

誌 謝

在這本論文完成的同時，也代表了兩年的研究所生涯終於畫上了一個句點，從最初對研究的啟蒙、實驗設計與結果的邏輯思考，一路走來，最要感謝的是盧敏吉老師耐心的指導與陪伴，讓我順利的度過大大小小的問題與難關，盧老師對於實驗的基本精神的嚴格要求，還有樂觀且幽默的面對問題的態度，不止改變了我解決問題的方法，也將會一直影響我日後的生活觀。

還要感謝生理科的陳卓昇老師、王慧如老師和閔明源老師，你們給了我研究和實驗方面許多重要的觀點和提示，而林文川老師提供寶貴的動物糖尿病模型的經驗，李妙蓉老師百忙中協助我順利的使用流式細胞儀，吳禮字老師對於細菌實驗詳細的建議和解說，讓我實驗能夠步上正軌，此外，特別感謝口試委員：盧敏吉教授、吳禮字教授及黃志揚教授對於我論文完整且專業的指正和建議，老師們給予的教導和指點是我這段求學過程中最珍貴的寶藏。

許多時候，當我在實驗或生活上感到無助無依時，幸運的我有親愛的同學悅和、湯姐、素虹、厚志、泓汶、宗晃和慈安，以及可愛的學弟妹美蘭、國豐，你們給了我最溫暖的鼓勵和幫助，還有給我最大精神力量的志哲，這些點點滴滴都將是我最美的回憶。

最重要的，當然要感謝一直為我付出心力和守護我的父母，如果我今天有一點點小小的成果，那都是屬於你們的，最後僅以此本論文獻給所有愛護我的人。

中文摘要

糖尿病為慢性的新陳代謝疾病，病人除了有慢性血糖升高的情況，並且時常伴隨著長期併發症，也比較容易受到感染。糖尿病也被認為是下呼吸道感染的一種獨立危險因子，之前研究顯示，同樣罹患敗血症時，糖尿病人反而比非糖尿病人較不容易進入更嚴重的病程，例如成人呼吸窘迫症。

在特殊感染方面，肺炎克雷伯氏菌特別好發於台灣的糖尿病人，其引起的原發性肺炎，病程進展快速，多數伴隨敗血症症狀，導致了高死亡率。肺臟中常駐的肺泡巨噬細胞，具有吞噬及殺菌能力，並且調節下呼吸道免疫系統的功能，是肺臟中抵抗外來微生物的第一道防線。為了研究糖尿病對於肺泡巨噬細胞功能的影響，本篇實驗先以 STZ 分別誘發 6 週齡及 30 週齡小鼠糖尿病，並持續飼養到第 33 週齡，使其分別成為慢性及急性糖尿病小鼠後，利用支氣管灌流術分離出小鼠的肺泡巨噬細胞，將肺泡巨噬細胞與標定螢光的小球或大腸桿菌在體外培養 2 小時後，以流式細胞儀分析肺泡巨噬細胞之吞噬能力。在糖尿病容易遭受肺炎克雷伯氏菌感染之研究方面，本篇實驗從小鼠支氣管注射克雷伯氏菌，造成糖尿病小鼠下呼吸道感染 20 小時後，取出小鼠的左肺和血漿分別塗抹於培養基上培養 18 小時，之後計算左肺和血漿中的克雷伯氏菌含量。結果顯示，慢性糖尿病小鼠之肺泡巨噬細胞吞噬能力與正常小鼠相當，而慢性糖尿病小鼠在遭受克雷伯氏菌感染後，其左肺中的克雷

伯氏菌含量明顯的較正常小鼠多出 21 倍，但其血漿中的克雷伯氏菌含量與正常小鼠並無差異。至於急性糖尿病小鼠不論在左肺和血漿中克雷伯氏菌含量，均與正常小鼠和慢性糖尿病小鼠沒有差異。本研究顯示台灣糖尿病人對於克雷伯氏菌引起肺炎特殊的易感受性，可能是與糖尿病人肺泡巨噬細胞對於克雷伯氏菌殺菌能力變差有關。經由本篇實驗，可以引導出研究糖尿病下呼吸道免疫機轉的新方向。

目錄

誌謝	1.
中文摘要	2.
目錄	3.
表目錄	6.
圖目錄	7.
符號與縮寫	9.
第一章 緒論	11.
壹 糖尿病之概論	11.
第一節 糖尿病的定義	11.
第二節 糖尿病的分類	11.
第三節 糖尿病的流行病學	13.
第四節 糖尿病之實驗動物模型	15.
貳 糖尿病與感染	15.
第一節 糖尿病對感染之感受性	15.
第二節 糖尿病與免疫系統	16.
參 肺泡巨噬細胞	19.
第一節 肺泡巨噬細胞簡介	19.
第二節 來源及動力學	20.
第三節 外型特徵	21.
第四節 代謝特性	21.
第五節 抗微生物之機轉	22.
肆 肺炎克雷伯氏菌	24.
第一節 肺炎克雷伯氏菌簡介	24.
第二節 肺炎克雷伯氏菌機轉	25.
第三節 肺炎克雷伯氏菌之流行病學	26.
伍 研究目的	27.

第一節	慢性糖尿病小鼠肺泡巨噬細胞吞噬能力	-----27.
第二節	慢性糖尿病小鼠肺泡巨噬細胞吞噬對於肺炎克雷伯氏菌之殺菌能力	-----27.
第二章	材料與方法	----- 31.
壹	糖尿病動物模型之誘發	-----31.
第一節	檸檬酸緩衝溶液的製備	-----31.
第二節	實驗動物之品管	-----32.
第三節	糖尿病的誘發	-----33.
第四節	小鼠血糖測量	-----33.
貳	小鼠肺泡巨噬細胞及血液之取得	-----34.
第一節	小鼠支氣管灌流數及血液採集	-----34.
第二節	細胞計數	-----35.
第三節	細胞型態	-----36.
參	小鼠肺泡巨噬細胞之吞噬能力	-----38.
第一節	小鼠新鮮血清的製備	-----38.
第二節	螢光小球的製備	-----38.
第三節	肺泡巨噬細胞吞噬螢光小球	-----39.
第四節	肺泡巨噬細胞吞噬螢光 <i>E. coli.</i>	-----41.
肆	小鼠肺泡巨噬細胞清除 <i>Klebsiella pneumoniae</i> 的能力	----- 42.
第一節	定量 <i>Klebsiella pneumoniae</i> 菌液濃度	-----42.
第二節	小鼠肺部感染 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	----- 45.
第三節	感染後小鼠肺中及血中 <i>Klebsiella pneumoniae</i> 含量	-----46.
伍	統計方法	----- 49.
第三章	結果	-----51.
壹	糖尿病小鼠之生理	-----51.
第一節	糖尿病小鼠之血糖值	-----51.
第二節	糖尿病小鼠之體重	-----53.
貳	糖尿病小鼠之肺泡巨噬細胞	-----54.
第一節	肺泡巨噬細胞之型態和比例	-----54.

第二節	肺泡巨噬細胞之數目 -----	54.
第三節	肺泡巨噬細胞之吞噬能力 -----	55.
第四節	肺泡巨噬細胞對於 <i>Klebsiella pneumoniae</i> 的殺菌能力--	60.
第四章	討論 -----	75.
第五章	結論 -----	85.
第六章	參考文獻 -----	86.
英文摘要	-----	96.
作者簡歷	-----	98.

表目錄

表一：	慢性糖尿病小鼠之體重紀錄 -----	66.
	(The body weight of the chronic DM mice)	

圖目錄

圖一：	肺泡巨噬細胞在光學和電子顯微鏡下的外觀呈現 -----	29.
	(The morphology of alveolar macrophage under the microscopy)	
圖二：	肺泡巨噬細胞消化外來微生物之代謝途徑 -----	30.
	(Metabolic concomitants of particle ingestion by macrophages)	
圖三：	慢性糖尿病小鼠血糖值 -----	63.
	(Blood sugar value of chronic DM vs. control mice)	
圖四：	急性糖尿病小鼠血糖值 -----	64.
	(Blood sugar value of acute DM vs. control mice)	
圖五：	慢性糖尿病小鼠體重紀錄 -----	65.
	(Body weight of chronic DM vs. control mice)	
圖六：	急性糖尿病小鼠體重紀錄 -----	67.
	(Body weight of acute DM vs. control mice)	
圖七：	慢性和急性糖尿病小鼠之肺泡巨噬細胞數目 -----	68.
	(Number of AMs from acute and chronic DM vs. control mice)	
圖八：	慢性和急性糖尿病小鼠之肺泡巨噬細胞數目 -----	69.
	(Number of AMs from acute and chronic DM vs. control mice)	
圖九：	慢性糖尿病小鼠之肺泡巨噬細胞所吞噬的螢光強度 -----	70.
	(Beads fluorescent strength in AMs from chronic DM vs. control mice)	
圖十：	有吞噬螢光小球的肺泡巨噬細胞佔全部肺泡巨噬細胞數目的百分比 -----	71.

(% of AMs from chronic and acute DM vs. control mice phagocytizing beads)

圖十一： 糖尿病小鼠之肺泡巨噬細胞所吞噬的螢光強度 -----72.

(Beads fluorescent strength in AMs from chronic and acute DM vs. control mice)

圖十二： 糖尿病小鼠左肺均質液的 *K. Pneumonia* 菌落數 -----73.

(Bactericidal ability of left lung to *K. Pneumonia* from chronic and acute DM vs. control mice.)

圖十三： 糖尿病小鼠血漿中的 *K. Pneumonia* 菌落數 -----74.

(Bactericidal ability of plasma to *K. Pneumonia* from chronic and acute DM vs. control mice)

符號與縮寫

6-PG : 6-phosphogluconate 葡萄糖 6 磷酸

AMs : Alveolar Macrophage 肺泡巨噬細胞

BAL : Bronchoalveolar Lavage Fluid 支氣管灌流術

DM : Diabetes Mellitus 糖尿病

FBS : Fetal Bovine Serum 胎兒牛血清

G-6-P : Glucose-6-Phosphate 葡萄糖-6-磷酸

G-6-PD : Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase 葡萄糖-6-磷酸脫氫?

GSH : Reduced Glutathione 還原型穀氨基硫

GSSG : Oxidized Glutathione 氧化型穀氨基硫

HLA : Human Leukocyte Antigen 人類白血球抗原

HMPS : Hexose Monophosphate Shunt 己糖-磷酸分路.

IDDM : Insulin-Dependent Diabetes Mellitus 胰島素依賴型糖尿病

IL-2 : Interleukin-2 間白素 2

K.p. : *Klebsiella pneumoniae* 肺炎克雷伯氏菌

LPS : Lipopolysaccharide 脂多醣體

NADPH : Reduced Nicotine Adenine Dinucleotide Phosphate

菸醯胺腺嘌呤二核? 酸磷酸之還原態

NADP⁺ : Oxidized Nicotine Adenine Dinucleotide Phosphate

菸鹼醯胺腺嘌呤二核? 酸磷酸之氧化態

NIDDM : Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus 非胰島素依賴型糖尿病

PBS : Phosphate Buffer Saline 磷酸鹽緩衝溶液

PMNs : Polymorphonuclear Leukocytes 多型核白血球

PMs : Peritoneal Macrophages 腹腔巨噬細胞

STZ : Streptozotocin 鏈氮黴素

第一章 緒論

壹、糖尿病之概論

糖尿病(diabetes mellitus; DM)是一種最常見的內分泌疾病，本病的特點是代謝異常，導致病人有慢性血糖升高的情況；並且時常會伴隨著長期併發症如眼、腎、神經和血管病變等 (Wilson and Foster,1992)。

一、 糖尿病的定義

糖尿病為慢性的新陳代謝疾病，胰臟 細胞受到自體免疫或病毒的破壞導致胰島素分泌不足，或是胰島素的作用有缺陷，或胰島素作用細胞上的接受器有所缺損都有可能是致病的原因，如果胰臟蘭氏小島的細胞，無法分泌足量的胰島素 (Insulin)，或是體內的胰島素無法發揮功能，導致生理的代謝功能無法充分的發揮降血糖的作用時，人體所攝取的食物，經過消化、吸收、轉化成葡萄糖之後，血中葡萄糖含量就會累積超出了正常範圍，病人臨床症狀為血中葡萄糖濃度過高，並且有多吃、多喝、多尿 (三多症狀)、口乾、疲倦及體重減輕等症狀。

二、 糖尿病的分類

(1)第一型糖尿病(Type 1): 為胰島素依賴型糖尿病(insulin-dependent

diabetes mellitus; IDDM), 多在 40 歲前發作；特徵是逐漸失去胰臟蘭氏小島的細胞，最後導致循環中無胰島素存在，病因被認為是與人類白血球抗原 (human leukocyte antigen HLA) DQ、DR 最有關聯 (Thorsby et al., 1993)，此病為和抗原表現有關的遺傳性自體免疫疾病，病人有抗胰島組織抗體，引起 T 淋巴球浸潤，最後摧毀胰島。另外曾注意到環境因素的特殊病毒感染 B 細胞有可能是造成糖尿病的原因，因為曾有不少季節性變化的相關性在此病毒感染發生與糖尿病發病之間，但病毒理論仍未被證實。病人大多需要依賴注射胰島素控制血糖。

(2) 第二型糖尿病 (Type 2): 為非胰島素依賴型糖尿病

(noninsulin-dependent diabetes mellitus; NIDDM), 多發生在 40 歲以後，此糖尿病患者多為肥胖者，血漿胰島素多為正常或偏高，其脂肪組織細胞之胰島素受器細胞數目常減少，胰島素對葡萄糖耐量升高，病因為胰島素抗性及相對胰島素不足，大多由於胰島素接受器的下調節造成胰島素接受器濃度降低，或者在細胞表面接受器之後，細胞內的葡萄糖代謝有缺陷；以上種種現象造成病患血中就算有足量的胰島素，然而胰島素仍然無法對於細胞發揮功能。病人大多不須依賴注射胰島素，而是靠控制飲食或服用降血糖藥物來控制病情。

無論是哪一型的糖尿病，到最後都會因為血糖的不正常而引起一些併發

症，如視網膜病變、腎病變、血管病變、神經病變、感染、酮酸中毒等。

三、糖尿病的流行病學

隨著生活水準的提高，飲食及生活形態的改變，糖尿病已成為普遍分佈全世界的慢性疾病，並且有逐漸增多的趨勢，發病率大約為 1~2% (Wilson and Foster,1992)，世界上約有 2 億人口罹患糖尿病，在已開發國家中均排名十大主要死因之內(Fujimoto, 1966)；在台灣地區糖尿病則已連續多年在十大死亡原因中排名高居在第五位(行政院衛生署, 2000)，患者總數約在 30~40 萬人左右，而且人數仍然日益增加中，顯示了對於糖尿病的控制及延緩其併發症的發展方面仍然需要改善。病患人口的分佈及常見的併發症發生率如下：

第 1 型糖尿病 (胰島素依賴型；IDDM)：在台灣地區僅佔所有糖尿病患者人口的 3.5% (戴東原, 1996)，總數在 14,000 人。第 2 型糖尿病 (非胰島素依賴型；NIDDM)：在台灣地區佔所有糖尿病患者人口的 96.5% (戴東原, 1996)，總數在 40 萬人，但未被診斷出的糖尿病人約佔 2/3 左右，因此推斷台灣地區糖尿病人總數應該在 100 萬人以上 (張家禎, 1993)。

血管疾病：高血糖、高血壓、及血脂異常是造成血管病變的主要因素，常見的有冠狀動脈心臟病、腦中風或週邊血管阻塞。在血管疾病致死因方面，IDDM 主要為微血管病變，NIDDM 則主要為心臟血管與腦血管疾

病方面 (Marks, 1977)。腎病變：IDDM 發病 20 年後，腎病變的發生率為 30~50 %，25 年到達高原期以後，腎病變發生率並不太增加 (Andersen, 1983)，而腎病變佔了 IDDM 患者死亡原因的 55 % (Marks, 1977)。而 NIDDM 發病 20 年後，腎病變的發生率為 25~34 %，25 年之後，罹患率會一直上升，患者 35 年累積發病率可達 75 % (Ballard et al., 1988) 而腎病變只佔了 NIDDM 患者死亡原因的 7 % (King, 1971)，在台灣地區糖尿病為血液透析原因的第二位 (曾芳郁, 1996)，在美國為第一位 (Mauer et al., 1985)。視網膜病變：在美國，糖尿病是造成成人失明的主要原因 (Wilson, et al. 1992)，而糖尿病患者眼睛失明的機會又比一般人高出 25 倍，在發病 20 年之後，IDDM 約有 90 %，NIDDM 約有 25.8% 會發生視網膜病變 (郭清輝, 1998)。神經病變：在台灣地區，糖尿病發病初期約有 7.5% 會有神經病變，發病至 25 年可達 50% (郭清輝, 1998)。在美國的調查顯示糖尿病患者神經病變的罹患率高達 60% (Dyok, 1993)。

感染：糖尿病人常見有陰道、泌尿道的感染，皮膚黴菌感染及足部感染等 (陳國群, 1997)，其中以足部感染的問題最為嚴重，再加上病人有血管阻塞、神經病變、傷口不易癒合等問題，使足部容易發生潰瘍、壞死、甚至需要截肢。根據臺大醫院 1982~1991 年間的調查，在台大接受下肢截肢的手術的病人，糖尿病患就佔了 37.2%，此外，在台灣，因糖尿病足部感染的死亡率是同年齡人口死亡率的 5.95% (郭清輝, 1998)。

四、糖尿病之實驗動物模型

糖尿病的動物模型分為 IDDM 和 NIDDM 兩種，NIDDM 型大多是經由基因改造的方式，使老鼠體內有胰島素抗性及血糖上升的情形，常見的有 db/db 及 ob/ob 小鼠等，而一般實驗室動物以藥物誘導產生糖尿病的方式，則是屬於 IDDM 型，常用的藥物為 streptozotocin (STZ) 及 alloxan，兩者的作用皆為破壞胰臟細胞，並且造成不可逆的傷害，此結果會讓實驗動物產生類似於人類 IDDM 的症狀，如高血糖，低胰島素，體重減輕等，這種誘發式的糖尿病動物模型的特點在於，雖然老鼠會產生與 IDDM 相同的生理反應，但是卻不會有人類 IDDM 的自體免疫情形發生 (Mords et al, 1985)。

貳、糖尿病與感染

一、糖尿病對感染之感受性

高度感染之感受性：普遍的認為，與健康的人相較，糖尿病患者比較容易受到感染 (Robbins et al., 1944; Seymour et al., 1963)，而且糖尿病也被認為是一種獨立的危險因子，導致容易使人得到下呼吸道感染 (Mackowaik et

al., 1979), 對於糖尿病而言, 有許多的因素會提昇感染及併發症的危險性, 例如: 糖尿病的持久度, 嚴重的非感染性併發症, 血糖濃度的高低等, 將在下文中更詳細的介紹。

二、糖尿病與免疫系統

(1) 多型核白血球 (Polymorphonuclear Leukocytes; PMNs) 功能:

. 移動及趨化能力: 糖尿病人的嗜中性白血球 (PMNs) 趨化能力較正常人差——曾有研究指出, 在傷口發炎反應開始的 2~4 小時內, 糖尿病人的嗜中性白血球 (PMNs) 趨化移動到發炎部位的數量較正常人少, 而在體外實驗方面, 同樣地, 糖尿病人的 PMNs 對於趨化物質所產生的趨化反應能力, 也比正常人低 (Mowat et al., 1971), 此外, 若將正常人的 PMNs 培養在高血糖濃度中, 並不會影響正常人 PMNs 的趨化能力; 反之, 若將糖尿病人的 PMNs 培養在含有胰島素的環境中, 卻能改善糖尿病人 PMNs 的趨化能力 (Brayton et al., 1970)。

. 吞噬能力: 糖尿病人 PMNs 的吞噬能力較正常人差——實驗報告中, 未控制血糖的糖尿病人, 其有吞噬肺炎鏈球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 的 PMNs 數量比正常人少, 在控制血糖之後, PMNs 的吞噬能力有改善的情形, 但仍無法達到正常的吞噬能力 (Bagdade et al., 1974), 如果將正常人的 PMNs 放在糖尿病人的血清中培養, 正常人 PMNs 的吞噬能力會下

降；相反地，若將糖尿病人的 PMNs 放在正常人的血清中培養，其 PMNs 的吞噬能力就會提昇 (Bybee et al., 1964)，在 PMNs 吞噬菌量的多寡方面，不論是金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)，或是念珠菌 (*Candida guilliermondii*) 被吞噬的數量，糖尿病人都是比正常人少很多的，而 PMNs 吞噬菌量的多寡和培養環境的血清種類卻沒有發現有相關性 (Nolan et al., 1978; Davidson et al., 1984)。

· 附著能力：血糖控制不良的糖尿病人，他們的 PMNs 附著到玻璃管柱的能力明顯的受到傷害，然而若將病人的血糖控制住 1-2 個月之後，PMNs 的附著能力就有明顯的改善 (Peterson et al, 1977)，若觀察病人 PMNs 附著到尼龍材質管柱上的能力，也能觀察到同樣的情形，而且病人在血糖控制後 PMNs 的附著能力能夠增加 53% ~74% (Bagdade et al., 1978, 1980)，後來更有人從生理學的方向探討發現，糖尿病人 PMNs 附著到牛的動脈的能力比正常人下降了 60%，但是 PMNs 附著能力的衰弱程度卻未發現與病人血中的 HbA_{1c} 濃度有相關性 (Andersen et al., 1980)。

· 殺菌能力：

糖尿病人的 PMNs 殺菌能力較差，未控制血糖的糖尿病人，其 PMNs 吞噬的金黃葡萄球菌數量遠比正常人及血糖受控制的病人少得多 (Repine et al., 1980)，其後有人用綠膿桿菌測試，糖尿病人就算血糖被控制之後，他們 PMNs 殺菌能力仍然沒有改善 (Naghibi et al., 1987)，若 PMNs 受到外來顆

粒性異物刺激後，以冷光檢測超氧離子 (superoxide anion) 或過氧化產物 (superoxide production) 的含量，糖尿病人的過氧化產物比正常人少 (Winocour et al., 1988)，而當 PMNs 遭遇到酵散 (zymosan) 或是金黃葡萄球菌的刺激後，糖尿病人的前列腺素 E (prostaglandin E) 和血栓素 B2 (thromboxane B2) 的產量以及對於合成或釋放白三烯素 B4 (leukotriene B4) 的能力都比正常人微弱 (Qvist et al., 1983) (Jubiz et al., 1984)。

(2) 單核球 (Monocyte) 功能：

糖尿病人循環血中的單核球數目比較少 (Geisler et al., 1982)，而這些單核球吞噬白色念珠菌 (*Candida albicand*) 或表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 的能力皆有受損，但是當吞噬乳化小球 (latex particles) 或綿羊紅血球時，糖尿病人的單核球的吞噬能力與正常人是沒有差異的 (Glass et al., 1987; Katz et al., 1983)，此外，糖尿病人的單核球在對付李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*) 時，不止吞噬能力降低，趨化能力也出現受損情形 (Hill et al., 1983)，但是也有實驗發現，糖尿病人的單核球在吞噬酵散 (zymosan) 時，其吞噬活動的代謝產物，如過氧化物、單磷酸己糖含量比一般正常人高，證明糖尿病人單核球吞噬活動時有較高的代謝能力 (Kitahara et al., 1980)。

(3) 細胞調節免疫 (cell-mediate immunity)：

大量的報告都指出糖尿病體外實驗的細胞調節免疫功能受到損害；例如當血糖控制不良的糖尿病人的淋巴球，對於植物血球凝集素 (phytohemagglutinin；PHA) 刺激所產生的轉型反應較正常人微弱 (MacCuish et al., 1974)，儘管血糖有良好控制的糖尿病人的淋巴球遭遇葡萄球菌抗原時，轉型反應依然也較正常人低下 (Casey et al., 1987)，在酮酸中毒的糖尿病童身上，他們的 T 淋巴球有絲分裂活動減低，一但病童代謝回到正常，他們的 T 淋巴球有絲分裂即回復正常 (Kolterman et al., 1980)，而 IDDM 糖尿病人 T 細胞所分泌的間白素 2 (interleukin-2；IL-2) 產量也較少，IL-2 的主要功能是調控 T 細胞的增殖能力和活性 (Kaye et al., 1986)，同樣地，IDDM 糖尿病人的自然殺手細胞 (natural killer cells；NK cells) 對於干擾素的反應能力也比正常人減弱 (Negishi et al., 1988)。

參、肺泡巨噬細胞

一、肺泡巨噬細胞簡介

肺泡巨噬細胞 (Alveolar macrophage; AMs) 是一種在肺臟中常駐的單核吞噬細胞，它主要的功能是作為肺臟抵抗外來病原的第一道防線，尤其是在於對抗吸入性顆粒方面 (Cohen et al., 1975; Green et al., 1964)，自從 1961 年，Myrvik 等人從兔子的肺臟灌洗中獲得了 AMs 後，AMs 的研究方法即被普

遍的應用 (Myrvik et al., 1961)。隨後這種肺泡灌洗技術就被獲准應用在研究人類的 AMs 上 (Finley et al., 1967), 人們便可以藉由這種研究方法了解動物或是人類的肺臟生理或病理。因為 AMs 居留在一種富含空氣的組織表面, 所以它會直接暴露在吸入性的微生物或毒性中, 包括了煙塵或特殊的空氣污染等, 而在肺泡這樣的一個需氧環境下造就了 AMs 發展出特殊的代謝適應 (Simon et al., 1977)。

二、 來源及動力學

存在身體內各器官的巨噬細胞都是由骨髓中的先驅細胞衍生而來的 (van Furth et al., 1970; Volkman et al., 1965), 有人更進一步證明, 骨髓中的先驅細胞衍生成循環血中的單核球, 這些單核球再發育成代謝特徵和功能皆不相同的 AMs (Bowden et al., 1969, 1972), 其中有一項最直接的證據來自於, 曾有人將女性的骨髓移植到男性病人身上, 最後男性的 AMs 皆沒有帶有 Y 染色體, 證明了男性的 AMs 都是從移植後的女性骨髓而來, 同樣的, 若將男性的骨髓移植到女性病人身上, 最後女性的 AMs 皆帶有 Y 染色體, 而且宿主的 AMs 最多在 100 天內都會被供給者的骨髓衍生細胞取代 (Thomas et al., 1976)。無疑的, AMs 有自我繁殖的能力 (Lin et al., 1975), 在人類的 AMs 方面, 從重氫標定的胸腺嘧啶來追蹤 AMs 複製的結果, 發現 AMs 雖然有複製繁殖的能力, 但其比例只佔了約 0.35~1.25 %, 證明了

AMs 主要的來源並非由本身複製繁殖而來 (Golde et al., 1974)。

三、外型特徵

AMs 在光學和電子顯微鏡下的外觀呈現 (圖一), 肺泡巨噬細胞的大小可有 15~50 μm , 若利用 Giemsa 染色法, 可以看到灰色的細胞質內包含許多藍黑色的顆粒及細胞質空泡, 細胞核與細胞質的比例通常為 1:3, 有的時候細胞質可看見很多的空泡, 以及經由過碘酸-Schiff 染色法可觀察到大量的非特異性酯, AMs 的胞器包含了完整的高基氏體和一些粒腺體 (Mann et al., 1971; Cohen et al., 1971), 而內質網分布並不廣泛, 大部分是粗糙型內質網 (Harris et al., 1970), 其他還包含了核糖體和肝糖顆粒存在 (Mann et al., 1971; Cohen et al., 1971)。AMs 有一個很重要的特點就是擁有大量由細胞膜所封包住的包含體, 在人類的 AMs 包含體中發現有酸性磷酸酶的聚集 (Pratt et al., 1971), 在兔子的 AMs 發生吞噬作用時, 這些包含體都會轉變成吞噬性小泡, 所以, 很顯然的, 這些包含體就是初級的溶小體 (Stossel et al., 1972; Cohn et al., 1963), 從掃描式電子顯微鏡下可看到 AMs 膜表面皺襞特徵 (圖一), 當 AMs 附著到玻璃時, 它的細胞膜會延展並生出板狀和絲狀的偽足 (Quan et al., 1977)。

四、代謝特性

AMs 與其他的吞噬細胞比起來，有較高的呼吸速率，然而，在它進行吞噬作用時，僅有少量的氧消耗增加情形 (Oren et al., 1963)，曾經有人利用抑制糖解作用或氧化代謝的抑制劑，來觀察這些吞噬細胞在厭氧的環境下，吞噬外來顆粒的能力有無變化，發現這樣的厭氧環境對一般的 PMNs 及腹腔巨噬細胞 (peritoneal macrophages; PMs) 的吞噬能力毫無影響 (Sbarra et al., 1959)，卻會造成 AMs 的吞噬能力大大減低 (Cohen et al., 1971; Oren et al., 1963; Mason et al., 1973)，因此，相對於其它吞噬細胞，AMs 在發生吞噬作用時需要氧化及糖解的代謝。在酵素方面，相對於 PMs，AMs 含有較高量的細胞色素氧化酶，而乳酸激酶和果糖磷酸激酶的含量卻很少，符合了需氧性的能量代謝途徑 (Simon et al., 1977)。

五、抗微生物之機轉

(1) 捕捉微生物：

AMs 的細胞膜上有可與 IgG 抗體的 Fc 部位結合的接受器 (Reynolds et al., 1975)，以及補體接受器 (Shurin et al., 1978)，這些接受器對於 AMs 在接觸和消化外來顆粒的功能上扮演很重要的角色 (Mantovani et al., 1972)，若觀察兔子感染卡介菌 (*Bacillus Calmette-Cuerin*) 之後的免疫反應，其 AMs 細胞膜上的補體和 IgG 接受器的數量及親和力的都會上升

(Montarroso et al., 1978), 這項改變反映出了 AMs 的『活化』可能與對於調理過的微生物的吞噬能力增強有關。當 AMs 接觸到外來顆粒進而被活化後, 肌動蛋白 (actin) 牽動了微絲 (micro - filaments), 再加上其他一些輔因子的作用, 導致了細胞質的收縮, 這種收縮提供了形成偽足以及吸入外來顆粒的力量 (Stossel et al., 1976)。

(2) 殺菌的機制：

AMs 在一般休息狀態時就會產生過氧化氫 (H_2O_2), 在吞噬進行時則會產生更多的過氧化氫 (Gee et al., 1970; Klebanoff et al., 1973), 產生 H_2O_2 的過程可能是由 NADPH 氧化酶 (NADPH oxidase) 的反應而來, 而 NADPH 氧化酶則可以刺激經由戊糖磷酸代謝 (hexose monophosphate shunt) 途徑的呼吸和活化反應, 在經由 NADPH 氧化酶到 H_2O_2 產生的過程中, 超氧離子 (superoxide anion; O_2^-) 可以直接的殺菌, H_2O_2 最後可被觸酶 (catalase) 轉換成水和氧 (圖二) (Rossi et al., 1973)。

(3) AMs 的分泌：

AMs 可以分泌一些細胞激素、群落刺激因子 (colony - stimulating activity), 這些由 AMs 分泌出來的物質可以誘導顆粒性白血球 (granulocyte) 和單核球幹細胞 (monocyte stem cell) 之複製 (Golde et al., 1972), 這些細胞激素還可誘導刺激骨髓中的顆粒性白血球和單核球遷移到肺臟中 (Glode et

al., 1974)。

(4) 抗原呈獻 (Antigen presenting) :

在免疫反應中，輔助型 T 細胞 (helper T cell) 的活化需要蛋白質抗原，而負責呈現出抗原給輔助型 T 細胞的就是單核球系統 (Unanue et al., 1984)，當抗原經由巨噬細胞處理過後，巨噬細胞膜的表面就會一起呈現外來抗原和自我抗原 (self- antigen) 給 T 細胞，供 T 細胞辨認並啟動下一步免疫防禦。

肆、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*; *K.p.*)

一、肺炎克雷伯氏菌簡介

肺炎克雷伯氏菌 (*K. pneumoniae*) 屬於革蘭氏陰性 (Gram negative) 腸內桿菌科細菌 (Enterobacteriaceae)，有莢膜 (capsule) 為其主要毒力因子 (virulence factor)，大多利用檸檬酸鹽 (citrate) 和葡萄糖 (glucose) 為主要碳源 (carbon sources) (Podschun and Ullmann, 1998)；常常造成下呼吸道及尿道感染，可導致肺部組織出血性壞死，也是常見的院內感染菌，雖然在所有肺炎病例中，是 *K. pneumoniae* 造成的只有佔了 3%，但它卻可以導致非常高的死亡率，假如 *K. pneumoniae* 肺炎病人沒有接受治療，其死亡率甚至可以

高達 90% (Baron, 1991)。

二、肺炎克雷伯氏菌致病機轉

(1) 莢膜：

莢膜是 *K. pneumoniae* 必須的致病因子 (Cryz et al., 1992)，因為莢膜不止可以保護 *K. pneumoniae* 免於被 PMNs 吞噬 (Podschun et al., 1992)，還可以防止被人類血清之殺菌因子 (bactericidal serum factors) 殺死 (Williams et al., 1983)，而莢膜多糖體 (capsular polysaccharide; CPS) 中的甘露糖 (mannose) 含糖量的多寡，也曾被指出與致病力有關，例如較低致病力的莢膜血清型，具有重複的 mannose-2/3-mannose 的結構，容易被巨噬細胞表面的外源凝集素 (surface lectin) 辨識，進而被吞噬清除 (Athmna et al., 1991)。

(2) 血清抗性與脂多醣體 (serum resistance and lipopolysaccharide;

LPS)：

細菌避開血清殺菌效應的作用稱為細菌血清抗性 (serum resistance)，*K. pneumoniae* 避開血清殺菌效應的方法可能有兩種：(1) CPS 掩蔽下層的 LPS，所形成的表面結構抑制了宿主細胞補體系統的活化；(2) LPS 中的 O 抗原側鏈可伸出莢膜層，暴露於外在環境中，此長鏈的 O-polysaccharide side

chain 會阻止補體 C3b 接近菌體表面，使宿主無法形成溶菌膜攻擊複合體 (lytic membrane attack complex ; C5b-C9)，因而細菌細胞膜就不會被破壞，細菌也不會死亡了 (Podschun and Ullmann, 1998)。

(3) 宿主因素：

K. pneumoniae 的感染特別好發於小孩、老年或者免疫系統有缺陷的人，而且正服用抗代謝藥物的治療或本身有糖尿病或酗酒者，更是高危險群 (Highsmith and Jarvis, 1985)。

三、肺炎克雷伯氏菌之流行病學

K. pneumoniae 是一種伺機性感染的細菌，對於住院已久，免疫力較差的病人 (Carpenter, 1990)，或是有糖尿病或慢性肺阻塞的病人，較具攻擊性，而且此菌所引起的肺炎，在給予抗生素治療後，仍有高達 50% 的死亡率 (Lorian and Topf, 1972; Graybill et al., 1973)，在國外，化膿性肝膿瘍大部分是由多種微生物引起的 (McDonald et al., 1984)，然而在台灣則是由單一微生物 (monomicrobial) *K. pneumoniae* 所造成，而且多發生在糖尿病患者身上；在國外，*K. pneumoniae* 肝膿瘍佔所有化膿性肝膿瘍的 27% (Goldman et al., 1978; Greenstein et al., 1984)，在台灣 *K. pneumoniae* 肝膿瘍卻高佔了 80% (Cheng et al., 1997)；也因為如此大的差異，*K. pneumoniae*

遂引起了國內感染科醫師和專家學者的高度重視，

伍、 研究目的

一、 慢性糖尿病小鼠肺泡巨噬細胞吞噬能力

已知糖尿病是一種慢性的疾病，且糖尿病對於遭受下呼吸道感染而言是一個獨立的危險因素 (Mackowiak et al., 1979)，但是若對於同樣得到敗血症的病人作觀察，反而糖尿病人比非糖尿病人較不容易進入更嚴重的病程，例如成人呼吸窘迫症 (acute respiratory disease syndrom; ARDS; Moss et al., 2000)，而就本文前述所了解的，無疑地，肺泡巨噬細胞在下呼吸道，是抵抗外來微生物的主力，亦是第一線的吞噬細胞 (Dorthy et al., 2000)，所以，為了要觀察糖尿病對於下呼吸道免疫能力的影響，最直接的方法就是以慢性糖尿病小鼠的肺泡巨噬細胞對於外來顆粒或者大腸桿菌 (*E.coli*) 之吞噬能力作為本篇的研究題材。

二、 慢性糖尿病小鼠肺泡巨噬細胞對於肺炎克雷伯氏菌之殺菌能力

根據文獻記錄發現，肺炎克雷伯氏菌特別好發於台灣的糖尿病人，其引起的原發性肺炎，病程進展快速，病情嚴重，甚至出現敗血症症狀，且

伴隨高死亡率 (Cheng et al., 1991; Chen et al., 2000) , 為此特殊關聯 , 於是本篇實驗欲探討慢性糖尿病是否會造成小鼠的肺泡巨噬細胞消滅肺炎克雷伯氏菌的能力降低。

(圖一): 肺泡巨噬細胞在光學和電子顯微鏡下的外觀呈現

Figure 1. The morphology of alveolar macrophage under the microscopy. (J. Gen. Micro. 129:2181-2191, 1983.)

第二章 材料與方法

壹、糖尿病動物模型的誘發

一、0.05 M, PH 4.5 檸檬酸鹽緩衝溶液 (Citrate buffer) 的製備

材料：

檸檬酸鹽(Citric Acid; $C_6H_5Na_3O_7$; USB)、微量天平、二次水(dd H₂O)、1N & 12N 氫氧化鈉(NaOH)、1N & 12N 鹽酸 (HCl)、50 ml 離心管(50 ml centrifuge tube)、塑膠滴管 (dropper)、小燒杯、拭淨紙 (wipes)、酸鹼側定儀 (pH Vision, Jenco, Electronic; LTD)、PH 4、PH 6.8 校正液，試管震盪器 (vortex mixer)。

方法：

加入 10 ml dd H₂O, 加入 2.5 mmole Citric Acid, vortex 均勻, 加入 dd H₂O 至 30 ml, vortex 均勻, 先後以 PH 4、PH 6.8 校正酸鹼測定儀, 以 dd H₂O 清洗探針, 以拭鏡紙擦乾探針, 測量 sodium citrate buffer 的 PH 值, 太酸：慢慢滴加 NaOH, 太鹼：慢慢滴加 HCl 直到 PH = 4.5, 酸鹼互換間, 須以 dd H₂O 清洗探針, 以拭鏡紙擦乾探針, 最後加入 dd H₂O 至 50ml, 其 PH 應為 4.5。

二、實驗動物之品管：

1. 動物品系：C57BL/6J male mice
2. 動物來源：國家科學委員會 - 國家實驗動物繁殖及研究中心
3. 動物週齡：4 週
4. 飼養環境：恆溫 22 ，空調房間，相對溼度約 55 % ，12 小時照明

三、糖尿病的誘發

材料：

PE 飼養盒、木屑墊料、鼠用飼料、餵水水瓶、一次水、磅秤、streptozotocin (N-(Methylnitrosocarbamoyl)-o glucosamine; Sigma) 0.05M; pH 4.5 ; 4 的檸檬酸緩衝溶液(citrate buffer)、吸管唧筒 (pipette pump)、吸管尖 (blue tip)、注射用針 (1 c.c. syringe)、5 c.c. 試管。

步驟：

將 PE 盒底部鋪滿墊料，蓋子上放置飼料及裝水小瓶，把小鼠放在 PE 盒中飼養 2 weeks，任其自由進食飲水，將 6-week-old 的小鼠秤重，依小鼠的體重酌取 0.55mg/g 的 streptozotocin 的量，注射前先將 streptozotocin 溶於 0.2 ml 的 citrate buffer，稀釋後至少 2 分鐘後再讓小鼠接受注射，小鼠接受連續 4 天腹腔的 streptozotocin 注射，在第一次注射 streptozotocin 的 7 天後測量小鼠血

糖值，血糖值必須 300mg/dl 才視為有意義之糖尿病誘發，若血糖值未超過 300mg/dl ，則再連續給予小鼠兩天的 0.55mg/g 的 streptozotocin 注射，同樣的，在第一次注射 streptozotocin 的 7 天後測量小鼠血糖值，血糖值必須 300mg/dl ，小鼠糖尿病誘發後養育 6 個月，每週秤一次體重並記錄。

四、小鼠血糖測量

材料：

葡萄糖分析儀 (Model 1500 sidekick glucose analyzer; YSI)、校正液 (YSI 2747 standard; YSI)、 $25\ \mu\text{l}$ 鈍針加樣器 (YSI 1501; YSI)、膠帶、報紙、透明小塑膠袋、麻醉用玻璃鐘罩、麻醉用小罩杯、拭淨紙 (wipes)、乾棉球、止血小夾、70% 酒精棉、水、小燒杯、乙醚 (ethyl ether)、解剖台、解剖用剪刀、

方法：

準備材料，鋪報紙，注入乙醚於玻璃鐘罩及麻醉小罩杯，校正儀器，校正液值為 180mg/dl ，用水清洗 pipette 後，用拭淨紙擦乾，將小鼠放入玻璃鐘罩中麻醉，小鼠昏迷後，將其平躺置於解剖台上，小鼠四肢以膠帶固定，若小鼠有醒來的跡象，以麻醉小杯蓋住其口鼻，70% 酒精棉消毒小鼠尾巴，用剪刀剪斷一小段 mice 尾巴，擠出 5-6 滴血 ($> 25\ \mu\text{l}$) 於透明平滑塑膠帶

上，以鈍針加樣器吸取 25 μ l mice 全血，將全血打入儀器測量血糖值，清洗 pipette 後，用拭鏡紙擦乾，以乾棉球及止血夾夾住尾小鼠尾巴止血，記錄血糖值。

貳、小鼠肺泡巨噬細胞及血液之取得

一、小鼠支氣管灌流術 (bronchoalveolar lavage fluid; BAL) 及血液採集

材料：

糖尿病誘發 6 個月後之小鼠、乙醚 (ethyl ether)、麻醉用玻璃鐘罩、麻醉小罩杯、解剖板、乾棉花、膠帶、棉線、解剖盤、圓頭鑷子、尖頭鑷子、尖頭小剪刀、圓頭剪刀、70% 噴頭酒精 (70% alcohol)、無菌生理食鹽水 (normal saline)、無菌一倍磷酸鹽緩衝溶液 (1X PBS)、含肝制凝素 (heparin) 的抗凝管、離心管 (15 ml 50 ml centrifuge tube) 微量離心管 (1.5 ml micro centrifuge tube)、PE 管 (polyethylene tube; PE - 50) , 21 號針頭 (21-gauge needle)、針筒 (1 ml syringe)、26 號針頭的 1 ml 無菌注射針，冰塊，冰桶。

步驟：

PBS 置於冰上，以 saline 製備稀釋的 heparin 於將要存血的微量離心管

中，器皿以 70% 酒精消毒、以食鹽水沖洗殘餘酒精，器械泡於無菌食鹽水中，乙醚麻醉小鼠，用膠帶將小鼠四肢固定在解剖板上，以 70% 酒精噴溼消毒小鼠全身的毛，將皮從肚子到頸部剪開，腋下稍微橫向剪開，把皮往外左右搬開，使皮肉分離，從肚子剪開肉，剪到胸下圍時，沿著肋骨橫向剪開，剪開約 1/3 胸骨，將胸骨提高，小心剪開橫隔膜，以 1 ml 無菌注射針從心尖插入心臟，採集全血，將全血靜置已含有稀釋 heparin 的微量離心管中，頸部皮用 2 支鑷子剝開，找到甲狀腺和氣管，小心仔細的扯開氣管上的肉，解剖板旋轉 180°、小鼠頭朝自己，將氣管上的肌肉膜拉高並剪開，暴露出氣管後，用鑷子將氣管撐住，鑷子夾線，從氣管下方穿線，用尖剪刀在鑷子下方、也就是較靠近頭的地方替氣管剪一小洞，穿入 PE 管，綁線固定，用膠帶在桌上固定 PE 管，插上已經抽好的 4、1 ml 的 1X PBS 的針筒，慢慢打入 PBS，看到肺脹起來，再慢慢吸回 PBS，打入與吸回 PBS 的時間共約 2 min.，吸回的 lavage 打入 15 ml 離心管中，離心管要置於 4℃ 冰上，重複灌洗 1 ml PBS，最後總共灌出 15 ml 支氣管灌流液。

二、細胞計數 (cell count)

材料：

15 ml 離心管 (15 ml centrifuge tube)、滅菌一倍磷酸鹽緩衝溶液 (1X PBS)、滴管 (dropper)、電動吸取器 (electrical Pipette)、無菌吸管 (5 ml

pipettes)、細胞計數盤 (hemacytometer; Hausser Scientific, USA)、計數器、顯微鏡 (microscopy)、離心機。

步驟：

15 ml 支氣管灌流液，離心 1100 rpm、4、5 min，倒掉 1X PBS，輕輕把管子底部細胞敲散，加入 1X PBS 至 5 ml，以 5 c.c. 電動 pipette 小心地混合細胞液，這一步是為了清洗細胞，離心 1100 rpm、4、5 min，倒掉 PBS、輕輕敲散底部細胞，加入 1X PBS 至 5 ml，電動 pipette 小心均勻地混合後，吸 20 μ l 細胞液，前 2 - 3 滴去掉，輕輕打入已經蓋上蓋玻片的細胞計數盤的凹槽中，看到細胞液剛好蓋滿格子即可，再顯微鏡下算取井自四周四大格之細胞總數，再以下列公式計算細胞的總數。

公式： $(\text{四格計算細胞總數}/4) \times 5 \text{ ml} \times 10^4 = \text{支氣管灌流液中的細胞數目。}$

三、細胞型態

A.) Cytospin

材料：

玻片 (micro slides glass; Daco)、玻片架、滴管 (droper)、cytospin 用固定架和 cytospin 用漏斗 (Shadon)、打洞濾紙 (190005 Filter

Cards; Shandon)、 cytospin 離心機 (cytospin 3; Shadon)。

步驟：

固定架上架玻片，貼濾紙，洞對固定架的洞，放漏斗，夾住，滴 7 滴支氣管灌洗液，開離心機 power，開蓋子，架子放對稱，蓋內蓋，壓緊，蓋外蓋，按 set speed 300 rpm.，按 set time 5 min.，按 START。

B.) Giemsa stain

材料：

甲醇 (methanol)、 Giemsa 染液、二次水 (ddH₂O)、 染盒、滴管 (droper)、玻片架、水盒、顯微鏡 (microscopy)。

步驟：

取出 cytospin 好的玻片，風乾，用滴管灑 1 c.c 甲醇 (methanol) 於玻片上，固定細胞用，風乾，約 30 min. 後，玻片放入玻片架，Gimsa 使用前搖勻，取 3 c.c. Giemsa 染液，加 dd H₂O 到 90 c.c.，使 Giemsa 染液與 dd H₂O 的比例為 1:30，玻片架放入裝好染液染瓶中，稍微上下動一下，染勻，染 30 min，片架拿出，放入水盒中，用水沖 1 min，風乾，在光學顯微鏡下看片，觀察細胞型態。若染不好，則重複步驟，從滴加甲醇開始。

參、小鼠肺泡巨噬細胞的吞噬能力

一、小鼠新鮮血清的製備

材料：

小鼠之新鮮全血、15 離心管 (15 ml centrifuge tube)、離心機、試管架。

步驟：

取 C57BL/6J 小鼠全血 6ml 以上，等血液凝固，離心 2500 rpm，20 min，取出上層的血清 (serum)，血清再離心 4000 rpm，30 min，使血球和 fibrinogen 在血清中完全除去。

二、螢光小球 (FL-Beads) 的製備

材料：

RPMI Medium 1640、1 × 0.1 micro filtered with L-glutamin (Gibco ©)，胎兒牛血清 (fetal bovine serum; FBS)、15 離心管 (15 ml centrifuge tube)、試管架、鋁箔紙、Fluoresbrite carboxylate 0.85micro (Sphero™ Microparticles, yellow; Pharmingen)、離心機、冰桶、冰、新鮮小鼠血清、無菌通風櫥、試管震盪器 (vortex mixer)。

步驟：

在無菌通風櫥中操作，避光，所有溶液皆置於冰桶上，加 10 ml RPMI-1640 於 15 ml 離心管中，離心管包上鋁箔紙，加 1 ml Fluoresbrite carboxylate 0.85 micro，離心 4000 rpm、4、30 min，除去上清液，加 10 ml RPMI-1640，離心 4000 rpm、4、30 min，除去上清液，加 10 ml RPMI-1640，離心 4000 rpm、4、30 min，除去上清液，加少許 RPMI-1640 打散混合，加 2~5 ml 新鮮小鼠血清，靜置使其發生調理作用 (opsonize)，4、30 min，離心 4000 rpm、4、30 min，除去上清液，加 10 ml RPMI-1640，輕敲離心管底，盡量將沈澱結塊物打散，離心 4000 rpm、4、30 min，除去上清液，加 10 ml RPMI-1640，輕敲離心管底，盡量將沈澱結塊物打散，離心 4000 rpm、4、30 min，除去上清液，加 3 ml FBS，打散螢光小球，離心 4000 rpm、4、10 min，除去上清液，加 5 ml RPMI-1640，離心 4000 rpm、4、30 min，除去上清液，加 5 ml RPMI-1640，離心 4000 rpm、4、30 min，除去上清液，敲散沈澱在試管底部的螢光小球，加 6 ml RPMI，製備完之螢光小球儲存於 4

。

三、肺泡巨噬細胞吞噬螢光小球

材料：

製備完好之螢光小球、0.1% FBS/1×PBS、經滅菌及過濾的一倍磷酸鹽緩

衝溶 (1X PBS)、4 % 副福馬林 (4 % paraformaldehyde= 4g paraformaldehyde/ 100 ml PBS)、70 % 酒精 (alcohol)、RPMI-1640、1000 μ l、200 μ l 吸管唧筒 (pipette pump)、吸管尖 (blue tip)、5 ml 試管 (流式細胞儀 Falcon ©)、試管蓋、試管架、電動吸取器 (electrical Pipette)、冰桶、冰、鋁箔紙、37 °C 培養箱 (incubator)、離心機、流式細胞儀、計時器、試管震盪器 (vortex mixer)。

步驟：

開 37 °C 培養箱，使其達到 250 rpm，將 0.1 % FBS、RPMI-1640、製備好的螢光小球水浴回溫到 37 °C，水浴槽加蓋使螢光小球避光，肺泡灌洗液的 cell count 完，依比例將 cell 分裝到 falcon 中，一組分裝 2 管；(1) 4 °C 完全不加 beads (2) 加 37 °C beads，不加 beads 的細胞靜置於冰上即可，要加 beads 的細胞離心 1200 rpm、4 °C、10 min，直接在離心機旁倒掉上清液，輕輕打散細胞，falcon 包上鋁箔紙，關燈，加入 50 μ l 的 0.1 % FBS，加入 50 μ l 的 RPMI-1640，螢光小球混和均勻，加入 50 μ l 的螢光小球，立即置入 37 °C，250 rpm 培養箱中，120 min，另一組輕輕搖晃後置於冰上蓋上蓋子避光，2 hr 後加入 1 ml 4 °C、4 % paraformaldehyde，充分混和，靜置冰上，蓋上蓋子避光，10 min，離心 1200 rpm、4 °C、10 min，除去上清液，避光，將細胞輕輕打散，加 2 ml PBS，輕輕搖晃，離心 1200 rpm、4 °C、10 min，除去上清液，避光，將細胞輕輕打散，加 1 ml PBS，輕輕搖晃，上機，使用

流式細胞儀 FL-1 即可，FITC 必須由 495 nm 藍光激發，並激發出 525 nm，由細胞儀偵測接收。

四、肺泡巨噬細胞吞噬螢光 *E. coli*

材料：

胎兒牛血清 (fetal bovine serum; FBS)、經滅菌及過濾的一倍磷酸鹽緩衝液 (1X PBS)、70% 酒精 (alcohol)、PHAGOTEST[®] Kit：(1) *E. coli*-FITC (2) Quenching solution (3) Lysing solution (4) Washing solution (5) DNA staining solution (Orpegen Pharma)、1000 μ l、200 μ l、20 μ l 吸管唧筒 (pipette pump)、吸管尖 (blue & yellow tip)、5 ml 試管 (流式細胞儀 Falcon ©)、試管蓋、試管架、冰桶、冰、鋁箔紙、37 $^{\circ}$ C 水浴槽、離心機、流式細胞儀 (FACSCaliburTM)、計時器、試管震盪器 (vortex mixer)。

步驟：

開 37 $^{\circ}$ C 水浴槽，使其達到 37 $^{\circ}$ C，將 FBS 和 Lysing solution 放在 37 $^{\circ}$ C 水浴槽，使其回溫到 25 $^{\circ}$ C，肺泡灌洗液的 cell count 完，依比例將 cell 分裝到 falcon 中，一組分裝 3 管：(1) 完全不加 *E. coli* (2) 4 $\times 10^5$ 加 *E. coli* (2×10^5 cells/管) (3) 37 $^{\circ}$ C 加 *E. coli* (2×10^5 cells/管)，細胞離心 1100 rpm, 4 min, 5

min，直接在離心機旁倒掉上清液，輕輕打散細胞，falcon 包上鋁箔紙，關燈，在冰上，加入 100 μ l PBS，在冰上，加入 20 μ l FBS，在冰上，加入 20 μ l *E. coli*，低速 vortex 2-3 秒鐘，放入 37 $^{\circ}$ C 水浴槽，incubate 2 hr，水浴槽加蓋避光，另一組置於冰上蓋上蓋子避光，2 hr 後在冰上加入 100 μ l Quenching solution，低速 vortex，在冰上加入 3 ml Washing solution，vortex，離心 1100 rpm、5 min、4 $^{\circ}$ C，除去上清液，避光，將細胞輕輕打散，在冰上加入 1.5 ml Washing solution，低速 vortex，離心 1100rpm、5 min、4 $^{\circ}$ C，除去上清液，避光，將細胞輕輕打散，在室溫下，加入已回溫至室溫的 2 ml Lysing solution，低速 vortex，室溫下，靜置 20 min，避光，離心 1100rpm、5 min、4 $^{\circ}$ C，除去上清液，避光，將細胞輕輕打散，在冰上加入 3 ml Washing solution，低速 vortex，離心 1100rpm、5 min、4 $^{\circ}$ C，除去上清液，避光，將細胞輕輕打散，在冰上加入 200 μ l DNA staining solution，低速 vortex，靜置冰上 10 min，蓋上蓋子避光，加 0.5 ml PBS，低速 vortex，60 min 內上機，FITC 必須由 488 nm 藍光激發。

肆、小鼠肺泡巨噬細胞清除 *Klebsiella pneumoniae* 的能力

一、定量 *Klebsiella pneumoniae* 菌液濃度

A.) 稀釋菌液及培養

材料：

酒精燈、70% 噴霧酒精、擦手紙、裝 70% 酒精的小燒杯、微量離心管 (1.5 ml micro centrifuge tube)、微量離心管放置架 (ependorff rack)、15 ml 無菌培養血清瓶、試管架、無菌 Tryptic Soy Broth (TSB broth; Becton Dickinson)、無菌 LB Agar, Miller plate (Becton Dickinson)、電動吸取器 (electrical Pipette)、無菌吸管 (5 ml pipettes)、無菌的一倍磷酸鹽緩衝液 (1X PBS) 1000 μ l 200 μ l、20 μ l 吸管唧筒 (pipette pump)、吸管尖 (blue & yellow tip)、白金 loop、三角玻璃棒、廢物桶、筆、無菌通風櫥、37 $^{\circ}$ C 培養箱 (incubator), *Klebsiella pneumoniae* (來源：中國醫藥學院附設醫院之原發性肺炎臨床病人分離之細菌)。

步驟：

以下步驟必須在無菌通風櫥中操作，用 loop 取 1 個 colony 的 *K. pneumoniae*，將 *K. pneumoniae* 種入 5 ml TSB broth, mix，放入 37 $^{\circ}$ C 培養箱，shake，overnight (18 hr) 培養，18 hr 後，取 20 μ l 含 *K. pneumoniae* 的 broth，種入 5 ml TSB broth, mix，放入 37 $^{\circ}$ C 培養箱，shake，overnight 18 hr 培養，18 hr 後，作 *K. pneumoniae* 菌液的 1:10 連續稀釋，準備 10 支標記號碼的微量離心管，各加入 0.9 ml 無菌 PBS，取 100 μ l 含 *K. pneumoniae* 的 broth 置入 0.9 ml 無菌 PBS，mix，取第一管稀釋菌液 100 μ l，置入下一管 0.9

ml 無菌 PBS , mix , 重複上述步驟 , 共 10 次 1 : 10 連續稀釋 , 準備 10 盤標記號碼的 LB agar plate , 塗抹稀釋菌液前 , 先在 LB agar plate 上滴加 30 μ l 無菌 PBS , 以防止菌液尚未塗勻就先乾掉 , 每管稀釋菌液 , 均勻 mix , 各取 30 μ l 滴加在 LB agar plate 上 , 以三角玻璃棒均勻塗抹 , 三角玻璃棒泡在 70 % 酒精 , 取出後陰乾 , 才能再塗抹下一盤 , 將塗抹好稀釋菌液的 LB agar plate , 放入 37 $^{\circ}$ C 培養箱 , overnight (18 hr) 培養 , 18 hr 後 , 計算並記錄 plates 上的 colony 數目 , 剩下的各管稀釋菌液用來測量 O.D. 值。

B.) 稀釋菌液的 O.D 值

材料 :

10 倍連續稀釋的 *K. pneumoniae* 菌液 , 光譜測定儀 (Spectrophotometer Du[®] 640; Beckman Coulter)、石英管 (cuvette; Hellma) , 沖洗用 70 % 酒精 (alcohol)、拭淨紙 (wipes)、廢物桶、廢液桶、試管架、無菌一倍磷酸鹽緩衝液 (1X PBS)、1000 μ l 吸管唧筒 (pipette pump)、吸管尖(blue tips)。

步驟 :

打開光譜測定儀 , 設定波長為 600 nm , 暖機 30 min , 取 600 μ l 無菌 PBS 作為 blank , 以 70 % 酒精沖洗石英管 , 拭淨紙擦乾 , 將稀釋菌液均勻 mix , 各取 600 μ l , 測量吸光值 , 紀錄 , 隔日比對相同稀釋菌液濃度在 LB Agar 上

生長的菌落數目。

結果：

10^{-5} 稀釋菌液的 colony 數目 100

10^{-3} 稀釋菌液濃度應為： 10^4 CFU / 30 μ l

以 10^{-3} 稀釋菌液之吸光值 = 0.0045 表示菌液濃度為

： 10^4 CFU / 30 μ l

二、小鼠肺部感染 *Klebsiella pneumoniae*

材料：

C57BL/6J 雄性小鼠、乙醚 (ethyl ether)、麻醉用玻璃鐘罩、解剖板、無菌乾棉球、膠帶、縫線、縫針、持針器、解剖盤、麻醉小罩杯、優碘、剃毛機、試管震盪器 (vortex mixer)、手術燈、鈍頭鑷子、尖頭鑷子、尖頭小剪刀、圓頭剪刀、70% 噴頭酒精、無菌生理食鹽水(normal saline)、50 μ l 微量注射針筒 (50 μ l syringe)、離心管(15 ml & 50 ml centrifuge tube)、微量離心管 (1.5 ml micro - centrifuge tube) 、高速離心管中、PE 管 (polyethylene tube; PE - 50) , 21 號針頭 (21-gauge needle)、針筒(1 ml syringe)、26 號針頭的 1 ml 無菌注射針 , 冰塊 , 冰桶、 10^4 CFU/30 μ l 濃度之 *K. pneumoniae*。

步驟：

器皿 70% 酒精消毒，以無菌 normal saline 沖洗殘餘酒精，器械泡於無菌 normal saline 中，微量針以無菌 normal saline 沖洗數次，再用 10^4 CFU/30 μ l 濃度之 *K. pneumoniae* 菌液沖洗一次，*K. pneumoniae* 菌液 vortex 均勻，以微量針抽好 30 μ l *K. pneumoniae*，乙醚麻醉小鼠、不可麻死，用膠帶將小鼠四肢固定在解剖板上，將小鼠門牙以線綁住，拉直小鼠頭部再用膠帶固定，剃掉小鼠頸部的毛後，以優碘消毒小鼠頸部皮膚，將小鼠頸部皮剪開，用鑷子將氣管上方的肉和胸腺小心撥開，將氣管上的膜拉高，剪開膜露出氣管，暴露出氣管後，用鑷子將氣管撐住，以 21 號針頭注射入 30 μ l *K. pneumoniae*，共 10^4 隻，讓小鼠直立 2 min.，將小鼠頸部的皮縫合，放回飼養盒，使其自由進食進水，飼養 20 小時。

三、感染後小鼠肺中及血中 *Klebsiella pneumoniae* 含量

A.) 老鼠左肺、肺泡巨噬細胞及血液檢體的取得

材料：

感染 *K. pneumoniae* 20 hr. 後之 C57BL/6J 雄性小鼠、乙醚 (ethyl ether)、麻醉用玻璃鐘罩、解剖板、無菌乾棉球、膠帶、縫線、止血鉗、解剖盤、麻醉小罩杯、優碘、鈍頭鑷子、尖頭鑷子、尖頭小剪刀、圓頭剪刀、70% 噴頭酒精、無菌生理食鹽水 (normal saline)、無菌一倍磷酸鹽緩衝溶液(1X

PBS)、含肝制凝素 (heparin) 的抗凝管、離心管(15 ml & 50 ml centrifuge tube)、微量離心管 (1.5 ml micro - centrifuge tube)、PE 管 (polyethylene tube; PE - 50) , 21 號針頭 (21-gauge needle)、針筒(1 ml syringe)、26 號針頭的 1 ml 無菌注射針 , 冰塊 , 冰桶。

步驟 :

PBS 置於冰上 , 以無菌 normal saline 製備稀釋的 heparin 於即將存血的微量離心管中 , 器皿用 70 % 酒精消毒、以無菌 normal saline 沖洗殘餘酒精 , 器械泡於無菌 normal saline 中 , 小鼠感染後 20 小時 , 乙醚麻醉小鼠 , 以下手術部分皆在無菌通風櫥中操作 , 將小鼠胸腔打開 , 以 1 c.c. 空氣插入心臟 , 採集 0.2 c.c. 全血 , 將全血靜置已含 0.1 c.c. 稀釋 heparin 的微量離心管中 , 全血靜置於冰上 , 將胸骨完全剪開 , 以止血鉗將肋骨往左右扳開固定 , 頸部皮用 2 隻尖鑷子剝開 , 找到甲狀腺、氣管 , 小心仔細的扯開氣管上的肉 , 將氣管上的膜拉高 , 剪開露出氣管 , 暴露出氣管後 , 用鑷子將氣管撐住 , 鑷子夾線 , 從氣管下方穿線 , 將小鼠心臟拉高剪去 , 將其左肺以鈍端鑷子拉出後 , 可看到左支氣管 , 用止血鉗把左肺拉出固定住 , 左支氣管用縫線綁兩個死結 , 剪下左肺 , 放入含有 3 ml PBS 的高速離心管中 , 將左肺靜置於冰上 , 用尖剪刀在鑷子下方 (較靠近頭的地方) 替氣管剪一小洞 , 穿入 PE tube , PE tube 綁線固定 , 用膠帶在桌上固定 PE tube , 插上抽好 0.6 c.c. PBS 的針筒 , 慢慢打

入 PBS ，看到右肺脹起來，再慢慢吸回 PBS ，重複灌洗 0.6 c.c. PBS ，最後總共灌出 3 ml 灌洗液 (BAL) ，肺泡灌洗液靜置於冰上。

B.) 老鼠檢體處理

材料：

均質機、滅菌的均質棒、DEPC 水、氯仿 (Phenol Chloroform IsoAmul alcohol)、70 % 酒精 (alcohol)、裝冰塊的小燒杯、廢液桶、離心機、15 ml 離心管、玻片 (micro slides glass; Daco)、玻片架、滴管 (droper)、cytospin 用固定架和 cytospin 用漏斗 (Shadon)、打洞濾紙 (190005 Filter Cards; Shandon)、cytospin 離心機 (cytospin 3; Shadon)、小鼠肺泡灌洗液、左肺、全血、微量離心機 (Microfuge centrifuge; Beckman)。

步驟：

將小鼠的肺泡灌洗液拿去做 cytospin ，玻片陰乾以甲醇固定，作 Giemsa 染色，將左肺以均質機在冰上均質，均質液置於冰上，清洗均質棒，15 ml 離心管內裝 DEPC 水、氯仿、70 % 酒精，順序為：DEPC 水兩次、氯仿一次、DEPC 水一次、70 % 酒精一次、等酒精乾燥。清洗完均製棒後才能均質下一管左肺；0.2 ml 全血離心 2500 rpm ，15 min. ，離出血清後靜置於冰上。

C.) 老鼠肺中及血液中 *Klebsiella pneumoniae* 含量

材料：

酒精燈、70% 噴霧酒精 擦手紙、裝 70% 酒精的小燒杯、微量離心管 (1.5 ml micro - centrifuge tube)、微量離心管放置架 (ependorff rack)、15 ml 無菌培養血清瓶、三角玻璃棒、無菌 PBS、無菌 LB agar plate、1000p、200p、20p 吸管唧筒 (pipette pump)、吸管尖 (blue & yellow tip)、無菌 blue、yellow tips、廢物桶、筆、無菌通風櫥、37 培養箱 (incubator)、老鼠左肺均質液、已分離出血清的全血。

步驟：

取老鼠之肺均質液及血清各 100 μ l 用無菌 PBS 作 1:10 的連續稀釋，各稀釋到 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 倍，取均質液及血清還有各倍數稀釋液各 20 μ l 均勻塗抹於標記好的 LB agar 上，再將血清與血球混合，形成全血，取全血 20 μ l 均勻塗抹於 LB agar 上，將塗抹好的 LB agar 靜置於 37 培養箱中，培養 18 小時，18 小時後計算 LB agar 上的菌落數。

伍、統計方法

慢性糖尿病組與其控制組；急性糖尿病組與其控制組的血糖值和體重紀錄、急性糖尿病組與其控制組的 AMs 吞噬能力實驗使用成對測試分析 (Paired Student-t test; Excel©Window 2000; t 檢定; 成對母體平均數差異檢定)。慢性糖尿病組與其控制組；急性糖尿病組與其控制組的 AM 和殺菌能力實驗取 $\log \text{CFU}+1$ 之後，使用成對測試分析。慢性糖尿病組與其控制組的血糖值和體重紀錄、急性糖尿病組與慢性糖尿病組的比較，皆使用非配對測試 (Unpaired Student-t test; Excel©Window 2000; t 檢定; 兩個母體平均數差異檢定，假設變異數不相等)

第三章 結果

壹、 糖尿病小鼠之生理

一、 糖尿病小鼠之血糖值

6 週齡之 C57BL/6J 品系的小鼠，控制組的小鼠注射檸檬酸鹽緩衝溶液 (citrate buffer)，實驗組的小鼠則以連續注射 4 天以上的 STZ，破壞胰臟蘭氏小島之 β 細胞後，測量小鼠之全血中葡萄糖 (glucose) 的濃度，若小鼠之血糖值 $> 300 \text{ mg/dl}$ ，則是為有意義之成功糖尿病誘發，在小鼠第 8 週齡時，也就是糖尿病誘發後兩星期，控制組的小鼠，其血糖平均值為 $142 \pm 3.3 \text{ mg/dl}$ ，實驗組的小鼠血糖平均值為 $361.2 \pm 3.3 \text{ mg/dl}$ ，且實驗組小鼠血糖值與控制組小鼠血糖值比較，兩組有明顯統計學上的差異，其 $p < 0.05$ ，因此，結果顯示本實驗成功的誘發了小鼠的糖尿病，在小鼠成功誘發糖尿病之後，持續飼養小鼠到 6 個月大，使其變成慢性糖尿病之小鼠，在將其犧牲之前一週，也就是 29 週齡時，為確認小鼠仍然有糖尿病，於是再次檢測小鼠的血糖值，則控制組的小鼠血糖平均值為 $208.8 \pm 19.8 \text{ mg/dl}$ ，實驗組的小鼠血糖平均值為 518.6 ± 25.8 ，實驗組小鼠血糖值與控制組小鼠血糖值比較，兩組有明顯統計學上的差異，其 $p < 0.05$ ，無疑的，實驗組小鼠血糖值仍然維持 $> 300 \text{ mg/dl}$ 的濃度，而且與糖尿病誘發初期也就是第 8 週齡時相比較，實驗組

小鼠血糖值有升高的情形，而且 $p < 0.05$ ，有統計學上的差異，在控制組小鼠方面，29 週齡時，其血糖平均值與第 8 週齡時相比較有明顯上升的情形， $p < 0.05$ ，但是雖然控制組小鼠血糖亦有上升，但是其血糖濃度仍然未達 300 mg/dl，尚未構成罹患糖尿病的條件，所以控制組之小鼠依然是正常沒有糖尿病之小鼠（圖三）。第 8 週控制組小鼠 $n = 42$ ，實驗組小鼠 $n = 46$ ，第 29 週控制組小鼠 $n = 10$ ，實驗組小鼠 $n = 27$ ，以非配對測試比較，結果以 Mean \pm SEM 表示。至於急性糖尿病組的小鼠，其誘發方式為之前的控制組小鼠在第 30 週齡時分離出一組，一樣給予 4 天以上連續注射 STZ 誘發糖尿病，誘發後第 18 ~ 20 天，有就是第 33 週齡時犧牲，此組就當作急性糖尿病小鼠，急性糖尿病小鼠的血糖平均值在第 32 週齡時為 320.8 ± 5.7 mg/dl，血糖值 > 300 mg/dl，證明小鼠被成功的誘發糖尿病，而其控制組的血糖值則為 185.3 ± 9.9 mg/dl，急性糖尿病組與控制組血糖值比較 $p < 0.05$ ，有明顯統計學上的差異（圖四）。第 32 週控制組小鼠 $n = 4$ ，急性糖尿病組小鼠 $n = 4$ ，以配對測試比較，結果以 Mean \pm SEM 表示。若將急性糖尿病組小鼠與第 8 週慢性糖尿病小鼠血糖比較，急性糖尿病組小鼠血糖值較高，其 $p < 0.05$ ，若將急性糖尿病組小鼠與第 29 週慢性糖尿病小鼠血糖比較，29 週慢性糖尿病組小鼠血糖值高出許多，其 $p < 0.05$ ，除此之外，無論慢性或急性之糖尿病小鼠，只要經過 STZ 誘發糖尿病，與正常小鼠相較，都有出現多吃、多喝、多尿之三多症狀。

二、 糖尿病小鼠之體重

從誘發小鼠慢性糖尿病開始，比較每個月糖尿病小鼠與控制組小鼠之體重變化，其 Mean \pm SEM 值表示於（表一），結果顯示自小鼠成功誘發糖尿病後一個月開始，糖尿病組之小鼠體重皆比正常小鼠輕，且 $p < 0.05$ ，每一個月兩組別的小鼠體重比較皆有統計學上的差異（圖五）。在誘發急性糖尿病小鼠方面，在第 30 週齡時，急性糖尿病組之體重平均值為 28.33 ± 1.12 g，控制組小鼠之體重平均值為 28.17 ± 1.19 g 及，兩組體重並無統計學上的差異，在糖尿病誘發後第 18 天，也就是小鼠第 33 週齡時，急性糖尿病組之體重平均值為 24.5 ± 1.32 g，控制組小鼠之體重平均值為 27.5 ± 1.55 g，兩組之體重比較， $p = 0.067$ 。尚未達到統計學的差異（圖六）。第 33 週控制組小鼠 $n = 4$ ，急性糖尿病組小鼠 $n = 4$ ，以配對測試比較，結果以 Mean \pm SEM 表示。

貳、糖尿病小鼠之肺泡巨噬細胞

一、 肺泡巨噬細胞之型態和比例

將支氣管灌流液 (BAL) 所取得之細胞，以 Giemsa stain 染色，可看到

灌流液中細胞之種類及比例，Giemsa stain 可將肺泡巨噬細胞質染成紅色，細胞核染成深藍色，肺泡巨噬細胞之核質比約為 1 : 3，有時可在細胞質看見空泡，染色結果顯示無論是慢性糖尿病小鼠、急性糖尿病小鼠或正常組小鼠，其肺泡巨噬細胞在灌流液中之比例皆 > 92 %。

二、肺泡巨噬細胞之數目

從支氣管灌流液 (BAL) 所取得之肺泡巨噬細胞數目，控制組小鼠有 $6.8 \pm 0.58 \times 10^5$ cells，慢性糖尿病小鼠有 $8.58 \pm 0.84 \times 10^5$ cells，慢性糖尿病小鼠與其控制組細胞數目比較有統計學的差異， $P < 0.05$ (圖七)。第 33 週控制組小鼠 $n = 9$ ，慢性糖尿病組小鼠 $n = 9$ ，以配對測試比較，結果以 Mean \pm SEM 表示。急性糖尿病小鼠灌流液細胞數目則為 $13.95 \pm 1.05 \times 10^5$ cells，其控制組細胞數目則為 $6.7 \pm 1.795 \times 10^5$ cells，但是兩組相比較，其 $p = 0.15$ ，急性糖尿病小鼠之灌流液細胞數和其控制組的細胞數目沒有差異，(圖七)，33 週控制組小鼠 $n = 3$ ，急性糖尿病組小鼠 $n = 3$ ，以配對測試比較，結果以 Mean \pm SEM 表示。如果拿慢性糖尿病小鼠之灌流液細胞數和急性糖尿病組的細胞數目相比較，急性糖尿病組的細胞數目要比慢性糖尿病小鼠多， $p < 0.05$ 。33 週慢性糖尿病小鼠 $n = 9$ ，急性糖尿病組小鼠 $n = 3$ ，以非配對測試比較，結果以 Mean \pm SEM 表示。

三、肺泡巨噬細胞之吞噬能力

(1) 以小鼠肺泡巨噬細胞在體外吞噬螢光小球的實驗，觀察糖尿病小鼠的肺泡巨噬細胞對於非生物性物質 (nonbiological) 的吞噬能力，結果分三方面來評估鼠肺泡巨噬細胞吞噬能力，第一：有吞噬螢光小球的肺泡巨噬細胞佔全部肺泡巨噬細胞數目的百分比 (gated %)，第二：有吞噬螢光小球的肺泡巨噬細胞，其細胞所吞噬的螢光強度 (FL-Mean)，相當於每一個有吞噬作用發生的肺泡巨噬細胞，其平均所吞的螢光小球數量，第三：參照 Gina 等人的方法 (Gina et al, 2000)，以經過計算的吞噬指標 (Phagocytosis Index; $PI = \text{mean} \times \text{gated \%}$)，來表示肺泡巨噬細胞的吞噬能力。此外，為了考量小鼠巨噬細胞本身的背景值，每隻老鼠還作了一項肺泡巨噬細胞未加螢光小球的 no beads 組，慢性糖尿病小鼠之肺泡巨噬細胞有吞噬能力的百分比為 $6.67 \pm 3.27\%$ ，其控制組小鼠之肺泡巨噬細胞有吞噬能力的百分比為 $4.31 \pm 2.64\%$ ，結果顯示慢性糖尿病小鼠有吞噬能力的肺泡巨噬細胞數量比正常小鼠多， $p < 0.05$ (圖八)，第 33 週齡慢性糖尿病小鼠 $n = 3$ ；控制組小鼠 $n = 3$ ，以配對測試比較，結果以 $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ 表示。而控制組小鼠的 no beads 組為 $0.81 \pm 0.59\%$ ，慢性糖尿病小鼠 no beads 組為 $0.81 \pm 0.18\%$ ，控制組和慢性糖尿病小鼠的 no beads 組，沒有統

計差異， $p = 0.19$ ，並且不論控制組和慢性糖尿病組的有 beads 組和其 no beads 組相較，彼此間也都沒有統計差異。慢性糖尿病小鼠之肺泡巨噬細胞其細胞所吞嚥的螢光強度 (FL-Mean) 為 376.6 ± 221.1 ，控制組之肺泡巨噬細胞所吞嚥的螢光強度 369 ± 210.1 ，以慢性糖尿病小鼠和控制組之肺泡巨噬細胞所吞嚥的螢光強度比較， $p = 0.42$ ，所以兩組吞嚥的螢光強度並沒有差異 (圖九)，第 33 週齡慢性糖尿病小鼠 $n = 3$ ；控制組小鼠 $n = 3$ ，以配對測試比較，結果以 Mean \pm SEM 表示。而控制小鼠的 no beads 組螢光強度為 141.1 ± 56.8 ，慢性糖尿病小鼠 no beads 組為 165.3 ± 69.5 ，控制組和慢性糖尿病小鼠的 no beads 組螢光強度，沒有統計差異， $p = 0.21$ ，並且不論控制組和慢性糖尿病組的有 beads 組和其 no beads 組相較，彼此間也都沒有統計差異。經過運算後吞嚥指標 (PI) 結果，慢性糖尿病小鼠之肺泡巨噬細胞吞嚥指標 (PI) 為 36.32 ± 32.01 ，控制組之肺泡巨噬細胞的吞嚥指標 (PI) 為 25.12 ± 23.53 ，以慢性糖尿病小鼠和控制組之肺泡巨噬細胞的吞嚥指標 (PI) 比較， $p = 0.15$ ，所以兩組肺泡巨噬細胞吞嚥指標並沒有差異，而控制組小鼠的 no beads 組為 1.365 ± 0.99 ，慢性糖尿病小鼠 no beads 組為 1.53 ± 0.75 ，控制組和慢性糖尿病小鼠的 no beads 組，沒有統計差異， $p = 0.372$ ，並且不論控制組和慢性糖尿病組的有 beads 組和其 no beads 組相較，彼此間都沒有統計差異，第

33 週齡慢性糖尿病小鼠 $n = 3$ ；控制組小鼠 $n = 3$ ，以配對測試比較，結果以 $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ 表示。

(2) 以小鼠肺泡巨噬細胞在體外吞噬螢光 *E. coli* 的實驗，觀察糖尿病小鼠的肺泡巨噬細胞對於生物性物質 (biological)，尤其是細菌的 LPS 的吞噬能力，結果也是由三方面來評估鼠肺泡巨噬細胞吞噬能力：gated%，FL-Mean 和 PI，此外，此項實驗除了考量小鼠巨噬細胞本身的背景值還考慮了螢光 *E. coli* 的干擾值，每隻老鼠還作了一項肺泡巨噬細胞也加了螢光 *E. coli*，然後將細胞和螢光 *E. coli* 靜置於 4 的組別，並將 37 組的 AMs 表現的 gated%，FL-Mean 和 PI 數值扣除掉 4 組的 AMs 表現的 gated%，FL-Mean 和 PI 數值，結果顯示慢性糖尿病小鼠之肺泡巨噬細胞有吞噬能力的百分比為 $3.13 \pm 1.51\%$ ，其控制組之肺泡巨噬細胞有吞噬能力的百分比為 $3.43 \pm 1.99\%$ ，結果顯示慢性糖尿病小鼠有吞噬能力的肺泡巨噬細胞數量與正常小鼠一樣多， $p = 0.22$ (圖十)。第 33 週齡慢性糖尿病小鼠 $n = 3$ ；控制組小鼠 $n = 3$ ，以配對測試比較，結果以 $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ 表示。而控制組小鼠的 4 *E. coli* 組為 $3.31 \pm 1.97\%$ ，慢性糖尿病小鼠 4 *E. coli* 組為 $6.86 \pm 2.03\%$ ，控制組和慢性糖尿病小鼠的 4 *E. coli* 組，慢性糖尿病小鼠的背景值要比控制組小鼠來得高， $p < 0.05$ ，並且慢性糖尿病組的 37 *E. coli* 組和其 4 *E. coli* 組相較，37 *E. coli* 組

的有吞噬增加的情形， $p < 0.05$ 。以慢性糖尿病小鼠和控制組之肺泡巨噬細胞所吞噬的螢光強度比較， $p = 0.16$ ，所以兩組吞噬的螢光強度並沒有差異，而控制組小鼠的 37 *E. coli* 組 AMs 表現 FL-Mean 為 10.4 ± 9.25 ，慢性糖尿病小鼠組則為 49.58 ± 23.93 (圖十一)。第 33 週齡慢性糖尿病小鼠 $n = 3$ ；控制組小鼠 $n = 3$ ，以配對測試比較，結果以 Mean \pm SEM 表示。控制組和慢性糖尿病小鼠的 4 *E. coli* 組，沒有統計差異， $p = 0.24$ ，並且不論控制組和慢性糖尿病組的 37 *E. coli* 組和其 4 *E. coli* 組相較，彼此間都沒有統計差異。經過運算後吞噬指標 (PI) 結果，慢性糖尿病小鼠之肺泡巨噬細胞吞噬指標 (PI) 為 1.28 ± 0.48 ，控制組之肺泡巨噬細胞 37 *E. coli* 組的吞噬指標 (PI) 為 0.73 ± 0.71 ，以慢性糖尿病小鼠和控制組之肺泡巨噬細胞 37 *E. coli* 組的吞噬指標 (PI) 比較， $p = 0.23$ ，所以兩組肺泡巨噬細胞吞噬指標慢性糖尿病小鼠與控制組沒有差異。第 33 週齡慢性糖尿病小鼠 $n = 3$ ；控制組小鼠 $n = 3$ ，以配對測試比較，結果以 Mean \pm SEM 表示。而控制小鼠的 4 *E. coli* 組 (PI) 為 2.34 ± 1.21 ，慢性糖尿病小鼠 4 *E. coli* 組為 5 ± 1.41 ，控制組和慢性糖尿病小鼠的 4 *E. coli* 組，也有統計差異， $p < 0.05$ ，慢性糖尿病小鼠的背景值要比控制組小鼠來得高，並且慢性糖尿病組的 37 *E. coli* 組和其 4 *E. coli* 組相較，37 *E. coli* 組的吞噬指標有上升的情形， $p < 0.05$ 。

急性糖尿病小鼠之肺泡巨噬細胞有吞噬能力的百分比為 $3.18 \pm 0.97\%$ ，其控制組之肺泡巨噬細胞有吞噬能力的百分比為 $8.61 \pm 3.33\%$ ，結果顯示急性糖尿病小鼠有吞噬能力的肺泡巨噬細胞數量與正常小鼠， $p = 0.078$ ，及慢性糖尿病小鼠間都沒有差異， $p = 0.49$ （圖十）。第 33 週齡急性糖尿病小鼠 $n = 3$ ；控制組小鼠 $n = 3$ ；以配對測試比較；慢性糖尿病小鼠 $n = 3$ ；以非配對測試比較；結果以 Mean \pm SEM 表示。而控制組小鼠的 4 *E. coli* 組為 $2.79 \pm 1.47\%$ ，急性糖尿病小鼠 4 *E. coli* 組為 $5.7 \pm 1.94\%$ ，控制組和急性糖尿病小鼠的 4 *E. coli* 組，急性糖尿病小鼠的背景值與控制組小鼠沒有差異， $p = 0.19$ ，並且急性糖尿病組的 37 *E. coli* 組和其 4 *E. coli* 組相較，37 *E. coli* 組的有吞噬增加的情形， $p < 0.05$ 。倘若以急性糖尿病小鼠和控制組之肺泡巨噬細胞所吞噬的螢光強度比較， $p = 0.34$ ，與慢性糖尿病小鼠相比， $p = 0.12$ ，所以急性糖尿病小鼠和不論和控制組或慢性糖尿病組相較吞噬的螢光強度相較並沒有差異，而控制組小鼠的 37 *E. coli* 組 AMs 表現 FL-Mean 為 12.67 ± 3.18 ，急性糖尿病小鼠組則為 5.16 ± 4.72 （圖十一）。第 33 週齡急性糖尿病小鼠 $n = 3$ ；控制組小鼠 $n = 3$ ，以配對測試比較，第 33 週齡慢性糖尿病小鼠 $n = 3$ ；以非配對測試比較，結果以 Mean \pm SEM 表示。控制組和急性糖尿病小鼠的 4 *E. coli* 組，沒有統計差異， $p = 0.2$ ，並且不論控制組和急性糖尿病組的

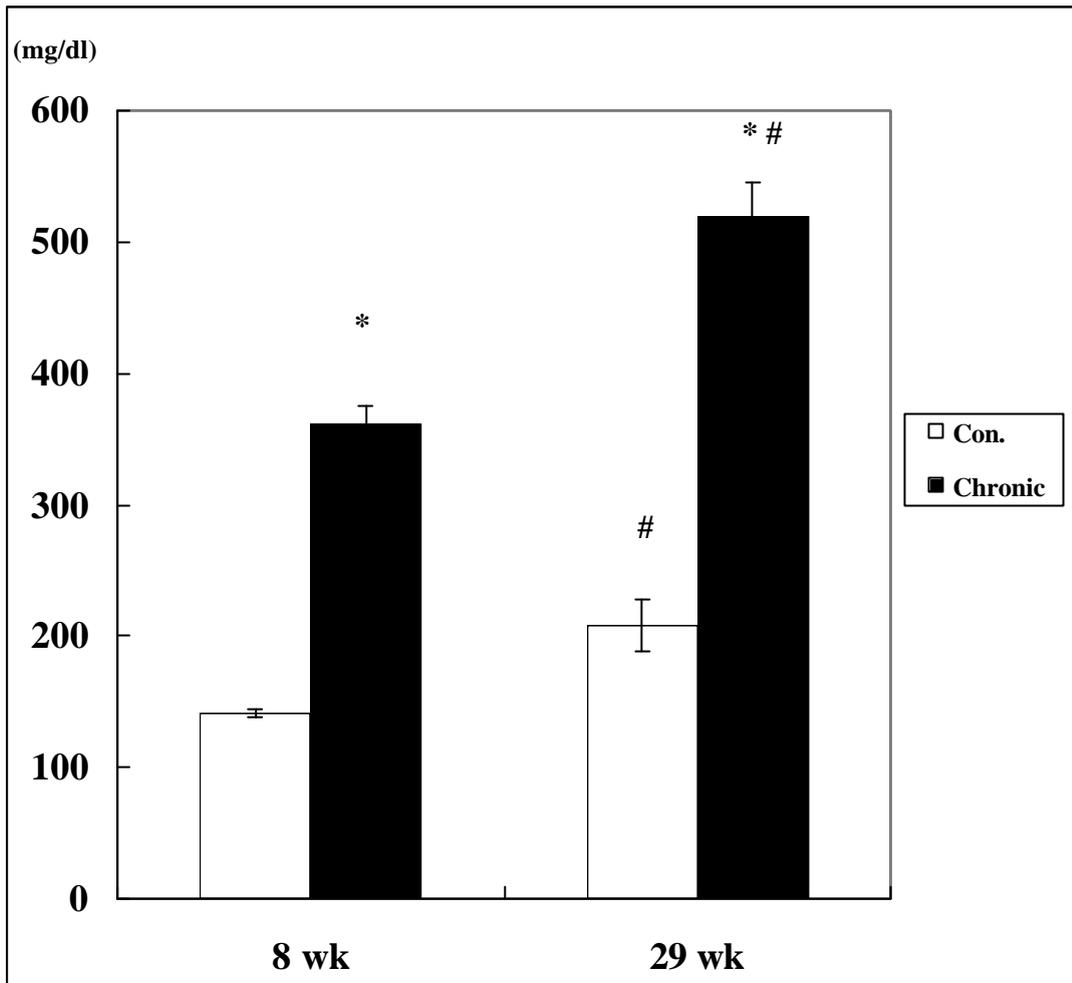
37 *E. coli* 組和其 4 *E. coli* 組相較，彼此間都沒有統計差異。經過運算後吞噬指標 (PI) 結果，急性糖尿病小鼠之肺泡巨噬細胞吞噬指標 (PI) 為 1.27 ± 0.77 ，控制組之肺泡巨噬細胞 37 *E. coli* 組的吞噬指標 (PI) 為 0.17 ± 0.15 ，以急性糖尿病小鼠和控制組之肺泡巨噬細胞 37 *E. coli* 組的吞噬指標 (PI) 比較， $p = 0.16$ ， $p =$ 所以兩組肺泡巨噬細胞吞噬指標急性糖尿病小鼠與控制組沒有差異。但值得注意的是與慢性糖尿病小鼠吞噬指標 (PI) 比較， $p = 0.054$ ，顯示吞噬指標慢性糖尿病小鼠比急性糖尿病小鼠要高。第 33 週齡急性糖尿病小鼠 $n = 3$ ；控制組小鼠 $n = 3$ ，以配對測試比較，第 33 週齡慢性糖尿病小鼠 $n = 3$ ，以非配對測試比較；結果以 Mean \pm SEM 表示。

四、肺泡巨噬細胞對於 *K. Pneumonia* 的殺菌能力

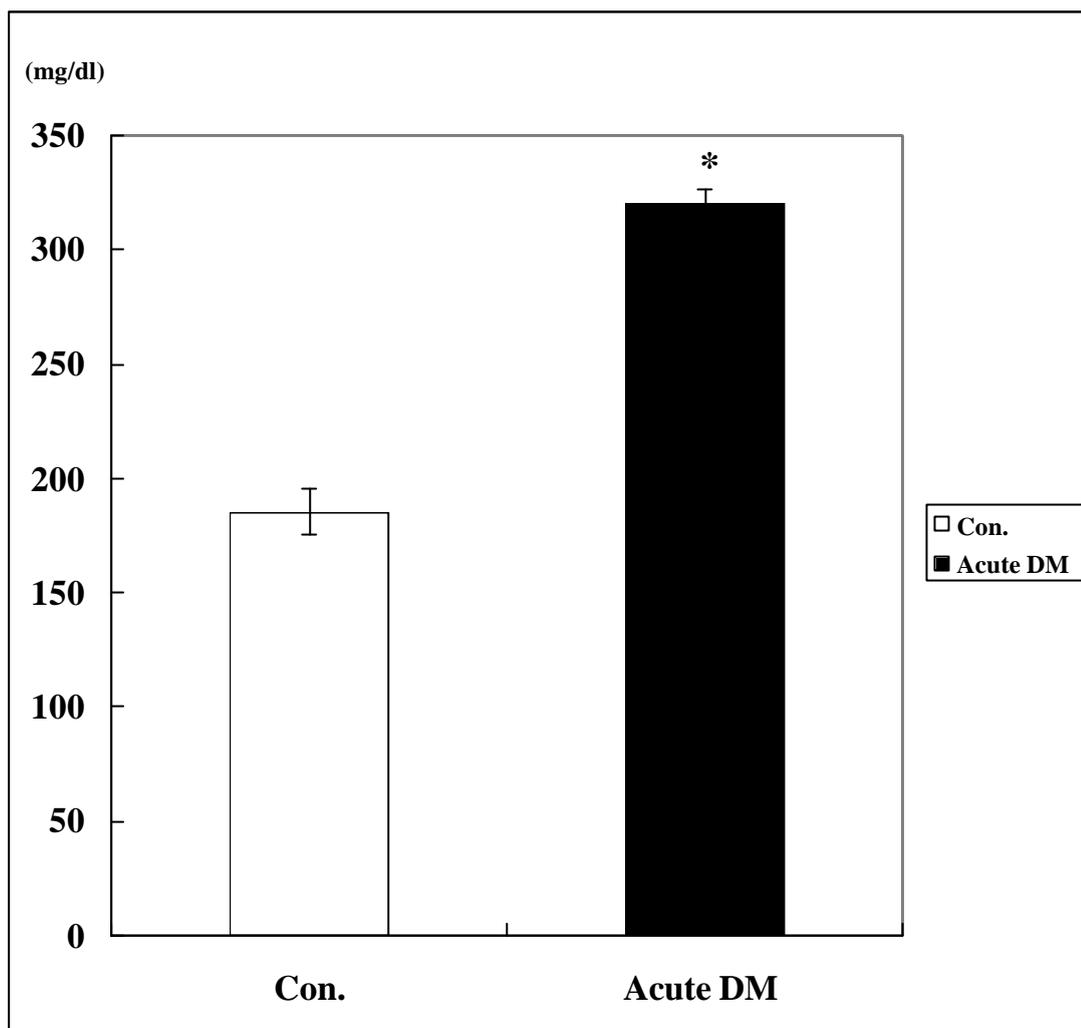
將慢性和急性糖尿病小鼠感染 10^4 CFU *K. pneumoniae* 20 小時後，計算小鼠左肺均質液和血漿中的 *K. pneumoniae* 菌落數 +1 之後，再取 log 值 (菌量 = $\log(\text{cfu}+1)$)，來觀察小鼠肺泡巨噬細胞對於 *K. pneumoniae* 之殺菌能力，慢性糖尿病小鼠左肺均質液的 *K. pneumoniae* 菌量平均值為 1.533 ± 0.28 ，其控制組小鼠為 0.32 ± 0.16 ，慢性糖尿病小鼠左肺的 *K. pneumoniae* 含菌量明顯比控制組小鼠多， $p < 0.05$ (圖十二)，第 33 週慢性糖尿病小鼠 $n = 3$ ，控制組小鼠

n = 3, 以配對測試比較, 結果以 Mean \pm SEM 表示。急性糖尿病小鼠左肺均質液的 *K. pneumoniae* 菌量平均值為 1.93 \pm 0.96, 其控制組小鼠為 0.77 \pm 0.54, 急性糖尿病小鼠左肺的 *K. pneumoniae* 含菌量與控制組比較沒有差異, $p = 0.11$, (圖十二)。第 33 週急性糖尿病小鼠 n = 3, 控制組小鼠 n = 3, 以配對測試比較, 結果以 Mean \pm SEM 表示。慢性糖尿病小鼠和急性糖尿病小鼠左肺的 *K. pneumoniae* 含菌量比較, $p = 0.37$, 結果一樣沒有統計學上的差異 (圖十二)。第 33 週慢性糖尿病小鼠 n = 3, 急性糖尿病小鼠 n = 3, 以非配對測試比較, 結果以 Mean \pm SEM 表示。慢性糖尿病小鼠血漿中的 *K. pneumoniae* 含菌量平均值為 0.66 \pm 0.66, 其控制組小鼠為 0, 慢性糖尿病小鼠血漿中的 *K. pneumoniae* 含菌量和控制組小鼠之間沒有統計差異, $p = 0.21$ (圖十三)。第 33 週慢性糖尿病小鼠 n = 3, 控制組小鼠 n = 3, 以配對測試比較, 結果以 Mean \pm SEM 表示。急性糖尿病小鼠血漿中的 *K. pneumoniae* 含菌量平均值為 0.6 \pm 0.6, 其控制組小鼠為 0.16 \pm 0.16, 急性糖尿病小鼠血漿中的含菌量和控制組小鼠之間也沒有統計差異, $p = 0.21$ (圖十三)。第 33 週急性糖尿病小鼠 n = 3, 控制組小鼠 n = 3, 以配對測試比較, 結果以 Mean \pm SEM 表示。慢性糖尿病小鼠和急性糖尿病小鼠血漿中的 *K. pneumoniae* 含菌量比較, $p = 0.47$, 結果仍然沒有統計學上的差異 (圖十三)。第 33 週慢性糖尿病小鼠 n =

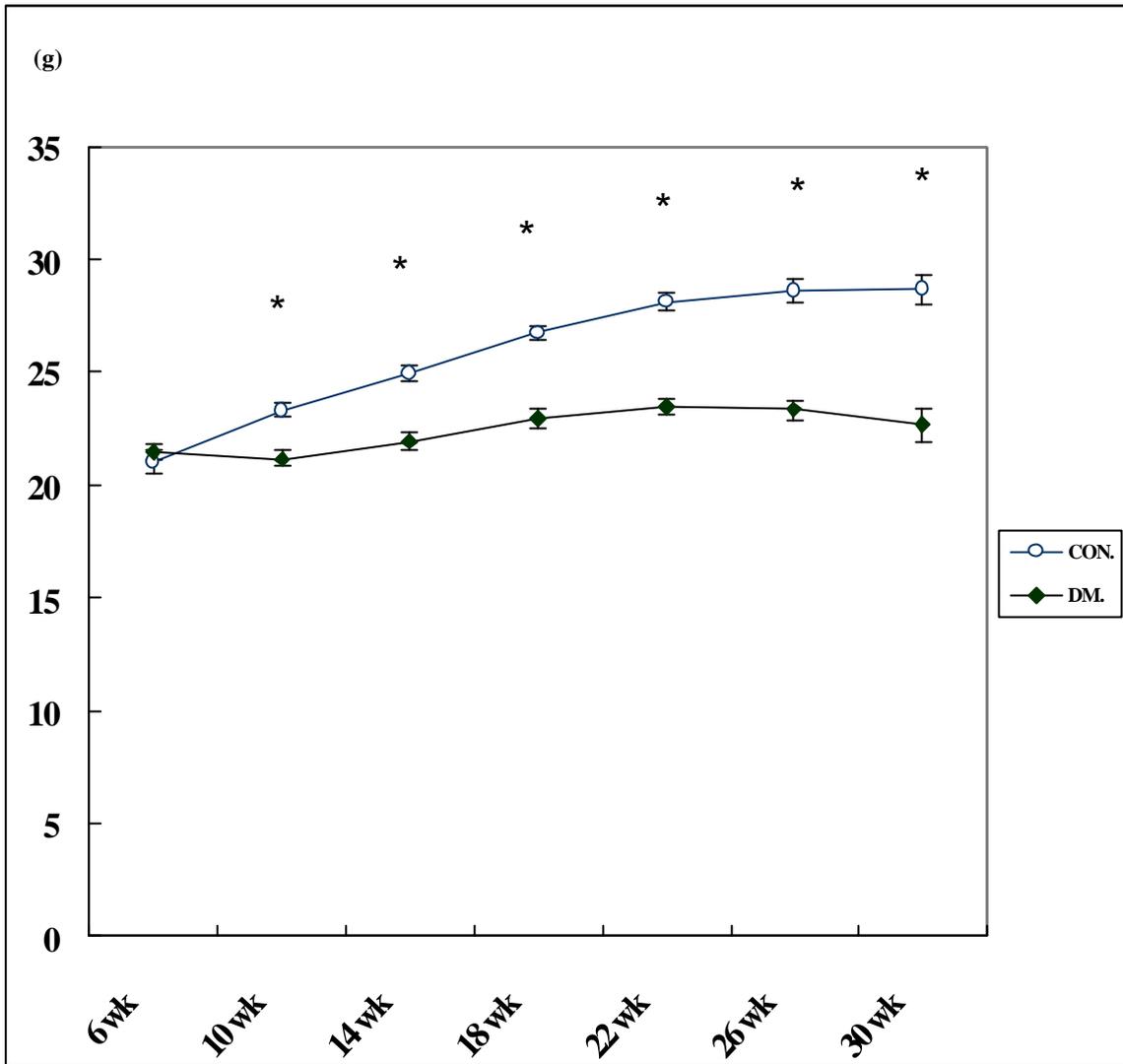
3, 急性糖尿病小鼠 $n = 3$, 以非配對測試比較, 結果以 $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ 表示。



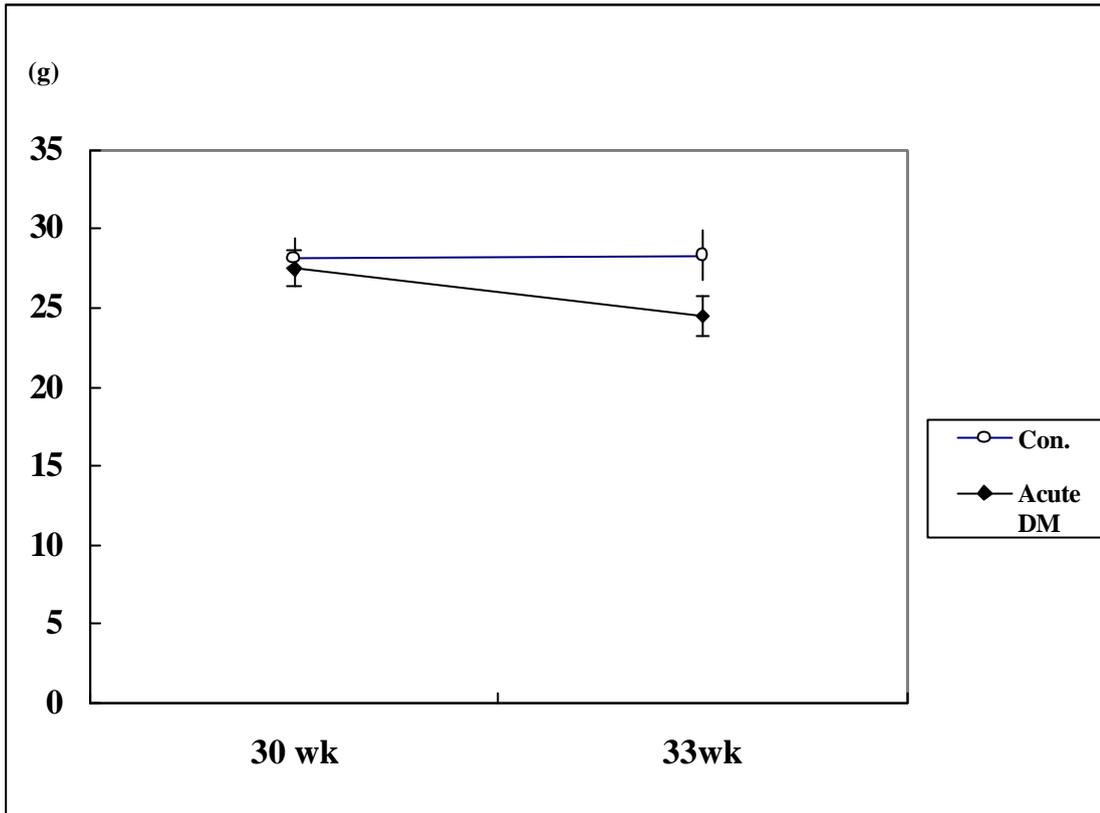
(圖三) 慢性糖尿病小鼠血糖值 (Fig. 3. Blood sugar value of chronic DM vs. control mice) : 第 8 週控制組小鼠 (6 週齡時依體重給予 0.1 ml/g , 6 天之 citrate buffer) , $n = 42$, 慢性糖尿病組小鼠 (6 週齡時依體重給予 55 mg/kg , 6 天之 STZ) , $n = 46$, 第 29 週控制組小鼠 $n = 10$, 實驗組慢性糖尿病小鼠 $n = 27$, 以非配對測試比較 , 結果以 Mean \pm SEM 表示 , * $p < 0.05$: DM vs. Con , # $p < 0.05$: 29 wk vs. 8 wk。



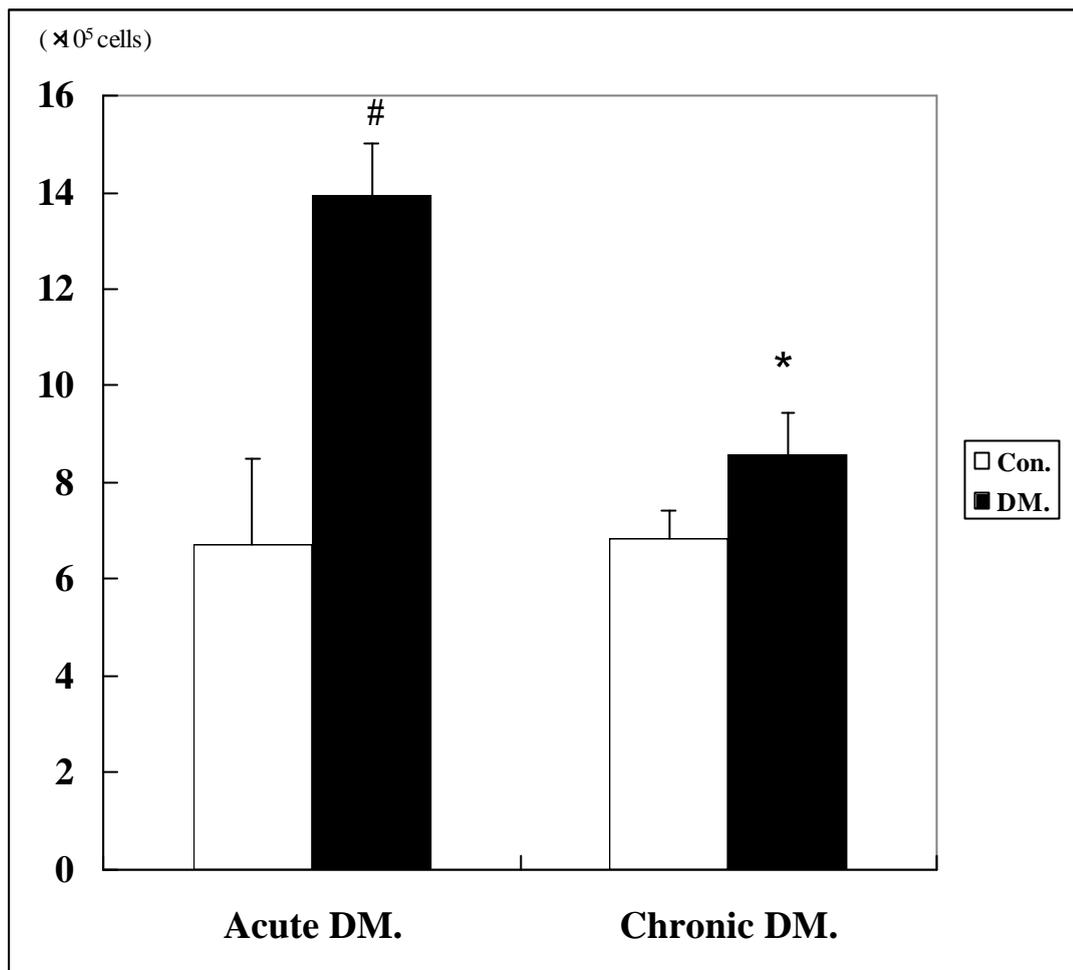
(圖四) 急性糖尿病小鼠血糖值 (Fig. 4. Blood sugar value of acute DM vs. control mice) : 第 32 週齡控制組小鼠 (30 週齡時依體重給予 0.1 ml/g , 6 天之 citrate buffer) , $n = 4$, 急性糖尿病組小鼠 (30 週齡時依體重給予 55 mg/kg , 6 天之 STZ) , $n = 4$, 以配對測試比較 , 結果以 Mean \pm SEM 表示 , $*p < 0.05$: DM vs. Con.



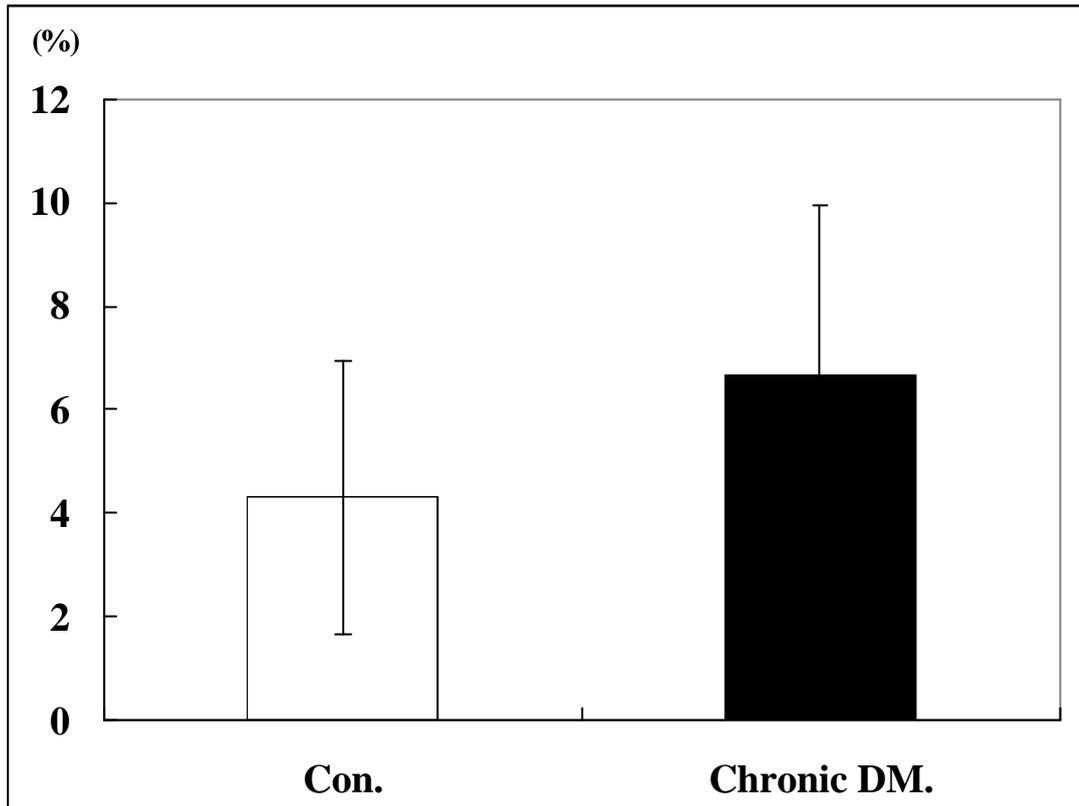
(圖五) 慢性糖尿病小鼠體重紀錄 (Fig. 5. Body weight of chronic DM vs. control mice) : 控制組小鼠 (6週齡時依體重給予 0.1 ml/g, 6天之 citrate buffer), 糖尿病組小鼠 (6週齡時依體重給予 55 mg/kg, 6天之 STZ), 以非配對測試比較, 結果以 Mean \pm SEM 表示, * $p < 0.05$: DM vs. Con.



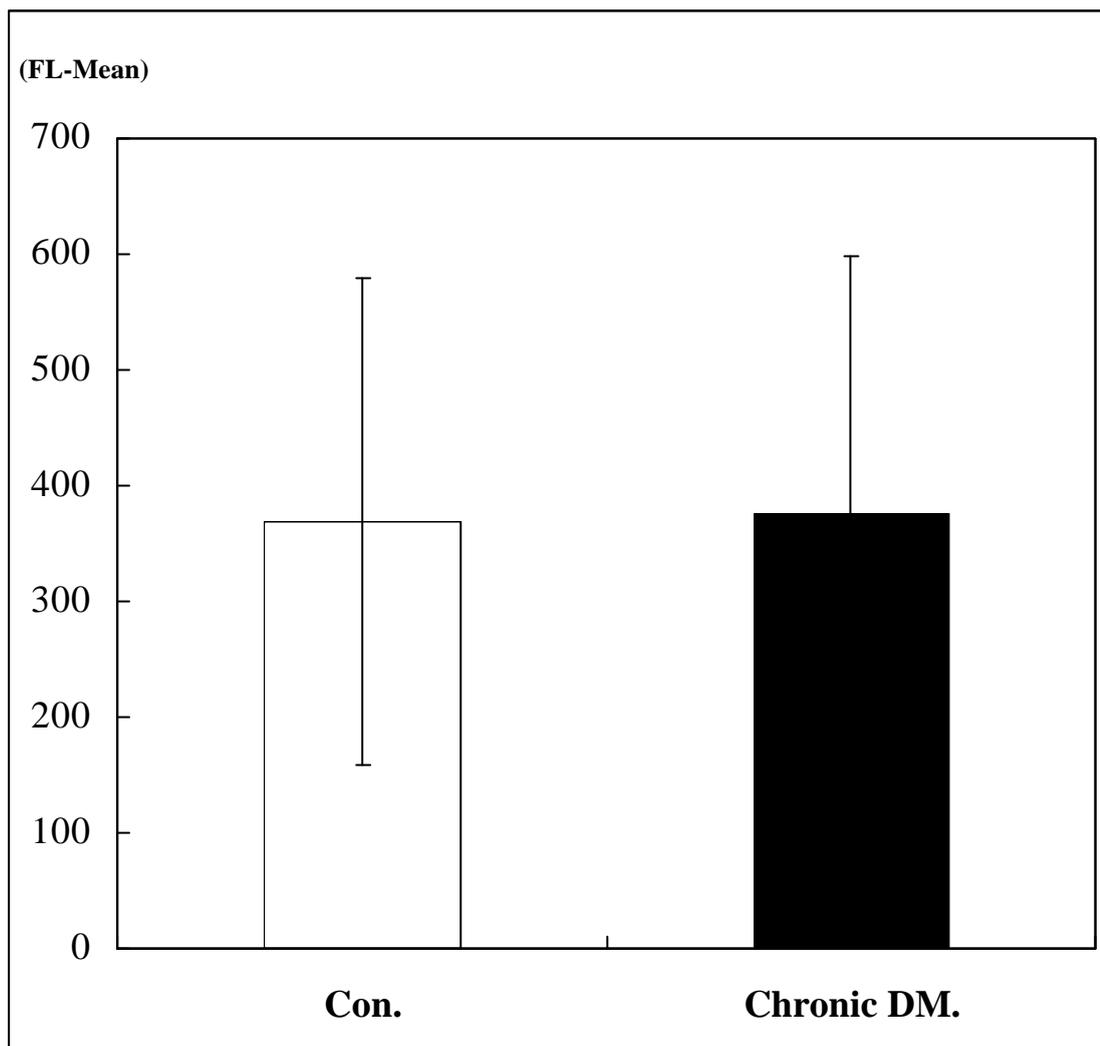
(圖六) 急性糖尿病小鼠體重紀錄 (Fig. 6. Body weight of acute DM vs. control mice) : 控制組小鼠 (30 週齡時依體重給予 0.1 ml/g , 6 天之 citrate buffer) , $n = 4$, 急性糖尿病組小鼠 (30 週齡時依體重給予 55 mg/kg , 6 天之 STZ) , $n = 4$, 以配對測試比較 , 結果以 Mean \pm SEM 表示。



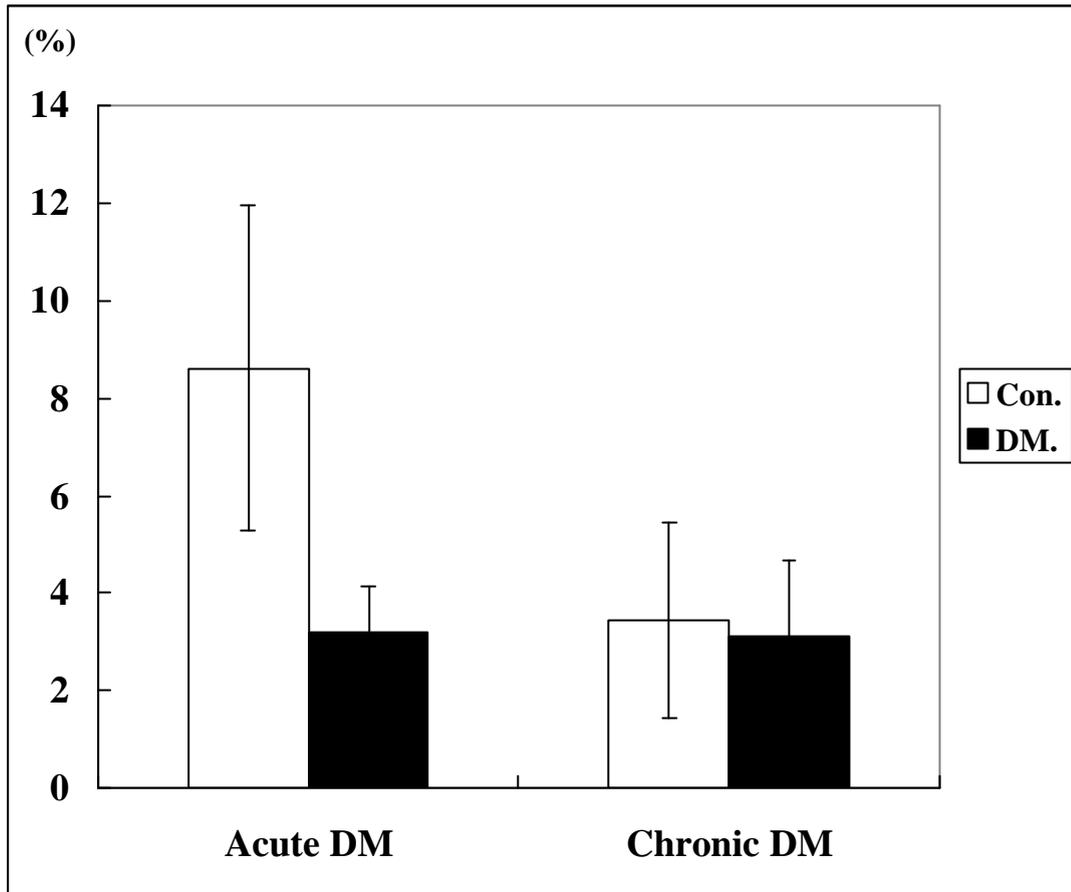
(圖七) 慢性和急性糖尿病小鼠之肺泡巨噬細胞數目 (Fig. 7. Number of AMs from acute and chronic DM vs. control mice) : 第 33 週齡慢性糖尿病組小鼠 $n = 9$, 控制組小鼠 $n = 9$, 以配對測試比較; 第 33 週齡急性糖尿病組小鼠 $n = 3$, 控制組小鼠 $n = 3$, 以配對測試比較, 33 週齡慢性糖尿病小鼠 $n = 9$, 急性糖尿病組小鼠 $n = 3$, 以非配對測試比較, 結果以 Mean \pm SEM 表示, ^{*} $p < 0.05$: DM vs. Con ; [#] $p < 0.05$: Acute DM vs. Chronic DM。



(圖八) 有吞噬螢光小球的肺泡巨噬細胞佔全部肺泡巨噬細胞數目的百分比 (Fig. 8. % of AMs from chronic DM vs. control mice phagocytizing beads) :第 33 週齡控制組小鼠 (6 週齡時依體重給予 0.1 ml/g , 6 天之 citrate buffer) , n = 3 , 慢性糖尿病組小鼠(6 週齡時依體重給予 55 mg/kg , 6 天之 STZ) , n = 3 , 以配對測試比較 , 結果以 Mean \pm SEM 表示。

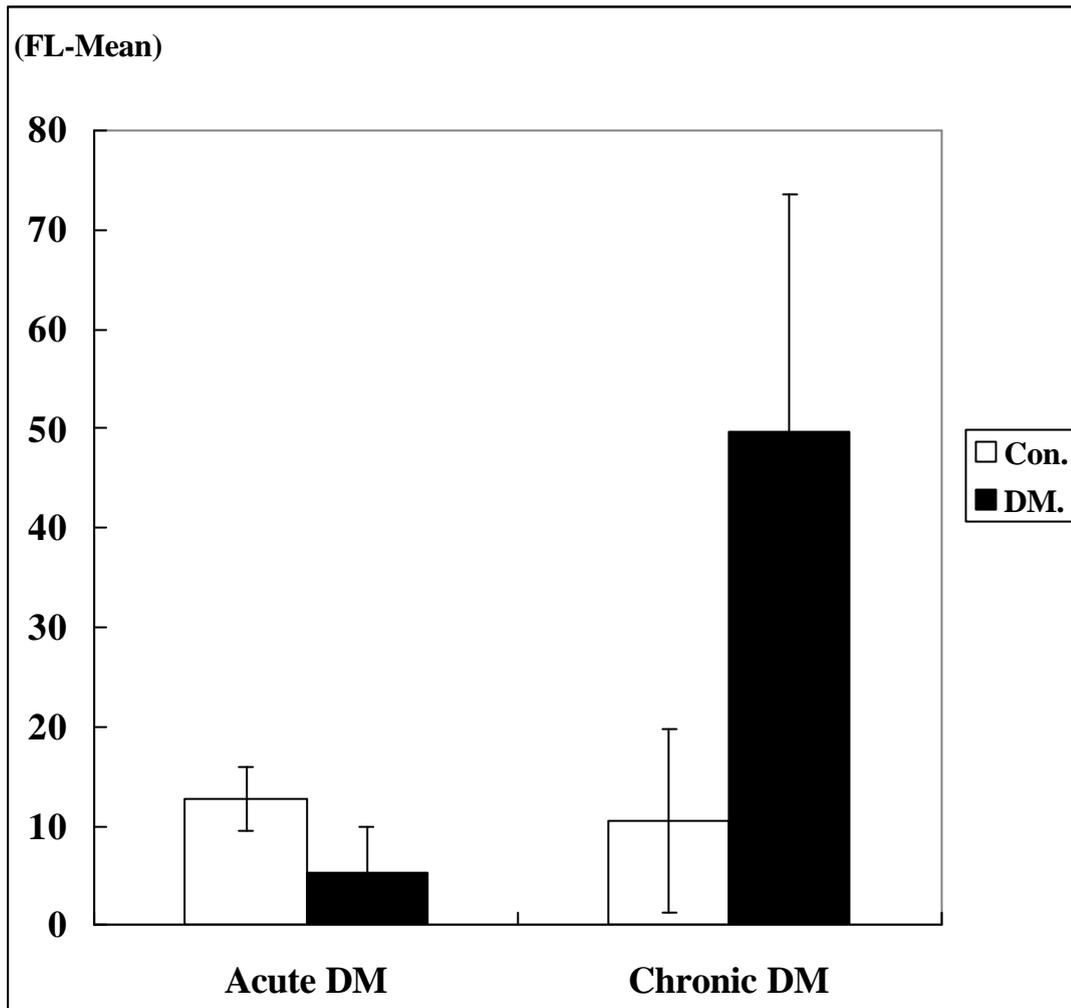


(圖九) 慢性糖尿病小鼠之肺泡巨噬細胞所吞噬的螢光強度 (Fig. 9. Beads fluorescent strength in AMs from chronic DM vs. control mice) : 第第 33 週齡控制組小鼠 (6 週齡時依體重給予 0.1 ml/g , 6 天之 citrate buffer) , n = 3 , 慢性糖尿病組小鼠 (6 週齡時依體重給予 55 mg/kg , 6 天之 STZ) , n = 3 , 以配對測試比較 , 結果以 Mean ±SEM 表示。

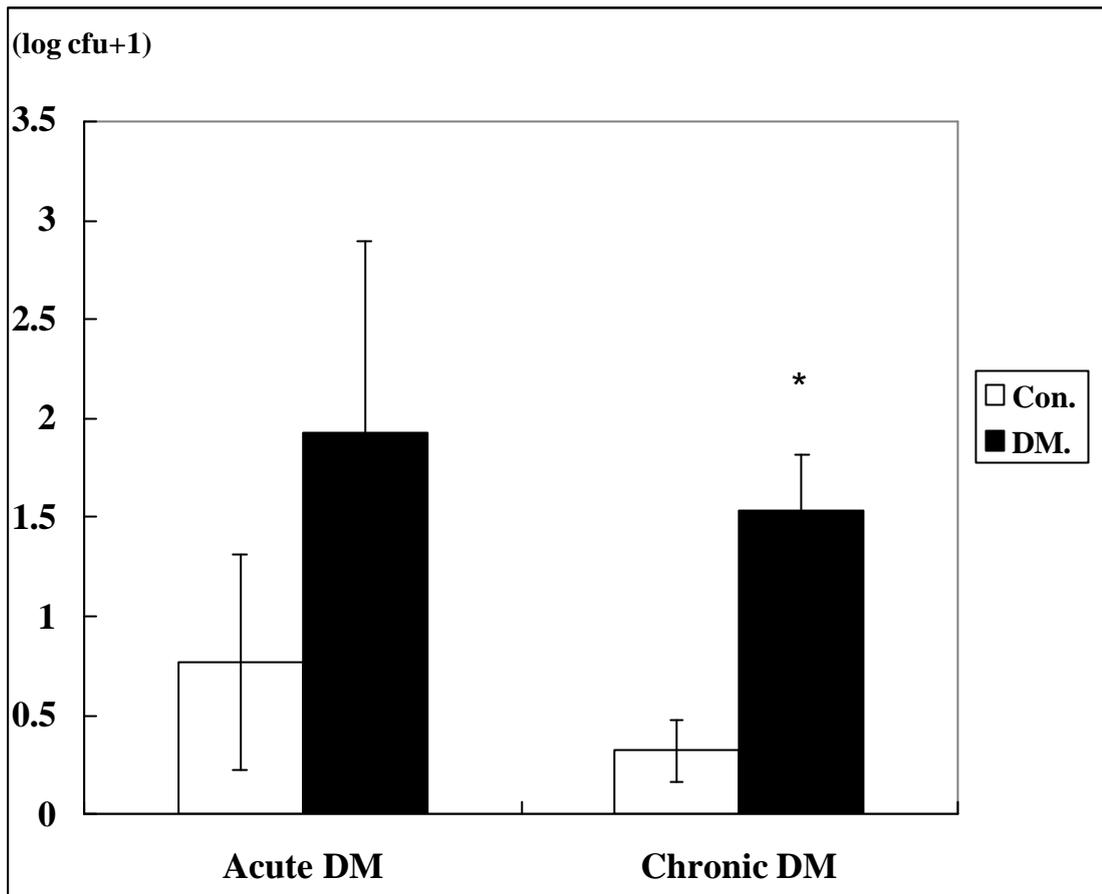


(圖十) 有吞噬螢光小球的肺泡巨噬細胞佔全部肺泡巨噬細胞數目的百分比 (Fig. 10. % of AMs from chronic and acute DM vs. control mice phagocytizing beads) : 第 33 週齡急性糖尿病組小鼠, $n = 3$, 控制組小鼠, $n = 3$, 以配對測試比較, 慢性糖尿病組小鼠, $n = 3$, 控制組小鼠, $n = 3$, 以配對測試比較, 急性糖尿病組與慢性糖尿病組, 以非配對測試比較, 結果以 Mean \pm SEM 表示, $^*p < 0.05$: DM vs. Con ; $^{\#}p < 0.05$: Acute DM vs. Chronic DM。

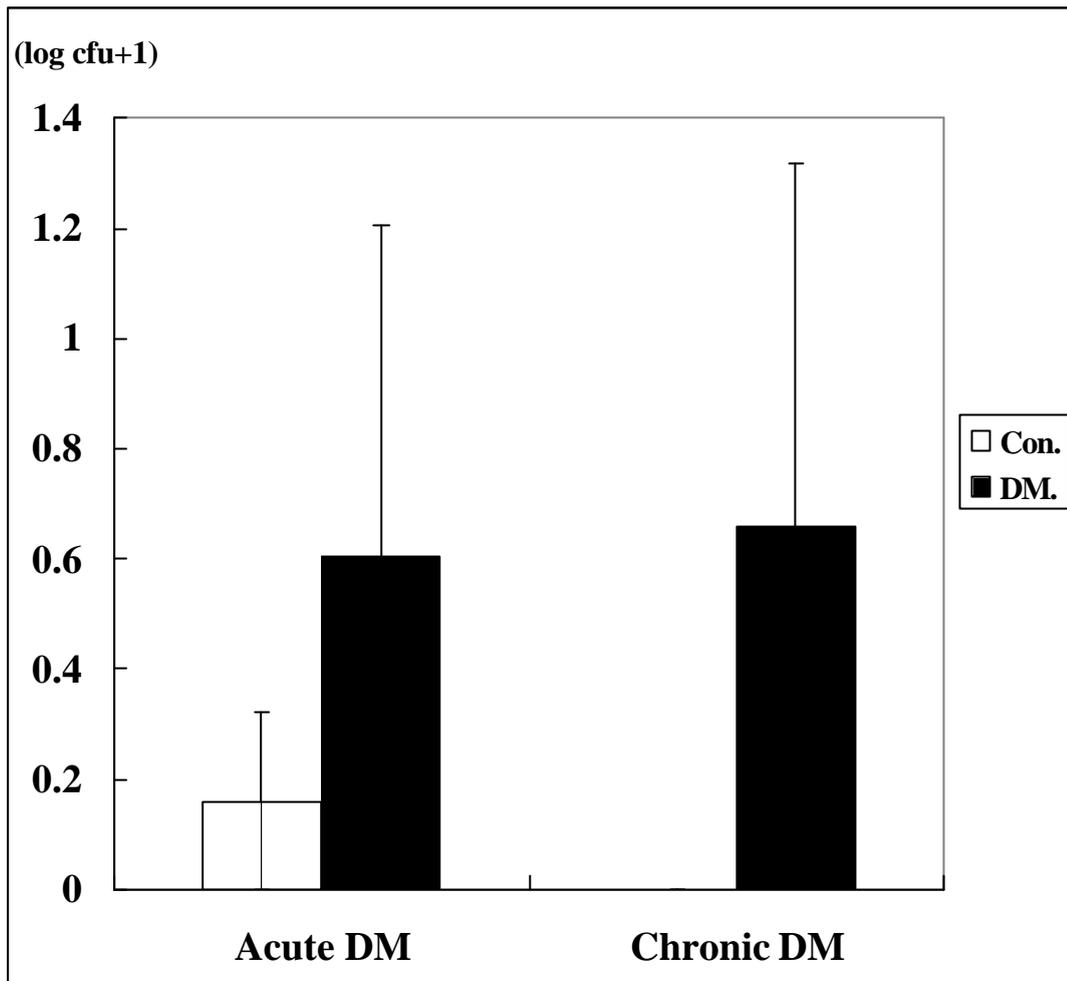
。



(圖十一) 糖尿病小鼠之肺泡巨噬細胞所吞噬的螢光強度 (Fig. 11. Beads fluorescent strength in AMs from chronic and acute DM vs. control mice) : 第 33 週齡急性糖尿病組小鼠, $n = 3$, 控制組小鼠, $n = 3$, 以配對測試比較, 慢性糖尿病組小鼠, $n = 3$, 控制組小鼠, $n = 3$, 以配對測試比較, 急性糖尿病組與慢性糖尿病組, 以非配對測試比較, 結果以 Mean \pm SEM 表示, $^* p < 0.05$: DM vs. Con ; $^{\#} p < 0.05$: Acute DM vs. Chronic DM。



(圖十二) 慢性糖尿病小鼠左肺均質液的 *K. Pneumonia* 菌落數 (Fig. 12. Bactericidal ability of left lung to *K. Pneumonia* from chronic and acute DM vs. control mice.): 第 33 週齡慢性糖尿病小鼠 $n = 3$, 控制組小鼠 $n = 3$, 第 33 週齡急性糖尿病小鼠 $n = 3$, 控制組小鼠 $n = 3$, 以配對測試比較, 33 週齡慢性糖尿病小鼠 $n = 3$, 急性糖尿病組小鼠 $n = 3$, 以非配對測試比較, 結果以 Mean \pm SEM 表示, * $p < 0.05$: Chronic DM vs. Con.。



(圖十三) 慢性糖尿病小鼠血漿中的 *K. Pneumonia* 菌落數 (Fig. 13.

Bactericidal ability of plasma to *K. Pneumonia* from chronic and acute DM vs.

control mice.): 第 33 週齡慢性糖尿病小鼠 $n = 3$, 控制組小鼠 $n = 3$, 第 33 週

齡急性糖尿病小鼠 $n = 3$, 控制組小鼠 $n = 3$, 以配對測試比較, 33 週齡慢性

糖尿病小鼠 $n = 3$, 急性糖尿病組小鼠 $n = 3$, 以非配對測試比較, 結果以 Mean

\pm SEM 表示。

第四章 討論

從本實驗的結果可以發現：一、小鼠下呼吸道抵禦外來物質的第一防線的肺泡巨噬細胞，其吞噬能力在罹患慢性糖尿病的小鼠並沒有變化；二、慢性糖尿病小鼠的肺泡巨噬細胞，面對 *K. pneumoniae* 的感染，其殺菌能力比正常小鼠的差；三、更進一步，在急性的血糖升高 (Acute Hyperglycemia) 小鼠，肺泡巨噬細胞對 *K. pneumoniae* 的殺菌能力與正常小鼠並未發現明顯的差異。

糖尿病人之生理表現為血中葡萄糖濃度過高，並且有多吃、多喝、多尿（三多症狀）、口乾、疲倦及體重減輕等症狀 (Wilson and Foster, 1992)，在本篇實驗結果中，糖尿病的 C57BL/6J 的小鼠，不止糖尿病誘發初期，小鼠血糖濃度到達 > 300 mg/dl 的糖尿病定義標準，小鼠若持續飼養到第 29 週齡，成為慢性糖尿病時，小鼠平均血糖濃度甚至可以突破 500 mg/dl，另外亦有人作出相同之結果：其發現血糖濃度在糖尿病的 C57BL/6J 的小鼠中，在以 STZ 誘發糖尿病後，持續維持到第 25 週齡時，其血中葡萄糖濃度糖會從 300 mg/dl 攀升至 400 mg/dl 以上 (Vidya et al., 1996)，然而本篇實驗飼養之糖尿病小鼠，維持到 29 週齡以上，所以其血糖甚至持續升高至 500 mg/dl 以上是相當合理的，在糖尿病小鼠的體重變化方面，本篇實驗飼養之糖尿病小鼠，在誘發糖尿病之後一個月開始，體重明顯的比正常小鼠來的輕，相同的結果出現在以 C57BL/6J 為品系背景的雜交小鼠，同樣的以 STZ 誘發糖尿

病方式，在第 28 週齡時，不論是公鼠或母鼠，糖尿病小鼠之體重，皆明顯比正常控制組之小鼠減輕許多，其糖尿病小鼠之體重為 24.5 ± 1.8 g；控制組小鼠之體重則為 28.1 ± 1.5 (Kako et al., 1999)，以上的結果，再加上糖尿病小鼠生活過程中諸如多吃，多喝，多尿等其他生理現象，都一致的證明了本篇實驗成功的誘發和維持了慢性糖尿病之動物模型。

根據文獻記載，小鼠的支氣管灌流液 (BAL) 中，巨噬細胞佔了 90 ~ 95 %，5 ~ 10 % 的淋巴球，1 ~ 2 % 的多型核白血球 (Innocent et al., 1988)，而本篇實驗的小鼠 BAL 中，肺泡巨噬細胞的比例皆 > 92 %，符合了肺泡巨噬細胞在 BAL 中應有的純度標準，同樣有人由 C57BL/6J 小鼠的 3 ml 灌流液中，獲得了 5×10^5 的細胞，其中有 92 % 以上是肺泡巨噬細胞 (Tachibana et al., 1992)，但是本實驗的控制組小鼠的 BAL 中卻可獲得 $6.7 \times 10^5 \pm 1.795$ 的細胞，造成本實驗所得到的細胞數比較多的原因，推測為本實驗總共灌流了 15 ml 灌流液，因為較多體積的灌流液所以獲得了較多的灌流細胞數，然而在糖尿病小鼠的灌流液方面，本實驗所得到的糖尿病小鼠的 BAL 中細胞數目，不論在急性或是慢性糖尿病小鼠，都遠比控制組小鼠還要多，但是他人以 STZ 誘發 ICR 小鼠糖尿病 10 天後，糖尿病小鼠的灌流液中 AMs 數目與一般控制組的小鼠並無差異 (Amano et al., 2000)，推測本實驗所得到的糖尿病小鼠的 BAL 中細胞數目，會和他人有如此大的差異原因可能為：本實驗的慢性糖尿病小鼠在糖尿病誘發後 27 週才犧牲，就算是急性糖尿病小鼠也至少在糖尿病

誘發後第 18 天犧牲，遠比 Amano 的小鼠維持糖尿病的時間長，而且已經有人證明，糖尿病小鼠的 PMs 及白血球的細胞表面黏附因子的表現，例如：Mac-1、-2、-3、ICAM-1，要比正常小鼠多 (Ptak et al., 1998)，推測慢性糖尿病小鼠循環血中的單核球長期在這些黏附因子增多的環境之下，較易黏附在微血管壁，也因此造成了糖尿病小鼠之單核球較容易進入肺組織形成肺泡巨噬細胞。

在巨噬細胞的吞噬能力研究方面，曾有人以腹腔巨噬細胞 (Peritoneal macrophages ; PMs) 為觀察的主角，同樣以 STZ 誘發的糖尿病小鼠，牠們的 PMs 吞噬非生物性 (nonbiological) 的乳化小球 (latex beads) 的能力與健康小鼠一樣良好 (Nakano et al., 1984)，此項實驗結果，與本篇實驗結果一致，對照本篇實驗方法，本篇實驗用來刺激肺泡巨噬細胞吞噬反應的物質，同樣是使用非生物性的螢光小球 (Fluoresbrite carboxylate)，結果從肺泡巨噬細胞吞噬的螢光強度 (FL-Mean)，和肺泡巨噬細胞的吞噬指標 (PI) 來看，慢性糖尿病小鼠與正常小鼠之間並沒有差異存在，然而，相反的結果卻出現在另一項實驗結果中，STZ 誘發的糖尿病小鼠，牠們的 PMs 吞噬螢光小球及結核桿菌 (tubercle bacillus) 的能力比正常小鼠要大大的減低，(Saiki et al., 1980)，值得注意的是，Saiki 的實驗方法和本篇實驗方法差別在：他們的小鼠 PMs 挑戰螢光小球是體內 (in vivo) 實驗，如此一來尚需考慮到小鼠體內的環境，例如體液免疫 (humoral immune)、細胞免疫 (cellular immune)，甚至血

糖濃度等，對於小鼠 PMs 吞噬反應的影響，而我的小鼠 AMs 挑戰螢光小球則是較單純的體外 (in vitro) 實驗；雖然本篇實驗中，從肺泡巨噬細胞吞噬的螢光強度 (FL-Mean)，和肺泡巨噬細胞的吞噬指標 (PI) 來看，慢性糖尿病小鼠與正常小鼠吞噬能力是一樣的，但是本篇實驗的慢性糖尿病小鼠，其肺泡巨噬細胞的吞噬指標 (PI)，要比急性糖尿病小鼠來得多，顯示在本篇實驗中，慢性糖尿病小鼠的 AMs 跟急性糖尿病小鼠的 AMs 比較，慢性糖尿病小鼠的 AMs 有較高傾向的吞噬活性，推測急性的血糖升高有可能是影響肺泡巨噬細胞吞噬能力的原因之一。還有一項實驗是對 STZ 誘發的糖尿病大鼠，其網狀活化系統 (reticuloendothelial system; RES) 吞噬碳化膠囊 (collidal carbon) 的能力作長時間的觀察，分別以誘發後第 14 天和 28 天兩個時間點來作比較，發現 DM 大鼠在第 28 天時，RES 清除碳化膠囊所花的時間 (8.1 ± 0.04 min.)，要比第 14 天所花的清除時間 (6.3 ± 0.79 min.) 來得久，但是無論哪一個時間點，DM 大鼠的 RES 清除碳化膠囊所需的時間都比正常小鼠短，顯示了 DM 大鼠的 RES 吞噬能力似乎要比正常小鼠還好，如果給予 DM 大鼠胰島素的治療，在誘發後第 14 天，其 RES 的吞噬能力有更增強的情形，但是若給予 DM 大鼠抗生素，其 RES 吞噬能力並沒有改變，排除了可能是慢性的細菌感染因素來影響 RES 吞噬碳化膠囊的能力 (Cornell et al., 1981)，因此，藉由 Cornell 的實驗結果可推斷，老鼠的胰島素缺乏，和高血糖濃度都有可能是左右本篇實驗中糖尿病小鼠 AMs 吞噬能力的原因之一。

在研究小鼠 AMs 面對生物性 (biological) 外來物質的挑戰方面，也有類似的實驗，但是以金黃色葡萄球菌 (*S. aureus*) 當作外來刺激源，觀察天生的糖尿病大鼠 (BB rats) 之肺泡巨噬細胞吞噬能力，結果 DM 之大鼠吞噬能力比正常大鼠差 (Sima et al., 1988)。倘若刺激 PMs 吞噬作用的物質換成熱殺死的白色念珠菌 (*Candida albicans*)，糖尿病小鼠 PMs 的吞噬能力仍然與正常組相同 (Poterson et al., 1981)，另外有人以未經過調理作用的表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 來觀察 PMs 經由凝集素接受體 (lectin receptor) 捕捉吞噬細菌的能力，結果證明了以 alloxan 誘發的糖尿病小鼠，其 PMs 的 lectin receptor 數目減低，吞噬能力也隨之比控制組小鼠差了許多 (Glass et al., 1986)，但是亦有報告指出，同樣以 alloxan 誘發的 DM 小鼠循環血中的巨噬細胞，吞噬經過調理作用的綿羊血球的能力 (Sheep erythrocytes; SRBC)，糖尿病小鼠巨噬細胞吞進 SRBC 的數量跟正常小鼠是一樣多的 (Ptak et al., 1981)。令人驚訝的是，無論上述的哪一種實驗，完全沒有與本篇實驗雷同的結果出現；在本篇實驗中，研究小鼠肺泡巨噬細胞面對經過調理作用的螢光 *E.coli*，慢性糖尿病組與正常小鼠除了在吞噬的螢光強度上沒有差異外，無論是從參與吞噬作用的肺泡巨噬細胞百分比 (gated %)，或是肺泡巨噬細胞的吞噬指標 (PI) 來看，慢性糖尿病小鼠肺泡巨噬細胞的吞噬能力顯然都比正常小鼠好，造成與別人相反結果的原因，初步推測，因為本篇實驗的慢性糖尿病小鼠，自糖尿病誘發後又持續飼養了 27 週，時間至少超過了 189 天，而他人

所誘發的糖尿病老鼠都沒有飼養超過 100 天，而根據資料，原存在肺組織的肺泡巨噬細胞在 100 天之內會完全被新生的肺泡巨噬細胞取代 (Thomas et al., 1976)，顯示本篇實驗的小鼠的 AMs 應該完全屬於新生的，而且是在與糖尿病尚未誘發前的生理環境完全不同的情況下，例如：高血糖、低胰島素濃度等，重新由骨髓衍生的新細胞，而他人老鼠的 AMs 絕大部分應該屬於糖尿病尚未誘發的生理環境下所製造的舊有 AMs 族群，所以不同生理環境下製造的 AMs，擁有不同的生理表現或功能，例如：不同的 AMs 細胞膜上抗體接受器 (Fc receptors)、補體接受器 (complement receptors)、凝集素接受體 (lectin receptor) 的表現、或是不同的抗原呈獻能力、甚至有不同吞噬能力出現都是有可能發生的。

曾有文獻指出，被 STZ 誘發 IDDM 的大白鼠之肺泡巨噬細胞殺菌能力有下降的情形，作者以醋酸鹽 (Phorbol myristate acetate; PMA) 刺激 AMs 的吞噬作用後，測定 AMs 超氧離子 (O_2^-) 的產量，發現糖尿病大白鼠的 AMs 產生 (O_2^-) 的能力，明顯比健康大白鼠的能力差，糖尿病大白鼠的 AMs (O_2^-) 產量為 (14.4 ± 2.0 nmol/ 10^6 cells, 20 min)，健康大白鼠為 (26.2 ± 1.9 nmol / 10^6 cells, 20 min) (Mohsenin et al., 1990)。另有人以金黃色葡萄球菌 (*S. aureus*) 當作外來刺激源，觀察天生的糖尿病大鼠 (BB rats) 之肺泡巨噬細胞吞噬及清除 *S. aureus* 的能力，同樣的，糖尿病大鼠的殺菌能力也是有明顯受損的情形，然而若給予糖尿病大鼠一段時間的胰島素治療，糖尿病大鼠衰弱的殺菌能力可

以恢復到健康大鼠的水準，作者於是推測，胰島素的缺乏與糖尿病大鼠殺菌能力減弱有很大的關係 (Sima et al., 1988)，以 STZ 誘發的糖尿病小鼠，讓稻麴菌 (*Rhizopus oryzae*) 感染其肺泡巨噬細胞後，不止 AMs 附著到菌絲的能力減弱，而且真菌的孢子仍然可以繼續發芽 (Waldorf et al., 1984)，在糖尿病小鼠的 PMs 研究方面，糖尿病小鼠 PMs 對於乳化小球 (latex beads) 雖然有與正常小鼠一樣良好的吞噬能力，但是小鼠體內的抗體免疫反應卻比正常老鼠差，於是作者推測，抗體免疫反應的受損，可能是造成糖尿病小鼠容易受到感染的原因之一 (NaKano et al., 1984)，另外有人取出 STZ 誘發之糖尿病小鼠的脾臟巨噬細胞 (splenic macrophages)，使脾臟巨噬細胞在體外受到白色念珠菌 (*C. albican*) 感染後，發現糖尿病小鼠的脾臟巨噬細胞殺死白色念珠菌的能力比正常小鼠要好，但是若先讓糖尿病小鼠感染白色念珠菌，一星期後卻發現糖尿病小鼠血中的 INF- 濃度遽降，甚至到了無法測得的地步，而且小鼠的巨噬細胞的活化情形，也比沒有糖尿病的小鼠差，作者依據此結果推測，糖尿病小鼠在感染初期的 INF- 濃度變化是影響糖尿病小鼠對於感染的感受性 (susceptibility) 較高的原因 (Mosci et al., 1993)，還有文獻指出，以 alloxan 誘發的糖尿病小鼠身上，牠們的 PMs 釋放的單核球細胞激素，例如： IL-6 、 TNF- 的產量，都比正常小鼠高，不止如此，糖尿病小鼠的 PMs 及白血球的細胞表面黏附因子的表現，例如： Mac-1 、 -2 、 -3 、 ICAM-1 ，也比正常小鼠多，作者推測這些結果可能都是左右糖尿病小鼠殺菌能力的原因

(Ptak et al., 1998), 至於 PMs 經由抗體接受體 Fc receptor 與免疫複合物結合的殺菌路徑方面, STZ 誘發之糖尿病大鼠, 作者使用以放射碘離子標訂的老鼠 IgG 免疫聚集體 (125I-labeled aggregated rat IgG; (ARG)), 來研究 PMs Fc receptor 的表現情形, 結果糖尿病大鼠的 PMs 細胞表面雖然擁有較多數量的 Fc receptor, 但是其 Fc receptor 的親合力卻是比正常大鼠衰弱許多的, 而且其處理被 Fc receptor 接上的免疫複合體的異化代謝(catabolism)能力, 也比正常大鼠差 (Abrass et al., 1984)。綜觀上述的實驗結果, 糖尿病老鼠的殺菌能力都比正常老鼠來的差, 所以在本篇實驗的結果中, 慢性糖尿病小鼠對於 *K. pneumoniae* 殺菌能力較正常小鼠差, 可能的原因有: (1) 慢性糖尿病小鼠 AMs 超氧離子 (O_2^-) 的產量比正常小鼠低, 而我們都知道, AMs 主要就是經由超氧離子 (O_2^-) 代謝途徑來殺死外來微生物(圖二), 所以超氧離子 (O_2^-) 的產量一定對於慢性糖尿病小鼠 AMs 殺死 *K. pneumoniae* 的能力有很重要的影響, (2) 慢性糖尿病小鼠細胞激素, 例如: INF-、IL-6、TNF- 等, 分泌的種類或量的變化, 因為這些細胞激素都有活化巨噬細胞的功能 (Abbas, Lichtman and Pober, 2000)。

至於本篇實驗的結果中, 為何慢性糖尿病小鼠 AMs 對於螢光 *E.coli* 的吞噬能力較正常小鼠好, 但是對於殺死 *K. pneumoniae* 的能力較差, 推測可能的原因有: (1) AMs 擁有較好的吞噬能力, 不一定等於擁有較好的殺菌能力, 也許慢性糖尿病小鼠之肺泡巨噬細胞膜表面捕捉細菌的接受器, 有較多

的數量或較好的親和性，但是細菌被吞入之後，糖尿病小鼠 AMs 細胞質內的殺菌系統機能反而比較低下，所以造成了糖尿病小鼠 AMs 雖然能夠大量吞噬細菌，但卻無法殺死細菌的窘境。(2) *K. pneumoniae* 因為有莢膜 (capsule)，所以對於吞噬細胞而言，有莢膜的 *K. pneumoniae* 本來就比沒有莢膜的 *E. coli* 難捕捉和吞噬消化 (Schaechter et al., 1998)。(3) AMs 遭遇 *E. coli* 挑戰的實驗是在體外 (in vitro)，AMs 遭遇 *K. pneumoniae* 挑戰的實驗則是在體內 (in vivo)，本篇實驗必須考慮到小鼠體內的環境，例如體液免疫 (humoral immune) 細胞免疫 (cellular immune)，甚至血糖濃度等對於 AMs 吞噬能力的影響。(4) 由於 *K. pneumoniae* 大多利用檸檬酸鹽 (citrate) 和葡萄糖 (glucose) 當作主要碳源 (carbon source) (Podschun and Ullmann, 1998)，所以在高血糖濃度的慢性糖尿病小鼠體內，對於 *K. pneumoniae* 來說，是一個營養相當充足的環境，推測很有可能 *K. pneumoniae* 進入慢性糖尿病小鼠下呼吸道後，因為良好的營養環境而造成 *K. pneumoniae* 在 20 小時內大量繁殖，以至於慢性糖尿病小鼠的 AMs 不堪負荷，就算有很好的殺菌能力，也無法完全清除大量繁殖的 *K. pneumoniae*。

最後，在經由本研究所有的實驗結果來推測出，肺泡巨噬細胞吞噬能力增加可能是導致糖尿病人雖然容易遭受下呼吸道感染 (Mackowaik et al., 1979)，但是較不容易進入更嚴重的病程，例如成人呼吸窘迫症 (acute respiratory disease syndrom; ARDS; Moss et al., 2000) 的原因之一，再者，台灣糖尿病人

對於 *K. pneumoniae* 特殊的易感受性，可能是因為肺泡巨噬細胞對於 *K. pneumoniae* 殺菌能力變差所引起的。除了這些研究的結果之外，本實驗仍有延伸的空間，例如尚可進一步若將小鼠肺泡巨噬細胞，培養在高葡萄糖的培養基中，藉此觀察單純的高糖分濃度是否會影響肺泡巨噬細胞之吞噬能力，慢性糖尿病小鼠對於 *K. pneumoniae* 的易感受性是否有選擇性，可嘗試感染慢性糖尿病小鼠不同種類的 *K. pneumoniae*，例如以台灣臨床常見的 *K. pneumoniae* 菌種，與美國菌種中心 (ATCC) 的 *K. pneumoniae* 菌種，感染慢性糖尿病小鼠後，觀察其肺泡巨噬細胞是否有不同之殺菌能力，如此一來，就可更進一步釐清，台灣糖尿病人對於 *K. pneumoniae* 的特殊易感受性，是否是由於台灣特殊的 *K. pneumoniae* 菌種造成。

第五章 結論

從本實驗的結果可以發現：一、若將小鼠分離出肺泡巨噬細胞後，在體外分別面對螢光小球及 *E.coli* 的挑戰，結果顯示罹患慢性糖尿病的小鼠肺泡巨噬細胞吞噬能力與急性糖尿病小鼠相比較，慢性糖尿病的小鼠肺泡巨噬細胞傾向較高的吞噬活性；二、小鼠的下呼吸道，直接經由氣管注射感染 *K. pneumoniae* 20 小時後，慢性糖尿病小鼠肺泡巨噬細胞殺菌能力比正常小鼠的差；三、在急性的血糖升高 (Acute Hyperglycemia) 小鼠，肺泡巨噬細胞對 *K. pneumoniae* 的殺菌能力與正常小鼠並未發現明顯的差異。

第六章 參考文獻

1. Abrass CK, Hori M. Alterations in Fc receptor function of macrophages from streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Immunol.* 133(3):1307-1312, 1984.
2. Andersen B, Goldsmith GH, Spagnuolo PJ. Neutrophil adhesive dysfunction in diabetes mellitus: the role of cellular plasma factors. *J. Lab. Clin. Med.* 111:275-85, 1980
3. Andersen AR, Christiansen JS. et al. Diabetic nephropathy in Type I (insulin-dependent) diabetes: an epidemiological study. *Diabetologia* 25(6):496-501, 1983.
4. Bagdade JD, Root RK, Bulger RJ. Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes.* 23:9-15, 1974.
5. Bagdade JD, Stewart M, Walters E. Impaired granulocyte adherence: a reversible defect in host defense in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes.* 27:677-81, 1978.
6. Bagdade JD, Walters E. Impaired granulocyte adherence in mildly diabetic patients: effects of tolazamide treatment. *Diabetes.* 29:309-11, 1980.
7. Bowden DH, Adamson IYR, Grantham WG, et al: Origin of the lung macrophage: evidence derived from radiation injury. *Arch. Pathol.* 88:540-546, 1969.
8. Bowden DH, Adamson IYR: The pulmonary interstitial cell as immediate precursor of the alveolar macrophage. *Am. J. Pathol.* 68:521-528, 1972.
9. Brayton RG, Stokes PE, Schwartz MS, Louria DB. Effect of alcohol and various diseases on leukocyte mobilization phagocytosis and intracellular bacterial killing. *N. Eng. J. Med.* 282:123-8,1970.

10. Bybee JD, Roggers DE. The phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes obtained from patients with diabetes mellitus. *J. Lab. Clin. Med.* 64:1-13,1964.
11. Baron S. Medical Microbiology 1991.
12. Case JI, Heeter BJ, Klyshevich KA. Impaired response of lymphocytes of diabetic subjects to antigen of *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 136:495-501, 1987.
13. Cheng DL, Liu YC, Yen MY, et al. Septic Metastatic Lesion of Pyogenic Liver Abscess. *Arch. Intern. Med.* 151:1557-1559, 1997.
14. Cheng DL, Liu YC, *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Taiwan. 中華感染醫誌 *J. Infect. Dis. Soc. Roc.* 82-5, 1997.
15. Cohen AB, Gold WM: Defense mechanisms of the lungs. *Ann. Rev. Physiol.* 37:325-350,1975.
16. Cohen AB, Cline MJ,: The human alveolar macrophage: isolation, cultivation in vitro, and studies of morphologic and functional characteristics. *J. Clin. Invest.* 50:1390-1398, 1971.
17. Cohn ZA, Wiener E: The particulate hydrolases of macrophages. II. Biochemical and morphological response to particle ingestion. *J. Exp. Med.* 118:1009-1020, 1963.
18. Cornell RP. RES hyperphagocytosis by rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *American Journal of Physiology.* 240(3):G225-231.1981.
19. Cryz SJ, R. Germanier. Safety and immunogenicity of *Klebsiella pneumoniae* K1 capsular polysaccharide. *Infect. Immun.* 151:665-671, 1984.
20. Davidson J, Sowden JM, Fletcher J. Defective phagocytosis in insulin controlled diabetics: evidence for a reaction between glucose and opsonizing proteins. *J.*

- Clin. Pathol.* 37:783,1984.
21. Fujimoto WY. Overview of Diabetes Mellitus in different population group. *Diabetic. Med.* 13:S7-S10,1996.
 22. Finley TN, Swenson EW, Curran WA, et al: Bronchopulmonary lavage in normal in normal subjects and patients with obstructive lung disease. *Ann. Intern. Med.* 66:651-658, 1967.
 23. Geisler G, Almdal T, Bennedsen J, et al. Monocyte functions in diabetes mellitus. *Acta Pathology Microbiology Immunology Scand.* 90C: 33-7, 1982.
 24. Chen GH, Raju CR, Michael W, et al. Intrapulmonary TNF gene therapy reverses sepsis induced suppression of lung antibacterial host defense. *J. Immun.* 165:6496-6503, 2000.
 25. Glass EJ, Stewart J, Matthews DM, et al. Impairment of monocyte “lectin-like” receptor activity in Type I (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 30:228-31, 1987.
 26. Glass EJ, Stewart J, Weir DM. Altered immune function in alloxan-induced diabetes in mice. *Clin. Exp. Immun.* 65(3):614-21,1986.
 27. Green GM, Kass EH: The role of the alveolar macrophage in the clearance of bacteria from the lung. *J. Exp. Med.* 119:167-175, 1964.
 28. Golde DW, Finley TN, Cline MJ: Production of colony-stimulation factor by human macrophages. *Lancet* 2: 1397-1399, 1972.
 29. Golde DW, Cline MJ: Regulation of granulopoiesis. *N. Engl. J. Med.* 291:1388-1395, 1974.
 30. Golde DW, Byers LA, Finley TN: Proliferative capacity of human alveolar macrophage. *Nature.* 247:373-375, 1974.
 31. Golde DW, Finley TN, Cline MJ: The pulmonary macrophage in acute leukemia. *N Engl. J. Med.* 290:875-878, 1974.

32. Goldmand JM, Kowalee JK. Hepatic abscess and Osteomyelitis from *Klebsiella pneumoniae*. *JAMA*. 240-260,1978.
33. Graybill J, W Marshall, P Charache, et al. Nosocomial pneumonia. A continuing major problem. *Am. Rev. Respir. Dis.* 108:1130-1140, 1973.
34. Greenstein AJ, Lowenthal D, Hammer GS et al. Continuing change in patterns of diseases in pyogenic liver abscess: a study of 30 patients. *Am. J. Gastroenterol.* 79:217-226, 1984.
35. Hideak A, Hidefumi Y, Masachika S, et al. Impairment of endotoxin-induced macrophage inflammatory protein 2 gene expression in alveolar macrophages in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Infect. Immun.* 68(5): 2925-2929, 2000.
36. Harris JO, Swenson EW, Johnson JE III: Human alveolar macrophages: comparison of phagocytic ability, glucose utilization, and ultrastructure in smokers and nonsmokers. *J. Clin. Invest.* 49:2086-2096, 1970.
37. Hill HE, Augustine NH, Raslison MI, Santos JI. Defective monocytes chemotactic response in diabetes mellitus. *Clin. Immun.* 3:70-71,1983.
38. Innocent N, Mbawuike, Herbert B, *Infect. Immun.* 56:577-581, 1998.
39. Jubiz W, Draper RE, Gale J, Nolan G. Decreased leukocytes B₄ synthesis by polymorphonuclear leukocytes from male patients with diabetes mellitus. *Prostaglandins leukotrienes Med.* 14:305-11, 1984.
40. Kako et al. Diabetic human apo B transgenic mice. *J. Lip. Res.* 40: 1999
41. Kandel G, Marcon NE, Peogenic liver abscess: new concepts of an old disease. *Am J Gastroenterol.* 1984; 79:65-71. atz S, Klein B, Elian I, et al.. Phagocytic activity of monocytes from diabetic patients. *Diabetes Care.* 6:479-82, 1983.
42. Kaye WA, Adri, MN, Soelder JS, et al. Acquired defect in interleukin-2 production in patients with Type I diabetes mellitus. *N. Engl. Med.* 315:920-4, 1986.

43. Kitahara M, Eyre HJ, Lynch RE, et al. Metabolic activity of diabetic monocytes. *Diabetes*. 29:251-6, 1980.
44. Klebanoff SJ, Hamon CB,: Antimicrobial systems of mononuclear phagocytes, Mononuclear phagocytes in Immunity, Infection, and Pathology. Edited by R van Furth. Oxford, Blackwell Scientific Publications. 507-531, 1973.
45. Kolterman OG, Olefsky JM, Kurahara C, Taylor K. A defect in cell-mediated immune function in insulin-resistant diabetic and obese subjects. *J. Lab. Clin. Med.* 96:535-43L, 1980.
46. Lin Hs, Kuhn C, Kuo Tt; Clonal growth of hamster free alveolar cells in soft agar. *J. Exp. Med.* 142:877-886,1975.
47. Lorian V and B Topf. Microbiology of nosocomial infections. *Arch. Intern. Med.* 130:104-110, 1972.
48. MacCulish AC, Urbaniak SJ, Campbell CJ, et al. Phytohemagglutinin transformation and circulating lymphocyte subpopulations in insulin-dependent diabetic patients. Diabetic patients. *Diabetes*. 25:908-12, 1974.
49. Mann PEG, Cohen AB, Finley TN, et al: Alveolar macrophages structural and functional differences between nonsmokers and smokers of marijuana and tobacco. *Lab. Invest.* 25:111-120, 1971.
50. Man tovani B, RabinovitchcM, Nussenzweig V: Phagpcytosis of iimmune complexes by macrophages. Defferent roles of the macrophage receptor sites for complement (C3) and for immunoglobukin (IgG). *J. Exp. Med.* 135:780-792, 1972.
51. Mauer SM, Chavers BM. A comparison of kidney disease in type I and type II diabetes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 189: 299-303, 1985.
52. Mohsenin V, Latifpour J. Respiratory burst in alveolar macrophages of diabetic rats. *Journal of Applied physiology*. 68(6):2384-90, 1990.

53. Montarroso AM, Myrvik QN: Effect of BCG vaccination on the IgG and complement receptors on rabbit alveolar macrophages. *J. Reticuloendothel. Soc.* 24:93-99, 1978.
54. Mosci P, Vecchiare A, Cenci E, et al. Low dose streptozotocin-induced diabetes in mice. I. Course of *Candida albicans* infection. *Cell. Immun.* 150(1) 27-35, 1993.
55. Moss M, Parsons PE, et al. Diabetic patients have a decreased incidence of acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care. Med.* 28:2187-2192, 2000.
56. Mordes JP, Rossini AA. Animal models of diabetes mellitus. *Joslin's Diabetes mellitus.* 1985.
57. Myrvik QN, Leake ES, Fariss B, Fariss B. Studies on pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbit: a technique to procure them in a high state of purity. *J. Immun.* 86:128-132, 1961.
58. Naghibi M, Smith RP, Baltch AL, et al. The effect of diabetes mellitus on chemotactic and bactericidal activity of human polymorphonuclear leukocytes. *Diabetes Research Clinical Practice.* 4:24-35, 1987.
59. Nakano K, Yoshida T, Kondo M, Nurarnatsu S. Immune responsiveness and phagocytic activity of macrophages in streptozotocin (SZ)-induced diabetic mice. *Endocrinologia Japonica.* 31(1):15-22, 1984.
60. Negishi K, Gupta S, Chandy KG, et al. Interferon responsiveness of natural killer cells in Type I human diabetes. *Diabetes Research.* 7:49-52, 1988.
61. Nolan CM, Beaty HN, Bagdade JD. Further characterization of the impaired bactericidal function of granulocytes in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes.* 27:889-94.P, 1978.
62. Podschun R and Ullmann U. *Klebsiella* spp. As Nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Micro. Res.* 11:589-603, 1998.

63. Podschun R, Penner I and Ullmann U. Interaction Klebsiella capsule type 7 with human polymorphonuclear leucocytes. *Micro. Pathog.* 13:371-379, 1992.
64. Peterson CM, Jones RI, Koenig RJ, et al. Reversible hematologic sequelae of diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.* 86:425-9, 1977.
65. Peterson EM, Ambe NA, Valdes I, Argulli ER, Phagocytosis and chemotaxis of macrophages from normal and diabetic mice. *Acta Diabetologica Latina.* 18(2):129-13, 1981.
66. Pratt SA, Smith MH, Ladman AJ, et al: The ultrastructure of alveolar macrophages from human cigarette smokers and nonsmokers. *Lab. Invest.* 24:331-338, 1971.
67. Ptak W, Klimek M, Bryniarski K, Ptak M, Majcher P. Macrophage function in alloxan diabetic mice: expression of adhesion molecules, generation of monokines and oxygen and NO radicals. *Clin. Exp. Immun.* 114(1):13-18, 1998.
68. Ptak W, Rewicka M, Bielecka J. Macrophage function in alloxan-diabetic mice: expression and activity of Fc receptors. *J. Clin. Lab. Immun.* 5(2):121-124, 1981.
69. Quan SG, Golde DW: Surface morphology of the human alveolar macrophage. *Exp. Cell. Res.* 109:71-77, 1977.
70. Quchi E, Selvaraj RJ, Sbarra AJ: The biochemical activities of rabbit alveolar macrophages during phagocytosis. *Exp. Cell. Res.* 40:456-468, 1965.
71. Qvist R, Larkins RG. Diminished production of thromboxane B₂ and prostaglandin E by stimulated polymorphonuclear leukocytes from insulin treated diabetic subjects. *Diabetes.* 32:622-6.R, 1983.
72. Repine JE, Clawson CC, Goetz FC. Bactericidal function of neutrophils from patients with acute bacterial infections and from diabetes. *J. Infect. Dis.* 142:869-75, 1980.
73. Reynolds HY, Atkinson JP, Newball HH et al: Receptors for immunoglobulin and

- complement on human alveolar macrophage. Immunol pulmonary alveolar macrophages. *J. Reticul. Soc.* 19:37-45, 1976.
74. Robbins SL, Tucker AW Jr. The cause of death in diabetes: a report of 307 autopsied cases. *N. Engl. J. Med.* 231:865-8, 1944.
75. Rossi F, Zabucci G, Romeo D: Metabolism of phagocytosing mononuclear phagocytes, Monuclear Phagocytes in Immunity, Infection, and Pathology. Edited by R van Furth. Oxford, Blackwell scientific Publications, 441-462, 1973.
76. Saiki O, Negoro S, Tsuyuguchi I, Yamamura Y. Depressed immunological defence mechanisms in mice with experimentally induced diabetes. *Infect. Immun.* 28(1):127-131, 1980.
77. Sbrera AJ, Karnovsky ML: The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 234:1355-1362, 1959.
78. Seymour A, Phear D. The causes of death in diabetes mellitus. A study of diabetic mortality in the Royal Adelaide Hospital from 1956 to 1960. *Med. J. Aust.* 1:890-4, 1963.
79. Shurin SB, Stossel TP: Complement (C3)- activated phagocytosis by lung macrophages. *J. Immun.* 110:1305-1312, 1978.
80. Sima AA, O'neill SJ, Naimar KD. Bactericidal phagocytosis and intracellular killing by alveolar macrophages in BB rats. *Diabetes.* 37(5):544-5469, 1988.
81. Simon LM, Robin ED, Phillips JR, et al: Enzymatic basis for bioenergetics differences of alveolar versus peritoneal macrophages and enzyme regulation by molecular O₂. *J. Clin. Invest.* 59:443-448, 1977.
82. Stossel TP, Maxon RJ, Pollar TF, et al: Isolation and properties of phagocytic vesicles. II. Alveolar macrophages. *J. Clin. Invest* 51:604-614, 1972.
83. Stossel TP: The mechanism of phagocytosis. *J. Reticul. Soc* 19:237-245, 1976.

84. Thomas ED, ramberg RE, Sale GE et al: Direct evidence for a bone marrow origin of the alveolar macrophage in man. *Science*. 192:1016-1018, 1976.
85. Thomas JM, Camprubi S, Williams P. Surface exposure of the O-antigen in *Klebsiella pneumoniae* O1: K1 serotype strains. *Micro. Pathog.* 5:141-147, 1988.
86. Thorsby E, Ronningen KS. Particular HLA-DQ molecules play a dominant role in determining susceptibility or resistance to type I diabetes mellitus. *Diabetologia*. 36(5): 371-377 U, 1993.
87. Unanue ER, Beller DI, Lu CY, Allen PM. Antigen presentation: comments on its regulation and mechanism. *J. Immun.* 132:1-5 V, 1984.
88. van Furth R: Origin and kinetics of monocytes and macrophages. *Seminar Hematology* 7:125-141, 1970.
89. Vidya VK, Deborah LW, Renee CL. Increased atherosclerosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *J. Clin. Invest.* 97(7):1767-1773, 1996.
90. Volkman A, Gowans JL: The origin of macrophages from bone marrow in the rat. *Br. J. Exp. Pathol.* 46:62-70, 1965 W.
91. Waldorf AR, Levitz SM, Diamond RD. In vivo bronchoalveolar macrophage defense against *Rhizopus oryzae* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Infect. Dis.* 150(5):752-760, 1984.
92. Waldorf AR, Ruderman N, Diamond RD. Specific susceptibility to mucormycosis in murine diabetes and bronchoalveolar macrophage defense against *Rhizopus*. *J. Clin. Invest.* 74(1):150-160, 1984.
93. Wilson JD, Foster DW. Williams textbook of endocrinology 1992.
94. Winocour PH, Lenton J, Puxty JA, Anderson DC. Leukocyte microbicidal activity assessed by chemiluminescence in elderly non-insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetes Research*. 9:73-5, 1988.
95. Williams PP, Lamabert A, Brown MRW, Jones RJ. The role of the O and K

- antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. *J. Gen. Micro.* 129:2181-2191, 1983.
96. William G, Honcking MD, David W. The pulmonary-alveolar macrophage. *N. Engl. J. Med.* 13:580-587, 1979.
97. 行政院衛生署 90 年死因簡要統計
98. 郭清輝 (1998) 臨床醫學 41 : 336。
99. 陳國群編著 (1997) 最新糖尿病精要。
100. 潘文涵、葉文婷、胡啟民 (1998) 台灣地區糖尿病之盛行率及認知狀況。

英文摘要

Diabetes mellitus is often identified as an independent risk factor for the development of lower respiratory tract infections. Previous studies showed that the diabetic patients with septic shock are susceptible to bacterial lung infections, but less likely to develop severe lung injury, such as ARDS, compared with the nondiabetics.

In Taiwan, *Klebsiella pneumoniae* is a leading pathogen of primary pneumonia with bacteremia in diabetic patients and causes high mortality. Alveolar macrophages (AMs) are a critical component of host defense against lung infections. They not only provide the first-line phagocytic and bactericidal defense against microbial invasion but also modulate the immunity of the lower respiratory tract. To investigate the functions of AMs from diabetic mice, mice were treated with STZ at 6 and 30 wk old, chronic and acute diabetes, respectively, and were kept until 33 wk old for further studies. The phagocytic capacities of AMs from bronchoalveolar lavage were measured by the *in-vitro* fluorescence-labelled beads or *E-coli* labeling and subsequent FACScalibur flow cytometer analysis. Furthermore, the chronic and acute diabetic mice were infected with *K. pneumoniae* by intra-trachea injection. Twenty hr later, the homogenized left lung and the plasma from the infected mice were plated on LB agar and incubated for 18 hr to determine the bacterial count. The results showed that the AMs from chronic diabetic and control mice had similar phagocytic capacities. The left lung from *K. pneumoniae*-infected chronic diabetic mice had 21-fold bacteria colonies than that from control mice. However, the bacteria counts from left lung and plasma were similar in the acute and chronic diabetic mice. It is likely that the

decrease of the bactericidal ability of AMs contributes to the high susceptibility to *K. pneumoniae* in diabetic subjects. This study may provide a new approach to the investigation of the immune mechanisms of lower respiratory tract from diabetic animals.

作者簡歷

作者姓名：吳宇晨

出生日期：民國六十六年九月十日

出生地：台灣省台中市

學 歷：民國八十八年六月畢業於中山醫學大學醫事技術系

民國九十一年六月畢業於中國醫藥學院醫學研究所生理科

