

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

中藥治療敗血症之細胞凋亡表徵研究-三年的研究(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2320-B-039-036-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：中國醫藥大學中醫學系

計畫主持人：林國瑞

共同主持人：蔡金川

計畫參與人員：李貞穎、張禮財

報告類型：精簡報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 6 月 9 日

一、計畫中文摘要：

關鍵詞：敗血症(sepsis)、細胞凋亡(apoptosis)、中藥、死亡率(mortality)

敗血症在加護病房是導致死亡常見的疾病，在美國每年有超過 50 萬人有敗血症之疾病，且約有壹拾柒萬五千人死亡。敗血症的結果，導致身體內產生許多發炎的物質(如細胞介質，自由基等等)，會使細胞和器官受損，導致器官衰竭，目前許多的研究都是針對抗發炎來治療敗血症，例如抗內毒素、抗細胞介質。但治療的成績效果皆未達理想。

最近在許多報告中，細胞凋亡(apoptosis)已被證明是敗血症中會引起身體的淋巴系統細胞死亡的很重要的原因。假如敗血症使身體存在發炎抗進的狀態，細胞凋亡可能對身體有益，可以減少淋巴球產生過多的發炎細胞介質，相反的，淋巴球的凋亡而減少淋巴系統防禦，可能使敗血症對抗細菌的防禦系統減少而有害敗血症的痊癒。目前此觀念非常類似中醫學的理论，陰陽需調和，過陰過陽對身體都不好，需要有陰陽平衡，如此在整個抵禦淋巴系統平衡的狀態下，可能對身體之防禦有好處。

另外，細胞凋亡受到許多因子的調控，其中包括有 bcl-2 gene family、caspase inhibitors、NF- κ B、Fas/CD95、TNF-R1、TRAIL-R1、TRAIL-R2 的調控。bcl-2 為抗細胞凋亡的成員，此蛋白質產物 bcl-2 可在免疫系統遭受大量抗原刺激時，防止細胞凋亡，包括：組織缺氧、血清和生長因子不足、腎上腺促糖皮質激素的刺激和離子放射線等等。caspase inhibitor 可防止淋巴細胞走向細胞凋亡。而 NF- κ B 在發炎反應過程中及細胞存活與否扮演很重要的角色。Fas/CD95 為死亡訊息的接受器，在敗血症時會被活化，導致細胞凋亡，但是其他像 TNF-R1、TRAIL-R1、TRAIL-R2 的作用，目前尚未明確。

實驗欲觀察中藥與單一成分藥能否對敗血症誘導的淋巴球細胞凋亡的各種調控因子，如：bcl-2、TNF- α 、Fas-lig 等各種機轉去解明，並研究中藥治療敗血症生存的機率之改善及機轉，以及存活率也是用來研究中藥與單一成分藥能否使在臨床上為敗血症的小鼠，研究觀察其對淋巴球細胞的凋亡有關調控的作用。

二、計畫英文摘要：

Keywords : Apoptosis, sepsis, mortality, Herb drug

Sepsis is the leading cause of death in many intensive care units (1). The Centers for Disease Control estimated that over 500,000 people develop sepsis and 175,000 die annually in the United States alone (1). Recently, apoptosis has been identified as an important cause of lymphocyte cell death in sepsis (2–4). Sepsis results in activation of numerous proinflammatory mediators, which may damage cells and result in organ injury. A major focus of sepsis research has been the development of antiinflammatory strategies, e.g., antiendotoxin or anticytokine agents (5). If a hyperinflammatory state exists, apoptosis may be beneficial to the host by eliminating lymphocytes that produce excessive proinflammatory cytokines (4, 5). Conversely, lymphocyte apoptosis may be harmful in sepsis by causing depletion of lymphocytes that are essential for defense against invading microorganisms (4, 5).

Apoptosis is modulated by many factors, including *bcl-2* gene family, caspase inhibitors, NF- κ B, Fas/CD95, TNF-R1, TRAIL-R1 and TRAIL-R2. Bcl-2 which contains both pro- and antiapoptotic members (6-8). The protein product Bcl-2 can prevent apoptotic cell death from a wide array of adverse stimuli, including hypoxia, serum and growth factor withdrawal, glucocorticoids, and ionizing irradiation, among others (9, 10). Caspase inhibitors prevent lymphocyte apoptosis and protect mice from sepsis-induced death. NF- κ B plays a pivotal role in inflammatory process and in cell survival. Fas/CD95 had been evoked in experimental or human sepsis, but others such as TNF-R1, TRAIL-R1 or TRAIL-R2 have not been studied at present time.

The present experiments are performed to determine whether Herb drug and their pure compound could prevent sepsis-induced lymphocyte apoptosis. Survival studies are also undertaken to show whether prevention of lymphocyte apoptosis could result in an improvement in survival in a clinically relevant animal model of sepsis.

三、報告內容：

1.前言--

敗血症(Sepsis)會打擊每一個人，它主要是由感染所引起。其定義為人體免疫系統對感染產生的全身性發炎反應；此種反應原是人類本能抑制感染的防衛機轉，但是若發生過度的免疫發炎反應時，會引起敗血性休克(Septic shock)及多重器官功能異常症候群[Multiple Organ Dysfunction Syndrome(MODS/MOF)]的現象產生，最後導致極高的死亡率【11】。雖然對於敗血症及其併發症致病機轉的認識和治療的研究有長足的進步，敗血症的死亡率仍沒有改善。目前許多研究都是針對抗發炎來治療敗血症,例如抗內毒素、抗細胞介質。但治療的成績效果未達理想。

美國流行病學的研究顯示：每年敗血症的發生案例約有七十五萬個病案，只有 50%到 70%存活率，其至少造成 22 萬人的死亡發生；根據統計，在加護病房的敗血症死亡率約在百分之 30 至 50 之間，佔美國死亡主因的第 11 位。同樣的，在衛生署民國 90 年台灣地區死亡原因的統計公報中，敗血症佔國人主要死因的第 13 位，但在老年人口中則為第 12 位；因為敗血症具有如此高的發生率及死亡率，要如何治療，一直是醫學界相當棘手的問題。

2.研究目的--

敗血症在加護病房是導致死亡常見的疾病，在美國每年有超過 50 萬人有敗血症之疾病，且約有壹拾柒萬五千人死亡。最近在許多報告中，細胞凋亡(apoptosis)已被證明在敗血症中會引起身體的淋巴系統細胞死亡的很重要的原因，敗血症的結果，導致身體內產生許多發炎的物質(如細胞介質，自由基等等)，會使細胞和器官受損，許多的研究都是針對抗發炎來治療敗血症，例如抗內毒素、抗細胞介質。

假如敗血症使身體存在發炎抗進的狀態，細胞凋亡可能對身體有益，可以減少淋巴球產生過多的發炎細胞介質，相反的，淋巴球的凋亡而減少淋巴系統防禦，可能使敗血症對抗細菌的防禦系統減少而有害敗血症的痊癒。目前此觀念非常類似中醫學的理論，陰陽需調和，過陰過陽對身體都不好。另外，細胞凋亡受到許多因子的調控，其中包括有 bcl-2 gene family、caspase inhibitors、NF- κ B、Fas/CD95、TNF-R1 的調控。

本實驗欲觀察中藥與單一成分藥能否對敗血症誘導的淋巴球細胞凋亡的各種調控因子，如：bcl-2、TNF- α 、Fas-lig 等各種機轉去解明，並研究中藥治療敗血症生存的機率之改善及機轉，以及 survival study 也是用來研究中藥與單一成分藥能否使在臨床上為敗血症的小鼠，研究觀察其對淋巴球細胞的凋亡有關調控的作用。

3.文獻探討—

敗血症及敗血性休克是嚴重的臨床癥候群，是某種微生物或其產生的毒性侵入血流的結果。發冷發熱，心動過速，呼吸急促，精神改變是敗血症常見的急性臨床表現【11-14】。當出現低血壓和器官灌流不足等體徵時，稱之為敗血性休克。循環機能不全的特徵為血管系統阻力降低，心肌收縮功能降低，微循環鬱滯及血液分佈發生改變，彌漫性細胞和組織損傷，最於導致多器官功能衰竭，即使採用適當的抗菌藥物治療並加強護理，許多病人仍死於敗血性休克。由此使預防及更有效的治療策略顯得極為重要。【11】

敗血症的表現，見於各種微生物引起的嚴重的全身性感染。然而，明顯的休克，最常見是由革蘭陰性細菌引起的，佔病例的 60%~70%。由於血液內微生物產物的相互影響，特別是革蘭陰性桿菌內毒素作用於宿主的中介物質系統，觸發敗血症和休克的發生【11,15-17】。

在外科加護病房，敗血症是導致死亡的最主要原因；而在小兒及內科加護病房，敗血症卻是大部分發生率及死亡率的原因。在美國的疾病控制中心，每年將近有 500,000 的人發生

敗血症，而有 175,000 的人死亡【11】。近來，已有報告指出細胞凋亡在敗血症及內毒素動物實驗中，扮演者細胞死亡的重要機制【19-23】。

細胞凋亡 (apoptosis) 是強調它是一種自然的生理過程，也稱它作細胞計畫性死亡 (programmed cell death; PCD)，或是細胞自殺 (cell suicide)【24-27】。早在 1951 年首先由 Glucksmann 觀察肝細胞死亡的情形所發現的【28】。之後，於 1972 年由 Kerr 和 Searle 稱此種細胞死亡的型式為細胞計畫性死亡【29】。

細胞死亡的方式大致可分為細胞壞死 (necrosis) 和細胞凋亡 (apoptosis) 兩大類。細胞壞死的形態特徵是膜通透性增加、細胞外形發生不規則變化、內質網擴張、核染色質不規則的位移、線粒體及核腫脹、溶酶體破壞、細胞膜破裂、胞漿外溢，這種死亡過程常引起炎症反應【24】。

這種死亡過程不導致溶酶體及細胞膜破裂，沒有細胞內涵物外泄，故不引起炎症反應和周圍組織的次級損傷。它的結局是被吞噬細胞或鄰周細胞所識別、吞噬，或自然脫落而離開生物體。其生物化學反應主要是胞漿內 Ca^{2+} 濃度增加，脂質氧化增加，漿膜的轉運功能不變，蛋白質發生降解，核酸內切酶被激活，染色質 DNA 被核酸內切酶在核小體單位之間降解，產生若干寡核甘酸片段，在瓊脂糖凝膠電泳上呈現階梯狀 DNA 區帶圖譜 (DNA ladder)，這些區帶可由 50~300kb 的 DNA 片段組成，或進一步降解為不同倍數的 180~200 個鹼基對的寡核甘酸片段，這個長度即是核小體重覆單位的大小【30】。

有報告指出，在創傷與敗血症發炎反應過程中，細胞凋亡可以被種種的壓力性中介物 (包括 glucocorticoids, inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF), prostanoids, etc) 所誘發【24-26, 31-33】。有証證據顯示，在誘發的敗血症模式中，胸腺是呈獻加速性的細胞凋亡【19, 21, 34-35】。

在細胞凋亡的傳遞路徑中，參與的分子有三大類【24】：(1) FasL/Fas 及 TNF/TNFR：這類蛋白質分子位於細胞膜表面，其功能在接受外來訊息，導致細胞凋亡。(2) Bcl-2 family：存在粒線體膜上，受細胞內壓力刺激後其結構會改變，使粒線體的膜電位產生變化，此變化關係著細胞凋亡是否被誘發【36】。(3) Caspase family：此類分子在細胞凋亡過程裡扮演多種角色，包括訊息傳遞、執行細胞凋亡等。

4. 研究方法—

A、實驗設計：

將 C57BL/6/J mice 分成 4 組，組 (a) (b) 各 5 隻，組 (c) (d) 各 10 隻，組別如下所示：(a) PBS 實驗組；(b) 中藥實驗組-三黃瀉心湯、瀉清丸、大承氣湯 (c) K.pneumonia 實驗組；(d) K.pneumonia+中藥實驗組-三黃瀉心湯、瀉清丸、大承氣湯；實驗進行前均不給予任何藥劑，正常供水及飲食。實驗一開始，組(a.)給予同體積之 PBS;組(b.)給予同體積之 PBS;組(c.)腹腔注射 K.pneumonia (5×10^7)/0.5ml；組(d.)腹腔注射 K.pneumonia (5×10^7)，30 分鐘後，組(a.)給予 PBS 0.1c.c/10g;組(b.)給予中藥 (0.25-0.1g/kg);組(c.) 同體積之 PBS;組(d.) 給予中藥 (0.25-0.1g/kg);各組分別在 12 小時後犧牲。解剖取下胸腺秤重，一部分組織抽 DNA 作 DNA 洋菜膠電泳，一部分組織以 10%福馬林固定以即將進行 HE stain 及免疫組織化學染色分 (immunohistochemical assay)，觀察 caspase-3 的變化；並做免疫螢光分析，分析胸腺細胞之次細胞株群數目與百分比。一部分組織磨碎後取細胞，準備細胞懸浮，並利用 Hemacytometer 來決定細胞數目。而細胞存活率 (Viability) 則由 trypan blue exclusion method 來決定。

B、敗血症的誘導

利用 *K.pneumonia*，藉由腹腔注射（每 0.5ccPBS 含 5×10^7 個細菌），而誘導小鼠敗血症的發生。注射於老鼠腹腔中的菌株先在培養基中，37℃ 下過夜搖晃培養，直到產生每毫升約 10^8 到 10^9 個細菌，然後種在新的培養基中進行次培養 3 小時後使用。細菌數目是利用 Turbidimetric assay 來測定。用 0.5 毫升含有 5×10^7 個細菌的 PBS 緩衝溶液對老鼠進行腹腔內注射，控制組則包括 0.5 毫升的 PBS 緩衝溶液注射及單純給中藥處理兩組，共三組。在腹腔注射細菌及中藥（0.25-0.1g/kg）再繼續培養小鼠 12 小時，再取小鼠之胸腺。

C、細菌的定量

在 blood agar (BAP) 培養 18~24 小時於 37°C 培養箱，再以比濁法 (Beckman DU-640, Spectrophotometer, Beckman Instruments; Somerset, N.J., U.S.A.) 定量細菌的濃度。(OD₆₀₀=1，其細菌的濃度約為 1×10^8 CFU/ml)。

D、胸腺重量及細胞數目的測定：

After time intervals, the mice are sacrificed and the thymus is removed and weighted using a balance with an accuracy to 0.0001 g. Cell viability of the total population was estimated by the trypan blue exclusion method, as described previously (8). Adding an equivalent volume of trypan blue solution to an aliquot of resuspended cells. Stained and unstained cells were counted in a hemacytometer. Mean values obtained represent data of triplicates from each separate experiment.

E、DNA 片段之純化

犧牲各組老鼠，抽取脾臟細胞 DNA 的方法如前一方法所示。將 Lysate 在 4°C，13,000 xg 下，離心 10 分鐘。含有 DNA 片段的上清液先與 Proteinase K (0.1 mg/ml) 在 50°C 下培育過夜，再以 RNase A (50ug/ml) 37°C 下培育 30 分鐘。接著以 Phenol、Pheno1/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) 來抽取 DNA，然後以 50% isopropanol 及 glycogen (20μg) 在零 20°C 下培育 3 小時，將 DNA 沈澱出來。沈澱物以 80% 酒精沖洗、乾燥，再溶入 10 μl (Tris-HCl)-EDTA 緩衝溶液。接著將此溶液進行 DNA 洋菜膠電泳，使用的緩衝液中為含有 2 mM EDTA, 90 mM Tris/borate 之緩衝液 (pH 8.0)。電泳之後，將洋菜膠以 Ethidium bromide (1μg/ml) 染色，再以 UV light 照射觀察。

F、組織病理學檢驗—HE stain

將胸腺組織以 10% 中性福馬林固定，再以脫水滲蠟機脫水，並進行石蠟包埋後用切片機切成 3μm 切片備用。以 H/E 染色方法染色（步驟如下），於光學顯微鏡下做組織病理變化之觀察。

G、流式細胞儀：

將各組小鼠解剖取下脾臟、胸腺、腸繫膜淋巴結磨碎，收集細胞，細胞用含有 1% BSA 和 0.01% 的 PBS 洗 2 次，紅血球以低張的 ice-cold ammonium chloride 溶解。細胞用 PBS 重懸浮，然後再加入不同的螢光抗體標記。在冰中培育 30-45 分鐘之後，再以冰冷之 HBSS 洗兩次。以含有 2% FCS 及 0.1% NaN₃ 之 HBSS 將懸浮液中的細胞濃度調整到 1×10^6 細胞/毫升。染色的細胞以 Flowcytometry (FACScan, Becton-Dickinson, Mountain View CA) 來分析脾臟細胞之次細胞株群數目與百分比，使用光波長為 488nm。(Becton Dickinson).

5. 結果—

A. 敗血症引發小鼠胸腺萎縮的動態變化

將分別處理過的 C57BL6/J 小鼠，於 12 小時後，分別取出胸腺，精秤重量，結果如圖 1 所示，在給予小鼠 *K.pneumonia* 12 小時後，胸腺重量明顯萎縮，但敗血症組與治療組之間並沒有顯著的差別。而細胞數目，結果如圖 2 所示，敗血症組的胸腺細胞數目降至最低。然而

細胞的存活率，結果如圖 3 所示，敗血症組的細胞存活率並沒有很明顯地下降，反而是中藥治療組的細胞存活率降至最低。而此種胸腺的萎縮和細胞數目減少的原因可能是胸腺細胞的大量死亡。而於 DNA 膠體電泳實驗中即可觀察到胸腺細胞 DNA 有片段化的情形，其 DNA 片段大約為 180~200bp，結果如圖 4 所示。明顯地，敗血症造成胸腺的萎縮和細胞死亡，是藉由所謂細胞計劃性死亡的途徑而造成的。

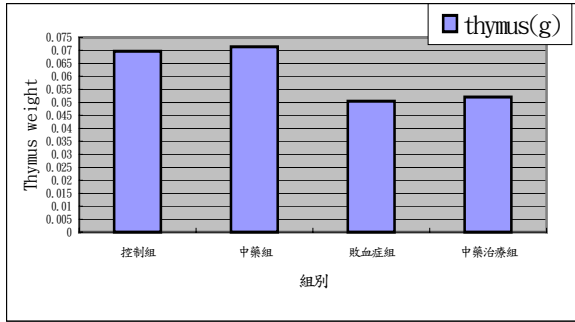


圖 1：胸腺重量 (g)

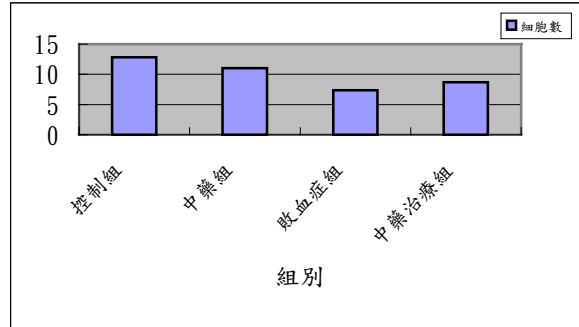


圖 2：胸腺細胞數目 (x10⁷)

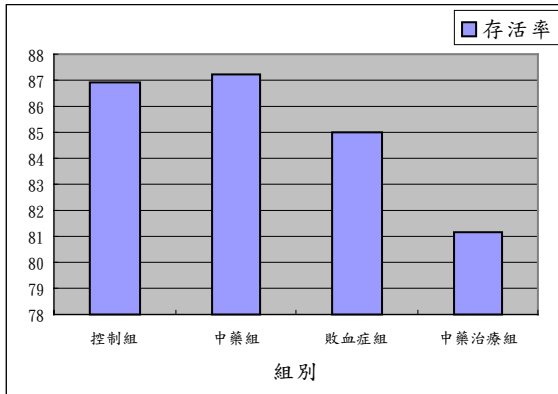


圖 3：胸腺細胞存活率 (%)

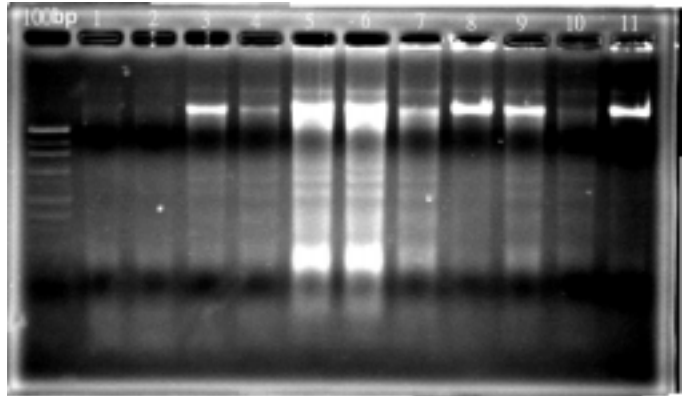


圖 4：Lane1，為 PBS 控制組；Lane2、3，為中藥控制組；Lane4、5、6、7，為敗血症組；Lane8、9、10、11，為敗血症中藥治療組。

D. Flow Cytometry：Apoptosis 定量

結果如圖 5 所示，在敗血症組中的胸腺細胞，細胞凋亡的量明顯比其他組來得多而達到最高。其次是中藥治療組。有趣的是，控制組的胸腺細胞在晚期凋亡細胞中是占最高比率的，而敗血症組的胸腺細胞在早期凋亡細胞中是最高的，如圖 6 所示。

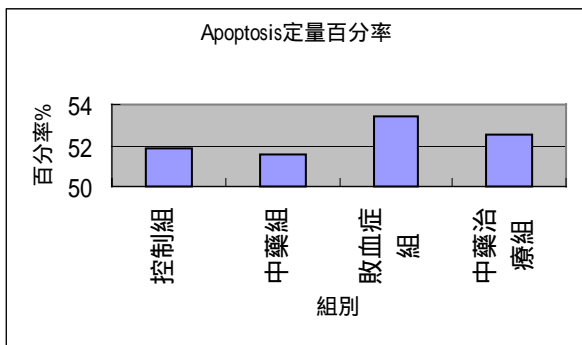


圖 5：胸腺細胞凋亡定量百分率 (%)

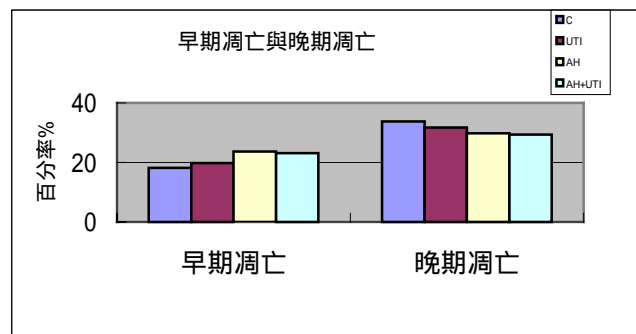


圖 6：胸腺細胞早期凋亡與晚期凋亡

E. Flow Cytometry：免疫螢光分析 (CD3、CD4、CD8、)

由上述實驗發現，敗血症小鼠的胸腺細胞數目明顯地減少。為了想要更深入探討胸腺細

胞的大量死亡，是屬於何種胸腺細胞次群的改變所造成的現象。因此利用免疫螢光分析法來追蹤敗血症小鼠之胸腺細胞次族群的變動情形。結果如圖 7 所示，以 $CD4^+CD8^+$ 胸腺細胞下降最明顯，其次是 NK cell 數目亦下降。有趣的是， $CD4^+CD8^-$ 胸腺細胞在受到細菌刺激 24 小時後，其細胞數目有明顯的上升，其次是 $CD4^-CD8^+$ 胸腺細胞上升，此細胞的變化暗示著 $CD4^+CD8^-$ 胸腺細胞可能受到 *K.pneumonia* 的刺激而活化。由此可知，敗血症會造成胸腺內 $CD4^+CD8^+$ 胸腺細胞的大量減少，而使得胸腺萎縮。

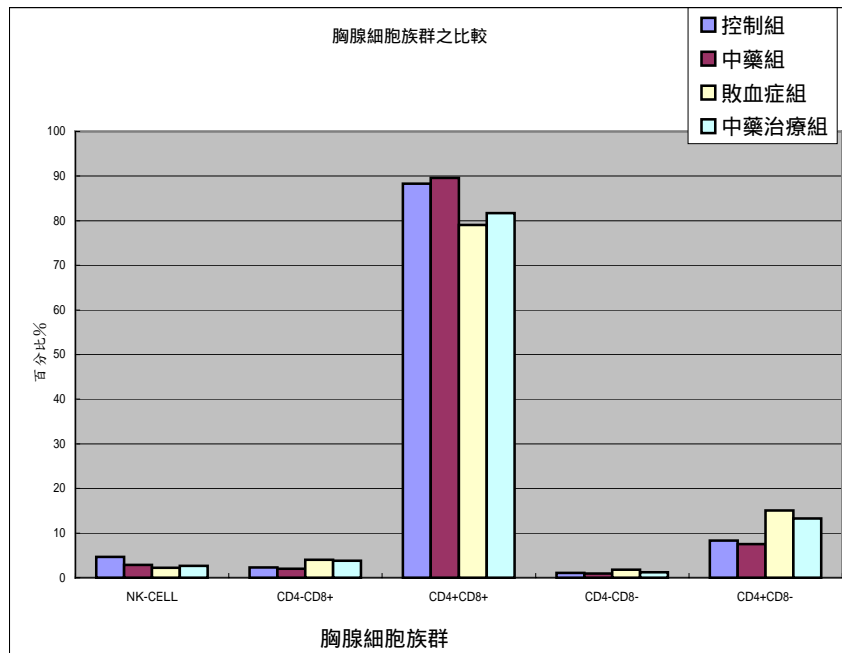


圖 7：胸腺細胞族群

6. 討論

由 *K.pneumonia* 所釋放的外毒素中，其成分包含 hemolysins, enterotoxins 將會造成 T 淋巴球的製造工廠，即胸腺的萎縮。從上述的結果中，胸腺細胞的死亡是走向所謂的細胞計劃性死亡 (apoptosis)，而不是 necrosis。

為什麼胸腺細胞走向細胞凋亡而不是細胞壞死？有可能是 *K.pneumonia* 細菌的外毒素成分中有與胸腺細胞細胞膜上的凋亡受體結合，而走向 apoptosis。也有可能是宿住因抗原的刺激，而釋放的調節因子與自身胸腺細胞細胞膜上的凋亡受體結合，而走向 apoptosis。

從病理組織染色及免疫組織化學染色結果中，可以發現胸腺細胞凋亡的區域大部分出現在胸腺的皮質部。而在免疫螢光分析的結果中，可以知道胸腺細胞的減少以 $CD4^+CD8^+$ 胸腺細胞下降最明顯，這一細胞是屬於不成熟的 T 細胞，而胸腺的皮質部分就是以不成熟的 T 細胞主。而比較成熟的 T 細胞主要集中在胸腺的髓質層。

然而從免疫螢光分析的結果中， $CD4^+CD8^-$ 胸腺細胞在受到細菌刺激 24 小時後，其細胞數目有明顯的上升，此細胞的變化可能是受到 *K.pneumonia* 的刺激而活化。由此可知，敗血症會造成胸腺內 $CD4^+CD8^+$ 胸腺細胞的大量減少，而使得胸腺萎縮。

從胸腺重量的結果可以看到，敗血症小鼠的胸腺明顯萎縮，但敗血症組與中藥治療組之間並沒有顯著的差別。而在免疫組織化學染色中也同樣有類似的結果，就是中藥治療組的凋亡現象-caspase3 並沒有顯著降低。這些現象告訴我們中藥的治療效果並沒有比預期的好。而從胸腺細胞的存活率來看，治療組是最低的。另外從小鼠的存活率來看，雖然說治療組的存活率是比敗血症組來的高，但這兩者之間的差異並不大。造成這種種的結果，推測可能的原因是治療組並沒有達到有效的藥物劑量。

而從 DNA 膠體電泳實驗及 Apoptosis 定量中可觀察到中藥治療組也有細胞凋亡的現象，

這一結果告訴我們中藥沒有完全阻止細胞凋亡的作用，但是具有降低細胞凋亡的作用。

另一方面，從單一注射中藥來看，各結果都顯示中藥並不會對胸腺造成任何影響，也不會去刺激胸腺細胞各 T 細胞次群的改變。這樣的現象或許告訴我們中藥並不會對個體造成影響。

7. 參考文獻—

1. Stone, R. ,1994. *Science* **264**, 365–367.
2. Wang, S. D., Huang, K. J., Lin, Y. S. & Lei, H. Y. ,1994. *J. Immunol.* **152**, 5014–5021.
3. Ayala, A., Herndon, C., Lehman, D., DeMaso, C., Ayala, C. & Chaudry, I. ,1995 *Shock* **3**, 259–268.
4. Hotchkiss, R. S., Swanson, P. E., Cobb, J. P., Jacobson, A., Buchman, T. G. & Karl, I. ,1997.*Crit. Care Med.* **25**, 1298–1307.
5. Bone, R. C. ,1996. *Crit. Care Med.* **24**, 1125–1129.
6. Korsmeyer, S. J., Shutter, J. R., Veis, D. J., Merry, D. E. & Oltvai, Z. N. ,1993. *Cancer Biol.* **4**, 327–335.
7. Reed, J. C. ,1997.*Nature (London)* **387**, 773–776.
8. Kroemer, G. ,1997. *Nat. Med.* **3**, 614–620.
9. Sentman, C. L., Shutter, J. R., Hockenbery, D., Kanagawa, O. & Korsmeyer, S. J. ,1991. *Cell* **67**, 879–886.
10. Strasser, A., Harris, A. W. & Cory, S. ,1991.*Cell* **67**, 889–899 .
11. HARRISON'S Principles of Internal Medicine, 15/e
12. Morrison, D.C. 1987. Endotoxin and disease. *Annu. Rev. Med.* **38**:417.
13. Parillo, J.E. 1989. The cardiovascular pathophysiology of sepsis. *Annu. Rev. Med.* **40**:469.
14. Glauser, M.P., Zanetti, J.D., Baumgartner, and J. Cohen. 1991. Septic shock: pathogenesis. *Lancet* **338**:732-736.
15. Duma, R.J. 1985. Gram-negative bacillary infections: pathogenic and pathophysiologic correlates. *Am. J. Med.* **78**:154.
16. Kreger, B.E., Craven, D.E., and McCabe, W.R. 1980. Gram-negative bacteremia. IV. Re-evaluation of clinical features and treatment in 612 patients. *Am. J. Med.* **68**:344.
17. Marshall, N.E., and Ziegler, H.K. 1991. Lipopolysaccharide responsiveness is an important factor in the generation of optimal antigen-specific T cell responses during infection with Gram-negative bacteria. *J. Immunol.* **147**:2333-2339.
18. Stone, R. 1994. Search for sepsis drugs goes on despite past failures. *Science* **264**:365.
19. Wang, S.D., Huang, K.J., Lin, Y.S. & Lei, H. Y., 1994. Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *J. Immunol.* **152**:5014.
20. Grigg, J.M., Savill, J.S., Sarraf, C., Haslett, C., and Silvenman, M. 1991. Neutrophil apoptosis and clearance from neonatal lungs. *Lancet* **338**:720.
21. Barke, R.A., Roy, S.B., Chapin, R., and Charboneau. 1994. The role of programmed cell death (apoptosis) in thymic involution following sepsis. *Arch. Surg.* **129**:1256.
22. Ayala, A., Herndon, D., Lehman, C., DeMaso, C., Ayala, C., and Chaudry, I. 1995. The induction of accelerated thymic programmed cell death during polymicrobial sepsis: control by corticosteroids but not tumor necrosis factor. *Shock* **3**:259

23. Ayala, A., C. D. Herdon, D. Lehman, and I. H. Chaudry. 1996. Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: variation in onset, frequency, and nature of the mediators. *Blood* 87:4261.
24. Robbins Pathologic Basis of Disease
25. Schwartz LM, Osborne BA: Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunol Today* 14:582, 1993
26. Cohen JJ, Duke RC, Fadok VA, Sellins KS: Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 10:267, 1992
27. Distaso B, Youle RJ: Programmed cell death and the immune system: Physiopathological implications of apoptosis. *J Immunol Res* 3:14, 1991
28. Glucksmann, A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.* 26:59, 1951.
29. Kerr, J. F. R., A. H. Wyllie, and J. Searle. *Curr. Opin. Cell Biol.* Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239, 1972.
30. Allen PD, Bustan SA, Newland AC. The role of apoptosis (programmed cell death) in haemopoiesis and the immune system. *Blood Rev.* 1993;7:63-73.
31. Cook JA, Li E, Halushka PV: Arachidonic acid metabolism in endotoxemia and sepsis: Therapeutic approaches, in Faist E, Meakins JL, Schildberg FW(eds): *Host Defense Dysfunction in Trauma, Shock and Sepsis: Mechanisms and Therapeutic Approaches*. Berlin, Germany, Springer-Verlag, 1993, p297.
32. Calvano SE: Glucocorticoid-immune system interactions in injury and sepsis, in Faist E, Meakins JL, Schildberg FW(eds): *Host Defense Dysfunction in Trauma, Shock and Sepsis. Mechanisms and Therapeutic Approaches*. Berlin, Germany, Springer-Verlag, 1993, p331.
33. van der Poll T, Lowry SF: Tumor necrosis factor in sepsis: Mediator of multiple organ failure or essential part of host defense? *Shock* 3:1, 1995
34. Ayala A, Lehman DL, Herdon CD, Chaudry IH: Accelerated thymic apoptosis during polymicrobial sepsis is driven by corticosteroids but not by tumor necrosis factor. *Surg Forum* 45:112, 1994
35. By Alfred Ayala, Crystal D. Herdon, Donna L. Lehman, Carol A. Ayala, and Irshad H. Chaudry. Differential induction of apoptosis in lymphoid tissues during sepsis: Variation in onset, frequency, and the nature of the mediators. *Blood*, Vol 87, no10(May 15), 1996:pp 4261-4275.
36. John C. Reed. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *NATURE* Vol.387.19 JUNE 1997.

第 59 回日本消化器外科學會定期學術總會於 2004 年 7 月 21 日～7 月 23 日於日本舉行，有許多國家的專家代表參加。在會議中將可以看見日本做研究的嚴謹及謹慎的精神，有許許多多是值得我們取法之處。此次大會，林國瑞所長還將應邀回母校—日本國立茲賀醫科大學演講，演講題目及內容如下：

Expression of TLR2 and TLR4 in protease inhibitors treated human monocyte with SARS-spike protein. K.J. Lin¹, J. C-H Lin², K. Hanasawa³, T. Tani³. ¹Dept. Surgery, China Medical University Hospital, #2 Yu-Der Rd. Taichung, Taiwan . ²Dept. Biochemistry, University of Lethbridge, 4401 University Drive Lethbridge Alberta Canada. and ³Dept. Surgery, Shiga University of Medical Science, Otsu, Shiga, Japan.

In 1990, LPS was shown to bind to CD14 on the surface of mononuclear phagocytic cells. Monocyte responsiveness to LPS is dependent upon CD14 and receptors of toll-like receptor (TLR) family. Spike proteins of coronavirus, including the coronavirus that causes severe acute respiratory syndrome (SARS), associate with cellular receptors to mediate infection of their target cells. In our study, we investigated SARS-spike protein treated by protease inhibitors (FOY, Futhan and urinastatin) in vitro, and the expression of TLR2 and TLR4 by flow cytometry in human monocyte. Healthy human volunteers were enrolled in this study. Whole blood was collected in CPT Vacutainer tubes, then monocytes were isolated by Percoll gradient. We found that the express of TLR4 in human monocyte with SARS-spike protein treated by protease inhibitors was not changed, but TLR2 was decreased about 10~20% . We also find that medium containing 10% FBS activated the expression of TLR2 in human monocytes.