

中文摘要

在台灣，糖尿病(diabetes mellitus, DM)病人容易感染克雷伯氏肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)，由 KP 造成的院內感染與社區性肺炎具有快速的臨床病程與高死亡率，而 KP 的黏性特質(mucoviscosity)被認為是重要的致病因子。肺臟中常駐的肺泡巨噬細胞(alveolar macrophage, AM)，具有吞噬與殺菌的功能，是肺臟抵抗外來微生物的第一道防線。為探討黏性特質(mucoviscosity)與糖尿病在不同群(cluster) KP 間之致病作用，本研究中，將 6 週齡的 C57BL/6J 小鼠腹腔注射 streptozotocin，以誘發糖尿病，並持續飼養至 30 週，將不同 cluster 低黏性(hypo-mucoid)與高黏性(hyper-mucoid)，且基因相似度高達 98 % 成對的 KP，分別以菌量 1×10^4 cfu 感染正常與糖尿病小鼠，於 20 或 40 小時將其犧牲。為研究 KP 在肺部與血液中清除的情形，將小鼠左肺均質(homogenize)，同時收集小鼠心臟血液，進行細菌培養；將小鼠右肺進行支氣管灌流術(bronchoalveolar lavage)分離巨噬細胞，探討 KP 入侵肺部後引起 AM 的凋亡(apoptosis)與吞噬(phagocytosis)情形。結果顯示，在 hypo-mucoid KP 的感染中，DM 小鼠肺部或血液內的 KP 菌量比在正常小鼠的肺或血液內明顯增多；正常小鼠分別感染成對 KP 時，hyper-mucoid KP 在肺中的菌量比 hypo-mucoid KP 顯著增加。而在宿

主防禦方面，DM 小鼠的巨噬細胞對 KP 具有正常的吞噬能力，凋亡現象也與正常小鼠一致。為進一步研究 AM 與 hypo-或 hyper-mucoid KP 之間是否存在著不同的交互作用(interaction)，因此利用老鼠的巨噬細胞株(RAW 264.7 cell line)感染 hypo-或 hyper-mucoid KP，比較 KP 對巨噬細胞的存活力(viability)與凋亡(apoptosis)之作用，同時也比較 KP 對巨噬細胞的附著(adhesion)與在巨噬細胞內的 KP 存活量(macrophage-associated KP)，結果發現，hyper-mucoid KP 對巨噬細胞具較高的黏著量，甚至可以進入巨噬細胞中存活約一小時；而利用轉移子突變(mini-Tn10 transposon mutagenesis)方式將 hyper-mucoid KP 的黏性去除，再予以感染巨噬細胞，則失去其原先的高黏著量，也無法在巨噬細胞內存活。經由本篇的研究結果，說明了黏性特質影響細菌與巨噬細胞間的交互作用，KP 的黏性特質是一個獨立致病因子，hyper-mucoid KP 具有較高的致病力；然而，DM 此因子一旦存在，便使 hypo-mucoid KP 的致病力加成，不僅如此，hypo-mucoid KP 可能存在著有別於黏性特質的致病因子。

Abstract

Diabetic (DM) patients are susceptible to *Klebsiella pneumoniae* (KP) infection, resulting in community- and hospital-acquired pneumonia and a high mortality rate in Taiwan. In the lungs, alveolar macrophages (AM) are pivotal for the defense against KP invasion. To investigate the effect of mucoviscosity and diabetes on virulence of KP between divergent cluster, in this study, C57BL/6J male mice was intraperitoneally injected with streptozotocin at 6 wk and DM was successfully induced with a blood sugar of 300 mg/dl at 8 wk. At 30 wk, the diabetic mice were instilled intratracheally with hypo- or hyper-mucoid KP from divergent cluster, and sacrificed 20 hr or 40 hr later. To study the clearance of KP in the lung and blood, the KP burden was determined by culturing the homogenate of left lung and the intra-cardiac blood. The lung burden of hyper-mucoid KP, after 20 hr of infection, was greater than that of hypo-mucoid one in control mice. Besides, the hypo-mucoid KP burden in the lung or blood of infected diabetic mice was more than that of control ones. The phagocytic ability and apoptosis of AM from right lung was assessed by Gram stain and FACScan analysis, respectively. The results showed that AM from diabetic mice possess normal phagocytic ability and their percentage of apoptosis was similar to that of control mice. Furthermore, to study the interaction between hypo-/hyper-mucoid KP and macrophage cell line, RAW 264.7 cells were infected with hyper- or hypo-mucoid KP. It showed that there was no difference in the percentages of cell apoptosis. However, hyper-mucoid KP adhere and invade into RAW 264.7 cells easier than hypo-mucoid one, and it survived longer in the host cell. Additionally, mini-Tn10 transposon mutagenesis was introduced into wild type KP and resulted in a mutant KP with hypo-mucoid phenotype. RAW 264.7 cells were infected by this mutant KP, and thereafter, the adhesion and invasion of the mutant KP was decreased. These results suggested that the mucoid property was not only a key factor for KP to adhere and to invade macrophages, but also an independent KP virulent factor. On the other hand, DM played an important role for the infection by hypomucoid KP possibly making animals susceptible to hypo-mucoid KP infection.

誌謝

2002 的初秋，茫然與軟弱的我進入醫研所；而 2004 的仲夏，我用希望、勇氣與熱情為這兩年劃下逗點，並朝著下一個更高深的學術殿堂邁進。一路走來，最要感謝我的指導教授盧敏吉老師與蔡宗統老師，謝謝你們耐心的指導與幫助。盧老師對研究的基本精神與實驗過程的重視，以及樂觀幽默地面對問題的態度，使我學會了如何有系統地去探索問題、分析問題及解決問題，更重要的是讓我具有勇氣與熱情。蔡老師對科學的美感與創新獨到的見解，啟發我更寬廣與多元的思考模式，也讓我對大自然有更深刻的體會。

非常感謝生理科的全體師長，給予我研究和實驗方面的建議與提示，以及生理書報討論的教導與指正，經由書報討論的訓練，除了專業知識的成長之外，也使我能夠對研究設計進行批判與條理分明的表達意見。很謝謝李妙蓉老師、謝長奇老師在百忙中熱心的解說流氏細胞儀，協助我順利的分析資料，而林文川老師寶貴的糖尿病動物模型經驗之提供，使我的實驗能步上正軌，還要感謝賴怡琪老師對於細菌實驗詳細的教導與特別的觀點，使我的研究能更加深入，也引發我對細菌行為與宿主防禦濃厚的興趣，此外，邱乾順主任與其他口試委員：盧敏吉老師、蔡宗統老師、李妙蓉老師、賴怡琪老師對於我論文完整而專業的指正與建議，在此致上最深的感謝。

追求真理的路上，幸好有伴同行，在我茫然與軟弱時，有親愛的學長姐與同學扶我一把，給我力量。謝謝美蘭學姐、家欣學長對實驗的指導，特別感謝亦師亦友的程姐與靜華學姐，在我茫然的時候，給我精闢的建議與溫暖的關心。也很感謝與我一起成長、前進的同學瓊文、湯姐、瓊瑤、致芬、佩蓓、竹莞、玲瑜、慧淇、昆瀚與郁婷，特別是佩玉，謝謝你的”於心不忍”，特別是信忠，感謝你的熱心，以及”用在刀口上的朋友”慧芬，謝謝你的”捨命陪君子”，在我軟弱的時候，你們給我最大的幫助與鼓勵，此外，還有學妹怡均、怡蓓、曉嵐，謝謝你們。

最重要的，我要感謝一直為我付出心力的爸媽與哥哥，謝謝你們讓我無後顧之憂的求學，還要感謝年底將與我步上紅毯的未婚夫碩爵，謝謝你的陪伴與支持，讓我可以盡情任性的研究，真的謝謝你。

真的謝謝大家，我會帶著你們送給我的禮物--希望、勇氣與熱情，朝著追求真理的路上邁進，一直在心裡祝福著你們。

目錄

中文摘要	1
英文摘要	3
誌謝	4
目錄	6
圖目錄	9
略字表	12
第一章 緒論	14
壹、前言	14
貳、糖尿病(diabetes mellitus, DM)概述	14
參、糖尿病和感染	19
肆、肺炎克雷伯氏菌(<i>Klebsiella pneumoniae</i> , KP)	22
伍、肺泡巨噬細胞(alveolar macrophage, AM)	27
陸、細菌的致病與巨噬細胞凋亡 (apoptosis)	32
柒、研究目的	34
第二章 研究設計與方法	36
壹、研究設計	36
貳、研究方法	38
第一節 體內試驗(<i>in vivo</i>)	38

一、糖尿病動物模型的建立-----	38
二、小鼠肺部感染 <i>Klebsiella pneumoniae</i> (KP) -----	41
三、感染後小鼠左肺、右肺肺泡巨噬細胞 (broachoalveolar lavage)及血液的取得-----	44
四、小鼠肺部及血液中 <i>Klebsiella pneumoniae</i> 菌量-----	46
五、肺泡巨噬細胞吞噬 <i>Klebsiella pneumoniae</i> 菌量之計數--	47
六 肺泡巨噬細胞凋亡之偵測-----	50
第二節 體外試驗(<i>in vitro</i>) -----	51
一、RAW 264.7 細胞株感染 <i>Klebsiella pneumoniae</i> -----	51
二、 <i>Klebsiella pneumoniae</i> 所造成之細胞毒性(cytotoxicity)與所誘發之細胞凋亡(inducing-apoptosis)-----	53
三、 <i>Klebsiella pneumoniae</i> 對 RAW cells 的附著(adhesion)及 KP 在巨噬細胞內的存活量評估-----	55
四、Mini-Tn10 transposon mutagenesis-----	56
參、統計方法-----	59
第三章 結果-----	61
第一節 體內試驗(<i>in vivo</i>) -----	61
1-1. DM 小鼠實驗模式之建立-----	61
1-2. KP1004n (hypo-mucoid) 與 KP1004m (hyper-mucoid) 之	

肺部感染-----	62
1-3. Cluster A 的 paired KP (hypo-mucoid : KP1084/ hyper-mucoid : KP1112) 肺部之感染-----	63
1-4. Cluster B 的 paired KP (hypo-mucoid : KP1008/ hyper-mucoid : KP2002) 肺部之感染-----	65
1-5. Cluster C 的 paired KP (hypo-mucoid : KP1283/ hyper-mucoid : KP1284) 肺部之感染-----	66
第二節 體外試驗(<i>in vitro</i>)-----	67
2-1. Hypo-/hyper-mucoid KP 所造成之細胞毒性(cytotoxicity) 與所誘發之細胞凋亡(inducing-apoptosis) -----	67
2-2. Hypo-/hyper-mucoid KP 對 RAW cells 的附著(adhesion) 及 KP 在巨噬細胞內的存活量評估-----	68
2-3. 突變株與野生株 KP (mutant/ wild type KP) 對 RAW cells 的附著 (adhesion) 及 KP 在巨噬細胞內的存活量 評估-----	69
第四章 討論-----	71
第五章 結論-----	82
第六章 參考資料-----	83
作者簡歷 -----	107

圖目錄

- 圖一、 *Klebsiella pneumoniae* 相關致病因子-----92
- 圖二、 Alveolar macrophage 之殺菌機制-----93
- 圖三、 糖尿病小鼠血糖值比較。控制組小鼠(con)與糖尿病組小鼠(DM)第八週齡與第二十八週齡之血糖值-----94
- 圖四、 糖尿病小鼠體重變化。控制組(con)小鼠與糖尿病組(DM)小鼠各週齡體重紀錄-----95
- 圖五 正常與 DM 小鼠肺部感染 KP1004n (hypo-mucoid) 與 KP1004m (hyper-mucoid) 20 小時後，在肺部(A)及血液(B)中的 KP 菌落數-----96
- 圖六、 糖尿病小鼠肺泡巨噬細胞(AM)對 hyper-mucoid KP (KP1004m) 的吞噬量-----97
- 圖七 正常與 DM 小鼠肺部感染 cluster A 的 paired KP (hypo-mucoid : KP1084/hyper-mucoid : KP1112) 20 小時後，在肺部(A)及血液(B)中的 KP 菌落數-----98
- 圖八、 Cluster A 的 paired KP (hypo-mucoid : KP1084/hyper-mucoid : KP1112)對正常與 DM 小鼠肺泡巨噬細胞(AM)引發之凋亡--99
- 圖九 正常與 DM 小鼠肺部感染 cluster A 的 paired KP (hypo-mucoid : KP1084/hyper-mucoid : KP1112) 40 小時後，在肺部(A)及血液

(B)中的 KP 菌落數-----100

圖十、正常與 DM 小鼠肺部感染 cluster B 的 paired KP (hypo-mucoid : KP1008/hyper-mucoid : KP2002) 20 小時後，在肺部(A)及血液 (B)中的 KP 菌落數-----101

圖十一、正常與 DM 小鼠肺部感染 cluster C 的 paired KP (hypo-mucoid : KP1283/hyper-mucoid : KP1284) 20 小時後，在肺部(A)及血液(B)中的 KP 菌落數-----102

圖十二、Cluster A 的 paired KP (hypo-mucoid : KP1084/hyper-mucoid : KP1112)感染老鼠巨噬細胞株 (RAW 264.7)所誘發之細胞凋亡(inducing- apoptosis)-----103

圖十三、Cluster A 的 paired KP (hypo-mucoid : KP1084/hyper-mucoid : KP1112) 感染老鼠巨噬細胞株 (RAW 264.7) , KP 對細胞株的附著(adhesion)與 KP 在巨噬細胞內存活的菌落數 -----104

圖十四、突變株 KP (mutant : KPG6)與野生株 KP (wild type : KP1112) 依照 MOI=1 與 MOI=10 分別感染老鼠巨噬細胞株 (RAW 264.7) , KP 對細胞株附著(adhesion)之菌落數-----105

圖十五、突變株 KP (mutant : KPG6)與野生株 KP (wild type : KP1112) 依照 MOI=1 與 MOI=10 分別感染老鼠巨噬細胞株 (RAW

264.7), KP 在巨噬細胞內存活的菌落數-----106

略字表

DM : diabetes mellitus

KP : *Klebsiella pneumoniae*

AM : alveolar macrophage

BAL : bronchoalveolar lavage

BALF : bronchoalveolar lavage fluid

STZ : streptozotocin

FACScan : flow cytometry

NDDG : National Diabetes Data Group

FPG : fasting plasma glucose

IFG : impaired fasting glucose

GAD : glutamic acid decarboxylase

DKA : diabetic ketoacidosis

NKHS : nonketotic hyperosmolar state

PMNL, PMN : polymorphonuclear leukocyte

IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 : interleukin-1, interleukin-2, interleukin-6,
interleukin-8

TNF-a : Tumor necrosis factor a

COPD : chronic obstructive pulmonary disease

LPS : lipopolysaccharide

CPS : capsular polysaccharide

NADPH : reduced nicotine adenine dinucleotide phosphate

MSR : macrophage scavenger receptor

MMR : macrophage mannose receptor

PFGE : pulse d-field gel electrophoresis

PBS : phosphate buffer saline

FBS : fetal bovine serum

MOI : multiplicity of infection

DAPI : 4,6-diamidino-2-phenylindole

INF- γ : interferon gamma

MIP-2 : macrophage inflammatory protein-2

第一章 緒論

壹、前言

在台灣，糖尿病(diabetes mellitus, DM)盛行率逐年上升，住院率更是居高不下(Wei et al., 2002)，於民國 71 年至 90 年間，DM 一直位居國人前十大死因的第五名，根據行政院衛生署 91 年 6 月所公佈的資料中(行政院衛生署, 2002)，DM 的死因順位已由原先第五名晉升至第四名，其每千萬人口的死亡率高達 39.26，且其大多死於 DM 的併發症。DM 病人的感染問題一直存在，尤其是 DM 病人很容易引發細菌性呼吸道感染，而且感染期間很長(Smitherman et al., 1995)，特別是由肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)所造成的肺部感染，其臨床病程進展快速，且其死亡率高達 54 % (Ko et al., 2002)。由於台灣 DM 病人容易感染 KP，因而這幾年國內的專家學者與感染科醫師紛紛投入對 KP 的研究，以尋找 KP 的致病機制。

貳、糖尿病(diabetes mellitus, DM)概述

(一) 定義

糖尿病(DM)是一種常見的內分泌疾病，其共同特徵是病人具有高血糖值。導因於不同原因，造成病人體內胰島素相對或絕對不足，或周邊組織器官對胰島素(insulin)產生抗性(resistance)，

使細胞無法有效利用葡萄糖(glucose)，進而造成高血糖。而長期的高血糖，連帶影響許多器官及系統，產生腎臟病變，視網膜，心臟血管及神經病變等(Carter et al., 1996)。糖尿病的定義，已經由 National Diabetes Data Group (NDDG)及世界衛生組織(WHO)在 1997 年修正如下：1)空腹血糖 (fasting plasma glucose, FPG) <110 mg/dl (6.1 mmol/L)是為正常 2)FPG 介於 110~126 mg/dl (6.1 mmol/L ~ 7.0 mmol/L)，是為 impaired fasting glucose (IFG) 3)FPG ≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/L)，定義為 DM。另外，若隨機血糖 ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/L)，且合併糖尿病典型症狀（多渴、多尿、體重減輕）也可診斷為 DM (Alberti and Zimmet, 1997)。

（二）分類

根據發病原因，可將 DM 分為 type 1、type 2 及其它特異型三類，type 1 DM 可分為 type 1 A 及 type 1 B。

1. Type 1 A

此類病人以非裔美人或有家族史的亞洲人為主。他們出生時體內胰臟 β 細胞的數目是正常的。但因不明原因，包括病毒感染、環境等因素活化自體免疫系統，使 β 細胞受到破壞而逐漸減少進而造成 insulin 分泌不足(Schranz et al., 1998)。Type 1A DM 涉及許多基因，他們大多有 HLA DR3 及 1 或 HLA DR40 而在

HLA 基因位置(locus)上(Schranz., 1998) , 又以 DQA1*0301 , DQB1*0302及 DQA1*501, DQB1*0201 最為相關,可在 40 % type 1A DM 病人身上發現。胰島細胞自體抗體(ICAs)是由數種不同抗體組成 , 他們會攻擊胰島的不同分子如 glutamic acid decarboxylase (GAD) , insulin , IA-2/ICA512 等。而這些自體免疫反應有：1 產生自體免疫抗體 2 活化的淋巴球在胰臟胰島旁之淋巴結 , 及血液循環內分布 3 T-淋巴球的增生 4 釋出 cytokines。這些淋巴球在胰島細胞內浸的情況稱之為 insulitis。雖然胰島內有包含 β -cell 外的不同細胞(δ -cell , ϵ -cell , PP-cell) 存在 , 但這些自體抗體似乎僅破壞 β -cell 而已。

2. Type 1B

如同 type 1A , 也是缺乏 insulin , 但這些病人體內並沒有免疫標誌 (immunology marker) , 因此造成 β -cell 被破壞的原因並不清楚。

3. Type 2 DM

導因於三大病態生理學特徵：周邊組織對 insulin 的抗性、insulin 分泌減少 , 以及肝臟 glucose 製造增加(Cline et al., 1999)。肥胖 , 尤其是軀幹性的肥胖 , 常會加重 insulin resistance (Gerich, 1998) 這是由於脂肪細胞會分泌許多生物性產物 如 leptin TNF-

、游離脂肪酸改變了 insulin 的分泌、作用，體重增加甚至也與 insulin resistance 相關。在疾病早期，血糖耐受性仍可維持正常，這是因為 insulin 代償性的分泌增加。當這種代償機制無法再維持下去時，血糖耐受性便開始下降。先是飯後血糖升高，接下來飯前血糖也會升高。最終結果便是胰島細胞的衰竭。另外也有研究發現，由於 GluT-4 transport 的缺損，造成了肌肉內 glycogen 合成異常，而成為 insulin 抗性的重要原因(Shulman, 1999)。Type 2 DM 有很強的基因遺傳性。雖然主要基因尚未被確定，但可以肯定的是其為多基因多因子遺傳(Defornzo, 1997)。

4.其它型 DM

原因包括因基因缺損使 insulin 分泌減少或功能障礙，或個體本身對 glucose 耐受性下降。胰島細胞若遭大量 (80 %) 破壞，或其他內分泌疾病對 insulin 的作用產生拮抗，如肢端肥大症，庫辛氏病 (Cushing's disease) 等，也會使病人產生 DM。

(三) 流行病學

在過去 20 年間，DM 盛行率大增。在 1976~1994 年間，在美國的盛行率由 8.9 上升至 12.3 %。且 type 2 DM 增加的速度遠比 type 1 DM 快(Rosenbloom et al., 1999)。Type 1 及 type 2 DM 的分布有地域性。在 Scandinavia，有全世界最多的 type 1 DM 患

者，在芬蘭每年便有十萬分之三十五的發生機率；而太平洋地區的 type 1 DM 少許多，在日本及中國，發生率約每年十萬分之一至十萬分之三；北歐及美國的發生率約每年十萬分之七。Type 1 DM 的發生率反應了與其相關的 HLA 基因分佈的地域性，type 2 DM 的盛行率，在太平洋地區最高，印度及美國次之，而在蘇俄及中國大陸最少。可能是由於遺傳、環境及種族不同有關。在台灣地區，國人糖尿病盛行率隨年齡與年代的增加而升高。於 1996-2000 年之間，男女年齡別 DM 盛行率由 0-9 歲 0.4-1.2/1000 增加到 70 歲的 129-210/1000；五年間，所有年齡的男性盛行率介於 29-37/1000，女性則介於 38-46/1000。此外，男性歷年 DM 住院率介於 18.6-20.0%，女性則是 16.5-17.8%。因此，台灣 DM 的盛行率不僅逐年上升，住院盛行率更是居高不下，DM 是非常值得大家正視的現代健康問題(Wei et al., 2002)。

(四) DM 併發症

DM 併發症可分為急性及慢性：

1. 急性併發症

(1) 糖尿酮酸中毒 (diabetic ketoacidosis, DKA)：由於 insulin 的不足及昇糖激素，兒茶酚胺，皮質醇，或生長激素過度分泌，使得肝臟的糖質新生作用增加，且變成肝臟代謝途徑進而產生酮體。

其臨床表現為噁心、嘔吐、痛、多尿、呼吸困難及意識不清。

(2)高滲透壓、高血糖非酮酸中毒(nonketotic hyperosmolar state, NKHS)：由於胰島素相對不足，且水份缺乏造成。由於 insulin 的不足，使糖質新生作用增加，組織利用 glucose 減少，加上高血糖造成的利尿作用，使血管內容積嚴重缺乏造成。NKHS 的 insulin 缺乏程度較 DKA 為輕。其臨床症狀包括多尿、姿態性低血壓，其中樞神經症狀，包括疲倦、嗜睡、遲鈍、癱瘓，甚至昏迷。

2.慢性併發症

DM 影響許多器官系統，且造成 DM 最常見到的死亡及罹病原因，可分為血管性及非血管性。血管性又可分為巨血管性及微血管性，巨血管性包括冠狀動脈疾病，週邊血管疾病(Grund et al., 1999)；微血管性包括視網膜病變，神經病變與腎病變(Grundy et al., 1995)。非血管性，包括腸胃功能障礙、性功能障礙、皮膚病史。除了上述合併症，容易受到感染也是 DM 病人常見問題。

參、糖尿病和感染

(一) DM 病人對感染的高感受性(high susceptibility)

有一些感染特別容易發生在 DM 的病人，甚至只有他們才會得到；有些感染在 DM 病人身上會特別嚴重，其產生併發症的機

會也較高。常見的感染有呼吸道感染、泌尿道感染、軟組織感染等(Nirmal et al., 1999)。就呼吸道感染而言，DM 早期被視為獨立的危險因子(Mackowiak et al., 1979)，但近來有文獻提出不同看法，認為 DM 並不是呼吸道感染的獨立致病因子，而是 DM 會增加呼吸道對特定微生物的感受性，例如對金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、革蘭氏陰性菌等。使 DM 病人在某幾種肺部的感染，發生率比一般人高，甚至致病率及死亡率也較增加(Robbins et al., 1944; Helene et al., 2001)。在眾多微生物之中，以細菌所引起的感染最為常見也持續較久(Smitherman et al., 1995)，例如在台灣因 KP 所引起的肝膿瘍(liver abscess)中便有 45 %至 75 %是 DM 病人(Wang et al., 1998)。因此，具有 DM 的病人較容易感染某些特殊微生物，例如由 group B *Streptococcus* 所引起的菌血症在 DM 的病人身上其盛行率便有 27.5 % (Farley et al., 1993)；此外，有 30-60 %的 DM 病人會感染 KP 而引發菌血症 (Leibovici et al., 1991)，肝膿瘍，眼內炎 (Chee et al., 1995)。

(二) 糖尿病與免疫系統

DM病人對感染之所以具高感受性，乃是由於其免疫功能上的缺損，目前認為高血糖會造成免疫方面的改變，如巨噬細胞在高血糖的環境，其殺菌能力會下降(Nielson and Hindson., 1989)，

白血球抗微生物的能力亦降低，但良好的血糖控制卻可以改善免疫功能，降低感染(Gallacher et al., 1995; McMahon et al., 1995)。

免疫系統的改變分成以下幾點討論：

1. 先天性免疫(innate immunity)

(1) 多型核白血球(ploymorphonuclear leukocyte, PMNL, PMN)：

Type 1 和 type 2 DM 病人縱使其黏著因子表現增加，以及產生較多的自由基，但是嗜中性白血球卻對自由基的刺激敏感度，及本身趨化能力(neutrophil chemotaxis)均有顯著下降(Delamaire et al., 1997)。此外，在吞嚥作用、氧化呼吸作用(oxidative burst) 和殺菌作用的功能也減弱；在細胞激素分泌方面，細胞靜止狀態中分泌的 TNF- α 、interleukin-6 (IL-6)、interleukin-8 (IL-8)皆會增加；一旦細胞受到刺激，嗜中性白血球產生 IL-6 和 IL-8 的量就會比正常細胞少(Helene et al., 2001)。

(2) 單核球(monocyte)及巨噬細胞(macrophage)：

單核球與巨噬細胞的功能也有所改變。在早期的研究指出，慢性糖尿病大鼠(BB rat)的肺泡巨噬細胞(alveolar macrophage, AM)吞嚥金黃色葡萄球菌的能力比正常的 AM 差，同時其殺菌力也減低(Sima et al., 1988)。

2. 適應性免疫(Adaptive immunity)

在體液免疫方面並沒有受到 DM 太大的影響，不僅具正常的免疫球蛋白量，對於疫苗注射的反應也正常。但是，細胞免疫方面卻有改變。在某些致病菌的刺激之下，例如金黃色葡萄球菌，淋巴球的增生反應並沒有因此而增加，但對其他的致病菌，如白色念珠菌(*Candida albicans*)的反應卻很正常(Deresinski et al., 1995)。

肆、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)

(一) 一般特徵

肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)是一種革蘭氏陰性菌(Gram-negative)，屬腸內桿菌科(Enterobacteriae)，為伺機性感染的致病原，從輕微的泌尿道感染到嚴重菌血症(bacteremia)乃至具高死亡率的肺炎皆可由 KP 感染造成(Bartlett et al., 1986)。KP 會造成急性且嚴重的肺炎與肺的破壞，由 KP 所引起的肺部感染特色便是臨床病程進展快速，且經常合併肺膿瘍及多肺葉的侵犯(Meyer et al., 1993)，其痰液呈現紅醋栗色果醬(currant jelly)。KP 在革蘭氏染色(Gram stain)之下便有明顯表現，由於具有莢膜(capsule)，有些 KP 在培養皿中會形成黏性的菌株；KP 以 D 型的葡萄糖(D-glucose)和檸檬酸鹽(citrate)為主要碳源(Podschun et al., 1998)。此外，R 因子(R factor)使其對 ampicillin、

carbeucillin 具抗藥性，並由於現今抗生素的廣泛使用，使得更多具抗藥性的菌株出現。

(二) 流行病學與高危險群

KP 是大葉型肺炎的重要致病菌，此外也會造成泌尿道感染、肝膿瘍(liver abscess)、腦膜炎(meningitis)等，甚至導致菌血症；有 9%的泌尿道感染與 14%的菌血症病人與 KP 相關，僅次於大腸桿菌(*E. coli*; CDC, 1982)。KP 感染造成的死亡率平均約在 35% (Fine, 1996); 而 KP 的感染常發生在免疫功能有問題的病人，例如糖尿病者、正在服用抗代謝藥物或類固醇的病人與酗酒者。此外，KP 造成的下呼吸道感染，除了上述危險因子外，還包括慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)，而且大多發生在 40 歲以上的病人(Pierce et al, 1974)。在台灣，社區感染(community-acquired infection)佔了 73%；此與國外有所不同，在國外以院內感染(nosocomial infection)居多，佔了 43-77% (Yang et al., 2001)。根據美國疾病管制局統計，克雷伯氏菌屬(*Klebsiella spp.*)佔了院內感染的 8%及流行性爆發的 3%。在台灣，1920 年至 1960 年之間，KP 便被視為造成社區性肺炎的重要原因(Carpenter et al., 1990)，近十年來，KP 造成社區性感染的肝膿瘍與日俱增，由 30%上升至 80%，

同時有 70 % 左右的病人具有 DM (Wang et al., 1998; Ko et al., 2002)。因此，有專家學者針對其 KP 族群研究，發現 Cluster A KP 是造成台灣肝膿瘍主要的 KP 族群，其相似度有 $72.4 \% \pm 9.4 \%$ (Lau et al., 2000)。由於台灣地區 DM 病人對 KP 具有很大的感受性，而且會感染特定部位，使得 KP 感染被視為重要的公共健康問題。

(三) 重要致病因子(virulence factor)

關於克雷伯氏菌屬(*Klebsiella spp.*)的感染，經由體外與體內實驗(*in vitro and in vivo*)，得知某些細菌的因子可以引發疾病的產生，這些因子有五種(圖一)，包括莢膜(capsule)、具黏附力的纖毛(pili)、siderophores、血清抵抗(serum resistance)與脂多醣體(lipopolysaccharide, LPS)；而莢膜與脂多糖體在 KP 感染中是最主要，也最被重視的致病因子(Williams et al., 1990)。

1. 莢膜 (capsule)

KP 通常會形成顯著的莢膜，其莢膜主要是由複雜的酸性多醣體所組成稱之莢膜多醣體(capsular polysaccharides, CPS)。一般而言，CPS 可被分為兩類，第一類富含尿酸(uronic acid)，以其為酸性組成，具有較大的分子量；第二類 CPS 的分子量低，其酸性組成較具多樣性(Lai et al., 2003)。由於 CPS 上的某些酸性組

成使得 KP 具有黏性特質 (mucoid) , 而黏性的程度則被認為與感染的形成有關 (Nassif et al., 1986) , 很多研究也證實 KP 的黏性 (mucoviscosity) 是重要的致病因子 , 在臨床上所分離出具有入侵性的菌株大都具有黏性的特質 (Fang et al., 2004) 。在莢膜上造成黏性特質的 colanic acid (M antigen) , 可由 rcsA 、 rmpA 、 rmpB 等基因調控其表現 , 當活化 colanic acid 大量合成時 , 會使細菌表現黏性 (mucoid phenotype; Nassif et al., 1989; McCallum et al., 1991) 。另外 , K 抗原是莢膜上具有重複次單元的多醣類 , 其組成大多是 4-6 個的糖類單元加上尿酸 (uronic acid) ; 目前 , 克雷伯氏菌屬 (*Klebsiella spp.*) K 抗原有 77 種 (Ørskov et al., 1984) 。莢膜包披在 KP 的最外層 , 有很多研究指出 , 莢膜對 KP 的致病力而言是必要的 , 原因在於莢膜一方面可以保護 KP 免於受到 PMN 的吞噬 (Podschn et al., 1992) , 另一方面又能使 KP 躲掉血清殺菌因子 (bactericidal serum factors) 的攻擊 , 成為 KP 重要的屏蔽 (Williams and Tomás, 1990) 。在體內實驗發現 , 將大白鼠施打抗 KP 的 CPS 單株抗體 , 可以減少 KP 肺炎的出血與嚴重度 , 證明了莢膜對於 KP 肺炎形成的重要性 (Held et al., 1992) ; 而在體外實驗也發現 CPS 會抑制巨噬細胞的分化能力和功能 (Yokochi et al., 1977) 。有研究指出 , 造成呼吸道的感染 , 尤其是院內感染 , 可

能與莢膜上的第 1、3、4、5 型 K 抗原有所關聯；在另一實驗中則認為第 1、2 型 K 抗原最具致病力，因為其缺乏 mannose-2/3-mannose 的結構，無法被 AM 辨認吞噬(kabha., 1995)。此外，引起 DM 病人感染而造成肝膿瘍的 KP 莢膜血清型以 K1 為主，K2 次之(Fung et al., 2002)。

2. 脂多醣體 (lipopolysaccharide, LPS)

LPS 位在細胞壁上，組成包括脂質 A (lipid A)、核心糖脂 (core glycolipid) 與 O 抗原 (O-polysaccharide antigen; Cortés et al., 2002)；其中 O 抗原可以抵抗補體所調節的殺菌機制，因為 O 抗原的側支鏈 (O side chain) 會伸展至莢膜外而曝露到外在環境中，一旦遇上補體便會與之固定，阻止補體接近 KP 的細胞膜，因而避開了補體的攻擊(Albertí et al., 1996)。另一個次單位脂質 A，進入宿主體內會引起發燒、改變白血球功能。一般而言，LPS 進入體內會活化補體及巨噬細胞，然而 KP 的 LPS 因 CPS 的屏蔽而減弱了宿主免疫系統的活化。

除了上述二種致病因子外，KP 也可運用具黏附力的纖毛(pili)黏附於宿主細胞表面而達到致病的第一步；此外，biofilm 此種外層多醣體(exopolysaccharide)的形成亦可幫助 KP 抵禦抗生素與吞噬細胞的攻擊。

(四) KP 肺部感染

當 KP 入侵肺部時，會開始大量繁殖，在這同時，原始肺部的防禦機制便是活化非特異性免疫，例如肺泡巨噬細胞(AM)，快速地將細菌由呼吸道清除掉(Lipscomb et al., 1995)。此外，KP 肺炎最明顯的臨床併發症便是 KP 會由肺泡散佈至血液中，宿主一旦無法將 KP 由血液中清除，生物體內會累積大量內毒素，導致多重器官功能失常與死亡(Thomas et al., 2002)。

伍、肺泡巨噬細胞 (Alveolar macrophage, AM)

(一) AM 簡介

肺泡巨噬細胞(AM)位在空氣和肺組織的界面間，為一種常駐肺臟的單核吞噬細胞，也是下呼吸道對抗微生物入侵的第一道宿主防禦。先天和後天免疫對於肺泡抗微生物而言，AM 才是最主要的(William & Martin, 2000)。若將正常吸煙者進行肺泡灌流(bronchoalveolar lavage)，可發現沖出來的細胞大約 85 % 是 AM，7 % 12 % 是淋巴球，而嗜中性白血球只佔了不到 3 %，因此 AM 對於吸入性顆粒和微生物的清除，吞噬和殺菌是相當重要的(Murray & Nadel, 2000)。除了吞噬和殺菌作用外，AM 也會分泌一些化學物質，在發炎反應中扮演著調節的角色。大致上 AM 主要的功能可包括：1 對抗入侵肺部的微生物和吸入性顆粒 2 清除

肺部的表面張力素³ 抑制不適當的免疫反應⁴ 抗原呈現及活化發炎和免疫系統。

(二) AM 形態及來源

AM 的細胞直徑大小為 15-50 μm ，細胞質核比例約為 3:1，擁有許多質膜所形成的包含體(cytoplasmic inclusions)；其中最大特色便是具高密度的顆粒和粒線體，偶爾，有些 AM 會出現板狀體的結構(lamellar bodies)。大多數的 AM 可以存活數週到數個月，最後經由黏膜纖毛的清除或淋巴管離開肺部，甚至在肺部死亡而被吞噬(Brain et al., 1977)。存在身體各組織器官的巨噬細胞乃由骨髓幹細胞(myeloid stem cell)衍生成類骨髓細胞(myeloid)，再分化成單核球(monocyte)釋放到血液中循環(Furth et al., 1970)。這些單核球會進入到肺或其他器官，隨著不同器官環境的刺激下，單核球分化成巨噬細胞；由於進入肺的單核球處於具表面張力素和富含磷脂、高氧環境之下，而使 AM 的生物特性有別於其他的巨噬細胞(Shellito and Kaltreider, 1984)。此外，在重氫標定胸腺嘧啶的實驗中，可以得知 AM 在肺部雖有複製能力，但卻只佔 0.35 % - 1.25 % 的比例。由此可知，AM 的來源大多是由單核球進入肺部分化而來(Golde et al., 1974)。

(三) 代謝

多數的單核球和巨噬細胞是偏向厭氧的，然而 AM 卻是進行需氧代謝(Simon et al., 1977)。一般巨噬細胞行吞嚥作用和吞嚥後引發的呼吸性作用(respiratory burst)，亦即經由 NADPH 氧化酶和己糖單磷酸代謝途徑(hexose monophosphate shunt)。由於對於氰化物並不敏感，因此其能量消耗主要依賴糖解作用(Cline and Lehrer, 1968)。但是，AM 的能量來源卻是依賴氧氣和氧化代謝。在 AM 平時休息狀態便有很高的 H₂O₂ 產生，而吞嚥後所耗費的氧氣及代謝更是明顯增加(Babior, 1984)。

(四) 抗微生物的機制

1. 活化

一般而言，單核球和巨噬細胞可以很快地被活化，而達到毒殺微生物(microbicidal)和毒殺腫瘤(tumorcidal)複雜的生物代謝活性(Adams and Hamilton, 1984)。引發巨噬細胞活化的因子有宿主本身產生的生理因子例如細胞激素(cytokines)，以及外來環境因子例如微生物，會經由不同的活化途徑造成巨噬細胞不同的活化狀態。巨噬細胞的活化狀態可包括吞嚥作用和產生細胞毒性狀態，免疫和細胞抗原呈現狀態及特定性分化狀態(Hoffman, 2000)。因此，一但吸入性顆粒和微生物進入肺部則會引發 AM 的活化，將其清除消滅。

2. 吞嚥作用

AM 的吞嚥作用對於宿主防禦入侵的微生物而言是很重要的。行吞嚥作用等吞嚥粒子的理想大小則介於 1~3 μm 之間 (Canner, 1980)。在 AM 的表面具有許多接受器，與吞嚥作用有關的接受器有：

(1) 清道夫接受器 (macrophage scavenger receptors, MSR_s): 可以結合及胞攝低密度脂蛋白 (low-density lipoproteins)，有些 MSR_s 則可和胞外基質或細菌的脂台酸 (lipoteichoic acids)、LPS 結合，而引發吞嚥作用。

(2) 免疫球蛋白 Fc 接受器 (immunoglobulin Fc-receptors): 可與經抗體調理過粒子與微生物結合並吞嚥。一旦與其結合後，AM 會釋出許多細胞激素如 TNF 及引發呼吸作用產生超氧離子 (superoxide; Foreback et al., 1997)。

(3) 辨識補體的接受器 (complement receptors): 會和補體、微生物複合物的補體部位結合進而促進吞嚥作用。

(4) 甘露糖接受器 (macrophage mannose receptors, MMR_s): 可調節內攝，吞嚥及細胞毒性。例如有些莢膜具有重複 mannose-2/3-mannose 結構的克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 易被 AM 的 MMR_s 辨識及結合，進而引發 AM 的吞嚥 (kabha, 1995)。

(5) CD14:會和 LPS 結合，調節吞噬並引發訊息傳遞(signal transduction)，形成引起發炎反應的細胞激素(pro-inflammatory cytokines)。

當外在分子結合到 AM 表面，在分子上的 ligands 會和 AM 上的接受器產生交互作用，AM 的細胞膜沿著此分子展開，藉著膜下的肌動蛋白(actin)及微絲(microfilaments)將此分子噬入，形成了吞噬小泡(phagosome)，如由 Fc 接受器所產生的吞噬小泡。吞噬作用可被分類成二種：需經調理及不需調理的吞噬(opsonic and nonopsonic phagocytosis)。在人類及小鼠的 AM 中，其 C3b/iC3b 接受器相當少量，甚至小鼠的 AM 不具 IgG，Fc 的接受器(Berger et al.,1994; Stokes et al., 1998)；此外，在下呼吸道出現抗體及補體的量也很少，因此 AM 消滅肺部的致病原最有可能的方式便是利用非調理性吞噬(Doroth et al., 2000)。

3. AM 的殺菌機制

有二種方式可以達到殺菌的效果，一為溶小體(lysosome)內酵素活化，另一為超氧離子(superoxide)的產生，而最佳的殺菌能力便是兩者的協調(Mandell, 2000)。當免疫複合物，細菌內毒素或其它發炎因子與細胞表面接受器結合便會觸發 respiratory

burst (Pizzorno, 1999), 由訊息傳遞(signal transduction)引發質膜上 NADPH 氧化? 進行氧化還原產生超氧離子, 並釋放到吞噬小泡內或細胞外將致病原殺死(圖二)。另外, 在吞噬小泡形成後, 會很快地與溶小體(lysosome)融合, 形成次級溶小體(secondary lysosome or phagolysosome)。若 PH= 5 時, 會使其內 43 種酵素活化而能殺菌及消化物質(Nyberg et al., 1994)。不僅如此, 在溶小體(lysosome)內的 myeloperoxidase 也可將 H_2O_2 和氯離子轉換成 hypochlorite, 更加強了殺菌能力。

4.分泌化學物質和抗原呈現

巨噬細胞一旦活化便會分泌引起發炎反應的細胞激素(pro-inflammatory cytokines), 例如 TNF- α 、IL-1、IL-6、MIP-1/2、INF- γ 等, 可誘導顆粒性白血球和單核球進入肺泡內以及活化其它免疫系統; 此外, 也可由吞噬作用將抗原處理過, 呈現給 T 細胞辨識, 啟動進一步的免疫防禦。

陸、細菌的致病與巨噬細胞凋亡(apoptosis)

經由體外實驗(*in vitro*), 很多細菌的致病因子已被認為是導致細胞凋亡的調節物質(mediator); 細菌經由內毒素, 或其它致病因子與宿主細胞死亡相關的基因交互作用而造成宿主細胞的凋亡(Chen et al., 1994)。一般而言, 宿主免疫細胞的凋亡, 尤其

是單核吞噬細胞，如 PMN 或 AM 等凋亡，對細菌來說是有利的。某些細菌會藉由誘發細胞凋亡的方式殺死巨噬細胞，克服巨噬細胞的吞噬與殺菌機制，而達到細菌散播的目的(Hilbi et al., 1997)。除了藉由誘發凋亡作為破壞宿主及其防禦機制之外，有些細菌，也會藉凋亡而觸發發炎反應，破壞宿主的組織，例如：志賀氏桿菌(*Shigella*)，其 IL-1 β 轉換酶(interleukin 1 β converting enzyme)的活化，不僅造成宿主細胞凋亡，同時會切割 IL-1，使其活化並由宿主細胞釋出，大量破壞宿主細胞造成赤痢(Sansonetti et al., 1995)。另外，有一些胞內細菌(intracellular bacteria)，由於與巨噬細胞共存，因此會抑制細胞的凋亡(Colotta et al., 1992)，此時，巨噬細胞的凋亡對宿主而言卻是防禦的機轉。在分枝桿菌(*Mycobacteria*)感染的實驗發現，巨噬細胞凋亡的數目愈多其存活的分枝桿菌數目便愈少(Molloy et al., 1994)。有趣的是，另一種分枝桿菌的感染則會活化巨噬細胞的 Fas 接受器而誘發凋亡，在這同時也使細胞的殺菌機制無法啟動，讓細胞的凋亡不具防禦功能(Elkon and Kaplan, 1996)。因此，細菌誘發巨噬細胞的凋亡具有不同的意義，但就胞外菌(extracellular bacteria)而言，引發巨噬細胞的凋亡是一種有效的武器(Zychlinsky et al., 1997)。

柒、研究目的

先前的研究發現，cluster A 的 KP 是造成台灣 KP 肝膿瘍的主要族群(Lau et al., 2000)；而我們實驗室由不同疾病的檢體，收集近五百株 KP 進行 PFGE (pulse d-field gel electrophrosis)分群，分析出相似的 cluster A KP，以及其他的 cluster B、C...等，也有不屬於 cluster 內的 KP。在台灣，KP 造成的社區性肺炎的死亡率高達 54 % (Ko et al., 2002)，然而造成 KP 呼吸道感染的致病機制及 DM 病人對 KP 的高感受性和 KP 的致病因子，仍尚未清楚

近年來，許多學者針對 KP 的黏性特質進行研究，發現經過突變而成為 hypo-mucoid KP 便不具致病力 (Fang et al., 2004)。由於目前皆以突變的 KP 菌株研究 KP 的黏性，為避免因突變而影響 KP 某些未知的生物特性或功能，本實驗選擇以野生型(wild type)臨床分離菌株，亦即由 cluster A、B、C 中挑選出基因相似程度最高、黏性特質差異最大的成對 KP (paired KP)進行黏性的致病研究。為探討不同 cluster KP 的黏性特質在糖尿病與正常血糖動物的致病力，將來自不同 cluster 的成對 KP 分別感染正常與糖尿病小鼠的肺部，觀察 20 或 40 小時後動物肺部 KP 的清除情形，同時進一步探討 KP 是否有散佈至血液中；更進一步，也將成對的 KP 分別感染老鼠的巨噬細胞株，探討 KP 與巨噬細胞之間的

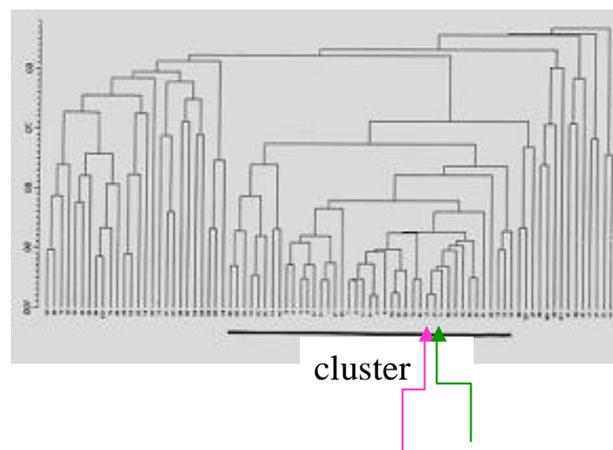
交互作用(interaction)；藉由來自不同 cluster 的成對 KP 進行體內 (*in vivo*) 試驗與體外試驗 (*in vitro*)，比較黏性特質及糖尿病的致病作用，試圖找出 KP 的致病機制。

第二章 研究設計與方法

壹、研究設計

此研究在 cluster A、B、C 與不在 cluster 之內的 KP 中，挑選出經 PFGE 方式分析，其間 PFGE pattern 的相似度約 98 %，以黏度測試 (string test) 區分黏性，一為低黏性(hypo-mucoid)，另一為高黏性(hyper-mucoid)的成對 KP (paired KP)，進行體內試驗 (*in vivo*) 與體外試驗 (*in vitro*)。

1. Cluster 的定義：以 PFGE 方式將 KP 基因進行分析，當其 PFGE pattern 相似度高達 80 % 以上便成為一個 cluster。
2. 成對 KP 定義：在同一個 cluster 中所挑選出 PFGE pattern 有 98 % 相似度的 hyper-mucoid 和 hypo-mucoid KP 便稱為成對 KP。



Paired KP: hypo-mucoid hyper-mucoid

第一節 體內試驗 (*in vivo*)

將低黏性(hypo-mucoid)與高黏性(hyper-mucoid)基因相似度

高達 98 % 成對的 KP，分別以菌量 1×10^4 cfu 感染正常與糖尿病小鼠，於 20 或 40 小時將其犧牲。將小鼠右肺進行支氣管灌流術 (bronchoalveolar lavage)，將肺泡巨噬細胞 (AM) 沖出，探討 KP 入侵肺部後引起 AM 的凋亡 (apoptosis) 與吞噬 (phagocytosis) 情形；為了解 KP 在肺部清除的情形，將小鼠左肺均質，培養細菌；同時收集小鼠心臟血液，進行細菌培養，可知 KP 是否自肺部散佈至血液中。以此比較黏性特質與糖尿病的致病作用。

第二節 體外試驗 (*in vitro*)

雖然 KP 被視為胞外菌，但有研究指出 KP 可以入侵肺部上皮細胞內並引發其凋亡 (Oelschlaeger et al., 1997 ; Cortés et al., 2002)。因此將低黏性 (hypo-mucoid) 與高黏性 (hyper-mucoid) 基因相似度高達 98 % 成對的 KP，分別以 MOI (multiplicity of infection ; 1 或 10) 感染老鼠巨噬細胞株 (RAW 264.7 cell lines)，比較 KP 對巨噬細胞的存活力 (viability) 與凋亡 (apoptosis) 之影響，同時也比較 KP 對巨噬細胞的附著 (adhesion) 與 KP 在巨噬細胞內的存活量 (macrophage-associated KP)。探討黏性特質是否具細胞毒性，以及黏性特質是否會影響 KP 對巨噬細胞的附著與 KP 在巨噬細胞內的存活量。

另外，有實驗提出，莢膜多糖體 (CPS) 厚度會阻礙 KP 對上

皮細胞的附著與入侵(Sahly et al., 2000), 但有些學者持不同看法, 認為莢膜多糖體(CPS)是最早與宿主細胞互動的細菌成分, 也和 KP 群體間之聚集有關(Sabine et al., 1999); 因此, 為探討莢膜多糖體(CPS)黏性特質對細菌與巨噬細胞的黏附、在巨噬細胞內的存活是否重要, 利用轉移子突變(miniTn10 transposon mutagenesis)的方式將 hyper-mucoid KP (KP1112)黏性特質去除, 將野生型(wild type)與突變型(mutant type) KP 分別感染老鼠巨噬細胞株, 比較兩者對巨噬細胞的附著與在巨噬細胞內的存活量。

貳、研究方法

第一節 體內試驗(*in vivo*)

一、糖尿病動物模型的建立

* 材料：

檸檬酸鹽 (citric acid; $C_6H_5Na_3O_7$; USB)、微量天平、二次水 (ddH₂O)、1N & 12N 氫氧化鈉 (NaOH)、1N & 12N 鹽酸 (HCl)、50 ml 離心管(5 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)、pH4、pH6.8 校正液, 試管震盪器(vortex mixer)、PE 飼養盒、木屑墊料、鼠用飼料、餵水用水瓶、一次水、磅秤、streptozotocin (N-(Methylnitrosocarbamoyl)-o-glucosamine; Sigma)、0.05 M ,

pH4.5 , 4 的檸檬酸緩衝溶液(citrate buffer)、吸管唧筒(pipette pump)、微量吸管套(blue tip)、1 ml 注射用針(1ml syringe)、5 ml 試管、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 151; YSI)、膠帶、報紙、透明小塑膠袋、麻醉用玻璃鐘罩、麻醉用小罩杯、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。

* 步驟：

1-1. 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?：5 週
- 4.動物分組：將 5 週大的 mice 分為對照組與糖尿病組
- 5.飼養環境：恆溫 22 、空調房間，相對溼度 55%、12 小時照明

1-2. 0.05M, pH 4.5 檸檬酸鹽緩衝溶液(citrate buffer)的配製

加入 10ml dd H₂O , 加入 2.5 mmole citric acid、vortex 均勻 , 加入 ddH₂O 至 30 ml , vortex 均勻 , 先後以 pH4、 pH6.8 校正酸鹼測定儀 , 以 ddH₂O 清洗探針 , 以鏡紙擦乾探針 , 測量 sodium citrate

buffer 的 PH 值，以 NaOH、HCl 滴定之，直到 pH4.5，酸鹼互換間，須以 ddH₂O 清洗探針，以拭鏡紙擦乾探針，最後加入 ddH₂O 至 50 ml，其 pH 應為 4.5。

1-3. 糖尿病的誘發

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 1 week，任其自由進食飲水，將 6 週大的小鼠秤重，糖尿病組依小鼠的體重酌取 0.055 mg/ml/g 的 streptozotocin (STZ) 的量，注射先將 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（但是泡藥後要盡快完成注射以防 streptozotocin 失去活性），小鼠接受連續 4 天腹腔的 streptozotocin 注射；而對照組小鼠則依照體重取與糖尿病組相等量之 citrate buffer 腹腔注射 4 天。在連續四天腹腔注射完成後的第七天測量小鼠血糖值，血糖值必須 > 300 mg/dl 才視為有意義之糖尿病誘發，若血糖值未超過 300 mg/dl，則再連續給予小鼠兩天的 0.055 mg/g 的 streptozotocin 注射，同樣的，在兩天注射 streptozotocin 完成後的第七天測量小鼠血糖值，血糖值必須 > 300 mg/dl，糖尿病誘發後養育 6 個月至小鼠週齡為 30 週左右，於小鼠週齡為 28 週時再進行一次血糖測量，每週秤一次體重並記錄。

1-4. 血糖的測量

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 180 mg/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，用剪刀剪斷一小段尾巴，擠出 5-6 滴血(> 25 μ l)於透明平滑塑膠帶上，以鈍針加樣器吸收取 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。

二、小鼠肺部感染 *Klebsiella pneumoniae* (KP)

* 材料：

Klebsiella pneumoniae (KP)、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; eppendorf)、微量離心管放置架(eppendorff rack)、15ml 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溶(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、無菌通風櫥、37 培養箱(incubator) , 10 倍連續稀釋的 KP 菌液、廢物桶、廢液桶、試管架、30 週 C57BL/6J 雄性小鼠、乙醚(ethyl ether)、麻醉用玻璃鐘罩、無菌乾棉球、膠帶、縫線、縫針、持針器、解剖盤、麻醉小罩杯、優碘、彎盆、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)、27 號針頭的 1ml 無菌注射針、 10^4 cfu/30 μ l 濃度之 KP、冰塊 , 冰桶。

* 步驟 :

2-1. *Klebsiella pneumoniae* (KP)

1.KP 來源：中國醫藥大學附設醫院之臨床病人分離之 KP 菌株 (中國醫藥大學附設醫院湯惠玲小姐提供)

2.KP 種類：

(1) Cluster A: KP1084 與 KP1112

(2) Cluster B: KP1008 與 KP2002

(3) Cluster C: KP1283 與 KP1284

(4) 不在 cluster 之內的 KP: KP1004 因 plasmid 的有無，而有兩種不同的表現型，一為高黏性另一是低黏性，KP1004n 與

KP1004m

表列如下：

cluster	Paired KP	String test	DM history
KP1004 (不在cluster 之內)	KP1004n	-	+
	KP1004m	+	+
A	KP1084	-	+
	KP1112	+	-
B	KP1008	-	-
	KP2002	+	+
C	KP1283	-	+
	KP1284	+	+

2-2. 定量 *Klebsiella pneumoniae* 菌液濃度

以下步驟必須在無菌通風櫥中操作，用 loop 取 1 個 colony 的 KP，將 KP 種入 3ml TSB broth，混合，放入 37 培養箱，培養 18 小時後，作 KP 菌液的 1:10 連續積釋，準備 10 支標記號碼的微量離心管，各加入 900 μ l 無菌 PBS，取 100 μ l 含 KP 的 broth 置入 900 μ l 無菌 PBS，混合，重覆上述步驟，共 10 次 1:10 連續稀釋，準備 10 盤標記號碼的 LB agar plate，每管稀釋菌液，混合均勻，各取 20 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，在火

焰上反覆燒烤三次，並冷卻之，再塗抹下一盤，將塗抹好稀釋菌液的 LB agar plate，放入 37 °C 培養箱，培養 18 小時後，計數並記錄 plates 上的 colony 數目，經計算並回推每管稀釋菌液的菌量，之後取 10^{-3} 此管稀釋菌液，以 PBS 做進一步稀釋而達到 10^4 cfu/30 μ l。

2-3. *Klebsiella pneumoniae* (KP) 肺部之感染

器皿以 70 %酒精消毒，以無菌 normal saline 沖洗殘餘酒精，器械泡於無菌 normal saline，微量針以 KP 菌液沖洗一次，KP 菌液 vortex 均勻，以微量針抽好 30 μ l KP 菌液，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，用鑷子將氣管游離出並撐住，以 27 號針頭注射入 30 μ l KP，共 10^4 cfu，讓小鼠直立 2 min，將小鼠頸部的皮縫合，再以優碘消毒小鼠頸部皮膚並放回飼養盒，使其自由進食進水，飼養 20 小時或 40 小時。

三、感染後小鼠左肺、右肺肺泡巨噬細胞 (bronchoalveolar lavage) 及血液的取得

* 材料：

感染 KP 20h 或 40 h 之後 C57BL/6J 雄性小鼠、乙醚(enthyl ether)、麻醉用玻璃鐘罩、無菌乾棉球、膠帶、縫線、止血鉗、解剖盤、麻醉小罩杯、優碘、彎盆、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 EDTA 的抗凝管、離心管(15ml centrifuge tube)、微量離心管(1.5ml micro-centrifuge tube)、離心管(15ml & 50 ml centrifuge tube)、PE 管(polyethylene tube ; PE-50) , 21 號針頭(21gauge needle)、針筒(1ml syringe)、26 號針頭的 1ml 無菌注射針 , 冰塊、冰桶。

* 步驟：

將事先滅菌的器皿以無菌 normal saline 倒入適量 , 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桶中操作 , 將小鼠胸腔打開 , 將胸骨完全剪開 , 以止血鉗將肋骨往左右扳開固定 , , 以 1 ml 空針插入心臟 , 採集 0.2 ml 全血 , 將全血置入己含 EDTA 的抗凝管中並混合之 , 全血靜置於冰上 , 剪開頸部皮膚 , 並用 2 隻尖鑷子撥開 , 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，把左肺拉出並用止血鉗將左支氣管夾緊，左支氣管用縫線綁兩個死結，剪下左肺，以無菌 normal saline 沖過並放入含有 3 ml PBS 的高速離心管中，將左肺靜置於冰上，接續進行支氣管灌流術(bronchoalveolar lavage ; BAL)，用尖剪刀在鑷子下方（較靠近頭的方）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 ml PBS 的針筒，慢慢打入 PBS，看到右肺脹起來，再慢吸回 PBS，重複灌洗 0.6 ml PBS，最後總共灌出 15 ml 灌洗液(BALF)，肺泡灌洗液靜置於冰上。

四、小鼠肺部及血液中 *Klebsiella pneumoniae* 菌量測定

* 材料：

均質機、滅菌的均質棒、70 %酒精(alcohol)、裝冰塊的小燒杯、廢液桶、15 ml 離心管、左肺、全血、無菌的一倍磷酸鹽緩衝液(1X PBS)、電子天平秤、酒精燈、70 %噴霧酒精、擦手紙、裝 70%酒精的小燒杯、微量離心管(1.5ml micro-centrifuge tube)、微量離心管放置架(ependorff rack)、試管震盪器(vortex mixer)、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)、廢物桶、無

菌通風櫥、37 培養箱(incubator)、小鼠左肺均質液與 0.2 ml 全血。

* 步驟：

4-1. 小鼠左肺及血液的處理

將左肺以電子天平秤重，之後以均質機在 10000 rpm、10 秒、4 下共均質三次，均質液置於冰上，清洗質棒，15 ml 離心管內裝 70%酒精與無菌 1X PBS，順序為：70%酒精二次，等酒精乾燥後以無菌 1X PBS 清洗三次。清洗完均製棒後才能均質下一管左肺；0.2 ml 全血置於冰上。

4-2. 左肺及血液的細菌培養

取老鼠之肺均質液與全血 100 μ l 用無菌 PBS 作 1:10 的連續稀釋，各稀釋到 10^{-1} 、 10^{-2} 倍，取均質液及全血與其 10^{-1} 、 10^{-2} 倍稀釋液各 100 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。

五、肺泡巨噬細胞吞噬 *Klebsiella pneumoniae* 菌量之計數

* 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(hemocytometer; Hausser Scientific, USA)、計數器、顯微鏡(microscopy)、離心機、小鼠肺泡灌洗液、玻片(micro slides glass; Daco)、玻片架、滴管(dropper)、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)、Giemsa 染液(Mediatech)、ddH₂O、methanol、Gram stain Kit (Mediatech)、光學顯微鏡(Olympus)。

* 步驟：

5-1. 細胞計數 (cell count)

15 ml 支氣管灌流液，離心 1200 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 ml 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】(四格計算細胞總數/4) \times 3 ml $\times 10^4$ = 支氣管灌流液中
細胞數目

5-2. 細胞型態

A.) Cytospin

固定架上架玻片，貼濾紙，洞對固定的洞，放漏斗，夾住，滴 $40\ \mu\text{l}$ (約有 4×10^3 cells) 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

取出 cytopspin 好的玻片，風乾，用滴管灑 1ml 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，Giemsa 使用前搖勻，取 3 ml Giemsa 染液，加 ddH₂O 到 90 ml，使 Giemsa 染液與 ddH₂O 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 400x 下看片，觀察細胞型態。

5-3. 胞內細菌量計數

取出 cytopspin 好的玻片，風乾，以火焰將玻片背面快速烘烤一遍，以 Gram stain Kit (Mediatech)第一劑染一分鐘，之後以自來水將玻片背沖 30 秒，再染第二劑一分鐘便以自來水將玻片背沖 30 秒，接續第三劑脫色 15 秒，便以自來水將玻片背沖 30 秒後染

第四劑一分鐘，而後玻片背沖 30 秒，風乾，以光學顯微鏡在 1000 x 油鏡下看片，計數胞內的 KP 細菌數。

六、肺泡巨噬細胞凋亡之偵測

* 材料：

小鼠肺泡灌洗液、細胞凋亡偵測試劑組(cell death detection Kit ; Roche)、電動 pipette、10ml 電動 pipette 吸管、微量離心管、1000 μ l、200 μ l、20 μ l 吸管唧筒(pipette pump)、吸管尖(blue & yellow tip)、15 ml & 50 ml 離心管(15ml & 50 ml centrifuge tube)、1X PBS、5ml 試管(Falcon ; BD)、試管放置盒、離心機、流氏細胞儀(Flow cytometer , FACScan; BD)、鋁箔紙、避光用冰桶、試管震盪器(vortex mixer)。

* 步驟：

將小鼠肺泡灌洗液在 4 $^{\circ}$ C、1100 rpm、5 分鐘離心後，倒去上清液，並加入 10 ml PBS 以相同條件離心，將細胞清洗兩次，之後加入 3 ml PBS，並以電動 pipette 混合，每組各取 20 μ l 至細胞計數器進行細胞計數，並將各組之細胞以相同條件離心後，個別加入 100 μ l HEPES buffer，每組分別取 1×10^5 個細胞數至 5 ml 試管 (Falcon ; BD) 中分成四管，其餘每組細胞則混合分裝至 5ml 試管共三管以調條件用，依照需要將此七管加入螢光試劑各

是 1 μ l 分別如下：1st 皆不加，2nd 則加入 Annexin-V 螢光試劑，3rd 加入 PI 螢光試劑，4th、5th、6th、7th 則加入 Annexin-V 螢光試劑及 PI 螢光試劑，靜置室溫反應 20 分鐘後，每管各加入 400 μ l PBS 混合之，於一小時內需以流氏細胞儀收集資料分析。

第二節 體外試驗(*in vitro*)

一、RAW 264.7 細胞株感染 *Klebsiella pneumoniae*

* 材料：

RAW264.7 cell line (老鼠巨噬細胞株; ATCC)、RPMI-1640 medium (GIBCO)、fetal bovine serum (FBS; GIBCO)、L-glutamine (GIBCO)、peniciline-streptomycin (GIBCO)、fungizone amphotericin B (250 μ g/ml)、sodium bicarbonate (sigma)、trypsin-EDTA (GIBCO)、1X PBS、細胞培養皿 (T75)、0.2 μ m filter、3 ml 玻璃吸管、電動 pipette、10 ml 電動 pipette 吸管、70 % 酒精、倒立顯微鏡 (Nikon Ellipae TE300)、細胞培養箱 (37 $^{\circ}$ C ; 5 % CO₂)、6-well 細胞培養盤、細胞計數器、37 $^{\circ}$ C 水浴槽 (water box)、hypo-/hyper- mucoid *Klebsiella pneumoniae* 已定量菌液、蓋玻片 (2 \times 2 mm²)、1000 μ l、200 μ l、20 μ l 吸管唧筒 (pipette pump)、吸管尖 (blue & yellow tip)、酒精燈、試管震盪器 (vortex mixer)。

* 步驟：

1-1. 細胞培養

將第十一代 RAW264.7 cells 自 -80 冰箱取出一管(約 1×10^7 cells), 於 37 水浴槽回溫, 而後加入含有 10 ml 培養液中(內含 RPMI-1640 medium、10% FBS、1% L-glutamine、1% penicilline-streptomycin、0.2 % fungizone amphotericin B), 放入細胞培養箱中, 每天觀察細胞生長情形, 若細胞長滿則須分盤, 即將培養皿中的培養液以連接抽吸幫浦(suction pump)玻璃吸管將培養液吸淨, 並以 1X PBS 清洗細胞二次後加入 1 ml trypsin-EDTA 靜置細胞培養箱一分鐘, 之後加入 3 ml 培養液並以電動 pipette 上下抽吸以將貼於壁上之細胞沖下, 並混合均勻取 0.5 ml 細胞液加入含有 10 ml 培養液, 放置於細胞培養箱中。

1-2 *Klebsiella pneumoniae* 之感染

準備 6-well 細胞培養皿, 標記組別 (blank、hypomuroid、hypermuroid) 與 MOI (multiplicity of infection; 1 或 10) 並在每一 well 加入 2 ml 細胞培養液或有些則再放入蓋玻片, 經細胞分盤與計數後, 每一 well 分別放入第十五代 1×10^6 RAW264.7 cells, 而後靜置於細胞培養箱一小時使細胞貼壁, 一小時將其取出並吸淨原先之培養液, 以 1X PBS 清洗細胞二次後, 每一 well 加入 2ml 純 RPMI-1640 medium, 再加入先前已定量好的 KP 菌量

(MOI=1 則加入 1×10^6 KP/ 1×10^6 RAW cells , MOI=10 則加入 1×10^7 KP/ 1×10^6 RAW cells), 輕輕搖勻, 而後再放入細胞培養箱四十五分鐘。

二、 *Klebsiella pneumoniae* 所造成之細胞毒性(cytotoxicity)與所誘發之細胞凋亡(inducing- apoptosis)

* 材料 :

已感染四十五分鐘之 RAW264.7 cells 、 RPMI-1640 medium (GIBCO) fetal bovine serum (FBS; GIBCO) gentamicine(sigma) 3 ml 玻璃吸管、 10 ml 電動 pipette 吸管、 電動 pipette、 70 %酒精、 倒立顯微鏡 (Nikon Ellipae TE300) 細胞培養箱 (37 °C ; 5 % CO₂) 1X PBS、 蓋玻片 (2 × 2 mm²) 4 % paraformaldehyde、 0.4 % trypan blue (sigma) DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole; Sigma) 37 °C 水浴槽 (water box) 1000p、 200p、 20p 吸管唧筒 (pipette pump) 吸管尖(blue & yellow tip) 15 ml 離心管(15 ml centrifuge tube)、 膠帶、 螢光顯微鏡 (Olympus)、 酒精燈。

* 步驟 :

2-1. Trypan blue 細胞存活力測試

將已感染四十五分鐘之 RAW264.7 cells 其培養液吸淨, 再以 1X PBS 清洗細胞三次, 而後加入含有 gentamicine (100 µg/ml)

的 RPMI-1640 medium (含有 10 % FBS) 2 ml 放置一小時,隨後將其培養液吸淨,再以 1X PBS 清洗細胞三次便加入 1 ml 0.4 % trypan blue 靜置三分鐘,之後將 trypan blue 移除,加入 1 ml 1X PBS,置於倒立顯微鏡之下評估被 trypan blue 染上的細胞百分比。

2-2. DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) 核染色

A.) 1 μ g/ml DAPI 配製

將 0.5 ml ddH₂O 加至含有 5 mg 粉狀 DAPI 的 1ml 避光瓶中並搖勻,儲存於-20 冰箱中,使用時則取 1 μ l 至 10 ml PBS 中稀釋並避光混合之後即可染色。

B.) DAPI 染色

將已感染四十五分鐘之 RAW264.7 cells (其 6-well 細胞培養皿上放置蓋玻片可使細胞貼壁) 其培養液吸淨,再以 1X PBS 清洗細胞三次,而後加入含有 gentamicine (100 μ g/ml) 的 RPMI-1640 medium (含有 10% FBS) 2 ml 放置十二小時,之後將其培養液吸淨,再以 1X PBS 清洗細胞三次,便加入 1 ml 4% paraformaldehyde 三十分鐘以固定細胞,而後吸除之,再以 1X PBS 清洗細胞三次,於每一 well 中再加入 1 ml DAPI (1 μ g/ml) 於室溫下反應三十分鐘,再以 1X PBS 清洗細胞三次,之後將蓋玻片

移開轉置於玻片上，以膠帶將蓋玻片四周固定，於螢光顯微鏡 400x 下觀察 (340/380 excitation)。

三、 *Klebsiella pneumoniae* 對 RAW cells 的附著 (adhesion) 及 KP 在巨噬細胞內的存活量 (macrophage-associated KP) 評估

* 材料：

已感染四十五分鐘之 RAW264.7 cells、RPMI-1640 medium (GIBCO) fetal bovine serum (FBS; GIBCO) gentamicine (sigma) Triton- X 100 (Merck) 細胞刮杓、3ml 玻璃吸管、電動 pipette、10 ml 電動 pipette 吸管、70% 酒精、倒立顯微鏡 (Nikon Ellipae TE300) 細胞培養箱 (37 °C ; 5 % CO₂) 1X PBS、37 °C 水浴槽 (water box) 1000 μ l、200 μ l、20 μ l 吸管唧筒 (pipette pump) 吸管尖 (blue & yellow tip) 15 ml 離心管 (15 ml centrifuge tube) LB agar 三角玻璃棒、酒精燈、LB agar 微量離心管 (1.5 ml micro centrifuge tube) 微量離心管放置架 (eppendorff rack) 試管震盪器 (vortex mixer)。

* 步驟：

將已感染四十五分鐘之 RAW264.7 cells 之培養液吸淨，再以 1X PBS 清洗細胞三次，而後不加 (評估 adhesion) 或加入 (KP 在巨噬細胞內的存活量評估) 含有 gentamicine (100 μ g/ml) 的

RPMI-1640 medium(含有 10 % FBS) 2 ml 放置一小時，之後將其培養液吸淨，再以 1X PBS 清洗細胞三次，分別加入 1 ml 0.5 % Triton-X 100 靜置 10 分鐘，而後以細胞刮杓將細胞刮下，以 pipette 重覆抽吸三次混合，並取 100 μ l 之細胞細菌混合液至 900 μ l PBS 稀釋之，再取 20 μ l 稀釋液至 LB agar 上塗盤，將塗抹好的 LB agar 靜置於 37 培養箱中，培養 18 小時後，計算 LB agar 上的菌落數。

四、Mini-Tn10 transposon mutagenesis

* 材料：

M9 salt (Becton Dickinson)、 agar (Becton Dickinson)、 Glucose、 MgSO₄、 CaCl₂、 kanamycine(sigma)、 *E. coli*(S17-1?pir, mini-Tn10 ; 中山醫學大學微免科賴怡琪教授提供)、 細菌培養箱、 1000 μ l、 200 μ l、 20 μ l 吸管唧筒 (pipette pump)、 8 爪 pipette、 吸管尖 (blue & yellow tip)、 微量離心管 (1.5 ml micro centrifuge tube ; eppendorf)、 微量離心管放置架 (eppendorff rack)、 無菌 normal saline、 2 \times 2 cm² NC membrane、 酒精燈、 試管震盪器(vortex mixer)、 塗盤用無菌滾珠、 70%酒精、 鑷子、 無菌牙籤、 96-well plate、 3M 鋁箔膠帶、 剪刀、 擦手紙、 保鮮膜、 垃圾盤、 牙籤丟

棄桶。

* 步驟：

4-1. M9 medium (agar and plate) 配製

取 7.5 g agar 加入 400 ml ddH₂O 混合均勻，再取 5.64 g M9 salt 加入 100 ml ddH₂O，將上二者滅菌，當其溫度於 45-50 時將二者加在一起，並依序加入無菌 10 ml 20% glucose、無菌 1 ml 1M MgSO₄、無菌 50 ml 1M CaCl₂、500 μl kanamycin (50 g/ml)，當加入 CaCl₂ 會有白色物質產生，可搖晃之再加下者，之後將配製好之培養基適量倒入無菌培養皿中待其冷卻凝固；若為 broth 則無須加入 agar，以相同條件配製。

4-2. Conjugation 試驗

取 2 ml LB broth，加入 2 μl kanamycin (50 g/ml)使之為 50 μg/ml 的濃度，之後挑 KP1112 與 *E. coli* (miniTn10；已構築含 kanamycin 抗藥基因)單一 colony 種入 broth 中，斜放在 37、160 rpm 細菌培養箱，培養 18 小時。隔日，將已長菌的 broth 由培養箱取出，並將 broth 分別取 1.5 ml 至 eppendorf，KP1112 則以 13000 rpm 離心 3~5 分鐘，*E. coli* 則以 6000 rpm 離心 3 分鐘，之後移除上清液並個別加入 1 ml 無菌 normal saline (contain 10 mM MgSO₄)，以 pipette 將其重覆抽吸以混合均勻，洗去

kanamycin，再進行第二次相同條件的離心，之後吸去上清液，加入 1 ml 無菌 normal saline 以 pipette 重覆抽吸混合之，而後 KP1112 不離心，*E. coli* 則需以相同條件再離心第三次，之後加入 1 ml normal saline (contain 10 mM MgSO₄) 並將之混合均勻。KP1112 與 *E. coli* 各取 500 μl 到 eppendorf 並混合均勻，以 13000 rpm 離心 3 分鐘，移除上清液並加入 100 μl 無菌 normal saline (contain 10 mM MgSO₄)；另一方面則以過火滅菌過的鑷子取 2 × 2 cm² NC membrane 放到 M9 plate 上，將混合均勻的 KP1112 與 *E. coli* 菌液取 100 μl 到 NC membrane 中心點，須小心避免溢出，之後將其放置於 37 °C 細菌培養箱，培養 4 小時。4 小時後，以過火鑷子夾 NC membrane 兩對角將其置入 2 ml 的 M9 broth (contain 50 μg/ml kanamycin) 培養基中，並且以試管震盪器 (vortex mixer) 將其上的細菌震盪至培養基中 (可見到培養基由清澈略變渾濁)，之後放入 37 °C、160 rpm 細菌培養箱中放置一小時，再取 200 μl 至 M9 plate 中，放入滾珠將 plate 塗乾，放於 37 °C、160 rpm 細菌培養箱，培養 18 小時。

4-3. 細菌挑選與保存

隔日將長出的細菌 (已 mutagenesis 成功)，依照需要 (分成 hypo-/hyper-mucoid) 以牙籤挑出，並放置於每一 well 已有 100

μ l M9 broth (contain 50 μ g/ml kanamycin) 之 96-well plate 中 , 將牙籤在 broth 輕輕攪拌 , 在細菌挑選完畢後 , 以 3M 膠帶將 96-well plate 密封 , 蓋上外蓋 , 將 96-well plate 放入放入 37 、 120 rpm 細菌培養箱 , 以膠帶固定之 , 培養 18 小時。

18 小時後 , 打開 96-well plate 撕開膠帶 , 可見每一 well 中有白色的細菌沉澱 , 於每一 well 中加入 50 μ l 80 % glucose , 以 3M 膠帶將 96-well plate 密封 , 蓋上外蓋 , 其外並以保鮮膜包住以防水氣 , 放進-80 冰箱保存 , 而感興趣的細菌則取 20 μ l 菌液至 2 ml LB broth (contain 50 μ g/ml kanamycin) 增菌 , 進行對 RAW cells 的附著 (adhesion) 及 KP 在巨噬細胞內的存活量評估之實驗。

參、統計方法

本實驗正常與糖尿病小鼠其體重、血糖值及感染 KP 後 , 其 cfu+1 取 log 之後的值、凋亡的百分比、吞噬細菌數之比較以成對 t 測試 (paired-t test; SPSS 10.0) 檢定 ; 正常與糖尿病小鼠其不同週數的血糖值的比較 , 及正常或糖尿病小鼠感染不同 KP 後 , 其 cfu+1 取 log 後的值、凋亡的百分比之比較 , 以獨立 t 測試 (independent-t test; SPSS 10.0) 檢定。另外 , 成對 KP 感染巨噬細胞株之細胞存活力、凋亡之百分比及 KP 附著、KP 在巨噬

細胞內的存活量之 $\text{cfu}+1$ 取 \log 後的值，皆使用獨立 t 測試 (independent-t test; SPSS 10.0) 檢定。實驗資料的統計數據以平均值 \pm 標準誤差 (mean \pm standard error of the mean, mean \pm SE) 表示。當 P 值小於 0.05 時 ($P < 0.05$)，代表具有統計學上顯著的差異。

第三章 結果

第一節 體內試驗(*in vivo*)

1-1. DM 小鼠實驗模式之建立

為探討 KP 在肺部感染時，糖尿病(DM)是否為致病因子，故須建立 DM 小鼠模式。將 6 週齡 C57BL/6J 公鼠分為兩組，控制組 (Con) 則予檸檬酸鹽緩衝液注射；糖尿病組 (DM) 予連續四天低劑量 STZ 腹腔注射，以破壞蘭氏小島之 β -cell 而誘發糖尿病，當第 8 週隨機血糖大於 300mg/dl 時便定義其為糖尿病鼠。

1. 小鼠血糖

結果圖三顯示第八週時，控制組隨機血糖為 117.5 ± 2.1 mg/dl，DM 組則為 320.3 ± 5.8 mg/dl，符合 DM 定義且 DM 組血糖明顯較控制組高 ($P < 0.05$ ； $n = 46$)。為使 DM 小鼠長期處在高血糖的生理情況下，將二組一起飼養至 30 週齡才進行實驗；於二十八週時測其血糖，控制組隨機血糖為 118.9 ± 1.9 mg/dl，DM 組則為 411.3 ± 8.5 mg/dl，DM 組血糖明顯較控制組高並持續至 28 週($P < 0.05$ ； $n = 46$)。此外，DM 小鼠其 28 週的血糖較第 8 週時有顯著性的上升 ($P < 0.05$)。

2. 小鼠體重

圖四結果顯示於第十週時，DM 小鼠體重為 20.2 ± 0.2 克，正

常小鼠體重 21.4 ± 0.2 克，其體重明顯較正常小鼠輕 ($P < 0.05$; $n= 46$)，此現象一直持續至小鼠週齡 30 週，於實驗進行前 DM 小鼠體重為 23.0 ± 0.2 克，正常小鼠體重 28.0 ± 0.2 克，兩者有統計學上之顯著差異。

除了血糖大於 300 mg/dl 體重減輕之外，DM 小鼠於飼養半年間也呈現多尿、多喝的現象。

1-2. KP1004n (hypo-mucoid) 與 KP1004m (hyper-mucoid) 之肺部感染

1. KP1004n (hypo-mucoid) 與 KP1004m (hyper-mucoid) 在正常與 DM 小鼠肺及血液中之菌量

為比較 KP1004 其黏性(mucoid)在正常與 DM 小鼠肺部感染的差異，因此於感染後 20 小時進行肺部 KP 菌量培養。圖五 A. 顯示在低黏性(hypo-mucoid) KP 感染時，正常小鼠肺部 KP 之 cfu+1 取 log 後為 0，DM 小鼠為 $\log \text{cfu}+1 = 4.0 \pm 0.7$ ，較正常小鼠顯著增加($P < 0.05$; $n= 3$)，而高黏性 (hyper-mucoid) KP 在兩組肺部感染之菌量則無統計上的差異 (正常組為 $\log \text{cfu}+1 = 3.3 \pm 0.3$ ，DM 組為 $\log \text{cfu}+1 = 4.1 \pm 0.6$; $n= 4$)。正常小鼠感染 KP1004n 與 KP1004m，肺部的菌量以 hyper-mucoid KP 明顯高許多($P < 0.05$; $n= 3$)。

為進一步探討黏性特質、糖尿病對 KP1004n 與 KP1004m 由

肺部散佈至血液中的影響，因而取小鼠心臟之血液進行細菌培養。圖五 B.結果顯示：hypo-mucoid KP 感染時，正常小鼠血液 KP 之 cfu+1 取 log 後為 0，DM 小鼠為 $\log \text{cfu}+1 = 0.4$ ，hyper-mucoid KP 感染正常鼠之 $\log \text{cfu}+1$ 為 0，DM 鼠為 0.3，以上在血液中菌量皆無統計上之顯著差異(n= 3)。

2. DM 小鼠肺泡巨噬細胞 (AM) 吞噬 hyper-mucoid KP 的能力

由於先前實驗發現，DM 小鼠肺部清除 hyper-mucoid KP 的能力不受 DM 影響。為了證實 DM 小鼠的肺泡巨噬細胞 (AM) 與正常小鼠一樣，皆擁有正常的吞噬能力，因而將 AM 自感染 20 小時的小鼠右肺沖出並染 Gram stain，計數每個 AM 胞內的 KP 數量。結果圖六表示，正常小鼠 = $17.6 \pm 1.7 \text{ KP/AM}$ ，DM 小鼠 = $15.3 \pm 1.2 \text{ KP/AM}$ ，兩者相較 (n= 5) 並無顯著差異。

1-3. Cluster A 的 paired KP (hypo-mucoid : KP1084/hyper-mucoid : KP1112) 肺部之感染

1. Cluster A 的 paired KP 在正常與 DM 小鼠肺及血液中之菌量 (20 小時)

為比較 cluster A 其黏性 (mucoid) 在正常與 DM 小鼠肺部感染的差異，將肺部感染後 20 小時進行 KP 菌量培養。圖七 A.顯示，hypo-mucoid KP 在正常鼠肺部菌量 $\log \text{cfu}+1 = 4.8 \pm 0.2$ ，

DM 鼠 $\log \text{cfu}+1 = 4.2 \pm 0.2$; hyper-mucoid KP 感染, 正常鼠 $\log \text{cfu}+1 = 6.3 \pm 0.4$, DM 鼠 $\log \text{cfu}+1 = 5.4 \pm 0.3$ 。在正常小鼠 paired KP 感染中, hyper-mucoid KP 在肺中之菌量比 hypo-mucoid KP 顯著較多 ($P < 0.05$; $n = 5$)。

為探討黏性特質或糖尿病會影響 cluster A KP 由肺部進入至血液中, 故取小鼠心臟血液進行細菌培養。圖七 B. 結果表示, hypo-mucoid KP 感染時, DM 小鼠血液中的細菌量是正常小鼠的 500 倍 (正常組 $\log \text{cfu}+1 = 0.3 \pm 0.3$, DM 組 $\log \text{cfu}+1 = 2.3 \pm 0.6$; $P < 0.05$, $n = 4$)。hyper-mucoid KP 感染時, 正常小鼠血液中的細菌量 $\log \text{cfu}+1 = 2.4 \pm 0.8$, DM 小鼠 $\log \text{cfu}+1 = 1.4 \pm 0.5$ 。此外, 在正常小鼠 paired KP 感染中, hyper-mucoid KP 在血液中菌量較 hypo-mucoid KP 明顯增高 ($P < 0.05$; $n = 4$); 而在 DM 小鼠 paired KP 感染中, hyper-mucoid KP 在血液中的菌量較 hypo-mucoid KP 有減少的趨勢 ($P = 0.075$)。

2. Cluster A 的 paired KP 對正常與 DM 小鼠肺泡巨噬細胞 (AM) 引發之凋亡

為探討黏性、糖尿病二者是否會加重肺泡巨噬細胞的凋亡, 將 AM 自感染 20 小時的小鼠右肺沖出, 並染細胞死亡偵測試劑, 依據未感染的對照組 (sham group) 其細胞族群 (AM 佔 95% 以

上)之條件,圈選已感染小鼠的 AM 族群,以流氏細胞儀分析其凋亡。圖八結果表示, hypo-mucoid KP 感染時,正常鼠的 AM 凋亡百分比為 $12.5 \pm 2.6\%$, DM 小鼠為 $8.5 \pm 1.3\%$; hypo-mucoid KP 感染時,正常鼠的 AM 凋亡百分比為 $9.9 \pm 1.9\%$, DM 小鼠為 $10.4 \pm 1.7\%$,以上四者間(n= 4)皆無差異。

3. Cluster A 的 paired KP 在正常與 DM 小鼠肺及血液中之菌量 (40 小時)

20 小時的肺部感染造成正常與 DM 小鼠病程變化之不同,欲了解在感染 40 小時是否有一致的感染進程,因此將小鼠肺部感染 40 小時後,取其左肺與血液進行細菌培養。圖九 A.顯示,感染 hypo-mucoid 或 hyper-mucoid KP 之正常與 DM 小鼠其肺部細菌量取 log 依序為 $\log \text{cfu}+1 = 5.5 \pm 0.9$, 5.3 ± 1.4 , 5.5 ± 0.9 , 5.1 ± 0.5 ,彼此間並無統計上的差異(n= 3)。其血液菌量(log cfu+1)依序如下, 4.1 ± 0.6 , 2.5 ± 0.8 , 4.9 ± 0.8 , 3.5 ± 0.3 ,如圖九 B.所示,彼此間並無統計上的差異(n= 3)。

1-4. Cluster B 的 paired KP (hypo-mucoid : KP1008/hyper-mucoid : KP2002) 肺部之感染

cluster B 的 paired KP 在正常與 DM 小鼠肺及血液中之菌量

為研究不同 cluster 間是否具相同的感染現象,故挑選 cluster

B paired KP 感染正常與 DM 小鼠肺部，欲了解 paired KP 在肺中的生長情況，因此將感染 20 小時的肺部進行細菌培養。得到結果圖十 A 所示，hypo-mucoid 組正常小鼠肺部細菌量(log cfu+1) 為 3.5 ± 0.02 ，DM 鼠為 4.7 ± 0.1 ，DM 組肺中的細菌量較控制組多 ($P < 0.05$; n= 3); hyper-mucoid 組正常小鼠肺部細菌量(log cfu +1)為 5.2 ± 0.8 ，DM 鼠為 4.8 ± 1.1 (n= 3)。欲探求黏性特質或 DM 可促使 KP 入侵至血液中，將感染小鼠血液作細菌培養，其結果圖十 B，hypo-mucoid 組正常小鼠血中細菌量 log cfu+1 = 1.2 ± 0.7 ，DM 鼠 log cfu+1 = 1.1 ± 0.5 ；hyper-mucoid 組正常小鼠血中細菌量(log cfu +1)為 2.1 ± 0.5 ，DM 鼠為 1.3 ± 0.6 。在 DM 小鼠 paired KP 感染中，hyper-mucoid KP 在血液中的菌量較 hypo-mucoid KP 多 ($P < 0.05$ ；n= 3)。

1-5. Cluster C 的 paired KP (hypo-mucoid：KP1283/hyper-mucoid：KP1284) 肺部之感染

cluster C 的 paired KP 在正常與 DM 小鼠肺及血液中之菌量

為了解 cluster C 與 cluster A、B 間，其肺及血中 KP 的清除是否相同，因而採之前相同做法。圖十一 A 顯示：感染 hypo-mucoid 或 hyper-mucoid KP 之正常與 DM 小鼠其肺部細菌量(log cfu+1)依序為 3.7 ± 0.3 ， 5.1 ± 0.8 ， 5.1 ± 0.3 ， 6.0 ± 0.3 ，

在正常小鼠 paired KP 感染中，hyper-mucoid KP 在肺中菌量較 hypo-mucoid KP 明顯增加 ($P < 0.05$; $n = 3$)。圖十一 B. 顯示血液中的 KP 量($\log \text{cfu}+1$)依序如下： 2.1 ± 0.8 , 2.9 ± 0.3 , 2.9 ± 0.5 , 0.5 ± 0.5 , 由此得知在 hyper-mucoid KP 肺部感染中，DM 鼠血液中的菌量比正常鼠少 ($P < 0.05$; $n = 4$)。

第二節 體外試驗(*in vitro*)

由於正常小鼠在來自不同 cluster KP 感染時，hyper-mucoid KP 在肺中之菌量皆比 hypo-mucoid KP 顯著增加，為進一步研究 AM 與 hypo-/hyper-mucoid KP 之間是否存在著不同的交互作用 (interaction)，因此利用老鼠的巨噬細胞株感染不同 cluster KP，以模擬在肺泡中，AM 與 KP 交互作用的情形。

2-1. Hypo-/hyper-mucoid KP 所造成之細胞毒性 (cytotoxicity) 與所誘發之細胞凋亡 (inducing-apoptosis)

1. Trypan blue 細胞存活力測試

將 1×10^6 的巨噬細胞分別以 $\text{MOI} = 10$ 感染 hypo-mucoid、hyper-mucoid KP 45 分鐘或不感染作為控制組 (blank)，放置 1 小時之後以 Trypan blue 評估巨噬細胞的存活力。其被 Trypan blue 染上的結果如下，控制組 (blank) 為 $3.2 \pm 0.1 \%$ ，hypo-mucoid 組為 $6.1 \pm 1.0 \%$ ，hyper-mucoid 組為 $7.3 \pm 0.9 \%$ ，hypo-mucoid KP

與控制組相比，沒有任何統計上的差異，只有 hyper-mucoid KP 較具細胞毒性(cytotoxicity; $P < 0.05$, $n= 3$)。

2. DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) 核染色

細胞感染後，放置 12 小時，染 DAPI stain，以評估細胞凋亡的百分比。圖十二顯示細胞凋亡百分比依序，控制組(blank)為 $4.7 \pm 0.6\%$, hypo-mucoid 組為 $7.4 \pm 0.7\%$, hyper-mucoid 組為 $8.7 \pm 0.4\%$ 。兩種 KP 感染所誘發之細胞凋亡皆較控制組高($P < 0.05$; $n= 3$)，而兩種 KP 間所誘發的凋亡沒有任何差異。

2-2. Hypo-/hyper-mucoid KP 對 RAW cells 的附著 (adhesion) 及 KP 在巨噬細胞內的存活 (macrophage-associated KP) 評估

1. KP 的附著 (adhesion)

為評估黏性特質是否可減少 KP 對巨噬細胞的附著，因此將 1×10^6 的巨噬細胞分別以 $MOI= 10$ 感染 hypo-mucoid、hyper-mucoid KP 45 分鐘，培養黏附胞外的細菌。將培養出的 cfu+1 取 log 之後，如圖十三 A. 表示 hyper-mucoid KP 比 hypo-mucoid 組具有較高的附著(adhesion)細菌數(hypo- : $\log \text{ cfu+1} = 3.8 \pm 0.3$, hyper -: $\log \text{ cfu+1} = 5.1 \pm 0.05$; $P < 0.05$, $n= 3$)。

2. KP 在巨噬細胞內的存活 (macrophage-associated KP)

由於 hyper-mucoid KP 具較高的黏附力，為研究其是否能進一

步入侵巨噬細胞內，將細胞感染後，以 100 μ g/ml gentamicin 殺死胞外之細菌後，將細胞打破與刮下，培養其胞內的 KP 菌量。

其結果如圖十三 B.，hypo-mucoid 組為 $\log \text{cfu}+1 = 0.5 \pm 0.5$ ，hyper-mucoid 組為 $\log \text{cfu}+1 = 3.7 \pm 0.03$ ，hyper-mucoid 比 hypo-mucoid KP 在巨噬細胞內存活的細菌數較多 ($P < 0.05$; $n = 5$)。

2-3. 突變株與野生株 KP (mutant/wild type KP) 對 RAW cells 的附著 (adhesion) 及 KP 在巨噬細胞內的存活 (macrophage-associated KP) 評估

先前的實驗以 paired KP 方式感染細胞株，hyper-mucoid KP 具較高的附著力與在巨噬細胞內存活的 KP 數較多，雖然兩者黏性差異大，但有可能是其他基因調控附著與入侵力，因為基因相似度 98%，無法證實完全是黏性特質導致結果的不同，故將 hyper-mucoid KP (KP1112) 以 mini-Tn10 transposon mutagenesis 方式，挑選出完全具低黏性的突變菌株 (KPG6)，分別感染巨噬細胞株，評估 mutant (KPG6) 與 wild type KP (KP1112) 對 RAW cells 的附著及在 RAW cells 內存活的細菌數。

1. KP 附著 (adhesion)

用 MOI= 1、MOI= 10 感染細胞株，以之前所述方式得到以下結果圖十四 A.: 感染 45 分鐘後，MOI= 1 其附著菌量 ($\log \text{cfu}+1$)

依序： 1.1 ± 1.1 、 4.0 ± 0.1 ，wild type 具有較高的附著菌量 ($P < 0.05$ ； $n = 3$)；MOI= 10 其附著菌量(log cfu+1)依序： 2.6 ± 1.3 、 4.8 ± 0.08 ；當 MOI=10 時，wild type KP 比 MOI= 1 時有較高之附著力($P < 0.05$)。若將細胞感染後放置一小時，扣除 RAW cells 內存活的細菌數後，MOI=1 其附著菌量(log cfu+1)依序為 2.1 ± 1.0 、 4.1 ± 0.1 ，MOI=10 則是 wild type 具較高之附著力(mutant： $\log \text{cfu}+1 = 3.5 \pm 0.3$ ，wild type： $\log \text{cfu}+1 = 4.8 \pm 0.1$ ； $P < 0.05$ ， $n = 3$)；wild type KP 於 MOI=10 時，具較高之附著力 ($P < 0.05$)，如圖十四 B.所示。

2. KP 在巨噬細胞內的存活 (macrophage-associated KP)

依 MOI= 1、MOI= 10 感染細胞株，以先前所述方式得到以下結果如圖十五，感染後以 $100 \mu\text{g/ml}$ gentamicin 作用 1 小時，MOI=1 菌量無任何統計上之差異(mutant： $\log \text{cfu}+1 = 0$ ，wild type： $\log \text{cfu}+1 = 0.9 \pm 0.9$)；MOI=10 菌量(log cfu+1)依序為 0.9 ± 0.9 、 3.6 ± 0.2 ，wild type KP 在巨噬細胞內具較多存活的細菌數($P < 0.05$ ， $n = 3$)；wild type 在 MOI=10 時比 MOI=1 有較多存活的 KP 數($P < 0.05$ ， $n = 3$)。

第四章 討論

台灣的 DM 病人容易感染 KP，而在臨床上造成原發性肝膿瘍的 KP 菌株大都具有黏性的特質，且被定義為具入侵性 (Fang et al., 2004)。本實驗藉由臨床分離之野生型(wild type)，來自不同 cluster 的成對 KP (paired KP)進行體內試驗(*in vivo*)與體外試驗(*in vitro*)，比較黏性特質與糖尿病對 KP 的致病作用。在不同 cluster 的成對 KP 肺部感染 20 小時後，其肺部與血液中 KP 的清除，具有兩種共同的結果，歸納如下：一、在 hypo-mucoid KP 的感染中，DM 小鼠肺部或血液內的 KP 菌量比正常小鼠的肺或血液內明顯高；二、正常小鼠分別感染成對 KP 時，hyper-mucoid KP 在肺中的菌量比 hypo-mucoid KP 顯著增加。另外，較特別的現象便是於 cluster B、C 內，hypo-mucoid KP 會由正常鼠的肺部散佈至血液中；而在宿主防禦方面，DM 小鼠的巨噬細胞對 KP 具有正常的吞噬能力，凋亡現象也與正常小鼠一致。在體外試驗(*in vitro*)中，予巨噬細胞感染成對 KP 也發現，hyper-mucoid KP 對巨噬細胞具較高的黏著量，甚至可以進入巨噬細胞中存活一小時；而利用 mini-Tn10 transposon mutagenesis 方式將 hyper-mucoid KP 的黏性去除，再予以感染巨噬細胞，則失去其原先的高黏著量，也無法在巨噬細胞內存活；藉由上述結果，試圖從黏性特質及糖尿病探討 KP 的致病作用。

糖尿病病人的生理表現為高血糖，並且伴隨體重減輕、多渴，多尿等典型症狀(Wilson and Foster, 1992)，在本實驗的結果中，C57BL/6J 小鼠，在誘發初期已符合 DM 的定義。根據 Thomas 等學者(1976)指出，原存在肺組織的肺泡巨噬細胞在 100 天內會重新被新生的肺泡巨噬細胞所取代，因此為使肺內的巨噬細胞完全被高血糖狀況下新生的巨噬細胞取代，因此將小鼠飼養約半年，至 30 週齡進行實驗。在本實驗飼養晚期，DM 小鼠血糖可突破 400 mg/dl，此與 Vidya 等學者的結果相同，發現以 STZ 誘發 C57BL/6J 小鼠發生糖尿病，持續飼養至 25 週時，DM 小鼠的血糖會由 300 mg/dl 攀升至 400 mg/dl 以上。而在小鼠體重變化方面，本實驗 DM 小鼠於誘發後 4 週的體重明顯比正常小鼠輕，一直持續至 30 週。先前有實驗指出，C57BL/6L 小鼠若以 STZ 誘發 DM，於 28 週時，其 DM 小鼠體重平均為 24.5 ± 1.8 g，正常小鼠體重為 28.1 ± 4.5 g，DM 小鼠之體重明顯較正常鼠輕，此結果與本實驗的 DM 小鼠模式吻合(KaKo et al., 1999)。此外，也有研究利用 STZ 單次大劑量誘發 ICR 小鼠糖尿病，於誘發後 10 天後，DM 小鼠體重明顯比控制組小鼠輕(Amano et al., 2000)。由 DM 小鼠的血糖明顯增高、體重減輕，以及飼養半年間 DM 小鼠呈現多尿、多渴等生理現象，以上結果證實了本實驗 DM 小鼠模式成功建立。

DM 普遍被認為是一種獨立致病因子，DM 病人對感染具有高

感受性，很容易導致下呼吸道感染。但近年來，卻有學者提出不同看法，根據 Koziel 等人(1995)提出，DM 並非是呼吸道感染的獨立致病因子，而是 DM 會增加呼吸道對特定微生物的感受性，例如對金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 與革蘭氏陰性菌等。在以金黃色葡萄球菌感染 BB 大鼠的實驗指出，長期處在高血糖生理狀況下的 BB 大鼠，其肺泡巨噬細胞的殺菌能力下降(Sima et al., 1988)。另外，Amano 等人(2000)則以急性高血糖的小鼠模式，由肺部感染 *Pseudomonas aeruginosa* (1×10^7 cfu/mouse)，發現糖尿病小鼠 24 小時的死亡率高達 90%，而正常鼠死亡率則為 0%，此結果與本研究的初步存活率實驗一致。在初步的存活率試驗中，予正常與 DM 小鼠肺部感染 cluster A 的 paired KP (1×10^4 CFU/mouse)，於感染 72 小時後，感染 hyper-muoid KP 的正常及 DM 小鼠與感染 hypo-muoid KP 的 DM 小鼠死亡率約 40% 左右，以上三者感染後 120 小時內全部死亡；但是感染 hypo-muoid KP 的正常小鼠，於 72 小時的存活率約有 80%，乃至 120 小時仍有 60% 的存活率（控制組 n = 5，DM 組 n = 6），以上死亡率的結果與 KP 感染後 20 小時，肺及血液中 KP 菌量結果成正比。在 cluster A 中，hyper-muoid KP 感染不論正常或 DM 小鼠，其肺與血液中有大量的 KP 菌量並且 cfu 相似，因此兩者的死亡率相當，也證實了高黏性的 KP 具有高致病力，而 DM 對 hyper-muoid KP 在兩組小鼠 KP 菌量的

清除中並無太大影響。在 hypo-mucoid KP 的感染中，結果卻不然，以感染 20 小時後的肺部菌量而言，兩者並無差異，但是血液中卻有極大的差異；正常鼠血液中僅有少量 KP，而 DM 鼠血液中菌量卻是正常鼠的 500 倍左右，配合初步死亡率實驗結果說明了 DM 鼠比正常鼠對 hypo-mucoid KP 較具致病性與死亡率，也闡明了在 hypo-mucoid KP 的感染裡，DM 扮演著關鍵的角色。相同的結論出現在 cluster B、C 與 KP1004 的 hypo-mucoid KP 感染中，但其間的差異卻是上述三者肺部 KP 菌量有所差異，亦即上述三者感染小鼠肺部 20 小時後，雖然血液中並無差異，但是 DM 鼠肺部的 KP 菌量皆比正常鼠明顯增加，代表 DM 鼠對 hypo-mucoid KP 感染之高感受性。至於，cluster A hypo-mucoid KP 在血液中有所差異，在肺中則無差異的結果與其它 cluster 不同，原因有可能在於不同 cluster 間有不同的感染進程，與不同的致病行為，由於皆挑選 20 小時觀察 KP 的清除狀況，因此來自不同 cluster hypo-mucoid KP 會有不太相同的菌量，但是趨勢與結論卻是共同的，由此可知，藉由 DM 此因子，可加成 hypo-mucoid KP 之致病力。

DM 病人之所以被視為對感染具高感受性，其原因可能是免疫功能上的缺損，例如嗜中性白血球吞噬功能、殺菌功能與驅化能力下降，其所分泌的 IL-6, IL-8 等細胞激素減少 (Helene et al, 2001) 或者

巨噬細胞分泌 MIP-2、INF- γ 的量降低(Mosci et al., 1993)。於 2002 年 Thomas 等學者提出，予 INF- γ ^{-/-} 小鼠肺部感染 KP，其肺部與血液中 KP 的菌量比正常鼠高出一百倍，且具有較高的死亡率；根據另一項實驗也發現肺泡巨噬細胞分泌 MIP-2 的量減少會增加小鼠對 *Pseudomonas aeruginosa* 肺部感染之感受性(Amano et al., 2000)。在 hypo-mucoid KP 肺部感染中，藉由 DM 可加成其致病性，原因可能在於 DM 造成肺泡巨噬細胞分泌細胞激素的能力缺損、殺菌功能與吞噬能力下降或是巨噬細胞的凋亡增加；其中，因 DM 引起的細胞激素分泌改變、殺菌與吞噬能力下降已被較多學者研究，在巨噬細胞凋亡方面卻較少被探討。然而，在本實驗中，藉由流式細胞儀之凋亡分析，結果則排除了因肺泡巨噬細胞凋亡，而造成 DM 鼠對 hypo-mucoid KP 具高感受性的可能，因為不論正常鼠或 DM 鼠感染 hypo-mucoid 與 hyper-mucoid KP，其肺泡巨噬細胞的凋亡皆無差異。在肺泡巨噬細胞凋亡方面，有研究利用低劑量肺炎雙球菌(*pneumococci*)感染小鼠肺部，使小鼠處於極輕度感染，發現若以凋亡抑制劑(caspase inhibitor)抑制巨噬細胞凋亡，則會增加小鼠菌血症的機率，因此提出巨噬細胞的凋亡可以促進宿主對肺炎雙球菌的清除(Dockrell, 2003)，其結果與本實驗不同。但值得注意的是，本實驗所用的細菌為革蘭氏陰性菌，菌量會造成小鼠較嚴重的感染，此外，動物模式也有所不同，本實驗

使用正常與 DM 兩種小鼠，因此結果會有所不同。關於肺部感染時，黏性與 DM 二者在 AM 凋亡與細菌清除能力間造成之影響，需要進一步探討。

將正常與 DM 鼠感染來自不同 cluster 的 hyper-mucoid KP，DM 鼠與正常鼠肺部的 KP 菌量沒有差異，亦即兩者肺部菌量的清除類似，因此 DM 小鼠肺部對 hyper-mucoid KP 的清除能力與正常小鼠一樣；類似的比較實驗可在脾臟巨噬細胞 (splenic macrophage) 體外試驗中看到，以 STZ 誘發 DM 小鼠，取出脾臟巨噬細胞予以感染白色念珠菌 (*Candida albicans*)，比較兩組殺菌能力，發現 DM 小鼠之脾臟巨噬細胞清除黴菌的能力比正常鼠佳 (Mosci et al., 1993)。為了進一步證實清除 hyper-mucoid KP 能力相同導因於 DM 鼠與正常鼠，擁有相同的吞噬功能，因此評估 AM 吞噬 hyper-mucoid KP 的能力，結果發現 DM 鼠吞噬 KP 的數量與正常鼠相同，而在 Lu 等學者(2002)的研究也支持這樣的結果，藉由支氣管灌流術將正常與 DM 鼠之 AM 沖出，並予 beads 與 *E. coli* 之吞噬，兩種小鼠吞噬 beads 與 *E. coli* 的能力一致。因此，DM 小鼠的肺泡巨噬細胞對 KP 具有正常的吞噬能力。

黏性特質一直被視為與 KP 的致病力有關，而高黏性的 KP 具有較高的致病力。本實驗於正常小鼠給予高、低黏性的 KP 肺部感染中

也證實了相同的結果，正常小鼠肺部對 hyper-mucoid KP 的清除比 hypo-mucoid KP 減少許多，在不同 cluster 間皆有相似的情形；於初步的存活率實驗中，指出感染 hypo-mucoid KP 的正常小鼠有較高的存活率。為研究 KP 黏性與致病性間的關聯，有許多學者利用不同的突變方式去除 KP 的黏性，其中，有研究指出 *galU* 基因缺損的 KP 不能利用半乳糖而無法合成莢膜多糖體(CPS)，也無法產生黏性，因此其對 BALB/c 小鼠不具任何致病性(Lai et al., 2001)；另一方面，Fang 等學者(2004)，利用 mini Tn5 轉移子突變(transposon mutagenesis)方式使 KP 黏性降低，以 1×10^6 cfu 感染正常小鼠腹部，發現感染低黏性突變株的正常小鼠於沒有任何致病現象，而感染野生型菌株(wild type)則在 12 小時後立即死亡，以上結果與本實驗結果相符。但是，上述研究與本實驗不同的是，其皆使用突變方式將細菌的黏性降低，因此感染正常鼠的低黏性菌株並非臨床所分離的野生株；本實驗選擇臨床分離的野生型成對 KP，兩者基因相似度 98%，但黏性差異大，藉此研究 KP 的黏性特質，以避免因突變而影響 KP 某些未知的生物特性或功能；雖是如此，但成對 KP 基因 98% 的相似度，似乎無法完全說明黏性特質是致病關鍵，因而本實驗中也利用 mini-Tn10 轉移子突變方式將 hyper-mucoid KP (KP1112)突變為 hypo-mucoid KP (KPG6)，使之有莢膜，但黏性很低 (string -)，再予之感染正常鼠肺部(1×10^4

cfu/mouse), 其感染 20 小時後肺部與血中皆無 KP 菌量, 並且可存活下, 而感染野生型 (KP1112) 的正常鼠, 其肺與血中皆有很多菌量, 也無法存活(n= 3, 結果未列)。由以上結果可知, 高黏性的 KP 對免疫功能健全的生物體而言具有致病力, 亦即 KP 的黏性特質是一個獨立致病因子。

相較於高黏性 KP, 低黏性 KP 卻被視為較不具致病力, 因此較少被研究, 然而本實驗的結果卻指出, DM 可以加成其致病力; 另外, 值得注意的是, cluster B C 之 hypo-mucoid KP 能由肺部散佈至血液中, 而 cluster A 之低黏性 KP 即使較難在血液中散佈, 在肺中也有不少細菌量, 此種細菌行為與突變株低黏性 KP (KPG6) 感染有所不同, 突變株以相同菌量感染正常鼠, 在肺與血液中, 突變株會被清除掉且毫無致病力, 這意味著臨床分離之野生型 hypo-mucoid KP 可能具有別於黏性特質的致病因子存在。根據我們先前的研究, 由不同疾病的檢體, 收集近五百株 KP 進行黏性測試 (string test), 其中, hypo-mucoid KP 佔了全部的四分之三, 而 hyper-mucoid KP 只佔四分之一。由此, 野生型 hypo-mucoid KP 是不容忽視的一群。

正常小鼠在來自不同 cluster KP 感染時, hyper-mucoid KP 在肺中之菌量皆比 hypo-mucoid KP 顯著增加, 由於肺泡巨噬細胞會居留在富含空氣的表面, 直接與入侵肺部的細菌接觸(Simon et al., 1977), 為

進一步研究造成上述結果的原因，因此利用老鼠的巨噬細胞株感染不同 cluster KP，以模擬在肺泡中，AM 與 KP 的互動情形。在先前的實驗，大部分學者大多採用肺上皮細胞研究 KP 對宿主的黏著與入侵，於 2002 年 Cortés 等學者，將臨床分離出較不具莢膜與經突變無莢膜之 KP 感染肺上皮細胞，結果發現莢膜較薄或是無莢膜 KP 黏附力比厚莢膜菌株更強，其進入宿主胞內之菌數也較多，但是將其感染小鼠卻沒有任何致病力，說明了肺上皮細胞具有防禦細菌入侵的能力，而厚莢膜 KP 可避掉此種防禦機制而能致病。在本實驗中，具高黏性 KP 莢膜較厚，低黏性 KP 莢膜較薄，以相同的條件感染巨噬細胞，所做出的結果卻相反，高黏性 KP 的附著量較多，進入宿主胞內的菌量也較多，與上述實驗一致的是厚莢膜 KP 致病力高。其間的差異可能是本實驗選用巨噬細胞株，並非肺上皮細胞株，而不同的細胞株具有不同的接受器(receptor)，因此造成 KP 有不同的黏附菌量。先前有一項研究，作者使用四株不同的細胞株進行 KP 的感染，比較 KP 莢膜對不同細胞株附著的影響，發現厚莢膜的野生型 KP 僅對 A-549 細胞株附著能力差，但對 HT-29-MTX 10 細胞株之附著力比無莢膜的 KP 還強(Sabine et al., 1999)。另外，在 Fang (2004)等學者以 RAW 264.7 細胞株感染野生型及 *magA* 突變型 KP 所得結果與本實驗不同，野生型菌株被巨噬細胞吞噬較少，而 *magA* 突變型 KP 則吞噬進去較多，

在三十分鐘內皆被消化分解，是以宿主防禦行為為出發點；而本實驗則試圖以細菌行為切入，發現感染後一小時，仍有 KP 在巨噬細胞內存活，且存活者皆是高黏性 KP，而低黏性 KP 在巨噬細胞內較少，具推測有可能是被吞噬後，莢膜較薄、黏性較低，細菌較不易形成菌體間的聚集或連結(interconnection)，因而很快被消化分解，而高黏性 KP 則反之，具有外層多醣體網(exopolysaccharide web)可彼此連結(interconnection)因而黏性大，也因此造成 KP 附著菌量高，即使被吞噬也較難被分解。此外，高附著量並非代表 KP 全部與巨噬細胞結合(binding)，有可能只有部分細菌和巨噬細胞結合，但因外層多醣體網造成細菌彼此連結，因而造成高附著量，也因此高黏性 KP 突變後，便失去原先高附著菌量。

曾有學者提出：不同的宿主因子對感染具有不同的感受性，因此其研究使用 C57BL/6J 與 BALB/c 小鼠感染 *Burkholderia pseudomallei*，其結果顯示 BALB/c 對感染具較高之感受性(Liu et al., 2002)。為了排除不同小鼠品系，有不同的感受性而造成實驗結果之不同，因此本實驗也使用 BALB/c 糖尿病動物模式，將 cluster A 的 paired KP 依先前條件 (1×10^4 cfu/mouse) 感染正常與糖尿病 BALB/c 小鼠，其結果與 C57BL/6J 糖尿病動物模式實驗結論相似，但 BALB/c 小鼠肺與血液中的菌落數比 C57BL/6J 小鼠略多。

在本篇研究中，藉由感染巨噬細胞株的細胞實驗中，說明 KP 的黏性特質影響細菌與巨噬細胞的交互作用，或許因此 hypo-mucoid KP 與 hyper-mucoid KP 有不同的細菌行為，而引發不同的宿主反應；在感染糖尿病小鼠肺部的動物實驗得知，KP 的黏性特質是一個獨立致病因子；此外，DM 在 hypo-mucoid KP 感染中扮演著重要的角色，其可加成 hypo-mucoid KP 之致病力。

第五章 結論

在本篇研究中，將臨床分離之野生型(wild type)，來自不同 cluster 的成對 KP (paired KP) 進行體內試驗(*in vivo*)與體外試驗(*in vitro*)，比較黏性特質及糖尿病對 KP 的致病作用，結果說明了黏性特質影響細菌與巨噬細胞間的交互作用，且 KP 的黏性特質是一個獨立致病因子，hyper-mucoid KP 具有較高的致病力；然而，DM 此因子一旦存在，便使 hypo-mucoid KP 的致病力加成，不僅如此，hypo-mucoid KP 可能存在著有別於黏性特質的致病因子。根據我們先前的研究，由不同疾病的檢體，收集近五百株 KP 進行黏性測試(string test)，其中，hypo-mucoid KP 佔了全部的四分之三，而 hyper-mucoid KP 只佔四分之一。因此，野生型 hypo-mucoid KP 是不容忽視的一群，值得我們進一步之探討。

第六章 參考資料

1. Adams DO, and Hamilton TA. The cell biology of macrophage activation. *Annu. Rev. Immunol.* 2:283, 1984.
2. Alberti KG, and Zimimet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes, provisional report of a WHO Consultation. *Diabet Med.* 15:539, 1997
3. Alberti S, Alvarez D, and Merino S et al. Analysis of complement C3 deposition and degradation on *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 1996.
4. Amano H, Yamamoto H, and Senba M et al. Impairment of Endotoxin-Induced Macrophage Inflammatory Protein 2 Gene Expression in Alveolar Macrophages in Streptozotocin-Induced Diabetes in Mice. *Infect. Immun.* 68: 2925-2929, 2000.
5. Arturo Z and Philippe S. Apoptosis in Bacterial Pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 100: 493-495, 1997.
6. Babior BM. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood.* 64:959, 1984.
7. Bartlett JG, O'Keefe FP, and Tally TJ et al. Bacteriology of hospital-acquired pneumonia. *Arch. Intern. Med.* 146:868-871, 1986.
8. Berger MT, Norvell MF, and Tosi SN et al. Tissue-specific Fc and complement receptor expression by alveolar macrophages determines relative importance of IgG and complement in promoting phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pediatr. Res.* 35:68-77, 1994.
9. Bistrain BR. Host defenses and susceptibility to infection in patients with diabetes mellitus. *Infect Dis Clin North Am.* 9:1-9, 1995.

10. Brain JD, Godleski JJ, and Sorokin SP. Quantification, origin, and fate of pulmonary macrophages. In Brain JD, Proctor DD, Reid LM (eds): Respiratory Defense Mechanisms (Part II). New York: Marcel Dekker, p 849-892, 1977.
11. Camner P. Alveolar clearance. *Eur. J. Respir. Dis.* 61(Suppl 107): 59-72, 1980.
12. Carpenter JL. Klebsiella pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Rev. Infect. Dis.* 12:672-82, 1990.
13. Carter JS et al. Non-insulin-dependent diabetes mellitus in minorities in the United States. *Ann Intern Med.* 125:221, 1996.
14. Centers for Disease Control. National nosocomial infection study report. Annual summary 1979, issued March 1982.
15. Chee SP, and Ang CL. Endogenous Klebsiella endophthalmitis -- a case series. *Ann Acad. Med. Singapore.* 24:473-478, 1995
16. Chen Y, and Zychlinsky A. Apoptosis induced by bacterial pathogens. *Microb. Pathogen.* 17: 203-212, 1994.
17. Cline GW et al. Impaired glucose transport as a cause of decreased insulin-stimulated muscle glycogen synthesis in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 341:240, 1999.
18. Cline MJ, and Lehrer RL. Phagocytosis by human monocytes. *Blood.* 32:423, 1968.
19. Colotta FF, Polentarutti S, and Mantovani A et al. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood.* 80: 2012-2020, 1992.
20. Cortes G et al. Molecular Analysis of the Contribution of the Capsular Polysaccharide and the Lipopolysaccharide O Side Chain to the Virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a Murine Model of Pneumonia. *Infect. Immun.* 70: 2583-2590, 2002.

21. Defornzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Rev.* 5:177, 1997.
22. Delamaire M, Maugeudre D, Moreno M et al. Impaired leucocyte function in diabetic patients. *Diabetic Med* 14:29, 1997.
23. Deresinski S. Infections in the diabetic patient: Strategies for the clinician. *Infectious Disease Reports.* 1:1, 1995.
24. Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The relationship of glycemic exposure (HbA1C) to the risk of development and progression of retinopathy in the diabetes control and complications trial. *Diabetes.* 44:968, 1995.
25. Dockrell DH, Marriott HM, and Ridger VC et al. Alveolar Macrophage Apoptosis Contributes to Pneumococcal Clearance in a Resolving Model of Pulmonary Infection. *The Journal of Immunology.* 171: 5380-5388, 2003.
26. Dorothy OY, and Cheung. Role of Pulmonary Alveolar Macrophages in Defense of the Lung against *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 68:4585-4592, 2000.
27. Fang CT et al. A Novel Virulence Gene in *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Primary Liver Abscess and Septic Metastatic Complications. *The Journal of Experimental Medicine.* 199: 697-705, 2004.
28. Farley MM, Harvey RC, and Stull T et al. A population-based assessment of invasive disease due to group B streptococcus in nonpregnant adults. *N. Eng.l J. Med.* 328:1807-1811, 1993
29. Fine MJ, Smith MA, and Carson CA et al. Prognosis and outcomes of patients with community-acquired pneumonia. A meta-analysis. *JAMA* 275:134-141, 1996.
30. Foreback JL, Remick DG, and Crockettorabi E et al. Cytokine responses of human blood monocytes stimulated with Igs. *Inflammation.* 21:501, 1997.

31. Fung CP, and Chang FY et al. A global emerging disease of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: is serotype K1 an important factor for complicated endophthalmitis? *Gut*. 50:420-424, 2002.
32. Gallacher SJ, Thomson G, and Fraser WD et al. Neutrophil bactericidal function in diabetes mellitus: evidence for association with blood glucose control. *Diabet Med*. 12:916-20, 1995.
33. Gerich JE. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: Impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev*. 19:491, 1998.
34. Golde DW, Byers LA, and Finley TN. Proliferative capacity of human alveolar macrophage. *Nature*. 247:373-375, 1974.
35. Grundy SM et al. Diabetes and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 100:1134, 1999.
36. Guadalupe C et al. Role of Lung Epithelial Cells in Defense against *Klebsiella pneumoniae* Pneumonia. *Infect. Immun*. 70:1075-1080, 2002
37. Hany S et al. Capsule Impedes Adhesion to and Invasion of Epithelial Cells by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun*. 68:6744-6749, 2000.
38. Held TK, Trautmann M, and Mielke ME et al. Monoclonal antibody against *Klebsiella* capsular polysaccharide reduces severity and hematogenic spread of experimental *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. *Infect. Immun*. 60:1771-1778, 1992.
39. Helene M, Calvet, and Thomas TY. Infection in diabetes. *Infectious Disease Clinics of North America*.15, 2001.
40. Hilbi H, Zychlinsky A, and Sansonetti PJ. Macrophage apoptosis in microbial infections. *Parasitology*. 115 Suppl: S79-87, 1997.
41. Hoffman. *Hematology: Basic Principles and Practice*, 3rd , 2000.

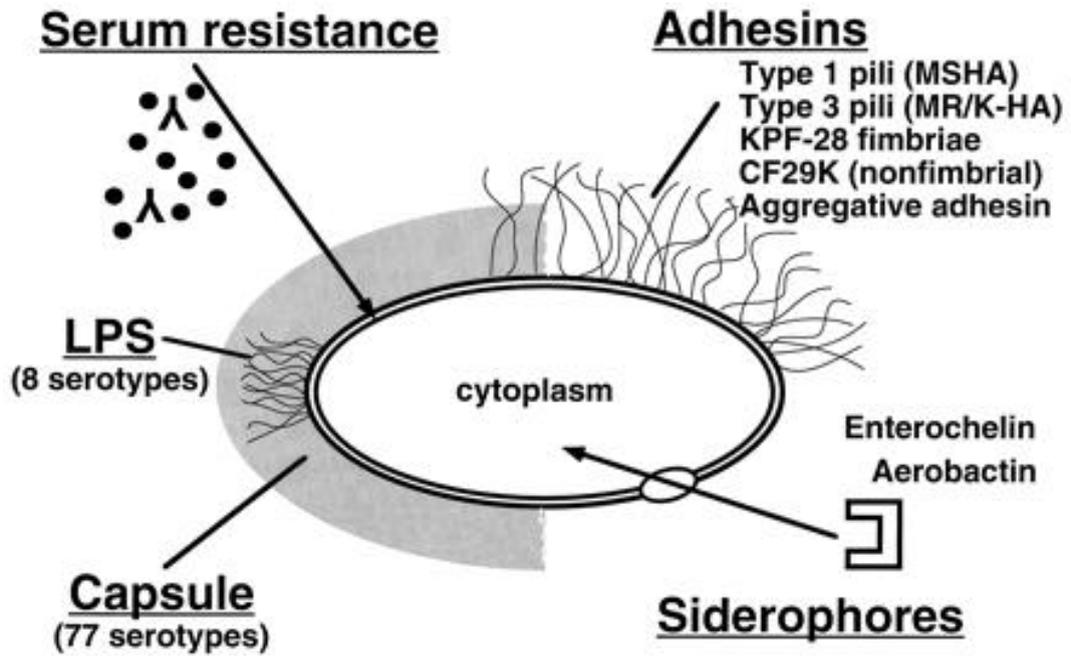
42. Kabha KL, Nissimov AA, and Keisari HP et al. Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 63:847-852. 1995.
43. Kako et al. Diabetes human apo B transgenic mice. *J. Lip. Res.* 40,1999.
44. Koziel H, Koziel MJ. Pulmonary complications of diabetes mellitus: Pneumonia. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 9:65, 1995.
45. Lai YC et al. RmpA2, an Activator of Capsule Biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43, Regulates K2 cps Gene Expression at the Transcriptional Level. 185: 788-800. 2003.
46. Lai YC, Peng HL, and Chang HY. Identification of Genes Induced In Vivo during *Klebsiella pneumoniae* CG43 Infection. *Infect. Immun.* 69:7140-7145, 2001.
47. Laochumroonvorapong PS, Paul KE, and Kaplan G. H₂O₂ induces monocyte apoptosis and reduces viability of *Mycobacterium avium*-M. intracellular within cultured human monocytes. *Infect. Immun.* 64: 452-459, 1996.
48. Lau YJ et al. Identification of a Major Cluster of *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Patients with Liver Abscess in Taiwan. *J. Clin. Microbiology.* 38: 412-414, 2000.
49. Leibovici L, Samra Z, and Konisberger H et al. Bacteremia in adult diabetic patients. *Diabetes Care.* 14:89-94, 1991
50. Lipscomb MF et al. The regulation of pulmonary immunity. *Adv. Immunol.* 59:369-455,1995.
51. Liu B, Koo GC, and Chua KL et al. Model of Differential Susceptibility to Mucosal *Burkholderia pseudomallei* Infection. *Infect. Immun.* 70: 504-511, 2002.

52. Mackowiak PR, Martin, and Smith J. The role of bacterial interference in the increased prevalence of oropharyngeal gram-negative bacilli among alcoholics and diabetics. *Am. Rev. Respir. Dis.*120: 589-593, 1979.
53. Mandell. *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5th, 2000.
54. McCallum et al. The *rcaA* gene of *Klebsiella pneumoniae* O1: K20 is involved in expression of the serotype-specific K (capsular) antigen. *Infect Immun.* 59 (2): 494-502, 1991.
55. Meyer KS, Urban JA, and Eagan BJ et al. J. Rahal. 1993.
56. Molloy AP, and Kaplan G. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. *J. Exp. Med.* 180: 1499-1509, 1994.
57. Mosci P, Vecchiare A, and Cenci E et al. Low dose streptozotocin-induced diabetes in mice. I. Course of *Candida albicans* infection. *Cell immune.* 150(1) 27-35, 1993.
58. Murray & Nadel. *Textbook of Respiratory Medicine*, 3rd, 2000.
59. Nassif X, and Sansonetti PJ. Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. *Infect. Immun.* 54: 603-608, 1986.
60. Nassif X, Honore N, and Vasselon T et al. Sansonetti. Positive control of colanic acid synthesis in *Escherichia coli* by *rmpA* and *rmpB*, two virulence-plasmid genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 3:1349-1359, 1989.
61. Nielson CP, and Hindson DA. *Diabetes.* 38, 1031-1035, 1989.
62. Nirmal J et al. Infections in patient with diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 341: 1906 - 1912, 1999.
63. Nosocomial outbreak of *Klebsiella* infection resistant to late-generation cephalosporins. *Ann. Intern. Med.* 119:353-358, 1991.

64. Nyberg K, Johansson A, and Camner P et al. Phagolysosomal pH in alveolar macrophages from smokers and nonsmokers. *Hum Exp Toxicol.* 13:175-179, 1994.
65. Oelschlaeger T, and Tall B. Invasion of cultured human epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae* isolated from the urinary tract. *Infect. Immun.* 65:2950-2958, 1997.
66. Orskov I, and Orskov F. Serotyping of *Klebsiella*. *Methods Microbiol.* 14:143-164, 1984.
67. Pierce AK, and Sanford JP. Aerobic gram-negative bacillary pneumonias. *Am Rev. Respir. Dis.* 110:647-658, 1974.
68. Pizzorno. *Textbook of Natural Medicine*, 2nd, 1999.
69. Podschun R, and Ullmann U. *Klebsiella* capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum. *J. Med. Microbiol.* 36:250-254, 1992.
70. Podschun R, and Ullmann U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clin. Microbiology Reviews.* Vol. 11, p. 589-603, 1998.
71. Robbins SL, and Tucker AW. The cause of death in diabetes: a report of 307 autopsied cases. *N. Engl. J. Med.* 231:865, 1944.
72. Rosenbloom AL et al. Emerging epidemic of type 2 diabetes in youth. *Diabetes Care.* 22:345, 1999.
73. Sabine FB et al. Consequences of Reduction of *Klebsiella pneumoniae* Capsule Expression on Interactions of This Bacterium with Epithelial Cells. *Infect. Immun.* 67: 554-561, 1999.
74. Sansonetti PJ, Arondel JJ, and Cavaillon M et al. Role of IL-1 in the pathogenesis of experimental shigellosis. *J. Clin. Invest.* 96: 884-892, 1995.

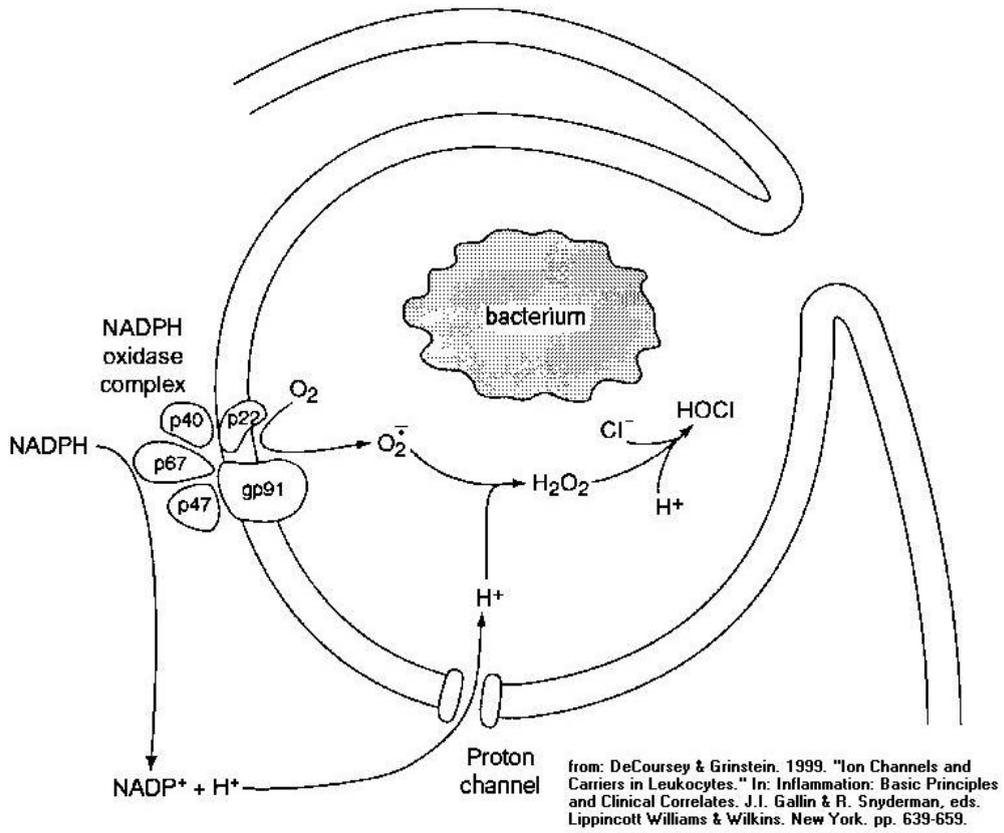
75. Schranz DB, and Lernmark A. Immunology in diabetes: An update. *Diabetes Metab Rev.* 14(1): 3-29, 1998.
76. Schranz DB, and Lernmark A. Immunology in diabetes: An update. *Diabetes Metab. Rev.* 14:3, 1998.
77. Shellito J, and Kaltreider HB. Heterogeneity of immunologic function amongst subfractions of normal rat alveolar macrophages. *Am Rev. Respir. Dis.* 129:747-753, 1984.
78. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance in human. *Am J Cardiol.* 84:3J, 1999.
79. Sima AA, O'Neill SJ, and Naimark D et al. Bacterial phagocytosis and intracellular killing by alveolar macrophages in BB rats. *Diabetes.* 37: 544-549, 1988.
80. Simon LM, Robin ED, and Phillips JR et al. Enzymic basis of bioenergetic difference of alveolar versus peritoneal macrophages and enzyme regulation by molecular O₂. *J. Clin. Invest.* 59:443, 1977.
81. Smitherman KO, and Peacock JE. *Med. Clin. N. Am.* 79, 53-77, 1995.
82. Stokes RW, and Thorson LM. Speert Nonopsonic and opsonic association of *Mycobacterium tuberculosis* with resident alveolar macrophages is inefficient. *J. Immunol.* 160:5514-5521, 1998.
83. Thomas AM et al. Divergent Role of Gamma Interferon in a Murine Model of Pulmonary versus Systemic *Klebsiella pneumoniae* Infection. *Infect. Immun.* 70: 6310-6318, 2002.
84. Van Furth R, Hirsch JG, and Fedorko ME. Morphology and peroxidase cytochemistry of mouse promonocytes, monocytes and macrophages. *J. Exp. Med.* 132:794-805, 1970.

85. Vidya VK, Deborah LW, and Renee CL. Increased atherosclerosis in streptozotocin- induced diabetic mice. *J. Clin. Invest.* 97(7): 1767-1773, 1996.
86. Wang JH, Liu YC, and Lee SS et al. Primary liver abscess due to *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin Infect Dis.* 26:1434-1438, 1998
87. Wei JN et al. Prevalence and hospitalization rates of diabetes mellitus in Taiwan, 1996-2000. *Taiwan J. Public Health.* 21 (3): 173-180, 2002..
88. Wen-Chien KO, David L et al. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *CDC.* 8, 2002.
89. William J. Martin and Rajamouli Pasula. *AM.J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23:4, 434-435, 2000.
90. Williams P, and Tomas JM. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. *Rev. Med. Microbiol.* 1:196-204, 1990.
91. Williams P, and Tomas JM. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. *Rev. Med. Microbiol.* 1:196-204, 1990.
92. Yang PY et al. *Klebsiella pneumoniae* bacteremia : community-acquired v.s. nosocomial infection. *Chang Gung MED. J.* 24: 688-96, 2001.
93. Yokochi T, Nakashima I, and Kato N. Effect of capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* on the differentiation and functional capacity of macrophages cultured in vitro. *Microbiol. Immunol.* 21:601-610, 1977.
94. 行政院衛生署 91 年死因簡要統計。



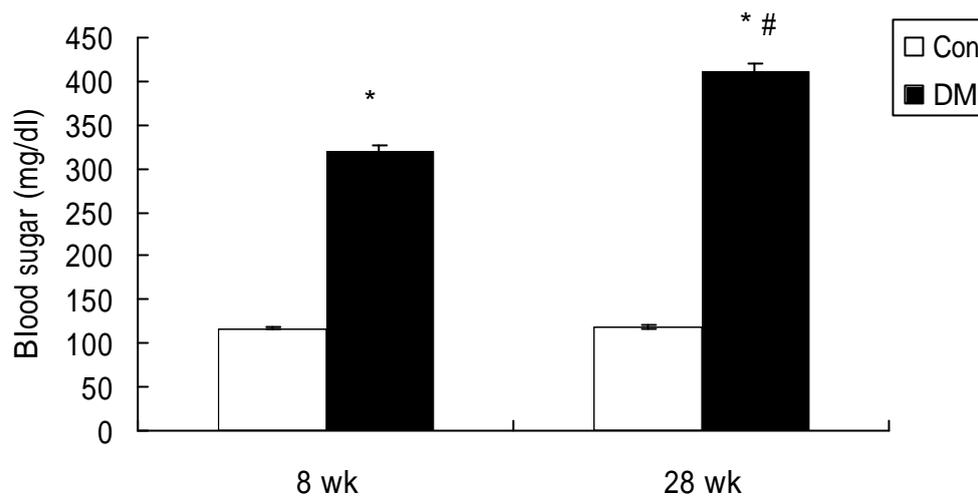
圖一、 *Klebsiella pneumoniae* 相關致病因子

(Podschun and Ullmann, 1998)

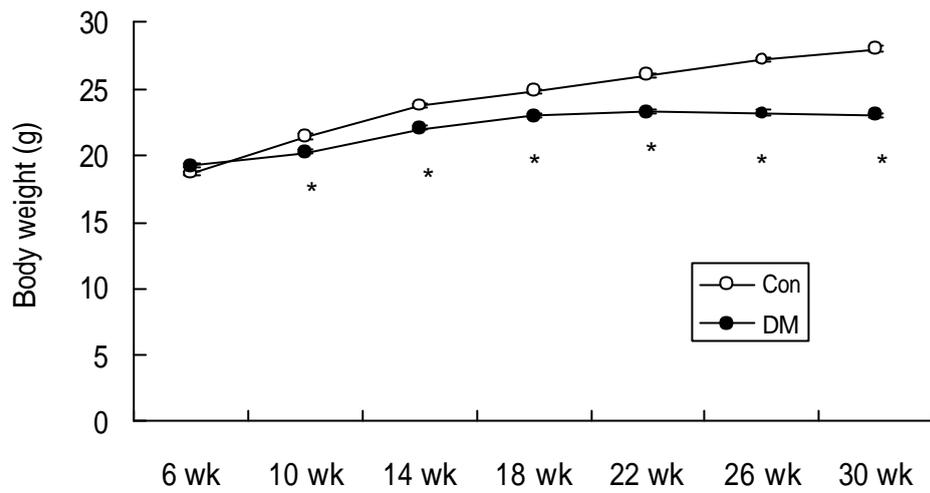


圖二、Alveolar macrophage 之殺菌機制

(DeCoursey and Grinstein, 1999)

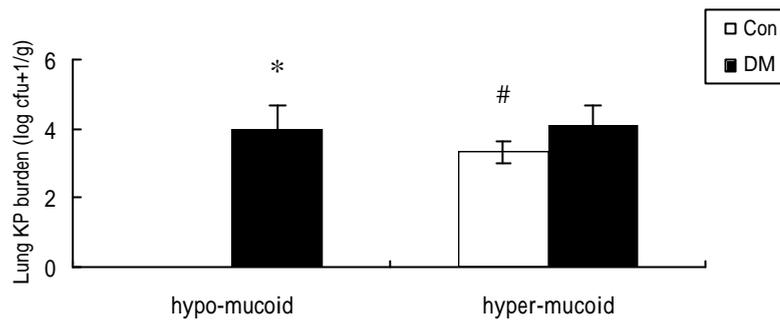


圖三、糖尿病小鼠血糖值比較。小鼠於 6 週齡時腹腔注射 STZ，誘發產生糖尿病，控制組小鼠(Con)與糖尿病組小鼠(DM)第八週齡與第二十八週齡之血糖值。控制組與糖尿病組小鼠 $n = 46$, $*P < 0.05$, DM vs. Con ; $\#P < 0.05$, DM at 28 wk vs. 8 wk。

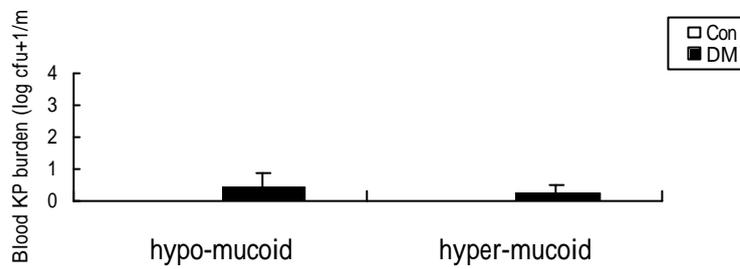


圖四、糖尿病小鼠體重變化。6週齡小鼠腹腔注射 STZ 誘發產生糖尿病，控制組(Con)小鼠與糖尿病組(DM)小鼠各週齡體重紀錄。控制組與糖尿病組小鼠 $n = 46$ ， $*P < 0.05$ ，DM vs. Con。

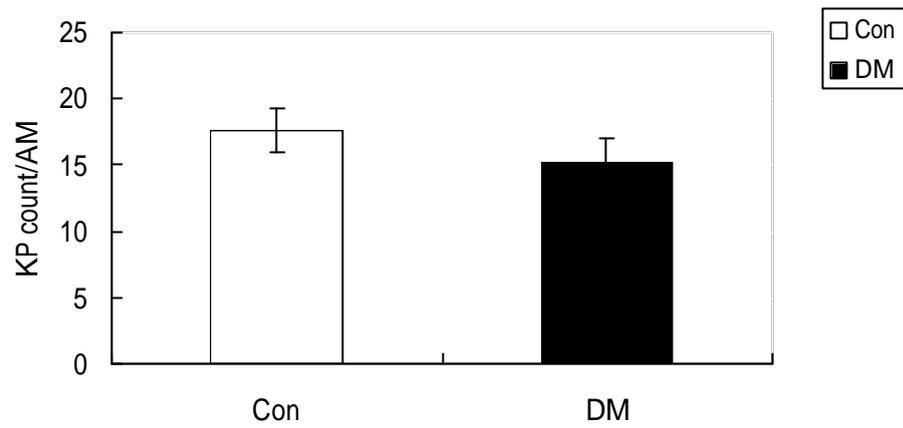
A.



B.

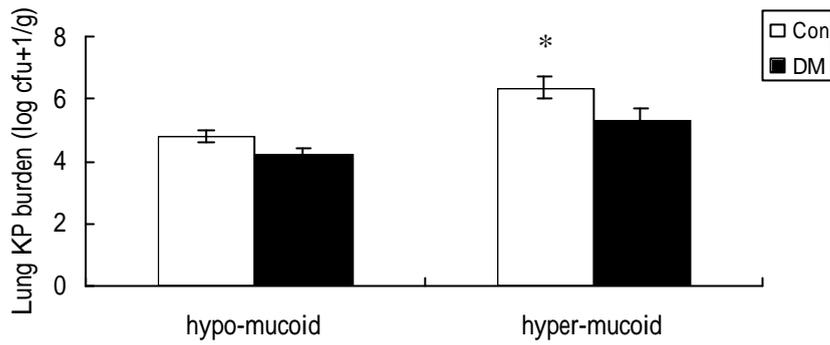


圖五 正常與 DM 小鼠肺部感染 KP1004n (hypo-mucoid) 與 KP1004m (hyper-mucoid) 20 小時後, 在肺部(A)及血液(B)中的 KP 菌落數 A. 控制組 (Con) 小鼠與糖尿病組 (DM) 小鼠 $n = 4$, $*P < 0.05$, DM vs. Con in hypo-mucoid group ; $^{\#}P < 0.05$, Con in hyper-mucoid group vs. hypo-mucoid group。 B. 控制組 (Con) 小鼠與糖尿病組 (DM) 小鼠 $n = 3$ 。

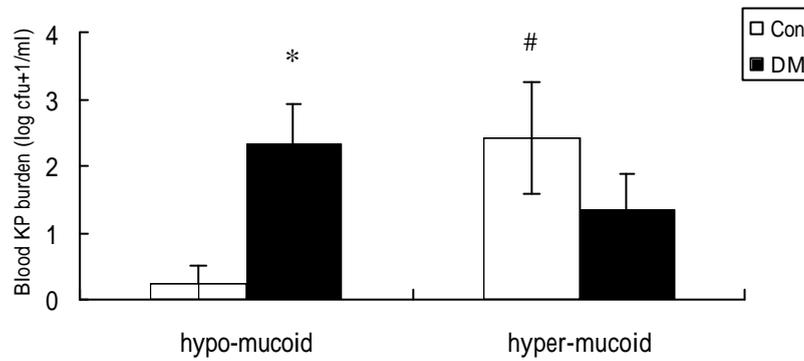


圖六 糖尿病小鼠肺泡巨噬細胞 (AM) 對 hyper-mucoid KP (KP1004m) 的吞噬量。控制組(Con)小鼠與糖尿病組(DM)小鼠 n = 5。

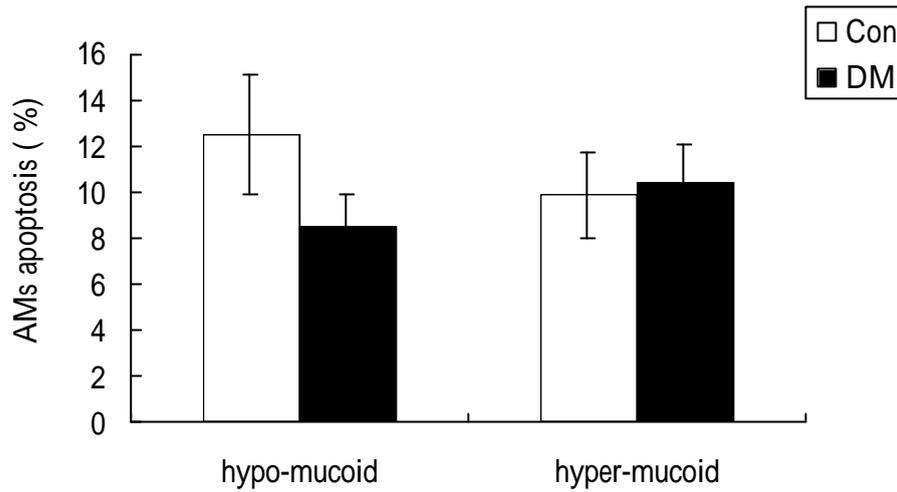
A.



B.

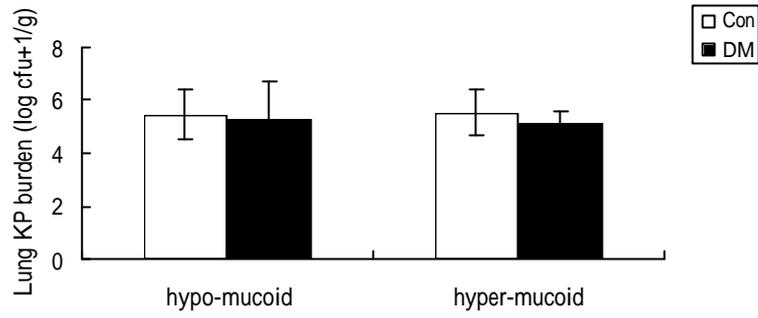


圖七、正常與 DM 小鼠肺部感染 cluster A 的 paired KP (hypo-mucoid : KP1084/hyper-mucoid : KP1112) 20 小時後，在肺部(A)及血液(B)中的 KP 菌落數。A. 控制組 (Con) 小鼠與糖尿病組 (DM) 小鼠 $n = 5$, $*P < 0.05$, Con in hyper-mucoid group vs. hypo-mucoid group。B. 控制組 (Con) 小鼠與糖尿病組 (DM) 小鼠 $n = 4$, $*P < 0.05$, DM vs. Con in hypo-mucoid group ; $\#P < 0.05$, Con in hyper-mucoid group vs. hypo-mucoid group。

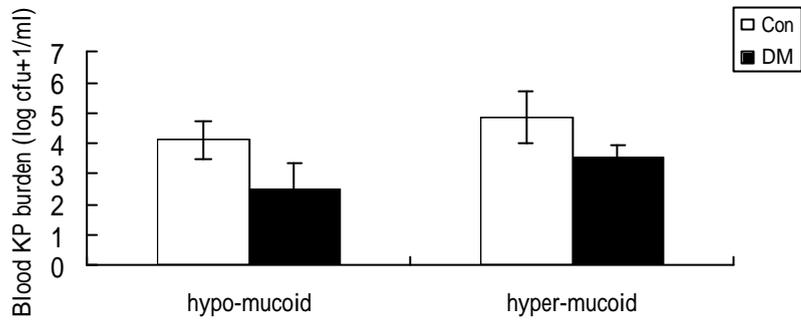


圖八、Cluster A 的 paired KP (hypo-mucoid : KP1084/hyper-mucoid : KP1112)感染小鼠肺部 20 小時後，以流氏細胞儀(FACScan)分析正常與 DM 小鼠肺泡巨噬細胞(AM)之凋亡百分比。控制組 (Con) 小鼠與糖尿病組 (DM) 小鼠 n = 4。

A.

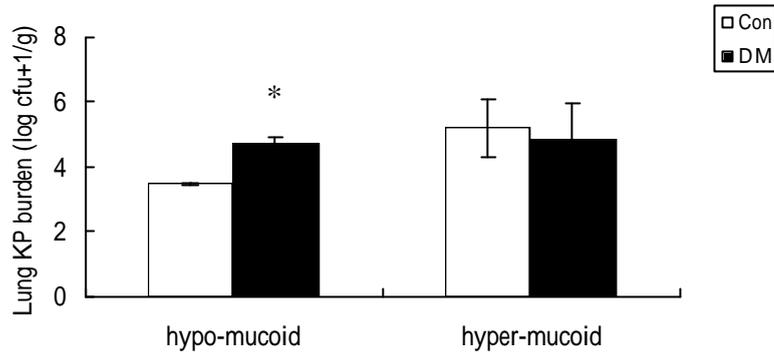


B.

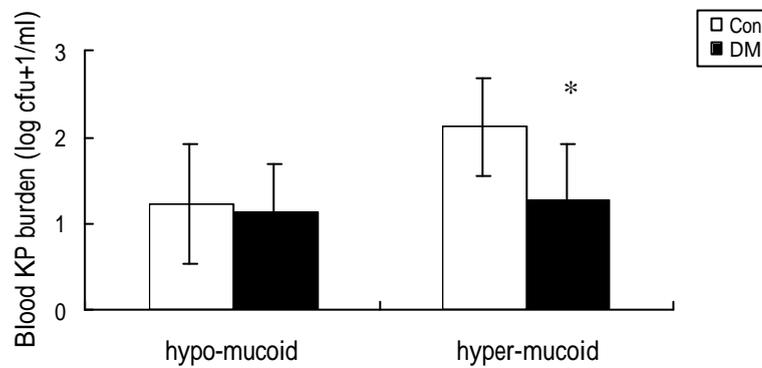


圖九、正常與 DM 小鼠肺部感染 cluster A 的 paired KP (hypo-mucoid : KP1084/hyper-mucoid : KP1112) 40 小時後，在肺部(A)及血液(B)中的 KP 菌落數。A. 控制組 (Con) 小鼠與糖尿病組 (DM) 小鼠 n = 3。
B. 控制組 (Con) 小鼠與糖尿病組 (DM) 小鼠 n = 3。

A.

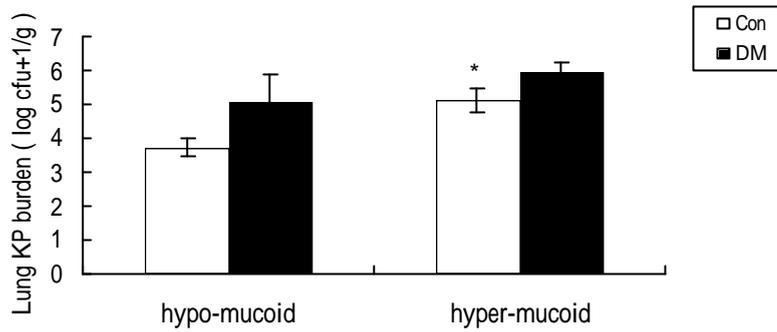


B.

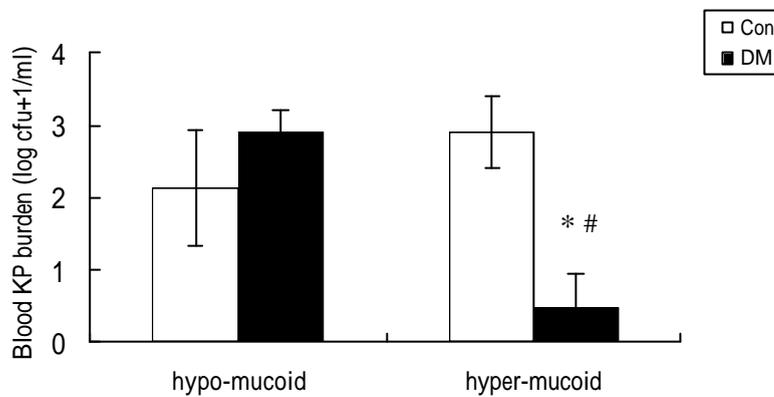


圖十、正常與 DM 小鼠肺部感染 cluster B 的 paired KP (hypo-mucoid : KP1008/hyper-mucoid : KP2002) 20 小時後，在肺部(A)及血液(B)中的 KP 菌落數。A. 控制組 (Con) 小鼠與糖尿病組 (DM) 小鼠 $n = 3$, $*P < 0.05$, DM vs. Con in hypo-mucoid group。B. 控制組 (Con) 小鼠與糖尿病組 (DM) 小鼠 $n = 3$, $*P < 0.05$, DM vs. Con in hyper-mucoid group。

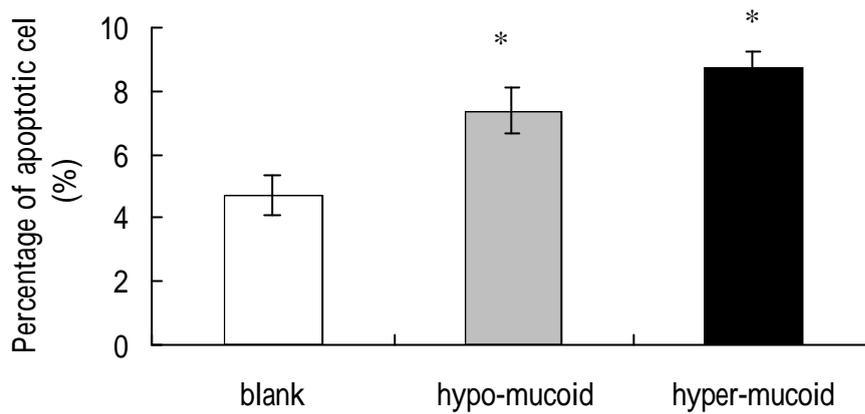
A.



B.

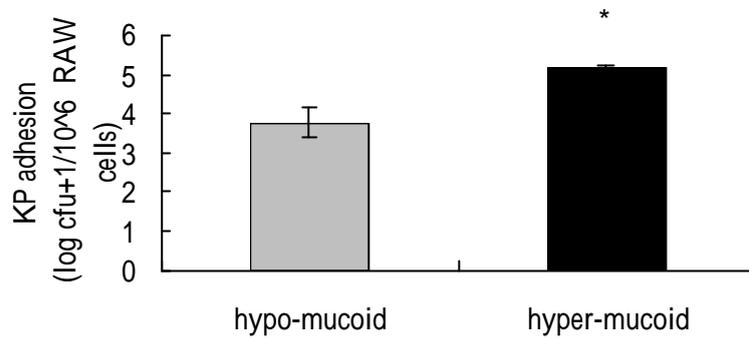


圖十一、正常與 DM 小鼠肺部感染 cluster C 的 paired KP (hypo-mucoid : KP1283/hyper-mucoid : KP1284) 20 小時後，在肺部(A)及血液(B)中的 KP 菌落數。A. 控制組 (Con) 小鼠 $n = 4$ ，糖尿病組 (DM) 小鼠 $n = 3$ ， $*P < 0.05$ ，Con in hyper-mucoid group vs. hypo-mucoid group。B. 控制組 (Con) 小鼠 $n = 4$ ，糖尿病組 (DM) 小鼠 $n = 3$ ， $*P < 0.05$ ，DM vs. Con in hyper-mucoid group； $\#P < 0.05$ ，DM in hyper-mucoid group vs. hypo-mucoid group。

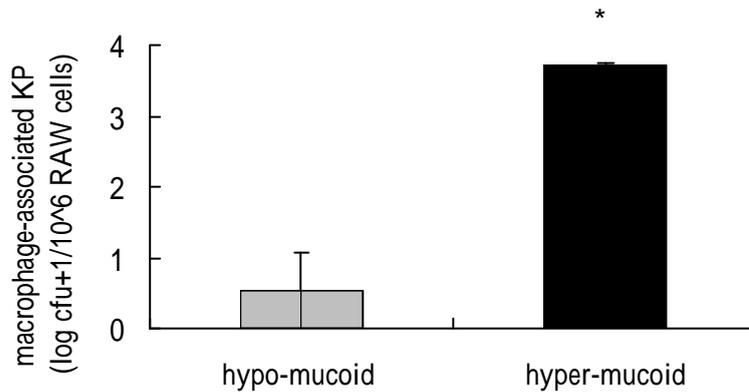


圖十二、 Cluster A 的 paired KP (hypo-mucoid : KP1084/hyper-mucoid : KP1112) 感染老鼠巨噬細胞株 (RAW 264.7) 所誘發之細胞凋亡 (inducing-apoptosis) blank 組 : 未感染之 RAW 264.7 細胞, hypo-mucoid 組 : 感染 hypo-mucoid KP (KP1084) 之 RAW 264.7 細胞, hyper- mucoid 組 : 感染 hypo- mucoid KP (KP1084) 之 RAW 264.7 細胞, 以上各組 n = 3 , * $P < 0.05$, hypo-/ hyper- mucoid vs. blank。

A.

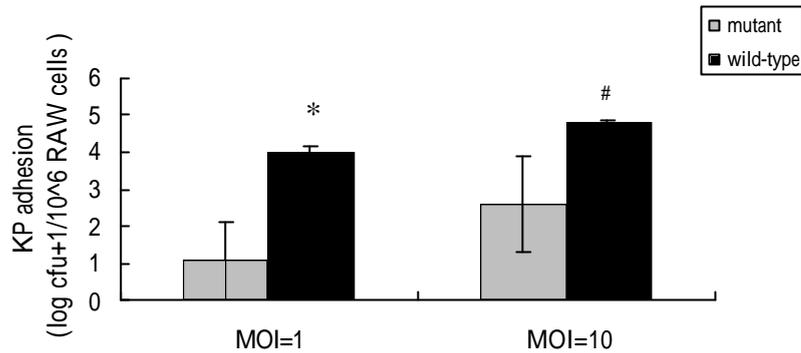


B.

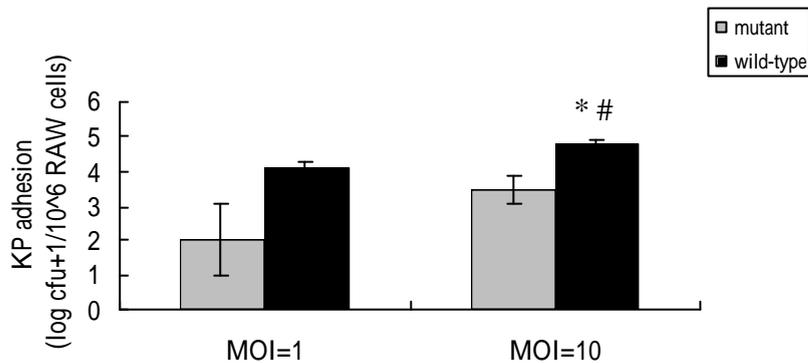


圖十三、 Cluster A 的 paired KP (hypo-mucoid : KP1084/hyper-mucoid : KP1112)感染老鼠巨噬細胞株 (RAW 264.7) , KP 對細胞株的附著 (adhesion)與 KP 在巨噬細胞內存活的菌落數。 A. Hypo-/hyper-mucoid KP 感染後(0 小時)對細胞株附著的菌落數 , 各組 n= 3 ; B. Hypo-/hyper-mucoid KP 在巨噬細胞內存活的菌落數 , 各組 n= 5 , * $P < 0.05$, hyper- mucoid vs. hypo-mucoid。

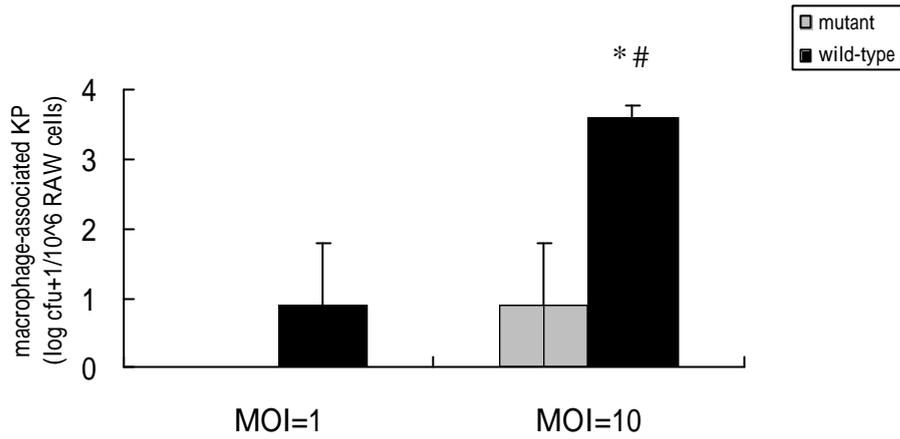
A.



B.



圖十四、突變株 KP (mutant : KPG6)與野生株 KP (wild type : KP1112) 依照 MOI=1 與 MOI=10 分別感染老鼠巨噬細胞株 (RAW 264.7) , KP 對細胞株附著(adhesion)之菌落數。 A. mutant /wild type KP 感染後(0 小時)對細胞株附著的菌落數。 B. mutant /wild type KP 感染後 1 小時 對細胞株附著的菌落數。 以上各組 n= 3 , * $P < 0.05$, wild type vs. mutant ; # $P < 0.05$, wild type in MOI= 10 group vs. MOI= 1 group。



圖十五、突變株 KP (mutant : KPG6)與野生株 KP (wild type : KP1112) 依照 MOI=1 與 MOI=10 分別感染老鼠巨噬細胞株(RAW 264.7) , KP 在巨噬細胞內存活的菌落數 , 以上各組 n = 3 , * $P < 0.05$, wild type vs. mutant ; # $P < 0.05$, wild type in MOI= 10 group vs. MOI= 1 group。

作者簡歷

作者姓名：陳靜嫻

出生日期：民國六十六年十二月十五日

出生地：台灣省嘉義市

學歷：民國八十九年六月畢業於中國醫藥學院護理系

民國九十三年六月畢業於中國醫藥大學醫學研究所生理科