

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（II）

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-93-2314-B-002-055

執行期間：92年8月1日94年7月31日

第二年計畫執行期間：93年8月1日94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

中華民國九十四年十月二十日

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。小腸細胞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，TPN 之使用會造成腸黏膜細胞發生萎縮，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。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。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，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。

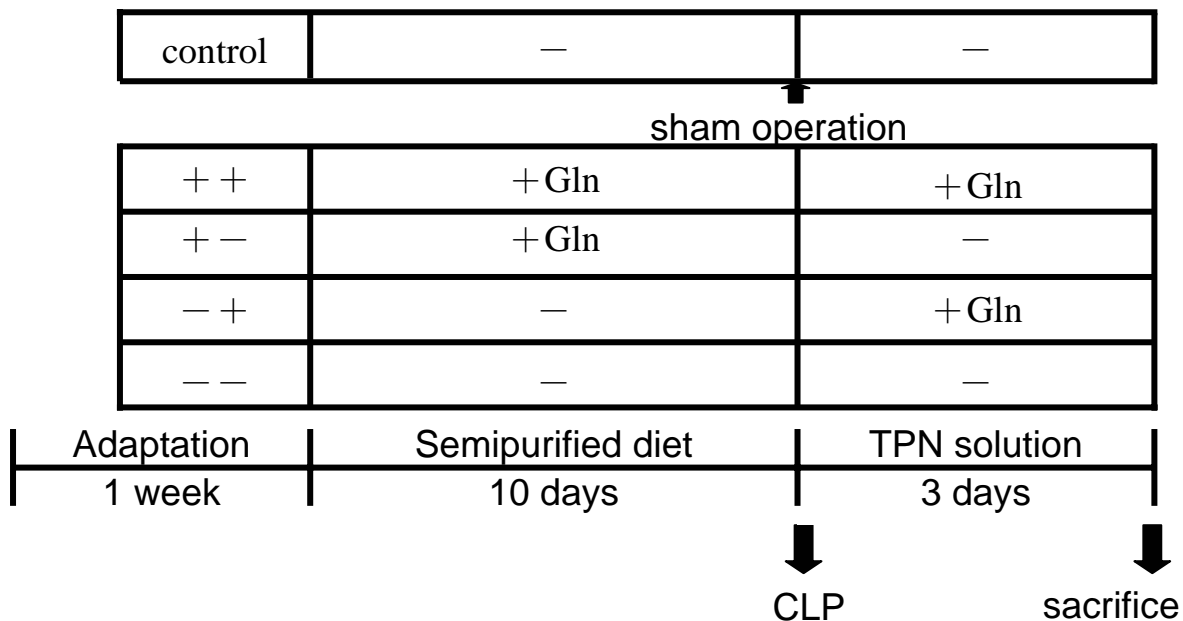
近年來免疫營養 (immunonutrition) 在疾病上之應用成為研究之重點，而其中 glutamine (Gln) 之添加受到相當之重視。Gln 為人體中含量最多的游離胺基酸，由於其可以自行在體內合成故屬非必需胺基酸。有研究顯示在一些異化作用疾病發生時，體內 Gln 的量會減少。已有研究顯示 Gln 添加於 TPN 的配方中，有助於維持腸道構造和功能之完整性並可增加氮保留量並預防細菌轉移，在以盲腸結紮並穿刺手術 (cecal ligation and puncture, CLP) 引致敗血症後給予之 TPN 輸液中補充 Gln，可減少體內蛋白質的分解、增加肌肉蛋白質的合成、進而改善氮平衡的情形、維持腸胃道黏膜的功能，而使存活率有明顯之改善。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。

本實驗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。本計畫分成兩年進行，第一年主要探討 GALT 中 T 及 B 淋巴細胞之分佈比例，腹腔中巨噬細胞吞噬能力及腸道中 sIgA 之分泌等。第二年分析血中營養素變化、腹水中 cytokine 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，本年度僅就第二年的成果做報告。

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。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。CLP 三天後犧牲老鼠取 Peyer's patches，腹腔巨噬細胞及腸道沖洗液做分析。



結果

血漿中游離胺基酸之組成結果顯示，control 組及添加 Gln 之 3 組，不論在敗血症之前或之後添加，其血漿中 Gln 濃度均顯著較未添加組高(Fig 1)。血漿中各種 cytokines 之濃度結果顯示，IL-2 以及 IL-4 並未能偵測到，而 IL-10 則在五組之間無統計上之差異。腹腔灌洗液中各種 cytokines 之濃度結果顯示，TNF- α 及 IFN- γ 在五組之間皆無統計上之差異。

脾臟之淋巴細胞經 PHA 刺激後，IL-2、IL-10 以及 IFN- γ ，五組間並無顯著之差異；而 IL-4 之濃度在此次實驗中並無法偵測到。TNF- α 在經 LPS 刺激後，五組間並無顯著之差異。另外，Peyer's patches 之淋巴細胞經刺激後所分泌 IL-10 之分泌在有引致敗血症之四組其濃度無明顯之差異，但都比控制組低且有

統計上之差異 (Fig 2)。而 $IFN-\gamma$ 在五組間則無顯著差異； $TNF-\alpha$ 在敗血症前後均補充 Gln 組和敗血症後才補充 Gln 組兩組間則無顯著之差異，但敗血症前後均補充 Gln 組 $TNF-\alpha$ 的分泌量較其它三組高，並有統計上之差異。(Fig 3)

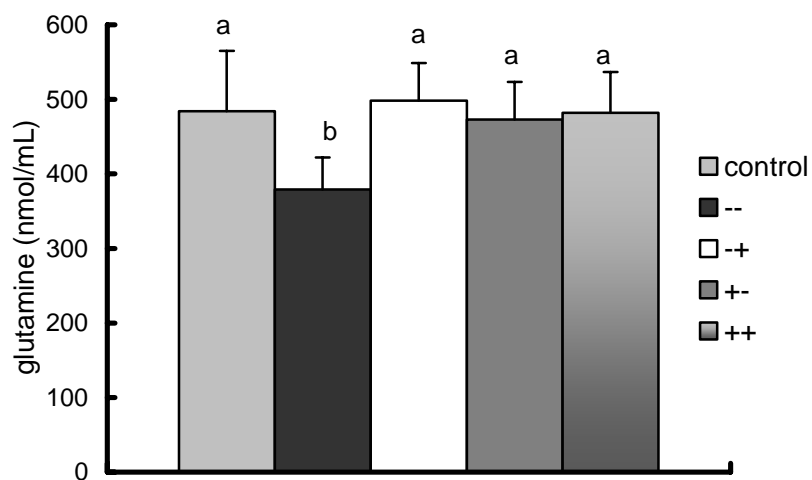


Figure 1. Plasma glutamine concentrations of the five groups 3 days after CLP

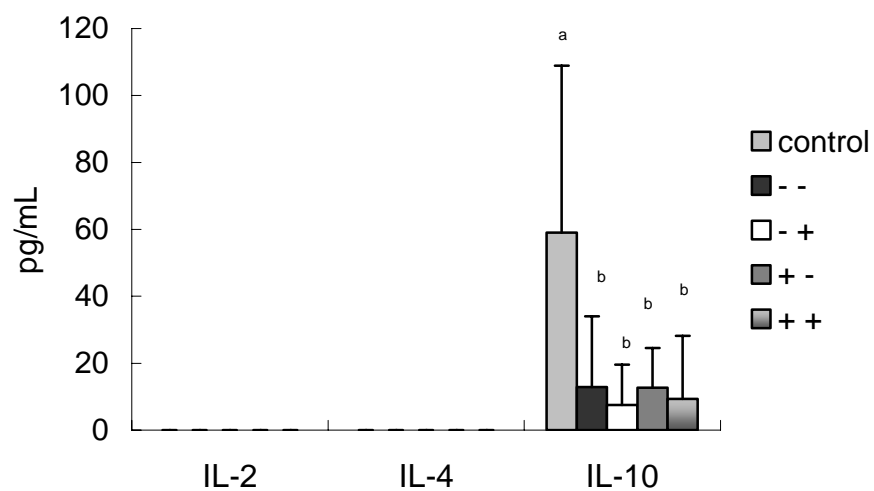


Figure 2. The concentrations of cytokines released by Peyer's patches lymphocytes after PHA stimulation for 24 hours

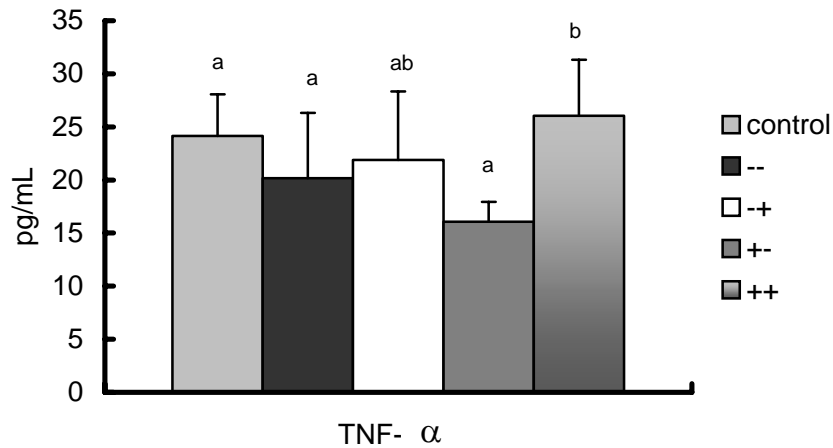


Figure 3. The concentrations of TNF- α released by Peyer's patches lymphocytes after LPS stimulation for 24 hours

討論

近年來有些研究發現在敗血症狀態下，血中的 Gln pool 會流失，Gln 濃度下降以提供肝臟製造急性蛋白質或抗體並供腸道及一些分裂快速之細胞(如:免疫細胞)能量來源，此時飲食中如果沒有給予足夠的 Gln 補充，則會使肺、肌肉及腎等器官中之 Gln 釋出，其中以肌肉發生分解的情況最為嚴重，身體呈現負氮平衡。而本實驗結果顯示，Gln 添加之組別，其血中 Gln 濃度均顯著較未添加組高，並且跟 control 組無差異。顯示本實驗給予 Gln 之劑量即使只給予 3 天仍能有效提昇血中之 Gln 濃度使其恢復正常並參與體內之代謝反應。由於血中 Gln 濃度可作為敗血症嚴重程度之指標，本實驗添加 Gln 之組別，明顯較未添加組提升血中 Gln 濃度，顯示無論敗血症手術前或後添加 Gln 皆可維持血漿中 Gln 之濃度。

在各種細胞激素分泌量方面，IL-4 與 IL-10 為 B 細胞之生長因子，由 Th2 細胞所分泌，除了促進 B 細胞生長之外，亦會刺激 Th2 細胞分化而抑制 Th1 細胞之分化；本實驗結果之中，IL-4 不論在血漿中或是脾臟細胞及 Peyer's patches 中之淋巴細胞，利用 PHA 刺激之上清液中均無法偵測到。而在 IL-10 方面，在血漿中以及脾臟細胞利用 PHA 刺激之上清液中五組間並無顯著之差異；但在 Peyer's patches 之刺激上清液中，Control 組明顯較有施行 CLP 手術之四組分泌量高，而施行 CLP 手術之四組間則無顯著差異，推測可能是 CLP 手術後 IL-10 已受刺激分泌，故再將其 Peyer's patches 內之淋巴細胞進行體外刺激無法正確反映其體內分泌的情形。TNF- α 是一種由巨噬細胞以及自然殺手細胞所分泌之細胞激素，主要之功能在於活化巨噬細胞以及毒殺細胞；本實驗結果顯示，不論在腹腔灌洗液或是脾臟細胞利用 LPS 刺激後之上清液中，TNF- α 之濃度在五組間並無差異，但在 Peyer's patches 之淋巴細胞以 LPS 刺激後之上清液中，引致

敗血症前後都給予 Gln 之補充，能明顯增加 TNF- α 之濃度，結果發現以 CLP 引致敗血症發生之前後皆補充 Gln，對 TNF- α 之分泌有促進之作用。而在第一年所測的吞噬能力的結果方面，敗血症前以及前後皆給予 Gln 之補充能明顯促進腹腔灌洗液中之巨噬細胞之吞噬能力。故推論巨噬細胞吞噬能力之增加可能是因為 TNF- α 之濃度增加之故。

在本研究所測定之各項分析項目中，敗血症後及前後均補充 Gln 之組別在胺基酸代謝上，顯著較敗血症前補充及未補充組為佳；而免疫反應之增進上，則是在敗血症前及前後皆補充 Gln 組細胞吞噬能力較強。而腸道免疫之結果顯示，在敗血症前補充 Gln 組，可以增進 Peyer's patches 內淋巴細胞的數目及血漿中 IgA 之濃度，敗血症後補充 Gln 組更可增加小腸灌洗液中 IgA 之濃度，而敗血症前後皆有補充 Gln 組除了可增進前述項目外，並增加了腸道 Peyer's patches 之顆粒數、Peyer's patches 受細菌刺激後 TNF- α 之分泌。故前後均補充 Gln 的對敗血症後免疫力有提升效果。

計畫成果自評

本計畫均遵照當初之實驗設計進行，且結果已被美國 Nutrition 及 British Journal of Nutrition 期刊接受。

References

1. Alverdy JC, Aoye E, Weiss-Carrington P, et al (1992) The effect of glutamine-enriched TPN on gut immune cellularity. J Surg Res 52: 34-38
2. Yeh SL, Yeh CL, Lin MT, Chen WJ (2001) Effects of glutamine-supplemented total parenteral nutrition on cytokine production and T cell population in septic rats. J Parenter Enter Nutr 25:269-274
3. Furukawa S, Saito H, Inaba T, et al (1997) Glutamine-enriched enteral diet enhances bacterial clearance in protected bacterial peritonitis, regardless of glutamine form. J Parenter Enter Nutr 21:208-14
4. Rohde T, Maclean DA, Klarlund Pedersen B (1996) Glutamine, lymphocyte proliferation and cytokine production. Scand J Immunol 44:648-650
5. Gianotti L, Alexander JW, Gennari R, et al (1995) Oral glutamine decreases bacterial translocation and improves survival in experimental gut-origin sepsis. J Parenter Enter Nutr 19:69-74
6. Karinch AM, Pan M, Lin CM, et al (2001) Glutamine metabolism in sepsis and infection. J Nutr. 131:2535S-8S; discussion 2550S-1S