

一、計畫中文摘要：

關鍵詞：嚴重急性呼吸道症候群(SARS)、monocytes、cytokine、中藥、TLR(Toll-like receptor)

嚴重急性呼吸道症候群(SARS)這是世界衛生組織(WHO)於三月十五日新公布名稱，在這之前稱非典型肺炎。此事件開始於 2003 年二月廿六日越南河內的一位美國商人發病就醫，後來送香港治療後死亡。之後在香港、越南陸續出現非典型肺炎合併有呼吸道衰竭案例。其特點為發生瀰漫性肺炎及呼吸衰竭，較過去所知病毒、細菌引起的非典型肺炎嚴重，因此取名為嚴重急性呼吸道症候群。

SARS 到目前為止的台灣統計數據，約有可能病例 678 例、以出院病例 498 例、已死亡病例 84 例，SARS 似乎並不像流感傳染力那麼強，不過現在國際間旅遊頻繁，仍有快速散布至全球的危險。雖然已經嘗試使用幾種藥物，但是到目前為止，仍無預防或治療的建議用藥，抗生素並無效果。假如 SARS 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 SARS 對抗病毒的防禦系統減少而有害 SARS 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，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。

當 sepsis 時，其與感染的出現有關。SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) 與感染或非感染有關(Fig.1)。SARS 的臨床表徵就是 sepsis，在 Bone(1)的研究中指出，感染後生理之變化會產生 cytokine syndrome，機體又可相應地表現出代償性抗炎反應綜合症候群 (compensatory anti-inflammatory response syndrome, CARS)。而由 SIRS 過渡到 MODS (Multiple Organ Dysfunction Syndrome), 實際上就是 SIRS、MARS (Mixed Anti-inflammatory Response Syndrome) 與 CARS 相互作用, 由平衡到失衡的結果 (Fig. 2)。倘若失衡，則會導致 CHAOS，意即有休克、細胞凋亡、多器官功能衰竭以及免疫系統受抑制等狀況會產生。

目前發現 SARS 多發生於成人，學齡前孩童的病例少，且有研究指出 Human Cytomegalovirus 會經由 CD14 和 Toll-like receptor 2 將訊息傳遞至細胞內，活化 MAPK、NF κ B 等，使發炎反應產生 cytokines(2)。如果能在此路徑上阻斷 Toll-like receptor 與 SARS 病毒的結合或阻斷路徑中任何一個激酶的活化，均有可能降低 cytokines 的產生，並減少過度的發炎反應。

SARS 治療過程就如敗血症之演變由休克進而到 MODS，因此本實驗欲觀察在體外，於 SARS-CoV S protein 刺激之細胞激素風暴期所使用的益氣固脫（清營湯）之中藥治療 SARS-associated Coronavirus 對 monocytes 的影響，從檢測 cytokine(TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8、IL-10 and IL-12)、CD marker(CD 14)及 TLR-2(Toll-like receptor)、TLR-4、NF κ B 之蛋白表現量來評估 SARS-CoV S protein 與 monocytes 細胞死亡的關係及益氣固脫（清營湯）之中藥在 SARS-CoV S protein 對 monocytes 的影響與作用機制，進而探討中藥對發炎基因反應的影響，並且可以此實驗模式去篩選更多的中藥。

Fig.1

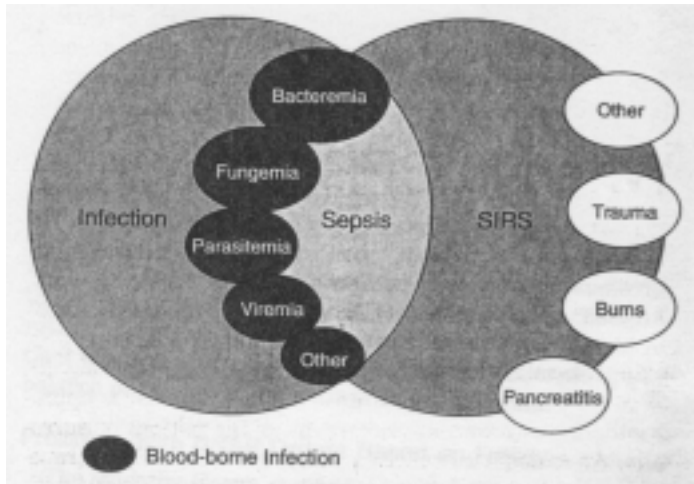
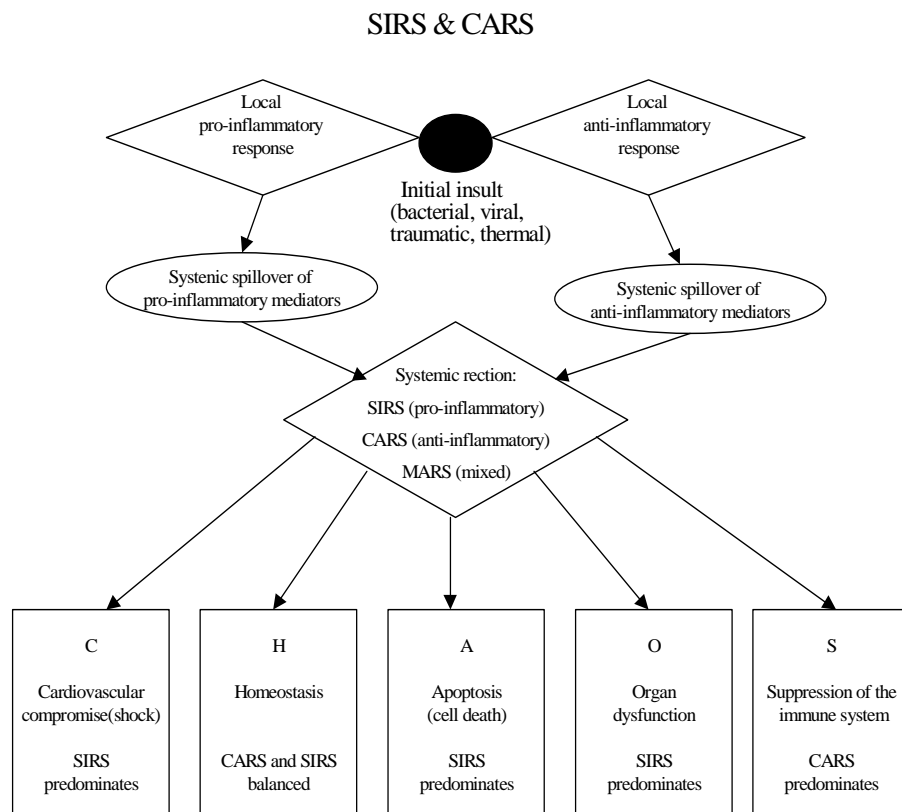


Fig.2



二、計畫英文摘要：

Keywords : SARS 、 monocytes 、 cytokine 、 Herb drug 、 TLR(Toll-like receptor)

A worldwide outbreak of severe acute respiratory syndrome(SARS) has been associated with exposures originating from a single ill health care worker from Guangdong Province,China.Taiwan. As of March 25, the Taiwan Department of Health has reported six probable cases. Dates of illness onset ranged from February 25 to March 17.Of these six ill persons, four reported travel to Guangdong province and Hong Kong during the week before illness onset; none of them had stayed at hotel M. The other two cases occurred in family members of the first patient. Two patients required mechanical ventilation but have improved clinically.(3)

Rangel-Frausto et al.(4) show that a diagnosis of SIRS is very sensitive and correlates with mortality and organ dysfunction as manifest by disseminated intravascular coagulation, the acute respiratory distress syndrome, acute renal failure, and shock. They present convincing epidemiologic evidence for the hypothesis that SIRS represents a hierarchical continuum of an increased inflammatory response to infectious and noninfectious stimuli, since end-organ dysfunction and mortality increased with each stage of the inflammatory response. While sepsis is associated with the presence of infection, SIRS can be associated with either infectious or noninfectious insults (eg, trauma, burns, and pancreatitis) (Fig 1).

If the compensatory anti-inflammatory reaction is sufficiently severe, it will manifest clinically as anergy(5,6), an increased susceptibility to infection (5,7-9), or both. I have dubbed these findings the "compensatory anti-inflammatory response syndrome" (CARS).The interaction between pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators can be viewed as a battle between opposite forces, which are often unbalanced (Fig.2)These mediators interact initially in the microenvironment. If the mediators balance each other and the initial result is overcome, homeostasis is restored. If not, proinflammatory and anti-inflammatory mediators may be found in the systemic circulation. If balance cannot be established there and homeostasis is not restored,a massive proinflammatory reaction(SIRS) or an anti-inflammatory reaction (CARS) will ensure.

It is possible that compared monocytes infected by SARS-CoV S protein in vitro determines the fate of monocytes, thereby possibly having an enormous impact on the process of inflammation and the development of tissue injury. The purpose of this study ,one is to investigate how SARS-CoV S protein influence the fate of monocytes in vitro, the other is performed to determine whether Herb drug could prevent SARS-CoV S protein -induced immune response of monocytes ,and moreover, to realize the mechanisms, CD marker(CD 14),the protein expression of TLR-2(Toll-like receptor) 、 TLR-4 、 NF κ B,cytokine levels, monocytes death will be measured.

目 錄

一、計畫中文摘要.....	I
二、計畫英文要.....	III
三、計畫內容.....	1
1. 前言.....	1
2. 研究目的.....	1
3. 文獻探討.....	1
4. 研究方法.....	2
5. 結果.....	3
6. 討論.....	5
7. 參考文獻.....	6

三、報告內容：

1.前言--

中國醫學對抗疫疾已有三千多年經驗，而中醫學與嚴重急性呼吸道症候群(SARS)最相關聯的疫情及醫學發展就是寒病與溫病。前者見於東漢後期，由張景仲《傷寒論·序》(10)得知其死亡率甚高；後者發展於明清，由於國際交流及交通發達，促使疫疾席捲各地，以吳又可《瘟疫論》(11)、葉天士、吳鞠通、王孟英等溫病學說之爭鳴，可見其嚴重性。從疾病的發生來看，中醫認為外邪必須在人體正氣內虛、抗病力弱時才能入侵人體發生疾病。但當邪毒熾盛時，則正氣略弱者染病率與死亡率將大幅升高，正如《內經素問·刺法論》(12)所說：「五疫之至，皆相染易，無問大小，病狀相似。」，由 SARS 臨床表現可確認它是邪毒熾盛之瘟疫。因一般人染病病狀相似，在一般外感與內傷病所強調之體質辨症論治就較不重要；反之，因臨床傳化迅速，針對邪毒病因入裏傳化之病程分期分症辨症論治成為討論本病首要重點。

2.研究目的--

本子計畫，擬以細胞激素風暴期所使用的益氣固脫（清營湯）之中藥觀察在體外，治療 SARS-CoV S protein 對 monocytes 的影響，再從檢測 cytokine(TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8、IL-10 and IL-12)、CD marker(CD 14)及 TLR-2(Toll-like receptor)、TLR-4、NF κ B 之蛋白表現量來評估 SARS-CoV S protein 與 monocytes 細胞死亡的關係及益氣固脫（清營湯）之中藥在 SARS-CoV S protein 對 monocytes 的影響與作用機制，進而探討中藥對發炎基因反應的影響，並且可以此實驗模式去篩選更多的中藥。

3.文獻探討—

SARS 的分期辨症，依初期、肺炎期、衰竭期與恢復期的臨床病情變化給藥。

一、病毒入侵初期：症狀表現以上呼吸道感染、咳嗽、高熱表現為主者，屬邪入肺衛，以銀翹散與麻杏仁時肝湯何方為主，功能在辛涼解表。動員體內的免疫系統對抗病毒。臨床上，在依溼熱的輕重，佐量給予「藿朴夏苓湯」或「三仁湯」

二、肺炎期：病人呼吸困難、X光片表現肺部間質組織浸潤、高熱反覆，屬毒熱熾盛、氣營兩燔，以清溫敗毒散、甘露消毒丹加減，瀉火解毒，加強抗病毒，抑制過度抗進的免疫反應，減少組織破壞以控制肺炎。

三、衰竭期：病人出現神智昏沉嗜睡、肺部氣體交換功能不足、血氧偏低、電解質紊亂、淋巴球下降等現象，屬熱入下焦、少陰厥陰兩虛，用復脈湯合參附湯加減，以益氣固脫，加強心肺功能與調整電解質。

四、恢復期：理論上，如病人能經及時治療，由肺炎期或衰竭期好轉進入恢復期，體力尚未完全復原，容易疲倦，口乾，偶有低熱、食慾不振，屬氣陰兩虛、餘熱未清，宜以清暑益氣湯加減，清除病毒免疫大戰後產生的代謝廢物與自由基，兼平補元氣，促進體力復原。

細胞激素風暴期，約在發病 7-14 天，肺炎嚴重發展期，多在發病後 7-14 天左右。臨床的突出表現為氣促喘悶明顯，或伴有紫紺，重者可出現邪入營血，氣竭喘脫。治療上在祛邪的同時必須重視扶正，可選用清營湯、清宮湯合生脈、復脈湯加減，同時可佐以活血化瘀、化痰除濕之藥，以阻止肺炎發展、吸收發炎液，降低呼吸窘迫與插管率。

晚期患者嚴重時喘促煩躁，甚則不能活動，西醫以插管治療，中醫可佐以清營解毒，益氣養陰藥方。而病況危及時，喘促，昏迷自汗，四肢厥逆，脈危欲絕。治以益氣固脫，或兼以辛涼開竅，可選用參附生脈湯送服安宮牛黃丸或紫雪丹以拯救危逆，經過搶救病人仍有希

望存活。

清營湯之藥物組成為生地黄 15 克、玄參 9 克、竹葉心 10 克、麥冬 9 克、丹參 6 克、黃連 5 克、金銀花 9 克、連翹 6 克，其功效主治抗菌，消炎，解毒，調整水液代謝。主要用于：乙型肝炎、流行性腦脊膜炎、腸傷寒、敗血症，見身熱夜甚，心煩不眠，或脈細數者。

4. 研究方法—

A、實驗設計：

抽健康自願者的血，首先以 Ficol-hypaque 的方法收集新鮮的 monocytes，monocytes 以細胞計數器計數，以 1×10^6 cells/ml 放入 24well 中，分別加入清營湯、protease inhibitors 和一組不加中藥的對照組，3hrs 後再加入 **SARS-CoV S protein 刺激**，再檢測 cytokine(TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8、IL-10 and IL-12)、CD marker(CD)及 TLR-2(Toll-like receptor)、TLR-4、NF κ B 之蛋白表現量之結果去分析。

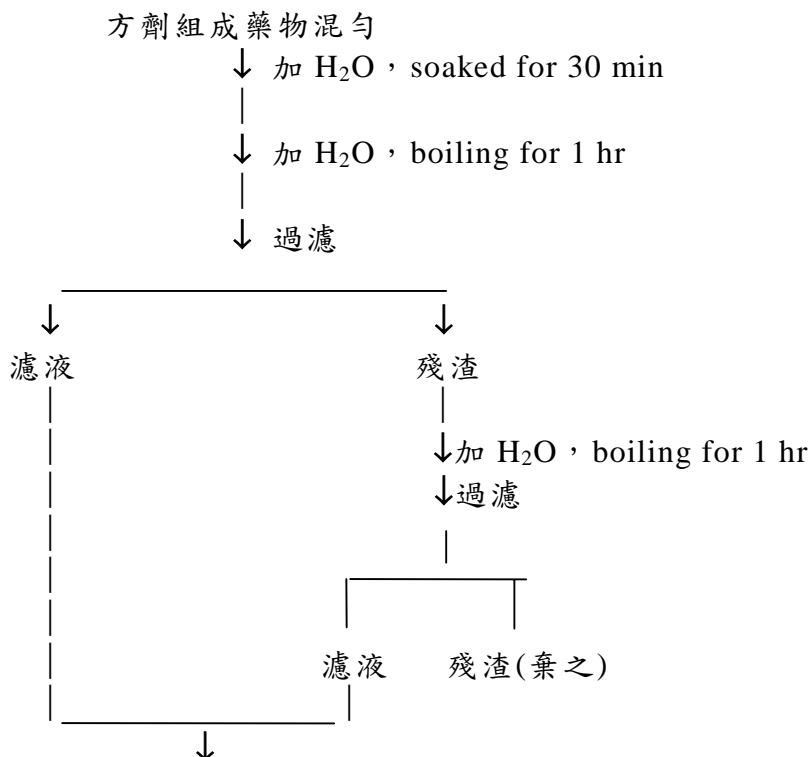
B、中草藥材：

I. 委託中國醫藥學院附設醫院中藥局主任張永勳博士收集並鑑定基源

清營湯：犀角(Rhinocertis Cornu)、生地黄(Rehmanniae Radix et Rhizoma)、玄參(Scrophulariae Radix)、竹葉(BAMBOO LEAF)、麥冬(Creening Li ri ope Root)、丹參(red sage root)、黃連(Coptis Rhizoma)、金銀花(Lonicera japonica Thumb.)、連翹(Forsythiae Fructus)

II. 方劑水抽出物之製備

組成藥物混勻後 → 加水浸漬 30 分鐘 → 以水浴法在攝氏 100⁰ C 連續抽取二回 → 過濾、減壓濃縮 → 冷凍乾燥，得乾燥粉末以備實驗使用(記錄產率)。



濾液合併，減壓濃縮，冷凍乾燥，得乾燥粉末以備實驗使用(記錄產率)。

C、Monocyte isolation

Peripheral blood was obtained from normal volunteer donors after informed consent. Blood was anticoagulated with EDTA, and the platelet fraction was decreased by centrifugation of whole

blood at 1.5 g for 10 min and removing the plasma/platelet layer. Mononuclear cells were then isolated by Ficoll–Hypaque sedimentation. Monocytes were selected by plating the mononuclear cells into Costar flasks in serum free media for 2 h at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂-95% air, and then non-adherent cells were removed. Complete media, Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium supplemented with 1% l-glutamine, 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), 1% penicillin/streptomycin and 50 μ mol/l 2-mercaptoethanol (2-MER), was then added to ready the cells for culture.

D · Cytokine assays

As described previously (14), Tumor necrosis factor (TNF)- α, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12 levels in the cell free supernatants were measured using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay methods (Genzyme Corporation, Cambridge, MA) after 4- and 12-h coculture with or without inactive SARS-associated Coronavirus. For each assay, a standard curve using recombinant cytokine was constructed.

E · Flow cytometry

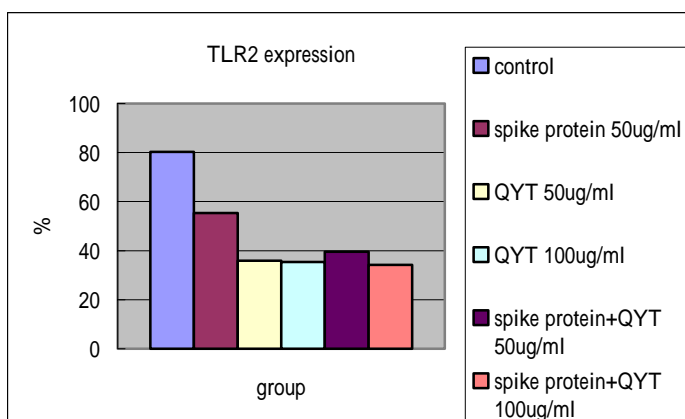
PMN cell death was assessed according to the percentages of PMNs with hypodiploid DNA using the technique described by Nicoletti et al. (15). Briefly, after the coculture with or without SARS-associated Coronavirus, cells were centrifuged, and fixed with 4% ice-cold paraformaldehyde. After washing, cells were incubated with fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-CD 14, CD13, CD4 and CD8 monoclonal antibody (Pharmingen, San Diego, CA) for 30 min at 4 °C to differentiate PMNs from other cellular components or SARS-associated Coronavirus, and propidium iodide (PI) (Sigma, St. Louis, MO) was added to a final concentration of 50 μ g/mL and incubated for 30 min at 4 °C in the dark before analysis. Cells were analyzed using a FACS calibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, USA) and at least 10,000 events were counted per sample.

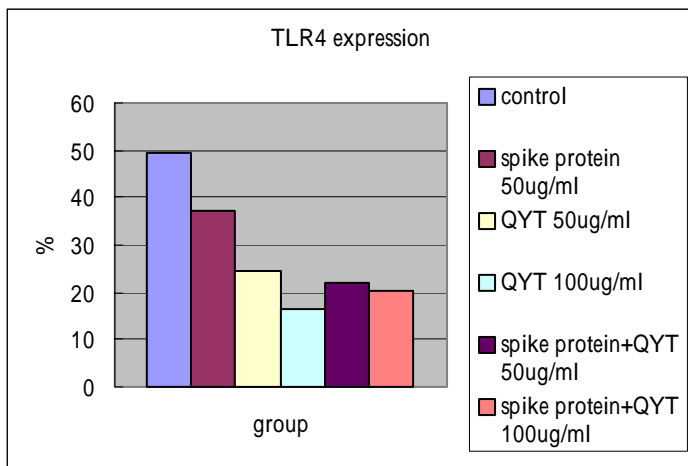
E · 流式細胞儀：

收集細胞，細胞用含有1% BSA和0.01%的PBS洗2次，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1×10⁶ 細胞/毫升。染色的細胞以Flowcytometry (FACSscan, 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).

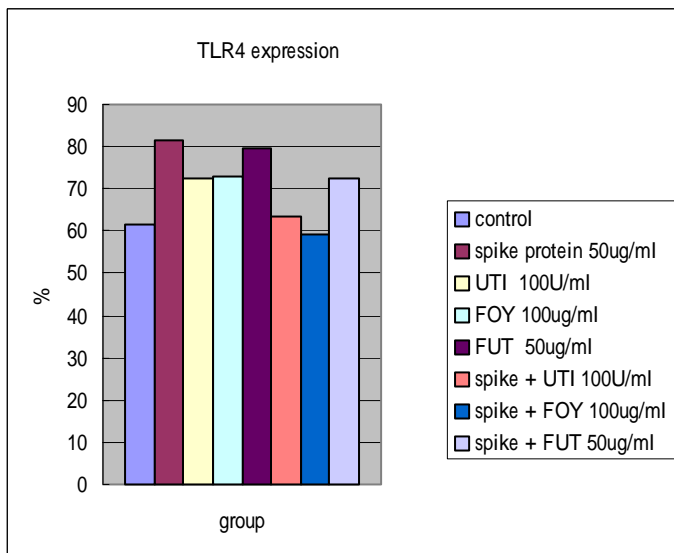
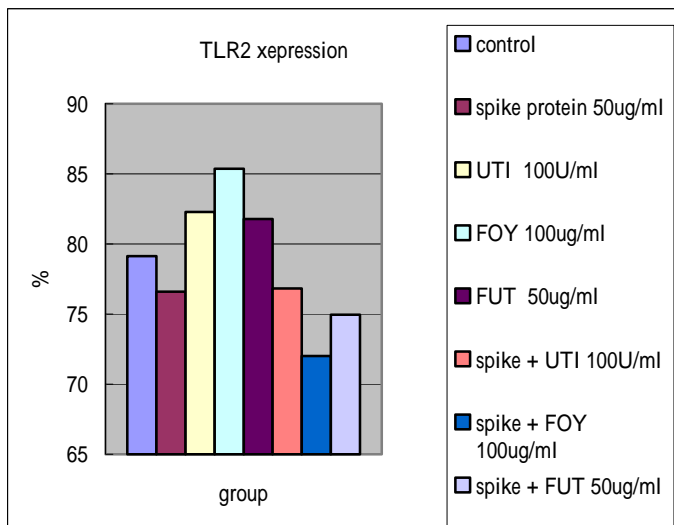
5. 結果—

A. TLR expression





由上面兩個圖表，我們可以看到無論是 TLR2 或 TLR4 在受到 SARS-CoV S protein 刺激以及加中藥治療之後，其表現量都呈下降趨勢。



相同的狀況之下發現，protease inhibitors 本身就會刺激 TLR 的表現上升，以 protease inhibitors 去治療時，表現量反而會呈下降的情況。

B.NFkB expression

本實驗用 EMSA 的方法去偵測 NFkB 的表現，發現並無其表現。

6. 討論—

清營湯，清營的意思，就是清除營分之熱的意思，2003年5月19日《中國中醫藥報》：廣東省中醫院治療 SARS 採用中西醫結合。它的症狀有高熱，發病時體溫 39.00 ± 0.60 ，多伴有關節、肌肉酸痛、惡寒、腹瀉、疲乏、氣促、胸悶、頭痛、咳嗽、噁心、嘔吐等症狀，舌質以紅為主，舌苔以薄黃苔、黃膩苔、白膩苔為主。辨證病位在肺，病變涉及脾胃。採取衛氣營血辨證和三焦辨證進行分期和分型。他們按病情將本病分為早期、中期，極期(高峰期)、恢復期4期。

1. 早期針對濕熱阻遏肺衛、表寒裡熱挾濕等不同證候，治療重在宣透清化，方選三仁湯、升降散、麻杏甘石湯加減。
2. 中期針對濕熱蘊毒、邪伏膜原、邪阻少陽等不同證候，採用清化濕熱、宣暢氣機，選用甘露消毒丹、達原飲、蒿芩清膽湯等方加減。
3. 極期主要針對邪盛正虛、熱入營血以及內閉外脫證候，選用白虎湯、清營湯、犀角湯等方加減。
4. 恢復期要扶正透邪並用，兼以化濕、活血。

本實驗利用正常人的周邊血液單核球，在體外以 SARS-CoV S protein 刺激以及清營湯做治療我們可以看到無論是 TLR2 或 TLR4 都呈下降之趨勢。其原因之一可能是 SARS-CoV S protein 去佔住了 toll-like receptor 的 binding site，使其表現量下降，因此並無發現細胞核內的 NF κ B 的表現。

另外一部份，我們都知道蛋白酶抑制劑 (FOY, FUT, UTI) 已經被發現其在抑制白血球的活化有很多的好處。但是，它們的作用機轉至今尚未完全瞭解。UTI 是一種從人尿中分離純化的蛋白酶抑制劑，是一種分子量 67000D 的糖蛋白。大量研究顯示：當人體受到感染、發熱、腫瘤、妊娠、休克、手術、給予糖皮質激素等刺激時，人體尿液中 UTI (尿胰蛋白酶抑制劑) 活性升高。進一步研究發現，在人血漿內存在較高濃度的蛋白酶抑制劑，而在人體受到嚴重損傷時，其被消耗，濃度明顯下降，但隨人體的恢復，其濃度又回升。這表明 UTI 可能具有抵抗外來刺激，減少外界損傷因子對人體的損傷，維持人體內環境平衡的作用。隨後的充分證實了這一點，大量藥理藥效學研究和臨床研究表明：UTI 具有抑制多種蛋白、糖和脂類的水解酶的活性；抑制炎症介質的過度釋放；改善微循環和組織灌注等重要的藥理作用，從而在人體受到外界損傷時起到保護作用。FOY (gabexate mesilate) 為合成的絲胺酸蛋白酶抑制劑 (serine protease inhibitor)。根據 Tamaki 及 Okamura 等人發表的臨床試驗證實靜脈注射 gabexate mesilate 1-2 mg/kg/hr 可以改善約 50% DIC 病患的臨床症狀及血液參數。其中包括敗血症、白血病、硬腫瘤及感染等疾病引起的 DIC。

本實驗利用正常人的周邊血液單核球，在體外以 SARS-CoV S protein 刺激以及蛋白酶

抑制劑 (FOY,FUT,UTI) 做治療我們可以看到 protease inhibitors 本身就會刺激 TLR 的表現上升，以 protease inhibitors 去治療時，表現量反而會呈下降的情況。

7. 參考文獻—

1. Bone, R. C. ,1996. *Crit. Care Med.* **24**, 1125–1129.
2. Teresa Compton et al: Human Cytomegalovirus activated inflammatory cytokine responses via CD14 and toll-like receptor 2. *J virology* 77(8):4588-4596,2003.
3. T Tsang et al.,2003 *JAMA* 289,1918-1920.
4. Schneiderman LJ et al. Medical futility: its meaning and ethical implications. *Ann Intern Med.* 1990;112:949-954.
5. Hotchkiss, R. S., Swanson, P. E., Cobb, J. P., Jacobson, A., Buchman, T. G. & Karl, I. ,1997. *Crit. Care Med.* **25**, 1298–1307.
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. 傷寒論
11. 瘟疫論
12. 內經素問·刺法論
13. Kitayama J, Fuhlbrigge RC, Puri KD, Springer TA: P-selectin, L-selectin, and alpha 4 integrin have distinct roles in eosinophil tethering and arrest on vascular endothelial cells under physiological flow conditions. *J Immunol* 159:3929-3939, 1997.
14. Takeaki Matsuda et al: Ratio of Bacteria to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) Determines PMN Fate. *SHOCK* 12(5):365-372,1999.
15. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C: A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139:271-9, 1991.
16. Jian-Xin Jiang et al: Kinetics of mitogen-activated protein kinase family in lipopolysaccharide-stimulated mouse Kupffer cells and their role in cytokine production. *SHOCK* 18(4):336-341, 2002.
17. Claude Lachance et al: Involvement of Aminopeptidase N (CD13) in Infection of Human Neural Cells by Human Coronavirus 229E. *J Virology* 72(8):6511-6519,1998.