中 國 醫 藥 學 院 醫 學 研 究 所

碩 士 論 文

中藥複方萃取物 CDT-01 對於敗血性肺傷害作用之研究

The Effects of Chinese Herb Extract CDT-01 on Septic Lung Injury

NATIONAL CENTRAL LIBRARY
國家圖書館

研 究 生 ： 徐 泓 汶

指 導 教 授 ： 盧 敏 吉

中華民國九十一年 六月

致謝

學如逆水行舟不進則退，如今輕舟已過萬重山。兩年研究所的生涯，一路走來點滴在心頭。看著即將完成的論文心中百感交集，要感謝的真的人很多僅以此文表達我的誠摯謝意。

首先我最要感謝的便是我的指導老師盧敏吉教授。這兩年來您對於我在學業上的指導以及生活上的照顧，不僅讓我在學術的領域中有所成長，在研究的態度、方法與專業知識上亦獲得很大的啟發；同時也由於您開明的作風使我在待人處世的態度與方式上，也學到非常多，相信這些對於往後的發展將有非常深遠的影響。

回顧求學的過程中，感謝李妙蓉老師、陳卓昇老師、王慧如老師、吳介信老師、謝文聰老師、吳禮字老師、楊婷婷老師、閔明源老師以及惠華姊平日的鼓勵與指導，幸賴許多師長朋友的協助，讓我得以克服挫折與困難。此外，有賴許多同學以及學弟妹的精神支持甚至實質協助，例如：悅和、玫真、湯姊、文玲、宇晨、美蘭、景煥、偉全、寶倫、永昇、鄭宜昌醫師等人，都是在這緊湊、忙碌的研究生活中不可或

缺的緩衝液，也由於他們使我研究所的生活更顯充實。可能尚有一些未提及的朋友們，在此均一併致謝。

特別感謝在我碩士口試的過程中，盧敏吉教授、陳卓昇教授、李妙蓉教授、許明志教授與邱?順博士所提供的建議及指正，使我的論文內容更為充實與與完善。若是沒有這些老師的幫忙，我不會如此順利拿到碩士學位。

最後我要感謝瑋琪無時無刻的關懷與鼓勵，這是使我能繼續前進的原動力。最重要的是感謝我摯愛的父親、母親和姊姊，你們對我的照顧和支持使我能專心於研究工作，沒有後顧之憂，在此將這份成就與喜悅與你們一同分享。當然也要感謝我的電腦，謝謝它陪我度過碩士生活中的每一天和我一起合力完成我的論文。這段喜、怒、哀、樂的日子是我一輩子也忘不了的，僅以此致謝在此亦表達個人內心最深之感謝。

中文摘要

敗血症是造成病人在加護病房中死亡的重要原因。但是臨床上除了抗生素之外，缺乏更有效的藥物用來治療敗血症。此外，敗血症常伴隨著急性肺傷害的產生而導致死亡率增高。雖然造成急性肺傷害的機制並不十分清楚，然而肺泡巨噬細胞是肺部防禦系統的第一線同時也調控許多和生理有關因子的表現，因此可能在敗血症中扮演著相當關鍵的角色。

本篇研究主要是探討中藥複方萃取物 CDT-01 對於敗血性大白鼠肺傷害的研究。我們由先前盲腸結紮穿刺手術誘發敗血症的研究中發現，在晚期敗血症時，肺泡巨噬細胞的減少似乎是伴隨著其細胞凋亡增加的緣故。為了進一步研究當敗血症晚期時，中藥複方萃取物 CDT-01 對於肺泡巨噬細胞以及敗血症的影響。

我們使用盲腸結紮穿刺手術誘發敗血症，並在手術結束後一或六小時分別給予水或是 CDT-01 治療。於晚期敗血症時（二十小時）偵測其肺泡巨噬細胞凋亡之比例、吞噬功能的情況、肺部防禦功能的改變以及對於各器官方面的影響。我們利用支氣管肺泡灌流的技術來分離肺泡巨噬細胞，其肺泡巨噬細胞的純度皆需大於 95%以上，經處理後以流式細胞儀分析肺泡巨噬細胞凋亡的情形。我們發現肺泡巨噬細胞凋亡之比例，在盲

腸手術後一小時給予 CDT-01 之給藥組比對照組降低了 83% 左右；但在盲腸手術後六小時給予 CDT-01 之給藥組比起對照組肺泡巨噬細胞凋亡的比例反而增加了 63%，結果顯示盲腸手術後一小時早給予 CDT-01 的確可以降低肺泡巨噬細胞凋亡的比例。在盲腸手術後一小時給予 CDT-01 或是水並測量肺部細菌的數目，發現對照組細菌的數目為給藥組的 12 倍。由此得知盲腸手術後一小時給予 CDT-01 確實可以增強敗血症大白鼠肺部的防禦機制。此外測量肺泡巨噬細胞吞噬功能後發現在對照組中吞噬能力指數為 256.6 ±35.79；給藥組的數值則為 198.99±104.52，（p＝0.28），結果顯示在盲腸手術後一小時給予 CDT-01 並不會影響肺泡巨噬細胞的吞噬能力。

綜合本研究的結果顯示，早給予中藥複方萃取物 CDT-01 可以有效的改善敗血性肺傷害的情況。因此我們的研究將可以藉由改善敗血症之肺傷害的作用，進一步降低敗血症所產生的高死亡率；也可能可以提供敗血症以及其所伴隨之肺傷害一個新的治療方向。

目錄

致謝 ---------- 2
中文摘要 ---------- 4
目錄 ---------- 6
表目錄與圖目錄 ---------- 9
專有名詞符號與縮寫 ---------- 11
第一章總論 ---------- 14
壹. 敗血症之概論 ---------- 14
第一節 前言 ---------- 14
第二節 敗血症的定義及致病機轉 ---------- 15
第三節 敗血症器官傷害及肺傷害 ---------- 18
第四節 敗血症臨床症狀表現及治療 ---------- 20
貳. 巨噬細胞與敗血症 ---------- 22
第一節 敗血症的免疫反應 ---------- 22
第二節 巨噬細胞及其功能 ---------- 25
第三節 細胞凋亡和影響的因素 ---------- 26
參. 中藥治療敗血症之療效 ---------- 29
第一節 清熱藥與敗血症 ---------- 29
第二節 清熱藥的藥理作用 ---------- 30
肆. 研究主題與實驗動機 ---------- 32

第二章材料與方法 ---------- 41
第一節 中藥CDT－01的製備方法 ---------- 41
第二節 誘發敗血症大白鼠動物模型及給藥方式 ---------- 42
第三節 分離肺泡巨噬細胞及其相關實驗 ---------- 47
第四節 細胞形態與細胞計數 ---------- 50
第五節 肺部巨噬細胞凋亡之偵測 ---------- 52
第六節 肺泡巨噬細胞吞噬能力偵測 ---------- 54
第七節 肺部細菌培養 ---------- 56
第八節 生化數值的測量 ---------- 58
第九節 統計方法 ---------- 60
第三章 結果 ---------- 61
一. 中藥萃取物 CDT-01 的有效抽提率 ---------- 61
二. 誘發敗血症大白鼠之外觀 ---------- 61
三. 支氣管灌流之肺泡巨噬細胞數目 ---------- 62
3-1 手術後早（1h）給水或給 CDT-01 之細胞數目 ---------- 62
3-2 手術後晚（6h）給水或給 CDT-01 之細胞數目 ---------- 62
四. 肺泡巨噬細胞形態和比例 ---------- 63
五. 肺泡巨噬細胞之凋亡比例 ---------- 63
5-1 手術後早（1h）給水或給 CDT-01 細胞凋亡比例 ---------- 64
5-2 手術後晚期（6h）給水或給 CDT-01 細胞凋亡比例 ---------- 65
六. 敗血症對肺泡巨噬細胞吞噬能力的影響 ---------- 65

七. 肺部細菌培養的結果 ---------- 65
八. 晚期敗血症對於生化數值的影響 ---------- 66
第四章討論 ---------- 75
第五章結論 ---------- 81
第六章參考文獻 ---------- 82
英文摘要 ---------- 98
作者簡歷 ---------- 99
著作權聲明 ---------- 100

專有名詞符號與縮寫

AA：Arachidonic Acid **花生四烯酸**

ALB：Albumin **白蛋白**

ALI：Acute Lung Injury **急性肺傷害**

AM：Alveolar macrophage **肺泡巨噬細胞**

ARDS：Adult Respiratory Distress Syndrome **成人呼吸窘迫症**

BAL：Bronchoalveolar Lavage **支氣管肺泡灌流液**

BUN：Blood Urea Nitrogen **血液尿素氮**

CFU：Colony Forming Unit **菌落形成單位**

CFU-GM：Colony Forming Unit Granulocyte Monocyte **菌落形成單位顆粒球單核球**

CLP：Cecal Ligation and Puncture **盲腸結紮穿刺**

CRE：Creatine **肌酸酐**

CTL：Cytotoxic T Lymphocytes **細胞毒性 T 細胞**

DIC：Disseminated Intravascular Coagulation **瀰漫性血管內凝血**

FBS：Fetal Bovine Serum **胎牛血清**

GOT：Glutamyl Oxaloacetic Transaminase **麩酸草酸丙酮轉胺**？

GPT：Glutamyl Pyrubic Transaminase **麩酸丙酮酸轉胺**？

ICAMs：Intercellular Adhesion Molecules **細胞內黏附分子**

ICU：Intensive Care Unit **加護病房**

IL：Interleukin **血球介素**

LDH：Lactic dehydrogenase **乳酸脫氫酵素**

LTA：Lipoteichoic acid **脂磷壁酸**

LPS：Lipopolysaccharide **脂多醣**

MODS：multi-organ dysfunction syndrome **多器官衰竭症候群**

MPO：Myeloperoxide **髓過氧化?**

NK cell：Natural Killer Cells **自然殺手細胞**

NO：Nitric oxide **一氧化氮**

PAF：Platelet Activating Factor **血小板活化因子**

PBS：Phosphate Buffer Saline **磷酸鹽緩衝溶液**

PCD：Programmed Cell Death **程序性細胞死亡**

PMN：Polymorphonuclear Cell **多形核白血球**

PS：Phosphatidylserine **磷脂絲胺酸**

SIRS：System Inflammatory Response Syndrome **全身性發炎反應症候群**

TNF：Tumor Necrosis Factor **腫瘤壞死因子**

TP：Total protein **總蛋白質**

表目錄與圖目錄

圖一：敗血症的模型---34

（Model of sepsis）

圖二：造成敗血症的來源------------------------------------- 35

（Etiology of sepsis）

表一：全身性發炎反應症候群之模型及相關名詞定義------ 36

（Definition of the disorders associated with SIRS）

圖三：微生物活化巨噬細胞分泌活性物質造成器官的損傷-37

（Secretion of inflammatory mediator by microorganism-activated macrophage caused multi-organ damage）

表二：敗血症臨床上表現------------------------------------- 38

（Clinical manifestation of sepsis）

表三：細胞凋亡與壞死的差異性------------------------------39

（Characteristics of apoptosis and necrosis）

圖四：中藥複方萃取物 CDT-01 之水抽提率------------------ 67

（The content percentage of Chinese herb water extract CDT-01）

圖五(A)：早給予 CDT-01 對肺泡巨噬細胞數目的影響------- 68

（Effect of the cell number of AM by early administration CDT-01）

圖五(B):晚給予 CDT-01 對肺泡巨噬細胞數目的影響------- 68
（Effect of the cell number of AM by late administration CDT-01）
圖六(A):早給予 CDT-01 對肺泡巨噬細胞凋亡的影響------- 69
（Effect on the apoptotic percentages of AM by early administration CDT-01）
圖六(B):晚給予 CDT-01 對肺泡巨噬細胞凋亡的影響------ 69
（Effect on the apoptotic percentages of AM by late administration CDT-01）
圖七:早給予 CDT-01 對肺泡巨噬細胞吞噬能力的影響------- 70
（The phagocytotic ability of AM by early administration of CDT-01）
圖八:早給予 CDT-01 對肺部細菌數量的作用----------------- 71
（Effect on the Bacterial growth in the lung by early administration CDT-01）
圖九：早給予 CDT-01 對敗血症大白鼠 GPT、GOT 的影響-- 72
（Effect of early administration of CDT-01 on the Glutamyl Oxaloacetic Transaminase and Glutamyl Pyrubic Transaminase in septic rats）
圖十：早給予 CDT-01 對敗血症大白鼠 TP、ALB 的影響---- 73
（Effect of early administration of CDT-01 on the total

protein and albumin in septic rats)

圖十一：早給予 CDT-01 **對敗血症大白鼠** GLU、CRE、BUN **的影響**-- 74

（Effect of early administration of CDT-01 on the glucose、creatine and blood urea nitrogen in Septic rats）

第 一 章 總 論

壹.敗血症之概論

第一節 前言

敗血症 (sepsis) 的發生與否對於加護病房中的急症和重症病患，始終是扮演著操控生死的一項關鍵因素（Astiz et al., 1998；Diaz et al., 1999；Mbithe and Mutunga, 2001)。敗血症在字面上的解釋是腐敗的意思，醫學上則是產生惡臭膿液的發炎反應，起初是因為細菌侵入血液中所產生的（Zantl et al., 1998)。在 Philadelphia CHEST 2001 所舉行的第 67 屆美國國家胸腔內科學會內科醫師年會（ACCP/SCCM）中指出，敗血症和由於敗血症所導致的相關疾病其死亡率有上升的趨勢（Nystrom, 1998)。在美國，從 1988 年到 1998 年敗血症的發病率增加了 23.3%；死亡人數也比 1979 年增加了一倍之多。在 1995 年的統計數據指出，美國每一年約有 500,000 以上的病人感染敗血症（Brun-Buisson et al., 1995；Chen et al., 2000)，其死亡率約為 30-50%（Ahmad, 1995 ；Mbithe and Mutunga, 2001)。此外，在 Rangel-Frausto 等人 1995 年調查 ICU 和一般病房的 3708 名病患，發現約有 68% 的病患達到所謂 SIRS（systemic inflammatory response

syndrome）標準；在這些病人中有 26% 的人會發展成為敗血症, 18% 成為嚴重性的敗血症(severe sepsis)以及 4% 的人會演變為敗血性休克（septic shock)，其死亡率同時也和病情的嚴重程度成正比（表一)。雖然醫學的發展，使得敗血症的機制更進一步被瞭解；但是現今臨床上對於敗血症病患的治療，大多數仍舊是以抗生素，像是採用青黴素類（penicillin）或者是頭孢子菌類（cephalosporines）進行殺菌為主；並增加臥床休息、保持營養及電解質平衡、給予適當的水分、退燒藥物或是以呼吸輔助器維持病人的呼吸等消極的支持性療法以維持病人的生命。如此一來，不僅浪費醫療成本，而且對於病人而言也不是一種最妥善的治療方式。因此確立敗血症的機轉，期望給予病人更完善的治療方式；甚至能在致病初期給予適當的處理措施或是藥物，避免嚴重敗血症的發生以挽救更多病患的生命，對我們而言則更顯得格外重要。

第二節 敗血症的定義及致病機轉

2-1 敗血症大部份是由於細菌所引起

過去由於醫學並不發達，對於敗血症的一切所知無幾，充其量也只知道敗血症是由細菌感染所引起的一種疾病。並且往往將菌血症、敗血症甚至是壞血症和血癌混為一談；直

到一九一四年 Schottmueller 等人對敗血症做出定義，才使得人們對於敗血症有了初步的了解。Schottmueller 等人認為敗血症是微生物經由門脈侵入血流中進而造成生病，這和後來我們對於敗血症的認知上並沒有很大的差異。正常情形下血液中是呈現無菌狀態，當細菌侵入宿主的血流中可稱之為菌血症 (bacteremia)；當侵入的細菌引發更嚴重一連串的全身發炎反應後（Lodato et al., 1999)，則是稱之為敗血症。無論是外來或是宿主體內本身的細菌；甚至是黴菌、寄生蟲、病毒也都有可能引發敗血症(表二)(Oberholhzer et al., 2001)，但最主要仍舊是以細菌為主。

2-2 革蘭氏陰性細菌最常引發敗血症

過去數十年間，引起敗血症的病原菌中，以革蘭氏陰性細菌造成的傷害最為常見（Bassett, 1971)；其中常見的細菌如：大腸桿菌（Escherichia coli)、綠膿桿菌（Pseudomonas aeruginosa)、克雷伯氏菌（Klebsiella pneumoniae) 等，都是屬於革蘭氏陰性細菌。這些細菌中有的是胃腸道內的正常菌叢，因為某些因素使得細菌從胃腸道中遷移（O'Boyle et al.,1998)，散播到鄰近組織裡。像是闌尾炎破裂引起的細菌性腹膜炎、或細菌由會陰部遷移到尿道或是膀胱中。同時敗血症的病灶常發生在肺部、生殖泌尿道、肝膽胃腸道等處，除此之外創傷、手術也是引起敗血症的原因之一(Weiss et al.,

1999）。

2-3 微生物和防禦功能缺失導致敗血症更加惡化

當宿主受到微生物的侵犯，正常情況下會被宿主的免疫防禦系統辨識並進行清除。但是假若微生物的數量太多或是宿主的防禦機制出現了障礙，因此微生物無法被網狀內皮系統（reticuloendothelial system）**有效的清除，使其不斷地在血液中繁殖，同時也釋放出更多的產物，如此不斷惡性循環下去，造成無法抵擋的破壞也使得宿主敗血症的嚴重程度增加。**

2-4 敗血症的定義和嚴重程度的分級

敗血症在臨床上的定義就是必須具有明確感染的來源以及符合下列幾項條件：體溫（大於 38℃**或是小於** 36℃**）、心跳加速（每分鐘大於** 90**下）、呼吸速率方面（每分鐘大於** 20**次）、白血球數目（每毫升血液中白血球數目大於** 12,000 **或是小於** 4,000**個）之中兩者或是兩者以上（表三），才可稱為敗血症（**Bone et al., 1992；Ailko et al.,1999）。**而且為了區分敗血症的病程，**ACCP/SCCM**在** 1992**年提出了全身性發炎反應症候群（**systemic inflammatory response syndrome, SIRS）**模型，企圖用此一模型區分敗血症的病程，依照嚴重程度分成下列幾個時期（**Proulx et al.,1996）：1. **全身性發炎反應症候群、**2. **敗血症、**3. **嚴重的敗血症、**4. **敗血性休**

克、5. 多重器官功能異常症候群（multiple organ dysfunction syndrome, MODS）。

第三節 敗血症器官傷害及肺傷害

3-1 敗血症會引起許多器官的傷害

以最常造成敗血症的革蘭氏陰性細菌為例，當其侵入人體後會因為細菌本身或其產物在宿主體內和網狀內皮系統產生交互作用（Kayal et al.,1998），像是內毒素（Lipopolysaccharide, LPS）可以刺激巨噬細胞及單核球（Zhang et al., 1999）分泌出許多種和發炎有關的物質例如：前列腺素、細胞激素等（Kubo et al., 1998），造成宿主本身免疫防禦機制過度活化（Raju et al., 2001）；使得血液動力學發生變化，造成組織方面的受損，甚至導致多重器官衰竭（Short et al., 1983）和成人呼吸窘迫症（adult respiratory distress syndrome, ARDS）的出現（表四），因此增加敗血病人死亡的比率（Meduri et al., 1995）。

3-2 急性肺損傷在敗血症的器官傷害中最為常見

由於敗血症的形成導致內皮細胞受損、對器官的灌注不足使得許多器官造成傷害，如肝臟、脾臟、腎臟、肺臟等，其中肺臟便是最容易遭受破壞的器官（Ridings et al., 1997）。在敗血症的病患中，有極高的比例會形成 ARDS，

其死亡率很高的甚至會達到 40-60%之多（Bernard et al., 1994)。成人呼吸窘迫症並非是一個獨立的疾病；而是一種連續性的病理特徵，早期階段為急性肺損傷（acute lung injury, ALI）晚期嚴重的 ALI 則稱之為 ARDS（Rubenfeld et al., 1999)。

3-3 肺傷害主要是細胞遷移以及發炎反應造成

肺部損傷常見於重大創傷、休克、敗血症等病理過程（Kraus et al., 1993)。雖然造成 ALI 及 ARDS 發病的確切機轉仍未完全闡明；但是可以確定應該和全身性發炎反應症候群（SIRS）有所關聯（Zhang et al., 2001)。一般而言，肺損傷可能是涉及兩個主要的過程，細胞的遷移與聚集以及發炎物質的釋放導致通透性加劇。當宿主受到微生物侵犯感染後，會活化補體系統（complement system)、血小板活化因子(platelet activating factor , PAF)、花生四烯酸(arachidonic acid , AA）以及調節和發炎有關的細胞激素（cytokines)，進而活化細胞內黏附分子（intracellular adhesion molecules, ICAMs）這使得嗜中性白血球（neutrophil）會由循環的血液中進入到肺泡腔內，造成嗜中性白血球在肺泡腔內的比例增高（Czermak et al., 1999)。嗜中性白血球的移動本身並不會導致肺損傷，但是游走到肺泡內後會產生髓過氧化?（myeloperoxide, MPO）與彈性蛋白?（elastase)，前者引

起脂質過氧化、細胞膜受損；後者導致膠原、蛋白多醣、纖維素被分解而造成細胞外基質和基底膜受損因此損傷肺泡上皮，使得毛細血管滲漏直接影響肺泡的氣體交換功能。除了上述的細胞激素作用之外可能還有許多物質參與肺損傷的反應；血小板活化因子也是一種可以強烈引起缺血和休克的介質（Redl et al., 1993）。藉由免疫反應的不斷進行，造成肺部組織的損傷增加而使得呼吸系統功能衰竭。

第四節 敗血症的臨床症狀表現及治療

4-1 敗血症在臨床症狀以及血液動力學上會發生改變

當微生物侵入造成感染而引發敗血症後，在臨床上的症狀會出現，如發燒、寒顫、心搏加速、呼吸急促、代謝性酸中毒、意識改變及低血壓等現象（Nystrom, 1998；Bossink et al.,1999）(表六)。為了確定病人是否感染敗血症，在實驗室的診斷方面，敗血症的病原菌必須由血液或是其它感染病灶取得檢體經培養以確定診斷（Schuster, 1989）。此外敗血症在血液動力學方面上更會出現明顯的改變(Koo et al., 2001；Yang et al., 1999)，敗血症早期時，屬於高血液動力學代謝時期（Wang et al., 1999)，會出現呼吸急促、呼吸鹼血症、動脈氧分壓下降等現象；隨著時間以及嚴重程度的增加會進入到晚期的敗血症，這是屬於低血液動力學代謝的時期

（Yang et al., 1999）。在晚期時常因低血壓造成灌注量不足，使得器官受損的情況加劇。在人類敗血症的患者中，也有為數不少的病患最終演變成為成人呼吸窘迫症，或是形成瀰漫性血管內凝血（disseminated intravascular coagulation, DIC），這些因素也都是導致敗血症高死亡率的原因（Gando et al., 1995；Fisher et al., 1994）。

4-2 抗生素治療敗血症效果不彰

敗血症常發生在新生兒、老人或者是必須長期住院的病患身上。根據八十九年行政院衛生署的統計，敗血症在台灣的死亡率排名第十四位；但因敗血症會造成其它器官的損傷進而引發器官的衰竭，所以病人的死因則很有可能會被歸類為別種疾病譬如肺炎亦會引發敗血症，是九十年台灣十大死因的第八位，因此實際上感染敗血症的人數應該會更多。近年來，儘管醫學、抗生素的發展如此進步，但是在治療敗血症上，確仍然未見明顯的進步；感染敗血症的病患即使經過抗生素的治療，其死亡率仍舊很高（Bone, 1993）。由此可見單是只靠殺菌作用，對於治療敗血症並非是一個最有效的方法。

4-3 敗血症採用的治療方法

現今在敗血症的治療上，包括：1. 抗菌藥物（antimicrobial agents）的使用。2. 感染病灶的處理，經由外科手術切開以除

去感染源。3. 治療基本疾病。4. 支持療法：給予大量點滴輸注液、升壓劑以維持生命現象（Kocherlakota et al., 1997；Simon et al., 2000）。除了抗生素的研究之外，在過去幾年之間，對於敗血症的其它治療方法也一直在進行，這些包括使用類固醇（Putterman, 1989）、對抗內毒素的單株抗體（Schedel et al., 1991）、血小板活化因子（PAF）拮抗劑（Cundell et al., 1995）及可溶性 TNF 受體（Eidelman et al.,1995），但是臨床上的治療結果仍無法有效降低死亡率。因此敗血症及其誘發的相關疾病仍需更深入研究，期望能有效改善臨床上因為敗血症所造成高死亡率的情況。

貳. 巨噬細胞與敗血症

第一節　細菌在敗血症中的免疫反應

1-1 內毒素是造成敗血症的主要成因

感染人類的細菌可分為產毒性（toxigenic）以及非產毒性（non-toxigenic）兩大類。細菌致病的來源無論是細菌本身或其分泌物，均會和人體產生交互作用引起免疫反應（Scott et al.,1999； Tapper and Herwald, 2000）。使用革蘭氏染色可將細菌分為革蘭氏陽性細菌（Gram-positive bacteria）以及革蘭氏陰性細菌（Gram-negative bacteria）兩

大類（Groeneveld et al.,2001）。其中 lipoteichoic acid（LTA）存在於革蘭氏陽性細菌中（Fischer, 1990）；而 LPS 則存在於革蘭氏陰性細菌中，此即內毒素的一種（Rietschel et al., 1994；Hancock et al., 2000）。有些細菌比較特別可以分泌出外毒素（Beno et al., 2001），為細菌繁殖時所分泌出的一種可溶解性蛋白質。內毒素是由細菌細胞壁外膜脂多醣所構成，其中脂質 A（lipid A）是最具毒性的部份（David et al., 1999；Zhang et al., 1995），更因脂質的免疫原性較差，不易誘導抗體產生所以無法將內毒素中和。臨床上，革蘭氏陰性細菌感染所引起的發燒、瀰漫性血管內凝血（DIC）、敗血症等大部份可歸因於內毒素的作用（Varma et al., 2001；Cybulsky et al., 1988）。

1-2 藉由免疫機制的啟動清除外來的病原菌

免疫反應是屬於身體正常的防禦機制，一般而言，人體免疫機制可以區分為自我和外來兩種情況。自我防禦包含摧毀體內異常增殖的癌細胞；外來防禦則是包含抵抗微生物侵犯（如細菌、病毒、黴菌等）以及移除非微生物的異物（如毒素、代謝後的廢物等）（Labro, 2000）。免疫防禦一般概略的分成兩道防線：第一道是非特異性免疫反應（non- specific immune response），例如皮膚、黏液、巨噬細胞等天然屏障。第二道防線是特異性免疫反應（specific immune response），

為T細胞和B細胞兩大部份(Samaranayake and Samaranayake, 2001)。非特異性免疫是在身體表面形成一道城牆，阻止病菌的入侵；此外身體的各種分泌液（如唾液、淚液和酵素）也都具有殺菌的能力（Gachon et al., 1998)。微生物侵入人體時，會被吞噬細胞吞噬或是藉由產生發炎反應進一步殺死細菌。發炎反應可以阻止病原菌在體內擴散，也可以吸引大量免疫反應細胞聚集，因此發炎反應雖然會出現紅、腫、熱、痛這些不舒服的症狀，但卻也是我們最重要的防禦系統（Munford and Pugin 2001)。

1-3 免疫系統失去平衡比微生物影響更大

當外界微生物侵入後，會藉由啟動發炎反應達到殺菌作用。但是倘若發炎機制遭受破壞失去了平衡，便會造成一連串無法抵擋的嚴重結果，敗血症便是一個很好的例子（Arnalich et al., 2000；Horn 1998)。有不少研究指出TNF和IL-1是敗血症時最主要的調控因子（Weiss et al., 1999)；這個關鍵的發現是因為以靜脈注射TNF以及IL-1到動物體內之後，會使得實驗動物的血液動力學發生改變，表現的情況和內毒素血症以及敗血症十分相似（Natanson et al., 1989；Fisher et al., 1991)。除了上述的兩個最主要的細胞因子之外，敗血症也和其他許多的細胞因子、前列腺素衍生物以及NO等等密不可分（Ando et al., 2000)，因此我們可以

說敗血症和整個免疫機制的調控是息息相關的。

第二節 巨噬細胞及其功能

2-1 巨噬細胞是由單核球所演化而成

血液中有血球和血漿兩種成分。血漿內含有各種維持生命的成分；血球則可分為紅血球、白血球、血小板，功能上各司其職。白血球可再細分為顆粒球、單核球、淋巴球三種類型（Nikolic et al., 2001)。當微生物入侵後會被吞噬細胞吞噬，吞噬細胞中又以嗜中性白血球效果最佳，在適當的調理素作用下，最能有效的吞噬並殺死大部份入侵人體的病原菌，因此又稱被為專業性吞噬細胞（Labro, 2000；Hampton et al., 1998)。當單核球遷移到各處組織內就演化成巨噬細胞，巨噬細胞的吞噬作用雖然比不上嗜中性白血球，但是卻具有另一項重要的功能，即是將所吞入之病原菌經過處理後呈現給 T 細胞或是 B 細胞，更進一步引發免疫反應以清除細菌（Hart, 1997)。

2-2 巨噬細胞在整個免疫系統中扮演關鍵的角色

巨噬細胞是一個通稱，在我們身體組織或是器官中會有不同的名稱，像是肺泡中的巨噬細胞稱為肺泡巨噬細胞（alveolar macrophage, AM)、肝臟中的巨噬細胞則為庫柏細胞（Kupffer cell）、神經組織中的是小神經膠質細胞

（microglial cell）（Hashimoto et al., 1999）。巨噬細胞一般而言有四大功能，即吞噬作用、辨識作用、攻擊作用和修復作用。過去我們一直以為巨噬細胞像是清道夫是種吞噬細胞而已，直到 1995 年諾貝爾醫學生理獎得主 Doherty 和 Zinkernagel 的研究發現；巨噬細胞是聯結第一道天然免疫防線和第二道特異性免疫防線的主角，也可以說巨噬細胞是開啟人體自體免疫反應的一把鑰匙，也因此巨噬細胞在免疫反應中是扮演重要的角色。

第三節 細胞凋亡

3-1 細胞死亡：壞死（necrosis）與凋亡（apoptosis）

細胞注定是會死亡的，有些死亡是生理性；而有些則屬於病理性的變化。細胞死亡包括兩種不同的表現形態（表七）：細胞壞死以及細胞凋亡（Lieberthal et al., 1998）。細胞凋亡的表現為單一或個別細胞死亡，出現細胞皺縮、核破裂及凋亡小體形成為特徵；在型態學上表現為細胞外觀縮小，與鄰近細胞脫離但質膜和胞器完整，核仁裂解最後質膜內陷將細胞分割為多個由膜包裹並含有核碎片的凋亡小體（Reed, 2000）。此外細胞凋亡的過程中不會有內容物外溢與炎症反應的情況。這些特點顯然與細胞壞死不同。細胞壞死的結果會造成細胞成群死亡。其病理特徵為質膜的完整性喪

失、膜電化學梯度破壞使細胞內容物外溢。型態學上的表現為細胞外形增大、內質網擴張、粒線體及核腫脹、質膜破裂、細胞溶解（Drueke, 1997)。由此發現細胞凋亡和細胞壞死之間有許多的差異性。

3-2 細胞凋亡

病理學家 Kerr 在 1972 年首次提出細胞凋亡的? 念，同時也啟發了細胞凋亡研究的開始，經過 30 年的發展，對細胞凋亡的研究已成為當前細胞分子生物領域的焦點。在希臘文中 apoptosis 這個字是用來描述樹葉或花瓣從枝頭掉落的狀態（Reed, 2000；Ueda and Shah, 2000)。細胞凋亡是正常細胞受到生理或病理性刺激後所出現的一種自發性死亡過程，這過程在組織分化、器官發育上具有極為重要的意義。細胞凋亡也是種細胞程序性細胞死亡(programmed cell death, PCD）屬於主動過程，涉及了一系列基因的表現和調控的作用，目的是維持內在環境穩定（Distelhorst and Dubyak, 1998；Brown and MacLeod , 2001)。細胞凋亡是生物體內重要的生理現象，例如蝌蚪變成青蛙時尾巴逐漸消失就是藉由細胞凋亡所產生的結果。.

3-3 細胞凋亡的生理意義

細胞凋亡在細胞生物中所扮演的生理角色（1）個體發生時的可塑性（developmental plasticity）及適當性（the fittest

cells)：個體發生學開始往往製造數量過多的細胞，在依據情況來決定所需的細胞。（2）塑造個體和器官型態：舉凡腸管腔道的形成、尾巴的消失等等一切型態的形成。（3）恆定（homeostasis)：細胞數目狀態的恆定藉由細胞增殖與凋亡達成平衡。（4）除去危險性細胞：當生物個體受環境或病毒的影響時，可藉由細胞凋亡來除去這些危險性細胞，因而保護生物個體。

3-4 細胞凋亡的研究

研究細胞凋亡的方法可採用形態學、細胞學、生物化學和分子生物等技術方面，一.Caspases 系列：Capases 的活性是鑑別細胞凋亡的一個重要指標。二.TNF 家族：TNF 及其受器是一個龐大的家族，包括多種受器 Fas、Trail 等以及相對應的配體 FasL、DR4 和 DR5 等，這些配體與受器結合則引發細胞內連鎖反應，導致細胞凋亡（Mitsiades et al., 2000)。三.Bcl-2 家族：和 TNF 家族相反，Bcl-2 基因能阻止細胞進入凋亡過程，可藉此達到阻止細胞凋亡。四.Annexin V 測定：細胞膜結構的改變是細胞死亡的基本過程，細胞膜上的 phospholipid phosphatidylserine（PS）由膜內翻轉到膜外是細胞凋亡早期表現的重要依據（Naito et al., 1997)。

3-5 影響細胞凋亡的因素

細胞凋亡會受到多方面因素影響（Behnia et al., 2000；

Badley et al., 2000)，一.基因類：P53 基因、Bcl-2 基因、c-myc 基因等。二.細胞因子類：某些內源性激素、TNF 可誘發多種細胞發生凋亡。三.抗原類：如細胞表面的 Fas 抗原在特定條件下可誘導凋亡。四.細胞類：自然殺手細胞（NK cell)、細胞毒性 T 細胞（CTL)。五.藥物類：某些外源性糖皮質激素、細胞毒藥物及抗腫瘤藥物等。六.外源性刺激：低劑量的輻射、缺血及再灌注性損傷等。

參. 中藥治療敗血症之療效

第一節　清熱藥與敗血症

1-1　人體維持動態的恆溫狀態

生命的維持仰賴正常生理代謝的平衡，人體的一切活動都是要消耗能量的，而能量的來源便是藉由食物的供應經過消化與代謝所轉變得到的。正常情況下熱量的產生與排除處於動態平衡，這使我們體溫維持在 37℃恆溫。一旦人體受到外界因素導致生病，可能會造成機能亢進、組織充血、產熱大於散熱，進而影響體溫使體溫超過 37℃，這就是所謂的發燒。敗血症因為外界微生物侵入人體；使得活化一連串的免疫反應造成發炎情況的產生，常常出現高燒的症狀（Munford and Pugin, 2001)。

1-2 清熱藥對於感染性疾病具有療效

現代醫學應用抗生素或是磺胺藥等等的合成藥物治療感染性的疾病，雖然具有殺菌的效果，但是其隱藏的毒性以及副作用卻也相當令人擔憂。此外由於細菌耐藥性的出現，最終迫使我們必須動用到最後一線的抗生素來治療，這點更是令人感到憂心忡忡。因此除了研究更強力的抗生素之餘，從免疫調節的角度著手不外乎是一個更佳的選擇。我們老祖先運用清熱中藥，如黃芩具有影響花生四烯酸代謝的作用（鄧文龍, 1988)、藉由抑制發熱中樞之前列腺素的合成達到解熱的作用（鄧文龍, 1988)。更重要的是這類中藥大多安全無毒，因此相當值得更進一步研究探討。

第二節 清熱藥的藥理作用

2-1 清熱藥和抗生素並不相同

清熱法是宗【素問. 至真要大論】: 乃熱者寒之的意思，是用寒涼之藥物解去體內的熱。著名的方劑有五味消毒飲、黃連解毒湯、犀角地黃湯等等。而清熱藥中最主要是含有?類及生物鹼類這兩種成分。這兩類成分味苦卻常常是清熱藥的有效成分之一。一.? 類: 主要是黃酮? (如黃芩、金銀花)、環烯醚? ? (如? 子、玄蔘)。二.生物鹼類: 大多為小蘗鹼類（如黃連、黃柏)。清熱藥對多種感染性疾病有良好的療

效，因此長期以來常常將清熱藥和抗生素視為同類作用的藥物。但是近年來的研究發現，若是僅以抗菌作用解釋清熱藥不完全正確的。雖然清熱藥也有很強的抗菌作用；但是大多數的清熱藥卻是一類以調節免疫為主具有廣泛藥理作用的藥物，這一點和抗生素在本質上有很大的區別。

2-2 中藥具有多方面的藥理作用

中藥普遍而言具有許多性能、功用，也就是說中藥具有相當多的現代藥理作用。以清熱藥為例，根據近年來的研究指出其藥理作用包括，抗微生物作用，如黃芩中的黃芩？元（baicalein)、苦參的苦參鹼（matrine)、金銀花中的氯原酸（chlorogenic acid）和黃氯原酸（isochlorogenic acid）以及黃連所富含的小蘗鹼（berberine）等，均具有顯著的抗菌作用。解熱作用方面，我們知道發燒是感染性疾病普遍的症狀之一，一九三七年 Smith 報告指出淡竹葉具有解熱作用；此外如黃芩中黃芩？也具有解熱的功效（唐汝愚，等 1958)。抗炎作用：發炎是身體的防禦機轉，因此急性炎症是感染最重要的病理過程之一。像是秦皮乙素（aesculetin)、牡丹酚（paeonol）等便具有抑制發炎的作用。除此之外清熱藥尚具有許多作用，像是夏枯草具有增強腹腔巨噬細胞功能及溶菌酵素含量（王文杰，等 1994)，黃連、黃柏具有調節β腎上腺素產生降壓的效果（荒石和男,等，1982)，？子能抑

制腫瘤壞死因子產生（杜德極,等, 1990)、? 子也具有保肝利膽的作用（伊原信夫, 等 1981）等。經由這些作用的綜合表現構成了清熱藥的整體表現。對於嚴重的感染，清熱藥清除病原菌的能力或許不及抗生素來的直接，但已知以抗生素治療感染性疾病，雖然可以快速獲得療效，相對的也可能會使防禦機制的免疫反應變的比較差，這可能也是因為免疫機制尚未受到充分刺激和記憶的緣故。所以這更進一步闡明使用清熱藥治療敗血症和使用抗生素之間的不同之處。

第四節　研究設計與目的

我們研究的目的，是探討以黃芩、黃柏等中藥複方萃取物 CDT-01 對於敗血症大白鼠肺傷害的作用為何。實驗中使用盲腸結紮穿刺手術，誘發大白鼠產生敗血症。觀察在晚期敗血症（二十小時）大白鼠之表現：

一. 檢查中藥複方萃取物 CDT-01, 是否對於敗血症大白鼠之肺泡巨噬細胞具有保護作用。將給予 CDT-01 或是水之敗血症大白鼠，經由支氣管肺泡灌流技術分離出肺泡巨噬細胞，計算後比較其細胞數目；同時藉由流式細胞儀之偵測，進一步評估肺泡巨噬細胞之細胞凋亡比例的表現。

二. 探討在給予 CDT-01 或是水之敗血症大白鼠及正常大白鼠的肺部細菌的數量，評估 CDT-01 是否具有增強敗血

症大白鼠肺部防禦機轉的作用。實驗是將肺臟均質後，以無菌操作技術做細菌的培養。經過二十四小時後分別計算菌落數並做比較。

三. 其次，我們想瞭解給予 CDT-01 對肺泡巨噬細胞的吞噬功能有何差異。將給予 CDT-01 或是水之敗血症大白鼠之肺泡巨噬細胞以支氣管灌流技術取出，與接有螢光之大腸桿菌反應一定時間後，以流式細胞儀偵測其螢光之表現藉以評估肺泡巨噬細胞的吞噬能力。

四. 研究敗血症晚期對於大白鼠器官方面的傷害，及中藥複方萃取物 CDT-01 對敗血症大白鼠器官傷害的影響。收集給予 CDT-01 或是水之敗血症大白鼠及正常大白鼠的血漿，測量生化數值的表現，評估器官方面受傷害程度的依據。

圖一：敗血症的模型

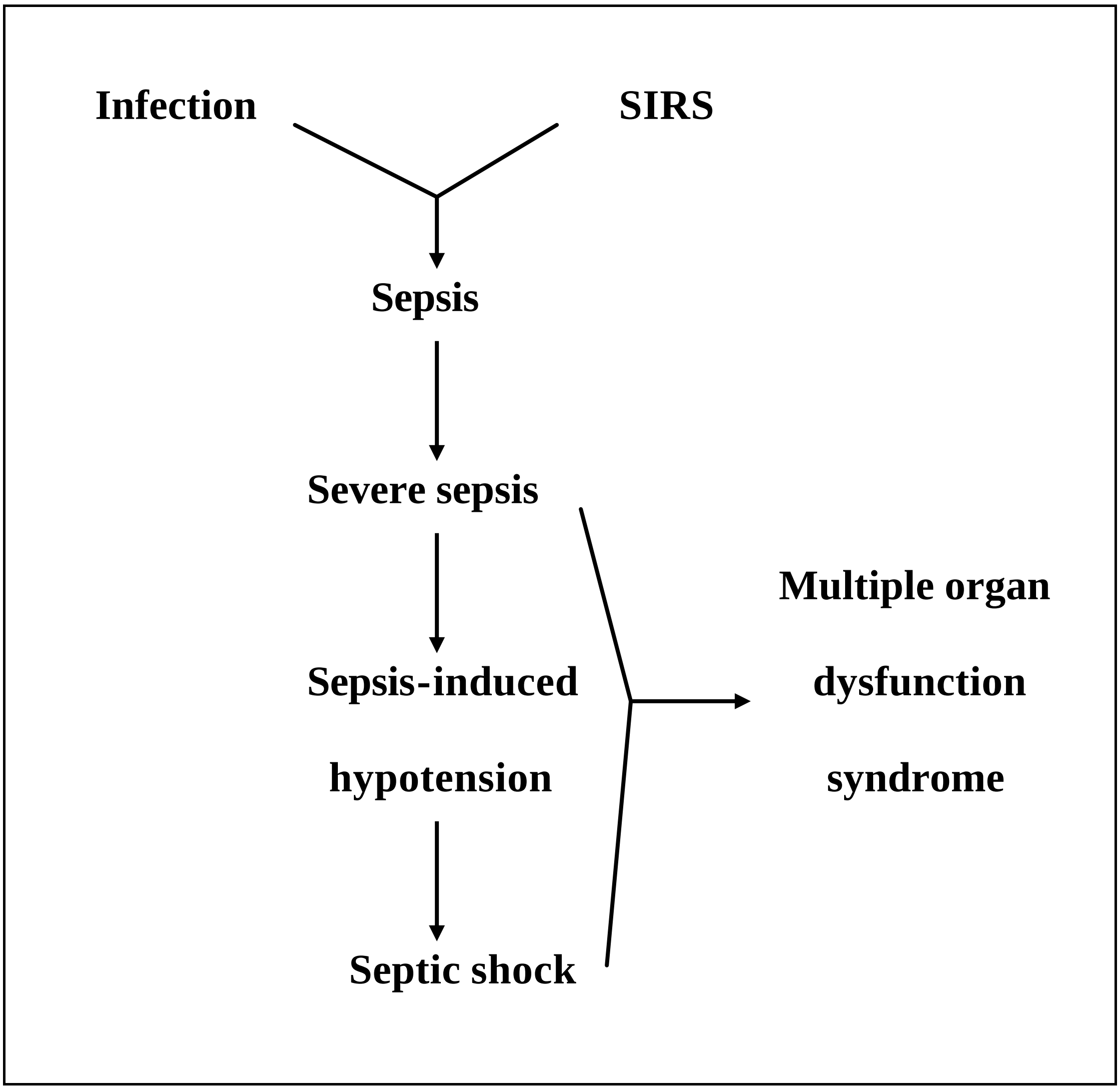


Fig. 1：The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology （Nystrom, J. Antimicrob. Chemother., Jan 1998; 41: 1 - 7.）

圖二：造成敗血症的來源

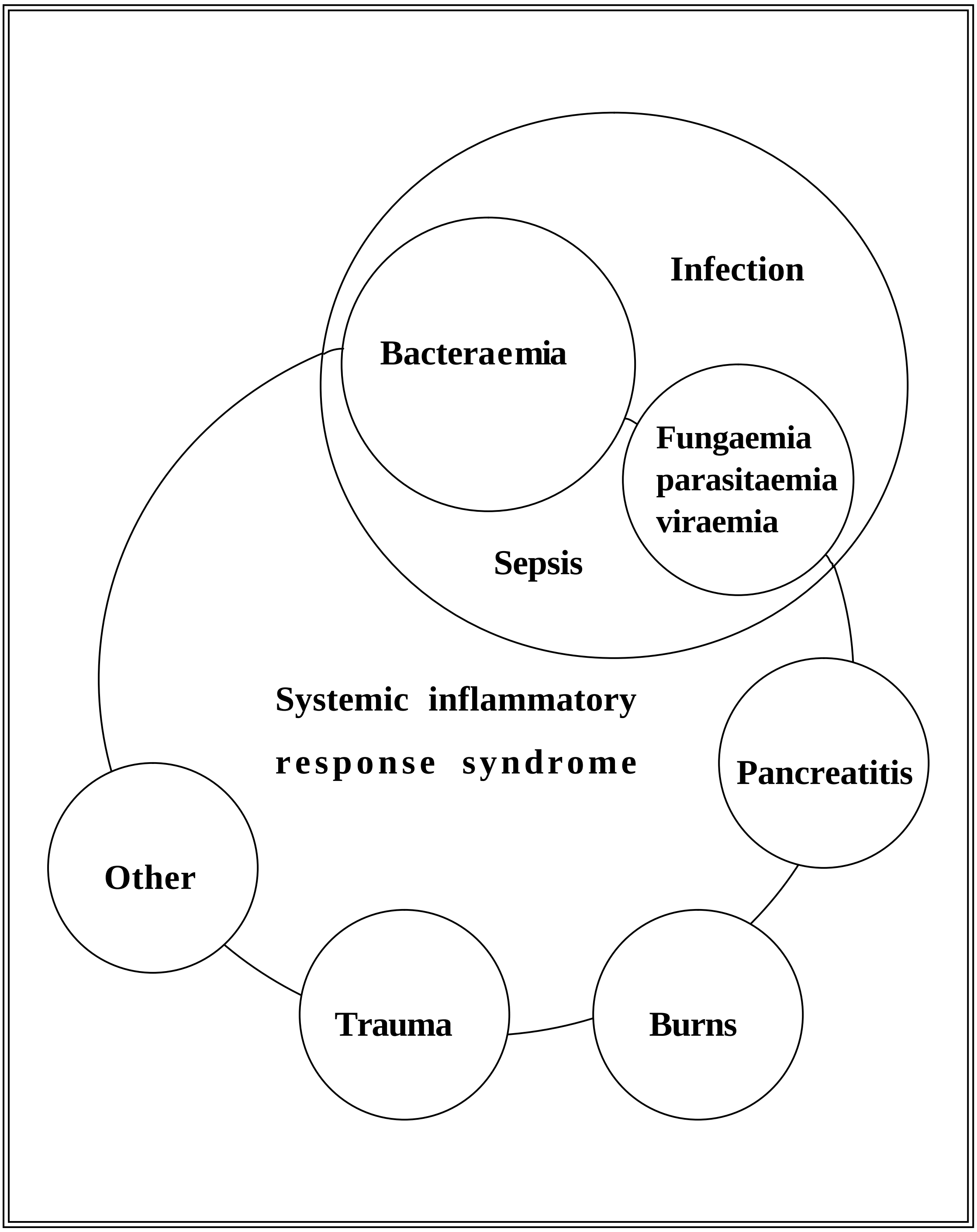


Fig. 2：Etiology of sepsis

表一：全身性發炎反應症候群之模型及相關名詞定義

Definitions
Infection＝microbial phenomenon characterized by an inflammatory response to the presence of microorganisms or the invasion of normally sterile host tissue by those organisms.
Systemic inflammatory response syndrome（SIRS）＝The response is manifested by two or more of the following conditions: (1)temperature＞38℃ or＜36℃；(2)heart rate ＞90 beats per minute；(3)respiratory rate＞20 breaths per minute or $PaCO_2$＜32 mm Hg；(4)WBC count＞12,000/ cu mm,＜4,000/cu mm, or＞10% immature(band)forms
Sepsis＝the systemic response to infection
Severe sepsis＝sepsis associated with organ dysfunction, hypotension or hypoperfusion
Septic shock＝sepsis-induced with hypotension despite Adequate fluid resuscitation along with the presence of perfusion abnormalities
Multiple organ dysfunction syndrome（MODS）＝presence of altered organ function in an acutely ill patient

Table 1：A uniform system for defining the spectrum of disorders associated with sepsis.（Chest. 101：1644-1655, 1992）

圖三：微生物活化巨噬細胞分泌活性物質造成器官的損傷

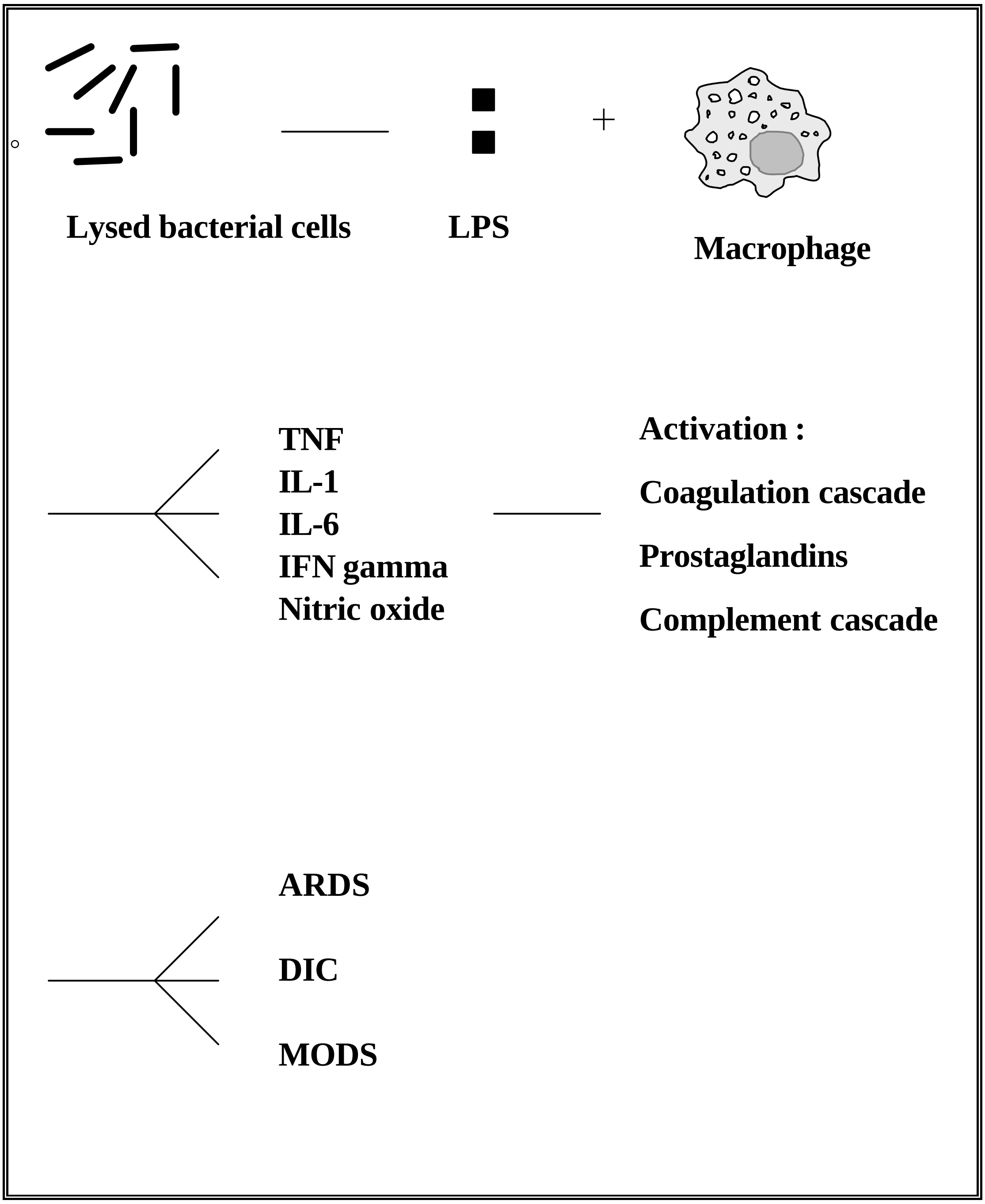


Fig. 3.： Secretion of inflammatory mediator by microorganism-activated macrophage caused multi-organ damage.

表二：敗血症臨床上表現

Hyperthermia, hypothermia
Tachypnea
Tachycardia
Hyperdynamic state
Hypotension
Impaired organ perfusion
Circulatory shock
Metabolic abnormalities（lactic acidosis）
Multiple organ system failure
Adult respiratory distress syndrome（ARDS）
Renal filure
Hypatobiliary dysfunction
Central nervous system dysfunction

Table 2： Clinical expression of sepsis

表三：細胞凋亡與壞死的差異性

Apoptosis	*Necrosis*
Affects scattered individual cells	Affects massive and contiguous cells
Chromatin marginates as large crescent	Chromatin marginates as small aggregates
A ladder of DNA fragmentation (~200 bp)	Smear pattern of DNA
Cytoplasm and cell volume ↓	Cytoplasm and cell volume ↑
Organelles retain integrity	Organelles swell (mitochondria, endoplasmic reticulum)
Cell breaks into small fragments	Cell ruptures
Cell fragments are phagocytized	Cell contents are released
No inflammation	Extensive inflammation

Table 3：Characteristics of apoptosis and necrosis Ueda and Shah（2000）Tubular cell damage in acute renal failure—apoptosis, necrosis, or both Nephrol. Dial. Transplant., Mar 2000; 15: 318 - 323.

第二章　材料與方法

第一節　中藥 CDT-01 的製備方法

1-1 CDT-01 製備的材料

1. 黃芩、黃柏等中藥材
2. 二次水
3. 剪刀
4. 5 公升圓底燒瓶
5. 電子天平
6. 燒杯
7. 水浴槽
8. 溫度計
9. 減壓濃縮機（Rotary evaporator）
10. 抽氣機（aspirator）
11. 冷凝機
12. 烘箱
13. 自動 pipet

1-2 CDT-01 中藥水抽取的萃取方法

選取黃芩（*Scutellaria baicalensis* Georgi）、黃柏（*Phellodendron amurense* Rupr.）等為主的清熱解毒藥材，

將藥材表面的泥沙除去並將其切製成較小的顆粒以增加體表面積，使得有效成分能充分萃取出。依固定的比例將所需的藥材以電子天平秤好總重 200 公克，裝入 5 公升的圓底燒瓶中，再加入二次蒸餾水 1000mL，待其將藥材充分浸潤後。以隔水加熱保持 95℃、加熱 1 小時，總共萃取 3 次並收集所得的濾液。

1-3 中藥 CDT-01 濃縮與配製

將三次所得到的濾液混合以減壓濃縮機進行濃縮，要注意每個閥門必須轉緊以防止漏氣。濃縮萃取所用的條件是每分鐘 60-70 轉、溫度維持 50℃、壓力為 80mmHg 左右；為避免突沸的產生，因此必須以階梯狀逐次下降到 80mmHg，最後濃縮到呈現黏稠狀即可。配製成 2g/Kg 的溶液經分裝後儲存於-20℃之中，直到實驗需要再取出。

第二節 誘發敗血症大白鼠動物模型（Septic Rat Experiment Model）及給藥方式

2-1 實驗的材料及試劑：

1. 大白鼠（Sprague-Dawley rat, S.D. rat）
2. 磅秤
3. 剪刀
4. 鑷子

5. 止血箝

6. 持針器

7. 縫合線（6-0 monofilament Nylon）

8. 絲線（3-0 silk）

9. 手套

10. 膠帶

11. 擦拭紙

12. 棉花

13. 麻醉用玻璃罩

14. 解剖不銹鋼盤

15. 解剖手術盤

16. 剃毛機

17. 吸塵器

18. 針（18-gauge needle）

19. 抽吸器（suction）

20. 生理食鹽水（saline）

21. 一倍磷酸鹽緩衝容液（1X phosphate buffer saline, PBS buffer, PH 7.3-7.4）

22. PE 管（polyethylene tube）

23. 乙醚（ethyl ether）

24. 酒精（70% alcohol）

25. 碘酒

26. 針筒（5 ml syringe）

27. PH 測量儀（Microcomputer PH-Vision 607, JENCO Electronics, LTD）

2-2 實驗動物的來源與品管：

1. 動物品種：無特別致病原，雄性的 S.D. 大白鼠。

2. 動物來源：國家實驗動物繁殖及研究中心。

3. 動物體重及週齡：200~250 克重（約 6~8 週）。

4. 飼養環境條件：22℃恆溫空調房間，相對濕度約為 55% 左右，半日照明環境，自由飲水及餵食標準的大白鼠飼料。

2-3 動物之實驗模型及組別：

誘發敗血症採用盲腸結紮穿刺手術（cecal ligation and puncture, CLP）

一. 敗血症給 ddH_2O 組：盲腸結紮穿刺手術後 20 小時（敗血症晚期），以餵管投予 ddH_2O。

二. 敗血症給 CDT-01 組：盲腸結紮穿刺手術後 20 小時（敗血症晚期），以餵管投予 2g/Kg 的 CDT-01。

三. Sham 給 ddH_2O 組：進行偽手術後 20 小時，以餵管投予 ddH_2O。

2-4 實驗步驟與方法：

以磅秤量實驗動物的體重，取重約 200 克到 250 克的雄性 Spraque- Dawley 大白鼠，在手術前一晚給予禁食（約 8~12 小時），以免動物在手術過程中分泌大量的黏性唾液；使得其呼吸道阻塞導致所實驗的動物呼吸停止而死亡。將手術過程中所需的器具放置妥當，則可開始進行盲腸結紮穿刺手術誘發敗血症。在進行 CLP 步驟之前，所有的器械必須以 70 %的酒精消毒，待酒精完全揮發乾燥才具有消毒作用。將消毒好的器械浸泡在裝有生理食鹽水的解剖盤中；之後將乙醚倒入麻醉用的玻璃罩內（約倒入 30ml 左右即可，過量或是不足容易使實驗動物死亡或是出現麻醉效果不佳的情況）。

將 S.D.大白鼠放入充滿乙醚的玻璃罩內使其昏迷，等到大白鼠出現意識不清的麻醉跡象，將其取出平放在解剖盤上。以膠帶固定四肢於解剖盤上，取一段棉線纏繞住大白鼠的牙齒，並往後拉將棉線固定於板子上；這動作的目的在於將 S.D.大白鼠的氣管儘量拉直，避免在手術過程中因為其呼吸道的阻塞而死亡。因為採用乙醚來進行麻醉會使得實驗動物產生過多的黏性分泌物，所以必須利用抽吸器將分泌物吸出，以保持呼吸道的通暢。

用剃毛刀將其胸、腹部的毛剔除，使得手術能順利進行；剔除下來的毛可以用吸塵器吸取乾淨。因為這些散落的

毛也算是一種抗原，若是手術過程時進入腹腔中，也可能會引起發炎反應。此外，也要適時給予 S.D. 大白鼠適量的麻醉；因為乙醚的麻醉效果必須是吸收後經過重新分佈才會有作用。以 70%的酒精將手套消毒後，再用碘酒消毒剃完毛的部位，利用鑷子先將皮膚層夾起，以剪刀的鈍端剪開約 2~2.2 公分的小切口；至於肌肉層的部份也和皮膚層的處理方式相似。再剪開切口時為了不傷及腹腔中的臟器，需將肌肉層儘量拉高，此外沿著中心線剪也可以避免出血的情況，方便手術作業的進行。

利用鈍頭的鑷子小心地將盲腸取出並以棉花沾取生理食鹽水使腸子能保持濕潤確保腸子的活動力，使手術過程中可能產生的傷害降低，接著則可以開始進行結紮穿刺的步驟。取一段事先浸濕好的棉線，小心的挑出盲腸連接大腸處末端三分之一的位置，利用鑷子穿過腸繫膜較少血管的位置夾著棉線打兩個結將盲腸結紮；注意打的結不要鬆脫。將結紮好的盲腸以鑷子夾住，取十八號針頭穿刺兩個洞，穿刺的同時輕輕的旋轉並前後動一下再將針慢慢退出，各擠出約一個米粒般大小的糞便，均勻地塗抹在洞口處避免洞口癒合，確保盲腸內的糞便能繼續滲漏出；在偽手術組（Sham operated group）的老鼠部份則是將盲腸暴露出來之後，但不以針頭進行穿刺的動作到此則算完成手術。最後用鑷子將盲腸放回腹

腔中並以兩層?合方式分別?合肌肉層與皮膚層，以棉花沾取碘酒均勻塗抹在腹部傷口周圍。接著在 S.D.大白鼠頸後方以皮下注射的方式給予每 100 克 4 毫升的無菌生理食鹽水，避免老鼠因為手術後疼痛不飲水而出現脫水的情況，手術到此完成了。將其放回籠中使其自由飲水、進食以及活動。

維持手術的穩定和再現性是很重要的，若是技術很穩定；以盲腸結紮穿刺引發敗血症是很理想的動物模型，其死亡率在 72 小時可達 95%之多。依實驗設計的需要在 CLP 手術後 1 小時或是 6 小時以口服的方式給予 ddH_2O 或是 2g/Kg 的 CDT-01。以餵管給藥時需利用左手將大白鼠的頭部、前肢及尾巴固定，避免給藥時發生扭動及掙扎的情形，以右手將餵管沿著其食道伸到胃中投予 ddH_2O 或是 CDT-01。要注意的是因為食道是很平順地而氣管則是呈現環狀結構，若是中間遇到阻礙則表示可能誤入氣管，則必需小心退出重新來過避免造成老鼠因氣管阻塞而死亡。

第三節 分離肺泡巨噬細胞及其相關實驗

3-1 實驗所需的材料與試劑

1. 200~250 公克重雄性大白鼠（Sprague-Dawley rat, S.D. rat)
2. 剪刀
3. 鑷子

4. 止血箝

5. 手套

6. 膠帶

7. 麻醉用玻璃罩

8. 棉線（3-0 silk）

9. 口罩

10. 棉花

11. 碘酒

12. 解剖不銹鋼盤

13. 解剖手術盤

14. 抽吸器（suction）

15. 生理食鹽水（Normal saline）

16. 經過滅菌和過濾後的一倍磷酸鹽緩衝容液（autoclaved and filtered 1X phosphate buffer saline, PBS buffer）,PH 值為 7.3-7.4 之間

17. PE 管（polyethylene tube, PE-240）

18. 乙醚（ethyl ether）

19. 酒精（70% alcohol）

20. 細胞計數器（Hemocytometer；Hausser Scientific, USA）

21. 冷凍離心機（centrifuge, IEC centra GP8R）

22. 顯微鏡

23. 電動吸量管（auto-electrical pipette）

24. 冰桶

25. 離心管（15mL 和 50mL centrifuge tube, Falcon）

26. 持針器

3-2 分離肺臟的方法

預先將適量的乙醚倒入麻醉用玻璃罩內，接著準備好實驗所需的器材，將器械以 70%的酒精消毒，必須待其完全乾燥後才具有消毒作用，再裝入生理食鹽水於解剖手術盤之中。

取先前已誘發敗血症的 S.D.大白鼠，在手術後的二十小時也就是晚期的敗血症，用乙醚麻醉並取膠帶固定於解剖手術盤上。使用碘酒和 70%的酒精消毒大白鼠的腹部和胸部，將胸骨下緣的皮膚層和肌肉層以剪刀? 向剪開，為避免傷及肺臟必須將胸骨盡量提高並依兩層的方式剪開至咽喉處，以鑷子小心分離氣管並以止血箝夾緊避免血液逆流入氣管中影響實驗，接著在止血箝上端處用剪刀剪斷，將止血箝提起避免傷害到肺臟可以用鈍頭的鑷子小心將肺臟從周圍組織中分離出來。

取出肺臟後迅速放入冰的一倍 PBS 溶液之中，以鑷子將心臟提起並取剪刀剪去心臟使血液盡量流掉，之後以冰的一

倍 PBS 溶液清洗數遍，如此可以減低紅血球造成實驗誤差的因素。手術後所有的過程必須在冰上操作，以保持細胞活性。

3-3 支氣管灌流技術（Bronchoalveolar Lavage Fluid, BAL technique）分離肺泡巨噬細胞

事前將灌流用的 PE 管以小火過火，使前端捲曲方便能固定在氣管上，接著套入 6 毫升的針筒以完成灌流器。將灌流管前端插入氣管中並以濕潤之棉繩綁緊連接處防止鬆脫。

每次吸取 5 毫升容量的一倍 PBS 溶液徐緩的滴注入肺中，在注入溶液時必須將肺臟置於低處使溶液能順勢流進肺中；而將溶液回抽時則位置必須相反，依肺臟在上灌流器在下原則緩慢進行回抽。以此方法回收率可達百分之九十以上，直到收集 100 毫升則可停止。

剛開始因為肺葉尚未完全張開因此必須更加緩慢和小心灌流，整個灌流的時間約控制在一小時左右，所收集的灌流液必須置於冰上保持細胞之活性以便進行後續的實驗。

第四節 細胞形態與細胞計數

4-1 Giemsa Stain 和 cytospin 實驗所需的材料與試劑

1. Giemsa Stain 染劑

2. 玻片（micro slides glass, Daco）

3. 濾紙（190005 Filter Cards, Shandon）

4. 滴管（dropper）

5. 甲醇（Methanol）

6. 顯微鏡（Microscopy）

7. 細胞計數盤（Hemacytometer；Hausser Scientific, USA）

8. Cytospin 離心機（機型：Cytospin 3, Shandon）

9. Cytospin 漏斗和固定夾

10. 微量吸管（tip）

11. 吸量管（Pipette, Gilson）

12. 手持計數器

4-2. 細胞計數（Cell counting）的實驗步驟

將同一組的兩管灌流液在 4℃、1200rpm、10 分鐘下離心，接著將上清液倒掉後小心地輕輕敲打 corning tube 底部的細胞，盡量使細胞能均勻分散。依次分別加入 10、5、5ml，再將其倒入另一管中使兩管巨噬細胞能混合成一管，得到總共 20 毫升含有巨噬細胞的一倍 PBS 溶液，相同的步驟總共清洗三次。

將最後所得到的細胞液充分混合，以吸量管吸取約 20μL 的細胞液並去掉前端的 1 至 2 滴，沿著凹槽處將細胞液滴入細胞計數盤中以進行細胞計數。細胞計數的方法是依

照公式來計算灌流液中肺泡巨噬細胞的總數量。公式：(四格所得之細胞總數/4）$\times 10^{4} \times 20$＝灌流所得之肺泡巨噬細胞。

4-3 Cytospin 的方法

以滴管吸取 1 滴充分混合的細胞液，滴入 cytospin 的漏斗中以 300rpm、5 分鐘的轉速將細胞打在玻片上。取出玻片在室溫中風乾，約 30 分鐘後浸泡在甲醇中讓細胞完全固定，再次風乾後取稀釋 30 倍的 Giemsa stain 滴在玻片上進行染色的步驟。經過 30 分鐘充分反應後再以二次水蒸餾水沖洗，待玻片上的水分完全風乾後以光學顯微鏡觀察肺部巨噬細胞所佔的比例以及形態。

第五節 肺部巨噬細胞凋亡之偵測

5-1 細胞凋亡所需之材料

1. 細胞凋亡偵測試劑組（cell death detection kit；Roche）
2. 電動吸取器
3. 冰桶
4. 50 毫升離心管（corning tube, Bibby sterilin LTD)
5. 5 毫升試管（Falcon)
6. 試管架
7. 冷凍離心機（centrifuge, IEC centra GP8R)

8. 滅菌及過濾的一倍磷酸鹽緩衝溶液（1X PBS）

9. 流氏細胞儀（Flow cytometer, FACScan；BD）

10. 微量離心管（tip）

5-2 以流氏細胞儀（FACScan）偵測細胞凋亡

取給予水或是 CDT-01 的敗血症大白鼠，在 20 小時犧牲以支氣管灌流技術分離肺泡巨噬細胞，依照組別將同一組的灌流液在 4℃、1,200rpm、10 分鐘下離心後合併在同一管，將上清液倒去後再加入 20ml 以相同的離心條件將細胞清洗 3 次。

依據細胞計數方法所得之肺部巨噬細胞的數量，兩組各取 4×10^6 個細胞數。兩管均以 1,500rpm、5 分鐘離心，將上清液倒去輕敲離心管底部使細胞均勻分散，並加入 400μl 的 Hepes buffer。各取 100μl 將實驗組和對照組各分裝成 4 管，每一管均含有 1×10^6 個細胞數。

依照需要將 4 管分成 A.不加螢光試劑 B.只加入 Annexin-V 螢光試劑 C.只加入 PI 螢光試劑 D.同時加入 Annexin-V 和 PI 雙染。所加入的螢光試劑各是 2μl，完成以上動作後將 8 管靜置於室溫下反應 15-20 分鐘，反應完成後以流氏細胞儀收集資料分析。

第六節 肺泡巨噬細胞吞噬能力偵測

6-1 偵測細胞吞噬功能的材料

1. 偵測吞噬功能試劑組（Phagotest kit, ORPegen pharm)
2. 電動吸取器
3. 冰桶
4. 50 毫升離心管
5. 5 毫升試管（Falcon)
6. 試管架
7. 冷凍離心機（centrifuge, IEC centra GP8R)
8. 滅菌及過濾的一倍磷酸鹽緩衝溶液（1X PBS)
9. 流氏細胞儀（Flow cytometer, FASC；BD)
10. 微量離心管（tip)
11. 37℃水浴槽
12. 胎牛血清（Fetal bovine serum, FBS)
13. 鋁箔紙
14. 震盪器（Shaker, vortex-2 Genie Scientific industries)

6-2 流氏細胞儀偵測肺泡巨噬細胞吞噬能力

取給予水或是 CDT-01 的敗血症大白鼠，在 20 小時犧牲以支氣管灌流技術分離肺泡巨噬細胞，依照組別將同一組的灌流液在 4℃、1200rpm、10 分鐘下離心後合併在同一管，將

上清液倒去後再加入20毫升以相同的離心條件將細胞清洗3次。

以細胞計數盤計算肺泡巨噬細胞的數量，實驗組與對照組各取固定量的細胞數分裝成3管到試管中，使每一管均含有 4×10^5 個細胞數，將每一組的3管分成A.不加E.coli組；B.加入E.coli置於4℃組；C.加E.coli置於37℃組。分裝後以1100rpm、4℃、5分鐘進行離心將上清液倒去，輕輕敲試管底部使細胞分散。在避光以及冰上的條件下，依照實驗需要分別加入100μl的PBS buffer、20μl的FBS、20μl含有 2×10^7 個細菌數的E.coli，以低速混合均勻。將每一組的C管放進37℃水域槽中避光反應2小時，而A、B管則靜置於冰上等待。

2小時後在冰上加入100μl的藍色Quenching solution停止反應以及3ml的washing solution 並以低速震盪混合均勻，以1100rpm、4℃、5分鐘離心除去上清液，避光下將細胞敲散並於冰上加入1.5ml的washing solution再次混合均勻並離心，除去上清液後在避光下將細胞敲散並加入已回至室溫的lysing solution 2ml以降低紅血球的干擾，室溫下避光靜置20分鐘。重複離心動作除去上清液在冰上加入3ml的washing solution 再次離心除去上清液，在冰上加入200μl的DNA staining solution 混合均勻後冰上避光靜置10分鐘，

反應完成後加入 0.5ml 的 PBS buffer 接著在 1 小時內以流氏細胞儀分析其吞噬能力。

第七節　肺部細菌培養

7-1　肺部細菌培養所需的材料

1. 大白鼠（Sprague-Dawley rat, S.D. rat)
2. 磅秤
3. 剪刀
4. 鑷子
5. 止血鉗
6. 手套
7. 膠帶
8. 擦拭紙
9. 棉花
10. 麻醉用玻璃罩
11. 解剖不銹鋼盤
12. 解剖手術盤
13. 剃毛機
14. 吸塵器
15. 針（18-gauge needle）
16. 抽吸器（suction)

17. 生理食鹽水（saline）

18. 一倍磷酸鹽緩衝容液（1X phosphate buffer saline, PBS buffer）

19. 乙醚（ethyl ether）

20. 酒精（70% alcohol）

21. 碘酒

22. 燒杯

23. 酒精燈

24. 打火機

25. 吸量器（pipette）

26. 酒精（90% alcohol）

27. 培養基（tryptone soy agar plates,TSA；BD）

28. 均質機（ULTRA TURRAX T25 basic 1KA Labortechnik）

29. 三角玻璃棒

30. 50毫升離心管

31. 培養箱（Firstek Firstek scientific）

7-2 肺部菌落培養步驟

取體重適當的 S.D.大白鼠隨機分成敗血症組或偽手術組，分別給予水或是中藥萃取物 CDT-01。在 20 小時晚期敗血症時將大白鼠犧牲，以無菌技術依照先前分離肺臟的方法

將肺臟分離。

在無菌的情況下，以剪刀將左肺分離裝入離心管以電子天平秤取左肺的重量。每一管均加入 5ml 的一倍無菌 PBS buffer ，以均質機在 10,000rpm、50 秒、4℃下將肺臟均質化，依 10 倍連續稀釋法將均質溶液稀釋。以吸量器吸取 100μl 的均質液滴加到培養基（tryptone soy agar plates,TSA）內進行細菌的培養，在 37℃培養箱 24 小時之後計算菌落的數目並拍照紀錄（Join-Lambert et al., 2001）計算結果。

第八節 生化數值的測量

8-1 偵測生化數值所需材料與試劑

1. 大白鼠（Sprague-Dawley rat, S.D. rat)
2. 剪刀
3. 鑷子
4. 手套
5. 膠帶
6. 擦拭紙
7. 棉花
8. 麻醉用玻璃罩
9. 解剖不銹鋼盤
10. 解剖手術盤

11. 剃毛機

12. 吸塵器

13. 針（18-gauge needle）

14. 抽吸器（suction）

15. 生理食鹽水（saline）

16. 一倍磷酸鹽緩衝容液（1X phosphate buffer saline, PBS buffer）

17. 乙醚（ethyl ether）

18. 酒精（70% alcohol）

19. 碘酒

20. 吸量器（pipette）

21. 微量離心管（eppendoff）

22. 冷凍離心機

23. 含有抗凝劑的生化管

24. 23號 5毫升注射針

25. 微量吸管（tip）

26. 生化數據測量儀（SmartLab, ERBA）

27. 測量用生化試劑組

8-2 測量生化數值的方法

取體重適當（約 200-250g重）的 S.D.大白鼠隨機分成敗

血症組或偽手術組，依實驗設計給予水或是 2g/Kg 的中藥萃取物 CDT-01。在 20 小時晚期敗血症時，利用 5ml 無菌注射針筒經由股靜脈來收集全血。將全血注入到含有抗凝劑（Heparin）的生化管中並靜置 10 分鐘，以 3000rpm、4℃、5 分鐘條件下進行離心並收集血漿的部份。每一組均分別取出 500μl 的血漿，將樣本及所需試劑配置好則可以用生化數據儀來進行測量 blood sugar、GOT、GPT、ALB、TP、BUN、CRE 等項目。

第九節　統計方法

在實驗中分成敗血症給水、敗血症給藥、偽手術給水三個組別，使用成對測試分析（paired Student-t test, t檢定：成對母體平均數差異檢定）。實驗資料的統計數據以平均值±標準差（mean±standard deviation, SD）來表示，比較時只有當 P 值小於 0.05（P＜0.05）才具有統計學上顯著差異性。

第三章結果

一. 中藥萃取物 CDT-01 的有效抽提率

每一次萃取前秤量藥材重量依照固定比例均勻混合，總重為 200 公克重。加入適當量的二次水蒸餾水 1000ml，萃取三次以減壓濃縮處理後經烘箱 50℃烘乾，於實驗期間總共萃取四次，將四次所測得的抽提率平均後，計算中藥萃取物之產率得棕褐色粗抽物約為 26.61%左右（圖四）。公式為：(水抽提萃取後所得之粗抽物實際乾重 / 最初所秤取藥材之總重）×100%。

二. 誘發敗血症大白鼠之外觀

在 1980 年 Keith A. 等人就已經開始應用盲腸結紮穿刺手術（CLP）誘發大白鼠產生敗血症，所以本模型是一個相當穩定的方法，而且所引發的敗血症是屬於多細菌株型的敗血症，所造成的敗血症情況比注射內毒素的方法更為接近臨床上病人的實際情況。

給予敗血症以及偽手術組的大白鼠水或是 CDT-01，我們觀察到敗血症大白鼠給予水的組別在 20 小時晚期敗血症時外觀上和敗血症給 CDT-01 或偽手術的兩組具有明顯差異。其外觀上出現 1.較為嗜睡、2.不活潑活動力下降、3.眼睛口

鼻處出血、4.毛色無光澤、5.腹部腫大且觸摸感覺較硬；其它兩組在外觀上較為相似且無上述情形。

三. 支氣管灌流之肺泡巨噬細胞數目

3-1 手術後早（1h）給水或給 CDT-01 之細胞數目

本實驗是探討盲腸結紮穿刺手術後一小時給予 CDT-01 對於敗血症大白鼠肺泡巨噬細胞數目的影響。在盲腸結紮穿刺手術後二十小時由給藥組（敗血症大白鼠給予 CDT-01）與對照組（敗血症大白鼠給予水）經支氣管灌流後取得肺泡巨噬細胞，灌流液的回收率皆大於 95% 以上，接著以細胞計數盤進行計數。對照組與給藥組之 n＝6，在給藥組中肺泡巨噬細胞數目為 $9.99 \pm 1.04 \times 10^6$；對照組的肺泡巨噬細胞數目則為 $7.15 \pm 0.76 \times 10^6$，在二十小時對照組所得之肺泡巨噬細胞數目，比起給藥組中所得到的數目為少，但兩者經 paired Student-t test 統計以 Mean±SD 表示 $p = 0.065$（$p > 0.05$）。因此以盲腸結紮穿刺手術誘發敗血症後一小時給予 CDT-01，雖然具有使肺泡巨噬細胞數目增加的趨勢但是卻不具有統計上的明顯差異。(圖五(A))

3-2 手術後晚（6h）給水或給 CDT-01 之細胞數目

本實驗是探討盲腸結紮穿刺手術後六小時給予 CDT-01 對於敗血症大白鼠肺泡巨噬細胞數目的影響。以盲腸結紮穿

刺手術誘發敗血症後六小時給予水或是 CDT-01，觀察手術後二十小時晚期敗血症之肺泡巨噬細胞數目變化以細胞計數盤進行計數。對照組與給藥組 n＝3，對照組的肺泡巨噬細胞數目為 $9.17 \pm 1.37 \times 10^6$ 而給藥組的數目為 $8.83 \pm 0.47 \times 10^6$，兩組數值經 paired Student-t test 統計以 Mean±SD 表示 $p = 0.38$（$p > 0.05$）。因此以盲腸結紮穿刺手術誘發敗血症後六小時給予 CDT-01 並不能增加肺泡巨噬細胞的數目。（圖五(B)）

四. 肺泡巨噬細胞形態和比例

本實驗的目的是為了偵測經由肺泡支氣管灌流方式所得之肺泡巨噬細胞的純度。實驗的設計是將肺臟摘除下來經支氣管灌流所得到的肺泡巨噬細胞，經由離心將細胞打到玻片上（cytospin），以 Giemsa stain 染色分辨灌流液中所得之細胞形態。Giemsa stain 可將細胞核染成藍色而細胞質則成紅色，藉此可清楚觀察出細胞形態。在手術後二十小時晚期敗血症中觀察得到結果顯示，分別在對照組與給藥組中肺泡巨噬細胞的純度皆大於 98% 以上。

五. 肺泡巨噬細胞細胞凋亡之比例

5-1 手術後早（1h）給水或給 CDT-01 細胞凋亡比例

本實驗是探討盲腸結紮穿刺手術後一小時給予 CDT-01

對於敗血症大白鼠肺泡巨噬細胞凋亡方面的影響。將灌流後所得之肺泡巨噬細胞以流氏細胞儀（FACScan）進行分析。偵測細胞凋亡的原理是依據細胞凋亡時膜內的 phosphatidylserine（PS）會翻轉至膜外與螢光結合，藉由偵測其螢光產生右移的變化得到細胞凋亡的結果。在二十小時晚期敗血症時將大白鼠犧牲，觀察肺泡巨噬細胞凋亡的情況。對照組與給藥組之 n＝6，在敗血症大白鼠給予水的對照組其細胞凋亡的比例為 15.57±4.59%；在敗血症給予 CDT-01 的給藥組中則為 8.45±2.17%。結果經由 paired Student's-test 統計以 Mean±SD 表示 $p = 0.021$（$p < 0.05$）。因此在盲腸結紮穿刺手術後一小時給予 CDT-01 後發現可以明顯降低敗血症所造成肺泡巨噬細胞凋亡的比例。（圖六(A)）

5-2 手術後晚（6h）給水或給 CDT-01 細胞凋亡比例

本實驗是探討盲腸結紮穿刺手術後六小時給予 CDT-01 對於敗血症大白鼠肺泡巨噬細胞凋亡方面的影響。盲腸結紮穿刺手術後將敗血症大白鼠隨機分組，在六小時後分別給予水或是 CDT-01。當二十小時晚期敗血症時將大白鼠犧牲，並觀察肺泡巨噬細胞凋亡的情況。對照組與給藥組 n＝3，在對照組之肺泡巨噬細胞凋亡的比例為 9.66±2.25%；給藥組則為 15.79±0.32%。結果經由 paired Student's-test 分析以 Mean±SD 表示 $p = 0.043$（$p < 0.05$）。因此在盲腸結紮穿刺手術後六

小時給予 CDT-01 並不能降低肺泡巨噬細胞凋亡之情形，反而使給藥組肺泡巨噬細胞凋亡之比例更高。（圖六(B)）

六. 敗血症對肺泡巨噬細胞吞噬能力的影響

本實驗是研究肺泡巨噬細胞在晚期敗血症時，給予 CDT-01 對於其吞噬功能的影響為何。實驗中使肺泡巨噬細胞接上標有螢光的大腸桿菌（E.coli-FITC），再以流氏細胞儀偵測其螢光的變化情況。敗血症對於肺泡巨噬細胞吞噬作用的影響以吞噬能力指數（phagocytotic Index, PI）表示：PI ＝【（參與吞噬作用的肺泡巨噬細胞數目/全部巨噬細胞數目）×100】×【被吞噬的細菌總數/全部肺泡巨噬細胞數目】。對照組與給藥組 n＝3，經過測量肺泡巨噬細胞吞噬功能後發現在對照組中吞噬能力指數為 256.6±35.79；給藥組的吞噬能力指數則為 198.99±104.52，結果經由 paired Student’s-test 分析以 Mean±SD 表示 p＝0.28（p＞0.05）。因此在盲腸結紮穿刺手術誘發敗血症後一小時給予 CDT-01 後發現，給藥組的吞噬能力似乎比對照組的數值略為下降但是仍不具有統計學上的差異。（圖七）

七. 肺部細菌培養的結果

本實驗的目的是為了研究 CDT-01 對於晚期敗血症大白

鼠，是否具有加強其肺部防禦機轉的作用。在盲腸結紮穿刺手術後一小時給予 CDT-01，於二十小時晚期敗血症時將敗血症大白鼠犧牲接著將肺臟分離於均質後取均質液塗抹於培養基上經過 24 小時培養後，計算菌落形成單位的數目可得最初細菌的數目。將細菌數除以所秤得均質肺臟的重量取對數可得結果。這三組中 $n=4$，經過實驗後發現在對照組中細菌數目為 log 5.16±0.57 cfu/gm，給藥組的數值為 log 4.23±0.91 cfu/gm，而偽手術給水的組別（偽手術組）為 log 4.19±0.19 cfu/gm。結果經由 paired Student's-test 分析並以 Mean±SD 表示後發現，對照組和給藥組以及偽手術組均具有統計上差異，*p* 值分別為 $p=0.014$；$p=0.049$（$p<0.05$），在給藥組和偽手術組比較 $p=0.45$（$p>0.05$）。因此本實驗中發現當晚期敗血症時肺部防禦的能力會明顯下降以及在盲腸結紮穿刺手術誘發敗血症後一小時給予 CDT-01，確實能明顯增加肺部的防禦能力（圖八）。

八. 晚期敗血症對於各生化數值的影響

本實驗是為了探討在盲腸結紮穿刺手術後一小時給予 CDT-01 對於晚期敗血症時器官傷害的影響。實驗的設計是在晚期敗血症時收集血漿以測量代表各個器官情況的生化數值。分別測量血糖（blood sugar, GLU）、麩酸草酸丙酮轉胺

?（glutamyl oxaloacetic transaminase, GOT)、麩酸丙酮酸轉胺?(glutamyl pyrubic transaminase, GPT)、白蛋白(albumin, ALB)、總蛋白質(total protein, TP)、血液尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、肌酸酐（creatine, CRE）七項生化數值的變化。分別將偽手術組、對照組以及給藥組之生化數值經由 paired Student's-test 分析並以 Mean±SD 表示發現， *p* 值均＞0.05 故不具有統計學上明顯的差異（圖九、十、十一)。

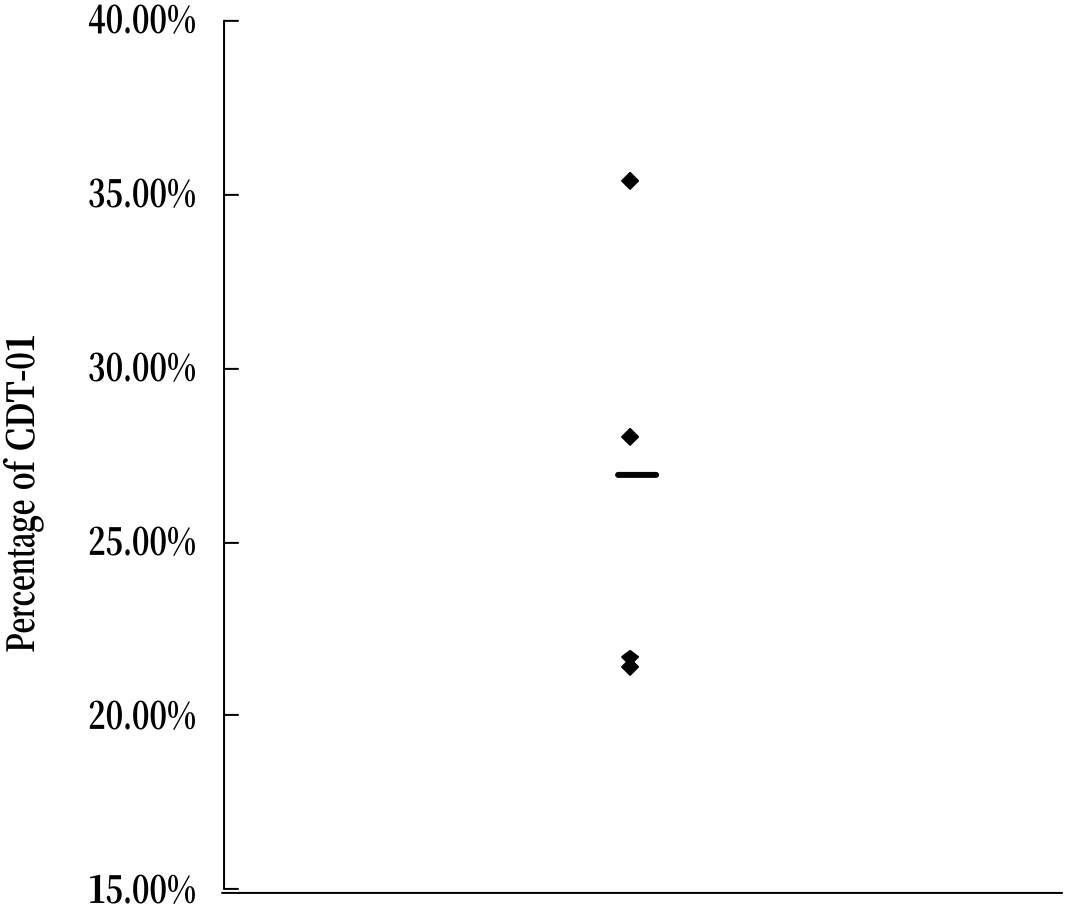


圖 四：

複方中藥萃取物 CDT-01 **是以水抽取所得之粗抽物。分別以水萃取之後將粗抽物經減壓濃縮後取一部份濃稠液體以烘箱於** 50 **下烘乾，計算有效物質的抽提率；**n=4。

(A)　　　　　　　　　　　　(B)

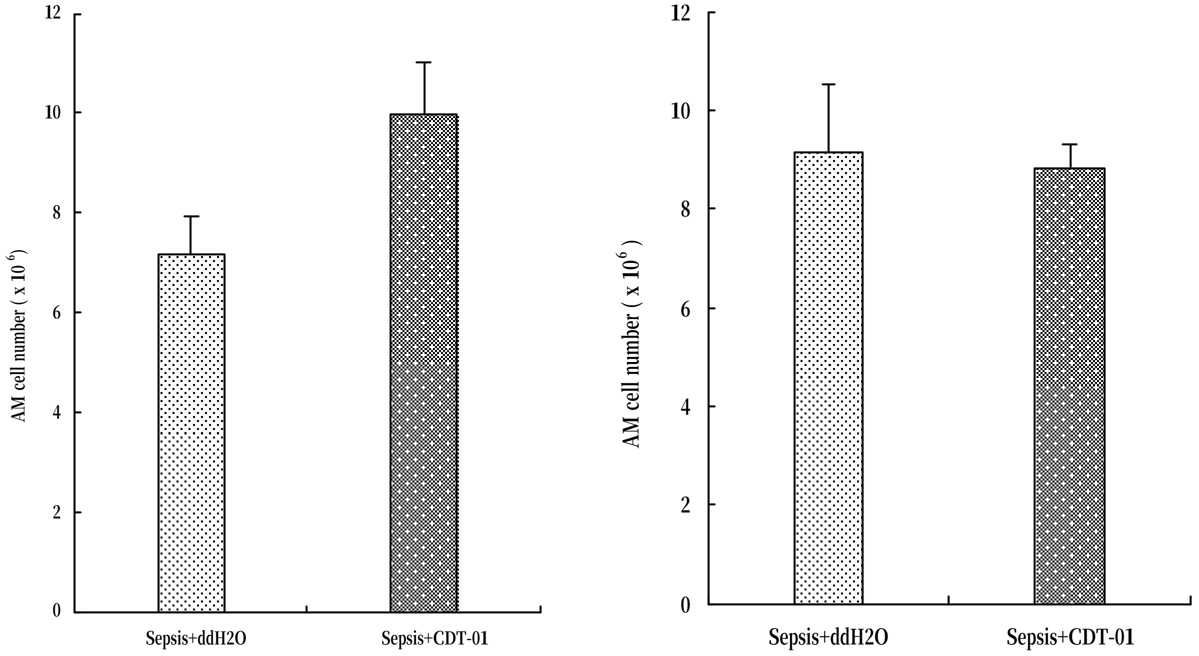


圖 五：

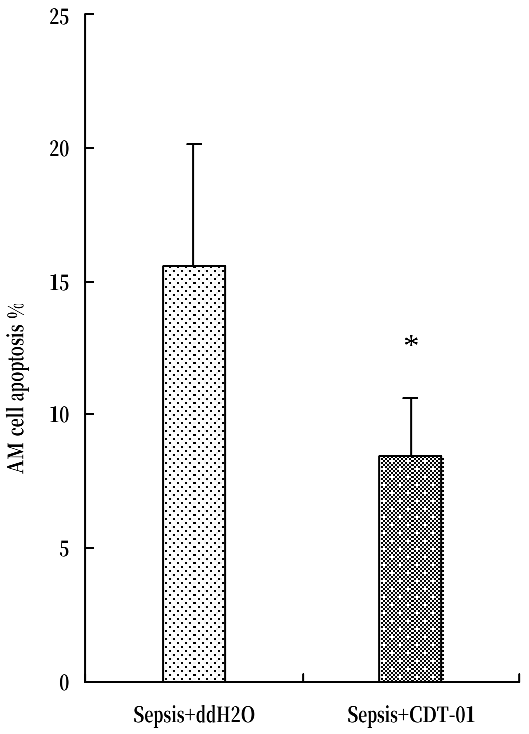
(A)

以盲腸結紮穿刺手術誘發敗血症，在手術後一小時給予水（對照組）或是 CDT-01（**給藥組**），**對照組與給藥組之** n＝6。**實驗設計在二十小時晚期敗血症時測量其肺泡巨噬細胞的數目，經** paired Student’s-test **分析結果並以** Mean±SD **表示** $p = 0.065$（$p > 0.05$），**因此兩組之間不具有統計學上差異**。

(B)

以盲腸結紮穿刺手術誘發敗血症，在手術後六小時給予水（對照組）或是 CDT-01（**給藥組**），**對照組與給藥組之** n＝3。**實驗設計在二十小時晚期敗血症時測量其肺泡巨噬細胞的數目，經** paired Student’s-test **分析結果並以** Mean±SD **表示** $p = 0.38$（$p > 0.05$），**因此兩組之間並不具有統計學上差異性**。

(A)



(B)

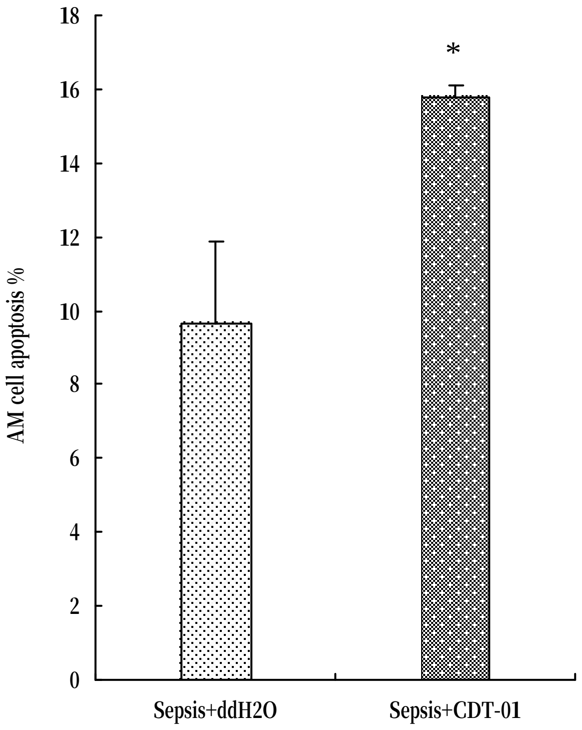


圖 六：

(A)

以盲腸結紮穿刺手術誘發敗血症，在手術後一小時給予水（對照組）或是 CDT-01（**給藥組**），**對照組與給藥組之** n＝6。**在二十小時晚期敗血症時測量肺泡巨噬細胞的凋亡情形，結果經由** paired Student's-test **分析並以** Mean±SD **表示** *p＝0.021（p＜0.05），**兩組之間明顯具有統計學上差異。**

(B)

以盲腸結紮穿刺手術誘發敗血症，在手術後六小時給予水（對照組）或是 CDT-01（**給藥組**），**對照組與給藥組之** n＝3。**在二十小時晚期敗血症時測量肺泡巨噬細胞的凋亡情形，結果經由** paired Student's-test **分析並以** Mean±SD **表示** *p＝0.043（p＜0.05），**兩組之間明顯具有統計學上差異。**

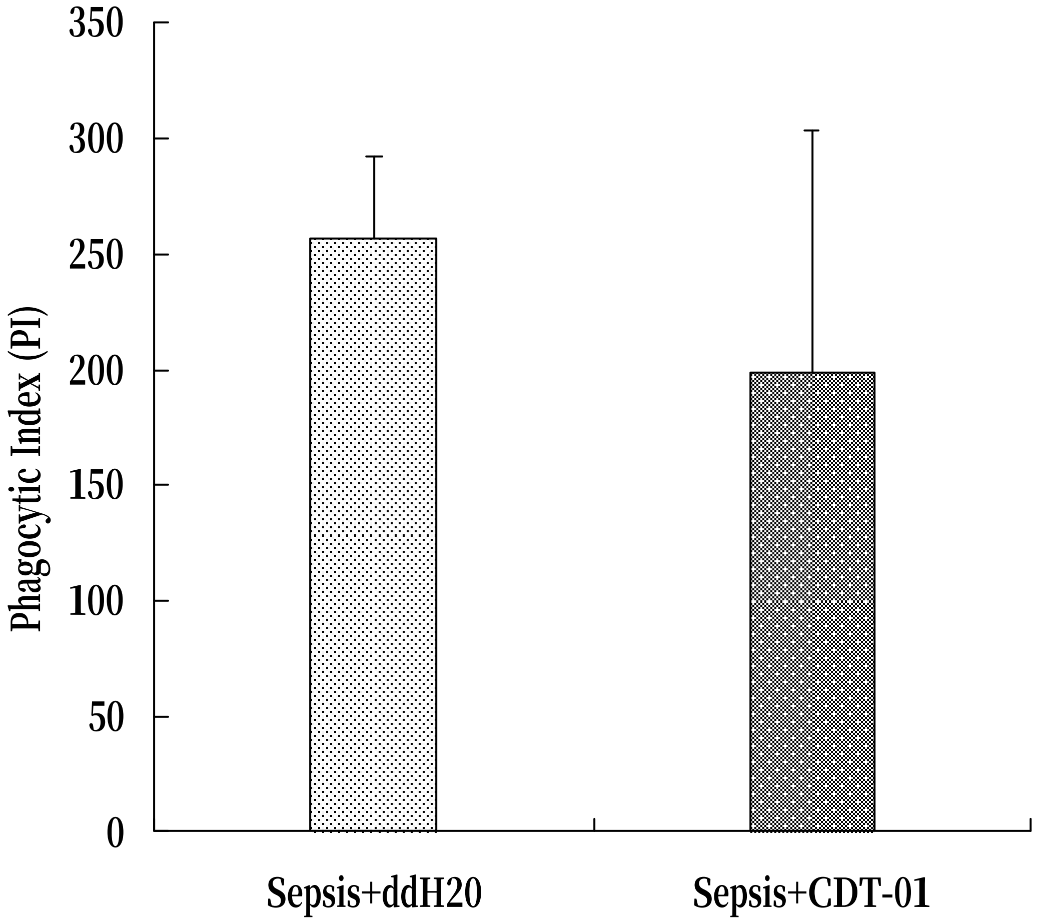


圖 七：

以盲腸結紮穿刺手術誘發敗血症，在手術後一小時給予水（對照組）或是 CDT-01 **（給藥組），對照組與給藥組之** n＝3。**在二十小時晚期敗血症時測量肺泡巨噬細胞的吞噬能力，所得結果經由** paired Student’s-test **分析並以** Mean±SD **表示** $p = 0.28$（$p > 0.05$），**因此兩者之間不具有統計學上差異。**

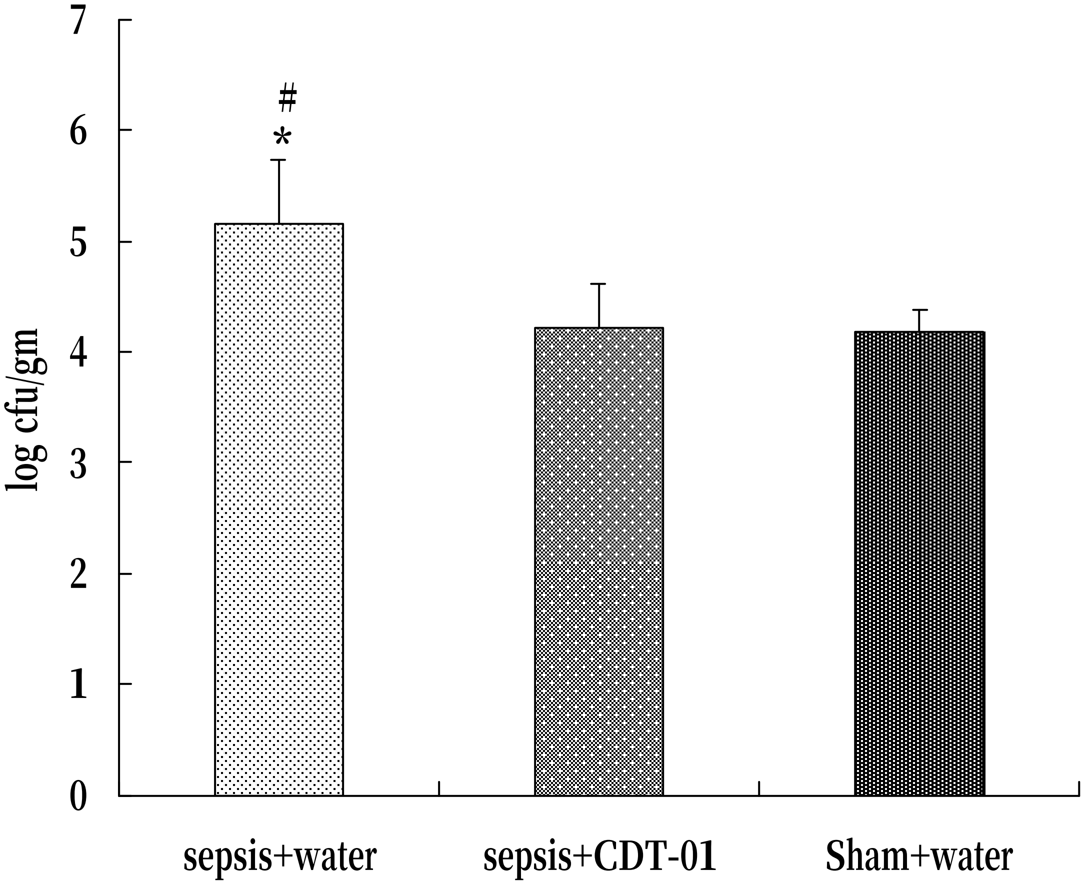


圖 八：

盲腸結紮穿刺手術後一小時給予水（對照組）或是 CDT-01（**給藥組**）**以及偽手術給予水（偽手術組），對照組、給藥組及偽手術組之** n＝3。**測量晚期敗血症時肺部的細菌數，取左肺秤重均質後做細菌培養經二十四小時後計算菌落數。結果經** paired Student’s-test **分析並以** Mean±SD **表示** #p＝0.014；*p **值**＝0.049（p＜0.05）**均具有統計上差異**（#**對照組與實驗組比較**；*****對照組與偽手術組比較**），**實驗組與偽手術組比較後**，p=0.45（p＞0.05）**不具統計上差異。**

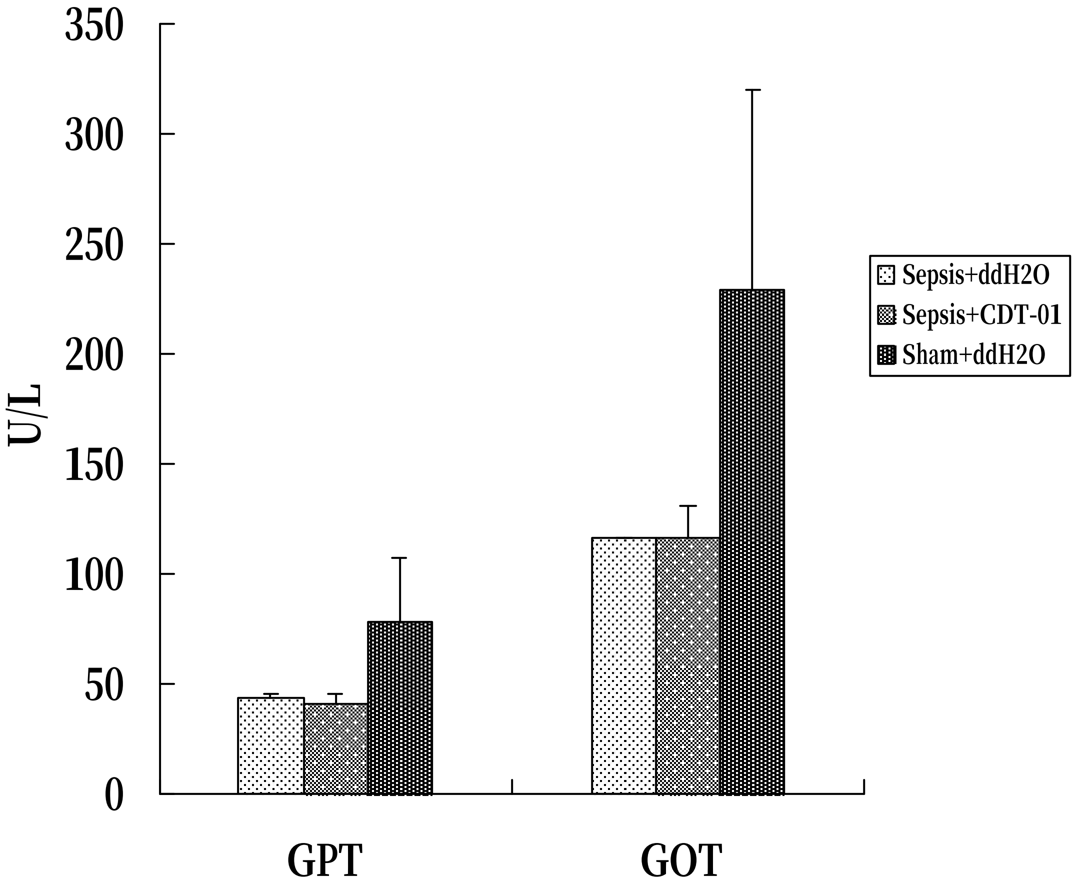
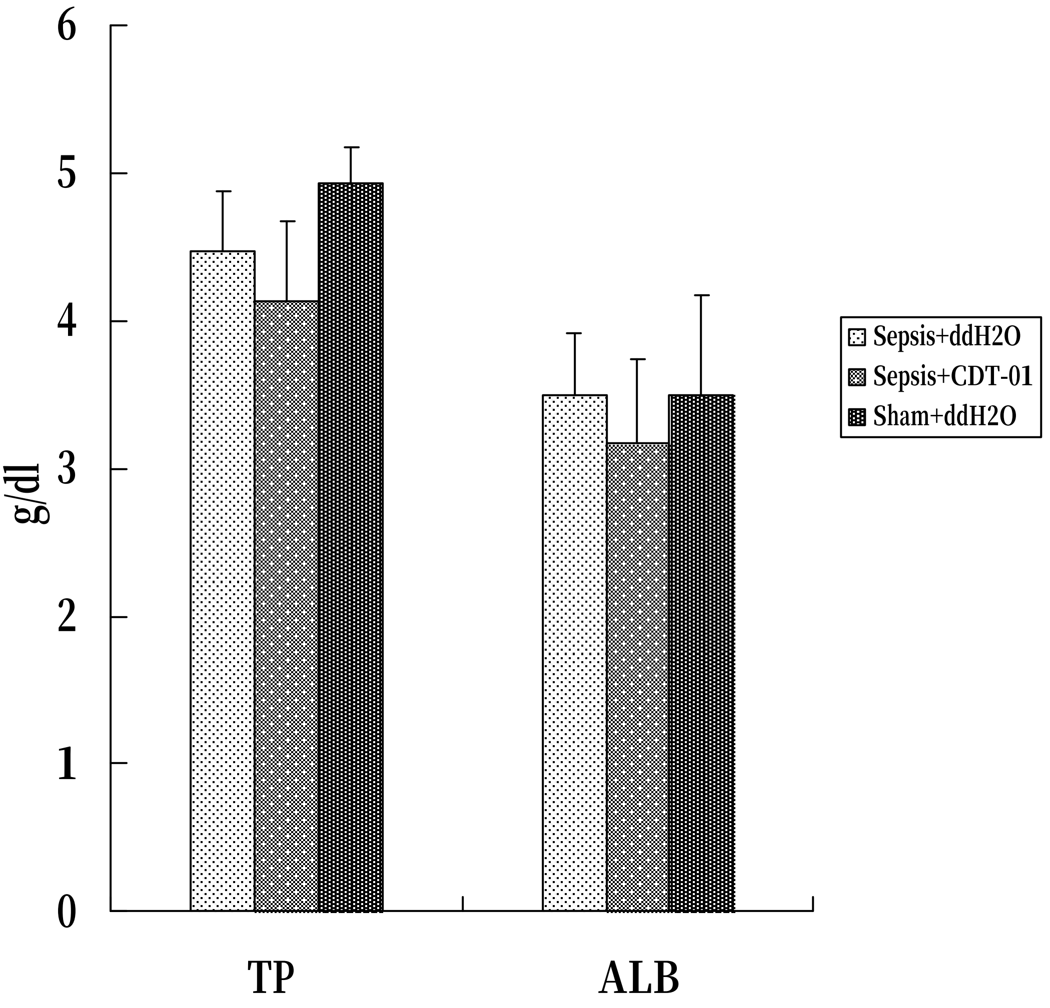


圖 九：

盲腸結紮穿刺手術後一小時給予水（對照組）或是 CDT-01**（給藥組）以及偽手術給予水（偽手術組），對照組、給藥組及偽手術組之** n＝3。**測量在晚期敗血症大白鼠生化值的情況。結果經** paired Student's-test **分析並以** Mean±SD **表示在**（glutamyl oxaloacetic transaminase, GPT）、（glutamyl pyrubic transaminase, GOT）**方面均不具有統計學上差異。**



圖十：

盲腸結紮穿刺手術後一小時給予水（對照組）或是 CDT-01（給藥組）以及偽手術給予水（偽手術組），對照組、給藥組及偽手術組之 n＝3。測量在晚期敗血症大白鼠生化值的情況。結果經 paired Student's-test 分析並以 Mean±SD 表示在（total protein, TP）、（albumin, ALB）方面均不具有統計學上差異。

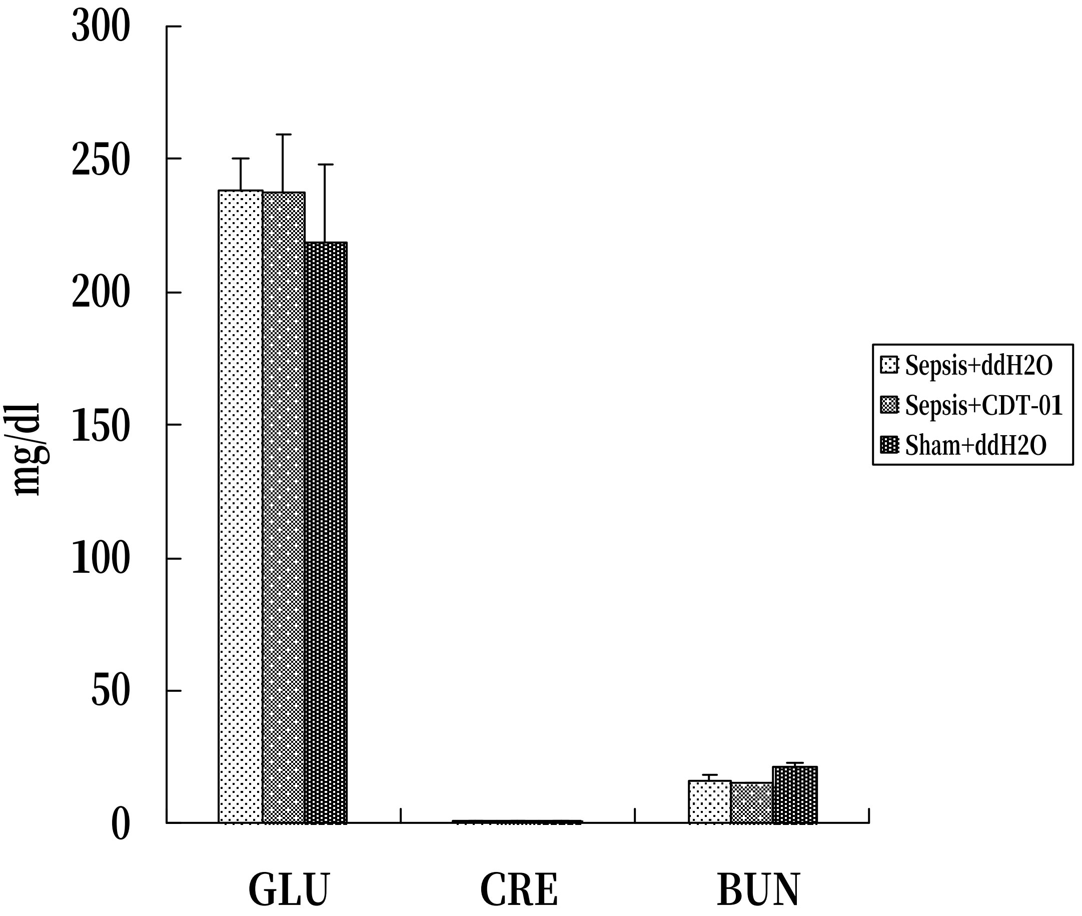


圖 十一：

盲腸結紮穿刺手術後一小時給予水（對照組）或是 CDT-01（給藥組）以及偽手術給予水（偽手術組），對照組、給藥組及偽手術組之 n＝3。測量在晚期敗血症大白鼠生化值的情況。結果經 paired Student's-test 分析並以 Mean±SD 表示在（glucose, GLU）、（creatine, CRE）、（blood urea nitrogen, BUN）方面均不具有統計學上差異。

第四章討論

敗血症儘管經過適當的手術、給予強效抗生素或是支持性療法當做輔助，所導致的死亡率仍然高達 40-60%（Alía et al., 1999）。在敗血症所衍生出的疾病之中又以肺傷害所導致的死亡率為最高（Matthay, 1999）。在 25-40%的敗血症病患會發展出急性肺傷害（Sriskandan et al., 1995），但卻沒有預防或治療敗血症肺傷害的藥物，本研究發現 CDT-01 對於敗血症肺傷害所伴隨之細胞凋亡的表現具有明顯的改善作用；由肺部細菌培養的實驗中，進一步發現 CDT-01 可以增加敗血症大白鼠之肺部防禦的能力。

在防禦機制中如中性球、單核球和巨噬細胞等均扮演著相當重要的角色（Hampton et al., 1998）。巨噬細胞除了吞噬、清除外來致病菌維持正常生理作用之外更具有調控免疫的功能。在肺臟的巨噬細胞中，肺泡巨噬細胞的數量最多且是第一線的防禦機轉（Nelson S, 2001），當受到外來微生物入侵造成感染，肺泡巨噬細胞會藉由微生物所產生出之內毒素刺激，釋放出許多活性物質，如細胞激素、一氧化氮（nitric oxide, NO）、前列腺素類等（Xagorari et al., 2001），導致免疫機制不平衡引發敗血症。敗血症晚期大白鼠的肺泡巨噬細胞數量有明顯下降的表現，是伴隨著 AM 的細胞凋亡增加（Lu

et al., 2001)。因此，對於降低敗血症所伴隨之急性肺傷害以及維持肺泡巨噬細胞的正常免疫調節機制是相當重要的。

在晚期敗血症時肺泡巨噬細胞的細胞凋亡確實有明顯增加的現象（Lu et al., 2001)。本研究是將複方中藥萃取出的粗抽物 CDT-01 應用在敗血症大白鼠上，評估對於敗血症的治療效果。本研究以盲腸結紮穿刺手術誘發敗血症後，給予中藥複方萃取物 CDT-01 觀察肺泡巨噬細胞的細胞數目。中藥 CDT-01 治療之給藥組其細胞數目比未經治療之對照組略為呈現增加的趨勢，$p = 0.06$。造成肺泡巨噬細胞數目的增加可能原因有二種，一是來源增加、二是死亡率減少。實驗中發現早給予 CDT-01, 藉由流式細胞儀分析敗血症大白鼠之肺泡巨噬細胞，其細胞凋亡的比例確實明顯下降。所以早給予中藥複方萃取物 CDT-01 治療，對於敗血症大白鼠之肺泡巨噬細胞具有保護的作用，經由肺部細菌培養的實驗中發現給藥組肺部的細菌數量明顯比對照組減少。增加有防禦功能的肺泡巨噬細胞之數目，就很可能增強肺部防禦微生物入侵及殺菌能力；而晚給予中藥複方萃取物 CDT-01 後，發現敗血症肺泡巨噬細胞凋亡的比例明顯增加同時也使得細胞數目隨之減少。

由於中藥複方萃取物 CDT-01 含有黃柏、黃芩等藥材，已知黃芩、黃柏對金黃色葡萄球菌、大腸桿菌、綠膿桿菌、

肺炎球菌、溶血性鏈球菌等，具有廣泛而且不同程度的抗菌作用（宋霄宏，等 1988；陰健，等 1993），此外黃芩和黃柏也具有調節免疫方面的作用（Mori H, 1995；劉湘摘譯，1995）。因此中藥複方萃取物 CDT-01 可能是藉由殺死細菌使得其所分泌之毒素減少，達到降低肺泡巨噬細胞的損傷；或是藉由調節免疫系統進而避免細胞凋亡的增加。我們嘗試晚給予 CDT-01 並觀察對於肺泡巨噬細胞之作用。比較晚給予 CDT-01 或是水的兩組中發現，在晚期敗血症時肺泡巨噬細胞的數目並無顯著差異存在；在細胞凋亡方面，晚給予 CDT-01 之實驗組其細胞凋亡之比例明顯比給予水之對照組來的高。為何實驗組的細胞凋亡比例增加而肺泡巨噬細胞數目卻無差異，可能是因為肺泡巨噬細胞之計算是以顯微鏡觀測肺泡巨噬細胞之外觀型態，並藉由細胞計數盤計數。因此若是肺泡巨噬細胞已出現早期細胞凋亡的情況，可能在細胞型態上仍有其完整性，故計數上可能有所誤差；然而流式細胞儀對於細胞凋亡之偵測是藉由螢光染劑 Annexin-V 與細胞膜上之 PS 結合（Hu B., 2000），所以可以較早偵測出細胞凋亡的發生。

此外我們分別將早給予 CDT-01 或是晚給予 CDT-01 的組別其細胞凋亡之結果與給予水的組別作比較，發現早給予 CDT-01 對敗血症之肺泡巨噬細胞具有保護作用。因此

CDT-01 若是藉由殺菌作用而達到保護肺泡巨噬細胞的目的, 理論上在早給予和晚給予 CDT-01 應該均有其效果存在。然而在晚給予 CDT-01 卻無此一效果；甚至會促進細胞凋亡比例的增加。這原因可能是因為當我們晚給予 CDT-01 時, 敗血症大白鼠體內細菌數量較多、也可能因為體內已累積大量毒素, 因此在晚給予 CDT-01 時, 無法有效降低肺泡巨噬細胞凋亡的比例。但是這種假設卻不能夠解釋, 為何在晚給予中藥複方萃取物 CDT 之後, 細胞凋亡之比例反而比給予水的組別來的高。大白鼠接受盲腸穿刺手術誘發敗血症後八到十小時稱為早期敗血症, 這是屬於可以恢復的時期。我們晚給予 CDT-01 是在手術後六小時進行, 藥物經過吸收、分布與代謝後理論上仍屬於早期敗血症的時期, 應該具有保護巨噬細胞的作用, 但是研究後發現並非如此。根據以上結果顯示, 中藥複方萃取物 CDT-01 對敗血症肺傷害的保護作用或許不完全是經由殺菌作用；可能是藉由調節免疫機制以降低肺泡巨噬細胞之凋亡比例來達成的, 這也提供我們未來一個新的實驗方向, 由免疫機制的角度去研究中藥複方萃取物 CDT-01 對於敗血症肺傷害的作用。

本研究中進一步探討 CDT-01 對於敗血症大白鼠之血液及肺臟中細菌數量的影響, 藉此評估中藥複方萃取物 CDT-01 對於防禦細菌入侵能力之作用。由肺臟中細菌數量的結果顯

示，將敗血症給予水之對照組與偽手術組做比較，$*p$ 值 < 0.05 表示敗血症給予水之大白鼠肺部細菌數量確實比偽手術組高 12 倍；在敗血症給予 CDT-01 之實驗組與敗血症給予水之對照組做比較，$\#p = 0.01$ 則表示以 CDT-01 治療之敗血症大白鼠，其肺部細菌數量明顯減少；將敗血症給予 CDT-01 之實驗組與偽手術組比較 p 值 $= 0.45$ 代表兩組之間不據統計學之差異。經由以上結果顯示中藥複方萃取物 CDT-01 確實具有加強敗血症大白鼠之肺部防禦外來微生物的作用。一般而言肺部細菌的來源可能是來自於空氣中；在敗血症時肺部之細菌也可能時由血液中遷移來的（O'Boyle et al.,1998）。我們由血液中細菌培養結果初步顯示，血液中並無細菌存在。

已知中藥複方萃取物 CDT-01 確實具有加強敗血症之肺部防禦機轉的作用，是否會是藉由增加肺泡巨噬細胞的吞噬功能。經由肺泡巨噬細胞吞噬能力指數得知，在敗血症給予 CDT-01 之實驗組與敗血症給予水之對照組做比較，兩組之間肺泡巨噬細胞的吞噬能力指數並無顯著差異 p 值 $= 0.28$。由結果發現，中藥複方萃取物 CDT-01 可能不是經由增加肺泡巨噬細胞吞噬能力來達到加強肺部防禦機轉的作用。

為進一步了解敗血症對器官傷害方面的影響，於晚期敗血症時收集血漿，探討敗血症給予 CDT-01 之實驗組、敗血症給予水之對照組及偽手術組，相互比較在 blood sugar、肝

臟功能（GOT、GPT、ALB、TP、）及腎臟功能（BUN、CRE）之生化數值的變化，結果發現均無統計學上差異。可是敗血症確實會對器官方面造成損傷，為何統計學上無明顯差異存在。這可能是因為當生化數值出現明顯變化時，表示器官傷害已經非常嚴重。我們將敗血症大白鼠在二十小時犧牲的這個時間點可能不足以讓生化數值出現明顯改變，才會造成無統計學上的差異存在（Huber-Lang et al., 2001)。

第五章結論

敗血症確實會造成肺部傷害，同時伴隨肺泡巨噬細胞凋亡及肺部細菌數量的增加。根據本實驗的結果中發現，早給予中藥複方萃取物 CDT-01 具有降低敗血症大白鼠肺泡巨噬細胞凋亡的作用，藉以保護肺泡巨噬細胞；同時也具有增加肺部防禦機轉的效果以降低肺部細菌之數量。所以早給予中藥複方萃取 CDT-01 應該對於敗血症之肺傷害能有所改善，或許能提供敗血症治療上一個新的方向，增加敗血症病人的存活率。

第六章參考文獻

1. Astiz M.E, Rackow E.C. Septic shock. *Lancet* 1998; 351: 1501-1505
2. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992;20:864-874.
3. American thoracic society（1998）Respiratory health hazards in agriculture. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1998; 158: 1 - 76.
4. Arnalich F, Garcia-Palomero E, López J, Jiménez M et al.,（2000）Predictive value of nuclear factor ?B activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis. Infect. Immun., 2000; 68: 1942 - 1945.
5. Ando H, Takamura T, Ota T, Nagai Y（2000）Cerivastatin Improves Survival of Mice with Lipopolysaccharide-Induced Sepsis. J. Pharmacol . Exp. Ther., 2000; 294: 1043 - 1046.
6. Alía I., Esteban A., Gordo F., et al.,（1999）A Randomized and Controlled Trial of the Effect of Treatment Aimed at Maximizing Oxygen Delivery in Patients With Severe

Sepsis or Septic Shock. Chest, 1999; 115: 453 - 461.

7. Ahmad S. (1995) Sepsis-related alterations in non-immune cell-signaling. Compr Ther, 1995; 21(12): 737-40.

8. Bossink A. W. J, Groeneveld A. B. J, Hack C. E, et al., (1999) The Clinical Host Response to Microbial Infection in Medical Patients With Fever. Chest, 1999; 116: 380 - 390.

9. Badley A.D, Pilon A.A.,Landay A. et al., (2000) Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis. Blood, 2000; 96: 2951 - 2964.

10. Bernard G.R., Artigas A.,Brigham K. L. et al., (1994.) The American-European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1994 149: 818-824.

11. Buisson .B, C., Doyon F, et al. (1995) Incidence risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults : a multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. JAMA., 1995；274 : 968

12. Bassett D.J. (1971) Causes and prevention of sepsis due to Gram-negative bacteria. Common-source outbreaks. J. R. Soc. Med., 1971; 64: 980 - 986.

13. Beno D.W. A., Uhing M.R., Goto M et al., (2001) Staphylococcal enterotoxin B potentiates LPS-induced hepatic dysfunction in chronically catheterized rats Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001; 280: 866 - 872.

14. Brown E.M.and MacLeod R.J.(2001) Extracellular Calcium Sensing and Extracellular Calcium Signaling Physiol Rev, 2001; 81: 239 - 297.

15. Behnia M, Robertson K.A, and Martin W.J (2000) Lung Infections : Role of Apoptosis in Host Defense and Pathogenesis of Disease. Chest, 2000; 117: 1771 - 1777.

16. Bone R.C, (1993) Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. Clin. Microbiol. Rev., 1993; 6:57 -68.

17. Breuille D, Voisin L, Contrepois M, et al., (1999) A Sustained Rat Model for Studying the Long-Lasting Catabolic State of Sepsis. Infect. Immun., 1999; 67: 1079-1085.

18. Czermak B.J., Breckwoldt M, Ravage Z. B et al., (1999) Mechanisms of Enhanced Lung Injury during Sepsis. Pathol A. J., 1999; 154: 1057 - 1065.

19. Cybulsky M.I, Chan M.K.W, Movat H.Z. (1988) Acute inflammation and microthrombosis induced by endotoxin, interleukin-1, and tumor necrosis factor and their

implication in gram-negative infection. Lab. Invest. 1988;58:365-378.

20. Cundell D.R, Gerard N.P, Gerard C, et al., (1995) Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet -activating factor. Nature, 1995; 377(6548): 435-8.

21. Chen G.H, Reddy R.C., Newstead M.W. et al., (2000) Intrapulmonary TNF Gene Therapy Reverses Sepsis-Induced Suppression of Lung Antibacterial Host Defense. J. Immunol., 2000; 165: 6496 - 6503.

22. Christofidou-Solomidou M, Pietra G.G., Solomides C.C, Arguiris E et al. (2000) Immunotargeting of glucose oxidase to endothelium in vivo causes oxidative vascular injury in the lungs. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000; 278: 794 - 805.

23. Chang T.C and Huang A.H (2000) Rapid Differentiation of Fermentative from Nonferment- ative Gram-Negative Bacilli in Positive Blood Cultures by an Impedance Method. J. Clin. Microbiol., 2000; 38: 3589 - 3594.

24. Distelhorst C.W. and Dubyak G. (1998) Role of Calcium in Glucocorticosteroid-Induced Apoptosis of Thymocytes and Lymphoma Cells: Resurrection of Old Theories by New Findings. Blood, 1998; 91: 731 - 734.

25. Diaz, Rodriguez J.A, and Frutos F, (1999) A Randomized and Controlled Trial of the Effect of Treatment Aimed at Maximizing Oxygen Delivery in Patients With Severe Sepsis or Septic Shock. Chest, 1999; 115: 453 - 461.

26. Derek N.J.H. (1997) Dendritic Cells: Unique Leukocyte Populations Which Control the Primary Immune Response. Blood, 1997; 90: 3245 – 3287.

27. David S.A, Silverstein R, Amura C.R, et al., (1999) Lipopolyamines: Novel Antiendotoxin Compounds That Reduce Mortality in Experimental Sepsis Caused by Gram-Negative Bacteria. Antimicrob. Agents Chemother., 1999; 43: 912 - 919.

28. Drueke T, Zhang P, and Gogusev J (1997) Apoptosis: background and possible role in secondary hyperparathyroidism. Nephrol. Dial. Transplant., 1997; 12: 2228 - 2233.

29. Fischer W. (1990) Bacterial phosphoglycolipids and lipoteichoic acids. In: Kates M,ed. Handbook of Lipid Research. New York: Plenum Press, 1990: pp.123-234

30. Fisher E, Marano M.A, Barber A.E et al., (1991) Comparison between effects of interleukin-1α administration and sublethal endotoxemia in primates. Am. J. Physiol., 1991; 261: R442-R452

31. Groeneveld A. B. J, Bossink A. W. J, Mierlo G.J.V（2001）Circulating Inflammatory Mediators in Patients with Fever: Predicting Bloodstream Infection. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2001; 8: 1189 - 1195.

32. Gachon and Lacazette（1998）Tear lipocalin and the eye's front line of defence. Br. J. Ophthalmol., 1998; 82: 453 – 455.

33. Gando S., Nakanishi Y., and Tedo I.（1995）Cytokines and plasminogen activator inhibitor-1 in posttrauma disseminated intravascular coagulation: relationship to multiple organ dysfunction syndrome. Crit Care Med, 1995; 23(11): 1835-42.

34. Horn K.D（1998）Evolving strategies in the treatment of sepsis and systemic inflammatory response syndrome, (SIRS). QJM, 1998; 91: 265 - 277.

35. Hampton M.B., Kettle A.J., and Winterbourn C.C.（1998）Inside the Neutrophil Phagosome: Oxidants, Myeloperoxidase, and Bacterial Killing. Blood, 1998; 92: 3007 - 3017.

36. Hancock R.E.W and Scott M.G（2000）The role of antimicrobial peptides in animal defenses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000；97, 16: 8856-8861.

37. Hu B., Sonstein J, Christensen PJ. et al.,（2000）Deficient In Vitro and In Vivo Phagocytosis of Apoptotic T Cells by

Resident Murine Alveolar Macrophages. *The Journal of Immunology*, 2000, 165: 2124-2133.

38. Huber-Lang M.,. Sarma V.J.,. Lu K.T, et al（2001）Role of C5a in Multiorgan Failure During Sepsis. J. Immunol., Jan 2001; 166: 1193 - 1199.

39. Jr C.J.F., Opal S.M., Lowry S.F., et al.,（1994）Role of interleukin-1 and the therapeutic potential of interleukin-1 receptor antagonist in sepsis. Circ. Shock, 1994; 44(1): 1-8.

40. Join-Lambert O.F., Michéa-Hamzehpour M., Köhler T. et al.,（2001）Differential Selection of Multidrug Efflux Mutants by Trovafloxacin and Ciprofloxacin in an Experimental Model of *Pseudomonas aeruginosa* Acute Pneumonia in Rats. Antimicrob. Agents Chemother., 2001; 45 (2): 2571-576

41. Kubo A., Minamino N., Isumi Y., et al.,（1998）Production of Adrenomedullin in Macrophage Cell Line and Peritoneal Macrophage. J. Biol. Chem, 1998; 273: 16730 – 16738.

42. Koo D.J, Zhou M, Chaudry I.H, and Wang P,（2001）The role of adrenomedullin in producing differential hemodynamic responses during sepsis. Res J.S, 2001;95(2): 207-18.

43. Kraus P.A, Lipman J, Lee C.C., et al.,（1993）Acute lung

injury at Baragwanath ICU. An eight-month audit and call for consensus for other organ failure in the adult respiratory distress syndrome. Chest, 1993; 103: 1832 – 1836.

44. Kocherlakota P. and Gamma E.F.L, (1997) Human Granulocyte Colony-stimulating Factor May Improve Outcome Attributable to Neonatal Sepsis Complicated by Neutropenia. Pediatrics, 1997; 100: 6.

45. Kayal S, Jean-Philippe J, Aguini N et al. (1998) Elevated Circulating E-Selectin, Intercellular Adhesion Molecule 1, and von Willebrand Factor in Patients with Severe Infection Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1998; 157: 776 – 784.

48. Lodato R.F, Khan A. R, Zembowicz M.J, Weisbrodt N.W et al., (1999) Roles of IL-1 and TNF in the decreased ileal muscle contractility induced by lipopolysaccharide. Am. J. Physiol., 1999; 276: G1356 - 1362.

49. Lieberthal W, Menza S.A, and Levine J.S, (1998) Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. Am. J. Physiol., 1998; 274: R315 - 327.

50. Meduri G.U, Headley S, Kohler G. et al (1995) Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor

outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. Chest, 1995; 107: 1062 - 1073.

51. Mutunga M, Fulton B, Bullock R. et al.(2001) Circulating Endothelial Cells in Patients with Septic Shock. Am. J. Respir. Crit. Care Med.,2001; 163: 195 - 200.

52. Marie-Thérése L (2000) Interference of Antibacterial Agents with Phagocyte Functions: Immunomodulation or "Immuno-Fairy Tales"? Clin. Microbiol. Rev., 2000; 13: 615 - 650.

53. Matthay M.A, (1999) Conference Summary* Acute Lung Injury. Chest. *1999;116:119S-126S.*

54. Mitsiades, Poulaki, Tseleni-Balafouta et al., (2000) Thyroid Carcinoma Cells Are Resistant to FAS-mediated Apoptosis But Sensitive to Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand. Cancer Res., 2000; 60: 4122 – 4129.

55. Munford R.S and Pugin J (2001) Normal Responses to Injury Prevent Systemic Inflammation and Can Be Immunosuppressive. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2001 163: 316 - 321.

56. Nikolic B, Cooke D. T, Zhao G (2001) Both ?dT Cells and NK Cells Inhibit the Engraftment of Xenogeneic Rat Bone

Marrow Cells and the Induction of Xenograft Tolerance. Immunol M J., 2001; 166: 1398 - 1404.

57. Naito M., Nagashima K., Mashima T. et al., (1997) Phosphatidylserine externalization is a downstream event of interleukin-1ß-converting enzyme family protease activation during apoptosis. Blood, 1997; 89: 2060 - 2066.

58. Natanson C, Eichenholz P.W, Danner R.L. et al., (1989) Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs stimulate the cardiovascular profile of human septic shock. J. Exp. Med. 1989;169: 823-832

59. Nelson S. (2001) Novel Nonantibiotic Therapies for Pneumonia : Cytokines and Host Defense. Chest, 2001; 119: 419 - 425.

60. Oberholhzer C., Oberholzer A.,Clare-Salzler M. et al., (2001) Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. FASEB J., 2001; 15: 879 - 892.

61. O'Boyle C.J., MacFie J., Mitchell C.J. et al., (1998) Microbiology of bacterial translocation in humans. Gut, 1998; 42: 29 - 35.

62. Putterman C, (1989) Corticosteroids in sepsis and septic shock: has the jury reached a verdict ? Isr. J. Med. Sci., 1989; 25: 332-338.

63. Proulx F., Fayon M., Farrell C.A., Lacroix J. et al.,（1996） Epidemiology of sepsis and multiple organ dysfunction syndrome in children. Chest, 1996; 109: 1033 - 1037.

64. Per-Olof N,（1998） The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology J. Antimicrob. Chemother., 1998; 41: 1 - 7.

65. Rubenfeld G.D., Caldwell E., Granton J., et al.,（1999） Interobserver variability in applying a radiographic definition for ARDS. Chest, 1999; 116: 1347 - 1353.

66. Redl H., Gasser H., Schlag G. et al.,（1993） Involvement of oxygen radicals in shock related cell injury. Br. Med. Bull., 1993; 49: 556 - 565.

67. Reed J.C. （2000） Mechanisms of Apoptosis. Am. J. Pathol., 2000; 157: 1415 - 1430.

68. Ridings P.C., Holloway S., Bloomfield G.L., Phillips M. L. et al.,（1997） Protective role of synthetic sialylated oligosaccharide in sepsis-induced acute lung injury. J. Appl Physiol, 1997; 82: 644 - 651.

69. Rangel-Frausto M.S., Pittet D., Costigan M., et al.,（1995） The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. [see comments]. JAMA. , 1995; 273 :117-23.

70. Reddy R.C., Chen G.H., Newstead M.W. et al.,（2001）

Alveolar Macrophage Deactivation in Murine Septic Peritonitis: Role of Interleukin 10. Infect. Immun., 2001; 69: 1394 - 1401.

71. Rietschel E.T., Kirikae T., Schade F.U. et al.,（1994） Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. FASEB J, 1994; 8 217-225

72. Short B.L., Gardiner W.M., Walker R.I. et al.（1983） Rat intraperitoneal sepsis-a clinically relevant model.Circ Shock, 1983; 10(4): 351-359.

73. Simon D. and Trenholme G.,（2000） Antibiotic selection for patients with septic shock. Clin C.C., 2000; 16(2): 215-31.

74. Schutte H., Rosseau S., Czymek R.et al.,（1997） Synergism Between Endotoxin Priming and Exotoxin Challenge in Provoking Severe Vascular Leakage in Rabbit Lungs. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1997; 156: 819 - 824.

75. Schuster H.P. (1989) Infection as a cause of multiple organ failure. Definition, pathophysiology and diagnostic parameters. Anasth Intensivther Notfallmed, 1989; 24: 206-11.

76. Scott M.G., Gold M.R., and Hancock R.E.W.（1999） Interaction of Cationic Peptides with Lipoteichoic Acid

and Gram-Positive Bacteria. Infect. Immun., 1999; 67: 6445 - 6453.

77. Schoene R.B（2001）Limits of human lung function at high altitude. J. Exp. Biol., 2001; 204: 3121 - 3127.

78. Shin-ichi H., Suzuki T., Hong-Yan D. et al.,（1999）Serial Analysis of Gene Expression in Human Monocytes and Macrophages. Blood, Aug 1999; 94: 837 - 844.3

79. Sreskandan S, Cohen J.（1995）The pathogenesis of septic shock. J infect. 30：201-206.

80. Samaranayake Y.H. and Samaranayake L.P.（2001）Experimental Oral Candidiasis in Animal Models. Clinl. Microbiol., 2001:14 ; 398-429.

81. Tapper H. and Herwald H.（2000）Modulation of hemostatic mechanisms in bacterial infectious diseases. Blood, 2000; 96: 2329 - 2337.

82. Takada K., Ohno N., and Yadomae T. et al.,（1994）Lysozyme regulates LPS-induced interleukin-6 release in mice. Circ. Shock, 1994; 44: 169-74.

83. Ueda N. and Shah S.V.（2000）Tubular cell damage in acute renal failure—apoptosis, necrosis, or both Nephrol. Dial. Transplant., 2000; 15: 318 - 323

84. Varma T.K., Toliver-Kinsky T.E., Lin C.Y. et al.,（2001）Cellular Mechanisms That Cause Suppressed Gamma

Interferon Secretion in Endotoxin-Tolerant Mice. Infect. Immun., 2001; 69: 5249-5263

85. Weiss M., Moldawer L.L., and Schneider E.M. (1999) Granulocyte Colony-Stimulating Factor to Prevent the Progression of Systemic Nonresponsiveness in Systemic Inflammatory Response Syndrome and Sepsis. Blood, 1999; 93: 425 - 439.

86. Wang P., Ba Z.F., Cioffi W.G. et al., (1999) Salutary effects of ATP-MgCl2 on the depressed endothelium-dependent relaxation during hyper- dynamic sepsis. Crit. Care Med., 1999; 27(5): 959-64.

87. Wesen S.H. and Der B. (1914) Sepsis. Verhandl Dtsch Kongress Inner Med.,1914; 31:257-280

88. Xagorari A., Papapetropoulos A, Mauromatis A., et al., (2001) Luteolin Inhibits an Endotoxin- Stimulated Phosphorylation Cascade and Proinflammatory Cytokine Production in Macrophages. J. Pharmacol. Exp. Ther., 2001; 296: 181 - 187.

89. Yang S., Zhou M., Koo D.J. et al., (1999) Pentoxifylline prevents the transition from the hyperdynamic to hypodynamic response during sepsis. Am. J. Physiol., 1999; 277: H1036 - 1044.

90. Yang S., Cioffi W.G., Bland K.I. et al., (1999) Differential

alterations in systemic and regional oxygen delivery and consumption during the early and late stages of sepsis. J. Trauma, 1999; 47: 706-12.

91. Zhang F.X., Kirschning C.J., Mancinelli R., et al., (1999) Bacterial Lipopolysaccharide Activates Nuclear Factor-? through Interleukin-1 Signaling Mediators in Cultured Human Dermal Endothelial Cells and Mononuclear Phagocytes Chem J. B., 1999; 274: 7611 - 7614.

92. Zantl N., Uebe A., Neumann B. et al., (1998) Essential Role of Gamma Interferon in Survival of Colon Ascendens Stent Peritonitis, a Novel Murine Model of Abdominal Sepsis. Infect. Immun.,1998; 66: 2300 - 2309.

93. Zhang S.F., Lin S.X., Gao W. et al., (2001) Report of the consensus conference on diagnostic criteria of ALI/ARDS at high altitudes in Western China. Intensive Care Med., 2001; 27: 1539-1546.

94. Zhang Y., Broser M., (1995) Activation of the interleukin six gene by Mycobacterium tuberculosis or lipopolysaccharide is mediated by nuclear factors NF IL-6 and NF-kappa B. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995; 92: 3632-3632.

95. **鄧文龍**（1988）**中藥的抗內毒素作用研究與進展（續）**. **中藥藥理與臨床**, 1988；4（4）：45

96. 鄧文龍（1988）中藥的抗內毒素作用研究與進展. 中藥藥理與臨床, 1988；4（3）：59
97. 馬友度（1980）醫方新解, 上海科學技術出版社, 1980：83.
98. 荒石和男,等（1982）國外醫學中醫中藥分冊, 1982,（6）：7
99. 杜德極,等（1990）30 種中醫方藥對 TNF 生成的影響.中藥藥理與臨床, 1990；6（5）：27
100. 王文杰, 等（1994）紫草素抗炎對白三烯 B_4 生物合成的抑制作用.藥學學報, 1994；29（3）：161.
101. 伊原信夫, 等（1981）中藥茵陳、山? 子、黃芩對半乳糖胺爆發型肝炎的防治療效. 國外醫學 中醫中藥分冊 1981；(1)：55.
102. 唐汝愚, 等（1958）黃芩降低血壓作用的研究 生理學報 1958；22（2）：91.
103. 宋霄宏, 等（1988）炮製對黃芩體外抗菌的影響. 中藥材 1988；11（5）：34
104. 陰健, 等（1993）中藥現代研究與臨床應用（1）. 北京：學苑出版社, 1993：587
105. Mori H,（1995）黃柏中抑制細胞免疫反應的成分. 國外醫學中醫中藥分冊, 1995；17（6）：47
106. 劉湘摘譯,（1995）黃芩根甲醇的藥理作用及其黃酮化合物對人牙齦層纖維細胞的作用. 國外醫學植物藥分冊, 1995；10（5）：225

英文摘要

Sepsis is one of the most common causes of mortality in the intensive care units. Frequently, it is complicated with the occurrence of acute lung injury, which results in even more deaths in suffered patients. However, other than antibiotics, there is not a drug proved to be clinically effective for the treatment of sepsis. Though the mechanisms of acute lung injury（ALI）were not fully understood, alveolar macrophages (AM), as the first–line lung defender, regulate many aspects of physiological functions.In the late phase of cecal ligation and puncture (CLP)-induced sepsis, the number of AM was significantly decreased, for which the enhanced cellular apoptosis was responsible.In this study, chinese herb extract CDT-01 or water was administrated at one（early）or six（late）hour after CLP-induced sepsis. At 20 hr post CLP, animals were sacrificed and lungs were removed. AM were isolated and their percentage of apoptosis and ability of phagocytosis were determined by a flow cytometer. The results showed that the purity of AM, as stained by Giemsa, from all groups was >99%. As compared with those from water-treated sepsis rats（15.57±4.59%）, the apoptosis of AM from early CDT-01-treated ones（8.45±2.17%） markedly decreased. However, the apoptosis of AM from late CDT-01-administrated rats（9.66±2.25%）significantly increased than that from water-treated animals（15.79±0.32%）. Cultures of left lung from water-treated rats grew 12-times more bacteria than those from early CDT-01-treated onces. The phagocytic index of AM was similar in both groups. It is likely that early administration of CDT-01 protected the lungs from sepsis-induced injury by improving AM survival rate and augmenting AM bactericidal activity. Current results suggests that CDT-01 may be a therapeutic agent for sepsis, ALI, and the super-infections.

作者簡歷

作者姓名：徐泓汶

出生日期：五月二十八日

出生地：台灣省新竹市

學歷：民國八十九年六月畢業於中國醫藥學院藥學系

民國九十一年六月畢業於中國醫藥學院醫學研究所