

出國報告（出國類別：實習）

赴美國哈佛醫學院 Joslin diabetes center
實習脂肪細胞調控對糖尿病標靶診療
藥物開發之應用研究

服務機關：核能研究所

姓名職稱：王屏燕 助理研究員

派赴國家：美國

出國期間：105 年 10 月 9 日~105 年 12 月 9 日

報告日期：106 年 1 月 9 日

摘要

本次國外公差之目的地為到美國哈佛醫學院Joslin diabetes center 的曾玉華教授實驗室 (Tseng Lab) 進行『脂肪細胞調控對糖尿病標靶診療藥物開發之應用研究』之實習。本次出國實習主要目的是學習小鼠及人類脂肪細胞的培養分化技術及功能性測試，包括Oil red staining、oxygen consumption test、glucose uptake及fatty acid uptake and fatty acid oxidation。可應用作為本所發展糖尿病診療標靶藥物之篩選平台。另外，透過實際參與該中心定期討論會，收集最新褐色脂肪活性調控分子、調控機制之最新研究成果，以期對本所糖尿病診療新穎標靶分子之開發提供助益。

曾玉華教授藉由低溫刺激的血清分析研究發現了多個具調控特性的lipid稱為lipokine，能增進褐色脂肪的活化、血中三酸甘油脂的代謝及胰島素的感受性等，為褐色脂肪對代謝的影響的新途徑，為相當新穎的研究成果。而在實習期間參與之研討會也提及了褐色脂肪細胞所產生的exosomal miRNA對肝臟也具有調控之作用。另外也有使用Mirabegron活化褐色脂肪之臨床試驗結果。本次出國實習收穫豐碩，期盼能增進本所新藥研發能力，並對本所未來研究發展有所助益。本次出國實習期程自105年10月9日至105年12月9日，共計62天。

目 次

摘 要	i
一、目 的	1
二、過 程	2
三、心 得	3
四、建 議 事 項	29
五、附 錄	31

一、目的

糖尿病是全球人類健康的第三大威脅，僅次於癌症與心血管疾病，世界衛生組織更將 2016 年的主題定為”打敗糖尿病”，根據統計預測第二型糖尿病病患到 2030 年將超過 5.8 億人，相關醫療支出超過 7,700 億美元。由於目前的降血糖藥物有低血糖、體重增加、肝腎毒性等副作用，新穎診療技術有其必要性與急迫性；曾玉華（Tseng Yu-Hua）教授是國際著名的代謝病學專家，領導哈佛大學醫學院 Joslin 糖尿病中心肥胖和激素研究部門，2010 年被評為哈佛大學醫學領域的 Eleanor and Miles Shore 榮譽學者，其研究團隊發現了調控棕色脂肪生成的一種關鍵機制，褐色化的脂肪細胞，可增加葡萄糖及脂肪的代謝，降低血糖濃度，並消耗多餘熱量，對抗肥胖。透過調節褐色脂肪的生成機制而增加棕色脂肪形成，對於治療肥胖及代謝性疾病為相當具有潛力的新治療方法。其中已知褐色脂肪可增加葡萄糖及脂肪的代謝，降低血糖並對抗肥胖，因此引發褐色脂肪相關標靶診療藥物的研究熱潮，包括以褐色脂肪靶向性胜肽攜帶糖皮質激素抑制劑來促進褐色脂肪功能。透過開發受體標靶藥物攜帶活化褐色脂肪因子，可以是一種有效打敗糖尿病之醫療策略。

因此為了本所未來對糖尿病診療新穎標靶分子之開發及相關應用研究，本次前往實習的內容有：白色脂肪及褐色脂肪細胞之培養、分化技術以及脂肪細胞的功能性測試，可作為本所發展糖尿病診療標靶藥物之篩選平台，經過修飾或消化裁切之胜肽及天然物可利用脂肪細胞篩選系統評估其有效性。此外，並實際參與該中心定期討論會，收集最新褐色脂肪活性調控分子資料及機制探討等，汲取褐色脂肪與疾病調控之最新研究成果。將有助於未來針對糖尿病及其併發症之相關標靶之開發及相關合作研究產出，期待對本所糖尿病診療新穎標靶分子之開發提供助益。

二、過 程

本次出國實習於 105 年 10 月 9 日桃園出發，經美國紐約轉機於 10 月 10 日抵達實習所在地美國麻州波士頓市，開始為期 2 個月之實習行程。期間並參與「The 3rd BBDC-Joslin-UCPH Conference」糖尿病的細胞機制與細胞治療研討會。並於 12 月 7 日結束實習。12 月 9 日返抵國門。詳細實習行程如下表：

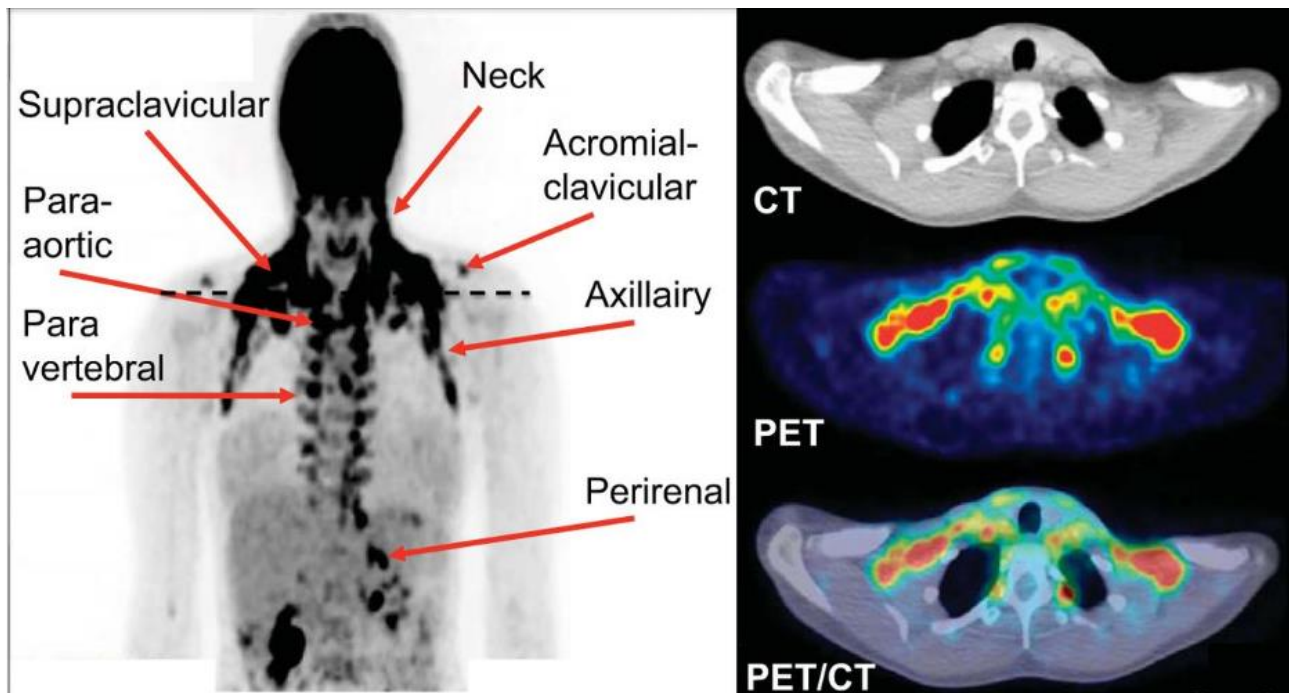
姓名	王屏燕		出國期間	自 105 年 10 月 9 日 至 105 年 12 月 9 日 計 62 天			
出國事由	赴美國波士頓哈佛大學醫學院 Joslin 糖尿病中心研習脂肪細胞調控對糖尿病標靶診療藥物開發之應用研究						
行 程			公差地點		工 作 內 容		
月	日	星期	地 點		國名	地 名	
			出 發	抵 達			
10	9	日	桃園	波士頓	美國	波士頓	去程
10-11	10-9	一 三			美國	波士頓	脂肪細胞調控對糖尿病標靶診療藥物開發之應用研究
11-11	10-12	四 六			美國	波士頓	The 3rd BBDC-Joslin-UCPH Conference : Cellular Mechanisms and Cell-Based Therapy of Diabetes
11-12	13-7	日 三			美國	波士頓	脂肪細胞調控對糖尿病標靶診療藥物開發之應用研究
12	8-9	四 五	波士頓	桃園	中華民國	桃園	回程

三、心得

(一)褐色脂肪細胞與疾病之相關性

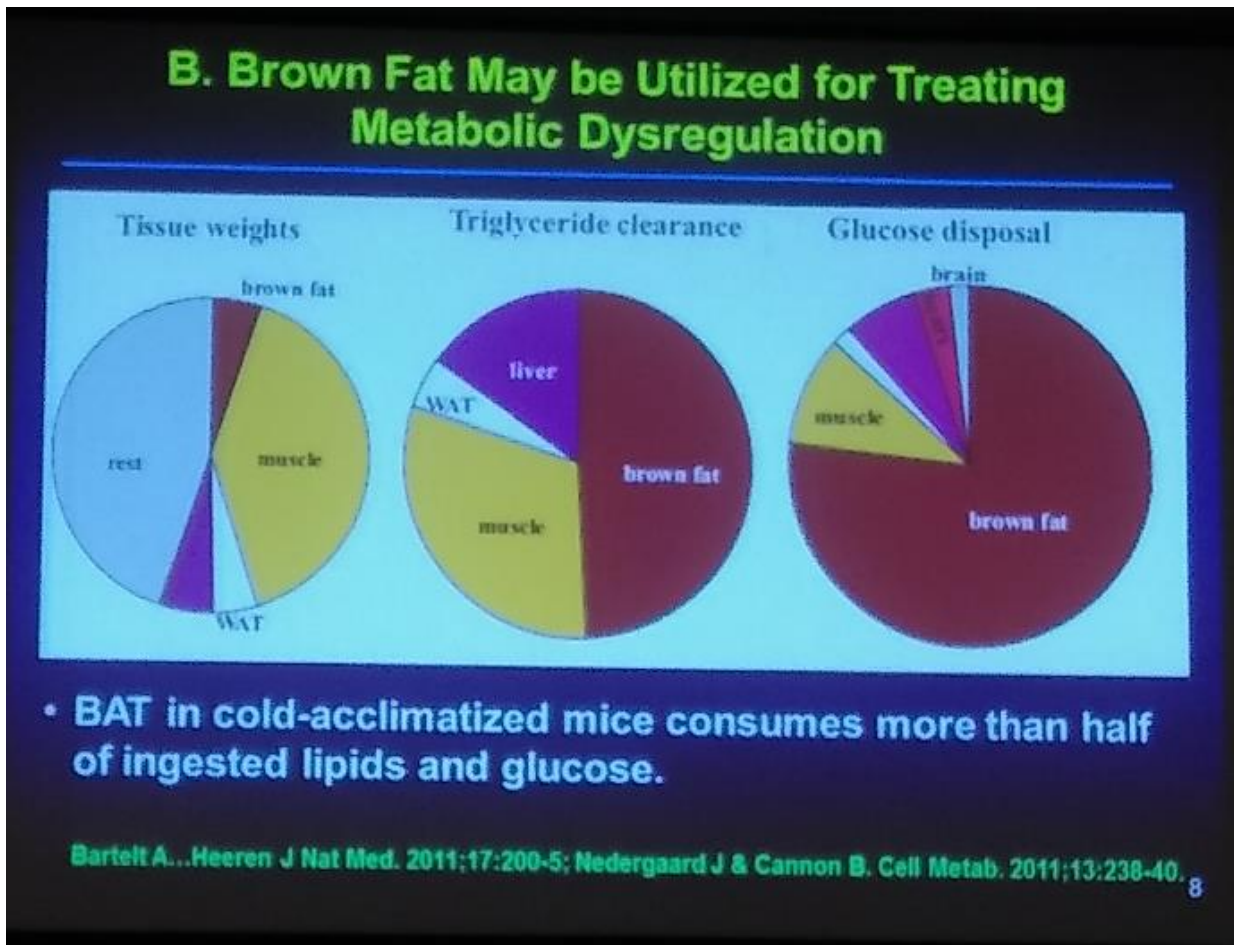
目前以知至少有三種脂肪細胞，第一種為白色脂肪細胞，主要的功能是能量的儲存，第二種為褐色脂肪細胞，受低溫刺激而活化，主要的功能是產熱禦寒而大量消耗能量，第三種則是米色脂肪，是低溫刺激下白色脂肪特化而成，具有褐色脂肪產熱消耗熱量之特性，不過顏色較淡因此稱為米色脂肪，多半位於皮下脂肪。

由於褐色脂肪主要的功能是產熱維持體溫，因此過去被認為只出現在嬰兒期的背部肩胛骨之間，直到 2009 年發表在新英格蘭期刊的研究才找到平息爭論的確切證據，證實了成人真的有棕色脂肪。而在成人身上，截至目前為止，脖子後方深層接近脊椎處，還有左右鎖骨上方，是確定包埋有棕色脂肪組織的位置，如下圖(目前偵測褐色脂肪活性的標準方法為 FDG PET 造影，因為褐色脂肪活化時會大量增加葡萄糖的攝取)。另外在心臟側面、胸椎兩側，以及兩側腎臟上方的腎上腺周圍也曾有被發現褐色脂肪的存在。



而褐色脂肪之所以呈現褐色是因為細胞質中的粒線體數量遠比白色脂肪細胞多。粒線體含有細胞色素，所以細胞外觀呈現深棕色。粒線體是細胞氧化多種營養素產生能量的「引擎」，而褐色脂肪細胞能產熱的秘密在於粒線體膜上存在大量的第一型去耦合蛋白（uncoupling protein 1，簡稱 UCP1），也是褐色脂肪最重要的分子標記。研究指出當褐色脂肪活化可大量

增加葡萄糖及脂肪酸的攝取，UCP1 能加快細胞分解脂肪酸的速率。而小鼠的研究也指出褐色脂肪約占體重的比率是相當低，但其活化後對葡萄糖及三酸甘油脂的代謝卻超過總體代謝的百分之五十（如下圖）。從另一個方面來看，在人的研究中褐色脂肪活化的最佳情況下能燒掉每天基礎代謝量 10~20%的熱能，一年可燃燒掉相當於 4.1 公斤脂肪的熱量，並且能大量增加葡萄糖及脂肪酸的消耗，由此不難看出脂肪細胞在能量代謝上所扮演的重要角色，並可能是肥胖或代謝症候群具潛力之標的。



以疾病的角度來看，褐色脂肪的活性與肥胖、糖尿病、動脈粥狀硬化及惡病質都有關係。以肥胖而言，已有許多動物模式的報告闡述褐色脂肪與肥胖的關聯性。動物若 KO 其褐色脂肪的 UCP1 表現，則明顯在出生 30 天後及體重增加超過百分之五十，呈現肥胖，而褐色脂肪較多的小鼠則對肥胖有抵抗性。而不管是透過藥物活化褐色脂肪，或是自另健康動物移植褐色脂肪至肥胖動物，均有減重的效果。而在人的研究中，褐色脂肪活性與基礎代謝率呈正相關而與體脂肪及 BMI 成反比，肥胖的人其褐色脂肪對低溫刺激及胰島素刺激的反應比瘦的人少了百分之五十。另一個研究也指出，透過胃切除術減肥的患者，他們的體重減輕與褐色脂

肪活化有關。

在一個回朔性的研究中指出高血糖的病患其褐色脂肪的活性在 FDG 的 PET scan 中便偵測不到。在大鼠的實驗中，褐色脂肪活化所增加攝取的基質，90%是脂肪酸，10%是葡萄糖，尚不知在人體的狀況是否相同。不過在小鼠的實驗中指出褐色脂肪對 insulin 的感受性較白色脂肪更敏感，褐色脂肪缺乏 insulin receptor 的小鼠發生了糖尿病，而餵食高脂食物的小鼠其褐色脂肪的胰島素抗性增加且減少葡萄糖的攝取量。另外的研究也指出 cafeteria diet 也使褐色脂肪的產熱能力下降，並顯示 insulin signaling 對糖尿病小鼠及肥胖的糖尿病女人的褐色脂肪產熱能力扮演了重要的角色。綜合以上，顯示褐色脂肪對於葡萄糖-胰島素平衡的確有相當的影響力，可能作為第二型糖尿病未來的治療標的。

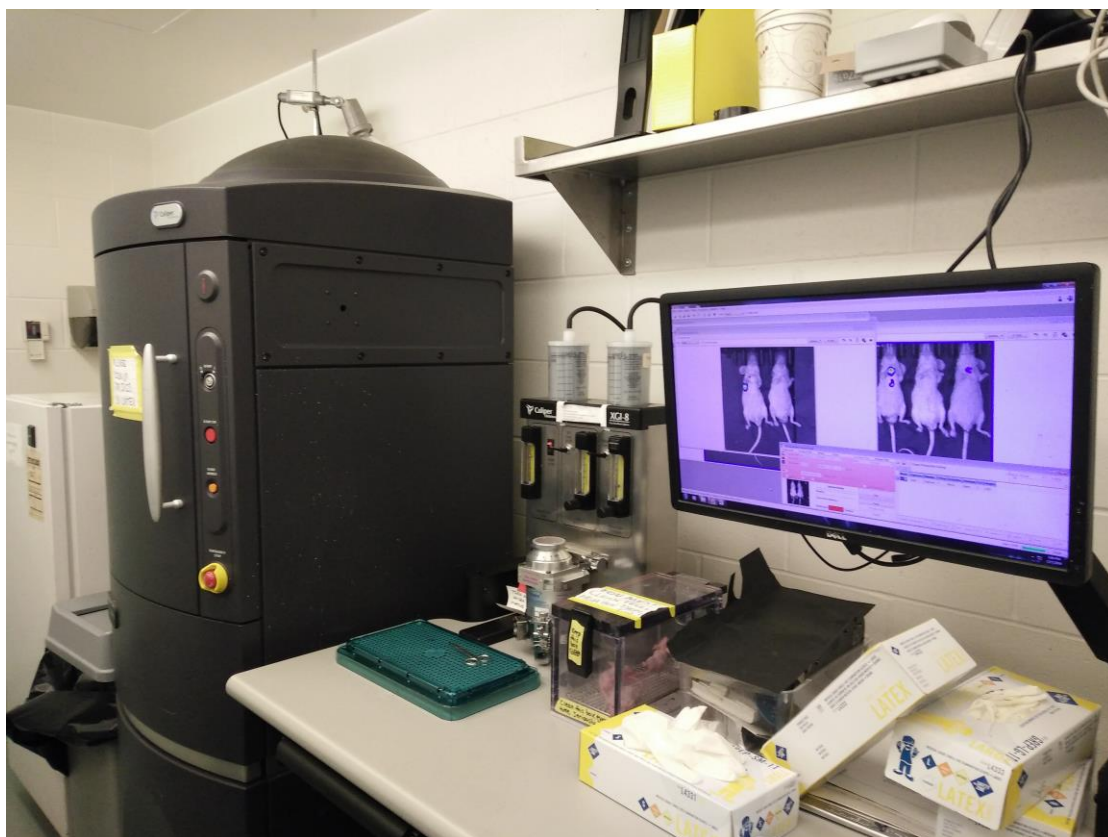
褐色脂肪也被報告與癌症惡病質與冠狀動脈粥狀硬化有關，不過仍無一致性的結論，因為影響的因子很多包括病程、腫瘤種類、性別、BMI、所處環境溫度許多的因子都需一併評估。不過有報告發現心血管周邊脂肪有一種與褐色脂肪細胞的結構及蛋白質體分析均有高度的相似性，並同樣具有受低溫刺激而產熱的能力，並且報告指出此種脂肪細胞對動脈粥狀硬化的病程有保護的作用，是動脈粥狀硬化這個領域的熱門研究標的。

在成人對褐色脂肪產熱的需求性已較嬰孩大大減低，是否褐色脂肪在成人體內還扮演了其他的角色?實驗鼠的研究已指出褐色脂肪對於代謝也具有重要的調節功能。例如在動物模式中，褐色脂肪對於矯正高脂質血症具有決定性的影響。此外，當小鼠的褐色脂肪細胞因缺乏 insulin receptor 而萎縮，結果也進一步造成胰島 β cell 的減少，造成糖尿病及葡萄糖不耐，顯示褐色脂肪對於血糖平衡具有一定的影響。褐色細胞也參與了脂肪肌肉組織間的交互作用，間接影響了 physical exercise 的效果。而肌肉細胞所產生的 irisin 可增加褐色脂肪 UCP1 的表現量，人體中 irisin 的量也確實和褐色脂肪的活性有關。

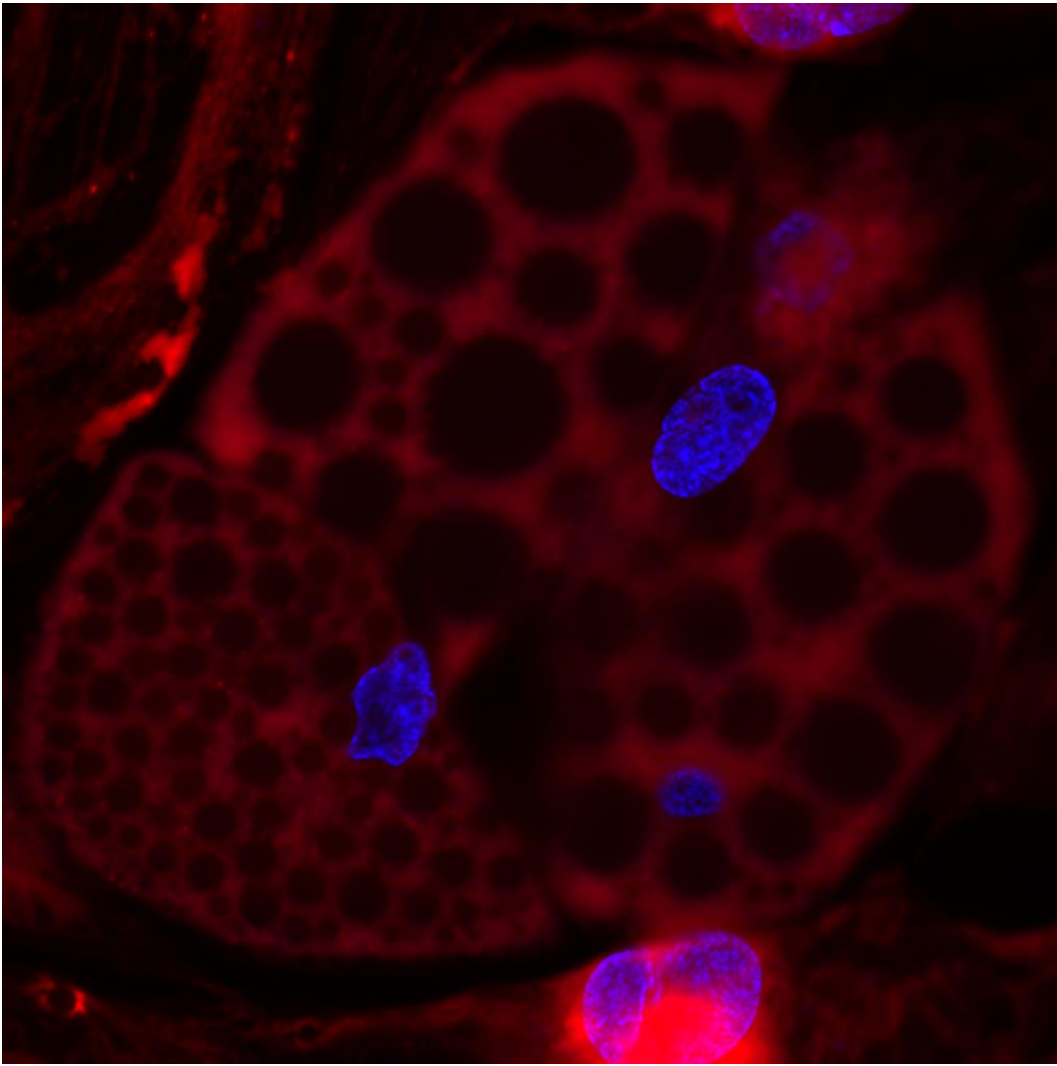
褐色脂肪對人體代謝的影響至少包括三個層面:能量儲存及消耗之平衡、葡萄糖代謝、作為類似賀爾蒙之調節功能。褐色脂肪所扮演的各種角色仍待更多進一步的研究來闡明。

(二)Tseng Lab 褐色脂肪的調控因子相關研究

褐色脂肪最重要的分子標記即是 UCP1，當褐色脂肪活化時 UCP1 的表現量便會上升。而白色脂肪的 UCP1 表現則非常低。因此曾教授利用 CRISPR 基因剪輯技術，使白色脂肪也能高度表現 UCP1，並攜帶 GFP reporter 可以螢光示蹤。再將 UCP1 高表現的白色脂肪(未分化)植入以高脂食物誘導肥胖的小鼠可成功分化，並產生效果。(因實驗的內容尚未發表，因此在這裡不說明實習期間觀察到的結果)，下圖為以 IVIS 追蹤其活性。



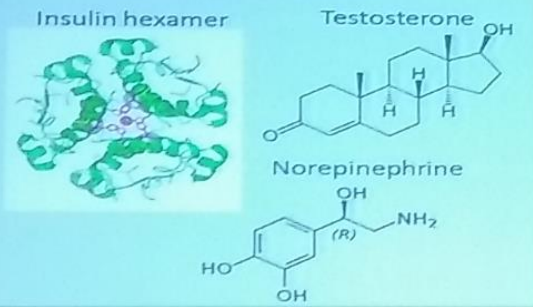
除了 IVIS 外有另一染劑可利用 confocal 觀察當褐色脂肪細胞活化時，染劑藉由溫度變化而會有顏色逐漸消失的情況，染色如下圖(不過無法顯示出顏色變化)，其中藍色為細胞褐染色，空洞為細胞質內的油滴，紅色即為感溫染劑之顏色。連續影像擷取後可觀察到，經給予 forskolin 後褐色細胞會活化而產熱，圖中的紅色便漸漸消失，不過發生的情況每個細胞並不均一，顯示每個脂肪細胞分化及活化狀況不同的一種 multi-phenotype 的特性。



近年來已經有一些 lipid 被發現具有調節代謝的功能如增加胰島素的作用及葡萄糖的耐受性等(如下圖)。這些 lipid 因為具有類似賀爾蒙的調節功能，稱為” lipokine ”脂肪激素。曾教授的實驗室近期對於 lipokine 脂肪激素對於褐色脂肪細胞及冷刺激的相關調節作用進行了深入的探討，並發現了與褐色脂肪活化相關的脂肪激素 12,13-diHOME(相關成果已投稿)。

Lipids Function as Endocrine Factors

Classic Hormones

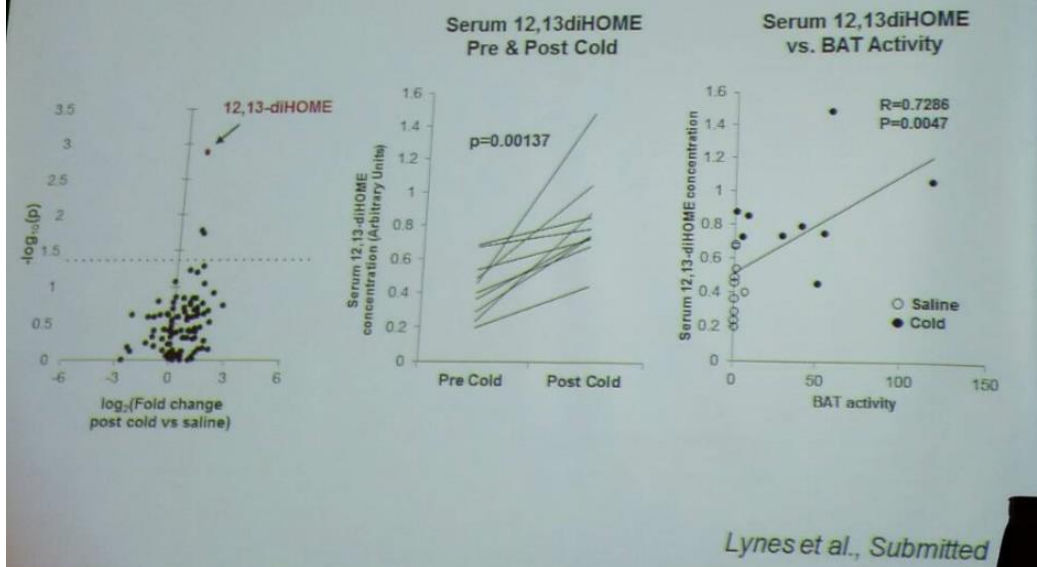


Lipid Hormones

- **Lipokines**
- C16:1n7-Palmitoleate → Improve insulin action (*Cao et al., Cell 2008*)
- PC 18:0/18:1 → Increase muscle FA uptake (*Liu et al., Nature 2013*)
- FAHFAs/PAHSAs → Improve glucose tolerance (*Yore et al., Cell 2014*)

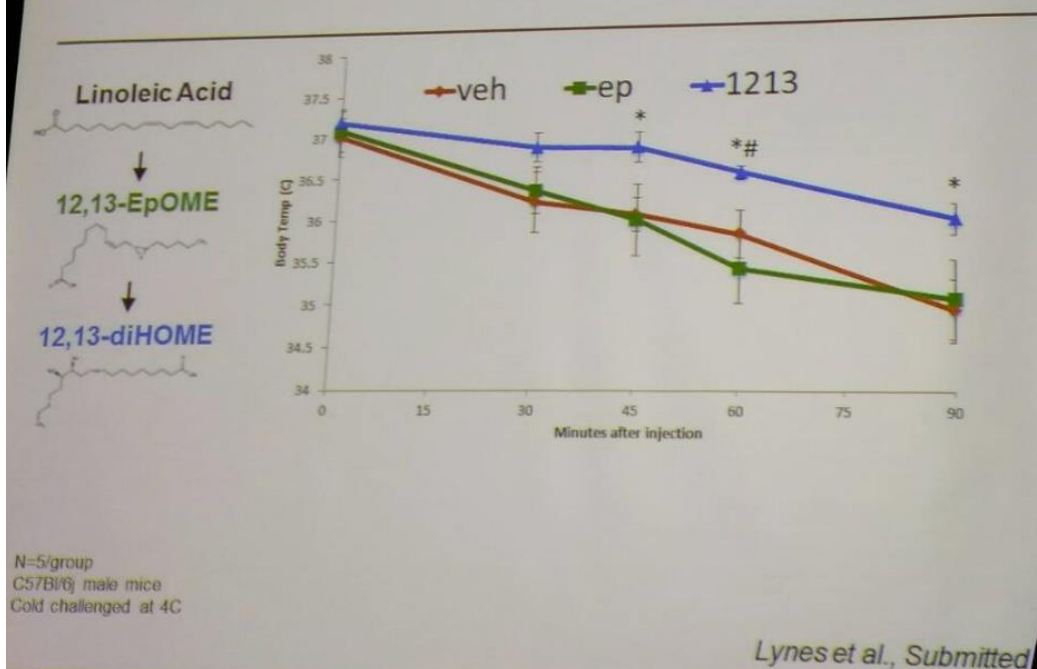
文獻指出，冷刺激能透過活化褐色脂肪組織增進生物體對胰島素的感受性。而脂肪組織是以脂肪代謝為主。因此，他們假設冷刺激可能是誘發某些具有調節功能的 **lipid** 增加，進而促進褐色脂肪組織的活化並增進胰島素的感受性，意即假設冷刺激對生物體代謝的影響，可能是經由脂肪激素 **lipokine** 調控。透過分析健康受試者經過 1 小時冷刺激後的血清樣本，在 88 種已知具有調節功能的 **lipid** 並比對與褐色脂肪組織活化的相關性，發現在所有的冷刺激的受試者血清中 12,13-diHOME 均有上升的情況。證實了在小鼠及健康受試者中，12,13-diHOME 是冷刺激所誘發增加的，並增加褐色脂肪的活性。

Serum 12,13-diHOME levels are Elevated by Cold and Correlated with BAT Activities

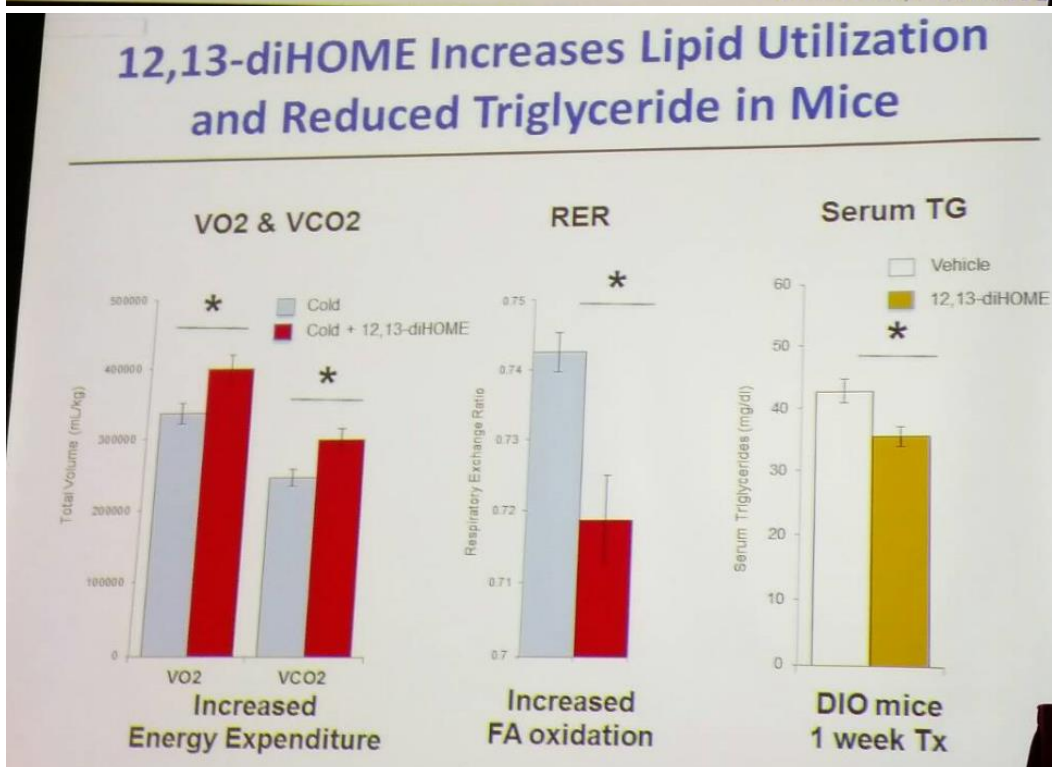


另外，由於肥胖者的褐色脂肪的活性較低，在進一步分析 12,13-diHOME 在瘦及肥胖的受試者中發現血清中 12,13-diHOME 的濃度與受試者的 BMI 及胰島素感受性成反比。在老鼠的實驗中，給予 12,13-diHOME 發現可以增加脂肪細胞對冷的耐受性(如下圖)，並且增加褐色脂肪攝入脂肪酸，並減少血清中三酸甘油脂的濃度，顯示 12,13-diHOME 對脂肪的代謝有明顯的助益。

12,13-diHOME Enhances Cold Tolerance

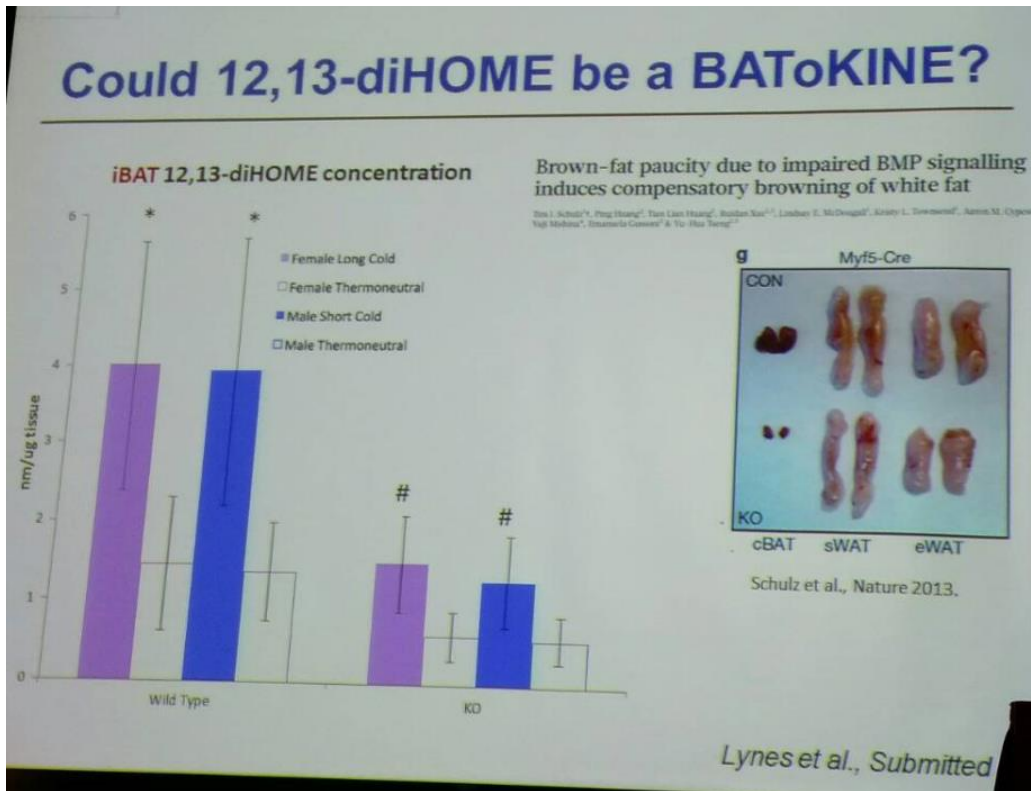


並且 12,13-diHOME 也增加褐色脂肪攝入脂肪酸，及減少血清中三酸甘油脂的濃度(如下 2 張圖)，顯示 12,13-diHOME 對脂肪的代謝有明顯的助益。



12,13-diHOME 除了是冷刺激下的調節因子外，曾教授的研究團隊更利用褐色脂肪 KO mice 在冷刺激下的表現量明顯少於對照小鼠，顯示 12,13-diHOME 是一種主要來自於褐色脂肪的

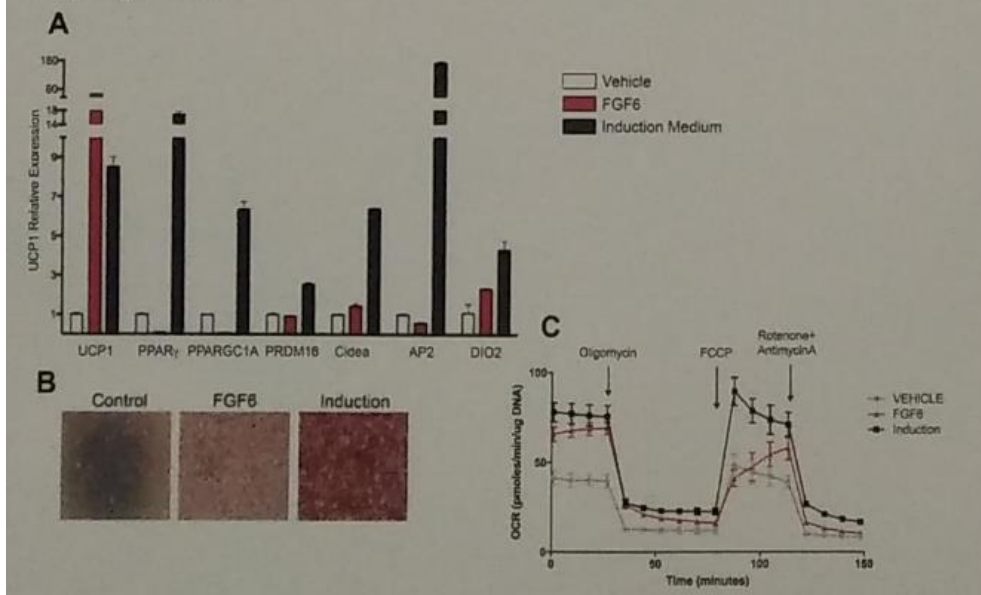
調節性脂肪激素，意即是一種 batokine (褐色脂肪激素)，如下圖。12,13-diHOME 最初被發現與 neutrophil 的 oxidative burst 相關成分。這是 12,13-diHOME 首次被發現與褐色脂肪的生理活性及冷刺激有關，相關結果已投稿 nature medicine 。



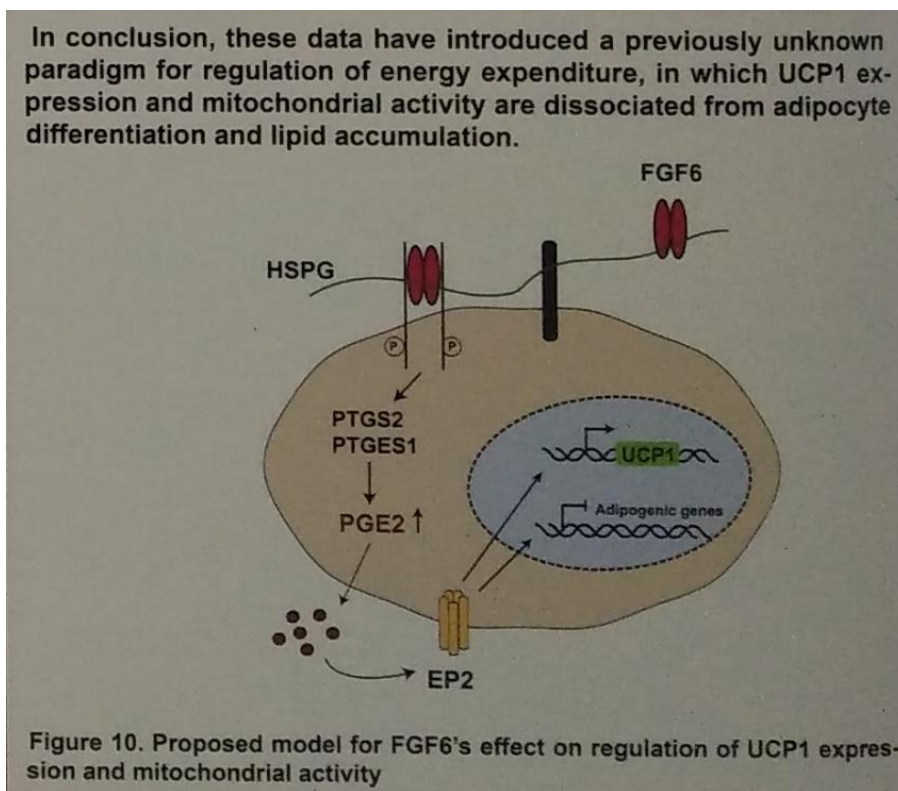
除了 12,13-diHOME 之外，曾教授的研究團隊也發現另外一個冷刺激所誘發的細胞激素，不過相關的結果尚未投稿及發表，在這裡簡稱為 H。在活體給予 H 抑制劑時發現動物明顯不耐低溫，顯示 H 對於產熱及維持體溫的重要性。而初步發現在離體的試驗中 H 可增加脂肪組織對葡萄糖的攝取並增加脂肪組織對胰島素的感受性。

除了脂肪激素外，曾教授的團隊還發現 FGF6 (fibroblast growth factor 6)可增加脂肪細胞的 UCP1(uncoupling protein 1)的表現，UCP1 是褐色脂肪細胞能增加能量代謝及產熱的重要因子。並且 FGF6 對脂肪細胞的影響是與脂肪細胞的分化無關，在未分化成熟的 preadipocyte 即有明顯的效果。

4. FGF6-mediated induction of UCP1 is independent of adipogenesis



FGF6 的研究結果顯示了一條新的能量代謝的調節途徑，FGF6 增加 PGE2 的表現進而增進 UCP1 表現及能量代謝，這個過程和過去已發表的研究結果不同，是與脂肪細胞分化與細胞內油滴聚集無關。



文獻指出褐色脂肪細胞的會受光週期的影響，曾教授也進行了光與褐色脂肪細胞對葡萄糖攝取的相關研究(相關研究尚未發表及投稿)，實驗的結果指出光暴露 24 小時相較於對照組黑

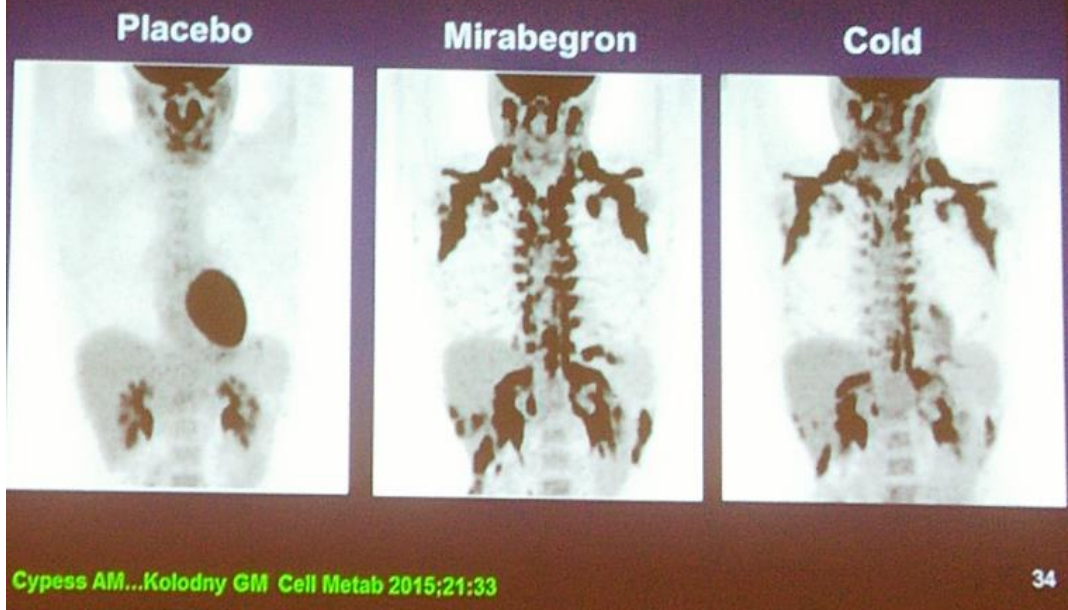
暗 24 小時的褐色脂肪細胞有較高的葡萄糖攝取。而在活體的部分也顯示，光感應受體缺乏小鼠其褐色脂肪的葡萄糖攝取量較低，可能與葡萄糖轉運體在細胞膜上的減少有關。

另外，他們也正以具抗發炎特性之單株抗體 M antagonists (已有專利，已知對 Inflammatory bowel diseases (IBD)具有療效)投與第一型糖尿病之 NOD 母鼠，測試是否可延緩或避免第一型糖尿病之發生，不過在實習結束前尚未有結果。

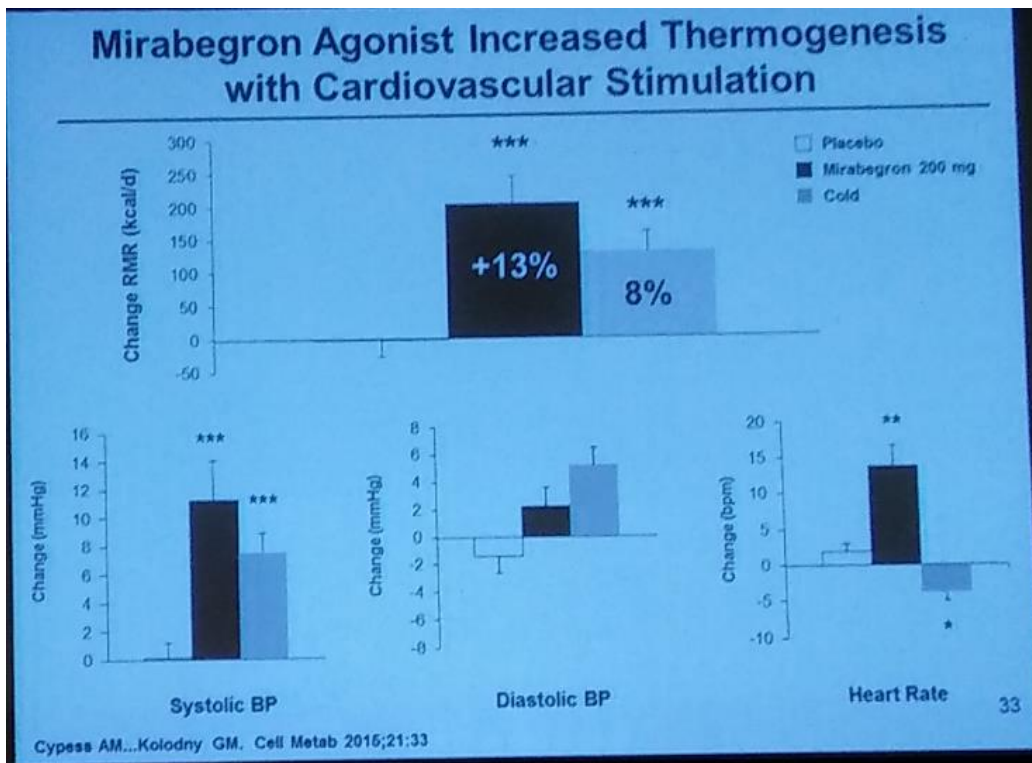
(三)The 3rd BBDC-Joslin-UCPH Conference: Cellular Mechanisms and Cell-Based Therapy of Diabetes

在冷刺激發生時，交感神經會釋放 norepinephrine 並藉由 $\beta 3$ adrenergic receptor 活化褐色脂肪使之增加脂肪酸及葡萄糖消耗進而增加產熱抵禦寒冷。因此褐色脂肪活化被認為具有潛力對抗肥胖及代謝症候群。會中臨床醫師 Aaron Cypress 報告了利用 $\beta 3$ adrenergic receptor agonist 在臨床試驗中對褐色脂肪活化的效果。研究中使用之 $\beta 3$ adrenergic receptor agonist 為 Mirabegron，是近期 FDA approved 膀胱過動症之二線用藥。結果顯示投與 Mirabegron 200 mg (此劑量是膀胱過動症的劑量的 4 倍) 確實可活化褐色脂肪細胞，在 FDG 的造影下顯示與冷刺激的褐色脂肪活化的效果類似，如下圖。這也表示 Mirabegron 確實增加褐色脂肪的葡萄糖攝取。這個結果也是首次證明可利用 $\beta 3$ adrenergic receptor agonist 活化人體之褐色脂肪。(基於安全性的考量每個受試者僅能接受 3 次的 PET/CT scan，所以下圖為單次投予 Mirabegron 200 mg 的褐色脂肪活化狀況，也顯示能代表褐色脂肪活性的指標仍待開發。)

The β 3-AR Agonist Mirabegron Activated Human BAT



單次投與 Mirabegron 200 mg 增加褐色脂肪之產熱效率達 13%，並且增加了 RER (Resting Metabolic Rate) 約 200 kcal/d。但由於引發 β 1 adrenergic receptor 的 cross reaction，導致心臟的 β 1 adrenergic receptor 也引發訊息傳導，因此也出現了增加收縮壓及心跳之副作用(如下圖)，不過每日投予 200 mg，連續 12 周仍呈現良好的耐受性。Mirabegron 也許不是褐色脂肪活化的最後解答，但可避免不舒服的冷刺激，透過藥物達到活化褐色脂肪並進而增進能量代謝對抗肥胖，也可能對葡萄糖及脂肪代謝有所助益。



而 RMR 的增加與褐色脂肪活化正相關，而與增加的心跳、血壓無明顯之相關性。可說明 Mirabegron 並非透過增加心跳及血壓而增加基礎代謝率。

C. Ronald Kahn 為 Joslin Diabetes Center 資深研究員及哈佛醫學院之教授，為世界知名之糖尿病、胰島素訊息傳導路徑的研究專家，他報告了脂肪細胞所釋放之 miRNA 對生物體內其他器官的影響，為相當新穎的概念，成果已被 nature 所接受。miRNA 屬於非編碼 RNA，無法進一步轉譯成蛋白質，但具有調控基因表達等重要的調節作用。成熟 miRNAs 的產生首先在核內由一種稱為 Drosha 酶處理後再在 Exportin-5 幫助下轉運到細胞核外之後再由胞質 Dicer 酶進行處理，酶切後成為成熟的 miRNAs。他們發現隨著年齡的增加小鼠皮下脂肪的 Dicer 表現量下降，而且愛滋病患具有 lipodistrophy 的現象也同時顯現了脂肪細胞的 Dicer 表現量下降。因此他們設計了針對脂肪細胞的 Dicer KO mice (如下圖)，而在 Dicer KO mice 確實發生了類似 HIV 患者的 lipodystrophy，並具有 insulin resistance 及 fatty liver。

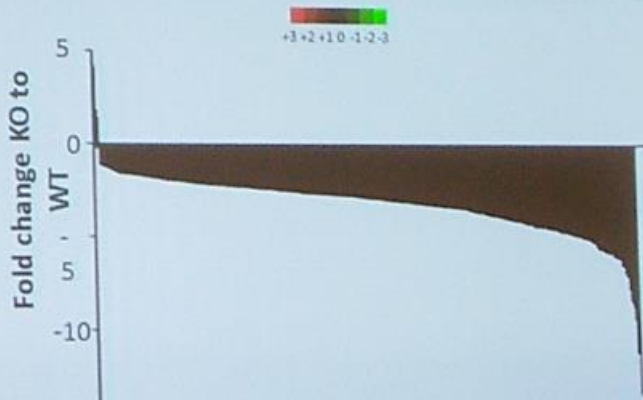
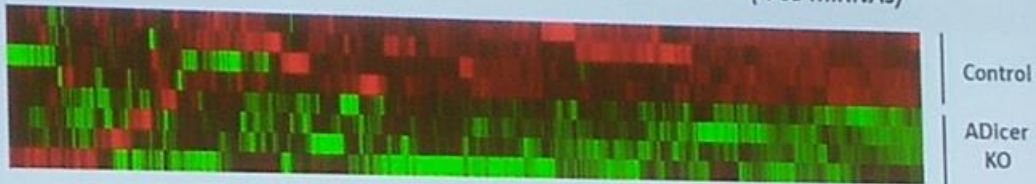
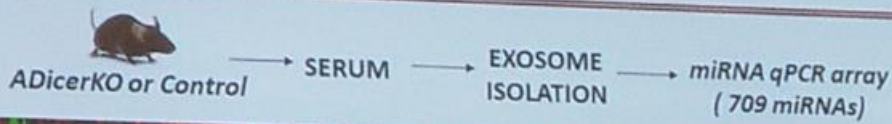
Development and Characterization of Adipose Tissue Specific Dicer KO Mice



Mori MA, et al, JCI, 2014

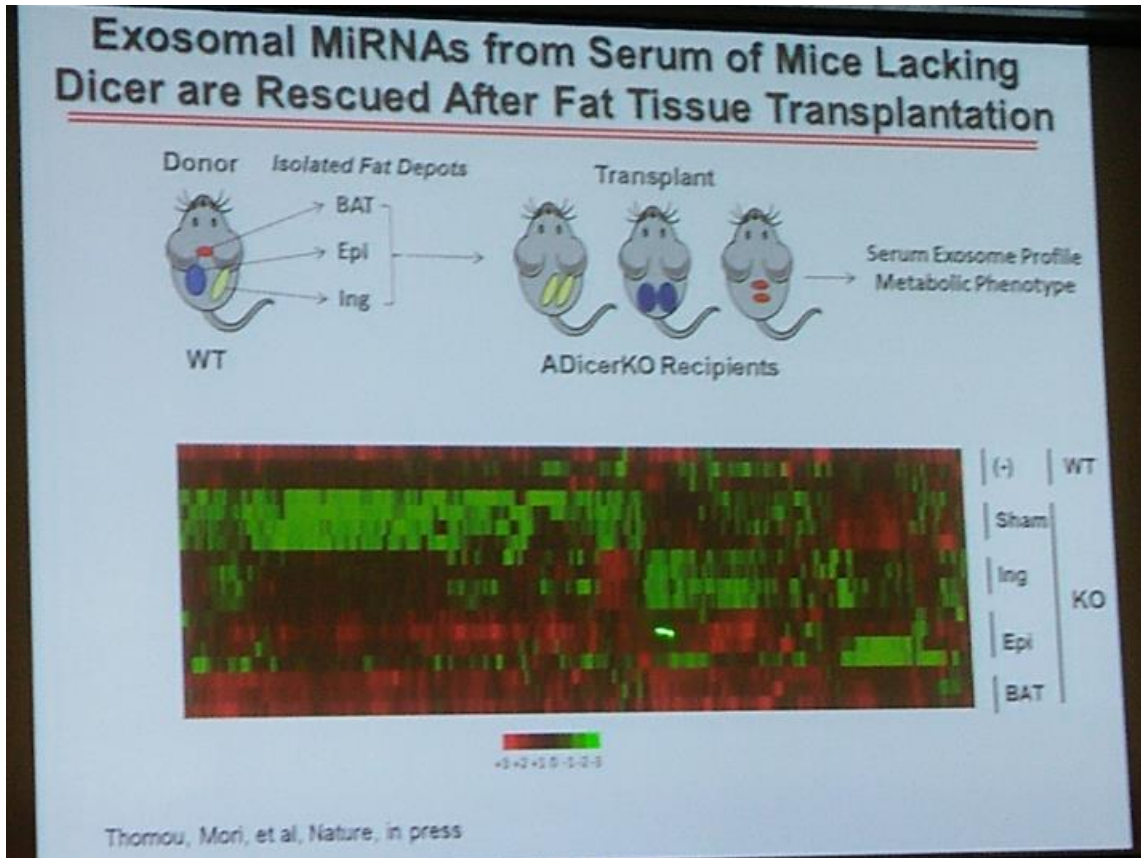
分析 Dicer KO mice 血清中之 exosomal miRNA 確實發現有大量的減少，如下圖

Reduced Circulation Exosomal miRNAs in Serum of ADicerKO Mice



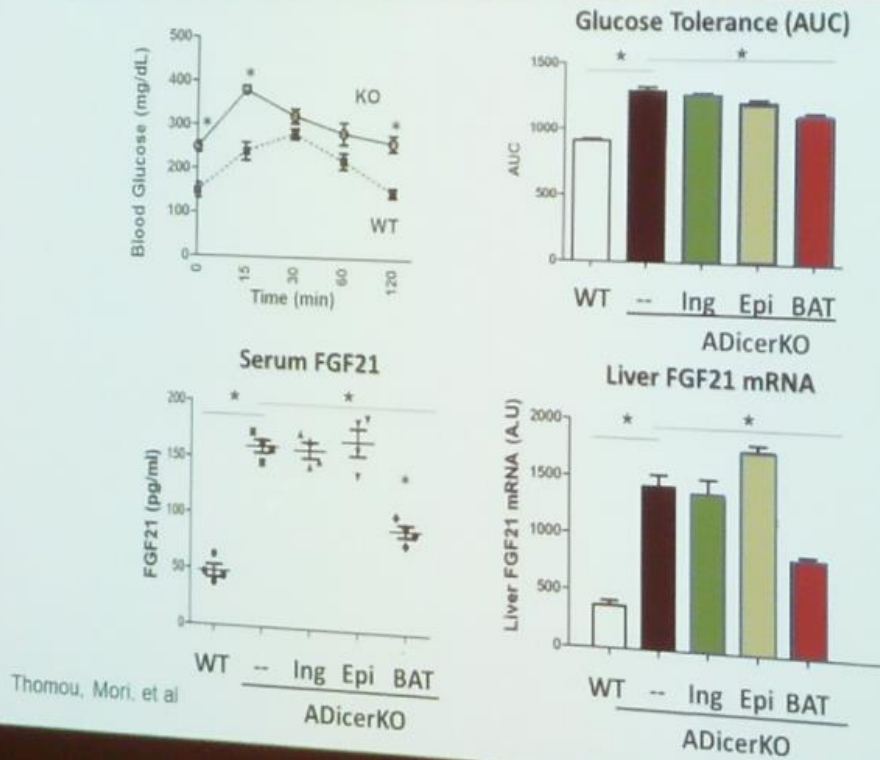
Thomou, Mori, in press

而 exosomal miRNA 的減少可藉由移植 wild type 小鼠的脂肪細胞而逆轉，他們移植了三種脂肪細胞，包括褐色脂肪細胞、epididymal 白色脂肪、inguinal 白色脂肪，而以移植褐色脂肪細胞的效果最為明顯，如下圖

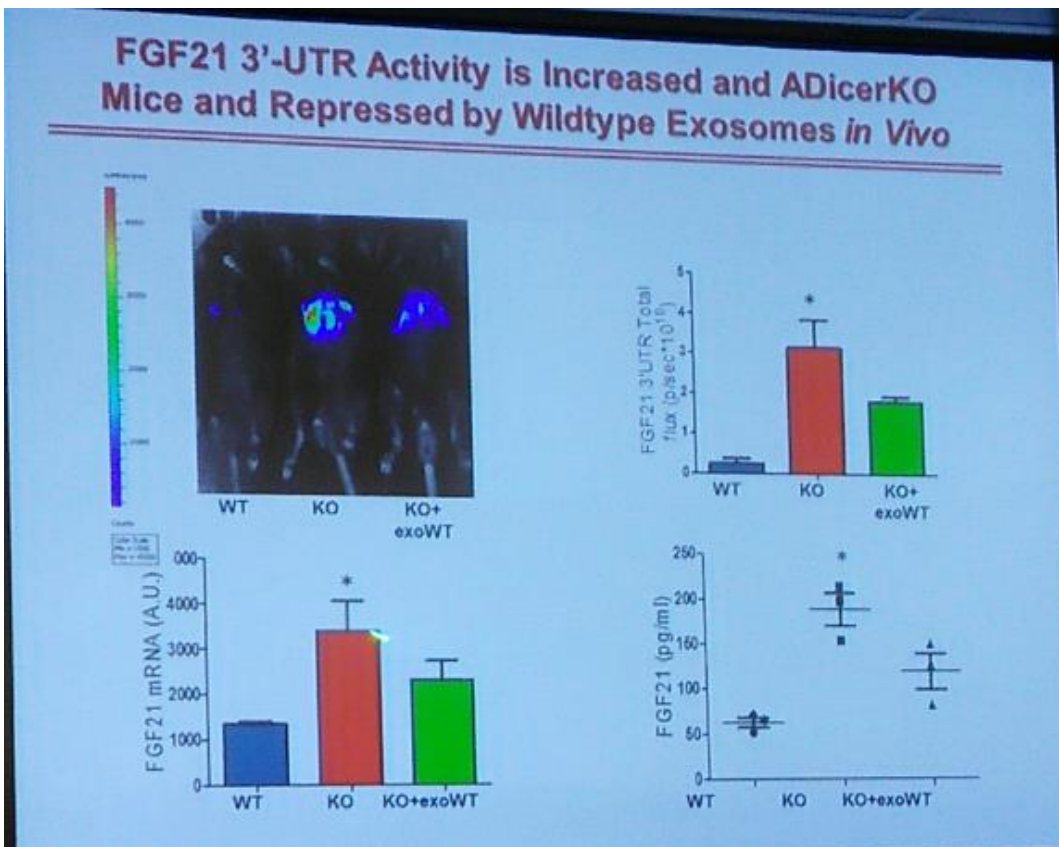


而從下圖也可以看出移植 wild type 的褐色脂肪(BAT)至 Dicer KO mice，在葡萄糖耐受性及肝臟 FGF21 表現量的改善都與無移植的 Dicer KO mice 有顯著差異，且與 wild type 的狀況較為接近，顯示移植褐色脂肪不僅增加了 exosomal miRNA，也因此有增加葡萄糖耐受性的效果。如下圖

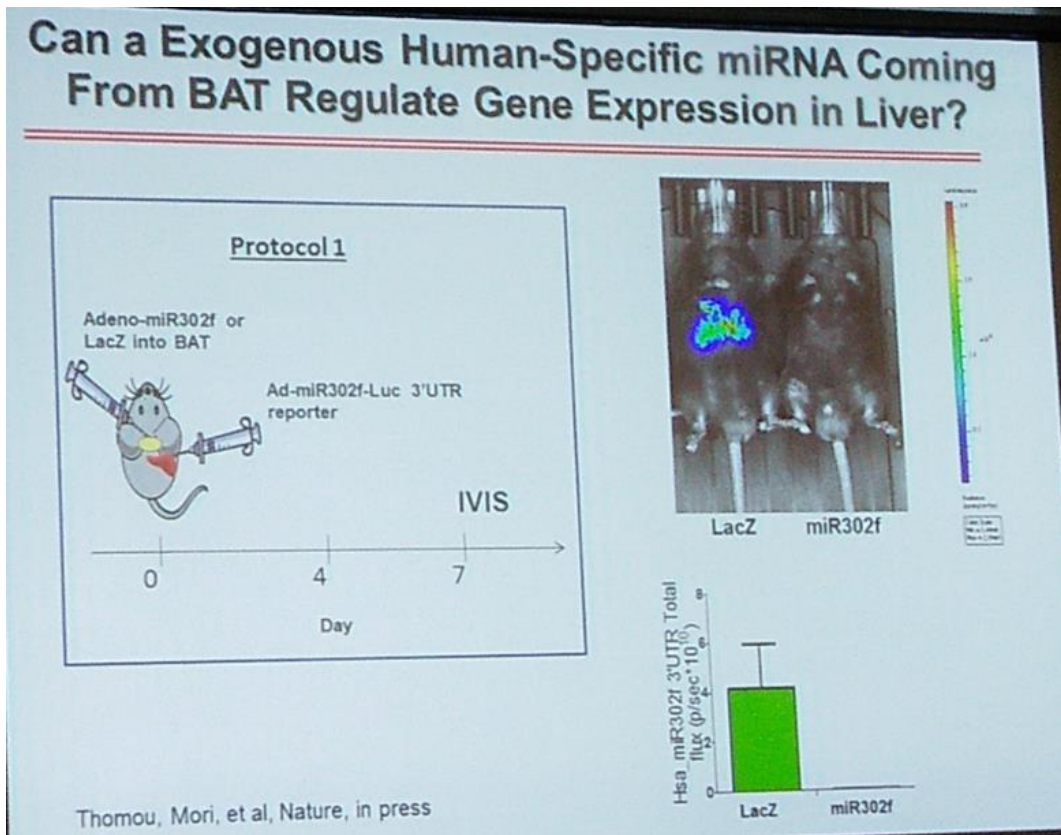
Multiple Metabolic Effects of Adipose Transplantation into ADicerKO Mice



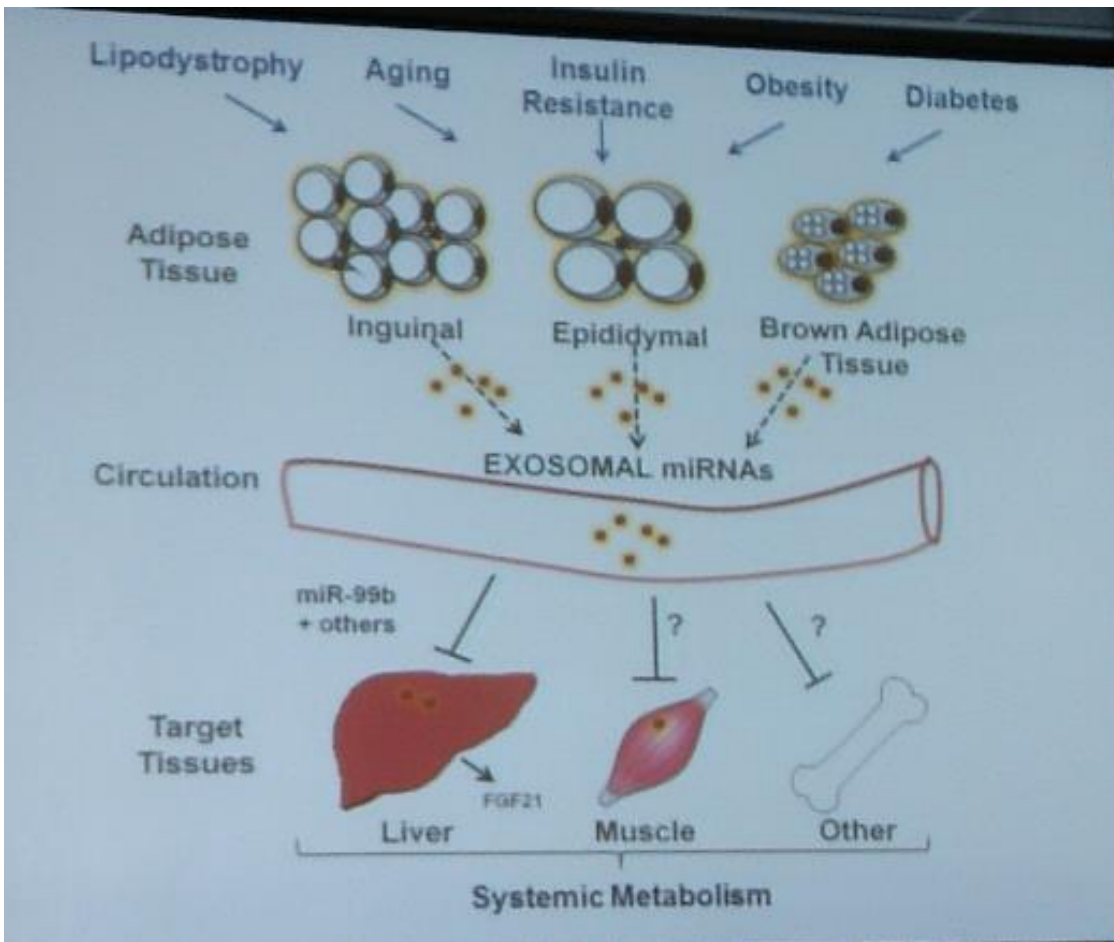
更進一步證明，直接將 wild type 的 exosome 打入 Dicer KO mice，也同樣在 FGF21 的表現量有明顯的改善，顯示這個回復的現象確實是由 exosome 內的成分所誘發，如下圖。



下圖的投影片則說明了，來自人類褐色脂肪(BAT) 的 miRNA (miR302f)直接打入小鼠的褐色脂肪中卻也影響了肝臟的基因表現。



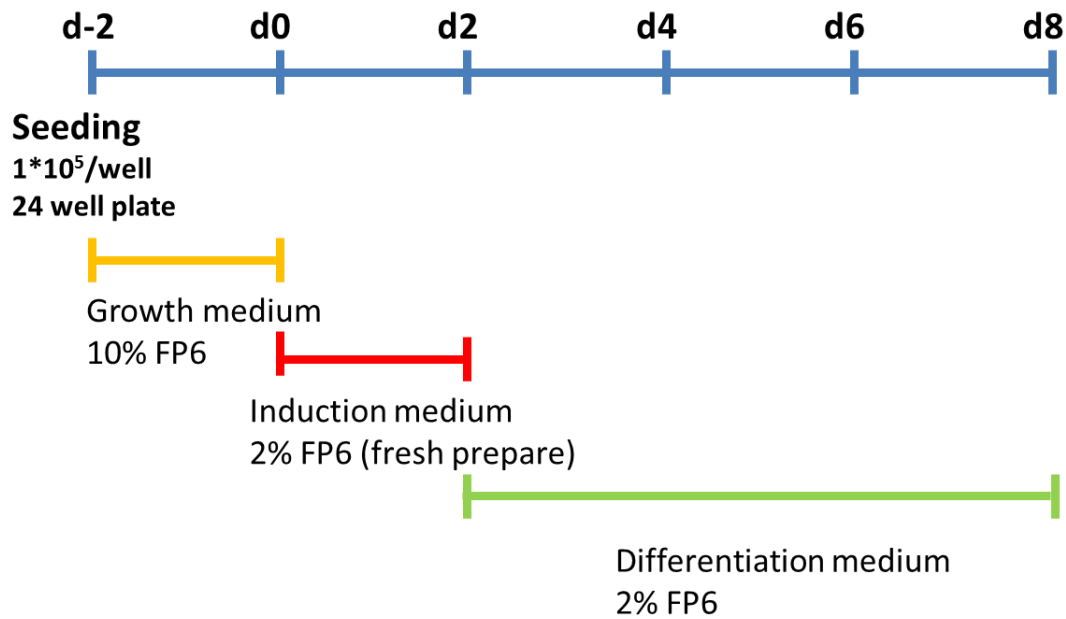
這個結果說明了脂肪細胞並非只是能量儲存及能量代謝，還有許多的調節功能是尚未被發現的，而 C. Ronald Kahn 教授則是發現了褐色脂肪藉由 exosomal miRNA 對葡萄糖代謝及肝臟基因表現的影響。未來可能會有更多的研究成果顯示脂肪細胞的以 miRNA 對不同的能量代謝相關器官如肝臟、肌肉或其他器官的影響及與疾病的關聯性。如下圖



(四)白色脂肪及褐色脂肪細胞之培養及分化技術

小鼠及人類褐色脂肪細胞之分化所需之時程及誘導分化之培養液成分或濃度不同，以下分別論述。

小鼠褐色脂肪細胞 WT-1 cell 的分化時間較短約 8 天左右可分化成熟，進行後續的葡萄糖攝取等試驗，也可分析不同分化天期之基因或蛋白表現，確認藥物處理或基因更動後之影響。WT-1 cell 的 induction 效果很好僅需兩天，而人類的 adipocyte 則需要 18 天之久。WT-1 cell 的分化日程如下：

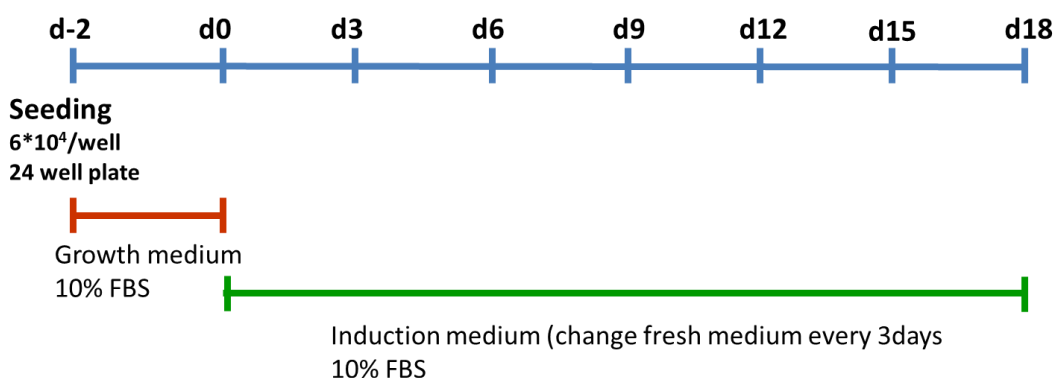


Seeding 的細胞須以 growth medium 使其長滿整個 well (confluency)，當細胞進入生長的停滯期後方可進行分化，細胞若一邊生長一邊分化則會造成分化不均，會影響後續的分析結果。不同分化液的配方如下：

Induction medium			
DMEM			
49mL			
FP6			
1mL			
Indomethacin	50	Stock: 125mM	Final: 0.125 mM
uL			
Dexamethasone	50	2mg/mL=5 mM	5 uM
uL			
IBMX	500	50 mM	0.5 mM
uL			
Insulin	0.6	10 mg/mL=1.67mM	20 uM
uL			
T3	5 uL	10 uM	1 uM

Differentiation medium			
DMEM			
49mL			
FP6			
1mL			
Insulin	0.6	10 mg/mL=1.67mM	20 uM
uL			
T3	5 uL	10 uM	1 uM

人類來源之 immortalized 脂肪細胞 A41 需培養及分化共 20 天是相當長的一段時間，因此需多分化備用之細胞，以免中途發生狀況，須重頭培養。而因為分化期間長，對每一個 well 的分化狀況都需注意且均一，否則最後分化完之細胞各 well 之間若有差異則可能造成無法判斷實驗處理之細胞所造成之影響。實驗室中有其他株 immortalized 脂肪細胞如 A38 等，生長速度及分化的條件及狀況都會有差異，A41 是生長及分化相當良好的細胞，其培養及分化日程如下：



分化液配方如下：

Growth medium

Ingredients	Molarity	Volume
DMEM/High Glucose		890ml
FBS: Sigma F6178 (Lot #15C023) or ATLAS EF-0050-A(lot#14101411)	10%	100ml
Pen/Strep	0.1mM, 0.06mM	10ml

pH to 7.4 using either HCl or NaOH and sterile filter

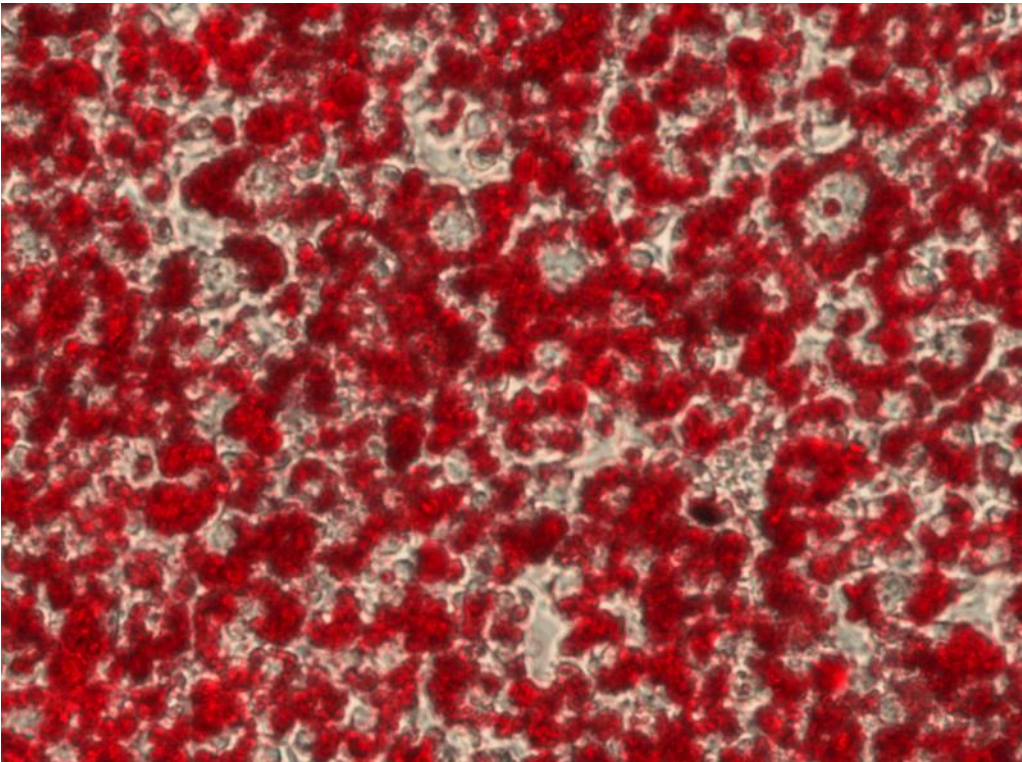
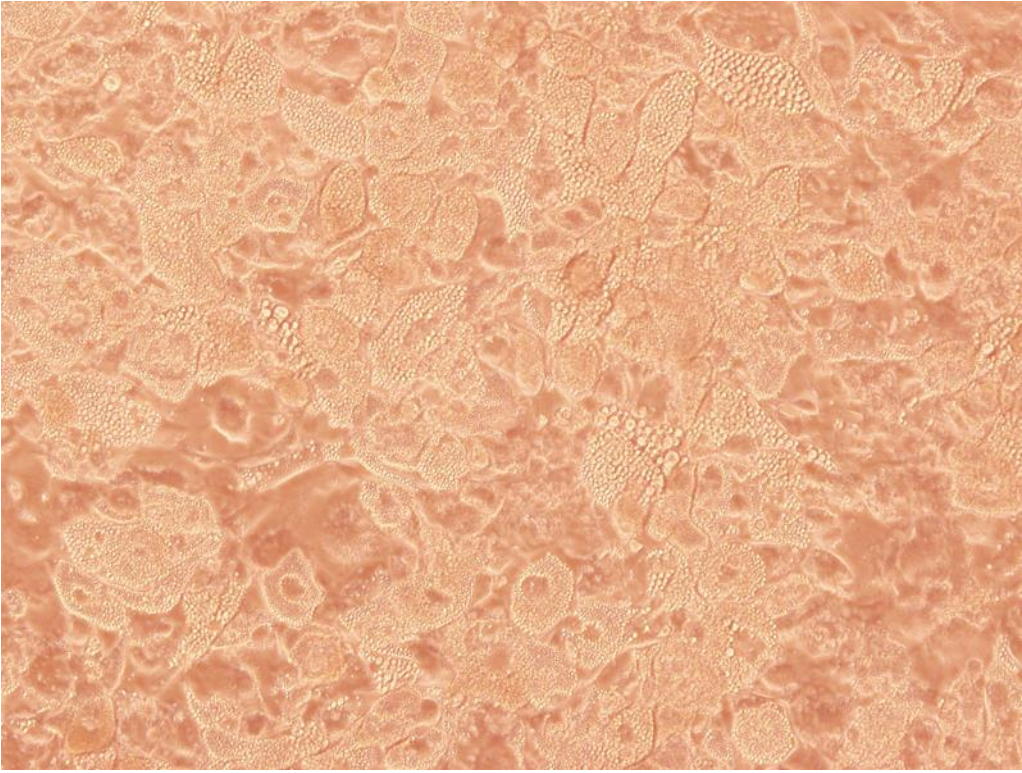
Induction medium (各 stock 濃度同 WT-1 cell 之 induction medium)

Ingredients	Molarity	Volume
DMDM/H		48.5ml
FBS	2%	1ml
Pen/Strep	0.1 mM, 0.06 mM	500ul
Biotin	33 μ M	50ul
Human Insulin	0.5 μ M	15ul
Pantothenate	17 μ M	100 μ l
Dexamethasone	0.1 μ M	1 μ l
T3	2 nM	10 μ l
IBMX	500 μ M	500ul
Indomethacin	30 μ M	12.5ul

pH to 7.4 using either HCl or NaOH and sterile filter

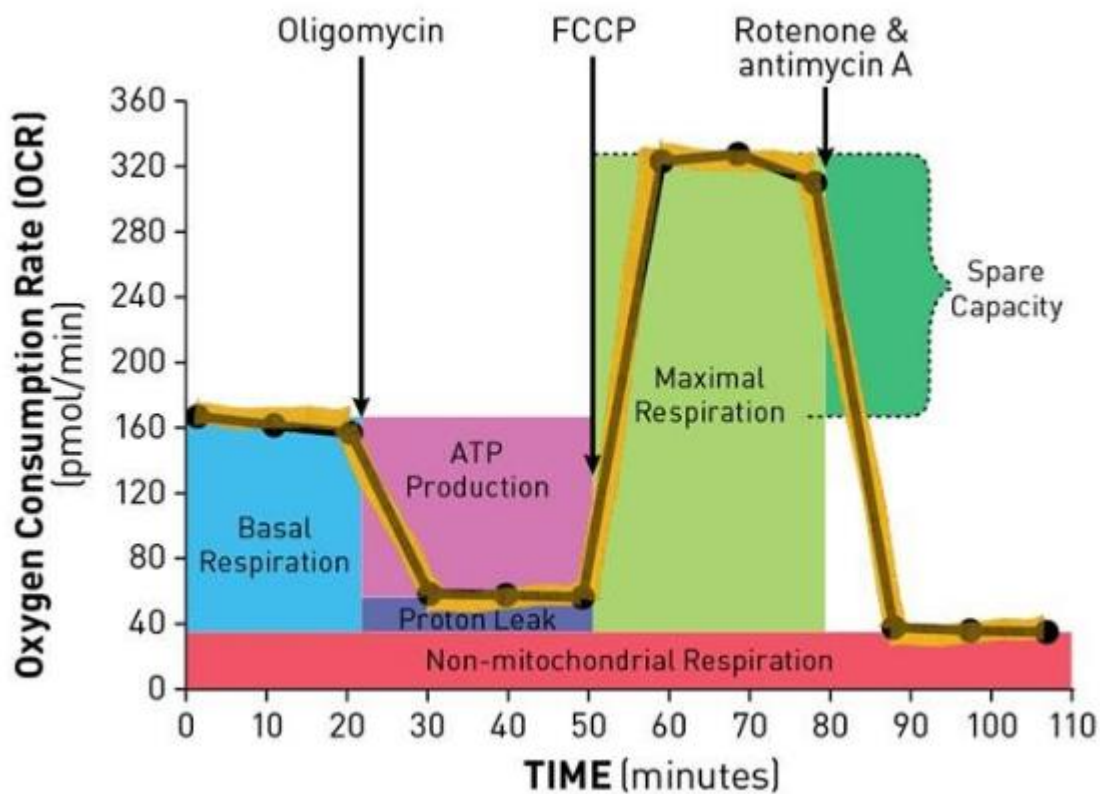
(五)脂肪細胞之功能性測試(Functional assay)**Oil red staining**

分化成熟的 adipocyte 會形成油滴聚積在細胞質內。透過 oil red 可將油滴染色，確認藥物處理沒有影響到 adipocyte 的成熟功能。細胞在染色前須經 10% formaldehyde 固定，可一次固定多盤置於 4°C 冰箱，之後依次進行染色，oil red 溶解於 isopropanol 在使用前需將雜質過濾。adipocyte 染色後可利用 isopropanol 將 oil red 再次溶解出來於 510 nm 偵測其吸光值將再次溶解出的 oil red 進行定量，可量化 adipocyte 的分化情形。脂肪細胞染色前與染色後的情況如下兩張圖。

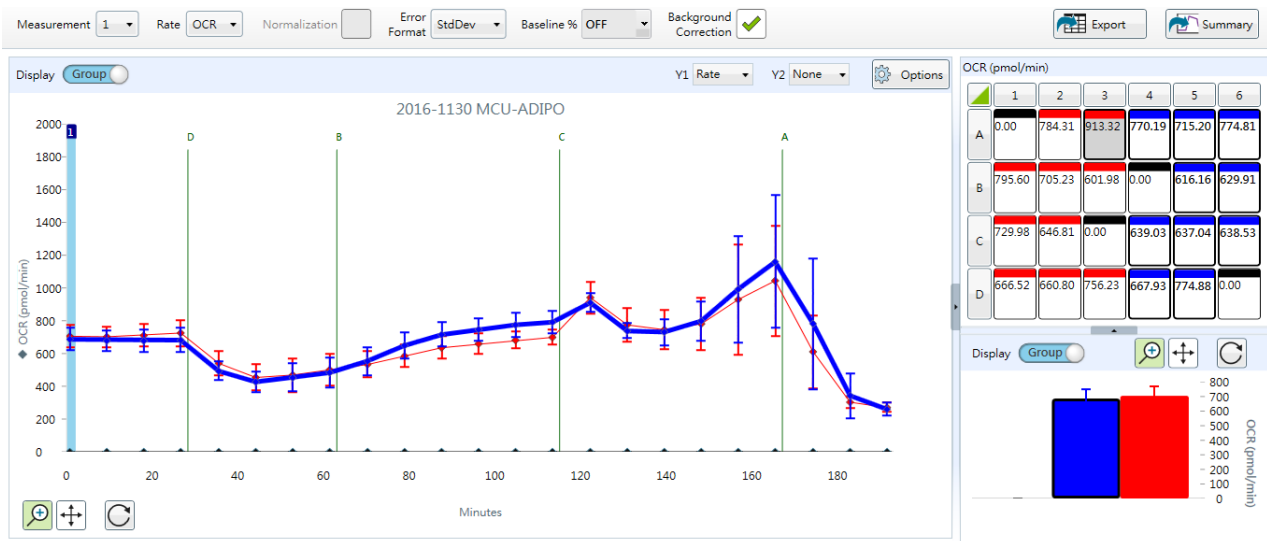


Oxygen consumption rate (OCR) & Extra Cellular Acidification Rate (ECAR)

由於粒線體氧化磷酸化反應會消耗氧氣，糖解作用會產生乳酸排出細胞外解離出氫離子，因此同時偵測細胞周圍環境的氧氣消耗率以及產酸率就可偵測整體能量代謝，即 OCR(Oxygen Consumption Rate)與 ECAR(Extra Cellular Acidification Rate)。為了分析 adipocyte 的有氧呼吸需利用 Seahorse Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience Inc., North Billerica, MA) 進行 OCR 的量化。細胞的 seeding 和分化都需在 seahorse 專用之培養盤。因為分析時會進行震動，故需在 seahorse 專用盤上 coating 0.2 % galetin 以免細胞在分析過程中脫落。經由之前敘述過的培養及分化 protocol 之後，在分析前需在前一天將 seahorse 的專用 probe rehydration，而為了偵測 pH 值需在上機前更換為 seahorse 分析用的 running medium (不含 sodium bicarbonate 和 FBS) 在無二氧化碳的 37°C 培養箱培養 1 小時。由於能量代謝系統平時並不會以極限狀況運作，因此為了將樣本間的差異放大，加入藥物用以評估粒線體或糖解作用的極限運作能力，如下圖：



如圖所示，起始先偵測基礎的耗氧狀況，先加入 Oligomycin 為 ATP synthase inhibitor 抑制粒線體產生 ATP，因此被抑制的耗氧量就表示有多少氧氣參與合成 ATP，剩下之部分則為 proton leak 即是經由 uncouple 所消耗之氧氣。接著加入 FCCP，此藥物為 uncoupler 在適當的濃度可不破壞電子傳遞鏈而讓粒線體以極限狀況空轉，用以評估粒線體的最大耗氧能力，FCCP 在每種不同株細胞之間的作用濃度及產生毒性之濃度不同，需先進行測試，最後加入電子傳遞鏈的抑制劑 Complex I inhibitor Rotenone & complex III inhibitor Antimycin A，將粒線體的耗氧完全關閉，確定其偵測的背景值。為了模擬細胞冷刺激所產生的作用則加入 forskolin 進行評估。在實驗室的實際操作結果如下圖：



Glucose uptake

分化成熟的脂肪細胞活化時會增加葡萄糖及脂肪酸的攝取及代謝。為了測試藥物處理或改變基因表現是否影響脂肪細胞之代謝活性，葡萄糖攝取及脂肪酸攝取及氧化是重要的參考依據。葡萄糖攝取實驗步驟如下：

- 首先將分化成熟之脂肪細胞改為以 serum free 的 DMEM/H 培養 4 小時，使細胞處於飢餓的狀態。
- 以 KRH buffer 沖洗細胞 2 次，將待測細胞一半加入 KRH buffer，另一半加入含 insulin 的 KRH buffer，培養 30 min，可測試細胞在有無 insulin 刺激下的反應。
- 每個 well 間隔 10 秒加入 2-deoxy-[3H]glucose (0.1 mM, 0.5 μ Ci/ml; PerkinElmer Life and Analytical Science, Waltham, MA)，每一組要有 2 個 well 是加入含 glucose transporter inhibitor cytochalasin B (20 μ M) in 2-deoxy-[3H]glucose，作為非特異性 glucose uptake，
- 注意每個 well 的作用時間都是 5 分鐘，因此以同樣間隔加入 ice cold 0.9% NaCl 終止反應
- 將 0.9% NaCl 吸除，每個 well 加入 0.05 N NaOH 將細胞 lysis
- 將細胞 lysis 液加入 4 ml of scintillant 並置於計讀器計讀
- 將剩餘細胞 lysis 液以 BCA protein lysis kit 測出每個 well 蛋白量，作為之後 normalize 之用。
- 將每個 well 加入量之 2-deoxy-[3H]glucose 同時計讀作為 standard 推算每個 well 的 2-deoxy-[3H]glucose 攝取量。

Fatty acid uptake & fatty acid oxidation

分化成熟的脂肪細胞活化時會增加葡萄糖及脂肪酸的攝取及代謝。為了測試藥物處理或改變基因表現是否影響脂肪細胞之代謝活性，葡萄糖攝取及脂肪酸攝取及氧化是重要的參考依據。脂肪酸攝取及氧化的實驗步驟如下：

- 首先將分化成熟之脂肪細胞改為以 serum free 的 medium 培養 4 小時，使細胞處於飢餓的狀態。
- 以 serum free DMEM/H 配製含 4% BSA、0.1 mM palmitic acid, and 0.2 μ Ci/ml [1- 14 C]palmitic acid (PerkinElmer Life and Analytical Science, Waltham, MA)之 fatty acid incubation medium
- 更換為 fatty acid incubation medium 培養 1 h
- 1h 後將 incubation medium 移入含 1 M acetic acid 的玻璃瓶並迅速蓋上並於室溫 shaking 1 小時，所釋放之 $^{14}\text{CO}_2$ 氣體會被玻璃瓶中所另外放置含 hyamine hydroxide 的 eppendorf 所捕捉。最後透過計數含 hyamine hydroxide 的 eppendorf 可以 $^{14}\text{CO}_2$ 的產量計算 fatty acid oxidation 。
- 而 fatty acid uptake 則是先以 0.05 N NaOH 將細胞 lysis 並以 chloroform-methanol mixture (2:1) 萃取出位於上層水層之 ^{14}C lipids，並透過計數 ^{14}C counts 計算出 ^{14}C lipids 換算細胞所攝取之 fatty acid

四、建議事項

(一)持續關注脂肪細胞對代謝功能之影響及機制，並尋求未來合作的可能性

雖然降血糖藥物有需多種類，但仍無法達到良好控制血糖的目標。糖尿病市場規模大，近年來各藥廠均投入新型降血糖藥的開發。較新的降血糖藥物如 DPP-4 inhibitor 是抑制腸泌素的分解而促進胰島素分泌、減少升糖素分泌；而今年健保開始給付的新藥 SLT-2 抑制劑則是藉由抑制腎小管上的鈉-葡萄糖共同運輸蛋白(sodium-glucose co-transporter 2, 簡稱 SGLT2), 降低腎臟回收葡萄糖的能力, 讓糖分隨尿液排出體外。換言之新藥之開發均建立在新的血糖調節機制上, 而褐色脂肪細胞活化除了本身對葡萄糖的攝取及利用增加外, 也可能如心得中所提到的透過褐色細胞所產生的 lipokine、exosomal miRNA 等對其他代謝器官如肝臟、肌肉等造成影響。故褐色脂肪的確有可能是發展新藥的潛力標的, 並可能同時具有減重的功效。雖然褐色脂肪細胞自 2009 年才確認存在於成人身體上, 相關研究尚未完全揭露其功能, 但越來越多的證據顯示褐色脂肪細胞或其分泌的因子確實對代謝具有影響力, 可繼續參加相關的研討會等加以關注。同位素標定在代謝的研究上扮演重要的角色, 許多代謝實驗的進行均需利用營養素標定同位素來進行, 除此之外, 曾教授所發現的 lipokine, 也相同地可利用同位素標定進一步追蹤研究其在其他器官的分布及作用等, 本所可以同位素標定之專業技術建立合作關係。

(二)開發褐色脂肪專一性標靶

由 $\beta 3$ adrenergic receptor agonist Mirabegron 進行的人體試驗結果來看, 確實可利用藥物有效活化褐色脂肪, 但由於其專一性不足, 對於心血管仍有一些輕微副作用。因此開發褐色脂肪專一性標靶對於安全地活化褐色脂肪是相當重要的。曾玉華教授對脂肪細胞表面受體也有相關研究, 曾發表褐色脂肪細胞專一性受體 PAT2、P2RX5。不過這兩個 receptor 並無 ligand 可進行進一步的活體研究測試。這個部份需要透過單株抗體的產製來進行, 但受限於本所並無相關技術, 可能須以委託產製或合作研究之方式進行。未來隨著褐色脂肪細胞更多功能或機制的發現成為一個治療的標的時, 專一性標靶可增加其有效性及減少藥量。

(三)開發褐色脂肪功能性檢驗

目前褐色脂肪活性之檢測標準是 FDG PET scan，然而受限於接受劑量，無法在人體連續多次使用，因此臨床研究試驗設計會受限並且後續追蹤就不容易執行。曾教授利用受試者褐色脂肪細胞活化後分析血液，尋找血液中增加的分子與褐色脂肪的相關性，進而發現了相關的調節性 lipid，即 lipokine。這也顯示了她對於開發褐色細胞活性的血液檢驗相當具有企圖心。液態檢體在近幾年蔚為風潮，也是未來的趨勢，目前血液中 exosome 的檢測在各疾病領域如腫瘤等也逐漸受到重視。未來若能透過抽血檢測褐色脂肪的產物，例如 lipid 或 exosomal miRNA 藉以代表其活性，對於褐色脂肪相關的藥物開發相當有助益，因為雖然在臨床前的試驗動物可連續進行造影，但在人體的應用上，FDG scan 仍是受限。

(四)利用脂肪細胞功能性測試或活體試驗篩選具潛力藥物

本次所學之細胞培養分化及功能性測試可應用於具潛力藥物之篩選，而活體的部分也可以利用葡萄糖耐受性試驗、胰島素耐受性試驗及低溫耐受性試驗進行活體之測試。也可利用本所既有之 FDG PET 造影進行給藥後褐色脂肪活性變化的觀察。此外，也可利用高脂肪餵食之肥胖動物模式，進行以上所提及的各項測試，評估在各不同動物模式下的給藥效果。

五、附 錄



與 Tseng Lab member 合影