

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

添加精胺酸對腹膜炎引致敗血症老鼠腸道及全身性免疫反應之影響(2/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2320-B-038-029-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：臺北醫學大學保健營養學系

計畫主持人：葉松鈴

計畫參與人員：王怡云

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 93 年 9 月 30 日

前言

細菌性感染引起之敗血症是造成重症病人死亡的主要原因之一，敗血症會造成細胞激素的過度釋出，而引起體內代謝的失衡乃至於多重器官衰竭。敗血症也會造成腸繫膜血流量減少、小腸黏膜水腫、小腸細胞對營養素之利用率降低，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。有研究顯示，敗血症病患或動物其血漿中精氨酸 (arginine, Arg) 之濃度會下降，添加 Arg 可提升血中 Arg 濃度，改善敗血症動物之存活率(1)。過去的研究顯示在腹膜炎引致敗血症後以靜脈輸入 Arg 之老鼠存活率有明顯之改善，而給予胃灌食組其存活率則與不給 Arg 之控制組無差異(2)，也有研究顯示 Arg 添加之敗血症組腸繫膜淋巴結及肝、脾中細菌數量均顯著較未添加組少(3)，但除此之外並無實驗探討 Arg 是藉由何種免疫機制改善敗血症老鼠之存活率。

腸道淋巴組織(gut associated lymphoid tissue, GALT)是腸道及腸外組織重要的防禦系統，腸道內 70-80%的免疫球蛋白由腸黏膜淋巴組織產生。在腹膜炎引致敗血症之實驗模式中，腸道是直接受到傷害的地方，若 Arg 添加可增加敗血症動物之存活率，是否有可能因增強了腸道及全身性免疫反應而致。故本實驗將老鼠以盲腸結紮及穿孔手術(cecal ligation and puncture, CLP)引致腹膜炎，這是一種被認為最接近臨床上腹膜炎引發敗血症的動物模式，並在敗血症前以由口進食，敗血症後以全靜脈營養之輸入方式給與 Arg，來研究 Arg 對敗血症時腸道及全身性免疫反應之影響。本實驗為一兩年期之計畫，上年度計畫探討血中 T 及 B 淋巴細胞之分佈比例及腹腔中巨噬細胞及白血球之吞噬能力，本年度探討 Arg 對腸道 Peyer's patches 淋巴細胞之分佈，IgA 分泌之及對脾臟細胞激素 mRNA 表現之影響。

實驗材料及方法

本計畫以 230g-250g 之 Wistar 雄性老鼠為實驗對象，共分為四組，經一星期之適應期後，其中兩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 2% Arg 取代 casein 之飲食，兩組為等氮量。各給予十天後，四組均實行 CLP 同時進行頸靜脈插管。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(5)。在兩種飲食之組別中各取一組在敗血症後輸入一般之全靜脈營養(TPN)輸液，剩下之兩組輸入以 2% Arg 取代氨基酸溶液之輸液，故四組分別為：(1) CLP 前後均未添加 Arg 組 (control 組) (2) CLP 前給一般飲食，CLP 後給添加 Arg 之 TPN (3) CLP 前給添加 Arg 之飲食，手術後給一般之 TPN (4) CLP 前後均添加 Arg 組。四組之營養素組成、總熱量以及

總氮量均相等，每組 12 隻。在前驅實驗中我們發現在第三天時淋巴結的數目最多且最明顯，故在引致敗血症三天後犧牲老鼠，取小腸沖洗液 peyer's patches 及脾臟供分析之用。

結果

小腸上 Peyer's patches 之數目及 Peyer's patches 中淋巴球之數目+/+顯著較-/-及-/+組高但與+/-組無差異(數據未顯示)。Peyer's patches 中淋巴細胞之分佈比例包括 CD3, CD4, CD8, CD45Ra 各組之間並無差異(Fig. 1)。小腸 IgA 之分泌量+/+顯著較-/-及-/+組高但與+/-組無差異(Fig. 2)。

討論

本研究結果顯示小腸上 Peyer's patches 的數目及 Peyer's patches 中淋巴球之數目，在敗血症前後均添加 Arg 組，顯著較控制組及在敗血症之後添加組高，此結果與前人之結果相似(4,5)，前人之結果亦顯示飲食中添加 Arg 可促進週邊血中 T 細胞之增殖及裸鼠脾臟 T 細胞之數目。為了解 Arg 對 Peyer's patches 中 total B (CD45Ra⁺), total T (CD3⁺), helper T (CD4⁺), 及 cytotoxic T (CD8⁺) lymphocytes 之影響，故分析不同組 Peyer's patches 中淋巴球之分布，結果顯示各組間各種淋巴球之分布均無差異性，顯示在敗血症前後均添加 Arg，可促進 Peyer's patches 中淋巴球之增殖，但對淋巴球之分布比例並無影響。小腸 IgA 之分泌量在敗血症前後均添加 Arg 組，顯著較控制組及在敗血症之後添加組高，由於 IgA 是主要用於殺滅腸道細菌之抗體，此結果顯示添加 Arg 可有助於提昇敗血症時之黏膜免疫能力。為探討促進小腸 IgA 分泌之機轉，本研究亦以體外刺激之方式分析脾臟淋巴球分泌 interleukin (IL)-2, IL-4, IL-10, interferon- γ 之能力，結果顯示在敗血症前後均添加 Arg 之組別，IL-10 之分泌量顯著較其他組高，IL-10 屬於 Th2 type 之細胞激素，會促進體液性免疫反應，可能因此促進了腸道 IgA 之分泌。本計劃之研究結果顯示在敗血症前添加 Arg 有促進腸道及全身性免疫反應之趨勢，而在敗血症前後均添加 Arg 則有加強之效果，在此實驗中我們並沒有發現 Arg 添加組對致死率有正面之影響，但由於本實驗在敗血症後只觀察三天，是否較長時間觀察會有正面之影響，則有待更進一步之證實。

計畫成果自評

本計畫為兩年期計劃，目前計畫已執行完畢，結果已分別刊登於美國 Journal of Parenteral and Enteral Nutrition (27: 235-240, 2003)及 Clinical nutrition (23:561-569, 2004)期刊，另尚有部分結果已投稿仍待審查中。

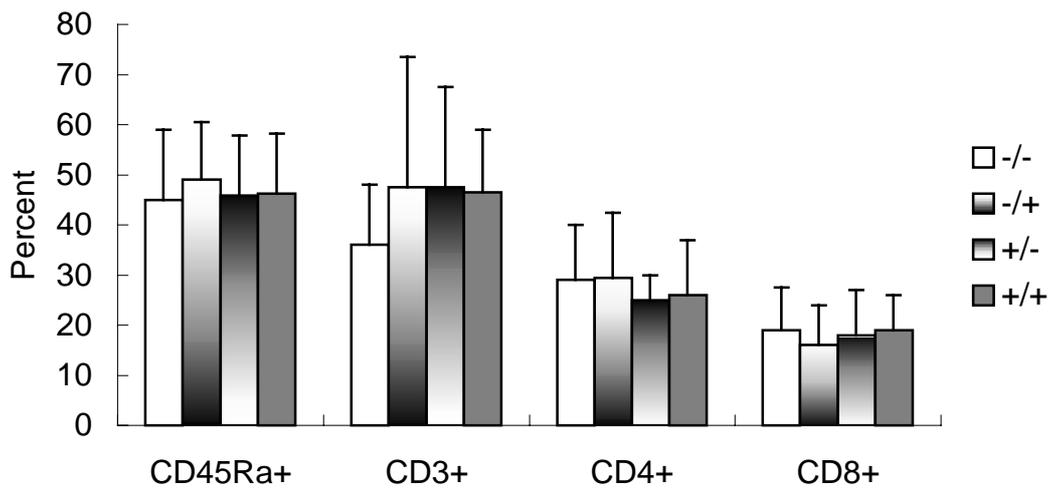


Fig. 1 The distribution of CD45Ra⁺, CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ lymphocytes in Peyer's patches among the 4 groups 3 days after CLP. There were no differences in the distributions of CD45Ra⁺, CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ cells in Peyer's patches among the 4 groups (group 1, *n* = 8; group 2, *n* = 8; group 3, *n* = 9; group 4, *n* = 11).

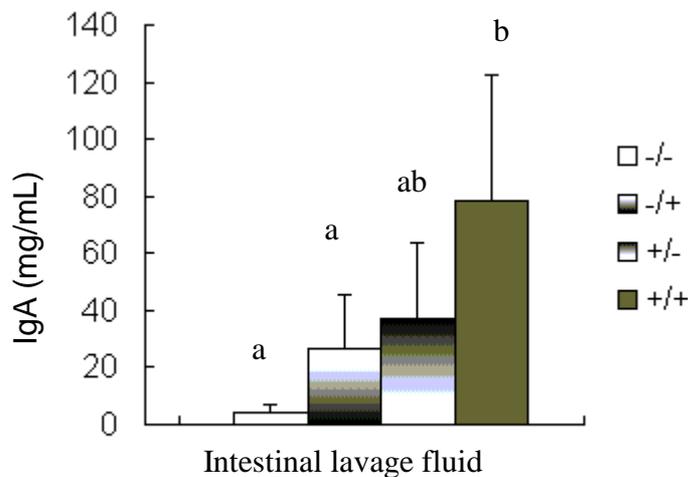


Fig. 2. Total immunoglobulin A (IgA) concentrations in intestinal lavage fluid in the 4 groups 3 days after CLP. Different letters indicate a significant difference among the groups. IgA levels in intestinal lavage fluid were significantly higher in group 4 (+/+) than in groups 1 and 2 (-/-, -/+), and there was no difference from group 3 (+/-). (group1, *n* = 9; group 2, *n* = 8; group 3, *n* = 9; group 4, *n* = 11).

References

1. Freund HR, Ryan JA, Fischer JE. Amino acid derangements in patients with sepsis. *Ann Surg* 188:423-430,1978
2. Madden HP, Breslin RJ, Wasserkurg HL, et al. Stimulation of T cell immunity by arginine enhances survival in peritonitis. *J Surg Res* 44:658-663,1988
3. Gianotti L, Alexander JW, Pyles T, et al. Arginine-supplemented diets improve survival in gut-derived sepsis and peritonitis by modulating bacterial clearance. *Ann Surg* 217:644-654,1993
4. Barbul A, Efron JE, Shawe T, Wasserkrug HL. Arginine increases the number of T lymphocytes in nude mice. *J Parenter Enter Nutr* 13S:7S (abstr 14), 1989
5. Barbul A, Lazarou SA, Efron DT, Wasserkrug HL, Efron G. Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. *Surgery* 108: 331-317, 1990

