

添加麩醯胺對腹膜炎引致敗血症老鼠脾臟細胞激素mRNA表現之影響

Effects of glutamine supplementation on splenocyte cytokine mRNA expression in rats with septic peritonitis

賴育妮* 邱琬淳 商惠芳 葉松鈴# 陳維昭

台北醫學大學保健營養研究所 微生物免疫學科 台灣大學醫學院外科

前言

敗血症 (sepsis) 是一種在臨床上十分常見且死亡率極高的併發症，當細菌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，最後導致多器官之衰竭。已有研究顯示，代謝失衡主要是由於敗血症引致免疫系統及器官細胞中細胞激素分泌不正常所致，許多研究均以細胞激素之分泌量作為發炎或受傷嚴重程度之指標。然而由於細胞激素半衰期很短，分泌的高峰期各有不同，在體液內的濃度極低，故有些細胞激素並無法偵測到。於是敏感性及準確度皆高之RT-PCR (reverse-transcription polymerase chain reaction)技術被廣泛的運用在偵測細胞激素mRNA的表現量，以預測細胞激素之分泌量。

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。因此如何增進病人免疫功能，降低感染是重要的研究方向，近年來免疫營養 (immunonutrition)遂成為研究之重點，而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，同時也是腸黏膜及免疫細胞之重要能量來源。已有研究顯示Gln添加於TPN配方中，有助於維持腸道構造和功能的完整性、增加氮保留量並防止細菌轉移。另外，於TPN溶液中添加Gln可維持Th2細胞所分泌的細胞激素—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。本實驗室前之研究顯示，於敗血症前給予飲食中補充Gln，可增進腹腔巨噬細胞之吞噬能力；而無論是在敗血症前或後給予Gln之補充皆可增加GALT內淋巴細胞之增生，並促進IgA之分泌。為了更進一步探討Gln之補充對敗血症所引起之免疫反應，到底是偏向細胞性或是體液性免疫反應，故本實驗以盲腸結紮並穿孔手術 (cecal ligation and puncture, CLP) 引致老鼠敗血症，進而觀察Gln對敗血症老鼠脾臟淋巴細胞分佈及Th1或Th2所分泌之細胞激素mRNA表現之影響。

目的

CLP為最接近人體因腹膜炎引致敗血症之良好動物模式，故本實驗以此方式引致敗血症，並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。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，探討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，或敗血症發生後以靜脈輸入也可達到同樣之效果。

材料與方法

實驗以Wistar雄性老鼠為對象，共分為五組，一組為normal control組，不做CLP但做頸靜脈插管手術，手術前給予一般飼料配方，術後給予傳統之TPN輸液。其餘四組均施行CLP及頸靜脈插管手術，分別為：CLP前給一般飼料配方，術後給傳統之TPN輸液 (--)；CLP前給一般飲食，CLP後給富含Gln之TPN輸液 (++)；CLP前給富含Gln之飲食，手術後給傳統之TPN輸液 (+-)；CLP前後均給富含Gln之配方 (++++)。五組之營養素組成、總熱量以及總氮量均相等，富含Gln之配方以Gln取代總氮量之25%。在引致敗血症三天後犧牲老鼠，取腹水及脾臟供分析之用。

分析項目

腹水中NO的測定: ELISA kit

脾臟細胞中T細胞、B細胞之分佈: Flow cytometry

細胞激素包括Th1: interferon (IFN)- γ , interleukin (IL)-2 ; Th2: IL-4, IL-10,及tumor necrosis factor (TNF)- α mRNA表現量之測定: RT-PCR

Table 1. Composition of semipurified diet (g/kg)

	Gln-supplemented	without Gln
Casein	165	220
Corn starch	667	657
Soybean oil	44	44
Gln	45	--
Total nitrogen	35.2	35.2
Vitamin ^a	10	10
Salt mixture ^b	35	35
Methyl-cellulose	30	30
Choline chloride	1	1
DL-Methionine	3	3
Total calorie	3904kcal	3904kcal

Table 2. Composition of TPN solution (mL/L)

	+Gln	--
Glucose soln (50%)	418	412
20% Fat emulsion	50	50
Moriamin-SN (10%) ^c	417	556
Gln (g)	11	--
Infuvita ^{**} No1	7	7
Infuvita ^{**} No2	1	1
NaCl 3%	35	35
KCl 7%	10	10
K ₃ PO ₄ 8.7%	10	10
Ca-gluconate	10	10
MgSO ₄	4	4
Zn SO ₄	2	2
Choline chloride(g)	1	1

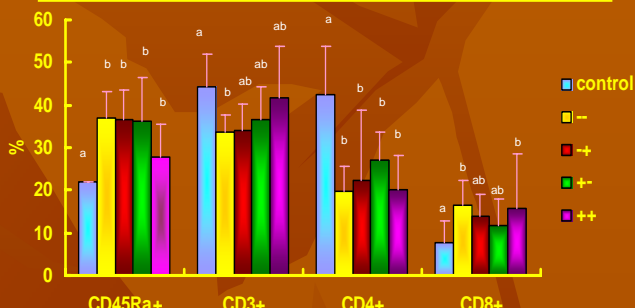


Figure 1. The distribution of CD45Ra+, CD3+, CD4+ and CD8+ lymphocytes in the spleen in the five groups 3 days after CLP.

Different letters indicate significant difference among groups (p < 0.05)

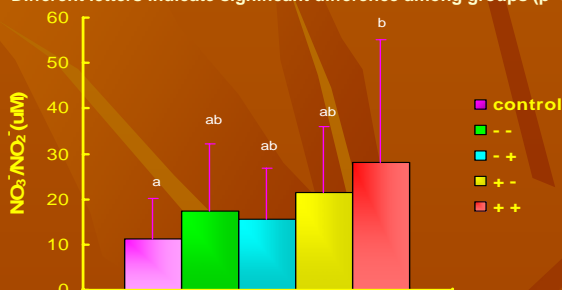


Figure 2. Nitric oxide (NO) concentrations in PLF of the five groups 3 days after CLP. Different letters indicate significant difference among groups (p < 0.05)

Figure 3. The mRNA expression of cytokines in the spleen of the five groups 3 days after CLP

	IL-2	IL-4	IL-10	IFN- γ	TNF- α
Control	1.9 \pm 0.11 ^a	1.87 \pm 0.16 ^a	1.79 \pm 0.11 ^a	1.99 \pm 0.26 ^a	1.65 \pm 0.05 ^a
--	2.06 \pm 0.21 ^{ac}	2.13 \pm 0.30 ^{ac}	1.90 \pm 0.23 ^a	2.21 \pm 0.26 ^a	1.79 \pm 0.24 ^a
+-	2.45 \pm 0.16 ^b	2.49 \pm 0.16 ^b	2.21 \pm 0.19 ^b	2.68 \pm 0.21 ^b	2.31 \pm 0.41 ^b
++	2.26 \pm 0.26 ^{bc}	2.35 \pm 0.22 ^{bc}	1.97 \pm 0.21 ^{ac}	2.57 \pm 0.34 ^b	1.99 \pm 0.21 ^{ab}
+++	2.42 \pm 0.23 ^b	2.37 \pm 0.29 ^b	2.12 \pm 0.17 ^{bc}	2.52 \pm 0.33 ^b	2.19 \pm 0.34 ^b

Values are expressed as means \pm SD. Groups without sharing common letters in the same column indicate significant difference at p < 0.05

結論

- 研究結果顯示敗血症會造成脾臟T細胞分佈之減少，但無論是在敗血症前或後給予Gln的補充皆可以維持脾臟T細胞之分佈。
- 在敗血症前後皆補充Gln其腹水中NO之濃度較control組高，脾臟細胞內TNF- α mRNA表現量亦較高，可能TNF- α 之表現促進敗血症後巨噬細胞之活性，因而釋出較多之NO增進巨噬細胞之吞噬能力，此結果與本實驗室前之研究結果有一致性。
- 在敗血症後給予Gln的補充會增加脾臟細胞內Th1及Th2細胞激素mRNA表現量，雖然Th1與Th2細胞兩者所分泌之細胞激素具拮抗作用，但細胞激素之分泌還要經過一連串post-transcription修飾，並經translation之後才能合成蛋白質，是否細胞激素之分泌會在此期間受到一些因子之調控則需更進一步之研究。

References:

- Fukatsu K, Kudsk KA, Zarzaur BL, Wu Y, Hanna MK, DeWitt RC. TPN decreases IL-4 and IL-10 mRNA expression in lipopolysaccharide stimulated intestinal lamina propria cells but glutamine supplementation preserves the expression. Shock 15 :318-22, 2001
- Lai YN, Yeh SL, Lin MT, Shang HF, Chen WJ: Glutamine supplementation enhances mucosal immunity in rats with gut-derived sepsis. Nutrition 20:286-291, 2004