

國立臺灣大學口腔生物科學所

碩士論文

Graduate Institute of Oral Biology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

探討利用酵母菌進行豆類發酵後的產物對實驗性

異位性皮膚炎老鼠模式的免疫調節作用

Immunomodulatory effect of a legume-based  
fermented product by *Saccharomyces cerevisiae* in  
experimental atopic dermatitis



黃靖甯

Ching-ning Haung

指導教授：賈景山 博士

Advisor: Jean-san Chia, Ph.D.

中華民國 99 年 7 月

July, 2010

## 中文摘要

腸道是人體重要的免疫系統，在腸道的淋巴組織(Gut-associated lymphoid tissue, GALT)約占身體免疫系統的 70%。腸道細菌的刺激對於腸道免疫系統的調節是相當重要的，其中像是益生菌，可以改變宿主腸道菌叢而產生有益健康效果，並可以在大腸中利用小腸無法消化吸收的物質(益生物質)為食物，例如： $\beta$  聚糖，發酵產生有益腸道之物質並抑制壞菌生長。豆科植物 Legume 特別是指帶有豆莢且有整齊排列種子包裹在內的植物，像是蠶豆、豌豆等。豆類的營養價值高，富含纖維素、脂質、礦物質及維他命等，其中大豆更含有大量的必需胺基酸，是很好的蛋白質來源。發酵作用可分解大分子物質、增加易消化性、增進生物可利用性，進而提高營養價值；發酵物不僅易於消化吸收，還可消除自由基、抗老化，增強抵抗力。本實驗主要的研究目的：是想去探討酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)以及利用酵母菌進行豆類發酵後的產物對實驗性異位性皮膚炎老鼠模式的免疫調節作用。已有許多文獻指出：食用以酵母菌、乳酸菌發酵的食品是具有抗氧化、抗癌以及增加免疫力等功效，此外，韓國的一種傳統的豆類發酵食品 Chungkukjang 在文獻中提到對於過敏反應是有益的，特別像是氣喘和異位性皮膚炎。首先，利用異位性皮膚炎的老鼠動物模式來進行實驗，結果顯示，不論在誘導期或是作用期的異位性皮膚炎，餵食豆類發酵產物(SCLFP)的老鼠，所分泌的細胞激素會傾向 TH1 的反應，以及顯著提升抗發炎細胞 IL-10 的量，在細胞增生指數則是呈現顯著被抑制的結果。為了增強免疫反應的差異，在藥劑的部分添加了金黃色葡萄球菌腸毒素 B，在外觀以及組織切片的結果，都可以看到餵食豆類發酵產物在異位性皮膚炎的症狀上都有明顯的改善。最後，去探討建立口服耐受性對異位性皮膚炎的影響，結果顯示，建立口服耐受性是可以成功降低對於外來物質容易產生敏感性的免疫反應，進一步去影響異位性皮膚炎的免疫調節。綜合以上，我們推測餵食豆類發酵產物可以去調節 TH1 與 TH2 之間的平衡，此外，對於異位性皮膚炎症狀的改善，推測可能是與誘導調節性 T 細胞的產生有關。

## 英文摘要

The gastrointestinal tract is the important immunity system and the functions as a barrier against antigens from microorganisms and food. The generation of immunophysiologic regulation in the gut depends on the establishment of indigenous microflora. Probiotics are defined as live bacterial preparations with clinically documented health effects in humans. Legumes are plants that have pods with tidy rows of seeds inside includes beans, peas, lentils and peanuts. Pulses contain significant amounts of crude fibre, lipids, minerals and vitamins. Soy contains significant amounts of all the essential amino acids for humans and so is a good source of protein. The fermentation process helps not only in improving the organoleptic quality of legumes but also enhances nutritional quality. Fermentation is an important area of research, which entails the ability to hydrolyze soy protein into smaller peptides. In addition, previous study demonstrated that a Korean traditional fermented soybean food: Chungkukjang may be beneficial for several allergic conditions such as asthma and atopic dermatitis. In this study, we use an experimental atopic dermatitis animal model to investigate immunomodulation effect of *saccharomyces cerevisiae* and it's legume fermented product. Our result showed that in mice under induction or effect phase of atopic dermatitis, the administration of *saccharomyces cerevisiae* legume fermented product (SCLFP) can induce Th1 specific immune response and increase cytokine IL-10. Furthermore, SCLFP-administration can improve skin lesions. On the other hand, SCLFP may enhance oral tolerance that decreased allergic response. We hypothesized that the effect of SCLFP on atopic dermatitis may be related to the induction of regulatory T cells.

## 目錄

中文摘要 .....	I
英文摘要 .....	II
目錄 .....	III
圖目錄 .....	V
第一章 文獻回顧 .....	1
第一節 飲食影響免疫調節 .....	1
第二節 豆科植物(Legume) .....	3
第三節 豆類的營養價值及用途 .....	4
第四節 直接食用豆類的問題 .....	5
第五節 發酵豆類食品之營養與機能 .....	6
第六節 釀酒酵母( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) .....	7
第七節 過敏簡介 .....	9
第八節 異位性皮膚炎(atopic dermatitis) .....	9
第九節 金黃色葡萄球菌與異位性皮膚炎的關係 .....	12
第十節 口服耐受性與異位性皮膚炎的關係 .....	13
第十一節 研究目的與實驗設計 .....	14
第二章 實驗材料與方法 .....	15
第一節 實驗動物小鼠 .....	15
第二節 建立異位性皮膚炎老鼠動物模式(Atopic dermatitis model) .....	15
第三節 豆類發酵產物的製備 .....	16
第四節 熱致死酵母菌( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) 的製備 .....	16
第五節 老鼠食道插管餵食 .....	17
第六節 異位性皮膚炎之誘導期實驗設計 .....	17
第七節 異位性皮膚炎之作用期實驗設計 .....	17
第八節 作用期的異位性皮膚炎老鼠模式加上金黃色葡萄球菌腸毒素 B (Staphylococcal enterotoxin B)實驗設計 .....	18
第九節 建立口服耐受性(oral tolerance)對異位性皮膚炎之作用期實驗設計 .....	19
第十節 老鼠血清特異性抗體(specific antibody)的偵測 .....	19
第十一節 老鼠脾臟(Spleen)、腸繫膜淋巴結(Mesenteric lymph node)、浸潤淋 巴結(Draing lymph node)細胞培養及刺激的方法 .....	20
第十二節 細胞增生(cell proliferation)的偵測 .....	22
第十三節 細胞激素(cytokine)的偵測 .....	22
第十四節 組織化學染色(H&E stain) .....	23
第十五節 組織化學染色表皮厚度加以量化 .....	23
第十六節 組織化學染色發炎細胞 Eosinphils 的計數 .....	23
第十七節 統計分析 .....	24

第三章 實驗結果 .....	24
第一節 偵測誘導期的浸潤淋巴結以 OVA 刺激後分泌細胞激素的情形 .....	24
第二節 偵測誘導期的浸潤淋巴結以 OVA 刺激後細胞增生的情形 .....	25
第三節 偵測作用期的老鼠血清中抗 OVA 特異性抗體 .....	26
第四節 作用期的異位性皮膚炎老鼠模式各組在外觀上的差異 .....	27
第五節 偵測作用期的脾臟細胞及腸繫膜淋巴結細胞以 OVA 刺激後分泌細胞 激素的情形 .....	27
第六節 偵測作用期的脾臟細胞及腸繫膜淋巴結以 OVA 刺激後細胞增生的情 形 .....	29
第七節 作用期的異位性皮膚炎老鼠模式加上金黃色葡萄球菌腸毒素 B ( <i>Staphylococcal enterotoxin B</i> ) 各組在外觀上的差異 .....	29
第八節 作用期的異位性皮膚炎老鼠模式加上金黃色葡萄球菌腸毒素 B ( <i>Staphylococcal enterotoxin B</i> ) H&E stain 在各組皮膚上的差異 .....	30
第九節 作用期的異位性皮膚炎老鼠模式加上金黃色葡萄球菌腸毒素 B ( <i>Staphylococcal enterotoxin B</i> ) H&E stain 在各組皮膚上的差異加以量化統計 .....	31
第十節 作用期的異位性皮膚炎老鼠模式加上金黃色葡萄球菌腸毒素 B ( <i>Staphylococcal enterotoxin B</i> ) 在各組皮膚上發炎細胞 Eosinophils 浸潤的差異 加以量化統計 .....	32
第十一節 作用期的異位性皮膚炎老鼠模式加上金黃色葡萄球菌腸毒素 B ( <i>Staphylococcal enterotoxin B</i> ) 體重的變化 .....	32
第十二節 建立口服耐受性在作用期的異位性皮膚炎老鼠模式各組在外觀上 的差異 .....	33
第十三節 建立口服耐受性在偵測作用期的老鼠血清中抗 OVA 特異性抗體 .....	34
第十四節 建立口服耐受性在偵測作用期的脾臟細胞及腸繫膜淋巴結細胞以 OVA 刺激後分泌細胞激素的情形 .....	35
第十五節 建立口服耐受性在偵測作用期的脾臟細胞及腸繫膜淋巴結以 OVA 刺激後細胞增生的情形 .....	36
第四章 討論 .....	37
第五章 參考文獻 .....	44

## 圖目錄

圖一、異位性皮膚炎的建立 .....	61
圖二、異位性皮膚炎之誘導期實驗設計 .....	62
圖三、偵測誘導期的浸潤淋巴結以 OVA 刺激後分泌細胞激素的情形 .....	63
圖四、偵測誘導期的浸潤淋巴結以 OVA 刺激後細胞增生的情形 .....	64
圖五、異位性皮膚炎之作用期實驗設計 .....	65
圖六、偵測作用期的老鼠血清中抗 OVA 特異性抗體 .....	66
圖七、作用期的異位性皮膚炎老鼠模式各組在外觀上的差異 .....	67
圖八、偵測作用期的脾臟細胞以 OVA 刺激後分泌細胞激素的情形 .....	68
圖九、偵測作用期的腸繫膜淋巴結細胞以 OVA 刺激後分泌細胞激素的情形 ....	69
圖十、偵測作用期的脾臟細胞及腸繫膜淋巴結以 OVA 刺激後細胞增生的情形 ..	70
圖十一、作用期的異位性皮膚炎老鼠模式加上金黃色葡萄球菌腸毒素 B ( <i>Staphylococcal enterotoxin B</i> ) 各組在外觀上的差異 .....	71
圖十二、作用期的異位性皮膚炎老鼠模式加上金黃色葡萄球菌腸毒素 B ( <i>Staphylococcal enterotoxin B</i> ) H&E stain 在各組皮膚上的差異 .....	72
圖十三、作用期的異位性皮膚炎老鼠模式加上金黃色葡萄球菌腸毒素 B ( <i>Staphylococcal enterotoxin B</i> ) H&E stain 在各組皮膚上的差異加以量化統計 .....	73
圖十四、作用期的異位性皮膚炎老鼠模式加上金黃色葡萄球菌腸毒素 B ( <i>Staphylococcal enterotoxin B</i> ) 在各組皮膚上發炎細胞 Eosinophils 浸潤的差 異加以量化統計 .....	74
圖十五、作用期的異位性皮膚炎老鼠模式加上金黃色葡萄球菌腸毒素 B ( <i>Staphylococcal enterotoxin B</i> ) 體重的變化 .....	75
圖十六、探討建立口服耐受性(oral tolerance)對異位性皮膚炎之作用期實驗設 計 .....	76
圖十七、建立口服耐受性在作用期的異位性皮膚炎老鼠模式各組在外觀上的差異 .....	77
圖十八、建立口服耐受性在偵測作用期的老鼠血清中抗 OVA 特異性抗體 .....	78
圖十九、建立口服耐受性在偵測作用期的脾臟細胞以 OVA 刺激後分泌細胞激素的 情形 .....	79
圖二十、建立口服耐受性在偵測作用期的腸繫膜淋巴結細胞以 OVA 刺激後分泌細 胞激素的情形 .....	80
圖二十一、建立口服耐受性在偵測作用期的脾臟細胞及腸繫膜淋巴結以 OVA 刺激 後細胞增生的情形 .....	81
附表、附圖 .....	82

## 第一章 文獻回顧

### 第一節 飲食影響免疫調節

近年來人們對腸道的看法出現了新轉向，過去，我們只知道腸道具有消化、吸收的功能，但有愈來愈多的文獻指出，腸道不只是消化系統，還與免疫能力息息相關。Sanderson 指出，改變飲食的組成成分可能可以調節免疫能力，例如：減少病菌感染及致病的機率、降低過敏反應等(Sanderson, 2007)。

#### 腸道概論

腸道是將食物消化，且能選擇性吸收的重要器官，黏膜表面對於食物成分、病原性微生物、腸內細菌和消化酵素等各式各樣的刺激，具有物理性與化學性的隔離機能。腸道也是人體最重要的免疫系統，存在於腸道的淋巴組織(Gut-associated lymphoid tissue, GALT)約占身體免疫系統的 70%(Isolauri, 2001b)。

腸道表面除了有腸道上皮細胞外，還有一種特化成圓頂狀的上皮細胞，稱為 M 細胞(Membranous cell)，其表面不具有絨毛覆蓋，而是呈現凹陷的形狀，使得微生物或抗原可由此路徑通過，M 細胞底下即為派伊爾氏淋巴結(Payer's patch, PP)，派伊爾氏淋巴結中的抗原呈獻細胞(Antigen presenting cell, APC)將會進行免疫細胞的辨識。除此之外，存在於黏膜固有層中之免疫細胞還包括：B 細胞、輔助型 T 細胞、毒殺型 T 細胞、單核球、巨噬細胞、樹突細胞、和顆粒細胞、肥大細胞等(Isolauri, 2001a; Nagata et al., 2000)。

腸道黏膜中的抗體，以 IgA(Immunoglobulin A,IgA)含量最豐富，IgA 是經由漿細胞分泌之 J 鍊(J chain)將兩個單體結合而以雙體的形式存在。在腸道的黏膜中分泌型的 IgA(Secretory IgA,S-IgA)會以結合的方式達到抵禦外來病原菌的角色，S-IgA 為直接與病原菌結合，進而避免病原菌黏附到上皮細胞表面，因此 S-IgA 在腸道黏

膜系統中扮演著免疫防禦的重要角色(Blum et al., 1999)。

腸道細菌的刺激對於腸道免疫系統的調節是相當重要的(Fujioka et al., 2004)，其中口服耐受性(oral tolerance)是指對於經口攝取的食物抗原，在免疫耐受性狀態下並不會誘導產生對抗食物抗原的免疫反應，這也是跟腸道中的細菌有很大的關係(Brandtzaeg, 2002)，此外，也有研究證實腸道菌會去影響口服耐受性的作用，導致過敏的免疫反應產生，研究指出，利用腸道無菌老鼠與正常老鼠進行口服耐受性的實驗，將老鼠經口攝取蛋白抗原一段時間，之後再將相同蛋白抗原注入腹腔內，接著進行老鼠體內免疫反應的測試，結果顯示，腸道無菌老鼠的 Th2 相關的免疫反應 IgG1 和 IgE 抗體相對於正常老鼠是顯著上升的(Sudo et al., 1997)。

### 益生菌(probiotic)

益生菌，衍生自希臘語是”for life”，解釋為某一原生動物產生的物質可以促使另一原生動物生長。是指可以改變宿主腸道菌叢而產生有益健康效果的活性微生物，並可以在大腸中利用小腸無法消化吸收的物質為食物，發酵產生有益腸道之物質並抑制壞菌生長(Commane et al., 2005)。廣義的定義為：凡是應用到人類或其他動物，藉由改善腸內微生物平衡且有益於宿主的活菌，不論是單一或混合菌株均可視為益生菌(Spanhaak et al., 1998)。

俄國科學家 Metchnikoff 在 1908 年提出飲用發酵乳可以延長壽命的理論，認為乳酸菌可以抑制有害菌的生長，進而延緩老化(Mercenier et al., 2003)。研究指出，以乳酸菌餵食老鼠，可以使腸道中 IgA 的分泌量增加，顯示可增強腸道黏膜的免疫反應(Perdigon et al., 1994)。其他研究也顯示，益生菌能對抗腸胃道及呼吸道的感染，尤其是 Lactobacillus 和 Bifidobacterium 有刺激免疫力的效果，藉由增加抗體產生和白血球的吞噬作用以強化免疫系統(Sakai et al., 2006)。實驗也證實，讓患有異位性皮膚炎的孕婦服用發酵乳，可降低嬰兒出生後異位性皮膚炎的發生率(Jung and Stingl, 2008; Kalliomaki et al., 2001)。除此之外，在預防感染以及抗腫瘤的研究也指出，乳酸菌及雙叉桿菌之菌體的成分可以活化人體淋巴細胞且具有抗腫瘤的效果。最後在營養方面的研究指出，人體在營養不良的情況下，容易導致腸道上皮細胞萎縮，使得免疫力下降，影響消化吸收的能力，而益生菌能強化免疫力並



改善營養不良的狀況，此外，益生菌也可以改善乳糖不耐症(lactose intolerance)的營養問題(Hamilton-Miller, 2004)(附圖六)。

### 益生物質(Prebiotics)

益生物質，是指能夠選擇性促進益生菌生長之物質，其在小腸內不被消化吸收但可以提供益生菌在大腸內生長繁殖所必須的營養和發酵的原料，間接調節宿主的免疫力(de Vrese and Schrezenmeir, 2008)。例如：一些食物原料，膳食纖維(dietary fibre)、不被消化的澱粉(nondigestible food ingredients)以及寡糖(Oligosaccharides)，由於結構特殊，不能被人體消化道酵素分解，可通過消化道而被腸內的益生菌選擇性的發酵利用(Gibson and Roberfroid, 1995; Kullen and Bettler, 2005; Palframan et al., 2003)。研究指出，木寡糖可選擇性的被腸道中的雙叉桿菌發酵產生短鏈脂肪酸，而降低腸道 pH 值，使腸內菌相組成產生變化(Campbell et al., 1997)。同時，也有文獻指出，果寡糖可提高腸道中雙叉桿菌的數量，且能降低腸道的有害菌(Gibson and Roberfroid, 1995)。Iikura 與 Nagura 從動物實驗中發現，給與食物過敏的老鼠餵食果寡糖，糞便中的有機酸(如酪酸等)會增加，而且能夠降低血清中 IgE 的濃度，進而改善過敏症狀(Nagura et al., 2002)。除此之外，在餵食果寡糖五周的老鼠中發現，糞便的 IgA 與血清中的 IgG 都是顯著上升的，並且在致免後感染沙門氏桿菌的存活率也較高(Benyacoub et al., 2008)。

### 第二節 豆科植物(Legume)

Legume 特別是指帶有豆莢且有整齊排列種子包裹在內的植物，像是蠶豆、豌豆、扁豆、花生……等，都是屬於 legume 中的一員。豆類的營養價值高，富含纖維素、脂質、礦物質及維他命……等，其中常見的大豆更含有大量的必需胺基酸，是很好的蛋白質來源，另外大豆的成分像是大豆異黃酮素(isoflavones)，研究發現他可以減少癌症、心臟病及其他疾病的危險性、而皂素(saponin)則可以促進免疫功能並具有抗癌的功效。(美國黃豆學會台灣辦事處網站資料)(附表一)

### 第三節 豆類的營養價值及用途

近幾年來，大豆及其製品受到科學家和營養學家的重視，因為研究指出具有防癌及增進健康的效果。其中特別是大豆蛋白質具有許多神奇的機能，包括降低膽固醇、預防動脈硬化、預防高血壓、預防肥胖、增加免疫力、預防腦中風、降血糖、預防骨質疏鬆症、防癌、延年益壽、增強肌肉……等(青山敏明,1999)。大豆蛋白質水解物(beta-conglycinin)也具有免疫活性及抗氧化效應(Yamauchi & Suetsuna, 1993; Chen et al., 1995)。

根據流行病學資料指出，西方人罹患乳癌，大腸癌和攝護腺癌的機率比東方人高出約 4 倍，可能與大豆食品攝取量有密切的關係(Messina et al., 1994)。除了大豆外一些常見的豆類也含有許多營養物，列舉如下：

青豆：為豌豆之製品，營養價值較新鮮豌豆稍差，經常均作為菜餚中之配料。

黑豆：又稱烏豆，營養價值與黃豆等，能治腳氣，療風濕，可補腎亦能補血。

綠豆：性寒，能解暑熱，豆粉能外敷，豆殼可作枕蕊，為夏令消暑解熱食品。

紅豆：含維他命 B 極豐富，功能利小便，治泄瀉，治腳腫。頗為有益之食品。

四季豆：青翠爽脆，普通均作菜餚食，富含維他命 C 類，營養不及黑豆與黃豆。

豌豆：含有糖質脂肪質很豐，為炒菜中主要配料，有益中氣，並能治療泄瀉。

扁豆：健脾胃，除濕熱，治綠便，療治多年便溏，是豆類中良好營養品之一。

眉豆：健脾養胃，營養成份較其它豆類稍差，普通用作糕點，或作豆沙餡用。

蠶豆：營養價值最高，含有蛋白質、糖、維他命 B 和 C 甚豐，礦物質頗多。

## 第四節 直接食用豆類的問題

雖然豆類的營養成份豐富，但豆類並非絕無缺點，直接食用豆類的生物利用率較差，因為含有某些抗營養因數(antinutritional factors)，不僅不利於人體對養分的消化吸收，而且有害於健康。例如：

### 1. 影響人體對碳水化合物的利用效率

隱藏在豆類中的蛋白抑制劑，可以與胰蛋白(trypsin inhibitor)或抑凝乳蛋白結合，抑制水解蛋白的活性，使胃腸消化蛋白質的能力下降。另外，尚有 $\gamma$ 澱粉抑制劑，使澱粉活性下降，影響人體對碳水化合物的利用效率。

### 2. 造成鈣、鎂等礦物元素吸收下降

植酸(phytic acid)，是由肌酸與磷組成，是一種有機酸，在所有種子中都存在，豆類中含量最高。它既可與豆類本身所含的鈣、鎂結合，生成不為人體吸收的植酸鈣鎂鹽類，又可在腸道中與其他食物中的鈣結合，變成不溶性的植酸鈣，導致鈣、鎂等礦物元素的吸收率下降。故長期偏食豆類是會導致體內鈣缺乏的可能性。

### 3. 脹氣

豆類中含有產氣化合物，因此一旦吃得過多會造成腸胃脹氣的不舒服的感覺，脹氣是由不能被人體消化吸收的寡糖,如水酥四糖(stachyose)及棉實糖(raffinose),在胃腸中被微生物發酵產生之氣體。

### 4. 刺激腸胃道

豆類中所含的皂角素，會有降低表面張力的作用，食用後對消化道粘膜有強烈的刺激性，會導致胃腸道紅腫、充血。如果可以延長煮沸的時間及進行發酵可以減少或消除這些問題(王豐洲,1972;Wood, 1998)。

## 第五節 發酵豆類食品之營養與機能

所謂發酵，就是利用微生物分類對於食物進行加工處理，又稱為發酵食品。在發酵過程中，微生物保留了原來食物中的一些活性成分，如多糖、膳食纖維、生物類黃酮等對機體有益的物質，還能分解某些對人體不利的因子，如豆類中的低聚糖、脹氣因子等。微生物新陳代謝時產生的不少代謝產物，多數有調節機體生物功能的作用，能抑制體內有害物的產生(Wang et al., 2006)。

此外，發酵具有保存食物的效果，既可防止不良微生物腐敗，又能防止氧化性品質劣變。我們不難發現，發酵食品不添加抗氧化劑也沒有油耗味，可能與抗氧化成份有關，許多生大豆具有之營養阻害物質，經浸泡、清洗、蒸煮後可去除大部分。發酵作用可分解大分子物質及營養阻害物質，能增加易消化性，增進生物可利用率，進而提高營養價值;同時發酵作用也產生一些物質，有些使風味變好，有些具有增進健康的效果。發酵物不僅易於消化吸收，還可消除自由基，抗老化，增強抵抗力(Frias et al., 2008; Reddy et al., 1982)。

豆類發酵食品例如:味噌具有強抗氧化劑活性，味噌湯有降低胃癌死亡率之效果(Ebine, 1986)。豆腐乳具有高蛋白質及高鈣，天貝具有抗氧化活性，發酵後產生抗菌物質，能抑制某些革蘭氏陽性菌(Winarno & Reddy, 1986)。發酵使豆奶減少豆臭味及引起脹氣的碳水化合物，並增加必須胺基酸。納豆(natto)是發酵大豆食品中機能性效果研發最完全的，納豆中的脂質能抵抗氧化腐敗，可能是在發酵過程中產生的抗氧化物質的作用(Esaki, et al., 1990,Hattori, et al.1995)亦研究出納豆菌發酵的大豆可保護不飽和脂肪酸和細胞免於氧化，其效果與維他命 E 相當或更高。活性氧自由基會危害健康，造成動脈硬化、老化、破壞 DNA 及引起癌症;超氧歧化酶(superoxide dismutase, SOD)，與延長壽命有關。納豆具有 SOD 及過氧化氫酶

(caltase)能消除自由基,與納豆的健康機能性很有關。目前納豆受人矚目的效能還有溶解血栓，預防骨質疏鬆症，強抗菌性及抗氧化作用。

## 第六節 釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)

又稱啤酒酵母、麵包酵母。自古以來，酵母菌是用途最廣泛的真菌，人類經常利用它的發酵作用來製造各種發麵食品與醇酒。釀酒酵母的分類是屬於真菌子囊菌群(Division Ascomycota)半子囊菌綱(Class Hemiascomycetes)內孢霉目(Order Endomycetales) 酵母科(Family Saccharomycetaceas) 酵母屬(Genus *Saccharomyces*)。其細胞為球形或卵型，直徑為 5–10  $\mu\text{m}$ ，生活史可分為:(1)單倍體:以出芽方式產生個體(2)二倍體:通過簡單的有絲分裂繁殖，但在外界條件不佳時能夠進入減數分裂，生成一系列單倍體的孢子。單倍體可以交配，重新形成二倍體。酵母有兩種交配類型，稱作  $\alpha$  和  $\alpha$ ，是一種原始的性別分化，因此很有研究價值，由於是最簡單的真核生物，所以也被運用在分子生物學和細胞生物學研究的模式生物。



### $\beta$ -聚醣( $\beta$ -glucans)

$\beta$ -聚醣為多醣體，是構成釀酒酵母細胞壁的主要成分。除此之外，也可以來自真菌像是:靈芝、特定的致病菌以及穀類植物像是:燕麥、大麥等， $\beta$ -聚醣是  $\beta(1\rightarrow3)$ ， $\beta(1\rightarrow6)$ 的異型聚合體，會依照不同的來源而有不同的化學結構，主要是以  $\beta(1\rightarrow3)$ 的六碳糖為骨幹，相隔不同數目的  $\beta(1\rightarrow3)$ 六碳糖接有  $\beta(1\rightarrow6)$ 六碳糖的側鍊，例如:在真菌則是  $\beta(1\rightarrow3)$ 的六碳糖接上短的  $\beta(1\rightarrow6)$ 六碳糖的側鍊，在酵母菌則是  $\beta(1\rightarrow3)$ 的六碳糖接上長的  $\beta(1\rightarrow6)$ 六碳糖的側鍊。(Volman et al., 2008)

## β-聚醣的免疫調節

β-聚醣是真菌及酵母菌細胞壁的主要成分，能被先天型的免疫系統辨認，像是分子型態辨識受器(pattern recognition receptor, PRRs)或是補體(complement)系統，進一步引發免疫反應。也由於來源不同，有不同的化學鍵結，產生多種水溶性、分子量、帶電量等特性，進一步去刺激抗原呈獻細胞(APC)誘導出不同表面受體集合的免疫細胞分化(Volman et al., 2008)，有些加強免疫反應，有的則能活化 T 細胞分化為 Th1 免疫反應，以避免 IgE 所引起的過敏反應(Saito et al., 2003)。同時研究也指出釀酒酵母細胞壁上的 β-聚醣主要為 zymosan，可以刺激巨噬細胞(macrophages)分泌細胞激素 TNF-α(Brown et al., 2003)、IL-2、IL-10 以及 IL-12 來引發進一步的免疫反應(Du et al., 2006)。

### In vitro studies

研究指出 β-聚醣在體外的實驗中證實，可以增強巨噬細胞的活性、活化抗菌的能力、以及幫助單核球與嗜中性球的活化(Tzianabos, 2000; Williams, 1997; Zekovic et al., 2005)。同時，也可以藉由增加發炎前趨物、抗氧化物質以及一些化學機素來達到促進免疫反應的功效(Adachi et al., 1994; Olson et al., 1996; Young et al., 2001)。除了對巨噬細胞以及嗜中性球的影響外，在靈芝的 β-聚醣外研究中發現，β-聚醣可以去影響樹突細胞(dendritic cells)誘導 Th1 免疫反應的細胞激素的產生(Lin et al., 2006)。

### In vivo studies

在老鼠實驗中，餵食來自於靈芝的 β-聚醣與 *Sclerotinia sclerotiorum* glucan(SSG)，結果顯示，測試老鼠的脾臟細胞發現由 ovalbumin 所誘導產生的 Th1 免疫反應的細胞激素 IFN- $\gamma$  是顯示上升的，然而與 Th2 免疫反應相關的細胞激素 IL-4 與 IL-5 則是呈現下降的(Lin et al., 2006; Saito et al., 2003; Suzuki et al., 2001)。除此之外，

Suzuki et al 也證實測試餵食 *Sclerotinia sclerotiorum* glucan(SSG)的老鼠脾臟細胞，可以看到 Th1 相關的細胞激素 IgG2a 的分泌顯著上升，而 Th2 免疫反應相關的 IgG1 則是顯著下降，這些文獻都支持了  $\beta$ -聚醣可以誘導 Th1 特異性的免疫反應，進一步去調節與 Th2 之間的免疫平衡的反應。

## 第七節 過敏簡介

過敏是指身體對應該無害的外來蛋白質(過敏原)，例如:灰塵、花粉、塵蟎，產生免疫反應過度的結果。會過敏的人主要是有異位性體質，與遺傳(基因)有關，使得體內的免疫系統傾向 Th2 的反應並且容易產生免疫球蛋白 E(IgE)抗體，去抵抗過敏原。過敏原通常是透過呼吸道、肺、皮膚、和腸道等進入人體，當身體第一次接觸到過敏原並不會產生過敏反應，但之後再次接觸時就會產生發炎、腫脹、發紅、發癢、以及水質(例如流淚)的分泌物增加等過敏反應。

當過量 IgE 刺激化學物質釋放，造成微血管擴張、平滑肌收縮，引發皮膚、呼吸道、腸胃等不適。由 IgE 引起的過度免疫反應稱為第一型過敏，異位性皮膚炎、氣喘、過敏性鼻炎都是第一型過敏的臨床症狀。(康健雜誌,過敏專刊,2009)

## 第八節 異位性皮膚炎(atopic dermatitis)

又稱為異位性溼疹 (atopic eczema) 是一種慢性反覆性的皮膚疾病(Barnetson and Rogers, 2002)，此種疾病在嬰幼兒、兒童、青少年及成人都會發生，主要發病期為五歲以下的兒童，研究顯示:大約有50%的病患是在一歲以前發病，另有30%的病患在1~5歲間發病，有將近80%的異位性皮膚炎患者會在後來出現過敏性鼻炎或氣喘(Spergel and Paller, 2003)(朱家瑜, 2007)。根據統計，在開發中國家約有15-20%的兒童會有異位性皮膚炎的困擾，且發生率還在逐年升高(Williams, 2002)。根據

衛生署國民健康局委託台大公衛學院所做「台灣出生世代研究」嬰幼兒異位性皮膚炎盛行率已從1995年的1%，大幅攀升到2004年的6.7%。據估計，全台目前約有300萬人飽受異位性皮膚炎之苦(康健雜誌,過敏專刊,2009)。目前認為異位性皮膚炎的致病機轉相當複雜，包括基因上具有敏感性、免疫功能的失調、週遭環境的影響、生化代謝上的異常與皮膚障壁功能的缺陷等(Fartasch, 1997; Leung and Bieber, 2003; Pastore et al., 1997; Trautmann et al., 2000) (Geha, 2003; Howell et al., 2004; Leung and Bieber, 2003; Novak et al., 2003)。

### 基因的異常

研究指出與異位性皮膚炎發病有關的染色體位置包括:1q21、3q21、5q31-33、16q12、17q11等等。5q31-33區域內包含許多Th2細胞相關之細胞激素的基因，像是:介白素(interleukin;IL)3、4、5、13，而目前已知異位性皮膚炎與Th2免疫反應有密切的關係。另外1q21則與另一種皮膚角化疾病-乾癬有關的基因位置，由這個關聯性也暗示異位性皮膚炎可能也與皮膚本身的分化不正常相關(Forrest et al., 1999; Leung and Bieber, 2003)(附圖五)。

### 免疫上的異常

大約在70%~80%異位性皮膚炎的患者血液中可測得E型免疫球蛋白(IgE)上升的情形，同時也看到患者血中的嗜伊紅性血球數量的上升(Eosinophilia)。研究發現，異位性皮膚炎的病人血液中具有較高比例的過敏原特异性T細胞，而這些T細胞主要會分泌細胞激素IL-4、IL-5、IL-13，但只有分泌少量的丙型干擾素(interferon- $\gamma$ )，此一免疫功能上的異常會導致病人較容易產生IgE。此外這些細胞激素也會誘發vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1)、E-selectin以及intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1)表現增加，使得嗜伊紅性血球(Eosinophils)浸潤到皮膚發炎處(Hanifin et al., 1996; Sampson, 2003; Spergel et al., 1998; Wakita et al., 1994)。



## 皮膚障壁功能的異常

許多研究發現，異位性皮膚炎的病患的皮膚障壁功能有顯著的異常，包含經皮水分散失度transepidermal water loss (TEWL)明顯上升、與皮膚角質纖維相關的蛋白filaggrin基因的突變、角質層含水量減少與皮膚天然油脂含量下降，這樣的現象即使是在病患的正常皮膚也很顯著，因此可能不是因為皮膚發炎所造成的，而是先天病患就有所缺失的結果。目前對於異位性皮膚炎的致病機轉被認為可以分為：(1)由內而外(The inside-out):也就是因為患者體內免疫體質異常而引發皮膚炎。(2)由外而內(The outside-in):是由於患者先天的皮膚代謝與保護功能的異常，使得許多過敏原極易經由皮膚吸收致敏，而引發免疫反應的結果(Boguniewicz and Leung, ; Morar et al., 2007; Nomura et al., 2007; Palmer et al., 2006)。

造成異位性皮膚炎發作或使病情惡化的危險因子以吸入性過敏原 (inhalant allergens)、日常飲食及其他刺激物 (irritants) 佔大多數；此外如氣候、患者的精神狀態及細菌感染也都算是危險因子之一(Chan and Hanifin, 1993; Geha, 2003; Leung and Bieber, 2003; Novak et al., 2003)。異位性皮膚炎最主要的症狀為皮膚搔癢 (pruritus)，同時經常伴隨紅斑 (erythema) 及皮膚乾燥 (skin dry)。皮膚搔癢對於患者來說是一件非常痛苦的事，患者常因抓癢而造成皮膚破皮，進一步引起細菌感染而造成更嚴重的傷害。如果病情控制的不盡理想，則病灶有可能會蔓延全身，包括頭皮、身上、手掌、腳掌、都可受到侵犯，最後甚至演變成紅皮症，也就是全身超過百分之九十的皮膚侵犯，使得患者與其他正常人的外表也有很大的差異，對患者的心理及日常社交生活也會造成非常大的影響及困擾(RoThe and Grant-Kels, 1996) (附圖一)。

目前為止異位性皮膚炎仍然沒有根治的方法，因此治療的目的主要著重在「控制病情」而不是「治癒」。異位性皮膚炎的主要治療目標為降低皮膚發炎程度、

避免接觸危險因子以及緩解患者皮膚搔癢和乾燥狀態。治療方法主要可分為藥物及非藥物療法，藥物療法又有局部性及全身性給藥的區別，要決定以何種方法治療，取決於患者症狀發作時的速度與嚴重程度而定。

## 第九節 金黃色葡萄球菌與異位性皮膚炎的關係

研究指出皮膚上的細菌，尤其是金黃色葡萄球菌，可能與異位性皮膚炎的發生扮演一個相當重要的關係。Leyden等人在1974年發表異位性皮膚炎病患皮膚上金黃色葡萄球菌菌落數之定量研究，發現金黃色葡萄球菌可以在超過90%異位性皮膚炎病患病灶處分離出來，即使在病患的外觀正常皮膚處，也有50%以上的檢出率；然而，在正常人的皮膚只有5%可以檢測到金黃色葡萄球菌的存在，這些菌多半只存在於正常人的鼻子或皮膚皺摺處。除此之外，研究也發現病灶處的菌落密度與病灶的嚴重性有顯著的相關，皮膚炎的程度越厲害，檢測出金黃色葡萄球菌的比例就越高(Leyden and Kligman, 1977; Leyden et al., 1974)(朱家瑜,2007)。

近年的研究發現金黃色葡萄球菌所製造的外毒素(exotoxins)可以做為超級抗原(superantigens)，例如金黃色葡萄球菌腸毒素B (Staphylococcal enterotoxin B)，這些超級抗原可以直接活化T細胞並放大T細胞之反應而不需要經由抗原的辨認的過程。實驗也證實:直接將這些超級抗原的萃取物塗抹在正常的皮膚上可以引發皮膚的發炎反應，超級抗原也可以提高T細胞之皮膚淋巴相關抗原cutaneous lymphocyte-associated antigen(CLA; The homing receptor for The skin)的表現量，因而促進了T細胞浸潤到皮膚的過程，這些超級抗原也可以做為過敏原，引發IgE的相關反應，導致肥大細胞(mast cells)與嗜鹼性白血球的去顆粒作用，IgE的產生也與異位性皮膚炎的嚴重度呈現高度的相關性(Breuer et al., 2000; Leung et al., 1993; Strickland et al., 1999)(朱家瑜,2007)。

台大醫院研究發現，雖然金黃色葡萄球菌腸毒素 B 在健康人及異位性皮膚炎病人身上都會引起 T 細胞的活化，但是兩者的 T 細胞被活化之後所製造的細胞激素以及細胞凋亡的情形卻大不相同。金黃色葡萄球菌腸毒素 B 在健康人的 T 細胞引起 Th1 細胞激素的製造，而在異位性皮膚炎病人的 T 細胞卻引起 Th2 細胞激素的製造。而且，異位性皮膚炎病人的 T 細胞比健康人的 T 細胞較少有金黃色葡萄球菌腸毒素 B 活化之後引起的細胞凋亡。此外，Th2 細胞激素如 IL-4 可抑制此種細胞凋亡。這些結果暗示異位性皮膚炎皮膚內的 T 細胞受到金黃色葡萄球菌超級抗原活化後主要製造 Th2 細胞激素，因而比較不容易死亡，因此發炎處被活化的 T 細胞無法被清除，皮膚的過敏性發炎反應也就不會終止，這可能是異位性皮膚炎為何會多年不癒的主要原因之一(Cardona et al., 2006; Cho et al., 2001a; Cho et al., 2001b)(台大醫院小兒科衛教資訊，蔡紋如醫師，2005)。



## 第十節 口服耐受性與異位性皮膚炎的關係

人體的腸道免疫系統 原本具有黏膜耐受性的機能，能對經由腸道進入的蛋白有耐受性而不會出現免疫反應，稱為口服耐受性(oral tolerance)。孩童在一歲以前腸道的屏障還未成熟，所以蛋白抗原較容易通過而誘發出過敏反應；再加上小朋友在一歲前免疫系統的口服耐受性機轉還沒有成熟，所以遇到外來的蛋白就會造成過敏的症狀(Isolauri, 1997)。

在先前的文獻探討中提到，異位性皮膚炎好發生在五歲以下的兒童，有研究推測，異位性皮膚炎的發生是與孩童的口服耐受性(oral tolerance)尚未建立健全所導致，使得孩童對於外來物質容易產生敏感性的免疫反應，當孩童再次經由皮膚接觸到相同的抗原，就會引起異位性皮膚炎的過敏症狀。

近年來許多研究都認為腸道內的免疫反應以及腸道內的菌叢，都與引起過敏

反應有高度的相關性，研究指出患有異位性皮膚炎的孩童，大多伴隨著食物過敏的症狀，當吃到敏感性的食物，會使得皮膚上的過敏症狀變得更加嚴重(Sampson, 2003)。實驗的結果也可以看到，在異位性皮膚炎的患者腸道的菌叢相較於健康人的腸道，是有較多的金黃色葡萄球菌的分佈，而明顯有較少的益生菌 Bifidobacterium 存在(Watanabe et al., 2003)，所以我們可以知道腸道的失衡可能在引起異位性皮膚炎或是使得病情惡化中扮演重要的角色。

## 第十一節 研究目的與實驗設計

由文獻回顧中我們可以知道腸道免疫的重要性，其中特別是腸道內的微生物生態系，稱為腸道菌相，扮演著主要的調節角色。文獻中提到益生菌與部分疾病間的免疫調節存在有很大的相關性。此外，益生菌利用益生物質在腸道進行發酵加以調節，以及從動物實驗中也看到餵食益生物質也的確對宿主的免疫調節有所影響。

文獻中指出，食用豆類具有防癌及增進健康的效果。其中特別是大豆蛋白質可以降低膽固醇、預防動脈硬化、預防高血壓、預防肥胖、增加免疫力、預防腦中風、降血糖等 (青山敏明,1999)。除此之外，利用發酵作用可分解大分子物質及營養阻害物質,能增加易消化性,增進生物可利用率,進而提高營養價值;同時發酵作用也產生一些物質,有些使風味變好,有些具有增進健康的效果.發酵物不僅易於消化,吸收,還可消除自由基,抗老化,增強抵抗力(Frias et al., 2008; Reddy et al., 1982)。

此外，在韓國的一種傳統的豆類發酵食品 Chungkukjang 研究顯示，食用後對於過敏反應是有益的，特別像是氣喘(asthma)和異位性皮膚炎(atopic dermatitis) (Choi et al., 2008)。本實驗主要的研究目的:是想去探討酵母菌(*Saccharomyces*

cerevisiae)以及利用酵母菌進行豆類發酵後的產物對實驗性異位性皮膚炎老鼠模式的免疫調節作用。

在實驗設計的部份，首先要建立異位性皮膚炎的老鼠動物模式來進行實驗(圖一)(Spergel et al., 1998)，除了已有文獻的佐證外，另一方面，利用異位性皮膚炎的老鼠動物模式可以很直接的在外觀上進行觀測，對於初步探討豆類發酵產物在過敏反應方面的調節是很有幫助的。在實驗的過程中老鼠以插管餵食的方式，持續餵食豆類發酵產物(*Saccharomyces cerevisiae* Legume fermented product)，簡稱 SCLFP。

在實驗的進行過程中，除了要注意外觀皮膚的變化，也要抽血來偵測血清中抗體的變化，另外也定期量測老鼠的體重變化確定豆類發酵產物的安全性。最後，將老鼠犧牲後取血清、脾臟、腸繫膜淋巴結、浸潤淋巴結來進行免疫調節的偵測。



## 第二章 實驗材料與方法

### 第一節 實驗動物小鼠

購自台大醫學院繁殖組之 4-5 週 BALB/C 雌鼠，於代養單位飼養在溫度 20-22 度的代養環境中;設定夜晚及白日各 12 小時，飼料與飲水供小鼠自由取食。

### 第二節 建立異位性皮膚炎老鼠動物模式(Atopic dermatitis model)

主要是參照王莉芳醫師實驗室進行老鼠貼膚致敏(Epicutaneous sensitization)，以及參考文獻(Spergel et al., 1998)的方式。所使用的為 BALB/C 雌

性老鼠(n=6~10)，在開始餵食後一周進行(老鼠八周大)，利用雞卵蛋白 Ovalbumin (OVA)用量:100mg/ml、20µl/patch;加於貼布膠帶(finn chambers)上，將老鼠背部剃毛後，直接黏附於剃毛後老鼠的背部皮膚，並且利用止血繃帶加以固定。以每天換藥的方式，連續五天的貼皮致敏，之後須休息兩個禮拜，為一個循環，必須進行三個循環(圖一)。

### 第三節 豆類發酵產物的製備

實驗中所使用的豆類發酵產物(*Saccharomyces cerevisiae* Legume fermented product)主要是由廠商所提供。主要的成分含有大豆、黑豆以及紅豆，其大概的製備的流程如下:

- (1) 分別將不同的豆類潤濕及浸泡。
- (2) 泡軟後研磨成液狀，並以酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 進行 150 小時的發酵作用。
- (3) 最後以高溫乾燥，並以一定比例混合後，製裝於膠囊中即完成。



### 第四節 熱致死酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*) 的製備

參考市售酵母菌豆類發酵產物的製造過程，將豆類浸潤研磨後以酵母菌共同發酵 150 小時後加熱至 100°C 持續 30 分鐘，其後加以乾燥。製備只含酵母菌的餵食劑時，以含有 10 克酵母菌提取物(yeast extrat)與 20 克細菌白朊(Bacto peptone)以及 20 克葡萄糖(glucose)的一公升培養液，接種酵母菌培養 24 小時至 600nm 吸光值約為 1.4~1.5。將培養後的酵母菌加以高速離心後倒上清，利用二次水混合洗去培養液，再次高速離心後加二次水型成懸浮液，以滾水進行隔水加熱 30 分鐘，過程中不斷攪拌。待其懸浮液冷卻後，以每 1.5ml 離心管分裝 1ml 懸浮液進行真空乾燥，儲存於 4°C 備用，餵食前才稱重並復水。

## 第五節 老鼠食道插管餵食

依照所設計的不同實驗組別分別餵食二次水、豆類發酵產物、酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae*，以餵食管強迫定量餵食，從老鼠七周大開始餵食，每週餵食三次，豆類發酵產物、酵母菌製備為粉末且溶於二次水中，餵食濃度為 150mg/ml，0.2ml/隻，餵食二次水的量為 0.2ml/隻。

## 第六節 異位性皮膚炎之誘導期實驗設計

使用 5-8 週齡的 BALB/c 小鼠，每組有 5 隻老鼠。分組如下：

- (a) Negative 組: 貼膚致敏的藥劑為 PBS，沒有進行餵食。
- (b) Positive 組: 貼膚致敏的藥劑為 OVA，沒有進行餵食。
- (c) SCLFP 組: 貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行豆類發酵產物的餵食。
- (d) Yeast 組: 貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行酵母菌的餵食。
- (e) H2O 組: 貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行二次水的餵食。

從 6 周大開始進行餵食，每週餵食三次，餵食的動作會一直持續到老鼠犧牲時，在餵食一個禮拜後，開始進行連續五天的貼皮致敏，老鼠在致敏後一星期犧牲(圖二)。

藥劑的用量：

- (a) PBS:20 $\mu$ l/patch。
- (b) OVA:100mg/ml，20 $\mu$ l/patch。

## 第七節 異位性皮膚炎之作用期實驗設計

使用 5-8 週齡的 BALB/c 小鼠，每組有 6-10 隻老鼠。分組如下：

- (a) Negative 組: 貼膚致敏的藥劑為 PBS，沒有進行餵食。
- (b) Positive 組: 貼膚致敏的藥劑為 OVA，沒有進行餵食。

(c) SCLFP 組: 貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行豆類發酵產物的餵食。

(d) Yeast 組: 貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行酵母菌的餵食。

(e) H2O 組: 貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行二次水的餵食。

從 6 周大開始進行餵食，每週餵食三次，餵食的動作會一直持續到老鼠犧牲時，在餵食一個禮拜後，開始進行連續五天的貼皮致敏，之後須休息兩個禮拜，為一個循環，必須進行三個循環，老鼠在最後一次貼皮致敏後一星期犧牲(圖五)。

藥劑的用量:

(a) PBS:20 $\mu$ l/patch。

(b) OVA:100mg/ml，20 $\mu$ l/patch。

## 第八節 作用期的異位性皮膚炎老鼠模式加上金黃色葡萄球菌腸毒素 B

### (Staphylococcal enterotoxin B)實驗設計

使用 5-8 週齡的 BALB/c 小鼠，每組有 6-10 隻老鼠。分組如下:

(a) Negative 組: 貼膚致敏的藥劑為 PBS+SEB，沒有進行餵食。

(b) SCLFP 組: 貼膚致敏的藥劑為 OVA+SEB，進行豆類發酵產物的餵食。

(c) H2O 組: 貼膚致敏的藥劑為 OVA+SEB，進行二次水的餵食。

從 6 周大開始進行餵食，每週餵食三次，餵食的動作會一直持續到老鼠犧牲時，在餵食一個禮拜後，開始進行連續五天的貼皮致敏，之後須休息兩個禮拜，為一個循環，必須進行三個循環，老鼠在最後一次貼皮致敏後一星期犧牲。(附圖二)

藥劑的用量:

(a) PBS:20 $\mu$ l/patch。

(b) OVA:100mg/ml，20 $\mu$ l/patch。

(c) SEB:400 $\mu$ g/ml，10 $\mu$ l/patch。



## 第九節 建立口服耐受性(oral tolerance)對異位性皮膚炎之作用期實驗

### 設計

參考文獻(Cehade and Mayer, 2005; Mayer and Shao, 2004; Mucida et al., 2005)

採用每天餵食，以低劑量(Low dose)的方式進行。(附圖三)

(A) SCLFP 組: SCLFP: 90mg/ml, 200 $\mu$ l/mice。

(B) TOL 組: OVA: 25mg/ml, 200 $\mu$ l/mice。

(C) SCLFP+TOL 組: SCLFP: 90mg/ml, OVA: 25mg/ml, 200 $\mu$ l/mice。

使用 5-8 週齡的 BALB/c 小鼠，每組有 6-10 隻老鼠。分組如下:

(a) Negative 組: 貼膚致敏的藥劑為 PBS，沒有進行餵食。

(b) Positive 組: 貼膚致敏的藥劑為 OVA，沒有進行餵食。

(c) SCLFP 組: 貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行豆類發酵產物的餵食。

(d) TOL 組: 貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行 OVA 的餵食。

(e) SCLFP+TOL 組: 貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行豆類發酵產物加上 OVA 的餵食。

從 6 周大開始進行餵食，餵食的動作會一直持續到老鼠犧牲時，在餵食一個禮拜後，開始進行連續五天的貼皮致敏，之後須休息兩個禮拜，為一個循環，必須進行三個循環，老鼠在最後一次貼皮致敏後一星期犧牲(圖十六)。

藥劑的用量:

(a) PBS: 20 $\mu$ l/patch。

(b) OVA: 100mg/ml, 20 $\mu$ l/patch。

## 第十節 老鼠血清特異性抗體(specific antibody)的偵測

利用眼窩採血的方式取血，之後以 7500 r.p.m. 10 min 進行離心，取血清。偵測血清中抗 OVA 之特異性抗體 IgE、IgG1、IgA、IgG2a 的表現。

- (1) 參照 ELISA 套組 (BeThyl; Laboratory, Montgomery, Texas, USA) 說明書。以 coating buffer (0.05 M carbonate-bicarbonate, pH 9.6) 稀釋 OVA，最終濃度為 20 $\mu$ g/ml，各取 100  $\mu$ l/well 加入 96 孔微定量盤 (96-well plate, Nunc, Roskild, Denmark) 中，置於 4 $^{\circ}$ C 作用隔夜。
- (2) 隔天以一倍 PBST (PBS buffer, 0.05 % Tween 20) 清洗三次，以除去未結合之蛋白質，再加入 200  $\mu$ l/well blocking buffer (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 1 % BSA, pH 8.0)，室溫作用 2 個小時，以阻隔非特異性之結合位置，再以一倍 PBST 清洗三次後，加入 100  $\mu$ l/well 以 sample diluent (50 mM Tris, 0.14 M NaCl, 1 % BSA, 0.05 % Tween 20, pH 8.0) 稀釋過的檢體，置於 4 $^{\circ}$ C 作用隔夜。
- (3) 隔天以一倍 PBST 清洗三次後，加入 100  $\mu$ l/well 以 sample diluent 1 : 10000 至 1:50000 稀釋之 HRP conjugated detect antibody，於室溫下作用 2 個小時，接著再以一倍 PBST 清洗三次後，加入 100  $\mu$ l/well TMB 呈色劑 (Clinical)，避光靜置 10~20 分鐘呈色，以 100  $\mu$ l/well 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 終止反應後，在波長 450 nm 下判讀吸光值。

## 第十一節 老鼠脾臟 (Spleen)、腸繫膜淋巴結 (Mesenteric lymph node)、 浸潤淋巴結 (Draining lymph node) 細胞培養及刺激的方法

### 細胞培養

- (1) 在老鼠犧牲時取脾臟、腸繫膜淋巴結以及浸潤淋巴結，將取出的脾臟放入裝有 10ml 之一倍 HBSS medium 10 公分培養皿中，將腸繫膜淋巴結取出後放入裝有 0.5ml cRPMI medium 的 24 孔盤中，將浸潤淋巴結取出後放入裝有 2 ml cRPMI medium 的 6 孔盤中，藉由將淋巴結移至加有新鮮 cRPMI 的圓孔洗去表面血液。
- (2) 以兩片滅菌後的磨砂玻片進行脾臟的研磨，而以滅菌後針筒的尾端進行腸繫膜淋巴結的研磨，利用滅菌後針筒的尾端壓出浸潤淋巴結的細胞再以兩片滅菌後的磨砂玻片加以研磨。

- (3)將細胞磨出後，以鑷子將茶包袋以漏斗樣方式置於 15 mL 離心管管口上，以 pipet 將 tissue cell mixture sup.吸起，緩慢滴入茶包袋中，使 sup.過濾並流入 15 mL 離心管中，加以濾去大塊組織。
- (4)離心，1500 rpm，5 min，室溫下，stop without brakes。
- (5)去除上清液(pellet 為紅色加白色)，輕拍打散細胞後，在脾臟的部分加入 10 ml 冰的含 8.3% NH<sub>4</sub>Cl 及 1% KHCO<sub>3</sub> 之紅血球分解緩衝液(RBC lysis buffer); 腸繫膜淋巴結不需加紅血球分解緩衝液，而浸潤淋巴結則加 2ml 紅血球分解緩衝液。
- (6)離心，1500 rpm，5 min，室溫下，stop without brakes。
- (7)去除上清液(pellet 為白色)，輕拍打散細胞，在加入 1ml 含有 10%胎牛血清(fetal calf serum,FCS)，1%HEPES，1%L-glutamine，1% Penicillin/Streptomycin 之 cRPMI 1640 細胞培養液(complete RPMI, cRPMI)。
- (8)將打散後的細胞懸浮於 cRPMI 中，混合均勻，並取少許細胞液計算細胞數目。
- (9)於 96 well culture plate 中種入 1x10<sup>6</sup> 個細胞/well；多餘之細胞則丟棄不使用。

#### 刺激的方法

- (1) 在脾臟、腸繫膜淋巴結的部分，將同一隻老鼠的細胞分成三個刺激條件，並且做三重覆的處理，分別是：
  - (a)控制組:每個 well 種入細胞後不做任何處理。
  - (b)OVA 組:每個 well 加入濃度為 50ug/ml 的 OVA 進行刺激。
  - (c)Concanavalin A (ConA; Sigma, St.Louis, MO.T 細胞分裂素)組:當作 proliferation 的 positive control，每個 well 加入濃度為 2ug/ml。
- (2) 在浸潤淋巴結的部分則將同組老鼠的細胞放在一起，以組為單位同樣做三個條件的刺激，且做三至五個重覆的處理，條件如上述。
- (3) 培養於 37°C，5% CO<sub>2</sub> 之細胞培養箱。培養 48 小時後，每孔收取 0.15ml 細胞培養液，用於細胞激素的測定。

## 第十二節 細胞增生(cell proliferation)的偵測

參考 Humen et al.發表的實驗方法。(Humen et al., 2005)

- (1)在培養 48 小時後，每孔收取 0.15ml 細胞培養液，用於細胞激素的測定。  
同時加回 0.15ml 含有 isotopes:[meThyl-<sup>3</sup>H] Thymidine (PerkinElmer, Boston, Massachusetts, USA) 培養液，濃度為 1uci/well。在不同刺激的組別同樣加入如上的刺激濃度(OVA 組: 加入濃度為 50ug/ml 的 OVA 進行刺激。ConA 組: 加入濃度為 2ug/ml)。
- (2)一起培養 16~22 小時後，使用細胞收集器(Unifilter harvester, PerkinElmer)將細胞收至 96 孔濾紙盤(unifilter-96 GF/C)，風乾兩天，盤底貼上膠膜(BackSeal)，並加入 25ul/well 閃爍液(Microscint-20, Packard, Meriden, Connecticut, USA)，貼上封膜(TopSeal)後送入計數儀器(TopCount, PerkinElmer)進行放射記數。

## 第十三節 細胞激素(cytokine)的偵測

- (1)參照ELISA套組(DuoSet ELISA; R&D Systems, Minneapolis, Minneaota, USA)說明書。將cytokine capture antibody以一倍的PBS(PH7.2)加以稀釋後，各取 100  $\mu$ l/well加入96孔微量盤(96-well plate, Nunc, Roskild, Denmark)中，置於4°C作用隔夜。
- (2)隔天以一倍PBST (PBS buffer, 0.05 % Tween 20)清洗三次，以除去未結合之蛋白質，再加入200  $\mu$ l/well reagent diluent (1%BSA於一倍的PBS中)，於室溫下作用兩個小時，以阻隔非特異性之結合位置，再以一倍PBST (PBS buffer, 0.05 % Tween 20)清洗三次後，加入以reagent diluent 連續稀釋兩倍的標準品，以及稀釋過的細胞培養液(100ul/well)，置於4°C作用隔夜。
- (3)隔天以一倍PBST (PBS buffer, 0.05 % Tween 20)清洗三次後，加入以一倍的PBS稀釋後的抗小鼠細胞激素的單株抗體(detection antibody)，於室溫下作用兩個小時，以一倍PBST (PBS buffer, 0.05 % Tween 20)清洗三次後，加入稀釋200倍之streptavidin-HRP，室溫下避光作用20分鐘。接著以一倍PBST

(PBS buffer, 0.05 % Tween 20)清洗三次後，加入四甲基聯苯胺(TMB，3,3,5,5-tetramethyl benzidine)呈色(100ul/well)，避光靜置，直到呈現藍色後，視顏色深淺情況加入2 M  $H_2SO_4$ 終止反應，在波長450 nm下判讀吸光值，再扣除波長550nm所測的背景值。以標準品濃度做標準曲線，將各樣品吸光值代入標準曲線計算各抗體濃度。

#### 第十四節 組織化學染色(H&E stain)

在老鼠犧牲時取下皮膚，以福馬林浸泡4個小時以上，利用PBS加以清洗組織後，以石蠟進行包埋，之後將組織切成4-5 $\mu$ m大小的標本。

- (1) 加標本浸入xyline中，進行脫蠟的動作。
- (2) 在依次浸入100-70%的酒精中，進行回水的動作。
- (3) 浸入Haematoxylin(紫色)中約90秒，用流水清洗後，在浸入胺水中，在以清水清洗後，放入Eosin(紅色)中約40秒。
- (4) 最後放入100%酒精中，加以洗乾淨以及退色，等組織風乾後，進行封片。

#### 第十五節 組織化學染色表皮厚度加以量化

在200倍視野的顯微鏡下利用尺標刻度來進行表皮增厚的量化，分別是以：(輕度)Mild:10 $\mu$ m~20 $\mu$ m，(中度)Moderate:20 $\mu$ m~50 $\mu$ m，(重度)Severe:>50 $\mu$ m來做為皮膚發炎程度的區分。

#### 第十六節 組織化學染色發炎細胞Eosinophils的計數

利用量測各組皮膚上發炎細胞Eosinophils浸潤來評估老鼠皮膚發炎的程度。主要是計數四個顯微鏡下400倍的視野中Eosinophils的細胞個數後再平均所顯示的結果。

## 第十七節 統計分析

本研究中實驗結果皆以平均值(Mean)與標準差(Standard Deviation)表示，利用 Student's t-test 比較實驗結果中各項數據之間的差異，並且以  $P < 0.05$  作為達到統計學上的顯著差異的界定標準。\*代表統計學上  $P$  值  $< 0.05$ ，\*\*代表  $P$  值  $< 0.001$ ，\*\*\*代表統計學上  $P$  值  $< 0.0001$ 。

## 第三章 實驗結果

### 第一節 偵測誘導期的浸潤淋巴結以 OVA 刺激後分泌細胞激素的情形

在誘導期的異位性皮膚炎動物模式中，為了去觀察餵食豆類發酵產物(SCLFP)後浸潤淋巴結的免疫反應，我們利用 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 的方式，偵測誘導期的浸潤淋巴結以雞卵蛋白 OVA 刺激 48hr 後分泌細胞激素的情形。此外，在實驗中多增加了一個以酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)進行餵食的組別以當作免疫調節的 positive control。由於文獻中指出酵母菌的細胞壁中的主要成分-beta-glucan 具有免疫調節的功能(Suzuki et al., 2001; Volman et al., 2008)。在實驗中沒有以 OVA 致敏，是利用 PBS 來進行貼膚不會引起免疫反應的組別來當作 negative control。

我們觀察與 Th1 相關的細胞激素 IFN- $\gamma$  以及與 Th2 相關的細胞激素 IL-13、IL-4 的表現，同時也偵測了抗發炎細胞激素 IL-10，想要去比較在餵食豆類發酵產物後 Th1 與 Th2 的免疫反應是否有差異。實驗結果顯示，餵食豆類發酵產物(SCLFP)老鼠的浸潤淋巴結細胞 *in vitro* 以 OVA 的刺激 48hr 後，細胞分泌細胞激素 IFN- $\gamma$  的量相對於餵食酵母菌與餵食二次水的組別是有顯著上升的，同時，我們也看到餵食酵母菌的組別細胞分泌細胞激素 IFN- $\gamma$  的量，相對於餵食二次水的組別也是有顯著上升的(圖三(A))。

在細胞分泌細胞激素 IL-13 的部分，結果顯示，餵食酵母菌的組別細胞分泌細胞激素 IL-13，相對於餵食豆類發酵產物的組別與餵食二次水的組別，量是有顯著下降的(圖三(B))。在細胞分泌細胞激素 IL-4 的部分，結果顯示，餵食豆類發酵產物的組別與餵食酵母菌的組別細胞分泌細胞激素 IL-4，相對於餵食二次水的組別，量是有下降的趨勢，但沒有達到顯著差異(圖三(C))。在細胞分泌細胞激素 IL-10 的部分，結果顯示，餵食豆類發酵產物的組別細胞分泌細胞激素 IL-10，相對於餵食酵母菌的組別及餵食二次水的組別，量是有顯著上升的(圖三(D))。

在偵測誘導期的浸潤淋巴結以 OVA 刺激後分泌細胞激素的結果中，我們可以看到餵食豆類發酵產物後老鼠浸潤淋巴結的免疫反應，細胞分泌細胞激素會傾向於 Th1 的反應，以及顯著提升抗發炎細胞激素 IL-10 的量。另外，在餵食酵母菌的組別中，我們可以看到老鼠浸潤淋巴結的免疫反應也是傾向於 Th1 的反應，以及可以看到 Th2 相關的細胞激素 IL-13 的顯著下降，但對於分泌抗發炎激素 IL-10 沒有影響。

## 第二節 偵測誘導期的浸潤淋巴結以 OVA 刺激後細胞增生的情形

為了更進一步探討餵食豆類發酵產物後，在異位性皮膚炎誘導期的浸潤淋巴結對於OVA的刺激所產生的免疫反應，我們利用isotopes $[H^3]$  Thymidine Incorporation偵測浸潤淋巴結細胞以OVA刺激後細胞增生的情形。首先，將老鼠犧牲後取出浸潤淋巴結，以有無加OVA兩個條件進行細胞培養48hr後，加入isotopes $[H^3]$ Thymidine Incorporation培養16hr，以計數儀器進行放射線計數。圖示以有加OVA的細胞增生結果cpm值除以沒有以OVA培養的組別，所得到增生的倍數， $stimulation\ indexes = [H^3]Thymidine\ Incorporation\ (cpm) / unstimulated\ cells$ 。結果顯示，餵食豆類發酵產物老鼠的浸潤淋巴結細胞以*in vitro* OVA的刺激增生的結果，相對於餵食酵母菌的組別及餵食二次水的組別， $stimulation\ indexes$ 是有顯著被抑制的(圖四)。另外，在餵食酵母菌的組別，則可以看到老鼠的浸潤淋巴結細胞以*in vitro*

OVA的剌激增生，相對於餵食二次水的組別，stimulation indexes是有顯著上升的(圖四)。

在偵測誘導期的浸潤淋巴結以OVA剌激後細胞增生的結果中，我們可以看到餵食豆類發酵產物後老鼠浸潤淋巴結的免疫反應，對於OVA的剌激細胞增生是顯著被抑制的，我們推測可能是由於餵食豆類發酵產物後，老鼠浸潤淋巴結細胞誘導分泌抗發炎細胞激素IL-10，加以調控了細胞對於OVA剌激後增生的情形。同時我們也看到餵食酵母菌的組別，對於OVA的剌激細胞增生是顯著上升的，我們推測可能餵食酵母菌對於分泌抗發炎激素IL-10沒有影響(圖三(D))，所以也無法藉由分泌IL-10加以調控了細胞對於OVA剌激後增生的情形。

### 第三節 偵測作用期的老鼠血清中抗 OVA 特異性抗體

在誘導期的異位性皮膚炎動物模式中，我們的確看到餵食豆類發酵產物後對於老鼠浸潤淋巴結細胞的免疫調節會造成影響。進一步我們建立作用期的異位性皮膚炎動物模式，加以探討所引起系統性的免疫反應。

為了觀察在餵食豆類發酵產物後血清中抗 OVA 特異性抗體的表現，首先將犧牲後的老鼠血清利用 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)的方式，以血清連續 10 倍稀釋的方式來偵測 OD450 的值，並取 OD450 值為 1.0 以內的結果來進行比較，OD450 的值越高表示在血清中所偵測的抗體越多，想要去比較在餵食豆類發酵產物後 Th1 與 Th2 的免疫反應是否有差異。實驗結果顯示，餵食豆類發酵產物的組別，血清中產生抗 OVA 特異性抗體 IgE，相對於餵食二次水的組別是有顯著下降(圖六(A))。相反的，在血清中產生抗 OVA 特異性抗體 IgG2a，餵食豆類發酵產物的組別相對於餵食二次水的組別是則是有顯著上升(圖六(B))。

在偵測作用期的老鼠血清中抗OVA特異性抗體的結果中，我們可以看到餵食豆類發酵產物老鼠體內產生的抗OVA之特異性抗體與Th2相關的IgE的結果是顯著下降，而與Th1相關的抗體IgG2a的表現是顯著上升。因此我們推測，餵食豆類發酵產物在作用期異位性皮膚炎的老鼠動物模式中，可能可以藉由提升Th1細胞的免



疫調節而進一步降低Th2細胞引起的過敏反應。

#### 第四節 作用期的異位性皮膚炎老鼠模式各組在外觀上的差異

除了探討作用期的異位性皮膚炎老鼠模式體內的免疫反應外，我們也可以藉由觀測外觀上各組皮膚的差異來進行討論。結果顯示，在進行貼皮致敏三個循環後，老鼠犧牲前的皮膚狀況。分組如下：(A)Negative 組：貼膚致敏的藥劑為 PBS，沒有進行餵食。(B)Positive 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，沒有進行餵食。(C)SCLFP 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行豆類發酵產物的餵食。(D)Yeast 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行酵母菌的餵食。(E) H<sub>2</sub>O 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行二次水的餵食。箭頭所指為明顯的紅腫傷口(圖七)。

在外觀上的觀察，我們可以看到 Positive 的組別，在背部的皮膚出現明顯紅腫發炎的情形，並伴隨著一些傷口，相反的 Negative 的組別則沒有明顯的發炎情形。然而，在餵食豆類發酵產物(SCLFP)、餵食酵母菌與餵食二次水的組別在外觀上，都可以看到有紅腫發炎的情形，但難以利用肉眼加以分辨三組的嚴重程度。

#### 第五節 偵測作用期的脾臟細胞及腸繫膜淋巴結細胞以 OVA 刺激後分泌細胞激素的情形

在先前偵測老鼠血清的部分，我們看到了餵食豆類發酵產物老鼠體內的抗 OVA 之特異性抗體與 Th2 相關的抗體 IgE 的表現是顯著下降，而與 Th1 相關的抗體 IgG2a 的表現是顯著上升。接著我們利用 Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)的方式來偵測脾臟細胞及腸繫膜淋巴結細胞以 OVA 刺激 48hr 後分泌細胞激素的情形。我們觀察與 Th1 相關的細胞激素 IFN- $\gamma$  以及與 Th2 相關的細胞激素 IL-4 的表現，同時也偵測了抗發炎細胞激素 IL-10，想要去比較在餵食豆類發酵產物後 Th1 與 Th2 的免疫反應是否有差異。實驗結果顯示，在偵測脾臟細胞的

部分，餵食豆類發酵產物老鼠 *in vitro* 以 OVA 的刺激 48hr 後，細胞分泌細胞激素 IFN- $\gamma$  的量相對於餵食二次水的組別是有顯著上升的，同時，我們也看到餵食酵母菌的組別細胞分泌細胞激素 IFN- $\gamma$  的量，相對於餵食二次水的組別也是有顯著上升的(圖八(A))。

在脾臟細胞分泌細胞激素 IL-4 的部分，結果顯示，餵食酵母菌的組別細胞分泌細胞激素 IL-4，相對於餵食豆類發酵產物的組別與餵食二次水的組別，量是有顯著下降(圖八(B))。在脾臟細胞分泌細胞激素 IL-10 的部分，結果顯示，餵食豆類發酵產物的組別細胞分泌細胞激素 IL-10，相對於餵食酵母菌的組別及餵食二次水的組別，量是有顯著上升的(圖八(C))。

在偵測腸繫膜淋巴結細胞的部分，餵食豆類發酵產物老鼠 *in vitro* 以 OVA 的刺激 48hr 後，細胞分泌細胞激素 IFN- $\gamma$  的量相對於餵食二次水的組以及餵食酵母菌的組別細胞分泌細胞激素 IFN- $\gamma$  的量，相對於餵食二次水的組別呈現有統計上的差異，但沒有顯著差異(圖九(A))。在腸繫膜淋巴結細胞分泌細胞激素 IL-4、IL-10 的部分，結果顯示，有統計上的意義但皆沒有達到顯著差異(圖九(B)(C))。

在偵測作用期的脾臟細胞及腸繫膜淋巴結細胞以 OVA 刺激後分泌細胞激素的結果中，我們可以看到在系統性的免疫反應上，不論是脾臟細胞或腸繫膜淋巴結細胞在餵食豆類發酵產物後都傾向 Th1 的免疫反應，並且顯著提升抗發炎細胞激素 IL-10 的量。結果與先前偵測老鼠血清的部分，Th1 相關的抗體 IgG2a 的表現是顯著上升，以及偵測誘導期的浸潤淋巴結以 OVA 刺激後分泌細胞激素的結果都是呈現一致的。另外，在餵食酵母菌的組別中，我們可以看到老鼠在系統性的免疫反應也是傾向於 Th1 的反應，以及可以看到 Th2 相關的細胞激素 IL-4 在脾臟細胞的顯著下降，有趣的是，在腸繫膜淋巴結細胞刺激分泌 IL-4 則呈現顯著上升。同樣的對於分泌抗發炎激素 IL-10 沒有影響，與偵測誘導期的浸潤淋巴結以 OVA 刺激後分泌細胞激素的結果是呈現一致的。

## 第六節 偵測作用期的脾臟細胞及腸繫膜淋巴結以 OVA 刺激後細胞增生的情形

同樣的，為了更進一步探討餵食豆類發酵產物後，在異位性皮膚炎作用期的脾臟細胞及腸繫膜淋巴結細胞對於 OVA 的刺激所產生系統性的免疫反應，我們利用 isotopes [ $H^3$ ] Thymidine Incorporation 偵測脾臟細胞及腸繫膜淋巴結細胞以 OVA 刺激後細胞增生的情形。首先，將老鼠犧牲後取出脾臟細胞及腸繫膜淋巴結，以有無加 OVA 兩個條件進行細胞培養 48hr 後，加入 isotopes [ $H^3$ ]Thymidine Incorporation 培養 16hr，以記數儀器進行放射線計數。圖示以有加 OVA 的細胞增生結果 cpm 值除以沒有以 OVA 培養的組別，所得到增生的倍數，stimulation indexes= [ $H^3$ ] Thymidine Incorporation (cpm) / unstimulated cells。結果顯示，餵食豆類發酵產物老鼠的脾臟細胞以 *in vitro* OVA 的刺激增生的結果，相對於餵食酵母菌的組別 stimulation indexes 是有顯著被抑制的，而相對於餵食二次水的組別，stimulation indexes 也是呈現被抑制的情形，但沒有達到顯著差異(圖十(A))。然而，在餵食豆類發酵產物老鼠的腸繫膜淋巴結細胞以 *in vitro* OVA 的刺激增生的結果，我們可以看到相對於餵食酵母菌的組別及餵食二次水的組別，都沒有達到顯著差異(圖十(B))。

## 第七節 作用期的異位性皮膚炎老鼠模式加上金黃色葡萄球菌腸毒素 B (*Staphylococcal enterotoxin B*) 各組在外觀上的差異

在先前的實驗中，比較皮膚外觀上的差異，餵食豆類發酵產物、餵食酵母菌與餵食二次水的組別在外觀上，都可以看到有紅腫發炎的情形，但難以利用肉眼加以分辨三組的嚴重程度(圖七)。為了增強免疫反應的差異，在藥劑的部分添加了金黃色葡萄球菌腸毒素 B (SEB)。研究指出:有 90%的異位性皮膚炎患者在皮膚損傷的部位發現有金黃色葡萄球菌的聚集(Breuer K, et al.2000 Allergy)，同時也有文

獻指出，在這些聚集的金黃色葡萄球菌中，有 65% 會產生具有超級抗原特性的腸毒素(Campbell DE, et al.1998 Arch Dis Child)，所以研究推測，這些聚集產生的具有超級抗原特性的腸毒素，可能在異位性皮膚炎的皮膚上扮演促進發炎的角色 (Girolomoni G, et al. 2001 *J Am Acad Dermatol* , Kyu Han Kim, et al. 2006 *J Korean Med Sci*)。

實驗進行貼皮致敏三個循環後，老鼠犧牲前的皮膚狀況，實驗的組別中，在藥劑的部分都會添加 SEB，其中利用 PBS 來進行貼膚沒有以 OVA 致敏的組別當作 negative control，以 OVA 致敏且餵水的組別當作 positive control。分組如下：

(A)Negative 組: 貼膚致敏的藥劑為 PBS+SEB，沒有進行餵食。(B) SCLFP 組: 貼膚致敏的藥劑為 OVA+SEB，進行豆類發酵產物的餵食。(C) H2O 組: 貼膚致敏的藥劑為 OVA+SEB，進行二次水的餵食。箭頭所指為明顯的紅腫傷口。(圖十一)

在外觀上的觀測，我們可以清楚的看到，在餵食二次水的組別老鼠皮膚有明顯的紅腫發炎以及傷口的出現，同時掉毛的情形相對於 Negative 的組別與餵食豆類發酵產物的組別都更為明顯。而在 Negative 的組別，我們可以看到也有出現紅腫發炎的皮膚，推測是由於加了金黃色葡萄球菌腸毒素 B (SEB) 所以也造成輕微的免疫反應。在餵食豆類發酵產物(SCLFP)的組別中，我們可以看到相對於餵食二次水的組別，老鼠皮膚紅腫發炎、傷口的出現以及掉毛的情形，都有改善的現象。

## 第八節 作用期的異位性皮膚炎老鼠模式加上金黃色葡萄球菌腸毒素 B (*Staphylococcal enterotoxin B*) H&E stain 在各組皮膚上的差異

在外觀上我們已經看到在(A)Negative 組 (B) SCLFP 組 (C) H2O 組是有明顯差異的(圖十一)。所以我們進一步利用以 Haematoxylin(紫色) & Eosin(紅色)進行皮膚的組織染色，分組如下:(A) 100 倍視野下(E) 200 倍視野下 Normal 組: 為沒有做任何處理的老鼠皮膚。(B) 100 倍視野下(F) 200 倍視野下 Negative 組: 貼膚致敏的藥劑為 PBS+SEB，沒有進行餵食。(C) 100 倍視野下(G) 200 倍視野下 SCLFP 組: 貼

膚致敏的藥劑為 OVA+SEB，進行豆類發酵產物的餵食。(D) 100 倍視野下(H) 200 倍視野下 H<sub>2</sub>O 組: 貼膚致敏的藥劑為 OVA+SEB，進行二次水的餵食(圖十二)。

由 H&E stain 的結果我們可以看到，在餵食二次水的組別皮膚發炎的情形以及表皮的增厚，相對於 Negative 的組別與餵食豆類發酵產物的組別都是呈現明顯較嚴重的免疫反應。我們也可以看到在餵食豆類發酵產物後，在老鼠皮膚的發炎反應於表皮的增厚，相對於餵食二次水的皮膚狀況是有明顯的改善的。然而在 Negative 的組別，相對於 Normal 沒有做任何處理的老鼠皮膚，也可以看到表皮有增厚的情形。各組在老鼠皮膚所顯示 H&E stain 的結果，與我們在外觀上的觀測有一致的情形(圖十一)。

### 第九節 作用期的異位性皮膚炎老鼠模式加上金黃色葡萄球菌腸毒素 B (*Staphylococcal enterotoxin B*) H&E stain 在各組皮膚上的差異加以量化統計

在 H&E stain 的結果中我們看到各組的差異，接著利用量測表皮的厚度來加以量化皮膚發炎的程度，分別是: (輕度) Mild :10 $\mu$ m~20 $\mu$ m，(中度) Moderate :20 $\mu$ m~50 $\mu$ m，(重度) Severe : > 50 $\mu$ m(圖十二(A)(B)(C))。

每組各有五隻老鼠的染色結果，結果顯示，在 Negative 的組別有四隻是屬於輕度增厚(Mild)，一隻屬於中度增厚(Moderate)。在餵食豆類發酵產物的組別有兩隻是屬於輕度增厚(Mild)，兩隻是屬於中度增厚(Moderate)，一隻是屬於重度增厚(Severe)。在餵食二次水的組別則可以看到有兩隻是屬於中度增厚(Moderate)，三隻是屬於重度增厚(Severe)(圖十三)。

將各組皮膚上的差異加以量化統計的結果中，我們可以看到 Negative 的組別皮膚表皮增厚傾向輕度的，餵食豆類發酵產物的組別則傾向輕度與中度，在餵食二次水的組別則傾向表現中度與重度的結果。所以我們可以知道餵食豆類發酵產物

後對於皮膚上的發炎反應也可以加以調節。

#### 第十節 作用期的異位性皮膚炎老鼠模式加上金黃色葡萄球菌腸毒素 B (*Staphylococcal enterotoxin B*)在各組皮膚上發炎細胞 Eosinophils 浸潤的差異加以量化統計

在 H&E stain 的結果中我們看到各組的差異，以及在表皮厚度的量測上也統計出各組的差異，接著利用量測各組皮膚上發炎細胞 Eosinophils 浸潤來評估老鼠皮膚發炎的程度。

由(圖十四(A))可以看到，為 H2O 組: 貼膚致敏的藥劑為 OVA+SEB，進行二次水的餵食。在 400 倍視野下顯示發炎細胞 Eosinophils 的情形，箭頭所指即為發炎細胞 Eosinophils。主要是計數四個顯微鏡下 400 倍的視野中 Eosinophils 的細胞個數後再平均所顯示的結果，每組有五隻老鼠，由實驗結果我們可以看到 Eosinophils 細胞浸潤的情形在餵二次水的組別相對於餵食豆類發酵產物的組別，是有顯著上升的，所以我們可以知道，餵食豆類發酵產物可以減緩作用期的異位性皮膚炎動物模式在皮膚損傷的發炎狀況。(圖十四(B))

#### 第十一節 作用期的異位性皮膚炎老鼠模式加上金黃色葡萄球菌腸毒素 B (*Staphylococcal enterotoxin B*)體重的變化

在藥劑添加了金黃色葡萄球菌腸毒素 B(SEB)的實驗結果中，我們清楚的看到老鼠外觀及切片染色後在各組的差異。接下來，我們將實驗的老鼠每個禮拜的體重變化做了整理，計算出每組老鼠的體重平均值，從第一周開始餵食，圖中箭頭所指為進行貼膚致敏的週數(圖十五)。

結果顯示，從開始實驗到老鼠犧牲，各組老鼠的體重變化都維持在 15g~20g 的範圍內，餵食豆類發酵產物的老鼠體重每週的結果，相對於餵食二次水的老鼠

以及 Negative 的組別都是較重的，而且我們可以看到在 Negative 的組別老鼠體重沒有太大的變化，但在進行第二次貼膚致敏(第四週)後餵食二次水的老鼠體重開始下降，並且在第三次貼膚致敏(第六週) 餵食豆類發酵產物(SCLFP)的老鼠體重，相對於餵食二次水的老鼠體重，是較高的。在觀測各組老鼠體重變化的結果中可以知道，在各組的藥劑加了 SEB 不會對老鼠產生劇烈的變化。

## 第十二節 建立口服耐受性在作用期的異位性皮膚炎老鼠模式各組在外觀上的差異

在先前的文獻探討中提到，異位性皮膚炎好發生在五歲以下的兒童，有研究推測，異位性皮膚炎的發生是與孩童的口服耐受性(Oral tolerance)尚未建立健全所導致，使得孩童對於外來物質容易產生敏感性的免疫反應，當孩童再次經由皮膚接觸到相同的抗原，就會引起異位性皮膚炎的過敏症狀。

我們建立了口服耐受性在作用期的異位性皮膚炎老鼠模式，首先，從老鼠皮膚外觀來進行觀測，在進行貼皮致敏三個循環後，老鼠犧牲前的皮膚狀況。分組如下：(A)Negative 組：貼膚致敏的藥劑為 PBS，沒有進行餵食。(B)Positive 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，沒有進行餵食。(C)SCLFP 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行豆類發酵產物的餵食。(D)TOL 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行 OVA 的餵食。(E) SCLFP+TOL 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行豆類發酵產物加上 OVA 的餵食。箭頭所指為明顯的紅腫傷口(圖十七)。

在外觀上的觀察，我們可以看到 Positive 的組別，在背部的皮膚出現明顯紅腫發炎的情形，並伴隨著一些傷口，相反的 Negative 的組別則沒有明顯的發炎情形。然而，在餵食豆類發酵產物(SCLFP)、TOL 的組別與同時餵食豆類發酵產物加雞卵蛋白 OVA 的組別(SCLFP+TOL)在外觀上，都可以看到有紅腫發炎的情形，但難以利用肉眼加以分辨三組的嚴重程度。

### 第十三節 建立口服耐受性在偵測作用期的老鼠血清中抗 OVA 特異性抗體

進一步我們想去探討建立口服耐受性在作用期的異位性皮膚炎所引起的系統性的免疫反應。為了觀察在餵食 OVA 後所建立的口服耐受性以及餵食 OVA 加上豆類發酵產物在系統性免疫反應，我們利用 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)的方式來偵測血清中抗 OVA 特異性抗體的表現，首先將犧牲後的老鼠血清，以連續 10 倍稀釋的方式來偵測 OD450 的值，並取 OD450 值為 1.0 以內的結果來進行比較，想探討所建立的口服耐受性在作用期的異位性皮膚炎中，Th1 與 Th2 的免疫反應是否有差異。實驗結果顯示，在 TOL 的組別，血清中產生抗 OVA 特異性抗體 IgE，相對於餵食豆類發酵產物以及 Positive 的組別，是呈現顯著的下降。同樣的我們也可以看到，在 SCLFP+TOL 的組別，血清中產生抗 OVA 特異性抗體 IgE，相對於餵食豆類發酵產物以及 Positive 的組別，也是呈現顯著的下降，有趣的是，在同時餵食 OVA 加上豆類發酵產物的組別，血清中產生抗 OVA 特異性抗體 IgE，相對於只餵食 OVA 的組別也呈現顯著下降(圖十八(A))。

在偵測血清中產生抗OVA特異性抗體IgG2a的結果，我們可以看到在TOL的組別，相對於餵食豆類發酵產物以及Positive的組別，是呈現顯著的下降。同樣的我們也可以看到，在SCLFP+TOL的組別，血清中產生抗OVA特異性抗體IgG2a，相對於餵食豆類發酵產物以及Positive的組別，也是呈現顯著的下降(圖十八(B))。

所以由結果可以知道建立口服耐受性的老鼠體內產生的抗OVA之特異性抗體與Th2相關的抗體IgE以及與Th1相關的抗體IgG2a的結果都是顯著下降，因此我們推測建立口服耐受性是可以成功降低對於外來物質容易產生敏感性的免疫反應，進一步去影響異位性皮膚炎的免疫調節。



#### 第十四節 建立口服耐受性在偵測作用期的脾臟細胞及腸繫膜淋巴結細胞以 OVA 刺激後分泌細胞激素的情形

在先前偵測血清特異性 OVA 抗體的結果中，我們看到建立口服耐受性在作用期的異位性皮膚炎，會降低對於 OVA 容易產生敏感性的 Th1 及 Th2 的免疫反應，接著我們利用 Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)的方式來偵測脾臟細胞及腸繫膜淋巴結細胞以 OVA 刺激 48hr 後分泌細胞激素的情形。我們觀察與 Th1 相關的細胞激素 IFN- $\gamma$  以及與 Th2 相關的細胞激素 IL-13 的表現，同時也偵測了抗發炎細胞激素 IL-10，想探討所建立的口服耐受性在作用期的異位性皮膚炎中，Th1 與 Th2 的免疫反應是否有差異。。

實驗結果顯示，在偵測脾臟細胞的部分，餵食 OVA 的老鼠(TOL) *in vitro* 以 OVA 的刺激 48hr 後，細胞激素 IL-13 的部分，結果顯示，餵食 OVA 的老鼠(TOL) 細胞分泌細胞激素 IL-13，相對於餵食豆類發酵產物的組別與 Positive 的組別，量是有顯著下降，同樣的在 SCLFP+TOL 的組別也看到，相對於餵食豆類發酵產物的組別與 Positive 的組別，量是有顯著下降(圖十九(B))。在脾臟細胞分泌細胞激素 IL-10 的部分，結果顯示，只有餵食豆類發酵產物的組別細胞分泌細胞激素 IL-10，相對於 Positive 的組別量是有顯著上升的，然而在 TOL 的組別以及 SCLFP+TOL 的組別，相對於 Positive 的組別分泌 IL-10 是有上升的趨勢，但沒有達到顯著差異(圖十九(C))。然而，在細胞分泌細胞激素 IFN- $\gamma$  的量結果卻不如我們預期，相對於 Positive 的組別是有顯著上升的，同時，我們也看到餵食豆類發酵產物的組別細胞分泌細胞激素 IFN- $\gamma$  的量，相對於 Positive 的組別也是有顯著上升的(圖十九(A))。

在偵測腸繫膜淋巴結細胞的部分，結果顯示，餵食 SCLFP+OVA 的老鼠 *in vitro* 以 OVA 的刺激 48hr 後，細胞分泌細胞激素 IFN- $\gamma$  的量相對於 Positive 的組別是有統計的上的差異，但沒有顯著的差異(圖二十(A))。

在腸繫膜淋巴結細胞分泌細胞激素 IL-13 的部分，結果顯示，餵食 OVA 的老

鼠(TOL)細胞分泌細胞激素 IL-13，相對於 Positive 的組別與餵食豆類發酵產物 (SCLFP)的組別，同樣的有統計的上的差異，但沒有顯著的差異 (圖二十(B))。在腸繫膜淋巴結細胞分泌細胞激素 IL-10 的部分，結果顯示，在餵食豆類發酵產物 (SCLFP)、餵食 OVA 的老鼠(TOL)以及 SCLFP+TOL 的組別皆沒有顯著性的差異 (圖二十(C))。

在建立口服耐受性偵測作用期的脾臟細胞及腸繫膜淋巴結細胞以 OVA 刺激後分泌細胞激素的結果中，我們可以看到在系統性的免疫反應上，餵食 OVA 的組別 (TOL)在 Th2 相關的細胞激素 IL-13 的分泌都是顯著下降的，SCLFP+TOL 的組別在脾臟細胞的結果，也是達到顯著下降，而對於分泌抗發炎激素 IL-10 沒有影響。比較特別的是在 Th1 相關的細胞激素 IFN- $\gamma$  的部分，TOL 的組別在脾臟細胞分泌 IFN- $\gamma$  相對於 Positive 的組別，是顯著上升的。

#### 第十五節 建立口服耐受性在偵測作用期的脾臟細胞及腸繫膜淋巴結以 OVA 刺激後細胞增生的情形

同樣的，為了更進一步探討建立口服耐受性後，在異位性皮膚炎作用期的脾臟細胞及腸繫膜淋巴結細胞對於 OVA 的刺激所產生系統性的免疫反應，我們利用 isotopes $[H^3]$  Thymidine Incorporation 偵測脾臟細胞及腸繫膜淋巴結細胞以 OVA 刺激後細胞增生的情形。首先，將老鼠犧牲後取出脾臟細胞及腸繫膜淋巴結，以有無加 OVA 兩個條件進行細胞培養 48hr 後，加入 isotopes  $[H^3]$ Thymidine Incorporation 培養 16hr，以記數儀器進行放射線計數。圖示以有加 OVA 的細胞增生結果 cpm 值除以沒有以 OVA 培養的組別，所得到增生的倍數，stimulation indexes= $[H^3]$  Thymidine Incorporation (cpm) / unstimulated cells。結果顯示，在餵食豆類發酵產物、餵食 OVA 的老鼠(TOL)以及 SCLFP+TOL 的組別的脾臟細胞以 *in vitro* OVA 的刺激增生的結果，相對於 Positive 的組別 stimulation indexes 是有顯著

被抑制的 (圖二十一(A))。然而，在餵食豆類發酵產物、餵食 OVA 的老鼠(TOL) 以及 SCLFP+TOL 的組別的腸繫膜淋巴結細胞以 *in vitro* OVA 的刺激增生的結果，我們可以看到相對於 Positive 的組別，都沒有達到顯著差異(圖二十一(B))。

#### 第四章 討論

參考行政院衛生署所公告的「健康食品之輔助調整過敏體質功能評估方法」，文中提到，所謂降低過敏反應，針對不同過敏型式有各種過敏反應的指標，例如：降低血清過敏抗體的含量、降低發炎反應、減少過敏反應相關細胞激素或介質的分泌、調節 T 細胞分泌細胞激素、降低呼吸阻力等。(行政院衛生署食品衛生處。2007。健康食品之輔助調整過敏體質功能評估方法)

在實驗中，我們建立了異位性皮膚炎的動物模式，分別去探討引起過敏的兩個階段：(1)誘導期(induction phase)，初次接觸到過敏原，T 細胞在浸潤淋巴結中被激活，對特定的抗原誘發專一性 IgE 抗體的產生。(2)作用期(effector phase)，再次接觸到過敏原，T 細胞產生反應，傾向 Th2 的免疫反應，肥大細胞也會釋放組織胺，造成組織發炎，皮膚也會出現症狀。

在異位性皮膚炎誘導期的階段，我們偵測了浸潤淋巴結細胞以抗原 OVA 刺激後分泌細胞激素以及細胞增生的情形。結果顯示，餵食豆類發酵產物(SCLFP)的老鼠，所分泌的細胞激素會傾向 Th1 的反應，以及顯著提升抗發炎細胞 IL-10 的量，在細胞增生指數則是呈現顯著被抑制的結果。另外，在餵食酵母菌(Yeast)的組別中，可以看到所分泌的細胞激素也是傾向 Th1 的反應，不同的是，與 Th2 相關的細胞激素 IL-13 則是顯著下降的，但對於抗發炎激素 IL-10 的分泌是沒有影響的，而細胞增生指數則是呈現顯著上升的結果。(圖三、圖四)

我們推測可能是由於餵食豆類發酵產物(SCLFP)後，老鼠浸潤淋巴結細胞誘導分泌抗發炎細胞激素IL-10，加以調控了細胞對於OVA刺激後增生的情形，而由於

餵食酵母菌(Yeast)對於分泌抗發炎激素IL-10沒有影響，所以也無法藉由分泌IL-10加以調控了細胞對於OVA刺激後增生的情形。

文獻中提到，餵食益生菌可以進一步去調控腸道的平衡，可能是藉由刺激產生Th1的細胞激素去調控抗過敏的效用。(Fuller, 1991; Hesse et al., 1999; Miettinen et al., 1998) 在老鼠實驗中，餵食來自於靈芝的 $\beta$ -聚醣與Sclerotinia sclerotiorum glucan(SSG)，結果顯示，測試老鼠的脾臟細胞發現由ovalbumin所誘導產生的Th1免疫反應的細胞激素IFN- $\gamma$ 是顯示上升的，然而與Th2免疫反應相關的細胞激素IL-4與IL-5則是呈現下降的。(Lin et al., 2006; Saito et al., 2003; Suzuki et al., 2001)在本實驗的結果，我們同樣看到餵食酵母菌(Yeast)的組別，Th1的免疫反應上升，而Th2的免疫反應下降，然而，在餵食豆類發酵產物(SCLFP)的老鼠同樣提升Th1的免疫反應，卻沒有顯著降低Th2的反應。

在異位性皮膚炎作用期的階段，我們去觀測各組老鼠在皮膚外觀上的差異，此外，也偵測老鼠血清中OVA特異性抗體、脾臟細胞及腸繫膜淋巴結細胞以OVA刺激後分泌細胞激素以及細胞增生的情形。結果顯示，在皮膚外觀上，我們可以明顯看出Positive組與Negative組在傷口及皮膚發炎的差異，然而，在餵食豆類發酵產物(SCLFP)、餵食酵母菌與餵食二次水的組別在外觀上，都可以看到有紅腫發炎的情形，但難以利用肉眼加以分辨三組的嚴重程度。(圖七)

在偵測老鼠血清中OVA特異性抗體的結果，可以看到餵食豆類發酵產物(SCLFP)的老鼠，抗體與Th2相關的IgE的結果是顯著下降，而與Th1相關的抗體IgG2a的表現是顯著上升。(圖六)在分泌細胞激素的結果，我們可以看到在系統性的免疫反應上，不論是脾臟細胞或腸繫膜淋巴結細胞在餵食豆類發酵產物(SCLFP)後都傾向Th1的免疫反應，並且顯著提升抗發炎細胞激素IL-10的量。(圖八、圖九)餵食豆類發酵產物(SCLFP)老鼠的脾臟細胞以in vitro OVA的刺激增生，可以看到細胞增生指數則是呈現顯著被抑制的結果。(圖十)在異位性皮膚炎作用期的階段，我們得到的結果是與異位性皮膚炎誘導期的結果呈現一致的。

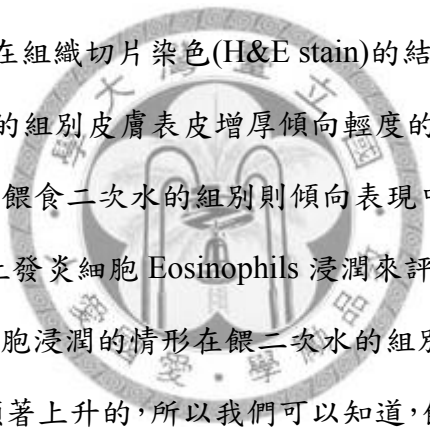
Iikura 與 Nagura 從動物實驗中發現，給與食物過敏的老鼠餵食益生物質果寡糖，糞便中的有機酸(如酪酸等)會增加，而且能夠降低血清中 IgE 的濃度，進而改善過敏症狀。(Nagura et al., 2002)除此之外，在餵食果寡糖五周的老鼠中發現，糞便的 IgA 與血清中的 IgG 都是顯著上升的，並且在致免後感染沙門氏桿菌的存活率也較高。(Benyacoub et al., 2008) 除此之外，Suzuki et al 也證實測試餵食 *Sclerotinia sclerotiorum* glucan(SSG)的老鼠脾臟細胞，可以看到 Th1 相關的細胞激素 IgG2a 的分泌顯著上升，而 Th2 免疫反應相關的 IgG1 則是顯著下降，這些文獻都支持了益生物質  $\beta$ -聚糖可以誘導 Th1 特異性的免疫反應，進一步去調節與 Th2 之間的免疫平衡的反應。

在異位性皮膚炎動物模式中，餵食豆類發酵產物(SCLFP)的老鼠不論是誘導期或是作用期都可以看到 Th1 的免疫反應顯著上升，血清中 Th2 的免疫反應下降，是與文獻的結果一致。比較特別的是我們看到細胞激素 IL-10 顯著上升，細胞對 OVA 的刺激增生指數是顯著下降，是與餵食酵母菌(Yeast)不一樣的結果。

Interleukin-10(IL-10)是一個抗發炎的細胞激素，在阻止發炎反應與自體免疫疾病上扮演重要的角色。(Hawrylowicz and O'Garra, 2005; Moore et al., 2001; O'Garra et al., 2008)IL-10 可以被主動性免疫(adaptive immune)細胞表現，包含了 Th1、Th2、Th17、調節性 T 細胞(Treg)等，也可以被先天性免疫(innate immune)細胞表現，包含樹突細胞(dendritic cells)、巨噬細胞(macrophages)、肥大細胞(mast cells)、nature killer cells、eosinophil 與 neutrophils 等。(Saraiva and O'Garra, 2010)(附圖七)IL-10 的產生目前被認為與免疫的耐受性以及調節性 T 細胞免疫反應有很大的關係。(Moore et al., 2001; O'Garra and Vieira, 2004; Roncarolo et al., 2006)

研究指出皮膚上的細菌，尤其是金黃色葡萄球菌，可能與異位性皮膚炎的發生扮演一個相當重要的關係。在先前的實驗中，比較皮膚外觀上的差異，餵食豆類發酵產物(SCLFP)、餵食酵母菌與餵食二次水的組別在外觀上，都可以看到有紅

腫發炎的情形，但難以利用肉眼加以分辨三組的嚴重程度。為了增強免疫反應的差異，在藥劑的部分添加了金黃色葡萄球菌腸毒素 B (SEB)。研究指出:有 90%的異位性皮膚炎患者在皮膚損傷的部位發現有金黃色葡萄球菌的聚集(Breuer K, et al.2000 Allergy)，同時也有文獻指出，在這些聚集的金黃色葡萄球菌中，有 65%會產生具有超級抗原特性的腸毒素(Campbell DE, et al.1998 Arch Dis Child)，所以研究推測，這些聚集產生的具有超級抗原特性的腸毒素，可能在異位性皮膚炎的皮膚上扮演促進發炎的角色(Girolomoni G, et al. 2001 J Am Acad Dermatol ，Kyu Han Kim, et al. 2006 J Korean Med Sci)。

老鼠皮膚外觀的結果，在餵食豆類發酵產物(SCLFP)的組別中，我們可以看到相對於餵食二次水的組別，老鼠皮膚紅腫發炎、傷口的出現以及掉毛的情形，都有改善的現象(圖十一)。在組織切片染色(H&E stain)的結果上，我們將表皮增厚的情形加以量化，Negative 的組別皮膚表皮增厚傾向輕度的，餵食豆類發酵產物的組別則傾向輕度與中度，在餵食二次水的組別則傾向表現中度與重度的結果(圖十三)。利用量測各組皮膚上發炎細胞 Eosinophils 浸潤來評估老鼠皮膚發炎的程  
度，結果顯示，Eosinophils 細胞浸潤的情形在餵二次水的組別相對於餵食豆類發酵產物(SCLFP)的組別，是有顯著上升的，所以我們可以知道，餵食豆類發酵產物(SCLFP)可以減緩作用期的異位性皮膚炎動物模式在皮膚損傷的發炎狀況(圖十四)。最後，整理老鼠每周的體重變化，結果顯示，餵食豆類發酵產物(SCLFP)的老鼠健康狀況是最好的(圖十五)。

文獻指出發炎細胞 Eosinophils 在異位性皮膚炎中扮演重要的角色，Eosinophils 活化後會出現在周邊血液及損傷的皮膚中，在異位性皮膚炎的患者中常可看到 Eosinophils 增加的情形。(Kapp, 1993; Leiferman et al., 1985; Simon et al., 2004)研究指出可能是藉由 IL-5 與 GM-CSF 相關的機制，進一步去抑制了 Eosinophils 自我凋亡(apoptosis)，造成在異位性皮膚炎中有累積的情形(Wedi et al., 1999)。CCR3 所引起的免疫路徑對於 Eosinophil 在皮膚發炎的部位進行回復(recruitment)是必需的，

以及幫助 Eosinophil 進潤到皮膚的部位。(Gombert et al., 2005; Hochstetter et al., 2000) Eosinophils 在異位性皮膚炎造成細胞浸潤的情形，是會使得發炎的情況更加惡化。(Werfel, 2009)

口服耐受性(oral tolerance)對於調控腸道免疫扮演重要的角色，如果口服耐受性失去功能就會引起食物過敏的反應，Chase 在 1946 年提出口服耐受性是指，抗原暴露是先經由口服的路徑接觸，會進一步去活化抑制對抗抗原的免疫反應。(Chehade and Mayer, 2005)

在動物實驗中，口服耐受性可以經由一次餵食大量抗原(High dose)或是利用持續餵食少量抗原(Low dose)所引起，分別走向不同的路徑。(Friedman and Weiner, 1994)餵食高劑量(High dose)的抗原會引起淋巴細胞對抗原的應變性差(anergy)(Whitacre et al., 1991)或是不反應(deletion)(Chen et al., 1995a)造成淋巴細胞的不反應主要是透過 T 細胞的接受器，讓共同刺激訊號(costimulatory signal)產生錯誤(Appleman and Boussiotis, 2003)，也可以透過細胞激素 IL-2、IL-12 來進行封鎖(blocked)。(MarTh et al., 1998)餵食低劑量(Low dose)的抗原主要是引起調節性 T 細胞(regulatory T cell)來進行抑制免疫反應的調節，可以分成三種細胞，分別是：(1)Th3 cells:主要是透過分泌 TGF- $\beta$  來進行抑制。(2)TR1 cells:主要是透過分泌 IL-10 來進行抑制。(3)CD4+CD25+ cells:可能是藉由細胞表面連接 TGF- $\beta$  來進行抑制。(Barone et al., 1995; Chen et al., 1995b; Garside et al., 1995)(附圖四)

在先前的文獻探討中提到，異位性皮膚炎好發生在五歲以下的兒童，有研究推測，異位性皮膚炎的發生是與孩童的口服耐受性(oral tolerance)尚未建立健全所導致，使得孩童對於外來物質容易產生敏感性的免疫反應，當孩童再次經由皮膚接觸到相同的抗原，就會引起異位性皮膚炎的過敏症狀。研究指出患有異位性皮膚炎的孩童，大多伴隨著食物過敏的症狀，當吃到敏感性的食物，會使得皮膚上的過敏症狀變得更加嚴重(Sampson, 2003)。實驗的結果也可以看到，在異位性皮膚

炎的患者腸道的菌叢相較於健康人的腸道，是有較多的金黃色葡萄球菌的分佈，而明顯有較少的益生菌 Bifidobacterium 存在(Watanabe et al., 2003)，所以我們可以知道腸道的失衡可能在引起異位性皮膚炎或是使得病情惡化中扮演重要的角色。

有文獻認為利用提升口服耐受性的能力，可能可以用來治療過敏性的疾病或是自體免疫方面的疾病。(Higgins and Weiner, 1988; Nagler-Anderson et al., 1986; Nussenblatt et al., 1990; Peron et al., 2009)在 Mucida 所建立的口服耐受性動物實驗中，結果顯示，餵食低劑量抗原蛋白 OVA，可以經由 TGF- $\beta$  與 FOXP3，進一步去誘導抗原特異性 T 細胞產生，利用主動傳輸(adoptive transfer)的實驗證實由口服耐受性所誘導的抗原特異性 T 細胞可以去降低氣喘的反應，藉由抑制 Th2 相關的免疫反應。(Mucida et al., 2005)

在我們所建立的口服耐受性老鼠模式，是以持續餵食低劑量抗原 OVA 的方式進行，去探討口服耐受性對於作用期的異位性皮膚炎老鼠模式的影響。結果顯示，在外觀上的觀察，餵食豆類發酵產物(SCLFP)、TOL 的組別與同時餵食豆類發酵產物加雞卵蛋白 OVA 的組別(SCLFP+TOL)在外觀上，都可以看到有紅腫發炎的情形，但難以利用肉眼加以分辨三組的嚴重程度(圖十八)。在系統性的免疫反應上，我們可以看到建立口服耐受性的老鼠體內產生的抗 OVA 之特異性抗體與 Th2 相關的抗體 IgE 以及與 Th1 相關的抗體 IgG2a 的結果都是顯著下降，有趣的是，在同時餵食 OVA 加上豆類發酵產物的組別，血清中產生抗 OVA 特異性抗體 IgE，相對於只餵食 OVA 的組別也呈現顯著下降(圖十七)。因此我們推測建立口服耐受性是可以成功降低對於外來物質容易產生敏感性的免疫反應，進一步去影響異位性皮膚炎的免疫調節。餵食 OVA 的組別(TOL)在 Th2 相關的細胞激素 IL-13 的分泌都是顯著下降的，SCLFP+TOL 的組別在脾臟細胞的結果，也是達到顯著下降，而對於分泌抗發炎激素 IL-10 沒有影響。比較特別的是在 Th1 相關的細胞激素 IFN- $\gamma$  的部分，TOL 的組別在脾臟細胞分泌 IFN- $\gamma$  相對於 Positive 的組別，是顯著上升的，然而在腸繫膜淋巴結細胞的部分則沒有顯著差異，但是在 SCLFP+TOL 的



組別卻是顯著下降的(圖十九、圖二十)。在餵食豆類發酵產物(SCLFP)、餵食 OVA 的老鼠(TOL)以及 SCLFP+TOL 的組別的脾臟細胞以 in vitro OVA 的刺激增生的結果，相對於 Positive 的組別 stimulation indexes 是有顯著被抑制的 (圖二十一)。

有研究探討在異位性皮膚炎損傷的皮膚，人類的調節性 T 細胞在功能以及細胞激素的表現，結果顯示，在發炎的皮膚可以看到 Tr1 細胞的功能缺失，同時，也沒有看到 CD4+CD25+Foxp3+調節性 T 細胞在皮膚進潤的情形，也就是說，在異位性皮膚炎的患者在誘導耐受性的功能上是有問題的。(Verhagen et al., 2006)在本實驗所建立的口服耐受性實驗中，可以證實口服耐受性的重要性，是可以成功降低對於外來物質容易產生敏感性的免疫反應，綜合以上，我們推測餵食豆類發酵產物可以去調節 Th1 與 Th2 之間的平衡，此外，實驗結果中也看到抗發炎激素 IL-10 的顯著上升，推測可能是與誘導調節性 T 細胞的產生有關，也進一步去改善異位性皮膚炎症狀。



## 第五章 參考文獻

行政院衛生署食品衛生處。2007。健康食品之輔助調整過敏體質功能評估方法

王豐洲，1972。黃豆之加工利用。食品工業。04(09)：3-8

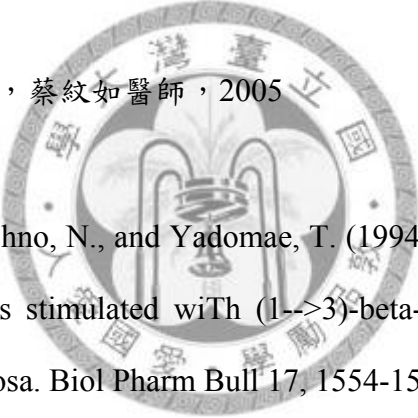
朱家瑜，2007。異位性皮膚炎。

青山敏明，1999。大豆 蛋白質 大豆 生理機能研究。食品 開發. 34(7): 15-17

潘文雄，1996。發酵物妙用多。元氣齋出版社。台北。

康健雜誌，過敏專刊，2009

台大醫院小兒科衛教資訊，蔡紋如醫師，2005



Adachi, Y., Okazaki, M., Ohno, N., and Yadomae, T. (1994). Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1->3)-beta-D-glucan, grifolan (GRN), isolated from *Grifola frondosa*. *Biol Pharm Bull* 17, 1554-1560.

Appleman, L.J., and Boussiotis, V.A. (2003). T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev* 192, 161-180.

Barone, K.S., Jain, S.L., and Michael, J.G. (1995). Effect of in vivo depletion of CD4+ and CD8+ cells on The induction and maintenance of oral tolerance. *Cell Immunol* 163, 19-29.

Barnetson, R.S., and Rogers, M. (2002). Childhood atopic eczema. *BMJ* 324, 1376-1379.

Benyacoub, J., Rochat, F., Saudan, K.Y., Rochat, I., Antille, N., Cherbut, C., von der Weid, T., Schiffrin, E.J., and Blum, S. (2008). Feeding a diet containing a fructooligosaccharide mix can enhance *Salmonella* vaccine efficacy in mice. *J Nutr* 138, 123-129.

Blum, S., Alvarez, S., Haller, D., Perez, P., and Schiffrin, E.J. (1999). Intestinal microflora and The interaction wiTh immunocompetent cells. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76, 199-205.

Boguniewicz, M., and Leung, D.Y. Recent insights into atopic dermatitis and implications for management of infectious complications. *J Allergy Clin Immunol* 125, 4-13; quiz 14-15.



Brandtzaeg, P.E. (2002). Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. *Ann N Y Acad Sci* 964, 13-45.

Breuer, K., Wittmann, M., Bosche, B., Kapp, A., and Werfel, T. (2000). Severe atopic dermatitis is associated wiTh sensitization to staphylococcal enterotoxin B (SEB). *Allergy* 55, 551-555.

Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., Marshall, A.S., and Gordon, S. (2003). Dectin-1 mediates The biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* 197,

1119-1124.

Benyacoub, J., Rochat, F., Saudan, K.Y., Rochat, I., Antille, N., Cherbut, C., von der Weid, T., Schiffrin, E.J., and Blum, S. (2008). Feeding a diet containing a fructooligosaccharide mix can enhance *Salmonella* vaccine efficacy in mice. *J Nutr* 138, 123-129.

Campbell, J.M., Fahey, G.C., Jr., and Wolf, B.W. (1997). Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J Nutr* 127, 130-136.

Cardona, I.D., Goleva, E., Ou, L.S., and Leung, D.Y. (2006). Staphylococcal enterotoxin B inhibits regulatory T cells by inducing glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein ligand on monocytes. *J Allergy Clin Immunol* 117, 688-695.

Chan, S.C., and Hanifin, J.M. (1993). Immunopharmacologic aspects of atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy* 11, 523-541.

Cehade, M., and Mayer, L. (2005). Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol* 115, 3-12; quiz 13.

Cho, S.H., Strickland, I., Boguniewicz, M., and Leung, D.Y. (2001a). Fibronectin and fibrinogen contribute to The enhanced binding of *Staphylococcus aureus* to atopic skin. *J Allergy Clin Immunol* 108, 269-274.

Cho, S.H., Strickland, I., Tomkinson, A., Fehring, A.P., Gelfand, E.W., and Leung,

D.Y. (2001b). Preferential binding of *Staphylococcus aureus* to skin sites of Th2-mediated inflammation in a murine model. *J Invest Dermatol* 116, 658-663.

Chen, H.-M., Muramoto, K. and Yamauchi, F., 1995, Structural analysis of antioxidative peptides from soybean  $\beta$ -conglycinin. *J. Agric. Food Chem.*, 43: 574-578

Chen, Y., Inobe, J., Marks, R., Gonnella, P., Kuchroo, V.K., and Weiner, H.L. (1995a). Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature* 376, 177-180.

Chen, Y., Inobe, J., and Weiner, H.L. (1995b). Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depleted mice: both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells mediate active suppression. *J Immunol* 155, 910-916.

Choi, Y.H., Lim, H., Heo, M.Y., Kwon, D.Y., and Kim, H.P. (2008). Anti-inflammatory activity of The ethanol extract of Chungkukjang, Korean fermented bean: 5-lipoxygenase inhibition. *J Med Food* 11, 539-543.

Commane, D.M., Shortt, C.T., Silvi, S., Cresci, A., Hughes, R.M., and Rowland, I.R. (2005). Effects of fermentation products of pro- and prebiotics on trans-epithelial electrical resistance in an in vitro model of The colon. *Nutr Cancer* 51, 102-109.

de Vrese, M., and Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 111, 1-66.

Doull, I.J., Campbell, M.J., and Holgate, S.T. (1998). Duration of growth suppressive

effects of regular inhaled corticosteroids. *Arch Dis Child* 78, 172-173.

Du, Z., Kelly, E., Mecklenbrauker, I., Agle, L., Herrero, C., Paik, P., and Ivashkiv, L.B. (2006). Selective regulation of IL-10 signaling and function by zymosan. *J Immunol* 176, 4785-4792.

Ebine, H., 1986, Fermented soy bean milk and other fermented legume milk products. In Reddy, N. R., Pierson, M. D. and Salunkhe, D. K. (eds.), "Legume-based fermented foods." CRC Press, Boca Ration, Florida, U.S.A. pp. 47-68.

Esaki, H., Nohara, Y., Onozaki, H., and Osawa, T., 1990, Antioxidative activity of natto. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 37. 474-477.

Fartasch, M. (1997). Epidermal barrier in disorders of The skin. *Microsc Res Tech* 38, 361-372.

Forrest, S., Dunn, K., Elliott, K., Fitzpatrick, E., Fullerton, J., McCarThy, M., Brown, J., Hill, D., and Williamson, R. (1999). Identifying genes predisposing to atopic eczema. *J Allergy Clin Immunol* 104, 1066-1070.

Frias, J., Song, Y.S., Martinez-Villaluenga, C., Gonzalez de Mejia, E., and Vidal-Valverde, C. (2008). Immunoreactivity and amino acid content of fermented soybean products. *J Agric Food Chem* 56, 99-105.

Friedman, A., and Weiner, H.L. (1994). Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6688-6692.

Fujioka, N., Morimoto, Y., Arai, T., and Kikuchi, M. (2004). Discrimination between normal and malignant human gastric tissues by Fourier transform infrared spectroscopy. *Cancer Detect Prev* 28, 32-36.

Fuller, R. (1991). Probiotics in human medicine. *Gut* 32, 439-442.

Garside, P., Steel, M., Liew, F.Y., and Mowat, A.M. (1995). CD4+ but not CD8+ T cells are required for The induction of oral tolerance. *Int Immunol* 7, 501-504.

Geha, R.S. (2003). Allergy and hypersensitivity. Nature versus nurture in allergy and hypersensitivity. *Curr Opin Immunol* 15, 603-608.

Gibson, G.R., and Roberfroid, M.B. (1995). Dietary modulation of The human colonic microbiota: introducing The concept of prebiotics. *J Nutr* 125, 1401-1412.

Girolomoni, G., and Pastore, S. (2001). The role of keratinocytes in The paThogenesis of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 45, S25-28.

Gombert, M., Dieu-Nosjean, M.C., Winterberg, F., Bunemann, E., Kubitza, R.C., Da Cunha, L., Haahtela, A., Lehtimaki, S., Muller, A., Rieker, J., *et al.* (2005). CCL1-CCR8 interactions: an axis mediating The recruitment of T cells and Langerhans-type dendritic cells to sites of atopic skin inflammation. *J Immunol* 174, 5082-5091.

Hamilton-Miller, J.M. (2004). Probiotics and prebiotics in The elderly. *Postgrad Med J* 80, 447-451.

Hattori, T., Ohishi, H., Yokota, T., Ohoami, H. and Watanabe, K., 1995, Antioxidative effect of crude antioxidant preparation from soybean fermented by *Bacillus natto*. *Lebensm.-Wissh. U.- Technol.*, 28. 135-138.

Hanifin, J.M., Chan, S.C., Cheng, J.B., Toft, S.J., Henderson, W.R., Jr., Kirby, D.S., and Weiner, E.S. (1996). Type 4 phosphodiesterase inhibitors have clinical and in vitro anti-inflammatory effects in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 107, 51-56.

Hawrylowicz, C.M., and O'Garra, A. (2005). Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 5, 271-283.

Hessle, C., Hanson, L.A., and Wold, A.E. (1999). Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production. *Clin Exp Immunol* 116, 276-282.

Higgins, P.J., and Weiner, H.L. (1988). Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein and its fragments. *J Immunol* 140, 440-445.

Howell, M.D., Jones, J.F., Kisich, K.O., Streib, J.E., Gallo, R.L., and Leung, D.Y. (2004). Selective killing of vaccinia virus by LL-37: implications for eczema vaccinatum. *J Immunol* 172, 1763-1767.



Hochstetter, R., Dobos, G., Kimmig, D., Dulkys, Y., Kapp, A., and Elsner, J. (2000). The CC chemokine receptor 3 CCR3 is functionally expressed on eosinophils but not on neutrophils. *Eur J Immunol* 30, 2759-2764.

Humen, M.A., De Antoni, G.L., Benyacoub, J., Costas, M.E., Cardozo, M.I., Kozubsky, L., Saudan, K.Y., Boenzli-Bruand, A., Blum, S., Schiffrin, E.J., et al. (2005). *Lactobacillus johnsonii* La1 antagonizes *Giardia intestinalis* in vivo. *Infect Immun* 73, 1265-1269.

Isolauri, E. (1997). Intestinal involvement in atopic disease. *J R Soc Med* 90 *Suppl* 30, 15-20.

Isolauri, E. (2001a). Probiotics in human disease. *Am J Clin Nutr* 73, 1142S-1146S.

Isolauri, E. (2001b). Probiotics in The prevention and treatment of allergic disease. *Pediatr Allergy Immunol* 12 *Suppl* 14, 56-59.

Jung, T., and Stingl, G. (2008). Atopic dermatitis: Therapeutic concepts evolving from new pathophysiologic insights. *J Allergy Clin Immunol* 122, 1074-1081.

Kalliomaki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., and Isolauri, E. (2001). Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357, 1076-1079.

- Kapp, A. (1993). The role of eosinophils in The paThogenesis of atopic dermatitis--eosinophil granule proteins as markers of disease activity. *Allergy* 48, 1-5.
- Kim, K.H., Han, J.H., Chung, J.H., Cho, K.H., and Eun, H.C. (2006). Role of staphylococcal superantigen in atopic dermatitis: influence on keratinocytes. *J Korean Med Sci* 21, 315-323.
- Kullen, M.J., and Bettler, J. (2005). The delivery of probiotics and prebiotics to infants. *Curr Pharm Des* 11, 55-74.
- Leiferman, K.M., Ackerman, S.J., Sampson, H.A., Haugen, H.S., Venencie, P.Y., and Gleich, G.J. (1985). Dermal deposition of eosinophil-granule major basic protein in atopic dermatitis. Comparison wiTh onchocerciasis. *N Engl J Med* 313, 282-285.
- Leung, D.Y., and Bieber, T. (2003). Atopic dermatitis. *Lancet* 361, 151-160.
- Leung, D.Y., Harbeck, R., Bina, P., Reiser, R.F., Yang, E., Norris, D.A., Hanifin, J.M., and Sampson, H.A. (1993). Presence of IgE antibodies to staphylococcal exotoxins on The skin of patients wiTh atopic dermatitis. Evidence for a new group of allergens. *J Clin Invest* 92, 1374-1380.
- Leyden, J.J., and Kligman, A.M. (1977). The case for steroid--antibiotic combinations. *Br J Dermatol* 96, 179-187.
- Leyden, J.J., Marples, R.R., and Kligman, A.M. (1974). Staphylococcus aureus in The lesions of atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 90, 525-530.

Lin, Y.L., Lee, S.S., Hou, S.M., and Chiang, B.L. (2006). Polysaccharide purified from *Ganoderma lucidum* induces gene expression changes in human dendritic cells and promotes T helper 1 immune response in BALB/c mice. *Mol Pharmacol* 70, 637-644.

MarTh, T., Zeitz, Z., Ludviksson, B., Strober, W., and Kelsall, B. (1998). Murine model of oral tolerance. Induction of Fas-mediated apoptosis by blockade of interleukin-12. *Ann N Y Acad Sci* 859, 290-294.

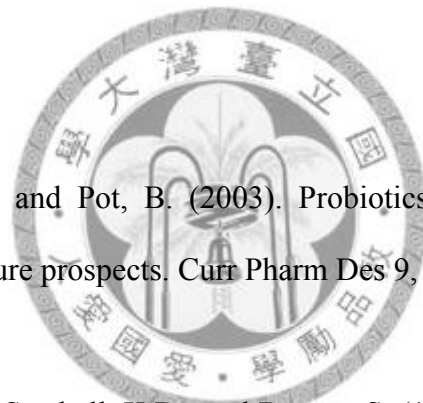
Mayer, L., and Shao, L. (2004). Therapeutic potential of oral tolerance. *Nat Rev Immunol* 4, 407-419.

Mercenier, A., Pavan, S., and Pot, B. (2003). Probiotics as bioTherapeutic agents: present knowledge and future prospects. *Curr Pharm Des* 9, 175-191.

Messina, M.J., Persky, V., Setchell, K.D., and Barnes, S. (1994). Soy intake and cancer risk: a review of The in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer* 21, 113-131.

Miettinen, M., Matikainen, S., Vuopio-Varkila, J., Pirhonen, J., Varkila, K., Kurimoto, M., and Julkunen, I. (1998). Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* 66, 6058-6062.

Morar, N., Cookson, W.O., Harper, J.I., and Moffatt, M.F. (2007). Filaggrin mutations in children wiTh severe atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 127, 1667-1672.



Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., and O'Garra, A. (2001).

Interleukin-10 and The interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19, 683-765.

Mucida, D., Kutchukhidze, N., Erazo, A., Russo, M., Lafaille, J.J., and Curotto de Lafaille, M.A. (2005). Oral tolerance in The absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest* 115, 1923-1933.

Nagata, S., McKenzie, C., Pender, S.L., Bajaj-Elliott, M., Fairclough, P.D., Walker-Smith, J.A., Monteleone, G., and MacDonald, T.T. (2000). Human Peyer's patch T cells are sensitized to dietary antigen and display a Th cell type 1 cytokine profile. *J Immunol* 165, 5315-5321.

Nagler-Anderson, C., Bober, L.A., Robinson, M.E., Siskind, G.W., and Thorbecke, G.J. (1986). Suppression of type II collagen-induced arthritis by intragastric administration of soluble type II collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 7443-7446.

Nagura, T., Hachimura, S., Hashiguchi, M., Ueda, Y., Kanno, T., Kikuchi, H., Sayama, K., and Kaminogawa, S. (2002). Suppressive effect of dietary raffinose on T-helper 2 cell-mediated immunity. *Br J Nutr* 88, 421-426.

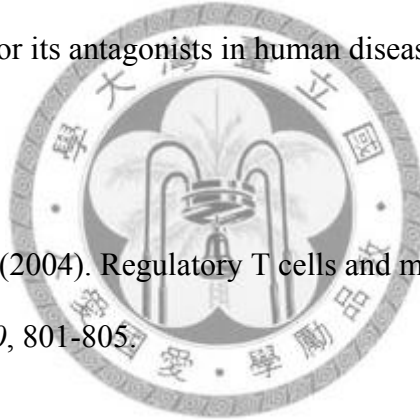
Nomura, T., Sandilands, A., Akiyama, M., Liao, H., Evans, A.T., Sakai, K., Ota, M., Sugiura, H., Yamamoto, K., Sato, H., et al. (2007). Unique mutations in The filaggrin gene in Japanese patients with ichthyosis vulgaris and atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 119, 434-440.

Novak, N., Bieber, T., and Leung, D.Y. (2003). Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 112, S128-139.

Nussenblatt, R.B., Caspi, R.R., Mahdi, R., Chan, C.C., Roberge, F., Lider, O., and Weiner, H.L. (1990). Inhibition of S-antigen induced experimental autoimmune uveoretinitis by oral induction of tolerance with S-antigen. *J Immunol* 144, 1689-1695.

O'Garra, A., Barrat, F.J., Castro, A.G., Vicari, A., and Hawrylowicz, C. (2008). Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunol Rev* 223, 114-131.

O'Garra, A., and Vieira, P. (2004). Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 10, 801-805.



Olson, E.J., Standing, J.E., Griego-Harper, N., Hoffman, O.A., and Limper, A.H. (1996). Fungal beta-glucan interacts with vitronectin and stimulates tumor necrosis factor alpha release from macrophages. *Infect Immun* 64, 3548-3554.

Palframan, R., Gibson, G.R., and Rastall, R.A. (2003). Development of a quantitative tool for The comparison of The prebiotic effect of dietary oligosaccharides. *Lett Appl Microbiol* 37, 281-284.

Palmer, C.N., Irvine, A.D., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S.P.,

Goudie, D.R., Sandilands, A., Campbell, L.E., Smith, F.J., et al. (2006). Common loss-of-function variants of The epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 38, 441-446.

Pastore, S., Fanales-Belasio, E., Albanesi, C., Chinni, L.M., Giannetti, A., and Girolomoni, G. (1997). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is overproduced by keratinocytes in atopic dermatitis. Implications for sustained dendritic cell activation in The skin. *J Clin Invest* 99, 3009-3017.

Perdigon, G., Rachid, M., De Budeguer, M.V., and Valdez, J.C. (1994). Effect of yogurt feeding on The small and large intestine associated lymphoid cells in mice. *J Dairy Res* 61, 553-562.

Peron, J.P., de Oliveira, A.P., and Rizzo, L.V. (2009). It takes guts for tolerance: The phenomenon of oral tolerance and The regulation of autoimmune response. *Autoimmun Rev* 9, 1-4.

Reddy, N.R., Pierson, M.D., SaThe, S.K., and Salunkhe, D.K. (1982). Legume-based fermented foods: Their preparation and nutritional quality. *Crit Rev Food Sci Nutr* 17, 335-370.

Roncarolo, M.G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., and Levings, M.K. (2006). Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212, 28-50.

RoThe, M.J., and Grant-Kels, J.M. (1996). Atopic dermatitis: an update. *J Am Acad Dermatol* 35, 1-13; quiz 14-16.

Saraiva, M., and O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 10, 170-181.

Saito, K., Yajima, T., Nishimura, H., Aiba, K., Ishimitsu, R., Matsuguchi, T., Fushimi, T., Ohshima, Y., Tsukamoto, Y., and Yoshikai, Y. (2003). Soluble branched beta-(1,4)glucans from *Acetobacter* species show strong activities to induce interleukin-12 in vitro and inhibit T-helper 2 cellular response with immunoglobulin E production in vivo. *J Biol Chem* 278, 38571-38578.

Sakai, K., Fujii, N., and Chukeatirote, E. (2006). Racemization of l-lactic acid in pH-swing open fermentation of kitchen refuse by selective proliferation of *Lactobacillus plantarum*. *J Biosci Bioeng* 102, 227-232.

Sampson, H.A. (2003). The evaluation and management of food allergy in atopic dermatitis. *Clin Dermatol* 21, 183-192.

Sanderson, I.R. (2007). Dietary modulation of GALT. *J Nutr* 137, 2557S-2562S.

Simon, D., BraaThen, L.R., and Simon, H.U. (2004). Eosinophils and atopic dermatitis. *Allergy* 59, 561-570.

Spanhaak, S., Havenaar, R., and Schaafsma, G. (1998). The effect of consumption of

milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on The intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur J Clin Nutr* 52, 899-907.

Spergel, J.M., Mizoguchi, E., Brewer, J.P., Martin, T.R., Bhan, A.K., and Geha, R.S. (1998). Epicutaneous sensitization with protein antigen induces localized allergic dermatitis and hyperresponsiveness to methacholine after single exposure to aerosolized antigen in mice. *J Clin Invest* 101, 1614-1622.

Spergel, J.M., and Paller, A.S. (2003). Atopic dermatitis and The atopic march. *J Allergy Clin Immunol* 112, S118-127.

Strickland, I., Hauk, P.J., Trumble, A.E., Picker, L.J., and Leung, D.Y. (1999). Evidence for superantigen involvement in skin homing of T cells in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 112, 249-253.

Sudo, N., Sawamura, S., Tanaka, K., Aiba, Y., Kubo, C., and Koga, Y. (1997). The requirement of intestinal bacterial flora for The development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *J Immunol* 159, 1739-1745.

Suzuki, Y., Adachi, Y., Ohno, N., and Yadomae, T. (2001). Th1/Th2-Balancing immunomodulating activity of gel-forming (1 $\rightarrow$ 3)-beta-glucans from fungi. *Biol Pharm Bull* 24, 811-819.

Trautmann, A., Akdis, M., Kleemann, D., Altnauer, F., Simon, H.U., Graeve, T., Noll, M., Brocker, E.B., Blaser, K., and Akdis, C.A. (2000). T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis. *J Clin*



Invest 106, 25-35.

Tzianabos, A.O. (2000). Polysaccharide immunomodulators as Therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clin Microbiol Rev* 13, 523-533.

Verhagen, J., Akdis, M., Traidl-Hoffmann, C., Schmid-Grendelmeier, P., Hijnen, D., Knol, E.F., Behrendt, H., Blaser, K., and Akdis, C.A. (2006). Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. *J Allergy Clin Immunol* 117, 176-183.

Volman, J.J., Ramakers, J.D., and Plat, J. (2008). Dietary modulation of immune function by beta-glucans. *Physiol Behav* 94, 276-284.

Wakita, H., Sakamoto, T., Tokura, Y., and Takigawa, M. (1994). E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 as critical adhesion molecules for infiltration of T lymphocytes and eosinophils in atopic dermatitis. *J Cutan PaThol* 21, 33-39.

Wang, Y.C., Yu, R.C., and Chou, C.C. (2006). Antioxidative activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol* 23, 128-135.

Watanabe, S., Narisawa, Y., Arase, S., Okamatsu, H., Ikenaga, T., Tajiri, Y., and Kumemura, M. (2003). Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. *J Allergy Clin Immunol* 111, 587-591.

Wedi, B., Raap, U., and Kapp, A. (1999). Significant delay of apoptosis and Fas resistance in eosinophils of subjects with intrinsic and extrinsic type of atopic

dermatitis. *Int Arch Allergy Immunol* 118, 234-235.

Werfel, T. (2009). The role of leukocytes, keratinocytes, and allergen-specific IgE in The development of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 129, 1878-1891.

Whitacre, C.C., Gienapp, I.E., Orosz, C.G., and Bitar, D.M. (1991). Oral tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. III. Evidence for clonal anergy. *J Immunol* 147, 2155-2163.

Williams, D.L. (1997). Overview of (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan immunobiology. *Mediators Inflamm* 6, 247-250.

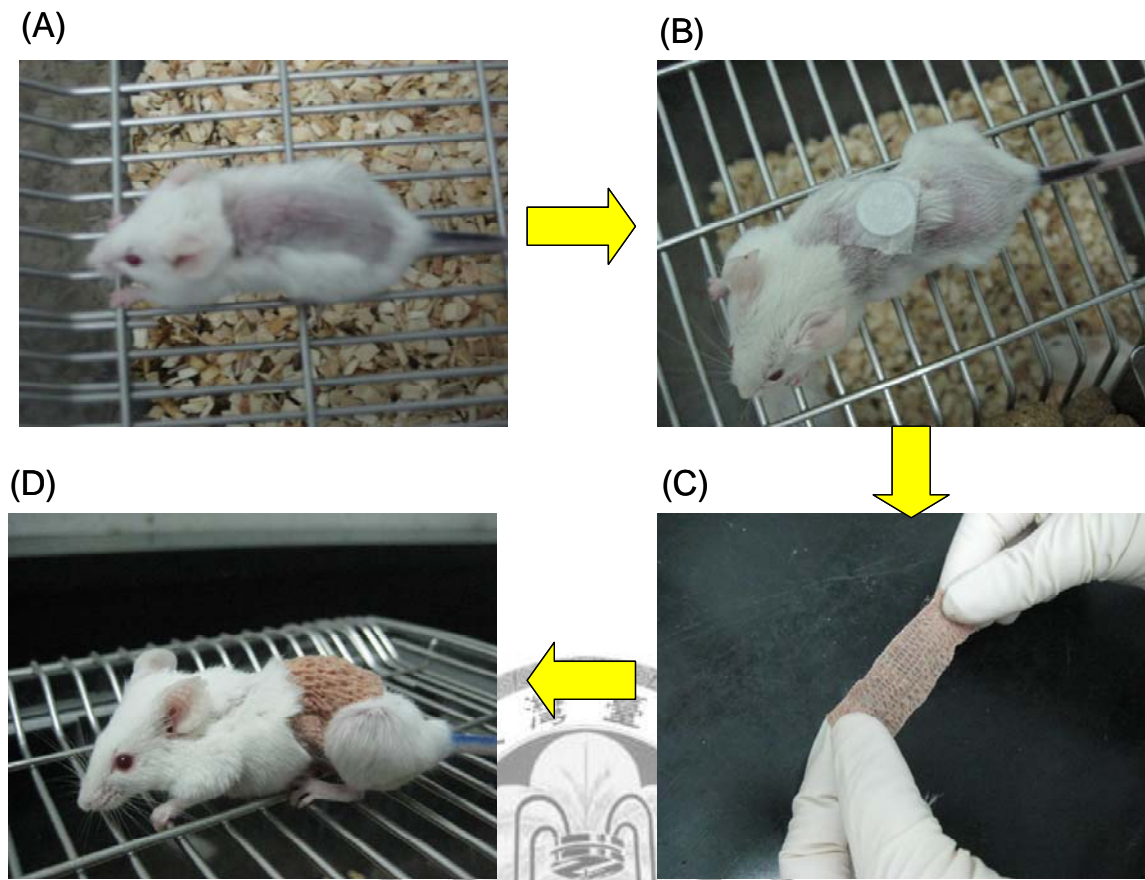
Williams, H. (2002). New treatments for atopic dermatitis. *BMJ* 324, 1533-1534.

Wood, B. J. B., 1998, Protein-rich foods based on fermented vegetable. In Wood, B. J. B., (ed.), "Microbiology of fermented foods", vol. 2, Blackie A & P, London, pp. 484-504.

Yamauchi, F., Suetsuna, K., 1993, Immunological effects of dietary peptide derived from soybean protein. *J. Nutr. Biochem.* 4:450-457.

Young, S.H., Ye, J., Frazer, D.G., Shi, X., and Castranova, V. (2001). Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha production in 1 $\rightarrow$ 3-beta-glucan (zymosan)-activated macrophages. *J Biol Chem* 276, 20781-20787.

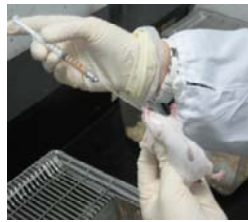
Zekovic, D.B., Kwiatkowski, S., Vrvic, M.M., Jakovljevic, D., and Moran, C.A. (2005). Natural and modified (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucans in health promotion and disease alleviation. *Crit Rev Biotechnol* 25, 205-230.



圖一、異位性皮膚炎的建立

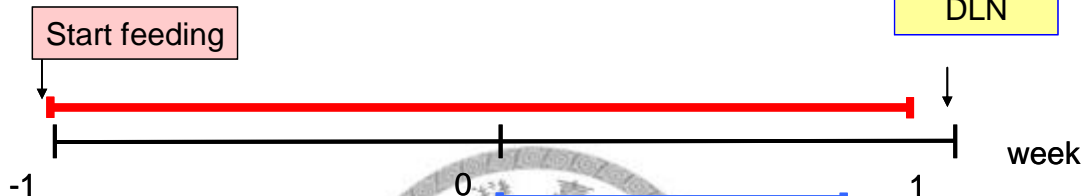
主要是以經皮致敏(Epicutaneous sensitization)的方式來建立。(A)先將老鼠背部的毛剃除。(B)再以雞卵蛋白 Ovalbumin (OVA)用量:100mg/ml、20ul/patch;加於貼布膠帶(finn chambers)後貼附於老鼠背上。(C)(D)利用止血繃帶加以固定。以每天換藥的方式，連續五天的貼皮致敏，之後須休息兩個禮拜，為一個循環，必須進行三個循環。

N=5	immunize	feeding
(A) Negative	PBS	X
(B) Positive	Ovalbumin (OVA)	X
(C) SCLFP	Ovalbumin (OVA)	SCLFP
(D) Yeast	Ovalbumin (OVA)	Yeast
(E) H2O	Ovalbumin (OVA)	H2O



SCLFP、yeast : 150 mg/ml、200  $\mu$ l / mice  
H2O: 200  $\mu$ l / mice

**Sacrifice**  
取serum,  
DLN



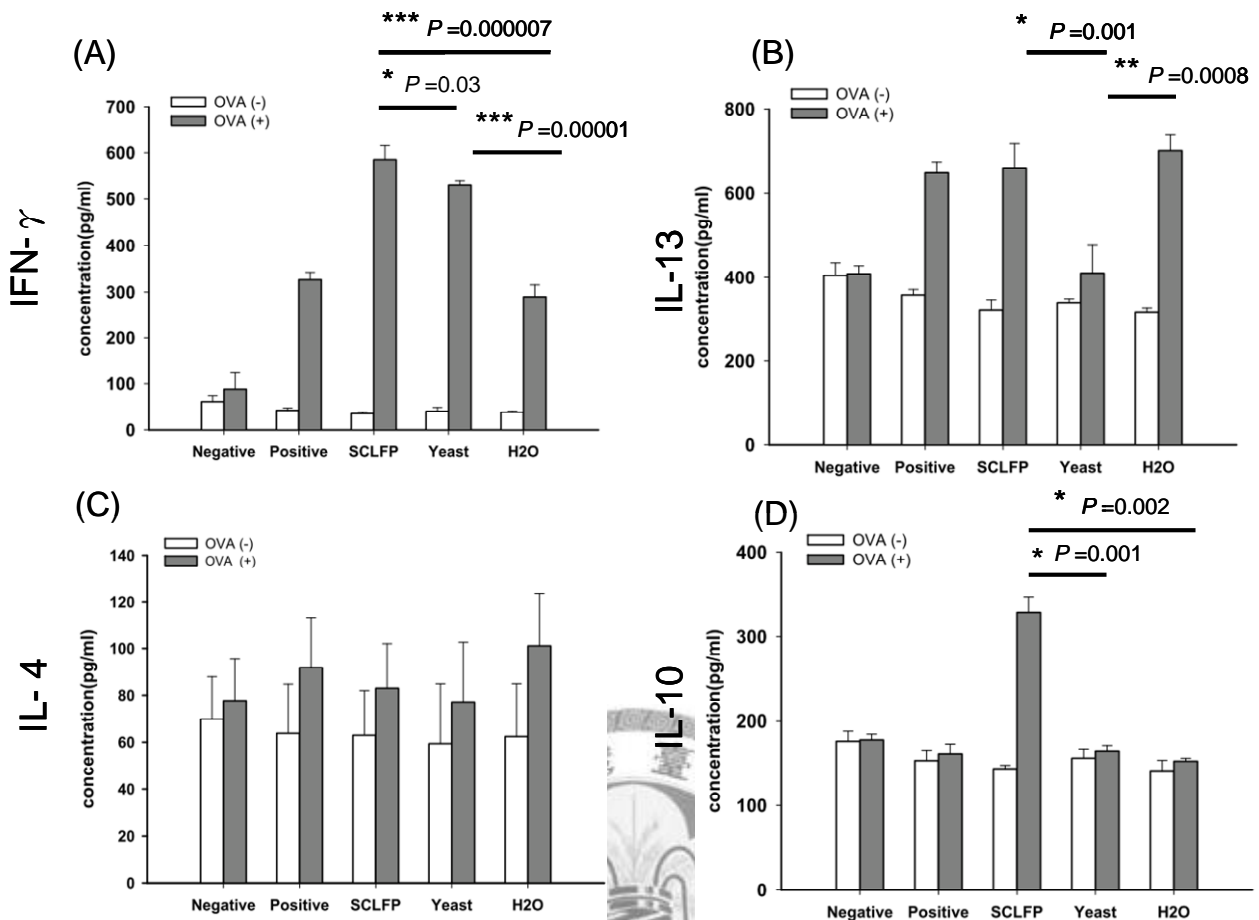
1st immunization  
貼皮 d1~d5



PBS : 20  $\mu$ l/patch  
OVA : 100mg/ml、20  $\mu$ l/patch

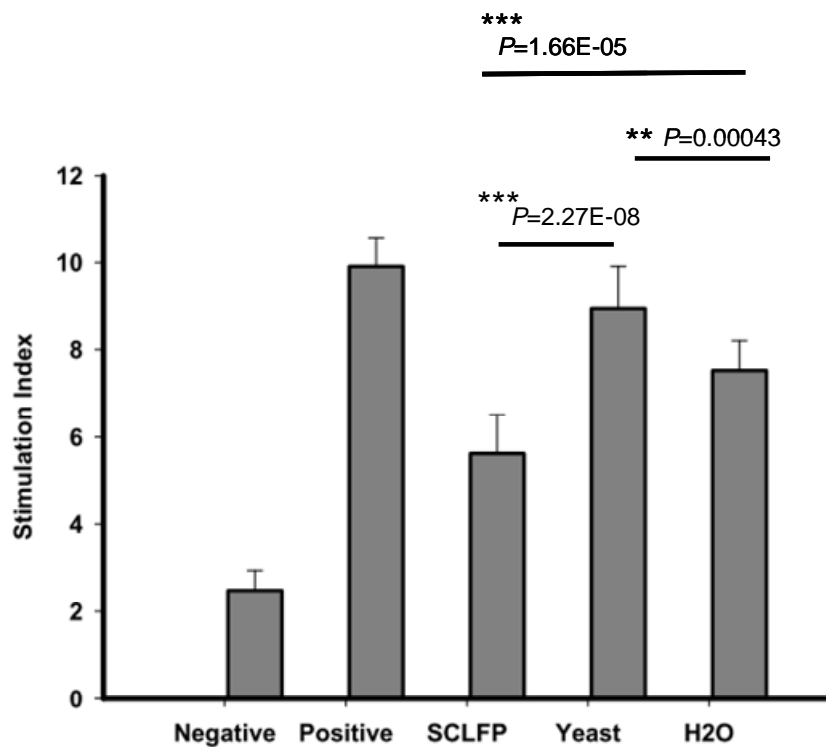
## 圖二、異位性皮膚炎之誘導期實驗設計

使用 5-8 週齡的 BALB/c 小鼠，每組有 5 隻老鼠。分組如下：(A)Negative 組：貼膚致敏的藥劑為 PBS，沒有進行餵食。(B)Positive 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，沒有進行餵食。(C)SCLFP 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行豆類發酵產物的餵食。(D)Yeast 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行酵母菌的餵食。(E) H2O 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行二次水的餵食。從 6 周大開始進行餵食，餵食的動作會一直持續到老鼠犧牲時，在餵食一個禮拜後，開始進行連續五天的貼皮致敏，老鼠在致敏後一星期犧牲。



圖三、偵測誘導期的浸潤淋巴結以 OVA 刺激後分泌細胞激素的情形

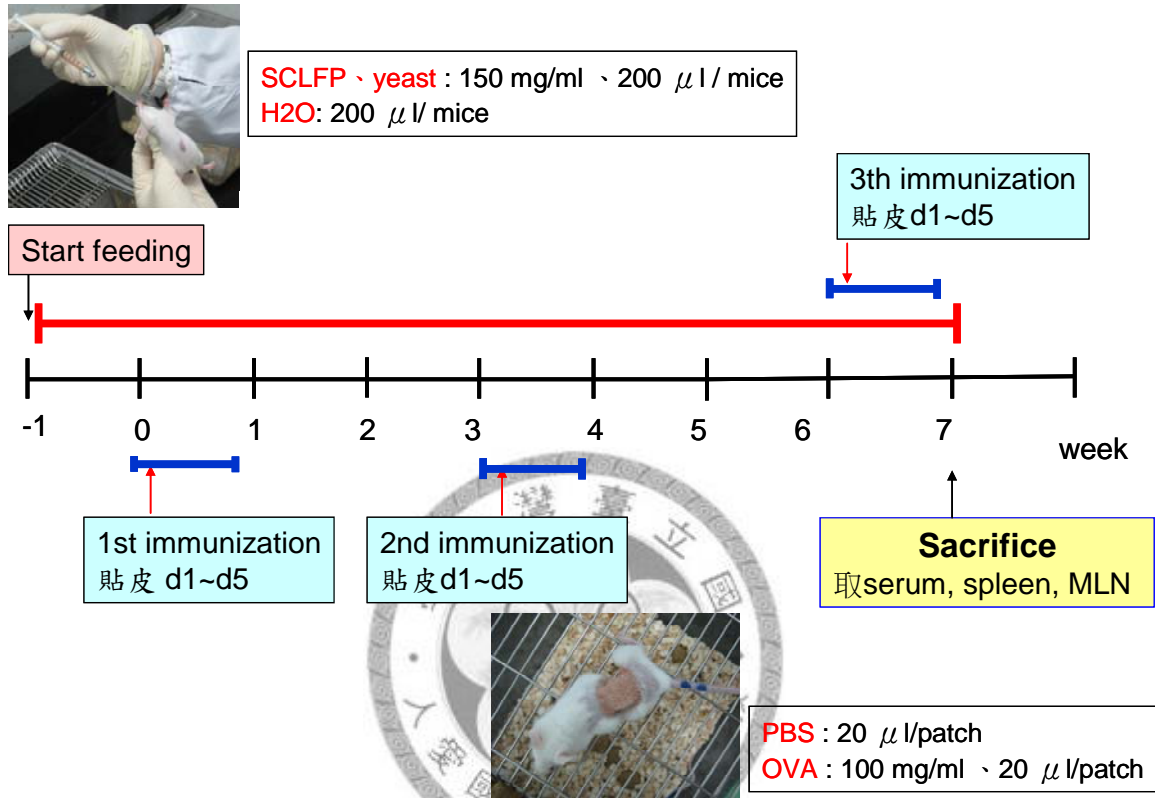
利用 ELISA 來測定有無以 OVA 刺激浸潤淋巴結的細胞，培養 48hr 後，所分泌的細胞激素(A)IFN- $\gamma$ 。(B)IL-13。(C)IL-4。(D)IL-10。\*代表統計學上  $P$  值 $<0.05$ ，\*\*代表  $P$  值 $<0.001$ ，\*\*\*代表統計學上  $P$  值 $<0.0001$ 。



圖四、偵測誘導期的浸潤淋巴結以 OVA 刺激後細胞增生的情形

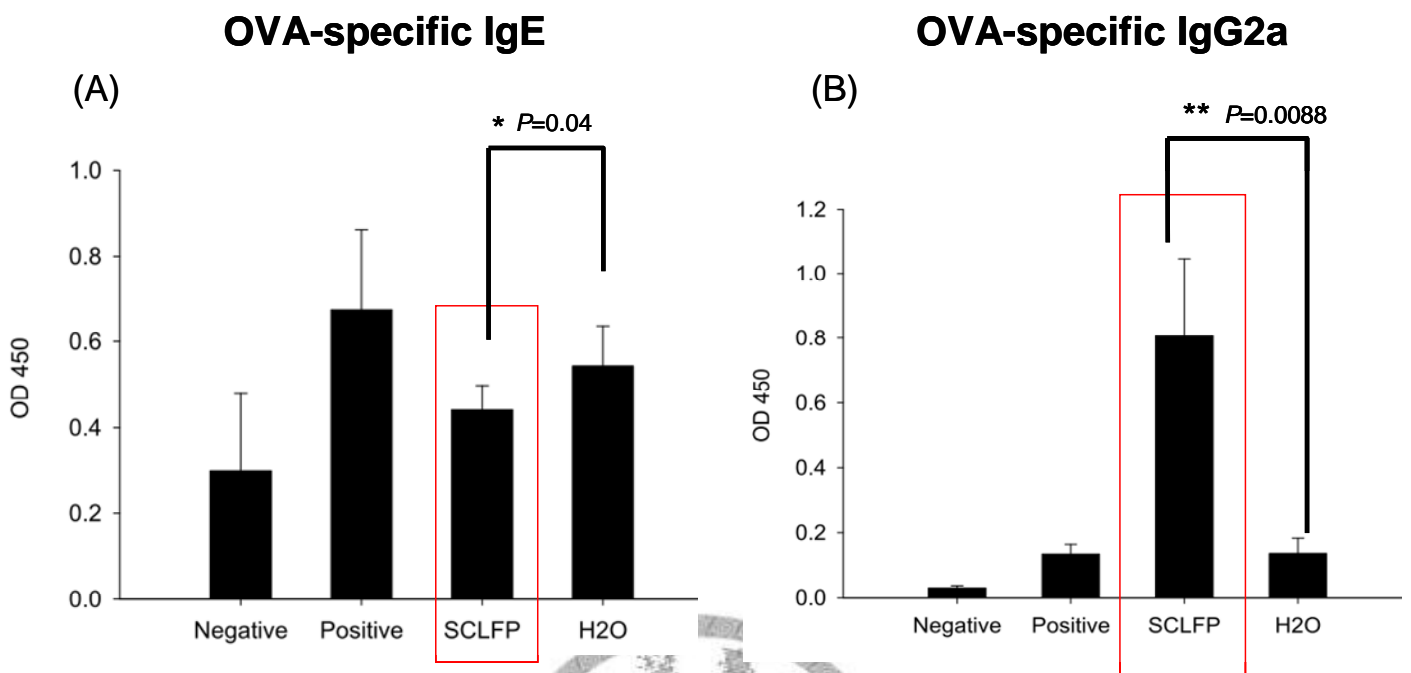
將老鼠犧牲後取出浸潤淋巴結，以有無加 OVA 兩個條件進行細胞培養 48hr 後，加入 isotopes $[H^3]$ thymidine Incorporation 培養 16hr，以記數儀器進行放射線計數。圖示以有加 OVA 的細胞增生結果 cpm 值除以沒有以 OVA 培養的組別，所得到增生的倍數， $\text{stimulation indexes} = \frac{[H^3]\text{thymidine Incorporation (cpm)}}{\text{unstimulated cells}}$ 。\*代表統計學上  $P$  值 $<0.05$ ，\*\*代表  $P$  值 $<0.001$ ，\*\*\*代表統計學上  $P$  值 $<0.0001$ 。

N=6	immunize	feeding
(A) Negative	PBS	X
(B) Positive	Ovalbumin (OVA)	X
(C) SCLFP	Ovalbumin (OVA)	SCLFP
(D) Yeast	Ovalbumin (OVA)	Yeast
(E) H2O	Ovalbumin (OVA)	H2O



圖五、異位性皮膚炎之作用期實驗設計

使用 5-8 週齡的 BALB/c 小鼠，每組有 6~10 隻老鼠。分組如下：(A)Negative 組：貼膚致敏的藥劑為 PBS，沒有進行餵食。(B)Positive 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，沒有進行餵食。(C)SCLFP 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行豆類發酵產物的餵食。(D)Yeast 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行酵母菌的餵食。(E) H2O 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行二次水的餵食。從 6 周大開始進行餵食，餵食的動作會一直持續到老鼠犧牲時，在餵食一個禮拜後，開始進行連續五天的貼皮致敏，之後須休息兩個禮拜，為一個循環，必須進行三個循環，老鼠在最後一次貼皮致敏後一星期犧牲。

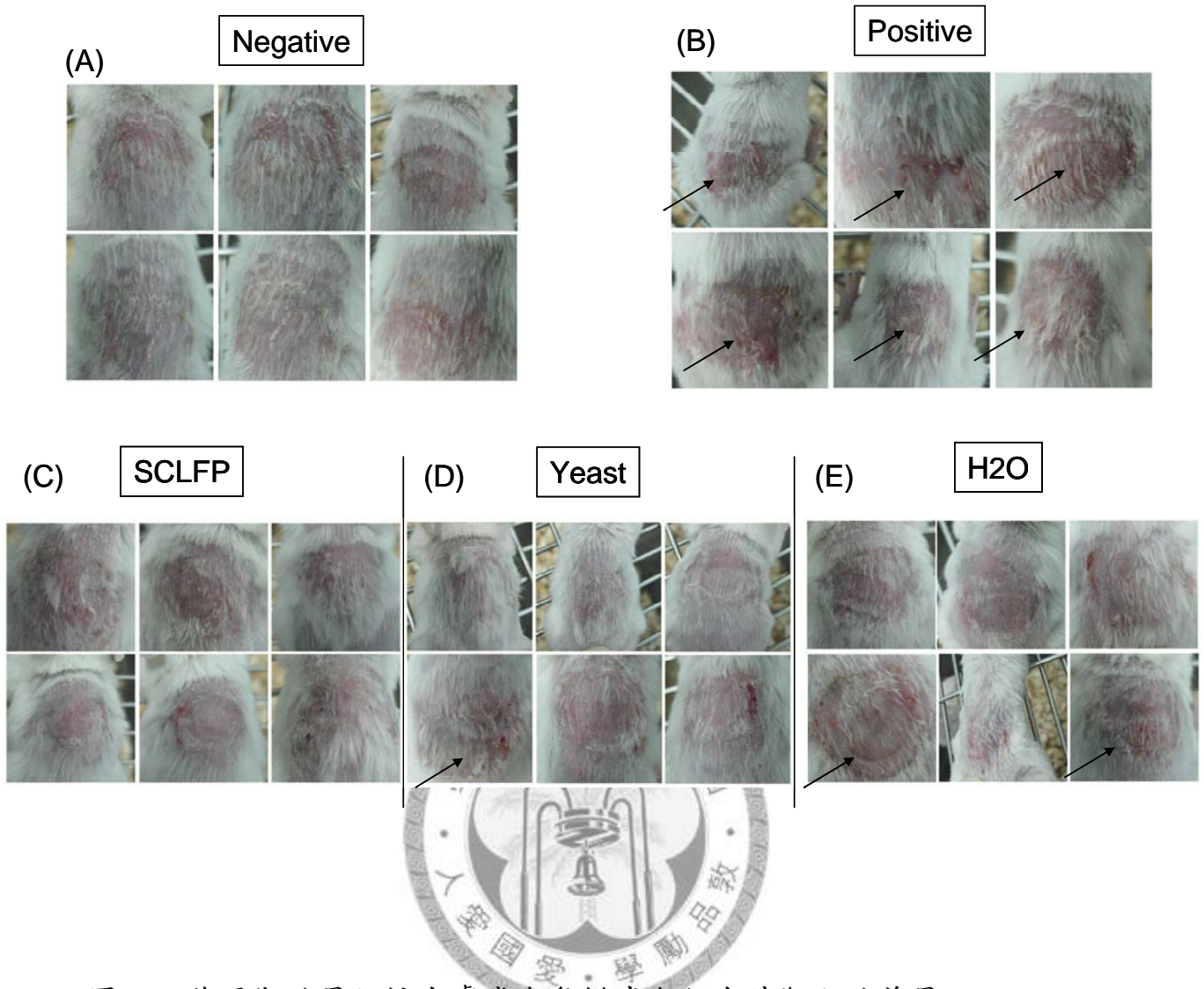


圖六、偵測作用期的老鼠血清中抗 OVA 特異性抗體

利用 ELISA 來測定老鼠血清中抗 OVA 特異性抗體在餵食豆類發酵產物後是否有差異。以血清連續 10 倍稀釋的方式來偵測 OD450 的值，並取 OD450 值為 1.0 以內的結果來進行比較。(A)抗 OVA 特異性抗體 IgE。(B)抗 OVA 特異性抗體 IgG2a。

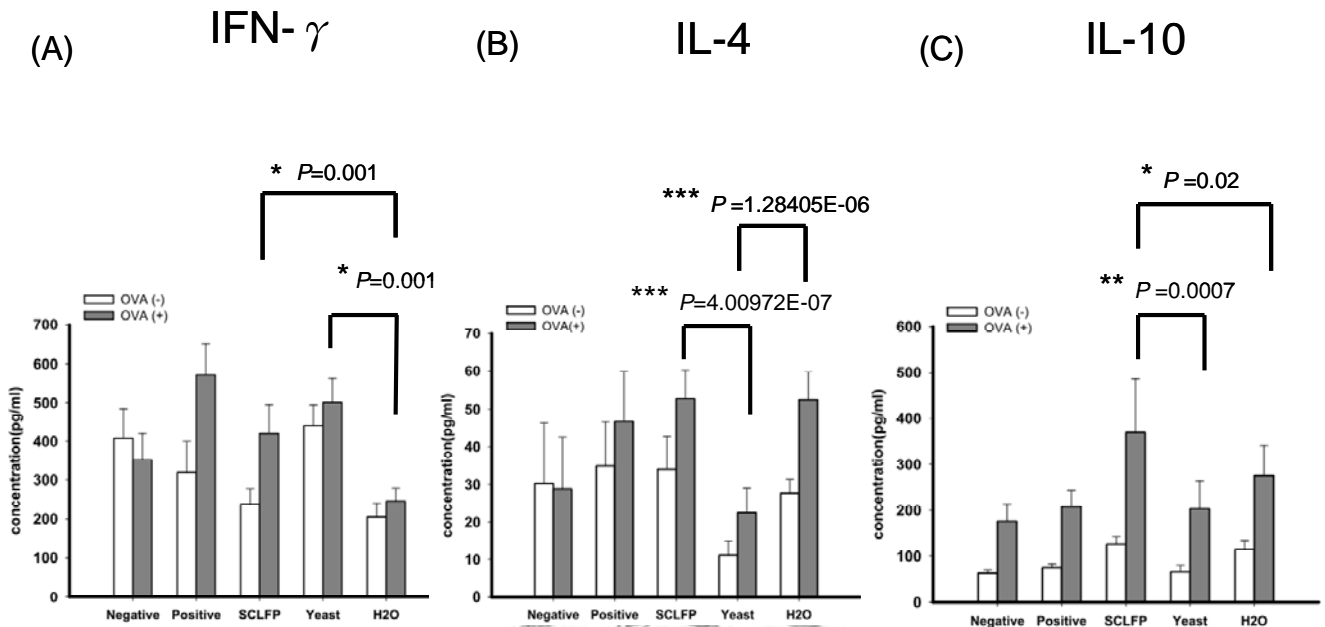
\*代表統計學上  $P$  值 $<0.05$ ，\*\*代表  $P$  值 $<0.001$ ，\*\*\*代表統計學上  $P$  值 $<0.0001$ 。





圖七、作用期的異位性皮膚炎老鼠模式各組在外觀上的差異

在進行貼皮致敏三個循環後，老鼠犧牲前的皮膚狀況。分組如下：(A)Negative組：貼膚致敏的藥劑為 PBS，沒有進行餵食。(B)Positive組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，沒有進行餵食。(C)SCLFP組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行豆類發酵產物的餵食。(D)Yeast組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行酵母菌的餵食。(E) H2O組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行二次水的餵食。箭頭所指為明顯的紅腫傷口。



圖八、偵測作用期的脾臟細胞以 OVA 刺激後分泌細胞激素的情形

利用 ELISA 來測定有無以 OVA 刺激脾臟細胞，培養 48hr 後，所分泌的細胞激素。

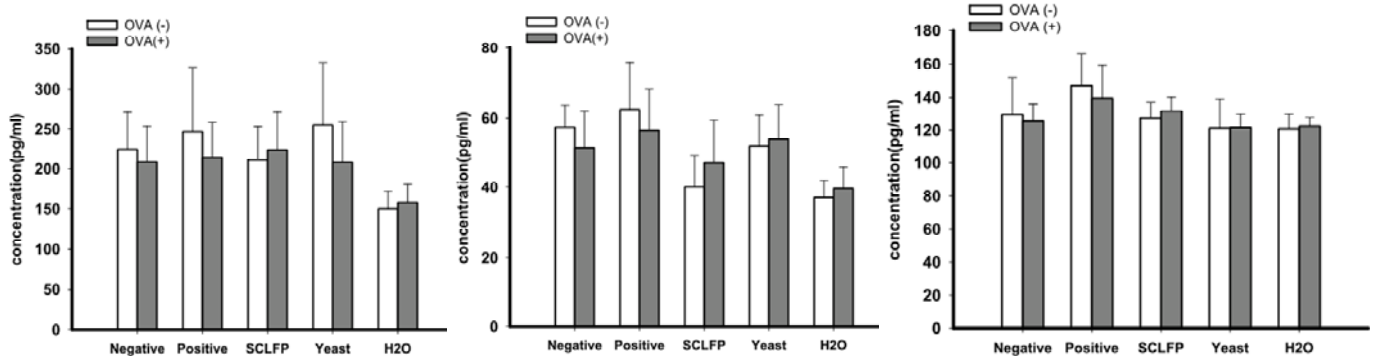
脾臟細胞(A)IFN- $\gamma$ 。(B)IL-4。(C)IL-10。\*代表統計學上  $P$  值 $<0.05$ ，\*\*代表  $P$  值

$<0.001$ ，\*\*\*代表統計學上  $P$  值 $<0.0001$ 。

(A) IFN- $\gamma$

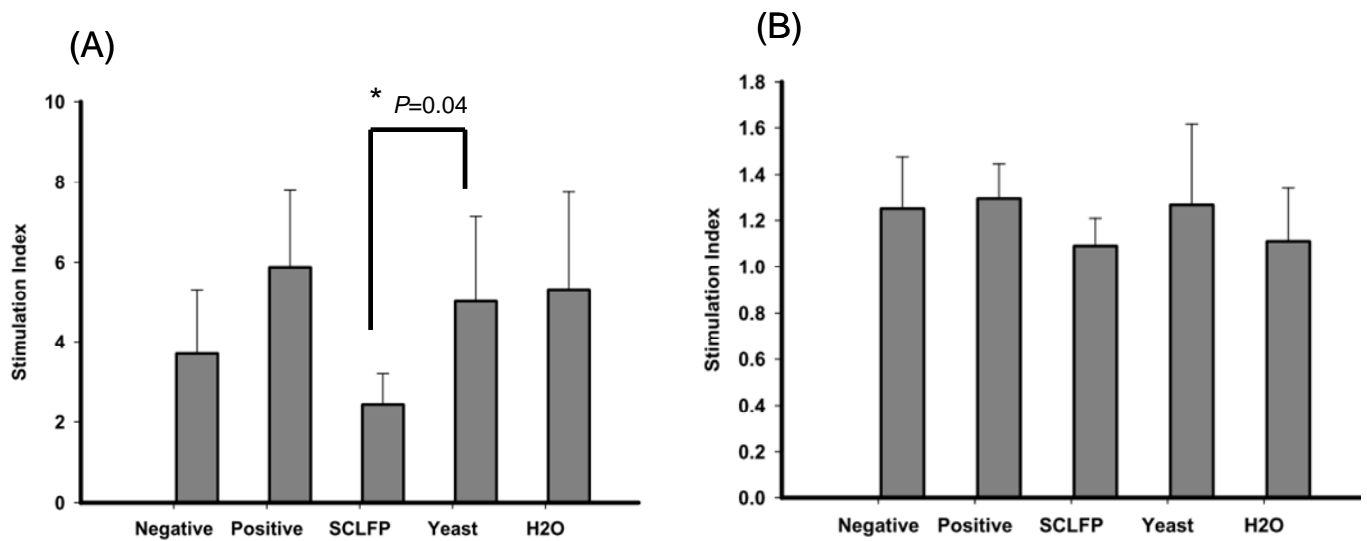
(B) IL-4

(C) IL-10



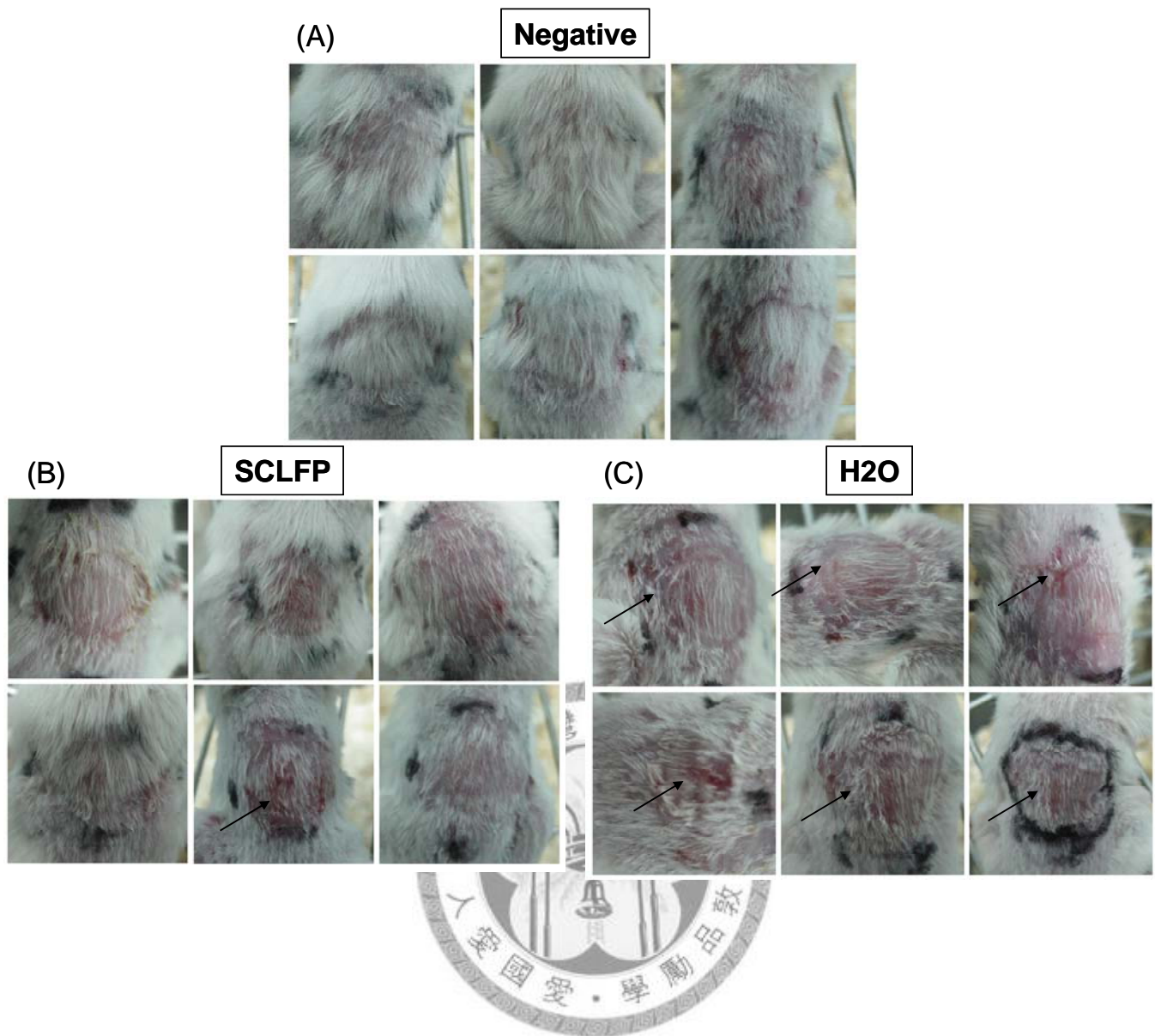
圖九、偵測作用期的腸繫膜淋巴結細胞以 OVA 刺激後分泌細胞激素的情形

利用 ELISA 來測定有無以 OVA 刺激腸繫膜淋巴結的細胞，培養 48hr 後，所分泌的細胞激素。腸繫膜淋巴結的細胞 (A)IFN- $\gamma$ 。(B)IL-4。(C)IL-10。\*代表統計學上  $P$  值 $<0.05$ ，\*\*代表  $P$  值 $<0.001$ ，\*\*\*代表統計學上  $P$  值 $<0.0001$ 。



圖十、偵測作用期的脾臟細胞及腸繫膜淋巴結以 OVA 刺激後細胞增生的情形

將老鼠犧牲後取出脾臟細胞及腸繫膜淋巴結細胞，以有無加 OVA 兩個條件進行細胞培養 48hr 後，加入 isotopes  $[H^3]$ thymidine Incorporation 培養 16hr，以記數儀器進行放射線計數。圖示以有加 OVA 的細胞增生結果 cpm 值除以沒有以 OVA 培養的組別，所得到增生的倍數， $\text{stimulation indexes} = [H^3]\text{thymidine Incorporation (cpm)} / \text{unstimulated cells}$ 。(A)脾臟細胞以 OVA 刺激後增生情形(B)腸繫膜淋巴結細胞以 OVA 刺激後增生情形。\*代表統計學上  $P$  值  $< 0.05$ ，\*\*代表  $P$  值  $< 0.001$ ，\*\*\*代表統計學上  $P$  值  $< 0.0001$ 。



圖十一、作用期的異位性皮膚炎老鼠模式加上金黃色葡萄球菌腸毒素 B

(*Staphylococcal enterotoxin B*) 各組在外觀上的差異

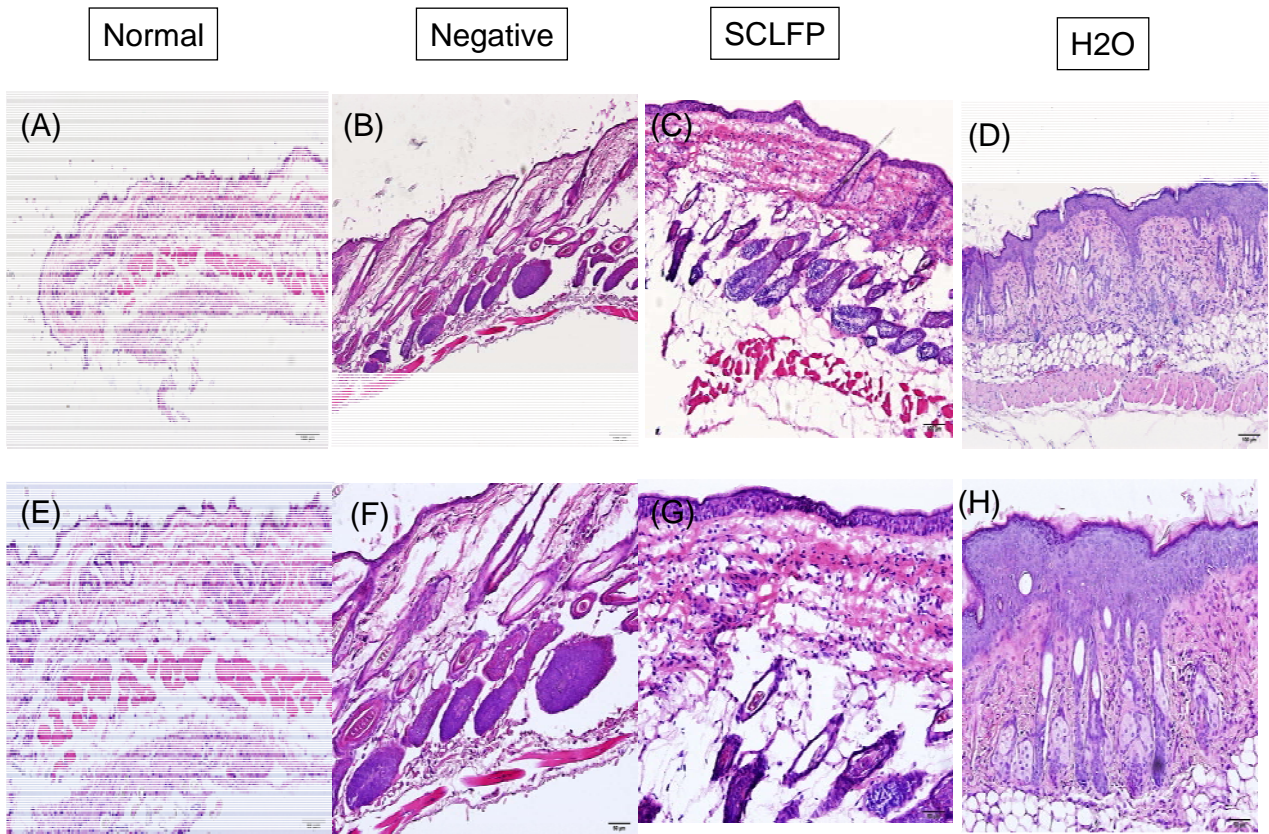
為了增強免疫反應的差異，在藥劑的部分添加了金黃色葡萄球菌腸毒素 B (SEB)。

在進行貼皮致敏三個循環後，老鼠犧牲前的皮膚狀況。分組如下：(A)Negative 組：貼

膚致敏的藥劑為 PBS+SEB，沒有進行餵食。(B) SCLFP 組：貼膚致敏的藥劑為

OVA+SEB，進行豆類發酵產物的餵食。(C) H2O 組：貼膚致敏的藥劑為

OVA+SEB，進行二次水的餵食。箭頭所指為明顯的紅腫傷口。



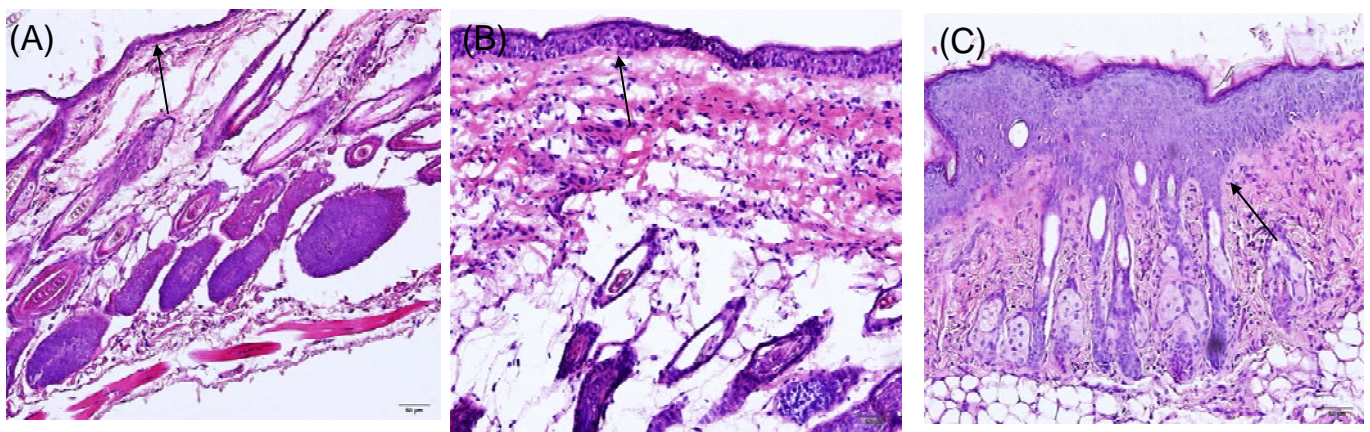
圖十二、作用期的異位性皮膚炎老鼠模式加上金黃色葡萄球菌腸毒素 B (*Staphylococcal enterotoxin B*) H&E stain 在各組皮膚上的差異

為了增強免疫反應的差異，在藥劑的部分添加了金黃色葡萄球菌腸毒素 B (SEB)。在進行貼皮致敏三個循環後，老鼠犧牲前的皮膚狀況。以 Haematoxylin(紫色) & Eosin(紅色)進行皮膚的組織染色，分組如下：(A) 100 倍視野下(E) 200 倍視野下 Normal 組：為沒有做任何處理的老鼠皮膚。(B) 100 倍視野下(F) 200 倍視野下 Negative 組：貼膚致敏的藥劑為 PBS+SEB，沒有進行餵食。(C) 100 倍視野下(G) 200 倍視野下 SCLFP 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA+SEB，進行豆類發酵產物的餵食。(D) 100 倍視野下(H) 200 倍視野下 H2O 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA+SEB，進行二次水的餵食。

Mild :10  $\mu$ m~20  $\mu$ m

Moderate :20  $\mu$ m~50  $\mu$ m

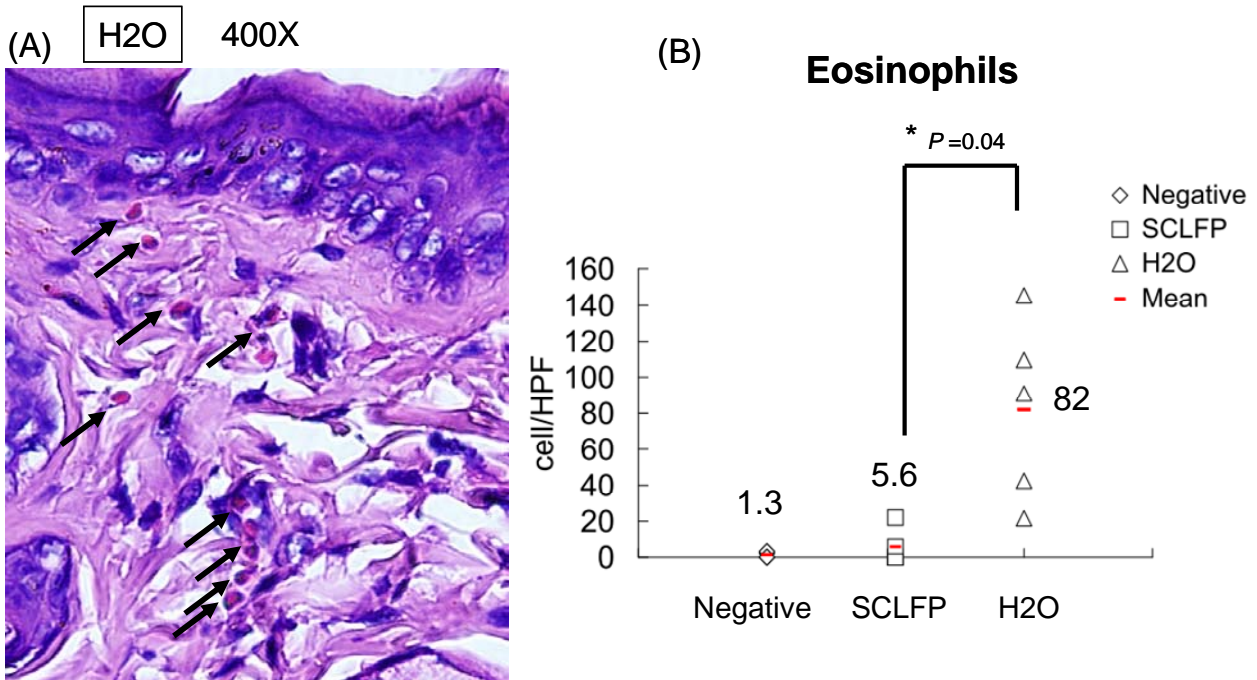
Severe : > 50  $\mu$ m



N=5	Mild	Moderate	Severe
Negative	4	1	0
SCLFP	2	2	1
H2O	0	2	3

圖十三、作用期的異位性皮膚炎老鼠模式加上金黃色葡萄球菌腸毒素 B (*Staphylococcal enterotoxin B*) H&E stain 在各組皮膚上的差異加以量化統計

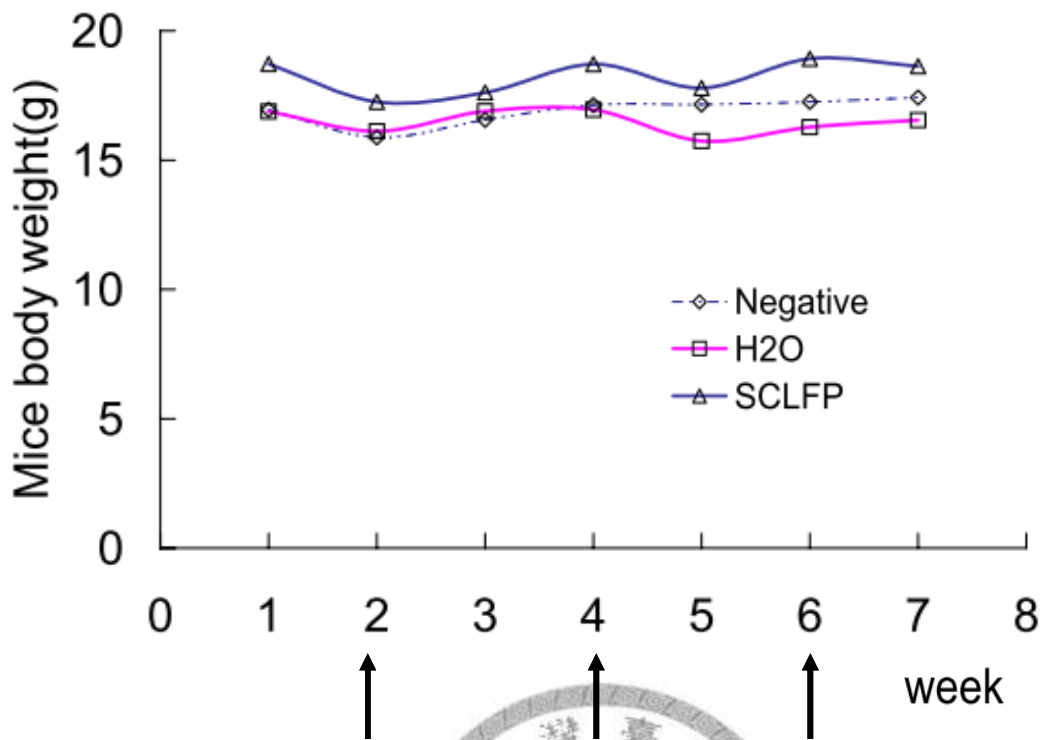
為了增強免疫反應的差異，在藥劑的部分添加了金黃色葡萄球菌腸毒素 B (SEB)。在進行貼皮致敏三個循環後，老鼠犧牲前的皮膚狀況。以 Haematoxylin(紫色) & Eosin(紅色)進行皮膚的組織染色，每組 n=5，分組如下：(A)Negative 組：貼膚致敏的藥劑為 PBS+SEB，沒有進行餵食。(B) SCLFP 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA+SEB，進行豆類發酵產物的餵食。(C) H2O 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA+SEB，進行二次水的餵食。以表皮的厚度來加以量化皮膚發炎的程度，分別是：(輕度) Mild :10 $\mu$ m~20 $\mu$ m，(中度)Moderate :20 $\mu$ m~50 $\mu$ m，(重度)Severe : > 50 $\mu$ m。



圖十四、作用期的異位性皮膚炎老鼠模式加上金黃色葡萄球菌腸毒素 B (*Staphylococcal enterotoxin B*) 在各組皮膚上發炎細胞 Eosinophils 浸潤的差異加以量化統計

圖(A)為 H2O 組: 貼膚致敏的藥劑為 OVA+SEB, 進行二次水的餵食。在 400 倍視野下顯示發炎細胞 Eosinophils 的情形, 箭頭所指即為發炎細胞 Eosinophils。圖(B)為在高倍視野下(400 倍)在各組出現發炎細胞 Eosinophils 的個數, 及其平均值。每組 n=5, 分組如下: (A)Negative 組: 貼膚致敏的藥劑為 PBS+SEB, 沒有進行餵食。(B) SCLFP 組: 貼膚致敏的藥劑為 OVA+SEB, 進行豆類發酵產物的餵食。(C) H2O 組: 貼膚致敏的藥劑為 OVA+SEB, 進行二次水的餵食。\*代表統計學上 P 值<0.05, \*\*代表 P 值<0.001, \*\*\*代表統計學上 P 值<0.0001。





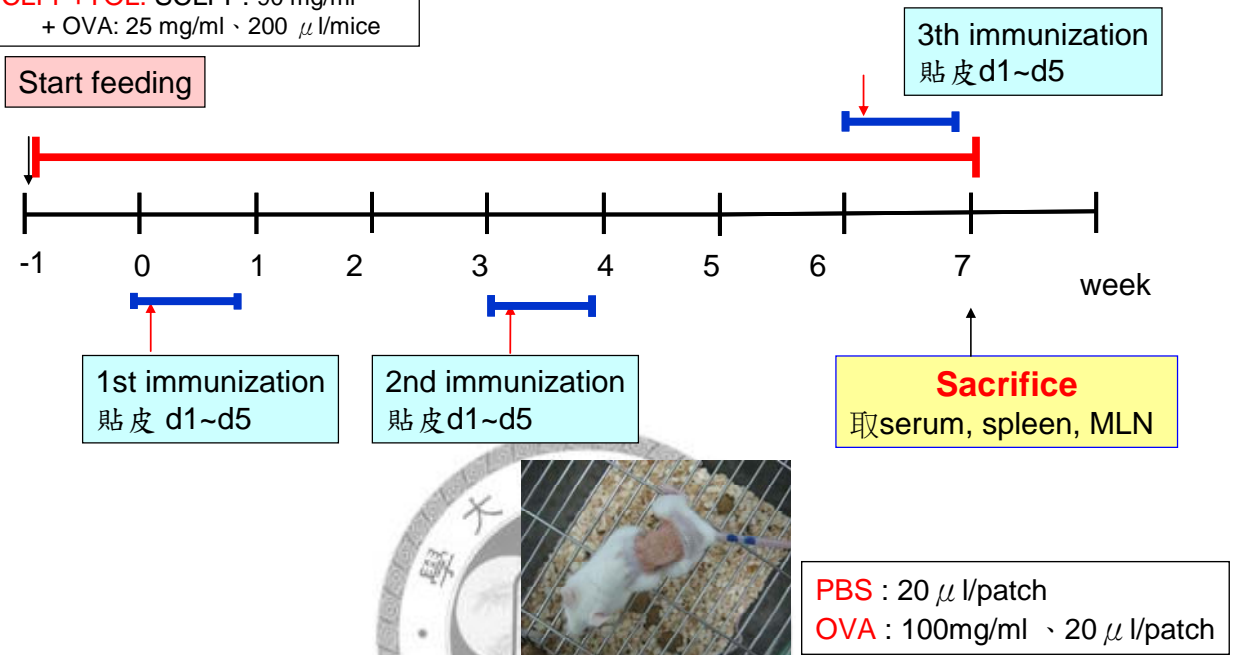
圖十五、作用期的異位性皮膚炎老鼠模式加上金黃色葡萄球菌腸毒素 B (*Staphylococcal enterotoxin B*)體重的變化

老鼠分組如下：(A)Negative 組：貼膚致敏的藥劑為 PBS+SEB，沒有進行餵食。(B) SCLFP 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA+SEB，進行豆類發酵產物的餵食。(C) H2O 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA+SEB，進行二次水的餵食。從第一周開始餵食，箭頭所指為進行貼膚致敏的週數。



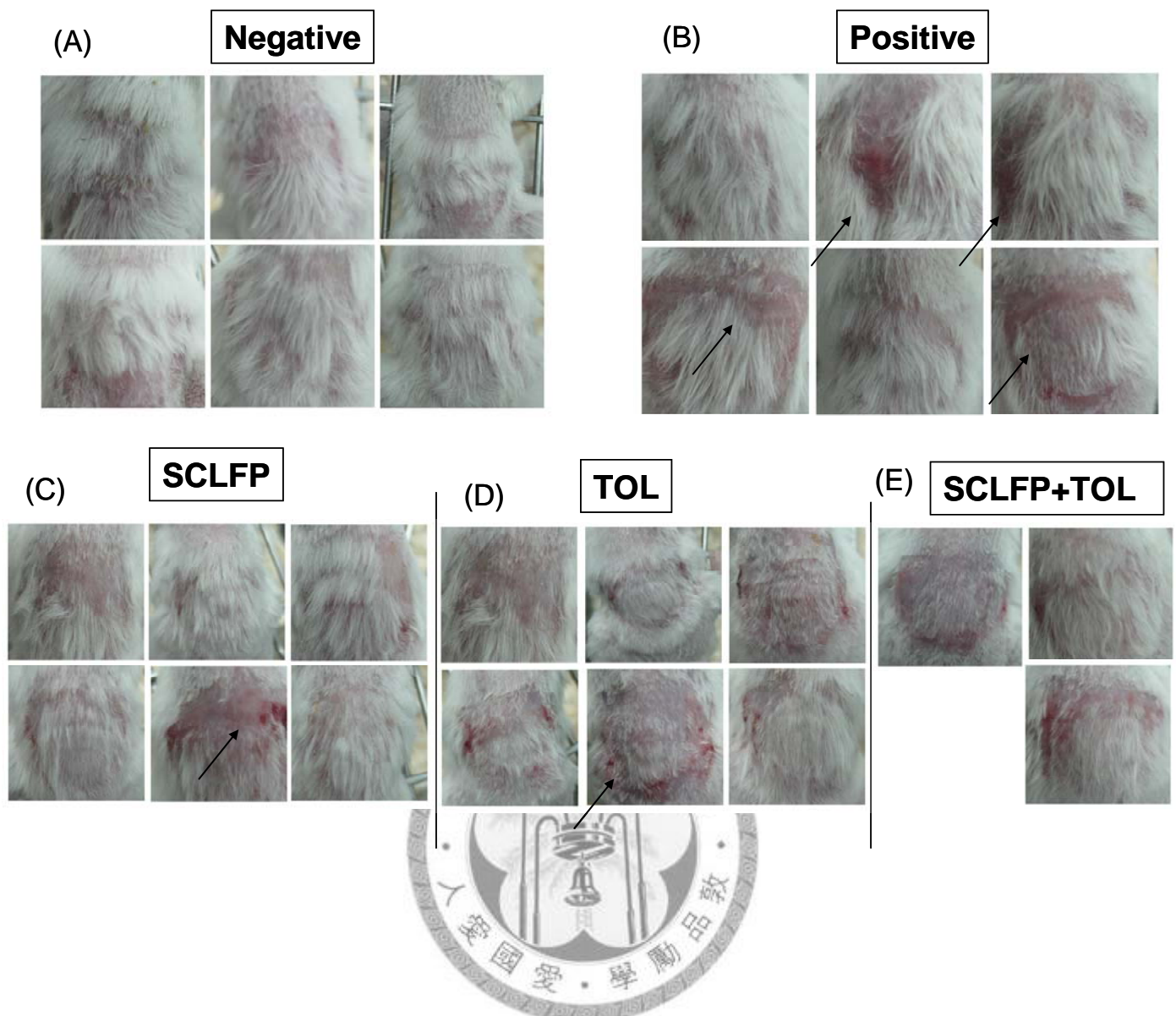
**SCLFP** :90 mg/ml 、 200  $\mu$ l / mice  
**TOL**: OVA: 25 mg/ml 、 200  $\mu$ l/mice  
**SCLFP+TOL**: SCLFP: 90 mg/ml 、  
 + OVA: 25 mg/ml 、 200  $\mu$ l/mice

	immunize	feeding
(A) Negative	PBS	X
(B) Positive	Ovalbumin (OVA)	X
(C) SCLFP	Ovalbumin (OVA)	SCLFP
(D) Tol	Ovalbumin (OVA)	OVA
(E) SCLFP+Tol	Ovalbumin (OVA)	SCLFP+OVA



圖十六、探討建立口服耐受性(oral tolerance)對異位性皮膚炎之作  
 用期實驗設計

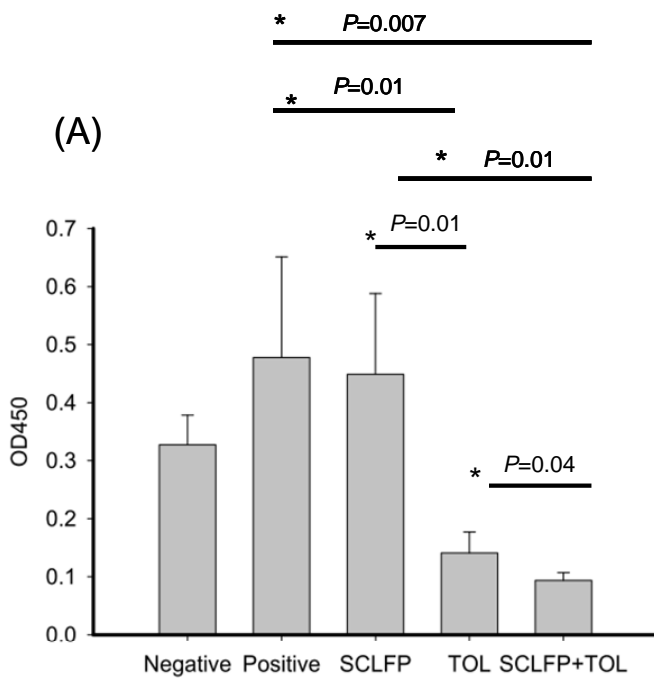
使用 5-8 週齡的 BALB/c 小鼠，每組有 6~10 隻老鼠。分組如下：(A)Negative 組：貼膚致敏的藥劑為 PBS，沒有進行餵食。(B)Positive 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，沒有進行餵食。(C)SCLFP 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行豆類發酵產物的餵食。(D)TOL 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行 OVA 的餵食。(E) SCLFP+TOL 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行豆類發酵產物加上 OVA 的餵食。從 6 周大開始進行餵食，餵食的動作會一直持續到老鼠犧牲時，在餵食一個禮拜後，開始進行連續五天的貼皮致敏，之後須休息兩個禮拜，為一個循環，必須進行三個循環，老鼠在最後一次貼皮致敏後一星期犧牲。



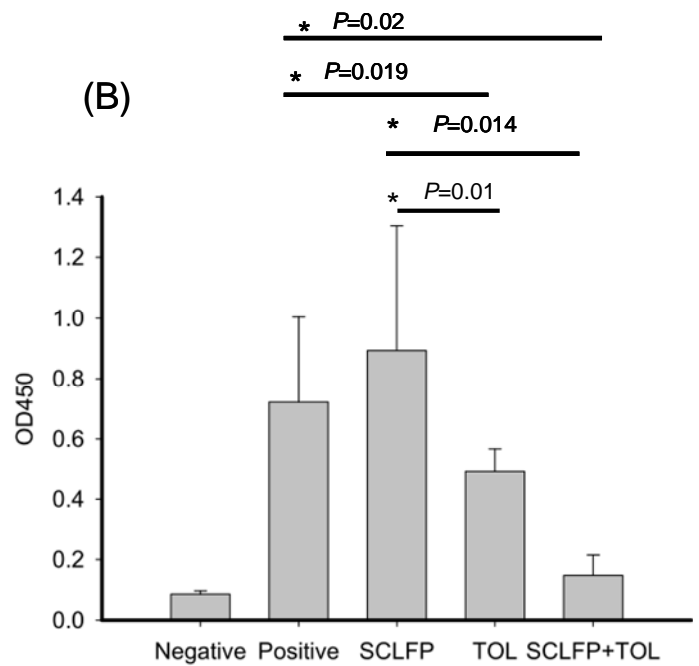
圖十七、建立口服耐受性在作用期的異位性皮膚炎老鼠模式各組在外觀上的差異

在進行貼皮致敏三個循環後，老鼠犧牲前的皮膚狀況。分組如下：(A)Negative 組：貼膚致敏的藥劑為 PBS，沒有進行餵食。(B)Positive 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，沒有進行餵食。(C)SCLFP 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行豆類發酵產物的餵食。(D)TOL 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行 OVA 的餵食。(E) SCLFP+TOL 組：貼膚致敏的藥劑為 OVA，進行豆類發酵產物加上 OVA 的餵食。箭頭所指為明顯的紅腫傷口。

## OVA-specific-IgE



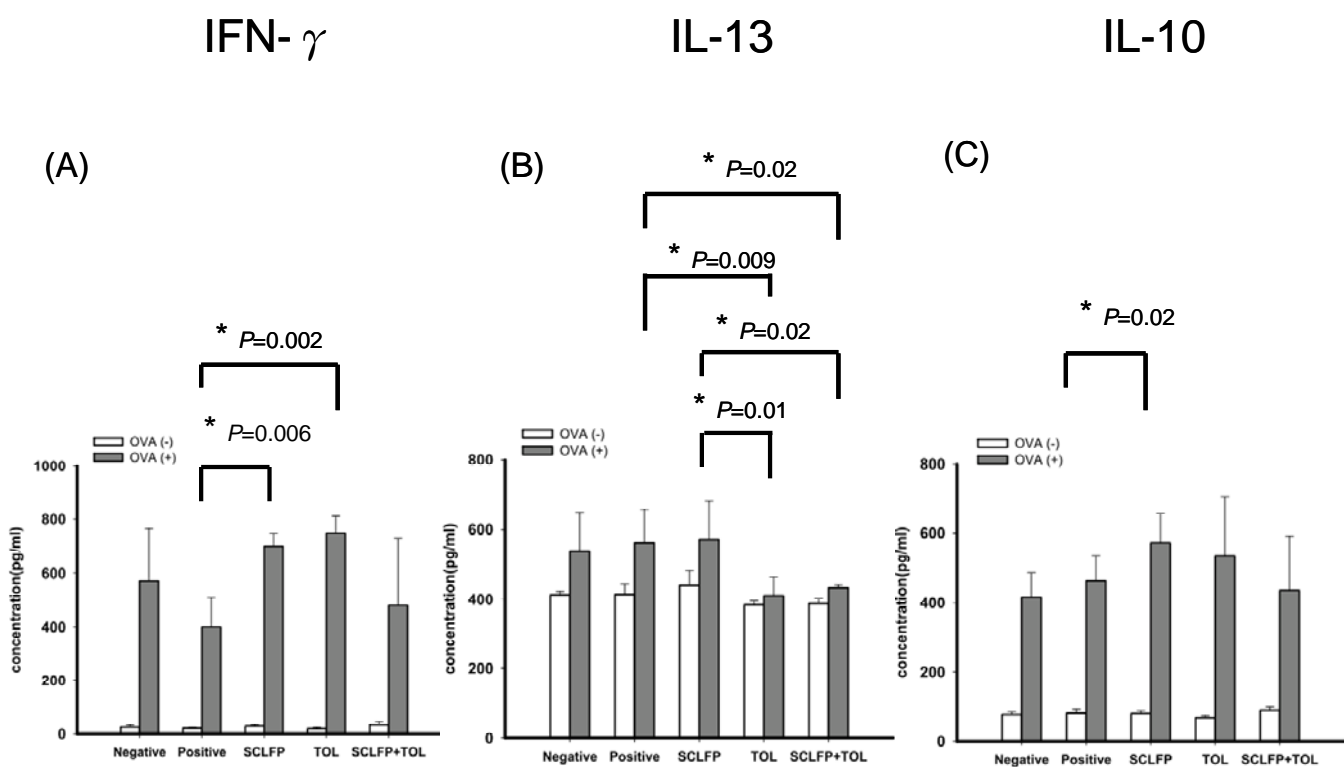
## OVA-specific-IgG2a



圖十八、建立口服耐受性在偵測作用期的老鼠血清中抗 OVA 特異性抗體

利用 ELISA 來測定老鼠血清中抗 OVA 特異性抗體在建立口服耐受性後是否有差異。以血清連續 10 倍稀釋的方式來偵測 OD450 的值，並取 OD450 值為 1.0 以內的結果來進行比較。(A)抗 OVA 特異性抗體 IgE。(B)抗 OVA 特異性抗體 IgG2a。

\*代表統計學上  $P$  值 $<0.05$ ，\*\*代表  $P$  值 $<0.001$ ，\*\*\*代表統計學上  $P$  值 $<0.0001$ 。



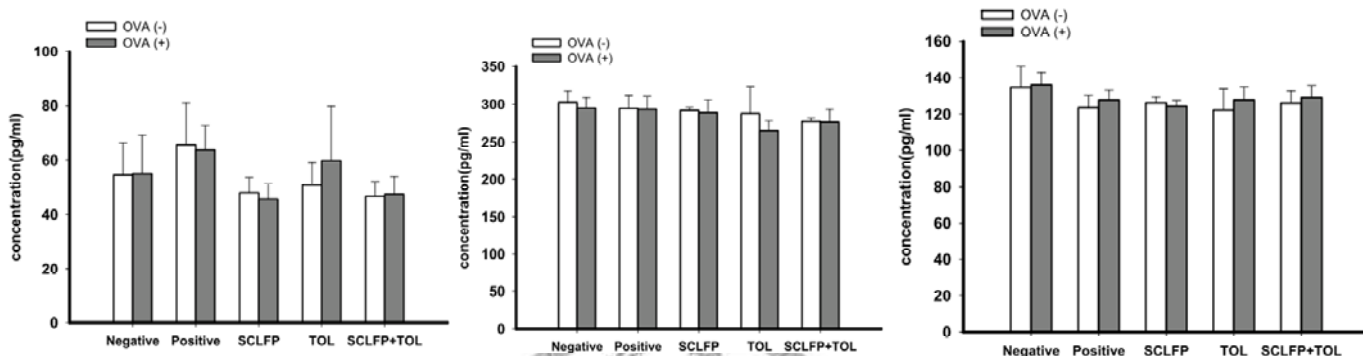
圖十九、建立口服耐受性在偵測作用期的脾臟細胞以 OVA 刺激後分泌細胞激素的情形

利用 ELISA 來測定有無以 OVA 刺激脾臟細胞，培養 48hr 後，所分泌的細胞激素。脾臟細胞(A)IFN- $\gamma$ 。(B)IL-13。(C)IL-10。\*代表統計學上  $P$  值 $<0.05$ ，\*\*代表  $P$  值 $<0.001$ ，\*\*\*代表統計學上  $P$  值 $<0.0001$ 。

(A) IFN- $\gamma$

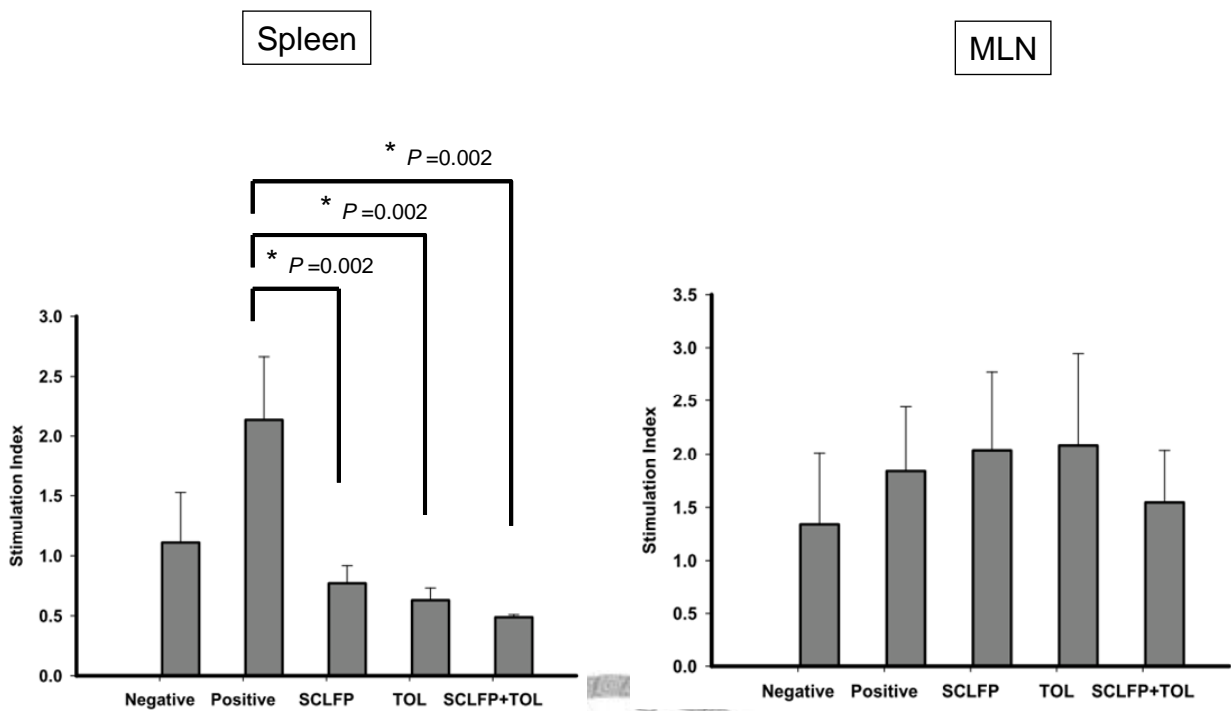
(B) IL-13

(C) IL-10



圖二十、建立口服耐受性在偵測作用期的腸繫膜淋巴結細胞以 OVA 刺激後分泌細胞激素的情形

利用 ELISA 來測定有無以 OVA 刺激腸繫膜淋巴結細胞，培養 48hr 後，所分泌的細胞激素。腸繫膜淋巴結細胞(A)IFN- $\gamma$ 。(B)IL-13。(C)IL-10。\*代表統計學上  $P$  值 $<0.05$ ，\*\*代表  $P$  值 $<0.001$ ，\*\*\*代表統計學上  $P$  值 $<0.0001$ 。



圖二十一、建立口服耐受性在偵測作用期的脾臟細胞及腸繫膜淋巴結以 OVA 刺激後細胞增生的情形

將老鼠犧牲後取出脾臟細胞及腸繫膜淋巴結細胞，以有無加 OVA 兩個條件進行細胞培養 48hr 後，加入 isotopes $[H^3]$ thymidine Incorporation 培養 16hr，以記數儀器進行放射線計數。圖示以有加 OVA 的細胞增生結果 cpm 值除以沒有以 OVA 培養的組別，所得到增生的倍數， $\text{stimulation indexes} = [H^3]\text{thymidine Incorporation (cpm)} / \text{unstimulated cells}$ 。(A)脾臟細胞以 OVA 刺激後增生情形(B)腸繫膜淋巴結細胞以 OVA 刺激後增生情形。\*代表統計學上  $P$  值 $<0.05$ ，\*\*代表  $P$  值 $<0.001$ ，\*\*\*代表統計學上  $P$  值 $<0.0001$ 。

## 附表、附圖

附表一、 大豆的重要成分及功能

大豆成分	功能性
蛋白質	可提供人體需要之八種必須氨基酸，低脂且不含膽固醇。
大豆油	大豆油不含膽固醇，其飽和油脂低又含高量必須脂肪酸及健康的 $\omega$ -3 脂肪酸。
大豆纖維	大豆中含有 30%的水溶性纖維。食用四週後，可降低 11%膽固醇。
異黃酮素	異黃酮素中的 Genistein 及 Daidzein 是抗氧化劑又有微弱的雌激素功能。研究發現它可以減少癌症、心臟病及其他疾病的危險性。
皂素	結構與膽固醇相似，可降低膽固醇的吸收及促進其排泄，研究發現它可以促進免疫功能並具有抗癌功效。
卵磷脂	可減少血小板聚合以避免血栓；卵磷脂也可助膽結石之溶解。
植物固醇	結構與膽固醇類似，不被吸收，可以降低 12%膽固醇並預防結腸癌及心臟病。
植酸	大豆中之抗氧化劑，可防癌。
蛋白抑制劑	可抑制致癌酵素的活性，避免癌症之發生。
資料來源：摘錄自美國黃豆學會台灣辦事處網站資料	



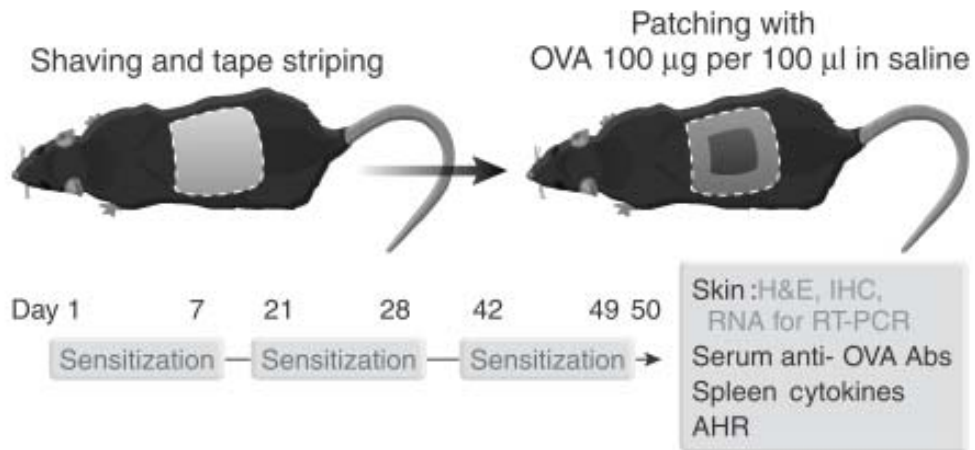
附圖一、 異位性皮膚炎臨床症狀



**FIGURE 1:** Clinical appearance of atopic dermatitis lesions in patients. A. Mild atopic dermatitis appears as a localized area of skin inflammation with erythema and dryness. In a child + parent, B. Acute skin inflammation exacerbated by infection in a child with atopic dermatitis, C. Chronic skin inflammation with lichenification in an adult with adult dermatitis

An Bras Dermatol (2008)83,(1):57-73.

附圖二、建立經皮致敏老鼠模式



**Figure 1. EC sensitization protocol.** Mice were sensitized with ovalbumin (OVA) (100 µg) or saline applied in 100 µl to a sterile patch. The patch was placed for a 1-week period and then removed. Two weeks later, an identical patch was reapplied to the same skin site. Each mouse had a total of three 1 week exposures to patch separated from each other by 2 week intervals. All experiments were performed at the end of the third sensitization.



Journal of Investigative Dermatology (2009) 129, 31–40.

### 附圖三、建立口服耐受性老鼠模式

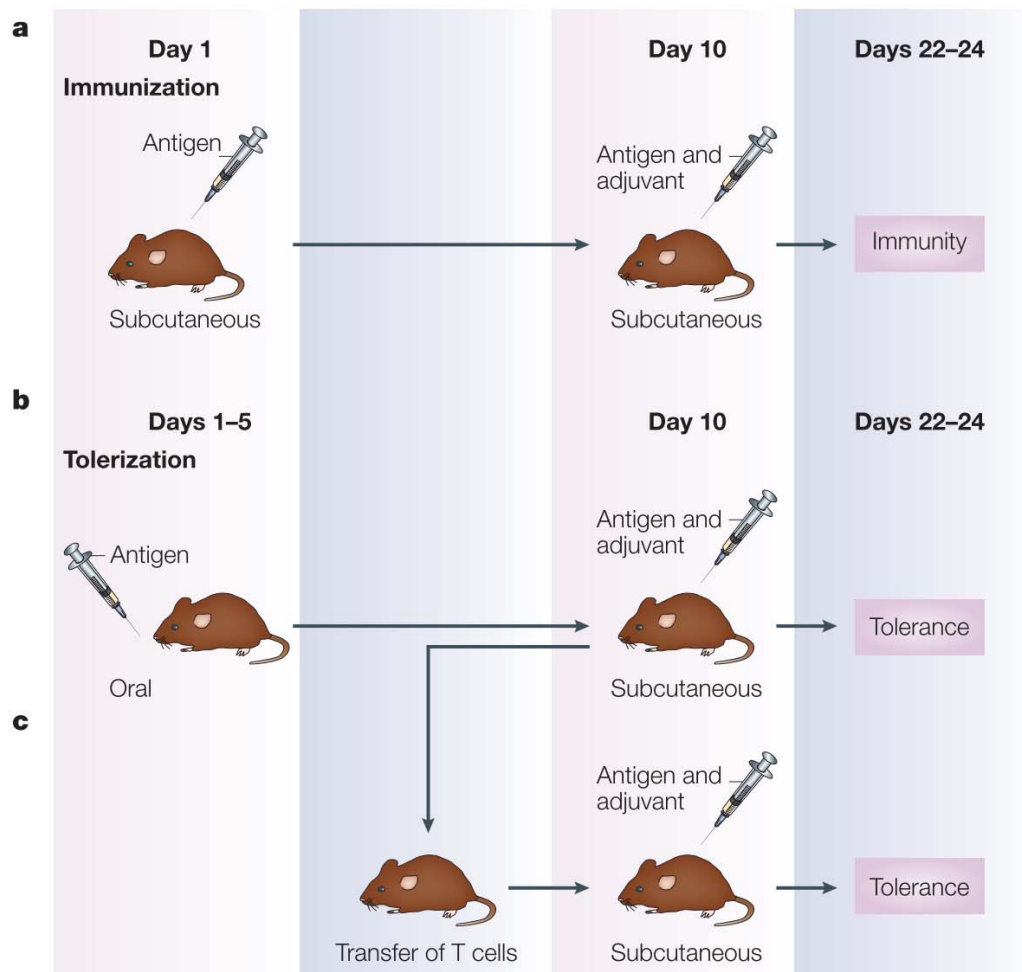
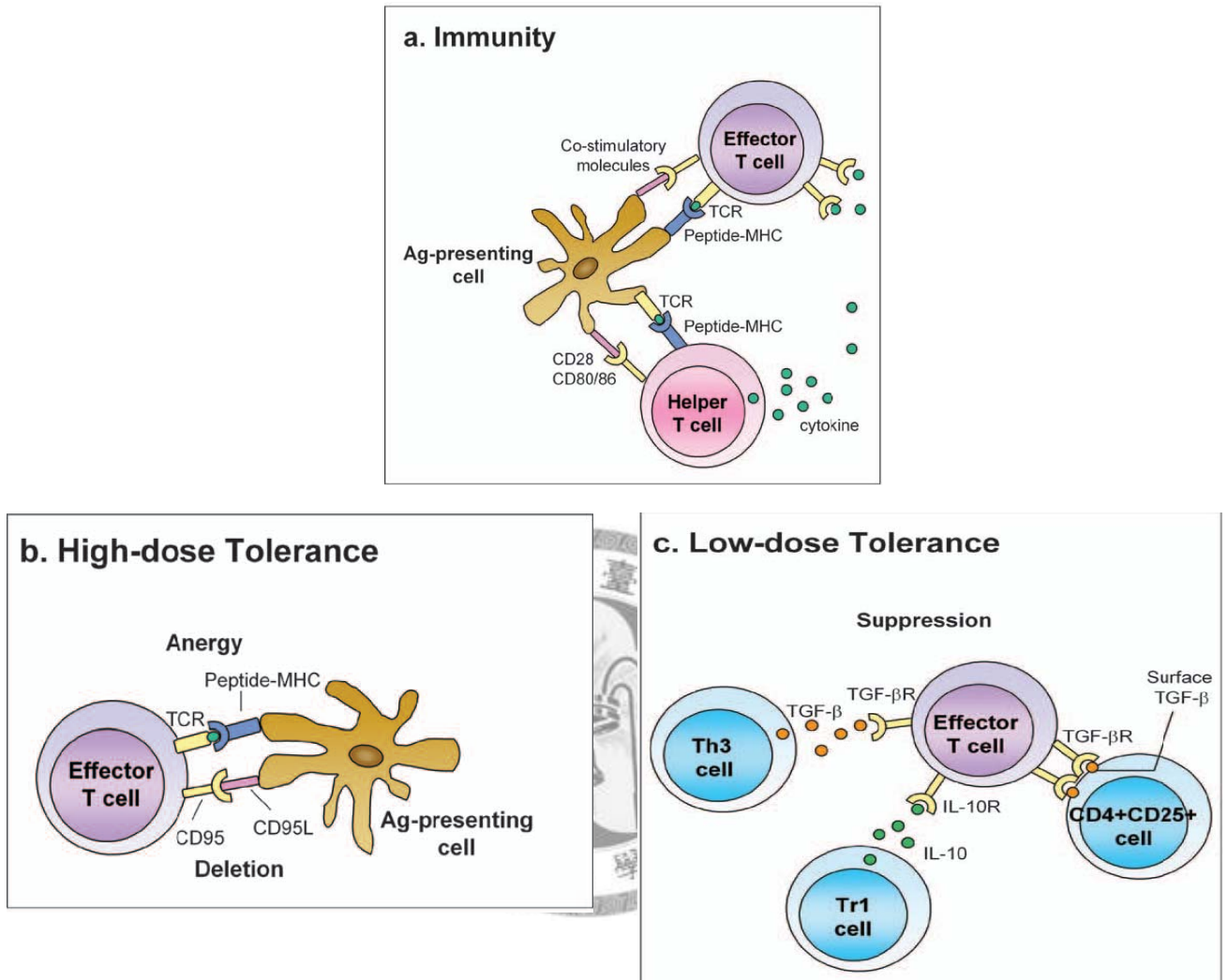


Figure 1 | **Induction of oral tolerance.** **a** | Mice that are immunized subcutaneously and then boosted subcutaneously with antigen plus adjuvant, such as Freund's complete adjuvant or alum, show a robust *in vitro* cell-mediated and antibody response to the immunizing antigen. **b** | Mice that are first orally fed antigen, then immunized subcutaneously with antigen plus an adjuvant have reduced immune responses to that antigen after *in vitro* restimulation. **c** | Finally, T cells from mice that are fed antigen (low dose) can be transferred to naive mice. Immunization of mice that received the tolerized T cells results in the same reduced response as seen in the mice that were fed antigen orally. This shows that oral feeding of antigen can induce an active (but inhibitory) immune response that is mediated by T cells.

Nat Rev Immunol (2004).4, 407-419.

附圖四、口服耐受性免疫調控機制



**FIG 3. Mechanisms of oral tolerance. a,** Generation of an immune response requires ligation of the T-cell receptor with peptide-MHC complexes in the presence of appropriate costimulatory molecules (CD80 and CD86) and cytokines. **b,** With high doses of oral antigen, T-cell receptor cross-linking can occur in the absence of costimulation or in the presence of inhibitory ligands (CD95 and CD95 ligand), leading to anergy or deletion, respectively. **c,** Low doses of oral antigen lead to the activation of regulatory T cells, which suppress immune responses through soluble or cell surface-associated suppressive cytokines (IL-10 and TGF- $\beta$ ). *L*, Ligand; *R*, receptor.

J Allergy Clin Immunol (2005)115:3-12.

附圖五、異位性皮膚炎免疫調控機制

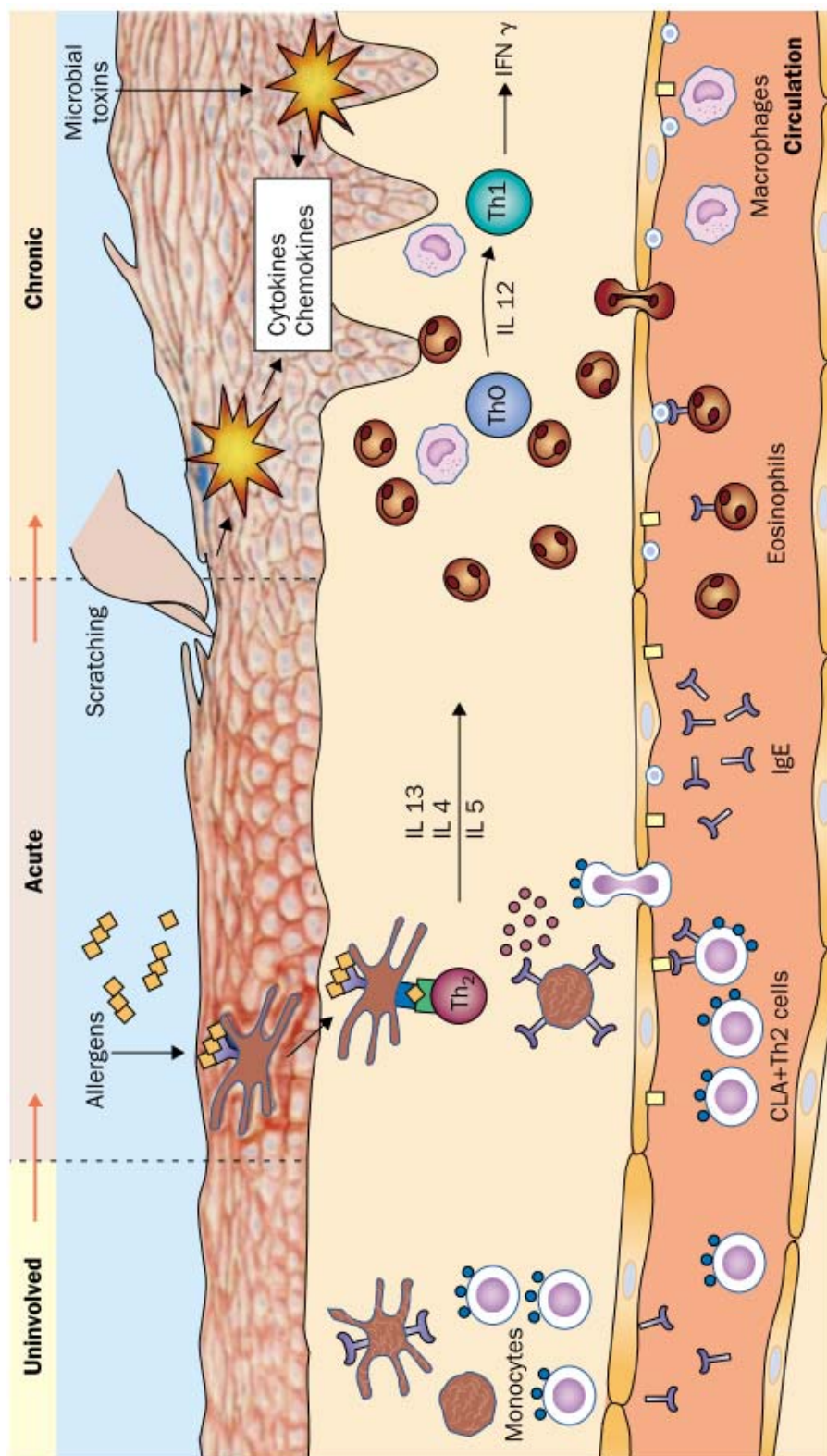
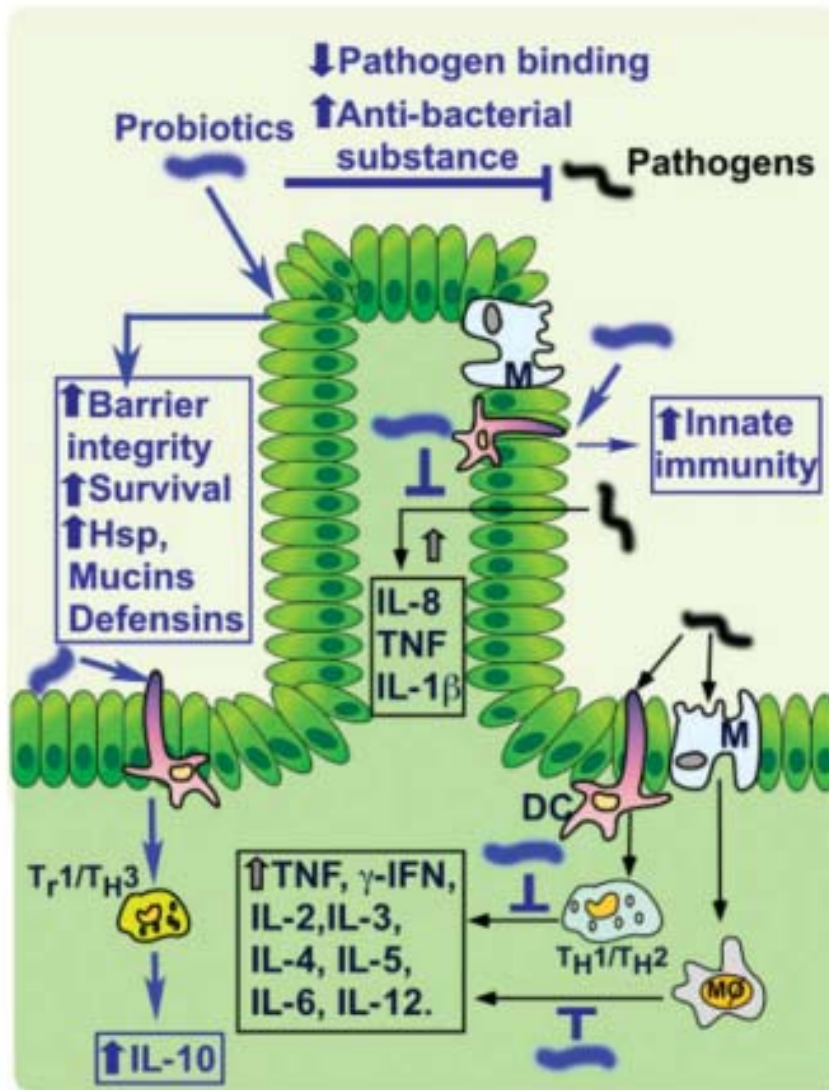


Figure 3: Immunological pathways in atopic dermatitis

Lancet (2003). 361, 151-160.

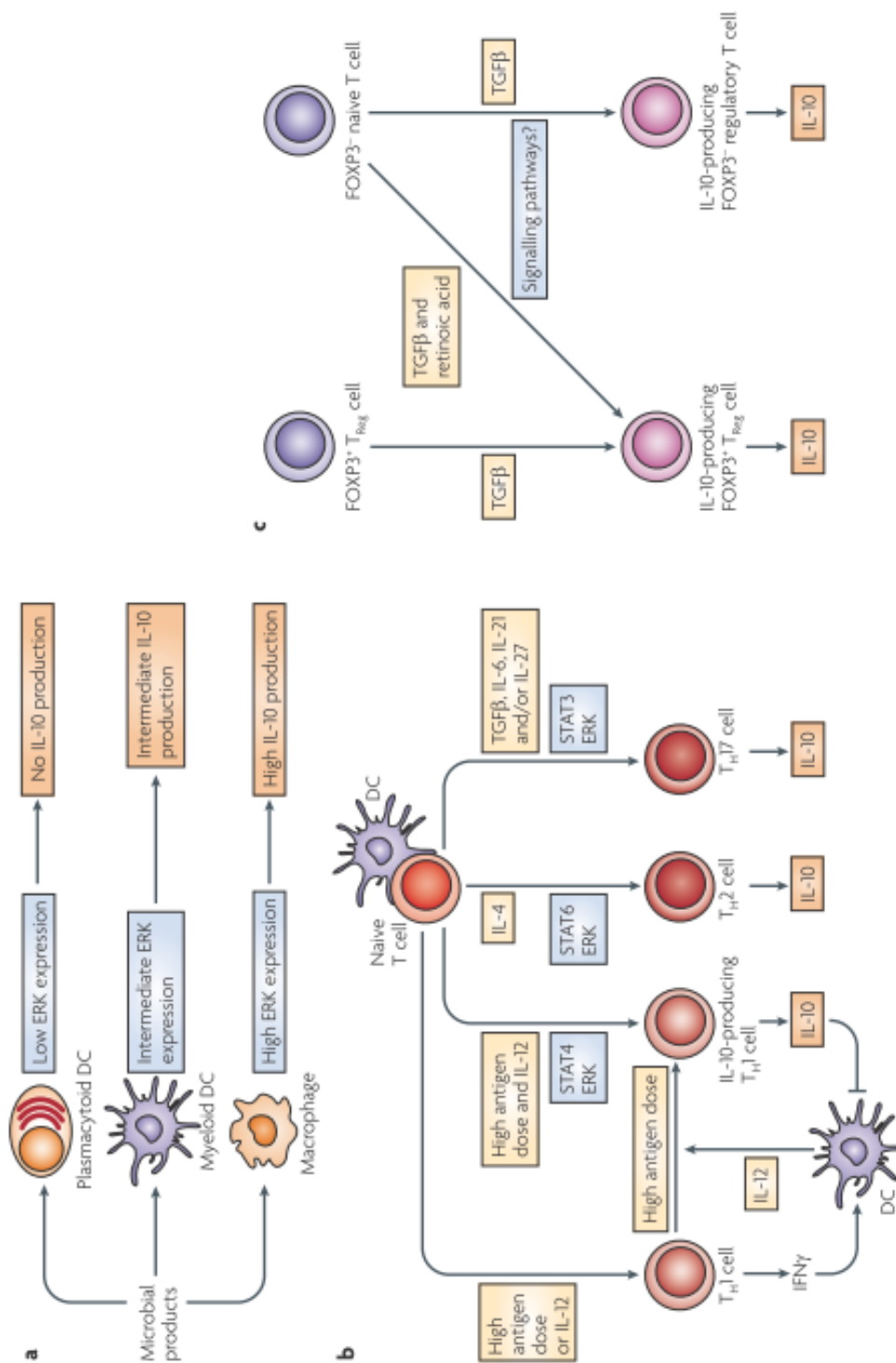
附圖六、益生菌免疫調節機制圖



**FIGURE 1.** Regulation of host homeostasis by probiotics. Probiotics induce several beneficial host responses. These include 1) blocking pathogenic bacterial effects by producing antibacterial substances and competing with pathogens for binding to epithelial cells; 2) defining the balance between necessary and excessive defense immunity by increasing innate immunity, up-regulating antiinflammatory cytokine production, and inhibiting proinflammatory cytokine production; and 3) promoting intestinal epithelial cell homeostasis by increasing survival barrier function, and cytoprotective responses. DC, dendritic cell; IL, interleukin; M, M-cell; Hsp, heat shock protein.

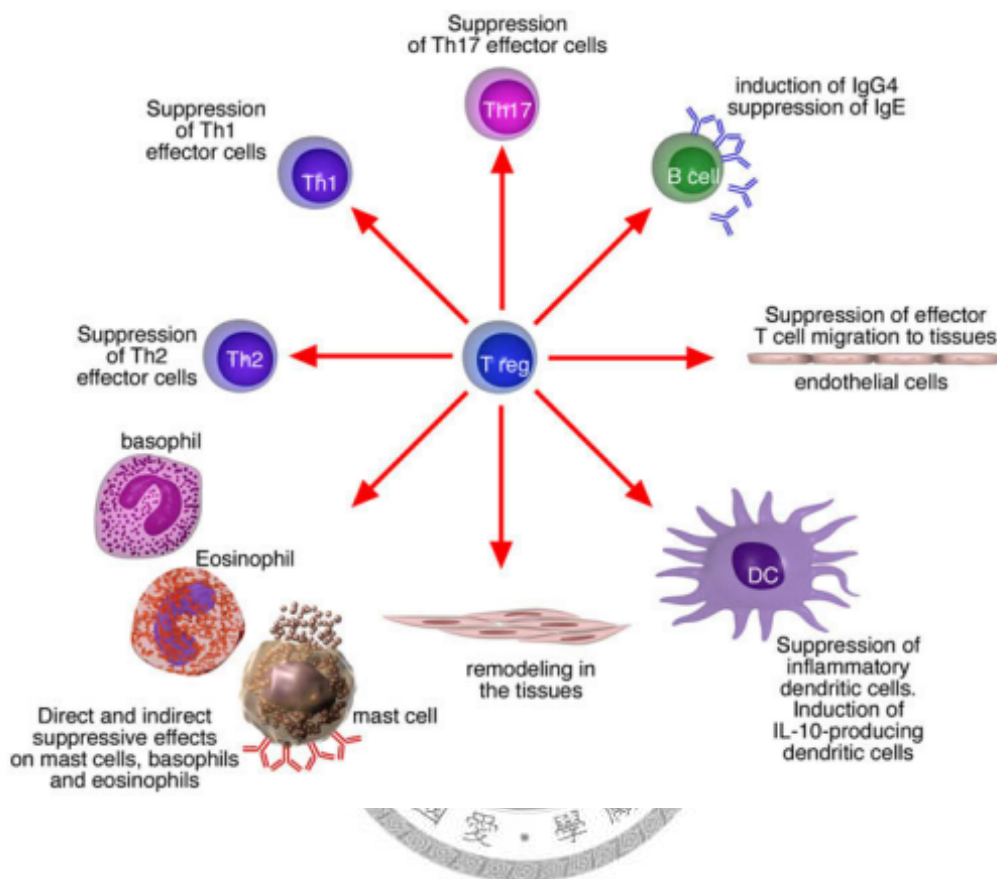
Inflamm Bowel Dis (2008)14:1585–1596.

附圖七、細胞激素 IL-10 在免疫反應中的表現



Nat Rev Immunol (2010) 10, 170-181.

附圖八、Foxp3+CD4+CD25+ and Tr1 細胞對於過敏反應的調節方式



J Allergy Clin Immunol (2009);123:735-46.