK and AMPK were determined by Western blotting. β -actin served as an internal control. (B) The quantitative data are presented as means \pm SD of three repeats from three independent study. ** $p < 0.01$ compared with the OA-treated group.

Fig. 5

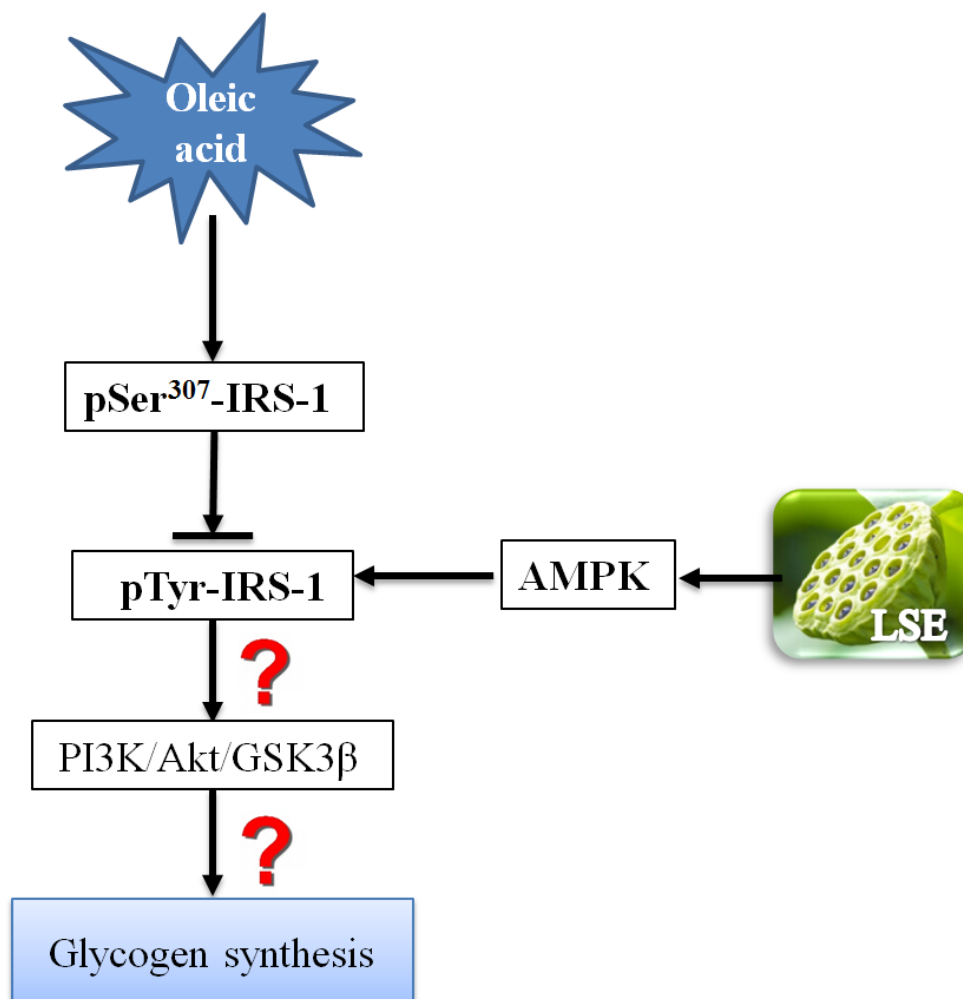


Fig. 5. A proposed model for the inhibitory effect of LSE on OA-induced hepatic insulin resistance in HepG2 cells. OA induces Ser307 phosphorylation of critical IRS-1 sites, reducing IRS-1 tyrosine phosphorylation, and thereby inhibiting IRS-1 binding to insulin receptor. These results may downregulate PI3K/Akt/GSK3 β signaling pathway and reduce insulin-stimulated glucose uptake and glycogen synthesis. Given that, future experiments will test this possibility. On the other hand, IRS-1 tyrosine phosphorylation has been demonstrated to be positively regulated by AMPK activation. In our results, LSE is shown to activate AMPK activity leading to block IRS-1 serine phosphorylation and attenuate OA-induced insulin signaling blockade.