

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

口服酵母菌對 BALB/c 小鼠鼻腔黏膜
免疫之調節能力

Immunomodulation of *saccharomyces cerevisiae* on
intranasal immunization in BALB/c mice

魏中帆

Chung-fan Wei

指導教授：賈景山 博士

Advisor: Jean-san Chia, Ph.D.

中華民國 98 年 7 月

July, 2009

中文摘要

來自靈芝、酵母菌等真菌細胞壁的多醣類，如以 $\beta(1 \rightarrow 3), \beta(1 \rightarrow 6)$ 鍵結之化合物，統稱為 β -聚糖。 β -聚糖被報導具有免疫調節的能力，如增進免疫力能預防癌症及微生物感染；或是改變免疫反應的途徑，如降低 Th2 反應卻增加 Th1 反應，以減少過敏發生。而鼻腔內給予之疫苗能除了引發接種者血清中特異性免疫球蛋白 G (Immunoglobulin G, IgG)，更能使接種者產生在上呼吸道局部的分泌型免疫球蛋白 A，IgA 在黏膜能中和外來物抗原，降低經飛沫傳染散播的微生物入侵宿主之機率，這是注射疫苗很難達到的效果。並且鼻腔疫苗有容易施行大規模接種之優點，雖然大部分鼻腔疫苗尚在實驗階段，但其具有研發潛力。實驗建立鼻腔內致免的動物模式。以大腸桿菌致病株所分離的忌熱性腸毒素(heat-labile enterotoxin, LT)做為佐劑，卵清白蛋白(ovalbumin, OVA)為抗原，從鼻腔給予 BALB/c 小鼠。而小鼠從致免前一周開始每周三次分別餵食二次水、熱致死之啤酒酵母或市售啤酒酵母大豆發酵產物直到犧牲。實驗期間，每週採集小鼠的唾液、測定抗白蛋白之分泌型 IgA 以及採集血清測定抗 OVA 之 IgG 和 IgE。結果顯示，小鼠餵食啤酒酵母及市售啤酒酵母大豆發酵產物的小鼠唾液中有較高的抗 OVA 特異性唾液 IgA 及血清中 IgG 和 IgE。初步認為飲食中含有啤酒酵母及市售啤酒酵母大豆發酵產物可促進特定免疫球蛋白生成，可能透過 Th1 之細胞激素 IFN- γ 和 Th2 之細胞激素 IL-5 的分泌增加。因此服用熱致死啤酒酵母的相關產品可能加強宿主保護力，增進鼻腔內疫苗效果，但亦有增加對特定抗原過敏之風險。

英文摘要

β -glucans as $\beta(1\rightarrow3)$, $\beta(1\rightarrow6)$ binding polysaccharides derived from fungal cell wall, like *Ganoderma lucidum* and yeasts. β -glucans have been reported that confers immunomodulation with oral administration or intravenous injection. The immunomodulated functions of β -glucans may promote lymphocytes tumor cytotoxic ability or protect against microbial infections. Nevertheless, some kinds of β -glucan can also skew Th1/Th2 balance, may inhibit allergic response. Intranasal administrated nasal vaccines elicit hosts' systemic specific immunoglobulin G (IgG), also elicit secretory IgA that may neutralize respiratory pathogens at local mucosa. Nasal vaccines are potential, since they are easily accessible for large population, and required without needles and syringes. In present research, we nasal immunized BALB/c mice with heat-labile enterotoxin(LT) from wild-type entero-pathogenic *E. coli* and ovalbumin (OVA) for 4 times, 1-week internal. In parallel, we oral administrated the mice with sterile water, heat-killed *sacchromyces cerevisiae*, or commercial *sacchromyces cerevisiae* legume fermentated product trice a week, started from 1 week before the first nasal immunization, and last to the second week after the last immunization, mice were sacrificed. Saliva, serum of mice was collected every week since feeding started, the samples were detected the specific anti-OVA IgA, IgG and IgE with ELISA. The present data shows that anti-OVA salivary IgA and anti-OVA serum IgG1, IgG2a and IgE in *sacchromyces cerevisiae* and commercial *sacchromyces cerevisiae* legume fermentated product-feeding mice with LT+OVA immunized. It's preliminarily considered that *sacchromyces cerevisiae* or related products-intake may enhance specific antibody production, through IL-5 and IFN- γ -secreting increased. Therefore, oral intake *sacchromyces cerevisiae* or related products may protect hosts against pathogen, enhance nasal vaccine efficacy, but increase IgE-mediated allergy risk.

目錄

中文摘要.....	i
英文摘要.....	ii
圖目錄.....	iii
第一章 文獻回顧.....	1
第一節 黏膜免疫.....	1
第二節 鼻腔免疫與鼻腔相關淋巴組織免疫.....	3
第三節 腸道免疫.....	4
第四節 健康食品的免疫調節.....	5
第五節 啤酒酵母.....	6
第六節 健康食品之免疫調節評估方法.....	8
第七節 研究動機與目的.....	8
第二章 材料及方法.....	10
第一節 實驗動物小鼠.....	10
第二節 製備熱致死啤酒酵母.....	10
第三節 飼食與黏膜致免計畫.....	10
第四節 檢體與組織收集.....	11
第五節 酵素連結免疫吸附試驗.....	12
第六節 細胞增生測試.....	14
第七節 細胞分群測定.....	14
第八節 聚丙烯醯胺膠體電泳法及銀染.....	14
第九節 統計方法.....	15
第三章 實驗結果.....	16
第一節 鼻腔致免溶液進行膠片電泳.....	16
第二節 小鼠體重比較.....	16
第三節 唾液、BALF、血清中抗 OVA 之特異性 IgA.....	16

第四節 血清中抗OVA之特異性 IgG 與 IgE.....	17
第五節 唾液、BALF、血清中總 IgA 含量.....	18
第六節 血清中總 IgG 和 IgE.....	19
第七節 脾臟及不同淋巴結細胞的特異性增生.....	20
第八節 脾臟及不同淋巴結細胞的非特異性增生.....	21
第九節 初代細胞針對 OVA 分泌的細胞激素.....	22
第十節 初代免疫細胞分群之百分比.....	23
第四章 討論.....	23
第一節 唾液、BALF、血清中抗 OVA 之特異性 IgA 與 細胞激素.....	23
第二節 血清中抗 OVA 之特異性 IgG 與 IgE 與 細胞激素.....	24
第三節 血清中總抗體含量.....	25
第四節 脾臟及淋巴結細胞的增生與細胞表現型之百分比.....	26
第五節 小鼠體重比較.....	26
第五章 總結論.....	27
第六章 參考文獻.....	29

圖目錄

圖一、實驗動物小鼠分組及實驗時間表.....	37
圖二、致免溶液蛋白質電泳膠片.....	38
圖三、鼻腔致免 BALB/c 雌鼠並且餵食各種食品的體重.....	39
圖四、黏膜之唾液及肺沖液中抗 OVA 特異性 IgA.....	40
圖五、血清中抗 OVA 特異性 IgG1, IgG2a, IgA, IgE.....	41
圖六、黏膜之唾液及 BALF 中總 IgA.....	42
圖七、血清中各種總抗體.....	43
圖八、初代細胞增生結果.....	44
圖九、體外培養初代細胞於 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OVA 之條件四天，細胞培養液中的細胞激素.....	45
圖十、初代細胞表現型分群.....	46



第一章 文獻回顧

前言

無論是細菌、病毒感染或是接種疫苗，均會導致宿主產生後天型的免疫反應 (adaptive immune response)，其包含細胞免疫力 (cellular immunity) 以及體液免疫力 (humoral immunity)。

細胞性免疫反應舉凡 T 細胞活化，如輔助型 T 細胞誘發 B 細胞分泌抗體以及毒殺型 T 細胞藉由殺死巨噬細胞或是被細胞內微生物感染的體細胞以清除入侵的致病微生物。而體液性免疫反應則主要是指抗體，透過 B 細胞與所分化的漿細胞 (plasma cells) 分泌，具有中和或排除細胞外微生物及毒素的功能。

藉由檢視細胞活性、定量抗體濃度可初步了解免疫反應的效果。



第一節 黏膜免疫

黏膜覆蓋於呼吸道、腸胃道、生殖道等部位，具有外分泌腺體能有效利用物理性和化學性機制，以黏液排出或利用酵素分解外來物質。除此之外，尚有高度特化的先天型及後天型黏膜免疫系統 (mucosal immune system) 保護著黏膜部位，形成身體對抗環境中潛在入侵的防線。健康成人的體內，黏膜部位的免疫細胞約占有全身的 80%；來源有駐守在原本部位的細胞或是往來於黏膜相關免疫組織 (mucosa-associated lymphoid tissues, MALT) 的免疫細胞，同時此組織屬於哺乳類最大的免疫組織。(Mestecky *et al.*, 2005)

MALT 展現出與全身性免疫系統很不同的區域劃分與功能。在解剖上定義啟動免疫反應的黏膜免疫組織 (inductive site) 有培耶氏斑 (Peyer's patch)、腸繫膜淋巴結、群聚或單獨的小腸濾泡，以及食道兩邊的扁桃腺及腺狀腫 (Mowat *et al.*, 2003, Kiyono *et al.*, 2004)。而黏膜組織及外分泌線周邊有大量的類免疫 (lymphoid) 細胞群聚則被視為執行免疫反應的位置 (effector site)。相對於全身性免疫系統，MALT 具有一些特別表現型及功能的 B 細胞、T 細胞以及伴隨細胞 (accessory cells)，並且主

要在各黏膜部位間循環，後文將提到的歸家(homing)功能。

在黏膜引發免疫反應部位，黏附性的上皮細胞及特化之微皺摺細胞(microfold cells, M cells)攝入抗原，送給位於內皮細胞層中的細胞如樹突細胞(dendritic cells, DCs)，B 細胞和巨噬細胞等專業抗原呈獻細胞(professional antigen presenting cells, APCs)，並將抗原呈獻給 CD4⁺ 和 CD8⁺ αβ T 細胞(Bilsborough *et al.*, 2004)。某些抗原甚至被上皮細胞直接處理(process)並呈獻給鄰近內皮的 T 細胞、γδT 細胞及 NKT 細胞。因此，黏膜組織的免疫反應被抗原、APC 的性質及微環境所控管。另外，一些如食物蛋白質等非致病性抗原被黏膜 DC 呈獻，可能引發 Th2 及一些調節性 T 細胞的活化，這類抑制性的免疫力稱為”口服耐受性”(oral tolerance) (Iwasaki *et al.*, 1999)。先前認為抗原或佐劑(adjuvant)具有如類鐸受器配體(Toll-like receptor ligand, TLR ligand)的危險訊號(danger signal)，能活化黏膜抗原呈獻細胞引發體液及細胞性免疫反應而非耐受性((Mowat *et al.*, 2003)。但根據 Rakoff-Nahoum 等人報導，腸道的共生菌叢恆定需要 TLR 的識別(Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004)。

黏膜免疫系統的特徵尚有 sIgA 分泌和免疫細胞的 homing 能力。

後天的體液免疫具有不同的種類(isotype)的抗體，由於成熟B cell被活化時進行類型轉換(class switch)，因而分化成特定種類抗體的分泌細胞(antibody secreting cell)。儘管黏膜上覆蓋之黏液中含有 IgM 和 IgG，最大量並重要的卻是 sIgA。sIgA 為二聚體或多聚體，由 J鍊(J-chain)連接各 IgA 單體(Lycke *et al.*, 1999)。J鍊的功能為避免被蛋白酶裂解，並且與黏膜上皮細胞內側的受器(polymeric immunoglobulin receptor, pIgR)結合經由穿胞轉運(transcytosis)送至黏膜表面進行中和(neutralize)抗原的功能(Wijburg *et al.*, 2006)。也就是說，IgA 結合至抗原後並不活化補體或是結合至淋巴球上的 Fcγ 受器，因此不導致發炎作用，稱為”免疫排除”(immune exclusion)(Corthesy *et al.*, 2007; Brandtzaeg, 2006; Sait *et al.*, 2007)。所以，黏膜部位的 IgA 也許可以防止共生菌或無害抗原造成的局部發炎甚至全身性的免疫反應發生(Macpherson *et al.*, 2004)。雖然在 IgA 缺失的病人起初並無特殊免疫疾病症狀，但

似乎有較高機率發生自體免疫疾病(Latif, 2007)。然而，IgA的來源不同，功能也有所不同。對致病性抗原具特異性的IgA通常藉由T細胞活化B細胞所產生(Lycke *et al.*, 1987; Hornquist *et al.*, 1995)，而低親合力的抗共生菌之IgA，可以直接由被DC活化的B細胞分泌(Macpherson *et al.*, 2000)。

免疫細胞在感染部位活化、產生IgA的細胞在需要抗體的黏膜部分進行分泌，是較為經濟有效的免疫反應。例如，口服疫苗與注射式疫苗相比，引發較多的表現 $\alpha 4\beta 7$ 的T和B細胞，幫助他們往腸道黏膜移動(Youngman *et al.*, 2002)。Naïve B細胞藉由L-選擇素(L-selectin, CD62L)與周邊淋巴結或各黏膜部位的長內皮細胞小靜脈(high endothelial venule, HEV)作用而滾動(Gallatin *et al.*, 1983; Streeter *et al.*, 1988)。此外，在淋巴結和培耶氏斑之HEV表現的趨化激素(chemokine) CCL21和CCL19能夠結合Naïve B細胞上的CCR7，進而表現LFA-1和 $\alpha 4\beta 7$ ，與HEV上的配體有更強的親和力，因此停留在當地(Warnock *et al.*, 2000)。以腸道為例，B細胞分化成為IgA-ASC主要發生在腸道的培耶氏斑，由於其具有增生中心(germinal center)的構造，提供大量T細胞活化B細胞的作用(Butcher *et al.*, 1982)。同時在retinoic acid存在下，形成homing至腸胃道的IgA-ASC(Iwata *et al.*, 2004)。由於表面的受器與黏膜上皮細胞所表達的配體能夠交互作用，因此在黏膜被活化的淋巴球於循環過程中，較易累積在具有適合配體的黏膜部位發揮功能。

第二節 鼻腔免疫(nasal immunity)與鼻腔相關淋巴組織(nasal-associated lymphoid tissue, NALT)免疫

腸道和氣管相關的免疫組織在結構與功能方面之研究較為透徹，反之鼻腔免疫則研究較少，但經由飛沫傳染的致病菌，卻是經由鼻腔進入宿主體內。近年來物種間交互傳染病日漸增加，人們缺乏對新種病毒的免疫力和恐懼於人及禽類的流感病毒變異，可能造成大規模感染。學者們致力於發展鼻腔給予的疫苗，來防止病毒進入人體導致疾病的傳播，因此鼻腔黏膜相關的免疫反應也逐漸受到重

視。人類口咽部具有腺狀腫、扁桃腺等特化組織形成魏氏環(Waldeyer's ring)，齶齒類實驗小鼠則無此構造，因此稱為鼻腔相關免疫組織(NALT)。Heritage等人已發現小鼠由鼻腔內致免(intranasal immunization, i.n.)，能在NALT及頸部淋巴結(cervical lymph nodes, CLNs)中發現針對致免抗原的IgA-ASC。能從唾液、呼吸道、腸道和生殖道分泌物中測得IgA，並在血清中亦有對抗原具特異性的IgG存在(Heritage *et al.*, 1997, 1998)。文獻指出，位於CLN的IgA-ASC源自於NALT，可能從NALT輸出的淋巴管通往CLN，進而循環至全身性免疫系統(Hishiki *et al.*, 2004)，針對NALT的CD4⁺ T細胞測定其細胞激素的mRNA表現量，顯示其為Th0細胞，可由致免的抗原或佐劑引導成為Th1或Th2(Kiyono *et al.*, 2004)。例如將蛋白質抗原與強效的黏膜佐劑—霍亂毒素共同從鼻腔給與小鼠時，容易引發Th2免疫反應，促進分泌對抗原特異的IgA(Shimoda *et al.*, 2001)。因此從鼻腔引發的免疫反應，可能影響其他部位受到相同抗原感染的免疫機制。

第三節 腸道免疫

相對於以血液為主的系統性免疫力(systemic immunity)，腸道為重要的黏膜免疫力(mucosal immunity)形成的部位。由於腸道不斷地與食物的蛋白質和共生菌接觸，同時也是食入病原菌的第一道防線；因此黏膜免疫系統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(immune response)。

一般認為專業抗原呈獻細胞--樹突細胞扮演著決定免疫路徑的重要角色(Steinman *et al.*, 2003)。培耶氏斑和腸繫膜淋巴結已經鑑別出不同表面受體分群(subsets)的樹突細胞，如 CD11c^{hi}CD11b⁺CD8α⁺，CD11c^{hi}CD11b⁻CD8α⁺和CD11c^{hi}CD11b⁻CD8α⁻，活化後主要分泌 IL-10 誘使 T 細胞分化成第二型輔助型 T 細胞(type 2 helper T cells, Th2)或是調節性 T 細胞(regulatory T cells, Treg)(Iwasaki *et al.*, 1999)並且促使 B 細胞分化為分泌 IgA 的漿細胞(Mora *et al.*, 2006)。此外，在固

有層(lamina propria)鑑定出的 CD11c^{hi}CD11b^{hi}樹突細胞則能從類鐸受體 5 (toll-like receptor, TLR)的配體被活化，引發 Th1, Th17 的輔助型 T 細胞和 IgA⁺漿細胞分化 (Uematsu *et al.*, 2008)。

此外，腸道共生菌/益生菌的存在也具有調節宿主免疫系統的能力。共生菌/益生菌本身及其代謝產物、細胞壁及 DNA 皆有調節免疫的潛力。共生菌/益生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 分泌於腸道則阻止致病菌的入侵(Macpherson *et al.*, 2001)；細胞壁及 DNA 則屬於先天免疫所辨識的非宿主分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP)可引發後續免疫反應，形成後天免疫力 (Vreese *et al.*, 2008)。

第四節 健康食品的免疫調節

Sanderson 指出，改變飲食的組成成分可能調節免疫能力。例如，減少病菌感染及致病的機率、降低過敏反應、甚至作為疫苗接種的共佐劑(co-adjuvant)(Olivares *et al.*, 2007)。

目前報導飲食調節免疫系統的主要影響有：

- A. 食用活的非致病性益生菌(probiotics)，除了上述共生菌的功能，其代謝膳食纖維成為有機酸(Sanderson *et al.*, 2007)，可刺激腸道的上皮細胞產生白血球趨化素(chemokine)，如巨噬細胞發炎素-1(macrophage inflammatory protein-1, MIP-1)，使聚集腸道的免疫球增加，促進免疫反應(Ohtsuka *et al.*, 2001)。
- B. 食用能活化 APC 的分子。例如 β -聚糖(β -glucan)，來自真菌類如靈芝或燕麥等特定穀類。 β -聚糖主要為細菌、真菌類細胞壁之成分，能被動物先天型免疫系統所辨識，引發後天型免疫反應。 β -多醣類依照各種來源，有不同的化學鍵結，導致多種水溶性、分子量、帶電量的特性，使刺激抗原呈獻細胞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，有些則能活化 T 細胞朝向 Th1 分化，以避免 IgE 引起的過敏反應 (Saito *et al.*, 2003)。

C. 食用益菌生(prebiotics)。此為腸道共生菌能夠分解、代謝的成分，通常宿主無法消化利用。如菊糖(inulin)、果寡糖(oligofructose)等本身不能刺激宿主免疫反應，但其存在能篩選腸道共生菌叢，間接調節宿主免疫力(Vrese *et al.*, 2008)。餵食果寡糖五周的小鼠，其特定糞便 IgA, 血清 IgG 皆明顯高於控制組；並且致免後感染沙門氏菌的存活率，亦是食用果寡糖組較高(Benyacoub *et al.*, 2008)。

綜合以上，飲食造成的免疫調節影響全身性免疫力的機制仍有待研究，但許多動物及人體實驗結果卻顯示飲食組成改變，對整體免疫力有所影響，腸道免疫可能操控全身性免疫反應。



第五節 啤酒酵母

1. 啤酒酵母簡介

啤酒酵母屬於真菌子囊菌綱，是單獨球形至卵圓形存在，無性生殖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。啤酒酵母與人類文明生活息息相關，從歷史文明記載的開始，啤酒酵母就被運用製造各種發酵食品，常見的有酒類、烘焙食品甚至醃製食品。而由於酵母菌是最簡單的真核生物，也被運用於分子生物學和細胞生物學研究的模式生物。

2. 口服啤酒酵母的生理功效

β -聚糖是服用啤酒酵母常被探討、能影響服用者機能的成分。各種水族生物(如魚類、甲殼類)以飼料中添加 β -聚糖改善其免疫機能，甚至做為疫苗的佐劑(Dalmo and Bøgwald, 2008)。

哺乳類方面， β -聚糖被用於癌症的治療。不論口服或靜脈注射，搭配抗腫瘤抗體，

於幾種癌症模式的實驗動物小鼠有延長壽命功能，如神經膠瘤(Cheung *et al.*, 2002)和大腸癌(Mushiake *et al.*, 2005)。β-聚糖亦被使用在微生物感染的疾病，如感染HIV患者的注射的DNA疫苗中含有zymosan，可藉由活化補體系統刺激輔助型T細胞引發的免疫反應(Ara *et al.*, 2001)。此外，Nicolosi等人指出高膽固醇病人，食用添加從啤酒酵母萃取的β-聚糖可有效降低病人血中的膽固醇(Nicolosi *et al.*, 1999)。

β-聚糖不屬於纖維素，是 $\beta(1\rightarrow3), \beta(1\rightarrow6)$ 的異型聚合體。其中 $\beta(1\rightarrow3)$ 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。啤酒酵母細胞壁上的β-聚糖主要為zymosan，以及結構為 $\beta(1\rightarrow3)$ 六碳糖的MG。能刺激先天免疫的巨噬細胞產生細胞激素如IL-2, IL-10和IL-12以引發後天型免疫反應(Du *et al.*, 2006)。

β-聚糖活化免疫反應的可能機制是，由於其化學結構與哺乳類很不同，能作用在哺乳類非特異性先天免疫系統中的分子型態辨識受器(pattern recognition receptors, PRRs)或是補體(complements)系統，引發免疫反應。其中巨噬細胞最主要的 PRR 為 dectin-1，而其上的糖類辨識部位能認識 $\beta(1\rightarrow3)$ 六碳糖，活化下游訊息傳遞，如 syk 途徑使活性氧化物(reactive oxygen species, ROS)產生以及細胞激素的合成，另外的途徑引發吞噬作用。由於 TLR 也能辨認 β-聚糖，有時 dectin-1 會與 TLR 協同活化。TLR 部分主要為 TLR-2 及 TLR-4 會被 β-聚糖活化，藉由 MyD88 途徑製造 IL-2, IL-12 和 TNF- α 。

中性球、單核球和自然殺手細胞上表現由CD11b和CD13複合的補體受器3(complement receptor 3, CR3)。β-聚糖亦可被辨認以及活化syk和iC3途徑，活化腫瘤毒殺能力，對自然殺手細胞最重要，由於其此細胞沒有dectin-1。而清除受器(scavenger receptor)在血液細胞和內皮細胞表面可以發現。β-聚糖可活化一些訊息傳導，如PI3K、MAPK，但是功能尚不清楚(Diniz *et al.*, 2004)。

第六節 健康食品之免疫調節評估方法

健康食品的免疫調節功能評估，是針對包括非特異性及特異性免疫功能之評估。其中非特異性免疫力主要包括如中性白血球(neutrophils)及單核球(monocytes)的吞噬能力或是自然殺手細胞的活性(natural killer activity)，細胞在體外與健康食品共同培養後分析與控制組的結果是否有顯著差異。而特異性免疫力主要是針對一些特定的抗原作進一步的評估，在老鼠身上可以利用外加注射一些特定的抗原，再進行抗原特異性免疫反應的評估，其中可以包括如特異性抗體的測定或是抗原特異性的 T 細胞增殖反應和細胞激素的定量。(行政院衛生署食品衛生處。2002。健康食品之免疫調節評估方法)

第七節 研究動機與目的

在文獻整理中已經顯示，黏膜部位分泌的中和性 sIgA 有助於減少微生物進入宿主，降低被感染的機會。然而要在希望的黏膜部位產生針對特定病原體的 sIgA，則需要在當地、或是具有 homing 到希望部位能力的遠端黏膜引發免疫反應。預防小兒麻痺的沙賓口服疫苗，為典型的黏膜疫苗；以及許多引發腸胃道疾病的微生物，如輪狀病毒(Dennehy, 2008)、霍亂弧菌(Jelinek and Kollaritsch, 2008)等也積極開發口服疫苗。

上呼吸道也是容易受感染的黏膜區域，無法由口服疫苗滿足，因此各地研究團隊積極開發從鼻腔給予的疫苗。鼻腔疫苗與口服疫苗相似，有幾項優勢：除了能在給與疫苗的局部產生 sIgA 外，還有接種方便、不須經由打針的程序，易於大規模實施，並且接種者同時引發全身性免疫反應，血液中具有特異性 IgG(Davis , 2001)。較常見的鼻腔噴霧疫苗為預防流感的 FluMistTM，由重組的減毒流感病毒製造，依據每季流行更動病毒株。FluMistTM與注射流感疫苗相比，的確在鼻腔有較高量的 IgA 以及細胞免疫力，但是接種者血液中的 IgG 效價較低。在一般人施行 FluMistTM約有 60-90%的效能，而在老年人中需要搭配其他疫苗(比如針劑流感疫苗)

才能獲得有效保護力(Holmgren and Czerkinsky, 2005)。

除了減毒疫苗，也有研究使用純化的病原體抗原加入佐劑，主要有三種模式：(1)油水融合的懸浮液或是微脂粒(liposomes)可以增加抗原被免疫球吞噬的機會並被呈獻；(2)使用危險訊號(danger signal)，如霍亂毒素(cholera toxin, CT), CpG-核酸序列，活化免疫反應；(3)利用細胞激素或是其他分子，透過活化抗原呈獻細胞的costimulatory molecules，引發免疫反應。或是使用無毒或低毒性的微生物做為佐劑，如乳酸菌或是沙門氏菌，經由基因轉殖使其表現其他病原體抗原於細胞壁表面。但大多還在實驗階段，目前最常使用的黏膜致免動物模式為抗原加上毒素佐劑(Schijns, 2003)。

其中致病性大腸桿菌製造的忌熱性腸毒素(heat-labile enterotoxin, LT)，其DNA序列有80%與霍亂弧菌產生的霍亂毒素相似，由一個A次單元及五個B次單元所構成，A次單元具有ADP-核糖轉移酶可在宿主細胞中製造大量cAMP，導致脫水，是毒性的來源；B次單元則可與細胞上GMI受器結合以進入宿主細胞。但LT和CT同時也是很有效的黏膜佐劑，將抗原與毒素混合後從黏膜給予可引發針對抗原的免疫反應(Elson *et al.*, 1984; Lycke *et al.*, 1986; Clements *et al.*, 1988)。可是同時也有引發對毒素及抗原的IgE產生，可能造成過敏反應(Tamura *et al.*, 1994; Snider *et al.*, 1994)。近年來有許多研發團隊將A次單元以分生方法加以突變，去除ADP-核糖轉移酶的活性使毒性減弱或消除。已有動物實驗結果顯示ADP-核糖轉移酶失活的突變毒素仍具有佐劑的能力，無論是口服或從鼻腔給予，其引發免疫反應之能力與原型LT相似(de Haan *et al.*, 1996；Momoi *et al.*, 2008)。

由此可知，黏膜疫苗在效能上還有可以改進的空間。例如 Benyacoub *et al.*餵食小鼠菊糖，以提升口服減毒沙門氏菌疫苗效果，例如特異性糞便中 IgA 和血清 IgG 的增加。根據前述，食用益生菌等機能性食品有助於調節免疫力。因此本實驗使用野生株忌熱性腸毒素加上卵清白蛋白(Ovalbumin, OVA)抗原從鼻腔給予 BALB/c 小鼠，建立鼻腔致免模式。實驗期間灌食啤酒酵母(saccharomyces cerevisiae, SC)

及市售啤酒酵母發酵產物(saccharomyces cerevisiae legume fermented product, SCLFP)，藉由檢定唾液中與血清中抗體量，以及致免後兩週之初代細胞增生和細胞激素分泌，觀察飲食可否促進疫苗的效能。

第二章 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°C的代養環境；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 製備熱致死啤酒酵母

根據市售啤酒酵母豆類發酵產物的製造過程，啤酒酵母與豆類共同發酵後加熱至100°C持續30分鐘。製備只含啤酒酵母的餵食劑時，以含有10g酵母菌抽取物(yeast extract)和20g細菌蛋白胨(Bacto peptone)與20g葡萄糖(glucose)的一公升培養液，接種啤酒酵母培養24小時至600nm吸光值約為1。將啤酒酵母離心，加二次水混合洗去培養液，再次離心後加二次水形成懸浮液，以滾水進行隔水加熱30分鐘，其間不停攪拌。待懸浮液冷卻，每1.5ml離心管分裝1ml進行真空乾燥，儲存於4°C備用，餵食前才稱重並復水。

第三節 餵食與黏膜致免計畫

5-8週齡BALB/c小鼠，一組6隻。如圖一所示，每週分別鼻腔(intranasal, i.n.)致免PBS或LT+OVA溶液，共致免四次。體積為每鼻孔10μl，LT和OVA致免的劑量為每隻小鼠給予2μg LT及20μg OVA(albumin from chicken egg white, Sigma)。第一次致免前一週開始進行胃管灌食，每週三次直到犧牲為止。鼻腔給予1倍PBS的組別餵食二次水，每次0.2ml，是為致免控制組；致免LT與OVA溶液之小鼠則有餵食二次水(飲食控制組)、市售啤酒酵母豆類發酵產物與熱致死啤酒

酵母三組。小鼠於最後一次致免後第二週犧牲。餵食小鼠前稱取乾燥啤酒酵母及啤酒酵母豆類發酵產物，以二次水復水成為 150 mg/ml，每隻小鼠每次餵食 0.2 ml。

第四節 檢體與組織收集

從鼻腔致免前一週開始，每週採集小鼠的唾液、血清。犧牲時，先以 Ketamine/Rompun 麻醉小鼠，從眼窩放血後斷頸，以 70% 酒精消毒小鼠後在無菌操作台取出脾臟(spleen)、頸部淋巴結(cervical lymph nodes, CLN)及腸繫膜淋巴結(mesenteric lymph nodes, MLN)，分離初代細胞。之後小鼠移出無菌操作台，由氣管收取支氣管肺泡沖洗液(bronchial alveolar lavage fluid, BALF)。

唾液：腹腔注射 0.15 ml 之 0.2 mg/ml 的 pilocarpine HCl (Salagen) 水溶液，等待兩分鐘使藥效作用，保定小鼠，用 200 μ l 滴管尖收取，儲存於 1.5 ml 離心管(Kweon et al., 2002)。置於 -30°C 冰箱中直到用酵素連結免疫吸附試驗(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)測定 IgA。

血清：腹腔注射 Ketamine/ Rompun，待小鼠昏迷以內面塗有肝素的毛細管進行眼窩採血，採集約 0.1 ml。在 4°C 以 10000 rpm 離心後取上清液，置於 -30°C 冰箱中直到用 ELISA 方法測定各抗體濃度。

支氣管肺泡沖洗液：BALB/c 小鼠斷頸犧牲後，以 1 ml 之 1 倍 HBSS 由氣管沖入肺中，沖洗反覆兩次後置於 1.5 ml 離心管。儲存於 -30°C 冰箱中直到用 ELISA 方法測定 IgA。

分離初代細胞：脾臟—脾臟放在 10 ml 之 1 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，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% NH₄Cl 及 1% KHCO₃ 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 含有 10 % 胎牛血清(fetal calf serum, FCS)，1 % HEPES，1 % L-glutamine，1 %

Penicillin/Streptomycin 之 RPMI1640 細胞培養液(complete RPMI, cRPMI)，細胞記數後備用。

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 3 ml 針筒的活塞底部將淋巴結中的細胞壓出，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，將細胞沉澱拍散，加入 1 ml cRPMI，細胞記數後備用。定量細胞種在圓底 96 孔盤，培養並給予刺激以測定細胞增生；並收取細胞培養上清液，測定其中各種細胞激素(cytokine)濃度。

第五節 酵素連結免疫吸附試驗

抗 OVA 特異性抗體：參照 ELISA 套組(Bethyl; Laboratory, Montgomery, Texas, USA)說明書。20 μ g/ml OVA 稀釋於含 0.05 M carbonate-bicarbonate 之 coating buffer (pH9.6)加入 ELISA 專用 96 孔盤(96-well plate, Nunc, Roskilde, Denmark)，每孔加入 0.1 ml，放置於 4°C。隔夜取出以 1 倍 PBST (1× PBS, 0.05% Tween 20)清洗三回，洗去未接至盤底的蛋白質，加入 0.2 ml 含 50 mM Tris，0.14 M NaCl，1% BSA 之 blocking buffer，置於室溫兩小時，以填補盤底能夠接上蛋白質的位置。以 1 倍 PBST 清洗三回後，加入以 diluent buffer (0.2 ml 含 50 mM Tris，0.14 M NaCl，1% BSA, 0.05% Tween 20)連續兩倍稀釋的唾液檢體或是連續十倍稀釋的血清檢體(0.1 ml/well)，放置於 4°C。隔夜取出以 1 倍 PBST 清洗三回，加入軛有 HRP 的抗小鼠血清球蛋白的單株抗體(anti-mouse Ig HRP conjugated detection antibody)，稀釋倍數 10000 至 50000 不等，於室溫作用兩小時。1 倍 PBST 清洗三回後，加入 0.1 ml/well TMB 呈色劑(Clinical)，避光靜置，0.1 ml/well 加入 2 N H₂SO₄使呈色反應停止，以波長 450 nm 判讀吸光值。將稀釋倍數與對應的吸光值做成曲線公式，計算出吸光值為 0.1 時的稀釋倍數，以 log₂ 或 log₁₀ 表示。

總抗體：參照 ELISA 套組(Bethyl; Laboratory, Montgomery, Texas, USA)說明

書。Ig capture antibody 稀釋於含 0.05 M carbonate-bicarbonate 之 coating buffer (pH9.6)加入 ELISA 專用 96 孔盤，每孔加入 0.1 ml，放置於 4 °C。隔夜取出以 1 倍 PBST 清洗三回，洗去未接至盤底的蛋白質，加入 0.2 ml blocking buffer，置於室溫兩小時，以填補盤底能夠接上蛋白質的位置。以 1 倍 PBST 清洗三回後，加入以 diluent buffer 連續兩倍稀釋的標準品，以及稀釋 1000 倍的唾液/糞便檢體或是稀釋 1000000 倍的血清檢體(0.1 ml/well)，放置於 4°C。隔夜取出以 1 倍 PBST 清洗三回，加入 HRP conjugated detection antibody，稀釋倍數 10000 至 50000 不等，於室溫作用兩小時。1 倍 PBST 清洗三回後，加入 0.1 ml/well TMB 呈色劑(Clinical)，避光靜置，0.1 ml/well 加入 2 N H₂SO₄使呈色反應停止，以波長 450 nm 判讀吸光值。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。

細胞激素：參照 ELISA 套組(DuoSet ELISA; R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA)說明書。cytokine capture antibody 稀釋於含 1 倍 PBS(pH7.2)加入 ELISA 專用 96 孔盤，每孔加入 0.1 ml，放置於 4°C。隔夜取出以 1 倍 PBST 清洗三回，洗去未接至盤底的蛋白質，加入 0.2 ml reagent diluent (0.2 ml 含 0.05% Tween 20 之 1 倍 PBS)，置於室溫兩小時，以填補盤底能夠接上蛋白質的位置。以 1 倍 PBST 清洗三回後，加入以 reagent diluent 連續稀釋兩倍的標準品，以及稀釋的初代細胞培養液 (0.1 ml/well)，放置於 4°C。隔夜取出以 1 倍 PBST 清洗三回，加入抗小鼠細胞激素的單株抗體(detection antibody)，於室溫作用兩小時。1 倍 PBST 清洗三回後，加入以 reagent diluent 稀釋 200 倍之 strepavidin-HRP，室溫作用 20 分鐘。1 倍 PBST 清洗三回後，0.1 ml/well 加入 TMB 呈色(Clinical)，避光靜置，0.1 ml/well 加入 2 N H₂SO₄使呈色反應停止，以波長 450 nm 判讀吸光值，波長 550 nm 為參考值。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細胞激素濃度。

第六節 細胞增生測試

根據Humen *et al.* 發表的實驗方法，加以修改(Humen *et al.*, 2005)。將脾臟初代細胞定量至 1×10^7 cells/ml；淋巴結初代細胞定量至 5×10^6 cells/ml，皆以0.1 ml/well種至96孔圓底盤。分別用cRPMI培養基(控制組)，或含有20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OVA，2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ concanavalin A (ConA; Sigma, St. Louis, MO. T細胞分裂素，於培養第二天加入)，2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS(單核球或B細胞分裂素)的cRPMI刺激，每種刺激進行三重複，培養於37°C，5% CO₂之細胞培養箱。培養第四天，每孔收取0.15 ml細胞培養液，用於細胞激素測定。並加回0.15 ml含有[³H]thymidine (PerkinElmer, Boston, Massachusetts, USA)的刺激培養基，濃度為1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$ 。培養16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)，加入25 $\mu\text{l}/\text{well}$ 閃爍液(Microscint-20, Packard, Meriden, Connecticut, USA)，貼上封膜(TopSeal)後送入計數儀器(TopCount, PerkinElmer)進行放射線記數。

第七節 細胞分群測定

小鼠的脾臟、CLN、MLN 初代單細胞懸浮液，分別已 fluorescein isothiocyanate (FITC)、phycoerythrin (PE)、PE-Cy5、APC 螢光標定如下：(1)anti-CD3-APC、anti-CD4-PE-Cy5、anti-CD8-PE、anti-CD25-FITC，(2)anti-B220-FITC、anti-IgA-PE，(4)以大鼠 IgG2a isotype control-FITC、PE、PE-Cy5、APC (eBioscience, San Diego, Calif. USA)做為對照，並以 CellQuest software (Beckton-Dickinson Inc.)進行數據分析。

第八節 聚丙烯醯胺膠體電泳法(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)及銀染

利用15% separating gel 分離OVA和LT的兩種次單位。0.75 mm之15% separating

gel 一片的配方為 3ml 40% 1:29 bis-acrylamide:acrylamide (Bio Basic Inc., Canada) , 1.98 ml 1.5 M Tris (pH8.8) , 0.08 ml 10% SDS , 2.626 ml 二次水 , 0.273 ml 之 15 mg/ml ammonium persulfate 和 5 μ l TEMED (*N,N,N',N'-tetramethyl-ethylenediamine*) , 倒進鑄膠台後以少許 2-butanol 將表面壓平。待 Separating gel 凝固 , 製備上層 4.5% stacking gel , 一片的配方為 0.36 ml 40% 1:29 bis-acrylamide:acrylamide , 0.5 ml 0.5 M Tris (pH6.8) , 0.02 ml 10% SDS , 1.04 ml 二次水 , 0.08 ml 之 15 mg/ml ammonium persulfate 以及 2 μ l TEMED , 加入洗去 2-butanol 的 separating gel , 插入齒梳以製造樣品槽。5 μ l 樣品各加入 5 μ l sample treat buffer (4% SDS, 4% β -mercaptoethanol, 0.2 M Tris, pH6.8) 和 BPB dye 以 1:1 比例的混合液 , 95°C 處理 5 分鐘後載入 SDS-PAGE , 加入 SDS running buffer 並以每片 25 mA 電流通電 1.5 至 2 小時。

膠片以電流分離完畢 , 取下用銀染法呈色所有蛋白質。先用 60 ml 固定溶液 (2.5% trichloroacetic acid, 50% acetone, 25 μ l 37% formaldehyde) 進行固定 5 分鐘 , 水洗三回 , 浸於二次水 5 分鐘 , 水洗三回 , 再以 50% acetone 浸五分鐘 , 以 60 ml 前處理溶液 (100 μ l 10% sodium thiosulfate 5-hydrate, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 作用 1 分鐘 , 水洗三回 , 最後用含 0.8 ml 20% AgNO_3 , 0.6 ml 37% formaldehyde 的 60 ml 溶液染色 8 分鐘 , 水洗三回 , 洗去多餘染色劑後以 2% Na_2CO_3 , 1.54% formaldehyde , 0.00417% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 呈色至膠片出現棕色條紋 , 用 1% 冰醋酸退染 30 秒以上 , 以二次水清洗後封片。

第九節 統計方法

實驗數據以 mean \pm SD 表示。各組間的差異使用 *Student's t-test* 計算 , 統計上的顯著差異以各組間的 p 值 < 0.05 評估。

第三章 實驗結果

第一節 鼻腔致免溶液進行膠片電泳

每次致免小鼠前將儲存於 4°C 之 LT 與 OVA 加在離心管，以 1 倍 PBS 稀釋至 40 μg LT 與 800 μg OVA 於 0.4 ml 體積，另一離心管僅有 1 倍 PBS，置於冰上。每隻致免控制組小鼠從鼻腔給予共 20 μl 之 1 倍 PBS; LT+OVA 致免組則從鼻腔給予 LT 與 OVA 混合液 20 μl ，每個鼻孔注入 10 μl 。圖二中膠片的 lane 1-8 為每次致免小鼠後儲存的溶液，取 5 μl 進行蛋白質電泳，含有主要蛋白質為 44 kDa 的 OVA 5 μg 以及 0.5 μg LT，由 27 kDa 之 LTA 和 11 kDa 之 LTB 組成。另外 lane 9 為 0.4 μg LT，lane 10 為 5 μg OVA，做為比對。由圖可知，每次每隻小鼠進行鼻腔給予的致免試劑內容物濃度一致。



第二節 小鼠體重比較

鼻腔給予 PBS 飼食二次過濾水的組別為致免控制組，於實驗期間體重維持在 17-20 g，如圖三所示。而致免 LT+OVA 飼食二次水的小鼠(飲食控制組)則在第一次致免後體重開始下降，從第一到第五週，體重數值明顯低於致免控制組，最低體重為第二週的 12.72 g，只有致免控制組的 66.46%。而餵食啤酒酵母和啤酒酵母豆類發酵產物的 LT+OVA 致免小鼠，雖然體重也明顯減輕，但體重相較於同時間點的負控制組約為 72.7-96.9%，體重下降較少。

第三節 唾液、BALF、血清中抗 OVA 之特異性 IgA

圖四 a 為小鼠唾液中的抗 OVA 特異性 IgA，從 2 的 4 次方開始連續二倍稀釋，以 $\log 2$ 為單位，因此若 16 倍稀釋的唾液樣品的 ELISA 結果，對 450 nm 吸光值小於 0.1 則屬於超出偵測範圍，以 0 計算其特異性 IgA 的量。其中鼻腔給予 PBS 飼食二次水的小鼠之唾液特異性 IgA 於各週皆為 0，因此沒有顯示數據。

在致免 LT+OVA 並餵食二次水的飲食控制組小鼠，唾液中抗 OVA 之特異性 IgA

於 0 至 3 週四次致免，僅在 0 至 1 週時從測不到 IgA 到可以定量，而在 1 至 4 週內的唾液特異性 IgA 並不隨著致免次數增加而上升，直到最後一次致免的第二週，特異性 IgA 才增加。相反地，餵食啤酒酵母和啤酒酵母豆類發酵產物的 LT+OVA 致免小鼠第二週開始有特異性 IgA 劇烈增加，到致免最後一次(第三週)開始 IgA 不再上升直到小鼠犧牲。此外，餵食啤酒酵母和啤酒酵母豆類發酵產物的 LT+OVA 致免小鼠，在 3 至 5 週的唾液抗 OVA 之 IgA 顯著高於飲食控制組，其中以第三週餵食啤酒酵母和啤酒酵母豆類發酵產物的 LT+OVA 致免小鼠相差最大，相對於飲食控制組小鼠之唾液中特異性 IgA 分別高 20.4 以及 23.86 倍。

圖四 b 是小鼠 BALF 中的抗 OVA 特異性 IgA，從 10 的 2 次方開始連續十倍稀釋，以 log 10 為單位。餵食啤酒酵母和啤酒酵母豆類發酵產物的 LT+OVA 致免小鼠，相對於飲食控制組小鼠之 BALF 中特異性 IgA 分別高 1.36 以及 1.35 倍，統計上卻具有顯著差異($p < 0.05$)。

圖五 c 為小鼠血清中的抗 OVA 特異性 IgA，從 10 的 2 次方開始連續十倍稀釋，以 log 10 為單位。各組隨著致免次數增加，血清中抗 OVA 之特異性 IgA 皆增加，至最後一次致免後一週達到最高，第五週則較為下降。其中，餵食啤酒酵母並 LT+OVA 致免之小鼠在三至五週所誘發的特異性 IgA 分別為飲食控制組小鼠的 1.51、1.26 和 1.26 倍，具有顯著差異($p < 0.05$)。而餵食啤酒酵母豆類發酵產物並 LT+OVA 致免之小鼠在三至五週所誘發的特異性 IgA 分別為飲食控制組小鼠的 1.3、1.11 和 1.16 倍，僅第三和第五週具有顯著差異($p < 0.05$)。

第四節 血清中抗 OVA 之特異性 IgG 與 IgE

各組 LT+OVA 致免小鼠在最後一次致免後一週有最高的 IgG1 表現，如圖五 a 所示。餵食啤酒酵母的小鼠抗 OVA 之特異性 IgG1 於 2 至 5 週分別為飲食控制組小鼠的 1.12、1.14、1.08 和 1.10 倍，且有顯著差異。

IgG2a 部分如圖五 b 所示，飲食控制組小鼠隨著時間持續上升至犧牲。而餵食啤

酒酵母和啤酒酵母豆類發酵產物的 LT+OVA 致免組別之血清中抗 OVA 特異性 IgG2a 則是在第四週達到最高量，但二至五週皆明顯高於飲食控制組。餵食啤酒酵母小鼠相對於飲食控制組小鼠的血清抗 OVA 之 IgG2a 從第二週到第五週分別為 1.36、1.5、1.37 和 1.27 倍；而餵食啤酒酵母豆類發酵產物小鼠相對於飲食控制組小鼠的血清抗 OVA 之 IgG2a 從第二週到第五週分別為 1.38、1.45、1.37 和 1.27 倍。

相反地，LT+OVA 致免小鼠在餵食啤酒酵母和啤酒酵母豆類發酵產物的組別，血清中抗 OVA 之特異性 IgE 持續上升至犧牲時，如圖五 d 所示；但飲食控制組小鼠的血清中特異性 IgE 則是在第四週達到最高。然而第二週至第五週，餵食啤酒酵母及啤酒酵母豆類發酵產物引發的特異性 IgE 皆顯著高於飲食控制組。餵食啤酒酵母小鼠相對於飲食控制組小鼠的血清抗 OVA 之 IgE 從第二週到第五週分別為 1.24、1.30、1.22 和 1.35 倍；而餵食啤酒酵母豆類發酵產物小鼠相對於飲食控制組小鼠的血清抗 OVA 之 IgE 從第二週到第五週分別為 1.27、1.26、1.24 和 1.38 倍。

第五節 唾液、BALF、血清中總 IgA 含量

用 ELISA 方法測定稀釋 1025 倍之小鼠唾液，將各樣品的 450 nm 吸光值代入標準品所建立的標準曲線。如圖六 a 所示，飲食控制組小鼠在第一次致免後唾液中 IgA 明顯較致免控制組小鼠明顯升高，持續到第五週。然而餵食啤酒酵母和啤酒酵母豆類發酵產物的 LT+OVA 致免小鼠，從第一週開始的總 IgA 與致免控制組別較相近，也就是說，比飲食控制組少。其中餵食啤酒酵母豆類發酵產物的 LT+OVA 致免小鼠之唾液總 IgA 在第一週至第四週明顯低於飲食控制組小鼠；一至四週分別為飲食控制組小鼠的 21.19 %、22.41 %、39.99 % 以及 60.07 %。餵食啤酒酵母的 LT+OVA 致免小鼠之唾液總 IgA 在第一週至第三週明顯低於飲食控制組小鼠；一至三週分別為飲食控制組小鼠的 33.55 %、29.50 %、以及 40.27 %。然而，在最後一次致免的一週後，即第五週，餵食啤酒酵母或啤酒酵母豆類發酵產物的 LT+OVA 致免小鼠誘發的唾液總 IgA 上升雖仍低於飲食控制組小鼠但已沒有顯著差異。

BALF 稀釋 100 倍，如圖六 b 所示，LT+OVA 致免小鼠的 BALF 總 IgA 明顯高於致免控制組，不同飲食的 LT+OVA 致免組別間沒有顯著差異，跟唾液中總 IgA 在犧牲前所測得的趨勢相近。

血清的稀釋倍數為 10 的六次方。圖七 c 表示，飲食控制組小鼠在第二次致免後血清中總 IgA 明顯較致免控制組小鼠明顯升高，持續到第五週。然而餵食啤酒酵母和啤酒酵母豆類發酵產物的 LT+OVA 致免小鼠，從致免後一周開始，誘發的血清 IgA 比飲食控制組別少。其中餵食啤酒酵母豆類發酵產物的 LT+OVA 致免小鼠之血清總 IgA 在第一週至第五週明顯低於飲食控制組小鼠；一至五週分別為飲食控制組小鼠的 9.12 %、36.68 %、40.53 %、61.78 % 以及 66.94 %。餵食啤酒酵母的 LT+OVA 致免小鼠之血清總 IgA 在第一週至第三週明顯低於飲食控制組小鼠；一至三週分別為飲食控制組小鼠的 65.20 %、39.02 %、以及 66.59 %。不同於唾液總 IgA 的結果，第五週時餵食啤酒酵母及啤酒酵母豆類發酵產物的 LT+OVA 致免小鼠之血清總 IgA 仍然顯著低於飲食控制組小鼠。餵食啤酒酵母及啤酒酵母豆類發酵產物的 LT+OVA 致免小鼠之血清總 IgA 為飲食控制組別的 87.32 % 和 66.94 %。

第六節 血清中總 IgG 和 IgE

如圖七 a 所示，飲食控制組小鼠從第二次致免之後(第二週)，至第五週的血清中總 IgG1 顯著高於致免控制組小鼠。有趣的是，餵食啤酒酵母及啤酒酵母豆類發酵產物的 LT+OVA 致免小鼠的血清總 IgG1，從開始致免到犧牲皆略低於飲食控制組別，但只有第二週有顯著差異；然而，在此時間點，餵食啤酒酵母及啤酒酵母豆類發酵產物的 LT+OVA 致免小鼠的血清總 IgG1，分別是飲食控制組別的 86.94% 和 92.73%，相差的量不大。

同樣地，圖七 b 表示，飲食控制組小鼠從第二週至第五週的血清中總 IgG2a 顯著高於致免控制組小鼠。然而，餵食啤酒酵母及啤酒酵母豆類發酵產物的 LT+OVA 致免小鼠的血清總 IgG2a，在第一週至第三週低於飲食控制組小鼠。其中餵食啤酒

酵母的 LT+OVA 致免小鼠之血清總 IgG2a 僅第一週和第二週顯著低於飲食控制組小鼠，依時間點分別為飲食控制組小鼠的 76.14 % 和 64.45 %。而餵食啤酒酵母豆類發酵產物的 LT+OVA 致免小鼠之血清總 IgG2a 從第一週至第三週皆顯著低於飲食控制組小鼠，依時間點分別為飲食控制組小鼠的 87.41 %、44.64 % 和 50.59 %。但是不論餵食啤酒酵母或是啤酒酵母豆類發酵產物的 LT+OVA 致免小鼠，在最後一次致免之後，血清中總 IgG2a 與飲食控制組小鼠沒有顯著差異，甚至餵食啤酒酵母的 LT+OVA 致免組別之血清總 IgG2a 與飲食控制組別幾乎相等。而餵食啤酒酵母豆類發酵產物的 LT+OVA 致免組別之血清總 IgG2a 略低於飲食控制組別。

飲食控制組小鼠，從第一次致免後(第一週)至第四週的血清中總 IgE 顯著高於致免控制組小鼠(圖七 d)。與血清總 IgG1、IgG2a 相似，餵食啤酒酵母豆類發酵產物的 LT+OVA 致免小鼠之血清總 IgE 在第一週到第四週低於飲食控制組別，其中僅第三週沒有顯著差異；從第一週至第四週餵食啤酒酵母豆類發酵產物的 LT+OVA 致免小鼠為飲食控制組小鼠的 37.64 %、50.26 %、86.67 % 和 62.26 %。而餵食啤酒酵母的 LT+OVA 致免小鼠的血清總 IgE 雖然在第一至第三週略低於飲食控制組別，但只有第一週有顯著差異，為飲食控制組小鼠的 51.91 %。在最後一次致免後的第二週(第五週)，則 LT+OVA 致免所導致的血清總 IgE 上升之效果不再明顯，不論餵食的項目，LT+OVA 致免小鼠中血清總 IgE 的量與致免控制組的小鼠相似。

第七節 脾臟及不同淋巴結細胞的特異性增生

脾臟、CLN、MLN 的初代單細胞懸浮液，以四種條件、各三重覆種在 96 孔盤。四種條件為每隻小鼠的初代細胞分別以單獨 cRPMI、20 $\mu\text{g/ml}$ OVA、2 $\mu\text{g/ml}$ conA 以及 2 $\mu\text{g/ml}$ LPS 培養 5 天。其中，單獨 cRPMI 的處理當作每隻小鼠細胞的控制項目，由於每隻小鼠的各種免疫細胞比例可能有所差異，以其他條件之實驗數據相對於單獨 cRPMI 處理的倍數(fold induction)表示。初代細胞與 20 $\mu\text{g/ml}$ OVA 共同培養的處理視為 LT+OVA 致免小鼠的特異性增生分析。

各組 LT+OVA 致免組別的單獨 cRPMI 處理之增生放射性讀值(cpm)明顯高於致免控制組別，表示餵食各種食品之 LT+OVA 致免小鼠的脾臟初代細胞在單獨 cRPMI 處理後的增生情況較為活化(圖八 a)。並且如圖八 b 所示在 OVA 處理的 cpm 讀值以在單獨 cRPMI 處理的讀值校正後，各組 LT+OVA 致免的 OVA 處理增生倍數皆顯著高於致免控制組別，所以 LT+OVA 致免後的確可以在脾臟此全身性免疫器官於體外表現對 OVA 的特異性增生。但餵食各種食品的 LT+OVA 致免小鼠間並未有明顯差異，雖然在增生倍數上以餵食啤酒酵母和啤酒酵母豆類發酵產物的組別較餵食二次水的 LT+OVA 致免小鼠來得高，分別為飲食控制組的 1.55 和 2.18 倍。

此外，圖八 c 和 e 所表示之 CLN 和 MLN 的單獨 cRPMI 處理在各 LT+OVA 致免組別有較致免控制組別高的 cpm 讀值，但無顯著差異。並且 OVA 處理的 LT+OVA 致免組別在增生倍數上雖高於 PBS 致免小鼠，但無顯著差異。其中最接近致免部位的 CLN 在增生倍數上以餵食啤酒酵母和啤酒酵母豆類發酵產物的組別為飲食控制組的 1.89 和 1.75 倍。

第八節 脾臟及不同淋巴結細胞的非特異性增生

小鼠的初代細胞體外培養加入 conA，為所有 T 細胞的裂殖素；加入 LPS 則為單核球或 B 細胞的裂殖素，實驗結果視為初代細胞的非特異性增生。

如圖八 a 所示，雖然初代脾臟細胞處理 conA 後，各組的 cpm 值沒有顯著差異。但由於 PBS 致免控制組別的單獨 cRPMI 處理所得 cpm 值較低，經過校正後，如圖八 b 表示，LT+OVA 致免的各組別之增生倍數明顯低於致免控制組。LPS 處理的脾臟細胞，以致免控制組的 cpm 值最高，並且顯著高於飲食控制組別。校正後的則是 LT+OVA 致免的各組皆顯著較致免控制組別低。

CLN 部分如圖八 c 所示， $[3H]$ thymidine 合成入細胞 DNA 的 cpm 讀值無論是以 conA 或 LPS 處理，LT+OVA 致免的各組別皆遠高於致免控制組，僅餵食啤酒酵母的 LT+OVA 致免於 LPS 處理沒有顯著差異。經過校正，如圖八 d 表示，conA 或

LPS 處理之 LT+OVA 致免的各組別皆高於致免控制組，僅飲食控制組於 LPS 處理沒有顯著差異。然而 LT+OVA 致免不同餵食組別間沒有明顯差異。

此外，從 MLN 分出的初代細胞於 conA 處理的 cpm 讀值以 LT+OVA 致免的各組高於 PBS 致免控制組別(圖八 e)，但校正後並無顯著差異(圖八 f)。然而 LPS 處理的 MLN 初代細胞，無論 cpm 絶對值(圖八 e)或是校正後的增生倍數(圖八 f)，都以 LT+OVA 致免的各組顯著高於 PBS 致免組別，但是 LT+OVA 致免餵食不同食品的組別間沒有明顯差異。

第九節 初代細胞針對 OVA 分泌的細胞激素

收取體外以 OVA 處理的小鼠初代細胞四天培養液，用 ELISA 測定其中 IL-5 和 IFN- γ 的量。

如圖九 a 所示，脾臟中輔助型 T 細胞被 OVA 刺激所分泌的 IL-5 以 LT+OVA 致免的各組顯著高於 PBS 致免組別。並且餵食啤酒酵母與啤酒酵母豆類發酵產物之 LT+OVA 致免的 IL-5 量更明顯比飲食控制組別高，分別為飲食控制組別的 2.06 與 2.47 倍。

如圖九 b 所示，CLN 部分飲食控制組和致免控制組別的初代細胞，於 OVA 刺激下產生的 IL-5 具有相似量，餵食啤酒酵母和啤酒酵母豆類發酵的 LT+OVA 致免組別的 IL-5 較為上升，分別為飲食控制組別的 2.23 與 2.08 倍，只有餵食啤酒酵母組相對於飲食控制組別有顯著差異。而離致免部位遠處的黏膜淋巴結—MLN 之初代細胞則對 OVA 刺激較無 IL-5 分泌上升的反應，LT+OVA 致免的各組 MLN 分泌之 IL-5 量與 PBS 致免組別相似，不過餵食啤酒酵母與啤酒酵母豆類發酵產物的 LT+OVA 致免組別有較餵食二次水的兩組非顯著的上升，大約是餵食二次水組別的 1.5 倍。

此外在圖九 c，脾臟分出之初代細胞被 OVA 刺激所分泌的 IFN- γ 以 LT+OVA 致免的各組顯著高於致免控制組別。並且餵食啤酒酵母與啤酒酵母豆類發酵產物之

LT+OVA 致免的 IFN- γ 量更明顯比飲食控制組別高，分別為飲食控制組別的 3.71 與 4.77 倍。而不論 CLN 或 MLN(圖九 d)，不同的致免和餵食似乎不影響 OVA 刺激後初代細胞分泌 IFN- γ 的能力。

第十節 初代免疫細胞分群之百分比

小鼠犧牲時，一部份初代細胞以帶有不同螢光物質的抗體針對細胞膜上各種蛋白進行表面染色。計算 CD4/CD8 的相對百分比、CD4 $^+$ CD25 $^+$ 百分比以及 B220 $^+$ 的 B 細胞百分比或是 B220IgA $^+$ 的漿細胞(plasma cells)百分比。

圖十 a 和 b 結果顯示，在脾臟、CLN 或 MLN 的細胞中 CD4/CD8 及 CD4 $^+$ CD25 $^+$ 的百分比皆不會因為致免和餵食而改變。

圖十 c 中 B220 $^+$ 分群的 B 細胞方面，則可發現較接近致免部位的 CLN 在 LT+OVA 致免的各組有明顯較致免控制組高約兩倍，LT+OVA 致免但餵食不同食品的 B 細胞百分比則類似。並且在圖十 d 所示 B220IgA $^+$ 在 CLN 也是相同趨勢，LT+OVA 致免的各組顯著高於致免控制組 2.85-3.85 倍，不同餵食的 LT+OVA 致免則不明顯改變漿細胞百分比。然而 MLN 中無論是 B 細胞或漿細胞的百分比，在各組間無差異。

第四章 討論

第一節 唾液、BALF、血清中抗 OVA 之特異性 IgA 與細胞激素

接種疫苗最重要的目的為產生以及維持具有針對致病菌或病毒之抗體。已知肌肉注射之疫苗可以引發有效的 IgG 抗體產生。然而對於從黏膜入侵宿主的外來物則可能以針對外來物之分泌性 IgA 中和，從而阻止外來物。以流感病毒為例，市面上的注射疫苗可以使接種者血清中具有 IgG，但呼吸道部位的分泌性 IgA 則相對較少 (Bender *et al.*, 1991; Glezen *et al.*, 1982; Renegar *et al.*, 1991)。因此試圖發展鼻腔內給予的流感疫苗，以保護呼吸道黏膜不被流感病毒黏附及進行大量複製，並且

此疫苗不但引發部位性的IgA，同時也使接種者產生全身性的IgG (Asahi-Ozaki *et al.*, 2004 ; Lee *et al.*, 2003 ; Mendelman *et al.*, 2004 ; Tumpey *et al.*, 2001)。

本篇實驗結果顯示相較於飲食控制組，飲食中含有啤酒酵母時，能在接種其間至接種後兩週內具有較高量的IgA產生，不論是在呼吸道相關的唾液、肺沖液，或是代表全身性免疫力的血漿中。

從B細胞製造免疫球蛋白需經過增生與成熟的過程，其間需要生長或分化因子參與。作為分化因子的細胞激素依據作用在B細胞發生的效果分為二，一種使B細胞進行類型轉換，調節活化B細胞所產生的種類(isotype)；另一種則誘導B細胞成熟，使進行類型轉換後B細胞生長及分化成為分泌抗體的漿細胞。TGF- β 使B細胞類型轉換成IgA，並且使B細胞表面的IL-5受器表現量上升。一般認為IL-5活化嗜酸性球，近年發現其對IgA的產生很重要，選擇性地將類型轉換成表現IgA之B細胞分化為漿細胞，並維持其分泌的功能(Salvi *et al.*, 1999)。雖然Salvi S指出參與B細胞的類型轉換和分化的細胞激素由呼吸道上皮細胞所產生，由於實驗技術及實驗動物有限，並未取得免疫作用部位的上皮細胞，僅取引發免疫部位之淋巴結。但仍可由致免部位最近的CLN初代細胞培養上清液中測得較高的IL-5濃度，於餵食啤酒酵母及其豆類發酵產物的LT+OVA致免組別，可能仍有分泌IL-5之輔助型T細胞參與在維持IgA的製造與分泌，因此在BALF和唾液中有較多的IgA。並且，離致免部位較遠的MLN初代細胞經OVA刺激後其細胞激素IL-5量在餵食啤酒酵母及其豆類發酵產物的LT+OVA致免組比相同致免餵食二次水組別稍上升，顯示腸道可能參與IgA的增量。

第二節 血清中抗 OVA 之特異性 IgG 與 IgE 與細胞激素

抗體的產生通常被認定為Th2活化B細胞的效果。然而Th1所分泌的細胞激素也可以誘導B細胞產生抗體，不同於Th2細胞激素引發的抗體類型。DeKruyff等人指出雖然Th1的免疫路徑主要活化細胞免疫，但IgG2a的產生需要Th1細胞分泌的IFN- γ

與IL-2同時存在；而IgG1和IgE則主要透過Th2細胞分泌的IL-4存在使B細胞進行類型轉換，有時還有IL-5參與。一般認為感染引發Th1或Th2的平衡對於疾病的認定很重要。因此IgG2a和IgG1的產量可分別作為傾向Th1及Th2免疫反應的標誌(DeKruyff *et al.*, 1993)。本實驗顯示於LT+OVA致免小鼠中，不論血清中IgG2a或IgG1，以餵食啤酒酵母及啤酒酵母豆類發酵產物高於餵食二次水的控制組，表示餵食啤酒酵母及其豆類發酵產物可能增強全身性Th1及Th2免疫反應。與脾臟初代細胞於體外與OVA共培養四天測得細胞激素結果相關，餵食啤酒酵母和啤酒酵母豆類發酵產物的LT+OVA組別相對於LT+OVA致免控制組，不但有較高的Th2細胞激素IL-5也有較高的Th1細胞激素IFN- γ 。

第三節 血清中總抗體含量

由第一章的文獻整理中已知IgA在黏膜組織的重要性，但在血液中IgA多以單體存在，並且可以與一些免疫細胞如巨噬細胞、中性球和嗜酸性球上之Fc α 受器-I作用，發生發炎反應(Otten and van Egmond, 2004)。而IgE接在肥大細胞(mast cell)上的Fc ϵ 受器，待IgE與其針對的抗原作用時活化肥大細胞，使肥大細胞釋放組織胺等顆粒性物質造成附近血管更為通透，使局部腫脹形成過敏反應。IgE與肥大細胞上的Fc ϵ 受器具有高親和性，所以低量IgE也能引發過敏。因此由血清中總IgA和IgE實驗結果中，相對於飲食控制組攝取啤酒酵母豆類發酵產物或啤酒酵母可能可以降低過敏發生的機率，然而可能容易引發對接種抗原的過敏反應。

血清中各個isotype的IgG以單體存在著，它們於重鍊的部分具有不同Fc蛋白三級結構，依據抗體Fc部分能與各種細胞上Fc受器交互作用，或是活化補體系統，促進後續免疫反應以清除外來抗原，而引發的免疫反應決定IgG所屬isotype的功能。IgG1最主要可以調理(opsonize)抗原，使其藉由與Fc γ 受器作用更易被巨噬細胞或中性球等免疫細胞吞噬，引發發炎反應，此外也進行中和、活化補體(complement)及自然殺手細胞並且會輕微活化肥大細胞。IgG2則主要進行抗原中和，並稍為活

化補體系統(Janeway *et al.*, 2005)。從小鼠血清中總IgG1、和IgG2a因為LT+OVA由鼻腔致免而上升，為免疫反應發生時伴隨的現象，然而飲食中含有啤酒酵母及其豆類發酵產物，可能稍微緩和抗體IgG濃度增加，而減少非特異性的過敏反應發生。

第四節 脾臟及淋巴結細胞的增生與細胞表現型之百分比

外加 OVA 蛋白測定初代細胞之增生現象可測定具特異性之功能 T 或 B 細胞於體內致免時期引發細胞族群擴充(clonal expansion)能力。LT+OVA 從鼻腔致免相對於致免控制組，可分別引發 OVA 刺激之 OVA 選殖細胞、conA 刺激之 T 細胞和 LPS 刺激之 B 細胞顯著的增生反應，但不包含脾臟細胞。暗示著主要是鼻腔致免改變免疫細胞數的平衡，而非飲食。

同理，飲食並不特別改變各表現型細胞的百分比，但增加了 CLN 的 B 細胞和 IgA⁺漿細胞之免疫球百分比。雖然 Nikolic *et al.*指出在小鼠骨髓及脾臟中的細胞中，B220 不只表現於 B 細胞表面，一些樹突細胞上亦有 B220(Nikolic *et al.*, 2002)。然而 2007 年 Rodríguez-Monroy 研究 NALT 和鼻腔的各種表現型之細胞分群，發現表現 B220 之細胞幾乎皆為 CD19⁺，因此至少可以判定本實驗所染到 CLN 的 B220⁺細胞主要為 B 細胞(Rodríguez-Monroy *et al.*, 2007)。

第五節 小鼠體重比較

小鼠的體重常表現其整體健康狀況。LT+OVA 致免之小鼠組別發現體重比不引發免疫反應的 PBS 鼻腔給予組別明顯下降，可知野生株 LT 的毒性可能影響小鼠的生理機能。然而餵食了啤酒酵母發酵產物則小鼠隨著 LT+OVA 致免次數增加及致免後期間拉長，其體重下降有限。餵食啤酒酵母之小鼠則是在最後兩次致免(第二週)才開始降低。不同於前述的突變株 LT 與野生株引發類似免疫力，Tsuji 等人曾指出 ADP-核糖轉移酶失活的突變 LT 在去除毒性後，其誘發的免疫反應較原型 LT 佳(Tsuji *et al.*, 1997)，則有可能是毒性造成實驗動物不健康導致免疫力低落。此外，給

予較大體積的液體疫苗，可能使接種者由食道吞入(Mestecky *et al.*, 2005)，造成實驗小鼠食慾不佳導致體重下降。

第五章 總結論

總的來說，小鼠每週飲食中包含 30 mg 啤酒酵母或是啤酒酵母豆類發酵產物共三次，可初步增加其特異性黏膜及全身性抗體，甚至細胞活性；但是非特異性總抗體則較飲食控制組為低。

然而要確切了解飲食所增進的特異性免疫力，則需要建立飛沫傳染致病微生物的動物模式，如流感病毒。實驗程序與本實驗模式類似，先以流感疫苗將小鼠致免，同時分組餵食二次水、啤酒酵母和啤酒酵母豆類發酵產物，最後使小鼠感染致死劑量的流感病毒，評估各種飲食是否具有較高的存活力，可確認啤酒酵母及其豆類發酵產物所引發較高的特異性抗體真的對食用者具有較高免疫保護力。

除了第一章對啤酒酵母調節免疫力的著重在 β -聚糖的成分，免疫調節的其他成分或機制尚有：飲食中添加核苷酸亦被證實可以增強免疫反應，如避免細菌感染、誘導Th1型免疫反應。並且Uauy等人發表核苷酸能夠刺激剛離乳大鼠之小腸上皮細胞，使小腸內黏膜蛋白和DNA增加，絨毛增長，以及雙醣酶活性上升(Uauy *et al.*, 1990)。此外在OVA-T細胞受器的轉基因小鼠上也發現，當小鼠飲水中皆含有2 % OVA時，飲食中有添加核苷酸之組別的糞便中含有較高量的IgA，暗示著腸道中較多IgA存在。機制則可能透過 $\gamma\delta^+$ T細胞的活化，引發IL-7分泌所導致(Nagafuchi *et al.*, 2002)。

近年有研究指出，攝取n-3的長鏈不飽和脂肪酸可抑制代謝中產生的類花生酸(eicosanoids)所引發的過度發炎反應，並且阻止B細胞產生IgE (Sijben *et al.*, 2007)。例如Watanabe等人已在1994年證明以含有10%紫蘇種籽油的飼料讓ICR小鼠自由取食，由於紫蘇種籽油具有高量n-3不飽和脂肪酸[18:3(n-3)/18:2(n-6) = 3.9]相較於[18:3(n-3)/18:2(n-6) = 0.01]的紅花種籽油，使同為腹腔注射Alum+OVA致免的ICR

小鼠有較低的效價的OVA特異性IgE(Watanabe *et al.*, 1994)。然而，在BALB/c以OVA致敏小鼠的模式上，以飲食中含5%紫蘇種籽油相對含玉米油的組別其血清中具有稍微上升的OVA特異性IgE，以及顯著較高的總IgE。Chang等人認為在不同種類的小鼠、紫蘇種籽油攝取量有所差別或是致免及致敏的模式不同所造成，並指出BALB/c小鼠攝取紫蘇種籽油顯著較低的三酸甘油脂、膽固醇、高密度脂蛋白和低密度脂蛋白並且特異性IgG1和IgA下降，作者認為血中脂肪與脂蛋白濃度與IgG1、IgA有正相關的關係，但與IgG2a無相關。進一步分析血清中總IgE與三酸甘油脂和高密度脂蛋白(或高密度脂蛋白/低密度脂蛋白)濃度形成負相關。顯示飲食調節脂肪代謝食同時具有改變體液免疫的能力(Chang *et al.*, 2009)。並且Ma等人指出 α -亞麻酸及其代謝物(EPA或DHA)可能改變免疫細胞膜表面的lipid raft進而調節免疫系統的細胞訊息傳遞(Ma *et al.*, 2004)。亦即調整血中脂肪酸比例可能連帶改變免疫細胞作用與各種抗體濃度。

因此，未來可將餵食小鼠的血清測定其三酸甘油脂、膽固醇等生理指標與抗體產生做相對性的統計比較；或是從啤酒酵母分離出細胞壁及其他部分，進行模式動物體內的免疫能力調節檢定，以明白啤酒酵母參與在免疫作用的角色。

第六章 參考文獻

行政院衛生署食品衛生處。2002。健康食品之免疫調節評估方法

Ara Y, Saito T, Takagi T, Hagiwara E, Miyagi Y, Sugiyama M, Kawamoto S, Ishii N, Yoshida T, Hanashi D, Koshino T, Okada H, Okuda K. (2001) Zymosan enhances the immune response to DNA vaccine for human immunodeficiency virus type-1 through the activation of complement system. *Immunology*. 103(1):98-105

Asahi-Ozaki Y, Yoshikawa T, Iwakura Y, Suzuki Y, Tamura S, Kurata T, Sata T. (2004) Secretory IgA antibodies provide cross-protection against infection with different strains of influenza B virus. *J Med Virol*. 74(2):328-335

Bender BS, Johnson MP, Small PA. (1991) Influenza in senescent mice: impaired cytotoxic T-lymphocyte activity is correlated with prolonged infection. *Immunology* 72(4):514-519

Benyacoub J, Rochat F, Saudan KY, Rochat I, Antille N, Cherbut C, von der Weid T, Schiffelin EJ, Blum S. (2008) Feeding a diet containing a fructooligosaccharide mix can enhance Salmonella vaccine efficacy in mice. *J Nutr*. 138(1):123-9

Bilsborough J, Viney JL. (2004) Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance, and disease. *Gastroenterology* 127(1):300-309

Brandtzæg P, Carlsen HS, Halstensen TS. (2006) The B-cell system in inflammatory bowel disease. *Adv Exp Med Biol*. 579:149-167

Butcher EC, Rouse RV, Coffman RL, Nottenburg CN, Hardy RR, Weissman IL. (1982) Surface phenotype of Peyer's patch germinal center cells: implications for the role of germinal centers in B cell differentiation. *J Immunol*. 129(6):2698-2707

Chang HH, Chen CS, Lin JY. (2009) Dietary perilla oil lowers serum lipids and ovalbumin-specific IgG1, but increases total IgE levels in ovalbumin-challenged mice. *Food Chem Toxicol*. 47(4):848-54

Cheung NK, Modak S, Vickers A, Knuckles B. (2002) Orally administered β -glucans enhance anti-tumor effects of monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother*. 51(10): 557-64

Clements JD, Hartzog NM, Lyon FL. (1988) Adjuvant activity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and effect on the induction of oral tolerance in mice to unrelated protein antigens. *Vaccine*. 6(3):269-77

Corthesy B. (2007) Roundtrip ticket for secretory IgA: role in mucosal homeostasis? *J Immunol*. 178(1):27-32

Dalmo RA, Bøgwald J. (2008) Beta-glucans as conductors of immune symphonies. *Fish Shellfish Immunol*. 25(4):384-96

DeKruyff RH, Rizzo LV, Umetsu DT. (1993) Induction of immunoglobulin synthesis by CD4+ T cell clones. *Semin Immunol*. 5(6):421-30

Dennehy PH. (2008) Rotavirus Vaccines: an overview. *Clin microbiol Rev*. 21(1):198-208

Diniz SN, Nomizo R, Cisalpino PS, Teixeira MM, Brown GD, Mantovani A, Gordon S, Reis LF, Dias AA, (2004) PTX3 function Medicinal applications of fungal glucans as an opsonin for the dectin-1-dependent internalization of zymosan by macrophages. *J Leukoc Biol*. 75(4):649-656

Du Z, Kelly E, Mecklenbrauker I, Agle L, Herrero C, Paik P, Ivashkiv LB. (2006) Selective regulation of IL-10 signaling and function by zymosan. *J Immunol*. 176(8):4785-92

Elson CO, Ealding W. (1984) Cholera toxin feeding did not induce oral tolerance in mice and abrogated oral tolerance to an unrelated protein antigen. *J Immunol*. 133(6):2892-7

Gallatin WM, Weissman IL, Butcher EC. (2006) A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature*. 304(5921):30-4

Glezen WP. (1982) Serious morbidity and mortality associated with influenza epidemics. *Epidemiol Rev*. 4:25-44

de Haan L, Verweij WR, Feil IK, Lijnema TH, Hol WG, Agsteribbe E, Wilschut J. (1996) Mutants of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with reduced ADP-ribosylation activity or no activity retain the immunogenic properties of the native

holotoxin. *Infect Immun.* 64(12):5413-6.

Heritage PL, Brook MA, Underdown BJ, McDermott MR. (1998) Intranasal immunization with polymer-grafted microparticles activates the nasal-associated lymphoid tissue and draining lymph nodes. *Immunology.* 93(2):249-256.

Heritage PL, Underdown BJ, Arsenault AL, Snider DP, McDermott MR. (1997) Comparison of murine nasal-associated lymphoid tissue and Peyer's patches. *Am J Respir Crit Care Med.* 156(4 Pt 1):1256-1262.

Hishiki H, Zuercher AW, Valosky J, Coffin SE. (2004) Regional differences in the early mucosal immune response induced by primary inoculation of mice with respiratory syncytial virus. *Microb Pathog.* 36(3):141-146

Holmgren J, Czerkinsky C. (2005) Mucosal immunity and vaccine. *Nat Med Rev.* 11:s45-s53

Hornquist CE, Ekman L, Grdic KD, Schon K, Lycke NY. (1995) Paradoxical IgA immunity in CD4-deficient mice. Lack of cholera toxin-specific protective immunity despite normal gut mucosal IgA differentiation. *J Immunol.* 155(6):2877-2887

Humen MA, De Antoni GL, Benyacoub J, Costas ME, Cardozo MI, Kozubsky L, Saudan KY, Boenzi-Bruand A, Blum S, et al. (2005) Lactobacillus Johnsonii La1 antagonizes Giardia intestinalis in vivo. *Infect Immun.* 73(2):1265-9

Iwasaki A, Kelsall BL. (1999) Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med.* 190(2):229-239

Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, Song SY. (2004) Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity.* 21(4):527-538

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. (2005) Immunobiology, 6th edn. (Garland Science, New York and London)

Jelinek T, Kollaritsch H. (2008) Vaccination with Dukoral against travelers' diarrhea (ETEC) and cholera. *Expert Rev Vaccines.* 7(5):561-7

Kiyono H, Fukuyama S. (2004) NALT-versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity Nat Rev. Immunol. 4(9):699-710

Kweon MN, Yamamoto M, Watanabe F, Tamura S, Van Ginkel FW, Miyauchi A, Takagi H, Takeda Y, Hamabata T, Fujihashi K, McGhee JR, Kiyono H. (2002) A nontoxic chimeric enterotoxin adjuvant induces protective immunity in both mucosal and systemic compartments with reduced IgE antibodies. J Infect Dis. 186(9):1261-9

Latiff AH, Kerr MA. (2007) The clinical significance of immunoglobulin A deficiency . Ann Clin Biochem. 44(Pt 2):131-139

Lee MS, Yang CF. (2003) Cross-reactive H1N1 antibody responses to a live attenuated influenza vaccine in children: implication for selection of vaccine strains. J Infect Dis. 188(9):1362-6

Lycke N, Erlandsson L, Ekman L, Schon K, Leanderson T. (1999) Lack of J chain inhibits the transport of gut IgA and abrogates the development of intestinal antitoxic protection. J Immunol. 163(2):913-919

Lycke N, Eriksen L, Holmgren J. (1987) Protection against cholera toxin after oral immunization is thymus-dependent and associated with intestinal production of neutralizing IgA antitoxin. Scand J Immunol. 25(4):413-419

Lycke N, Holmgren J. (1986) Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens. Immunology. 59(2):301-8

Ma DW, Seo J, Switzer KC, Fan YY, McMurray DN, Lupton JR, Chapkin RS. (2004) N-3 PUFA and membrane microdomains: a new frontier in bioactive lipid research. J Nutr Biochem. 15(11):700-706

Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM. (2000) A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. Science 288(5474):2222-2226

Macpherson AJ, Hunziker L, McCoy K, Lamarre A. (2001) IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. Microbes Infect. 3(12):1021-35

Macpherson AJ, Uhr T. (2004) Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*. 303(5664):1662-1665

Mendelman PM, Rappaport R, Cho I, Block S, Gruber W, August M, et al. (2004) Live attenuated influenza vaccine induces cross-reactive antibody responses in children against an a/Fujian/411/2002-like H3N2 antigenic variant strain. *Pediatr Infect Dis J*. 23(11):1053-5

Mestecky J. et al. (2005) Mucosal Immunology 3rd edn. (Academic Press, San Diego)
Mora JR, Iwata M, Eksteen B, Song SY, Junt T, Senman B, Otipoby KL, Yokota A, Takeuchi H, Ricciardi-Castagnoli P, Rajewsky K, Adams DH, von Andrian UH. (2006) Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science*. 314(5802):1157-1160

Momoi F, Hashizume T, Kurita-Ochiai T, Yuki Y, Kiyono H, Yamamoto M. (2008) Nasal vaccination with the 40-kilodalton outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* and a nontoxic chimeric enterotoxin adjuvant induces long-term protective immunity with reduced levels of immunoglobulin E antibodies. *Infect Immun*. 76(6):2777-84

Mowat AM. (2003) Anatomical basis of tolerance and immunity to immunity to intestinal antigen. *Nat Rev Immunol*. 3(4):331-341

Mushiake H, Tsunoda T, Nukatsuka M, Shimao K, Fukushima M, Tahara H. (2005) Dendritic cells might be one of key factors for eliciting antitumor effect by chemoimmunotherapy in vivo. *Cancer Immunol Immunother*. 54(2):120-8

Nagafuchi S, Totsuka M, Hachimura S, Goto M, Takahashi T, Yajima T, Kuwata T, Kaminogawa S. (2002) Dietary nucleotides increase the mucosal IgA response and the secretion of transforming growth factor beta from intestinal epithelial cells in mice. *Cytotechnology*. 40(1-3):49-58

Nikolic T, Dingjan GM, Leenen PJ, Hendriks RW. (2002) A subfraction of B220(+) cells in murine bone marrow and spleen does not belong to the B cell lineage but has dendritic cell characteristics. *Eur J Immunol*. 32(2):686-92

Nicolosi R, Bell SJ, Bistrian BR, Greenberg I, Forse RA, Blackburn GL. (1999) Plasma lipid changes after supplementation with beta-glucan fiber from yeast. *Am J*

Clin Nutr. 70(2):208-12

Ohtsuka Y, Lee J, Stamm DS, Sanderson IR. (2001) MIP-2 secreted by epithelial cells increases neutrophil and lymphocyte recruitment in the mouse intestine. Gut. 49(4):526-33

Otten M.A, van Egmond, M. (2004) The Fc receptor for IgA (FcαRI, CD89). Immunol Lett. 92(1-2):23-31

Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. (2004) Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. Cell. 118(2):229-241

Renegar KB, Small PA Jr. (1991) Immunoglobulin A mediation of murine nasal anti-influenza virus immunity. J Virol. 65(4):2146-8

Rodríguez-Monroy MA, Rojas-Hernández S, Moreno-Fierros L. (2007) Phenotypic and functional differences between lymphocytes from NALT and nasal passages of mice. Scand J Immunol. 65(3):276-88

Sait LC, Galic M, Price JD, Simpfendorfer KR, Diavatopoulos DA, Uren TK, Janssen PH, Wijburg OL, Strugnell RA. (2007) Secretory antibodies reduce systemic antibody responses against the gastrointestinal commensal flora. Int Immunol. 19(3):257-265

Saito K, Yajima T, Nishimura H, Aiba K, Ishimitsu R, Matsuguchi T, Fushimi T, Ohshima Y, Tsukamoto Y, 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(40):38571-8

Salvi S, Holgate ST. (1999) Could the airway epithelium play an important role in mucosal immunoglobulin A production? Clin Exp Allergy. 29(12):1597-605
Sanderson IR. (2007) Dietary modulation of GALT. J Nutr. 137(11 Suppl):2557S-2562S

Schijns VE. (2003) Mechanisms of vaccine adjuvant activity: initiation and regulation of immune responses by vaccine adjuvants. Vaccine. 21(9-10):829-31

Shimoda M, Nakamura T, Takahashi Y, Asanuma H, Tamura S, Kurata T, Mizuochi T, Azuma N, Kanno C, Takemori T. (2001) Isotype-specific selection of high affinity memory B cells in nasal-associated lymphoid tissue. *J Exp Med.* 194(11):1597-1607

Sijben JW, Calder PC, (2007) Differential immunomodulation with longchain n-3 PUFA in health and chronic disease. *Proc Nutr Soc.* 66(2):237-259

Snider DP, Marshall JS, Perdue MH, Liang H. (1994) Production of IgE antibody and allergic sensitization of intestinal and peripheral tissues after oral immunization with protein Ag and cholera toxin. *J Immunol.* 153(2):647-57

Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21:685-711

Streeter PR, Rouse BT, Butcher EC. (1988) Immunohistologic and functional characterization of a vascular addressin involved in lymphocyte homing into peripheral lymph nodes. *J Cell Biol.* 107(5):1853-1862

Tamura S, Shoji Y, Hashiguchi K, Aizawa C, Kurata T. (1994) Effect of cholera toxin adjuvant on IgE antibody response to orally or nasally administered ovalbumin. *Vaccine.* 12(13):1238-40

Tsuji T, Yokochi T, Kamiya H, Kawamoto Y, Miyama A, Asano Y. (1997) Relationship between a low toxicity of the mutant A subunit of enterotoxigenic *Escherichia coli* enterotoxin and its strong adjuvant action. *Immunology.* 90(2):176-82

Tumpey TM, Renshaw M, Clements JD, Katz JM. (2001) Mucosal delivery of inactivated influenza vaccine induces B-cell-dependent heterosubtypic cross-protection against lethal influenza A H5N1 virus infection. *J Virol.* 75(11):5141-50

Uaay R, Stringel G, Thomas R, Quan R. (1990) Effect of dietary nucleosides on growth and maturation of the developing gut in the rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 10(4):497-503.

Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang BG, Jung YJ, Nishiyama M, Sato S, Tsujimura T, Yamamoto M, Yokota Y, Kiyono H, Miyasaka M, Ishii KJ, Akira S.

(2008) Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol.* 9(7):769-76

Volman JJ, Ramakers JD, Plat J. (2008) Dietary modulation of immune function by beta-glucans. *Physiol Behav.* 94(2):276-84

Vrese M, Schrezenmeir J. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. (2008) *Adv Biochem Engin/Biotechnol.* 111: 1-66

Warnock RA, Campbell JJ, Dorf ME, Matsuzawa A, McEvoy LM, Butcher EC. (2000) The role of chemokines in the microenvironmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules. *J Exp Med.* 191(1):77-88

Watanabe S, Sakai N, Yasui Y, Kimura Y, Kobayashi T, Mizutani T, Okuyama H. (1994) A high a-linolenate diet suppresses antigen-induced immunoglobulin E response and anaphylactic shock in mice. *J Nutr.* 124(9):1566-73

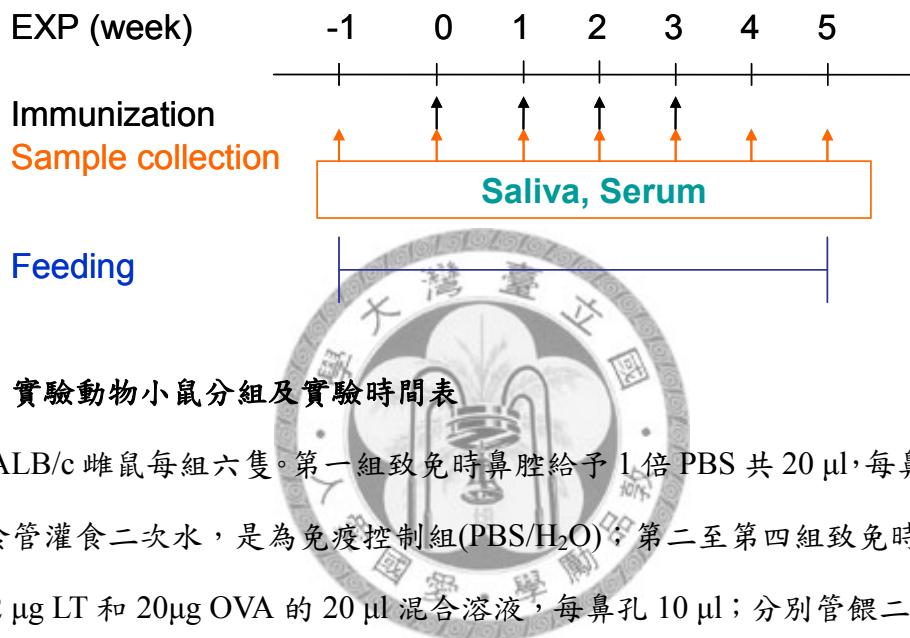
Wijburg OL, Uren TK, Simpfendorfer K, Johansen FE, Brandtzaeg P, Strugnell RA. (2006) Innate secretory antibodies protect against natural *Salmonella typhimurium* infection. *J Exp Med.* 203(1):21-26

Youngman KR, Franco MA, Kuklin NA, Rott LS, Butcher EC, Greenberg HB. (2002) Correlation of tissue distribution, developmental phenotype, and intestinal homing receptor expression of antigen specific B cells during the murine anti-rotavirus immune response. *J Immunol.* 168(5):2173-2181

(a)

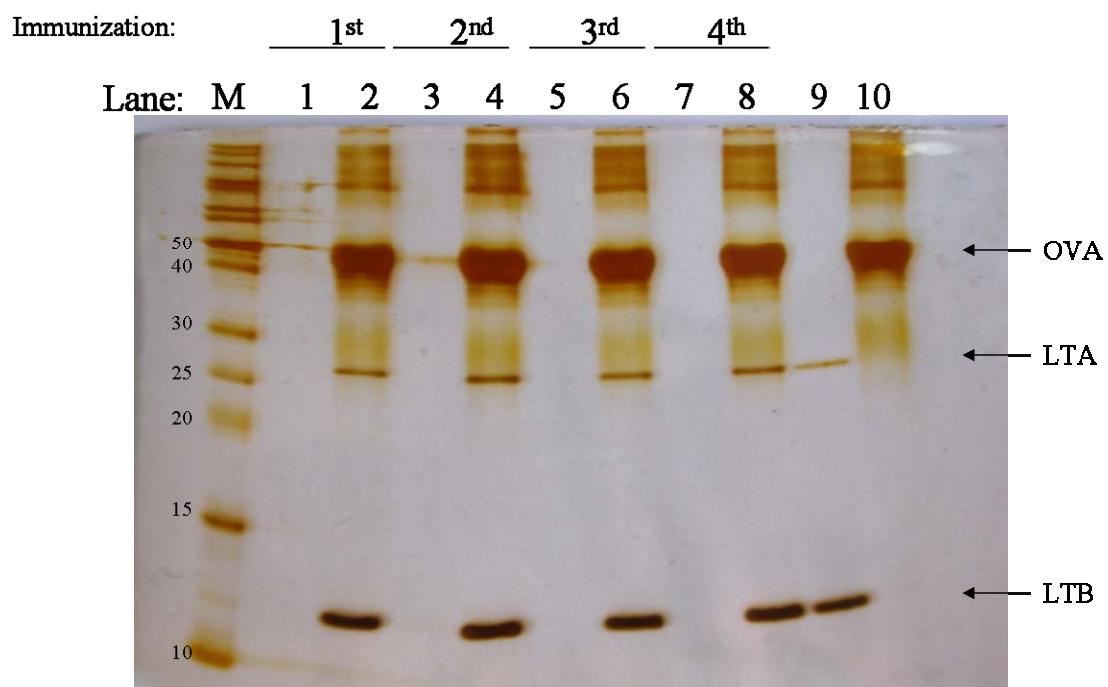
	Immunization/ feeding	dose	
I	PBS / H ₂ O	--/ 0.2 ml	i.n.
II	LT+OVA / H ₂ O	2 μ g, 20 μ g / 0.2 ml	i.n.
III	LT+OVA / SC	2 μ g, 20 μ g / 0.2 ml	i.n.
IV	LT+OVA / SCLFP	2 μ g, 20 μ g / 0.2 ml	i.n.

(b)



圖一、實驗動物小鼠分組及實驗時間表

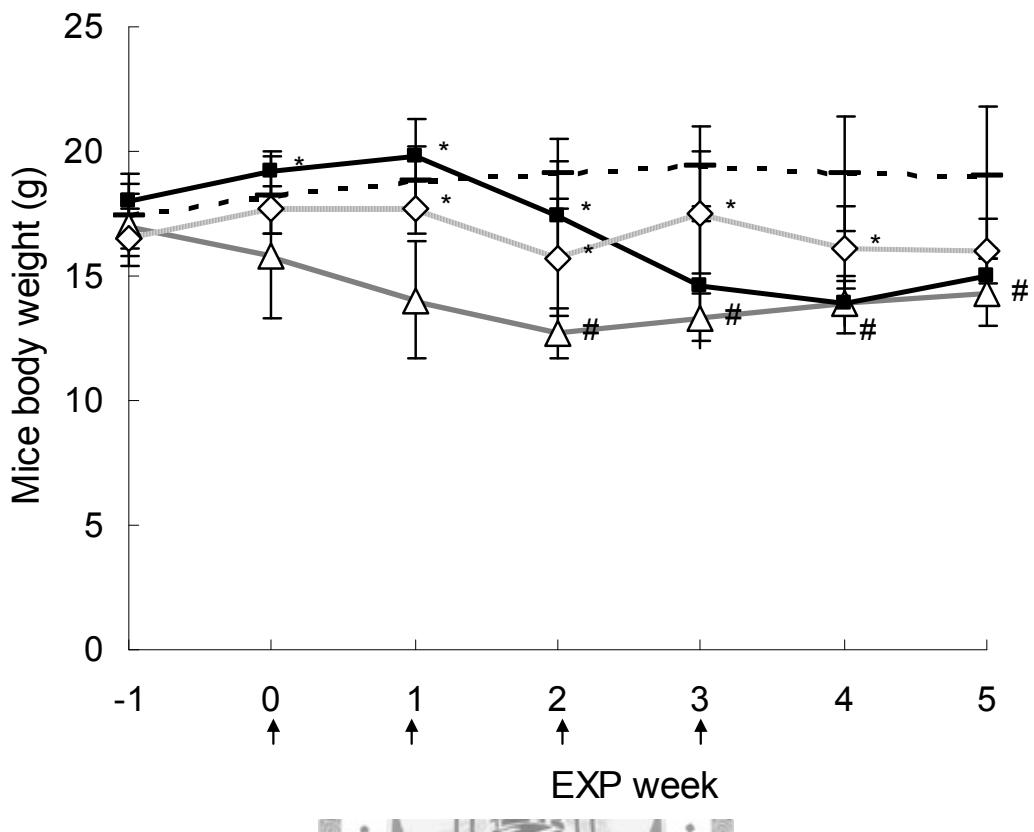
(a)BALB/c 雌鼠每組六隻。第一組致免時鼻腔給予 1 倍 PBS 共 20 μ l, 每鼻孔 10 μ l, 用餵食管灌食二次水, 是為免疫控制組(PBS/H₂O)；第二至第四組致免時鼻腔給予含有 2 μ g LT 和 20 μ g OVA 的 20 μ l 混合溶液, 每鼻孔 10 μ l；分別管餵二次水(飲食控制組, LT+OVA/H₂O)、啤酒酵母(LT+OVA/SC)、啤酒酵母豆類發酵產物(LT+OVA/SCLFP)。(b)小鼠以第一次致免設為實驗第 0 周, 共致免四次, 每次致免間隔一週。餵食從第一次致免前一週開始, 每週三次, 持續至犧牲。此外每週收取小鼠唾液及血清, 以 ELISA 測定其中抗體量。



圖二、致免溶液蛋白質電泳膠片

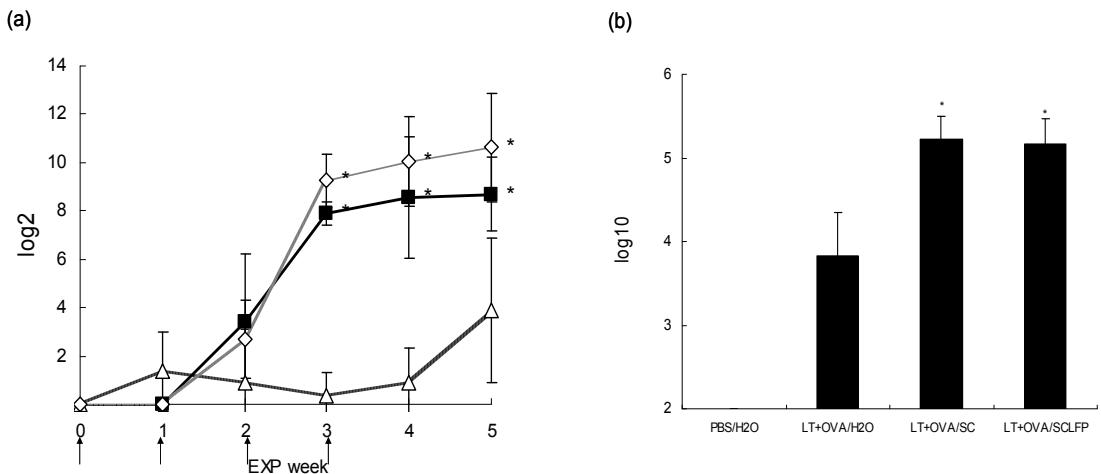
致免溶液經 SDS-PAGE 膠片電泳後銀。Lane 1, 3, 5, 7：第 0 週至第 3 週鼻腔給予小鼠之 1 倍 PBS；Lane 2, 4, 6, 8：第 0 週至第 3 週鼻腔給予小鼠之 LT(0.5 μ g)與 OVA(5 μ g)；Lane 9：0.4 μ g LT；Lane 10：5 μ g OVA。

OVA 蛋白質主要集中在 44 kDa。而每分子 LT 由一個 A 次單位與五個 B 次單位組成，因此電泳膠片圖中比較 LTA：LTB 濃度約為 1：5。A 次單位約為 27 kDa，B 次單位約為 11 kDa。



圖三、鼻腔致免 BALB/c 雌鼠並且餵食各種食品的體重

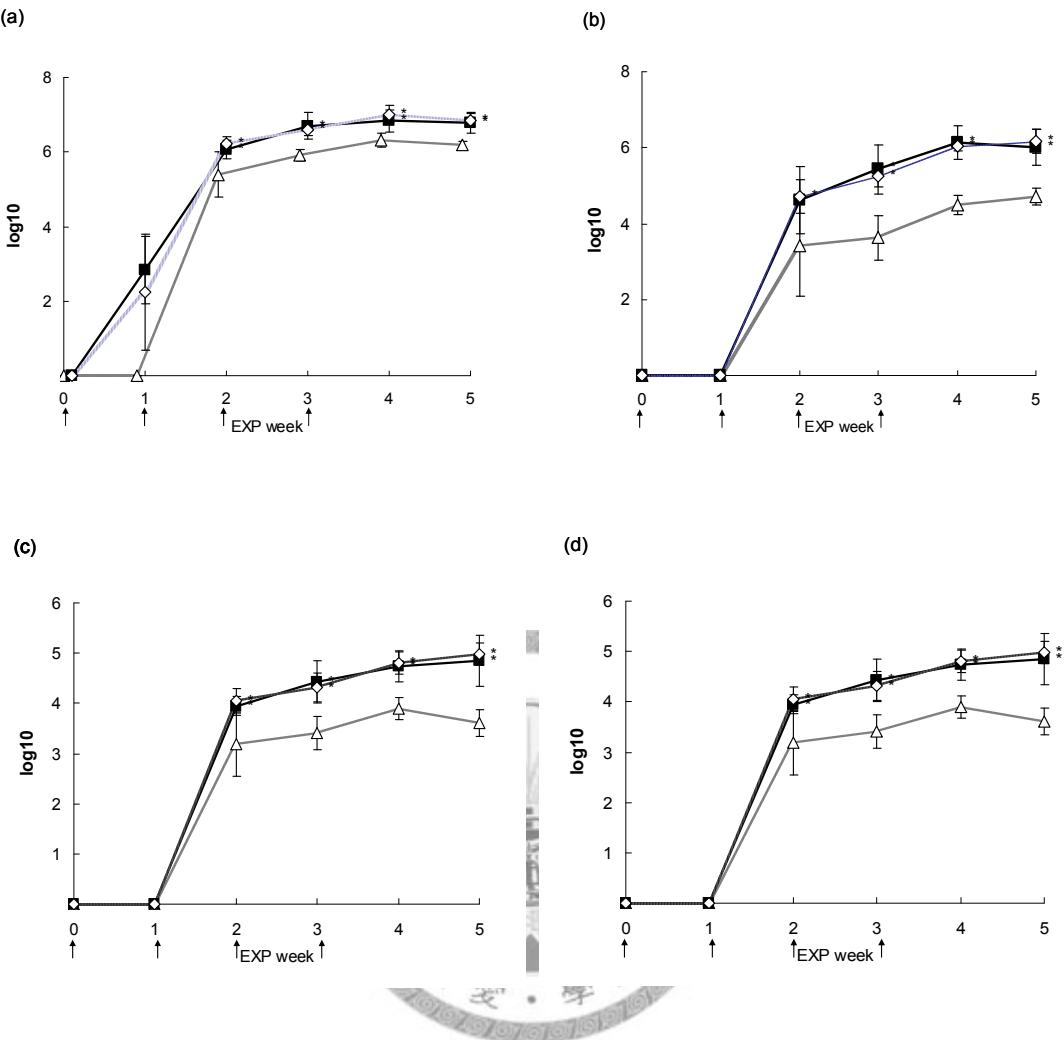
小鼠在實驗週數 0, 1, 2, 3 進行四次鼻腔致免 PBS 或 LT+OVA，以箭頭表示。並從第一次致免前一週開始每週三次的灌食，鼻腔給予 PBS 隻小鼠餵食二次水 (PBS/H₂O, ---)，而鼻腔致免 LT+OVA 分別餵食二次水 (LT+OVA/H₂O, -----)、啤酒酵母 (LT+OVA/SC, ——) 或市售啤酒酵母豆類發酵產物 (LT+OVA/SCLFP,)。餵食進行至第五週犧牲。*為 LT+OVA/SC 或 LT+OVA/SCLFP 相對飲食控制組的 *p* 值小於 0.05。



圖四、黏膜之唾液及肺沖液(brochoalveolar lavage fluid, BALF)中抗 OVA 特異性

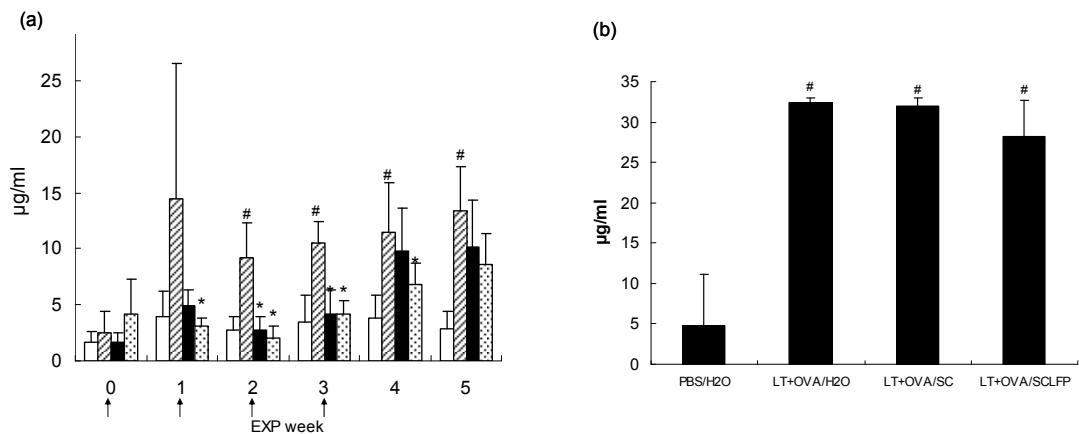
IgA

(a)抗 OVA 特異性唾液 IgA。在各實驗時間點收取小鼠唾液，用 ELISA 定量緊接在黏附盤底之 OVA 蛋白質的 IgA，是為抗 OVA 之特異性 IgA，實驗結果以二倍連續稀釋樣品時，進行呈色後 OD₄₅₀ 為 0.1 的稀釋倍數表示。其中 代表 LT+OVA/H₂O， 代表 LT+OVA/SC， 代表 LT+OVA/SCLFP。PBS/H₂O 測不到數據。(b)抗 OVA 特異性 BALF IgA。於犧牲小鼠時收取 BALF，用 ELISA 定量緊接在黏附盤底之 OVA 蛋白質的 IgA，是為抗 OVA 之特異性 IgA，實驗結果以十倍連續稀釋樣品時，OD₄₅₀ 為 0.1 的稀釋倍數表示。*為 LT+OVA/SC 或 LT+OVA/SCLFP 相對飲食控制組的 *p* 值小於 0.05。



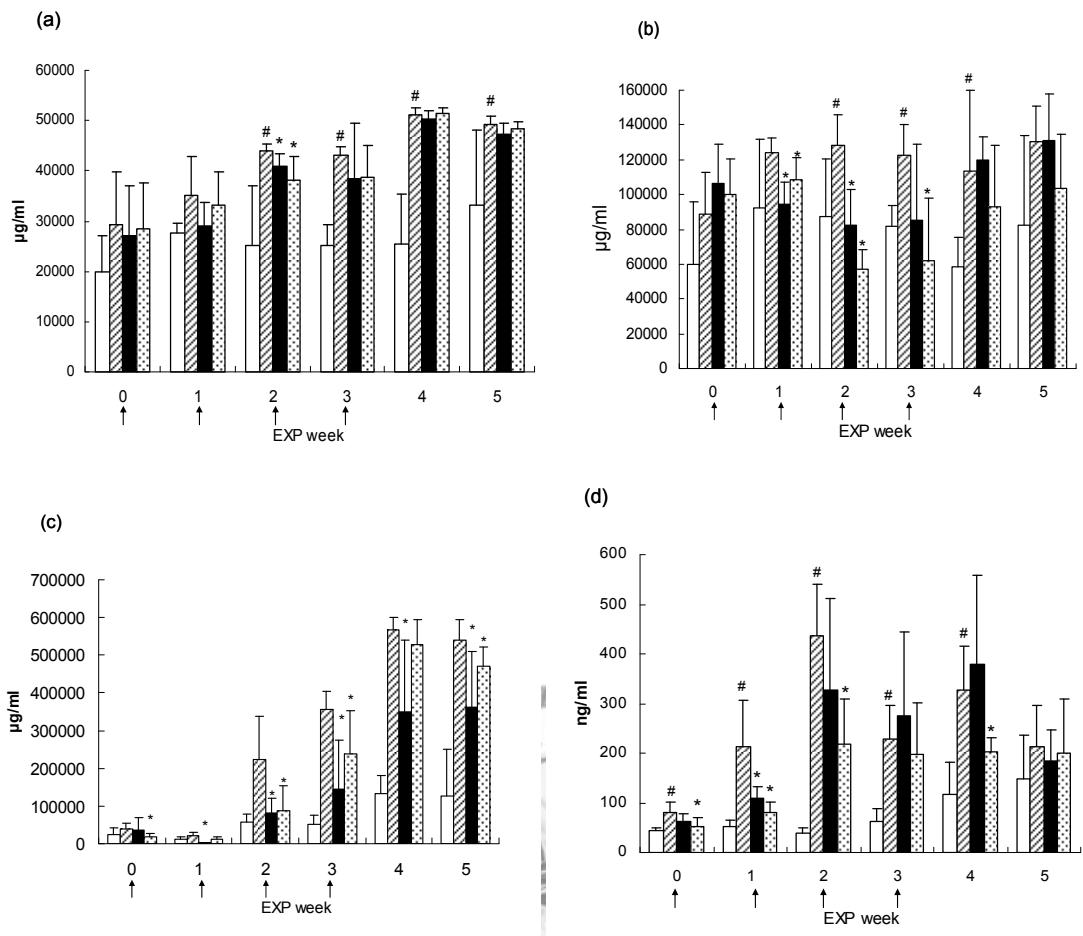
圖五、血清中抗 OVA 特異性 IgG1, IgG2a, IgA, IgE

在各實驗時間點收取小鼠唾液，用 ELISA 定量緊接在黏附盤底之 OVA 蛋白質的各種類抗體，是為抗 OVA 之特異性抗體，實驗結果以十倍連續稀釋樣品時，進行呈色後 OD_{450} 為 0.1 的稀釋倍數表示。——代表 LT+OVA/H₂O，———代表 LT+OVA/SC，———代表 LT+OVA/SCLFP。PBS/H₂O 測不到數據。(a) 血清中抗 OVA 特異性 IgG1；(b) 血清中抗 OVA 特異性 IgG2a；(c) 血清中抗 OVA 特異性 IgA；(d) 血清中抗 OVA 特異性 IgE。*為 LT+OVA/SC 或 LT+OVA/SCLFP 相對飲食控制組的 p 值小於 0.05。



圖六、黏膜之唾液及 BALF 中總 IgA

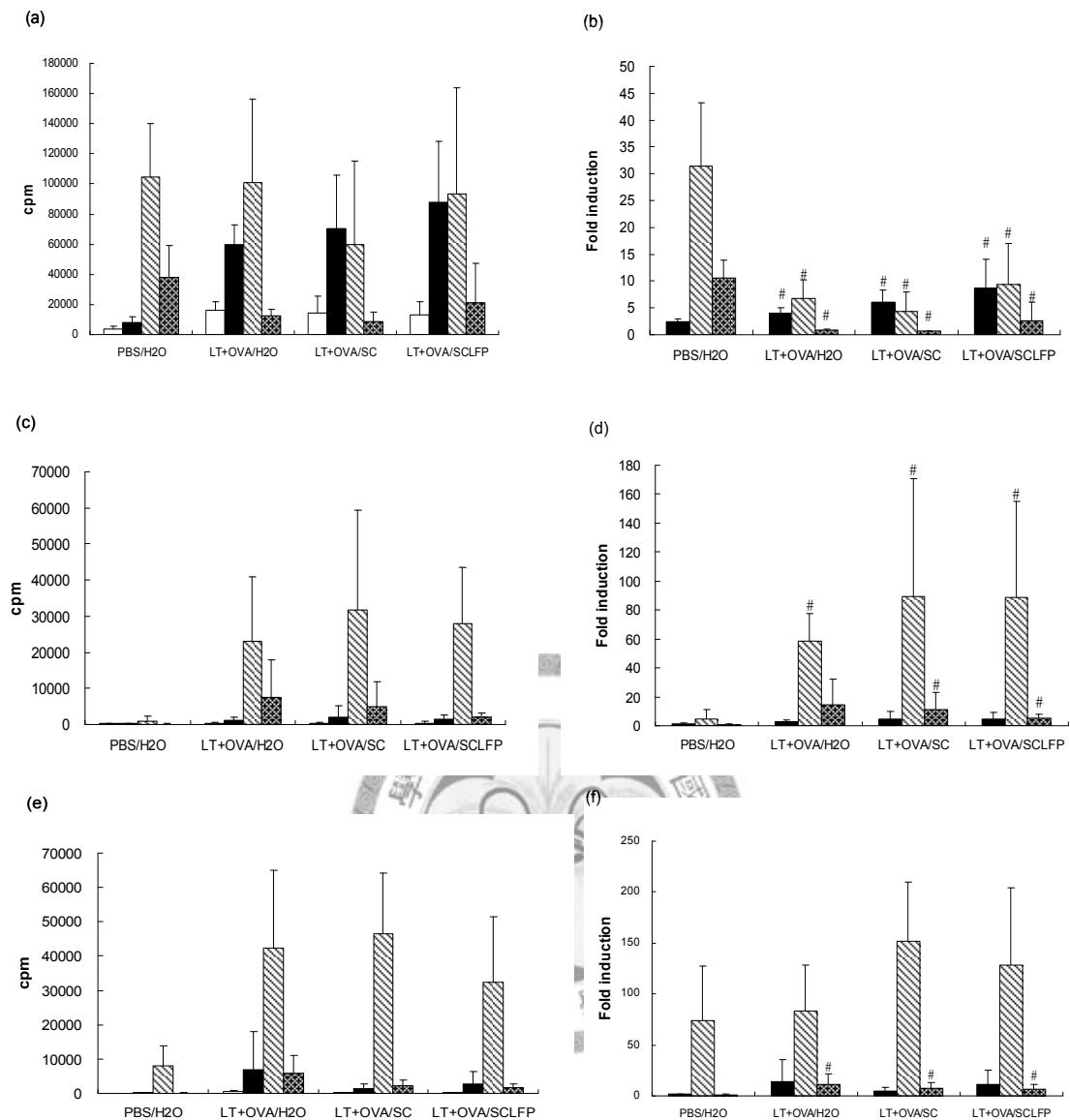
在各實驗時間點收取小鼠唾液以及小鼠犧牲時收取 BALF，用 ELISA 定量唾液中所有 IgA。將各樣品呈色後 OD_{450} 的數值代入連續稀釋標準品所得到的標準曲線公式，再乘以稀釋倍數，得到樣品中總 IgA 濃度。(a)各時間點唾液中總 IgA。□代表 PBS/H₂O，▨代表 LT+OVA/H₂O，■代表 LT+OVA/SC，▣表示 LT+OVA/SCLFP。(b) BALF 中總 IgA。#為各組相對致免控制組(PBS/H₂O)做 *t test*，*p* 值小於 0.05，*為 LT+OVA/SC 或 LT+OVA/SCLFP 相對飲食控制組(LT+OVA/H₂O)的 *p* 值小於 0.05。



圖七、血清中各種總抗體

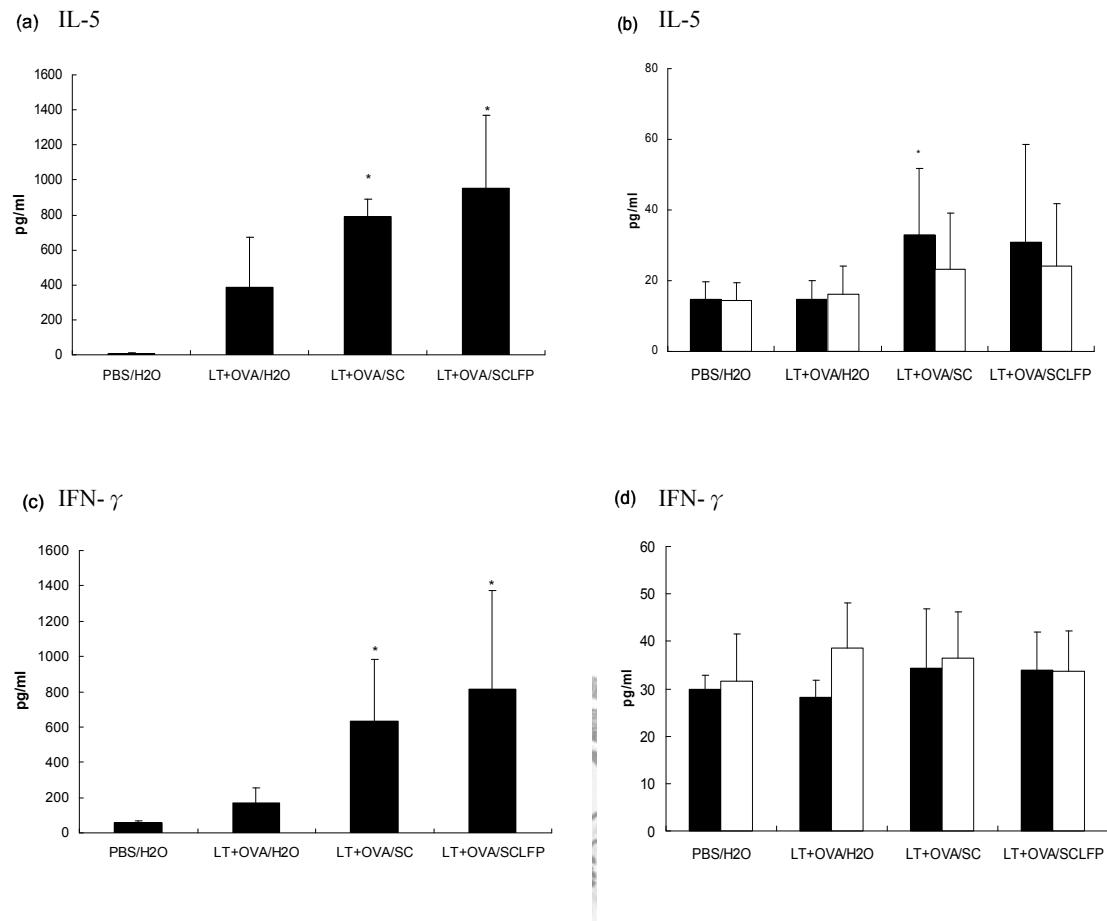
在各實驗時間點收取小鼠眼窩週邊血，離心分出上清液即血清，用 ELISA 定量血清中所有 IgG1、IgG2a、IgA 或 IgE。將各樣品呈色後 OD₄₅₀ 的數值代入連續稀釋標準品所得到的標準曲線公式，再乘以稀釋倍數，得到樣品中總抗體濃度。□代表 PBS/H₂O，▨代表 LT+OVA/H₂O，■代表 LT+OVA/SC，▨表示 LT+OVA/SCLFP。

(a) 血清中總 IgG1；(b) 血清中總 IgG2a；(c) 血清中總 IgA；(d) 血清中總 IgE。# 為各組相對致免控制組(PBS/H₂O)做 *t* test，*p* 值小於 0.05，*為 LT+OVA/SC 或 LT+OVA/SCLFP 相對飲食控制組(LT+OVA/H₂O)的 *p* 值小於 0.05。

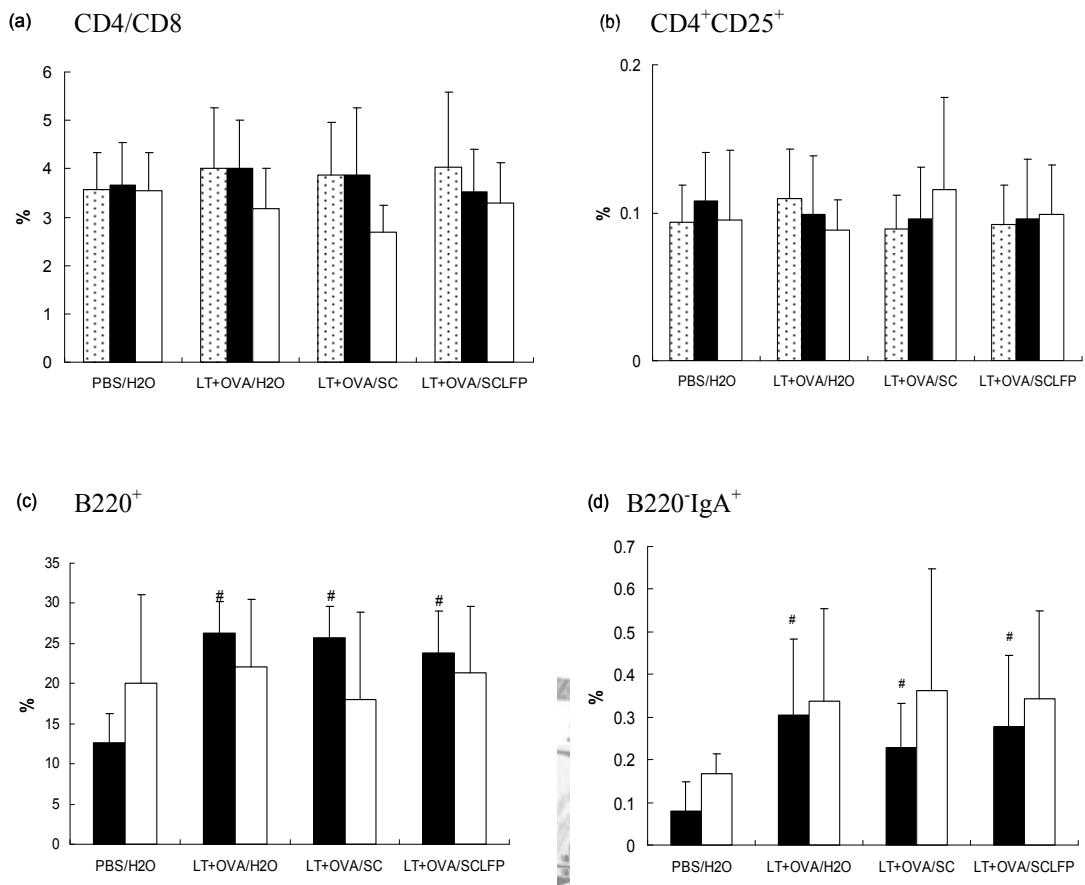


圖八、初代細胞增生結果

小鼠於實驗第五週犧牲，分離初代細胞成單細胞懸浮液，分別以三重複進行單獨 cRPMI(□)、20 µg/ml OVA(■)、2 µg/ml conA(▨)及 2 µg/ml LPS(▨)四種條件培養。在第四天加入放射性[³H]thymidine，16 小時後收取細胞至 96 孔濾紙盤，待濾紙乾燥加閃爍液以計數儀器進行放射線計數，以 counts per minute(cpm)為單位。脾臟(a)、CLN(c)和 MLN(e)的初代細胞於體外培養時進行增生，增加細胞數，使加入具放射性的[³H]thymidine 時，能夠合成較多[³H]thymidine 進入 DNA，導致較高的 cpm 讀值。此外，以 OVA、conA 及 LPS 培養條件所得的 cpm 值除以單獨 cRPMI 培養，得到增生倍數，分為脾臟(b)、CLN(d)、MLN(f)三種組織。



圖九、體外培養初代細胞於 20 μ g/ml OVA 之條件四天，細胞培養液中的細胞激素
 體外培養之初代細胞第四天收取上清液，以 ELISA 測定培養液中細胞激素，將各
 樣品呈色數值代入標準品所得之標準曲線公式，乘回樣品稀釋倍數，得到各樣品
 細胞激素濃度。(a)和(c)為脾臟初代細胞之 IL-5 和 IFN- γ ；(b)和(d)為 CLN(■)和
 MLN(□)初代細胞之 IL-5 和 IFN- γ 。*為 LT+OVA/SC 或 LT+OVA/SCLFP 相對飲食
 控制組(LT+OVA/H₂O)的 p 值小於 0.05。



圖十、初代細胞表現型分群

脾臟(■)、CLN(■)、MLN(□)分初初代細胞之單細胞懸浮液，以軛有螢光物質的抗體染色小鼠細胞表面標記，藉此分析各種表面型細胞分群之百分比。(a)CD4/CD8比率；(b)CD4⁺CD25⁺百分比；(c)B220⁺；(d)B220⁻IgA⁺。#為各組相對致免控制組(PBS/H₂O)做 *t* test，p 值小於 0.05。