

國立臺灣體育運動大學
National Taiwan University of Physical
Education and Sport
體育研究所碩士學位論文

藉由茯苓多醣體在無熱壓力下脫水減重對大專男性
角力運動員免疫調節的反應

THE ALLEVIATING EFFECTS OF DEHYDRATION
UNDER NO HYPERTHERMIA ON IMMUNOMODULATORY
RESPONSE BY POLYSACCHARIDE FRACTION FROM
FU-LING (PORIACOCOS) IN MALE COLLEGIATE
WRESTLERS



研究生：賴文彥 撰

指導教授：陳裕鏞 教授

中華民國 100 年 12 月

國立臺灣體育學院 體育研究所

碩士學位論文審定書

研究生：賴文彥

論文題目：藉由茯苓多醣體在無熱壓力下脫水減重對大專男性角力運

動員免疫調節的反應業經本委員會評審認可，合於碩士水準。

論文考試委員會委員：

學位考試委員會 召集人	<u>林上亨</u>	(副)教授或博士
論文口試委員	<u>林鴻琦</u>	(副)教授或博士
論文口試委員	<u>陳裕鏞</u>	(副)教授或博士
論文口試委員	<u>趙萃端</u>	(副)教授或博士
論文口試委員	<u>林文宗</u>	(副)教授或博士
論文口試委員	_____	(副)教授或博士
指導教授	<u>陳裕鏞</u>	(副)教授或博士
研究所所長	<u>陳裕鏞</u>	(副)教授或博士

中華民國 99 年 12 月 19 日

論文名稱：藉由茯苓多醣體在無熱壓力下脫水減重對大專男性角力運動員免疫調節的反應

總頁數：77 頁

院校所組別：國立臺灣體育運動大學體育研究所自然科學組

畢業時間：一百學年度第一學期

研究生：賴文彥

指導教授：陳裕鏞博士

中文摘要

本研究目的在探討大學角力運動員在無熱壓力下脫水減重對免疫系統的衝擊，招募 25 位男性大學角力運動員自願者經歷脫水計畫。研究方法：未避免影響培訓計畫，實驗時間選擇避開比賽期且沒有大強度的訓練、比賽或遊戲。實驗中訓練時間與強度為兩小時訓練中以 25% ($VO_2\text{peak}$) 強度行走 10 分鐘並休息 20 分鐘，訓練期間隨時觀察體溫變化當體溫超過 37.8 度時即立刻停止訓練。在相同訓練環境下（溫度 25.4 ± 3.3 度，濕度 $89 \pm 7\%$ ，風速 0.2 ± 0.1 m/s）依個別身體組成控制飲食能量需求以避免除了水分攝取限制之外因素影響實驗。13 位控制組（DE）在 84 小時後尿液比重 1.030，脫水減輕 4.52%，其餘 12 位對照組（EU）無水分攝取限制。抽取血液分離周邊單核白血球（PBMNC）後以不同濃度茯苓多醣體共同培養（PCPS, 1-30 $\mu\text{g}/\text{l}$ ）24 小時之後控制組（DE）對人類白血病細胞 U937 之成長抑制率，在濃度（PCPS, 25 $\mu\text{g}/\text{l}$ ）時達到最高峰。實驗結果：分析各組單核白血球（PBMNC）與茯苓多醣體（PCPS）共同培養（MNC-CM）後

刺激人類白血病細胞 U937，控制組脫水後的
(PCPS-MNC-CM) 的 NBT 還原試驗分析 U937 細胞被誘導
分化成熟之程度，確實有較低的數值 $63.7 \pm 4.7\%$ 。並分析其
脫水後的控制組的周邊單和白血球與茯苓多醣體的共同培養
液 POST-DE-PCPS-MNC-CM 的細胞激素所分泌的 $\text{INF-}\gamma$ ，
 $\text{IL-1}\beta$ and $\text{TNF-}\alpha$ 皆顯著低於對照組。結論：推論角力運動員
在無熱壓力下脫水減重的免疫調節能力低於無脫水的對照
組。

關鍵詞：脫水、單核白血球、免疫調節、白血病細胞 U937、
角力運動員

Lai, Wen-Yen(2011) The Alleviating Effects of Dehydration Under no Hyperthermia on Immunomodulatory Response by Polysaccharide Fraction from Fu-Ling (Poria cocos) in Male Collegiate Wrestlers. Unpublished master thesis, NationalTaiwanCollege of Physical Education

Abstract

Background : To evaluate the impact of hydration status under ambient environmental temperature on the immune system, 25 male collegiate wrestlers, were recruited to undergo dehydration program. **Methods** : To avoid the interference the training program and the performance, the experimental duration was selected to be not in season period , therefore, no subjects registered in any competitions, games or intensive training. The same mild exercise intensity (at about an individually estimated VO_2 peak of 25%) , as walking on treadmill, for 2 hour duration with 10 minutes rest with every 20 minutes intervals to measure tympanic body temperature to prevent from hyperthermia and the same water volume (1.5ml per Kcal) ingestion. When the Tympanic body temperature, measured at rest during exercise, was over 37.8 oC, the walking exercise on treadmill quits. 13 subjects, have controlled diets with individual energy requirements to prevent from body mass loss as well as with restricted water to cause 4.52% dehydration, as urinary specific gravity at about 1.030 in 84 hours, were dehydrated group (DE) and the others 12 subjects that of without water restriction to keep total body weight were euhydrated group (EU) . Peripheral blood monocytes (PBMNC) after dehydration was isolated to perform immunomodulatory response test by being incubated with polysaccharide fraction from fu-ling (Poria

cocos) (PCPS, 1-30 $\mu\text{g/l}$) , which the conditioned medium are prepared to be termed as PCPS-MNC-CM. Greater PCPS (25 $\mu\text{g/l}$) was needed in DE group to prepare the PCPS-MNC-CM, which is reached up to plateau in growth inhibitory curve for Treated U973. Results : The Treated U937 cells, incubated together with POST-DE-PCPS-MNC-CM at post-dehydration, exhibited much lower NBT positive value as $63.7\pm 4.7\%$. By analyzing the cytokines secretion in PCPS-MNC-CM from subjects after dehydration, amounts of $\text{INF-}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$ and $\text{TNF-}\alpha$ were much lower than that of euhydration. Conclusion : In conclusion, the immunomodulatory responsibilities by PCPS in dehydration were lower in male collegiate wrestlers.

Keyword: Dehydration; Mononuclear cells; Immunomodulatory; U937; Wrestlers.

謝致

在研究所的生涯隨著論文的完成而告一段落，感謝所上的教授們教導我不同領域上的知識以及課堂上所學不到的經驗。本論文的完成要特別感謝體研所所長陳裕鏞老師的教導與鼓勵，原本想放棄學位當一位小小公務員；由於裕鏞老師的督促與耐心指導，讓我重拾信心於學位論文上。並承口試委員林正常老師、林文郎老師、趙榮瑞老師及林鴻琦博士不吝繁瑣的給予批閱輔正，方能順利完成。

在實驗過程中得到嘉義大學蘭潭校區的廖惠芬老師及實驗室的所有夥伴以及目前在攻讀博士班的王識豪的鼎力相助與不厭其煩的教導我實驗技巧。讓一位門外漢可以接觸這奧妙的免疫學相關研究。

在論文口試後家中發生一些變故，先是三哥脊椎的病變；後是父親的罹癌，感謝二姐與在中國醫藥大學開刀房服務的三姐，辦理留職停薪在父親膝側無微不至的照顧，讓我無後顧之憂，也讓父親最後能安詳的離開。最後要感謝剛過逝的父親、家人、妻子與剛出生的寶貝女兒薇帆，有你們在背後的支持與鼓勵才是我最大的動力。

賴文彥謹謝

中華民國一〇〇年十二月

目錄

摘要	I
英文摘要	III
致謝	V
目錄	VI
表目錄	VIII
圖目錄	IX
第一章緒論	1
第一節前言	1
第二節文獻回顧	4
第三節角力選手減重議題	20
第二章實驗目的與架構	23
第一節實驗目的	23
第二節實驗架構	24
第三章材料與方法	25
第一節實驗流程	25
第二節實驗材料	30
第三節實驗方法與步驟	30
第四節實驗方法	36
第四章實驗結果	37
第一節基本資料	37
第二節脫水後的生理參數上的變化	37
第三節脫水後免疫學參數和對白血病 U937 的免疫調節作用的變化	38
第四節脫水後在 PCPS-MNC-CM 的 cytokines 分泌物的	

變動	39
第五章結論	41
參考文獻	53

表目錄

表 1	基本資料	47
表 2	脫水前後的生理參數上的變化	48
表 3	脫水前後在免疫細胞與 cytokines 分泌物的變動	49
表 4	脫水前後對白血病 U937 作用的特徵變化	50
表 5	脫水前後在 PCPS-MNC-CM 的 cytokines 分泌物的變動 .	51

圖目錄

圖 1 實驗架構	23
圖 2-a 在無熱壓力下無脫水減重的 PCPS-MNC-CM，對 U937 細胞存活率之影響	45
圖 2-b 在無熱壓力下脫水減重的 PCPS-MNC-CM，對 U937 細胞 存活率之影響	45

第一章緒論

第一節前言

美國運動醫學會（ACSM）針對角力選手減重問題（Weight Loss in Wrestlers）的立場聲明，*Medicine and Science in Sports and Exercise*, 28（2），ix-xii, 1996. 雖然有越來越多的證據警告急速減重的行為可能會降低運動表現甚至使選手的健康及正常的成長發展受到威脅，但此行為仍在角力選手中盛行。為了加強教育及降低角力選手健康上的危險，ACSM 特別提出建議以教育運動教練及角力選手，建立正確的營養和減重觀念，避免急速減重並制定減重的規範。

最佳的營養可提高運動員的表現及運動後的恢復。美國營養協會、加拿大營養師及美國運動醫學學院的立場聲明倡導選擇合適的食物、飲品、進食的時間和補充劑的選擇有助最佳健康和運動表現。運動營養專家能進一步調整這些普及建議以配合個別運動員的健康、運動、營養需求、食物偏好、體重和體成分目標。在運動前，膳食或點心應提供足夠的流質維持體液水平、含較低脂肪和纖維以促使胃部排空和減少腸道不適、含較高糖類以維持血糖水平、含適量蛋白質；而食物組合必須為運動員所熟悉且接受。運動期間，營養攝取的主要目的是補充體液的流失及提供糖類（每小時約 30 至 60 克）以維持血糖水平。運動後，飲食目標是提供充足的糖類與能量以補充肌酐糖和確保快速恢復，進食蛋白質可提供合成及修補肌肉組織的氨基酸。運動員應被教導正確的減重

方式；如平時能控制飲食、均衡攝食各類食物、三餐以五穀為主食、多攝取高纖維食物、少油、少糖、少鹽的飲食原則、多喝白開水且飲酒要節制。輔導有關營養素的用途、並需經過仔細評估其安全性、效力以及是否被列為禁制或非法的物品才可謹慎地被使用；而不是為了奪牌、爭取榮耀常鋌而走險的利用急速減重的方式來達成目的。

什麼是免疫系統呢？簡單地說，人類免疫系統是由許多各式各樣不同功能的免疫細胞（包括 T 細胞、B 細胞、淋巴活化殺手細胞、自然殺手細胞、巨噬細胞……等）經由繁雜精細的各式細胞激素（包括干擾素 - α 、- β 、- γ 、介白素 1 和腫瘤壞死因子 - α ……等）訊息的傳遞活化，而共同構成對入侵身體內病因的防護網路，有如國家的國防系統中各軍種的軍隊，經由巡防偵察得知敵軍入侵，並回報指揮系統，再由指揮系統以軍令訊息的傳達而啟動各路軍種以協同進行對抗入侵敵軍的聯合軍事行動。

對於腫瘤細胞而言，則因細胞的不正常分化，導致無法行使其應有的正常功能，而且還無限制地增殖出更多同樣無用的細胞，而使器官衰竭。這有如身體內叛變的細胞！免疫系統的免疫細胞便有如禁衛軍般地執行弭平內亂的軍事行動。

在近代免疫學的發展過程中，科學家逐漸了解到在健康身體中的免疫系統，可迅速地針對入侵體內的病因作出免疫系統活化的反應，引發各種不同功能的免疫細胞協同作用，進而以毒殺、吞噬和結合等方式來去除病因，恢復健康。作

用期間各種不同免疫細胞間的協同作用，則是靠不同細胞激素的傳遞。人體便是靠這樣的網路系統，精密準確地負起捍衛的重責大任，並排除自然自然界中無數伺機而動，想入侵身體的病因。

茯苓因為存在某些藥理成分可促進健康而被傳統中藥廣泛使用。一些功能性的黴菌多醣體，例如：(G型多醣體...)存在有抗腫瘤活性。從茯苓提煉出來的多醣體也被觀察到對抗血癌具有免疫調節作用，在免疫系統中具有誘導抗增生及分化作用，會使惡性血癌細胞成熟且能執行正常生理作用。免疫調節細胞並可以刺激產生更多且多樣性的細胞激素。

角力選手在比賽前經常發生極端性減重，如禁食、使用瀉藥、減肥丸、利尿劑及高溫環境下流汗脫水，導致快速的體重減輕。流失體液會造成循環系統中異常的恆定狀態，因而導致免疫系統的變化。大學男性角力運動員在熱壓力下，會影響免疫系統、免疫反應與免疫細胞的循環；然而在輕微脫水沒有熱壓力情況下，也被觀察到會影響免疫調節反應。

為了觀察在無熱壓力條件下脫水減重對免疫調節反應的效果，我們執行一個實驗，用角力運動員的血球單核細胞與茯苓分化出的多醣體一起培養來形成一個培養液叫MNC-CM，對抗白血球U937細胞的反應，並評估其抑制率、過氧化物及酵素連結免疫分析之結果，並用PHA來作為正向控制免疫刺激對照。

第二節文獻回顧

壹、 免疫系統

免疫系統是一種可保護脊椎動物免於病原體侵入的防禦系統。它包含各式各樣可以專一辨認和去除入侵者的細胞和分子。免疫反應在功能上可分成兩個相關的行為－辨認及反應。免疫辨認是專一性的，即使由很細微的化學差異，都可以分辨出不同的病原體。除了辨識外來物，還可以分辨出自己的細胞和蛋白質。免疫系統一旦發現外來物則啟動數種細胞和分子產生適當的反應來消滅或中和它，這即所謂效應功能（effector function）。所以此系統將開始辨認的結果轉換為不同的效應反應，不同的效應反應針對個別的病原。若又碰到相同的病原時，因免疫系統具記憶性，就可增強免疫反應而殺死病原，所以一般來說免疫系統大致可分為專一性及非專一性兩大類（Kuby 2002；龔 2006；宮 2006）。

貳、 非專一性免疫反應（Nonspecific immunity）

非專一性免疫又稱先天性免疫（innate immunity）是指健康個體一直具有的一種宿主的防禦力，準備阻斷病原體的侵入和快速成功消滅進入宿主組織的病原體，包含了解剖性（anatomic）、生理性（physiologic）、胞攝性（endocytic）、吞噬性（phagocytic）和發炎性（inflammatory）等四種防禦機制。

一、解剖性防禦

解剖性防禦為身體抵禦外來病原體的第一道防線，此防線包括了皮膚以及分布於呼吸道、消化道的黏膜。完整且健康的皮膚及黏膜不僅可防止病原侵入，還可抑制大部分微生物的生長，譬如皮膚的低 pH 值使得很多細菌無法生長；或是纖毛擺動會將病原體清除掉，而眼淚及唾液會把入侵的外來物沖掉等。一旦出現了傷口，病原體便可通過身體的第一道防線進入體，此時則需要其它的防禦方式。

二、生理性防禦

生理性的防禦包含了溫度、pH、氧和一些溶解因子。例如：高體溫的雞會抑制引起炭疽病的病原生長。另外，大部分的病原不能存活於胃酸的低 pH 值環境下，而新生兒因胃酸不足，所以較成人容易生病。而溶酶（lysozyme）能有效的破壞溶解細菌細胞壁中的肽糖層使細菌無法存活；而干擾素（interferons）是已被病毒感染的細胞所分泌之蛋白質，它可使其周圍細胞不再被另一種病毒感染；補體（complement）可藉專一性或非專一性的免疫機轉而活化，而破壞病原的膜，使其死亡。

三、胞攝及吞嚥作用防禦

這是兩種重要的先天性免疫機能。胞攝作用是細胞將其外液的分子攝入之能力，可分為兩種，第一是胞飲作用（pinocytosis）依細胞外液中分子的濃度，使膜凹陷而將分子攝入。第二是受體媒介的胞攝作用（receptor-mediated

endocytosis)，攝入能和受體結合的分子。以上兩種型式，分子攝入後都會形成攝入小泡（endocytic vesicles），再融合成攝入體（endosome），酸性的攝入體環境會使與分子結合的受體離開，留下分子與初級溶酶體（primary lysosome）結合成次級溶酶體。初級溶酶體由高基氏體產生，含多量蛋白分解酶（proteases）、核解酶（nucleases）、脂解酶（lipases）和其它水解酶。次級溶酶體中的分子會被分解成胜肽類、核苷酸和糖後被排出。而吞噬作用是膜伸出偽足包圍粒子攝入形成吞噬體（phagosome），吞噬體比攝入小泡大 10 到 20 倍。偽足的伸出需要微絲（microfilament）的參與，而攝入作用則不需要。事實上大部分細胞都可行胞攝作用，卻只有特殊的細胞可行吞噬作用，而這些細胞包括單核球、中性球及巨噬細胞等。

四、發炎反應防禦

發炎反應是由一連串由化學媒介物的交互作用所產生的，其中有些媒介物是來自侵入的病原，有些來自受損組織的釋放，還有一些則來自漿細胞的酵素系統和發炎反應中白血球所產生的。發炎反應有 3 個基本特性（1）血管擴張，造成微血管網充血，組織溫度上升和呈現紅色。（2）增加血管通透性，使大量體液流出造成滲出液聚集而使組織水腫。（3）吞噬細胞的移動，因血管通透性增加，促使多種白血球細胞移入組織中，其中吞噬細胞先吸附在血管內壁再移出至發炎區，吞噬細菌，釋放水解酶，溶解附近正常細胞。

參、專一性免疫反應（Specific immunity）

專一性免疫又稱為後天性免疫 (acquired immunity)，當病原沒有受第一道防禦機制攔截而續入侵體內時，此時專一性免疫反應即會啟動。專一性免疫是針對特定的外來病原體，所以有其專一性、多樣性、記憶性及自我辨識性。這特殊的免疫反應能辨別只有微小差異的抗原，即使只有一個胺基酸的點突變，此免疫反應也會產生無數多樣的辨認分子來辨別，辨別完成後會產生記憶性，以後再碰到同一種抗原時，可加強免疫反應，有些也是終生性的。專一性免疫反應主要由淋巴細胞 (lymphocyte) 及抗原呈獻細胞 (antigen presenting cell, APC) 所主導的。淋巴球細胞是白血球的一種，由骨髓製造，利用淋巴系統循環至全身。淋巴細胞主要分佈兩群：B 細胞和 T 細胞。APC 則包含了樹突狀細胞 (dendritic cell)、巨噬細胞 (macrophage) 及活化的 B 細胞，其將抗原攝入後並表現於細胞膜上，使 T 細胞能辨認抗原而與其結合。專一性免疫防禦機制分為細胞媒介性免疫 (cell-mediated immunity) 及體液性免疫 (humoral immunity)。T 細胞進行細胞媒介性反應 (cell-mediated response)，抗原跟 T 細胞結合後，進而活化輔助型 T 細胞 (Th cell) 細胞及毒殺型 T 細胞 (CTLs)。Th 細胞會分泌細胞激素，促進噬菌細胞的吞噬反應，而 CTLs 則可毒殺病毒感染細胞及腫瘤細胞。另外，在體液性反應中 (humoral response)，B 細胞一旦接觸抗原則會進行分化成漿細胞 (Plasma cell)，之後漿細胞便製造抗體。

肆、單核球/巨噬細胞 (Monocyte/Macrophage)

血液中的單核球與組織中的巨噬細胞共同組成單核球細胞吞噬系統，於骨髓中造血時，顆粒球－單核球先驅細胞先分化為前單核球，當離開骨髓進入血中後才進一步分化為成熟的單核球，而在血中的 8 小時裡，它們會先變大，接著轉移到組織並分化為特別的組織巨噬細胞。當巨噬細胞吞噬外來抗原時，其能被活化而進行一連串反應，另外 Th 所分泌之 $\text{INF-}\gamma$ 能強化其反應。巨噬細胞主要吞噬之抗原為微生物、不溶顆粒、受損或死亡之細胞及細胞碎片。活化的巨噬細胞會產生許多細菌及細胞毒殺物質，如 H_2O_2 、NO 及 $\text{TNF-}\alpha$ ，這些物質能破壞被吞噬之抗原。同時，巨噬細胞也扮演抗原呈現細胞的角色 (APC)，將一部分的抗原消化成肽與 MHC class II 分子結合，並將抗原呈現給 Th，進一步活化 Th 而增強免疫反應。另外，活化後的巨噬細胞也會經由分泌的因子，而引起發炎反應，其中包含 IL-1、6、 $\text{TNF-}\alpha$ 、補體蛋白及水解酶。

伍、 T 細胞 (T cell)

T 細胞是針對在骨髓裡由幹細胞分化而成的先驅 T 細胞，其需要在胸腺 (thymus) 裡繼續分化成熟，為具有免疫力之 T 細胞。T 細胞帶有 CD3 的表面抗原，除此之外另還帶有 CD4 或 CD8 的表面抗原。帶有 CD4 表面抗原之 T 細胞稱之為 (T helper cell, Th)，其可辨識抗原呈現細胞 (APC) 上之 MHC (major histocompatibility complex) class II 分子所呈現之抗原。而帶有 CD8 表面抗原之 T 細胞稱之為毒殺型 T 細胞 (cytotoxic T cell, Tc)，其可辨識經由抗原呈現細胞 (APC) 上的 MHC class I 複合體所呈現之抗原。

陸、 輔助型 T 細胞 (T helper cell, Th)

當 CD4-淋巴細胞與胜肽-MHC class II 複合體交互作用後，並會促使 CD4 淋巴細胞分化成為 Th 細胞。當 Th 細胞與巨噬細胞上帶有抗原之 class II MHC 複合分子結合後，便會促使 Th 細胞分泌細胞激素 IFN- γ 。巨噬細胞會受到 IFN- γ 之誘導，增加細胞激素 (TNF- α 、IL-1) 與細菌及細胞毒殺物質的分泌，因而加強消滅病原的能力。同時，IFN- γ 也會增加 MHC class II 分子的表現量。另外，Th1 所分泌之 IFN- γ 及 IL-2 同時也會活化自然殺手細胞。

而當 Th 細胞辨識 B-cell 所呈現出胜肽 MHC class II 複合體時，會分泌 IL-1、IL-2、IL-4、IL-5 及 IL-6。這些細胞激素會促進 B 細胞製造及分泌抗體，另外還能促進 B 細胞增生及分化成為可分泌免疫球蛋白的漿細胞。

柒、 毒殺型 T 細胞 (Tc cell)

毒殺型 T 細胞會須經由三種訊號的傳遞，才能被活化及分化成為有毒殺細胞作用 CTL (cytotoxic T lymphocyte)。首先，Tc 會辨識標的細胞上 MHC class II 分子相關的抗原，另外，Tc 上之 CD28 也會與標的細胞上 B7 結合，兩個訊號同時刺激 Tc 的活化。此時，活化後的 Tc 會表現細胞激素 IL-2 受器，並與 IL-2 結合進，而促進抗原活化後的 Tc 增生及分化，成為有毒殺能力的 CTL。CTL 主要是對於 MHC class I 分子標示後的病毒感染細胞及腫瘤細胞進行結合，而當 CTL 與標的細胞分離後幾個小時內，標的細胞就會因細胞凋亡而死。

捌、 B 細胞 (B cell)

B 細胞是在骨髓中產生，並於其中進行抗原不依賴型的發育，同時包含 Ig 基因重組過程。成熟後的 B 細胞帶有單一抗原特異性之免疫球蛋白，會轉移至淋巴細胞相關的 B 細胞區。當 B 細胞受到抗原及活化 Th 細胞刺激後，會繼續增殖及分化成為記憶 B 細胞及漿細胞 (plasma cell)。記憶 B 細胞壽命長，且對於抗原具有特殊之記憶能力，當相同抗原再次侵入身體後，記憶 B 細胞能辨識，並引起更快、更劇烈之次級免疫反應。而漿細胞則是以製造及分泌免疫球蛋白為主。

玖、 免疫系統對於白血病細胞的作用

目前癌症之治療方式有放射療法、手術及化學療法為主，但治療過程中會造成嚴重之副作用。因此尋找如何癌症且不會傷害細胞之方法，是醫學界所重視之一項議題；免疫療法已成為醫學界之新寵兒。免疫療法是利用提升自身之免疫功能，進而達到對抗腫瘤的作用；茯苓因為存在某些藥理成分可促進健康而被傳統中藥廣泛使用。一些功能性的黴菌多醣體，例如：(G 型多醣體 ...) 存在有抗腫瘤活性 (Wang SY, 1997)；在我們的研究中，從茯苓提煉出來的多醣體也被觀察到對抗血癌具有免疫調節作用，在免疫系統中具有誘導抗增生及分化作用，會使惡性血癌細胞成熟且能執行正常生理作用。免疫調節細胞並可以刺激產生更多且多樣性的細胞激素。(陳裕鏞，2004)

壹拾、 細胞激素 (Cytokine)

有效免疫反應發生包括了淋巴細胞，發炎細胞和造血細胞。這些複雜的交互作用中，是藉由一些分泌出來的低分子量蛋白質來作為媒介，其所扮演的角色為細胞對細胞的聯繫而這些小分子蛋白質就稱為細胞激素（cytokines）。細胞激素是一群低分子量的調節蛋白質，為體內的白血球細胞和其他相關的各種細胞，經誘導性刺激產生反應而分泌出來的物質。細胞激素結合在目標細胞（target cell）膜上的特殊受器上，啟動生化反應，負責訊號的傳導並且改變目標細胞內的基因表現型態，對於一個特別的細胞激素，其本質是由細胞膜上的特殊受器所決定的。細胞激素可與所分泌的自體細胞膜受器結合，產生自我調控。同時細胞激素也可以結合到製造細胞激素鄰近之目標細胞受器上，以調控其他細胞，例如當 Th 細胞受器與巨噬細胞或 B 細胞上之抗原 MHC 複合體結合時，便會誘導細胞激素的分泌，而在細胞與細胞間緊密交互作用時，細胞激素便會與巨噬細胞或 B 細胞上之細胞激素受體結合，達到調控之作用。細胞激素主要具有幾種特質，第一為親多組織性（Pleiotropy）。一個細胞激素能對於不同細胞產生不同作用，例如由 Th 細胞所分泌之 IL-4，不但能促進 B 細胞的活化與分化，還能促進胸腺細胞及肥大細胞的增生。第二為重複性（redundancy），指不同細胞激素具有相同功效，例如由 Th 細胞所分泌之 IL-2、IL-4 及 IL-5 分別對於 B 細胞都有增生的效果。第三為協同作用（synergy），指兩種細胞激素合併所達到之效果遠大於個別細胞激素單獨作用，例如 Th 細胞所分泌之 IL-4 與 IL-5，合併一起作用會誘導 B 細胞之抗體類別轉換 isotype switch 成 IgE。第四為拮抗性（Antagonism），指一個細胞激素會抑制另一個細胞激

素的作用，例如 Th 細胞所分泌之 IFN- γ 會阻斷 IL-4 所誘導之 B 細胞類別轉換成 IgE。第五為連鎖反應誘導 (Cascade induction)，指一個細胞激素誘導目標細胞去分泌另一個細胞激素，之後再誘導下一個目標細胞去分泌其他細胞激素，因而產生一連串反應，例如 Th 細胞所分泌之 IFN- γ 會活化巨噬細胞分泌 IL-12，IL-12 進而促進 Th 細胞分泌其他細胞激素，如 IFN- γ 、TNF- α 及 IL-2。

細胞激素可分為以下之四大類：

一、 干擾素 (Interferons, IFNs)

干擾素之抗病毒活性，使其在約五十年前被發現 (Isaacs and Lindenmann 1957)，之後幾年對於干擾素的研究亦發現，其不但具有免疫調節功效，同時也可抑制腫瘤的生長 (Pestka and others 1987; Salgame and others 1991; Powrie and Coffman 1993)。干擾素可分為兩大類，第一類干擾素包含 IFN- α 及 IFN- β 。其主要由病毒感染之細胞所分泌，提供較早之非專一性免疫防禦機制以對抗病毒。第一類干擾素會誘導未感染之細胞製造一種能降解 mRNA 的酵素，當此細胞受到感染後，酵素會被活化來分解病毒及細胞之 mRNA。此不但能防止病毒蛋白被複製，同時也會導致受感染之細胞走向死亡之路徑。對於抗癌臨床試驗，目前最常用的干擾素為 IFN- α 。當給罹患血液惡性病 (如：白血病、淋巴瘤、骨髓瘤) 或實質性腫瘤 (如：黑色素腫瘤、腎癌、乳癌) 的病人每天注射重組的 IFN- α ，則會誘導腫瘤完全或部分的退化 (Kuby 2002)。

第二類干擾素為 IFN- γ ，其在非專一性免疫及專一性免疫防禦機制都扮演著重要的角色。IFN- γ 被 Th 細胞、Tc 細胞及自然殺手細胞所分泌，在病毒未感染之細胞中，它可以抑制病毒之複製，同時可以啟動發炎反應。另外，在惡性腫瘤上的 MHC class I 分子表現量亦會大幅的降低，而 IFN- γ 可以增加腫瘤細胞上 MHC class I 分子的表現量，因而使得腫瘤更容易成為 Tc 細胞毒殺的目標。IFN- γ 也會增加抗原呈現細胞上之 MHC class II 分子的表現量，因而增加抗原與 Th 細胞結合的機會。除此之外，IFN- γ 還可以直接或間接的提升巨噬細胞、自然殺手細胞及 Tc 細胞之活性。

二、 間白素 (Interleukine, ILs)

間白素主要 Th 細胞所分泌，少部分由單核吞噬細胞或組織間細胞分泌，常被探討的包含 IL-1 到 IL-17，其數量及種類持續被發現增加中。IL-1 α 及 IL-1 β 是由單核球、巨噬細胞、B 細胞、樹狀細胞等其他細胞所分泌。IL-1 β 可刺激活化 Th 細胞及自然殺手細胞，而對於 B 細胞則可促進其成熟。另外，IL-1 β 還可誘導周邊淋巴球細胞產生 GM-CSF (Kaushansky et al., 1988)，以及促進巨噬細胞分泌 TNFs 及 IFNs 等細胞激素 (Wang 1996)。而當 IL-1 與 IL-6 一起作用時，則可達到協同效果，刺激 Th 細胞分泌 IL-2 (Dinarello 1991)。IL-2 可誘導 Th 及 Tc 細胞的增生，並加強自然殺手細胞及 Tc 細胞的活性。

三、 腫瘤壞死因子 (Tumor necrosis factors, TNFs)

腫瘤壞死因子分為兩種 TNF- α 與 TNF- β 。其中 TNF- α 為被活化的 T 細胞與 B 細胞、巨噬細胞、自然殺手細胞及嗜中性白血球所分泌。當 TNF- α 作用於腫瘤細胞時，則可誘導其走向凋亡路徑 (Legdeur and others 1996)，TNF- α 具有抗腫瘤功能 (Vassalli 1992)。TNF- α 還可以經由破壞腫瘤附近血管的內皮細胞來抑制腫瘤自身的血管新生，達到降低腫瘤生長所需之養份 (Kuby 2002)。因此在臨床上 TNF- α 常被當作一種抗腫瘤藥物來使用。

另外，當 TNF- α 與其他細胞激素，如 IL-1 (Onozaki et al., 1988; Tamatani et al., 1989)、IFN- α 及 IFN- γ (Kikuchi et al., 1992) 共存時則會達到協同效應，誘導骨髓性白血病細胞株分化 (Lotem and Sachs 1987; (Munker and Koeffler 1987; Wang et al., 1991)。同時，TNF- α 與 IFN- γ 一起作用時，則會提高 MHC class II 分子的表現量 (Pujol-Borrell et al., 1987)。TNF- α 還可以活化巨噬細胞，並增加巨噬細胞上 TNF- α 受器之數量，達到加強巨噬細胞對於 TNF- α 之反應，以更進一步活化巨噬細胞及增加巨噬細胞分泌 TNF- α (Janeway and Travers 1996)。TNF- β 由 Th 及 Tc 細胞所分泌，其功效類似於 TNF- α ，對於腫瘤細胞有毒殺之效果，TNF- β 對於巨噬細胞及嗜中性白血球也可加強其吞噬能力。

四、其他細胞激素

顆粒性巨噬細胞集落刺激因子 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF) 主要為誘導骨髓中的幹細胞 (bone marrow stem cell) 分化成顆粒細胞及

巨噬細胞前驅物細胞 (granulocyte-macrophage progenitor cells, G/M progenitor cells)，進而促進顆粒細胞及巨噬細胞形成群落 (G/M colony) (Dexter and Heyworth 1994; Thomas et al., 2002)。

轉型生長因子 (Transforming growth factor β , TGF- β) 對於單核球及巨噬細胞會產生化學趨性吸引，同時可以限制發炎反應，促進傷口癒合。

壹拾壹、白血病 (leukemia)

白血病 (leukemia) 一般通稱為血癌，當正常造血幹細胞分化異常，產生惡性細胞增生或病變後導致造血細胞組織異常、浸潤身體組織，使體內各器官功能失調 (Harrison 1995)。引發白血病之真正原因尚未明確，除遺傳因素外，可能與輻射、苯及其衍生物等有關，在遺傳及基因突變方面，若先天染色體異常，例如唐氏症候群 (Down's) 或布倫氏症候群 (Bloom's) 等先天疾病可能誘導白血病的發生；正常人罹患血癌的機率約為兩萬五千分之一，但於原子彈爆炸圈的倖存居民，罹患白血病的機率高達六十分之一；此外懷孕婦女使用腹腔 X 光照射，出生胎兒罹患白血病之機率也較高；長期接觸有機苯之工人或曾接受過含氫化合物 (Alkylating agents) 化學治療的病人，亦有較高的白血病罹患機率；另外，第一型人類 T 淋巴球細胞性病毒 HTLV-I 病毒感染或自體免疫能力缺陷可能與慢性淋巴球性白血病有關。依細胞來源可分為兩種：淋巴球性 (lymphoid) 及骨髓性 (myeloid)，

而依細胞發育分化程度可分為急性 (acute) 及慢性 (chronic) 白血病。

壹拾貳、急性白血病 (acute leukemia)

急性白血病好發於幼童，血癌為小兒癌病之第一位，發病的人數有逐年增加之趨勢。急性白血病細胞之分化程度較低，大部分停留在芽細胞階段，疾病惡化程度迅速，屬於突發性疾病在短期內會導致死亡 (Hoelzer 1993)，死亡原因通常為白血病細胞浸潤骨髓，取代正常細胞之造血功能，引發一些併發症所致。依據急性白血病分類法，急性骨髓性白血病 (AML) 可細分為 M0 至 M7 等八種類型；而急性淋巴球性白血病 (ALL) 可分為 L1 至 L3 三種類型，另外還有急性雙型白血病及骨髓生成不良症候群 (MDS) (何 2001)，一般研究用的 HL-60 細胞株屬於 M2 亞型 (Dalton et al., 1998)，本實驗使用 U937 細胞株屬於急性骨髓性白血病中的 M5 亞型細胞。

壹拾參、慢性白血病 (chronic leukemia)

慢性白血病細胞大多分化較為成熟，細胞由原始之芽細胞至完全成熟之顆粒球皆有，病期較長較緩和，好發於 40 歲以上之男性。可分為慢性骨髓增殖障礙、B 慢性淋巴增殖障礙 (B-CLD)、T 慢性淋巴增殖障礙 (T-CLD)、免疫增殖障礙及惡性淋巴腫 (何 2001)。

壹拾肆、人類白血病細胞株 U937

白血病就是血癌，起因於骨髓內的原始造血幹細胞發生基因突變，使得這種細胞分化能力變差，仍一直停留在沒有正常功能的原始狀態而不會成熟，但卻會一直分裂製造新的個體細胞。它不具備正常白血球分化成熟後的自然凋零現象，因此其數量會逐步增加，逐漸對周遭的正常造血細胞構成壓擠、破壞，而使得造血功能變差。這種血癌細胞也會被釋放到血液，甚至可侵犯肝、脾、淋巴各類組織及器官，造成器官功能失調及衰竭（藍 1998）。白血病的成因複雜，目前可能的致病原因及看法包括放射線照射、化學藥品引起及遺傳因素等等。

本實驗所用之人類白血病細胞株為 U937，其為 Sunstrom 與 Nilsson 在 1976 年，由一位 37 歲患有組織性淋巴瘤（histocytic lymphoma）男性的肋膜積液中所抽取出來並進行培養。此細胞在造血過程中分類為未成熟之單核母細胞（monoblast），但卻可經由一些特定物質之誘導，而分化為成熟的單核球或巨噬細胞。例如，食物萃取物：靈芝多醣體（polysaccharide of *Ganoderma lucidum*）（Lieu et al., 1992）；化學物質：retinoic acid（Olsson and Breitman 1982）（Olsson et al., 1982），植物血球凝集素（phytohemagglutinin, PHA）（Takeda et al., 1993）；細胞激素：IFN- γ （Ralph et al., 1983）、TNF- α （Wright et al., 1992）、IL-1 β （Lieu et al., 1992）等。

壹拾伍、U937 細胞株分化之評估

一、細胞之貼附性及形態變化

U937 細胞屬於懸浮性細胞，若被誘導分化為成熟的單核細胞或巨噬細胞，可觀察到大部分細胞貼附於培養器皿之底部。利用光學顯微鏡觀察形態改變，誘導分化後的 U937 細胞具有較小的核質比例，細胞質呈現淡染性，且核仁染色體變少而疏鬆 (Sunström and Nilsson 1976)。

二、 NBT (nitroblue tetrazolium) 還原試驗

NBT 還原試驗屬於細胞功能評估的一種，當有外來細菌侵入人體時，生物體內單核球或巨噬細胞會將外來細菌顆粒吞噬進入胞內，淋巴球吞噬細菌後即形成一個小囊，釋放超氧陰離子 O₂⁻ 進而破壞細菌。利用 nitroblue tetrazolium (NBT) 試劑之還原作用，O₂⁻ 會將 NBT 試劑還原成紫色結晶 formazan，故可以用 NBT 還原試驗分析 U937 細胞被誘導分化成熟之程度 (Baehner and others 1968)。

三、 非特異性脂酶 (nonspecific esterase, NSE) 染色法

NSE 為單核球細胞之專一性酵素，研究上被使用於評估單核球或巨噬細胞之分化作用。U937 細胞於分化成熟後呈現對 NSE 強烈染色性質，相較於未處理之 U937 細胞對 NSE 所呈現的弱染性，於顯微鏡下觀察可評估 U937 細胞是否分化成熟 (Yam and others 1971)。

四、 吞噬試驗

吞噬試驗為另一種細胞功能評估的方法，實驗利用酵母菌或小珠子與 U937 細胞共同培養，若 U937 細胞經過誘導分化變為成熟單核球或巨噬細胞，則具有吞噬的能力，可於顯

微鏡下觀察吞噬反應。另外若以螢光標定的大腸桿菌（Fluorescein Isothiocyanate；FITC-labeled E. coli）作為吞噬作用之標的細胞，可藉由流式細胞儀分析吞噬作用的程度（Gallagher and others 1979）。

五、細胞表面抗原分析

不同細胞表面所表現的表面抗原不同，若 U937 細胞經由誘導分化成單核球細胞或巨噬細胞，通常可由細胞表面抗原分析到 CD11b，CD11b 表現於早期的單核球細胞、巨噬細胞、嗜中性白血球、嗜伊紅性顆粒球及自然殺手細胞（Ault and Springer 1981）。另外於成熟單核球細胞表面亦可分析到 CD14 及 CD68，分別專一性表現於早期及晚期的單核細胞球（Goyert and others 1981）。

第三節 角力選手減重議題

壹、減重的目的

運動員減重為了三個目的：

- 一、符合比賽的體重限制，甚至參加更輕的量級。
- 二、改善並增加個人魅力，以呈現更完美體態。
- 三、增進運動表現 (Fogelholm, 1994)。

貳、相關研究

角力選手都以為自己有過多的脂肪，但研究顯示高中的角力選手在非比賽季節中，體脂百分比只有 8%~11%，遠低於一般高中生平均值 15%。研究指出 89%美國大學角力選手為達比賽標準，平均在三天內降低 4.4 公斤，僅有 7%選手表示在賽季中從未節食。41% 的大學角力運動員每一季裡每週都會減少 5.0-9.1 公斤的體重，而高中角力運動員每週亦減少 2.7-4.5 公斤體重。(Steen & Brownell, 1990)。而常見的減重方法（如運動、減食、禁食、及脫水等），有 25%~67% 的角力選手選擇這種減重方式，影響體內水分、肝醣含量及非脂體重 (lean body mass) 並且造成選手體內電解質改變，醣類代謝功能也受到負面影響，而導致攻擊爆發力總功率下降及情緒低落 (Hall & Lane, 2001)。急速減重使水分從體內流失，其中細胞內液佔總流失量 30-60%、組織間液佔總流

失量 30-60%、血漿約佔總流失量 8-12%(Fogelholm, 1994)。密西根大學曾針對 2532 位角力運動員做過調查，在賽季期間平均減重 6 磅，超過 50%角力運動員減重超過 5 磅，其中 27%減重超過 10 磅，72%角力運動員每周從事至少一種有害身體的減重方式，52%角力運動員每周從事至少兩種有害身體的減重方式，12%角力運動員每周從事至少五種有害身體的減重方式，報導指出 2%角力運動員每週使用瀉藥、減肥丸或利尿劑(Kinningham, 2001)。

角力選手使用這些激烈方式急速減重，相信能增加比賽的得勝率；但諷刺的是，急速減重可能會降低運動表現，甚至使這些選手的健康受到威脅。如果採用限制食物且不攝取水分的方法減重，在生理上將產生聯合作用，對角力競賽會有更嚴重的負面影響。研究結果發現急速減重除了造成脂肪的減少外，水分和肌肉量也會有流失的現象，

參、 脫水對免疫力的影響

角力選手在比賽前經常發生極端性減重，如高溫環境下流汗脫水，導致快速的體重減輕。流失體液會造成循環系統中異常的恆定狀態，在熱壓力下，會影響免疫系統、免疫反應與免疫細胞的循環。例如鉀離子的集中增加，鈉離子與氯離子不受影響；血漿中的白血球與總蛋白的水平線提升，因而導致免疫調節的變化(Ohira Y, 1981)。探討七位女划船選手在經歷高強度的划船鍛鍊後，因為體溫上升並且有對血液白血球、嗜中性和自然兇手(CD3-/16+)細胞含量的有差別的作用；Penkman MA,2008)；然而在輕微脫水沒有熱壓力情況

下，也會影響免疫調節反應，已在大學男性角力運動員中被觀察到。

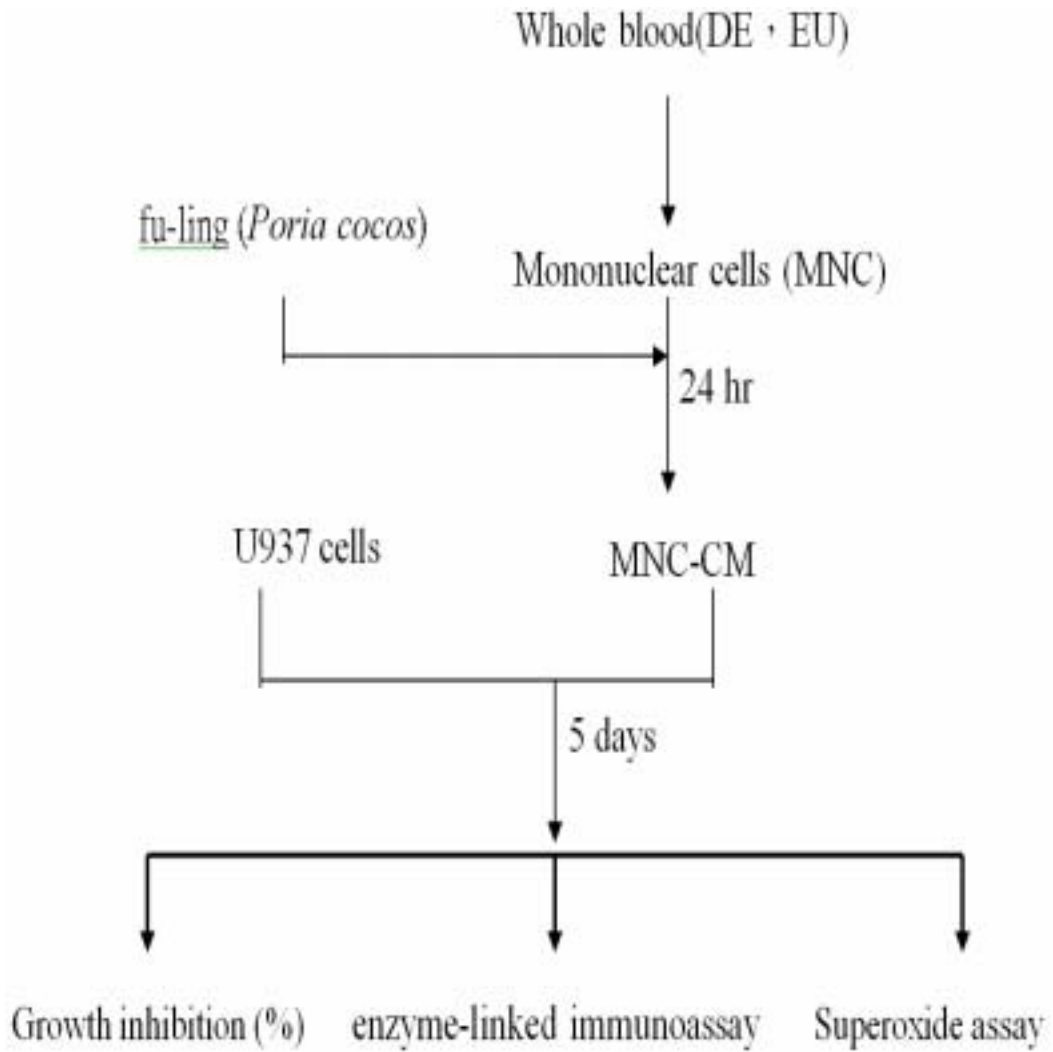
為了觀察在無熱壓力條件下脫水減重對免疫調節反應的效果，我們執行一個實驗，由茯苓分化出的多醣體，對抗人類白血球 U937 癌細胞的反應，用角力運動員的人類週邊血液單核細胞與茯苓分化出的多醣體一起培養來形成一個培養值叫 MNC-CM，PHA 被用來作為正向控制免疫刺激。

第二章實驗目的與架構

第一節實驗目的

- 壹、 探討角力運動員在無熱壓力下脫水減重是否會影響免疫調節能力。
- 貳、 探討角力運動員在無熱壓力下脫水減重前後，以不同濃度的茯苓多醣體與血液單核細胞之共同培養液對於白血球 U937 癌細胞的刺激反應後之生長抑制率 (Growth inhibition)。
- 參、 探討角力運動員在無熱壓力下脫水減重前後，以不同濃度的茯苓多醣體與血液單核細胞之共同培養液對於白血球 U937 癌細胞的刺激反應後之過氧化物分析 (Superoxide assay)。
- 肆、 探討角力運動員在無熱壓力下脫水減重前後，以不同濃度的茯苓多醣體與血液單核細胞之共同培養液對於白血球 U937 癌細胞的刺激反應後之酵素連結免疫分析 (enzyme-linked immunoassay, ELISA)。

第二節 實驗架構



圖一 實驗架構

第三章材料與方法

第一節實驗流程

在經過台灣體育大學人倫委員會申請通過後，招募 27 位大專男性角力運動員志願者，並經過內科醫師診斷是否有像糖尿病、肺病、心血管疾病、骨骼與肌肉方面的臨床疾病評估後，去除 2 位。25 位男性大學角力運動員被招募經歷脫水計畫；未避免影響培訓計畫，實驗時間選擇避開比賽期且沒有大強度的訓練、比賽或遊戲。實驗中訓練時間與強度為兩小時訓練中以 25%(V O₂peak)強度行走 10 分鐘並休息 20 分鐘，訓練期間隨時觀察體溫變化當體溫超過 37.8 度時即立刻停止訓練。在相同訓練環境下(溫度 25.4 ± 3.3 度,濕度 89 ± 7 %，風速 0.2 ± 0.1 m/s)，全部的飲食皆在嚴格的管控下，尿液的蒐集在第一天及最後一天的早上 7 點第一次尿。藉以評估在無熱壓力下脫水減重對免疫系統的衝擊。實驗中的飲食由合格之營養師調配依個別身體組成控制飲食能量需求(15%蛋白質，脂肪 25% 和 60%的碳水化合物，包含 0.2L 的牛奶攝取)以避免除了水分攝取限制之外因素影響實驗。13 位控制組(DE)目標在 84 小時後尿液比重高於 1.025 且脫水減輕 4.00%，其餘 12 位對照組(EU)無水攝取分限制且體重減少小於 0.3%，尿液比重低於 1.020。在早上 8：00 抽取血液樣本，並於實驗前四週測得(VO₂peak)值。

第二節 實驗材料

壹、 fu-ling (*Poria cocos*)購自本地草本植物的藥局
(DEAE-Sephadex A-25, DEAE-Sephadex C-25)

貳、 實驗細胞

一、 人類白血病細胞株 (U937)

來自食品工業發展研究所菌種中心 (國家衛生研究院細胞庫)菌種中心編號： BCRC 60435, 細胞株來源： ATCC CRL-1593.2。

二、 志願者(25位大專角力運動員)人類周邊血液單核細胞

取自 20.3 ± 1.4 歲之健康成年人周邊血液，並已簽署捐血同意書。

參、 實驗藥品及試劑

Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, St. Louis, MO, USA)

RPMI medium :

RPMI medium 1640 (Gibco BRL, Gaithersburg, MO, USA)

Sodium bicarbonate (Na_2CO_3) (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Fetal bovine serum (FBS, 胎牛血清) (Gibco, USA)

Phosphate buffer saline (PBS) :

Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Sodium chloride (氯化鈉, NaCl) (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Potassium chloride (氯化鉀, KCl) (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Ficoll-PaqueTMPlus (Pharmacia, Sweden)

Phytohemagglutinin (PHA, 植物凝集素) (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Polymyxin B salt (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Phorbol myristate acetate (PMA) (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Human IL-1 β ELISA kit (R&D Systems, Inc., USA)

Human IFN- γ ELISA kit (R&D Systems, Inc., USA)

Human TNF- α ELISA kit (R&D Systems, Inc., USA)

Methyl blue (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Phenol red (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Liu A 及 Liu B dye (MERCK, Germany)

Nitroblue tetrazolium (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Safranin O (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Trypan blue (Gibco BRL, USA)

Liquid N₂ 液態氮 (冷研科技, 嘉義, 台灣)

肆、 實驗器材與儀器

1 mL 針筒 (Terumo, USA)

5 mL、10 mL、25 mL serological pipettes (Greiner)

15 mL、50 mL 離心管 (Greiner)

10 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1000 μ L micropipette (Gilson, France)

3 cm, 10 cm dish (Greiner)

96 well immunoplate (Nunc)

25 cm²、75 cm² cell culture flask (Corning-Costar, Cambridge, MA, USA)

0.45 μ m 無菌針筒過濾器 (Millipore, Bedford, MA, USA)

橡膠刮片 cell scraper (Greiner)

血球計數器 (Briolett live, NY, USA)

載玻片 (德國磨砂, No.2407)

真空採血管

滅菌消毒指示帶

微量電子天秤 (HR-200, A&D, Tokyo, Japan)

桌上型離心機 Centrifugator (KOBOTA 5100, 雙鷹, Japan)

桌上型小離心機 Centrifugator (KOBOTA 2100, Japan)

倒立式顯微鏡 Inverted microscope (OLYMPUS CK 30, Japan)

直立式顯微鏡 microscope (Eclipse E400, Nikon, Japan)

吸管輔助器 pipet-Aid (Drummond Science Co., Englewood, NJ, USA)

無菌操作台 Laminar flow (日順, 嘉義, 台灣)

CO₂ 培養箱 CO₂ incubator (SANYO-Electric CO., Japan)

酵素免疫分析儀 (ELISA reader, BIO-TEK INSTRUMENTS, INC.)

純水製造機 Milli-Q ultrapure water system (Millipore, Bedford, MA, USA)

高壓滅菌釜 Autoclave (HL-341, 嘉義, 台灣)

液態氮冷凍鋼筒 Liquid nitrogen refrigerator (Taylor-Wharton, 34HC)

攝氧量測試系統 CORTEX Biophysik MetaMax 3 B 便攜式
CPX 系統 (Cortex, Leipzig, Germany) (Osmometer, model
Vapro5520, Wescor, Inc. Logan, USA)

紅外線溫度計 Infrared Tympanic Thermometer (Sherwood
Medical, St. Louis, MO)

尿液比重計 (model A300CL;Spartan, Tokyo, Japan)

鈉鉀濃度檢測 (Beckman E2A, USA). Ion-selective electrodes,
Beckman E2A analyzer (Beckman Instruments, Brea, CA).

第三節 實驗方法與步驟

壹、 U937 細胞株培養

一、 細胞解凍及培養

實驗前兩週，將裝細胞之冷凍小管從液態氮筒取出，於 37 °C 恆溫水浴槽進行快速解凍，使其融化至剩一小塊冰時，立即移至無菌操作台將細胞液吸取出，加入已含有培養液 (RPMI 1640/10 % FBS/1 % Glutamine) 之離心管中，以轉速 1000 rpm 離心 6 分鐘後去除上清液，再以培養液 (RPMI 1640/10 % FBS/1 % glutamine) 懸浮細胞並將細胞數調整至 2×10^5 /mL，放入底面積 75 cm² cell culture flask (75T)，於 37 °C、6 % CO₂、95 % 相對溼度恆溫培養箱培養。解凍後的 U937 細胞固定每二至三天進行一次細胞繼代培養，約兩週後確認細胞株呈現指數型生長且存活率達 98 % 以上，可進行細胞實驗。

二、 細胞冷凍

取得之 U937 細胞株經過常規繼代培養，可利用液態氮將細胞冷凍保存。細胞株大量培養後調整細胞數至 1×10^7 cells/mL，懸浮於 RPMI medium (RPMI 1640, 10 % FBS and 2 mM Glutamine) 中，取 0.9 mL 細胞液與 0.1 mL dimethyl sulfoxide (DMSO) 混合均勻，置入無菌冷凍小管中，標明細胞名稱、數目及日期。細胞冷凍採用慢速冷凍方式，先將細胞冷凍小管放入保溫鋼瓶中，以棉花固定冷凍小管，置於 -80 °C 冰箱隔夜，隔天取出細胞冷凍小管，移入液態氮鋼筒中保存，此法細胞株可保存數年。

貳、 分離人類周邊血液單核細胞 (Peripheral blood Mononuclear cell, MNC)

抽取 23 ± 2 歲健康成年男性血液至含有 heparin 抗凝血劑之真空採血管，取 20 mL 血液緩緩加入含有 20 mL Ficoll-PaqueTM Plus 溶液，(density = 1.077 g/mL) 之 50 mL 離心管上層，小心保持上下兩層界面，混免兩層溶液混合，以密度梯度離心原理，室溫下以 2000 rpm 離心 15 分鐘後，可見離心管中由上而下分為五層，分別為：黃色血漿 (plasma)、白色單核細胞 (mononuclear cell, MNC)、透明 Ficoll-Paque 溶液、多形核白血球層 (polymorphonuclear leucocyte, PMN) 及暗紅色紅血球及血小板。將最上層黃色血漿吸除後，以無菌滴管吸取收集白色單核細胞層，以等體積 HBSS 溶液混合均勻，以 1200 rpm 離心 10 分鐘，清洗兩次後去除上清液，以 RPMI medium (RPMI 1640, 10 % FBS and

2 mM Glutamine)懸浮單核細胞，調整細胞數至 1.5×10^6 /mL 備用。

參、製備條件培養液 (MNC-condition medium)

於無菌操作枱中，取 2 mL 上述 1.5×10^6 cells/mL 之人類單核細胞液 (MNC)，加入新鮮配製不同濃度且過濾後備用之白鳳豆凝集素供試液於 3 cm 培養皿中混合均勻。正控制組使用濃度為 10 μ g/mL 之植物凝集素 (phytohemagglutinin, PHA); 而控制組則加入 RPMI medium。置於 37 °C、6 % CO₂、95 % 相對溼度恆溫培養箱培養中培養一天後，收集各組培養液以 1000 rpm 10 分鐘離心，除去細胞及雜質，得到不同濃度樣品刺激人類單核細胞一天之無菌條件培養液 (MNC-CM)，貯存於 -20 °C 冰箱中保存。

肆、茯苓單核細胞條件培養液 (PCPS-MNC-CM) 間接抑制 U937 生長之試驗

U937 細胞於進行實驗前一天進行常規細胞繼代，維持細胞生長狀態處於對數生長期。將 U937 細胞數調整至 2×10^5 cells/mL，取 1 mL 細胞液與 0.6 mL (30 % v/v) 上述步驟收集之各組條件培養液 (控制組、對照組及 PHA 組)，再加入 0.4 mL 培養液混合，培養於 3 cm 培養皿中，置於 37 °C、5 % CO₂、95 % 相對溼度恆溫培養箱中培養。

培養五天後，將可能貼附在培養盤底部之細胞以橡膠刮片 (cell scraper) 輕輕刮下，利用錐藍染劑排除法 (trypan blue dye exclusion method) 計算生長抑制率。其原理為當細

胞受損或死亡，錐藍染劑可進入細胞內將細胞染色，於顯微鏡下觀察，可觀察到染為藍色的細胞，即為死細胞；若細胞生長良好且細胞膜完整無缺，錐藍染劑無法進細胞內染色，於顯微鏡下可觀察到細胞呈現晶亮透明狀態，以此法可計算出活細胞及死細胞之數目 (Maines et al., 1999)。利用實驗組與控制組細胞存活率之比較，可計算出細胞的生長抑制率 (growth inhibition %)。本實驗結果為重複三次之平均值。

伍、 茯苓單核細胞條件培養液 (PCPS-MNC-CM) 誘導 U937 分化之形態學變化分析

收集控制組及各個不同濃度處理組的細胞並計算其細胞數後，1000 rpm 離心 10 分鐘，倒去上清液，再以 PBS 溶液清洗一次，去除上清液後，加入含有 20% FBS 之 PBS 溶液將濃度調整成 1×10^6 cells/mL，吸取 80 μ L 出來，利用細胞離心製片機 (cytospin)，以 1000 rpm，5 分鐘將細胞打出固定於載玻片上，風乾後以 Liu's stain 染色法 (Liu A 30 秒；Liu B 2 分鐘) 染色。風乾後在顯微鏡下以 1000 倍放大觀察 100 顆細胞，並依照形態學特徵將其分化之程度區分為三級：

未成熟之單核母細胞 (immature blasts)

分化程度介於中間者 (intermediate)

分化成熟之單核球或巨噬細胞 (mature monocytes or macrophages)，然後計算其比例。

陸、 NBT 還原試驗

原理乃利用 Phorbol myristate acetate (PMA) 可刺激成熟的 Myeloid 細胞製造大量的過氧化物 (superoxide)，此過氧化物可以將水溶性黃色的 Nitroblue tetrazolium (NBT) 還原成為藍黑色沉澱之 Formazan，因此稱為「NBT 還原試驗」，其方法為：收集培養五天之 U937 細胞，將細胞濃度調整成 1×10^6 cells/mL，取出 0.5 mL 的細胞液至離心小管中，再加入 0.5 mL NBT 溶液 (內含 NBT 2 mg/mL 及 1 μ M PMA)，置於 37 °C、5 % CO₂、95 % 相對溼度恆溫培養箱培養中培養 2 小時後，取出 90 μ L 混合液，用細胞離心製片機 (cytospin) 把細胞打出固定在載玻片上風乾以 0.5% 紅色之 Safranin O 做為對照染色，然後在顯微鏡下觀察 100 顆細胞，計算含有藍黑色沉澱 Formazan 沉澱細胞所佔之比例即為 NBT 還原試之陽性率。

柒、 單核細胞條件培養液 (MNC-CM) 中細胞激素 IL-1 β 、IFN- γ 及 TNF- α 之含量測定

一、 使用套組

以下細胞激素酵素免疫套組由 R&D Systems (USA) 所購得。

human IL-1 β ELISA kit

human IFN- γ ELISA kit

human TNF- α ELISA kit

二、 使用試劑

1. Wash buffer

取 Wash buffer 濃縮液 20 mL ，以 DD H₂O 稀釋至 500 mL 備用。

2. Dilute buffer

取 Dilute buffer 濃縮液 20 mL ，以 DD H₂O 稀釋至 100 mL 備用。

3. Substrate solution

呈色基質液 A 與呈色基質液 B 必需以等體積相互混合均勻後，避光備用。

4. Stand dilute/diluent buffer

Stand powder 以 dilute buffer 復溶完全後，以 dilute buffer 進行序列式稀釋。

5. Conjugate solution

6. Stop solution

第四節 實驗方法

單核細胞條件培養液中細胞激素的測定為利用酵素連結免疫分析法 (enzyme-linked immunoassay, ELISA)。其原理為細胞激素抗体固定於 96 well ELISA plate 中，再加入含有抗原之檢體，利用抗原-抗體間的高親和性及高專一性來做結合，之後再加入與細胞激素 Conjugate 之二次抗體，二次抗體與抗體之間具有高度專一性及高度親和性，所以兩者會產生不可逆的鍵結，而二次抗體上又連結著經酵素標記的呈色基質，因此當加入呈色液與酵素反應，會產生有顏色的產物，經由光學密度(optical density)的測量，即可定抗原之量。

利用 antibody (細胞激素抗體) 被覆的 96 well ELISA plate 中每個 well 加入 50 μ L Assay diluent buffer，再加入 200 μ L 的標準品(先經 Standard dilute /diluent buffer 序列稀釋)及單核細胞條件培養液 (MNC-CM)，在室溫下反應 2 小時讓抗原與抗體連結。之後再以 wash buffer 清洗四次，將游離之抗原移除。接著再加入 cytokine conjugate solution 200 μ L/well 在室溫下靜置 1 小時。再以 wash buffer 清洗四次，吸乾 wash buffer 後，添加 200 μ L/well 的呈色基質液 (Color reagent A 與 Color reagent B 採 1:1 等體積混合)，避光反應 30 分鐘，最後加入 stop solution 50 μ L/well，停止呈色反應。以 ELISA reader 測定 450 nm 吸光值，並帶入由標準品所得到之標準曲線，求得細胞激素在單核細胞條件培養液中之含量。

第四章實驗結果

第一節基本資料

25 位大專角力運動員的基本資料如平均年齡 20.3 ± 1.4 歲(年齡 18-23 歲)，平均身高 170.1 ± 6.3 公分，淨體重 81.0 ± 11.8 公斤，由表一可以觀察到控制組與對照組的基本資料年齡、身高、體重、體脂肪、運動能力和血清蛋白皆無明顯差異；最大攝氧量部分控制組輕微低於對照組 ($P=0.022$)。

第二節脫水後的生理參數上的變化

由表二可以觀察到，控制組的體重減輕 4.52 ± 1.32 公斤，對照組的體重變化僅 0.23%。在體溫的變化部分控制組與對照組皆無顯著差異。血比容部分控制組脫水後 $48.6 \pm 1.2\%$ 與脫水前 $46.4 \pm 1.3\%$ 、對照組 $46.4 \pm 1.5\%$ 皆有顯著差異 ($p < 0.01$)。血清滲透壓部分控制組脫水後 301.6 ± 3.6 (mosmol/kg H_2O) 與脫水前 284.3 ± 3.6 (mosmol/kg H_2O)、對照組 285.5 ± 4.8 (mosmol/kg H_2O) 皆有顯著差異 ($p < 0.01$)。鈉離子部分控制組脫水後 154.3 ± 3.6 (mM) 與脫水前 147.4 ± 1.9 (mM)、對照組 149.7 ± 3.9 (mM) 皆有顯著差異 ($p < 0.01$)。鉀離子部分控制組前測 5.2 ± 0.3 (mM) 後側 5.1 ± 0.5 (mM) 對照組鈉離子前測 5.7 ± 0.6 (mM) 與後側

5.3±0.4(mM)皆無顯著差異。在尿液比重部分控制組脫水後 1.030±0.004 與脫水前 1.013±0.004、對照組 1.015±0.005 皆有顯著差異 ($p<0.01$)。在尿液滲透壓部分控制組脫水後 914±93.2(mosmol/kg H₂O)與脫水前 471.3±85.2(mosmol/kg H₂O)、對照組 466.4±77.5(mosmol/kg H₂O)皆有顯著差異 ($p<0.01$)。

第三節脫水後免疫學參數和對白血病 U937 的免疫調節作用的變化

由表三可知，在循環中的白血球細胞總數量，控制組後測的總數量為 $8.34\pm 0.92 \times 10^6$ per/ml 輕微高於控制組前測總數量 $7.45\pm 0.83 \times 10^6$ per/ml 與對照組後測總數量 $7.78\pm 1.04 \times 10^6$ per/ml ($p = 0.016$ and 0.013)。相同的是在單核球細胞總數量，控制組後測的數量也輕微高於控制組前測總數量與對照組後測總數量 ($p = 0.026$)。我們的實驗樣本中觀察到，在控制組的後測與前測或對照組間的血清中的細胞激素如干擾素 (IFN- γ)、腫瘤壞死因子 (TNF- α) 僅有微小的變化。以不同濃度茯苓多醣體與 MNC-CM 共同培養 (PCPS-MNC-CM, 1-30 $\mu\text{g/l}$) 24 小時之後，對人類白血病細胞 U937 之成長抑制率，由圖一可知在濃度 (PCPS, 15 $\mu\text{g/l}$) 時的控制組前測的 PRE-DE-PCPS-MNC-CM 達到最高 88.53% 抑制率。換言之當茯苓多醣體濃度增加到 (PCPS, 20-30 $\mu\text{g/l}$) 與人類白血病細胞 U937 之成長抑制率皆無法達到最高峰。在對照組的不同濃度

茯苓多醣體與 MNC-CM 共同培養的前測與後測 (PRE-EU-PCPS-MNC-CM 和 POST-EU-PCPS-MNC-CM) 對白血病細胞 U937 之成長抑制率獲得高度相似性曲線。然而控制組的 (POST-EU-PCPS-MNC-CM) 對人類白血病細胞 U937 之成長抑制率，在濃度 (PCPS, 25 $\mu\text{g}/\text{l}$) 時達到最高峰 88.65% 抑制率。我們將控制組與對照組的前測與後測的 PRE-DE-PCPS-MNC-CM、PRE-EU-PCPS-MNC-CM、POST-DE-PCPS-MNC-CM 與 POST-EU-PCPS-MNC-CM 於 (PCPS, 15 $\mu\text{g}/\text{l}$) 時與白血病細胞 U937 共同培養五天後經 NBT 的還原試驗，由表四我們可以得知，在對照組前測、後測與控制組的前測 NBT 的還原試驗值為 83-85% 之間；但控制組後測 NBT 的還原試驗值為 $63.7 \pm 4.7\%$ 與對照的 PHA-MNC-CM 經 NBT 的還原試驗值大約在 72.5% 且 U937 的生存能力大約在 94% 有正面價值顯示了實驗的可靠性。

第四節脫水後在 PCPS-MNC-CM 的 cytokines 分泌物的變動

眾所皆知 PCPS-MNC-CM 的 cytokines 的分泌物潛在作用是對未發育成熟的白血病細胞刺激分化。我們測量了血液單核細胞 (MNC) 中的 $\text{INF}\gamma$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IL-1}\beta$ 數值對於脫水後的免疫調節作用是否造成影響。 $\text{INF}\gamma$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 的 cytokines 分泌物是探測不到 PCPS 單獨和控制。比較細胞激素 $\text{INF-}\gamma$ 的存在於控制組前測值為 $612 \pm 84 \text{ pg}/\text{ml}$ ，對照組前

測值為 547 ± 76 pg/ml 與對照組後測值為 581 ± 89 pg/m 皆顯著高於控制組後測值為 354 ± 83 pg/ml. 由表五可發現在 TNF- α 和 IL-1 β 也獲得相同類似的趨向。控制組的後測值 INF γ 、TNF- α 和 IL-1 β 與對照組前後測值與控制組前測值皆有顯著差異。(p<0.01)

第五章 結論

這主題是將角力選手於比賽中的各種級別隨機分成對照組 (EU) 和控制組 (DE) 兩組。雖然控制組 (DE) 在重量上有較大的標準偏差，但這兩組的年齡、淨體重、身高、體脂率、運動能力或乳清蛋白水平皆沒有明顯的差異。在本研究的所有受試者身體狀況皆為健康的，乳清蛋白皆在正常範圍內，且未出現營養不良的狀況。在脫水後的裸身重量約減少了 4.5%，可視為體內水分的損失。在控制組 (DE) 脫水後的狀態下體重約損失 4-5%，呈現了更佳的的血球容積值以及血清滲透壓。對照組 (EU) 正常的血球容積值和血清滲透壓數值，在實驗後減重約 0.23%，可以呈現出對照組 (EU) 真實的狀態。在控制組 (DE) 脫水前與脫水後的血球密度和血清滲透壓兩者均有顯著的差異。因在實驗期間每位被實驗者的飲食和能量攝取皆受到領有證照的營養師妥善控制以作為個別化評估，我們認為體重的減失主要源自於水份的流失。

由勞倫斯 (Lawrence) 提到，可藉由判斷尿比重的範圍正常值約在 1.013 到 1.015 之間，在經歷 84 小時的脫水後，控制組 (DE) 後測比控制組 (DE) 前測與對照組 (EU) 前後測的尿比重以及尿滲透壓值都較大，這表示控制組的角力運動員有脫水的狀況。紅外線體溫量測是用來監視以及控制身體溫度是否在範圍內。暫且不管前後的脫水程序，讓對照組 (EU) 和控制組 (DE) 兩組都約保持在 37.0- 37.5°C 之間，這可防止免疫

系統受到熱而損傷。在(陳裕鏞, 2004)的研究顯示, 在 37°C 下培養的單核細胞壞死的比例較低。由(Mitchell 等人, 2002)指出雖然白血球數量在低程度脫水或低程度水和作用上無呈現差異。我們的數據顯示控制組脫水後白血球與單核球總數兩者皆有含糊不清的增加, 其中可能來自脫水造成血清濃度增加, 但是仍需要更多脫水的血清證據來加以證明。由表三可知, 在控制組(DE)脫水前與脫水後血清中的細胞因子 cytokines 幾乎相同(包含 IFN- γ 和 TNF- α), 因此我們可以假設脫水狀態並不會影響血清中細胞因子的分泌。

在控制的 U937 細胞所有樣本約有 94% 存活, 且無明顯差異。接受血液單核細胞與茯苓多醣體共同培養的培養液刺激後白血病 U937 細胞分化成熟而非直接被殺死。已知茯苓多醣體有促進免疫調節作用; 為了說明無熱壓力的脫水對血液單核細胞的免疫調節作用, 在各組一起隔離培養血液單核細胞與茯苓多醣體共同培養。對於血液單核細胞與茯苓多醣體共同培養的免疫調節作用將決定於每個實驗對象的人體免疫狀態而定。通常情況下可以得到先天的免疫調節作用, 於各種濃度的茯苓多醣體劑量控制 U937 細胞之間生長抑制。在目前數據中, 在控制組(DE)和對照組(EU)實驗的前測以及對照組(EU)實驗的後測, 茯苓多醣體濃度約在 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 達到 U937 細胞生長抑制率的最高狀態; 此外, 控制組(DE)脫水後的血液單核細胞經 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 茯苓多醣體的刺激處理 U937 細胞可觀察到 U937 生長抑制率明顯降低。在控制組(DE)實驗的後測中發現茯苓多醣體約在 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 達到 U937 細胞生長抑制率的最高狀態。每個實驗對象藉由植物凝集素(PHA)取

代茯苓多醣體與血液單核細胞的正面對照並進行監測，以驗證在本試驗的測試系統的正常性，結果 U937 細胞生長抑制率有類似的曲線。我們可以假設，脫水狀態可能導致對 U937 細胞生長抑制率的效應下降。控制的主要來源是茯苓多醣體免疫調節作用促使白血病細胞 U937 本身的分化，而不是直接殺死白血病細胞 U937 本身。在誘導分化期間 U937 藉由茯苓多醣體與血液單核細胞培養(PCPS-MNC-CM)發展；分化成熟的 U937 細胞能形成過氧化物，由此可見更多的 NBT 還原試驗成紫色結晶 formazan，在本研究中也獲得證實，由表四可得知。雖然所有經過茯苓多醣體與血液單核細胞培養(PCPS-MNC-CM) 在控制組(DE)後測比起控制組(DE)和對照組(EU)實驗的前測以及對照組(EU)實驗的後測於茯苓多醣體濃度 15 μ g/ml 共同培養後的 U937 細胞經 NBT 還原試驗明顯降低。提供了另一項證據在脫水狀態下降低了免疫調節作用。

白血病細胞潛在的分化誘導影響主要來自茯苓多醣體與血液單核細胞培養(PCPS-MNC-CM)。由於茯苓多醣體與血液單核細胞培養(PCPS-MNC-CM)的細胞因子分泌促使 U937 成熟，這也是眾所皆知。換句話說，茯苓多醣體與血液單核細胞培養(PCPS-MNC-CM)細胞因子的分泌量代表了免疫責任。為解決此問題，將(PCPS-MNC-CM)裡分泌的細胞因子利用酵素連結免疫分析法 (enzyme-linked immunoassay, ELISA) 分析被藏匿的細胞因子。在控制組(DE)後測比起控制組(DE)和對照組(EU)實驗的前測以及對照組(EU)實驗的後測在相同濃度的茯苓多醣的免疫調節下，測得脫水後明顯較低的細胞因子分泌；特別是 INF- γ , IL-1 β 和 TNF- α 的分泌

量。在過熱練習和被動的過熱狀態中，藉由激脂多醣(LPS)或植物凝集素(PHA)的刺激實驗中，相似的現象在白血球的分泌物也被觀察到。

這是值得注意的，藉由細胞因子試驗證實了三個關鍵的細胞因子在治療白血病細胞 U937 分化成熟的直接關係。可以推定在脫水情況下，MNC 分泌較少的三個關鍵的細胞因子，導致白血病 U937 細胞的成熟和生長抑制曲線兩者都較低。由表三可知，雖然單核細胞與白血球總數在脫水狀態，有較高的不明確表示，它可被視為影響脫水的濃縮血清量。由表五可知，在相同條件下，例如：相同數量的單核細胞在相同濃度的茯苓多醣刺激，可以得知在脫水狀態下單核細胞的細胞激素分泌較低。

總之，在男大學角力運動員在無熱壓力下脫水後，藉由茯苓多醣體與單核球(MNC)共同培養後會促使細胞因子分泌(INF- γ , IL-1 β 和 TNF- α)，在刺激白血病細胞 U937 分化成熟可以顯示 1.生長抑制率的顯著下降 2.NBT 還原試驗的顯著降低 3.細胞因子分泌顯著減少等免疫調節的反應下降。

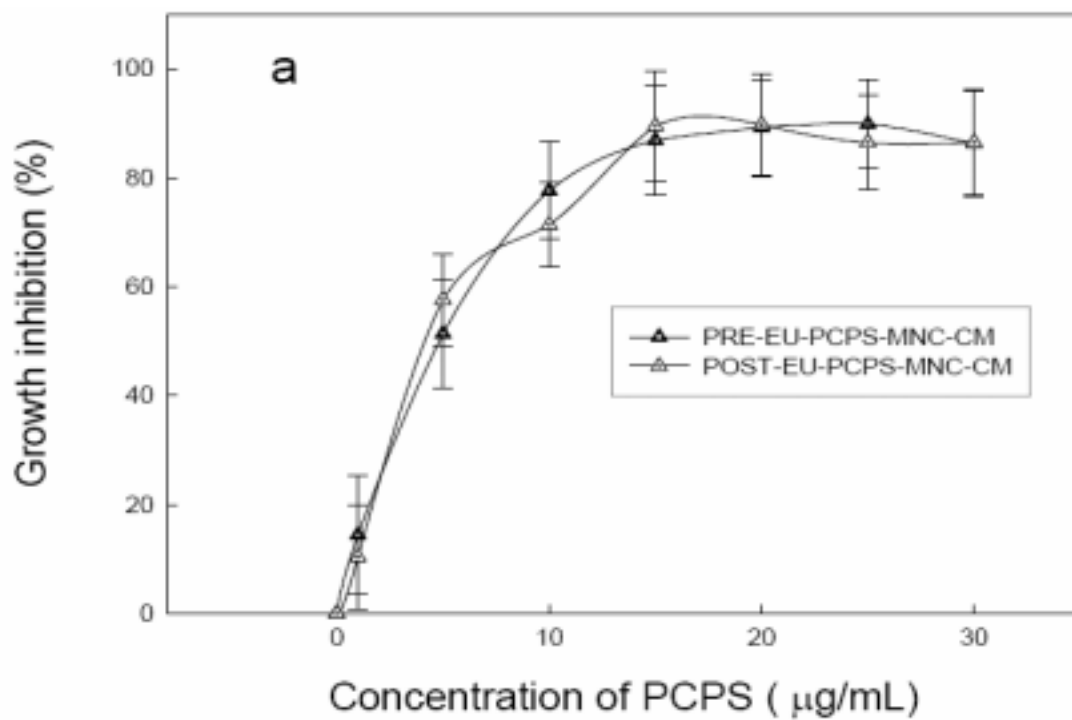


圖 2-a 在無熱壓力下無脫水減重的 PCPS-MNC-CM，對 U937 細胞存活率之影響

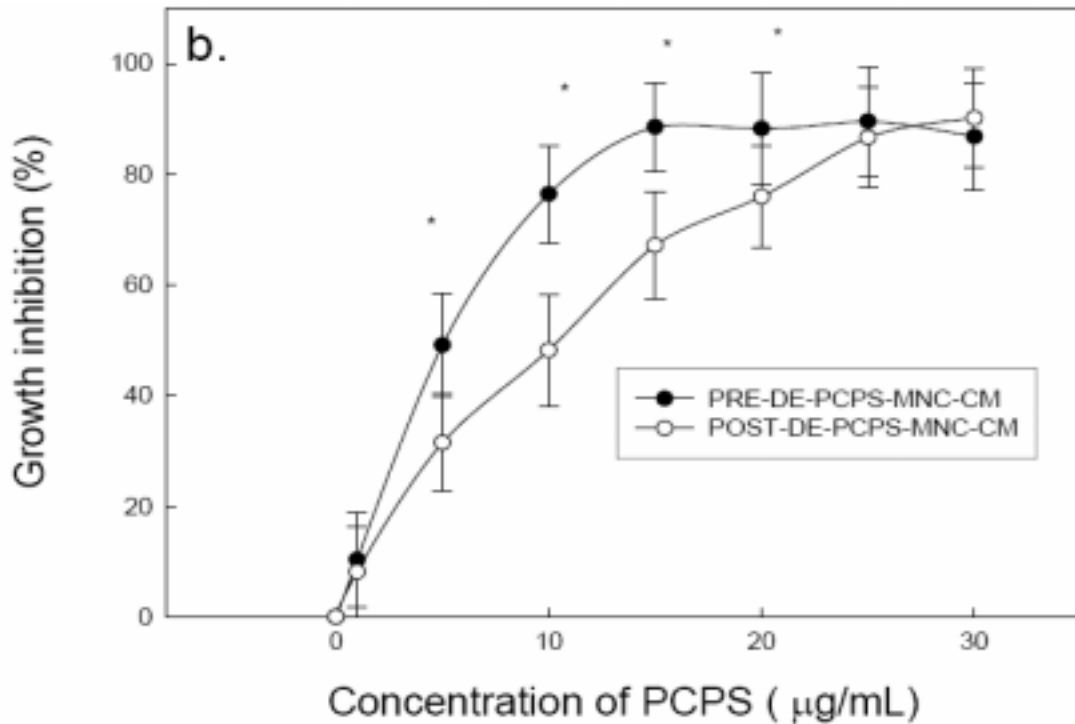


圖 2-b 在無熱壓力下脫水減重的 PCPS-MNC-CM，對 U937 細胞
存活率之影響

Growth inhibition (%) of U937 cells incubated with MNC-CM prepared with various levels of polysaccharide from *Poria cocos* (PC-PS) in euhydration group (EU) (a) and in dehydration group (DE) (b). Leukemic cells (1×10^5 cells/ml) were incubated in the presence of 20% MNC-CM and vial cells were counted after 5 days of cultivation. PC-PS-MNC-CMs were prepared after 5 day of cultivation of human peripheral

blood mononuclear cells with various levels of PC-PS. Bars in the figure represent standard error of means from three separate experiments.

表 1 基本資料 (Characteristics and physiological parameters of subjects)

	DE (n = 13)	EU (n = 12)
Age (years)	20.8 ± 1.4	19.8 ± 1.3
Height (cm)	170.9 ± 6.2	169.3 ± 6.6
Naked Weight (kg)	82.1 ± 11.7	78.7 ± 12.3
Body Fat (%)	15.9 ± 8.7	14.5 ± 7.1
VO₂peak (ml/[kg x min])	43.5 ± 3.6	47.3 ± 4.2
Serum Albumin (g/dl)	4.6 ± 0.8	4.4 ± 0.7

DE , dehydration group. EU, euhydration group. VO₂peak (ml/[kg x min]), peak volume of O₂consumption. One-way analysis of variance was used for comparison between various groups. *p < 0.05 means significant difference in comparison to the sedentary control group.

表 2 脫水前後的生理參數上的變化 (Changes in physiological parameters before and after dehydration program)

	Pre-dehydration		Post-dehydration	
	DE (n = 13)	EU (n = 12)	DE (n = 13)	EU (n = 12)
Naked body weight loss (%)	-----	-----	4.52±1.32*	0.23±0.31
Tympanic body temperature (°C)	37.2±0.3	37.4±0.4	37.1±0.4	37.5±0.4
Hematocrit (%)	46.4±1.3	46.2±1.4	48.6±1.2*	46.4±1.5
Serum Osmolality (mosmol/kg H ₂ O)	284.3±3.6	283.2±5.2	301.6±3.6*	285.5±4.8
Serum [Na ⁺] (mM)	147.4±1.9	148.5±2.6	154.3±3.6*	149.7±3.5
Serum [K ⁺] (mM)	5.2±0.3	5.1±0.5	5.7±0.6	5.3±0.4
Urinary specific gravity	1.013± 0.004	1.014±0.003	1.030±0.004*	1.015±0.005
Urinary osmolality (mOsm/kg H ₂ O)	471.3±85.2	439.8±71.6	914±93.2*	466.4±77.5

DE , dehydration group. EU, euhydration group.
 Pre-dehydration, the status before dehydration program.
 Post-dehydration, the status after dehydration program.
 One-way analysis of variance was used for comparison between various groups. *p < 0.05 means significant difference in comparison to the euhydration group.

表 3 脫水前後在免疫細胞與 cytokines 分泌物的變動 (Changes in immune cells and cytokines before and after dehydration program)

	Pre-dehydration		Post-dehydration	
	DE	EU	DE	EU
	(n = 13)	(n = 12)	(n = 13)	(n = 12)
Total white count (10 ⁶ per/ ml)	7.45±0.83	7.61±0.91	8.34±0.92	7.28±1.10
MNC (10 ⁶ per/ ml)	2.62±0.47	2.71±0.51	3.04±0.46	2.85±0.58
IFN- γ (pg/ml)	45±27	36±22	38±19	27±18
TNF- α (pg/ml)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

DE , dehydration group. EU, euhydration group.

Pre-dehydration, the status before dehydration program.

Post-dehydration, the status after dehydration program. MNC, mononuclear cells. One-way analysis of variance was used for comparison between various groups.

* $p < 0.01$ means significant difference in comparison to the euhydration group.

表 4 脫水前後對白血病 U937 作用的特徵變化 (The characteristics of Treated U937 leukemia cells)

Induction treatment	NBT reduction in Treated U937 (%)	The viability in Treated U937 (%)
Control	3.4±2.9	95.5±3.1
PCPS-alone	4.6±2.5	93.2±4.3
PBS-MNC-CM	12.3±4.2	95.1±3.7
PRE-DE-PCPS-MNC-CM	84.6±5.2	94.7±4.5
POST-DE-PCPS-MNC-CM	63.7±4.7*	93.8±3.6
PRE-EU-PCPS-MNC-CM	85.2±3.8	94.5±3.9
POST-EU-PCPS-MNC-CM	83.8±4.4	95.1±3.3
PHA-MNC-CM	72.5±5.2	94.4±3.8

PBMNC (Peripheral Blood Mononuclear cells) isolated from normal health adults were incubated with 1×10^5 cells/ml initially in combined with PC-PS (15 $\mu\text{g/ml}$) at 37 °C for 5 days. The MNC-CM from DE group at pre-dehydration termed as PRE-DE-PCPS-MNC-CM and that of at post-dehydration as POST-DE-PCPS-MNC-CM. EU group at pre-dehydration termed as PRE-EU-PCPS-MNC-CM, and that of at post-dehydration as POST-EU-PCPS-MNC-CM. PHA-MNC-CM,

positive control group (phytohemagglutinin 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Data averaged from these separate experiments were expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.01$ means significant difference in comparison to the euhydration group.

表 5 脫水前後在 PCPS-MNC-CM 的 cytokines 分泌物的變動 (The cytokines secretion in PCPS-MNC-CM from DE and EU at pre-term and post-term of dehydration)

Induction treatment	INF- γ (pg/ml) secretion in MNC-CM	TNF- α (pg/ml) secretion in MNC-CM	IL-1 β (pg/ml) secretion in MNC-CM
Control	N.D.	N.D.	N.D.
PC-PS-alone	N.D.	N.D.	N.D.
PBS-MNC-CM	16 \pm 15	142 \pm 63	113 \pm 71
PRE-DE-PCPS-MNC-CM	612 \pm 84	1142 \pm 73	719 \pm 98
POST-DE-PCPS-MNC-CM	354 \pm 83*	762 \pm 96*	412 \pm 112*
PRE-EU-PCPS-MNC-CM	547 \pm 76	1272 \pm 85	691 \pm 74
POST-EU-PCPS-MNC-CM	581 \pm 89	1214 \pm 102	682 \pm 95
PHA-MNC-CM	884 \pm 79*	1002 \pm 78*	851 \pm 68*

PBMNC (Peripheral Blood Mononuclear cells) isolated from normal health adults were incubated with 1×10^5 cells/ml initially in combined with PC-PS (15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 5 days. The MNC-CM from DE group at pre-dehydration termed

as PRE-DE-PCPS-MNC-CM and that of at post-dehydration as POST-DE-PCPS-MNC-CM. EU group at pre-dehydration termed as PRE-EU-PCPS-MNC-CM, and that of at post-dehydration as POST-EU-PCPS-MNC-CM. PHA-MNC-CM, positive control group (phytohemagglutinin 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The conditioned media were then collected and assayed for the activity of TNF- α and IFN- γ . Data averaged from these separate experiments were expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.01$ means significant difference in comparison to the euhydration group.

參考文獻

中文部分

- 林璧鳳、江伯倫譯 (2006)。基礎免疫學 (免疫系統的功能和異常)。台灣：藝軒圖書出版社。
- 何敏夫 (2001)。血液學。台灣：藝軒出版社。
- 李素文 (2002)。細胞生物學實驗手冊。台北：九州圖書文物有限公司。
- 陳裕鏞 (2004)。茯苓經由調節免疫對抗人類白癌細胞株及肝癌細胞株 HepG2/A2 中 B 型肝炎病毒的 HBsAg 抗原表現之作用。博士論文，國立台灣大學，台北。
- 廖慧芬 (2002)。黑大豆活性多醣體之分析及其經由調節免疫提升造血功能與抑制腫瘤生長之研究。博士論文，國立陽明大學，台北。
- 馬嘉贛 (2003)。黃連誘導 U937 細胞株行細胞凋亡之機制探討及對 BALB/CJ 公鼠之免疫調節作用。博士論文，國立台灣大學，台北。
- 徐麗嵐 (2002)。以柳松菇與鴻喜菇誘導人類白血病細胞 (U937) 分化及對 Balb/c 鼠皮下移植 CT26 腫瘤之抑制效果。碩士論文，國立台灣大學，台北。

- 王韻寧 (2004)。黑豆浸泡液誘導人類白血病細胞株 (U937) 分化之分析及對 Balb/c 鼠皮下移植 CT26 腫瘤之抑制效果。碩士論文，國立台灣大學，台北。
- 歐馨婷 (2001)。多種蔬菜抑制人類白血病細胞 (U937) 增殖與誘導其分化之探討。碩士論文，國立台灣大學，台北。
- 陳宣諭 (2004)。巴西洋菇對人類白血病 U937 細胞生長抑制機制及對 Balb/c 鼠尾靜脈注射 CT26 細胞之腫瘤轉移抑制效果。碩士論文，國立台灣大學，台北。
- 林念蓁 (2006)。巴西洋菇發酵物對 Balb/c 鼠之非特異性免疫調節及其免疫調節蛋白純化與生理活性之探討。碩士論文，國立台灣大學，台北。
- 龔浩瑄 (2006)。黑豆免疫活性物質對人類單核細胞之免疫調節作用及其對人類白血病細胞株 U937 之生長抑制。碩士論文，國立台灣大學，台北。
- 宮華婷 (2006)。初乳之免疫調節作用及對人類白血病細胞 U937 之抑制效果。碩士論文，國立台灣大學，台北。
- 張佳惠 (2005)。愛玉瘦果中多胜肽區分之抗腫瘤及免疫調節作用。碩士論文，國立台灣大學，台北。
- 陳裕仁 (1995)。冬蟲夏草抑制人類白血病細胞增殖與誘導其分化之作用。碩士論文，國立陽明大學，台北。
- 藍以政 (1998)。血液疾病簡介。內科新知。

英文部分

- Armstrong LE, Herrera Soto JA, Hacker FT, Casa DJ, Kavouras SA, Maresh CM. (1998) .*Urinary indices during dehydration, exercise, and rehydration*. Int J Sport Nutr 8: 345-355.
- Akagawa K. (1994) .*Differentiation and function of human monocytes*. Hum Cell 7: 116-120 Links.
- Ault KA, Springer TA. (1981) . *Cross-reaction of a rat-anti-mouse phagocyte-specific monoclonal activity (anti-mac-1) with human monocytes NK cells*. J Immunol 126(1): 359-364.
- Ajit Sodhi, Shikha Tarangand Varun Keshewani. (2007) .*Concanavalin A induced expression of Toll-like receptors in murine peritoneal macrophages in vitro*. Int Immunopharmacol. Apr; 7(4): 454-63.
- Baehner RL, Nathan DG. (1968) .*Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease*. N Engl J Med. 278: 971-976.
- Chen YY, Chang HM. (2004) .*Antiproliferative and differentiating effects of polysaccharide fraction from fu-ling (Poria cocos) on human leukemic U937 and HL-60 cells*. Food Chem Toxicol 42(5): 759-769.
- Chen YJ, Shiao MS, Lee SS, Wang SY. (1997) .*Effect of Cordyceps sinensis on the proliferation differentiation of human leukemic U937 cells*. Life

- Sci 60(25): 2349-2359.
- Chen YJ, Huang AC, Chang HH, Liao HF, Jiang CM, Lai LY, Chan JT, Chen YY, Chiang J. (2009). *Caffeic acid phenethyl ester, an antioxidant from propolis, protects peripheral blood mononuclear cells of competitive cyclists against hyperthermal stress.* J Food Sci 74: 162-167.
- Downing JF, Martinez-Valdez H, Elizondo RS, Walker EB, Taylor MW.(1988). *Hyperthermia in humans enhances interferon-gamma synthesis and alters the peripheral lymphocyte population.* J Interferon Res 8: 143-150.
- Dinarello CA. (1991). *Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism.* Blood 77(8): 1627-1752.
- Dexter TM, Heyworth CM. (1994). Growth factors and molecular control of hematopoiesis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 13 (2): 3-8.
- Francesconi RP, Hubbard RW, Szlyk P, Schnakenberg D, Carlson D, Leva N, Sils I, Hubbard L, Pease V, Young J, Moore D. (1987). *Urinary and hematologic indexes of hypohydration.* J Appl Physiol 62: 1271-1276.
- Fujimiya Y, Kobori H, Oshiman K, Soda R, Ebina T. (1998). *Tumoricidal activity of high molecular weight polysaccharides derived from Agaricus blazei via oral administration in the mouse tumor model.* Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi 45(4): 246-252.

- Fujimiya Y, Suzuki Y, Oshiman KI, Kobori H, Moriguchi K, Nakashima H, Matumoto Y, Takahara S, Ebina T, Katakura R. (1998) .*Selective tumoricidaleffect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycete, Agaricus blazei Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis*. Cancer Immunol Immunother 46(3): 147-159.
- Goyert SM, Ferreo EM, Seremetis SV, Winchester RJ, Silver J, Mattison AC. (1986) .*Biochemistry expression of myelomonocytic antigens*. J Immunol 137(12): 3909-3914.
- Hoelzer DF. (1993) .*Therapy of the newly diagnosed adult with acute lymphoblastic leukemia*. Hematol Oncol Clin North Am 7(1):139-160.
- Honma Y, Tobe H, Makishima M, Yokoyama A, Okabe-Kado J. (1998) .*Induction of differentiation of myelogenous leukemia cells by humulone, a bitter in the hop*. Leuk Res 22(7): 605-610.
- Izawa S, Inoue Y. (2004) .*A screening system for antioxidants using thioredoxin-deficient yeast; discovery of thermostable antioxidant activity from Agaricus blazei Murill*. Appl Microbiol Biotechnol 64(4): 537-542.
- Janeway CA, Travers P. (1996) .*Immunobiology*. Garland Publishing Inc. New york.
- Jeon KS, Na HJ, Kim YM, Kwon HJ. (2005) .*Antiangiogenic*

activity of 4-O-methylgallic acid from Canavalia gladiata, a dietary legume. Biochem Biophys Res Commun. May 20;330(4):1268-74.

Jimenez C, Melin B, Savourey G, Launay JC, Alonso A, Mathieu J. (2007) .*Effects of passive hyperthermia versus exercise-induced hyperthermia on immune responses: hormonal implications.* Eur Cytokine Netw 18: 154-161.

Joachim A, Dulmer N, Dauqschies A. (1999) .*Differentiation of two Oesophagostomum spp. from pigs, O. dentatum and O. quadrispinulatum, by computer-assisted image analysis of fourth-stage larvae.* Parasitol Int. 48(1): 63-71.

Jordinson M, Deprez PH, Playford RJ, Heal S, Freeman TC, Alison M, Calam J. (1996) .*Soybean lectin stimulates pancreatic exocrine secretion via CCK-A receptors in rats.* American Journal of Physiology 207:653-9.

Julio E, Angela R, Manuel AO, Antonio M, Jose AF. (2000) .*Purification and characterization of a mannan binding lectin specifically expressed in corms of saffron plant (crocus sativus L.).* Journal of Agricultural and Food Chemistry 48:457-63.

Kaushansky K, Lin N, Adamson JW. (1988) .*Interleukin-1 stimulates fibroblasts to synthesize granulocyte-macrophage and granulocyte colony-stimulating factors. Mechanism for the*

- hematopoietic response to inflammation. J Clin Invest* 81(7): 92-97.
- Kenefick RW, Maresh CM, Armstrong LE, Riebe D, Echegaray ME, Castellani JW. (2007) .*Rehydration with fluid of varying tonicities: effects on fluid regulatory hormones and exercise performance in the heat. J Appl Physiol* May; 102:1899-1905.
- Keshewani V, Sodhi A. (2007) .*Differential activation of macrophages in vitro by lectin Concanavalin A, Phytohemagglutinin and Wheat germ agglutinin: production and regulation of nitric oxide. Nitric Oxide.* Mar;16(2):294-305.
- Kinningham RB, Gorenflo DW. (2001) . *Weight loss methods of high school wrestlers. Med Sci Sports Exerc* 33: 810-813.
- Kuby J. (2002) .*Immunology. 4th ed.* W. H. Freeman Co., New York.
- Lawrence E, Armstrong, CM, Maresh, CV, Gabaree, JR, Hoffman SA, Kavouras, RW, Kenefick, JW, Castellani and Lynn E. (1997) .*Ahlquist Thermal and circulatory responses during exercise effects of hypohydration, dehydration, and water intake. J Appl Physiol* 82: 2028-2035.
- Legdeur MC, Bontje PM, Ossenkoppele GJ, Beelen RH, van de Loosdrecht AA, Broekhoven MG, Langenhuijsen MM, Thijsen SF, Hofstee H, Schuurhuis GJ. (1996) .*The*

- role of BCL-2 and bax protein in monocyte-mediated apoptosis in human leukemic cell lines. Exp Hematol 24(13): 1530-1539.*
- Lieu CW, Lee SS, Wang SY. (1992) .*The effect of Ganoderma lucidum on induction of differentiation in leukemic U937 cells. Anticancer Res 12(4): 1211-1216.*
- Lis H, Sharon N. (1989) . Lectins. *Chapman and Hall*. New York U.S.A. Liu F, Ooi VEC, Chang ST. 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sciences 60:763-71.*
- Lotem J, Sachs L. (1987) .*Regulation of cell-surface receptors for hematopoietic differentiation-inducing protein MGI-2 on normal and leukemic myeloid cells. Int J Cancer 40(4): 532-539.*
- Mitchell JB, Dugas JP, McFarlin BK, Nelson MJ. (2002) .*Effect of exercise, heatstress, and hydration on immune cell number and function. Med Sci SportsExerc 34: 1941-1950.*
- Murakami, T ; Kohno, K ; Kishi, A ; Matsuda, H ; Yoshikawa, M. (2000) .*Medicinal Foodstuffs. XIX. Absolute Stereostructures of Canavalioid, a New Ent-Kaurane-Type Diterpene Glycoside, and Gladiosides A1, A2, A3, B1, B2, B3, C1, and C2, New Acylated Flavonol Glycosides, from Sword Bean, the Seeds of Canavalia gladiata" Chem. Pharm. Bull.48(11): 1673-80.*

- Margarito MC, Edgar Z, Felix C. (2001) .*Purification and charactrtization of a galactose-specific lectin from corn (Zea mays) coleoptyle*. Biochimica et Biophysica Acta 1568:37-44.
- Mody R, Joshi S, Chaney W. (1995) .*Use of lectin as diagnostic and therapeutic tools for cancer*. Journal pharmacy. Toxicol. Methods 33:1-10.
- Munker R, Koeffler HP. (1987).*Tumornecrosis factor: recent advances*. Klin Wochenschr 65(8): 345-52.
- Naoto S, Irwin JG, Els JMVD, Willy JP. (1988) .*Binding properties of a mannose-specific lectin from the snowdrop (galanthus nivalis) bulb*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 263:728-34.
- Nagata J, Higashiuesato Y, Maeda G, Chinen I, Saito M, Iwabuchi K, Onoe K. (2001) .*Effects of water-soluble hemicellulose from soybean hull on serum antibody levels and activation of macrophages in rats*. J Agric Food Chem 49(10): 4965-4970.
- Niess AM, Fehrenbach E, Lehmann R, Opavsky L, Jesse M, Northoff H, Dickhuth HH. (2003) .*Impact of elevated ambient temperatures on the acute immune response to intensive endurance exercise*. Eur J Appl Physiol 89: 344-351.
- Ohira Y, Girandola RN, Simpson DR, Ikawa S. (1981) .*Responses of leukocytes and other hematologic parameters to thermal dehydration*. J

- Appl Physiol 50: 38-40.
- Ohno N, Furukawa M, Miura NN, Adachi Y, Motoi M, Yadomae T. (2001). *Antitumor β -glucan from the cultured fruit body of Agaricus blazei*. Biol Pharm Bull 24(7): 820-828.
- Onozki K, Urawa H, Tamatani T, Iwamura Y, Hashimoto T, Baba T. (1988) . *Synergistic interactions of interleukin 1, interferon-beta, and tumor necrosis factor in terminally differentiating a mouse myeloid leukemic cell line (MI). Evidence that interferon-beta is an autocrine differentiating factor*. J Immunol 140(1): 112-119.
- Penkman MA, Field CJ, Sellar CM, Harber VJ, Bell GJ. (2008) . *Effect of hydration status on high-intensity rowing performance and immune function*. Int J Sports Physiol Perform 3: 531-546.
- Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE. (1987) . *Interferons and their actions*. Annu Rev Biochem 56: 727-777.
- Peumans WJ, Vandamme EMJ. (1995) . *Lectin al plant defence proteins*.
In: Puzstai A, Bardocz S, editors. *Lectin: biomedical perspectives*. (1996) . *Taylor and Francis*. London p 1-21.
- Popowski LA, Oppliger RA, Lambert GP, Johnson RF, Johnson AK, Gisolfi CV. (2001) . *Blood and urinary measures*

- of hydration status during progressive acute dehydration. Med Sci Sports Exerc 33: 747-753.*
- Powrie F, Coffman RL. (1993) .*Cytokine regulation of T-cell functiona potential therapeutic intervention. Immunology Today 14(6): 270-274.*
- Pujol-Borrell R, Todd I, Doshi M, Bottazzo GF, Sutton R, Gray D, Adolf GR, Feldmann M. (1983) .*HLA-DR class II induction in human islet cells by interferon-gamma plus tumor necrosis factor or lymphotoxin. Nature 326(6110): 304-306.*
- Ralph P, Harris PE, Punjabi CJ, Welte K, Litcofsky PB, Ho MK, Rubin BY, Moore MA, Springer TA. (1983) .*Lymphokine inducing terminal differentiation of the human monoblast leukemia line U937: a role for interferon- γ . Blood 62(6): 1169-1175.*
- Robinson JL, Seal RF, Spady DW, Joffres MR. (1998) .*Comparison of esophageal, rectal, axillary, bladder, tympanic, and pulmonary artery temperatures in children. J Pediatr 133: 553-556.*
- Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL, Bloom BR. (1991) .*Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clone. Sci 254(5029): 279-282.*
- Sharon N, Lis H. (1989) .*Lectins as cell recognition molecules. Science. Oct 13; 246(4927):227-34.*

- Shephard RJ. (2002) .*Exercise under hot conditions: a major threat to the immune response?*J Sports Med Phys Fitness 42: 368-378.
- Tamatani T, Kimura S, Hashimoto T, Onozaki K. (1989) .*Purification of guinea pig tumor necrosis factor (TNF): comparison of its antiproliferative and differentiative activities for myeloid leukemic cell lines with those of recombinant human TNF.* J Biochem 105(1): 55-60.
- Takaku T, Kimura Y, Okuda H. (2001) .*Isolation of an antitumor compound from Agaricus blazei Murill and its Mechanism of action.* J Nutr 131(5): 1409-1413.
- Taloret TPN, Isoda H, Maekawa T. (2002) . *Agaricus blazei (Class Basidiomycotina) aqueous extract enhances the expression of c-Jun protein in MCF7 cells.* J Agric Food Chem 50(18): 5162-5166.
- Takimoto H, Wakita D, Kawaguchi K, Kumazawa Y. (2004) .*Potentiation of cytotoxic activity in naive and tumor-bearing mice by oral administration of hot-water extracts from Agaricus brazei fruiting bodies.* Biol Pharm Bull 27(3): 404-406.
- Vassalli P. (1992) .*The pathophysiology of tumor necrosis factors.* Allergy 58(8): 727-9.
- Wang HX, Ng TB, Ooi VE, Liu WK, Chang ST. (1996) .*A polysaccharide-peptide complex from cultured mycelia of the mushroom Tricboloma mongolicum*

- with immunoenhancing and antitumor activities.*
 Biochem Cell BIOL 74(1): 95-100.
- Wang SY, Hsu ML, Hsu HC, Tzeng CH, Lee SS, Shiao MS, Ho CK. (1997) .*The anti-tumor effect of Ganoderma lucidum is mediated by cytokines released from activated macrophages Tlymphocytes.* Int J Cancer 70: 699-705.
- Wright SC, Kumar P, Tam AW, Shen N, Varma M, Larrick JW. (1992) .*Apoptosis and DNA fragmentation precede TNF-induced cytolysis in U937 cells.* J Cell Biochem 48(4): 344-355.
- Yamanaka H, Hagiwara K, Kirisawa R, Iwai H. (2003) .*Proinflammatory cytokines in bovine colostrum potentiate the mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells from newborn calves through IL-2 and CD25 expression.* Microbiol Immunol 47(6): 461-468.
- Yoneda K, Ueta E, Yamamoto T, Osaki T. (1991) .*Immunomodulatory effects of sizofiran (SPG) on lymphocytes and polymorphonuclear leukocytes.* Clin Exp Immunol 86: 229-235.
- Yuji K, Sadaji T, Koichi M, Tsutomu S, Sadao G. (2001) .*Agallic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells.* Cancer Letters 34:7-13.
- Yuan-Feng Lin, Horng-Mo Lee, Sy-Jye Leu, Yu-Hui Tsai.

(2007) .*The essentiality of PKC α and PKC β translocation for CD14⁺ monocyte differentiation towards macrophages and dendritic cells, respectively.* Reseach Article.

Zhong M, Tai A, Yamamoto I. (2005) .*In vitro augmentation of natural killer activity and interferon-gamma production in murine spleen cells with Agaricus blazei fruiting body fractions.* Biosci Biotechnol Biochem. 2005 Dec;69(12):2466-9.