

R
008.8
4485-1

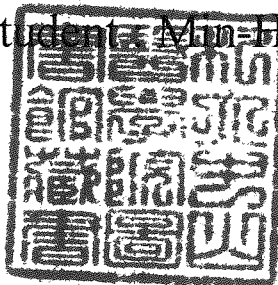
私立中山醫學院營養科學研究所碩士論文
Master Thesis, Graduate Institute of Nutritional Science,
Chung-Shan Medical and Dental College

碩士論文
Master Thesis

指導教授：劉承慈 博士
Advisor : Cheng - Tzu Liu, Ph. D.

高葡萄糖濃度下補充穀氨醯胺
對 T-淋巴細胞之影響
The effect of glutamine supplementation
on T- lymphocyte in high
glucose concentration

研究生：黃敏惠
Graduate Student Min-Hui Huang



中華民國八十八年七月
參考書 July, 1999 外借

中山醫學院圖書館



C055160

授權書

(博碩士論文)

本授權書所授權之論文為本人在 中山醫學院 營養科學研究所 87 學年度第 2 學期
取得碩士學位之論文。

論文名稱：高葡萄糖濃度下補充穀氨醯胺對 T-淋巴細胞之影響

不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予行政院國家科學委員會科學技術資料中心、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

本論文為本人向經濟部智慧財產局申請專利的附件之一，請將全文資料延後兩年後再公開。(請註明文號:)

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文全文資料，授予教育部指定送繳之圖書館及本人畢業學校圖書館，為學術研究之目的以各種方法重製，或為上述目的再授權他人以各種方法重製，不限地域與時間，惟每人以一份為限。

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。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。上述同意與不同意之欄位若未鈎選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：劉承慈

研究生簽名：黃敏惠
(親筆正楷)

學號：R86307
(務必填寫)

日期：民國 88 年 7 月 28 日

-
1. 本授權書於民國 85 年 4 月 10 日送請內政部著作權委員會（現為經濟部智慧財產局）修正定稿。
 2. 本案依據教育部國家圖書館 85.4.19 台(85)圖編字第 712 號函辦理。

簽署人須知

1. 依著作權法的規定，任何單位以網路、光碟與微縮等方式整合國內學術資料，均須先得到著作財產權人授權，請分別在兩種利用方式的同意欄內鉤選並填妥各項資料。
我國博碩士論文八十二學年度以前摘要資料庫及八十四學年度以後全文資料微片目錄資料庫已上載於行政院國家科學委員會科學技術資料中心網站 www.stic.gov.tw，八十一學年度以後摘要資料庫已上載於教育部國家圖書館網站 www.ncl.edu.tw。
2. 所謂非專屬授權是指被授權人所取得的權利並非獨占性的使用權，授權人尚可將相同的權利重複授權給他人使用；反之即為專屬授權，如果您已簽署專屬授權書予其他法人或自然人，請勿簽署本授權書，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可授權其他法人或自然人上述的行為。
3. 全國博碩士論文全文資料整合計畫的宏觀效益：

在個人方面，您的論文將可永久保存(微縮技術在理論上可保存八百年，實證已逾百年)，也因為您的授權，使得後進得以透過電腦網路與光碟多管道檢索，您的論文將因而被充分利用。在國家總體利益方面，紙本容易因影印而造成裝訂上的傷害，圖書館中孤本的公開陳列與外借也有破損之虞，唯有賴政府全面性的整合，借助科技設備才能一舉完成保存與利用的全方位效益，回憶您過去尋找資料之不便經驗，學弟與學妹確實須要您的論文與授權書。

研究生姓名：黃敏惠 聯絡電話：(06) 5836098

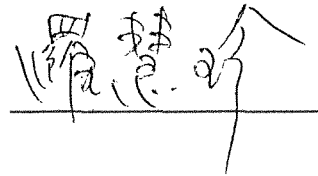
地址：臺南縣善化鎮小新里 129-3 號

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

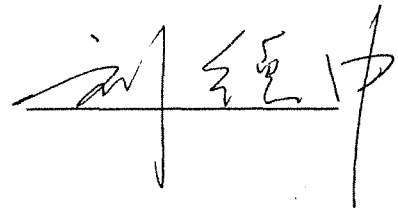
彰化基督教醫院醫學研究部副研究員

羅慧珍博士



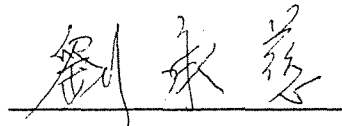
私立中山醫學院營養科學研究所副教授

劉德中 博士



私立中山醫學院營養科學研究所副教授

劉承慈 博士



(論文指導教授)

中華民國八十八年七月

學生黃敏惠論文題目高葡萄糖濃度下補充穀氨醯胺對 T-淋
巴細胞之影響，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：劉承慈 副教授 簽名：劉承慈

中華民國 88 年 7 月

謝 誌

感謝恩師 劉承慈 博士兩年來在研究及待人處事上之指導與教誨，使我獲益良多。文稿初成，承蒙 羅慧珍 博士與 劉德中 博士於百忙之中，撥冗審閱，指正疏漏之處，使本論文更臻完善，併此衷忱致謝。

兩年來的研究所生活，感謝學長國峰、學姊玲貞之指導與鼓勵、學弟妹們之協助，以及同學們之間彼此幫忙、學習與砥礪，在此一併致上誠摯的謝意。

最後，要特別感謝父母、妹妹及弟弟在這兩年來的體諒與支持，使我能順利完成學業，謹以此論文獻給我的家人、師長及好友，一起分享這份喜悅。

黃敏惠 謹誌於

中山醫學院營養科學研究所
中華民國八十八年七月

目錄

	頁次
摘要.....	III
中英文專有名詞及縮寫對照一覽表.....	V
壹、前言.....	1
貳、文獻探討.....	3
一.T-淋巴細胞及其對葡萄糖與穀氨醯胺代謝作用.....	3
1.T-淋巴細胞.....	3
2.T-淋巴細胞之活化作用.....	6
3.葡萄糖及穀氨醯胺對T-淋巴細胞之重要性.....	8
二.胰島素及其作用.....	15
1.胰島素.....	15
2.胰島素接受器.....	16
3.葡萄糖運輸系統及其調節.....	20
三.胰島素抵抗性及相關機制.....	23
1.胰島素去敏感作用.....	23
2.葡萄糖運輸裝置去敏感作用.....	25
3.六碳醣胺代謝途徑.....	26
四.實驗設計原理.....	29
五.研究目的.....	30
參、實驗材料.....	31
一.化學試藥.....	31
二.儀器設備.....	32
三.實驗動物.....	33
肆、實驗方法.....	34
一.初代淋巴細胞製備.....	34
二.淋巴細胞之活化.....	36
三.不同葡萄糖與穀氨醯胺濃度對Con A活化淋巴細胞之 影響.....	37
四.葡萄糖運輸系統線性初速率之時間觀察.....	39
五.不同葡萄糖與穀氨醯胺濃度對葡萄糖運輸系統之影響.....	42
六.不同胰島素濃度對淋巴細胞之葡萄糖運輸作用之影響.....	43
七.統計分析.....	44

伍、結果.....	46
一.以 Con A 當分裂原，刺激大白鼠淋巴細胞複製之最適 濃度探討.....	46
二.不同葡萄糖與穀氨醯胺濃度對 Con A 活化淋巴細胞之 影響.....	47
三.葡萄糖運輸系統線性初速率之時間觀察.....	49
四.不同葡萄糖與穀氨醯胺濃度對葡萄糖運輸系統之影響	49
五.不同胰島素濃度對葡萄糖運輸系統之反應.....	51
陸、討論.....	64
柒、結論.....	73
捌、參考文獻.....	74

摘要

在長期血糖控制不良的糖尿病及某些壓力狀態下，均會出現高血糖的情形，且不論在糖尿病或壓力狀態下的病患，普遍有高感染性併發症的問題，這可能與患者免疫功能低下有關，而 T-淋巴細胞在免疫功能中扮演重要角色。過去許多研究指出，正常及壓力狀態下，穀氨醯胺(glutamine)具有免疫促進作用，但在糖尿病狀況下之作用並不清楚。故本研究以 *in vitro* 研究方法，瞭解穀氨醯胺在高葡萄糖濃度下，對 T-淋巴細胞複製功能的影響。同時，因為在典型胰島素標的(target)組織/細胞，會於高血糖下出現胰島素抗性，且過去相關的研究報告指出，此與高血糖協同高濃度穀氨醯胺反應之代謝產物堆積有關，故本研究之另一目的是觀察淋巴細胞在正常及高濃度葡萄糖/穀氨醯胺存在下，胰島素所調控的葡萄糖攝取反應。實驗方法乃取大白鼠頸部淋巴結，經密度梯度以 1.077Kg/m^3 溶液離心得到淋巴細胞，以 $[^3\text{H}]$ -thymidine 併入 DNA 之速率做為複製指數，另外將淋巴細胞經 24 hr concanavalin A 刺激後，以 silicon oil-layer 之方法，來偵測胞外 $[^3\text{H}]$ 2-deoxyglucose 運送進胞內之速率。結果顯示：淋巴細胞於高葡萄糖狀態下時，給予約 2 mM 之穀氨醯胺，可增加淋巴細胞之複製率，但之後隨著穀氨醯胺濃度的增加，淋巴細胞複製率隨著降低。另外對於淋巴細胞葡萄

糖運輸系統之影響方面，給予高劑量之葡萄糖及穀氨醯胺時，發現並不會影響淋巴細胞其葡萄糖運輸系統。而在不同胰島素濃度下，淋巴細胞葡萄糖的運輸作用亦不受影響。由以上結果可知，在高血糖狀態下，給予適量濃度的穀氨醯胺，可增加淋巴細胞之複製率，進而提高免疫能力，但過高劑量穀氨醯胺的補充反而降低淋巴細胞之複製功能。因此在高血糖狀況下，補充穀氨醯胺應注意其劑量。而由於淋巴細胞之葡萄糖運輸速率並不受胰島素所調控，且 GLUT-4 為目前所知唯一受胰島素所調控之 GLUT isoform，因此淋巴細胞可能並不表現 GLUT-4。此外，由淋巴細胞葡萄糖運輸系統之結果可知，高濃度之葡萄糖及穀氨醯胺造成淋巴細胞複製功能之降低，並非由於抑制其葡萄糖運輸功能所致。

中英文專有名詞及縮寫對照一覽表

Con A	concanavalin A	刀豆素
GLUT	glucose transporter	葡萄糖運輸裝置
GTS	glucose transport system	葡萄糖運輸系統
	glutamine	穀氨醯胺
HBP	hexosamine biosynthetic pathway	六碳醯胺代謝途徑
	in vitro	體外系統
	in vivo	體內系統
	insulin	胰島素
	insulin receptor	胰島素接受器
	insulin resistance	胰島素抵抗性
IL	interleukin	細胞間白素
	mitogen	分裂原
PHA	phytohaemagglutinin	植物凝集素
[³ H] thymidine	tritium thymidine	氚標記胸腺嘧啶



壹、前言

T-淋巴細胞在細胞免疫功能中扮演調節之重要角色。過去許多研究指出，為達淋巴細胞複製能力，有必要保持血清中穀氨醯胺(glutamine)濃度於生理範圍(Parry et al., 1990)，並且在壓力狀況下，常發現血清穀氨醯胺濃度低下，而建議應增加其補充(Lacey et al., 1990)。目前已有多種品牌之國產及進口強化穀氨醯胺之營養劑於臨床上使用，並陸續有關於臨床試驗結果之報導。然而，有關在臨床上過量使用穀氨醯胺可能造成之負面影響，則尚未被提出。

近來的研究報告指出，在肌肉及脂肪細胞內發現的六碳醯胺代謝途徑，與這些細胞胰島素抵抗性之形成有關。而來自葡萄糖代謝之 fructose-6-phosphate 及穀氨醯胺為該途徑之重要受質。亦即於高血糖狀況下，一旦經胰島素使得大量葡萄糖進入細胞內，若又同時有高量穀氨醯胺加入，則在這些細胞內形成高量此代謝途徑之產物。這些產物的累積會造成細胞葡萄糖運輸系統的去敏感作用，即產生胰島素抵抗性(insulin resistance)的狀態，進一步使其葡萄糖利用率下降(Marshall et al., 1991; McClain et al., 1996)。因此，於生理壓力下，淋巴細胞利用葡萄糖量增加，而穀氨醯胺在壓力下之補充不見得需要，並且過度補充有可能影響細胞對葡萄糖利用的情況下，高濃度穀氨醯胺有可能反而負面影響淋巴細胞

功能。

此外，本研究室曾利用動物模型觀察發現，在壓力狀況下，雖然血液中穀氨醯胺濃度顯著下降，但額外補充穀氨醯胺，並無法完全恢復淋巴細胞之正常功能。且發現壓力狀況下，淋巴細胞對穀氨醯胺之利用率下降，轉而利用較高量之葡萄糖(張,1997年)。

故本研究以 *in vitro* 研究方法，瞭解穀氨醯胺在高葡萄糖濃度下對 T-淋巴細胞複製功能的影響，並觀察淋巴細胞在正常及高濃度葡萄糖/穀氨醯胺存在下，胰島素所調控的葡萄糖攝取反應。

貳、文獻探討

一. T-淋巴細胞及其對葡萄糖與穀氨醯胺代謝作用

脊椎動物之免疫系統，可保護其免於受環境中各種傳染性微生物侵入，及減少病原造成傷害的防禦系統。其中包括各式各樣可專一辨認病原體上的抗原，以及將病原體去除之細胞與分子。而 T-淋巴細胞在細胞免疫中扮演調節中樞的角色，故本研究針對 T-淋巴細胞的功能特性加以探討。

1. T-淋巴細胞

淋巴細胞(lymphoid cells)由初級淋巴器官(primary lymphoid organs): 胸腺(thymus)和骨髓(bone marrow)所產生。初級淋巴器官為淋巴細胞生成作用(lymphopoiesis)的主要場所，在此，淋巴幹細胞(lymphoid stem cells)分化為淋巴細胞，進而增殖成熟為具有功能性的細胞，並獲得專一性的抗原接受器，以便日後應付抗原的刺激。接著淋巴細胞會經由血液循環，而遷移到二級淋巴器官(secondary lymphoid organs)。

二級淋巴器官包括具外膜的脾臟(spleen)、淋巴結(lymph nodes)，及遍佈全身但不具外膜的淋巴組織，稱為黏膜相關淋巴組織(mucosal - associated lymphoid

tissues, MALT)：扁桃腺(tonsil)與腸道的白氏集合淋巴結(Peyer's Patches)。二級淋巴器官可提供作用空間，使成熟的淋巴細胞彼此間與附屬細胞及抗原相互作用，並將免疫反應散播出去(Allison et al., 1987)。

T-細胞與 B-細胞為兩種主要的淋巴細胞，其中 T-細胞因在胸腺中進行分化(thymus-derived)，故命名為 T-淋巴細胞。在不同的淋巴器官中，T-細胞與 B-細胞的比率也會有所不同：其中淋巴結含有較多的 T-細胞，約 55-80 %；脾臟含量中等，約有 40 %；而白氏集合淋巴結則含較少量，約 ~30 % (Hunt, 1987)。由於本實驗欲探討 T-細胞的功能特性，因此選擇含量較豐富之淋巴結作為細胞取得來源。以下針對淋巴結作概略性介紹。

淋巴結通常位於淋巴管的匯流處，為構成身體網路的一部分。聚集的淋巴結分佈於頸部、腋下、鼠蹊部、縱隔腔及腹腔(Tilney, 1971) (圖 1-1)。保護皮膚的淋巴結位於較表層，稱為體淋巴結(somatic nodes)；深部淋巴結可保護呼吸道、消化道、泌尿、生殖道之黏膜表層，稱為內臟淋巴結(visceral nodes)。淋巴結主要的免疫功能為負責對抗經由淋巴系統過濾，來自皮膚或內表皮(internal surface)的抗原。經由此途徑過濾的抗原會導致抗體釋放到血液循環中，並且引發局部的細胞性免疫(cell-mediated immunity, CMI) (Kaufmann, 1993)。

T 淋巴細胞具有多種的型態與功能，可區分為不同的亞群(subpopulation)：① 輔助型(T-helper cell, T_H) T 細胞可幫助 B 細胞分裂、分化及製造抗體，並可與

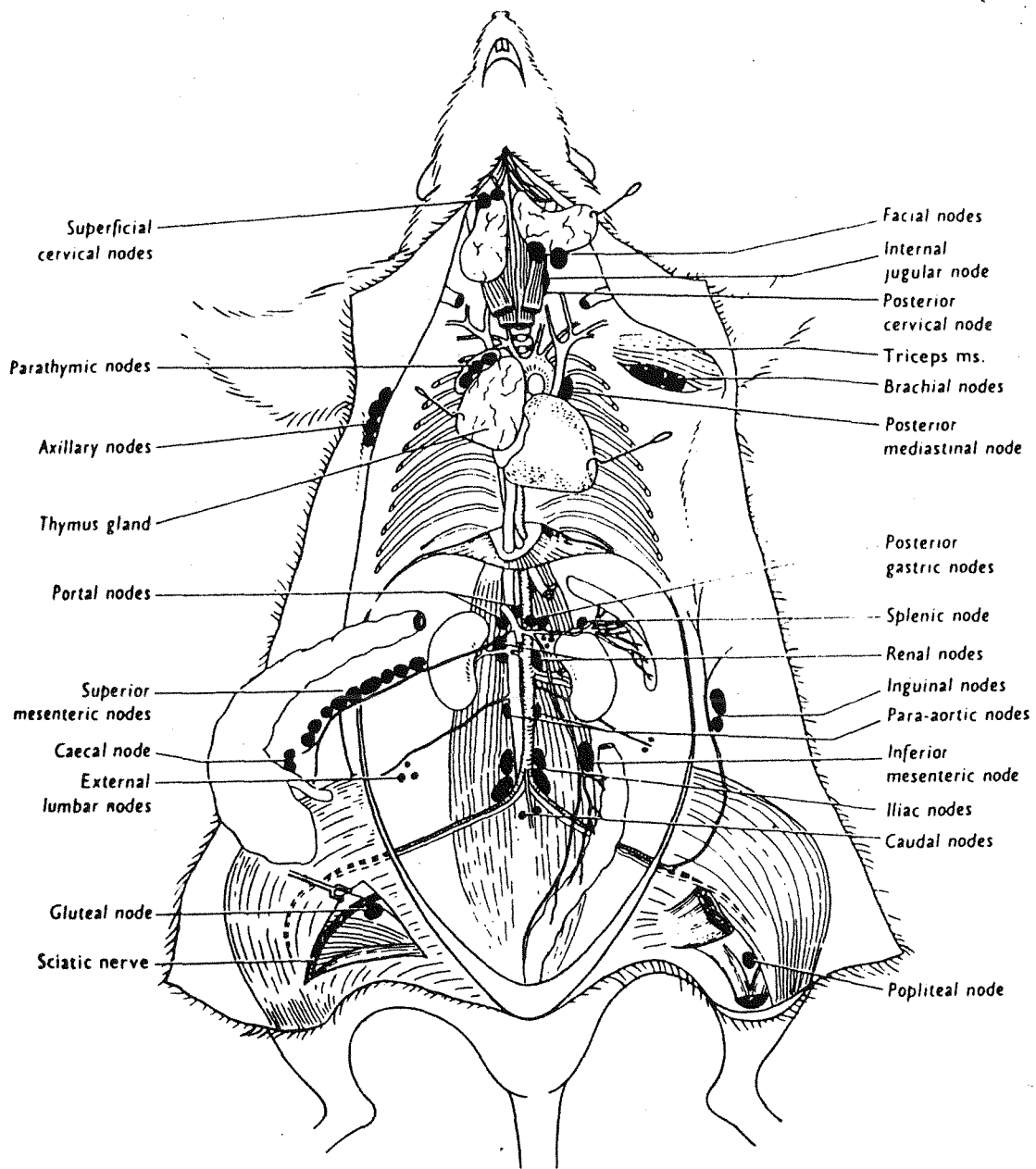


圖 1-1: 大鼠淋巴結分佈圖。

Fig 1-1: Lymph node groups in the dissected adult rat.
 nodes lying dorsally are demonstrated by reflecting
 muscles and viscera.
 Adapted from Tilney. (1971)

單核吞噬細胞交互作用幫助消滅病原；② 毒殺型(T-cytotoxic cell, Tc) T細胞負責破壞被病毒或其他胞內病原感染的宿主細胞；以及③ 抑制型(T-suppressor cell, Ts) T細胞。而 T 淋巴細胞可藉由細胞 - 細胞間的交互作用，與釋放細胞激素(cytokines)來調節免疫反應，因此在細胞免疫反應中扮演重要的角色(Mosmann et al., 1989)。

2. T-淋巴細胞之活化作用

淋巴細胞在正常狀況下，有 90 % 是處於休止狀態。當淋巴細胞辨識到抗原呈現細胞(antigen-presenting cells ; APC)的細胞表面上，主要組織相容複合(major histocompatibility complex, MHC)分子中的抗原性胜肽，並與之結合後，即被活化(Allison et al., 1987)。抗原誘導之活化與增生，通常發生於淋巴組織中，而此淋巴細胞在試管中(in vitro)培養時，若加入活化劑，亦可看到活化的情形。活化劑有兩類：

(1) 抗原

T-淋巴細胞在細胞膜表面具有特化的(specialised)接受器，稱為 T-細胞抗原接受器(T cell antigen receptor, TCR)，其為雙硫鍵連結異質雙聚體之醣蛋白質。目前已知 TCR 有兩型，即 TCR-1 (γ/δ) 與 TCR-2 (α/β)。TCR 可使 T 細胞辨識各種不同的抗原，其與細胞表面上多胜肽複合體所謂的 CD3 結合

在一起(TCR-CD3 complex) (Clevers et al., 1988)。兩種型式的 TCR 在構造上很類似，但在解剖學上的位置則有顯著的不同：大部分的成熟胸腺淋巴細胞分化為 TCR-2 (α/β)，僅有少數不到 1 % 的細胞表現出 TCR-1 (γ/δ)，因此在二級淋巴器官及循環中，大多數為 TCR-2 (α/β)。TCR-1 (γ/δ) 細胞雖然在二級淋巴器官及循環中含量甚少，然而在黏膜上皮之存量豐富，主要功能為保護身體的黏膜表面(Ladel et al., 1995)。

TCR-2 T 細胞可再分成兩種不相重疊的細胞群：帶有 CD4 標記的 T 細胞 (T_H)，其主要的功能是輔助免疫反應，而帶有 CD8 標記的 T 細胞 (T_c)，其最主要的功能則是進行毒殺作用。細胞是否具有 CD4 或 CD8 接受器，會限制 T 細胞與何種型式的細胞交互作用。其中 CD4 T 細胞，可辨識第 II 型主要組織相複合體分子上的特異性抗原而與之結合(Bierer et al., 1989)。而攜帶 CD8 標記的 T_c 細胞則可辨認第 I 型 MHC 分子與之結合(Bjorkman et al., 1987)。

當 T-淋巴細胞與抗原結合後，便開始分泌細胞激素(lymphokines) (Nathan et al., 1983) 以及進行細胞複製，來調控免疫反應(Paul et al., 1994)。由於抗原對淋巴細胞之刺激作用，只對少部份 T-淋巴細胞中具有該抗原接受器之細胞有活化作用，因此在體外實驗之觀察中，由單一抗原誘發之複製反應是相當微弱的。

(2) 分裂原

分裂原是一群不經過專一性抗原辨認過程，而直接活化淋巴細胞的分子。這在研究 T 細胞與 B 細胞的活化十分有用。T 淋巴細胞可被由紅菜豆所萃取出來的植物凝集素 (phytohemagglutinin, PHA) (Nowell et al., 1960) 以及由蓖麻子所萃取出來的刀豆素 (concanavilin A, Con A) (Moller et al., 1978) 等分裂原所刺激(圖 1-2)。這些分子會與 T 細胞活化有關的表面分子，如 T 細胞接受器 CD3 結合(Weiss et al., 1984)。在此活化過程中，輔助型細胞 (T_H) 會釋放出淋巴激素 - IL-2 (Smith et al., 1980)，並且在細胞表面會表現激素接受器 (IL-2 receptor) (Kaye et al., 1984)，此為 T 淋巴細胞複製作用所必需 (Gillis et al., 1982)。故有些對於觀察分裂原誘發 T 淋巴細胞複製之研究，是以 IL-2 與 IL-2 receptor 之交互作用，作為細胞複製指標 (Depper et al., 1985)。

由於在試管內，淋巴細胞對分裂原之反應很類似對抗原刺激之反應，因此本研究以 Con A 對 T- 淋巴細胞之刺激為活化該細胞之方法，並以細胞複製之能力當做其功能性之指標。

3. 葡萄糖及穀氨醯胺對 T-淋巴細胞之重要性

過去研究發現，對於許多快速分生的細胞而言，
如：腸上皮細胞 (enterocytes)、網狀上皮細胞

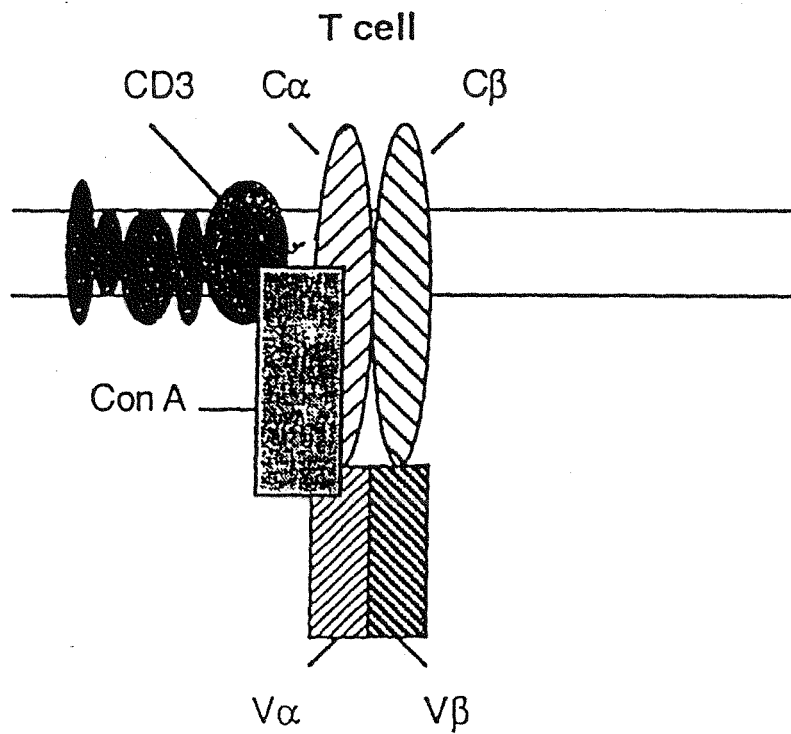


圖 1-2: Con A 與 T-細胞接受器中的 CD3 結合，活化淋巴細胞。

Fig 1-2: Con A concomitantly interacts with the TCR/CD3 molecule to achieve the T cell stimulation.

Adapted from Licastro et al. (1993)

(reticulocytes)、血管內皮細胞(vascular endothelial cells)、腫瘤細胞(tumor cells)、纖維母細胞(fibroblasts)、淋巴細胞(lymphocytes)、胸腺細胞(thymocytes)、巨噬細胞(macrophages)及某些培養的細胞(cultured cells)，其對葡萄糖及穀氨醯胺均有很高的利用率(Reitzer et al., 1979; Brand et al., 1984; Leighton et al., 1987; Ashy et al., 1988; Newsholme et al., 1987, 1994)。且此二代謝受質主要提供細胞複製所需之能量來源以及核酸合成之前趨物質(Newsholme et al., 1985)。

葡萄糖經完全氧化作用，可產生大量 ATP、二氧化碳與水，可有效的產生能量。但在某些因氧氣供應不足或需快速供能的生理狀況下，則需由糖解作用(glycolysis)產生能量。Culvenor 等人在之前的研究報告指出，以 Con A 活化淋巴細胞時，其葡萄糖的攝取(uptake)量及利用率較無活化的狀態下顯著的提高(Culvenor and Weidemann, 1976; Brand et al., 1984)。在 1985 年亦有學者研究指出，胸腺細胞(thymocyte)在進行複製時，其葡萄糖的代謝較休止狀態下增加 53 倍，有 90 % 的葡萄糖被利用而轉變成乳酸，在休止狀態時則僅有 56 % (Brand, 1985)。

在哺乳動物體內的胺基酸池與血液中，穀氨醯胺為含量最豐富的胺基酸，血清中生理濃度範圍約為 0.6 mmol/l (Ham and McKeehan, 1979; Hall et al., 1996)，並且在許多細胞生理反應中為必需的。包括：① 為腎臟氨生成作用(ammoniogenesis)的重要基質(Welbourne et al., 1986)。② 可調節蛋白質合成(Jepson et al., 1988;

MacLennan et al., 1987)。③ 提供氮(nitrogen)作為核苷酸(nucleotide)生合成之必需前趨物，如：adenosine triphosphate (ATP)、purine、pyrimidine、amino sugar 及其他的氨基酸(Frisell, 1982)。④ 細胞進行複製時之主要燃料(Newsholme et al., 1985)。特別是對於免疫細胞的生長與功能，扮演重要的角色 (Alexander, 1993; Newsholme, 1996) (圖 1-3)。

Ardawi 與 Newsholme (1983)於淋巴細胞培養液中添加穀氨醯胺之研究發現，在未添加葡萄糖的情況下，穀氨醯胺之代謝產物-天門冬氨酸(aspartate)會隨著培養時間的增加而提高其濃度，且細胞中 ATP/ADP 及 ATP/AMP 比值維持恆定狀態，顯示淋巴細胞也利用穀氨醯胺供能，葡萄糖並非其唯一的能量來源。並且根據 Parry-Billings 等人(1990)之研究發現，為達到淋巴細胞最大複製能力，需維持血清中穀氨醯胺濃度於生理範圍(約 0.6 mmol/l)。

由於在正常哺乳動物，穀氨醯胺可為體內自行合成，因此為非必需胺基酸(non-essential amino acid)。但在一些報告中指出，由於在某些壓力狀態下，如敗血症(sepsis)、外創傷(trauma)、嚴重燒傷(major burn injury)、手術(major surgery)及嚴重急性胰臟炎(severe acute pancreatitis)的病患中，常發現血清中穀氨醯胺濃度有低於正常生理範圍之現象(Lacey et al., 1990; Souba et al., 1990)，這可能與病患免疫功能受到抑制及併發感染的發生率有關(Burke et al., 1989)。因此有部份研究認為，在壓力狀態下，會因內生性之穀氨醯胺量不足以供免疫

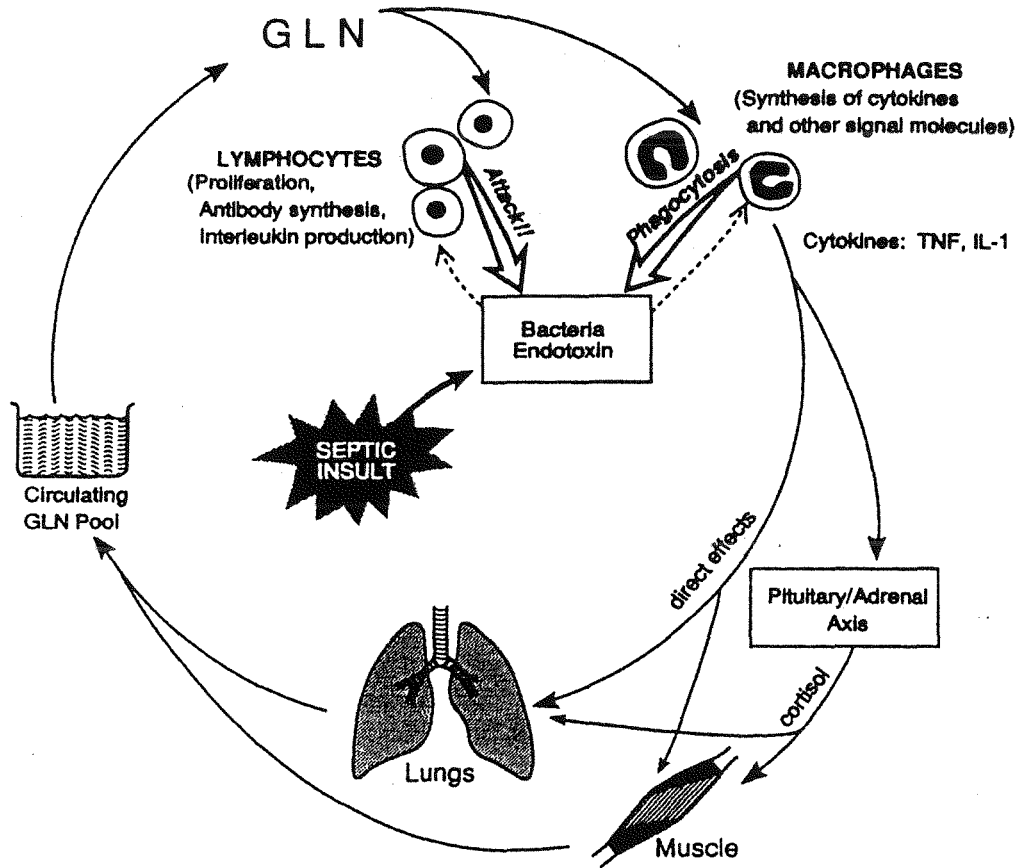


圖 1-3: 穀氨醯胺與免疫系統之關係。

Fig 1-3: The utilization of glutamine in lymphocytes.

Adapted from Brand et al. (1986)

系統之細胞所需，而造成免疫力低下，因此建議應增加補充(van der Hulst et al., 1993)。

目前已有多種品牌之國產及進口加強穀氨醯胺營養劑於臨床上使用，並且陸續有關於臨床試驗之報導，這些結果整理如下：

- (1) 在結腸手術後的病患，供給穀氨醯胺可維持體內氮平衡，以及改善肌肉中穀氨醯胺濃度(Stehle et al., 1989)。
- (2) 穀氨醯胺可提高燒傷病患其嗜中性球(neutrophils)對抗細菌之功能(bactericidal function)，減少病患感染情形 (Ogle et al., 1994)。
- (3) 在骨髓移植之病患，經靜脈營養供給穀氨醯胺可改善其氮平衡、減少微生物菌落之形成，降低臨床感染的發生率，而縮短住院期(Ziegler et al., 1992)。
- (4) 在動物實驗模式，穀氨醯胺的提供，可降低因熱休克所引發大鼠之腸道上皮細胞死亡率，顯示穀氨醯胺可維持腸道細胞生長，並在預防腸黏膜萎縮方面，扮演保護的角色(Chow and Zhang, 1998)。
- (5) 對於嚴重急性胰臟炎病患，其給予穀氨醯胺，可促進淋巴細胞增生，降低前發炎細胞激素 (IL-8)的釋放，改善病患之免疫機能(de Beaux et al., 1998)。

(6) 給予多發性創傷之病患穀氨醯胺，可降低其肺炎、菌血症及敗血症等併發症的發生率 (Houdijk et al., 1998)。

由以上可知，補充穀氨醯胺具有免疫促進之功能，但仍有一些未能證明其在免疫方面功能性之結果。例如：1993 年 Xu 等人對正常動物之研究發現，給予大鼠含穀氨醯胺之元素飲食(elemental diet)，其細菌移位(bacterial translocation)之發生率為 88 %，此結果顯著高於給予標準飲食之餵食組(13 %)。由於細菌移位作用與腸黏膜障壁及免疫系統功能低下有關，此結果顯示，穀氨醯胺不但不能預防由元素飲食所引起的免疫抑制作用，而且可能使之惡化，因此補充穀氨醯胺之作用仍需進一步證實 (Xu et al., 1993)。此外，雖然有關過量補充穀氨醯胺可能造成細胞傷害之報告，至今尚未被提出，但有文獻指出，在許多胰島素敏感性組織中，若有大量葡萄糖與穀氨醯胺同時進入細胞中，會造成六碳醣胺代謝產物的累積，進而影響其能量利用 (Marshall et al., 1991)。

之前本研究室曾利用動物模型，以內毒素 (lipopolysaccharide) 誘發大鼠敗血症，來觀察壓力下，受活化之淋巴細胞對於穀氨醯胺之需求，與正常生理狀態下淋巴細胞對穀氨醯胺之需求有何不同，並與這些狀況下，淋巴細胞對葡萄糖的利用率加以比較。結果發現，雖然血液中穀氨醯胺濃度於壓力狀態下顯著下降，但額外補充穀氨醯胺並無法恢復淋巴細胞之正常功能。並發現壓力狀態下，淋巴細胞對穀氨醯胺的利用率下降，轉

而利用較高量的葡萄糖(張, 1997年)。因此, 於生理壓力下, 淋巴細胞利用葡萄糖量增加, 而穀氨醯胺在壓力下補充不見得需要的情況下, 若濫加補充穀氨醯胺, 有可能影響細胞對於葡萄糖之利用, 如此可能進一步負面影響淋巴細胞功能。

二、胰島素及其作用

1. 胰島素

胰島素(insulin)是由胰臟中蘭氏小島(islets of Langerhans)的 β 細胞所分泌, 為一個以雙硫橋(disulfide bridges)連結兩串氨基酸形成的多胜肽(polypeptide) (Brange and Langkjoer, 1993), 是身體內主要具有直接降低血糖功能的激素。

對於胰島素的分泌作用, 最重要的生理調節因子為血漿中葡萄糖濃度。當血液中葡萄糖濃度過高時, 蘭氏小島的 β 細胞直接受葡萄糖的刺激分泌胰島素, 因此血糖愈高, 胰島素的分泌也愈多(Jansson and Hellerstrom, 1983)。在正常狀態下, 血中葡萄糖對胰島素分泌的控制非常精確, 因此血中葡萄糖與胰島素的濃度呈正相關性 (Hedeskov, 1980)。此外, 胰島素的分泌亦受到其他調節因子所影響, 如: 氨基酸、脂肪酸、酮體(ketone body)及昇糖素(glucagon)皆會刺激胰島素分泌, 而體抑素(somatostatin)、腎上腺素

(epinephrine 及 norepinephrine)等則會抑制胰島素的分泌(Howell, 1984; Flatt et al., 1991)。

而對於許多胰島素所作用的組織而言，胰島素是一個重要的同化性激素(anabolic hormone)。其在各種組織的主要作用如下：① 在脂肪組織中：可增加葡萄糖、鉀離子的吸收，脂肪酸、磷酸甘油的合成及三酸甘油酯的沉積；② 在肌肉中：可增加葡萄糖、氨基酸、鉀離子及酮體的吸收，肝醣及核醣體的蛋白質合成，減少蛋白質的分解代謝；③ 在肝臟中：可增加蛋白質、脂肪及肝醣的合成，減少酮體生成。另外，並可增加細胞的生長，因此在代謝上扮演著一個非常重要的角色(Cheatham et al., 1995)。

2. 胰島素接受器

胰島素分泌後，調節上述多種代謝作用，是經由與標的組織(target tissue)細胞膜上的一特定醣蛋白接受器—胰島素接受器(insulin receptors)相結合，而開始其一連串的生理作用(圖 1-4)。胰島素接受器是一個分子量約 400 kDa 的複合蛋白質(Collier and Gorden, 1991)。此接受器是一個四聚體，由兩個 α (125 kDa)和兩個 β (90 kDa)醣蛋白次單位(glycoprotein subunits)所組成，形成 $\alpha_2\beta_2$ 的結構(Czech, 1985)。

在大多數哺乳動物細胞中，皆可發現有胰島素接受器的表現，並且在一些傳統上被認為是非胰島素

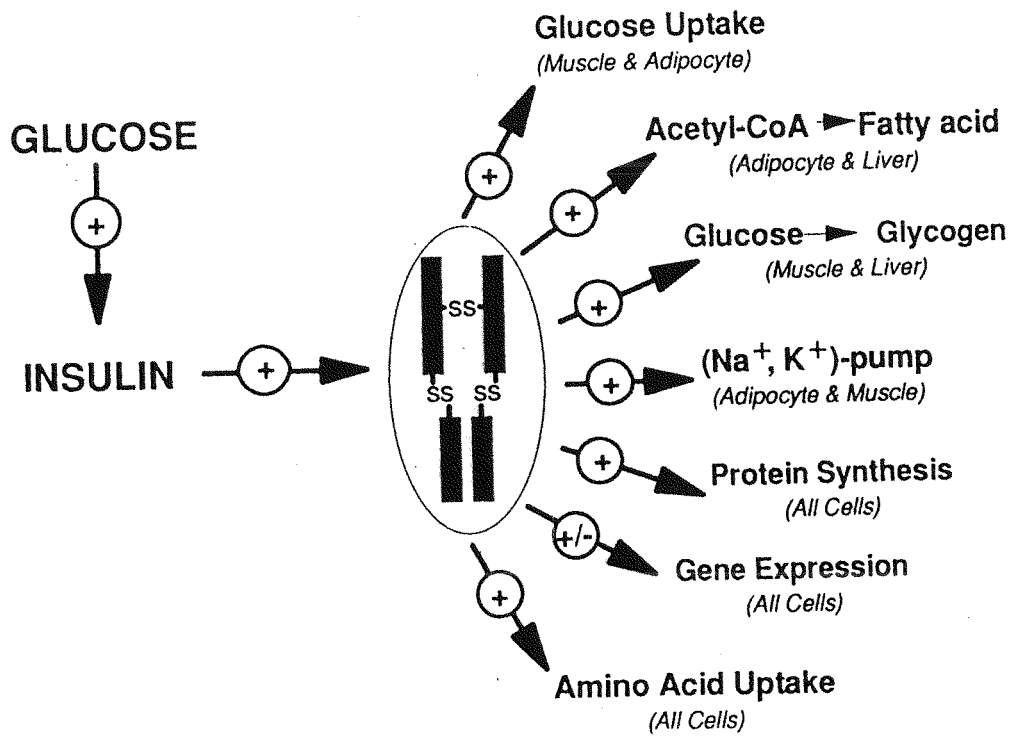


圖 1-4: 胰島素之主要作用。

Fig 1-4: Major insulin responses found in various cell and tissues.

Adapted from White and Kahn. (1993)

標的的細胞(non-classical targets of insulin)，也有此接受器的表現，包括：腦細胞(brain cells)、紅血球(erythrocytes)、血管內皮細胞(vascular endothelial cells)、性腺細胞(gonadal cells)、腎臟細胞(kidney cell)以及淋巴細胞(lymphocytes)等(Havrankova et al., 1978; Im et al., 1983; King et al., 1983; Saucier et al., 1981; Pitcher et al., 1995; Helderman, 1984)。

然而，在一些有胰島素接受器表現的組織/細胞中，其生理作用是否受胰島素調控，則至少取決於以下二因素：

(1) 胰島素接受器之數目(concentration of receptors)

在過去的研究發現不同細胞中，胰島素接受器的數目有很大的差異性。例如在脂肪及肝臟細胞中，有較多的接受器存在，約有 200,000 個；而每個紅血球細胞中，約只有 40 個接受器，因此對於胰島素的調控作用較不顯著(Caro et al., 1988; Im et al., 1983)。

(2) 胰島素接受器之次單位大小(subunit size of receptors)

之前研究發現，在不同組織中，胰島素接受器的大小也有所不同。當以單株抗體辨識(recognition by monoclonal antibodies)人類及大白鼠，不同組織中的胰島素接受器，發現在不同的組織中，胰島素具有異質性(heterogeneity) (Caro et

al., 1988; Burant et al., 1986)。

胰島素接受器為一種醣蛋白之大分子，其 α 及 β 次單位皆有高度糖化的現象(glycation)。之前研究發現，若無此糖化作用，則會降低胰島素之作用。在腦細胞中，接受器之分子量較肝臟及脂肪細胞之接受器為小，可能由於其糖化作用減少所致，而此可能為腦細胞不受胰島素調控之原因(Heidenreich et al., 1983; Lowe et al., 1986)。

另外，當以單株抗體辨識來比較腦(brain)及胎盤(placenta)之接受器結構時，發現此兩種組織的胰島素接受器，主要不同在於 α -次單位(Roth et al., 1986)。並且在人類胎盤細胞中也發現，其胰島素接受器結合之特性也不同於其他組織(Jonas et al., 1986)。

之前研究報告指出，休止狀態下的淋巴細胞(noncytotoxic T cells)並不表現胰島素接受器，但在經分裂原，如：Con A, PHA 活化後，在其細胞表面則會表現出具有高親和力之胰島素接受器。且此接受器對胰島素之親和力與許多胰島素敏感性組織(insulin-sensitive tissues)，如：肝臟(hepatocytes)及脂肪(adipocytes)組織的接受器類似(Helderman and Strom, 1977; Braciale et al., 1982)。另外，許多有關胰島素促進淋巴細胞活化過程之研究也發現，在以分裂原活化細胞，並有胰島素存在時，細胞之活化過程會因胰島素之存在而加強(Snow et al., 1981)。並且 Helderman

於 1981 年之研究發現，當以 PHA 活化淋巴細胞，使其在細胞膜表面有胰島素接受器之表現時，會促進淋巴細胞之能量代謝：增加細胞對葡萄糖及氨基酸的運輸、葡萄糖及乳酸氧化作用，並使細胞更有效率的進行複製(Helderman, 1981; Straus and Pang, 1982; Snow, 1985)。另外，在淋巴細胞胰島素接受器之相關研究方面，Van 等人研究指出，其接受器的兩個主要醣蛋白次單位，分子量分別為 130,000 及 90,000 dalton (Van et al., 1981)。而活化的淋巴細胞，每個細胞約可表現 16,600 個胰島素接受器(Galbraith et al., 1982)。

3. 葡萄糖運輸系統及其調節

多年來已知，胰島素在清除血液中過高的葡萄糖濃度上扮演重要的角色，而此一作用乃涉及對葡萄糖運輸裝置(glucose transporters, GLUT)的調節。葡萄糖運輸裝置是一族(family)相關的蛋白質，可攜帶葡萄糖穿過細胞膜。在此運輸過程中，葡萄糖暫時與其在細胞膜外側之蛋白質接受器結合，並接著被釋放至膜內側。

至目前為止，已分辨出七種不同的運輸裝置(isoforms GLUT - 1, 2, 3, 4, 5, 7) (表 1-1)，分佈於不同細胞。在紅血球及內皮細胞中為 GLUT-1；在肝臟細胞中為 GLUT-2；在胎盤細胞中為 GLUT-3；而在肌肉及脂肪細胞中為 GLUT-4，此為目前所知唯一受胰

島素所調控之 GLUT isoform (Gould and Holman, 1993)。另外在小腸及腎臟細胞中之 Na^+ - glucose cotransporters (SGLT-1) 亦不受胰島素調控，可能與小腸之吸收、腎之再吸收功能有關(Hirayama et al., 1996)。

於 1965 年，Crofford 及 Renold 首先證實，胰島素能刺激葡萄糖的運輸作用。多年來已知，在兩種主要哺乳動物組織 - 肌肉及脂肪組織中，胰島素可促進其葡萄糖運輸過程，迄今已有許多相關研究 (Simpson et al., 1986; Calderhead et al., 1990; Stenbit et al., 1996; Olefsky, 1999)。在未受刺激之脂肪細胞，只有少量百分比之葡萄糖運輸裝置在細胞膜上，而加胰島素至細胞則顯著增加其數目，最多可達 10 倍，且細胞內胞器膜上之葡萄糖運輸裝置數目相對減少 (Cushman et al., 1980; Karnieli et al., 1981)。由於大部分關於胰島素對葡萄糖運輸作用之研究，是利用脂肪細胞及肌肉細胞進行的，故對相關機制之瞭解，目前大多根據於此二組織方面之證據。而 Chakrabarti 等人研究指出，在周邊血液淋巴細胞中，有 GLUT-2 及 GLUT-3 的表現(Chakrabarti et al., 1994)。

胰島素促進葡萄糖運輸之機制如下：① 胰島素與細胞表面特殊的接受器結合後，會引發一連串訊息的傳遞(Kahn, 1985)。② 此訊息會促使細胞內胞器膜上之葡萄糖運輸裝置的分子，從細胞質的分子池 (a pool of the molecules) 中，快速移位 (translocation) 至細胞膜上 (Mehler et al., 1980)。③ 接著會增加細胞

Glucose transporter	Distribution	K_m (mmol/l)	Comments
GLUT-1	Erythrocytes Endothelial cells Blood-brain barrier Blood-retina barrier Adipocytes	~ 2 *	Mainly in plasma membrane K_m for net efflux much higher: asymmetry may allow GLUT-1 to function as a unidirectional transporter at low extracellular glucose levels [24]
GLUT-2	Islet B cells Hepatocytes Intestine (basolateral membranes)	~ 66	Located in the plasma membrane High K_m allows cells to act as 'glucose sensors' Insulin-insensitive; down-regulated by hyperglycaemia in islet B cells Relatively high affinity for fructose
GLUT-3	Neurons Intestine Placenta Heart	~ 9	Up-regulated in brain by hypoglycaemia
GLUT-4	Skeletal muscle Cardiac muscle Adipocytes	~ 5	Insulin-sensitive Mainly intracellular in basal state; insulin (and exercise, in muscle) induce translocation to plasma membrane
GLUT-5	Skeletal muscle Heart Intestine (apical membrane) Adipocytes	~ 6 †	Fructose transporter Very low affinity for glucose
GLUT-7	Hepatocytes (endoplasmic reticulum only)	?	Transports glucose derived from glucose-6-phosphate (generated by glucose-6- phosphatase, which is located in the endoplasmic reticulum) into cytosol for release

* K_m for net influx.

† K_m for fructose.

These K_m values are approximate. The K_m (which is inversely related to the affinity for glucose) of a glucose transporter may vary depending on the cell type that expresses it. Furthermore, the glucose analogue used and the experimental method can affect the K_m value.

表 1-1: 葡萄糖運輸裝置之種類及分佈圖。

Table 1-1: Tissue distribution of facilitative glucose transporters.

Adapted from Kruszynska. (1997)

膜表面之運輸裝置數目，而促進葡萄糖進入細胞中。這些受器分子在內噬作用(internalization)時被融入細胞內，且被再循環(recycled) (Karnieli et al., 1981) (圖 1-5)。

三、胰島素抵抗性及相關機制

胰島素抵抗性(insulin resistance)是在多種病理狀態下會發生的代謝問題，包括肥胖及糖尿病，並且對於 NIDDM 患者長期併發症的發生，是一個主要的促進因子 (DeFronzo et al., 1982)。胰島素抵抗性之特徵為在血中呈現高濃度胰島素，但其促進葡萄糖運輸的作用卻降低，並且對於葡萄糖代謝的刺激作用亦發生缺損之現象。然而胰島素抵抗性之形成機制至今仍尚未完全瞭解，許多研究指出，可能與下列之情形有關：

1. 胰島素去敏感作用

許多有關胰島素抗性的研究指出，此狀態會造成胰島素對葡萄糖的調節作用發生損害情形，而這些損害可能與胰島素接受器的功能或親和力降低有關 (Olefsky et al., 1976; Wigand and Blackard, 1979)。

在肥胖症病患，常維持一空腹高血胰島素濃度狀態 (Elahi et al., 1982)，但在血中單核球、脂肪細胞、骨骼肌及肝臟中的胰島素接受器卻反而減少，且

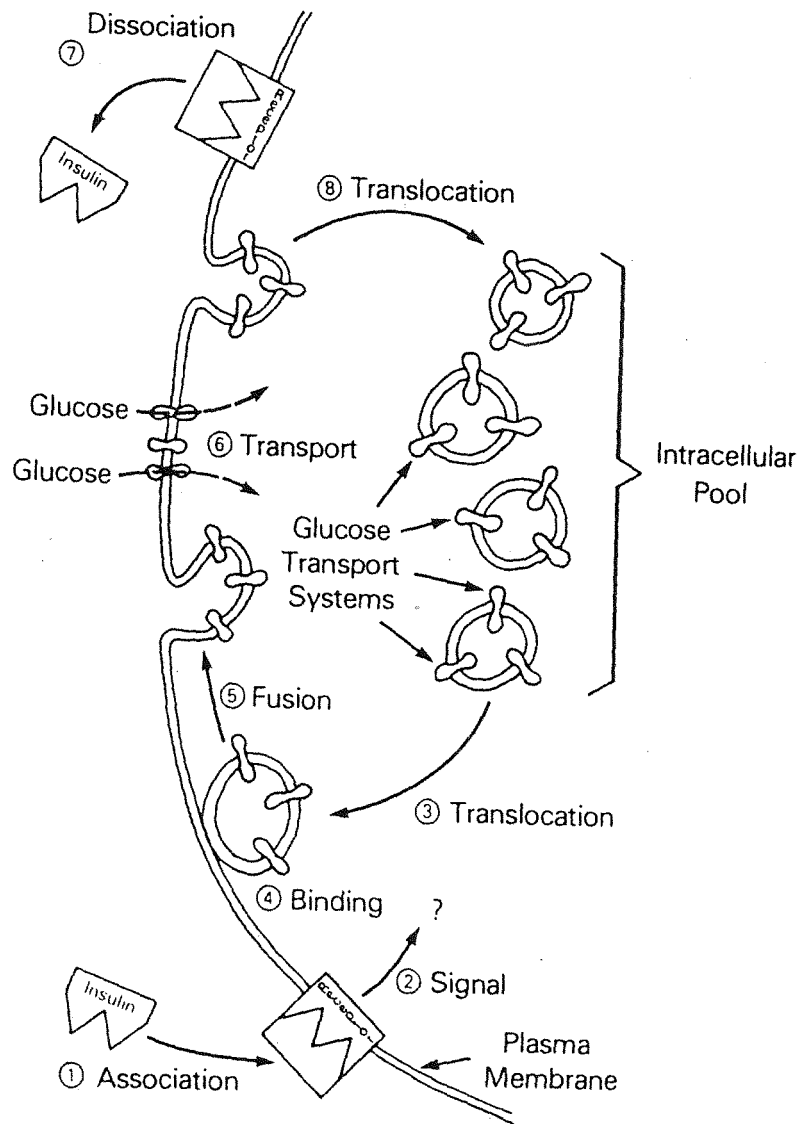


圖 1-5: 葡萄糖運送分子受胰島素影響之轉位作用。

Fig 1-5: Schematic representation of a hypothetical mechanism of insulin's stimulation action on glucose transport in the isolated rat epididymal adipose cell.

Adapted from Karnieli. (1981)

其標的組織對胰島素的敏感度也降低。此種衰退調節 (down-regulation) 即是由於胰島素接受器內移至胞內，而使其表面數目減少所致 (Bar et al., 1979; Maegawa et al., 1991; Sinha et al., 1987)。此種現象為在某些生理或病理狀態如：壓力 (stress)、肥胖症 (obesity) 及第二型糖尿病 (non-insulin dependent [type II] diabetes mellitus, NIDDM) 的患者，產生胰島素抵抗性 (insulin resistance) 的部分原因 (Moller et al., 1989; Cama et al., 1990)。

2. 葡萄糖運輸裝置去敏感作用

多年來已知，肌肉是胰島素促進葡萄糖利用的主要組織之一 (Randle et al., 1964)，而當胰島素抵抗性發生時，胰島素對肌肉組織代謝的調節作用會有損害的情形發生：肝醣合成速率降低、葡萄糖攝取減少 (Rothman et al., 1992; 1995)。另外，在脂肪細胞之研究中發現，細胞內胰島素刺激葡萄糖運輸之作用有減少的現象 (Garvey et al., 1989)。

在飲食之影響方面，1994 年有學者研究指出，脂肪酸 (fatty acid) 會抑制胰島素對葡萄糖攝取的刺激作用，降低肝醣合成及碳水化合物之氧化，且此種抑制作用呈現一劑量正相關性 (dose-dependent) (Boden et al., 1994)。1996 以動物實驗模式的研究發現，當餵食大白鼠高脂肪飲食，造成血漿中游離脂肪酸濃度升高，在骨骼肌中會抑制糖解作用，而使胰島素刺激

葡萄糖攝取的作用降低(Jason et al., 1996)

由此以上可知，胰島素抵抗性之發生，部分是受到細胞內葡萄糖運輸裝置之調節。葡萄糖運輸裝置去敏感作用，即被廣泛用於說明胰島素促進細胞攝取葡萄糖的作用低下之現象。組織葡萄糖運輸系統去敏感作用對活體之主要影響在於其造成循環系統的高血糖作用，而對原先胰島素敏感性組織/細胞而言，此去敏感作用影響細胞的能量利用，因而進一步影響其功能性，例如在糖尿病病患之肌肉造成衰弱無力，或可能對宿主免疫系統功能造成損害。

3. 六碳醣胺代謝途徑 (hexosamine biosynthetic pathway , HBP)

血糖濃度恆定性之改變，會影響骨骼肌細胞葡萄糖運輸裝置的表現(Bourey et al.,1990)。關於由高血糖造成胰島素抵抗性的可能機制，在之前於肌肉及脂肪細胞的研究中發現，六碳醣胺代謝途徑(hexosamine biosynthetic pathway, HBP)可能扮演一個重要的角色(Marshall et al., 1991; McClain and Ctook, 1996)。

圖 1-6 顯示，當細胞長期處於一個高血糖、高血胰島素的狀態時，葡萄糖會增加進入細胞的量，進而提高醣解途徑中 fructose-6-phosphate (F-6-P)的量，當 F-6-P 量過高時，會與氨基酸聚合成一個聚合物，稱為葡萄糖胺(glucosamine)，此聚合物會使胰島素去敏感性，降低其對葡萄糖的運輸作用。另一方面，也會干擾其二級訊息(secondary messenger)的傳遞，而產生

胰島素抵抗性的現象。葡萄糖胺造成上述之影響，在許多報告中皆被證實，包括對初代大鼠脂肪細胞(Chen et al., 1997)、3T3-L1 脂肪細胞(Thomson et al., 1997)、肌肉細胞(Robinson et al., 1993; Hawkins et al., 1997; Baron et al., 1995)之研究。

此高濃度葡萄糖誘發之葡萄糖運輸裝置去敏感作用，需要有氨基酸的協同作用，其中又以穀氨醯胺(glutamine)的作用最大(Traxinger and Marshall, 1989)。此外，穀氨醯胺在細胞內與高劑量葡萄糖，經六碳醯胺代謝途徑產生之代謝產物的累積而導致胰島素抵抗性，此代謝途徑之關鍵酵素之一為 glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase。穀氨醯胺為此酵素的一個受質，當以穀氨醯胺類似物抑制該酵素活性時，可使細胞免於發生由高葡萄糖所誘發之胰島素抵抗性。

細胞內存在之六碳醯胺代謝途徑，在正常狀況下佔總葡萄糖代謝的 2 ~ 3 %，其他約 97 % 的葡萄糖則經由糖解 / TCA 循環代謝。因此在正常血液葡萄糖濃度下，經六碳醯胺代謝途徑之終產物累積量很少，但於高血糖狀況開始時，胰島素使得大量葡萄糖進入細胞，造成經六碳醯胺代謝途徑之產物累積量相對增加，進一步使得細胞對胰島素調控之敏感性低下，以及葡萄糖利用率降低之後果(Marshall et al., 1991)。

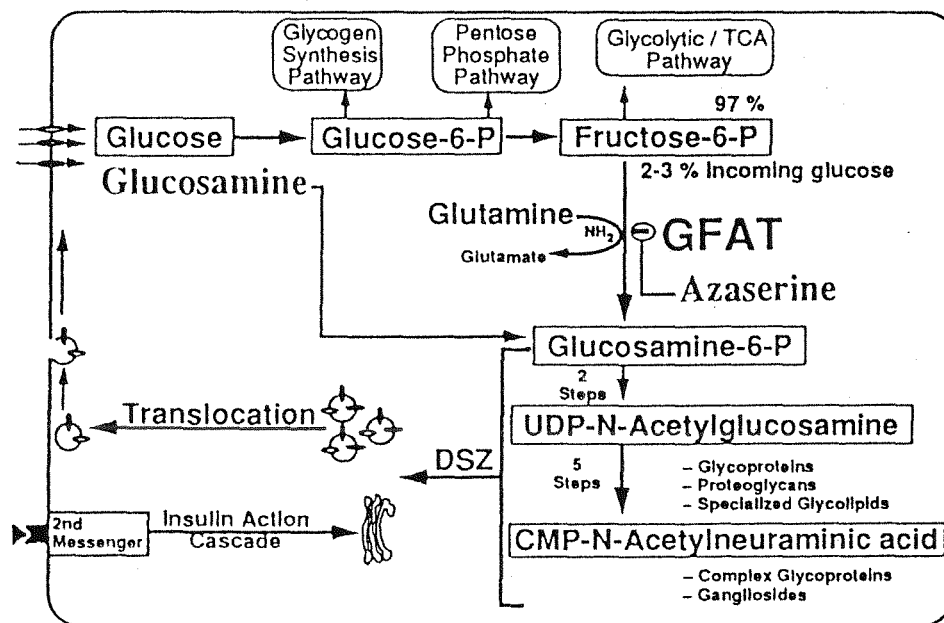


圖 1-6: 六碳醣胺代謝途徑。

Fig 1-6: Hexosamine biosynthetic pathway, HBP.

Adapted from Marshall et al. (1991)

四. 實驗設計原理

本研究中對於葡萄糖運輸系統之觀察，均以葡萄糖為受質，而以 ^3H 標記之 2-deoxy-D-glucose (2-DG) 追蹤細胞運輸葡萄糖的情形，該葡萄糖類似物利用葡萄糖運輸裝置進入細胞中，且可被六碳醣激酶(hexokinase) 代謝為 2-deoxy-glucose-6-phosphate 並堆積於細胞內，此作用使得觀察者能順利捕捉該放射性受質進入細胞內的量(Cunningham and Cremer, 1981)。若以放射性標記之葡萄糖為追蹤受質，則會因其可代謝成可移出胞外之產物，如: H_2O 而干擾觀察結果。

於一般進行葡萄糖運輸系統之活性研究時，對於葡萄糖運輸系統之觀察，常以 ^3H 標記之 2-deoxy-glucose 或 3-O-methylglucose 追蹤細胞運輸葡萄糖的情形。過去有學者將由老鼠分離出之脂肪細胞，分別以 [^3H]-2-deoxyglucose 及 [^{14}C]-3-O-methylglucose 測試葡萄糖之運輸速率，結果發現兩者在運輸速率上，並無差異存在(Traxinger and Marshall, 1990)，故本研究僅以 [^3H]-2-deoxyglucose 追蹤細胞運輸葡萄糖的情形。

此外為校正非專一性運輸之干擾，故本研究以 2-deoxy-D- [^3H]-glucose 追蹤總葡萄糖之攝取量，均將扣除在 0.3 mM phloretin 存在下，所測得之細胞沉澱物放射量。Phloretin (2', 4', 6', 4-tretrahydroxydihydrochalcone)

可抑制專一性葡萄糖之運輸 (specific sugar transport inhibitors)，0.3 mM 之 phloretin 可有效抑制葡萄糖運輸系統活性 (Vasianin, 1989)。

另外，在觀察六碳醣胺受質對葡萄糖運輸之研究方面，主要參考過去學者在 3T3-L1 脂肪細胞之實驗設計 (Hresko et al., 1998)，將活化之淋巴細胞，於不同濃度六碳醣胺受質之培養液中，添加胰島素進行預培養，主要目的為胰島素可增加細胞膜表面之葡萄糖運輸裝置，促進葡萄糖運輸到細胞內，以利六碳醣胺之生成。將細胞以 PBS 清洗後，再加入胰島素培養 30 分鐘，以利實驗之觀察。

五. 研究目的

本研究主要以體外研究之模式，瞭解在正常及高葡萄糖/穀氨醯胺濃度下，對活化之淋巴細胞複製功能及葡萄糖運輸系統之影響，以及其葡萄糖運輸作用受胰島素調控之情形。

參. 實驗材料

一. 化學試藥：

Albumin Bovine (nitrogen content 16.0)：購自美國 Sigma 公司

Alcohol (95 %)：購自台灣省煙酒公賣局

Antibiotic (Penicillin : 10000 Units/ml, Streptomycin : 10 mg/ml)：

購自 Biological Industries

Calcium Chloride Anhydrous Powder (95 %)：購自日本昭和公司

Concanavalin A：購自美國 Sigma 公司

Cupric Sulfate (98 %)：購自美國 Sigma 公司

Diagnostics：密度 1.077, 購自美國 Sigma 公司

D (+) - glucose：購自美國 Sigma 公司

2- deoxy-D- $[^3\text{H}]$ -glucose (1 mCi/ml)：購自英國 Amersham 公司

Fetal Bovine Serum (FBS)：購自 Hyclone Laboratorise, Inc

Folin ciocalteu's phenol reagent：購自美國 Sigma 公司

Insulin：購自美國 Sigma 公司

L - glutamine (99 %)：購自美國 Sigma 公司

Magnesium Chloride (98 %)：購自日本昭和公司

Phloretin：購自美國 Sigma 公司

Potassium Chloride (70 %)：購自美國 Fisher 公司

Potassium Dihydrogenphosphate (99 %)：購自日本昭和公司

Potassium Hydorxide (85 %)：購自日本昭和公司

Potassium Sodium Tartrate Tetrahydrate (99.5 %) : 購自日本昭和
公司

RPMI - 1640 (without L - glutamine) : 購自 Biological Industrise

Silicone fluid : Dow Corning 550

Phthalic Acid Dinonyl Ester 購自日本昭和

Sodium Carbonate Decahydrate (99.5 %) : 購自日本昭和

Sodium Chloride (99.9 %) : 購自美國 TEDIA 公司

Sodium Hydroxide : 購自日本和光公司

Sodium Phosphate Dibasic Hephthydrate (100.2 %) : 購自日本昭和
公司

[6 - H³] - Thymidine (1 mCi/ml) : 購自英國 Amersham 公司

Trisodium Citrate Dihydrate (99 %) : 購自日本昭和

Trypan blue solution (0.4 %) : 購自美國 Sigma 公司

二. 儀器設備 :

1. 無菌操作台

Laminar flow, NUAIR Biological Ssfety 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, U3000, Hitach, Japan

6. 血球計數板 (Hemocytometer), 計數器 (Counter)

7. 細胞收集器

Semiautomatic Cell Harvester, Skatron, England

8. 閃爍偵檢器

Liquid Scitillation Analyzer, packard 2100 TR

9. 水浴槽

Shaker Bath BT – 150

三. 實驗動物 :

自國家科學委員會動物中心購入 6 ~ 8 週齡 (150 ~ 200 g), 雄性 Wistar 大白鼠, 飼育於標準動物室。動物飼養條件為自動空氣調節(換氣率每小時 12 次), 自動光照控制(光照 / 黑夜各 12 小時), 室溫控制於 25 °C、相對濕度 55%。動物餵給自來水及標準大鼠飼料(自由取食)至動物適應環境後犧牲(體重約 200 ~ 250 g)。

肆. 實驗方法

一. 初代淋巴細胞製備

(1) PBS (phosphate – buffered saline) 之製備

將下表中的成份於室溫下溶於二次水中，溶解後以 KOH 調 pH 至 7.2~7.4，予以滅菌。

本研究所使用之 PBS 組成如下：

試藥	終濃度 (g/l)
NaCl	8.0
KCl	0.2
Na ₂ HPO ₄	0.24
KH ₂ PO ₄	1.44

(2) 淋巴細胞之製備

大白鼠以 CO₂ 犧牲後，取出頸部淋巴結。將取出的淋巴結立即放入裝有無菌 PBS 的離心管中，然後用不鏽鋼網狀研磨器將淋巴結組織撕磨碎，如此可自淋巴結釋放出大量能存活之淋巴細胞。以濾紙將多餘脂肪及結締組織的碎片去除，並用 PBS 將細胞洗入離心管中，均勻混合後在 18 °C 以 400× g 離心 10 分鐘。將沉澱下來的細胞再懸浮於 PBS 中後，以上述條件再離心，反覆的以同樣步驟沖洗細胞共兩次。

將沉澱下來的細胞懸浮於 PBS ，再將所得之富含淋巴細胞之細胞懸浮液沿著管壁，緩慢加至裝有 Ficoll - Hypaque 密度梯度溶液(密度 1.077 kg/m^3)離心管中，使該細胞懸浮液覆蓋於淋巴細胞分離液之上。將上述的離心管以 $400\times g$ 的速度離心 15 分鐘，離心後由於比重的不同，會在 PBS 懸浮液和密度梯度溶液之間有明顯的淋巴細胞集中現象。

用滴管將這些集中的淋巴細胞移到另外的離心管中，加入 PBS 使細胞懸浮後，再以 $400\times g$ 離心 10 分鐘，移除上清液後，以 RPMI - 1640 沖洗沉澱在底層的淋巴細胞，再離心 10 分鐘後，去除上清液，加入 1 ml RPMI - 1640 ，以滴管重複吸放數次，使細胞懸浮分散均勻，並計算每毫升中所含細胞數目。

(3) 淋巴細胞計數之方法

將上述細胞懸浮液經適當稀釋倍數後，以 1:1 (v/v) 與染色劑(trypan blue)均勻混合，吸取適當量於血球計數板上，置於相位差顯微鏡下觀察計數。若整個細胞被染成藍色，則表示由於細胞膜不完整，而造成染劑進入細胞內，此代表細胞死亡。無上述情形者，則視為存活之細胞。

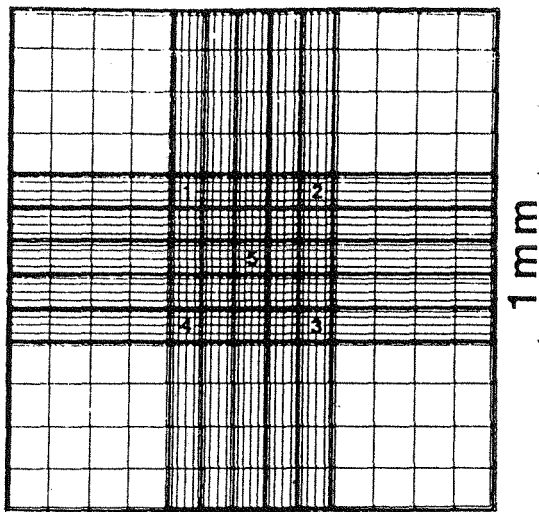
細胞總數計算方法：

$$\begin{aligned} & \text{角落四大格淋巴細胞數} \times 1/4 \times 10^4 \times \text{稀釋倍數} \\ & = \text{每毫升細胞數} \end{aligned}$$

細胞存活率計算方法：

$$\begin{aligned} & (\text{淋巴細胞總數} - \text{細胞死亡數}) / \text{淋巴細胞總數} \times \\ & 100\% = \text{細胞存活率} \end{aligned}$$

經上述方法所製備之淋巴細胞以 trypen blue 測定，存活率需達 95% 以上。



二. 淋巴細胞之活化

將製備出之淋巴細胞懸浮於以 RPMI - 1640 為基礎之標準培養液中，該培養液中包含終濃度 2 mM glutamine、10 % FBS、1 % 抗生素(含 streptomycin 及 penicillin)。另外，為活化 T - 淋巴細胞，於培養液中加入 5 μ g / ml concanavalin A (Con A)，根據先期試驗發現，此為使淋巴細胞複製率達最大所需之最小 Con A 濃度。上述培養液於使用前以無菌過濾膜

過濾。培養時將密度調整為 5×10^6 cell / ml 之細胞懸浮液放入 75 cm^2 之細胞培養瓶中，再置入二氧化碳培養箱，於 37°C ，5 % CO_2 培養 24 小時備用(用於 glucose transport 之研究)。

三.不同葡萄糖與穀氨醯胺濃度對 Con A 活化淋巴細胞之影響

本研究利用三種方法，測試不同濃度葡萄糖與穀氨醯胺對淋巴細胞之影響。

方法一： 利用有 ^3H (tritium)標記的 thymidine 併入細胞內 DNA 中的量，當作淋巴細胞複製的指標。每個 well 加入 $0.2 \mu\text{Ci}$ [$6 - ^3\text{H}$] 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)。

將製備出之淋巴細胞，懸浮於培養液中，並製成密度 2.5×10^6 cell / ml 之懸浮液。該培養液以 RPMI - 1640 為基質，其中含有：10 % FBS、1 % 抗生素(含 Penicilline 及 Streptomycine)並加入促 T-淋巴細胞分裂素(Con A) $5 \mu\text{g}$ / ml 活化 T 細胞。實驗分為三組：第一組於培養液中不另外添加葡萄糖，

但加入 0 至 10 mM 之穀氨醯胺 (0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 mM)；第二組於培養液中另外添加 20 mM 葡萄糖，且加入 0 至 10 mM 穀氨醯胺；第三組於培養液中另外添加 40 mM 葡萄糖，以及 0 至 10 mM 穀氨醯胺。

將上述之細胞懸浮液種於 96 孔培養盤 (0.2 ml / well)，並培養於二氧化碳恆溫箱中(37 °C)。培養 48 小時後，加入[6 - ³H] thymidine 至培養液中，然後繼續培養 18 小時。利用半自動細胞收集器以甲醇沖洗，將細胞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 2 ml 閃爍計數液。以閃爍偵檢器檢測 1 分鐘，測定併入濾紙上之細胞內 DNA 的放射量，其放射量以 cpm 表示。

方法二： 將製備出之淋巴細胞 (2.5×10^6 cell / ml)，培養於以 RPMI - 1640 為基質之培養液，其中含有：10 % FBS、1 % 抗生素(含 Penicilline 及 Streptomycine) 並加入促 T-淋巴細胞分裂素(Con A) $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ 活化 T 細胞。實驗分為四組：第一組培養液中另外添加 20 mM 之葡萄糖，但不添加穀氨醯胺；第二組於培養液中另外添加 20 mM 葡萄糖，且加入 10 mM 穀氨醯胺；第三組及第四組於培養液中皆不另外添加葡萄糖，但於第四組中另外加入 10 mM 穀氨醯胺。將細胞種於 96 孔培養盤，培養於二氧化碳恆溫箱

中 66 小時後，觀察細胞數之變化，並檢測其蛋白質量。由於在 RPMI-1640 培養液中，原來存在 10 mM 葡萄糖，故於額外添加葡萄糖之組別中，均已含 10 mM 葡萄糖。

四. 葡萄糖運輸系統線性初速率之時間觀察

葡萄糖之運輸速率，係以 silicone oil - layer 方法 (Pozueta et al., 1991)，測定細胞對葡萄糖攝取之初速率，於 1.5 ml 離心管中測定。取方法二中所述，經過 24 小時 Con A 活化，以及培養後之淋巴細胞進行觀察。測定葡萄糖運輸速率前需先製備含 silicone oil - layer 之微量離心管。製備方法如下：每一個離心管中，先在底層加入 40 μ l 20% 蔗糖溶液，並於其上鋪一層 400 μ l silicone oil 混合液，此離心管之作用為利用比重不同，可有效將細胞及培養液分開。

實驗進行時，首先將細胞懸浮液及培養液，分別於 37 $^{\circ}$ C 預熱 5 分鐘。實驗開始時，將已預熱之細胞懸浮液(密度為 2×10^7 cell / 管)，預培養於含 25 ng / ml 胰島素之 PBS (含 1% BSA) 中，37 $^{\circ}$ C, 30 分鐘。然後加入含 0.6 μ Ci 之 2-deoxy-D-[3 H] glucose (受質葡萄糖終濃度為 0.1 mM) 之培養液，於作用時間分別為 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 7.5, 10, 15 分鐘時結束作用之後，取出細胞懸浮液和培養液之混合液，

加至前述微量離心管中之 silicone oil layer 之上，接著離心 50 秒，可使細胞沉澱至蔗糖溶液層(離心管底部)，而培養液仍浮於油層上方。將離心後之 1.5 ml 離心管投入液態氮中，待冷凍後將含細胞沉澱物之蔗糖層剪下，置於含 0.1 N NaOH 之試管中分解細胞。於 4°C 下放置隔夜以溶胞，然後取出部分以閃爍計數器測其中 ^3H 放射量，另取出部分以 Lowry's 方法定量蛋白質。細胞於不同作用時間下，攝取受質之速率經計算後，結果以每單位時間、每單位細胞蛋白質攝取葡萄糖之速率表示(nmol 受質 / min / mg. 蛋白質)。

另外，為校正因非專一性運輸裝置(non-specific transporter)之干擾，包括：捕捉於細胞沉澱物中之總放射量，尚包含捕捉於細胞沉澱物間的放射性受質，其會干擾觀察結果，故總 2-deoxy-D- ^3H -glucose 之攝取量均將扣除在 0.3 mM phloretin 存在下，所測得之細胞沉澱物放射量。

(1) 蛋白質濃度測定 (Lowry et al, 1951):

a. 原理

本測定係以 Lowry's 方法進行，利用鹼處理，使蛋白質水解成氨基酸，而氨基酸上之-COOH 可與 Cu^{2+} 作用，並藉由 Folin reagent 呈色，故可得知蛋白質濃度。

b. 試劑配製

Soln A : 2 % Sodium Carborate Decahydrate

0.4 % NaOH

0.16 % Potassium Sodium Tartrate Tetrahydrate

Soln B : 4 % Cupric Sulphate

Soln C : A : B = 50 : 1 (volume)

Soln D : Folin – ciocalteu's phenol reagent : 1 N NaOH
= 1 : 1 (volume)

c. 分析法

將 0.1 ml 之 sample 加 1 ml 之 Soln C 混合在 cuvette 中放置 10 分鐘，再加 0.1 ml 之 Soln D 混合放置 45 分鐘後，利用分光光度計，於波長 660 nm 吸光值下，測定蛋白質濃度。

d. 標準曲線之製作

配製濃度為 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg / ml 之 BSA ，以上述方法測定。所得反應曲線如圖一。

e. 計算

欲測樣品中蛋白質含量之計算，以內插法由標準曲線進行。

(2) 葡萄糖攝取速率之計算方法：

利用相同濃度之受質有相同比活性而求得單位時間、單位蛋白質之運輸，計算方法如下：

a. 取 10 μ l 含放射性標記之培養液，再加入 490 μ l

- 0.1 N 之 NaOH 及閃爍計數液，以閃爍偵檢器測其放射量(cpm)。
- b. 經由體積莫耳濃度推算出 10 μ l 不同葡萄糖濃度培養液之莫耳數。
 - c. 由莫耳數除以所測得之放射量即為不同葡萄糖濃度下之比活性。
 - d. 由前述以 0.1 N NaOH 分解之細胞溶胞溶液中，取出 0.5 ml，加入閃爍計數液得放射量;另外取出 0.1 ml 以 Lowry 法測得蛋白質含量。
 - e. 藉由 d. 測得之放射量 \times c. 獲得之比活性，可推得在不同濃度的葡萄糖存在下，其進入細胞內之莫耳數。
 - f. 將所得之莫耳數，除以利用 Lowry 法測得之蛋白質量與反應之時間，即為葡萄糖之運輸速率。

五. 不同葡萄糖與穀氨醯胺濃度對葡萄糖運輸系統之影響

取方法二中所述，經過 24 小時 Con A 活化，及培養之淋巴細胞，以 PBS 清洗細胞 4 次後，培養於以 RPMI - 1640 為基礎之標準培養液中，添加 250 ng / ml 之胰島素及 1 % BSA。將實驗分為四組：第一組培養液中另外添加 20 mM

之葡萄糖，但不添加穀氨醯胺；第二組於培養液中另外添加 20 mM 葡萄糖，且加入 10 mM 穀氨醯胺；第三組及第四組於培養液中皆不另外添加葡萄糖，但於第四組中另外加入 10 mM 穀氨醯胺，在 37 °C 下培養 6 小時及 24 小時。

細胞經上述培養後予以清洗，接著取清洗後之細胞 (2×10^7 cell/ml) 分別培養於含 0 至 250 ng/ml 胰島素之 PBS (含 1% BSA) 中，37 °C，30 分鐘。然後加入 2-deoxy-D-[³H] glucose (受質葡萄糖終濃度為 0.1 mM)，其作用時間之選擇為根據方法四中所得之結果。於結束作用之後，取出細胞懸浮液和培養液之混合液，利用前面所述之 silicone oil - layer 及 Lowry's 方法進行觀察。細胞攝取受質之速率經計算後，結果以每單位時間、每單位細胞蛋白質攝取葡萄糖之速率表示 (nmol 受質 / min / mg. 蛋白質)。

六.不同胰島素濃度對淋巴細胞之葡萄糖運輸作用之影響

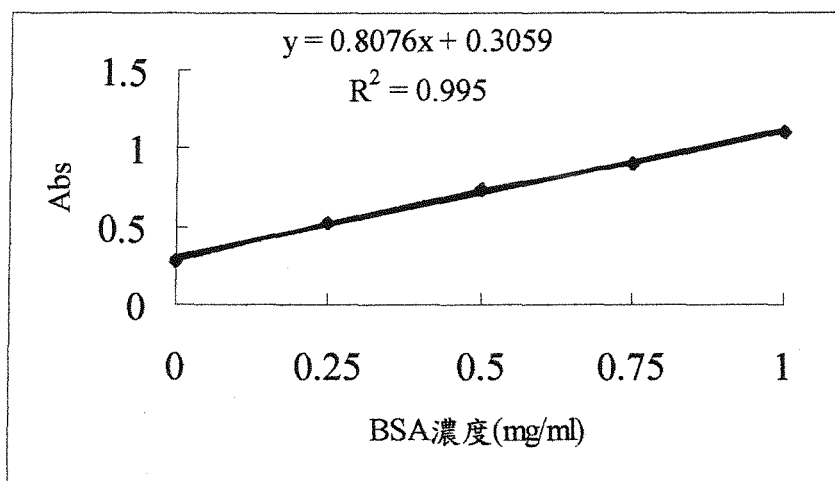
取方法二中所述，經過 24 小時 Con A 活化,及培養之淋巴細胞，以 PBS 清洗細胞 4 次後，培養於以 RPMI - 1640 為基礎之標準培養液中，添加 250 ng / ml 之胰島素及 1% BSA, 在 37 °C 下培養 6 小時。

細胞經上述培養後予以清洗，接著取清洗後之細胞 (2

$\times 10^7$ cell / ml) 分別培養於 0 至 250 ng / ml 胰島素之 PBS (含 1 % BSA) 中，37 °C, 30 分鐘。作用開始時，加入 2-deoxy-D-[³H] glucose (受質葡萄糖終濃度為 0.1 mM)，於結束作用後，取出細胞懸浮液和培養液之混合液，根據前面所述之 silicone oil - layer 及 Lowry's 方法進行觀察。細胞攝取受質之速率經計算後，結果以每單位時間、每單位細胞蛋白質攝取葡萄糖之速率表示 (nmol 受質 / min / mg. 蛋白質)。

七. 統計分析

每一數據均以 3 至 5 個測量值之平均值 \pm 標準誤差表示。不同試驗組間之顯著差異以 Student's t - test 分析之 ($p < 0.05$)。



圖一. 蛋白質濃度測定標準曲線之製作。

Fig. 2 The standard curve of protein concentration.

以 0 mg/ml、0.25 mg/ml、0.5 mg/ml、0.75 mg/ml、1 mg/ml 濃度的 BSA，在波長 660 nm 下測得吸光值，以 BSA 之濃度對其吸光值作圖，求出趨勢線方程式： $y = 0.8076x + 0.3059$ ($R^2 = 0.995$)

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探討

本研究於先期實驗，以 [³H] thymidine 併入細胞內 DNA 的量當作淋巴細胞複製率之指標，測試最適淋巴細胞複製之 Con A 濃度。結果發現，給予不同濃度的 Con A 刺激時，淋巴細胞複製率均與不添加 Con A 之複製率有顯著性差異 ($p < 0.05$)。並且比較各個不同的 Con A 濃度之細胞複製率，發現亦有差異性 ($p < 0.05$)，顯示在不同濃度之 Con A 刺激下，會有不同的複製結果。

正常大鼠淋巴細胞於 Con A $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ (終濃度) 刺激下，培養 48 小時，可以達到最大細胞複製率。而之後隨著 Con A 濃度的增加，淋巴細胞複製率亦隨之下降，且當其濃度提升至 $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ 以上時，發現細胞複製率較無添加時為低。因此本研究皆以 Con A $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ 濃度來活化淋巴細胞(圖一)。

二. 不同葡萄糖與穀氨醯胺濃度對 Con A 活化淋巴細胞之影響

本研究利用三種方法來測試不同濃度葡萄糖與穀氨醯胺對淋巴細胞之影響。首先將活化之淋巴細胞分別培養於含有不同葡萄糖及穀氨醯胺濃度之培養液中，利用 [³H]thymidine 併入細胞內 DNA 中的量，來觀察不同葡萄糖與穀氨醯胺濃度對淋巴細胞複製的影響。由於 RPMI-1640 培養液中，存在 10 mM 葡萄糖，故於額外添加葡萄糖之組別中，均已含 10 mM 葡萄糖。

結果發現，添加不同濃度之穀氨醯胺，淋巴細胞複製率皆顯著高於未添加穀氨醯胺時之複製率 ($p < 0.05$)。約在 0.5 ~ 2 mM 濃度範圍之穀氨醯胺培養下，其淋巴細胞之複製率達到最大，但之後隨著穀氨醯胺濃度的增加，淋巴細胞複製率會隨之下降，並且在不同的葡萄糖濃度下 (10, 30, 50 mM)，皆發現有同樣的現象 (圖二、三、四)。而在固定的穀氨醯胺濃度下 (0, 2, 6, 10 mM)，隨著培養液中葡萄糖濃度之增加，淋巴細胞複製率亦隨之降低。並且在不同的穀氨醯胺濃度下，皆有同樣的現象 (圖五)。由以上結果可知，培養液中含穀氨醯胺濃度 2 mM，葡萄糖濃度 10 mM 時，為淋巴細胞達到最大細胞複製率之培養條件。但當葡萄糖

及穀氨醯胺濃度皆提高時，隨著兩者濃度之增加，反而有使淋巴細胞複製率下降之現象。

方法二為將製備之淋巴細胞分別培養於不同葡萄糖及穀氨醯胺濃度之培養液中，將實驗分成四組：第一組為含 30 mM 葡萄糖，不含穀氨醯胺；第二組為含 30 mM 葡萄糖及 10 mM 穀氨醯胺；第三組與第四組皆含 10 mM 葡萄糖，而第四組另添加 10 mM 穀氨醯胺。於二氧化碳恆溫箱培養 66 小時後，觀察細胞數之變化，並檢測其蛋白質量。

由表一之結果發現，在第三組無另外添加葡萄糖及穀氨醯胺之條件，在經 66 小時培養後，其細胞數明顯較其他三組為低($p < 0.05$)。而在蛋白質量的檢測方面，在第二及第四組有另外添加穀氨醯胺的條件下，細胞蛋白質量皆顯著高於其他兩組($p < 0.05$)。並且在第四組，含 10 mM 之葡萄糖，其蛋白質量顯著高於第二組，含 30 mM 之葡萄糖($p < 0.05$)。

由以上結果可知，穀氨醯胺的添加，可促進淋巴細胞之複製作用，但隨著所含葡萄糖濃度的增加，會使淋巴細胞之複製率降低，此與方法一之結果相符。並且由表一之結果可知， $[^3\text{H}]$ thymidine 併入細胞內 DNA 中的量為淋巴細胞進行複製之結果。

三. 葡萄糖運輸系統線性初速率之時間觀察

先期實驗尋求葡萄糖運輸線性初速率之反應時間範圍。製備之淋巴細胞經 Con A 活化 24 小時後，加入含 2-deoxy-[³H]glucose 之培養液，觀察由 0 至 15 分鐘之各作用時間點(0, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 7.5, 10, 15 分鐘)下，葡萄糖之運輸速率。由圖六結果可知，葡萄糖的運輸速率會隨著反應時間的增加而增加，顯示在這些所觀察的反應時間點，葡萄糖之運輸維持於一初速率範圍，因此本研究以下對淋巴細胞葡萄糖運輸系統之觀察，皆以加入 2-deoxy-[³H]glucose 反應 7.5 分鐘，作為 glucose 之反應時間。

四. 不同葡萄糖與穀氨醯胺濃度對葡萄糖運輸系統之影響

淋巴細胞經 Con A 活化後，培養於以 RPMI - 1640 為基礎之標準培養液中，添加 250 ng / ml 之胰島素及 1 % BSA。並將實驗分為四組：第一組培養液中另外添加 20 mM 之葡萄糖，但不添加 glutamine；第二組於培養液中另外添加 20 mM glucose，且加入 10 mM

glutamine ; 第三組及第四組於培養液中皆不另外添加 glucose , 但於第四組中另外加入 10 mM glutamine , 分別預培養 6 小時(圖七、圖八)及 24 小時(圖九、圖十)來觀察不同濃度葡萄糖及穀氨醯胺, 對淋巴細胞的葡萄糖運輸速率之影響。

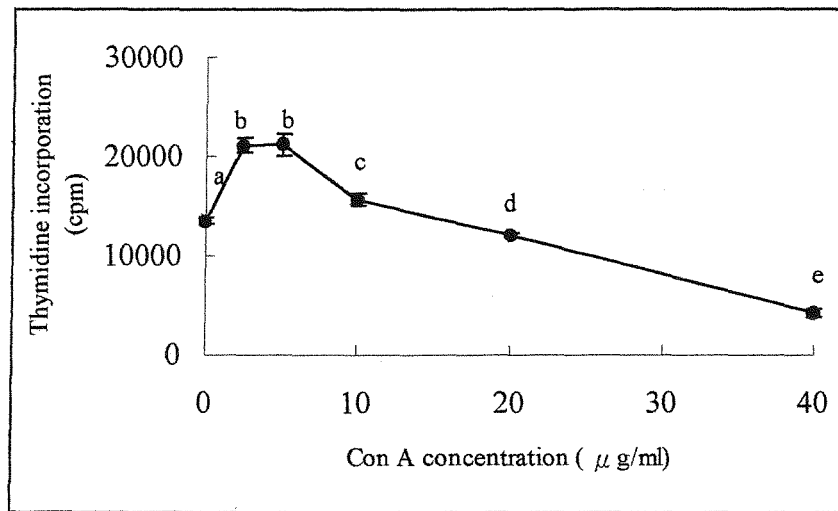
圖七之結果為總葡萄糖運輸速率, 未扣除經 phloretin 抑制下之葡萄糖運輸速率, 而圖八之結果則為淨葡萄糖運輸速率, 已扣除經 phloretin 抑制下之葡萄糖運輸速率。由圖七與圖八之結果發現, 在第二及第四組, 另外添加 10 mM glutamine 之條件下, 淋巴細胞對葡萄糖之運輸速率, 顯著高於第一及第三組之無另外添加穀氨醯胺者($p < 0.05$)。顯示穀氨醯胺的添加可促進淋巴細胞的葡萄糖運輸。並由第二組(30 mM glucose)及第四組(10 mM glucose)之結果發現, 淋巴細胞之葡萄糖運輸作用, 在不同葡萄糖濃度下, 並無顯著性差異。

而圖九及圖十分別為未扣除經 phloretin 抑制下之總葡萄糖運輸速率, 及已扣除經 phloretin 抑制下之淨葡萄糖運輸速率。在圖九之結果顯示, 在第二及第四組, 另外添加 10 mM glutamine 之條件下, 淋巴細胞對葡萄糖之運輸速率, 亦顯著高於第一及第三組之無另外添加穀氨醯胺者($p < 0.05$)。而圖十之結果在扣除經

phloretin 抑制下之淨葡萄糖運輸速率後，四組間之葡萄糖運輸速率，並無統計上之顯著差異，但在第二及第四組，另外添加穀氨醯胺的條件下，其葡萄糖之運輸仍有高於其他兩組之趨勢。此現象與圖七、圖八經預培養 6 小時之結果相似。

五. 不同胰島素濃度對葡萄糖運輸系統之反應

淋巴細胞經活化後，在不同濃度胰島素(0, 1, 10, 25, 100, 250 ng/ml)下預培養 30 分鐘，然後加入含以 2-deoxy-[³H]glucose 標記之葡萄糖的培養液，來觀察淋巴細胞在不同濃度之胰島素，對葡萄糖運輸速率之反應。由圖十一之結果可發現，淋巴細胞在添加不同胰島素濃度下，不論是總葡萄糖運輸速率(未扣除經 phloretin 抑制下之葡萄糖運輸速率)或淨葡萄糖運輸速率(已扣除 phloretin 抑制下之葡萄糖運輸速率)，皆與無胰島素存在下沒有差異。

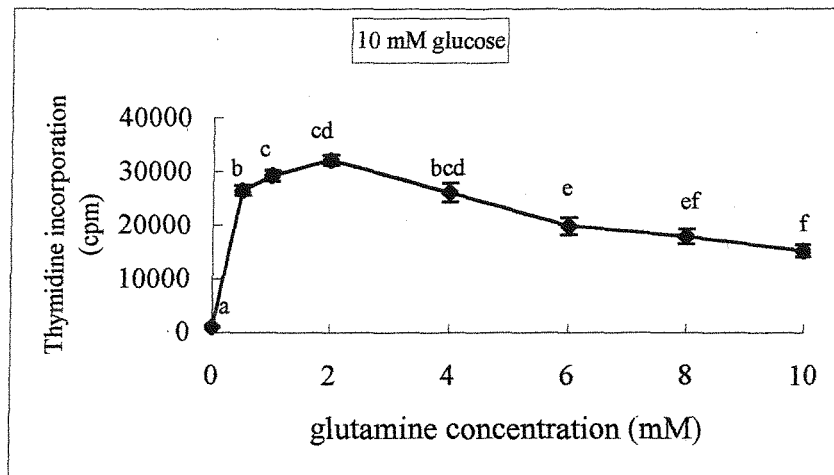


圖一. 大白鼠淋巴細胞於不同 Con A 濃度之淋巴複製率。

Fig. 1 The proliferation rate of lymphocytes from rats in the presence of various concentration of Con A.

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(0, 2.5, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 終濃度)，培養 48 小時後，加入 $[^3\text{H}]$ thymidine 再繼續培養 18 小時，測 ^3H 併入細胞內 DNA 之量以 cpm 表示。每個點表示重覆做 5 個 wells，數據表示方式為平均值 \pm 標準誤差。

a, b, c, d, e, f: 相同符號之數據間無顯著差異($P < 0.05$)。

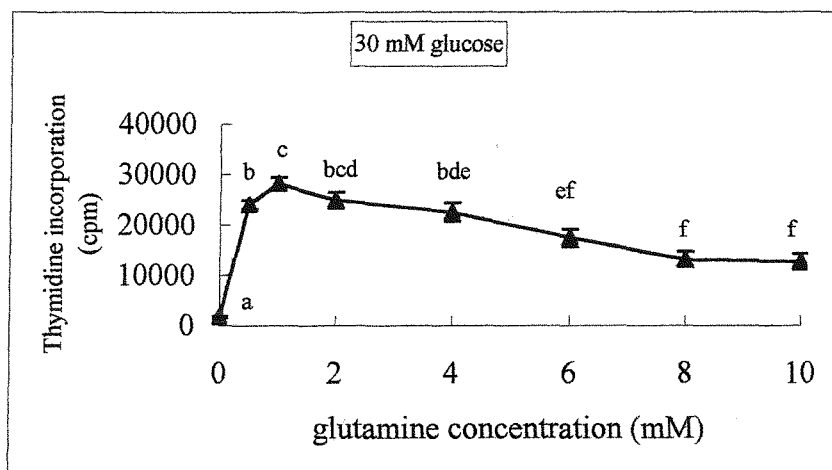


圖二. 大白鼠淋巴細胞於 10 mM 葡萄糖及不同濃度穀氨醯胺之淋巴細胞複製率。

Fig. 2 The proliferation rate of lymphocyte from rats in the presence of 10 mM glucose and various concentration of glutamine.

96 wells 培養盤，每個 well 約含 5×10^5 個細胞數，培養液以 RPMI-1640 為基質，其中含有 10 % FBS、1 % 抗生素，另外添加 0 至 10 mM glutamine (0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 mM)，培養 48 小時後，加入 [^3H] thymidine 再繼續培養 18 小時，測 ^3H 併入細胞內 DNA 之量以 cpm 表示。每個點表示重覆做 10 個 wells，數據表示方式為平均值 \pm 標準誤差。

a, b, c, d, e, f: 相同符號之數據間無顯著差異 ($P < 0.05$)。

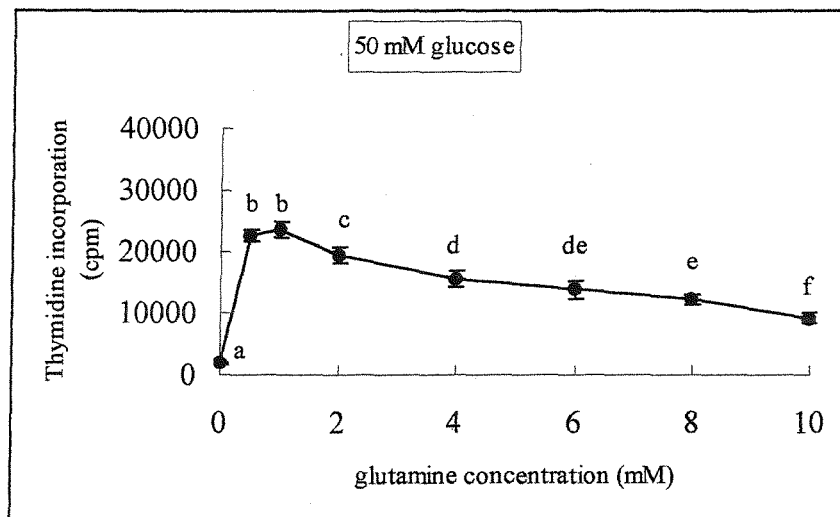


圖三. 大白鼠淋巴細胞於 30 mM 葡萄糖及不同濃度穀氨醯胺之淋巴細胞複製率。

Fig. 3 The proliferation rate of lymphocyte from rats in the presence of 30 mM glucose and various concentration of glutamine.

96 wells 培養盤，每個 well 約含 5×10^5 個細胞數，培養液以 RPMI-1640 為基質，其中含有 10 % FBS、1 % 抗生素，另外添加 20 mM glucose 及 0 至 10 mM glutamine (0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 mM)，培養 48 小時後，加入 $[^3\text{H}]$ thymidine 再繼續培養 18 小時，測 ^3H 併入細胞內 DNA 之量以 cpm 表示。每個點表示重覆做 10 個 wells，數據表示方式為平均值 \pm 標準誤差。

a, b, c, d, e, f: 相同符號之數據間無顯著差異 ($P < 0.05$)。

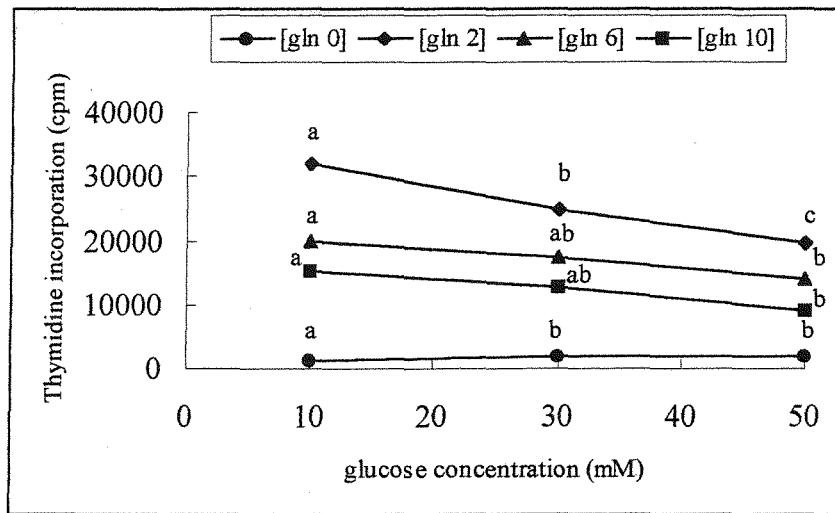


圖四. 大白鼠淋巴細胞於 50 mM 葡萄糖及不同濃度穀氨醯胺之淋巴細胞複製率。

Fig. 4 The proliferation rate of lymphocyte from rats in the presence of 50 mM glucose and various concentration of glutamine.

96 wells 培養盤，每個 well 約含 5×10^5 個細胞數，培養液以 RPMI-1640 為基質，其中含有 10 % FBS、1 % 抗生素，另外添加 40 mM glucose 及 0 至 10 mM glutamine (0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 mM)，培養 48 小時後，加入 $[^3\text{H}]$ thymidine 再繼續培養 18 小時，測 ^3H 併入細胞內 DNA 之量以 cpm 表示。每個點表示重覆做 10 個 wells，數據表示方式為平均值 \pm 標準誤差。

a, b, c, d, e, f: 相同符號之數據間無顯著差異 ($P < 0.05$)。



圖五. 大白鼠淋巴細胞於不同葡萄糖及穀氨醯胺濃度之淋巴細胞複製率。

Fig. 5 The proliferation rate of lymphocyte from rats in the presence of various concentration of glucose and glutamine.

葡萄糖濃度為 10, 30, 50 mM，穀氨醯胺濃度為 0, 2, 6, 10 mM。數據取自圖二、圖三、圖四。

a, b, c: 相同符號之數據間無顯著差異($P < 0.05$)。

表一. 不同葡萄糖及穀氨醯胺濃度對活化淋巴細胞數目及蛋白質含量之影響。

Fig. 1 The effect of various concentration of glucose and glutamine on number and protein content of activated lymphocytes.

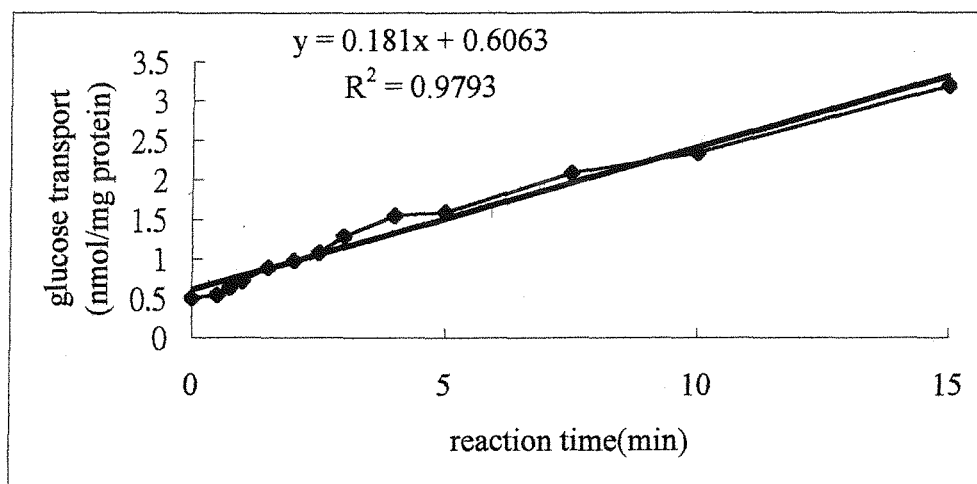
組別	細胞數目($\times 10^5$ 個)/well	蛋白質(μg)/well
1	—	24 ± 0.3^a
2	8.93 ± 0.498^a	44 ± 1.9^b
3	6.22 ± 0.312^b	25 ± 0.9^a
4	8.95 ± 0.266^a	56 ± 0.5^c

96 wells 培養盤，每個 well 約含 5×10^5 個細胞數，培養液以 RPMI- 為基質，其中含有 10 % FBS、1 % 抗生素。組別 1: [glu] = 30 mM, [gln] = 0 mM; 組別 2: [glu] = 30 mM, [gln] = 10 mM; 組別 3: [glu] = 10 mM, [gln] = 0 mM; 組別 4: [glu] = 10 mM, [gln] = 10 mM，培養 66 小時後，計算細胞數目及測蛋白質量之結果。

數據表示方式為平均值 \pm 標準誤差。

每個數據表示重覆做 8 個 wells。

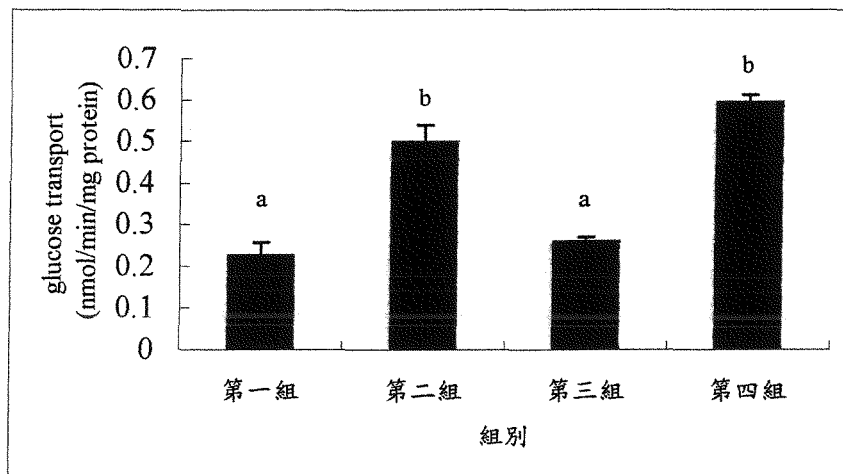
a, b, c: 相同符號之數據間無顯著差異($P < 0.05$)。



圖六. 葡萄糖運輸之反應時間。

Fig. 6 The timed reaction of glucose transport.

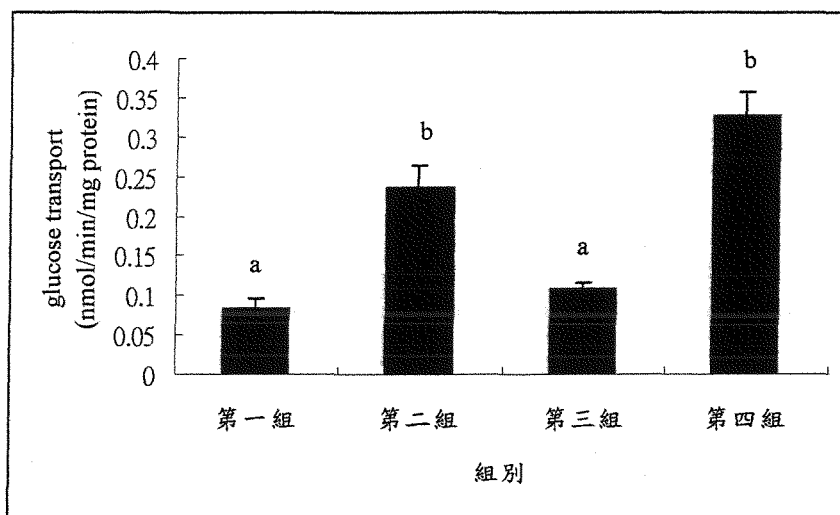
先期實驗尋求葡萄糖運輸線性初速率之反應時間範圍。製備之淋巴細胞經 Con A 活化 24 小時後，加入含 2-deoxy-[³H]glucose 之培養液，觀察由 0 至 15 分鐘之各作用時間點(0, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 7.5, 10, 15 分鐘)下，葡萄糖之運輸速率。



圖七. 不同葡萄糖(glu)與穀氨醯胺(gln)濃度對總葡萄糖運輸之影響。

Fig 7. The effect of various concentrations of glucose and glutamine on total glucose transport.

細胞經活化後於不同葡萄糖與穀氨醯胺濃度下培養 6 小時, 加入含 2-deoxy-[³H]glucose 之培養液, 觀察不同濃度葡萄糖及穀氨醯胺對葡萄糖運輸速率之反應。此為總葡萄糖運輸速率, 未扣除經 phloretin 抑制下之葡萄糖運輸速率。第一組: [glu] = 30 mM, [gln] = 0 mM; 第二組: [glu] = 30 mM, [gln] = 10 mM; 第三組: [glu] = 10 mM, [gln] = 0 mM; 第四組: [glu] = 10 mM, [gln] = 10 mM。數據表示方式為平均值±標準誤差。
a, b: 相同符號之數據間無顯著差異(P<0.05)。

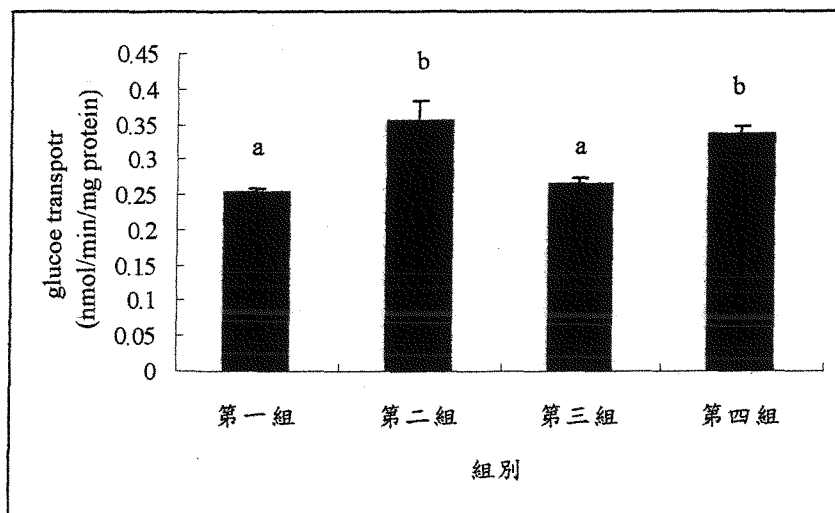


圖八. 不同葡萄糖(glu)與穀氨醯胺(gln)濃度對淨葡萄糖運輸之影響。

Fig 8. The effect of various concentrations of glucose and glutamine on net glucose transport.

細胞經活化後於不同葡萄糖與穀氨醯胺濃度下培養 6 小時, 加入含 2-deoxy- ^3H glucose 之培養液, 觀察不同濃度葡萄糖及穀氨醯胺對葡萄糖運輸速率之反應。此為淨葡萄糖運輸速率, 已扣除經 phloretin 抑制下之葡萄糖運輸速率。第一組: $[\text{glu}] = 30 \text{ mM}$, $[\text{gln}] = 0 \text{ mM}$; 第二組: $[\text{glu}] = 30 \text{ mM}$, $[\text{gln}] = 10 \text{ mM}$; 第三組: $[\text{glu}] = 10 \text{ mM}$, $[\text{gln}] = 0 \text{ mM}$; 第四組: $[\text{glu}] = 10 \text{ mM}$, $[\text{gln}] = 10 \text{ mM}$ 。數據表示方式為平均值 \pm 標準誤差。

a, b: 相同符號之數據間無顯著差異($P < 0.05$)。



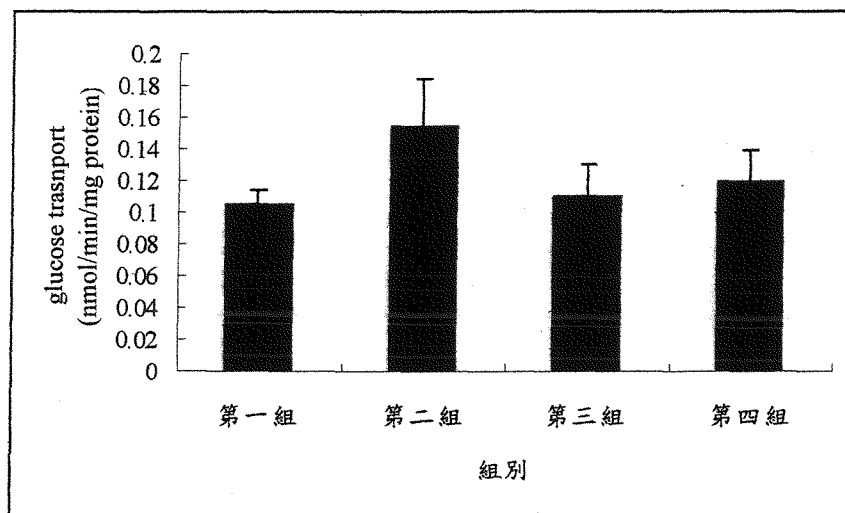
圖九. 不同葡萄糖(glu)與穀氨醯胺(gln)濃度對總葡萄糖運輸之影響。

Fig 9. The effect of various concentrations of glucose and glutamine on total glucose transport.

細胞經活化後於不同葡萄糖與穀氨醯胺濃度下培養 24 小時, 加入含 2-deoxy-[³H]glucose 之培養液, 觀察不同濃度葡萄糖及穀氨醯胺對葡萄糖運輸速率之反應。此為總葡萄糖運輸速率, 未扣除經 phloretin 抑制下之葡萄糖運輸速率。第一組: [glu] = 30 mM, [gln] = 0 mM; 第二組: [glu] = 30 mM, [gln] = 10 mM; 第三組: [glu] = 10 mM, [gln] = 0 mM; 第四組: [glu] = 10 mM, [gln] = 10 mM。

數據表示方式為平均值±標準誤差。

a, b: 相同符號之數據間無顯著差異(P<0.05)。



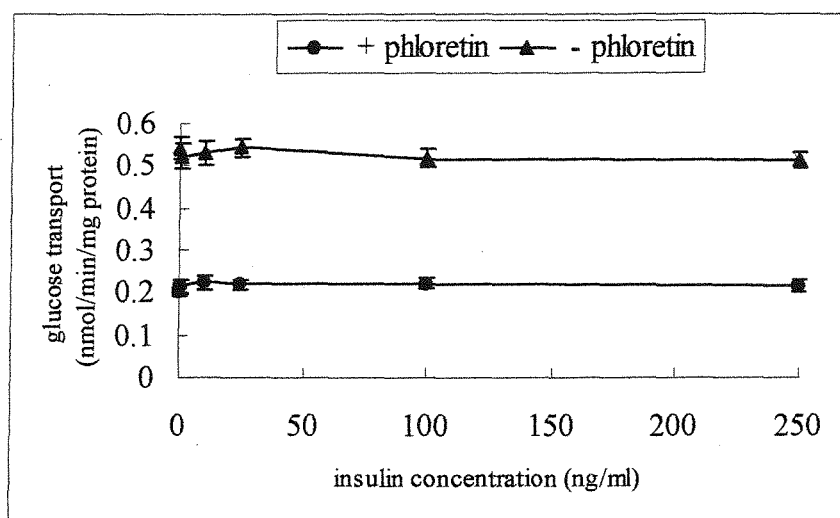
圖十. 不同葡萄糖(glu)與穀氨醯胺(gln)濃度對淨葡萄糖運輸之影響。

Fig 10. The effect of various concentrations of glucose and glutamine on net glucose transport.

細胞經活化後於不同葡萄糖與穀氨醯胺濃度下培養 24 小時，加入含 2-deoxy- ^3H glucose 之培養液，觀察不同濃度葡萄糖及穀氨醯胺對葡萄糖運輸速率之反應。此為淨葡萄糖運輸速率，已扣除經 phloretin 抑制下之葡萄糖運輸速率。第一組： $[\text{glu}] = 30 \text{ mM}$, $[\text{gln}] = 0 \text{ mM}$ ；第二組： $[\text{glu}] = 30 \text{ mM}$, $[\text{gln}] = 10 \text{ mM}$ ；第三組： $[\text{glu}] = 10 \text{ mM}$, $[\text{gln}] = 0 \text{ mM}$ ；第四組： $[\text{glu}] = 10 \text{ mM}$, $[\text{gln}] = 10 \text{ mM}$ 。

數據表示方式為平均值 \pm 標準誤差。

各組間數據皆無顯著差異 ($P < 0.05$)。



圖十一. 不同胰島素濃度對活化淋巴細胞之葡萄糖運輸系統
胰島素劑量反應。

Fig 11. Insulin dose response of glucose transport system in activated lymphocytes.

製備之淋巴細胞經 Con A 活化 24 小時後，在不同濃度胰島素(0, 1, 10, 25, 100, 250 ng/ml)下培養 30 分鐘後，加入含 2-deoxy- ^3H glucose 之培養液，觀察不同濃度胰島素對葡萄糖運輸速率之反應。- phloretin 表示總葡萄糖運輸速率，未扣除經 phloretin 抑制下之葡萄糖運輸速率; + phloretin 表示淨葡萄糖運輸速率，已扣除經 phloretin 抑制下之葡萄糖運輸速率。

數據表示方式為平均值± 標準誤差。

各組間數據皆無顯著差異。

陸、討論

一. Con A 濃度對大鼠淋巴細胞複製功能之影響

由圖一之結果可知，在不同濃度的 Con A 處理下，皆可活化淋巴細胞，刺激其進行細胞複製($p < 0.05$)。

Smith 等人(1980)指出，在分裂原刺激下，會促使輔助型 T 淋巴細胞(T_H)釋放出 T 細胞複製作用所必需的淋巴激素 IL-2。而 Weiss 等人(1984)，利用人類 T-淋巴細胞株(Jurkat)及 CD3-negative T-淋巴細胞株，以分裂原處理，探討分裂原活化 T-淋巴細胞之機轉。結果發現在 CD3-negative 的淋巴細胞株，其 IL-2 的產量遠低於 CD3 的淋巴細胞株。另外，Kaye 等人(1984)指出，在分裂原刺激下，T-淋巴細胞會在細胞表面表現大量 IL-2 接受器。由以上文獻可知，Con A 藉由 CD3 引發 IL-2 釋放，並同時增加 T-淋巴細胞表面 IL-2 接受器之表現，而促進 T-淋巴細胞的複製作用。

由於淋巴細胞對 Con A 之反應很類似對抗原刺激之反應，而開始淋巴細胞增殖作用。因此以 Con A 活化淋巴細胞可代表外來抗原對 T-細胞之刺激作用，並且細胞複製之能力，可當作其功能性之指標。

二. 不同葡萄糖與穀氨醯胺濃度對 Con A 活化淋巴細胞之影響

本研究以三種方法來觀察葡萄糖與穀氨醯胺濃度對淋巴細胞之影響。在利用 $[^3\text{H}]$ thymidine 併入細胞內 DNA 中的量，來觀察淋巴細胞複製情形，由圖二、圖三、圖四及圖五之結果可知，淋巴細胞在添加不同濃度之穀氨醯胺後，其 $[^3\text{H}]$ thymidine 併入細胞量相較無添加時有顯著增加($p < 0.05$)。Rohde 等人(1996) 觀察添加 0 到 20 mM 穀氨醯胺濃度(0, 0.3, 0.6, 1.0, 20 mM)，對 PHA 活化之單核球(mononuclear cells)複製功能的影響，發現在 0.3 ~ 1.0 mM 穀氨醯胺濃度下，其 $[^3\text{H}]$ thymidine 併入細胞量會增加，但當濃度提高至 20 mM 時，其 $[^3\text{H}]$ thymidine 併入細胞量則與未添加穀氨醯胺情況下，並無差異，此與本實驗之結果相似， $[^3\text{H}]$ thymidine 併入量會隨穀氨醯胺增加而有下降趨勢。由圖五可發現，未添加穀氨醯胺時， $[^3\text{H}]$ thymidine 併入細胞量，在 30 mM 葡萄糖濃度下，明顯高於 10 mM 葡萄糖濃度，顯示高葡萄糖狀態會促進淋巴細胞併入更多 $[^3\text{H}]$ thymidine。

而 Lorenzi 等人(1986)利用人類內皮細胞暴露於 30 mM 葡萄糖下，發現內皮細胞 $[^3\text{H}]$ thymidine 併入細

胞作用上升，並且 $[^3\text{H}]$ thymidine 併入作用上升可能是為了進行 DNA 修補，而不是細胞複製作用進行所致。為確認此是否與細胞複製有關，故又另外觀察淋巴細胞數目及蛋白質含量。由表一之結果可知，在添加穀氨醯胺的條件下，細胞數目及蛋白質量皆顯著高於無添加之組別($p < 0.05$)，顯示以 $[^3\text{H}]$ thymidine 併入細胞內 DNA 中的量，為用以進行淋巴細胞複製作用之結果，而非 DNA 修補。

在穀氨醯胺與胸腺細胞(thymocyte)功能之相關研究指出，以 LPS (lipopolysaccharide)活化胸腺細胞，並添加穀氨醯胺時發現，當添加濃度為 0.03 mM 時，就可促進胸腺細胞之複製($p < 0.05$)，並且隨著添加濃度的上升，當穀氨醯胺濃度為 2 mM 時，胸腺細胞複製率達到最大($p < 0.001$) (Wallace and Keast, 1992)。此與本實驗所得之結果相似，穀氨醯胺濃度為 2 mM 時可達到最大細胞複製功能。

另外在 1995 年有學者比較不同細胞數、不同分裂原及穀氨醯胺濃度，以及不同的培養時間，對觀察淋巴細胞複製結果之影響發現，不同濃度穀氨醯胺對於刺激細胞複製情形，會受培養之細胞數、分裂原濃度及培養時間的不同所影響。因此，所得到可促進最大細胞複製功能之穀氨醯胺濃度，會因培養條件的不

同而產生些許之差異性(Szondy, 1995)。

Rohde 等人(1996)在其研究結果中亦發現，穀氨醯胺的添加可促進 IL-2 及 IFN- γ (interferon- γ)之產生($p < 0.05$)，但若添加穀氨醯胺之前趨物(glutamate)，細胞複製及 IL-2、IFN- γ 的產生並不受影響，顯示淋巴細胞無法自行合成穀氨醯胺。由以上可知，T-淋巴細胞產生 IL-2 及 IFN- γ 需有穀氨醯胺之添加，這或許可以解釋在維持最佳淋巴細胞複製功能上，為何穀氨醯胺是必需的。另外 Yaqoob and Calder (1997)的研究指出，穀氨醯胺的添加，可促使 Con A 所活化的淋巴細胞所分泌的 IL-2 增加 2.7 倍，且其表現 IL-2 接受器的數量亦增加(由 30 %到 45%)。

由以上可知，適量的穀氨醯胺的確可增加 T-淋巴細胞之複製功能，但過高劑量的補充反而會降低淋巴細胞之複製功能。並且隨著葡萄糖濃度的增加，淋巴細胞複製率有隨之下降的趨勢。而 Traxinger 及 Marshall 等人(1990)研究指出，在脂肪細胞中，給予高濃度葡萄糖及穀氨醯胺時，此兩者可形成一聚合物，稱為 glucosamine，而當此聚合物存在時，會造成胰島素去敏感作用，而降低對葡萄糖的運輸，另一方面也會抑制胰島素二級訊息傳遞。在正常生理狀態下，胰島素經由與胰島素接受器結合，而引發一連串訊息

傳遞，進而調節多種生理功能，例如：葡萄糖運輸、蛋白質合成及細胞生長等(圖 2-1)。

Hresko 等人(1998)指出，glucosamine 可抑制胰島素活化的訊息傳遞，包括：胰島素接受器的自磷酸化、insulin receptor substrate-1 (IRS-1) 磷酸化、phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3 kinase) 活化作用。而 Welham 等人(1997)在淋巴細胞中的相關研究指出，IRS 磷酸化後會導致 PI-3 kinase、Grb2、Syp 等二級訊息傳遞途徑活化。因此，本實驗中所觀察到在高葡萄糖與穀氨醯胺存在下，淋巴細胞複製作用降低，其是否與葡萄糖及穀氨醯胺聚合成 glucosamine，抑制 IRS 磷酸化而阻斷下游二級訊息傳遞有關，有待進一步證實。並且在 glucosamine 形成途徑中，一關鍵酵素：GFAT 是否存在淋巴細胞中，至今仍無相關文獻報告，因此亦需做進一步觀察。

另一方面，在高濃度葡萄糖與穀氨醯胺條件下，所造成淋巴細胞複製率下降之現象，是否與抑制其葡萄糖運輸作用有關，則在以下進行探討。

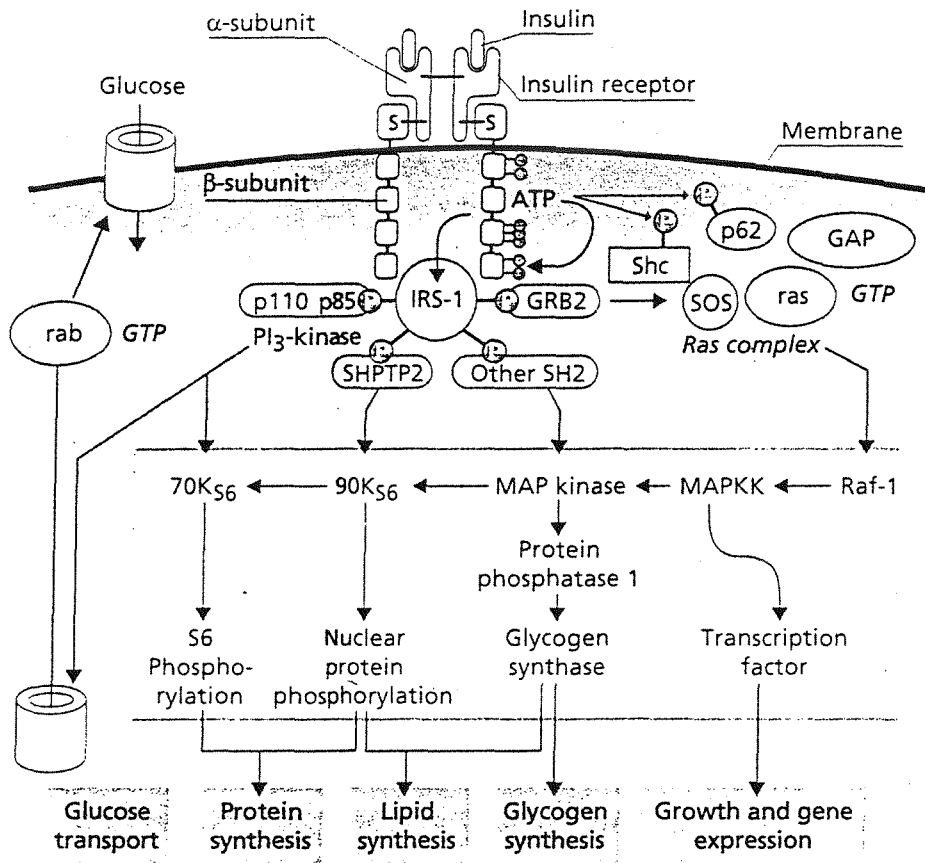


圖 2-1: 胰島素訊息傳遞途徑。

Fig 2-1: Insulin signaling pathway.

Adapted from Maratos-Flier et al. (1997)

三. 不同葡萄糖與穀氨醯胺濃度對葡萄糖運輸系統之影響

由圖五之結果發現，隨著葡萄糖與穀氨醯胺濃度增加，淋巴細胞複製率亦隨之下降，由於在脂肪及肌肉細胞中的研究指出，當葡萄糖大量進入細胞時，會經由 GFAT 作用形成葡萄糖胺，進而抑制葡萄糖的運輸作用 (Chem et al., 1997; Thomson et al., 1997; Robinson et al., 1993)。為了瞭解前面所觀察到淋巴細胞複製率的下降是否與此途徑有關，因此將淋巴細胞經活化後，培養於不同葡萄糖及穀氨醯胺濃度中，觀察其對葡萄糖運輸作用之影響。

由圖七及圖八，培養時間為 6 小時之結果顯示，不論是否在高葡萄糖濃度下，穀氨醯胺的添加，皆顯著提高淋巴細胞對葡萄糖的運輸作用 ($p < 0.05$)。並且在圖九及圖十，培養時間延長至 24 小時後，亦發現有同樣的情形。由此可知，在高濃度葡萄糖及穀氨醯胺條件下，造成淋巴細胞複製功能之降低，並非由於抑制其葡萄糖運輸功能所導致。

四. 不同濃度胰島素對葡萄糖運輸系統之反應

由圖十一之結果發現，淋巴細胞經 Con A 活化後，在不同濃度胰島素(0, 1, 10, 25, 100, 250 ng/ml)培養下，其葡萄糖運輸速率與無添加胰島素之運輸速率並無差異。在 Chakrabarti 等人(1994)以人類的周邊血液淋巴細胞，利用 Western 及免疫沉澱法發現，未活化的淋巴細胞可表現出 GLUT-2 及 GLUT-3 兩種葡萄糖運輸裝置，而在經 PHA 活化後，細胞會表現出 GLUT-1。

而在本實驗圖十一的結果中，發現活化後的淋巴細胞，其葡萄糖運輸系統並不受胰島素添加的影響，顯示在淋巴細胞中，可能不表現 GLUT-4，其葡萄糖運輸系統不受胰島素所調控。而之前有學者研究指出，在活化的 T-淋巴細胞中添加胰島素，可增加其對葡萄糖利用率(Helderman et al., 1981; Snow et al., 1985)。然而在本實驗中觀察到，胰島素並無法調控淋巴細胞之葡萄糖運輸作用，因此，活化之 T-淋巴細胞可能是經由其他途徑來提高葡萄糖之利用率。例如：在 Curto 等人(1990)研究中指出，胰島素可以活化淋巴細胞中的丙酮酸去氫酶複合體(pyruvate dehydrogenase complex)活性，而此複合體為丙酮酸進入 Krebs 循環

之速率限制酵素，在細胞能量代謝過程中扮演重要角色。另外在 1995 年，Tu 等人指出，胰島素也可活化淋巴細胞中甘油醇-3-磷酸去氫酶(glycerol-3-phosphate dehydrogenase)活性，促進甘油醇-3-磷酸產生，而進一步合成三酸甘油酯(triacylglycerol)。由於此兩種酵素參予葡萄糖之能量代謝作用，因此在淋巴細胞中，胰島素增加葡萄糖之利用率，可能與胰島素活化此兩種酵素，而增加其對葡萄糖代謝作用有關。

柒、結論

在高葡萄糖濃度下，給予適量濃度的穀氨醯胺(約 2 mM)可增加淋巴細胞複製率，但過高劑量穀氨醯胺(> 2 mM)的補充反而降低淋巴細胞之複製功能，因此在高血糖狀態下，補充穀氨醯胺應注意其劑量。而由淋巴細胞葡萄糖運輸系統之觀察結果可知，在高濃度之葡萄糖及穀氨醯胺條件下，造成淋巴細胞複製功能之降低，並非由於抑制其葡萄糖運輸功能所致，至於是否因細胞產生六碳醣胺產物造成，則需進一步證實。此外，由不同胰島素濃度對葡萄糖運輸系統之反應可知，淋巴細胞之葡萄糖運輸作用並不受胰島素所調控。

捌、參考文獻

張佩琳 (1997) 敗血症影響大白鼠淋巴細胞糖解及穀氨醯胺分解作用之探討，中山醫學院營養科學研究所碩士論文。

Alexander J. W. (1993) Immunoenhancement via enteral nutrition. *Arch. Surg.* 128: 1242-1245.

Allison J. P. and Lanier L. L. (1987) Structure, function, and serology of the T-cell antigen receptor complex. *Annu. Rev. Immunol.* 5: 503-540.

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

Ashy A. A., Salleh M. Araawi M. (1988) Glucose, glutamine, and ketone-body metabolism in human enterocytes. *Metabolism* 37: 602-609.

Bar R. S., Harrison L. C., Muggeo M., Gorden P., Kahn C. R. and Roth J. (1979) Regulation of insulin receptors in normal and abnormal physiology in humans. *Adv. Intern. Med.* 24: 23-53.

Baron A. D., Zhu J. S., Zhu J. H., Weldon H., Maianu L. and Garvey W. T. (1995) Glucosamine induces insulin resistance in vivo by affecting GLUT 4 translocation in skeletal muscle. Implications for glucose toxicity. *J. Clin. Invest.* 96: 2792-2801.

Bierer B. E., Slickman B. P., Ratnofsky S. E. and Burakoff S. J. (1989) The biological roles of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 579-599.

Bjorkman P. J., Saper M. A., Samraoui B., Bennett W. S., Strominger J. L. and Wiley D. C. (1987) The foreign antigen binding site and T-cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329: 512-518.

Boden G., Chen X., Ruiz J., White J.V. and Rossetti L. (1994) Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J. Clin. Invest.* 93: 2438-2446.

Bourey R. E., Koranyi L., James D. E., Mueckler M. and Permutt M. A. (1990) Effects of altered glucose homeostasis on glucose transporter expression in skeletal muscle of the rat. *J. Clin. Invest.* 86: 542-547.

Braciale V. L., Gavin J. R. 3d and Braciale T. J. (1982) Inducible expression of insulin receptors on T lymphocyte clones. *J. Exp. Med.* 156: 664-669.

Brand K., Williams J. F. and Weidemann M. J. (1984) Glucose and glutamine metabolism in rat thymocytes. *Biochem. J.* 221: 471-475.

Brand K. (1985) Glutamine and glucose metabolism during thymocyte proliferation. Pathways of glutamine and glutamate metabolism. *Biochem. J.* 228: 353-361.

Brand K., Leibold W. and Luppia P., Schoerner C. and Schulz A. (1986) Metabolic alterations associated with proliferation of mitogen-activated lymphocytes and of lymphoblastoid cell lines. Evaluation of glucose and glutamine metabolism. *Immunobiol.* 173: 23-34.

Brange J. and Langkjoer L. (1993) Insulin structure and stability. *Pharm. Biotechnol.* 5: 315-350.

Burant C. F., Treutelaar M. K., Block N.E. and Buse M. G. (1986) Structural differences between liver- and muscle-derived insulin receptors in rats. *J. Biol. Chem.* 261: 14361-14364.

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

Calderhead D. M., Kitagawa K., Tanner L. I., Holman G. D. and Lienhard G. E. (1990) Insulin regulation of the two glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 265: 13800-13808.

Cama A., Patterson A. P., Kadowaki T., Kadowaki H., Siegel G., D'Ambrosio D., Lillioja S., Roth J. and Taylor S. I. (1990) The amino acid sequence of the insulin receptor is normal in an insulin-resistant Pima Indian. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70: 1155-1161.

Caro J. F., Raju S. M., Sinha M. K., Goldfine I. D. and Dohm G. L. (1988) Heterogeneity of human liver, muscle, and adipose tissue insulin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151: 123-129.

Chakrabarti R, Jung CY, Lee TP, Liu H, Mookerjee BK. (1994) Changes in glucose transport and transporter isoforms during the activation of human peripheral blood lymphocytes by phytohemagglutinin. *J Immunol.* 152: 2660-8.

Cheatham B. and Kahn C. R. (1995) Insulin action and the insulin

signaling network.. *Endocr. Rev.* 16: 117-142.

Chen H., Ing B. L., Robinson K. A., Feagin A. C., Buse M. G. and Quon M. J. (1997) Effects of overexpression of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) and glucosamine treatment on translocation of GLUT4 in rat adipose cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 135: 67-77.

Chow A. and Zhang R. (1998) Glutamine reduces heat shock-induced cell death in rat intestinal epithelial cells. *J. Nutr.* 128: 1296-1301.

Clevers H., Alarcon B., Wileman T. and Terhorst C. (1988) The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu. Rev. Immunol.* 6: 629-662.

Collier E. and Gorden P. (1991) O-linked oligosaccharides on insulin receptor. *Diabetes* 40: 197-203.

Crofford O. B., Jeanrenaud B. and Renold A. E. (1965) Effect of insulin on the transport and metabolism of sorbitol by incubated rat epididymal adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 111: 429-439.

Culvenor J. G. and Weidemann M. J. (1976) Phytohaemagglutinin stimulation of rat thymus lymphocytes glycolysis. *Biochim. Biophys. Acta* 437: 354-363.

Cunningham V. J. and Cremer J. E. (1981) A method for the simultaneous estimation of regional rates of glucose influx and phosphorylation in rat brain using radiolabeled 2-deoxyglucose. *Brain Res.* 221: 319-330.

Curto M., Piccinini M., Marino C., Mostert M., Bruno R. and Rinaudo M. T. (1990) Pyruvate dehydrogenase activation by insulin in human circulating lymphocytes and the possible pathway involved. *Int. J. Biochem.* 22:99-106.

Cushman S. w. and Wardzala L. J. (1980) Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 255: 4758-4762.

Czech M. P. (1985) The nature and regulation of the insulin receptor: structure and function. *Annu. Rev. Physiol.* 47: 357-381.

de Beaux A. C., O'Riordain M. G., Ross J. A., Jodozi L., Carter D. C. and Fearon K. C. (1998) Glutamine-supplemented total parenteral nutrition reduces blood mononuclear cell interleukin-8 release in severe acute pancreatitis. *Nutrition* 14: 261-265.

DeFronzo R. A., Simonson D. and Ferrannini E. (1982) Hepatic and peripheral insulin resistance: a common feature of type 2 (non-insulin-dependent) and type 1 (insulin -dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 23: 313-319.

Depper J. M., Leonard W. J., Drogula C., Kronke M., Waldmann T. A. and Greene W. C. (1985) Interleukin 2 (IL-2) augments transcription of IL-2 receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82: 4230-4234.

Elahi D., Nagulesparan M., Hershcopf R.J., Muller D. C., Tobin J. D., Blix P. M., Rubenstein A. H., Unger R. H. and Andres R. (1982) Feedback inhibition of insulin secretion by insulin: relation to the hyperinsulinemia of obesity. *N. Engl. J. Med.* 306: 1196-1202.

Flatt P. R., Barnett C. R., Shibier O. and Swanston-Flatt S. K. (1991) Direct and indirect actions of nutrients in the regulation of insulin secretion from the pancreatic beta cells. *Proc. Nutr. Soc.* 50: 559-566.

Frisell, W. R. (1982) *Human Biochemistry*. Frisell W. R. (ed) Macmillan CO. New York.

Galbraith R. A., Buse M. G. and Marchalonis J. J. (1982) Insulin binding to cultured B- and T-lymphocytes. *Immunol. Lett.* 4: 141-144.

Garvey W. T., Huecksteadt T. P. and Birnbaum M. J. (1989) Pretranslational suppression of an insulin-responsive glucose transporter in rates with diabetes mellitus. *Science* 245: 60-63.

Gillis S., Mochizuki D. Y., Conlon P. J., Hefeneider S. H., Rathun C. A., Gillis A. E., Frank M. B., Henney C. S. and Watson J. D. (1982) Molecular characterization of interleukin 2. *Immunol. Rev.* 63: 167-209.

Gould G. W. and Holman G. D. (1993) The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem. J.* 295: 329-341.

Hall J. C., Heel K. and McCauley R. (1996) Glutamine. *Br. J. Surg.* 83: 305-312.

Ham R. G. McKeehan W. L. (1979) Media and growth requirements. *Methods Enzymol.* 58: 44-93.

Havrankova J., Roth J. and Brownstein M. (1978) Insulin receptors

are widely distributed in the central nervous system of the rat. *Nature* 272: 827-829.

Hawkins M., Angelov I., Liu R., Barzilai N. and Rossetti L. (1997) The tissue concentration of UDP-N-acetylglucosamine modulates the stimulatory effect of insulin on skeletal muscle glucose uptake. *J. Biol. Chem.* 272: 4889-4895.

Hedeskov C. J. (1980) Mechanism of glucose-induced insulin secretion. *Physiol. Rev.* 60: 442-509.

Heidenreich K. A., Zahniser N. R., Berhanu P., Brandenburg D. and Oldfsky J. M. (1983) Structural differences between insulin receptors in the brain and peripheral target tissues. *J. Biol. Chem.* 258: 8527-8530.

Helderman J. H. and Strom T. B. (1977) Emergence of insulin receptors upon alloimmune T cells in the rat. *J. Clin. Invest.* 59: 338-344.

Helderman J. H. (1981) Role of insulin in the intermediary metabolism of the activated thymic-derived lymphocyte. *J. Clin. Invest.* 67: 1636-1642.

Helderman J. H. (1984) Acute regulation of human lymphocyte insulin receptors. Analysis by the glucose clamp. *J. Clin. Invest.* 74: 1428-1435.

Hirayama B. A., Lostao M. P., Panayotova-Heiermann M., Loo D. D., Turk E. and Wright E. M. (1996) Kinetic and specificity differences between rat, human, and rabbit Na⁺-glucose cotransporters (SGLT-1). *Am. J. Physiol.* 270: G919-926.

Houdijk A. P., Rijnsburgerr E. R., Jansen J., Wesdorp R. I., Weiss J. K., McCamish M. A., Teerlink T., Meuwissen S. G., Haarman H. J., Thijs L. G. van Leeuwen P. A. (1998) Randomised trial of glutamine-enriched enteral nutrition on infectious morbidity in patients with multiple trauma. *Lancet* 352: 772-776.

Howell S. L. (1984) The mechanism of insulin secretion. *Diabetologia* 26: 319-327.

Hresko R. C., Heimberg H., Maggie M.-Y. and Mike Mueckler. (1998) Glucosamine-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is caused by depletion of intracellular ATP. *J. Biol. Chem.* 273: 20658-20668.

Hunt S. V. (1987) Lymphocytes. Klaus G. G. B. (ed). IRL Press, Oxford, English.

Im J. H., Meezan E., Rackley C. E. and Kin H. D. (1983) Isolation and characterization of human erythrocyte insulin receptors. *J. Biol. Chem.* 258: 5021-5026.

Imamura J, T., Koffler, M, and Helderman. (1988) Severe diabetes induced in subtotally depancreatized dogs by sutained hyperglycemia. *Diabetes* 37: 600-609.

Jansson L. and Hellerstrom C. (1983) Stimulation by glucose of the blood flow to the pancreatic islets of the rat. *Diabetologia* 25: 45-50.

Jason K. Kim., Jae K. Wi. and Jang H. Youn. (1996) Plasma free fatty acids decrease insulin-stimulated skeletal muscle glucose uptake by suppressing glycolysis in conscious rats. *Diabetes* 45:

446-453.

Jepson M. M. Bates P. C., Broadbent 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.

Jonas H. A., Newman J. D. and Harrison L. C. (1986) An atypical insulin receptor with high affinity for insulin-like growth factors copurified with placental insulin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83: 4124-4128.

Kahn C. R. (1985) The molecular mechanism of insulin action. *Annu. Rev. Med.* 36: 429-451.

Karnieli E., Zarnowski M. J., Hissin P. J., Simpson I. A., Salaans L. B. and Cushman S. W. (1981) Insulin-stimulated translocation of glucose transport systems in the isolated rat adipose cell. Time course, reversal, insulin concentration dependency, and relationship to glucose transport activity. *J. Biol. Chem.* 256: 4772-4777.

Kaufmann S. H. E. (1993) Cell-mediated immunity. Hastings R. C.(ed). *Leprosy*, ed 2. Edinburgh, Churchill Livingstone.

Kaye J., Gillis S., Mizel S. B., Shevach E. M., Malek T. R., Dinarello C. A., Lachman L. B. and Janeway C. A. Jr. (1984) Growth of a cloned helper T cell line induced by a monoclonal antibody specific for the antigen receptor: interleukin 1 is required for the expression of receptors for interleukin 2. *J. Immunol.* 133: 1339-1345.

King G. L., Buzney S. M., Kahn C. R., Hetu N., Buchwald S.,

Macdonald S. G. and Rand L. I. (1983) Differential responsiveness to insulin of endothelial and support cells from micro- and macrovessels. *J. Clin. Invest.* 71: 974-979.

Kruszynaka Y. T. (1997) Textbook of diabetes. Pickup J. C. and Williams G. (eds) Bladkwell Science Press, U. S. A.

Lacey J. M. and Wilmore D. W. (1990) Is glutamine a conditionally essential amino acids. *Nutr. Rev.* 48: 297-309.

Ladel C. H., Blum C., Dreher A., Reifenberg K. and Kaufmann S. H. (1995) Protective role of gamma/delta T cells and alpha/beta T cells in tuberculosis. *Eur. J. Immunol.* 25: 2877-2881.

Leighton B., Curi R., Hussein A. 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 Lett.* 225: 93-96.

Licastro F., Morini M. C., Bolognesi A. and Stirpe F. (1993) Ricin induces the production of human peripheral-blood mononuclear cells. *Biochem. J.* 294: 517-520.

Lowe W. L. Jr., Boyd F. T., Clarke D. W., Raizada M. K., Hart C. and LeRoith D. (1986) Development of brain insulin receptors: structural and functional studies of insulin receptors from whole brain and primary cell cultures. *Endocrinology* 119: 25-35.

Lorenzi M., Montisano D. F., Toledo S. and Barriénx A. (1986) High glucose induces DNA damage in cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 77: 322-325.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

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 Lett.* 215: 187-191.

Maegawa H., Shigeta Y., Egawa K. and Kobayashi M. (1991) Impaired autophosphorylation of insulin receptors from abdominal skeletal muscle in nonobese subjects with NIDDM. *Diabetes* 40: 815-819.

Maratos-Flier E., Goldstein B. J. and Kahn C. R. (1997) Textbook of diabetes. Pickup J. C. and Williams G. (eds) Blackwell Science Press, U. S. A.

Marshall S., Bacote V. and Traxinger R. R. (1991) Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 266: 4706-4712.

McClain D. A. and Crook E. D. (1996) Hexosamines and insulin resistance. *Diabetes* 45: 1003-1009.

Mehler P. S., Sussman A. L., Maman A., Leitner J. W. and Sussman K. E. (1980) role of insulin secretagogues in the regulation of somatostatin binding by isolated rat islets. *J. Clin. Invest.* 66: 1334-1338.

Moller D. E., Yokota A. and Flier J. S. (1989) Normal insulin

receptor Cdna sequence in Pima Indians with NIDDM. *Diabetes*. 38: 1496-1500.

Moller G., Hammarstrom L., Moller E., Persson U., Smith E., Waterfield D. and Waterfield E. (1978) Lymphocyte activation by Con A. *Haematologia* 12: 37-45.

Mosmann T. R. and Coffman R. L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 145-173.

Nathan C. E., Murray H. W. Wiebe M. E. and Rubin B. Y. (1983) Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J. Exp. Med.* 158: 670-689.

Newsholme E. A., Crabtree B. Ardawi M. S. (1985) The role of high rates of glycolysis and glutamine utilization in rapidly dividing cells. *Bioscience Reports* 5: 393-400.

Newsholme E. A., Crabtree B. Ardawi M. S. (1985) Glutamine metabolism in lymphocytes: its biochemical, physiological and clinical importance. *Q. J. Exp. Physiol.* 70: 473-489.

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

Newsholme E. A. and Carrie A. L. (1994) Quantitative aspects of glucose and glutamine metabolism by intestinal cells. *Gut.* 35: S13-17.

Newsholme E. A. (1996) The possible role of glutamine in some cells of the immune system and the possible consequence for the whole animal. *Experientia*. 52: 455-459.

Nowell P. C. (1960) Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 20: 462-466.

Ogle C. K., Ogle J. D., Mao J. X., Simon J., Noel J. G., Li B. G. and Alexander J. W. (1994) Effect of glutamine on phagocytosis and bacterial killing by normal and pediatric burn patient neutrophils. *JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.* 18: 128-133.

Olefsky J. M., Bacon V. C. and Baur S. (1976) Insulin receptors of skeletal muscle: specific insulin binding sites and demonstration of decrease numbers of sites in obese rats. *Metabolism* 25: 179-191.

Olefsky J. M. (1999) Insulin-stimulated glucose transport minireview series. *J. Biol. Chem.* 274: 1863

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.

Paul W. E. and Seder R. A. (1994) Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76: 241-251.

Pitcher J. A., Touhara K., Payne E. S. and Lefkowitz R. J. (1995) Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid. *J. Biol. Chem.* 270: 11707-11710.

Pozueta-Romero J., Frehner M. and Akazawa T. (1991) Filtering centrifugation through two layers of silicone oil: a method for the kinetic analysis of rapid metabolite transport in organelles. *Cell Struct. Funct.* 16: 357-363.

Randle P. J., Newsholme E. A. and Garland P. B. (1964) Regulation of glucose uptake by muscle. 8. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, and of alloxan-diabetes and starvation, on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscle. *Biochem. J.* 93: 652-665.

Reitzer L. J., Wice B. M. and Kennell D. (1979) Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 254: 2669-2676.

Robinson K. A., Sens D. A. and Buse M. G. (1993) Pre-exposure to glucosamine induces insulin resistance of glucose transport and glycogen synthesis in isolated rat skeletal muscles. Study of mechanisms in muscle and in rat-1 fibroblasts overexpressing the human insulin receptor. *Diabetes* 42: 1333-1346.

Rohde T., Maclean D. A. and Klarlund P. (1996) Glutamine, lymphocyte proliferation and cytokine production. *Scand. J. Immunol.* 44: 648-650.

Roth R. A., Morgan D. O., Beaudoin J. and Sara V. (1986) Purification and characterization of the human brain insulin receptor. *J. Biol. Chem.* 261: 3753-3757.

Rothman D. L., Magnusson I., Cline G., Gerard D., Kahn C. R., Shulman R. G. and Shulman G. I. (1995) Decrease muscle glucose transport/phosphorylation is an early defect in the pathogenesis of

non-insulin-dependent diabetes mellitus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 983-987.

Rothman D. L., Shulman R. G. and Shulman G. I. (1992) ³¹P nuclear magnetic resonance measurements of muscle glucose-6-phosphate: evidence for reduced insulin-dependent muscle glucose transport or phosphorylation activity in non-insulin dependent diabetes mellitus. J. Clin. Invest. 89: 1069-1075.

Saucier J., Dube J. Y. and Tremblay R. R. (1981) Specific insulin binding sites in rat testis: characterization and variation. Endocrinology 109: 2220-2225.

Simpson I. A. and Cushman S. W. (1986) Hormonal regulation of mammalian glucose transport. Annu. Rev. Biochem. 55: 1059-1089.

Sinha M. K., Pories W. J., Flickinger E. G., Meelheim D. and Caro J. F. (1987) Insulin-receptors kinase activity of adipose tissue from morbidly obese humans with and without NIDDM. Diabetes 36: 620-625.

Smith K. A. (1980) T-cell growth factor. Immunol. Rev. 51: 337-357.

Snow E. C., Feldbush T. L. and Oaks J. A. (1981) The effect of growth hormone and insulin upon MLC responses and the generation of cytotoxic lymphocytes. J. Immunol. 126: 161-164.

Snow E. C. (1985) Insulin and growth hormone function as minor growth factors that potentiate lymphocyte activation. J. Immunol. 135: 776S-778S.

Souba W. W., Klimberg V. S., Plumley D. A., Salloum R. M., Flynn T. C. Bland K. I. and Copeland E. M. 3d (1990) The role of glutamine in maintaining a healthy gut and supporting the metabolic response to injury and infection. *J. Surg. Res.* 48: 383-391.

Stehle P., Zander J., Mertes N., Albers S., Puchstein C., Lawin P. and Furst P. (1989) Effect of parenteral glutamine peptide supplements on muscle glutamine loss and nitrogen balance after major surgery. *Lancet* 1: 231-233.

Stenbit A. E., Burcelin R., Katz E. B., Taso T. S., Gautier N., Charron M. J. and Le Marchand-Brustel Y. (1996) Diverse effects of Glut4 ablation on glucose uptake and glycogen synthesis in red and white skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* 98: 629-634.

Straus D. S. and Pang K. J. (1982) Insulin receptors on cultured murine lymphoid tumor cell lines. *Mol. Cell Biochem.* 47: 161-169.

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

Thomson M. J., Williams M. G. and Frost S. C. (1997) Development of insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 272: 7759-7764.

Tilney N. L. (1971) Patterns of lymphatic drainage in the adult laboratory rat. *J. Anat.* 109: 369-383.

Traxinger R. R. and Marshall S. (1989) Role of amino acids in modulating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. *J. Biol Chem.* 264: 20910-20916.

Traxinger R. R. and Marshall S. (1990) Suitability of 2-deoxyglucose for measuring initial rates of glucose uptake in isolated adipocytes. *Biochem. Int.* 22: 607-615.

Tu K. Y., Ju HS., Pettit F., Sheve W., Toek N. H., Matthews R. and Matthews K. (1995) Glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity in human lymphocytes: effects of insulin, obesity and weight loss. *Biochem Biophys Res Commun.* 207: 183-190.

Van Obberghen E., Ksauga M., Le Cam A., Hedo J. A., Itin A. and Harrison L. C. (1981) Biosynthetic labeling of insulin receptor: studies of subunits in cultured human IM-9 lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78: 1052-1056.

Vasianin S. I. (1989) The action of inhibitors of sugar transport phlorizin, phloretin, and cytochalasin B in model systems. *Tsitologiya* 31: 57-65.

van der Hulst R. R., van Kreel B. K., von Meyfeldt M. F., Burmmer R. J., Arends J. W., Deutz N. E. and Soeters P. B. (1993) Glutamine and the preservation of gut integrity. *Lancet* 341: 1363-1369.

Wallace C. and Keast D. (1992) Glutamine and Macrophage function. *Metabolism* 41: 1016-1020.

Welbourne T. C., Childress D. and Givens G. (1986) Renal regulation of interorgan glutamine flow in metabolic acidosis. *Am.*

J. Physiol. 255: R859-R866.

Weiss A., Imboden J., Shoback D. and Stobo J. (1984) Role of T3 surface molecules in human T-cell activation: T3-dependent activation results in an increase in cytoplasmic free calcium. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81: 4169-4173.

Welham M. J., Bone H., Levings M., Learmonth L., Wang L. M., Leslie K. B., Pierce J. H. and Schrader J. W. (1997) Insulin receptor substrate-2 is the major 170-kDa protein phosphorylated on tyrosine in response to cytokines in murine lymphohemopoietic cells. J. Biol. Chem. 272: 1377-1381.

White M. F. and Kahn C. R. (1993) Insulin resistance. Moller D. E. (ed) John Wiley and Sons Press, England.

Wigand J. P. and Blackard W. G. (1979) Down-regulation of insulin receptors in obese man. Diabetes 28: 287-291.

Xu D., Qi L., Thirstrup C., Berg R. deitch E. A. (1993) Elemental diet-induced bacterial translocation and immunosuppression is not reversed by glutamine. J. Trauma 35: 821-824.

Yaqoob P., Calder PC. (1997) Glutamine requirement of proliferating T lymphocytes. Nutrition 13: 646-51.

Ziegler T.R., Young L.S., Benfell K., Scheltinga M., Hortos K., Bye R., Morrow F. D., Jacobs D. O., Smith R. J. and Antin J. H. (1992) Clinical and metabolic efficacy of glutamine-supplemented parenteral nutrition after bone marrow transplantation. A randomized, double-blind, control study. Ann. Intern. Med. 116: 821-828.