

R
008.8
7253

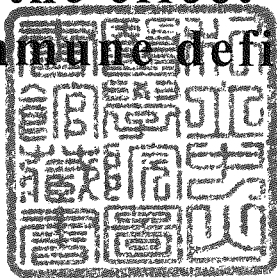
私立中山醫學院營養科學研究所
Graduate Institute of Nutritional Science
Chung Shan Medical and Dental College

碩士論文
Master Thesis

指導教授：蘇國雄 博士
劉承慈 博士

Advisor: Kou-Hsiung Su, Ph.D.
Cheng-Tzu Liu, Ph.D.

穀氨醯胺對免疫失調影響之探討
Studies on the effect of glutamine to
immune deficiency



研究生：劉靜宜
Graduate Student: Ching-Yi Liu

參考書恕不外借

中華民國八十六年七月
July, 1997

中山醫學院圖書館



C046132

授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人年度在中山醫學院營養科學研究所
-----組 86 學 年 第 2 學 期 所 撰 碩 士 學 位 論 文。

論文名稱：穀氨酶對免疫失調影響之探討

同意本國網路或
 具料，本
不有學並重
同著委與製
意作員台發
財會灣行
產科學。
權學術
之技術
論及路
文資及
提料科
要中技
，心網
授，路
予得連
國重線
家製，
圖成得
書電不
館子限
、實地
本料域
人權時
畢後間
業收與
學錄次
校於數
及該，
行單以
政位光
院之碟

同意本資微佰至
 具中小之圖
不有小組服
同著，製務
意作得作。年
財不之本
產限研論
權地究文月
之域報因後
論時告涉再
文間、及公
全與獎專開
文次勵利。
資數代等
料以表智
，微作慧
授縮、財
予、博產
行光碩權
政碟士之
院重論申
國製文請
家後三，
科發權請
學行資將
委，料本
員並等論
會得值文
科享新全
學該台文
技中幣延
術心伍後

同意本畢他
 具學以
不有校各
同著圖種
意作書方
財館法
產，重
權為製
之學，
論術不
文研限
全究時
文之間
資目與
料的地
，以域
授各，
予種惟
教方每
育法人
部重以
指製一
定，份
送或為
繳為限
之上。
圖述
書目
館的
及再
本授
人權

上述授權內容均無須訂立、讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。上述授權內容均無須訂立、讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。

指導教授姓名：蘇國雄 劉承慈

研究生簽名：劉靜宜 學號：R84302
(親筆正楷)

日期：民國 86 年 7 月 18 日

備註：1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。
2. 授權書二項不者，民國 85 年 4 月 10 日送請著委會修正定稿。
3. 本授權書已於民國 85 年 4 月 10 日送請著委會修正定稿。

簽署人須知

1. 著作權法第17條規定，著作權人得依本法之規定，授權他人行使全部或一部之著作財產權。授權行為，除另有約定外，授權人得隨時撤回。授權契約，應以授權人與受讓人簽名或蓋章為要件。授權契約，應以授權人與受讓人簽名或蓋章為要件。授權契約，應以授權人與受讓人簽名或蓋章為要件。
2. 著作權法第17條規定，著作權人得依本法之規定，授權他人行使全部或一部之著作財產權。授權行為，除另有約定外，授權人得隨時撤回。授權契約，應以授權人與受讓人簽名或蓋章為要件。授權契約，應以授權人與受讓人簽名或蓋章為要件。授權契約，應以授權人與受讓人簽名或蓋章為要件。
3. 著作權法第17條規定，著作權人得依本法之規定，授權他人行使全部或一部之著作財產權。授權行為，除另有約定外，授權人得隨時撤回。授權契約，應以授權人與受讓人簽名或蓋章為要件。授權契約，應以授權人與受讓人簽名或蓋章為要件。授權契約，應以授權人與受讓人簽名或蓋章為要件。
4. 著作權法第17條規定，著作權人得依本法之規定，授權他人行使全部或一部之著作財產權。授權行為，除另有約定外，授權人得隨時撤回。授權契約，應以授權人與受讓人簽名或蓋章為要件。授權契約，應以授權人與受讓人簽名或蓋章為要件。授權契約，應以授權人與受讓人簽名或蓋章為要件。
5. 著作權法第17條規定，著作權人得依本法之規定，授權他人行使全部或一部之著作財產權。授權行為，除另有約定外，授權人得隨時撤回。授權契約，應以授權人與受讓人簽名或蓋章為要件。授權契約，應以授權人與受讓人簽名或蓋章為要件。授權契約，應以授權人與受讓人簽名或蓋章為要件。

 研究生姓名：劉靜宜 聯絡電話：(049) 242627
 地址：南投市民族路322巷25號

本論文為中山醫學院授與理學碩士學位之必備條件之一，經中山醫學院營養科學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

國立台大醫學院醫事技術所副教授

賴信志 博士

賴信志

私立中山醫學院營養科學研究所教授
(論文指導教授)

蘇國雄 博士

蘇國雄

私立中山醫學院營養科學研究所副教授
(論文指導教授)

劉承慈 博士

劉承慈

中華民國八十六年六月

學生劉靜宜論文題目為穀氨醯胺對免疫失調影響之探討，其論文已經中山醫學院營養科學研究所碩士論文考試委員會審查合格及口試通過，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：蘇國雄 博士

簽名：蘇國雄

劉承慈 博士

簽名：劉承慈

中華民國八十六年七月

謝 誌

由衷感謝我的指導教授 蘇國雄 博士兩年來的悉心指導與教誨及 劉承慈 博士在生活上之關懷與鼓勵，使得無論在課業、實驗研究或待人處事上皆受益良多，得以順利完成研究。本論文復蒙劉老師多次詳加閱改，使得以順利完成付梓，感謝之意，難以言表。

文稿初成，承蒙 賴信志 博士撥冗審閱及斧正，使本論文更臻完善，謹此衷忱致謝。

研究期間，感謝 蔡嘉哲 院長對本研究之支持與鼓勵，並提供寶貴意見及血液樣品。並感謝 徐成金 博士在實驗儀器上的支援，及中山醫院 詹組長，再靜、惠玲 之協助，使本研究得以順利完成。此外，感謝實驗室 佩琳 及學弟 國峰、科銘 在研究上的幫忙與配合、玲貞 學姊的關懷，心瑜、俊茂、晉慧、振宇、世宗 學長、聖烈、相訓、杏珠、哲誌、至凱、海永、秀君、曉琪、韻蘭、建順、明才、偉爵、威徹、敏惠、孟訓 等於研究上之幫忙與協助，在此致上誠摯的謝意。

最後，特別要感謝我的父母親及姊妹，在挫折時給予鼓勵、支持、與包容，謹以本論文獻給關懷、愛護、體諒我的父母、家人、親屬、師長及好友。

劉靜宜 謹誌於

中山醫學院營養科學研究所

中華民國八十六年七月

目錄

	頁次
中文摘要.....	III
英文摘要.....	V
中英專有名詞及縮寫對照一覽表.....	VII
壹. 前言.....	1
貳. 文獻探討.....	3
一、穀氨醯胺 (Glutamine).....	3
二、穀氨醯胺在生理、生化上扮演的角色.....	4
三、動物及人類血液中穀氨醯胺濃度.....	5
四、外生性穀氨醯胺對於維持生理需求之必要性.....	5
五、穀氨醯胺對免疫失調之影響.....	9
敗血症.....	9
(一) 敗血症的成因.....	9
(二) 已知穀氨醯胺對敗血症之影響.....	10
自體免疫疾病.....	16
(一) 自體免疫疾病及其成因.....	16
六、以有標記之放射性 thymidine 併入細胞觀察淋巴細胞功能之模型及其原理.....	21
參、實驗材料.....	27
一、化學試藥.....	27
二、酵素名稱.....	29
三、儀器設備.....	29
四、實驗動物.....	29
肆、實驗方法.....	30
一、以敗血症動物模型觀察穀氨醯胺之作用.....	30
二、以自體免疫疾病病人觀察穀氨醯胺之作用.....	38

三、強化穀氨醯胺營養配方中穀氨醯胺之安定性分析...	41
四、統計分析.....	41
伍、結果.....	42
一、以 Con A 當分裂原刺激大白鼠淋巴細胞複製之最適 濃度之探討.....	42
二、以 LPS 誘發大白鼠敗血後，不同淋巴細胞數、不同 培養時間及穀氨醯胺濃度對淋巴細胞複製率之影 響.....	42
三、穀氨醯胺餵食對 LPS 誘發敗血症大白鼠其攝食 量、體重及脾重百分比及血漿中麩胺醯胺濃度之 影響.....	43
四、穀氨醯胺餵食對 LPS 誘發敗血症大白鼠淋巴細胞 複製率之影響.....	
五、以人類自體免疫病人觀察穀氨醯胺對淋巴細胞複 製率之作用.....	44
六、自體免疫疾病治療藥物對正常淋巴細胞複製率之 影響.....	46
七、強化穀氨醯胺營養品配方中穀氨醯胺之安定性分 析.....	47
陸、討論.....	71
柒、結論.....	78
捌、參考文獻.....	79

中文摘要

穀氨醯胺是人體合成蛋白質所需的一種胺基酸，其可由體內自行合成，為一非必需胺基酸，是肌肉及血液中含最豐富的胺基酸。然而，在某些病理狀況下；例如：手術、敗血、感染時，血液中穀氨醯胺的含量會降低，有學者指出，血漿中穀氨醯胺濃度降低可能影響正常的淋巴細胞功能，其造成單核細胞複製率降低，可能與該宿主免疫力低下易受感染有關。另外，先前有多位學者研究顯示，穀氨醯胺具有免疫促進作用。故本研究針對二種類型之免疫失調作用(1) 敗血症(2) 自體免疫疾病，觀察給予穀氨醯胺之影響。

本研究分為三部分，一. 動物實驗部分，觀察穀氨醯胺餵食(200mg/day/200g B.W.)對 LPS 誘發大白鼠(Wistar)敗血其攝食量、體重、脾重百分比、血漿中穀氨醯胺濃度及以 Con A 當刺激原時對 T-淋巴細胞複製率之影響。二. 臨床實驗部分，觀察健康正常人自體免疫病人(全身性紅斑狼瘡、類風濕性關節炎)其血中穀氨醯胺濃度、淋巴細胞數目、以 Con A 當刺激原時培養基中含有不同濃度之穀氨醯胺(0-2 mM;終濃度)對其淋巴細胞複製率之影響，以及自體免疫疾病治療藥物對淋巴細胞複製率之影響。三. 強化穀氨醯胺營養配方中穀氨醯胺存於不同時間及溫度下之安定性分析。

實驗結果顯示穀氨醯胺餵食對敗血症大白鼠其攝食量、體重、脾重百分比及血漿中穀氨醯胺無顯著影響，但可顯著增加淋巴細胞複製率。而自體免疫病人其血中穀氨醯胺濃度及淋巴細胞數比正常人有偏低現象，且對穀氨醯胺有較大之敏感性，然而自體免疫病人治療藥物並不影響此類病人對穀氨醯胺之敏感性。另外，隨著儲存時間增加會降低營養配方中穀氨醯胺之安定性，且以 4 °C 優於室溫儲存。

由以上結果，可建議敗血病人於正常飲食下，可額外補充穀氨醯胺。但因尚不知前者受穀氨醯胺調控之主要細胞型式(cell type)為 CD4⁺或 CD8⁺，故無法確知穀氨醯胺對自體免疫病人之影響為正面或負面，此有待進一步證實。另外，建議當使用強化穀氨醯胺之營養配方時，亦需注意其新鮮度，以期達到較好之功效。

Abstract

Glutamine is a nonessential amino acid for protein synthesis. It can be synthesized in the body, and is most abundant amino acid in muscle and blood. However, under some pathological conditions, e.g. surgery, sepsis or infection, glutamine content in the blood will decrease. Some authors indicated that decrease of serum glutamine may influence normal lymphocyte function and thus cause decrease of monocyte proliferation rate. Furthermore, several authors suggested that glutamine can enhance immune function. Therefore, in this study the influence of glutamine supplementation on sepsis and autoimmune disease were investigated.

The present study was divided into three parts. In the first part, the effect of extra glutamine intake on food intake, body weight, relative spleen weight and plasma glutamine concentration of LPS-induced septic rats were observed. T lymphocyte proliferation rate stimulated by Con A was also studied. In the second part, the plasma glutamine concentration, lymphocyte number and T lymphocyte proliferation rate stimulated by Con A in the normal human and autoimmune disease patients were observed. The effect of drugs for autoimmune disease on lymphocyte proliferation rate was also studied. In the third part, analysis of the stability of commercial glutamine-enriched formula stored in different time and temperature were carried out.

The results show that glutamine feeding had no significant influence on food intake 、 relative spleen weight and plasma glutamine concentration , but significantly increase lymphocyte proliferation rate. Plasma glutamine concentration and lymphocytes number of autoimmune disease patients were lower than normal subjects. Patients of autoimmune disease were more sensitive to glutamine , and medical treatment did not influence the sensitivity. Furthermore , stability of glutamine in nutritional formula decreased as storage time increased , and storage at 4 °C is better than that at room temperature.

We suggest that the supplementation of glutamine to septic patients can be helpful. However , whether CD4⁺ or CD8⁺ lymphocytes are regulated by glutamine is remains unknown , thus the significance of glutamine on autoimmune patients are need to be clarified. Besides , fresh nutritional formula should be used to get better effects.

中英文專有名詞及縮寫對照——覽表

autoimmune	自體免疫	
chloroquine	氯奎因	
concanavalin A	刀豆素	(Con A)
endotoxemia	內毒素血症	
enteral nutrition	腸道營養	(EN)
glucocorticoid	糖皮酯醇	
glutamine	穀氨醯胺	
glutamine-enriched	強化穀氨醯胺	
helper T-cell	輔助型 T 細胞	(T _H)
in vitro	體外系統	
in vivo	體內系統	
interferon	干擾素	(IFN)
interleukin	細胞間白素	(IL)
lipopolysaccharide	脂多醣體	(LPS)
methotrexate	胺基甲基葉酸	(MTX)
mitogen	分裂原	
phytohaemagglutinin	植物凝植素	(PHA)
rheumatoid arthritis	類風濕性關節炎	(RA)
suppressor T-cell	抑制型 T 細胞	(T _s)
system lupus erythematosus	全身性紅斑狼瘡	(SLE)
total parenteral nutrition	完全靜脈營養	(TPN)
tumor necrosis factor	腫瘤壞死因子	(TNF)
tritium thymidine	氚標記胸腺嘧啶	[³ H] thymidine

壹、前言：

穀氨醯胺是血液中含有最豐富的胺基酸，其為一種非必需胺基酸，主要內生性來源為骨骼肌、肺臟、脂肪組織、肝臟等，先前有多位學者之研究顯示，此胺基酸具有免疫促進作用。在體外系統(in vitro)下，其可促進正常淋巴細胞對分裂原(mitogen)刺激所產生的複製反應。然而在某些生理狀況下，例如；手術、敗血、感染時，血液中穀氨醯胺的含量會降低，有學者提出，這類情況下可能影響正常的淋巴細胞功能。目前已有強化穀氨醯胺之商品，許多文獻指出給予這些患者之 TPN 中添加穀氨醯胺，可減緩其血液及肌肉中穀氨醯胺池降低之現象，減少感染發生率且有助於病情之恢復。

類風濕性關節炎(RA)是最早被發現的自體免疫疾病之一，導因於免疫作用失調；患者 T-淋巴細胞數目及功能通常低於正常人，而 B-淋巴細胞功能常增加。且全身性紅斑狼瘡(SLE)病人亦常發現 B-細胞過度活化，自發性產生過多的自體抗體。在以一些患有 SLE 之病人及動物為模式的研究中發現，以 Phytohaemagglutinin(PHA)刺激其免疫細胞時發現其 T-細胞產生 Interleukin-2 (IL-2)之能力均明顯降低。另外，也有文獻指出，以 Concanavalin-A (Con A)刺激來自正常 RA 或 SLE 之病人的週邊淋巴細胞並未發現 IL-2 產量或細胞複製能力受到疾病狀態的影響，但在來自 RA 患者之細胞發現其 IL-2 receptor 之表現低於來自正常人的

細胞。另有學者發現以 PHA 刺激 RA 病人之 T-淋巴細胞其複製能力明顯低於正常細胞。所以，雖然在自體免疫疾病的治療上，一般使用免疫抑制劑藥物，例如；Methotrexate、Chloroquine 等，但亦有人主張利用促進免疫作用的藥物，例如；Isopronosine、Levamisole 來治療患者，根據文獻報告，此類治療亦有不錯效果。但以藥物治療疾病時常產生一些副作用如；頭痛、下痢、肝、腎障害等，且可能增加感染發生率。而穀氨醯胺是一種具有免疫促進作用的天然營養素，在體內系統(in vivo)研究中發現其可促進 IL-2 之釋出，然而其與自體免疫病人的淋巴細胞之作用的相關性，目前尚未有人提出報告。因此本研究目的之一是要觀察在體外系統給予穀氨醯胺對自體免疫病人淋巴細胞之影響，以做為未來建議使用於此類患者之參考。

貳、文獻探討：

一、穀氨醯胺 (Glutamine)：

穀氨醯胺 (glutamine) 是人體合成蛋白質所需的一種胺基酸，其由碳(41.09%)、氫(6.9%)、氧(32.84%)、氮(19.17%)所組合而成，分子量為 146.15，是身體血液及胺基酸池中含量最豐富的胺基酸，它除了可由飲食中蛋白質經由腸道吸收提供外生性來源外，身體也可由許多胺基酸例如：丙胺酸、結胺酸、白胺酸等經轉胺作用 (transamination) 將氨基轉給 α -酮戊二酸 (α -ketoglutarate) 形成麩胺酸 (glutamate)；另外，由其他胺基酸經轉胺或脫胺作用 (deamination) 產生的氨 (ammonium ions, NH_4^+)，經穀氨醯胺合成酶 (glutamine synthetase) 作用，可與麩胺酸結合形成穀氨醯胺，提供內生性來源。穀氨醯胺可藉由穀氨醯胺酶 (glutaminase) 作用，將 δ -胺基變成羥基放出氨，而本身變成麩胺酸 (圖一)，此過程主要發生在腎及肝中。

幾乎所有組織皆可合成穀氨醯胺，主要合成器官為骨骼肌、肺臟、脂肪組織及肝臟，主要消耗穀氨醯胺的器官有腸道、肝、腎、免疫系統。

二、穀氨醯胺在生理，生化上扮演的角色：

由於 glutamine 有 2 個易移動的氮基，即 α -amino nitrogen 及 δ -amide nitrogen，所以其為組織間氮的主要攜帶者 (Marliss et al., 1971)，且在不同組織有各種不同功能，包括：(1) 腎臟氮的產生，可調控局部的 pH 值 (Golden et al., 1982)。(2) 可在肝臟為醣質新生的重要受質 (Kimura et al., 1988)，刺激肝醣合成 (Rennie et al., 1994)。(3) 可調控肌肉蛋白質的生合成 (Jepson et al., 1988)，這些調控作用可能是藉由促進 Growth Hormone (GH) 分泌所致 (Welbourine et al., 1995)。(4) 其可提供氮 (nitrogen) 及碳 (carbon) 原子合成嘌呤嘍啶，此二者是細胞 DNA 及 RNA 合成所必須，因此為所有細胞核酸、蛋白質、醣胺生合成的前趨物 (Krebs et al., 1980)。(5) 可抑制脂肪酸的氧化 (Malaisse et al., 1980)，抑制脂質分解 (Cersosimo et al., 1986, Dechelotte et al., 1991)，及促進 glutathione 生合成 (Hong et al., 1992)。(6) 其為腸道黏膜 (Windmueller and Spaeth, 1980) 及其他快速分化細胞、像是纖維母細胞 (fibroblasts) (Zeilke et al., 1978)，血管內皮細胞 (vascular endothelial cells) (Leighton et al., 1987)、淋巴細胞 (lymphocyte) (Newsholme, Crabtree, and Ardawi, 1985)、及巨噬細胞 (macrophage) (Newsholme et al., 1987) 之主要能量來源。

三、動物及人類血液中穀氨醯胺濃度：

在正常的循環狀況下穀氨醯胺的產生及釋放會達到淨平衡，因此血液中會維持一衡定量，人類血漿中濃度大約 600 μ M，佔循環中全部游離胺基酸量的 20%，在人類的骨骼肌中，游離穀氨醯胺的濃度約 20mM，其佔全部游離胺基酸池中的 60%以上(Bergstrom et al., 1974)，其在肌肉及血漿中之含量示於圖一。動物血漿中其濃度大約 1mM (Parry-Billings.,1991)。

四、外生性穀氨醯胺對於維持生理需求之必要性

必需與非必需胺基酸之定義

必需胺基酸(essential amino acid)及非必需胺基酸(nonessential amino acid)之定義是，凡合成蛋白質所需之胺基酸中，身體無法自行合成，需由外界(食物)補充者為必需；而身體可自行製造足夠量者為非必需。由於穀氨醯胺可由體內自行合成，因此被歸類為非必需胺基酸。然而，近年來有學者指出在某些生理、病理狀況下，人體所合成的穀氨醯胺不足，以致於其在血液中之濃度下降，而成為條件必需胺基酸“conditionally essential amino acid (Lacey et al.,1990)”這些變化將於下文中討論。

不同生理狀態下血液穀氨醯胺池之變化：

有報告指出在很多不同代謝疾病狀況下，例如：手術、受傷、感染時腸胃道、免疫細胞、發炎組織及腎臟會明顯增加穀氨醯胺的消耗，因此會快速動用骨骼肌儲存的穀氨醯胺，同時增加肺中穀氨醯胺的合成以用來支持肝臟醣質新生、蛋白質合成及其他組織所需，因此雖然肌肉和肺大量增加穀氨醯胺的釋放，但循環中、及細胞池中穀氨醯胺濃度仍會快速下降，且降低的程度比其他氨基酸還大。受傷及敗血病人其肌肉中穀氨醯胺降低約 50%(Askanazi et al., 1980, Roth et al., 1982)，燒傷病患血中穀氨醯胺濃度最多可降至正常人的 20%(Parry-Billings et al., 1990)。另外，有文獻指出長期過度運動者其血漿中此量亦會明顯下降，且單核細胞(mononuclear)複製率減少(Rohde et al., 1996)。因此可知穀氨醯胺內生性合成的量，可能不足夠提供給對穀氨醯胺需求增加的組織。並且 Parry-Billings 等人(1990)提出因血漿中穀氨醯胺濃度降低所造成之單核細胞複製率降低可能與該宿主免疫力低下易受感染有關，因而建議在此情況下若能加以補充穀氨醯胺可能可改善宿主之免疫能力。

大部分臨床使用之營養配方中，通常不特別添加穀氨醯胺，其原因包括：(1) 認為它是非必需氨基酸所以不添加。(2) 它和其它的胺基酸比較，相當不穩定，且放置的時間(shelf life)短，在室溫下會被分解

產生大量 pyroglutamate 及 ammonia 之毒性物質 (Lowe et al.,1990), 因此常被排除使用。(3). 關於添加穀氨醯胺對人類之安全性方面的報告不足。故一般只有在口服(oral)及腸道(tube - feeding)營養配方中, 含有少量來自蛋白質或部分水解蛋白質的穀氨醯胺, 約佔總氨基酸的 4-10%(Smith et al.,1990)。

In vitro 穀氨醯胺對代謝之影響及益處：

1984 年 Smith 等人培養肌肉細胞結果顯示, 穀氨醯胺可以刺激蛋白質合成, 直接抑制蛋白質的降解 (degradation), 且亦有學者指出, 老鼠骨骼肌中蛋白質的合成速率和細胞內穀氨醯胺的濃度有正相關, 因此, 支持了穀氨醯胺可能和調控肌肉蛋白轉運 (turnover)有關 (MacLennan et al., 1987)。此外, 穀氨醯胺是淋巴細胞複製所需的營養素, 在正常培養基中提昇其濃度, 則穀氨醯胺在淋巴細胞的代謝速率也會增加 (Ardawi et al.,1988), 當培養基中穀氨醯胺濃度降低時會明顯的減低淋巴細胞的複製速率 (Newsholme et al.,1990)。

In vivo 穀氨醯胺對代謝之影響及益處：

穀氨醯胺是蛋白質的結構單位, 而蛋白質是構成細胞要素之一, 因此有很多學者研究當給予強化穀氨醯胺的飲食 (Glutamine - enriched) 視其對免疫功能之

影響，最早此研究主要觀察於動物，主要焦點是以腸道當一個免疫器官，乃因腸胃道是人體抵抗外來物的第一道防線之一，可抵抗細菌入侵或毒物物質進到循環系統中。例如：1987年 Hwang 等人指出，以老鼠為動物實驗模式，添加穀氨醯胺到 TPN 溶液中，可減少由於完全靜脈注射營養所造成的黏膜萎縮現象，且可增加黏膜重量、絨毛高度、DNA 含量(O'Dwyer et al., 1989)，減少腸內細菌發生轉移(translocation)(Burke et al., 1989)，促進小腸切除後腸黏膜的增生(hyperplasia)(Klimberg et al.,1990)，增加小腸腺窩細胞複製進而促進小腸受到放射性傷害時黏膜的復原(Souba et al., 1990)。另外，亦有實驗證實，穀氨醯胺是宿主防禦機制及傷口癒合所必須(Cadwell et al.,1989)。例如：glutamine 是 lymphocyte、macrophage 主要能量來源(Newsholme et al.,1985, Newsholme et al.,1987)，其為免疫防禦細胞，且 glutamine 可促進蛋白質合成(Jepson et al.,1988)，而蛋白質是傷口癒合所必須(Patten et al.,1995)。且動物實驗發現，給予外生性穀氨醯胺可避免或逆轉由於手術後造成血漿及組織中穀氨醯胺濃度的下降(Smith et al., 1990)，及可減少由於 TPN 易導致肝硬化(hepatic steatosis)的現象(Li et al.,1990)。並且 TPN 中供給穀氨醯胺可減低受大腸桿菌(*Esherichia coli*)感染之大白鼠死亡發生率(Inoue et al.,1993)。在人體研究方面，TPN 中供給穀氨醯胺可節省肌肉中的穀氨醯胺，及促進氮平衡，抵消由於手術或創傷所造成

的肌肉細胞中穀氨醯胺濃度及骨骼肌蛋白質合成降低的現象(Hammarqvist et al.,1989 , Stehle et al.,1989)。另外也有報告指出其可促進骨髓移植病人之氮平衡，減少感染發生率，縮短住院期(Ziegler et al.,1992)，及避免由於 TPN 所造成小腸通透性(permeability)增加、絨毛高度的減少，而保護黏膜結構(van der Hulst et al.,1993)。且，1994 年 O’Riordain 等人指出，大腸切除手術病人，TPN 中供給穀氨醯胺可增加 T- cell DNA 合成。由此結果我們可以得知，穀氨醯胺可能也是一個促進淋巴細胞功能的方法之一。

五、穀氨醯胺對免疫失調之影響

因由前面所述得知穀氨醯胺對免疫功能之影響，故本研究針對二種類型之免疫失調作用 (1) 敗血症 (2) 自體免疫疾病，觀察給予穀氨醯胺之影響。

敗血症：

(一) 敗血症的成因

具有致病性的各種不同細菌均可成為敗血症的病原菌，縱使致病力較弱的細菌在人體抵抗力降低或大量進入時也可造成敗血症。常見的致病菌有革蘭氏陰性菌(例如：大腸桿菌、沙門氏菌等)、革蘭氏陽性菌(例如：金黃色葡萄球菌、腸球菌等)、產氣桿菌、鏈球菌等(載自英,1992)。另外，黴菌、真菌、寄生蟲亦會導致敗血症發生(Bone et al.,1992)。

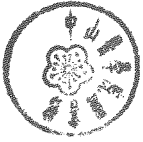
(二) 已知穀氨醯胺對敗血症之影響

以敗血症的動物模型，觀察在正常飲食之外額外餵食穀氨醯胺對其淋巴細胞功能及血液穀氨醯胺濃度變化之影響，其相關之文獻探討敘述如下：

內毒素(Endotoxin)是造成敗血的主要原因之一，它是革蘭氏陰性菌細胞壁外脂雙層上的脂多醣體(lipopolysaccharide)的衍生物，它會與膜上受器結合，經由細胞激素及荷爾蒙調控改變造成身體生理代謝改變，而導致敗血症的發生。

1. 細胞激素調控；

外來物質入侵會引發巨噬細胞分泌細胞激素，例如；腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor α ; TNF- α)、細胞間白素(interleukin-2 ; IL-2)、IL-1，而快速執行保護效果。如；TNF- α 可增加巨噬細胞黏著於血管內皮細胞上。因而使更多的細胞進到發炎部位，並且增加巨噬細胞及嗜中性白血球殺滅微生物的能力。另外，也可促使自然殺手細胞釋出干擾素 γ (interferon - γ ; IFN- γ)進一步增進巨噬細胞殺菌能力。然而敗血症發生時所釋放出來的細菌產物會過度刺激細胞激素產生，而更加增進促凝血酶原激酶(thromboplastin)及血小板活化因子(platelet - activating factor)分泌，造成血液循環細胞附著及血小板凝集血纖維沉積



(platelet aggregation fibrin deposition), 導致彌漫性血管內凝結(disseminated intravascular coagulation)而改變血管通透性, 造成血壓改變(王聖予 等人.,1996)。另外, TNF、IFN- γ 亦會促使組織合成毒性物質, 例如: 肝臟庫氏細胞(kupffer cell)分泌一氧化氮(NO), 造成血管舒張, 血壓下降(Palmer et al.,1987, Nakaki et al.,1990), 送到各組織器官的血量、氧氣、養分等供應減少, 造成多重器官的衰竭(multiple organ failue ;MOF)。

另外, 有學者指出, 由靜脈 TNF- α 灌流到小鼠體內則造成明顯的負氮平衡(Michie et al.,1989), 且 TNF- α 會抑制脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase)酵素活性而增加循環中的 TG, 以及對胰島素產生抗性(resistance)而導致高血糖, 這些都是敗血的特徵(Lang .,1995)。而這些細胞激素也會直接或間接毒害腎、肺等, 改變其代謝造成多重器官衰竭。其中肺之損害及肌肉蛋白質降解及腸吸收降低可能會導致血中穀氨醯胺之濃度下降(Michie,1996)。

2. 荷爾蒙代謝改變;

敗血會潛在的刺激神經內分泌(neuroendocrine)及交感神經系統(sympathetic nervous system)的活化(Baue et al.,1984), 因此會增加腎上腺素(epinephrine)、副腎上腺素(norepinephrine)、可體松(cortisol)、腎上腺皮質刺激素(adrenocorticotropic hormone ;

ACTH)、生長荷爾蒙 (growth hormone) 及昇糖素 (glucagon) 的分泌 (Michie, 1996)。

3. 敗血期間代謝的改變及其對體內穀氨醯胺利用之影響；

感染期間宿主抵抗細菌感染及修護受傷害組織須要消耗大量能量，因此會快速動用脂肪，碳水化合物及加速蛋白質分解，提供能量來源。

(1) 碳水化合物代謝；

中度或重度感染時葡萄糖產生增加 150-200% 因此血糖會增加 (Wolfe et al., 1986)，在嚴重敗血時，內臟血流量會減少，造成組織缺氧，導致器官衰竭。由於肝功能受損，因而降低葡萄糖產生，造成低血糖，且組織行無氧醣解 (glycolysis) 作用增加，因此血中乳酸量會增加 (Cerra, 1987)。

(2) 蛋白質代謝；

敗血期間，由於組織器官衰竭，造成蛋白質合成減少。且組織處於異化狀態下，蛋白質降解 (breakdown) 增加，每天氮流失可能高達 30 克，因而造成負氮平衡。且尿素合成及尿中磷酸肌酸、尿酸、氮之排泄量增加。

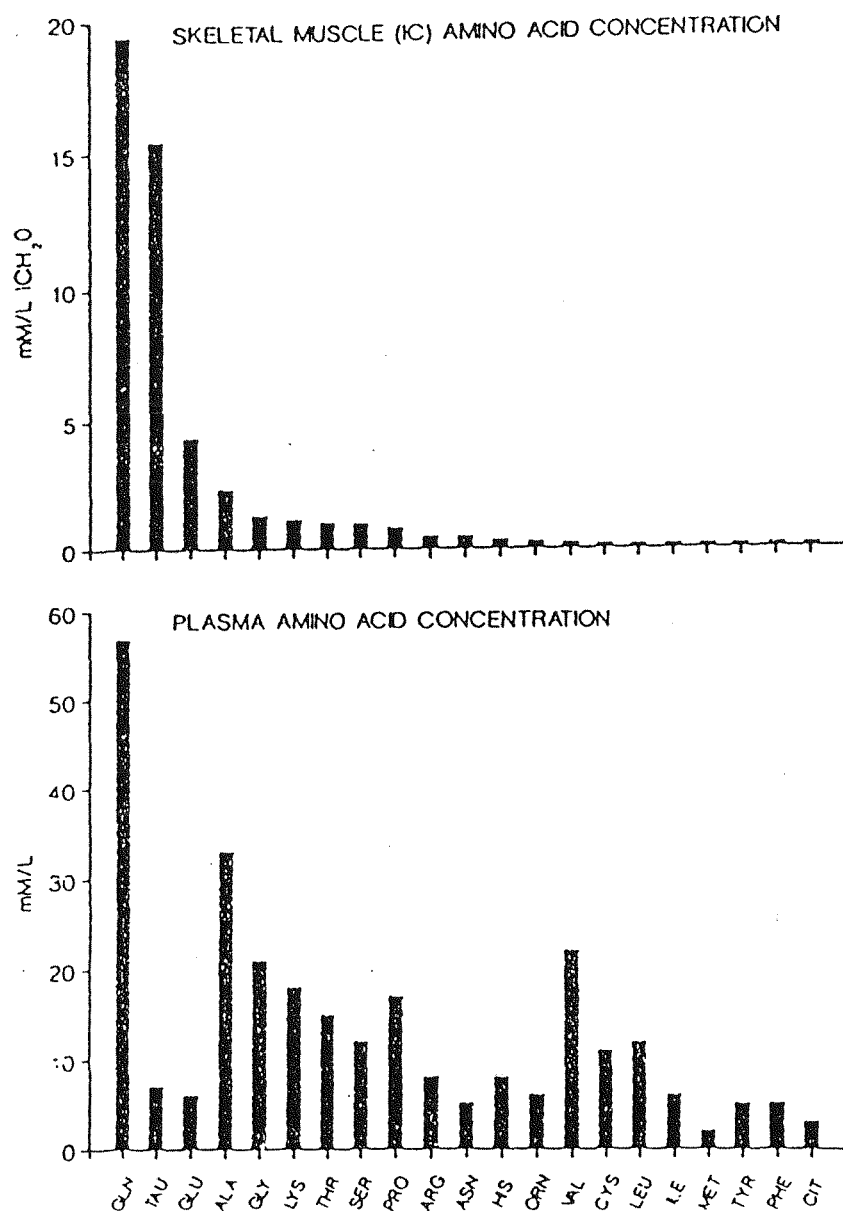
另外，血中白蛋白、轉鐵蛋白(transferrin)降低，急性期蛋白質(acute-phase protein)如：C-反應蛋白(c-reactive protein)、纖維蛋白原(fibrinogen)、血紅素結合素(haptoglobin)的合成會增加(Michie,1996)。

穀氨醯胺是身體血漿及骨骼肌中含量最豐富的胺基酸，它是組織間氮轉運(transport)主要來源，當嚴重感染時常會造成酸中毒(acidosis)，為了平衡此現象，因此腎臟會大量攝取血中穀氨醯胺，利用其提供的氮(NH_4^+)，中和過多的氫離子(hydrogen ions)，由於穀氨醯胺大量降解，這可能也是加速敗血病人氮流失的另一個原因(Michie,1996)。

(3) 脂肪代謝；

由於敗血期間血糖降低能量產生不足，為減少蛋白質流失，因而動用脂肪當能量來源，加速脂質分解，所以循環中三酸甘油脂(triglyceride;TG)濃度增加(Michie,1996)。

有報告指出，在敗血時肌肉中 glutamine synthetase 活性顯著增加，肌肉中穀氨醯胺含量有下降現象，且敗血早期其血中穀氨醯胺濃度有增加現象(Austgen et al.,1992)。此穀氨醯胺釋放增加可能為供給對穀氨醯胺需求增加的組織如免疫細胞，因而可



圖一、正常人肌肉及血漿中游離胺基酸之濃度

Fig.1 Free amino acids in plasma and skeletal muscle

Data reprint with permission from the Journal of Applied Physiology.

能有助於免疫作用。

有學者研究證實，在敗血及內毒素血症 (endotoxemia) 期間，由於降低了黏膜 glutaminase specific activity 及減少轉運穀氨醯胺的刷狀緣轉運者 (brush - border transports) 數目，使吸收下降，因而造成穀氨醯胺從血液攝取量減少 (Souba et al., 1990, Salloum et al., 1991)。由於敗血會促進肌肉蛋白質降解，抑制蛋白質合成 (Hasselgren et al., 1986, Hall-Angeras et al., 1991)，且敗血期間肝臟、腎臟及淋巴細胞會增進對穀氨醯胺的攝取、利用和代謝 (Ardawi et al., 1991)，因此血中穀氨醯胺池含量下降 (Roth et al., 1982)，而這可能會導致免疫功能降低。有文獻指出，以分裂原刺激培養敗血症病人之週邊淋巴細胞發現其 Interleukine -2 (IL-2) 濃度及 T-淋巴細胞量降低，同時淋巴細胞之複製能力也下降 (Wood et al., 1984, Nishijima et al., 1986)。另外，亦有學者指出，以分裂原刺激培養敗血症大白鼠之脾臟細胞，其 IL-2 濃度及脾臟細胞的複製能力亦會下降 (Gough et al., 1988)。然而，有文獻指出穀氨醯胺可促進 IL-2 產生 (Calder et al., 1992)。1994 年 Chen 等人研究顯示，若對患有內毒素血症之老鼠由靜脈注射提供穀氨醯胺，可促進其腸道代謝，降低黏膜萎縮的程度，且有助於障壁功能的維持。穀氨醯胺餵食之作用可能受劑量及餵食時間長短之影響，有研究指出 TPN 方式給予穀氨醯胺不如經口 (enteral, EN) 給予，而在相關 EN 實驗中

穀氨醯胺大多加於飲水中，以致無法確實定量其作用，所以本研究採用餵灌方式觀察穀氨醯胺對 LPS 誘發敗血症大白鼠其免疫功能之影響。

自體免疫疾病：

(一) 自體免疫疾病及其成因

個體在正常情況下，免疫系統最基本的功能是辨識自身的組織和識別異體，不會對自己產生抗體，即對自身的組織有耐受性，通常僅在外來物質侵入身體時，才會形成抗體。正常人體血清中可存在多種自身抗原的抗體（生理性抗體），但這些抗體量極低，不足以破壞自身成分，但可以清除衰老退變的自身組織，此種現象稱為自體免疫 (autoimmunity)，而當這種反應強度太大導致嚴重組織損傷，表現臨床症狀時，則稱之為自體免疫疾病 (autoimmune disease)。

自體免疫疾病常出現於很多免疫系統異常或過敏性疾病病人，也可出現於慢性肝病、感染、血液疾病、甚至正常人。常見的自體免疫疾病可分，器官專一性免疫疾病 (organ-specific autoimmune disease) 及全身性自體免疫疾病 (multisystem autoimmune disease)。器官專一性疾病只侷限於某個部位，常侵犯的目標器官包括甲狀腺、腎上腺、

胃及胰臟(盧孟佑.,1992)。而全身性的疾病則廣泛散佈於全身各處，包括類風濕性關節炎(rheumatoid arthritis ; RA)、全身性紅斑狼瘡(system lupus erythematosus ; SLE)、及硬皮症(systemic sclerosis ; SSc)等疾病，其常會侵犯皮膚、心、肝、腎關節、肌肉及淋巴結等(潘昭雄.,1988)。

致病原因至目前為止尚不清楚，可能相關的因素有，1. 遺傳因素：有研究指出 SLE 患者的家屬，比一般群眾的罹患率高出約 100-200 倍(林明泉.,1993)，2. 環境因素：外來抗原(細菌、病毒)、紫外線會使 SLE 更加惡化。3. 荷爾蒙因素：在人類和老鼠，女性比男性容易得 SLE(潘昭雄.,1988)，且有報告顯示，抑制型 T-細胞(suppressor T-cell ; Ts)的缺失在女性比男性有較大的自體免疫疾病發生率，然而對於小孩和年老者男女病人比率則較不懸殊(Devriere et al.,1987)。4. 體內免疫反應細胞異常，對正常的組織細胞發生免疫反應，而產生自體抗體。

RA 是最早被發現的自體免疫疾病之一，導因於免疫調節作用失調，有學者觀察 RA 病人其 Ts 功能時，發現以 Concanavalin A(Con A)刺激時，Ts 產量減少且功能缺失(Sakane et al.,1982)。對於有節結(nodules)產生的病人，與沒有節結產生之病人比較，前者抑制型細胞之抑制作用明顯減少(Patel et

al.,1982)。並且，RA 病人其周邊淋巴血液中 Ts-細胞有降低現象，而關節滑液中則無發現 (Veys et al.,1983)。然而，一般在發炎的關節部位可發現經活化的 CD4⁺ T-細胞浸潤 (Williams et al.,1996)。

人類和老鼠的 SLE 病人，免疫反應異常皆有一個特徵，即是 B- 細胞過度活化(hyperactivity)，製造過多的自體抗體(Cass et al.,1968)。其與細胞內的核抗原作用形成免疫複合物，並且固著補體，然後附著在血液循環或固著在組織上，如：皮膚、滑膜、漿膜、肺臟、心臟、腎臟等造成傷害(潘昭雄.,1988)。

在 in vitro 實驗中發現，SLE 患者其週邊血液淋巴細胞與正常人比較，其會自發性的產生更多的免疫球蛋白(immunoglobulin)且會增加細胞的複製作用 (Ginsberg et al.,1979, Jasin et al.,1975)。對於易罹患紅斑狼瘡疾病的小鼠，造成其自體免疫疾病時一般特徵會發現其有 IL-2 缺乏現象，且以 PHA 刺激 SLE、RA 病人的週邊血液單核細胞(peripheral blood mononuclear cells)，則明顯減少 IL-2 產生(Talal et al.,1983)。另外，在分離患有狼瘡自體免疫疾病小鼠的脾臟細胞及 SLE 病人之週邊血液單核細胞以 PHA 刺激時，發現其 T-細胞產生 IL-2 之能力均明顯降低，由於 T-細胞生長主要受到 IL-2 之調控，因此認

為此時 IL-2 可能無法當作 T-細胞生長因子之功能 (Santoro et al.,1984)(Huang et al.,1988)。1986 年 van den Akker 等人研究發現患有 SLE 的小鼠，其 T-細胞功能有降低現象。亦有文獻指出，以 Con A 刺激來自正常、RA、或 SLE 病人的週邊血液淋巴細胞時，並未發現 IL-2 產量或細胞複製能力受到疾病狀態的影響，但在來自 RA 患者之細胞發現其 IL-2 接受器之表現低於正常細胞 (Stolzenburg et al.,1988)。臨床上 SLE 病人其血中 gamma、delta T-細胞量較正常人高，且主要分泌 IL-6 的 T-細胞亞群 CD4⁺、CD29⁺ 在血液量會增加，而 IL-6 的過度產生會造成此類自體免疫病人 B 細胞過度活化，增加抗體合成 (al-Janadi and Raziuddin,1993)。有研究顯示人類和老鼠的 SLE 都有 T-細胞功能降低的現象，SLE 病人 T-細胞免疫反應之所以降低有部分原因是血液中 T-細胞數目減少的原因，而且以 Ts 和細胞表面有 IgG 接受器的 T-細胞減少的比其他 T-細胞多。因為 Ts-細胞數目減少，所以 SLE 病人淋巴細胞抑制 B-細胞合成 DNA 抗體的能力就降低了，因此 SLE 病人才會有那麼多的 DNA 抗體產生 (潘昭雄.,1988)。

因此一般認為 SLE 患者，B-細胞免疫增強現象可能是 B-細胞內部異常，吞噬細胞處理抗原的過程異常，輔助型 T-細胞(helper T -cell)活性增強或 Ts 功能降低所致 (潘昭雄.,1988)。

由於自體免疫病人常發生細胞性及體液性免疫異常現象，因此臨床上常發現此類病人有感染現象，如；SLE病人常發生帶狀泡疹(Herpes zoster)病毒感染之現象，而RA病人亦常受此病毒及非洲淋巴細胞瘤病毒(Epstein - Barr Virus)之感染(Kahl et al.,1994 ; van der Veen et al.,1994 ; Newkirk et al.,1995)。且有文獻指出，以Corticosteroid及免疫抑制藥物治療SLE患者(Iliopoulos and Tsokos .,1996)，或MTX治療RA患者有很高的感染發生率(van der Veen et al.,1994)。而感染往往是加速自體免疫病人死亡率的重要因素之一，且有報告指，有32%的SLE病人是因感染而導致死亡(Abu-Shakra et al.,1995)。

自體免疫係一種免疫不良的疾病，可能因為病人體中的T-淋巴細胞無法發揮抑制外來侵犯的功能，或是由於長期的感染所致，因此，應用增進免疫能力來改善病人症狀的觀念隨即而生。例如；Levamisole是一種具有促進免疫功能的藥物，有文獻指出其用於治療SLE病人亦有不錯效果(Gordon et al.,1977)。Isoprinosine (IPS)是一種抗病毒藥劑，在體外實驗中發現其有免疫調控作用，可促進正常人淋巴細胞對分裂素原Con A的反應(Morin et al.,1979)。而小鼠淋巴細胞以IPS處理，其可藉由增加 suppressor cell 活性，有免疫調控效應(Renoux et al.,1979)。且有研究指出，IPS明顯增加SLE病人其淋巴細胞對Con A、PHA的反應，在RA患者也有些微增加。且SLE

病人淋巴細胞和 IPS 培養，顯著增加 IL-2 產生，顯示其在自體免疫疾病上有免疫調控作用，且對 SLE 有潛在的治療價值(Nakamura et al.,1983)。然而，由前述可知穀氨醯胺亦有免疫促進作用，因此本研究將以 in vitro 觀察其對此類病人淋巴細胞複製之影響。

(二) 穀氨醯胺對自體免疫疾病可能之影響

有報告指出 RA 病人有肌肉蛋白質流失及負氮平衡之情形(Rall et al.,1996)，而如前所述，肌肉蛋白質下降會降低血液中穀氨醯胺之濃度(Hammarqvist et al.,1989, Stehle et al.,1989)，而此可能為影響免疫作用的原因之一。然而，至目前為止尚未有相關研究觀察在這類病人血中穀氨醯胺濃度及穀氨醯胺在此類病人之免疫能力上所扮演之角色，故本研究將觀察之。

六、以有標記之放射性 thymidine 併入細胞觀察淋巴細胞功能之模型及其原理：

1. 淋巴細胞：

淋巴細胞由中央或原發性淋巴器官(胸腺與骨髓)產生，其中有些淋巴細胞包含經由血液循環而移轉至續發性淋巴組織(secondary lymphocyte tissue)如；脾臟、淋巴結、扁桃腺及黏膜結合之淋巴組織。整個淋巴組織約佔總體重的 2%，成人平均有 10^{12} 個淋巴細胞。

2. 淋巴細胞之複製機制：

抗原會被免疫系統的細胞，例如：單核細胞 (monocytes) 及巨噬細胞 (macrophage) 經由非專一性受器或和免疫細胞上 Fc 受器結合的抗體形成免疫複合物而吞嚥攝入的抗原，經過修飾後，將分解的抗原胜肽片斷送回到免疫細胞表面，此即是抗原呈獻細胞 (antigen-presenting cells ; APC)，與主組織相容性複合基因 (major histocompatibility complex ; MHC) 結合。T 細胞表面有接受器 (T cell receptor ; TCR) 會和 APC 表面的抗原/MHC 複合物結合，藉由特殊 T 細胞抗原受器認知，將抗原呈獻給 T 細胞，導致淋巴激素 (lymphokine) 的釋放及 T 細胞的增生 (圖二)。

3. 分裂原 (mitogen) 活化 T 細胞：

淋巴細胞可受到分裂原 (細胞增殖誘導物) 的刺激而活化。分裂原凝集素 (lectin) 是碳水化合物聯結蛋白質所形成，主要來自各種細菌及植物。例如：Con A 及植物凝集素 (phytohaemagglutinin ; PHA)，可和特殊細胞表面的接受器結合，刺激人類及鼠類的 T 細胞。

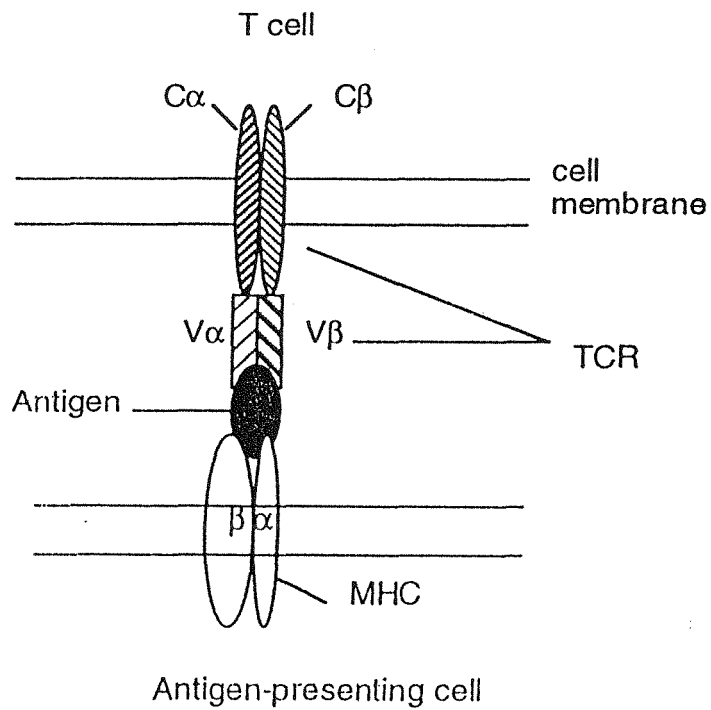
Con A 是由蓖麻子所萃取出來，俗稱刀豆素，是一種促細胞分裂素，會刺激淋巴細胞複製，作用機制可能是這些分子與 T-細胞活化有關之表面分子，如 T-細胞受器 CD 3 結合 (圖三)，在刺激過程中，

正常細胞之輔助型 T 細胞(T_H)會釋出淋巴激素。例如：IL - 2，它是 T 細胞的增殖因子及活化劑，同時細胞表面本身會表現 IL - 2 receptor 此 ligan - receptor 之結合為細胞複製作用所必須，其可引起基因的轉譯(transcription)，使細胞表面的 transferrin receptor 表現而結合 transferrin。在 in vitro 實驗，培養基中，通常是以胎牛血清(fetal calf serum)來提供 transferrin。此會造成基因的 transcription，使得在細胞循環(cell cycle)過程中進一步進入 DNA 合成的階段。

淋巴細胞在正常狀況下是相當靜止的代謝狀態，循環中淋巴細胞有 90% 是處於休息狀態下“resting cell”，在免疫刺激下為了促進細胞分化、分泌抗體、細胞激素(cytokines)等，由於此過程需要核酸及蛋白質的合成，因而促進了淋巴細胞代謝速率。有報告指出，以 PHA 及 Con A 刺激小鼠(Ardawi et al., 1983)及人(Parry et al., 1990)時，穀氨醯胺的濃度對淋巴細胞的複製很重要，當培養基中添加 0.05 mM 穀氨醯胺時，人之淋巴細胞複製率比添加 0.6 mM 者約降低 50%。且有學者研究指出，當以 Con A 刺激淋巴細胞複製時，細胞內穀氨醯胺的利用(Ardawi et al., 1988)及穀氨醯胺轉移進入淋巴細胞(Schroeder et al., 1990)此二者皆會增加，超過休止狀態。1990 年 Newsholme 等人，實驗發現，當培養基中穀氨醯胺

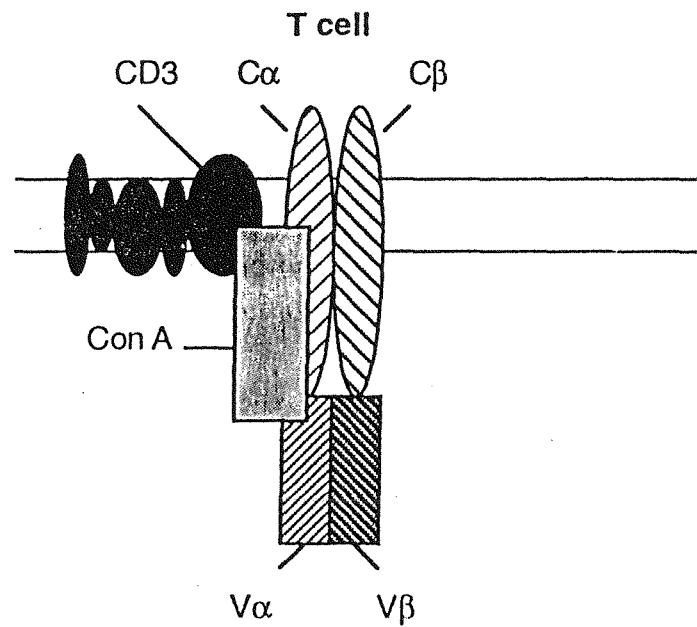
濃度降低時會明顯減低淋巴細胞的複製速率。

以 Con A 刺激淋巴細胞的增殖和抗原刺激淋巴細胞的結果很類似，因此本研究以 Con A 刺激淋巴細胞增殖來觀察穀氨醯胺對免疫功能的影響。



圖二、淋巴細胞的複製機制

Fig. 2 The molecular interaction between variable regions of the TCR α and β chains and the antigenic ligand exposed in linkage with the MHC molecules on the surface of the antigen presenting cell (take from Licastro et al., 1993)



圖三、分裂原活化 T 細胞

Fig. 3 Con A concomitantly interacts with the TCR/CD3 molecule to achieve the T cell stimulation (take from Licastro et al., 1993)

參、實驗材料：

一、化學試藥：

1. Antibiotic (Penicilin :10000 Units/ml , Streptomycin : 10 mg/ml) :
購自 Biological Industries
2. Alcohol : 95%, 購自台灣省煙酒公賣局
3. Albumine bovine : >96%, 購自美國 Sigma 公司
4. Calcium Chloride Anhydrous Powder : 昭和一級, 95%, 購自日本昭和公司
5. Chloroquine : 購自美國 Sigma 公司
6. Concanavalin A : 購自美國 Sigma 公司(L-7647)
7. Diagnostics : 密度 1.077 購自美國 Sigma 公司
8. Economical Biodegradable counting cocktail :Research Products International Corp.
9. Fetal Bovine Serum : 購自 Hyclone Laboratories , Inc
10. Glycerol : ACS 級, 99.9%, 購自美國 Sigma 公司
11. Heparin Sodium (5000 Units/ml) : 購自中國化學製藥股份有限公司
12. Hydrocortisone -Water Solution: 購自美國 Sigma 公司
13. Isotonic sodium chloride solution :0.9%, 信東化學工業股份有限公司
14. α -Ketoglutarate : 購自德國 Boehringer Mannheim 公司

15. Lipopolysaccharide : 購自美國 Sigma 公司
16. L-Glutamine : 99%, 購自美國 Sigma 公司
17. Magnesium Chloride : 試藥特級, 98%, 購自日本昭和公司
18. Methanol : 景明化學工業股份有限公司
19. Methotrexate (Amethopterin): >98%, 購自美國 Sigma 公司
20. NADH : 98%, 購自德國 Boehringer Mannheim 公司
21. Perchloric Acid (70%): 試藥特級, 日本和光公司
22. Potassium Chloride : ACS 級, 購自美國 Fisher 公司
23. Potassium Dihydrogenphosphate: 試藥特級, 99%, 購自日本昭和
和公司
24. Potassium Hydroxide : 昭和一級, 85%, 購自日本昭和公司
25. RPMI-1640 (without L-glutamine): 購自 Biological Industries
26. Sodium Phosphate Dibasic Heptyhydrate : ACS 級, 100.2%, 購自
美國 TEDIA 公司
27. Sodium Chloride : ACS 級, 99.9%, 購自美國 TEDIA 公司
28. Sodium Hydroxide : 試藥特級, 96%, 日本和光公司
29. Triethanolamine : GC 級, >97%, 購自美國 Fluka 公司
30. Trypan blue solution (0.4%): 購自美國 Sigma 公司
31. [6-H³] Thymidine (1 mCi/ml): 購自英國 Amersham 公司
32. Universalindicator : 購自英國 BDH

二. 酵素名稱：

Glutamate dehydrogenase (120 U/mg ,at 25 °C)： EC 1.4.1.3

L- Asparaginase (80 U/mg ,at 25 °C)： EC 3.5.1.1

以上二者均購自德國 Boehringer Mannheim 公司

三. 儀器設備：

1. 無菌操作台 (Laminar flow): NUAIR Biological Safety Cabinets
2. 二氧化碳恆溫器 (CO₂ incubator): REVCO
3. 冷凍離心機 (Freeze centrifuge): CR21, Hitachi, Japan
4. 相位差顯微鏡 (Phase- Contrast Microscope): Diophot TMD
NiKon, Japan
5. 分光光譜儀 (UV-VIS Spectrophotometer): U-3000, Hitach, Japan
6. 血球計數板 (Hemocytometer), 計數器 (Counter)
7. Semiautomatic Cell Harvester 12 CH: Skatron, England
8. 閃爍偵檢器 (Liquid Scitillation Analyzer): Packard 2100 TR

四. 實驗動物：

由國家科學委員會動物中心提供 8-10 週齡 (200-220g) 雄性 Wistar 大白鼠，動物飼養條件為自動空氣調節，自動光照控制 (12 小時白晝, 12 小時黑夜)，室溫 25 °C，相對濕度 55%，空氣調節每小時 12 次之動物房中。動物給予自由進食福壽牌實驗動物試飼料及飲水。

肆、實驗方法：

一. 以敗血症動物模型觀察穀氨醯胺之作用：

(一). 以 LPS 誘發大白鼠敗血症

內毒素(lipopolysaccharide from salmonella typhimurium 5mg/Kg BW)，溶於 1 毫升無菌生理食鹽水(0.9%)，注射到大白鼠腹腔中，禁食 24 小時，但給予自由飲水，犧牲動物的方式是以二氧化碳使其窒息死亡，然後立即剖腹，以含抗凝血劑(100 μ l，5000 units/ml)的注射針筒抽取 7 ~ 8 ml 下腔靜脈的血液，其中 4ml 全血做淋巴細胞複製情況之觀察，剩餘血液樣品則以 2500 rpm 離心 10 分鐘製得血漿上清液。

(二). 來自敗血症大白鼠之淋巴細胞之培養條件之觀察：

因 Szondy (1995) 曾經提出不同 Con A 濃度、glutamine 濃度、細胞數、及培養時間會影響觀察結果，故本研究首先對於不同實驗條件進行觀察。

將淋巴細胞以不同時間及不同細胞數培養於不同 glutamine 濃度下，觀察淋巴細胞之複製情形。

1. 血液樣品收集和製備：

以真空抗凝血管(heparinized)抽取大白鼠之血液約 7~8 毫升，其中 4ml 全血用來製備淋巴細胞，作細胞複製率之觀察，剩餘血液則製備成血漿，分析其 glutamine 濃度及加入週邊淋巴細胞培養液中觀察自體血漿 (autologus plasma) 對細胞複製率之影響。

2. 週邊淋巴細胞複製率之觀察：

(1) 週邊淋巴細胞之製備：

將來自大白鼠之全血樣品 4ml 以 3.5 ml PBS 稀釋。PBS (Phosphate-buffered saline) 之組成及製備方法如下：

稱取 Sodium Chloride (NaCl) 8 g，Calcium Chloride (CaCl₂) 0.1 g，Sodium Phosphate Dibasic Hephthrate (Na₂HPO₄) 0.2 g，Potassium Dihydrogenphosphate (KH₂PO₄) 0.2 g，Potassium Chloride (KCl) 0.2 g，Magnesium Chloride (MgCl₂) 0.1 g，將其溶於 1 升的二次蒸餾水中，校正 PH 在 7.2 至 7.4 之間。

將稀釋後之血液，延管壁緩慢加到預先裝有 7.5ml 的密度梯度溶液 (Diagnostics，密度 1.077 kg/m³) 中，在 400xg、18 °C 下離心 15 分鐘，此時淋巴細胞位於 PBS 與密度梯度溶液之界面中。用滴管吸

取淋巴細胞層，以 PBS buffer 沖洗細胞後，再以 400xg、18 °C 離心 10 分鐘，移除上層液，而沉降在底層的淋巴細胞，以 RPMI-1640 (without glutamine) 沖洗，離心 10 分鐘，除去上層液後，加入 1ml RPMI-1640，以滴管小心重複吸放數次，使細胞懸浮分散均勻，並計算每毫升中所含細胞數目。

(2) 淋巴細胞計數之方法：

將上述細胞懸浮液稀釋 100 倍後，以 1:1(v/v)與染色劑(trypan blue)對半稀釋。混合均勻後，吸取適當量於血球計數板上，置於相位差顯微鏡下觀察計算，若整個細胞被染成藍色表示細胞膜不完整造成染劑進入細胞內，而此代表細胞死亡，若只有細胞外圍染成藍色表示細胞存活。

細胞存活率計算方法：

$$\begin{aligned} & (\text{存活} + \text{死亡細胞數}) \times 2 \times 10^4 \times 100 = \text{每毫升細胞總數} \\ \text{存活率 \%} & = (\text{淋巴細胞總數} - \text{死亡細胞數}) / \text{淋巴細胞總數} \times 100\% \end{aligned}$$

以此方法計算使本實驗細胞製備均有 $\geq 95\%$ 之存活率

(3) 淋巴細胞培養之方法：

將已製備好的淋巴細胞接種於 96-wells 的培養盤中，使每個 well 含有 2.4×10^5 、 3.6×10^5 、 4.8×10^5 個細胞數，且每個 well 加入 antibiotics(100 units;

終濃度), autologous plasma (10%;終濃度)glutamine (0、0.1、0.5、2 mM;終濃度)及 concanavalin A(Con A)10 μ g/ml(終濃度), (glutamine、Con A 此二者使用前新鮮製備, 以 RPMI -1640 without glutamine 配製, 並且以無菌過濾膜 0.2 μ m 過濾), 最後以 RPMI-1640 定量至每個 well 總體積為 200 μ l, 樣品在不同條件重複做 4 個 wells, 之後將培養盤放入 37 $^{\circ}$ C, 5%二氧化碳恆溫培養箱中, 培養 12、24、36、48、60 或 72 小時。

(4) 淋巴細胞複製率的測量 :

利用有 ^3H (tritium) label 的 thymidine 併入胞內 DNA 中的量, 當作淋巴細胞複製的指標。每個 well 加入 20 μ l (10 μ Ci /ml) [^3H]thymidine 此劑量可提供足夠的 thymidine 滲入 DNA, 以精確測量細胞的複製, 但卻不會引起細胞過度的放射性傷害(Knight 1987)。

加入含有放射性 thymidine 再繼續培養 18 小時後, 利用半自動細胞收集器以甲醇沖洗將其收集到玻璃纖維濾紙上, 晾乾後, 將其放入閃爍計數瓶中加入 2ml 閃爍計數液, 以閃爍偵檢器測 1 分鐘, 放射量以 cpm 表示。計算 ^3H -thymidine 併入胞內 DNA 的量。

3. 血漿中 glutamine 濃度之測定：

(1) 血漿之製備方法：

血液以 2500rpm 離心 10 分鐘(18 °C)，上清液即為血漿，將其儲存於-80 °C，於 1 個月內進行分析。

(2) 血漿去蛋白化(deproteinization)之方法：

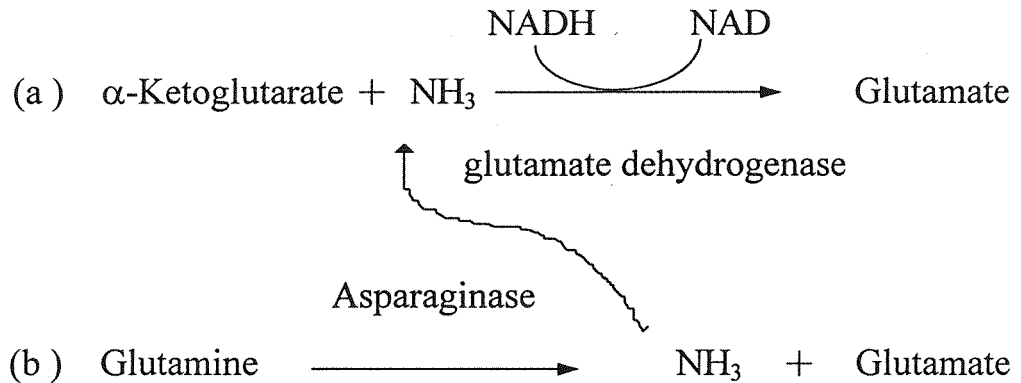
將上述血漿解凍後，取 0.25 ml 與 0.25 ml 之 10%過氯酸(perchloric acid ; PCA)於振盪機上混合均勻，離心 2 分鐘(10000xg)後，取上層清液 0.25 ml 至裝有 10 μ l 酸鹼指示劑之新管中，再加入 0.5 M triethanolamine / 2 M KOH，振盪均勻，將酸中和，使樣品達中性(pH=7; 淡綠色)，再以 10000xg 離心 2 分鐘，上清液則待測其 glutamine 濃度。上述之製備過程須置於冰上。

(3) 血漿中 glutamine 濃度之分析方法：

Glutamine 濃度的測量是以經修改之 Windmueller 與 Spaeth (1976) 等人之方法。

Asparagine 以 KH_2PO_4 (80mM;pH 6.6)，於 4 °C 冰箱中透析 24 小時，每隔 12 小時更換一次透析液。

A. 分析原理如下：



以 asparaginase 與 glutamate dehydrogenase 所催化之反應偶合，使來自 glutamine 之分解產物 NH_3 進一步與 α -ketoglutarate 反應，致使 NADH 氧化為 NAD，而可於波長 340 nm 測得吸光值之變化，此一定量與 [glutamine] 成正相關，但因樣品中含有高量之 NH_3 ，故在進行反應 (b) 前，先以反應 (a) 移除非來自 glutamine 之 NH_3 。反應 (a) 於波長 340 nm 下測得之吸光值為 ①。反應 (b) 同樣於此波長可測得其吸光值為 ②，將 ② - ① 則可得 glutamine 濃度。

B. 分析溶液之組成及分析步驟：

在 1 ml 吸光槽 (cuvette) 中加入終濃度為 75mM 之 KH_2PO_4 (pH8.0)、50% glycerol、17.34 mM NADH、10% albumin bovine (SBA)、400 mM α -ketoglutarate、 H_2O 、及 25 μl glutamate dehydrogenase，並加入適量待分析之溶液樣品，或水 (當控制組)，或 glutamine 標準品，混合均勻，於室溫下靜置 30 分鐘

後，以分光光度計 U-3000 在波長 340 nm 下測吸光值，此讀值為①。之後，各吸光槽中再分別加入 15 μ l asparaginase，置於室溫下 90 分鐘測其吸光值 (Abs)，此讀值為②。

[附註]:1.KH₂PO₄ (pH8.0):可於 4 °C 下保存一個星期。

:2.BSA 及 glycerol:均為穩定酵素分析之功用。

C. Glutamine 濃度之計算：

$$\text{Abs ①} - \text{Abs ②} = \text{Abs ③}$$

$$\left[(\text{血液樣品 Abs ③} - \text{控制組 Abs ③}) \times \text{標準品濃度} \right] \\ \div (\text{標準品 Abs ③} - \text{控制組 Abs ③}) \times 2 \times (\text{驗液毫升數} + 250) \div 250 = \text{Glutamine concentration } (\mu\text{M})$$

(三). Glutamine 餵食對 LPS 誘發大白鼠敗血症之影響：

首先將動物分成二組：

第一組：給予穀氨醯胺，並注射內毒素，以(Gln+，LPS+)表示

第二組：不給穀氨醯胺，並注射內毒素，以(Gln-，LPS+)表示

將穀氨醯胺溶液(對照組)或水(控制組)，藉由食管直接灌餵穀氨醯胺 (200mg/day/200g B.W.)，溶於 2 ml 水，持續 7 天。並且在第 7 天時，同時將內毒素 (lipopolysaccharide from salmonella typhimurium 5mg/Kg BW)，溶於 1 毫升無菌生理食鹽水(0.9%)，注射到

大白鼠腹腔中，禁食 24 小時，但給予自由飲水，犧牲動物的方式是以二氧化碳使其窒息死亡，然後立即剖腹，以含抗凝血劑(100 μ l, 5000units/ml heparine)的注射針筒抽取 7 ~ 8 ml 下腔靜脈的血液，其中 4 ml 全血做淋巴細胞複製情況之觀察，剩餘血液樣品則以 2500 rpm 離心 10 分鐘製得血漿上清液。

1. 淋巴細胞複製率之觀察：

週邊淋巴細胞培養之方法：

血液淋巴細胞製備方法如前所述，將已製備好的淋巴細胞接種於 96 - wells 的培養盤中，使每個 well 含有 3.6×10^5 個細胞數，且每個 well 加入 antibiotics (100 units;終濃度)， autologous plasma (10%; 終濃度) glutamine (0、0.5、0.75、2 mM;終濃度)及 Con A 10 μ g/ml (終濃度)，(glutamine、Con A 此二者使用前新鮮製備，以 RPMI -1640 without glutamine 配製，並且以無菌過濾膜 0.2 μ m 過濾)，最後以 RPMI-1640 定量至每個 well 總體積為 200 μ l，樣品在不同條件重複做 4 個 wells，之後將培養盤放入 37 $^{\circ}$ C，5%二氧化碳恆溫培養箱中，培養 36、60 小時。淋巴細胞複製率的測量則與前述之方法相同。

2. 血漿中 glutamine 濃度之分析：

將上述製得之血漿，以前述分析血漿中 glutamine 之分析方法進行。

二. 以自體免疫疾病病人觀察穀氨醯胺之作用：

(一). 實驗對象：

1. 中山醫學院附設醫院自體免疫病人

(1) 全身性紅斑狼瘡(SLE)

藥物治療：Plaquenil (400 mg/day)、Imuran (Azathioprine)(100 mg/day)、Prednisolone (5-15 mg/day)

年齡：18-66歲，平均32歲

人數：男3，女20

(2) 風濕性關節炎(RA)：

藥物治療：Methotrexate(15 mg/1week)、Plaquenil (400 mg/day)、Prednisolone (5-15 mg/day)

年齡：20-70歲，平均41歲

人數：男7人，女18人

2. 健康正常人：

年齡：23-34歲，平均27歲

人數：13人

(二). 血液樣品收集和製備：

以真空抗凝血管(heparinized)抽取自體免疫病人及正常人之血液10毫升，並於2小時內進行實驗，其中4ml全血用來製備淋巴細胞，作細胞複製率之

觀察，剩餘血液則製備成血漿，分析其 glutamine 濃度及加入週邊淋巴細胞培養液中觀察自體血漿 (autologous plasma) 對細胞複製率之影響。

[附註]：取血時間為早餐後至午餐前，並於抽血後 2 小時內進行實驗分析。

(三). 血漿中 glutamine 濃度之測定：

血漿製備及分析其 glutamine 濃度之方法與動物實驗之方法相同。

(四). 週邊淋巴細胞複製率之觀察：

1. 週邊淋巴細胞之製備及淋巴細胞計數之方法同前面動物實驗所述。

2. 淋巴細胞培養之方法：

將已製備好的淋巴細胞接種於 96 - wells 的培養盤中，使每個 well 含有 3×10^5 個細胞數，且每個 well 加入 antibiotics (100 units; 終濃度)，autologous plasma (10%; 終濃度)，glutamine (0、0.15、0.3、0.5、0.7、1.0、2.0 mM; 終濃度) 及 Con A (0、1、10、100 $\mu\text{g/ml}$; 終濃度)，(glutamine, Con A 此二者使用前新鮮製備，以 RPMI -1640 without glutamine 配製，並且以無菌過濾膜 0.2 μm 過濾)，最後以 RPMI-1640 定量至每個 well 總體積為 200 μl ，樣品在不同條件重複做 4 個

wells，之後將培養盤放入 37 °C，5%二氧化碳恆溫培養箱中，培養 48 小時。淋巴細胞複製率的測量則與前述動物實驗之方法相同。

(五). 自體免疫病人治療藥物對淋巴細胞複製率影響之觀察：

其淋巴細胞複製率之測定方法同上，但培養基中額外加入 methotrexate(MTX)(0、0.01、0.1、1 mM;終濃度)、chloroquine(0、6.3、63、630 nM;終濃度)、hydrocortisone(0、0.5、5、10mM;終濃度)進行觀察。

MTX 劑量是參考 Bacci 等人(1996)報告，指出給予病人 8-12 g/m²MTX，其血中 MTX 之濃度約 700-1000 mμmol/l。

chloroquine 劑量是參考 Tett 等人(1989)報告，指出給予口服 155 mg hydroxychloroquine 其血中此藥濃度約為 11.7ng/ml。

prednisolone 與 hydrocortisone 皆為固醇類藥物，因此以 hydrocortisone 代替使用，由於 glucocorticoid 為其類似物，所以 hydrocortison 使用劑量是參考 R 等人(1995)報告，其指出給予 glucocorticoid 0.06-0.15mg/Kg/day 其血漿中濃度約 5-10nM。

三. 強化 glutamine 營養品配方中 glutamine 之安定性分析：

稱取樣品(某品牌之含穀氨醯胺的特殊元素狀營養品) 0.806 g 溶於 8ml 之生理食鹽水或二次蒸餾水中，以濾紙過濾，取濾液分析其 glutamine 濃度。

分析溶液之組成及製備方法與前述 glutamine 分析相同，但在第一次分析時須先加入 15 μ l 稀釋 100 倍透析過之 asparaginase (透析方法同前述)，因配方中含有蛋白質水解產物 asparagine，此方式可排除其干擾。同樣靜置 45 分鐘後，測其吸光值①，再加入 15 μ l 未稀釋有透析過之 asparaginase，靜置 90 分鐘，測其吸光值②，而 glutamine 濃度之計算方法同前述。

四. 統計分析：

統計分析是以 one way analysis of variance (ANOVA) 來分析，數值做 4 重複(n=4)，取其平均值正負標準差 (Mean \pm Standard Deviation) 加以表示，並以 Duncan's test 來測試處理組間的顯著差異(P<0.05)。

伍、結果

一. 以 Con A 當分裂原刺激大白鼠淋巴細胞複製之最適濃度之探討：

本研究以 [³H]thymidine 併入胞內 DNA 的量當作淋巴細胞複製之指標時，發現正常大白鼠週邊淋巴細胞於 Con A 10 μ g/ml(終濃度)刺激下，培養 48 小時，其複製率達到最大 (圖四)。此結果與 Szondy(1995)研究以 Con A 刺激大白鼠頸部淋巴結之淋巴細胞，觀察其對淋巴細胞複製率之影響時所用之 Con A 濃度一樣。因此在本實驗中以敗血症動物模式，探討不同 glutamine 濃度、細胞數、不同培養時間對淋巴細胞複製之影響時，所給予刺激劑 Con A 之濃度皆以 10 μ g/ml(終濃度)來做觀察。

二. 以 LPS 誘發大白鼠敗血後，不同淋巴細胞數、不同培養時間及 glutamine 濃度對淋巴細胞複製率之影響：

1. 不同培養時間、不同 glutamine 濃度之影響：

實驗結果發現，以 LPS 誘發大白鼠敗血後，當培養盤中每個 well 約含 2.4×10^5 個淋巴細胞數時，於不同培養時間(如圖五所示)，加入 [³H] thymidine 然後在再培養 18 小時，測其 thymidine 併入胞內 DNA 之量，發現在第 60 小時，當培養基中含 0.1、0.5、2 mM 之 glutamine 濃度，比不含 glutamine 者有較高的淋巴細胞複製率，其

中又以含有 2 mM glutamine 最大。且當每個 well 約含 3.6×10^5 及 4.8×10^5 之細胞數時，其結果亦有相似現象(圖六、圖七)。

2. 不同細胞數、不同 glutamine 濃度之影響：

由結果可發現，培養 48 小時後，每個 well 約含 4.8×10^5 個淋巴細胞數者比含 2.4×10^5 、 3.6×10^5 個細胞數有較高的複製率，且在添加 0.5 mM glutamine 時達最大(圖八)。而培養 72 小時亦與培養 48 小時的結果有相似的趨式(圖十)。當淋巴細胞培養 60 小時，測其 thymidine 併入 DNA 之量，發現隨著培養基中 glutamine 濃度增加，則淋巴細胞複製率亦隨之增加，且在 3 種不同細胞數培養下皆有相同現象，並且當每個 well 含 4.8×10^5 與 2.4×10^5 個細胞數比較，其顯著增加淋巴細胞複製率，但與 3.6×10^5 個細胞數比較則無顯著差異(圖九)。

三. Glutamine 餵食對 LPS 誘發敗血症大白鼠其攝食量、體重、脾重百分比及血漿中 glutamine 濃度之影響：

實驗結果顯示大白鼠在正常飲食額外餵食 glutamine(200 mg/day/200 g B.W.)一星期與沒有額外餵食 glutamine 者(以水灌餵)，以 LPS 誘發使其敗血後，其食物攝取量、體重變化、脾重百分比及血漿中 glutamine 濃度變化(示於表一)，兩組間無統計上顯著差異($p > 0.05$)。

四. Glutamine 餵食對 LPS 誘發敗血症大白鼠淋巴細胞複製率之影響：

餵食 glutamine 一星期後以 LPS 誘發使其敗血，取其週邊淋巴細胞觀察其對淋巴細胞複製率之影響，發現當培養基中添加不同濃度之 glutamine (0.1、0.5、0.75、2 mM; 終濃度) 培養 36 小時後，其 thymidine 併入胞內 DNA 之量，以添加 0.5 mM glutamine 時複製率顯著增加 ($p < 0.05$)。而沒有餵食 glutamine 者，發現在培養基中添加各個不同濃度之 glutamine 其複製率並無顯著差異 ($p > 0.05$) (圖十一)。另外，有胃灌 glutamine 者雖在任何 glutamine 濃度下均高於無胃灌者，但無顯著差異。

當淋巴細胞培養 60 小時後再觀察其複製率時，同樣餵食 glutamine 組，當培養基中添加 0.5 mM glutamine 則顯著增加其複製率 ($p < 0.05$)，並且顯著大於無餵食 glutamine 組 ($p < 0.05$)。而無餵食 glutamine 組則於培養基中添加 0.75 mM glutamine 時顯著增加其複製率 ($p < 0.05$) (圖十二)。

五. 以人類自體免疫病人觀察 glutamine 對淋巴細胞複製率之作用：

1. 正常人及自體免疫病人血漿中 glutamine 之比較：

研究結果顯示，SLE 及 RA 病人其血漿中 glutamine 濃度與正常人比較有偏低現象。正常人血中 glutamine

濃度平均約 545 μM ($n=13$;因數字接近或重複所以無法直接由圖中看出人數), SLE($n=23$)病人中有 9 位其血中 glutamine 降至正常人的 80%, 其中有 3 人降至 50%。RA($n=25$)病人中有 13 位其血中 glutamine 降至正常人的 80%, 其中有 1 人降至 50%(圖十三)。

2. 自體免疫病人與正常人淋巴細胞數之觀察：

正常人($n=6$)每毫升血液中所含淋巴細胞數目約為 5.6×10^6 個細胞數, SLE 病人($n=11$)約為 4.1×10^6 , RA 病人($n=19$)約為 4.92×10^6 個細胞數。此結果顯示 SLE 及 RA 病人血中淋巴細胞數目比正常人有所下降趨勢(圖十四)。

3. 以 Con A 刺激淋巴細胞複製觀察其最適條件探討：

先期試驗結果發現, 當培養淋巴細胞之培養基中添加不同 Con A 濃度刺激淋巴細胞時, 以 20 至 200 $\mu\text{g/ml}$ (終濃度)有較好的複製效率(data no show)。因此再進一步以濃度 10、100、200 $\mu\text{g/ml}$ 觀察其複製情況, 結果在 Con A 濃度為 100 $\mu\text{g/ml}$ (終濃度)時對人類淋巴細胞複製達最大的刺激作用, 因此本研究對人類臨床觀察中刺激淋巴細胞複製所使用 Con A 濃度皆採用 100 $\mu\text{g/ml}$ (終濃度)(圖十五)。

4. 培養基中添加胎牛血清、胎牛血清加抗凝血劑 (heparine)及自體血漿對淋巴細胞複製之影響：

培養基中添加自體血漿其淋巴細胞複製率顯著高於胎牛血清及胎牛血清加抗凝血劑($p < 0.05$)。且抗凝血劑的添加並不影響淋巴細胞複製率(圖十六)。

5. Glutamine 對自體免疫病人淋巴細胞複製率之影響：

培養 SLE 及 RA 病人週邊淋巴細胞之培養基中添加 glutamine 由 0 mM 增加至 0.3 mM 時，其 [^3H] thymidine 併入胞內 DNA 之增加倍率與正常人比較有偏高之趨勢(圖十七)。

六. 自體免疫疾病治療藥物對正常淋巴細胞複製率之影響：

因本實驗之病人均有使用某些治療藥物，為瞭解圖十七之結果是否因藥物引起，故進行如下觀察。由於無法購得與治療這些病人相同之藥物，因此有的藥物以有相似效用之藥品代替。

1. Methotrexate(MTX) 對淋巴細胞複製率之影響：

結果顯示在第一位健康受試者之淋巴細胞之培養基中添加 0.01、0.1、1 mM MTX 顯著的促進淋巴細胞複製($p < 0.05$)。而不同的 MTX 濃度對淋巴細胞複製無顯著差異($p > 0.05$)(圖十八)同樣在第二位健康受試者亦有一樣的結果(圖十九)。

2. Chloroquine 對淋巴細胞複製率之影響：

結果顯示在第一位健康受試者之淋巴細胞之培養

基中添加 6.3 、 63 nM(終濃度)chloroquine ，比不添加者顯著的促進淋巴細胞的複製($p < 0.05$)，而當添加 630 nM chloroquine 則與不添加者無顯著差異($p > 0.05$)(圖二十)。在第二位健康受試者之淋巴細胞的複製實驗中發現在培養基添加 0.3 、 0.5 mM glutamine 時有增加細胞複製率之趨勢但無統計上顯著差異($p > 0.05$)，當 chloroquine 添加於不含有 glutamine 或含有 1 mM glutamine 之培養基中則 chloroquine 顯著促進淋巴細胞複製($p < 0.05$)(圖二十一)。

3. Hydrocortisone 對淋巴細胞複製率之影響：

實驗結果顯示，添加 10 nM Hydrocortisone 有顯著抑制淋巴細胞複製($p < 0.05$)，而 0.5 ， 5 nM 則無顯著差異($p > 0.05$)(圖二十二)。

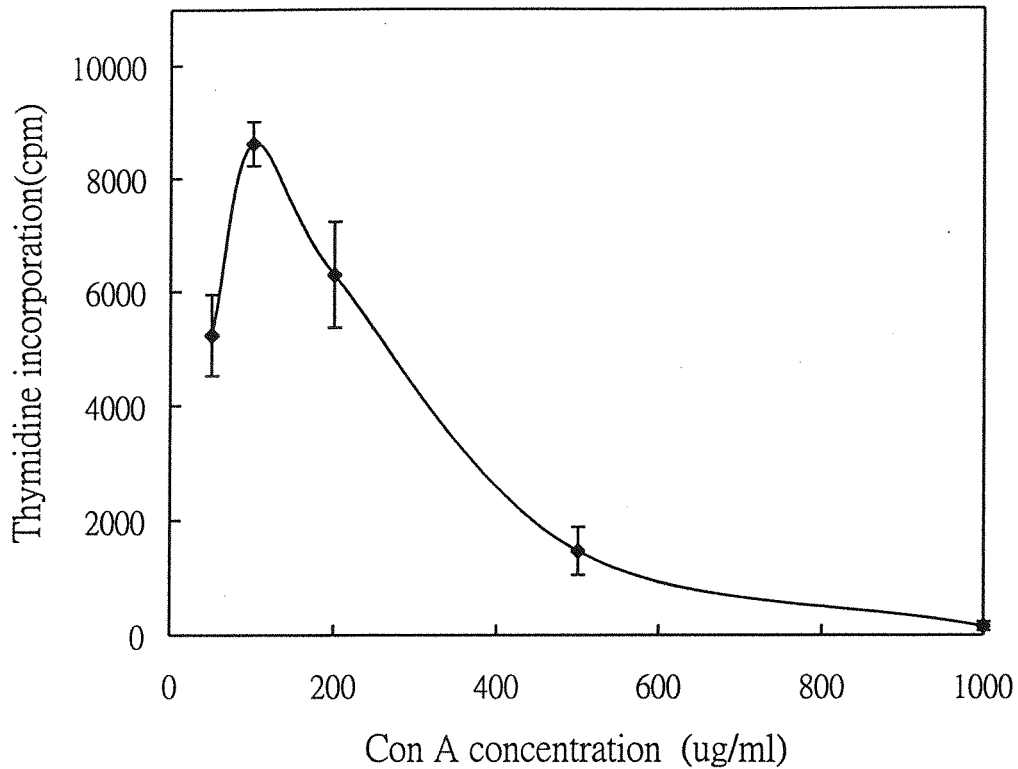
4. 自體免疫病人治療藥物對正常淋巴細胞於 0 mM 及 0.3 mM 或 0.5 mM glutamine 存在時對複製反應之影響：

培養基中添加三種不同濃度之不同藥物與不添加者，當 glutamine 濃度由 0 mM 增加至 0.3 mM 或 0.5 mM 時，其 [^3H]thymidine 併入胞內 DNA 之增加倍率無很大差異(表二)。

七. 強化 glutamine 營養品配方中 glutamine 之安定性分析：

以生理食鹽水或水配製之 glutamine 溶液放置室溫

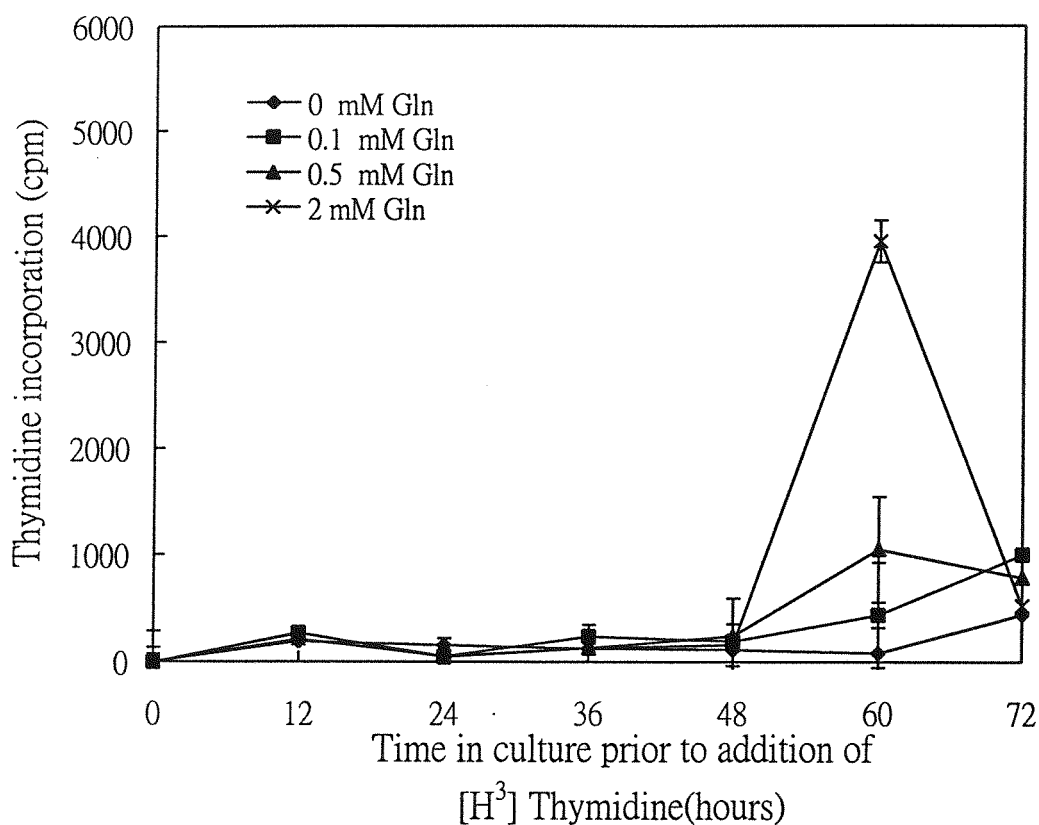
下隨時間增加 glutamine 濃度亦隨之降低，而儲存於 4 °C 下 24 小時其降低程度較存於室溫 24 小時少，但放置 4 °C 下 48 、 96 小時則測得之 glutamine 濃度高於 24 小時，且儲存 48 小時甚至高於新鮮配製時之濃度（表三）。



圖四、培養大白鼠週邊淋巴細胞，於不同 Con A 濃度刺激下，其^[3H] thymidine 併入胞內 DNA 之量。

Fig. 4 Incorporation of [³H] thymidine into the DNA of Con A-stimulated lymphocytes of rats at different concentration of glutamine of muscle.

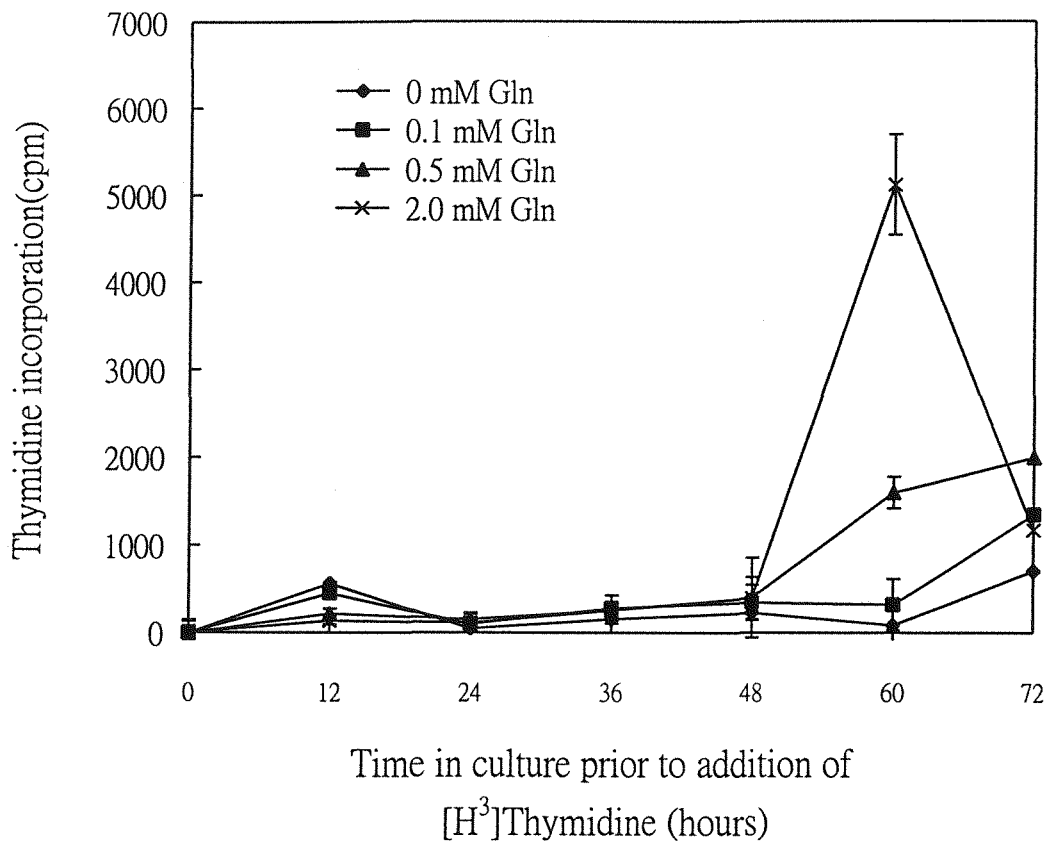
96 wells 培養盤，每個 well 約含 5×10^5 個細胞數，以不同 Con A 濃度刺激(5、10、20、50、100 $\mu\text{g/ml}$ 終濃度)，培養 48 小時後，加入 [³H] thymidine 再繼續培養 18 小時，測 ³H 併入胞內 DNA 之量以 cpm 表示。每個點表示重複做 4 個 wells，取其平均值 \pm 標準差。



圖五、以 LPS 誘發大白鼠敗血後，培養盤中每個 well 約含 2.4×10^5 個淋巴細胞以 Con A 刺激，培養於不同 glutamine 濃度，及各個不同時間下，其 $[^3\text{H}]$ thymidine 併入胞內 DNA 之量。

Fig. 5 Incorporation of $[^3\text{H}]$ thymidine into the DNA of Con A-stimulated lymphocytes from LPS-induced septic rats at different concentration of glutamine of culture

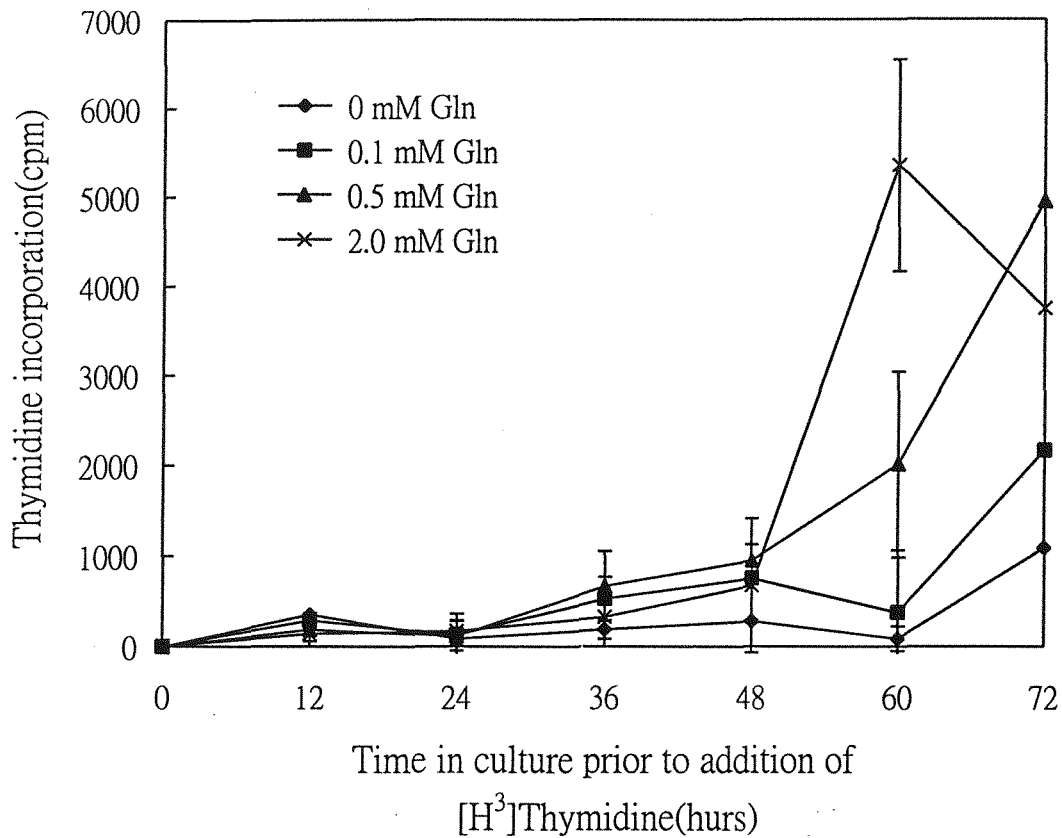
96 wells 培養盤，每個 well 約含 2.4×10^5 個細胞數，以 Con A $10\mu\text{g/ml}$ (終濃度) 刺激下，在不同 glutamine 濃度下：◆, 0 mM；■, 0.1 mM；▲, 0.5 mM；×, 2mM (終濃度)，於不同培養時間，加入 $[^3\text{H}]$ thymidine 再繼續培養 18 小時，測 ^3H 併入胞內 DNA 之量以 cpm 表示。每個點表示重複做 4 個 wells，取其平均值 ± 標準差。



圖六、以 LPS 誘發大白鼠敗血後，培養盤中每個 well 約含 3.6×10^5 個淋巴細胞以 Con A 刺激，培養於在不同 glutamine 濃度，不同時間下，其 $[^3\text{H}]$ thymidine 併入胞內 DNA 之量。

Fig. 6 Incorporation of $[^3\text{H}]$ thymidine into the DNA of Con A-stimulated lymphocytes from LPS-induced septic rats at different concentration of glutamine of culture.

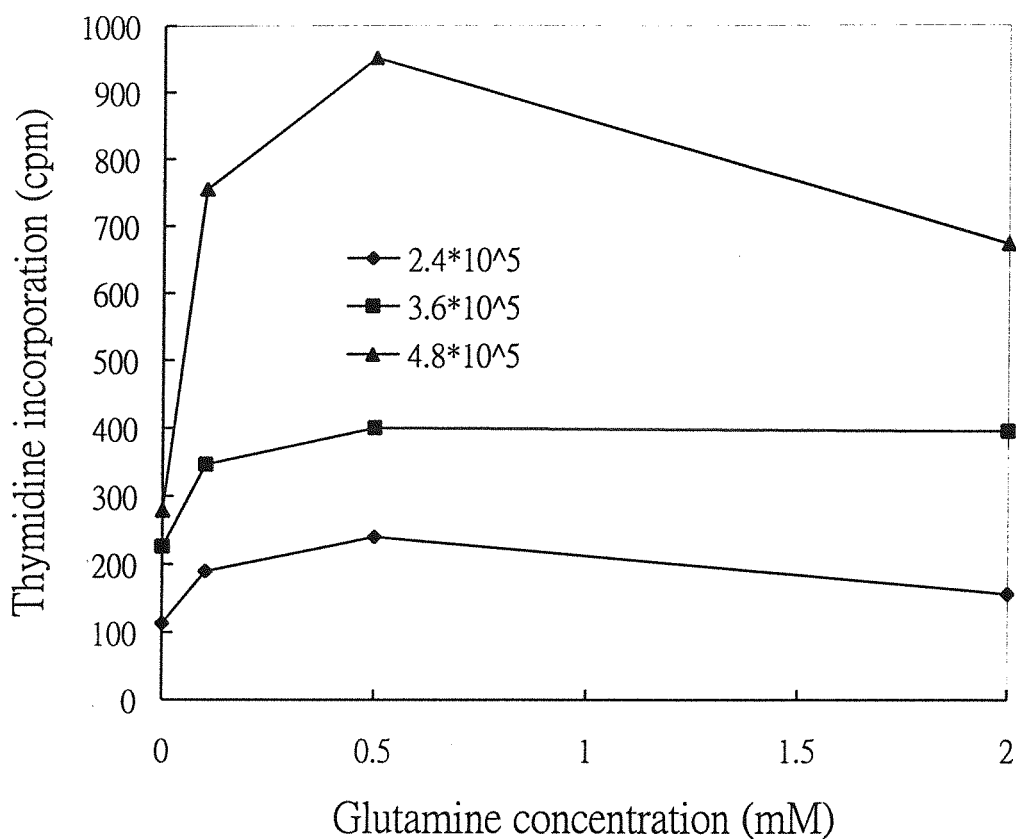
96 wells 培養盤，每個 well 約含 3.6×10^5 個細胞數，以 Con A 刺激，在不同 glutamine 濃度下：◆，0 mM；■，0.1 mM；▲，0.5 mM；×，2mM。(終濃度)，分別於不同培養時間（12、24、36、48、60、72）後，加入 $[^3\text{H}]$ thymidine 再繼續培養 18 小時，測 ^3H 併入胞內 DNA 之量以 cpm 表示。每個點表示重複做 4 個 wells，取其平均值 ± 標準差。



圖七、以 LPS 誘發大白鼠敗血後，培養盤中每個 well 約含 4.8×10^5 個淋巴細胞以 Con A 刺激，培養於不同 glutamine 濃度，各個不同時間下，其 ^3H thymidine 併入胞內 DNA 之量。

Fig. 7 Incorporation of ^3H thymidine into the DNA of Con A-stimulated lymphocytes from LPS-induced septic rats at different concentration of glutamine of culture.

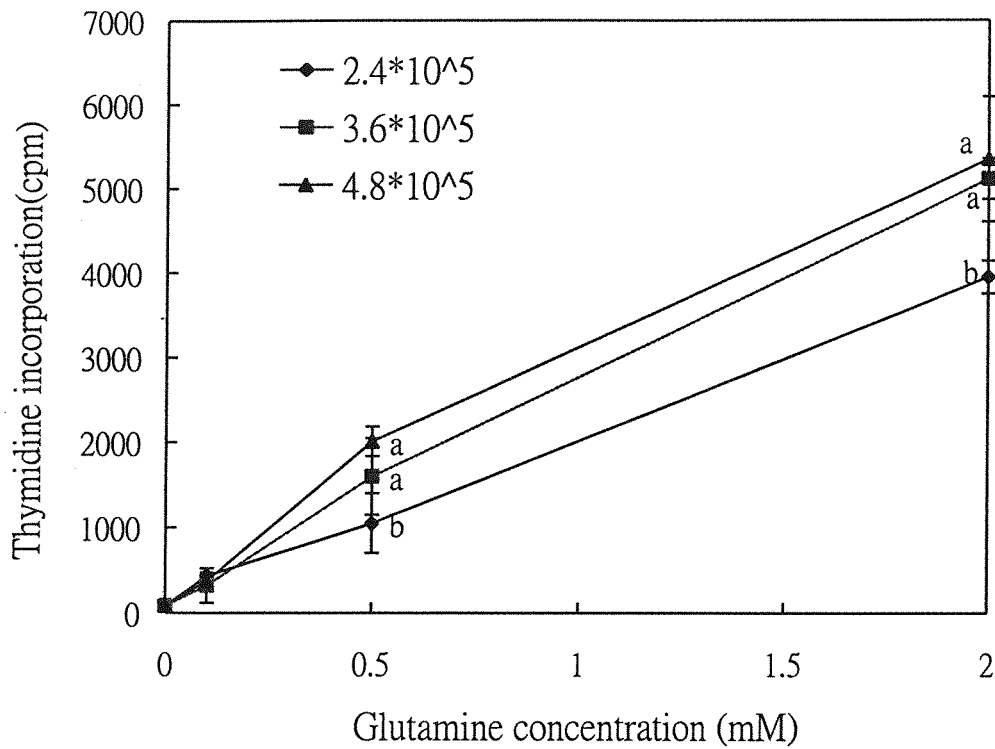
96 wells 培養盤，每個 well 約含 4.8×10^5 個細胞數，以 Con A $10\mu\text{g}/\text{ml}$ (終濃度) 刺激下，在不同 glutamine 濃度下：◆, 0 mM；■, 0.1 mM；▲, 0.5 mM；×, 2mM (終濃度)，於不同培養時間，加入 ^3H thymidine 再繼續培養 18 小時，測 ^3H 併入胞內 DNA 之量以 cpm 表示。每個點表示重複做 4 個 wells，取其平均值 ± 標準差。



圖八、以 LPS 誘發大白鼠敗血後，其淋巴細胞以 Con A 刺激，在不同 glutamine 濃度，不同細胞數目下培養 48 小時，其 [³H] thymidine 併入胞內 DNA 之量。

Fig.8 Incorporation of [³H] thymidine into the DNA of Con A-stimulated lymphocytes from LPS-induced septic at different concentration of glutamine at various cell number of culture for 48 hr.

96 wells 培養盤，每個 well 約含：◆, 2.4×10^5 ; ■, 3.6×10^5 ; ▲, 4.8×10^5 個細胞數，以 Con A 刺激下，在不同 glutamine 濃度：0、0.1、0.5、2 mM (終濃度)，培養 48 小時後，加入 [³H] thymidine 再繼續培養 18 小時，測 ³H 併入胞內 DNA 之量以 cpm 表示。每個點表示重複做 4 個 wells，取其平均值 ± 標準差。

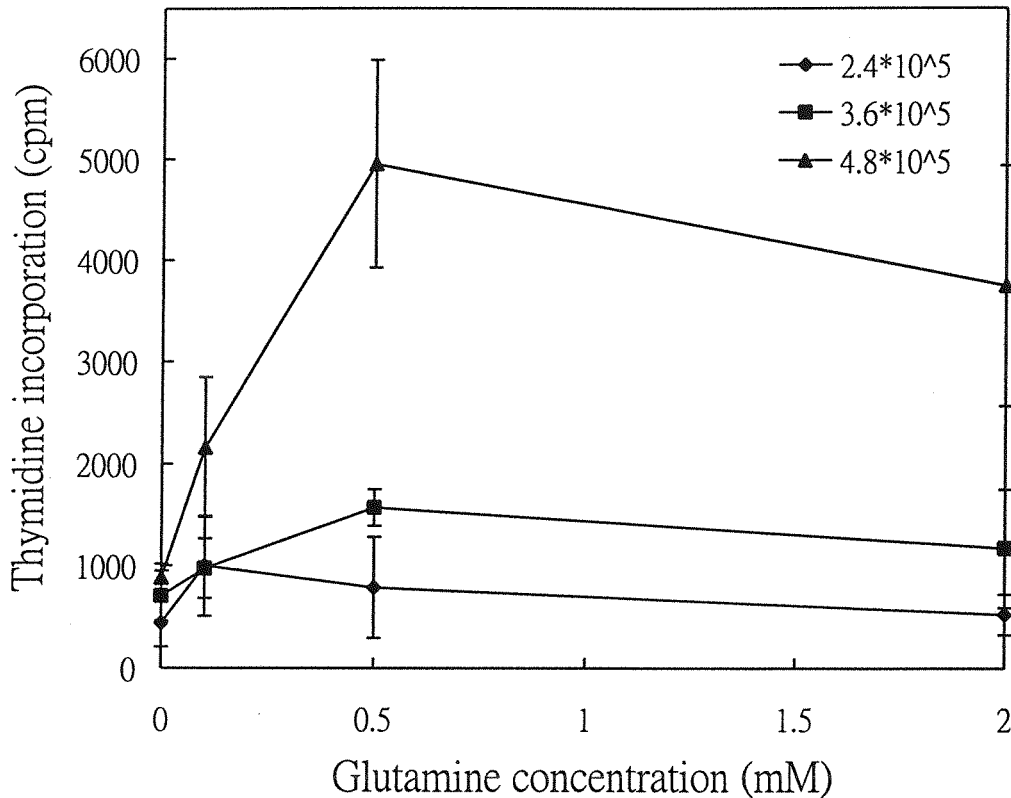


圖九、以 LPS 誘發大白鼠敗血後，其淋巴細胞以 Con A 刺激，在不同 glutamine 濃度，不同細胞數目下培養 60 小時，其 [³H] thymidine 併入胞內 DNA 之量。

Fig.9 Incorporation of [³H] thymidine into the DNA of Con A-stimulated lymphocytes from LPS-induced septic at different concentration of glutamine at various cell number of culture for 60 hr.

96 wells 培養盤，每個 well 約含：◆， 2.4×10^5 ；■， 3.6×10^5 ；▲， 4.8×10^5 個細胞數，以 Con A 刺激下，在不同 glutamine 濃度：0、0.1、0.5、2 mM (終濃度)，培養 60 小時後，加入 [³H] thymidine 再繼續培養 18 小時，測 ³H 併入胞內 DNA 之量以 cpm 表示。每個點表示重複做 4 個 wells，取其平均值 ± 標準差。

“a” “b” 表示不同細胞數組別間具顯著差異 ($p < 0.05$)。



圖十、以 LPS 誘發大白鼠敗血後，其淋巴細胞以 Con A 刺激，在不同 glutamine 濃度，不同細胞數目下培養 72 小時，其 [³H] thymidine 併入胞內 DNA 之量。

Fig. 10 incorporation of [³H] thymidine into the DNA of Con A-stimulated lymphocytes from LPS-induced septic at different concentration of glutamine at various cell number of culture for 72 hr.

96 wells 培養盤，每個 well 約含：◆, 2.4×10^5 ；■, 3.6×10^5 ；▲, 4.8×10^5 個細胞數，以 Con A 刺激下，在不同 glutamine 濃度：0、0.1、0.5、2 mM (終濃度)，培養 72 小時後，加入 [³H] thymidine 再繼續培養 18 小時，測 ³H 併入胞內 DNA 之量以 cpm 表示。每個點表示重複做 4 個 wells，取其平均值 ± 標準差。

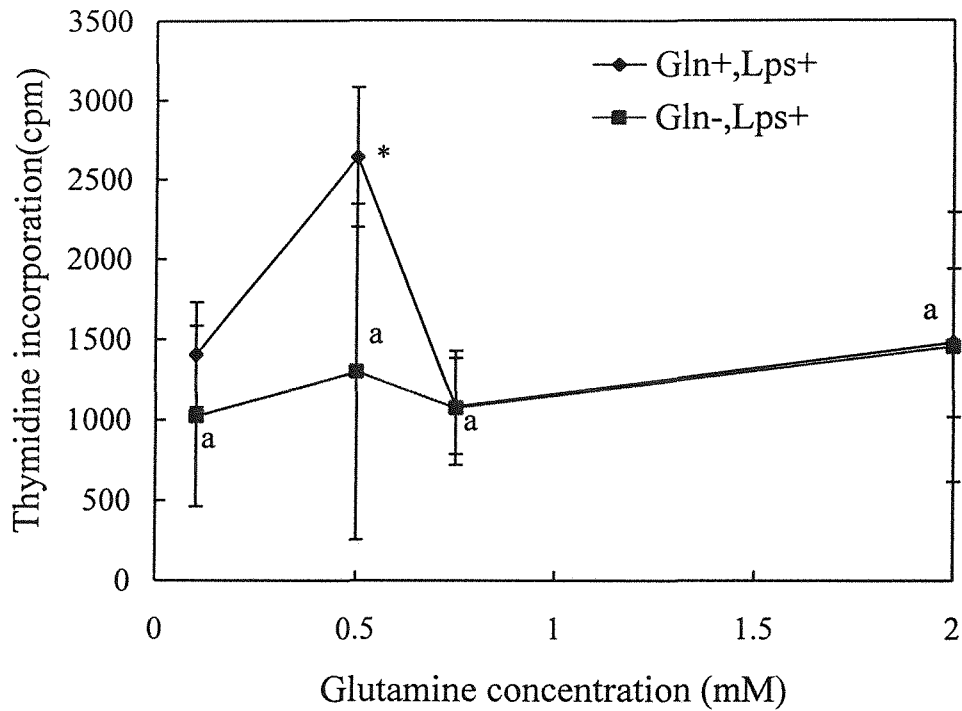
表一. 麩胺醯胺餵食對 LPS 誘發敗血症大白鼠其攝食量、體重、脾重百分比及血漿中麩胺醯胺濃度之影響：

Table 1. Effect of extra glutamine intake on food intake、body weight、relative spleen weight and plasma glutamine concentration of LPS-induced sepsis rat.

	No feeding glutamine	Feeding glutamine
Food intake (g)	20.9 ± 1.49 ^a	19.5 ± 0.6 ^a
Body weight (g)	47.2 ± 7.0 ^a	43.5 ± 3.6 ^a
R S W	0.40 ± 0.07 ^a	0.423 ± 0.05 ^a
Glutamine (μM)	861.1 ± 74.6 ^a	816.2 ± 74.6 ^a

R S W (relative spleen weight=spleen weight / body weight × 100%)

數值上方之符號 a 表示組間無顯著差異(p>0.05)



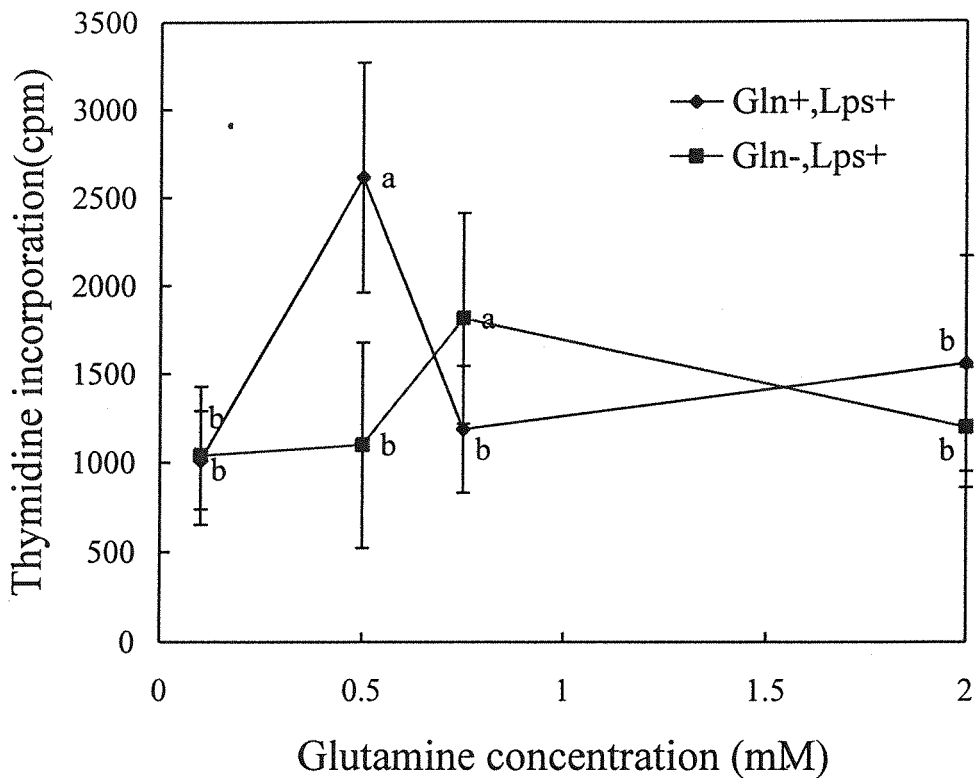
圖十一、Glutamine 餵食對 LPS 誘發敗血症大白鼠之淋巴細胞以 Con A 刺激，於不同 glutamine 濃度下培養 36 小時，其 $[^3\text{H}]$ thymidine 併入胞內 DNA 之量。

Fig.11 Incorporation of $[^3\text{H}]$ thymidine into the DNA of Con A-stimulated lymphocyte from LPS-induced rats at different concentration of glutamine for 36 hr. Rats were previously fed with or without extra amount of glutamine in addition to their normal diet.

96 wells 培養盤中，每個 well 約含 3.6×10^5 個淋巴細胞以 Con A 刺激，在不同 glutamine 濃度下(0.1、0.5、0.75、2 mM；終濃度)培養 36 小時後，加入 $[^3\text{H}]$ thymidine 再繼續培養 18 小時，測 ^3H 併入胞內 DNA 之量以 cpm 表示。◆, 餵食 glutamine；■, 無餵食 glutamine。每個點表示重複做 4 個 wells，取其平均值 \pm 標準差。

圖上方之"*"表示餵食 glutamine 組內培養基中含濃度之 glutamine 達顯著差異($p < 0.05$)。

圖上方之符號 a 表示餵食 glutamine 無餵食組間未達顯著差異($p > 0.05$)。



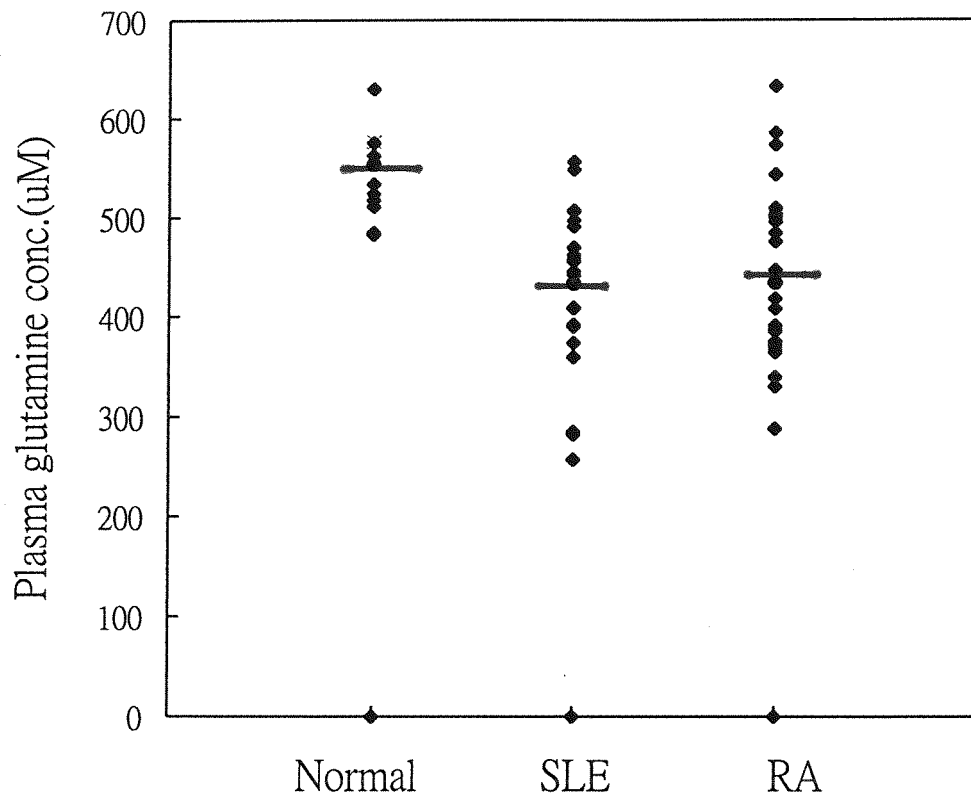
圖十二、Glutamine 餵食對 LPS 誘發敗血症大鼠之淋巴細胞以 Con A 刺激，於不同 glutamine 濃度下，培養 60 小時，其 $[^3\text{H}]$ thymidine 併入胞內 DNA 之量。

Fig.12 Incorporation of $[^3\text{H}]$ thymidine into the DNA of Con A-stimulated lymphocyte from LPS-induced rats at different concentration of glutamine for 60 hr. Rats were previously fed with or without extra amount of glutamine in addition to their normal diet.

96 wells 培養盤中，每個 well 約含 3.6×10^5 個淋巴細胞以 Con A 刺激，在不同 glutamine 濃度下 (0.1、0.5、0.75、2 mM；終濃度) 培養 60 小時後，加入 $[^3\text{H}]$ thymidine 再繼續培養 18 小時，測 ^3H 併入胞內 DNA 之量以 cpm 表示。◆，餵食 glutamine；■，無餵食 glutamine。每個點表示重複做 4 個 wells，取其平均值 \pm 標準差。

圖上方之符號不同(a, b)表示餵食 glutamine 組內培養基中含不同濃度之 glutamine 達顯著差異($p < 0.05$)。

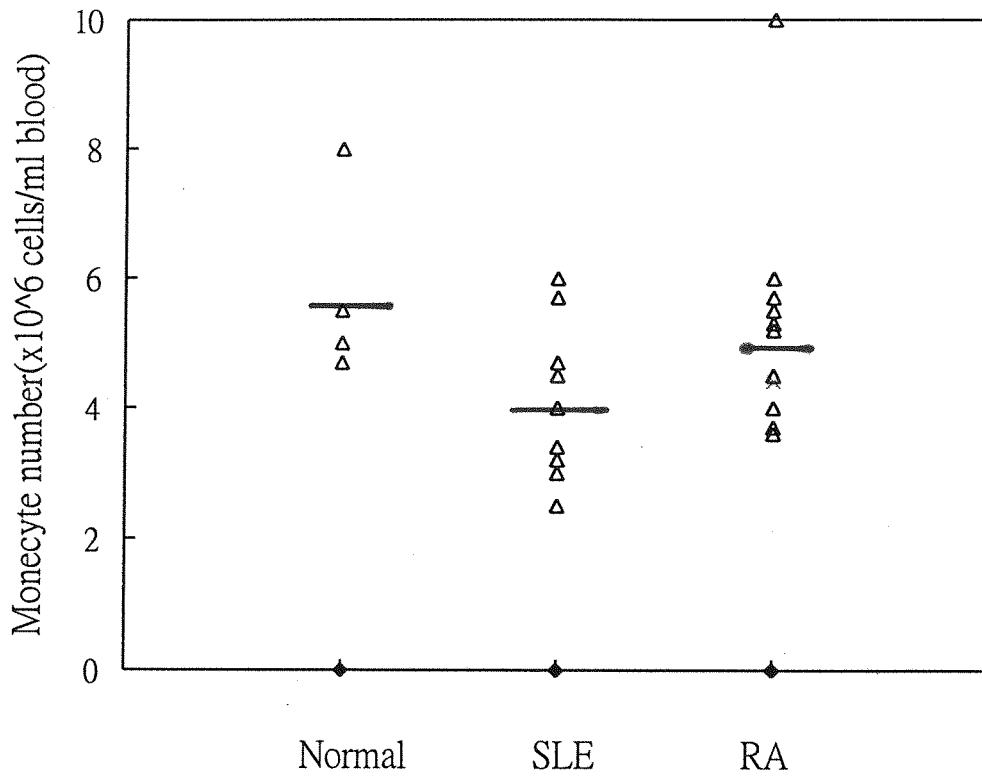
圖上方之"*"表示餵食 glutamine 與不餵食組間達顯著差異($p < 0.05$)。



圖十三、正常人及系統性紅斑狼瘡(SLE)、類風濕性關節炎(RA)病人，其血漿中 glutamine 之濃度(µM)。

Fig. 13 The concentration of glutamine in plasma of normal , SLE or RA patients

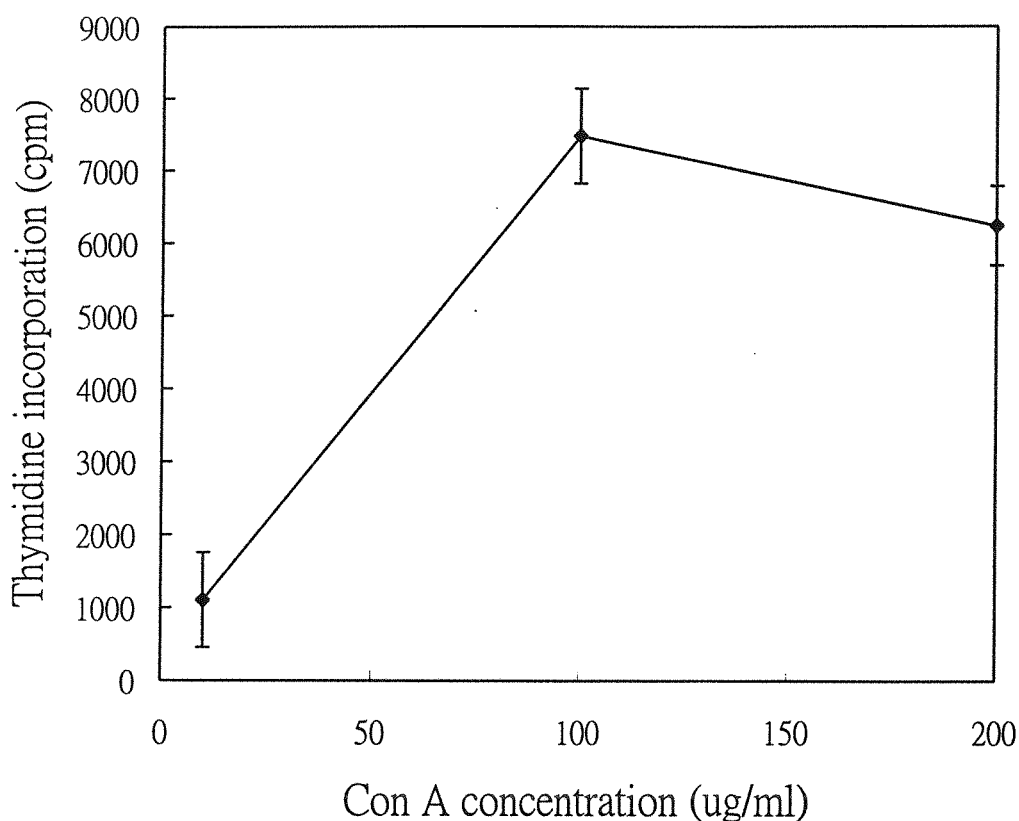
正常人(normal ; n=13)、系統性紅斑狼瘡(SLE ; n=23)、類風濕性關節炎病(RA ; n=25)。



圖十四、正常人及系統性紅斑狼瘡、類風濕性關節炎病人，其每毫升血液中所含淋巴細胞數目。

Fig.14 The number of lymphocyte in plasma of normal , SLE or RA patients

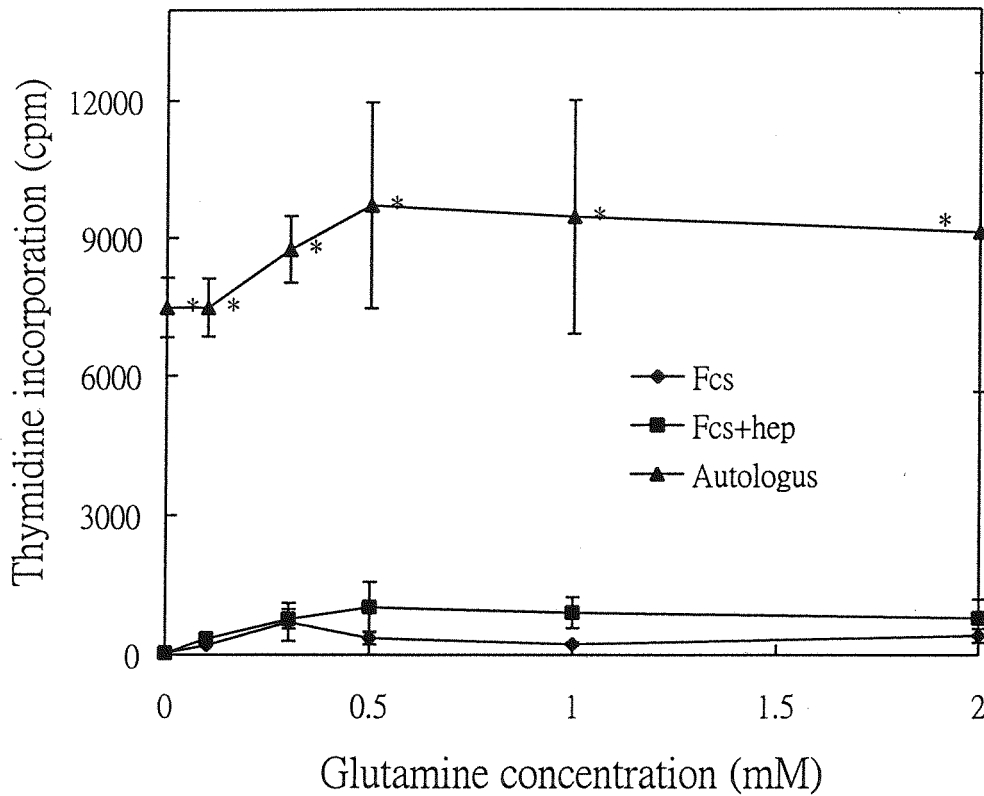
正常人(normal ; n=6)、系統性紅斑狼瘡(SLE ; n=11)、類風濕性關節炎病(RA ; n=19)。



圖十五、正常人週邊淋巴細胞以不同 Con A 濃度刺激，其 $[^3\text{H}]$ thymidine 併入胞內 DNA 之量。

Fig 15. The amount of $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation into the DNA of Con A-stimulated normal lymphocytes at different concentration glutamine.

96 wells 培養盤，每個 well 約含 3×10^5 個細胞數，以不同濃度 Con A(10、100、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 終濃度) 刺激，培養 48 小時後，加入 $[^3\text{H}]$ thymidine 再繼續培養 18 小時，測 ^3H 併入胞內 DNA 之量以 cpm 表示。每個點表示重複做 4 個 wells，取其平均值 \pm 標準差。

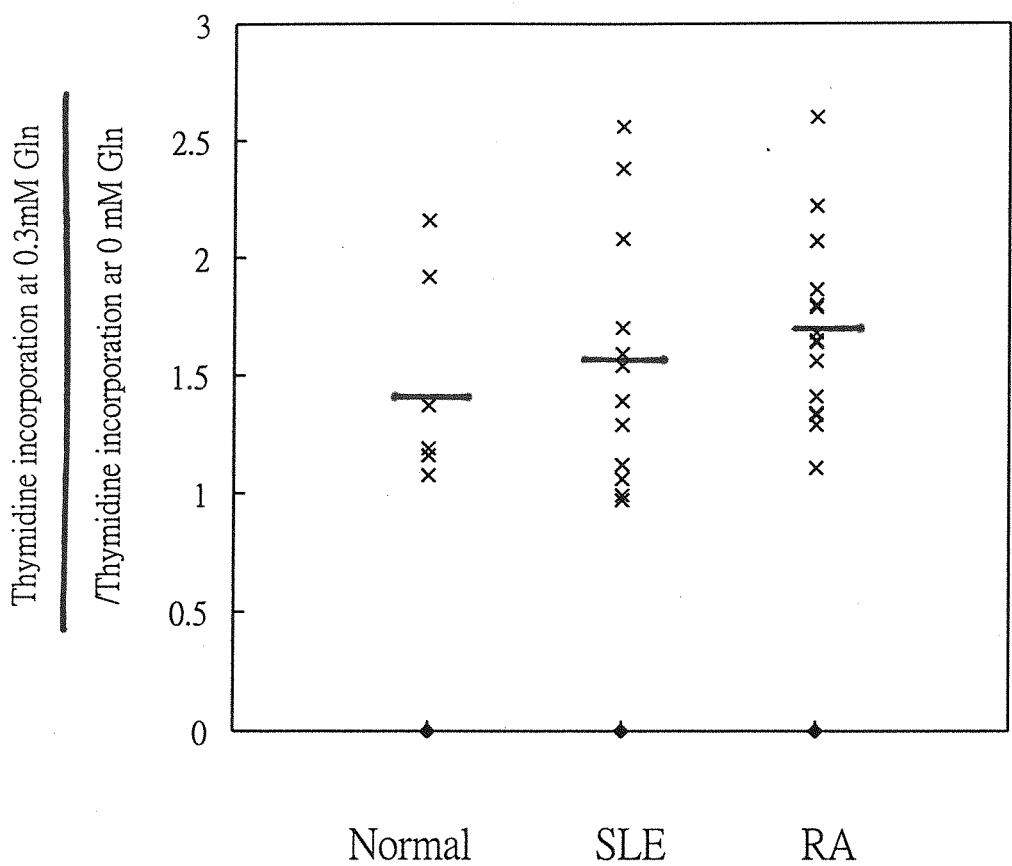


圖十六、培養正常人週邊淋巴細胞，培養基中添加胎牛血清、胎牛血清加抗凝血劑及自體血漿，在不同 glutamine 濃度下，以 Con A 刺激，其 $[^3\text{H}]$ thymidine 併入胞內 DNA 之量。

Fig 16. Incorporation of $[^3\text{H}]$ thymidine into the DNA of Con A-stimulated lymphocytes of normal rats at different concentration of glutamine with FCS, FCS+heparine and autologus plasma of culture.

96 wells 培養盤，每個 well 約含 3×10^5 個細胞數，加入：
 ◆，胎牛血清(FCS)；
 ■，胎牛血清加抗凝血劑(FCS+Heparine)；
 或▲，自體血漿(autologus plasma)終濃度 10%，不同 glutamine 濃度(0、0.1、0.3、0.5、1.0、2.0 mM; 終濃度)，以 Con A (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 終濃度)刺激，培養 48 小時後，加入 $[^3\text{H}]$ thymidine 再繼續培養 18 小時，測 ^3H 併入胞內 DNA 之量以 cpm 表示。每個點表示重複做 4 個 wells，取其平均值 \pm 標準差。

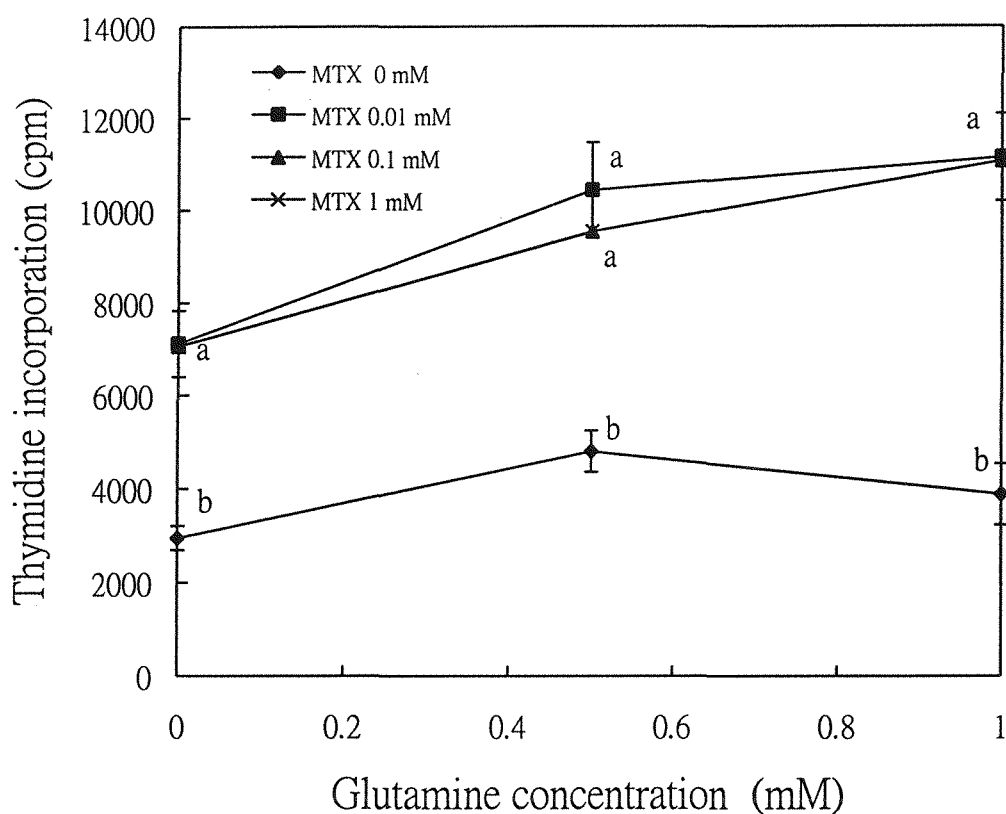
圖上方 * 表示組別間達到顯著差異 ($P < 0.05$)



圖十七、培養正常人及系統性紅斑狼瘡、類風濕性關節炎病人週邊淋巴細胞之培養基中，添加的 glutamine 由 0 mM 增加至 0.3 mM 時，其³H] thymidine 併入胞內 DNA 之增加倍率。

Fig. 17 The ratio of incorporation of [³H]thymidine into the DNA of Con A-stimulated lymphocytes of normal, SLE and RA patient at the concentrations of glutamine increasing from 0mM to 0.3mM in the culture.

96 wells 培養盤，每個 well 約含 3×10^5 個細胞數，以 Con A(100 μ g/ml) 刺激，培養 48 小時後，加入 [³H] thymidine 再繼續培養 18 小時，測 ³H 併入胞內 DNA 之量以 cpm 表示。每個點表示重複做 4 個 wells，取其平均值 \pm 標準差。

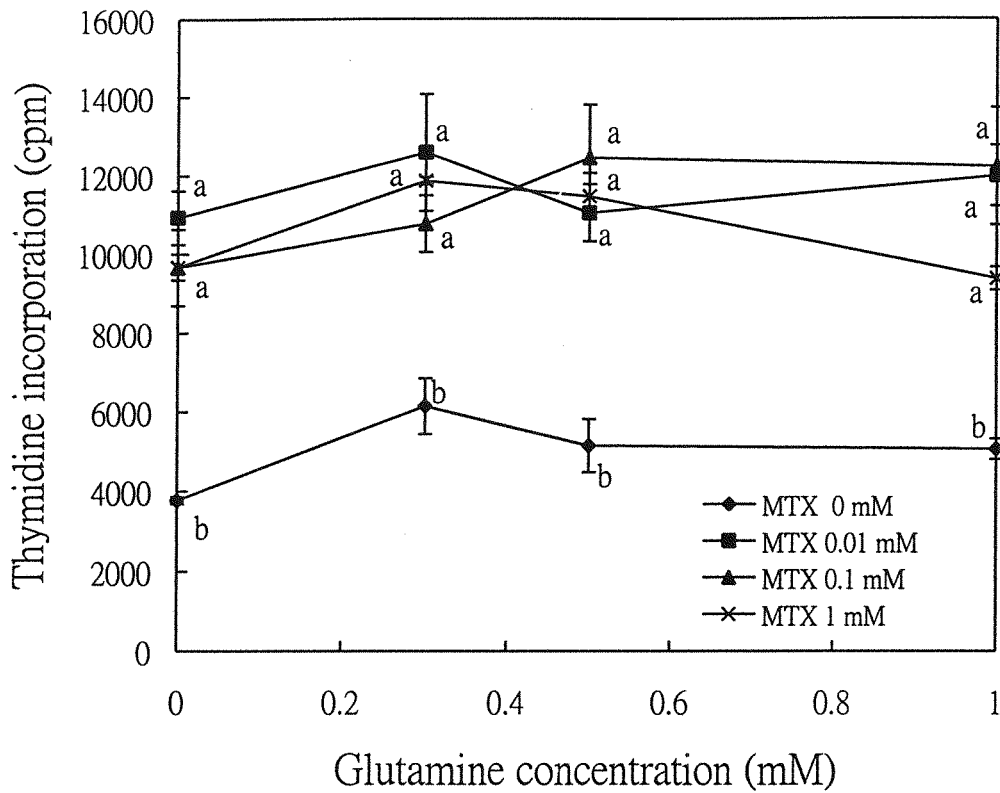


圖十八、第一位正常人週邊淋巴細胞以體外(in vitro)方式添加 methotrexate，其 $[^3\text{H}]$ thymidine 併入胞內 DNA 之量。

Fig. 18 Effect of methotrexate on the incorporation of $[^3\text{H}]$ thymidine into the DNA of normal human lymphocytes.

96 wells 培養盤，每個 well 約含 3×10^5 個細胞數，以 Con A (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 終濃度) 刺激，分別加入不同濃度之 methotrexate：◆, 0 mM；■, 0.01 mM；▲, 0.1 mM；×, 1.0 mM。(終濃度)，不同 glutamine 濃度(0、0.5、1mM)，培養 48 小時後，加入 $[^3\text{H}]$ thymidine 再繼續培養 18 小時，測 ^3H 併入 DNA 之量以 cpm 表示。每個點表示重複做 4 個 wells，取其平均值 \pm 標準差。

圖上方之符號不同(a, b)表示添加與不添加 MTX 相比較具有顯著差異($p < 0.05$)。

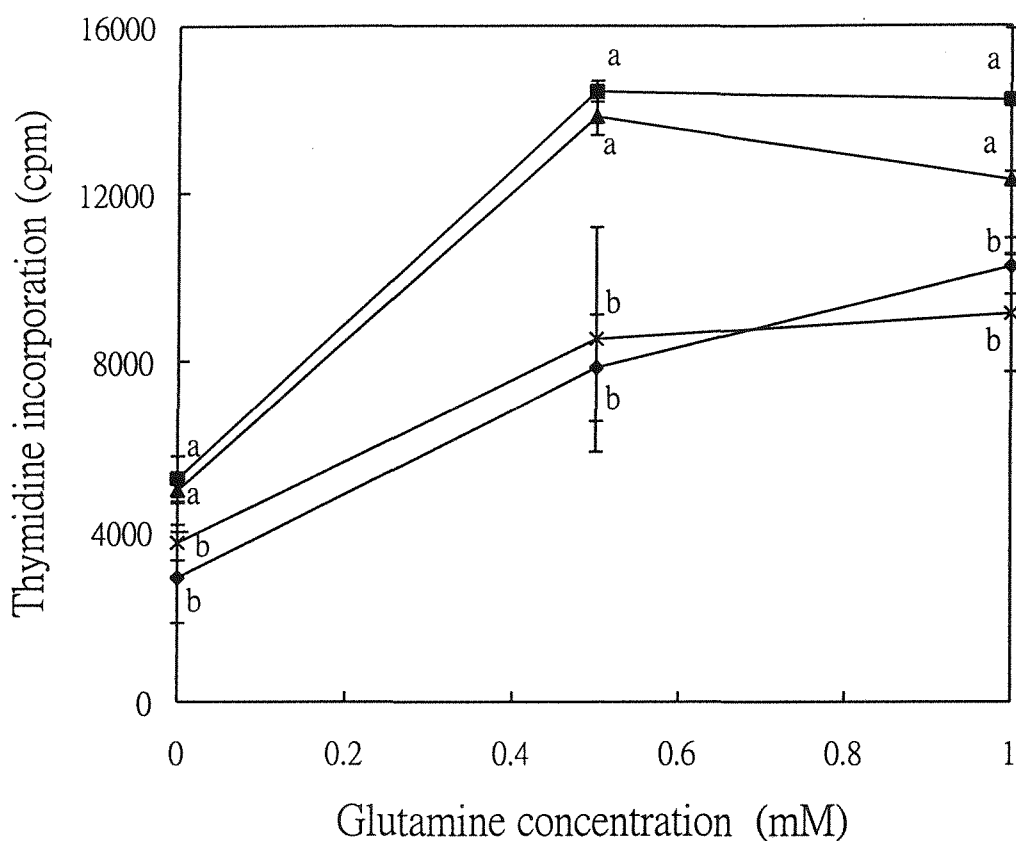


圖十九、第二位正常人週邊淋巴細胞以體外(in vitro)方式添加 methotrexate，其³H] thymidine 併入胞內 DNA 之量。

Fig.19 Effect of methotrexate on the incorporation of [³H] thymidine into the DNA of normal human lymphocytes.

96 wells 培養盤，每個 well 約含 3×10^5 個細胞數，以 Con A (100 μ g/ml; 終濃度) 刺激，分別加入不同濃度之 methotrexate：◆, 0 mM；■, 0.01 mM；▲, 0.1 mM；X, 1.0 mM。(終濃度)，不同 glutamine 濃度(0、0.3、0.5、1mM)，培養 48 小時後，加入 [³H] thymidine 再繼續培養 18 小時，測 ³H 併入胞內 DNA 之量以 cpm 表示。每個點表示重複做 4 個 wells，取其平均值 ± 標準差。

圖上方之符號不同(a, b)表示添加與不添加 MTX 相比較具有顯著差異($p < 0.05$)。

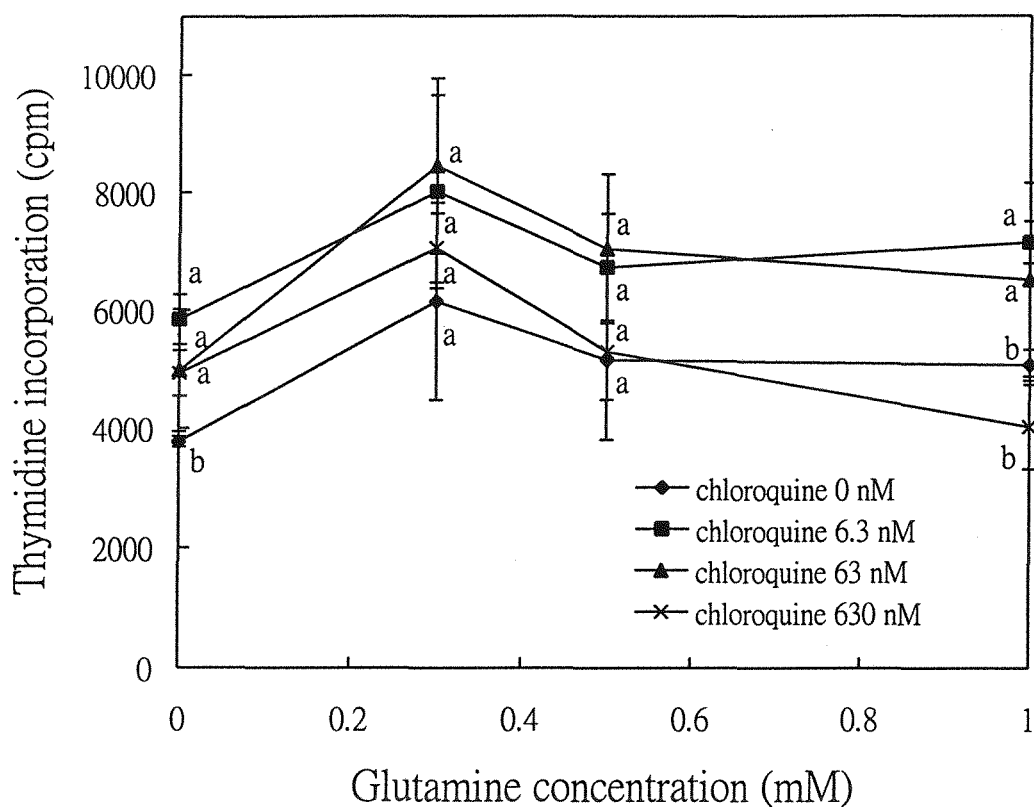


圖二十、第一位正常人週邊淋巴細胞以體外(in vitro)方式添加 chloroquine，其 $[^3\text{H}]$ thymidine 併入胞內 DNA 之量。

Fig. 20 Effect of chloroquine on the incorporation of $[^3\text{H}]$ thymidine into the DNA of normal human lymphocytes.

96 wells 培養盤，每個 well 約含 3×10^5 個細胞數，以 Con A ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$; 終濃度) 刺激，分別加入不同濃度之 chloroquine：◆, 0 nM；■, 6.3 nM；▲, 63 nM；×, 630 nM (終濃度)，不同 glutamine 濃度(0、0.5、1mM) 培養 48 小時後，加入 $[^3\text{H}]$ thymidine 再繼續培養 18 小時，測 ^3H 併入胞內 DNA 之量以 cpm 表示。每個點表示重複做 4 個 wells，取其平均值 \pm 標準差。

圖上方之符號不同(a, b)表示添加與不添加 chloroquine 相比較具有顯著差異($p < 0.05$)。

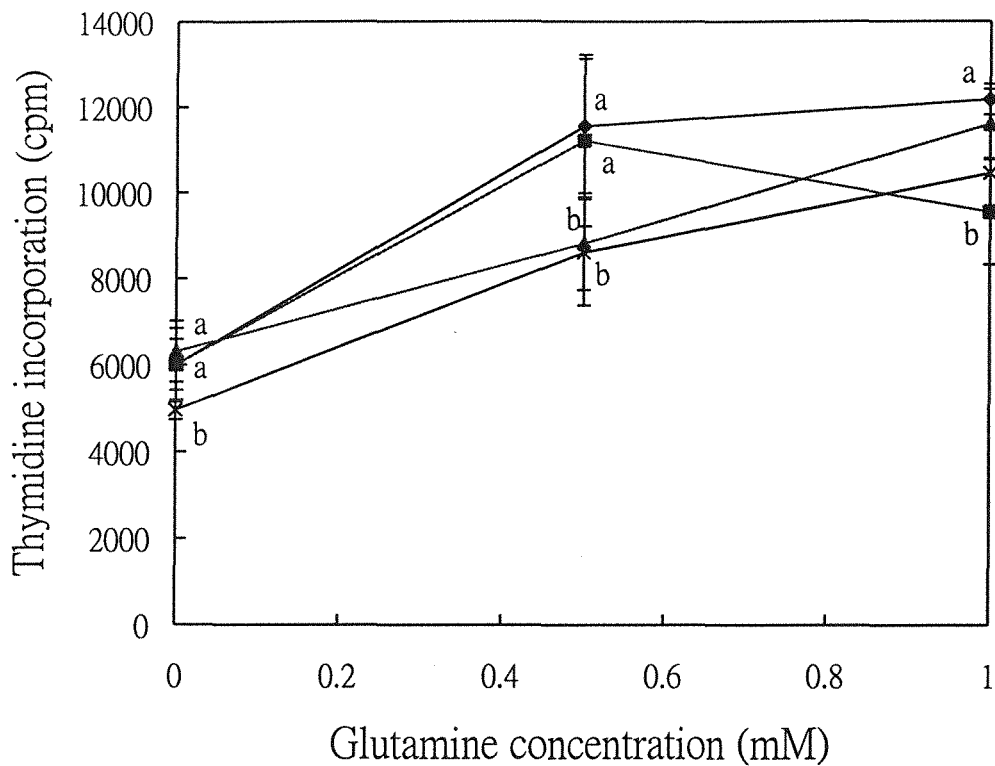


圖二十一、第二位正常人週邊淋巴細胞以體外 (in vitro) 方式添加 chloroquine，其³H thymidine 併入胞內 DNA 之量。

Fig.21 Effect of chloroquine on the incorporation of [³H] thymidine into the DNA of normal human lymphocytes.

96 wells 培養盤，每個 well 約含 3×10^5 個細胞數，以 Con A (100 μ g/ml; 終濃度) 刺激，分別加入不同濃度之 chloroquine：◆，0 nM；■，6.3 nM；▲，63 nM；×，630 nM (終濃度)，不同 glutamine 濃度(0、0.3、0.5、1mM) 培養 48 小時後，加入 [³H] thymidine 再繼續培養 18 小時，測 ³H 併入胞內 DNA 之量以 cpm 表示。每個點表示重複做 4 個 wells，取其平均值 ± 標準差。

圖上方之符號不同(a, b)表示添加與不添加 chloroquine 相比較具有顯著差異($p < 0.05$)。



圖二十二、正常人週邊淋巴細胞以體外 (in vitro) 方式添加 hydrocortisone in vitro，其 $[^3\text{H}]$ thymidine 併入胞內 DNA 之量。

Fig.22 Effect of hydrocortisone on the incorporation of $[^3\text{H}]$ thymidine into the DNA of normal human lymphocytes.

96 wells 培養盤，每個 well 約含 3×10^5 個細胞數，以 Con A ($100 \mu\text{g/ml}$; 終濃度) 刺激，分別加入不同濃度之 hydrocortisone : ◆, 0 nM ; ■, 0.5 nM ; ▲, 5 nM ; ×, 10 nM .(終濃度)，不同 glutamine 濃度 (0、0.5、1mM)，培養 48 小時後，加入 $[^3\text{H}]$ thymidine 在再繼續培養 18 小時，測 ^3H 併入 DNA 之量以 cpm 表示。每個點表示重複做 4 個 wells，取其平均值 \pm 標準差。

圖上方之符號不同 (a, b) 表示添加與不添加 hydrocortisone 相比較具有顯著差異 ($p < 0.05$)。

表二、自體免疫病人治療藥物對正常淋巴細胞於 0 mM 及 0.3 mM 或 0.5 mM glutamine 存在時複製反應之影響。
 表中數據代表 glutamine 由 0mM 增加至 0.3mM 或 0.5mM 時； $[^3\text{H}]$ thymidine 併入細胞內 DNA 之增加倍率。

Table 2 The effect of drugs for autoimmune disease on normal lymphocyte response to glutamine .

The response are expressed as the ratio of thymidine incorporation into the cell at 0 mM to that at 0.3 or 0.5 mM.

	Methotrexate (mM)				Chloroquine (nM)				Hydrocortison (nM)			
	0	0.01	0.1	1	0	6.3	63	630	0	0.5	5	10
Ratio	1.16	1.31	1.24	1.29	2.16	2.04	2.25	1.85	1.92	1.87	1.39	1.74

Ratio : 平均來自 1 至 2 個受試者；每一個受試者之淋巴細胞培養於 96well 培養盤，每個 well 約含 3×10^5 個細胞數，
 重複做 4 個 wells 取其平均值 ± 標準差。

表三、加強 glutamine 之營養配方在不同溶劑及溫度儲存下之安定性。

Table3. Stability of commercial formula which contained glutamine in different solvent and stored in different temperature.

Solvent	Fresh	Room temp.		4 °C		
		6hrs	24hrs	24hrs	48hrs	96hrs
Saline	7729.1 ± 96.6	7498.8 ± 168.7	6404.8 ± 45.40	6809.3 ± 105.9	8176.9 ± 44.4	7648.4 ± 113.8
Water	7619.7 ± 62.0	7520.6 ± 117.6	6023.3 ± 139.2	6678.6 ± 40.60	8049.9 ± 54.0	7487.0 ± 95.60

表中數據單位為μM

因某品牌之含 glutamine 的特殊元素狀營養品，建議食用方式為，將 76 g 之該營養品溶於 250 ml 水中。而本實驗分析是稱取樣品 0.86 g 溶於 8 ml 之生理食鹽水或二次蒸餾水中依上述建議濃度稀釋四倍，因此營養品所含建議 glutamine 濃度乃須將上述數值乘以 4 倍。

陸、討論：

本研究發現來自 LPS 誘發敗血症之大白鼠之淋巴細胞複製率，在不同培養時間、細胞數、glutamine 濃度(圖五、六、七、八、九、十)之趨勢，均與 Szondy(1995)對來自正常大白鼠頸部淋巴結之觀察結果類似：在正常大白鼠淋巴細胞， $[^3\text{H}]$ thymidine 併入胞內 DNA，會隨著培養時間增長而增加，達到最大量然後再下降，且 glutamine 促進 $[^3\text{H}]$ thymidine 併入 DNA 之程度，會受到培養時間、細胞、或刺激劑(mitogen)濃度之影響；以 $10\mu\text{g/ml}$ Con A 刺激時，培養基中 glutamine 濃度為 0.3mM 時，在 36 小時其複製率達最大，當濃度增加至 2mM 則於 48 小時達最大複製率。而培養時間與 glutamine 濃度對 $[^3\text{H}]$ thymidine 併入胞內 DNA 之影響，Szondy(1995)認為由於培養基中細胞分化的數目受到 IL-2 產生的控制，其開始會進入複製階段，然後細胞中止複製，最後細胞死亡，而當複製反應達最大時表示進入細胞循環中的最終細胞數，當其下降時表示細胞已進入休止狀態。而淋巴細胞進入細胞循環也決定於 glutamine 的濃度，其影響可能是由於它是嘌呤、嘧啶生合成之前趨物，而此為 DNA 合成所必須。

有研究指出 glutamine 提供氮源促進 DNA、RNA 合成，其達最大反應速率一半所須濃度約為 $20\mu\text{M}$ ，而要使 DNA 合成速率達最大，所須的 glutamine 濃度約須大於 $200\mu\text{M}$ (比 K_m 值大 10 倍)(Szondy & Newsholme 1989)，而 Szondy(1995)實驗也發現 $[^3\text{H}]$ thymidine 併入胞內 DNA 所須最適 glutamine

濃度(300 μ M)與其相似。Szondy 觀察正常細胞與本實驗觀察敗血細胞不同處在於，Szondy 在 0.3 mM glutamine 所觀察最大細胞複製率和 2 mM 時觀察到之最大複製無顯著差異。然而本實驗的敗血細胞在 2 mM glutamine 存在下其最大反應 2-3 倍於 0.5mM glutamine 存在下之最大複製率(圖五、六、七)。在正常人血中 glutamine 濃度約 0.5 mM，而敗血病人其血中量會降低。根據 Szondy 與本實驗結果可推論對正常宿主而言，提高血液中 glutamine 濃度達 2 mM 應不影響，然而對敗血病宿主提供由 0.5 至 2 mM 之 glutamine 時可促進其淋巴細胞複製，增加免疫能力。

本研究發現 LPS 誘發大白鼠敗血時，細胞複製達巔峰之時間比 Szondy 在正常大白鼠頸部淋巴細胞之發現有延遲現象(圖十一、圖十二)。這顯示可能 LPS 造成細胞特性或血漿之變化，因而導致細胞對外來免疫刺激(immune challenge)之反應會有所延遲，因為 Con A 可代表(模擬)外來抗原對 T-cell 之活化刺激作用。根據 Akagawa 等人(1995)動物實驗發現，注射白色念珠菌(*candida albicans*)或革蘭氏陰性菌後，再以 *Esherichia coli* (*E.coli* 病原菌)感染大白鼠，可導致動物死亡，若根據本研究之結果可推論，*E. Coli* 導致敗血大白鼠死亡之作用可能與敗血大鼠之淋巴細胞在感染時反應延遲有關。若欲證明此假設可用同樣劑量之 *E. coli* 觀察其是否對正常鼠有致死作用。

本研究發現不同培養條件(時間、glutamine 濃度、細胞

數)對細胞複製達 peak 之反應有所不同。例如，當培養基中含有 2.4×10^5 個細胞數時複製率以含有 2mM glutamine 於培養 60 小時達最大，依序為 0.5、0.1、0 mM，然而當培養至 72 小時，含有 2mM glutamine 者其複製率急速下降，而含 0.5 mM 者亦有下降趨勢，然而含 0.1mM glutamine 及不含者，培養至 72 小時其複製率仍有上升趨勢(圖五)。但是，當每個 well 約含 3.6×10^5 細胞數時，含有 0.5mM glutamine 者其複製率與含 0.1mM 及不含者有相同增加趨勢(圖六)。且當含 4.8×10^5 個細胞數時其更為增加(圖七)。另外當培養 60 小時，則 4.8×10^5 與 3.6×10^5 個細胞數對複製率無顯著差異(圖九)，而培養 48 或 72 小時則顯著大於 3.6×10^5 及 2.4×10^5 個細胞數(圖八、圖十)。由本實驗結果可知，選擇適當的研究條件對於觀察 glutamine 的作用有很大的影響，這可由本研究之另一結果，以 glutamine 餵食之大白鼠其淋巴細胞在培養 36 小時及 60 小時之差異進一步證實(圖十一、圖十二)。

實驗發現以 LPS 誘發 rat 敗血，雖然餵食 glutamine 沒有增加血中 glutamine 濃度，但其細胞複製比不餵食者，有增加現象，且此結果無受飲食因素之影響(表一)。而此原因可能和血漿取樣時間有關。

In vito 發現以 mitogen 刺激鼠類及人類淋巴細胞時，低濃度的 glutamine 會降低其複製率。例如：

Ardawi & Newsholme (1983) 以 Con A 刺激大鼠腸繫膜(mesenteric)淋巴細胞，當培養基中無 glutamine 時細胞複製非常低，添加 $1 \mu\text{M}$ 其複製率約增加 4 倍，而在 0.3mM 時達

最大。此外，Szondy (1989)以 PHA 刺激大鼠淋巴細胞，當培養基中加入 0.01 mM glutamine 其複製率最低，當隨著濃度由 0.01mM 增加到 1 mM 則複製率也顯著增加，當添加 0.3mM 則在培養 48 小時達到最大，給予 1mM 則在 60 小時有最大複製率。在人類研究方面，Parry-billings (1990)等人以 Con A 刺激其周邊淋巴細胞，當培養基中含有 0.5mM glutamine 時，其複製達到最大，然而當 glutamine 濃度低於 0.5mM 時則會降低複製率。另外，Rohde 等人(1995)培養正常健康人血液單核細胞(mononuclear)，以 PHA 刺激時發現以含有 0.3mM 的 glutamine 對淋巴細胞的複製達到最大反應。而本實驗亦發現，當細胞培養於 autologous plasma 系統以 Con A 刺激淋巴細胞，則其最大的複製反應是在 0.3-0.35mM，此結果與前者結果一致。

由實驗結果發現，自體免疫病人其血漿中 glutamine 與正常人比較有下降趨勢(圖十三)，然而當培養基中所含之 glutamine 由 0 增加至 0.3 mM 時，雖然 SLE 病人(n=23)中有 3 人血中 glutamine 濃度低於 300 μ M、RA 病人(n=25)中有 1 人，然而當加入 10%血漿於培養基時其濃度與正常人只有些微減少，但其 [3 H]thymidine 併入淋巴細胞增加的倍率高於正常人(圖十七)，顯示其對 glutamine 的刺激有較大的反應，但不知此增加的為 CD4⁺或 CD8⁺，乃需利用 flow cytometry 方法進一步分析探討。

因為本實驗所觀察之自體免疫病人有服用各種藥物，為瞭解自體免疫病人淋巴細胞對 glutamine 刺激的敏感性增加

是細胞本身變異或因病人服用藥物所影響，因此觀察本研究採血之自體免疫病人所使用之治療藥物對複製率之影響。結果發現藥物對其影響不大(表二)。

另外實驗中發現免疫抑制藥物 methotrexate(MTX)、chloroquine 有促進細胞複製率之現象。

MTX 其化學結構近似葉酸，為一種葉酸拮抗劑，會抑制二氫葉酸還原酶，且對胸苷酸合成酶也有微弱的抑制作用，使 DNA 無法合成，而有調控免疫反應，因此被用來當作免疫抑制劑使用，其作用最初用於治療腫瘤，另外，亦用於改善自體免疫問題(Goodman Gilman et al.,1992)。

Rosenthal 等人(1987)將約 20g 小鼠由腹膜注射 MTX (1~9 mg/Kg)，以 LPS 及 PHA 刺激其脾臟淋巴細胞(2×10^6)，發現其會顯著的抑制細胞複製，且 in vitro 中以 pokweed 刺激人類淋巴細胞時 MTX 也會顯著降低免疫球蛋白的產生(O'Meara et al.,1985)。然而本實驗發現 MTX 有促進淋巴細胞複製現象(圖十八、圖十九)，而此不同結果可能因使用刺激劑不同、藥物劑量不同、細胞數不同或其他因素導致。

Hydroxychloroquine(Plaquenil); 其作用與 Chloroquine 極為類似。Chloroquine 是一種抗瘧疾藥物，對紅血球內寄生的瘧原蟲很有效，是一種抑制症狀的藥物，有學者指出 Chloroquine 會使嗜中性白血球的移動及嗜伊紅性白血球的化學吸引素(chemotaxis)受到抑制，且 Macrophage 及 T lymphocytes 對 mitogen 的反應減弱，以及一些依賴補體的抗

原抗體反應也受損(Goodman Gilman et al.,1992)，另一可能是因拮抗 prostaglandin E2 產生(Goodwin et al.,1978)。因而有抗發炎作用 (anti-inflammatory) 及免疫抑制效應 (immunosuppressive)。

Landewe 等人(1995)，以 α CO3 MoAb 刺激 RA 病人滑液 (synovial) 組織的 T 細胞發現，培養基中含有 Chloroquine 10-100(μ M) 會抑制 T 細胞的複製。而本研究結果發現 chloroquine 會促進周邊淋巴細胞的複製現象(圖二十、二十一)，並且有文獻指出以 PHA 刺激正常人淋巴細胞，發現當培養基中添加 0.02 μ M Chloroquine 時顯著刺激細胞複製，然而當給更高量濃度時，則此藥會抑制淋巴細胞複製(Ruzicka et al.,1980)。且 Schof 等人(1993)指出，以 PHA 刺激正常人淋巴細胞，給予 0.022-0.2 μ M Chloroquine 對複製率沒有影響，當高濃度時(22 μ M)則有抑制現象，因此推測對複製率之影響可能與劑量有關。另外對於患有牛皮癬病人淋巴細胞培養液含有 2.2-0.022 μ M 時，則促進淋巴複製率可達三倍，而同樣高濃度之 Chloroquine 則亦會抑制淋巴細胞複製。Goodwin(1978)認為此可能原因是牛皮癬病人周邊血液 Ts 細胞之敏感性不同所致。然而此須更進一步分析其 CD4⁺與 CD8⁺之量來作確定，另可能是因 Chloroquine 拮抗 prostaglandin E2 產生，而此仍淋巴細胞 transformation 抑制者(Goodwin 1978)。

Hydrocortisone 為 glucocorticoid 有很多研究指出 glucocorticoid 有抑制免疫及抗發炎作用，而此可能和其減少很多 interleukin 基因表現有關。例如，其會抑制人類 T cell 生長因子 r-interferon messenger RNA (Arya et al., 1984) 及淋巴細胞 IL-4(Wu et al., 1991)的產生，且本實驗中同樣也發現 hydrocortisone 有降低淋巴細胞複製率之現象(圖二十二)。

加強 glutamine 之營養配方在不同溶劑及溫度儲存下其安定性試驗結果發現，隨著儲存時間增加其濃度有下降現象，此與 Lowe 等人(1990)觀察結果相同，故建議一般使用配成飲料時最好新鮮製備。在本研究中，當配製成溶液之營養劑儲存 48 小時後，所測得之 glutamine 濃度反而增加(表三)，其原因可能是因此產品為含有蛋白水解物如水解玉米澱粉、水解黃豆蛋白、乳清蛋白濃縮物、乳清蛋白水解物等，於儲存期中分解而釋出 glutamine 所致。或因細菌污染，分解產生大量 ammonia，而實驗(a)步驟中加入 glutamate dehydrogenase 以移除 NH_3 之干擾的量不足，以致仍有過多 NH_3 存於分析系統中所致。

柒、結論：

敗血會導致血中穀氨醯胺濃度下降，穀氨醯胺餵食雖未增加血中此胺基酸濃度，但可顯著增加淋巴細胞複製率，如此可促進宿主抵抗感染的能力，所以可建議敗血病人於正常飲食下，可額外補充穀氨醯胺。而在自體免疫病人其血中穀氨醯胺亦有下降現象，且對來自自體免疫宿主之淋巴細胞調控不同於對正常宿主之淋巴細胞。但因尚不知前者受穀氨醯胺調控之主要細胞型式(cell type)為 $CD4^+$ 或 $CD8^+$ ，故無法確知穀氨醯胺對自體免疫病人之影響為正面或負面，此有待進一步證實。另外，建議當使用強化穀氨醯胺之營養配方時，亦需注意其新鮮度，以期達到較好之功效。

捌、参考文献：

Abu-Shakra, M., Urowitz, M. B., Gladman, D. D., Gough, J. (1995) Mortality studies in systemic lupus erythematosus. Results from a single center. I. Causes of death. *J. Rheumatol.* 22, No. 7, 1259-1264.

Akagawa, G., Abe, S., Yamaguchi, H. (1995) Mortality of *Candida albicans*-infected mice is facilitated by superinfection of *Escherichia coli* or administration of its lipopolysaccharide. *J. Infect. Dis.* 171, NO. 6, 1539-1544.

Al-Janadi, M., Raziuddin, S. (1993) B cell hyperactivity is a function of T cell derived cytokines in systemic lupus erythematosus. *J. Rheumatol.* 20, No. 11, 1885-1891.

Ardawi, M. S. M. and Newsholme, E. A. (1983) Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. *Biochem. J.* 212, 835-842.

Ardawi, M. S. M. (1988) Glutamine and glucose metabolism in human peripheral lymphocytes. *Metabolism* 37, 99.

Ardawi, M. S., Majzoub, M. F., Kateiah, S. M., Newsholme, E. A. (1991) Maximal activity of phosphate-dependent glutaminase and glutamine metabolism in septic rats. *J. Lab. Clin. Med.* 118, 26-32.

Arya, S.K., F.Wong-staal, and R.C. gallo, (1984) Dexamethasone-mediated inhibition of human T cell growth factor and r-interferon messenger RNA. *J. Immunol.* 133, 273.

Askanazi, J., Carpentier, Y. A., Michelsen, C. B., Elwyn, D. H., Furst, P., Kantrowitz, L. R., Gump, F. E., and Kinney J.M. (1980) Muscle and plasma amino acids following injury influence of intercurrent infection. *Ann. Surg.* 192, 78-85.

Austgen, T. R., Chakraborti, R., Chen, M. K., and Souba, W. W. (1992) Adaptive regulation in skeletal muscle glutamine metabolism in endotoxin-treated rats. *The Journal of Trauma.* 32, No. 5, 600-607.

Bacci, G., Ferrari, S., Picci, P., Zolezzi, C., Gherlinzoni, F., Inantorno, D., Cazzola, A. (1996) Methotrexate serum concentration and histological response to multiagent primary chemotherapy for osteosarcoma of the limbs. *J. Chemother* 8, No. 6, 472-478.

Baue, A. E., Gunther, B., Hartl, W., Ackenhal, M., Heberer, G. (1984) Altered hormonal activity in severely ill patients after injury or sepsis. *Arch. Surg.* 119, 264.

Bergstrom, J., Furst, P., Noree, L.-O., and Vinnars, E. (1974) Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. *Journal Of Applied Physiology* 36, No. 6, 693-697.

Bone, R. C., Balk, R. A. and Cerra F. B. (1992) *Chest* 106, No. 6, 1644-1655.

Burke, D. J., Alverdy, J. C., Aoys, E., and Moss, G. (1989) Glutamine-Supplemented total parenteral nutrition improves gut immune function. *Arch. Surg.* 124, 1396-1399.

Calder, P. C., Newsholme, E. A. (1992) Glutamine promotes interleukin-2 production by concanavalin A-stimulated lymphocytes. *Proc. Nut. Soc.* 51, 105A.

Caldwell, M. D. (1989) Local glutamine metabolism in wounds and inflammation. *Metabolism* 38, 34-39.

Cass, R. M., Mongan, E. S., Jacox, R. F., et al. (1968) Immunoglobulins G, A and M in systemic lupus erythematosus. *Ann. Intern. Med.* 69, 749-756.

Cerra, F. B. (1987) Hypermetabolism, organ failure and metabolic support. *Surgery* 101, 1.

Cersosimo, E., Williams, P., Hoxworth, B., Lacy, W., and Abumarad, N. (1986) Glutamine blocks lipolysis and ketogenesis of fasting. *Am. J. Physiol.* 250, E248-E252.

Chen, K., Okuma, T., Olamura, K., Torigoe, Y., and amiyauchi, Y. (1994) Glutamine-supplemented parenteral nutrition gGut Mucosa Integrity and function in endotoxemic rats. *J. P. E. N.* 18, 167-171.

Dechelotte, P., Darmaun, D., Rorgier, M., Hecketsweiler, B., Rigal, O., and Desjeux, j. F. (1991) Absorption and metabolic effects of enterally administered glutamine in humans. *Am. J. Physiol.* 260, G677-G682.

Devriere, J., Brohee, D., Kennes, B., De Maertelaer, V., Neve, P. (1987) Effect of age , sex and health status on human lymphocyte functions: demonstration of a sex-related defect in suppressor cell function. *Arch. Gerontol. Gerratr.* 6, No. 2, 163-175.

Ginsberg, W.W., Funkelman, F. D., and Fipsky, P. E. (1979) Circulating and pokeweed mitogen-induced immunoglobulin-secreting cells in systemic lupus erythematosus. *Clin. exp. Immunol.* 35, 76-88.

Golden, M. H. N., Jahoor, P., and Jackson, A. A. (1982) Glutamine production rate and its contribution to urinary ammonia in normal man. *Clinical Science* 62, 299-305.

Goodman Gilman, A., Rall, T. W., Nres, A. S., Taylor, P. (1992) The pharmacological basis of therapeutics. Eight edition volume 2, 1271, 1582.

Goodwin, J. S., Messner, R. P., Peale, G. T. (1978) Prostaglandin suppression of mitogen stimulated lymphocytes in vito :change with mitogen dose and preincubation. *J. Chin Inves* 62, 735-760.

Gordon, B. L 2d., Yanagihara, R. (1977) Treatment of systemic lupus erythematosus with T-cell immunopotentiator levamisole:a follow-up report of 16 patients under treatment for a minimun period of four months. *Ann. Allergy.* 39, No. 4, 227-236.

Gough, D. B., Moss, N. M., Jordan, A., Grbic, J. T., Rodrick, M. L., and Mannick, J. A. (1988) Recombinant interleukin-2 (rIL-2) improves immune response and host resistance to septic challenge in thermally injured mice. *Surgery* 104, 292-300.

Hammarqvist, F., Wernerman, J., Ali, R., Decken, A. V. D., and Vinnars, E. (1989) Addition of glutamine to total parenteral nutrition after elective abdominal surgery spares free glutamine in muscle, counteracts the fall in muscle protein synthesis, and improves nitrogen balance. *Ann. Surg.* 209, No. 4, 455-461.

Hall-Angeras M., Angeras U., Von All-men D., et al. (1991) Influence of sepsis in rats on muscle protein turnover in vivo and in tissue incubated under different in vitro conditions. *Metabolism* 40, 247-251.

Hasselgren, P., Talamini, M., James, J. H., and Fischer, J. E. (1986) Protein metabolism in different types of skeletal muscle during early and late sepsis in rats. *Arch. Surg.* 121, 918-923.

Houng, R. W., Rounds, J. D., Helton, W. S., Robinson, M. K., Wilmore, D. W. (1992) Glutamine preserves liver glutathione after lethal hepatic injury. *Ann. Surg.* 215, No. 2, 114-119.

Huang, Y. P., Perrin, L. H., Miescher, P. A., Zubler, R. H. (1988) Correlation of T and B cell activities in vitro and serum IL-2 levels in systemic lupus erythematosus. *The Journal Of Immunology* 141, No. 3, 827-833.

Hwang, T., O'Dwyer, S., Smith, R.,etal. (1987) Preservation of small bowel mucosa using glutamine enriched parenteral nutrition. *Surg. Forum* 38, 56-58.

Iliopoulos, A, G., Tsokos, G. C. (1996) Immunopathogenesis and spectrum of infections in systemic lupus erythematosus. *Semin. Arthritis. Rheum.* 25, No. 5, 318-336.

Inoue, Y., G, J. P., and Snysen, P. J. (1993) Effect of glutamine-supplemented total parenteral nutrition on recovery of the small intestine after starvation atrophy. *J. P. E. N.* 17, 165-170.

Jasin, H. E. and Ziff, M. (1975) Immunoglobulin synthesis by peripheral blood cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* 18, No. 3, 219-228.

Jepson, M. M., Bates, P. C., Broabent, P., Pell, J. M., and Millward, D. J. (1988) Relationship between glutamine concentration and protein synthesis in rat skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 255, E166-E172.

Kahl, L. E. (1994) Herpes zoster infections in systemic lupus erythematosus: risk factors and outcome. *J. Rheumatol.* 21, No. 1, 84-86.

Kimura, R. E., Lapina, T. R., Johnston, J., and Ilich, J. Z. (1988) The effect of fasting on rat portal venous and aortic blood glucose, lactate, alanine, and glutamine. *Pediatric Research* 23, No. 2, 241-244.

Klimberg, V. S., Souba, W.W., Dolson, D.J., Salloum, R. M., Hautamaki, R. D., Plumley, D. A., Mendenhall, W. M., Bova, F. J., Bland, K. I., and Copeland, E. M. (1990) Prophylactic glutamine protects the intestinal mucosa from radiation injury. *Cancer* 66, 62-68.

Knight, S. C. (1987) In *Lymphocytes, A Practical Approach*, Ed. Klaus, G. G. B. IRL Press, Oxford, PP. 189-208.

Krebs, R.E., Lapin, T. R., Johnston, J., Ilich, J. Z. (1980) Glutamine metabolism in the animal body. In *Glutamine: Metabolism, Enzymology, and Regulation*, Mora, J. Palacios Rcds. Academic Press, New York, 319-329.

Lacey, J. M., and Wilmore, D. W. (1990) Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutrition reviews* 48, No. 8, 297-309.

Landewe, R. B. M., Miltenburg, A. M. M., Verdonk, M. J. A., Verweij, C. L., Breedveld, F. C., Daha, M. R., and Dijkmans, B. A. C. (1995) Chloroquine inhibits T cell proliferation by interfering with IL-2 production and responsiveness. *Clin. Exp. Immunol.* 102, 144-151.

Lang, C. H. (1995) Role of cytokines in glucose metabolism. In: *Human Cytokines: Their Role in Disease and Therapy*, B. B. Aggarwal, R. K.

Puri, editors, Cambridge, Blackwell, p. 271.

Leighton, B., Curi, R., Hussein, A., and Newsholme, E. A. (1987) Maximum activities of some key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, Krebs cycle and fatty acid utilization in bovine pulmonary endothelial cells. *FEBS Letters* 225, No. 1,2, 93-96.

Li, S., Nussbaum, M. S., Mcfadden, D. W., Zhang, F. S., Lafrance, R. J., Dayal, R. (1990) Addition of L-glutamine to total parenteral nutrition and its effects on portal insulin and glucagon and the development of hepatic steatosis in rats. *Ann. Surg.* 48, 421-426.

Lowe D.K., Benfell K., Smith R.J., et al. (1990) The safety of glutamine-enriched parenteral nutrient solutions in humans. *Am. J. Nutr.*

Maclennan, P. A., Brown, R. A., and Rennie, M. J. (1987) A positive relationship between protein synthetic rate and intracellular glutamine concentration in perfused rat skeletal muscle. *FEBS Letters* 215, No. 1, 187-191.

Malaisse, W. J., Sener, A., and Carpinrlli, A. R. (1980) The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release XLVI. Physiological role of L-glutamine as a fuel for pancreatic islete *Mol. cell. Endocrinol.* 20, 171-189.

Marliss, E. B., Aoki, T. T., Pozetsky, T., et al. (1971) Muscle and splanchnic glutamine and glutamate metabolism in postabsorptive and starved man. *J. Clin. Invest.* 50, 814-817.

O'Riordain, M. G., Fearon, K. C. H., Ross, J. A., Rogers, P., Falconer, J. S., Badtolo, D. C. C., Garden, O. J. and Carter, D. C. (1994) Glutamine-supplemented total parenteral nutrition enhances T-lymphocyte response in surgical patients undergoing colorectal resection. *Annals Of Surgery* 220, No.2, 212-221.

Michie, H. R. (1996) Metabolism of sepsis and multiple organ failure. *World J.k Surg* 20, 460-464.

Michie, H.R., Sherman, M. L., Spriggs, D. R., et al. (1989) Chronic TNF infusion causes anorexia but not accelerated nitrogen loss. *Annk. Surg.* 209, 19.

Morin, A., Griscelli, C., Daguillard, F. (1979) Effect de l'isoprinosine sur l'activation des lymphocyte humains in vitro. *Ann. Immunol. (Inst Pasteur)* 130c, 541.

Nakaki, T., Hishikawa, K., Suzuki, H., Saruta, T., and Kato, R. (1990) L-arginine-insucsd hypotension. 15, 696.

Nakamura, T., Miyasaka, N., Pope, R. M., Talal, N., Russell I. J. (1983) Immunomodulation by isoprinosine: effects on in vitro immune functions of lymyphocytes from humans with antoimmune diseases. *Clin. Exp. Immunol* 52, No. 1, 67-74.

Newkirk, M. M., Duffy, K. N., Paleckova, A., Ivaskova, E., Galianova, A., Seeman, J., Vojtechovsky, K., Dostal, C. (1995) Herpes viruses in multicase families with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 22, No. 11, 2055-2061.

Newsholme, E. A. and Parry-Billings, M. (1990) Properties of glutamine release for muscle and its importance for the immune system. *J. P. E. N.* 14, No. 4, 63S-67S.

Newsholme, E. A., Crabtree, B., and Ardawi, M. S. M. (1985) Glutamine metabolism in lymphocytes: its biochemich, physiological and clinical importance. *Q. Jour. Exp. Physiol.* 70, 473.

Newsholme, P., Gordon, S., and Newsholme, E. A. (1987) Rates of utilization and fates of glucose, glutamine, pyruvate, fatty acids and ketone bodies by mouse macrophages. *Biochem. J.* 242, 631-636.

Nishijima, M. K., Takezawa, J., Hosotsubo, K. K., Takahashi, H., Shimada, Y., and Yoshiya, I. (1986) Serial changes in cellular immunity of patients with multiple organ-system failure. *Critical Care Medicine* 14, No. 2, 87-91.

O'Dwyer, S. T., Smith, R. J., Hwang, T. L., and Wilmore, D. W. (1989) Maintenance of small bowel mucosa with glutamine-enriched parenteral nutrition. *American Society For Parenteral And Enteral Nutrition* 13, No. 6, 579-585.

O'Meara, A. M. W., Brazil, J., and Reen, D. J. (1985) The effect of methotrexate on in vitro immunoglobulin production. *J. Immunopharmac.* 7, 235-245.

Palmer, R. M., Ferrige, A. G., and Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524-526.

Parry-Billings, M., Leighton, B., Dimitriadis, G. D., Curi, R., Bone, J., Bevan, S., Colquhoun, A., and Newsholme, E. A. (1991) The effect of tumour bearing on skeletal muscle glutaminem

Parry-Billings, M., Evans, J., Calder, P. C., and Newsholme, E. A. (1990) Does glutamine contribute to immunosuppression after major burns? *Lancet* 336, 523-525.

Patel, V., Panayi, G. S., Shepherd, P., Richter, M., Harkness, J., Gibson, T. (1982) Lymphocyte studies in rheumatoid arthritis. V. Suppressor cell function in peripheral blood. *Scans. J. Rheumatol.* 11, No. 3, 133-137.

Patten, J. A. (1995) Nutrition and wound healing. *Compend Contin Ecluc Dent*, 16, No. 2, 200, 202-104, 206-208 passim; quiz 214.

Rall, L. C., Rosen, C. J., Dolnikowski, G., Hartman, W. J., Lundgren, N., Abad, L. W., Dinarello, C. A., Roubenoff, R. (1996) Protein metabolism in rheumatoid arthritis and aging. Effects of muscle strength training and tumor necrosis factor alpha. *Arthritis. Rheum.* 39, No. 7, 1115-1124.

Renoux, G., Renoux, M., Guillaumin, J. M. (1979) Isoprinosine as an immunopotentiator. *J. Immunopharmacol.* 1, 337.

Rennie, M. J., Tadros, L., Khogali, S., Ahmed, A., and Taylor, P. M. (1994) Glutamine transport and its metabolic effects. *J. Nutr.* 124, 503S-

508S.

R, hol. H., Skrede, K. K., Aer, C. E., Wiik, P. (1995) Dexamethasone and methylprednisolone affect rat peritoneal phagocyte chemiluminescence after administration in vivo. *Eur. J. pharmacol* 286, No. 1, 9-17.

Rohde, T., Maclean D. A., Hartkopp, A., Pedersen, B. K. (1996) The immune system and serum glutamine during a triathlon. *Eur. J. Appl. Physiol.* 74, No. 5, 428-434.

Rohde, T., Ullum, H., Rasmussen, J. P., Lristensen, J. H., Newsholme, E., Pedersen, B. K. (1995) Effects of glutamine on the immune system: influence of muscular exercise and HIV infection. *J. Appl. Physiol.* 79, No. 1, 146-150.

Rosenthal, G. J., Germolec, D. R., Lamm, K. R., Ackermann, M. F., and Luster, M. I. (1987) Comparative effects on the immune system of methotrexate and trimetrexate. *Int. J. Immunopharmacol.* 9, No. 7, 793-801.

Roth, E., Funovics, J., Muhlbacher, F., Schemper, M., Mauritz, W., Sporn, P., and Fritsch A. (1982) Metabolic disorders in severe abdominal sepsis : Glutamine Deficiency in Skeletal muscle. *Clinical Nutrition* 1, 25-41.

Ruzicka, T., Loosen, H., Strassburger, Goertz, G.(1980) Effect of chloroquine on the PAH-induced lymphocyte transformation. *Arch Dermatol Res* 267, 87-89.

Sakane, T., Takada, S., Murakawa, Y., Kotani, H., Honda, M. & Ueda, Y.(1982) T cell function in patient with rheumatoid arthritis: defects in production of and responsiveness to concanavalin - A- induced suppressor T cells. *J. Immunol.* 129, 1972-1977.

Salloum, R.M., Copeland, E.M., and Souba, W. W.(1991) Brush border transport of glutamine and other substrates during sepsis and endotoxemia. *Ann. Surg.* 213, No. 5, 401-410.

Santoro, T. j., Malek, T. R., Rosenberg, Y. J., Morse, H. C.; and

Steinberg, A. D. (1984) Signals required for activation and autoimmune T lymphocytes. *J. Mol. Cell. Immunol.* 1, 347-356.

Schopf, R. E., Ockenfels, H. M., Schultewolter, T., Morsches, B. (1993) Chloroquine stimulates the mitogen-driven lymphocyte proliferation in patients with psoriasis. *Dermatology* 187, 100-103.

Schroder, M.T., Schafer, G., and Schauder, P. (1990) Characterization of glutamine transport into resting and concanavalin A-stimulated peripheral human lymphocytes. *Journal Of Cellular Physiology* 145, 155-161.

Smith, R. J. (1984) Regulation of protein degradation in differentiated skeletal muscle cell in monolayer culture. In *intracellular protein catabolism, progress in clinical and biological research*. Alan. R. Liss, New York. 180, 633-635.

Smith, R. J. and Wilmore, D. W. (1990) Glutamine nutrition and requirements. *J. P. E. N.* 14, 94S-99S.

Stehle, P., Zander, J., Mertes, N., Albers, S., Puchstein, C. H., Lawin, P. (1989) Effect of parenteral glutamine peptide supplements on muscle glutamine loss and nitrogen balance after major surgery. *Lancet* 4, 231-233.

Szondy, Z. and Newsholme, E. A. (1989) The effect of glutamine concentration on the activity of carbamoyl-phosphate synthase II and on the incorporation of [³H]thymidine into DNA in rat mesenteric lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin. *Biochem. J.* 261, 979-983.

Souba, W. W., Herskowitz, K., Klimberg, V.S., Salloum, R., Plumiley, D. A., Flynn, T. C., and Copeland, E. M. (1990) The effects of sepsis and endotoxemia on gut glutamine metabolism. *Ann. Surg.* 211, No.5, 543-551.

Souba, W. W., Klimberg, V. S., Hautamaki, R. D., Mendenhall, W. H., Bova, F. C., Hoqard, R. J., Bland, K. I, and Copeland, E. M. (1990) Oral glutamine reduces bacterial translocation following abdominal radiation.

Journal Of Surgical Research Research 48, 1-5.

Stolzenburg, T., Binz, H., Fontana, A., Felder, M., Wagenhaeuser, F. J. (1988) Impaired mitogen-induced interferon-gamma production in rheumatoid arthritis and related diseases. *Scand. J. Immunol.* 27, No. 1, 73-81.

Szondy, Z. (1995) The effects of cell number, concentrations of mitogen and glutamine and time of culture on [³H]thymidine incorporation into cervical lymph node lymphocytes stimulated by Concanavalin- A. *Immunology Letters* 45, 167-171.

Talal, N., Dauphine, M., Christadoss, P., Fernandes, G., Russell, I. J., Miyasaka, N., Nakamura, T. (1983) Interleukin-2 and autoimmune disease. *Adv. Nephrol. Necker. Hosp.* 12, 239-250.

Tett, S. E., Cutler, D. J., Day, R. O., Brown, K. F. (1989) Bioavailability of hydroxychloroquine tablets in healthy volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 27, No. 6, 771-779.

Van der Veen, M. J., van der Heide, A., Kruize, A. A., Bijlsma, J. W. (1994) Infection rate and use of antibiotics in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate [see comments]. *Ann. Rheum. Dis.* 53, No. 4, 224-228.

Van den Akker, T.W., Stuy, M. C., Bianchi, A. T. J., and Benner, R. (1986) Decreased in vivo functional T cell capacity in the murine autoimmune strains MRL/Mp-lpr/lpy and Male BXSB/ Mp. *Immunobiol* 171, 45-56.

Vander Hulst, R. R. W. J., Vankreel, B. K., Vonmeyenfelst, M. F., Brummer, R. M., Arends, J., Deutz, N. E. P., and Soeters, P. (1993) Glutamine and the preservation of gut integrity. *Lancet* 334, 1363-1365.

Veys, E. M., Hermans, P., Verbruggen, G., Mielants, H. (1983) Immunoregulatory changes in autoimmune disease. *Diagn. Immunol.* 1, No. 3, 224-232.

Welbourne, T. C. (1995) Increased plasma bicarbonate and growth hormone after an oral glutamine load. *Am. J. Clin. Nutr.* 61, 1058-1061.

Williams, R. C. (1996) Autoimmune mechanisms involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Adv. Dent. Res.* 10, No. 1, 47-51.

Windmueller, H. G. and Spaeth A. E. (1976) *Arch, Biochem, Biophys.* 175, 670-676.

Windmueller, H. G. and Spaeth A. E. (1980) Respiratory fuels and nitrogen metabolism in vivo in small intestine of ged tats. *Journal Of Biological Chemistry* 255, No. 1, 107-112.

Wolfe, R. R. (1986) Substrate kinetics in sepsis. In the scientific basis for the care of the critically ill patient, R. A. Little, K. N. Frayn, editors. Manchester, Manchester University Press p.123.

Wood, J. J., Rodrick, M. L., Omahony, J. B., Palder, S. B., Saporoschetz, I., Deon, P., and Mannick, J. A. (1984) Inadequate interleukin 2 production. A fundamental immunological deficiency in patients with major burns. *Ann. Surg.* 200, No. 3, 311-320.

Wu, C. Y., C. Fargeas, T. Nakajima, and G. Deiespesse. (1991) Glucocorticoids suppress the production of interleukin 4 by human lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 21, 2645.

Zeilke, R. H., Ozand, P. T., Tildon, J. T., Sevdalian, D. A., and Cornblath, M. (1978) Reciprocal regulation of glucose and glutamine utilization by cultured human diploid fibroblasts. *Cell. Physiol.* 95, 41-48.

Ziegler, T. R., Young, L. S., Benfell, K., Scheltinga, M., Hortos, K., Bye, R., Morrow, F. D., Jacobs, D. O., Smith, R. J., Antin, J. H., Wilmore, D. W. (1992) Clinical and metabolic efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition after bone marrow transplantation. *Annals of Internal Medicine.* 116, 821-828.

王聖予, 李麗玲, 陳慧玲, 馮潤蘭, 楊志元, 謝國珍: 免疫學 (第4版). 藝軒圖書出版社. 第 17 章, p. 10. (1996)

林明泉, 臨床血清免疫學. 合記圖書出版社.p. 276.

戴自英: 實用內科學 (第 8 版). 金名圖書有限公司. 第 1 章, p. 214-219. (1992)

潘昭雄: 臨床免疫學. 新士林出版社. 第 8 章, p. 587-649. (1988)

潘昭雄: 臨床免疫學. 新士林出版社. 第 9 章, p. 650-716. (1988)

盧孟佑, 施金元等: 免疫學. 分記圖書出版社. 第 23 章, p.350-352.(1992)

鄭端業, 陳文旭: 藥理學 (第 2 版). 華杏出版股分有公司. 第 65 章, 第 3 節, p.203-205.(1991)