



## 一、中文摘要

為瞭解氧化壓力及糖化蛋白質在糖尿病之淋巴細胞功能低下所扮演的角色，本研究進行二部分實驗。第一個部分將 Wistar 大鼠依體重隨機分為三組，分別經由尾靜脈注射 STZ(65 mg/kg)、載劑或於 STZ 誘發糖尿病後第三天起每日注射一次長效胰島素(4 units/rat)。於注射後一、二、四及八週犧牲並收集血液及免疫組織測定 GSH、TBARS 及 vitamin E 含量，並測定頸部淋巴細胞之複製功能同時於第八週時以 DTH 確認細胞免疫反應，然後分析淋巴細胞功能與淋巴結氧化還原狀態的關係。實驗的第二個部分是以取自正常 Wistar 大鼠之淋巴細胞，觀察糖化蛋白質對淋巴細胞功能之影響。在 STZ 誘發糖尿病的動物模型觀察發現：八週期間內 T-淋巴細胞之活性雖有略低於控制組的趨勢但無統計學上的意義。然而 CNBD 誘發之 DTH 結果顯示糖尿病顯著造成細胞免疫反應低下。整體而言，GSH 含量在不同免疫組織中並無一致的時程變化趨勢且在不同組動物間此含量大多無顯著差異。TBARS 含量在糖尿病組血液中有隨時間逐漸高於控制組的趨勢而於免疫組織之含量則隨糖尿病進行而降低但與控制組間大多無顯著差異。而在 vitamin E 含量方面，則不論在血液或免疫組織中糖尿病組均有高於控制組的趨勢，但各組間也大多無顯著差異。由統計學分析發現淋巴細胞功能變化與氧化壓力變化之間無顯著相關性。在 *in vitro* 實驗方面發現：將 BSA 與葡萄糖共同培養形成 AGE-BSA 產物添加於由正常 Wistar 大鼠製備淋巴細胞培養液中，並以 Con A (0-50 ug/mL) 刺激時，T-淋巴細胞的複製會受 AGE-BSA 之抑制且此具有 AGE-BSA 濃度依賴性。若於 AGE-BSA 形成期間有精胺酸存在則可降低此抑制作用，且此抑制作用之降低與先前存在 AGE-BSA 培養液中之精胺酸濃度有關。總結本研究

結果，免疫組織之氧化壓力與糖尿病淋巴細胞功能低下無關而白蛋白糖化產物則是造成淋巴細胞功能低下的一個原因。利用有抑制糖化蛋白形成作用之營養素精胺酸可逆轉高葡萄糖存在下白蛋白糖化引起的免疫抑制作用。

關鍵詞：糖尿病 免疫 氧化壓力 糖化白蛋白 精胺酸

## Abstract

In order to investigate roles of oxidative stress and glycosylated protein on lymphocyte dysfunction in diabetes, two different experiments were carried out in the present study. In the first experiment, Wistar rats were randomly assigned to three different groups by weight. Rats of the three groups were injected (i.v.) with STZ (65 mg/kg) and with or without further treatment with Lente insulin (4 units/rat/day) three days after the injection (insulin group or diabetes group, respectively) or injected with vehicle (control group). One, 2, 4 and 8 weeks after the injection, rats were killed. Samples of blood, spleen, thymus and cervical lymph nodes were collected for the determination of GSH, TBARS and vitamin E content. Lymph node lymphocytes were also prepared for the determination of proliferation rate. Rats were determined for their delayed type hypersensitivity (DTH) response to CDNB at the end of 8 weeks after the injection. In the second experiment, cervical lymph node lymphocytes were prepared from normal Wistar rats. Effects of BSA-AGE derivatives on the proliferation function of these cells were investigated. In the study with STZ-DM model, we found that, throughout the investigation period, proliferation rates of lymphocytes from DM groups were slightly lower than that from the control groups without statistic significance. However, the

DTH response in DM group were significantly lower than the control at 8 weeks after the injection. This result indicated decreased cellular immunity induced by diabetes. GSH contents in various immune tissues from diabetic rats were similar to that from the controls. TBARS or vitamin E contents in blood samples from DM group tend to be higher or lower than that from the control, respectively, without statistic significance. Statistic analysis indicated that there is no correlation between oxidative stress in lymph node and the function of lymph node lymphocytes. In the in vitro study, the present study incubated BSA with glucose in the absence or presence of various concentrations of arginine. The BSA-AGE products generated were dialyzed and added to the culture medium of lymphocytes isolated from normal rats and stimulated with Con A (0-50 ug/mL). It was found that the proliferation rate of these cells were significantly suppressed by the AGE-BSA products formed in the absence of arginine in a dose dependent manner. The presence of arginine during the formation of AGE-BSA could reverse the effect of AGE-BSA products on lymphocytes and this effect is arginine concentration dependent. In conclusion, the present study did not find correlation between oxidative stress in lymph node and the proliferation function of cells prepare from the nodes. However, the presence of glycosylated albumin product was found to inhibit the function of lymphocytes and this can be reversed by the addition of arginine during the formation of such products.

Keywords : Diabetes Mellitus Immunity  
Oxidative stress Arginine

glucosylated albumin

## 二、緣由與目的

糖尿病是全球高盛行率之慢性病，在已開發國家中均排名十大主要死亡原因之列<sup>1</sup>。在糖尿病患者醫療照顧中，患者免疫能力的促進是非常值得重視的問題，因為：1)一些少見於一般人的感染常見於糖尿病；2)患者易因神經及血管病變而受到外傷而不自覺；3)患者傷口不易癒合以致與感染源接觸的機會增加，而傷口不易癒合本身也與患者免疫細胞功能低下關係密切；4)患者一旦感染，則比常人易因代謝紊亂而發生致命性高血糖及/或酸中毒等併發症；5)患者的尿道感染具有引起菌血症的高危險性；且6)感染是造成患者死亡的主要原因之一。以上均造成糖尿病控制上極大的困難。

有關糖尿病為何會使宿主易受感染目前並無明確的機制被提出，但在其它糖尿病併發症被提出最普遍的共通原因之一就是血糖控制不良所引起的 AGEs 及相關衍生物之堆積<sup>2</sup>。目前已發現許多細胞具有 AGEs 之受體（包括淋巴細胞<sup>3</sup>）。在正常下，人類及動物淋巴細胞的 AGEs 受體可受 AGEs 誘發，這可能影響細胞之免疫活性。

此外，近來有關糖尿病併發症發展的機制被提出的另一原因係有關糖尿病狀態下的氧化壓力。糖尿病人糖化血紅素與總自由基清除活性間有顯著逆相關，且其血漿中尿酸，維生素 E 及維生素 C 濃度均較低，反應出總抗氧化活性降低<sup>4-6</sup>、脂質過氧化作用增加<sup>7-9</sup>，紅血球抗氧化防禦力亦降低<sup>7</sup>。Dandona 等人顯示在糖尿病人隨活性氧分子（reactive oxygen species）產生的增加造成 DNA 的氧化傷害<sup>10</sup>。

以強化特殊營養素的營養介入法改善宿主免疫功能，雖已有許多臨床上之應用，但目前尚未應用於糖尿病患。本

計畫申請人於執行八十七年度的國科會研究計畫時曾發現以 STZ 誘發大鼠糖尿病後，其淋巴細胞在 concanavalin A 的刺激下反應顯著低於正常動物<sup>11</sup>。且針對精胺酸在 STZ 誘發的糖尿病大鼠 T 淋巴細胞活性的 ex vivo 的觀察，也發現以 2%精胺酸加在飲水中二個月即可顯著促進 STZ 誘發糖尿病所造成 T 淋巴細胞複製活性低下的情形，但未對其作用機制進行瞭解。本研究的目的之一是利用 STZ-誘發大鼠糖尿病之模型，系統性探討進行之糖尿病對免疫功能之影響，並瞭解其機制是否與氧化壓力及/或糖化蛋白質的作用有關。本研究的另一目的則是探討補充精胺酸及/或維生素 E 對以 STZ-誘發糖尿病大鼠之免疫調節作用及瞭解其與氧化壓力及/或糖化蛋白質的作用相關性。若與氧化壓力則未來將進一步瞭解是否補充維生素 E 可額外增進糖尿病人的免疫功能。

### 三、結果與討論

#### (一) 以 streptozotocin(STZ)誘發糖尿病依賴性(IDDM)大鼠之動物模型特徵

本研究使用雄性 Wistar 大鼠，飼育於光照/黑夜各 12 h 之標準動物室，並餵自來水及標準大鼠飼料(自由取食)。於動物適應環境後(體重 230±11 g)隨機分組於 48 隻大鼠尾靜脈注射 STZ(65 mg/kg 體重)誘發糖尿病，且其中 24 隻每日下午 5 時再以 4 單位長效胰島素皮下注射(以下簡稱胰島素組)，24 隻控制組大鼠則於尾靜脈注射等體積載劑(citrate buffer, pH4.2)。表一顯示注射後八週內各組與糖尿病相關特徵的變化情形，其中 STZ 組於誘發後一週即已有明顯糖尿病症狀，胰島素的注射則可部分校正這些症狀，惟在空腹血糖值方面胰島素組均呈較糖尿病未處理組高的趨勢。由於在收集血液樣品前均有禁食，而為避免胰島素干擾禁食狀態下血糖測試結果故未給予胰島素之注射有

關。為確定餵食狀態下胰島素之作用本研究進行期間曾以血糖機觀察三組動物 24 h 血糖變化，發現在實驗進行的八週內控制組均在 90-110 mg/dl，糖尿病組均在 300-600 mg/dl，而胰島素組則是在 8 am 至 4 pm 皆高於 300 mg/dl 且在 8pm 至半夜血糖降至 100 mg/dl 左右，即此組比糖尿病較少持續曝露在高血糖下。

#### (二) T-淋巴細胞之活性

由圖 1 之結果可知當 Con A 濃度在 2.5  $\mu$ g/ml 時，T-淋巴細胞將 [<sup>3</sup>H]-thymidine 併入胞內 DNA 的量會明顯增加，但在糖尿病組、胰島素組與控制組間均無顯著差異。此第八週時糖尿病組與控制組間無顯著差異的結果與我們八十七年度的觀察結果不同<sup>11</sup>。但糖尿病大鼠對 CDNB 產生顯著低於制組的 DTH 反應顯著其的確有細胞免疫低下的問題，且此結果與過去其它學者的結果一致<sup>12</sup>。探討本研究未發現糖尿病明顯降低淋巴細胞複製功能的可能原因是由於本研究需較大體積之血液樣品供各項分析，故在細胞培養液中使用胎牛血清而非如之前研究中使用之自體血清。推測糖尿病大鼠之自體血清至少可透過三個因素影響細胞功能(1)偏高的葡萄糖含量，(2)偏低的胰島素含量(in vitro 數據顯示提高培養液中胰島素濃度可部分逆轉抑制作用)，(3)偏高的糖化蛋白質含量(參閱下文)。血清中的其他成分的差異如何造影響免疫細胞功能也是未來將繼續探討的方向。

#### (三) 組織及血液之氧化還原態

##### (a) GSH/GSSG

在免疫組織中 total GSH, GSH 及 GSSG 之含量示於表。在脾臟方面，糖尿病組之 total GSH 在一至四週均低於控制組且於第四週時有顯著差異(P<0.05)且至第八週時則與控制組相似。胰島素之注射對糖尿病無顯著影響且於第四週時胰島素組顯著高於控制組(P<0.05)。

島素組顯著高於控制組( $P < 0.05$ )。

在胸腺方面, total GSH 含量在糖尿病組第一至四週時均低於控制組, 且於第四週時有顯著差異( $P < 0.05$ )。胰島素組除了在第四週時含量顯著高於糖尿病組( $P < 0.05$ )外, 其餘觀察時間點三組間均無顯著差異。而還原型 GSH 濃度變化糖尿病組於第一及四週均顯著低於控制組( $P < 0.05$ )。胰島素組於各觀察時間點均略高於糖尿病及控制組, 且與糖尿病組間之差異具統計學意義。氧化型 GSH 濃度之變化, 糖尿病組 GSSG 含量除了在第四週顯著低於控制組外( $P < 0.05$ ), 其餘時間點均與控制組相似。胰島素注射並未影響 GSSG 含量, 但在第四週時也顯著低於控制組。

在頸部淋巴結方面, total GSH 含量在糖尿病組於第二週時即顯著高於控制組( $P < 0.05$ ), 隨後遞減, 至第八週時顯著低於控制組( $P < 0.05$ )。而胰島素組於第二週時顯著高於控制組且於第八週時高於糖尿病組( $P < 0.05$ ), 其餘時間點均無差異。而還原型 GSH 含量在糖尿病組於第二週時顯著高於控制組( $P < 0.05$ ), 然後下降至第八週時顯著低於控制組( $P < 0.05$ )。胰島素組之還原型 GSH 在四及八週時顯著高於糖尿病組( $P < 0.05$ ), 且在第二及八週時也顯著高於控制組( $P < 0.05$ )。在 GSSG 含量方面則各組間均無顯著差異。

由以上結果並未發現糖尿病與對 GSH 含量的顯著影響, 此結果與 McLennan 等人(1991)在肝臟所觀察到的結果相似<sup>13</sup>, 而與 Loven 等人(1986)在肝臟所觀察到的結果及 Garg 等人在以 STZ 誘發的糖尿病大鼠, 紅血球中脂質過氧化產物 malondialdehyde 在注射六週後顯著增加, 且主要天然保護之抗氧化物 glutathione 及  $\alpha$ -tocopherol 分別在糖尿病大鼠的紅血球及血漿中都較低之結果不同<sup>14,15</sup>。由於與 Loven 等人的研究模型比較異同, 發現本研與 McLennan

的共通點是採自由取食而 Loven 等人則限制大鼠進食量與控制組同, 故 McLennan 等人建議, 不顯著的氧化壓力可能是因糖尿病大鼠的大量飲食(約為控制組的兩倍)中提供了較多的抗氧化營素所致。未來的相關實驗需考慮飲食設計的因素。

#### (b) TBARS

本研究以 TBARS 之生成量表示大鼠免疫組織及血液之脂質過氧化狀態, 結果示於表 3。血漿含量在第一週時三組間有顯著差異, 其中以胰島素組最高, 糖尿病組次之而控制組最低, 而第二及四週時三組間無顯著差異, 第八週時則含量由高至低依序為糖尿病組, 胰島素組, 控制組。在本研究中因大鼠在第八週時之死亡率達 33.3% 故導致第八週的樣品數不足以進行統計學分析( $< 3$ )。

由表 3 中之結果可知, 三組間不論是在脾臟、胸腺或頸部淋巴結, TBARS 之含量均無顯著差異。

本研究在胸腺及頸部淋巴結觀察到的結果與 Pereira 等人(1994)的研究相似<sup>16</sup>, 且血漿含量與 Kedzirua-Kornatowska 等人(1998)觀察到的結果相似<sup>17</sup>。推測本實驗在第一、二、四及八週時未發現 TBARS 在糖尿病顯著增加的因素可能與血液及臟器中 GSH 及維生素 E 含量略高於控制組有關(表 2 及 4)。

#### (c) Vitamin E

血漿及免疫組織脾臟、胸腺及頸部淋巴結之 vitamin E 含量示於表 4。在觀察時程中糖尿病組免疫組織含量有高於控制組的趨勢; 且其中於第一週時脾臟, 第四及八週時腸繫膜淋巴結及第八週時胸腺中的含量均高於控制組者( $P < 0.05$ )。雖然有報導指出在糖尿病患血清中維生素 E 較正常人低<sup>18</sup>, 但 Sukalski 等人(1993)以 STZ-糖尿病大鼠則在肝臟中發現顯著高於控制組之 vitamin E 含量造成血漿及組織中高於控制組大鼠含量的原因可能有部分與飲

食攝取量較高有關<sup>19</sup>。且當糖尿病在胰島素供應不足下，會造成脂肪分解而使 vitamin E 由脂肪流向臟器造成堆積<sup>20</sup>。由本研究結果可知這可能提供糖尿病時組織臟器的防禦氧化壓力機制。

#### (四) 免疫功能與氧化壓力變化相關性

在觀察期間之頸部淋巴結淋巴細胞複製與頸部淋巴結 total GSH 及 TBARS 之相關性示於表 5。在誘發糖尿病的八週期間，細胞複製與 total GSH 含量間為負相關而與 TBARS 為正相關，但均無統計學的意義。胰島素組之細胞複製則與 total GSH 及 TBARS 均呈負相關，但亦無統計學上的意義。控制組之細胞複製則與 total GSH 正相關但與 TBARS 為負相關且均無統計學上的意義。

由本研究結果可知胰島素治療雖使血糖濃度介於正常及糖尿病之間，但由胰島素對於氧化壓力相關測定結果之影響未必使這些數值於糖尿病組與控制組之間的結果可知，胰島素對於體內氧化還原狀態的影響，可能有部分是獨立於調節血糖作用之外的。過去有報告指出，在 *in vitro* 肝細胞之培養，也會增加 total GSH 合成<sup>21</sup>。

#### (五) 以 NBT test 測定 AGE-BSA 形成

BSA 在有或無精胺酸存在下與 D-glucose 共同培養於 37°C 不同時間後，糖化程度以 NBT 試劑測定，且結果示於圖 2。AGE-BSA 之形成具有時間的依賴性，而未與葡萄糖共培養之控制組樣品（於培養兩週期間只含 BSA 而未添加 glucose）則無 NBT 反應（圖 3）。此形成糖化白蛋白之結果與其他學者的結果一致<sup>22,23</sup>。

#### (六) 不同的 AGE-BSA 製備物對淋巴細胞複製的影響

將分離自正常大鼠的淋巴細胞培養在含上述 AGE-BSA 樣品 (10% of medium, v/v) 之培養基中並以 Con A (0-50 ug/mL) 刺激觀察細胞複製率，結果示於圖 4 及 5。圖 4 之結果顯示 T-淋巴細胞的複製

會受 AGE-BSA 之抑制且此具有 AGE-BSA 濃度依賴性。若於 AGE-BSA 形成期間有精胺酸存在則可降低此抑制作用，且此抑制作用之降低與先前存在 AGE-BSA 培養液中之精胺酸濃度有關（圖 5）。

臨床及實驗室的研究大多以 amino-guanidine 抑制蛋白質之糖化。而近年來有學者提出精胺酸與 aminoguanidine 有類似的官能基，且也證實在白蛋白與葡萄糖共同培養時添加精胺酸可明顯抑制糖化作用達 70%<sup>23</sup>。由於本研究於收集糖化培養物到進行分析前均將樣品以大量 PBS 透析，故可排除 free 精胺酸對圖 5 所觀察到的結果之干擾。

#### 四、計畫成果自評

由於本計畫最初預計執行期間為三年，今以一年規劃故主要針對糖尿病抑制淋巴細胞功能的機制部分探討。除了上述由結果衍生出未來之研究方向外，未來將繼續進行巨噬細胞活性在糖尿病之變化及相關機制部分的探討。

本計畫係繼八十七年度執行國科會計畫的觀察後，進一步瞭解氧化壓力是否亦是造成糖尿病免疫細胞活性改變的原因；同時承接該研究之結果，以 *in vitro* 系統觀察糖化白蛋白對於淋巴細胞功能之影響，並以精胺酸之抗糖化作用觀察我們過去於 *ex vivo* 系統所觀察到之精胺酸作用是否是透過影響白蛋白之糖化反應所致，評估本計畫之執行達預期目的的 80%。本研究結果具有學述價值的部分包括：本研究首度發現糖化蛋白質對於淋巴細胞的功能的抑制作用，且過去在臨床上雖已應用強化精胺酸之營養劑提高病患免疫力，但相關機制均未考量到其在蛋白質糖化上所扮演的角色。糖化蛋白質是老化及許多慢性病的致病機轉，本研究的發現可能拓展精胺酸未來更進一步的應用方向。

在原先提出的三年計劃中規劃了對糖尿病大鼠巨噬細胞活性的評估，由於

控制組大鼠生長體重過快，而我們發現體重大於 250 g 之 Wistar 大鼠腹腔巨噬細胞的收率不佳，影響後續的實驗進行，故目前先改以 *in vitro* 系統進行先期試驗。

##### 五、參考文獻

1. Fujimoto, W.Y. (1996) Overview of Diabetes Mellitus in different population groups. *Diabetic Med.* 13: S7-S10.
2. Brownlee, M., Cerami, A. and Vlassara, H. (1988) Advanced glycosylation end products in issue and the biochemical basis of diabetic complications. *N. Engl. J. Med.* 318:1315.
3. Imani, F., Horii, Y., Suthanthiran, M., Skolnik, E.Y., Makita, Z., Sharma, V., Sehajpal, P. and Vlassara H. (1993) Advanced glycosylation endproduct-specific receptors on human and rat T-lymphocytes mediate synthesis of interferon gamma: role in tissue remodeling. *Journal of Experimental Medicine.* 178:2165-2172.
4. Maxwell, S.R., Thomason, H., Sandler, D., LeGuen, C., Baxter, M.A., Thorpe, G.H., Jones, A.F. and Barnett, A.H. (1997) Poor glycaemic control is associated with reduced serum free radical scavenging (antioxidant) activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Annals of Clin. Biochem.* 34(Pt 6): 638-644.
5. Maxwell, S.R., Thomason, H., Sandler, D., Leguen, C., Baxter, M.A., Thorpe, G.H., Jones, A.F. and Barnett, A.H. (1997) Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eu. J. Clin. Invest.* 27(6):484-490.
6. Nourooz-Zadeh, J., Rahimi, A., Rajaddini-Sarmadi, J., Tritschler, H., Rosen, P., Halliwell, B. and Betteridge, D.J. (1997) Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. *Diabetologia.* 40:1255.
7. Parthiban, A., Vijayalingam, S., Shanmugasundaram, K.R. and Mohan, R. 1995. Oxidative stress and the development of diabetic complications-antioxidants and lipid peroxidation in erythrocytes and cell membrane. *Cell Biology International.* 19: 987-993.
8. Altomare, E., Vendemiale, G., Ghicco, D., Procacci, V. and Cirelli, F. (1992) Increased lipid peroxidation in type 2 poorly controlled diabetic patients. *Diabete Metabol.* 18:264-271.
9. Gallou, G., Ruelland, A., Legras, B., Maugendre, D., Allannic, H., Cloarec, L. (1993) Plasma malondialdehyde in type 1 and type 2 diabetic patients. *Clin. Chim. Acta* 214:227-234.
10. Dandona, P., Thusu, K., Cook, S., Snyder, B., Makowski, J., Aemstrong, D., Nicotera, T. (1996) Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 347:444-445.
11. Liu, C.T., Cheng, K.M. and Tsi, L.C. (1999) Supplemental arginine on immune function of diabetic rats. *Amino Acids* .
12. Ptak, W., Rewicka, M., Gryglewski, A. and Bielecka, J. (1986) Differential effect of experimental diabetes on the early and late phase of contact sensitivity reaction in mice. *Intern. Arch. Allergy and Appl. Immunol.* 81:136.
13. McLennan, S. V., Heffernan, S., Wright, L., Rae, C., Fisher, E., Yue, D. K. and Turtle, J. R. (1991) Changes in

- diabetes. *Diabetes* 40: 344..
14. Loven, D., Schedl, H., Wilson, H., Daabees, T. T., Stegink, L.D., Diekus, M. and Oberley, L. (1996) Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxide dismutase activities in organ of rats with streptozocin-induced diabetes. *Diabetes* 35:503.
  15. Garg, M.C., Ojha, S. and Bansal, D.D. (1996) Antioxidant status of streptozotocin diabetic rats. *Indian J Experimental Biol.* 34:264-266. 647-653.
  16. Pereira, B., Costa Rosa, L. F. B., Safi, D. A., Bechara, E. J. H. and Curi, R. (1994) Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs of diabetic rats. *J Endocrinol.* 142:161.
  17. Kedzirua-Kornatowska K. and Luciak, M. (1998) Effect of angiotensin convertase inhibitors on lipid peroxidation and peroxy radical-trapping capacity in rats with experimental diabetes. *Biol. Mol. Biol. Inter.* 45:905.
  18. Knekt, P., Reunanen, A., Marniemi, J., Leino, A. and Aromaa, A. (1999) Low vitamin E status is a potential risk factor for insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Internal Med.* 245(1):99-102.
  19. Sukalski, K. A., Pinto, K. A. and Berntson, J. L. (1993) Decreased susceptibility of liver mitochondria from diabetes rats to oxidative damage and associated increase in  $\alpha$ -tocopherol. *Free Rad. Biol. Med.* 14:57.
  20. Granner, D. K. (1990) Hormones of the pancreas and GI tract. *Harper's Biochemistry.* Pp. 536.
  21. 楊頌芬 (1999) 胰島素及甲基脫氫皮質醇對肝細胞 GSH 合成之影響. 中山醫學院營養科學研究所碩士論文.
  22. Ramirez, R., Bedoya, F. J. Dolores Chiara M. and Sobrino F. (1997) Inhibitory effect of albumin-derived advanced glycosylation products on PMA-induced superoxide anion production by rat. *Life Sci.* 60:2279.
  23. Servetnick, D. A., Dryant, D., Wells-Knecht, K. J. and Wiesenfeld, P. L. (1996) L-arginine inhibits in vitro nonenzymatic glycation and advanced glycosylated end product formation of human serum albumin. *Amino Acids* 11:69.



表 1. 各組大鼠之體重增加量、尿量、食量、飲水量及空腹血糖的變化

組別	體重變化 (g/wk)	尿量 (ml/24h)	食量 (g/24 h)	飲水量 (ml/24h)	血糖 (mg/dl)
Week 1					
控制組	39.7 ± 17.0 <sup>a</sup>	27.3 ± 3.6 <sup>a</sup>	25.1 ± 1.8 <sup>a</sup>	49.3 ± 6.9 <sup>a</sup>	128 ± 17 <sup>a</sup>
糖尿病組	2.66 ± 31 <sup>b</sup>	154 ± 25 <sup>b</sup>	36.1 ± 3.7 <sup>b</sup>	196 ± 33 <sup>b</sup>	221 ± 69 <sup>b</sup>
胰島素組	11.8 ± 35.8 <sup>ab</sup>	125 ± 38 <sup>b</sup>	35.8 ± 6.5 <sup>b</sup>	165 ± 43 <sup>b</sup>	225 ± 57 <sup>b</sup>
Week 2					
控制組	106 ± 24 <sup>a</sup>	33.8 ± 11.8 <sup>a</sup>	29.2 ± 3.3 <sup>a</sup>	56.0 ± 14.0 <sup>a</sup>	115 ± 14 <sup>a</sup>
糖尿病組	34.0 ± 15.1 <sup>b</sup>	198 ± 13 <sup>b</sup>	46.0 ± 3.6 <sup>b</sup>	235 ± 29 <sup>b</sup>	187 ± 50 <sup>b</sup>
胰島素組	46.8 ± 22.4 <sup>b</sup>	153 ± 17 <sup>c</sup>	40.0 ± 2.1 <sup>c</sup>	184 ± 27 <sup>c</sup>	221 ± 36 <sup>b</sup>
Week 4					
控制組	137 ± 26 <sup>a</sup>	27.7 ± 5.86 <sup>a</sup>	27.0 ± 4.2 <sup>a</sup>	48.2 ± 10.2 <sup>a</sup>	145 ± 10 <sup>a</sup>
糖尿病組	30.0 ± 31.1 <sup>ba</sup>	73 ± 30 <sup>b</sup>	47.5 ± 7.9 <sup>b</sup>	204 ± 31 <sup>b</sup>	169 ± 77 <sup>ab</sup>
胰島素組	74.2 ± 18.3 <sup>c</sup>	138 ± 57 <sup>b</sup>	40.9 ± 8.6 <sup>b</sup>	164 ± 50 <sup>b</sup>	234 ± 69 <sup>b</sup>
Week 8					
控制組	242 ± 25.3 <sup>a</sup>	39.2 ± 3.4 <sup>a</sup>	28.0 ± 4.5 <sup>a</sup>	61.0 ± 4.5 <sup>a</sup>	160 ± 55 <sup>a</sup>
糖尿病組	53.1 ± 49.1 <sup>b</sup>	218 ± 48 <sup>b</sup>	51.0 ± 7.4 <sup>b</sup>	258 ± 58 <sup>b</sup>	224 ± 37 <sup>b</sup>
胰島素組	129 ± 38 <sup>c</sup>	199 ± 60 <sup>b</sup>	47.1 ± 5.1 <sup>b</sup>	223 ± 80 <sup>b</sup>	202 ± 34 <sup>ab</sup>

N=5~6, 數據以 Mean ± SD 表示; 資料以 one-way ANOVA 分析, 並以 LSD test 分析組間是否有顯著差異, a, b, c 不同符號間表示有顯著差異 (P < 0.05)。

表 3. 各組大鼠之血漿、紅血球、脾臟、胸腺及頸部淋巴結之 TBARS 含量變化

組別	血漿 (pmol/mg protein)	紅血球 (pmol/mg protein)	脾臟 (pmol/mg protein)	胸腺 (pmol/mg protein)	頸部淋巴結 (pmol/mg protein)
Week 1					
控制組	17.7±5.1 <sup>a</sup>	185±18	265±59	189±63	224±66
糖尿病組	44.5±17.1 <sup>b</sup>	188±34	276±113	213±77	187±82
胰島素組	63.3±2.5 <sup>c</sup>	225±46	225±73	191±55	172±72
Week 2					
控制組	7.00±1.00	260±92	320±96	431±185	293±98
糖尿病組	5.67±1.16	311±132	333±78	359±121	237±88
胰島素組	5.67±1.53	257±111	291±29	301±107	223±110
Week 4					
控制組	8.17±3.40	268±34 <sup>a</sup>	303±149	295±116	193±36
糖尿病組	14.0±4.4	275±48 <sup>ab</sup>	289±119	224±132	180±65
胰島素組	17.8±10.9	260±17 <sup>b</sup>	218±88	216±119	170±60
Week 8					
控制組	10.0±6.3	233±46	360±127	382±86	317±105
糖尿病組	35.0±7.1	245±120	297±227	367±235	145±21
胰島素組	26.7±19.7	200±67	410±121	413±161	418±191

N=5~6, 數據以 Mean±SD 表示; 資料以 one-way ANOVA 分析, 並以 LSD test 分析組間是否有顯著差異, a, b, c 不同符號間表示有顯著差異(P<0.05)。

表 2. 各組大鼠之脾臟、胸腺及頸部淋巴結之 total GSH、GSH 及 GSSG 含量變化

組別	脾臟			胸腺			頸部淋巴結		
	Total GSH (nmol/mg protein)	Total GSH (nmol/mg protein)	GSSG (nmol/mg protein)	Total GSH (nmol/mg protein)	Total GSH (nmol/mg protein)	GSSG (nmol/mg protein)	Total GSH (nmol/mg protein)	Total GSH (nmol/mg protein)	GSSG (nmol/mg protein)
Week 1									
控制組	13.7 ± 4.2	7.22 ± 0.22	0.377 ± 0.107	6.46 ± 0.14 <sup>a</sup>	8.25 ± 0.91	0.377 ± 0.107	3.47 ± 1.39	8.25 ± 0.91	2.39 ± 0.24
糖尿病組	9.28 ± 1.76	6.80 ± 1.17	0.890 ± 0.396	5.02 ± 0.52 <sup>b,a</sup>	-	0.890 ± 0.396	-	-	-
胰島素組	9.21 ± 2.90	10.3 ± 4.2	0.365 ± 0.149	6.82 ± 0.84	7.28 ± 0.77	0.365 ± 0.149	4.21 ± 2.15	7.28 ± 0.77	1.53 ± 0.71
Week 2									
控制組	15.4 ± 0.5	14.2 ± 3.1	0.850 ± 0.304	12.5 ± 2.6	7.07 ± 0.82 <sup>a</sup>	0.850 ± 0.304	4.20 ± 0.39	7.07 ± 0.82 <sup>a</sup>	1.44 ± 0.13
糖尿病組	13.0 ± 2.8	13.2 ± 2.5	0.740 ± 0.295	11.7 ± 1.9	9.33 ± 0.37 <sup>b</sup>	0.740 ± 0.295	6.72 ± 0.89	9.33 ± 0.37 <sup>b</sup>	1.30 ± 0.41
胰島素組	13.9 ± 0.8	14.7 ± 4.8	0.823 ± 0.482	13.0 ± 3.9	9.29 ± 0.84 <sup>b</sup>	0.823 ± 0.482	7.38 ± 1.03	9.29 ± 0.84 <sup>b</sup>	0.95 ± 0.10
Week 4									
控制組	16.8 ± 2.5 <sup>a</sup>	11.4 ± 0.8 <sup>a</sup>	0.847 ± 0.126 <sup>a</sup>	9.66 ± 0.82 <sup>a</sup>	6.87 ± 0.97	0.847 ± 0.126 <sup>a</sup>	4.51 ± 0.47 <sup>a</sup>	6.87 ± 0.97	1.19 ± 0.26
糖尿病組	12.1 ± 0.6 <sup>b</sup>	6.5 ± 1.7 <sup>b</sup>	0.423 ± 0.117 <sup>b</sup>	5.61 ± 1.51 <sup>b</sup>	6.76 ± 0.25	0.423 ± 0.117 <sup>b</sup>	5.31 ± 0.37 <sup>a</sup>	6.76 ± 0.25	0.73 ± 0.17
胰島素組	11.0 ± 2.5 <sup>b</sup>	11.3 ± 1.3 <sup>a</sup>	0.580 ± 0.056 <sup>b</sup>	10.1 ± 1.2 <sup>a</sup>	7.99 ± 1.35	0.580 ± 0.056 <sup>b</sup>	6.39 ± 0.56 <sup>b</sup>	7.99 ± 1.35	0.80 ± 0.41
Week 8									
控制組	7.82 ± 0.72	11.0 ± 1.1	0.287 ± 0.216	10.4 ± 1.2	12.2 ± 1.1	0.287 ± 0.216	11.0 ± 1.0 <sup>a</sup>	12.2 ± 1.1	0.61 ± 0.12
糖尿病組	9.00 ± 1.87	14.1 ± 0.8	0.275 ± 0.347	13.5 ± 1.5	5.57 ± 0.30	0.275 ± 0.347	5.26 ± 0.01 <sup>b</sup>	5.57 ± 0.30	0.16 ± 0.16
胰島素組	11.1 ± 3.7	15.1 ± 3.8	0.187 ± 0.186	14.7 ± 4.1	13.2 ± 4.4	0.187 ± 0.186	9.40 ± 0.31 <sup>c</sup>	13.2 ± 4.4	1.89 ± 2.35

N=5~6, 數據以 Mean ± SD 表示; 資料以 one-way ANOVA 分析, 並以 LSD test 分析組間是否有顯著差異, a, b, c 不同符號間表示有顯著差異 (P<0.05)。

表 3. 各組大鼠之血漿、紅血球、脾臟、胸腺及頸部淋巴結之 TBARS 含量變化

組別	血漿 (pmol/mg protein)	紅血球 (pmol/mg protein)	脾臟 (pmol/mg protein)	胸腺 (pmol/mg protein)	頸部淋巴結 (pmol/mg protein)
Week 1					
控制組	17.7±5.1 <sup>a</sup>	185±18	265±59	189±63	224±66
糖尿病組	44.5±17.1 <sup>b</sup>	188±34	276±113	213±77	187±82
胰島素組	63.3±2.5 <sup>c</sup>	225±46	225±73	191±55	172±72
Week 2					
控制組	7.00±1.00	260±92	320±96	431±185	293±98
糖尿病組	5.67±1.16	311±132	333±78	359±121	237±88
胰島素組	5.67±1.53	257±111	291±29	301±107	223±110
Week 4					
控制組	8.17±3.40	268±34 <sup>a</sup>	303±149	295±116	193±36
糖尿病組	14.0±4.4	275±48 <sup>ab</sup>	289±119	224±132	180±65
胰島素組	17.8±10.9	260±17 <sup>b</sup>	218±88	216±119	170±60
Week 8					
控制組	10.0±6.3	233±46	360±127	382±86	317±105
糖尿病組	35.0±7.1	245±120	297±227	367±235	145±21
胰島素組	26.7±19.7	200±67	410±121	413±161	418±191

N=5~6, 數據以 Mean±SD 表示; 資料以 one-way ANOVA 分析, 並以 LSD test 分析組間是否有顯著差異, a, b, c 不同符號間表示有顯著差異(P<0.05)。

表 4. 各組大鼠之血漿、脾臟、胸腺及頸部淋巴結之 vitamin E 含量變化

組別	血漿 ( $\mu\text{g}/\text{mg lipid}$ )	脾臟 ( $\mu\text{g}/\text{mg lipid}$ )	胸腺 ( $\mu\text{g}/\text{mg lipid}$ )	頸部淋巴結 ( $\mu\text{g}/\text{mg lipid}$ )
Week 1				
控制組	1.30±0.095	19.5±5.9	6.30±1.33	-
糖尿病組	1.18±0.40	30.6±6.3	8.63±2.57	-
胰島素組	1.12	26.2±4.4	9.33±2.75	18.08
Week 2				
控制組	1.27±0.30	30.6±7.3	5.42±2.90	20.2±1.4
糖尿病組	1.20±0.24	33.7±7.4	8.19±2.23	-
胰島素組	1.72±0.54	28.2±6.8	6.76±2.55	21.9
Week 4				
控制組	1.58±0.43	23.6±4.1	6.97±3.79	20.5±2.7
糖尿病組	1.29±0.26	26.8±5.5	8.61±3.89	28.2
胰島素組	1.58±0.51	26.6±4.6	10.2±1.0	28.6±5.0
Week 8				
控制組	1.98±0.37	30.3±4.7	6.75±2.50	24.1±6.5
糖尿病組	2.19±0.72	36.5±5.0	11.4±1.5	48.2±25.1
胰島素組	2.38±0.75	35.8±6.0	9.19±3.10	27.9

N=5~6, 數據以 Mean±SD 表示; 資料以 one-way ANOVA 分析, 並以 LSD test 分析組間是否有顯著差異, a, b, c 不同符號間表示有顯著差異(P<0.05)。

表 5. 各組大鼠頸部淋巴結淋巴細胞複製與頸部淋巴結 total GSH 及 TBARS 含量之相關性

組別	Total GSH	TBARS
控制組	r=0.1624 p=0.6334	r=-0.1072 p=0.7403
糖尿病組	r=-0.0123 p=0.9749	r=0.3450 p=0.2988
胰島素組	r=-0.2116 p=0.5092	r=-0.1175 p=0.7161

n=12; 數據以 SAS 分析, r 表示相關性, -表負相關, 顯著相關性 (P<0.05)。

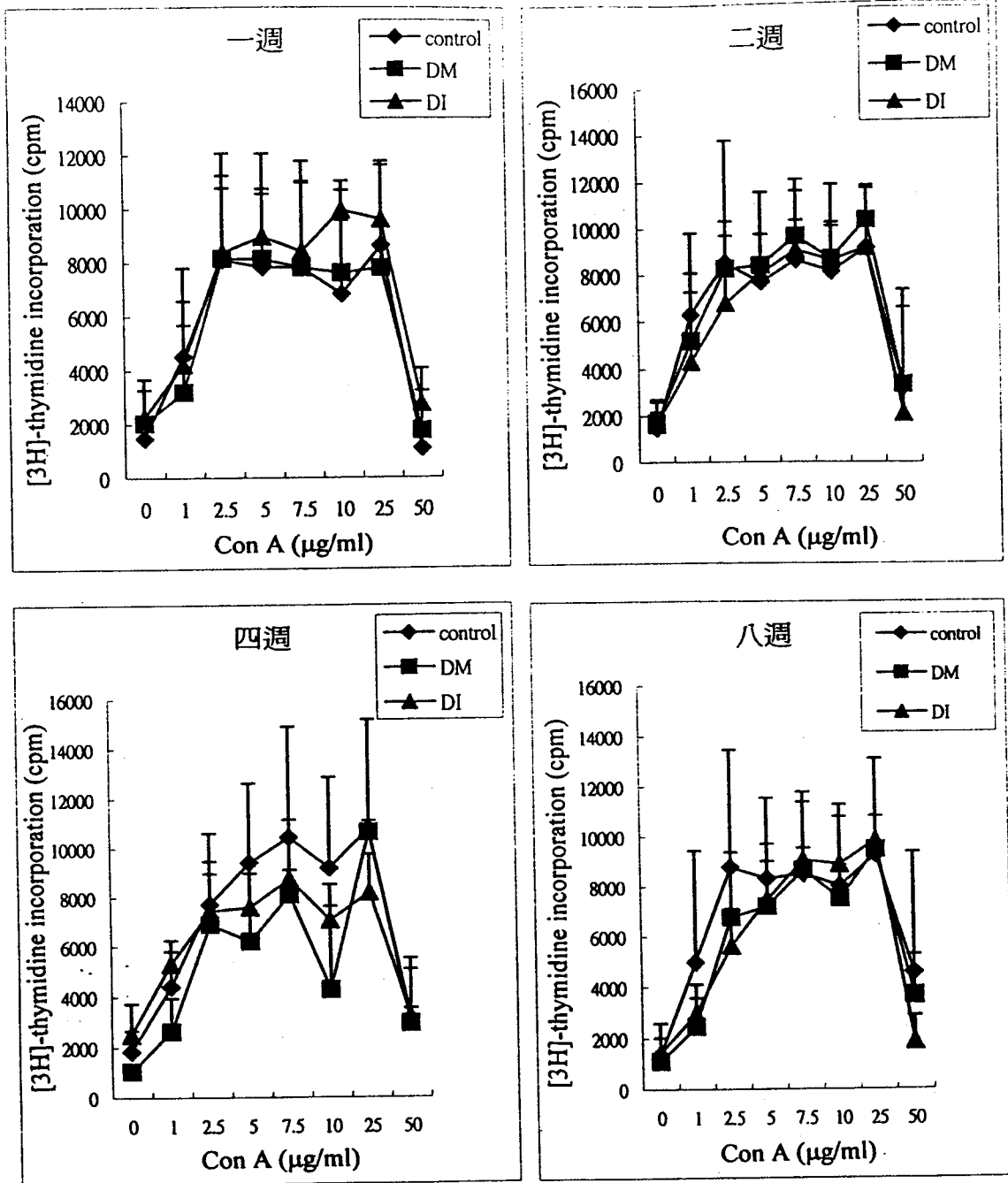


圖 1. 各組大鼠淋巴細胞在注射 STZ 或 saline 後不同時間以 Con A 刺激之複製反應。數據之表示方式為 Mean ± SD。

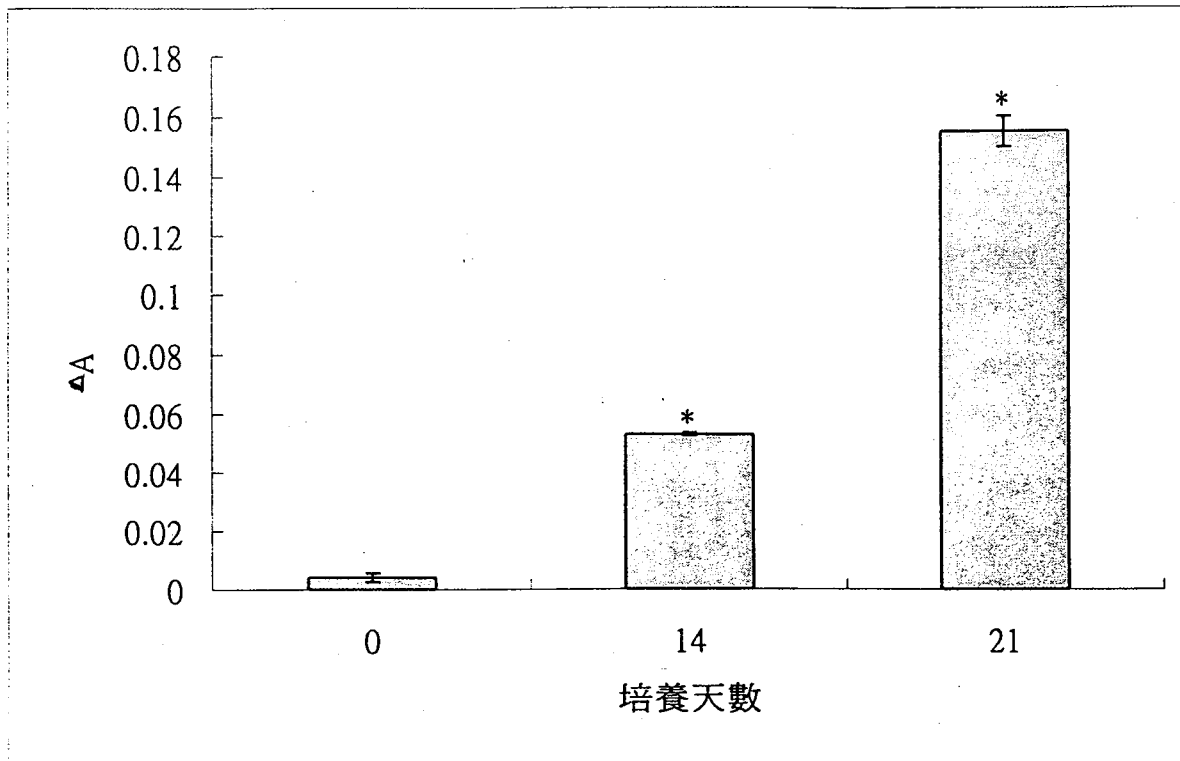


圖 2. BSA 與 D-glucose 共同培養於 37°C 不同時間後之糖化程度之 NBT 試劑測定。 BSA was dissolved at a concentration of 100 mg/ml in PBS (pH7.2) and incubated with D-glucose (200 mmol/l) at 37°C for 2 weeks. Unreacted glucose was removed by extensive dialysis against PBS. samples were 8x diluted.



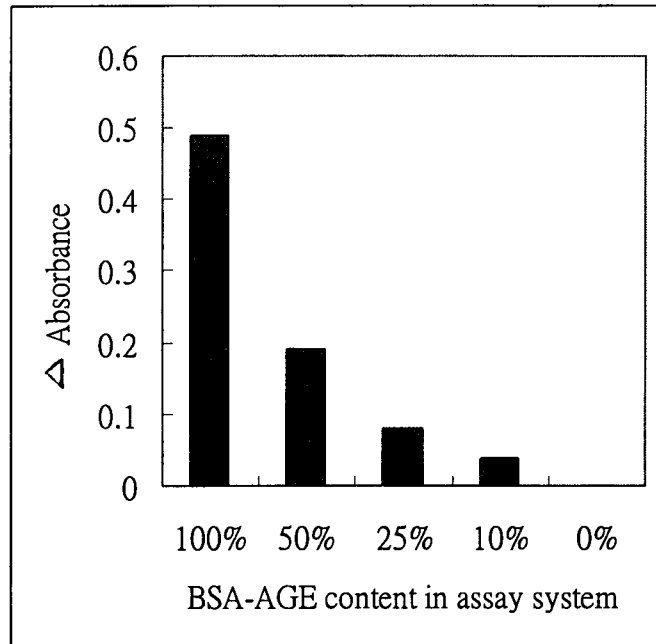


圖3. 不同BSA-AGE受測濃度呈現之NBT反應。BSA was dissolved at a concentration of 100 mg/ml in PBS (pH7.2) and incubated with D-glucose (200 mmol/l) at 37°C for 2 weeks. Unreacted glucose was removed by extensive dialysis against PBS. NBT reagent: sample=20:1 for 100% sample; data showed are absorbance changed between 12 to 16 minutes after starting the reaction.

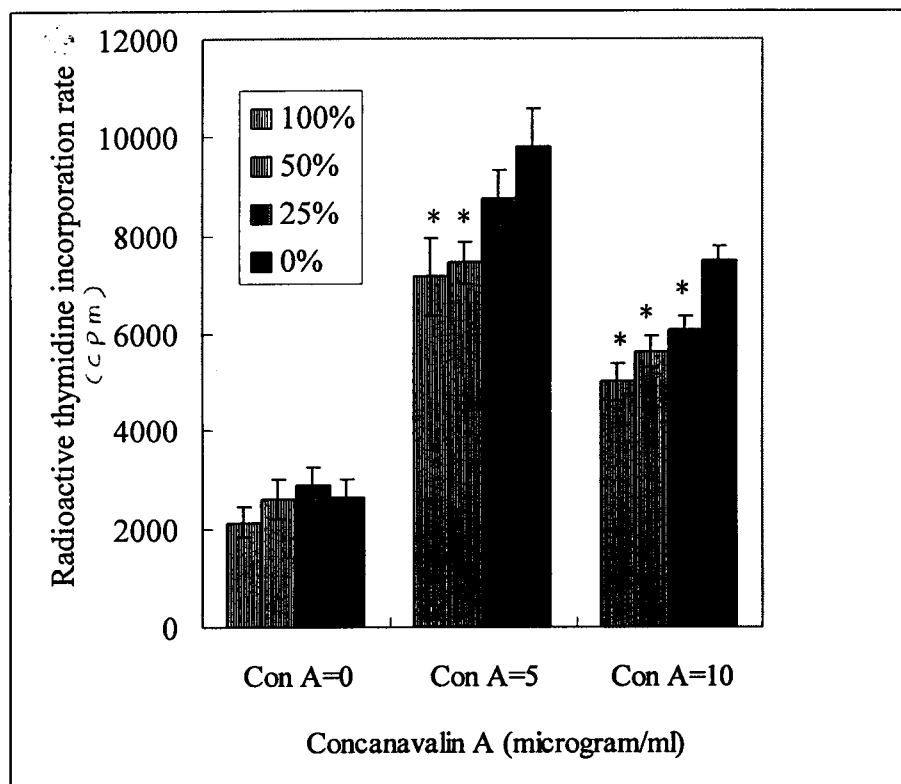


圖 4. 不同濃度 AGE-BSA 製備物對 T-淋巴細胞的複製率之影響。BSA was dissolved at a concentration of 100 mg/ml in PBS (pH7.2) and incubated with D-glucose (200 mmol/l) at 37°C for 2 weeks. Unreacted glucose was removed by extensive dialysis against PBS.

\*表示與 0%之間有顯著差異(P<0.05).

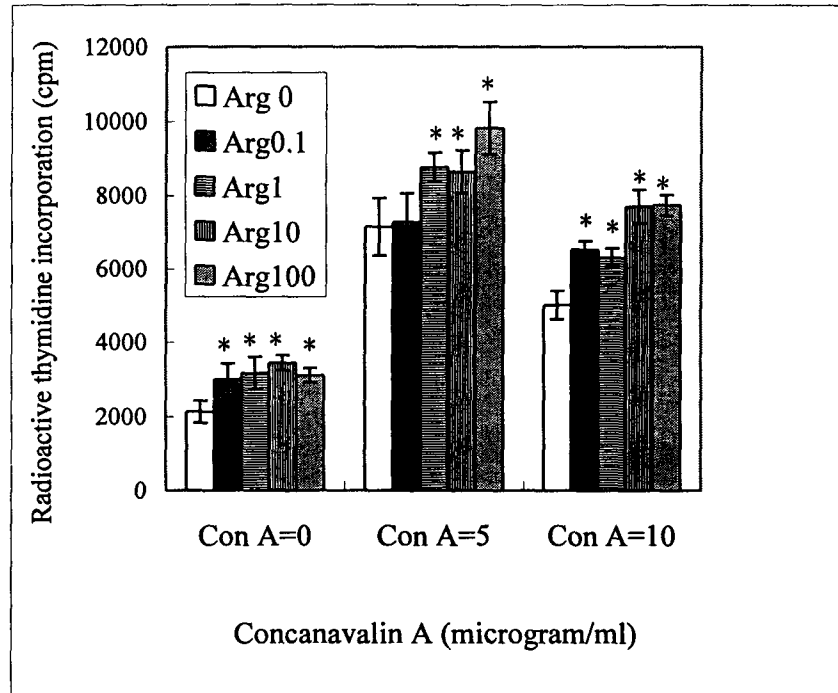


圖 5. 於 AGE-BSA 形成期間有不同濃度精氨酸存在對於 AGE-BSA 產物抑制淋巴細胞複製之作用的影響。BSA was dissolved at a concentration of 100 mg/ml in PBS (pH7.2) and incubated with D-glucose (200 mmol/l) at 37°C in the presence of 0, 0.1, 1, 10 or 100 mM of arginine for 2 weeks. Unreacted glucose and arginine was removed by extensive dialysis against PBS.

\*表示與 arginine=0 mM 之間有顯著差異(P<0.05).