

蔬果與中草藥發酵液對克服小鼠肝臟細胞株 FL83B 胰島素抗性的效果

Effects of fermentation extracts of fruits, vegetables and Chinese herbs in overcoming insulin resistance of mouse liver cell line FL83B

蘇江文¹、王凱弘²、許仁宏³

¹ 美和科技大學生物科技系 專題生

² 高雄醫學大學醫學研究所 博士生

³ 美和科技大學生物科技系 教授

¹ mynameisr4@yahoo.com.tw ² kevinwang0518@yahoo.com.tw
³ zhshu@meiho.edu.tw

摘要

胰島素抵抗(Insulin resistance, IR)被認為是第二型糖尿病的徵兆，當細胞產生胰島素抵抗會導致葡萄糖轉運蛋白 4 (glucose transporter type 4, GLUT4) 無法正常的對葡萄糖的吸收。本研究探討蔬果與中草藥發酵液對經誘導產生胰島素抵抗的小鼠細胞株 FL83B 的 GLUT4 和 peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) 的 mRNA 表現的影響，並觀察蔬果與中草藥發酵液是否能調控 GLUT4 和 PPAR- γ mRNA 的表現，來增加胰島素敏感性。首先以腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor - alpha, TNF- α) 誘導小鼠 FL83B 肝臟細胞產生胰島素抗性，再給予蔬果與中草藥發酵液，再以反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR) 測定 GLUT4 和 PPAR- γ mRNA 的表現。結果發現給予蔬果與中草藥發酵液 B 比對照組的 GLUT4 和 PPAR- γ mRNA 表現更為明顯，這表示蔬果與中草藥發酵液能增加 GLUT4 和 PPAR- γ 的表現，從而增加細胞對胰島素的敏感性。

關鍵字: 胰島素抗性、第二型糖尿病、蔬果與中草藥發酵液、GLUT4、PPAR- γ

ABSTRACT

Insulin resistance is a physiological condition where insulin, a natural hormone, becomes less effective in lowering blood sugars, will lead to abnormal in or incapable of glucose uptake by glucose transporter type 4, (GLUT4), and thus has been recognized as the preliminary symptom of diabetes mellitus Type 2. The experiment is aimed to find out the effects of fermentation extracts from fruits, vegetables and Chinese herbs, by treating induced insulin resistance rat liver cells FL83B, on mRNA expressions of GLUT4 and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) as well as the regulation of insulin resistance. The results shows that fermentation extracts of fruits, vegetables and Chinese herbs are effective in up-regulating the mRNA of GLUT4 和 PPAR- γ , and thus increase the sensitivity of cells responding to insulin.

Keyword: Insulin resistance, diabetes mellitus Type 2, GLUT4, PPAR- γ

前言

第二型糖尿病是一種常見的慢性病，罹患的人數則逐年增加，同時也是國人最常罹患的慢性病及主要死因，行政院衛生署公佈，2010年國人糖尿病為十大死因中第五位，大約90%糖尿病為第二型糖尿病(Zimmet et al., 2001)。

第二型糖尿病患者患病之前約有10至20年間會先出現胰島素抗性，而第二型糖尿病患者皆有胰島素抗性。因此胰島素抗性被認為是一個可能會發展成第二型糖尿病的前兆(Lillioja et al., 1988)。

胰島素抗性是骨骼肌、脂肪組織和肝臟等周邊組織的胰島素接受器(insulin receptor)訊息無法傳遞，使胰島素的敏感性下降(Bell and Polonsky, 2001; Fujimoto, 2000)，葡萄糖轉運蛋白(GLUT4)則無法正常的吸收葡萄糖，使得β細胞不斷大量的分泌胰島素，長期下來，最後導致β細胞的衰竭，胰島素分泌下降，引起明顯的糖尿病症狀(Hayden, 2002; Saltiel et al., 2001)

Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)為核激素受體家族之一，可使細胞的GLUT4的合成增加，使得細胞處理葡萄糖的能力增加，進而降低血中的葡萄糖。(Steven et al., 2003)

本研究選擇小鼠肝臟細胞株FL83B，此細胞株不必分化就具有胰島素敏感性，並以TNF- α (20ng/ml)處理細胞4小時，使細胞產生胰島素抗性(Cheng et al., 2008)，以蔬果與中草藥發酵液來觀察，是否能調控GLUT4和PPAR- γ mRNA的表現，來增加胰島素敏感性。

材料

一、細胞培養(cell culture)

FL83B上皮細胞(FL83B epithelial)為老鼠肝臟細胞，由生物資源保存及研究中心購得，ATCC編號為CRL-2390，BCRC編號為60325。以含有10% FBS與1X antibiotic的DMEM生長培養於37. C，5% CO₂之培養箱，2~3天需跟換一次培養溶液。

二、蔬果與中草藥發酵液(由萬寶祿生技公司提供)

發酵液名	蔬果與中草藥發酵液 A	蔬果與中草藥發酵液 B
主要原料	檸檬、鳳梨、蘋果、胡蘿蔔、甘藷葉、青花椰菜、高麗菜、山藥、金線蓮、決明子、魚腥草、明日葉、紫蘇、香椿、月見草、枸杞、冬蟲夏草、雪蓮花。	白花草、穿心蓮、茯苓、夏枯草、紅棗、人參、明日葉、香椿、月見草、魚腥草、決明子、雪蓮花、高麗菜、山藥、青花椰菜、甘藷葉、胡蘿蔔、鳳梨、蘋果、檸檬。

試驗相關藥品

名稱	廠商	Cat.No.
Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12 (Ham)1X	Invitrogen	11330-032
0.5% Trypsin-EDTA 10X	Invitrogen	15400-054
Antibiotic-Antimycotic100X	Invitrogen	15240-062
Fetal Bovine Serum, qualified	Invitrogen	10437-028
Phosphate Buffered Saline 10X	Invitrogen	70013-032
TNF-a from mouse, recombinant, expressed in E. coli cell culture tested	Sigma	T7539-UG
Insulin, form bovine pancreas	Sigma	I1882-100MG
TRIZOL® Reagent	Invitrogen	15596-018
Dimethyl sulphoxide (DMSO) Hybri-max®	Sigma	RNBB1137
SuperScript® III	Invitrogen	11752-050
2x Redy Master Mix Red	Bioman	TAQ-2001-1
Chloroform	Sigma	32211
Isopropyl alcohol (IPA)	Merck	1.09634.2500

方法

一、細胞存活濃度

為了測試 FL83B 細胞株在蔬果與中草藥發酵液 A 或 B 的存活濃度而進行此試驗。

本試驗共有 12 個濃度，除了對照不加發酵液以外，其餘 11 個濃度分別為：0、 1×10^{-4} 、 5×10^{-4} 、 1×10^{-3} 、 2×10^{-3} 、 5×10^{-3} 、 1×10^{-2} 、 2×10^{-2} 、 5×10^{-2} 、 1×10^{-1} 、 1.5×10^{-1} 和 2×10^{-1} 。

在 6 well 的培養皿，置入 5×10^4 個 FL83B 上皮細胞，待 24 小時細胞充分附著後，更新培養基，並同時給予不同濃度的蔬果與中草藥發酵液 A 或 B，每個濃度三重複。24 小時後把培養液吸出，各加入 7 ml trypsin (10 % 10 x trypsin、10 % 10 x PBS、80 % distilled water) 到各組中，待反應 10 分鐘後均勻打散，取約 10 μ l 至血球計數器計算細胞數量。以存活率 70 % 以上的濃度為試驗濃度。

二、蔬果與中草藥發酵液對 FL83B 之基因表現

為了觀察蔬果與中草藥發酵液對 FL83B 的基因表現，所以進行以下的試驗。

1. 細胞藥物處理

在 6 well 的培養皿，置入 5×10^5 個 FL83B 上皮細胞，待 24 小時後細胞充分附著，更新培養基，並同時給予不同的藥品，包含 insulin、TNF- α 、蔬果與中草藥發酵液 A 或蔬果與中草藥發酵液 B。

分為 12 種處理如下表。除添加 TNF- α 處理，另外先給予 4 小時反應外，其他處理都在添加藥品反應 24 小時後抽取 RNA。

藥品 處理	Insulin 100 nM/ml	TNF- α 20 ng/ml	蔬果 與中 草藥 發酵 液 A (FA)	蔬果 與中 草藥 發酵 液 B (FB)
Control	-	-	-	-
Insulin	+	-	-	-
TNF- α	-	+	-	-
IR + Insulin	+	+	-	-
IR + FA	-	+	5×10^{-4}	-
IR + FB	-	+	-	5×10^{-4}

2. RNA 抽取

將欲抽取 RNA 的細胞，先用 PBS 清洗過一次後，加入 1 ml TRIZOL reagent 靜待約 5 分鐘使細胞被完全分解，吸取至 eppendorf tube，並加入 0.2 ml chloroform，均勻震盪使溶液呈粉紅色，室溫靜置 3 分鐘後離心 12,000 g 15 分鐘，吸取上清透明水層溶液至另一個 eppendorf tube 中，加入 0.5 ml IPA 沉澱 RNA，混和均勻後適溫靜置 10 分鐘，離心 12,000 g 10 分鐘使 RNA 沉至管底，到去上清液後加入 75 % 酒精清洗殘餘的 IPA，均勻混和後離心 12,000 g 5 分鐘，移除酒精並在加入 75% 酒精，均勻混和後離心 12,000 g 5 分鐘，移除酒精並在 laminar flow 中乾燥 RNA 10 分鐘，並以無菌水回溶 RNA，以無菌水稀釋 RNA 並置於分光光度計測定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 讀值以計算 RNA 含量，之後進行 cDNA 的製備。

3. cDNA 製備

cDNA 製備依據 Invitrogen 廠商代理的 SuperScript® III (Cat. No. 11752-050) 流程，取 10 μ l 2x RT Reaction Mix (includes oligo(dt)₂₀ (2.5 M)、random hexamers (2.5 ng/ μ l)、10 mM MgCl₂、dNTPs) 和 RT Enzyme Mix (includes Superscript™ III、RNaseOUT™) 至 tube 中，加入 2 μ g RNA，並以無菌水定量至 20 μ l，進行反轉錄做用於 25 °C 10 分鐘，之後 50 °C 30 分鐘，最後於 85 °C 5 分鐘，置於 4 °C 加入 1 μ l E. coli RNase H 作用於 37 °C 20 分鐘。反轉錄製後儲存於 -80 °C，之後進行 PCR。

4. 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

本試驗所用的 primer 由 Genemessenger 生技公司合成，序列如下：

Actin F	5'-GGCCTCACTGTCCACCTTCCAG-3'
Actin R	5'-GACGCGACCATCCTCTCTTAG-3'
GLUT4 F	5'-GCCTGCCCCGAAAGAGTCTAAAG-3'
GLUT4 R	5'-CAGAGCCACGGTCATCAAGATG-3'
PPAR- γ F	5'-AAGGCGAGGGCGATCTTGACAG-3'
PPAR- γ R	5'-GGCCAGCATCGTGTAGATGATC-3'

PCR 反應為 7.5 μ l 2x Redy Master MixRed、10 μ M forward primer、10 μ M reverse primer、2 μ g cDNA，補水至總體積為 15 μ l。

反應條件為 94°C 反應 5 分鐘之後，以 94°C 45 秒、59°C 30 秒、72°C 1 分 30 秒反應，反覆循環 35 cycles，最後以 72°C 5 分鐘做為結束。

5. 瓊明膠膠體電泳(Agarose Gel Electrophoresis)

電泳使用的緩衝液為 1x TBE buffer，膠體為 3 %。

將PCR產物放入膠體上的well，另取標示用核酸(molecular weight marker)作對照。以100伏特進行電泳約40分鐘，將膠體置入ethidium bromide (0.5 µg/ml TBE) 溶液中染色，再在UV下判讀並照相。

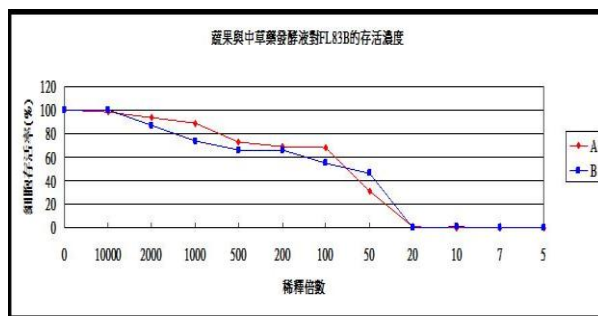
三、 間接免疫螢光染色(Indirectimmunofluorescence)

將蓋玻片置於 6 well Plate，植入細胞 1 x 10⁵ 個細胞，待 24 小時細胞貼附後，加入不同藥物處理 24 小時，共分四組: Control、TNF-α 20 ng/ml、TNF-α 20 ng/ml + insulin 100 nM、TNF-α 20 ng/ml + insulin。加入 4 % (v/v) paraformaldehyde 溶液(pH 7.4)，室溫固定 30 分鐘，之後以 PBS 清洗 3 次。接著加入 1 % horse serum blocking 1 小時，之後加入 anti-GLUT-4 and anti-Na+/K+ ATPase antibody 於室溫 1 小時，之後用 PBS 清洗三次，加入 Anti-goat-IgG-cy5 and Anti-Rabbit-IgG-cy 3 antibody 處理 1 小時，之後用 PBS 清洗三次。再加入 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)反應 5 分鐘，以 PBS 清洗一次，最後加入 mounting medium 封片，再以螢光顯微鏡觀察。

結果

一、 蔬果與中草藥發酵液對 FL83B 存活濃度

如圖一所示，以12種濃度測試細胞存活濃度，50倍稀釋濃度為到達1/2細胞致死的濃度，而20倍稀釋濃度為致死濃度，最後以稀釋2,000倍(存活率70%)的濃度進行後續試驗。

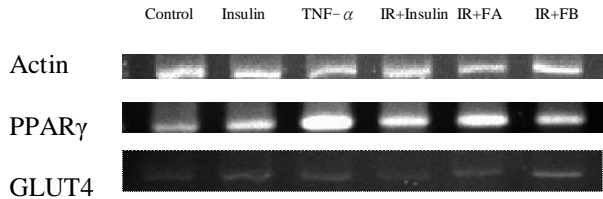


圖一：以12種濃度分析細胞存活濃度，50倍稀釋濃度為到達1/2細胞致死的濃度，而20倍稀釋濃度為致死濃度

度為致死濃度，最後以稀釋2,000倍(存活率70%)的濃度進行後續試驗。

二、 蔬果與中草藥發酵液對 FL83B 之基因表現

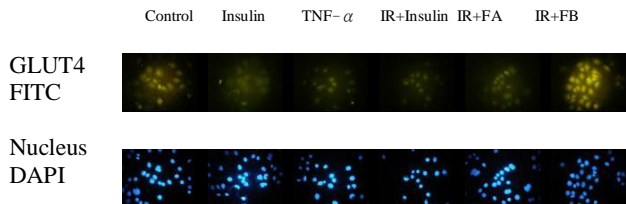
結果如圖二所示，顯示蔬果與中草藥發酵液不僅能修復胰島素接受器(insulin receptor)基因表現，而且可以促進PPAR-γ和GLUT-4基因表現量，其中以中草藥發酵液B (FB)的表現較優越。



圖二：RT-PCR觀察蔬果與中草藥發酵液對PPAR-γ和GLUT-4基因表現的影響。

三、 免疫螢光染色觀察蔬果與中草藥發酵液 B 對 GLUT-4 接受器的表現。

在於免疫螢光圖三所示，可以發現到Insulin、TNF-α、IR+Insulin 的表現在這當中表現較為不明顯，而蔬果與中草藥發酵液可以促進GLUT-4接受器的表現能力，尤為FB更為優越。



圖三：免疫螢光染色觀察蔬果與中草藥發酵液B對GLUT-4接受器的表現。結果顯示蔬果與中草藥發酵液B可以促進GLUT-4接受器的表現。

結論與討論

糖尿病為世界最常見的疾病之一，大約 90% 糖尿病為第二型糖尿病(Zimmet et al., 2001)。而第二型糖尿病患者發病前都會有胰島素抗性發生(Lillioja et al., 1988)。胰島素抗性也會帶來各種的代謝相關的疾病，對於醫療資源來說，也是一種負擔，解決胰島素抗性的問題，則可預防糖尿病的發生。本試驗在於基因和細胞層面初步結果證實蔬果

與中草藥發酵液具有克服胰島素抗性的能力，並預防糖尿病的發生。未來將會針對蔬果與中草藥發酵液 B 之詳細作用機制加以探討，應可發展成為治療或輔助糖尿病治療的保健食品。

參考文獻

1. Zimmet, P., K. G. M. M. Alberti, and J. Shaw. 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414:781-787.
2. Lillioja, S., D. M. Mott, B. V. Howard, P. H. Bennett, H. Yki-Jarvinen, D. Freymond, B. L. Nyomba, F. Zurlo, B. Swinburn, and C. Bogardus, 1988 Impaired glucose tolerance as a disorder of insulin action. Longitudinal and cross-sectional studies in Pima Indians, *N. Engl. J. Med.* 318:1217-1225.)
3. Bell, G. I. and K. S. Polonsky. 2001. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in β -cell function. *Nature* 414:788-791.
4. Fujimoto, W. Y. 2000. The importance of insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Am. J Med.* 108: 9S-14S.
5. Hayden, M. R. 2002. Islet amyloid, metabolic syndrome, and the natural progressive history of type 2 diabetes mellitus. *J. Pancreas.* 3:126-138.
6. Saltiel, A. R. and C. R. Kahn. 2001. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806.
7. Steven G, Anutosh R, Mary J, William H, Mirza A, Elyse S, Joseph S, Gary I, Stephen R. 2003. Aripiprazole an antipsychotic with a novel mechanism of action and risperidone vs placebo in patients with schizophrenia and schizoaffective disorder *Arch. Gen. Psychiatry* 60:681-690
8. Cheng, H.-L., H.-K. Huang, C.-I Chang, C.-P. Tsai and C.-H Chou. 2008. A cell-based screening identifies compounds from the stem of *Momordica charantia* that overcome insulin resistance and activate AMP-activated protein kinase. *J. Agric. Food Chem.* 56:6835-6843