

R  
008, 8  
1528  
88

私立中山醫學院營養科學研究所

Graduate Institute of Nutrition Science, Chung-Shan  
Medical and Dental Collage

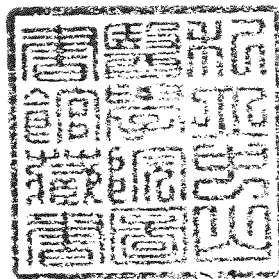
碩士論文

Master Thesis

補充精胺酸對 Streptozotocin 誘發糖尿病大白鼠免疫功能

之影響

Supplemental Arginine on Immune Function in  
Streptozotocin-induced Diabetic Rats



指導老師：劉承慈 博士(Dr. Cheng-Tzu Liu)

研究生：陳科銘(Ke-Ming Chen)

參考書恕不外借

中華民國八十八年七月

中山醫學院圖書館



C055150

## 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  
八十七學年度第二學期取得理學碩士學位之論文。

論文名稱：補充精胺酸對 Streptozotocin 誘發糖尿病大白鼠免疫功能之  
影響

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、國家圖書館及本人畢業學校圖書館，得不限地域、時間與次數以微縮、光碟或數位化等各種方式重製後散布發行或上載網路。

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。上述同意與不同意之欄位若未鈎選，本人同意視同授權。

指導教授姓名：劉承慈

研究生簽名：陳科欽 學號：R86302  
(親筆正楷)

日期：民國八十八年七月十六日

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

私立中山醫學營養系教授

李宗貴 博士

李宗貴

私立台北醫學院保健營養系副教授

葉松鈴 博士

葉松鈴

私立中山醫學營養系副教授  
(論文指導教授)

劉承慈 博士

劉承慈

中華民國八十八年七月

學生陳科銘，論文題目為「補充精胺酸對 Streptozotocin 誘發糖尿病大白鼠免疫功能之影響」。  
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 博士

簽名：劉承慈

中華民國八十八年七月十六日

寄信人: 科銘

標 題: 謝誌

發信站: 中山醫學院 BBS -- 絮情小站 (Wed Jul 21 09:27:18 1999)

來 源: ts1-p12.csmc.edu.tw.

首先感謝恩師 劉承慈老師這些年來的教誨及照顧，在此敬上十二萬分的謝意！

感謝所上各位老師及寄生蟲科和微生物科的老師在實驗及生活上的幫忙，使劣者受益非淺；也感謝同窗共修的各位同學對我這不成才的班代的支持、配合及對有所疏失處的包容。尤其謝謝蔡姐、敏惠、淑慧(球球)、怡萱(土狼)、惠、依萍、麗珍(SNOOPY)、詒芬、文華、藝婉(老闆娘)、淑琴(總管)、智伊及眾學弟妹，此外，還有“中山絮情 BBS”的各位網友如：Heart, Sundy, bon, III, jr, As, cubird, ... 等，當然還有我的最愛“輕舞飛揚”，感謝他的支持，雖然我不是“痞子蔡”也沒有他的感人行跡，但你是我的最愛”。

最後，感謝家人無限的支持與照顧!!

科銘  
1999.7.21  
于台中

# 目錄

	頁次
中英文專有名辭及縮寫對照覽表 .....	I
中文摘要 .....	1
壹、前言 .....	3
貳、文獻探討 .....	5
一、糖尿病定義及其分類 .....	5
二、糖尿病之併發症與流行病學 .....	6
三、糖尿病與免疫 .....	8
四、體內糖化蛋白終產物堆積與疾病發展的關係 .....	10
五、糖化終產物對免疫細胞的影響 .....	12
六、減少糖化終產物的方法 .....	12
七、精胺酸及其生理生化功能 .....	17
八、淋巴細胞及之功能及其活化 .....	18
九、精胺酸與淋巴細胞 .....	19
十、自然殺手細胞 .....	20
十一、動物模型 .....	21
參、實驗設計 .....	24
肆、實驗材料與方法 .....	25
一、實驗材料 .....	25
(1) 化學試藥 .....	25
(2) 儀器設備 .....	27
(3) 實驗動物 .....	27
二、實驗方法 .....	28
(1) 活體實驗 .....	28
(a) 糖尿病動物模型之建立 .....	28
(b) 血清及血漿製備 .....	28
(c) PBS 製備 .....	29
(d) 淋巴細胞製備 .....	29
(e) 淋巴細胞複製率之測量 .....	30
(f) 自然殺手細胞之製備 .....	30
(g) 標的細胞預培養 .....	31
(h) 自然殺手細胞毒殺作用之測定 .....	32
(2) 體外實驗 .....	33
(a) 糖化蛋白之測量 .....	33
(b) 糖化蛋白之製備 .....	33
(c) 糖化蛋白對自然殺手細胞毒殺作用的影響 .....	34
(d) 糖化蛋白對脾臟淋巴細胞複製率的影響 .....	35
(3) 統計分析 .....	35

伍、結果 .....	3 6
一、活體實驗 .....	3 6
(1) STZ 誘發 IDDM 大鼠之動物模型之建立.....	3 6
(2) Arginine 對正常大鼠及 STZ 大鼠淋巴系統的影響 .....	3 6
(3) Arginine 對正常大鼠及 STZ 大鼠脾臟非黏著性細胞 的影響.....	3 9
二、體外實驗 .....	4 3
(1) 糖化終產物之培養 .....	4 3
(2) 添加 arginine 或 glycine 對糖化終產物生成的影響 .....	4 3
(3) 糖化培養產物對於脾臟淋巴細胞複製的影響 .....	4 3
(4) 糖化培養產物對自然殺手細胞毒殺作用之影響 .....	4 5
陸、討論 .....	6 5
一、STZ 誘發糖尿病大鼠免疫功能之影響 .....	6 5
二、精胺酸對正常大鼠及 STZ 大鼠免疫功能的影響 .....	6 6
三、糖化終產物 .....	6 9
柒、結論 .....	7 1
捌、參考文獻 .....	7 2

## 中英文專有名辭及縮寫對照---覽表

原文	中譯	縮寫
diabetes mellitus	糖尿病	DM
$\beta$ 2-microglobulin		$\beta$ 2m
3-deoxyglucosone		3-DG
advanced glycation end products	糖化終產物	AGEs
Alzheimer disease	阿茲海默症	
aminoguanidine		AG
arginine	精胺酸	
bovine serum albumin	小牛血清蛋白	BSA
concanavalin A	刀豆素	Con A
cytokine	細胞激素	
helper T cell	輔助型 T 細胞	Th
hemoglobin	血紅素	
in vivo	體內實驗	
invitro	體外實驗	
insulin-dependent diabetes mellitus	胰島素依賴型糖尿病	IDDM
interferon- $\gamma$	干擾素- $\gamma$	INF- $\gamma$
interleukin	細胞間白素	IL
interleukin-2-receptor	細胞間白素-2 接受器	IL-2-R
maillard reaction	梅納反應	
natural killer cell	自然殺手細胞	NK
noninsulin-dependent diabetes mellitus	非胰島素依賴型糖尿病	NIDDM
phytohaemagglutinin	植物性血球凝集素	PHA
schiff base	許夫鹼	



streptozotocin		STZ
tritium thymidine	氚標記胸腺嘧啶	<sup>3</sup> H-thymidine
tumor necrosis factor- $\alpha$	腫瘤壞死因子- $\alpha$	TNF- $\alpha$
nitro blue terazolium		NBT



## 中文摘要

糖尿病(DM)併發症是DM患者普遍存在的問題,在之前有學者指出DM會造成免疫功能失調及體內糖化終產物(AGEs)的堆積,此現象並與DM併發症有關。L-arginine 在人體雖為一種非必需胺基酸,但在許多的研究報告中指出 L-arginine 可以刺激生長激素及胰島素等荷爾蒙的分泌且可以促進免疫功能的提升及阻礙 AGEs 的生成。故本研究目的主要針對 L-arginine 補充後對於正常大鼠及 streptozotocin(STZ)誘發糖尿病大鼠免疫功能的影響及是否因此可以減少 AGEs 的生成加以探討。

實驗方面方面,本研究分為二大部分:(1)活體實驗,以雄性 Wistar rat 靜脈注射 STZ(100mg/kg body wt.,i.v.)誘發糖尿病大鼠,觀察 STZ 對大鼠對免疫功能的影響及補充 L-arginine (2%)是否可正常化因 STZ 所造成之免疫功能的改變。(2)體外實驗,bovine serum albumin (BSA)與葡萄糖 (glucose)在添加或不添加 L-arginine 及 glycine 的情況下培養 14 天所產生的糖化產物,以 NBT 測量培養液中 AGEs 的生成量,並觀察此糖化培養產物對於脾臟淋巴細胞複製及脾臟自然殺手細胞的毒殺作用的影響。

實驗結果顯示,動物實驗中,在以 Con A 刺激下,STZ 大鼠淋巴細胞增殖較正常大鼠低,8 週 L-arginine (2%)的補充則可以促進正常大鼠及 STZ 大鼠的淋巴細胞增殖,但在長期 16 週的補充卻沒有促進的作用;另外,STZ 並不影響 NK 的活性,但 L-arginine (2%)補充則可增加 NK 的活性。在體

外實驗方面，在培養糖化培養產物時添加或不添加 L-arginine 不影響 AGEs 的生成；在細胞培養的實驗中添加不同的糖化培養產物到細胞培養液中，發現糖化產物會抑制免疫細胞的功能且在培養糖化產物中添加 L-arginine 並無法改善此現象。

由以上的結果可知，AGEs 是造成 DM 免疫功能低下的原因之一，但在培養糖化產物中添加 L-arginine 並不能抑制 AGEs 的生成；因此在動物實驗中補充 L-arginine 促進免疫功能可能是經由 L-arginine 的其他作用機制所致。長期 L-arginine 的補充未見有促進的效用，原因需再進一步的研究探討。

關鍵字：糖尿病，糖化終產物，淋巴細胞，自然殺手細胞，L-arginine

## 壹、前言

糖尿病(DM)是一種慢性長期的血糖過高症，患者分布佈遍佈全世界，並有逐漸增多的趨勢，在已開發國家及台灣地均排名十大死亡主要原因之列<sub>(行政院衛生署, 1997)</sub>。導致患者死亡的主要原因是慢性併發症，包括血管病變、腫瘤及感染；後二者與免疫能力低下的關係密切<sub>(Sakamoto et al. 1994)</sub>。這顯示需要更多有關 DM 之研究以預防及延緩患者發展出慢性併發症。

目前已有一些關於 DM 併發症發生的機制被提出，其中之一與長期高血糖所引起的非酵素性蛋白糖化反應(Maillard reaction)產生糖化終產物 (AGEs)有關，因長期高血糖的狀態下，血糖會與體內的蛋白發生糖化作用，進而影響其生理功能<sub>(Brownlee et al. 1980)</sub>。1992 年 Makita 等人利用 AGE 抗體測得 DM 患者體內中 AGEs 的含量是一般正常人的 2~3 倍，在 1996 年 Niwa 等人利用抗體偵測亦測得在血紅素及 $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2m)上有 AGEs 的形成，且 DM 的 AGEs 含量高於正常人，而組織中 AGEs 的堆積和 DM 的併發症，如：糖尿病腎臟病、糖尿病白內障、粥狀動脈硬化、Alzheimer disease 等疾病的發展也呈正相關。

此外，過去學者的研究中發現，Aminoguanidine(AG)會降低 AGEs 的形成且目前也使用在臨床上，但 AG 具有副作用，如導致肝功能異常，暫時性的血紅素下降或輕微的胃炎發生<sub>(Ledl and Schleicher, 1990)</sub>。也有文獻中指出，L-arginine 具有與 AG 相類似結構，因此也可以阻礙 AGEs 的形成，在體外

的研究中的確證實 L-arginine 可以降低 albumin 糖化作用 (Servetnick et al.1996) 。L-arginine 是一種半必需胺基酸，已知在許多動物模型，L-arginine 均顯示抗腫瘤及促進免疫的功能，且 L-arginine 有促進胰島素分泌的功能。此抗腫瘤的作用，可能與 L-arginine 促進與抗腫瘤有關的免疫調節作用有關，如：大白鼠補充 L-arginine 發現其抗腫瘤作用與促進其脾臟細胞對於 Con A 誘發的細胞增殖及 IL-2 的生成有關 (Reynolds et al. 1987) 。

DM 雖已知會造成免疫功能失調，但目前在此方面的研究報告並不多見，在 1978 年 Eliashiv 等的報告中指出，非胰島素依賴型糖尿病患者的淋巴細胞在植物性血球凝集素(phytohaemagglutinin ; PHA)刺激下之反應及成熟的 T 淋巴細胞比例均低於無糖尿病之控制組。Negishi 等學者(1987)的研究報告中也指出，第 1 及第 2 型糖尿病患者周邊血液中的自然殺手細胞的毒殺能力均低於正常人。

因此本研究的目的是觀察正常大鼠及 STZ 大鼠免疫細胞功能的差異及給予 L-arginine 的補充是否有促進免疫功能的作用；再進一步的體外實驗中，在 BSA 與葡萄糖培養糖化產物模式中觀察 AGEs 的生成是否受到 L-arginine 的影響，同時也觀察在細胞培養中添加不同的培養糖化產物是否改變脾臟淋巴細胞的複製力及 NK 的毒殺力。

## 貳、文獻探討

### 一、糖尿病定義及其分類

糖尿病(diabetes mellitus ; DM)是一種慢性新陳代謝異常的疾病，胰臟 $\beta$ 細胞受到自體免疫或病毒的破壞導致胰島素分泌不足，或是胰島素作用有缺陷或胰島素作用細胞上的接受器有所損壞均是致病的原因，病人在臨床上最重要的症狀為血中葡萄糖濃度過高，且有多吃、多喝、多尿(所謂三多的症狀)、口乾、疲倦及體重減輕等症狀。

新修正的糖尿病分類是依據病因為導向，不以治療為導向。所以最常見的胰島素依賴型糖尿病(insulin dependent diabetes mellitus ; IDDM)及非胰島素依賴型糖尿病(noninsulin dependent diabetes mellitus ; NIDDM)，分別改稱為第 1 型及第 2 型糖尿病，最新的分類標準如下。

ADA 1997 年版 糖尿病分類標準

- 一、 第 1 型糖尿病：可分為自體免疫型及不明原因型
- 二、 第 2 型糖尿病：胰島素抗性及相對胰島素不足所造成，病人不必依賴胰島素也可以生存，但此型 DM 仍有許多病因不明。
- 三、 其他類型：包括有胰臟 $\beta$ 細胞基因缺陷導致功能不全；胰島素作用的基因缺陷；外分泌性胰臟疾病；內分泌異常；藥物或化學藥品引起；感染症等原因。

(American Diabetes Association,1997)

由於 DM 長期影響正常代謝，且血糖控制不良之患者往往合併發生其他併發症，造成死亡率增加及生活品質降低，故有需要進一步的研究 DM 的致病機轉及預防與治療之方法，以降低 DM 的罹患率及死亡率。

## 二、糖尿病之併發症與流行病學

在台灣地區 DM 患者總數約在 30-40 萬人左右，其中第 2 型糖尿病(非胰島素依賴型；NIDDM) 占所有糖尿病患者人口 96.5%，第 1 型糖尿病(胰島素依賴型；IDDM) 僅占所有糖尿病患者人口 3.5%<sup>(台大 戴東原,1996)</sup>。在台灣 DM 已連續多年排名在十大死因的第五位<sup>(行政院衛生署,1998)</sup>，並且患者的人數仍日益增加，顯示對於糖尿病的控制及延緩其併發症的發展仍有待改善。DM 之併發症除了急性的酮酸血症及非酮酸性高滲透壓症外，常見於 DM 慢性併發症如下：

(1)視網膜病變：DM 患者眼睛失明的機會要比一般人高出 25 倍之多；在發病 20 年，IDDM 約有 90%，NIDDM 約有 25.8% 會發生視網膜病變<sup>(郭清輝,1998)</sup>。

(2)腎病變：最先出現的臨床表現是蛋白尿，隨後肌酸酐逐漸升高，最後演變成尿毒症，IDDM 約有 30~40% 及 NIDDM 約 10% 會形成尿毒症，在臺灣 DM 為目前血液透析原因的第二位，在美國為第一位<sup>(USRDS,1991,1992)</sup>。IDDM 的死亡原因中腎病變占 55%<sup>(Marks,1977 ; Joslin Diabetes Canter)</sup>。

(3)血管疾病：血管病變的發生主要原因是高血糖、高血壓及血脂異常等因素，常見的有冠狀動脈心臟病、腦中風及周邊血管阻塞。在血管疾病方面，IDDM 主要死因為微血管病變，NIDDM 則主要為心臟血管疾病與腦血管疾病<sup>(Marks,1977 ; Joslin Diabetes Canter)</sup>。

(4)神經病變：與 DM 的型別無關，在台灣地區 DM 發病初期約有 7.5% 會有神經病變，發病至 25 年可達 50%<sup>(郭清輝,1998)</sup>。在美國明尼蘇達州的調查顯示 DM 患者神經病變的罹患率高達 60%<sup>(Dyok,1993)</sup>。

(5)感染：皮膚之霉菌感染、陰道、泌尿道的感染及足部的感染等<sup>(陳國群,1997)</sup>，以足部感染的問題最為嚴重，由於病人有神經病變、血管阻塞及傷

口不易癒合等問題，使足部易發生潰瘍、壞疽、甚至需要截肢。跟據台大醫院調查 1982~1991 年間，在該院接受下肢截肢手術中 DM 占 37.2%且住院時間較一般人長(增加 14%)，此外，在臺灣因 DM 足部感染死亡率為同年齡層人口死亡率的 5.95%(郭清輝,1998)。

造成 DM 慢性併發症的原因推測有(陳國群 1997;郭清輝 1998)：

(1)高血糖：血糖過高 1. 可能和組織蛋白及其他分子發生糖化作用產生不可逆的糖化終產物(advanced glycation end products ; AGEs)造成糖化蛋白質以及糖化核酸的堆積；2. polyol 路徑引起的 sorbitol 增加，肌醇減少；3. 改變體內氧化還原狀態；4. 增加基底膜及基質如 fibronectin, type IV collagen 之合成。

(2)高血壓：DM 患者發生高血壓的機會約為非糖尿病患者的 2 倍，第 1 型糖尿病發生高血壓已知是由於腎功能變差所引起；第 2 型糖尿病也有可能因為腎病變造成高血壓。高血壓對於視網膜病變、腎臟病、動脈硬化均有不良的影響；尤其對腎病變的影響最大。

(3)血脂異常：部分 DM 患者有原發性的血脂異常，包括三酸甘油酯濃度增加，高密度脂蛋白膽固醇降低，非酯化之脂肪酸增加等，均為血管病變的重要因素與腎病變也有關連。

(4)其他：如肥胖，在 1998 年 Sowers 的報告指出肥胖與糖尿病關係密切；在國內的研究報告也有相同的結果(潘文涵等,1998)。

然而在最近的調查報告指出，從 1981 到 1990 年間，日本 DM 死亡原因中除心血管病變為第一位，因此長久以來對於 DM 併發症及防治的研究，均將焦點放在心血管疾病的研究上，然而惡性腫瘤及感染分別為 DM 死因的第二位及第三位(Skamoto et al.1994)，顯示可能與 DM 造成的免疫功能低下有密切關係，然而至目前為止，有關 DM 的免疫功能方面的研究卻不多，故本研究將針對 DM 免疫系統功能之影響進行探討。



### 三、糖尿病與免疫

在糖尿病與免疫方面，將分為二大部分加以討論：

#### (1) 免疫系統在 DM 發展上所扮演的角色

過去有關 DM 之免疫學研究大多集中在免疫異常在 DM 病理學上的觀察，特別是有關 IDDM 方面，目前已知與自體免疫有關。在死亡患者的胰島中利用“superantigens”偵測即可發現 T-細胞的存在且與 IDDM 的病程發展有關(Trucco et al.1995)，在 1998 年 Szelachowska 等學者的報告中，DM 患者 Th2 所分泌的 cytokine (IL-4, IL-10)顯著的減少，而 Th1 的 INF- $\gamma$ 及 IL-2 分泌則正常，顯示 Th2 活性低下應與 DM 有關。CD23 是多功能型的 cytokine，在 B-淋巴細胞的表面具有 CD23 的抗原，最近的研究報告中指出，利用 flow cytometry 偵測 CD20+(B-淋巴細胞)和 CD20+CD23+淋巴細胞次族群(subsets)及利用酵素免疫法測量血清中可溶性 CD23(sCD23+)，發現在 IDDM 的高危險群患者周邊血中 sCD23 濃度及 CD20+CD23+淋巴細胞的比率低於正常人，且周邊血中 sCD23 的濃度明顯高於胰臟嚴重損壞的 IDDM 患者，因此推測此現象與 DM 的發展有相關(Kretowski et al.1999)。雖然有學者提出造成 IDDM 患者胰島 $\beta$ 細胞壞死的可能原因是受到 NK 細胞毒殺所致(Hosszufalusi et al. 1993)，但在 1993 年 Ellerman 等人以 BB/W 大鼠或糖尿病傾向大鼠(diabetes-prone rat)之自發性自體免疫 IDDM 模型下，雖利用單株抗體(3.2.3 monoclonal antibody)抑制 NK 活性，但仍發現 DM 之發展，故提出了 NK 細胞活性並非致病原因。

#### (2) DM 對免疫功能的影响

目前為止雖僅有有限的研究報告提出長期 DM 會對免疫細胞功能造成抑制作用，如無感染 IDDM 患者的淋巴細胞在植物性血球凝集素 (phytohaemagglutinin ; PHA)刺激下之反應及成熟的 T 淋巴細胞比例均低於

無糖尿病之控制組(Eliashiv,1978)；而且由前述流行病學調查報告中所發現 DM 患者因腫瘤或感染的死亡率偏高，均顯示與 DM 免疫功能異常有關。

1987 年 Negishi 等學者研究報告中指出，第 1 及第 2 型 DM 患者周邊血液中的自然殺手細胞的毒殺能力均低於正常人。近年來 Tsujino 等人(1996) 的研究報告中也指出，慢性胰臟炎所導致的糖尿病患者其周邊血液中與自然殺手細胞(natural killer cell;NK)毒殺活性相似的 CD3+CD56+ T 細胞的比例亦顯著低於正常人。Hussain 等人(1987)指出，IDDM 患者 NK 細胞數低於正常人，但 NK 的毒殺活性在 DM 初期卻高於正常人，但在長期 DM (15 年病史)患者的 NK 毒殺活性則與正常人沒有差異。近年來也有學者指出(Field, 1995)，由 DM 傾向的大鼠(diabetes-prone rat; bbdp rat)頸部淋巴結及脾臟所取出的免疫細胞，會有較高的 splenic cytotoxicity (lysis of  $^{51}\text{Cr}$ -labeled YAC-1 cells)，而且對葡萄糖和 glutamine 也有較高的代謝率及較低的分裂反應( $^3\text{H}$ -thymidine uptake)。

DM 患者常有傷口癒合不良的情形，因而使感染更加嚴重，而傷口癒合不佳的情形則可能與免疫功能低下有關，比如已知巨噬細胞在傷口癒合的過程中即可提供調節傷口癒合所需的 IL-1,IL-6,TNF- $\alpha$  等 cytokines(Dieleman et al. 1996;Ford et al.1989)，這些 cytokines 可促進纖維母細胞的累積並因而能促進癒合之傷口的斷裂強度及傷口組織之發展(Rubbia-Brandt et al.1991)。而 DM 可能使傷口部位與巨噬細胞有關之 cytokines 之產生及相關的訊息傳遞發生變化而導致傷口癒合不易(Doxey et al.1998)。

由於目前為止大部分的研究均將焦點放在自體免疫與 IDDM 病程發展的相關性上，而在瞭解及改善 DM 之高腫瘤及感染死亡率之免疫學方面相關的研究報告卻不多見，因此引起本研究觀察淋巴細胞及自然殺手細胞活性的興趣，此二種細胞在宿主免疫功能將於下文中詳細說明。

#### 四、體內糖化蛋白終產物堆積與疾病發展的關係：

醣類上的醛基和酮基會和蛋白質的胺基進行非酵素性的反應，也就是“梅納反應 (Maillard reaction)”。DM 患者若長期血糖控制不良而處於高血糖狀態下亦會造成葡萄糖與血液或組織間甚至細胞內之蛋白質形成 advanced glycation end products(AGEs)。在 DM 動物模型中可証實合成 AGEs 與高血糖症的程度和時間的長短呈正相關(Sell et al 1992)。當 AGEs 堆積發生於血管壁時將會影響各種組織或器官的營養作用，進而影響到多種生理功能，如腎功能失調(Brownlee, 1985;Morris, 1986;Servetnick,1996)。目前尚不完全清楚胞內或胞外的糖化作用的機制及其後續對於蛋白質修飾作用的影響，但已知梅納反應的起始步驟是還原糖與蛋白質上的 $\alpha$ 或 $\epsilon$ 胺基縮合形成一個許夫鹼(schiff base)，然後再經安排形成 Amadori 產物或 ketoamine，最後則形成不可逆的產物 AGEs。(圖一)

Makita 等人(1992)當利用 AGE 抗體的免疫偵測法測得 DM 患者體內中 AGEs 的含量是一般正常人的 2~3 倍，在血紅素及 $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2m)亦可測得 AGEs 的形成且 DM 患者的含量更是高於正常人(Makita et al.1992;Araki et al.1992;Niwa et al.1996)。組織中 AGEs 的堆積和 DM 的併發症也有密切的關係，如：糖尿病腎臟病、糖尿病白內障及粥狀動脈硬化，其原因為 AGEs 刺激 cytokines 和生長因子(growth factor)的釋放；AGEs 造成基底膜不正常增厚、細胞外基質增生、促進血管內皮細胞的增生及改變血管通透性所致 (Makita et al. 1992; Araki et al. 1992)。1994 年 Mark 等人，以 pyrrolidine 和 pentosidine 的抗體偵測發現 Alzheimer disease 發展與 AGEs 的堆積成正相關。最近的報告中亦指出，第 2 型 DM 在血糖控制不良的情況下，IgG 可被 AGE 所修飾而且此 IgG-AGE 與自體免疫疾病之類風濕性關節炎有關(Newkirk et al.1998)。



## 五、糖化終產物對免疫細胞的影響

DM 併發症被提出最普遍的共同原因之一就是長期血糖控制不良所引起的 AGEs 及其衍生物的堆積(Vlassara et al.1994)，但有關 AGEs 對於 DM 免疫細胞功能的影響報告尚不多見。

目前已知在許多細胞上有 AGEs 的接受器，包括淋巴細胞、巨噬細胞及腦細胞等(Imani et al. 1993; Radoff et al. 1990;Vlassara et al. 1985)。在正常的狀態下，淋巴細胞及巨噬細胞的 AGEs 接受器可被 AGEs 所誘發；被活化巨噬細胞可對 AGEs 相關的衍生物進行吞噬並將其分解清除(Dobrian et al. 1996;Vlassara et al. 1985)，並同時促進 lymphokine，interleukin-1(IL-1)及 TNF- $\alpha$ 的分泌(Dobrian et al. 1996; Imani et al. 1993; Vlassara et al. 1989)。1998 年 Weiss 等人研究報告中曾指出，AGEs 經由增加血液中 IL-6 及 neoperin 而活化 DM 患者體內單核細胞(monocyte)和巨噬細胞，且此活化與 DM 腎病變的發展有關。至於 AGEs 對於淋巴細胞及 NK 細胞活性的影響尚未見到相關報告。

## 六、減少糖化終產物的方法

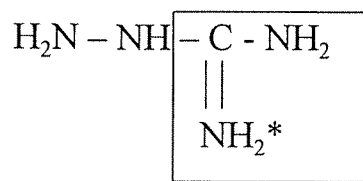
AGEs 既然是造成 DM 併發症普遍發生的原因，因此若能降低 AGEs 的生成及堆積應有助於減少 DM 併發症的發生率。目前已知體內 AGEs 的排除主要靠排泄及分解等過程如下所述：

在沒有腎病變的 DM 患者只要有良好的血糖控制便可以減少內生性 AGEs 的生成量，但在有糖尿病腎病變的患者就沒有明顯的效果，因為 AGEs 主要是經由腎臟排除，所以在腎病變的患者，血清中 AGEs 將會增加但尿液中的含量則會減少 (Koschinsky et al.1997)。另外，活化的巨噬細胞也可對 AGEs 相關的衍生物進行吞噬並將其分解清除(Vlassara et al. 1985; Dobrian et al. 1996)。

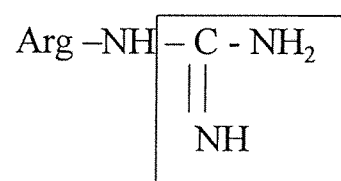
Aminoguanidine(AG)可以有效的抑制血糖所造成的蛋白質與蛋白質及蛋白質與脂質間的交聯作用其所造成的傷害(Ledl and Schleicher,1990)，因 AG 可以阻礙 amadori 產物進一步與蛋白質上的 $\alpha$ -NH<sub>2</sub> 基團進行反應產生糖化終產物(AGEs)，如 AG 可以阻礙 3-deoxyglucosone(3-DG)與蛋白質上的 $\alpha$ -NH<sub>2</sub> 基團形成 AGEs(圖二)(Brownlee et al.1986)。

雖然美國及歐洲的臨床研究中發現，AG 可有效的抑制由 amadori 產物與 3-DG 進行交聯作用(Ledl and Schleicher,1990)，但 AG 具有副作用，如導致肝功能異常，暫時性的血紅素下降或輕微的胃炎。已知 L-arginine 的結構與 AG 非常相似(圖三)，在 Maillard reaction 進行中，L-arginine 的添加將可經由 guanidinium 基團與糖化中間產物 amadori 的衍生物進行轉位(rearrangement)，行成不具活性的 substituted amadori 產物，而減少 3-DG 與 amadori 間的交互作用並降低 AGEs 的產生(圖四)(Servetnick et al.1996)。1996 年 Servetnick 即指出，人體血清白蛋白(HAS ; 100mg/ml)與葡萄糖(200mM)的混合液中若加入 L-arginine (200mM)，經 2 週 37°C 的培養可減少 70%AGEs 的生成，但添加 AG 則只降低 30%，因此添加 L-arginine 降 AGEs 的生成效果較 AG 為佳。除此之外，L-arginine 尚具有其他的生理功能，茲分述如下。





Aminoguanidine

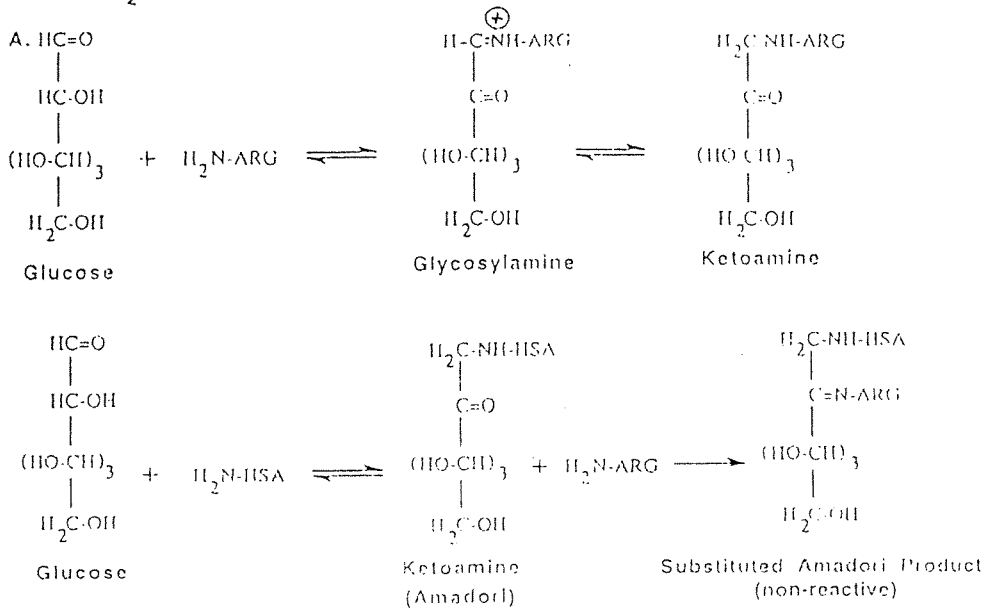


Arginine

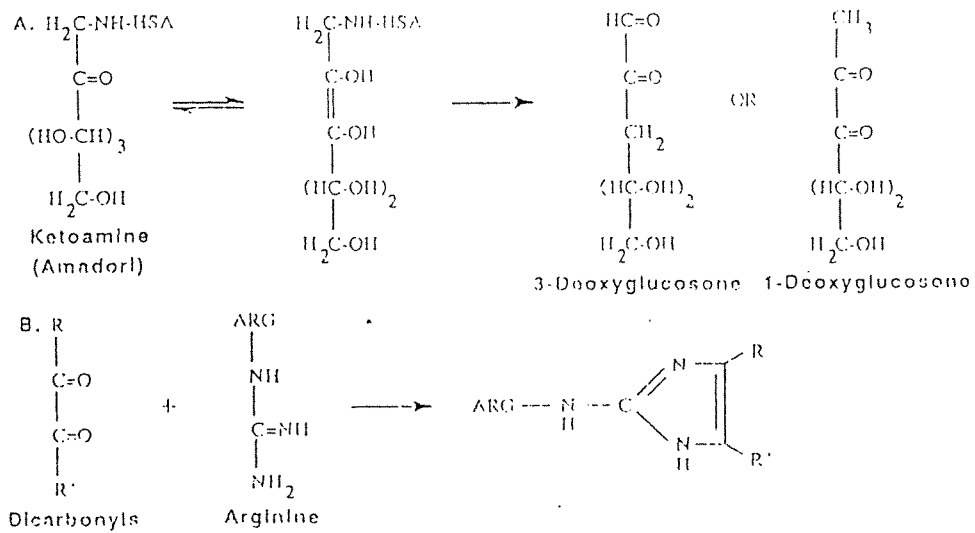
圖三 Aminoguanidine 與 Arginine 結構



1. Alpha-NH<sub>2</sub> Group Involvement



2. Guanidinium Group Involvement



圖四 精胺酸(arginine)抑制糖化終產物(AGEs)的生成

(圖取自 Servetnick et al.1996)

## 七、精胺酸及其生理生化功能

除在上文中提到精胺酸可減少醣類上醛基與酮基和蛋白質的胺基進行非酵素性的反應產生 AGEs 外，L-arginine 尚有其他生理功能，茲說明如下：

L-arginine 是一種半必需胺基酸(semi-essential amino acid)，屬於陽性離子胺基酸，其生理功能為：(1)在成長中的動物及疾病狀態下為必需胺基酸，參與細胞及組織蛋白的合成(Rose,1984)。(2)合成膠原蛋白所必需的胺基酸，有助傷口的癒合(Albina,1988)。(3)參與尿素循環(urea cycle)並為 creatinine，polyamine 等分子的前驅物。(4)NO 的前驅物質，L-arginine 可經由 arginine/NO pathway 產生 NO，NO 的生成可促使血管平滑肌舒張，減低血壓、血流及血小板的凝集(Giugliano et al.1997)。NOS 的活性與 L-arginine 的攝取及代謝有關(do Carmo et al.1998)。(5)在免疫功能方面，L-arginine 可增加胸腺及胸腺淋巴細胞數目(Barul et al.1980)。Reynolds 等人(1988)的研究中指出，補充 L-arginine(1%)後，有助於 cytotoxic T-lymphocyte development 及 poly IC-inducible NK 活性，且活化的 T 淋巴細胞上具有活性的 interleukin-2 receptor 表現也增加。(6)在抗腫瘤方面，補充 L-arginine 可促進脾臟細胞對於 Concanavalin A (Con A)所誘發的有絲分裂反應及 interleukin-2 產生 (Reynolds et al.1987)；L-arginine 透過增加巨噬細胞之噬菌作用達到對腫瘤生長及轉移之抑制作用 (Tachibana et al.1985)。(7)L-arginine 可以刺激胰臟β細胞分泌胰島素(Giugliano et al.1997)。

由於 L-arginine 有促進免疫功能及胰島素的分泌的作用，因此本研究中在 DM 大鼠的飲水中添加 L-arginine，觀察是否可以改善 DM 所造成的免疫功能失調的現象。

## 八、淋巴細胞及之功能及其活化

### (1) 淋巴細胞：

淋巴系統由淋巴球、上皮、及基質細胞(stromal cells)所組成，可分為獨立的包囊器官，或彌漫性淋巴組織的聚集。淋巴器官含有處在不同的發育階段的淋巴球，故可分為原發性(中樞淋巴上皮)器官及繼發性(周邊淋巴器官)。原發性器官是製造淋巴作用(lymphopoiesis)的場所，包括胸腺及骨髓，在此淋巴幹細胞(lymphoid stem cell)分化為淋巴細胞進而增殖成熟為具有功能的作用細胞。繼發性淋巴器官則包括有淋巴結、脾臟及黏膜相關組織，它們具有淋巴球互相間、淋巴球與抗原間交互作用所需的環境，並可將所產生的反應經由巨噬細胞、抗原呈現細胞以及成熟的 T 細胞及 B 細胞擴散出去。其中有些由原發性器官所產生的淋巴球可經由血液循環運輸到繼發性淋巴器官中。在成人體內平均有  $10^{12}$  個淋巴細胞，整個淋巴組織約占總體重的 2%。(王聖子等, 1996)

### (2) 以分裂原(mitogen)活化 T 細胞

淋巴細胞可受到分裂原(細胞增殖誘導物)的刺激而活化，分裂原凝集素(lectin)是由碳水化合物聯結蛋白質所形成，主要來自各種細菌和植物。例如：Concanavalin A (Con A)及 phytohaemagglutinin(PHA)，即可和特殊細胞表面的接受器結合，進而刺激活化 T 細胞。

Con A 是由蓖麻子所萃取出來，俗稱刀豆素，是一種促進細胞分裂素，會刺激淋巴複製，作用機制可能是 Con A 與 T 細胞活化有關之表面分子，如 T-細胞受器 CD3 結合，在刺激的過程中正常細胞之輔助型 T-細胞(Th)會釋出淋巴激素，例如：IL-2、T-細胞增殖因子及活化劑等，同時細胞表面本身會表現 IL-2 receptor，此 ligand-receptor 之結合為細胞複製所必須，

可引起基因的轉譯(transcription)，使細胞表面的 transferrin receptor 表現，進而結合 transferrin。在體外實驗，培養基中通常是以胎牛血清(fetal calf serum; FCS)來提供 transferrin，藉此造成基因的 transcription，使得在細胞週期(cell cycle)過程中進一步進入 DNA 的合成階段(Licastro,1993)。

淋巴細胞在正常的狀況下是處於休止狀態，循環中淋巴細胞有 90%是處於休止狀態下”resting cell”，當 T-細胞被活化後，會產生 lymphokines，如：IL-2，並在 T-細胞的表面表現出 IL-2 接受器(IL-2R)，當 IL-2 與 IL-2R 結合後將誘發一連串對細胞增殖及調控免疫活性的蛋白質的表現(Neckers and Cossman, 1983; Heikkila and Shwab, 1987)。T 細胞活化會進一步釋放 IL-6 活化 B 細胞並在肝臟中刺激急性蛋白的製造(王聖子, 1996)。

CD3 標記為 T 細胞所特有，而 Con A 會刺激活化具有 CD3 接受器的細胞，因此在本研究中選擇以 Con A 來作為刺激活化的分裂原。

## 九、精胺酸與淋巴細胞

有關精胺酸(arginine)對淋巴細胞的研究中發現，淋巴細胞本身並不會合成 arginine，arginine 主要是來自血液並靠特定運輸系統進入胞內(Boyd,1992)。Arginine 對於淋巴細胞是必需的，因 arginine 對於淋巴的重要性除了合成蛋白質外，也為合成 polyamines 的受質，arginine 可經由 ornithine 轉變為 polyamine，而 polyamine 的生合成可促進淋巴細胞的複製增殖，因此如 polyamine 的合成受到抑制，表示即可抑制淋巴細胞的複製也將受到抑制(Tabor,1984)。在體外的研究中即發現，在較高濃度的 arginine 下，分裂原(mitogen)刺激的淋巴細胞複製能力有明顯的提升，並產生較多的 IL-2 及較多的 IL-2R 表現(Torre,et al. 1993)。至於在活體內的研究中也發現，獲得 arginine(1%)補充的動物其淋巴細胞複製能力優於未獲得 arginine 補充者(Barbul, 1986)。

除動物模式外，人體實驗也發現，給與 arginine 的補充確實可使淋巴細胞在體外以分裂原刺激下，會有較多的 IL-2 產生及 IL-2R 的表現，並有較佳的複製能力 (Reynold et al.1987)。

## 十、自然殺手細胞

自然殺手細胞(Natural killer cell ; NK)是大顆粒性淋巴球(large granular lymphocytes)為第三族群細胞(Third population cell ; TPCs)，源自於骨髓，可在血液中及脾臟中發現，但在淋巴結、骨髓、胸腺和胸管中的NK細胞活化的則很少。以其分化而論，與T細胞最接近，但不表現T細胞接受體(T cell receptor)。NK細胞是人類先天免疫系統中重要的作用細胞，且可調控後天免疫反應。NK細胞能殺死某些腫瘤細胞，病毒感染的細胞，和正常異種胚緣細胞(normal allogeneic blast cell)並可分泌細胞激素，如GM-CSF(Granulocyte, macrophage-colon stimulating factor)，Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )及 Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ )等。

NK細胞在生物學上所扮演的角色仍未確定。許多的證據顯示它們參與移植的排斥作用、防止腫瘤的轉移及骨髓的移植排斥。NK細胞在抗腫瘤作用上可能是”第一線的防禦”，在適應性免疫反應生成之前就對腫瘤的核心發動攻擊。周邊血液中NK細胞活性隨著腫瘤的發展漸減，其他方面的免疫系統也是如此。

NK細胞進行毒殺作用的機制，對目標細胞的毒性損害可分為三種機制：一，在鈣離子存在下，當NK細胞與標的細胞接觸後，活化的NK細胞內細胞質顆粒會釋放出顆粒素-A(Granzyme-A)和穿孔素(perforin)。

perforin在有Ca<sup>++</sup>的存在下會進行 enzymic polymerization，在目標細胞上

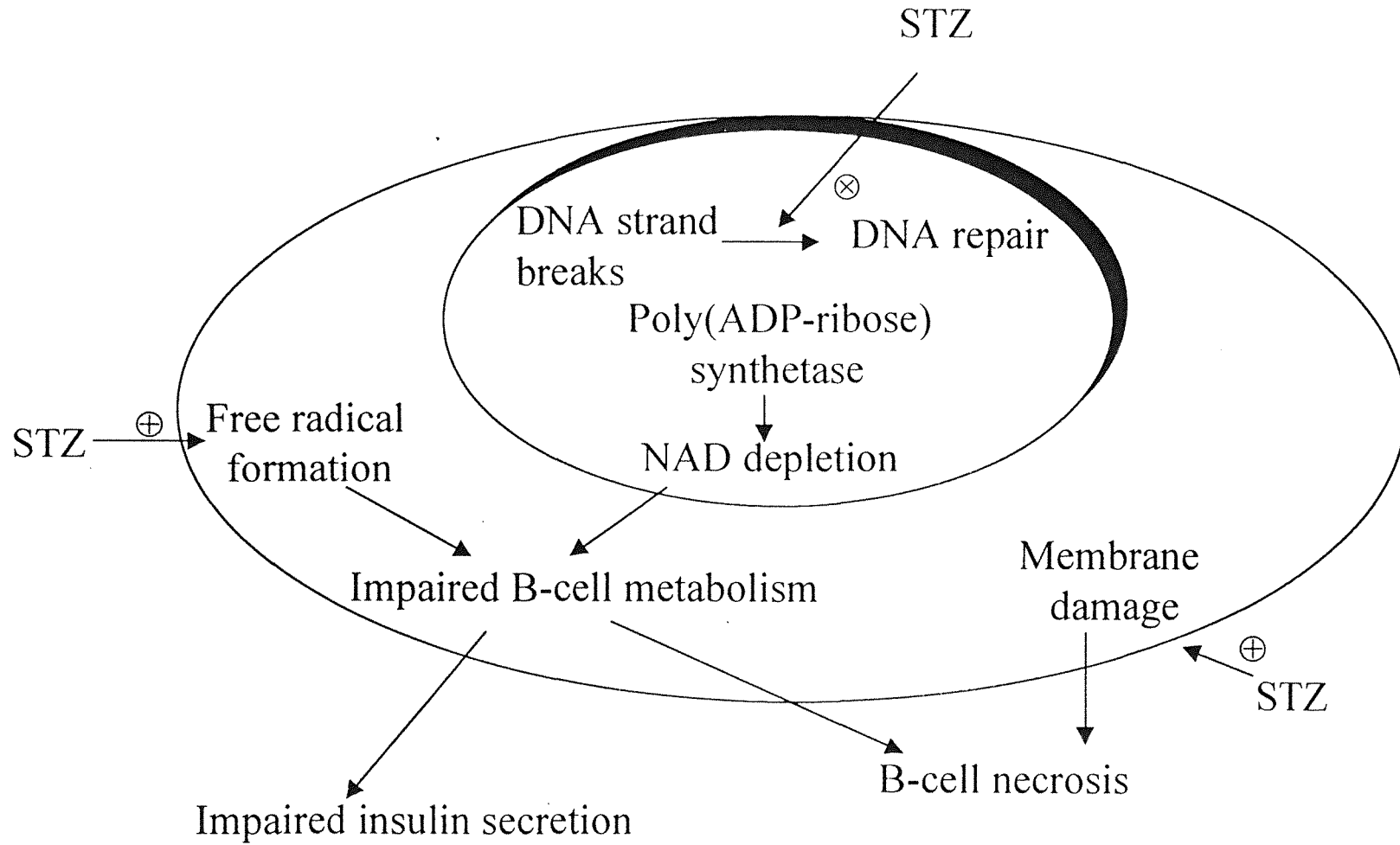
形成 perforin channel 而將目標細胞毒殺。但此毒殺的途徑需細胞曝露在高濃度的 IL-2 時才會表現出來。二、活化的 NK 細胞也可在與標的細胞接觸後釋出某些細胞激素，如：Lymphotoxin- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ 和 INF- $\gamma$ ，經由目標細胞的受器來觸發(trigger)目標細胞，進而改變調節它的蛋白質合成並造成細胞毒性傷害。三、NK 細胞可利用其表面蛋白分子，如 Fas 配體(Fas ligand)，與具有 Fas 分子標的細胞接觸後直接造成標的細胞進行計劃性細胞死亡(Programmed cell death)<sub>(Roitt et al.1996)</sub>。

NK 透過細胞溶解作用而抑制腫瘤細胞的生長，在體內為抗腫瘤的主要成員之一，由於 DM 患者因腫瘤死亡的比例偏高<sub>(Skamoto et al. 1994)</sub>，因此引起探討在 DM 狀況下 NK 毒殺活性是否改變的興趣。本研究將選用 NK 可辨識的淋巴腫瘤細胞(YAC-1)來進行 NK 毒殺活性測定。在之前學者的報告中也指出給予口服 arginine 後可以增加 NK 的活性<sub>(Puke et al.1991)</sub>，同時本研究也將觀察在飲水中給予 arginine 補充下是否對正常大鼠及 STZ 誘發糖尿病大鼠 NK 活性有不同。

## 十一、動物模型

目前常應用在研究IDDM的動物模型中，可分為二大類：1)誘發型，利用化學藥劑(alloxan和streptozotcin；STZ)或病毒等來誘發DM，alloxan和STZ兩種藥物皆為不可逆性的胰臟 $\beta$ 細胞毒性劑<sub>(Mordes et al.1985)</sub>；2)自發型，先天遺傳基因缺陷所致，如BB rats及NOD mice等，他們在不同年齡上的DM發展或症狀上或免疫及基因的表現上均與人體相似<sub>(Cheta 1998)</sub>。至於在本研究中所選用的則是以STZ誘發大鼠為實驗模型。有關STZ的作用機制，STZ會選擇性造成對於胰臟  $\beta$ -cell不可逆的損害，其作用方式可能有：(1)造成胰臟  $\beta$ -cell DNA的損害，(2)產生大量自由基(free radical)，(3)傷害胰臟  $\beta$ -cell

的細胞膜(圖五)。因此注射STZ後，將使得胰臟  $\beta$ -cell分泌insulin的功能受到損害及胰臟  $\beta$ -cell的死亡。1996年Saini等人的研究報告中指出，細胞培養下，高劑量STZ (30mM)會造成 $\beta$ -cell以necrosis的方式死亡，但在低劑量(15mM)時，細胞死亡則以apoptotic方式進行。此外，當以單一高劑量誘發動物DM時，由於此致病機制不涉及自體免疫反應(Saini et al.1996)，因此STZ誘發DM的動物模型所引起的相關併發症應直接與長期血糖偏高或胰島素缺乏有關。



圖五 Streptozotocin(STZ)誘發胰島素依賴型糖尿病(IDDM)

(取自 Pickup and Williams 1997)



## 參、實驗設計

已知長期糖尿病患相較於正常人會有免疫功能失調(Eliashiv et al.1978)及體內糖化蛋白終產物(Advanced glycation end products;AGEs)堆積增加(Makita et al.1992)，而精胺酸(arginine)具有提升免疫功能(Barul et al.1980)並降低 AGEs 的生成(Brownlee et al.1986)。本研究將分為二大部分：(1)活體實驗中，將先探討 STZ 誘發糖尿病大鼠下對免疫功能的影響，而補充 arginine 是否可正常化 STZ 所造成之免疫功能的改變。(2)體外實驗中，則以 bovine Serum Albumin(BSA)與葡萄糖混合溶液中添加或不添加 arginine 及 glycine 的情況下培養所產生的糖化產物，探討此糖化產物對於脾臟淋巴細胞複製及脾臟自然殺手細胞的毒殺作用的影響。

## 肆、實驗材料與方法

### 一、實驗材料

#### (1)化學試藥：

Glycine(99.9%)：購自美國 Sigma 公司

D(+)-Glucose：購自美國 Sigma 公司

Potassium Hydroxide(85%)：購自日本昭和公司

Magnesium Chloride(98%)：購自日本昭和公司

Sodium Carbonate(99.5%)：購自日本昭和公司

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

Sodium Phosphate Dibasic Hephhydrate(100.2)：購自日本昭和公司

Potassium Phosphate Dibasic (99.5%)：購自美國 TEDIA 公司

Sodium Chloride (99.9%)：購自美國 TEDIA 公司

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

Hydrochloric acid (35-37%)：購自日本和光公司

Sodium bicarbonate：購自日本和光公司

Folin ciocalteu's phenol reagent：購自美國 Pharmacia Biotech 公司

Alcohol (95%)：購自臺灣省菸酒公賣局

Bovine Serum Albumin：購自美國 Sigma 公司

Concanavalin A (15%)：購自美國 Sigma 公司

Trypan Blue Solution (0.4%)：購自美國 Sigma 公司

Fetal Bovine Serum (FBS)：購自美國 Gibco Laboratory

DNase 1：購自美國 Pharmacia Biotech 公司

NBT(Nitro Blue Tetrazolium)：購自英國 Melford Laboratories Ltd.

STZ(streptozotocin)：購自美國 Sigma 公司

Arginine：購自美國 Sigma 公司

Methanol：購自景明化學工業股份有限公司

Antibiotic(Penicilin：10000 units/ml，Streptomycin：10mg/ml)：購自美國 Sigma 公司

[6-<sup>3</sup>H] Thymidine(1mCi/ml)：購自英國 Amersham 公司

PRMI 1640：購自購自美國 Gibco Laboratory

生理食鹽水注射液：購自信東化學工業股份有限公司

尿糖檢測試紙：購自 Bayer

## **(2)儀器設備：**

1. 無菌操作台 (Laminar flow)：NUAIR Biological Safety Cabinets
2. 二氧化碳恆溫培養箱：REVCO
3. 冷凍離心機 (Freeze centrifuge)：Hitachi CR21
4. 光學顯微鏡 (Microscope)：Nikon YH-2
5. 分光光度計 (UV-VIS Spectrophotometer)：Hitachi U-3000
6. 血球計數板 (Hemocytometer)、計數器 (Counter)
7. Semiautomatic Cell Harvester 12Ch：Skatron
8. 閃爍偵測器(Liquid Scitillation Analyzer)：Packard 2100TR
9. 代謝籠：Tecniplast

## **(3)實驗動物：**

活體實驗方面，由國家科學委員會動物中心提供 8-10 週齡雄性 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%、動物自由進食及飲水。

體外實驗方面，則以國家科學委員會動物中心提供的 8-10 週齡雄性 Sprague-Dawely 大白鼠為對象。

## 二、實驗方法

### (1) 活體實驗：

#### (a) 糖尿病動物模型之建立

根據 Junod 等人(1969)建立糖尿病動物模型的方法加以修改，streptozotocin(100mg/ml)溶於生理食鹽水中，由大白鼠尾部靜脈注射入大白鼠體內，注射後第三天將大白鼠放置代謝籠中並收集尿液、量測食量、飲水及秤量體重，並以尿糖檢測試紙測試尿糖反應，判定是否成功誘發糖尿病，隨後將成功誘發之老鼠分為給予一般飲水組、2% arginine 組及 2% glycine 組。至於控制組則以生理食鹽水替代 STZ 注射，同時也將大鼠分為一般飲水組、2% arginine 組及 2% glycine 組。

每週將老鼠分別置於代謝籠中觀察並收集尿液，離心後取上清液至微量離心管中存於-20°C下，爾後再進行分析。大鼠將在注射後第 8 週及 16 週犧牲。

註：以下以 STZ 誘發糖尿病大鼠簡稱 STZ 大鼠

#### (b) 血清及血漿製備

大白鼠以 CO<sub>2</sub> 窒息犧牲後剪開腹部，由門靜脈抽取血液，將取得的血液一部份加入抗凝血劑以製備血漿；另一部份則不添加抗凝血劑以製備血清。血液以 4°C、2500rpm、10 分鐘離心，將血球分離取其上清液。不加抗凝血劑取得者者為血清；加抗凝血劑取得者為血漿。血漿存於-20°C下，再進行分析。血清用於淋巴細胞培養。

### (c)PBS(phosphate-buffer saline)製備

PBS 的組成成份：

試藥	終濃度(g/L)
NaCl	8
KCl	0.2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
CaCl	0.1
MgCl <sub>2</sub>	0.1

將上列的化學物質於室溫下溶於二次水中，以 KOH 溶液調整 pH 至 7.2~7.4 後經由 Whatman No1 濾紙過濾至血清瓶中，再經殺菌釜(121°C、1.5 大氣壓)中滅菌後放入 4°C 冰箱中儲存。

### (d)淋巴球之製備

以 CO<sub>2</sub> 將大白鼠窒息犧牲後取出其頸部淋巴結，將附著在淋巴結表面的脂肪去除後隨即放入裝有 PBS 的離心管中，在無菌操作台中將淋巴結取出置於金屬鐵網上並將淋巴結磨碎同時以 PBS 沖洗至離心管，隨後將取得的細胞溶液以濾紙過濾去除未剃除乾淨的脂肪及結締組織至 15 ml 離心管中，以 18°C、400xg 離心 10 分鐘。將離心下來的細胞以 RPMI 1640 懸浮，將細胞懸浮液滴入裝有淋巴球分離液(Folin ciocalteu's phenol reagent 密度 1.077)的離心管中(細胞懸浮液：淋巴球分離液=1：2)，於 18°C 下以 400 xg 離心 15 分鐘。由於比重的不同在淋巴球分離液與 RPMI 1640 中會有明顯的淋巴細胞聚集的區域，以玻璃滴管將細胞取出放入另一新的離心管中並加入 RPMI 1640 沖洗細胞，均勻混合後以 18°C、400 xg、10 分鐘的條件離心。最後將細胞懸浮在 RPMI 1640 中。將上述的細胞懸浮液取出一部份

經過適當的稀釋倍數後，與 trypan blue 1:1(v/v)加以染色來計算細胞數目及細胞存活率，在研究中細胞的存活率平均在 95%以上，並調整細胞密度至實驗進行時所需的濃度。

#### (e) 淋巴細胞複製率之測量

當細胞複製時會將 thymidine 併入細胞的 DNA 中，因此利用以有放射性  $^3\text{H}$  標定的 thymidine 作為淋巴細胞複製的指標。依據 Knight (1987) 加以修改之方法行之，每個 well 加入  $20\mu\text{l}(10\mu\text{Ci/ml})[^3\text{H}]\text{-thymidine}$ ，此劑量可以提供足夠的 thymidine 以供細胞複製時所需，但此劑量的放射性對細胞不會造成傷害。

將大白鼠以  $\text{CO}_2$  窒息犧牲，取大白鼠的頸部淋巴結製備淋巴細胞，淋巴細胞以每毫升  $5 \times 10^5$  個細胞培養在 96 well 中，培養液中含有 RPMI 1640、10% 自體血清、1% antibiotic 及不同濃度 ConA(0,1,2.5,7.5,10,25,50  $\mu\text{g/ml}$ )。48 小時後加入  $[^3\text{H}]\text{-thymidine}$ ，再培養 18 小時後，加入甲醇沖洗後利用 Semiautomatic Cell Harvester 將淋巴細胞收集到玻璃纖維濾紙上，將濾紙放入閃爍計數瓶中加入 2ml 閃爍計數液後以閃爍偵測器測 1 分鐘，放射量以 cpm 表示。以放射量讀值 cpm 作為淋巴細胞複製率的評估。

#### (f) 自然毒殺細胞之製備

將大白鼠以  $\text{CO}_2$  窒息犧牲取其脾臟，在含有 PBS 的培養皿中以鑷子將脾臟撕碎並以濾紙過濾至離心管中，濾去脂肪及結締組織，以  $18^\circ\text{C}$ 、 $400 \text{ xg}$  離心 10 分鐘。將離心下來的細胞以 RPMI 1640 懸浮，將細胞懸浮液滴加入裝有淋巴球分離液(Folin ciocalteu's phenol reagent 密度 1.077)的離心管中(細胞懸浮液：淋巴球分離液=1：2)， $18^\circ\text{C}$ 、 $400 \text{ xg}$ 。由於比重的不同

所致在淋巴球分離液與 RPMI 1640 中會有明顯的細胞聚集的區域，以玻璃滴管將細胞取出放入另一離心管中並加入 RPMI 1640 沖洗細胞，均勻混合後以 18°C、400 xg、10 分鐘的條件離心。最後以含有 10% FBS、1% antibiotic 的 RPMI 1640 培養液將細胞懸浮並加至培養皿(collagen coated)中，放入 37°C 培養箱中培養，因黏著性細胞會黏著在培養皿上以此方式去除黏著性細胞。培養 45 分鐘後由培養皿中將細胞培養液取出，以 18°C、400 xg、10 分鐘的條件離心，除去上清液，加入 1ml 的無菌水均勻混合 15 秒以漲破紅血球，隨即加入等體積 2 倍濃度的 PBS 使細胞懸浮液回復成正常 PBS 濃度，再加入大量的 PBS 將細胞完全懸浮起來，以 18°C、400 xg、10 分鐘的條件離心，除去上清液並將細胞懸浮在 RPMI 1640 中，以相同條件離心，除去上清液並將細胞懸浮在含 1% BSA 的 RPMI 1640(分析培養液)中。將細胞懸浮液取出一部份經過適當的稀釋倍數後，與 trypan blue 1:1(v/v)加以染色來計算細胞數目及細胞存活率，在研究中細胞的存活率平均在 95% 以上，並調整細胞密度至實驗進行時所需的濃度。

#### **(g)標的細胞 YAC-1(murine lymphoma, TIB 160)預培養**

當細胞在進行複製時會將 thymidine 併入細胞 DNA 中，依據 Knight (1987)加以修改之方法行。 $[^3\text{H}]$ -thymidine (5 $\mu\text{Ci/ml}$ )此劑量可以提供足夠的 thymidine 以供細胞複製時所需，但此劑量的放射性對細胞不會造成傷害。

在進行自然毒殺作用前 48 小時將 YAC-1 由 flask 取出，以 18°C、400 xg、5 分鐘離心，去除上清液，加入 1ml 細胞培養液(含 10% FBS 及 1% antibiotic 的 RPMI 1640)將細胞懸浮起來，取出 10 $\mu\text{l}$  的細胞懸浮液經 PBS 適當稀釋後再取 20 $\mu\text{l}$  與 trypan blue 1:1(v/v)加以染色來計算細胞數目。最後將細胞密度以培養液稀釋至每 ml 含  $5 \times 10^5$  個細胞，加入培養皿中置於 37°C 培養箱中培養，24 小時後加入據有放射性  $^3\text{H}$  標定的 thymidine (5 $\mu\text{Ci/ml}$ )，



繼續放入培養箱中培養。再經 24 小時的培養後將細胞由培養皿中取至 15ml 離心管中，以上述的方法離心並計算細胞數。YAC-1 以含 1% BSA 的 RPMI 1640(分析培養液)稀釋至  $4 \times 10^5$  個細胞/ml 進行實驗。

#### (h) 自然毒殺細胞(Natural killer cell;NK)毒殺作用之測定

根據 Whiteside 等人(1990)的實驗方法加以修改，將脾臟非黏著性單核細胞以分析培養液(含 1% BSA 的 RPMI 1640)調整至每毫升  $4 \times 10^7$  個細胞，取 100 $\mu$ l 加至 96 well 平底培養盤中，YAC-1 與 NK 細胞的比率為 100:1、50:1、25:1、12.5:1，並以僅有 YAC-1 細胞及 YAC-1 加 3M HCl 二組分別代表 YAC-1 自然死亡的放射量及 YAC-1 的總釋放射量。NK 細胞與 YAC-1 加入 96 well 平底培養盤中混合，並以 300rpm、3 分鐘的條件離心後放入 37°C 的培養箱中進行反應 4 小時。反應完畢後以 500rpm、5 分鐘的條件離心，取上層培養液 100 $\mu$ l 至閃爍計數瓶中，加入 2ml 的閃爍計數液均勻混合，利用閃爍偵測器偵測 1 分鐘，放射量以 cpm 表示。

毒殺百分比計算：

a：NK cell 與 YAC-1 混合培養所測得的放射量

b：YAC-1 自然死亡的放射量

c：YAC-1 與 3M HCl 表 YAC-1 的總放射量

毒殺%=[(a-b) / (c-b)]x100%

## (2)體外實驗：

### (a)糖化蛋白之測量

根據 Chung 等人(1988)的實驗方法加以修改，在不同濃度的 NBT(Nitro Blue Tetrazolium, 0.25, 0.5 及 0.75mM)下，BSA(50mg/ml)與 glucose(600mg/dl) 經 7 天的培養，發現當 NBT 濃度為 0.5mM 時可以得到較佳的反應條件，因此在後續的實驗中 NBT 均採用 0.5mM 的濃度進行。

- 1) carbonate buffer：含 75mM sodium carbonate 及 25mM sodium bicarbonate pH10.35。
- 2)NBT(Nitro Blue Tetrazolium) solution：0.5mM NBT(溶於 carbonate buffer 中)。
- 3)取糖化蛋白培養液樣品 10 $\mu$ l 至比色槽中加入 90 $\mu$ l carbonate buffer 及 1ml 0.5mM NBT 溶液，均勻混合後放置於 37 $^{\circ}$ C 的培養箱中進行反應。
- 4) 10 分鐘後，以分光光度儀測得波長 530nm 的吸光值為 A1，再放回培養箱中進行反應，20 分鐘後再以相同波長測得第二次吸光值為 A2。
- 5)計算  $\Delta A=(A2-A1)/10$   
 $\Delta A$  來表示蛋白糖化的程度。

### (b)糖化蛋白之製備

#### 1)培養時間

根據 Shamsi 等人(1998)的實驗方法加以修改，先後將 BSA(50mg/ml) 與 glucose(1000mM) 溶於 PBS 中，再以 0.22 $\mu$ m 濾膜無菌過濾至培養皿中以透氣膠帶密封後置於 37 $^{\circ}$ C 的無菌培養箱中培養，分別在第 0、14 及 21 天時將培養液收集，置於-20 $^{\circ}$ C 冰箱中儲存。待回後以 NBT 來分析樣品中

糖化蛋白的含量。

## 2)不同濃度 arginine 和 glycine 培養下對糖化蛋白生成之影響

組別 \ 成份	BSA(mg/ml)	Glucose(mM)	Arginine(mM)	Glycine(mM)
Control	50	1000	0	0
Arginine(高)	50	1000	500	0
Arginine(中)	50	1000	100	0
Arginine(低)	50	1000	50	0
Glycine(高)	50	1000	0	500
Glycine(中)	50	1000	0	100
Glycine(低)	50	1000	0	50

將上列的藥劑溶於 PBS 中，再以 0.22 $\mu$ m 濾膜無菌過濾至 dish 中以透氣膠帶密封後置於 37 $^{\circ}$ C 的無菌培養箱中培養。培養至 14 天後收集培養液並置於 -20 $^{\circ}$ C。

### (c)糖化蛋白對自然毒殺細胞毒殺作用的影響

由老鼠的脾臟中將自然毒殺細胞分離出來，將自然毒殺細胞以分析培養液含(1% BSA 的 RPMI 1640)調整至每毫升  $4 \times 10^7$  個細胞，取 100 $\mu$ l 加至 96 well 平底培養盤中，NK 細胞與 YAC-1 的比率為 12.5:1, 25:1, 50:1 及 100:1 進行實驗，再別加入 20 $\mu$ l 先前收集的不同濃度 arginine、glycine 和 glucose 與 BSA 反應下的培養液至 96 well 中。同時也以僅有加入 YAC-1 細胞及 YAC-1 加 3M HCl 二組分別代表 YAC-1 自然死亡的放射量及 YAC-1 的總釋放射量。NK 細胞與 YAC-1 加到 96 well 平底培養盤，以 300rpm、3 分鐘的條件離心，放入 37 $^{\circ}$ C 的培養箱中反應 4 小時。反應完畢後以 500rpm、5 分鐘的條件離心，取上層培養液 100 $\mu$ l 至閃爍計數瓶中，加入 2ml 的閃爍計數液均勻混合，利用閃爍偵測器偵測 1 分鐘，放射量以 cpm 表示。

毒殺百分比計算：

a：NK cell 與 YAC-1 混合培養所測得的放射量

b：YAC-1 自然死亡的放射量

c：YAC-1 與 3M HCl 表 YAC-1 的總放射量

$$\text{毒殺}\% = [(a-b) / (c-b)] \times 100\%$$

#### (d)糖化蛋白對脾臟淋巴細胞複製的影響

將大白鼠以 CO<sub>2</sub> 窒息犧牲，取大白鼠的脾臟製備淋巴細胞，方法如前所述。淋巴細胞以每毫升 5x10<sup>5</sup> 個細胞培養在 96 well 中(含有 RPMI 1640、10% FBS、1% antibiotic 及不同濃度 ConA (0,1,2.5,5, 25µg/ml))，再別加入以不同濃度 arginine、glycine 和 glucose 與 BSA 的培養液 20µl 至 96 well 中。48 小時後加入 [<sup>3</sup>H]-thymidine 再繼續培養 18 小時，加入甲醇沖洗後利用 Semiautomatic Cell Harvester 將淋巴細胞收集到玻璃纖維濾紙上，將濾紙放入閃爍計數瓶中加入 2ml 閃爍計數液後以閃爍偵測器測 1 分鐘，放射量以 cpm 表示。以放射量讀值 cpm 作為淋巴細胞複製率的評估。

#### (3)統計分析：

各組分析所得數據以平均值加減一個正負標準差(mean±SD)表示，統計則以 one-way analysis variance(ANOVA)(SPSS)進行分析，並以 Duncan's test 進行平均值間顯著差異分析(p<0.05)。

## 伍、結果

### 一、活體實驗

#### (1) 以 Streptozotocin(STZ)誘發胰島素依賴型糖尿病(IDDM)大白鼠之動物模型之建立

雄性 Wistar rat (250±30g) 經由靜脈注射 Streptozotocin (STZ)(100mg/kg body weight)誘發胰島素依賴型糖尿病(IDDM)，控制組則注射相同劑量之載體(生理食鹽水)。已有學者指出，經由靜脈注射 STZ 後的第三天可以測得高血糖及高尿糖反應<sup>(Alain Junod et al. 1969)</sup>，本實驗的確也是在第三天所測得高尿糖 (data not show)。在體重方面，STZ 注射後 8 週及 16 週體重明顯低於控制組( $p<0.05$ ) (圖 1-A)；注射 STZ 8 週及 16 週後血糖及尿糖也都顯著高於控制組( $p<0.05$ ) (圖 1-B；圖 1-C)。

本研究後續探討 arginine 效應時也因此均以此動物模型進行，實驗期中分別給予一般飲水及在飲水中補充 2% glycine 或 2% arginine。

#### (2) Arginine 對正常大白鼠及 STZ 誘發胰島素依賴型糖尿病大白鼠淋巴系統的影響

文獻曾指出在糖尿病狀態下會有免疫功能低下的情形，因此患者的感染率也高於一般正常人；由於 arginine 可以提昇免疫功能，如：增加胸腺及胸腺淋巴細胞數目<sup>(Barul et al.1980)</sup>、cytotoxic T-lymphocyte development、活化的 T 淋巴細胞上具有活性的 interleukin-2 receptor 表現增加、促進淋巴細胞的活化<sup>(Reynolds et al.1988)</sup>。因此在本實驗中，於 STZ

大鼠及正常大鼠的飲水中補充 2% arginine 並以補充 2% glycine 為對照組，觀察在 8 週及 16 週淋巴系統所受到的影響。

#### (a) 淋巴結重量及淋巴細胞數

8 週處理後淋巴結重量及淋巴細胞數目如表一所示。正常大鼠的淋巴結重在各處理組間沒有顯著的差異；STZ 大鼠在各處理組間也沒有顯著的差異，但 STZ 大鼠未處理或以 glycine 處理，其淋巴結均小於正常大鼠( $p < 0.05$ )，而 STZ 大鼠給予 arginine 補充組則與正常大鼠間沒有顯著差異；但在淋巴細胞數方面，arginine 作用則僅發現在正常大鼠，arginine 補充組淋巴細胞數目明顯高於一般飲水組及 glycine 組，至於 arginine 在 STZ 大鼠各處理組間則沒有差異，且 STZ 大鼠各組及正常大鼠各組間沒有顯著差異，但 STZ 大鼠各處理組均有較低於正常大的趨勢。淋巴結重與體重比，在各處理間均沒有顯著差異。在單位淋巴結重之淋巴細胞數方面，正常大鼠各處理組間沒有顯著的差異，但 arginine 補充有較高的趨勢；STZ 大鼠在各處理組間也沒有顯著的差異。

由以上的結果可知，正常大鼠經過 8 週 2% arginine 的補充，有提升淋巴細胞數及單位重淋巴結組織中淋巴細胞數目的效應；但在 STZ 大鼠中，雖然補充 2% arginine 也有增加淋巴結重的趨勢，但並不影響在淋巴細胞數目。

至於 16 週處理後，淋巴結重量及淋巴細胞數目如表二所示。在淋巴結重方面，正常大鼠補充 arginine 有增進淋結重的趨勢，而補充 glycine 則有降低的趨勢，且 arginine 與 glycine 二組間有顯著差異( $p < 0.05$ )；STZ 處理均導致大鼠淋巴結重低於正常大鼠，但各處理組間並沒有顯著差異。淋巴細胞數方面，正常大鼠中，arginine 雖有降

低細胞數目但與一般飲水組並沒有顯著差異，至於 glycine 則顯著降低正常大鼠之淋巴細胞數( $p < 0.05$ )；STZ 大鼠淋巴細胞數顯著低於正常大鼠，此外，若以 arginine 或 glycine 處理，其淋巴細胞數也有降低的趨勢，其中以 glycine 之影響較大。淋巴結重與體重比，正常大鼠給予一般飲水或給予 arginine 二組間沒有顯著差異，但 arginine 補充組則顯著高於 glycine 處理組。STZ 大鼠之淋巴結重與體重比與正常大鼠沒有顯著的差異且不論給予 arginine 或 glycine 的補充均不影響此結果。單位淋巴結重之淋巴細胞數方面，arginine 及 glycine 補充均有降低的趨勢，且其中 glycine 之作用有統計上的意義，STZ 大鼠與正常大鼠相比有較低的趨勢。

由以上的結果可知，正常大鼠補充 2% arginine 有增加淋巴結重的趨勢，但此結果可能與體重之增加有關，但在單位淋巴結重之淋巴細胞數反而是降低；但在 STZ 大鼠中，arginine 似乎不能改變進淋巴結重、淋巴細胞數、淋巴結重與體重的比值及單位淋巴結重之淋巴細胞數，反而 glycine 的補充可能會有更不利的影響。餵食 16 週的結果與 8 週的結果相較下，顯見長期餵食 arginine 會有不利的影響。

### **(b) 淋巴細胞複製**

正常大鼠在飲水中分別給予 2% glycine 或 2% arginine 8 週後，在不同濃度的 Con A 刺激下淋巴細胞複製能力均有明顯高於給予一般飲水組( $p < 0.05$ )，且在  $5\mu\text{g/ml}$  Con A 刺激下，2% arginine 補充組淋巴細胞複製能力明顯高於 2% glycine 組( $p < 0.05$ ) (圖 2-1)。STZ 大鼠淋巴細胞複製能力方面，STZ 大鼠給予一般飲水組在 Con A 濃度為 7.5、10 及  $25\mu\text{g/ml}$  的刺激下，明顯低於正常大鼠給予一般飲水組( $p < 0.05$ ) (圖 2-2)。在 Con A 濃度為 5、7.5、10 及  $25\mu\text{g/ml}$  的刺激作用下，STZ

大鼠在飲水中給予 2% arginine 的補充，其淋巴細胞的複製顯著高於以 STZ 大鼠給予一般飲水及 2% glycine 補充二組( $p < 0.05$ )(圖 2-2)。

正常大鼠在餵食 16 週後，給予一般飲水組的淋巴細胞複製能力反而明顯高於 arginine 及 glycine 補充組( $p < 0.05$ )(圖 3-1)。但在 STZ 大鼠中，一般飲水組在 1~5 $\mu\text{g/ml}$  Con A 的刺激下，淋巴複製率均明顯低於正常大鼠給予一般飲水組( $p < 0.05$ )(圖 3-2)；至於飲水中補充 arginine 或 glycine，在 Con A 濃度為 1, 2.5 及 5 $\mu\text{g/ml}$  的刺激下，淋巴複製均高於給予一般飲水組( $p < 0.05$ )(圖 3-2)，且與正常大鼠給予一般飲水沒有明顯的差異。

比較 8 週與 16 週的實驗結果，顯示在正常大鼠中，補充 2% arginine 8 週其淋巴複製有明顯的提升，但在補充 2% arginine 16 週後其淋巴複製卻明顯的降低；給予一般飲水的情況下，STZ 大鼠的淋巴複製在 8 週有顯著低於正常大鼠。另外，在 STZ 大鼠的飲水中補充 2% arginine 則可改善其淋巴複製力。

### **(3) Arginine 或 glycine 對正常大白鼠及 STZ 誘發胰島素依賴型糖尿病大白鼠脾臟非黏著性單核細胞的影響**

在免疫系統中只有自然殺手細胞可快速的毒殺不正常的細胞，如腫瘤細胞，因此自然殺手細胞的毒殺作用可能是一個重要的抗腫瘤的機制<sup>(Wiltrot et al.1985)</sup>，Arginine 可以促進 poly IC-inducible NK 活性<sup>(Reynolds et al.1988)</sup>，也對腫瘤生長及轉移有抑制作用<sup>(Tachibana et al.1985)</sup>。因此本實驗中，也觀察在 STZ 大鼠及正常大鼠的飲水中補充 2% arginine 或 2% glycine 8 週及 16 週後，對脾臟非黏著性單核細胞及其毒殺作用的影響。



### (a) 脾臟重量、脾臟非黏著性單核細胞數

經 8 週處理脾臟重量、脾臟非黏著性單核細胞數之結果示於表三。正常大鼠的脾臟重在各處理組間沒有顯著的差異；STZ 大鼠在各處理組間也沒有顯著的差異，但正常大鼠脾臟重於 STZ 大鼠各處理組 ( $p < 0.05$ )，而且 STZ 大鼠若給予 arginine 補充後脾臟重與正常大鼠間沒有顯著差異；在脾臟非黏著性單核細胞數方面，正常大鼠不論給予 arginine 或 glycine 補充均可使脾臟非黏著性單核細胞數高於一般飲水組 ( $p < 0.05$ )；STZ 大鼠給予一般飲水組其脾臟非黏著性單核細胞數顯著高於正常大鼠，但當 arginine 或 glycine 補充後，細胞數目反而較一般飲水組低 ( $p < 0.05$ )，且與正常大鼠的一般飲水組相似。在脾臟與體重比，各組間沒有顯著的差異。單位脾臟重之非黏著性單核細胞數，正常大鼠不論給予 arginine 或 glycine 補充，此比值均高於給予一般飲水 ( $p < 0.05$ )；STZ 大鼠的一般飲水組其單位脾臟重之非黏著性單核細胞數顯著高於正常大鼠，但在給予補充 arginine 或 glycine 二組此比值顯著降低且比值與正常大鼠相似。

經 16 週處理脾臟重量、脾臟非黏著性單核細胞數之結果示於表三在脾臟重方面，正常大鼠或 STZ 大鼠各處理組間沒有顯著差異，在正常大鼠各組均高於 STZ 大鼠 ( $p < 0.05$ )。脾臟非黏著性單核細胞數，正常大鼠給予 arginine 補充顯著低於給予 glycine 組 ( $p < 0.05$ )，且與一般飲水組相比，arginine 補充組有降低的趨勢但無顯著差異；STZ 大鼠各處理組間沒有顯著差異；且與正常大鼠相比，STZ 大鼠有降低的趨勢。在脾臟重與體重百分比，各處理組間沒有顯著差異。單位脾臟重之非黏著性單核細胞數，正常大鼠不論給予 arginine 或 glycine 補充均各與給予一般飲水組間沒有顯著差異；STZ 大鼠各處理組間亦沒有顯著差異；給予一般飲水時，正常大鼠與 STZ 大鼠間沒有顯著差異。

由以上的結果可知，在 8 週及 16 週的飼養，STZ 誘發糖尿病大鼠的脾臟重均顯著低於正常大鼠，在脾臟非黏著性單核細胞及單位脾臟重中非黏著性單核細胞數方面，在 8 週正常大鼠一般飲水組的細胞數均低於 STZ 大鼠，但在 16 週時卻沒有顯著差異。在正常大鼠及 STZ 大鼠的飲水中補充 2% arginine 8 週後，均使細胞數顯著高於一般飲水組，但在 16 週的餵食後，此效應消失不見。至於在細胞數、脾臟重及單位組織中細胞數方面，arginine 補充後也有相似的結果。

#### **(b)脾臟自然殺手細胞毒殺作用**

處理 8 週後，當正常大鼠給予 2% arginine 補充時其脾臟自然殺手細胞的毒殺能力在自然殺手細胞與目標細胞比為 100:1 時顯著高於一般飲水組( $p<0.05$ ) (圖 4-1)； STZ 大鼠與正常大鼠給予一般飲水組間在統計上沒有顯著的差異(圖 4-2)，若在 STZ 大鼠飲水中給予 2% arginine 補充，其自然殺手細胞的毒殺能力在自然殺手細胞與目標細胞比為 100:1 時也顯著高於一般飲水組及 2% glycine 組( $p<0.05$ )，且高於正常大鼠給予一般飲水( $p<0.05$ )(圖 4-2)。STZ 大鼠飲水中補充 2% glycine，其自然殺手細胞的毒殺能力明顯低於一般飲水組及正常大鼠( $p<0.05$ )(圖 4-2)。

相似的結果也可在處理 16 週後的分析中得到，正常大鼠若給予 2% arginine 補充，脾臟自然殺手細胞的毒殺能力在自然殺手細胞與目標細胞比為 100:1 顯著高於給予一般飲水組( $p<0.05$ ) (圖 5-1)。正常大鼠與 STZ 大鼠如給予一般飲水，其脾臟自然殺手細胞的毒殺作用並沒有差異；STZ 大鼠飲水中補充 2% arginine 組其自然殺手細胞的毒殺能力也顯著高於一般飲水組及 2% glycine 組，且高於給予一般飲水的正常大鼠 ( $p<0.05$ )(圖 5-2)。

在正常大鼠或 STZ 大鼠的飲水中添加 2% arginine 餵食 8 週及 16 週，自然殺手細胞的毒殺能力均顯著高於給予一般飲水組；但正常大鼠或 STZ 大鼠給予一般飲水間沒有顯著差異。

## 二、體外實驗

### (1) 糖化終產物之培養

將 BSA(50mg/ml)與 glucose(1000mM)混合溶於無菌之 PBS 中，以 0.22 $\mu$ m 的無菌過濾膜過濾，置於 37°C 5%CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 0、14 及 21 天。以 NBT 的方法測量培養液中糖化終產物生成的量。在培養 14 天後，在培養液中 AGEs 的生成量顯著高於未培養過培養液中 AGEs 的量，且 AGEs 的生成量隨時間的增加而增加(圖 6)。這與過去學者 Shamsi 等人(1998)利用免疫法測得在培養第 14 天 AGEs 的生成明顯高於未培養者之結果一致，因此往後的實驗進行的糖化終產物(AGEs)均是培養 14 天所得。

### (2) 添加 arginine 或 glycine 對糖化終產物生成的影響

控制組為 BSA(50mg/ml)與 glucose(1000mM)，實驗組中分別再添加不同濃度的 arginine(500mM、100mM 及 10mM)或相同濃度之 glycine 作為對照組。在培養 14 天後以 NBT 測量，在各組間並沒有差異(data not show)。

### (3) 糖化培養產物對於脾臟 T 淋巴細胞複製之影響

犧牲老鼠取其脾臟製備細胞，在 96 well 培養盤中每 well 分別添加 10%不同的糖化培養物，此部份分為在糖化培養物培養中分別添加高濃度及低濃度的 arginine 或 glycine。觀察在糖化培養物培養中添加 arginine 的培養產物對於脾臟淋巴複製的影響。

(a)高濃度：(圖 7-1)

BSA 與 glucose 共同培養時添加高濃度 arginine (500mM、100mM、50mM)或不加；添加相同濃度 glycine 為對照組。並在培養細胞時以不同濃度的 Con A (0、1、2.5、5、7.5、10、25 及 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )刺激。在不同濃度的 Con A 刺激下，未添加糖化培養產物(10%)，脾臟淋巴複製均顯著高於其他各組( $p<0.05$ )，顯示添加糖化產物時明顯抑制脾臟淋巴複製；而在培養糖化產物時，不論有無添加 arginine 或 glycine，均無法改善此現象。

(b)低濃度：(圖 7-2)

培養 BSA 加 glucose 時添加低濃度 arginine(5mM、1mM 及 0.5mM)；glycine 以添加相同濃度為對照組，分別添加 10%糖化培養產物至 96 well 中，並在培養細胞時以不同濃度的 Con A (0、1、2.5、5、7.5 及 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )刺激。並在培養細胞時以不同濃度的 Con A 濃度刺激作用下，未添加糖化培養產物，脾臟淋巴複製均顯著高於其他各組( $p<0.05$ )。不同濃度的 arginine 培養糖化產物的添加，在 Con A 濃度 2.5 或 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  刺激作用時，培養糖化產物時添加 arginine 濃度為 1mM，脾臟淋巴細胞複製力顯著高於添加濃度為 5mM 及 0.1mM，而添加 arginine 濃度為 5mM 及 0.1mM 二組間沒有顯著差異( $p<0.05$ )。不同濃度的 glycine 培養糖化產物的添加，在 Con A(1、5 及 25 $\mu\text{l}/\text{ml}$ )的刺激作用時，培養糖化終產物時添加 glycine 濃度為 5mM，脾臟淋巴細胞複製力顯著高於添加 glycine 濃度為 1mM 及 0.1mM( $p<0.05$ )；在 Con A 濃度為 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  的作用刺激下添加 glycine 濃度為 0.5mM 其複製力低於添加 glycine 濃度為 5mM 及 1mM 時( $p<0.05$ )。在 Con A 濃度為 1,5 及 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$  時，培養中添加 glycine 5mM 淋巴複製力高於未

添加 arginine 或 glycine 的糖化培養物 AGE-BSA 組( $p<0.05$ )；而在 Con A 濃度為 2.5 及 5 $\mu\text{g/ml}$  時，添加 arginine 濃度為 5mM 及 0.5mM 時其淋巴複製力低於 AGE-BSA 組( $p<0.05$ )。

#### **(4) 培養糖化產物對於自然殺手細胞毒殺作用之影響**

犧牲老鼠，取脾臟製備細胞，以脾臟非黏著性單核細胞與目標細胞(YAC-1)細胞數比為 12.5:1、25:1、50:1 及 100:1 進行自然殺手細胞(NK)毒殺的實驗。進行毒殺作用時，在 96 well 培養盤中每 well 中再添加 10% 的糖化培養產物，進行反應四小時。添加不同的糖化培養產物在不同的脾臟非黏著性細胞與目標細胞(YAC-1)比例毒殺作用均明顯低於未添加糖化培養產物( $p<0.05$ )(圖 8-1；圖 8-2)。

在培養液中添加糖化培養產物會抑制脾臟淋巴細胞複製及自然殺手細胞的毒殺作用；而在糖化培養產物的培養中添加不同濃度的 arginine 或 glycine 不影響以 NBT 定量之 AGE-BSA 的結果，且亦不影響 AGE-BSA 培養產物對脾臟淋巴細胞複製及自然殺手細胞活性之抑制作用也有相同的結果。

表 1 STZ 誘發糖尿病大白鼠及正常大白鼠給予餵食不同的飲水二個月，頸部淋巴結重、淋巴細胞數、頸部淋巴結重與體重比、淋巴細胞數與淋巴結重比

處 理	淋巴結重(g)	淋巴細胞數(x10 <sup>7</sup> )	淋巴結重/體重 (%)	淋巴細胞數(x10 <sup>7</sup> )/ 淋巴結重 (g)
Control+一般飲水 n=6	0.188±0.043 <sup>b</sup>	3.90±2.13 <sup>ab</sup>	0.0462±0.0118	19.7±6.8 <sup>ab</sup>
Control+glycine n=6	0.186±0.074 <sup>b</sup>	4.83±3.57 <sup>ab</sup>	0.0452±0.0173	22.5±11.8 <sup>ab</sup>
Control+arginine n=8	0.187±0.060 <sup>b</sup>	5.50±2.81 <sup>b</sup>	0.0474±0.0172	29.2±7.4 <sup>a</sup>
STZ+一般飲水 n=7	0.111±0.034 <sup>a</sup>	2.81±2.41 <sup>ab</sup>	0.0354±0.0098	22.1±11.6 <sup>ab</sup>
STZ+glycine n=7	0.114±0.028 <sup>a</sup>	2.06±1.39 <sup>a</sup>	0.0387±0.0090	16.5±9.7 <sup>b</sup>
STZ+arginine n=10	0.142±0.052 <sup>ab</sup>	2.74±2.17 <sup>ab</sup>	0.0487±0.0207	17.6±6.9 <sup>b</sup>

資料以 One-way ANOVA 分析，並以 Duncan' test 分析組間是否有顯著差異並以 <sup>a,b,c</sup> 表示。(p<0.05)

表 2 STZ 誘發糖尿病大白鼠及正常大白鼠給予餵食不同的飲水四個月，頸部淋巴結重、淋巴細胞數、頸部淋巴結重與體重比、淋巴細胞數與淋巴結重比

處 理	淋巴結重(g)	淋巴細胞數( $\times 10^7$ )	淋巴結重/體重 (%)	淋巴細胞數( $\times 10^7$ )/ 淋巴結重(g)
Control+一般飲水 n=4	0.147 $\pm$ 0.018 <sup>a b</sup>	2.83 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>	0.0328 $\pm$ 0.0057 <sup>ab</sup>	19.0 $\pm$ 6.53 <sup>a</sup>
Control+glycine n=6	0.117 $\pm$ 0.041 <sup>b c</sup>	0.94 $\pm$ 0.31 <sup>bc</sup>	0.0255 $\pm$ 0.0069 <sup>a</sup>	8.26 $\pm$ 2.04 <sup>bc</sup>
Control+arginine n=4	0.186 $\pm$ 0.029 <sup>a</sup>	1.92 $\pm$ 0.92 <sup>a b</sup>	0.0375 $\pm$ 0.0051 <sup>b</sup>	9.95 $\pm$ 3.40 <sup>a bc</sup>
STZ+一般飲水 n=5	0.102 $\pm$ 0.026 <sup>bc</sup>	1.42 $\pm$ 1.15 <sup>bc</sup>	0.0344 $\pm$ 0.0052 <sup>ab</sup>	12.86 $\pm$ 10.34 <sup>a b</sup>
STZ+glycine n=3	0.094 $\pm$ 0.007 <sup>c</sup>	0.28 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>	0.0323 $\pm$ 0.0040 <sup>ab</sup>	2.926 $\pm$ 1.57 <sup>c</sup>
STZ+arginine n=6	0.093 $\pm$ 0.035 <sup>c</sup>	1.05 $\pm$ 0.82 <sup>bc</sup>	0.0318 $\pm$ 0.0062 <sup>ab</sup>	10.20 $\pm$ 6.04 <sup>a bc</sup>

資料以 One-way ANOVA 分析，並以 Duncan' test 分析組間是否有顯著差異並以<sup>a,b,c</sup>表示。(p<0.05)



表 3 STZ 誘發糖尿病大白鼠及正常大白鼠給予餵食不同的飲水二個月，脾臟重、脾臟非黏著性單核細胞數、脾臟重與體重比、脾臟非黏著性單核細胞數與脾重比

處 理	脾臟重(g)	脾臟非黏著性單核細胞數(x10 <sup>7</sup> )	脾臟/體重(%)	脾臟非黏著性單核細胞數(x10 <sup>7</sup> )/脾臟重(g)
Control+一般飲水 n=6	0.978±0.078 <sup>ac</sup>	3.44±1.19 <sup>a</sup>	0.239±0.02	3.50±1.26 <sup>a</sup>
Control+glycine n=6	1.119±0.296 <sup>a</sup>	9.40±7.54 <sup>b</sup>	0.268±0.06	8.19±6.42 <sup>b</sup>
Control+arginine n=8	1.022±0.083 <sup>a</sup>	11.5±3.96 <sup>b</sup>	0.258±0.02	11.26±3.78 <sup>b</sup>
STZ+一般飲水 n=7	0.781±0.065 <sup>b</sup>	7.86±2.95 <sup>b</sup>	0.251±0.04	10.23±3.80 <sup>b</sup>
STZ+glycine n=7	0.735±0.130 <sup>b</sup>	3.14±2.73 <sup>a</sup>	0.252±0.04	3.91±2.68 <sup>a</sup>
STZ+arginine n=10	0.819±0.165 <sup>bc</sup>	3.29±1.40 <sup>a</sup>	0.275±0.04	4.02±1.56 <sup>a</sup>

資料以 One-way ANOVA 分析，並以 Duncan' test 分析組間是否有顯著差異並以<sup>a,b,c</sup>表示。(p<0.05)

表 4 STZ 誘發糖尿病大白鼠及正常大白鼠給予不同的飲水四個月，脾臟重、脾臟非黏著性單核細胞數、脾臟重/體重、脾臟非黏著性單核細胞數/脾重

處 理	脾臟重(g)	脾臟非黏著性單核細胞數( $\times 10^7$ )	脾臟/體重(%)	脾臟非黏著性單核細胞數( $\times 10^7$ )/脾臟重(g)
Control+一般飲水 n=6	0.900 $\pm$ 0.100 <sup>a</sup>	5.58 $\pm$ 2.57 <sup>ab</sup>	0.201 $\pm$ 0.03	6.28 $\pm$ 3.15 <sup>ab</sup>
Control+glycine n=6	0.900 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	7.11 $\pm$ 1.60 <sup>a</sup>	0.201 $\pm$ 0.03	7.90 $\pm$ 1.52 <sup>b</sup>
Control+arginine n=8	0.975 $\pm$ 0.179 <sup>a</sup>	3.46 $\pm$ 1.90 <sup>b</sup>	0.196 $\pm$ 0.03	3.43 $\pm$ 1.29 <sup>a</sup>
STZ+一般飲水 n=7	0.627 $\pm$ 0.122 <sup>b</sup>	4.08 $\pm$ 1.21 <sup>b</sup>	0.217 $\pm$ 0.06	6.67 $\pm$ 2.08 <sup>b</sup>
STZ+glycine n=7	0.657 $\pm$ 0.10 <sup>b</sup>	3.58 $\pm$ 1.03 <sup>b</sup>	0.221 $\pm$ 0.02	5.40 $\pm$ 0.87 <sup>ab</sup>
STZ+arginine n=10	0.678 $\pm$ 0.224 <sup>b</sup>	4.46 $\pm$ 1.51 <sup>b</sup>	0.234 $\pm$ 0.05	6.75 $\pm$ 2.56 <sup>b</sup>

資料以 One-way ANOVA 分析，並以 Duncan' test 分析組間是否有顯著差異並以<sup>a,b,c</sup>表示。(p<0.05)

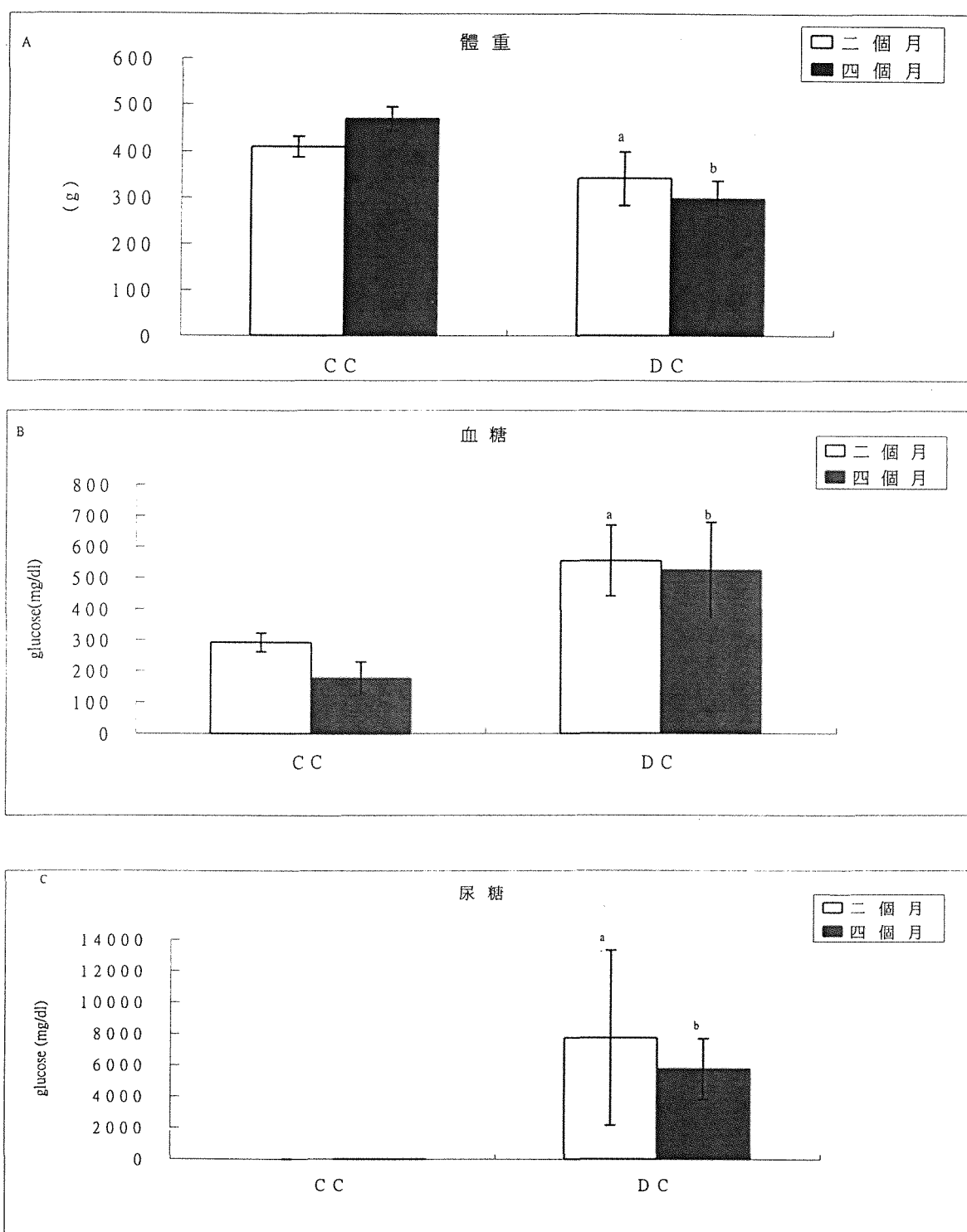


圖 1 以 STZ 誘發糖尿病鼠模型，觀察其體重、血糖及尿糖的變化。

Wistar 雄性大白鼠注射 STZ(100mg/kg body wt)誘發糖尿病大白鼠，控制組則注射載體。CC：控制組；DC：STZ 誘發糖尿病；□：二個月；■：四個月。Mean±SD，n=5。(a)表示與二個月的控制組有顯著差異(p<0.05)；(b)表示與四個月的控制組有顯著差異(p<0.05)。

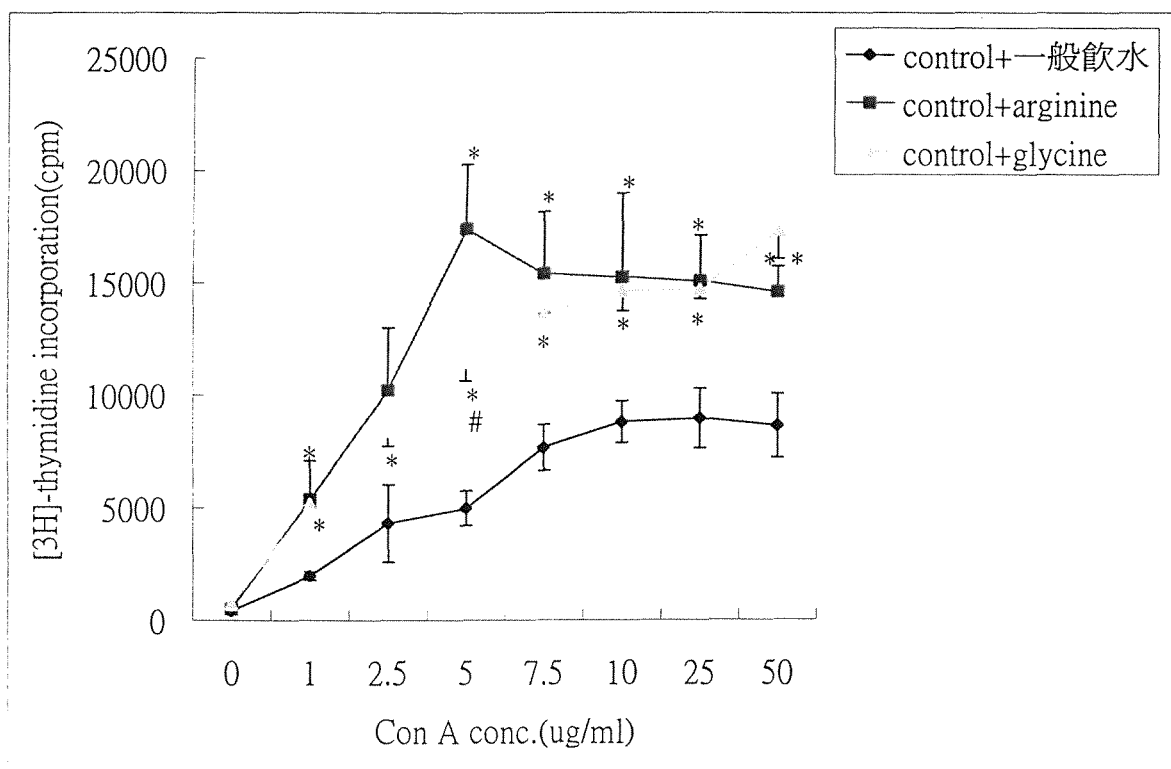


圖 2-1 正常大白鼠分別給予不同的飲水二個月對於淋巴複製的影響。

正常大白鼠分別給予一般飲水或含 2%arginine、2%glycine 的飲水二個月。取頸部淋巴結，純化後分植到 96 well 培養盤中，每 well 含有  $5 \times 10^5$  個細胞，並給予不同濃度的 Con A (0,1,2.5,5,7.5,10,25 及 50  $\mu\text{g/ml}$ ；終濃度) 刺激。培養 48 小時後添加  $[^3\text{H}]$ -thymidine，再繼續培養 18 小時，測  $[^3\text{H}]$ -thymidine 併入細胞 DNA 的量，以 cpm 表示。◆：一般飲水；■：補充 2% arginine；▲：補充 2%glycine。Mean $\pm$ SD，n=3。(\*)與 control 給予一般飲水有顯著差異(p<0.05)；(#)2%arginine 與 2%glycine 組有顯著差異(p<0.05)。

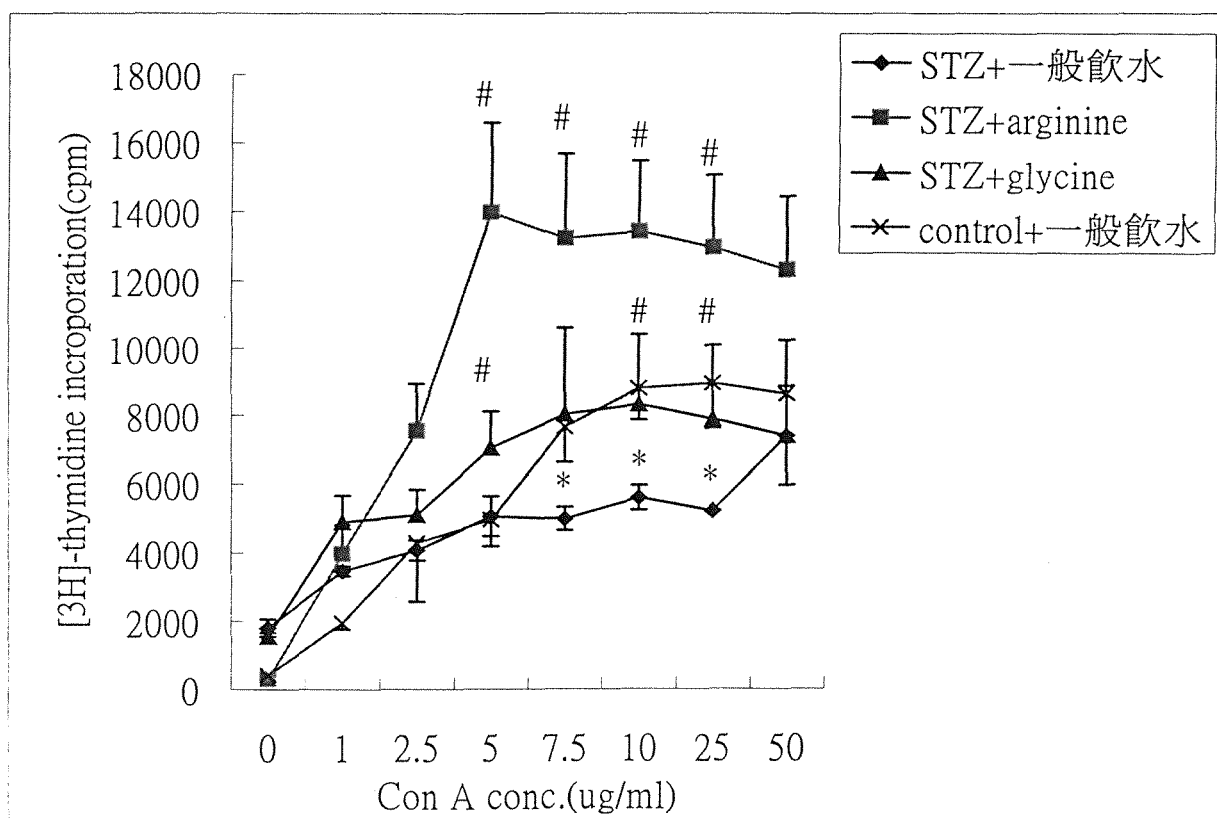


圖 2-2 STZ 誘發糖尿病大白鼠分別給予不同的飲水二個月對於淋巴複製的影響。

STZ 誘發糖尿病大白鼠分別給予一般飲水、2%arginine 及 2%glycine 二個月。取頸部淋巴結，純化後分植到 96 well 培養盤中，每 well 含有  $5 \times 10^5$  個細胞，給予不同濃度的 Con A (0,1,2.5,5,7.5,10,25 及 50  $\mu\text{g/ml}$ ；終濃度) 刺激。培養 48 小時後添加  $[^3\text{H}]$ -thymidine，再繼續培養 18 小時，測  $[^3\text{H}]$ -thymidine 併入細胞 DNA 的量，以 cpm 表示。Mean $\pm$ SD，n=3。(#)與 STZ 給予一般飲水組有顯著差異(p<0.05)。(\*)control 給予一般飲水組與 STZ 給予一般飲水組有顯著差異(p<0.05)。

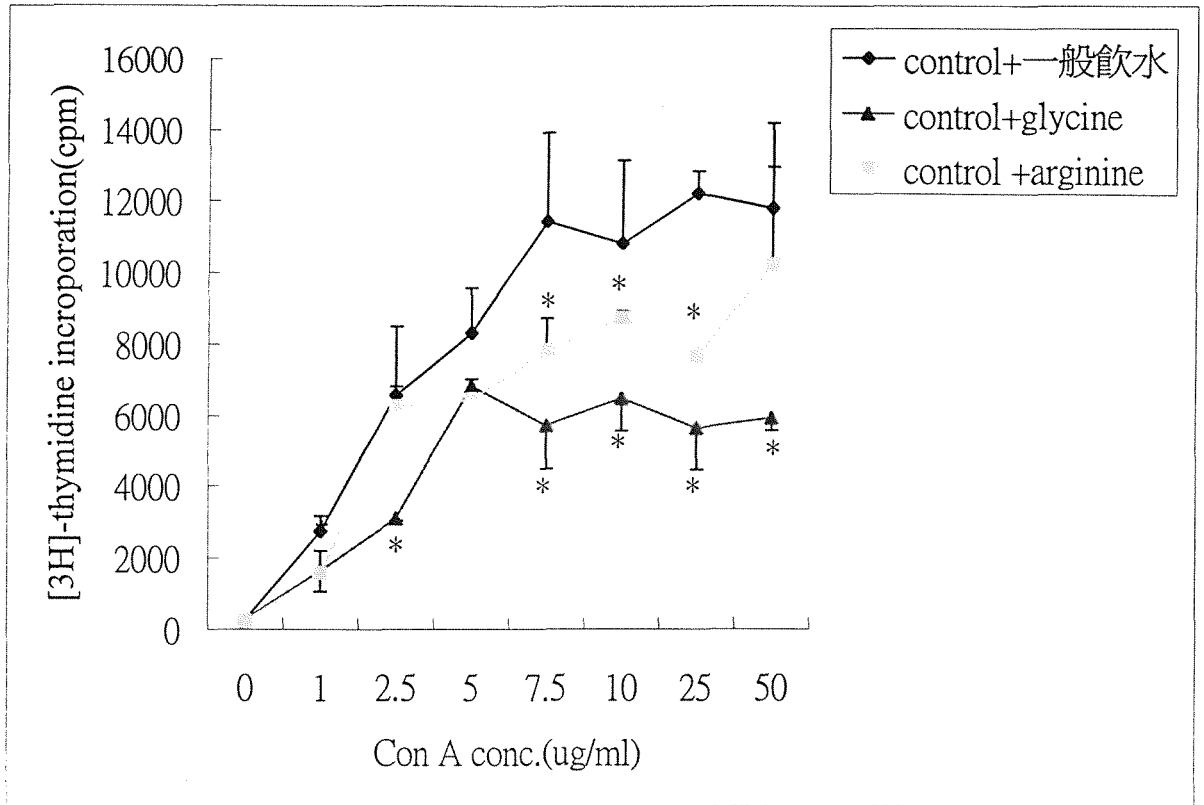


圖 3-1 正常大白鼠分別給予不同的飲水四個月對於淋巴複製的影響。

正常大白鼠分別給予一般飲水、2%arginine 及 2%glycine 四個月。取頸部淋巴結，純化後分植到 96 well 培養盤中，每 well 含有  $5 \times 10^5$  個細胞，給予不同濃度的 Con A (0,1,2.5,5,7.5,10,25 及 50  $\mu\text{g/ml}$ ；終濃度)刺激。培養 48 小時後添加  $[^3\text{H}]$ -thymidine，再繼續培養 18 小時，測  $[^3\text{H}]$ -thymidine 併入細胞 DNA 的量以 cpm 表示。Mean $\pm$ SD，n=3。(\*)與 control 給予一般飲水組有顯著差異(p<0.05)。

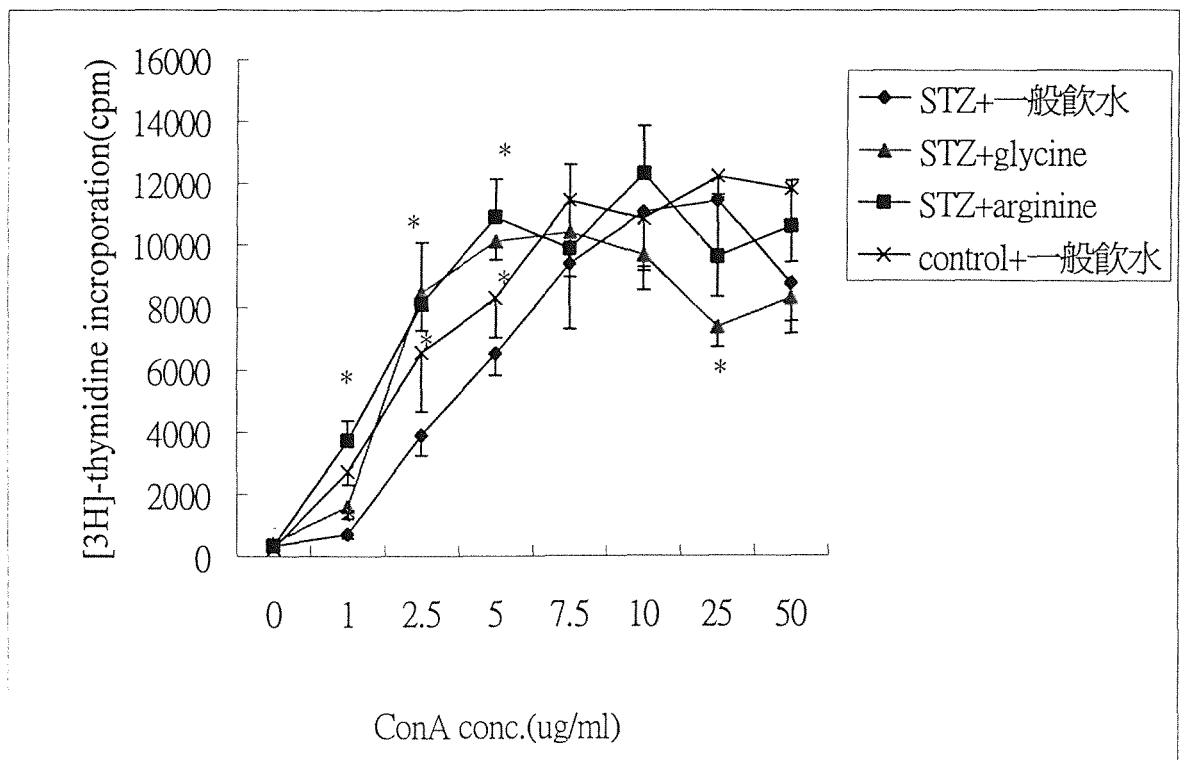


圖 3-2 以 STZ 誘發糖尿病大白鼠分別給予不同的飲水四個月對於淋巴複製的影響。

STZ 誘發糖尿病大白鼠分別給予一般飲水、2%arginine 及 2%glycine 四個月。取頸部淋巴結，純化後分植到 96 well 培養盤中，每 well 含有  $5 \times 10^5$  個細胞，給予不同濃度的 Con A (0,1,2.5,5,7.5,10,25 及 50  $\mu\text{g/ml}$ ；終濃度) 刺激。培養 48 小時後添加  $[^3\text{H}]$ -thymidine，再繼續培養 18 小時，測  $[^3\text{H}]$ -thymidine 併入胞內 DNA 的量以 cpm 表示。Mean $\pm$ SD，n=3。(\*)與 STZ 給予一般飲水組有顯著差異(p<0.05)。

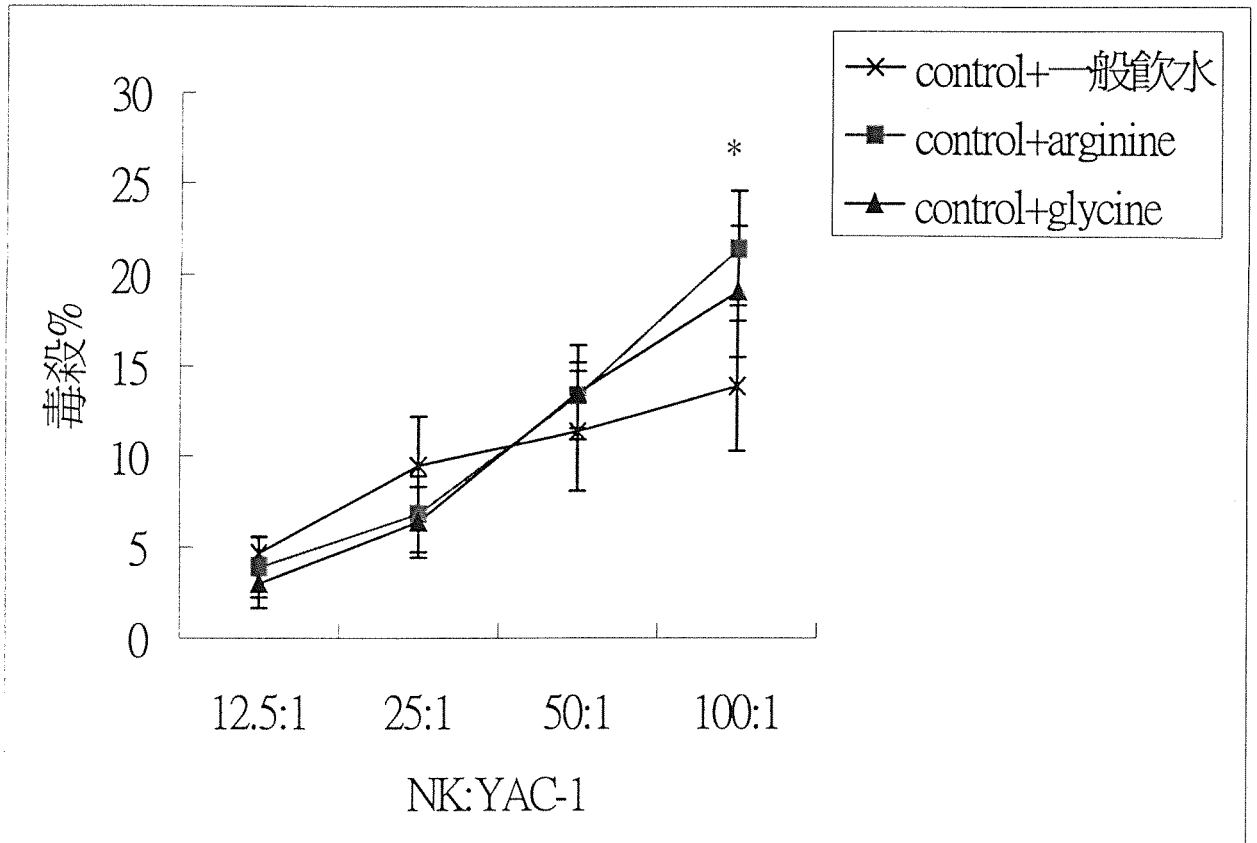


圖 4-1 正常大白鼠分別給予不同的飲水二個月對於自然殺手細胞(NK)毒殺作用的影響。

正常大白鼠分別給予一般飲水、2%arginine 及 2%glycine 二個月。在 96 well 培養盤中，自然殺手細胞(NK)與目標細胞(YAC-1)以 12.5:1, 25:1, 50:1 及 100:1 的比例混合，置於 37°C 5%CO<sub>2</sub> 培養箱中培養四小時，取培養上清液，測放射量。計算毒殺百分比。Mean±SD, n=5。(\*)與給予一般飲水有顯著差異(p<0.05)。



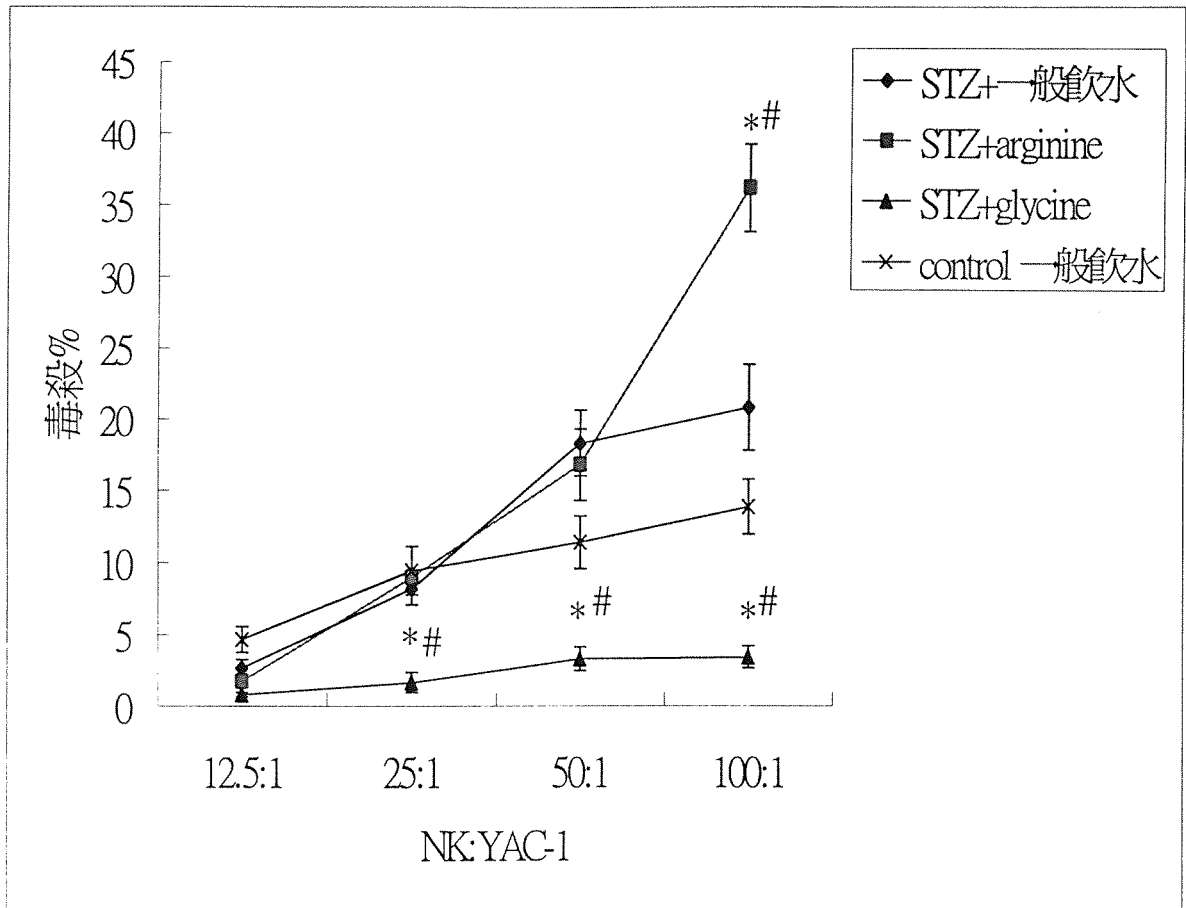


圖 4-2 以 STZ 誘發糖尿病大白鼠分別給予不同的飲水二個月對於自然殺手細胞(NK)毒殺作用的影響。

以 STZ 誘發糖尿病大白鼠分別給予一般飲水、2%arginine 及 2%glycine 二個月。在 96 well 培養盤中，自然殺手細胞(NK)與目標細胞(YAC-1)以 12.5:1, 25:1, 50:1 及 100:1 的比例混合，置於 37°C 5%CO<sub>2</sub> 培養箱中培養四小時，取培養上清液，測放射量。計算毒殺百分比。Mean±SD, n=3。(\*)與給予一般飲水有顯著差異(p<0.05)；(#)與 STZ 誘發糖尿病大白鼠給予一般飲水有顯著差異(p<0.05)。

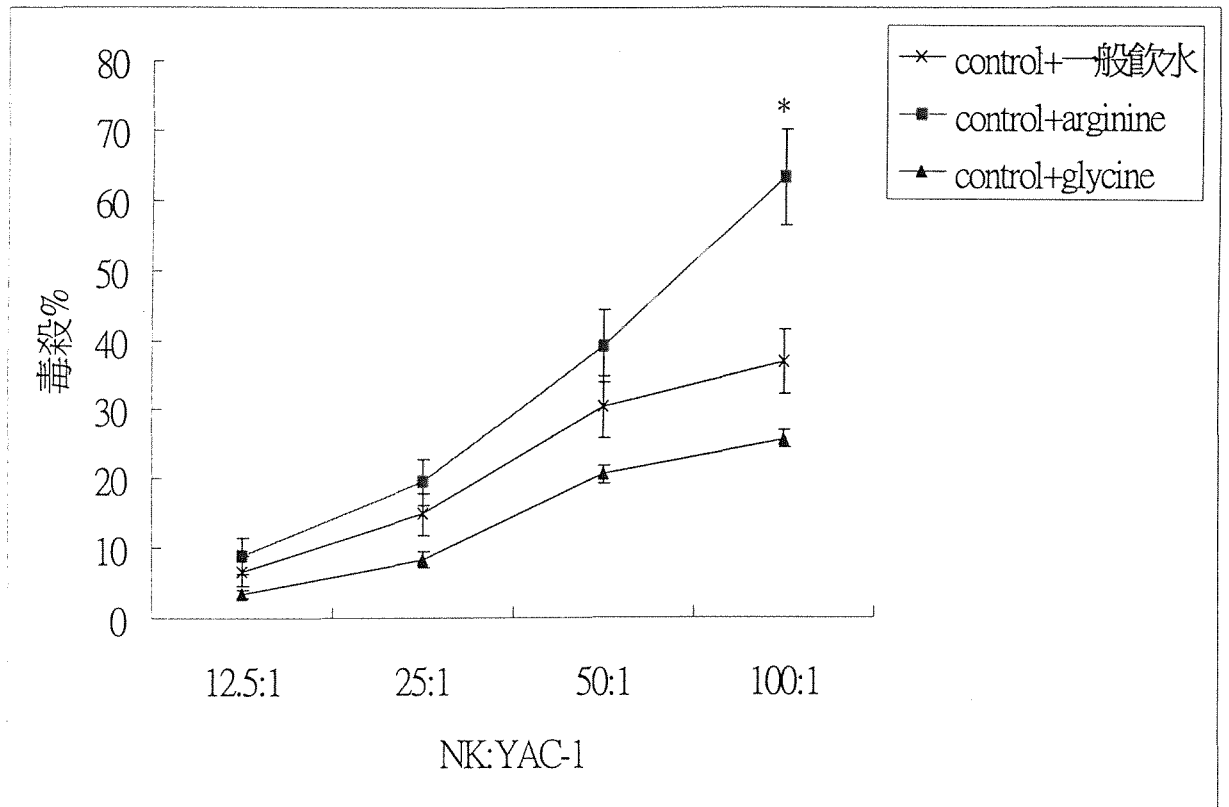


圖 5-1 正常大白鼠分別給予不同的飲水四個月對於自然殺手細胞(NK)毒殺作用的影響。

正常大白鼠分別給予一般飲水、2%arginine 及 2%glycine 四個月。在 96 well 培養盤中，自然殺手細胞(NK)與目標細胞(YAC-1)以 12.5:1, 25:1, 50:1 及 100:1 的比例混合，置於 37°C 5%CO<sub>2</sub> 培養箱中培養四小時，取培養上清液，測放射量。計算毒殺百分比。Mean±SD, n=3。(\*)與給予一般飲水有顯著差異(p<0.05)。

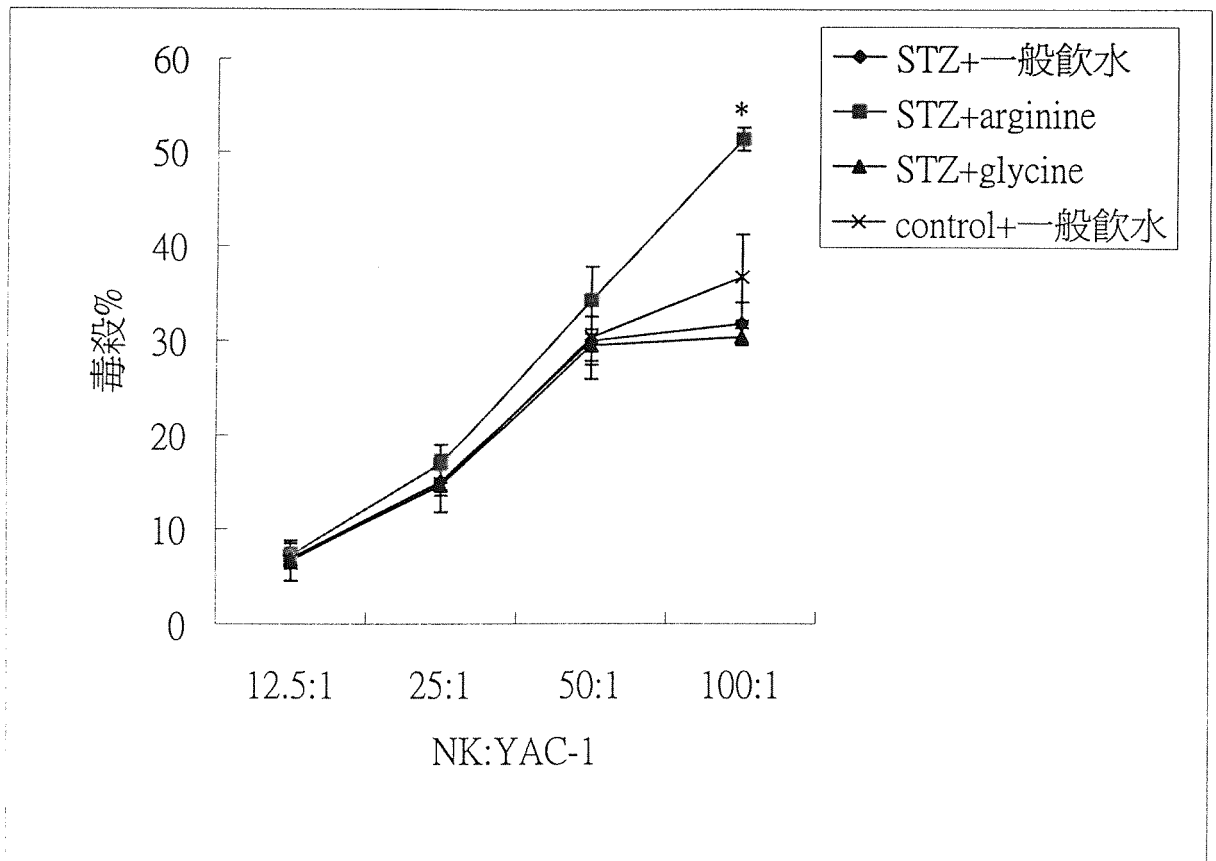


圖 5-2 以 STZ 誘發糖尿病大白鼠分別給予不同的飲水四個月對於自然殺手細胞(NK)毒殺作用的影響。

以 STZ 誘發糖尿病大白鼠分別給予一般飲水、2%arginine 及 2%glycine 四個月。在 96 well 培養盤中，自然殺手細胞(NK)與目標細胞(YAC-1)以 12.5:1, 25:1, 50:1 及 100:1 的比例混合，置於 37°C 5%CO<sub>2</sub> 培養箱中培養四小時，取培養上清液，測放射量。計算毒殺百分比。Mean±SD, n=3。(\*)與給予一般飲水有顯著差異(p<0.05)。

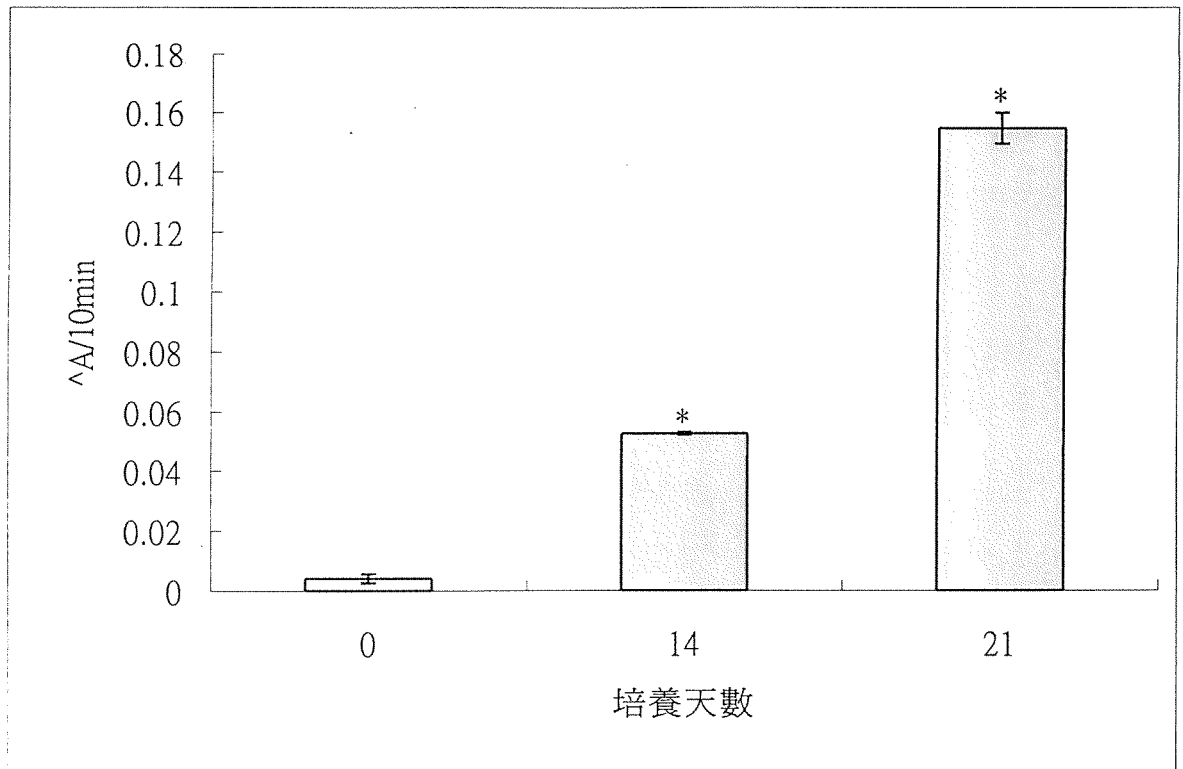


圖 6 不同的培養時間糖化終產物(AGEs)生成量的變化

BSA(50mg/ml)與 glucose(1000mM)溶於 PBS 中，置於 37°C 5%CO<sub>2</sub> 的培養箱中培養，培養時間為 0、14 及 21 天。以 NBT(0.5mM)測糖化終產物(AGEs)生成量。(\*) 表與第 0 天有顯著差異(p<0.05)。

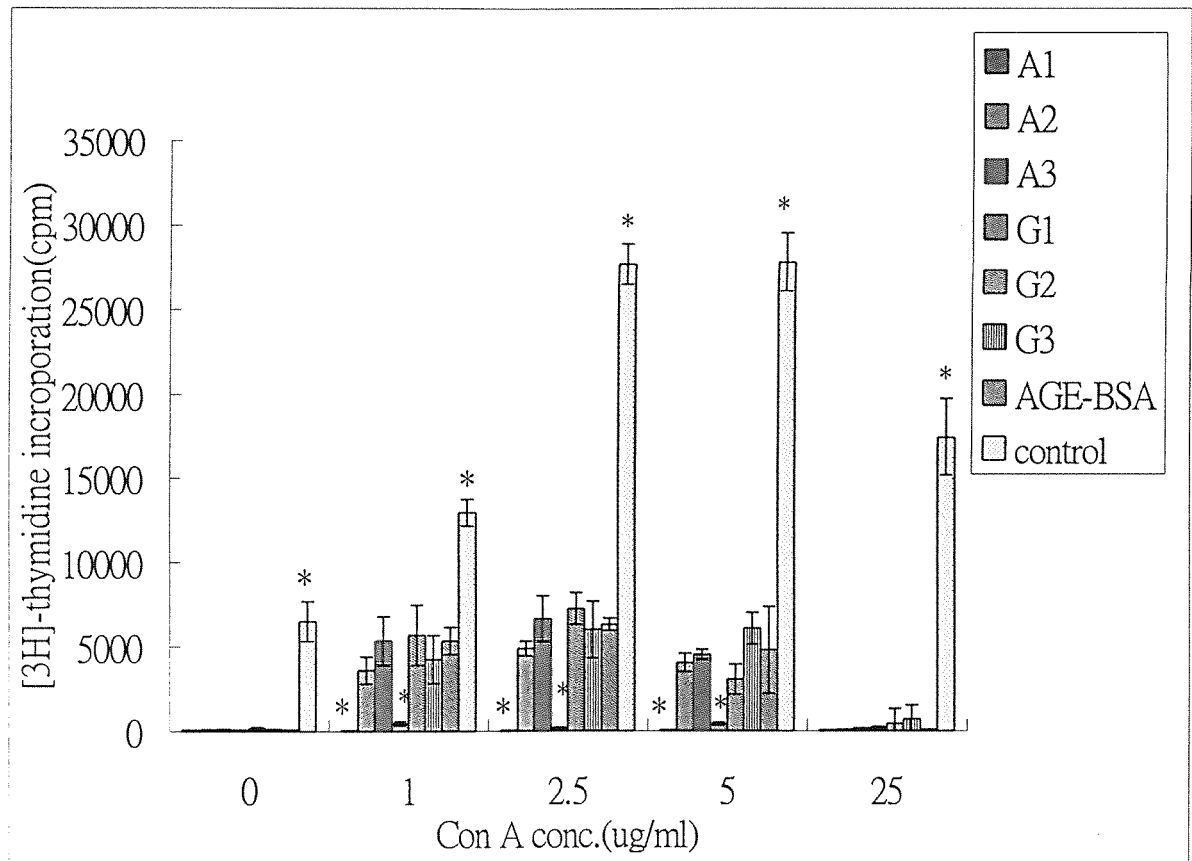


圖 7-1 添加不同的糖化產物(高濃度)對於脾臟淋巴細胞複製之影響。

在 96 well 盤中，每 well 含有  $5 \times 10^5$  個細胞，分別添加 20 $\mu$ l 經由 arginine 或 glycine 以不同濃度(500mM, 100mM 及 10mM)與 BSA(50mg/ml)及 glucose(1000mM)在 37°C 5%CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 14 天的糖化終產物。A1, arginine(500mM); A2, arginine(100mM); A3, arginine(10mM); G1, glycine(500mM); G2, glycine(100mM); G3, glycine(10mM); AGE-BSA, BSA(50mg/ml)+glucose(1000mM); control, 未添加糖化終產物。以不同濃度的 Con A (0, 1, 2.5, 5, 25  $\mu$ g/ml) 刺激。培養 48 小時，加入 [<sup>3</sup>H]-thymidine 再繼續培養 18 小時，測 [<sup>3</sup>H]-thymidine 併入胞內 DNA 的量以 cpm 表示。Mean $\pm$ SD, n=6。(\*)表與 AGE-BSA 有顯著差異(p < 0.05)。

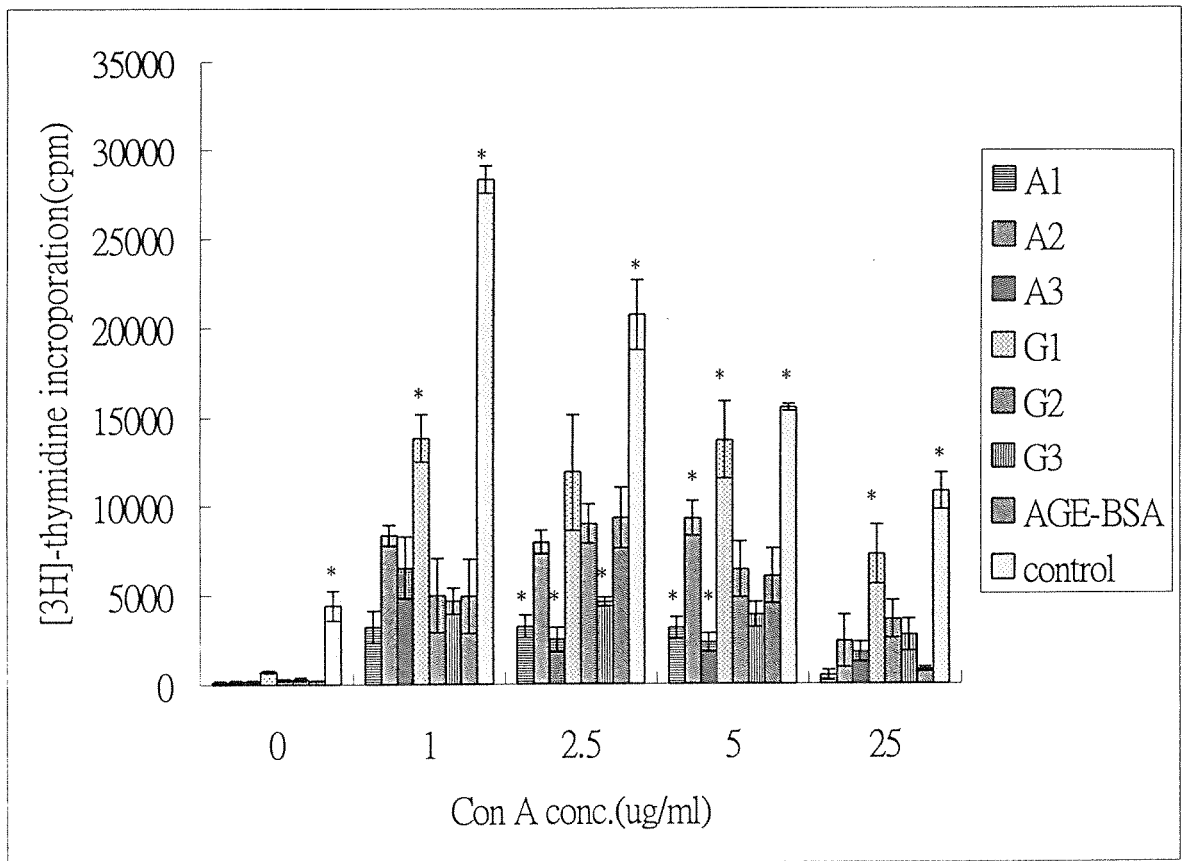


圖 7-2 添加不同的糖化終產物(低濃度)對於脾臟淋巴細胞複製之影響。

在 96 well 盤中，每 well 含有  $5 \times 10^5$  個細胞，分別添加 20  $\mu$ l 經由 arginine 以不同濃度(A1:5mM, A2:1mM 及 A3:0.1mM)或 glycine 以不同濃度(G1:5mM, G2:1mM 及 G3:0.1mM)與 BSA(50mg/ml)及 glucose(1000mM)在 37°C 5%CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 14 天的糖化終產物，AGE-BSA：BSA(50mg/ml)與 glucose(1000mM)，control：不添加任何糖化產物。以不同濃度的 Con A (0,1,2.5,5,25  $\mu$ g/ml)刺激。培養 48 小時，加入 [<sup>3</sup>H]-thymidine 再繼續培養 18 小時，測 [<sup>3</sup>H]-thymidine 併入胞內 DNA 的量以 cpm 表示。Mean  $\pm$  SD, n=6。(\*)表與 AGE-BSA 有顯著差異(p < 0.05)。

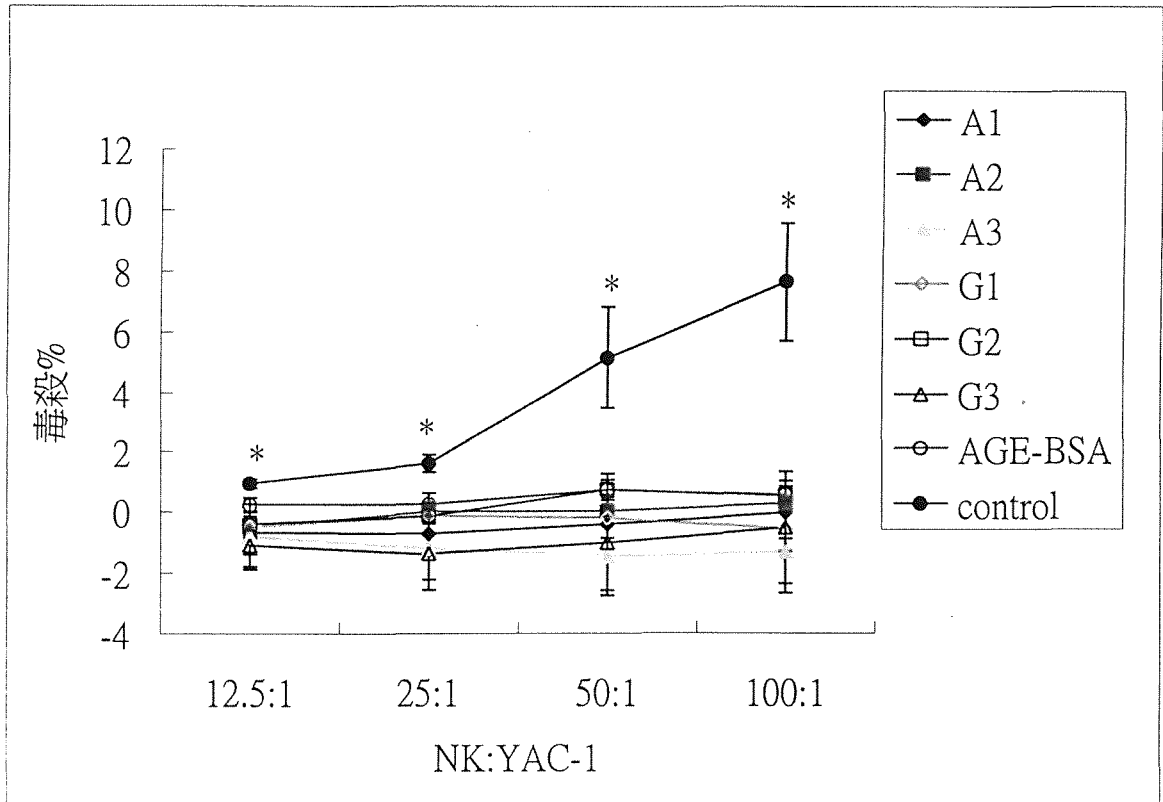


圖 8-1 添加不同的糖化產物(高濃度)對於自然殺手細胞(NK cell)毒殺作用之影響。

在 96 well 盤中脾臟非黏著性單核細胞與目標細胞的比率分別為 100:1, 50:1, 25:1 及 12.5:1 進行毒殺作用，分別添加 20 $\mu$ l 經由 arginine 或 glycine 以不同濃度(500mM, 100mM 及 10mM)與 BSA(50mg/ml)及 glucose(1000mM)在 37 $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 14 天之糖化產物。  
 ◆:A1, arginine(500mM); ■:A2, arginine(100mM); ▲:A3, arginine(1mM); ◇:G1, glycine(500mM); □:G2, glycine(100mM); △:G3, glycine(10mM); ○:AGE-BSA, BSA(50mg/ml)+glucose(1000mM); ●:control, 未添加糖化終產物。在 37 $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub> 培養箱中進行毒殺反應四小時，取培養上清液測放射量，計算毒殺百分比。Mean $\pm$ SD, n=9。(\*)：與 AGE-BSA 有顯著差異(p<0.05)。

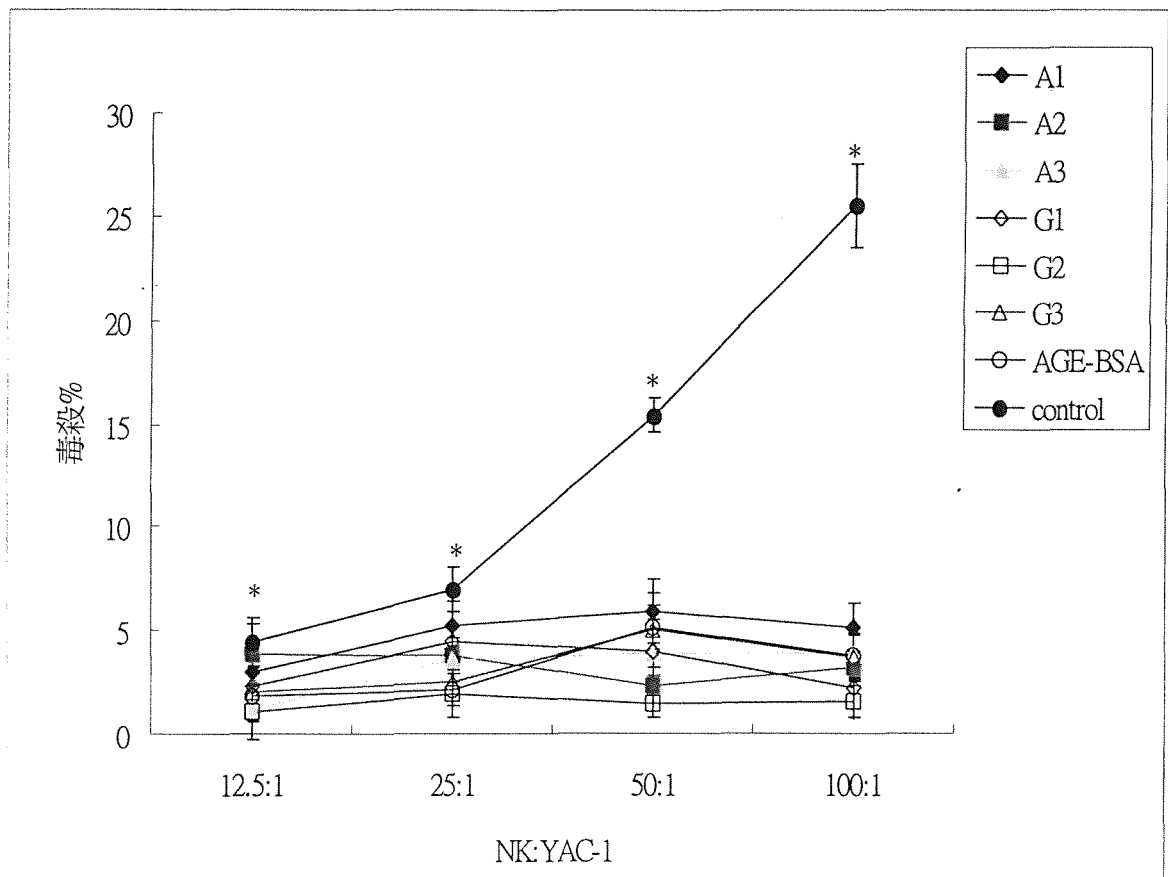
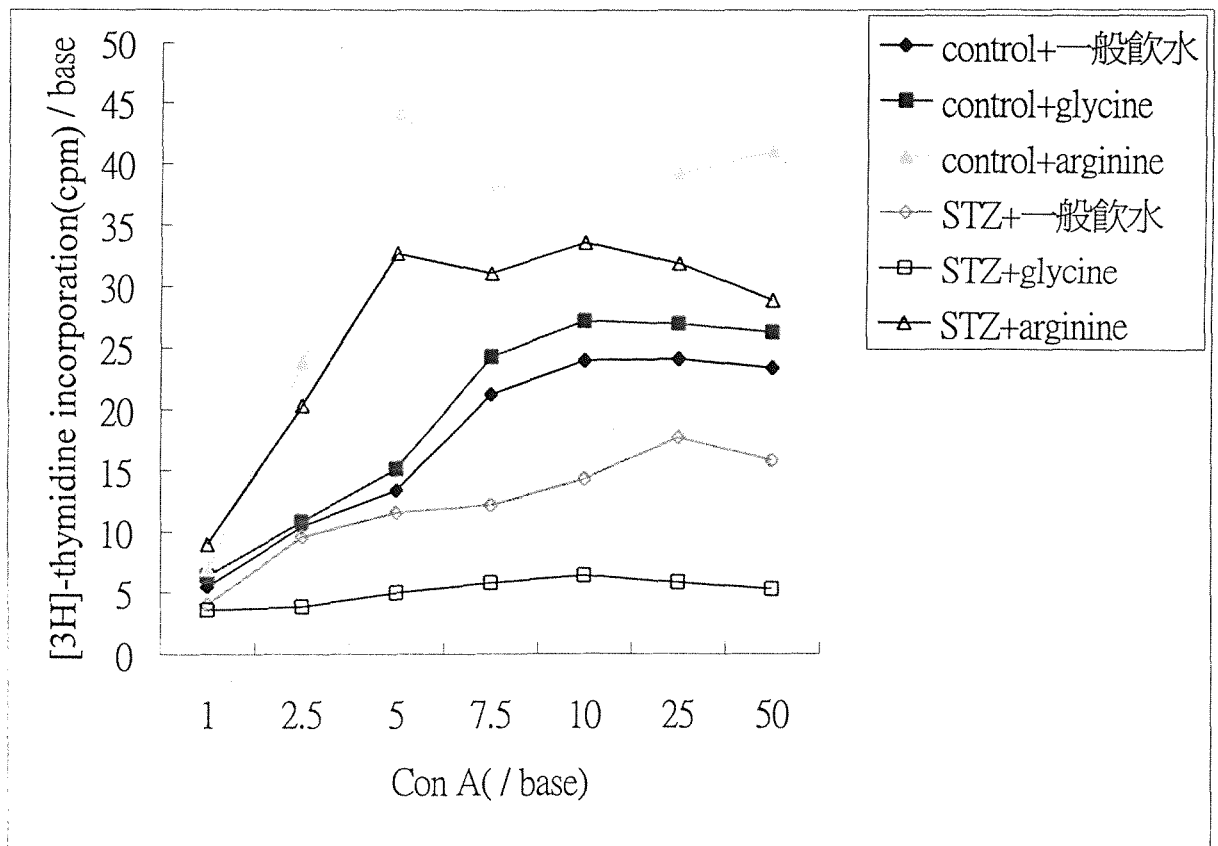


圖 8-2 添加不同的糖化產物(低濃度)對於自然殺手細胞(NK cell)毒殺作用之影響。

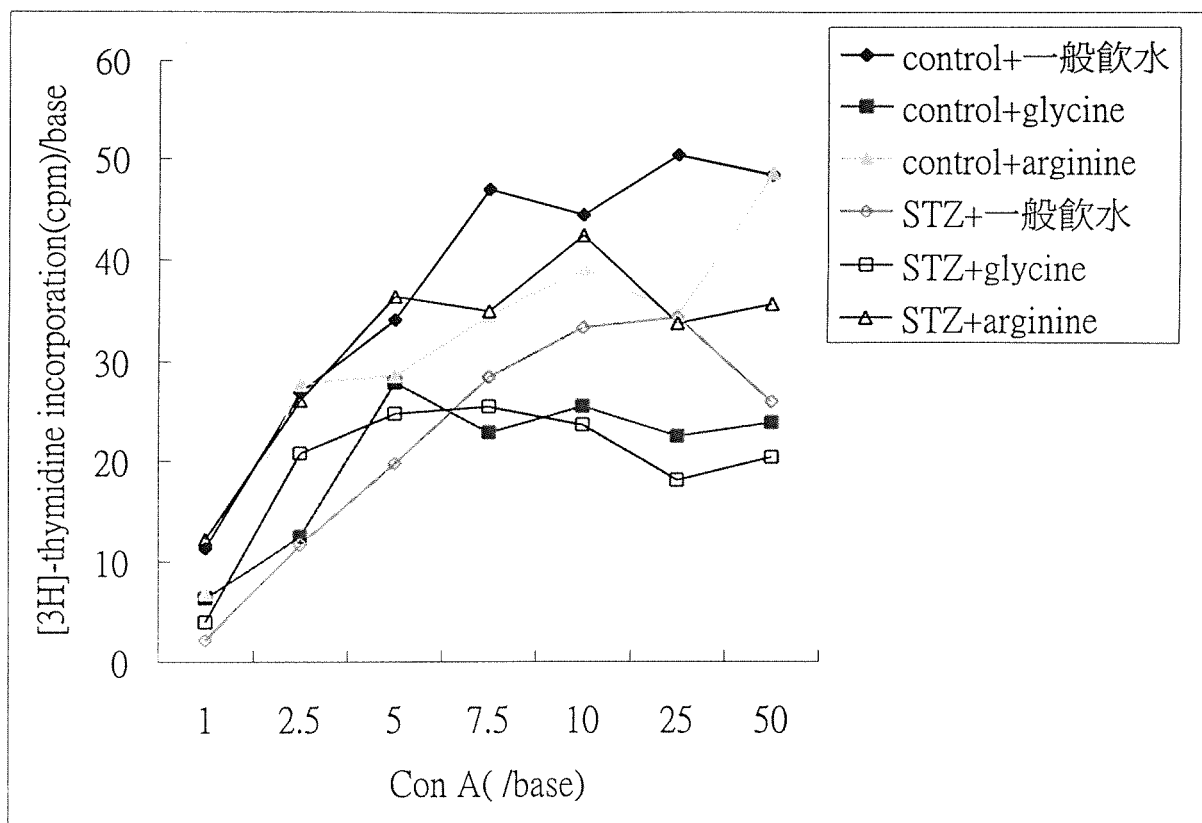
在 96 well 盤中脾臟非黏著性單核細胞與目標細胞的比率分別為 100:1,50:1,25:1 及 12.5:1 進行毒殺作用，分別添加 20 $\mu$ l 經由 arginine 或 glycine 以不同濃度(5mM,1mM 及 0.1mM)與 BSA(50mg/ml)及 glucose(1000mM)在 37 $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub> 培養箱中培養 14 天的糖化產物。  
 ◆:A1,arginine(5mM);■:A2,arginine(1mM);▲:A3,arginine(0.1mM);  
 ◇:G1,glycine(5mM);□:G2,glycine(1mM);△:G3,glycine(0.1mM);○:AGE-BSA,BSA(50mg/ml)+glucose(1000mM);●:control,未添加糖化產物。在 37 $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub> 培養箱中進行毒殺反應四小時，取培養上清液測放射量，計算毒殺百分比。Mean $\pm$ SD, n=9。(\*):與 AGE-BSA 有顯著差異(p<0.05)。





附圖一、正常大白鼠及 STZ 誘發糖尿病大鼠給予不同的飲水餵食二個月對於淋巴複製的影響。

此圖根據圖 2-1 及圖 2-2 經分別除以 Con A 濃度為  $0\mu\text{g/ml}$  時  $[^3\text{H}]$ -thymidine 併入 DNA 的量 (cpm)，縱軸以 Con A 濃度為  $0\mu\text{g/ml}$  時為 1，其複製增加的倍數表示；橫軸以 Con A/base 表示。



附圖二、正常大白鼠及 STZ 誘發糖尿病大鼠給予不同的飲水餵食四個月對於淋巴複製的影響。

此圖根據圖 3-1 及圖 3-2 經分別除以 Con A 濃度為  $0\mu\text{g/ml}$  時  $[^3\text{H}]$ -thymidine 併入 DNA 的量 (cpm)，縱軸以 Con A 濃度為  $0\mu\text{g/ml}$  時為 1，其複製增加的倍數表示；橫軸以 Con A/base 表示。

## 陸、討論

### 一、STZ 誘發糖尿病大鼠免疫功能之影響

在之前的許多文獻中指出，糖尿病患者有易感染(Skamoto et al.1994)及免疫細胞功能低下的情形(Eliashiv et al.1978)，同時患者亦出現體內糖化終產物堆積(Makita et al.1992;Araki et al.1992;Niwa et al.1996)。在本研究以 STZ 誘發糖尿病大鼠分別觀察 8 週及 16 週其對免疫功能之影響。

在實驗的結果，STZ(100mg/kg body wt, i.v.)誘發 DM 大鼠給予一般飲水其淋巴結重及淋巴細胞數在 8 週及 16 週均低於正常大鼠的趨勢，但在單位重淋巴結中含淋巴細胞數卻沒有顯著差異。在淋巴複製方面，STZ 大鼠在 8 週有顯著低於正常大鼠，在 16 週時，在統計上沒有顯著的差異但有較低的趨勢。此結果可部份反應出在 DM 狀態下會造成免疫功能降低，與文獻中指出在 DM 狀態下會有免疫功能低下的結果一致(Eliashiv et al.1978)。

在注射 STZ 後不論 8 週或 16 週，其淋巴細胞在 Con A 刺激下之複製功能均小於正常大鼠，顯示長期高血糖對免疫系統之抑制作用有關。高血糖本身對於淋巴細胞的影響，有學者提出，高糖狀況下會增加細胞 DNA turnover 速度增加(Macallan et al.1998)，而 AGEs 可能為重要的因素，在本研究同時進行 in vitro 的研究觀察中發現，AGE-BSA 加入細胞培養液中確實能強烈的抑制淋巴細胞複製。

在 8 週及 16 週的飼養，STZ 大鼠其脾臟重均顯著低於正常大鼠，但此變化與體重變化呈相關性，故非脾臟發生特異性變化的結果。而在脾臟非黏著性單核細胞及單位脾臟重所含非黏著性單核細胞數發現，STZ 注射

後 8 週後大鼠的細胞數高於正常大鼠，但在 16 週時卻沒有顯著差異。此結果與淋巴結淋巴細胞數的結果不符，有必要在未來的研究中進一步探討此二免疫器官中次族群細胞(cell subsets)之差異性方能進一步的瞭解原因。Gupta 等人(1986)的研究中指出，在初診斷出的 IDDM 患者週邊血液中的 NK 細胞數及活性均低於正常人，但 Hussain 等人(1996)的研究中發現，在患有胰島素依賴型糖尿病(IDDM)患者血清中含有較高量的 IL-2,IFN- $\gamma$ ,IL-2 及 TNF- $\alpha$ ，且有文獻指出這可能與 AGEs 的刺激有關(Weiss et al.1998)，經由這些激素的刺激可活化自然殺手細胞及增加其增殖。

本研究的結果，在注射 STZ 後 8 週及 16 週時觀察自然殺手細胞的毒殺作用發現，STZ 大鼠與正常大鼠間在統計上沒有顯著差異，與 Hussain 等人(1987)的研究報告中指出，IDDM 的患者 NK 的毒殺活性在 DM 初期高於正常人及 Shliakhovenko 等人(1991)研究報告中指出，在 IDDM 患者週邊血 NK(CD56)的毒殺作用明顯低於正常人，的結果並不一致，但與長期 DM(15 年病史)患者的 NK 毒殺活性卻與正常人沒有顯著差異(Hussain et al.1987)的結果相似，故 DM 對 NK 毒殺活性之影響至少與其發病時間的長短有關。但在本研究體外的實驗中發現，在培養液中添加 AGE-BSA 明顯抑制 NK 的活性，可證實 DM 下 NK 活性的降低與 AGEs 有關。

## 二、精胺酸對正常大鼠及 STZ 大鼠免疫功能的影响

在本研究及過去的研究均發現，在 DM 狀態下會有免疫功能低下。而 arginine 具有促進免疫功能的作用，在之前的報告中被證實，L-arginine 的補充可以提升免疫功能，如：補充 arginine 可以增加胸腺及胸腺淋巴細胞數目(Barul et al.1980)。也有報告指出，在人體實驗，給予口服 L-arginine(30g/day)3 到 14 天後，淋巴細胞複製力有明顯的增加(Burbul et al.1981)，在目前臨床上在燒燙傷及重病患者的商業配方飲食中已有添加 arginine 以增加患者的免疫

力。此外，在 DM 之免疫功能低下亦可能部分與 AGEs 的堆積有關，而 arginine 可抑制 AGEs 的生成<sup>(Ledl and Schleicher,1990)</sup>。故本研究亦探討正常大鼠及 STZ 大鼠給予 arginine 補充後對其免疫功能之影響有何異同。

而由本研究之結果顯示精胺酸之補充在正常大鼠及 STZ 大鼠免疫功能之影響至少可來自於對淋巴細胞及 NK 細胞活性二方面：

### (1) 淋巴細胞

本研究發現，在正常大鼠飲水中補充 2% arginine 8 週後淋巴細胞數、單位重淋巴結淋巴細胞數及淋巴細胞複製有增加的趨勢，但在 16 週的餵食後只有淋巴結重的增加，在細胞數及淋巴細胞複製方面卻有減少的趨勢。STZ 大鼠在飲水中補充 2% arginine 8 週可增加淋巴結重約 30%，但淋巴細胞數及單位重淋巴結中含淋巴細胞數沒有顯著差異；在 16 週時，淋巴結重、淋巴細胞數及單位重淋巴結中含淋巴細胞數間沒有顯著差異。但在 STZ 大白鼠給予 2% arginine 餵食 8 週及 16 週後，取淋巴結淋巴細胞在體外給予 Con A 的刺激下其複製力均有顯著的高於 STZ 給予一般飲水組

在給予 L-arginine 補充為何可增加免疫刺激反應，其機制尚不清楚，在先前學者的報告中提出，L-arginine 促進免疫作用並非由 L-arginine 直接作用而是間接的經由荷爾蒙的作用<sup>(Torre et al.1993)</sup>。在老鼠給予 L-arginine 可刺激 hypophyseal-pituitary axis 分泌荷爾蒙<sup>(Barbul et al.1986)</sup>，經由補充 L-arginine 後造成荷爾蒙改變程度會因不同的生理狀態而不同<sup>(Saito et al.1987;Daly et al.1988)</sup>。

由本研究結果發現，在正常大鼠給予 2% arginine 補充 8 週有促進淋巴細胞功能但在 16 週卻無促進的作用，推測可能的原因：(1)在長期的 arginine 刺激下體內可能已產生對 arginine 及 arginine 所誘發的荷爾蒙產生適應；(2)長期的 arginine 刺激可能會對細胞有毒殺作用，雖無這方面的其他證據，

但在體外之研究發現，在培養液中添加高濃度的 arginine (25mM) 會對受 phytohemagglutinin-A (PHA ; 5 $\mu$ g / ml) 刺激之淋巴細胞增殖有抑制之作用 (Weibke et al.1997)。

根據過去的報告 L-arginine 在正常狀況下有促進免疫功能的作用外 (Burbul et al.1981)，其在 DM 的狀況下亦可能透過阻礙 AGEs 的生成因而減少體內 AGEs 的堆積，進而影響免疫系統之細胞，但在本研究體外實驗的結果顯示，在 BSA 與葡萄糖培養糖化產物中添加 arginine 不能改變培養液以 NBT 所定量 AGEs 的含量，因此，在 DM 下補充 2% arginine 造成淋巴細胞功能提升可能是經由其他機制所致，需再進一步的探討。

在 Con A 濃度 5 $\mu$ g/ml 時，STZ 大鼠給予 2% glycine 補充 8 週及 16 週均可促進淋巴複製力，但在正常大鼠則只有在補充 8 週時有促進的作用，16 週時便沒有此作用，而其增加的幅度比給予 2% arginine 小，因此，可能因為補充蛋白質的攝取以彌補在糖尿病下的營養狀態不良而非 glycine 特異性的作用。

## (2)脾臟非黏著性單核細胞

本研究發現，在正常大鼠的飲水中補充 2% arginine 8 週後可增加脾臟非黏著性單核細胞數，但在 16 週的餵食後則與一般飲水組無顯著差異；在注射 STZ 後會增加脾臟非黏著性單核細胞數而給予 2% arginine 8 週後其顯著低於給予一般飲水組且與正常大鼠相似，但在 16 週的餵食後則與一般飲水組無顯著差異。在 8 週時，正常大鼠給予 2% arginine 補充所增加脾臟非黏著性單核細胞數與 STZ 所造成細胞數的增加，在免疫功能上的意義有待進一步的釐清。STZ 大鼠給予 2% arginine 補充 8 週時，脾臟非黏著性單核細胞數趨近正常，而且在給予 2% glycine 補充也有相同的結果，顯

示可能與增加氮的攝取有關而非特異性的現象。

本研究發現，不論正常大鼠或 STZ 大鼠在飲水中添加 2% arginine 餵食 8 週及 16 週，自然殺手細胞的毒殺作用均有顯著增加。Brittenden 等人(1994)的報告指出，給予正常人 L-arginine(30g/day)餵食 3 天，在血清中可測得有較高量的 cytokines, IL-1 $\beta$ , IL-2, interferon- $\gamma$  及 TNF- $\alpha$ ，且自然殺手細胞的毒殺能力會提升，但機制不明。Xiao 等人(1995)的研究中發現，在培養液中添加 L-arginine 可提升自然殺手細胞的毒殺作用並在培養液中測出有較高量的 NO 生成，而在添加 NG-monomethyl-L-arginine(L-NMMA)後抑制 NO 的生成也抑制了自然殺手細胞對目標細胞的毒殺作用，Orucevic 等人(1996)在體內及體外的研究中發現，以 IL-2 的處理增加自然殺手細胞的毒殺作用時有較多的 NO 產生，當給予 L-NMMA 後便減少的由 IL-2 所誘發的毒殺作用及 NO 的生成量，推論由 IL-2 所誘發增加的毒殺作用可能也是經由 NO 的生成所致。Ogawa 等人(1998)的研究也有相同的發現。這此機制可用以解釋本研究所發現的在 STZ 大鼠給予 L-arginine 的補充促進自然殺手細胞對目標細胞的毒殺作用。

### 三、糖化終產物

在 BSA 與葡萄糖共同培養 14 天後產生的培養糖化產物，經與 NBT 反應定量分析糖化終產物，發現不論是否有添加 arginine 或 glycine 其結果間沒有顯著的差異，這與 Servetnick 等人(1996)利用螢光測定時發現在培養中添加 arginine 時其糖化終產物的生成會減少，及 Shamsi 等人(1998)利用抗體-抗原免疫法來偵測糖化終產物的生成，發現 L-arginine 可快速的與糖化中間產物 methylglyoxal(MG)進行反應產生糖化終產物的結果不一致。由此可知，不同的研究所採用之糖化產物定量分析法不同得到的結果會有所差異，而本研究所採用之以 NBT 氧化還原反應定量 AGEs，測試有無添

加 arginine 或 glycine 間均沒有顯著差，推測可能與 NBT 氧化還原反應對 AGEs 無專一性有關。



## 柒、結論：

根據活體實驗的研究發現以 STZ 誘發 DM 8 週及 16 週後，將使淋巴細胞功能降低但並不影響脾臟自然殺手細胞的活性，至於體外實驗的結果顯示 DM 所造成的淋巴細胞功能降低至少部分是受到 AGEs 形成所影響。在活體實驗方面，給予 arginine 補充可以增加淋巴細胞功能及脾臟自然殺手細胞的活性，但此效應受到 arginine 餵食時間長短的影響，特別是在淋巴細胞功能，8 週的餵食可增加淋巴細胞功能，但 16 週的餵食反而會降低。Arginine 促進 DM 大鼠免疫功能可能並非透過抑制 AGEs 之形成，因為：(1) 在活體的研究中給予 arginine 補充不能顯著降低 NBT 所定量之血液 AGEs；(2) 體外的研究中，在 BSA 與葡萄糖培養液中加入 arginine 並不會影響培養液中 AGEs 的生成，且無法提升淋巴細胞及 NK 細胞的功能。因此 arginine 提升 STZ 大鼠免疫功能可能是經由改善 AGEs 形成以外的機制所致。

## 捌、参考文献

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.

American Diabetes Association (1997) The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus: Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* 20 : 1183.

Araki, N., Ueno, N., Chakrabarti, B., Morino, Y. and Horiuchi, S. (1992) Immunochemical evidence for the presence of advanced glycation end products in human lens proteins and its positive correlation with aging. *J. Biol. Chem.* 267 (15) : 10211.

Barbul, A. (1986) Arginine: Biochemistry, physiology, and therapeutic implications. *JPEN* 10 : 227.

Barbul, A., Wasserkrug, H. L. and Sisto, D. A. (1980) Thymic and immune stimulatory actions of arginine. *JPEN* 4 : 446.

Barbul, A., Sisto, D. A., Wasserkrug, H. L. and Efron, G. (1981) Arginine stimulates lymphocyte immune response in healthy human beings. *Surg.90* : 244.

Boyd, C. A. and Crawford, D. H. (1992) Activation of cationic amino acid transport through system y<sup>+</sup> correlates with expression of the T-cell early antigen gene in human lymphocytes. *Eur. J. Physiol.* 422 : 87.

Brittenden, J., Park, K. G., Heys, S. D., Ross, C., Ashby, J., Ah-See, A. K. and Eremin, O. (1994) L-arginine stimulates host defenses in patients with breast cancer. *Surg.* 115 (2) : 205.

Brownlee, M., Vlassara, H. and Cerami, A. (1985) Nonenzymatic glycosylation products on collagen covalently trap low-density lipoprotein. *Diabetes* 34 : 938.

Brownlee, M., Vlassara, H., Kooney, A., Ulrich, P. and Cerami, A. (1986) Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* 232 : 1629.

Cheta, D. (1998) Animal models of type I (insulin-dependent ) diabetes mellitus. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism* 11 (1) : 11.

Chung, H., Lee, H. and Gutman, I. S. (1988) Effect of nitroblue tetrazolium concentration on fructosamine assay for quantifying glycated protein. *Clin. Chem.* 34 : 2106.

Daly, J. M., Reynolds, J., Thom, A., Kinsley, L., Dietrick-Gallagher, M., Shou, J. and Ruggieri, B. (1998) Immune and metabolic effects of arginine in the surgical patient. *Ann. Surg.* 208 : 512.

Dieleman, L. A., Elson, C. O., Tennyson, G.S., and Beagley, K.W. (1996) Kinetics of cytokine expression during healing of acute colitis in mice. *Am. J. physiol.* 271 (1 pt1) : G130.

Do Carmo, A., Lopes, C., Santos, M., Proenca, R., Cunha-Vaz, J. and Carvalho, A. P. (1998) Nitric oxide synthase activity and L-arginine metabolism in the retinas from streptozotocin-induced diabetic rats. *General Pharmacol.* 30 (3) : 319.

Dobrian, A., Lazar, V., Tirziu, D. and Simionescu, M. (1996) Increased macrophage uptake of irreversibly glycated albumin modified density lipoproteins of normal and diabetic subjects is mediated by non-saturable mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* 1317 (1) : 5.

Doxey, D. L., Nares, S., Park, B., Trieu, C., Cutler, C. W. and Iacopino, A. M. (1998) Diabetes-induced impairment of macrophage cytokine release in a rat model: potential role of serum lipids. *Life Sci.* 63 (13) : 1127.

Eliashiv, A., Olumide, F., Norton, L. and Eiseman, B. (1978) Depression of cell-mediated immunity in diabete. *Arch. Surg.* 113 (10) : 1180.

Ellerman, K., Wroblewski, M. Rabinovitch, A. and Like, A. (1993) Natural killer cell depletion and diabetes mellitus in the BB/W or rat. *Diabetologia* 36: 596.

Field, C. J. (1995) A diet producing a low diabetes incidence modifies immune abnormalities in diabetes-prone BB rat. *J. Nutr.* 125 : 595.

Ford, H. R., Hoffman, R. A., Wing, E. J., Magee, D. M., McIntyre, L. and Simmon, R. L. (1989) Hractionization of wound cytokines in the sponge matrix model. *Arch. surg.* 124 (12) : 1422.

Giugliano, D., Marfella, R., Ritacampora, G., Coppola, L., Cozzolino, D. and Felicw D'Onofrio (1997) The vascular effects of L-arginine in humans: The role of endogenous insulin. *J. Clin. Invest.* 99 : 1997.

Gupta, S., Charles, M. A., Waldeck, N., Kershner, A. and Buckingham, B. (1986) Multiparameter immunologic studies in patients with newly diagnosed type 1 insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res.* 3 (5) : 225.

Hayase, F., Nagaraj, R. H., Miyata, S., Njoroge, F. G. and Monnier, V. M. (1989) Aging of proteins: immunological detection of a glucose-derived pyrrole formed during maillard reaction in vivo. *J. Biol. Chem.* 264 (7) : 3758.

Heikkila, K. and Schwab, G. (1987) A c-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but not progress from G<sub>0</sub> to G<sub>1</sub>. *Nature* 328 : 445.

Hosszuflusi, N., Chan, E., Teruya, M., Takei, S., Granger, G. and Charles, M. A. (1993) Quantitative phenotypic and functional analyses of islet immune. *Diabetologia* 36 (11) : 1146.

Hussain, M. J., Alviggi, L., Millward, B. A., Leslie, R. D. and Vergani, D. (1987) Evidence that the reduced number of natural killer cells in type 1 (insulin-dependent) diabetes may be genetically determined. *Diabetologia* 30 (12) : 907.

Hussain, M. J., Peakman, M., Gallati, H., Lo, S. S., Hawa, M., Viberti, G. C., Watkins, P. J., Leslie, R. D. and Vergani, D. (1996) Elevated serum levels of macrophage-derived cytokines precede and accompany the onset of IDDM. *Diabetologia* 39 (1) : 60.

Imani, F., Horii, Y., Suthanthiran, M., Skolnik, E. Y., Makita, Z., Sharma, V., Sehajpal, P., and Vlassara H. (1993) Advanced glycosylation end product-specific receptors on human and rat T-lymphocytes mediate synthesis of interferon gamma: role in tissue remodeling. *J. Exp. Med.* 178 (6) : 2165.

Junod, A., Lambert, E. A. and Renold, E. A. (1969) Diabetogenic action of streptozotocin: Relationship of dose to metabolic response. *J. Clin. Invest.* 48 : 2129.

Knight, S. C. (1987) In lymphocytes, a practical approach, Ed. Klaus, G.G.B. IRL press, Oxford, pp.189.

Koschinsky, T., Jiang, C. I., Mitsuhashi, T. and Vlassara, H. (1997) Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins) : An environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 : 6474.

Kretowski, A., Szelachowska, M., Pietruczuk, M. and Kinalska, I. (1999) CD23 antigen expression on B lymphocytes and soluble CD23 levels in peripheral blood of high-risk type 1 diabetes subjects. *Scand. J. Immunol.* 49 (1) : 78.

Ledl, F. and Schleicher, E. (1990) New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body. *Angewandte Chemie* 29 : 565.

Licastro, F., Morini, M. C., Bolognesi, A. and Stirpe, F. (1993) Ricin induced the production of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta by human peripheral-blood mononuclear cells. *Biochem. J.* 294 : 517.

Macallan, D. C., Fullerton, C. A., Neese, R. A., Haddock, K., Park, S. S. and Hellerstein, M. K. (1998) Measurement of cell proliferation by labeling of DNA with stable isotope-labeled glucose: studies in vitro, in animals, and in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (2) : 708.

Makita, Z., H. Vlassara, E., Rayfield, K., Cartwright, E., Friedman, R., Rodby, A. and Bucala, R. (1992) Hemoglobin-AGE : a circulating marker of advanced glycosylation. *Science (Wash.DC)* 58 : 651.

Makita, Z., Vlassara, H., Cerami, A., and Bucala, R. (1992) Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. *J. Biol. Chem.* 267 (8) : 5133.

Matsuzawa, Y. (1998) Decreased nitricoxide-mediated natural killer cell activation in chronic fatigue syndrome. *Eur. J. Clin. Invest.* 28 (11) : 937.

Mordes, J. P. and Rossini, A. A. (1985) Animal models of diabetes mellitus. In *Joslin's diabetes mellitus*. 12. ed. (ed Marble, A. et al. ) Lea and Febiger, Philadelphia, Chp. 7, 110.

Morris, M. A. and Preddy, L. (1986 ) Glycosylation accelerates albumin degradation in normal and diabetic dogs. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 35 : 267.

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.

Negishi, K., Waldeck, N., Chandy, G., Buckingham, B. and Kershner, A. (1987) Natural killer cell and islet killer activities in human type 1 diabetes. Exp. Clin. Endocrinol. 89 (3) : 345.

Newkirk, M. M., Lepage, K., Niwa, T. and Rubin, L. (1998) Advanced glycation endproducts (AGE) on IgG, a target for circulating antibodies in North American Indians with rheumatoid arthritis (RA). Cell. Mol. Biol. 44 (7) : 1129.

Niwa, T., Sato, T., Katsuzaki, T., Tomoo, T., Miyazaki, N., Tatemichi, Y. T. and T Kondo. (1996) Amyloid  $\beta$ 2-microglobulin is modified with N $\epsilon$ - (carboxymethyl) lysine in dialysis-related amyloidosis. Kidney Int. 50 : 1303.

Ogawa, M., Nishiura, T., Yoshimura, M., Horikawa, Y., Yoshida, H., Okajima, Y., Matsumura, I., Ishikawa, J., Nakao, H., Tomiyama, Y., Kanayama, Y., Kanakura Y. (1998) Decreased nitricoxide-mediated natural killer cell activation in chronic fatigue syndrome. Eur. J. Clin. 28 (11) : 937.

Orucevic, A. and Lala, P. K. (1996) Effects of N (G) -Nitro-L-arginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis, on IL-2-induced LAK cell generation in vivo and in vitro in healthy and tumor-bearing mice. Cell. Immunol. 169 (1) : 125.

Puke, K. G., Hayes, P. D., Garlick, P. J., Sewell, H., and Eremin, O. (1991) Stimulation of lymphocytes natural cytotoxicity by L-arginine. Lancet 337 : 645.

Radoff, S., Cerami, A. and Vlassara, H. (1990) Isolation of surface binding protein specific for advanced glycosylation end products from mouse macrophage-derived cell line RAW264. 7. Diabetes 39 (12) : 1510.

Reynold, D. S., Boom, W. H. and Abbas, A. K. (1987) Inhibition of B lymphocyte activation by interferon-gamma. J. Immunol. 139 : 767.

Reynolds, J. V., Daly, J. M., Zhang, S., Evantash, E., Shou, J., Sigal, R. and Ziegler, M. M. (1988) Immunomodulatory mechanisms of arginine. Surg. 104 (2) : 142.

Rose, W. C., Oesterling, M. J. and Womack, M. J. (1984) 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.

- Rubbia-Brandt, L., Sappino, A. P. and Gabbiani, G. (1991) Locally applied GM-CSF induces the accumulation of alpha-smooth muscle actin containing myofibroblasts. removal of senescent macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (17) : 5588.
- Saini, K. S., Thompson, C., Winterford, C. M., Walker, N. I. and Cameron, D. P. (1996) Streptozotocin at low dose induces apoptosis at high doses causes necrosis in a murine pancreatic beta cell line,INS-1. *Biochem. Mol. Biol. Intern.* 39 (6) : 1229.
- Saito, H., Trocki, O., Wang, S., Gonce, S. J., Joffe, S. N. and Alexander, J. W. (1987) Metabolic and immune effects of dietary arginine supplementation after burn. *Arch. Surg.* 122 : 784.
- Sell, D. R., Lapolla, A., Odetti, P., Fogarty, J. and Monnier, V. M. (1992) Pentosidine formation in skin correlates with severity of complications in individuals with long-standing IDDM. *Diabetes* 41 (10) : 1286.
- Servetnick, D. A., Bryant, D., Well-Knecht, K. J. and Wiesenfeld, P. L. (1996) L-arginine inhibits in vitro nonenzymatic glycation and advanced glycosylate end product formation of human serum albumin. *Amino Acids* 11 : 69.
- Shamsi, A. F., Partal, A. and Nagaraj, H. R. (1998) Immunological evidence for methylglyoxal-derived modification in vivo. *J. Biol.Chem.* 73, (2) : 6928.
- Shliakhovenko, V. S., Guzov, M. A., Milenko, S. E., Mikhailovskaia, E. V., Kalinovskii, A. K., Khodak, A. A. and Zak, K. P. (1991) Natural killer cells of different immunological phenotypes (CD16+ , CD56+ and CD57+ ) in the blood of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Vrachebnoe Delo* (2) : 36.
- Skamoto, N., Hotta, N., Toyoda, T. (1994) The cause of death in Japanese diabetics based on survey results among 11, 648 diabetics during 1981-1990. *J. Janpan Diab Soc.* 37 : 773.
- Smith, A. M., Taneda, S., Richey, L. P., Miyata, S., Ahi-Du, Y., Stern, D. and Perry, G. (1994) Advanced maillard reaction end products are associated with Alzheimer disaese patology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (91) : 5710.
- Sowers, J. R. (1998) Obesity and cardiovascular disease. *Clin. Chem.* 44 (8Pt2 ) : 1821.
- Szelachowska, M., Kretowski, A. and Kinalska, I. (1998) Decreased in vitro and IL-

10 production by peripheral blood in first degree relatives at high risk of diabetes type-I. *Hormone Met. Res.* 30 (8) : 526.

Tabor, C. W. and Tabor, H. (1984) Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53 : 749.

Tachibana, K., Mukai, K. and Hiraoka, I. (1985) Evaluation of the effect of arginine-enriched amino acid solution on tumor growth. *JPEN* 9 : 428.

Torre, P. M., Ronnenberg, A. G., Hartman, W. J. and Prior, R. (1993) Supplemental arginine and ornithine do not affect spleenocyte proliferation in surgically treated rats. *JPEN* 17 : 532.

Trucco, M. and Laporte, R. (1995) Exposure to superantigens as an immunogenetic explanation of type I diabetes mini-epidemics. *J. Pediatric Endocrinol. Met.* 8 (1) : 3.

Tsujino, M., Kumasaka, Y., Imamura, K. and Takebe, K. (1996) Peripheral lymphocyte subset of patients with pancreatic diabetes mellitus-about a decreased ratio of T-LGL and ability of host defense . *Journal of the Japanese Association for Infectious Disease* 70 (4) : 325.

Vlassara, H. (1992) Receptor-mediated interactions of advanced glycosylation end products with cellular components within diabetic tissues. *Diabetes* 41 Suppl2 : 52.

Vlassara, H., Brownlee, M. and Cerami, A. (1985) High-affinity-receptor-mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins : a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82(17) : 5588.

Vlassara, H., Brownlee, M. and Cerami, A. (1989) Macrophage receptor-mediated processing and regulation of advanced glycosylation end product (AGE ) -modified proteins:rol in diabetes and aging. *Prog. Clin. Biol. Res.* 304 : 205.

Vlassara, H., Bucala, R. and Striker, L. (1994) Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic and clinical implications for diabetes and aging. *Lab. Invest.* 70 : 138.

Weiss, M. F., Rodby, R. A., Justice, A. C. and Hricik, D. E. (1998) Free pentosidine and neopterin as markers of progression rate in diabetic nephropathy. *Kidney Intern.* 54 (1) : 193.

Whiteside, T. L., Bryant, J., Day, R. and Hergerman, R. B. (1990) Natural killer



cytotoxicity in the diagnosis of immune dysfunction:Criteria for a reproducible assay. J. Clin. Lab.Anal. 4 : 102.

Wiebke, A. E., Grieshop, A. N., Sidner, A. R., Howard, J. T., and Yang, S. (1997) Effect of L-arginine supplementation on human lymphocyte proliferation in response to nonspecific and alloantigenic stimulation. J. surg. Res. 70 : 89.

Wiltrout, R. H., Herberman, R. B., Green, K. M. and Talmadge, J. E. (1985) Role of organ-associated NK cell in decreased formation of experimental metastases in lung and liver. J. Immunol. 134 : 4267.

Xiao, L., Eneroth, P. H. and Qureshi, G. A. (1995) Nitric oxide synthase pathway may mediate human natural killer cell cytotoxicity. Scand. J. Immunol. 42 (5) : 505.

行政院衛生署(1997)中華民國八十五年衛生統計(二)生命統計，台北市，臺灣省。

王聖予、李麗俐、陳慧玲、馮潤蘭、楊志元、謝國珍編譯，原著 Roitt . Brostoff . .Male. (1996)免疫學，第四版。

郭清輝(1998)臨床醫學 41 : 336。

陳國群編著(1997)最新糖尿病精要。

潘文涵、葉文婷、胡啟民和何橈通(1998)臺灣地區糖尿病之盛行率及認知狀況。國民營養現況。