

中華民國第 64 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組 動物與醫學學科

第三名

052007

以小鼠模式剖析膳食鹽類與 T 淋巴細胞在發炎
性腸道疾病之功能性連結

學校名稱： 臺北市立麗山高級中學

作者： 高二 邱冠璇	指導老師： 蕭國偉 林獻升
-------------------	-----------------------------

關鍵詞： 發炎性腸道疾病、膳食鉀鹽、T 淋巴細胞

以小鼠模式剖析膳食鹽類與 T 淋巴細胞 在發炎性腸道疾病之功能性連結

摘 要

臺灣發炎性腸道疾病 (IBD) 之年增率高居全球第二，且臺灣人鉀攝取量已被報導為全球最低。本研究主旨為探討膳食鹽類與 T 淋巴細胞在 IBD 中所扮演之角色並發展藥物用於臨床治療。我們首先以 IBD 常用動物模式 DSS 誘發小鼠腸炎建立疾病動物模式並檢測其血中五大電解質，包含鈉、鉀、氯、鈣、鎂之濃度，發現在腸炎早期跟晚期，其血清中鉀濃度均會顯著增加。接著以低鉀飼料進一步證實在腸炎中鉀濃度上升為一種保護機制且低鉀飲食會惡化腸炎發展。同時也利用後天免疫相關基因剔除小鼠證實低鉀飲食會促進 CD4⁺ T 淋巴細胞中發炎激素 IL-17 表現量增加，而保鉀型利尿劑 Spironolactone 則能有效抑制 IL-17 發炎激素表現量進而抑制腸炎發展，證實其治療腸炎可行性以及未來臨床上可運用在 IBD 之治療。

關鍵詞：發炎性腸道疾病、膳食鉀鹽、T 淋巴細胞

壹、前言

一、研究動機

發炎性腸道疾病 (Inflammatory Bowel Disease, IBD) 是一種免疫性疾病，其症狀包含腹痛、體重減輕、腹瀉、血便等 (Neurath, 2019)，並會增加罹患大腸直腸癌的風險 (Dyson & Rutter, 2012)，目前 IBD 在臨床上的治療方式包括使用氨基水楊酸、皮質類固醇、抗生素、免疫調節劑等，然而這些治療方法對某部份患者沒有反應或於治療後失去療效 (Hazel & O' Connor, 2020)。在 2017 年 Ng et al. 發表於 *The Lancet* 雜誌的一篇論文提到 IBD 在過去十年中已成為全球重要的公共衛生健康議題，且主要盛行於新興工業化國家以及高度工業化國家，像是北美、澳大利亞與大多數歐洲國家 (Ng et al., 2017)；發展中國家的 IBD 發病率處於少數患病個案階段，新興工業化國家處於加速發病階段，高度工業化國家的發病及患病率較高且有逐漸平穩的現象 (Kaplan & Windsor, 2021)。

而相關研究進一步分析歐洲地區發現，在地中海沿岸國家的 IBD 盛行率較其他歐洲國家低 (Ng et al., 2017)。由於飲食習慣影響著 IBD 的發展，過去文獻發現在地中海附近國家盛行的地中海飲食，主要以攝入大量富含鉀離子的蔬菜水果為特徵，其會促使 Treg cell 和 Th17 cell 平衡，進而穩定腸道免疫系統 (Khalili et al., 2018)。

南韓與臺灣兩者工業化程度相差不多，但是南韓的 IBD 年增率呈現減低的趨勢，臺灣卻呈現高度成長且年增率位居全球第二，僅次於巴西 (Ng et al., 2017)，而經過統計卻發現，在全球五十多個國家中，臺灣人的每日鉀攝取量不到 2 公克，在此排名中為倒數第一，遠低於世界衛生組織 (WHO) 所建議的每日鉀攝取量 3.5 公克 (Reddin et al., 2023)。

先天免疫系統與後天免疫系統是人體抵抗病原體的兩種重要機制；先天免疫系統是非專一性、無記憶性的防禦功能，包括物理屏障、化學因子、吞噬細胞等，可以迅速地對抗各種病原體，而後天免疫系統是專一性、有記憶性的防禦功能，包括體液免疫和細胞媒介免疫等，可以識別並針對特定的病原體啟動免疫反應，並在再度感染時產生更強的抵抗力。目前 IBD 的發病機制尚未被完全釐清，然而已有相關文獻指出後天免疫系統在其發病機制中扮演關鍵的角色 (Geremia et al., 2014)。

綜合上述，IBD 在臺灣高度持續成長是否與每日膳食鉀鹽攝取不足有關則為本研究

探討方向，膳食鉀鹽攝取不足是否為造成 IBD 的危險因子？本研究亦進一步探討膳食鹽類與後天免疫系統在腸炎中之相關性，故以小鼠動物模式來探討膳食鹽類與 IBD 的關係並剖析其在後天免疫系統中的相關調控機轉，希望藉此找尋有效治療 IBD 之新方法。

二、研究目的

- (一) 探討膳食鹽類與發炎性腸道疾病之關係
- (二) 探討在後天免疫系統中，膳食鹽類對於發炎性腸道疾病之影響
- (三) 找尋有效治療發炎性腸道疾病之方法

貳、研究設備及器材

本研究所使用之設備及器材與其用途簡介如表一。

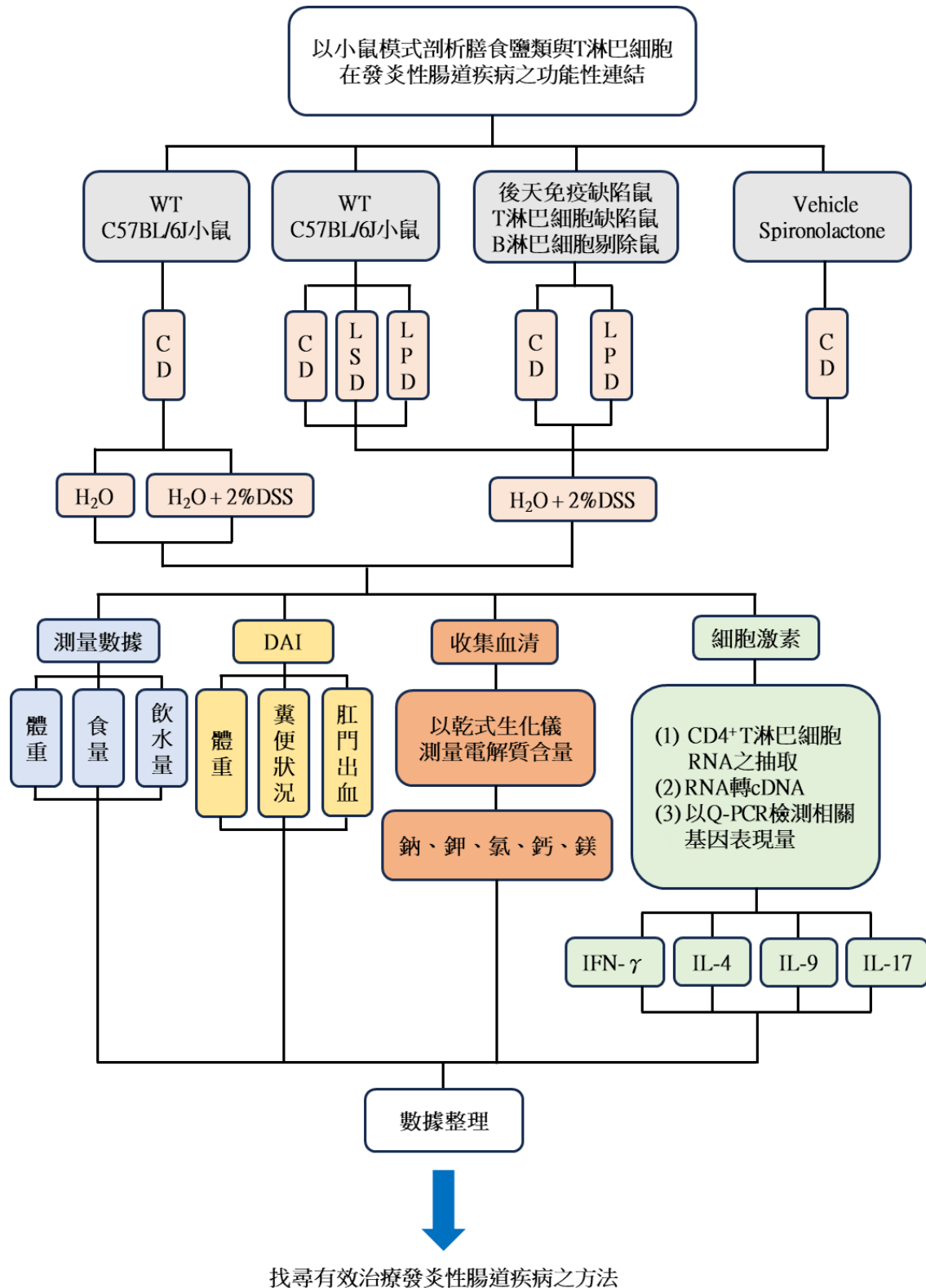
表一、研究設備及器材

(表一資料來源：作者整理)

名稱	用途
Dextran Sulfate Sodium (DSS)	誘導小鼠腸炎
Control Diet (CD) D10001i (K=0.36%) (Na=0.12%)	小鼠飼料
Low Sodium Diet (LSD) D02051701i (Na<0.03%)	小鼠飼料
Low Potassium Diet (LPD) D05112204i (K<0.03%)	小鼠飼料
核酸潔淨操作台	實驗用
高速離心機	離心
烘箱	烘乾液體
微量分光光度計	測 DNA 與 RNA 濃度
4 度冰箱	檢體保存
-30 度冰箱	檢體保存
-80 度冰箱	檢體保存
聚合酶連鎖反應儀	PCR
微波爐	製作膠體
電磁加熱攪拌器	攪拌溶液
電泳盒	進行核酸電泳
乾式生化儀	測電解質濃度
乾浴器	加熱
QuantStudio 7 Real-Time PCR System	Q-PCR

參、研究過程或方法

本研究之實驗流程如圖一。



圖一、實驗流程圖

(圖一資料來源：作者繪製)

一、動物實驗

(一) 小鼠模型

小鼠來源於國家動物中心所購買之野生型 (Wild Type, WT) C57BL/6J 小鼠、The Jackson Laboratory 購買回來繁殖之 B6.*Rag2*^{-/-}小鼠以及 B6.*Tcra*^{-/-}小鼠，B 淋巴細胞剔除鼠模型為施打 Anti-B220+Anti-CD19 之 WT 小鼠，自出生第七~八週開始進行實驗。

(二) IBD 動物模式

餵食小鼠含有 DSS 的飲用水，為研究 IBD 最廣泛的實驗模型，其具快速、簡單、可重複性以及可控性之優點。DSS 會導致腸道上皮細胞損傷而改變腸道通透性，造成細胞凋亡，破壞腸道屏障功能 (barrier function) 與黏蛋白 (mucin)，使腸道內微生物菌群 (microbiome) 進入黏膜與免疫反應交互作用，誘導小鼠產生腸炎 (Eichele & Kharbanda, 2017)。DSS 含量低於 2%時症狀較不明顯，高於 2%時小鼠致死率較高，故本研究利用含有 2% DSS 飲用水建立疾病動物模式，於實驗結束後更換回一般飲用水，其症狀會有改善之現象。

(三) 小鼠飼料

本研究使用 Research Diets, Inc.的 OpenSource Diets，餵食小鼠不同鹽類比例飼料以及一般飲用水或含有 2% DSS 飲用水，以每籠 2 到 4 隻小鼠做為一實驗單位。每週更換一次飼養籠，飼料以及一般飲用水或含有 2% DSS 的飲用水分別在飼養第 0 天與第 3 天更換，並記錄剩餘飼料重量及飲水量。

二、小鼠基因型鑑定

(一) 小鼠腳趾溶解

將小鼠腳趾樣本置於微量離心管中並於室溫離心 (25°C, 12000 rpm, 1 分鐘)，避免腳趾樣本附著在管壁，接著將 Proteinase K (PK) 配置於 Proteinase K Buffer (PK buffer) 中 (20 μ L PK/1 mL PK buffer)，取 200 μ L 配置好的溶液加入各內含樣本的

微量離心管中，最後將其置於 60°C 烘箱，待隔日小鼠腳趾溶解。

(二) DNA 萃取

從烘箱內取出小鼠腳趾樣本震盪混合後離心 (25°C, 12000 rpm, 5 分鐘)，使組織沉澱，加入上清液 50 μ L 於裝有 200 μ L 100% 酒精的微量離心管中，離心 (25°C, 12000 rpm, 10 分鐘)。再來倒出微量離心管中的酒精，並以擦手紙吸乾微量離心管上多餘的酒精，將打開蓋子的微量離心管置於架上，接著蓋上保鮮膜並放入 60°C 烘箱，經過 30 分鐘烘乾，使酒精完全揮發。之後加入 102 μ L QH_2O 於微量離心管，再透過微量分光光度計進行 DNA 濃度檢測，將 DNA 濃度調整至 100 ng/mL，最後保存於 4°C 冰箱。

(三) 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

配置含有 2x Master Mix 與 Primer 之混合液 (8.5 μ L QH_2O + 1.5 μ L DMSO + 12.5 μ L 2X Master Mix + 0.5 μ L Primer)。分別取 23 μ L 之混合液與 2 μ L 小鼠腳趾 DNA 溶液於 0.2 mL 的微量離心管，並標示編號後，將其置於聚合酶連鎖反應儀上，接著調整參數值，進行反應。

(四) 製作電泳膠體

加入 1X TAE 以及 Agarose (2 g Agarose/100 mL 1X TAE) 於放有攪拌子之血清瓶中，測量其重量並歸零，將血清瓶放入微波爐中加熱至沸騰後取出，放在先前已歸零的秤上，因微波加熱時會使水蒸發，故需加入 QH_2O 至原始秤量的重量，接著放置血清瓶於電磁加熱攪拌器上，觀察其體積並加入安全染劑 (每 20 mL 溶液加入 1 μ L 安全染劑)，攪拌冷卻約 20 至 30 分鐘後，倒入裝有齒刷的製膠模具中。凝固後，取出膠的齒刷，將膠體放入電泳盒內，倒入 0.5X TAE 蓋過膠體，接著加入 25 μ L 的 sample 以及 15 μ L 的 marker，待 marker 跑到倒數第二條線時停止，取出膠體並用紫外線照射結果，確認小鼠基因型。

以下為 Primer 資訊：

Rag2-WT	(F) CTGACTGCCTACCCCATGTT (R) CCATGTTGCTTCCAAACCAT
Rag2-KO	(F) AATTCGCCAATGACAAGACG (R) CCATGTTGCTTCCAAACCAT
Tcra-WT	(F) TGACTCCCAAATCAATGTGC (R) GGTGAGATGACCCAAAGCAG
Tcra-KO	(F) TGACTCCCAAATCAATGTGC (R) CTACCCGCTTCCATTGCTC

三、檢測電解質濃度

(一) 收集小鼠血清

自小鼠尾巴採血，置於 1.5 mL 微量離心管中，於 37°C 培養箱中培養 30 分鐘，待其凝血。以離心（25°C, 3000 rpm, 10 分鐘）使血液分層。取全部上清液加入新的 1.5 mL 微量離心管，在 4°C 下以 3000 rpm 離心 10 分鐘，並收集上清液。此上清液即為小鼠血清，分裝後保存於 -80°C 冰箱。

(二) 檢測電解質濃度

從 -80°C 冰箱中拿出血清並放置於冰上，開啟乾式生化儀，將乾式試片裝進乾式生化儀中，接著設定樣品種類及編號，依照欲檢測之電解質，於不同試片上加入 50 μ L 或 15 μ L 血清，以乾式生化儀檢測電解質濃度。

四、檢測 CD4⁺ T 淋巴細胞之相關基因表現

(一) RNA 之抽取

由小鼠尾巴血純化出 T 淋巴細胞後，加入 RA-1 與 2-mercaptoethanol 之混合溶液 500 μ L（1 μ L 2-mercaptoethanol/100 μ L RA-1）並離心（11000x g, 2 分鐘），取 350 μ L 上清液加入裝有 nucleospin filter 的微量離心管中過濾後離心（11000x g, 1 分鐘），取出 nucleospin filter，加入 350 μ L 酒精混合均勻，並將其加入 nucleospin RNA column

後離心（11000x g, 30秒），接著移至新的微量離心管並加入350 μ L Membrane Desalting Buffer(MDB) 離心（11000x g, 1分鐘），再移至新的微量離心管後加入95 μ L的reconstituted rDNase與reaction buffer for rDNase混合溶液（reconstituted rDNase：reaction buffer for rDNase=1：9），放置於室溫下15分鐘，待DNA移除後，加入200 μ L RAW2並離心（11000x g, 30秒）。將nucleospin RNA column移至新的微量離心管，重複此動作兩次，並在期間分別加入600 μ L RAW3、250 μ L RAW3以及32 μ L RNase-free H₂O，且皆需離心（11000x g, 30秒、2分鐘、1分鐘），離心後以微量分光光度計測量RNA濃度，並將所有樣本調至相同濃度。

（二）RNA 轉 cDNA

加入濃度為 500 ng 的 RNA 樣本到新的微量離心管中，並以 RNase-free H₂O 補足體積至 19.5mL，同時開啟乾浴器設置 65°C，接著加入 2 μ L cDNA Primer mix 於每管 RNA 樣本後加熱（65°C, 5 分鐘），再放置於冰上五分鐘。加入 9 μ L 混合液（1 μ L DTT+1 μ L RNase out+1 μ L SS III+6 μ L 5x buffer）於 RNA 樣本，50°C 加熱 1 小時，再以 70°C 加熱 15 分鐘，將製備完成之 cDNA 置於-30°C 冰箱保存。

（三）即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, Q-PCR)

準備新的微量離心管並標示編號，從-30°C冰箱中拿出cDNA樣本稀釋，混合均勻後，於384-well plate孔中加入15 μ L混合液（10 μ L 2X SYBR+0.6 μ L Primer+4.4 μ L QH₂O），再加入5 μ L稀釋完畢之cDNA樣本於對應位置後離心（25°C, 2000 rpm, 2分鐘），最後放入QS7中反應。

以下為Primer資訊：

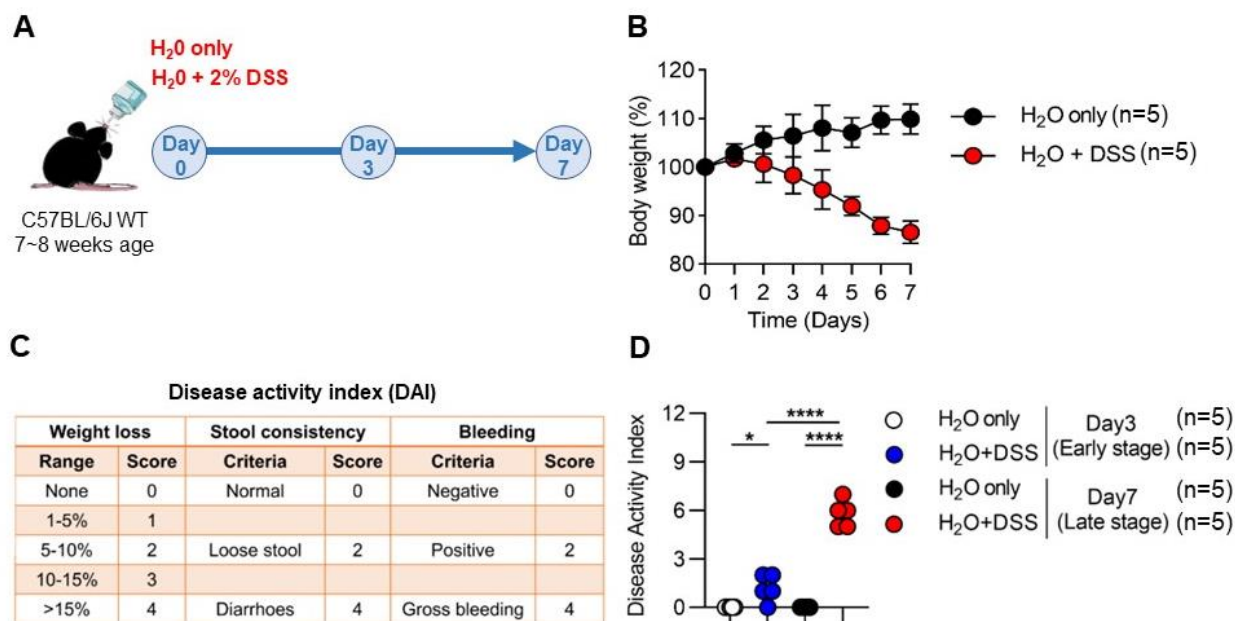
IFN- γ	(F) A T C T G G A G G A A C T G G C A A A A (R) T T C A A G A C T T C A A A G A G T C T G A G G
IL-4	(F) G A G A G A T C A T C G G C A T T T T G A (R) T C T G T G G T G T T C T T C G T T G C

IL-9	(F) GTCTCTCCGTCCCAACTGATG (R) GATTTCTGTGTGGCATTGGTC
IL-17	(F) CTCCAGAAGGCCCTCAGACTA (R) CTTTCCCTCCGCATTGACAC

肆、研究結果與討論

一、建立 DSS 誘發小鼠腸炎之疾病模式

DSS 是一種人工合成的硫酸鈉，其可模擬人類的 IBD，具反應快速、操作簡單、可重複性以及可控性之優點，因此已被廣泛用於相關研究，當小鼠飲用含有 DSS 的飲用水時，小鼠腸道上皮細胞的屏障功能會被破壞，進而增加腸道通透性，除此之外，DSS 也會抑制黏蛋白的分泌，降低腸道黏膜的保護作用 (Eichele & Kharbanda, 2017)。上述因素會導致腸道內微生物菌群的不平衡，致使有害微生物入侵腸道上皮，並刺激免疫系統產生過度的發炎反應，經過一段時間的作用下，會導致小鼠出現腸道出血、腹瀉、體重減輕等嚴重之腸炎症狀 (Eichele & Kharbanda, 2017)。本研究利用觀察小鼠體重變化與疾病活動指數 (Disease Activity Index, DAI) 作為評估小鼠腸炎發展的主要指標，我們透過體重減輕程度、糞便狀況以及肛門是否出血作為 DAI 的評分項目，分數越高代表小鼠腸炎發展越嚴重，在體重減輕程度中，小鼠體重減少原體重的 1%到 5%為 1 分，5%到 10%為 2 分，10%到 15%為 3 分，大於 15%則為 4 分；在糞便狀況中，小鼠軟便為 2 分，有腹瀉現象則為 4 分；在肛門出血狀況中，輕微出血為 2 分，大出血則為 4 分 (圖二 C)，為探討在 DSS 誘發小鼠腸炎之疾病模式中，如何影響小鼠體重變化以及 DAI。我們分別給予 WT 小鼠一般飲用水以及含有 2% DSS 飲用水，且皆餵食一般飼料，我們自給予 WT 小鼠飲用含有 2% DSS 飲用水的第 1 天 (飼養第 0 天) 開始測量體重並記錄 DAI 至飼養第 7 天 (圖二 A)。發現飲用一般飲用水的 WT 小鼠組別，其體重有上升的現象，而飲用含有 2% DSS 飲用水的 WT 小鼠組別，其體重在飼養第 3 天 (早期疾病發展) 低於首次測量之體重，呈現下降的情形，在飼養第 7 天 (晚期疾病發展) 則有更明顯之體重減輕程度，並低於首次測量體重之 90% (圖二 B)。接著我們發現飲用含有 2% DSS 飲用水的 WT 小鼠組別 DAI 在飼養第 3 天 (早期疾病發展) 時與飼養第 0 天相比有顯著增加，而在飼養第 7 天 (晚期疾病發展) 之 DAI 則較飼養第 3 天 (早期疾病發展) 更高於飼養第 0 天，代表 DAI 隨著腸炎發展會有逐漸上升的情形 (圖二 D)，顯示 DSS 誘發小鼠腸炎會使體重下降並造成 DAI 上升，且會隨著時間增長而更加明顯，到晚期會有更嚴重之現象。



圖二、建立 DSS 誘發小鼠腸炎之疾病模式

- (A) 將 WT 小鼠依照分別給予一般飲用水和含有 2% DSS 飲用水作為分組依據，共兩組，且皆餵食一般飼料，於飼養第 0 天至飼養第 7 天每日測量體重與 DAI。
- (B) WT 小鼠於飼養第 0 天到飼養第 7 天體重變化百分比。飲用含有 2% DSS 飲用水的小鼠組別，其體重有下降情形，且隨著疾病發展，晚期則有更明顯之體重減輕程度。
- (C) 小鼠疾病活動指數 (DAI) 評分項目及標準。DAI 分數越高代表其症狀越嚴重。
- (D) WT 小鼠於飼養第 3 天（疾病早期）與飼養第 7 天（疾病晚期）之 DAI 情形。疾病晚期的 DAI 分數較早期高。

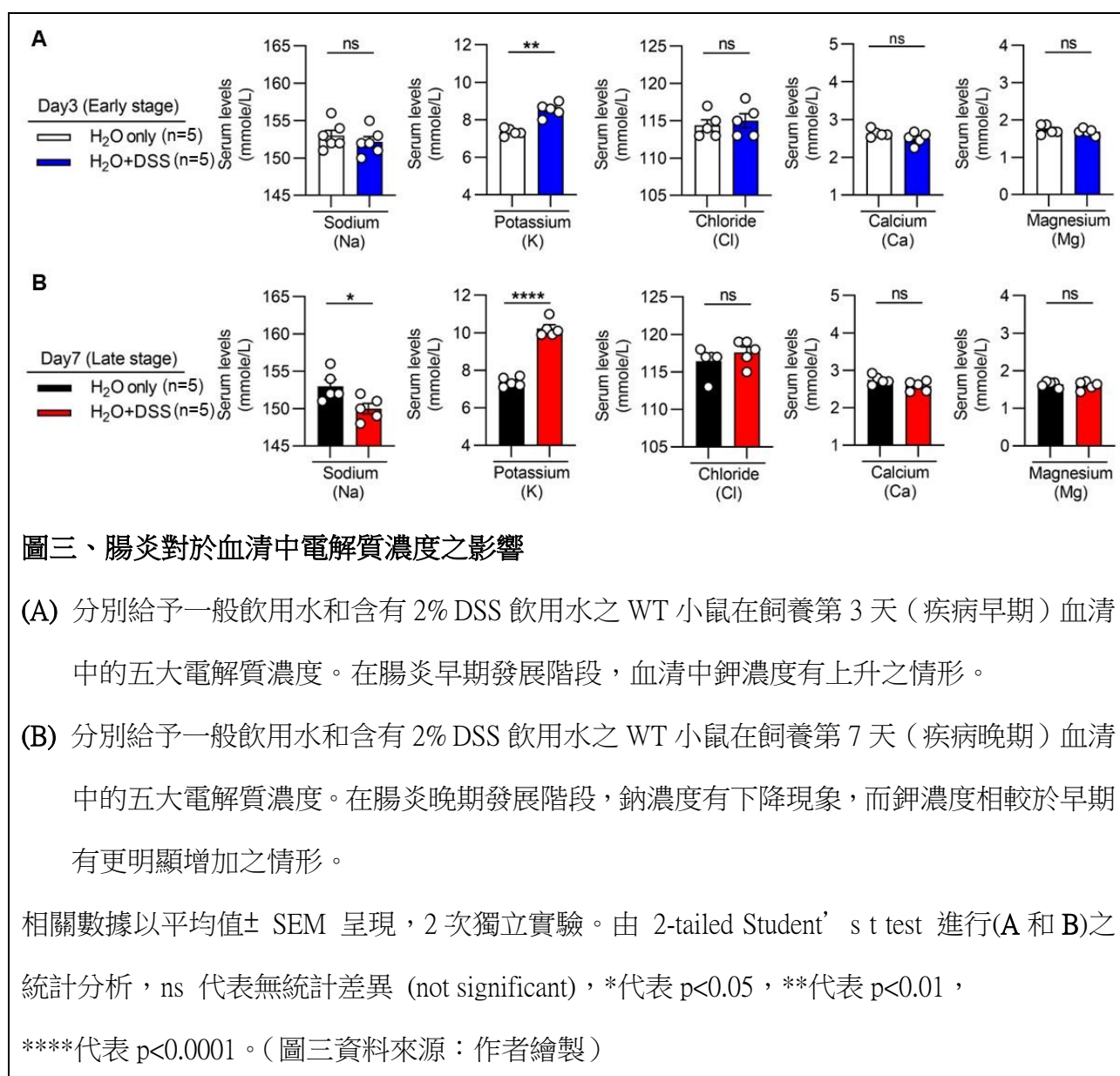
相關數據以平均值± SEM 呈現，2 次獨立實驗。由 two-way ANOVA with Tukey' s multiple comparisons test 進行(B)之統計分析或由 one-way ANOVA with Tukey' s multiple comparisons test 進行(D)之統計分析，*代表 p<0.05 ，****代表 p<0.0001。

（圖二資料來源：作者整理及繪製）

二、探討腸炎對於血清中電解質濃度之影響

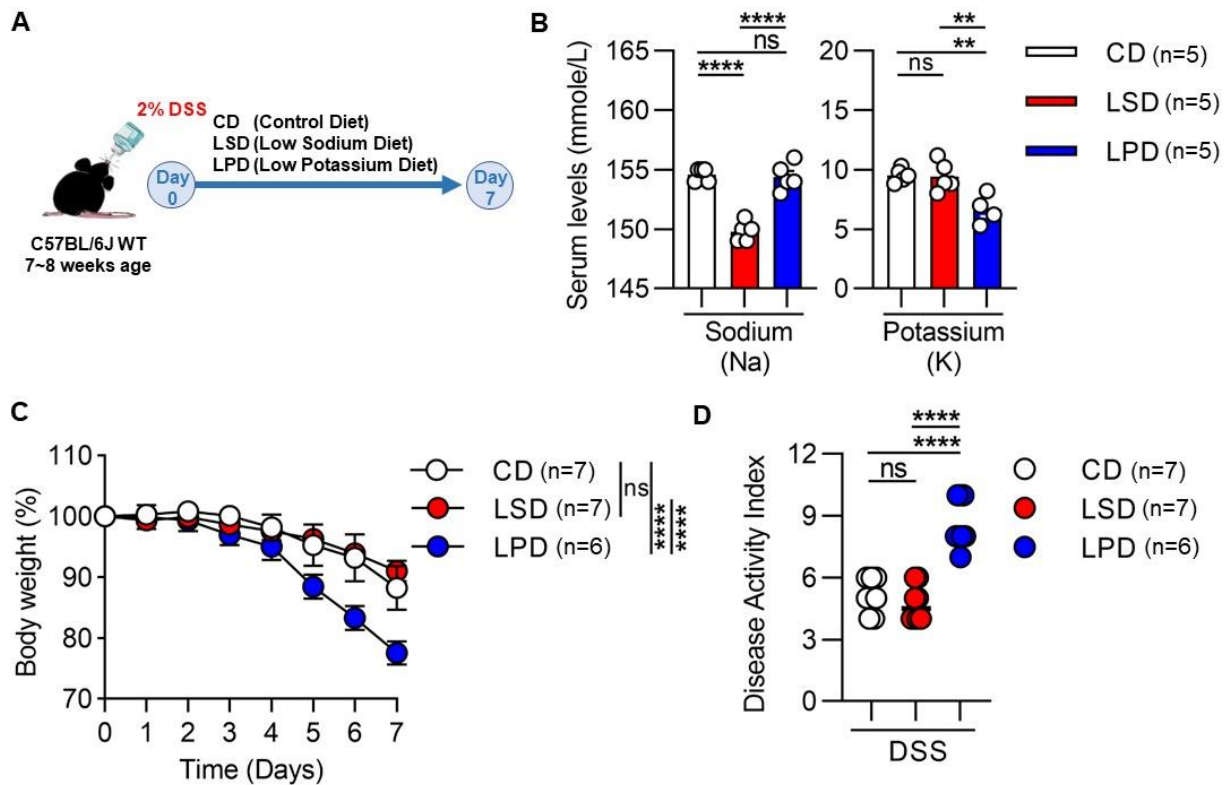
由於相關文獻提到 IBD 盛行率較低的地中海沿岸國家，其盛行的地中海飲食，主要以攝入大量富含鉀離子的蔬菜水果為特徵，可穩定腸道免疫系統 (Khalili et al., 2018)，故想進一步探討體內電解質與腸炎之關係。本研究在給予 WT 小鼠飲用含有 2% DSS 飲用

水之飼養第 3 天以及飼養第 7 天收集小鼠血液，分離出血清後，利用乾式生化儀檢測血中前五大電解質，包含鈉、鉀、氯、鈣、鎂之濃度。結果發現飲用含有 2% DSS 飲用水的 WT 小鼠組別在飼養第 3 天，其血清中的鉀濃度較飲用一般飲用水的 WT 小鼠組別高，此外，鈉、氯、鈣、鎂濃度則與之無顯著差異（圖三 A），而在飼養第 7 天時，飲用含有 2% DSS 飲用水的 WT 小鼠組別之血清中鈉濃度有下降的現象，且其血清中的鉀濃度相較於飼養第 3 天有更顯著升高之情形（圖三 B），表示在腸炎發展過程中，會導致血清中的鉀濃度上升以及鈉濃度下降。由實驗結果可得知，在腸炎早期及晚期時，皆會造成血中鉀濃度上升，鈉濃度則是在晚期有下降的情形。



三、探討鈉與鉀在腸炎中所扮演的角色

由前述研究結果（圖三）可得知，在腸炎發展過程中，會造成血中鈉濃度下降以及鉀濃度上升的情況發生。為探討鈉與鉀在腸炎發展過程中所扮演的角色，本研究使用 Research Diets, Inc. 的 OpenSource Diets，分別餵食 WT 小鼠對照飼料、低鈉飼料與低鉀飼料，且皆給予含有 2% DSS 的飲用水。我們自給予 WT 小鼠飲用含有 2% DSS 飲用水的第 1 天（飼養第 0 天）開始測量體重並記錄 DAI 至飼養第 7 天（圖四 A），並在飼養第 7 天分離小鼠血清，檢測血清中鈉與鉀的濃度。結果發現低鈉飲食及低鉀飲食的小鼠組別會分別造成血清中鈉濃度與鉀濃度減少，且低鈉飲食中的鈉濃度下降並不會使鉀濃度產生變化，低鉀飲食中的鉀濃度下降也不會使鈉濃度產生變化（圖四 B）。在體重變化的部分，對照飲食以及低鈉飲食所造成之體重減輕程度並無顯著差異，而低鉀飲食相較於對照飲食以及低鈉飲食，有較顯著之體重減輕現象，且在飼養第 7 天時，體重已低於首次測量體重之 80%（圖四 C）。接著進一步觀察小鼠 DAI，發現低鉀飲食較對照飼料以及低鈉飼料的小鼠組別有較高的 DAI，食用對照飼料以及低鈉飼料的小鼠組別，兩者的 DAI 則無顯著差異（圖四 D）。從上述結果可得知低鉀飲食會降低血清中的鉀濃度並導致腸炎惡化，顯示在腸炎發展過程中，所造成之血清中的鉀濃度上升（圖三），可能為一種保護機制來抑制腸炎的發展，如果強制降低血鉀則會惡化疾病發展。



圖四、低鉀飲食會降低血清中鉀濃度並導致腸炎惡化

(A) 將 WT 小鼠依照餵食對照飼料 (CD)、低鈉飼料 (LSD)、低鉀飼料 (LPD) 作為分組依據，共三組，且皆給予含有 2% DSS 飲用水，於飼養第 0 天至飼養第 7 天每日測量體重與 DAI。

(B) 2% DSS 誘導腸炎之 WT 小鼠於飼養第 7 天血清中鈉離子與鉀離子濃度。低鈉飲食及低鉀飲食會分別造成血清中鈉濃度與鉀濃度下降。

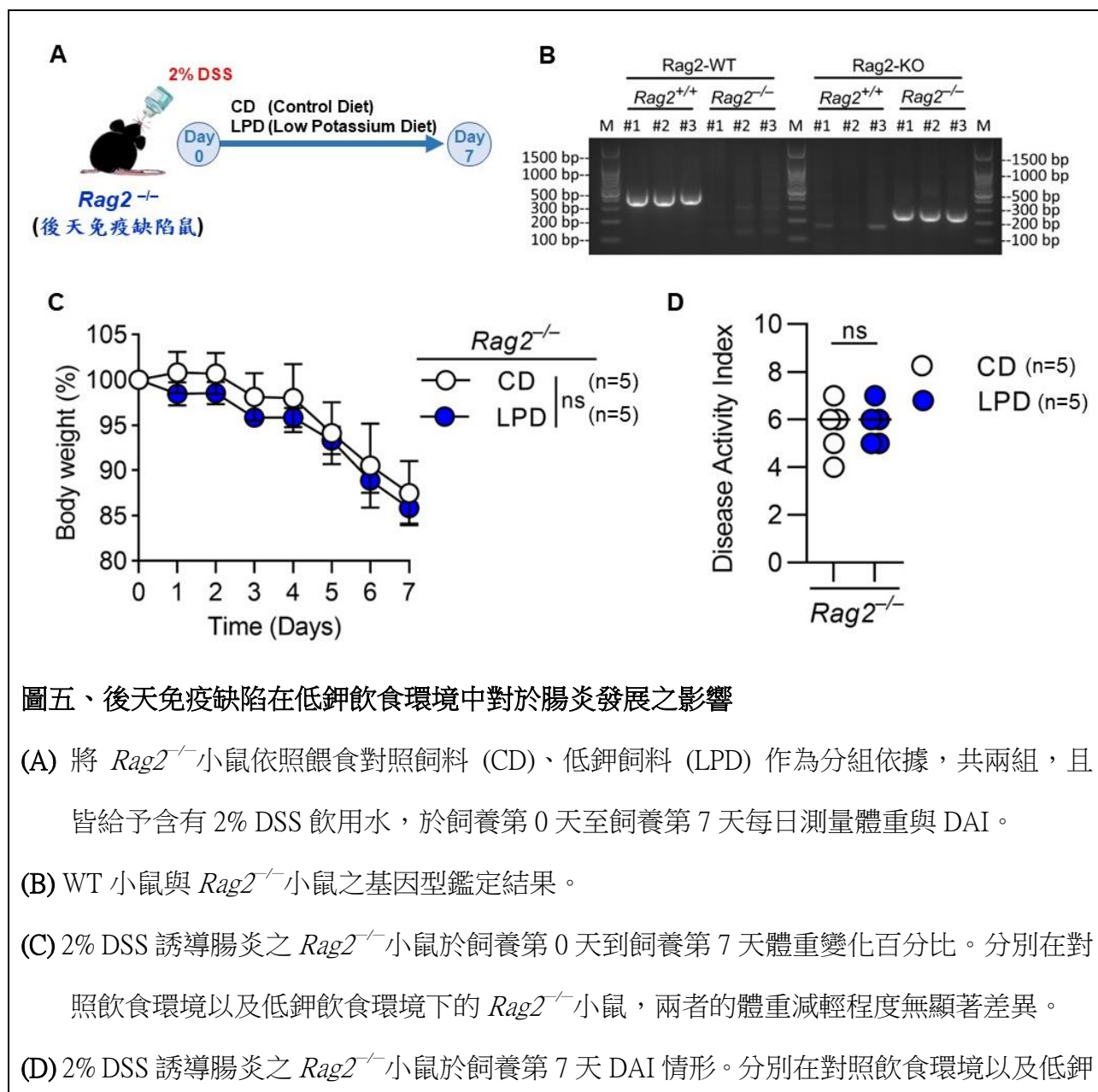
(C) 2% DSS 誘導腸炎之 WT 小鼠於飼養第 0 天到飼養第 7 天體重變化百分比。低鉀飲食組別小鼠相較於對照飲食組別以及低鈉飲食組別的小鼠，有較顯著之體重減輕現象。

(D) 2% DSS 誘導腸炎之 WT 小鼠於飼養第 7 天 DAI 情形。低鉀飲食組別小鼠相較於對照飲食組別以及低鈉飲食組別的小鼠，有較高之 DAI 分數，說明低鉀飲食會造成較嚴重之腸炎發展。

相關數據以平均值 $\pm$ SEM 呈現，2 次獨立實驗。由 one-way ANOVA with Tukey' s multiple comparisons test 進行 (B 和 D)之統計分析或由 two-way ANOVA with Tukey' s multiple comparisons test 進行(C)之統計分析，ns 代表無統計差異 (not significant)，**代表 $p < 0.01$ ，****代表 $p < 0.0001$ 。(圖四資料來源：作者繪製)

四、探討後天免疫系統在低鉀飲食環境對於腸炎之影響

本研究利用 $Rag2^{-/-}$ 小鼠作為實驗動物模型（圖五 A 和 B），其體內缺乏重組激活基因 2 (RAG-2)，會使 B 淋巴細胞與 T 淋巴細胞無法成熟，具有後天免疫缺陷之特性，接著分別餵食其對照飼料以及低鉀飼料，且皆給予含有 2% DSS 飲用水。我們自給予 $Rag2^{-/-}$ 小鼠飲用含有 2% DSS 飲用水的第 1 天（飼養第 0 天）開始測量體重並記錄 DAI 至飼養第 7 天（圖五 A）。結果發現分別在對照飲食環境以及低鉀飲食環境下的 $Rag2^{-/-}$ 小鼠，兩者的體重減輕程度與 DAI 皆無顯著差異（圖五 C 和 D）。從上述結果可得知後天免疫缺陷會使低鉀飲食所造成之腸炎惡化現象消失，顯示後天免疫系統在低鉀飲食所造成之腸炎惡化中扮演重要角色。



圖五、後天免疫缺陷在低鉀飲食環境中對於腸炎發展之影響

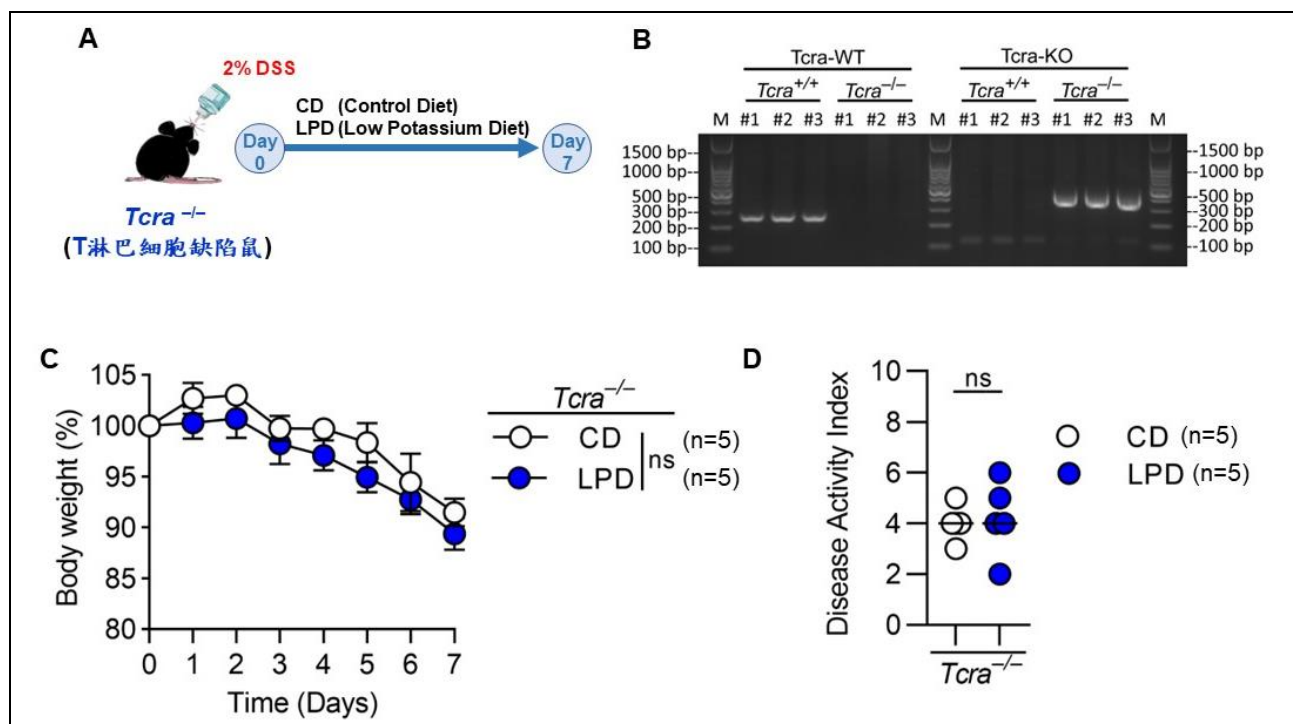
- (A) 將 $Rag2^{-/-}$ 小鼠依照餵食對照飼料 (CD)、低鉀飼料 (LPD) 作為分組依據，共兩組，且皆給予含有 2% DSS 飲用水，於飼養第 0 天至飼養第 7 天每日測量體重與 DAI。
- (B) WT 小鼠與 $Rag2^{-/-}$ 小鼠之基因型鑑定結果。
- (C) 2% DSS 誘導腸炎之 $Rag2^{-/-}$ 小鼠於飼養第 0 天到飼養第 7 天體重變化百分比。分別在對照飲食環境以及低鉀飲食環境下的 $Rag2^{-/-}$ 小鼠，兩者的體重減輕程度無顯著差異。
- (D) 2% DSS 誘導腸炎之 $Rag2^{-/-}$ 小鼠於飼養第 7 天 DAI 情形。分別在對照飲食環境以及低鉀

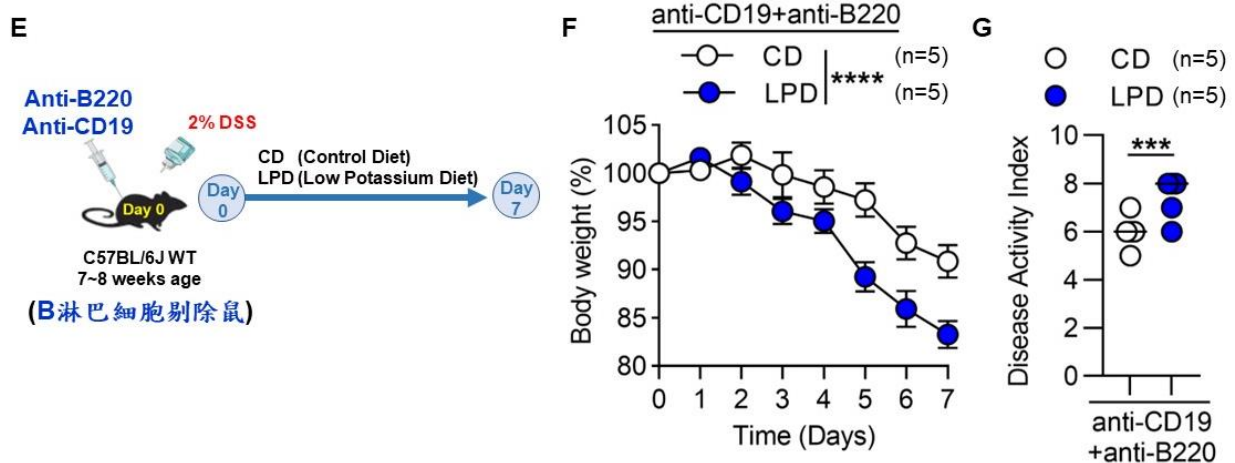
飲食環境下的 *Rag2*^{-/-} 小鼠，兩者的 DAI 無顯著差異。

相關數據以平均值± SEM 呈現，2 次獨立實驗。由 two-way ANOVA with Tukey' s multiple comparisons test 進行(C)之統計分析或由 2-tailed Student' s t test 進行(D)之統計分析，ns 代表無統計差異 (not significant)。(圖五資料來源：作者繪製)

五、探討 T 或 B 淋巴細胞在低鉀飲食環境對於腸炎之影響

由於後天免疫缺陷小鼠是因為其體內 T 淋巴細胞以及 B 淋巴細胞無法成熟，因此想探討在後天免疫缺陷下，使低鉀飲食所造成之腸炎惡化消失之現象，究竟是 T 淋巴細胞還是 B 淋巴細胞扮演最關鍵性角色。本研究利用 *Tcra*^{-/-} 小鼠作為 T 淋巴細胞缺陷小鼠模型 (圖六 B) 以及在飼養第 0 天施打 Anti-B220 抗體與 Anti-CD19 抗體的 WT 小鼠作為 B 淋巴細胞剔除小鼠模型，餵食對照飼料以及低鉀飼料，且皆給予含有 2% DSS 飲用水，共四組 (圖六 A 和 E)。結果發現在 T 淋巴細胞缺陷小鼠組別中，其對照飲食與低鉀飲食之小鼠體重減輕程度以及 DAI 無顯著差別 (圖六 C 和 D)；而在 B 淋巴細胞剔除小鼠組別中，低鉀飲食環境所造成的體重減輕程度較對照飲食環境嚴重 (圖六 F)，且在低鉀飲食環境下之小鼠 DAI 也較對照飲食小鼠高 (圖六 G)。顯示在後天免疫系統中，T 淋巴細胞在低鉀飲食所造成之腸炎惡化中扮演最關鍵角色。





圖六、T 或 B 淋巴細胞在低鉀飲食環境對於腸炎發展之影響

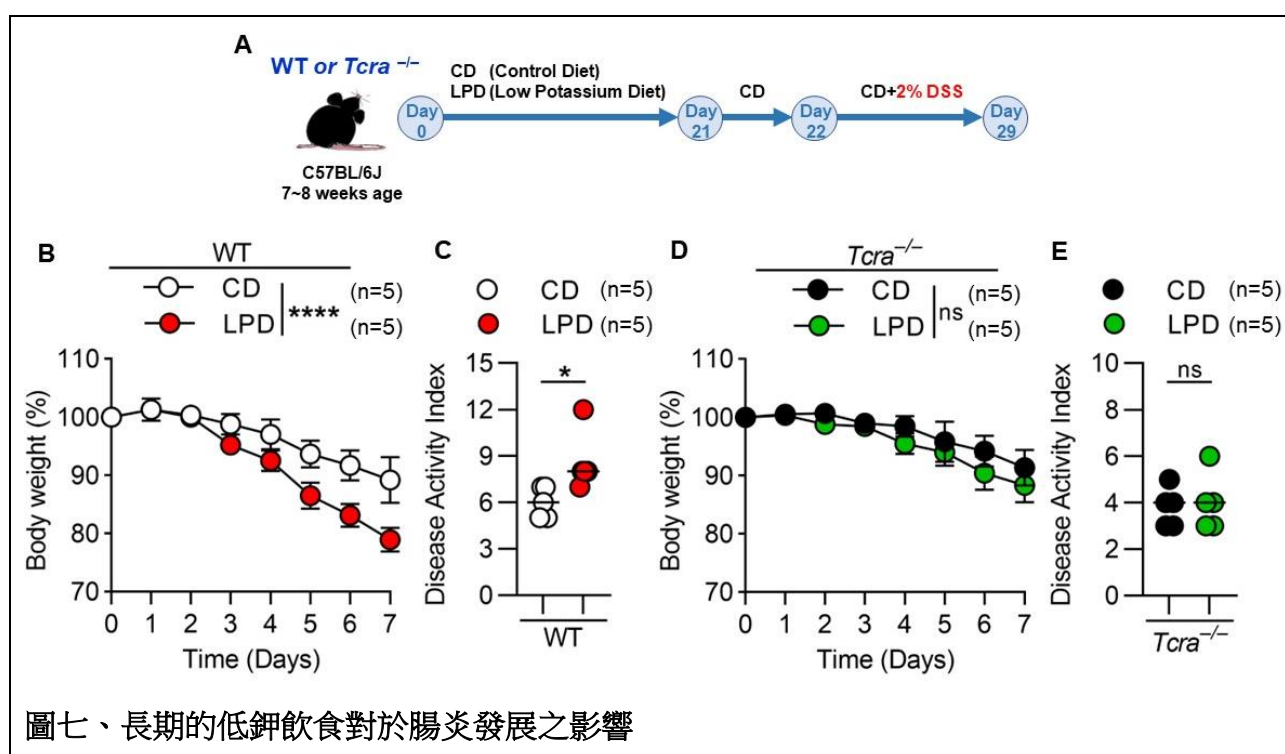
- (A) 將 $Tcra^{-/-}$ 小鼠依照餵食對照飼料 (CD)、低鉀飼料 (LPD) 作為分組依據，共兩組，且皆給予含有 2% DSS 飲用水，於飼養第 0 天至飼養第 7 天每日測量體重與 DAI。
- (B) WT 小鼠與 $Tcra^{-/-}$ 小鼠之基因型鑑定結果。
- (C) 2% DSS 誘導腸炎之 $Tcra^{-/-}$ 小鼠於飼養第 0 天到飼養第 7 天體重變化百分比。分別在對照飲食環境以及低鉀飲食環境下的 $Tcra^{-/-}$ 小鼠，兩者的體重減輕程度無顯著差異。
- (D) 2% DSS 誘導腸炎之 $Tcra^{-/-}$ 小鼠於飼養第 7 天 DAI 情形。分別在對照飲食環境以及低鉀飲食環境下的 $Tcra^{-/-}$ 小鼠，兩者的 DAI 無顯著差異。
- (E) 將 WT 小鼠在飼養第 0 天注射 Anti-B220+Anti-CD19，使其體內 B 淋巴細胞無法作用，為 B 淋巴細胞剔除鼠，並依照餵食對照飼料 (CD)、低鉀飼料 (LPD) 進行分組，共兩組，且皆給予含有 2% DSS 飲用水，於飼養第 0 天至飼養第 7 天每日測量體重與 DAI。
- (F) 2% DSS 誘導腸炎之 B 淋巴細胞剔除鼠於飼養第 0 天到飼養第 7 天體重變化百分比。低鉀飲食組別相較於對照飲食組別小鼠，有較顯著之體重減輕現象。
- (G) 2% DSS 誘導腸炎之 B 淋巴細胞剔除鼠於飼養第 7 天 DAI 情形。低鉀飲食組別相較於對照飲食組別小鼠，有較高之 DAI 分數，腸炎發展較嚴重。

相關數據以平均值± SEM 呈現，2 次獨立實驗。由 two-way ANOVA with Tukey' s multiple comparisons test 進行(C 和 F)之統計分析或由 2-tailed Student' s t test 進行(D 和 G)之統計分析，ns 代表無統計差異 (not significant)，***代表 $p < 0.001$ ，****p 代表 $p < 0.0001$ 。

(圖六資料來源：作者繪製)

六、探討長期的低鉀飲食對於腸炎之影響

WHO 建議成人每日應攝取 3.5 公克的鉀，然而，經過全球五十多個國家統計，發現只有四個國家的每日鉀攝取量達到此標準，而其他國家則普遍低於這個數值，而臺灣在此排名中為倒數第一，每日平均只攝取不到 2 公克的鉀，遠低於 WHO 的建議量，代表臺灣人可能長期面臨缺乏鉀的風險 (Reddin et al., 2023)。為模擬臺灣人長期鉀攝取量不足之情形，本研究進行為期四週的實驗，探討長期處於低鉀飲食環境下對於腸炎之影響。使用 WT 小鼠與 *Tcra*^{-/-} 小鼠，共四組，先皆餵食三週的對照飼料或低鉀飼料，並於每週測量一次體重，再將所有飼料更換為對照飼料，使小鼠休息一天後，給予小鼠含有 2% DSS 飲用水，觀察其體重變化與 DAI (圖七 A)。在 WT 小鼠組別中，我們發現在長期低鉀飲食環境之小鼠，其體重減輕程度較對照飲食小鼠多，且在飲用含有 2% DSS 飲用水的第 7 天，其體重已低於首次測量體重之 80% (圖七 B)，其 DAI 也較對照飲食小鼠高 (圖七 C)；而在 *Tcra*^{-/-} 小鼠組別中，我們發現長期的低鉀飲食以及對照飲食環境下，兩組小鼠的體重減輕程度與 DAI 皆無顯著差異 (圖七 D 和 E)。從上述結果可得知，T 淋巴細胞在長期的低鉀飲食環境會惡化腸炎的發展，且在其缺少表現時，會使腸炎惡化的情形消失，顯示長期的低鉀飲食環境會影響 T 淋巴細胞而造成腸炎惡化，即便立即恢復正常飲食也還是無法阻止其惡化現象發生。



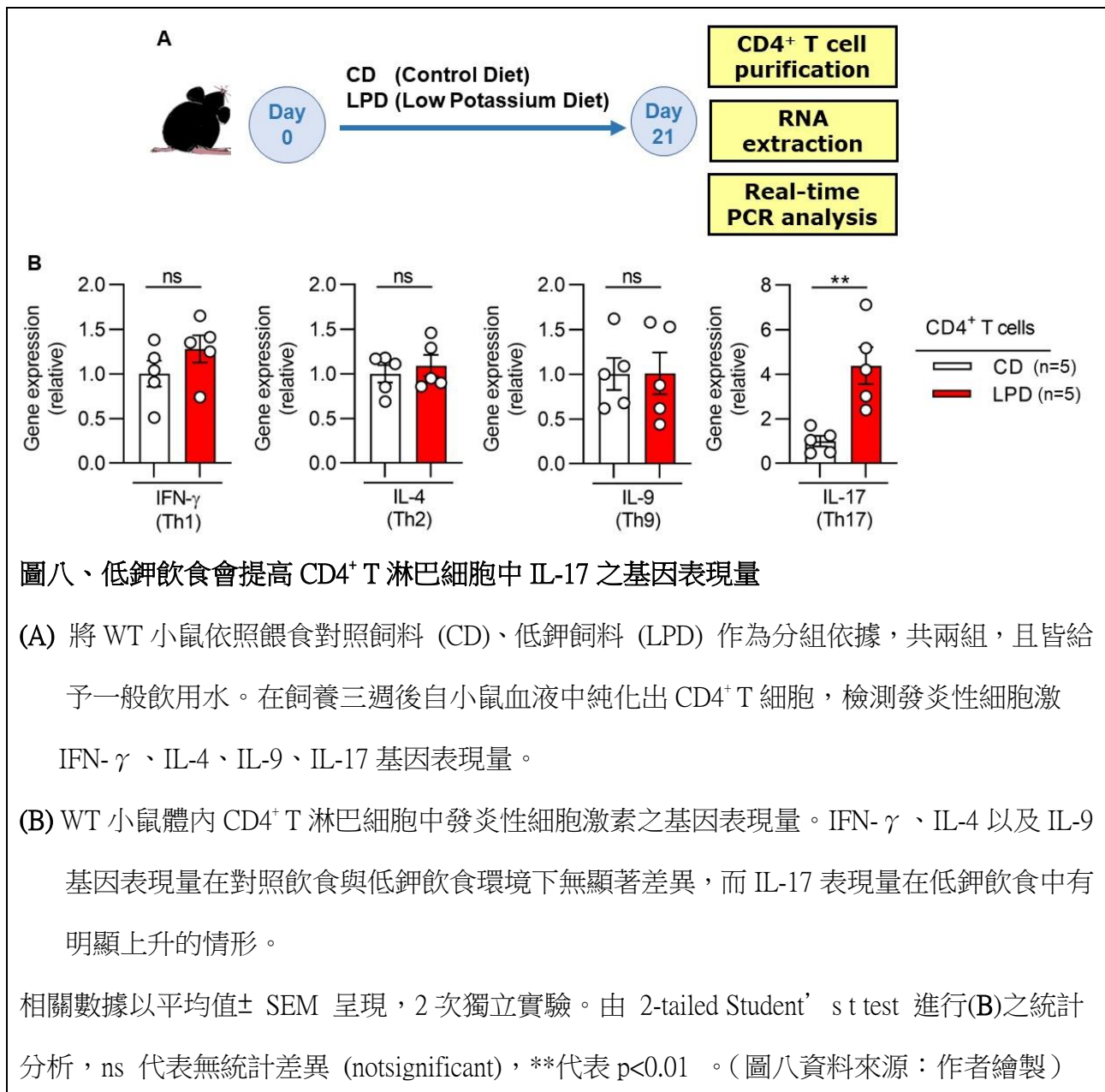
- (A) 將 WT 小鼠與 $Tcra^{-/-}$ 小鼠進行分組，皆餵食低鉀飼料 (LPD) 與一般飲用水三週，接著將飼料換成對照飼料 (CD) 一天後，更換飲用水為含有 2% DSS 飲用水，每日測量體重與 DAI。
- (B) 2% DSS 誘導腸炎之 WT 小鼠體重變化百分比。長期低鉀飲食環境相較於長期對照飲食環境下的小鼠，有較顯著之體重減輕現象。
- (C) 2% DSS 誘導腸炎之 WT 小鼠 DAI 情形。長期低鉀飲食環境相較於長期對照飲食環境下的小鼠，有較高之 DAI 分數，腸炎發展較嚴重。
- (D) 2% DSS 誘導腸炎之 $Tcra^{-/-}$ 小鼠體重變化百分比。分別在長期低鉀飲食環境與長期對照飲食環境下的小鼠，兩者的體重減輕程度無顯著差異。
- (E) 2% DSS 誘導腸炎之 $Tcra^{-/-}$ 小鼠 DAI 情形。分別在長期低鉀飲食環境與長期對照飲食環境下的小鼠，兩者的 DAI 無顯著差異。

相關數據以平均值 $\pm$ SEM 呈現，2 次獨立實驗。由 two-way ANOVA with Tukey' s multiple comparisons test 進行 (B 和 D) 之統計分析或由 2-tailed Student' s t test 進行 (C 和 E) 之統計分析，ns 代表無統計差異 (not significant)，*p 代表 <0.05 ，****p 代表 <0.0001 。

(圖七資料來源：作者繪製)

七、探討低鉀飲食對於 $CD4^+$ T 淋巴細胞中細胞激素之影響

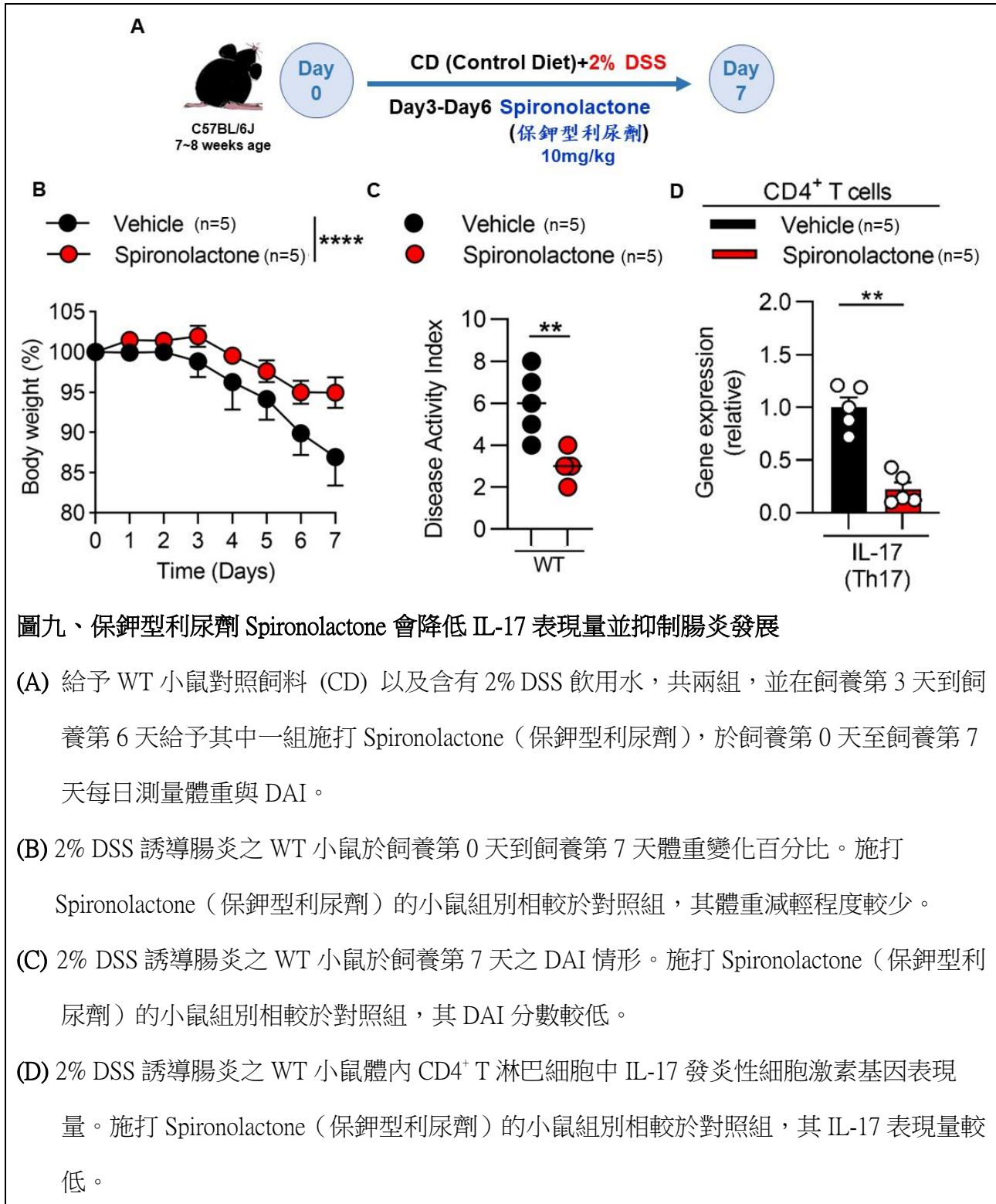
在腸炎發展過程中輔助型 $CD4^+$ Th 細胞扮演關鍵角色，並且可再分成四種亞型，包含 IFN- γ -positive 的 Th1 細胞、IL-4-positive 的 Th2 細胞、IL-9-positive 的 Th9 細胞以及 IL-17-positive 的 Th17 細胞 (Choy et al., 2017)，故本研究想探討上述發炎性細胞激素在低鉀飲食所造成之腸炎惡化中扮演之角色。我們分別餵食 WT 小鼠對照飼料與低鉀飼料，且皆給予一般飲用水三週後，抽取小鼠尾巴血後純化出 $CD4^+$ T 淋巴細胞，再以 Q-PCR 檢測發炎性細胞激素 IFN- γ 、IL-4、IL-9、IL-17 基因表現量 (圖八 A)。從實驗結果能得知在 $CD4^+$ T 淋巴細胞中，IFN- γ 、IL-4 以及 IL-9 表現量在 Control 飲食與低鉀飲食環境下無顯著差異，而 IL-17 在低鉀飲食中有明顯上升的情形 (圖八 B)。顯示低鉀飲食可能會促進第 17 型輔助型 T 淋巴細胞大量表達促發炎細胞激素 IL-17 來造成腸炎惡化。



八、探討保鉀型利尿劑 Spironolactone 對於腸炎之影響

保鉀型利尿劑與其他利尿劑最大的不同在於其可抑制鉀的排泄，過去在臨床上主要用來治療高血壓 (Nishizaka et al, 2003) 與心衰竭 (Ferreira et al, 2023) 問題造成之相關疾病。本研究餵食 WT 小鼠對照飼料以及含有 2% DSS 的飲用水，分為對照組及實驗組共兩組，實驗組在飼養第 3 天至第 6 天於小鼠腹腔注射保鉀型利尿劑 Spironolactone，以 10% DMSO 與 90% Corn oil 作為溶劑，每公斤小鼠體重施打 10 毫克之 Spironolactone，觀察其體重變化、DAI 以及 CD4⁺ T 淋巴細胞中 IL-17 發炎性細胞激素之基因表現量 (圖九 A)。結果發現實驗組小鼠體重減輕程度較對照組少，在飼養第 7 天只下降至首次測量體

重之約 95%，對照組則低於首次測量體重之 90%（圖九 B），而在 DAI 方面，實驗組顯著低於對照組（圖九 C）。接著以 Q-PCR 檢測 WT 小鼠在飼養第 7 天之 $CD4^+$ T 淋巴細胞中 IL-17 發炎性細胞激素基因表現量，發現實驗組顯著低於對照組（圖九 D），顯示保鉀型利尿劑 Spironolactone 能有效抑制 $CD4^+$ T 淋巴細胞中 IL-17 發炎性細胞激素表現量進而抑制腸炎發展。



相關數據以平均值 $\pm$ SEM 呈現，2 次獨立實驗。由 two-way ANOVA with Tukey' s multiple comparisons test 進行(B)之統計分析或由 2-tailed Student' s t test 進行(C 和 D)之統計分析，**p 代表 <0.01 , ****p 代表 <0.0001 。(圖九資料來源：作者繪製)

伍、結論

一、建立 DSS 誘發小鼠腸炎之疾病模式

(一) DSS 誘發小鼠腸炎會使體重下降並造成 DAI 上升，且會隨著時間增長而更加明顯，到晚期會有更嚴重之現象。

(二) 在腸炎早期及晚期皆會造成血中鉀濃度上升，鈉濃度則是在晚期有下降的情形。

二、膳食鹽類與腸炎之關係

(一) 在腸炎發展過程中所造成之血中的鉀濃度上升，為一種保護機制來抑制腸炎的發展，如果強制降低血鉀則會惡化疾病發展。

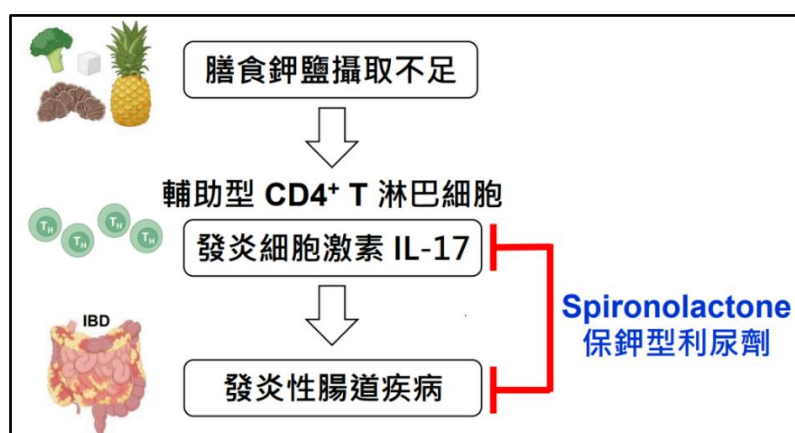
(二) 長期的低鉀飲食環境會影響 T 淋巴細胞而造成腸炎惡化，即便立即恢復正常飲食也還是無法阻止其惡化現象發生。

三、在後天免疫系統中，膳食鹽類對於腸炎之影響

(一) 低鉀飲食會促進第 17 型輔助型 T 淋巴細胞大量表達促發炎細胞激素 IL-17 來造成腸炎惡化。

(二) 保鉀型利尿劑 Spironolactone 能有效抑制 IL-17 表現量進而抑制腸炎發展。

綜合上述，我們以小鼠動物模式證實無論長期還是短期的膳食鉀鹽攝取不足均可能對發炎性腸道疾病造成惡化之風險，其相關機轉可能是透過影響 Th17 細胞大量表達促發炎細胞激素 IL-17 造成腸炎惡化，最後利用保鉀型利尿劑 Spironolactone 可抑制 Th17 細胞分化來抑制腸炎發展，證實其應用於治療腸炎之可行性，未來在臨床上有望運用在 IBD 患者治療（圖十）。



圖十、本研究結論，探討膳食鹽類、T 淋巴細胞及腸炎之關係並利用藥物治療

（圖十資料來源：作者繪製）

陸、參考文獻資料

- Choy, M. C., Visvanathan, K., & De Cruz, P. (2017). An overview of the innate and adaptive immune system in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, 23(1), 2-13.
- Dyson, J. K., & Rutter, M. D. (2012). Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: what is the real magnitude of the risk?. *World journal of gastroenterology: WJG*, 18(29), 3839.
- Eichele, D. D., & Kharbanda, K. K. (2017). Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World journal of gastroenterology*, 23(33), 6016.
- Ferreira, J. P., Cleland, J. G., Girerd, N., Bozec, E., Rossignol, P., Pellicori, P., ... & Zannad, F. (2023). Spironolactone effect on cardiac structure and function of patients with heart failure and preserved ejection fraction: a pooled analysis of three randomized trials. *European journal of heart failure*, 25(1), 108-113.
- Geremia, A., Biancheri, P., Allan, P., Corazza, G. R., & Di Sabatino, A. (2014). Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmunity reviews*, 13(1), 3-10.
- Hazel, K., & O' Connor, A. (2020). Emerging treatments for inflammatory bowel disease. *Therapeutic advances in chronic disease*, 11, 2040622319899297.
- Kaplan, G. G., & Windsor, J. W. (2021). The four epidemiological stages in the global evolution of inflammatory bowel disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 18(1), 56-66.
- Khalili, H., Chan, S. S., Lochhead, P., Ananthakrishnan, A. N., Hart, A. R., & Chan, A. T. (2018). The

role of diet in the aetiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 15(9), 525-535.

Neurath, M. F. (2019). Targeting immune cell circuits and trafficking in inflammatory bowel disease. *Nature immunology*, 20(8), 970-979.

Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., ... & Kaplan, G. G. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*, 390(10114), 2769-2778.

Nishizaka, M. K., Zaman, M. A., & Calhoun, D. A. (2003). Efficacy of low-dose spironolactone in subjects with resistant hypertension. *American journal of hypertension*, 16(11), 925-930.

Reddin, C., Ferguson, J., Murphy, R., Clarke, A., Judge, C., Griffith, V., ... & O' Donnell, M. J. (2023). Global mean potassium intake: a systematic review and Bayesian meta-analysis. *European Journal of Nutrition*, 1-11.

【評語】 052007

由於臺灣 IBD 呈現高度成長且年增率位居全球第二，且臺灣人的每日鉀攝取量不到 2 公克，遠低於世界衛生組織（WHO）所建議的每日鉀攝取量 3.5 公克，因此假設膳食鉀鹽攝取不足為造成 IBD 的危險因子。實驗的目的在探討膳食鹽類與 T 淋巴細胞在 IBD 中所扮演之角色並發展藥物用於臨床治療。

1. 整體實驗設計合理，數據分析也明確，實驗結果、討論與結論也都非常有條理合理。然而實驗部分有一疑問如下：作為評估小鼠腸炎發展主要指標的疾病活動指數（Disease Activity Index, DAI）如何建立的？是否有學術依據。
2. 使用動物模型如 DSS 誘導小鼠腸炎是常見的 IBD 研究方法，但其模擬人類疾病的程度有限。人類的發炎性腸道疾病（IBD）是一個複雜的疾病，包含多種不同的致病機制和發展路徑，且其病理生理可能與動物模型有所不同。因此，從動物模型到人類的轉譯性可能存在挑戰。
3. 研究指出 IL-17 在 CD4+ T 淋巴細胞中的表現量增加與腸炎的發展有關，而 Spironolactone 能抑制其表現。然而，IBD 的發病機制極其複雜，並不僅僅依賴於單一分子或通路。因此，單一靶點治療的有效性和長期效果仍需更深入的研究來確認。
4. 雖然動物模型顯示了 Spironolactone 對於抑制腸炎的潛力，但其在人類臨床治療中的效果和安全性需要進一步評估。

作品簡報

以小鼠模式剖析膳食鹽類與 T 淋巴細胞 在發炎性腸道疾病之功能性連結

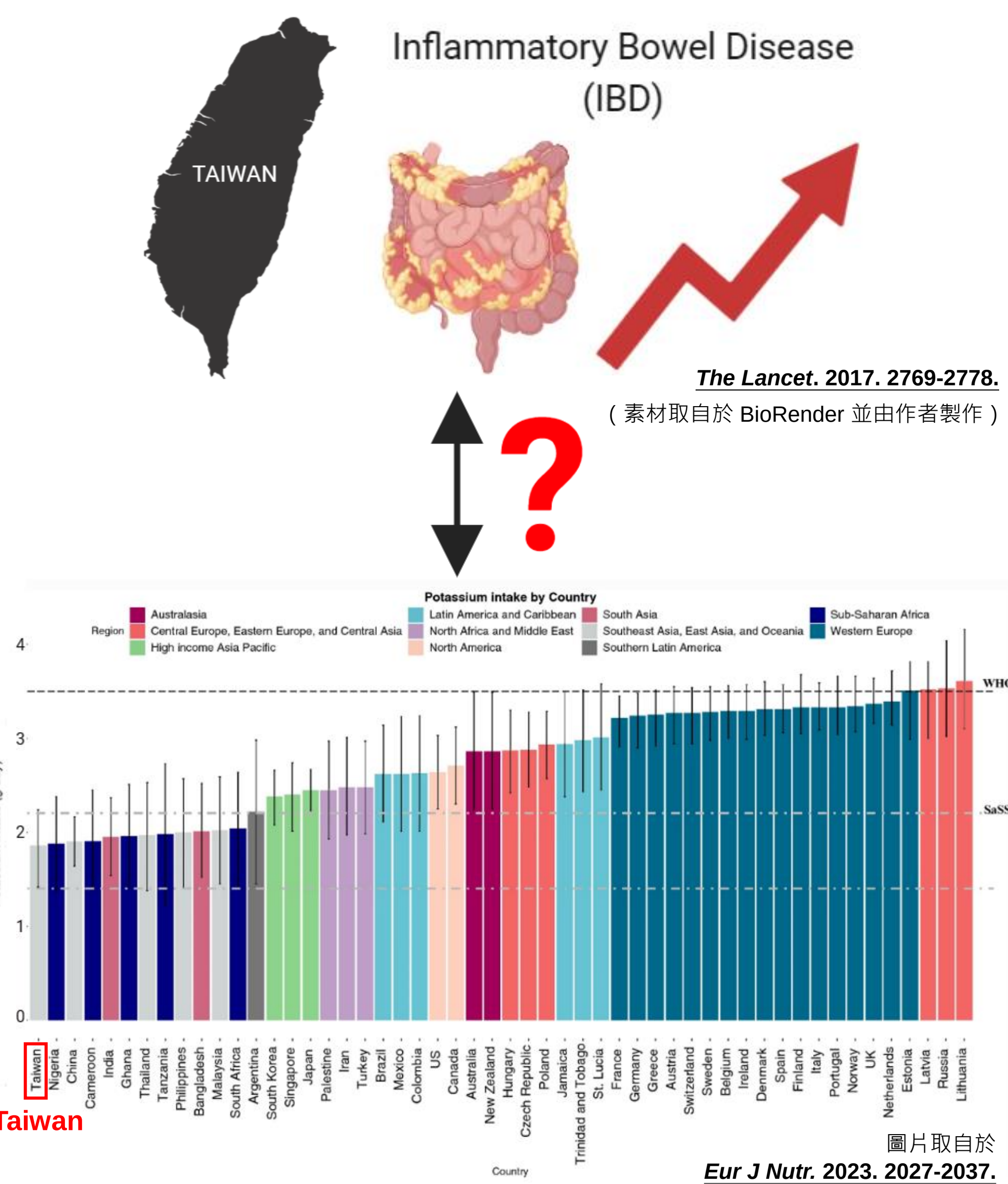
**Functional dissection of the linkage between dietary salt and T lymphocytes
in inflammatory bowel disease by using mouse models**

研究動機

發炎性腸道疾病 (Inflammatory Bowel Disease, IBD) 是一種免疫性疾病，症狀包含腹痛、體重減輕、腹瀉、血便等，並會增加罹患大腸直腸癌的風險。在2017年發表於 *The Lancet* 雜誌的一篇論文提到 IBD 在過去十年中已成為全球重要的公共衛生健康議題，主要盛行於新興工業化國家以及高度工業化國家，而 **IBD 在臺灣呈現高度成長且年增率高居全球第二**。

根據2023年文獻統計分析全球五十多個國家其人民每日鉀攝取量，發現**臺灣人民每日鉀攝取量在此排名中為倒數第一**，每日攝取不到2公克的鉀，遠低於世界衛生組織 (WHO) 所建議的每日鉀攝取量3.5公克。

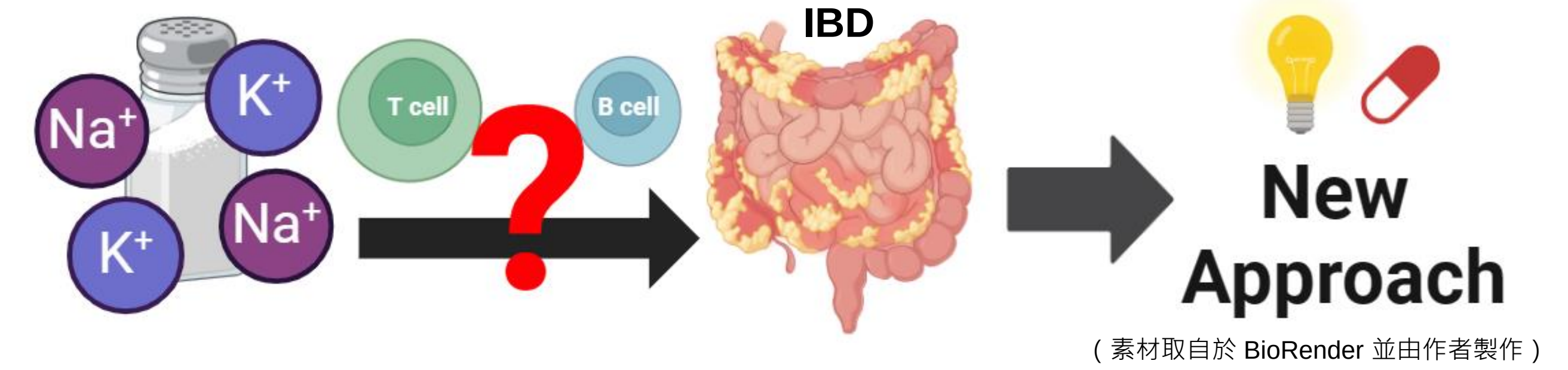
IBD 在臺灣持續成長，故其對於臺灣是關鍵之健康危害疾病及重要的研究議題。本研究將以臨床前小鼠動物模式來剖析膳食鹽類與 T 淋巴細胞在 IBD 的關係並發展藥物用於臨床治療，期待能為 IBD 患者帶來新的治療方向。



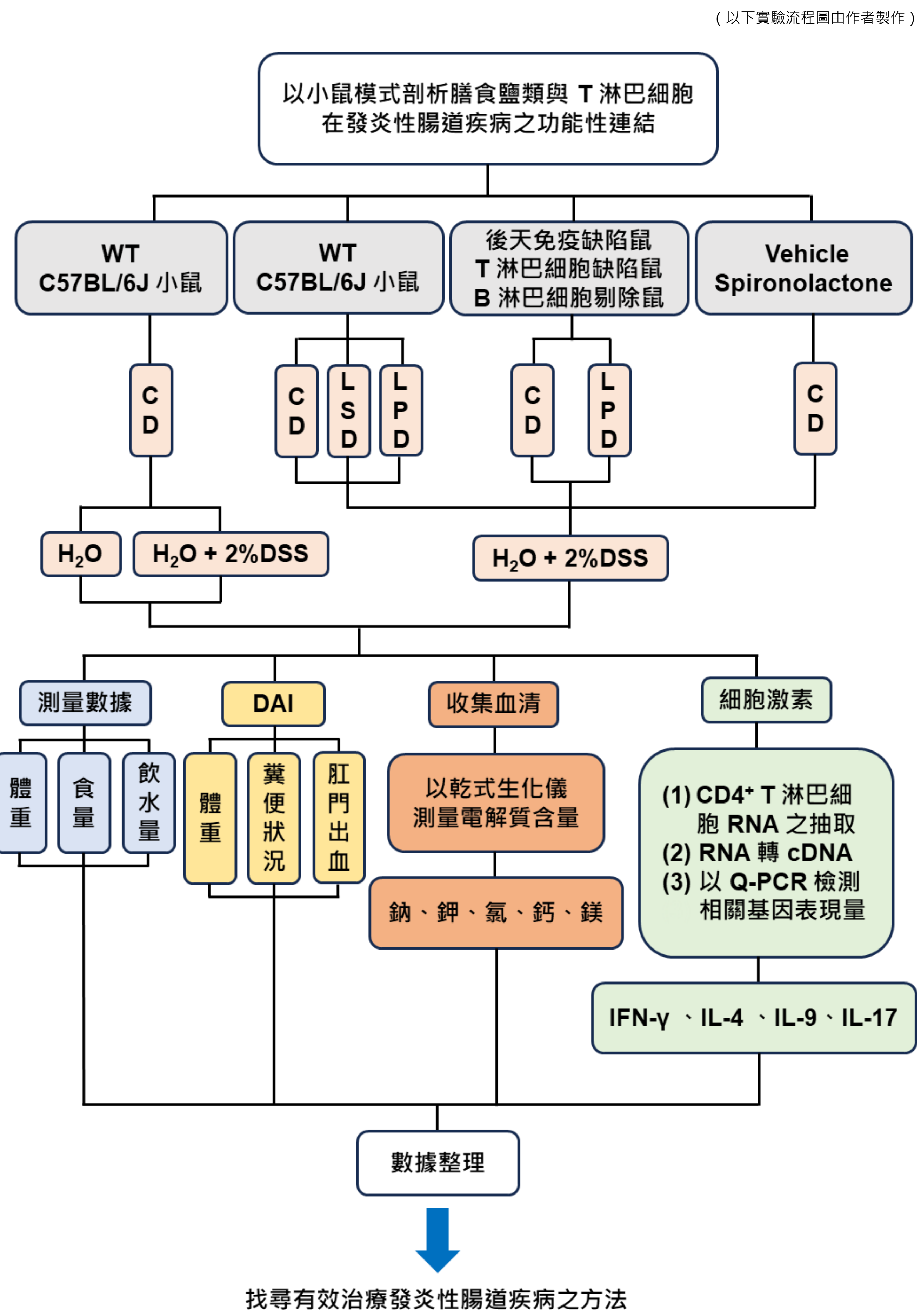
研究目的

本研究主要以臨床前小鼠動物模式來探討膳食鹽類與 IBD 的關係並剖析其相關調控機轉，研究目的如下：

- 探討膳食鹽類與發炎性腸道疾病之關係
- 探討在後天免疫系統中，膳食鹽類對於發炎性腸道疾病之影響
- 找尋有效治療發炎性腸道疾病之方法



實驗流程



研究過程或方法

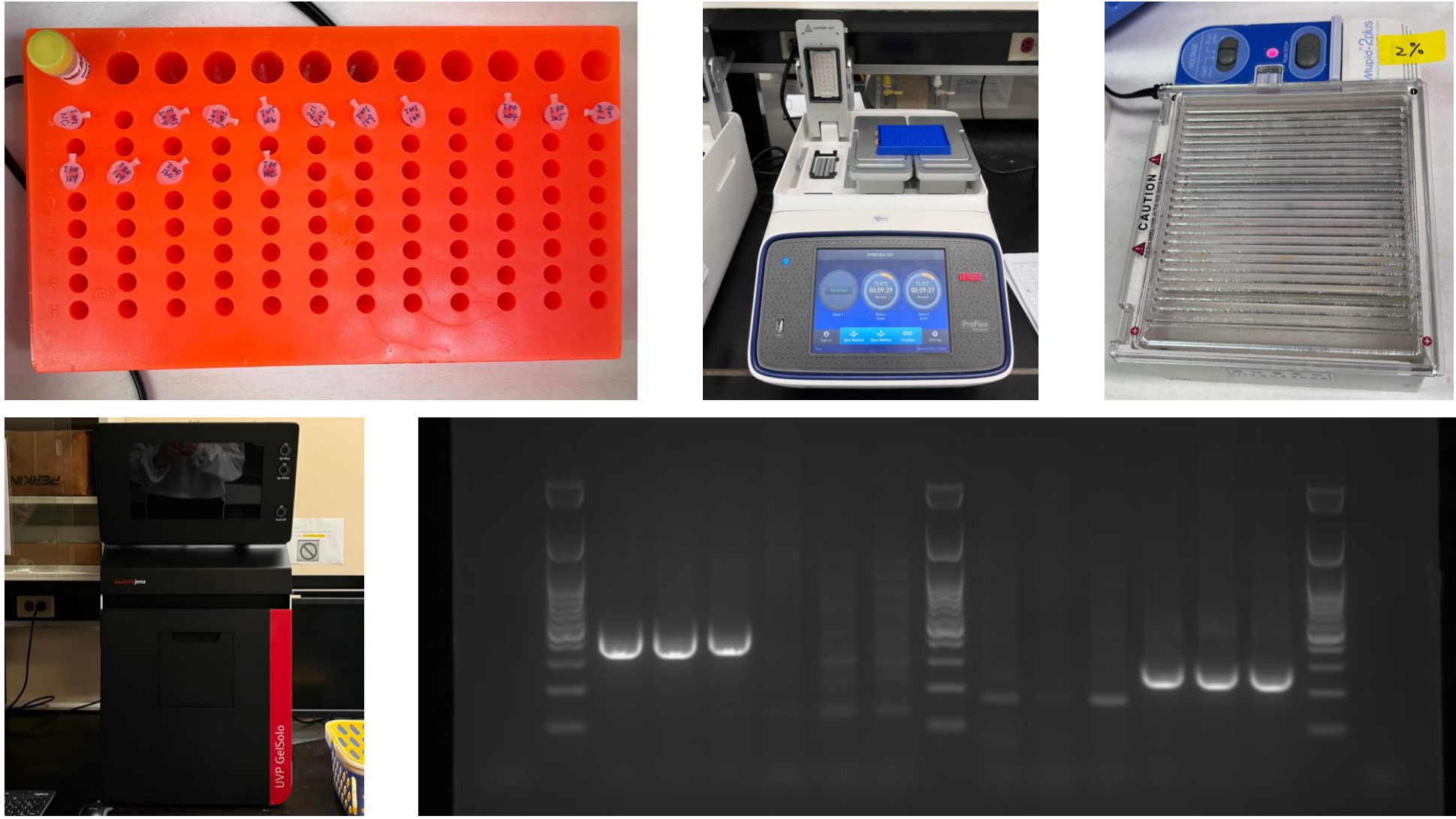
一、動物實驗



二、免疫缺陷小鼠基因型鑑定

以下為 Primer 資訊：

後天免疫缺陷鼠 (<i>Rag2</i> ^{-/-})	Rag2-WT	(F) CTGACTGCCTACCCCATGTT (R) CCATGTTGCTTCCAAACCAT
	Rag2-KO	(F) AATTCGCCAATGACAAGACG (R) CCATGTTGCTTCCAAACCAT
T 淋巴細胞缺陷鼠 (<i>Tcrα</i> ^{-/-})	TCRα-WT	(F) TGACTCCCAAATCAATGTGC (R) GGTGAGATGACCCAAAGCAG
	TCRα-KO	(F) TGACTCCCAAATCAATGTGC (R) CTACCCGCTTCCATTGCTC



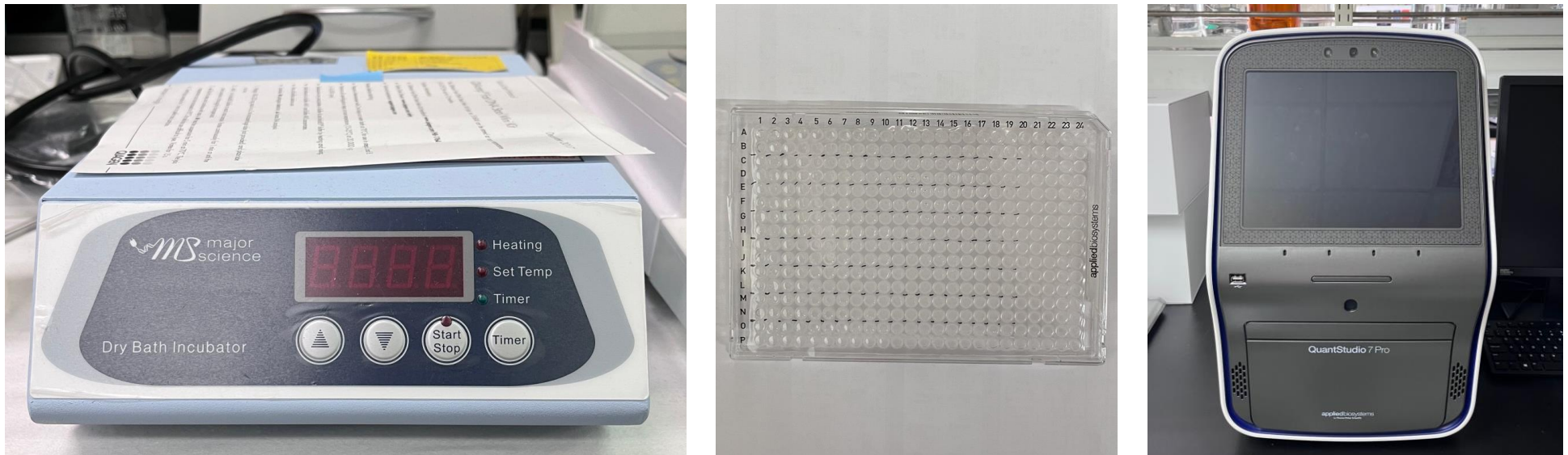
三、檢測電解質濃度



四、檢測 CD4⁺ T 淋巴細胞之相關基因表現

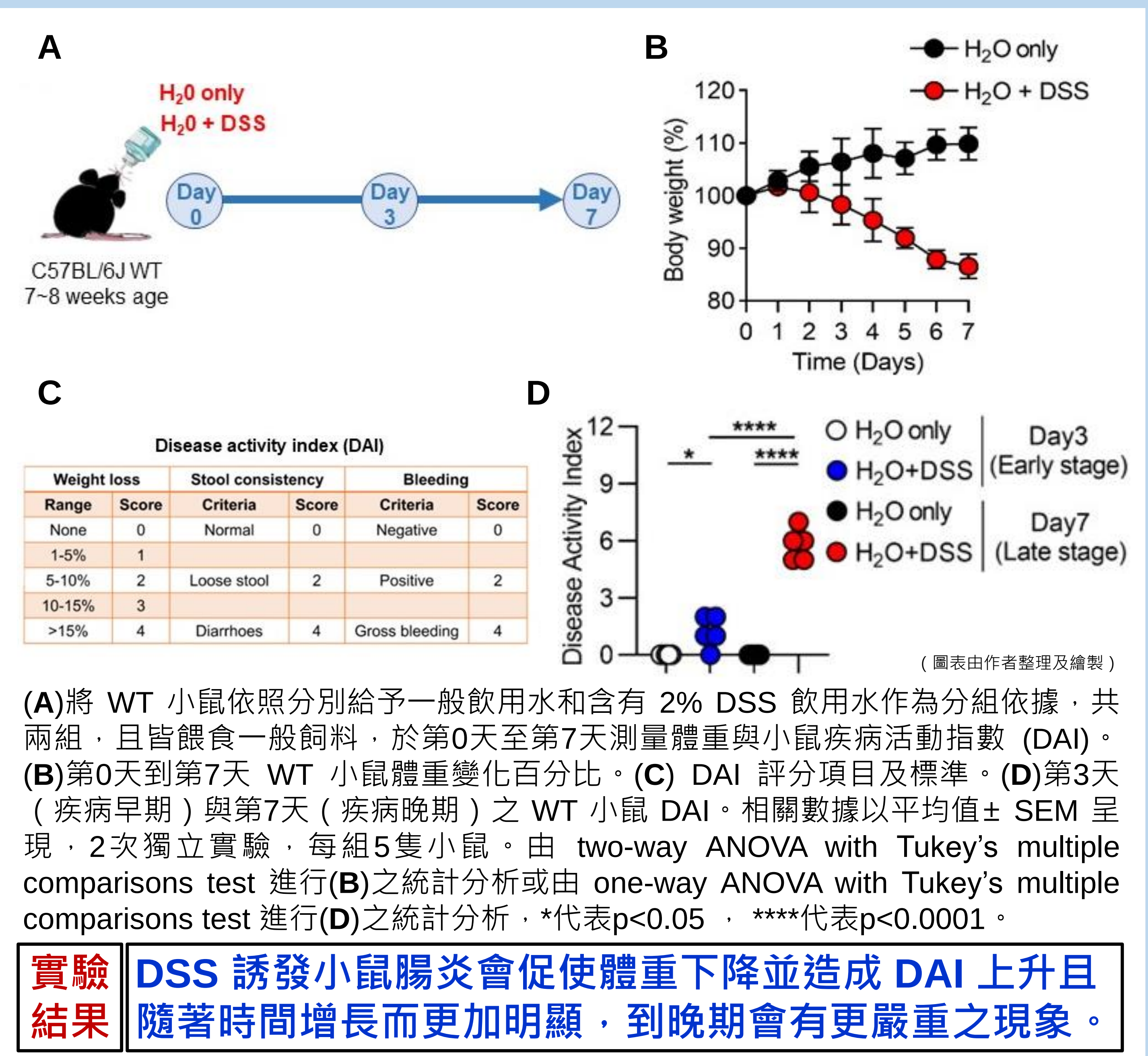
以下為 Primer 資訊：

IFN-γ	(F) ATCTGGAGGAACTGGCAAAA (R) TTCAAGACTTCAAAGAGTCTGAGG
IL-4	(F) GAGAGATCATCGGCATTTTGA (R) TCTGTGGTGTTCTTCGTTGC
IL-9	(F) GTCTCTCCGTCCCAACTGATG (R) GATTTCTGTGTGGCATTGGTC
IL-17	(F) CTCCAGAAGGCCCTCAGACTA (R) CTTTCCCTCCGCATTGACAC

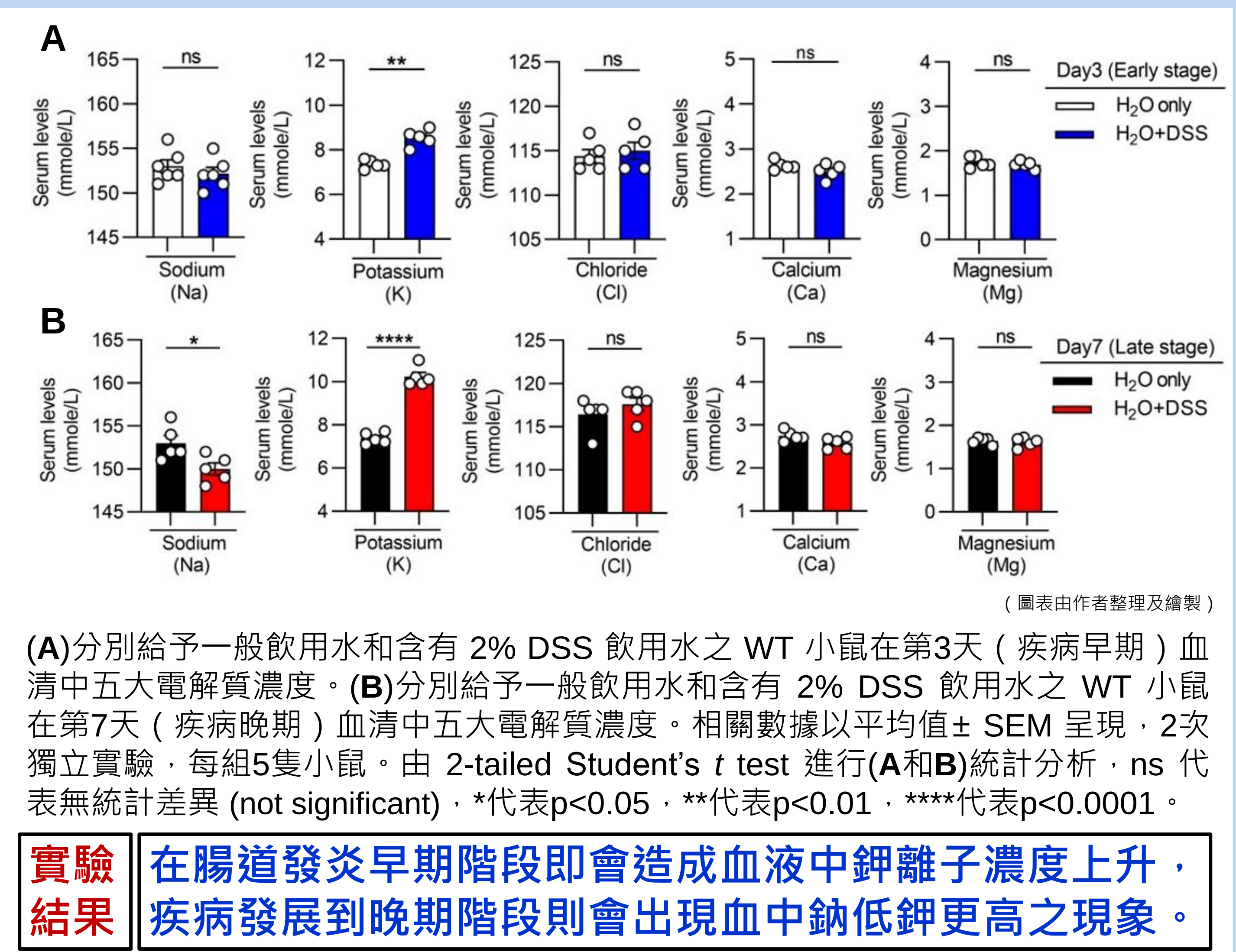


研究結果與討論

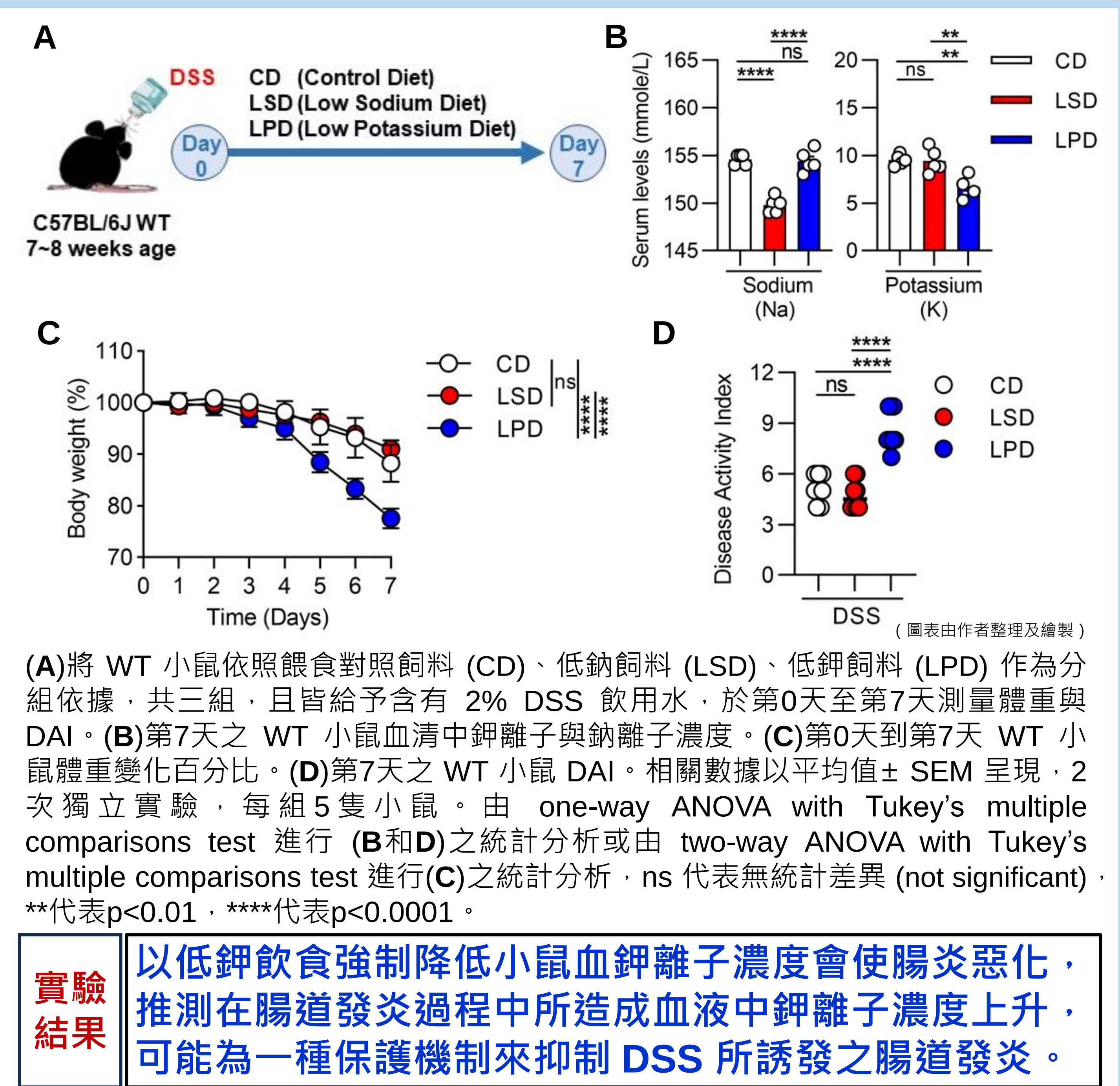
圖一、建立 DSS 誘發小鼠腸炎之疾病模式



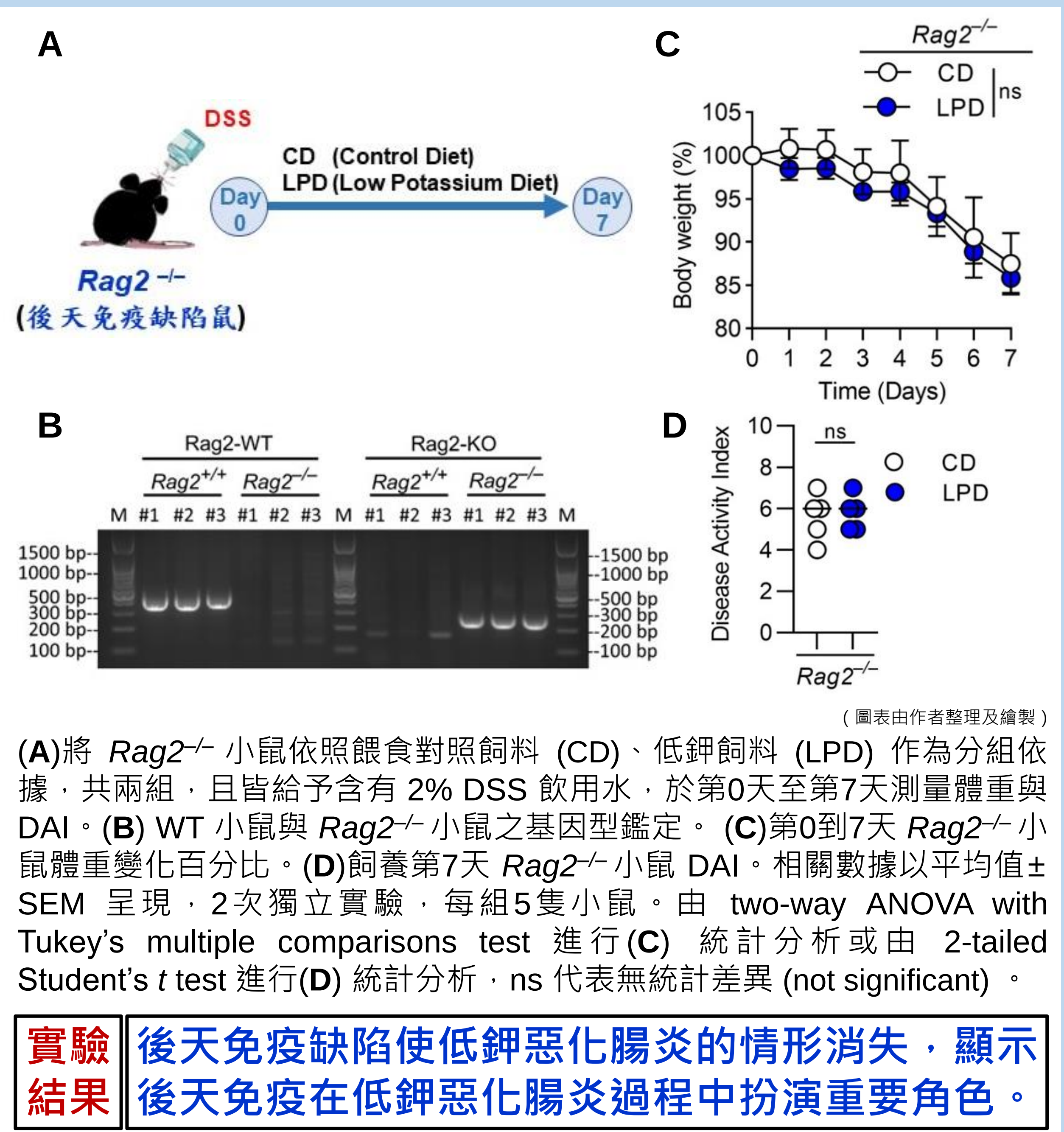
圖二、探討 DSS 誘發小鼠腸炎發展過程中，血中五大電解質，鈉、鉀、氯、鈣、鎂濃度變化



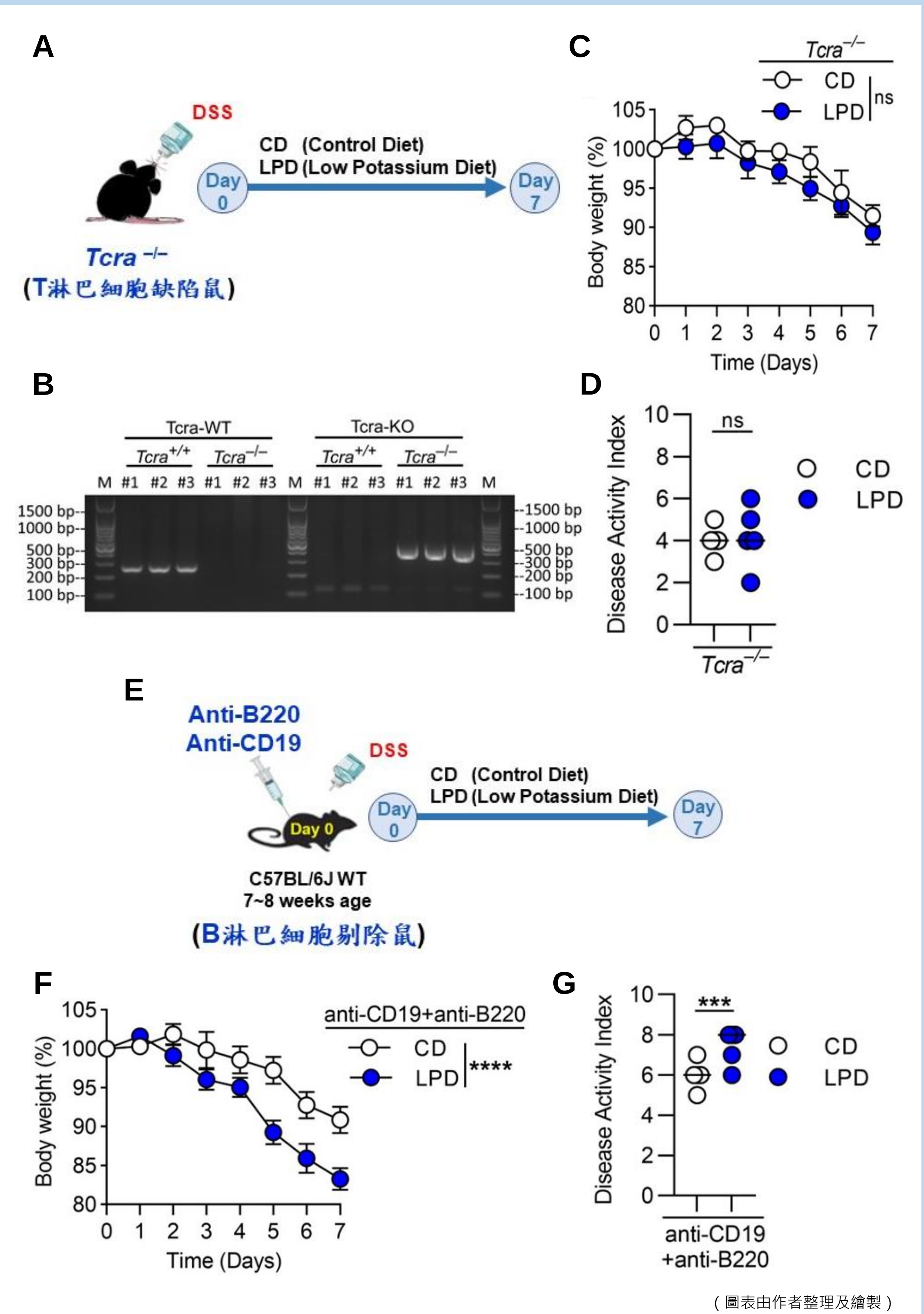
圖三、低鉀飲食會降低血鉀濃度並導致腸炎惡化



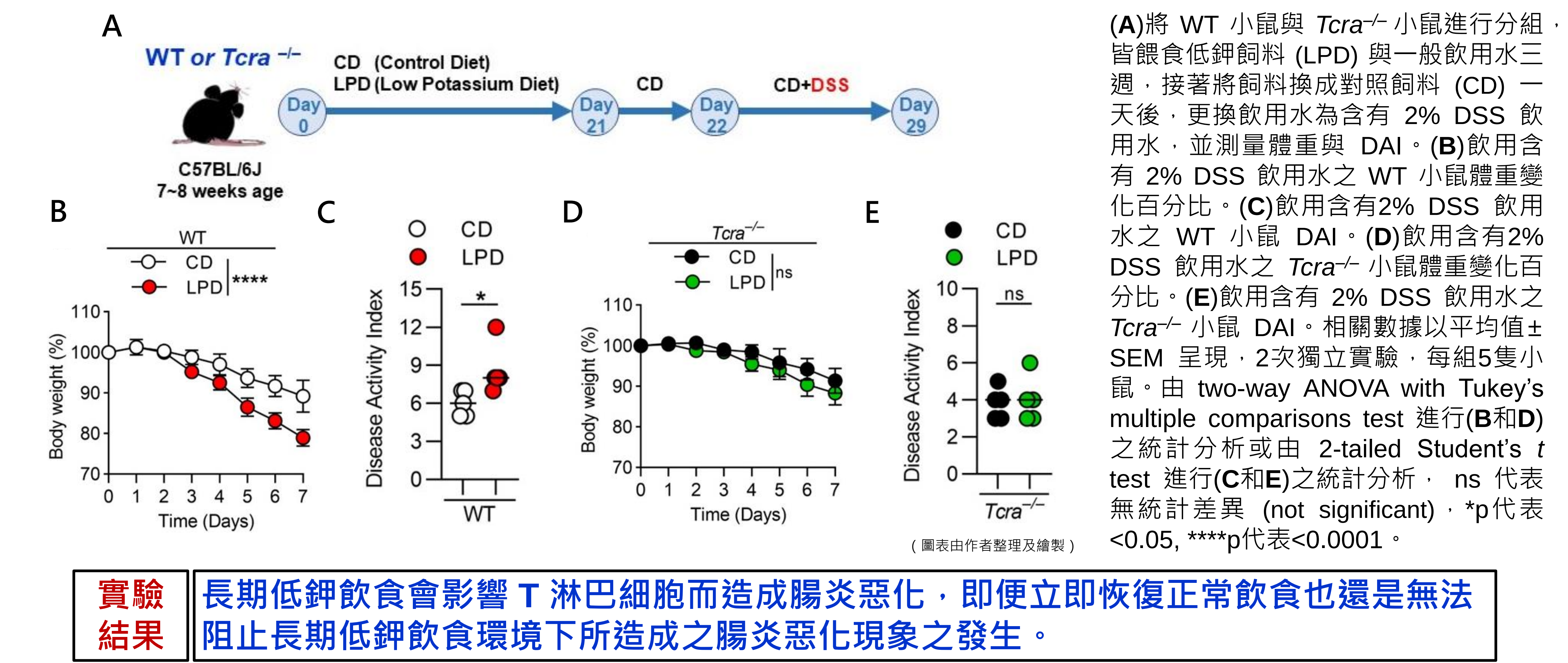
圖四、探討後天免疫系統在低鉀飲食所造成腸炎惡化扮演之角色



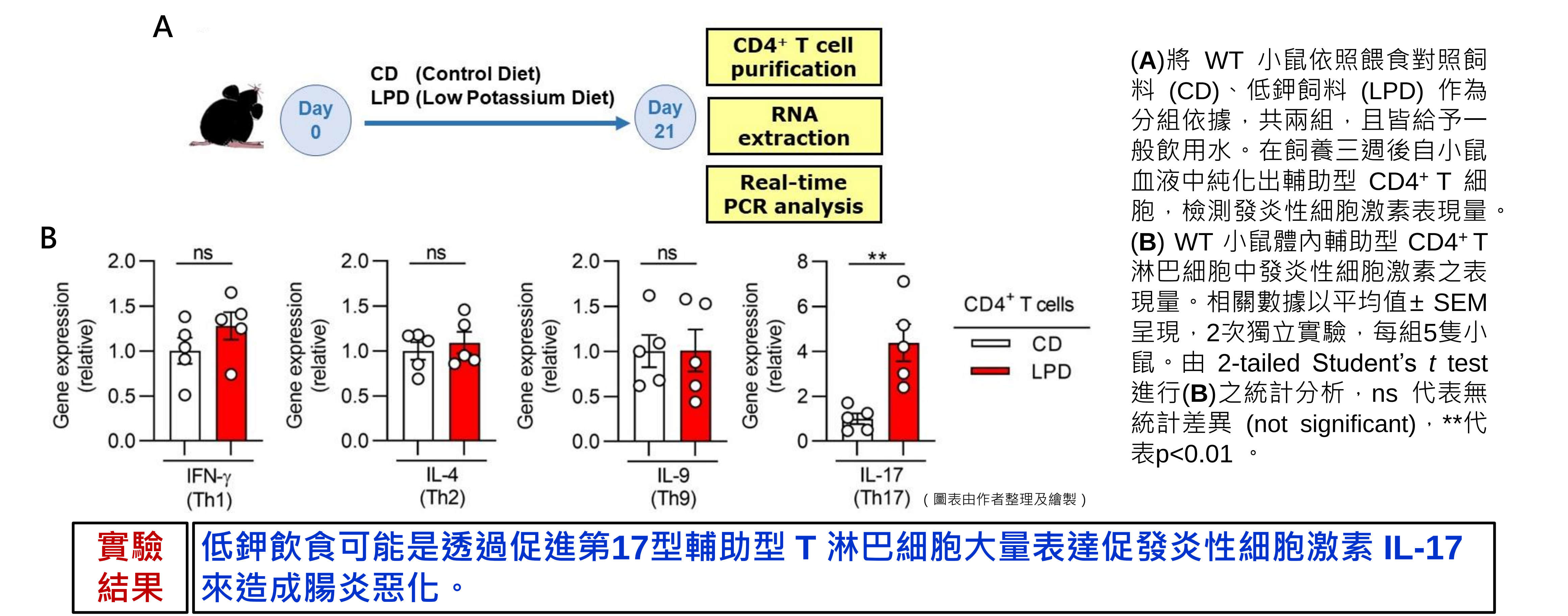
圖五、剖析在低鉀飲食惡化小鼠腸炎過程中 T 淋巴細胞與 B 淋巴細胞之角色



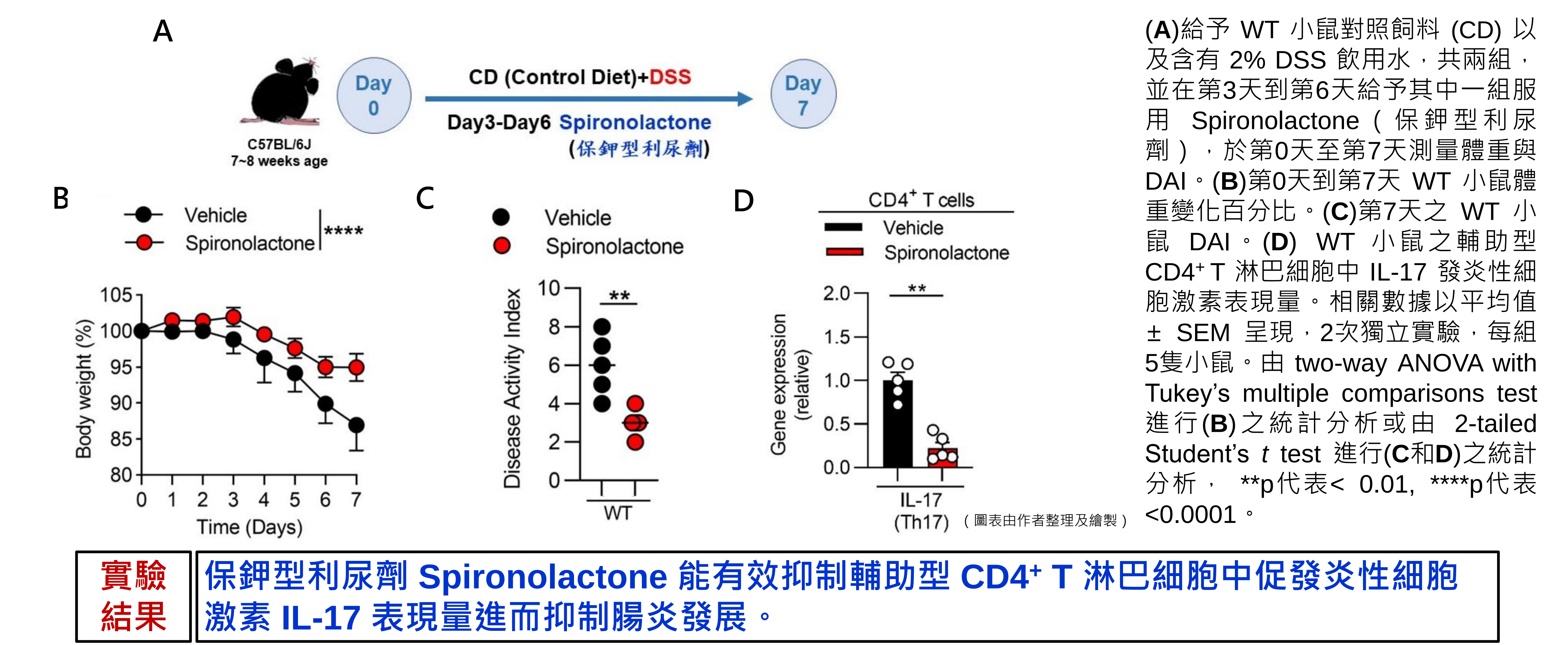
圖六、探討長期低鉀飲食對於腸炎之影響



圖七、低鉀飲食會提高 CD4⁺ T 淋巴細胞中 IL-17 之基因表現量

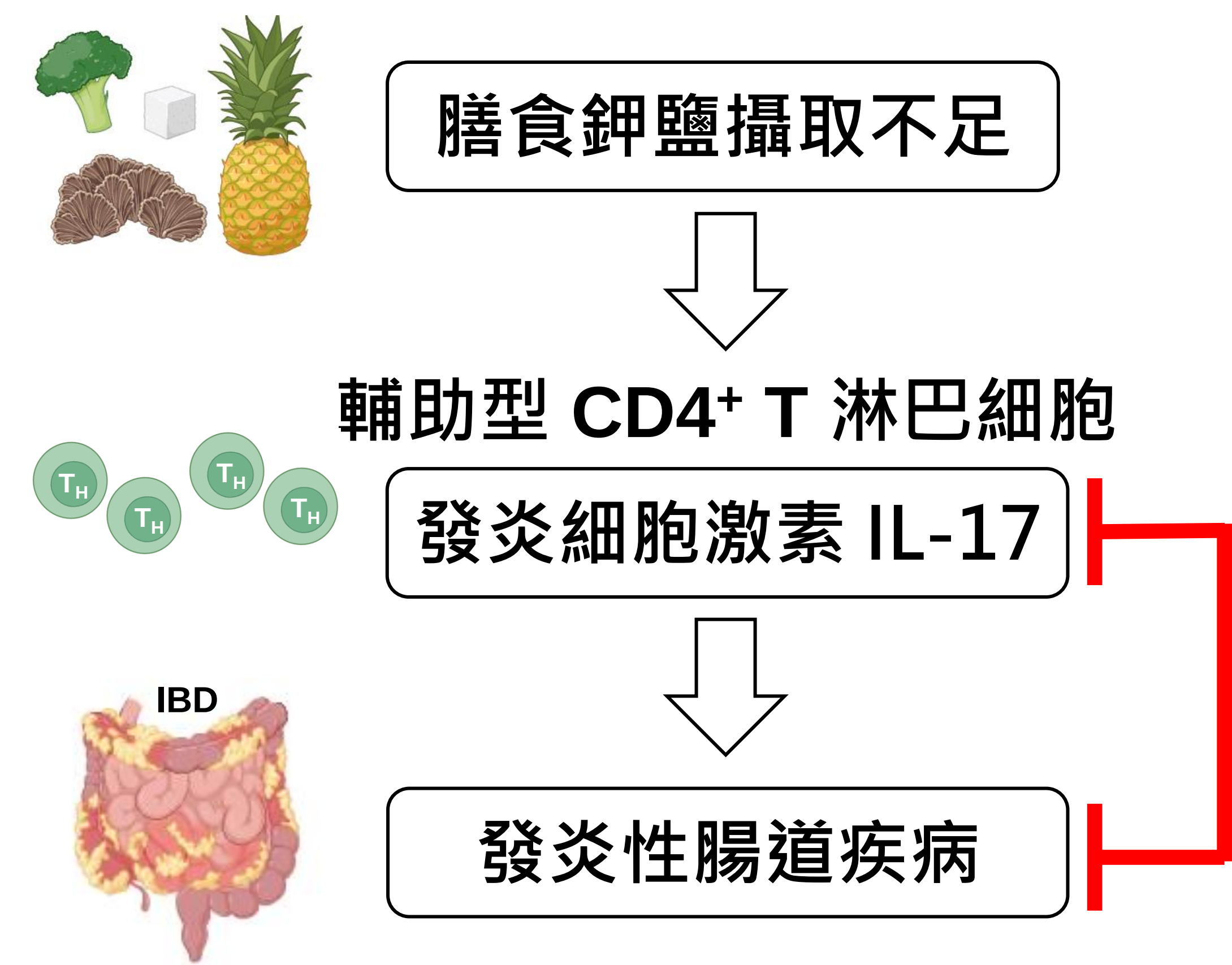


圖八、保鉀型利尿劑 Spironolactone 會降低 IL-17 表現量並抑制腸炎發展



結論

參考文獻



(素材取自於 BioRender 並由作者製作)

Spironolactone 有機會以老藥新用治療臨床 IBD 患者

(1) Choy, M. C., Visvanathan, K., & De Cruz, P. (2017). An overview of the innate and adaptive immune system in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, 23(1), 2-13.

(2) Eichele, D. D., & Kharbanda, K. K. (2017). Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World journal of gastroenterology*, 23(33), 6016.

(3) Kaplan, G. G., & Windsor, J. W. (2021). The four epidemiological stages in the global evolution of inflammatory bowel disease. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 18(1), 56-66.

(4) Khalili, H., Chan, S. S., Lochhead, P., Ananthakrishnan, A. N., Hart, A. R., & Chan, A. T. (2018). The role of diet in the aetopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 15(9), 525-535.

(5) Ng, S. C., Shi, H. Y., Hamidi, N., Underwood, F. E., Tang, W., Benchimol, E. I., ... & Kaplan, G. G. (2017). Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet*, 390(10114), 2769-2778.

(6) Reddin, C., Ferguson, J., Murphy, R., Clarke, A., Judge, C., Griffith, V., ... & O'Donnell, M. J. (2023). Global mean potassium intake: a systematic review and Bayesian meta-analysis. *European Journal of Nutrition*, 1-11.