

目錄

第一章 緒論.....	1
第一節 研究背景.....	1~3
第二節 研究目的.....	4
第二章材料與方法.....	5
第一節 研究對象.....	5
第二節 研究方法.....	6
第三節 統計分析.....	7
第三章 研究結果.....	8
表格.....	9~11
圖表.....	12
第四章 討論.....	13~15
第五章 結論.....	16
參考文獻.....	17~23
附錄一: Criteria for the Diagnosis of Diabetes Mellitus.....	24
附錄二: 放射免疫分析(Radioimmunoassay, RIA).....	25~36
關鍵字.....	37

第一章 緒論

第一節 研究背景

併發粥狀硬化性心血管疾病(atherosclerotic cardiovascular complications)是造成第二型糖尿病患者死亡的最主要原因,但其間的機制並不是非常清楚,血脂肪(lipid)代謝異常、止血因子(hemostatic factors)異常以及產生胰島素阻抗(insulin resistance)都是可能的原因之一。¹ 過去研究顯示,脂肪組織(adipose tissue)不只是能量儲存的器官而已,它也扮演了內分泌器官的角色,²⁻⁵ 它分泌了一些可影響血糖恆定的自由基脂肪酸(free fatty acid)^{2,6-8} 及一些稱做 adipocytokines 的賀爾蒙(peptide hormone),² 這些 adipocytokines 包括了 plasminogen activator inhibitor type 1(PAI-1),^{1-2,9-16} tumor necrosis factor- α (TNF- α),^{1-2,16-20} leptin,^{1-2,20-29} interleukin 6,^{2,16,30} resistin,^{2,5,20} angiotensin - II,² acylation stimulating protein(ASP),² adiponectin。^{1-2,16,20} 這些脂肪組織所分泌的物質可能與糖尿病患者產生 insulin resistance 及併發粥狀硬化性心血管疾病有關。^{16,20} Adiponectin 它是一種 adipose tissue-specific plasma protein,在 1990 年代中期由 4 個不同的團體使用不同的方法所發現,因此有 Adipocyte complement-related protein 30(Acrp 30), Adipose most

abundant gene transcript(apM1), AdipoQ, gelatin-binding protein(gpd28)等不同名稱,但還是以 Adiponectin 最常被使用。² 它包含了 244 種氨基酸,其基因位於 3q27 的人類染色體上,在血中的濃度非常豐富,約佔了總血漿蛋白的 0.01% ,血漿中的參考濃度為 5-30 μ g/ml。^{1,31-33} 最近國外的研究報告顯示,它具有抗發炎 (anti-inflammatory),抗糖尿病(antidiabetic), insulin-sensitizing 及抗血管粥狀硬化(antiatherogenic)的特性,其血清中的濃度,男性族群明顯低於女性族群,而且在肥胖者、第二型糖尿病患者、冠狀動脈疾病患者當中,其血清中 Adiponectin 的濃度亦是偏低的。^{1,16,33-36} 但在第一型糖尿病及末期腎衰竭患者,其血清中 Adiponectin 的濃度卻是偏高的。³⁷⁻³⁸ 而原本無糖尿病的人,若其血清中 Adiponectin 的濃度偏低,將來產生糖尿病的機會較高。³¹⁻³² 我們知道, Insulin resistance 是產生第二型糖尿病的主要原因,而且與肥胖有相當密切的關係,藉由 Thiazolidinedione (peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist)這類藥品^{20,39} 或體重的減輕,¹⁰ 將增加其血清中 Adiponectin 的濃度而改善其 insulin sensitivity 及增加 β -cell 分泌 insulin, 不但可以治療第二型糖尿病患,也可藉由血清中 Adiponectin 濃度的增加來減少 vascular intervention 後血管的再狹窄。⁴⁰ 另外有研究報告指出,在糖尿病患者當中,合併有冠狀動脈疾

病者,其血清中 Adiponectin 的濃度會比未合併有冠狀動脈疾病者低。¹ 可見 Adiponectin 在冠狀動脈疾病與糖尿病上及其間伴演了很重要的角色,但很可惜的是,這些研究報告大多是國外的資料,國內的報告卻很少,因此研究本土的資料是有其必要性的。

第二節 研究目的

既然有研究報告指出,在糖尿病患者當中,合併有冠狀動脈疾病者,其血清中 **Adiponectin** 的濃度會比未合併有冠狀動脈疾病者低,理論上,在冠狀動脈疾病患者當中,合併有糖尿病者,其血清中 **Adiponectin** 的濃度應該也會比未合併有糖尿病者低。故本人設計此一實驗來研究本土冠狀動脈疾病患者當中第二型糖尿病與非糖尿病患者間其血清中 **Adiponectin** 濃度的差異。

第二章 材料與方法

第一節 研究對象

本研究總共收集了 106 位患者,男性 50 位,女性 56 位,平均年齡 59 歲(23 歲至 83 歲),其中 82 位患有冠狀動脈疾病或糖尿病,24 位為正常控制組。冠狀動脈疾病者共 41 位,其中合併有第二型糖尿病患者共 19 位,未合併者共 22 位。第二型糖尿病患者共 60 位。

第二節 研究方法

冠狀動脈疾病的診斷標準為經由心導管血管射影，主要冠狀動脈分支管腔直徑減少大於 75%以上者，即管腔狹窄程度大於 75%以上。糖尿病的定義乃根據 2000 年美國糖尿病協會標準(American Diabetes Association,2000)(見附錄一)。所有的血液樣本都符合空腹 8 小時以上，離心後將血清存放於 -70°C 的溫度下以便於日後的分析。以 RIA(Radioimmunoassay)方式(見附錄二)來測量血清中 Adiponectin 的濃度，使用的 human adiponectin RIA kit 是 The LINCO Research, Inc.此家公司所生產，Adiponectin RIA assay 所使用的標的抗原為 ^{125}I -labeled Murine Adiponectin, 抗体為 Multispecies Adiponectin Rabbit antiserum, 使用的技術為 double antibody/PEG technique, 使用的 Adiponectin Standards 為 recombinant Human Adiponectin。同一批實驗的誤差(Intra-assay Precision)(%CV: coefficient variation, 變異係數)與不同批實驗的誤差(Interassay Precision)(%CV)分別為 3.59 與 6.90, 一般若小於 10 均可接受。

第三節 統計分析

以 t 檢定(Students' t test)來分析冠狀動脈疾病患者當中,合併有第二型糖尿病者及無糖尿病者,其血清中 Adiponectin 濃度的差異,另外也以 t 檢定來分析第二型糖尿病患者與正常者,冠狀動脈疾病患者與正常者,男性與女性間血清中 Adiponectin 濃度的差異。以皮爾生(Pearson)相關係數來分析血清中 Adiponectin 的濃度與 BMI(body mass index)之間的相關性。

第三章 研究結果

患者基本資料列於 Table 1。本篇研究結果顯示,冠狀動脈疾病患者當中,合併有第二型糖尿病者,其血清中 Adiponectin 的濃度比無合併糖尿病者低,但其差異未達統計顯著水準 (Table 2)($p=0.186$)。冠狀動脈疾病患者,其血清中 Adiponectin 的濃度比正常者低,但其差異亦未達統計顯著水準 (Table 3)($p=0.181$)。第二型糖尿病患者,其血清中 Adiponectin 的濃度明顯低於正常者 (Table 4)($P<0.01$)。男性血清中 Adiponectin 的濃度亦明顯低於女性 (Table 5)($p=0.0175$)。血清中 Adiponectin 的濃度與 BMI 呈現負相關性,且有達到統計顯著水準($r=-0.479$, $p<0.01$)(Figure),即肥胖者其血清中 Adiponectin 的濃度較低。

Table 1. 患者基本資料

	All	Male	Female	CAD with DM	CAD without DM	CAD	DM	Normal control
N	106	50	56	19	22	41	60	24
Age (y)	59±15	62.36±11.46	55.34±16.64	65.05±10.65	69.5±7.95	67.44±9.45	60.62±10.62	44.04±17.52
BMI (kg/m²)	24.61±3.86	25.10±3.95	24.16±3.76	26.30±3.77	23.72±3.10	24.91±3.62	26.02±3.66	21.89±3.36
Adiponectin (mg/ml)	12.73±7.03	11.21±6.94	14.09±6.88	12.87±6.39	15.18±9.48	14.11±8.18	10.58±5.68	15.85±5.70

Table 2. 冠狀動脈疾病患者中有無糖尿病其血清中 Adiponectin 濃度的差異

	CAD	CAD	P
	With DM	Without DM	
Case Number	19	22	
Fasting Adiponectin, μg/ml	12.87\pm6.39	15.18\pm9.48	0.186(NS)

NS, not significant. Data are mean \pm SEM. t=-0.903

Table 3. 冠狀動脈疾病患者與正常控制組間血清中 Adiponectin 的差異

	CAD	Normal control	P
Case Number	41	24	
Fasting Adiponectin, μg/ml	14.11\pm8.18	15.85\pm5.70	0.181(NS)

NS, not significant. Data are mean \pm SEM. t=-0.918

Table 4. 糖尿病患者與正常控制組間血清中 Adiponectin 的差異

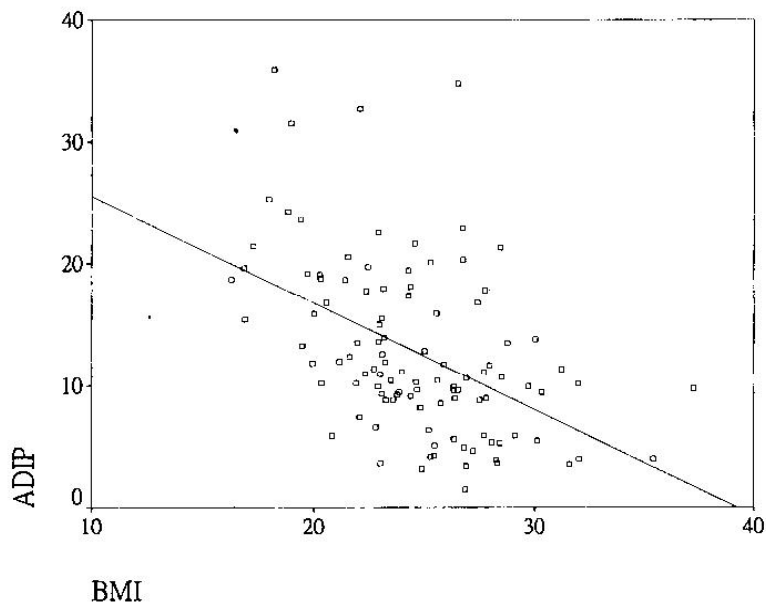
	DM	Normal control	P
Case Number	60	24	
Fasting Adiponectin, μg/ml	10.58\pm5.68	15.85\pm5.70	<0.01

Data are mean \pm SEM. t=3.842

Table 5. 男性與女性間血清中 Adiponectin 的差異

Sex	Male	Female	P
Case Number	50	56	
Fasting Adiponectin, μg/ml	11.21\pm6.94	14.09\pm6.88	0.0175

Data are mean \pm SEM. t=-2.142



$r = -0.479, p < 0.01$
ADIP: adiponectin ($\mu\text{g/dL}$)
BMI: body mass index (kg/m^2)

Figure. 血清中 Adiponectin 的濃度與 BMI 間的關係

第四章 討論

冠狀動脈疾病的危險因子包括了糖尿病、高血壓、高脂血症、抽煙、家族史、男性大於 45 歲、停經後的婦女。除了這些較確定的已知危險因子之外,陸續有許多其他的危險因子被發現,例如血液中 fibrinogen, hs-CRP 增高等等。我們知道血管內皮細胞受損(vascular endothelial injury)是產生動脈血管硬化(atherosclerosis)最重要的第一步驟,研究報告指出,有一種由脂肪組織所分泌類似膠原蛋白(collagen-like)的蛋白質 Adiponectin,它具有抗發炎(anti-inflammatory),抗糖尿病(antidiabetic),抗血管粥狀硬化(antiatherogenic)的特性。^{33-34,38} 在血管內皮細胞受損時,它會聚積在受損動脈血管壁的 subendothelial space,⁴⁰⁻⁴² 我們知道,monocyte 附著到 endothelial cells 上是血管受損的基本步驟,也是動脈粥狀硬化過程(atherosclerotic process)早期步驟,而 Adiponectin 會抑制 monocyte 附著到 endothelial cells 上,抑制 macrophage 轉變成 foam cell,以及抑制 macrophage 分泌 TNF- α 。另外,Adiponectin 也會藉由伴演 platelet-derived growth factor-BB-binding protein 的角色而抑制因 growth factor 所誘發的血管平滑肌細胞(vascular smooth muscle cells)增生(proliferation)及 migration。⁴¹ 動物實驗亦發現,缺

乏 Adiponectin 的老鼠,在其受損的血管上(mechanically injured arteries)會發現有嚴重的 neointimal thickening 及血管平滑肌細胞增生,補充 Adiponectin 後, neointimal proliferation 會得到改善,⁴⁰ 根據以上種種跡顯示,Adiponectin 具有 anti-atherosclerosis 的作用。而且其血清中濃度與 hs-CRP 呈現負相關性。⁴³ 研究報告指出,在冠狀動脈疾病患者當中,其血清中 Adiponectin 的濃度會明顯偏低,^{35-36,40-41,43-45} 但在此次研究報告當中顯示,冠狀動脈疾病患者,其血清中 Adiponectin 的濃度雖比正常者低,但其差異卻未達統計顯著水準,或許與本次研究的樣本數太小(包括冠狀動脈疾病患者及正常控制組)及血清中 Adiponectin 的濃度變異性很大有關,進一步的研究是必須的。

另外有研究報告指出,在糖尿病患者當中,合併有冠狀動脈疾病者,其血清中 Adiponectin 的濃度會比未合併有冠狀動脈疾病者低。¹ 理論上,在冠狀動脈疾病患者當中,合併有糖尿病者,其血清中 Adiponectin 的濃度是應該也會比未合併有糖尿病者低,但在本研究報告當中顯示,冠狀動脈疾病患者當中,合併有第二型糖尿病患者,其血清中 Adiponectin 的濃度雖比無合併糖尿病者低,但其差異卻未達統計顯著水準,或許與本研究樣本數太小(只有 41 位冠狀動脈疾病患者)及血清中 Adiponectin 的濃度變異性很大有關,故進一

步的研究是必須的。

男性血清中 Adiponectin 的濃度明顯低於女性，此次的研究結果亦是如此，根據動物實驗,其原因可能與男性賀爾蒙(Androgen)有關。³³

另外，在第二型糖尿病患者,其血清中 Adiponectin 的濃度明顯低於正常者及血清中 Adiponectin的濃度與 BMI 呈現負相關性這方面，³³⁻³⁶ 此次的研究結果亦是如此。不管是肥胖或瘦的人,Intra-abdominal fat(IAF) depot 才是 insulin sensitivity 的主要決定者,而非 subcutaneous fat(SCF) depot。而 Adiponectin 主要是來自於 IAF,而非 SCF, IAF depot 愈多則 Adiponectin 濃度愈低。⁴⁶,這也解釋了 Adiponectin 與 BMI 為何呈現負相關性而非正相關性。

第五章 結論

冠狀動脈疾病患者當中第二型糖尿病患者與非糖尿病患者間,其血清中 Adiponectin 的濃度並無明顯的差異。冠狀動脈疾病患者與正常者間,其血清中 Adiponectin 的濃度亦無明顯的差異。可能與樣本數較少及血清中 Adiponectin 的濃度變異性很大有關,故進一步的研究是必須的。男性血清中 Adiponectin 的濃度明顯低於女性,糖尿病患者及肥胖者,其血清中 Adiponectin 的濃度明顯低於非糖尿病患者及非肥胖者。

參考資料

1. Hotta K, Funahashi T, Arita Y, *et al.* Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1595-1599.
2. Stefan N, Stumvoll M. Adiponectin—its role in metabolism and beyond. *Horm Metab Res.* 2002; 34: 469-474.
3. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000; 106:473-481.
4. Havel PJ. Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and Adiponectin. *Curr Opin Lipidol.* 2002; 13:51-59.
5. Shuldiner AR, Yang R, Gong DW. Resistin, obesity and insulin resistance—the emerging role of the adipocyte as an endocrine organ. *N Engl J Med.* 2001; 345:1345-1346.
6. McGarry JD. Banting Lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of Type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002; 51:7-18.
7. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000; 106:171-176.

8. Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes*. 1997; 46:3-10.
9. Auwerx J, Bouillon R, Collen D, *et al*. Tissue-type plasminogen activator antigen and plasminogen activator inhibitor in diabetes mellitus. *Arteriosclerosis*. 1988; 8:68-72.
10. Juhan-Vague I, Roul C, Alessi MC, *et al*. Increased plasminogen activator inhibitor activity in non insulin dependent diabetic patients: relationship with plasma insulin. *Thromb Haemost*. 1989; 61:370-373.
11. Shimomura I, Funahashi T, Takahashi M, *et al*. Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat Med*. 1996; 2:800-803.
12. Alessi MC, Peiretti F, Morange P, *et al*. Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue: possible link between visceral fat accumulation and vascular disease. *Diabetes*. 1997; 46:860-867.
13. Hotamisligil GS. Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000; 24, Suppl.4:S23-S27.
14. Alessi MC, Morange P, Juhan-Vague I. Fat cell function and fibrinolysis. *Horm Metab Res*. 2000; 32:504-508.
15. Kim S, Moustaid-Moussa N. Secretory, endocrine and autocrine/paracrine

- function of the adipocyte. *J Nutr.* 2000; 130:3110S-3115S.
16. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, *et al.* Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:1930-1935
 17. Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor α : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes.* 1994;43:1271-1278.
 18. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993; 259:87-91.
 19. Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, *et al.* TNF- α inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91:4854-4858.
 20. Goldstein BJ. Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 2002; 90:3G-10G.
 21. Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, *et al.* Leptin reverse insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature.* 1999; 401:73-76.
 22. Masuzaki H, Ogawa Y, Aizawa-Abe M, *et al.* Glucose metabolism and insulin sensitivity in transgenic mice overexpressing leptin with lethal yellow agouti mutation: usefulness of leptin for the treatment of

- obesity-associated diabetes. *Diabetes*. 1999; 48:1615-1622
23. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, *et al*. Effects of the obese gene production on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 1995; 269:540-543.
24. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, *et al*. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*. 1995; 269:546-549.
25. Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, *et al*. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide γ gene expression in ob/ob mice. *Diabetes*. 1996; 45:531-535.
26. Dunbar JC, Hu Y, Lu H. Intracerebroventricular leptin increases lumbar and renal sympathetic nerve activity and blood pressure in normal rats. *Diabetes*. 1997; 46:2040-2043.
27. Fruhbeck G, Aguado M, Gomez-Ambrosi J, *et al*. Lipolytic effect of in vivo leptin administration on adipocytes of lean and ob/ob mice, but not db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 250:99-102.
28. Siegrist-Kaiser CA, Pauli V, Juge-Aubry CE, *et al*. Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J Clin Invest*. 1997; 100:2858-2864.
29. Zimmet P, Boyko EJ, Collier GR, *et al*. Etiology of the metabolic syndrome:

- potential role of insulin resistance, leptin resistance, and other players. *Ann N Y Acad Sci.* 1999; 892:25-44.
30. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, *et al.* C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA.* 2001; 286:327-334.
31. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, *et al.* Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet.* 2003; 361:226-228.
32. Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, *et al.* Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima India population. *Lancet.* 2002; 360:57-58.
33. Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, *et al.* Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes.* 2002; 51: 2734-2741.
34. Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, *et al.* Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 3815-3819.
35. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, *et al.* Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation.* 1999; 100: 2473-2476.
36. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, *et al.* Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res*

- Commun. 1999; 257: 79-83.
37. Imagawa A, Funahashi T, Nakamura M, *et al.* Elevated serum concentration of adipose-derived factor, adiponectin, in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2002; 25:1665-1666.
38. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, *et al.* Adiponectin, metabolic risk factors, and cardiovascular events among patients with end-stage renal disease. *Am Soc Nephrol.* 2002; 13:134-141.
39. Yang WS, Jeng CY, Wu TJ, *et al.* Synthetic peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist, rosiglitazone, increases plasma levels of adiponectin in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2002; 25:376-380.
40. Matsuda M, Shimomura I, Sata M, *et al.* Role of Adiponectin in preventing vascular stenosis. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:37487-37491.
41. Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, *et al.* Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vas Biol.* 2003; 23:85-89.
42. Okamoto Y, Arita Y, Nishida M, *et al.* An adipocyte-derived plasma protein, Adiponectin, adheres to injured vascular walls. *Horm Metab Res.* 2000; 32:47-50.

43. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, *et al.* Reciprocal association of C-reactive protein with Adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation*. 2003; 107:671-674.
44. Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, *et al.* Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2002; 106:2767-2770.
45. Shimada K, Miyauchi K, Mokuno H, *et al.* Predictive value of the adipocyte-derived plasma protein adiponectin for restenosis after elective coronary stenting. *Japanese Heart Journal*. 2002; 43:85-91.
46. Cnop M, Havel P.J, Utzschneider K.M, *et al.* Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia*. 2003; 46:459-469.

附錄一: Criteria for the Diagnosis of Diabetes Mellitus

Criteria for the Diagnosis of Diabetes Mellitus
Symptoms of diabetes plus random blood glucose concentration ≥ 11.1 mmol/L(200 mg/dL)
or
Fasting plasma glucose ≥ 7.0 mmol(126 mg/dL)
or
Two-hour plasma glucose ≥ 11.1 mmol(200 mg/dL) during an oral glucose tolerance test
In the absence of unequivocal hyperglycemia and acute metabolic decompensation, these criteria should be confirmed by repeat testing on a different day

Random is defined as without regard to time since the last meal.

Fasting is defined as no caloric intake for at least 8 h.

The test should be performed using a glucose load containing the equivalent of 75g anhydrous glucose dissolved in water; not recommended for routine clinical use.

Source: Adapted from American Diabetes Association, 2000.

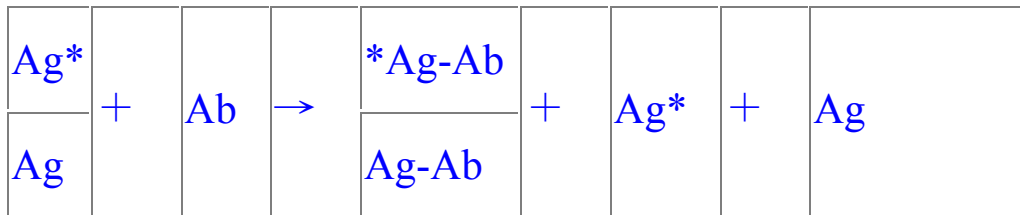
附錄二：放射免疫分析(Radioimmunoassay, RIA)

放射免疫分析 (Radioimmunoassay, RIA) 就是利用抗原與抗體間專一性的反應特性來定量待測物質的一種檢驗技術。1960 年代，Yalow 和 Berson 博士共同發表「競爭性蛋白質結合原理」，並依據此原理發展出放射免疫分析技術；此技術具有靈敏度，專一性和準確性極高的特質，可廣泛的應用在內分泌學、藥品與毒物質分析、病毒和腫瘤相關抗原測定等方面，這兩人更於 1977 年因此而成為諾貝爾醫學獎的得主。

放射免疫分析基本原理

一、競爭性放射免疫分析技術

傳統的放射免疫分析法所應用的基本原理就是「競爭性蛋白質結合原理」。其關鍵在於分子與分子間對結合位置的競爭，亦可解釋為抗原間相互競爭抗體的結合位置。我們可以圖一來解釋，圖中 **Ag** 代表抗原，也就是我們所想要檢測的物質；*為放射性物質，標化在已知濃度的抗原上面（***Ag**）；**Ab** 代表抗體，通常為與抗原有專一性結合性質的抗體；**Ag-Ab** 指抗原與抗體的結合物。



圖一、放射免疫分析的基本原理

*代表放射性物質，**Ag** 代表抗原（待測物質），**Ab** 代表抗體

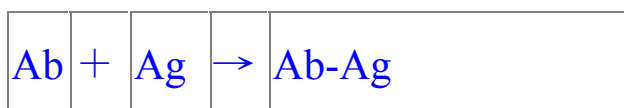
整個反應中，***Ag** 與 **Ab** 為已知的條件，而***Ag-Ab** 為可測量出的濃度

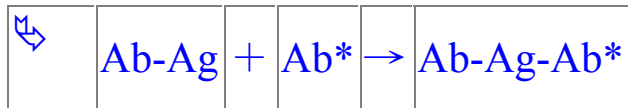
在放射免疫分析的實驗中，加入超量的標化抗原（***Ag**）與未標化抗原（**Ag**：也就是待測濃度的物質），去與較少量的抗體（**Ab**）做競爭性結合。如果實驗結果所計量到的結合物（***Ag-Ab**）放射活性較高，表示待測物的濃度

較低。如果所計量到的結合物放射活性較低，則表示待測物的濃度較高。藉由標準曲線圖的分析，可以推算出待測物的濃度。

二、結合性放射免疫分析技術

由於傳統的放射免疫分析法會在極高濃度及極低濃度時，標準曲線呈超近水平線狀態，此時數值僅能以估計值來計算。再加上分離方法相當複雜，操作過程往往受技術人員的穩定性而發生誤差；為能彌補上述的缺失，因此發展出另一種新的放射免疫分析法—Immunoradiometric Assay 簡稱 IRMA 法，又稱之為三明治法。其原理相當簡單，將抗體吸附在試管壁上，當其與檢體（抗原）反應後，再以清洗，即可將未結合物質分離出來。現今的放射免疫分析組件皆已商業化，多是以 IRMA 方式。將超量的抗體與抗原加在一起反應。如圖二所示，以第一抗體（Ab）依固相方式吸附於試管壁或塑膠材質上，再將放射性物質標化在第二種抗體（Ab*）上。操作時，先將檢體（抗原；Ag）加入已吸附含有抗體的試管內，培養一段時間，以水洗去未結合抗原，再加上標化放射性物質的第二種抗體，再培養一段時間，洗去未結合物質，此時留在空管內即為「三明治」式的抗體+抗原+抗體複合物（Ab-Ag-Ab*），此時所計量得之放射性與欲測物的濃度成正比。





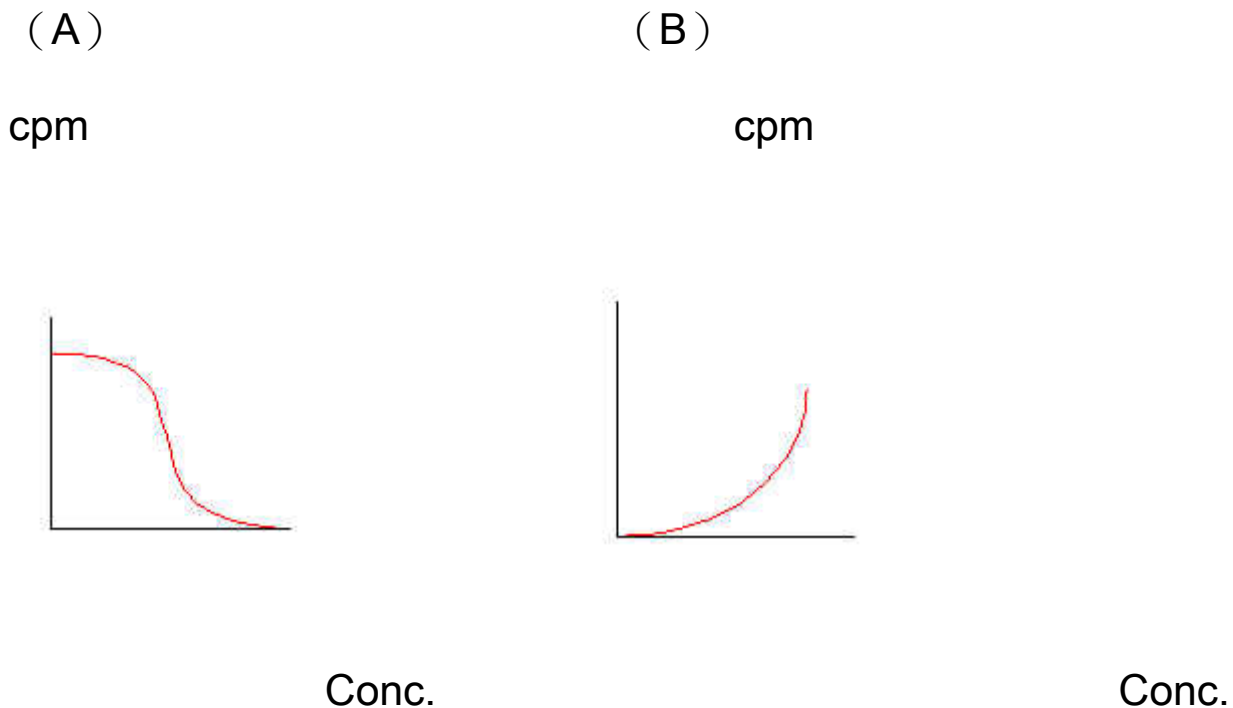
圖二、IRMA 的作用原理

Ag 為抗原（待測物質），Ab 為抗體，*Ab 為放射性標化的二級抗體

整個反應中，Ab 與 Ab* 為已知的條件，而 Ab-Ag-Ab* 為可測量出的濃度

IRMA 是另一種常用的放射免疫分析方法，所用的是屬於抗體結合性的分析而非相互的競爭。以第一抗體與抗原結合後，把反應剩餘之抗原清除，再以過量之標記二級抗體結合後，把反應剩餘之抗體清除；此時測量 Ab-Ag-Ab* complex 的量，再與標準曲線圖對照，就可以知道檢體中抗原的濃度。若 Complex 的量則抗原的濃度亦大，反之則小。

標準曲線的製作



圖三、(A) RIA 的標準曲線圖，待測物質的濃度 (Ag, conc.)

與所測得的反應計數 (*Ag-Ab, cpm) 呈反比。

(B) IRMA 的標準曲線圖，待測物質的濃度 (Ag, conc.)

與所測得的反應計數 (Ag-Ab*, cpm) 呈正比。

在作放射免疫分析實驗時，通常會先設計幾個欲測物質 (抗原) 的已知濃度，稱之為標準量，再加上一定量的抗體和標示抗原，依據抗原與抗體間發生的競爭性結合作用，經一段時間反應後，除去未結合的抗原，依據所計測到的放射性強度，可以得到一個曲線圖，稱之為標準曲線圖。然後未

知濃度的檢體經實驗後所計測到的放射性量，再與標準曲線圖比對，即可求得正確的濃度數值。

操作內容及方法

RIA 系統是依據 “Law of mass action” 的免疫化學反應，必需具備抗體、標記抗原、抗原、培育條件與過程，分離結合型與游離型抗原的方法，放射活性計數，建立標準曲線及計算結果，此外還需要做品質管制的工作。

1. 抗體

與測定系統的敏感度與特異性有密切關係。目前利用動物製造出之抗體分為多株抗體(polyclonal antibody)與單株抗體兩種。利用 “競爭抑制” 原理之 RIA，較適合使用多株抗體，因它與抗原之親和力 (affinity) 較強，多株抗體產量較少亦符合於 “稀釋度越大，測定系統敏感度越高” 的特性。單株抗體的優點是純度高、特異性佳，可大量生產、但親合力弱，適合使用於以 “標記抗體” 及過量抗體為特點的 IRMA 方法。

2. 標記抗原

在 RIA 操作系統內，原則上使用之標記抗原濃度，約與欲測樣品濃度接近，這樣才能讓兩者互相競爭抗體之結合位置。標記抗原品質很重要，它必需仍保有抗原性才能與抗體結合。用做標記的抗原必須完全純化，這種物質亦可當做標準液使用，兩者最好相同。

目前最常用的放射性同位數是碘-125 (半衰期 60 天，高計數效率：90% ，商用供給含量高：95% ，能量低：約 40 KeV) 。

測定系統的敏感度與標記抗原之比活度(specific activity)有很大關係。越高比活度的標記抗原，在建立測定系統時，使用的量可越少，標記抗原的量越少，敏感度越高。

3. 抗原

用做標準液之抗原與欲測樣品，不需要有完全相同的化學構造或生物特性，但兩者的免疫特性必須相同。也就是說，它們與抗體的免疫化學反應力必須相同。通常我們會使用與欲測樣品之分子構造完全相同的物質當標準液，以避免與抗體結合力不同所造成的結果誤差。

4. 培育條件

放射免疫分析系統內，各種反應物質需放在同樣選定溫度，以及緩衝液內培育一段特定的時間。操作時，所有反應劑相繼加入試管內，依序為：緩衝液、標準液或檢體、抗體、及標記抗原。

培育時間通常以達到反應平衡為止，但有些情況下，在未達平衡時即行分離。

較重要的是培育時間，必須每個試管一樣。

培育的溫度控制相當重要，反應在室溫或 37°C 下比 4°C 較早達到平衡，然而太高的溫度會破壞標記或未標記抗原減低抗原結合力。此外，抗原抗體反應之平衡常數亦與溫度有關，在 4°C 下抗原抗體結合後解離較少，可得到較高的 B/F 值。緩衝液的酸鹼度(pH)及所含離子強度對整個反應系統亦有很大影響，太強的酸或鹼會使抗原抗體結合物解離，一般在 pH 為 7.4 ~ 8.6 時影響較小。

5. 游離體與結合體的分離

放射免疫分析實驗中，在同一根試管中，加入了標化了的抗原，未標化抗原與抗體，在經過一段反應時間後，必須將抗原與抗體結合物與未結合的抗原分離，才能計算所需要的放射性強度。理想的分離方法必須能夠不干擾結合反應，不受血清或血漿的影響，經濟且迅速的將游離體與結合體完全分離。以下介紹幾種代表性的分離方法：

(一)電泳層析法

此法係選擇一種適當的支持物如濾紙，澱粉膠或 polyacrylamide 等使未破壞的游離態物質吸附在起始點位置，在電流及緩衝溶液的帶動下，將抗原與抗體結合物，未結合抗原、抗體，以不同速度移動。以對起始點距離長短不同而達到分離目的。此種方法固然可以將各個不同狀態的物質完全分

離，但是太費時，複雜又不經濟，因此，除了用來評定標化抗原的好壞外，很少用在一般的放射免疫分析實驗上。

(二) 吸附法

通常是利用某些物質可以吸附游離體的特性，如活性碳·矽化合物等，再以離心力的方式·將結合物與未結合物分離。此種方法最經濟且方便·通常大量標本檢驗時·多採用其法。

(三) 分層沈澱法

中性鹽類或有機溶劑，在適當條件下，會使免疫球蛋白沈澱。如 Ammonium Sulfate，Ethanol，PEG 等。此種方法大多受溫度，酸鹼值、蛋白質濃度等影響，必須經過實驗來確定適當條件。

(四) 雙重抗體沈澱法

當抗原與抗體結合後，再加上第二種抗體·利用離心力來使結合物沈澱下來。是一種相當理想的分離法。但是要注意所謂的第二種抗體—通常是純化的 IgG，是否有未知的影響因素·必須多次實驗來確定。

(五) 雙抗體固態分寫法

有一些不溶性的聚合物體如 polystyrene， silicates，離子交換樹脂等，會與第二種抗體以共價鍵吸附。再加上抗原及第一種抗體反應，再以簡單的沖洗方式，將未結合物質分離。此種方法有相當好的敏感度，抗體用量亦可減少。但是每一批製造組件 (kit) 可能會有差異，不能混合使用。

放射免疫分析的品質管制

檢驗人員在操作放射免疫分析實驗時，通常必須注意所謂的品質管制。品質管制的觀念為仔細的研究操作方式，按步就班小心操作。實驗結果自然會將誤差減少到最小。這也就是品質管制最大的精神意義。我們在進行品質管制分析時，須注意一些基本要素。首先要注意實驗材料是否過期而致使標化物發生解離現象。檢查的方法很簡單，在一根試管內，加入定量的抗體與標化抗原，經過一定時間培養後分解未結合物，再依加入的標化抗原，計算得到所謂的 B_0/T 值，若是低於 40%，則表示標化物質已有蛋白質解離現象。其次是觀察依實驗結果所繪出的標準曲線，必須是自高到低，能夠聯成一條平滑的曲線，各實驗點如果跳離標準曲線的軌跡太多，則表示此次實驗結果有誤差，會減低實驗結果的可信度。每一個實驗點，最少做 2 至 5 個試管的測試，將其結果求得變異數值，若是大於 10%，則此次實驗點必須再做一次。為了控制實驗本質，我們可將同一個實驗點重覆幾次，得到所謂的實驗組內誤差，亦可將同一個實驗點在每一個實驗中加入重作，得到所謂的實驗組外誤差。長久下來，製成一個圖表，以供長期的品管評估。

取材自 慈濟醫院核子醫學科醫檢師 張素雲

放射免疫分析

簡述(<http://www.tzuchi.com.tw/dl/HealthInfo/new 13.htm>)

關鍵字:

Adiponectin

冠狀動脈疾病

糖尿病