

中國醫藥大學 醫學研究所
碩士學位論文

大白鼠外傷性出血性休克後炎症反應在

性別差異上之研究：

基於功能性基因體學並應用賀爾蒙調節來治療因創傷
導致多重器官衰竭之嶄新療法的研究

**The Gender Dimorphism of Inflammatory
Response Following Traumatic Hemorrhagic Shock:
A study based on its functional genomics and
validation of a novel therapeutic approach for
post-traumatic multiple organ failure by hormonal
modulation**

指導教授：陳瑞杰 副教授

研究生：鍾侑庭

中華民國九十五年九月

中文摘要

關鍵詞：性別差異，雌激素，細胞激素，外傷性出血性休克，多重器官衰竭，功能性基因體，基因晶片、DNA 微陣列

背景：外傷早期死亡主要原因包括頭部外傷與出血性休克，晚期則為器官衰竭。研究顯示，外傷好發於年輕男性。許多研究指出性別差異源自於性賀爾蒙效用。肝臟是一個代謝功能複雜且重要的器官，各類休克常導致肝臟衰竭，同時合併極高的死亡率。DNA 微陣列提供一個樞紐性工具，讓生物學界能夠了解複雜疾病之基因體變化，而外傷導致生物體急速與巨大衝擊正可提供一個獨特機會得以研究功能性基因體與蛋白質體的變化。

目的：藉由 DNA 微陣列技術，全面瞭解外傷性出血性休克導致基因體表現之變化在性別上的差異，並觀察基因體變化與細胞層級變化及臨床指標，如：細胞激素與雌激素，以期找出其間之關連性。

方法：本實驗之對象為大白鼠，共分三組，每組 12 隻，雌雄各半。第一組：控制組，第二組：出血性休克組，第三組：急救組。出血性休克採用固定血壓方式，並維持平均動脈壓為 45-55 毫米汞柱達一小時。實驗結束後四小時給予安樂死，同時將大白鼠肝臟組織取下並且由心臟抽血。以肝組織作為微陣列之分析。血中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 及 17 β -estradiol 也予以檢測。

結果：出血性休克組雄性 4 小時雄鼠死亡率為 66.7%，雌性則為 50%。在死亡個案當中，雄鼠平均存活時間亦較短 (81.3 分鐘 vs.123 分鐘，

$p < 0.05$)。在雌激素方面，雌性明顯高於雄性 ($p < 0.001$)。無論雌雄，出血性休克組血清中四種細胞激素均有最高的表現。在 DNA 微陣列技術的實驗方面，大白鼠基因晶片(GeneChip[®])可檢測 31042 個基因，研究發現結果發現出血性休克後 4.1 % 的基因有明顯改變；而以輸液急救後則有 3.7% 有明顯改變。

討論：出血性休克組雄鼠死亡率較雌鼠高，在死亡個案當中，雄鼠平均存活時間亦較短。這樣的結果顯示雌鼠對外傷性出血性休克有較高的忍受性。除了 TNF- α 以外，三組肝組織基因的表現大致上與血清相對應細胞激素濃度變化一致，其主因可能為 TNF- α 最早出現，且半衰其很短之故。外傷性出血性休克在急性期改變的基因表現大都與細胞內能量製造與代謝機轉有關，部分則與基因訊號傳遞或與細胞基質與結構蛋白質製造相關。

結論：雌性在外傷性出血性休克之後的系統性炎症反應的調節中扮演重要角色，由本研究發現它可降低此類損傷早期的死亡率。

英文摘要

Key words: gender dimorphism, cytokines, estrogen, traumatic hemorrhagic shock, multiple organ failure (MOF), functional genomics, Gene chip, cDNA Microarray

Background : The majority of trauma patients in the acute and early categories died as a result of neurologic dysfunction, and hemorrhage. As all are known, the mortality rate of male following trauma is higher compared to that of females. A number of studies indicated that this sex difference was primarily the effect of sex hormones. The liver is a complex metabolically active organ, particularly susceptible to shock, and liver failure carries a high mortality rate. DNA microarray technology provide a pivotal tool in understanding the functional genomics of complex diseases.

Purpose : Under the application of DNA microarray technology, we can have a global understanding of the pattern and difference of immune restoration and gene expression following traumatic hemorrhagic shock in the male and female rats. We also want to correlate these observed gene expressions with cellular change and clinical parameters such as hormone levels and serum cytokine concentrations.

Methods : In our study, mature Sprague-Dawley rats with half for each sex, were divided into three groups, each group having 12 rats: group I: control group (sham operation); group II: hemorrhagic group; group III: resuscitative

group . Hemorrhagic shock was induced by withdrawing blood via left femoral artery within 10 minutes and maintain MABP between 45-55 mmHg for one hour . The animals were sacrificed by euthanasia at 4 hrs after the finish of experiment to obtain the liver and whole blood. The liver samples were harvested for microarray analysis. The cytokines including TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, as well as 17 β -estradiol will be measured through the blood samples.

Results: In shock group, the 4-hour mortality rate was 66.7% male subgroup and 50% in female subgroup. Among the mortality rats, male rats had shorter mean survival time than females did (81.3 min. vs. 123 min.). In regard to 17- β estradiol, plasma levels in females were significantly higher than those in males ($p < 0.001$). Regardless of sexes, hemorrhagic group had the highest and control group had the lowest plasma levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10. In the microarray study, the GeneChip[®] revealed 4.1% (1283/31042) of assessed genes were altered. As compared with hemorrhagic group, the GeneChip[®] revealed 4.1% (1149/31042) of assessed genes were altered.

Discussion: In shock group, the mortality rate was significant higher in male subgroup. Among the mortality rats, male rats had shorter mean survival time than females did. The current data of mortality and plasma levels of cytokines in shock group suggesting that females have more protective from traumatic hemorrhagic shock than males do. Except for the TNF- α , the gene expression in the liver were approximately in accordance with the corresponding cytokine

levels in the blood. Most of the significant genes are energy producing and metabolically related genes, and some are signal transduction and matrix & structural proteins synthesis related.

Conclusion: Female play an important role on modulation for systemic inflammatory response following traumatic hemorrhagic shock and resuscitation, therefore, reduce the early mortality of the injured rats.



致謝

今日能夠完成本研究及論文，最要感謝的是指導教授陳瑞杰副院長讓我有機會參與其國科會研究計劃「大白鼠外傷性出血性休克後炎性反應在性別差異上之研究：基於功能性基因體學並應用賀爾蒙調節來治療因創傷導致多重器官衰竭之嶄新療法的研究」。當初剛考上研究所，心想自己對外傷有相當的興趣，而陳副院長正是這個領域的權威，便請他擔任我的指導教授，而副院長也很爽快答應。研究所尚未開學，自己還在思索未來的研究主題時，副院長已拿了一份外傷與基因體的參考資料要我好好研讀並在兩週後報告，當時直覺不妙，未來兩年必定不好過。果然，不久之後副院長便交付這項研究計畫，並安排我至長庚醫學大學學習動物實驗操作技術。

在那段時間非常感謝樓迎統教授的指導與其研究生陳熙文的技術協助使我對動物實驗有了基本的概念。回來之後開始著手實驗規劃，發現仍有一堆難題需要解決，在哪裡做實驗（因沒有專屬實驗室）、實驗器械、儀器及助理均缺，檢測的試劑、微陣列晶片之訂購與分析技術亦是一大考驗。所幸這些難題隨著實驗的規劃與進行逐步解決，這當中特別要感謝麻醉部吳世銓部長提供實驗室及相關設備、急診部鄭宜昌醫師與其助理謝曉嵐在動物實驗的實際操作上的協助以及張建國教授在微陣列實驗方面的指導。要感謝的人實在很多：急診室彥芳護理長及秀惠副護理長，經常要麻煩你們幫忙將血液標本離心；秀鳳姐，多虧妳熱心幫忙申請實驗相關物料在此一併致謝；其他還有急診檢驗室、細菌室、分子生物實驗室的同仁

及張建國主任的研究助理志玫，謝謝你們的協助使這個研究能夠完成。兩年的研究讓我有機會跨進基礎研究的領域，接觸基礎醫學最新的進展。這個過程是艱辛的，一方面醫院的臨床工作繁忙，上班的壓力極大，每到下班幾已心力交瘁，只想好好休息；另一方面，基礎研究非一蹴可幾，尤其是對毫無動物實驗經驗的我而言更是千頭萬緒。感謝急診部陳維恭主任在排班上的協助，減少上班班數，讓我有較充裕的時間從事實驗。最後也感謝外傷部助理秋秀及急診部助理俊忠，經常麻煩你們有關行政、文書方面的瑣事，讓我節省不少這方面的作業時間。

兩年的努力總會有收穫的，如今論文業已經鍾景光教授、楊大羽副教授、陳瑞杰副教授及林嘉興助理教授的指導完成審查並付梓，而我也順利通過口試完成碩士學業。然而這絕非代表研究已經結束，接下來的工作還有論文的發表，當然也期望未來能從這個實驗的結果，繼續從事進一步的研究。

目錄

書名頁	I
口試委員審定書	II
中文摘要	III
英文摘要	V
致謝	VIII
目錄	X
圖表目錄	XI
第一章 前言	1
第二章 研究方法	18
第三章 研究結果	26
第四章 討論	63
第五章 結論與建議	71
圖表	72
參考文獻	78

圖表目錄

- 圖 1: GeneChip®Rat Genome 230 2.0 Array
(Affimetrix) 晶片 72
- 圖 2: DNA 微陣列操作及分析流程 . . . 73
- 圖 3: 平均中心靜脈壓之變化 74
- 圖 4: 平均動脈壓之變化 74
- 圖 5: TNF- α 血中濃度及肝組織中相對基因之比
較 75
- 圖 6: IL-1 β 血中濃度及肝組織中相對基因之比
較 75
- 圖 7: IL-6 血中濃度及肝組織中相對基因之比
較 76
- 圖 8: IL-10 血中濃度及肝組織中相對基因之比
較 76
- 圖 9: 主要基因之分子功能 (出血性休克組 vs 控制
組) 77
- 圖 10: 主要基因之分子功能 (急救組 vs 出血性休克
組) 77

第一章 前言

第一節 研究背景

一、外傷流行病學

包含台灣在內，事故傷害一直是青壯年最主要的死因。根據中華民國衛生署94年度的統計，事故傷害在所有年齡層中位居國內第五大死亡原因¹⁻⁴。Trunkey⁵於1983年發表著名的「trimodal distribution of trauma death」。在他們的研究中發現因外傷有三個死亡高峰，分別為立即、早期及晚期。因根據研究顯示有高達50%死亡發生逾受傷後1小時內，主要原因為嚴重出血與中樞神經系統創傷⁶，另外大約30%的死亡則發生於受傷後1-2小時內，主要原因為嚴重內臟損傷⁷，其中仍以出血性休克為最多；而晚期死亡則為感染導致多重器官衰竭，而其中一開始嚴重的出血仍佔有關鍵的地位。由以上數據可知出血性休克是造成創傷死亡最主要的直接及間接原因。因此致力於研究因外傷導致出血性休克，並試圖從其中找出有效的治療方式對降低外傷死亡絕對有極大的助益⁸。

二、外傷性出血性休克

所謂休克，在病生理的定義上意味組織灌流不足導致細胞缺氧的狀態。由於缺氧導致新陳代謝改變，造成細胞功能失調並釋放炎症介質（細胞激素），而這些介質依序引發一連串的反应，包括凝血機能障礙、免疫抑制、最後造成器官衰竭而致死亡⁹。出血是外傷導致休克最常見的原因，也是外傷立即及早期死亡最主要的原因。

過去幾十年有許多努力及研究試圖闡明因嚴重出血所引發的病生理機轉與免疫學方面的變化。在這些研究中已觀察到單獨的出血性休克或同時加上軟組織傷害（例如剖腹）對 cell-mediated 及 humoral 免疫的影響¹⁰⁻¹³。出血性休克會顯著地降低特異性（specific）及非特異性（non-specific）免疫反應¹⁴⁻¹⁵。這種免疫的降低在引發出血性休克後 30 分中後即發生，並一直維持 24 小時^{14, 16-18}。嚴重出血也曾被報告會引發內分泌的改變，包括增加 adrenocorticotrophic hormone、corticosterone 及 beta-endorphin 的分泌¹⁹。

組織創傷是機械性的事件；而出血性休克則為生理症候群。外傷性出血性休克所引發的賀爾蒙及炎性介質的反應與其他型態的休克是有明顯不同的²⁰。因出血及組織損傷而活化系統性炎性反應是外傷性出血性休克後病生理機轉之重要元素。系統性炎性反應之活化因子包括缺血 / 再灌注損傷及中性白血球的活化。而微血管因出血性休克導致“無血流(no-flow)”合併長期缺血以及“再灌注”損傷也會刺激中性白血球的活化。導致無代償性、無法回復之出血性休克的機轉包括(1)“小動脈的敏感度降低”其臨床表現為持續小動脈擴張及其對貝他型刺激劑(β -agonist)反應降低(2)細胞損傷及活化正炎性(proinflammatory)和抗炎性(counterinflammatory)機轉。以上的種種變化所代表的是微循環衰竭。而休克之後即使給予適當急救仍會因心輸出量的再分配及持續腸缺血也可能會因而發生無可回復的出血性休克。

先前相關的研究已經顯示在外傷性出血性休克時期血管內皮細

胞的損傷已然發生，即使給予輸液急救其損傷仍然持續。而重點是血管內皮細胞在維持組織灌注佔有關鍵性的角色²¹⁻²³。因此，在出血性休克後觀察如何維持內皮細胞功能具有潛力的治療方式是非常重要的。研究顯示快速給予輸液治療來補充流失的血液，以維持血壓及組織灌注是處理外傷性出血性休克其中一個重要的里程碑。然而即使給予看似成功的急救，仍有不少創傷患者在損傷初期存活下來，卻在之後因敗血症及多重器官衰竭而死亡²⁴⁻²⁶。

三、外傷性出血性休克之動物研究模型

過去數十年來，有許多研究機構及學者投入極大的努力致力於嚴重出血的研究。在眾多的研究中，有以臨床實驗者，也有以動物為研究對象。以人體研究出血性休克困難度及變數較高，因為在這種危急的狀況下，需要立即給予適當急救處置，經常無法配合研究的設計，同時由於病患在臨床表現的異質性使得臨床實驗多所限制，然而其畢竟是臨床研究，較能反映實際狀況；而以動物模型研究，則較能控制各項變因，使得研究單純化，然而因研究動物畢竟不同於人體，且設計的狀況也不見得符合現況，因此不能以研究的結果直接應用於臨床，但這種研究模型目前仍廣泛地被使用來研究出血性休克之病理機轉，由此模型所得到的前臨床資料也可作為出血性休克介入性治療的基礎。成功的外傷性出血性休克模型需要對所有面向，包括機械的、生理學的、細胞生物學的及免疫學的均有深刻的理解。同時外傷性出血性休克引發之炎性反應會隨時間而有不同的變化，所以早期或晚期炎性反應是相異的。

目前研究外傷性出血性休克主要模型有二：

1. 非控制性出血模型 (Uncontrolled hemorrhage model)

此種模型以誘導脾臟損傷或主動脈撕裂等方式造成出血性休克，較適合用來研究輸液治療的時機、種類及輸液量²⁸⁻³⁷。影響實驗變數包括創傷種類、休克時間及輸液種類。優點是可以適切的反應臨床狀況，同時也造成組織損傷；缺點是出血量無法控制。

2. 控制性出血模型 (Controlled hemorrhage model)

此種模型可以使實驗者較精確地控制休克的程度，但現實狀況並非如此，因此較難反應現實狀況。雖然如此，因為此種模型較易操作因此廣為從事出血性休克研究者作為相關研究的模型。此種模型又可分成兩種模型：

A. 固定血容模型 (fixed-volume model)

以固定出血量誘導休克，通常根據實驗動物體重來決定，並藉由動脈導管監測血壓。此種模型被廣泛用來研究出血性休克後新陳代謝及組織病理學方面的變化、存活率及治療效果。影響實驗的變數包括誘發休克之速度、休克時間(1-2小時)、休克嚴重程度、使用麻醉藥種類及輸液種類。此種模型的優點是可以評估休克代償機轉，但缺點則是低血壓的程度無法維持一定且須另外以傷口模擬創傷狀態。

B. 固定血壓模型 (fixed-volume model)

藉由動脈導管及血壓監測器監測血壓，視需要從動脈導管抽血以達到所設定的血壓。其研究範圍及變數影響與固定血容模

型相同。優點是低血壓的程度、期間及出血量可被控制及監測，雖然這種模型無法完全模擬臨床狀況，但因為實驗條件好控制，因此最常用作出血性休克的模型。本實驗即採用此模型。

四、細胞激素 (Cytokine) 的介紹

在外傷性出血性休克引發系統性炎症反應在細胞層級變化的研究中，細胞激素是最常被用來與各項生理指標、預後及其他更細微的變化，如基因的表現來做比較，因為細胞激素是最為醫界及學界所熟知，也是目前研究比較透徹的。細胞激素可分為三類，分別為正炎症 (Proinflammatory) 細胞激素，如TNF- α 、IL-1、IL-6及IL-8；抗炎性 (Antiinflammatory) 細胞激素，如IL-4、IL-10、IL-13及TGF- β ；及溶解性細胞激素接受體 (Soluble cytokine receptor)。現將幾種代表性的細胞激素其功能及損傷急性期的血中表現敘述如下：

1. TNF- α

TNF- α 是宿主在損傷反應後最早產生，也是最強的細胞激素。它主要由T型淋巴球及巨嗜細胞所分泌，此外也由肝臟的Kupffer細胞所分泌。在出血性休克早期Kupffer細胞TNF- α 的濃度及其相對應mRNA的表現均增加³⁸。雖然TNF- α 的半衰期小於20分鐘，但這麼短暫的出現已足以引發顯著的新陳代謝及血行動力學變化並能刺激下游介質的分泌。研究顯示受傷後，宿主血中TNF- α 濃度開始升高並在4小時內達到高峰，之後即快速下降³⁹⁻⁴⁰。根據Tracey及其同事⁴¹的研究顯示以高劑量TNF- α 靜脈注射於動物體內會導致低血壓、頻

脈、呼吸過快、乳酸中毒、高血鉀、高血糖，繼之引發低血糖。此外TNF- α 亦能活化凝血機能，促進黏合分子、PGE2、血小板活化因子（PAF）、Glucocorticoids、及Eicosanoids得表現及釋放⁴²。

2. IL-1

雖然IL-1及TNF- α 作用類似，但他們有各自的接受體及細胞內訊息傳導路徑。IL-1有兩種型態：一為IL-1 α ，另一為IL-1 β 。他們主要由被活化的巨嗜細胞及內皮細胞所分泌。IL-1 α 與細胞膜有關而IL-1 β 則較能由循環中被測出。此外，對於外傷，IL-1可藉由對局部prostaglandin的刺激而誘發典型炎性反應。IL-1的半衰期約6分鐘。

3. IL-6

IL-6 由多種細胞所分泌包括纖維母細胞、內皮細胞、Kupffer細胞、中性白血球、巨嗜細胞、T型及B型淋巴球。它影響多種生物功能包括免疫球蛋白的及白血球的製造及急性期的反應⁴³⁻⁴⁴。根據Chaudry的研究³⁸，出血性休克早期Kupffer細胞IL-6的濃度及其相對應mRNA的表現與TNF- α 一樣均增加。IL-6具有正炎性及抗炎性的作用，在許多動物研究顯示IL-6的正炎性反應是藉由活化B型淋巴球及誘導chemokines及黏合分子（adhesion molecule）在內皮細胞的表現⁴⁵。另一方面，根據Meng⁴⁶等人的研究出血性休克模型，在急救時以合成的IL-6靜脈注入老鼠體內後，肝臟和肺臟的損傷明顯減少而且白血球的浸潤亦降低。其他相關的研究也顯示以合成的IL-6注入實驗動物亦會降低血中TNF- α 及IL-1 β 的濃度，這些結果說明了IL-6亦有抗炎性作用⁴⁷。

4. IL-10

IL-10 剛開始被認為是細胞激素合成抑制因子(CSIF)。IL-10 由 T 型淋巴球、B 型淋巴球、巨嗜細胞、單核白血球及角化細胞分泌。在出血性休克或感染等壓力下 IL-10 可改變許多免疫細胞分泌細胞激素的量，因此它對免疫反應是有調節的作用。某些研究顯示 IL-10 對正炎症反應控制具有重要的角色。在巨嗜細胞，IL-10 受 TNF- α 的刺激而分泌，但會反過來抑制 TNF- α 及 IL-6 的產生⁴⁸。

五、外傷性出血性休克急性期的免疫反應

外傷性出血性休克急性期的免疫反應是極為複雜的，有許多回饋機制。因此無法以單一反應路徑來解釋，而需要全面且同時檢視所有參與急性反應之細胞激素及免疫細胞⁴⁹。以系統而言，不管損傷的原因是出血、缺血、再灌注、骨折或組織損傷，身體對這些損傷的反應即是要藉由協調免疫系統、心血管系統、內分泌系統及神經系統來維持身體的恆定。自從1980年代末期以來，細胞激素、細胞激素的介質、以及其接受體已被認定可做為外傷病患死亡及殘疾的預測指標。此外，這些炎症介質所引發的系統性反應對原是因應身體的損傷所採取的保護措施，然而過度的反應卻對宿主產生傷害。血中介質 (mediator) 的濃度通常與炎症反應的高低有平行的關係，因此血中有高濃度的細胞激素，緊接而來的可能是嚴重的器官失調 (organ dysfunction)⁵⁰。當嚴重損傷 (如外傷性出血性休克) 發生時多型性中性白血球 (PMN) 是最早出現在損傷部位的免疫細胞，並分泌許多介質包括細胞激素引發系統性炎症反應 (Systemic

inflammatory response syndrome, SIRS) , 同時也刺激巨嗜細胞 (Macrophage) 及淋巴球 (Lymphocyte) 進一步分泌各種細胞激素, 引發更激烈的SIRS反應或CARS (Compensated anti-inflammatory response syndrome) 反應, 導致包括補體、凝血等系統的活化, 造成內皮細胞及實質器官的損傷, 如果此種反應持續激化, 終致器官衰竭而死亡。

就細胞激素的變化而言, 外傷性出血性休克導致正炎性與抗炎性細胞激素在血中濃度的變化, 在時序上是有所不同的。之前已提到的TNF- α 最早產生, 並促使其他細胞激素的分泌, 但因其半衰期很短故很快在血中的濃度即降下來, 研究顯示⁴⁰ TNF- α 血中濃度在外傷性出血性休克後1-2小時內即達到最高值, 並在4小時內降下來。IL-6及IL-10則隨之升高, IL-6血中濃度在4小時內即達高峰, 但在4小時即降下來; IL-10最慢升高, 在4小時血中濃度仍在高點, 在12-24小時仍可在血中維持相當顯著的濃度。TNF- α 血中濃度之所以很快降低一方面因其半衰期很短, 另外據信是因為受到IL-10及IL-6的抑制。而IL-10及IL-6則是因TNF- α 刺激巨嗜細胞而使分泌增加。巨嗜細胞也可因自主神經系統釋出catecholamine的刺激產生IL-10, 但catecholamine卻可抑制TNF- α 及IL-6的分泌。因此IL-6在血中的濃度於4小時內也降低, 這與用LPS誘發敗血症, IL-6能維持高血中濃度超過24小時是有明顯不同的。

六、外傷性出血性休克對肝臟的影響

肝臟是一個代謝活力旺盛且複雜的器官, 然而它也特別容易受

到休克的影響而造成損傷。導致肝細胞損傷的原因很多，而其致病機轉也是多重的，然而炎性反應的活化、ROS (reactive oxygen species) 過度製造、微循環的障礙、Kupffer 細胞的活化、微循環的障礙、白血球及竇狀 (sinusoidal) 內皮細胞的黏著分子 (adhesion molecule) 的正調控 (upregulation)、加強血管收縮物質的釋放、增加肝血管對血管收縮物質的敏感度及血管擴張物質的負調控 (downregulation) 是導致肝損傷共同的機轉⁵¹。而在出血性休克中，因缺血導致肝臟氧氣供應減少、造成肝細胞缺氧而產生氧自由基 (oxygen free radicals) 並誘使中性白血球引發一連串炎性反應在肝損傷的病理機轉佔有重要角色⁵²⁻⁵³。而肝細胞缺氧也會使得其製造 ATP 的能力降低，細胞膜及細胞器官 (organelle) 會損傷進而導致肝功能失調。當出血性休克後以輸液急救後肝細胞 ATP 增加，然而細胞因伴隨而來的腫脹而使得能量製造機制失調。在出血性休克引致肝損傷的研究⁵⁴發現循環中的 endothelin 是受到正調控的，而 endothelin 會影響肝門系統，進一步惡化肝臟微循環導致肝功能失調。因此抑制 endothelin 對肝門系統的作用會減少出血性休克後肝臟損傷⁵⁵⁻⁵⁶。

在 Jarrar 及 Chaudry 回溯性研究中⁵⁷，他們將主要的焦點放在創傷、出血性休克及敗血症後會產生細胞和組織，特別是肝細胞，失調的因子與介質及其訊息傳導路徑。其中 mitogen-activated protein kinases (MAPK)、轉錄因子 (transcription factors)、一氧化氮 (nitric oxide)、熱休克蛋白 (heat shock proteins) 及細胞激素尤其重要。

七、性別差異與外傷預後

研究顯示，外傷好發於年輕男性。而在預後方面，Oberholzer 及其同事⁵⁸ 在對 1,276 位外傷嚴重度分數 (Injury Severity Score, ISS) ≥ 9 分的病患的研究中發現 ISS ≥ 25 分的族群中男性產生敗血症及多重器官衰竭的比率明顯高於女性 (敗血症：30.7% 比 17.0%；多重器官衰竭：29.6% 比 16.0%)。這個結果顯示對於嚴重外傷，女性預後優於男性。此外 Majetschak 及其同事⁵⁹ 在對 84 位 ISS ≥ 16 分鈍挫傷傷患的研究中嚴重損傷的男性傷患其引發嚴重的敗血症與創傷早期血中細胞激素的增加有關。這樣的發現顯示炎症反應的過度活化會增加男性傷患因發敗血症的機會。

八、性別差異與免疫反應

許多研究指出性別差異源自於性賀爾蒙效用，外傷後性賀爾蒙導致免疫不同反應。同時性賀爾蒙已經被證明造成男女性間心臟血管反應，免疫反應，血中細胞激素，及 T 細胞活性之明顯地不同；並可藉由其合成的賀爾蒙製劑與拮抗劑來調節上述之反應。

最近的研究顯示雄性賀爾蒙在外傷性出血性休克後產生免疫抑制扮演重要角色⁶⁰⁻⁶²。相反的，求偶前期 (proestrus) 的雌鼠在遭受外傷性出血性休克後其心臟血管功能及免疫功能仍能維持⁶³⁻⁶⁴。而在出血性休克前 14 天將雄性動物閹割可預防免疫反應之抑制⁶⁵。此外在雄性動物注射睪固酮接受體拮抗劑 flutamide 外傷性出血性休克後免疫反應、心臟及肝臟功能的抑制⁶⁶⁻⁶⁷。因此在外傷性出血性

休克中，雄性賀爾蒙在引發細胞及組織失能方面顯然扮演惡化的角色。相反的，在求偶前期雌性賀爾蒙（如 prolactin 及 estrogen）濃度的增加則對外傷性出血性休克的免疫反應則與雄性有相反的作用。

九、性賀爾蒙濃度

如同先前所提到的，動物實驗顯示雌鼠對外傷性出血性休克後引發的免疫及生理反應具有保護作用，而這個保護作用是因為 17β -estradiol (E2) 之故。然而在臨床研究中，外傷性出血性休克後女性是否有比男性有較好的預後則仍有不同的報告⁶⁸。在臨床研究中女性賀爾蒙在不同月經週期的血中濃度不同，因此很難控制其血中濃度。另一方面在老鼠的動物實驗中，雌性賀爾蒙則較容易控制因為老鼠求偶週期很短，因此使得老鼠成為觀察在求偶週期各種變化的理想動物。老鼠的動情周期約 4-5 天，共分四期，分別為：求偶前期（proestrus）、求偶期（estrus）、求偶間期（metestrus）及停慾期（diestrus）。而上述四期可以光學顯微鏡觀察老鼠陰道抹片的細胞型態來區分：在光學顯微鏡下，求偶前期陰道抹片的細胞型態主要由有核的上皮細胞所組成；求偶期主要為無核的角化細胞；而求偶間期由同等比率的白血球、無核角化細胞及有核上皮細胞所組成；至於停慾期則主要為白血球⁶⁹。在老鼠動情週期期間，求偶前期有最高的血中二氫基女性素（estradiol）及泌乳激素（prolactin）；然而上述兩種激素在求偶期卻最低。Zellweger 及其同事⁷⁰在其研究中指出，雌鼠在求偶前期遭受出血性休克後其免疫反應相對於雄

鼠是增強的。總結上述的發現，要在外傷性出血性休克後雌性賀爾蒙對免疫功能及生理反應的研究上獲致滿意的結果，以適當的方法選擇具有血中高濃度雌激素之求偶前期的雌鼠在研究性別差異對出血性休克的影響是非常重要的。

十、基因體學

所謂基因體學即是藉由系統性的探索來研究整個基因體的結構與功能，因此她又可分為結構基因體學（Structural genomics）及功能基因體學（Functional genomics）。結構基因體學主要研究基因體的結構，如人類基因體之定序。在美國健康總署及能源部的合作下，人類基因體計畫組織（the Human Genome Project Organization；HGPO）正式於1988年成立，並由遺傳學家 Victor McKusick 出任首任負責人，期待藉由此自組織從事人類基因的解序工作。這個計畫後來在與美國民間「賽雷拉」公司的競爭下，於2003年提前完成人類基因序列的定序，基因體學從此進入一個嶄新的紀元。然而即使知道基因體的定序，也只不過是掌握一本大書裡面所有字母排列，書本所表達的意涵，字母所串成的文字及語句所代表的意義還是無從得知。而基因體研究的目標不僅在了解基因體的結構，更希望藉由探索基因在特定細胞形式、特定時間內的表現樣式以了解其在生物體上的作用，也就是所謂的功能基因體學。在正常情況下我們是看不出基因正的功能，唯有當基因發生變化、表現過強或受到抑制甚至喪失功能時才能藉由與正常時的表現而了解其真正的作用。運用這樣的觀念來從事功能基因體學的研究並應用於醫學上，已在遺

傳疾病及癌症的診斷與治療方面有突飛猛進的發展，例如杭丁頓氏症（Huntington's disease）及囊纖維化症（Cystic fibrosis）致病基因的發現即是經典例證。因此以功能基因體學為基礎以發展出 DNA 診斷、基因治療、細胞治療及藥物發現⁷¹對於從事醫學研究者而言不啻是一個值得努力的方向。

然而要如何以功能基因體學來從事醫學研究？這勢必要了解研究功能基因體學的技術。以點印跡分析（dot blot analysis）來探索某基因在特定組織中隨時間而變化的表現樣式是其中常用的技術。然而這種方法一次只能探究一種基因，若要全面研究該組織所有基因隨時間改變而表現的樣式，是必須製造一個超大型的點印跡（dot blot）並包含相對應於細胞中所有可能 mRNA 的單股 DNA，接著再讓標記過的細胞 RNA 和這個巨大的點印跡相互雜合⁷²⁻⁷³。不過這些 DNA 點的體積會造成很大的問題。近年來由於由於半導體工業及生物技術的發展，體積問題已獲致突破性的解決，分子生物學家發明的生物晶片體積很小，是用來分析整個基因體或蛋白質體表現主要的利器。生物晶片依其分析的對象可再分為基因晶片（Gene chip）或稱 DNA 微陣列（DNA microarray）及蛋白質晶（Protein chip）片，而 DNA 微陣列又有寡核苷酸微陣列（Oligonucleotide microarray）及互補核苷酸微陣列（cDNA microarray）兩種。

十一、DNA 微陣列

DNA 微陣列是使用矽晶片、玻璃或高分子為材料，將已知序列的寡核苷酸（稱為探針，probe）排列放置在微陣列上，再將待測樣

品 (target) 滴在微陣列上，利用互補鹼基雜合作用的原理，由樣品與微陣列上的基因序列相互作用的情形獲取所需的資訊並加以分析。DNA 微陣列製作方式主要有兩種，一為原位合成法 (in situ oligo synthesis)，另一為預合成法 (pre-synthesized oligos)。原位合成法是利用光蝕刻技術 (photolithographic technique) 在小型玻璃微晶片表面以微小、緊密相距的點建造短的 DNAs，其所製成的晶片即為寡核酸微陣列。以這種技術製作而成的晶片以 Affymetrix 公司製造的 25 員體 (25-mers) 的微晶片為代表，然而這種晶片成本較高。預合成法則是將核苷酸預先合成，其長度甚至可達數千鹼基，再以一具有平行筆針的機器將含有預合成的核苷酸點在晶片上，此種方法成本較低但製作較耗時。

以 DNA 微陣列應用於醫學上可做為基因表現分析、基因型表現及疾病管理⁷⁴。因為微陣列上的寡核苷酸或 cDNA 可以和細胞中分離出來的、經過標記的 RNA (或是相對應的 cDNA) 雜核，以研究細胞中哪一個基因會被表現出來，再藉由電腦強大的分析功能以了解基因體在生物體的表現形式及調控機制，進而做為疾病診斷及新治療方式的研發。由於 DNA 微陣列技術的發展，它不僅被用來研究遺傳疾病及癌症診斷與治療⁷⁵⁻⁷⁶，近幾年在敗血症引系統性炎症反應的研究中也大量使用此種技術來分析⁷⁷⁻⁸⁰。應用 DNA 微陣列技術研究敗血症導致基因表現值與量的變化可以對其所調控網絡有更全觀及嶄新的視野，這對於治療因感染及發引導致器官衰竭提供新的方向。Qureshi⁸¹ 在今年五月份 Shock 雜誌中即發表以 DNA 微陣

列分析在以 lipopolysaccharide (LPS) 引發炎性訊息傳導路徑 (inflammatory signaling pathway)，進而導致敗血性休克的老鼠實驗中，proteasome 是調控這些路徑的關鍵介質。

十二、為何外傷性出血性休克須以 DNA 微陣列技術研究

嚴重外傷病患經常死於出血性休克、敗血症及多重器官衰竭。而宿主炎性反應網絡 (inflammatory network) 的活化導致細胞及組織損傷在上述症候群的致病機轉中扮演主要的角色。對外傷性出血性休克的致病機轉及性別差異對其在免疫功能及生理反應影響的研究方面在近幾十年來有相當的進展，然而大部份均針對某一特定介質或訊息傳導路徑做研究，對於外傷性出血性休克後導致基因表現的差異進而影響蛋白質的製造引發細胞內連串的反应及生物體的變化並無全觀性的了解。事實上因外傷對生物體產生巨大的衝擊，正可提供一個獨特的機會來研究基因體的變化以及其調控的蛋白質體的變化，進而對外傷性出血性休克引發的系統性炎性反應有全面性的了解，並發展出有效的治療，因為這種對生物體急速與巨大衝擊，反而是癌症等慢性疾病及遺傳疾病所無法呈現的。DNA 微陣列提供一個樞紐性工具，讓生物學界能夠了解複雜疾病之基因體變化，但是目前為止，卻甚少被應用於嚴重外傷病患。

雖然外傷、出血性休克及感染均會引發系統性炎性反應，然而它們在基因表現的變化及引發的訊息傳導路徑卻不盡相同⁸²。Cobb 等人⁸³ 使用盲腸結紮及穿刺 (cecal ligation and puncture, CLP) 模型研究老鼠的脾臟 (對刺激導致細胞凋亡敏感) 及肝臟 (反抗刺激導

致細胞凋亡) 在敗血症後基因的表現。藉由微陣列技術，他們發現因敗血症導致老鼠 588 個基因有改變，而這些有改變的基因是具器官特異性的。在這個研究中敗血症 24 小時後肝組織表現有改變的基因大部分與膜蛋白及接受體有關；而在脾臟的部分則主要與訊息傳遞介質 (signaling cascades)、細胞死亡路徑 (cell death pathways) 及細胞激素的製造有關。Biberthaler 等人⁸⁴ 在嚴重多重外傷預後的臨床研究中，使用 Affymetrix U133A 微陣列分析單核白血球基因表現的變化，發現死亡患者那組與活化 c-JUN 有關的正炎性基因及細胞內傳導路徑均有過度表現的現象，顯示 c-JUN 與嚴重多重外傷的預後有關。根據 Chen 等人⁸⁵ 以 Atlas Rat 1.2 cDNA expression arrays 分析出血性休克及以不同輸液急救後在不同時間(0 小時及 24 小時) 及不同組織 (肝臟、肺臟及脾臟) 基因表現的變化，顯示在嚴重的出血性休克模型中，由基因調控的細胞反應深深受到休克本身及不同輸液的影響。以上這些研究均使用微陣列技術對調控基因作全面性的分析，藉由這種技術所獲致的資料以及以電腦強大的功能分析這些資料，使我們對外傷、休克及感染所引發的系統性炎性反應有更全面性的了解，甚至可由資料全面的探勘找出以前所未發現的機轉。

外傷多發生於原來健康的生物體，我們假設當嚴重外傷發生後身體會因基因體表現的改變引發一連串炎性及免疫的變化，若生物體存活下來則基因體的表現再次回復正常。基於以上的推論，基因體的表現因嚴重外傷巨大的衝擊而改變，使我們有機會在短時間內

觀察到此一變化。因此我們可藉由生物模式（大白鼠外傷性出血性休克及急救模型），比較外傷性出血性休克及以輸液及輸血急救對臨床指標、細胞激素的影響，再利用 DNA 微陣列技術分析基因表現的變化，以期找出其間的關聯。經由觀察雄鼠與雌鼠對外傷性出血性休克與急救不同的反應與結果，也可探究性別對外傷性出血性休克與急救所引發的系統性炎性反應的影響。

第二節 研究目的

在本研究中計畫以老鼠嚴重的外傷性出血性休克模型，並根據以上的假設來觀察因性別導致性荷爾蒙差異對免疫反應及功能性基因體學的影響。經由功能性基因體學對大白鼠外傷性出血性休克的研究，期待能在臨床上對嚴重外傷性出血性休克病人的急救上有更全面性及新的觀念以改善這類病人的預後。

第二章 研究方法

第一節 研究材料

一、實驗動物準備

本研究以大白鼠 (Sprague-Dawley rats) 為實驗對象，其來源為中華民國國家科學委員會國家實驗動物繁殖及研究中心，雌雄各半。所有動物自購入後即飼養於中國醫藥大學動物中心，室內溫度維持在 23°C，並保持固定光照週期 (光-暗週期：各 12 小時)，所有大白鼠均飼養至年齡 9-11 週大，才開始進行實驗。所有大白鼠在實驗前均不限制其日常飲食。實驗前三天所有實驗動物即被送至實驗室以適應實驗室的環境。實驗前有 15 分鐘穩定實驗動物生理狀況並以溫度控制器維持實驗動物體溫 ($37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) 直至實驗完成。

二、麻醉

以腹膜內注射 Citosol (25-40 mg/kg)，直到大白鼠被適當麻醉。

三、導管準備

以 Polyethylene tubes (PE-50) 進行動靜脈插管，包括插入右頸靜脈以作為輸液輸注之用，並以 Cardiomax -II model 85 (Columbus Instruments International Co., Ohio, USA) 監測中心靜脈壓。插入右股動脈並以 Cardiomax -II model 85 (Columbus Instruments International Co., Ohio, USA) 連續監測平均動脈壓。插入左股動脈以作為抽血造成出血性休克及輸血急救之用。所有實驗動物在實驗中均給予林格氏液輸注 (10 毫升/公斤/小時)，以補充體液喪失。

四、實驗分組

36 隻大白鼠被隨機分成三組，每組 12 隻，雌雄各半，每組再分成雌雄兩次組：

第一組：控制組（只施行剖腹手術，Sham operation）

第二組：出血性休克組（剖腹手術＋出血性休克）

第三組：急救組（剖腹手術＋出血性休克＋輸血及輸液急救）

第二節 研究設計

一、出血性休克及急救模型

本實驗所採用出血性休克模型是使用固定血壓之出血（fixed-pressure hemorrhage）。在第二組及第三組中，出血性休克的誘發是以從左股動脈抽血，在十分鐘內讓平均動脈壓下降至 50+5 毫米汞柱，並以抽血及輸血方式維持此血壓 60 分鐘。休克維持 60 分鐘之後，第二組不給予急救；而第三組則給予輸血及輸液急救（原抽血量均被完全輸回，並以兩倍於輸血量之林格氏液輸注），急救應於十分鐘內完成。第一組除了接受剖腹、動靜脈插管及給予基本輸液外，在實驗期間並不給予誘發出課及急救。急救期後，實驗動物之動靜脈插管即予拔除，並將血管結紮，令其甦醒。四小時後所有實驗動物均給予安樂死以進行抽血及取肝。

二、實驗步驟

時間 (分)	0	15	25	85	95
Gr. I	A	B			
Gr. II	A	B	C	D	
Gr. III	A	B	C	D	E
	A1	B1	C1	E1	F1

A1：開始準備實驗

A：準備期 (90 分鐘)：包括剖腹手術（從恥骨到劍突沿腹中線切開老鼠腹部後，立即將傷口縫合）、儀器準備及動靜脈插管，完成以上步驟後才開始計時。

B1：實驗開始（開始計時）

B：穩定期 (15 分鐘)

C1：開始抽血

C：誘發出血性休克 (10 分鐘)：在 10 分鐘內，從老鼠體內抽血(2.5 毫升/公斤體重)，平均動脈壓維持在 50 ± 5 毫米汞柱

D：休克維持期 (60 分鐘)：藉抽血或將血回輸維持平均動脈壓在 50 ± 5 毫米汞柱

E1：開始急救：輸血及輸液

E：急救期 (10 分鐘)：

1. 將抽出之血(2.5 毫升/公斤體重)輸回實驗動物血管內
2. 靜脈輸液(Lactated Ringer solution :5 毫升/公斤體重)

說明

1. 灰色區域代表上述各項(ABCD)執行期間
2. 空白區域代表此段期間不做任何動作
3. 在第 85 分鐘時三組實驗動物全部執行上述 E 之動作

時間 (分)	95	335
Gr. I		F
Gr. II		F
Gr. III		F

F1 G1

F1：移除管路、結紮血管及縫合傷口。

F：恢復期（4 小時）

G1：實驗開始後 4 小時（第 335 分鐘）以安樂死方式犧牲各次組老鼠(各次組 6 隻), 並立即從死亡老鼠以心臟穿刺方式取得血液及肝臟組織。恢復期期間若老鼠死亡，立即以上述方式取得血液及肝臟組織以供研究。

三、血清收集與儲存

在老鼠被犧牲後即採用心臟穿刺的方式收集全血。並以含 EDTA 之試管收集血液並立即離心（速度：3000 轉/分，共 10 分鐘），

將上清液收集於抗凍離心管（1.5cc），再貯存於-70°C 冰箱中直至分析。分析雌激素及細胞激素所使用的試劑簡述如下：

1. 17 β -estradiol 血清濃度之分析是使用市售酵素連結免疫吸收分析法（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA），其操作方法如製造廠商所附的使用說明書(Cayman Chemical Company, USA)。
2. IL-1 β , IL-6, IL-10 及 TNF- α 的血中活性也是以 ELISA 方式檢測，其操作方法如製造廠商所附的使用說明書(R&D Systems, Inc, USA)。

四、肝臟組織取得與儲存

1. 肝臟組織取得步驟如下：

從恥骨到劍突沿腹中線切開老鼠腹部切下肝臟中葉一體節(重量 > 1 公克)，並在中葉近端以 3-0 絲線結紮血管止血

2. 將肝臟組織至入標本瓶並迅速置入液態氮鋼瓶中，再送至-70°C 的冷凍庫中冷藏直到做微陣列（Microarray）分析。

五、微陣列技術

1. 介紹

本實驗是以 GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array（Affymetrix, Inc.，圖一），運用微陣列技術來分析核糖核苷酸在肝組織的表現，它可檢測超過三萬個基因。GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array 的製造是結合 photolithography 及 combinatorial chemistry 的技術而產稱的。每一陣列上（Array）有高達 130×10^6 不同寡核苷酸

(Oligonucleotide) 探針被合成。每個寡核苷酸均位陣列上稱做「Probe cell」的特定區域。每個 probe cell 數十萬至百萬份特定寡核苷酸拷貝。

在實驗操作過程中以 biotin 標記的 RNA 或 DNA 片段我們稱之為「目標物」會被雜合至探針陣列上。被雜合的探針會以 streptavidin phycoerythrin conjugate 染色並以 GeneChip® Scanner 3000 或 GeneArray® Scanner 掃描。在 570 nm 波長光射出量正比於與每個探針陣列結合的標的物的量⁸⁶⁻⁸⁷。

本實驗共分三組，每組再分雌雄兩次組，因為經費限制每組雌雄各選擇兩個肝臟組織標本(共 12 個標本)進行 DNA 微陣列實驗。

2. GeneChip® 之操作及分析流程 (圖二)

甲. 核糖核苷酸之準備 (RNA preparation)

總 RNA 由大白鼠肝組織標本被萃取出來並在 1% agarose-formaldehyde 膠上跑電泳以決定 RNA 的完整性。所有 RNA 標本必須達到分析品質要求以確保能以最高品質的 RNA 來做微陣列雜合實驗。總 RNA 及以 biotin 標定的 cRNA 均須測定其在 260nm 及 280nm 波長光吸收值(分別以 A_{260} 及 A_{280} 表示)，只有 A_{260} / A_{280} 比值在 1.8 至 2.1 之間才符合標準。比值小於 1.8 代表蛋白質可能遭受污染；比值超過 2.1 則表示 RNA 可能變質、truncated cRNA 轉錄本、或過多單獨核苷酸。總 RNA 通過品質要求後才進行雙股 cDNA 的合成，接下來便是以 cDNA 為模

版在試管中進行轉錄 (in vitro transcription, IVT) 反應來合成 cRNA。在進行雜合反應前 cRNA 會先被裂解成含 100 至 250 鹼基對的片段。在 cDNA 合成後、cRNA 合成後及 cRNA 成片段後均須以電泳來確保 cDNA、cRNA 及 cRNA 片段的品質以利雜合的進行並獲致良好的實驗結果。

乙. 基因微陣列雜合 (Gene microarray hybridization)

包含 cRNA 片段(標的物)、probe array controls、BSA 及 herring sperm DNA 的雜合溶液會與探針陣列進行 16 小時的雜合反應。

丙. Fluidics Station Setup

在 PC 支援的工作站，使用 Affymetrix® Microarray Suite or GeneChip Operating Software (GCOS) 來定義特定實驗資訊。探針陣列形式、標本名稱及說明會先被輸入並以獨特的檔名存檔。完成以上步驟並以適當緩衝液注入 fluidics station 後即準備進行洗滌及染色。

丁. 探針陣列洗滌及染色

在完成雜合反應後便會在 fluidics station 上進行自動洗滌(去除未雜合的 cRNA 片段)及染色。

戊. 探針陣列掃描

一旦探針陣列完成雜合、洗滌及染色，即開始進行掃描。每個可執行 Affymetrix Microarray Suite 或 GCOS 軟體的工作站均控制一個掃描器。軟體會定義 probe cells 並計算每個 cell 的強度。每個完整的探針陣列影像會另以實驗名稱存成資料影像檔 (.dat)

己. 資料分析

藉由資料影像檔 (.dat image) 來分析每個 cell 的強度 (cell intensity data)，其結果以.cel 存檔。由 cell 的強度資料可產生探針強度資料，其結果以長條狀或圖形的格式來表示，並以.chp 存檔。最後就可產生基因表現的初步資料。數據分析的資訊由 GeneChip® Expression Analysis: Data Analysis Fundamentals booklet (P/N 701190)提供。

3. 基因表現之比較

資料完成初步分析後，可利用 NetAffx™ Analysis Center (www.affymetrix.com)、DNA-Chip Analyser (www.dchip.org) 或商用軟體系統 Genedata Expressionist™ Pro 進行資料進一步探勘，包括三組間基因表現差異的比較、表現基因的分群 (Hierarchical clustering)、Principal component analysis (PCA) 及路徑探勘 (Pathway exploration)。

第三節 統計方法

各組之間的比較是使用 one-way analysis of variance (ANOVA) 統計方式分析。同一組不同時期血行動力學資料的比較則是以 paired Student's *t*-test 來分析。所有的數據均以平均值±標準差 (Means ±SD) 表示。P 值<0.05 及表示有統計學上的意義。以上統計均使用市售軟體 SPSS 第 13 版在電腦上執行。

第三章 研究結果

第一節 描述性統計分析:

一、年齡與體重 (表一)

三組在年齡方面並無明顯差異。但在體重方面若以同一性別比較，三組並無明顯差異性；但若以各組性別差異比較，雄性次組明顯比雌性次組重 ($p<0.05$)。

表一：

		年齡 (週數)	平均體重 (範圍) (公克)	P 值
控制組	雄 (n=6)	9-11	338.2±29.0 (314-384)	<0.05
	雌 (n=6)	9-11	274.7±24.4 (250-316)	
休克組	雄 (n=6)	9-11	351.2±13.0 (328-366)	<0.05
	雌 (n=6)	9-11	286.7±34.5 (233-336)	
急救組	雄 (n=6)	9-11	338.2±19.8 (306-360)	<0.05
	雌 (n=6)	9-11	285.2±22.3 (253-305)	

二、血行動力學變化

在平均中心靜脈壓 (MCVP) 的比較方面，控制組之雌性次組在休克期的 MCVP 明顯高於雄性次組 ($p<0.05$ ，圖三)。無論是控制組、出血性休克組或急救組，雄性次組在穩定期、休克期及急救期之平均中心靜脈壓均有顯著差異 ($p<0.001$)；然而以上三時期的平

均中心靜脈壓在控制組及出血性休克組的雌性次組卻無統計學上的差異。在急救組的雌性次組也只顯示急救期的平均中心靜脈壓明顯高於休克期及穩定期 ($p<0.001$)。無論雌雄，急救組在急救期的平均中心靜脈壓均明顯高於控制組及出血性休克組 ($p<0.05$ ，圖三)。

在平均動脈壓的比較方面 (MABP)，除了在出血性休克組之急救期外，三組雌雄兩次組在相對應時期的平均動脈壓的比較上並無統計學上的差異；在出血性休克組雌性次組之平均動脈壓在急救期明顯高於雄性次組 ($p=0.048$)。在控制組，無論雌雄各期的平均動脈壓並無明顯差異。在出血性休克組，雄性次組平均動脈壓在休克期及急救期並無統計學上差異；然而雌性次組急救期的平均動脈壓卻明顯高於雄性次組。在急救組，無論雌雄其急救期的平均動脈壓均明顯高於休克期 ($p<0.001$ ，圖四)。

三、死亡率與存活時間

在本實驗中控制組及急救組所有實驗動物均能存活至實驗終止才被犧牲。然而在出血性休克組中，雄性次組有 4 隻 (66.7%) 在實驗終止前即死亡 (分別在恢復期第 14 分鐘、第 52 分鐘、第 72 分鐘及第 187 分鐘死亡)；而雌性次組有 3 隻 (50%) 死亡 (分別在恢復期第 91 分鐘、第 93 分鐘及第 185 分鐘)。

四、血清 17 β -estradiol 的濃度

三組之雄性次組血中的 17 β -estradiol 濃度均明顯低於雌性次組 ($p < 0.05$, 表二)。若以同一性別比較, 三組 17 β -estradiol 血中的濃度則無統計學上的差異。

表二：

	17 β -estradiol (pg/ml)		<i>p</i> 值
	雄	雌	
控制組	25.2 \pm 6.8	77.7 \pm 52.4	0.035
休克組	16.4 \pm 8.3	76.2 \pm 39.1	0.004
急救組	21.4 \pm 12.1	55.9 \pm 25.0	0.012

五、血清細胞激素濃度 (表三~六)

1. 性別差異

無論是控制組或急救組其血中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-10 濃度在雌雄的比較上並無明顯差異 ($p > 0.05$)。而在出血性休克組, 雌性次組血中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 濃度明顯低於雄性次組 ($p < 0.001$)；然而其血中 IL-10 濃度卻明顯高於雄性次組 ($p < 0.001$)。

2. 三組間的差異

不論性別, 出血性休克組有最高的血中細胞激素濃度而控制組則最低。與控制組比較, 出血性休克雄鼠次組血中正炎性細胞激素升高程度明顯高於雌鼠, 其升高倍數分別為 TNF- α : 5.7 倍、IL-1 β : 18.1 倍、IL-6: 15.9 倍；而雌鼠次組升高的倍數則分別為 TNF- α :

2.3 倍、IL-1 β : 2.8 倍、IL-6 : 2.6 倍。出血性休克組雄性次組 IL-10 升高的倍數為 4 倍；而雄性次組升高只有 1.9 倍。

與出血性休克組比較，急救組四小時的血中細胞激素濃度均顯著下降 ($p < 0.001$)，雖仍高於控制組，但與控制組並無顯著差異。與出血性休克組比較，急救組雄鼠次組血中正炎性細胞激素下降程度明顯大於雌鼠，其下降程度分別為 TNF- α : 85.8%、IL-1 β : 92.5%、IL-6 : 91.8%；而雌鼠次組下降程度則分別為 TNF- α : 60.2%、IL-1 β : 61.8%、IL-6 : 57.8%。至於在抗炎性細胞激素方面，雌鼠次組下降的程度則明顯大於雄性次組。急救組中雌性次組 IL-10 下降程度為 72.2%；而雌性次組則為 46.8%。

表三：

	TNF- α (pg/ml)		<i>p</i> 值
	雄	雌	
控制組	40.0 \pm 3.0	42.9 \pm 4.5	0.695
休克組	228.4 \pm 26.4 [#]	98.9 \pm 13.1* [#]	* $<$ 0.001
急救組	37.1 \pm 3.2	39.4 \pm 7.8	0.758
<i>P</i> 值	[#] \leq 0.001 vs 控制組及急救組		

表四：

	IL-1 β (pg/ml)		<i>p</i> 值
	雄	雌	
控制組	558.4 \pm 33.1	450.8 \pm 35.2	0.444
休克組	10082.9 \pm 575.0 [#]	1275.7 \pm 87.6* [#]	* $<$ 0.001
急救組	756.9 \pm 60.4	487.1 \pm 42.4	0.061
<i>p</i> 值	[#] \leq 0.001 vs 控制組及急救組		

表五：

	IL-6(pg/ml)		<i>p</i> 值
	雄	雌	
控制組	606.8 \pm 38.3	503.8 \pm 31.1	0.442
休克組	9674.8 \pm 547.6 [#]	1290.5 \pm 84.3* [#]	* $<$ 0.001
急救組	791.0 \pm 66.1	545.1 \pm 36.9	0.073
<i>P</i> 值	[#] \leq 0.001 vs 控制組及急救組		

表六：

	IL-10(pg/ml)		<i>p</i> 值
	雄	雌	
控制組	127.6 \pm 21.7	146.7 \pm 16.4	0.107
休克組	264.2 \pm 16.5 [#]	581.3 \pm 28.9* [#]	* $<$ 0.001
急救組	140.6 \pm 16.9	161.5 \pm 16.9	0.079
<i>p</i> 值	[#] \leq 0.001 vs 控制組及急救組		

第二節 推論性統計分析

一、血中細胞激素與其相對應基因在肝組織表現之比較

對於 GeneChip[®] Array (Rat Expression Array 230 2.0)，TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-10 基因之 probe set ID 如表七。

基因	Probe set ID
TNF- α	1370928_at
IL-1 β	1398256_at
IL-6	1387087_at
IL-10	1387711_at

控制組、出血性休克組及急救組 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-10 血中濃度與其相對應基因在肝臟組織表現之比較分別圖示如圖五~八。

二、微陣列分析

三組實驗動物分別各取一雄一雌之肝組織進行微陣列之分析（每一組織做兩片晶片，共十二片）。所採用的晶片為 GeneChip[®] Probe Arrays (Affymetrix, Inc.)，此晶片可檢測超過三萬個基因。在 635nm 波長下基因的訊號顯示為 P call 者才列入分析。Up-regulation 基因定義為以 2 為底的對數 (log ratio) > 1.5；而 Down-regulation 基因則定義為以 2 為底的對數 (log ratio) < -1.5。

為分析出血性休克、急救及性別對基因表現的影響，本研究將基因表現分成下列九種狀況：表八

F/M	> 1.5	1.5~-1.5	< -1.5
M			
> 1.5	A	B	C
1.5~-1.5	D	E	F
< -1.5	G	H	I

F/M : Log ratio of signal of female over male

M : Log ratio in male

A : 休克 (或急救) 及雌激素的影響皆為 up-regulation

B : 休克 (或急救) 的影響為 up-regulation, 但雌性為 non-significance

C : 休克 (或急救) 的影響為 up-regulation, 但雌性為 down-regulation

D : 休克 (或急救) 的影響為 non-significance, 但雌性為 up-regulation

E : 休克 (或急救) 及雌性的影響皆為 non-significance

F : 休克 (或急救) 的影響為 non-significance, 但雌性為 down-regulation

G : 休克 (或急救) 的影響為 down-regulation, 但雌激素為 up-regulation

H : 休克 (或急救) 的影響為 down-regulation, 但雌性為 non-significance

I : 休克 (或急救) 及雌性的影響皆為 down-regulation

1. 出血性休克組與控制組基因表現之比較

在與控制組的基因比較下, 出血性休克組中有 12762 個基因 (41.11%) 在兩性均有顯著訊號 (P), 表列如表九:

表九：

基因表現		基因個數
休克對基因的影響	性別對基因的影響 (雌性 vs 雄性)	(N=12762)
Up-regulation (U)	U	7 (0.05)
	N	317 (2.48)
	D	236 (1.85)
無明顯影響 (N)	U	257 (2.01)
	N	11479 (89.95)
	D	197 (1.54)
Down-regulation (D)	U	105 (0.82)
	N	162 (1.27)
	D	2 (0.02)

甲、出血性休克對基因表現有影響，但性別無影響者

表十： Up-regulation 共 317 個基因（在 Biocarta 網站上可找到
Pathway 者有 30 個基因）

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Log Ratio	
			Male	Female
1367648_at	insulin-like growth factor binding protein 2	Igfbp2	3.6	-1.4
1367707_at	fatty acid synthase	Fasn	2	-0.9

1367720_at	aminolevulinate, delta-, dehydratase	Alad	2.1	0.4
1367892_at	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 2	Pdk2	2.6	0.8
1368283_at	enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase	Ehhadh	2.2	1.2
1368458_at	cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1	Cyp7a1	5.1	0
1368651_at	pyruvate kinase, liver and RBC	Pklr	1.6	0.8
1368692_a_at	Choline kinase alpha	Chka	2.8	-0.2
1368794_at	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase	Haao	1.9	0.1
1368915_at	kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase)	Kmo	2	1.1
1369150_at	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	Pdk4	1.7	1.8
1370787_at	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	Bcl2l11	3.1	0
1370812_at	Bcl2-like 1 同 1370787_at (表十)	Bcl2l1	1.6	1.1
1370870_at	malic enzyme 1	Me1	1.9	0.8
1370968_at	nuclear factor of kappa light	Nfkb1	1.9	0.9

	chain gene enhancer in B-cells 1, p105			
1371363_at	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	Gpd1	2.9	0.3
1371819_at	Histone deacetylase 5	Hdac5	1.9	0.6
1371824_at	adenylate kinase 3-like 1	Ak311	2.1	0.6
1374524_at	selenocysteine lyase	RGD:1359 514	1.6	0.2
1375673_at	Mitogen activated protein kinase kinase kinase 1	Map3k1	2.2	-0.2
1375852_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	Hmgcr	2.6	-0.1
1376755_at	retinoic acid receptor, beta	Rarb	2.5	0.5
1379526_at	Myelin basic protein	Mbp	2.2	0
1382778_at	Dual specificity phosphatase 6	Dusp6	2.1	3.1
1384842_s_at	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	RGD:6198 31	1.6	0.6
1386947_at	cadherin 1	Cdh1	2.5	0.7
1387156_at	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	Hsd17b2	1.6	2
1387312_a_at	Glucokinase	Gck	1.8	0.5
1388240_a_at	integrin alpha 7	Itga7	1.9	-0.7

1398282_at	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	Kynu	2	-1
------------	---------------------------------------	------	---	----

表十一： Down-regulation 共 162 個基因（在 Biocarta 網站上可
找到 Pathway 者有 11 個基因）

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Log Ratio	
			Male	Female
1367701_at	receptor (calcitonin) activity modifying protein 2	Ramp2	-1.7	-0.9
1367834_at	spermidine synthase	Srm	-1.8	-0.1
1368835_at	signal transducer and activator of transcription 1	Stat1	-1.9	-0.1
1368975_at	CD38 antigen	Cd38	-2	-0.3
1370096_at	perforin 1 (pore forming protein)	Prf1	-1.7	0.7
1370256_at	frizzled homolog 1 (Drosophila)	Fzd1	-1.8	-0.1
1373400_at	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type 2, alpha	Prkar2a	-1.7	-0.8
1390325_at	CD38 antigen 同 1368975_at(表十一)	Cd38	-1.7	0.1
1393347_at	integrin alpha L	Itgal	-2.1	-0.2
1393987_s_at	G protein-coupled receptor kinase 6	Gprk6	-1.7	-0.6

1396446_at	calcium activated nucleotidase 1	Cant1	-1.7	-0.1
------------	-------------------------------------	-------	------	------

乙、性別對基因表現有影響，但出血性休克無影響：

表十二： Up regulation： 共 257 genes（在 Biocarta 網站上可找到
Pathway 者有 10 個基因）

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Log Ratio	
			Male	Female
1368247_at	heat shock 70kD protein 1A heat shock 70kD protein 1B	Hspa1a Hspa1b	-1	3.2
1368430_at	Legumain	Lgmn	-0.9	0
1368862_at	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	Akt1	-1.3	-0.3
1369197_at	apoptotic peptidase activating factor 1	Apaf1	-1.4	0.4
1369943_at	transglutaminase 2, C polypeptide	Tgm2	0.1	-0.3
1370530_a_at	phospholipase D1	Pld1	0	0.6
1374232_at	phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide	Pik3ca	-1.3	1
1383075_at	cyclin D1	Ccnd1	-0.5	1.8
1384580_at	complement component 6	C6	-0.9	1
1396411_at	phosphatidylinositol	Pik3ca	-1.4	-0.2

	3-kinase, catalytic, alpha polypeptide 同 1374232_at(表十二)			
--	---	--	--	--

表十三： Down-regulation 共 197 個基因（在 Biocarta 網站上可找到 Pathway 者共 23 個基因）

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Log Ratio	
			Male	Female
1367652_at	insulin-like growth factor binding protein 3	Igfbp3	1.5	-0.4
1367920_at	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 5	Edg5	-0.1	-0.1
1367940_at	chemokine orphan receptor 1	Cmkor1	0.6	-2.7
1367985_at	aminolevulinic acid synthase 2	Alas2	-0.6	0.1
1368144_at	regulator of G-protein signaling 2	Rgs2	1.3	0.1
1368160_at	insulin-like growth factor binding protein 1 同 Igfbp2(表十)	Igfbp1	0.7	-0.7
1368659_at	alanine-glyoxylate aminotransferase 2	Agxt2	0.3	1.2

1369050_at	phosphatidylinositol 3-kinase, C2 domain containing, gamma polypeptide	Pik3c2g	1	0.3
1369467_a_at	6-phosphofructo-2-kinase/fr uctose-2,6-biphosphatase 1	Pfkfb1	1.1	1.1
1369485_at	cytosolic acetyl-CoA hydrolase	Cach	1.4	1.4
1369986_at	hydroxyacyl glutathione hydrolase	Hagh	1.2	0.3
1370725_a_at	glucose-6-phosphatase, catalytic	G6pc	0.8	0.1
1377064_at	dual specificity phosphatase 6 同 1382778_at(表十)	Dusp6	0.6	-0.8
1383094_at	Interleukin 2 receptor, alpha chain	Il2ra	0.3	-0.5
1384574_at	UDP-glucose dehydrogenase	Ugdh	1.4	-0.7
1386881_at	insulin-like growth factor binding protein 3 同 1374232_at(表十三)	Igfbp3	1.3	-0.5
1386944_a_at	glucose-6-phosphatase, catalytic 同 1370725_at(表十三)	G6pc	0.7	0.1

1386953_at	hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1	Hsd11b1	-0.2	0
1387024_at	dual specificity phosphatase 6 同 1382778_at(表十) 同 1377064_at(表十三)	Dusp6	0.9	-0.1
1387074_at	regulator of G-protein signaling 2 同 1368144_at(表十三)	Rgs2	1.3	-0.3
1387357_at	trimethyllysine hydroxylase, epsilon	Tmlhe	1.2	-0.1
1387505_at	guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 1	Gnai1	-0.4	0.3
1387951_at	decay acceleratating factor 1	Daf1	1.2	0.7

丙、同時受出血性休克及性別（雌 vs 雄）的影響：

表十四： 均為 Up-regulation 共 7 個基因（在 Biocarta 網站上可找到
Pathway 者無）

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Log Ratio	
			Male	Female
1368569_at	aldo-keto reductase family 1, member B7	Akr1b7	3.4	0.2
1369493_at	Prolactin receptor	Prlr	3.2	0.1
1370384_a_at	Prolactin receptor	Prlr	3.8	-0.5

1370789_a_at	Prolactin receptor	Prlr	3.8	0.2
1376944_at	Prolactin receptor	Prlr	4.7	-0.8
1379238_at			1.7	0.7
1387006_at	rat senescence marker protein 2A gene, exons 1 and 2	Smp2a	4.7	-0.2

表十五：出血性休克為 Up-regulation；性別為 Down-regulation，
共 236 個基因（在 Biocarta 網站上可找到 Pathway 者共
34 個基因）

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Log Ratio	
			Male	Female
1368073_at	interferon regulatory factor 1	Irf1	3.4	0.8
1368124_at	dual specificity phosphatase 5 同 Dusp1,6	Dusp5	2.6	0
1368146_at	dual specificity phosphatase 1 同 Dusp1,5	Dusp1	3.1	-0.1
1368147_at	dual specificity phosphatase 1 同 1368146_at(表十五)	Dusp1	3.6	0
1368308_at	myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	Myc	2.1	-0.7

1368519_at	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E, member 1	Serpine1	5.3	-1.7
1368527_at	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	Ptgs2	4.6	0.7
1368592_at	interleukin 1 alpha	Il1a	2.7	-0.7
1368869_at	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	Akap12	2.6	0
1368871_at	mitogen activated protein kinase kinase kinase 1 同 1375673_at(表十)	Map3k1	2.7	-0.3
1368947_at	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	Gadd45a	2.9	-1
1369044_a_at	phosphodiesterase 4B	Pde4b	3.8	0.2
1369191_at	interleukin 6	Il6	1.9	1.6
1369268_at	activating transcription factor 3	Atf3	5.9	0.6
1369526_at	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, short/branched chain	Acadsb	1.7	0.2
1369560_at	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble) 同 1371363_at(表十)	Gpd1	2.9	0.9
1369788_s_at	v-jun sarcoma virus 17	Jun	2.4	-0.3

	oncogene homolog (avian)			
1369863_at	alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide	Adh4	3.3	1.2
1370113_at	inhibitor of apoptosis protein 1	Birc3	3.1	-0.2
1370474_at	thyroid hormone receptor beta	Thrb	2.1	-0.2
1370688_at	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	Gclc	1.7	-0.2
1371170_a_at	interleukin 1 alpha 同 1369592_at(表十五)	Il1a	2.7	-0.6
1374404_at	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian) 同 1369788_s_at(表十五)	Jun	2.9	0.1
1378960_at	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble) 同 1371363_at(表十) 同 1369560_at(表十五)	Gpd1	2.9	-0.5
1380230_at	GTP cyclohydrolase 1	Gch	3	-1.6
1382982_at	Guanine nucleotide binding protein, beta 1	Gnb1	3.5	-0.9
1387144_at	integrin alpha 1 同 Itga7(表十) 同 Itgal(表十一)	Itga1	2.3	-3
1387219_at	Adrenomedullin	Adm	3	-0.8

1387263_at	pyruvate kinase, liver and RBC 同 1368651_at(表十)	Pklr	2.2	0.3
1387573_a_at	nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2	Nr5a2	1.6	0
1387788_at	Jun-B oncogene	Junb	2.8	-0.5
1387848_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase 同 1375852_at(表十)	Hmgcr	3.1	-0.4
1389528_s_at	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian) 同 1369788_s_at(表十五) 同 1374404_at(表十五)	Jun	2.7	0.2
1392264_s_at	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E, member 1 同 1368519_at(表十五)	Serpine1	4.7	-1.5

表十六：出血性休克為 Down-regulation；性別為 Up-regulation，共 105 個基因（在 Biocarta 網站上可找到 Pathway 者:3 個基因）

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Log Ratio	
			Male	Female
1367881_at	protein tyrosine phosphatase, non-receptor	Ptpns1	-1.6	-0.1

	type substrate 1			
1388135_at	replication protein A2	Rpa2	-1.8	0.2
1389195_at	DNA fragmentation factor, alpha subunit	Dffa	-1.9	0

表十七：出血性休克及性別均為 Down-regulation，共 2 個基因（在 Biocarta 網站上可找到 Pathway 者：0 個基因）

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Log Ratio	
			Male	Female
1368447_x_at	serine protease inhibitor, Kazal type 1	Spink1	-2.7	1.8
1387193_a_at	serine protease inhibitor, Kazal type 1	Spink1	-2.7	3.9

丁、基因分類

表十八：

摘要

Rat230_2 probe sets:	31099
Rat230_2 probe sets annotated molecular function:	14240
Uploaded probe sets:	1283
Uploaded probe sets annotated molecular function:	700

分子功能	No. (%)	<i>p</i> value
------	---------	----------------

Enzyme regulator activity (858)	55 (6.4)	0.05594
Transporter activity (2095)	89 (4.2)	0.12595
Signal transducer activity (2731)	146 (5.3)	0.24729
Binding (10707)	511 (4.7)	0.16897
Transcription regulator activity (1529)	86 (5.6)	0.17478
Catalytic activity (5780)	303 (5.2)	0.13635
Anti-oxidant activity (59)	12 (3.3)	0.58695
Translation regulator activity (174)	2 (1.1)	0.02931
Motor activity (196)	3 (1.5)	0.03980
Structural molecule activity (844)	17 (2.0)	6.6×10^{-5}

表十九：

摘要

Rat230_2 probe sets:	31099
Rat230_2 probe sets annotated cellular component:	12740
Uploaded probe sets:	1283
Uploaded probe sets annotated cellular component:	596

細胞組成	No. (%)	<i>p</i> value
Extracellular matrix (285)	11 (3.8)	0.50809
Extracellular region (2354)	116 (4.9)	0.52533
Protein complex (2774)	99 (3.5)	0.00213
<i>Glycerol-3-phosphatase dehydrogenase</i>	3 (60.0)	4.93×10^{-9}

<i>complex (5)</i>		
Cell (11903)	558 (4.6)	0.84475
<i>ATP-binding cassette transporter complex (10)</i>	1 (10.0)	0.42530
<i>Intracellular (8618)</i>	398 (4.6)	0/64319
<i>HMC protein complex (51)</i>	17 (33.3)	2.79×10 ⁻²²
<i>Cell fraction (1040)</i>	63 (6.0)	0.12761
<i>Basal part of cell (10)</i>	1 (10.0)	0.42530
<i>Apical part of cell (68)</i>	3 (4.4)	0.91692
<i>Cell surface (134)</i>	9 (5.0)	0.47648
<i>Membrane (5554)</i>	280 (5.0)	0.08785
<i>Immunological synapse (71)</i>	17 (23.9)	1.31×10 ⁻¹⁴
<i>Cell projection (287)</i>	7 (2.4)	0.12091
<i>Leading edge (83)</i>	5 (6.0)	0.56019
Synapse (286)	8 (2.7)	0.12761
Membrane-enclosed lumen (870)	35 (4.9)	0.34308
Envelope (410)	12 (2.9)	0.08782

2. 急救組與出血性休克組的比較：

在與休克組的基因比較下，急救組中有 14258 個基因 (45.93%)

在兩性均有顯著訊號 (P)，表列如表二十：

基因表現		基因個數
急救對基因的影響	性別對基因的影響 (雌性 vs 雄性)	(N=14258)
Up-regulation (U)	U	4 (0.03)
	N	467 (3.28)
	D	71 (0.50)
無明顯影響 (N)	U	138 (0.97)
	N	13109 (91.94)
	D	164 (1.15)
Down-regulation (D)	U	40 (0.28)
	N	251 (1.76)
	D	14 (0.10)

甲、輸液治療對基因表現有影響；性別無影響

表二十一： Up-regulation 共 467 個基因（在 Biocarta 網站上可找到
Pathway 者:21 個基因）

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Log Ratio	
			Male	Female
1368229_at	survival of motor neuron protein interacting protein 1	Sip1	1.6	0.3
1368647_at	G protein-coupled receptor kinase 6 同 1393987_s_at(表十一)	Gprk6	1.8	0.6
1368862_at	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 同 1368862_at(表十二)	Akt1	1.8	0.3
1368896_at	MAD homolog 7 (Drosophila) 同 Sip1(表二十一)	Madh7	1.9	0.3
1369248_a_at	baculoviral IAP repeat-containing 4	Birc4	2.2	1
1370450_at	tropomyosin 3, gamma	Tpm3	1.6	0
1370531_a_at	phospholipase D1 同 1370530_a_at(表十一)	Pld1	1.8	-0.1
1373400_at	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type 2, alpha 同 1373400_at(表十一)	Prkar2a	1.7	0.7

1374232_at	phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha polypeptide 同 1368144_at(表十二)	Pik3ca	2.4	-0.2
1386897_at	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins methyltransferase-like 2	Hrmt112	2.9	-0.1
1387120_at	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 3	Psmc3	2	0.9
1387391_at	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	Cdkn1a	1.9	0.2
1387940_at	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 5 epsilon	Eif2b5	5	0.8
1388130_at	Zyxin	Zyx	1.6	-0.1
1389867_at	CUG triplet repeat, RNA binding protein 2 同 Hrmt112 (表二十一)	Cugbp2	2	-0.4
1390386_at	caspase 3	Casp3	3.1	0.4
1397221_s_at	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6 同 1384842_at(表十)	RGD:619 831	2.2	1.5
1398249_at	solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase), member 20	Slc25a20	2	-0.6

1398764_at	ribosomal protein L21	Rpl21	2	0.2
1398831_at	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 4	Psmb4	1.8	1.2
1398869_at	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase, 4	Psmc4	2.1	-0.7

表二十二： Down regulation 共 251 個基因（在 Biocarta 網站上可找到 Pathway 者有 44 個基因）

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Log Ratio	
			Male	Female
1367707_at	fatty acid synthase 同 1367707_at(表十)	Fasn	-3.6	-0.8
1367708_a_at	fatty acid synthase 同 1367707_at(表十、二十二)	Fasn	-2.8	-0.8
1367839_at	farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1	Fdft1	-2.2	-0.5
1367854_at	ATP citrate lyase	Acly	-4.4	-1.6
1367856_at	glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6pd	-2.3	-1.5
1367892_at	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 2 同 1367892_at(表十)	Pdk2	-2.4	-1.3
1368073_at	interferon regulatory factor 1	Irf1	-3	-0.4

	同 1368073_at(表十五)			
1368144_at	regulator of G-protein signaling 2 同 1368144(表十三) 同 1387024(表十三)	Rgs2	-1.7	0.1
1368146_at	dual specificity phosphatase 1 同 1368146_at(同表十五) 同 1368147_at(同表十五)	Dusp1	-1.9	0.4
1368147_at	dual specificity phosphatase 1 同 1368146_at(同表十五) 同 1368147_at(同表十五)	Dusp1	-2.4	1.1
1368275_at	sterol-C4-methyl oxidase-like	Sc4mol	-2	-0.4
1368308_at	myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian) 同 1368308_at(同表十五)	Myc	-1.9	0.4
1368378_at	formyltetrahydrofolate dehydrogenase	Fthfd	-2.6	-1
1368458_at	cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1 同 1368458_at(同表十)	Cyp7a1	-2.1	-2
1368527_at	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 同 1368527_at(同表十五)	Ptgs2	-3.1	-0.3
1368574_at	adrenergic receptor, alpha 1b	Adra1b	-2.2	-0.3
1368592_at	interleukin 1 alpha	Il1a	-3.1	0.9

	同 1368592_at(同表十五) 同 1371170_at(同表十五)			
1368651_at	pyruvate kinase, liver and RBC 同 1368651_at(同表十) 同 1387263_at(同表十五)	Pklr	-2.5	-0.8
1368871_at	mitogen activated protein kinase kinase kinase 1 同 1375673_at(同表十) 同 1368871_at(同表十五)	Map3k1	-2.4	0
1369044_a_at	phosphodiesterase 4B 同 1369044_a_at(同表十五)	Pde4b	-2.5	0.4
1369519_at	endothelin 1	Edn1	-2.1	0.1
1369560_at	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble) 同 1371363_at(同表十) 同 1369560_at(同表十五) 同 1378960_at(同表十五)	Gpd1	-2.4	0.2
1369788_s_at	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian) 同 1369788_s_at(同表十五) 同 1374404_at(同表十五) 同 1389528_s_at(同表十五)	Jun	-1.9	-0.2
1370067_at	Malic enzyme 1 同 1370870_at(同表十)	Me1	-2.3	-1.3

1370113_at	inhibitor of apoptosis protein 1 同 1370113_at(同表十五)	Birc3	-3.1	-0.1
1370474_at	thyroid hormone receptor beta 同 1370474_at(同表十五)	Thrb	-1.6	-0.2
1370573_at	sarcosine dehydrogenase	Sardh	-2.2	-0.3
1370870_at	Malic enzyme 1 同 1370870_at(同表十) 同 1370067_at(同表二十二)	Me1	-1.7	-0.9
1371170_a_at	Interleukin 1 alpha 同 1368592_at(同表十五、二十二) 同 1371170_at(同表十五)	Il1a	-2.9	1.2
1371363_at	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	Gpd1	-2.2	-0.2
1371824_at	adenylate kinase 3-like 1 同 1371824_at(同表十)	Ak3l1	-1.6	-1.2
1372323_at	sarcosine dehydrogenase 同 1370573_s_at(同表十五)	Sardh	-2	-0.9
1374404_at	v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian) 同 1369788_at(同表十五)	Jun	-2.7	-0.5
1375673_at	Mitogen activated protein kinase kinase kinase 1 同 1375673_at(同表十)	Map3k1	-2.1	-0.1

	同 1368871_at(同表十五、二十二)			
1375852_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase 同 1375852_at(同表十) 同 1387848_at(同表十五)	Hmgcr	-2.8	-1
1376755_at	retinoic acid receptor, beta 同 1376755_at(同表十)	Rarb	-2.3	-0.7
1379293_at	granzyme A	Gzma	-1.6	0.1
1379526_at	Myelin basic protein 同 1379526_at(同表十)	Mbp	-2.3	1.7
1386978_at	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3-like	Bnip3l	-2.1	-1
1387505_at	guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 1 同 1387505_at(同表十三)	Gnai1	-2.2	-0.6
1387566_at	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	Pla2g4a	-1.7	0
1388294_at	succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein	Sdhd	-1.6	-0.3
1391661_at	Hypothetical gene supported by NM_024381	Gyk	-2.3	0.5
1392730_at	Protein phosphatase 1,	Ppp1cb	-2	-0.3

	catalytic subunit, beta isoform			
--	---------------------------------	--	--	--

乙、同時受以輸血及輸液急救及性別（雌 vs 雄）的影響：

表二十三：均為 Up-regulation 共 4 個基因（在 Biocarta 網站上可
找到 Pathway 者有 1 個基因）

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Log Ratio	
			Male	Female
1380888_at	histone 1, H2ai (predicted) histone 1, H4a (predicted)	Hist1h2ai Hist1h4a	1.7	0.2
1384544_at	paraoxonase 3	RGD:130 2965	3.2	1.9
1395618_at	COP9 signalosome subunit 4	RGD:130 2952	2.1	-0.2
1396077_at	Transcribed locus		1.9	0.1

表 二十四：以輸血及輸液急救為 Up-regulation；性別為
Down-regulation，共 71 個基因（在 Biocarta 網站上
可找到 Pathway 者共 7 個基因）

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Log Ratio	
			Male	Female
1368247_at	heat shock 70kD protein 1A heat shock 70kD protein 1B 同 1368247_at(同表十)	Hspa1a Hspa1b	5.7	-4.1
1368487_at	serine (or cysteine) proteinase	Serpinb2	3.4	0.5

	inhibitor, clade B, member 2			
1368489_at	fos-like antigen 1	Fosl1	1.7	-0.3
1368657_at	matrix metalloproteinase 3	Mmp3	2.9	0.2
1369663_at	epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	Ephx2	2.4	-0.3
1383458_at	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit	Cacna1d	2	-0.2
1387538_at	acetyl-coenzyme A carboxylase alpha	Acaca	2.1	1.1

表二十五：以輸血及輸液急救為 Down-regulation；性別為
Up-regulation，共 40 個基因（在 Biocarta 網站上可找到
Pathway 者:5 個基因）

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Log Ratio	
			Male	Female
1367667_at	faresyl diphosphate synthase	Fdps	-2.1	0
1367979_s_at	cytochrome P450, subfamily 51	Cyp51	-1.9	-0.2
1368519_at	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E, member 1 同 1368519_at(表十五) 同 1392624_s_at(表十五)	Serpine1	-5	0.4

1368878_at	isopentenyl-diphosphate delta isomerase	Idi1	-2.9	0.5
1368940_at	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 2	P2ry2	-1.7	0.1

表二十六：以輸血及輸液急救均為 Down-regulation；性別：

Down-regulation，共 14 個基因（在 Biocarta 網站上可找到 Pathway 者:1 個基因）

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Log Ratio	
			Male	Female
1367601_at	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	Cited2	-1.7	-0.6
1368321_at	early growth response 1	Egr1	-2.2	-0.3
1369863_at	alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide 同 1369863_at(表十五)	Adh4	-2.8	-1.7
1371211_a_at	neuregulin 1	Nrg1	-2	-2.1
1371412_a_at	Neuronal regeneration related protein	Nrep	-1.7	-2
1372016_at	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta (predicted)	Gadd45b _predicte d	-2.6	-1.2
1374446_at	TCDD-inducible	Tiparp_pr	-2.2	-0.2

	poly(ADP-ribose) polymerase (predicted)	edicted		
1375043_at	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	Fos	-2.2	-0.7
1382210_at	Strain Wistar Rap2a mRNA, 5' UTR		-1.7	-2
1387067_at	lens epithelial protein	Lenep	-1.9	0.1
1387186_at	RAB9, member RAS oncogene family	Rab9	-1.7	0.3
1389108_at	similar to tubulin-specific chaperone d	LOC3633 09	-1.8	-1.5
1393244_at	Nuclear protein localization 4	Npl4	-1.9	-1.3
1397525_at	Transcribed locus, strongly similar to NP_054884.1 hormone-regulated proliferation-associated 20 kDa protein; HSPC125 protein; My013 protein; hormone-regulated proliferation-associated protein, 20 kDa [Homo sapiens]		-2.1	-0.1

丁、基因分類

表二十七：

摘要		
Rat230_2 probe sets:		31099
Rat230_2 probe sets annotated molecular function:		14240
Uploaded probe sets:		1149
Uploaded probe sets annotated molecular function:		614

分子功能	No. (%)	<i>p</i> value
Enzyme regulator activity (858)	33 (3.8)	0.48851
Transporter activity (2095)	75 (3.5)	0.13217
<i>Oxygen transporter activity (16)</i>	4 (25)	5.13×10^{-5}
Signal transducer activity (2731)	115 (4.2)	0.77280
<i>MHC class I receptor activity (41)</i>	10 (24.3)	2.44×10^{-10}
<i>Prolactin receptor activity (5)</i>	2 (40)	9.64×10^{-5}
Binding (10707)	452 (4.2)	0.35595
<i>Phosphopantetheine binding (2)</i>	2 (100)	2.81×10^{-11}
<i>Tetrapyrrole binding (137)</i>	16 (11.6)	2.21×10^{-5}
<i>Insulin-like growth factor binding (37)</i>	6 (18.1)	9.73×10^{-5}
<i>Importin- α export receptor activity (1)</i>	1 (100)	2.69×10^{-6}
<i>IL-1, type I receptor binding (3)</i>	2 (66.6)	1.13×10^{-7}
Transcription regulator activity (1529)	66 (4.3)	0.9928
Catalytic activity (5780)	293 (5.0)	2.71×10^{-4}
<i>Oxidoreductase activity (762)</i>	65 (8.5)	4.02×10^{-9}

Antioxidant activity (59)	5 (8.4)	0.11470
Translation regulator activity (174)	7 (4.0)	0.85032
Motor activity (196)	5 (2.5)	0.22169
Structural molecule activity (844)	24 (2.8)	0.04496

表二十八：

摘要

Rat230_2 probe sets:	31099
Rat230_2 probe sets annotated cellular component:	12740
Uploaded probe sets:	1149
Uploaded probe sets annotated cellular component:	547

細胞組成	No. (%)	<i>p</i> value
Extracellular matrix (285)	12 (4.2)	0.94424
Extracellular region (2354)	89 (3.7)	0.17406
Protein complex (2774)	128 (4.6)	0.34612
<i>Hemoglobin complex (10)</i>	5 (50.0)	1.02×10^{-12}
Cell (11903)	520 (4.3)	0.11489
<i>Cell fraction (1040)</i>	44 (4.2)	0.91698
<i>Protein complex (2774)</i>	128 (4.6)	0.34612
<i>Basal part of cell (10)</i>	1 (10.0)	0.37317
<i>Apical part of cell (68)</i>	2 (2.9)	0.58127
<i>Cell soma (35)</i>	2 (5.7)	0.67800
<i>Cell projection (287)</i>	6 (2.0)	0.10634
<i>Leading edge (83)</i>	7 (2.4)	0.39562

Synapse (286)	2 (0.6)	0.00297
Membrane-enclosed lumen (870)	35 (4.0)	0.68336
Organelle (7110)	331 (4.6)	0.03373
Virion (24)	1 (4.1)	0.97551
Envelope (410)	22 (5.3)	0.27626



第四章 討論

第一節 結果討論

一、年齡與體重

在三組雌雄基本資料的比較中，雄鼠體重明顯大於雌鼠，且兩者有明顯統計學上的差異。體重的差異是否會影響血型動力學變化、血清賀爾蒙變化、炎性反應及基因體學的呢？答案是否定的，根據De Maio A.及其同事的研究⁷³，損傷後的預後受到引發損傷的種類及程度、所在環境、物種基因、性別以及年齡綜合影響。相較於年輕者，老年者其免疫功能較差，因此當遭受敗血症時其死亡率亦較高⁸⁹。相反的，體重對損傷後所引發的反應影響很小。因此在本實驗中兩性體重雖有明顯差異，並不會對炎性反應基因體變化及預後產生顯著影響。

二、血行動力學變化

在本實驗中，我們發現各組老鼠在同一時期之中心靜脈壓有顯著差異，因此中心靜脈壓（CVP）並非監測血行動力學變化可靠的指標。雖然在重症照護中，中心靜脈壓的監測是屬於常規且必要的，然而在急性損傷期間平均中心靜脈壓的監測到底有無必要仍有爭議。如同Graham Hocking所述⁸⁸，放置中心靜脈導管主要適應症包括：1. 測量中心靜脈壓，2. 當周邊靜脈打不到時可作為靜脈輸注管路，3. 注射血管活性劑或強心劑等須從中心靜脈給予的藥物，4. 注射高張溶液包括全靜脈營養，及5. 血液透析或血漿置換術。在本

實驗中導致各組平均中心靜脈壓變易大的因素包括右心功能、靜脈回流、右心順應性、胸腔內壓力及老鼠的姿勢。因此中心靜脈壓必須與其他方法（如脈搏、血壓及尿出量）一起評估心臟功能及血容狀態。以中心靜脈壓評估心臟功能及血容狀態時，其對治療反應所產生的數據變化遠比其絕對值來得重要。

關於平均收縮壓的比較本實驗發現在出血性休克組中，急救期（停止誘發出血，但也未給予輸血及輸液急救）雌鼠次組的平均動脈壓明顯高於雄鼠次組（ $p=0.048$ ），這個結果顯示雌鼠對休克的容忍度明顯優於雄鼠。然而從急救組急救期（停止誘發出血，並給予輸血及輸液急救）發現雌雄兩次組平均收縮壓並無顯著差異，顯示一旦出血被控制後，輸血及輸液治療可克服性別差異，達到維持穩定血行動力學之效果，可見輸血及輸液治療在出血獲得控制後仍是最主要的治療。

三、死亡率與存活時間

許多動物研究顯示相較於雄鼠，雌鼠有較強的免疫反應，因此遭受損傷後，雌鼠有較高的存活率⁷⁵。兩性間免疫反應的差異主要來自於雌雄間性賀爾蒙的不同。在本實驗中，出血性休克組四小時存活率，雌鼠明顯高於雄鼠（分別為50%及33.3%）。

四、血清 17 β -estradiol 濃度

就如先前所提到的，兩性間免疫反應的差異主要來自於雌雄間性賀爾蒙的不同。在動物實驗方面已證實雌性賀爾蒙

(17β -estradiol) 對外傷性出血性休克引發的免疫及生理反應具有保護的作用。然而在臨床研究方面，女性在遭遇損傷後是否較男性有較佳的預後，卻有不同的結論。由於隨著月經週期時間的不同，血中雌性荷爾蒙的濃度會隨之變化，因此在臨床研究時很難去控制雌性賀爾蒙的濃度，這也就造成在臨床研究中性別在損傷後引發的免疫反應及預後方面有不同結果的主要原因。另一方面，在大白鼠實驗中雌性賀爾蒙血中濃度就比較容易受控制，一來因為大白鼠的動情周期較短，使研究者較容易選擇具有高濃度雌激素時期的大白鼠作為實驗的對象；再者也可藉由睪丸切除術加上注射雌性賀爾蒙的方式維持大白鼠血中高濃度的雌性賀爾蒙。經由上述的方式均可較客觀的研究雌性賀爾蒙對損傷引發的免疫反應及其預後，而這卻是臨床研究所無法做到的。

大白鼠的動情週期約維持4天，可再細分為：前動情期、動情期、動情中期及動情後期。藉由光學顯微鏡檢視陰道抹片的細胞型態可決定動情週期的分期：動情前期陰道抹片在光學顯微鏡下可見其細胞主要為有核的上皮細胞。動情前期有最高的血中雌激素及泌乳激素 (prolactin) 濃度；而動情期前述兩種激素血中濃度最低，之後再逐漸上升至動情期達到高峰。Wichmann及其同事發現雌鼠在動情前期遭受出血性休克其免疫反應是增強的；然而同樣的刺激，在雄鼠方面其免疫反應卻是受到抑制。綜合以上所述，為得到外傷性出血性休克後雌性賀爾蒙對免疫功能及生理反應令研究者滿意的結果，以適當的方法以確動研究動物確實處於動情前期以維持血中高

濃度雌性賀爾蒙對本研究有相當重要的影響。

然而在本研究中雖然雌鼠血中 17β -estradiol 濃度明顯高於雄鼠，然而在三雌鼠次組間血中 17β -estradiol 的濃度卻有極大的差異，這也顯示在本實驗中雌鼠血中的 17β -estradiol 濃度控制的並不是很好，究其原因主要是：藉由光學顯微鏡雖可決定實驗動物是否處於動情前期階段，然而我們還是無法確定此時期的起始及結束時間，由於陰道抹片均是在實驗前才做，而抽血卻是在實驗結束後才進行，期間有約 6 小時的差距，因此抽血時血中 17β -estradiol 的濃度不見得能代表實驗時血中的濃度，也就是說當抽血時實驗動物不見得仍處於前動情期，此時血中 17β -estradiol 濃度可能是處於動情期較低的狀況。

五、血清細胞激素濃度

由實驗結果顯示出血性休克導致實驗動物死亡，從出血性休克組血中細胞激素大幅升高顯示細胞激素與休克導致死亡佔有關，而這種關聯在許多相關文獻已經證實。然而同樣是出血性休克，雌性次組的死亡率低於雄性次組（3/6 比 4/6）。進一步比較雌雄間細胞激素的差異我們發現出血性休克雄性次組血中正炎性細胞激素（TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6）升高程度明顯大於雌性次組；而雌性次組血中抗炎性細胞激素（IL-10）則明顯大於雄性次組。可見雌性對外傷性出血性休克的保護作用可能與炎性細胞激素的調節有關，而其調節應是受到雌性賀爾蒙的控制⁸⁸。然而由急救組血中細胞激素

濃度下降與控制組無明顯差異，顯示輸血及輸液治療對炎性反應的影響較性別差異的影響為大。

六、微陣列分析

在微陣列分析方面，首先我們比較血中細胞激素濃度與其對應之基因在肝組織的表現發現除了血中 TNF- α 濃度與肝組織基因表現不一致外，IL-1 β 、IL-6 及 IL-10 血中濃度及肝組織基因表現一致。根據研究顯示在出血性休克後 TNF- α 在內分鐘內血中濃度急速上升，但四小時內即降下來，此可以解釋為何在出血性休克組四小時後 TNF- α 血中濃度雖然是最高，但與另兩組比較，出血性休克組肝組織相對應基因卻未有相對明顯的表現。至於經由微陣列技術所得到有明顯表現之基因的研究中，從上述血清細胞激素與預後所獲致的結果顯示性別差異對外傷性出血性休克引發的系統性炎性反應與預後的影響不如輸液治療的影響重要，因此欲了解性別差異對外傷性出血性休克後對肝組織基因表現的影響只須比較休克組與控制組即可。由本實驗結果可發現在 1283 個有明顯表現的基因中，受性別（雌激素）影響的基因有 804 個，其中為 up-regulation 者 369 個，down-regulation 者 435 個。其中特別重要且須進一步研究並驗證其受雌激素影響者包括：在 up-regulation 基因有 Hsp、Lgmn、Akt1、Apaf1、Tgm2、Pld1、Pik3ca、Ccnd1、C6、Prlr 及 Ptpns1 等 11 個基因；而在 down-regulation 基因則有 Igfbp、Edg5、Cmkor1、Alas2、Rgs2、Agxt2、Pik3c2g、Pfkfb1、Cach、Hagh、G6pc、Dusp、Il2ra、

Ugdh、Hsd11b1、Tm1he、Gnail、Daf1、Myc、Il1a、Map3k1、Il6 及 Birc3 等 23 個基因。

第二節 研究限制

本實驗有四個主要的研究限制：第一，雌性次組雌性賀爾蒙的控制不好。雖然雌性次組血中雌激素的濃度明顯高於雄性次組，然而雌性次組彼此間雌激素的濃度卻有很大的差異，顯示本實驗在雌激素濃度的控制不良，而上述的狀況可能會影響實驗結果。造成雌激素控制不良的原因是因為在本實驗中動情週期是以大白鼠陰道抹片在光學顯微鏡下細胞型態來決定，而這中方法只能決定期別，但無發得知各期之起始時間及結束時間。在實驗前即要選擇求偶前期（proestrus）的雌鼠，然而當實驗結束，進行抽血及取肝時以間隔超過 6 小時，此時雌鼠是否仍處於求偶前期實難判斷，這也導致雌鼠次組間血中雌激素濃度差異極大之主因。如何改進此缺點，我們建議在未來類似的實驗可以去勢（castration）後的雄鼠取代雌鼠（依據相關文獻，兩側睪丸切除術應在實驗前二週進行），再於實驗前注射雌激素於去勢後的大白鼠，如此不但可維持較高且一致的血中雌激素，各組間實驗老鼠的體重也不會因性別而有統計學上的差異而造成實驗上的誤差。

第二，本實驗主要是研究性別差異對外傷出血性系統性炎症反應與基因體的影響，雖然實驗證實雌性在急性期有較好的預後，然而本研究並未比較兩側卵巢切除後雌鼠與注射雌激素於去勢後雄鼠的預後及其血中雌激素與細胞激素濃度及肝組織相對基因之表

現，因此無法證實雌鼠之所以有較好的預後是由於雌激素調控細胞激素的變化所得到的結果，而非是由於雄性激素的影響。不過性賀爾蒙對外傷性出血性休克的影響與對細胞激素的調節已有相當多的論文發表，並已獲得證實，本研究重點是在藉由微陣列的技術大量且快速分析其中有表現的基因是受到雌激素的調控，並試圖找出其中關鍵的基因作為日後以賀爾蒙作為對外傷性出血性休克之輔助治療之基礎。因此在「雌性對於外傷性出血性休克所引發的系統性炎症反應具有保護作用是源自於雌激素對細胞激素調控」的既有基礎下，本實驗不再重複驗證雌激素的影響。

第三、本實驗主要是研究不同性別的大白鼠在遭受外傷性出血性休克後急性期的預後在性別上之差異。雖然外傷性出血性休克後四小時血中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-10 濃度可代表該實驗動物在損傷後急性期系統性炎症反應之概況，然而對於長期的預後與其血中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-10 濃度卻未研究，如此無法對於外傷性出血性休克對於預後與血中細胞激素之變化及肝組織相對基因之表現有更全觀之了解，因此更長時期、系列性的評估，例如損傷後 12 小時及 24 小時，可考慮在未來的研究進行。

第四則是以微陣列研究的個數太少，由於微陣列晶片價格昂貴，無法以此技術全面研究每一隻實驗動物，本實驗三組總共 36 隻大白鼠中僅選擇 12 隻來做微陣列研究，在實驗的代表性來說仍是不夠充分的，其所得到的結果可能會因有表現個數太多增加研究上的困難，甚至無法從中找到真正對外傷性出血性休克有關鍵影響的基

因，因此在未來相關類似的研究，若要得到更具統計意義的結果，爭取更充裕的經費以購買足夠的微陣列晶片是必須的。



第五章 結論

由本研究發現雌鼠在外傷性出血性休克時血中正炎性細胞激素明顯低於雄鼠；而抗炎性細胞激素明顯高於雄鼠。雌鼠早期的死亡率明顯低於雄鼠、其平均存活時間亦較雄鼠為長。以上的結果均支持雌性性別對外傷性出血性休克具有保護作用，它可調節細胞激素並降低死亡率。

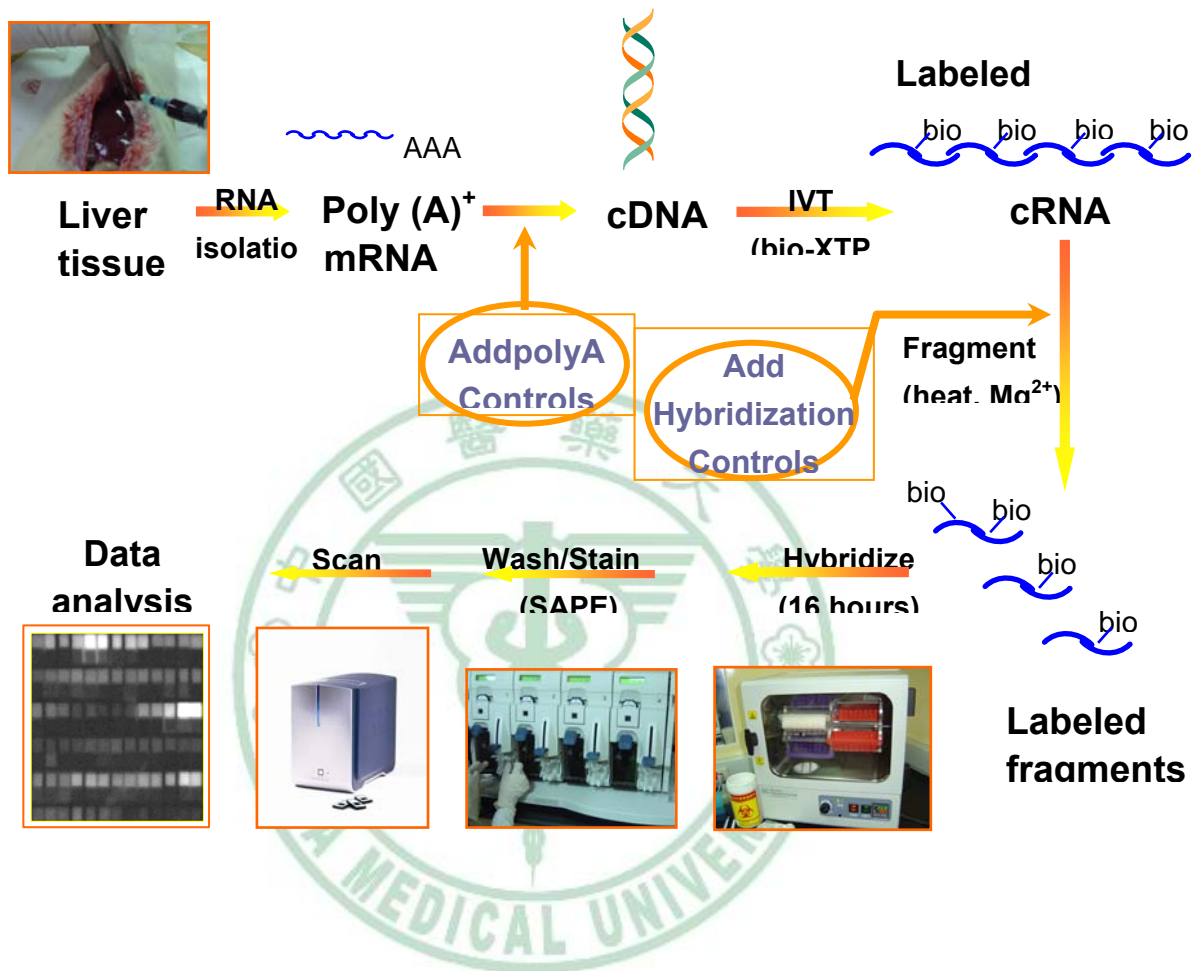


圖表

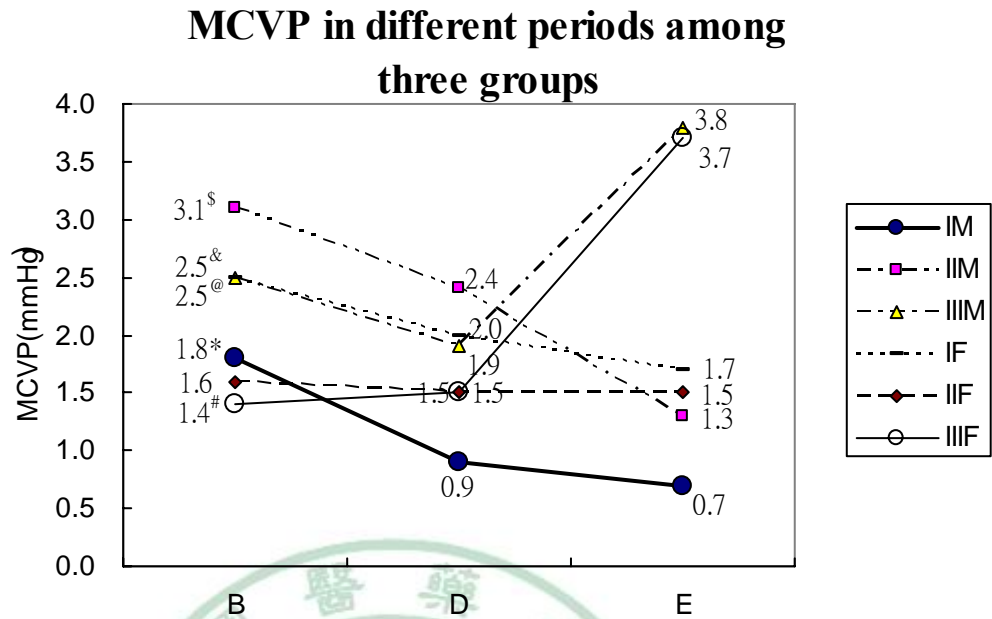
<圖一> GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array (Affimetrix) 晶片



<圖二> 微陣列操作及分析流程

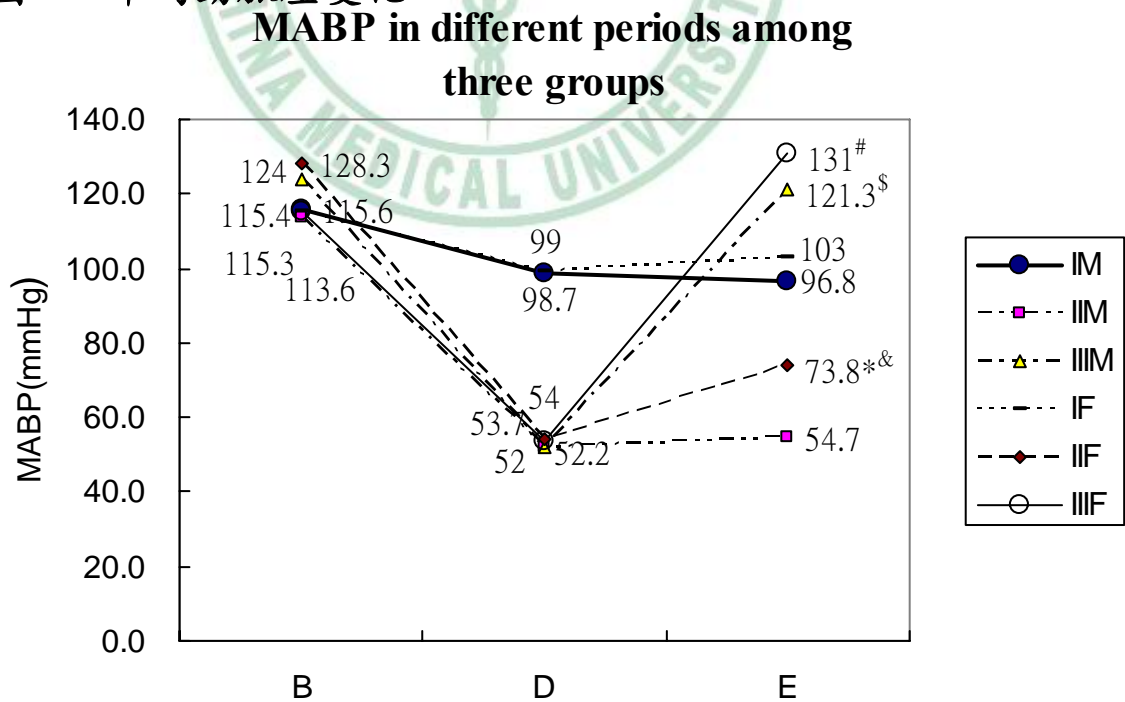


<圖 3> 平均中心靜脈壓變化



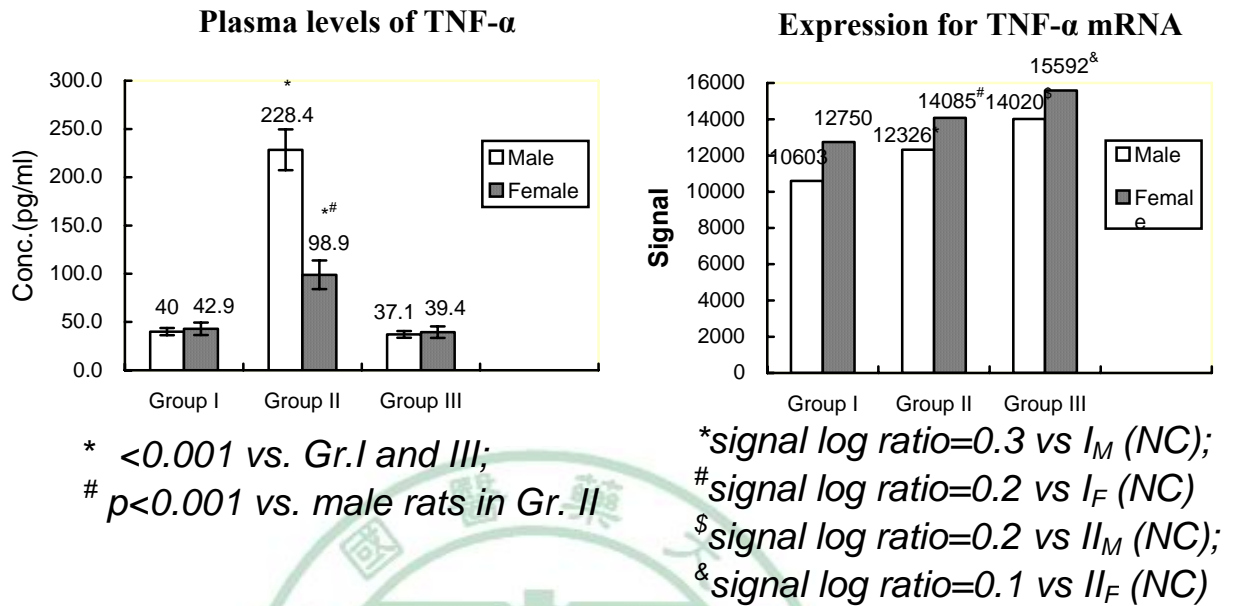
B：穩定期；D：休克期；E：急救期
[§] $p < 0.05$ vs. 休克及急救期(II_M)；[&] $p < 0.05$ vs. 急救期(I_F)；
[@] $p < 0.05$ vs. 急救期(III_M)；^{*} $p < 0.05$ vs. 休克及急救期(I_M)；
[#] $p < 0.05$ vs. 急救期(III_F)。

<圖 4> 平均動脈壓變化

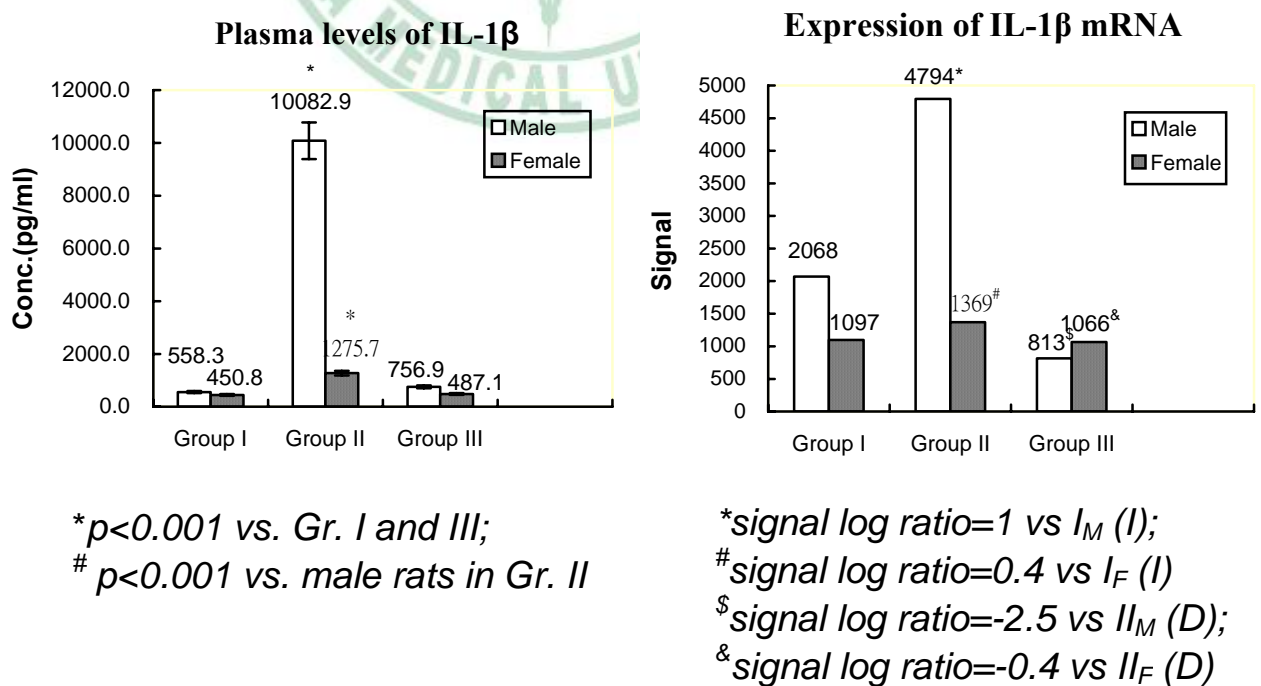


B：穩定期；D：休克期；E：急救期
^{*} $p < 0.05$ vs. II_M in E；[#] $p < 0.05$ vs. 休克期 (III_F)；[§] $p < 0.05$ vs. 休克期 (III_M)；[&] $p < 0.05$ vs. 休克期 (II_F)。

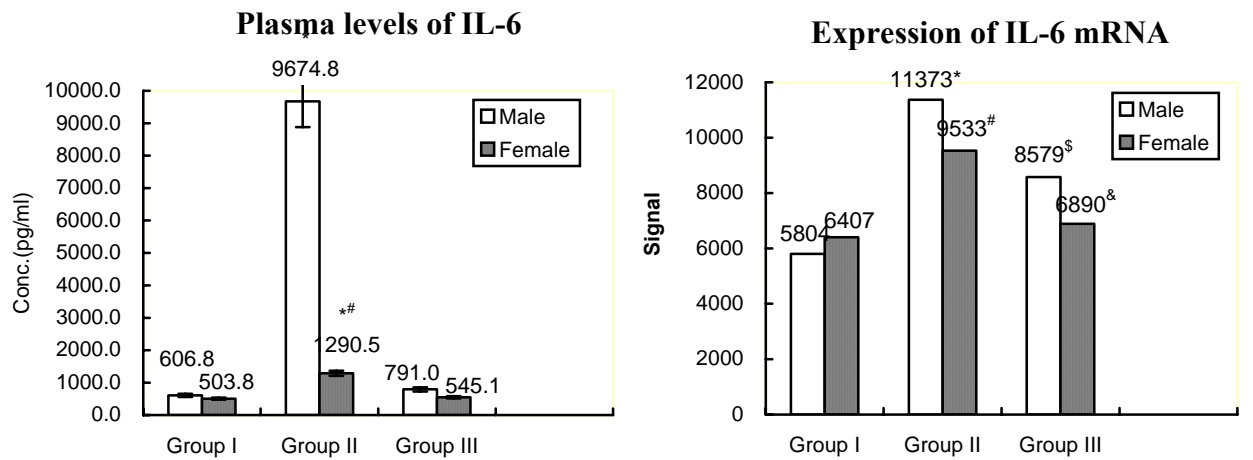
<圖 5> TNF- α 血中濃度及肝組織中信使核糖核苷酸 (mRNA) 之比較



<圖 6> IL-1 β 血中濃度及肝組織中信使核糖核苷酸之比較



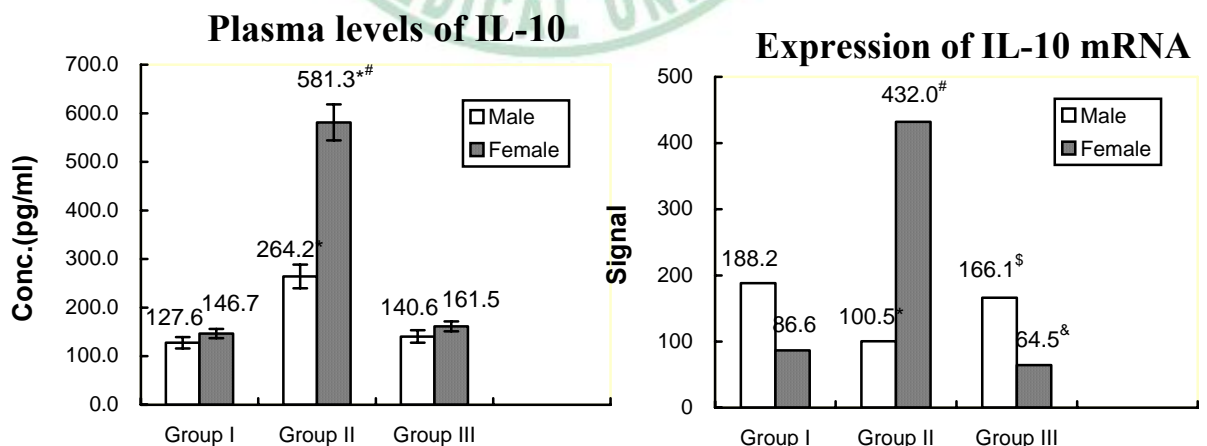
<圖 7> IL-6 血中濃度及肝組織中信使核糖核苷酸之比較



* $p < 0.001$ vs. Gr. I and III;
$p < 0.001$ vs. male rats in Gr. II

*signal log ratio=1.1 vs $I_M (I)$;
#signal log ratio=0.5 vs $I_F (I)$
\$signal log ratio=-0.4 vs $II_M (NC)$;
&signal log ratio=-0.3 vs $II_F (D)$

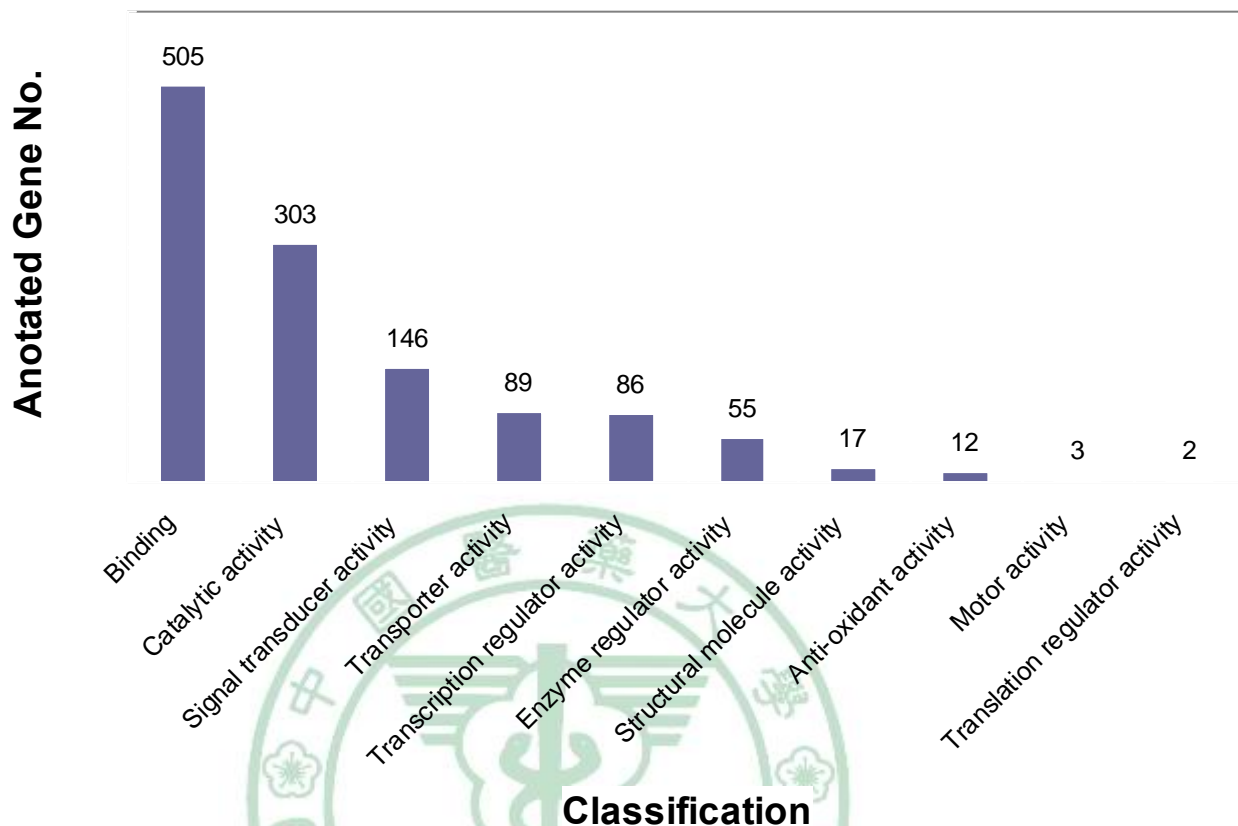
<圖 8> IL-10 血中濃度及肝組織中信使核糖核苷酸之比較



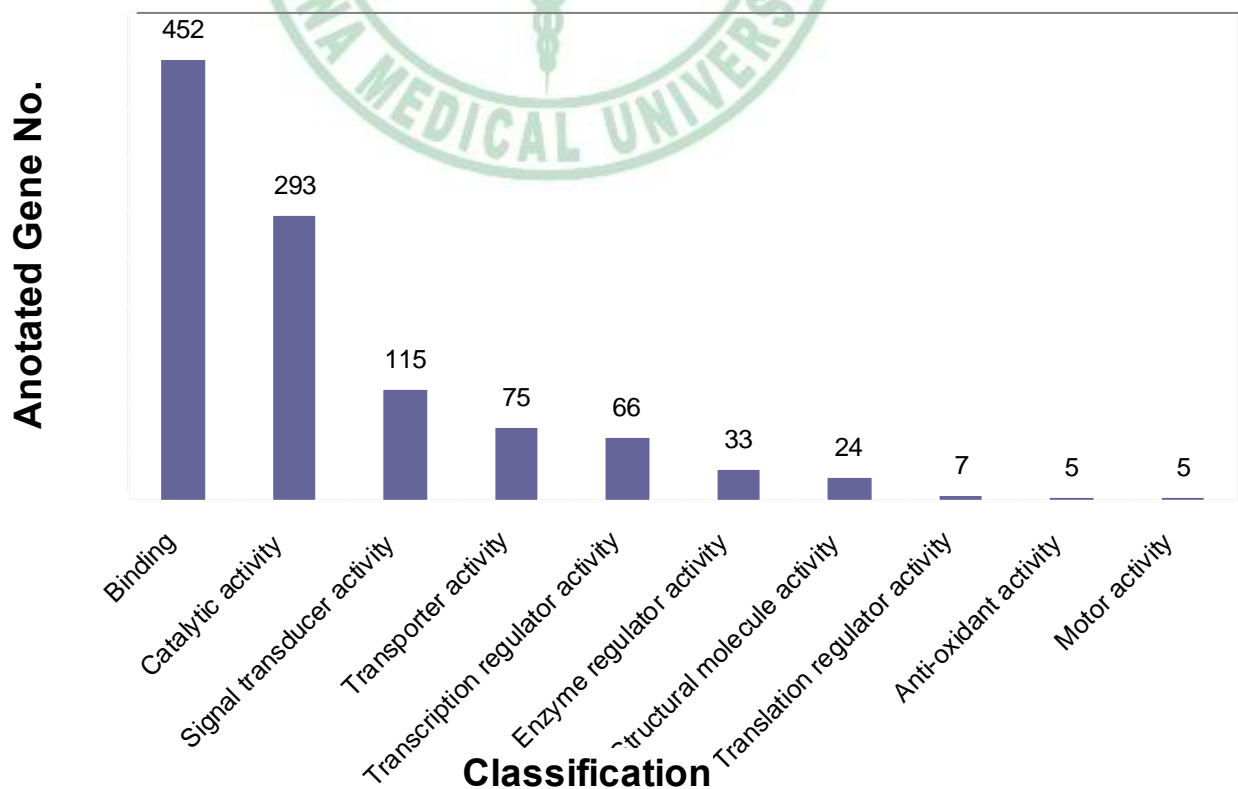
* $p < 0.001$ vs. Gr. I and III;
$p < 0.001$ vs. male rats in Gr. II

*signal log ratio=-1.2 vs $I_M (D)$;
#signal log ratio=2.3 vs $I_F (I)$
\$signal log ratio=-0.6 vs $II_M (NC)$;
&signal log ratio=-2.9 vs $II_F (D)$

<圖 9> 主要基因之分子功能 (出血性休克組 vs 控制組)



<圖 10> 主要基因之分子功能 (急救組 vs 出血性休克組)



參考文獻

1. National Academy of Science/National Research Council (NAS/NRC): Accidental Death and Disability: The Neglected Disease of Modern Society. Washington, DC, Governmental Printing Office, 1966.
2. National Academy of Science: Injury in America, A Continuing Health Problem. Washington, DC, National Academy Press, 1985.
3. Bazzoli G.J., Madura K.J., Cooper G.F., MacKenzie E.J., Maier R.V.: Progress in the Development of Trauma Systems in the United States. JAMA 273:395-401, 1999.
4. 衛生署，生命統計 2004.
5. Trunkey DD. Trauma. Sci Am. February 249:28, 1983.
6. Sauaia A., Moore F.A., Moore E.E., Moser K.S., Brennan R., Read R.A., Pons P.T.: Epidemiology of Trauma Deaths: A Reassessment. J Trauma 38:185-193, 1995.
7. Pope A, French G, Longnecker D.E.: Fluid Resuscitation. State of the Science for Treating Combat Casualties and Civilian Injuries. Washington, DC: National Academy Press, 1999.
8. Vincent JL: Prevention and therapy of multiple organ failure. World J Surg 20:465-470, 1996.
9. Maier RV : Pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome--endotoxin, inflammatory cells, and their mediators: cytokines and reactive oxygen species. Surgical Infections.

- 1(3):197-204; discussion 204-5, 2000.
- 10.Kuan N.K., Passaro E., Apoptosis: Programmed cell death, *Arch Surg* 13:773-775, 1998.
- 11.Hetts S.W., To die or not to die: An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 279: 300-307, 1998.
- 12.Papathanassoglou E.D., Moynihan J.A., Ackerman M.H.: Does programmed cell death (apoptosis) play a role in the development of multiple organ dysfunction in critically ill patients? A review and a theoretical framework. *Crit Care Med* 28: 537-549, 2000.
- 13.Marshall J.: Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome, *Crit Care Med.* 29(suppl 7): S99-S106, 2001.
- 14.Chaudry I.H., Ayala A, Ertel W, Stephan R.N.: Hemorrhage and resuscitation: immunological aspects. *Am J Physiol* 259:R663-R678, 1990.
- 15.Ayala A, Lehman D.L., Herdon C.D., Chaudry I.H.: Mechanism of enhanced susceptibility to sepsis following hemorrhage: interleukin-10 suppression of T-cell response is mediated by eicosanoid-induced IL-4 release. *Arch Surg* 129:1172-1178, 1994.
- 16.Stephan R.N., Kupper T.S., Geha A.S., Baue A.S., Chaudry I.H.: Hemorrhage without tissue trauma produces immunosuppression and enhances susceptibility to sepsis. *Arch Surg* 122:62-68, 1987.

17. Ayala A, Perrin MM, Chaudry I.H.: Defective macrophage antigen presentation following hemorrhage is associated with the loss of MHC class II (Ia) antigens. *Immunology* 70:33-39, 1990.
18. Zellweger R, Ayala A, DeMaso C.M., Chaudry I.H.: Trauma-hemorrhage causes prolonged depression in cellular immunity. *Shock* 4:149-153, 1995.
19. O'Benar J.D., Hannon J.P., Peterson J.L., Bossone C.A.: Beta-endorphin, ACTH, and cortisol response to hemorrhage in conscious pigs. *Am J Physiol* 252:R953-R958, 1987 .
20. Stephan R.N., Kupper T.S., Geha A.S., Baue A.S., Chaudry I.H.: Hemorrhage without tissue trauma produces immunosuppression and enhances susceptibility to sepsis. *Arch Surg* 122: 62-68 . 1987.
21. Fry D.E.: Microcirculatory arrest theory of SIRS and MODS. In: Baue AE, Faist E, Fry DE, eds. *Multiple Organ Failure*. New York, NY: Springer; 2000.
22. Ba ZF. Kuebler JF. Rue LW 3rd. Bland KI. Wang P. Chaudry IH: Gender dimorphic tissue perfusion response after acute hemorrhage and resuscitation: role of vascular endothelial cell function. *American Journal of Physiology - Heart & Circulatory Physiology*. 284(6):H2162-9, 2003.
23. Savoye G. Tamion F. Richard V. Varin R. Thuillez C: Hemorrhagic shock resuscitation affects early and selective mesenteric artery

- endothelial function through a free radical-dependent mechanism. *Shock* 23(5):411-6, 2005.
24. Peitzman A.B., Billiar T.R., Harbrecht B.G., et al.: Hemorrhagic shock. *Current Problems in Surgery* 32(11): 925-1002, 1995.
25. Regel G, Lobenhoffer P, Grotz M., Pape H.C., Lehmann U., Tscherne H.: Treatment results of patients with multiple trauma: an analysis of 3406 cases treated between 1972 and 1991 at a German Level I trauma center. *J Trauma* 38: 70–78, 1995.
26. Sauaia A., Moore F.A., Moore E.E., et al.: Early predictors of postinjury multiple organ failure. *Arch Surg* 129: 39–45, 1994.
27. Lomas-Niera J.L., Perl M., Chung C.S., Ayala A.. Shock and Hemorrhage: an overview of animal models. *Shock* 24(Suppl. 1):33–39, 2005.
28. Krausz M.M., Hirsh M.: Bolus versus continuous fluid resuscitation and splenectomy for treatment of uncontrolled hemorrhagic shock after massive splenic injury. *J Trauma* 55:62–68, 2003.
29. Varicoda E.Y., Poli de Figueiredo L.F., Cruz R.J., Jr, Silva L.E., Rocha e Silva M: Blood loss after fluid resuscitation with isotonic or hypertonic saline for the initial treatment of uncontrolled hemorrhage induced by spleen rupture. *J Trauma* 112–117, 2003.
30. Nan X, Xi-Chun W, You-Fang D, Ren L, Kun-Lun T: Effect of initial fluid resuscitation on subsequent treatment in uncontrolled

- hemorrhagic shock in rats. *Shock* 21:276–280, 2004.
31. Krausz MM, Bashenko Y, Hirsh M: Improved survival in uncontrolled hemorrhagic shock induced by massive splenic injury in the proestrus phase of the reproductive cycle in the female rat. *Shock* 20:444–448, 2003.
32. Brundage SI, Schreiber MA, Holcomb JB, Zautke N, Mastrangelo MA, Macaitis J, Tweardy DJ: Amplification of the proinflammatory transcription factor cascade increases with severity of uncontrolled hemorrhage in swine. *J Surg Res* 113:74–80, 2003.
33. Alexander JW, MacMillan BG, Stinnett JD, Ogle CK, Boziam RE, Fischer JE, Oakes JB, Morris MJ, Krummel R: Beneficial effects of aggressive protein feeding in severely burned children. *Ann Surg* 192:505–517, 1980.
34. Zagola GP, Knowles R, Black KW, Prielipp R: Total parenteral nutrition increases mortality after hemorrhage. *Crit Care Med* 19:54–59, 1991.
35. Kudsk KA, Stone JM, Carpenter G, Sheldon GF: Enteral and parenteral feeding influences mortality after hemoglobin E. coli peritonitis in normal rats. *J Trauma* 23:605–609, 1983.
36. Gray L.S., Gnarra J.R., Engelhard V.H.: Demonstration of a calcium influx in cytolytic T lymphocytes in response to target cell binding. *J Immunol* 38:63–69, 1987.

37. Gottlieb JE, Menashe PI, Cruz E: Gastrointestinal complications in critically ill patients: the intensivists' overview. *Am J Gastroenterol* 81:227–238, 1986.
38. Zhu XL, Zellweger R, Zhu XH, Ayala A, and Chaudry IH. Cytokine gene expression in splenic macrophages and Kupffer cells following haemorrhage. *Cytokine* 7: 8-14, 1995.
39. Ferguson KL, Taheri P, Rodriguez J, et al: Tumor necrosis factor activity increases in the early response to trauma. *Acad Emerg Med* 4:1035–1040, 1997.
40. Gilles Clermont et al. :The Acute Inflammatory Response in Diverse Shock States. *Shock* 24(1): 74-84, 2005.
41. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, et al: Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 234:470–474, 1986.
42. Van der Poll T, Marchant A, Buurman WA: Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. *J Immunol* 155:5397–5401, 1995.
43. Meng ZH, Dyer K, Billiar TR, Tweardy DJ. Essential role for IL-6 in postresuscitation inflammation in hemorrhagic shock. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C343–C351, 2001.
44. Romano M, Sironi M, Toniatti C, et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment.

- Immunity 6:315–325, 1997.
45. Romano M, Sironi M, Toniatti C, et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 6:315–325, 1997.
46. Meng ZH, Dyer K, Billiar TR, Tweardy DJ. Distinct effects of systemic infusion of G-CSF vs. IL-6 on lung and liver inflammation and injury in hemorrhagic shock. *Shock* 14:41–48, 2000.
47. Brundage SI, Zautke NA, Holcomb JB, Spain DA, Lam JC, Mastrangelo MA, Macaitis JM, Tweardy DJ: Interleukin-6 infusion blunts proinflammatory cytokine production without causing systematic toxicity in a swine model of uncontrolled hemorrhagic shock. *J Trauma* 57(5): 970-979, 2004.
48. Shenksr R, Coulson WF, and Abraham E. Hemorrhage and resuscitation induce alterations in cytokine expression and the development of acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 10: 290-297, 1994.
49. Chow C.C., Clermont G., Kumar R., Lagoa C., Tawadrous Z., Gallo D., Betten B., Bartels J., Constantine G., Fink M.P., Billiar T.R., Vodovotz Y.: The acute inflammatory response in diverse shock states. *Shock* 24(1): 74–84, 2005.
50. DeLong W.G., Christopher T. Born CT: Cytokines in Patients with Polytrauma. *Clinical Orthopaedics and related Research* 422: 57–65,

- 2004.
51. Yokoyama Y, Nimura Y, Nagino M, Bland KI, and Chaudry IH: Current understanding of gender dimorphism in hepatic pathophysiology. *Journal of Surgical Research* 128: 147–156, 2005.
 52. Kershenovich SD, and Weissbrod AB: Liver fibrosis and inflammation. A review *Ann Hepatol* 2: 159, 2003.
 53. Jaeschke H, Bautista AP, Spolarics Z, and Spitzer JJ: Superoxide generation by neutrophils and Kupffer cells during in vivo reperfusion after hepatic ischemia in rats. *J Leukocyte Biol* 52: 377, 1992.
 54. Chang H, Wu GJ, Wang SM, and Hung CR: Plasma endothelin level changes during hemorrhagic shock. *J Trauma* 35: 825, 1993.
 55. Pannen BH, Bauer M, Noldge-Schomburg GF, *et al.* : Regulation of hepatic blood flow during resuscitation from hemorrhagic shock: role of NO and endothelins. *Am J Physiol* 272: H2736, 1997.
 56. Rensing H, Bauer I, Zhang J X, *et al.*: Endothelin-1 and heme oxygenase-1 as modulators of sinusoidal tone in the stress-exposed rat liver. *Hepatology* 36: 1453, 2002.
 57. Jarrar D, Chaudry IH, Wang P: Organ dysfunction following hemorrhage and sepsis: mechanisms and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Medicine* 4(6): 575-83, 1999.
 58. Oberholzer A, Keel M, Zellweger R, *et al.*: Incidence of septic

- complications and multiple organ failure in severely injured patients : Is sex specific. *J Trauma* 48, 932-937, 2000.
59. Majetschak M, Obertacke,U, Waydhas C, et al.: Gender differences in posttraumatic cytokine release of endotoxin stimulated whole blood and its relation to the development of severe sepsis. *J Trauma* 47:21212., 1999.
60. Wichmann MW, Ayala A, Chaudry IH: Male sex steroids are responsible for depressing macrophage immune function after trauma-hemorrhage. *Am J Physiol* 273:C1335-C1340,1997.
61. Angele MK, Ayala A, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH: Testosterone: the culprit for producing splenocyte immune depression following trauma-hemorrhage. *Am J Physiol* 274:C1530-C1536, 1998.
62. Remmers DE, Cioffi WG, Bland KI, Wang P, Angele MK, Chaudry IH: Testosterone: the crucial hormone responsible for depressing myocardial function in males after trauma-hemorrhage. *Ann Surg* 227:790-799, 1998.
63. Wichmann MW, Zellweger R, DeMaso CM, Ayala A, Chaudry IH. Enhanced immune responses in females as opposed to decreased responses in males following hemorrhagic shock. *Cytokine*. 1996; 8:853-863.
64. Zellweger R, Wichmann MW, Ayala A, Stein S, DeMaso CM,

- Chaudry IH. Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than males. *Crit Care Med.* 1997; 25:106-110.
65. Wichmann MW, Zellweger R, DeMaso CM, Ayala A, Chaudry IH: Mechanism of immunosuppression in males following trauma-hemorrhage: critical role of testosterone. *Arch Surg* 131:1186-1191, 1996.
66. Wichmann MW, Angele MK, Ayala A, Cioffi WG, Chaudry IH: Flutamide: a novel agent for restoring the depressed cell-mediated immunity following soft-tissue trauma and hemorrhagic shock. *Shock* 8(4):242-8, 1997.
67. Wsieh TC, Yang SL, Choudhry MA, Yu WP, Bland KI, Schwacha MG, Chaudry IH: Flutamide restores cardiac functions following trauma-hemorrhage via estrogen-dependent pathway through upregulation of PGC-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1152: 865-878, 2005.
68. Maio AD, Torres MB, and Reeves RH: Genetic determinants influencing the response to injury, inflammation, and sepsis. *Shock* 23(1): 11–17, 2005.
69. Marcondes FK, Bianchi FJ, and Tanno AP: Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. *Braz. J. Biol.* 62(4a): 609-614, 2002.

70. Zellweger R, Wichmann MW, Ayala A, Stein S, DeMaso CM, Chaudry IH: Females in proestrus state maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better than males. *Crit Care Med* 25(1):106-10, 1997.
71. 謝豐舟、梁金銅、邱錦輝：從基因體科學到基因體醫學。立大圖書有限公司，民國 94 年。
72. Weaver RF: Genomics and proteomics. *Molecular Biology*, 3rd ed., 24:805-853, 2005.
73. Strausberg RL, Finely AMJ. Functional genomics: technological challenges and opportunities. *Physiol Genomics* 1999; 1: 25-32.
74. Lockhart DJ, Winzeler EA. Genomics, gene expression, and DNA arrays. *Nature* 2000; 405; 827-836.
75. Franke L, Bakel H, Fokkens L, de Jong ED, Eqmont-Petersen M, Wijmenqa C: Reconstruction of a functional human gene network, with an application for prioritizing positional candidate genes. *Am J Hum Genet* 78(6):1011-25, 2006.
76. Wu X, Dewey TG: From microarray to biological networks: Analysis of gene expression profiles. *Methods Mol Biol* 316:35-48, 2006.
77. Prucha M, Ruryk A, Boriss H, Möller E, Zazula R, Herold I, Claus RA, Reinhart KA, Deigner P, Russwurm S: Expression profiling: Toward an application in sepsis diagnostics. *Shock* 22(1):29-33, 2004.

78. Cobb JP, Brownstein BH, Watson MA, Shannon WD, Laramie JM, Qiu Y, Stormo GD, Morrissey JJ, Buchman TG, Karl IE, and Hotchkiss RS: Injury in the Era of Genomics. *Shock* 15:165-170, 2001.
79. Chung TP, Hotchkiss RS, Laramie JM, et al: Sepsis gene expression profiling II: Effect of antibiotics over time on murine splenocytes after cecal ligation and puncture. *Abstr. Shock* 15 (Suppl 1): 26, 2001.
80. Chung TP, Laramie JM, Cobb JP: Functional Genomics of Critical Illness and Injury. *Critical Care Medicine* 30: S51-S57, 2002.
81. Shen J, Reis J, Morrison DC, Papasian C, Raghavakaimal S, Kolbert C, Qureshi AA, Vogel SN, Qureshi N: Key inflammatory signaling pathways are regulated by the proteasome. *Shock* 25(5):472-484, 2006.
82. Brownstein BH, Logvinenko T, Lederer JA, Cobb JP, Hubbard WJ, Chaudry IH, Remick DG, Baker HV, Xiao W, Mannick JA: Commonality and differences in leukocyte gene expression patterns among three models of inflammation and injury. *Physiol. Genomics* 24: 298-309, 2006.
83. Cobb JP, Laramie JM, Morrissey JJ, et al: Sepsis gene expression profiling murine splenic compared to hepatic responses determined using cDNA microarrays. *Crit Care Med* 30:2711-2721, 2002.

84. Biberthaler P, Bogner V, Baker HV, Lopez MC, Neth P, Kanz KG, Mutschler W, Jochum M, and Moldawer LL: Shock 24(1):11-19, 2005.
85. Chen H, Alam HB, Luis RI, Rhee P, Li Y, and Koustova E: Identification of expression patterns associated with hemorrhage and resuscitation: Integrated approach to data analysis. J Trauma 60(4):701-724, 2006.
86. Affymetrix, Inc. "GeneChip® Expression Analysis Technical Manual" 2002-2004.
http://www.affymetrix.com/support/technical/manual/expression_manual.affx.
87. Affymetrix, Inc. "GeneChip® Expression Analysis: Data Analysis Fundamentals" 2002-2004..
88. Hocking G.: Central venous access and monitoring. Update in Anesthesia, issue 12:, 2000.
89. Szalay L. Shimizu T. Suzuki T. Yu HP. Choudhry MA. Schwacha MG. Rue LW 3rd. Bland KI. Chaudry IH: Estradiol improves cardiac and hepatic function after trauma-hemorrhage: role of enhanced heat shock protein expression. American Journal of Physiology - Regulatory Integrative & Comparative Physiology 290(3):R812-8, 2006.