

公開
 密件、不公開

執行機關(計畫)識別碼：020104U113

行政院農業委員會九十七年度科技計畫研究報告

計畫名稱：**探討中藥草對仔豬腸道生理與改善下痢之效果
(1) (第1年/全程1年)**

(英文名稱) **Study investigated the feasibility of growth and health promoter for weaned piglets with the Chinese traditional herbal medicine Shen ling bai zhu san**

計畫編號：**97農科-2.1.4-牧-U1(13)**

全程計畫期間：**97年1月1日至97年12月31日**

本年計畫期間：**97年1月1日至97年12月31日**

計畫主持人：**林宥欣**

執行機關：**私立中國醫藥大學**

合作機關：**國立中興大學**



一、中文摘要：

小豬出生至3週斷乳離開母豬過團體生活，期間因不同原因造成下痢，嚴重甚至死亡，損失約10-20%。針對”下痢”症狀，目前養豬戶都採用預防性施予抗生素，濫用抗生素除了會引起細菌的抗藥性，人體若攝入殘留過量抗生素的肉類食品，一樣會使人體的病原菌產生抗藥性，危害人體健康。在傳統中藥領域提升免疫系統上，已有相當研究，其臨床使用上亦相當普及。參苓白朮散出自宋太平惠民和劑局方，由黨苓、白朮、茯苓、山藥、白扁豆、蓮肉、桔梗、薏苡仁、砂仁、甘草、大棗等中藥所組成。其功能：補氣健脾和胃滲濕。臨床上主要使用於治療胃腸虛弱而食慾不振，易起泄瀉等症狀。為希望藉由結合中藥研究，針對豬隻下痢問題進行改善，將中藥本質達到農業畜牧上的應用，本計畫研究為先行利用老鼠動物模式探討使用中藥”參苓白朮散”對老鼠生長性能及各項免疫性狀之評估。結果得知，參苓白朮散不但可誘導巨噬細胞釋放不同類型細胞素，決定並參與非特异性免疫反應性質。並在小鼠動物實驗中，餵食參苓白朮散可提升其攝食量且體重明顯增加，對老鼠的肝腎功能不會引起功能異常。進一步將此理論應用於對離乳仔豬下痢之處理。

二、英文摘要：

Weaned pigs living group life experience diarrhea caused by different reason. Losses 10-20% due to diarrhea and mortality have been extensive on many of the affected farms. Antibiotics are generally added to animal diets to maintain animal health and prevent diarrhea. We know that abuse of antibiotics increases the emergence of antibiotic resistant bacteria. After livestock consume the feed containing antibiotics, most of the antibiotics return to people and it is harmful to health. Shen ling bai zhu san, a traditional Chinese prescription medicine, is composed of eleven herbal medicines : fu ling, gan cao, shan yao, bai zhu, ren shen, bai bian dou, jie geng, hong zao, sha ren, lian zi, yi yi ren. Shen ling bai zhu san is commonly used to remedy poor appetite, frequent diarrhea, and emaciation. A study using the prematurely weaned rat as a model for the pig was undertaken to evaluate the effects of Chinese traditional herbal medicine Shen ling bai zhu san. on growth performance, immune response and hepatorenal function of weaned piglets. Then we utilize above results to investigate the feasibility of replacing antibiotic as growth and health promoter for weaned piglets with the Chinese traditional herbal medicine Shen ling bai zhu san.

三、計畫目的：

利用老鼠動物模式探討使用中藥”參苓白朮散”對老鼠生長性能及各項免疫性狀之評估，進而應用於豬腸道生理與改善下痢情況。本研究方法共分兩大部分進行，第一部份為體外免疫細胞培養(巨噬細胞)，探討參苓白朮散於不同濃度下對巨噬細胞分泌cytokines之影響。第二部份為體內動物實驗，利用幼鼠為動物模式，探討參苓白朮散對幼鼠生長性能及免疫性狀之評估。

四、重要工作項目及實施方法：

(1)藥物:參苓白朮散(科學中藥)。

(2)體外細胞模式(免疫細胞巨噬細胞試驗探討其細胞之免疫表現):以參苓白朮散三種不同濃度進行體外巨噬細胞(Macrophage)之免疫表現。選用Macrophage當實驗的胞株,其細胞培養基為10%胎牛血清(FBS, Hyclone Laboratories, Logan, USA)之培養液,培養於5% CO₂之37 °C恆溫培養箱,繼代培養時,先以PBS清洗2次,再利用Pipet Tip和新鮮培養液於沖下細胞,以1000rpm離心5 min,以適量新鮮培養液懸浮細胞並分種於新的培養皿中,作為接下來測試細胞免疫(細胞素cytokine)。

(3)動物: BALB/c mice(出生15天,重量約20 g)購自國家動物實驗中心,試驗動物飼養於有空調溫度23±2°C、溼度55±5%、明暗各12hr之環境。自由飲水和標準飼料,其飼料內容及比例符合AIN(american institute of nutrition)之規範,試驗動物區分為控制組及實驗組,每組之隻數至少6隻。其控制組:不給予任何中藥。實驗組:利用餵食方式給予中藥(參苓白朮散)。(4)體重與體型動物試驗設計(分為四組分析方法),其規劃如下: a.動物分組及給藥:幼鼠隨機分為4組,每組6隻:對照組(不施加任何藥物)、實驗組一(灌胃參苓白朮散,劑量為0.012g中藥/天)、實驗組二(灌胃參苓白朮散,劑量為0.002 g中藥/天)、實驗組三(灌胃參苓白朮散,劑量為0.00033g中藥/天)。 b.採食量、動物體重進行紀錄。 c.肝腎之毒性測試:連續灌胃30天參苓白朮散出生於採血分析Glutamat-Oxalacetat-Transaminase(GOT)、Glutamat-Pyruvat-Transaminase(GPT)和肌酸酐creatinine。血清生化值測定:在乙醚麻醉下,由腹部動脈採血犧牲,收集的血液靜置於4°C,3000 rpm離心10min取上清液使用市售檢驗試劑(Roche)以自動生化測定儀(Cobas Mira,Roche)測GOT、GPT、creatinine。 d.腸道組織學性狀方面:連續灌胃30天參苓白朮散後,將老鼠犧牲,每次取樣6隻老鼠,取樣後將小腸組織試片保存在4% formaldehyde (PBS pH7.4)中,然後進行切片組織觀察。(5)特異性免疫反應:以卵白蛋白(ovalbumin,OVA)對老鼠行腹腔注射,以得到抗體生成的曲線圖及時間表。出生15天的老鼠在餵食中藥一周後先採血,以作為整個實驗過程的基本值。出生後第22天開始給予250 μL, Ovalbumin 5% 腹腔注射致敏老鼠,並採集血液。出生後第30天重複腹腔注射一次並採集血液。第32天採集血液。分離血清,以ELISA測定特異性抗體specific IgG力價。

五、結果與討論：

(一) 體外免疫細胞模式: 利用Cytokine Antibody Array得知參苓白朮散可有效誘導巨噬細胞釋放細胞。結果得知，利用參苓白朮散於細胞測試，在沒有傷害細胞情況下的中藥濃度中，具有刺激免疫細胞不同細胞素(IL-5、IL-6、GCSF、GM-CSF、TNF α 等)的產生，其細胞素功能為可刺激T及B細胞的活化增加其免疫情況(圖一)。

(二) 體動物試驗: 控制組(不施藥物)、實驗組一(劑量0.00033g/天)、實驗組二(劑量0.002g/天)和實驗組三(劑量0.012g/天)。

1. 攝食量g/30天: 控制組:258.1、實驗組一:280.6、實驗組二:268.7、實驗組三:295.8。
2. 體重變化g/30天: 對照組:+7.7、實驗組一:+9.2、實驗組二:+9.1和實驗組三:+11.4(圖二和圖三)。

3. 肝腎功能(N=6):

對照組: GOT 106.46 ± 9.44 (U/L), GPT 40.40 ± 2.22 (U/L), Creatinine 0.39 ± 0.18 (mg/dL)。

實驗組1 (0.006g/天): GOT 118.55 ± 11.47 (U/L), GPT 43.30 ± 3.15 (U/L), Creatinine 0.30 ± 0.20 (mg/dL)。

實驗組2 (0.03g/天): GOT 115.83 ± 8.97 (U/L), GPT 41.68 ± 2.95 (U/L), Creatinine 0.34 ± 0.14 (mg/dl)。由以上數據其服用中藥參苓白朮散對於老鼠的肝腎功能無明顯差異，顯示無造成肝腎功能異常。

4. 組織切片:

小腸(Small Intestine)組織: 隨服用中藥濃度增加其小腸絨毛長度增長。對照組:小腸絨毛 $441.2 \pm 13.9 \mu\text{m}$ ，實驗組1 (0.006g/天): $461.2 \pm 28.2 \mu\text{m}$ ，實驗組2 (0.03g/天): $493.2 \pm 12.5 \mu\text{m}$ (圖四)。

肝、腎(Liver、kidney)組織切片:由組織切片來看，切片上沒有免疫細胞的生成，和對照組比較得知，服用中藥參苓白朮散對於老鼠的肝腎組織，不影響肝組織與腎組織的細胞形態表現，因得知對照組和實驗組其肝腎組織並無發炎反應產生(圖五)。

5. 體內動物細胞素分析-Cytokine測試: 服用中藥參苓白朮散的老鼠有非特異性免疫反應，具有刺激小鼠分泌細胞素(TIMP-1、MIP-2)的產生，其細胞素功能為具有提昇活化態肝臟星狀細胞存活率之能力情況(圖六)。

6. 老鼠OVA進行致敏IgG(ng/ml)濃度測定(N=6):

對照組: $758,010 \pm 1,697$ ，實驗組1(0.006g/d): $743,400 \pm 1,756$ ，實驗組2(0.03g/d): $738,840 \pm 1,214$ 。結果顯示服用中藥IgG無明顯差異。對OVA無特異性抗體表現。

六、結論

- (一)細胞素分析結果得知，參苓白朮散可誘導巨噬細胞釋放不同類型細胞素，決定並參與非特異性免疫反應性質。
- (二)小鼠實驗得知，餵食參苓白朮散可提升其攝食量且觀察到體重明顯增加。腸道組織切片觀察小腸絨毛長度隨服用中藥濃度增加而增長。
- (三)服用中藥對於老鼠的肝腎功能無明顯差異，顯示無造成肝腎功能異常。由肝腎組織切片得知對照組和實驗組其組織無免疫反應。
- (四)服用中藥，特異性免疫蛋白IgG無明顯差異，對OVA無特異性抗體表現。但服用中藥的老鼠有非特異性免疫反應。
- (五)整計畫研究皆符合計畫進度。

七、參考文獻：

- 1.李洽恩, 如何利用營養方法來戰勝小豬下痢, 飼料營養雜誌: 1987年一月號P18~23
- 2.莊榮賢, 2006。乳鐵蛋白對早期離乳仔豬生長、腸道及免疫性狀之影響。國立中興大學畜產學系碩士論文, 台中市。
- 3.台灣常見之豬腸道疾病, 動藥技術專刊2006/10/19
- 4.夏良宙, 仔豬早期分離式離乳及其利弊, 中國畜牧雜誌第 33 卷(01)第 7 期, p45~48
- 5.蘇瓊珍, 黃珠芳, 張直, 初生體重及離乳前後之飼養方式對仔豬生長性能的影響, 中國畜牧學會會誌 第28卷 第1期 1~9, 1999
- 6.陳彥旭, 漫談抗生素之濫用, 高醫醫訊月刊, 2000年8月, 第二十卷第三期
- 7.張上淳, 陳美文, 林美智, 胡幼圃, 台灣人用抗生素與動物用抗生素使用量之調查研究, 衛生署委託之研究計畫(計畫編號89SHU028) 張得銘, 「抗生素濫用影響國人健康」(2000年5月, 凱倫出版社印行)
- 8.楊志立, 黃文端, 曾慶彪, 雷洪武, 楊立勇參苓白朮散加味治療嬰幼兒腹瀉175例 CJ TCM Apr. 2005 Vol. 17 No. 2, 166
- 9.方清文, 參苓白朮散治療嬰幼兒秋季腹瀉118例, 現代中西醫結合雜誌2000年第9卷第21期11月號, 2106-2107
- 10.張一星, 參苓白朮散治療小兒脾虛泄瀉臨床體會, 現代中西醫結合雜誌2001年第10卷第18期9月號, 1785
- 11.鄧祥雄, 黃俊山, 參苓白朮散加減治療免疫功能低下48例, 吉林中醫藥1997年第4, 14-15
- 12.陳舟杭, 參苓白朮散加減治療嬰幼兒腹瀉, 浙江中西醫結合雜誌2006年第16卷第6期, 382
- 13.Bayley, H.S. and W.E. Carlson. 1970. Comparisons of simple and complex diets for baby pigs: Effects of form of feed and glucose addition. J. Anim. Sci. 30:394-401.
- 14.Campbell, N. D., K. L. Soeken and E.A.D. Rankin. 1986. Infant weaning patterns and related maternal-infant health outcomes. Public Health Nurs. 357.
- 15.Falkowski, J. F. and F. X. Aherne. 1984. Fumaric and citric acid as feed additives in starter pig nutrition. J. Anim. Sci. 58 : 935—938.
- 16.Haensly, W. E., B. R. Dunsford and D. A. Knahe. 1988. Early-weaned pigs show changes in small intestinal goblet cell concentrations. J. Vet. Med. C. 17233 (Abstr.).
- 17.Hancock, J.D., E.R. Peo, Jr., A.J. Lewis and R.A. Moxley. 1990. Effect of ethanol extraction and heat treatment of soybean flakes on function and morphology of pig intestine. J. Anim. Sci. 68:3244-3251
- 18.Henry, R. W., D. W. Pickard, and P. E. Hughes. 1985. Citric acid and fumaric acids as food additives for early-weaned piglets. Anim. Prod. 40 : 505—509.
- 19.Jensen, V. S., S. K. Jensen and K. Jakobsen. 1997. Development of digestive enzyme in pigs with emphasis on lipolytic activity in the stomach and pancreas. J. Anim. Sci. 75: 437-445.
- 20.Miller, B. G., T. J. Newby, C. R. Stokes and F. J. Bourne. 1972. Influence of diet on postweaning malabsorption and diarrhoea in the pigs. Res. Vet. Sci. 36:187-193.
- 21.ON SMALL INTESTINAL STRUCTURE AND FUNCTION IN PREMATURELY WEANED RATS” , J. Anim. Sci. 1991. 69:2894-2903
22. Ravindran, V. and E. T. Kornegay. 1993. Acidification of weaner pig diets: A review. J.

六、結論

- (一)細胞素分析結果得知，參苓白朮散可誘導巨噬細胞釋放不同類型細胞素，決定並參與非特異性免疫反應性質。
- (二)小鼠實驗得知，餵食參苓白朮散可提升其攝食量且觀察到體重明顯增加。腸道組織切片觀察小腸絨毛長度隨服用中藥濃度增加而增長。
- (三)服用中藥對於老鼠的肝腎功能無明顯差異，顯示無造成肝腎功能異常。由肝腎組織切片得知對照組和實驗組其組織無免疫反應。
- (四)服用中藥，特異性免疫蛋白IgG無明顯差異，對OVA無特異性抗體表現。但服用中藥的老鼠有非特異性免疫反應。
- (五)整計畫研究皆符合計畫進度。

七、參考文獻：

- 1.李洽恩,如何利用營養方法來戰勝小豬下痢,飼料營養雜誌:1987年一月號P18~23
- 2.莊榮賢,2006。乳鐵蛋白對早期離乳仔豬生長、腸道及免疫性狀之影響。國立中興大學畜產學系碩士論文,台中市。
- 3.台灣常見之豬腸道疾病,動藥技術專刊2006/10/19
- 4.夏良宙,仔豬早期分離式離乳及其利弊,中國畜牧雜誌第33卷(01)第7期,p45~48
- 5.蘇瓊珍,黃珠芳,張直,初生體重及離乳前後之飼養方式對仔豬生長性能的影響,中國畜牧學會會誌第28卷第1期1~9,1999
- 6.陳彥旭,漫談抗生素之濫用,高醫醫訊月刊,2000年8月,第二十卷第三期
- 7.張上淳,陳美文,林美智,胡幼圃,台灣人用抗生素與動物用抗生素使用量之調查研究,衛生署委託之研究計畫(計畫編號89SHU028)張得銘,「抗生素濫用影響國人健康」(2000年5月,凱倫出版社印行)
- 8.楊志立,黃文端,曾慶彪,雷洪武,楊立勇參苓白朮散加味治療嬰幼兒腹瀉175例 CJ TCM Apr. 2005 Vol. 17 No. 2,166
- 9.方清文,參苓白朮散治療嬰幼兒秋季腹瀉118例,現代中西醫結合雜誌2000年第9卷第21期11月號,2106-2107
- 10.張一星,參苓白朮散治療小兒脾虛泄瀉臨床體會,現代中西醫結合雜誌2001年第10卷第18期9月號,1785
- 11.鄧祥雄,黃俊山,參苓白朮散加減治療免疫功能低下48例,吉林中醫藥1997年第4,14-15
- 12.陳舟杭,參苓白朮散加減治療嬰幼兒腹瀉,浙江中西醫結合雜誌2006年第16卷第6期,382
- 13.Bayley, H.S. and W.E. Carlson. 1970. Comparisons of simple and complex diets for baby pigs: Effects of form of feed and glucose addition. J. Anim. Sci. 30:394-401.
- 14.Campbell, N. D., K. L. Soeken and E.A.D. Rankin. 1986. Infant weaning patterns and related maternal-infant health outcomes. Public Health Nurs. 357.
- 15.Falkowski, J. F. and F. X. Aherne. 1984. Fumaric and citric acid as feed additives in starter pig nutrition. J. Anim. Sci. 58 : 935—938.
- 16.Haensly, W. E., B. R. Dunsford and D. A. Knahe. 1988.Early-weaned pigs show changes in small intestinal goblet cell concentrations. J. Vet. Med. C. 17233 (Abstr.).
- 17.Hancock, J.D., E.R. Peo, Jr., A.J. Lewis and R.A. Moxley. 1990. Effect of ethanol extraction and heat treatment of soybean flakes on function and morphology of pig intestine. J. Anim. Sci. 68:3244-3251
- 18.Henry, R. W., D. W. Pickard, and P. E. Hughes. 1985. Citric acid and fumaric acids as food additives for early-weaned piglets. Anim. Prod. 40 : 505—509.
- 19.Jensen, V. S., S. K. Jensen and K. Jakobsen. 1997. Development of digestive enzyme in pigs with emphasis on lipolytic activity in the stomach and pancreas. J. Anim. Sci. 75: 437-445.
- 20.Miller, B. G., T. J. Newby, C. R. Stokes and F. J. Bourne. 1972. Influence of diet on postweaning malabsorption and diarrhoea in the pigs. Res. Vet. Sci.36:187-193.
- 21.ON SMALL INTESTINAL STRUCTURE AND FUNCTION IN PREMATURELY WEANED RATS”, J. Anim. Sci. 1991. 69:2894-2903
22. Ravindran, V. and E. T. Kornegay. 1993. Acidification of weaner pig diets: A review. J.

Sci. Food and Agri. 62 : 313—322.