

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

添加麩醯胺對腹膜炎引致敗血症老鼠腸道及全身性免疫反應之影響(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2314-B-002-278-

執行期間：92年08月01日至93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 93 年 5 月 13 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫進度報告

計畫名稱：添加麩醯胺對腹膜炎引致敗血症老鼠腸道及全身性免疫功能之影響 (I)

Effects of glutamine supplementation on the systemic and mucosal immunity in rats with gut-derived sepsis

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC-92-2314-B-002-278

執行期間：92年8月1日至94年7月31日

第一年計畫執行期間：92年8月1日至93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

中華民國九十三年五月十三日

前言

敗血症(sepsis)是一種在臨床上十分常見而且死亡率極高的併發症，當細菌以及其內毒素侵入人體後，會造成體內的代謝失衡以及組織之分解，最後導致多重器官之衰竭，其中包括對小腸之損害。敗血症會造成腸繫膜血流阻力增加而降低腸繫膜之血流量、小腸黏膜水腫、小腸細胞對葡萄糖及 glutamine(Gln)之利用率降低、黏膜中酵素活性及吸收功能下降，這些構造和功能上之改變，會造成腸道免疫功能受損，使細菌轉移之情形更為嚴重。

全靜脈營養(total parenteral nutrition, TPN)是一種非經腸道的營養支持方式，常用於腸道功能障礙之病人，由於 TPN 之使用會造成腸黏膜細胞及組織內 gut associated lymphoid tissue (GALT)發生萎縮，而使得腸黏膜通透性增加，增加細菌轉移的比例而引發感染，並併發敗血症等症狀。

在體內的免疫系統中，腸道淋巴組織(gut associated lymphoid tissue, GALT)是腸道及腸外黏膜組織重要的防禦系統，其中有 70-80%的免疫球蛋白由腸黏膜產生以抵禦侵入腸道之致病原。GALT 包括 Peyer's patches、Intraepithelial lymphocytes 及 Lamina propria lymphocytes。當有細菌侵入 GALT 後，則會刺激 GALT 內的 lymphocytes 分泌出一些免疫相關物質來對抗細菌，如：IgA 跟一些 cytokines。IgA 是保護體內黏膜組織最主要的免疫球蛋白，其可防止黏膜組織細菌過度生長，並跟細菌結合防止細菌沾黏於黏膜上，而一些體外實驗發現 IgA 的分泌受到一些 cytokines 的調控，如：Th1 細胞所分泌的 interferon(IFN)- γ 及 tumor necrosis factors(TNF)- α 會抑制 IgA 的分泌，而 Th2 細胞所分泌的 Interleukin(IL)-4, 6,10 則有促進 IgA 分泌的作用。

近年來免疫營養(immunonutrition)遂成為研究之重點，而 Gln 之添加受到相當之重視。Gln 為人體中含量最多的游離胺基酸，佔骨骼肌細胞內游離胺基酸量的 60%，由於其可以自行在體內合成故屬非必需胺基酸，它同時也是一些快速生長細胞之能量來源。有研究顯示在一些異化作用疾病發生時，體內 Gln 的量會減少。已有研究顯示 Gln 添加於全靜脈營養的配方中，有助於維持腸道構造和功能之完整性並可增加氮保留量並預防細菌轉移，敗血症老鼠若補充 Gln 可增加其存活率。體外實驗顯示 Gln 之添加可促進 T lymphocyte 增生。另外，於 TPN 溶液中添加 Gln 可維持 Th2 細胞所分泌的 cytokines - IL-4、IL-10 mRNA 的表現量並維持小腸 IgA 的分泌，增進黏膜免疫的功能。

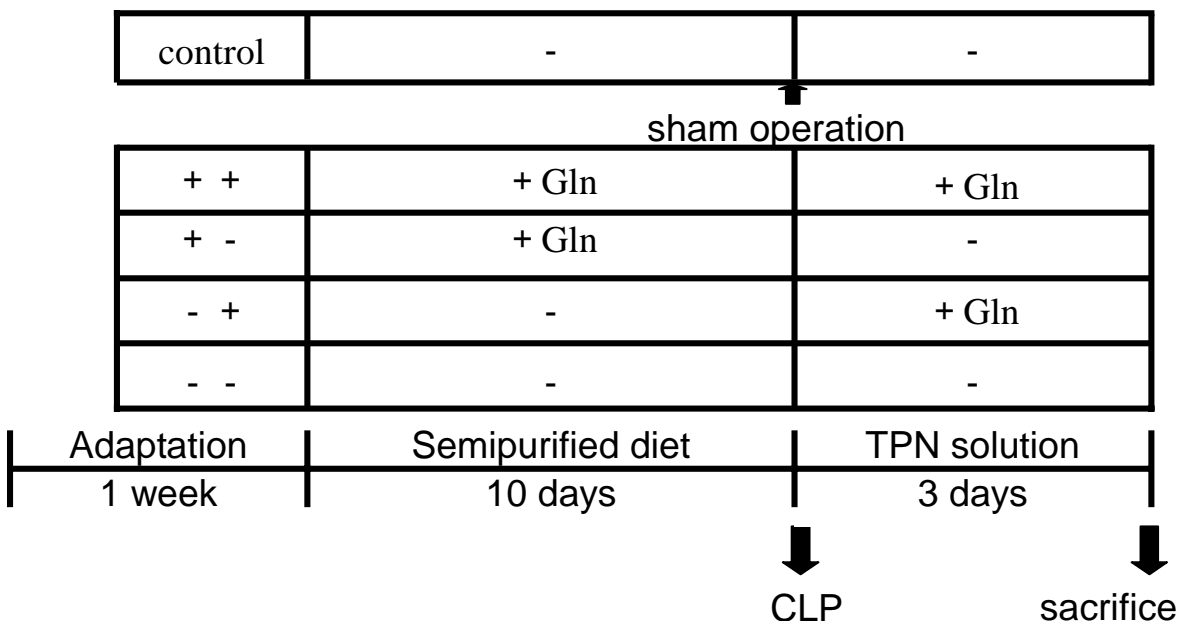
其他研究也觀察到，在以盲腸結紮並穿刺手術(cecal ligation and puncture, CLP)引致敗血症後給予之 TPN 輸液中補充 Gln，可減少體內蛋白質的分解、增加肌肉蛋白質的合成、進而改善氮平衡的情形、維持腸胃道黏膜的功能，而使存活率有明顯之改善。

本實驗擬在敗血症前以由口進食，敗血症後以 TPN 輸入方式給與 Gln，來研究 Gln 對敗血症的影響，以完整探討 Gln 對敗血症時腸道及全身性免疫反應之影響。由於敗血症之發生並無法預知，因此本實驗在敗血症發生之前後給或不

給 Gln 來模擬有敗血症危險之重症病人，是否可在住院後即給予 Gln，來預防敗血症或減輕敗血症之嚴重程度，或事後以靜脈輸入也可達到同樣之效果。本計畫分成兩年進行，第一年主要探討 GALT、脾臟、血液中 T 及 B 淋巴細胞之分佈比例，腹腔中巨噬細胞及全血中白血球之吞噬能力等。第二年分析血中營養素變化、腹水中 cytokine 濃度、腸道中 sIgA 之濃度、巨噬細胞及腸道、脾臟收集之淋巴細胞以體外刺激後之免疫反應。現僅就第一年之執行進度作一報告。

材料與方法

以 230-250g 之 Wistar 雄性老鼠為實驗對象，共分為五組，經一星期之適應期後，其中三組給予自行調配一般組成之 semipurified diet，其餘兩組給予相同形式並以 Gln 取代總氮量 25% 之飲食，兩組為等熱量等氮量(30)。各給予十天後，除 control 組施行 sham operation，其餘四組均實行 CLP 手術，control 組與 4 組 CLP 組均進行頸靜脈插管手術。CLP 手術為將老鼠以乙醚麻醉後，在上腹部中線切開約 2 公分，在 ileocecal valve 下方以 2-0 絲線紮緊，用 18 號針頭穿刺盲腸兩次後將腹部縫合，以引致腹膜炎及敗血症。在兩種飲食之 CLP 組別中各取一組與 control 組在敗血症後輸入一般之 TPN 輸液，剩下之兩組輸入以 Gln 取代總氮量 25% 之 TPN 輸液，故五組中一組為 normal control 組，不做 CLP 但作頸靜脈插管手術，手術前給一般配方，插管手術後給一般 TPN 配方。其餘四組均施行 CLP 及頸靜脈插管手術，分別為：(1) CLP 前給一般配方，CLP 後給一般 TPN 配方 (- - 組) (2) CLP 前給一般飲食，CLP 後給富含 Gln 之 TPN 輸液 (- + 組) (3) CLP 前給富含 Gln 之飲食，手術後給一般之 TPN 輸液 (+ - 組) (4) CLP 前後均給富含 Gln 之配方 (+ + 組)。五組之營養素組成、總熱量以及總氮量均相等，分組如下圖所示。



結果

一、腹腔灌洗液中白血球的總細胞數之計算（圖一）：

腹腔灌洗液中的細胞主要為巨噬細胞和嗜中性白血球，以 Turk ' s solution 染色計數後，在腹腔灌洗液中，其腹腔中巨噬細胞數五組間並無統計上之差異。

二、小腸壁上 Peyer's patches 之總顆粒數（圖二）以及其中淋巴細胞數量之計數（圖三）

由 Pretest 得知進行 CLP 手術後的第三天，老鼠小腸壁上 Peyer's patches 內的淋巴細胞受腹腔內細菌刺激而增生，Peyer's patches 腫大而明顯。而在敗血症前後均補充 Gln 組，其小腸上 Peyer's patches 之總顆粒數明顯比 CLP 前後均未添加 Gln 組多，並有統計上之差異。而 Peyer's patches 中淋巴細胞的總細胞數，不論在敗血症之前或之後有添加 Gln 之 3 組均明顯較 control 組高，且有統計上之差異。

三、全血、脾臟以及 Peyer's patches 中淋巴細胞亞群（subpopulation）分佈

（1）全血中淋巴細胞亞群分佈（圖四）

經由流式細胞儀的分析，全血中 B 細胞（CD45Ra⁺）在有施行 CLP 手術的四組間並無統計上的差異，但在敗血症前後都有添加 Gln 組則明顯高於 control 組，有統計上之差異。Total T 細胞在有施行 CLP 手術的四組間無統計上的差異，且不論在敗血症之前或之後添加 Gln 之三組與 control 組亦無統計上的差異，但在敗血症前後皆無添加 Gln 組其 Total T 細胞則明顯低於 control 組，有統計上之差異。輔助 T 細胞（CD4⁺）則是 CLP 前有添加及前後均有添加 Gln 之兩組與 control 組無統計上之差異，並都高於 CLP 後有添加及前後均無添加 Gln 之兩組並且有統計上之差異。抑制 T 細胞及殺手 T 細胞（CD8⁺）之分佈，五組間並無統計上之差異。

（2）脾臟中淋巴細胞亞群分佈（圖五）

經由流式細胞儀的分析，脾臟細胞中 B 細胞（CD45Ra⁺）在有施行 CLP 手術的四組間並無統計上的差異，並且明顯高於 control 組，有統計上之差異。Total T 細胞在有施行 CLP 手術的四組間無統計上的差異，且不論在敗血症之前或之後添加 Gln 之三組與 control 組亦無統計上的差異，但在敗血症前後皆無添加 Gln 組其 Total T 細胞則明顯低於 control 組，且有統計上之差異。輔助 T 細胞（CD4⁺）在有施行 CLP 手術的四組間並無統計上的差異，並且明顯低於 control 組，有統計上之差異。抑制 T 細胞及殺手 T 細胞（CD8⁺）之分佈，有施行 CLP 手術的四組間並無統計上的差異，而 CLP 前後均補充 Gln 組則較 control 組高，且有統計上之差異。

(3) Peyer's patches 中淋巴細胞亞群分佈 (圖六)

Peyer's patches 中 B 細胞 (CD45Ra⁺) 和抑制 T 細胞及殺手 T 細胞 (CD8⁺) 之分佈, 五組間並無統計上之差異。而 Total T 細胞及輔助 T 細胞 (CD4⁺) 則都在有施行 CLP 手術的四組間無統計上的差異, 且不論在敗血症之前或之後添加 Gln 之三組與 control 組亦無統計上的差異, 但在敗血症前後皆無添加 Gln 組其 Total T 細胞則明顯低於 control 組, 且有統計上之差異。

四、細胞吞噬能力之測定

(1) 腹腔灌洗液中巨噬細胞之吞噬能力 (圖七)

結果顯示, 在敗血症前後均補充 Gln 組以及引致敗血症前補充 Gln 組其巨噬細胞之吞噬能力明顯較引致敗血症前後皆無補充 Gln 組以及控制組為強。但引致敗血症前補充 Gln 組及引致敗血症後補充 Gln 組則無統計上之差異。

(2) 全血中嗜中性白血球之吞噬能力 (圖八)

經由 Flow cytometry 的分析, 五組之週邊血液中嗜中性白血球之吞噬能力並無明顯之差異。

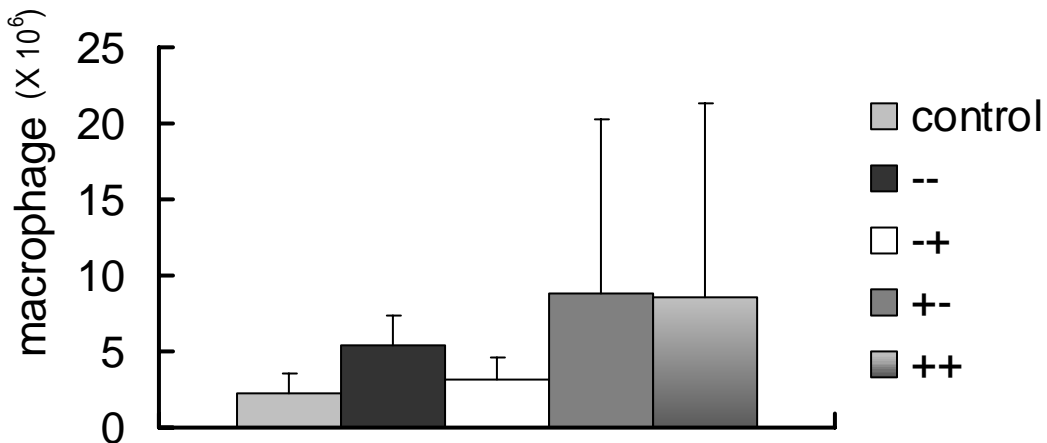


Figure 1. The numbers of macrophage in peritoneal lavage fluid (PLF) in the five groups 3 days after CLP

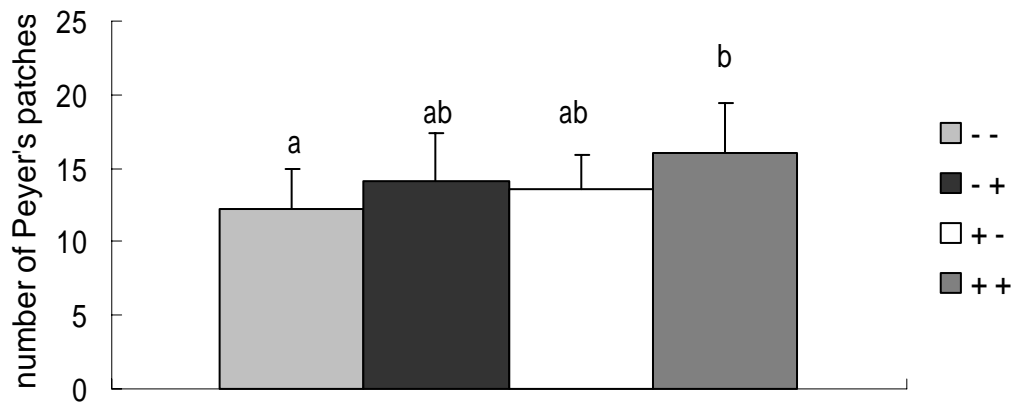


Figure 2. The number of Peyer's patches on the whole small intestine in the four groups 3 days after CLP

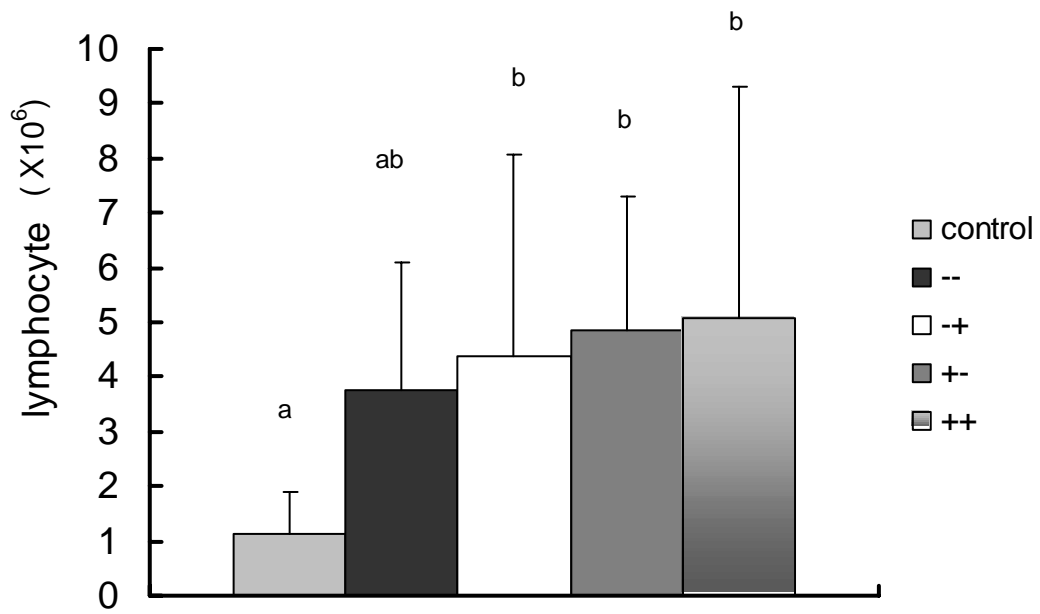


Figure 3. The number of lymphocyte in the Peyer's patches in the five groups 3 days after CLP

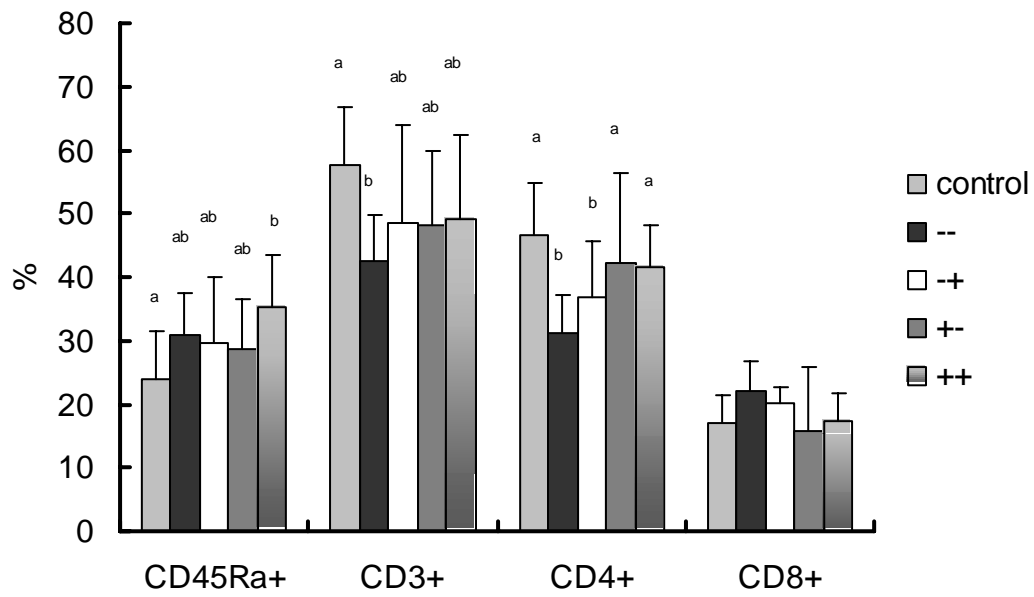


Figure 4. The distribution of CD45Ra⁺, CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in the whole blood in the five groups 3 days after CLP

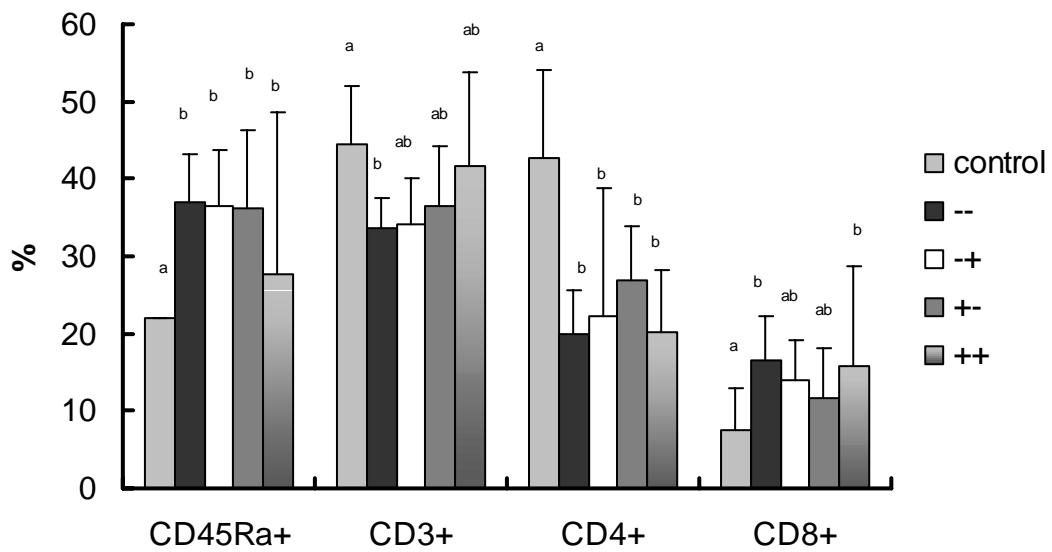


Figure 5. The distribution of CD45Ra⁺, CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in the spleen in the five groups 3 days after CLP

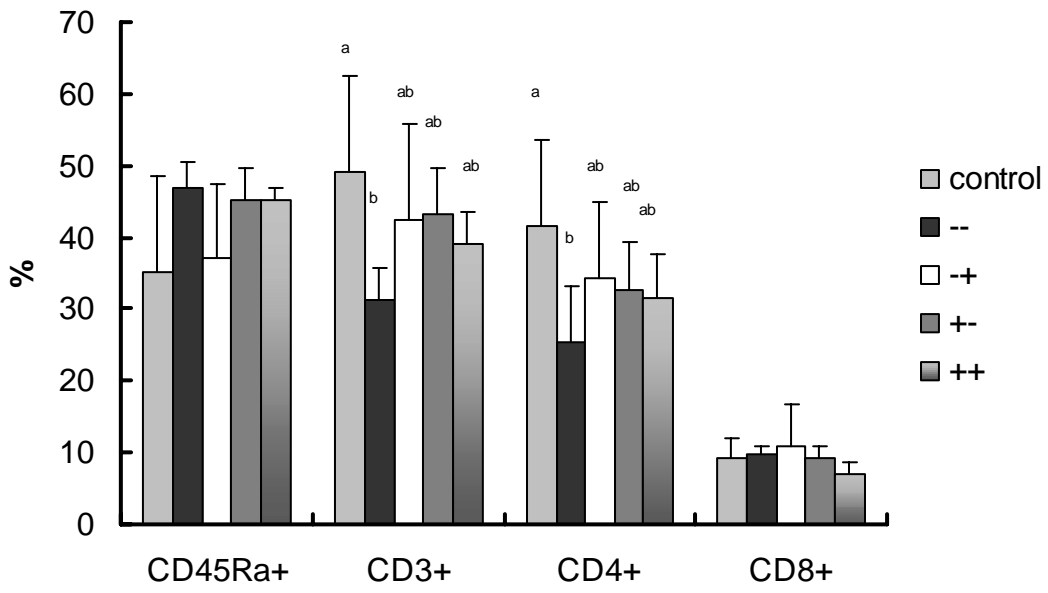


Figure 6. The distribution of CD45Ra⁺, CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in the Peyer's patches in the five groups 3 days after CLP

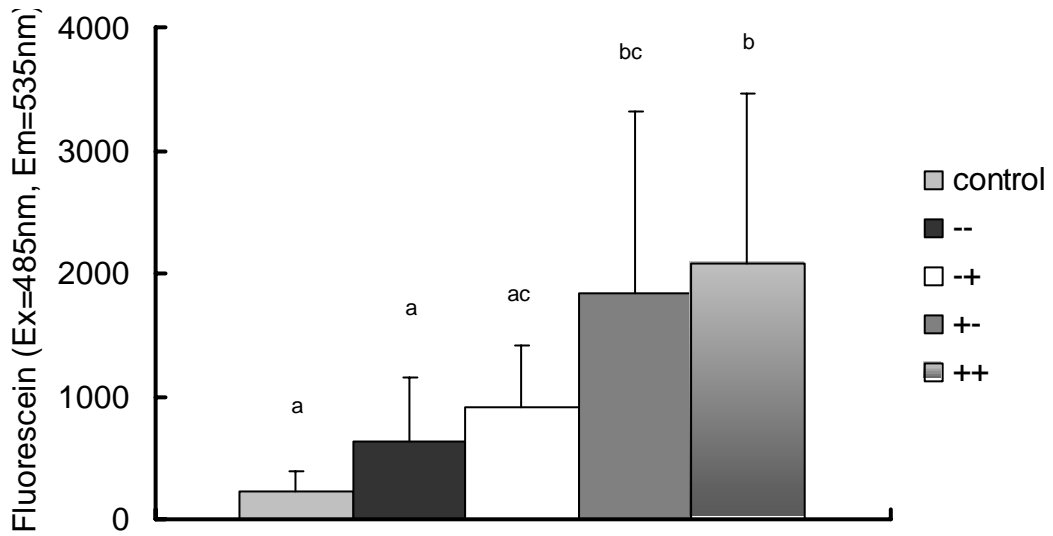


Figure 7. Phagocytic activity of peritoneal macrophage

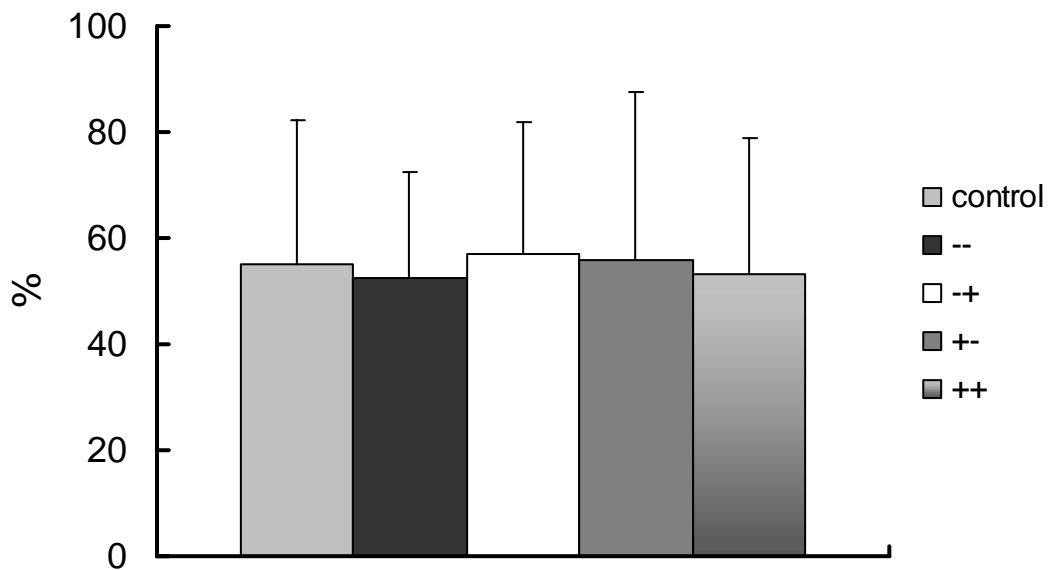


Figure 8. Phagocytic activity of peripheral blood neutrophils by flow cytometry

討論

References

1. Leon P, Redmond HP, Stein TP, et al: Arginine supplementation improves histone and acute phase protein synthesis during gram-negative sepsis in the rats. *J Parenter Enter Nutr* 15:503-508, 1991
2. Fischer JE: Muscle protein catabolism in cirrhotic patients reduced by branch-chain amino acids *Nutr Rev* 41:146-149, 1983
3. Bagby GJ, Spitzer JA: Decreased myocardial extracellular and muscle lipoprotein lipase activities in endotoxin-treated rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 168:395-398, 1981
4. Bagby GJ, Corll CB, Martinez RR: Triacylglycerol kinetics in endotoxic rats with suppressed lipoprotein lipase activity. *Am J Physiol* 253:E59-64, 1987
5. Kiyono H, McGhee JR: T helper cells for mucosal response responses. In: Ogra PL, Lamm ME, McGhee JR, et al., eds. *Handbook of mucosal*

immunology. San Diego:Academic Press: 263-273, 1994

6. Daly JM, Reynold J, Thom A: Immune and metabolic effects of arginine in the surgical patients. *Ann Surg* 208:512-515, 1988
7. Kay JE, Lindsay VJ: Polyamine synthesis during lymphocyte activation. *Exp Cell Res* 77:428-436, 1973