行政院國家科學委員會專題研究計畫　期中進度報告

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(1/2)

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：NSC91-2320-B-038-017-
執行期間：91 年 08 月 01 日至 92 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

報告類型：精簡報告
報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文
處理方式：本計畫可公開查詢

中　華　民　國 92 年 5 月 21 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫進度報告

計畫名稱：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（1/2）
Effects of arginine 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-91-2320-B038-017

執行期間：91 年 8 月 1 日 93 年 7 月 31 日

第一年計畫執行期間：91 年 8 月 1 日 92 年 7 月 31 日

計畫主持人：葉松鈴

計畫參與人員：王怡云

執行單位：台北醫學大學保健營養系

中華民國九十二年五月三十一日

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(1)。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(2)。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(3)，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(4)，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刺手術(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(5)，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。本年度計畫主要探討腸道、脾臟、血液中 T 及 B 淋巴細胞之分佈比例，腹腔中巨噬細胞及白血球之吞噬能力等。

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 value 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，取腹水，收集腹腔 macrophage，由腹腔動脈收集血液樣本，並取下小腸及脾臟供分析之用。

結果

腹腔沖洗液(peritoneal lavage fluid, PLF)中厭氧菌及好氧菌之總數在 group3(+/-)及 group 4 (+/+)顯著較 group 1 (-/-)及 group 2 (-/+)為低(Fig 1)。但在全血中不論厭氧菌或好氧菌之總數在各組之間均無差異(Fig 1) 。腹腔中巨噬細胞之吞噬能力 group3(+/-)及 group 4 (+/+)顯著較 group 1 (-/-)及 group 2 (-/+)為高(Fig 2) 。全血中 polymorphonuclear neutrophils (PMNs) 之吞噬能力在各組之間均無差異(數據未顯示) 。血中及腹腔沖洗液中 NO_2^-/NO_3^-在 CLP 後三天各組之間並無差異(數據未顯示) 。另外全血、脾臟及 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(數據未顯示) 。

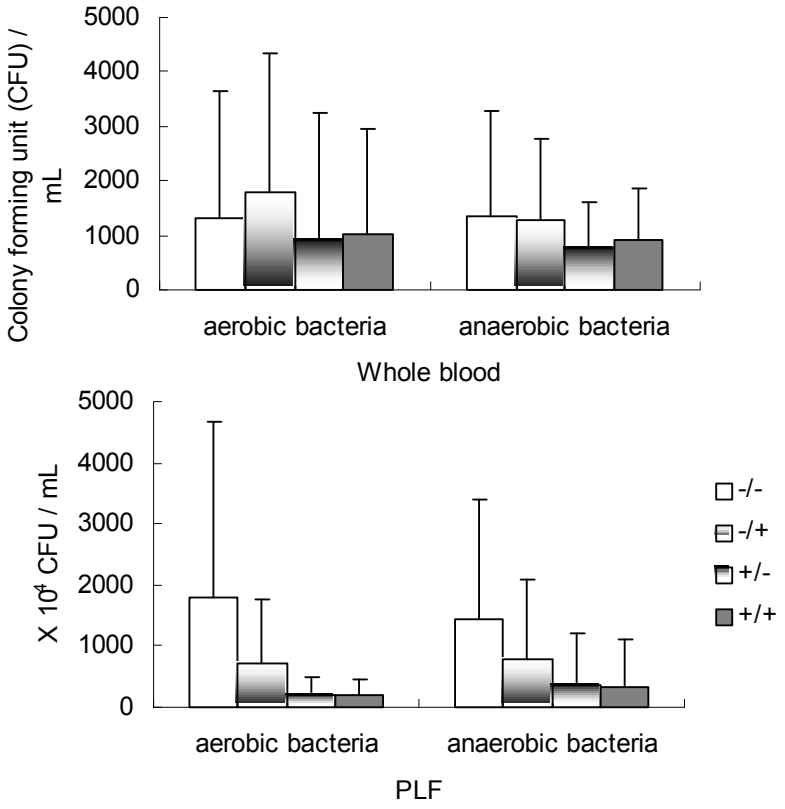

Fig. 1. Total counts of aerobic and anaerobic bacteria in whole blood and peritoneal lavage fluid (PLF) in the 4 groups 3 days after CLP. Aerobic bacteria were isolated on TSA blood agar plates and cultured in a 37℃ incubator for 24 h. Anaerobic bacteria were isolated on CDC blood agar plates and cultured in Gas-Pak jar at 37℃ for 48 h. The numbers of total aerobic or anaerobic bacteria in PLF of groups 3 and 4 were significantly less than those of groups 1 and 2 *($p < 0.05$).* Total numbers of

bacteria in whole blood did not differ among the 4 groups ($p > 0.05$).(group 1, n = 12; group 2, n = 13; group 3, n =12; group 4, n = 11).

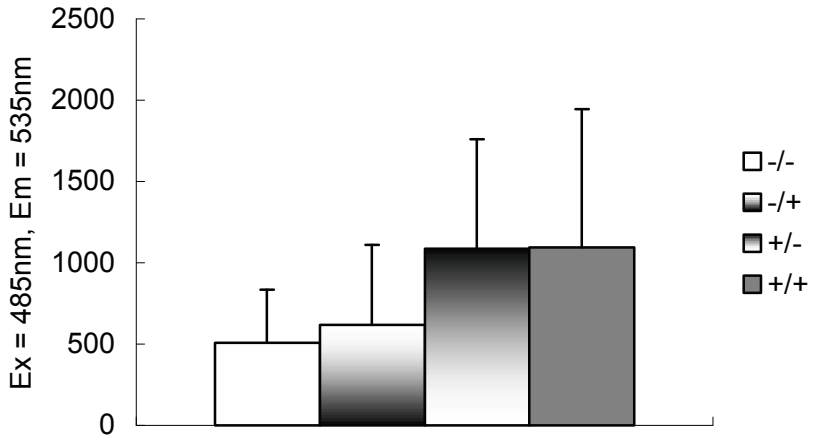

Fig. 2. Phagocytic activity of peritoneal macrophages. After subtraction the background of the control wells, the phagocytic activities of groups 3 (+/-) and 4 (+/+) were significant higher than those of groups 1 (-/-) and 2 (-/+) ($p < 0.05$). (group 1, n = 8; group 2, n = 11; group 3, n =9; group 4, n = 9)

討論

本研究結果顯示腹腔中巨噬細胞之吞噬能力 group3(+/-)及 group 4 (+/+)顯著較 group 1 (-/-)及 group 2 (-/+)為高，同時腹腔沖洗液中厭氧菌及好氧菌之總數在 group3(+/-)及 group 4 (+/+)顯著較 group 1 (-/-)及 group 2 (-/+)為低，由於 CLP 會導致腹腔遭受細菌之污染，特別是源自腸內之厭氧菌。此結果顯示在敗血症前添加 Arg 可促進腹腔中巨噬細胞之吞噬能力，並因此降低腹腔中細菌之總數，在敗血症前後均添加 Arg 似乎有加強之效果，但若在敗血症後以靜脈輸入之方式添加 Arg 並沒有增強腹腔中巨噬細胞之吞噬能力，及降低腹腔中細菌之總數之效用。Hibbs et al(6)之體外實驗顯示，Arg 增進巨噬細胞毒殺細菌的能力可能是藉由 NO 產生所致。在本實驗中我們並沒有發現 Arg 添加組血中及腹腔沖洗液中 NO 濃度增加，可能本實驗模式引致之代謝壓力使 NO 濃度已上升至極限，而不易觀察組間之差異性。由於本實驗並未分析巨噬細胞中 NO 之濃度，是否 Arg 添加造成巨噬細胞中 NO 濃度增加，因此促進了巨噬細胞之吞噬能力，仍有待進一步之證實。

計畫成果自評

本計畫均遵照當初之實驗設計進行，本年度之計畫執行已接近完成，且部分結果已投稿美國 Journal of parenteral and enteral nutrition 期刊。

References

1. Navaratnam N, Morris S, Traber D, et al. Endotoxin（LPS）increases mesenteric vascular resistance（MVR）and bacterial translocation. J Trauma 30:1104-1115,1990
2. Freund HR, Ryan JA, Fischer JE. Amino acid derangements in patients with sepsis. Ann Surg 188:423-430,1978
3. 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
4. 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
5. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock-A review of laboratory models and a proposal. J Surg Res 29:189-201,1980
6. Hibbs JB, Vavrin Z, Taintor RR: L-Arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. J Immunol 138:550-555, 1987