

R
008.8
4462-1
87

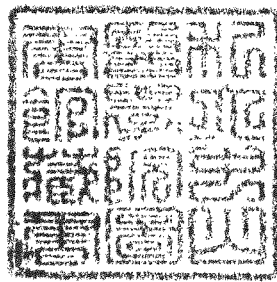
私立中山醫學院營養科學研究所碩士論文
Master Thesis , Graduate Institute of Nutritional Science,
Chung-Shun Medical and Dental Collage

碩士論文
Master Thesis

指導教授：劉承慈 博士
(Cheng-Tzu Liu , Ph.D)

白芍對免疫功能之影響

The effect of *Pasonia lactifloro* in immune function



研究生：黃國峰
(Guo-Feng Huang)

中華民國八十七年七月

July, 1998

中山醫學院圖書館



C050082

參考書恕不外借

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
_____ 組 86 學年度第 2 學期所撰 碩士 學位論文。

論文名稱：白芍對免疫功能之影響

同意 不同意

本人具有著作財產權之論文提要，授予國家圖書館、本人畢業學校及行政院國家科學委員會科學技術資料中心，得重製成電子資料檔後收錄於該單位之網路，並與台灣學術網路及科技網路連線，得不限地域時間與次數，以光碟或紙本重製發行。

同意 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，得不限地域時間與次數以微縮、光碟重製後發行，並得享該中心微縮小組製作之研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔資料等值新台幣伍佰元之服務。本論文因涉及專利等智慧財產權之申請，請將本論文全文延後至民國 __ 年 __ 月後再公開。

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，不限時間與地域，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。

指導教授姓名：劉承慈

研究生簽名：黃國華 學號：R85309
(親筆正楷)

日期：民國 87 年 1 月 30 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. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。
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. 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，請分別在三種利用方式的同意欄內鈎選並填妥各項資料。
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。
3. 授權人的權利與義務：
在美國授權博碩士論文予UMI公司(博碩士論文全文資料發行公司)製作發行，須交付美金45元的出版費，銷售年逾七件以上時得享收入10%的權利金約美金20元；在國內本計畫之經費全數由政府支應，收入亦應歸國庫，為答謝您的支持，科資中心特為您提供新台幣500元的等值資料服務(以研究報告、獎勵代表作、博碩士論文三檔為限)，請逕洽本案聯絡人，地址電話詳如第5項。義務方面唯一要注意是，著作人日後不可以主張終止本授權書，但您仍可以授權其他自然人或法人上述的行為。
4. 全國博碩士論文全文資料微縮片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。
5. 本案聯絡電話：(02)7377746 江守田、王淑貞
地址：台北市和平東路二段106號17樓1702室

研究生姓名：黃國峰 聯絡電話：(05)2275705

地址：嘉義市宣信街472巷28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

私立中國醫藥學院營養系副教授

沈立言 博士

沈立言

私立中山醫學院營養科學研究所教授

李宗貴 博士

李宗貴

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)

劉承慈

中華民國八十七年七月

學生黃國峰論文題目為白芍對免疫功能之影響，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 87年 7月 20日

謝 誌

由衷感謝指導教授劉承慈博士兩年來之細心指導與教誨，使得無論在研究或待人處事上皆獲益良多，且撥冗閱改，使論文得以順利付梓，在此致上最深之謝意。文稿初成，承蒙沈立言博士、李宗貴博士之指正疏漏，並提供改進意見，得以更臻完備，謹以此由衷感謝。

實驗期間感謝李宗貴教授、徐成金教授及王進崑教授在實驗儀器上之支援，使研究得以順利完成。另外，感謝學姊佩玲、靜宜、心瑜、梅桂及學長坤澤、振宇、俊茂、相訓、聖烈實驗及課業上之指導，玲貞學姊及秀鈴學姊之關懷，科銘、敏惠在實驗上的大力相助及玉珍、曉琪、秀君、韻蘭、威徹、明才、順子、加松等研究上之幫忙與協助，在此致上誠摯的謝意，及感謝大白鼠的犧牲奉獻而順利完成實驗。並感謝所有幫助過我的人，雖在此沒一一提到您們的名字，但是在我內心深處永遠感激。

最後感謝我的奶奶、父母、姊姊及我的一些好友對我的支持與精神上的鼓勵，謹以本論文獻給關懷、愛護我的家人、師長及好友與我一起分享此榮耀。

黃國峰 謹誌於
中山醫學院營養科學所
中華民國八十七年七月

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.....	2
一、白芍的組成和功能性及白芍與精胺酸之關連.....	2
二、淋巴細胞之作用及精胺酸對其功能性所扮演 之角色.....	5
三、敗血症及宿主免疫力.....	10
四、自然殺手細胞的作用及其活性之測定方法.....	17
五、研究目的.....	20
參、材料與方法.....	21
一、化學試藥.....	21
二、酵素名稱.....	23
三、儀器設備.....	23
四、白芍水萃物之製備及定量.....	24
五、實驗動物.....	26
六、淋巴細胞的製備與培養.....	27
七、淋巴細胞複製率的測量.....	31
八、淋巴細胞精胺酸運輸速率測定.....	31
九、自然殺手細胞活性測定.....	34
十、統計分析.....	37
肆、結果.....	40
一、白芍定量之結果.....	40
二、注射脂多醣誘發敗血症大白鼠其體重、脾臟重 量之變化.....	41
三、脂多醣注射對淋巴細胞複製之影響.....	41
四、白芍對淋巴細胞複製之影響.....	42
五、注射脂多醣對精胺酸運輸速率之影響.....	43
六、白芍對精胺酸運輸速率之影響.....	44
七、白芍於自然殺手細胞活性測定及未來研究方向之	

評估	45
伍、討論	65
陸、結論	75
柒、參考文獻	76

中文摘要

先前有學者指出白芍之藥理活性包括抗炎、免疫調節等功能，本研究主要想瞭解白芍對淋巴細胞及自然殺手(Natural Killer, NK)細胞活性之影響，並進一步觀察白芍之免疫調節作用是否與促進細胞精胺酸之運輸有關。因此本研究以 Wistar 大白鼠觀察白芍水萃物添加至細胞培養液對 concanavalin A (Con A)刺激之淋巴細胞複製及對精胺酸運輸之影響和對 NK 細胞活性之影響，並以注射脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)至大白鼠為敗血症模式觀察白芍對壓力狀態下淋巴細胞複製及對精胺酸運輸之影響和 NK 細胞活性之影響。實驗方法乃取大白鼠頸部淋巴結經 Ficoll-Hypaque 密度梯度溶液(1.077 kg/m^3) 離心得到淋巴細胞，以 $[6\text{-}^3\text{H}]$ -thymidine 併入 DNA 之速率做為複製指數，淋巴細胞經 24 h Con A 刺激後以 silicon oil-layer 之方法來偵測胞外 $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ arginine 運送進胞內之初速率。而在脾臟 NK 細胞活性測定方面則以 YAC-1 為靶細胞並觀察添加不同濃度之白芍於培養液中對 NK 細胞毒殺 YAC-1 細胞之影響。結果發現在淋巴複製方面，在未給予 Con A 時，敗血壓力組之細胞複製力顯著高於控制組($P < 0.05$)，但在 Con A 刺激下則顯著較低，以 $50 \mu\text{g/ml}$ Con A 刺激時，敗血壓力抑制其複製達 49 % ($P < 0.05$)，以 $100 \mu\text{g/ml}$ Con A 刺激時，敗血壓力抑制其複製達 47 % ($P < 0.01$)。白芍水萃物之添加不會誘發未經 Con A 刺激之細胞複製。50 $\mu\text{g/ml}$ Con A 刺激之控制組或敗血壓力組之淋巴細胞複製力亦不受白芍水萃物促進，但在 100 $\mu\text{g/ml}$ Con A 刺激時，添加白芍水萃物相當於芍藥甘 6.58 $\mu\text{g/ml}$

時可促進控制組淋巴細胞複製($P < 0.05$)，添加白芍水萃物相當於芍藥甘 3.29-32.9 $\mu\text{g/ml}$ 時可促進壓力狀態下之淋巴細胞複製($P < 0.05$)。當白芍水萃物之添加量相當於芍藥甘 329 $\mu\text{g/ml}$ 以上時，不論有無 Con A 之刺激，細胞之複製能力均顯著受到抑制($P < 0.05$)。在淋巴細胞對精胺酸運輸方面，當給予濃度 0.005-10 mM 精胺酸時，由動力學研究發現淋巴細胞對精胺酸運輸之高親和力和低親和力過程 Km 值分別為 0.13 ± 0.02 mM 及 18.79 ± 3.05 mM，當上述白芍水萃物添加時，對控制組及敗血壓力組之高親和力和低親和力過程 Km 值並無影響。白芍對於控制組大鼠及敗血壓力組之大鼠 NK 細胞活性之影響均無統計上之意義。此外，芍藥甘含量在 32.9 $\mu\text{g/ml}$ 以上時可增加 YAC-1 之死亡。

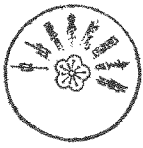
Abstract

Previous studies by others have indicated the pharmacological activities of *Pasonia lactiflora* include anti-inflammatory and immune regulatory functions. The aim of this study is to determine how the function of lymphocytes and Natural Killer (NK) cells are affected by *Pasonia lactiflora* and whether or not the regulatory effect of *Pasonia lactiflora* is via the effect on the transport of arginine into cells. In this study Wistar rats were used and the water extract of *Pasonia lactiflora* was added to assay systems to investigate concanavalin A (Con A) stimulated proliferation of lymphocytes and the cytotoxicity of NK cells. This study also used a lipopolysaccharide (LPS) induced sepsis model in rats to observe how physiological stress affects the function of lymphocytes and NK cells in the presence of *Pasonia lactiflora*. Lymphocytes were isolated from lymph nodes with the use of Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. The [6-³H]-thymidine incorporation rate was measured as the proliferation index. The silicon oil technique was used to determine the rate of [U-¹⁴C]-arginine transport into these cells. All cells were previously stimulated with Con A for 24 h. The cytotoxicity of spleen NK cells on the target YAC-1 cells was also observed in the absence or presence of *Pasonia lactiflora* in medium. Results of the present study demonstrate that in the absence of Con A significantly increase the proliferation rate of septic lymphocytes ($P < 0.05$). While when septic cells stimulated with 50 µg/ml or 100 µg/ml of Con A this rate is inhibited by about 49 % ($P < 0.05$) or 47 % ($p < 0.01$), respectively. The addition of water extract of *Pasonia lactiflora* which is equivalent to the paeoniflorin content of 6.58

$\mu\text{g/ml}$ ($P<0.05$) and 3.29-32.9 $\mu\text{g/ml}$ ($P<0.05$),. enhanced lymphocyte isolated from both control and septic rats to proliferation, respectively. The result on kinetics of arginine transport in lymphocyte showed a high-affinity and a low affinity processes with K_m values of 0.127 ± 0.016 mM and 18.789 ± 3.053 mM , respectively. The addition of water extract of *Pasonia lactifloro* did not affect the K_m values of high-affinity or low-affinity process of either lymphocytes from control or from septic injected rats. *Pasonia lactifloro* also showed no significant effect on the cytotoxicity of NK cells from either control or septic rats NK. In addition, at higher than the level of 32.9 $\mu\text{g/ml}$ of paeoniflorin , the water extract of *Pasonia lactifloro* induced the death of the lymphoma cell line YAC-1.

中英文專有名詞及縮寫對照一覽表

concanavalin A	刀豆素	(Con A)
cytokines	細胞激素	
dexamethasone	抗炎劑之類固醇	(DEX)
glucocorticoids	糖皮酯醇	
helper T-cell	輔助型 T 細胞	(T _H)
interferon	干擾素	(IFN)
interleukins	細胞介白素	(IL)
<i>in vitro</i>	體外系統	
<i>in vivo</i>	體內系統	
lipopolysaccharide	脂多醣	(LPS)
mitogen	刺激分裂原	
phytohaemagglutinin	植物凝集素	(PHA)
sepsis	敗血症	
suppressor T-cell	抑制型 T 細胞	(T _s)
tridium thymidine	氚標記胸腺嘧啶	[³ H]
tumor necrosis factor	腫瘤壞死因子	(TNF)



壹、前言

胺基酸對於所有動物細胞而言，是不可或缺的营养成份，而哺乳動物的細胞攝取陽性離子胺基酸 (cationic amino acids) 時，需靠 γ^+ 運輸系統/運輸器 (transporter)。其動力學在細胞對陽性離子胺基酸之利用率方面非常重要。精胺酸 (arginine) 在哺乳動物的細胞具有多重角色，包括：(1)為必需胺基酸；(2)為目前所知唯一的一氧化氮自由基 (NO)的前趨物，而 NO 在生理、生化上扮演多重且非常重要的角色；(3)為許多其他重要生化分子的前趨物；(4)可促進多種荷爾蒙之分泌，故在 γ^+ 系統運輸之胺基酸中，以對精胺酸之研究較多且完整。

關於淋巴細胞陽離子性胺基酸運輸系統之觀察，始自 1992 年 (Boyd and Crawford)，而 Liu and Newsholme (1994)觀察發現：(1)淋巴細胞需由胞外攝取其複製所需之精胺酸；(2)抑制精胺酸之運輸，可抑制淋巴細胞之複製能力。因此， γ^+ 運輸系統之活性，可能調節淋巴細胞之功能。此外，亦有報告指出，精胺酸可促進白細胞介素-2 (Interleukin-2 ; IL-2)之產生及白細胞介素-2 受器 (Interleukin-2 receptor ; IL-2R)之表現 (Buren,1990)，這也顯示精胺酸對淋巴細胞的重要性。

在劉鷹翔和馬玉卓 (1995)有關中藥材白芍之研究，有証據顯示，白芍和精胺酸關係密切。因此，白芍之藥理活性可能藉由促進 γ^+ 運輸系統活性而達成，故本研究將探討白芍對頸部淋巴結細胞之 γ^+ 運輸系統的影響，及白芍對脾臟自然殺手細胞 (NK)之影響，並推測白芍中與此作用相關之成份，及作用機制。

貳、文獻探討

一、白芍的組成和功能性及白芍與精胺酸之關連 白芍

白芍(*Paeonia lactiflora*) 別名芍藥，屬毛茛科植物芍藥的乾燥根，其主要成份為芍藥甘 (*Paeoniflorin*)，白芍的另外成份還包括芍藥醇(*Paeonol*)、芍藥鹼 (*Paeonia*)、*Alliflorin*、*Oxypaeoniflorin*、苯甲酸(*Benzoic acid*)、揮發油、脂肪油、樹脂、鞣質(*Tannin*)、糖、澱粉黏液、蛋白質等成份。

白芍具有多重生理與藥理活性之中藥，研究較多的功能性成份為白芍總甘(*total glucosides of paeony*，*TGP*)，已在臨床上應用於類風濕性關節炎、肝炎、和老化性疾病等。依據1995年劉鷹翔和馬玉卓及1994年徐叔雲的報告中所述，白芍的藥理作用包括：

(1)、解痙作用：

芍藥甘對胃、腸、子宮均有抑制作用，降低肌張力和自發運動。

(2)、對循環系統的作用：

芍藥甘有擴張冠狀動脈血管，使血流量增加，使血壓輕微下降，故可用於高血壓患者。

(3)、抗菌作用：

對金黃色葡萄球菌、志賀氏痢疾桿菌，有明顯抑制作用。

(4)、抗炎作用：

芍藥甘對大鼠實驗性腳腫，具有抗炎作用。

(5)、抗潰瘍作用：

芍藥甘對 stress 潰瘍有預防作用。

(6)、鎮靜、鎮痛、與抗驚厥作用：

芍藥對中樞神經系統的不同部位，有一定的抑制作用。

芍藥甘有明顯的鎮痛之效，且芍藥能對抗馬錢子鹼引起之驚厥。

(7)、抑制血小板凝集作用：

芍藥甘對 ADP 誘發的大鼠血小板聚集有抑制作用。

(8)、免疫調節作用：

觀察 TGP 對 T 淋巴細胞的作用，顯示 TGP 在體內外可促進 T 細胞活性的誘發，這可能為調節免疫作用之因子，因此，白芍可能藉此調節免疫功能。

(9)、抗氧化作用：

TGP 可抑制 H_2O_2 引起之溶血現象，可能與抑制 GSH 消耗及對膜保護作用有關，其作用機制及可能之臨床用途，有待更進一步研究。

此外，白芍也具有養血調經及解熱等作用。

精胺酸

胺基酸對於所有動物細胞而言，是不可或缺的营养素，其為合成蛋白質所必需的原料，而陽性離子胺基酸精胺酸具有以下特性：(1) 對正在成長之動物及正在成長之小孩為必需胺基酸(Rose, 1948 and Nakagawa, 1963)，但對成鼠、狗及成人為非必需胺基酸(Rose, et al. 1948)，且發現對正常健康人維持氮平

衡是非必需(Borman, et al. 1946), 對疾病狀態則為必需的(Rose, et al. 1948)。參與細胞及組織蛋白質之合成(Rose, et al. 1948); (2)可促進生長激素、胰島素、昇糖素和兒茶酚氨等荷爾蒙之分泌(Rakoff, 1973 and Barbul, 1986); (3)為合成 collagen 之胺基酸, 有助傷口之癒合(Albina, et al. 1988); (4)在免疫功能方面, 會增加老鼠胸腺重量(Barbul, et al. 1977), 及當以細胞分裂原 Con A、PHA 刺激後, 老鼠胸腺細胞及人體之周邊血液淋巴細胞會複製增殖(Barbul, et al. 1981), 使敗血動物生存增加(Madden, et al. 1988)及處於病理壓力下之淋巴細胞複製增加(Cerra, et al. 1990); (5)透過 NO 之產生及促進淋巴細胞複製之作用, 使其具有促進免疫系統功能及抗腫瘤的特性(Anggard, 1994); (6)藉產生 NO 調節內皮細胞和平滑肌的放鬆及抗凝血(Moncada, et al. 1991)。因此, 精胺酸之運輸特別具有其重要性。此外, 精胺酸也參與 Urea cycle 及形成 creatinine (林穎正, 1997)、polyamine(Tabor and Tabor, 1984)等重要生化分子之前趨物。

白芍與精胺酸之關連

白芍藥理作用中與精胺酸之利用相關者包括:(1)其可促進巨噬細胞產生 NO, 而目前唯一已知之高等動物體內 NO 之前驅物為精胺酸(Anggard, 1994), 且免疫系統細胞必須由外界攝取此胺基酸;(2)其為降低平滑肌收縮、擴張血管及降低血壓之作用, 在早期白芍即被用於治療心血管疾病(Nakaki, 1990), 而目前已知, 精胺酸衍生物 NO, 在此作用上扮演重

要之角色。此外，白芍總甘(TGP)可促進周邊血液淋巴細胞之分裂反應及 IL-2(interleukin-2)之產生，增加 IL-2R(interleukin-2R)密度及某些次級 T-淋巴細胞數目(劉鷹翔和馬玉卓，1995)。雖然直到目前，尚未有直接證據證明白芍調節陽性離子胺基酸之利用率，然而如上所述，於白芍藥理作用中至少有部分與白芍調節精胺酸衍生物 NO 的產生有關(劉鷹翔和馬玉卓，1995)，本研究推論，這或許與白芍促進細胞對精胺酸之攝取有關。因在巨噬細胞及血管平滑肌細胞中，其 NO 產生之增加部分依賴胞外精胺酸運輸至胞內(Albritton, et al. 1989 ; MacLeod , et al. 1990)。

二、淋巴細胞之作用及精胺酸對其功能性所扮演之角色

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轉移至續發性淋巴組織 (secondary lymphocyte tissue)如：脾臟、淋巴結、扁桃腺及黏膜結合之淋巴組織，淋巴細胞主要分 B-淋巴細胞和 T-淋巴細胞。

T細胞可分為輔助型 T細胞 (T helper cell 簡稱 T_H cell)、毒殺型 T細胞 (T cytotoxic cell 簡稱 T_C cell)和抑制型 T細胞 (T supressor cell 簡稱 T_S cell)， CD_4 為 T_H 細胞膜上糖蛋白之標記， CD_8 為 T_C 細胞膜上糖蛋白之標記。 CD_4 T細胞可辨認特异性抗原第 II 類主要組織相容複合體 (major histocompatibility

complex II ; MHC II)分子，並與之結合，而 CD₈ T 細胞可辨認第 I 類 MHC 分子並與之結合(Bjorkmen, 1987)(圖 1-1)

T 細胞的活化

1. 抗原活化 T 細胞

T-淋巴細胞在細胞膜上會產生特定的抗原結合受器，稱 T 細胞抗原受體 (T-cell receptor ; TCR)，能與抗原呈獻細胞 (antigen-presenting cells ; APC)表面上 MHC II 分子上的抗原相結合 (Bjorkman, 1980)。當 T 細胞受到抗原刺激後，便開始進行複製及分泌各種細胞激素 (cytokines)，有時稱做淋巴激素 (lymphokines)來調控免疫反應。其調控之免疫反應包括：T-淋巴細胞活化 B-淋巴細胞分泌 TNF α (tumor necrosis factor α) 及 T-淋巴細胞活化巨噬細胞產生 interferon- γ (Paul and Seder, 1994)。

2. 刺激分裂原(mitogen)活化 T 細胞

凝集素分裂原可來自植物及細菌，例如：刀豆素 (conavalin A ; 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 T 細胞。Con A 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 CD₃ 結合，促進訊息傳遞到淋巴細胞內部，進而加強基因的表現及 transcriptional 的活化，使休止狀態下的 T-淋巴細胞進入細胞

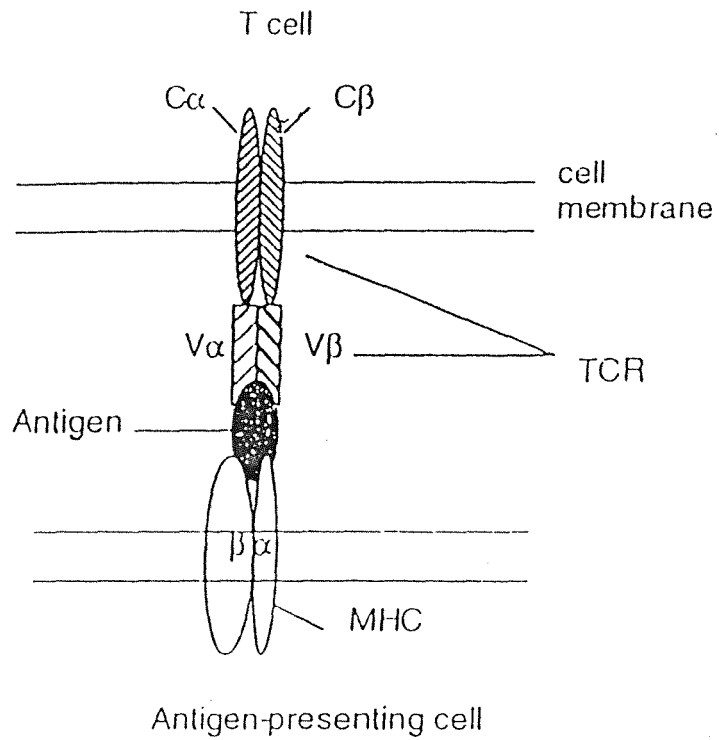


圖 1-1 : Antigen-presenting cell (APC)與 T-細胞受器之接合作用。

T-細胞表面之受器 TCR α 及 β chain (V α 及 V β)，可專一性的辨識抗原呈獻細胞上的 MHC 分子的抗原，而誘導 T-細胞活化及增生。

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

週期(Licastro, 1993) (圖 1-2)

當 T 淋巴細胞被活化後，會產生 lymphokines(IL-2)及在其表面表現出接受增殖及分化因子的受器(IL-2R)。當 IL-2 和 IL-2R 結合後，會誘發一連串對細胞增殖及調控免疫細胞活性之蛋白質的表現 (Neckers, 1983 ; Heikkila, 1987)。

精胺酸與淋巴細胞功能之關連

有關精胺酸對淋巴細胞之功能性研究發現，淋巴細胞不合成精胺酸，精胺酸必需來自血液，並靠運輸系統進入胞內(Boyd, 1992)。因此精胺酸對淋巴細胞是必需的，其對淋巴細胞之重要性除了合成蛋白質以執行其功能外，尚有其他特異性之作用。精胺酸為合成 polyamine 之間接受質，可經由 ornithine 轉變為 polyamine，而 polyamine 之生合成可促進淋巴細胞之複製增殖，抑制 polyamine 即抑制淋巴細胞之複製(Tabor, 1984)。因此抑制精胺酸之運輸，可抑制淋巴細胞之複製能力(Liu and Newsholme 1994)。而經刺激分裂原 (mitogen)刺激之齧齒類動物淋巴細胞，在較高濃度精胺酸之下，複製能力明顯提升，產生較多 IL-2，並有較多 IL-2R 之表現(Torre, et al. 1993)。獲得精胺酸補充之動物，其淋巴細胞之複製能力優於未獲得精胺酸補充者 (Barbul, 1986)。人體實驗也發現，獲得精胺酸補充之受測者，其淋巴細胞經體外刺激分裂原之刺激，有較多 IL-2 產生，且於體外培養條件下，這些細胞表現較多的 IL-2R，並有較佳複製能力 (Reynolds, et al. 1987)。

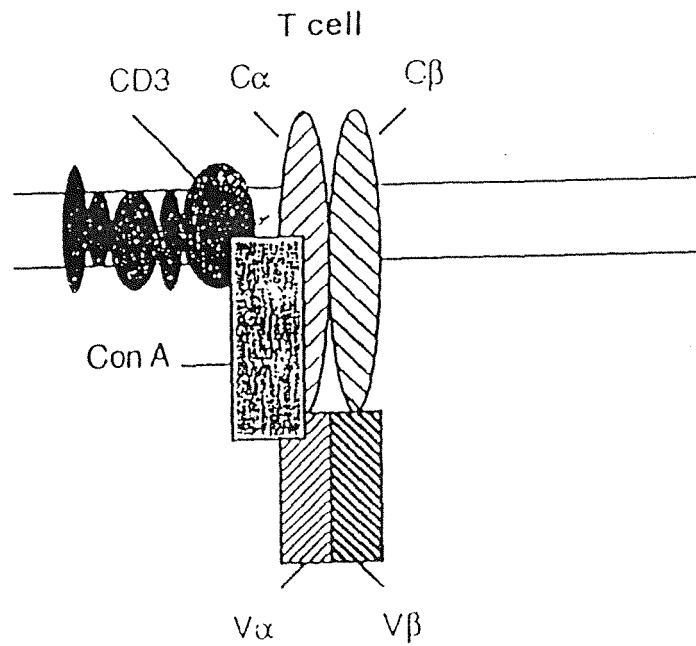


圖 1-2 : 刺激分裂原與 TCR/CD₃之接合作用。

Con A 可直接與 T-細胞受器中之 CD₃相接合，加速訊息傳遞、迅速有效活化 T-細胞。

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

在某些疾病狀態下，例如敗血症，病人常出現免疫力下降之情形。而動物實驗結果發現，若將敗血症大白鼠之淋巴細胞培養於含牛胎血清(FCS)標準培養液中，則細胞可正常複製，但若將上述培養於含有來自敗血症大白鼠的血清之培養液中，即使給予足量精胺酸，亦無法使之正常複製(Liu, 1995)，推測可能部分與敗血症抑制細胞利用精胺酸有關。

以 Con A 刺激 T-淋巴細胞複製能力與抗原刺激作用細胞很類似，所以本研究以 Con A 刺激 T-淋巴細胞複製，觀察敗血症對大白鼠 T-淋巴細胞之精胺酸利用的影響。

三、敗血症及宿主免疫力

敗血症之成因

敗血症是生理壓力中具代表性的模式之一。而發生敗血症是臨床上常面對的問題，可因嚴重感染(serious infection)而造成全身性發炎反應症候群 (systemic inflammatory response syndrome)(Thorton and Takauwa, 1997)。而內毒素 (Endotoxin) 是造成敗血的主要原因之一，它是革蘭氏陰性菌(gram negative bacteremia)細胞壁外脂雙層上的脂多醣 (lipopolysaccharide)的衍生物(圖 1-3)，它會與巨噬細胞膜上受器結合，經由細胞激素及荷爾蒙調控改變而造成身體生理代謝改變，導致敗血症發生。但也有可能由革蘭氏陽性菌 (gram postive organism)、黴菌 (fungi)、病毒 (virisus)和寄生蟲等引起的(王聖子，1996)。

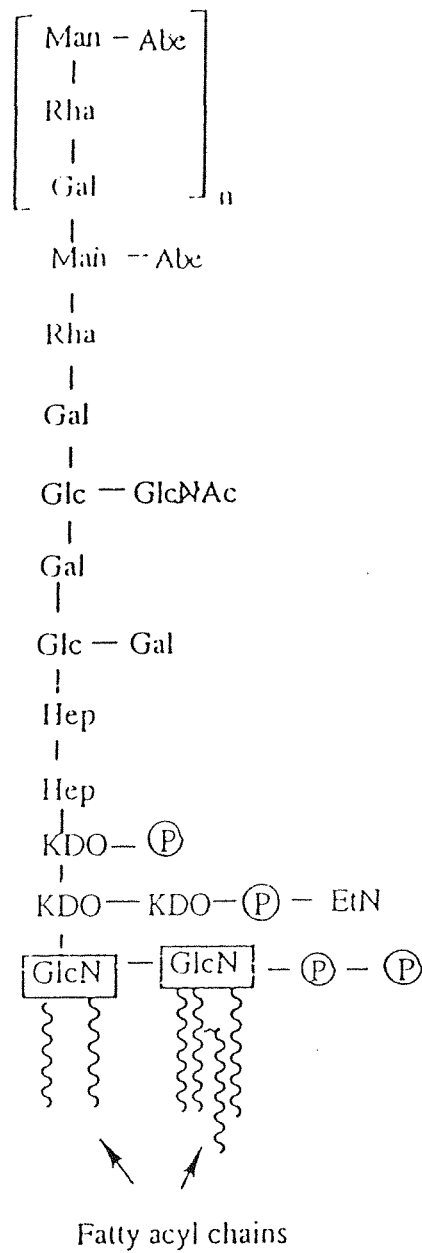


圖 1-3 : 革蘭氏陰性菌之脂多醣的分子結構

The structure of the lipopolysaccharide molecule from *Salmonella typhimurium*
 Abbreviations used: Abe , abequose , EtN , ethanolamine ; Galgalactose; Glc ,
 glucose ; GlcN , glucamine; GlcNAC , N-acetyl-glucosamine ; Hep ,heptulose; KDO,
 2oket0-3-dexyoctonate; Man, Mannose; Rha, rhamose. Endotoxin prepared from
 different source has different component and sequence of the carbohydrate.(Fig. is
 taken from KUBY 免疫學)

ACCP(American College of Chest Physicians)和 SCCM (Society of Critical Medicine Consensus Conference)會員在 1991 年對敗血症和併發症給予定義。內容包括病人有以下症狀：

- 1 . 體溫大於 38 °C 或小於 36 °C
- 2 . 呼吸速率每分鐘大於 20 次或過度換氣(hyperventilation)
- 3 . 心血管衰竭，例如：每分鐘心跳大於九十下
- 4 . 白血球數 $>12000 \text{ cells/nm}^3$ 或是白血球數 $<4000 \text{ cells/nm}^3$ 或有不成熟白血球超過 10 % 。

(ACCP/SCCM consensus conference committee, 1992)

細胞激素調控

敗血症會造成血液中某些非荷爾蒙調控因子濃度的增加，包括有 TNF(tumour necrosis factor)、各式的 interleukins、platelet activating factor、arachidonic acid metabolites 及 nitric oxide (Clark, et al. 1992)。微生物入侵刺激之後症狀主要原因之一為其會引發巨噬細胞分泌細胞激素，例如：TNF- α 、IL-1，因而快速執行多種保護效果。例如：TNF- α 會造成內皮細胞及巨噬細胞改變，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，且增加巨噬細胞及嗜中性白血球殺滅微生物的能力。另一方面也能促使自然殺手細胞釋出 IFN- γ ，進一步增加巨噬細胞殺菌能力。然而敗血症發生時所釋放出的細菌產物會過度刺激細胞激素產生，而增加促凝血(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，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 (Nakaki, 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 failure)(Jansen, 1996)。

荷爾蒙代謝改變

敗血症會潛在刺激神經內分泌 (neuroendocrine)及交感神經系統 (sympathetic nervous system)的活化 (Baue, 1984)，因此會增加腎上腺素 (epinephrine)、副腎上腺素 (norepinephrine)、可體松 (cortisone)、腎上腺素皮質刺激素 (adrenocorticotrophic hormone ; ACTH)、生長荷爾蒙 (growth hormone)及昇糖素 (glucagon)之分泌(王聖予，1996)。

敗血症對 T-淋巴細胞功能影響

敗血症之病人及接受手術治療之病人與燒傷或創傷之病人，往往出現免疫力變差之現象，包括：

- (1)、宿主抵抗力下降 (Heyland, 1994)。
- (2)、淋巴細胞功能減弱，例如：淋巴細胞複製時 IL-2 受器表現及 T-細胞所分泌之 IL-2 分子明顯減少，IL-2 是開起細胞複製之鎖，當 T-淋巴細胞數目減少，則後續免疫活化反應將

受影響 (Wood, 1984)。

(3)、給予 mitrogenic 刺激來自敗血症之人及動物淋巴細胞，淋巴細胞複製能力受到抑制，尤其是 IL-2 的生成量。

無論是人或動物模式之研究都相類似，發現敗血症誘發 T-淋巴細胞複製能力下降之現象。且在動物模式研究中發現敗血症誘發大白鼠死亡率與 T-淋巴細胞複製能力受抑制之現象很吻合 (Chuang, 1990)。

LPS 及其誘發之系統性發炎反應

來自革蘭氏陰性菌之內毒素會造成腹膜炎(peritonitis)或腹內膿瘍(intraabdominal abscess)，且在臨床上產生一連串的毒性效應(toxic effect)，如：發燒和寒顫(fever and chills)、休克、有時會引發嚴重的敗血症、多發性器官功能異常(multiple organ dysfunction)，甚至死亡(Deith, 1987)。

1933 年 Boivin 等從老鼠傷寒菌取出內毒素，證明其含有蛋白質、脂質與多醣體(polysaccharides)三種化學成份。腹腔注射 LPS 會在短時間內吸收進入血液，且增加腸壁細胞的通透性，使細菌和內毒素會從腸管內腔游移(translocation)至腸外器官，如：腸系膜淋巴結、肝臟、脾臟等，而加重症狀(Deith, et al. 1987)。腹腔注射 LPS 會誘發 cytokines 如：TNF(Gamble, et al. 1985)和 IL-1(Berilacqua, 1985)及增加 PGE₂(prostaglandin E₂；前列腺素)之產生(Weidenfeld, et al. 1995)，ACTH (adrenocorticotropic hormone；腎上腺皮質刺激素)及 CS (corticosterone；皮質脂酮)的增加(Weidenfeld, et al. 1995)。

LPS 注射後會和巨噬細胞膜上的受器結合，結合後誘發發炎前物質 IL-1、TNF 之釋放，而 LPS 及 IL-1 會誘發 PGE₂ 的產生 (Katsuura, 1989 and Rosenquist, 1996)，PGE₂ 會反過來抑制 IL-1 (Monick, et al. 1987) 及 TNF (Vancheri, et al. 1996) 之釋放及抑制巨噬細胞的活性。IL-1、TNF 可藉由活化其他細胞或刺激細胞的增殖而加強免疫力，前列腺素則會抑制免疫力。

目前本研究中的動物模式是依照 (Wichterman, et al. 1980) 以內毒素誘發大白鼠敗血症的方法。借此模式想瞭解生理壓力期間淋巴細胞的複製狀況及其對精胺酸運輸系統之作用情形。

LPS 對淋巴細胞功能之影響

LPS 能刺激多種 cytokines，包括 IL-1、TNF α 、IFN- α/β (Mizel, 1982)，且 TNF α 、IFN- α/β 能刺激淋巴細胞移動 (migration) (Issekutz, et al. 1986)，而在 *in vivo* 之實驗，LPS、TNF、IFN 能刺激淋巴細胞之移動，從血液移送到發炎組織 (Thomas, 1989)，顯示 LPS 刺激淋巴細胞移動至發炎組織可經由刺激 TNF α 、IFN- α/β 之產生。

淋巴細胞在正常狀態下並不活躍，循環中淋巴細胞有 90% 是處於休息狀態下 (resting cell)，在免疫刺激下才轉為活化，可增進細胞分化、分泌抗體及細胞激素等，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。當 LPS 進入體內，會被視為抗原，抗原會被免疫系統的細胞，例如：單核細胞 (monocytes) 及巨噬細胞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，而吞噬進入的抗原，經過修飾後，將分解的抗原胜肽片段送到免疫細胞表面，此即抗原呈獻細胞，而與組織相容複合體結合。T 細胞表面上有接受器(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 細胞的增生和免疫調控作用。

在 *in vitro* 研究中，LPS 會刺激 B-細胞 MHC-II 表現增加，使 B-細胞作為抗原呈獻細胞之功能更強(Daum, et al. 1993)，且在 *in vitro* 研究中，內毒素 LPS 會誘發 B 淋巴細胞之增殖(Morrison and Jacobs, 1976)，且會影響 T 淋巴細胞之增殖(Vogel, et al. 1983)。而 *in vivo* 注射 LPS 之觀察，則會抑制刺激分裂原對淋巴細胞之作用(Goodwin, et al. 1978)，此係經由抑制 IL-2 的產生(Walker, et al. 1983)及經由增加胞內之 cAMP 的量(Gemsa, 1975 and Goodwin, 1980)，來抑制淋巴細胞的複製。

LPS 對細胞精胺酸攝取之影響

如前所述，精胺酸對淋巴細胞有其重要性，但是否病理狀態會影響淋巴細胞對精胺酸利用並不清楚，過去在其他細胞之 *in vitro* 研究中，有學者指出將 LPS 加在 mouse 腹腔巨噬細胞(Sato, et al. 1992)、老鼠肺部微血管及血管內皮細胞的培養液中，會促進精胺酸之攝取，但在血管平滑肌則不影響精胺酸之攝取，顯示精胺酸之攝取會隨細胞不同而有不同的調節(Durante, 1996)。而在 *in vivo* 研究中，LPS 注射至活體內，LPS

會活化某些調節生理活性之 cytokine or hormone，進而可能間接影響細胞對精胺酸之利用，例如注射 LPS 後，處於壓力狀態下，Glucocorticoids 會增加(Nakano, et al. 1987)。而在 *in vitro* 研究中，Glucocorticoids 之類似物 dexamethasone(DEX) 亦會抑制老鼠肺部微血管內皮細胞精胺酸之攝取(Pan, et al. 1996)。因此，身體處於壓力狀態下，亦有可能會降低淋巴細胞對精胺酸之攝取。

四、NK 細胞的作用及其活性之測定方法

NK 的性質

自然殺手細胞 (Natural Killer, NK) 是淋巴細胞的一種，源自骨髓，可在血液及脾臟中發現(Vujanovic, et al. 1988)；因 NK 細胞為內含顆粒之淋巴細胞，曾命名為 "large granular lymphocytes" (大顆粒之淋巴細胞)(Vaage, et al. 1991)。NK 是種無類別的細胞 (null cell)，為不屬於 T 或 B 細胞的第三類細胞。在外型上，NK 與 T 及 B 細胞也有顯著不同之處。T 與 B 細胞在外型上無法區別，而 NK 細胞則可藉其細胞中所含之顆粒與 T 及 B 細胞區別。

NK 可在未與抗原接觸的哺乳動物體內覓得，因之其屬於非特異性防禦系統的成員。這些由正常動物取得的淋巴球對腫瘤細胞具有高度毒殺能力（但對正常細胞則不會），NK 細胞的活性並不具有真正免疫現象：(1)除了對某些種類的細胞

(例如腫瘤細胞)具有毒殺能力外，並沒有證據顯示 NK 細胞具有專一性特質。(2)雖 NK 細胞在先前暴露到一種腫瘤細胞的環境之後，日後對所有腫瘤目標物的反應能力可加強，但它們也沒有專一性的記憶反應存在。

NK 溶菌機制

NK 在動物體能執不少防禦工作，例如尋找、辨識及殺滅癌細胞、病毒感染的細胞、真菌、細菌等。這種尋找及摧毀病原的行為稱免疫監測 (immune surveillance)。NK 以非吞噬的方式殺害病原細胞，即不用將病原細胞食入便能加以殺害。當其功擊病原細胞時，首先與病原細胞結合，然後以一種需 Ca^{2+} (Ca^{2+} -dependent)的機制將所分泌的物質加之於需殺害的細胞上，導致該等細胞的溶裂。NK 執行此殺滅工作可獨自完成或得抗體協助。

IFN 能活化 NK 細胞，增加 NK 細胞去溶解標的細胞的能力(Reynolds, et al. 1987)，可能是因 IFN 能誘發 NK 細胞增殖或轉變 NK 細胞之先質細胞成為有功能性之 NK 細胞，IL-2 也能藉由 IL-2 及 IL-2R 之交互作用刺激 NK 細胞之增殖，且在不需抗原或分裂原刺激下(Yamada and Ortaldo, 1987)，IL-2 亦能不需經由進入細胞循環或 IL-2R 之表現，而增加 NK 細胞毒殺溶解能力(Ortald, 1984)。1979 年 Roder 和 Klein 發現 PGE_2 能抑制 NK 細胞之活性，因 LPS 之注射會減少 IL-2 之表現(Walker, et al. 1983)，且會增加 PGE_2 之生成。故本研究推論，LPS 之注射會抑制大鼠 NK 細胞之活性。至於白芍是否對此活性有所

影響，迄今尚未有相關之報告被提出，故於本研究中一併觀察。

NK 活性之測定原理

NK 活性之測定有數種方法可進行，目前所知包括① Cell Death Detection ELISA (Three-step immunoreaction)，原理使用”sandwich enzyme immunoassay”在靶細胞死亡後用 mouse 單株抗體定量偵測 DNA 及 histones 。② Cellular DNA Fragmentation ELISA (Four-step immunoreaction)，原理使用”sandwich enzyme immunoassay”在受損之靶細胞釋放 Brd U-labeled DNA fragments 至上澄液，用兩支 mouse 之單株抗體偵測 DNA 及 BrdU 。③ In Situ cell Death Detection kit, Fluorescein，原理使用細胞計數法及螢光顯微鏡檢查法，以 kit 來偵測及定量單細胞在程式化死亡(apoptosis)中斷裂之單股及雙股 DNA 。④ In Situ cell Death Detection kit, AP 及 In Situ cell Death Detection kit, POD，原理使用光學顯微鏡檢查法，以 kit 來偵測及定量單細胞之程式化死亡細胞斷裂之單股及雙股 DNA 。⑤ cytotoxicity Detection kit (LDH)，原理使用比色儀分析死亡後細胞釋放至上澄液之 lactate dehydrogenase (LDH)活性。

而本實驗採用 cytotoxicity Detection kit (LDH)之偵測法，在 NK 細胞活性測定，以 YAC-1 細胞為靶細胞，因 YAC-1 細胞含大量 LDH (lactate dehydrogenase)，經 NK 細胞毒殺後，細胞死亡及細胞膜受損時，LDH 會釋放，而 LDH 活性用酵素去

分析，收集無細胞之上澄液與酵素反應，， lactate 經 LDH 催化轉變成 pyruvate 時，將 NAD^+ 還原成 NADH/H^+ ，隨後催化轉移 NADH/H^+ 給 tetrazolium salt INT 還原成 formazan 及 H/H^+ ，LDH 釋放多，顯示毒殺效果好。

五、研究目的

本研究主要想瞭解白芍對淋巴細胞及 NK 細胞活性之影響，並進一步觀察白芍之免疫調節作用是否與促進細胞精胺酸之攝取有關。

參、材料與方法

一、化學試藥：

Acetic acid：購自景明化學工業股份有限公司

Acetonitrile：購自景明化學工業股份有限公司

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

Alochol (95%)：購自臺灣省煙酒公賣局

Antibiotic (Penicilin：10000 Units/ml, Streptomycin：
10mg/ml)：購自 Biological Industries

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

Concanavalin A (15%)：購自美國 Sigma 公司

Cupric sulfete (98%)：購自美國 Sigma 公司

Diagnostics:密度 1.077kg/m^3 購自美國 Sigma 公司

Fetal Bovine Serum (FBS)：購自以色列 Hyclone

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

L-Arginine (98%)：購自美國 Sigma 公司

L-Glutamine (99%)：購自美國 Sigma 公司

Lipopolysaccharide：購自美國 Sigma 公司

Magnesium Chloride(98%)：購自日本昭和司

Methanol：景明化學工業股份有限公司

n-Butyl p-Hydroxybenzoate: 購自美國 Sigma 公司

Paeoniflorin: 購自日本米山藥品工業株式會社

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

Potassium Dihydrogenphosphate (99%) : 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
Industries

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

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

Sodium Hydroxide : 購自日本和光公司

Sodium Phosphate Dibasic Heptyhydrate(100.2%) : 購自
日本昭和公司

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

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

Triton X-100 : 購自美國 Sigma 公司

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

[U-C¹⁴]Arginine (50μCi/ml) : 購自英國 Amersham 公司

YAC-1 細胞 : 購自食品工業發展研究所菌種保存及研究中心 ,
菌種中心編號 CCRC 60147

生理食鹽水注射液 : 購自信東化學工業股份有限公司

白芍 : 來自市面中藥行

二、酵素名稱：

Cytotoxicity Detection Kit (LDH)

Solution 1: Catalyst (Diaphorase/NAD⁺ mixture)

Solution 2: Dye solution (INT and sodium lactate)

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) : U3000 , 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 2100TR
9. 水浴槽 Shaker Bath BT-150
10. 培養箱 (Incubator) REVCO

- 11 .96 微孔比色儀(Microplate reader)
- 12 . 高效能液相層析儀(HPLC)
 - 1). pump, model LC 6200A, Hitachi, Japan
 - 2) .photodiode array detector, model LC 4500, Hitachi, Japan
- 13 .25 cm²細胞培養瓶(25cm² cell culture flasks)
- 14 .75 cm²細胞培養瓶(75cm² cell culture flasks)

四、白芍水萃物之製備及定量

實驗方法

(一)白芍水萃物之製備：

稱取白芍 10 g 置於 1 L 錐形瓶內，加入 500 ml 二次蒸餾水，用隔水加熱方法，以沸水將瓶中水分蒸發至剩 200 ml，再以紗布過濾，將濾液放於冷凍乾燥機凍乾，刮取白芍粉末。將此粉末儲存於 -80 °C 備用。

(二)白芍水萃物指標成份定量：

1. 標準品溶液之調製：

精確稱取 paeoniflorin 2.6 mg 置於 10 ml 定量瓶中，加入 70% 的甲醇到刻度，於超音波震盪使其溶解後，即為標準品溶液 1，取 1 溶液 5 ml 以 70% 甲醇稀釋至 10 ml，即為標準品溶液 2，取 2 溶液 5 ml 以 70%

甲醇稀釋至 10 ml，即為標準品溶液 3，取 3 溶液 2.5 ml 以 70% 甲醇稀釋至 5 ml，即為標準品溶液 4，取四隻 1 ml 定量瓶，各加 0.1 ml 內部標準品溶液，分別以標準溶液 1、2、3、4，加至刻度即得。

2. 檢品溶液之調製：

精確稱取前述白芍水萃物之粉末檢品 50 mg 置於玻璃瓶中，加入 70% 的甲醇 20 ml 於超音波震盪 15 分鐘後，40 °C 水浴震盪 20 分，回溫後，另取 0.1 ml 內部標準品之溶液至 1 ml 定量瓶中，加檢品溶液至刻度後，過 0.45 μ m 濾膜即得。

3. 內部標準品溶液之調製：

精確稱取 n-Butyl p-Hydroxybenzoate 11.0 mg 於 100 ml 定量瓶中，加入 70% 的甲醇到刻度，於超音波震盪使其溶解後，即為內部標準品溶液。

4. 層析條件：

- (1). Column： μ Bondapak C18 3.9 mm \times 300 mm (Waters 股份有限公司)
- (2). 波長：標準品成份 250 nm，內標準品 成份 254 nm
- (3). 流速：0.8ml/min
- (4). 移動相：Acetonitrile：water(內加 0.5 % Acetic acid)
- (5). 注射量：20 μ l
- (6). 析出條件：

A : water(內加 0.5 % acetic acid)

B : methanol

C : acetonitrile

Time(min) A : B : C

0	85	100	15
10	80	100	20
20	75	100	25
35	60	100	40
45	55	100	45
55	50	100	50
65	10	100	90
70	85	100	15

五、實驗動物

由國家科學委員會動物中心提供 8-10 週齡 (200-220 g) 雄性 Wistar 大白鼠。動物飼養條件為自動光照控制 (12 小時白晝、12 小時黑夜)，室內溫度控制於 25 °C、相對濕度 55 %，自動空氣調節 (換氣率每小時 12 次) 之動物房中。動物給予自由進食 (福壽牌實驗動物飼料) 及飲水直到實驗開始進行。

六、淋巴細胞之製備與培養

一)、注射內毒素大白鼠血清製備：

內毒素 (lipopolysaccharide from salmonella typhimurium 5 mg/Kg BW)，溶於 1 毫升之無菌生理食鹽水，注射到大白鼠腹腔中，經 24 小時後犧牲。於此 24 小時期間予以禁食，但給予自由飲水。犧牲動物的方式是以 CO₂ 使其窒息死亡，然後立即剖腹，由其下腔靜脈抽取靜脈血。然後經由離心 1350 × g 10 分鐘取得上澄液(血清)。並且將上澄液置於透析膜中，於 4 °C 進行透析。每隔 24 小時更換一次透析液 (phosphate-buffered saline pH 7.2-7.4) 共更換兩次。再將透析後的上澄液保存於 -20 °C 備用。

二)、正常大白鼠血清製備：

大白鼠給予自由進食及飲水，直到實驗開始進行。將無菌生理食鹽水注射到大白鼠腹腔中，經 24 小時後犧牲。於此 24 小時期間予以禁食，但給予自由飲水，之後以 CO₂ 犧牲，由其下腔靜脈抽取靜脈血。然後經由離心 1350 × g 10 分鐘取得上澄液。並且將上澄液置於透析膜中，於 4 °C 進行透析。每隔 24 小時更換一次透析液 (phosphate-buffered saline pH 7.2-7.4) 共更換兩次。再將透析後的上澄液保存於 -20 °C 備用。

三)、 PBS (phosphate-buffered saline)之製備：

將下表中的成份於室溫下溶於二次水中，溶解後經由濾紙過濾；以 KOH 調 pH 至 7.2-7.4，在 4 °C 保存一個月。回溫後分析 PBS buffer 其 pH 仍然保持穩定。

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
NaHPO ₄	0.2
KH ₂ PO ₄	0.2
CaCl ₂	0.1
MgCl ₂	0.1

四)、 淋巴細胞之製備：

大白鼠以 CO₂ 犧牲後，取出頸部淋巴結，立即放入裝有 PBS 的離心管中。用金屬網將淋巴結磨碎，並以濾紙過濾以除去未剝除之脂肪、用 PBS 將細胞洗入 50 ml 離心管中，均勻混合後於 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 PBS 懸浮液沿管壁緩慢滴到裝有 Ficoll-Hypaque 密度梯度溶液(密度 1.077 kg/m^3) 離心管中，使該 PBS 懸浮液覆蓋於密度梯度溶液之上。

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明顯有淋巴細胞集中的現象。用滴管將集中之淋巴細胞移到另外一支離心管中。加入 PBS 使細胞懸浮之後，再以 $400 \times g$ 離心 10 分鐘，移除上層液，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 1 ml 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。

五)、淋巴球細胞計數之方法：

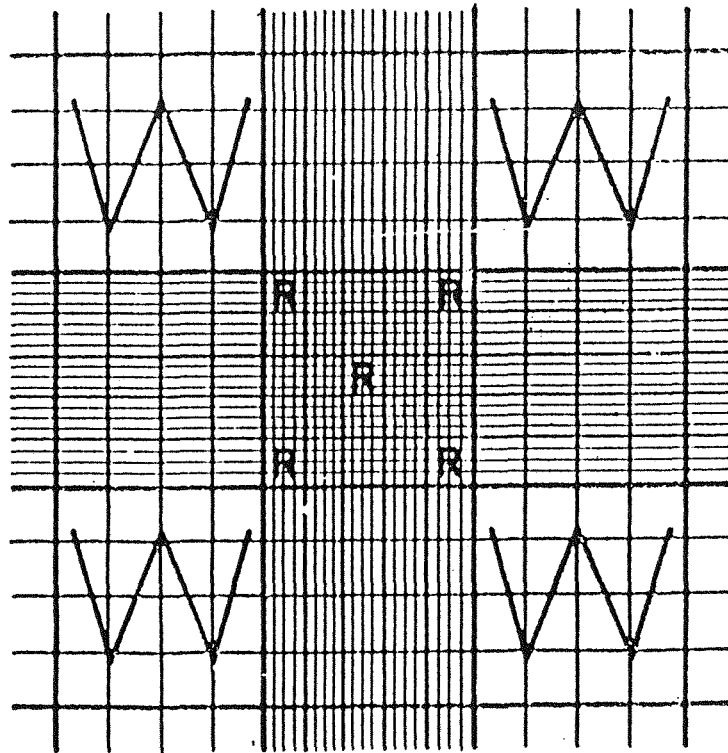
將上述細胞懸浮液經適當稀釋倍數後，以 1:1 (v/v) 與染色劑 (trypan blue) 混合測定細胞存活率，同時計數細胞數。吸取適當量於血球計數板上，於顯微鏡下觀察計數，若整個細胞被染成藍色表示細胞膜不完整造成染劑進入細胞內，而此代表細胞死亡，其餘則視為存活之細胞。

細胞總數計算方法：

角落四大格淋巴球數 $\times 1/4 \times 10^4 \times$ 稀釋倍數 = 每毫升細胞總數

存活率 % = (淋巴細胞總數 - 死亡細胞數) / 淋巴細胞總數 $\times 100\%$

以此方法計算使本實驗細胞製備均 $\geq 95\%$ 之存活率。



六)、淋巴細胞的活化及培養

將製備出的淋巴細胞，培養於以 RPMI-1640 (without glutamine) 為基質之培養液中，而每 100ml 培養液中含 10% FBS、2 mM Glutamine、50 $\mu\text{g/ml}$ Con A 及 1% antibiotic (含 Penicilline 及 Streptomycine)。上述培養液係於使用前以無菌過濾膜過濾。培養時將密度為 5×10^6 個 cell/ml 之細胞懸浮液，放入 75 cm^2 之細胞培養瓶中，再置入 37°C 、5% CO_2 之培養箱 24 hr 備用 (用於 arginine transport 研究)。

七、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 μl (10 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) [^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發生(Knight 1987)。

取大白鼠頸部淋巴結製備淋巴細胞，將細胞懸浮液培養在以 RPMI-1640(without glutamine)為基質之培養液[含 2mM glutamine、10% FBS、1% antibiotic(含 Penicilline 及 Streptomycine)及 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之 Con A]，48 h 後加入含有放射性 [^3H]thymidine 再繼續培養 18 小時，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，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 min，放射量以 cpm 表示。計算 [^3H]thymidine 併入胞內 DNA 的量。

八、淋巴細胞精胺酸運輸速率測定

精胺酸之運輸速率，係以 silicone oil-layer 方法測定細胞對精胺酸攝取之初速率，於 1.5 ml 離心管中測定。如上所述，取經 24 hr Con A 活化及培養後之淋巴細胞進行觀察。實驗進行前所需細胞之密度為 $5-7 \times 10^7$ 個 cell/ml。培養液為

以 PBS 為基質內含由 0.005 mM 至 10 mM 不同濃度精胺酸、[U- 14 C] 精胺酸 (50 μ Ci/ml) 及 10% 控制組或注射 LPS 組之血清，添加或不添加白芍至培養液中。測定精胺酸運輸速率前製備含 silicone oil-layer 之離心管，製備方法如下：每一 1.5 ml 離心管中底層加入 40 μ l 20% 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，有效將細胞與培養液分離開來。

進行實驗時，首先先將細胞懸浮液及培養液分別於 37 $^{\circ}$ C 預熱 5 分鐘，開始實驗時，將已預熱之離心管培養液加入已預熱之細胞懸浮液中，並繼續培養於 37 $^{\circ}$ C，在達預設作用時間 (45 秒，請參看圖 3-1) 時，取出細胞懸浮液和培養液之混合液鋪於前述離心管中之 silicone oil layer 之上，之後離心，使細胞沉澱至糖溶液層，而培養液仍浮於油層上，再將離心後之 1.5 ml 離心管投入液態氮中冷凍。將含細胞之糖溶液層切下，並置於含 0.1N NaOH 之試管中分解細胞。分解 24 小時後以閃爍計數器測其中 14 C 放射量，及蛋白質含量。結果以每單位細胞蛋白質攝取精胺酸之初速率表示。

蛋白質濃度測定 (Lowry et al., 1951)

(1) 原理：

本測定係以勞瑞法進行，利用鹼處理，使蛋白質水解成胺基酸，而胺基酸上之 -COOH 可與 Cu^{2+} 作用，並藉由 Folin reagent 而呈色，故可得知蛋白質濃度。

(2)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 : 1N NaOH=1 : 1
(volume)

(3)分析法：

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

(4)標準曲線之製作：

配製濃度為 0 mg/ml 、 0.25 mg/ml 、 0.5 mg/ml 、 0.75 mg/ml 、 1 mg/ml 之 BSA ，以上述反應系統測定，所得反應曲線(如圖 3-2)

(5)計算：樣品中蛋白質含量之計算以內差法由標準曲線進行

精胺酸攝取初速率之計算方法

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

1. 取 10 μ l 加了放射性標定之培養液加 490 μ l 0.1N 之 NaOH ，以閃爍計數液測放射量(dpm)
2. 經由體積莫耳濃度推算取出 10 μ l 不同精胺酸濃度培養液之莫耳數

3. 由莫耳數除以測得之 dpm 即不同精胺酸濃度下之比活性
4. 而前述置於 0.1N NaOH 分解細胞之試管中 24 小時，分別取 0.5 ml 加閃爍計數液測放射量，及取 100 μ l 以 Lowry 法測得蛋白質含量
5. 藉由相同濃度之精胺酸有相同之比活性，而推得不同濃度精胺酸進入細胞內之莫耳數
6. 所得之莫耳數除以以 Lowry 法測得之蛋白質及反應之時間，即為精胺酸運送之初速率。

由不同濃度之精胺酸，觀察運輸系統動力學參數 K_m 及 V_{max} ，兩參數將由 Eadie-Hofstee plot (V vs V/S) 取得。

九、NK 細胞活性測定

本實驗利用 NK 之靶細胞 YAC-1，經 NK 細胞毒殺後，YAC-1 釋放 LDH 之活性，來測定 NK 細胞之毒殺作用。

脾臟 NK 細胞的製備

從大白鼠取下新鮮脾臟置於無菌 PBS 的培養皿中，以鑷子撕碎脾臟，搖動培養皿，使單細胞溶出。將濾紙貼於架在 50 ml 離心管之漏斗上，接著以吸管吸取培養皿中之液體，經過濾紙過濾，再以 PBS 沖洗漏斗上殘餘的細胞。以 $400 \times g$ 於 $18^\circ C$ 離心 10min 後去上澄液，將細胞懸浮於 2 ml RPMI-1640(without glutamine) 中，以吸管混勻。將細胞懸浮液延

管壁慢慢滴於含 6 ml Ficoll-Hypaque 密度梯度溶液 (密度 1.077 kg/m^3) 的 15 ml 管中，以 $400 \times g$ 於 18°C 離心 15 min 後，取中間層並置放於 15 ml 離心管中，即為單核細胞。將此單核細胞以 RPMI-1640(without glutamine) 清洗，以 $400 \times g$ 於 18°C 離心 10 min，去上澄液，加入 0.5-1 ml 分析培養液 (1 % BSA 和 2 mM glutamine in RPMI-1640) 混合均勻，以 trypan blue 計數細胞數目，再以分析培養液配製成所需細胞密度 (4×10^6 個 cell/100 μl)。

YAC-1 的培養

首先配製 50 ml 培養液，其中含 2 mM glutamine、10 % FBS、1 % antibiotic 於 RPMI-1640(without glutamine)，並無菌過濾。將液態氮中取出之 YAC-1 細胞，放置於 37°C 水浴中解凍一分鐘。以 RPMI-1640(without glutamine) 清洗並離心 ($300 \times g$) 5 min。去上澄液，加入上述培養液，以吸管混勻並分置 25 cm^2 培養瓶，培養於 37°C 、5 % CO_2 備用。觀察脾臟 NK 細胞活性時，收集培養之 YAC-1，並於上述分析培養液中懸浮成密度為 4×10^4 個 cell/100 μl 。

毒殺性 (toxicity) 分析

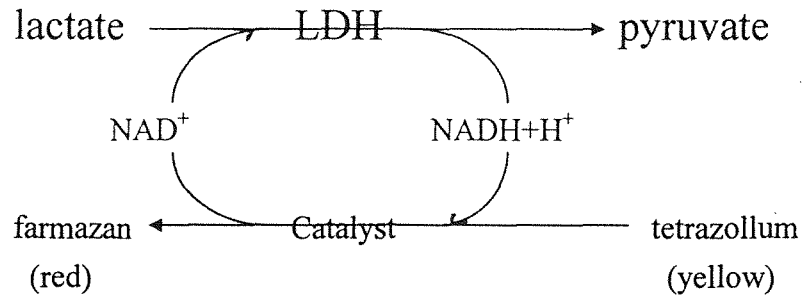
採用 Cytotoxicity Detection kit (LDH) (Boehringer Mannheim) 分析。為觀察白芍對 NK 活性之影響，分別配製不同

濃度之白芍，白芍濃度分別為 5 mg/ml、0.5 mg/ml、0.05 mg/ml、0.025 mg/ml、0 mg/ml，添加於分析系統中。至於分析系統中單核細胞：YAC-1 細胞的比例則分別為 10:1、5:1、2.5:1、1:1 來觀察 NK 細胞毒殺作用。

實驗進行時，將培養之細胞分為四組：

- (1) 配製 200 μ l/well 不同比例的單核細胞：YAC-1 細胞，以不加 YAC-1 細胞當控制組(control)。
- (2) 配製 assay medium 200 μ l/well 置於平底 96 孔 well 當 background control。
- (3) 配製 100 μ l assay medium/well + 100 μ l YAC-1 細胞/well，置於平底 96 孔 well 當 low control。
- (4) 配製 100 μ l 2% Triton X-100 (in assay medium)+ 100 μ l YAC-1 細胞/well，置於平底 96 孔 well 當 high control。

利用平板離心法，以 150 \times g 將上述含細胞之培養盤離心 3min 後，培養於 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、4hr，再利用平板離心法以 250 \times g 離心 5 min，由每 well 取出 100 μ l 上澄液至另一平板 96well 孔，取出時要小心，避免取到下層。加入恆溫後的 100 μ l kit II : kit I (45 : 1)，kit I : catalyst(Diaphorase/NAD⁺ mixture)；kit II : Dye solution (INT and sodium lactate)，目的使 tetrazolium salt INT 還原成 formazan(如下圖)。包上鋁箔，靜置 30 min，再利用 ELISA reader 於 490 nm 及大於 600 nm 的參考波長，測其吸光值。



毒殺作用 % :

$$\left[(\text{單核細胞: YAC-1 細胞}) - \text{控制組} - [(\text{low control}) - (\text{background control})] \right] \div [(\text{high control}) - (\text{low control})] \times 100\%$$

YAC-1 存活率 % :

$$1 - \left[[(\text{low control}) - (\text{background control})] \div [(\text{high control}) - (\text{background control})] \right] \times 100\%$$

十、統計分析

本實驗統計上分析法採 Student's t test 比較各組間差異性，數據的表現方式為平均值±標準差 (Mean±Standard Deviation)。

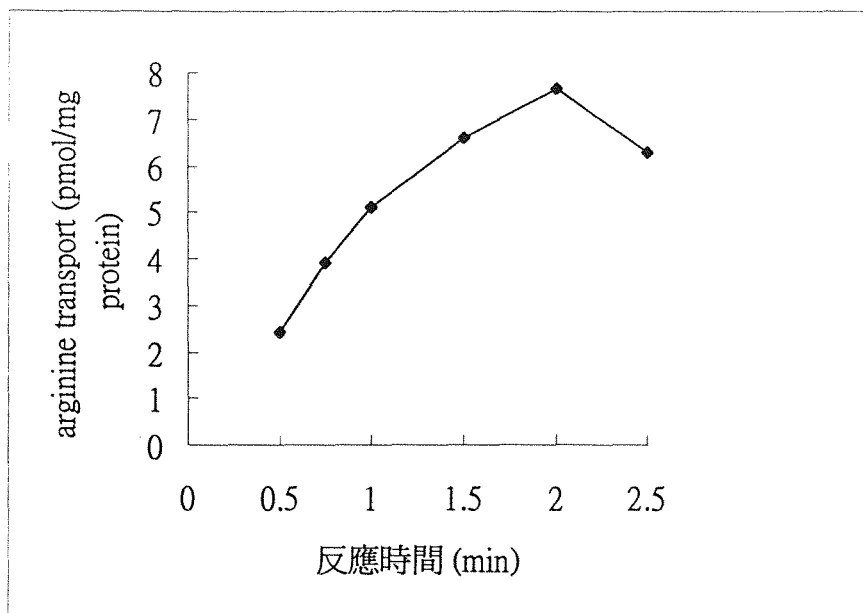


圖 3-1 Arginine transport 之時間反應

Fig. 3-1 The time reaction of arginine transport

先期實驗尋求 initial arginine transport 之反應時間，結果發現在反應到 2 min 時 $R^2=0.9452$ ；反應到 1 min 時 $R^2=0.9866$ ，因此，本實驗以 0.75 min (45sec) 為觀察 arginine transport 之初速率之時間範圍。

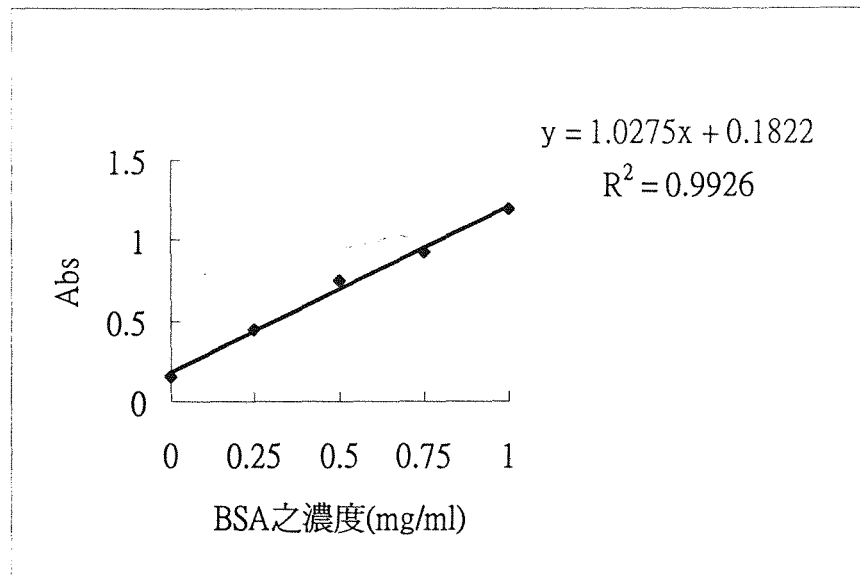


圖 3-2 蛋白質濃度測定標準曲線之製作

Fig. 3-2 The standard curve of protein concentration.

以 0mg/ml、0.25mg/ml、0.5mg/ml、0.75mg/ml、1mg/ml 之濃度的 BSA，在波長 660nm 下測得吸光值，以 BSA 之濃度對其吸光值做圖，求出趨勢線方程式：

$$Y=1.0275X + 0.1822 (R^2=0.9926)$$

四：結果

白芍定量之結果

以 HPLC 方法將不同濃度芍藥甘標準品溶液所得白芍指標成份的波峰面積對內部標準品波峰面積之比值為縱座標，並以所注入標準品的濃度為橫座標，作一線性迴歸。實驗結果分別在 15.26 min 及 52.70 min 有 peak 出現，而單獨注射內部標準品時則滯留時間在 52.70 min 有 peak 出現，表示 15.26 min 出現之 peak 為標準溶液，求得檢量線方程式： $Y=20.802X+0.1306$ （圖 4-1）。由檢品溶液所得指標成份的波峰面積對內部標準品波峰面積之比值，以此檢量線方程式換算芍藥甘含量。

將四批經過水萃並凍乾過的白芍粉末，經過 HPLC 予以定量，求得指標成份的波峰面積對內部標準品波峰面積之比值，分別為 3.607、2.075、1.753 及 3.607，經由檢量線線性迴歸方程式 $Y=20.802X+0.1306$ 分別得到檢品溶液中芍藥甘含量分別為 0.1671 mg/ml、0.0934 mg/ml、0.0779 mg/ml 及 0.1647 mg/ml，經換算可得每毫克白芍水萃物粉末中此標準品含量各為 0.0668 mg、0.0373 mg、0.0311 mg 及 0.0658 mg。以下實驗中白芍水萃物添加量，均以其中芍藥甘含量為基礎。

注射 LPS 誘發敗血症大白鼠其體重、脾臟重量之變化及其他特徵

大白鼠在注射生理食鹽水(控制組)及注射 LPS(lipopolysaccharide)(敗血壓力組)後，禁食 24 小時之實驗結果顯示，敗血壓力組大白鼠之體重減少較多，但與控制組相比較並無顯著上之差異。但其脾臟重百分比方面，敗血壓力組脾臟重量增加較控制組為多，在統計學上有明顯差異($P < 0.01$)(表 4-1)，此外，以 LPS 注射 24 小時後會有嗜睡、活動力變差及腹瀉之情形。

LPS 注射對淋巴細胞複製之影響

由圖 4-2 得知，在控制組老鼠給予 50 $\mu\text{g/ml}$ Concanavalin A (Con A)刺激(以下簡稱 Con A 50)及給予 100 $\mu\text{g/ml}$ Con A 刺激(以下簡稱 Con A 100)時，均與不添加 Con A 有顯著性差異 ($P < 0.01$)，且 Con A 50 與 Con A 100 相比較亦有顯著差異 ($P < 0.05$)，在控制組以 Con A 50 之複製效果最佳。而在敗血壓力組老鼠給予 Con A 50 與不添加 Con A 有顯著性差異 ($P < 0.01$)，給予 Con A 100 與不添加 Con A 亦有顯著差異 ($P < 0.05$)，且發現 Con A 50 較 Con A 100 複製效果佳，但兩者間並無統計上差異 ($P > 0.05$)。

且由圖 4-2 控制組和敗血壓力組相比較發現，在不給予 Con A 刺激時，敗血壓力組之淋巴細胞複製較控制組明顯，兩者有顯著性差異 ($P < 0.05$)，當給予

Con A 50 時，在敗血壓力組雖有增加淋巴細胞複製，但與控制組比較，敗血壓力組淋巴細胞複製率較小，抑制複製達約 49%，且有明顯差異性($P<0.05$)，而當給予 Con A 100 時也有相類似的情形，抑制淋巴細胞複製達 47%，且有明顯差異性($P<0.01$)。

白芍對淋巴細胞複製之影響

由表 4-2 得知，在控制組老鼠之淋巴細胞培養液中，添加不同濃度之白芍，而不給予任何 Con A 刺激時，發現當添加白芍水萃物相當於芍藥甘 65.8 $\mu\text{g/ml}$ 培養液以上時，與不給任何白芍相比較，會抑制淋巴細胞複製，且有顯著性差異 ($P<0.05$)，以 Con A 50 刺激下，白芍水萃物雖有促進淋巴細胞增殖現象，但與未添加白芍水萃物者相比較並無統計上之差異，當白芍水萃物添加量相當於芍藥甘 329 $\mu\text{g/ml}$ 培養液以上時，與不給任何白芍相比較，會抑制淋巴細胞複製，且有顯著性差異 ($P<0.01$)。而當給予 Con A 100 刺激時，發現白芍水萃物添加量相當於芍藥甘 0.65-32.9 $\mu\text{g/ml}$ 培養液時，可促進淋巴細胞複製，且在添加量相當於芍藥甘 6.58 $\mu\text{g/ml}$ 培養液時，與未添加白芍水萃物者相比較有統計學上之意義 ($p<0.05$)，當白芍水萃物添加量相當於芍藥甘 329 $\mu\text{g/ml}$ 培養液以上時，與不給任何白芍相比較，會抑制淋巴細胞複製，且有顯著性差異 ($P<0.01$)。

由表 4-3 得知，在敗血壓力組老鼠，添加不同濃

度之白芍水萃物，而不給予任何 Con A 刺激時，發現與控制組有相似情形，在添加量為芍藥甘 32.9 $\mu\text{g/ml}$ 培養液時會抑制敗血壓力下之淋巴細胞複製，且與未添加白芍水萃物者相比較有顯著差異 ($P < 0.05$)，而添加量相當於芍藥甘 65.8-329 $\mu\text{g/ml}$ 之培養液時亦會抑制敗血壓力下之淋巴細胞複製，且與未添加白芍水萃物者相比較有顯著差異 ($P < 0.01$)。在 Con A 50 刺激下，來自敗血壓力下之大鼠淋巴細胞與來自控制組者類似地會受白芍水萃物促進其增殖作用，但與未添加白芍水萃物之敗血大鼠淋巴細胞相較並無統計上差異，當白芍水萃物添加量相當於芍藥甘 329 $\mu\text{g/ml}$ 培養液以上時，與不給任何白芍相比較，會抑制淋巴細胞複製，且有顯著性差異 ($P < 0.01$)。而當給予 Con A 100 時，白芍水萃物在添加量相當於芍藥甘 0.65-65.8 $\mu\text{g/ml}$ 培養液時，可促進敗血壓力下之淋巴細胞複製。且添加量在芍藥甘 3.29-32.9 $\mu\text{g/ml}$ 之培養液時，此促進作用有顯著意義 ($p < 0.05$)，當白芍水萃物添加量相當於芍藥甘 329 $\mu\text{g/ml}$ 培養液以上時，與不給任何白芍相比較，會抑制淋巴細胞複製，且有顯著性差異 ($P < 0.01$)。

注射 LPS 對精胺酸運輸速率之影響

有關淋巴細胞精胺酸運輸動力學之觀察結果，本研究以兩種方式表示，其一為將每組實驗條件下所取得之數據平均後以 Eadie-Hofstee plot 作圖，所得 K_m 、 V_{max} 分別示於各圖之說明文中。另一為將每

組實驗條件下所取得之數據分別以 Eadie-Hofstee plot 作圖得 K_m 及 V_{max} ，然後以平均值±標準偏差表示並示於表 4-4。控制組與注射 LPS 組，經過 24 hr 50 $\mu\text{g/ml}$ Con A 刺激後之淋巴細胞的精胺酸運輸其結果分別於(圖 4-3、圖 4-5)，再經由 Eadie-Hofstee plot (V vs V/S) 求得運輸系統高親和力和低親和力之動力學參數 K_m 及 V_{max} 值(圖 4-4、圖 4-6)。研究結果發現控制組大鼠之淋巴細胞之精胺酸運輸系統具有兩種親和力其 K_m 值分別為高親和力： 0.1275 ± 0.0165 mM，低親和力： 18.789 ± 3.053 mM(表 4-4)。敗血壓力組大鼠之淋巴細胞之精胺酸運輸系統亦具有兩種親和力其 K_m 值分別為高親和力： 0.117 ± 0.053 mM，低親和力： 16.477 ± 3.718 mM(表 4-4)。當敗血壓力組之動力學參數和控制組相比較(表 4-4)，發現敗血壓力組高親和力之 K_m 值與 V_{max} 值及低親和力之 K_m 值與 V_{max} 值之改變均無統計上之意義。

白芍對精胺酸運輸速率之影響

為瞭解白芍是否是藉由促進細胞對精胺酸之攝取而達到其藥效，因而觀察白芍添加後對控制組及注射 LPS 組，經 24 hr 50 $\mu\text{g/ml}$ Con A 刺激後之淋巴細胞的精胺酸運輸之影響。白芍水草物之添加量係根據其使淋巴細胞之複製作用達最大之芍藥甘濃度範圍，以相當於 13.16 $\mu\text{g/ml}$ 芍藥甘之量添加，其結果(圖 4-7、圖 4-9)再經由 Eadie-Hofstee plot (V vs V/S) 求得運輸系統高、低親和力之動力學參數 K_m 及 V_{max} 值

(圖 4-8、圖 4-10)。結果在控制組有添加白芍水萃物之高親和力 K_m 值為 0.1926 ± 0.049 mM，低親和力 K_m 值為 21.839 ± 5.187 mM(表 4-4)。在控制組有無添加白芍水萃物(表 4-4)，不管於高、低親和力之 K_m 或 V_{max} 值均無顯著變化，在敗血壓力組有添加白芍水萃物與敗血壓力組相比較，亦發現不管於高、低親和力之 K_m 或 V_{max} 值均無統計上之差異。

白芍於 NK 細胞活性測定及未來研究方向之評估

在無白芍水萃物存在下敗血壓力組之 NK 細胞毒殺特性雖低於控制組，但無顯著差異(表 4-5)。在白芍水萃物對控制組大鼠 NK 毒殺活性之影響方面，由表 4-6 之結果可發現，白芍水萃物之添加有抑制 NK 活性之趨勢，但亦無統計上之意義。在敗血壓力組大鼠，亦發現白芍水萃物之添加有抑制 NK 活性之趨勢，且無統計上之意義(表 4-7)。而在表 4-8 白芍水萃物在添加量相當於芍藥甘 $32.9 \mu\text{g/ml}$ 以上之培養液時可增加 YAC-1 之死亡。

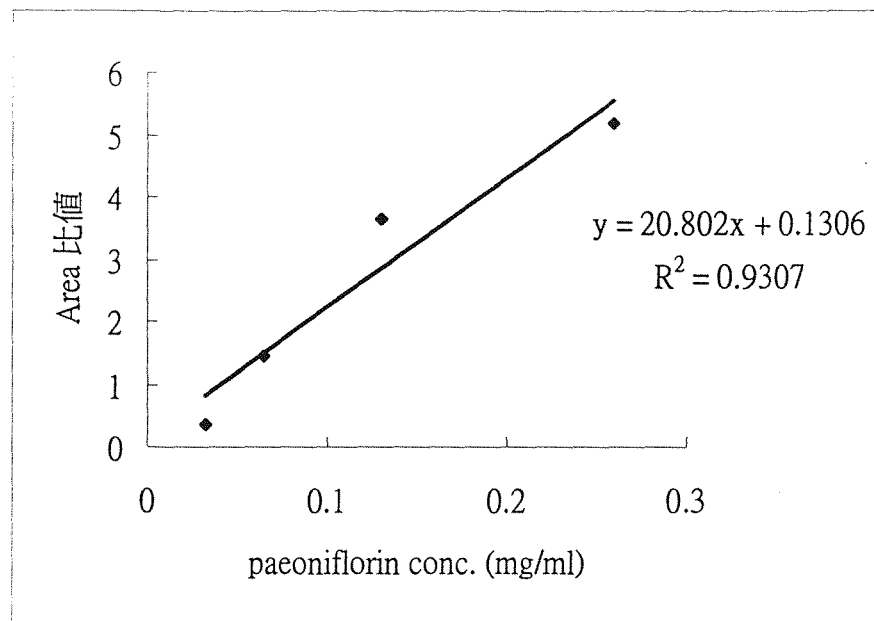


圖 4-1 芍藥甘檢量線之製作。

Fig.4-1 Calibration curve of paeoniflorin.

以微量吸管吸取 paeoniflorin 標準溶液，以 70% 甲醇分別配製成 0.0325mg/ml、0.065mg/ml、0.13mg/ml、0.26mg/ml 之不同濃度之待測液，取 4 隻 1ml 定量瓶，內各加 0.1ml 內部標準溶液(n-Butyl p-Hydroxybenzoate) 分別取 20 μ l 注入 HPLC 中，以各濃度之標準品溶液所得標準品指標成份的波峰面積對內部標準品波峰面積的比值為縱座標，注入標準品的量為橫座標，做一線性迴歸，求得檢量線方程式 $Y=20.802X + 0.1306$

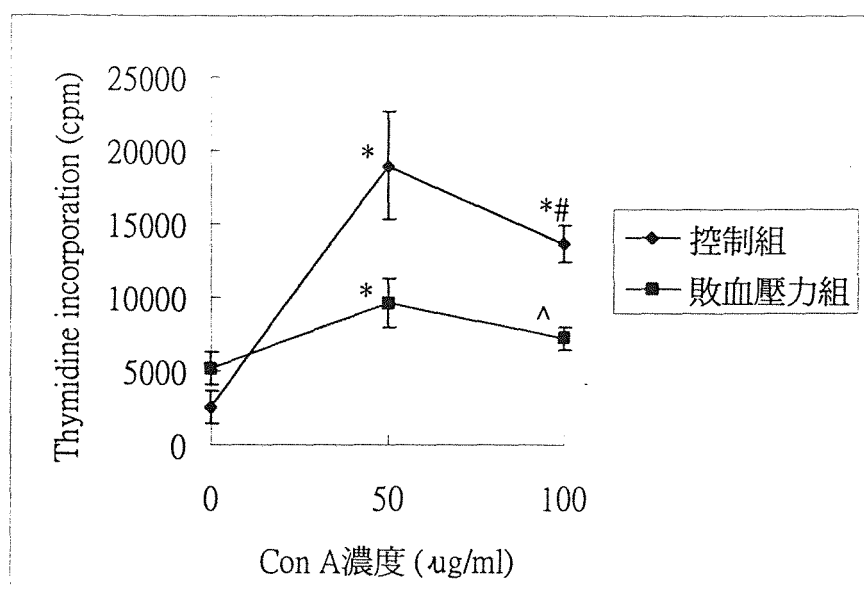


圖 4-2 控制組及敗血壓力組給予不同濃度 Con A 之淋巴細胞複製率。

Fig. 4-2 The proliferation rate of lymphocytes from control rats and septic rats in the presence of various concentration of Con A.

大白鼠分別注射生理食鹽水及 LPS 24 小時後犧牲，取出淋巴結之淋巴細胞，以不同濃度之 Con A 培養 48 小時，其 $[H^3]$ thymidine 併入胞內 DNA 之量，結果以 Mean \pm SD 表示(每個點表示四個實驗數據之平均值)。

* 表示與 Con A 0 μ g/ml 比較時，有顯著性差異($p < 0.01$)

表示 Con A 50 μ g/ml 與 Con A 100 μ g/ml 比較有顯著性差異($p < 0.05$)

^ 表示與 Con A 0 μ g/ml 比較時，有顯著性差異($p < 0.05$)

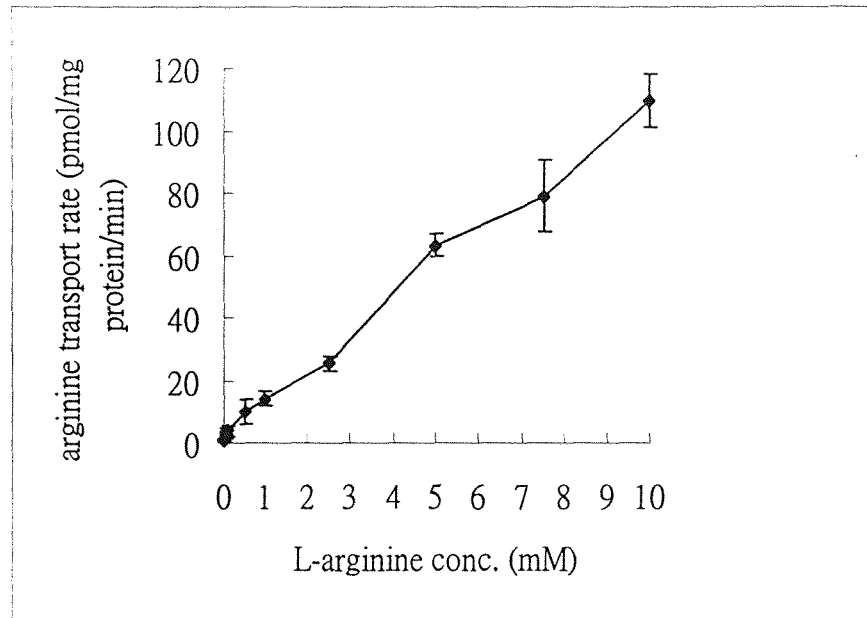


圖 4-3 不同精胺酸濃度下，控制組大鼠淋巴細胞之精胺酸運輸速率。

Fig. 4-3 The transport rate of arginine of lymphocyte from control rats at various concentration of arginine.

注射生理食鹽水之老鼠的淋巴細胞培養 24 小時後，與含注射生理食鹽水透析過之血清，在不同濃度之精胺酸(0.005 mM-10mM)，反應 45 秒之精胺酸運輸速率，結果以 Mean \pm SD 表示 (每個點表示三次分開之實驗所得數據之平均值，每次實驗一至三重複)。

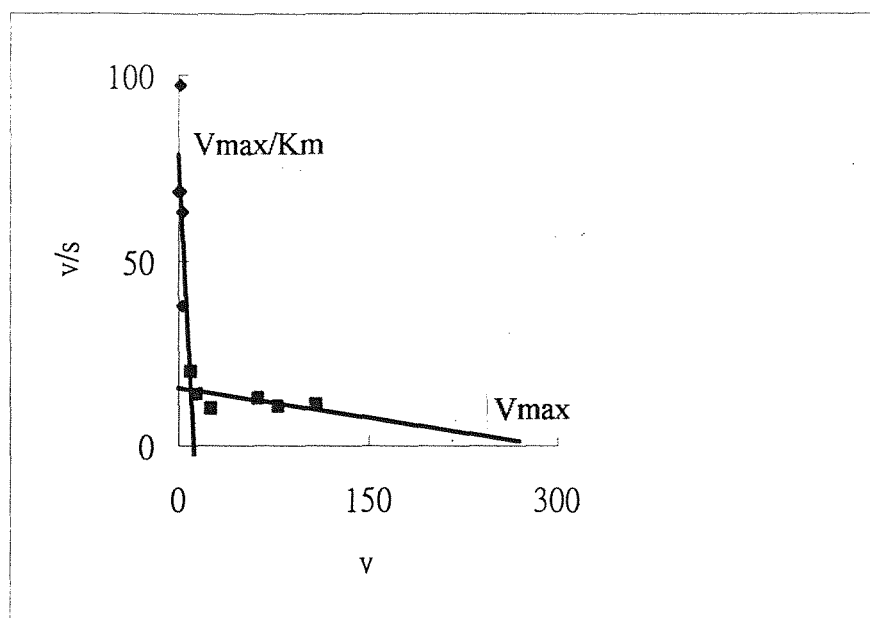


圖 4-4 控制組大鼠淋巴細胞之精胺酸運輸動力學 Eadie-Hofstee plot (V vs V/S)作圖。

Fig. 4-4 The Eadie-Hofstee plot for the kinetic of arginine transport in lymphocytes from control rats.

數據來自圖 4-3 之結果，由此圖可分別得到高、低親和力之 K_m 值及 V_{max} 值，所得之高親和力 K_m 值為 0.153 mM； V_{max} 值為 12.40 pmol/mg protein/min；低親和力 K_m 值為 15.313 mM； V_{max} 值為 269.96 pmol/mg protein/min.

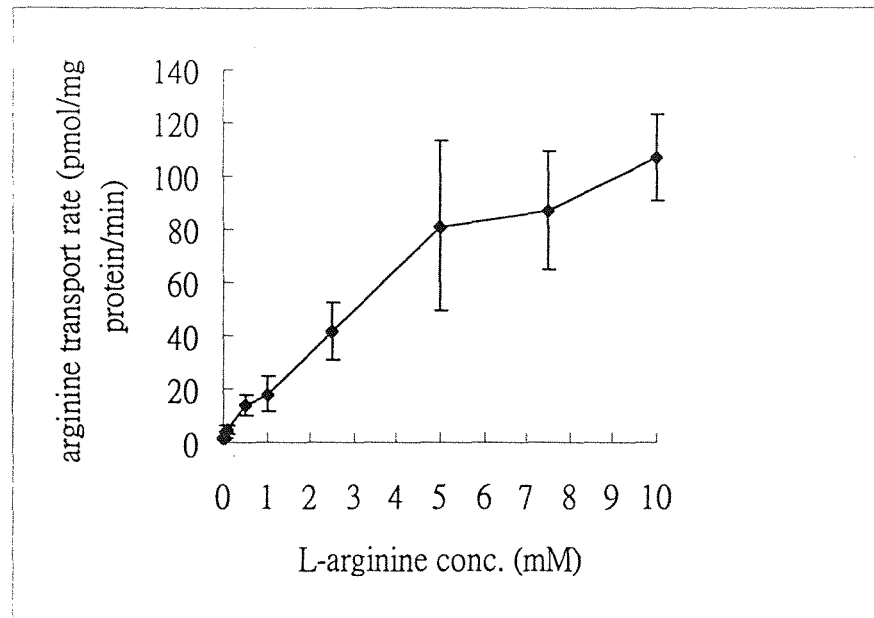


圖 4-5 不同精胺酸濃度下，敗血壓力組大鼠淋巴細胞之精胺酸運輸速率。

Fig. 4-5 The transport rate of arginine of lymphocyte from septic rats at various concentration of arginine.

注射 LPS 之老鼠的淋巴細胞培養 24 小時後，與含注射 LPS 透析過之血清，在不同濃度之精胺酸(0.005mM-10mM)，反應 45 秒之精胺酸運輸速率，結果以 Mean \pm SD 表示（每個點表示三次分開之實驗所得數據之平均值，每次實驗一至三重複）。

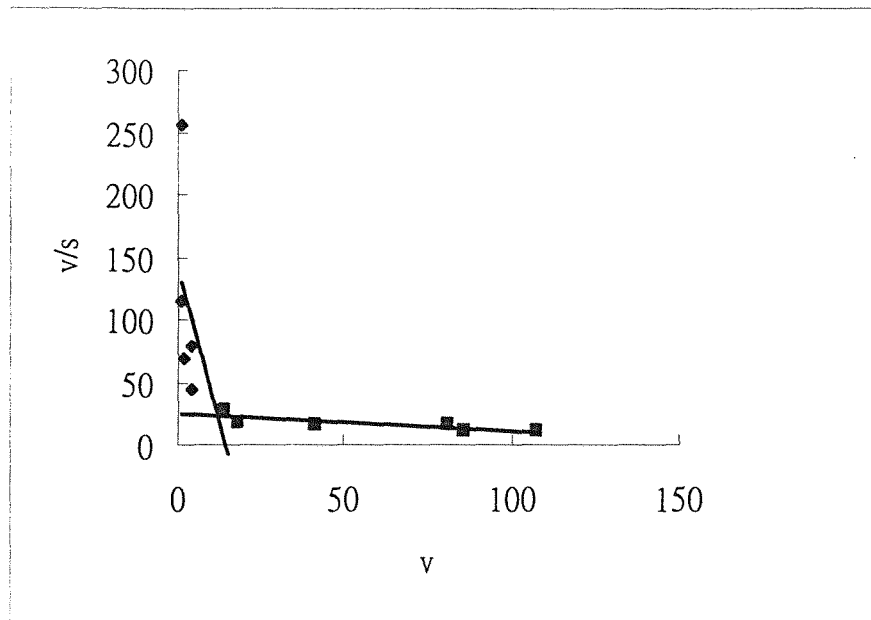


圖 4-6 敗血壓力組大鼠淋巴細胞之精胺酸運輸動力學
Eadie-Hofstee plot (V vs V/S)作圖。

Fig. 4-6 The Eadie-Hofstee plot for the kinetic of arginine
transport in lymphocytes from septic rats.

數據來自圖 4-5 之結果，由此圖可分別得到高、低親和力之 K_m 值及 V_{max} 值，所得之高親和力 K_m 值為 0.101 mM； V_{max} 值為 14.33 pmol/mg protein /min；低親和力 K_m 值為 7.81 mM； V_{max} 值為 188.42 pmol/mg protein/min.

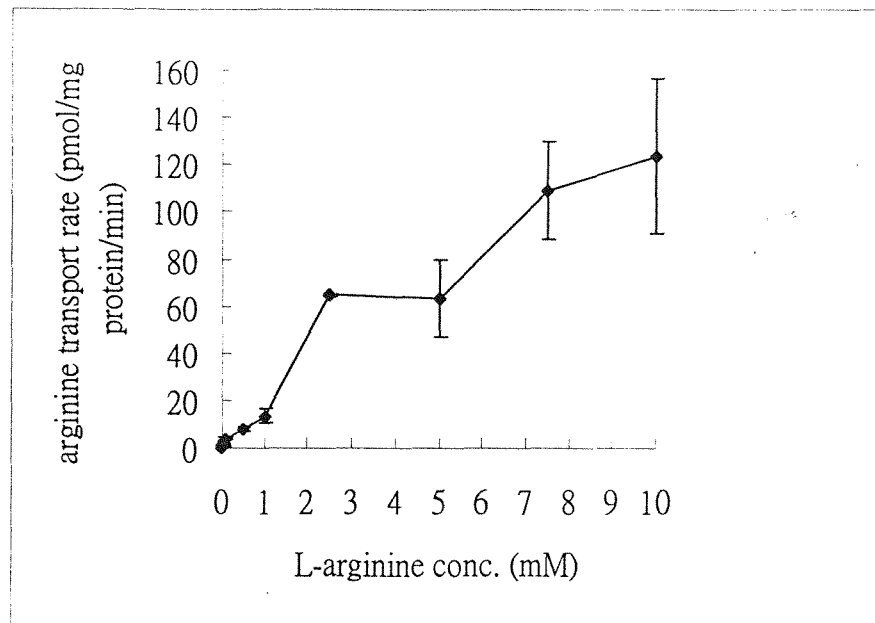


圖 4-7 不同精胺酸濃度下，控制組大鼠淋巴細胞，添加白芍水草物之精胺酸運輸速率。

Fig. 4-7 The transport rate of arginine of lymphocyte from control rats at various concentration of arginine with the addition of water of *Pasonia lactifloro*.

注射生理食鹽水之老鼠的淋巴細胞培養 24 小時後，與含注射生理食鹽水透析過之血清，添加白芍(13.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 芍藥甘)，在不同濃度之精胺酸下(0.005-10mM)，反應 45 秒之精胺酸運輸速率，結果以 Mean \pm SD 表示(每個點表示三次分開之實驗所得數據之平均值，每次實驗一至三重複)。

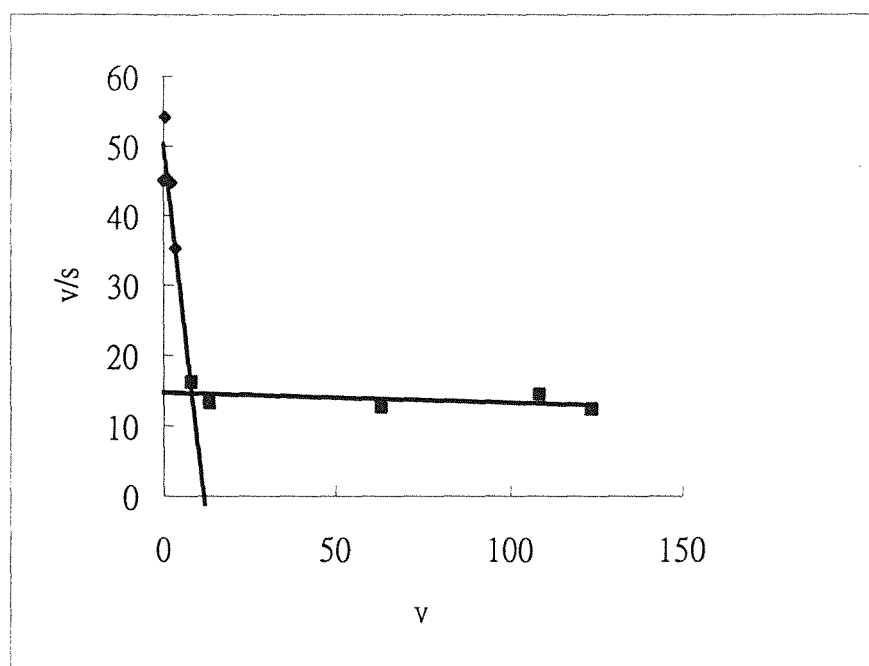


圖 4-8 控制組大鼠淋巴細胞，添加白芍水草物之精胺酸運輸動力學 Eadie -Hofstee plot (V vs V/S) 作圖。

Fig. 4-8 The Eadie-Hofstee plot for the kinetic of arginine transport in lymphocytes from control rats with the addition of water extract of *Pasonia lactifloro*.

數據來自圖 4-7 之結果，由此圖可分別得到高、低親和力之 K_m 值及 V_{max} 值，所得之高親和力 K_m 值為 0.230 mM； V_{max} 值為 11.8 pmol/mg protein /min；低親和力 K_m 值為 28.1 mM； V_{max} 值為 477 pmol/mg protein/min.

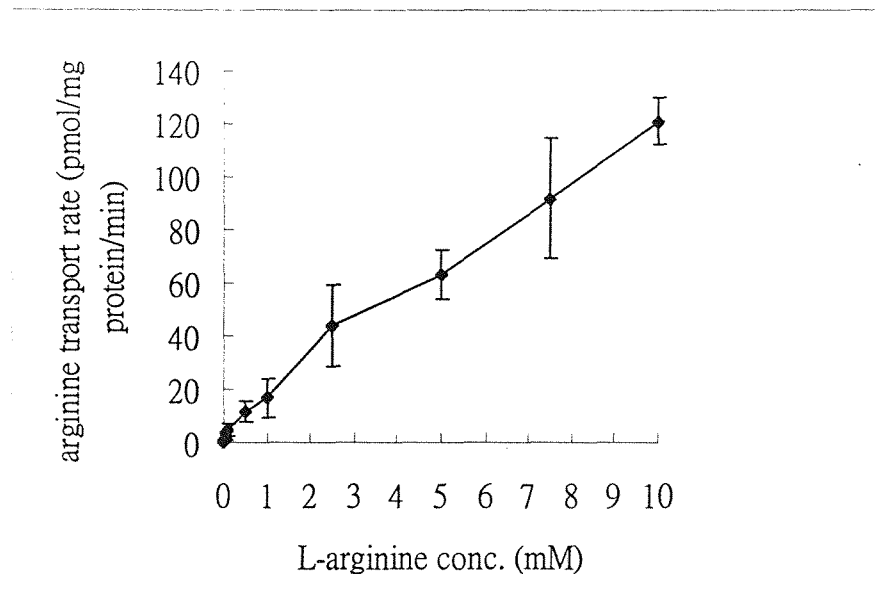


圖 4-9 不同精胺酸濃度下，敗血壓力組大鼠淋巴細胞，添加白芍水萃物之精胺酸運輸速率。

Fig. 4-9 The transport rate of arginine of lymphocyte from septic rats at various concentration of arginine with the addition of water of *Pasonia lactiflora*.

注射 LPS 之老鼠的淋巴細胞培養 24 小時後，與含注射 LPS 透析過之血清，添加白芍(13.16 $\mu\text{g/ml}$ 芍藥甘)，在不同濃度之精胺酸(0.005-10mM)，反應 45 秒之精胺酸運輸速率，結果以 mean \pm SD 表示 (每個點表示三次分開之實驗所得數據之平均值，每次實驗一至三重複)。

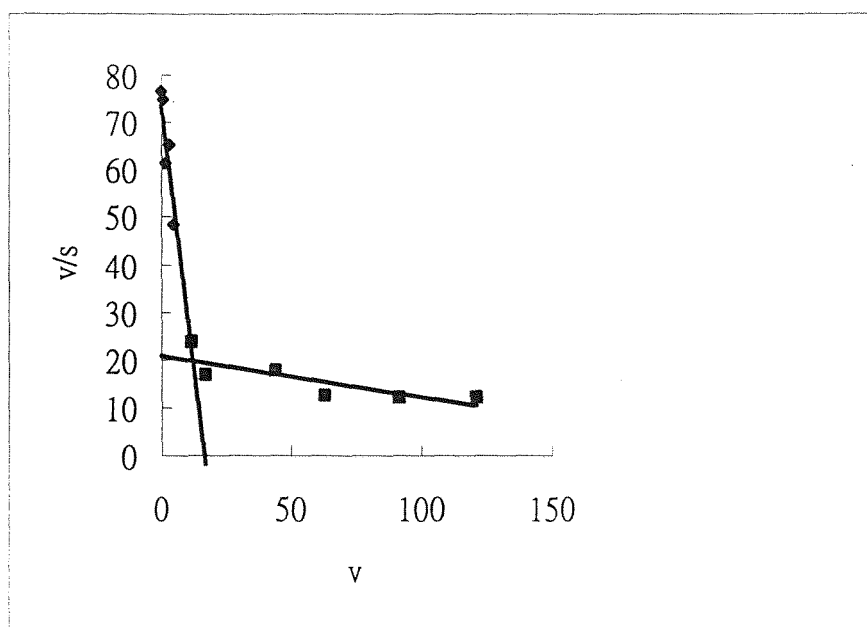


圖 4-10 敗血壓力組大鼠淋巴細胞，添加白芍水萃物之精胺酸運輸動力學 Eadie-Hofstee plot (V vs V/S) 作圖。

Fig. 4-10 The Eadie-Hofstee plot for the kinetic of arginine transport in lymphocytes from septic rats with the addition of water extract of *Pasonia lactifloro*.

數據來自圖 4-9 之結果，由此圖可分別得到高、低親和力之 K_m 值及 V_{max} 值，所得之高親和力 K_m 值為 0.225 mM； V_{max} 值為 16.8 pmol/mg protein /min；低親和力 K_m 值為 11.50 mM； V_{max} 值為 240.12 pmol/mg protein/min.

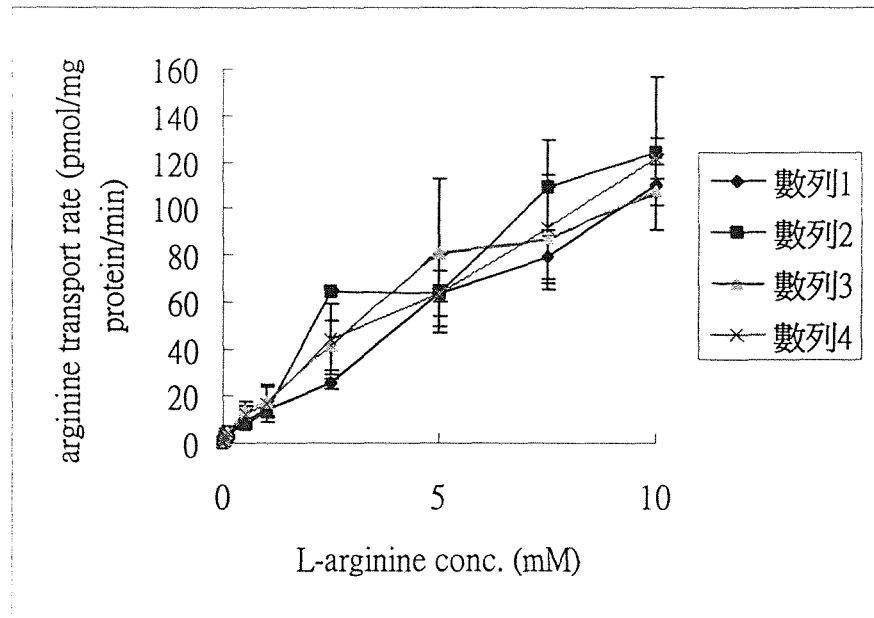


圖 4-11 於不同精胺酸濃度下，各種處理對精胺酸運輸速率之影響。

Fig. 4-11 Summary of the effect of water extract of paeoniflorin on arginine transport rate of lymphocytes from control and septic rats at various concentration of arginine.

數列 1：注射生理食鹽水之老鼠的淋巴細胞培養 24 小時後，與含注射生理食鹽水透析過之血清，在不同濃度之精胺酸(0.005mM-10mM)，反應 45 秒之精胺酸運輸速率

數列 2：注射生理食鹽水之老鼠的淋巴細胞培養 24 小時後，與含注射生理食鹽水透析過之血清，添加白芍，在不同濃度之精胺酸(0.005mM-10mM)，反應 45 秒之精胺酸運輸速率

數列 3：注射 LPS 之老鼠的淋巴細胞培養 24 小時後，與含注射 LPS 透析過之血清，在不同濃度之精胺酸(0.005mM-10mM)，反應 45 秒之精胺酸運輸速率

數列 4：注射 LPS 之老鼠的淋巴細胞培養 24 小時後，與含注射 LPS 透析過之血清，添加白芍，在不同濃度之精胺酸(0.005mM-10mM)，反應 45 秒之精胺酸運輸速率

統計上的分析法採 Student's t test，數據的表示方式為 Mean \pm SD

表 4-1 注射 LPS 誘發敗血症大白鼠其體重、脾臟重量之變化
 Table 4-1 The induction of sepsis by the injection of LPS on body weight and relative spleen weight of rats.

	控制組 (N=35) (注射生理食鹽水)	敗血壓力組 (N=49) (注射 LPS)
體重變化(g)	-21.69±9.72	-24.35±9.12
脾重/體重比 (g/g)	0.26±0.05	0.42±0.11*

RSW (relative spleen weight = spleen weight / body weight × 100%)

統計上之分析法採 Student's t test，數據的表示方式為 Mean±SD

*: 表控制組和敗血壓力組相比較有顯著差異 (P<0.01)

-: 表示體重減輕

控制組平均值來自 35 個數據

敗血壓力組平均值來自 49 個數據

表 4-2 在不同濃度 Con A 刺激下，添加不同濃度之白芍水萃物對控制組大鼠淋巴細胞複製之影響。

Table 4-2 The effect of various concentrations of water extract of paeoniflorin on the proliferation rate of lymphocytes from control rats.

Con A 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	芍藥甘濃度 ($\mu\text{g/ml}$)						
	0	0.658	3.29	6.58	32.9	65.8	329
Con A 0	2439 \pm 1117	2546 \pm 1107	1647 \pm 136	3274 \pm 1677	2170 \pm 1328	844 \pm 477*	303 \pm 86*
Con A 50	18910 \pm 3661	19100 \pm 2474	20516 \pm 1455	18999 \pm 4231	17920 \pm 1732	16160 \pm 1513	888 \pm 1071 [^]
Con A 100	13607 \pm 1291	16320 \pm 2837	15115 \pm 1935	16298 \pm 1001 [#]	17443 \pm 3076	15412 \pm 3407	173 \pm 60 [^]

白芍水萃物濃度以芍藥甘含量表示，結果以 Mean \pm SD 表示(每個點表示四個實驗數據之平均值)。

* 在 Con A 0 時，為與無白芍存在下有顯著差異(P<0.05)

在 Con A 100 時，為與無白芍存在下有顯著差異(P<0.05)

[^] 在 Con A 50 及 Con A 100 時，為與無白芍存在下有顯著差異(P<0.01)

表 4-3 在不同濃度 Con A 刺激下，添加不同濃度之白芍水萃物對敗血壓力組大鼠淋巴細胞複製之影響。

Table 4-3 The effect of various concentrations of water extract of paeoniflorin on the proliferation rate of lymphocytes from septic rats.

Con A 濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	芍藥甘濃度 ($\mu\text{g/ml}$)						
	0	0.658	3.29	6.58	32.9	65.8	329
Con A 0	5163 \pm 1126	4569 \pm 1411	4436 \pm 549	5542 \pm 1102	3124 \pm 856*	1216 \pm 416**	456 \pm 319**
Con A 50	9545 \pm 1693	7859 \pm 787	9479 \pm 2061	8444 \pm 1422	8414 \pm 613	8857 \pm 2152	1151 \pm 977##
Con A 100	7181 \pm 727	10418 \pm 3204	9645 \pm 694#	10788 \pm 90#	10756 \pm 838#	8900 \pm 1892	746 \pm 357##

白芍水萃物濃度以芍藥甘含量表示，結果以 Mean \pm SD 表示(每個點表示四個實驗數據之平均值)。

* 在 Con A 0 時，為與無白芍存在下有顯著差異(P<0.05)

** 在 Con A 0 時，為與無白芍存在下有顯著差異(P<0.01)

在 Con A 100 時，為與無白芍存在下有顯著差異(P<0.05)

##在 Con A 50 及 Con A 100 時，為與無白芍存在下有顯著差異(P<0.01)

表 4-4 在控制組組及敗血壓力組的老鼠在有無添加相當於芍藥甘 13.16 $\mu\text{g/ml}$ 之白芍水萃物處理下之精胺酸運輸系統之動力學

Table 4-4 The kinetic parameters of arginine transport system in lymphocytes from control or septic rats with or without the addition of water extract of *pasonia lactifloro*.

動力學參數	控制組(注射生理食鹽水)		敗血壓力組(注射 LPS)	
	無白芍	加白芍	無白芍	加白芍
Km (High) (mM)	0.13±0.02	0.19±0.05	0.12 ±0.05	0.17±0.09
Km (Low) (mM)	18.79 ±3.05	21.84 ±5.19	16.48±3.72	12.35±0.96
Vm (High) (pmol/mg protein/min)	11.84±4.90	10.23±2.52	13.63 ±4.97	15.08 ±9.38
Vm (Low) (pmol/mg protein/min)	289.63 ±48.26	353.90 ±142.27	262.559 ±95.57	249.85±70.87

統計上之分析法採 Student's t test，每組數值表示由 3-6 個實驗數據之平均值，數據的表示方式為 Mean±SD

控制組和敗血壓力組相比較，各組之間並無統計上之差異

控制組或敗血壓力組在無添加白芍水萃物時與有添加白芍水萃物相比較，各組之間並無統計上之差異

表 4-5 在控制組及敗血壓力組大鼠，NK 細胞對 YAC-1 之毒殺率。
 Table 4-5 Rate of cytotoxicity of NK cells from control and septic rats to YAC-1 cells.

脾細胞/YAC-1 數目比	控制組 (注射生理食鹽水)%	敗血壓力組 (注射 LPS)%
10 : 1	11.94±11.41	-8.1±14.34
5 : 1	7.01±12.23	0.33 ±15.82
2.5 : 1	7.89±27.89	-2.73 ±19.88
1 : 1	-4.17±9.29	-2.36 ±21.70

統計上之分析法採 Student's t test，數據的表示方式為 Mean±SD
 每組平均值來自 3 個數據

表 4-6 在控制組添加不同濃度之白芍水萃物時，NK 細胞對 YAC-1 之毒殺率。

Table 4-6 The effect of various concentration of water extract of *Pasonia lactifloro* on the rate of cytotoxicity of NK cells from control rats to YAC-1 cells.

脾細胞/YAC-1 數目比	控制組 (注射生理食鹽水)%		
	白芍水萃物		
	0 µg/ml 芍藥甘	1.64 µg/ml 芍藥甘	3.29 µg/ml 芍藥甘
10 : 1	11.94±4.74	4.55±4.74	7.33±9.73
5 : 1	7.01±12.23	3.77±14.17	-1.08±62.72
2.5 : 1	7.89±27.89	-10.24±16.47	-1.36±15.77
1 : 1	-4.17±9.29	-11.35±19.43	-2.06±10.97

統計上之分析法採 Student's t test，數據的表示方式為 Mean±SD
每組平均值來自 3 個數據

表 4-7 在敗血壓力組添加不同濃度之白芍水萃物時，NK 細胞對 YAC-1 之毒殺率。

Table 4-7 The effect of various concentration of water extract of *Pasonia lactifloro* on the rate of cytotoxicity of NK cells from septic rats to YAC-1 cells.

脾細胞/YAC-1 數目比	敗血壓力組 (注射 LPS)%	
	白芍水萃物	
	0 µg/ml 芍藥甘	3.29 µg/ml 芍藥甘
10 : 1	-8.1 ±14.34	-16.06±13.78
5 : 1	0.33±15.82	13.36 ±46.10
2.5 : 1	-2.73±19.88	-14.76 ±8.58
1 : 1	-2.36±21.70	-20.80 ±17.73

統計上之分析法採 Student's t test，數據的表示方式為 Mean±SD 每組平均值來自 3 個數據

表 4-8 各種白芍水萃物對 YAC-1 存活率之影響。

Table 4-8 The survival rate of YAC-1 in the presence of various concentration of water extract of *Pasonia lactifloro* .

白芍水萃物含量(芍藥甘 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	YAC-1 存活率
0	89.69 %
1.64	86.1 %
3.29	88.48 %
32.9	58 %
329	34.33 %

每組平均值來自 3 個數據

伍、討論

大鼠對 LPS 注射之一般反應

注射 LPS 會刺激 IL-1 之產生，而過多之 IL-1 分泌會造成發燒、發炎、嗜睡、疲倦、組織的破壞、血管硬化等情形(張建國 1996)，1993 年 Torre 則指出注射內毒素會導致較低之食物攝取、體重減輕、較少胸腺細胞結構(less thymic cellularity)、較大脾臟重量，本實驗也發現類似之結果(表 4-1)，即 LPS 注射導致體重減輕較多，且有明顯脾臟增重現象，1981 年 Ingram 等人亦指出老鼠注射 LPS 會增加脾臟重量，認為可能是注射 LPS 後，脾臟處於發炎狀態，會增加巨噬細胞的量，因而脾臟重量增加。此外，本實驗也發現注射 LPS 至老鼠有腹瀉之情形。

Con A 對控制組及敗血壓力組大鼠淋巴細胞複製能力之影響

在圖 4-2 之結果發現，不管在控制組或敗血壓力組老鼠，給予不同濃度的 Con A 刺激時，均與不添加 Con A 之淋巴細胞有顯著性差異，且 Con A 50 和 Con A 100 相比較亦有差異，在注射生理食鹽水組 Con A 50 之複製效果較 Con A 100 佳，而在敗血壓力組亦是以 Con A 50 之複製效果較 Con A 100 好，顯示不同濃度之 Con A 刺激不同生理狀態下之淋巴細胞，會有不同的複製效果。此可能與在不同生理情況下，不同濃度

之 Con A 與 T 細胞活化有關之表面分子 T 細胞受器中的 CD₃ 結合數目有關(Licastro, et al. 1993)。Con A 刺激淋巴細胞的複製，很類似受專一性抗原刺激，而開始一連串的淋巴細胞增殖作用，因此 Con A 可代表(模擬)外來抗原對 T-細胞之刺激作用。而在不給予 Con A 刺激時，敗血壓力組淋巴細胞複製較控制組明顯，且有顯著差異，顯示 LPS 會刺激淋巴細胞的增殖，這可能是由於 LPS 至老鼠對老鼠的 B 淋巴細胞為一種刺激分裂原(Morrison and Jacobs, 1976)，而 1983 年 Vogel 等人也提出內毒素 LPS 會誘發 T 淋巴細胞增殖，因而注射 LPS 之老鼠分離出的淋巴結淋巴細胞表現較高複製能力。

而當給予 Con A 50 及 Con A 100 時，敗血壓力組與未給予 Con A 時相比較，敗血壓力組雖有增加淋巴細胞複製，但與控制組比較，敗血壓力組分別在 Con A 50 及 Con A 100 刺激 24 小時後，抑制淋巴細胞的複製達 49% 及 47%，有文獻指出以刺激分裂原 PHA 和 Con A 培養敗血病人之周邊淋巴細胞發現其 IL-2 濃度及淋巴細胞之複製力也下降，且在敗血壓力下，淋巴細胞功能減弱，淋巴細胞複製時，IL-2 受器及 T-細胞所分泌的 IL-2 分子明顯減少，而 IL-2 的功能與細胞複製有關，當 T-淋巴細胞數目減少時，則後續之免疫活性將受影響。(Wood, 1984 and Nishijima, 1986)。另外也有學者指出，以刺激分裂原 PHA 和 Con A 培養敗血症大白鼠的脾臟細胞，其 IL-2 濃度及脾臟細胞的複製能力亦會下降(Gough, et al. 1988)。1993 年 Marshall 等人指出靜脈注射革蘭氏陰性菌至老鼠

24 小時後犧牲，發現顯著壓抑 Con A 誘發淋巴細胞之增殖反應，此可能與革蘭氏陰性菌之內毒素可誘發糖皮酯醇 (glucocorticoids, GS) 之釋放有關 (Ku et al. 1996)，而革蘭氏陰性菌 LPS 所誘發之 GS 能抑制 IL-2 產生，而減低 T 淋巴球之繁殖 (Gillis, et al. 1979)。Fauci 於 1974 年也指出在 *in vivo* 之實驗，若以 PHA 為細胞刺激分裂素時，淋巴球繁殖率受 GS 之影響不大，但若以 Con A 刺激時則有明顯下降現象。本研究之結果與以上多位學者研究之結果相符合。

白芍對於控制組及敗血壓力組大鼠淋巴細胞複製能力之影響

表 4-2、4-3 結果顯示不管在控制組或敗血壓力組，不給予任何 Con A 刺激時，發現在添加白芍水草物相當於芍藥甘 0-32.9 $\mu\text{g/ml}$ 培養液時並未刺激淋巴細胞的增生，而在添加之白芍水草物相當於芍藥甘 65.8 $\mu\text{g/ml}$ 培養液以上時，則會抑制控制組淋巴細胞的增殖，而敗血壓力組在添加之白芍水草物相當於芍藥甘 32.9 $\mu\text{g/ml}$ 培養液以上時亦會抑制淋巴細胞的增殖。雖至目前尚未有文獻提到白芍萃取物對淋巴細胞之影響，但有學者曾以白芍總甘 (total glucosides of paeony, TGP) 做研究，1992 年陳敏珠指出高濃度白芍總甘對 LPS 刺激巨噬細胞分泌 IL-1 與 TNF- α 以及 B 細胞增殖反應具有抑制作用，此至少有部分是藉由 IL-1 產生大量 PGE₂ 有關。梁君山等人用小鼠胸腺細胞增殖檢測 IL-1 及 TGP 對 IL-1 產生的影響進行探

討，結果發現 LPS 誘發小鼠胸腺巨噬細胞產生 IL-1 之最佳濃度為 8 mg/L。1989 年梁君山指出 TGP 可依賴性地增加 IL-1 之產生，但高濃度 TGP(0.25-125 mg/L) 時，IL-1 之產生顯著下降，顯示 TGP 對 IL-1 之產生具有雙向作用，且 1994 年王志堅指出在 0.1-0.5 mg/L 劑量下，TGP 對正常人的 LPS 誘發周邊單核細胞產生 IL-1、PHA 誘發淋巴增殖和 IL-2 之產生均呈濃度性的雙向作用。雖然來自巨噬細胞之 PGE₂ 可抑制 IL-2 之產生 (Walker, et al. 1983)，但在本研究系統中，僅有極少量巨噬細胞存在，這是否足以造成對淋巴細胞複製之影響有待進一步觀察。欲知此 *in vitro* 之作用是否受巨噬細胞影響，可移除本研究細胞製備物中之黏著性細胞再做增殖實驗。

當控制組或敗血壓力組給予 Con A 50 及 Con A 100 時，在低濃度白芍會刺激淋巴細胞增殖，而在高濃度白芍卻會抑制淋巴細胞增殖，此情形與 1995 年劉鷹翔與馬玉卓及 1994 年徐叔雲在白芍總甘免疫的基礎與研究進展一文中所提到，TGP 對小鼠脾淋巴細胞 Con A 增殖反應和體外抗體誘生呈現濃度依賴性雙向作用相似，低濃度 TGP 促進 Con A 增殖反應和 Th 細胞誘生，而高濃度時會抑制。由表 4-2、4-3 結果可知，當有 Con A 刺激時，低濃度的白芍可能對淋巴細胞的增殖反應具有促進作用，由本實驗之結果，當在有刺激分裂原存在下(此模擬抗原結合淋巴細胞之情形)，白芍確實具有增強免疫力的效果。

本研究發現在無 Con A 刺激下白芍水草物並無誘發細胞複製之作用，但在 Con A 存在下，其適量可

促進細胞之複製，由此推論白芍水萃物之成分可促進淋巴細胞進入細胞週期(cell cycle) 後之作用，但無法使休止狀態之細胞進入細胞週期。

有鑑於上述白芍水萃物對活化之淋巴細胞複製功能之雙向影響，是否表示白芍水萃物對於動物體內其它快速分生細胞，例如腸黏膜細胞之複製作用亦有雙向之影響，有待更進一步探討。

白芍對控制組及敗血壓力組大鼠淋巴細胞利用精胺酸之影響

淋巴細胞陽離子性胺基酸運輸系統動力學曾由 1994 年 Liu 和 Newsholme 進一步探討及確認，並由精胺酸進入淋巴細胞之研究發現，此陽離子性胺基酸可經由高親和力及低親和力兩種過程進入細胞，如增加之部份為高親和力者，則因 K_m 值接近生理狀態下之濃度(約 $100 \mu\text{M}$)，細胞對陽離子性胺基酸之利用可大為提高，無需給予過量精胺酸，可避免增加體內排除含氮廢物之負擔；但若增加之部份主要為低親和力 (K_m 大於 1 mM) 則可能有必要更進一步探討促進其運輸之方式及營養上適當之供應濃度。而假使促進精胺酸運輸系統活性並未改變 K_m 值而只改變 V_{max} 值，則表示增加細胞膜上之運輸器數量，但若促進精胺酸運輸系統活性是改變 K_m 值，則可能因改變運輸系統之親和力(例如改變其立體結構)或改變細胞膜內外之電位差。而本實驗敗血壓力組與控制組在經過 24 hr Con A 刺激之淋巴細胞精胺酸運輸相比較，發現注射

LPS 至老鼠，並未改變高、低親和力之 K_m 值，而 V_{max} 也未改變(表 4-4)，顯示處於病理狀態下之淋巴細胞之功能降低應不是經由 LPS 對精胺酸之運輸動力學的改变。

過去在其他 *in vitro* 研究中，有學者指出 LPS 加在培養液會促進 mouse 腹腔巨噬細胞、老鼠肺部微血管及血管內皮細胞精胺酸運輸能力，但 1996 年 Durante 等學者卻發現血管平滑肌精胺酸之運輸並不受 LPS 影響，因此提出精胺酸之運輸的調節作用會因細胞種類而有差異。1995 年 Cendan 等人在 *in vitro* 研究發現 IL-1 能促進精胺酸之運輸。且 1994 年 Inoue 等人也指出在肝血漿膜濾泡(hepatic plasma membrane vesicles, HPMVs)，注射 LPS 至老鼠(7.5 mg/kg BW) 在兩小時內會增加精胺酸運輸，但至 24 小時則回復。

本研究之觀察系統均添加來自控制組或敗血壓力組大鼠之血清。當注射 LPS 至體內後，會刺激 IL-1 誘發 PGE_2 之產生，而過量之 PGE_2 會反過來抑制 IL-1 及 $TNF\alpha$ 之釋放(Monick, 1987 and Vancheri, 1996)。在 *in vitro* 之研究，含有 LPS 的培養液在老鼠肺部微血管及血管內皮細胞等細胞會促進精胺酸之運輸，至於將 LPS 注射至老鼠體內的 *in vivo* 實驗則尚未有學者提出是否細胞對精胺酸運輸也有影響，而 1992 年 Pacitti 等人曾注射 $TNF(50 \text{ mg/ml BW})$ 至老鼠，發現 TNF 可刺激肝細胞精胺酸之運輸，因而認為 LPS 注射至體內應也會增進精胺酸之運輸，這可能是 PGE_2 之作用尚未達抑制 IL-1 效果前，但於淋巴細胞之精胺酸運輸目前尚未有過深入研究。由於本研究模型並未測

定血液中 IL-1 之含量，故無法推論相關之原因。但也有可能是未於適當時間點觀察淋巴細胞之精胺酸運輸速率，因而無法瞭解 LPS 注射後對淋巴細胞之調節作用。若欲瞭解是否 IL-1 含量之變化與本研究之結果(未發現運輸動力學受 LPS 影響)有關，可能需要 LPS 注射後於不同時間點犧牲大鼠以觀察淋巴細胞之精胺酸運輸速率及血中 IL-1 含量之相關性。此外注射 LPS 後處於壓力狀態下，固醇類 glucocorticoids 會增加，但 1996 年 Pan 等人於 *in vitro* 實驗曾發現 glucocorticoids 的類似物-dexamethasone 會抑制精胺酸之運輸，因此注射 LPS 後，血液內 glucocorticoids 亦可能是抑制淋巴細胞精胺酸運輸的可能原因之一。

本研究所觀察到之精胺酸運輸系統與其他學者於其他細胞之研究相較之結果示於表 5-1，在高親和力 K_m 方面符合，但在低親和力 K_m 方面不同，可能原因是淋巴細胞低親和性之運輸蛋白與其他動物細胞低親和性之運輸蛋白不同及本研究觀察精胺酸運輸作用時，採用之精胺酸濃度尚未能使運輸作用達到飽和，故有可能造成動力學參數作圖之誤差。

白芍在控制組或敗血壓力組均未增加精胺酸運輸，顯示白芍並未促進淋巴細胞對精胺酸之運輸，但實驗結果卻顯示白芍可促進淋巴細胞之增殖，並非經由精胺酸之運輸的影響。

白芍對於 NK 細胞毒殺性之影響

至於在 NK 活性分析方面，本實驗發現注射 LPS 組與控制組並無顯著差異(表 4-5)，雖然敗血壓力組較低，但無統計上之差異。曾有學者提出 LPS 注射會誘發 IFNs 產生(王聖予 1996)，而 IFNs 可促進 NK 細胞之毒殺作用(Reynolds, et al. 1982)。但 LPS 之注射也會增加 PGE₂ 之生成，而 PGE₂ 則抑制了 NK 細胞之活性(Rader, 1979)，顯示 LPS 有可能增進或抑制 NK 活性，至於本研究是受那種因素或細胞激素之影響，有待研究探討。

在白芍水萃物存在下，NK 細胞對 YAC-1 之毒殺率實驗，結果發現無論在控制組或敗血壓力組，NK 活性也無統計上差異。雖然此結果顯示不管在控制組或敗血壓力組，白芍並未影響 NK 細胞毒殺 YAC-1 細胞之活性，但本實驗之誤差值相當大且有負值出現，這可能是因實驗製備的脾細胞中內含紅血球細胞及巨噬細胞之影響，造成實驗數值不穩定之情形。

而在 YAC-1 之存活率結果發現，在相當於芍藥甘 32.9 µg/ml 培養液以上時，白芍水萃物對 YAC-1 有毒殺作用，而此毒殺作用並未經由 NK 細胞之作用(表 4-8)，且對 YAC-1 具有特異性，因為在芍藥甘 32.9 µg/ml 培養液時白芍對受 Con A 活化之初代培養之淋巴細胞具有促進複製之作用，YAC-1 細胞是來自淋巴瘤(lymphoma)之腫瘤細胞，本實驗之結果顯示白芍本身可能具有直接之抗腫瘤細胞作用。此在未來可再

進一步的研究與探討。

表 5-1 各種不同類型之精胺酸運輸之 K_m (達 1/2 最大運輸速率之精胺酸濃度)。

Table 5-1 The K_m of arginine transporter in various cell type.

動物品系	細胞型	Km(mM)		參考文獻
		高親和性	低親和性	
老鼠	淋巴細胞 (Lymphocytes)	0.13	18.8	本研究
	肝細胞(安定細胞系 McA-RH777)	0.13	2.5	White, M. F. 1982
	肝細胞(安定細胞系 McA-RH8994)	0.06	0.51	White, M. F. 1982
	纖維母細胞 (Fibroblast)	0.13	1.4	White, M. F. 1982
	神經膠質 (glial)	0.015	0.035	Schmidlin, A. 1994
	血管平滑肌細胞 (VSMC)	0.125	1.4	Durante, W. 1995
兔子	兔子結膜 (pigmented rabbit conjunctiva)	0.07	5.9	Hosoya, K.1997
人體	小腸 Caco-2 細胞	0.041	37	Pan, M.1995
豬	肺部動脈內皮 細胞(Pulmonary artery endothelial cells)	0.304	3.9	Greene, B. 1993

陸、結論

在淋巴細胞複製方面，敗血壓力會抑制 Con A 刺激下之複製作用，顯示敗血壓力下會影響淋巴細胞之功能。而白芍對控制組或 LPS 組老鼠淋巴細胞之複製有促進或抑制作用取決於使用之劑量。而白芍對淋巴細胞之複製之促進作用並非經由精胺酸運輸系統之影響。本研究未發現白芍水萃物對來自控制組或 LPS 注射組動物之 NK 細胞毒殺 YAC-1 細胞作用具有影響，且在含量 32.9 $\mu\text{g/ml}$ 芍藥甘以上時白芍水萃物可能對 YAC-1 有毒殺作用。本研究結果指出，白芍應可在正常及敗血壓力下可改善宿主細胞免疫功能，但因其安全域值不大，其適當之攝取劑量有待更進一步之觀察。

柒、参考文献

1. ACCP/SCCM Consensus Conference. Definition of sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies iv sepsis. 1992. Chest 101: 864-874.
2. Albina, J. E., Mills, C. D., Barbul, A., Thirkill, C. E., Henry, W. L., Mastrofrancesco, B. and Caldwell, M. D. 1988. Arginine metabolism in wounds. Am. J. Physiol. 254: E459-E467.
3. Albritton , L. M., Tseng, L., Scadden, D. and Cunningham, J. M. 1989. A potative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. Cell 57: 659-666
4. Anggard, E. 1994. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. Lancet 343: 1199-1206.
5. Barbul, A., Rettura, G., Levenson, S. M. and Seifter E. 1977. Arginine: a thymotropic and wound-healing promoting agent . Surg. Forum . 28: 101-103
6. Barbul, A., Wasserkrug, H. L. and Sisto, D. A. 1980. Thymic and immune stimulatory actions of arginine. JPEN 4: 446-449.
7. Barbul, A., Wasserkrug, H. L., Seifter, E. and Efron, G. 1980. Immunostimulatory effects of arginine in normal and injured rats. J. Surg. Res. 29: 228-235.
8. Barbul, A., Rettura, G. Wasserkrug, H. L. and Efron, G. 1981. Arginine stimulates lymphocyte immune response in healthy humans. Surg. 90: 244-251.
9. Barbul, A. 1986. Arginine: Biochmistry, physiology, and therapeutic implications. JPEN 10: 227-238.
10. Barbul, A., Sisto, D. A., Wasserkrug, H. L., Levenson, S. M., Efron , G. and Seifter, E. 1981. Arginine stimulates thymic immune function and ameliorates the obesity and the hyperglycemia of genetically

obese mice. JPEN 5: 492-495.

11. Baue , A. E., Gunther, B. Hartl, W., Ackenheil, M. and Heberer, G. 1984. Altered hormonal activity in severely ill patients after injury or sepsis. Arch. Surg. 119: 1125-1132.
12. Berilacqua, M. P., Pober, J. S., Wheeler, M. E., Cotran, R. S. and Gimbrone, M. J. 1985. Interleukin I acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell line. J. Clin. Invest. 76: 2003-2011.
13. 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.
14. Borman, A., Wood, T. and Blank, H. 1946. The role of arginine in growth with some observations on the effect of arginoic acid. J. Biol. Chem. 166: 585-594.
15. Boyd, C. A. and Crawford, D. H. 1992. Activation of cationic amino acid transport through system y⁺ correlates with expression of the T-cell early antigen gene in human lymphocytes. Eur. J. Physiol. 422: 87-89.
16. Brittenden, J., Heys, S. D. and Eremin, O. 1994. L-arginine and malignant disease: a potential therapeutic role. Europ. J. Surg. Oncol. 20: 189-192.
17. Buren, C. T., Rudolph, F. B., Kulkarni, A., Pizzini, R., Fanslow, W. C. and Kumar, S. 1990. Reversal of immunosuppression induced by a protein free diet: comparison of nucleotides, fish oil, and arginine. Crit. Care Med. 18: S114-S117.
18. Cendan, J. C., Souba, W. W., Copeland, E. M. and Lind, D. S. 1995. Cytokines regulate endotoxin stimulation of endothelial cell arginine transport. Surg. 117: 213-219.

19. Cerra, F. B., Lehman, S., Konstantinides, N., Konstantinides, F., Shronts, E. P. and Holman, R. 1990. Effect of enteral nutrient on in vitro test of immune function in ICU patients: A preliminary report. *Nutr.* 6: S84-S87.
20. Christensen, H. N. 1990. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiol. Rev.* 70: 43-77.
21. Chuang, J. C., Yu, C. L. And Wang, S. R. 1990. Modulation of human lymphocyte proliferation by amino acids. *Clin. Exp. Immunol.* 81: 173-176.
22. Church, G. M. and Gilbert, W. 1984. Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1991-1995.
23. Clark, I. A. Gray, K. M. and Rockett, E. J. 1992. Increased lymphotoxin in human malarial serum and the ability of this cytokine to increase plasma interleukin-6 and cause hypoglycaemia in mice: implications for malarial pathology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86: 602-607.
24. Closs, E. I., Albritton, L. M., Kim, J. W. and Cunningham, J. M. 1993. Identification of a low affinity, high capacity transporter of cationic acids in mouse liver. *J. Biol. Chem.* 269: 7538-7544.
25. Daly, J. M., Reynolds, J., Thom, A., Kinsley, L., Dietrick-Gallagher, M., Shou, J. and Ruggieri, B. 1988. Immune and metabolic effects of arginine in the surgical patient. *Ann. Surg.* 208: 512-523.
26. Daly, J. M., Leiberman, M. D., Goldfine, J., Shou, J., Rosato, E. F. and Lavin, P. 1989. Enteral nutrition with supplemental arginine, RNA, and omega-3 fatty acids in patients after operation: Immunologic, metabolic, and clinical outcome. *Surg.* 112: 56-63.
27. Daum, J. R., Shepherd D. M. and Noelle. R. J. 1993. Immunotoxicology of cadmium and mercury on B-lymphocytes-I. Effects on lymphocyte function. *J. Immunopharmacol.* 15: 383-394.

28. Deith, E. A., Berg, R. and Specian, R. 1987. Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. *Arch. Surg.* 122: 185-190.
29. Depper, J. M., Leonard, W. J., Drogual, C., Kronke, M., Waldmann, T. A. and Greene, W. C. 1985. Interleukin 2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 4230-4234.
30. Dupre, J., Curtis, J. D., Waddell, R. W. and Beck, J. C. 1968. Alimentary factors in the endocrine response to administration of arginine in man. *Lancet* II: 28-29.
31. Durante, W., Liao, L., Iftikhar, I., O'Brien, W. E. and Schafer, A. I. 1996. Differential regulation of L-arginine transport and nitric oxide production by vascular smooth muscle and endothelium. *Circ. Res.* 78: 1075-1082.
32. Durante, W., Liao, L. and Schafer, A. I. 1995. Differential regulation of L-arginine transport and inducible NOS in cultured vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 268: H1158-H1164.
33. Fauci, A. S., Dale, D. C. 1974. The effect of *in vivo* hydrocortisone on subpopulations of human lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 53: 240-246.
34. Gamble, J. R., Harlan, J. M., Klebanoff, S. J. and Vadas, M. A. 1985. Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8667-8671.
35. Gemsa, D., Steggemann, L., Menzel, J. and Till, G. 1975. Release of cyclic AMP from macrophages by stimulation with prostaglandins. *J. Immunol.* 114: 1422-1424.
36. Gianotti, L., Alexander, J. W., Yonyia, P. and Fukushima, R. 1993. Arginine-supplemented diets improve survival in gut-derived sepsis and peritonitis by modulating bacterial clearance. *Ann. Surg.* 217:644-651.

37. Gillis, S., Crabtree, G. R., Smith, K. A. 1979. Glucocorticoid-induced inhibition of T-cell growth factor production, I. The effect on mitogen-induced lymphocyte proliferation. *J. Immunol.* 123: 1624-1631.
38. Goodwin, J. S., Messner, R. P. and Peaks, G. T. 1978. Prostaglandin suppression of mitogen-stimulated lymphocytes in vitro. *J. Clin. Invest.* 62: 753-60.
39. Goodwin, J.S., and Webb, D. R. 1980. Regulation of the immune response by prostaglandins. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 15: 106-122.
40. 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. *Surg.* 104: 292-300.
41. Greene, B., Pacitti, A. J. and Souba, W. W. 1993. Characterization of L-arginine transport by pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 264: L351-356.
42. Heikkila, K., Schwab, G. 1987. A c-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but not progress from G₀ to G₁. *Nature* 328: 445-449.
43. Heyland, D. K., Cook, D. J. and Guyatt, G. H. 1994. Does the formulation of enteral feeding products influence infectious morbidity and mortality rates in the critically ill patients? *Critical. Care. Med.* 22: 1192-1202.
44. Hosoya, K., Horibe, Y., Kim, K. J. and Lee, V. H. 1997. Na (+)-dependent L-arginine transport in the pigmented rabbit conjunctiva. *Exp. Eye Res.* 65: 547-53.
45. Inoue, Y., Bode, B. P. and Souba, W. W. 1994. Hepatic Na (+)-independent amino acid transport in endotoxemic rats: evidence for selective stimulation of arginine transport. *Shock* 2 : 164-72.

46. Ingram, G. A. and Alexander, J. B. 1981. The primary immune response of brown trout (*Salmo trutta*) to cellular and soluble antigens: Enumeration of antibody-secreting and antigen-binding cells, and the production of antibody. *Acta Biol. Med. Germ.* 40: 317-30.
47. Issekutz, T. B., Stoltz, J. M. and Webster, D. M. 1986. Role of interferon in lymphocyte recruitment into the skin. *Cell. Immunol.* 99: 322-333.
48. Issekutz, T. B. and Stoltz, J. M. 1989. Stimulation of lymphocyte migration by endotoxin, tumor necrosis factor, and interferon. *Cell. Immunol.* 120: 165-173.
49. Jansen, P. M., Tineke, C. T. M. and Chang, L. A. 1996. Release of interleukin-12 in experimental *Escherichia coli* septic shock in baboons: relation to plasma level of interleukin -10 and interferon-gamma. *Blood* 87: 5144-5151.
50. Katsuura, G., Gottschall, P. E., Dahl, R. R. and Arimura, A. 1989. Interleukin -1 beta increases prostaglandin E₂ in rat astrocyte cultures: modulatory effect of neuropeptides. *Endocrinol.* 124: 3125-3127.
51. Kirk, S. J. and Barbul, A. 1990. Role of arginine in trauma, sepsis and immunity. *JPEN* 14: 226S-229S.
52. Ku, N. O., Michie, S. A., Soetikno, R. M., Resurreccion, E. Z., Broome, R. L., Oshima, R.G. and Omary, M. B. 1996. Susceptibility to hepatotoxicity in transgenic mice that express a dominant-negative human keratin 18 mutant. *J. Clin. Invest.* 98: 1034-1046.
53. Licastro, F. Morini, M. C., Bolognesi, A. and Stirpe, F. 1993. Ricin induces the production of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta by human peripheral-blood mononuclear cells. *Biochem. J.* 294: 517-520.
54. Liu, C.T. and Newsholme, E. A. 1994. Arginine and Lymphocyte proliferation. 14th arginine symposium. Paris, France.

55. Liu, C.T. 1995. Studies on the role of arginine in lymphocytes. Ph. D. dissertation, Merton College, Oxford University. England, U. K.
56. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-273 .
57. Maca, R. D. 1983. The effects of prostaglandins on the proliferation of cultured human T lymphocytes. *Immunopharmacol.* 6: 267-277.
58. MacLeod, C. L., Finley, K., Kakuda, D., Kozak, C. A. and Wilkinson, M. F. 1990. Activated T cells express a novel gene on chromosome 8 that is closely related to the murine ecotropic retroviral receptor. *Mol. Cell Biol.* 10: 3663-3674.
59. Madden, H. P., Breslin, R. J, Wasserkrug, H. L, Efron, G. and Barbul, A. 1988. Stimulation of T cell immunity enhances survival in peritonitis. *J. Surg. Res.* 44: 658-663.
60. Marshall, J. C., Ribeiro, M. B., Chu, P. T., Rotstein, O. D. and Sheiner, P. A. 1993. Portal endotoxemia stimulates the release of an immunosuppressive factor from alveolar and splenic macrophages. *J Surg. Res.* 55: 14-20.
61. Mizel, S. B. 1982. Interleukin-1 and T cell activation. *Immunol. Rev.* 63: 51-72.
62. Moncada, S. and Higgs, A. 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New England J. Med.* 329: 2002-2012.
63. Moncada, S., Palmer, R. M. and Higgs, E. A. 1991. Nitric oxide: physiology , pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.
64. Monick, M., Glazier, J. and Hunninghake, G. W. 1987. Human Alveolar macrophages suppress interleukin-1 activity via the secretion of prostaglandin E₂ . *Am. Rev. Respir. Dis.* 135: 72-77.

65. Morrison, D. C. and Jacobs, D. M. 1976. Binding of polymyxin B to the lipid A protein of bacterial lipopolysaccharide. *Immunochem.* 133: 813-821.
66. Nakano, K., Suzuki, S. and Oh, C. 1987. Significance of increased secretion of glucocorticoids in mice and rats injected with bacterial endotoxin. *Brain Behav. Immunol.* 1: 159-172.
67. Nakagawa, I., Takahashi, T., Suzuki, T. and Kobayashi, K. 1963. Amino acid requirements of children: minimal needs of tryptophan, arginine and histidine based on nitrogen balance method. *J. Nutr.* 80: 305-310.
68. Nakaki, T., Hishimawa, K., Suzuki, H., Takao, S. and Kato, R. 1990. L-arginine induced hypotension. *Lancet* 336-696.
69. Neckers, L. M. and Cossman, J. 1983. Transferrin receptor induction in mitogen-stimulated human T lymphocytes is required for DNA synthesis and cell division and is regulated by interleukin-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 3494-3498.
70. Nishijima, M. K., Takezawa, J., Hosotsbo, K. K., Takahashi, H., Shimada, Y., Yoshiya, I. 1986. Serial changes in cellular immunity of septic patients with multiple organ-system failure. *Crit. Care. Med.* 142: 87-91.
71. Pacitti, A. J., Copeland, E. M., Souba, W. W. 1992. Stimulation of hepatocyte $\gamma(+)$ -mediated L-arginine transport by an inflammatory agent. *Surg.* 112: 403-411.
- 72.. Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. and Moncada, S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526.
73. Palmer, R. M. J., Ashton, D. S. and Moncada, S. 1988. Vascular endothelial cells synthesized nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666.

74. Pan, M., Wasa, M., Ryan, U. and Souba, W. 1996. Lipopolysaccharide and tumor necrosis factor stimulate lung microvascular arginine uptake, a response attenuated by dexamethasone. *JPEN* 20: 50-55.
75. Pan, M., Malandro, M., Stevens, B. R. 1995. Regulation of system y⁺ arginine transport capacity in differentiating human intestinal Caco-2 cells. *Am. J. Physiol.* 268: G578-G585.
76. Paul, W. E. and Seder, R. A. 1994. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76: 241-251.
77. Rakoff, J. S., Siver, T. M. and Sinha, Y. N. 1973. Prolactin and growth hormone release in response to sequential stimulation by arginine and TRF. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 37: 641-644.
78. Rande, D. J., Zelinsky, R., Chabrier, P.E., Castaigne, A., Geschwind, Herbert. and Adnot, S. 1992. L-arginine improves endothelium-dependent relaxation of conductance and resistance coronary arteries in coronary artery disease. *J. Cardiovascular Pharmacol.* 20: S211-S218.
79. Rappaport, R. S. and Dodge, G. R. 1982. Prostaglandin E inhibits the production of human interleukin 2. *J. Exp. Med.* 155: 943-948.
80. Reynolds, J. V., Daly, J. M., Zhang, S., Evantash, E., Shou, J., Sigal, R. and Ziegler, M. 1988. Immunomodulatory mechanisms of arginine. *Surg.* 104:142-151.
81. Reynolds, D. S., Boom, W. H. and Abbas, A. K. 1987. Inhibition of B lymphocyte activation by interferon-gamma. *J. Immunol.* 139: 767-773.
82. Reynolds, C. W., Timanen, T. T., Hansen, C. T. and Herberman, R. B. 1982. Natural killer cell activity in the rat. Analysis of effector cell morphology and effects of interferon on natural killer cell function in the a thymic (nude) rat. *Eur. J. Immunol.* 12: 577-582.

83. Roder, J. C. and Klein, M. 1979. Target -effector interaction in the natural cell system IV. Modulation by cyclic nucleotides. *J. Immunol.* 123: 2785-2790.
84. Rose, W. C., Oesterling, M. J. and Womack, M. J. 1948. Comparative growth on diets containing ten and nineteen amino acids, with further observations upon the role of glutamic and aspartic acid. *J. Biol. Chem.* 176: 753-762.
85. Rosenquist, J. B., Ohlin, A. and Lerner, U. H. 1996. Cytokine-induced inhibition of bone matrix proteins is not mediated by prostaglandins. *Inflamm. Res.* 45: 457-463.
86. Rotoli, B. M., Bussolati, O., Dall'Asta, V. and Gazzola, G. C. 1989. The transport of L-arginine in Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 164: 1093-1098.
87. Sato, H., Fujiwara, M. and Bannai, S. 1992. Effect of lipopolysaccharide on transport and metabolism of arginine in mouse peritoneal macrophages. *J. Leukocyte Biol.* 52: 161-164.
88. Schmidlin, A. and Wiesinger, H. 1994. Transport of L-arginine in cultured glial cells. *GLLA* 11: 262-268.
89. Seifter, E., Deturra, G. and Barbul, A. 1978. Arginine: an essential amino acid for injured rats. *Surg.* 84: 224-230.
90. Tabor, C. W. and Tabor, H. 1984. Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53: 749-790.
91. Takauwa, T., Endo, S., Inada, K., Kasai, T., Yamada, Y. and Ogawa, M. 1997. Assessment of inflammatory cytokine, nitrate/nitrite, type II phospholipase A₂, and soluble adhesion molecules in systemic inflammatory response syndrome. *Res. Com. Mol. Pathol. Pharmacol.* 98: 43-52.
92. Thompson, P. A., Jelinek, D. F., Lipsky, P. E. 1984. Regulation of human B cell proliferation by prostaglandin E₂. *J. Immunol.* 133:

2446-2453.

93. Thorton, F. J., Schaffer, M. R. and Barbul, A. 1997. Wound healing in sepsis and trauma . Shock 8: 391-340.
94. Torre, P. M., Ronnenberg, A. G., Hartman, W. J. and Prior, R. 1993. Supplemental arginine and ornithine do not affect splenocyte proliferation in surgically treated rats. JPEN 17: 532-536.
95. Vaage, J. T., Dissen, E., Ager, A., Fossum, S. and Rolstad, B. 1991. Allospecific recognition of hemic cells in vitro by natural killer cells from athymic rats: evidence that allodeterminants coded for by single major histocompatibility complex haplotypes are recognized. Eur. J. Immunol. 21: 2167-2175.
96. Vancheri, C., Crimi, N., Conte, E., Pistorio, M. P., Mastruzzo, C., Lamicela, M., Messin, A. and Mistetta, A. 1996. Human lung fibroblasts inhibit tumor necrosis factor-alpha production by LPS-activated monocyte. Am. J. Res. Cell Mol. Biol. 15: 460-466.
97. Vogel, S. N., Hilfiker, M. L. and Caulfield, M. J. 1983. Endotoxin-induced Tlymphocyte proliferation. J. Immunol. 130: 1774-1779.
98. Vujanovic, N. L., Herberman, R. B., Maghazachi, A. and Hiserodt, J. C. 1988. Lymphokine-activated killer cells in rats. III. A simple method for the purification of large granular lymphocytes and their rapid expansion and conversion into lymphokine-activated killer cells. J. Exp. Med. 167: 15-29.
99. Walker, C., Kristensen, F., Bettens, F. and deweck, A. L. 1983. lymphokine regulation of activated lymphocytes.I.Prostaglandin E₂-induced inhibition of interleukin 2 production. J. Immunol. 130: 1770-1773.
100. Wang, H., Kavanaugh, M. P., North, R.. A. and Kabat, D. 1991. Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. Nature 352: 729-731.

101. Weidenfeld, J., Amire, I. and Shohami, E. 1993. Role of glucocorticoids in the regulation of brain prostaglandin biosynthesis under basal conditions and in response to endotoxin. *Endocrinol.* 132: 941-945.
102. Weidenfeld, J., Crumeyrolle, M. and Haour, F. 1995. Effect of bacterial endotoxin and interleukin -1 on prostaglandin biosynthesis by the hippocampus of mouse brain :Role of interleukin-1 receptors and glucocorticoids. *Neuroendocrine.* 62: 39-46.
103. Wichterman, K. A., Baue, A. E. and Chaudry, I. H. 1980. Sepsis and septic shock- a review of laboratory model and a proposal. *J. Surg. Res.* 29: 189-201.
104. White, M. F. 1985. The transport of cationic acids across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* 822: 355-374.
105. White, M. F. and Christensen, H. N. 1982. Cationic amino acid transport into cultured animal cells. II. Transport system barely perceptible in ordinary hepatocytes. But active in hepatoma cell lines. *J. Biol. Chem.* 257: 4450-4457.
106. Wood, T. T., Rodrick, M. L., O'Mahony, J. B., Palder, S. B., Saporoschetz, I., D'Eon, P. and Mannick, J. A. 1984. Inadequate interleukin-2 production. A fundamental immunological deficiency in patients with major burns. *Ann. Surg.* 200: 311-320.
107. Yamada, S., and Ortaldo, J. R. 1987. Regulation of large granular lymphocytes and human T cell growth and function by recombinant interleukin-2: induction of interleukin 2 receptor and promotion of growth of cells with enhanced cytotoxicity. *J. Leukocyte Biol.* 41: 505-517.
108. 劉鷹翔和馬玉卓. 1995. 白芍的化學成份與藥理研究進展. *中草藥* 26: 437-440.
109. 林秀珍、黃成禹、溫國慶和孫慈悌. 1994. 荊芥連翹湯中

- peoniflorin,geniposide 及 glycyrrhizin 成份之高效液相層析定量方法之研究. 藥物食品分析 2: 133-140.
- 110.劉淑芳、林隆達和溫國慶. 1993. 溫清中梔子之 Geniposide 及芍藥之 paeoniflorin 定量研究. 藥物食品分析 1: 191-198.
- 111.王聖予. 1996. 免疫學. 藝軒出版社. pp10-15.
- 112.呂鋒洲和林仁混. 1987. 基礎酵素學. 聯經公司出版. p56-78.
- 113.盧孟佑和施金元編譯. 1992. Roitt 免疫學. 合記圖書出版社. p350-362.
- 114.張文正總編譯. 1997. KUBY 免疫學. 合記圖書出版社. p356-362.
- 115.徐叔雲. 1994. 白芍總甘免疫藥理的基礎與臨床研究進展. 中醫藥雜誌 5: 19-20.
- 116.顏焜熒和楊玲玲. 1994. 中藥免疫調節之研究. 中醫藥年報 11: 486-488.
- 117.梁君山. 1989. 中國藥理學通報 5: 354.
- 118.陳敏珠. 1992. 中國藥理學通報 8: 409.
- 119.王志堅. 1994. 中國藥理學通報 10: 197.
- 120.張建國. 1996. 中藥方劑對於單核球所分泌細胞激素的作用. 中醫藥年報 14: 133-140.
- 121.林穎正、周昆達、陳甫倫、莊文博、楊明杰和藍敏瑛編譯. 1997. Stryer's 生物化學. 合記圖書出版社. P509-528.