行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：添加 Arginine 之全靜脈營養對敗血症老鼠營養素代謝及免疫功能之影響（II）
Effects of Parenterally Infused L-Arginine Supplemented Solution on Nutrients Metabolism and Immune Function in Septic Rats（II）

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC-89-2314-B-002-526

執行期間：88 年 8 月 1 日 90 年 7 月 31 日

第二年計畫執行期間：89 年 8 月 1 日 90 年 7 月 31 日

計畫主持人：陳維昭

執行單位：台大醫學院外科

中華民國九十年十月十五日

中文摘要

本研究的目的在探討全靜脈營養(TPN)溶液中添加 Arginine(Arg)，對敗血症發生之早期及晚期營養素代謝及免疫功能之影響。本實驗使用體重 200-250g 之雄性 Wistar 大白鼠，進行頸靜脈插管後將老鼠分為 Arg 組及 Glycine (Gly)組，完全由 TPN 供給營養，添加量分別為 3.15 公克 Arg/公升及 5.43 公克 Gly/公升 TPN 溶液，如此可使兩組給予之必需胺基酸完全相同，並使兩組輸入之 TPN 為等熱量等氮量，TPN 溶液之熱量濃度為 1 kcal/mL，氮供應量為 270mg/kg 體重/天，氮與熱量比為 1：143，TPN 輸入 5 天後以盲腸穿刺及結紮手術(CLP)引發敗血症。在敗血症後的 2、4、6 及 24 小時各時間點犧牲老鼠，取腹腔動脈血及腹水供分析用。並收集 TPN 最後兩天及 CLP 後 24 小時之尿液做氮平衡之分析。結果顯示在氮平衡方面，CLP 前 Arg 組及 Gly 組呈現正氮平衡，而 CLP 後兩組之間均呈現負氮平衡，但 2 組間皆無統計上之差異。在血中胺基酸組成方面，Arg 組血中 Arg 濃度顯著比 Gly 組高。在支鏈胺基酸(BCAA)方面，在 CLP 後 2 小時 Gly 組之 valine 濃度比 Arg 組高，但在其他各時間點 2 組的 BCAA 濃度皆無差異，CLP 後 2 及 24 小時時血中 alanine(Ala)的濃度在 Arg 組皆比 Gly 組高，表示在 CLP 後 Arg 組肌肉組織分解較明顯，且分解所產生之 BCAA 快速轉變成 Ala，而 Ala 經 Alanine cycle 可轉變成葡萄糖供身體在異化作用時使用，所以認為 Arg 組的敗血症老鼠肌肉組織的異化作用較 Gly 組明顯。在淋巴球之 T 細胞分佈方面，Arg 組之 CD4/CD8 比例在 24 小時時比 Gly 組高。腹水中之 cytokine 部份在 CLP 後 6 小時 interleukin-1β及 tumor necrosis factor -α的濃度 Gly 組高於 Arg 組，interleukin-6 的濃度在 24 小時時 Gly 組亦是高於 Arg 組。血中及腹水中 nitric oxide 的濃度在 CLP 後 4 小時時 Arg 組皆比 Gly 組高且有統計上之差異。此結果顯示與添加 Gly 組相較，TPN 溶液中添加 Arg 可減少敗血症時腹水中 cytokine 之分泌，應可因而減輕敗血症老鼠之局部發炎反應，亦可促進敗血症老鼠的細胞性免疫能力，因此 Arg 的添加對於提升敗血症老鼠免疫力具有正面效果，但並無法防止敗血症引致之肌肉組織分解及負氮平衡。

Abstract

Previous reports have shown that oral arginine (Arg) has immune-enhancing properties in injury. However, the effects of parenterally infused Arg on septic condition are not well understood. We used a sepsis rat model to study Arg infusion on inflammatory-related cytokines and the blood T lymphocyte population in vivo. Rats with internal jugular catheters were divided into 2 groups. The 2 groups received isonitrogenous total parenteral nutrition (TPN) supplemented with 270 mg of

nitrogen per kilogram per day as either Arg or glycine (Gly). TPN provided 270 kcal / kg body weight, and the kcal/nitrogen ratio was 143:1. TPN was maintained for 5 or 6 days, according to the sacrifice schedule of the rats. On day 5, sepsis was induced by cecal ligation and puncture (CLP). After CLP for 2, 4, 6, and 24 h, rats were sacrificed, respectively. The results demonstrated that interleukin-1β and tumor necrosis factor-α concentrations in peritoneal lavage fluid at 6 h, and interleukin-6 levels at 24 h after CLP in the Gly group were significantly higher than those in the Arg group. The T lymphocyte population in blood revealed that CD8+ suppressor T cell number was significantly higher in the Gly group than in the Arg group at 6 h after CLP. The blood CD4+/CD8+ ratio was significantly higher in the Arg group than in the Gly group at 24 h after CLP. A negative nitrogen balance was observed in both the Arg and Gly groups after CLP; there was no significant difference in nitrogen balance between the 2 septic groups. These results suggest that, compared with Gly-infused groups, Arg infusion resulted in a lower level of inflammatory-related cytokines in the location of the injurious stimulus, and cellular immunity was enhanced at late septic stage. However, TPN with Arg demonstrated no beneficial effect in preventing nitrogen loss.

Key words: arginine, total parenteral nutrition, sepsis, cytokine, T cell population

計畫緣由與目的

敗血症是一種嚴重的發炎反應，常因感染所引起，會引起體內激素分泌之不平衡，而造成體內營養素代謝異常及組織蛋白質的破壞分解等情形。近年來常有實驗使用特殊單一胺基酸給予受傷或異化性疾病患者，來觀察在壓力狀況下特殊營養素添加對病患是否有正面之影響，而 arginine (Arg)是近年常被研究的特殊胺基酸。在全靜脈營養(total parenteral nutrition, TPN)溶液中添加 Arg 發現對引致敗血症之老鼠可促進急性蛋白質之合成（1）。但除此之外目前並無關於 TPN 溶液中添加 Arg 對 TPN 併發敗血症老鼠免疫反應及營養素代謝之相關研究，因此本研究是以 TPN 輸入後引致敗血症之動物模式來探討 L-Arg 之添加對敗血症老鼠脂質代謝、肌肉組織異化情形之影響，並觀察引致敗血症後不同時間點細胞激素(cytokine)之反應，與營養素代謝之相關性。本計畫分成兩年進行，第一年已就 L-arginine 之添加對敗血症老鼠各不同組別間血脂及肝臟脂質代謝、肌肉組織異化情形，及 T 淋巴球分佈之影響做報告。本年度探討 L-arginine 之添加對不同組別，不同時間點細胞激素(cytokine)之反應及氮平衡之影響。

材料與方法

本研究使用 Wistar 品系之雄性大白鼠，體重約 200-230gm，經 2 週之適應期之後給予頸靜脈插管手術，手術後經過 24 小時的恢復期，之後將老鼠分為 2 組，一組為精胺酸組(Arginine，Arg)，一組為甘胺酸組(Glycine，Gly)，完全以 TPN 方式供給營養，輸入輸液 5 天之後將老鼠施予盲腸結紮並穿刺手術(Cecal ligation and puncture,CLP) 引致腹膜炎並引發敗血症。本實驗 Arg 之添加採用外加的方式，添加量為 3.15 公克/公升 TPN 溶液，兩組給予之必需胺基酸完全相同，且兩組輸入之 TPN 為等熱量等氮量，TPN 溶液之熱量濃度為 1 kcal/ml，葡萄糖、胺基酸、脂質之熱量百分比分別為 76.5：16.3：8.6，氮供應量為 270mg/kg 體重/天，氮與熱量比為 1：143，維生素礦物質電解質均足量加入。在 CLP 之後 2, 4,6, 及 24 小時分別犧牲老鼠，取其血漿及腹水分別測定其中 interleukin (IL)-1β, IL-2, IL-6, tumor necrosis factor (TNF)-α的濃度。在引致敗血症之前三天及引致後之 24 小時，收集其尿液置入含有 6N HCL 之燒杯中，紀錄總量並取少量儲存於-70oC 冰箱中，留待測定氮保留量之用。

結果

在 CLP 前 Arg 組及 Gly 組之間呈現正氮平衡，但 2 組間無統計上之差異，在 CLP 後 Arg 組及 Gly 組之間則呈現負氮平衡兩組間亦沒有統計上之差異（圖 1）。

Arg 組及 Gly 組血中 IL-6 及 TNF-α之濃度在 CLP 後 2、4、6 及 24 小時各個時間點皆無統計上之差異。但在 IL-6 方面 Arg 組及 Gly 組在 CLP 後 24 小時時濃度均較同組其他時間點高（表 1）。血中之 IL-1β在各個時間點皆無法測得，而 IL-2 在 CLP 後 24 小時時才測到，但 2 組之間並無統計上差異(數據未顯示)。

在腹水中各細胞激素的分泌方面，IL-1β在 CLP 後 6 小時 Arg 組的濃度比 Gly 組高， Gly 組同組間以 6 小時時 IL-6 濃度為最高。TNF-α在 CLP 後 6 小時在 Arg 組的濃度比 Gly 組高，與 IL-1β相同的是 Gly 組之 TNF-α在 CLP 6 小時後其量達到最高點。IL-6 濃度在 CLP 後 24 小時時 Gly 組明顯較 Arg 組高，且 Gly 組腹水中 IL-6 濃度在 24 小時時較其他時間點高。但 Arg 組在 CLP 後 2、4、6 及 24 小時各個時間點 IL-6 之濃度皆無明顯差異（表 2）。另外，腹水中之 IFN-γ及 IL-4 在 CLP 後各個時間點皆無法測得，而 IL-2 在 CLP 後 24 小時時才測到，但 2 組之間並無統計上差異(數據未顯示)。

Table I. Plasma interleukin (IL)-1β, IL-6 and TNF-α concentrations in the 2 groups at various time points after CLP

	IL-6	TNF-α pg/ml	IL-1β
2 h after CLP			
Arg	49.3±33.2	50.6±27.6	ND
Gly	49.8±48.2	84.9±76.0	ND
4 h after CLP			
Arg	31.7±3.0	105.8±96.0	ND
Gly	17.5±7.5	81.2±75.0	ND
6 h after CLP			
Arg	21.5±12.8	40.8±33.2	ND
Gly	17.6±7.1	251.5±220.1	ND
24 h after CLP			
Arg	163.8±35.5*	312.6±616.4	ND
Gly	177.8±21.0*	87.7±102.8	ND

ND: not detectable.

*Significantly higher than the corresponding groups at other time points.

Table II. Interleukin (IL)-1β, IL-6 and tumor necrosis factor (TNF)-α concentrations in peritoneal lavage fluid in the 2 groups at various time points after CLP

	IL-1β	IL-6 pg/ml	TNF-α
2 h after CLP			
Arg	128.0±31.0	306.5±163.9	1235.9±1213.0
Gly	152.9±73.4	371.2±145.0	469.3±154.8
4 h after CLP			
Arg	214.0±98.3	262.5±127.9	1147.7±648.6
Gly	135.6±40.0	236.2±71.4	651.2±341.3
6 h after CLP			
Arg	142.8±45.7	171.5±87.4	565.0±318.5
Gly	401.5±331.8†*	241.3±155.9	2117.7±2226.7†*
24 h after CLP			
Arg	14.2±9.6§	685.0±581.3	167.9±163.1‡
Gly	36.8±23.8	1348.1±1501.9†*	204.3±186.2

*: Significantly different from the Arg group at the same time point.

† Significantly different from corresponding groups at other time points.

‡ Significantly different from the Arg group 2 h after CLP.

§ Significantly different from the Arg group 4 h after CLP.

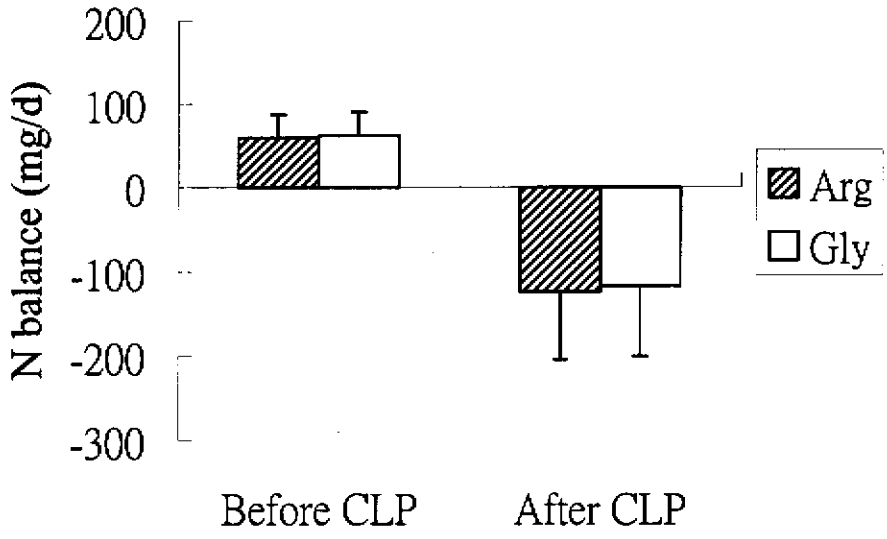

Fig 1. Nitrogen balance before and after CLP between the 2 groups.
There was no difference in nitrogen balance between the 2 groups before or after CLP.

討論

在本實驗中兩組在 TPN 輸入後體重可維持並呈現正氮平衡，且兩組間之沒有差異顯示 270kcal/kg BW/day 之熱量給予量可維持其生理所需，也顯示兩組老鼠在敗血症引致前生理狀況類似。

兩組老鼠在 CLP 後均呈現負氮平衡顯示敗血症時體內的蛋白質會大量分解，過去的實驗發現在切除腫瘤術後，如果給予 Arg 的補充則可比控制組減少負氮平衡的現象(2)，而本實驗結果中 Arg 組及 Gly 組 CLP 後負氮平衡現象並沒有明顯差異，顯示 Arg 對於促進敗血症之老鼠體氮之保留的作用並不明顯。由於敗血症發生時體內必需增強免疫力來保護身體不受細菌繼續的感染，因此有實驗亦指出在術後所給予的 Arg 在增強病人免疫力的作用比增進體內氮含量之保留來得重要(3)。由去年的結果亦顯示 Arg 的添加有增強細胞性免疫反應之功用，此部分之結果與 Daly 等人之論點相符合。

在本實驗 Plasma 中之 cytokines 各時間點只有 IL-6 及 TNF-α 能被偵測到，而在 CLP 後 24 小時可測到少量的 IL-2，過去實驗常以測量 plasma 中的 cytokine 的濃度來評估病人發炎反應的程度，但要測 plasma 中 cytokine 的濃度是很困難的，因其半衰期短且分泌範圍小 (4,5) ，而本實驗引致敗血症的方式是盲腸結紮及穿刺手術，因此產生發炎反應的部位是在腹腔內，屬於局部性的發炎反應，因此 plasma 中的 cytokine 不是偵測不到就是濃度很低。在腹水可測得 IL-1β、IL-6 及 TNF-α，而在 CLP 後 24 小時可測到少量的 IL-2，在 CLP 6h 後 IL-1β及 TNF-α

及在 24h 後 IL-6 的濃度在 Gly 組皆比 Arg 組高，過去在一些惡病質(cachexia)及發炎性疾病發生時，常會有病人體重減輕，肌肉、脂肪及骨骼等組織分解的現象產生，並認為這些現象與體內 cytokine 的分泌有關，cytokine 濃度愈高體內異化作用愈強烈(6,7)，在 sepsis 狀態下如果 IL-6 及 TNF-α 濃度過高往往會引起致命的敗血症性休克、血液在器官中凝集導致多重器官衰竭(8)，本實驗腹水中 cytokine 的濃度在 Gly 組較 Arg 組高，但在蛋白質代謝方面，由去年的研究結果顯示，Arg 組敗血症老鼠體內肌肉組織異化情形反而較 Gly 組老鼠明顯，顯示腹水中 cytokine 分泌增加與肌肉組織異化作用程度並無相關性。由於本實驗在各時間點均未測得血中 cytokine 之濃度，腹水中 cytokine 之濃度只能表示局部發炎情形，而不能代表全身性之發炎反應。

過去的實驗亦顯示給予術後病人 Arg 之補充在增進其免疫能力遠比減少負氮平衡來的重要(3)，也就是說明了 Arg 之補充在體內遭受重大壓力下時，其主要作用在增進免疫能力及減輕發炎反應，在本實驗中 Arg 的添加對於敗血症老鼠並無改善肌肉組織異化及減輕其負氮平衡之效用，但對於 cytokine 分泌有抑制的效果，並可增強其細胞性之免疫反應。

計畫成果自評

本計畫均遵照當初之實驗設計進行，並已將兩年之計畫全部執行完成。本計畫之結果最近已投稿美國 Nutrition 期刊。

References

1. Leon P, Redmond HP, Stein TP, et al. (1991) Arginine supplementation improves histone and acute phase protein synthesis during gram-negative sepsis in the rats. J Parenter Enter Nutr 15:503-508

2. Elsair J, Poey J, Issad H, et al.(1978) Effect of arginine chlorhydrate on man. Biomed Express 29:312-317

3. Daly JM, Reynolds J, Thom A. (1988) Immune and metabolic effects of arginine in the surgical patient. Ann Surg 208:512-523

4. May LT, Viguet H, Kenney JS, et al. (1992) High levels of "complexed" interleukin-6 in human blood.J Biol Chem 267:19698-19704.

5. DiPiro JT. (1997) Cytokine networks with infection: mycobacterial infections , leishmaniasis , human immunodeficiency virus infection, and sepsis Pharmacotherapy 17:205-223

6. Moldawer LL, Copeland EMⅢ. (1997) Proinflammatory cytokines, nutrition support, and the cachexia syndrome: interactions and therapeutic options. Cancer 79:1828-1839

7. Hardardottir I, Grunfeld C, Feingold KR. (1994) Effects of endotoxin and cytokines on lipid metabolism. Curr Opin Lipidol 5:207-215

8. Foëx BA, Shelly MP. (1996) The cytokine response to critical illness. J Accid Emerg Med 13:154-162