

國立台灣大學醫學院生理學研究所碩士論文

Graduate Institute of Physiology, College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

梨形蟲感染排除後之小鼠腸道呈現

持續性上皮屏障失常及黏膜發炎的現象：

探討「後感染腸躁症」之致病機轉

Persistent Gut Barrier Dysfunction and Mucosal
Inflammation after Eradication of *Giardia lamblia*
Infection: Implications for the Pathogenesis of
Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome

陳姿伶

Tzu Ling Chen

指導教授：余佳慧 博士

Supervisor：Linda Chia- Hui Yu, Ph.D.

中華民國 99 年 6 月

June, 2010

國立臺灣大學碩士學位論文 口試委員會審定書

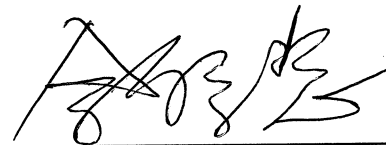
論文題目：

梨形蟲感染排除後之小鼠腸道呈現持續性上皮屏障失常及黏膜發炎的現象：探討「後感染腸躁症」之致病機轉

Persisten Gut Barrier Dysfunction and Mucosal Inflammation after Eradication of *Giardia lamblia* Infection: Implications for the Pathogenesis of Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome

本論文係陳姿伶君（學號：R97441006）在國立臺灣大學生理學研究所完成之碩士學位論文，於民國九十九年六月二十四日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：



（指導教授）

孫錦忠

黃俊良

吳明賢

所長：

吳美玲

謝辭

碩班兩年一轉眼間就結束了，一路上學習的過程雖然艱辛但也充滿了歡笑。首先要感謝最有氣質的余佳慧老師，老師總是能夠非常有耐心的為我講解實驗數據，不厭其煩地指導我實驗上遇到的問題，也讓我學習到為人師表在教學上應有的態度。真的很謝謝余老師。此外，我也要感謝我的口試委員陽明腦科所盧俊良老師、台大醫院吳明賢醫師、以及台大寄生蟲學科孫錦虹老師，謝謝你們熱心的指導。在此也要特別感謝孫錦虹老師提供我們梨形蟲，讓我們的實驗得以順利進行。

接下來要感謝腸道實驗室的大家，謝謝彥臻學姐，我永遠都不會忘記我們在八樓一起做實驗辛苦的時光，挑戰五分鐘吃午餐，縱使身體疲憊仍然硬撐著把實驗做完，一起在八樓發瘋似的學 *Giardia* 游泳跟 *Giardia* 對話，真的很謝謝妳幫我這麼多忙。謝謝絢媛，妳是我最好的實驗夥伴，每次跟妳聊天都覺得很開心，我回高雄之後要想我喔。謝謝熱心的莉伶學姐，總是能很仔細的教導我實驗技術，也幫了我很多忙。謝謝瑋庭學長常常跑到八樓來關心我們，幫我們買午餐，解決我實驗上的一堆疑難雜症。謝謝菁英學姐在我遇到困難的時候為我加油打氣，還有謝謝霽雲總是能幫我解決電腦上的問題。此外，還有怡禎，謝謝你能夠當 *Giardia* 的機動組。也謝謝孫老師的助理玉嬌及立欣，為了幫我們養出健康的寄生蟲讓妳們倍感壓力，真的是辛苦了，八樓真是個溫馨的地方啊。也謝謝我的研究所同學們，最有活力的十二指腸曉君，認識妳這個朋友值得！此外，還要謝謝家人般的朋友鈴涓，我真的不能沒有妳這個認識十幾年的好朋友，每次光跟妳聊聊天就有振奮精神的效果。

最後，我要感謝我最可愛的爸爸媽媽，謝謝你們一直支持我做我自己想做的事情，讓我衣食無缺、無後顧之憂的念書，謝謝哥哥嫂嫂，每次回家都讓我感到很溫暖，我最愛我的家人了。謝謝孟緯，謝謝你一直擔任我的垃圾桶甚至是出氣桶，謝謝你在我焦慮的時候安慰我，電腦出問題的時候幫助我。碩班雖然只有短短兩

年，要感謝的人很多很多，最後再一次跟所有關心我的人說一聲謝謝，我愛你們！

研究經費致謝

「感謝行政院衛生署暨國立台灣大學傳染病防治研究及教育中心提供經費補助」

“The authors acknowledge the financial support provided by Infectious Diseases

Research and Education Center, Department of Health and National Taiwan University.”



摘要

腸躁症是一種功能性缺損的腸道疾病，症狀包括腹部疼痛以及排便習慣的改變，然而卻無法偵測到明顯腸道組織病變或病原體之存在。最新研究發現在腸躁症病人身上有低程度腸道組織發炎，黏膜屏障失能和腸腔細菌增生的現象。許多文獻指出感染性急性腸胃炎之後可能會誘發腸躁症，此種類型特稱為「後感染腸躁症」。梨形蟲 *Giardia lamblia* 是一種常見以水作傳染媒介之腸道寄生蟲。近年在挪威之流行病學研究發現，高達 80 % 受梨形蟲感染的病人在受感染後的 12-30 個月，且在已排除體內之寄生蟲至少 6 個月之後出現腸躁症的症狀。儘管腸躁症造成了相當嚴重的醫療問題，但苦於無適當之實驗動物模式，消化醫學界對腸躁症之致病機轉及原理仍不清楚。因此本實驗的目的為利用梨形蟲感染小鼠建立「後感染腸躁症」的動物模式，並探討梨形蟲感染期間及後排除期是否會引發腸道屏障失常及發炎現象。本實驗將 Balb/c 小鼠灌食 10^7 隻 *Giardia lamblia* GS/M 品系之滋養體，或給予無菌之磷酸鹽緩衝液，並在感染後第 0 天至第 49 天每週分別計數小腸中滋養體的數目以建立出感染曲線。由感染曲線得知，梨形蟲寄生於小腸之高峰期約在感染第 4 天到第 7 天，本實驗中稱為「感染期」；而在感染第 14 天則完全無法偵測到寄生蟲，因此本實驗將第 21 天到第 49 天視為「後排除期」。本實驗接著分析腸道黏膜層中內吞至細胞內的細菌數作為腸道屏障功能的指標。分析小腸及大腸之黏膜層細菌量發現，在感染第 7 天（中位數分別為 164.2 及 253.4 CFU/g）及第 35 天（中位數分別為 118.4 及 98.1 CFU/g）時皆明顯高於感染前即第 0 天之黏膜細菌量（中位數分別為 0.0 及 0.3 CFU/g）。緩衝液灌食組第 35 天時，其小腸及大腸黏膜層細菌量與第 0 天相似。在第 7 天時，感染組之小腸及大腸總細菌量比起緩衝液組顯著增加 4-10 倍，表示腸道細菌在感染期有增生現象；但第 35 天，感染組和緩衝液組並無差別。此外，在感染第 7 和 35 天時，在小腸之上皮表層細菌量相較於個別之緩衝液組皆有升高，顯示出梨形蟲感染期至後排除期會有持續性腸道細菌附著的現象。而在感染第 7 天時，黏膜之 occludin 有片斷化的

情形。此外，小腸組織的骨髓過氧化酶活性在第 7 天及第 35 天時也提高。在感染第 7 天時，血液中嗜中性白血球之百分比增加，並在第 7 天及第 35 天的小腸組織切片中皆有看到大量嗜中性白血球進到腺窩附近。此外，在感染第 35 天，小腸中之腫瘤壞死因子 α (TNF α)，細胞激素-1 β (IL-1 β) 及巨噬細胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α) 總量增加，並伴隨著誘導型一氧化氮合成酶 (iNOS) 表現增加的情形。由上述之實驗結果顯示，小鼠在梨形蟲感染之「後排除期」，會有腸道上皮屏障失常引發腸腔細菌持續進入腸組織的現象，並伴隨著腸道發炎及嗜中性白血球的活化情形產生。而此梨形蟲感染「後排除期」之動物模式或許將來可用來探討「後感染腸躁症」之致病機轉。

關鍵詞：後感染腸躁症、梨形蟲、腸道屏障、骨髓過氧化酶、嗜中性白血球、誘導型一氧化氮合成酶



Abstract

Irritable bowel syndrome (IBS) is a functional gastrointestinal disorder characterized by abdominal pain and changes in bowel habits, for which neither apparent structural lesion nor presence of pathogen could be found. Recent data indicated that low grade intestinal inflammation, impaired mucosal barrier function, and enteric bacterial overgrowth were identified in IBS patients. Consistent evidence showed that IBS may be the adverse outcome of an acute episode of infectious gastroenteritis, termed post-infectious (PI) IBS. *Giardia lamblia* is the most frequently identified etiologic agent of waterborne disease worldwide. Recent epidemiological data from Norway indicated that more than 80 % of patients from an outbreak of giardiasis showed IBS symptoms after 12-30 months post-onset of *Giardia* infection and at least 6 months after the clearance of parasites. Despite that IBS represents a substantial clinical problem, its mechanism and pathogenesis remain poorly understood mainly due to the lack of animal models. The aim of the current study is to establish a PI-IBS model using *Giardia*-infected mice and to evaluate gut barrier dysfunction and mucosal inflammation during infection and after eradication of parasites. Balb/c mice were inoculated with 10e7 trophozoites of *Giardia lamblia* strain GS/M or pair-fed with phosphate-buffered saline (PBS). The trophozoites in the small intestines were enumerated weekly from PI day 0 to 49 to determine the time course of parasitic

infection. *Giardia* colonization peaked at PI day 4-7 and this period was termed the 'infection phase'; the parasites were cleared by PI day 14, and therefore, day 21-49 was denoted the 'post-clearance phase'. Intestinal epithelial barrier dysfunction was evidenced by increased bacterial colony forming units (CFU) in the gut mucosa. The medium of mucosal endocytosed bacterial counts in the small and large intestines on PI day 7 (164.2 and 253.4 CFU/g) and on PI day 35 (118.4 and 98.1 CFU/g) were respectively higher than the values on PI day 0 (0.0 and 0.3 CFU/g). In mouse pair-fed with PBS, the mucosal bacterial counts in small and large intestines on day 35 were comparable with day 0. Total bacterial counts in small and large intestines on PI day 7 in mouse infected with *G. lamblia* was 4 to 10 times higher than those pair-fed with PBS, suggesting bacterial overgrowth during giardiasis; whereas no difference was seen between the two groups on PI day 35. The numbers of superficial bacteria in small intestines of *Giardia*-infected mice increased on day 7 and day 35 compared to those pair-fed with PBS, suggesting bacterial adherence during infection and after clearance of *Giardia*. Increased tight junctional occludin cleavage was noticed in small intestinal mucosa during infection. Heightened intestinal myeloperoxidase activity was found on day 7 and 35. Increased percentage of neutrophils in white blood cells was seen on PI day 7, and augmented neutrophil infiltration into the crypt area in small intestinal tissues was observed on PI day 7 and 35. Elevated intestinal TNF α , IL-1 β and MIP-1 α

levels were associated with increased epithelial iNOS expression on PI day 35. In conclusion, *Giardia*-infected mice showed persistent enteric bacterial influx accompanied by mucosal inflammation and neutrophil activation after parasite clearance. The post-giardiasis animals may be suitable models for investigating gut barrier dysfunction underlying the mechanism of PI-IBS.

Keywords: post-infectious (PI) IBS, *Giardia lamblia*, gut barrier, myeloperoxidase, neutrophils, iNOS



中英文縮寫名詞對照表

adhesion molecule	固著因子
arginine	精胺酸
biotin	生物素
chemokine	趨化物
cold shock	冷刺激
cytokine	細胞激素
dendritic cell	樹狀細胞
diazonium salt	重氮鹽類
dithiothreitol	二硫代蘇糖醇
endocytosis	內吞作用
eosin	伊紅
ethylenediaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
fresh blood agar plate	血液瓊脂平板
gentamicin	慶大黴素
haematoxylin	蘇木紫
hemocytometer	血球計數器
interferon(INF)- γ	干擾素 γ
Interleukin	細胞激素
lymphocyte	淋巴球
macrophage	巨噬細胞
macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α	巨噬細胞炎性蛋白-1 α
mast cell	巨大細胞
monocyte	單核球
myeloperoxidase	骨髓過氧化酶
nature killer cell	自然殺手細胞
nducible nitric oxide synthase, iNOS	誘導型一氧化氮合成酶
neutrophil	嗜中性白血球
oral gavage	灌食
paraformaldehyde	三聚甲醛
peroxynitrite	過亞硝酸根
phosphate-buffered saline, PBS	磷酸鹽緩衝液
potassium phosphate dibasic	磷酸氫二鉀
potassium phosphate monobasic	磷酸二氫鉀
specific esterase	特異性脂酶

superoxide	超氧化物
tight junction	緊密連結
trophozoite	滋養體
trypan blue solution	台盼藍染劑
tumor necrosis factor (TNF) α	瘤壞死因子 α
urethane	氨基鉀酸酯
xylene	二甲苯



目錄

口試委員會審定書	
誌謝.....	I
中文摘要.....	III
英文摘要.....	V
中英文縮寫名詞對照.....	VIII
一、前言.....	1
1. 腸道組織之外觀結構.....	1
2. 腸道生理功能.....	1
2.1.物理性屏障.....	1
2.2.化學性屏障.....	3
2.3.免疫性屏障.....	3
2.3.1 巨噬細胞 (macrophage).....	4
2.3.2 多型核嗜中性白血球.....	4
2.3.3 適應性免疫反應.....	6
3. 腸腔內共生細菌 (commensal bacteria).....	6
4. 腸躁症 (Irritable Bowel Syndrome, IBS)	7
4.1. IBS 之病理症狀.....	7
4.2. 後感染腸躁症 Post-infectious Irritable Bowel Syndrome (PI-IBS).....	9
5. 梨形蟲 (<i>Giardia lamblia</i>)	10
5.1 梨形蟲分類和自然史(natural course).....	10
5.2 梨形蟲感染引發腸道病變.....	11
5.3 宿主對 <i>G. lamblia</i> 感染的防衛機制.....	11
5.3.1 自然性屏障.....	11
5.3.2. 宿主的免疫反應.....	11
5.3.3 梨形蟲對宿主的免疫抑制.....	13

6. <i>Giardia</i> 感染與 PI-IBS 之關係.....	14
7. 本實驗之目的.....	14
二、材料與方法.....	16
1. 實驗動物.....	16
2. 實驗寄生蟲.....	16
3. 實驗動物分組.....	17
4. 組織處理及實驗分析.....	18
4.1. <i>Giardia lamblia</i> trophozoites 計數.....	18
4.2 腸道細菌數目變化分析.....	18
4.2.1 腸道黏膜細胞內吞細菌(mucosal endocytosed bacteria)分析.....	18
4.2.2 腸道上皮表層細菌(superficial bacteria)量分析.....	20
4.2.3 腸段總細菌量(total bacteria)分析.....	20
4.3. 白血球總數、嗜中性白血球、淋巴球、單核白血球之百分比計數.....	21
4.4. 腸道組織中嗜中性白血球染色 (neutrophil staining)	21
4.5. 腸道組織骨髓過氧化酶 (Myeloperoxidase, MPO) 活性測定.....	22
4.6. 小鼠腸道組織細胞激素之表現量測試.....	23
4.6.1 瘤壞死因子 α (Tumor necrosis factor (TNF) α)、巨噬細胞炎性蛋白-1 α (Macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α)、細胞激素 (IL-1 β 、IL-6 及 IL-12) 之表現量測試.....	23
4.6.2 干擾素 γ (Interferon(INF)- γ) 之表現量測試.....	24
4.7. 小鼠血清中 IL-1 β 之表現量測試.....	25
4.8. 組織切片及染色.....	25
4.8.1 石蠟包埋檢體的製備.....	25
4.8.2 蘇木紫-伊紅染色 (Haematoxylin and Eosin Staining).....	26

4.8.3 免疫螢光染色-誘導型一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)	26
4.9 西方轉漬法 (Western blotting).....	27
4.9.1 黏膜層蛋白質萃取	27
4.9.2 蛋白質定量.....	28
4.9.3 蛋白質電泳.....	28
4.9.4 蛋白質分析.....	28
4.10 細胞凋亡染色-缺口末端標記技術 (terminal deoxynucleotide transferase biotin-dUTP nick-end labeling, TUNEL).....	29
4.11 統計方法.....	30
三、實驗結果.....	32
1. <i>G. lamblia</i> 之感染曲線.....	32
2. 腸道黏膜細胞之內吞細菌(mucosal endocytosed bacteria)量.....	32
3. <i>G. lamblia</i> 感染對於腸道的總細菌量及表層細菌量之影響.....	33
3.1. 腸道總細菌量(total bacteria).....	33
3.2. 腸道上皮表層細菌(superficial bacteria)量.....	34
4. 腸道黏膜組織中 occludin 之表現.....	34
5. 白血球總數、嗜中性白血球、淋巴球及單核白血球百分比計數.....	34
6. 腸道組織中嗜中性白血球染色 (neutrophil staining)	35
7. 腸道組織骨髓過氧化酶 (Myeloperoxidase, MPO) 活性測定.....	35
8. 小鼠腸道組織 TNF α 、MIP-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12 及 INF γ 之表現量測試.....	36
9. 小鼠血清中 IL-1 β 之表現量測試.....	36
10. 腸道組織中 iNOS 之表現.....	37
11. <i>G. lamblia</i> 感染對於小腸絨毛型態及腸道上皮細胞凋亡之影響.....	37

四、討論	39
五、圖表.....	49
六、參考文獻.....	66



圖目錄

圖 1、腸道管壁結構之縱向剖面圖.....	50
圖 2、 <i>G. lamblia</i> 的生活史.....	51
圖 3、 <i>G. lamblia</i> 之感染曲線.....	52
圖 4、腸道黏膜細胞之內吞細菌量.....	53
圖 5、腸道總細菌量.....	54
圖 6、腸道上皮表層細菌量.....	55
圖 7、Occludin 之蛋白表現量測定.....	56
圖 8、白血球總數、嗜中性白血球、淋巴球及單核白血球百分比.....	57
圖 9、腸道組織中嗜中性白血球染色.....	58
圖 10、腸組織之嗜中性白血球數量與骨髓過氧化酶活性測定.....	59
圖 11、小腸組織細胞激素活性測定.....	60
圖 12、大腸組織細胞激素活性測定.....	61
圖 13、小鼠血清中 IL-1 β 之表現量測試.....	62
圖 14、腸道中 iNOS 之表現.....	63
圖 15、 <i>G. lamblia</i> 感染對於小腸絨毛型態及腸道上皮細胞凋亡之影響	64

表目錄

表 1、 <i>G. lamblia</i> 感染對於腸道之內吞細菌量、總細菌量及表層細菌量之影.....	49
---	----



一、前言

1. 腸道組織之外觀結構

腸道管壁之組織結構如圖 1 所示，腸道管腔表面有大量皺摺以增加吸收的表面積，表面之指狀突起稱為絨毛 (villi)。絨毛的表層由上皮細胞所覆蓋，上皮細胞朝向管腔面的膜上含有更小的突起稱為微絨毛 (microvilli)，整個所覆蓋的表面又稱為刷狀緣 (brush border)。而固有層 (lamina propria) 位於上皮細胞之下方，為富含神經末梢、血管、與免疫細胞的結締組織。在固有層下方則有一層薄的黏膜肌 (muscularis mucosa)。上皮細胞層、固有層及黏膜肌三層構造合稱為黏膜層 (mucosa)。

位於黏膜層下方另有一結締組織稱之為黏膜下層 (submucosa)，內含有大量之神經血管。管腔最外層為外肌層 (muscularis externa)，由兩層平滑肌所組成，分別為內環肌 (circular muscle) 及外縱肌 (longitudinal muscle)，內環肌纖維包圍在管外，收縮時會造成管徑縮小，而外縱肌收縮時則會造成腸管縱向縮短。此外，腸道中亦含有腸神經系統，其神經細胞位於黏膜下層的黏膜下層神經叢 (submucosal plexus) 及埋在內環和外縱肌間的腸肌神經叢 (myenteric plexus)。

2. 腸道生理功能

腸道主要有五大生理功能，運動、分泌、消化、吸收以及屏障功能。由於腸道腔室中有大量的共生細菌 (commensal bacteria)，且腸道為第一個與外界食物或病原菌和寄生蟲接觸的部位，因此屏障功能 (barrier function) 對人體健康的維持扮演著極為重要的角色。目前將腸道屏障功能分為：物理性屏障、化學性屏障、以及免疫性屏障三大類。本論文在此特別針對屏障功能做探討。

2.1. 物理性屏障

腸道之物理性屏障包括黏液層及上皮細胞。黏液 (mucus) 由黏液素組成，成份為醣蛋白 (glycoprotein) 及水，由位於腸道上皮層的杯狀細胞 (goblet cells) 分泌；另外，在十二指腸中尚有布魯納氏腺 (Brunner's glands)，為多分支的腺體，開口於腺窩，分泌消化酵素以及黏液。黏液層覆蓋在腸道表皮的外面，為大部分腸內共生細菌棲息之地。由於黏液不易被細菌的多醣水解酶 (glycosidase) 以及宿主本身的蛋白質分解酶 (protease) 所分解，因此可防止細菌直接接觸到腸道上皮細胞 (1, 2)。

上皮細胞具有極性 (polarity)，可分為朝向管腔的黏膜面 (mucosal side) 或稱為頂側 (apical side)，以及朝向漿液面的漿膜側 (serosal side) 或稱為基底側 (basolateral side)。相鄰的兩個腸道上皮細胞之間，有特殊的蛋白例如緊密連結 (tight junction)、附著連結 (adherens junction) 以及胞橋體 (desmosome) 將基底側做連結(3)，其中緊密連結所在之處為兩細胞之間距離最窄的空隙，約 90 Å，位於基底側細胞膜與微絨毛交接處，是三者中最靠近管腔的結構，緊密結合主要由三種膜蛋白組成，分別為 claudin, occludin 和連結黏連分子 (junctional adhesion molecules, JAM) (3)；而附著連結之間的空隙距離約為 200 Å，位於緊密連結與胞橋體之間；胞橋體之間的空隙距離約為 240 Å，為三者最下方之結構。由於這些獨特的連結構造，使得細胞間隙相當狹窄，大部分物質無法自由進出腸道上皮細胞兩側(4)。緊密連結使分子量大於 500 D 的物質無法由細胞間進入，因此阻擋了管腔中的細菌、毒素、未分解的蛋白抗原等大分子入侵體內，以避免引起不當之免疫反應(5)。另一方面，些許尚未被完全消化的大分子可經由表皮細胞的內吞作用 (endocytosis) 進入內小體 (endosome)，繼續被融合的溶解酵素 (lysosomal enzyme) 分解成不具免疫抗原性的小分子，再釋入固有層，而此類經由細胞吸收進而將管腔中分子物質帶入固有層的過程，稱為穿細胞路徑 (transcellular pathway)；而分子物質若經由細胞之間的空隙進入固有層中，則稱為細胞間路徑 (paracellular pathway)(6)。因此，腸道黏膜層所具有之物理性屏障功能，可以作為人體與外在

物質接觸的第一道防線。

2.2 化學性屏障

腸道表面能釋放出抗微生物肽 (antimicrobial peptides, AMPs)，目前在人類總共有三大類，分別為防禦素 (defensins)、抗菌肽 (cathelicidins)、以及富組蛋白 (histatin)。抗微生物肽主要的功能為 1) 在細菌上穿孔，破壞細菌結構使內容物流出，而達到殺菌效果、2) 抑制細菌細胞膜的合成、3) 促使細菌細胞膜之自我水解(7)。另外還有其他功能例如，可趨使嗜中性白血球、巨噬細胞及其他免疫細胞之聚集，預防細菌接觸及菌落之形成(8)。防禦素為帶正電之肽，由小腸腺窩中的巴聶特氏體 (Paneth cell) 所分泌，可結合帶負電的細胞壁，在細胞壁上打洞造成高度通透性，抑制細菌生長和存活(9)。

2.3 免疫性屏障

免疫反應可分為先天性免疫反應 (innate immunity) 及適應性免疫反應 (adaptive immunity)。先天性免疫反應的專一性不高，當外來病原菌通過腸道進入體內時，最快啟動的即為先天性免疫反應，而先天性免疫反應可以進一步活化適應性免疫反應，但所需時間較長，因此先天性免疫反應為腸道生理中第一道免疫防禦屏障。

先天性免疫反應一般而言數分鐘即可啟動，其由許多不同種類之細胞及化學物質所組成，參與其中的免疫細胞包含常駐在固有層的巨噬細胞 (macrophage)、樹狀細胞 (dendritic cells)、自然殺手細胞 (nature killer cells)、巨大細胞 (mast cells) 以及由血液進入腸道組織中之多型核嗜中性白血球 (polymorphonuclear neutrophils)。其中常駐型巨噬細胞 (resident macrophages) 是由血液循環中的單核球 (monocyte) 進入腸道組織中分化而成。而適應性免疫的活化需花費數天至數個禮拜，以產生具專一性的 T 型淋巴球及 B 型淋巴球。

2.3.1 巨噬細胞 (macrophage)

腸道的黏膜層是身體中最多巨噬細胞的貯存地(10)，這些巨噬細胞是來自於血液中的單核球 (monocyte)，在非發炎的情況下，血液中的 monocyte 會受到固有層中內生性的化學引誘物 (chemoattractant) 作用而進入固有層中，這些剛進入固有層中的巨噬細胞會進行功能上的分化，而成為仍然能吞噬細菌但不會產生發炎性細胞激素(cytokine)的巨噬細胞，以避免腸道組織在正常生理時受到不當之傷害，稱為常駐型巨噬細胞 (resident macrophage)，其可做為腸道天生性免疫反應的第一道屏障(10, 11)。

而當外來病原體入侵而引起發炎反應的時候，血液中的 monocyte 會受到發炎相關的趨化物 (chemokines or chemoattractants) 驅使而進入到固有層，能吸引 monocyte 到發炎部位的化學物質可分為三大類：帶有半胱氨酸 (cysteine) 的 chemokines 或稱為 inflammatory CC chemokines (例如細胞白介素(interleukin-8, IL-8)，巨噬細胞炎性蛋白-1 α 【Macrophage inflammatory protein, MIP-1 α 】；未帶 cysteine 的趨化物質 (例如補體 【complement components】及轉型生長因子 β 【Transforming growth factor β , TGF- β 】)；此外還有 pathogen-derived peptides (例如 formyl-Met-Leu-Phe (fMLP))。其中，當腸道組織受到葛蘭氏陰性菌外壁物質脂多糖或一些細胞激素例如腫瘤壞死因子 α (TNF α) 及 IL-1 β 刺激後，會促使腸道上皮細胞或腸道中的白血球釋出 inflammatory CC chemokines，此時 monocyte 會順著結合在固有層細胞間的蛋白聚糖 (proteoglycan) 之濃度梯度移動，進入發炎之組織中(10)。

2.3.2 多型核嗜中性白血球

多型核嗜中性白血球主要是藉由吞噬病原體或釋出細胞內之毒殺物質來達到殺菌的效果。在血液中的多型核嗜中性白血球在腸道受到細菌感染及發炎反應時會被組織中的化學趨化物質例如 IL-8 吸引，並藉由固著因子 (adhesion molecules)

與血管內皮細胞結合的作用滲透到組織當中(12)。過去研究顯示，在發炎的情況下，腸道腺窩中多型核嗜中性白血球的數量會大量增加(13)。

嗜中性白血球可以氧化的方式達到殺菌效果，嗜中性白血球顆粒物質內有大量的菸鹼胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶（NADPH oxidase）和骨髓過氧化酵素（myeloperoxidase, MPO）(14)，由過去研究得知 MPO 酵素活性和嗜中性白血球進入組織之數目成正比，因此組織內酵素活性的上升可作為嗜中性白血球進入組織的代表(15, 16)。在嗜中性白血球吞噬細菌的過程中，NADPH oxidase 作用產生超氧化物（superoxide）；骨髓過氧化酵素由胞內釋放至胞外環境，並催化 H_2O_2 和氯離子結合，形成次氯酸（hypochlorous acid, HOCl）(17)。超氧化物及次氯酸為一具有強力殺菌能力的自由基，為中性分子，能使脂質過氧化以利於穿透細菌細胞壁，在細菌體內進行氧化作用毒殺細菌。此外次氯酸可藉由加氯作用（chlorination）和細菌結構蛋白結合，此作用已知可加強人體內對此細菌蛋白之免疫反應，加強抗原表現細胞（antigen presenting cells, APC）呈現細菌抗原之能力(17)。嗜中性白血球體內的骨髓過氧化酵素亦可釋放到細胞外面，和巨噬細胞上巨噬細胞甘露糖受器（macrophage mannose receptor, MMR）結合(18)。

嗜中性白血球亦可以非氧化的方式達到殺菌效果。嗜中性白血球中的顆粒可分為初級顆粒及次級顆粒，初級顆粒會較早釋出其內容物，例如骨髓過氧化酵素、彈性蛋白酶（elastase）和殺菌/通透性增加蛋白（bactericidal permeability-increasing protein, BPI）等。而次級顆粒中的內容物會在等待嗜中性白血球活化後才形成，如乳鐵蛋白（lactoferrin）等(19)。其中 BPI 可活化水解葛蘭氏陰性菌之外層細胞壁磷酸脂，增加細菌細胞壁之通透性，而 BPI 同時也可以透過與細菌細胞壁結合，增強嗜中性白血球吞噬細菌的能力(20)。彈性蛋白酶則可破壞葛蘭氏陰性菌之細胞壁，但對於葛蘭氏陽性菌則無影響(21)。此外，嗜中性白血球的顆粒中含有 defensins，也是以非氧化的方式將細菌細胞膜打洞而達到殺菌效果。除了 defensins 此種 antimicrobial peptides 外，嗜中性白血球亦能釋

出 cathelicidin，cathelicidin 具有殺菌之功能且可以避免病原體（例如：致病性的大腸桿菌）貼附於腸壁(22)。

2.3.3 適應性免疫反應

適應性免疫反應可分為細胞免疫反應（cell-mediated immunity）及抗體免疫反應(humoral immunity)。細胞免疫反應由 T 細胞所主導，T 細胞可大致分為胞毒性 T 細胞（Tc cell）及輔助性 T 細胞(Th cell)，其中 Th cell 能釋出多種 cytokines，並能進一步誘導 B 細胞的免疫球蛋白的同型轉變(isotype switching)以產生不同型的抗體。其中 IgA 在腸道免疫中扮演著重要的角色，在固有層中的分化的 B 細胞產生 IgA dimer，而 Th1 cell 產生的 IFN- γ 可使腸道上皮細胞表面的 IgA 受體(polymeric Ig receptor)表現增加，進而促使 IgA 穿越上皮細胞而分泌至腸腔中以辨識及包圍病原體(23)。

3. 腸腔內共生細菌 (commensal bacteria)

腸道中的共生細菌叢從出生後開始建立，其建構會受到幼體的飲食及所處的生活環境影響。整個腸道中，共生細菌叢的密度及種類由腸道前端至後端遞增，也就是大腸為最多共生細菌之部位。據估計人類大腸腔室中細菌數約為每克糞便 10^{11} 到 10^{12} 之多，而消化道總細菌數為全身細胞數的十倍。這些共生細菌叢會創造出一個理想的腸道生態環境，正常生理狀況下不引發任何發炎反應，並能與外來病原體競爭營養及空間進而防止外來病原體的入侵(24)。另外最近文獻亦記載了共生細菌叢能幫助維持腸道屏障功能，例如能夠產生殺菌物質細菌素（bacteriocin）及乳酸（lactic acid），除此之外還能夠協助分解一些無法消化的食物殘留物質、幫助離子(例如鎂離子及鈣離子)的吸收、以及產生維生素 K 等功能(24)。

但某些疾病例如腸道缺血再灌流（intestinal ischemia/reperfusion）、腸阻塞 (bowel obstruction)等可見腸道屏障功能失常進而導致大量腸腔內共生細菌或抗原

穿越腸上皮細胞甚至轉移至肝臟及脾臟(25, 26)。此腸腔細菌移位(bacterial translocation, BT) 至其它內臟和血液循環的現象, 可能進而引發敗血症 (septic shock)、全身性發炎反應症候群 (systemic inflammatory syndrome) 甚至是多重器官衰竭(27)。而這些容易轉移的細菌種類涵蓋了好氧菌及厭氧菌，其中以 *Escherichia coli* 及桿菌屬 (*Bacteroides*) 為主(28)。

此外，過去的研究發現，誘發性的一氧化氮合成酶 (iNOS) 的大量表現會導致腸腔細菌移位 (bacterial translocation) (29)。而導致 BT 的機制可能是因為過量的 iNOS 使 NO 易結合 superoxide 形成過亞硝酸根 (peroxynitrite) 會造成腸道上皮細胞的凋亡(29)，且在內毒素血症小鼠 (endotoxemic mice) 的實驗中也發現，過量的 iNOS 會導致 tight junction 例如 ZO-1 及 occludin 的破壞，這些都會使腸道屏障受損而使細菌容易進入體內(30)。

4. 腸躁症 (Irritable Bowel Syndrome, IBS)

4.1. IBS 之病理症狀

IBS 是一種功能性異常的腸胃道疾病，患者會有長期的腹痛並伴隨排便習慣的改變，且透過內視鏡、糞便篩檢等檢查並無發現任何病原體感染或腸道之病變。所有年齡層及性別的人都有可能罹患 IBS，其中女性的罹患率又比男性高。IBS 之病人在北美洲及歐洲大約佔有 10~15 % 的人口，而亞洲地區例如新加坡及東京則大約佔有 8.6~9.8 % (31, 32)。且 IBS 除了影響到病人之生活品質外，對社會而言也耗費了相當多的醫療資源。罹患 IBS 之病人除了腹痛外，另有腹脹等症狀，且依據糞便型態的不同還可區分為三大類分別為 IBS-D (diarrhea)，以腹瀉為主的病人；IBS-C(constipation)，症狀以便秘為主；以及 IBS-A(alternate)，即腹瀉及便秘交替。目前消化道醫學界對於 IBS 的了解並不多，因此臨床上的診斷方式是採用問卷問診，需符合下列 Rome criteria III，求診者必須要有長達六個月以上的腹部不適，或每個月至少三天以上感到腹部不適並持續三個月以上，此外並符合以

下：1) 排便後症狀可以得到舒緩；2) 排便頻率的改變；3) 糞便型態的改變，三項中兩項之症狀。

由於在 IBS 病人內視鏡的診斷上無法看出腸道外觀有明顯的受損，因此早期甚至將其視為一種精神疾病(33, 34)。但後來的研究漸漸發現 IBS 病人還是有一些與一般健康人相異的病理現象。早期研究發現 IBS 病人小腸中的腸嗜鉻細胞 (Enterochromaffin cell)、巨大細胞(mast cells)或神經纖維所釋出的過量的神經傳遞物質血清素 (serotonin) 會作用於腸神經叢並影響至中樞神經而造成痛覺，此可能為 IBS 病人有腹痛症狀之成因(35, 36)。而雌性激素易導致血清素引發之內臟痛覺 (visceral hypersensitivity)亦被懷疑是 IBS 病患比例女性多於男性的原因之一(37)。過去有文獻指出，brain-gut axis 的不正常為造成 IBS 的可能原因，例如長期的心理壓力容易導致 IBS (38)。而亦有文獻指出 IBS 病人確實較正常人容易焦慮及情緒不穩定，此外經由分析 IBS 病人心電圖之 R-R interval 也發現，IBS 病人可能有自律神經功能異常的情形(39)。

最新的研究更發現了 IBS 的病人的確有全身性或腸道發炎反應上升的現象，例如 Van der Veek et al.記載利用由血液抽取 DNA 之研究發現，IBS 的病人 TNF α 之基因表現量較正常人為高，而 IL-10 此種抑制發炎反應之細胞激素的表現卻較低(40)，且 Liebrechts et al. 研究也發現 IBS 的病人血液中的 IL-6、IL-1 β 及 TNF α 濃度較正常人高(41)，此外 O'Mahony et al.也指出 IBS 的病人血液中 IL-10 與 IL-12 之比例也較正常人低(42)。而 Macsharry et al. 在 IBS 病人大腸組織切片中的分析也看到 TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 之表現有較正常人高，但 IL-8、CXCL-9 Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) 的表現會減少(43)。且由 Spiller 等人也對 IBS 病人研究發現，病人腸道上皮細胞內的淋巴球、固有層中的 T 細胞以及巨噬細胞皆有增多的趨勢(44)，其他研究也發現小腸中的 mast cell 數目也有增加之現象 (35)。整體而言，目前已公認低程度(low grade)腸道發炎為 IBS 的病變之一(31)。

此外，Spiller 等人利用 IBS 病人的尿液分析乳果糖 (lactulose) 及甘露醇

(mannitol) 之比例 (L/M ratio) 研究發現，病人小腸腸道的通透性較正常人高，顯示出黏膜屏障的缺損可能促使腸腔內細菌或抗原入侵，可能是造成發炎反應的原因之一(44)。而 Marshall 等人同樣利用尿液分析方法，分析患細菌感染之腸胃炎而引發 IBS 的病人，也發現腸道通透性有升高的現象(45)。而最近的文獻中，偵測尿液中聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 3350/400 回收比例之研究結果也發現，IBS 病人確實有腸道通透性較一般人高的情形(46)。此外，以 IBS 病人進行 Lactulose breath test 結果發現，IBS 病人腸道細菌有大量增生的現象(47, 48)。Posserud 等人利用分析小腸液的方法也看到 IBS 病人小腸中細菌會大量增生(49)。

到目前為止，醫學上對於 IBS 的病理症狀及致病機轉不甚了解，且實驗動物模式尚未建立也使得學者對於 IBS 的研究更加困難。

4.2. 後感染腸躁症 Post-infectious Irritable Bowel Syndrome (PI-IBS)

急性的病原菌感染結束之後也可能引發 IBS，此種由於感染之方式所引起的 IBS 又特別稱作'後感染腸躁症'(PI-IBS)。所有 IBS 的病人中大約有 6~17 % 屬於 PI-IBS，PI-IBS 在歐洲較為常見，但最近的文獻也指出東方人也會罹患 PI-IBS (35)。具有感染性的細菌被認為是 PI-IBS 主要的致病因子，例如 *Salmonella*、*Shigella* 及 *Campylobacter* (35)。其中被 *Shigella* 感染的病人中約有 8~10 % 會引發 PI-IBS(50)，而病人被 *Campylobacter* 感染導致 PI-IBS 則約為 10 % (51)。近年來更發現除了細菌外，某些病毒(輪狀病毒、腺病毒、杯狀病毒)及寄生蟲(例如梨形蟲 *Giardia lamblia* 及人芽囊原蟲 *Blastocystis hominis*) 的感染也可能造成 PI-IBS (35)。患者的年齡、受感染的病原體種類、以及感染的時間長短，都可能影響到 PI-IBS 的發生與否。

5. 梨形蟲 (*Giardia lamblia*)

5.1 梨形蟲分類和自然史(natural course)

Giardia 為一種常見的腸道原蟲類寄生蟲，最初的命名方式是依據其來源宿主，但在 1952 年的文獻中提出了依照外在型態做為分類的依據，因此目前是依據 *Giardia* 滋養體(trophozoites)中的 median body 的型態分類。*Giardia* 可劃分為三大類：1) *G. agilis*，感染兩棲類為主；2) *G. muris*，感染齧齒類或鳥類；3) *G. lamblia*(又名 *G. duodenalis*, *G. ntestinalis*)主要寄主為人類，但同時也會感染老鼠等其他哺乳類，以及鳥類及爬蟲類(52)。*G. lamblia* 是一種以水為傳播媒介的寄生蟲。在已發展的國家中，大約有 2 %的成人以及 6~8 %的幼童受到 *Giardia* 的感染(53)。大約有半數以上的人受到 *Giardia* 感染並不會有任何症狀，然而少部份的人卻會出現嚴重的腹瀉、腹痛及體重減輕等症狀，但症狀一般都在感染後第 6 天到第 15 天出現，而在症狀出現後大約兩個禮拜即可排除體內之寄生蟲(54)。目前研究指出，造成不同個體感染 *Giardia* 後有不同症狀反應的可能原因如下：1)宿主的免疫狀態不同；2)年齡；3)身體營養狀態不同；4)感染的寄生蟲品系與劑量不同(54)。

G. lamblia 的生活史如圖 2 所示，主要可分為兩大時期，第一時期為包囊體(cyst)期，包囊體為造成傳染的主要媒介，且包囊體具有厚壁可抵抗外界環境之變化，因此可在多種環境下生存。已有研究證實 *Giardia* 的包囊體在 4°C 的水中可存活長達三個月之久；第二時期為滋養體(trophozoite)期，trophozoite 具有吸盤，內有兩個胞核，四對鞭毛，能行落葉狀運動。滋養體會貼附在小腸上皮細胞表面並造成病變。當宿主吃到含有 cysts 的食物或水時，cysts 便伴隨食物進入體內。當 cyst 經過胃酸等不同種類消化液刺激後，會在小腸中(尤其是小腸前端)進行脫囊化(excystation)而釋出 trophozoite。Trophozoite 主要寄生於小腸中，並以無性生殖之方式大量增生。當 trophozoite 由小腸進入結腸後，便會開始進行囊體化(encystation)，再度形成 cysts。此時 cysts 便會隨著糞便排出體外，並伺機感染其他宿主(55)。

過去的實驗中，以 *G. lamblia* GS/M 品系感染 BALB/c 小鼠後，腸道中寄生蟲的數量在感染後第五天達到最高峰，而第十二天則完全排除(56)；感染 C57BL/6 小鼠也有相同的情形(57)，顯示出 *G. lamblia* 對老鼠的感染週期大約會在一個禮拜達最高峰而在約兩個禮拜結束。至於 *G. muris* 對於老鼠之感染週期則可長達將近一個月(58)。

5.2 梨形蟲感染引發腸道病變

經由動物模式的研究發現，*Giardia* 感染會使小腸出現功能上或型態上的缺損，型態上的病變包涵了刷狀緣面積減少(59, 60)、絨毛短縮(61)、以及腺窩增生(61)。此外在其他方面的影響包含腸道細菌增生(62)、腸道通透性增加(63)、蛋白酶及雙糖酶的活性降低(60, 64)並會造成黏膜層發炎反應(65)。

5.3 宿主對 *G. lamblia* 感染的防衛機制

5.3.1 自然性屏障

腸道上皮細胞平均每三到五天會進行自然性的細胞凋亡進而脫落於腸管腔中。因此為了避免因隨著寄主脫落之腸道上皮細胞而被排出體外，*G. lamblia* 的 trophozoites 必須不停地進行移動，並轉而附著於正常未進行細胞凋亡之腸道上皮細胞。腸道表面的黏液在調節 trophozoite 吸附於寄主腸道上，扮演著一重要的角色。前人在細胞模式的研究也證實了黏液會阻擾 trophozoites 的貼附(66)。此外，腸道內共生菌也能防止 trophozoites 的貼附。過去研究指出，給與灌食腸益生菌 *Lactobacillus casei* 的小鼠能更早排除腸道中 *G. lamblia* 的 cysts，並減少 trophozoites 貼附於腸道的數目(67)。

5.3.2. 宿主的免疫反應

具有殺菌能力的胜肽類如防禦素（defensin）及乳鐵蛋白（lactoferrin）在體外

實驗中 (*in vitro*) 發現具有殺死 *G. lamblia* trophozoites 的能力(68)。此外，具有殺菌作用的一氧化氮 (nitric oxide, NO) 與防禦 *G. lamblia* 的機制有所相關。NO 是在一氧化氮合成酶 (NO synthase, NOS) 的作用之下以精胺酸 (arginine) 為原料合成。一氧化氮合成酶可分為三大類：1) endothelial NOS (eNOS)，與血管擴張有關；2) neuronal NOS (nNOS)，與神經傳導有關；3) inducible NOS (iNOS)，當上皮細胞，巨噬細胞或其他細胞受到細菌內毒素或酵母多醣 (zymosan) 刺激之下，或有干擾素 (Interferon gamma, IFN- γ) 存在下而誘發產生 NO (69)。由體外實驗中結果顯示，NO 會抑制 *G. lamblia* trophozoites 的生長，且對於 trophozoites 有毒害的作用，會使 trophozoites 數量減少(69)。然而利用人類小腸上皮細胞的實驗中卻發現，*G. lamblia* 會藉由消耗 arginine 以競爭減少 NO 的產生(70)。但 NO 在感染 *Giardia* 的動物中所扮演的角色仍尚不清楚。目前有研究顯示，預先給予被 *G. muris* 感染的小鼠 NOS 的抑制劑 L-NMMA 對於小鼠體內 trophozoites 數目並沒有影響。但此研究也無法完全排除 NO 的重要性，因為或許抑制劑無法百分之百抑制所有的 NOS，或者 NO 可能作用在較晚期的 *Giardia* 感染(71)。此外，前人研究指出小腸上皮細胞在外來病原體入侵而引發發炎反應下，會增加 iNOS 的表現量(55)。

除了有殺菌能力的肽類與 NO 以外，也有研究發現，在體外實驗當中，人類的巨噬細胞會吞噬 *G. lamblia* 的 trophozoites (72)。但也有研究顯示，在受 *Giardia* 感染的病人小腸切片並不會看到巨噬細胞的表現量增加 (73)。而嗜中性白血球也參與在宿主對抗 *Giardia* 的感染，過去在受 *Giardia* 感染的山羊小腸中發現，嗜中性白血球會進入小腸上皮細胞及固有層中(74)。嗜中性白血球所釋出的防禦素能殺害 trophozoites (68)，且在體外的實驗中也發現嗜中性白血球能降低 *Giardia* trophozoites 的貼附能力(75)。

此外過去研究也指出，interleukin-6 (IL-6) 在寄生蟲感染初期寄生蟲數量的控制及清除體內寄生蟲上扮演著重要角色。IL-6-deficient 小鼠體內 *G. lamblia* 的 trophozoites 的數目在感染高峰（約感染後第 14 天）時相較於 wild type 組較高，

且在感染後第 28 天仍無法完全排除 trophozoites (76)。研究指出，IL-6 可由 mast cell 所釋出，而以 *G. lamblia* 感染之小鼠小腸黏膜 mast cell 數目有顯著性的增加。在缺乏正常功能 mast cell (mast cell-deficient) 的老鼠身上，無法在兩週內排除 *G. lamblia* 的感染(56)。經由上述的文獻研究得知，mast cell 在調節 *G. lamblia* 感染宿主免疫反應中扮演著重要角色。最近也有研究顯示，mast cell 藉由調控 dendritic cell、B 細胞及 T 細胞而促進適應性免疫反應的作用(77)。但在人類的感染中，IL-6 及 mast cell 是否也參與調控的機制則未知。

接著探討宿主所產生的適應性免疫反應。過去研究發現，T 細胞缺陷 (T cell-deficient) 的小鼠被 *G. lamblia* 感染一週後，體內的寄生蟲數目比 wild type 小鼠多，且無法如正常的 wild type 小鼠般能夠在兩週內清除寄生蟲，顯示出 T 細胞在感染高峰時在 *G. lamblia* 的控制上之重要性(78)。而過去研究也發現小鼠被 *G. muris* 感染後，CD8⁺ T 細胞的表現增加會造成刷狀緣的表面積減少、雙糖酶活性降低、及增加 crypt/villus 長度比例，而 CD8⁺ T 細胞及 CD4⁺ T 細胞表現增加則會造成淋巴細胞大量進入腸組織中(60)。此外，研究發現先天缺乏抗體的病人被 *G. lamblia* 感染後產生症狀持續的時間會較長(79)，且亦有研究指出，IgA-deficient 的小鼠無論是受到 *G. muris* 或 *G. lamblia* 的感染後都無法根除體內之寄生蟲(58)。這些文獻都說明 B 細胞在 *Giardia* 感染較後期（即兩週之後）對感染的控制上相當具有重要性。

5.3.3 梨形蟲對宿主的免疫抑制

Giardia 對於宿主也會有抵抗的機制，以確保自己能夠在宿主體內順利繁殖。例如 *Giardia* 的 trophozoites 表面會表現出不同種類的蛋白質 (variant-specific surface proteins)，此種抗原變異 (antigenic variation) 的現象使得宿主原已啟動之免疫反應難以辨識新抗原而無法有效的對抗 *Giardia* (52, 80)。因此 *Giardia* 具有對抗宿主發炎及免疫反應的機制，過去研究發現受 *Giardia* 感染的病人中僅有約 4 % 的人出

現小腸發炎的現象(73)。也有文獻記載 *G. muris* 感染之 B10 及 Balb/c 品系小鼠小腸切片並沒有發炎反應相關細胞（例如 lymphocyte）增多的情形，且腸道組織的 IL-6 量反而呈現明顯降低的情形(59, 71)。此外，*G. lamblia* 會藉由消耗 arginine 以競爭減少具有殺菌作用之 NO 的產生(70, 81)。

6. *Giardia* 感染與 PI-IBS 之關係

在 2002 年的一篇文獻中提到，義大利的一個小鎮爆發了 *G. lamblia* 的感染，後來發現這些被感染的病人中高達 82 % 的病人出現了持續性的症狀（例如腹瀉），以 IBS 問卷進行診斷後發現可能罹患了 IBS，且這些病人的症狀無法利用抗寄生蟲的藥物而獲得治療。但若以 IBS 的症狀作為醫治的方向治療，反而能有效地減低病患的不適，由此更能證明上述這些病人罹患的疾病為 IBS (82)。而在 2006，義大利針對醫院求診病患的研究也發現，有 6.5 % 受到 *G. lamblia* 感染的病人患有 IBS (83)。

而挪威的 Bergen 在 2004 年的一場大雨之後，因為水質的污染而爆發了大規模的 *G. lamblia* 感染，後來發現這些病人當中，大約有 80.5 % 病人(受 *G. lamblia* 感染 12 到 30 個月以後，且已根除體內之 *G. lamblia* 至少 6 個月)無法以抗寄生蟲藥物治癒，並且伴隨了腹脹、腹痛以及腹瀉等類似於 IBS 的症狀出現，而觀察這些病人的十二指腸切片，則發現到發炎現象的發生(84, 85)。

由上述研究可知，*G. lamblia* 之感染與 PI-IBS 的發生有著密切之相關性，且誘發 PI-IBS 的比例非常之高，然而目前對於兩者間關係之研究並不多。

7. 本實驗之目的

目前由於消化道醫學界對於 IBS 之病理變化及致病機轉並不清楚，其中主要原因為尚未有適當的動物模式可供研究。因此希望藉由 *G. lamblia* 感染小鼠的方

式建立一個 PI-IBS 之動物模式，探討 *G lamblia* 感染期間以及排除後對於腸道屏障功能及發炎反應所造成的影響。希望日後藉由此 PI-IBS 之動物模式，能夠深入探討 IBS 之腸道生理功能改變及其致病機轉。



二、材料與方法

1. 實驗動物

實驗中所採用之實驗動物自國立台灣大學醫學院動物實驗中心購買，為無特定病原體 (Specific Pathogen Free, SPF) 的雄性 BALB/c 小鼠，年齡為五至六週。飼養在符合 P2 級實驗規定的動物房中，室內溫度維持在 23 ± 2 °C，溼度 55 ± 5 %，光照自早上七時至下午七時，維持光照週期為白天黑夜各 12 小時，並給與充足滅菌過之飲水和飼料。

2. 實驗寄生蟲

本實驗所採用之感染寄生蟲種類為梨形鞭毛蟲 *Giardia lamblia*，GS/M 品系，由國立台灣大學醫學院寄生蟲學科孫錦虹老師實驗室培養，將正值對數生長期 (logarithmic phase) 的 *Giardia lamblia* 滋養體 (trophozoites) 飼養於裝有 TYI-S-33 培養液 (0.6 g/L KH_2PO_4 , 1.3 g/L $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 10 g/L Glucose, 2 g/L NaCl【JT Baker, NJ, USA】; 20 g/L Trypticase peptone, 10 g/L Yeast extract【BD, NJ, USA】; 0.2 g/L L-Ascorbic acid, 2 g/L L-Cysteine chloride, 0.75 g/L Bile【Sigma, St Louis MO, USA】; 10 % bovine serum【Hyclone, MA, USA】) 的玻璃試管 (Kimble chase, NJ, USA) 中 (86)，培養液需經由 0.2~0.4 μm 之無菌濾網過濾，以確保 trophozoites 生長在無菌的環境中，為 axenic culture。每 4 到 5 天更換一次培養液，待寄生蟲生長之放大培養數量足夠後，開始製備感染液用以感染小鼠。感染液之製備流程如下：

待 *Giardia lamblia* trophozoites 貼附滿 50 ml 塑膠離心管 (polypropylene conical tube, BD) 管壁後，將離心管置於冰上冷刺激 (cold shock) 20 分鐘，使貼附於管壁的 trophozoites 脫落，以 1500 rpm，4 °C 離心 7 分鐘後，將上清液倒除，再加入無菌之磷酸鹽緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) 以作 trophozoites 懸浮液。PBS 溶液配製方法為【8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 0.12 g/L KH_2PO_4 , 0.91 g/L Na_2HPO_4 , pH 7.4,

Sigma】。利用血球計數器 (hemocytometer) 計數 trophozoites 總數，並以無菌之 PBS 將 trophozoites 溶液濃度調為 10^8 隻 trophozoites /ml。

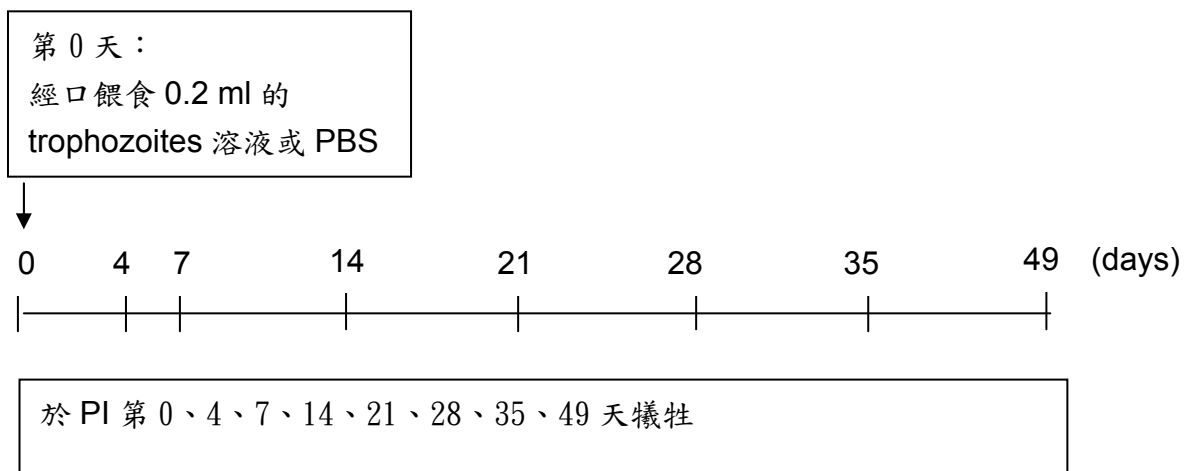
3. 實驗動物分組

實驗組別主要劃分為兩大組，PBS 組及 *G. lamblia* 感染組。所有感染步驟皆於 P2 級的無菌操作台及空間內進行並使用滅菌過之器材及溶液。PBS 組每隻小鼠以滅菌之短餵食針經口灌食(oral gavage) 0.2 ml 的無菌 PBS。*G. lamblia* 感染組則給予灌食 0.2 ml 之 trophozoites 溶液 (10^8 trophozoites/ml)，並以此餵食日為感染之第 0 天。於犧牲日，將小鼠以腹腔注射氨基鉀酸酯 (Urethane, 1.2g/kg B. W, Sigma) 麻醉並剖腹以收集組織進行實驗分析。

實驗動物感染流程

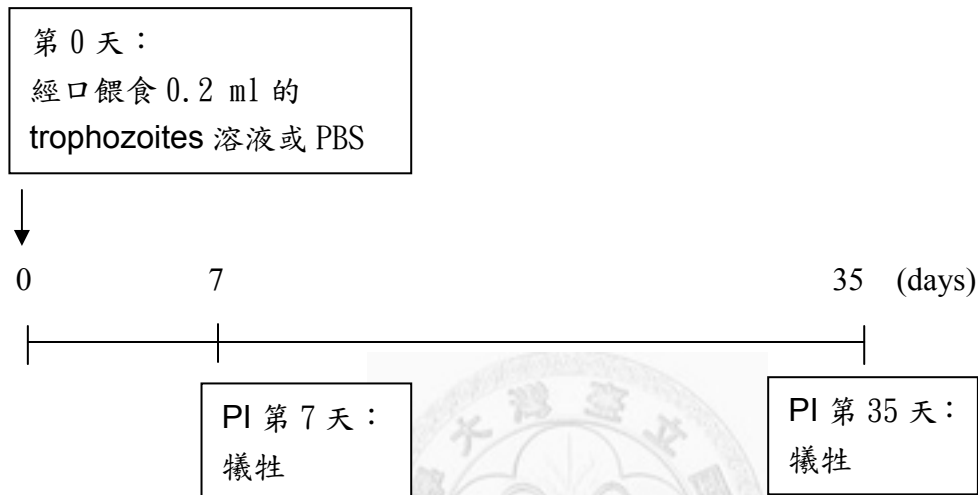
實驗 1：

將 *G. lamblia* 組的小鼠，於感染後(post-infectious, PI) 之第 4、7、14、21、28、35、49 天犧牲；而 PBS 組的小鼠只於灌食後第 7、35、49 天犧牲。將未灌食之小鼠於第 0 天犧牲。於犧牲日，計算小鼠小腸前段 5 cm 腸道中 trophozoites 之數目以得到 *G. lamblia* 的感染曲線(infection course) (詳見 4.1 方法)。



實驗 2：

將 *G. lamblia* 組和 PBS 組的小鼠於第 7 天和第 35 天麻醉犧牲以收集組織進行實驗分析。本論文將感染 *G. lamblia* 後第 7 天視為「感染期」(infection phase) 而第 35 天視為「後排除期」(post-clearance phase)。



4. 組織處理及實驗分析

4.1. *Giardia lamblia* trophozoites 計數

實驗小鼠以腹腔注射氨基鉀酸酯 (Urethane, 1.2g/kg B. W) 麻醉後，取出小腸前段 5 公分，縱剖開並以 37°C PBS 將食糜稍作清除後，將腸道切成 5 段，並置於 2 ml 4°C 之 PBS。腸道溶液置於冰上以冷刺激(cold shock) 3 分鐘後，震盪搖晃 30 秒，使貼附於腸道壁上之 trophozoites 脫落至溶液當中。利用血球計數器計數腸道溶液中 trophozoites 之總數目(58)。

4.2 腸道細菌數目變化分析

4.2.1 腸道黏膜細胞內吞細菌(mucosal endocytosed bacteria)分析

將實驗動物之小腸(10 公分, mid-jejunum)及大腸(5 公分)縱剖開以無菌 PBS 洗

去食糜後，截切成每段為一公分之腸段。組織分別置於 37 °C，10 ml 含有 1 mM 乙二胺四乙酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA, Sigma) 及 5.55 mM 葡萄糖 (D-glucose, Sigma) 之無菌 PBS，於 37 °C 水浴槽中作用 10 分鐘。將腸道組織輕輕地收集放入內含新鮮無菌 10 ml PBS (含有 1 mM EDTA 及 5.55 mM D-glucose) 的新管，以手劇烈搖晃 10 次後，將腸道組織液體以孔徑為 80 μ m 之濾網過濾(nylon mesh, BD)，並收集通過濾網之含有單顆細胞的濾液，置於冰上保存。將殘留於濾網上的腸道組織再次放入新鮮無菌之 10 ml PBS (含有 1 mM EDTA 及 5.55 mM D-glucose)，在 37°C 下作用 5 分鐘後，以手劇烈搖晃 10 次，將腸道組織液體以濾網(孔徑為 80 μ m)過濾，並收集通過之細胞濾液，置於冰上保存，重複此步驟一次。將三次收集到之細胞濾液以 1000 x g，4°C 離心 15 分鐘，收集沉底之細胞 (cell pellet)後，將沉底細胞重新懸浮於 1 ml PBS (只含有 5.55 mM D-glucose)。取出少量細胞懸浮液，與台盼藍染劑(trypan blue solution) 均勻混合 (細胞懸浮液最終含有 0.024 % trypan blue)，並以血球計數器計數存活細胞之濃度。光學顯微鏡物鏡觀察到的腸道黏膜細胞中，較大的細胞為上皮細胞；較小的細胞為其它在固有層 (lamina propria) 存在的細胞如纖維母細胞、白血球、紅血球等等。從小腸 (mid-jejunum) 分離出之大細胞所佔的比例為 $52 \pm 1.6\%$ ，而從大腸分離出之大細胞所佔的比例則為 $63.2 \pm 2.7\%$ 。將腸道黏膜細胞計數後，最終以 0.8×10^6 cells/ml 的濃度加入含有 300 μ g/ml 慶大黴素(gentamicin, Invitrogen, CA, USA)及 5.55 mM D-glucose 的無菌 PBS，置於震盪器上以 55 rpm，37 °C，作用 30 分鐘後，將凝聚之細胞打散 (此步驟目的為確保 gentamicin 能充分作用殺死細胞外或細胞間的細菌)，再繼續作用 30 分鐘。以 gentamicin 總共作用 1 小時以殺死細胞外細菌後，細胞以無菌 PBS (含 5.55 mM D-glucose)清洗兩次 (離心 1000x g，4°C，10 分鐘)，洗去細胞外之 gentamicin。將沉底細胞以 5×10^6 cells/ml 的濃度加入含有 1% 非離子型表面活性劑 Triton X-100 (Sigma)之無菌 PBS 懸浮，置於冰上 10 分鐘，使得細胞內細菌釋出。取其中 200 μ l 細胞液塗抹於非選擇性培養基之新鮮血液瓊脂

平板 (fresh blood agar plate) (Scientific Biotech Corp.)，置於 37°C 培養。24 小時後，計算細菌菌落形成單位 (CFU) 數目。最後將數據標準化為每 10^6 個腸黏膜細胞中有多少菌落形成單位以呈現實驗結果(87, 88)。

4.2.2 腸道上皮表層細菌(superficial bacteria)量分析

取出小腸腸段 5 公分(distal small intestine)，縱剖開以無菌之 PBS 將食糜清洗乾淨及以無菌擦手紙吸走多餘水份後秤重。將腸道裁剪成每段約為 1 公分之腸段後，置入 30 ml 之含有 0.016 % 二硫代蘇糖醇(Dithiothreitol, DTT, Sigma)之無菌 PBS 在室溫下作用 15 分鐘以去除腸道表面之黏液(mucus)。將腸道取出，加入無菌 PBS (比例為 0.01 g 的腸段加入 1 ml 無菌 PBS)，以震盪搖晃 30 秒，以洗下腸道表面的黏液和細菌。重複此清洗動作共兩次。將第三次清洗用之 PBS，取出 200 μ l 塗抹於非選擇性培養基之新鮮血液瓊脂平板 (fresh blood agar plate) (Scientific Biotech Corp.)，置於 37°C 培養 24 小時。24 小時後，計算細菌菌落形成單位 (CFU) 數目。最後將數據標準化為每公克之腸組織的菌落形成單位數目 (CFU/g)。

4.2.3 腸段總細菌量(total bacteria)分析

以無菌剪刀及鑷子取出小腸及大腸各 1 cm，縱剖開後置入無菌之 PBS 中將食糜去除，再將腸段放入 50 ml 無菌之 PBS 再做清洗，以確保食糜完全清除。將腸段多餘的液體以滅過菌之擦手紙吸乾，加入無菌之 PBS (比例為 1 公克組織加入 10 ml PBS)。將均質機和超音波震盪機依序以 75% 酒精、兩次無菌 PBS 清洗過後再使用。分別將小腸及大腸組織以每次 10 秒，連續三次的方式將組織在冰上完全均質化後，再以超音波震盪機破膜 10 秒。將均質完後的組織液分別以適當比例稀釋，取出 200 μ l 塗抹於非選擇性培養基之新鮮血液瓊脂平板 (fresh blood agar plate) (Scientific Biotech Corp.) 中，置於 37°C 培養。24 小時後，計算細菌菌落形成單位 (CFU) 數目。將每個培養基其菌落形成單位數目分別除以 200 μ l 中所含組織公

克數(0.02 公克)以將數據標準化為每公克之腸組織的菌落形成單位數目 (CFU/g)。

4.3. 白血球總數、嗜中性白血球、淋巴球、單核白血球之百分比計數

小鼠以心臟採血之方式收集血液，將血液置於含有 EDTA 之採血管(BD, NJ, USA)。取 10 μ l 血液置於玻片，以另一個玻片壓住血滴使其均勻擴散之後輕刮，使血液均勻分佈於玻片上。待玻片自然風乾後，以 PBS 潤洗玻片。將 Liu's A (ASK, Taoyuan, Taiwan) 染劑均勻滴於玻片作用 30 秒後，以 PBS 清洗兩次。玻片再以 Liu's B (ASK) 染劑作用 1 分鐘，並利用 PBS 清洗兩次後，待玻片晾乾後即可進行封片。將玻片放置顯微鏡下觀察白血球細胞核形狀，細胞質顆粒性及細胞大小，以辨認出單核球細胞 (monocyte)、淋巴球細胞 (lymphocyte)，及嗜中性白血球細胞 (neutrophil)。平均每一片共計數 300 至 350 顆白血球，並將其分類，以得到單核球細胞 (monocyte)、淋巴球細胞 (lymphocyte)，及嗜中性白血球細胞 (neutrophil) 在血液中之分布百分比。而採血管剩餘之血液則是送至台灣大學醫學院實驗動物中心，利用血球分析儀 (Medonic CA-620, Stockholm, Sweden) 進行血液中白血球數量之分析。

4.4. 腸道組織中嗜中性白血球染色 (neutrophil staining)

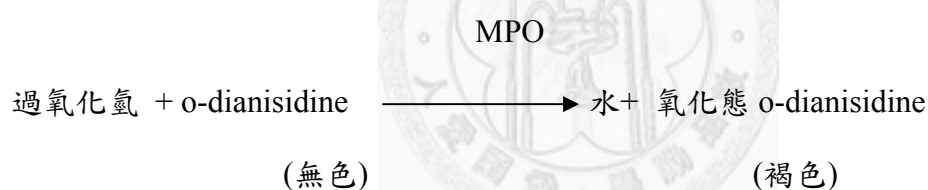
本實驗利用 naphthol AS-D chloroacetate (specific esterase) (Sigma, 90C2) 此試劑進行嗜中性白血球染色。此試劑中 naphthol AS-D chloroacetate 可被嗜中性白血球中的特異性脂酶 (specific esterase) 水解後，產生自由的 naphthol 化合物，之後再和試劑中重氮鹽類 (diazonium salt) 作用後，呈現紫褐色。利用此方法以便確認嗜中性白血球在切片腸道中分佈位置。

實驗步驟大致如下，將小腸組織切片脫蠟還水後，將其放入檸檬酸鹽-丙酮-甲醇混合液 (citrate-acetone-methanol) 於室溫下作用 1 分鐘，之後以二次去離子水清洗乾淨並在室溫放置乾燥至少 20 分鐘。等待的過程中，將試劑中稀釋過之

TRIZMALTM 6.3 緩衝液加溫至 37°C，再避光的環境下，加入 2 ml AS-D chloroacetate 溶液（AS-D chloroacetate 溶液必須在要染色前才可配置，且使用一次後就需丟棄），此時溶液整體應呈現混濁狀，切記不可過濾。將兩溶液均勻混合後，將切片放入在 37°C 環境下作用五分鐘，之後再以二次去離子水清洗至少三分鐘，等待切片風乾即可封片觀察。詳細步驟可參考 Sigma 所附之操作手冊。而定量之方法則是在每隻小鼠的小腸切片中，於顯微鏡觀察下隨機選取 5 個 200 倍放大之圖像視野，並計算其中嗜中性白血球數量之總和。

4.5. 腸道組織骨髓過氧化酶 (Myeloperoxidase, MPO) 活性測定

此分析原理是利用 MPO 會促使過氧化氫和還原態無色 o-dianisidine 作用，轉換成有顏色氧化態之 o-dianisidine，利用褐色吸光值之變化，來求得有多少量之過氧化氫被消耗。



因此 1 unit 的 MPO 活性之定義為在一分鐘內可消耗 1 μmole 的過氧化氫

實驗步驟如下：

取出大約 1cm 的小腸腸段，以 PBS 將食糜清洗及吸乾多餘液體後，將組織放入 1.5 ml 微量離心管，丟入液態氮中急速冷卻，保存至 -80 °C 冰箱。待測試時，將組織取出並秤重，之後以比例為 1 g 組織加入 10 ml 的 50 mM 磷酸緩衝液 (phosphate buffer, pH 6.0) 【內含 0.5 % hexadecyltrimethylammonium bromide, HTAB】。磷酸緩衝液為 7.5 份的磷酸二氫鉀 (Potassium phosphate monobasic, KH_2PO_4) 加入 1 份的磷酸氫二鉀 (Potassium phosphate dibasic, K_2HPO_4)，兩種溶液依此比例混合後，即可得到 pH 為 6.0 之緩衝溶液。將組織以均質機均質化 (在冰

上操作，均質時間每次 10 秒，連續三次)，再以超音波振盪機破膜 10 秒。組織液以轉速為 12000 g，10 °C 離心 20 分鐘，之後取上清液 7 µl 加至 96 孔盤中，每一樣本重複三次。在每一孔中加入反應混合溶液 200 µl 後，利用分光光度儀 (spectrophotometer, Bio-Rad, CA, USA) 讀取 450 nm 吸光值，每 50 秒讀取一次，共讀取四次吸光值。反應混合溶液成份為 0.005 mM 的 o-dianisidine，0.05 % 的 1 % 過氧化氫，10% 的磷酸緩衝液和 90% 二次蒸餾水(89)。讀取吸光值後，以時間為橫軸，吸光值為縱軸作分析，可得一斜率，表示每秒其吸光值之變化量。由於已知 1 µmole 過氧化氫可以和 o-dianisidine 反應產生 1.13×10^{-2} 吸光值之變化，因此和實驗所得斜率相除後，即可得每分鐘有多少 µmole 過氧化氫被消耗，之後除以組織重量毫克數 (7 µl 樣本中，含 0.7 mg 組織)，以標準化。一單位(Unit) MPO 活性之定義為，每分鐘可消耗 1 µmole 過氧化氫。

4.6. 小鼠腸道組織細胞激素之表現量測試

4.6.1 瘤壞死因子 α (Tumor necrosis factor (TNF) α)、巨噬細胞炎性蛋白-1 α (Macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α)、細胞激素 (IL-1 β 、IL-6 及 IL-12) 之表現量測試

於不同感染天數收集小鼠之小腸前段組織，收集步驟同骨髓過氧化酶活性分析所描述。然而在組織秤重後，每 1 公克的組織則是加入 10 ml 的 4°C PBS (每 7 ml PBS 內溶解一顆 complete-Mini 【protease inhibitors cocktail (Roche, Penzberg, Germany)】)。將組織以均質機均質化 (在冰上操作，均質時間每次 10 秒，連續三次)，再以超音波振盪機破膜，同樣地在冰上操作，每次 10 秒，連續 3 次。之後將均質液以 12000 g，4°C 離心 30 分鐘，取上清液保存。取部份上清液做蛋白質定量，利用 DC protein assay kit (Bio-Rad) 測量蛋白質濃度。根據偵測不同細胞激素 (cytokine) 的需求，將每一樣本以 PBS 稀釋為適當之蛋白質濃度 (偵測 TNF α 表現

量時，蛋白濃度調整為 0.5 mg/ml；偵測 MIP-1 α 時表現量時，蛋白濃度調整為 2 mg/ml，而 IL-1 β 、IL-6 及 IL-12 則分別為 0.2 mg/ml、0.5 mg/ml 及 5 mg/ml)。利用酵素連結免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit)

【Peprotech Inc., Rocky Hill, New Jersey, USA】，首先加入 capture antibody 作用 24 小時，接著移除 capture antibody 且在每一孔洞加入 300 μ l 之 wash buffer，並再次移除 wash buffer，以達到清洗之效用，此清洗步驟需重複 4 次。再以 block buffer 進行封鎖非專一性結合作用 1 小時，清洗後加入 100 μ l 組織上清液和已知細胞激素濃度之標準溶液至 96 孔盤，每一樣本重複兩次，置放於室溫下作用 2 小時（亦可將其置放於平面搖晃器，轉速為 40 rpm，以不搖晃出液體為原則）。作用完畢後以 wash buffer 重複清洗 4 次。每孔洞加入 100 μ l 之 detection antibody 於室溫作用 1 小時，在第 4 次清洗步驟後，確認 wash buffer 完全移除，並於每一孔洞加入 100 μ l 的 conjugate 溶液於室溫下作用 30 分鐘，作用完畢後再次移除孔洞中溶液，並重複以 wash buffer 清洗 4 次。同樣地在第 4 次清洗步驟時，確認盤中 wash buffer 完全移除完畢後，再於每一孔洞加入 100 μ l 之受質溶液 (ABTS substrate solution) 後，將 96 孔盤置放於分光光度計，以波長 405 nm 及 650 nm 讀取吸光值，每五分鐘讀取一次，共讀取 30 分鐘。最後選取加入 ABTS 溶液後，第 20 或 25 分鐘後之 405 及 650 讀值，並以 405 nm 讀取之吸光值扣除背景值 650 nm 讀取之吸光值。將組織和標準溶液吸光值相比計算後，求出組織上清液中細胞激素之蛋白含量（詳細步驟可參閱試劑中所附之操作手冊）。本實驗中亦偵測小鼠大腸腸段中 TNF α 及 MIP-1 α 之表現量，蛋白濃度分別調整為 4 mg/ml 及 1 mg/ml，實驗之步驟如上所述。

4.6.2 干擾素 γ (Interferon(INF)- γ) 之表現量測試

小腸中蛋白液之收集如上述，蛋白質定量後將每一樣本以 PBS 稀釋為 5 mg/ml，利用酵素連結免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit) 【eBioscience, San Diego, USA】分析。首先加入 capture antibody 於 4 $^{\circ}$ C 中作

用 24 小時，接著移除 capture antibody 且在每一孔洞加入 300 μl 之 wash buffer，並再次移除 wash buffer，以達到清洗之效用，此清洗步驟需重複 5 次。再以試劑中之 1X Assay Diluent 進行封鎖非專一性結合作用 1 小時，清洗後加入 100 μl 組織上清液和已知細胞激素濃度之標準溶液至 96 孔盤，每一樣本重複兩次，置放於室溫下作用 2 小時（亦可將其置放於平面搖晃器，轉速為 40 rpm，以不搖晃出液體為原則）。作用完畢後以 wash buffer 重複清洗 5 次。在第 5 次清洗步驟後，確認 wash buffer 完全移除，並於每一孔洞加入 100 μl 的 detection antibody 於室溫下作用 1 小時，作用完畢後再次移除孔洞中溶液，並重複以 wash buffer 清洗 5 次。確認 wash buffer 完全移除，並於每一孔洞加入 100 μl 的 conjugate 溶液於室溫下作用 30 分鐘，作用完畢後再次移除孔洞中溶液，並重複以 wash buffer 清洗 7 次。確認盤中 wash buffer 完全移除完畢後，再於每一孔洞加入 100 μl 之受質溶液（試劑中之 substrate solution）作用 15 分鐘後，接著加入 50 μl 之 stop solution(即 2N H_2SO_4)停止反應。將 96 孔盤置放於分光光度計，以波長 450 nm 及 570 nm 讀取吸光值，並以 450 nm 讀取之吸光值扣除背景值 570 nm 讀取之吸光值。將組織和標準溶液吸光值相比計算後，求出組織上清液中細胞激素之蛋白含量（詳細步驟可參閱試劑中所附之操作手冊）。

4.7. 小鼠血清中 IL-1 β 之表現量測試

小鼠以心臟採血之方式收集血液，將血液以轉速為 3500 g，4 $^{\circ}\text{C}$ 離心 30 分鐘後取上層之血清利用酵素連結免疫吸附分析法（enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit）分析。實驗之步驟同小鼠組織之 IL-1 β 表現量測試。

4.8. 組織切片及染色

4.8.1 石蠟包埋檢體的製備

剪下腸段 1 cm 後，縱剖開並以 PBS 將食糜清除，以釘書機固定於紙板上，浸泡在含 4 %三聚甲醛 (paraformaldehyde) 之 PBS 中固定腸道組織。一週後，組織依次浸泡在漸進式提高濃度的酒精 (75 % - 100 %)以及二甲苯 (xylene)中進行脫水以及脫酒精動作，隨後將組織以絨毛及腺窩軸 (crypt to villi axis)以平行於切割面的角度放置於石蠟中包埋固定。接著以手搖式組織切片機 (Spencer 820 rotary microtome, Cambridge Scientific Products, Cambridge, MA, USA)切成 4 μ m 厚度的切片。進行不同染色實驗前，組織切片皆需進行脫蠟及還水之步驟。步驟為將組織切片浸泡在二甲苯 10 到 15 分鐘去除石蠟，之後將其放入 100 %的酒精 2 次，各 7 分鐘，再依序放入 90 %、80 %、70 %酒精各 5 分鐘，以流動清水清洗 30 秒至 1 分鐘，最後以二次蒸餾水清洗之後即可進行染色實驗。

4.8.2 蘇木紫-伊紅染色 (Haematoxylin and Eosin Staining)

組織切片進行脫蠟及還水步驟後，將其放入蘇木紫 (haematoxylin)溶液 2.5 分鐘，取出以流動清水清洗 1 分鐘。將玻片上多餘水分甩乾除去後，轉置伊紅 (eosin) 溶液作用 8 秒，取出以流動清水清洗 1 分鐘。將玻片放置 90 %的酒精，迅速拿起，再放置於 100 %的酒精重複一樣步驟，並以二次蒸餾水稍作沖洗，待檢體晾乾後，進行封片。

4.8.3 免疫螢光染色-誘導型一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)

將已脫蠟還水之組織切片置於 50 mM 氯化銨 (NH_4Cl) 溶液，在室溫下 10 分鐘以消滅自發性螢光 (autofluorescence)。以 PBS 清洗三次後，加入 2% BSA 以及 2% normal goat serum，並於室溫下作用 1 小時以進行封鎖非專一性結合，之後加入一級抗體作用 (如下表)，於 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷房中水平搖晃放置一晚。隔日於室溫下，再繼續水平搖晃作用 1.5 小時。先以 PBS 清洗三次，於避光環境下，加入二級抗體 (如下表)，在室溫中作用 1 小時。將組織切片以 PBS 清洗三次後，最後在避光

環境中，進行 Hoechst dye (1 mg/ml in PBS, Invitrogen) 染色 30 分鐘，待玻片晾乾即可封片，並以螢光顯微鏡觀察。

一級抗體

標靶蛋白	克隆	廠商及型號	濃度
Polyclonal Rabbit Anti-human iNOS/NOS (Cross-reactivity to mouse iNOS)		BD biosciences, 610333	250 µg/ml 1:50

二級抗體

標靶蛋白	克隆	廠商及型號	濃度
goat anti-rabbit IgG -Alexa Fluor 488		Invitrogen, #A11034	10 µg /ml 1:1000

4.9 西方轉漬法 (Western blotting)

利用西方轉漬法技術測量小腸黏膜層中緊密連結 occludin 的表現。

4.9.1 黏膜層蛋白質萃取

將大約 7 cm 的小腸組織剪下，縱向剖開後以 PBS 清洗管腔中的食糜，利用玻片刮取黏膜層組織，放入液態氮中急速冷卻，保存至 -80 °C 冰箱。待測試時，將組織取出並秤重，加入適量之抽取蛋白緩衝液 (complete RIPA buffer) (每克組織加入 10 ml complete RIPA buffer 【內含 50 mM Tris-HCl, pH 7.4、1 % Nonidet P-40、0.25 % sodium deoxycholate、0.1 % SDS、150 mM NaCl、5mM Na₃VO₄、10 mM NaF 以及一顆 complete-Mini】，以均質機每次十秒共三次的方式在冰上將組織磨碎後，再利用超音波震盪機在冰上破膜 10 秒，並置於冰上靜置 30 到 60 分鐘。將均質液以 14000 xg 在 4 °C 的環境中離心 15 分鐘，收集其上清液。

4.9.2 蛋白質定量

利用 DC protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 測量蛋白質濃度，並且利用 complete RIPA buffer 調整至每個樣品的濃度為 5 mg/ml，在加入相同體積的樣本緩衝液 (sample buffer) 【4 % SDS, 20% glycerol, 10 % β -mercaptoethanol, 0.5 M Tris-HCl, 0.04 mg/ml Bromophenol blue】，將樣品加熱至 95 °C，5 分鐘後即可達到將蛋白質變性的效果。組織樣品分裝後，儲存於 -80 °C 的冰箱中，待進行免疫轉漬實驗時取出使用。

4.9.3 蛋白質電泳

製作下層分離膠體 (resolving gel) 【分析 occludin 為 10 % polyacrylamide】以及上層堆積膠體 (stacking gel) 【4% polyacrylamide, pH 6.8】，將等量的樣本混和液 (10 μ l) 注入膠體槽 (well) 中，以 75 V 的電壓先將蛋白質堆積在上層堆積膠體的最下層之後，利用 150 V 的電壓將蛋白質進行分離，隨後轉移至硝化纖維素轉漬膜 (Whatman, Boston, USA)。

4.9.4 蛋白質分析

將硝化纖維素轉漬膜以 5 % 的無脂牛奶 (non-fat milk) 在室溫下進行封鎖反應 (blocking) 1 小時後，用含有 0.1 % 的展著劑 (Tween 20) 的 Tris 緩衝液 (Tris buffer solution, TBS) 【1.21 g/L Tris 及 8.76 g/L NaCl, pH 7.5】，又稱為清洗緩衝液 (washing buffer, Tween-TBS, TTBS) 潤洗三次。加入以 TBS 稀釋之一級抗體 (如下表所示)，在冷房中水平搖晃作用一晚後，隔日於室溫下再作用 1 小時。以清洗緩衝液 (TTBS) 清洗硝化纖維素轉漬膜三次，每次 15 分鐘後，加入二級抗體 (如下表所示) 在室溫下水平搖晃 1 小時。將硝化纖維素轉漬膜以清洗緩衝液 (TTBS) 清洗三次後，加入 chemiluminescence 偵測反應液 (Millipore, Billerica, MA, USA)，以 UVP

AutoChemi™ System (UVP, Upland, CA, USA)偵測蛋白質帶，並且利用 Gel-Pro Analyzer 3.1 軟體量化蛋白質帶的密度。本實驗方法利用標準分子量標記 (Biomax, Ontario, Canada)對照欲偵測蛋白質其分子量及座落位置， β -actin 的分子量為 42 kD，occludin 的分子量為 65 kD。

一級抗體

標靶蛋白	克隆	廠商及型號	濃度
Monoclonal mouse anti-mouse occludin	OC-3F10	Invitrogen, 33-1500	0.5 mg/ml 1:3000
Monoclonal mouse anti-mouse β -actin	AC-15	Sigma, #A5441	0.29 μ g/ml 1:10000

二級抗體

標靶蛋白	克隆	廠商及型號	濃度
goat anti-mouse IgG-HRP		Santa Cruz, SC-2005	0.4 μ g/ml 1:5000

4.10 細胞凋亡染色-缺口末端標記技術 (terminal deoxynucleotide transferase biotin-dUTP nick-end labeling, TUNEL)

本實驗的實驗原理為利用細胞凋亡時，DNA 片段化為其重要表徵之一。染色時加入能夠偵測 DNA 片段的 3'-OH 端的 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)，使 DNA 片段可與有標記生物素 (biotin) 或未標記生物素之去氧核苷酸，再加入帶有山葵過氧化酶 (horseradish peroxidase, HRP) 的 streptavidin，streptavidin

會再與 biotin 結合，最後再加入 diaminobenzidine (DAB)，DAB 在 HRP 的催化下會呈現咖啡色，利用此方法即可偵測具有 DNA 片段的細胞，也就是發生細胞凋亡的細胞。

本實驗利用 TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection kit (Calbiochem, San Diego, USA, Cat. #QIA33) 進行 TUNEL (terminal deoxynucleotide transferase biotin-dUTP nick-end labeling) 的染色，實驗步驟大致如下：1. 通透作用 (Permeabilization)：將切片脫蠟還水後開始進行實驗，此步驟在組織上加入 Proteinase K，作用 20 分鐘後再以 Tris 緩衝液 (Tris buffer solution, TBS) 【20 mM Tris 及 140 mM NaCl, pH 7.5】搖洗。2. 抑制內生性過氧化酶作用 (Inactivation of Endogenous Peroxidase)：利用甲醇 (methanol) 將過氧化氫 (H_2O_2) 稀釋成濃度 3 % 後加入組織反應 5 分鐘，再以 TBS 搖洗。3. DNA 片段標定作用 (DNA Fragment Labeling)：加上 TdT enzyme 在 37 °C 下作用 90 分鐘。4. 停止反應 (Termination)：加上停止緩衝液 (stop buffer)，再以 TBS 搖洗 10 分鐘。5. 偵測作用 (Detection)：加上含有 HRP 的 conjugated 溶液 30 分鐘，再以 TBS 搖洗 10 分鐘，再加上 DAB 呈色，約 6 到 10 分鐘之後，以二次蒸餾水清洗之後，即可封片觀察。而量化之方法則是於每隻小鼠的小腸組織切片中，於顯微鏡下觀察結構完整之絨毛（約 6~10 根），計數其頂端出現 TUNEL(+) 染色上皮細胞的絨毛數量百分比。

4.11 統計方法

細菌生長的數據 (CFU/g) 及嗜中性白血球染色之量化是利用在同一組別數據的中位數進行 Mann Whitney nonparametric 測驗法。而 occludin 之蛋白表現量、其他白血球之數據（白血球總數及各種白血球所佔百分比）、骨髓過氧化酶活性及血清中 IL-1 β 測試則是以 t-test 檢驗法。組織中細胞激素之分析結果則是利用單變方分析 (one-way-ANOVA) 處理，檢視數據群組之間是否具有差異性，再以 Student-Newman-Keuls post-hoc 測驗法 (Sigma Stat version 2.03) 進行組間平均值之

顯著性分析。所有統計分析方法皆以 $P < 0.05$ ，認定為有統計學上的顯著性差異。



三、實驗結果

1. *G. lamblia* 之感染曲線

首先我們要探討的是，在灌食 *G. lamblia* 組之實驗小鼠，腸道中滋養體 (trophozoites) 之存在數目及感染時間。在第一部份的實驗中，分別在感染後天數 (post-infection days) 第 0、4、7、14、21、28、35、49 天犧牲實驗動物，並分析其前端小腸所含之 *G. lamblia* trophozoites 數目，以建立出感染曲線 (圖 3)。將腸道洗去食糜後，經 cold shock 使貼附腸壁上之 trophozoites 脫落，計算出 trophozoites 之數目。由圖 3 結果得知，在第 4 天和第 7 天時，可觀察到小鼠腸道中 trophozoites 的存在，證實小鼠有感染到 *G. lamblia*。在感染後第 4 天數目最高為 $(1.1 \pm 0.5) \times 10^4$ trophozoites 而在感染第 7 天為 $(5.8 \pm 1.7) \times 10^3$ trophozoites，此段時間正值感染高峰期。在感染第 14 天之後，則無法在腸道中偵測到 trophozoites 的存在，代表此時 *G. lamblia* 已被排出體外。因此經由上述結果，本實驗將第 4-7 天視為「感染期」 (infection phase) 而第 21-49 天視為「後排除期」 (post-clearance phase)。

2. 腸道黏膜細胞之內吞細菌 (mucosal endocytosed bacteria) 量

本實驗分析小腸 (mid-jejunum) 及大腸 (colon) 黏膜細胞之內吞細菌量，以評估腸腔細菌入侵黏膜的程度。此方法測量細胞內吞細菌量而不計算細胞外的細菌量，以排除腸腔細菌污染樣本的可能性。首先，本實驗確認第 0 天的的小腸及大腸黏膜細胞之內吞細菌量中位數分別為 0 和 0.3 CFU/g。

在圖 4A 中，在感染後第 4 天及第 7 天時，小腸黏膜細胞之內吞細菌量相較於第 0 天有顯著的上升。然而在感染後第 14 天，小腸黏膜細胞之內吞細菌量與感染第 0 天相比則無顯著差異。在感染後第 21、28、35、49 天時，雖無法於腸道中偵測到 trophozoites 之存在，但小腸黏膜細胞之內吞細菌量相較於第 0 天，依然有顯著的升高。*G. lamblia* 感染後第 7 天和第 35 天之小腸黏膜內吞細菌量中位數為 164.2

CFU/g 和 118.4 CFU/g，相較於 PBS 餵食之實驗動物組分別為 0 及 0.3 CFU/g，皆有顯著增高的情形(表一)。

在圖 4B 中，大腸黏膜細胞之內吞細菌量在第 4、7 天的感染高峰期時相較於第 0 天有顯著升高，但在第 14 天時則無顯著差異。感染後第 21、28、35、49 天之大腸腸黏膜細胞之內吞細菌量與第 0 天相比，有顯著性的增高。*G. lamblia* 感染後第 7 天和第 35 天之大腸黏膜內吞細菌量中位數為 253.4 CFU/g 和 98.1 CFU/g，相較於 PBS 餵食之實驗動物組分別為 1.3 及 0 CFU/g，亦皆有顯著增高(表一)。

由此實驗結果顯示，在 *G. lamblia* 感染之刺激下，在第 4 及 7 天的感染高峰時期，可誘發細菌進入小腸及大腸腸道黏膜細胞內。在感染第 14 天後此現象略為下降，與感染第 0 天相比，無顯著性之差異。然而在感染後第 21、28、35、49 天即腸道內寄生蟲排除之後，腸道黏膜細胞之內吞細菌數又開始上升，與第 0 天相比，有達到顯著之差異。

3. *G. lamblia* 感染對於腸道的總細菌量及表層細菌量之影響

3.1. 腸道總細菌量(total bacteria)

於灌食 PBS 和 *G. lamblia* 後第 7 天和第 35 天，截取兩組小鼠之小腸及大腸腸段各 1 cm，分析腸道中之總細菌量(圖 5 和表 1)。於第 7 天時，*G. lamblia* 組(中位數為 2.1×10^6 CFU/g)相較於 PBS 組(中位數為 2.0×10^5 CFU/g)之小腸總細菌量有約 10 倍之顯著性的增加(圖 5A 和表 1)。而 *G. lamblia* 組之大腸細菌總數(中位數為 5.4×10^5 CFU/g)，與 PBS 組(中位數為 1.4×10^5 CFU/g)相比亦有約 4 倍之顯著性的增加(圖 5B)。在第 35 天時，*G. lamblia* 組之小腸和大腸之總細菌量相較於各自的 PBS 組並無差異(圖 5 和表 1)。

由上述結果可知，在 *G. lamblia* 感染第 7 天(即正值感染時期)，小腸及大腸之細菌總量皆有顯著性的增加。在感染第 35 天時(後排除期)，不論是小腸或大

腸的細菌總量皆無顯著性的差異。

3.2. 腸道上皮表層細菌(superficial bacteria)量

接著本實驗要探討 *G. lamblia* 感染是否會對小腸和大腸之表層細菌量有所影響(圖 6 和表 1)。於第 7 天時,小腸中 *G. lamblia* 組(中位數為 3.6×10^5 CFU/g)腸道上皮表層細菌量相較於 PBS 組(中位數為 1.1×10^5 CFU/g)有約 3 倍顯著的增加,而大腸 *G. lamblia* 組(中位數為 3.6×10^5 CFU/g)腸道上皮表層細菌量相較於 PBS 組(中位數為 7.2×10^4 CFU/g)亦有約 5 倍明顯之增加(圖 6 和表 1)。在第 35 天,小腸 *G. lamblia* 組(中位數為 3.2×10^5 CFU/g)上皮表層細菌量相較於 PBS 組(中位數為 3.2×10^4 CFU/g)約有 10 倍之顯著增加;而大腸的上皮表層細菌量 *G. lamblia* 組相較於 PBS 組雖有增加趨勢但未達到統計差異(圖 6 和表 1)。

4. 腸道黏膜組織中 occludin 之表現

利用西方轉漬法測定小腸黏膜層中 occludin 之蛋白表現量。由圖 7 之結果顯示,感染第 7 天「感染期」時, *G. lamblia* 組斷裂的 occludin 片段表現較 PBS 組有顯著的增加,代表 occludin 有受到破壞,而感染第 35 天「後排除期」時, *G. lamblia* 組則沒有看到明顯之 occludin 破壞的情形。

5. 白血球總數、嗜中性白血球、淋巴球及單核白血球百分比計數

本實驗結果透過心臟採血之方式收集血液分析血液中白血球之總數(圖 8A),並進行抹片及染色以分析嗜中性白血球(圖 8B)、淋巴球(圖 8C)、以及單核球(圖 8D)在所有白血球中所佔的百分比。在感染第 7 天時, *G. lamblia* 組之白血球總數為 $2.6 \pm 0.4 (10^3/\text{mm}^3)$,相較於 PBS 組($4.4 \pm 0.5 (10^3/\text{mm}^3)$)有明顯之減少。而 *G. lamblia* 組之嗜中性球之百分比為 $21.7 \pm 3.9 \%$,相較於 PBS 組(9.7 ± 1.4

%)，有顯著的上升（圖 8B），至於淋巴球百分比則有顯著之降低（圖 8C）。而在感染第 35 天時，*G. lamblia* 組之嗜中性球之百分比為 $20.3 \pm 1.4\%$ ，相較於 PBS 組 ($10.5 \pm 1.1\%$)，有顯著之增加，而淋巴球則有顯著之降低。單核球百分比則都沒有明顯的差異。

6. 腸道組織中嗜中性白血球染色 (neutrophil staining)

本實驗接著利用小腸之石蠟切片進行腸道組織中嗜中性白血球之染色。由圖 9Ab 及 9Af，感染第 7 天時之小腸切片中可以看到大量嗜中性白血球分布於腸組織絨毛基部及腺窩的部位，而 PBS 組（圖 9Aa 及 9Ae）則沒有看到嗜中性白血球進入組織中。即使到了感染第 35 天（圖 9Ad 及 9Ah），雖然嗜中性白血球進入腸組織的數量較感染第 7 天時少，但相較於 PBS 組（圖 9Ac 及 9Ag）仍有增加之趨勢。由圖 9B 之量化結果顯示，無論是第 7 天「感染期」或第 35 天「後排除期」，*G. lamblia* 組（中位數分別為 99 及 5）相較於 PBS 組（中位數皆為 0）進入腸組織中之嗜中性白血球數目有明顯的增加。而第 0 天時，嗜中性白血球數目之中位數與 PBS 組相同，皆為 0。

7. 腸道組織骨髓過氧化酶 (Myeloperoxidase, MPO) 活性測定

由上述結果可知，在 *G. lamblia* 感染期之小鼠腸道總細菌量、表層細菌量和黏膜細胞內吞細菌量增加，及血液和腸組織中嗜中性白血球數目上升。而過去文獻指出，MPO 之酵素活性和嗜中性白血球進入腸道組織之數目成正比(15, 16)。因此本實驗欲更進一步測量小腸腸段中，MPO 酵素活性是否在 *G. lamblia* 「感染期」和「後排除期」有所改變。

在第 0 天時，小腸中 MPO 之活性基礎值為 3.0 ± 0.3 units/mg (N=6)。在感染第 7 天時，*G. lamblia* 組之小腸 MPO 活性(13.3 ± 2.0 units/mg) 較 PBS 組($4.0 \pm$

0.9 units/mg)來得高，且達到顯著性之差異(圖 10)。而在感染第 35 天時, *G. lamblia* 組之小腸 MPO 之酵素活性與 PBS 組相比，亦有統計學上顯著的提升。由上述結果可知，*G. lamblia* 感染後之第 7 天及第 35 天，皆能刺激及誘發小腸之 MPO 酵素活性顯著性的增加。

8. 小鼠腸道組織 $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{MIP-1}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 、 IL-12 及 $\text{INF}\gamma$ 之表現量測試

由 ELISA 分析法，偵測各種細胞激素在小腸表現量之改變。如圖 11A 和圖 11B 所示，正值 *G. lamblia* 「感染期」(感染第 7 天)，小腸之 $\text{TNF}\alpha$ 與 $\text{MIP-1}\alpha$ 表現量與第 0 天相比沒有顯著性的差異；然而在感染後第 35 天，也就是 *G. lamblia* 之「後排除期」，小腸腸段中 $\text{TNF}\alpha$ 與 $\text{MIP-1}\alpha$ 之表現量相較於第 0 天則有上升且達到統計顯著性。而 $\text{IL-1}\beta$ 之表現量則是在第 7 天時略為增加，而到第 35 天時顯著升高(圖 11C)。至於 IL-12 、 IL-6 及 $\text{INF}\gamma$ 活性相就於第 0 天則皆未達統計上之差異(圖 11D,E,F)，然而在第 7 天及 35 天時， $\text{INF}\gamma$ 表現量皆有比第 0 天高的趨勢，但未達統計差異。本實驗中亦偵測小鼠大腸腸段 $\text{TNF}\alpha$ 與 $\text{MIP-1}\alpha$ 之表現量(圖 12)，在感染後第 35 天亦有增加之趨勢，但可能因組織於 -80°C 冰箱中存放將近半年之久，而使蛋白質濃度表現太低，因而無法達到統計上顯著之差異。

9. 小鼠血清中 $\text{IL-1}\beta$ 之表現量測試

本實驗由心臟採血分離出血清後，分析其中 $\text{IL-1}\beta$ 之表現量(圖 13)。由 ELISA 分析後發現，感染第 7 天時，血清中 $\text{IL-1}\beta$ 之表現量相較於第 0 天有明顯的增加，而第 35 天時，相較於第 0 天雖有增加之趨勢，但沒有達到統計學上之差異。

10. 腸道組織中 iNOS 之表現

下一步利用免疫螢光染色法探討在 *G. lamblia* 的感染後，小腸中 iNOS 的表現量是否有改變。由圖 14 可觀察到，在感染第 0 天之小腸絨毛切片上，沒有偵測到 iNOS 的表現；然而在 *G. lamblia* 感染第 7 天，可在小腸絨毛切片之上皮細胞表層偵測到大量且螢光強度強大之 iNOS 表現。在感染之第 35 天的小腸上皮細胞中，同樣也可偵測到 iNOS 之螢光表現，雖其螢光強度比感染後第 7 天微弱，但與感染之第 0 天相比，螢光強度仍有增強之趨勢。而無論是第 0、7 或 35 天感染組之 isotype control，皆無法染色到 iNOS 之表現。由上述結果可知，*G. lamblia* 之感染，不論其處於正值感染期（感染後第 7 天）或是後排除期（感染後第 35 天），皆可造成腸道上皮細胞 iNOS 之表現量的提升。

11. *G. lamblia* 感染對於小腸絨毛型態及腸道上皮細胞凋亡之影響

本實驗利用蘇木紫-伊紅染色觀察腸道絨毛外觀型態之變化。在此部分實驗中，我們主要觀察小腸之絨毛型態的變化。在圖 15A 中，在感染第 0 天，也就是正常狀態下之絨毛，絨毛形狀完整且最外層覆蓋單一層腸道上皮細胞。在經過 *G. lamblia* 感染後第 7 天及第 35 天，小腸絨毛外觀構造無受到影響，絨毛結構正常。由此結果得知，*G. lamblia* 之感染，對感染小鼠之小腸腸道構造並不造成影響。

本部分實驗同時利用 TUNEL 的方法，偵測小腸細胞是否有細胞凋亡的現象。由圖 15B TUNEL 結果得知，在感染第 0 天中，小腸腸道上皮細胞並無凋亡之現象。同樣地，在以 *G. lamblia* 感染刺激第 7 天之小鼠小腸腸道細胞上也無觀察到凋亡之細胞存在。然而在 *G. lamblia* 感染刺激第 35 天，也就是 *G. lamblia* 排除期之小鼠小腸絨毛上，則觀察到凋亡之腸道上皮細胞在絨毛頂區域。而由量化之結果圖 14C 亦顯示，第 35 天時之有細胞現象之絨毛的百分比也有增加的趨勢。

由此部分結果顯示，*G. lamblia* 感染之刺激雖並不會對於小腸腸道絨毛之外觀

構造有所影響及破壞。然而在 *G. lamblia* 排除期，感染第 35 天時，卻觀察到部份小鼠之小腸腸道有上皮細胞凋亡之現象，但無統計學上之顯著性。



四、討論

本計劃首先在一定間隔之時間點分析 Balb/c 小鼠近端小腸中 *G. lamblia* trophozoites 的數量以建立感染曲線。實驗結果顯示出，感染之最高峰為第 4 到第 7 天，而第 14 天則無法觀察到 trophozoites 的存在，可見已由體內完全排除。因此本論文將感染 *G. lamblia* 後第 7 天視為「感染期」(infection phase) 而第 35 天視為「後排除期」(post-clearance phase)。過去文獻以 $10^6 \sim 10^7$ 隻 *G. lamblia* GS/M 品系之 trophozoites 感染 Balb/c 小鼠，在感染後約一週到達高峰，平均 trophozoites 的數目大約為 10^6 個，而在感染第二週至第三週後則無法在小腸偵測到寄生蟲(56, 57, 78)，這些時間點與本實驗所建立之感染曲線吻合。而在 C57BL/6 小鼠中，*G. lamblia* GS/M 之感染曲線時間點亦相似(57)。本實驗和前人結果得到之感染期類似，約在灌食後第 14 天完全排除寄生蟲。本實驗在最高峰之感染後第 4 天，計數到 *G. lamblia* trophozoites 之數目為 $(1.1 \pm 0.5) \times 10^4$ ，相較於前人之研究所計數到之數目較少，推測其原因可能和截取腸段長度以及判定 trophozoites 的標準不同。過去文獻指出 *G. lamblia* 主要寄生於前端小腸(55)，因此本實驗中採用 5 cm 的十二指腸作冷刺激使貼附於腸管腔之 trophozoites 脫落以利計數，並利用中段小腸做屏障功能和發炎反應的測試以比較同一隻小鼠感染量和腸道病變的相關性，而過去文獻有些文章則採用整段小腸(約 30 cm)作分析。另外，本實驗判定方式為在顯微鏡觀察下，計數具有游動能力之 trophozoites，當 *G. lamblia* trophozoites 失去其活動能力時，便無法判定其是否為 *G. lamblia* trophozoites。推測由於上述的原因使得本實驗中 *G. lamblia* trophozoites 之數目與前人研究相比較低。相同的是本實驗結果和前人文獻的感染曲線時間點一致，約在灌食後第 14 天完全排除寄生蟲。

本實驗利用 H&E 染色探討 *G. lamblia* 感染對於小腸型態之影響，結果發現無論是第 7 天「感染期」或第 35 天「後排除期」，小腸之絨毛構造及型態皆正常，黏膜上皮細胞層完整。過去有許多文獻記載 *Giardia* 感染會使小腸絨毛出現型態上的缺損，包含了絨毛縮短及腺窩增生等(62)，但這些現象通常都在人類受 *G. lamblia*

感染時或在 *G. muris* 感染的動物(如小鼠或沙鼠(gerbil))中看到(90, 91)，直到 2000 年才有研究指出 *G. lamblia* 中的 BRIS/95/HEPU/2041 品系也會造成小鼠腸道絨毛結構改變(92)。相反地，亦有實驗發現 *G. lamblia* 或 *G. muris* 感染在病人身上或動物模式中並不會誘發小腸絨毛構造及型態的改變(59, 73)。因此根據 *Giardia* 品系的不同及感染宿主的不同，*Giardia* 對於絨毛型態的影響也不相同。而在本實驗中並沒有看到絨毛縮短等型態上的病變，推測可能是所選擇的 *G. lamblia* 品系 (GS/M) 及其感染的宿主種類之差異所造成。

接著本實驗探討 *G. lamblia*「感染期」的腸道屏障功能和腸腔細菌移位的現象。實驗中分析腸道組織不同深度的細菌量以檢測 *G. lamblia* 感染是否會造成腸道細菌有不正常增生或移位的現象發生。結果發現，在 *G. lamblia* 感染後第 7 天，小腸及大腸腸段中無論是細菌總數、表層細菌數，或是黏膜細胞內吞細菌數皆增加。前人研究指出，將 *G. lamblia* 感染病人禁食後的十二指腸腸腔液體作分析，相較於未受 *G. lamblia* 感染的一般人，受 *G. lamblia* 感染者會有腸道中細菌大量增生的情形(62)。在出現吸收不良症狀的 *Giardia* 感染病人中，分析其前端小腸腸液細菌總數也發現有增加的現象(93)。此外，另有研究利用小腸內視鏡刮取 *Giardia* 感染病人小腸前端之部份黏膜層，也觀察到細菌增生的現象(93)。我們可以推論 *G. lamblia* 感染會使腸腔中細菌量增加，進而使貼附於腸道表層的細菌也增加。本實驗中，感染後第 7 天內吞至腸黏膜層之細菌也隨之有增加之現象，此外本實驗分析細胞間緊密連結 occludin 之表現的結果也發現有破壞的情形，顯示出腸道絨毛型態和上皮細胞雖然完整，但屏障功能有缺失。實驗設計中採用黏膜層細胞內吞細菌量而不計算細胞外的細菌量之原因是為了要排除腸腔細菌污染樣本的可能性。過去前人研究顯示，*G. lamblia* 感染除了造成腸道細菌不正常之增生外，在體外實驗結果得知 *Giardia* trophozoites 會促使腸道上皮細胞 MLC 磷酸化，並使 tight junction ZO-1 重組，進而使腸道上皮細胞間隙增大，造成腸道通透性的增高(94)。亦有研究發現 *G. lamblia* 會破壞人類小腸細胞株的 tight junction ZO-1(95)。由此可以推測

Giardia trophozoites 對於腸道屏障造成影響後可能會使腸腔中增生之細菌趁機經由 paracellular pathway 穿過上皮細胞間隙而進入組織中。此外，過去利用人類腸細胞株的實驗發現，TNF α (10 ng/ml) and INF γ (100 ng/ml)會破壞 tight junction 而使腸屏障功能缺損(96, 97); 另一研究指出低量的 INF γ (1 IU/ml)在不影響 tight junction 完整性的情況下，會引發細菌被內吞至腸道上皮細胞中並經細胞內通過此障壁。本實驗在感染期並未看到腸組織之 TNF α 增加而 INF γ 表現也只有增加之趨勢(無統計上差異)，推測在感染期也許低量 INF γ 亦有影響到腸道屏障使腸腔中細菌趁機進入腸組織中。

本實驗接下來進一步探討 *G. lamblia* 感染期與宿主之發炎反應的關係。實驗發現在 *G. lamblia* 感染後第 7 天的血液中 neutrophil 佔所有白血球百分比，相較於 PBS 灌食組，有明顯的升高。本實驗中除了在感染後第 7 天可觀察到血液中 neutrophil 數量的增加外，透過 neutrophil 染色的組織切片實驗結果中，可以看到 neutrophil 大多分布於在腸組織絨毛基部及腺窩的部位，且與感染前(第 0 天)相比，其數目亦有顯著的增加。在 *G. lamblia* 「感染期」，小腸組織中的骨髓過氧化酵素活性有增加，與 neutrophil 被趨化至腸組織的結果相吻合。在發炎反應發生時，neutrophil 為第一個被吸引至發炎組織並進行殺菌作用的白血球(98)，因此本實驗中 neutrophil 的增加可作為發炎反應的可能證據之一。過去研究顯示，在發炎的情況下，腸道腺窩中的 neutrophils 數量會大量的增加(13)。另外，過去研究也發現，被 *Giardia* 感染的山羊小腸腸組織中也會有 neutrophil 增多的現象，而此現象是發生在固有層以及上皮層中(74)。而由受 *Giardia* 感染的病人十二指腸切片中也發現進入固有層中的 neutrophil 有增多的現象(73)，且也有文獻發現受 *Giardia* 感染的病人中約有 16 %其十二指腸切片之腸道上皮細胞中有 neutrophil 大量進入(99)。Neutrophil 能夠以氧化的方式進行殺菌作用，neutrophil 顆粒物質內有大量的骨髓過氧化酵素，由過去研究得知此酵素活性和 neutrophil 進入組織之數目成正比，因此組織內骨髓過氧化酵素的上升可作為 neutrophil 進入組織的代表(15, 16)。由前人研究可知，

neutrophil 參與在宿主對抗 *Giardia* 的機制中，並可能藉由釋出自由基和防禦素毒殺 trophozoites(68)。另外，在體外實驗也證實 neutrophil 能降低 *Giardia* trophozoites 的貼附能力(75)。而本實驗結果顯示出 *G. lamblia* 感染刺激使得血液中 neutrophil 比例增加而趨化進入小腸組織中的 neutrophil 也變多並伴隨骨髓過氧化酵素活性上升，以產生具有強殺菌能力的自由基或活性氧化物。而本實驗中看到血液中淋巴球比例下降，可能是因為 neutrophil 比例增加所造成淋巴球比例相對下降。此外，本實驗在第 7 天看到血液中總白血球量反而下降，推測可能是此正值感染之高峰期間，多數白血球聚集至腸道以抵禦外來病原所造成。

正常之發炎反應在致病原被排除後，會走向消退作用(resolution)。一般情況下，血液循環中的 neutrophil 之半衰期約為六到十小時，而當 neutrophil 受到細菌或細胞激素(例如 IL-8 及 TNF α)刺激下，neutrophil 生命週期會延長至一到兩天，使之能有足夠的時間在發炎組織之中進行殺菌作用(100, 101)。若發炎反應無法消退便可能演變成慢性發炎狀態，因免疫細胞過度的活化而造成週邊組織的傷害(102)。過去有許多研究指出 phagocytes (如 neutrophil 及 macrophage) (103, 104)，Cytotoxic T cells, (105, 106)，或促發炎激素(TNF α 及 IFN γ)(107, 108)皆可能導致腸道黏膜構造破壞和屏障功能缺損。所以本實驗進而檢測在感染後第 35 天「後排除期」，小鼠血液中及腸道組織發炎的程度。結果顯示在後排除期與感染前相較，血液和小腸組織中的 neutrophil 數目和骨髓過氧化酵素活性仍然有增加，可見儘管 *Giardia* 已完全排除，小腸腸道仍維持發炎的現象。進而分析促發炎細胞素在腸道組織中表現量，結果發現在後排除期的小腸 TNF α 、MIP-1 α 及 IL-1 β 總量與感染前相比在統計學上明顯增高的現象，而 IFN γ 亦有增加的趨勢，顯示在寄生蟲排除後出現腸道組織發炎細胞素增加的現象，與此階段 neutrophil 數目和活化升高相符。此外，大腸之 TNF α 及 MIP-1 α 亦有增加的趨勢，但可能因為組織存放過久而無法達到統計上之顯著差異。過去文獻指出 macrophage 受刺激時會釋出 TNF α 及 IL-8，促使 neutrophil 藉由固著因子(adhesion molecules)的作用滲透趨化到發炎

的組織當中(12)。此外，IL-1 β 也與 neutrophil 之活化和趨化有關(109)。而 TNF α 亦能使 neutrophil 進入 priming 的狀態，使 neutrophil 在碰到下一次的病原刺激之下能更快速及更大量的產生活性氧化物(101)。而過去研究發現當外來病原體入侵時，血液中的 monocyte 會受到發炎相關的趨化物（例如 MIP-1 α ）驅使而進入到固有層分化成能夠吞噬病原體的 macrophage (11)。MIP-1 α 亦可趨化 neutrophil 進入發炎組織中(110)。過去文獻中也提到當腸道組織受到葛蘭氏陰性菌外壁物質脂多糖或一些細胞激素例如 TNF α 及 IL-1 β 刺激後，會促使腸道上皮細胞或腸道中的白血球釋出 inflammatory CC chemokines（例如 MIP-1 α ），此時也會促使 monocyte 順著結合在固有層細胞間的蛋白聚糖（proteoglycan）之濃度梯度移動，進入發炎之組織中(10)。在本實驗中，於「後排除期」亦可觀察到腸道黏膜內吞細菌數，與感染前相比，仍然呈現升高的情形。因此推測「後排除期」之腸組織發炎反應的延續，可能是因為腸道細菌持續增生和入侵黏膜細胞所引發的。

若將感染前(第 0 天)，感染期(第 7 天)，和後排除期(第 35 天)比較，在感染期有血液中 IL-1 β 濃度的上升，卻沒有看到腸組織 TNF α 、MIP-1 α 及 IL-1 β 的改變；而後排除期，血液中 IL-1 β 濃度仍然較感染前來得高，且腸組織的 TNF α 、MIP-1 α 及 IL-1 β 總量與感染前及感染期相比皆有增高的現象。我們想探討為何「後排除期」腸組織 TNF α 、MIP-1 α 及 IL-1 β 量會比感染期高。一般而言，宿主在 *G. lamblia* 或 *G. muris* 感染後的發炎反應會根據寄生蟲品系及宿主免疫系統而有所不同，有些會完全無發炎情形，也有些則呈現嚴重發炎狀態，或許可解釋臨床上的表現從無症狀到嚴重症狀都有。有些文獻指出 *G. lamblia* 感染最高峰時，宿主體內有 IL-6 上升及 T 細胞和 mast cells 活化；其中 IL-6 上升及 T 細胞活化與感染高峰時控制寄生蟲數量有關，而 IL-6 及 mast cells 之活化和 IgA 和寄生蟲的排除有關 (56, 76, 78)。另有文獻記載 *Giardia* 感染期並無腸道發炎情形，過去對一群受 *Giardia* 感染的人研究顯示，由這些病人的小腸切片分析 lymphocyte 及顆粒球（granulocytes）之表現，發現其中僅有約 4 % 的人出現小腸發炎的現象(73)。也有文獻記載 *G. muris*

感染之 B10 及 Balb/c 品系小鼠小腸切片並沒有發炎反應相關細胞（例如 lymphocyte）增多的情形，且腸道組織的 IL-6 量反而呈現明顯降低的情形(59, 71)。由此說明了 *Giardia* 感染並不一定會引起嚴重發炎情形，甚至有學者提出 *Giardia* 感染時可能具有抵抗及抑制宿主發炎反應的機制以確保寄生蟲本身的存活。舉例來說，*G. lamblia* 會藉由消耗 arginine 以競爭減少具有殺菌作用之 NO 的產生(70, 81)。過去研究也發現，*Giardia* 的 trophozoites 表面會表現出不同種類的蛋白質（variant-specific surface proteins），此種抗原變異（antigenic variation）的現象使得宿主原已啟動之免疫反應難以辨識新抗原而無法有效的對抗 *Giardia* (52, 80)。此外，有研究發現樹突細胞（dendritic cells）在 *G. lamblia* 的刺激之下反而會抑制 IL-12 的產生(111)。因此推測 *Giardia* trophozoites 存在時有一定的免疫抑制或干擾效果，以避免過強之宿主發炎反應危害到寄生蟲的生存，然而寄生蟲排除後，抑制宿主免疫反應即結束。實驗發現 *G. lamblia* 正值感染時會誘發血液中 IL-1 β 但不使腸組織 IL-1 β 和 TNF α 上升，推論可能是腸組織為 *G. lamblia* 寄生之所在，因此感染期時會產生抑制腸道發炎之作用而使腸組織 IL-1 β 或 TNF α 無法大量表現。IL-1 β 的功能與 TNF α 相仿，會促進固著因子上升，促進 neutrophil 活化和趨化，但不同的是 IL-1 β 不會在高量時引發組織傷害及細胞凋亡(112)。而 *G. lamblia* 排除後可能免疫抑制效果消失，因此導致特定促發炎細胞素(如 IL-1 β 、TNF α 及 MIP-1 α)在「後排除期」因應細菌入侵而上升。此外，本實驗結果中亦發現腸組織中 IFN γ 之表現在後排除期與感染期比起感染前有維持上升之趨勢，但無統計上意義。未來可測試抑制性細胞素(suppressive cytokine)如 TGF β 及 IL-10 在腸組織的表現。整體來說，寄生蟲感染當時引發腸腔細菌增生及入侵黏膜的現象，並導致腸管嗜中性球活化和血液 IL-1 β 濃度上升。在致病原排除後(即寄生蟲不存在時)，腸腔細菌卻持續入侵黏膜，且仍伴隨嗜中性球趨化和活化增多，再加上腸道組織中 TNF α 、MIP-1 α 及 IL-1 β 顯著增高的現象。而嗜中性球活化及促發炎細胞素的上升可能造成更多週邊組織的傷害，進而引發黏膜屏障損害的惡性循環。

這些 *Giardia* 「後排除期」的發炎反應與 IBS 病人研究結果相似。過去對 IBS 病人的研究指出，雖然透過內視鏡等檢查並無發現任何腸道之病變或明顯構造及組織的損害(33, 34)，然而最新研究發現血液中白血球 TNF α 之基因表現量，及血液中的 IL-6、IL-1 β 及 TNF α 濃度都較正常人為高(40)。更進一步利用 IBS 病人大腸組織切片也看到 TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 之表現則會較正常人高(43)。更有文獻指出 IBS 病人腸道的發炎性免疫細胞也有增多，直腸黏膜層的 neutrophil 活性上升(113)，腸道上皮細胞內的淋巴球、固有層中的 T 細胞以及巨噬細胞增多(44)，小腸中的 mast cell 數目增加(35)。而本實驗結果中，受 *G. lamblia* 感染之小鼠於「後排除期」，小腸組織形態完整但 neutrophil 數目及活性提高，而 TNF- α 、MIP-1 α 及 IL-1 β 表現亦呈現升高的情形，與前述 IBS 的發現頗為相似。此外，過去許多研究顯示，在 IBS 病人之小腸液中有發現細菌增生的情形(49)，且大腸菌叢組成會有所改變(114)，這些發現和 *G. lamblia* 「後排除期」之腸道總菌量增加相符。文獻中有記載腸道菌叢生態亦與防止外來病菌入侵有相關性(24)，因此未來應測試 IBS 病人之大腸黏膜層內吞細菌，及此指標之改變是否與發炎狀態有關聯。本實驗中看到 *Giardia* 「後排除期」之腸道病理現象與 PI-IBS 相似，因此這些結果說明了「後排除期」之小鼠或許可作為日後研究 PI-IBS 致病機轉之實驗動物模式。

為了探討腸道屏障喪失之致病機轉，本實驗進一步檢測相關因子如 iNOS 之參與。過去研究指出，在發炎反應下 iNOS 的表現量會增加(55)。此外，黏膜層 iNOS 和 NO 的大量表現也會造成腸道屏障功能之缺損(115)。因此本實驗接著檢測 *Giardia* 「感染期」和「後排除期」之腸道組織 iNOS 表現量。免疫螢光染色的結果發現，無論是正值感染之第 7 天或感染後之第 35 天，小腸上皮細胞皆有看到 iNOS 之表現增加。過去在細胞的實驗中發現，NO 會抑制 *G. lamblia* trophozoites 的生長，且對於 trophozoites 有毒害的作用，會使 trophozoites 數量減少(69)，因此推論小腸腸道上皮細胞在受到 trophozoites 的刺激下會表現大量的 iNOS 以對抗 trophozoites，且腸道上皮細胞正好是 trophozoites 貼附之處(54)，因此本實驗中看

到 iNOS 主要是表現在上皮細胞的部位而不是在腸道中之免疫細胞。而本實驗看到感染第 7 天時小腸腸道細菌有增生的情形。過去研究發現當上皮細胞或其他細胞受到病原體入侵，細菌內毒素或酵母多醣 (zymosan) 刺激之下會誘發產生 iNOS 和 NO(69)。因此本實驗中所看到的 iNOS 表現量增加也有可能是因為細菌增生而促發，並不單獨由 trophozoites 刺激所造成。值得一提的是 iNOS 上升會造成腸道屏障功能失常，過去文獻顯示 NO 會促使細菌經由細胞間或細胞內途徑通過上皮層 (116)。在細胞培養的實驗中發現，腸道上皮細胞株細胞受有氣態 NO、NO donor 的刺激下會出現屏障的缺損，包含了跨上皮細胞電阻 (transepithelial resistance, TER) 下降以及對探針通透性 (probe permeability) 上升的現象 (38, 44)。由人類腸道上皮細胞 Caco-2 中的研究顯示，過量 NO 可經由緊密連結 ZO-1 及 occludin 之破壞，而使跨上皮細胞電阻下降以及探針通透性上升 (115)。而利用 Caco-2 細胞株研究發現，給予細胞大腸桿菌及 NO donor 的作用下，會有細菌進入到細胞中，此外也發現細菌會穿越細胞層至下層培養液中 (117)。過去研究發現許多腸道疾病，如腸道缺血再灌流 (intestinal ischemia/ reperfusion) (118)、腸阻塞 (bowel obstruction) (119)、出血性休克 (hemorrhagic shock) (120, 121)、及內毒素血症 (endotoxemia) (30) 的動物模式中的細菌移位現象皆與黏膜 iNOS 表現量上升有關，然而若預先注射 iNOS 之抑制劑 (L-NAME, L-Nil etc.) 則可避免腸道屏障的喪失 (30, 122)。此外，最近本實驗室利用腸阻塞大鼠之研究亦發現，iNOS 經由非細胞凋亡依賴性的途徑促使細菌進入腸道上皮細胞中，使細菌經由細胞內之路徑穿越而進入固有組織 (116)。而本實驗結果中也有看到正值感染之第 7 天時 tight junction 受到破壞，因此可以解釋本實驗中於感染期，內吞至黏膜層細胞細菌數量增多的結果可能導因於 iNOS 造成之腸道屏障喪失而使細菌容易入侵。

此外，在「後排除期」即感染第 35 天時，雖然寄生蟲已不存在，卻仍然可以看到 iNOS 在腸道上皮細胞的表現增加的情形。過去以人類腸道上皮細胞株研究發現，細胞在 IL-1 β 、TNF α 以及 IFN γ 的刺激之下，iNOS mRNA 表現量會增加 (123)。

另外，大鼠腸道上皮細胞株 IEC-6 受 LPS、或 TNF α 、IL-1 β 以及 IFN γ 組成的 cytokine combination 之刺激下，會產生大量的 NO (124)。因此推測「後排除期」的腸道 iNOS 表現增加的原因一方面可能是因為腸道細菌貼附增加和黏膜內吞細菌量上升；另一方面可能是因為小腸組織中之 IL-1 β 、TNF α 以及 IFN γ 表現量增強的緣故。由此可以解釋本實驗中於後排除期時，內吞至黏膜層細胞細菌數量增多可能導因於 iNOS 促使內吞至腸道上皮細胞之細菌增多而導致之細菌入侵。但反過來說，細菌入侵亦為導致 iNOS 增高的原因。因此推測 *Giardia* 「感染期」和「後排除期」中觀察到上皮細胞 iNOS 的表現量增加可能造成腸道屏障失能的惡性循環。

腸道上皮細胞之凋亡亦可能導致屏障功能失常和細菌移位現象(107)。過去利用人類上皮細胞株研究發現，*G. lamblia* 品系中的 NF 及 S₂，會造成細胞之凋亡，然而 WB 及 PB 卻不會，可見並非所有 *G. lamblia* 品系皆會引發上皮細胞凋亡(95)。本實驗進一步檢測 *G. lamblia* 「感染期」和「後排除期」是否會出現腸道上皮細胞之凋亡的情形。實驗結果發現，*G. lamblia* 感染第 7 天沒有看到上皮細胞之凋亡，但有看到 iNOS 表現增加與 tight junction occludin 被破壞的情形，因此在感染期 iNOS 造成腸道通透性上升的機制可能與細胞凋亡無關，而和 MLC 磷酸化引發 tight junction 的打開有相關性(94)。然而在感染後第 35 天時，即使此時腸道中已經完全沒有 trophozoites，但有上皮細胞 iNOS 量增加的情形，且在部份小鼠的組織切片中確實有看到小腸腸道上皮細胞凋亡的現象，雖然量化之結果並沒有顯著差異。而量化之結果沒有顯著差異的原因，可能是因為數值間變異太大，並不是每隻老鼠都會出現上皮細胞凋亡，且凋亡的細胞數也有很大的差異。過去利用人類乳房細胞株及犬科腎臟上皮細胞株研究發現，凋亡之上皮細胞株其 occludin 和 ZO-1 也會隨之破壞(125)。而本實驗中 *G. lamblia* 感染第 35 天時雖有看到部份上皮細胞之凋亡，卻沒有看到 occludin 片斷化程度顯著地的增加，可能是因為感染第 35 天時造成上皮細胞凋亡之現象並不是每個個體皆會發生，因此分析片斷化 occludin 表現量時並無發現明顯改變；目前尚不知其它 tight junction 蛋白如 ZO-1, claudins 是

否有被破壞。整體而言，這些「後排除期」的腸道屏障缺失的機制 (如 $\text{TNF } \alpha$ 表現增高，iNOS 上升)都可能是 PI-IBS 之細菌入侵和腸道發炎反應的原因之一，亦可供未來發展 PI-IBS 治療方法的標的。未來研究方向為探討「後排除期」腸道巨大細胞活化和神經末端增生及痛覺增加的可能性。

由本論文之研究結果得到的結論為：1) 小鼠的 *G. lamblia* 感染排除後，其腸道黏膜有持續發炎反應伴隨著腸道屏障喪失，腸腔細菌增生及進入黏膜細胞情形，與 PI-IBS 的病人的腸道病理現象類似。 2) *G. lamblia* 感染「後排除期」之小鼠或許可作為日後研究 PI-IBS 致病機轉之實驗動物模式。



表 1、*G. lamblia* 感染對於腸道之內吞細菌量、總細菌量及表層細菌量之影響

		day 7			day 35		
		PBS	<i>G. lamblia</i>	P value	PBS	<i>G. lamblia</i>	P value
endocytosed bacteria (CFU/g)	jejunum	0.0	164.2*	P=0.002	0.3	118.4*	P=0.001
	colon	1.3	253.4*	P=0.002	0.0	98.1*	P=0.002
total bacteria (CFU/g)	jejunum	2.0 X 10 ⁵	2.1 X 10 ⁶ *	P=0.04	3.4 X 10 ⁶	1.4 X 10 ⁶	P=1
	colon	1.4 X 10 ⁵	5.4 X 10 ⁵ *	P=0.04	4.7 X 10 ⁵	3.2 X 10 ⁵	P=0.9
superficial bacteria (CFU/g)	jejunum	1.1 X 10 ⁵	3.6 X 10 ⁵ *	P=0.009	3.2 X 10 ⁴	3.2 X 10 ⁵ *	P=0.04
	colon	7.2 X 10 ⁴	3.6 X 10 ⁵ *	P=0.04	6.0 X 10 ⁴	1.8 X 10 ⁵	P=0.08

無論是大腸或小腸，在感染第 7 天「感染期」及第 35 天「後排除期」之腸道黏膜內吞細菌量相較個別 PBS 組皆有明顯的增加。而腸道總細菌量則是在感染第 7 天「感染期」時相較 PBS 組有顯著的增加，但第 35 天則是都沒有顯著差異。腸道之表層細菌量在感染第 7 天時，大腸及小腸相較個別 PBS 組皆有明顯增加，在第 35 天時，小腸之表層細菌量相較於 PBS 組亦有明顯增加，大腸雖有增加趨勢但無統計上之差異。* 代表 $P < 0.05$ ，相較於個別 PBS 組具有統計上之差異。

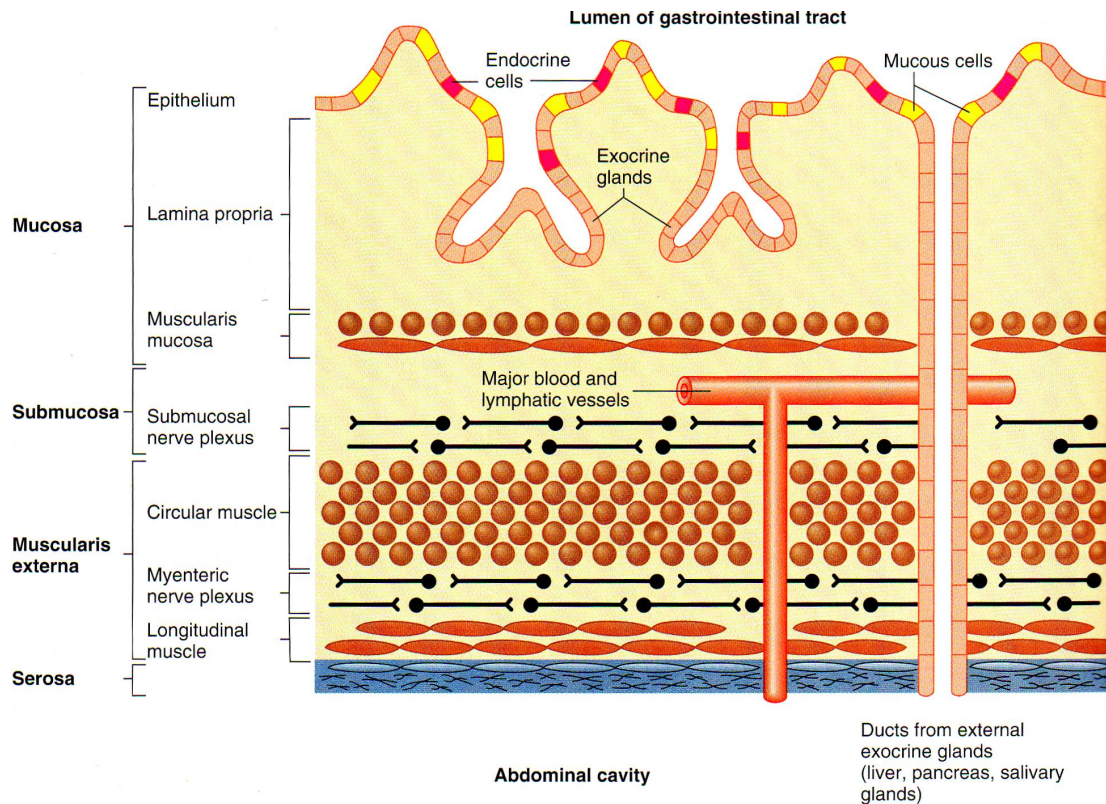


圖 1、腸道管壁結構之縱向剖面圖

腸道之管壁結構由黏膜側至漿膜側大致依序為黏膜層 (mucosa) (包含上皮細胞層【epithelium】、固有層【lamina propria】及黏膜肌【muscularis mucosa】)、黏膜下層 (submucosa)、兩層平滑肌及漿液面。除此之外，腸腔中亦有很多共生細菌的生存(126)。

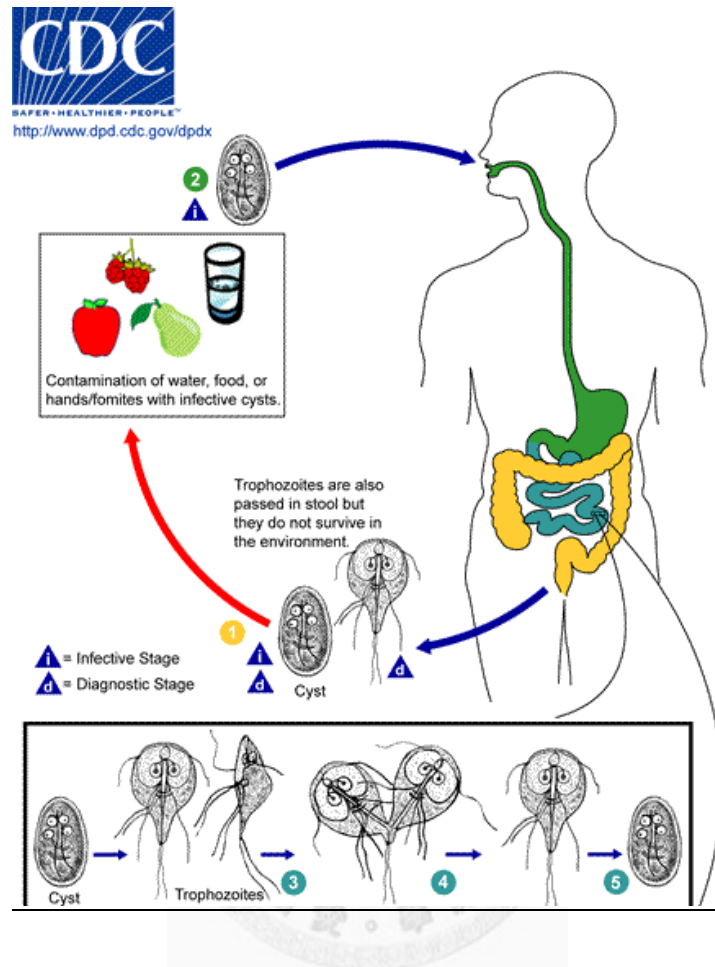


圖 2、*G. lamblia* 的生活史

含有 *Giardia* cysts 的食物或水被宿主吃下以後，cyst 在胃內受胃酸等消化液刺激便會在在小腸中（尤其是小腸前端）進行脫囊化（excystation）而釋出滋養體（trophozoite）。Trophozoite 主要寄生於近端小腸(十二指腸和空腸)中，以腹板（ventral disk）的吸盤固定在腸道上皮細胞刷狀緣上並以無性生殖之方式大量增生。當 trophozoite 由小腸進入結腸後，便會開始進行囊體化（encystation），再度形成 cysts 隨糞便排出體外(127)。

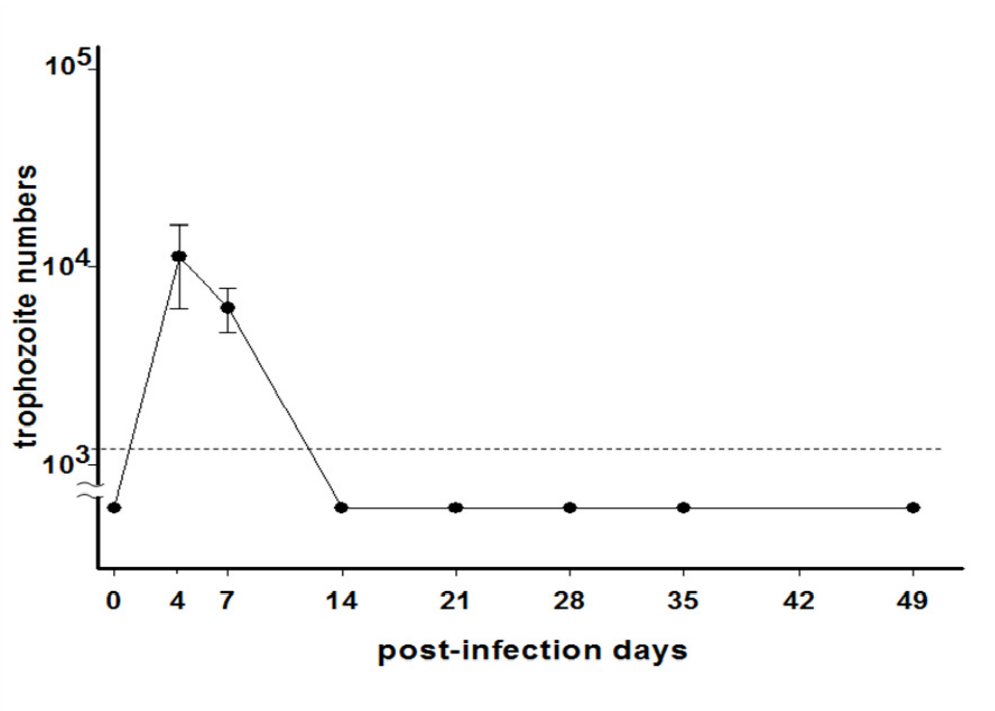
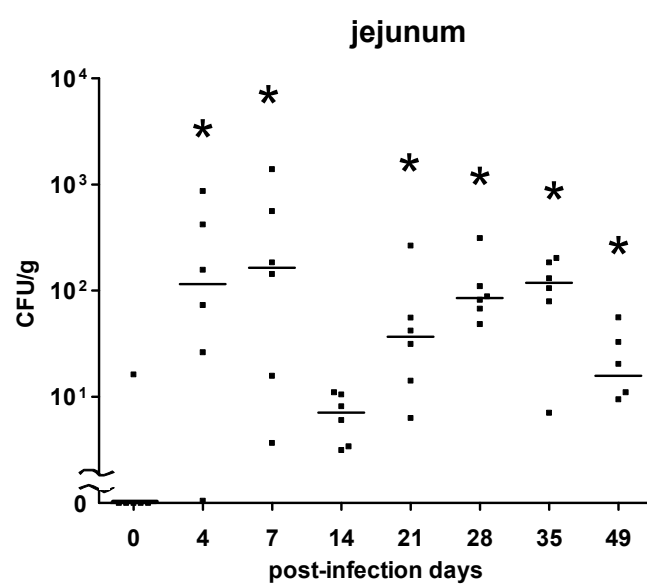


圖 3、 *G. lamblia* 之感染曲線

感染後第 4-7 天為感染之最高峰視為「感染期」(infection phase)而第 21-49 天 *G. lamblia* 已完全排除則視為「後排除期」(post-clearance phase)。N=6/group。

(A)



(B)

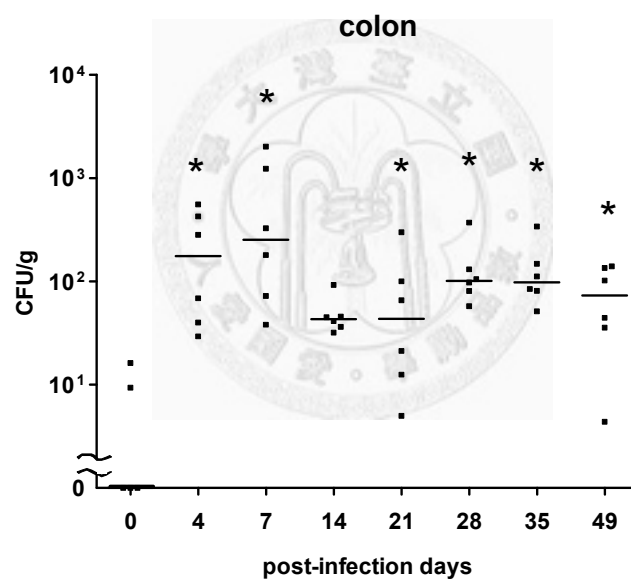
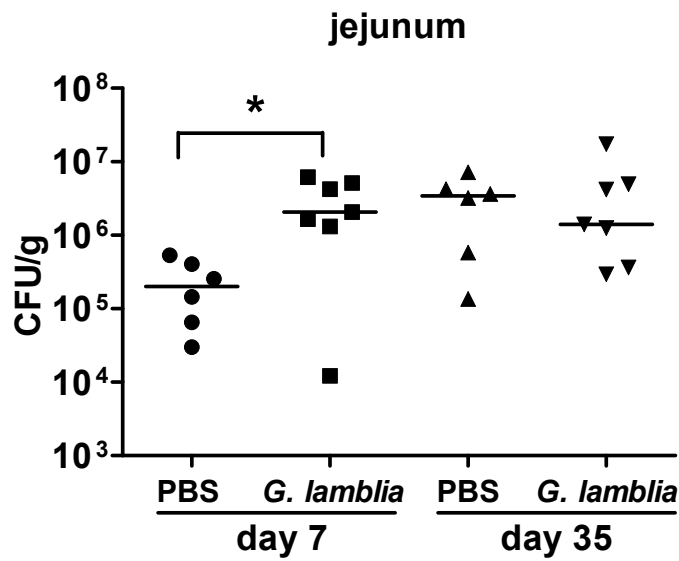


圖 4、腸道黏膜細胞之內吞細菌量

無論是在小腸 (A) 或是大腸 (B)，在第 4 及 7 天的感染高峰時期，可誘發細菌進入小腸及大腸腸道黏膜細胞內。而在感染後第 21、28、35、49 天即腸道內寄生蟲排除之後，腸道黏膜細胞之內吞細菌數又開始上升。圖中橫線代表中位數。

* $P < 0.05$ ，相較於第 0 天。N=6~7/group。

(A)



(B)

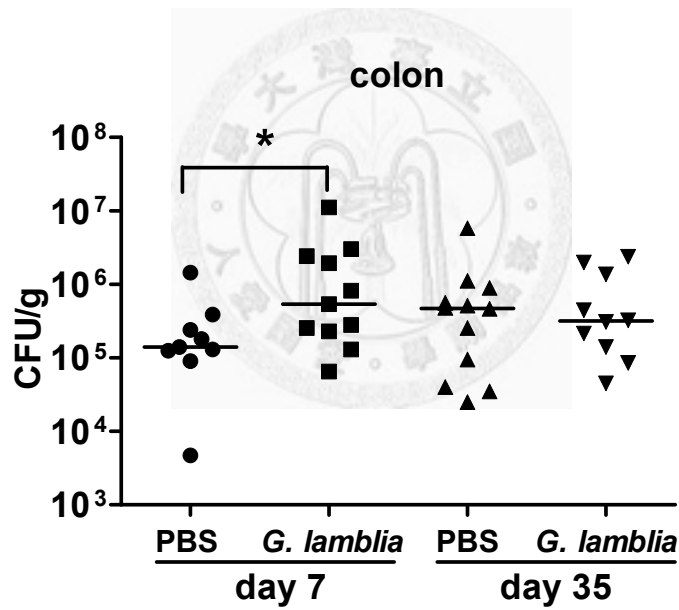
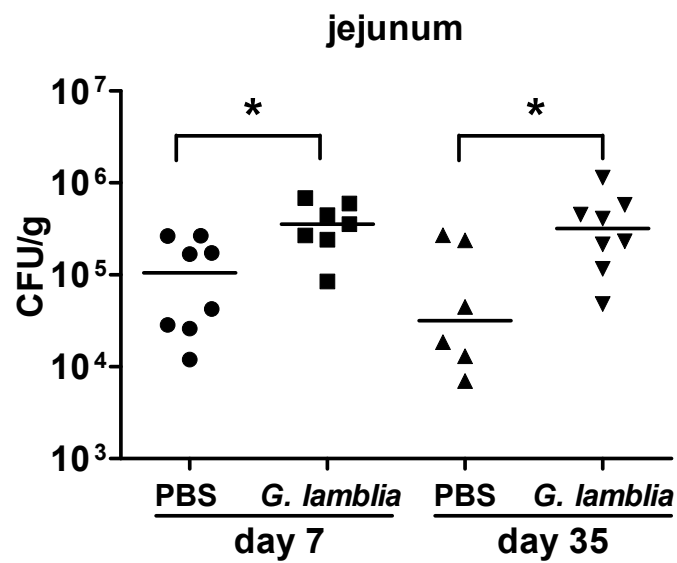


圖 5、腸道總細菌量

在感染後第 7 天「感染期」時，無論是小腸 (A) 或大腸 (B)，腸段總細菌量相較於 PBS 組皆有明顯增加。而在第 35 天「後排除期」時，則無明顯之差異。圖中橫線代表中位數。* $P < 0.05$ ，相較於個別 PBS 組。N=6~7/group in (A)；N=9~12/group in (B)。

(A)



(B)

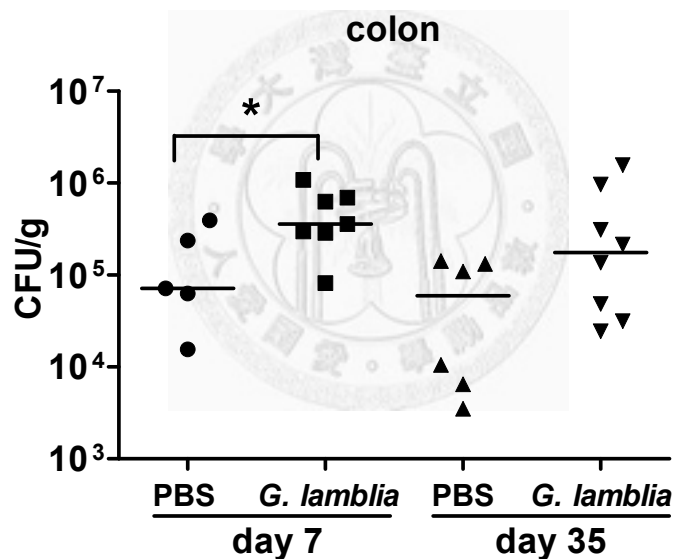


圖 6、腸道上皮表層細菌量

(A) 在小腸中，無論是第 7 天「感染期」或第 35 天「後排除期」，*G. lamblia* 組腸道上皮表層細菌量相較於 PBS 組有明顯之增加。(B) 大腸在感染期時也有明顯之增加，但後排除期則有增加之趨勢。圖中橫線代表中位數。* $P < 0.05$ ，相較於個別 PBS 組。N=5~8/group。

[illegible]

Bar chart showing cleaved occludin (% vs. PBS) for PBS and *G. lamblia* groups at day 7 and day 35. The y-axis represents cleaved occludin (% vs. PBS) from 0 to 400. The x-axis shows time points: day 7 and day 35. The legend indicates PBS (white bar) and *G. lamblia* (checkered bar). Error bars represent standard deviation. An asterisk (*) indicates a significant difference between the PBS and *G. lamblia* groups at day 7.

Time Point	PBS (%)	<i>G. lamblia</i> (%)
day 7	~100	~285*
day 35	~100	~110

(A) 利用西方轉漬法分析小腸黏膜層組織中 occludin 之蛋白表現量結果顯示，感染第 7 天「感染期」時，*G. lamblia* 組相較於 PBS 組，occludin 之破壞片段蛋白表現量較多，而第 35 天「後排除期」則是沒有差異，(B) 量化結果也符合此現象。* $P < 0.05$ ，相較於個別 PBS 組。N=4/group。

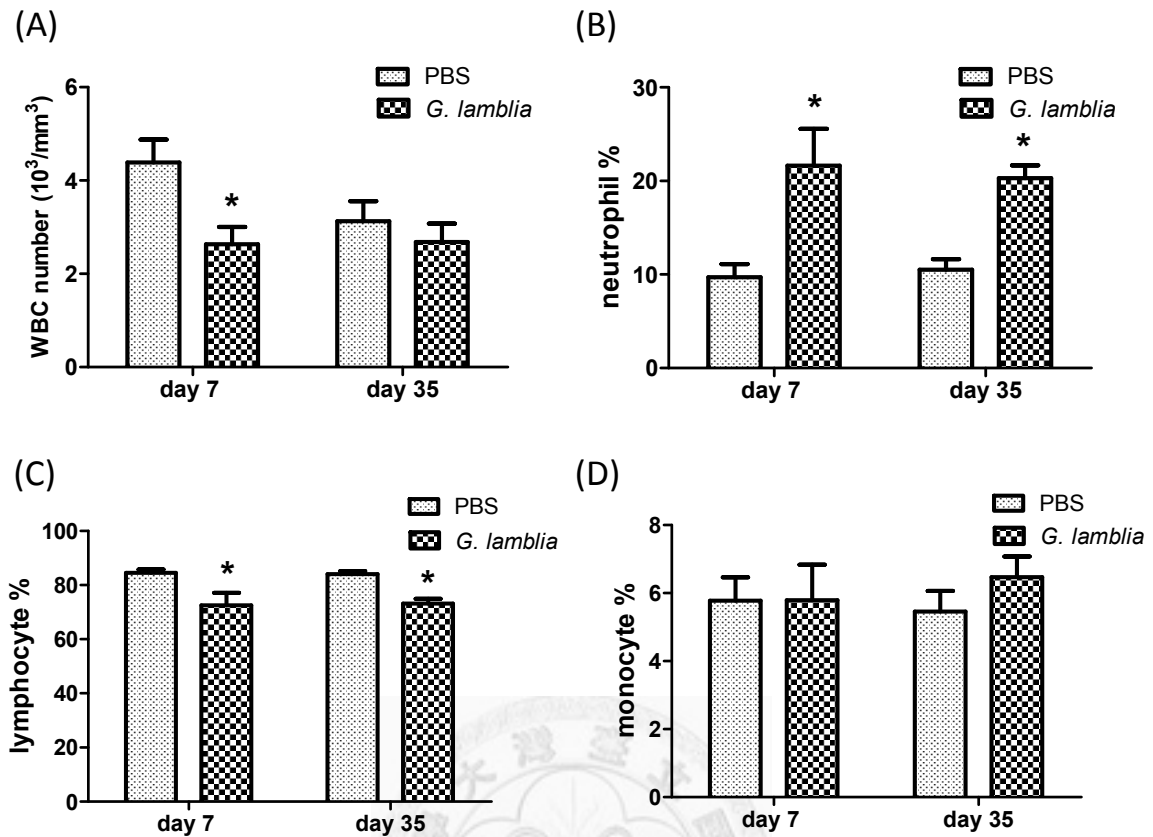
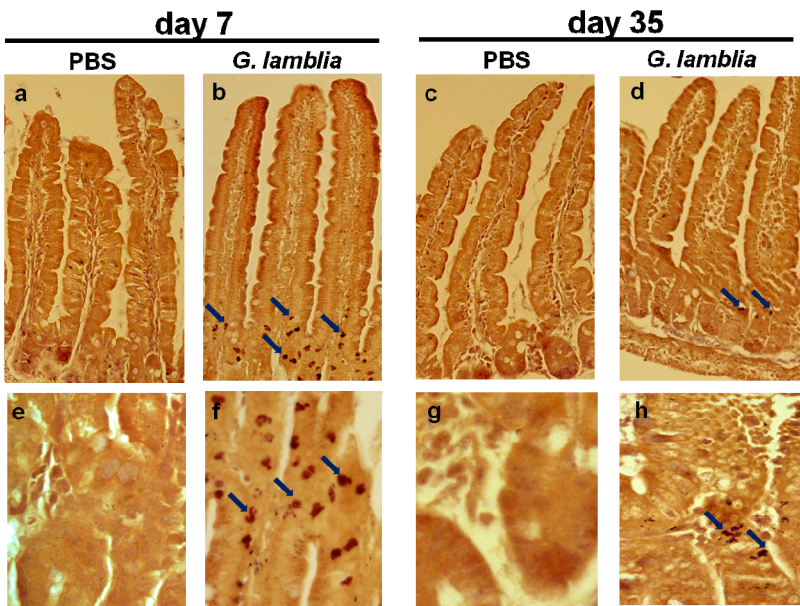


圖 8、白血球總數、嗜中性白血球、淋巴球及單核白血球百分比

(A) 感染第 7 天「感染期」時，*G. lamblia* 組相較於 PBS 組，白血球總數有顯著減少。(B) 嗜中性白血球所佔之百分比，無論是第 7 天「感染期」或第 35 天「後排除期」相較於個別 PBS 組，感染組皆有明顯之增加。(C) 淋巴球之百分比在第 7 天「感染期」及第 35 天「後排除期」時，*G. lamblia* 組相較於 PBS 組也有明顯之減少。(D) 而單核球之百分比則無明顯改變。* $P < 0.05$ ，相較於個別 PBS 組。第 7 天， $N=6\sim9/\text{group}$ ；第 35 天， $N=11\sim12/\text{group}$ 。

(A)



(B)

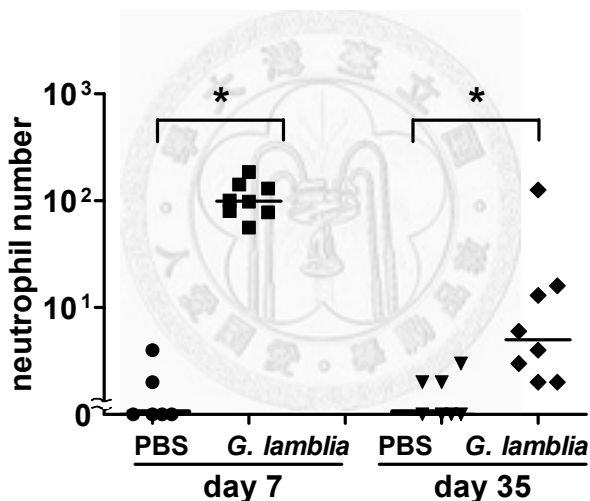


圖 9、腸道組織中嗜中性白血球染色

(A) 感染後第 7 天「感染期」時，PBS 組 (a,e) 沒有看到嗜中性白血球進入到腸組織中，但於 *G. lamblia* 感染組 (b,f) 則可以看到大量嗜中性白血球進入腸組織絨毛基部及腺窩的部位 (藍色箭頭)。感染後第 35 天「後排除期」，*G. lamblia* 感染組(d,h)相較於 PBS 組 (c,g) 仍有較多之嗜中性白血球進入腸組織。(a,b,c,d) 放大倍率為 200X；(e,f,g,h) 放大倍率為 400X。(B) 由量化之結果顯示出 *G. lamblia* 感染後之第 7 天「感染期」及第 35 天「後排除期」，進入到腸組織中的嗜中性白血球相較於個別 PBS 組皆有明顯的增加。N=6~8/group。

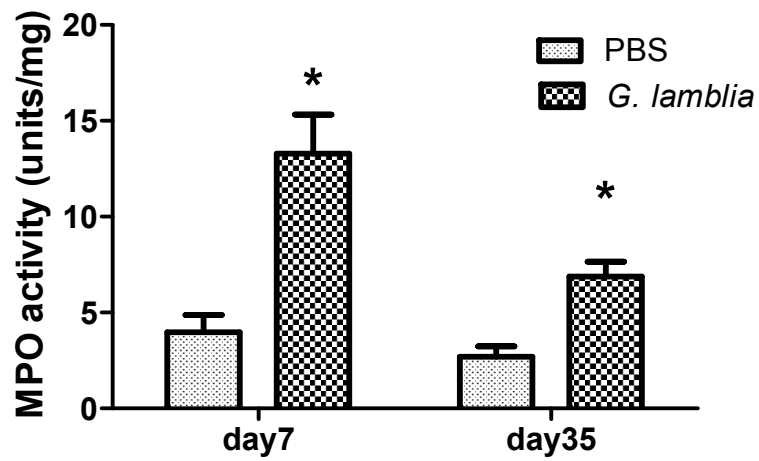


圖 10、腸組織之嗜中性白血球數量與骨髓過氧化酶活性測定

感染後之第 7 天「感染期」及第 35 天「後排除期」能刺激及誘發小腸之 MPO 酵素活性相較於個別 PBS 組顯著性的增加。圖中以平均值及標準誤表示。

* $P < 0.05$ ，相較於個別 PBS 組。N=6~8/group。

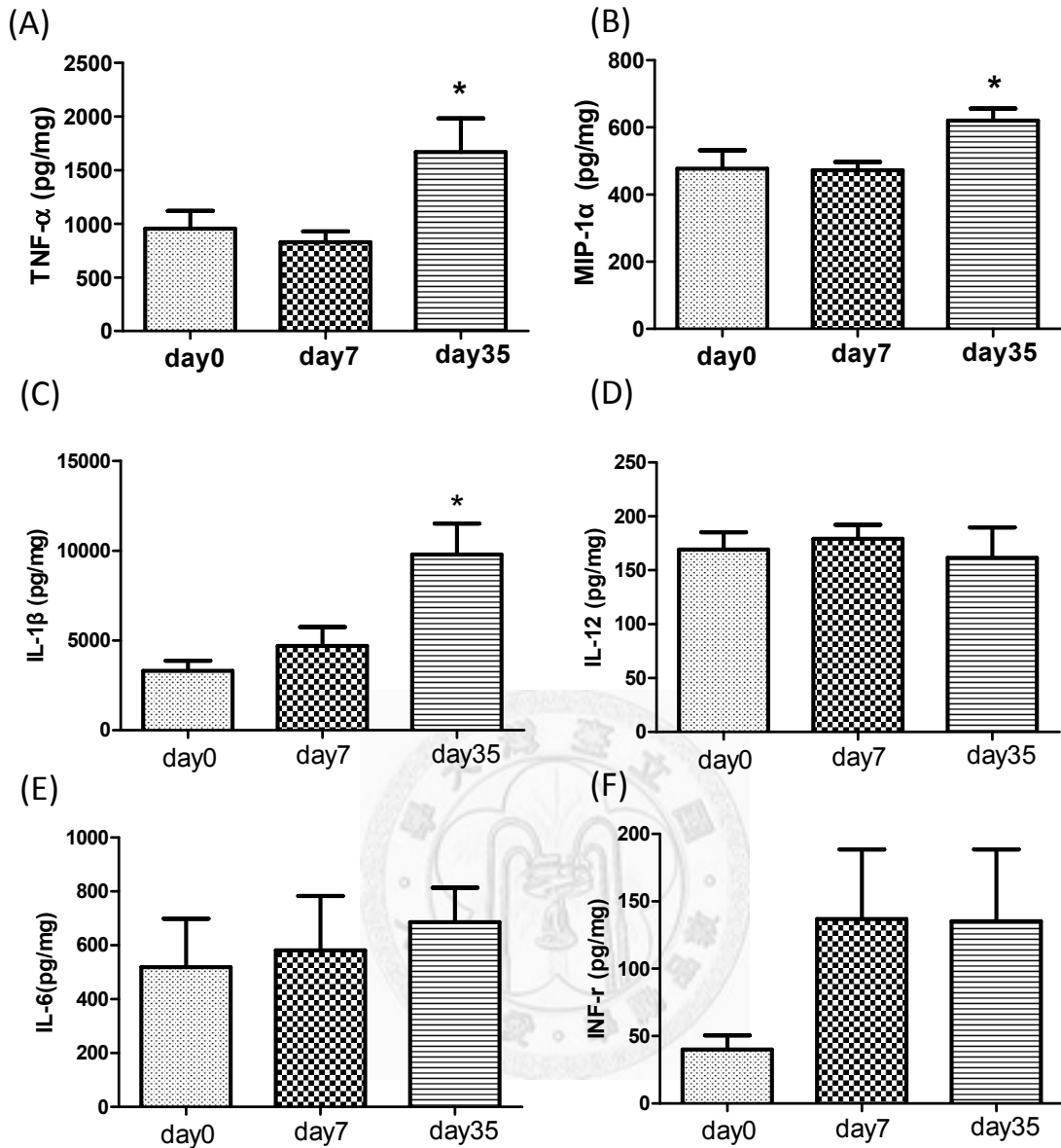
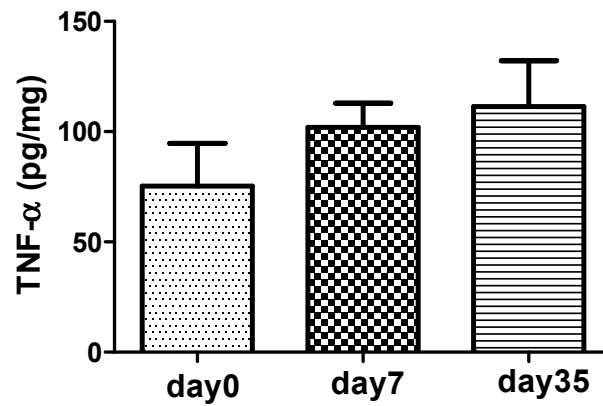


圖 11、小腸組織細胞激素活性測定

偵測小腸組織中 $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{MIP-1}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-12 、 IL-6 及 $\text{INF}\gamma$ 表現量。

(A) 第 35 天「後排除期」時，小腸中 $\text{TNF}\alpha$ 表現量與第 0 天相比有顯著性的升高。(B) $\text{MIP-1}\alpha$ 之表現量在第 35 天「後排除期」時相較於第 0 天亦有顯著升高。(C) $\text{IL-1}\beta$ 在第 35 天「後排除期」表現量相較於第 0 天有顯著升高。(D) IL-12 之表現量沒有顯著差異。(E) IL-6 之表現量亦沒有顯著差異。(F) $\text{INF}\gamma$ 在第 7 天「感染期」及第 35 天「後排除期」表現量相較於第 0 天雖有上升之趨勢但則皆未達統計上之差異。* $P < 0.05$ ，相較於第 0 天。 $N = 5 \sim 6/\text{group}$ 。

(A)



(B)

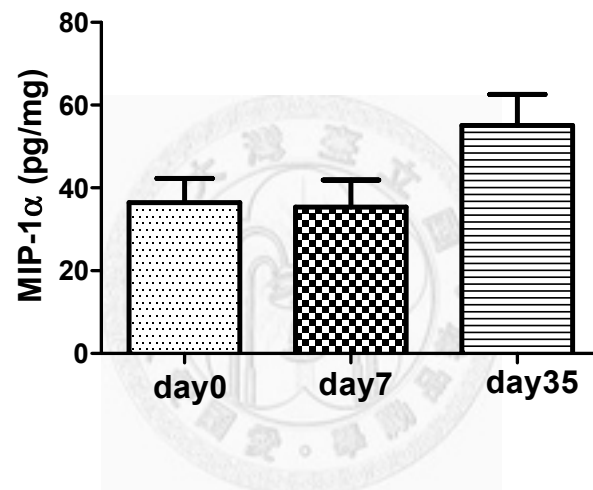


圖 12、大腸組織細胞激素活性測定

偵測大腸組織中 TNF α 及 MIP-1 α 表現量。(A) 在第 35 天「後排除期」時，大腸中 TNF α 表現量與第 0 天相比有升高的趨勢。(B) MIP-1 α 之表現量在第 35 天「後排除期」時相較於第 0 天亦有升高之趨勢。但可能因組織存放於-80℃中長達半年之久，因此蛋白表現量過低而使統計上並無法達到顯著之差異。

N=6~7/group。

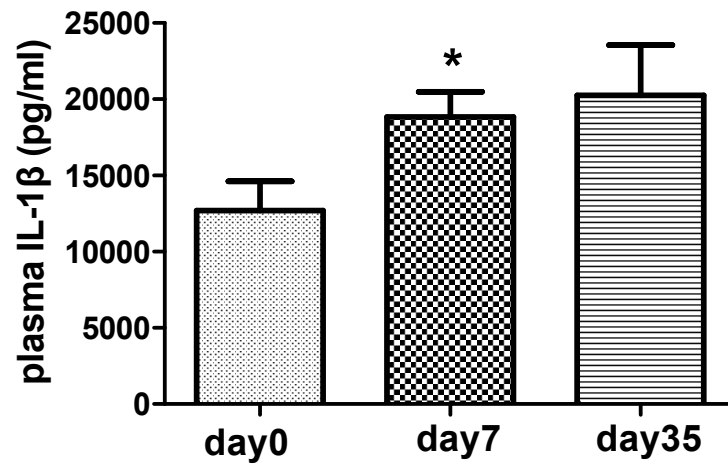


圖 13、小鼠血清中 IL-1 β 之表現量測試

感染第 7 天「感染期」時，血清中 IL-1 β 之表現量相較於第 0 天有明顯的增加，而第 35 天「後排除期」時，相較於第 0 天有增加之趨勢。* $P < 0.05$ ，相較於第 0 天。N=6~7/group。



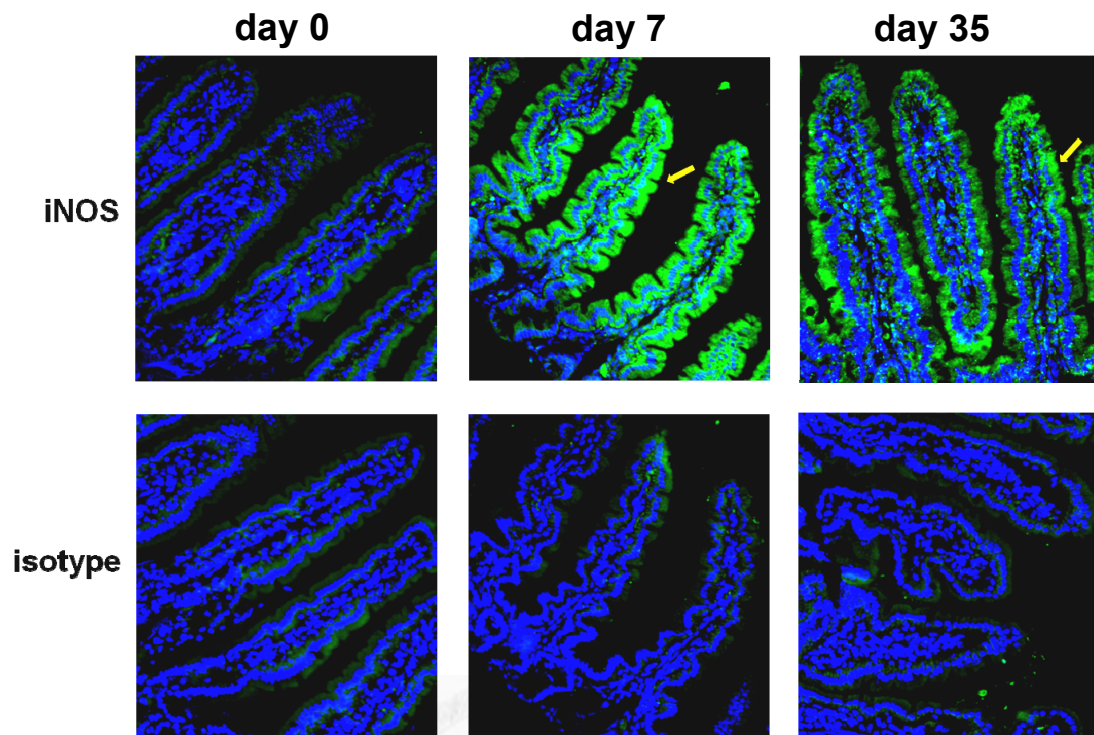


圖 14、腸道中 iNOS 之表現。

在 *G. lamblia* 感染第 7 天「感染期」，可在小腸絨毛切片之上皮細胞表層偵測到大量且螢光強度強大之 iNOS 表現（即黃色箭頭所指發較強綠色螢光處）。在感染之第 35 天「後排除期」的小腸上皮細胞中，相較於第 0 天同樣也可偵測到較多 iNOS 之螢光表現。Isotype 抗體則皆沒有染色。放大倍率為 200X。N=3/group。

圖 15、*G. lamblia* 感染對於小腸絨毛型態及腸道上皮細胞凋亡之影響

(A) *G. lamblia* 感染後第 7 天「感染期」及第 35 天「後排除期」，小腸絨毛外觀構造無受到影響，絨毛結構正常。放大倍率為 200X。(B) 在感染第 0 天中，小腸腸道上皮細胞並無凋亡之現象，*G. lamblia* 感染第 7 天「感染期」之小鼠小腸腸道上皮細胞也無觀察到細胞有凋亡之現象。然而在 *G. lamblia* 感染刺激第 35 天「後排除期」，則觀察到大量凋亡之腸道上皮細胞在絨毛頂端區域（紅色箭頭）。放大倍率為 400X。(C) 於每隻小鼠腸道組織中分析約 6-10 根結構完整之絨毛，有表現出上皮細胞凋亡現象之絨毛數目所佔之百分比。第 35 天「後排除期」時百分比有增加之趨勢。圖中橫線代表中位數。N=4~5/group。



六、 參考文獻

1. Fontaine N, Meslin JC, Lory S and Andrieux C. Intestinal mucin distribution in the germ-free rat and in the heteroxenic rat harbouring a human bacterial flora: effect of inulin in the diet. *Br J Nutr* 1996; **75**: 881-892.
2. Robertson AM and Wright DP. Bacterial glycosulphatases and sulphomucin degradation. *Can J Gastroenterol* 1997; **11**: 361-366.
3. Farquhar MG and Palade GE. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 1963; **17**: 375-412.
4. Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL, Jones SL and Odle J. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev* 2007; **87**: 545-564.
5. Hollander D. The intestinal permeability barrier. A hypothesis as to its regulation and involvement in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1992; **27**: 721-726.
6. Heyman M, Crain-Denoyelle AM and Desjeux JF. Endocytosis and processing of protein by isolated villus and crypt cells of the mouse small intestine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1989; **9**: 238-245.
7. Diamond G, Beckloff N, Weinberg A and Kisich KO. The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr Pharm Des* 2009; **15**: 2377-2392.
8. Ouellette AJ, Hsieh MM, Nosek MT *et al*. Mouse Paneth cell defensins: primary structures and antibacterial activities of numerous cryptdin isoforms. *Infect*

Immun 1994; **62**: 5040-5047.

9. Lehrer RI, Lichtenstein AK and Ganz T. Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol* 1993; **11**: 105-128.
10. Smith PD, Ochsenbauer-Jambor C and Smythies LE. Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunol Rev* 2005; **206**: 149-159.
11. Smythies LE, Sellers M, Clements RH *et al.* Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 2005; **115**: 66-75.
12. Baumgart DC and Dignass AU. Intestinal barrier function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; **5**: 685-694.
13. Nash S, Stafford J and Madara JL. Effects of polymorphonuclear leukocyte transmigration on the barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 1987; **80**: 1104-1113.
14. Babior BM, Lambeth JD and Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase. *Arch Biochem Biophys* 2002; **397**: 342-344.
15. McConnico RS, Weinstock D, Poston ME and Roberts MC. Myeloperoxidase activity of the large intestine in an equine model of acute colitis. *Am J Vet Res*

1999; **60**: 807-813.

16. Krawisz JE, Sharon P and Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 1984; **87**: 1344-1350.
17. Marcinkiewicz J. Neutrophil chloramines: missing links between innate and acquired immunity. *Immunol Today* 1997; **18**: 577-580.
18. Stahl PD. The mannose receptor and other macrophage lectins. *Curr Opin Immunol* 1992; **4**: 49-52.
19. Chertov O, Yang D, Howard OM and Oppenheim JJ. Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol Rev* 2000; **177**: 68-78.
20. Elsbach P. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense. *J Leukoc Biol* 1998; **64**: 14-18.
21. Burg ND and Pillinger MH. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin Immunol* 2001; **99**: 7-17.
22. Iimura M, Gallo RL, Hase K, Miyamoto Y, Eckmann L and Kagnoff MF. Cathelicidin mediates innate intestinal defense against colonization with epithelial adherent bacterial pathogens. *J Immunol* 2005; **174**: 4901-4907.

23. Mestecky J, Russell MW and Elson CO. Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface. *Gut* 1999; **44**: 2-5.
24. O'Hara AM and Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 2006; **7**: 688-693.
25. Hsiao JK, Huang CY, Lu YZ, Yang CY and Yu LC. Magnetic resonance imaging detects intestinal barrier dysfunction in a rat model of acute mesenteric ischemia/reperfusion injury. *Invest Radiol* 2009; **44**: 329-335.
26. Deitch EA, Bridges WM, Ma JW, Ma L, Berg RD and Specian RD. Obstructed intestine as a reservoir for systemic infection. *Am J Surg* 1990; **159**: 394-401.
27. Tani T, Hanasawa K, Endo Y *et al.* Bacterial translocation as a cause of septic shock in humans: a report of two cases. *Surg Today* 1997; **27**: 447-449.
28. Sagar PM, MacFie J, Sedman P, May J, Mancey-Jones B and Johnstone D. Intestinal obstruction promotes gut translocation of bacteria. *Dis Colon Rectum* 1995; **38**: 640-644.
29. Xu DZ, Lu Q and Deitch EA. Nitric oxide directly impairs intestinal barrier function. *Shock* 2002; **17**: 139-145.
30. Han X, Fink MP, Yang R and Delude RL. Increased iNOS activity is essential for intestinal epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice. *Shock*

2004; **21**: 261-270.

31. Stark D, van Hal S, Marriott D, Ellis J and Harkness J. Irritable bowel syndrome: a review on the role of intestinal protozoa and the importance of their detection and diagnosis. *Int J Parasitol* 2007; **37**: 11-20.
32. Gwee KA, Lu CL and Ghoshal UC. Epidemiology of irritable bowel syndrome in Asia: something old, something new, something borrowed. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; **24**: 1601-1607.
33. Svedlund J and Sjodin I. A psychosomatic approach to treatment in the irritable bowel syndrome and peptic ulcer disease with aspects of the design of clinical trials. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1985; **109**: 147-151.
34. Bradesi S, McRoberts JA, Anton PA and Mayer EA. Inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome: separate or unified? *Curr Opin Gastroenterol* 2003; **19**: 336-342.
35. Barbara G, Cremon C, Pallotti F, De Giorgio R, Stanghellini V and Corinaldesi R. Postinfectious irritable bowel syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; **48** Suppl 2: S95-97.
36. Barbara G, Wang B, Stanghellini V *et al.* Mast cell-dependent excitation of visceral-nociceptive sensory neurons in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2007; **132**: 26-37.

37. Lu CL, Hsieh JC, Dun NJ *et al.* Estrogen rapidly modulates 5-hydroxytryptophan-induced visceral hypersensitivity via GPR30 in rats. *Gastroenterology* 2009; **137**: 1040-1050.
38. Mach T. The brain-gut axis in irritable bowel syndrome--clinical aspects. *Med Sci Monit* 2004; **10**: RA125-131.
39. Lee CT, Chuang TY, Lu CL, Chen CY, Chang FY and Lee SD. Abnormal vagal cholinergic function and psychological behaviors in irritable bowel syndrome patients: a hospital-based Oriental study. *Dig Dis Sci* 1998; **43**: 1794-1799.
40. van der Veek PP, van den Berg M, de Kroon YE, Verspaget HW and Masclee AA. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2005; **100**: 2510-2516.
41. Liebrechts T, Adam B, Bredack C *et al.* Immune activation in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2007; **132**: 913-920.
42. O'Mahony L, McCarthy J, Kelly P *et al.* Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology* 2005; **128**: 541-551.
43. Macsharry J, O'Mahony L, Fanning A *et al.* Mucosal cytokine imbalance in irritable bowel syndrome. *Scand J Gastroenterol* 2008; **43**: 1467-1476.

44. Spiller RC, Jenkins D, Thornley JP *et al.* Increased rectal mucosal enteroendocrine cells, T lymphocytes, and increased gut permeability following acute *Campylobacter* enteritis and in post-dysenteric irritable bowel syndrome. *Gut* 2000; **47**: 804-811.
45. Thabane M and Marshall JK. Post-infectious irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2009; **15**: 3591-3596.
46. Park JH, Park DI, Kim HJ *et al.* The Relationship between Small-Intestinal Bacterial Overgrowth and Intestinal Permeability in Patients with Irritable Bowel Syndrome. *Gut Liver* 2009; **3**: 174-179.
47. Pimentel M, Chow EJ and Lin HC. Normalization of lactulose breath testing correlates with symptom improvement in irritable bowel syndrome. a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol* 2003; **98**: 412-419.
48. Walters B and Vanner SJ. Detection of bacterial overgrowth in IBS using the lactulose H₂ breath test: comparison with 14C-D-xylose and healthy controls. *Am J Gastroenterol* 2005; **100**: 1566-1570.
49. Posserud I, Stotzer PO, Bjornsson ES, Abrahamsson H and Simren M. Small intestinal bacterial overgrowth in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 2007; **56**: 802-808.

50. Wang LH, Fang XC and Pan GZ. Bacillary dysentery as a causative factor of irritable bowel syndrome and its pathogenesis. *Gut* 2004; **53**: 1096-1101.
51. Moss-Morris R and Spence M. To "lump" or to "split" the functional somatic syndromes: can infectious and emotional risk factors differentiate between the onset of chronic fatigue syndrome and irritable bowel syndrome? *Psychosom Med* 2006; **68**: 463-469.
52. Faubert G. Immune response to *Giardia duodenalis*. *Clin Microbiol Rev* 2000; **13**: 35-54, table of contents.
53. Gardner TB and Hill DR. Treatment of giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 2001; **14**: 114-128.
54. Roxstrom-Lindquist K, Palm D, Reiner D, Ringqvist E and Svard SG. *Giardia* immunity--an update. *Trends Parasitol* 2006; **22**: 26-31.
55. Eckmann L. Mucosal defences against *Giardia*. *Parasite Immunol* 2003; **25**: 259-270.
56. Li E, Zhou P, Petrin Z and Singer SM. Mast cell-dependent control of *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun* 2004; **72**: 6642-6649.
57. Davids BJ, Palm JE, Housley MP *et al*. Polymeric immunoglobulin receptor in intestinal immune defense against the lumen-dwelling protozoan parasite

Giardia. *J Immunol* 2006; **177**: 6281-6290.

58. Langford TD, Housley MP, Boes M *et al.* Central importance of immunoglobulin A in host defense against Giardia spp. *Infect Immun* 2002; **70**: 11-18.
59. Scott KG, Logan MR, Klammer GM, Teoh DA and Buret AG. Jejunal brush border microvillous alterations in Giardia muris-infected mice: role of T lymphocytes and interleukin-6. *Infect Immun* 2000; **68**: 3412-3418.
60. Scott KG, Yu LC and Buret AG. Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infect Immun* 2004; **72**: 3536-3542.
61. Farthing MJ. Giardiasis. *Gastroenterol Clin North Am* 1996; **25**: 493-515.
62. Tandon BN, Tandon RK, Satpathy BK and Shriniwas. Mechanism of malabsorption in giardiasis: a study of bacterial flora and bile salt deconjugation in upper jejunum. *Gut* 1977; **18**: 176-181.
63. Buret AG, Mitchell K, Muench DG and Scott KG. Giardia lamblia disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. *Parasitology* 2002; **125**: 11-19.

64. Seow F, Katelaris P and Ngu M. The effect of *Giardia lamblia* trophozoites on trypsin, chymotrypsin and amylase in vitro. *Parasitology* 1993; **106 (Pt 3)**: 233-238.
65. Jimenez JC, Fontaine J, Grzych JM, Dei-Cas E and Capron M. Systemic and mucosal responses to oral administration of excretory and secretory antigens from *Giardia intestinalis*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; **11**: 152-160.
66. Roskens H and Erlandsen SL. Inhibition of in vitro attachment of *Giardia* trophozoites by mucin. *J Parasitol* 2002; **88**: 869-873.
67. Shukla G, Devi P and Sehgal R. Effect of *Lactobacillus casei* as a probiotic on modulation of giardiasis. *Dig Dis Sci* 2008; **53**: 2671-2679.
68. Aley SB, Zimmerman M, Hetsko M, Selsted ME and Gillin FD. Killing of *Giardia lamblia* by cryptdins and cationic neutrophil peptides. *Infect Immun* 1994; **62**: 5397-5403.
69. Fernandes PD and Assreuy J. Role of nitric oxide and superoxide in *Giardia lamblia* killing. *Braz J Med Biol Res* 1997; **30**: 93-99.
70. Eckmann L, Laurent F, Langford TD *et al*. Nitric oxide production by human intestinal epithelial cells and competition for arginine as potential determinants of host defense against the lumen-dwelling pathogen *Giardia lamblia*. *J Immunol* 2000; **164**: 1478-1487.

71. Venkatesan P, Finch RG and Wakelin D. A comparison of mucosal inflammatory responses to *Giardia muris* in resistant B10 and susceptible BALB/c mice. *Parasite Immunol* 1997; **19**: 137-143.
72. Hill DR and Pearson RD. Ingestion of *Giardia lamblia* trophozoites by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 1987; **55**: 3155-3161.
73. Oberhuber G, Kastner N and Stolte M. Giardiasis: a histologic analysis of 567 cases. *Scand J Gastroenterol* 1997; **32**: 48-51.
74. Koudela B and Vitovec J. Experimental giardiasis in goat kids. *Vet Parasitol* 1998; **74**: 9-18.
75. Crouch AA, Seow WK, Whitman LM, Smith SE and Thong YH. Inhibition of adherence of *Giardia intestinalis* by human neutrophils and monocytes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991; **85**: 375-379.
76. Zhou P, Li E, Zhu N, Robertson J, Nash T and Singer SM. Role of interleukin-6 in the control of acute and chronic *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect Immun* 2003; **71**: 1566-1568.
77. Galli SJ, Nakae S and Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2005; **6**: 135-142.
78. Singer SM and Nash TE. T-cell-dependent control of acute *Giardia lamblia*

infections in mice. *Infect Immun* 2000; **68**: 170-175.

79. Perlmutter DH, Leichtner AM, Goldman H and Winter HS. Chronic diarrhea associated with hypogammaglobulinemia and enteropathy in infants and children. *Dig Dis Sci* 1985; **30**: 1149-1155.
80. Ropolo AS, Saura A, Carranza PG and Lujan HD. Identification of variant-specific surface proteins in *Giardia muris* trophozoites. *Infect Immun* 2005; **73**: 5208-5211.
81. Ringqvist E, Palm JE, Skarin H *et al.* Release of metabolic enzymes by *Giardia* in response to interaction with intestinal epithelial cells. *Mol Biochem Parasitol* 2008; **159**: 85-91.
82. D'Anchino M, Orlando D and De Feudis L. *Giardia lamblia* infections become clinically evident by eliciting symptoms of irritable bowel syndrome. *J Infect* 2002; **45**: 169-172.
83. Grazioli B, Matera G, Laratta C *et al.* *Giardia lamblia* infection in patients with irritable bowel syndrome and dyspepsia: a prospective study. *World J Gastroenterol* 2006; **12**: 1941-1944.
84. Nygard K, Schimmer B, Sobstad O *et al.* A large community outbreak of waterborne giardiasis-delayed detection in a non-endemic urban area. *BMC Public Health* 2006; **6**: 141.

85. Hanevik K, Hausken T, Morken MH *et al.* Persisting symptoms and duodenal inflammation related to *Giardia duodenalis* infection. *J Infect* 2007; **55**: 524-530.
86. Keister DB. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; **77**: 487-488.
87. Grossmann J, Maxson JM, Whitacre CM *et al.* New isolation technique to study apoptosis in human intestinal epithelial cells. *Am J Pathol* 1998; **153**: 53-62.
88. Grossmann J, Walther K, Artinger M *et al.* Progress on isolation and short-term ex-vivo culture of highly purified non-apoptotic human intestinal epithelial cells (IEC). *Eur J Cell Biol* 2003; **82**: 262-270.
89. Diaz-Granados N, Howe K, Lu J and McKay DM. Dextran sulfate sodium-induced colonic histopathology, but not altered epithelial ion transport, is reduced by inhibition of phosphodiesterase activity. *Am J Pathol* 2000; **156**: 2169-2177.
90. Muller N and von Allmen N. Recent insights into the mucosal reactions associated with *Giardia lamblia* infections. *Int J Parasitol* 2005; **35**: 1339-1347.
91. Troeger H, Epple HJ, Schneider T *et al.* Effect of chronic *Giardia lamblia* infection on epithelial transport and barrier function in human duodenum. *Gut* 2007; **56**: 328-335.
92. Williamson AL, O'Donoghue PJ, Upcroft JA and Upcroft P. Immune and

pathophysiological responses to different strains of *Giardia duodenalis* in neonatal mice. *Int J Parasitol* 2000; **30**: 129-136.

93. Tomkins AM, Wright SG, Drasar BS and James WP. Bacterial colonization of jejunal mucosa in giardiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978; **72**: 33-36.
94. Scott KG, Meddings JB, Kirk DR, Lees-Miller SP and Buret AG. Intestinal infection with *Giardia* spp. reduces epithelial barrier function in a myosin light chain kinase-dependent fashion. *Gastroenterology* 2002; **123**: 1179-1190.
95. Chin AC, Teoh DA, Scott KG, Meddings JB, Macnaughton WK and Buret AG. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect Immun* 2002; **70**: 3673-3680.
96. Youakim A and Ahdieh M. Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *Am J Physiol* 1999; **276**: G1279-1288.
97. Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT *et al.* TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; **286**: G367-376.
98. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P and Halbwachs Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects.

Lab Invest 2000; **80**: 617-653.

99. Koot BG, ten Kate FJ, Juffrie M, Rosalina I, Taminiau JJ and Benninga MA. Does *Giardia lamblia* cause villous atrophy in children?: A retrospective cohort study of the histological abnormalities in giardiasis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; **49**: 304-308.
100. Yamashiro S, Kamohara H, Wang JM, Yang D, Gong WH and Yoshimura T. Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *J Leukoc Biol* 2001; **69**: 698-704.
101. Lloyds D, Brindle NP and Hallett MB. Priming of human neutrophils by tumour necrosis factor-alpha and substance P is associated with tyrosine phosphorylation. *Immunology* 1995; **84**: 220-226.
102. Yu L. Protective mechanism against gut barrier dysfunction in mesenteric ischemia/reperfusion. *Adaptive medicine* 2010; **2**: 11-22.
103. Al-Ghoul WM, Khan M, Fazal N and Sayeed MM. Mechanisms of postburn intestinal barrier dysfunction in the rat: roles of epithelial cell renewal, E-cadherin, and neutrophil extravasation. *Crit Care Med* 2004; **32**: 1730-1739.
104. Anand RJ, Dai S, Rippel C *et al*. Activated macrophages inhibit enterocyte gap junctions via the release of nitric oxide. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*

2008; **294**: G109-119.

105. Abreu MT, Palladino AA, Arnold ET, Kwon RS and McRoberts JA. Modulation of barrier function during Fas-mediated apoptosis in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2000; **119**: 1524-1536.
106. Merger M, Viney JL, Borojevic R *et al.* Defining the roles of perforin, Fas/FasL, and tumour necrosis factor alpha in T cell induced mucosal damage in the mouse intestine. *Gut* 2002; **51**: 155-163.
107. Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD and Fromm M. Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis. *FASEB J* 2000; **14**: 1749-1753.
108. Wang F, Graham WV, Wang Y, Witkowski ED, Schwarz BT and Turner JR. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am J Pathol* 2005; **166**: 409-419.
109. Miller LS, Pietras EM, Uricchio LH *et al.* Inflammasome-mediated production of IL-1beta is required for neutrophil recruitment against *Staphylococcus aureus* in vivo. *J Immunol* 2007; **179**: 6933-6942.
110. Sato E, Simpson KL, Grisham MB, Koyama S and Robbins RA. Inhibition of MIP-1alpha-induced human neutrophil and monocyte chemotactic activity by

- reactive oxygen and nitrogen metabolites. *J Lab Clin Med* 2000; **135**: 161-169.
111. Kamda JD and Singer SM. Phosphoinositide 3-kinase-dependent inhibition of dendritic cell interleukin-12 production by *Giardia lamblia*. *Infect Immun* 2009; **77**: 685-693.
112. Homaidan FR, El-Sabban ME, Chakroun I, El-Sibai M and Dbaiibo GS. IL-1 stimulates ceramide accumulation without inducing apoptosis in intestinal epithelial cells. *Mediators Inflamm* 2002; **11**: 39-45.
113. Kristjansson G, Venge P, Wanders A, Loof L and Hallgren R. Clinical and subclinical intestinal inflammation assessed by the mucosal patch technique: studies of mucosal neutrophil and eosinophil activation in inflammatory bowel diseases and irritable bowel syndrome. *Gut* 2004; **53**: 1806-1812.
114. Camilleri M. Probiotics and irritable bowel syndrome: rationale, putative mechanisms, and evidence of clinical efficacy. *J Clin Gastroenterol* 2006; **40**: 264-269.
115. Han X, Fink MP and Delude RL. Proinflammatory cytokines cause NO*-dependent and -independent changes in expression and localization of tight junction proteins in intestinal epithelial cells. *Shock* 2003; **19**: 229-237.
116. Wu LL. Epithelial iNOS Impairs Tight Junctions Leading to Bacterial Translocation via Pkc ζ Activation and Rho-ROCK-Dependent Myosin Light Chain Phosphorylation in Obstructed Guts *Gastroenterology* 2010; **138**: S-4.

117. Inaba T, Alexander JW, Ogle JD and Ogle CK. Nitric oxide promotes the internalization and passage of viable bacteria through cultured Caco-2 intestinal epithelial cells. *Shock* 1999; **11**: 276-282.
118. Suzuki Y, Deitch EA, Mishima S, Lu Q and Xu D. Inducible nitric oxide synthase gene knockout mice have increased resistance to gut injury and bacterial translocation after an intestinal ischemia-reperfusion injury. *Crit Care Med* 2000; **28**: 3692-3696.
119. Palasthy Z, Kaszaki J, Lazar G, Nagy S and Boros M. Intestinal nitric oxide synthase activity changes during experimental colon obstruction. *Scand J Gastroenterol* 2006; **41**: 910-918.
120. Hua TC and Moochhala SM. Role of nitric oxide in hemorrhagic shock-induced bacterial translocation. *J Surg Res* 2000; **93**: 247-256.
121. Nadler EP and Ford HR. Regulation of bacterial translocation by nitric oxide. *Pediatr Surg Int* 2000; **16**: 165-168.
122. Demirkiran AE, Balkaya M, Tuncyurek P *et al.* The effects of nitric oxide supplementation and inhibition on bacterial translocation in bile duct ligated rats. *Acta Chir Belg* 2006; **106**: 202-205.
123. Marion R, Coeffier M, Leplingard A, Favennec L, Ducrotte P and Dechelotte P.

Cytokine-stimulated nitric oxide production and inducible NO-synthase mRNA level in human intestinal cells: lack of modulation by glutamine. *Clin Nutr* 2003; **22**: 523-528.

124. Kubes P and McCafferty DM. Nitric oxide and intestinal inflammation. *Am J Med* 2000; **109**: 150-158.
125. Bojarski C, Weiske J, Schoneberg T *et al*. The specific fates of tight junction proteins in apoptotic epithelial cells. *J Cell Sci* 2004; **117**: 2097-2107.
126. Widmaier EP, Raff H, Strang KT and Vander AJ. *Vander, Sherman, & Luciano's human physiology : the mechanisms of body function*. Boston, McGraw-Hill Higher Education, 2004.
127. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>