

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

期中進度報告  
期末報告

土肉桂葉精油及其主要成分桂皮醛抗糖尿病作用之探討

A Study on the anti-diabetic effects of Cinnamomum osmophloeum Kaneh and its  
major composition cinnamaldehyde

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC98-2320-B-040-017-MY3

執行期間：九十八年八月一日至一百零一年七月三十一日

執行機構及系所：中山醫學大學營養系

計畫主持人：劉承慈

共同主持人：李世傑

計畫參與人員：顏嘉均、張皓瑜、許文馨、劉育廷、李蒔華、蘇博輝

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

中 華 民 國 一 百 零 一 年 十 月 三 十 一 日

目錄	I
中文摘要及關鍵詞	III
英文摘要及關鍵詞	IV
報告內容	1
一、前言	1
二、研究目的	1
三、文獻探討	1
四、研究方法	5
五、結果	9
(一) 土肉桂葉精油組成分	9
(二) 大鼠代謝特徵與臟器、脂肪及骨骼肌重量	9
(三) 大鼠空腹血糖與血漿及胰臟胰島素含量	10
(四) 大鼠口服葡萄糖耐受性	10
(五) 大鼠其它血液生化值	10
(六) 大鼠腎功能指標	11
(七) 大鼠骨骼肌之氧化壓力及發炎指標	11
(八) 大鼠胰臟之氧化壓力及發炎指標	11
(九) 大鼠腎臟之氧化壓力及發炎指標	12
(十) 大鼠周邊血之氧化壓力及發炎反應	12
(十一) 大鼠骨骼肌肉 IR-beta、p-Akt-ser、p-Akt-thr、及 GLUT4 蛋白質表現量	12
(十二) 大鼠骨骼肌中 PI <sub>3</sub> K 活性	12
(十三) 體外試驗模式建立—利用 C2C12 肌母細胞株 (myoblasts) 分化為肌管(myotubes) 培養物之實驗模式	12
(十四) 不同濃度 insulin 刺激下 C2C12 肌管培養物中 IR-beta、GLUT4、p-Akt-ser 與 p-Akt-thr 蛋白質表現量	13
(十五) 土肉桂葉精油對於 C2C12 肌管培養物之毒性	13
(十六) 土肉桂葉精油預處理對 C2C12 肌管培養物在有或無胰島素刺激下胞內胰島素訊號及葡萄糖攝取活性之影響	13
(十七) 土肉桂葉精油預處理在有或無胰島素刺激下對於 C2C12 細胞 PI <sub>3</sub> K 活性及 2-NBDG 攝取能力之影響	14
六、討論	14
七、結論與建議	18
八、計畫成果自評	18
九、參考文獻	19

附錄 .....	27
表一、台灣土肉桂葉精油揮發性組成分 .....	27
表二、大鼠誘發糖尿病前後代謝特徵及空腹血糖值 .....	29
表三、控制組及有或無灌食土肉桂葉精油、肉桂醛及 glibenclimide 之糖尿病大鼠代謝特徵及組織或 器官重/體重比 .....	30
表四、控制組及有或無灌食土肉桂葉精油、肉桂醛及 glibenclimide 之糖尿病大鼠在誘發糖尿病後不 同天之空腹血糖值 .....	31
表五、控制組及有或無灌食土肉桂葉精油、肉桂醛及 glibenclimide 之糖尿病大鼠周邊血游離脂肪酸、 果糖胺、尿酸濃度及 HOMA-IR 值 .....	32
表六、控制組及有或無灌食土肉桂葉精油、肉桂醛及 glibenclimide 之糖尿病大鼠腎臟重/體重比及 腎功能指數 .....	33
表七、控制組及有或無灌食土肉桂葉精油、肉桂醛及 glibenclimide 之糖尿病大鼠骨骼肌中抗氧化及 發炎指標 .....	34
表八、控制組及有或無灌食土肉桂葉精油、肉桂醛及 glibenclimide 之糖尿病大鼠胰臟中抗氧化及發 炎指標 .....	35
表九、控制組及有或無灌食土肉桂葉精油、肉桂醛及 glibenclimide 之糖尿病大鼠腎臟中抗氧化及發 炎指標 .....	36
表十、控制組及有或無灌食土肉桂葉精油、肉桂醛及 glibenclimide 之糖尿病大鼠周邊血中抗氧化及 發炎指標 .....	37
圖一、土肉桂葉精油及肉桂醛對於糖尿病大鼠周邊血及胰臟胰島素含量之影響 .....	38
圖二、土肉桂葉精油及肉桂醛對於糖尿病大鼠在 OGTT 期間血糖及血中胰島素含量之影響 .....	39
圖三、土肉桂葉精油及肉桂醛對於糖尿病大鼠在 OGTT 期間周邊血中腸泌素含量之影響 .....	40
圖四、土肉桂葉精油及肉桂醛對於糖尿病大鼠骨骼肌中 SOCS3 表現量之影響 .....	41
圖五、土肉桂葉精油及肉桂醛對於糖尿病大鼠骨骼肌胰島素受體訊號表現及活性之影響 .....	42
圖六、土肉桂葉精油及肉桂醛對於糖尿病大鼠骨骼肌 PI <sub>3</sub> K 活性之影響 .....	43
圖七、胎牛血清及馬血清誘發 C2C12 細胞分化之活性比較 .....	44
圖八、胎牛血清及馬血清誘發之 C2C12 細胞分化對於胰島素刺激之 2-NBDG 攝取活性之影響 .....	45
圖九、胰島素對於 C2C12 肌管培養物胰島素受體訊號表現及活性之影響 .....	46
圖十、土肉桂葉精油對於 C2C12 肌管培養物存活率之影響 .....	47
圖十一、土肉桂葉精油對 C2C12 肌管培養物在無胰島素刺激下胰島素受體訊號表現及活性之影響 .....	48
圖十二、土肉桂葉精油對於 C2C12 肌管培養物在胰島素刺激下胰島素受體訊號表現及活性之影響 .....	49
圖十三、土肉桂葉精油對於 C2C12 肌管培養物在無或有胰島素刺激下 PI <sub>3</sub> K 活性之影響 .....	50
圖十四、土肉桂葉精油對於 C2C12 肌管培養物在無或有胰島素刺激下攝取 2-NBDG 之影響 .....	51

### 中文摘要及關鍵詞 (keywords)

**目的:**利用 *in vivo* 及 *in vitro* 模式,觀察台灣土肉桂葉精油(*Cinnamomum osmophloeum Kaneh*, CO) 抗糖尿病功能及相關機制。**方法:**將蒐集自嘉義大學實驗林之土肉桂葉以水蒸餾法製備精油,並利用 GC 與 GC/MS 分析成分。*In vivo* 研究利用雄性 Wistar 大鼠以 STZ 誘發糖尿病(DM)後,灌食不同劑量 CO 或肉桂醛 3 週,並以口服降血糖藥 glibenclimide (GBC)為正對照組。*In vitro* 研究利用 C2C12 肌管培養物,以不同濃度 CO 預處理 2 小時後,觀察胰島素刺激前後其攝取葡萄糖之反應。**結果:**CO 中主要成分為 linalool 佔 40.24%,而肉桂醛含量佔 6.87%,顯示本研究使用之土肉桂為 linalool 化學型。灌食 CO 可改善 DM 大鼠代謝狀況及骨骼肌流失,逆轉 DM 誘發之空腹高血糖、降低血中果糖胺濃度,並增加空腹血漿及胰臟胰島素含量,效果與 GBC 相當。在 OGTT 期間,CO 顯著減少 DM 大鼠血糖累積量,並增加周邊血中 GLP-1 及 GIP 累積量。HOMA-IR 計算值顯示,CO 增加胰島素敏感性且部分原因與降低周邊血中游離脂肪酸有關。觀察 DM 大鼠腎功能指標發現,所有劑量 CO 均可顯著改善尿中白蛋白及 BUN, 25 mg/kg BW 之 CO 顯著降低 CCR、GFR,但 50 mg/kg BW 之 CO 只降低 CCR。肉桂醛及 GBC 僅顯著降低 BUN,對於 CCR、GFR 及尿中白蛋白則無影響。觀察 DM 大鼠氧化壓力及發炎指標發現,CO 顯著逆轉糖尿病增加之胰臟、骨骼肌及周邊血中脂質過氧化程度,且在胰臟及周邊血之改善效果顯著優於肉桂醛及 GBC。此外,CO 顯著提升 DM 大鼠骨骼肌、胰臟及腎臟抗氧化酵素 SOD、GRd 及 GPx 活性,在骨骼肌及腎臟中效果優於肉桂醛及 GBC,而在胰臟中效果與肉桂醛相當但優於 GBC。CO 顯著增加 DM 大鼠骨骼肌、胰臟及腎臟中總麩胱甘肽含量,效果均優於肉桂醛及 GBC。另外,在周邊血中 CO 可顯著增加抗氧化酵素 SOD 及 GPx 之活性且也可顯著增加 GSH 含量,效果與肉桂醛相當但優於 GBC。在抗發炎作用方面,CO 顯著逆轉 DM 增加之骨骼肌、胰臟、腎臟及周邊血中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及一氧化氮衍生物(NO)濃度,在胰臟中效果優於肉桂醛及 GBC,在骨骼肌、腎臟及周邊血中效果與肉桂醛相當但優於 GBC。觀察骨骼肌胰島素受體相關訊號分子表現及活性發現,所有劑量之 CO 均逆轉糖尿病誘發之 IR-beta 表現量下降、促進 Akt 磷酸化程度及 PI $\beta$ K 活性,且 12.5 及 25 mg/kg BW CO 之效果優於 GBC。肉桂醛僅些微改善 Akt-thr 磷酸化程度,但未改善 IR-beta。活體外利用 C2C12 細胞株在馬血清作用下分化建立肌管培養物模式之研究發現,細胞在胰島素刺激下,顯著增加 IR-beta 及 GLUT4 表現、Akt-ser 及 Akt-thr 之磷酸化程度、PI $\beta$ K 活性及葡萄糖攝取能力。在不影響肌管培養物細胞存活率之濃度下,CO 在無胰島素存在時,不影響細胞 IR- $\beta$  及 GLUT4 表現、Akt 磷酸化程度、PI $\beta$ K 活性或細胞攝取葡萄糖之能力。在胰島素刺激下,0.2  $\mu$ g/ml 之 CO 顯著提升 IR-beta 表現量、PI $\beta$ K 活性,且促進 GLUT4 表現量程度也優於其他處理,但未顯著促進葡萄糖攝取能力;2  $\mu$ g/ml 之 CO 提升 Akt-ser 及 Akt-thr 磷酸化程度優於其他濃度,並顯著提升細胞葡萄糖攝取能力。**結論:**linalool 型 CO 在 DM 大鼠具有促進胰島素分泌及改善胰島素阻抗之降血糖作用,並能改善腎臟病變進行,且效果優於肉桂醛及 GBC。其作用機制包括改善糖尿病狀態下周邊循環及組織之氧化壓力及發炎狀態。*In vivo* 及 *in vitro* 研究證實其降血糖作用與促進胰島素受體相關訊號蛋白質表現及活化有關。

**關鍵字:**台灣土肉桂、糖尿病、抗氧化、肉桂醛、桉羅木醇、抗發炎、腎臟病變、胰島素敏感性、streptozotocine、大鼠、C2C12 細胞株

## 英文摘要及關鍵詞 (keywords)

**Aim:** To investigate antidiabetic effect of the leave essential oil of *Cinnamomum osmophloeum Kaneh* (CO) and the associated mechanisms. **Methods:** CO was prepared with leaves collected from a research farm of National Chiayi University by using hydrodistillation technique and analyzed with GC and GC/MS. *In vivo* study using STZ-DM Wistar rats that gavaged with CO or cinnamaldehyde (CA) for 3 weeks. Glibenclimide (GBC) was as positive control. *In vitro* study using cultured C2C12 myotubes that pretreated with CO for 2 hours. **Results:** The major composition of CO was linalool which represented 40.24%, while CA only represented 6.87% of the composition. CO showed hypoglycemic effects that associated with improved peripheral and pancreatic insulin content and HOMA-IR value. During the OGTT period, CO lowered glucose accumulation and elevated insulin, GLP-1 and GIP accumulation in peripheral blood. All tested doses of CO ameliorated microalbumin urea and BUN, but CCR and GFR were improved only by higher doses. CA and GBC only improved BUN but not other renal function parameters. In general, CO reversed diabetes-enhanced oxidative stress and inflammatory condition in pancreas, skeletal muscle and peripheral blood to an extent greater than that of CA and GBC, including lowered TBARS, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and NO levels, and elevated SOD, GRd, and GPx activities, and total GSH content. All tested doses of CO ameliorated IR-beta expression, Akt phosphorylation and PI<sub>3</sub>K activity in skeletal muscle in which 12.5 and 25 mg/kg of CO showed more effective than that of GBC. CA improved Akt-thr phosphorylation and PI<sub>3</sub>K activity but not IR-beta expression. In the presence of insulin, 0.2  $\mu$ g/ml of CO elevated the expression of IR-beta and GLUT4 and the activity of PI<sub>3</sub>K, while 2  $\mu$ g/ml of CO elevated Akt phosphorylation and glucose uptake capability of cells. **Conclusion :** linalool-type CO possessed an anti-diabetic effect via improving insulin secretory activity and insulin sensitivity and ameliorated the progressing of diabetic nephropathy which was more effective than that of CA and GBC. The mechanisms attributed to such activity of CO including anti-oxidative and anti-inflammatory effect of CO. *In vivo* and *in vitro* evidences showed that CO-improved insulin sensitivity was associated with improved insulin signaling protein expression and activation.

Keywords: anti-inflammatory; antioxidant; cinnamaldehyde; C2C12 cell line; *Cinnamomum osmophloeum Kaneh*; diabetes; insulin-sensitivity; linalool; nephropathy; rat; streptozotocine

## 報告內容

### 一、前言

糖尿病是一種慢性代謝相關症候群，隨著糖尿病進行，患者逐致病率及致殘率漸增高，不但影響其生活品質並威脅生命，這使得全球各國均致力於糖尿病的防治。隨著全球化腳步，糖尿病不再是已開發國家或地區的專利，許多開發中國家或地區的糖尿病盛行率也都在急遽增加—根據世界衛生組織 (World health organization; WHO) 資料顯示，全球不論已開發或開發中國家/地區之罹病人口均逐年上升，在2011年全世界約有3.47億人罹患糖尿病 [1]。根據行政院衛生署2005~2008年國民營養健康狀況變遷調查研究結果顯示，糖尿病盛行率已達9.2%，幾乎每10個台灣人就有1人罹病，其中65歲以上男性幾乎每4個便有1人罹患糖尿病，且發生率逐年攀升，並有年輕化趨勢 [2]。糖尿病的高血糖及其併發症的病理生理學，牽涉到不同程度的胰島素阻抗性及不同程度的胰島 $\beta$ 細胞功能衰竭，導致血糖不易獲得嚴密控制，而其高血糖所致的各種生理學及生化學變化的後果，也使血糖的控制更加複雜。糖尿病問題之複雜性，致使迄今仍無有效療法能完全控制糖尿病，科學家仍持續在尋求新療法。世界衛生組織的糖尿病專家委員會曾建議擴大觀察DM 傳統療法(e.g. 民俗療法)的功效 [3]，因而鼓勵了許多學者專家投入天然物抗糖尿病功效之研究。土肉桂為台灣特有的肉桂類植物，全島各處均有栽種，是種植面積廣大的經濟作物。本計畫主持人根據過去其他學者的報導，推論台灣土肉桂極可能具有抗糖尿病作用。考量在全球天然物與健康維護相關功能性研究的趨勢，均需要釐清作用成分，因而與大葉學生物產業科技系李世傑老師合作，製備台灣土肉桂葉精油，分析其化學成分，並與已知具有抗糖尿病作用之肉桂主要成分之一—肉桂醛比較其抗糖尿病作用並探討作用機制。透過本計畫之系統性研究，將能提供台灣土肉桂葉精油抗糖尿病作用及其機制相關證據，有利於推廣其在抗糖尿病之應用的學理依據。

### 二、研究目的

過去有研究顯示多種肉桂類植物的製備物具有抗糖尿病作用，但不同種類之肉桂產品，可能因品種及製備方法之差異，導致組成分的不同，而具有不同的生理功效。由於肉桂醛具許多已知生物學活性，過去關於台灣土肉桂精油的研究多針對肉桂醛型加以探討，且已有文獻報導肉桂醛之抗糖尿病作用，故本研究以台灣嘉義大學實驗苗圃培育之土肉桂品種，觀察其抗糖尿病功效及相關機制，對照肉桂醛之效果，並以傳統使用之口服降血糖藥為正對照組。本計畫共同主持人過去已製備出富含肉桂醛之土肉桂葉精油，因此本研究以動物試驗觀察台灣土肉桂葉精油在糖尿病大鼠之降血糖及改善糖尿病腎病變發展之功效。在降血糖作用機制方面，也探討其是否與改善肌肉胰島素抗拒性及/或促進胰島素分泌有關。而由於糖尿病周邊胰島素敏感性及胰島素分泌能力在疾病發展過程中之衰退，以及其慢性併發症發展機制，均牽涉到組織/細胞之氧化壓力及發炎反應增加，故本研究另一目的為探討土肉桂葉精油在糖尿病大鼠之抗氧化與抗發炎作用，與血糖控制及與糖尿病腎病變發展間的關係。土肉桂葉精油對於胰島素標的細胞訊號傳遞之調節作用，在本研究中亦利用活體與體外研究加以探討。

### 三、文獻探討

#### (一) 糖尿病及其慢性併發症

正常哺乳類動物，因攝食外生性糖或逆調節激素導致內生性糖增加而使周邊葡萄糖濃度上升時，會刺激胰島素分泌，以促進周邊對葡萄糖之利用率及抑制內生性葡萄糖新生作用速率，繼而降低血糖濃度。然而，在所有第1型糖尿病人及一些第2型糖尿病人，雖然血糖升高卻無相當量胰島素釋放回應，此類狀況主要係因胰島 $\beta$ 細胞缺乏/不足或 $\beta$ 細胞對於血糖濃度升高之刺激反應遲緩因而發生高血糖，此時患者除非使用外來胰島素(缺乏 $\beta$ 細胞者)或促進 $\beta$ 細胞分泌功能(分泌不足但有殘留 $\beta$ 細胞 mass 者)，否則不足以改善問題。另一方面，某一定量之胰島素是否可有效降低血液中葡萄糖含量，則尚取決於其標的組織/細胞對胰島素刺激之反應。胰島素主要標的組織有三，即肝臟、肌肉及脂肪組

織，其降低血糖的作用直接機制主要在於抑制肝臟葡萄糖新生作用及促進骨骼肌之葡萄糖攝取及利用，而間接機制則在於抑制肌肉蛋白質分解因而減少做為生糖前驅物之胺基酸的提供，及抑制脂肪組織三酸甘油酯的分解，繼而減少生糖前驅物--甘油之產生及游離脂肪酸的產生，後者會在肌肉抑制葡萄糖之利用率 [4-7]。在許多血中胰島素濃度正常之第 2 型糖尿病患，或在一些長期控制不良的第 1 型糖尿病患，其周邊胰島素之標的組織/器官(主要是肝臟及骨骼肌)對於胰島素的刺激發生抗拒性 [8]；亦即出現胰島素去敏感作用。因而在有胰島素抗拒性的第 2 型患者雖然有胰島素的分泌，但仍發生高血糖。而在有胰島素抗拒性的第 1 型患者也會因而造成胰島素療法的複雜性。長期血糖控制不良的患者，會因 glucose toxicity 作用，增加胰島素抗拒性及對胰臟  $\beta$  細胞的毒害性以致其對葡萄糖刺激之反應低下，進一步使高血糖惡化 [9]。

糖尿病病患若血糖沒有受到良好的控制，長時間處於高血糖狀態下，往往會伴隨許多慢性併發症發展，且其死因多為糖尿病併發症，而非高血糖本身，因此良好控制血糖及預防併發症發生，為控制糖尿病最主要目標。根據美國腎臟資料系統 (U. S. Renal Data system; USRDS) 統計，糖尿病併發症中，腎病變之發生相當普遍。在歐美國家，末期腎病病患中，約有 30% 是糖尿病所造成的 [10]。台灣行政院衛生署國民健康局的資料顯示，在台灣，第 1 型糖尿病患者，若沒有積極治療及控制血糖，10 至 15 年後約有 80% 的病人產生微量白蛋白尿，這些有微量白蛋白尿的病人每年約有 10 至 20% 的人會發展成臨床白蛋白尿，其中約有 50% 會在 10 年內發展成末期腎臟疾病，20 年內有 75% 會惡化至末期腎臟疾病。此外，國民健康局的資料顯示還顯示，台灣的第 2 型糖尿病患者，若沒有積極治療及控制血糖，大約有 20 至 40% 的微量白蛋白尿病人會惡化至臨床白蛋白尿期，其在 20 年後約有 20% 會發展成末期腎臟疾病，末期腎病的糖尿病病患中，約 60% 是第 2 型糖尿病 [11]。根據美國腎臟資料系統 (USRDS) 統計，2011 年台灣洗腎的發生率是全世界第四。根據健保局統計，全台目前約有 7 萬名洗腎者，每年還以 5 千人的速度成長 [10]。台灣的洗腎者中，將近 45% 是糖尿病控制不佳所導致 [11]。因此在糖尿病患中，降低及延緩腎病變發生為相當重要的課題。

早期的臨床及生化觀察發現，患者長期高血糖可能為發展出併發症最主要原因 [12, 13]，故迄今對於糖尿病之治療一直以血糖控制為主要方針。雖然如此，大多數學者認同糖尿病慢性併發症的發生是多重原因的，故若能在控制血糖以外再加以控制其他危險因子，包括改善氧化壓力及發炎狀況，則更能改善糖尿病治療成效。

## (二) 氧化壓力及發炎狀態在糖尿病進行及其併發症發生所扮演的角色

進行性  $\beta$  細胞功能衰退及其後續之  $\beta$  細胞死亡、胰島素敏感性降低、及糖尿病併發症發展都至少有部分緣於糖尿病狀態下增加之氧化壓力、發炎狀態；這些狀態都與高血糖強烈相關，而高血糖的這些有害作用往往被稱之為 glucose toxicity [14]。

**氧化壓力與糖尿病之進行** 已知急慢性高血糖引起細胞 reactive oxygen species (ROS) 含量增加及細胞酵素性與非酵素性抗氧化分子含量及活性降低 [15, 16]。且已有學者提出急性高血糖造成之 ROS 產生可透過的途徑包括：(1) 葡萄糖自動氧化，導致高糖下在粒線體產生 superoxide；(2) polyol 代謝途徑，此代謝途徑使得 NADPH 消耗增加，而不利於氧化態的 glutathione (GSH) 還原成保護形式的還原態；且(3) 增加之葡萄糖代謝中間物經 diacylglycerol 代謝途徑導致 protein kinase C 活化，進而活化 NADPH oxidase 產生 ROS [17-19]，而慢性高血糖可再透過形成 advanced glycosylated end products (AGEs) 造成更多 ROS 的產生。研究發現，ROS 涉及糖尿病患  $\beta$  細胞功能不佳、胰島素阻抗、及包括腎臟之組織器官功能損害 [20-22]。因而，改善氧化壓力被建議是控制血糖外治療糖尿病的重要標的 [23]。

**發炎作用與糖尿病之進行** 發炎是一種與促發炎細胞激素之調控及其他調節物質如 prostaglandins and related enzymes (e. g. cyclooxygenase) 之活化有關的狀態。發炎作用是在壓力下，如敗血症，引起胰島素阻抗 [24] 及  $\beta$  細胞衰竭 [25] 的重要原因。過去其他人的研究建議：可

視高血糖為一種促發炎狀態 [26, 27]。有報導指出，在 type 2 DM 病患的骨骼肌存在發炎現象及 NO 產生 [28]。在未經控制之糖尿病人血漿中、健康志願者經以高血糖 clamp procedure 維持急性高血糖狀態、及人類 monocytes 在高糖濃度下之培養物，均觀察到包括 TNF- $\alpha$  之發炎性細胞激素濃度上升 [29-31]。這些細胞激素涉及與糖尿病有關之周邊胰島素抵抗及  $\beta$  細胞損害，有部分原因是透過其在周邊組織及在胰島  $\beta$  細胞誘發 iNOS 表現及 NO 產生 [32-35]。在 STZ-DM 大鼠也可發現周邊 IL-1 $\beta$  與 TNF- $\alpha$  濃度顯著上升 [35]。調節促發炎細胞激素表現之 NF $\kappa$ B 之活化途徑可能涉及高血糖之發炎狀態 [36]；近來的研究報告指出在活體外，僅靠高葡萄糖濃度就能活化肝細胞 NF $\kappa$ B [37]，且若在 db/db mice 抑制肝臟之此轉錄因子活化即可改善這些動物的葡萄糖耐受性 [38]。此外，有足夠的證據顯示血清及尿液 TNF- $\alpha$  濃度在包括糖尿病腎臟病變的多種腎臟疾病被顯著上調 [39]，而活化之 NF- $\kappa$ B 對於調節許多涉及發炎反應之基因之轉錄與表現扮演關鍵角色 [40]，包括 TNF- $\alpha$ 。NF $\kappa$ B 在糖尿病腎臟亦被活化，而不論在糖尿病大鼠或糖尿病人，抑制 NF $\kappa$ B 可減緩糖尿病腎臟病變的發展 [41, 42]。

### (三) 近年有關台灣土肉桂生物學活性之研究

台灣本土的肉桂類包括有土肉桂 (*Cinnamomum osmophloeum* kaneh.)、山肉桂 (*C. insulari-montanum*)、日本香桂 (*C. japonicum*) 和胡氏肉桂 (*C. macrostemon*)，但其中以土肉桂具商業價值 [43, 44]，故有較大規模之栽種。台大森林系教授張上鎮研究團隊比較分離自十六種源及不同地理位置之土肉桂葉精油之化學組成後，將其類分為六種化學型：(1) 桂皮醛型，(2) 桂皮醛-桂皮乙酸酯型，(3) 桂皮乙酸酯型，(4) 枷羅木醇 (linalool) 型，(5) 樟腦型及 (6) 混合型 [45]。這些不同化學型的土肉桂之葉精油根據各自所特有的組成分，可提供不同實用價值。

關於台灣土肉桂的生物活性及應用性之研究中，文獻中多指出台灣土肉桂精油的各種生物性與肉桂醛有關，因而許多研究是針對肉桂醛型土肉桂葉精油進行。已發表的相關研究報導包括其抗真菌、抗紅火蟻、抗細菌、殺蚊幼蟲等作用。近年來也有許多關於土肉桂及肉桂醛在人體生理機能方面的報導，包括抗腫瘤、抗突變、抗發炎、抗氧化、降血尿酸等。由於過去已知的土肉桂葉精油功能中以抗發炎、抗氧化、降血尿酸作用可能與延緩糖尿病進行及其慢性併發症發展有關，故將近年來關於土肉桂之抗發炎、抗氧化、降血尿酸生物學活性相關研究綜評如下：

**抗氧化活性** Chua et al. [46] 以台灣土肉桂枝之 n-hexane (Hex)、ethyl acetate (EtOAc)、n-butanol (BuOH) 及水萃區分物研究其抗氧化活性，發現 BuOH 區分物在活體外於 mouse brain homogenates 分析系統呈現最佳之抗氧化效果且降低脂質過氧化程度。這些作者發現此區分中主要抗氧化能力可能來自於其中的高 total phenolic 成分含量。[47] 以純化自土肉桂葉精油之肉桂醛，發現其在  $\mu$ M 濃度範圍內，可劑量依賴性抑制 lipopolysaccharide (LPS) 刺激下增加之 J774A.1 巨噬細胞內 ROS 含量。

**抗發炎活性** Chao et al. [48] 首度報導台灣土肉桂葉精油之抗發炎活性，其發現土肉桂葉精油在 LPS 誘發之 J774A.1 巨噬細胞株有效抑制 proIL-1 $\beta$  蛋白質表現量，IL-1 $\beta$  及 IL-6 的產生，但該研究未釐出是精油中的何項成分具此功能。Fang et al. [49] 自台灣土肉桂葉分離出可劑量依賴性抑制巨噬細胞在 LPS 及 interferon (IFN)- $\gamma$  誘發下產生 NO、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  與 interleukin (IL)-12 的四種 kaempferol glycosides 化合物。Rao et al. [50] 則發現，土肉桂皮之 hexane、ethyl acetate 及甲醇萃取物可劑量依賴性抑制小鼠腹腔巨噬細胞在 LPS/IFN- $\gamma$  誘發下產生發炎性調節物—NO、TNF- $\alpha$  與 IL-12，並抑制 iNOS 蛋白質表現。Tung et al. [51] 發現土肉桂葉精油中的 trans-cinnamaldehyde、caryophyllene oxide、L-borneol、L-bornyl acetate、eugenol、beta-caryophyllene、E-nerolidol、及 cinnamyl acetate 對於抑制 LPS 刺激 RAW 264.7 巨噬細胞株產生 NO 均有極佳效果。

**抗高尿酸血症活性** 高尿酸血症是造成臨床上痛風發作的原因，也是在糖尿病患及其他病症常見的現象 [52]，血中尿酸主要係普林 (purine) 經代謝後產生，其中酵素 xanthine oxidase (XOD) 催化



hypoxanthine 氧化成xanthine 並進一步催化thanthine 為尿酸，此酵素在高尿酸血症之形成扮演重要角色。由於當XOD 在氧分子存在下催化hypoxanthine 及xnathine 最終代謝成尿酸之過程會釋放超氧自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)，因而產生ROS，故會藉此在微血管功能不良的問題扮演重角色且直接造成組織傷害，導致脂質過氧化、蛋白質變性及DNA 氧化 [53]。此外，研究也發現高尿酸刺激人類血管平滑肌細胞增生，並增加C-reactive protein 在這些細胞之表現，這可能造成與高尿酸相關之血管及組織損傷 [54]。在正常大鼠若以uricase抑制劑--oxonic acid (OA)誘發高尿酸水平，會導致高血壓、腎血管疾病及腎傷害 [54]。在糖尿病患血漿尿酸水平與腎功能惡化指數(血清creatinine 及SBP)間呈正相關 [55]，也與高尿酸造成糖尿病患者之血管併發症發生有關 [56]。也有學者指出，血尿酸濃度之上升可能是DM 與其腎病發展之危險因子 [52]。因為酵素XOD 在高尿酸血症之形成扮演重要角色，故可利用抑制XOD 活性的方式，阻斷體內將普林代謝為尿酸，治療高尿酸血症，而Wang et al. [57]觀察土肉桂葉乙醇萃取物(EtOH-Ext)、熱水萃取物(HW-Ext) 及葉精油在活體外對於XOD 活性之影響，結果發現試樣中以土肉桂葉精油呈現最佳之XOD 抑制活性。

#### (四) 已知肉桂醛之抗糖尿病作用及其相關之生物學活性

關於台灣土肉桂的生物活性及應用的許多文獻中多指出，其各種生物性與**主要成分之一——肉桂醛**有關。肉桂醛在大鼠的LD<sub>50</sub> 為1850±37 mg/kg bw。Subash Babu et al. [58]報導了肉桂醛的抗糖尿病作用，這些作者在STZ誘發之糖尿病大鼠投用5、10、及 20 mg/kg bw肉桂醛發現，與控制組相較其顯著依劑量效應下降血糖濃度(63.29%) ( $p < 0.05$ )。此外，經口投用肉桂醛 (20 mg/kg bw)顯著降低HbA<sub>1c</sub>、血清總膽固醇、TG濃度並同時顯著增加血漿胰島素、肝臟肝糖及HDL-膽固醇濃度。且肉桂醛逆轉血漿酵素(aspartate aminotransferase、alanine aminotransferase、lactate dehydrogenase、alkaline phosphatase及acid phosphatase)至接近正常。在本計畫執行期間，Chao et al. [59] 報導了肉桂醛在活體外透過降低細胞大小、cellular hypertrophy index及其中膠原蛋白IV、fibronectin、及alpha-smooth muscle actin (alpha-SMA) 之蛋白質含量，而抑制高葡萄糖誘發之腎臟interstitial纖維母細胞肥大，顯示以肉桂醛可能改善糖尿病所致之腎interstitial fibroblasts 增殖及hypertrophy的能力。

國內外的學者在各種肉桂成份的功能性研究中，均觀察到肉桂醛在發炎之實驗動物模式可抑制NF- $\kappa$ B活化，及NF- $\kappa$ B所促進之iNOS及COX-2基因轉錄[60]，並具抗氧化[60, 61]，與調節免疫細胞分泌細胞激素的種類之作用[62]。在活體外，肉桂醛也抑制LPS刺激之J774A.1巨噬細胞分泌IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 及IL-6，及人類THP-1單核球產生IL-1 $\beta$ 及TNF- $\alpha$ ，並抑制TLR4訊號路徑伴隨降低胞內proIL-1 $\beta$ 的含量[47]。然而，肉桂醛在活體外之抗發炎作用，並非透過抑制LPS與細胞結合或透過抑制細胞表現TLR4或CD14而造成其抗發炎之結果，而是與肉桂醛抗氧化作用伴隨發生。針對肉桂醛之抗氧化活性，有研究發現雖然於正常未予以氧化壓力誘導之大鼠灌食桂皮醛(2.14、6.96 或22.62 mg/kg body weight/day 補充10、30 及90 天)未發現腎臟之TBARS 或抗氧化酵素SOD、glutathione peroxidase、glutathione-s-transferas 及Catalase 活性受到影響 [63]，但是同一項研究發現在因老化引起氧化壓力增加之大鼠，補充肉桂醛(2 或6 mg/kg/day for 10 天)可改善ROS 上升及逆轉老化引起之腎臟總GSH 含量下降 [60]。

在抗高尿酸血症活性面，Wang et al. [57] 發現土肉桂葉精油主要成分中，以肉桂醛對於抑制XOD 活性具最佳之作用。當以肉桂醛灌食經oxonate 誘發之高尿酸血小鼠後，也發現其可顯著降低血清尿酸值至與allopurinol 相當的水準(降幅達84.48%)。故肉桂醛可能同時對於改善與高尿酸血有關之心血管及腎臟功能的問題有好處，例如糖尿病之腎臟及血管病變。

#### (五) 已知伽羅木醇之抗糖尿病作用及其相關之生物學活性

因為肉桂醛已知具有許多生物學活性，故目前關於土肉桂葉精油醫藥方面應用之研究，多以肉桂醛含量最高之桂皮醛型植株進行。本計畫原規劃以肉桂醛型進行觀察，但第一及二年研究均發現精油

效果均優於肉桂醛，經重新分析精油成分小心比對其組成分，確認其為桉羅木純型，最初送樣進行精油成分分析之樣品錯置，而誤認其為肉桂醛型。桉羅木醇型土肉桂在台灣中部有大面積栽種，然而至目前為止，在台灣土肉桂葉精油中，關於桉羅木醇型之葉精油生物學功能之科學研究報導尚屬有限。由於在本計畫執行期間，有文獻指出桉羅木醇具有抗糖尿病作用 [58]，因而對於我們使用桉羅木純型植株製備精油進行此項研究所獲得的結果，提供有力的支持證據。

桉羅木醇 (Linalool；又稱沉香醇或芳樟醇)，是一種單萜類化合物，由於其提供之獨特香味，在全球具傳統上的廣泛用途。透過以單一化合物或富含桉羅木醇的天然物 (如胡荽精油) 之形式，桉羅木醇傳統上做為香料，添加於包括化妝品、香水、洗髮精、衛浴肥皂及其他衛浴及非化妝品產品，如家用清潔劑及清潔用品 [64]。此外，桉羅木醇在歐洲及美國也是合法食品添加物，用於增加食品風味 [65]。由於廣泛應用於食用與外用，桉羅木醇的安全性已經充分的評估；在急性毒性方面小鼠經計算之急性口服LD50是為3500 mg/kg (10%於花生油中)，而在小鼠連續餵食28天的桉羅木醇亞慢性 (subchronic) 毒性研究報告則指出，在雄性小鼠餵食劑量約為116.6 mg/kg/day以下，完全無影響大鼠生長及肝腎等臟器功能及生殖功能 [65]。

一些富含桉羅木醇之植物製備物，傳統上已知具抗糖尿病作用，如印度傳統上用於治療糖尿病之 coriander seeds 精油 [66]。早期關於桉羅木醇在糖尿病大鼠的降血糖作用僅有極少數報導 [67]。最近Subash Babu et al. [58] 報導將STZ誘發之糖尿病大鼠以桉羅木醇 (25 mg/kg b.w.) 處理45天，可降低糖尿病大鼠周邊血及腎臟發炎相關指數含量及氧化狀態，並改善腎功能及腎臟組織學形態。此外，在活體外桉羅木醇依劑量效應促進大鼠橫膈 (diaphragm) 之葡萄糖利用率，並防止牛血清白蛋白在體外之糖化程度。

在其它有限的桉羅木醇生物學活性研究中，Peana et al. 發現投用於大鼠可抑制carrageenan-誘發之腳掌水腫，且其在活體外實驗發現LPS-誘發之巨噬細胞株J774. A1可透過抑制iNOS活性降低NO產生 [68, 69]。近來的活體外研究指出，土肉桂葉精油抗氧化活性亦可來自桉羅木醇 [61]。因而，本計畫主持人認為，此探討桉羅木醇型土肉桂葉精油抗糖尿病作用的研究結果，是一項新穎的發現，並有利於開發及提升此化學型土肉桂之經濟價值。

### 三、研究方法

#### (一) 土肉桂葉精油之製備與分析

本計畫所使用之土肉桂葉係取自嘉義大學社口實驗林苗圃大量選殖栽種且含高肉桂醛之土肉桂。精油製備係根據李漢中等人 [70] 的方法修改後進行。將土肉桂葉樣品(150 g)，以Clevenger-type 裝置進行水蒸餾6 h收集揮發性精油，然後測定精油成分。利用 HP6890系列之GC與5973 Network Mass Selective Detector定量測定精油化學組成分，並與標準品比對以鑑識出其主要成分肉桂醛的含量百分比。毛細管柱：DB-1 (長度60m，I.D為0.25 mm，膜厚為 0.25  $\mu$ m)，注入口溫度及偵測器溫度：分別為250°C、270°C。載體氣體：氮氣、流速1mL/min。升溫條件：初溫為40°C，維持10 min，每分鐘上升2°C至240°C，維持20 min。Ionization potential為70 eV。Ion source溫度設定為230 °C。Flux ratio設定為50:1。組成分的定量分析是根據其氣相層析圖，以如下公式1計算：

$$Q=A \times Y \quad (1)$$

其中Q = 精油中各揮發性成分的量；A = 各組成分在GC圖譜中波峰面積百分比；Y = 精油之recovery yield。

#### (二) 動物實驗

##### I. 實驗動物處理及樣本收集

本研究以五週齡(體重120-140 g)之雄性Wistar 大鼠進行。實驗初期隨機分為控制組6隻及糖尿病

組36隻。糖尿病之誘發係在動物空腹一夜後，以streptozotocin (65 mg/kg)由尾部靜脈注射破壞部份胰臟β-細胞以限制胰島素分泌控制組則注射載劑 (citrate buffer, pH 4.5)。於誘發後第三日隨機將糖尿病組各分為七組，每組6隻，並開始隔日給予胃灌一次載劑(玉米油)或不同劑量土肉桂葉精油(12.5、25 或50 mg/kg)、肉桂醛(40 mg/kg)或glibenclimide (GBC; 0.6 mg/kg)連續三週。飼育期間，動物飼養於代謝籠以記錄其飲水、排尿、攝食等狀況及記錄體重變化，所收集尿液並儲存備用於白蛋白及creatinine 分析。另外，於飼育期間予動物自由取食及飲水。口服葡萄糖耐受試驗(oral glucose tolerance test; OGTT)在誘發糖尿病後第二週進行。然後在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。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 x g)10 min，且血漿儲存於-20°C備用於生化分析。胰臟、骨骼肌及腎臟則在稱重後分別針對不同實驗項目處理如下。

## II. 口服葡萄糖耐受性試驗(OGTT)

土肉桂葉精油或肉桂醛之降血糖作用測定係以口服葡萄糖耐受性來測試(OGTT)。STZ大鼠分別灌食玉米油(控制組)、及以玉米油為載體之上述三種不同劑量土肉桂葉精油或肉桂醛。測試之步驟將參照我們過去採用的方法，於誘發第二週結束灌食後進行。在進行OGTT前將大鼠禁食15 h，進行時自尾部靜脈取血液樣品。採樣時間為0 min (剛要投予葡萄糖之前)，及投予葡萄糖後之5、10、20、30、60、90、120、150 及180 分鐘。立即將含抗凝血劑之heparin 血液樣品離心，儲存血漿於-20°C備用於胰泌素或葡萄糖分析。

## III. 其他生化分析

### 血糖濃度分析

飼養期間動物之血糖濃度監測將以血糖機(glucose oxidase/peroxidase 偶合反應)進行；口服葡萄糖耐受性測試期間及胰島素耐受性試驗測試期間收集之血漿中葡萄糖濃度，將於96孔盤以酵素法(hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase 偶合反應)利用分光光度計於波長340 nm 測定。分析系統中含triethanolamine 0.258 M, MgSO<sub>4</sub> 2.58 mM, ATP 62 mM, NADP 0.825 mM 及15 μl 之hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase。

### 胰島素定量分析

周邊血中胰島素濃度及胰臟中胰島素含量，將以大鼠胰島素ELISA 分析套組分析，其中胰臟樣品將以PBS 為萃取液，並以超音波破細胞後對上清液進行胰島素的定量，其結果將以(胰島素量/胰臟)表示。

### 果糖胺(Fructosamine)、非酯化脂肪酸(NEFA; 或稱游離脂肪酸FFA)及血尿酸分析

此分析分別利用 將利用商業fructosamine assay kit、NEFA kit及uric acid assay kit，依廠商說明之步驟進行分析。

## IV. 腎功能測定

腎功能測定是利用血液及尿液 creatinine 定量分析、血中尿素定量分析及微白蛋白尿分析，並以血中尿素氮(BUN)濃度、血漿肌酸酐廓清率(CCR)及腎絲球過濾率 GFR 做為腎功能指標。新鮮血漿及 24h 尿液離心後迅速儲存於-20C 備用於上述分析，分析法則以商業分析套組依據廠商說明進行。BUN 與 GFR(根據 Jaffe 氏法)計算方式如下：

$$\text{BUN}=0.466 \times (\text{blood urea conc.})$$

$$\text{CCR (mL/min)}=(\text{urine Cr}) \text{ mg/dL} \times \text{urine volume mL}/1440 \text{ min}/\text{plasma Cr mg/dL}$$

$$\text{GFR}_1 \text{ (mL/min/gm)}=\text{CCR}/\text{腎臟重}$$

$$\text{GFR}_2 \text{ (mL/min/Kg)}=\text{CCR}/\text{體重}$$

## V. 周邊血及組織樣品氧化壓力及發炎指標分析

血液樣品分析:葡萄糖分析先將血清樣品以 5% (v/v) HClO<sub>4</sub> 去蛋白然後以 Bergmeyer (1974) 方法分析。血漿中 nitrate/nitrite, IL-1β 及 TNF-α 分別以 nitrate/nitrite kit (Roche Diagnostics, Mannheim,

Germany), rat insulin enzyme-linked immunosorbent assay kit (MercoDia, Uppsala, Sweden), 及 rat TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  (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。血漿及骨骼肌中的抗氧化物酵素, GPx、Grd、SOD 活性及總 GSH 含量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(1988)測定 thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)。

## VI. 西方墨點分析法

取出之前離心好的上清液放於冰上回溫約三分鐘。上清液進行蛋白質定量 (Bio-Rad method), 將蛋白質濃度定量到適當濃度備用於電泳(80 ~ 120 伏特電壓, 2 小時) 以分離蛋白質。不同分子之電泳相關條件如下:

- (i) GLUT4: 蛋白質濃度定量至 20  $\mu\text{g}/16 \mu\text{l}$ , 且在 Bio-Rad 的系統下以 SDS-PAGE (10%) 於 running buffer 中進行電泳。抗體稀釋倍率為 rabbit anti-GLUT4 Ab, 1:2500; mouse anti-Actin Ab, 1:5000; goat anti-Mouse IgG Ab, 1:4000; goat anti-Rabbit IgG Ab, 1:4000。
- (ii) p-Akt (Ser 473): 蛋白質濃度定量至 100  $\mu\text{g}/16 \mu\text{l}$ , 且在 Bio-Rad 的系統下以 SDS-PAGE (10%) 於 running buffer 中進行電泳。抗體稀釋倍率為 rabbit anti-p-Akt (Ser 473) Ab, 1:500; rabbit anti-Akt Ab, 1:1000; goat anti-rabbit IgG Ab, 1:4000。
- (iii) p-Akt (Thr 308): 蛋白質濃度定量至 100  $\mu\text{g}/16 \mu\text{l}$ , 且在 Bio-Rad 的系統下以 SDS-PAGE (10%) 於 running buffer 中進行電泳。抗體稀釋倍率為 rabbit anti-p-Akt (Thr 308) Ab, 1:1000; rabbit anti-Akt Ab, 1:1000; goat anti-Rabbit IgG Ab, 1:4000。
- (iv) Insulin Receptor beta (IR- $\beta$ ): 蛋白質濃度定量至 100  $\mu\text{g}/16 \mu\text{l}$ , 且在 Bio-Rad 的系統下以 SDS-PAGE (9%) 於 running buffer 中進行電泳。抗體稀釋倍率為 mouse anti-IR- $\beta$  Ab, 1:1000; mouse anti-Actin Ab, 1:5000; goat anti-Mouse IgG Ab, 1:4000。
- (v) SOCS3: 蛋白質濃度定量至 100  $\mu\text{g}/16 \mu\text{l}$ , 且在 Bio-Rad 的系統下以 SDS-PAGE (12%) 於 running buffer 中進行電泳。抗體稀釋倍率為 rabbit anti-SOCS3 Ab, 1:600; mouse anti-Actin Ab, 1:5000; goat anti-Mouse IgG Ab, 1:4000。

電泳結束後, 將下膠取下, 於 Transfer buffer 中以 PVDF 膜進行蛋白質轉漬 (100 伏特電壓, 60 分鐘)。完成轉漬後, 置膜於含 5% skim milk 之 TBS 中在室溫進行 blocking (2 小時), blocking 後以 TBST 清洗 membrane (x3), 然後分別加入一次抗體於 4 $^{\circ}\text{C}$  下反應 overnight。隔天以 TBST 清洗膜 (x3) 後, 分別加入二次抗體反應 1 小時後再以 TBST 清洗 membrane (x3)。清洗完成後加入 Enhanced Chemiluminescence reagent (Enhanced luminal reagent 與 oxidizing reagent 以 1:1 比例混合均勻) 以冷光螢光影像分析系統進行影像分析。

## VII. PI3-Kinase (PI<sub>3</sub>K) 活性分析

利用商業分析套組 PhosphoSeek™ PI3-Kinase (PI<sub>3</sub>K) Assay Kit, 其分析原理為將 PI<sub>3</sub>K 作用之受質先行以螢光染劑染上, 若 PI3-Kinase 存在下則會使受質磷酸化, 而造成其螢光強度減少, 若 PI<sub>3</sub>K 活性或表現量越高, 則螢光量會隨之減少, 螢光強度之變化以 ELISA reader 於螢光區間波長 540 ~ 580nm 下測得吸光值。分析步驟依製造商之說明書進行。

### (三) 細胞實驗

#### I. 實驗細胞株及其繼代培養

C2C12 細胞株 (ATCC CRL-1772), Mouse muscle myoblast, Strain: C3H, 購自食品工業研究中心/國家衛生研究院細胞庫 (BCRC 60083)。以含 10% FBS 之 DMEM 培養細胞於 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5% 二氧化碳培養箱中。當細胞達到 80% 滿度時進行繼代培養, 以  $2 \times 10^5$  cells/ml 種入新 75 cm<sup>2</sup> 培養瓶中進行繼代培

養，每 3 日繼代培養一次。

## II. 細胞分化

繼代培養時經細胞計數後，以  $1 \times 10^5$  cells/ml 種入 96 wells、3 cm、10 cm 平底細胞培養盤，培養於  $37^\circ\text{C}$ ，5% 二氧化碳培養箱中。24 小時後細胞密度達到幾乎全滿時，吸除培養基，用 PBS 清洗細胞兩次後，改以 2% HS DMEM 培養，每 2 日更換分化培養基一次，6 日後分化完成。分化程度以細胞肌酸酐酶 (creatinase, CK) 活性評估。肌酸酐酶活性之測定是利用商業 creatine kinase kit 進行。

## III. 胰島素受體訊號路徑對於 Insulin 刺激之劑量反應測定

### 西方墨點分析

當 T75 flask 細胞培養至八分滿時，以  $1 \times 10^5$  細胞數/ml 的細胞密度種入 10 cm Dish (每 dish 加 10 ml)，48 hrs 後用 PBS 洗 2 次，換 HS medium (每 2 天換一次 medium) 使細胞分化，細胞分化 6 天後，吸除分化培養基，並以 PBS 清洗細胞 2 次，配製不含血清之 2% fatty acid-free BSA DMEM，於  $37^\circ\text{C}$ 、5% 二氧化碳箱培養 2 小時 (Blank 期)。

2 小時後，分別加入不同濃度之 Insulin (0nM、1.5nM、15nM、150nM)，培養 0、1、2、4 小時後，用 PBS 洗 3 次，加入 300  $\mu\text{l}$  的 Ripa buffer，使用細胞刮勺將細胞全部刮下，放入 eppendorf 中， $4^\circ\text{C}$  下以超音波細胞破碎機破細胞，在  $4^\circ\text{C}$  離心 10500 g、30 分鐘，取其上清液進行蛋白質定量，將蛋白質濃度定量到 30  $\mu\text{g}/12 \mu\text{l}$ ，加入 3  $\mu\text{l}$  的 5x sample buffer。樣品以乾熱器  $100^\circ\text{C}$  加熱 5 分鐘，冰浴後備用。其餘步驟同動物實驗之 Western blotting 分析。分析項目包括 GLUT4、IR-beta、Akt-Ser、Akt-Thr。

### 葡萄糖攝取速率試驗

當 T75 flask 細胞培養至八分滿時，以  $1 \times 10^5$  細胞數/ml 的細胞密度種入 96 孔盤 (每 well 加 200  $\mu\text{l}$ )，其餘步驟同以上的 Western blotting 分析方法，不同於在 Blank 期後，加入 200  $\mu\text{M}$  2-NBDG，放入 incubator 反應 30 分鐘後，於正立螢光顯微鏡下拍攝其螢光表現。或在反應 30 分鐘後加入 0.2 N NaOH 破細胞反應 5 分鐘，以 ELISA reader 於螢光區間波長 440~580 nm 下測得吸光值。

## IV. 土肉桂葉精油細胞毒性試驗 (MTT 試驗)

當 T75 flask 細胞培養至八分滿時，以  $1 \times 10^5$  細胞數/ml 的細胞密度種入 96 孔盤 (每 well 加 200  $\mu\text{l}$ )，48 hrs 後用 PBS 洗 2 次，換 HS medium (每 2 天換一次 medium) 使細胞分化，細胞分化 6 天後，吸除分化培養基，並以 PBS 清洗細胞 2 次，配製不含血清之 2% fatty acid-free BSA DMEM，之後分別加入不同濃度之土肉桂葉精油 (CO)，0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，以 DMSO 作載劑當控制組，CO 處理細胞 6 小時後，以 PBS 清洗細胞 2 次，配製不含血清之 2% fatty acid-free BSA DMEM，並加入 10  $\mu\text{l}/\text{well}$  之 5 mg/ml 的 MTT ((3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide)) 混合後，培養 2 小時後，吸除培養基，加入 200  $\mu\text{l}/\text{well}$  之 isopropanol 反應 30 分鐘使細胞破裂，於波長 570 nm 下測吸光值，並以波長 630 nm 之吸光值為參考吸光值。細胞存活率計算如下：

$$\text{細胞存活率 (\%)} = (A_{570 \text{ nm}} - A_{630 \text{ nm}})_{\text{sample}} / (A_{570 \text{ nm}} - A_{630 \text{ nm}})_{\text{control}} \times 100\%$$

## V. 土肉桂葉精油預處理及細胞之胰島素反應

### 西方墨點分析

前置方法同 Insulin 劑量測定之 Western blotting 分析，不同於在 2 小時 Blank 期給予不同濃度 CO (0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 作為 pre-treat，以 DMSO 作載劑當控制組，2 小時後以 PBS 洗 2 次，分為給予 150 nM 濃度之胰島素與不給予胰島素之組別，培養 0、1、2、4 小時後，後續步驟同 Insulin 劑量測定之 Western blotting 分析。分析項目包括 GLUT4、IR-beta、Akt-Ser、Akt-Thr、SOCS3，其進行方法如上述(二)動物實驗之西方墨點分析法所述。

### 葡萄糖攝取速率試驗

前置方法同 Insulin 劑量測定之葡萄糖攝取試驗，一樣在 2 小時 Blank 期給予不同濃度 CO 或載劑 DMSO 作為 pre-treat，2 小時後以 PBS 洗 2 次，分為給予 150 nM 濃度之胰島素與不給予胰島素之組別，

並同時加入 200  $\mu$ M 2-NBDG，放入 incubator 反應 30 分鐘，後續步驟同 Insulin 劑量測定之葡萄糖攝取試驗。

#### PhosphoSeek™ P I3-Kinase (PI<sub>3</sub>K) Assay Kit 分析

此分析之原理、試劑配置及實驗步驟均與動物實驗之實驗分析項目 4 相同，且依廠商說明書進行。

#### (四) 統計分析

實驗結果以 means  $\pm$  S.D 表示並利用 one-way ANOVA 分析。動物實驗利用 Student' s *t*-test 分析是否在控制組與未處理之糖尿病組間有顯著差異。利用 Duncan' s multiple-comparison test 分析是否不同處理條件之 STZ-DM 組間存在差異。細胞實驗不同組別間以 one-way ANOVA 進行分析，以 Student' s *t*-test 分析是否在細胞分化前後、或分化後有或無添加胰島素之實驗條件之間存在顯著差異。以 Duncan' s test 檢定分化後的細胞在相同胰島素添加條件下不同預處理組間是否存在顯著差異。所有統計分析之進行均利用商業軟體(SPSS 12 for WINDOWS; SPSS Inc., Chicago, IL)，並以  $p < 0.05$  視為組間有顯著差異具有顯著性。

### 四、結果

#### (一) 土肉桂葉精油組成分

利用GC與GC/MS分析結果顯示精油中含有101種揮發性組成分，包括單萜類(monoterpenoids)、二倍半萜類(sesquiterpenoids)、醇類(alcohols)、酚類(phenols)、醛類(aldehydes)、酮類(ketones)、酯類(esters)、酸(acids)、及其它化合物(Table 1)。而精油中最主要之化合物一組成分百分比高低排序為：linalool (40.24)、trans-cinnamyl acetate (11.71)、camphor (9.38)、cinnamaldehyde (6.87)、3-phenyl-2-propenal (4.06)、caryophyllene (2.65)、coumarin (2.13)、bornyl acetate (1.72)、limonene (1.53)、 $\alpha$ -(+)-pinene (1.38)、estragole (1.31)、及caryophyllene oxide (1.00)。此12種化合物含量均超過組成分1%，且合計佔精油組成分83.99%。四種cinnamaldehyde congeners共佔精油18.96%，百分比高低依序為trans-cinnamyl acetate (11.71)、cinnamaldehyde (6.87)、cis-cinnamic acid (0.23)、及2-hydroxybenzaldehyde (0.14) (Table 1)。根據此分析結果，及學者對於土肉桂化學型之分類依據(ref)，顯示本研究所使用之土肉桂之化學型屬於linalool 型，其佔組成分40.24%。肉桂醛在此精油中的含量則遠低於linalool。

#### (二) 大鼠代謝特徵與臟器、脂肪及骨骼肌重量

經由大鼠尾靜脈注射STZ誘發DM之大鼠，在注射三天後，空腹血糖值顯著高於注射載劑之控制組大鼠( $P < 0.05$ )，24小時的進食量、飲水量、排尿量顯著高於控制組大鼠，且體重顯著低於控制組大鼠，呈現糖尿病典型的多吃、多喝、多尿、體重減輕症狀(Table 2)。實驗期間灌食不同劑量CO之DM各組體重增加率與灌食載劑之DM組(DM-V組)相較雖未達顯著差異，但低、中、高劑量精油增加平均體重幅度分別為載劑組之136%、134%及116%，而灌食口服降血糖藥GBC組之體重增加率僅為載劑組之93% (Table 3)。此外，灌食不同劑量CO之DM各組均有逆轉糖尿病三多症狀之趨勢，其中以低劑量精油之作用達統計學意義，而GBC改善三多症狀之幅度不如CO，且與糖尿病組間亦未達統計學差異。由以上結果可知，經過CO灌食後，糖尿病大鼠的代謝狀況，可以獲得改善，且效果優於口服降血糖藥 (Table 3)。

糖尿病因缺乏胰島素，一般導致骨骼肌之顯著流失。本研究對骨骼肌的觀察係取三種骨骼肌-gastrocnemius、Soleus、EDL，觀察骨骼肌重量，結果發現糖尿病大鼠與控制組相較，三種骨骼肌-gastrocnemius、Soleus、EDL均有流失，其中以gastrocnemius及EDL流失達統計學上的意義。由於分別觀察此三種肌肉重量時發現變化幅度小，不易經由統計分析獲得組間的差異性，故進一步將此三種肌肉重量加總，並進行統計分析。結果發現，灌食CO組可顯著改善糖尿病之骨骼肌流失，且改善幅度略優於GBC (Table 3)。觀察糖尿病大鼠的肝臟及脾體重百分比發現，糖尿病大鼠與控制組相較均有

肝腫大情形，而CO在低及中劑量下均可顯著改善糖尿病之肝腫大，但高劑量CO則未改善DM肝腫大情形，GBC也無改善DM肝腫大之作用。在腎臟重量方面，DM大鼠有顯著腎腫大的情況，這與糖尿病造成腎臟代償性肥大有關；DM大鼠灌食CO後各組與灌食載劑之DM組相較，低及中劑量顯著改善腎腫大情況，而口服降血糖藥也有改善腎腫大的顯著效果(Table 3)。

### (三) 大鼠空腹血糖與血漿及胰臟胰島素含量

糖尿病大鼠與控制組大鼠相比，自誘發後第三天至犧牲時，隨著時間進行空腹血糖逐漸惡化。糖尿病大鼠經過灌食CO後，空腹血糖隨著時間進行之惡化程度改善；與灌食載劑之DM組相較，低劑量CO在第7天起即顯著改善血糖，而中及高劑量CO在第21也顯著改善血糖。灌食肉桂醛改善血糖的效果僅在第17天有明顯效果，而GBC改善血糖的效果雖在第10及17天具有顯著性，但第21天即呈現與載劑組無顯著差異的狀況 (Table 4)。推論GBC無法持續保持改善血糖之作用可能導因於該藥物為胰內作用藥物，而STZ誘發的糖尿病殘存beta細胞較少，且隨疾病進行尚會逐漸流失，導致GBC在此模式之長期藥效漸不明顯，此種口服藥日漸失效的現象也會發現於血糖控制不良的糖尿病患(ref)。根據CO作用與GBC的差異可推論，CO改善血糖的作用至少有部分並非依賴胰內作用機制。

糖尿病大鼠與控制組相較其周邊血液胰島素含量顯著減少；DM大鼠灌食CO後各組與DM-V組相較，不論在任何CO之劑量下均可顯著增加周邊血液胰島素含量，其中以低劑量CO所增加的周邊血液胰島素含量效果優於肉桂醛及口服降血糖藥，而中、高劑量的CO增加周邊血液胰島素含量效果與肉桂醛及口服降血糖藥相似 (Figure 1 (A))。另觀察大鼠胰臟胰島素含量發現，糖尿病大鼠與控制組相較其胰臟胰島素含量顯著減少；DM灌食CO後與灌食載劑組相較，胰臟胰島素含量均顯著增加，其效果優於肉桂醛，而口服降血糖藥增加胰臟胰島素含量之幅度低於低劑量CO，但與中及高劑量CO效果相似 (Figure 1(B))。由此結果可得知，灌食土肉桂葉精油增加血漿中胰島素濃度可能部份原因與增加胰臟中胰島素含量有關，肉桂醛有增加血中胰島素濃度但卻降低胰臟中胰島素含量顯示有可能刺激分泌，但對 $\beta$ 細胞質量或胰島素合成之效果不如CO及口服降血糖藥。

### (四) 大鼠口服葡萄糖耐受性

口服葡萄糖耐受試驗(OGTT)中發現，糖尿病大鼠在經口給予葡萄糖負荷後的累積血糖量顯著高於控制組；灌食CO之糖尿病大鼠與灌食載劑組相較，不論在任何劑量，血糖累積量均顯著較低，且CO改善口服葡萄糖耐受性的幅度優於肉桂醛，而與口服降血糖藥相似(Figure 2 (A))。

由OGTT期間所刺激之血漿中胰島素上升計算曲線下面積(AUC)可發現，經葡萄糖刺激後在90分內的血漿胰島素累積含量，糖尿病大鼠的血漿胰島素累積含量顯著低於控制組；灌食CO後各組有增加血漿中胰島素的累積量，與載劑組相較，增加的倍數分別為低劑量CO組 5.2倍、中劑量CO組 3.9倍、高劑量CO組 2.5倍、肉桂醛組 2.6倍、GBC組 4.5倍，以低劑量CO效果最為顯著，其他各組與糖尿病大鼠相比並無統計學上差異(Figure 2 (B))。

GIP、GLP-1是兩種腸道荷爾蒙，經葡萄糖刺激後而分泌，並可刺激胰臟 $\beta$ 細胞分泌胰島素。本實驗在OGTT期間，於口服葡萄糖負荷後，測量其血漿中GIP、GLP-1含量並計算其90分內曲線下面積。結果顯示，糖尿病大鼠中GIP、GLP-1含量顯著低於控制組；在GLP-1方面，灌食CO後各組的GLP-1含量均顯著高於DM-V組，其效果與肉桂醛及口服降血糖藥相似；在GIP方面，灌食CO後各組的GIP累積量顯著高於DM-V組，其效果優於肉桂醛及口服降血糖藥(Figure 3 (A) 及 (B))。

### (五) 大鼠其它血液生化值

Table 5中結果顯示，糖尿病大鼠的血漿中游離脂肪酸濃度顯著高於控制組；灌食CO後各組的血漿中游離脂肪酸濃度均顯著低於DM-V組，其效果與肉桂醛及口服降血糖藥相似。糖尿病大鼠的果糖胺濃度顯著高於控制組；灌食CO後各組的果糖胺濃度均顯著低於DM-V組，其效果與肉桂醛及口服降血糖藥相似。因此，灌食土肉桂葉精油可降低果糖胺濃度，顯示其減少血中蛋白質糖化程度。表五中結果顯示，糖尿病大鼠周邊血尿酸濃度顯著高於控制組；灌食CO後各組的尿酸濃度均顯著低於DM-V組，其效

果與肉桂醛及口服降血糖藥相似。以大鼠空腹血糖及胰島素濃度經計算，可得胰島素阻抗性指數HOMA-IR，結果顯示，糖尿病大鼠的胰島素阻抗性HOMA-IR 顯著高於控制組；灌食CO後各組的胰島素阻抗性HOMA-IR 均顯著低於DM-V組，其效果優於肉桂醛；口服降血糖藥降低胰島素阻抗性HOMA-IR效果與CO相似 (Table 5)

#### (六) 大鼠腎功能指標

在前述Table 1結果中已顯示糖尿病大鼠與正常控制組相較有增加之腎重/體重比值，這代表著糖尿病鼠腎臟出現代償性肥大的情況。觀察大鼠血液尿素氮濃度發現糖尿病大鼠血中尿素氮含量上升 (Table 6)，此反映出大鼠可能因缺乏胰島素導致體蛋白流失而至含氮廢物增加，但也有可能這些大鼠已發展腎病變。進一步觀察大鼠其它腎功能指標發現，糖尿病大鼠尿中白蛋白含量顯著高於控制組，進一步確認其已發生糖尿病腎病變初期微白蛋白尿的情況。而與控制組相較，糖尿病大鼠creatinine清除率顯著高於正常大鼠，顯示其糖尿病腎病變進行早期高過濾 (hyerfiltration)之特徵，此時腎臟腎絲球過濾率增加 ( $P<0.05$ )。灌食CO不論在何種劑量，均顯著改善血液尿素氮濃度，其效果與GBC相似。而三種劑量CO也顯著改善微白蛋白尿的程度，低、中、高劑量改善幅度分別達49.3%、50.7%及65.0%。口服降血糖藥GBC雖也些微改善糖尿病微白蛋白尿程度，但與載劑組間未達顯著差異，且改善幅度僅4.9% (Table 6)。中及高劑量CO顯著逆轉糖尿病腎絲球高過濾的情況，此作用反映於降低之CCR及GFR。而GBC雖有改善血糖，但卻未顯著改善糖尿病之CCR或GFR (Table 6)。

#### (七) 大鼠骨骼肌之氧化壓力及發炎指標

TBARS分析結果顯示相較於控制組，糖尿病大鼠骨骼肌中脂質過氧化程度顯著增加 ( $p<0.05$ )，伴隨顯著降低之抗氧化酵素SOD、GPx及GRd活性( $p<0.05$ ) 及總GSH含量 ( $p<0.05$ )。低、中、高劑量之CO及肉桂醛均顯著逆轉糖尿病所增加的肌肉脂質過氧化程度( $p<0.05$ )，但GBC並未顯著改善糖尿病大鼠肌肉脂質過氧化程度 (Table 7)。低及中劑量CO及肉桂醛均顯著改善糖尿病狀態下抗氧化酵素SOD、GPx及GRd活性 ( $p<0.05$ )，且效果優於GBC。高劑量CO則顯著增加SOD及GRd之活性( $p<0.05$ )，且效果優於GBC。所有劑量之CO及肉桂醛均顯著提升糖尿病大鼠骨骼肌中總GSH含量( $p<0.05$ )。降血糖藥GBC也顯著增加糖尿病大鼠肌肉總GSH含量，但效果不如低及中劑量CO (Table 7)。

觀察骨骼肌中發炎指標含量發現，糖尿病造成骨骼肌中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 及NO含量顯著增加 ( $p<0.05$ )。所有劑量之CO及肉桂醛均顯著降低糖尿病大鼠骨骼肌中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 及NO含量( $p<0.05$ )，其中又以低劑量CO及肉桂醛效果較好。而GBC並未顯著改善糖尿病大鼠骨骼肌發炎指數 (Table 7)。此外，本研究的觀察發現，所有劑量之CO在糖尿病大鼠骨骼肌均降低SOCS3之表現，而肉桂醛亦具有抑制SOCS3表現之效果，這些肉桂成分之效果與GBC相似 (Figure 4)。

#### (八) 大鼠胰臟之氧化壓力及發炎指標

TBARS分析結果顯示相較於控制組，糖尿病大鼠胰臟中脂質過氧化程度顯著增加，伴隨降低之抗氧化酵素SOD及GRd活性及總GSH含量 ( $p<0.05$ )。灌食低降量CO顯著逆轉糖尿病胰臟中脂質過氧化程度( $p<0.05$ )，且效果優於GBC (Table 8)，但中、高劑量CO及肉桂醛則未顯著改善糖尿病大鼠胰臟脂質過氧化程度。雖然所有劑量之CO及肉桂醛均顯著提升糖尿病胰臟中SOD及GRd之活性( $p<0.05$ )，但其中仍以低劑量CO效果最好 (Table 8)。所有劑量之CO及肉桂醛改善糖尿病胰臟SOD活性之效果均優於GBC，而GBC提升糖尿病胰臟中GRd之活性之效果也不如低劑量CO及肉桂醛 (Table 8)。此外，高劑量CO及肉桂醛顯著增加糖尿病GPx之活性( $p<0.05$ ) (Table 8)。所有劑量的CO及肉桂醛均顯著提升糖尿病大鼠胰臟中總GSH含量( $p<0.05$ )，且效果均優於GBC (Table 8)。

觀察胰臟中發炎指標發現，糖尿病造成大鼠胰臟中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 及NO含量顯著增加 ( $p<0.05$ )。低劑量CO顯著降低糖尿病胰臟中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 及NO含量( $p<0.05$ )，且效果優於肉桂醛及GBC (Table 8)。中劑量CO及肉桂醛可顯著降低糖尿病胰臟中IL-1 $\beta$ 及NO含量( $p<0.05$ )，且效果優於GBC (Table 8)。



### (九) 大鼠腎臟之氧化壓力及發炎指標

TBARS分析結果顯示相較於控制組，糖尿病大鼠腎臟中脂質過氧化程度顯著增加 ( $p < 0.05$ )，伴隨顯著降低之抗氧化酵素SOD、GPx及GRd活性( $p < 0.05$ )及總GSH含量 ( $p < 0.05$ )。所有劑量之CO、肉桂醛及GBC，均未顯著降低糖尿病大鼠腎臟脂質過氧化程度 (Table 9)。雖然低劑量CO確實可顯著提升糖尿病腎臟中這三種抗氧化酵素之活性 ( $p < 0.05$ )，中劑量CO可顯著提升SOD及GRd活性，且高劑量CO及肉桂醛可顯著提升腎臟GRd活性。前述CO提升抗氧化酵素活性之效果，均優於GBC (Table 9)。所有劑量CO及肉桂醛均顯著提升糖尿病大鼠腎臟中總GSH含量( $p < 0.05$ )，其中又以低劑量CO效果最好，而所有劑量CO提升腎臟中總GSH含量之效果均優於肉桂醛及GBC (Table 9)。

觀察腎臟中發炎指標含量發現，糖尿病大鼠腎臟中IL-1 $\beta$ 及NO含量顯著增加 ( $p < 0.05$ )，TNF- $\alpha$ 含量上升則不顯著。所有劑量之CO及肉桂醛均顯著降低糖尿病腎臟中IL-1 $\beta$ 及NO含量( $p < 0.05$ )，且降低IL-1 $\beta$ 之效果與GBC相當，而CO降低糖尿病腎臟中NO含量之效果則優於GBC (Table 9)。

### (十) 大鼠周邊血之氧化壓力及發炎反應

TBARS分析結果顯示相較於控制組，糖尿病大鼠周邊血漿中脂質過氧化程度顯著增加，伴隨降低之抗氧化酵素SOD及GPx活性及總GSH含量 ( $p < 0.05$ )。低劑量CO可顯著逆轉糖尿病周邊血中脂質過氧化程度( $p < 0.05$ )，且效果優於肉桂醛及GBC (Table 10)。低劑量之CO及肉桂醛可顯著提升糖尿病周邊血中SOD，且高劑量CO顯著提升GPx活性( $p < 0.05$ )，而肉桂醛及GBC均無改善糖尿病周邊血漿中抗氧化酵素活性之效果 (Table 10)。此外，所有劑量之CO及肉桂醛均顯著提升糖尿病大鼠周邊血中總GSH含量( $p < 0.05$ )，但GBC無此效果 (Table 10)。

觀察周邊血中發炎指標含量發現，糖尿病顯著增加大鼠周邊血中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 及NO濃度 ( $p < 0.05$ )。所有劑量之CO及肉桂醛均顯著降低糖尿病周邊血中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 及NO之含量( $p < 0.05$ )，且效果優於 GBC (Table 10)。

### (十一) 大鼠骨骼肌肉IR-beta、p-Akt-ser、p-Akt-thr、及GLUT4蛋白質表現量

與控制組相較，糖尿病導致骨骼肌IR-beta及GLUT4表現量降低 (Figure 5)，且akt磷酸化程度下降 (Figure 5))，而灌食CO不論低、中或高劑量均增加IR-beta表現量，但肉桂醛並無此效果。糖尿並大鼠骨骼肌GLUT4表現量則僅受到低劑量CO改善，其它劑量之CO、或肉桂醛均無改善GLUT4表現量的效果。Akt磷酸化方面，Akt-ser之磷酸化程度受到所有劑量之CO及肉桂醛之促進，而Akt-thr磷酸化程度則僅受到低及中劑量CO之改善，肉桂醛也些微改善Akt-thr磷酸化程度，但效果不如低及中劑量CO。口服降血糖藥GBC改善骨骼肌IR-beta表現量及Akt磷酸化程度，但改善效果顯示不如低及中劑量CO。

### (十二) 大鼠骨骼肌中PI<sub>3</sub>K活性

肌肉組織中PI<sub>3</sub>K活性方面，結果顯示，在糖尿病大鼠骨骼肌中PI<sub>3</sub>K活性顯著低於控制組，而給予不同劑量之CO發現，所有劑量之CO及肉桂醛均顯著提升骨骼肌PI<sub>3</sub>K活性，且低劑量CO改善PI<sub>3</sub>K活性的效果優於GBC。此結果顯示，土肉桂葉精油能夠改善糖尿病動物骨骼肌胰島素中游訊號之活化 (Figure 6)。

### (十三) 體外試驗模式建立—利用C2C12肌母細胞株 (myoblasts)分化為肌管(myotubes)培養物之實驗模式

骨骼肌纖維之分化最早來自胚胎時期中胚層之間葉細胞 (mesenchyme cells)，再由間葉細胞分化成為肌纖維母細胞 (myoblasts)，其後相鄰之肌纖維母細胞以前後方式相互融合形成長管形之多核細胞稱為肌管 (myotubes)，最後再由肌管成熟分化為骨骼肌纖維。可利用C2C12肌母細胞株 (myoblasts) 分化為肌管(myotubes)培養物，觀察土肉桂葉精油對於肌肉胰島素敏感性之影響。本研究於建立肌管培養物模式期間，觀察不同分化天數對於C2C12其內之creatine kinase活性之影響。實驗以含2% 馬血清DMEM 作為C2C12細胞株之分化培養基，測量creatine kinase酵素活性作為細胞分化成熟之指標，根據其活性程度可判斷其分化程度，以了解最適介入時間。結果顯示不論以FBS或HS介入，皆會隨著介入

天數越長其CK活性皆有越高之趨勢，又以HS其CK活性更為明顯，HS介入後第二天其分化程度即與FBS培養之組別具有顯著差異，而在第六天達到最高峰，顯著高於其它天數，隨後第八天有顯著下降之趨勢，故最適介入時間點為HS培養液介入後第六天(Figure 7 (A)、(B)及(C))。

C2C12細胞株分化前後與胰島素濃度對於攝取葡萄糖類似物2-NBDG之觀察數據顯示，以FBS培養之細胞因未分化為成熟肌肉細胞，在150 nM insulin存在下培養30分鐘其攝取2-NBDG速率顯著低於HS組別，而在15 nM濃度下FBS與HS彼此間統計上雖無統計差異，但已具有明顯不同之趨勢 (Figure 8 (A)及(B))。

#### (十四) 不同濃度insulin刺激下C2C12肌管培養物中IR-beta、GLUT4、p-Akt-ser與p-Akt-thr蛋白質表現量

當細胞分化6天後，移除分化培養基，並以PBS清洗細胞2次，配製不含血清之2% fatty acid-free BSA DMEM，於37℃、5% 二氧化碳箱培養2小時(Blank期)，2小時後分別加入不同濃度之Insulin (0nM、1.5nM、15nM、150nM)，培養0、1、2、4小時後收細胞。經分析發現，以不同濃度之胰島素刺激分化後的細胞兩小時時，所有濃度之胰島素與無胰島素刺激組相較，均顯著增加IR-beta 蛋白質及GLUT4蛋白質表現量，且在濃度15 nM及150 nM時達增幅 (Figure 9)。

在Akt磷酸化程度方面，無胰島素刺激下，Akt-ser及Akt-thr之磷酸化程度極低，且不會隨著時間而產生磷酸化程度之變化。當細胞分別受到1.5 nM及15 nM胰島素刺激時，在刺激一小時後，Akt-ser磷酸化即達最大程度，隨後隨著時間增加至四小時而磷酸化逐漸下降，但當刺激細胞之胰島素濃度提高至150 nM時，Akt-ser磷酸化在胰島素刺激後第二小時達最大程度，於第四小時略微下降 (Figure 9)。Akt-thr磷酸化結果則顯示，胰島素濃度在1.5 nM、15 nM及150 nM時，磷酸化程度在第二小時達最大程度，且在刺激後在第四小時略微降低 (Figure 9)。

根據前述2-NBDG攝取試驗之結果，以胰島素濃度150 nM刺激細胞，最能區別分化前後葡萄糖攝取之情形，而根據胰島素受體訊號分子磷酸化之時程觀察，則顯示以150 nM胰島素刺激細胞兩小時對於C2C12之胰島素訊號之表現最為穩定且易於觀察，故後續對於細胞胰島素刺激下之反映的測定均以胰島素濃度150 nM且刺激兩小時之時間進行。

#### (十五) 土肉桂葉精油對於C2C12肌管培養物之毒性

以不同濃度CO添加至分化後之C2C12細胞培養物，可發現在濃度0.2至20 µg/ml並不影響細胞存活率，但在TC濃度200及2000 µg/ml時，細胞存活率顯著降低，兩組與控制組相較存活率皆低於七成 (Figure 10)，故在以下實驗中，CO預處理分化後C2C12之濃度選在0.2、2及20 µg/ml。

#### (十六) 土肉桂葉精油預處理對C2C12肌管培養物在有或無胰島素刺激下胞內胰島素訊號及葡萄糖攝取活性之影響

土肉桂葉精油對於C2C12細胞IR-beta、p-Akt-ser、p-Akt-thr、GLUT4蛋白質表現量方面，數據顯示，以不同濃度CO預處理後，在無insulin存在下對於細胞IR-beta、GLUT4、Akt磷酸化程度均無顯著影響 (Figure 11)。若在預處理細胞後，於培養液中添加150 nM 胰島素刺激，則發現低劑量CO組能夠顯著提高IR-beta之表現量，但在中及高濃度CO組卻未發現顯著提升IR-beta表現量之效果 (Figure 12)。Insulin刺激下，不同濃度CO預處理過之肌管培養物，皆能夠顯著提升GLUT4之表現量，其中又以低濃度CO題升幅度最大 (Figure 12)。Insulin刺激下Akt-ser、Akt-thr之磷酸化程度方面，比較在刺激後一至四小時時時，不同預處理組間的差異，結果發現在一小時時CO各組間Akt-ser之磷酸化皆顯著高於控制組，其中又以中濃度CO提升幅度最大 (Figure 12)。另外也觀察到，在胰島素刺激後一小時及二小時時，中濃度CO顯著增加Akt-thr磷酸化，但是低及高濃度CO預處理，均未顯著提升Akt-thr磷酸化 (Figure 12)。

## (十七) 土肉桂葉精油預處理在有或無胰島素刺激下對於C2C12細胞PI<sub>3</sub>K活性及2-NBDG攝取能力之影響

以土肉桂葉精油預處理細胞細胞，在無胰島素存在情況下，細胞PI<sub>3</sub>K活性或細胞攝取螢光標誌之葡萄糖類似物2-NBDG之螢光強度均不受預處理之影響 (Figure 13 及 Figure 14)，反映出土肉桂葉精油成分不能透過調節非胰島素依賴性路徑促進細胞攝取葡萄糖。而在150 nM胰島素刺激下，以低濃度(0.2 µg/ml) CO預處理之細胞顯示具有提升PI<sub>3</sub>K活性之效果，但其它預處理條件之效果並不顯著 (Figure 13)。而在150 nM insulin存在下，觀察分別以0.2、2、20 µg/ml之CO預處理之細胞攝取葡萄糖之活性，結果顯示，CO在濃度0.2 µg/ml下並不影響攝取量，中濃度CO (2 µg/ml) 明顯提升細胞攝取2-NBDG之螢光強度，而在20 µg/ml濃度下細胞螢光強度卻低於中濃度CO組。以CO預處理之細胞呈現高於control組之2-NBDG螢光強度，且以濃度在2 µg/mL時之效果最佳 (Figure 14)。

## 五、討論

糖尿病是一種醣類、蛋白質、脂質代謝紊亂的症候群，主要臨床表現為吃多、喝多、尿多及體重減輕。糖尿病造成的高血糖及併發症病理複雜，牽涉到不同程度的胰島素抵抗及胰島β細胞功能衰竭，胰島素分泌減少伴隨組織對胰島素的調節反應不敏感，使得血糖不易獲得嚴密控制，繼而發展成為糖尿病大血管病變及糖尿病小血管病變等併發症，除了血糖上升之外，糖尿病也會導致血中游離脂肪酸濃度增加，高血糖及游離脂肪酸增加造成葡萄糖毒性及脂質毒性，其透過改變活性氧反應的途徑改變、增加細胞內鈣離子活化及內質網的氧化壓力，在胰臟β細胞會降低胰島素基因表現，最終導致細胞凋亡使β細胞質量流失而減少胰島素分泌，而在周邊導致對胰島素調節之葡萄糖利用率下降並減少肝醣合成 [71]。胰島素抵抗引起骨骼肌氧化能力減少且降低電子傳遞鏈活性 [72]，使骨骼肌代謝改變因而質量減少 [73]。研究指出，葡萄糖於腸道吸收後，刺激腸道荷爾蒙(GIP、GLP-1)分泌，促進胰臟中β細胞分泌胰島素 [74]。糖尿病使得腎絲球基底膜逐漸增厚，而有腎臟代償性肥大 [75]。血尿酸濃度的上升也與糖尿病慢性併發症發展相關；有研究發現，糖尿病患尿酸清除率下降且生成率上升，使得血中尿酸濃度增加，為影響糖尿病腎病變的危險因子之一 [76, 77]。

STZ 是已知能誘發糖尿病的試劑，它可破壞胰島β細胞 [71]，當動物注射 STZ 會改變細胞激素的組成，包括：IL-1β、TNF-α，且會誘發氧化壓力形成，傷害β細胞及DNA斷裂，導致減少葡萄糖氧化、胰島素分泌受損及胰島素合成受損，使得血糖上升、體重減輕並出現多喝、多吃、多尿症狀 [78]。本研究利用注射 STZ 之動物模式建立之吃多、喝多、尿多及體重減輕之糖尿病模式，顯示也造成動物顯著肌肉流失及腎臟代償性腫大現象，血漿中胰島素濃度及胰臟中胰島素含量顯著減少。此外，於OGTT期間發現，其有葡萄糖不耐、腸泌素分泌顯著減少等情況。血液生化值分析結果發現血中游離脂肪酸濃度顯著增加、果糖胺濃度、尿酸濃度顯著增加且HOMA-IR(胰島素抵抗性指數)顯著上升，這些現象與已知的糖尿病狀態一致。

過去許多研究均認為在肉桂之精油製備物中，肉桂醛是抗糖尿病的主要作用成分之一，因此本實驗設計肉桂醛組加以對照。根據其他人的研究發現，以肉桂醛 (5、10 或 20mg/kg BW) 灌食 STZ 誘發之糖尿病大鼠 45 天，可顯著降低其空腹血糖並且呈現劑量依賴性，且 20 mg/kg BW 肉桂醛可顯著提升 STZ-DM 大鼠體重、減少其食物攝取量、降低大鼠糖化血色素及總膽固醇、並增加其血中胰島素、高密度脂蛋白膽固醇濃度 [58]，本研究以 40 mg/kg bw 肉桂醛隔日灌食 STZ-DM 大鼠，在誘發後第 21 天所獲得的結果與之一致。而本研究還發現，在糖尿病大鼠灌食肉桂醛後，可顯著增加葡萄糖耐受性並於 OGTT 期間顯著增加周邊血中腸泌素及胰島素累積量，顯著減少周邊血中游離脂肪酸、尿酸、果糖胺濃度並，改善腎臟代償性肥大。另有研究發現，以 STZ 誘發第二型糖尿病模式之大鼠，灌食 20 mg/kg BW 肉桂醛可顯著降低糖尿病大鼠之 HOMA-IR(胰島素抵抗性指數)及血中總膽固醇 [79]。本研究使用之土肉桂葉精油(CO)劑量，其肉桂醛含量約相當於 0.9、1.8 及 3.6 mg/kg bw，但抗糖尿病的許多方面之

效果不是與 40 mg/kg bw 肉桂醛相當，就是優於純的肉桂醛，顯示其中另含作用成分。經再次確認研究中使用之精油發現枷羅木醇 (linalool) 可能才是其主要活性成分，灌食之精油劑量約相當於 5、10 或 20 mg/kg bw 之枷羅木醇。本研究發現灌食 CO 可顯著增加血中胰島素濃度及胰臟中胰島素含量，其中以低劑量土肉桂葉精油效果優於肉桂醛，推論土肉桂葉精油中可能含有其他未知的功能性成分拮抗肉桂醛的作用，故在較高劑量下影響胰島素產生及分泌，CO 中所含其他成分的生物學角色有待進一步釐清。本研究發現在糖尿病大鼠灌食土肉桂葉精油能顯著降低周邊血中游離脂肪酸濃度，由於血中游離脂肪酸濃度上升是造成糖尿病之胰島素阻抗的主要原因之一，本研究結果建議，土肉桂葉精油與肉桂醛改善胰島素阻抗性的機制，部份與改善血中游離脂肪酸含量有關。灌食 CO 顯著降低果糖胺濃度，則代表血糖獲得較佳控制。Glibenclamide 屬於磺醯脲素類胰內作用藥物，研究發現，糖尿病動物模式中，服用 glibenclamide 可顯著降低空腹血糖，顯著增加周邊胰島素分泌，顯著減少血中糖化血色素、三酸甘油酯及總膽固醇，降低胰島素阻抗性 [80]。在本研究灌食土肉桂葉精油之糖尿病大鼠發現，土肉桂葉精油改善糖尿病典型症狀效果及降低空腹血糖、減少周邊血果糖胺濃度、游離脂肪酸濃度及改善胰島素阻抗性之效果與 glibenclamide 相似，而增加血中胰島素濃度及胰臟中胰島素效果則優於 glibenclamide。由於本研究長期灌食 CO 或肉桂醛後，在 OGTT 期間，周邊血中累積之 GIP、GLP-1 含量皆有增加，且血中胰島素累積量也隨之增加，推論土肉桂葉精油與肉桂醛可藉由刺激腸泌素分泌，進而刺激胰臟  $\beta$  細胞分泌胰島素。

當血液中的白蛋白經由腎絲球滲出至尿液中，經由尿液排出到體外，稱為微白蛋白尿 (microalbuminuria)。腎臟腎絲球正常時，尿液中不會檢測出微蛋白，所以尿液中微蛋白的濃度可作為評估腎臟功能是否惡化也是判定糖尿病腎病變的重要指標 [81]。在本研究中糖尿病大鼠尿液中微蛋白的濃度相較正常大鼠明顯上升，而在灌食土肉桂葉精油後，尿液微蛋白的濃度均有下降，顯示土肉桂葉精油確實可以降低腎臟惡化的現象。尿素是動物體內蛋白質代謝的最終產物，其在肝臟經尿素循環產生血漿尿素氮，之後從腎臟經尿液排出體外。血漿尿素氮濃度會受到非腎臟病變的因素所影響，例如：含蛋白質的食物攝取量過高使得蛋白質的異化作用 (catabolism) 超過同化作用 (anabolism)，水分攝取不足，服用類固醇類藥物或是在受到嚴重感染時蛋白質快速分解時，BUN 的量會上升。而蛋白質攝取不足，營養不良或肝功能不良無法順利產生尿素時，BUN 的量則會下降。所以使用 BUN 作為腎功能評估指標時須搭配其他檢測較為準確 [82]。Creatine 在肝臟合成之後，會經由血液儲存於肌肉組織中，而在 creatine phosphokinase (CPK) 的催化下會轉變成 creatinine。creatinine 會經由腎臟近曲小管進到腎絲球過濾排出體外，不受腎小管再吸收及飲食、生活習慣的影響，為優於 BUN 測定的腎功能指標，經由測定血漿及尿液中的 creatinine 可計算出肌酸酐廓清率 (creatinine clearance, CCR)。尿素跟 creatinine 都是經由腎臟腎絲球排出體外，可利用廓清試驗來測定腎絲球的過濾機能 creatinine 的排出量與體重成正比，經由測定 CCR 除以體重可進一步計算出腎絲球過濾率 (glomerular filtration rate)。在臨床上的診斷通常會同時使用這三種指標，用來評估病人腎臟功能是否有受損以及受損的時間長短，而在評估糖尿病人是否合併有腎病變的產生，則會加入尿中白蛋白濃度作為評估的依據 [83]。研究指出在糖尿病患者，血糖介於 130~190 mg/dl，大部分 (12/15) 的病患其血清中的 creatinine 都比正常範圍 (creatinine: 0.6~1.5 mg/dl) 來得高，只有少數 (3/15 人) 病患血清中的尿素有偏高的現象。而在血糖介於 250~380 mg/dl 的組別，血清 creatinine 的濃度很明顯的提升達 97.5%，提升的變化量相較於血清尿素的變化量只有 2.22% 來的明顯，顯示相較於尿素，creatinine 的檢驗結果更有意義 [84]。本研究顯示相較於正常大鼠，糖尿病老鼠的 BUN、CCR、GFR 均明顯上升，此結果與上述的研究都是相符的。而糖尿病大鼠給予土肉桂葉精油可以有效降低血漿中 BUN，效果與 glibenclamide 相當，且較肉桂醛來的好；中劑量的土肉桂葉精油可以降低 CCR、GFR，低劑量沒有作用，高劑量只能降低 CCR，顯示中劑量的土肉桂葉精油是最能改善腎臟腎功能且效果較肉桂醛來得好。

很多研究中都指出糖尿病高血糖跟產生 ROS 造成氧化壓力，進而去破壞腎臟組織結構有關。高血糖會藉由自我氧化作用，氧化葡萄糖跟蛋白質糖化產物造成不正常的自由基的提升，使得腎臟間質細胞纖維化，形成糖尿病腎病變。同時促進 RAAS，使得腎絲球微血管通透性增加，白蛋白流失到尿中的量上升，造成腎臟功能更加惡化 [85-87]。此外，長期處於高糖環境易使周邊組織氧化壓力增加及促進發炎激素之分泌，且目前已知高氧化壓力及發炎反應與許多糖尿病之慢性併發症有極大相關性。Barbard 等人利用 STZ 將小鼠誘發糖尿病，發現會增加骨骼肌中之 ROS 生合成及周邊血中之  $H_2O_2$  含量 [88]。另外在 Huang 等人研究中，第二型糖尿病患之周邊血液中 MDA 含量會增加且 SOD 活性會下降 [89]。Brito 等人及 Bonnard 等人均在糖尿病大鼠中，發現其體內 ROS 含量及脂質過氧化程度會增加，且胰臟中之抗氧化酵素 (glutathione peroxidase、SOD、catalase) mRNA、蛋白質及其活性之表現會下降 [90,91]。也有文獻指出腎臟中 ROS 含量增加是糖尿病腎病變之發生原因之一，且有腎病變之糖尿病患者之周邊血液中可發現 MDA 含量增加且抗氧化酵素活性(catalase、glutathione peroxidase、SOD) 下降 [92,93]。在 in vitro 實驗中也發現長期處於高糖環境中會降低 Total Glutathione 含量 [94]。本研究利用 STZ 誘發糖尿病之大鼠，犧牲後取其骨骼肌、胰臟、腎臟及周邊血進行 MDA 含量測定、抗氧化酵素活性之測定及總麩胱甘肽含量測定，而結果發現無論是 MDA 含量、抗氧化酵素之活性或是總麩胱甘肽含量，經 STZ 誘發糖尿病之大鼠在上述三種臟器及周邊血中，均可發現 MDA 含量顯著上升、抗氧化酵素活性顯著下降且總麩胱甘肽含量顯著上升之情況，均與文獻之結果相符合。

糖尿病是一種會使體內發炎激素含量增加之慢性發炎狀態 [95]。促發炎細胞激素在骨骼肌、脂肪組織及肝細胞中會直接降低胰島素敏感性而增加胰島素阻抗，而使葡萄糖恆定失調 [96]。在第一型糖尿病患者血清中可發現 TNF- $\alpha$  之濃度增加 [97,98]，在第二型糖尿病患血液及骨骼肌中亦可發現 TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 IL-1 $\beta$  濃度增加 [33, 98]。也有文獻指出當給予糖尿病  $\beta$  細胞 IL-1 接受體之拮抗劑 (IL-1Ra) 後，可增加  $\beta$  細胞存活及功能 [99]。另外，NO 之生合成是透過 Nitric oxide synthesis (NOS) 路徑，發炎細胞產生之氧自由基會與 NO 反應生成  $NO_3^{\cdot-}$ ，進而導致氧化壓力增加及發炎狀態惡化 [99-102]。在糖尿病大鼠腎絲球基底膜中可發現大量 IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$ ，說明促發炎細胞激素 (IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18 及 TNF- $\alpha$ ) 在糖尿病進展至腎病變中佔重要部分 [103-106]。本研究以 STZ 誘發糖尿病之大鼠，犧牲後取其骨骼肌、胰臟、腎臟及周邊血進行促發炎細胞激素 (IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$ ) 測定及 NO 含量測定，來判斷是否有發炎現象。結果顯示，本研究利用之 STZ 模式顯著增加促發炎細胞激素 (IL-1 $\beta$  及 TNF- $\alpha$ ) 及 NO 含量，與上述文獻之發現相符合。

過去在其他研究中已發現，多種肉桂品系之各種萃取物不僅具抗糖尿病之功能，也具抗氧化及抗發炎之功能。*C. kotoense* 之葉萃取物可藉抑制 ROS 來抑制 non-small cell lung cancer (NSCLC) A549 細胞之轉移及生長 [107]。在 in vitro 實驗中指出，*C. tamala* 葉之甲醇萃取物可減少糖尿病大鼠取出之大腦 synaptosomes 脂質過氧化之產物，並具有清除 superoxide 及 hydroxyl radical 之活性 [108]。*C. tamala* 葉之水萃取物也可增加腸胃潰瘍之大鼠胃中 catalase 之活性 [109]。*C. zeylanicum* 樹皮水萃取物可增加高膽固醇飲食之大鼠肝中 SOD 及 catalase 之活性並降低脂質過氧化程度 [110]。給予肥胖或過重且有 IFG (impaired fasting glucose) 之病患肉桂水萃物，結果發現可降其血漿中脂質過氧化程度，也可增加紅血球中 SOD 及 GPx 之活性 [111]。*C. zeylanicum*、*C. cassia* 及 *C. osmophloeum* 之水萃物藉許多抗氧化試驗中證明也同樣具抗氧化之活性 [112-116]。有文獻指出，給予正常大鼠肉桂醛可增加其腎臟中 superoxide dismutase (SOD)、glutathione peroxidase (GPx) 及 glutathione-s-transferase [61]，也可改善因老化所引起之 ROS 上升及腎臟中總麩胱甘肽含量下降之情況 [60]。將豬大腦利用過氧化氫 ( $H_2O_2$ ) 誘發氧化壓力，發現 linalool 可改善其脂質過氧化程度 [117]。另外，給予禁食之大鼠 linalool，結果發現 linalool 可逆轉因禁食所引起的脂質過氧化程度及抗氧化酵素(Glutathione peroxidase、superoxide dismutase) 活性下降之情形 [118]。目前台灣土肉桂 (*C. osmophloeum*) 對於因糖尿病所引起之氧化壓力之影響尚不清楚。故本研究探討土肉桂葉精油對糖尿病大鼠氧化壓力之影響並與肉桂醛之作用相互

比較。結果顯示，土肉桂葉精油可逆轉因糖尿病所引起胰臟、骨骼肌及周邊血中之脂質過氧化程度，也可增加胰臟、骨骼肌、腎臟及周邊血中抗氧化酵素 (SOD、GPx 及 glutathione reductase) 活性及總巰胱甘肽含量，效果較肉桂醛及 glibenclamide 好。說明土肉桂葉精油改善糖尿病氧化壓力之作用有部分是獨立於血糖控制之效果，其作用成分除了肉桂醛外尚來自於精油中 linalool 或其他成分。

對於肉桂萃取物抗發炎作用之研究也有許多文獻證明。在 in vitro 實驗中，*C. cassia* 樹皮水萃取物也可減少受 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) 及 ionomycin 刺激之 RAW264.7 巨噬細胞促發炎細胞激素之生合成 (IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ ) [119]。土肉桂 (*C. osmophloeum*) 葉精油可降低 RAW264.7 巨噬細胞在 LPS 誘發下 NO、cyclooxygenase-2 (COX-2) 及 prostaglandin E2 (PGE2) 之生合成 [51,120]。土肉桂葉精油也可使巨噬細胞及單核細胞在 LPS 誘發下 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及 IL-6 蛋白質及 mRNA 之表現量減少 [47,121,122]，並可抑制 NO 之生成 [51,123,124]。另外有文獻指出，Linalool 可抑制 J774.A1 巨噬細胞受 LPS 刺激下 NO、PGE2 及 COX-2 之生合成 [69]。另外，有文獻指出，肉桂醛可使巨噬細胞及單核細胞在 LPS 誘發下 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及 NO 之表現量減少 [47,48,125]，而本研究也發現肉桂醛可減少糖尿病大鼠胰臟、骨骼肌、腎臟及周邊血中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及 NO 之含量，與過去的發現一致。另外，本研究顯示土肉桂葉精油也可減少糖尿病大鼠胰臟、骨骼肌、腎臟及周邊血中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  及 NO 之含量，效果優於肉桂醛。由於本研究所使用之精油中肉桂醛含量僅約 5%，而以 linalool 含量為主，推論精油抗發炎反應作用主要自於精油中 linalool，有可能其抗發炎活性優於肉桂醛，但也不能排除精油中存在其他抗發炎成分之可能性。另外，其抗發炎效果也優於 GBC，故推論 CO 抗發炎作用有部分是獨立於其控制血糖之效果。

由於本研究發現 CO 可改善糖尿病動物的 HOMA-IR，顯示具有改善周邊組織胰島素敏感性之作用，故進一步觀察 CO 改善糖尿病徵狀是否透過影響胰島素訊號之傳遞，而本結果也支持此論點。在 CO 介入下，低劑量可顯著增加 GLUT4 表現量，而高劑量 CO 提升骨骼肌 IR- $\beta$  表現量，且 CO 也提升 Akt 磷酸化程度。而胰島素中游訊號 PI<sub>3</sub>K 之活性，也觀察到於肌肉組織中發現以中劑量之 CO 組效果最為顯著。過去已有研究指出，肌肉中胰島素訊號之傳遞對於胰島素阻抗與糖尿病之形成具有重大影響，當肌肉中 GLUT4 表現量降低時會導致血糖上升與胰島素嚴重阻抗 [126]。有研究指出，給予高果糖飲食誘發其胰島素阻抗之大鼠，在給予 *C. cassia* 之萃取物後，可增加骨骼肌其 IR- $\beta$ 、IRS-1 及 PI<sub>3</sub>K 之蛋白質表現量，也證實經由骨骼肌增加對葡萄糖之攝取及提升胰島素訊號傳遞路徑可改善胰島素阻抗 [127,128]。

本研究以 C2C12 細胞株建立肌肉細胞之胰島素反應模式，其他學者曾以馬血清 (HS) [129,130] 或小牛血清 (CS) [131,132] 誘導 C2C12 肌原細胞分化為成熟肌肉細胞，而本實驗發現 HS 較能有效誘導細胞分化，且在分化 6 天後成熟指標 creatine kinase 活性達高峰，此與前人研究相近 [129]。C2C12 細胞株在分化為成熟肌肉細胞且形成肌管後，對於胰島素具高度敏感性，許多研究也證實其可在此細胞呈現完整地觀察到整個胰島素訊號傳遞路徑 [131,133]，本研究之發現與之一致。

以不同濃度之 CO 介入分化後之 C2C12，並觀察其 IR- $\beta$ 、GLUT4 表現量及 Akt-ser、Akt-thr 磷酸化程度發現，在胰島素存在下可觀察到低濃度之 CO 介入能夠提升 IR- $\beta$ 、GLUT4 以及 PI<sub>3</sub>K 之表現，反之若無胰島素存在，則無觀察到有任何變化，據此可證明 CO 可提升標的細胞之胰島素反應。有研究指出，使用 C2C12 細胞株分化 6 天後，加入肉桂酒精水溶液萃取物 3 小時後，顯著促進胞漿內 GLUT4 分子轉位至細胞膜上，增加葡萄糖攝入細胞，且與 PI<sub>3</sub>K 活性增加與 Akt 磷酸化增加有重要關聯 [129]。在 3T3-L1 脂肪細胞株之研究也發現，*Cinnamomum burmannii* 之萃取物及純化其內之多酚類，添加於分化後之 C2C12 細胞 3 小時，可增加 IR- $\beta$  蛋白質表現量及 GLUT4 蛋白質與 mRNA 的表現量，證實 *cinnamon* 有提升胰島素訊號蛋白質表現能力 [129,134]，也與本研究利用 CO 之發現一致。本研究為了更進一步確認 CO 對於標的細胞在胰島素存在下是否能夠藉由加強胰島素訊號之傳遞來提升葡萄糖之攝取，利用螢光標幟之葡萄糖類似物 2-NBDG (2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-

yl)amino]-2-deoxy-d-glucose)探 CO 對於細胞攝取葡萄糖能力之影響。2-NBDG 特性與葡萄糖相同，會藉由 GLUT4 進入細胞，但進入後無法利用亦無法代謝導致累積，即可以螢光之特性判斷細胞對於葡萄糖攝取之能力 [135]。本研究以 CO 處理分化後的 C2C12 細胞後可觀察到中濃度之 CO (0.2 µg/ml) 具有提升細胞對於葡萄糖之攝入能力之效果； Lee et al. 發現，3T3-L1 脂肪細胞株以台灣土肉桂葉中之黃酮苷 (flavone glycosides) 介入後，可提高其 GLUT4 的轉位，並增加 IR-beta 磷酸化，促進細胞攝入葡萄糖之能力 [136]。而本研究證實在胰島素刺激下 CO 具有增加細胞葡萄糖攝取之作用。

## 七、結論與建議

綜合本研究結果可知，在STZ誘發之糖尿病大鼠灌食適當劑量之台灣土肉桂葉精油，可改善糖尿病的典型症狀，降低血漿中游離脂肪酸濃度，增加空腹時周邊胰島素含量及胰臟中胰島素含量，並改善胰島素阻抗，進而降低空腹血糖，減少血中果糖胺濃度。在口服葡萄糖刺激下土肉桂葉精油可增加腸泌素分泌，伴隨增加之胰島素分泌。且以台灣土肉桂葉精油灌食STZ誘發之糖尿病大鼠，明顯改善其腎功能指標BUN、CCR、GFR、及白蛋白尿。土肉桂葉精油上述抗糖尿病活性，整體而言優於肉桂醛之作用，且優於口服降血糖藥glibenclimide之作用。而氧化及發炎指標之測定顯示土肉桂葉精油改善胰島素阻抗及增加胰島素分泌之作用，至少有部分是透過在胰臟、骨骼肌及周邊血中提升抗氧化及抗發炎活性導致所致，且效果也優於肉桂醛及glibenclamide。土肉桂葉精油除了能透過改善血糖及降低血尿酸濃度改善腎臟病變之發展外，也透過提高腎臟抗氧化及抗發炎活性保護腎臟。根據 *in vivo* 與 *in vitro* 觀察得知，土肉桂葉精油可直接透過增進骨骼肌組織及肌肉細胞胰島素訊號分子之表現及活化，而提高細胞攝取葡萄糖，且 *in vivo* 觀察顯示其效果優於肉桂醛與glibenclamide。由於本計畫在執行的第二年後半年重新確認所使用的土肉桂屬枷羅木醇型而非肉桂醛型，故推論枷羅木醇不但也具有抗糖尿病的效果，且可能尚且優於肉桂醛，未來將繼續朝此方向探討。此外，雖然在本研究使用之精油劑量，於健康大鼠並未發現影響代謝特性 (data not shown)，但本研究發現所使用的精油在高劑量時效果不如中或低劑量，依據分析精油成分的結果推論，佔精油組成分達9.38%之camphor，因具有已知之生物學毒性，是否拮抗精油中抗糖尿病活性分子之作用，值得未來進一步評估。

## 八、計畫成果自評

關於台灣土肉桂葉精油(CO)的抗糖尿病研究，過去尚未有相關報導。本計畫以系統性研究，逐步釐清CO抗糖尿病作用及相關機制，並與肉桂醛對照而得到上述重要結論。根據本研究結果可推論，適當劑量之土肉桂葉精油對於改善涉及糖尿病進行及其併發症發展的病理生理學，具有應用價值。且本研究所使用之精油其組成分中僅含少量肉桂醛而主要為枷羅木醇，此化學型土肉桂過去相關應用之研究極為有限，本研究為首度針對此精油生物學活性進行之系統性研究，其結果對於日後推廣更多相關研究及應用，深具意義。在執行本計畫期間 (2011年底)，有文獻發表了枷羅木醇之抗糖尿病活性，因此對於我們此項研究所獲得的結果，提供有力的支持證據。

在我們原先提出的計劃中，預計觀察台灣土肉桂葉精油及肉桂醛抗糖尿病角色及探討相關機制，大致均已完成；整體而言，本計劃依預計進度執行，評估本計畫之執行率符合90%以上，限於部分經費的刪減，原先預計進行的胰島組織 *in vitro* 觀察，未如預期進行，較為可惜，未來將視取得研究經費的狀況盡力完成觀察。本研究結果，在土肉桂葉精油在STZ-糖尿病大鼠之降血糖作用及改善腎臟病變發展之結果，已分別於前年(九十九年)及去年(一百年)發表於第三十六及三十七屆台灣營養學會年會暨學術研討會(台北及台中)；在土肉桂葉精油對糖尿病大鼠氧化壓力及發炎反應之影響的研究結果已在去年(一百年)發表於第三十七屆台灣營養學會年會暨學術研討會(台中)；而在土肉桂葉精油對於胰島素受體訊號分子表現量及活化之 *in vivo* 及 *in vitro* 研究結果，已於今年(一百零一年)發表於第三十八屆台灣營養學會年會暨學術研討會(台南)。因考量計畫之整體性及結果的一貫性，於計畫相關實驗

結束，彙整三年所有成果後，目前正以上述於研討會中發表之論文為基礎撰寫期刊論文，預計至明年（一百零二年）將可於SCI學術期刊發表三篇論文。

## 九、參考文獻

- [1] World Health Organisation. *Quick diabetes facts*. 2011. <http://www.who.int/diabetes/en/>.
- [2] 衛生署. 台灣營養健康狀況變遷調查. 2009. <http://nhsit.nhri.org.tw/>.
- [3] WHO expert committee: Diabetes Mellitus. 2nd rep. Geneva, World Health Org., 1980 (Tech. Rep. Ser. 646).
- [4] Wieland OH, Patzelt C, Loffler G. 1972. Active and inactive forms of pyruvate dehydrogenase in rat liver. Effect of starvation and refeeding and of insulin treatment on pyruvate dehydrogenase interconversion. *Eur. J Biochem* 26, 426-432.
- [5] Berger M, Hagg SA, Goodman MN, Ruderman NB. 1976. Glucose metabolism in perfused skeletal muscle. Effects of starvation, diabetes, fatty acids, acetoacetate, insulin and exercise on glucose uptake and isoposition. *Biochem J* 158, 191-196.
- [6] Hue L, Maisin L, Rider MH. 1988. Palmitate inhibits liver glycolysis. Involvement of fructose-2,6-bisphosphate in the glucose/fatty acid cycle. *Biochem J* 251, 541-546.
- [7] Randle PJ. 1998. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev* 14, 263-283.
- [8] Turner NC and Clapham JC. 1998. Insulin resistance, impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes, pathologic mechanisms and treatment: current status and therapeutic possibilities. *Progress in Drug Research* 51, 33-39.
- [9] Yki-Järvinen H. 1992. Glucose toxicity. *Endocrinol Rev* 13, 415-425.
- [10] USRDS Annual Data Rept. 2011. Chapter Twelve: International Comparisons. [http://www.usrds.org/2011/pdf/v2\\_ch012\\_11.pdf](http://www.usrds.org/2011/pdf/v2_ch012_11.pdf)
- [11] 行政院衛生署國民健康局. 2010. [http://health99.doh.gov.tw/Hot\\_News/h\\_NewsDetailN.aspx?TopIcNo=5891](http://health99.doh.gov.tw/Hot_News/h_NewsDetailN.aspx?TopIcNo=5891)
- [12] Pirate J. 1978. Diabetes Mellitus and its Degenerative complications: prospective study of 4,400 patients observed between 1947 and 1973. *Diabetes Care*. 1, 168-175.
- [13] Brownlee M. Advanced products of nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. In: Rifkin H, Porte D, eds. *Ellenberg and Rifkin's diabetes mellitus*. New York: Elsevier Science Publishing Co, 1991:279.
- [14] Dutour A. 1997. Mechanisms of glucose toxicity. New hope for prevention of diabetic complications. *Eur J Endocrinol* 136, 39-40.
- [15] Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J. 2000. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab* 26, 163-176.
- [16] Catherwood MA, Powell LA, Anderson P, McMaster D, Sharpe PC, Trimble ER. 2002. Glucose-induced oxidative stress in mesangial cells. *Kidney Int* 61, 599-608.
- [17] Ceriello A. 2000. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism* 49, 27-29.
- [18] Bonnefont-Rousselot D. 2002. Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5, 561-568.
- [19] Rolo AP, Palmeira CM. 2006. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 212, 167-178.



- [20] Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. 2003. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and  $\beta$ -cell dysfunction? *Diabetes* 52, 1-8.
- [21] Yamagishi S, Imaizumi T. 2005. Diabetic vascular complications: pathophysiology, biochemical basis and potential therapeutic strategy. *Curr Pharm* 11, 2279-2299.
- [22] Hayden MR, Tyagi SC. 2004. Neural redox stress and remodeling in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and diabetic neuropathy. *Med Sci Monit* 10, RA291-307.
- [23] Ceriello A. 2006. Controlling oxidative stress as a novel molecular approach to protecting the vascular wall in diabetes. *Curr Opin Lipidol* 17, 510-518.
- [24] Marik PE, Raghavan M. 2004. Stress-hyperglycemia, insulin and immunomodulation in sepsis. *Intensive Care* 30, 748-756.
- [25] Steppel JH, Horton ES. 2004. Beta-cell failure in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Current Diabetes Reports* 4, 169-175.
- [26] Pickup JC, Crook MA. 1998. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 41, 1241-1248.
- [27] Festa A, D'Agostino R, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. 2002. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome. *Circulation* 102, 42-47.
- [28] Torres SH, De Sanctis JB, de L Briceno M, Hernandez N, Finol HJ. 2004. Inflammation and nitric oxide production in skeletal muscle of type 2 diabetic patients. *J Endocrinol* 181, 419-427.
- [29] Pickup JC, Chusney GD, Thomas SM, Burt D. 2000. Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life Sci* 67, 291-300.
- [30] Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, Quagliaro L, Ceriello A, Giugliano D. 2002. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation* 106, 2067-2072.
- [31] Shanmugam N, Reddy MA, Guha M, Natarajan R. 2003. High glucose-induced expression of proinflammatory cytokine and chemokine genes in monocytic cells. *Diabetes* 52, 1256-1264.
- [32] Lang CH, Dobrescu C, Bagby GJ. 1992. Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. *Endocrinol* 130, 43-52.
- [33] Kapur S, Bedard S, 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.
- [34] Sprangers F, Sauerwein HP, Romijn JA, van Woerkom GM, Meijer AJ. 1998. Nitric oxide inhibits glycogen synthesis in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 330, 1045-1049.
- [35] Kwon G, Xu G, Marshall CA, McDaniel ML. 1999. Tumor necrosis factor alpha-induced pancreatic beta-cell insulin resistance is mediated by nitric oxide and prevented by 15-deoxy-Delta 12, 14-prostaglandin J2 and aminoguanidine. A role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation and iNOS expression. *J Biol Chem* 274, 18702-18708.
- [36] Aggarwal BB, Shishodia S. 2004. Suppression of the Nuclear factor- $\kappa$ B activation pathway by spice-derived phytochemicals. *Ann NY Acad Sci* 1030, 434-441.
- [37] Iwasaki Y, Kambayashi M, Asai M, Yoshida M, Nigawara T, Hashimoto K. 2007. High glucose alone, as well as in combination with proinflammatory cytokines, stimulates nuclear factor kappa-B-mediated transcription in hepatocytes *in vitro*. *J Diabetes and Its Complications* 21, 56-62.
- [38] Tamura Y, Ogihara T, Uchida T, Ikeda F, Kumashiro N, Nomiya T, Sato F, Hirose T, Tanaka Y, Mochizuki H, Kawamori R, Watada H. 2007. Amelioration of glucose tolerance by hepatic inhibition of

- nuclear factor  $\kappa$ B in *db/db* mice. *Diabetologia* 50, 131-141.
- [39] Navarro JF, Mora C, Macia M, Garcia J. 2003. Inflammatory parameters are independently associated with urinary albumin excretion in type 2 diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis* 42, 53-61.
- [40] Wang ZP, Cai SX, Liu DB, Xu X, Liang HP. 2006. Antiinflammatory effects of a novel peptide designed to bind with NF-kappaB p50 subunit. *Acta Pharmacol Sin* 27, 1474-1478.
- [41] Ding H, Li F, Xu M, Deng Y, Deng Q, Zhu Z, Cheng H, Fu Z, Wang Y. 2002. The effect of inhibiting nuclear factor-kappa B on the diabetic nephropathy. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 41, 605-609.
- [42] Schmid H, Boucherot A, Yasuda Y, Henger A, Brunner B, Eichinger F, Nitsche A, Kiss E, Bleich M, Grone HJ, Nelson PJ, Schlongorff D, Cohen CD, Kretzler M; European Renal cDNA Bank (ERCB) consortium. 2006. Modular activation of nuclear factor-kappaB transcriptional programs in human diabetic nephropathy. *Diabetes* 55, 2993-3003.
- [43] 張上鎮. 2002. 土肉桂葉子精油的生物活性與應用. *台灣林業*. 28(6), 31-35.
- [44] 謝瑞中. 2006. 肉桂天然香料的成分與應用. *林業研究專訊*. 13(4), 14-16.
- [45] 李漢中, 鄭森松, 劉如芸, 張上鎮. 2003. 不同地理品系土肉桂葉部精油之化學多態性. *中華林學季刊*. 36(4), 411-422.
- [46] Chua MT, Tung YT, Chang ST. 2008. Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*. *Bioresource Technology* 99, 1918–1925.
- [47] Chao LK, Hua KF, Hsu HY, Cheng SS, Lin IF, Chen CJ, Chen ST, Chang ST. 2008. Cinnamaldehyde inhibits pro-inflammatory cytokines secretion from monocytes/macrophages through suppression of intracellular signaling. *Food and Chemical Toxicology* 46, 220–231.
- [48] Chao LK, Hua KF, Hsu HY, et al. 2005. Study on the Antiinflammatory Activity of Essential Oil from Leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *J Agric Food Chem* 53, 7274-7278.
- [49] Fang SH, Rao YK and Tzeng YM. 2005. Inhibitory effects of flavonol glycosides from *Cinnamomum osmophloeum* on inflammatory mediators in LPS/IFN-c-activated murine macrophages. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13, 2381–2388.
- [50] Rao YK, Fang SH, Tzeng YM. 2007. Evaluation of the anti-inflammatory and anti-proliferation tumoral cells activities of *Antrodia camphorata*, *Cordyceps sinensis*, and *Cinnamomum osmophloeum* bark extracts. *J Ethnopharmacol* 114, 78–85.
- [51] Tung YT, Chua MT, Wang SY, Chang ST. 2008. Anti-inflammation activities of essential oil and its constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) twigs. *Bioresource Technol* 99, 3908–3913.
- [52] Xia JF, Liang QL, Huc P, Wang YM, Lid P, Guo-An Luo GA. 2009. Correlations of six related purine metabolites and diabetic nephropathy in Chinese type 2 diabetic patients. *Clin Biochem* 42, 215-220.
- [53] Dowell FJ, Hamilton CA, McMurray J, Reid JL. 1993. Effects of a xanthineoxidase hypoxanthine free-radical and reactive oxygen species generating system on endothelial function in New-Zealand white-rabbit aortic rings. *J Cardiovasc Pharmacol* 22, 792–797.
- [54] Kang DH, Nakagawa T, Feng LL. 2002. A role for uric acid in the progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13, 2888–2897.
- [55] Rao GN, Corson MA, Berk BC. 1991. Uric acid stimulates vascular smooth muscle cell proliferation by increasing platelet-derived growth-factor A chain expression. *J Biol Chem* 266, 8604–8608.
- [56] Ioachimescu AG, Hoogwerf BJ. Comments on the letter by Pitocco et al. 2008. Serum uric acid, mortality and glucose control in patients with type 2 diabetes mellitus: a PreCIS database study. *Diabet*

Med 25, 509.

- [57] Wang SY, Yang CW, Liao JW, Zhen WW, Chu FH, Chang ST. 2008. Essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum* acts as a xanthine oxidase inhibitor and reduces the serum uric acid levels in oxonate-induced mice. *Phytomedicine* 15, 940–945.
- [58] Subash Babu, P., S. Prabuseenivasan, et al. 2007. Cinnamaldehyde--a potential antidiabetic agent. *Phytomedicine* 14, 15-22.
- [59] Chao LK, Chang WT, Shih YW, Huang JS. 2010. Cinnamaldehyde impairs high glucose-induced hypertrophy in renal interstitial fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol* 244, 174-180.
- [60] Kim DH, Kim CH, Kim MS. 2007. Suppression of age-related inflammatory NF- $\kappa$ B activation by cinnamaldehyde. *Biogerontol* 8, 545–554.
- [61] Gowder SJT, Devaraj H. 2006. Effect of the Food Flavour Cinnamaldehyde on the Antioxidant Status of Rat Kidney. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 99, 379–382.
- [62] Lin SS, Lu TM, Chao PC, et al. 2011. *In vivo* cytokine modulatory effects of cinnamaldehyde, the major constituent of leaf essential oil from *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh. *Phytother Res* 25, 1511-1518.
- [63] Sivakumar J. T. Gowder and H. Devaraj. 2006. Effect of the Food Flavour Cinnamaldehyde on the Antioxidant Status of Rat Kidney. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 99, 379–382.
- [64] Ford RA, Domeyer B, Easterday O, Maier K, Middleton J. 2000. Criteria for development of a database for safety evaluation of fragrance ingredients. *Regul Toxicol Pharmacol* 31, 155-81.
- [65] Letizia CS, Cocchiara J, Lalko J, Api AM. 2003. Fragrance material review on linalool. *Food Chem Toxicol* 41, 943-64.
- [66] Swanston-Flatt SK, Day C, Bailey CJ, Flatt PR. 1990. Traditional plant treatments for diabetes. Studies in normal and streptozotocin-diabetic mice. *Diabetologia* 33, 462-464.
- [67] Afifi FU, Saket M, Jaghabir M. 1998. Hypoglycemic effect of linalool in normal and streptozotocin diabetic rats. *Acta Technol Leg* 9, 101-106.
- [68] Peana AT, D'Aquila PS, Panin F, et al. 2002. Antiinflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. *Phytomed* 9, 721-726.
- [69] Peana AT, Marzocco S, Popolo A, Pinto A. 2006. (–)-Linalool inhibits *in vitro* NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. *Life Sci* 78, 719-723.
- [70] 李漢中, 鄭森松, 劉如芸, 張上鎮. 2003. 不同地理品系土肉桂葉部精油之化學多態性. *中華林學季刊*. 36(4), 411-422.
- [71] Okamoto T, Kanemoto N, et al. 2008. Characterization of STZ-Induced Type 2 Diabetes in Zucker Fatty Rats. *Exp Anim* 57, 335-345.
- [72] Ritov VB, Menshikova EV, Azuma K, Wood R, Toledo FG, Goodpaster BH, Ruderman NB, Kelley DE. 2010. Deficiency of Electron Transport Chain in Human Skeletal Muscle Mitochondria in Type 2 Diabetes Mellitus and Obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E49-58.
- [73] Blachnio-Zabielska A, Zabielski P, et al. 2009. Effects of streptozotocin-induced diabetes and elevation of plasma FFA on ceramide metabolism in rat skeletal muscle. *Horm Metab Res* 42, 1-7.
- [74] Chia CW, Egan JM. 2009. Role and development of GLP-1 receptor agonists in the management of diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2, 37.
- [75] Thomson SE, McLennan SV, et al. 2008. Renal connective tissue growth factor correlates with glomerular basement membrane thickness and prospective albuminuria in a non-human primate model of

- diabetes: possible predictive marker for incipient diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications* 22, 284-294.
- [76] Oda E, Kawai R, et al. 2009. Uric acid is positively associated with metabolic syndrome but negatively associated with diabetes in Japanese men. *Intern Med* 48, 1785-1791.
- [77] Hovind P, Rossing P, et al. 2009. Serum uric acid as a predictor for development of diabetic nephropathy in type 1 diabetes: an inception cohort study. *Diabetes* 58, 1668-1671.
- [78] Briede J, Stivrina M, et al. 2007. Effect of cerebrocrast, a new long-acting compound on blood glucose and insulin levels in rats when administered before and after STZ-induced diabetes mellitus. *Cell Biochem Funct* 25, 673-680.
- [79] Zhang W, Xu YC, et al. 2008. Anti-diabetic effects of cinnamaldehyde and berberine and their impacts on retinol-binding protein 4 expression in rats with type 2 diabetes mellitus. *Chin Med J (Engl)* 121, 2124-2128.
- [80] Adeneye AA, Adeyemi OO. 2009. Further evaluation of antihyperglycaemic activity of *Hunteria umbellata* (K. Schum) Hallier f. seed extract in experimental diabetes. *J Ethnopharmacol* 126, 238-43
- [81] Sanchez-Lozada LG, Soto V, Tapia E, Avila-Casado C, Sautin YY, Nakagawa T, Franco M, Rodriguez-Iturbe B, Johnson RJ. 2008. Role of oxidative stress in the renal abnormalities induced by experimental hyperuricemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 295, F1134-F1141.
- [82] Griffin KA, Kramer H, Bidani AK. 2008. Adverse renal consequences of obesity. *Am J Physiol Renal Physiol* 294, F685-F696.
- [83] Hjelmessaeth J, Roislien J, Nordstrand N, Hofso D, Hager H, Hartmann A. 2010. Low serum creatinine is associated with type 2 diabetes in morbidly obese women and men: a cross-sectional study. *BMC Endocr Disord* 10, 6.
- [84] Anupriya Sharma, NBH, Wadel P, Das P. 2011. Influence of Hyperglycemia on Renal Function Parameters in Patients with Diabetes Mellitus. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives* 2, 734-773.
- [85] Lee HB, Yu MR, Yang Y, Jiang Z, Ha H. 2003. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14, S241-S245.
- [86] Niedowicz DM, Daleke DL. 2005. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem Biophys* 43, 289-330.
- [87] Nistala R, Whaley-Connell A, Sowers JR. 2008. Redox control of renal function and hypertension. *Antioxid Redox Signal* 10, 2047-2089.
- [88] Bravard A, Bonnard C, Durand A, Chauvin MA, Favier R, Vidal H, Rieusset J. 2011. Inhibition of xanthine oxidase reduces hyperglycemia-induced oxidative stress and improves mitochondrial alterations in skeletal muscle of diabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300, E581-591.
- [89] Huang X, Sun M, Li D, Liu J, Guo H, Dong Y, Jiang L, Pan Q, Man Y, Wan, S, *et al.* 2011. Augmented NADPH oxidase activity and p22phox expression in monocytes underlie oxidative stress of patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 91, 371-380.
- [90] Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseume E, Chauvin MA, Morio B, Vidal H, Rieusset J. 2008. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J Clin Invest* 118, 789-800.
- [91] Brito VB, Folmer V, Soares JC, Silveira ID, Rocha JB. 2007. Long-term sucrose and glucose consumption decreases the delta-aminolevulinate dehydratase activity in mice. *Nutrition* 23, 818-826.

- [92] Pan HZ, Zhang L, Guo MY, Sui H, Li H, Wu WH, Qu NQ, Liang MH, Chang D. 2010. The oxidative stress status in diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Acta Diabetol* 47, 71-76.
- [93] Yamagishi S, Matsui T. 2010. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. *Oxid Med Cell Longev* 3, 101-108.
- [94] Wu L, Nicholson W, Knobel SM, Steffner RJ, May JM, Piston DW, Powers AC. 2004. Oxidative stress is a mediator of glucose toxicity in insulin-secreting pancreatic islet cell lines. *J Biol Chem* 279, 12126-12134.
- [95] Qin B, Polansky MM, Anderson RA. 2010. Cinnamon extract regulates plasma levels of adipose-derived factors and expression of multiple genes related to carbohydrate metabolism and lipogenesis in adipose tissue of fructose-fed rats. *Horm Metab Res* 42, 187-193.
- [96] Bilan PJ, Samokhvalov V, Koshkina A, Schertzer JD, Samaan MC, Klip A. 2009. Direct and macrophage-mediated actions of fatty acids causing insulin resistance in muscle cells. *Arch Physiol Biochem* 115, 176-190.
- [97] Hotamisligil GS. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860-867
- [98] Wellen KE, Hotamisligil GS. 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115, 1111-1119
- [99] Ardestani A, Sauter NS, Paroni F, Dharmadhikari G, Cho JH, Lupi R, Marchetti P, Oberholzer J, Conte JK, Maedler K. 2011. Neutralizing interleukin-1beta (IL-1beta) induces beta-cell survival by maintaining PDX1 protein nuclear localization. *J Biol Chem* 286, 17144-17155.
- [100] Cooke JP. 2004. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation* 109, 1813-1818.
- [101] Cooke JP, Ghebremariam YT. 2011. Dietary nitrate, nitric oxide, and restenosis. *J Clin Invest* 121, 1258-1260.
- [102] Munzel T, Gori T, Bruno RM, Taddei S. 2010. Is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease? *Eur Heart J* 31, 2741-2748.
- [103] Alexandraki K, Piperi C, Kalofoutis C, Singh J, Alaveras A, Kalofoutis A. 2006. Inflammatory process in type 2 diabetes: The role of cytokines. *Ann N Y Acad Sci* 1084, 89-117.
- [104] Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C. 2008. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 19, 433-442.
- [105] Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C, de Fuentes MM, Garcia-Perez J. 2011. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 7, 327-340.
- [106] Navarro JF, Mora C. 2005. Role of inflammation in diabetic complications. *Nephrol Dial Transplant* 20, 2601-2604.
- [107] Chen CY, Chen CH, Lo YC, Wu BN, Wang HM, Lo WL, Yen CM, Lin RJ. 2008. Anticancer activity of isoobtusilactone A from *Cinnamomum kotoense*: involvement of apoptosis, cell-cycle dysregulation, mitochondria regulation, and reactive oxygen species. *J Nat Prod* 71, 933-940.
- [108] Devi SL, Kannappan S, Anuradha CV. 2007. Evaluation of in vitro antioxidant activity of Indian bay leaf, *Cinnamomum tamala* (Buch. -Ham.) T. Nees & Eberm using rat brain synaptosomes as model system. *Indian J Exp Biol* 45, 778-784.
- [109] Eswaran MB, Surendran S, Vijayakumar M, Ojha SK, Rawat AK, Rao Ch V. 2010. Gastroprotective activity of *Cinnamomum tamala* leaves on experimental gastric ulcers in rats. *J Ethnopharmacol* 128, 537-540.
- [110] Amin KA, Abd El-Twab TM. 2009. Oxidative markers, nitric oxide and homocysteine alteration in hypercholesterolemic rats: role of atorvastatine and cinnamon. *Int J Clin Exp Med* 2, 254-265.

- [111] Roussel AM, Hininger I, Benaraba R, Ziegenfuss TN, and Anderson RA. 2009. Antioxidant effects of a cinnamon extract in people with impaired fasting glucose that are overweight or obese. *J Am Coll Nutr* 28, 16-21.
- [112] Chua MT, Tung YT, Chang ST. 2008. Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*. *Bioresour Technol* 99, 1918-1925.
- [113] Dudonne S, Vitrac X, Coutiere P, Woillez M, Merillon JM. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J Agric Food Chem* 57, 1768-1774.
- [114] Dugoua JJ, Seely D, Perri D, Cooley K, Forelli T, Mills E, Koren G. 2007. From type 2 diabetes to antioxidant activity: a systematic review of the safety and efficacy of common and cassia cinnamon bark. *Can J Physiol Pharmacol* 85, 837-847.
- [115] Nagendra Prasad K, Yang B, Dong X, Jiang G, Zhang H, Xie H, Jiang Y. 2009. Flavonoid contents and antioxidant activities from *Cinnamomum* species. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10, 627-632.
- [116] Singh G, Maurya S, DeLampasona MP, Catalan CA. 2007. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food Chem Toxicol* 45, 1650-1661.
- [117] Celik S, Ozkaya A. 2002. Effects of intraperitoneally administered lipoic acid, vitamin E, and linalool on the level of total lipid and fatty acids in guinea pig brain with oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Biochem Mol Biol* 35, 547-552.
- [118] Dayangac A, Bahsi M, Ozkaya A, Yilmaz O. 2011. Linalool Improve Biochemical Damage and Fatty Acids Composition of Tests on Fasting Male Rats. 10, 1232-1238.
- [119] Kwon HK, Hwang JS, Lee CG, So JS, Sahoo A, Im CR, Jeon WK, Ko BS, Lee SH, Park, ZY, *et al.* 2011. Cinnamon extract suppresses experimental colitis through modulation of antigen-presenting cells. *World J Gastroenterol* 17, 976-986.
- [120] Lin CT, Chen CJ, Lin TY, Tung JC, Wang SY. 2008. Anti-inflammation activity of fruit essential oil from *Cinnamomum insularimontanum* Hayata. *Bioresour Technol* 99, 8783-8787.
- [121] Qin B, Dawson H, Polansky MM, Anderson RA. 2009. Cinnamon extract attenuates TNF-alpha-induced intestinal lipoprotein ApoB48 overproduction by regulating inflammatory, insulin, and lipoprotein pathways in enterocytes. *Horm Metab Res* 41, 516-522.
- [122] Qin B, Qiu W, Avramoglu RK, Adeli K. 2007. Tumor necrosis factor-alpha induces intestinal insulin resistance and stimulates the overproduction of intestinal apolipoprotein B48-containing lipoproteins. *Diabetes* 56, 450-461.
- [123] Kim BH, Lee YG, Lee J, Lee JY, Cho JY. 2010. Regulatory effect of cinnamaldehyde on monocyte/macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators Inflamm* 2010, Article ID 529359, 9 pages, doi: 10.1155/2010/529359.
- [124] Tung YT, Yen PL, Lin CY, Chang ST. 2010. Anti-inflammatory activities of essential oils and their constituents from different provenances of indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves. *Pharm Biol* 48, 1130-1136.
- [125] Lee HS, Kim BS, Kim MK. 2002. Suppression effect of *Cinnamomum cassia* bark-derived component on nitric oxide synthase. *J Agric Food Chem* 50, 7700-7703.
- [126] Stenbit AE, Tsao TS, Li J, Burcelin R, Geenen DL, Factor SM, Houseknecht K, Katz EB, Charron MJ.

1997. GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes. *Nature medicine* 3, 1096-1101.
- [127] Qin B, Nagasaki M, Ren M, Bajotto G, Oshida Y, Sato Y. 2003. Cinnamon extract (traditional herb) potentiates in vivo insulin-regulated glucose utilization via enhancing insulin signaling in rats. *Diabetes research and clinical practice* 62, 139-148.
- [128] Qin B, Nagasaki M, Ren M, Bajotto G, Oshida Y, Sato Y. 2004. Cinnamon extract prevents the insulin resistance induced by a high-fructose diet. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* 36, 119-125.
- [129] Absalan A, Mohiti-Ardakani J, Hadinedoushan H, Khalili M. 2012. Hydro-Alcoholic Cinnamon Extract, Enhances Glucose Transporter Isotype-4 Translocation from Intracellular Compartments into the Cytoplasmic Membrane of C2C12 Myotubes. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 27, 351-356.
- [130] Smith JL, Patil PB, Minter SD, Lipsitz JR, Fisher JS. 2005. Possibility of autocrine beta-adrenergic signaling in C2C12 myotubes. *Exp Biol Med (Maywood)* 230, 845-852.
- [131] Tortorella LL, Pilch PF. 2002. C2C12 myocytes lack an insulin-responsive vesicular compartment despite dexamethasone-induced GLUT4 expression. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 283, E514-524.
- [132] Tsuchiya Y, Hatakeyama H, Emoto N, Wagatsuma F, Matsushita S, Kanzaki M.(2010). Palmitate-induced down-regulation of sortilin and impaired GLUT4 trafficking in C2C12 myotubes. *The Journal of biological chemistry* 285, 34371-34381.
- [133] Chavez JA, Summers SA. 2003. Characterizing the effects of saturated fatty acids on insulin signaling and ceramide and diacylglycerol accumulation in 3T3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Archives of biochemistry and biophysics* 419, 101-109.
- [134] Cao H, Polansky MM, Anderson RA. 2007. Cinnamon extract and polyphenols affect the expression of tristetraprolin, insulin receptor, and glucose transporter 4 in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Archives of biochemistry and biophysics* 459, 214-222.
- [135] Zou C, Wang Y, Shen Z. 2005. 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 64, 207-215.
- [136] Lee MJ, Rao YK, Chen K, Lee YC, Tzeng YM. 2009. Effect of flavonol glycosides from *Cinnamomum osmophloeum* leaves on adiponectin secretion and phosphorylation of insulin receptor-beta in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of ethnopharmacology* 126, 79-85.

表一、台灣土肉桂葉精油揮發性組成分

Table 1. Volatile Components in the Native Essential Oils of Leaf from *C. osmophloeum* Kaneh.

Number	Compounds	RI <sup>a</sup>	Composition	CAS No.	Formula	MW	Number	Compounds	RI	Composition	CAS No.	Formula	MW
1	ethenylbenzene <sup>b</sup>	877	0.01%	100-42-5	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub>	104	52	(cis, trans)- $\alpha$ -farnesene	1434	0.20%	26560-14-5	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
2	tricyclene	920	0.01%	508-32-7	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	53	aromadendrene	1439	0.23%	489-39-4	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
3	$\alpha$ -thujene	924	0.06%	2867-05-2	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	54	$\beta$ -farnesene	1450	0.06%	18794-84-8	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
4	$\alpha$ -(-)-pinene	932	1.38%	80-56-8	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	55	$\alpha$ -humulene	1452	0.37%	6753-98-6	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
5	benzaldehyde	936	0.11%	100-52-7	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O	106	56	$\alpha$ -acoradiene	1457	0.06%	24048-44-0	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
6	$\alpha$ -fenchene	943	0.03%	471-84-1	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	57	alloaromadendrene	1459	0.15%	999209-01-5	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
7	camphene	945	0.63%	79-92-5	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	58	$\alpha$ -amorphene	1472	0.21%	483-75-0	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
8	sabinene	967	0.08%	3387-41-5	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	59	$\alpha$ -curcumene	1474	0.22%	644-30-4	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>	202
9	(-)- $\beta$ -pinene	972	0.45%	18172-67-3	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	60	germacrene-d	1477	0.09%	23986-74-5	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
10	$\beta$ -myrcene	984	0.35%	123-35-3	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	61	$\beta$ -selinene	1483	0.07%	17066-67-0	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
11	$\alpha$ -phellandrene	997	0.04%	99-83-2	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	62	$\gamma$ -muurolene	1486	0.02%	30021-74-0	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
12	3-carene	1004	0.01%	13466-78-9	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	63	$\alpha$ -zingibirene	1488	0.02%	495-60-3	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
13	$\alpha$ -terpinene	1010	0.03%	99-86-5	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	64	$\beta$ -patchoulene	1491	0.27%	514-51-2	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
14	cymentene	1015	0.68%	25155-15-1	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	134	65	acetylcugenol	1494	0.51%	93-28-7	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	206
15	2-hydroxybenzaldehyde	1019	0.14%	90-02-8	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	122	66	$\beta$ -bisabolene	1502	0.21%	495-61-4	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
16	1,8-cineol	1021	0.64%	470-82-6	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154	67	$\gamma$ -muurolene	1508	0.36%	30021-74-0	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
17	limonene	1024	1.53%	138-86-3	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	68	1S, cis-calamenene	1513	0.16%	483-77-2	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>	202
18	trans- $\alpha$ -ocimene	1030	0.05%	3779-61-1	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	69	$\delta$ -cadinene	1517	0.96%	483-76-1	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
19	$\beta$ -ocimene	1041	0.05%	13877-91-3	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	70	cadina-1,4-diene	1528	0.04%	29837-12-5	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204
20	$\gamma$ -terpinene	1052	0.07%	99-85-4	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	71	$\alpha$ -calacorene	1533	0.13%	999343-25-8	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub>	200
21	cis-linalool oxide	1063	0.13%	999083-25-3	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	170	72	(+)-nerolidol	1556	0.48%	142-50-7	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222
22	trans-linalool oxide	1077	0.13%	11063-78-8	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	170	73	lauric acid	1566	0.07%	143-07-7	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	200
23	terpinolene	1081	0.10%	586-62-9	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	74	(+) spathulenol	1572	0.39%	77171-55-2	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	220
24	linalool	1102	40.24%	78-70-6	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154	75	caryophyllene oxide	1575	1.00%	1139-30-6	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	220
25	camphor	1131	9.38%	464-49-3	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	152	76	(+)-ledol	1581	0.07%	577-27-5	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222
26	benzylacetaldehyde	1135	0.22%	104-53-0	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O	134	77	guaiol	1592	0.05%	489-86-1	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222
27	3-phenyl-2-propenol	1158	4.06%	104-55-2	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O	132	78	humulene oxide II	1599	0.13%	19888-34-7	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	220
28	4-terpineol	1169	0.20%	562-74-3	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154	79	alloaromadendrene oxide (I)	1617	0.01%	999012-25-8	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	220
29	estragole	1181	1.31%	140-67-0	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	148	80	ledene oxide (II)	1619	0.08%	999029-51-9	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	220
30	trans-cinnamaldehyde	1190	0.17%	14371-10-9	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O	132	81	6-cadinol	1621	0.06%	19435-97-3	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222
31	octyl acetate	1195	0.05%	112-14-1	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	172	82	10,10-dimethyl-2,6-dimethyl	1626	0.03%	19431-80-2	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	220
32	cis-citral	1219	0.07%	106-26-3	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	152		-bicyclo[7.2.0]undecan-5-ol					
33	cinnamaldehyde	1249	6.87%	104-55-2	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O	132	83	isoaromadendrene epoxide	1630	0.03%	999012-24-0	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	220
34	chavicol	1261	0.25%	501-92-8	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O	134	84	$\tau$ -cadinol	1635	0.03%	5937-11-1	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222
35	trans-anethol	1270	0.04%	4180-23-8	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	148	85	ortho-methoxy cinnamyl	1639	0.08%		C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	206
36	bornyl acetate	1273	1.72%	76-49-3	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	196	86	$\alpha$ -cadinol	1647	0.19%	481-34-5	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222
37	cinnamyl alcohol	1291	0.14%	104-54-1	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O	134	87	methoxyeugenol	1675	0.10%	6627-88-9	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	194
38	eugenol	1340	0.55%	97-53-0	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	164	88	zerumbone	1713	0.03%	471-05-6	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	218
39	cis-cinnamic acid	1347	0.23%	102-94-3	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	148	89	farnesyl acetate	1821	0.03%		C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	264
40	$\alpha$ -cubebene	1349	0.11%	17699-14-8	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	90	6,10,14-trimethylpentadecan-	1835	0.08%	502-69-2	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	268
41	geraniol acetate	1365	0.43%	105-87-3	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	196	91	farnesol	1897	0.03%	4602-84-0	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222
42	(+)-cyclosativene	1368	0.05%	999209-12-9	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	92	rimuene	1929	0.78%	1686-67-5	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>	272
43	$\alpha$ -ylangene	1371	0.09%	14912-44-8	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	93	ent-pimara-8(14),15-diene	1946	0.10%	19882-10-1	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>	272
44	isolekene	1373	0.02%	999350-67-0	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	94	hexadecanoic acid	1963	0.69%	57-10-3	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256
45	copaene	1376	0.85%	3856-25-5	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	95	bornyl cinnamate 1	1989	0.07%	6330-67-2	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	284
46	$\alpha$ -bourbonene	1383	0.07%	999137-43-5	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	96	manoyl oxide	2009	0.14%	596-84-9	C <sub>20</sub> H <sub>34</sub> O	290
47	$\beta$ -cubebene	1386	0.04%	13744-15-5	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	97	(-)-kaurene	2038	0.10%	562-28-7	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>	272



48	$\beta$ -elemene	1388	0.04%	515-13-9	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub>	204	98	phytol	2106	0.03%	150-86-7	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O	296
49	coumarin	1410	2.13%	91-64-5	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	146	99	linolenic acid	2128	0.17%	463-40-1	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	278
50	carvophyllene	1418	2.65%	87-44-5	C <sub>13</sub> H <sub>24</sub>	204	100	oleic Acid	2134	0.12%	112-80-1	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	282
51	trans-cinnamyl	1427	11.71%	21040-45-9	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	176	101	octadecanoic acid	2161	0.06%	57-11-4	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	284

<sup>a</sup>RI, Kovat's GC retention index calculated with C<sub>5</sub>-C<sub>25</sub> *n*-alkanes as references; <sup>b</sup>These volatiles were identified by comparing with the standard or authentic sample, while others were identified by referring to the computer mass libraries to compare the mass spectrum with the published data of known chemical structures.

表二、大鼠誘發糖尿病前後代謝特徵及空腹血糖值<sup>x</sup>

**Table 2. Metabolic characteristics and fasting blood glucose level of rats before and after the induction of diabetes<sup>x</sup>**

		Control	DM
Body weight (g)	Day 0	128.5±9.5	128.8±3.5
	Day 3	172.9±16.9	141.0±5.1 <sup>#</sup>
Food intake (g/24h)	Day 0	15.9±1.0	17.1±1.0
	Day 3	18.6±2.0	38.0±2.1 <sup>#</sup>
Water intake (ml/24h)	Day 0	32.6±1.8	45.2±4.8
	Day 3	37.1±5.1	230.2±11.9 <sup>#</sup>
Urine excretion (ml/24 h)	Day 0	8.6±0.9	10.2±2.0
	Day 3	7.8±0.8	188.8±14.8 <sup>#</sup>
Blood glucose (mg/dl)	Day 0	57±9.9	57±3.4
	Day 3	79.8±9.7	523.6±68.2 <sup>#</sup>

<sup>x</sup>Values are the mean ± SD for six rats per group and determined before (day 0) and 3 days after (day 3) the injection of streptozotocin or vehicle.

<sup>#</sup> Significantly different from the control group (P < 0.05).

表三、控制組及有或無灌食土肉桂葉精油、肉桂醛及 glibenclimide 之糖尿病大鼠代謝特徵及組織或器官重/體重比<sup>x</sup>

**Table 3. Metabolic characteristics and tissue/organ wt/body wt ratio of control rats or streptozotocin-induced diabetic rats who did or did not receive CO, cinnamaldehyde or glibenclimide<sup>x</sup>**

	Control-V	DM-V	DM-COL	DM-COM	DM-COH	DM-CA	DM-GBC
Body weight gain (g)	83.8±20.2	48.1±10.9 <sup>#</sup>	65.3±18.1	64.3±16.3	55.7±18.7	51.5±27.4 <sup>ab</sup>	44.8±37.5
Food intake (g/24 h)	22.7±1.3	33.5±3.7 <sup>#b</sup>	23.6±0.9 <sup>a</sup>	25.0±2.2 <sup>ab</sup>	25.5±3.7 <sup>ab</sup>	30.5±6.9 <sup>ab</sup>	26.2±12.0 <sup>ab</sup>
Water intake (ml/24 h)	52.3±9.6	160.3±23.5 <sup>#b</sup>	92.5±16.2 <sup>a</sup>	128.5±25.7 <sup>ab</sup>	123.3±24.2 <sup>ab</sup>	102.5±63.3 <sup>ab</sup>	126.2±20.1 <sup>ab</sup>
Urine excretion (ml/24 h)	14.3±1.7	145.8±15.5 <sup>#b</sup>	104.2±21.3 <sup>a</sup>	117.4±17.8 <sup>ab</sup>	110.3±22.3 <sup>ab</sup>	100.5±61.2 <sup>ab</sup>	119.3±23.4 <sup>ab</sup>
Skeletal muscle wt/bw (%) <sup>y</sup>	1.48±0.05	1.18±0.01 <sup>za</sup>	1.46±0.60 <sup>c</sup>	1.34±0.07 <sup>b</sup>	1.40±0.04 <sup>bc</sup>	1.32±0.09 <sup>b</sup>	1.38±0.08 <sup>bc</sup>
Liver wt/body wt (%)	3.52±0.19	4.84±0.26 <sup>#c</sup>	3.94±0.26 <sup>a</sup>	3.99±0.44 <sup>a</sup>	4.23±0.24 <sup>ab</sup>	4.53±0.27 <sup>bc</sup>	4.59±0.20 <sup>bc</sup>
Spleen wt/body wt (%)	0.28±0.03	0.31±0.03	0.27±0.03	0.28±0.02	0.27±0.03	0.28±0.03	0.28±0.01

<sup>x</sup>Values are the mean ± SD for six rats per group.

Control-V, control rats treated with vehicle; DM-V, DM rats treated with vehicle; DM-COL, DM rats treated with 12.5 mg/kg bw of CO; DM-COM, DM rats treated with 25 mg/kg bw of CO; DM-COH, DM rats treated with 50 mg/kg bw of CO; DM-CA, DM rats treated with 40 mg/kg bw of cinnamaldehyde; DM-GBC, DM rats treated with 0.6 mg/kg bw of glibenclimide.

<sup>y</sup> Sum of Gastrocnemius muscle, Soleus muscle and EDL muscle.

<sup>#</sup> Significantly different from the control group (P < 0.05).

a,b, c Means the DM groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( P < 0.05).

表四、控制組及有或無灌食土肉桂葉精油、肉桂醛及 glibenclimide 之糖尿病大鼠在誘發糖尿病後不同天之空腹血糖值<sup>x</sup>

**Table 4. Fasting blood glucose levels of control rats or diabetic rats who did or did not receive CO, cinnamaldehyde or glibenclimide on different days after the induction of diabetes<sup>x</sup>**

Time after induction	Fasting plasma glucose (mg/dl)						
	Control-V	DM-V	DM-COL	DM-COM	DM-COH	DM-CA	DM-GBC
Day 3	88.9±5.2	165.0±36.6 <sup>#</sup>	164.9±44.8	165.3±17.5	164.6±46.8	165.7±28.3	165.7±9.7
Day 10	89.8±9.8	200.7±41.8 <sup>#a</sup>	129.6±34.6 <sup>b</sup>	166.2±52.8 <sup>ab</sup>	160.8±51.4 <sup>ab</sup>	177.0±55.0 <sup>ab</sup>	186.8±73.9 <sup>a</sup>
Day 17	89.5±7.1	316.4±88.5 <sup>#a</sup>	160.9±32.4 <sup>b</sup>	249.9±76.6 <sup>a</sup>	263.1±119.9 <sup>a</sup>	275.0±95.4 <sup>a</sup>	302.5±81.8 <sup>a</sup>
Day 21	89.3±8.7	429.3±61.3 <sup>#a</sup>	174.6±47.3 <sup>b</sup>	323.8±88.7 <sup>c</sup>	327.2±61.3 <sup>c</sup>	369.8±109.7 <sup>ac</sup>	393.5±85.5 <sup>ac</sup>

<sup>x</sup>Values are the mean ± SD for six rats per group.

Control-V, control rats treated with vehicle; DM-V, DM rats treated with vehicle; DM-COL, DM rats treated with 12.5 mg/kg bw of CO; DM-COM, DM rats treated with 25 mg/kg bw of CO; DM-COH, DM rats treated with 50 mg/kg bw of CO; DM-CA, DM rats treated with 40 mg/kg bw of cinnamaldehyde; DM-GBC, DM rats treated with 0.6 mg/kg bw of glibenclimide.

<sup>#</sup> Significantly different from the control group (P < 0.05).

a,b, c Means the DM groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( P < 0.05).

表五、控制組及有或無灌食土肉桂葉精油、肉桂醛及 glibenclimide 之糖尿病大鼠周邊血游離脂肪酸、果糖胺、尿酸濃度及 HOMA-IR 值<sup>x</sup>

Table 5. Levels of free fatty acid, fructosamine, and uric acid, and the calculated HOMA-IR value of control rats or diabetic rats who did or did not receive CO, cinnamaldehyde or glibenclimide<sup>x</sup>

	Control-V	DM-V	DM-COL	DM-COM	DM-COH	DM-CA	DM-GBC
FFA (nmol/ $\mu$ l)	0.711±0.247	1.374±0.636 <sup>#b</sup>	0.928±0.192 <sup>a</sup>	0.743±0.240 <sup>a</sup>	0.786±0.179 <sup>a</sup>	0.822±0.218 <sup>a</sup>	0.904±0.283 <sup>a</sup>
Fructosamine (mg/dl)	1.174±0.908	13.798±8.416 <sup>#b</sup>	2.874±1.001 <sup>b</sup>	2.841±0.371 <sup>a</sup>	3.602±0.551 <sup>a</sup>	3.472±1.094 <sup>a</sup>	3.808±1.511 <sup>a</sup>
Uric acid (mg/dl)	2.784±1.196	9.863±2.607 <sup>#b</sup>	3.495±0.473 <sup>a</sup>	4.877±0.326 <sup>a</sup>	3.456±0.551 <sup>a</sup>	4.484±0.918 <sup>a</sup>	4.116±0.313 <sup>a</sup>
HOMA-IR	1.020±0.324	4.565±0.756 <sup>#c</sup>	1.562±0.283 <sup>ab</sup>	1.211±0.308 <sup>ab</sup>	1.042±0.219 <sup>a</sup>	2.023±0.687 <sup>b</sup>	1.827±1.085 <sup>ab</sup>

<sup>x</sup>Values are the mean  $\pm$  SD for six rats per group.

Control-V, control rats treated with vehicle; DM-V, DM rats treated with vehicle; DM-COL, DM rats treated with 12.5 mg/kg bw of CO; DM-COM, DM rats treated with 25 mg/kg bw of CO; DM-COH, DM rats treated with 50 mg/kg bw of CO; DM-CA, DM rats treated with 40 mg/kg bw of cinnamaldehyde; DM-GBC, DM rats treated with 0.6 mg/kg bw of glibenclimide.

HOMA-IR values are calculated with the formula: fasting plasma glucose (mg/dl) x fasting plasma insulin ( $\mu$ U/ml)/405.

<sup>#</sup> Significantly different from the control group ( $P < 0.05$ ).

a,b, c Means the DM groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

表六、控制組及有或無灌食土肉桂葉精油、肉桂醛及 glibenclimide 之糖尿病大鼠腎臟重/體重比及腎功能指數<sup>x</sup>

**Table 6. kidney weight/body weight ratio and renal function of control rats or streptozotocin-induced diabetic rats who did or did not receive CO, cinnamaldehyde or glibenclimide<sup>x</sup>**

	Control-V	DM-V	DM-COL	DM-COM	DM-COH	DM-CA	DM-GBC
Kidney wt/bw (%)	0.87±0.03	1.31±0.03 <sup>#b</sup>	1.11±0.06 <sup>a</sup>	1.10±0.10 <sup>a</sup>	1.21±0.02 <sup>ab</sup>	1.09±0.19 <sup>a</sup>	1.18±0.07 <sup>ab</sup>
Urinary albumin (mg/24h)	1.38±0.17	4.08±1.33 <sup>#c</sup>	2.07±0.41 <sup>ab</sup>	2.01±1.16 <sup>ab</sup>	1.43±0.18 <sup>a</sup>	3.51±0.99 <sup>bc</sup>	3.88±1.89 <sup>c</sup>
Blood urea nitrogen (mg/dl)	17.1±2.8	58.5±15.0 <sup>#c</sup>	26.4±3.1 <sup>a</sup>	30.5±5.4 <sup>a</sup>	32.0±8.3 <sup>a</sup>	43.0±6.7 <sup>b</sup>	31.2±8.6 <sup>a</sup>
CCR (ml/min)	0.33±0.09	1.13±0.22 <sup>#c</sup>	1.16±0.36 <sup>c</sup>	0.58±0.10 <sup>a</sup>	0.71±0.11 <sup>ab</sup>	0.92±0.14 <sup>bc</sup>	0.92±0.12 <sup>bc</sup>
GFR (CCR/KW)	0.15±0.04	0.46±0.06 <sup>#b</sup>	0.51±0.15 <sup>b</sup>	0.25±0.05 <sup>a</sup>	0.36±0.09 <sup>ab</sup>	0.43±0.05 <sup>bc</sup>	0.39±0.06 <sup>b</sup>

<sup>x</sup>Values are the mean ± SD for six rats per group.

Control-V, control rats treated with vehicle; DM-V, DM rats treated with vehicle; DM-COL, DM rats treated with 12.5 mg/kg bw of CO; DM-COM, DM rats treated with 25 mg/kg bw of CO; DM-COH, DM rats treated with 50 mg/kg bw of CO; DM-CA, DM rats treated with 40 mg/kg bw of cinnamaldehyde; DM-GBC, DM rats treated with 0.6 mg/kg bw of glibenclimide.

CCR (Creatinine clear rate) was calculated with the formula:  $\left[ \frac{\text{urine creatinine (mg/dl)} \times 24 \text{ hours urine volume (ml)}}{1440 \text{ (min)}} \right] / \text{plasma creatinine (mg/dl)}$

GFR (Glomerular filtration rate) was calculated with the formula: creatinine clear rate (CCR)/kidney weight (g)

<sup>#</sup> Significantly different from the control group (P < 0.05).

a,b, c Means the DM groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( P < 0.05).

表七、控制組及有或無灌食土肉桂葉精油、肉桂醛及 glibenclimide 之糖尿病大鼠骨骼肌中抗氧化及發炎指標<sup>x</sup>

**Table 7. Antioxidant and inflammatory parameters in skeletal muscle of control rats or streptozotocin-induced diabetic rats who did or did not receive CO, cinnamaldehyde or glibenclimide<sup>x</sup>**

	Control-V	DM-V	DM-COL	DM-COM	DM-COH	DM-CA	DM-GBC
TBARS (nmol/mg prot.)	0.21±0.05	0.63±0.03 <sup>#a</sup>	0.38±0.02 <sup>b</sup>	0.38±0.02 <sup>b</sup>	0.46±0.14 <sup>b</sup>	0.37±0.05 <sup>b</sup>	0.56±0.10 <sup>a</sup>
SOD (U/ mg prot.)	1.751±0.39	0.49±0.10 <sup>#a</sup>	1.42±0.29 <sup>b</sup>	1.45±0.37 <sup>b</sup>	1.00±0.12 <sup>cd</sup>	1.09±0.32 <sup>c</sup>	0.79±0.08 <sup>d</sup>
GPx (nmol NADPH/min/mg prot.)	27.6±6.3	17.7±2.8 <sup>#a</sup>	21.7±5.4 <sup>b</sup>	22.7±6.0 <sup>b</sup>	22.2±4.6 <sup>ab</sup>	24.1±4.9 <sup>b</sup>	19.4±1.4 <sup>ab</sup>
GRd (nmol NADPH/min/mg prot.)	7.50±1.28	4.43±0.87 <sup>#a</sup>	6.99±1.02 <sup>bc</sup>	6.28±1.08 <sup>b</sup>	7.63±1.11 <sup>c</sup>	6.30±1.17 <sup>b</sup>	6.49±1.27 <sup>b</sup>
Total GSH (nmol/mg prot.)	0.21±0.04	0.08±0.02 <sup>#a</sup>	0.21±0.04 <sup>bc</sup>	0.22±0.02 <sup>b</sup>	0.17±0.02 <sup>d</sup>	0.18±0.03 <sup>cd</sup>	0.16±0.03 <sup>d</sup>
IL-1 $\beta$ (pg/mg prot.)	1576±304	4200±942 <sup>#a</sup>	2287±885 <sup>b</sup>	2812±903 <sup>bc</sup>	2897±694 <sup>bc</sup>	2082±857 <sup>b</sup>	3788±858 <sup>ac</sup>
TNF- $\alpha$ (pg/mg prot.)	429±109	1586±315 <sup>#a</sup>	387±105 <sup>b</sup>	758±222 <sup>c</sup>	1113±362 <sup>d</sup>	492±128 <sup>bc</sup>	1715±418 <sup>a</sup>
NO (nmol/mg prot.)	1.20±0.31	2.18±0.37 <sup>#a</sup>	1.23±0.09 <sup>b</sup>	1.60±0.20 <sup>bc</sup>	1.66±0.18 <sup>c</sup>	1.32±0.17 <sup>bc</sup>	2.03±0.72 <sup>a</sup>

<sup>x</sup>Values are the mean  $\pm$  SD for six rats per group.

Control-V, control rats treated with vehicle; DM-V, DM rats treated with vehicle; DM-COL, DM rats treated with 12.5 mg/kg bw of CO; DM-COM, DM rats treated with 25 mg/kg bw of CO; DM-COH, DM rats treated with 50 mg/kg bw of CO; DM-CA, DM rats treated with 40 mg/kg bw of cinnamaldehyde; DM-GBC, DM rats treated with 0.6 mg/kg bw of glibenclimide.

<sup>#</sup> Significantly different from the control group (P < 0.05).

a, b, c Means the DM groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( P < 0.05).

表八、控制組及有或無灌食土肉桂葉精油、肉桂醛及 glibenclimide 之糖尿病大鼠胰臟中抗氧化及發炎指標<sup>x</sup>

**Table 8. Antioxidant and inflammatory parameters in pancreas of control rats or streptozotocin-induced diabetic rats who did or did not receive CO, cinnamaldehyde or glibenclimide<sup>x</sup>**

	Control-V	DM-V	DM-COL	DM-COM	DM-COH	DM-CA	DM-GBC
TBARS (nmol/mg prot.)	0.16±0.04	0.34±0.08* <sup>a</sup>	0.19±0.04 <sup>b</sup>	0.41±0.09 <sup>a</sup>	0.37±0.11 <sup>a</sup>	0.37±0.1 <sup>a</sup>	0.33±0.04 <sup>a</sup>
SOD (U/ mg prot.)	0.38±0.05	0.07±0.02* <sup>a</sup>	0.24±0.03 <sup>b</sup>	0.16±0.03 <sup>c</sup>	0.13±0.02 <sup>c</sup>	0.22±0.04 <sup>b</sup>	0.08±0.01 <sup>a</sup>
GPx (nmol NADPH/min/mg prot.)	42.1±9.3	39.5±11.0 <sup>a</sup>	44.7±7.5 <sup>ab</sup>	45.0±7.4 <sup>ab</sup>	49.6±9.8 <sup>b</sup>	48.8±6.8 <sup>b</sup>	44.5±5.9 <sup>ab</sup>
GRd (nmol NADPH/min/mg prot.)	22.5±1.8	11.5±1.7* <sup>a</sup>	19.0±0.7 <sup>b</sup>	14.9±1.2 <sup>c</sup>	15.9±1.6 <sup>c</sup>	17.7±1.9 <sup>b</sup>	15.5±0.8 <sup>c</sup>
Total GSH (nmol/mg prot.)	0.092±0.015	0.005±0.001* <sup>a</sup>	0.040±0.008 <sup>b</sup>	0.038±0.006 <sup>b</sup>	0.034±0.007 <sup>b</sup>	0.018±0.006 <sup>c</sup>	0.006±0.002 <sup>a</sup>
IL-1β (pg/mg prot.)	4905±1743	13287±4169* <sup>a</sup>	5284±994 <sup>b</sup>	9486±3201 <sup>c</sup>	12638±2026 <sup>a</sup>	7915±1734 <sup>bc</sup>	13008±2800 <sup>a</sup>
TNF-α (pg/mg prot.)	2048±575	4258±1266* <sup>a</sup>	2358±875 <sup>a</sup>	3326±1222 <sup>ab</sup>	3667±833 <sup>a</sup>	3924±1330 <sup>a</sup>	4272±1267 <sup>a</sup>
NO (nmol/mg prot.)	6.70±0.49	8.27±1.14* <sup>a</sup>	4.66±0.90 <sup>b</sup>	5.37±0.98 <sup>b</sup>	7.57±1.61 <sup>a</sup>	5.12±1.05 <sup>b</sup>	7.84±1.85 <sup>a</sup>

<sup>x</sup>Values are the mean ± SD for six rats per group.

Control-V, control rats treated with vehicle; DM-V, DM rats treated with vehicle; DM-COL, DM rats treated with 12.5 mg/kg bw of CO; DM-COM, DM rats treated with 25 mg/kg bw of CO; DM-COH, DM rats treated with 50 mg/kg bw of CO; DM-CA, DM rats treated with 40 mg/kg bw of cinnamaldehyde; DM-GBC, DM rats treated with 0.6 mg/kg bw of glibenclimide.

<sup>#</sup> Significantly different from the control group (P < 0.05).

a, b, c Means the DM groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( P < 0.05).



表九、控制組及有或無灌食土肉桂葉精油、肉桂醛及 glibenclimide 之糖尿病大鼠腎臟中抗氧化及發炎指標<sup>x</sup>

**Table 9. Antioxidant and inflammatory parameters in kidney of control rats or streptozotocin-induced diabetic rats who did or did not receive CO, cinnamaldehyde or glibenclimide<sup>x</sup>**

	Control-V	DM-V	DM-COL	DM-COM	DM-COH	DM-CA	DM-GBC
TBARS (nmol/mg prot.)	0.41±0.06	1.02±0.29 <sup>*a</sup>	1.15±0.11	1.15±0.26	0.96±0.23	0.91±0.15	1.12±0.07
SOD (U/ mg prot.)	0.28±0.08	0.13±0.03 <sup>*a</sup>	0.27±0.07 <sup>b</sup>	0.22±0.07 <sup>bc</sup>	0.11±0.03 <sup>a</sup>	0.17±0.04 <sup>ac</sup>	0.20±0.04 <sup>c</sup>
GPx (nmol NADPH/min/mg prot.)	61.4±6.3	45.2±7.5 <sup>*bc</sup>	57.4±4.6 <sup>a</sup>	53.4±9.7 <sup>ab</sup>	46.2±5.2 <sup>bc</sup>	53.6±10.5 <sup>ab</sup>	42.8±8.2 <sup>c</sup>
GRd (nmol NADPH/min/mg prot.)	24.2±2.5	7.07±1.09 <sup>*a</sup>	21.0±2.2 <sup>b</sup>	18.9±2.7 <sup>bc</sup>	16.9±1.6 <sup>c</sup>	20.1±3.6 <sup>b</sup>	10.4±1.6 <sup>d</sup>
Total GSH (nmol/mg prot.)	0.051±0.008	0.006±0.002 <sup>*a</sup>	0.039±0.009 <sup>b</sup>	0.026±0.005 <sup>c</sup>	0.025±0.006 <sup>c</sup>	0.018±0.007 <sup>d</sup>	0.011±0.002 <sup>ad</sup>
IL-1β (pg/mg prot.)	38198±9009	56569±12541 <sup>*a</sup>	22827±11860 <sup>b</sup>	37772±19576 <sup>b</sup>	25210±5260 <sup>b</sup>	35939±7129 <sup>b</sup>	36751±9277 <sup>b</sup>
TNF-α (pg/mg prot.)	4525±1046	5940±1568 <sup>a</sup>	4524±1242 <sup>b</sup>	4888±1069 <sup>ab</sup>	5052±1183 <sup>ab</sup>	5259±1023 <sup>ab</sup>	5578±871 <sup>ab</sup>
NO (nmol/mg prot.)	2.04±0.48	3.16±0.64 <sup>*a</sup>	2.08±0.49 <sup>b</sup>	2.09±0.34 <sup>b</sup>	2.09±0.39 <sup>b</sup>	2.03±0.41 <sup>b</sup>	2.66±0.50 <sup>c</sup>

<sup>x</sup>Values are the mean ± SD for six rats per group.

Control-V, control rats treated with vehicle; DM-V, DM rats treated with vehicle; DM-COL, DM rats treated with 12.5 mg/kg bw of CO; DM-COM, DM rats treated with 25 mg/kg bw of CO; DM-COH, DM rats treated with 50 mg/kg bw of CO; DM-CA, DM rats treated with 40 mg/kg bw of cinnamaldehyde; DM-GBC, DM rats treated with 0.6 mg/kg bw of glibenclimide.

<sup>#</sup> Significantly different from the control group (P < 0.05).

a, b, c Means the DM groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( P < 0.05).

表十、控制組及有或無灌食土肉桂葉精油、肉桂醛及 glibenclimide 之糖尿病大鼠周邊血中抗氧化及發炎指標<sup>x</sup>

**Table 10. Antioxidant and inflammatory parameters in peripheral blood of control rats or streptozotocin-induced diabetic rats who did or did not receive CO, cinnamaldehyde or glibenclimide<sup>x</sup>**

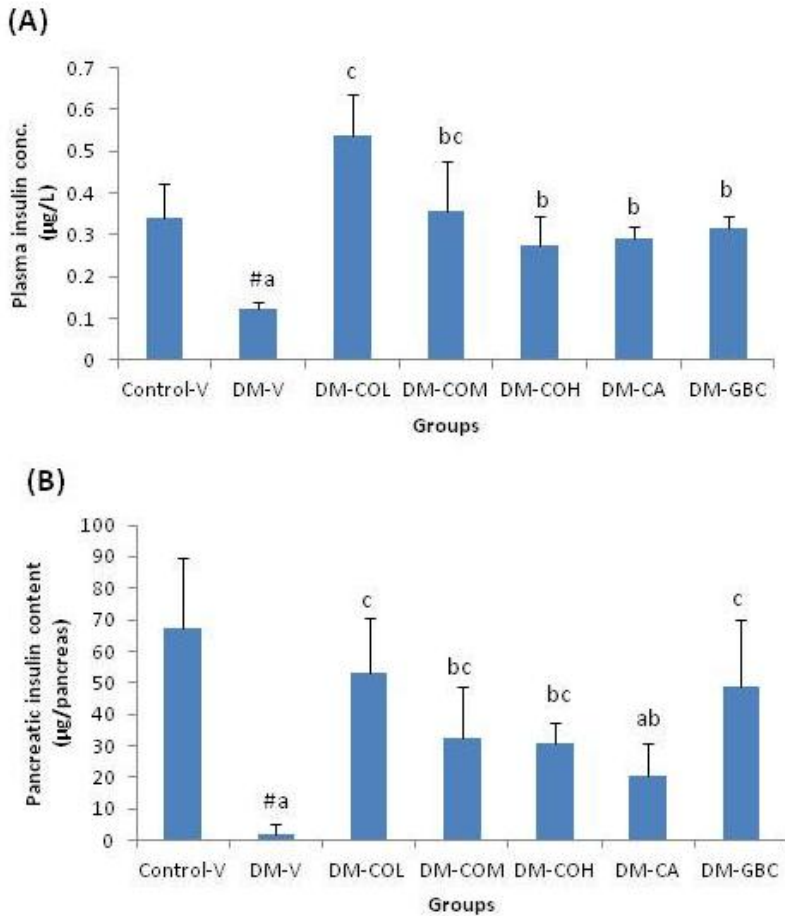
	Control	DM-CO	TC-L	TC-M	TC-H	CA	GC
TBARS (nmol / ml)	1.82±0.34	5.66±1.35* <sup>a</sup>	2.75±0.40 <sup>b</sup>	5.91±1.05 <sup>a</sup>	5.40±2.19 <sup>a</sup>	7.00±2.23 <sup>a</sup>	5.95±1.45 <sup>a</sup>
SOD (U / ml)	53.4±15.1	31.4±1.8* <sup>a</sup>	37.3±6.3 <sup>b</sup>	34.4±4.9 <sup>ab</sup>	31.6±3.4 <sup>a</sup>	30.2±1.8 <sup>a</sup>	31.5±5.0 <sup>a</sup>
GPx (nmol NADPH/min/ml)	909.6±55.9	808.9±71.9* <sup>a</sup>	903.9±39.0 <sup>a</sup>	874.4±63.2 <sup>ab</sup>	878.5±43.9 <sup>b</sup>	885.2±52.9 <sup>a</sup>	842.1±38.0 <sup>ab</sup>
GRd (nmol NADPH/min/ml)	32.5±3.0	28.1±4.1	32.3±9.1	30.5±4.7	28.8±10.6	31.9±7.5	27.5±4.4
Total GSH (nmol/ml)	1.13±0.09	0.54±0.17* <sup>a</sup>	1.08±0.12 <sup>bc</sup>	1.06±0.34 <sup>bc</sup>	0.96±0.14 <sup>b</sup>	1.33±0.34 <sup>c</sup>	0.68±0.17 <sup>a</sup>
IL-1 $\beta$ (pg/ml)	3568±760	23719±5996* <sup>a</sup>	4549±880 <sup>b</sup>	3506±1165 <sup>b</sup>	5129±1434 <sup>b</sup>	5285±1897 <sup>b</sup>	28491±7292 <sup>c</sup>
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	4405±1623	12941±4038* <sup>a</sup>	2168±1020 <sup>b</sup>	2306±728 <sup>b</sup>	3112±1022 <sup>b</sup>	2735±1525 <sup>b</sup>	4703±2366 <sup>b</sup>
NO (nmol/ml)	5.03±2.25	12.95±1.43* <sup>a</sup>	5.82±0.88 <sup>b</sup>	8.39±1.55 <sup>cd</sup>	7.75±1.06 <sup>c</sup>	9.79±2.79 <sup>d</sup>	12.02±1.51 <sup>a</sup>

<sup>x</sup>Values are the mean  $\pm$  SD for six rats per group.

Control-V, control rats treated with vehicle; DM-V, DM rats treated with vehicle; DM-COL, DM rats treated with 12.5 mg/kg bw of CO; DM-COM, DM rats treated with 25 mg/kg bw of CO; DM-COH, DM rats treated with 50 mg/kg bw of CO; DM-CA, DM rats treated with 40 mg/kg bw of cinnamaldehyde; DM-GBC, DM rats treated with 0.6 mg/kg bw of glibenclimide.

<sup>#</sup> Significantly different from the control group (P < 0.05).

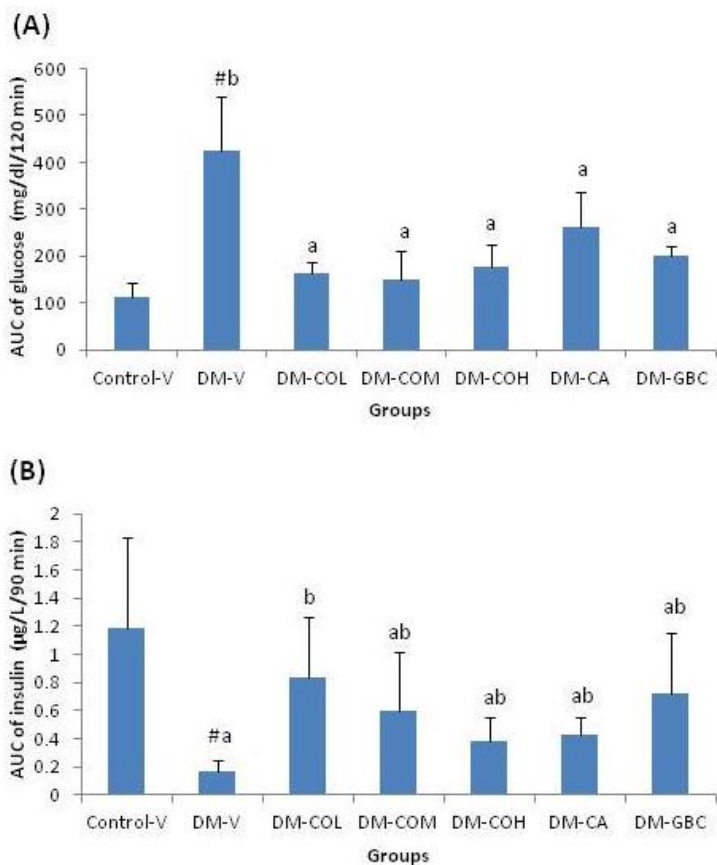
a, b, c Means the DM groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( P < 0.05).



圖一、土肉桂葉精油及肉桂醛對於糖尿病大鼠周邊血及胰臟胰島素含量之影響

Figure 1. Effect of CO and cinnamaldehyde on insulin levels in peripheral blood and in pancreas of diabetic rats

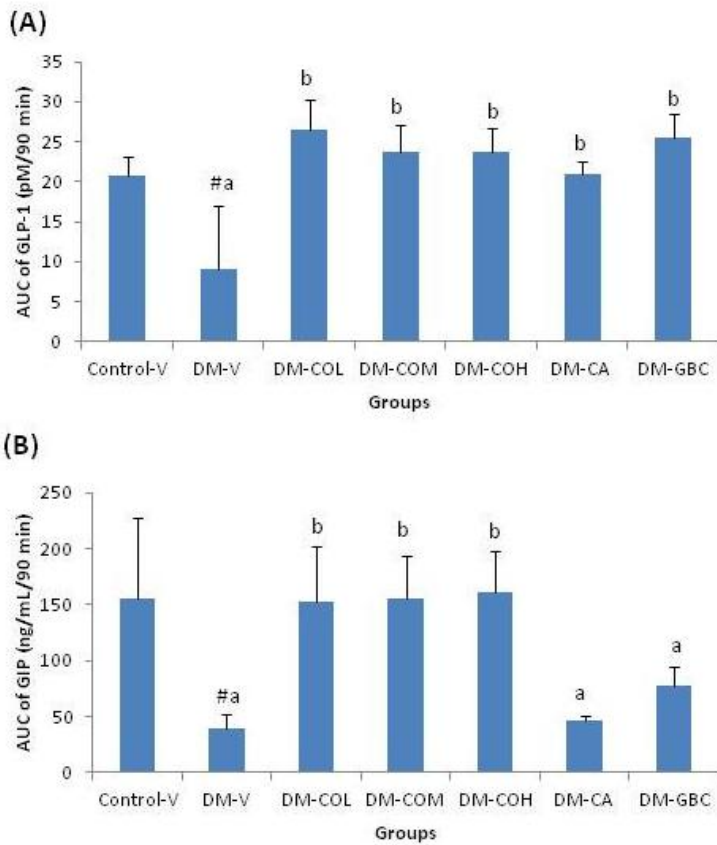
Control-V, control rats treated with vehicle; DM-V, DM rats treated with vehicle; DM-COL, DM rats treated with 12.5 mg/kg bw of CO; DM-COM, DM rats treated with 25 mg/kg bw of CO; DM-COH, DM rats treated with 50 mg/kg bw of CO; DM-CA, DM rats treated with 40 mg/kg bw of cinnamaldehyde; DM-GBC, DM rats treated with 0.6 mg/kg bw of glibenclimide. Data are means  $\pm$  SDs for six rats in each group. #Significantly different from the control ( $P < 0.05$ ). a, b, c not sharing the same letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).



圖二、土肉桂葉精油及肉桂醛對於糖尿病大鼠在 OGTT 期間血糖及血中胰島素含量之影響

Figure 2. Effect of CO and cinnamaldehyde on peripheral levels of glucose and insulin in diabetic rats during an OGTT period.

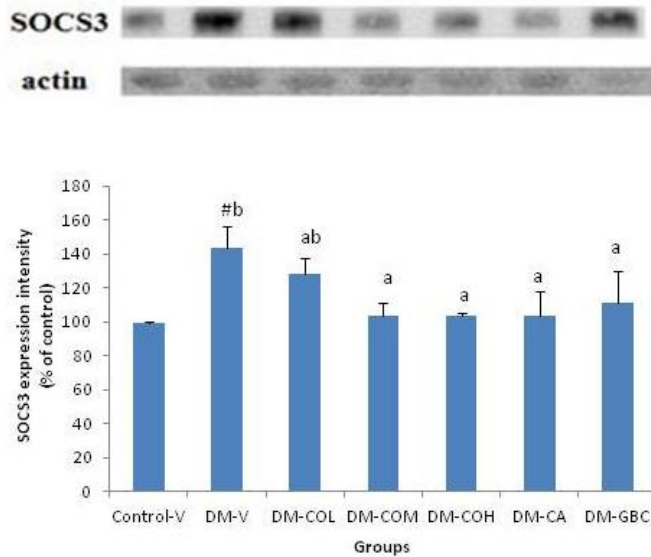
Effect of CO and cinnamaldehyde on the increment in plasma glucose (A) and on the increment in plasma insulin (B) in response to an oral glucose bolus were calculated during an OGTT period. A glucose bolus (1 g/kg body wt) was administered orally on day 17 after the induction of diabetes. Glucose was measured in plasma samples from the tail vein. Control-V, control rats treated with vehicle; DM-V, DM rats treated with vehicle; DM-COL, DM rats treated with 12.5 mg/kg bw of CO; DM-COM, DM rats treated with 25 mg/kg bw of CO; DM-COH, DM rats treated with 50 mg/kg bw of CO; DM-CA, DM rats treated with 40 mg/kg bw of cinnamaldehyde; DM-GBC, DM rats treated with 0.6 mg/kg bw of glibenclimide. Data are means±SDs for six rats in each group. #Significantly different from the control ( $P<0.05$ ). a, b not sharing the same letter are significantly different ( $P<0.05$ ).



圖三、土肉桂葉精油及肉桂醛對於糖尿病大鼠在 OGTT 期間周邊血中腸泌素含量之影響

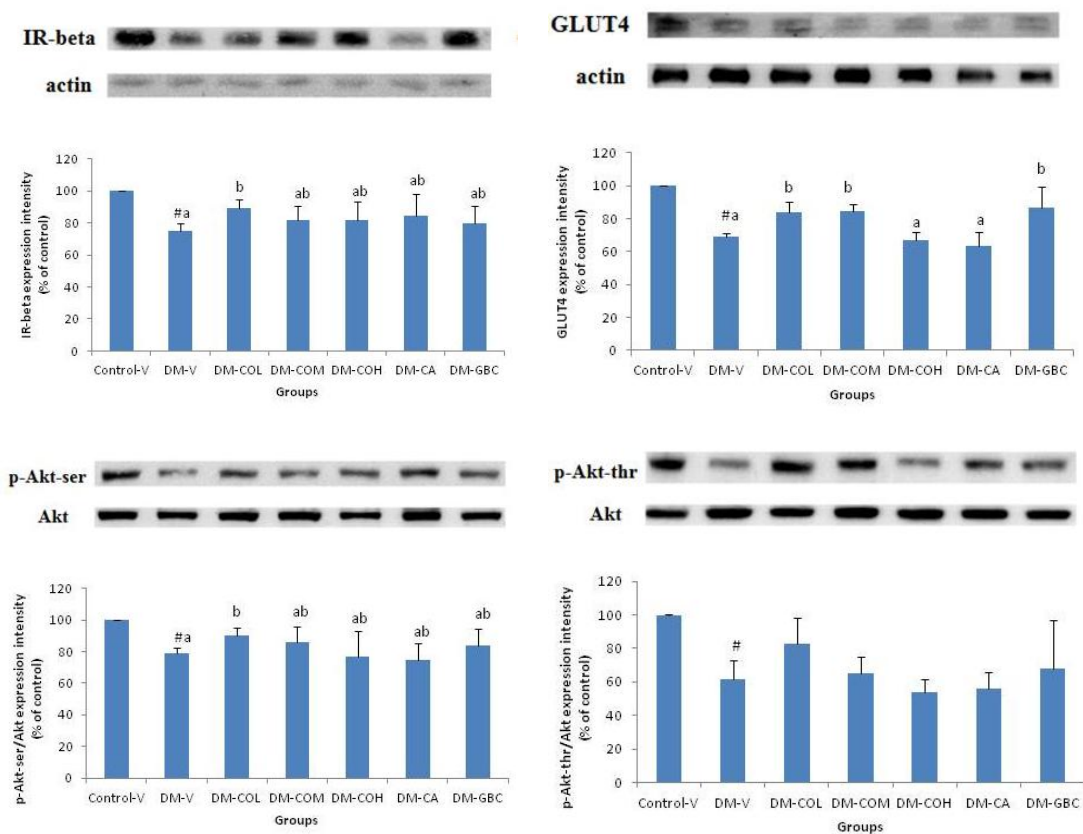
Figure 3. Effect of CO and cinnamaldehyde on peripheral levels of incretins in diabetic rats during an OGTT period.

Effect of CO and cinnamaldehyde on the increment in plasma GLP-1 (A) and on the increment in plasma GIP (B) in response to an oral glucose bolus were calculated during an OGTT period. A glucose bolus (1 g/kg body wt) was administered orally on day 17 after the induction of diabetes. Glucose was measured in plasma samples from the tail vein. Control-V, control rats treated with vehicle; DM-V, DM rats treated with vehicle; DM-COL, DM rats treated with 12.5 mg/kg bw of CO; DM-COM, DM rats treated with 25 mg/kg bw of CO; DM-COH, DM rats treated with 50 mg/kg bw of CO; DM-CA, DM rats treated with 40 mg/kg bw of cinnamaldehyde; DM-GBC, DM rats treated with 0.6 mg/kg bw of glibenclimide. Data are means±SDs for six rats in each group. #Significantly different from the control ( $P<0.05$ ). a,b not sharing the same letter are significantly different ( $P<0.05$ ).



圖四、土肉桂葉精油及肉桂醛對於糖尿病大鼠骨骼肌中 SOCS3 表現量之影響

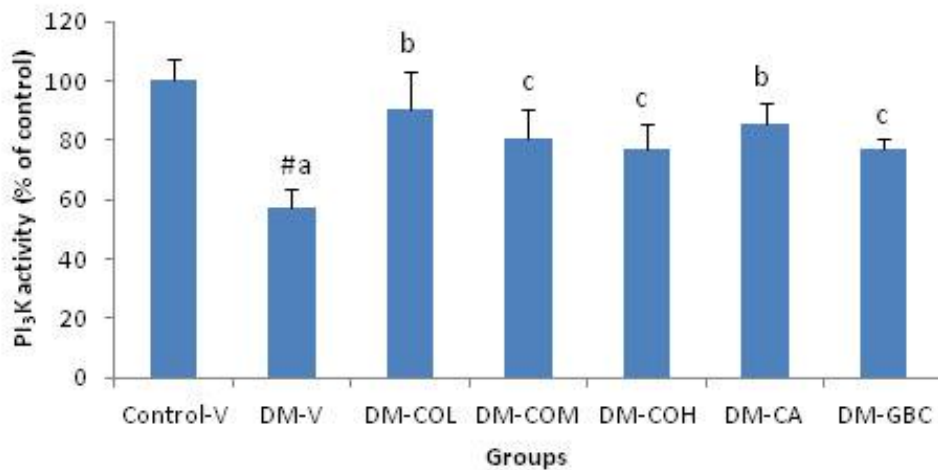
Figure 4. Effect of CO and cinnamaldehyde on the expression of SOCS3 in skeletal muscle from diabetic rats. Control-V, control rats treated with vehicle; DM-V, DM rats treated with vehicle; DM-COL, DM rats treated with 12.5 mg/kg bw of CO; DM-COM, DM rats treated with 25 mg/kg bw of CO; DM-COH, DM rats treated with 50 mg/kg bw of CO; DM-CA, DM rats treated with 40 mg/kg bw of cinnamaldehyde; DM-GBC, DM rats treated with 0.6 mg/kg bw of glibenclimide. Data are means±SDs for six rats in each group. #Significantly different from the control ( $P<0.05$ ). a, b not sharing the same letter are significantly different ( $P<0.05$ ).



圖五、土肉桂葉精油及肉桂醛對於糖尿病大鼠骨骼肌胰島素受體訊號表現及活性之影響

Figure 5. Effect of CO and cinnamaldehyde on the expression and activation of insulin receptor signaling molecules in skeletal muscle from diabetic rats.

Control-V, control rats treated with vehicle; DM-V, DM rats treated with vehicle; DM-COL, DM rats treated with 12.5 mg/kg bw of CO; DM-COM, DM rats treated with 25 mg/kg bw of CO; DM-COH, DM rats treated with 50 mg/kg bw of CO; DM-CA, DM rats treated with 40 mg/kg bw of cinnamaldehyde; DM-GBC, DM rats treated with 0.6 mg/kg bw of glibenclimide. Data are means±SDs for six rats in each group. #Significantly different from the control ( $P < 0.05$ ). a, b not sharing the same letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).

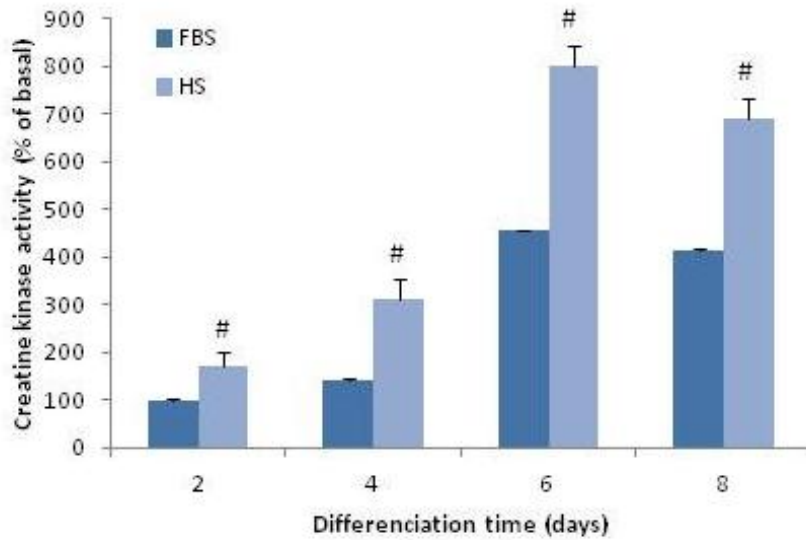


圖六、土肉桂葉精油及肉桂醛對於糖尿病大鼠骨骼肌 PI<sub>3</sub>K 活性之影響

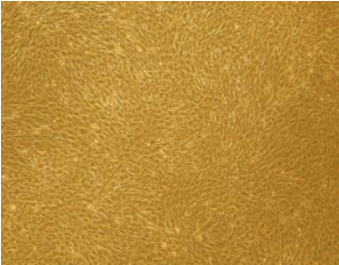
Figure 6. Effect of CO and cinnamaldehyde on the activity of PI<sub>3</sub>K in skeletal muscle from diabetic rats. Control-V, control rats treated with vehicle; DM-V, DM rats treated with vehicle; DM-COL, DM rats treated with 12.5 mg/kg bw of CO; DM-COM, DM rats treated with 25 mg/kg bw of CO; DM-COH, DM rats treated with 50 mg/kg bw of CO; DM-CA, DM rats treated with 40 mg/kg bw of cinnamaldehyde; DM-GBC, DM rats treated with 0.6 mg/kg bw of glibenclimide. Data are means±SDs for six rats in each group. #Significantly different from the control ( $P<0.05$ ). a, b, c not sharing the same letter are significantly different ( $P<0.05$ ).



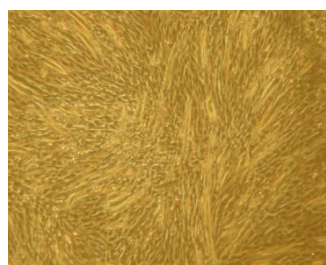
(A)



(B)



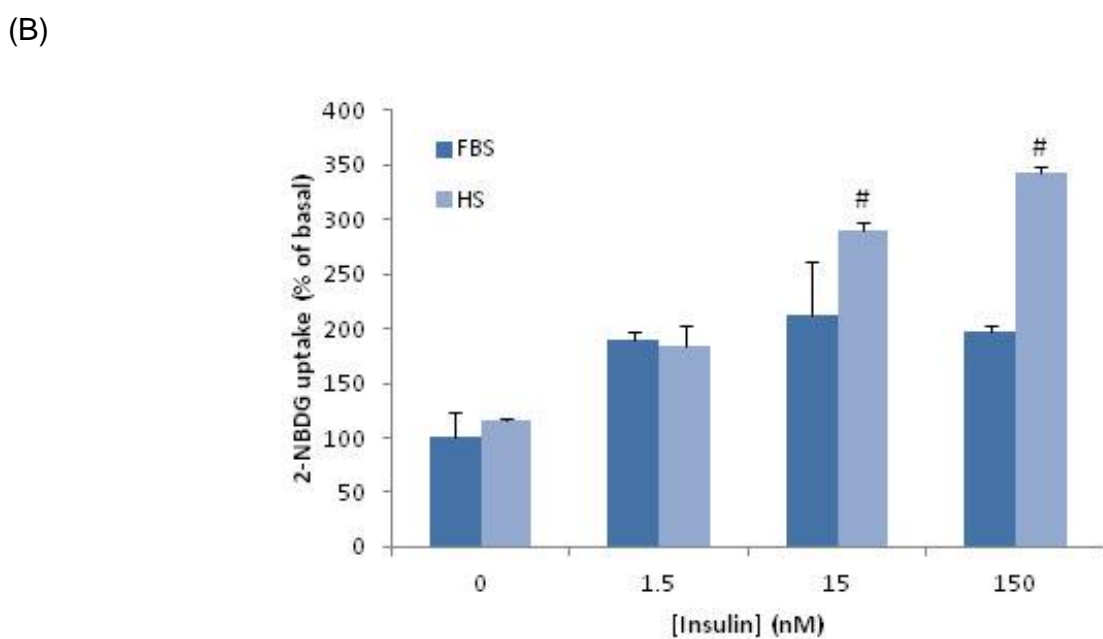
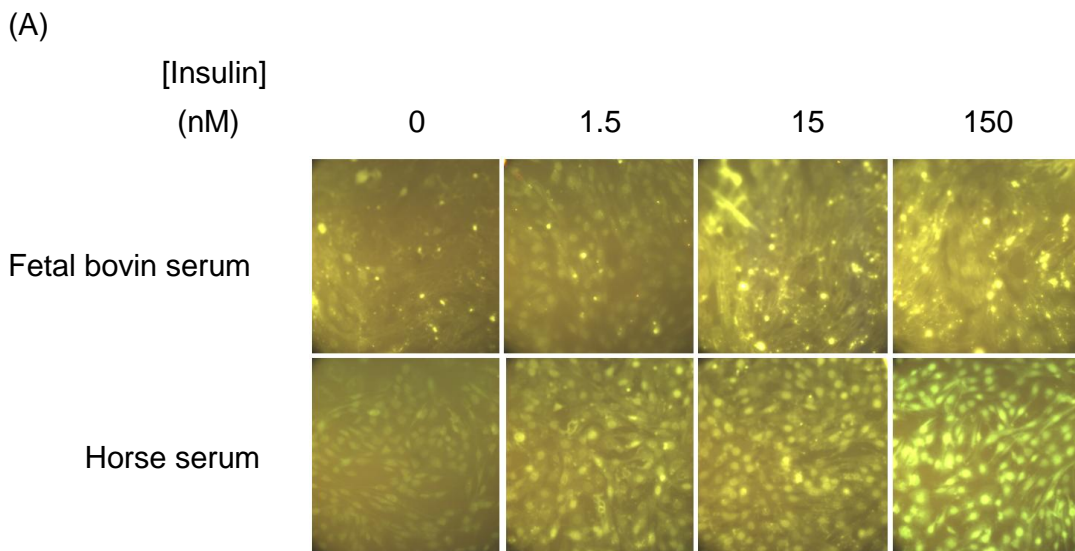
(C)



圖七、胎牛血清及馬血清誘發 C2C12 細胞分化之活性比較。

Figure 7. A comparison of the activity of fetal bovin serum and horse serum for the induction of C2C12 differentiation.

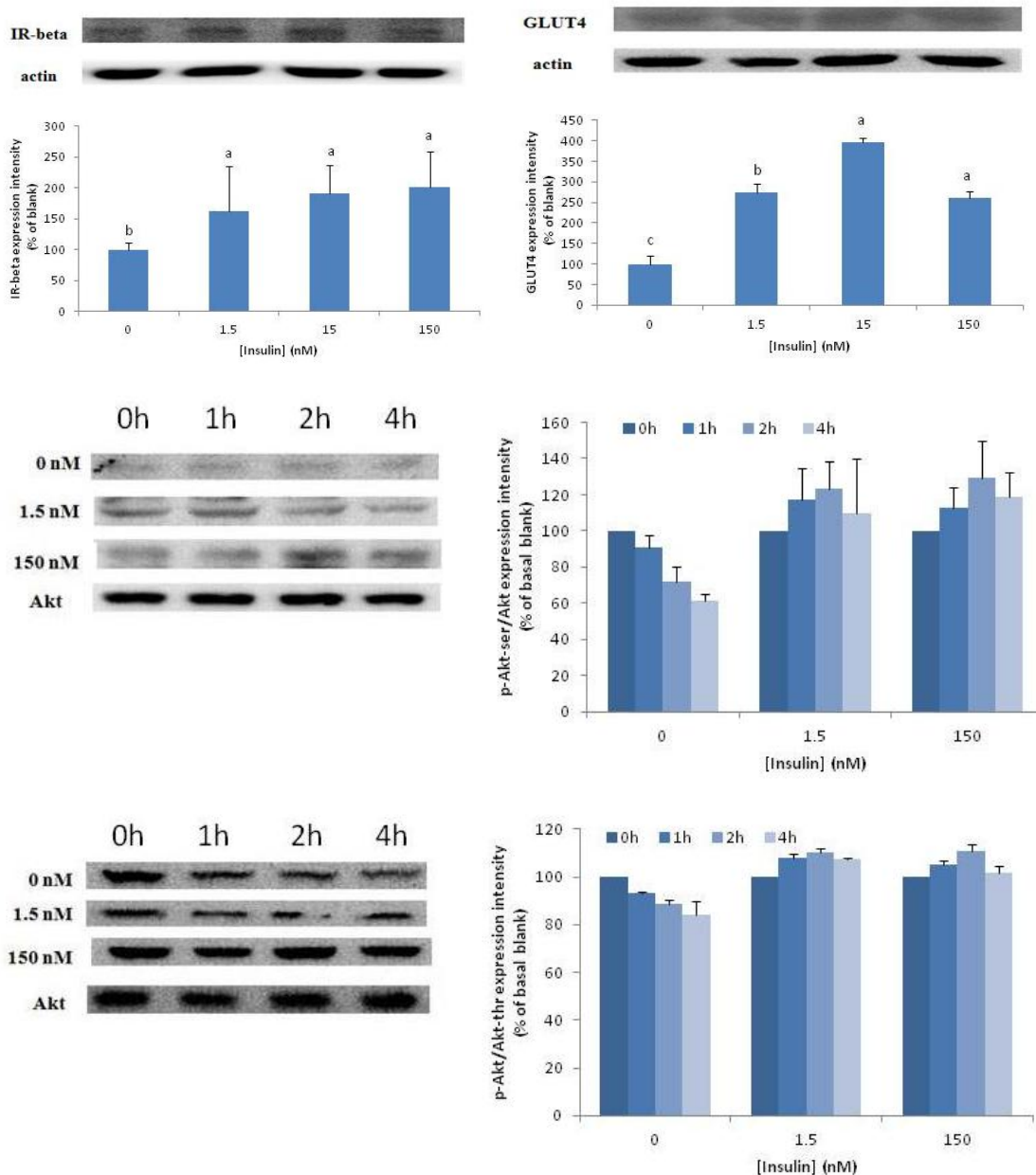
C2C12 cells were cultured in DMEM medium with the addition of fetal bovin serum or horse serum for 2, 4, 6, or 8 days followed by the determination of the marker for the differentiation of myotube which is creatine kinase activity (A). The morphology of fetal bovin serum-induced differentiation (B) and horse serum-induced differentiation (C) showed that horse serum was more active for C2C12 differentiation on day 6. Data are means $\pm$ SDs for three culture in each group. # Significantly different from the fetal bovin serum-treated group at the same day of culture.



圖八、胎牛血清及馬血清誘發之 C2C12 細胞分化對於胰島素刺激之 2-NBDG 攝取活性之影響。

Figure 8. Effect of fetal bovin serum- and horse serum-induced C2C12 cell differentiation on insulin-stimulated 2-NBDG uptake.

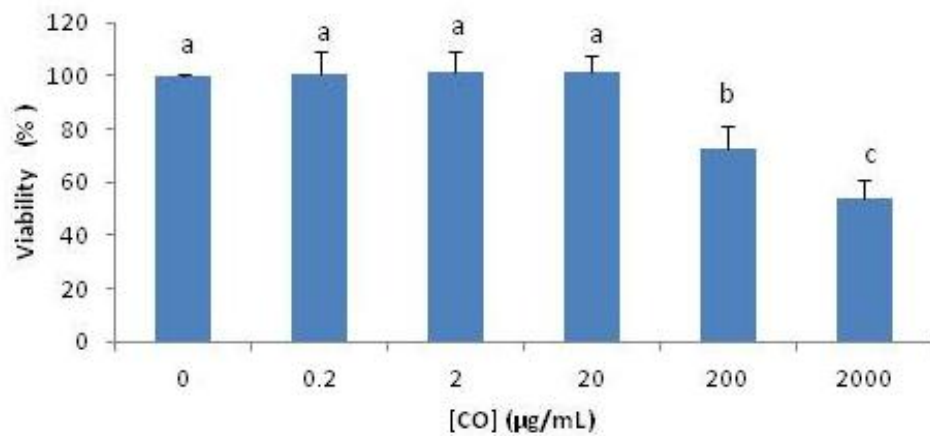
C2C12 cells were cultured in DMEM medium with the addition of fetal bovin serum or horse serum for 6 days followed by culture for 30 min in the presence of 0-150 nM of insulin with the addition of 2-NBDG in the culture medium. After the remove of the culture medium, the myotube was investigated with upright fluorescence microscope. The green fluorescence represents 2-NBDG uptaken by the myotube (A). The cells were also lysed for the quantitative determination of fluorescence in each culture with a fluorescence spectrophotometer (B). Data are means $\pm$ SDs for three culture in each group. # Significantly different from the fetal bovin serum-treated group at the same concentration of insulin.



圖九、胰島素對於 C2C12 肌管培養物胰島素受體訊號表現及活性之影響

Figure 9. Effect of insulin on the expression and activation of insulin receptor signaling molecules in C2C12 myotube.

C2C12 myotube was treated with various concentration of insulin (0, 1.5, 15, or 150 nM) for 2h followed by the determination of the expression of IR-beta and GLUT4 or for up to 4h followed by the determination of phosphorylation of Akt-ser and Akt-thr. Data are means±SDs for three culture in each group. a,b,c not sharing the same superscript letter are significantly different (  $P < 0.05$ ).

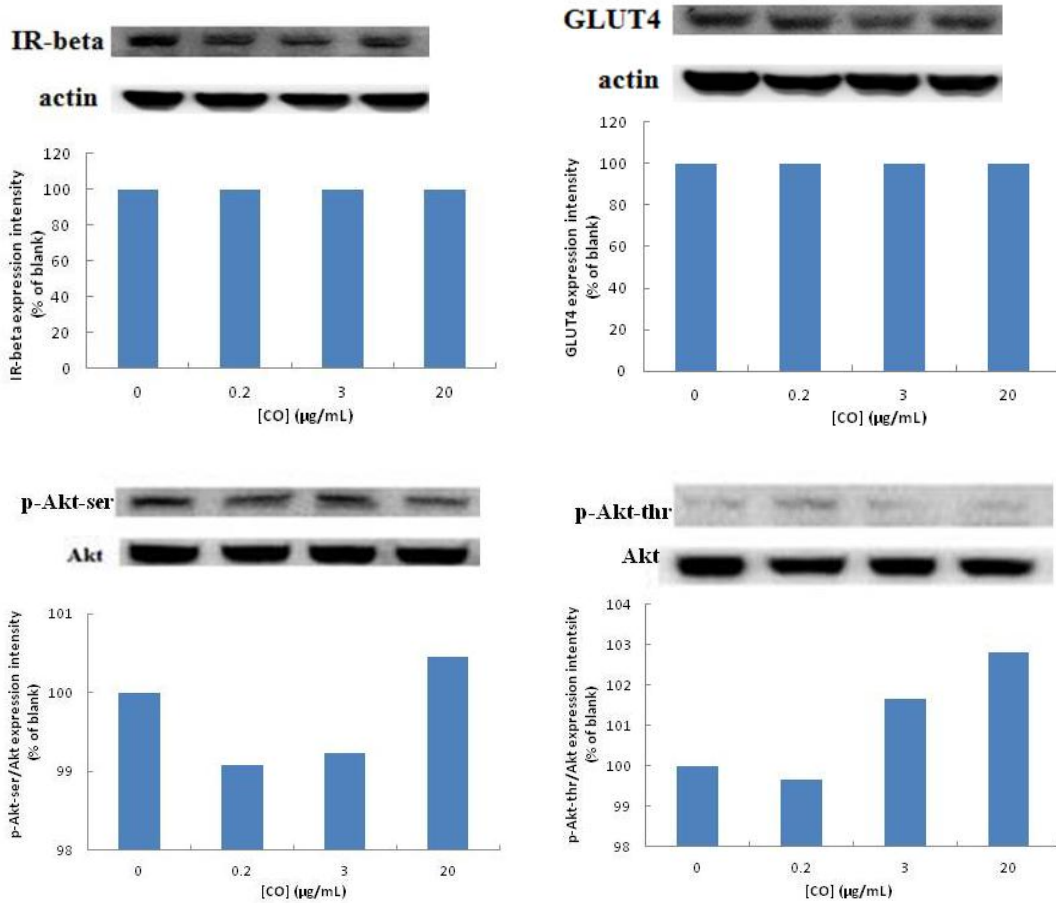


圖十、土肉桂葉精油對於 C2C12 肌管培養物存活率之影響。

Figure 10. Effect of CO on the viability of C2C12 myotube.

C2C12 myotube was treated with various concentration of CO (0, 0.2, 2, 20, 200, and 2000 µg/mL) and subsequently determined for the viability with an MTT assay kit.

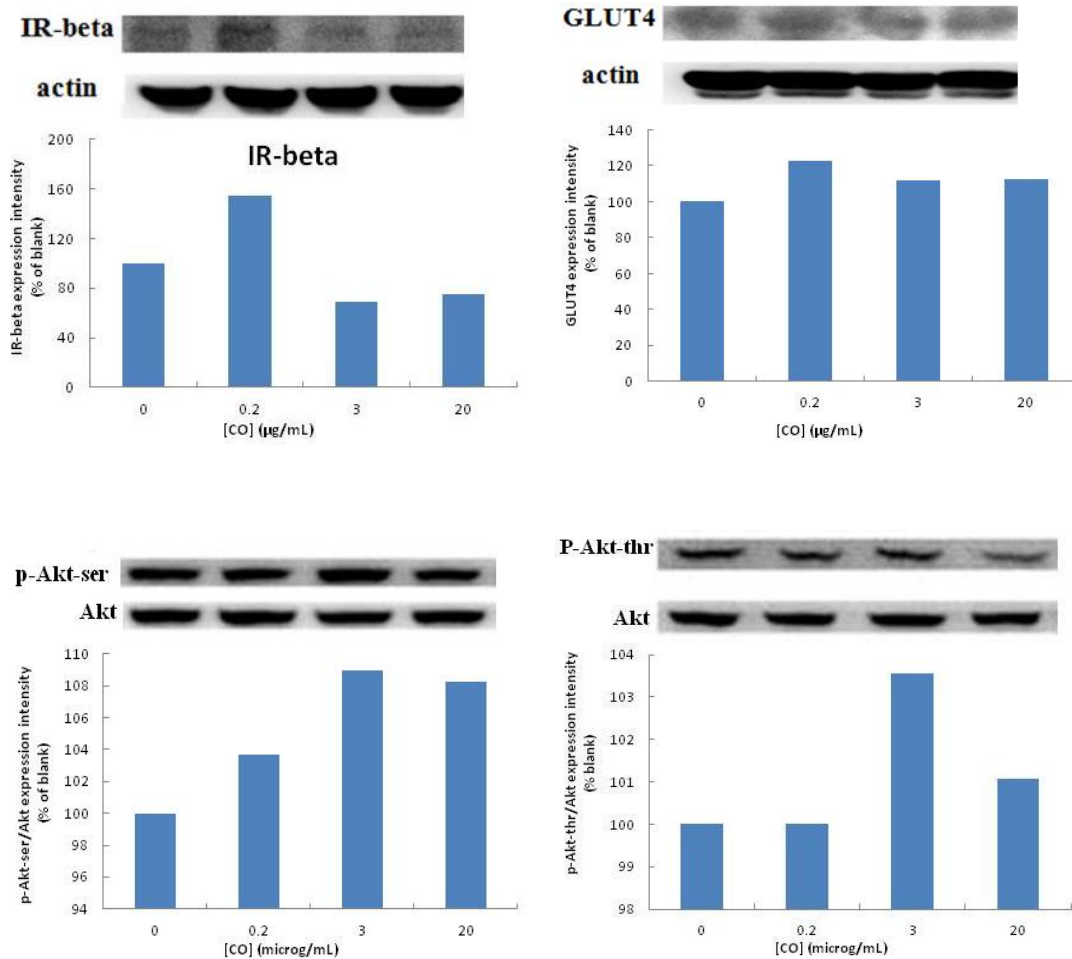
Data are means±SDs for three culture in each group. a,b,c not sharing the same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).



圖十一、土肉桂葉精油對於 C2C12 肌管培養物在無胰島素刺激下胰島素受體訊號表現及活性之影響

Figure 11. Effect of CO on the expression and activation of insulin receptor signaling molecules in C2C12 myotube in the absence of insulin.

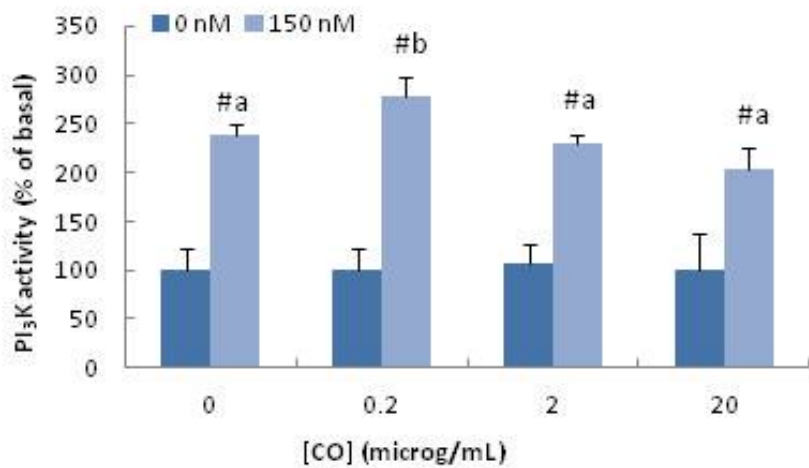
C2C12 myotube was pre-treated with various concentration of CO (0, 0.2, 2, or 20 µg/mL) and subsequently cultured for 2h in the absence of insulin followed by the determination of the expression of IR-beta and GLUT4, and the phosphorylation of Akt-ser and Akt-thr.



圖十二、土肉桂葉精油對於 C2C12 肌管培養物在胰島素刺激下胰島素受體訊號表現及活性之影響。

Figure 12. Effect of CO on the expression and activation of insulin receptor signaling molecules in C2C12 myotube stimulated with insulin.

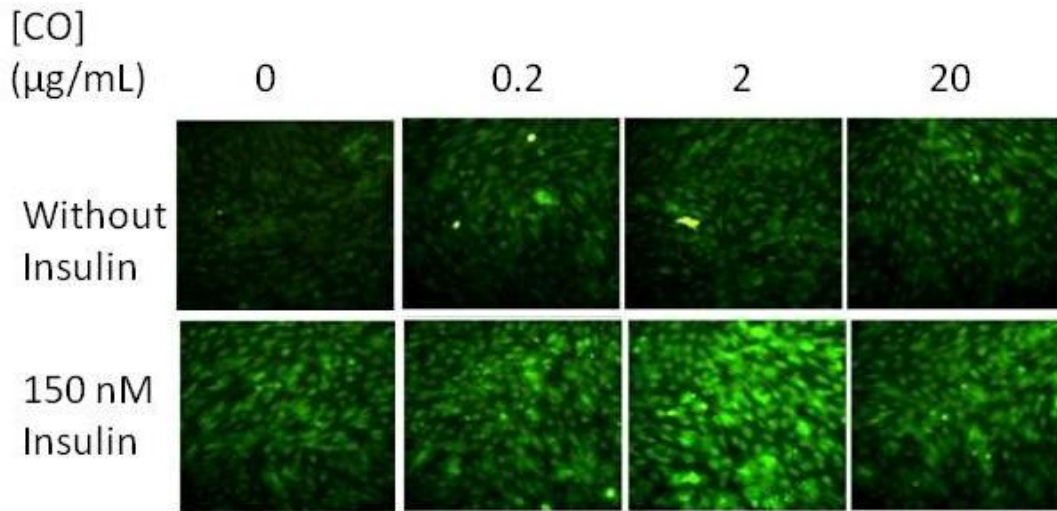
C2C12 myotube was pre-treated with various concentration of CO (0, 0.2, 2, or 20 µg/mL) and subsequently cultured for 2h in the presence of 150 nM of insulin followed by the determination of the expression of IR-beta and GLUT4, and the phosphorylation of Akt-ser and Akt-thr.



圖十三、土肉桂葉精油對於 C2C12 肌管培養物在無或有胰島素刺激下 PI<sub>3</sub>K 活性之影響。

Figure 13. Effect of CO on PI<sub>3</sub>K activity of C2C12 myotube in the absence or presence of insulin.

C2C12 myotube was pre-treated with various concentration of CO (0, 0.2, 2, or 20  $\mu$ g/mL) and subsequently cultured for 2h in the absence or presence of 150 nM of insulin followed by the determination of PI<sub>3</sub>K activity. Data are means $\pm$ SDs for three culture in each group. # Significantly different from the basal group (with the stimulation with insulin) at the same concentration of CO ( $P < 0.05$ ). a, b Means the insulin-stimulated groups not sharing the same superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ ).



圖十四、土肉桂葉精油對於 C2C12 肌管培養物在無或有胰島素刺激下攝取 2-NBDG 之影響。

Figure 14. Effect of CO on the uptake of 2-NBDG of C2C12 myotube in the absence or presence of insulin. C2C12 myotube was pre-treated with various concentration of CO (0, 0.2, 2, or 20  $\mu\text{g/mL}$ ) and subsequently cultured for 30 min in the absence or presence of 150 nM of insulin with the addition of 2-NBDG in the culture medium. After the remove of the culture medium, the myotube was investigated with upright fluorescence microscope. The green fluorescence represents 2-NBDG uptaken by the myotube.