

中國醫藥大學
醫學研究所
碩士學位論文

糖尿病加重敗血性老鼠的肺損傷

Septic Lung Injury is Aggravated in Diabetic Mice



指導教授：蔡宗統
共同指導教授：盧敏吉
研究生：張瓊文

中華民國九十三年七月

中文摘要

糖尿病為慢性新陳代謝疾病，民國 90 年行政院衛生署十大死因調查中，糖尿病排名第五位，有研究顯示，糖尿病病患較正常人容易遭受細菌的入侵，並且引發敗血症(Donder, 2002)，又因敗血症所引起之多器官功能衰竭以呼吸系統衰竭最為普遍，其死亡率可高達 60%，所以本研究主要是探討敗血症對於糖尿病老鼠肺部防禦機轉之影響及其造成肺部傷害的作用。我們將 BABL/c 老鼠以 Streptozotocin(STZ)誘發成糖尿病鼠，分別於 8 週及 30 週比較兩組老鼠血糖值，結果顯示本實驗成功的誘導形成糖尿病，並具有統計上之差異其 $P < 0.001$ ；於老鼠 32 週齡時，使用盲腸結紮穿刺手術模式，誘導老鼠產生敗血症，於手術後 20 小時，經由肺泡灌流技術分離出老鼠肺泡巨噬細胞，利用流式細胞儀及 DAPI 染色法偵測肺泡巨噬細胞凋亡比例，結果顯示糖尿病老鼠在未感染下，肺泡巨噬細胞凋亡比例與健康老鼠相當；但一旦引發敗血症，細胞凋亡比例以流式細胞儀偵測結果顯示，敗血症糖尿病老鼠誘發肺泡巨噬細胞凋亡比例約為敗血症正常血糖老鼠的 1.5 倍，而以 DAPI 染色結果約為未誘發敗血症健康老鼠的 3 倍。為了更進一步評估糖尿病老鼠誘發敗血症後，肺部清除細菌功能之影響，將術後 20 小時老鼠左肺取出進行均質，以無菌技術操作細胞培養 18~24 小時後，計算細菌之菌落數並將其作

比較，結果顯示未誘發敗血症的糖尿病及控制組老鼠，肺部細菌量是無差異；誘導敗血症後，控制組老鼠肺部細菌量會提升為原來的 846 倍，糖尿病老鼠又比控制組來得高約 91 倍。由以上研究結果顯示敗血症對糖尿病老鼠肺部傷害是比較嚴重的，而敗血症造成健康老鼠及糖尿病老鼠肺部傷害之差異性機制，是值得我們更進一步去研究探討。

英文摘要

Sepsis could cause serious lung injuries, including cellular apoptosis and vascular leakage. These resulted deteriorations of lung defense might lead to an increased susceptibility to pulmonary infection. Diabetes mellitus (DM) is identified as an independent risk factor for the development of lower respiratory tract infections, for which the depressed cellular protection may play a role. Since alveolar macrophages (AM) represent the first line immune effector cells of the lung airspace, we hypothesized that, for DM subjects, septic AM apoptosis will be augmented, and thereafter, the lung will be prone to the development of pneumonia. In the present study, DM was successfully induced in BALB/c male mice by streptozotocin i.p. injection, achieving a blood sugar 250ml/dl at 8 wk. At 32 wk, mice were cecal-ligated and -punctured and then scarified 20 h later. AM were obtained and their apoptosis was greater in septic DM mice than in septic normal ones ($24.9\% \pm 1.8\%$ vs. $16.8\% \pm 2.82\%$, $P < 0.05$). The lung bacterial burden was increased 91 fold in diabetic septic mice than in septic normal ones. Consequently, the additional worsening of septic lung injury in diabetic individuals could instigate a superimposed lung infection and/or respiratory failure.

致 謝

兩年的研究生涯中，首先感謝我的指導教授盧敏吉老師、蔡宗統老師，因您對研究工作的熱忱、執著和嚴謹態度以及自由民主的教學方式，使我對於學術研究和為人處世有更進一步的了解，同時，我也相信往後的日子裡，我都會秉持老師所教導的「誠實」及「努力」來完成身邊的每一件事情。另外，還要感謝生理科全體老師在課業及實驗上予以的幫助及鼓勵。此外，感謝陳卓昇老師、李妙蓉老師、黃志揚老師對於本篇論文的審閱及斧正，提供許多寶貴的意見，得使此論文順利完成。

在感謝的同時，當然不能遺忘嘉欣、忠榮、美蘭、泓文等學長姊在實驗上予以的指導及幫助；還有，我親愛的湯姐、靜嫻、致芬、慧淇、瓊瑤、信忠、珮蓓、佩玉、竹苑、玲瑜、昆翰等同學兩年來一起攜手奮鬥及溫馨互助的感情，讓我這兩年的求學生涯充滿美好的回憶，也要謝謝美麗的學妹怡均、蓉蓉對於實驗幫忙。

除此之外，感謝二技的謝建正老師、林月春老師及同學小萬、瓊慧、玉惠、珮陵、淑萍、阿甘、姝瑩，我想當初如果沒有你們的鼓勵應該沒有今天的致謝吧！

最後也是最重要的，我要謝謝一直支持我家人，我最愛的爸爸、媽媽，自稱冬季戀歌男女主角的大姊、大姊夫，愛看卡通的二姊、二

姊夫，把自己歸類於美女的三姊及四姊，比女生更愛美的弟弟及號稱自己醜醜但乖乖的小姪子魯魯米，因為有你們溫暖的關懷、支持及疼愛，使我能順利完成兩年的學業，進而自信的迎接人生另一個新的階段。

目 錄

中文摘要.....	2
英文摘要.....	4
致謝.....	5
目錄.....	7
附錄.....	11
圖目錄.....	12
專有名詞符號與縮寫.....	13
第一章 緒論.....	15
第一節 前言.....	15
第二節 敗血症之概論.....	15
2-1 敗血症定義和分級.....	15
2-2 敗血症發生率及盛行率.....	16
2-3 敗血症致病源及機轉.....	17
2-4 敗血症之免疫反應.....	18
2-5 敗血症與糖尿病相關.....	20
第三節 敗血症引發肺部損傷.....	21
3-1 肺部結構及功能.....	21
3-2 肺泡巨噬細胞.....	21

3-3 肺細胞死亡之生理及病理角色.....	23
3-4 敗血症對肺部的傷害.....	24
第四節 糖尿病概論.....	26
4-1 糖尿病的定義.....	26
4-2 糖尿病的分類.....	26
4-3 糖尿病症狀.....	28
4-4 糖尿病之盛行率.....	28
4-5 糖尿病免疫功能.....	29
4-6 糖尿病之感染.....	30
第三章 研究設計及目的.....	31
第一節 研究緣起與目的.....	31
第二節 研究架構與設計.....	32
第四章 實驗設計及方法.....	33
第一節 實驗動物組別.....	33
1-1 敗血症組(sepsis).....	33
1-2 控制組(sham).....	33
第二節 糖尿病動物模型誘發.....	33
2-1 檸檬酸鹽緩衝溶液之配置.....	33
2-2 實驗動物來源.....	34

2-3 糖尿病之誘發.....	34
2-4 小鼠血糖測量.....	35
第三節 誘發敗血症 BALB/c 老鼠動物模型.....	36
3-1 敗血症模式.....	36
第四節 分離肺泡巨噬細胞之實驗.....	37
4-1 小鼠支氣管灌流術.....	37
第五節 肺部巨噬細胞凋亡之偵測及相關實驗.....	38
5-1 細胞計數.....	38
5-2 Cytospin.....	39
5-3 細胞形態 (Giemsa stain)	40
5-4 流式細胞儀 (FACScan) 偵測細胞凋亡.....	40
5-5 DAPI 染色觀測細胞凋亡形態.....	41
第六節 肺部菌落培養.....	42
6-1 老鼠左肺之取得.....	42
6-2 肺部菌落培養步驟.....	43
第七節 統計方法.....	43
第五章 實驗結果.....	45
第一節 糖尿病老鼠之血糖值.....	45
第二節 糖尿病老鼠之體重.....	46

第三節 肺泡巨噬細胞形態和比例.....	47
第四節 支氣管灌流肺泡巨噬細胞數目.....	47
第五節 肺泡巨噬細胞細胞凋亡之比例.....	48
5-1 FACSscan 檢測誘發敗血症肺泡巨噬細胞凋亡之比例.....	48
5-2 DAPI 染色觀察誘發敗血症肺泡巨噬細胞凋亡之比例.....	49
第六節 肺部細菌培養結果.....	50
第六章 討論.....	58
第七章 結論.....	62
第八章 參考資料.....	63

附 錄

第一章 緒論.....	79
第一節 雌性素概述.....	79
1-1 雌性素 (estrogen)	79
1-2 雌性素接受器 (estrogen receptor; ER)	79
1-3 雌性素接受器的基因調控.....	80
1-4 雌性素與免疫.....	81
1-5 敗血症與雌性素相關性.....	83
第二章 研究設計及目的.....	84
第三章 實驗設計及方法.....	85
第一節 ER 接受器轉植至 Raw264.7 細胞相關實驗.....	85
1-1 細胞培養.....	85
1-2 質體萃取.....	85
1-3 DNA 轉植 (Transfection)	86
第四章 參考資料.....	88

圖目錄

圖一：確立糖尿病老鼠誘發成功，在予以 STZ 誘導糖尿病 8 週及 30 週測量老鼠血糖值.....	52
圖二：老鼠予以 STZ 誘發成慢性糖尿病鼠，週齡 6 到 30 週每月體重之紀錄.....	53
圖三：敗血症模式術後 20 小時，測量慢性糖尿病及非糖尿病老鼠之肺泡巨噬細胞數目.....	54
圖四：敗血症模式術後 20 小時，使用流式細胞儀(FACScan)測量慢性糖尿病及非糖尿病老鼠之肺泡巨噬細胞的凋亡情形.....	55
圖五：敗血症模式術後 20 小時，使用 DAPI 染色於顯微鏡下測量慢性糖尿病及非糖尿病老鼠之肺泡巨噬細胞的凋亡情形.....	56
圖六：敗血症模式術後 20 小時，測量慢性糖尿病及非糖尿病老鼠之肺部細菌菌落數量.....	57

專有名詞符號與縮寫

ALI: Acute Lung Injury 急性肺傷害

AM: Alveolar Macrophage 肺泡巨噬細胞

LBP: LPS-Bind Protein 脂多醣結合蛋白

ARDS: Acute Respiratory Distress Syndrome 急性呼吸窘迫症

CLP: Cecal Ligation and Puncture 盲腸結紮穿刺手術

DM: Diabetes Mellitus 糖尿病

IL: Interleukin 介白質素

LPS : Lipopolysaccharide 脂多醣

NK cell: Natural Killer cell 殺手細胞

NO: Nitric Oxide 一氧化氮

MODS: Multi-organ Dysfunction Syndrome 多重器官衰竭

ROS: Reactive oxygen species 氧自由基

SIRS: Systemic Inflammatory Response Syndrome 全身性發炎反應

症候群

DKA: Diabetic ketoacidosis 酮酸尿症

NIDDM: Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus 非胰島素依賴

型糖尿病

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

HLA: Human Leukocyte Antigen 人類白血球抗原

PMN: Polymorphonuclear Cell 多型核白血球

TNF: Tumor Necrosis Factor 腫瘤壞死因子

第一章 緒論

第一節 前言

敗血症主要是局部性感染所導致的全身性炎症反應，而糖尿病病人是感染的高危險群，所以其導致敗血症的機率也比一般健康人高；在臨床上敗血症所併發的多重器官衰竭敗血症，是加護病房病人常見死因之一，其中又以呼吸系統衰竭最為普遍，所以預防及治療敗血症的併發症是非常重要的，尤其對於有高感染頻率的糖尿病病人更是當務之急。

第二節 敗血症概論

2-1 敗血症定義和分級

Schttmuller 等學者在 1914 年，首先提出敗血症是因細菌體進入血液所引發的炎症疾病。1992 美國胸腔醫學及重症醫學會 (ACCP/SCCM)，更進一步的定義敗血症為：體溫大於 38 或小於 36、心跳每分鐘大於 90 下、呼吸每分鐘大於 20 次、血液中白血球數目每毫升大於 12,000 或小於 4,000 個或不成熟白血球大於 10%，條件符合其中兩項就稱為敗血症 (Bone et al., 1992; Bone, 1996; Alia et al., 1999)。

同時 ACCP/SCCM 將敗血症依嚴重程度分成：全身性發炎反應症候

群(systemic inflammatory response syndrome , SIRS)、敗血症(sepsis)、嚴重敗血症(severe sepsis)、敗血性休克(septic shock)、多重器官衰竭(multi-organ dysfunction syndrome , MODS ; Proulx et al. , 1996)。所以簡單的說，敗血症是必須有明確的感染來源，並且合併全身系統的炎症反應症候群。

2-2 敗血症發生率及盛行率

Sands 等學者針對八所醫學中心調查，發現每天每一千名病患中就有 2.8 人罹患敗血症(Sands et al. , 1997)，從 1988 年到 1998 年敗血症發病率增加了 23.3%，美國每年約有 75 萬人發生敗血症，22 萬人死於敗血症，其死亡排名與台灣相同皆在第十一位(Angus , 2001；行政院衛生署，2000)，根據近年發表 131 篇報告的歸納統計，敗血症整體死亡率為 49.7%(40-80%；Friedman et al. , 1998)，其中腹膜炎引起的敗血症死亡率高達 60-80%(Matthew et al. , 1999)。

1995 年，Rangel 等學者對加護病房(ICU)及一般病房的 3708 名病患進行調查，發現有 68%的病患會進展到 SIRS 標準，其中 26%會演變成為敗血症、18%為嚴重敗血症以及 4%為敗血性休克。同年 Salvo 等學者將義大利 99 所國家公認的 ICU 已確認為敗血症病患依 ACCP/SCCM 進行分類，發現有 52%為 SIRS、4.5%為敗血症、2.1%為嚴重敗血症和 3%為敗血症休克，由此可知敗血症在臨床上已成為病患

病情惡化潛在因素。

2-3 敗血症致病源及機轉

敗血症由細菌、黴菌、寄生蟲或病毒所引起(Oberholzer et al. , 2001) , 其中以革蘭氏陰性菌最常見如大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae* ; O' Boyle et al. , 1998) ; 疾病表現特徵有敗血性休克、凝血功能異常、發燒、低血壓、心跳加速、呼吸急迫、多器官功能衰竭(Claudia et al. , 1998; Kumins et al. , 1996; Matthew et al. , 1999) , 且發病的病灶大多來自肺部、生殖泌尿道、肝膽腸胃道、皮膚及軟組織(Akihiro et al. , 2000 ; Weiss et al. , 1999)。

當宿主受到病原體侵入時 , 正常情形下身體的免疫系統會進行辨識及清除 , 但病原體數量過多或宿主防禦降低時 , 會導致病原體無法有效被網狀內皮系統清除進而入侵血液 , 此時可稱之為菌血症 (bacteremia) , 更進一步引發全身發炎反應則為敗血症 (Lodato et al. , 1999 ; Dziarski , 1991)。

許多研究認為格蘭氏陰性菌所產生的內毒素 (Lipopolysaccharide ; LPS) 也是引發敗血症的原因之一 , 當 LPS 進入血液循環會與 LPS 結合蛋白 (LPS-bind protein ; LBP) 結合形成複合體 , 進而活化單核球及巨噬細胞表面的 CD14 (Tobias, 1999; Didier

et al. , 2001) , 再經由 Toll like receptor-4 (TLR-4)及 myeloid differentiation factor 88 (MYD88)的結合 , 將 CD14 所接收到的訊息轉送入細胞內(Didier et al. , 2001 ; Samuel et al. , 2001) , 最後由 NF- κ B 進行基因調節 , 使細胞活化及產生炎症激素(Hoffmann , 2002) ; 而由格蘭氏陽性菌所產生的內毒素 LTA (Lipoteichoic acids) , 其活化敗血症路徑與 LPS 相似 , 也是經由細胞表面 CD14 來做訊息的傳導(Jian et al. , 2001) ; 受到 LPS 及 LTA 活化的細胞會釋放細胞激素(Cytokines)及趨化激素(Chemokines)等 , 形成炎症反應(Kubo et al , 1998)。目前認為 TLR-4 是革蘭氏陰性菌內毒素的接受器,而 TLR-2 則是格蘭氏陽性菌的 Peptidoglycan 接受器(Takeuchi et al. , 1999)。

2-4 敗血症之免疫反應

細菌本身或其分泌物 , 會與人體作用引起免疫反應(Scott et al. , 1999 ; Tapper et al. , 2000) , 人類免疫反應一般分成兩道防線 , 第一道為非特異性免疫反應(Non-specific immune response)如皮膚、黏膜、黏液、巨噬細胞等天然屏障 ; 第二道為特異性免疫反應(Specific immune response)以 T 細胞和 B 細胞為主(Samaranayake et al. , 2001)。

當病原體侵入人體 , 會被吞噬細胞吞噬或產生炎症反應來殺死病

原體，吞噬細胞中又以嗜中性白血球最能有效吞噬並殺死大部份入侵者；而單核球經由血液系統進入組織即轉變成巨噬細胞進行吞噬，並將外來抗原進行辨識呈現給 T 細胞，進而活化 T 細胞使之產生記憶力，當身體再次受到相同病原體感染時，就會立即產生抗力，清除病原體(Nau et al. , 2002)。

受到活化的細胞會釋放多種炎症物質如腫瘤壞死因子(Tumor necrosis factor- ;TNF-)、介白質素-1 (Interleukin-1; IL-1)、介白質素-6 (Interleukin-6; IL-6)、介白質素-8 (Interleukin-8 ; IL-8)、干擾素 - (Interferon gamma ; IFN-)，前列腺素 (Prostaglandins)、血小板活化因子 (Platelet activation factor)、一氧化氮(Nitric oxide ; NO)、氧自由基(Reactive oxygen species ; ROS)等(Claudia et al. , 1998; Rietschel et al. , 1996)。

在敗血性休克時，如有過高的 TNF- 、 IL-1 和 IL-6，就象徵不可控制且有害的炎症反應(Keith et al. , 1996)。介白質素-12 (Interleukin-12 ; IL-12)在敗血症早期會增加殺手細胞(Natural killer ; NK)和 T 細胞數目，而 NK 和 T 細胞所釋放的 INF- 和其他細胞激素，會形成嚴重敗血症(Matthew et al. , 1999; Brunda, 1994)。而介白質素-10 (Interleukin-10 ; IL-10)，會活化 CD4⁺ T 細胞、B 細胞、單核白血球和上皮細胞，並且降低 TNF- 、 IL-1、 IL-12、

MIP-2(Macrophage inflammatory protein-2)、MIP-1 (Macrophage inflammatory protein-1) 和 一 些 chemokines 如 : C-X-C chemokines、C-C chemokines 、KC chemokines (Raju et al. , 2001 ; Bonfield et al. , 1995)。介白質素-13 (Interleukin-13 ; IL-13) 在敗血症中 , 同樣可降低 TNF- α 、MIP-2、MIP-1 、KC chemokines 和 C-X-C chemokines , 為保護性角色(Akihiro et al. , 2000) ; 一般來說 , 炎症激素出現在敗血症 , 並非全是有害的(Keith et al. , 1996 ; Bagby et al. , 1991 ; Eskandari et al. , 1992) , 它們之間的互動及協調對於敗血症的嚴重程度扮演一個決定角色。

2-5 敗血症與糖尿病相關性

在糖尿病研究中指出糖尿病病患容易增加細菌的入侵 , 並引發敗血症和動脈硬化的產生 (Donder , 2002) , 且在糖尿病人類或動物身上 , 皆發現循環免疫中的噬菌細胞功能是降低的 (Abrass and Hori , 1984)。進一步研究顯示 , 敗血症會惡化糖尿病病人葡萄糖的新陳代謝 , 其主要由靜脈注射葡萄糖進行葡萄糖耐受試驗 , 發現敗血症會增加非糖尿病老鼠葡萄糖的消耗 , 但不影響糖尿病老鼠葡萄糖的消耗 (Lang et al. , 1987)。

在 2001 年 Alain 等學者發表 , 1976-1980 年間 , 針對 533 位糖尿病及 8 , 675 位非糖尿病的成人 , 進行 12-16 年的追蹤研究 , 其死

亡人數在糖尿病有 36 人，而在非糖尿病有 265 人(前者每年有 4.7‰ 人死亡，後者有 1.5‰； $P < 0.001$)，在這 301 位死亡人數中，因肺炎感染導致死亡就有 58%，因敗血症死亡有 25%。但目前對於敗血症及糖尿病間的關係尚不清楚，因此有待我們更進一步研究及探討。針對糖尿病於下文中有更詳細介紹。

第三節 敗血症引發肺部損傷

3-1 肺部結構及功能

肺臟為身體氧氣提供之場所，位於胸腔內分左右兩邊，左肺含有 2 個肺葉，右肺則有 3 個葉肺，而氣體進入肺臟主要輸送途徑為鼻腔(Nasal cavity)、咽(Pharynx)、喉(Larynx)、氣管(Trachea)、支氣管(Bronchus)、細支氣管(Bronchioles)、終末細支氣管(Terminal bronchioles)、呼吸性支氣管(Respiratory bronchioles)、肺泡管(Alveolar duct)、肺泡囊(Alveolar sac)及肺泡(Alveolar)，進行氣體交換，提供氧氣、排出二氧化碳並且調節血液氫離子濃度。

3-2 肺泡巨噬細胞

在肺臟中的巨噬細胞主要有四種，分別為肺泡巨噬細胞(Alveolar macrophage；AM)、間質巨噬細胞(Interstitial macrophage)、血管內巨噬細胞(Intravasular macrophages)及樹枝細

胞(Dendritic cell)。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，骨髓中骨幹細胞分化成單核芽球(Monoblast)，進而衍生成前單核球(Promonocyte)，於血液中分化成單核球(Monocyte)，進入組織或器官即為巨噬細胞(Balsind, 1997)。AM 的大小約 15~50 μm ，細胞核呈現濃染無分葉，細胞質內有顆粒及細胞質空泡，細胞質與細胞核的比例為 3:1，約可存活 120 天(Mann et al., 1971)。

AM 是位於肺泡中的單核吞噬細胞，它主要貼附於富含空氣的肺泡上皮細胞或肺泡壁上(Sylvia et al., 2003)，而 AM 的功能除了清除老化細胞，最主要的功能是辨識入侵的微生物，如細菌、黴菌、微塵、抗原等(Khadom et al., 1985)。當 AM 受到刺激活化時會分泌酵素以進行吞噬及消化功能，並且釋放一些細胞激素如(TNF-、IL-1、IL-12)、趨化性發炎物質(MIP-2、MIP-1)及群落刺激因子，這些 AM 分泌出來物質可誘導顆粒性白血球和單核球幹細胞的複製，並吸引顆粒性白血球和單核球細胞遷移到肺臟組織中，強化防禦系統對抗感染原(Golde et al., 1972)；當巨噬細胞將抗原吞噬並處理後，會將抗原呈現給 T 細胞促使 T 細胞活化，所以 AM 為肺臟下呼吸道防禦機制的第一道防線(Damon et al., 1983)。

3-3 肺細胞死亡之生理及病理角色

細胞的死亡有兩種不同表現型態，分別為細胞壞死(Necrosis)及細胞凋亡(Apoptosis)。細胞壞死主要是因為一些非正常生理的因素發生，如熱及藥物導致的損傷、感染、梗塞、缺氧等因素，進而使細胞產生腫脹、細胞膜被分解破壞、蛋白質變性、胞器裂解融化，最後細胞死亡(Duvall et.al. , 1985)。細胞凋亡主要是細胞所出現的一種自發性程序性的死亡過程(programed cell death)，而細胞凋亡這個名詞，在 1972 年首次被 Kerr, Wyllie 和 Currie 所提出，其主要特徵為單一細胞出現細胞皺縮、核裂解、凋亡小體的產生(Kerr et al. , 1972)。而細胞凋亡與壞死時常同時出現，如貧血及氧化物質的產生皆會促使細胞凋亡與壞死(Keith, 2001)。

細胞凋亡的產生主要受到發炎性(Proinflammatory)及抗炎性(Anti-inflammatory)反應之間相互平衡所調控(Christine et al. , 2001)。有報告指出細胞壞死會引發炎症反應，反之細胞凋亡會引起抗炎症反應(Keith, 2001)，當身體初期產生炎症反應時，會抑制嗜中性球、巨噬細胞和其他細胞的凋亡，而延長其功能性及生存，但此生存的延長破壞了調控的平衡，可能會導致嗜中性球、巨噬細胞大量產生有害物質，造成組織的傷害及負擔(Hamada et al. , 1999 ; Hotchkiss et al. , 1997)。目前嚴重敗血症造成肺細胞死亡的原因

尚未清楚，有報告指出在敗血症肺傷害中的嗜中性球及肺部巨噬細胞凋亡增加，而細胞凋亡是嗜中性球自炎症組織中移除的路徑之一 (Christine et al., 2001)，其他相關研究也顯示敗血症會增加免疫淋巴球細胞的凋亡 (Hotchkiss et al., 2001)。

3-4 敗血症對肺部的傷害

敗血症是肺部損傷及抗菌機轉尚未清楚，而肺泡巨噬細胞 (Aveolar macrophage; AM) 是肺部一個很重要的免疫細胞，且為下呼吸道防禦機制第一道防線；AM 是直接接觸病原體的噬菌細胞，並擴大肺部炎反應，引起多種白血球趨化現象和細胞激素如 TNF- α IL-1、IL-6 (Raju et al., 2001)。

AM 於出血及敗血症後，經由 NF- κ B 及 MAPK 調控釋放的 cytokines 及 chemokines (Doraid et al., 2002)，是形成肺部損傷疾病重要因素。C-X-C chemokines 可促進嗜中性白血球黏附到內皮細胞轉移至肺部組織 (Czermak et al., 1999; Schmal et al., 1996)，在轉移至肺泡後會產生過氧化酶 (Myeloperoxidase; MPO) 和彈性蛋白酶 (Elastase)，MPO 會造成脂質過氧化及細胞膜受損，elastase 則會使膠原、蛋白多醣及纖維素被分解，造成細胞外基質和基底膜受損，進而損傷肺泡上皮使毛細血管滲漏影響氣體交換功能 (Redl et al., 1993)。

巨噬細胞受到 LPS 刺激產生的 MIP-2 會使 PMN (Polymorphonuclear Cell) 進入組織間隙，PMN 進入肺部組織與急性肺部損傷 (Acute lung injury ; ALI) 形成有關 (Czermak et al. , 1999 ; Schmal et al. , 1996 ; Randal et al , 2002) ; 且 LPS 也會增加肺泡巨噬細胞、肺上皮細胞、內皮細胞和間質細胞釋出 Nitric Oxide (NO) , NO 有抑菌、殺菌和阻止黴菌生長功能 (Kristor et al. , 1998 ; Wolkow , 1998) , 在生理上 NO 是提供一個保護的功能，但其過多時也會造成肺部損傷 (Ischiropoulos et al. , 1992)。

炎症過程是潛在組織破壞和免疫防禦、保護及修補組織之間的平衡；肺部損傷早期稱為急性肺傷害 (Acute lung injury ; ALI) , 晚期嚴重的 ALI 就稱為急性呼吸窘迫症 (Acute respiratory distress syndrome ; ARDS ; Rubenfeld et al. , 1999) , 而 ARDS 是炎症反應過度所造成的肺部組織損傷 (Windsor et al. , 1993 ; Martin , 1997) , 主要是因炎症反應過程中，受 LPS 活化的單核球和巨噬細胞釋放出 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8 等細胞激素，進而活化血管內皮細胞 (Endothelium) 及促使嗜中性球 (Neutrophils) 蓄積於肺部微血管中，並大量釋放自由基 (Free radical) , 導致肺組織損傷 (Alexander et al. , 2001 ; Brigitte et al. , 1999)。在外科 ICU 每 10 萬人就有 10-14 個 ARDS 病患，其死亡率高達 36-52% (Reynolds et al. ,

1998)；除此之外尚有許多物質參與肺部損傷反應，經由免疫反應持續進行，會形成更嚴重的組織損傷及器官衰竭。

第四節 糖尿病概論

4-1 糖尿病的定义

糖尿病是一種普遍的新陳代謝疾病，主要是體內無法釋放或有效的利用胰島素，導致血液中的葡萄糖異常升高；因胰臟細胞所分泌的胰島素，可促使葡萄糖進入細胞中產生能量或將其儲存，所以胰島素可以預防血糖的上升 (Robert et al. , 2000)。

NDDG(National Diabetes Data group)對於糖尿病的定义為：血清或血漿中的葡萄糖大於或等於 140mg/dl ($\geq 7\text{mmol/L}$)；而美國糖尿病協會則認為血漿中的葡萄糖只要大於 126mg/dl ($>6.99\text{mmol/L}$)就應懷疑可能有糖尿病(Mark et al. , 1995)。

4-2 糖尿病的分類

糖尿病目前臨床上將其分為三型，第一型糖尿病(Type I)又稱胰島素依賴型(Insulin-dependent diabetes mellitus ; IDDM)，因發病年齡在 40 歲前，病患大多為兒童或青少年，所以又稱為年輕型糖尿病 (juvenile diabetes ; William , 1999)。

在臨床上有 10~15%的 IDDM 病患會發展成酮酸尿症(Diabetic ketoacidosis ; DKA)，且 90%以上的病患血清測試中含有人類白血球

抗原(Human leukocyte antigen ; HLA) DR₃、DR₄、DR₃/DR₄及 DQ(James et al. , 2000) ; 因此許多學者認為此類型糖尿病可能和遺傳性自體免疫有關 , 原因為胰臟中的蘭氏小島細胞質抗體及蘭氏小島界面抗體 , 會引起 T 淋巴球、B 淋巴球及巨噬細胞的浸潤 , 導致胰臟中 90% 的 細胞遭受破壞 , 但其並不會影響 細胞(Mark et al. , 1995)。

另外也有學者認為環境因素可能也是導致 IDDM 的原因 , 幼年或青少年時期 , 因感染過濾性病毒或營養物不適當的攝取 , 導致免疫系統攻擊胰臟 細胞 , 造成胰島素嚴重缺乏 , 所此類病患需長期依靠施打胰島素來維持血糖值 (Robert et al. , 2000)。

第二型糖尿病 (type II) 又稱非胰島素依賴型 (Non-insulin-dependent diabetes mellitus ; NIDDM) , 此類病患血漿中的胰島素通常為正常或偏高 , 多發生在 40 歲以後(William, 2001) 且傾向家庭性 , 80~90%的病患有肥胖症狀特別是上半身肥胖(內臟/下腹部)(Robert et al. , 2000)。

原因主要為身體對胰島素產生了抗性 , 進而使骨骼肌對葡萄糖的吸收力降低及抑制肝糖的形成 , 但不會影響胰島素接受器和葡萄糖的運輸 , 治療方式以飲食控制運動口服藥物及注射胰島素來控制高血糖及預防 NHHHC(Nonketotic hyperglycemic-hyperosmolar coma ; Mark et al. , 1995)。

持續型糖尿病 (Secondary diabetes) 主要是經由其他疾病所導致的糖尿病例如：慢性胰臟炎、庫辛氏症、肢端肥大症，佔所有糖尿病的 5% (William, 2001)。

4-3 糖尿病症狀

糖尿病病患除了有高血糖外，還有多吃、多喝、多尿的三多症狀，當血糖大於 160~180mg/d 時，葡萄糖就會被排泄到尿液，此時水份也會大量被釋放到尿液中而產生多尿情形，也因為如此身體出現劇渴現象需大量補充水分，進而產生多喝情形，又因葡萄糖的喪失，導致卡路里的缺乏，身體進行代償作用產生飢餓感，所以出現多吃現象；因為胰島素的長期缺乏使第一型糖尿病病患有體重減輕的情形，但第二型則無，病患長期處於高血糖狀態，導致常會伴隨血管、眼睛、腎臟、皮膚和神經等併發症 (Robert et al., 2000)。

4-4 糖尿病之盛行率

在美國有 7% (8 百萬) 成年人是糖尿病患者 (Helene and Thomas, 2001)；行政院衛生署民國九十年十大死因調查，糖尿病在台灣為十大死因中的第五位；在台灣地區 NIDDM 佔所有糖尿病患者人口的 96.5%，總數為 40 萬；而 IDDM 佔了 3.5%，總數為 1 萬 4 千人，但未被診斷出的糖尿病病患約佔 2/3，所以推斷台灣地區糖尿病病患應高達 1 百萬人。

4-5 糖尿病免疫功能

糖尿病會影響細胞免疫功能，其中以多型核白血球(PMNLs)、單核球及淋巴球功能變化最大；研究發現 DM 病人 PMNLs 的附著、趨化、吞噬、氧化及細胞毒殺能力均呈現異常(Helene and Thomas, 2001)；且在糖尿病 type I 和 type II 中，嗜中性球的趨化及殺菌能力受到抑制，而因刺激所活化的 PMNLs 數目和炎症反應所產生的自由基也降低(Delamaire et al., 1997; Gallacher et al., 1995)。此外，有研究顯示糖尿病病人的單核球對李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)吞噬作用及趨化能力出現降低情形(Hill et al., 1983)，且 IDDM 病人 T 細胞及巨噬細胞所分泌的 IL-12 產量減少及自然殺手細胞(Natural killer cells)對於干擾素的反應也比正常人來得弱。IL-12 功能主要是調節 T 細胞的增殖能力和活性(Kaye et al., 1986; Negishi et al., 1988)，當其 IL-12 產量減少，T 細胞活性降低，其分泌的 IFN- γ 也減少，導致受 IFN- γ 活化 NK 細胞數減少，進而降低身體防禦能力。

在糖尿病的炎症反應中，來自單核球和 PMNLs 所產生的細胞激素是增加的，如周邊血液單核細胞(Peripheral blood mononuclear cells; PBMCs)受到刺激會增加 THF- β 、IL-6 及 IL-8 的釋放。值得注意的是，近年來研究證明高血脂(Hyperlipidemia)可能和糖尿病所

引起的細胞免疫反應有相關性(Lacopino , 2001 ; Helene et al. , 2001) , 但兩者間的相關性目前尚不清楚 , 只是臨床上第二型糖尿病病患常伴隨高血脂及心血管疾病。

4-6 糖尿病之感染

研究指出糖尿病是比較容易受到感染(Tsukaguchi et al , 2002 ; Alain et al. , 2001) , Golden 等人於 1990 至 1995 年 , 收集 411 位糖尿病病患執行冠狀動脈手術 , 並觀察手術後感染情形 ; 結果感染部位有腿部、胸腔傷口、肺炎和尿道感染 , 且發現手術前血糖濃度大於或等於 200mg/dl 有較高的感染情形(Golden et al. , 1999)。臨床上 , 糖尿病病患又以口腔念珠球菌(Oral candidiasis)和食道念珠球菌(Esophageal candidiasis)、菌尿症(Bacteriuria)、膀胱炎(Cystitis)、腳部感染、結核病(Tuberculosis)、S.aureus 肺炎和格蘭氏陰性菌肺炎、沙門氏桿菌腸炎(Salmonella enteritidis) 最常見 , 所以糖尿病為感染之高危險群。

因生活水準提升 , 飲食及生活型態的改變 , 糖尿病已普遍分佈於全世界 , 所以如何預防糖尿病的發生及降低糖尿病感染機率 , 是目前應重視的問題之一。

第三章 研究設計及目的

第一節 研究緣起與目的

敗血症是感染的併發症(Raju et al. , 2001) , 其感染後嚴重程度與感染病原體種類、感染部位、器官功能、宿主本身是否有疾病及生理機制狀態有相當大的關係(Derek et al. , 2001) , 有研究指出糖尿病病患較正常人容易遭受細菌的入侵 , 並且引發敗血症(Donder , 2002) , 臨床上發現敗血症所引起的多器官功能衰竭是導致加護病房病人死亡常見的原因之一(Baue , 2001) , 尤其以呼吸系統及腎臟系統衰竭最為普遍 , 其死亡率高達 60% (Kathryn , 2002)。所以敗血症病患其肺臟損傷程度 , 關係著病患之存活率 , 而肺泡巨噬細胞(alveolar macrophage ; AM)為肺臟下呼吸道防禦機制的第一道防線 , 是直接接觸病原體的噬菌細胞 , 因此 AM 傷害或凋亡是觀察肺部損傷一個重要指標。有學者對敗血症的病人做觀察 , 發現糖尿病病人比非糖尿病病人不易進入嚴重病程如呼吸窘迫症(ARDS ; Moss et al. , 2000)。所以本實驗主要是藉由觀察 AM 傷害及凋亡 , 來探討敗血症對於糖尿病老鼠肺部防禦機轉之影響及肺部傷害的作用。

第二節 研究架構與設計

本研究首先將 BABL/c 老鼠以 STZ 誘發成慢性糖尿病鼠，接著於老鼠 32 週齡時，使用盲腸結紮穿刺手術模式，來誘發老鼠產生敗血症，於手術後 20 小時將老鼠犧牲，經由肺泡灌流技術分離出肺泡巨噬細胞，計數後，利用 DAPI 染色及流式細胞儀偵測肺泡巨噬細胞凋亡比例的表現。為了更進一步評估肺部防禦機轉，將老鼠左肺取出進行均質，以無菌技術操作細胞培養 18~24 小時後，計算細菌之菌落數並將其作比較。

第四章 實驗設計及方法

第一節 實驗動物組別

1-1 敗血症組 (sepsis)

(1) 糖尿病老鼠予以盲腸結紮穿刺手術 (Cecal ligation and puncture ; CLP)

(2) 控制組老鼠予以盲腸結紮穿刺手術

1-2 非敗血症組 (sham) :

(1) 糖尿病老鼠無執行盲腸結紮穿刺手術

(2) 控制組老鼠無執行盲腸結紮穿刺手術

第二節 糖尿病動物模型誘發

2-1 0.05M , pH: 4.5 檸檬酸鹽緩衝溶液 (citrate buffer) 之配置

材料:

檸檬酸鹽 (Citric Acid ; $C_6H_5Na_3O_7$; USB)、微量天平、二次水 (ddH₂O)、50ml 離心管 (50ml centrifuge tube)、1N 及 12N 氫氧化鈉 (NaOH)、1N&12N 鹽酸 (HCl)、塑膠滴管 (dropper)、燒杯、拭鏡紙、酸鹼測定儀 (pH Vision , Jenco , Electronic ; LTD)、pH:4 & pH:7 校正液、試管震盪機 (vortex mixer)。

方法：

將 2.5 mmole Citric Acid 加入 50 ml 的 ddH₂O 中 vortex 均勻，先後以 pH:4 pH:7 校正液校正酸檢測定儀，進而測量 sodium citrate buffer 之 pH 值，分別以 NaOH 及 HCl 來調整 sodium citrate buffer，直到 pH 值等於 4.5。

2-2 實驗動物來源

其來源為國家科學委員會-國家實驗動物繁殖及研究中心，動物品系為 5 週、雄性、BALB/c 老鼠，飼養於 22 恆溫空調房間，相對溼度為 55% 左右，與以 12-12 小時光照與黑暗環境，自由飲水及進食。

2-3 糖尿病之誘發

材料：

PE 飼養盒、木屑、墊料、餵水瓶、一次水、磅秤、streptozotocin (N-(Methylnitrosocarbamoyl)-o glucosamins ; Sigma)、0.05M 檸檬酸緩衝溶液(citrate buffer)、1c.c 注射用針筒、5 c.c. 試管、吸管唧筒(pipette pump)、吸管尖(blue tip)。

方法：

將小鼠至於 PE 盒飼養 1 週，任其自由進食飲水，6 週時將老鼠秤重，依體重取 0.055 mg/g 的 streptozotocin 溶於 0.2 ml 的 citrate buffer 中，連續予以腹部注射 4 天，空 2 天再注射 2 天；在第 8 週時測量老鼠血糖值，血糖值須大於或等於 250 mg/dl 才視為有意義之糖尿病誘發；老鼠糖尿病誘發後飼養 6 個月，每週稱量體重並紀錄。

2-4 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 μ l 鈍針加樣器 (YSI 1501 ; YSI)、膠帶、報紙、透明塑膠袋、麻醉用玻璃鍾罩、拭淨紙、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：

將葡萄糖分析儀使用校正液校正 (校正液直為 180 mg/dl)，接著將老鼠放入玻璃鍾罩中麻醉，老鼠昏迷後將其平躺於解剖台上並固定四肢，以 70%酒精棉消毒老鼠尾巴，用剪刀剪一斷尾巴，擠出大於 25 μ l 的血於透明塑膠袋上，以鈍針加樣器吸取 25 μ l 老鼠全血，將

其注入儀器測量血糖值，清洗 pipette 並擦乾，以乾棉球及止血夾夾住老鼠尾巴止血，紀錄血糖值。

第三節 誘發敗血症 BALB/c 老鼠動物模型

3-1 敗血症模式

盲腸結紮穿刺手術(Cecal ligation and puncture ; CLP)

材料：

32 週大糖尿病鼠、乙醚、麻醉用玻璃鐘罩、70 % 的酒精、碘酒、無菌生理食鹽水(0.9% normal saline)、21 號針頭、1 ml 針筒一支、手術器械盒、彎盆、剪刀、鑷子、持針器、縫合針線(3-0 silk)、擦拭紙、報紙、固定膠帶、解剖台、剃毛機、吸塵器、痰液抽吸器、手套、無菌棉花。

方法：

老鼠為 32 週大，糖尿病及非糖尿病 BALB/c 老鼠。步驟進行前先將器械消毒，並將縫合線置於生理食鹽水中浸泡備用，使用乙醚麻醉老鼠，用布膠將小鼠四肢固定於解剖板上，以縫合線綁住牙齒，將氣管拉直，再以痰液抽吸器抽取痰液，以避免氣管阻塞並注意心跳；使用剃毛機將老鼠胸、腹部毛剃除，以吸塵器吸取，換上乾淨手套，以 70 % 酒精消毒手部保持無菌狀態；先以碘酒消毒老鼠腹部

1-2 cm，待乾再以 70 % 酒精消毒，以無菌乾棉球擦拭乾淨，使用鑷子夾起皮膚剪開一小切口，沿腹部中央剪開皮膚層約 1-2 cm，再剪開肌肉層露出盲腸，將盲腸末 1/3 處以縫合線進行結紮(綁 2 圈、1 圈、1 圈)，綁好後以 21 號針頭穿刺，並用兩隻鑷子擠出 1/5 米粒大糞便塗抹盲腸再放回腹腔內；分別縫合肌肉層、皮膚層，在縫合處的頭、尾均打 3 個節(各 2、1、1)，線的末端預留 2 cm 待綁好後將線頭剪斷；將固定膠帶取下，在老鼠脖子皮下處注射 1 ml 無菌生理食鹽水，以避免老鼠因手術後疼痛不飲水或腹瀉導致脫水現象。而控制組只將盲腸拿出後，再放回腹腔內並縫合。

第四節 分離肺泡巨噬細胞之實驗

4-1 小鼠支氣管灌流術(bronchoalveolar lavage fluid ; BAL)

材料：

32 週大的糖尿病鼠、乙醚、麻醉用玻璃鐘罩、麻醉小罩杯、70 % 的酒精、碘酒、無菌生理食鹽水(0.9% normal saline)、21 號針頭、1 ml 針筒、PE 管(polyethylene tube ; PE-50)、手術器械盒、彎盆、剪刀、鑷子、止血箝、縫合針線(3-0 silk)、擦拭紙、報紙、固定膠帶、解剖台、痰液抽吸器、手套、無菌棉花、無菌一倍磷酸鹽緩衝溶液(1X PBS ; PH:7.2 - 7.4)、離心管(15 ml 和 50 ml centrifuge

tube , Falcon)、冰桶、冰塊。

方法：

步驟進行前先將器械消毒，並將縫合線置於無菌生理食鹽水中浸泡備用，取先前以誘發敗血症的 BALB / c 老鼠，使用乙醚麻醉老鼠，用布膠將小鼠四肢固定於解剖板上，以縫合線綁住牙齒，將氣管拉直，再以痰液抽吸器抽取痰液，以避免氣管阻塞並注意心跳；換上乾淨手套以 70 % 酒精消毒，以碘酒消毒老鼠由氣管到腹部，待乾再以 70 % 酒精消毒，以乾棉球擦拭乾淨；先將氣管處皮膚剪開，並找出氣管，接著延肋緣，將皮膚層及肌肉層剪開，找出橫膈膜，小心將橫膈膜與肋緣分開，露出肺臟；以夾子扶住氣管將 PE 管插入，以縫合線綁 2 圈，吸取 1 ml PBS (每次 < 1ml)，溫和並輕輕注入肺中，觀察肺是否有漲大，輕輕回抽含有巨噬細胞的緩衝液，所得之液體延管壁注入管內(共 15 ml)並至冰上，接著取肝、脾、心、腎放置試管於冰上(存於 -20)。

第五節 肺部巨噬細胞凋亡之偵測及相關實驗

5-1 細胞計數

材料：

細胞計數器 (Hemocytometer ; Hausser Scientific , USA)、冷凍

離心機(centrifuge , IEC centra GP8R)、顯微鏡(microscopy)、1× PBS、電動吸量管(Electric Pipette)、微量吸管尖(tip)、計數器。

方法：

將所收集到的兩管灌流液在 4℃、1200rpm、5 分鐘下離心，接著將上清液倒掉，再輕敲位於離心管底部之細胞，使之均勻分散；再以電動吸管注入 10 毫升 1×PBS 溶液進行混合清洗後再離心一次。

最後在加入適當 1×PBS 溶液進行混合，以吸量管吸取約 20 μl 的細胞液並去除前端 1 至 2 滴，沿著凹槽處將細胞液滴入細胞計數盤中，使細胞液蓋滿格子，於顯微鏡下算取井字四周四大格之細胞，並將顯微鏡下所數得的細胞，依照公式來計算灌流液中肺巨噬細胞之總數，公式為：灌流所得之肺部巨噬細胞= (四格所得細胞總數 / 4) × 10⁴ × 稀釋液體積。

5-2 Cytospin

材料：

玻片、玻片架、cytospin 固定架及漏斗、打動濾紙、滴管、cytospin 離心機。

方法：

以 Pipette 吸取 40 μl 混合均勻的肺泡細胞液，將其滴入 Cytospin

的漏斗管中，設定 300 rpm 轉速、5 分鐘，將細胞打入玻片上，取出玻片在室溫中風乾。

5-3 細胞形態 (Giemsa stain)

材料：

Giemsa 染液、二次水(ddH₂O)、玻片染架盒、水盒、滴管、顯微鏡(microscopy)。

方法：

將 cytopsin 的玻片風乾置於玻片架，再放入已裝好染液的染盒中染 30 分鐘，其 Giemsa 與 ddH₂O 的比例為 1:29。30 分鐘後，將玻片架取出放入水盆中用水沖 1 分鐘，接著取出玻片於空氣中風乾，再使用光學顯微鏡觀察細胞形態。

5-4 流式細胞儀 (FACScan) 偵測細胞凋亡

材料：

細胞凋亡偵測試劑組 (cell death detection kit ; Roche)、微量離心管 (tip)、5 毫升試管 (Falcon , BD)、試管放置盒、冷凍離心機 (centrifuge)、1 × PBS、鋁箔紙、避光用冰桶、混合器 (Vortex)、流式細胞儀 (Flow cytometer , FACScan ; BD)。

方法：

依據細胞計數方法所得肺部巨噬細胞數量，兩組各取 4×10^5 個細胞數，將其以 1,200 rpm、5 分鐘離心，接著去除上清液並輕敲離心管底部使細胞均勻分散，加入 200 μ l 的 HEPES buffer，實驗組及對照組各取 50 μ l 分別分裝成 4 管，每管含有 1×10^5 的細胞。

將 4 管分別加入所需之螢光試劑各 0.8 μ l 為：1. 不加螢光試劑
2. 加 Annexin-V 螢光試劑 3. 加 PI 螢光試劑 4. 加 Annexin-V 和 PI 雙染螢光試劑，之後避光靜置於室溫下反應 20 分鐘隨之加入 0.3 ml PBS 溶液混合，於一小時內以流式細胞儀收集資料分析。

5-5 DAPI 染色觀測細胞凋亡形態

材料：

濃度 1 μ g/ml 的 DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole) 染劑 (sigma)、含有 AM 細胞 cytospin 的玻片、1 \times PBS、染色盒、滴管、螢光顯微鏡 (Fluorescence microscopy) 340/380 nm excitation

方法：

將含有 AM 細胞 cytospin 的玻片風乾，接著以 4% 類福馬林 (paraformaldehyde) 固定 30 分鐘，之後用 PBS 清洗三次，再將玻片置於染色盒中，使用濃度 1 μ g/ml 的 DAPI 染劑染色 30 分鐘，以 PBS

清洗至乾淨後放置螢光顯微鏡下進行觀察。

第六節 肺部菌落培養

6-1 老鼠左肺之取得

材料：

32 週大的糖尿病鼠、乙醚、麻醉用玻璃鐘罩、麻醉小罩杯、70 % 的酒精、碘酒、無菌生理食鹽水(0.9% normal saline)、手術器械盒、彎盆、剪刀、鑷子、止血箝、擦拭紙、報紙、固定膠帶、解剖台、痰液抽吸器、手套、無菌棉花、無菌細菌培養管、冰桶、冰塊。

方法：

步驟進行前先將器械消毒，使用乙醚麻醉老鼠，用布膠將小鼠四肢固定於解剖板上，以縫合線綁住牙齒，將氣管拉直，再以痰液抽吸器抽取痰液，以避免氣管阻塞並注意心跳；換上乾淨手套以 70 % 酒精消毒，以碘酒消毒老鼠由氣管到腹部，待乾再以 70 % 酒精消毒，以乾棉球擦拭乾淨；延肋緣將皮膚層及肌肉層剪開，找出橫膈膜，小心將橫膈膜與肋緣分開，露出肺臟，將左肺取下放於無菌細菌培養管置於冰上(存於-20)。

6-2 肺部菌落培養步驟

材料：

無菌 1 × PBS、混合器(Vortex)、均質機、滅菌均質棒、酒精(75% & 95%)、微量離心管(eppendorff)、混合器(Vortex)、三角玻璃棒、1000p 及 200p 吸管唧筒(pipette pump)、無菌操作檯、培養基(tryptone soy agar plates ; TSA)、培養箱(37 °C、5% CO₂)。

方法：

事先將無菌細菌培養管秤重，再將裝有左肺無菌細菌培養管秤重，了解肺實際重量。每管無菌細菌培養管均加入 3ml 的無菌 PBS buffer，接著將肺臟均質，並以 10 倍連續稀釋法將均質溶液連續稀釋 100 倍，以吸量器吸取原液、10 倍稀釋液、100 倍稀釋液，各取 100 μl 滴至培養基(TSA)內進行塗盤培養，24 小時後計算菌落數目並拍照紀錄。

第七節 統計方法

本論文數據以 Mean ± SEM 值表示。實驗中 sepsis 組中的糖尿病老鼠與非糖尿病老鼠是以雙尾 paired Student-t test 進行檢定，sham 組中的糖尿病老鼠與非糖尿病老鼠也是以雙尾 paired Student-t test 進行檢定。而 sepsis 及 sham 組兩組中的糖尿病鼠

則是以雙尾 Independent student-t test 檢定，相同的檢定也是使用於兩組非糖尿病鼠，P 值小於 0.05 視為統計上有顯著差異。

第五章 實驗結果

第一節 糖尿病老鼠之血糖值

BABL/c 品系之老鼠於 6 週時，糖尿病組將其注射 STZ 連續四天、休息兩天、再注射四天，而控制組則予以注射檸檬酸鹽緩衝溶液，在 8 週時，也就是在 STZ 破壞胰臟蘭氏小體之 β 細胞後，測量老鼠血糖濃度，如血糖 250 mg/dl 則視為有意義之糖尿病誘發成功；血糖值測量結果，控制組老鼠平均血糖為 $116.1 \pm 4.5 \text{ mg/dl}$ ，糖尿病組老鼠平均血糖值為 $287.5 \pm 13.4 \text{ mg/dl}$ ，將兩組老鼠血糖值進行比較，兩組有明顯統計上之差異其 $P < 0.001$ ，結果顯示糖尿病成功被誘導在本實驗。將誘發成功之老鼠飼養 6 個月大，使其變成慢性糖尿病鼠，在 30 週齡時須再次確認老鼠是否仍為糖尿病鼠，且血糖是否保持 250 mg/dl ，於是再次檢測老鼠血糖值，控制組老鼠平均血糖值為 $101.1 \pm 4.9 \text{ mg/dl}$ ，糖尿病組老鼠平均血糖值為 $430.3 \pm 18 \text{ mg/dl}$ ，將兩組老鼠血糖值進行比較，兩組有明顯統計上之差異($P < 0.001$)，比較糖尿病組老鼠 8 週與 30 週血糖值，統計上也有差異 $P = 0.000173$ ，此結果顯示，糖尿病老鼠血糖值依舊保持於 250 mg/dl 以上，且血糖有升高情形；在控制組，老鼠於 30 週的血糖值來得比 8 週時血糖值低，且 $P = 0.0318$ ；由此可見，予以 STZ 誘導所產生的糖尿病，會依老鼠週歲之增加而增加其血糖值(圖一)。

第二節 糖尿病老鼠之體重

紀錄 STZ 所誘發糖尿病老鼠體重於 6 週到 30 週，比較每個月糖尿病及控制組老鼠之體重變化，結果顯示 6 週控制組老鼠體重為 21.62 ± 0.11 g, $n=36$ ，糖尿病老鼠體重為 21.22 ± 0.03 g, $n=54$ ，其 $P = 0.222$ ；10 週控制組老鼠體重為 25.1 ± 0.08 g, $n=36$ ，糖尿病老鼠體重為 22.14 ± 0.22 g, $n=53$ ，其 $P = 0.0399$ ；14 週控制組老鼠體重為 28.9 ± 0.05 g, $n=36$ ，糖尿病老鼠體重為 24.46 ± 0.06 g, $n=53$ ，其 $P = 0.00015$ ；18 週控制組老鼠體重為 29.71 ± 0.07 g, $n=36$ ，糖尿病老鼠體重為 24.66 ± 0.08 g, $n=48$ ，其 $P = 0.00036$ ；22 週控制組老鼠體重為 30.84 ± 0.11 g, $n=36$ ，糖尿病老鼠體重為 25.12 ± 0.15 g, $n=48$ ，其 $P = 0.00134$ ；26 週控制組老鼠體重為 31.96 ± 0.09 g, $n=36$ ，糖尿病老鼠體重為 23.95 ± 0.06 g, $n=41$ ，其 $P = 0.00042$ ；30 週控制組老鼠體重為 31.89 ± 0.09 g, $n=36$ ，糖尿病老鼠體重為 24.37 ± 0.33 g, $n = 35$ ，其 $P = 0.00516$ 。所以糖尿病鼠誘發後一個月，其體重便輕於控制組，且有統計上差異，之後六個月，兩組老鼠體重皆有統計上的差異(圖二)。

第三節 肺泡巨噬細胞形態和比例

實驗首先將肺臟支氣管灌流所得到的肺泡巨噬細胞，經由細胞離心機將細胞打至玻片上(Cytospin)，接著以 Giemsa 染色 20 分鐘，之後再以顯微鏡觀察灌流液中所得細胞之形態及肺泡巨噬細胞之比例。Giemsa 染色會將肺泡巨噬細胞質染成紅色，細胞核染成深藍色，其比例核與質為 1:3，染色結果顯示，無論有無誘發敗血症之糖尿病或控制組老鼠，其肺泡巨噬細胞在灌流液中比例皆大於 95%。

第四節 支氣管灌流肺泡巨噬細胞數目

盲腸結紮穿刺手術後二十小時，經由支氣管灌流所得之肺泡巨噬細胞，以細胞計數盤計數細胞數，sham 組糖尿病老鼠肺泡巨噬細胞總數目為 $6.94 \pm 0.72 \times 10^5$ Cells/mice，控制組老鼠肺泡巨噬細胞數目為 $5.89 \pm 1.43 \times 10^5$ Cells/mice，兩者經 paired Student-t test 檢定值為 $P = 0.64$ ， $n=4$ ，並無統計上明顯差異；sepsis 組糖尿病老鼠肺泡巨噬細胞數目為 $5.44 \pm 1.37 \times 10^5$ Cells/mice，控制組老鼠肺泡巨噬細胞數目為 $5.83 \pm 1.64 \times 10^5$ Cells/mice，兩者經 paired Student-t test 檢定值為 $P = 0.47$ ， $n=8$ 並無統計上明顯差異；將 sham 組及 sepsis 組的糖尿病老鼠肺泡巨噬細胞數目經 Independent Student-t test 檢定值為 $P = 0.48$ 並無統計上明顯差異，將 sham 組

及 sepsis 組的控制組老鼠肺泡巨噬細胞數目經 Independent Student-t test 檢定值為 $P = 0.98$ 並無統計上明顯差異(圖三)。

第五節 肺泡巨噬細胞細胞凋亡之比例

5-1 FACSscan 檢測誘發敗血症肺泡巨噬細胞凋亡之比例

盲腸結紮穿刺手術後二十小時，經由支氣管灌流所得之肺泡巨噬細胞，將其以雙染劑方式區分壞死及凋亡細胞，並以流式細胞儀進行分析，細胞凋亡偵測原理主要是因為細胞凋亡時內膜的 phosphatidylserine (PS)會翻轉至膜外與螢光結合，藉由螢光產生右移的變化得到細胞凋亡之比例結果。結果顯示在 sham 組糖尿病老鼠其細胞凋亡比例為 $11.5 \pm 2.31\%$ ，控制組老鼠肺泡巨噬細胞凋亡比例為 $11.09 \pm 1.91\%$ ，將兩者經 paired Student-t test 檢定值為 $P = 0.597$ ， $n=4$ 並無統計上明顯差異；sepsis 組糖尿病老鼠肺泡巨噬細胞凋亡比例為 $24.9 \pm 1.81\%$ ，控制組老鼠肺泡巨噬細胞凋亡比例為 $16.84 \pm 2.82\%$ ，兩者經 paired Student-t test 檢定值為 $P = 0.017$ ， $n=8$ 肺泡巨噬細胞凋亡比例明顯有差異；將 sham 組及 sepsis 組的糖尿病老鼠肺泡巨噬細胞凋亡比例經 Independent Student-t test 檢定值為 $P = 0.0014$ ，統計上有明顯差異，將 sham 組及 sepsis 組的控制組老鼠肺泡巨噬細胞凋亡比例經 Independent Student-t test

檢定值為 $P = 0.208$ 並無統計上明顯差異，但凋亡比例有增加趨勢(圖四)；表示糖尿病老鼠未感染情形下，其肺泡巨噬細胞凋亡比例與非糖尿病老鼠相當，如予以一個感染因素(CLP)，甚至引發敗血症，糖尿病老鼠肺泡巨噬細胞凋亡比例就會大幅提高，約控制組老鼠誘發敗血症肺泡巨噬細胞凋亡比例的 1.5 倍。

5-2 DAPI 染色觀察誘發敗血症肺泡巨噬細胞凋亡之比例

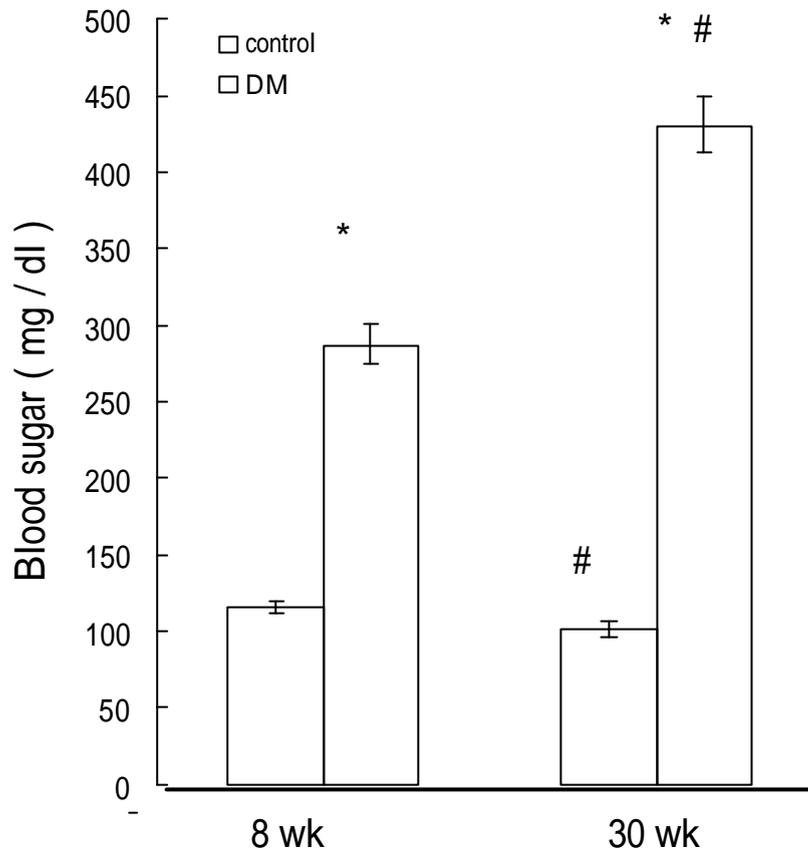
將肺臟支氣管灌流所得到的肺泡巨噬細胞，經由細胞離心機將細胞打置玻片上(Cytospin)，接著以 DAPI 染色 20 分鐘，之後再以螢光顯微鏡觀察肺泡巨噬細胞，判斷依據為細胞凋亡時細胞核會有皺縮、濃染、核分裂，進而計算凋亡之比例。結果顯示在 sham 組糖尿病老鼠其細胞凋亡比例為 $1.98 \pm 0.32\%$ ，控制組老鼠肺泡巨噬細胞凋亡比例為 $1.95 \pm 0.4\%$ ，將兩者經 paired Student-t test 檢定值為 $P = 0.929$ ， $n=4$ 並無統計上明顯差異；sepsis 組糖尿病老鼠肺泡巨噬細胞凋亡比例為 $5.92 \pm 0.72\%$ ，控制組老鼠肺泡巨噬細胞凋亡比例為 $3.84 \pm 0.84\%$ ，兩者經 paired Student-t test 檢定值為 $P = 0.0714$ ， $n=8$ ，肺泡巨噬細胞凋亡比例無明顯差異；將 sham 組及 sepsis 組的糖尿病老鼠肺泡巨噬細胞凋亡比例經 Independent Student-t test 檢定值為 $P = 0.00498$ ，統計上有明顯差異，將 sham 組及 sepsis 組

的控制組老鼠肺泡巨噬細胞凋亡比例經 Independent Student-t test 檢定值為 $P = 0.172$ 並無統計上明顯差異，其結果於圖四相似，表示在正常老鼠予以誘發敗血症感染，其肺泡巨噬細胞凋亡就比未誘發敗血症老鼠來得高；而糖尿病老鼠在一般情形下，其肺泡巨噬細胞凋亡比例與正常老鼠相當，一旦引發其感染因素(CLP)，就會導致老鼠肺泡巨噬細胞凋亡比例大幅提高，在 DAPI 染色約一般老鼠肺泡巨噬細胞凋亡比例的 3 倍。

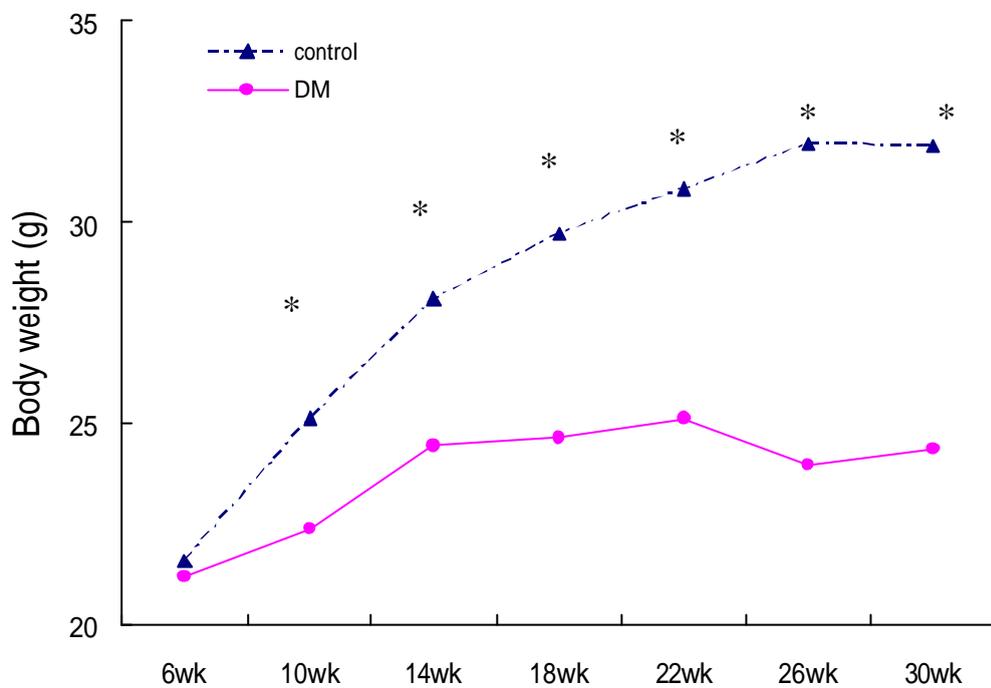
第六節 肺部細菌培養結果

盲腸手術後 20 小時，測量慢性糖尿病及非糖尿病老鼠之肺部細菌菌落數量，觀察在高血糖狀況下所誘發敗血症模式，其對肺部清除細菌功能之影響。將所誘發敗血症的老鼠於 20 小時犧牲，接著左肺進行均質，取均質液進行十倍連續稀釋，並各取 100 μ l 均質液塗抹於培養基，於 20 小時後計算細菌菌量。實驗結果顯示在 sham 組 DM 老鼠的肺部細菌量為 2.12 ± 0.85 cfu/g，而在控制組老鼠的肺部細菌量為 2.12 ± 0.85 cfu/g，兩者經雙尾 paired student-t test 檢定值為 $P = 0.65$ ， $n=5$ 是無統計上差異。sepsis 組 DM 老鼠肺部細菌量為 6.08 ± 0.41 cfu/g，而在控制組老鼠肺部細菌量為 3.81 ± 0.67 cfu/g，兩者經雙尾 paired student-t test 檢定值為 $P = 0.012$ ， $n=6$ 統計

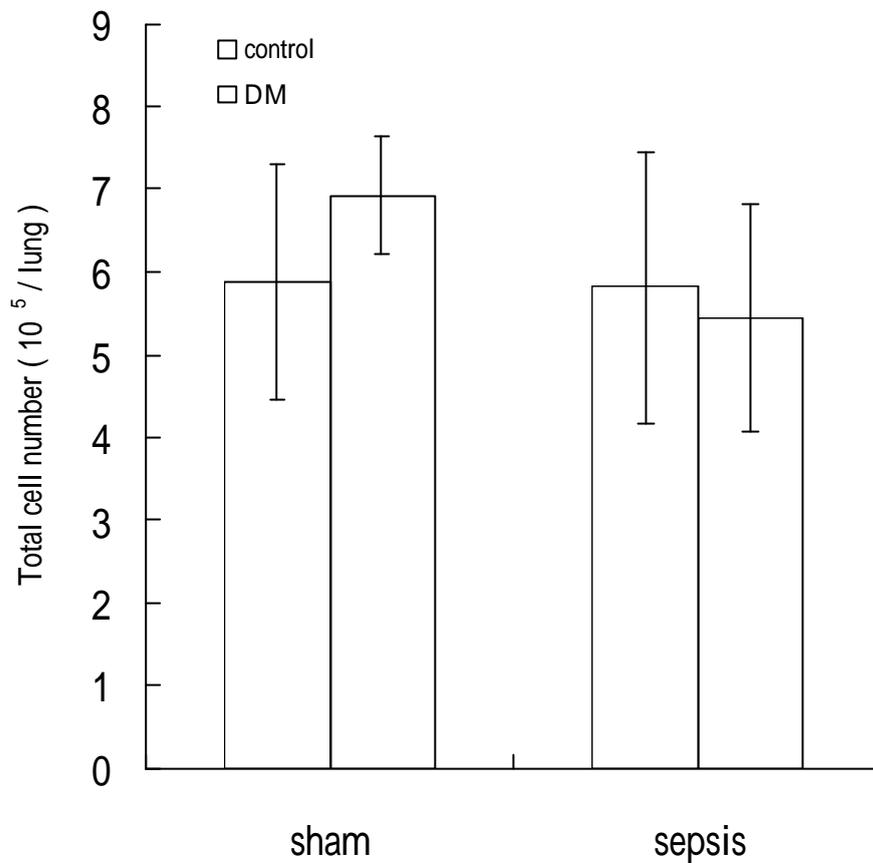
上有明顯差異。將 sham 組及 sepsis 組的 DM 老鼠，其的肺部細菌量以 Independent student-t test 檢定值為 $P = 0.0016$ ，統計上有明顯差異。將 sham 組及 sepsis 組的控制組老鼠，其肺部細菌量以 Independent student-t test 檢定值為 $P = 0.035$ ，統計上有明顯差異(圖六)。此結果表示，在未誘發 sepsis 情形下的 DM 及控制組老鼠，其肺部細菌量是相當的，如予以誘導 sepsis 後，控制組老鼠肺部細菌量會提升為原來的 846 倍；而 DM 老鼠誘導 sepsis 後，肺部細菌量又來比控制組誘發 sepsis 來得高約 91 倍。這結果顯示，在高血糖狀況下予以一個導致 sepsis 的因子，對於肺部清除細菌的功能是降低的，且其肺部受損是提高的。



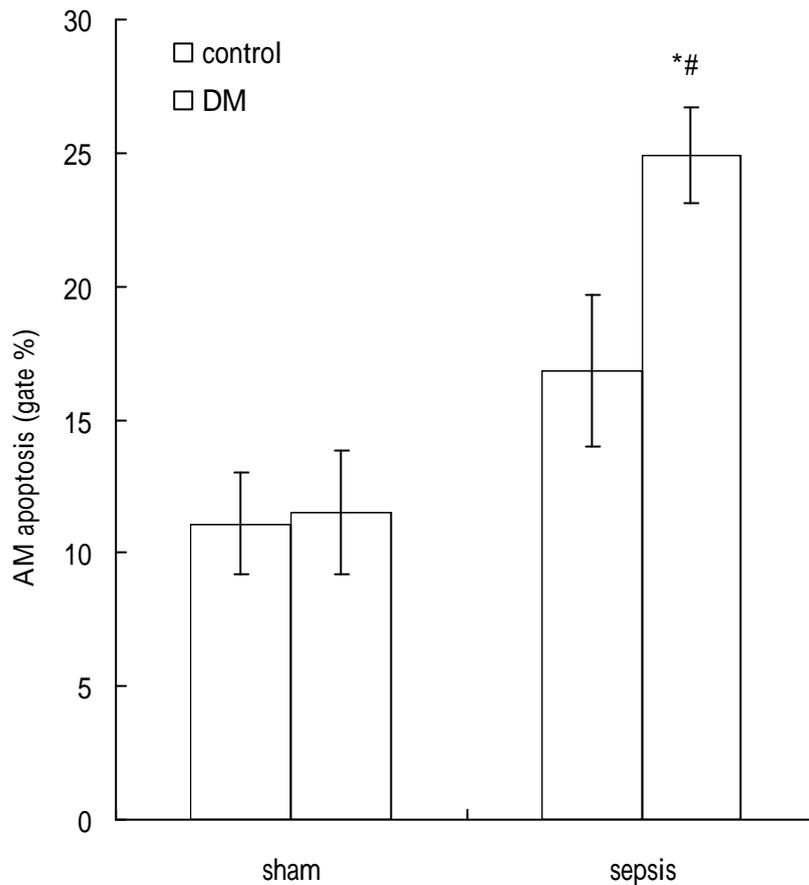
圖一、確立糖尿病老鼠誘發成功，在予以 STZ 誘導糖尿病 8 週及 30 週測量老鼠血糖值。控制組小鼠於 6 週齡時依體重予以 0.1ml/g citrate buffer 連續 4 天，分別在 8 週及 30 週時測量血糖值 n=36；慢性糖尿病老鼠則是於 6 週齡時依體重予以 55mg/kg STZ, 連續 4 天、空 2 天、再注射 2 天，在 8 週及 30 週時測量血糖值 n=33；將其以配對測試比較，結果以 mean \pm SEM 表示；*P < 0.05 vs. respective control, #P < 0.05, 30wk vs.8wk。



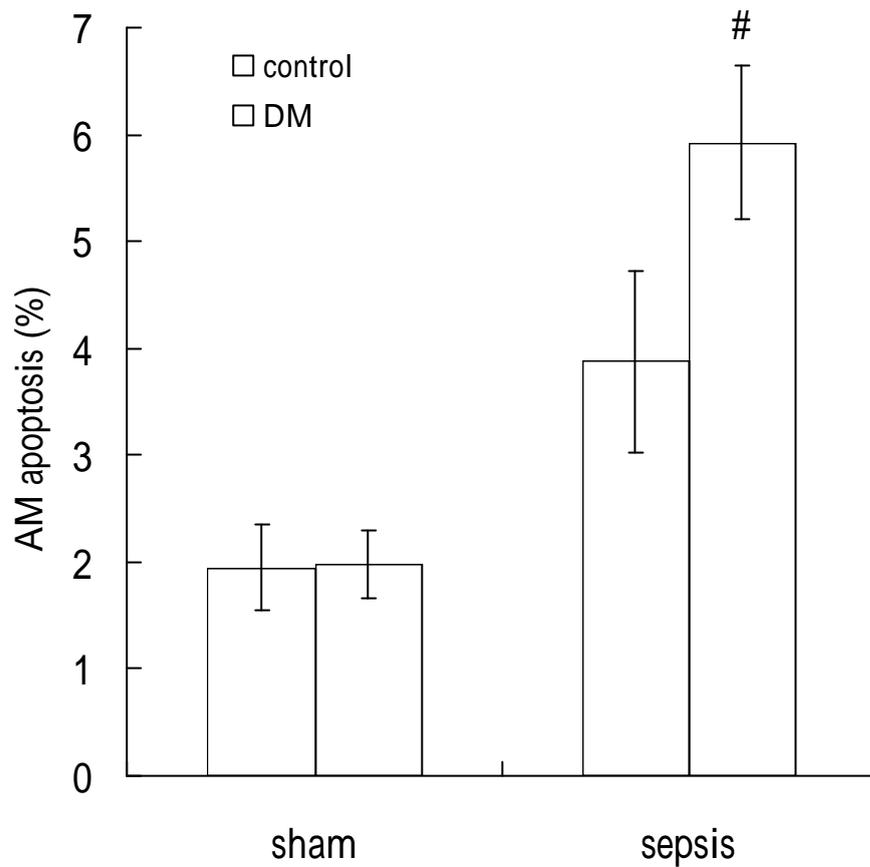
圖二、老鼠予以 STZ 誘發成慢性糖尿病鼠，週齡 6 到 30 週每月體重之紀錄。以配對方式做比較，結果顯示糖尿病鼠及非糖尿病鼠在其週齡 10 週時，兩組體重就有明顯差異，且 $P = 0.0399$ 。* $P < 0.05$ ，DM vs. control。



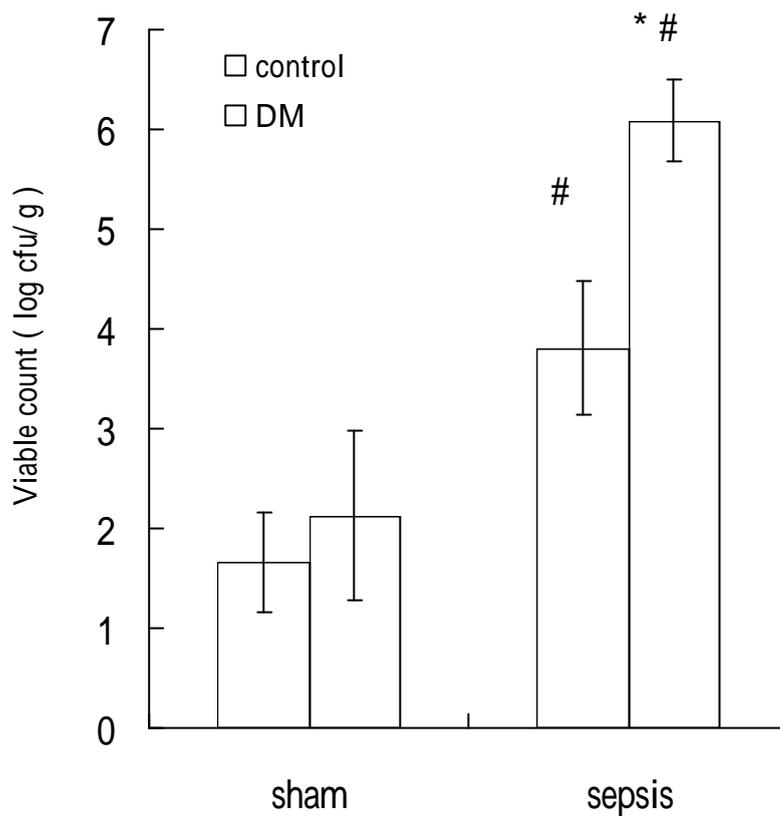
圖三、敗血症模式術後 20 小時，測量慢性糖尿病及非糖尿病老鼠之肺泡巨噬細胞數目。32 週齡的老鼠，在 sepsis 組的糖尿病與控制組及 sham 組的糖尿病與控制組之肺泡巨噬細胞數目，分別予以配對測試比較 (sepsis n=8; sham n=4)，結果顯示無統計上之差異；將 sepsis 與 sham 組兩者的糖尿病鼠的肺泡巨噬細胞數目，及非糖尿病鼠的肺泡巨噬細胞數目，以非配對測試比較，結果也顯示無統計上之差異 (P=NS)，其結果以 Mean ± SEM 表示。



圖四、敗血症模式術後 20 小時，使用流式細胞儀(FACScan)測量慢性糖尿病及非糖尿病老鼠之肺泡巨噬細胞的凋亡情形。32 週齡 sepsis 組，糖尿病與控制組老鼠肺泡巨噬細胞的凋亡，以配對測試比較， $n=8$ ；而 sham 組之糖尿病與控制組老鼠肺泡巨噬細胞的凋亡，以配對測試比較， $n=4$ ；sepsis 與 sham 組之糖尿病鼠及非糖尿病鼠肺泡巨噬細胞的凋亡則以非配對測試比較，結果以 Mean \pm SEM 表示。* $P < 0.05$ vs. respective control，[#] $P < 0.05$ ，sepsis vs. sham。



圖五、敗血症模式術後 20 小時，使用 DAPI 染色於顯微鏡下測量慢性糖尿病及非糖尿病老鼠之肺泡巨噬細胞的凋亡情形。32 週齡 sepsis 組，糖尿病與控制組老鼠肺泡巨噬細胞的凋亡，以配對測試比較， $n=8$ ；而 sham 組之糖尿病與控制組老鼠肺泡巨噬細胞的凋亡，以配對測試比較， $n=4$ ；sepsis 與 sham 組之糖尿病鼠及非糖尿病鼠肺泡巨噬細胞的凋亡則以非配對測試比較，結果以 Mean \pm SEM 表示。[#] $P < 0.05$ ，sepsis vs. sham。



圖六、敗血症模式術後 20 小時，測量慢性糖尿病及非糖尿病老鼠之肺部細菌菌落數量。32 週齡，sepsis 組的糖尿病與控制組老鼠肺部細菌菌落數量，以配對測試比較，n=6；而 sham 組之糖尿病與控制組老鼠肺泡巨噬細胞的凋亡，以配對測試比較，n=5；sepsis 與 sham 組之糖尿病鼠及非糖尿病鼠肺泡巨噬細胞的凋亡，則以非配對測試比較，結果以 Mean \pm SEM 表示。*P < 0.05 vs. respective control，#P < 0.05，sepsis vs. sham。

第六章 討論

敗血症是有明確的感染來源且合併全身系統性發炎反應症候群 (Systemic inflammatory response syndrome ; SIRS) , 其造成的全身性器官衰竭以呼吸系統衰竭最為普遍 (Akihiro et al. , 2000) , 而肺泡巨噬細胞是肺部防禦機制一個很重要免疫細胞 , 所以肺泡巨噬細胞的凋亡與損傷是肺部受損一個重要的指標。許多研究皆指出糖尿病病患比一般健康的人容易遭受到細菌的入侵 , 並且可能引發敗血症 (Donder , 2002) , 但 Moss 等學者於 2000 年研究臨床敗血症的病人 , 發現糖尿病病人比非糖尿病病人不容易進入嚴重病程如呼吸窘迫症。所以為了了解敗血症對於糖尿病患者所造成的肺部傷害 , 本篇實驗使用 STZ 誘導 BALB/c 糖尿病老鼠 , 並將其血糖值定義 = 250 mg/dl 才視為有意義的糖尿病誘發成功 , Vsevolody 等人於 2001 使用 STZ 誘發 C57BL/6J 老鼠 , 其將血糖值定義須大於 200 mg/dl 才為糖尿病鼠 , 所以本篇實驗對血糖值定義是合理的。實驗結果顯示於 8 週齡時 , 糖尿病老鼠平均血糖值為 287.5 ± 13.4 mg/dl , 將老鼠持續飼養至 30 週齡 , 使之成為慢性糖尿病老鼠 , 其平均血糖值為 430.3 ± 18 mg/dl , 此現象表示老鼠是持續處於高血糖狀態 , 且血糖值因週數的增加有持續上升情形 ; 有報告指出相同的結果 , 發現在予以 STZ 誘發 BALB/c 老鼠後 , 其血糖值在 8 週齡時為 250 mg/dl , 持續飼養到 25

週齡時，其血糖值則攀升至 360 mg/dl (Vidya et al., 1996)；所以本實驗老鼠於 30 週齡時，其平均血糖值為 430.3 ± 18 mg/dl 是合理的。本篇實驗中所飼養的糖尿病老鼠體重變化，在誘發後一個月，其體重明顯比控制組小鼠來得輕，且有統計上差；相同的結果顯示於 Yoko 等人於 1999 年所發表的報告中，其在 HuBTg 老鼠 8 週時使用 STZ 誘導糖尿病，結果發現 HuBTg 公鼠於 14 週，也就是誘發糖尿病後一個月，其體重明顯低於非糖尿病鼠，且 $P < 0.05$ 。由以上結果可了解本實驗成功誘導出慢性糖尿病老鼠。

接著本研究將 32 週齡大的糖尿病老鼠與控制組老鼠，以配對方式分成敗血症及非敗血症組兩組進行實驗，敗血症的模式主要是使用盲腸結紮穿刺術，主要是模擬臨床所發生的敗血症病程，接著使用 FACSscan 及 DAPI，來檢測敗血症對於糖尿病老鼠及控制組老鼠之肺泡巨噬細胞凋亡的影響。結果發現在控制組老鼠予以一個感染因素 (CLP)，並引發敗血症後 20 小時，其不論於 FACSscan 及 DAPI 所檢測出的肺泡巨噬細胞之凋亡，是高於未感染之控制組老鼠，且進一步測量老鼠之肺部細菌菌落數量，觀察其對肺部清除細菌功能之影響，發現 CLP 所誘發的敗血症會提升老鼠肺部的細菌量約原來的 846 倍，也就是說敗血症確實會導致嚴重的肺部損傷；相同的實驗結果在本實驗室使用 Sprague Dawley 老鼠，觀察其早期(9 小時)及晚期(20 小時)

敗血症，發現在早期敗血症，其肺泡巨噬細胞凋亡為健康老鼠的 2.5 倍，而晚期敗血症則為 3.2 倍，且肺泡巨噬細胞吞噬功能明顯比健康老鼠來得低 (LU et al., 2002)。然而在 2001 年 Liacos 等學者，收集臨床 20 位敗血症病患之肺泡巨噬細胞進行細胞凋亡分析，發現肺泡巨噬細胞凋亡情形，是比非敗血症病人來得少，且同年也有學者使用 CD-1 老鼠，將其利用 CLP 方式誘發敗血症，發現在敗血症老鼠及健康老鼠，其肺泡巨噬細胞的凋亡是無差異性，但分別在 CLP 後 6 小時、24 小時和 72 小時，利用支氣管灌流取得肺泡巨噬細胞，予以螢光小球進行肺泡巨噬細胞吞噬功能測試，發現敗血症時間越長，其吞噬功能越低 (Raju et al., 2001)。

糖尿病鼠研究方面，實驗發現在未感染情形下，糖尿病鼠肺泡巨噬細胞凋亡比例與正常老鼠相當，且測量其肺部細菌菌落數量，也與正常老鼠肺部細菌菌落數量無差異性；但一旦糖尿病鼠感染 (CLP) 進而引發敗血症，此時糖尿病老鼠肺泡巨噬細胞凋亡比例以 FACScan 檢測結果顯示，其肺泡巨噬細胞凋亡之比例約為控制組老鼠誘發敗血症導致肺泡巨噬細胞凋亡比例的 1.5 倍，而在 DAPI 染色檢測結果則是一般糖尿病老鼠肺泡巨噬細胞凋亡比例的 3 倍。觀察其對肺部清除細菌功能之影響，在糖尿病老鼠誘導敗血症後，其肺部細菌量來得比控制組老鼠誘發敗血症高約 91 倍。此結果顯示，糖尿病老鼠在未感染

產生敗血症時，其肺部損傷並無因糖尿病疾病而提高其肺部受損程度；但一旦因感染而產生敗血症，其肺部損害就會大幅提升，且比控制組老鼠產生敗血症時的肺部損傷更加嚴重。

推測可能原因為，有學者提出糖尿病的 PMNLs 之附著、趨化、吞噬、氧化及細胞毒殺能力均呈現抑制狀態，進一步觀察其炎症反應發現，來自單核球和 PMNLs 所產生的細胞激素，如 TNF- α 、IL-6 及 IL-8 的釋放是增加的 (Delamaire et al., 1997; Gallacher et al., 1995)，然而這些細胞激素大量產生所導致的過度炎症反應，是造成身體多重器官衰竭一個重要因素。Eliashiv 等學者於 1978 年，比較各 10 位糖尿病病人及非糖尿病人身體免疫系統之差別，發現糖尿病病人細胞免疫反應功能是降低的，主要是淋巴細胞活化及成熟度皆減少，所以相對細菌感染的頻率在糖尿病病人身上是增加的；而 Sima 等學者於 1988 年，觀察糖尿病大鼠其肺泡巨噬細胞，發現感染金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* bacteria) 後之吞噬及毒殺細菌能力，皆比一般正常大鼠來得差。所以在本研究結果發現糖尿病鼠予以誘發敗血症後 20 小時，其肺泡巨噬細胞之凋亡和肺部細菌菌落數量，是高於敗血症之非糖尿病老鼠，此結果是可想而知的。但目前對於敗血症如何導致肺部損傷，其機制尚未清楚，多數學者推測可能與過高的細胞激素產生有關，所以想更了解敗血症所造成糖尿病鼠肺部

傷害之機制，是有待我們繼續探討。近年許多研究發現在老鼠及天竺鼠上，雌性素可刺激巨噬細胞的吞噬能力，且提升巨噬細胞的清除能力(Schreiber et al. , 1988 ; Friedman , 1985) ，在臨床上觀察敗血症在女性的生存率比男性高(Asai et al. , 2001) ，且女性體內含較多的 IL-10 ，而在男性卻以 TNF- 較多(Schroder et al. , 2000) ，這可能是影響生存率一個重要因素。所以利用基因轉植雌性素接受器於巨噬細胞 (Raw264.7 細胞株) ，觀察予以雌性素接受器 基因轉植後的巨噬細胞在敗血症環境下，是否能提升其吞噬能力及細胞生存率，進而降低敗血症所造成的肺部傷害，也是我們所要進一步觀察之重點。

第七章 結論

由實驗結果可發現，糖尿病老鼠與非糖尿病老鼠在未感染情況下，其肺泡巨噬細胞凋亡與肺部細菌菌量數，是無任何的差異性；但本實驗採取 CLP 感染造成敗血症，結果可發現糖尿病老鼠與非糖尿病老鼠，其肺泡巨噬細胞凋亡與肺部細菌菌量數，皆比未感染情況下的糖尿病老鼠與非糖尿病老鼠來得高；而且糖尿病老鼠肺泡巨噬細胞凋亡與肺部細菌菌量數，經統計比較是大幅升高且高於敗血症非糖尿病老鼠。所以敗血症會造成糖尿病鼠更加重的肺部傷害。

第八章 參考資料

1. Abrass CK, Hori M. Alterations in Fc receptor function of macrophages from streptozotocin- induced diabetic rats. *J Immunol* 1984; 133:1307.
2. Akihiro M, Cory MH, Nickolas WL, Pamela ML, Holly LE, Robert MS, Steven LK. *J Immunol* 2000 ; 164:2738-2744.
3. Alain GB, Sharon S, Frederick LB. Diabetes and the risk of infection -related mortality in the U.S.. *Diabetes Care* 2001 ; 24:1044-1049.
4. Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* 2001; 7:167-202.
5. Alia I, Esteban A, Gordo F. A randomized and controlled trial of the effect of treatment aimed at maximizing oxygen delivery in patient with severe sepsis or septic shock. *Chest* 1999 ; 115:453-461.
6. Asai K, Hiki N, Mimura Y, Ogawa T, Unou K, Kaminishi M. Gender differences in cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cell: role of estrogen in modulating LPS-induced cytokine secretion in an ex vivo septic model. *Shock* 2001 ; 16:340-3.
7. Bagby GJ, Plessala KJ, Wilson LA, Thompson JJ, Nelson S. Divergent efficacy of antibody to tumor necrosis factor- α in

- intravascular and peritonitis models of sepsis. *J Infect Dis* 1991 ; 163:83-88.
8. Balsinde J, Dennis EA. Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A₂. *J Biol Chem* 1997 ; 272:16069-16072.
 9. Baue AE. Sepsis research: what did we do wrong? What would Semmelweis do today? *Shock* 2001 ; 16:1-8.
 10. Bone RC. The sepsis syndrome: definition and general approach to management. *Clin Chest Med* 1996 ; 17:175-81.
 11. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992 ; 101:1644-55.
 12. Bonfield TL, Konstan MW, Burfeind P, Panuska JR, Hilliard JB, Berger M. Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol* 1995 ;

13:257-261.

13. Brigitte N, Niko Z, Andreas V, Klaus E, Klaus P, Claus-Dieter H, Bernhard H. Mechanisms of acute inflammatory lung injury induced by abdominal sepsis. *Internat Immunol* 1999 ; 11:217-227.
14. Burn-Buisson C, Doyon F, Carlet J. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults: A multicenter prospective study in intensive care units. *JAMA* 1995 ; 274:968-974.
15. Lang CH, Dobrescu C, Bagby GJ, Spitzer JJ. Altered glucose kinetics in diabetic rats during gram-negative infection. *Am J. Physiol.* 1987 ; 253:E123-E129.
16. Abrass CK, Hori M. Alterations in Fc receptor function of macrophages from streptozotocin-induced diabetic rats. *J Immunol* 1984 ; 133:1307-1312.
17. Claudia RA, Silverstein R, Morrison DC. Mechanisms involved in the pathogenesis of sepsis are not necessarily reflected by in vitro cell activation studies. *Infect Immun* 1998 ; 66:5372-5378.
18. Czermak BJ, Breckwoldt M, Ravage ZB, Huber-Lang M, Schmal H, Bless NM, Friedl HP, Ward PA. Mechanisms of enhanced lung injury during sepsis. *Am J Pathol* 1999 ; 154:1057.

19. Damon M, Chavis C, Godard P, Michel FB, Paulet C. Purification and mass spectrometry identification of leukotriene D4 synthesized by human alveolar macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1983 ; 111:518-524.
20. Delamaire M, Maugender D, Moreno M. Impaired leucocyte function in diabetic patients. *Diabetic Med* 1997 ; 14:29.
21. Derek C, Randy S. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med* 2001 ; 29:7.
22. Didier H, Yoshiyuki A, Didier LR, Naohito O, Toshiro Y, Michel PG, Theierry C. Role of plasma, lipopolysaccharide- binding protein, and CD14 in response of mouse peritoneal exudates macrophages to endotoxin. *Infect Immun* 2001 ; 69:378-358.
23. Donders GG. Lower genital tract infections in diabetic women. *Curr Infect Dis Rep* 2002 ; 4:536-539.
24. Doraid J, Joachim FK, Loring WR, Sadis M, Ping W, Kirby IB, Irshad HC. Alveolar macrophage activation after trauma-hemorrhage and sepsis is dependent on NF- κ B and MAPK/ERK mechanisms. *Am J Physiol* 2002 ; 283:L799-L805.
25. Duvall E, Wyllie AH, Morris RG. Macrophage recognition of cells

- undergoing programmed cell death. *Immunology* 1985, 56:351.
26. Dziarski R. Peptidoglycan and lipopolysaccharide bind to the same binding site on lymphocytes. *J Biol Chem* 1991 ; 266:4719-4725.
27. Eliashiv A, Olumide F, Norton L, Eiseman B. Depression of cell-mediated immunity in diabetes. *Arch Surg* 1978 ; 113:1180.
28. Emre Seli MD, Aydin Arici MD. Sex steroids and the immune system. *Immunol Aller Clin N Am* 2002 ; 22:3-33.
29. Eskandari MK, Bologos G, Miller C, Nguyen DT, DeForge LE, Remick DG. Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. *J Immunol* 1992 ; 148:2724-2730.
30. Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit Care Med* 1998 ; 26:2078-2086.
31. Friedman D, Netti F, Schreiber AD. Effect of estradiol and steroid analogues on the clearance of immunoglobulin G-coated erythrocytes. *J Clin Invest* 1985 ; 75:162-7.
32. Gallacher S, Thomason G, Fraser WD. Neutropil bactericidal function in diabetes mellitus: Evidence for association with blood glucose control. *Diabetic Med* 1995 ; 12:916.

33. Golde DW, Finley TN, Cline MJ. Production of colony-stimulation factor by human macrophages. *Lancet* 1972 ; 2:1397-1399.
34. Golden SH, Peart-Vigilance C, Kao WH, Brancati FL. Perioperative glycemic control and the risk of infectious complications in a cohort of adults with diabetes. *Diabetes Care* 1999 ; 22:1480-14.
35. Helene M, Thomasn T. Infections in diabetes. *Infectious Disease Clinics of North America* 2001; 15:2.
36. Hill HE, Augustine NH, Rasllison MI, Santos JI. Defective monocytes chemotactic response in diabetes mellitus. *Clin Immun* 1998 ; 56:577-581.
37. Hoffmann A, Levchenko A, Scott ML, Baltimore D. The I β B-NF- β B signaling module:temporal control and selective gene activation. *Science* 2002 ; 298:1241-5.
38. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE, Hui JJ, Chang KC, Osborne DF, Freeman BD, Perren CJ, Buchman TG, Karl IE. Sepsis-induced apoptosis causes progressive progressive profound depletion of B and CD4⁺ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 2001 ; 166:6952-6963.
39. Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS. Peroxynitrite formation from

- macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biophys* 1992 ; 298:446.
40. Jian JG, Qiao X, Eleanor GZ, Kevin RH, David CM. Commercial preparations of lipoteichoic acid contain endotoxin that contributes to activation of mouse macrophages in vitro. *Infect Immuno* 2001 ; 69:751-757.
41. Kaye WA, Adri MN, Soeldner JS, Rabinowe SL, Kaldany A, Kahn CR, Bistran B, Srikant S, Ganda OP, Eisenbarth GS. Acquired defect in interleukin-2 production in patients with type I diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1986; 315:920-924.
42. Kathryn S. Sepsis poses an increased threat. 2002 ; 165:A471.
43. Keith RW, Nicholas WL, Theodore JS, Robert MS, Steven LK. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun* 1996 ; 64:4733-4738.
44. Keith B. Kelley's Textbook of Rheumatology. *Apoptosis* 2001 ; 6:291-300.
45. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972 ; 26:239.
46. McDonough KH, Barbee RW, Dobrescu C, Lang CH, Spitzer JJ.

Enhanced myocardial depression in diabetic rats during E. coli sepsis.

Am J Physiol 1987 ; 253:H276-H282.

47. Khadom NJ, Dedieu JF, Viso M. Bovine alveolar macrophage: a review. *Ann Rech Vet* 1985 ; 16:175-183.
48. Koziel H, Koziel MJ. Pulmonary complications of diabetes mellitus. Pneumonia. *Infect Diabet clin N Am* 1995 ; 9:65-96.
49. Kristof AS, Goldberg p, Laubach V, Hussain SN. Role of inducible nitric oxide synthase in endotoxin-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.*1998 ; 158:1883.
50. Kubo A, Minamino N, Isumi Y. Production of adrenomedullin in macrophage cell line and peritoneal macrophage. *J. Biol. Chem* 1998 ; 273:16730-16738.
51. Kumins NH, Hunt J, Gamelli RL, Filkins JP. Partial hepatectomy reduces the endotoxin-induced peak circulating level of tumor necrosis factor in rats. *Shock* 1996 ; 5:385-388.
52. Lacopino AM. Periodontitis and diabetes interrelationships: role of inflammation. *Ann Periodontol* 2001 ; 6:125-37.
53. Lang CH, Dobreacu C, Bagby GJ, Spitzer JJ. Altered glucose kinetics in diabetic rats during gram-negative infection. *Am J. Physiol* 1987 ;

253:E123.

54. Liacos C, Katsaragakis S, Konstadoulakis MM, Messaris EG, Papanicolaou M, Georgiadis GG, Menenakos E, Vasiliadi C, Androulakis G. Apoptosis in cells of bronchoalveolar lavage: a cellular reaction in patients who die with sepsis and respiratory failure. *Crit Care Med* 2001 ; 29:2310-2317.
55. Lodato RF, Khan AR, Zembowicz MJ, Weisbrod NW, Pressley TA, Li YF, Lodato JA, Zembowicz A, Moody FG. Roles of IL-1 and TNF in the decreased ileal muscle contractility induced by lipopolysaccharide. *Am J Physiol* 1999 ; 276:1356-62.
56. LU MC, Liu TA, Lee MR, Lin L, Chang WC. Apoptosis contributes to the decrement in numbers of alveolar macrophages from rats with polymicrobial sepsis. *J Microbiol Immunol Infect* 2002 ; 35:71-77.
57. Mann PEG, Cohen AB, Finley TN. Alveolar macrophages structural and functional differences between nonsmokers and smokers of marijuana and tobacco. *Lab.Inves.* 1971 ; 25:111-120.
58. Mark H, Robert B. Diabetes mellitus. *The Merck manual of Diagnosis and Therapy* 1995 ; 13:251.
59. Martin TR. Cytokines and the acute respiratory distress

- syndrome(ARDS): a question of balance. *Nature Med* 1997 ; 3:272.
60. Matthew LS, Cory MH, Nickolas WL, Robert MS, Steven LK.
Multiple roles for IL-12 in a model of acute sepsis peritonitis. *The J Immunol* 1999 ; 162:5437-5443.
61. Moss M, Parsons PE. Diabetic patients have a decreased incidence of acuter respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2000 ; 28:2187-2192.
62. Nau GJ, Joan Richmond FL, Schlesinger A, Jennings EG, Lander ES, Young RA. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. *PNAS* 2002 ; 99:1503-8.
63. Negishi K, Gupta S, Chandy KG. Interferon responsiveness of natural killer cells in Type I human diabetes. *Diab Res* 1988 ; 7:49- 52.
64. Oberholzner C, Oberholzer A, Clare-Salzler M. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *FASEB J* 2001 ; 15:879-892.
65. O' Boyle CJ, MacFie J, Mitchell CJ. Microbiology of bacterial translocation in humans. *Gut* 1998 ; 42:29-35.
66. Pacifici R, Rifas L, McCracken R. overian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin 1 release. *PNAS* 1989 ; 86:2398-402.

67. Proulx F, Fayon M, Farrell CA, Lacroix J. Epidemiology of sepsis and multiple organ dysfunction syndrome in children. *Chest* 1996 ; 109:1033-1037.
68. Randal AS, Xiao-pei G, Viktor B, Arshad R, David J, Sanda P, Theodore JS, Asrar BM. Nitric oxide stimulates macrophage inflammatory protein-2 expression in sepsis. *J Immunol* 2002 ; 169:2093-2101.
69. Raju CR, Gina HC, Michael WN, Tom M, Xianying Z, Kazuhiro T, Theodore J. Standiford. Alveolar macrophage deactivation in murine septic peritonitis: role of interleukin 10. *Infect Immun* 2001 ; 69:1394-1401.
70. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome(SIRS): A prospective study. *JAMA* 1995 ; 273:117-123.
71. Redl H, Gasser H, Schlag G. Involvement of oxygen radicals in shock related cell injury. *Br Med Bull* 1993 ; 49:556-565.
72. Reynolds HN, McCunn M, Borg U, Habashi N, Cottingham C, Bar-Lavi Y. Acute respiratory distress syndrome: estimated incidence and mortality rate in a 5 million-person population base.

Crit Care 1998 ; 2:29-34.

73. Rietschel ET, Brade H, Holst O. Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host adjunctive antibiotic treatment in preterm labor and response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol immunol* 1996 ; 216:39-81.
74. Robert B, Mark H, Andrew J, Robert M. Diabetes mellitus. *The Merck Manual of Medical Information—Home Edition* 2000 ; 13:147.
75. Rubenfeld GD, Caldwell E, Granton J. Interobserver variability in applying a radiographic definition for ARDS. *Chest* 1999 ; 116:1347-1353.
76. Salvo I, Cian W, Musicco M. The Italian sepsis study: Preliminary results on the incidence and evolution on SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 1995 ; 21:S244-S249.
77. Samaranayale YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol* 2001 ; 14:398-429.
78. Samuel JE, Sanna MG, Jean AN, Jiyoun K, Gerald LB, Daniel GR. Critical role of CD14 for production of proinflammatory cytokines and cytokine inhibitors during sepsis with failure to alter morbidity or

- mortality. *Infect Immun* 2001 ; 69:2099-2106.
79. Sands KE, Bates DW, Lanken PN. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers: Academic medical center consortium sepsis project working group. *JAMA* 1997 ; 278:234-240.
80. Schottmuller H. Wesen and behandlung der sepsis. *Verhandl Dtsch Kongress Inner Med* 1914 ; 31:257-280.
81. Schmal H, Shanley TP, Jones ML, Friedl HP, Ward PA. Role for macrophage inflammatory protein-2 in lipopolysaccharide- induced lung injury in rats. *J Immunol.* 1996 ; 156:1963.
82. Schreiber AD, Netti FM, Sanders MC. Effect of endogenous and synthetic sex steroids on the clearance of antibody-coated cells. *J Immunol* 1988 ; 141:2959-66.
83. Schroder J, Kahlke V, Book M. Gender differences in sepsis: genetically determined? *Shock* 2000 ; 14:307-310.
84. Scott MG, Gold MR, Hancock REW. Interaction of cationic peptides with lipoteichoic acid and gram-positive bacteria. *Infect Immun* 1999 ; 67:6445-6453.
85. Sima AA, O'Neill, Naimark D, Yagihashi S, Klass D. Bacterial phagocytosis and intracellular killing by alveolar macrophages in BB

- rats. *Diabetes* 1988 ; 37:544-549.
86. Sylvia K, Jaklien CL, Sandrine F, Judith B, Nico AM, Jennie P, Nico VR, Tom VDP. Alveolar macrophages have protective anti-inflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2003 ; 167:171-179.
87. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Talada H, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 1999 ; 11:443.
88. Tapper H, Herwad H. Modulation of hemostatic mechanisms in bacterial infectious diseases. *Blood* 2000 ; 96:2329-2337.
89. Tobias PS, Tapping RI, Gegner JA. Endotoxin interactions with lipopolysaccharide-responsive cells. *Clin Infect Dis* 1999 ; 28:476-81.
90. Tsukaguchi K, Okamura H, Matsuzawa K, Tamura M, Miyazaki R, Tamaki S, Kimura H. Longitudinal assessment of IFN-gamma production in patients with pulmonary tuberculosis complicated with diabetes mellitus. *Kekkaku* 2002 ; 77:409-13.
91. Vsevoloy P, Jessica WA, Abbys H, Matthewt S, Shawne S, Clarkeg T, Philipl S, Alanr S, Chrustopherp O. The impact of insulin-

- dependent diabetes on ventilatory control in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:624.
92. Vidya VK, Deborah LW, Renee CL. Increased atherosclerosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *J Clin Invest* 1996 ; 97:1767-1773.
93. Weiss M, Moldawer LL, Schneider EM. Granulocyte colony-stimulating factor to prevent the progression of systemic nonresponsiveness in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Blood* 1999 ; 93:425-439.
94. William FG. The gonads: development and function of the reproductive system. *Review of Medical Physiology* 1999 ; 23:398-439.
95. Windsor ACJ, Mullen PG, Fowler AA, Sugerman HJ. Role of the neutrophil in adult respiratory distress syndrome. *Br J Surg* 1993 ; 80:10.
96. Wolkow PP. Involvement and dual effects of nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol* 1998 ; 47:152.
97. Yuko K, Huang LS, James Y, Tommy K, Rajasekhar R, Ira JC. Streptozotocin-induced diabetes in human apolipoprotein B transgenic mice: effects on lipoproteins and atherosclerosis. *Jurnal of*

Lipid Research 1999 ; 40:2185-2194.

98. 行政院衛生署十大死因統計,2002.

附錄 脂多醣對 Raw264.7 巨噬細胞轉植雌性激素接受器之影響

第一章 緒論

第一節 雌性素概述

1-1 雌性素(estrogen)

雌性素為女性重要的賀爾蒙之一，由 C₁₈ 類固醇所構成，包括 17 β -二氫基女性素(17 β -estradiol;E₂)、女性素(estrone;E₁)和女性素醇(estriol)，其分泌是在卵巢濾泡、黃體及胎盤的顆粒層細胞(granulose cells)，而 17 β -estradiol 是主要的雌性素，經由循環而形成 estrone，estrone 在轉變成 estriol，此過程在肝臟進行(William, 2001; Robert et al., 1998)。

1-2 雌性素接受器(estrogen receptor; ER)

雌性素接受器有兩種，分別為雌性素接受器 (ER α)及 (ER β)，ER α 是由 599 個胺基酸所組成，分子量為 66kDa，主要出現於子宮、睪丸、腦下垂體、腎臟和腎上腺;ER β 由 485 胺基酸組成，分子量為 54kDa，主要出現於卵巢、前列腺、肺臟、膀胱、腦部及骨骼(William, 2001; Robert et al., 1998; Giguere et al., 1998; saunders et al., 1998)。

ER 在結構上有 A、B、C、D、E、F 六個功能區域，AB 區域為第一功能活化區(activation functional domain-1; AF-1 domain)，在

無 Ligand 存在下，亦可透過此區域活化 ER；C 區(DNA binding domain；DBD)是與 DNA 結合且形成二聚體(homodimer、heterodimer)；D 區則是連接 C、E 兩區的一段序列；E 區為第二活化功能區域(activation functional domain-2;AF-2 domain),是 Ligand 結合區(Ligand binding domain；LBD)；F 區功能未清楚(Moggs et al., 2001)；而 ER α 及 ER β 於 C 區有 97%相似度，E 區有 60%相似(Giguere et al., 1998；saunders et al., 1998)。

1-3 雌性素接受器的基因調控

雌性素接受器的基因調控有四類：第一類為傳統路徑，當雌性素經血液散佈至雌性素易感性細胞時，雌性素會進入細胞與細胞質的接受器結合形成複合體，因型態的改變使之呈現活化態進入細胞核，此複合體會結合在雌性素調節要素(estrogen regulatory elements;ERE)目標基因，進而促使基因轉錄合成特殊 mRNAs，再製造出蛋白質；而基因的表現是增強或抑制，蛋白質的增加或減少皆會影響生殖器官或其他組織(William, 2001；Robert et al., 1998；Hall et al., 2001)。第二類為非雌性素依賴型(Ligand-independent)，是由一些生長因子或 cAMP 活化細胞內的激酶路徑，導致 ER 磷酸化形成複合體結合至 ERE 啟動基因。第三類為非雌性素調節要素(ERE-independent)，當雌性素與其接受器形成複

合體後，會與 AP-1(Fos/Jun)轉錄因子結合，使 AP-1 蛋白到目標基因，啟動基因表現，並非結合至 DNA 上的 ERE 區。第四類為非基因型路徑，是雌性素直接作用於細胞膜表面的類雌性素接受器膜蛋白，所引起的一連串急性組織反應(Hall et al. , 2001)。

1-4 雌性素與免疫

多數研究指出雌性素可刺激巨噬細胞的吞噬能力，在老鼠及天竺鼠上發現，雌性素可提升巨噬細胞的清除能力(Schreiber et al. , 1988 ; Friedman , 1985) , 且會增加巨噬細胞中的 iNOS (inducible nitric oxide synthase)及顯露雌性素接受器的活性(You et al. , 2003) , 如將性腺切除會降低巨噬細胞的吞噬能力，予以雌性素治療則會使巨噬細胞的吞噬和代謝能力恢復到正常水平(Baranao et al. , 1991) ; 且雌性素會引導非基因的鈣訊息傳至細胞膜上的雌性素接受器，進而調節特殊基因種類訊息傳遞和巨噬細胞的活性(Guo et al. , 2002)。

但巨噬細胞的功能並非依賴吞噬能力而定，還有其因素參與包括：單核細胞附著血管內皮、單核細胞及巨噬細胞化學吸引因子，皆會影響巨噬細胞調節免疫的反應；而雌性素會抑制血管附著因子和單核細胞化學蛋白 1(monocyte chemotactic protein 1;MCP-1)出現在血管內皮及平滑肌細胞(Seli et al. , 2002 ; Seli et al. , 2001) , MCP-1

是一種化學激素，會吸引且活化單核球及巨噬細胞，所以當其受到抑制時，進而會降低巨噬細胞的補充和炎症反應(Kovacs et al., 1996)；經由老鼠體內研究顯示雌性素會降低巨噬細胞遷移抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor ; MIF)所誘導的巨噬細胞的活化(Gillian et al.;2003)，所以依上述而定，雌性素是抑制巨噬細胞的功能。

多數疾病的產生皆可能和雌性素及激素 (cytokines) 的互動有關，激素是由局部性組織所分泌的蛋白質，其功能是旁分泌或自體分泌的代謝，而雌性素可能會影響激素的製造及分泌 (emre, 2002) 並抑制單核球和巨噬細胞所產生的激素 IL-1、IL-6、TNF- α ，有研究顯示使用雌性素和黃體素治療更年期婦女，經一個月後其 IL-1 活性明顯降低(Pacifici et al., 1989; Kovacs et al., 1996)。而 IL-1 分為 IL-1 α 、IL-1 β 及 IL-1 接受器抗原 (IL-1 receptor antagonist; IL-1RA)，皆決定 IL-1 傳導活性，其中又以 IL-1 β 為主；所以 IL-1 β : IL-1RA 的比例常用於測量 IL-1 活性，在更年期的 IL-1 β : IL-1RA 比例是降低(Pacifici et al., 1993; Rogers et al., 1998)。

1-5 敗血症與雌性素相關性

性賀爾蒙在免疫扮演一個非常重要的角色，尤其以雌性素最為主要，所以女性是有較高的體免疫和細胞免疫(Gil et al. , 2003)，雌性老鼠在青春期免疫功能是增加的，經由損傷缺血所造成的敗血症，其生存力比雄性老鼠高(Markus et al. , 2002)。且臨床研究顯示敗血症在女性的復原是比較好(Asai et al. , 2001)，Schroder 等學者於 2000 年研究 201 名嚴重敗血症的病患，發現 68 位女性的生存率是高於男性；且在敗血症過程中，女性體內含較多的 IL-10，而在男性卻以 THNF- 較多。

第二章 研究設計及目的

敗血症是導致加護病房病人常見的死因之一(Baue, 2001), 經臨床上觀察敗血症在女性的生存率比男性高(Asai et al., 2001), 且多數研究發現在老鼠及天竺鼠上, 雌性素可刺激巨噬細胞的吞噬能力和清除能力(Schreiber et al., 1988; Friedman, 1985), 所以利用基因轉植雌性素接受器於巨噬細胞(Raw264.7 細胞株), 觀察予以雌性素接受器基因轉植後的巨噬細胞在敗血症環境下, 是否能提升其吞噬能力及細胞生存率, 進而降低敗血症所造成的肺部傷害。

第三章 實驗設計及方法

第一節 ER 接受器轉植至 Raw264.7 細胞相關實驗

1-1 細胞培養

材料：

Medium 1% Trypsine(GIBCO)、細胞培養基(dish)、無菌 1×PBS、1000p 吸管唧筒(pipette pump)、電動吸量管(Electric Pipette)、無菌操作檯、培養箱(37℃、5% CO₂)。

方法：

Raw264.7 細胞株，以含有 10%胎牛血清(Fetal Bovine serum;GIBCO)、1% Penicilline-streptomycin (GIBCO)、1% L-Glutamine(GIBCO)、1ml Fungizone Amphotericin B (GIBCO)的 RPMI(GIBCO)培養液將其培養在 5%二氧化碳、恆溫 37℃ 的培養箱中，每三天更換一次培養液；當細胞生長至九分滿，及以 1% Trypsine 將細胞游離下來，移至新培養基中重新貼附生長。

1-2 質體萃取

材料：

QIAprep Spin Miniprep Kit、1000p 吸管唧筒(pipette pump)、微量離心管(eppendorff)、離心機。

方法：

挑菌養在 3ml 含有 Ampicillin 的 LB medium 中培養 20 小時，利用 QIAprep Spin Miniprep Kit 萃取質體 DNA。首先將菌液離心 (3000rpm、4、5 分鐘) 倒掉上層液，加 250ul Buffer P1 回溶、打散沉澱下的菌體，將其移至 eppendorf，加 250ul Buffer P2 上下顛倒輕輕搖動於室溫作用 5 分鐘，在加入 350ul buffer N3 輕輕搖動，讓豆花狀的 Genomic DNA 結聚，冰上作用 5 分鐘，以 12000rpm、4 離心 10 分鐘，取上層液到 QIAprep column，離心 30~60sec 後倒掉離下來的液體，再加 500ul buffer PB 沖洗 QIAprep spin column，離心 50~60sec，倒掉液體，再加 750ul buffer PE 沖洗 QIAprep spin column，離心 30~60sec 後倒掉液體，最後空的 column 再離心 1 分鐘排除所有殘留液體，將 QIAprep column 移至於 1.5ml eppendorf，接著加 50 ul buffer EB 或 ddH2O 到 QIAprep column 中心停滯 1 分鐘，1400rpm 離心 1 分鐘，離心下來的液體即含有質體 DNA。

1-3 DNA 轉植 (Transfection)

材料：

Raw264.7 細胞、無 FBS 及抗生素的 RPMI medium、只有 FBS 的 RPMI medium、Invitrogen Lipofectamine 2000 transfection kit

(GIBCO)、ER- DNA、1000p 及 20p 吸管唧筒(pipette pump)、微量離心管(eppendorff)、

步驟：

1 $\times 10^6$ 細胞天於 60cm dish，將其 medium 換成無 FBS 及抗生素的 RPMI medium，選用 Invitrogen Lipofectamine 2000 transfection kit，利用 Lipofection 的原理進行基因轉質的實驗。首先將質體 DNA 與適量無 FBS 及抗生素的 RPMI medium 混合，再依外送 DNA 量，抽取 1:1 比例的 Lipofectamine 與無 FBS 及抗生素的 RPMI medium 混合，室溫作用 5 分鐘。接著將兩者以 Tip 混合 100 次，置於是溫 20 分鐘後加入含有細胞的 dish 中，放置培養箱養 6 小時，之後將 medium 換成只有 FBS 的 RPMI medium，置培養箱養 20 小時等其 ER- 蛋白質表顯。

第四章 參考資料

1. Asai K, Hiki N, Mimura Y, Ogawa T, Unou K, Kaminishi M. Gender differences in cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cell: role of estrogen in modulating LPS-induced cytokine secretion in an ex vivo septic model. *Shock* 2001 ; 16:340-3.
2. Baranao RI, Tenenbaum A, Rumi LS. Effects of sexual steroid hormones on the functionality of murine peritoneal macrophages. *Steroids* 1991 ; 56:481-5.
3. Baue AE. Sepsis research: what did we do wrong? What would semmelweis do today? *Shock* 2001 ; 16:1-8.
4. Emre S, Aydin A. Sex steroids and the immune system. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 2002 ; 22:3-33.
5. Friedman D, Netti F, Schreiber AD. Effect of estradiol and steroid analogues on the clearance of immunoglobulin G-coated erythrocytes. *J Clin Invest* 1985 ; 75:162-7.
6. Giguere V, Tremblay A, Tremblay GB. Estrogen receptor β : Re-evaluation of estrogen and antiestrogen signaling. *Steroids* 1998 ; 63 ;335-339.
7. Gil M, Eva S, Vikki MA, Thomas R, Joon S, Xiao-Ying H, Saehar M. Fortune K. Interaction of the estrogen receptors with the Fas ligand promoter in human monocytes. *J Immunol* 2003 ; 170:114-122.
8. Gillian SA, Stuart JM, KeJian L, Linda G, Moon JJ, Marisu T. Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. *J Clin Invest* 2003 ; 111:1309-1318.

9. Guo Z, Krucken J, Benten WP, Wunderlich F. Estradiol-induced nongenomic calcium signaling regulated genotropic signaling in macrophages. *J Biol Chem* 2002 ; 227:7044-50.
10. Hall JM, Couse JF, Korach KS. The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *J Biol Chem* 2001 ; 276:36869-36872.
11. Kovacs EJ, Faunce DE, Ramer-Quinn DS. Estrogen regulation of JE/MCP-1 mRNA expression in fibroblasts. *J Leukoc Biol* 1996 ; 59:562-8.
12. Markus W, Martin K, Martin G, Kirby I, Irshad H. Preservation of splenic immune functions by female sex hormones after trauma-hemorrhage. *Crit Care Med* 2002 ; 30:4.
13. Pacifici R, Rifas L, McCracken R. Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin 1 release. *Proc Natl Acad sci USA* 1989 ; 86:2398-402.
14. Pacifici R, Vannice JL, Rifas L. Monocytic secretion of interleukin-1 receptor antagonist in normal and osteoporotic women: effects of menopause and estrogen/progesterone therapy. *J Clin End* 1993 ; 77:1135-41.
15. Robert MB, Matthew NL, Bruce Mk, Bruce AS. The endocrine system. *Physiology* 1998 ; 8:779-1046.
16. Rogers A, Eastell R. Effects of estrogen therapy of postmenopausal women on cytokines measured in peripheral blood. *J Bone Miner Res* 1998 ; 13:1577-86.
17. Saunderson PTK. Oestrogen receptor beta (ER β). *Reviews of reproduction* 1998 ; 3:164-171.

18. Schreiber AD, Nettle FM, Sanders MC. Effect of endogenous and synthetic sex steroids on the clearance of antibody-coated cells. *J Immunol* 1988 ; 141:2959-66.
19. Schroder J, Kahlke V, Book M. Gender differences in sepsis: genetically determined? *Shock* 2000 ; 14:307-310.
20. Seli E, Pehlivan T, Selam B. Estradiol regulates MCP-1 in human coronary artery endothelial cells: a mechanism for its anti-atherogenic effect. *Fertil Steroid* 2002 ; 77:542-7.
21. Seli E, Selam B, Mor G. Estradiol regulates MCP-1 in human coronary artery smooth muscle cells: a mechanism for its anti-atherogenic effect. *Menopause* 2001 ; 8:296-301.
22. William FG. The gonads: development and function of the reproductive system. *Review of Medical Physiology* 1999 ; 23:398-439.
23. You HJ, Kim JY, Jeong HG. 17beta-Estradiol increases inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 ; 303:1129-34.