ƒ ‹ F | Œfia‹ ˙'e›ß• |–M^D‹ ª¤s›p e ƒ¤"G‡ł§i

¢æQ i„ – ƒ flg⁄ ›P⁄§ o"¢⁄ˇ ‡⁄¶‰Ł⁄ ¸´H ⁄ ⁄l" †{⁄§..v

¯T(2/2)

›p e^ §¡G §O«‹ ›p e

›p e‰ ¸s„¡GNSC94-2320-B-038-007-

ıƒ · ¶¡¡G94 ƒ~08 ⁄°01 ⁄ ƒƒ 95 ƒ~07 ⁄°31 ⁄Ø

ıƒ ‡ ƒ ¡G» O ¥´ ˙⁄j ˙« O • ¨¤t

›p e¥ D ø⁄¡HG, › Ö„a

‡ł§i^ «‹¡G§ „ª‡ł§i

‡ł§i" ¥ ¡G¥ Ñu Œ» • |˜‡‹ ª¤s⁄ –o‡ł§i⁄ ¸ o" ‰ ⁄

‡ B † zŁ¡fG¡¥»›p e¥ i ⁄ ‰ ¶‹ d,

⁄⁄ ¥` Œ 95 ƒ~8 ⁄°7 ⁄Ø

前言

敗血症(sepsis)是臨床上常見的併發症之一，常發生於重症或術後的病人，當細菌毒素侵入人體會促使體內的免疫細胞產生促發炎反應細胞激素(proinflammatory cytokines)，這些細胞激素除了會影響體內營養素正常代謝外，也會引發白血球過度活化表現過多的整合素(integrin)，而血管內皮細胞(endothelial cell, EC)亦會表現過多的免疫黏著分子(cellular adhesion molecule, CAM)，促使白血球在血管壁滾動(rolling) ，當白血球上之整合素和 EC 上之黏著分子相互黏著(adhesion)後，白血球就會由血管內遷移(transmigration)至周邊組織中，當其到達組織後會發生去顆粒作用，釋放許多的酵素以產生自由基及蛋白質分解酵素毒殺外來物質，但分泌過多時會傷害正常組織，這可能是敗血症引發多重器官衰竭的主要原因之一。由於 EC 上 CAM 之表現及白血球之遷移是造成組織傷害的起始步驟，故若能降低敗血症時 EC 上 CAM 之表現，或減少白血球之遷移，應可減輕敗血症因組織中過多白血球浸潤所引致之組織傷害。麩醯胺(glutamine, GLN)是細胞間質中含量最多的游離胺基酸，是免疫細胞及腸黏膜細胞之重要能量來源。近年來許多實驗顯示在創傷或疾病狀態下血中 GLN 之濃度會下降，且降低程度與疾病之嚴重程度相關，GLN 在某些生理或疾病狀況之下被認為是一種必需胺基酸。GLN 之添加已證實可促進 T lymphocyte 增生，促進腸黏膜免疫球蛋白之分泌，並增加巨噬細胞之吞噬能力。在 GLN 對免疫黏著分子的表現方面，有實驗顯示在全靜脈營養液中添加 GLN，可減少因使用靜脈營養所造成腸道中 ICAM-1 的過度表現，利用 video microscopy 觀察腸道發炎的大白鼠，發現給予 GLN 可減少其腸道血管中白血球黏著及遷移之反應。目前並無任何探討營養素介入對敗血症時組織及細胞免疫黏著分子表現及白血球細胞遷移之相關研究。因此本實驗以兩年的時間，分別以體內及體外實驗之模式來探討給予 GLN 補充對敗血症引致之組織傷害及免疫相關因子變化之影響。第一年已就飲食中添加 GLN，探討 GLN 對敗血症時組織器官免疫細胞及相關分子表現之影響繳交報告。第二年為細胞培養實驗，現在就第二年的部份做報告，探討內皮細胞及中性球，以腹部手術病人腹腔引流液刺激後，培養在不同濃度之 GLN 培養液中，觀察正常生理濃度下之 GLN 是否可降低各種黏著分子之表現，並減少白血球之遷移。

材料與方法

將人類臍帶靜脈血管以含有 collagenase 之 PBS 在 37℃，5%CO_2 的環境下灌

流 20 分鐘，並用 PBS 沖洗靜脈，收集灌流及清洗液中之臍靜脈內皮細胞(HUVEC)放入 medium199 中培養，細胞繼代培養則用 medium 199 加入 20% FCS 及 porcine intestinal heparin 培養液培養之，將細胞放入 coating 上 0.1% gelatine 之培養皿中，經過 2-3 次繼代培養後供實驗備用。

人類白血球之分離為抽取健康成人血液 10ml，與等量的 dextran-T500 混合後靜置 20 分鐘，待 buffy coat 與紅血球界線分明後，將 buffy coat 移至另一個離心管中離心後去除上清液將 PBS 加入沈澱物中以 1200 rpm，4°C，離心 10 分鐘 2 次以除去 dextran，去除上清液之後加入 2 ml 之 PBS 混合均勻後緩緩加入 4 ml 之 Ficoll-Paque 1.077 使之重疊，在 22°C 的環境下以 1200 rpm 離心 25 分鐘，此時將 Ficoll-Paque 1.077 層的細胞吸出，以 PBS 清洗之，此時所得之細胞為淋巴球及巨噬細胞，而位於下層的 PMN 及紅血球細胞加入 1 ml 的 PBS 後，再加入 3ml 的無菌水室溫下混合 30 秒後加入濃度為 2 倍的 PBS 使之變為等張溶液，將溶液以 1200 rpm 離心 10 分鐘將沈澱之 PMN 細胞加入淋巴球及巨噬細胞中混合均勻，將細胞數目調至 2×10^5 個/0.3ml 以備用。

白血球遷移出單層內皮細胞之實驗方法為，將 HUVEC 培養於具有 fibronectin 之 Insert 中，將其鋪滿單層之 HUVEC，培養在加入不同濃度 0，300，600，1000(μmol/L M-199)之 GLN，以 37℃，5%CO_2 環境下培養 24 小時後，加入培養於不同濃度 GLN 的白血球(1.5 $X10^6$ 個)中，而後加入 100 ul 的腹部手術患者腹腔引流液(PDF)刺激，3 小時後吸取上清液，而 insert 下層之溶液亦收集分析。

結果與討論

本實驗結果顯示，內皮細胞上黏著分子(包括 ICAM-1 及 VCAM-1)，及中性球上整合素(integrin, CD11b/CD18)及 interleukin(IL)-8 receptor 的表現，在以 PDF 刺激後，均較以正常人血清刺激為高，顯示 PDF 中有許多發炎反應介質，經其刺激後，會使內皮細胞及中性球活化而表現出黏著分子。在經 PDF 刺激的組別中，內皮細胞上表現的黏著分子，600 及 1000 uM GLN 組較 300 uM GLN 組為低(表一)，中性球上表現的 CD11b 及 IL-8 receptor 也有相同的結果(表二)，另外中性球穿過內皮細胞遷移至下層的收集液中之細胞數，也以 600 及 1000 uM GLN 組較 300 uM GLN 組為少(圖一)。內皮細胞上表現的黏著分子，及中性球上表現的整合素及 IL-8 receptor，均為發炎反應時表現的蛋白質，當發炎反應越嚴重時表現量越多，而白血球的遷移至發炎部位，是人體免疫反應的一種保護作用，但組織中白血球的浸潤過多會對組織造成傷害。本研究將內皮細胞及中性球分別培養於 0, 300, 600, 1000 uM GLN 中，300 uM GLN 為模擬重症病人體內 GLN 之濃度，600 uM 為正常人體內之生理濃度，而 1000 uM 為高於生理濃度。本研究結果顯示，在低於 GLN 之生理濃度下，以 PDF 刺激會表現較多的黏著分子，白血球的遷移也較多，但若接近或高於生理濃度的 GLN 之下，則使黏著分子，IL-8 及其 receptor 的表現減少，也可降低白血球的遷移。本研究結果可能可

應用於腹腔手術患者，在營養支持的過程中添加 GLN 或可有助於降低發炎反應及對組織之傷害。

Table 1. Intracellular adhesion molecules (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 expression on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) stimulated by control plasma or plasma and peritoneal drain fluid (PDF) from surgical patient at different GLN concentrations

GLN	ICAM-1	VCAM-1
	%	
0 uM		
Control	2.63±0.51	25.80±2.52
Plasma	4.76±2.35	23.65±2.36
PDF	25.61±2.53^{+}	43.65±2.34^{+}
300 uM		
Control	2.92±0.34	25.08±3.52
Plasma	6.04±0.65‡*	24.65±2.36
PDF	27.51±1.25^{+}	51.42±2.51^{+}*
600 uM		
Control	2.72±0.93	22.84±3.62
Plasma	5.17±0.32‡	19.65±3.35*
PDF	22.61±2.63^{+}*	44.57±3.62^{+}
1000 uM		
Control	3.72±0.90	22.37±4.11
Plasma	3.76±1.32*	15.65±3.65*
PDF	16.62±2.86^{+}*	39.28±2.55^{+}*

Results are representative of triplicate measurements. Data are presented as mean ± SD. $^{+}$Significantly different from the control and plasma groups at the same GLN concentration. ‡ Significantly different from the control group at the same GLN concentration. *Significantly different from the other GLN concentrations in the same group.

Table 2. Leukocyte interleukin (IL)-8 receptor and CD11b expressions stimulated by control plasma or plasma and peritoneal drain fluid (PDF) from surgical patients at different GLN concentrations

GLN	IL-8 receptor	CD11b
	%	
0 uM		
Control	3.15±0.51	12.57±0.32
Plasma	4.03±1.03	13.47±1.02
PDF	6.13±0.42^{+}*	19.85±0.56^{+}
300 uM		
Control	3.31±0.72	14.54±0.46
Plasma	7.12±0.32‡	16.43±0.98*
PDF	10.62±0.46^{+}	32.25±1.53^{+}*
600 uM		
Control	4.52±0.61	15.61±0.52
Plasma	6.63±0.21‡	14.13±0.63
PDF	10.75±0.34^{+}	25.94±0.90^{+}*
1000 uM		
Control	3.23±0.40	10.97±0.65
Plasma	4.53±0.65	11.27±0.89*
PDF	5.38±0.35^{+}*	13.91±1.92*

Results are representative of triplicate measurements. Data are presented as mean ± SD. $^{+}$Significantly different from the control and plasma groups at the same GLN concentration. ‡Significantly different from the control group at the same GLN concentration. *Significantly different from the other GLN concentrations in the same group.

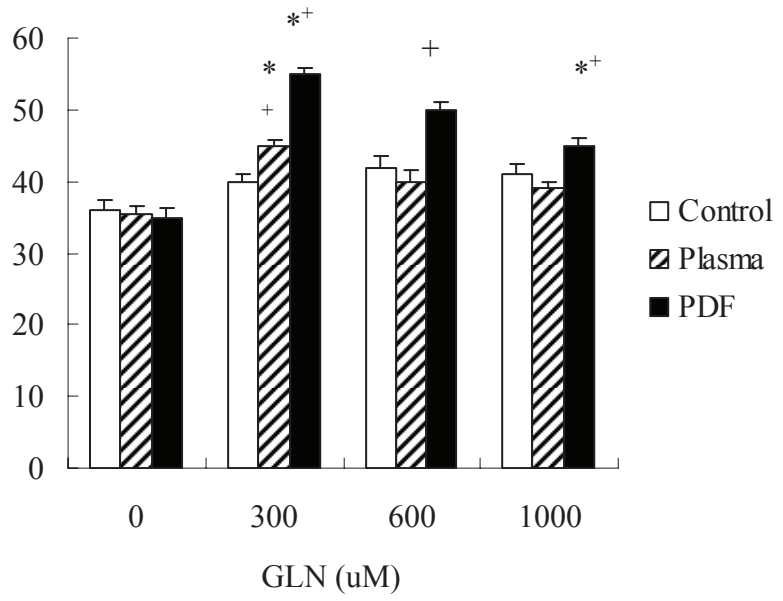

Fig. 1. Plasma and peritoneal drain fluid (PDF)-stimulated migration of polymorphonuclear neutrophils across human umbilical vein endothelial cells cultured on a human fibronectin-coated culture with the addition of different glutamine (GLN) concentrations. Values represent means ± SD in three wells from three separate experiments. $^{+}$Significantly different from the control group at the same GLN concentration. *Significantly different from the other GLN concentrations in the same group. No difference in polymorphonuclear neutrophils across endothelial cells in the control group was observed at various GLN concentrations.

計畫成果自評

本計畫為兩年期之計畫，目前已經全部執行完成，本計畫結果已分別發表於 Cytokine 31:329-334, 2005; Nutrition 22:408-413, 2006 and Shock 25:236-240, 2006。

References

1. Williams TJ, Hellewell PG: Endothelial cell biology. Adhesion molecules involved in the microvascular inflammatory response. *Am Rev Respir Dis* 146:S45-S50, 1992.

2. Springer TA: Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425-434, 1990.

3. Gao JX, Issekutz AC: Mac-1 (CD11b/CD18) is the predominant beta 2 (CD18) integrin mediating human neutrophil migration through synovial and dermal

fibroblast barriers. *Immunology* 88:463-470, 1996.

4. Fukatsu K, Lundberg AH, Kudsk KA, Hanna MK, Johnson CD, Wu Y, Wilcox HG, Zarzaur BL: Modulation of organ ICAM-1 expression during IV-TPN with glutamine and bombesin. *Shock* 15:24-28, 2001.

5. Arndt H, Kullmann F, Reuss F, Scholmerich J, Palitzsch KD: Glutamine attenuates leukocyte-endothelial cell adhesion in indomethacin-induced intestinal inflammation in the rat. *J Parenter Enteral Nutr* 1999; 23:12-18