

國立臺灣大學牙醫學院口腔生物科學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Oral Biology


College of Dentistry

National Taiwan University

Master Thesis

酵母菌豆類發酵食品對於小鼠腸道菌相分佈及
細胞激素分泌的調節功能

The Regulatory Effect of Legume-Based Fermented
Product by *Saccharomyces cerevisiae* on Intestinal Flora
Population and Cytokine Production in Mice

The seal of National Taiwan University is a circular emblem. It features a central design with a scale of justice and a book, surrounded by the university's name in Chinese characters: '國立臺灣大學' at the top and '牙醫學院' at the bottom. The seal is rendered in a light gray, semi-transparent style.

黃英哲

Ying-Che Huang

指導教授：賈景山 博士

Advisor: Jean-San Chia, Ph.D.

中華民國 100 年 7 月

July, 2011

致謝

從沒有實驗室經驗到一本論文的產生，碩士班兩年的學習對我來說著實不易，要感謝的人實在太多，兩年中 R1509 幾乎擁有我所有的實驗工作與生活，兩年的學習不只是知識上的增進還有待人接物的領略，很幸運可在兩年中遇到許多學識與處事皆值得景仰的師長與學長姐，還有很棒的夥伴們陪伴我一起克服兩年來種種困難使得兩年實驗生活不致單調乏味。

在碩士生涯兩年中，我要感謝我的指導教授賈景山教授在學識和實驗上給予的指引和教導，還有兩位口試委員王莉芳醫師和陳俊任老師在我的畢業口試和論文提出的想法及指教，往後必定深受啟發與影響。

再來要特別感謝惠婷學姐、筱菁學姐、秋月學姐在實驗想法與技術上給予的教導，在屢次遇到沮喪的瓶頸時好在能得到妳們最有力的協助，感謝江俊彬老師慷慨地借予照相顯微鏡，感謝靜怡學姊、淑貞學姐在皮膚實驗技術上的指導，感謝動物中心小緯以及各位工作人員的幫助，感謝鴻偉學長、中帆學姐、帝蓉學姐、奇玄學長給予我實驗上的建議，以及靖甯學姐、惠祺學姐、章魚學姐、旻潔學姐、永煌學長、傑仁學長在實驗上的教導，謝謝你們的耐心與鼓勵，感謝兩年來芷穎、李泱、學儒、鏡文、渝翔一起奮鬥與陪伴，你們是最棒的好夥伴，感謝 Hans 在實驗上的大力幫忙，你是最好的 buddy，還有智久、Lori 一起打氣，感謝昱璇、佳儒、杜杜、eating、高高各位可愛的學弟妹的陪伴，你們讓實驗室充滿溫馨的氣氛，感謝口生所椀纖和世杰以及各位好同學的相互鼓勵，感謝系辦雪華姐總能熱心的提供協助，感謝高師大夥伴的互相打氣，感謝國舜的鼓勵，感謝醫學院所有認識的人曾經給予的幫忙與鼓勵，沒有你們我的實驗將不會這麼順利，還有要非常非常感謝 BALB/c 小鼠的犧牲貢獻，每一隻都像史啞華一樣可愛的你們一定可以回到上帝的懷抱。

最後要感謝我最親愛的爸爸媽媽和姐姐，你們給予我最大的精神支持，最後的最後要感謝我自己，兩年的努力與汗水換來成長。

兩年的日子劃下句點，從兩年前的期盼轉為兩年後的不捨，我會記住這難忘的兩年回憶，期勉自己在未來的日子裡依然要在人生的道路上秉持信念繼續努力，永不放棄。

摘要

大豆發酵產物和調控腸道菌相分布具有免疫調節的功能而達到減緩發炎反應的功能，然而還沒有研究指出腸道菌相與發酵產物之間的關係。本實驗研究目的為藉建立三種動物模式：異位性皮膚炎模式、耳朵腫脹過敏模式、腸道炎模式來探討餵食大豆發酵食品(SCLFP)是否可藉由改變腸道微生物菌相而改善過敏及腸道發炎疾病。(1)異位性皮膚炎模式：在老鼠背部皮膚以雞卵蛋白及金黃色葡萄球菌外毒素貼皮致敏，可觀察到皮膚的浸潤淋巴結中 Th2 相關的 IL-4 和 Th17 相關 IL-17A、IL-17F 表現有上升，且腸道 *Lactobacillus* 數量下降，且背部皮膚外觀有發炎反應，而經餵食 SCLFP 後，腸道內的 *Lactobacillus* 有顯著增加的趨勢，皮膚的浸潤淋巴結中抗發炎細胞激素 IL-10 和 Th1 相關的 IFN- γ 表現則有上升的現象，IL-4 和 IL-17A、IL-17F 表現則有下降現象，並看到外觀觀察皮膚發炎有改善的現象。(2)耳朵腫脹過敏模式：以雞卵蛋白皮下注射於老鼠耳朵致敏，建立耳朵腫脹的遲發型過敏模式，經餵食 SCLFP 之後，腸道內的 *Lactobacillus* 有增加的趨勢，而腸繫膜淋巴結中 IL-10 表現則有上升的現象。(3)腸道炎模式：在老鼠日常飲用水中加入右旋糖酐硫酸酯鈉(Dextran sulphate sodium, DSS)引發腸道發炎，建立腸道炎模式，結果發現，餵食右旋糖酐硫酸酯鈉後，體重有下降，且大腸有發炎的症狀，腸道中 *Lactobacillus*、*Clostridium*、*SFB*、*Bifidobacterium* 數量有下降，*Enterobacterium*、*Bacteroides* 數量有上升的情形，經餵食 SCLFP 之後，腸道內的 *Lactobacillus* 則有顯著回升的趨勢，脾臟因發炎而重量增加現象有明顯降低，而體重與疾病活性指數則無明顯差異。因此餵食 SCLFP，可能透過調節腸道中菌叢分布並增加 *Lactobacillus* 數量，達到調節免疫的功能，進而降低過敏及腸道發炎的症狀。

Abstract

Legume-based fermented food and the population of gut microflora had the immunomodulatory effect in relieving inflammatory disease. However, no correlation between the gut microflora and fermented food had been reported. Therefore, immunomodulatory effect by administration of legume-based fermented product by *Saccharomyces cerevisiae* (SCLFP) was determined by three animal models including: experimental atopic dermatitis (AD), mouse ear swelling tests (MEST), and DSS-induced colitis. (1) AD model: AD was induced by epicutaneous sensitization with ovalbumin (OVA) and *Staphylococcal* enterotoxin B (SEB) on the dorsal skin. Th2-related IL-4, Th17-related IL-17A and IL-17F expression were increased in skin draining lymph nodes; gut *Lactobacilli* was decreased and skin inflammation were observed. Gut *Lactobacilli* was significantly increased and anti-inflammatory IL-10 and Th1-related IFN- γ expression in draining lymph nodes were increased as IL-4 and IL-17A and IL-17F were decreased after feeding with SCLFP, finally improved the skin lesion. (2) MEST: Ear delayed-type hypersensitivity swelling was induced by intradermal injection of OVA. Gut *Lactobacilli* and IL-10 expression in mesenteric lymph nodes were increased after administration of SCLFP. (3) DSS-induced colitis: Colitis was induced by feeding with dextran sulfate sodium (DSS) containing water. Mouse body weight decreased and the length of gut shortened implied colitis formation. Gut *Lactobacilli*, *Clostridia*, *SFB*, *Bifidobacteria* decreased as *Enterobacteria*, *Bacteroides* increased. Gut *Lactobacilli* were increased and spleen weight decreased significantly, but no significant change in weight loss and disease activity score (DAI) after administration of SCLFP. Therefore, administration of SCLFP may increase gut *Lactobacilli* population to modulate the immune response and thus ameliorate allergy and gut inflammation.

目錄

第一章 文獻回顧	1
第一節 腸道概論	1
第二節 人體腸道菌叢	2
第三節 食品調節腸道菌相及免疫調節機能	3
第四節 啤酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	6
第五節 豆類發酵食品	7
第六節 實驗動物模式介紹	7
第七節 研究動機與目的	10
第二章 材料與方法	11
第一節 實驗動物小鼠	11
第二節 啤酒酵母菌豆類發酵產物(SCLFP)的製備.....	11
第三節 小鼠食道插管餵食	11
第四節 異位性皮膚炎(Atopic dermatitis, AD)模式建立.....	11
第五節 耳朵腫脹過敏試驗(mouse ear swelling test, MEST) 模式建立.....	12
第六節 DSS 誘導腸炎模式(DSS-induced colitis)建立.....	12
第七節 組織與檢體收集	12
第八節 細菌核酸萃取(bacterial DNA extraction)	13
第九節 組織核酸萃取(tissue RNA extraction)	14
第十節 聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)	14
第十一節 即時定量聚合酶連鎖反應(real-time PCR).....	14
第十二節 組織化學染色(H&E stain).....	15
第十三節 統計分析	15
第三章 實驗結果	16
第一部分 異位性皮膚炎小鼠模式(atopic dermatitis, AD)	16
第一節 異位性皮膚炎小鼠腸道菌量.....	16

第二節 異位性皮膚炎小鼠浸潤淋巴結細胞激素表現.....	16
第三節 異位性皮膚炎小鼠外觀症狀.....	17
第二部分小鼠耳朵腫脹過敏模式(mouse ear swelling test, MEST).....	17
第一節 小鼠耳朵腫脹過敏模式腸道菌量.....	17
第二節 小鼠耳朵腫脹過敏模式腸繫膜淋巴結 OVA 專一性 IL-10 細胞激素表現.....	17
第三部分 DSS 誘導小鼠腸炎模式(DSS-induced colitis)	18
第一節 DSS 誘導小鼠腸炎模式腸道菌量	18
第二節 DSS 誘導小鼠腸炎模式疾病活性指數	18
第三節 DSS 誘導小鼠腸炎模式體重	18
第四節 DSS 誘導小鼠腸炎模式脾臟重量	19
第五節 DSS 誘導小鼠腸炎模式腸道長度	19
第四章 討論.....	20
第一節：異位性皮膚炎老鼠模式(Atopic dermatitis,AD).....	20
第二節：小鼠耳朵腫脹試驗(mouse ear swelling test, MEST).....	24
第三節：DSS 誘導腸炎老鼠模式(DSS-induced colitis).....	24
第五章 參考文獻.....	29

圖表目錄

圖一、異位型皮膚炎(atopic dermatitis)小鼠模式實驗設計.....	38
圖二、異位性皮膚炎小鼠模式各組腸道中細菌數量.....	39
圖三、異位性皮膚炎小鼠模式各組浸潤淋巴結的 OVA 專一性細胞激素表現..	40
圖四、異位性皮膚炎小鼠模式各組浸潤淋巴結的總細胞激素表現.....	41
圖六、小鼠耳朵腫脹過敏試驗(mouse ear swelling test)模式實驗設計.....	43
圖七、小鼠耳朵腫脹過敏試驗模式各組腸道中細菌數量.....	44
圖八、小鼠耳朵腫脹過敏試驗各組腸繫膜淋巴結 OVA 專一性細胞激素 IL-10 表現.....	45
圖九、DSS 誘導小鼠腸炎模式(DSS-induced colitis).....	46
圖十、DSS 誘導小鼠腸炎模式各組腸道中細菌數量.....	47
圖十一、DSS 誘導小鼠腸炎模式各組在給予 3%DSS 飲用水期間疾病活性指數 (disease activity index, DAI)變化.....	48
圖十二、DSS 誘導小鼠腸炎模式各組在給予 3%DSS 飲用水期間體重變化.....	49
圖十三、DSS 誘導小鼠腸炎模式各組脾臟相對重量.....	50
圖十四、DSS 誘導小鼠腸炎模式各組腸道相對長度.....	51
附表和附圖.....	52

第一章 文獻回顧

第一節 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、病原性微生物、腸道細菌、消化酵素等各式各樣的刺激，具有物理性及化學性的隔離機能。腸道也是人體最重要的免疫系統之一，存在於腸道的淋巴組織(Gut-associated lymphoid tissue, GALT)，約佔全身免疫系統的 70% (Isolauri, 2001)。黏膜免疫系統尚須對無害的蛋白具免疫耐受性(tolerance)，同時能夠辨認侵入性病原菌，引發免疫反應。

腸道表面除腸道上皮細胞外，還有一種特化成圓頂狀的上皮細胞，稱為 M 細胞(membranous cell)，其表面無絨毛覆蓋，呈現凹陷的形狀，使得微生物或抗原可從此路徑通過，M 細胞下方即為派爾氏淋巴結(Peyer's patch, PP)，派氏淋巴結中的抗原呈現細胞(antigen-presenting cell, APC)將會進行辨識。除此之外，存在於黏膜固有層(lamina propria)中之免疫細胞尚包含：B 細胞、輔助型 T 細胞(T helper cell)、毒殺型 T 細胞(T cytotoxic cell)、單核球、巨噬細胞、樹突細胞、顆粒細胞，和肥大細胞等(Isolauri, 2001)。

腸道黏膜中的抗體，以免疫球蛋白 IgA 含量最豐富，IgA 是經由漿細胞分泌之 J 鍊(J chain)將兩個單體結合為雙體的形式存在，腸道中分泌型 IgA (secretory IgA, S-IgA)以雙體的形式直接與病原菌結合，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先天免疫型防禦(innate immunity)的重要角色。

腸道共生益菌的存在也有調節宿主免疫系統的能力，共生益菌本身及其代謝產物、細胞壁及 DNA 皆可能具有調節免疫的潛力。共生益菌覆蓋於腸道黏膜避免致病菌滯留，並且誘導 B 細胞分化產生大量 IgA 分泌於腸道阻止致病菌的入侵 (Macpherson *et al.*, 2001)。細胞壁及 DNA 則屬於先天性免疫所辨識的病原相關分子模式(Pathogen associated molecular pattern, PAMP)可引發後續免疫反應，形成後

天免疫力(Verse *et al.*, 2008)。

第二節 人體腸道菌叢

宿主與腸道微生物存在著複雜多變的交互關係，腸道內的龐大微生物參予了宿主體內的一些生化反應，常被視為一個具有代謝功能的「器官」。這些微生物可以將宿主攝入但無法自行吸收的物質分解為小分子，以利宿主腸壁細胞吸收利用，提供宿主營養原及能量。

腸道微生物生態系統是由微生物、宿主上皮細胞、免疫系統、微血管系統及腸內神經系統之間的交互作用所構成的，與其他生態系相比，動物的腸道存在著高密度的細菌群落。腸道生態系統中，主要是真細菌、古細菌、酵母菌及絲狀真菌所構成。已知在成人人體腸道中至少存在著 500 種不同細菌，99% 以上的族群是由其中 30~40 種細菌所組成(Finegold *et al.*, 1974; Moore and Holdeman, 1974)，這些數量龐大的微生物又以厚壁菌門(*Firmicutes*)、類桿菌門(*Bacteroidetes*)及放射菌門(*Actinobacteria*)這三大門細菌為數最多。變形菌門(*Proteobacteria*)雖然在腸道生態系統中也是常見的一門，但數量相較之下較少。這些微生物會隨著時間、環境及空間變動進而改變其群落組成，造成腸道微生物群落的高複雜性，也增加了研究腸道微生物生態的困難度。

酸鹼值、溫度、氧氣等環境因子會影響胃腸道微生物菌相的組成，消化道的酸鹼值變化促使胃腸道各區域有不同的優勢菌種。以人體消化道為例，胃部的酸鹼值約在 pH 1~5 之間，主要的優勢菌種以幽門桿菌(*Helicobacter pylori*)為主，小腸環境較鹼性，由十二指腸到回腸酸鹼值會逐漸上升至 7.7 左右，在十二指腸的優勢菌種則為能耐微酸性鏈球菌屬(*Streptococcus*)、乳酸菌屬(*Lactobacillus*)，酸鹼值較高的回腸氧氣含量較低，因此主要菌種以鏈球菌屬及韋榮氏屬(*Veillonella*)、類桿菌屬(*Bacteroides*)、梭狀芽孢桿菌屬(*Clostridium*)的厭氧菌為主，盲腸及大腸因為有發酵反應的產生，酸鹼值會下降至 pH 5.7 左右，到了結腸尾端由於短鏈脂肪酸的吸收加上黏膜分泌鹼性物質，酸鹼值會回復到 pH 6.6~6.8，主要菌種以類桿菌屬、

梭狀芽孢桿菌屬、比菲德氏菌屬(*Bifidobacterium*)的厭氧菌及腸球菌屬(*Enterococcus*)為主(Wilson M, 2005; Hayashi H. *et al.*, 2005)。

新生的動物腸道原先為無菌狀態，最初為由來自母體的微生物，並隨著時間逐漸產生菌相的改變(Mitsuoka, 1992)。雖然健康個體中的腸道菌相幾乎是穩定的，但是菌相仍有可能因為一些外在因素而改變，例如年齡、生理狀況、藥物、疾病、飲食、壓力等.....。腸內微生物間的相互關係會影響腸內細菌菌叢的變動，當病原菌連續進入腸道時，原本健康人體腸道中均衡的菌叢組成會改變，而腸內細菌之間的相互拮抗現象之主因為 pH 值變化、氧化還原電位變化、乳酸、揮發性脂肪酸及細菌素等抗菌物質產生或營養素的競爭。此外，精神緊張及壓力亦為細菌菌叢變動的主要因素，嚴重會影響腸道的正常功能(Gibson *et al.*,1995)。

腸道微生物的功能有幫助消化宿主未消化的物質和宿主產生的物質，如黏多糖，黏蛋白，上皮細胞，酵素等，並扮演維持生命所需的角色，如幫助宿主正常營養吸收，維持宿主正常免疫系統，產生短鏈脂肪酸，維生素合成，早期解離膽鹽 (Gaskins, 2001; Falk *et al.*, 1998)。

第三節 食品調節腸道菌相及免疫調節機能

在發現有調節宿主腸道菌相功能的食物，主要分為三種：益生菌(probiotic)、益生素(prebiotic)、合益素(synbiotic)。益生菌被正式定義為「食用一定量可對宿主帶來健康效益的活微生物」(Guarner *et al.*, 1998)，益生素則被定義為「為無法消化的成分，食用後可選擇性刺激某一些原本就存在宿主腸道的細菌族群的生長和活性進而為宿主帶來健康效益」(Gibson *et al.*, 1995; Schrezenmeir *et al.*, 2001)，合菌素則被定義為「包含益生菌和益生素」的食品(Gibson *et al.*, 1995)，這些食品補充物對宿主腸道和腸道免疫系統具有許多複雜的影響，並在許多和腸道免疫系統相關疾病有改善效果。

最常被使用的益生菌為 *Lactobacillus* 和 *Bifidobacterium*，主要藉由幾種方式以

調節宿主腸道菌相：與病原菌競爭排除作用、產生抗生素及有機酸，降低 pH 值等。例如腸道內菌叢大致可分為游離族群、腸道內容物顆粒結合族群及腸壁組織結合族群三種，而 *Bifidobacterium* 等乳酸菌即屬於腸壁組織結合之族群微生物，其可定殖於腸道，抑制外來微生物於腸道內增殖(Fuller and Brooker, 1973)，而益菌為了平衡腸道菌相並抑制病原菌的滋生會藉由：(1)營養分的競爭：在腸道有限的結合位置下，當益菌較多時會與病原菌競爭腸道中的養分，使其無法在腸道中增殖；(2)腸道上皮細胞附著點的競爭：益菌會與病原菌競爭腸道上皮細胞的附著位置，使其無法在腸道附著增殖；(3)凝集吸附排除：有些益菌會將病原菌包覆起來，使其無法附著在腸壁上，並隨消化物排出體外(Fuller, 1989;林與江, 1996; Spring, 1997)。益生菌在發酵過程中亦會產生部分具有抑菌作用代謝物質，有助於腸道菌相之平衡，例如有機酸(Misra and Kuila, 1992)、過氧化氫(Dahiya and Speck, 1968; Condon, 1987)、殺菌素(bacteriocin) (Klaenhammer, 1993; Abee *et al.*, 1995)、天然殺菌素 Reuterin (Axelsson *et al.*, 1989; Paul Ross *et al.*, 2002)、聯乙醯(diacetyl) (Jay, 1983; Kang and Fung, 1999)及抗生素(如 reuterocyclin) (Ganzle *et al.*, 2002; Holtzel *et al.*, 2000)等。這些抑菌物質功能各異，除直接與害菌作用外，亦藉降低腸道 pH 值來減少害菌之增殖。例如 *Lactobacillus* 也能藉著產生像殺菌素(bacteriocin)來抑制微生物生長或產生黏液素(mucin)去阻礙病原分子的黏附(Forestier *et al.*, 2001; Mack *et al.*, 1999)。

益生菌對宿主免疫系統的調節，主要是藉由益生菌的組成成分(如細胞壁)透過腸道上皮細胞和 M 細胞進入腸道屏障以調節先天型及後天型免疫--對先天型免疫的調節：益生菌可增加自然殺手(natural killer)細胞的細胞毒殺能力和巨噬細胞的吞噬作用(Delcenserie *et al.*, 2008)，並增加一氧化氮(oxygen oxide)合成(Kengatharan *et al.*, 1996)；對後天免疫的調節：促進 B 細胞產生 IgA，增加黏附腸道中的抗原以抑制其進入腸壁內(Delcenserie *et al.*, 2008)。例如研究指出 *Lactobacillus* 可以藉由其細胞壁刺激宿主巨噬細胞的活化以引發宿主免疫反應(Tannock, 1997)，而

Lactobacillus rhamnosus GG 亦發現可在孩童身上藉由刺激 IgA 產生以顯著降低輪狀病毒(rotavirus)再感染率並降低腹瀉次數和時間(Kaila *et al.*, 1995)。

益生菌主要有菊糖(inulin)、半乳寡糖(galacto-oligosaccharides, GOS)、果寡糖(fructo-oligosaccharides, FOS)等，它們都具有不被人體消化代謝，且選擇性刺激腸道益菌生長的特性。益生菌調節免疫的機制尚未清楚，目前認為主要有幾種：促進腸道*Lactobacillus*屬的生長，使消化道相關的淋巴系統被活化(Manning and Gibson, 2004)、促進腸內細菌發酵產生一種短鏈脂肪酸(short chain fatty acid, SCFA)丁酸(butyrate)產生，使許多跟能量代謝和發炎相關的基因表現(Vanhoutvin *et al.*, 2009)和調控腸道障壁的緊密蛋白(tight junction protein)集結(Peng *et al.*, 2009)、促進另一種短鏈脂肪酸乙酸(acetate)及丙酸(propionate)產生，促進許多免疫相關基因表現，如細胞激素IL-10(Kiefer *et al.*, 2006)。

豆類食品亦為益生菌的重要的傳統食物來源，包括黃豆、菊糖(例如洋姜(Jerusalem artichok)，豆薯(jicama)，和菊苣根(chicory root)、天然燕麥，未精製小麥，未精製大麥，雪蓮果(yacon)。黃豆中主要的寡糖是棉子糖(raffinose)和水蘇糖(stachyose)，先前研究指出這些糖類可促進*Bifidobacterium infantis*的生長，但不會促進*Escherichia coli*、*Streptococcus faecalis*、*Lactobacillus acidophilus*的生長(Tamura Z.,1983)。

合益素即結合益生菌和益生素的食品，其可刺激食品中所含的益生菌的存活同時亦刺激腸道中的益菌存活。合益素通常為結合菊糖或FOS及*Lactobacillus acidophilus*、*Bifidobacterium lactis* 或*Lactobacillus casei*等益生菌，並透過上述益生菌及益生素的機制以促進免疫調節功能。人體研究指出，藉由分析糞便菌相，發現餵食孩童*L. rhamnosus GG*和GOS，可顯著增加腸道中*L. rhamnosus*數量和腸道內生的*Bifidobacteria*和*Lactobacilli*數量(Piirainen *et al.*, 2008)。人體的母乳乳汁亦被視為一種合益素，其內含有多種寡糖和產乳酸細菌，研究指出，餵食母乳可影響嬰兒的腸道菌叢內生性細菌建立，和餵食母乳替代品的嬰兒相比，餵食母乳的嬰兒

的糞便中也含有較多 *Bifidobacteria* 屬細菌 (Heyman *et al.*, 2002)。

第四節 啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)

啤酒酵母屬於真菌子囊菌綱，以單獨球形或卵圓形存在，無性生殖是以出芽方式產生個體，有性生殖是在圓形的子囊中形成 8 個卵圓形的子囊孢子。啤酒酵母與人類生活息息相關，很早就被用以製造各種發酵食品，常見如酒類、烘焙食品、醃漬食品。酵母菌是最簡單的真核生物，也被當作分子生物學和細胞生物學的模式生物。

真菌和酵母菌細胞壁的主要成分為 β -glucan，為一種多醣體，為口服啤酒酵母菌最常被探討並能影響服用者機能的部分。 β -glucan 能被先天性的免疫系統辨認，像是分子型態辨認受器 (pattern recognition receptor, PRRs) 或是補體 (complement) 系統，進一步引發免疫反應。 β -聚醣依照不同生物來源有不同的化學鍵結，導致有多種水溶性、分子量、帶電量的特性，使得刺激抗原呈獻細胞 (antigen presenting cell, APC) 後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，有些活化 T 細胞分化為 Th1 免疫反應，以避免 IgE 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 (macrophage) 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)，以增強免疫反應。

有研究指出，在 *in vivo* 老鼠模式中，以腹腔注射 ovalbumin 致免，並給予 β -聚醣類的靈芝多醣 (PS-G)、*Sclerotinia sclerotiorum* glucan (SSG) 或 *Acetobacter polysaccharogenes* AC-1，結果顯示，脾臟細胞皆產生 ovalbumin 專一性之 Th1 相關的細胞激素 IFN- γ 上升，而與 Th2 相關的細胞激素 IL-4、IL-5 則下降 (Lin *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2001)。

臨床研究也指出，在過敏鼻炎患者 (allergic rhinitis, AR) 進行鼻部致敏試驗，在 β -glucan 餵食後可顯著降低鼻腔沖洗液中 IL-4、IL-5 表現量和 eosinophil 的數量，

而顯著升高 IL-12 量 (Cengiz Kirmaz *et al.*, 2005)。

第五節 豆類發酵食品

在食品工業上，發酵作用的定義是指運用生物體使有機物分解的生物化學反應過程，此技術常用於製酒，製備豆類發酵食品。

在發酵過程中，微生物可分解大分子物質及營養阻害物質並保留食物中的一些活性成分，如多醣，膳食纖維，生物類黃酮等，增加易消化性和增進生物可利用率，並代謝某些對人體不利的因子如低聚醣、脹氣因子等，以提高營養價值，而微生物代謝產生的許多代謝產物，許多亦有調節有機體生物功能的作用，如某些發酵物可消除自由基，並抑制有害物質產生，達抗老化和增強生物體抵抗力 (Wang *et al.*, 2006)。此外，發酵亦具有保存食物的效果，既可防止不良微生物腐敗，又可防止氧化使品質劣敗，亦有促進食物風味變好之效 (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，味噌湯具有降低胃癌死亡率的效果 (Ebine, 1986)、天貝(一種印尼食品)具有抗氧化活性，發酵後產生抗菌物質，能抑制某些格蘭氏陽性菌生長 (Winarno & Reddy, 1986)、納豆(natto)則是發酵大豆食品中機能性效果研發最完全的，其可保護不飽和脂肪酸和細胞免於氧化，其效果與維他命 E 相當甚至更高，以達延年益壽之效，納豆尚具溶解血栓、預防骨質疏鬆症，強抗菌性之效、Chungkukjang (韓國式納豆)亦被發現能抑制免疫細胞中 5-脂氧合酶(5-lipoxygenase)活性並降低白三烯(leukotriene)分泌量，並緩解實驗小鼠的耳朵腫脹(ear edema)發炎症狀 (Choi YH. *et al.*, 2008)。

第六節 實驗動物模式介紹

1. 異位性皮膚炎小鼠模式 (Atopic dermatitis, AD)

異位性皮膚炎又稱異位型溼疹(atopic eczema)，為一種慢性和反覆性症狀，發

炎性，搔癢的皮膚疾病(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。患者的皮膚對許多東西有異常的發炎反應，如一些刺激物、食物、空氣中過敏原(如塵蟎)，而出現紅腫、片狀條紋、非常癢的症狀。研究顯示，大約有 50%的病患是在一歲以前發病，有 30%病患是在一到五歲發病，另有將近 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)目前認為異位性皮膚炎的機制相當複雜，包括基因感受性、免疫功能、環境因子、生化代謝異常、皮膚障壁缺陷等(Fartasch, 1997; Leung and Bieber, 2003; Pastore *et al.*, 2007; Trautmann *et al.*, 2000; Geha, 2003; Howell *et al.*, 2004; Novak *et al.*, 2003)。

就免疫功能上探討，約在 70%~80%異位型皮膚炎患者血液中可測得免疫球蛋白 IgE 有上升的情形，同時也可看到患者血液中的嗜酸性白血球(eosinophil)數量上升。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異性 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 IFN- γ ，此一免疫功能上的異常導致病人容易產生較多 IgE。此外這些細胞激素也會誘發細胞趨化因子 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)、E-selectin 以及 intracellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1)表現增加，使得 eosinophil 浸潤到皮膚發炎處 (Hanifin *et al.* 1996; Spergel *et al.* 1998; Wakita *et al.* 1994)。

腸道菌叢亦為過敏疾病中一個重要的因子，在臨床研究指出，過敏性孩童的腸道菌叢與無過敏疾病的孩童存有差異(Ouwehand *et al.*, 2001; Isolauri & Salminen, 2008; Shreiner *et al.*, 2008)。與無過敏疾病的孩童相比，過敏性孩童具有較少 *Bifidobacterium* 和較多 *Clostridium*，且有較高和成人相似的 *Lactobacilli* 菌叢分布 (Bjorksten *et al.*, 2001; Kalliomaki *et al.*, 2001; Murray *et al.*, 2005; Sepp *et al.*, 2005; Mah *et al.*, 2006)。亦有研究指出，比較以母乳餵食的嬰兒和母乳替代品餵食的嬰兒，母乳餵食的嬰兒具有較低過敏發生率，及較高腸道 *Bifidobacteria* 菌量、較低 *Clostridia* 菌量(Kalliomaki *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2003)。

2. 小鼠耳朵腫脹過敏試驗模式(mouse ear swelling test, MEST)

小鼠耳朵腫脹測試是一種國際公認的最方便的皮膚過敏原動物測試模式之一，試驗方式為利用將BALB/c小鼠以陽性過敏物質(例如ovalbumin)，在誘發階段第0、1、2天進行腹部的皮內注射，建立MEST的模式，誘發後第10天再進行致敏化過程，在左右耳分別以受試藥劑、溶劑進行耳朵皮內注射，注射後第11、12天(24、48小時)測量耳朵的腫脹程度，當左耳較右耳腫脹增加大於20%做為判定標準。(行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所自行研究期末報告書,民國96)。

3. DSS 誘導小鼠腸炎模式(DSS-induced colitis)

發炎性腸道疾病(Inflammatory bowel disease, IBD)是一群消化道疾病的共同稱呼，包括克隆氏腸炎(Crohn's disease, CD)和潰瘍性結腸炎(ulcerative colitis, UC)等。IBD之共同特徵是慢性腸炎導致腹痛、直腸出血、嘔吐、腹瀉，甚至是在消化道以外的區域也會出現肝炎、膽管炎、關節炎等症狀，但很少造成致命危險 (Fiocchi *et al.*, 1998)。

實驗上常以右旋醣酐硫酸酯鈉(dextran sulfate sodium, DSS)建立動物腸炎模式，DSS為非基因毒性之大腸致癌物質，會造成啮齒類動物誘發大腸炎症，因此常被用做炎症相關大腸癌之研究，研究大多將DSS溶於飲水中配置成濃度1%至5%以口服給予，引發類似於人類的潰瘍性腸炎(ulcerative colitis, UC)特徵的炎症(Okayasu *et al.*, 1990)，其機制尚未清楚，但大致認為DSS主要是藉由破壞腸道表皮細胞造成腸道曝露於外在抗原而產生發炎現象。

腸道菌叢為腸道發炎疾病一個重要的致病因子，在臨床研究中指出，在有IBD的病人可以看到腸道細菌的分布不均的現象，被認為有保護功能的細菌例如 *Bifidobacteria* 和 *Lactobacilli* 的量減少，並看到 *E. coli* 的量上升。研究也發現，在嚴重的克隆氏腸炎疾病中，無氧呼吸的腸道菌叢會顯著的增加，特別是 *Bacteroides* 屬的細菌(Ruseler-van Embden JG *et al.*, 1983)。

在動物實驗研究也有同樣的發現，研究指出，HLA-B27基因轉殖大鼠會自發

性產生慢性腸炎，然而若將基因轉殖大鼠置於無菌空間則不會有腸道發炎產生 (Taurog JD *et al.*, 1994)，IL-2缺失的小鼠亦會在十周大時產生腸道發炎疾病，但若將小鼠置於無菌空間亦不會有腸道發炎現象產生(Ku'hn R. *et al.*, 1993)。研究亦指出，在DSS誘導的腸炎中以抗生素Metronidazole和ciprofloxacin治療可以減輕DSS誘導急性腸炎的症狀，但在慢性模式上則失效(Hans *et al.*, 2000)。

第七節 研究動機與目的

由前述文獻可知，腸道菌相與過敏及大腸發炎疾病的確有直接的關係，因此本研究欲探討啤酒酵母大豆發酵產物是否可以調節菌相，並藉著調節菌相的功能影響免疫系統以達到緩解過敏及大腸發炎疾病的功能。

本研究建立三種動物模式—異位性皮膚炎小鼠模式、小鼠耳朵腫脹過敏模式、DSS 誘導小鼠腸炎模式，探討持續進行食道插管 SCLFP (啤酒酵母大豆發酵產物) 餵食之後，於老鼠犧牲當天收集腸道渣滓的方式來分析其中各種細菌專一性的 16S rDNA 含量，以得知腸道環境中各種細菌的數量，藉以觀察各種細菌量在餵食後是否有產生改變，並收集發炎部位相關的淋巴結如浸潤淋巴結以及腸繫膜淋巴結，分析細胞激素的分泌是否在餵食後有所改變，並與細菌的結果做連接，此外並定期觀察老鼠外觀症狀、體重、各項發炎指標，並製作發炎組織切片，以觀察在症狀上是否有改善的現象。

第二章 材料與方法

第一節 實驗動物小鼠

購自台大醫學院動物繁殖組之 4~5 周 BALB/c 雌鼠，於台大醫學院動物代養組飼養於溫度 20~22 度的代養環境中，設定白天及夜晚各 12 個小時循環，飼料與飲水於老鼠自由取食。

第二節 啤酒酵母菌豆類發酵產物(SCLFP)的製備

實驗中所使用之啤酒酵母菌豆類發酵產物(*Saccharomyces cerevisiae* legume fermented product, SCLFP)是由廠商提供，其主要成分為大豆、黑豆、紅豆、芥花油等，而其大概製備的流程如下：

- (1)將各種豆類分別潤溼及浸泡；
- (2)泡軟後研磨成液狀，置於發酵槽中由啤酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)進行 150 個小時的發酵作用；
- (3)最後以高溫乾燥，將不同豆類產物以一定比例混合，裝入膠囊中即完成。

第三節 小鼠食道插管餵食

將餵食管裝置在注射器上，伸進小鼠食道的方式強迫定量餵食；將 SCLFP 溶於二次水中，調配濃度為 150 mg/ml；自老鼠七周大時開始餵食，每周餵食三次，每次餵食 0.2 ml/隻。

第四節 異位性皮膚炎(Atopic dermatitis, AD)模式建立

主要是參考台大醫學院皮膚科王莉芳醫師實驗室的實驗方法進行貼皮致敏(epicutaneous sensitization)以及參考文獻(Spergel *et al.*, 1998)的方式。利用兩種藥劑--雞卵蛋白(ovalbumin, OVA): 以一倍 PBS 配製濃度為 100 mg/ml, 用量為 20 μ l/patch,

即每隻為 2 mg、金黃色葡萄球菌腸毒素 B (Staphylococcal enterotoxin B)：以一倍 PBS 配製濃度為 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，用量為 10 $\mu\text{l}/\text{patch}$ ，即每隻 4 μg ；將兩種藥劑滴於皮膚貼布(finn chamber)上，將老鼠背部皮膚剃毛後，直接貼附，並用彈性繃帶加以固定，以每天換藥的方式，進行連續五天的貼皮致敏，再休息兩個禮拜再進行第二次的貼皮，貼皮三次後，老鼠在最後一天貼皮隔天犧牲(組別設計見圖一)。

第五節 耳朵腫脹過敏試驗(mouse ear swelling test, MEST) 模式建立

依據參考文獻(Kohtaro Fujihashi *et al.*, 2001)的方式，利用 OVA 以一倍 PBS 和 alum (40 mg/ml) 1:1 的比例配製濃度為 1mg/ml，用量為 50 $\mu\text{l}/\text{隻}$ ，即每隻給予 50 μg ，以腹腔注射的方式致免老鼠，隔兩周再打第二次，總共打三次後，再利用 OVA 以一倍 PBS 配製成 10 mg/ml，用量為 20 $\mu\text{l}/\text{隻}$ ，即每隻給予 200 μg ，在老鼠的左耳以皮下注射的方式致免老鼠，另在右耳以 PBS 皮下注射做為控制組，老鼠在 72 小時後犧牲(組別設計見圖六)。

第六節 DSS 誘導腸炎模式(DSS-induced colitis)建立

依據參考文獻(Philip Alex *et al.*, 2009)，利用分子量為 35000~50000 Da 的右旋酞酐硫酸酯鈉(Dextran sulfate sodium, DSS)以二次水配製濃度為 3%，並經過高壓滅菌以及 0.45 μm 濾紙過濾後即可使用。先將小鼠餵食四周後，將飲用水換成 3%DSS 達十天，隔天進行犧牲(組別設計見圖九)。

第七節 組織與檢體收集

糞便：犧牲時，將老鼠小腸和大腸取下，用針筒的尾端將其內的渣滓刮出，並蒐集置於-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

脾臟：將脾臟放置在 10 ml 之一倍 HBSS 於 10 公分培養皿，以兩片滅菌過的載玻片磨砂面分離出單細胞懸浮液，以茶包袋濾去大塊組織於 15 ml 離心管，在室

溫 1500 rpm 離心五分鐘 (Centrifuge 5415 D, Eppendorf)，倒掉上清液，將細胞沉澱拍散，每離心管加入冰的 10 ml 含 8.3% NH_4Cl 及 1% KHCO_3 之紅血球分解緩衝液 (RBC lysis buffer)，盡快在室溫 1500 rpm 離心五分鐘，倒去上清液，拍散細胞後，加入 2 ml 加入含有 10% 胎牛血清(fetal calf serum, FCS)，1% HEPES，1% L-glutamine，1% Penicillin/ Streptomycin 之 RPMI 1640 細胞培養液(complete RPMI, cRPMI)，最後細胞計數後備用。

淋巴結：將淋巴結放在 0.5 ml cRPMI 於 24 孔盤，藉由將淋巴結移至加有新鮮 cRPMI 的圓孔洗去表面血液，以滅菌過的 3 ml 針筒的活塞底部將淋巴結的細胞壓出，形成單細胞懸浮液，以茶包袋濾去大塊組織於 15 ml 離心管，在室溫 1500 rpm 離心五分鐘，倒掉上清液，將細胞拍散，加入 1 ml cRPMI，最後細胞計數後備用。

第八節 細菌核酸萃取(bacterial DNA extraction)

1. 利用糞便 DNA 萃取套組 ZR Fecal DNA MiniPrep(ZYMO RESEARCH)和 QIAamp DNA Stool Mini Kit(QIAGEN)萃取出糞便中的 DNA。
2. 取 10-50 mg 糞便加入 200 μl lysis buffer(50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1% SDS)，再加入 0.3 g Zirconia-Silica beads (Biospec. Co.)和一顆 3 mM Tungsten-Carbide beads (QIAGEN)，加熱至 90 $^{\circ}\text{C}$ 十分鐘，使用均質振盪器 FastPrep 120 FP120 (Bio101, SAVANT)以震速 4.0、5.0、6.0 各 1 分鐘，加入 150 μl 1% SDS，加熱至 70 $^{\circ}\text{C}$ 十分鐘，加入 500 μl phenol 作用兩分鐘，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 離心 10000rpm 三分鐘，取上層液加入 500 μl phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1 混合)，震盪均勻後在 4 $^{\circ}\text{C}$ 離心 10000 rpm 三分鐘，取上層液加入 1000 μl 100% ethanol、40 μl 5 M NaCl，隔夜沉澱一個小時，取出後在 4 $^{\circ}\text{C}$ 離心 10000 rpm 三十分鐘，加入 1000 μl 70% ethanol，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 離心 10000 rpm 三分鐘，最後將 DNA pellet (白色顆粒) 以 50 μl ddH₂O 回溶。

第九節 組織核酸萃取(tissue RNA extraction)

將犧牲後的 BALB/c 老鼠組織加入液態氮磨碎後，加入 solution D (4M Guanidinium iso-thiocyanate、25 mM Sodium citrate pH 7.0、0.5% Sarcosyl、0.1 M 2-Mercaptoethanol)，搖晃均勻後分別加入 2 M Sodium Acetate pH 4.0、Acid phenol (water-saturated)、Chloroform:isomylalcohol (49:1)，搖晃均勻後在冰上作用 20 分鐘，經 10000 rpm 於 4°C 離心 20 分鐘，取上清液加入一倍體積 Isopropanol 於 -20°C 沉澱一小時。取出 sample 在 10000rpm 於 4°C 離心 20 分鐘，倒掉上清液後取 DNA pellet 加入 0.5ml solution D 回溶並移置 eppendorf 中，加入 0.5ml Isopropanol 於 -20°C 沉澱一小時。經光譜分析儀(Ultrospec 3300 pro, Amersham Bioscience)定量 RNA 濃度後，取 2 µg RNA 以 RQ1 DNase(Promega)於 65°C 作用 30 分鐘以進行 DNA 清除，再利用 M-MLV Reverse Transcriptase(Promega)以及 oligo-dT 於 37°C 作用一小時進行反轉錄。

第十節 聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)

將 cDNA 加入 0.04 µM 的正向和反向引子、1 unit Taq polymerase 及 0.25 mM dNTP 及 2 µl 的 10x buffer，加滅菌水補足體積至 25 µl，PCR 條件如下：95°C 五分鐘，25 個循環(95°C 45 秒，58°C 或 65°C 45 秒，72°C 一分鐘)以及 72°C 兩分鐘，作用結束後取 10 µl DNA 進行 2% 洋菜膠 DNA 電泳。最後洋菜膠照相完的結果以 Analysis System 120 (Scientific Imaging Systems, Eastman Kodak)分析。

第十一節 即時定量聚合酶連鎖反應(real-time PCR)

將 cDNA 和引子(Applied Biosystem)利用 POWER SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystem)於 Applied Biosystem 7500 system 中進行同步定量聚合酶連鎖反應，不同基因之 Ct 值結果將以 bacterial 16S rDNA gene 或 mouse β-actin gene 做為基準，代入以下公式：Relative expression= (2^{-dCt}) 。(引子序列清單附於附表 1)

第十二節 組織化學染色(H&E stain)

在老鼠犧牲當天取下大腸組織，以 10% 福馬林浸泡一天以上後送至台大醫學院動物中心進行脫水滲蠟，並以石蠟進行包埋，之後將組織切成 5-8 μm 大小的標本，最後即可進行 H&E 組織化學染色。

- (1) 將標本浸入 xyline 中，進行脫蠟；
- (2) 依次浸入 100%-70% 的酒精之中，進行回水；
- (3) 浸入 Haematoxylin 中染色約 100 秒，由流水褪色後浸入氫水約十秒進行固定，再放入 Eosin 中染色約四十秒；
- (4) 待組織風乾後，滴上適量中性樹脂進行封片。

第十三節 統計分析

本研究中結果皆以平均值(Mean)與標準差(Standard Deviation)表示，利用 Student's t-test 的 unpaired t test 比較實驗結果中各組數據之間的差異，並以 $P < 0.05$ 做為達到統計學上顯著差異的界定標準。*表示統計學上 $P < 0.05$ ，**表示統計學上 $P < 0.001$ ，***表示統計學上 $P < 0.0001$ 。



第三章 實驗結果

第一部分 異位性皮膚炎小鼠模式(atopic dermatitis, AD)

第一節 異位性皮膚炎小鼠腸道菌量

本實驗建立 OVA + SEB 貼皮致敏老鼠異位性皮膚炎模式，以觀察異位性皮膚炎患者體內腸道菌叢分布現象，並觀察餵食 SCLFP 是否有調節腸道菌叢功能。在此六種腸道常見菌叢中細菌相對量可以看出，即使是在同一組老鼠中，每隻老鼠的腸道內菌叢分布都不大相同(圖二)。在 OVA + SEB 貼皮致敏老鼠模式建立後，其對腸道菌叢中 *Clostridia*、*segmented filamentous bacterium (SFB)*、*Bacteroides*、*Enterobacteria*、*Bifidobacteria* 的菌量沒有太大改變，但造成 OVA+SEB / H₂O 組老鼠的 *Lactobacilli* 量下降。餵食 SCLFP 的 OVA+SEB / SCLFP 組，與 OVA+SEB / H₂O 組比較，*Lactobacilli* 則有顯著增加 (p=0.0360)，而在 *Clostridia*、*SFB*、*Bacteroides*、*Enterobacteria*、*Bifidobacteria* 的菌量上沒有顯著差異。

第二節 異位性皮膚炎小鼠浸潤淋巴結細胞激素表現

以 OVA + SEB 貼皮致敏建立老鼠異位性皮膚炎模式模擬異位性皮膚炎患者患部高 Th2、Th17 免疫反應的發炎現象，並在 RNA 層級觀察 Th2 相關的細胞激素 IL-4 和 Th17 相關的 IL-17A 和 IL-17F，並觀察 SCLFP 能否提高抗發炎細胞激素 IL-10 和 Th1 相關細胞激素 IFN- γ 並抑制 Th2 和 Th17 免疫反應。以含 OVA 培養液刺激 24 小時後的皮膚浸潤淋巴結細胞中，OVA + SEB 貼皮致敏造成 OVA+SEB / H₂O 組老鼠所表現的 OVA 專一性 IFN- γ 、IL-4 上升，也造成 OVA 專一性 IL-17A、IL-17F 上升(圖三)，餵食 SCLFP 的 OVA+SEB / SCLFP 組老鼠與 ddH₂O 組比較則有造成表現 OVA 專一性 IFN- γ 上升，和 OVA 專一性 IL-4、IL-17A、IL-17F 下降的現象。

以不含 OVA 的培養液培養 24 小時後的浸潤淋巴結細胞中，OVA + SEB 貼皮致敏造成 OVA+SEB / H₂O 組所表現的總 IL-17A 和 IL-17F 上升(圖四)。餵食 SCLFP

的 OVA+SEB /SCLFP 組與 OVA+SEB / H₂O 組比較則有造成總 IL-10 表現量上升，並造成總 IL-17A 和 IL-17F 表現量下降的現象。

第三節 異位性皮膚炎小鼠外觀症狀

從外觀觀察餵食 SCLFP 是否能改善老鼠異位性皮膚炎症狀。以 PBS + SEB 為藥劑的 PBS+SEB / H₂O 組，可看到有幾隻老鼠背部剃毛皮膚出現紅腫及發炎現象(圖五 A)，以 OVA+SEB 為藥劑亦觀察到 OVA+SEB / H₂O 組老鼠背部剃毛皮膚出現紅腫及發炎現象，潰瘍傷口和掉毛(圖五 B)，而餵食 SCLFP 的 OVA+SEB / SCLFP 組與 OVA+SEB / H₂O 組老鼠比較則可看到背部剃毛皮膚發炎現象不甚明顯，毛髮生長亦較快速正常(圖五 C)。

第二部分 小鼠耳朵腫脹過敏模式(mouse ear swelling test, MEST)

第一節 小鼠耳朵腫脹過敏模式腸道菌量

本實驗建立另外一種過敏模式—遲發型過敏模式，利用在耳朵進行皮下注射 OVA 導致產生耳朵腫脹過敏反應，欲觀察餵食 SCLFP 是否有調節腸道菌叢及降低過敏反應功能。在此四種腸道常見菌叢中細菌相對量可以看出，即使是在同一組老鼠中，每隻老鼠的腸道內菌叢分布都不大相同(圖七)。餵食 SCLFP 後的 OVA / SCLFP 組與 OVA / H₂O 比較，對腸道菌叢對 *Lactobacilli* 量有上升的現象，而在 *Clostridia*、*SFB*、*Bacteroides* 的菌量上沒有顯著趨勢。

第二節 小鼠耳朵腫脹過敏模式腸繫膜淋巴結 OVA 專一性 IL-10 細胞激素表現

為了觀察餵食 SCLFP 造成老鼠腸道菌叢分布量改變後，能否藉此影響腸道淋巴結的抗發炎相關的細胞激素 IL-10 分泌，我們取得老鼠腸繫膜淋巴結，以含 OVA 培養液刺激 24 小時後，觀察 RNA 層級中 OVA 專一性的 IL-10 表現。可看到餵食 SCLFP 的 OVA / SCLFP 組與 OVA / H₂O 組老鼠比較，OVA 專一性 IL-10 表現量有上升的現象(圖八)。

第三部分 DSS 誘導小鼠腸炎模式(DSS-induced colitis)

第一節 DSS 誘導小鼠腸炎模式腸道菌量

將 dextran sulfate sodium (DSS)加入老鼠日常飲水中建立老鼠腸道發炎模式以觀察腸炎患者體內腸道菌叢分布現象，並觀察餵食 SCLFP 有否有調節腸道菌叢功能。在此六種腸道常見菌叢中細菌相對量可以看出，即使是在同一組老鼠中，每隻老鼠的腸道內菌叢分布都不大相同(圖十)。在 DSS 誘導腸炎模式建立後，其對腸道菌叢中 *Lactobacilli*、*Clostridia*、*SFB*、*Bifidobacteria* 菌量有下降的現象，*Lactobacilli* 有達顯著差異($p=0.0091$)，而 *Bacteroides*、*Enterobacteria* 菌量則有上升的現象，而餵食 SCLFP 的 DSS / SCLFP 組與 DSS / H₂O 組比較，*Lactobacilli* 菌量則有顯著上升的現象($p=0.0235$)，而在 *Clostridia*、*SFB*、*Bacteroides*、*Enterobacteria*、*Bifidobacteria* 的菌量上沒有顯著趨勢。

第二節 DSS 誘導小鼠腸炎模式疾病活性指數

欲觀察餵食 SCLFP 後，能不能改善 DSS 誘導的腸道發炎模式的症狀。H₂O / H₂O 組和 H₂O / SCLFP 組可看到在體重下降程度、腹瀉程度、腸出血程度三項症狀評分中(積分計算參考附圖三)，皆無疾病產生現象(圖十一)，而以 3% DSS 誘導的 DSS / H₂O 組自餵食 3% DSS 飲食水後第七天起和 H₂O / H₂O 組比較達顯著差異，可開始看到些微的症狀，積分約為 2~3 分，有出現溫和的腹瀉，及些微直腸滲血的狀況，而積分一直增加到到第十天犧牲，積分約為 7~8 分，出現嚴重的腹瀉，以及直腸流血、脫缸的現象 ($p=0.0401, 0.0036, 0.0003, <0.0001$)，然而在餵 SCLFP 的 DSS / SCLFP 組與 DSS / H₂O 組比較，可發現第四天起，症狀有稍微較減輕的現象，但差異未達顯著。

第三節 DSS 誘導小鼠腸炎模式體重

欲觀察餵食 SCLFP 後，能不能改善以 DSS 誘導腸道發炎模式而導致體重下降

症狀。H₂O / H₂O 組和 H₂O / SCLFP 組可看到皆無體重下降產生現象(圖十二),SCLFP 組體重尚有明顯上升現象,在第五天即增加體重的 5%,在第六天和第十天達到顯著差異(p=0.0425,0.0214),以 3% DSS 誘導的 DSS / H₂O 組自餵食 3% DSS 飲食水後第七天起可開始看到體重開始下降,下降程度約為 95~99%,下降現象一直增加到第十天犧牲,下降程度約為 90~95%,然而在餵食 SCLFP 的 DSS / SCLFP 組和 DSS / H₂O 組比較,在第七天到第十天期間並未看到體重有明顯改變。

第四節 DSS 誘導小鼠腸炎模式脾臟重量

在急性或慢性發炎期,脾臟的免疫系統過度活化,會導致脾臟重量增加,實驗常以此判斷個體發炎嚴重情形,因此我們想觀察餵食 SCLFP 後,能不能改善 DSS 誘導的腸道發炎模式脾臟重量增加的症狀。以 3% DSS 誘導的 DSS / H₂O 組可看到脾臟重量有顯著上升的現象(p=0.0271)(圖十三),而餵食 SCLFP 後的 DSS /SCLFP 組與 DSS / H₂O 組相比脾臟重量則有顯著下降現象(p=0.0172)。

第五節 DSS 誘導小鼠腸炎模式腸道長度

在腸道發炎期,由於腸道發炎嚴重導腸道長度變得粗短,故實驗常以測量腸道長度判斷腸道發炎嚴重情形,因此我們想觀察餵食 SCLFP 後,能不能改善 DSS 誘導的腸道發炎模式腸道因發炎而長度縮短的症狀。以 3% DSS 誘導的 DSS / H₂O 組可看到腸道長度有顯著縮短的現象(p=0.0014)(圖十四),而在餵食 SCLFP 後的 DSS / SCLFP 組與 DSS / H₂O 組相比,腸道長度未有明顯改變。

第四章 討論

在近兩三年的研究指出，許多種細菌跟免疫的調節息息相關。例如在大腸的固有層中，節絲狀菌(*segmented filamentous bacterium, SFB*)可引起會分泌IL-17和IL-22的CD4⁺ 輔助T細胞(Th17)產生，有可能是SFB透過提高宿主和發炎以及抗微生物相關的基因表現(Ivanov *et al.*, 2009)。人體內高量常在菌叢*Bacteroides fragilis*，可在腸道誘導出表現FoxP3調節性T細胞(Tregs)產生，並發現 *B. fragilis*可分泌免疫調節分子polysaccharide A (PSA)，將CD4⁺ T細胞轉變為可分泌IL-10的FoxP3⁺調節性T細胞(June L. Round *et al.*, 2010)。腸道內生性的腸道菌叢中，*Clostridium*中尤其群集IV和XIVa兩屬，可造成腸道調節性T細胞數量的增加(Atarashi *et al.*, 2010)。

第一節：異位性皮膚炎老鼠模式(Atopic dermatitis, AD)

綜觀異位性皮膚炎(atopic dermatitis, AD)的致病機制，由於表皮細胞功能異常，導致刺激物和過敏原容易穿透進皮膚，當這些物質進入皮膚之後則會刺激角質細胞釋放許多不同種細胞激素和細胞趨化素，並刺激角質細胞和前發炎激素繼續生成，以及樹突細胞(dendritic cell)、T淋巴球、肥大細胞(mast cell)和表皮細胞，持續造成發炎和免疫反應。IgE 對環境過敏原的過度反應也是 AD 重要的因子，而樹突細胞和肥大細胞亦參予此反應，肥大細胞分泌血管活化胺(vasoactive amine)、組織胺(histamine)和一些細胞激素造成 IgE 參予的過敏反應，樹突細胞則透過特殊膜受器結合 IgE，並呈現可結合 IgE 的過敏原給 T 細胞，使 Th2 細胞分化並活化，在 AD 患部的大量活化樹突細胞透過分泌發炎細胞激素和細胞趨化素直接造成發炎反應。eosinophil 則由纖維母細胞分泌的細胞趨化素召喚，並分泌毒性分子和 IL-12，導致 Th1 反應產生，造成發炎反應持續(附圖一)。

近年來，AD的Th1/Th2的理論已經被改寫，出現了新的因子：分泌IL-17的輔助型T細胞(Th17) (Weaver *et al.*, 2007)。Th17細胞被認為是可分泌許多特定分泌細

胞激素如IL-17A、IL-17F、IL-22和IL-26。Th17細胞已被發現參與許多人體自體免疫疾病如多發性硬化症、類風濕性關節炎、腸道發炎疾病、乾癬(psoriasis)，以及參予胞外致病原清除(例如*Candida albicans*, *Borrelia burgdoferi*, *Mycobacterium tuberculosis*, 和*Streptococcus pneumoniae*)(Tesmer *et al.*, 2008)(附圖二)。

在臨床研究中發現，在AD病患身上出現許多Th17細胞和IL-17表現(Koga *et al.*, 2008)，分析AD病患的週邊血液單核球(PBMC)，發現IL-17⁺CD4⁺T細胞量有顯著的增加，且IL-17⁺CD4⁺T細胞量與AD症狀嚴重性有相關性，而在皮膚傷口患部，IL-17表現量也有增加，而在乳突真皮層以及表皮層中，IL-17⁺CD4⁺T細胞也出現較高數量。研究亦指出，IL-17的表現量在急性AD較慢性還高(Toda *et al.*, 2003)。

在前面文獻回顧提到，臨床研究中指出過敏患者腸道具有較少量的*Lactobacilli*、*Bifidobacteria*、*Enterococci*和較多量的*Clostridia*、*Staphylococcus aureus*，而在圖二裡可看到，在OVA貼膚致敏老鼠模式建立後，其對腸道菌叢中*Clostridia*、*SFB*、*Bacteroides*、*Enterobacteria*、*Bifidobacteria*的菌量沒有太大改變，但造成OVA+SEB/H₂O組中老鼠的*Lactobacilli*量下降。*Lactobacilli*量下降的結果與文獻相符，顯示在實驗上建立的小鼠AD模式，亦可觀察到和臨床結果一致的*Lactobacilli*量下降的結果，但*Bifidobacteria*的菌量則沒有看到顯著的趨勢，*Clostridia*的菌量亦無看到上升的現象，有可能是實驗模式環境與人體臨床環境的差異，亦或同菌種中和AD致病機轉無關之不同株數量不受影響的關係。

餵食SCLFP的SCLFP組，與ddH₂O組比較，*Lactobacilli*則有顯著增加，此結果則與文獻探討中所述益生菌和益生素的餵食增加*Lactobacilli*的菌量相符，但在*Bifidobacteria*的菌量上沒有顯著趨勢。

在益生菌方面的研究指出，在家族有過敏史的高過敏風險幼兒在出生六個月餵食低聚半乳糖(galactooligosaccharides, GOS)和低聚果糖(fructo-oligosaccharides, FOS)，有顯著降低溼疹(eczema)發生率的現象(Moro G. *et al.*, 2006)，而餵食達兩年

之後，GOS/FOS 的保護性依然存在，且哮喘(recurrent wheeze)、過敏性蕁麻疹(allergic urticaria)的發生率也會顯著性下降(Arslanoglu S. *et al.*, 2008)。

在益生菌方面的研究指出，餵食益生菌可調節腸道免疫平衡以達到抗過敏的效用，可能是藉由刺激產生 Th1 相關的細胞激素(Fuller, 1991; Hessele *et al.*, 1999; Miettinen *et al.*, 1998)。在大鼠身上進行 *Lactobacilli* 不同 species 的單一種細菌接種，可發現不同種的 *Lactobacilli* species 可影響免疫系統 Th1 和 Th2 的平衡。不同 species 之間可抑制彼此所誘導的細胞激素分泌，在腸道共同作用進而達到免疫平衡(Christensen *et al.*, 2002)。文獻亦推測，益生菌可以與黏膜免疫系統有交互作用，將人類的周邊血液單核球(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)以多種 *Lactobacilli* 菌種刺激，可增加 TNF- α 、IL-6、IL-10 表現(Miettinen M. *et al.*, 1996)。

探索 *Lactobacillus* 影響免疫系統機制的研究指出，*Lactobacillus* 似乎可透過樹突細胞(dendritic cell, DC)調節免疫反應，如用三種 *Lactobacillus* strain 可分別在 *in vitro* 環境下使人類骨髓性樹突細胞(human myeloid dendritic cell, MDC)表現 HLA-DR、CD83、CD40、CD80 和 CD86 並分泌高量 IL-12、IL-18 但不會分泌 IL-10。*Lactobacillus* strain 可顯著地使 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 細胞轉變為 Th1 和 Tc1，使得分泌高量 IFN- γ ，而無 IL-4 和 IL-13 (Mansour Mohamadzadeh *et al.*, 2005)。

本研究所使用的健康食品啤酒酵母菌大豆發酵產物(SCLFP)為一種利用啤酒酵母菌去發酵三種以上豆類磨成的粉末再乾燥所得。前面文獻回顧中提到，真菌和酵母菌的細胞壁主要成分為 β -glucan，一般認為其可被先天性免疫系統中分子型態辨認受器(pattern recognition receptor, PRR)和補體辨認，刺激抗原呈現細胞活化 Th1 免疫反應，進而抑制 Th2 免疫反應，避免 IgE 引起的過敏反應。

Interleukin-10 (IL-10) 是一個與抗發炎作用有關的細胞激素，在研究中已指出它在阻止發炎反應與自體免疫疾病中有重要角色(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 Th1、Th2、Th17、調節性 T 細胞(Treg)等，也可被先天性免疫細

胞表現，包含樹突細胞(dendritic cell)、巨噬細胞(macrophage)、肥大細胞(mast cell)、自然殺手細胞(Natural killer cell)、嗜酸性白血球(eosinophil)、嗜中性白血球(neutrophil)等(Saraiva and O'Garra, 2010)。IL-10 的產生目前被認為跟免疫耐受性以及調節性 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)。

在前述臨床症狀上目前被發現 Th17 細胞在 AD 似乎亦扮演重要的角色，而在實驗模式中，同樣以 OVA 貼皮致敏的小鼠造成了類似 AD 症狀的皮膚過敏症狀，並造成 IL-17A 和 IL-17F 在表皮表現(He *et al.*, 2007)，另一個 IL-17 家族的成員 IL-17E (又名 IL-25)，亦被認為參予 Th2 主導的發炎反應，而在 AD 病患的皮膚患部以及氣喘患者的肺部皆可看到 IL-25 以及 IL-25R 的表現(Wang *et al.*, 2007)。

在圖三及圖四結果中，OVA 貼膚致敏造成老鼠浸潤淋巴結細胞中所表現的總 IL-17A 和 IL-17F 量上升，OVA 專一性 IFN- γ 、IL-4、IL-17A、IL-17F 上升，此與文獻結果一致，而餵食 SCLFP 與 ddH₂O 組比較則有造成表現總 IL-10 表現量上升，總 IL-17A 和 IL-17F 表現量下降，和 OVA 專一性 IFN- γ 上升，OVA 專一性 IL-4、IL-17A、IL-17F 下降。推測有可能是 SCLFP 的餵食增加了 *Lactobacilli* 的菌量，而 *Lactobacilli* 藉由刺激產生 Th1 相關的 IFN- γ ，和 Treg 相關的 IL-10，而降低了 Th2 相關的 IL-4 及 Th17 相關的 IL-17A 和 IL-17F。而根據實驗室先前的研究，可看到酵母菌細胞壁的 β -glucan 可以直接調節免疫系統走向 Th1 的反應，故有可能 SCLFP 透過 β -glucan 直接調節了浸潤淋巴結細胞的免疫反應。

研究指出，將益生菌（包括 *Lactobacilli* 屬和 *Bifidobacteria* 屬）補充小孩及成人異位性皮膚炎患者的日常飲食，發現有減輕症狀的效用(Rosenfeldt *et al.*, 2003; Rijkers *et al.*, 2010)。研究指出餵食小孩異位性皮膚炎患者益生菌 *Bifidobacterium lactis* Bb-12，*Lactobacillus rhamnosus* GG 和 *Lactobacillus fermentum* VRI 003 PCC 顯著降低其異位性皮膚炎症狀指數（SCORing Atopic Dermatitis (SCORAD) index）。

以 PBS+SEB 為藥劑的 Negative 組，可看到有幾隻老鼠背部剃毛皮膚出現紅腫及發炎現象，顯示 SEB 單獨致敏亦可引起異位型皮膚炎的過敏反應，而以 OVA+SEB 為藥劑亦觀察到 ddH₂O 組老鼠背部剃毛皮膚出現紅腫及發炎現象，潰瘍傷口和掉毛，餵食 SCLFP 後與 ddH₂O 組老鼠比較則可看到背部剃毛皮膚發炎現象不甚明顯，毛髮生長亦較快速正常。顯示這樣的系統中，SCLFP 的劑量已經足夠調節菌量和免疫系統，並在症狀上看到效果。

第二節：小鼠耳朵腫脹試驗(mouse ear swelling test, MEST)

MEST 為一種第四型過敏反應(type IV hypersensitivity)，又稱延遲性過敏反應 (delayed-type hypersensitivity)，其在接觸抗原後 1~3 天出現，並與細胞性免疫反應共同造成有抗體參予的過敏反應，多位在表皮部位發生，例如接觸性皮膚炎。機制為在過敏原進入組織之後，活化 Th1 淋巴球來到組織，Th1 釋放 TNF- α 、TNF- β ，造成血管通透性增加，也釋放 IL-3 和 GM-CSF 刺激巨噬細胞(macrophage)產生，並釋放 IFN- γ 和 TNF- α 活化 macrophage，最後造成組織腫脹(附圖三)。

餵食 SCLFP 後，與 ddH₂O 組比較，對腸道菌叢對 *Lactobacilli* 量有上升的現象，而在 *Clostridia*、*SFB*、*Bacteroides* 的菌量上沒有顯著趨勢。取得老鼠腸繫膜淋巴結，以含 OVA 培養液刺激 24 小時後，觀察 RNA 層級中 OVA 專一性的 IL-10 表現。可看到餵食 SCLFP 與 ddH₂O 組比較有造成 OVA 專一性 IL-10 表現量上升的現象。此與前 AD 模式中看到一致的現象，所以在一個不同機制的過敏模式一樣可以看到 SCLFP 餵食後產生同樣的結果。

第三節：DSS 誘導腸炎老鼠模式(DSS-induced colitis)

目前研究已歸納出，發炎性腸道發炎疾病(Inflammatory bowel disease, IBD)的致病因子有四：基因感受性、腸道微生物抗原和佐劑、免疫反應、環境刺激物。

腸道微生物抗原在臨床腸道發炎疾病的疾病成因中扮演重要角色，尤其是在

急性期腸炎。從腸道細菌總量和組織的破壞程度的關聯性可以看出，組織的破壞程度導致細菌倍增進而造成發炎程度加重(Gerardo A. Hernández *et al.*, 2003)。在許多動物系統中，腸炎和免疫刺激的模式在不存在腸道菌叢的狀況下都無法建立(Sartor RB, 2004)。而給予抗生素及益生菌治療後，許多模式的症狀都會改善。

前述文獻回顧中提到，在臨床研究中，在 IBD 的病人身上可以看到腸道細菌有分布不均的現象，被認為有保護功能的細菌例如 *Bifidobacteria* 和 *Lactobacilli* 的量會減少，並看到 *E. coli* 和無氧呼吸細菌量如 *Bacteroides* 屬會顯著上升。

目前在實驗小鼠上，最常用來誘導模式產生的方式即是以餵食右旋醣酐硫酸酯鈉(dextran sulfate sodium, DSS)等方式。DSS的確切機制目前還不甚清楚，目前有幾點可能的說法，如DSS有可能直接影響了腸道的穿透性。細胞間隙連結(tight junction)蛋白zona occludens-1在DSS餵食後第一天就有顯著減少，導致腸道穿透性在第三天就顯著增加，造成後續大腸發炎反應(Kitajima *et al.*, 1999; Poritz *et al.*, 2007; Venkatraman *et al.*, 2000)。在急性和慢性DSS誘導的腸炎模式中，第一天就可發現腸道巨噬細胞(macrophage)、肝臟Kupffer細胞和腸繫膜淋巴結胞皆吸收進少量DSS (Kitajima *et al.*, 1999)。結合以上兩點發現可說明腸道通透性異常為DSS誘導的腸炎早期致病機制。另一種可能說法是DSS在大腸黏膜直接造成濃度相關型的細胞毒性，造成表皮細胞上蛋白integrin- $\alpha 4$ 和M290次單位改變，影響了它們和 $\gamma\delta$ -表皮細胞間T細胞的相互作用(Ni *et al.*, 1996)，而 $\gamma\delta$ -表皮細胞間T細胞的功用尚不明，但被認為與黏液保護和修復有關(Chen *et al.*, 2002)。

在免疫機制上面發現 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 細胞在 DSS 誘導的急性腸炎可能亦不是扮演重要角色。DSS 誘導急性腸炎中， $CD8^+$ T 細胞數量下降，而 $CD4^+$ T 細胞數量維持不變(Stevceva *et al.*, 2001)。而在 SCID、CD4 基因缺失、NK 基因缺失的老鼠，和無胸腺的 CD-1 裸鼠中皆可成功誘導 DSS 腸炎，顯示這些免疫細胞也非重要角色(Axelsson *et al.*, 1996)。

在細胞激素反應上發現 IFN- γ 、IL-4、IL-17F 皆參與 DSS 誘導腸炎模式的致

病機制：在 Swiss Webster 小鼠中觀察到 DSS 誘導腸炎模式細胞激素反應主要是 Th1 型，伴隨在發炎大腸組織中的 IFN- γ 和 IL-4 量增加(Dieleman *et al.*, 1998)，在 BALB/c 小鼠身上亦觀察到 IL-1、IL-12 和 TNF- α 與 DSS 劑量及大腸發炎症狀有正相關性(Egger *et al.*, 2000)，而在 IL-17 基因缺失的小鼠中發現 DSS 將誘導出更嚴重的腸炎反應，但在 IL-17F 缺失小鼠中卻發現 DSS 誘導腸炎模式症狀減輕，所以 IL-17F 亦被認為參與 DSS 誘導腸炎模式致病機制(Xuexian O. *et al.*, 2008)。

細菌在DSS誘導急性腸炎模式中的角色需要進一步探討，前面文獻回顧中提到，以抗生素Metronidazole和ciprofloxacin治療可減輕DSS誘導急性腸炎的症狀，而在小鼠身上建立DSS誘導腸炎後，餵食*L. paracasei*具有減輕發炎症狀的功能(Erika Milet *et al.*, 2009)，但亦有研究指出在無菌(Germ-free)鼠身上建立DSS誘導急性腸炎，一樣可看到嚴重的發炎反應(Kitajima *et al.*, 2001)，若給予一般腸道菌叢抗原反而可看到發炎反應減緩現象(Verdu *et al.*, 2000)，顯示腸道菌叢中有不同細菌在DSS誘導急性腸炎模式扮演不同角色。

但在大鼠身上建立以尾靜脈注射TNBS或口服DSS飲用水產生腸炎模式，不管是與急性期或慢性再作用期，其腸內細菌的總數量還是可看到皆比控制組顯著的高。而急性腸炎的細菌總數比慢性再作用期有更高顯著差異的細菌總數量。在急性腸炎，細菌的總數量和症狀嚴重指數有顯著的相關性(Gerardo A. Hernandez, *et al.*, 2003)。

若將養殖在無菌(germ-free)空間中的 HLA-B27 基因轉殖大鼠進行五種不同株中包含 *Bacteroides vulgatus* 接種，則將產生溫和性腸炎和胃炎，但若是去掉 *B. vulgatus* 再進行接種，則不會產生任何腸炎和胃炎發炎反應(Rath HC *et al.*, 1996)。若將 *B. vulgatus* 進行單菌接種，則會產生腸炎，但不產生胃炎(Rath HC *et al.*, 1999)。在 IL-10 缺失的老鼠中進行腸道菌 *E. faecalis* 和 *E. coli* 的單一細菌接種，老鼠皆產生腸炎症狀(Kim SC *et al.*, 2005)。*Klebsiella* 的單一細菌接種可引起溫和的全結腸炎(pancolitis)(Sartor RB, 2004)，而 *Bifidobacterium animalis* 的單一細菌接種可引起

遠端大腸和十二指腸發炎(Moran JP *et al.*, 2006)。

在圖十結果裡可看到，以 DSS 誘導腸炎模式建立後，其對腸道菌叢中 *Lactobacilli*、*Bifidobacteria* 菌量有下降的現象，此與文獻指出的現象是相符的，而 *Clostridium*、*SFB* 同樣也有下降的現象，在研究中似乎沒有著墨 DSS 和 *SFB* 菌之間的關係，也許可以據此再做進一步探討，而 *Enterobacteria*、*Bacteroides* 菌量則有上升的現象，此與文獻指出的現象是相符的，顯示這兩種菌可能在腸炎環境中的確會有增加的現象。

在益生菌方面的研究指出，在克隆氏腸炎疾病 (CD) 臨床研究中，在十名 CD 病患中，口服 21 天的果寡糖 (oligofructose) 和菊糖 (inulin)，將造成腸炎發炎症狀顯著降低，腸內 *Bifidobacteria* 量增加，並增加類鐸受器 (Toll-like receptor) 表現，以及黏膜樹突細胞的 IL-10 表現量增加(Lindsay JO *et al.*, 2006)。在潰瘍性腸炎(UC)臨床研究也指出，餵食菊糖和果寡糖兩個禮拜可增加受試者遠端及近端大腸 10 倍的 *Bifidobacteria* 和 *Lactobacilli* 的數量，亦有研究指出 UC 病人一起合併服用 *Bifidobacteria* 和添加果寡糖的菊糖可增加直腸黏膜 42 倍 *Bifidobacteria* 的菌落數(Furrie E, *et al.*, 2005)。

在實驗模式上亦看到，在 HLA-B27 轉殖基因大鼠中，大鼠容易產生自發性腸炎，而在共同餵食益生菌菊糖和益生菌之後，*Bifidobacteria* 和 *Lactobacilli* 的量會增加，黏膜前發炎細胞激素量會下降，具免疫調節功能的 TGF- β 會增加。(Schultz M. *et al.*, 2004)在使用 DSS 建立腸炎系統的 IL-10 缺失小鼠中個別餵食乳果糖 (lactulose) 和菊糖皆可緩解發炎現象 (Madsen K. *et al.*, 1999; Videla S. *et al.*, 2001)。

在抗生素和益生菌方面的研究指出，在臨床研究中，IBD 病患對抗生素和益生菌治療也有良好的反應(Sartor RB, 2004)抗生素在治療克隆氏腸炎(Crohn's colitis)是有效的，但對結腸炎無作用。抗生素對潰瘍性腸炎(ulcerative colitis)無治療效果，但對隱窩炎(pouchitis)有效。益生菌對預防出現反覆性、慢性的隱窩炎和

潰瘍性腸炎有效，但對嚴重的患者則無明顯效果，而用不同方式製備的益生菌反應亦不同(Kuisma J *et al.*, 2003; Gionchetti P *et al.*, 2000)。

在研究的結果指出餵食SCLFP後，與ddH₂O組比較，*Lactobacilli*菌量有顯著上升的現象，此與文獻符合，而在*Clostridia*、*SFB*、*Bacteroides*、*Enterobacteria*、*Bifidobacteria*的菌量上沒有顯著趨勢。然而在腸炎的症狀指標中：症狀疾病活性指數、體重下降比率、腸道長度結果中皆未看到餵食SCLFP後產生顯著改善效果，但脾臟因發炎腫大的重量有顯著降低的現象，顯示SCLFP的確有抗發炎反應的效用，可能必須提升餵食的天數以在症狀上產生更顯著改變，而未來亦將進一步分析大腸組織和腸道淋巴細胞中相關基因表現，以探討SCLFP對DSS誘導腸炎模式的細胞激素如IFN- γ 、IL-4、IL-10、IL-17A和IL-17F表現量改變。



第五章 參考文獻

行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所自行研究期末報告書，民國96年。

Arslanoglu, S., G. E. Moro, *et al.* (2008). "Early dietary intervention with a mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of allergic manifestations and infections during the first two years of life." J Nutr **138**(6): 1091-1095.

Atarashi, K., T. Tanoue, *et al.* (2011). "Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species." Science **331**(6015): 337-341.

Axelsson, L. G., E. Landstrom, *et al.* (1996). "Dextran sulfate sodium (DSS) induced experimental colitis in immunodeficient mice: effects in CD4(+) -cell depleted, athymic and NK-cell depleted SCID mice." Inflamm Res **45**(4): 181-191.

Brown, G. D., J. Herre, *et al.* (2003). "Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans." J Exp Med **197**(9): 1119-1124.

Chen, Y., K. Chou, *et al.* (2002). "Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14338-14343.

Choi, Y. H., H. Lim, *et al.* (2008). "Anti-inflammatory activity of the ethanol extract of *Chungkukjang*, Korean fermented bean: 5-lipoxygenase inhibition." J Med Food **11**(3): 539-543.

Christensen, H. R., H. Frokiaer, *et al.* (2002). "*Lactobacilli* differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells." J Immunol **168**(1): 171-178.

Dieleman, L. A., M. J. Palmen, *et al.* (1998). "Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines." Clin Exp Immunol **114**(3): 385-391.

Du, Z., E. Kelly, *et al.* (2006). "Selective regulation of IL-10 signaling and function by zymosan." J Immunol **176**(8): 4785-4792.

Egger, B., M. Bajaj-Elliott, *et al.* (2000). "Characterisation of acute murine dextran

- sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency." Digestion **62**(4): 240-248.
- Fartasch, M. (1997). "Epidermal barrier in disorders of the skin." Microsc Res Tech **38**(4): 361-372.
- Fooks, L. J. and G. R. Gibson (2002). "In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens." FEMS Microbiol Ecol **39**(1): 67-75.
- Forestier, C., C. De Champs, *et al.* (2001). "Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties." Res Microbiol **152**(2): 167-173.
- Fuller, R. (1991). "Probiotics in human medicine." Gut **32**(4): 439-442.
- Fuller, R. and B. E. Brooker (1974). "*Lactobacilli* which attach to the crop epithelium of the fowl." Am J Clin Nutr **27**(11): 1305-1312.
- Furrie, E., S. Macfarlane, *et al.* (2005). "Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial." Gut **54**(2): 242-249.
- Geha, R. S. (2003). "Allergy and hypersensitivity. Nature versus nurture in allergy and hypersensitivity." Curr Opin Immunol **15**(6): 603-608.
- Gibson, G. R. and M. B. Roberfroid (1995). "Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics." J Nutr **125**(6): 1401-1412.
- Gionchetti, P., F. Rizzello, *et al.* (2000). "Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial." Gastroenterology **119**(2): 305-309.
- Hanifin, J. M. (1991). "Atopic dermatitis in infants and children." Pediatr Clin North Am **38**(4): 763-789.
- Hans, W., J. Scholmerich, *et al.* (2000). "The role of the resident intestinal flora in acute and chronic dextran sulfate sodium-induced colitis in mice." Eur J Gastroenterol

Hepatol **12**(3): 267-273.

Hayashi, H., R. Takahashi, *et al.* (2005). "Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism." J Med Microbiol **54**(Pt 11): 1093-1101.

He, R., M. K. Oyoshi, *et al.* (2007). "Epicutaneous antigen exposure induces a Th17 response that drives airway inflammation after inhalation challenge." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(40): 15817-15822.

Hernandez, G. A. and C. B. Appleyard (2003). "Bacterial load in animal models of acute and chronic 'reactivated' colitis." Digestion **67**(3): 161-169.

Heyman, M. and S. Menard (2002). "Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology." Cell Mol Life Sci **59**(7): 1151-1165.

Howell, M. D., J. F. Jones, *et al.* (2004). "Selective killing of vaccinia virus by LL-37: implications for eczema vaccinatum." J Immunol **172**(3): 1763-1767.

Isolauri, E., Y. Sutas, *et al.* (2001). "Probiotics: effects on immunity." Am J Clin Nutr **73**(2 Suppl): 444S-450S.

Ivanov, II, K. Atarashi, *et al.* (2009). "Induction of intestinal Th17 cells by *segmented filamentous bacteria*." Cell **139**(3): 485-498.

Jenkins, D. J., C. W. Kendall, *et al.* (1999). "The effect of wheat bran particle size on laxation and colonic fermentation." J Am Coll Nutr **18**(4): 339-345.

Kaila, M., E. Isolauri, *et al.* (1995). "Viable versus inactivated *lactobacillus strain GG* in acute rotavirus diarrhoea." Arch Dis Child **72**(1): 51-53.

Kalliomaki, M., P. Kirjavainen, *et al.* (2001). "Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing." J Allergy Clin Immunol **107**(1): 129-134.

Kennedy, R. J., S. J. Kirk, *et al.* (2002). "Mucosal barrier function and the commensal flora." Gut **50**(3): 441-442.

- Kiefer, J., G. Beyer-Sehlmeyer, *et al.* (2006). "Mixtures of SCFA, composed according to physiologically available concentrations in the gut lumen, modulate histone acetylation in human HT29 colon cancer cells." Br J Nutr **96**(5): 803-810.
- Kim, S. C., S. L. Tonkonogy, *et al.* (2005). "Variable phenotypes of enterocolitis in interleukin 10-deficient mice monoassociated with two different commensal bacteria." Gastroenterology **128**(4): 891-906.
- Kirmaz, C., P. Bayrak, *et al.* (2005). "Effects of glucan treatment on the Th1/Th2 balance in patients with allergic rhinitis: a double-blind placebo-controlled study." Eur Cytokine Netw **16**(2): 128-134.
- Kitajima, S., S. Takuma, *et al.* (1999). "Tissue distribution of dextran sulfate sodium (DSS) in the acute phase of murine DSS-induced colitis." J Vet Med Sci **61**(1): 67-70.
- Koga, C., K. Kabashima, *et al.* (2008). "Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis." J Invest Dermatol **128**(11): 2625-2630.
- Kuhn, R., J. Lohler, *et al.* (1993). "Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis." Cell **75**(2): 263-274.
- Kuisma, J., S. Mentula, *et al.* (2003). "Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on ileal pouch inflammation and microbial flora." Aliment Pharmacol Ther **17**(4): 509-515.
- Leung, D. Y., M. Boguniewicz, *et al.* (2004). "New insights into atopic dermatitis." J Clin Invest **113**(5): 651-657.
- Lin, J. Y., M. L. Chen, *et al.* (2006). "*Ganoderma tsugae* supplementation alleviates bronchoalveolar inflammation in an airway sensitization and challenge mouse model." Int Immunopharmacol **6**(2): 241-251.
- Lindsay, J. O., K. Whelan, *et al.* (2006). "Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease." Gut **55**(3): 348-355.
- Mack, D. R., S. Michail, *et al.* (1999). "Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli*

- adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression." Am J Physiol **276**(4 Pt 1): G941-950.
- Madsen, K. L., J. S. Doyle, *et al.* (1999). "*Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice." Gastroenterology **116**(5): 1107-1114.
- Mah, K. W., B. Bjorksten, *et al.* (2006). "Distinct pattern of commensal gut microbiota in toddlers with eczema." Int Arch Allergy Immunol **140**(2): 157-163.
- Manning, T. S. and G. R. Gibson (2004). "Microbial-gut interactions in health and disease. Prebiotics." Best Pract Res Clin Gastroenterol **18**(2): 287-298.
- Miettinen, M., J. Vuopio-Varkila, *et al.* (1996). "Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria." Infect Immun **64**(12): 5403-5405.
- Mileti, E., G. Matteoli, *et al.* (2009). "Comparison of the immunomodulatory properties of three probiotic strains of *Lactobacilli* using complex culture systems: prediction for in vivo efficacy." PLoS One **4**(9): e7056.
- Minami, Y., K. Yazawa, *et al.* (1983). "Selectivity of utilization of galactosyl-oligosaccharides by *Bifidobacteria*." Chem Pharm Bull (Tokyo) **31**(5): 1688-1691.
- Mohamadzadeh, M., S. Olson, *et al.* (2005). "*Lactobacilli* activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(8): 2880-2885.
- Moro, G., S. Arslanoglu, *et al.* (2006). "A mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of atopic dermatitis during the first six months of age." Arch Dis Child **91**(10): 814-819.
- Murray, C. S., G. W. Tannock, *et al.* (2005). "Fecal microbiota in sensitized wheezy and non-sensitized non-wheezy children: a nested case-control study." Clin Exp Allergy **35**(6): 741-745.
- Ni, J., S. F. Chen, *et al.* (1996). "Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes." Gut **39**(2): 234-241.

- Novak, N., T. Bieber, *et al.* (2003). "Immune mechanisms leading to atopic dermatitis." J Allergy Clin Immunol **112**(6 Suppl): S128-139.
- Ouwehand, A. C., E. M. Tuomola, *et al.* (2001). "Microbial interactions to intestinal mucosal models." Methods Enzymol **337**: 200-212.
- Pastore, S., E. Fanales-Belasio, *et al.* (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**(12): 3009-3017.
- Peng, L., Z. R. Li, *et al.* (2009). "Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers." J Nutr **139**(9): 1619-1625.
- Piirainen, L., R. A. Kekkonen, *et al.* (2008). "In school-aged children a combination of galacto-oligosaccharides and *Lactobacillus GG* increases *Bifidobacteria* more than *Lactobacillus GG* on its own." Ann Nutr Metab **52**(3): 204-208.
- Poritz, L. S., K. I. Garver, *et al.* (2007). "Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis." J Surg Res **140**(1): 12-19.
- Rath, H. C., H. H. Herfarth, *et al.* (1996). "Normal luminal bacteria, especially *Bacteroides* species, mediate chronic colitis, gastritis, and arthritis in HLA-B27/human beta2 microglobulin transgenic rats." J Clin Invest **98**(4): 945-953.
- Rath, H. C., K. H. Wilson, *et al.* (1999). "Differential induction of colitis and gastritis in HLA-B27 transgenic rats selectively colonized with *Bacteroides vulgatus* or *Escherichia coli*." Infect Immun **67**(6): 2969-2974.
- Rijkers, G. T., S. Bengmark, *et al.* (2010). "Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: current status and recommendations for future research." J Nutr **140**(3): 671S-676S.
- Rosenfeldt, V., E. Benfeldt, *et al.* (2003). "Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis." J Allergy Clin Immunol **111**(2): 389-395.

- Round, J. L. and S. K. Mazmanian (2010). "Inducible FoxP3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(27): 12204-12209.
- Saito, K., T. Yajima, *et al.* (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**(40): 38571-38578.
- Sandin, A., L. Braback, *et al.* (2009). "Faecal short chain fatty acid pattern and allergy in early childhood." Acta Paediatr **98**(5): 823-827.
- Sartor, R. B. (2004). "Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics." Gastroenterology **126**(6): 1620-1633.
- Schrezenmeir, J. and M. de Vrese (2001). "Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition." Am J Clin Nutr **73**(2 Suppl): 361S-364S.
- Schultz, M., U. G. Strauch, *et al.* (2004). "Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis." Clin Diagn Lab Immunol **11**(2): 372-378.
- Sepp, E., K. Julge, *et al.* (2005). "Intestinal microbiota and immunoglobulin E responses in 5-year-old Estonian children." Clin Exp Allergy **35**(9): 1141-1146.
- Shreiner, A., G. B. Huffnagle, *et al.* (2008). "The "Microflora Hypothesis" of allergic disease." Adv Exp Med Biol **635**: 113-134.
- Spergel, J. M., E. Mizoguchi, *et al.* (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**(8): 1614-1622.
- Spergel, J. M. and A. S. Paller (2003). "Atopic dermatitis and the atopic march." J Allergy Clin Immunol **112**(6 Suppl): S118-127.
- Stevceva, L., P. Pavli, *et al.* (2001). "The inflammatory infiltrate in the acute stage of

the dextran sulphate sodium induced colitis: B cell response differs depending on the percentage of DSS used to induce it." BMC Clin Pathol **1**(1): 3.

Suzuki, Y., Y. Adachi, *et al.* (2001). "Th1/Th2-Balancing immunomodulating activity of gel-forming (1 \rightarrow 3)-beta-glucans from fungi." Biol Pharm Bull **24**(7): 811-819.

Tannock, G. W. (1997). "Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D." Trends Biotechnol **15**(7): 270-274.

Taurog, J. D., J. A. Richardson, *et al.* (1994). "The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats." J Exp Med **180**(6): 2359-2364.

Tesmer, L. A., S. K. Lundy, *et al.* (2008). "Th17 cells in human disease." Immunol Rev **223**: 87-113.

Toda, M., D. Y. Leung, *et al.* (2003). "Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions." J Allergy Clin Immunol **111**(4): 875-881.

Trautmann, A., M. Akdis, *et al.* (2000). "T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis." J Clin Invest **106**(1): 25-35.

Van de Merwe, J. P., J. H. Stegeman, *et al.* (1983). "The resident faecal flora is determined by genetic characteristics of the host. Implications for Crohn's disease?" Antonie Van Leeuwenhoek **49**(2): 119-124.

Vanhoutvin, S. A., F. J. Troost, *et al.* (2009). "Butyrate-induced transcriptional changes in human colonic mucosa." PLoS One **4**(8): e6759.

Venkatraman, A., B. S. Ramakrishna, *et al.* (2000). "Increased permeability in dextran sulphate colitis in rats: time course of development and effect of butyrate." Scand J Gastroenterol **35**(10): 1053-1059.

Verdu, E. F., P. Bercik, *et al.* (2000). "Oral administration of antigens from intestinal flora anaerobic bacteria reduces the severity of experimental acute colitis in BALB/c mice." Clin Exp Immunol **120**(1): 46-50.

Videla, S., J. Vilaseca, *et al.* (2001). "Dietary inulin improves distal colitis induced by dextran sodium sulfate in the rat." *Am J Gastroenterol* **96**(5): 1486-1493.

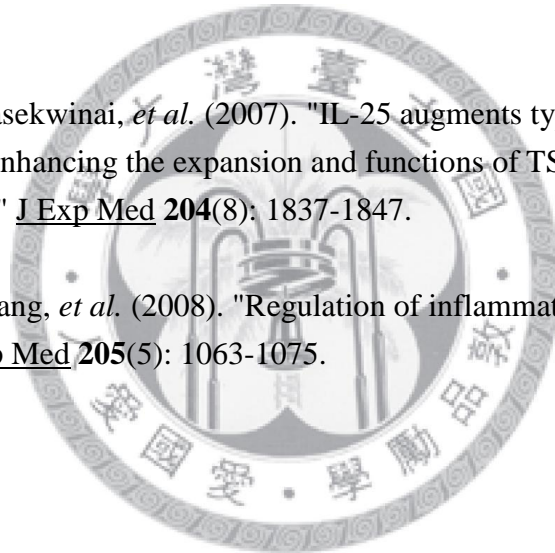
Volman, J. J., J. D. Ramakers, *et al.* (2008). "Dietary modulation of immune function by beta-glucans." *Physiol Behav* **94**(2): 276-284.

Wakita, H., T. Sakamoto, *et al.* (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**(1): 33-39.

Wang, X. J., J. G. Bai, *et al.* (2006). "Optimization of multienzyme production by two mixed strains in solid-state fermentation." *Appl Microbiol Biotechnol* **73**(3): 533-540.

Wang, Y. H., P. Angkasekwinai, *et al.* (2007). "IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells." *J Exp Med* **204**(8): 1837-1847.

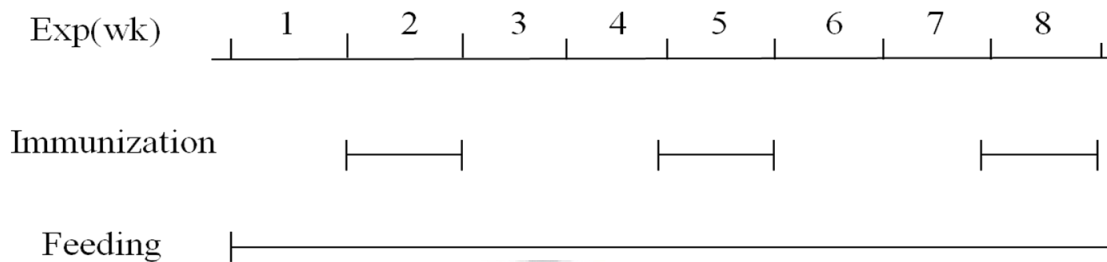
Yang, X. O., S. H. Chang, *et al.* (2008). "Regulation of inflammatory responses by IL-17F." *J Exp Med* **205**(5): 1063-1075.



(A)

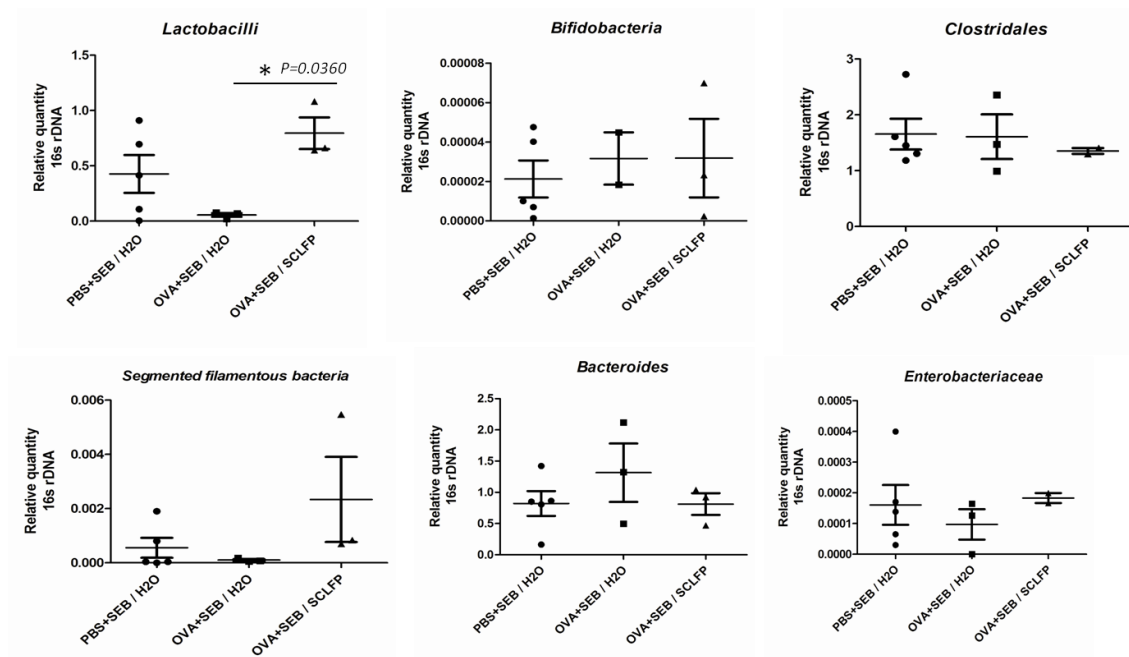
Group	Immunization/feeding	Dose	
(A) PBS+SEB / H ₂ O	PBS + SEB/ H ₂ O	--,4 μg / 0.2 ml	epicutaneous sensitization
(B) OVA+SEB / H ₂ O	OVA + SEB/ H ₂ O	2 mg,4 μg / 0.2 ml	ES
(C) OVA+SEB / SCLFP	OVA + SEB/ SCLFP	2 mg,4 μg / 0.2 ml	ES

(B)



圖一、異位型皮膚炎(atopic dermatitis)小鼠模式實驗設計

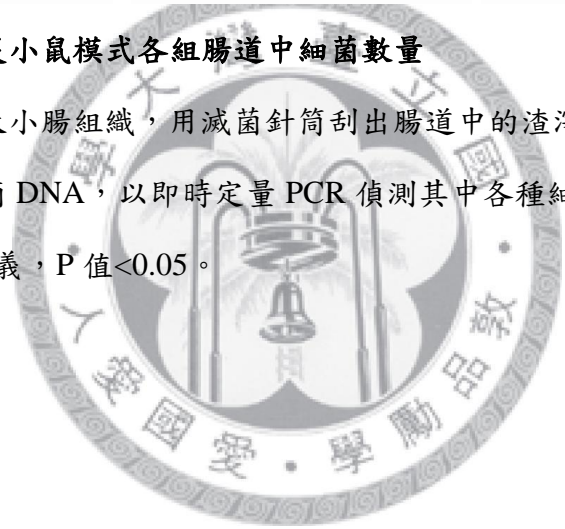
(A)使用七~八週齡 BALB/c 雌鼠，每組八隻，PBS+SEB / H₂O 組以 PBS/SEB 進行貼皮致敏，給予含有一倍 PBS 和 4 μg SEB 共 30 μl 藥劑，用餵食管餵食 0.2 ml 二次水，OVA+SEB / H₂O 組和 OVA+SEB / SCLFP 組以 OVA/SEB 進行貼皮致敏，給予 2mg OVA 和 4 μg SEB 共 30μl 藥劑，分別餵食 0.2 ml 二次水和 SCLFP。(B)實驗期間小鼠每周餵食三次且全程不間斷餵食，在餵食一個禮拜後，開始進行連續五天的貼皮致敏，休息兩個禮拜之後，進行第二次貼皮致敏，此為一循環，進行三循環之後，老鼠在最後一天貼皮隔天犧牲，犧牲時取小鼠的腸道渣滓、浸潤淋巴結、患部皮膚。



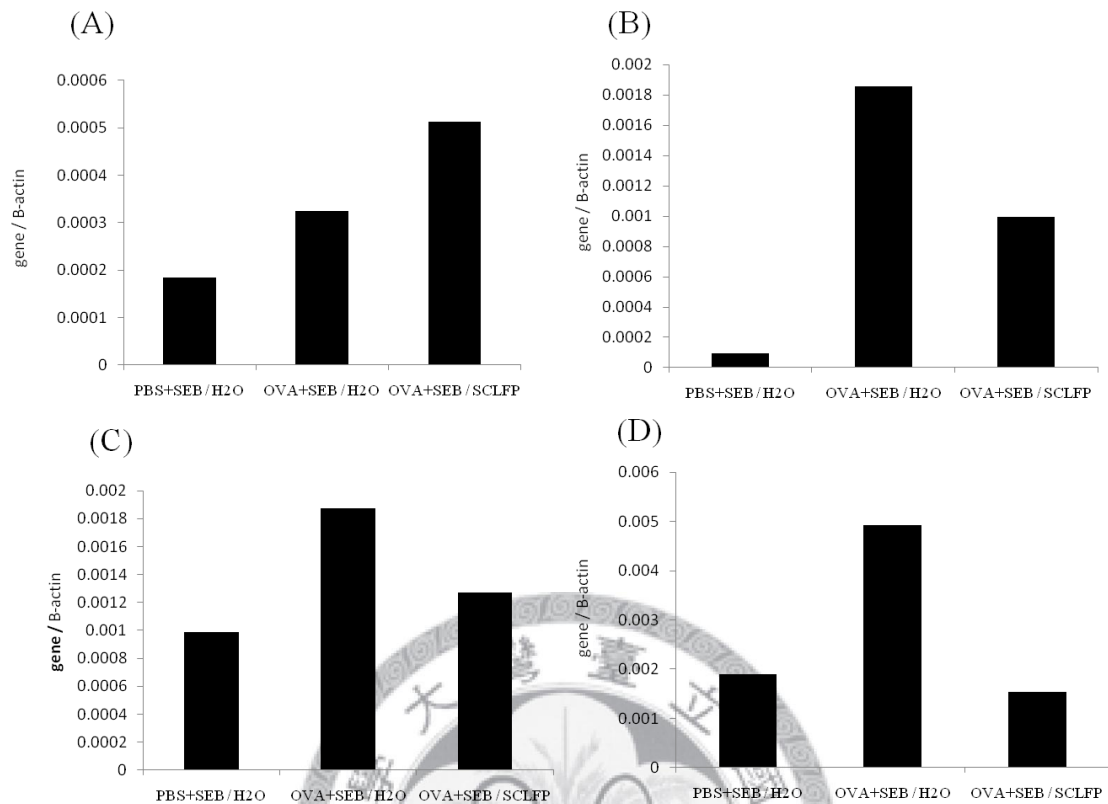
圖二、異位性皮膚炎小鼠模式各組腸道中細菌數量

將小鼠犧牲後取出大小腸組織，用滅菌針筒刮出腸道中的渣滓，並利用糞便 DNA 萃取套組萃取出細菌 DNA，以即時定量 PCR 偵測其中各種細菌的 16S rDNA 量。

*代表具統計學上意義，P 值<0.05。

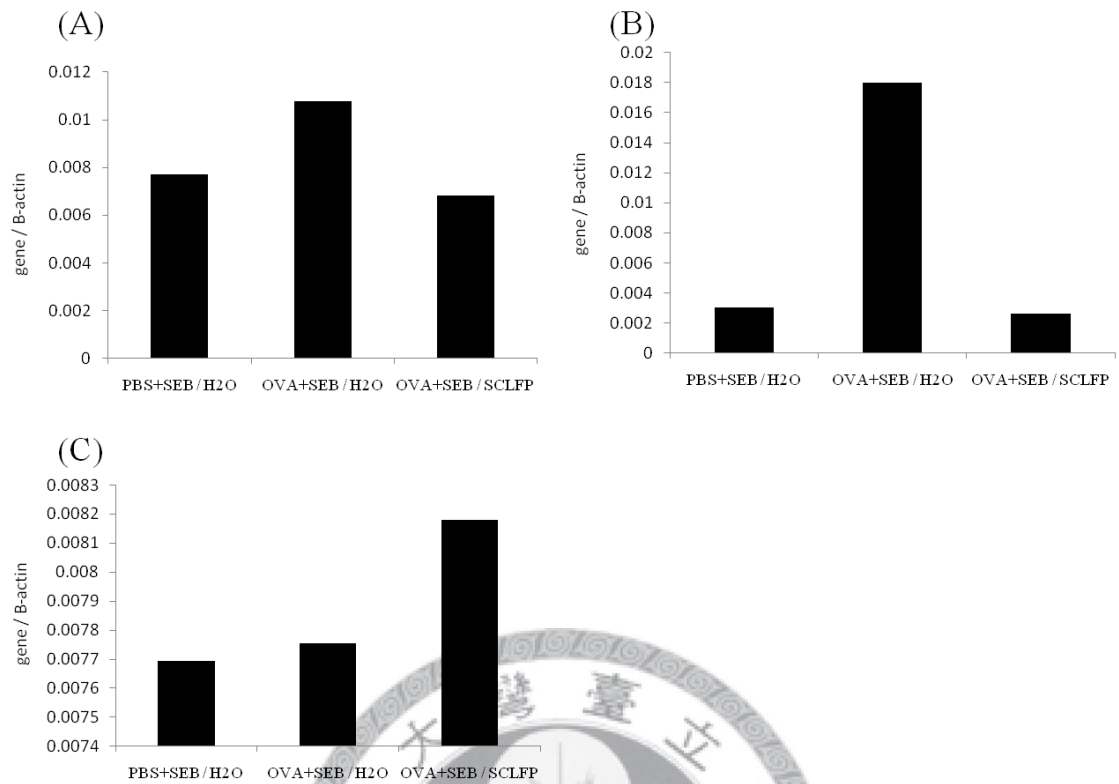


*



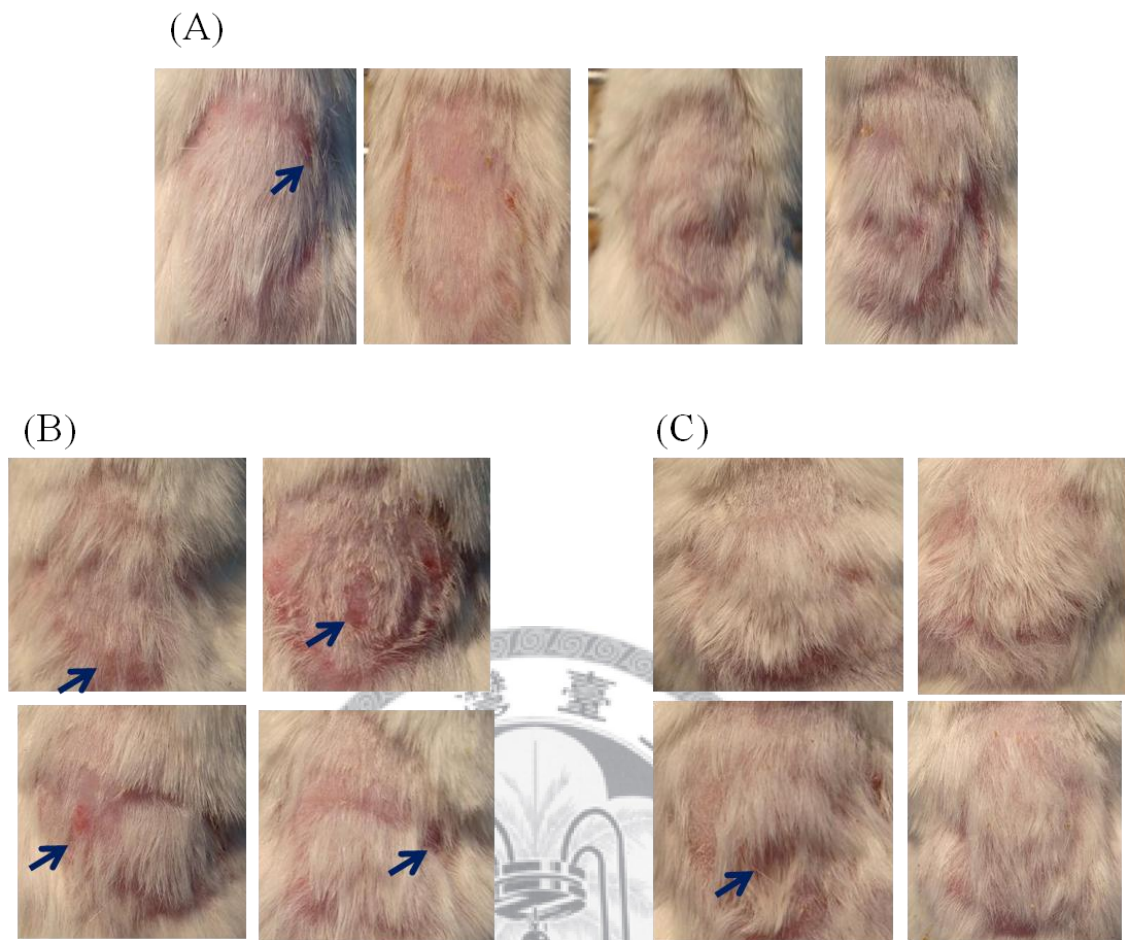
圖三、異位性皮膚炎小鼠模式各組浸潤淋巴結的 OVA 專一性細胞激素表現

將同組別小鼠取下的浸潤淋巴結(包括液淋巴結(axillary lymph nodes)和鼠蹊部淋巴結(inginnal lymph nodes))混合，處理成細胞懸浮液後以 OVA 刺激培養 24 hr，並萃取細胞 RNA 來觀察各種 OVA 專一性細胞激素表現--(A) IFN- γ ；(B) IL-4；(C) IL-17A；(D) IL-17F (老鼠隻數 n=4 混合，實驗重複一次)。



圖四、異位性皮膚炎小鼠模式各組浸潤淋巴結的總細胞激素表現

將同組別小鼠取下的浸潤淋巴結混合，處理成細胞懸浮液後以 RPMI 培養 24 hr，並萃取細胞 RNA 來觀察總細胞激素表現--(A) IL-17A；(B) IL-17F；(C) IL-10 (老鼠隻數 n=4 混合，實驗重複一次)。



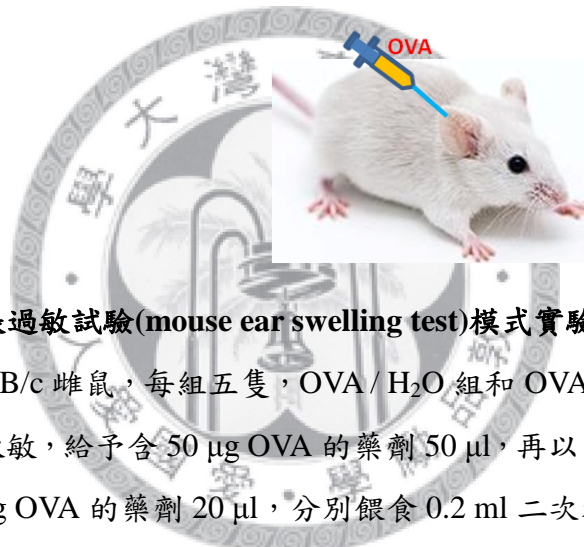
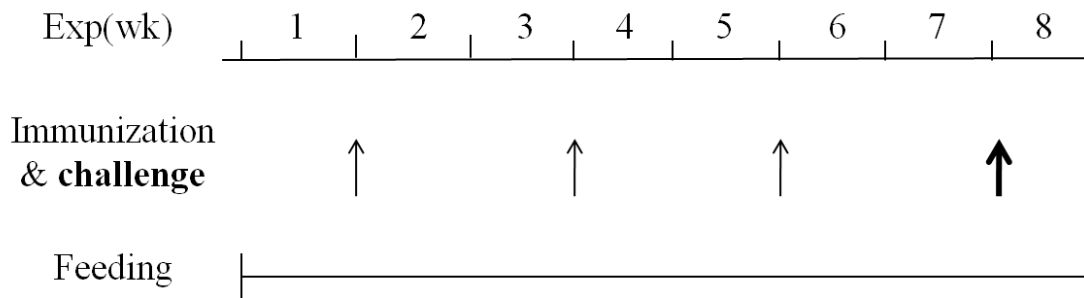
圖五、異位性皮膚炎小鼠模式各組外觀發炎症狀

在進行貼皮致敏三個循環後，小鼠犧牲當天皮膚外觀發炎症狀。小鼠分組如下(A) PBS+SEB / H₂O 組:貼皮致敏的藥劑為 PBS+SEB，餵食二次水；(B) OVA+SEB / H₂O 組: 貼皮致敏的藥劑為 OVA+SEB，餵食二次水；(C) PBS+SEB / SCLFP 組: 貼皮致敏的藥劑為 OVA+SEB，餵食 SCLFP；箭頭所指為明顯的紅腫傷口。

(A)

Group	Immunization/feeding/ challenge	Dose	
(A) OVA / H ₂ O	OVA / H ₂ O / OVA	50 µg / 0.2 ml / 200 µg	IP / ID
(B) OVA / SCLFP	OVA / SCLFP / OVA	50 µg / 0.2 ml / 200 µg	IP / ID

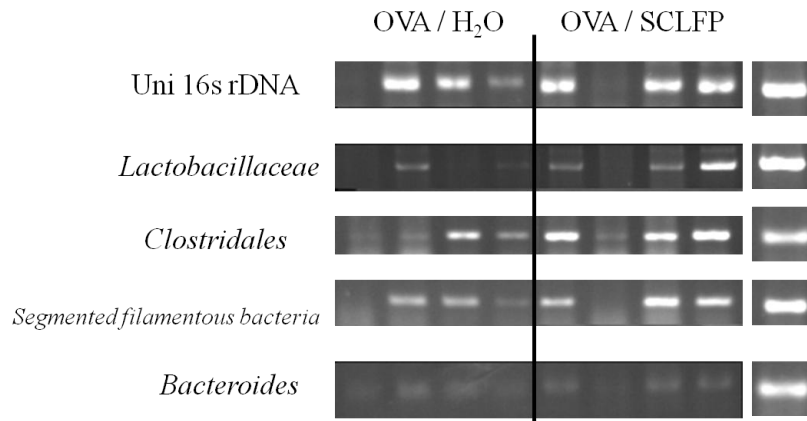
(B)



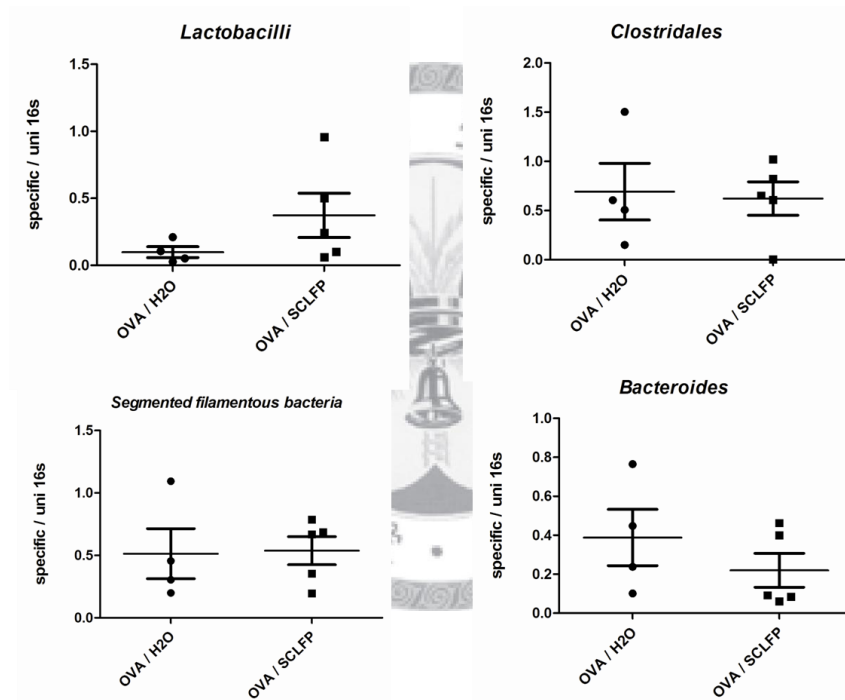
圖六、小鼠耳朵腫脹過敏試驗(mouse ear swelling test)模式實驗設計

使用七~八週齡 BALB/c 雌鼠，每組五隻，OVA / H₂O 組和 OVA / SCLFP 組以 OVA 進行三次腹腔注射致敏，給予含 50 µg OVA 的藥劑 50 µl，再以 OVA 進行耳朵皮下注射，給予含 200 µg OVA 的藥劑 20 µl，分別餵食 0.2 ml 二次水和 SCLFP。(B)實驗期間小鼠每周餵食三次且全程不間斷餵食，在餵食一個禮拜後，進行第一次 OVA 腹腔注射致敏，休息一個禮拜之後，再進行第二次 OVA 腹腔注射致敏，此為一循環，進行三循環之後，再進行左耳 OVA 皮下注射，老鼠在 72 hr 後犧牲，犧牲時取小鼠的腸道渣滓、腸繫膜淋巴結、耳朵組織。

(A)

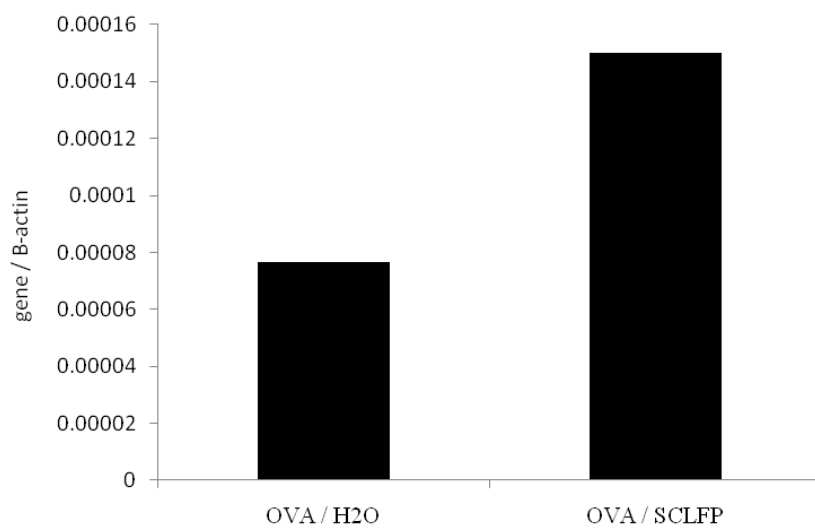


(B)



圖七、小鼠耳朵腫脹過敏試驗模式各組腸道中細菌數量

將老鼠犧牲後取出大小腸組織，用滅菌針筒刮出腸道中的渣滓，並利用酒精沉澱法萃取出細菌 DNA，以傳統 PCR 偵測其中各種細菌的 16S rDNA 量。圖示將測得的各種不同細菌 16S rDNA 的條帶亮度以 Image J 軟體量化後除以細菌 universal 16S rDNA 的條帶數值所得結果。



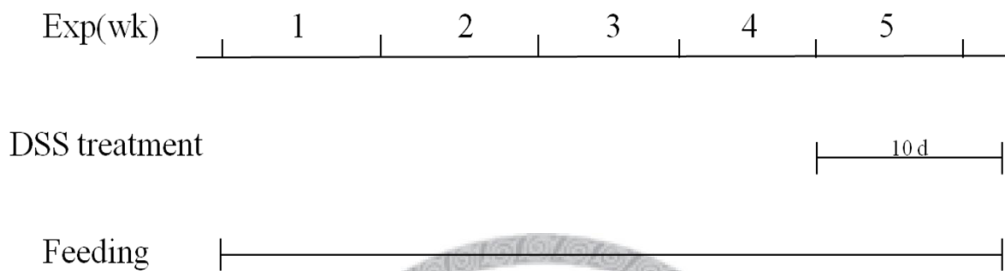
圖八、小鼠耳朵腫脹過敏試驗各組腸繫膜淋巴結 OVA 專一性細胞激素 IL-10 表現。將同組別小鼠取下的腸繫膜淋巴結混合，處理成細胞懸浮液後以 OVA 刺激培養 24 hr，並萃取細胞 RNA 來觀察 OVA 專一性細胞激素 IL-10 表現(老鼠隻數 n=3 混合，實驗重複一次)。



(A)

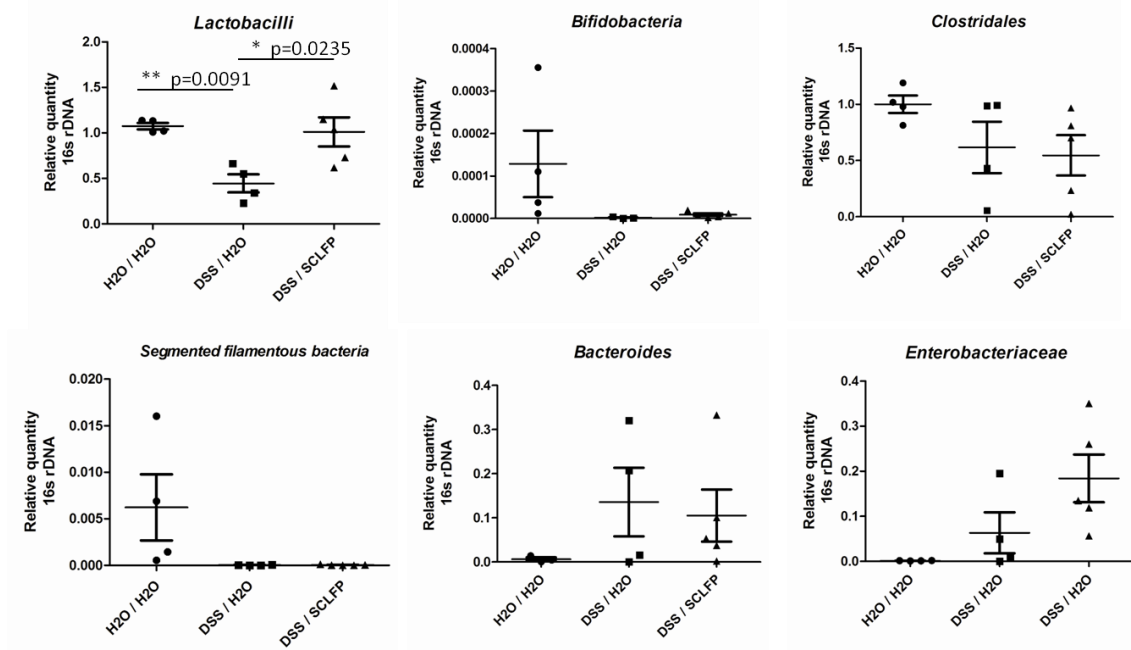
Group	DSS treatment/feeding	Dose	
(A) H ₂ O / H ₂ O	-- / H ₂ O	--/ 0.2 ml	at libitum
(B) H ₂ O / SCLFP	-- / SCLFP	-- / 0.2 ml	at libitum
(C) DSS / H ₂ O	√/ H ₂ O	3% / 0.2 ml	at libitum
(D) DSS / SCLFP	√/ / SCLFP	3% / 0.2 ml	at libitum

(B)



圖九、DSS 誘導小鼠腸炎模式(DSS-induced colitis)

(A)使用七~八週齡 BALB/c 雌鼠，每組五隻，H₂O / H₂O 組和 H₂O / SCLFP 組以二次水當飲用水，分別餵食 0.2 ml 二次水和 SCLFP，DSS / H₂O 組和 DSS / SCLFP 組以 3% DSS 水當飲用水，分別餵食二次水和 SCLFP。(B) 實驗期間小鼠每周餵食三次且全程不間斷餵食，在餵食四個禮拜後，將小鼠的飲用水換為 3% DSS 水，老鼠餵食十天後隔天犧牲，在 DSS 餵食期間每天觀察小鼠體重、症狀變化，小鼠犧牲當天取小鼠的大小腸、脾臟、腸道渣滓。

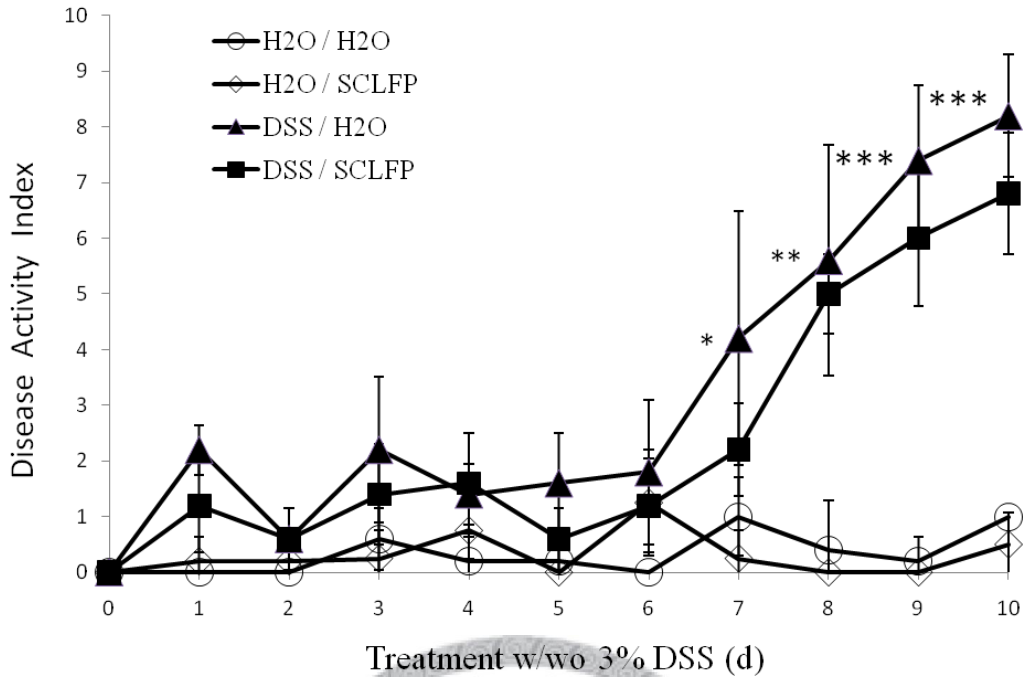


圖十、DSS 誘導小鼠腸炎模式各組腸道中細菌數量

將老鼠犧牲後取出大小腸組織，用滅菌針筒刮出腸道中的渣滓，並利用糞便 DNA 萃取套組萃取出細菌 DNA，以即時定量 PCR 偵測其中各種細菌的 16S rDNA 量。

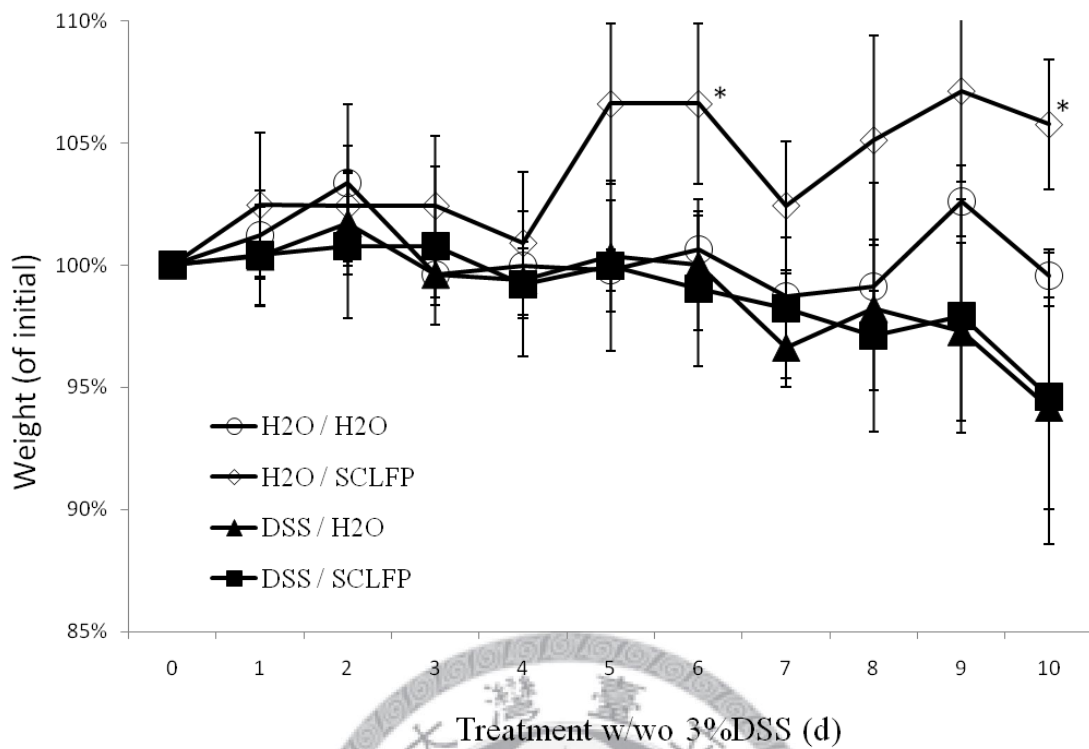
*代表具統計學上意義，P 值<0.05





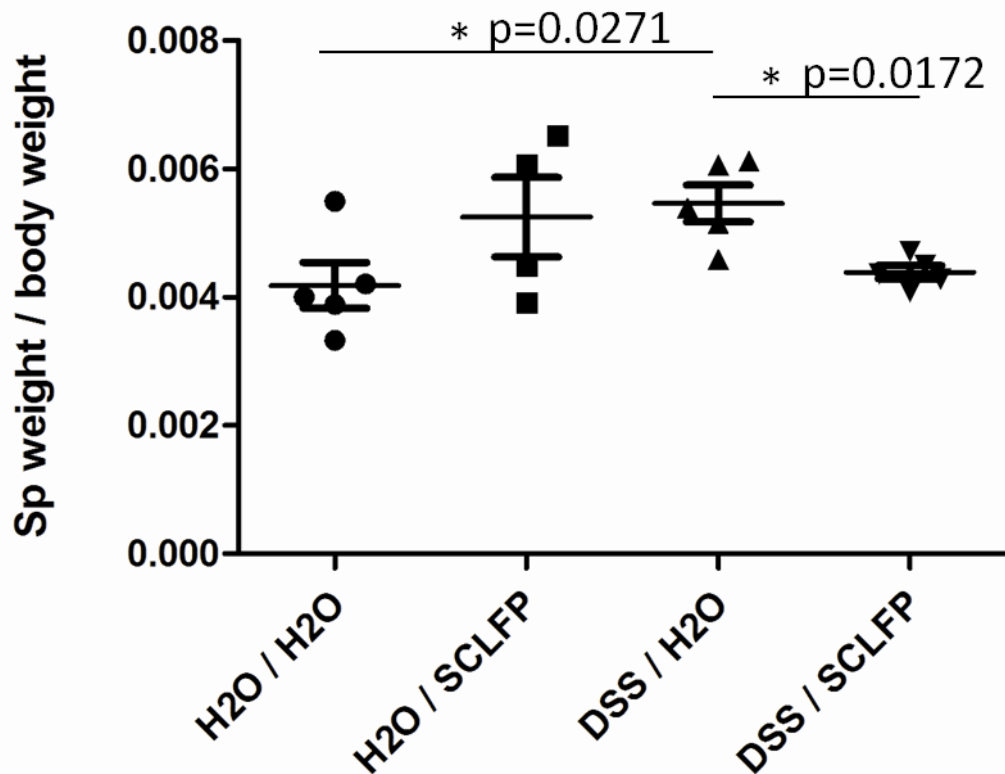
圖十一、DSS 誘導小鼠腸炎模式各組在給予 3%DSS 飲用水期間疾病活性指數 (disease activity index, DAI) 變化

實驗組別如下：H₂O / H₂O 組：給予正常飲水，餵食 ddH₂O；H₂O / SCLFP：給予正常飲水，餵食 SCLFP；DSS / H₂O 組：給予 3%DSS 飲水，餵食 ddH₂O；DSS / SCLFP 組：給予 3%DSS 飲水，餵食 SCLFP；實驗期間小鼠每周餵食三次且全程不間斷餵食，最後十天開始給予不同飲水，並在十天內每天進行 DAI 觀察。觀察 DAI 依據三個指標：體重下降、糞便黏稠度、肛門出血，照嚴重程度給予 0~4 分，判斷依據如後附圖，最後將積分加總。*代表具統計學上的意義，**為 P 值<0.01，***為 P 值<0.0001。*為相對於 H₂O / H₂O 組具顯著差異。



圖十二、DSS 誘導小鼠腸炎模式各組在給予 3%DSS 飲用水期間體重變化

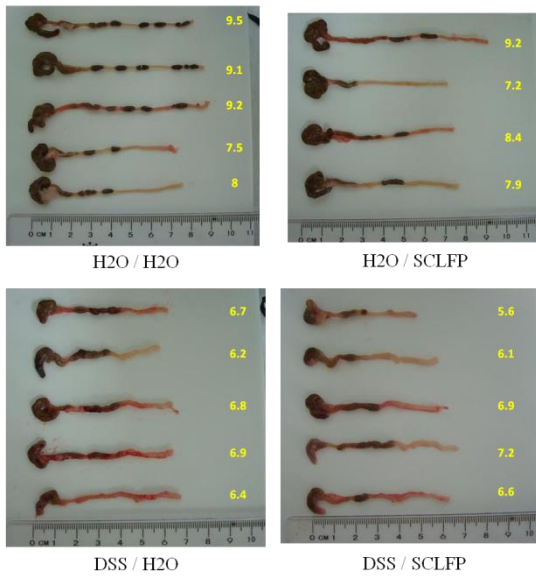
實驗組別如下：H₂O / H₂O 組：給予正常飲水，餵食 ddH₂O；H₂O / SCLFP：給予正常飲水，餵食 SCLFP；DSS / H₂O 組：給予 3%DSS 飲水，餵食 ddH₂O；DSS / SCLFP 組：給予 3%DSS 飲水，餵食 SCLFP；實驗期全程進行餵食，一週三天，最後十天開始給予不同飲水，並在十天內每天進行老鼠體重秤重。*代表具統計學上意義，P 值<0.05。*為相對於 H₂O / H₂O 組具顯著差異。



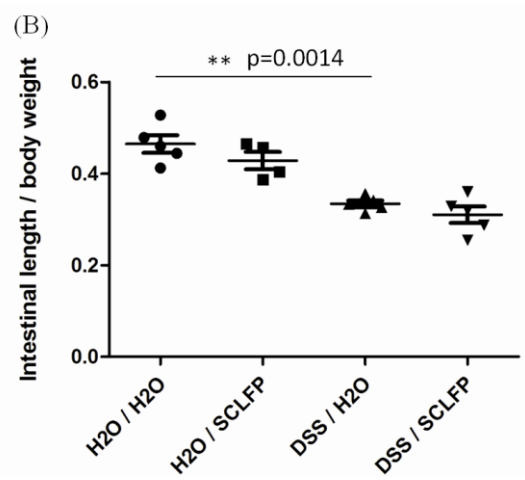
圖十三、DSS 誘導小鼠腸炎模式各組脾臟相對重量

實驗組別如下：H₂O / H₂O 組：給予正常飲水，餵食二次水；H₂O / SCLFP：給予正常飲水，餵食 SCLFP；DSS / H₂O 組：給予 3%DSS 飲水，餵食二次水； DSS / SCLFP 組：給予 3%DSS 飲水，餵食 SCLFP；實驗期間小鼠每周餵食三次且全程不間斷餵食，最後十天開始給予不同飲水，並在犧牲當天進行脾臟秤重，再除以實驗開始前老鼠八週大的體重，做成圖表表示。*代表具統計學上意義，P 值<0.05。

(A)



(B)



圖十四、DSS 誘導小鼠腸炎模式各組腸道相對長度

(A)實驗組別如下：H₂O / H₂O 組：給予正常飲水，餵食二次水；H₂O / SCLFP 組：給予正常飲水，餵食 SCLFP；DSS / H₂O 組：給予 3% DSS 飲水，餵食二次水；DSS / SCLFP 組：給予 3% DSS 飲水，餵食 SCLFP；實驗期間小鼠每周餵食三次且全程不間斷餵食，一週三天，最後十天開始給予不同飲水，並在犧牲當天進行腸道長度測量。(B)將犧牲當天測量到的腸道長度，除以實驗開始前老鼠八週大的體重，做成圖表表示。*代表具統計學上意義，P 值<0.05。

表一、引子清單

基因	正向引子序列(5'→3')	反向引子序列(5'→3')
All bacteria 16S rDNA(for PCR)	ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	ATTACCGCGGCTGCTGGC
All bacteria 16S rDNA	CCATGAAGTCGGAATCGCTAG	ACTCCCATGGTGTGACGG
<i>Clostridia</i> 16S rDNA	ACTCCTACGGGAGGCAGC	GCTTCTTAGTCAGGTACCGTCAT
<i>SFB</i> 16S rDNA	GACGCTGAGGCATGAGAGCAT	GACGGCACGGATTGTTATTCA
<i>Lactobacteria</i> 16S rDNA	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	CACCGCTACACATGGAG
<i>Bacteroides</i> 16S rDNA	GGTTCTGAGAGGAAGGTCCC	GCTGCCTCCCGTAGGAGT
<i>Enterobacteria</i> 16S rDNA	GTGCCAGCAGCCGCGGTAA	GCCTCAAGGGCACAACCTCCAAG
<i>Bifidobacteria</i> 16S rDNA	CTCCTGAAACGGGTGG	GGTGTCTTCCCGATATCTACA
Mouse β -actin	TGTATGAAGGCTTTGGTCTCCCT	AGGTGTGCACTTTTATTGGTCTCAA
Mouse IFN- γ	CAAGTGGCATAGATGTGGAAG	CAAGTGGCATAGATGTGGAAG
Mouse IL-4	TGTCATCCTGCTCTTCTTCTC	TCTGTGGTGTCTTTCGTTGC
Mouse IL-10	GGTTGCCAAGCCTTATCGG	TCTTACCTGCTCCACTGC
Mouse IL-17A	GGACTCTCCACCGCAATGA	GGCACTGAGCTTCCAGATC
Mouse IL-17F	CCCCATGGGATTACAACATCAC	CATTGATGCAGCCTGAGTGTCT

附圖一、DSS 誘導小鼠腸炎模式疾病活性指數評估

Table 1. *Calculation of DAI*

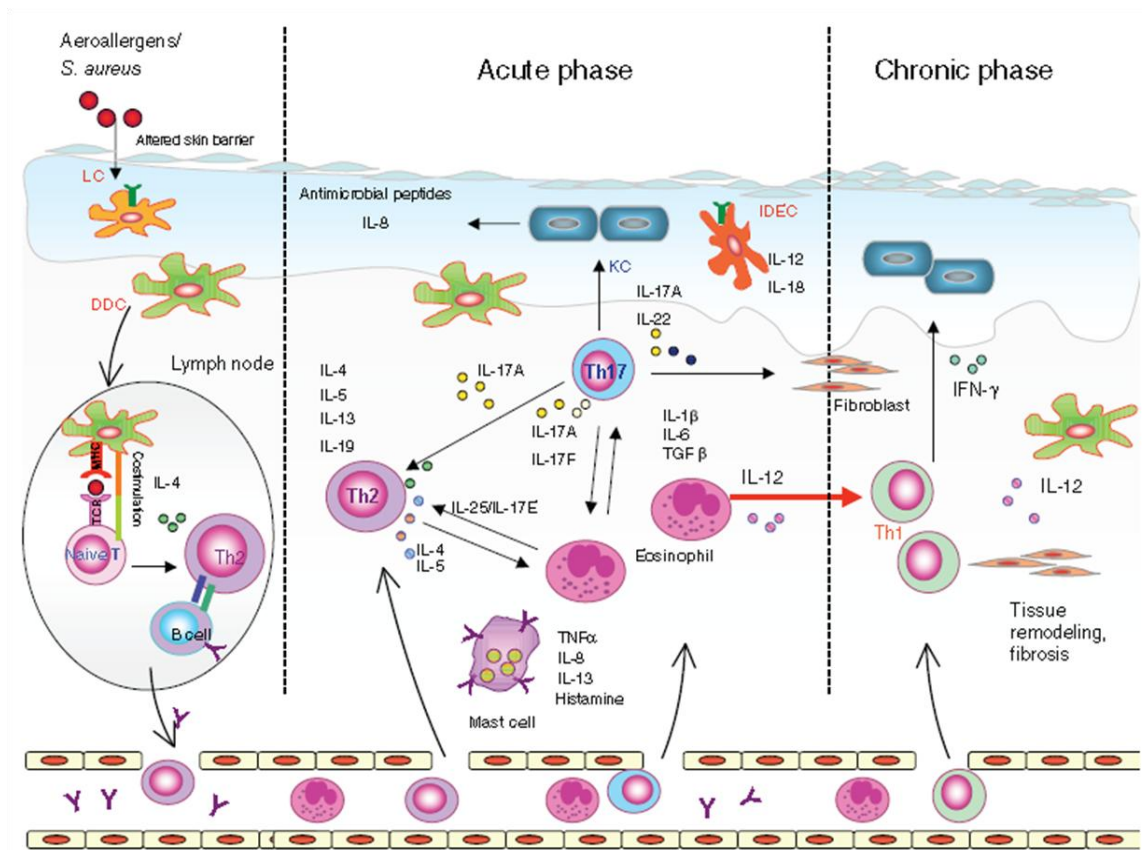
Score	Weight Loss, %	Stool Consistency	Peranal Bleeding
0	None	normal	none
1	1-5		
2	5-10	pasty stools	occult bleeding
3	10-20		
4	>20	diarrhea	gross bleeding

Disease activity index (DAI) was calculated as cumulative score of the 3 parameters weight loss, stool consistency, and peranal bleeding.

摘自 *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2009). 296: G1140–G1149

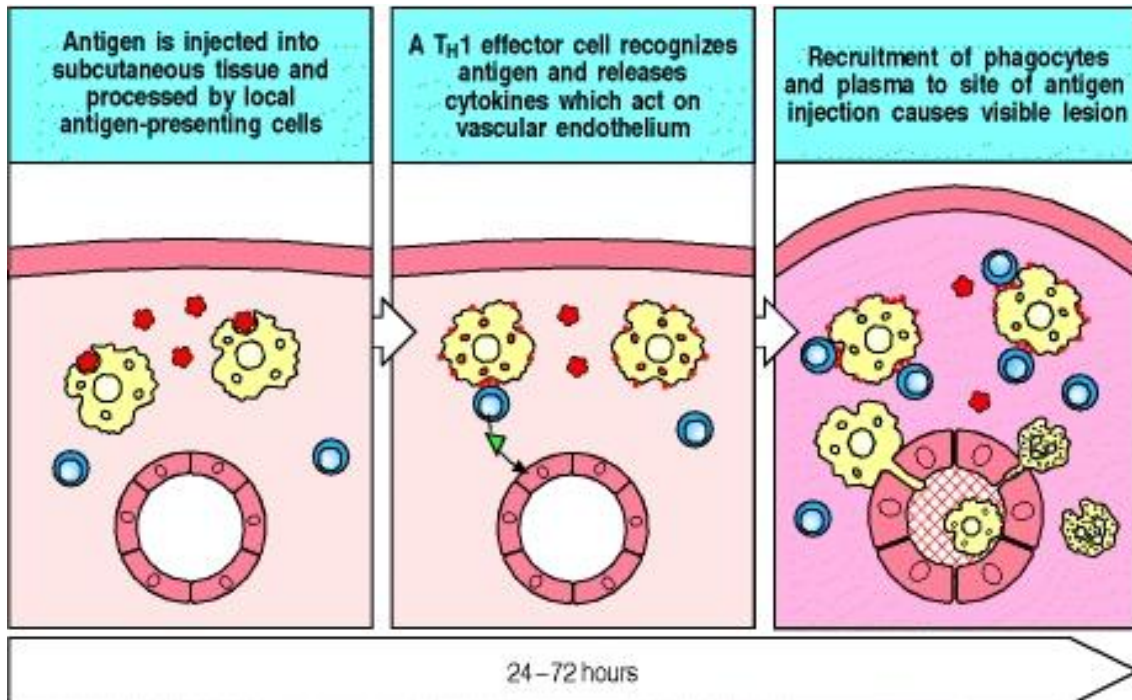


附圖二、Model of sequential T helper cell involvement in AD.



摘自 *Journal of Investigative Dermatology* (2008) 128, 2569–2571

附圖三、The stages of a delayed-type hypersensitivity reaction.



摘自 Janeway's Immunobiology(Garland Science) seventh edition

