

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

大蒜精油及其有機含硫組成分對於內毒素誘發大鼠腸道細菌移轉之影響及相關機制之探討(3/3)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2320-B-040-027-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：中山醫學大學營養科學研究所

計畫主持人：劉承慈

計畫參與人員：李宗貴 沈立言 蘇筱媛 徐婉甄

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 3 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

大蒜精油及其有機含硫組成分對於內毒素誘發大鼠腸
道細菌移轉之影響及相關機制之探討 3/3

Studies of the effects of garlic oil and its sulfur-containing
composition on endotoxin-induced intestinal bacteria
translocation and the related mechanisms

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號： NSC 92-2320-B-040-027

執行期間： 92年8月1日至93年7月31日

計畫主持人： 劉承慈

計畫參與人員： 李宗貴、沈立言、蘇筱媛、徐婉甄

成果報告類型： 完整報告

執行單位： 私立中山醫學院營養科學研究所

中華民國九十三年十月二十日

中文摘要

系統性發炎(SIRS)時嗜中性球產生大量自由基，造成腸黏膜受損，增加腸道菌叢感染的機會，已知是加重重症病患系統性發炎反應的重要原因之一，且此現象受到促發炎細胞激素之調節。本研究用雄性 Wistar 大鼠以載劑玉米油(CO, 2ml/kg BW) 或大蒜精油(GO, 50 及 200 mg/kg BW) 及其有機含硫成分(0.5 mmol/kg BW DAS、DADS 或 DATS) 灌食兩週後，由腹腔注射 5mg/kg 脂多糖(LPS) 誘發系統性發炎，同時禁食直到犧牲。在誘發後 2 或 3h 抽尾靜脈血，測定 TNF- α , IL-1 β , IL-6 濃度，且在 18h 後犧牲分析周邊血總白血球數及嗜中性球數，並分離嗜中性球，測量 PMA 刺激細胞釋放超氧自由基能力及趨化指數，另外也評估腸道組織嗜中性球浸潤及受損情形。此外，亦觀察這些大蒜成分在活體外對於促發炎細胞激素刺激下的大鼠小腸上皮細胞(IEC)存活率之影響。結果顯示，未灌食大蒜下，LPS 刺激組相較於控制組之血中細胞激素濃度、總白血球數、嗜中性球數、自由基釋放能力、穿透能力、趨化指數、腸道嗜中性球浸潤及黏膜受損情形皆顯著上升 ($p < 0.05$)。且在活體外促發炎細胞激素使 IEC 存活率下降 ($p < 0.05$)。在 LPS 刺激條件下，DAS 可顯著抑制 IL-1 β 濃度，但是 200 mg/kg GO 及 DATS 顯著提高三種細胞激素濃度 ($p < 0.05$)。50mg/kg GO 顯著降低血中嗜中性球數、自由基釋放能力、腸道嗜中性球浸潤及腸道細胞 apoptosis ($p < 0.05$)，而趨化指數及黏膜受損情形則有減緩的趨勢。DAS 及 DADS 不影響嗜中性球生理功能及腸道受損情形，但 DATS 顯著增加血中總白血球數、嗜中性球數、穿透能力、超氧自由基釋放能力、趨化指數、腸道嗜中性球浸潤及腸道細胞 apoptosis ($p < 0.05$)。且活體外實驗亦發現 IEC 在促發炎性細胞激素存在下對於 DATS 細胞毒性的感受性增加。由本研究結果可知，在 LPS 誘發系統性發炎反應時，血中促發炎激素濃度、總白血球數及嗜中性球數、自由基釋放能力及趨化反應的上升導致腸道嗜中性球浸潤及黏膜受損。而低劑量 GO 可藉由降低嗜中性球數及其超氧自由基釋放能力而減緩發炎組織傷害程度，然而，DATS 則會增加血中促發炎激素濃度、嗜中性球數、嗜中性球超氧自由基釋放能力及其趨化反應，而使得腸道損傷加劇。

關鍵字:大蒜精油，有機含硫成分，脂多糖，嗜中性球，自由基

英文摘要

Abstract

It is known that in SIRS, increased free radical from neutrophils regulated by proinflammatory cytokines raises the risk of opportunistic infection that deteriorates the clinical condition in such patients. The present study was carried out with male Wistar rats. All animals were were gavaged 50 or 200 mg/kg body wt garlic oil, or 0.5mmol/kg body weight OSCs of GO (DAS, DADS, or DATS), control animals were gavaged vehicle (corn oil, 2 mL/kg body wt) alone every other day for 2 weeks followed by the induction of SIRS by the injection of LPS (5mg/kg; i.p.). Food was removed at the time when the injection carried out until animals been killed. The control rat was injected with the same volume of vehicle. Blood was withdrawn from a lateral tail vein at 2 or 3 hours after the injection for the determination of TNF- α , IL-1 β , IL-6. All animals were killed at 18h after the injection and determined for the total white count and neutrophil count in peripheral blood. Neutrophils were isolated and determined for PMA-stimulated production of superoxide free radical and transmigration. Histological investigation was carried out with small intestine for neutrophil perfiltration and intestinal damage. The effects of these garlic compounds on the viability of IEC from rats in the absence or presence of inflammatory cytokines were also investigated in vitro. We found that LPS injection significantly elevated the concentration of inflammatory cytokines, total white count, neutrophil count, the capability of free radical production and transmigration in PMA-stimulated neutrophil, neutrophil perfiltration and apoptosis in intestine ($P < 0.05$). In addition, the presence of proinflammatory cytokines decreases the viability of IEC in vitro ($P < 0.05$). DAS significantly suppressed LPS-induced increase of IL-1 β level, however, 200 mg/kg GO and DATS significantly elevated the levels of all three cytokines in blood ($P < 0.05$). GO fed at the dose of 50mg/kg significantly lowered neutrophil count and the capability of free radical production and transmigration of neutrophil, and significantly ameliorated neutrophil perfiltration and apoptosis in the intestine ($P < 0.05$). Although DAS and DADS did not show any effect on the function of neutrophil and on intestine, DATS significantly elevated total white count and neutrophil count in blood and improved the capability of free radical production and transmigration of neutrophil, and significantly deteriorated neutrophil perfiltration and apoptosis in the intestine ($P < 0.05$). In vitro study also found that the sensitivity of IEC to the cytotoxicity of DATS was increased in the presence of proinflammatory cytokines. In conclusion, LPS-injection elevated the concentration of serum proinflammatory cytokines, total white count and neutrophil count in blood and the capability of free radical production and transmigration of neutrophil in association with neutrophil perfiltration and apoptosis in intestinal mucosa. GO fed at the dose of 50mg/kg GO ameliorated LPS-induced neutrophil perfiltration and apoptosis in intestinal mucosa in associated with lowered neutrophil count and the capability of free radical production of neutrophil, however, DATS deteriorated LPS-induced neutrophil perfiltration and apoptosis in intestinal mucosa in association with elevated serum concentration of inflammatory cytokines, neutrophil count and the capability of free radical production and transmigration of neutrophil.

Key words: Garlic oil , OSCs , Lipopolysaccharide , neutrophil , free radical

目 錄

中文摘要	I
英文摘要	II
目錄	III
壹、 前言	1
貳、 研究目的	2
參、 文獻探討	2
一、 腸道細菌之移轉及其相關機制	2
二、 嗜中性球的生理功能及在腸道黏膜防禦系統中所扮演的角色	4
三、 大蒜及其組成分	5
四、 已知之大蒜生理功能及其作用機制	5
五、 本研究前兩年執行期間之主要發現與本年度研究假說	8
肆、 研究方法	10
一、 系統性發炎反應之動物模式	10
二、 動物處理 protocol	10
三、 樣品收集	10
四、 分析項目	10
五、 IEC-18 培養及存活率測定	12
六、 統計分析	12
伍、 結果與討論	14
一、 灌食 GO 及其 OSCs 對於系統性發炎大鼠周邊血中白血球數之影響	14
二、 灌食 GO 及其 OSCs 對於系統性發炎大鼠嗜中性球遷移之影響	14
三、 灌食 GO 及其 OSCs 對於系統性發炎大鼠血中嗜中性球釋出超氧自由基能力之影響	15
四、 灌食 GO 及其 OSCs 對於系統性發炎大鼠迴腸細胞 apoptosis 之影響	16
五、 灌食 GO 及其 OSCs 對於系統性發炎大鼠血漿中發炎性細胞激素含量之影響	16
六、 GO 及其 OSCs 對於促發炎細胞激素作用下之大鼠小腸內皮細胞培養物存活率之影響	17
陸、 參考文獻	18
柒、 計畫成果自評	25
捌、 附表與附圖	27

壹、前言

重症病患通常在醫院加護中心會經歷休克、復甦、系統性發炎反應、敗血性休克、多重器官衰竭終至死亡幾個病情的階段。敗血性休克為加護中心常見但目前仍無法有效控制的問題，其死亡率大約是百分之 50 (Dal Nogare, 1991)。絕大部分進入加護中心的病患於第 7~10 天易發生續發性感染，這往往是造成及/或惡化系統性發炎反應進而發展至敗血性休克及多重器官衰竭甚至死亡的主要原因。過去的研究證實系統產生自由基是造成休克後復甦損害的主要關鍵 (McCord, 1985; Bulkley, 1987; Chamulitrat et al., 1996)。且在腸道，氧化壓力增加呈造成固有細菌由腸道轉移至體內造成患者發生伺機感染之重要機制之一 (Deitch et al., 1989)。因為缺血會引起組織釋放發炎調節物質使內皮與白細胞相互黏著性增加，導致在血液重新流動(復甦)期間毛細血管會捕捉多核形球 (Moss et al., 1996; Sun et al., 1998)。而浸潤之嗜中性球則是缺血性休克至復甦期間氧自由基的重要來源 (Majno and Joris, 1996)。當發炎造成初步之內皮傷害時；導致更多的發炎性調節物質釋放加重原有的傷害。而近年來，許多學者均提出發炎誘發之小腸黏膜上皮損傷主要是由於誘發 apoptosis 所致 (Moss et al., 1996; Sun et al., 1998; Ramachandran et al., 2000; Suzukin et al., 1998)。

大蒜及其成分因為具有抑制微生物生長的作用，在過去曾被其他學者稱為具有 antiseptic effect 且被建議可在臨床上當做抗生素替代物 (Chen et al., 1999; Arora and Kaur, 1999)。本計畫根據大蒜具有抗微生物、抗氧化、免疫調節等功能，觀察其精油成分是否有預防腸道細菌移轉方面之用途。在執行本計畫之第一、二年期間，我們針對動物模型之建立及不同劑量 GO 及其有幾含硫成分(OSCs)之急性及慢性灌食對於 LPS 誘發之大鼠腸道菌轉移及相關機制進行觀察。結果發現灌食大蒜精油中的 DADS 及 DATS 在此動物模式中不但無法藉由其抗氧化及 iNOS 抑制作用改善腸道菌的伺機感染，而且反而會惡化小腸黏膜損傷及腸道菌轉移，且以 DATS 惡化黏膜傷害的作用最嚴重 (蘇等人, 2002; 江等人, 2002)。由於本計畫所採用的發炎動物模式為一急性發炎過程，我們推論 GO 及其 OSCs 對於 LPS 誘發 BT 之影響與上皮細胞受到嗜中性球之損壞較有關而與巨噬細胞活性較無關，因而雖然 DATS 抑制 iNOS 之活性，但是 BT 更加嚴重。在執行本計畫第三年度之內容時，我們系統性觀察了嗜中性球在 LPS 誘發的 BT 中所扮演的角色及上述大蒜成分對於此模式下嗜中性球活性的影響。此外，由於小腸黏膜可直接作為促發炎性細胞激素之作用標的，故本計畫亦觀察 LPS 誘導下上述大蒜成分對於血清中促發炎性細胞激素含量增加的影響及是否在細胞激素作用下上述大蒜成分會影響大鼠小腸細胞之損傷。

貳、研究目的

觀察 GO 及其 OSCs 對於系統性發炎反應誘發之 neutrophil 浸潤與黏膜傷害之影響。此外，本研究亦欲觀察這些大蒜成分對於發炎性 cytokines 刺激之大鼠小腸上皮細胞株 IEC-18 存活率之影響。主要研究內容包括：觀察大蒜精油及其有機含硫成分對於(1)發炎性 cytokines 之產生，(2)發炎細胞 neutrophils 之活性，(3)發炎細胞 neutrophils 對於腸組織之浸潤，(4)腸道組織在發炎反應中發生 apoptosis 之情況，及(5)腸道細胞在發炎性 cytokines 作用下存活率之影響。

參、文獻探討

一、腸道細菌之移轉及其相關機制

根據定義腸道細菌之移轉(bacteria translocation; BT)係指腸道中固有的細菌通過黏膜固有層(lamina propria)至腸繫膜淋巴結(MLN)及體內其他部位或器官如，肝，脾，腎及血液中 (Maejima et al., 1984; Berg, 1992)。腸道的首要功能是吸收營養素並排除細菌及其產物。正常的腸道中含有大量好氧及厭氧菌，其通常與宿主共生，而細菌由腸道移轉至體內在正常人或動物不易發生因為(1)固有腸道微生物菌叢之存在防止細菌過度生長，(2)完整之腸上皮障壁，及(3)正常之宿主免疫抵抗力。然而，在重大壓力存在下會導致這些保護機制之崩潰或損壞。

目前已由各種類型重症病患及許多種與代謝壓力之疾病及治療有關的動物模型(休克，創傷，敗血及非腸道或元素腸道營養)之 MLN 直接培養出固有腸道細菌。且累積的證據顯示固有細菌由腸道之移轉，在源自腸道之伺機感染之致病原理是一個重要的早期步驟，也是造成或加重系統性感染之重要致病原因。歸納腸道微生物移轉的可能原因，可分為下列幾點：

(一)腸道細菌過度生長：

許多疾病狀態及常用以治療重症病人的療法會導致腸道菌叢的改變，使得細菌過度生長並由腸移轉至 MLN。而在重症病患常見過度生長之格蘭氏陰性菌擾亂固有腸道微生物菌叢 (Deitch, 1988)。腸道菌叢之調節取決於許多因素間複雜的交互作用包括胃酸分泌，腸道蠕動，膽汁及胰液之分泌，局部免疫力及腸道營養等等。此外，抗生素濫用也被建議是主要發生原因 (Berget al., 1988)。當這些因素使得潛在致病性細菌密度增加時，其會與侵入黏膜組織相關且常常接著移轉到遠端之淋巴器官。

(二)腸黏膜上皮通透性增加

在休克至復甦期間，會由於缺血期間營養不良性腸痙縮、休克及復甦後氧化壓力增加、iNOS 活性增加等原因使腸黏膜開始剝落；通透性增加。

局部休克造成發炎性物質之釋放 近來的研究數據指出浸潤之嗜中性球是缺血性休克至復甦期間氧自由基的重要來源 (Majno and Joris, 1996)。在血液重

新流動(復甦)期間毛細血管會捕捉多核形球, 這可能是因為缺血會引起內皮與白細胞相互黏著性增加(Majno and Joris, 1996)。此外, 缺血組織釋放血小板活化因子, 而血小板則負載發炎調節物質。當發炎造成初步之內皮傷害時; 滲出的血漿凝聚而凝血機制導致更多的發炎性調節物質釋放。在發炎物質中最有影響力的分子可能是 TNF 及 IL-1。這最後發展出之敗血症被歸咎於巨噬細胞之作用。在壓力或發炎反應中單核球/巨噬細胞及許多其他細胞被活化並產生大量 cytokines, 其活化全身的內皮細胞, 造成單核球及其他白細胞不當地黏在微循環中, 阻礙血液流動(Majno and Joris, 1996)。

休克及復甦後氧化壓力增加 腸對於缺血非常敏感, 腸黏膜開始剝落這會造成腸壁崩潰且變成細菌由腸腔進入組織間之通路, 使細菌達到血液中(Majno and Joris, 1996), 進而形成敗血性休克之階段。休克時組織缺血導致腸道微生物移轉已由許多證據證實, Bark et al. (1993) 發現出血性休克使大鼠腹膜淋巴結(MLN)出現各種細菌的移轉。且 E. coli 是在 MLN 發現的主要細菌。復甦期間之再供血期間也會因過氧化壓力對腸細胞之破壞造成微生物移轉。這有部分是因在血液重新流動期間微細血管壁對顆粒細胞黏著性增加, 造成如上述不必要的發炎作用。此外, 血液之重新流動代帶入氧也是產生自由基的根源。自由基與復甦造成損害之關係最早由 Alabama 之研究小組於 1981 年提出 (Granger et al., 1981)。Granger 與其同僚當時正在研究缺血對貓腸道之損害, 他們所利用將局部降低血壓至 30-40 mmHg 之模型發現缺血一小時即會造成損害。此損害不能在誘發前以抗組織氨或前列腺素合成之抑制劑保護但卻能以自由基清除劑, SOD 保護。因而該研究小組提出在他們的研究系統產生自由基的假說; 之後, 此機制由其他學者所證實且現在廣被接受為休克後復甦造成損害的主要關鍵 (McCord, 1985; Bulkley, 1987; Chamulitrat, et al., 1996.)。稍後許多研究者以內毒素誘發之系統性發炎反應動物模型觀察, 也確認腸道氧化壓力之增加為 BT 之機制之一 (Deitch et al., 1989)。所有這些發現指出氧自由基在小腸產生, 特別是在迴腸。

(三) 宿主免疫力失調

在休克之缺血期間, 因組織間血液供應不足, 故白細胞之輸送顯著下降, 而在血液中通常抵抗力也不足, 網狀內皮系統失調。腸道缺血促進區域發炎調節物質之產生。這些物質與壓力 hormone 及神經傳導物質間形成資訊通路互相調節功能及對壓力之反應, 這些反應已經由內毒素誘發之重大代謝壓力模型證實; 由於巨噬細胞, 淋巴細胞, 及嗜中性白血球含有許多 hormones 的受體包括 corticosteroids, insulin, growth hormone, catecholamines, acetylcholine, 及 endorphins, 故受傷後 hormonal milieu 之急劇變化可能在 immunocompetence 扮演重要角色 (Deitch and Bridges, 1987; Deitch et al., 1986; Liu et al., 2001)。

二、嗜中性球的生理功能及在腸道黏膜防禦系統中所扮演的角色

嗜中性球之活化過程係當細菌突破防線進入組織時，會經由微生物本身或其代謝產物及巨噬細胞 (resident macrophage) 與受傷宿主細胞所釋放促發炎調節因子 (包含：補體 C5a、formyl-peptide、PAF、leukotriene B4 及 IL-8)，而產生趨化物質濃度梯度 (chemotactic gradient)，經與 G protein coupled transmembrane glycoprotein 接合，活化 phospholipase，使鈣離子及 DAG 濃度上升，並活化 PKC (protein kinase C)、tyrosin kinase、Ras protein；同時，G protein coupled protein 也透過活化 PI3K 使嗜中性球 degranulation、活化 NADPH oxidase，同時表現能啟動貼附及遷移的受體 (包含：integrin family) 及重組細胞骨架 (包含：G-actin、F-actin)(Labro, 2000; Witko-Sarsat et al., 2000; Zhelev and Alteraifi, 2002)。PMA (phorbol myristate acetate) 亦經由此途徑活化 PKC，常作為吞噬細胞的活化劑(Smith, 1994)。

在趨化因子及促發炎細胞激素的作用下，內皮細胞表現黏著蛋白使嗜中性球因血流減緩而沿血管壁翻滾，藉由內皮細胞上 lectin-like molecules 微弱的貼附在內皮細胞上，Selectin 即是此 lectin-like molecules 之一。Selectin 有 L-selectin、E-selectin 及 P-selectin 三種，P-selectin 在 histamine、thrombin 及氧自由基刺激內皮細胞下，數分鐘內即可被表現在細胞膜上，E-selectin 在 IL-1、TNF- α 及 LPS 刺激內皮細胞 1-2 小時後才表現，而 L-selectin 快速表現在活化的嗜中性球表面。嗜中性球利用膜上 integrin 緊黏到血管壁上的受體，翻滾同時，嗜中性球仍持續表現貼附因子，之後，細胞骨架重組進而改變外型，最後穿透內皮細胞進入組織發炎位置，此過程即稱為趨化(chemotaxis)(Labro, 2000; Witko-Sarsat et al., 2000)。

當嗜中性球遷移到達至發炎組織的同時，下列事件也隨之發生：

- (1) 嗜中性球藉由受體辨認經調理素調理之病原菌 (如 C3b、Fc-Ig) 或非依賴調理素調理之病原菌。
- (2) 嗜中性球重組細胞骨架進而改變外型，伸展出一個小窪，將病原菌吞入形成小泡，並在細胞內進行消化。
- (3) 此時嗜中性球已被活化而 degranulation，經由膜的融合將之送進 phagosome 或釋放至細胞外，並造成呼吸爆炸 (respiratory burst) (Basset et al., 2003; Witko-Sarsat et al., 2000)。

如上所述已有許多文獻指出，在缺血後復甦期間宿主細胞本身的 xanthine oxidase (XO) 所產生的自由基直接造成組織傷害，受損之宿主細胞釋放訊息以活化嗜中性球遷移浸潤，而浸潤組織的嗜中性球釋放細胞毒殺的 ROS 為二次傷害之主因 ($O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、HOCl 及 N-chloramine)；雖然細胞本身有抗氧化酵素 (SOD 及 catalase) 及自由基清除劑 (α -tocopherol、ascorbate 及尿酸) 等抗氧化機制抗衡，當 ROS 產生速率大於抗氧化劑清除速率時就會造成傷害(Grisham and Granger, 1988)。在克隆氏症的病人身上，在發炎位置可偵測到釋放出 IL-1，TNF- α ，及 IL-8 等促發炎細胞激素及其吸引之發炎細胞(Fiocchi, 1998)。

在缺氧再灌流造成組織傷害的模式中，不論是抑制嗜中性球貼附能力或利用 ANS (antineutrophil serum) 減少嗜中性球皆會使血管的滲透性降低，並減緩發炎現象(Arfors et al., 1987)。在腸道發炎疾病 (inflammatory bowel disease, IBD) 氧自由基及其下游代謝物顯著性增加的源由就是周邊血液及發炎腸道組織內的吞噬細胞；1992 年 Simmonds 等人即證明 IBD 病人的腸黏膜經內視鏡可觀察到黏膜受損程度與氧化壓力成正比；而以化學冷光法 (Chemoluminescence) 利用各種氧

化還原酵素抑制劑及自由基清除劑辨別腸黏膜氧化壓力來源時，發現加入 sodium azide (MPO inhibitor) 可對腸黏膜氧自由基之產生達最大抑制作用達 89%，可推測嗜中性球浸潤可能是 IBD 患者腸黏膜受損之重要因素(Simmonds et al., 1992)。

三、大蒜及其組成分

大蒜(*Allium sativum* L.)在全世界許多國家均是烹調上必備之調味性食材。大蒜因其辛辣及調味上的價值及其醫藥特性，已被使用數世紀。大蒜之風味除了具有特色外，也很複雜，由數種揮發性前驅物經酵素作用衍生而來。Cavallito and Bailey (1944) 由大蒜中分離出可以賦與新鮮大蒜強烈香味之抑菌成分-大蒜素(allicin; Diallyl thiosulfinate)。而大蒜素是位於完整大蒜球莖細胞之細胞質中前驅物 alliin，在細胞被破壞時，與位於細胞液泡(vacuole)之 alliinase 作用而生成。其亦為新鮮大蒜水萃物的主要功能性成分。Brodnitz 等人發現大蒜素相當不穩定，在室溫下放置 20 小時後幾乎都分解成 diallyl sulfide(DAS), diallyl disulfide(DADS), diallyl trisulfide(DATS)等精油成分 (Brodnitz et al., 1971)。有關大蒜精油之研究早在 1844~1845 年 Wertheim 即以水蒸氣蒸餾法抽出進行成分分析之研究 (Wertheim, 1844; Wertheim, 1845)。稍後 Semmler 也以相同方法自大蒜得到 0.1~0.2%之精油，並經區分蒸餾後，鑑定出 di(2-propenyl)disulfide, di(2-propenyl)trisulfide 與 polysulfide 等成分 (Semmler, 1892)。Rundqvist (1909) 之報告指出，存於大蒜中能經酵素作用產生富有味道成分的前驅物可能是配糖物(glucoside)，直到 40 年後此一前驅物才被 Stoll 與 Seebach 分離出來，並鑑定是 S-substituted cysteine (Stoll and Seebach, 1947; 1948; 1949; 1951)。本計畫協同主持人沈立言等人曾依據 Sakamura and Hayashi 的方法製備組成穩定的大蒜精油產物，並分析出其中以 DADS 及 DATS 含量為最高，其次為 DAS (Sakamura and Hayashi, 1978; Sheenet al., 1992)。

四、已知之大蒜生理功能及其作用機制

大蒜在醫藥上的利用是相當古老且流傳很廣的傳統，這可由目前保存下來最古的醫學典籍中對其有所引用來說明，the Papyrus Ebers (1550 B.C)。至目前為止大蒜是被研究最多的一種藥用植物，在過去一百年中有超過 1300 篇文章討論之 (Agarwal, 1996)。這些出版物的主要針對於對有關大蒜在心血管系統之有利影響，且主要關於粥狀硬化。綜合過去及近年來對大蒜生理功能相關研究的發現，本計畫申請人在推論，大蒜因同時具有抑制微生物作用，抗氧化作用及促進免疫作用可協同改善病理狀態下腸道微生物移轉之問題。

(一)大蒜抑制微生物生長之作用 大蒜之抑菌作用可說是最早被發現的功能之一。根據文獻，Pasteur 在 1858 年即提出大蒜之抗菌活性 (Farbman et al., 1993)。據發現大蒜素具有 i) 對抗極大範圍之革蘭氏陰性及革蘭氏陽性細菌之抗菌活性，包括抗多重藥性之 *E. coli* 致腸道毒性菌株; ii) 抗真菌活性，特別

是對抗 *Candida albicans*; iii) 抗寄生蟲活性，包括某些主要的人類腸道 protozoan 原蟲如 *Entamoeba histolytica* 及 *Giardia lamblia*; 及 iv) 抗病毒活性。而目前已知 allicin 的主要抗微生物作用至少有部分是因為其與各種醌素之 thiol groups 反應所致 (Elnima et al., 1983)。且雖然過去許多研究觀察各種香辛料之抗菌作用，但幾乎所有相關研究均確認大蒜是其中抗菌範圍最廣且效果最好的 (Elnima et al., 1983; Ankri and Mirelman, 1999)。

大蒜精油之藥用特性在過去二、三十年內經廣泛地研究大蒜精油較一般的特性包括抗微生物，抗真菌，抗細菌，及殺蟲作用 (Dankert et al., 1979)。過去對於大蒜抗菌作用之研究，絕大多數都停留在選取不同萃取部分之區分在動物活體外之抑菌作用觀察 (Fenwick and Hanley, 1985)。如此之結果主要能針對大蒜在加工食品保存上之應用性加以證實外，對於作為活體內的抗感染作用仍屬推論階段，尚無證據能證實其在活體得實質“抗敗血症”效果 (Chen et al., 1985)，雖然過去有極少數學者根據大蒜在體外之抗菌作用稱大蒜具有“抗敗血症”作用 (Chen et al., 1999)。大蒜精油中主要成分 DAS 或 DADS 藉由影響 *K. pneumoniae* 之生長及其醌素活性而呈現劑量依賴性之毒殺作用 (Chen et al., 1999)。近年來許多文獻建議大蒜在當做抗微生物藥劑之潛力 (Arora and Kaur, 1999)。

在活體實驗方面，過去僅有少數研究以人及動物模型觀察大蒜之抑菌作用；Elnima El. et al (1983) 測試大蒜水萃取物對於志願者口腔菌叢之活性，並發現漱口水中含 10% 大蒜顯著少數種口腔細菌。在腸道微生物方面，Chowdhury AK. et al (1991) 以大蒜水萃取物及大蒜素觀察到其不僅在體外顯示顯著的抗菌活性對抗多重抗藥性之 *Shigella dysenteriae* 1, *Sh. flexneri* Y, *Sh. Sonnei* 及產生腸毒素之 *E. coli*。此二物質在實驗誘發之 shigellosis 兔子之活體內也顯示能對抗 *Sh. flexneri*。且在治療劑量下，此二物質未顯示任何不利血液生化值的作用。

(二) 大蒜之抗氧化作用 如上所述，氧自由基傷害目前認為是腸黏膜完整性損害主要機制之一。近年來許多研究報導指出大蒜的作用主要與其抗氧化活性與清除自由基的能力有關。過去其他學者利用體外研究觀察大蒜之作用發現，大蒜可抑制過氧化氫所造成之血管內皮細胞脂質過氧化傷害，抑制 LDL 氧化，及抑制氧化之 LDL 對血管內皮細胞之傷害，且這些作用是透過直接清除胞內過氧化物及提高 GSH 含量達成 (Ide and Hau, 1999)；此外，大蒜亦可透過抑制誘發巨噬細胞發炎反應時所產生的 nitric oxide 及過氧化物而達到減少組織傷害的效果 (Ide and Lau, 1999)。在人體試驗也發現，服用大蒜製劑二週顯著降低 apolipoprotein B 之脂蛋白氧化達 34% (Phelps and Harris, 1993)。

雖然過去許多研究確認大蒜之抗氧化作用，但在大蒜精油抗氧化作用的研究報告為數不多。本研究計畫申請人過去參與的研究發現，不論在餵食高或低脂飲食的正常大鼠，同時餵食大蒜精油及其有機含硫組成分，在可不同程度地增加

其紅血球 GSH 含量及肝臟 SOD 活性 (Sheen et al., 1999)。在其他學者以氧化傷害造成之腎毒性的動物模型中也發現大蒜精油可逆轉腎臟脂質過氧化及過氧化氫之產生及伴隨降低之腎臟抗氧化酵素活性(catalase, GSH peroxidase, GSH reductase 及 glutathione S-transferase), 及降低之腎臟 GSH 含量, 並改善腎功能 (Iqbal and Athar, 1998)。

(三)大蒜之免疫調節作用就大蒜對於感染的預防作用而言, 大部分研究強調大蒜及其衍生物之抗微生物特性為主要因素。對於大蒜與免疫系統之交互作用則所知有限。過去已有一些學者針對大蒜在活體外對於不同免疫細胞活性的調節作用, 及在正常活體內對一些免疫反應模式的影響, 但是根據我們所知, 尚無關於大蒜精油對於嗜中性球在急性發炎反應中的調節作用進行系統性的研究報告被發表。以下針對過去我們及其他學者的觀察結果加以探討:

大蒜與發炎反應 已有研究指出大蒜可透過花生四烯酸途徑抑制 PLA₂ 活性, 進而減少 PGE₂ 發炎物質產生(Srivastava, 1986)。Shalinsky 等人在小鼠乳腺癌細胞株 (NO.4526) 實驗模式中發現 allicin 抑制了 PGE₂ 的合成, 且並非經由 COX 和凝血合成酶 (thromboxane synthase(Shalinsky et al., 1989)。但其他研究卻發現大蒜成分 ajoene 可藉由抑制 COX-2 酵素活性而降低經 LPS 誘發 RAW264.7 巨噬細胞的 PGE₂ 合成進而調節發炎反應(Dirsch and Vollmar, 2001)。Verena 等人 (1998) 在 LPS 刺激巨噬細胞株 RAW264.7 下分別以 allicin 及 ajoene 處理, 結果 nitrite (NO₂) 分泌量隨兩者劑量上升而降低, 同時 iNOS 之活性、蛋白質表現量、mRNA 表現量皆下降; allicin 及 ajoene 皆有減少活化巨噬細胞中 iNOS 釋放的 nitrite (Dirsch et al., 1998)。在大蒜精油 GO 灌食 SD 大鼠後的巨噬細胞體外實驗模式亦呈現相同結果 (Yeh, 2000)。

在人體單核球事前先以大蒜萃取物 (0.01、0.1、1.0、10、50 及 100 µg/ml) 培養 1 小時後以 LPS 刺激後測其細胞激素之釋放, 結果顯示在事前先以大蒜萃取物 (≥0.1µg/ml) 處理的單核球活化後 IL-12 的釋放明顯低於未以大蒜萃取物處理組, 而以大蒜萃取物 (≥10µg/ml) 處理的細胞與未以大蒜萃取物處理組相比, 具抗發炎作用之 IL-10 的釋放顯著上升, 而促發炎反應的 TNF-α、IL-1α、IL-2、IL-6、IL-8 及 IFN-γ 的釋放顯著降低 (Hodge et al., 2002)。alliin 可降低 LPS 誘發單核球活化 IL-6 的釋放但對 PMA 刺激超氧自由基的產生並無影響(Salman et al., 1999)。

有研究指出, 嗜中性球加入 alliin 培養後會增加其吞噬 latex bead 的能力, 顯示 alliin 加強嗜中性球吞噬能力(Salman et al., 1999)。但是對於大蒜精油 (garlic oil, GO) 對於宿主第一防線細胞嗜中性球的生理活性影響尚不清楚。

大蒜與細胞免疫 在我們過去的一個研究中曾顯示大蒜精油對於 concanavalin A (Con A)-誘發之體外脾細胞複製之促進作用, 且本計畫申請人所屬之研究團隊在過去也發現 GO 對大鼠淋巴細胞活性有促進的作用, 近來尚未正式發表的結果也顯示其中組成分 DAS, DADS, 及 DATS 均為作用成分 (葉, 2000)。這與過去其他學者的報導顯示, 大蒜萃取物或其含硫成分 DAS 刺激 T 細

胞複製有一致的結果 (Lau et al., 1991)。有關大蒜成分已知之調節特定的免疫功能作用機制, Colic and Savic (2000)發現大蒜粉末之水性及乙醇萃取物對於培養之大鼠脾臟淋巴細胞複製之影響與增加之 IL-2 R alpha 表現及增加之 IL-2 產生相關。Morioka 等人發現大蒜萃取物可以增加自然殺手細胞 (NK cell) 毒殺 YAC-1 細胞, 並且在 Con A 分裂素刺激下淋巴細胞 IL-2 分泌量、IL-2 receptor 表現量及淋巴細胞增生能力增加 (Morioka et al., 1993)。Geng 等人在人體 T 淋巴球 (Jurkat cell) 模式以 TNF- α 及 H₂O₂ 來刺激細胞產生大量 ROS 並活化 NF- κ B 訊息傳遞, 添加大蒜水萃物 S-allyl cysteine 可有效藉由抑制 ROS 產生而減弱 NF- κ B 之活化, 減緩發炎反應 (Geng et al., 1997)。在體外細胞實驗也有數據顯示事前先以大蒜萃取物處理的細胞活化釋放 IL-2 及 TNF- α 明顯低於未以大蒜萃取物處理組, 並且與臨床 IBD 抗發炎藥 methylprednisolone 有加成的抑制效果 (Hodge et al., 2002)。在大蒜精油 GO 灌食 SD 大鼠後, Con A 刺激下淋巴細胞增生也因此而增加 (Yeh, 2000)。

五、本研究前兩年執行期間之主要發現與本年度研究假說

本計畫在執行第一年期間的主發現包括: 不論急性灌食高劑量 (200 mg/kg BW) 或低劑量 (50 mg/kg BW) GO 都有減少腸道格蘭氏陰性菌轉移之趨勢, 但並非由於腸腔格蘭氏陰性菌數減少之故; 雖然 GO 對於人類腸道之菌種在體外實驗曾被發現有明顯之抑制活性, 但以上結果顯示在本實驗劑量下 GO 降低細菌轉移可能與其殺菌作用較無關係, 而 GO 在活體內殺菌之活性值得未來進一步探討。此外, 急性灌食 GO 減少腸道格蘭氏陰性菌轉移之作用與其降低黏膜氧化壓力, 增加非蛋白質還原態 thiols 及腸黏膜完整性之結果一致, 顯示此為其作用機制之一。然而, 在慢性灌食之觀察結果顯示, 高劑量 GO 對於 LPS 誘發之細菌轉移呈負面之作用, 即灌食高劑量 GO 二週惡化細菌轉移, 且與惡化之黏膜氧化壓力有關。對於此現象, 再參考其他文獻之報導, 我們推論較高劑量之 GO 造成壓力下腸道菌轉移增加, 至少有兩種可能原因: (1) 高劑量 GO 直接損壞腸上皮細胞功能, 導致增加黏膜障壁通透性, 使得在壓力下腸道菌轉移至宿主體內之情況惡化; (2) 高劑量 GO 破壞腸道細菌之生態平衡導致喪失益生菌對宿主之保護作用, 這可能造成伺機菌之滋長及/或刺激黏膜發炎反應, 而黏膜之發炎性破壞進一步造成壓力下腸道菌轉移至宿主體內之情況惡化。而不論是上述何種原因, 都應會伴隨周邊發炎細胞活性之增加及惡化之腸道黏膜組織發炎細胞浸潤 (江等人, 2002)。根據第一年執行本研究的結果確認: LPS 誘發之系統性發炎反應是觀察腸道菌伺機感染之有用模型, 且也建立其與黏膜氧化壓力, NO 產生, 絨毛損傷之間的關係。證實急性利用 GO 可藉由改善黏膜氧化壓力及絨毛損傷而改善細菌轉移且與改善黏膜氧化壓力, NO 產生, 絨毛損傷有關。

為了釐清 GO 之主要活性成分 DAS, DADS 及 DATS 在 LPS 動物模型中之上述作用, 故本計畫於第二年度利用經由第一年所建立之 LPS 誘發 BT 模式觀察 DAS、

DAD 及 DATS 對於 BT 之影響且與第一年 GO 的作用相較發現：利用單一劑量胃灌 GO 降低因為內毒素所引起系統性發炎反應的腸道氧化壓力，保護腸道黏膜進而減少腸道細菌轉移至體內，且 GO 中有機含硫成分隨含硫數增加作用遞減。在長期灌食之觀察中發現不論是 GO 或其有機含硫成分，對於 BT 發生之嚴重度的影響不再取決於抗氧化能力或對於 NO 的抑制作用，而免疫力更是關鍵。在免疫學的觀察中，我們過去曾以 *in vitro* 模式發現 DAS 是三種 GO 含硫成分中對 T 淋巴細胞功能有最大促進作用者。在本研究由增加之淋巴結 cellularity 可得知與 *in vitro* 觀察結果相符。而這對於長期灌食大鼠改善 LPS 誘發之 BT 可能是一重要機制。另一方面，理論上含硫數愈多可提供較佳之抗氧化作用，這可由 DATS 造成組織較高非蛋白質還原態硫醇含量得證。但是在不論在急性或慢性作用中 DATS 均未改善脂質過氧化及黏膜完整性，顯示在本研究模式中 DATS 有其他方面的作用遮蓋此抗氧化效應且可用以解釋灌食高劑量 GO 造成的結果。我們推論長期灌食高劑量 GO 或 DATS 惡化 BT 可能與增加發炎細胞活性及腸黏膜組織之發炎細胞浸潤有關（蘇等人，2002；江等人，2002）。**根據第二年執行本研究的結果：**(1) 確認 DAS 為急性利用 GO 改善 BT 之主要成分之一，其可藉由改善黏膜氧化壓力，NO 產生，絨毛損傷而改善細菌轉移；(2) 確認 GO 與 DAS 改善 BT 之慢性長期作用主要涉及細胞免疫活性而非在於改善氧化傷害之作用；(3) 提出 DATS 為高劑量 GO 惡化 BT 的原因。

由於本研究所採用之系統性發炎反應為一急性發炎反應模式，動物可在誘發此模式後 48h 復原 (Liu et al., 2001)，因而不足以誘發巨噬細胞在黏膜之浸潤作用。雖然在 SIRS 中，巨噬細胞的主要角色在於釋放促發炎細胞激素及大量 NO，然而在此模式中許多其他類型的細胞也都能釋放這些成分，故本研究直接測定血中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 之濃度 (NO 已於第一、二年測定)。由於本研究模式所致之黏膜損傷，直接原因應與嗜中性球的組織浸潤及其活性關係較巨噬細胞密切，再根據我們在前兩年的研究結果，本(第三)年度的研究假說為：(1) GO 及其 OSCs 對於系統性發炎反應誘發之 BT 與其對於 neutrophil 之活性及在腸道黏膜之浸潤造成的黏膜傷害有關；(2) GO 及其 OSCs 對於系統性發炎反應誘發之 BT 與其對於發炎性 cytokines 刺激之大鼠小腸上皮細胞死亡有關。執行本年度計畫主要採用的研究方法包括觀察大蒜精油及其有機含硫成分對於：(1) LPS 誘發之發炎性 cytokines 之產生的影響，(2) LPS 誘發之發炎細胞 neutrophils 之活性的影響，(3) 發炎細胞 neutrophils 在腸組織之浸潤之影響，(4) 腸道組織在發炎反應中發生 apoptosis 之影響，及(5) 腸道細胞在發炎性 cytokines 作用下存活率之影響。

肆、研究方法

一、系統性發炎反應之動物模式

本研究採非致死性之系統發炎反應模式 (Liu et al., 2001)。此模式之誘發係以來自 *Salmonella typhimurium* 之內毒素 (5mg/ml/kg BW) 溶於生理食鹽水經由腹腔注射至大鼠，控制組則以腹腔注射等量生理食鹽水。

二、動物處理 protocol

大鼠自由進食至約 130 克，隨機分 7 組，分別隔日胃灌以下成分兩週；載劑玉米油 (CO, 2ml / kg BW)、大蒜精油 (GOL, 50mg / kg BW ; GOH, 200mg / kg BW) 及有機含硫成分 (DAS、DADS 及 DATS, 0.5 mmole / kg BW)，共灌食 8 次直至犧牲前一天 (體重約 250 克)。自灌食第一天至犧牲當天，大鼠皆飼養於代謝籠內，並記錄大鼠體重、飲水量、攝食量及尿量。犧牲前 18 小時禁食並腹腔注射內毒素或生理食鹽水。

三、樣品收集

1. 血液收集

大鼠注射 LPS 後 2h 及 3h 分別由尾靜脈採血製成血清備用於 cytokines 分析。在注射 LPS 後 18h 以 CO₂ 窒息犧牲大鼠，取下腔靜脈全血加入含 heparin 採血管，以備之後進行總白血球計數、differential count、分離嗜中性球及其功能分析。

2. 迴腸樣品製備

取盲囊前迴腸 10 公分，以 0.1% PMSF/PBS (w/v) 灌洗迴腸，剔除腸道外圍脂肪後分兩段，靠近盲囊端的前 5 公分置入有乾冰的 isopropanol，急速冷凍後存放 -80°C，之後以 tissue freezing medium 包埋進行冷凍切片；後 5 公分放入組織固定液中浸潤做臘塊切片染色，以上製備均在冰上進行。

四、分析項目

1. 總白血球計數及嗜中性球計數

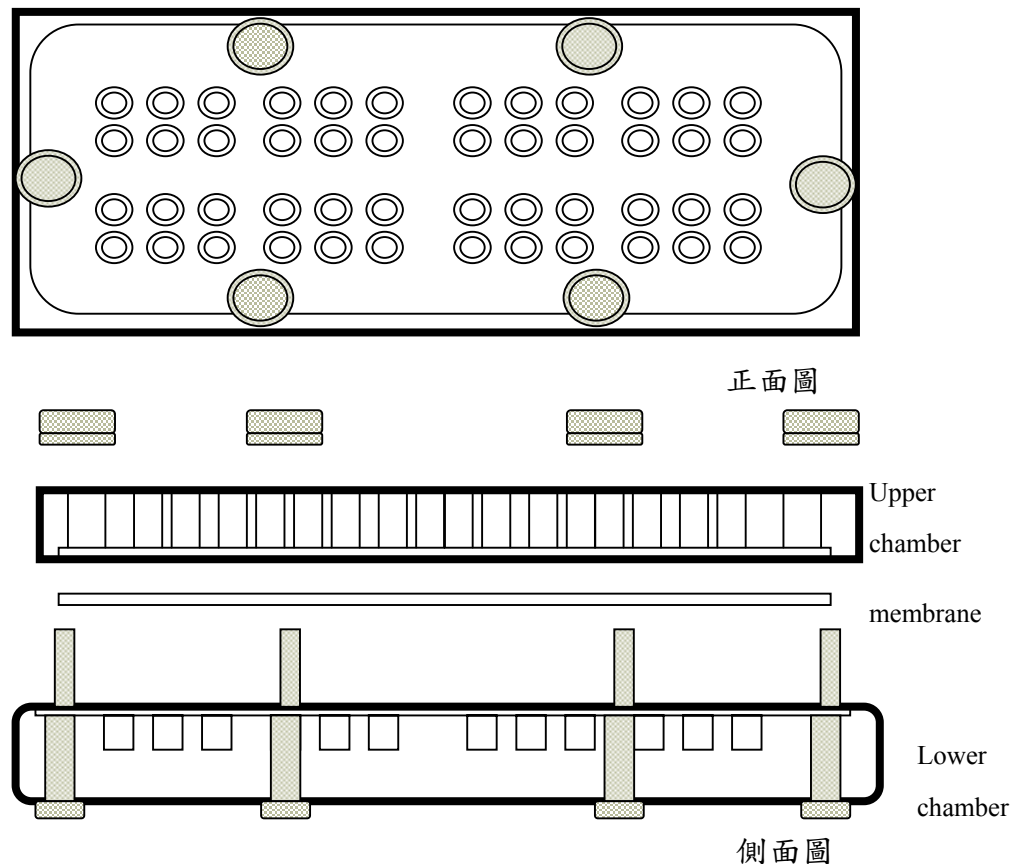
取含 heparin 全血以 2% (v/v) 冰醋酸水溶液破紅血球，取 10 μ l 以血球記數盤記數為總白血球計數；取 10 μ l 作抹片以 Diff Quik kit 染色，作 differential count，在光學顯微鏡 200 倍視野下隨機選取視野，計數每 100 顆細胞中嗜中性球之百分比，以總白血球數乘以百分比為嗜中性球計數。

2. 純化嗜中性球

取含 heparin 全血 4.5% dextran/saline (w/v) 混合均勻後，在 37°C 培養 60min，以玻璃滴管取出上層富含白血球的黃濁懸浮液後以 250g 室溫下離心 10 分鐘，留下細胞以 BSS 沖洗後，以密度 1.077Ficoll 做梯度離心，將多核型球與單核球分離。下層細胞以 BSS 清洗後，破污染之紅血球細胞並以適量的 BSS 再懸浮細胞，並以血球記數盤記數細胞數、存活率及純化率。經此製備流程所得之細胞存活率及純度均在 85% 以上。純化之細胞備用於以下遷移試驗、NBT 還原法及化學冷光分析。

3. 嗜中性球遷移試驗

本實驗修改 Frevert 等人之實驗方法進行 (Frevert et al., 1998)，如圖一所示，在 chemotaxis chamber 下層刺激組放 30 μ l 趨化劑 10⁻⁹M PMA 或控制組放等量載劑 BSS，上層各組加入 8000 顆細胞懸浮於 50 μ l BSS，中層 5 μ m PVP free membrane，在 37°C、5%CO₂ 環境培養 60 分鐘後，通透膜以 Diff-Quik kit 染色，每組 6 重複，光學顯微鏡 200 倍視野下隨機選取 5 個鏡頭，計數在有無趨化劑下遷移到膜下層的細胞數目。



圖一、Chemotaxis Chamber

4. NBT (nitro blue tetrazolium) 還原法

本實驗採用 Ravi Pillay 等人之方法進行(Ravi Pillay, 2003)，每個 200 μ l 分析試樣中（以 BSS 為培養基）最終含有 1×10^6 顆嗜中性球、0.1% BSA 及 0.1% NBT，刺激組另含 10^{-5} mM PMA，每組 3 重複。在 37 $^{\circ}$ C 培養 20 分鐘後以 2000 g、4 $^{\circ}$ C 離心 10 分鐘。去除上清液，將離心下之細胞以 110 μ l glacial acetic acid 溶解取 100 μ l 加入 96 孔盤測 560nm OD。然後將(有 PMA 刺激時之讀值-無 PMA 刺激時之讀值)/無 PMA 刺激時之讀值，並以 saline 組為 100% 計算注射 LPS 對於細胞釋放超氧自由基能力之影響。

5. 化學冷光分析

本實驗修改 Gyllenhammar 等人之方法(Gyllenhammar, 1987) 每個 200 μ l 分析試樣中（以 BSS 為培養基）最終含有 1×10^6 顆嗜中性球、0.1% BSA 及 0.3mM lucigenin，刺激組另含 10^{-5} mM PMA，每組 3 重複。37 $^{\circ}$ C 培養 5 分鐘後放入 chemoluminometer 偵測自由基，結果以 relative light unit (RLU) 表示。然後將(有 PMA 刺激時之讀值-無 PMA 刺激時之讀值)/無 PMA 刺激時之讀值，並以 saline 組為 100% 計算注射 LPS 對於細胞釋放超氧自由基能力之影響。

6. Myeloperoxidase (MPO) 染色

依照 Simmonds 等人之方法(Simmonds et al., 1992)利用 MPO 與其受質 H_2O_2 反應，反應產物氧化呈色劑 DAB (3,3 diaminobenzidine) 成為非水溶性的褐色色素顆粒而被顯微鏡觀察到。以 Tissue freezing medium 包埋樣品經冷凍切片完後以 glutaraldehyde-acetone 固定 1 分鐘，加入 DAB 與 H_2O_2 反應試劑反應 1 分鐘，滴上硝酸銅固定呈色 2 分鐘，以 Hematoxylene 背景染色。玻片經低濃度至高濃度酒精序列脫水、二甲苯澄清並封片後以光學顯微鏡 200 倍鏡頭下隨機取 5 個視野，以影像分析軟體 (Image-Pro® Plus Verson 4.5 for windows; Media Cybernetics) 分析 DAB 褐色顆粒占視野中的百分比為。

7. Terminal deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL) 染色

本方法係採用 TUNEL 染色套組進行。迴腸組織經組織固定液固定 24 小時後，以酒精脫水之後浸潤石蠟作成蠟塊，然後切片 $0.5 \mu m$ ，並根據廠商說明書進行實驗流程，加 protease K 在切片上室溫反應 15 分鐘，以一次水清洗完後加 3 % H_2O_2 室溫反應 5 分鐘，以 PBS 洗去，blocking buffer 反應 1 分鐘後加入酵素在潮濕盒 $37^\circ C$ 下反應 1 小時，之後擦去滴上 stop buffer 室溫反應 10 分鐘，以 PBS 洗去後滴上 anti-digoxigenin 室溫反應 10 分鐘，以 PBS 清洗兩次後，以 DAB 專一性偵測斷裂的 DNA 片段進行呈色，以 hematoxylene 背景染色，低濃度至高濃度酒精序列脫水、二甲苯澄清並封片後以光學顯微鏡 200 倍鏡頭下隨機取 5 個視野，以影像分析軟體 (Image-Pro® Plus Verson 4.5 for windows; Media Cybernetics) 分析 DAB 褐色顆粒占視野中的百分比。

8. Cytokines 分析

大鼠 cytokines, TNF- α , IL-1 β 及 IL-6 的分析套組購自 Biosource. 根據廠商說明書製備標準品作標準曲線，並以內插法計算血清樣品中的細胞激素濃度。

五、IEC-18 培養及存活率測定

大鼠小腸上皮細胞株(IEC-18)係購自新竹食工所菌種中心，細胞培養於 DMEM 培養液中，並置於 CO_2 培養箱培養，實驗所用之細胞代數為 $n+7 \sim n+10$ 。細胞存活率係利用商業 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrasodium bromide) cell growth kit. 將 IEC-18 細胞由 T75 flask 洗下之後，依廠商說明書進行，將細胞培養於 96 孔盤中，每盤加入 0.5×10^5 cells/100 μl ，並於培養液中加入不同濃度 GO (0~5 $\mu g/ml$), DAS (0~1.0 mM), DADS (0~1.0 mM) 或 DATS (0~1.0 mM)。並參考 Cavicchi et al 的方法加入 200 unit/ml IFN- γ , 5 ng/ml IL-1 β 及 100 ng/ml TNF- α 混合物。培養 18h 後加入 10 μl /well MTT/PBS, 混合後於 $37^\circ C$ 培養 4h, 再加入 100 μl isopropanol, 於波長 570 nm 測吸光值。

六、統計分析

動物實驗中各組分析所得數據以平均值加減一個正負標準差 (mean \pm SD) 表示，並利用 SPSS 軟體進行統計分析。控制組與 LPS 刺激組間之差異以 Independent Sample *t*-test 分析。LPS 刺激組各組間差異則先以 one-way analysis of ariance (ANOVA) 進行分析，再以 Duncan's test 分析組間差異。以上分析均以 $p < 0.05$ 為有顯著性。

細胞實驗中各組分析所得數據以平均值加減一個正負標準差 (mean±SD) 表示，並利用SPSS軟體進行統計分析。以Independent Sample *t*-test分析相同大蒜成分濃度存在下未加入cytokines與有加入cytokines組間之差異，並以Duncan's test分析相同處理組(無或有加入cytokines)之不同大蒜成分濃度間之差異。以上分析均以 $p < 0.05$ 為有顯著性。

伍、結果與討論

一、灌食 GO 及其 OSCs 對於系統性發炎大鼠周邊血中白血球數之影響

動物分別灌食載劑(玉米油; CO)、大蒜精油(GO)或其含硫成分 DAS、DADS 或 DATS 兩週後於禁食 18 小時,同時將 CO 組隨機分別注射 LPS 或生理食鹽水(LCO 或 SCO 組),灌食 GOL、GOH、DAS、DADS、DATS 組則由腹腔注射 LPS 為 LPS 刺激組(LGOL、LGOH、LDAS、LDADS、LDATS),犧牲後進行分析。

由結果可知注射 LPS 與注射 saline 相比顯著增加血中總白血球及嗜中性球數目(圖一; $P < 0.05$);而先前若灌食 200 mg/kg 之 GO 及灌食 DATS 者與灌食 CO 者相比在 LPS 刺激後,更進一步增加血中總白血球數目(圖一; $P < 0.05$)。此外,先前若灌食 50 mg/kg 之 GO 者與灌食 CO 者相比在 LPS 刺激後顯著降低血中嗜中性球數目,但先前若灌食 DATS 者與灌食 CO 者相比在 LPS 刺激後血中嗜中性球數目則顯著增多(圖一; $P < 0.05$)。

在創傷、SIRS 及敗血症患者均可發現調節嗜中性球因子失衡,如細胞激素、荷爾蒙、黏附因子等,導致嗜中性球生命期過長及生理功能過度表現,包括嗜中性球黏附、趨化、活化吞噬及呼吸爆炸,並因此成為組織損傷的主因。因此許多研究認為減少過度活化的嗜中性球,可減緩宿主受到的傷害(Grisham and Granger, 1988); Smith, 1994; Basset et al., 2003)。本研究發現 LPS 誘發系統性發炎會使血中總白血球及嗜中性球數目顯著增多,此與過去其他學者的結果一致(Smith, 1994; Rosenberger and Finlay, 2003)。而低劑量的大蒜精油可抑制血中嗜中性球數目的增加,但是高劑量的大蒜精油使總白血球上升卻不影響血中嗜中性球,因此有較多的單核球及淋巴球,而 DATS 可促使血中嗜中性球數目的增加。有研究指出促進嗜中性球增生的因子包括促發炎激素(如:IL-6、IL-8)及 GM-CSF,而 IL-1、IL-4、IL-10、TNF- α 及 IFN- γ 可調節 GM-CSF(Olivares et al., 1996; Schreck and Baeuerle, 1990)。低劑量的大蒜精油及 DATS 可分別減少及增加血中嗜中性球數目,是否與發炎反應中增加嗜中性球之細胞激素濃度增加有關,在本研究中另外進行了觀察及且於下文中討論。

二、灌食 GO 及其 OSCs 對於系統性發炎大鼠嗜中性球遷移之影響

本研究利用針對嗜中性球酵素 MPO(myeloperoxidase)之染色觀察大鼠腸道組織切片中嗜中性球浸潤之情形(圖二 A)。在切片圖示上箭頭指標的褐色顆粒即表示有 MPO 酵素出現的位置,褐色顆粒愈多即表示嗜中性球浸潤程度愈嚴重。經由影像分析軟體分析後以 SCO 組為 100%計算嗜中性球浸潤指數(圖二 B)。結果顯示注射 LPS 與注射 saline 相比有顯著較多的嗜中性球浸潤($P < 0.05$);而先前若灌食 50 mg/kg 之 GO 者與灌食 CO 者相比在 LPS 刺激後嗜中性球浸潤情形顯著較低($P < 0.05$)。此外,本研究收集並純化周邊血嗜中性球,觀察在無或有 10^{-9} M PMA 刺激下細胞在 chemotaxis chamber 遷移數量,以刺激前後細胞遷移數的差值代表嗜中性球趨化指數(圖三)。結果顯示,注射 LPS 組與注射 saline 組相較,

嗜中性球趨化指數顯著較高 ($P < 0.05$)；而若先前灌食 50 mg/kg 之 GO 組與灌食 CO 者相較，則有較低之嗜中性球趨化的趨勢，而若先前灌食 DATS 與灌食 CO 組相較，有顯著較高之嗜中性球趨化作用 ($P < 0.05$)。

有學者指出 LPS 可藉由訊息傳遞活化嗜中性球，使表現貼附及遷移的受體及重組細胞骨架，造成其遷移能力改變 (Zhelev and Alteraifi, 2002)，而抑制其貼附及遷移能力可有效減少嗜中性球浸潤情形，進而減緩發炎現象 (Savill, 1997)。本研究觀察嗜中性球對 PMA 的趨化反應，發現低劑量的大蒜精油有降低的趨勢，而 DATS 則顯著提高。各組所顯示之趨化反應，與我們觀察嗜中性球浸潤迴腸的趨勢相符合，因此可推論低劑量的大蒜精油及大蒜中 DATS 可藉由調節嗜中性球之趨化反應而影響組織浸潤情形。過去其他學者曾於活體外的觀察發現嗜中性球若先以大蒜萃取物 (garlic extracts) 處理後，其受到 f-MLP 刺激之遷移穿透 (transmigration) 及貼附能力明顯受到抑制 (Hofbauer et al., 2001)。在急性腦梗塞的病患嗜中性球之貼附分子 CD11a 表現顯著高於健康者，但可受到在 garlicin (dipropenylsulfide-oxygen-ester) 之作用而抑制 CD11a 表現 (Zhang et al., 2002)。由於本研究發現低劑量大蒜精油抑制嗜中性球浸潤腸組織，因此推論其機制可能有部分與調節嗜中性球貼附分子的表現有關。

三、灌食 GO 及其 OSCs 對於系統性發炎大鼠血中嗜中性球釋出超氧自由基能力之影響

本研究收集純化周邊血嗜中性球，在無或有 $10^{-5}M$ PMA 刺激下以 NBT 還原法偵測細胞產生超氧自由基的情形。嗜中性球活化倍率是以 [(有 PMA 刺激時之讀值 - 無 PMA 刺激時之讀值) / 無 PMA 刺激時之讀值] 計算，並以 saline 組為 100% 計算注射 LPS 對於細胞釋放超氧自由基能力之影響 (圖四)，注射 LPS 組與注射 saline 組相較，超氧自由基釋放能力顯著增加 ($P < 0.05$)；且若先前灌食 50 mg/kg 之 GO 組與灌食 CO 組相較有顯著較低之嗜中性球超氧自由基釋放能力 ($P < 0.05$)，而若先前灌食 DATS 組與灌食 CO 組相較則有顯著較高之超氧自由基釋放能力。此外，本研究亦在無或有 $10^{-5}M$ PMA 刺激下以化學冷光法觀察細胞產生超氧自由基的情形。嗜中性球活化倍率是以 [(有 PMA 刺激時之讀值 - 無 PMA 刺激時之讀值) / 無 PMA 刺激時之讀值] 計算，並以 saline 組為 100% 計算注射 LPS 對於細胞釋放超氧自由基能力之影響 (圖四)，注射 LPS 組與注射 saline 組相較，超氧自由基釋放能力顯著增加 ($P < 0.05$)；且若先前灌食 50 mg/kg 之 GO 組與灌食 CO 組相較有顯著較低之嗜中性球超氧自由基釋放能力 ($P < 0.05$)，而若先前灌食 DATS 組與灌食 CO 組相較則有增加超氧自由基釋放的趨勢。

在本研究中不論是以 NBT 還原法或化學冷光法，皆可見到 LPS 刺激使嗜中性球超氧自由基釋放能力顯著提升，低劑量的大蒜精油可抑制超氧自由基釋放能力，而 DATS 會增強超氧自由基釋放能力。本研究中超氧自由基釋放能力情形與下述腸道 apoptosis 發生情形相符，且此結果與過去其他學者所提出發炎期間嗜

中性球活化產生 ROS 是造成宿主細胞損傷主要因子之看法相符合 (Smith, 1994; Grisham and Granger, 1998)。而低劑量的大蒜精油可抑制嗜中性球活化以保護組織受損；而 DATS 促使嗜中性球活化產生超氧自由基使得組織受損愈嚴重。過去其他學者曾以 luminol 進行化學冷光法偵測嗜中性球活化產生呼吸爆炸，發現 ajoene 可抑制人類嗜中性球在 f-MLP 或 PMA 刺激下產生的呼吸爆炸 (Sud' ina et al., 1991)。以 TNF- α 及 H₂O₂ 刺激人類 T 淋巴球 (Jurkat cell) 所產生之大量 ROS 及活化 NF- κ B 之訊息傳遞，亦可藉由添加大蒜含硫成分 S-allyl cysteine 而抑制 (Geng et al., 1997)。

四、灌食 GO 及其 OSCs 對於系統性發炎大鼠迴腸細胞 apoptosis 之影響

近年來，許多學者均提出發炎誘發之小腸黏膜上皮損傷主要是由於誘發 apoptosis 所致 (Moss et al., 1996; Sun et al., 1998; Suzukin et al., 1998; Ramachandran et al., 2000)。本研究利用 TUNEL 染色觀察灌食大蒜精油及其含硫成分對於系統性發炎大鼠迴腸 apoptosis 之影響。在切片圖示上箭頭指標的褐色顆粒即表示有 apoptosis 發生的位置，褐色顆粒愈多即表示組織發生 apoptosis 程度愈嚴重(圖五 A)。切片經由影像分析軟體分析後整理以 saline 組為 100% 計算 apoptosis 指數 (圖五 B)。圖九 B 可見與注射 saline 組相較，注射 LPS 顯著誘發腸組織之 apoptosis ($P < 0.05$)；而若先前灌食 50 mg/kg 之 GO 與灌食 CO 組相比，在注射 LPS 後有顯著較低之嗜中性球浸潤情形 ($P < 0.05$)，而若先前灌食 DATS 與灌食 CO 組相比，在注射 LPS 後有顯著較高之嗜中性球浸潤情形 ($P < 0.05$)。嗜中性球的趨化及超氧自由基的釋放是造成組織浸潤及受損發生的重要因素，因此減少過度活化的嗜中性球可減緩發炎反應及組織損傷 (Grisham and Granger, 1988; Smith, 1994; Savill, 1997)。本研究在 LPS 誘導下，嗜中性球數目增多、穿透能力上升、遷移反應增加及超氧自由基釋放能力增加，結果造成腸道組織浸潤嚴重，這可用以說明為何 LPS 組的動物小腸黏膜 apoptosis 發生較嚴重。而低劑量的大蒜精油可藉由抑制嗜中性球數目增加、降低超氧自由基釋放能力來減緩迴腸組織受到浸潤及損傷；大蒜有機含硫成分 DAS 及 DADS 不影響嗜中性球生理功能及腸道受損情形，但是 DATS 反而會促進嗜中性球數目增加、增加穿透能力、加強趨化反應及增強超氧自由基釋放能力，導致迴腸浸潤及較嚴重之 apoptosis。

五、灌食 GO 及其 OSCs 對於系統性發炎大鼠血漿中發炎性細胞激素含量之影響

本研究在注射 LPS 後 2h 或 3h 由大鼠尾靜脈採血並製成血清，以 cytokines assay kits 測定周邊血中發炎性 cytokines，TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 之含量。在 saline 組並未偵測到任何這些 cytokines 之含量，但是在注射 LPS 組有明顯上升之 cytokines 含量(表一)。此結果發現，若先前灌食 200 mg/kg 之 GO 或 DATS，與其他 LPS 注射組相較有顯著較高之 TNF- α 、IL-1 β 濃度 ($P < 0.05$)，且 DATS 組有顯著較高之 IL-6 濃度 ($P < 0.05$)。若先前灌食 DAS 與 CO 組相較則有顯著較低

之 IL-1 β 濃度 (P<0.05)。

在包括細菌感染的許多病理學狀態下患者血中可偵測到高濃度的促發炎細胞激素 (Fong and Lowry, 1990)。人類嗜中性球中在發炎初期受到促發炎細胞激素而數目增加，且功能被活化；e.g.，IL-1、TNF- α 可促使 NADPH oxidase 活化而釋放 ROS，且 IL-1 β 會促進 MPO 釋放 (Dularay, et al., 1990; Shalaby et al., 1987)；IL-8 則可與 IFN- γ 、TNF- α 、GM-CSF 及 G-CSF 協同作用加強人類嗜中性球毒殺功能 (You et al., 1991)；正常情形下體內有一套抗發炎機制平衡發炎反應，e.g. IL-4 可抑制經 LPS 誘發嗜中性球 IL-8 之釋放量³¹，而 IL-10 可抑制經 LPS 誘發嗜中性球 IL-1 β 、IL-8 及 TNF- α 的釋放 (Cassatella et al., 1993)。有研究指出 ajoene 可抑制 LPS 活化巨噬細胞釋放 TNF- α (Romano et al., 1997)。在 LPS 刺激人體單核球模式中，誘發前先以大蒜萃取物培養，可增加抗發炎因子 IL-10 的釋放，並抑制促發炎因子 TNF- α 、IL-1 α 、IL-2、IL-6、IL-8 及 IFN- γ 的釋放 (Hodge et al., 2002)。另有研究指出 alliin 可降低 LPS 誘發單核球活化 IL-6 的釋放量 (Salman et al., 1999)。在利用人類全血觀察的 in vitro 模式中，分別有或無添加 GPE (garlic powder extracts)、DADS 及 allicin 與 LPS 培養 20 小時後，偵測血漿中細胞激素濃度。結果 10、100mg/L 的 GPE 可降低血中 IL-1 β 及 TNF- α 的釋放，但 IL-10 不受影響；1、10 及 100 μ mol/L 的 DADS 皆降低血中 IL-1 β 及 TNF- α 的釋放；1 及 10 μ mol/L allicin 不影響 IL-10，但在 100 μ mol/L 下 IL-10 的釋放受到抑制 (Keiss et al., 2003)。在本研究之 in vivo 模式中並未發現 garlic oil 可抑制周邊血中促發炎激素之濃度，且高劑量時甚至促進此濃度。此外，garlic oil 之 OSCs 中 DATS 具有顯著提高促發炎細胞激素濃度的作用。此結果至少可部分解釋本研究所觀察到灌食 DATS 組動物在 LPS 刺激下嗜中性球的生理活性與黏膜損傷增加的原因。

六、GO 及其 OSCs 對於促發炎細胞激素作用下之大鼠小腸內皮細胞培養物存活率之影響

本研究以 cytokine mix (CM: 200 U/ml IFN- γ , 5 ng/ml IL-1 β and 100 ng/ml TNF- α) 刺激腸道上皮細胞株 IEC-18，觀察細胞激素是否會影響細胞的生存，並以 MTT 分析結果表示，結果示於圖六。結果顯示不同濃度之 GO，DAS 或 DADS 無論在 control 組或 CM 刺激組，均不影響細胞生存；two-way ANOVA 分析顯示 CM 處理組細胞存活率低於 control 組 (P<0.01)，但與 GO、DAS 或 DADS 間並無交互作用。然而不論是否加入 cytokines，DATS 濃度愈高則細胞存活率愈低。且 two-way ANOVA 分析顯示 CM 處理組細胞存活率低於 control 組 (P<0.01)，且 DATS 抑制細胞存活率 (P<0.01)，此外 cytokines 與 DATS 間有交互作用；即 DATS 對於細胞存活率的抑制作用會因 cytokines 之存在而加強 (P<0.05)。此結果與 in vivo 觀察到灌食 DATS 組之小腸黏膜組織在 LPS 誘導下發生 apoptosis 較為嚴重之結果相符。目前已針對此現象提出研究假說，並在執行九十三年度國科會計畫時加

以探討。

綜合以上結果，本年度研究之結論是：在 LPS 刺激下，大鼠血中嗜中性球增多、穿透能力上升、趨化反應增加及超氧自由基釋放能力增加，造成腸道組織白血球浸潤及腸道受損。而在注射 LPS 前灌食低劑量的大蒜精油（50mg / kg BW）兩週可藉由減少嗜中性球數目及減緩超氧自由基釋放能力來減緩迴腸受到浸潤及損傷情形；但是在注射 LPS 前灌食 DATS（0.5 mmol / kg BW）則增加嗜中性球數目、穿透能力、趨化反應及釋放超氧自由基能力，導致惡化迴腸組織傷害，且 DATS 亦可能藉由增加血液中促發炎細胞激素含量及直接對小腸上皮細胞造成毒性而對於腸道細菌伺機感染有不利的影響。

陸、參考文獻

1. 江怡萱、蘇偉民、劉承慈、李宗貴和沈立言. 2002. 大蒜精油及其含硫成分對於內毒素誘發大鼠腸道細菌轉移之急性作用及相關機制之探討. 中華民國營養學會第二十八屆年會, 台南.
2. 蘇偉民、江怡萱、劉承慈、李宗貴和沈立言. 2002. 長期灌食大蒜精油或 diallyl sulfide 對於內毒素誘發大鼠腸道細菌轉移之影響. 中華民國營養學會第二十八屆年會, 台南.
3. 葉恩菱. 2000. 大蒜精油及其有機含硫成分-二烯丙基硫化物、二烯丙基二硫化物及二烯丙基三硫化物-調控 SD 大鼠淋巴細胞和巨噬細胞免疫反應之探討. 中山醫學院營養科學研究所碩士論文.
4. Agarwal, K. C. (1996). Therapeutic actions of garlic constituents. *Med Res Rev* 16, 111-124.
5. Ankri, S., and Mirelman, D. (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes & Infection*. 1, 125-129.
6. Arfors, K. E., Lundberg, C., Lindbom, L., Lundberg, K., Beatty, P. G., and Harlan, J. M. (1987). A monoclonal antibody to the membrane glycoprotein complex CD18 inhibits polymorphonuclear leukocyte accumulation and plasma leakage in vivo. *Blood* 69, 338-340.
7. Arora, D. S., and Kaur, J. (1999). Antimicrobial activity of spices. *International Journal of Antimicrobial Agents* 12, 257-262.
8. Bark, T., Katouli, M., Ljungqvist, O., Mollby, R., and Svenberg, T. (1993). Bacterial translocation after non-lethal hemorrhage in the rat. *Circulatory Shock*. 41, 60-5.
9. Basset, C., Holton, J., O'Mahony, R., and Roitt, I. (2003). Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine* 21 Suppl 2, S12-23.
10. Berg, R. D. (1992). Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *J Med*

23, 217-244.

11. Berg, R. D., Wommack, E., and Deitch, E. A. (1988). Immunosuppression and intestinal bacterial overgrowth synergistically promote bacterial translocation. *Arch Surg* 123, 1359-1364.
12. Broodnitz, M. H., Pascale, J. V., and Derslice, L. V. (1971). Flavor components of garlic extract. *J Agric Food Chem* 19, 273.
13. Bulkley, G. B. (1987). Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. *Br J Cancer* 55(S), 66-73.
14. Cassatella, M. A., Meda, L., Bonora, S., Ceska, M., and Constantin, G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 178, 2207-2211
15. Cavallito, C. J., and Bailey, J. H. (1944). Allicin, the anti-bacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. *J Am Chem Soc* 66, 1950.
16. Chamulitrat, W., Skrepnik, N. V., and Spitzer, J. J. (1996). Endotoxin-induced oxidative stress in the rat small intestine: role of nitric oxide. *Shock* 5, 217-222.
17. Chen, G. W., Chung, J. G., Ho, H. C., and Lin, J. G. (1999). Effects of the garlic compounds diallyl sulphide and diallyl disulphide on arylamine N-acetyltransferase activity in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Applied Toxicology* 19, 75-81.
18. Chen, H. C., Chang, M. D., and Chang, T. J. (1985). Antibacterial properties of some spice plants before and after heat treatment. *Chung-Hua Min Kuo Wei Sheng Wu Chi Mien i Hsueh Tsa Chih - Chinese J Microbiol Immunol* 18, 190-5.
19. Chowdhury, A. K., Ahsan, M., Islam, S. N., and Ahmed, Z. U. (1991). Efficacy of aqueous extract of garlic & allicin in experimental shigellosis in rabbits. *Indian J Med Res* 93, 33-36.
20. Colic, M., and Savic, M. (2000). Garlic extracts stimulate proliferation of rat lymphocytes in vitro by increasing IL-2 and IL-4 production. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 22, 163-181
21. Dal Nogare, A. R. (1991). Southwestern International Medicine Conference: Septic Shock. *Am J Med Sci* 302, 50-65.
22. Dankert, J., Tromp, T. F., de Vries, H., and Klasen, H. J. (1979). Antimicrobial activity of crude juices of *Allium ascalonicum*, *Allium cepa* and *Allium sativum*. *Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*

- Erste Abteilung Originale - Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie. 245, 229-39.
23. Deitch, E. A. (1988). Infection in the compromised host. *Surg clin North Am* 68, 181.
 24. Deitch, E. A., and Bridges, R. M. (1987). Stress hormones modulate neutrophil and lymphocyte activity in vitro. *Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care* 27, 1146-1154.
 25. Deitch, E. A., Taylor, M., Grisham, M., Ma, L., Gridges, W., and Berg, R. (1989). Endotoxin induces bacterial translocation and increases xantine oxidase activity. *Journal of Trauma-Injury Infection & Critical Care* 29, 1679-1683.
 26. Deitch, E. A., Winterton, J., and Berg, R. (1986). Thermal injury promotes bacterial translocation from the gastrointestinal tract in mice with impaired T-cell-mediated immunity. *Arch Surg* 121, 97-101.
 27. Dirsch, V. M., Kiemer, A. K., Wagner, H., and Vollmar, A. M. (1998). Effect of allicin and ajoene, two compounds of garlic, on inducible nitric oxide synthase. *Atherosclerosis* 139, 333-339.
 28. Dirsch, V. M., and Vollmar, A. M. (2001). Ajoene, a natural product with non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-like properties? *Biochem Pharmacol* 61, 587-593.
 29. Dularay, B., Elson, C. J., Clements-Jewery, S., Damais, C., and Lando, D. (1990). Recombinant human interleukin-1 beta primes human polymorphonuclear leukocytes for stimulus-induced myeloperoxidase release. *J Leukoc Biol* 47, 158-163.
 30. Elnima, E. I., Ahmed, S. A., Mekkawi, A. G., and Mossa, J. S. (1983). The antimicrobial activity of garlic and onion extracts. *Pharmazie*. 38, 747-8.
 31. Farbman, K. S., Barnett, E. D., Bolduc, G. R., and Klein, J. O. (1993). Antibacterial activity of garlic and onions: a historical perspective. *Pediatric Infectious Disease J* 12, 613-614.
 32. Fenwick, G. R., and Hanley, A. B. (1985). The genus *Allium*--Part 3. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*. 23, 1-73.
 33. Fiocchi, C. (1998). Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115, 182-205.
 34. Fong, Y., and Lowry, S. F. (1990). Tumor necrosis factor in the pathophysiology of infection and sepsis. *Clin Immunol Immunopathol* 55, 157-170.
 35. Frevert, C. W., Wong, V. A., Goodman, R. B., Goodwin, R., and Martin, T. R. (1998). Rapid fluorescence-based measurement of neutrophil migration in vitro. *J*

Immunol Methods 213, 41-52.

36. Geng, Z., Rong, Y., and Lau, B. H. (1997). S-allyl cysteine inhibits activation of nuclear factor kappa B in human T cells. *Free Radic Biol Med* 23, 345-350.
37. Granger, D. N., Rutili, G., McCord, J. M. (1981). Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterol* 81, 22-29.
38. Grisham, M. B., and Granger, D. N. (1988). Neutrophil-mediated mucosal injury. Role of reactive oxygen metabolites. *Dig Dis Sci* 33, 6S-15S.
39. Gyllenhammar, H. (1987). Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. *J Immunol Methods* 97, 209-213.
40. Hodge, G., Hodge, S., and Han, P. (2002). *Allium sativum* (garlic) suppresses leukocyte inflammatory cytokine production in vitro: potential therapeutic use in the treatment of inflammatory bowel disease. *Cytometry* 48, 209-215.
41. Hofbauer, R., Frass, M., Gmeiner, B., Kaye, A. D., and Frost, E. A. (2001). Effects of garlic extract (*Allium sativum*) on neutrophil migration at the cellular level. *Heart Dis* 3, 14-17.
42. Ide, N., and Hau, B. H. (1999). Aged garlic extract attenuates intracellular oxidative stress. *Phytomedicine*. 6, 125.
43. Ide, N., and Lau, B. H. (1999). S-allylcysteine attenuates oxidative stress in endothelial cells. *Drug Development & Industrial Pharmacy*. 25, 619.
44. Iqbal, M., and Athar, M. (1998). Attenuation of iron-nitritotriacetate (Fe-NTA)-mediated renal oxidative stress, toxicity and hyperproliferative response by the prophylactic treatment of rats with garlic oil. *Food Chem Toxicol* 36, 485.
45. Keiss, H. P., Dirsch, V. M., Hartung, T., Haffner, T., Trueman, L., Auger, J., Kahane, R., and Vollmar, A. M. (2003). Garlic (*Allium sativum* L.) modulates cytokine expression in lipopolysaccharide-activated human blood thereby inhibiting NF-kappaB activity. *J Nutr* 133, 2171-2175
46. Labro, M. T. (2000). Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or "immuno-fairy tales"? *Clin Microbiol Rev* 13, 615-650.
47. Lau, B. H. S., Yamasaki, T., and Gridley, D. S. (1991). Garlic compounds modulate macrophage and T-lymphocyte functions. *Mol Biother* 3, 103.
48. Liu, C-T., Chen, K-M., Chang, P-L., and Lii, C-K. (2001). Time dependent decrease of the proliferation response of concanavalin A stimulated lymphocyte to glutamine by the administration of endotoxin. *J Surg Res* 96, 246-254.
49. Maejima, K., Deitch, E. A., Berg, R. D. (1984). Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of rats receiving thermal injury. *Infection & Immunity* 43,

6-10.

50. Majno, G., and Joris, I. (1996). Inflammation: the actors and their language. In *Cell, Tissues, and Disease*. London pp. 675-711.
51. McCord, J. M. (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312, 159-163.
52. Morioka, N., Sze, L. L., Morton, D. L., and Irie, R. F. (1993). A protein fraction from aged garlic extract enhances cytotoxicity and proliferation of human lymphocytes mediated by interleukin-2 and concanavalin A. *Cancer Immunol Immunother* 37, 316-322.
53. Moss, S. F., Attia, L., Scholes, J. V., Walters, J. R. F., and Holt, P. R. (1996). Increased small intestinal apoptosis in celiac disease. *Gut* 39, 811-817.
54. Olivares Fontt, E., Heirman, C., Thielemans, K., and Vray, B. (1996). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: involvement in control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun* 64, 3429-3434.
55. Phelps, S., and Harris, W. S. (1993). Garlic supplementation and lipoprotein oxidation susceptibility. *Lipids*. 28, 475.
56. Ramachandran, A., Madesh, M., and Balasubramanian, K. A. (2000). Apoptosis in the intestinal epithelium: Its relevance in normal and pathophysiological conditions. *J Gastroenterol Hepatol* 15, 109-120.
57. Ravi Pillay, D. S. M., Sheril Daniel, Santy Daya (2003). Acetylcholine reduces cyanide-induced superoxide anion generation and lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 27, 61-64.
58. Romano, E. L., Montano, R. F., Brito, B., Apitz, R., Alonso, J., Romano, M., Gebran, S., and Soyano, A. (1997). Effects of Ajoene on lymphocyte and macrophage membrane-dependent functions. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 19, 15-36.
59. Rosenberger, C. M., and Finlay, B. B. (2003). Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 385-396.
60. Rundqvist, C. (1909). Pharmacologic investigations of *Allium* bulbs. *Pharm. Notisblad* 18, 323.
61. Sakamura, F., and Hayashi, S. (1978). Constituents of essential oil from rhizomes of *Zingiber officinale* Roscoe (Studies on constituents of essential oil from *Zingiber officinale* Roscoe part I). *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 52, 207.
62. Salman, H., Bergman, M., Bessler, H., Punskey, I., and Djaldetti, M. (1999). Effect of a garlic derivative (alliin) on peripheral blood cell immune responses. *Int J*

- Immunopharmacol *21*, 589-597.
63. Savill, J. (1997). Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol* *61*, 375-380.
 64. Schreck, R., and Baeuerle, P. A. (1990). NF-kappa B as inducible transcriptional activator of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene. *Mol Cell Biol* *10*, 1281-1286.
 65. Semmler, F. W. (1892). The essential oil of garlic (*Allium sativum*). *Arch. Pharm.* *230*, 434.
 66. Shalaby, M. R., Palladino, M. A., Jr., Hirabayashi, S. E., Eessalu, T. E., Lewis, G. D., Shepard, H. M., and Aggarwal, B. B. (1987). Receptor binding and activation of polymorphonuclear neutrophils by tumor necrosis factor-alpha. *J Leukoc Biol* *41*, 196-204.
 67. Shalinsky, D. R., McNamara, D. B., and Agrawal, K. C. (1989). Inhibition of GSH-dependent PGH2 isomerase in mammary adenocarcinoma cells by allicin. *Prostaglandins* *37*, 135-148.
 68. Sheen, L-Y., Chen, H-W., Kung, Y-L., Liu, C-T., and Lii, C-K. (1999). Effects of garlic oil and its organosulfur compounds on the activities of hepatic drug-metabolizing and antioxidant enzymes in rats fed high- and low-fat diets. *Nutrition and Cancer* *35*, 160.
 69. Sheen, L-Y., Lin, S-Y., and Tsai, S-J. (1992). Odor Assessments for volatile compounds of garlic and ginger essential oils by sniffing method of gas chromatography. *J. Chinese Agri. Chem. Soc.* *30*, 14.
 70. Simmonds, N. J., Allen, R. E., Stevens, T. R., Van Someren, R. N., Blake, D. R., and Rampton, D. S. (1992). Chemiluminescence assay of mucosal reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* *103*, 186-196.
 71. Smith, J. A. (1994). Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J Leukoc Biol* *56*, 672-686.
 72. Srivastava, K. C. (1986). Evidence for the mechanism by which garlic inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins Leukot Med* *22*, 313-321.
 73. Stoll, A., and Seebeck, E. (1947). Alliin, the pure mother substance of garlic oil. *Experientia* *3*, 114.
 74. Stoll, A., Seebeck, E. (1948). *Allium* compounds. I. Alliin, the pure mother compound of garlic oil. *Helv Chim Acta* *31*, 189.
 75. Stoll, A., and Seebeck, E. (1949). Uber den enzymatischen Abbau der Allins und die Eigenschaften der Allinase. *Helv Chim Acta* *32*, 197.

76. Stoll, A., and Seebeck, E. (1951). Chemical investigation on alliin, the specific principle of garlic. *Adv Enzymol* 11, 377.
77. Sud'ina, G. F., Tatarintsev, A. V., Koshkin, A. A., Zaitsev, S. V., Fedorov, N. A., and Varfolomeev, S. D. (1991). The role of adhesive interactions and extracellular matrix fibronectin from human polymorphonuclear leukocytes in the respiratory burst. *Biochim Biophys Acta* 1091, 257-260.
78. Sun, Z., Wang, X., Wallen, R. (1998). The influence of apoptosis on intestinal barrier integrity in rats. *Scand J Gastroenterol* 33, 415-422.
79. Suzukin, H. I., Suzuki, Y., Suzuki, M. (1998). Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. *Gut* 42, 530-537.
80. Wertheim, T. (1844). Investigation of garlic oil. *Annalen* 51, 289.
81. Wertheim, T. (1845). On the relationship between mustard and garlic oil. *Annalen* 55, 297.
82. Wertheim, W. A., Kunkel, S. L., Standiford, T. J., Burdick, M. D., Becker, F. S., Wilke, C. A., Gilbert, A. R., and Strieter, R. M. (1993). Regulation of neutrophil-derived IL-8: the role of prostaglandin E2, dexamethasone, and IL-4. *J Immunol* 151, 2166-2175.
83. Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., and Halbwachs-Mecarelli, L. (2000). Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80, 617-653.
84. Yeh, E. L. (2000). Effect of garlic oil and its organosulfur compounds-diallyl sulfide, diallyl disulfide and diallyl trisulfide-on the immune responses of lymphocytes and macrophages in Sprague-Dawley rats. Master Thesis of Graduate Institute of Nutritional Science Chung-Shan Medical University, 1-2.
85. Yuo, A., Kitagawa, S., Kasahara, T., Matsushima, K., Saito, M., and Takaku, F. (1991). Stimulation and priming of human neutrophils by interleukin-8: cooperation with tumor necrosis factor and colony-stimulating factors. *Blood* 78, 2708-2714.
86. Zhang, J. L., Sun, R. J., and Shi, Z. X. (2002). Effect of garlicin on adhesion molecules expression and deformability of peripheral neutrophils in patients with acute cerebral infarction *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 22, 423-425.
87. Zhelev, D. V., and Alteraifi, A. (2002). Signaling in the motility responses of the human neutrophil. *Ann Biomed Eng* 30, 356-370.

柒、計畫成果自評

本(第三)年度研究結果具有學術價值的部分包括：(1)確認在 LPS 誘發系統性發炎反應時，血中總白血球數及嗜中性球數、自由基釋放能力及趨化反應的上升導致腸道嗜中性球浸潤及黏膜受損，因而建立觀察嗜中性球功能與病理關聯的有用模型，(2)證實適當劑量的 GO 可藉由降低嗜中性球數及其超氧自由基釋放能力而減緩發炎組織傷害程度，(3)提出 DATS 與高劑量 GO 可能不利於與嗜中性球相關之發炎作用之機制。

在我們原先提出計畫中，第三年規劃的觀察模式因為前兩年的結果及對於更多的相關文獻探討而做了小幅修改。(1)原本預計利用腸黏膜組織之製備及體外培養瞭解大蒜精油及其有機含硫成分對於腸道傷害之影響，但發現計畫書中參考之模式容易造成組織額外的缺血性壓力干擾實驗結果故不適合本研究，改以培養大鼠小腸細胞(intestinal epithelial cells)取代；(2)由於造成 SIRS 黏膜損傷之直接原因與嗜中性球的組織浸潤及其活性關係較巨噬細胞密切，而巨噬細胞在本研究模式中的主要角色在於促發炎細胞激素之釋放及大量 NO 之產生，然而，在 SIRS 中許多其他類型的細胞也都能釋放這些成分，故本研究直接測定血中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 之濃度(NO 已於第一、二年測定)，取代觀察體外培養之巨噬細胞產生的上述細胞激素。且由於在過去執行本計畫的期間，並未觀察到巨噬細胞浸潤在此系統的意義，這可能是因為誘發 SIRS 至恢復之期間短，為一急性發炎反應模式，因而不足以誘發巨噬細胞浸潤作用，故將研究重點集中於觀察嗜中性球浸潤及與發炎作用相關之生理活性，且增加了對於小腸黏膜 apoptosis 的發生率項目，這是因為根據文獻指出發炎誘發之小腸黏膜上皮損傷主要是由於誘發 apoptosis 所致。本年度的研究結果不但呈現了嗜中性球在 LPS 誘發的 BT 中所可能扮演的角色及大蒜精油成份的影響，且研究結果與前兩年的研究結果可互相印証。整體而言，評估本計畫之執行達本年期目的之 95%。以上結果，有部分已於去年(九十二年)發表於台灣食品科學技術學會第三十二次會員大會(台南，嘉藥)，及今年(九十三年)發表於第三十屆中華民國營養學會年會暨學術研討會(台中，中山醫大)，目前正以這些結果為基礎撰寫學術論文。

總結在三年的計畫中，我們最初提出的問題是：(1)急性或慢性投用大蒜精油是否可抑制其後由 LPS 誘發的腸道微生物轉移作用？功能性成分為何？(2)抑制 BT 的機制是否與抑制腸道微生物之生長有關？(以腸道中總菌數及 G(-)菌數為指標)(3)抑制 BT 的機制是否與防止腸黏膜之破壞有關？是否透過改善氧化壓力及抑制 NO 產生？(4)抑制 BT 的機制是否與免疫功能之調節有關？是否透過促進細胞免疫及/或抑制發炎細胞活性？在完成此三年期計畫之際，我們提出的主要發現包括：(1) GO 是否抑制其後由 LPS 誘發的腸道微生物轉移作用與使用的劑量及投用時間長短有關；急性灌食高劑量(200 mg/kg BW)或低劑量(50 mg/kg BW)GO 都可減少腸道格蘭氏陰性菌轉移，而灌食二週之後的慢性作用以低劑量 GO 有改

善 BT 的效果，但高劑量 GO 卻惡化 BT。在 GO 的主要 OSCs 中減少腸道細菌轉移至體內之作用，隨含硫數增加而作用遞減。除 DAS 與 GO 有類似之改善 BT 效果外，DATS 甚至在急性及慢性作用中呈現惡化 BT 的情形。(2) 抑制 BT 的機制與抑制腸道微生物之生長無關：不論急性或慢性灌食 GO 或其 OSCs 均不影響腸道(盲囊)中總菌數或格蘭氏陰性菌數，故此並非 GO 抑制 BT 的機制；但是是否與菌相變化有關，仍待進一步釐清。(3) 抑制 BT 的急性作用機制與透過改善氧化壓力及抑制 NO 產生而防止腸黏膜破壞有關，但是抑制 BT 的慢性作用機制卻與這些大蒜成分之抗氧化能力或對於 NO 的抑制作用無關，而可能與免疫調節作用較有關；(4) 長期灌食低劑量 GO 與 DAS 可增加動物淋巴結重及其 cellularity 且 DAS 的作用優於 GO，但是均與 T 細胞釋放 cytokines 的能力無關；在發炎細胞活性方面，低劑量 GO 可藉由降低嗜中性球數及其超氧自由基釋放能力而減緩發炎組織傷害程度，而 DAS 卻可透過降低血液中 IL-1 β 之含量減緩腸黏膜 apoptosis 的發生；反之長期灌食 DATS 或高劑量 GO 均加重與嗜中性球相關之發炎作用機制。且長期灌食 DATS 會在發炎時增加血中促發炎細胞激素含量，且活體外研究結果顯示在發炎狀態下，DATS 對於小腸細胞造成直接的毒性。

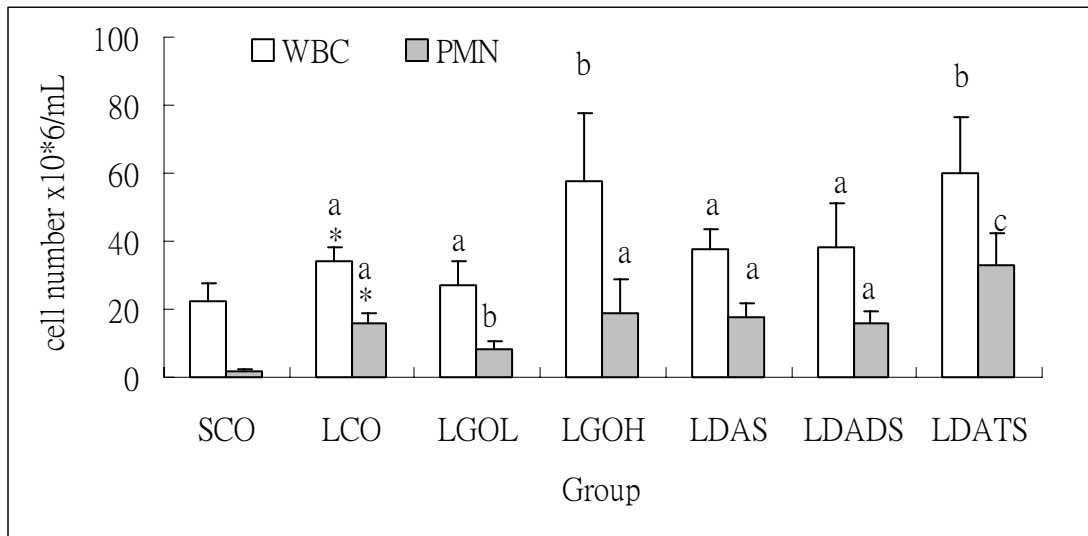
根據這些結果我們提出有待進一步釐清的課題包括：上述大蒜成分對於小腸上皮細胞的細胞毒性，特別 DATS，在正常下與發炎作用下可能存在差異性的影響；另一方面，這些大蒜成分在活體內對於腸道菌相的影響會影響這些微生物對於宿主的致病或保護作用。由於粗略的腸道總菌數及格蘭氏陰性菌的觀察並無法反映出確實的菌相，本研究目前的結果僅能說明這些大蒜成份在腸道內的環境無法顯著抑制腸道微生物的整體生長狀況，未來需進一步了解大蒜成分對於 BT 的改善或惡化作用是否亦可由其對於腸道細菌之生態平衡的影響來解釋。

捌、附錄(附表與附圖)

Table 1. 灌食大蒜精油及不同 OSCs 之大鼠在誘發系統性發炎反應後周邊血中促發炎性細胞激素濃度

	LCO	LGOL	LGOH	LDAS	LDADS	LDATS
TNF- α (pg/mL)	3089 \pm 508 ^a	3762 \pm 568 ^{ab}	3859 \pm 272 ^b	3370 \pm 724 ^{ab}	4050 \pm 345 ^b	3949 \pm 452 ^b
IL-1 β (pg/mL)	172 \pm 44 ^a	134 \pm 54 ^a	250 \pm 34 ^b	74 \pm 32 ^c	174 \pm 27 ^a	348 \pm 78 ^d
IL-6 (pg/mL)	448 \pm 61 ^a	505 \pm 115 ^{ab}	484 \pm 35 ^a	452 \pm 92 ^a	483 \pm 41 ^a	546 \pm 40 ^b

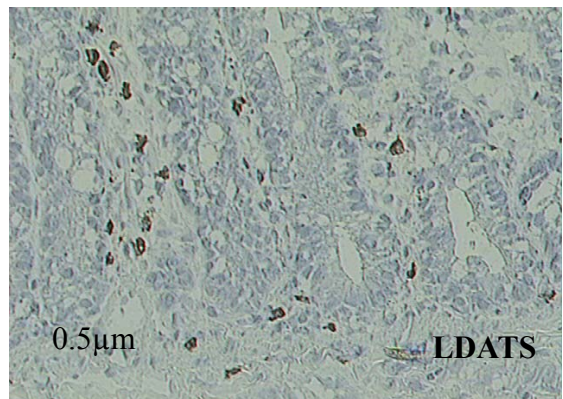
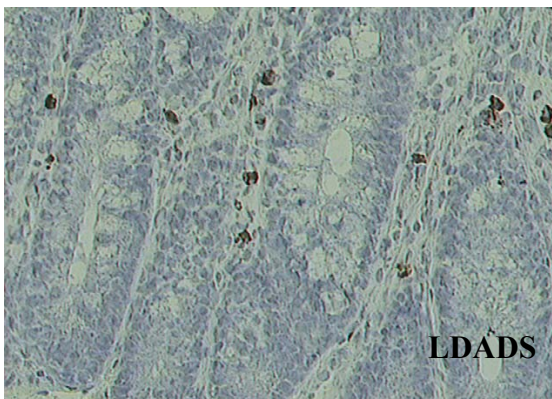
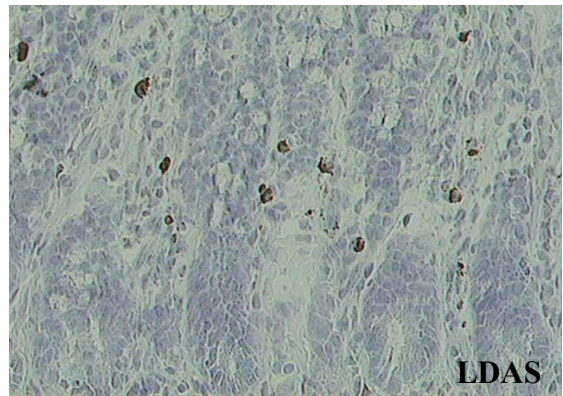
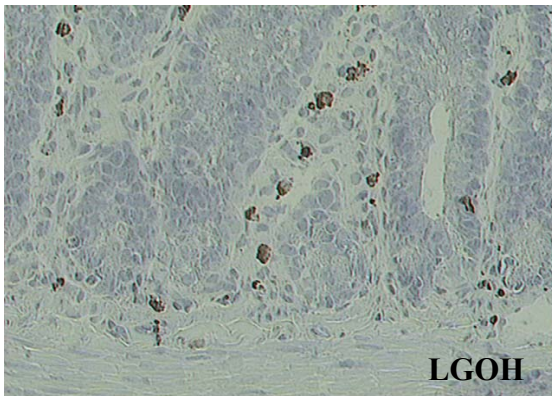
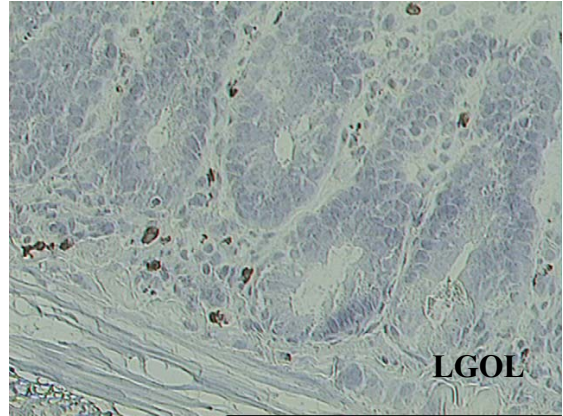
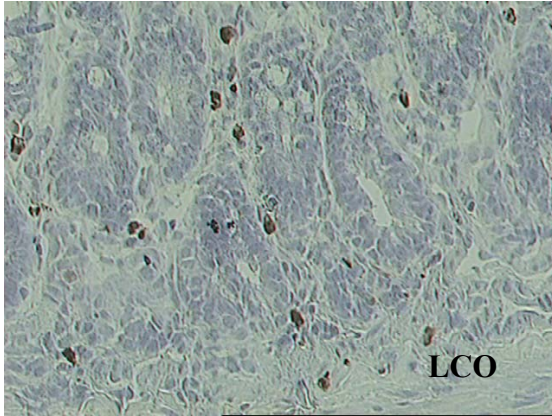
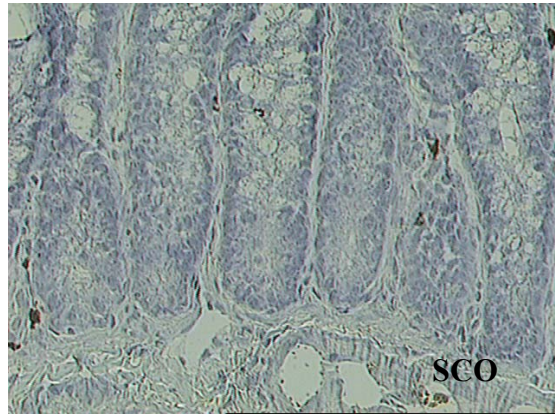
^{abcd} 不同符號表示組間有顯著差異(P<0.05). 數值為 Mean \pm SD



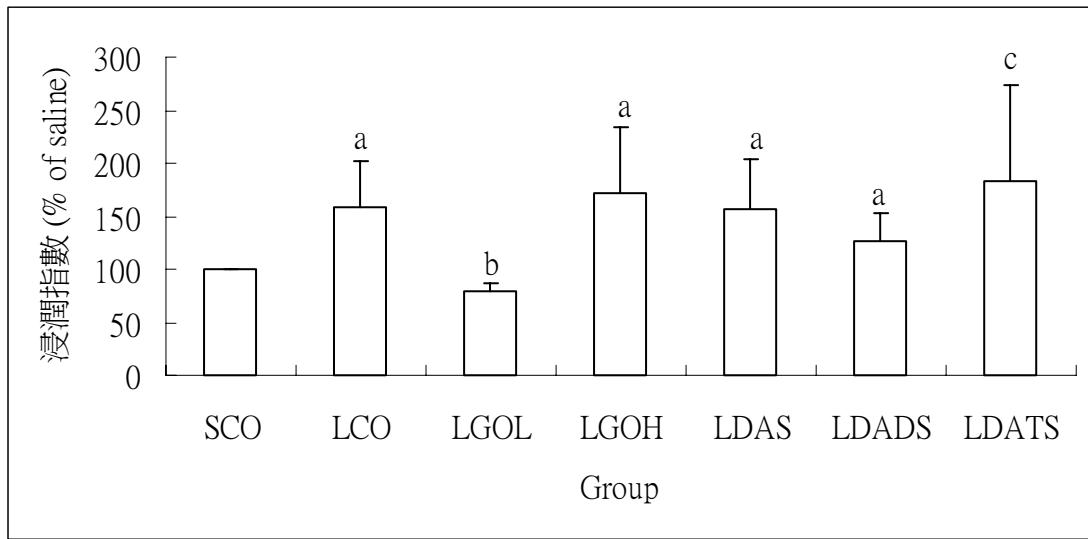
圖一、灌食大蒜精油及其含硫成分對於系統性發炎大鼠血中白血球數之影響

WBC, 總白血球數; PMN, 多形核球數. LPS刺激組 (LCO)與控制組 (SCO)數據以Independent Sample t-test分析兩組間是否有顯著差異;*表示LCO組與SCO組有顯著差異 (p<0.05); LPS刺激組 (LCO、LGOL、LGOH、LDAS、LDADS、LDATS)間數據以one-way ANOVA進行分析,並以Duncan's test分析組間是否有顯著差異。數值為Mean±SD。

(A)

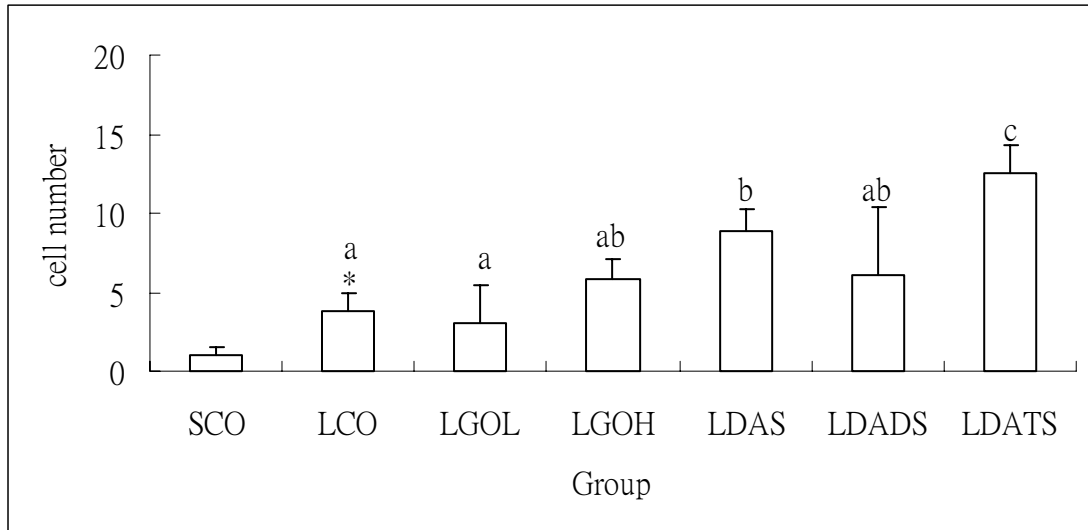


(B)



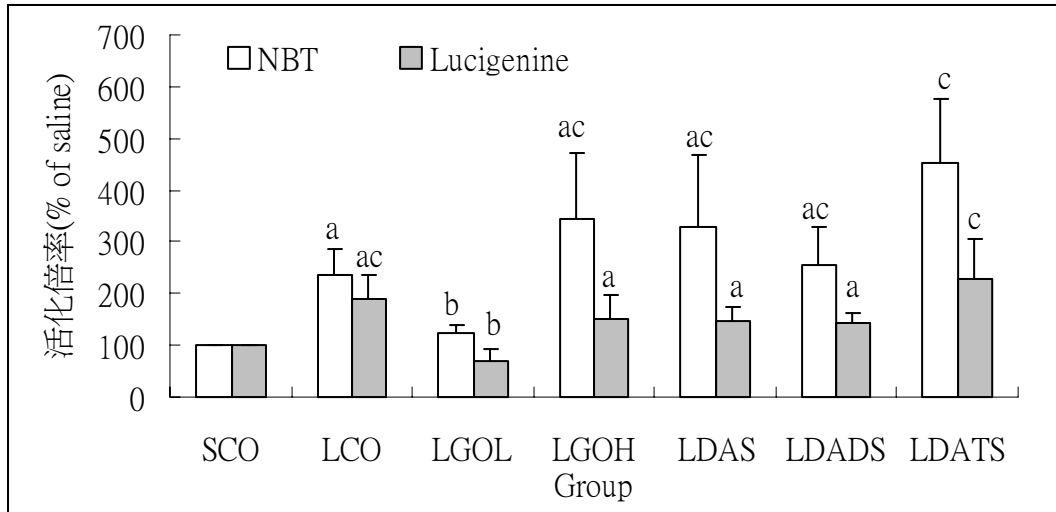
圖二、灌食大蒜精油及其含硫成分對於系統性發炎大鼠迴腸嗜中性球浸潤之影響

(A) MPO(myeloperoxidase)染色觀察迴腸嗜中性球浸潤情形。以光學顯微鏡200倍鏡頭觀察，箭頭指標褐色顆粒即為MPO反應。(B)浸潤指數;在切片圖示上箭頭指標的褐色顆粒。經由影像分析軟體分析後以SCO組為100%計算嗜中性球浸潤指數。LPS刺激組(LCO、LGOL、LGOH、LDAS、LDADS、LDATS)間數據以one-way ANOVA進行分析，並以Duncan's test分析組間是否有顯著差異。LPS刺激組間沒有abc相同字母表示有顯著差異($p < 0.05$)。數值為Mean±SD。



圖三、灌食大蒜精油及其含硫成分對於系統性發炎大鼠血中嗜中性球遷移之影響

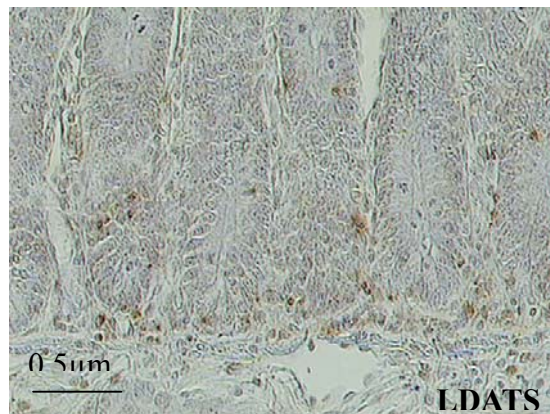
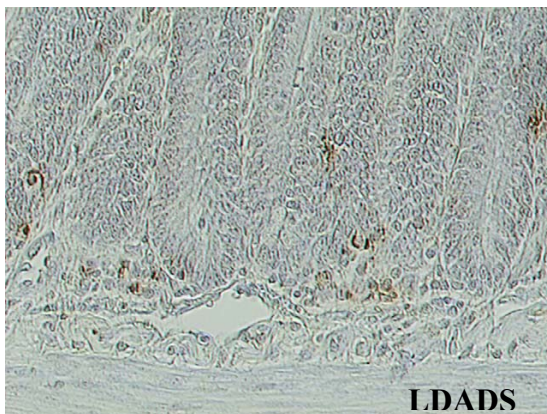
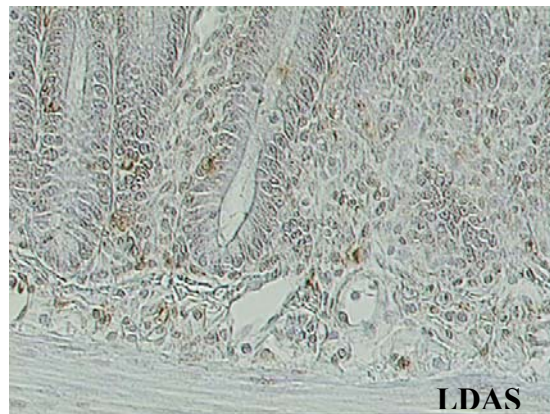
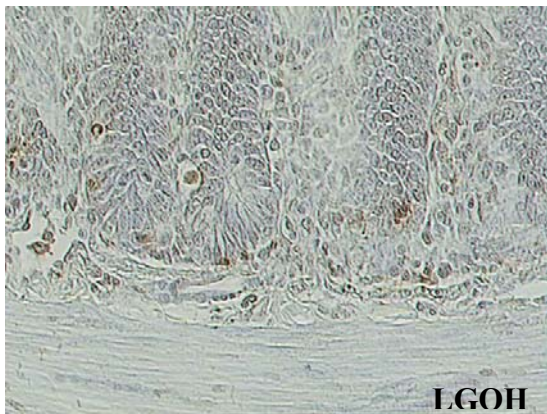
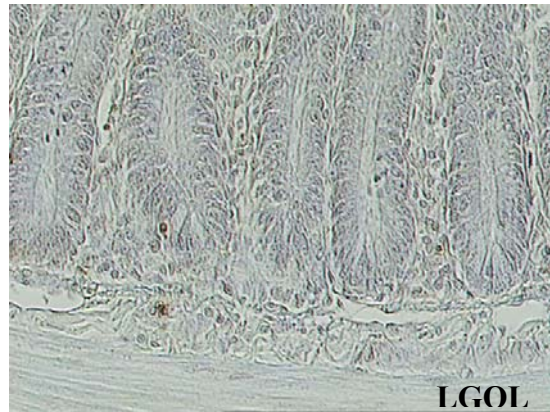
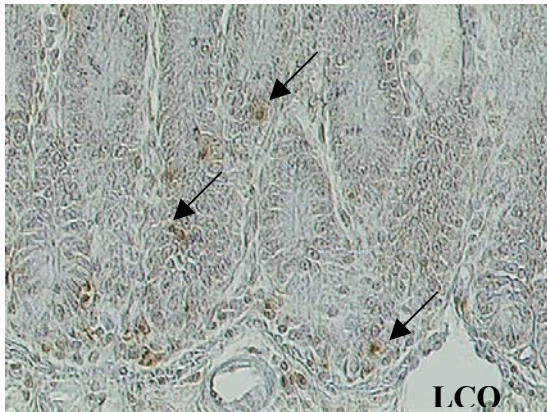
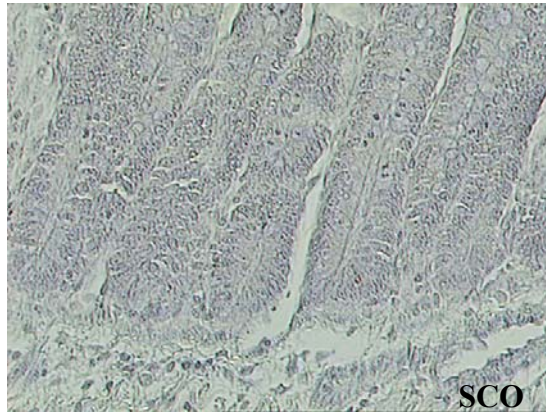
周邊血嗜中性球，觀察在無或有 10^{-9} M PMA 刺激下細胞在 **chemotaxis chamber** 遷移數量，以刺激前後細胞遷移數的差值代表嗜中性球趨化指數。LPS 刺激組 (LCO) 與控制組 (SCO) 數據以 Independent Sample t-test 分析兩組間是否有顯著差異；* 表示 LCO 組與 SCO 組有顯著差異 ($p < 0.05$)；LPS 刺激組 (LCO、LGOL、LGOH、LDAS、LDADS、LDATS) 間數據以 one-way ANOVA 進行分析，並以 Duncan's test 分析組間是否有顯著差異。LPS 刺激組間沒有 abc 相同字母表示有顯著差異 ($p < 0.05$)。數值為 Mean \pm SD。

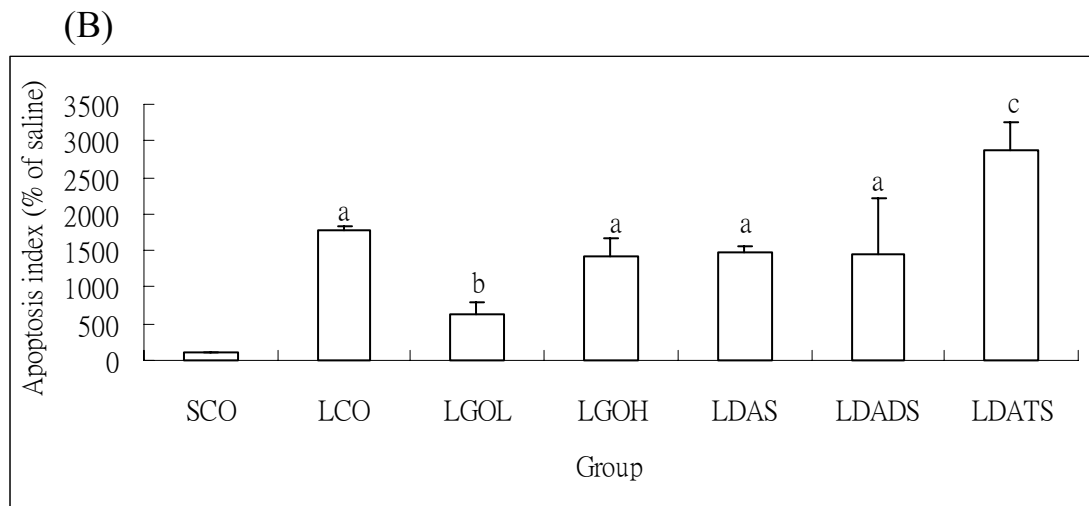


圖四、灌食大蒜精油及其含硫成分對於系統性發炎大鼠血中嗜中性球經 PMA 活化下釋出超氧自由基之影響

(A) 以 NBT 還原法偵測(B)以化學冷光法偵測. LPS 刺激組 (LCO、LGOL、LGOH、LDAS、LDADS、LDATS)間數據以 one-way ANOVA 進行分析，並以 Duncan's test 分析組間是否有顯著差異。LPS 刺激組間沒有 abc 相同字母表示有顯著差異 ($p < 0.05$)。數值為 Mean \pm SD。

(A)





圖五、灌食大蒜精油及其含硫成分對於系統性發炎大鼠迴腸細胞 apoptosis 之影響

(A) TUNEL 染色觀察迴腸細胞 apoptosis 發生情形。以光學顯微鏡 200 倍鏡頭觀察，箭頭指標褐色顆粒即為 apoptosis。(B) apoptosis 指數。LPS 刺激組 (LCO) 與控制組 (SCO) 數據以 Independent Sample t-test 分析組間是否有顯著差異；* 表示 LCO 組與 SCO 組有顯著差異 ($p < 0.05$)；LPS 刺激組 (LCO、LGOL、LGOH、LDAS、LDADS、LDATS) 間數據以 one-way ANOVA 進行分析，並以 Duncan's test 分析組間是否有顯著差異。LPS 刺激組間沒有 abc 相同字母表示有顯著差異 ($p < 0.05$)。數值為 Mean \pm SD。

