全靜脈營養液中添加 L-glutamine 對燒傷老鼠營養素代謝及免疫反應之影響

葉松鈴

台北醫學大學保健營養系

前言

燒燙傷是一種創傷後之發炎反應(post-traumatic inflammatory disease)，嚴重燒燙傷會造成賀爾蒙分泌之改變、蛋白質及脂質之分解、糖質新生、引起嚴重氮流失、代謝速率增加，也會活化吞噬細胞和中性球(neutrophil)及 arachidonic acid 之代謝反應，產生 eicosanoid 之代謝產物並促進 cytokine 之生成(1-4)。有研究顯示燒傷病人免疫功能會降低，體內 IgG 量減少、延遲性皮膚敏感試驗及腸道免疫功能受損，造成細菌轉移，而使病人較易受到感染，產生敗血性之併發症(5-7)。另外燒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(8-10)。Deitch 等人(11)建議燒傷 20%或不及 20%但有營養不良的人均應積極給予營養支持。

Glutamine(GLN)是全血中含量最多的氨基酸，也是細胞間質中含量最多的游離氨基酸，由於其在體內可自行合成，以往常忽略其重要性，近年來，一些研究發現在受傷及一些異化的疾病狀況下，血中及骨骼肌中 GLN 的濃度有明顯下降(12,13)，其下降量的多寡與其存活率相關(14)，而根據研究嚴重燒燙傷病人血中 GLN 濃度較正常人減少 58%,且此種低 GLN 濃度會持續 21 天以上(15)。另外一些複製快速的細胞如淋巴球、fibroblasts、癌細胞和腸黏膜細胞等均消耗大量的 GLN (16)，加上其在一些細胞、組織培養上的必要性，遂逐漸受到重視，甚至被認為在某些生理或疾病狀況之下，GLN 是一種必需氨基酸(17)。有研究顯示 GLN 添加於全靜脈營養(total parenteral nutrition,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(18-20)。GLN 除了在疾病狀況下對蛋白質代謝有正面影響外，近年來的實驗顯示 GLN 之添加在體外實驗可促進 T lymphocyte 增生(21)，在 interleukin(IL)-2 存在下 GLN 之添加可促進 killer cell 之活性同時 tumor necrosis factor (TNF)-α、interferon-γ之產生亦與 GLN 有 dose response 之關係(22)。人體實驗中顯示，骨髓移植的病人，飲食中添加 GLN 的組別血中 T lymphocyte、CD4 及 CD8 較未添加組高(23)，手術後的病人若添加 GLN 可使 T-cell DNA 之合成增加，但對 IL-2、TNF、IL-6 無影響(24)。在 GLN 對 NO 之產生上 in vitro 得到的結果並不一致，O'Dorod 等人(25)之實驗顯示，GLN 會促進 neutrophil 產生 NO 。而 Meininger 等人(26)的實驗則顯示 GLN 會調節 arginine-NO pathway 抑制 L-citrullin 轉變成 L-arginine， 因而抑制 NO 之產生，

而抑制 NO 之產生可應用於減輕發炎反應。

在燒燙傷補充 GLN 之研究方面，補充較高量 GLN 之燒傷老鼠其細菌轉移之比例較低(27)，而給予 Arginine 或 GLN 之前驅物質 ornithin A-ketoglutarate (OKG)之老鼠在燒傷後 2-3 天氮平衡之情形顯著較未添加 OKG 者為佳(28)，另外燒傷病人之中性白血球在體外實驗中若培養液中有 GLN 存在時，其噬菌能力會增強(29)。

TPN 是一種不經由腸道之營養支持方式，常用於重症病人。燒燙傷病人常需要 TPN 作為營養支持，目前並無在 TPN 溶液中添加 GLN 對燒傷病人營養素代謝及免疫反應之研究。因此本研究擬以燒傷老鼠之動物模式來探討 TPN 溶液中添加 GLN 對燒傷老鼠之影響。本研究將分成兩部分進行，由於燒傷會造成免疫能力之降低，為研究 GLN 之添加對燒傷後 24 小時內細胞激素及 T 淋巴球之變化情形，第一部份先以 TPN 方式輸入含 GLN 之溶液一星期再進行燒傷，來探討 GLN 之添加是否有可能減輕燒傷所造成之異化作用，並增強燒傷後之免疫能力。因現實生活中燒傷之發生並不能預知，故第二部份為燒傷後再給予富含 GLN 之 TPN 溶液 2 或 3 天，燒傷後之 48-72 小時是燒傷異化作用最嚴重之時期，而老鼠在燒燙傷 3 天之後可能漸漸恢復，故在輸入富含 GLN 之 TPN 48 及 72 小時後分別抽血，來觀察 GLN 之添加對燒傷後之異化作用及免疫能力之影響。

實驗材料及方法

第一部份

本計劃擬以 230-250g 之雄性 Wistar rat 為實驗對象，經一星期之適應期後，將老鼠分成 2 組，分別進行頸靜脈插管，完全由 TPN 方式供給營養一星期，兩組輸入之 TPN 溶液營養素含量均完全相同只有胺基酸組成不同，一組添加 Glycine(Gly)，一組添加 GLN，以往之研究顯示在 TPN 溶液添加 2%之 GLN，在氮平衡及維持小腸黏膜細胞重量上均較未添加組為佳(30)，故本研究亦以此為添加量。兩組輸液為等氮量（Isonitrogenous），TPN 溶液中所含熱量為 1kcal/1ml, 每天給予之熱量為 270kcal / kg BW, N / kcal 為 1:105, protein、fat、carbohydrate 約佔總熱量之 22%、11%、67%，一星期後進行燒燙傷實驗。本實驗組別為 GLN 燒傷組(GLN-Burn)及 Gly 燒傷組(Gly-Burn)。

燒燙傷實驗之動物模式：

將老鼠以腹腔注射麻醉後，剃掉背部的毛，將老鼠置於一底部開有一長方形空窗之隔熱模型中，將剃毛部位緊貼於空窗，再將此曝露處浸於沸水中 10 秒鐘，造成老鼠體表約 25%之三度燙傷(31,32)，燙傷後立即給予腹腔注射生理食鹽水(10ml/100g BW)以補充水分(32)。燙傷後之 1-6 小時每小時由頸靜脈抽血 0.5 ml，並於 24 小時時犧牲取血、腹腔 macrophage 及肝、腎、肺、脾等器官，來探討 GLN 添加與否對燒傷後短時間內不同時間點細胞激素及 nitric oxide (NO)產生之變化，及燒燙傷 24 小時後非特異性免疫反應、T 淋巴球分佈之情形。

測定之項目為：

1. 血漿中 NO 之測定：Arg 為 NO 之前身，本研究擬比較兩組各不同時間點 NO 產生量之差異性來探討 NO 與其他代謝變化上之相關性。NO 會轉變成 nitrate 及 nitrite, 將 nitrate 以 nitrate reductase 轉變成 nitrite 後，以比色法測定之(Calbiochem-Novabiochem Corp, USA)。

2. 血漿中 cytokine 之測定：擬測定之 cytokine 包括與發炎反應相關之 Interleukin (IL)-1β、IL-6、tumor necrosis factor(TNF)-α 及與 T cell proliferation 相關之 IL-2，cytokine 之測定為利用 ELISA 之方法(Biosource, Belgium)(33)。

3. macrophage cytokine之分泌：將兩組分離出之macrophage 以 $2x10^6$/ml之濃度置於培養皿中，以定量之LPS來刺激，經過 24 小時之培養後將之離心取上清液，以測定其cytokine之製造量，

4. 巨噬細胞吞噬綠膿桿菌之能力：由於臨床資料顯示燒傷病患最容易被綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)感染，本計劃擬用顯微鏡下觀察吞噬作用的方法，先將綠膿菌培養至mid-log phase，以 4℃的PBS洗 2 次，再以RPMI 1640 調整細菌濃度為 10^8 CFU/ml。 將腹腔收集之巨噬細胞以冷卻的RPMI 1640 清洗，再以含 10% 胎牛血清之RPMI調整細胞濃度為 2×10^5 cells/ml。吞噬作用之進行是將滅過菌、直徑 11 mm之圓型蓋玻片放入 24 孔培養皿中的每一孔洞中，再加入 1ml的巨噬細胞，在 37℃之CO_2培養箱中靜置 2 小時，讓巨噬細胞吸附於蓋玻片後，將未吸附之腹腔細胞沖洗掉，在 37℃，5%的CO_2培養箱中靜置 30 分鐘。以冷卻的PBS沖洗吸附在蓋玻片上的巨噬細胞以去除未被吞入之綠膿桿菌。以 1% methanol固定細胞後，再以 1% crystal violet染色。以油鏡將細胞放大 1000 倍後，觀察 100 個巨噬細胞的吞菌作用，並計算每個細胞吞噬細菌的數目。將巨噬細胞吞噬綠膿桿菌的數目，分為三種程度：小於 6 個，6 個至 19 個，大於 19 個細菌。分別計算 100 個巨噬細胞中三種所佔的百分比(34)。

5. 自然殺手(NK)細胞比例、數目及細胞活性之測定：將脾臟細胞取出並製成單一懸浮液，更進一步利用Tris-Ammonium chloride緩衝液將紅血球懸浮，白血球則利用Hank's溶液清洗三次。將NK細胞分離出後，利用Fluorescein isothiocyanate (FITC)及Phycoerythin (PE)染色之單株抗體來計算不同表面標記之比例和數目。NK細胞之活性則先培養其標的細胞(YAC-1 細胞株)，將YAC-1 細胞與^{51}Cr一起培養約 4 小時，再將殘餘之^{51}Cr除去，此時再加入NK細胞與已經與^{51}Cr培養過的標的細胞一起培養，過一段時間取出上清液，以counter計算其放射強度(35)。

6. T細胞之反應：取全血測定之。$CD4^+$及 $CD8^+$為helper T 及supressor T淋巴球上之細胞標記，測定$CD4^+$及 $CD8^+$蛋白質可知T淋巴球之變化情形。$CD4^+$及$CD8^+$量之下降或$CD4^+$/ $CD8^+$比例下降均表示免疫能力降低(36)。$CD4^+$及$CD8^+$ T淋巴球以接合FITC之antibody結合後以Flow Cytometry測定之(37)。

第二部份

同樣以 230-250g 之雄性 Wistar rat 為實驗對象，經一星期之適應期後，將老鼠分成 2 組，麻醉後分別進行頸靜脈插管並同時燒燙傷，燒燙傷後由 TPN 方式供給營養二或三天，兩組輸入之 TPN 溶液營養素含量均完全相同只有胺基酸組成不同，如第一部分實驗所述。在燒傷後之 48 及 72 小時分別犧牲老鼠，取腹腔吞噬細胞、血及肝腎肺等器官。

其測定項目為：

1. 肺、肝、腎之過氧化物之測定：根據研究顯示燒燙傷時 neutrophil 會侵襲遠端器官，造成器官中 malondialdehyde(MDA)之濃度增高，使器官受損(9,10)。測定器官中 MDA 之濃度可間接知道器官受損之程度。各器官以 250mM sucrose, 10mM Hepes 調成 pH 7.4 後，打成 15%之均質液測定其中之 TBARS 濃度(38)。

2. 肺、肝、腎臟抗氧化酵素活性之測定：Saitoh 等人(9)之研究顯示在燒傷 6 小時後即可看出肺中 superoxide dismutase (SOD)之活性明顯較未燒傷組高，顯示燒傷確會造成較大之氧化壓力。本研究擬測定肺、肝、腎之 SOD 及 glutathione peroxidase (GSHPx)活性，來探討 Arg 添加對燒傷老鼠體內抗氧化酵素活性之影響，並比較不同時間點抗氧化酵素活性之改變。SOD 及 GSHPx 之測定為將 15%之器官均質液，經離心後取 cytosolic fraction 測定其中之酵素活性(38)。

3. 血漿中乳酸之分析：血漿中乳酸濃度可作為兩組醣解作用進行之依據。

4. 血漿中游離脂肪酸之分析：血漿中游離脂肪酸濃度可知兩組脂解作用進行之狀況。

5. 血漿中 NO 濃度之測定：測定方法如第一部分所述。可知 GLN 添加對燒傷異化作用下血中 NO 產生之影響。

6. macrophage cytokine 之分泌：測定方法如第一部分所述。

7. T 細胞之反應：測定方法如第一部分所述。

8. 巨噬細胞吞噬綠膿桿菌之能力：測定方法如第一部分所述。

預期結果

預期 GLN 不論燒傷前或後添加於 TPN 溶液中可減輕燒傷所引致之異化作用，並增強免疫反應，期望將來可實際應用於燒傷之病患。但由於 GLN 對 NO 之產生到底是抑制或促進尚有爭議，可能亦因疾病狀況不同而有不同之影響，因為燒傷亦屬於一種發炎反應，若 GLN 之添加促進 NO 之產生，其對燒傷時所造成之正面或負面影響仍有待本實驗結果來釐清。

References:

1. Tredget EE, Yu YM: The metabolic effects of thermal injury. World J Surg 16: 68-79, 1992

2. Wolfe RR: Relation of metabolic studies to clinical nutrition-the example of burn injury. Am J Clin Nutr 64: 800-808, 1996

3. De-Souza DA, Greene LJ: Phamacological nutrition after burn injury. J Nutr 128: 797-803, 1998

4. Alexander JW: Mechanism of immunologic suppression in burn injury. J Trauma 30: S70-75, 1990

5. Alexander JW, Ogle CK, Stinnett JD, Macmillan BG: Asequential prospective analysis of immunologic abnormalities and infection following severe thermal

injury. Ann Surg 188: 809-816, 1978

6. Deitch EA: Intestinal permeability is increased in burn patients shortly after injury. Surgery 107: 411-416, 1990

7. Munster AM, Eurenius K, Katz RM, et al: Cell-mediated immunity after thermal injury. Ann Surg 117: 139-143, 1973

8. Nishigaki I, Hagihara M, Hiramatsu M, et al: Effect of thermal injury on lipid peroxide levels of rats. Biochem Med 24: 185-189, 1980

9. Saitoh D, Okada Y, Ookawara T, et al: Prevention of ongoing lipid peroxidation by wound excision and superoxide dismutase treatment in the burned rat. Am J Emerg Med 12: 142-146, 1994

10. Cetinkale O, Konukoglu D, Senel O, et al: Modulating the functions of neutrophils and lipid peroxidation by FK506 in a rat model of thermal injury. Burns 25:105-112, 1999

11. Deitch EA: Nutritional support of the burn patients. Crit Care Clin 11: 735-750, 1995

12. Kapadia CR, Muhlbacher F, Smith RJ, Wilmore DW: Alternations in glutamine metabolism in response to operative stress and food deprivation. Surg Form 33:19-21, 1982

13. Muhlbacher F, Kapadia CR, Colpoys MF, et al: Effects of glucocorticoids on glutamine metabolism in skeletal muscle. Am J Physiol 247:E75-38, 1984

14. Souba WW, Smith RJ, Willmore DW: Glutamine metabolism by the intestinal tract. J Parenter Enter Nutr 9:608-617, 1985

15. Parry-Billings M, Evans J, Calder PC, et al: Does glutamine contribute to immunosuppression after major burns? Lancet 336: 523-525, 1990

16. Souba WW: Glutamine: A key substrate for the splanchnic bed. Annu Rev Nutr 11:285-308, 1991

17. Lacey JM, Wilmore DW: Is glutamine a conditionally essential amino acid. Nutr Rev 48:297-309, 1990

18. Furst P, Albers S, Stehle P: Availability of glutamine supplied intravenously as

alanylglutamine. Metabolism 38:67-72, 1989

19. Hubl W, Roth E, Druml W: Influence of sepsis on metabolism of L-alanyl-L-glutamine(Ala-GLN) and glycyl-L-glutamine (Gly-GLN). Clin Nutr 8:55, 1989

20. O'Dwyer ST, Smith RJ, Hwang TL, et al: Maintenance of small bowel mucosa with glutamine-enriched parenteral nutrition. J Parenter Enter Nutr 13:579-585, 1989

21. Rohde T, Maclean DA, Klarlund Pedersen B: Glutamine, lymphocyte proliferation and cytokine production. Scand J Immunol 44:648-650, 1996

22. Heberer M, Babst R, Juretic A, et al: Role of glutamine in the immune response in critical illness. Nutr (Suppl) 12:S71-S72, 1996

23. Ziegler TR, Bye RL, Persinger RL, et al: Glutamine-enriched parenteral nutrition increases circulating lymphocytes after bone marrow transplanation. J Parenter Enter Nutr 18:17S, 1994

24. O'Riordain MG, Fearon KCH, Ross JA, et al: Glutamine-supplemented total parenteral nutrition enhances T-lynphicyte response in surgical patients undergoing colorectal resection. Ann Surg 220:212-221, 1994

25. O'Dowd Y, Newsholme P: Evidence for the involvement of glutamine in nitric oxide (NO) production by immunostimulated neutrophils. Biochem Soc Trans 25:403S, 1997

26. Meininger CJ, Wu G: L-glutamine inhibits nitric oxide synthesis in bovine venular endothelial cells. J Pharmacol Exp Ther 281:448-453, 1997

27. Tenenhaus M, Hansbrough JF, Zapata-Sirvent RL, et al: Supplementation of an elemental diet with alayl-glutamine decreases bacterial translocation in burned mice. Burns 20: 220-225, 1994

28. Le Boucher JE, Farges MC, Minet R, et al: Modulation of immune response with ornithin A-ketoglutarate in burn injury: an arginine or glutamine dependency? Nutrition 15: 773-777, 1999

29. Ogle CK, Ogle JD, Mao JX, et al: Effect of glutamine on phagocytosis and bacterial killing by normal and pediatric burn patient neutrophils. J Parenter

Enter Nutr 18: 128-133, 1994

30. Grant JP, Snyder PJ: Use of L-glutamine in total parenteral nutrition. J Surg Res 44: 506-513, 1988

31. Cui XL, Iwasa M, Iwasa Y, et al: Effects of dietary arginine supplementation on protein turnover and tissue protein synthesis in scald-burn rats. Nutrition 15: 563-569, 1999

32. Vaubourdolle M, Coudray-Lucas C, Jardel A, et al: Action of enterally administered ornithin α-ketoglutarate on protein breakdown in skeletal muscle and liver of the burned rat. J Parenter Enter Nutr 15: 517-520, 1991

33. Yeh SL, Chao CY, Lin MT, et al: Effects of parenteral infusion with medium-chain triglycerides and safflower oil emulsions on hepatic lipids, plasma amino acids, and inflammatory mediators in septic rats. Clin Nutr 19:115-120, 2000

34. Gilleland HE, Gilleland LL, Matthews JM, et al: Recombinant outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* elicits antibodies that mediate opsonophagocytic killing, but not complement-mediated bacteriolysis, of various strains of *P. aeruginosa.* Curr Microbiol 24: 1-7, 1992

35. Dawson HD, Li NQ, DeCicco KL, et al: Chronic marginal vitamin A status reduces natural killer cell number and function in aging Lewis rats. J Nutr 129: 1510-1517, 1999

36. Janu P, Li J, Renegar KB, et al: Recovery of gut-associated lymphoid tissue and upper respiratory tract immunity after parenteral nutrition. Ann Surg 225: 707-717, 1997

37. Li J, Kudsk KA, Janu P, et al: Effect of glutamine-enriched total parenteral nutrition on small intestinal gut-associated lymphoid tissue and upper respiratory tract immunity. Surgery 121: 542-549, 1997

38. Yeh SL, Chang KY, Huang PC, et al: Effects of n-3 and n-6 fatty acids on plasma eicosanoids and liver antioxidant enzymes in rats receiving total parenteral nutrition.Nutrition 13: 32-36, 1997