

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

L-glutamine 添加對燒燙傷老鼠營養素代謝及免疫反應之影響 (II)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2314-B-002-329-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學醫學院外科

計畫主持人：陳維昭

計畫參與人員：賴育妮

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 92年 10月 8日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫名稱：L-glutamine 添加對燒燙傷老鼠營養素代謝及免疫反應之影響(II)
Effects of L-glutamine supplementation on nutrient metabolism and immune response
in thermal injured mice (II)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC-91-2314-B-002-329

執行期間：91 年 8 月 1 日 92 年 7 月 31 日

計畫主持人：陳維昭

計畫參與人員：賴育妮

執行單位：台大醫學院外科

中華民國九十二年八月二十 日

中文摘要

本研究以燒燙傷小鼠的動物模式來探討 glutamine (GLN)之添加對燒燙傷小鼠血中 T 淋巴球分佈及特異性抗體產生之影響。由於燒燙傷病患最常被綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)感染，本研究以綠膿桿菌疫苗在燒傷前注入，來研究燒傷前後不同時間點特異性綠膿桿菌抗體產生之情形。實驗以剛斷奶之雄性 BALB/c mice 為對象，將小鼠分成 2 組，一組以酪蛋白為蛋白質來源，另一組則以 4 % (w/w)的 GLN 取代酪蛋白，兩組除胺基酸組成不同外，其餘飼料組成均完全相同。實驗開始前先眼窩採血當成測量抗體之基準值，並將綠膿桿菌疫苗(PEIF)注入小鼠背部皮下，在第四週時給予第二次疫苗注射，實驗期共 7 週。在第七週結束時將小鼠引致 30%燒傷，並於燒傷後 24 小時犧牲取血，測定 T 淋巴球分布情形，及各不同時間點抗體產生之情形。結果顯示在 T 淋巴球分布方面，不論是 CD3, CD4, CD8 在兩組之間均無差異。特異性綠膿桿菌抗體之產生，則在燒傷前的各時間點及燒傷後 GLN 添加組均顯著較控制組高。此結果顯示 GLN 之添加有促進體液性免疫反應之作用，但 CD4 T 細胞之增生可能不是特異性抗體產生之原因。

關鍵字：燒傷、glutamine、T 淋巴球分佈、特異性抗體、疫苗、綠膿桿菌

Abstract

This study investigated the effect of glutamine (GLN) supplementation on specific antibody production and T lymphocyte distribution in burned mice vaccinated with detoxified *Pseudomonas* exotoxin A linked with the outer membrane proteins I and F, named PEIF. Fifty BALB/c mice were assigned to 2 groups. One group was fed a control diet with casein as the protein source, while the other group was supplemented with 4% GLN replaced part of casein. The 2 groups were isonitrogenous. The mice were immunized twice with PEIF, and the production of specific antibodies against PEIF was measured every week. After 8 weeks, all mice received a 30% body surface area burn injury. Mice were sacrificed 24h after the burn. The distribution of blood T lymphocyte subpopulations and the specific antibody production were analyzed. The results demonstrated that there were no significant differences in CD3, CD4 and CD8 T cell populations between the 2 groups after the burn. The production of specific antibodies against *P. aeruginosa* significantly increased in the GLN group at 4 and 7 weeks after immunization, and 24 h after the burn. These results suggest that vaccinating mice with GLN supplementation may enhance humoral immunity before and after burn injury.

Key words: burn, glutamine, T cell population, specific antibody, vaccination

計畫緣由與目的

燒燙傷(thermal injury)是一種會增加氧化壓力之創傷，其在病理、生理上的變化包括嚴重的氮流失，代謝速率增加、賀爾蒙分泌之改變及免疫功能降低，另外燒燙傷也會促使活性氧自由基之產生，而使遠離燒傷部位之器官受損，傷口難以癒合易受細菌感染(1)。有報告顯示在受傷及手術狀況下，血中 GLN 的濃度明顯下降，可能因而抑制免疫反應(immunosuppression)。嚴重燒燙傷時血中 GLN 之濃度會降低，而補充較高量 GLN 之燒傷老鼠其腸道細菌轉移(translocation)之比例較低。另外，依據臨床統計資料顯示綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是目前院內感染之主要致病菌，燒燙傷病患亦最常被綠膿桿菌感染(2)。目前關於 GLN 補充對燒傷影響的研究並不多，大多著重在蛋白質及 GLN 之代謝，並無關於 GLN 對燒傷感染方面之研究，亦無對體內氧化狀態之研究，故在上年度計畫我們以燒燙傷小鼠的動物模式，來探討 GLN 之添加對燒燙傷老鼠體內 nitric oxide(NO)產生，一般營養素代謝，及抗氧化酵素系統之影響，及 GLN 添加對燒燙傷後感染綠膿桿菌致死率之影響。本年度計劃著重在 GLN 添加對燒燙傷時特異性抗體產生，及 T 淋巴球分布情形之影響。由於燒燙傷病患最常被綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)感染，本研究以綠膿桿菌疫苗在燒燙前注入，來探討燒燙前後特異性綠膿桿菌抗體產生之情形。

材料與方法

本實驗以 50 隻剛斷奶之雄性 BALB/c mice 為對象，將老鼠分成 2 組，實驗開始前先眼窩採血當成測量抗體之基準值，並將綠膿桿菌疫苗(PEIF)與 Freund's complete adjuvant 等量相互乳化後注入小鼠背部皮下，並給予實驗飲食。兩組之實驗飲食分別為，一組以酪蛋白為蛋白質來源，另一組則以 4 % (w/w)的 GLN 取代酪蛋白，兩組除胺基酸組成不同外，其餘飼料組成均完全相同。protein、fat、carbohydrate 約佔總熱量之 20%、12%、68%。由前驅實驗已得知 PEIF 抗原注入後約在 3-4 週時抗體 titer 達到高峰，此時再追加疫苗則在第 6-7 週時 titer 會再上升，故於第四週(第 29 天)時給予第二次疫苗加強注射，以增強抗體之分泌，實驗期共 7 週。在第七週結束時(第 50 天)將小鼠引致 30%燒傷，並於燒傷後 24 小時犧牲取血及器官。全血以 Flow Cytometry 測定 T 淋巴球分布情形，血漿測定 baseline(第 1 天)、第 29 天、第 50 天(燒傷前)及第 51 天(燒傷後 24 小時)等各不同時間點小鼠體內抗體產生之情形。另外在燒燙傷後 24 小時將小鼠之脾臟取出分離出淋巴細胞以體外刺激之方式，分析其細胞激素 interleukin (IL)-4, IL-6 之產生量。

結果與討論

本研究結果顯示在 T 淋巴球分布方面，不論是 CD3, CD4, CD8 在兩組之間均無差異(Table 1)。此結果與 Gismondo 等人(3)之研究不同，Gismondo 等人之研究顯示與控制組相較，GLN 添加會增加裸鼠腸道中 CD3, CD4, CD8 淋巴球分布。可能原因為 1) Gismondo 等人之研究為體外實驗，本實驗為體內實驗，體外實驗未必能真正反應體內狀況。2) 前之實驗鼠為正常鼠本實驗則為燒傷老鼠，在代謝壓力不同之狀況下，可能引致不同之結果。但在本實驗中我們發現，特異性綠膿桿菌抗體之產生，在燒傷前的各時間點及燒傷後 GLN 添加組均顯著較控制組高 (Fig 1)。此結果顯示 GLN 之添加有促進體液性免疫反應(humoral immunity)之作用，但 CD4 T 細胞之增生可能不是特異性抗體產生之原因。為了解細胞激素之分泌在抗體產生作用上所扮演的角色，我們也以體外刺激的方式，以 mitogen 刺激脾臟細胞來觀察與特異性抗體產生相關細胞激素分泌之情形，IL-4, IL-10 是由 Th2 type 細胞所分泌，Th2 type 細胞會活化 B 細胞並促進抗體之產生(4)，在本實驗中 GLN 添加組與控制組在 IL-10 分泌上並無差異，但 IL-4 則 GLN 添加組顯著較控制組高，此結果顯示 GLN 可能藉由促進 IL-4 之分泌來增加抗體之產生。

計畫成果自評

本計畫已遵照當初之實驗設計執行完畢，計畫之結果已投稿美國 Nutrition 雜誌，目前已獲接受正在付印中。

Table 1. Blood CD4, CD8, and CD3 cells and the CD4/CD8 ratio

Between the 2 groups after the burn

	CD4 (%)	CD8 (%)	CD4/CD8	CD3 (%)
Control	32.4 ± 6.9	14.8 ± 2.4	2.18 ± 0.23	45.3 ± 7.0
GLN	31.3 ± 4.8	12.8 ± 2.2	2.46 ± 0.25	38.5 ± 5.8

Data are expressed as the mean ± SD.

There were no significant differences in the distribution of CD4, CD8, CD3 populations or the CD4/CD8 ratio between the 2 groups.

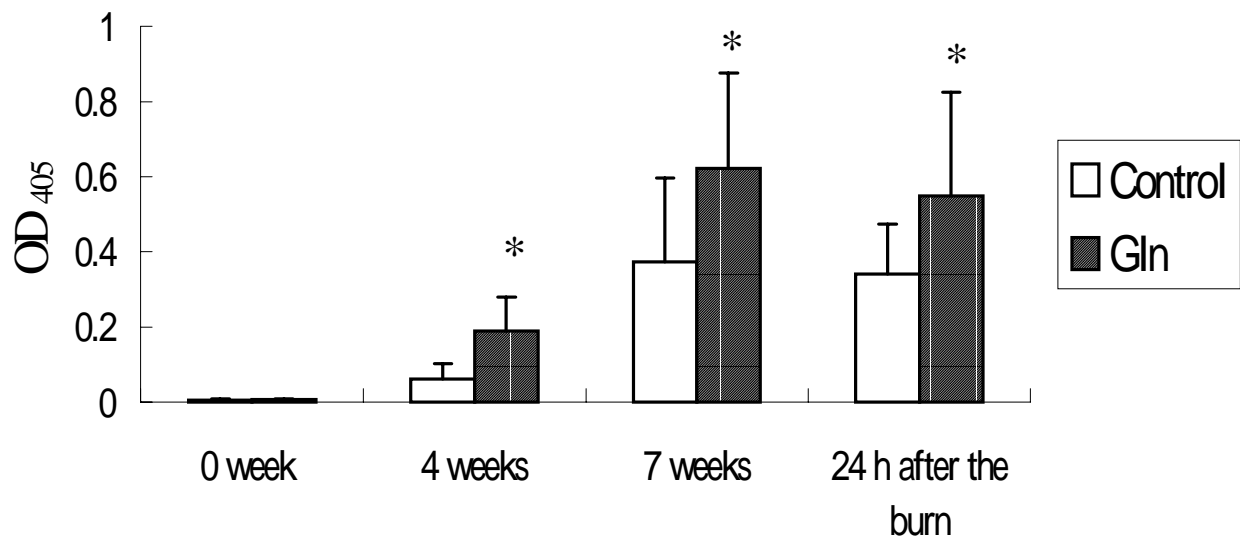


Fig. 1. Production of PEIF-specific antibodies in the control and Gln groups. Mice were immunized twice with recombinant PEIF protein on days 1 and 28, and sera antibody titers were measured by ELISA at weeks 0, 4, 7, and 24h after the burn. The dilution of mice antiserum was 1:1000. * Significant difference between the 2 groups ($p < 0.05$).

References

1. Tredget EE, Yu YM. The metabolic effects of thermal injury. *World J Surg* 1992;16:68-79.
2. Holder IA. The pathogenesis of infection owing to *Pseudomonas aeruginosa* using the burned mouse model: experimental studies from the Shriners Burns Institute, Cincinnati. *Can J Microbiol* 1985;31:393-402.
3. Gismondo MR, Drago L, Fassina MC, et al. Immunostimulating effect of oral glutamine. *Dig Dis Sci* 1998;43:1752-1757.
4. Dipiro JT. Cytokine networks with infection: mycobacterial infections, leishmaniasis, human immunodeficiency virus infection, and sepsis. *Pharmacotherapy* 1997;17:205-223.

