



中國醫藥大學
臨床醫學研究所
碩士學位論文

從麩氨基硫貯存量與 IL-6 變化探討大白鼠出血性休克後葡
萄糖-六-磷酸去氫酶及 IL-10 改變之相關性

Alternation of Rat Glutathione Reserve and IL-6 Following
Hemorrhagic Shock and its Correlation with Change of
Glucose-6-phosphate Dehydrogenase and IL-10

指導教授：陳瑞杰 教授

研究生：張耀田

中華民國九十七年七月

中國醫藥大學臨床醫學研究所

碩士後選人學位考試

論文題目

中文：從葡萄糖-六磷酸去氫酶與麩氨基硫貯存量變化探討大白鼠出血性休克後氧化壓力之改變及細胞激素IL-6與IL-10之相關性

英文：Alternation of Rat Oxidative Stress Following Hemorrhagic Shock and its Correlation with Cytokine IL-6 and IL-10 From Change of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase and Glutathione Reserve

本論文係張耀田於中國醫藥大學臨床醫學研究所完成之碩士論文，經考試委員審查及口試合格，特此證明。

考試委員

鄭美玲

黃志瑞

陳宗杰

所長：

林清淵

中華民國九十七年七月三十日

中文摘要：

關鍵詞：多重器官衰竭，出血性休克，葡萄糖-六-磷酸去氫酶，麩氨基硫，細胞激素，肝臟衰竭。

背景：創傷出血休克常造成死亡及器官衰竭。休克造成組織及細胞缺氧，誘發組織缺氧及再灌流傷害，產生過氧化物自由基，引起組織進一步傷害及發炎反應。休克常導致肝臟衰竭。

近期吾等以大白鼠之出血性模式應用 DNA 微陣列研究,發現休克與輸液復甦其基因體變化甚為相似，僅有葡萄糖-六-磷酸去氫酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD) 於出血休克及輸液治療後 24 小時呈現有意義減少。G6PD 為細胞關鍵調節酶，於細胞內氧化還原反應提供還原 NADPH 以維細胞恆定。麩氨基硫(glutathione) 能清除過氧化基，是肝細胞抗過氧化劑(antioxidant)能力的指標。除此之外，G6PD 產生之 NADPH 經由 Nox 途徑產生自由基。因此吾等推論 G6PD 在出血性休克後與輸液復甦中扮演一個重要角色，值得進一步探討。

方法：雄性大白鼠共分三組，第一組：控制組，第二組：休克組，第三組：休克及復甦組。每組分為 6 次組(實驗開始 0 小時、1.5 小時、4 小時、8 小時、12 小時、24 小時)。出血性休克採用大白鼠出血固定血壓模式，維持固定平均動脈壓為 40 ± 5 毫米汞柱達一小時。復甦組給予 10 毫升血液/公斤體重之乳酸林格液使穩定。實驗結束給予安樂死，同時將大白鼠由心臟抽血並且將肝臟組織取下。檢體保存於 -80°C 冰箱直到進一步實驗分析。血中細胞激 IL-6, IL-10 及 G6PD 活性，麩氨基硫(氧化態及還原態)及肝組織麩氨基硫(氧化態及還原態) 及 G6PD 予以檢測。

結果與討論：血液 G6PD 活性在休克組及復甦組早期即增加;並維持較控制組為高之活性。復甦液給與並未在 24 小時讓血液內 G6PD 活性增加的情形有所改變或消失。創傷出血休克後肝臟組織 G6PD 定量

先增加後下降。復甦介入降低肝臟組織之氧化壓力;也抑制肝臟組織 G6PD 在出血休克後增加之反應。創傷出血休克改變大白鼠血液內氧化壓力狀態;血液還原型麩氨基硫(GSH)及血液 GSH/GSSG 比值在休克後不久即走低並持續 12-24 小時。復甦液給與改善血中部分氧化壓力。創傷出血休克亦改變肝臟組織氧化壓力,但肝臟組織對於氧化壓力變化之反應殊於血液;肝臟組織的還原型麩氨基硫(GSH)及 GSH/GSSG 比值先下降;但在 8-12 小時點快速增加。然而復甦組並未出現此情形。發炎細胞激素 IL6 及抗發炎細胞激素 IL10 在創傷出血休克之後,最早的幾個小時內顯著增加,但只維持 8-12 小時。復甦液給與抑制發炎細胞激素 IL6 增加;然而復甦液給與只部份抑制抗發炎細胞激素 IL10 增加。

結論:創傷出血休克改變血液及肝臟組織的氧化壓力。也改變並調節血液中及肝臟 G6PD 之反應。但血液及肝臟之 G6PD 反應是有所不同。創傷出血休克後,血液中氧化壓力大增;血液中 G6PD 活性也增加;血液中發炎細胞激素 IL6 及抗發炎細胞激素 IL10 也增加。林格氏液復甦介入,抑制血液中發炎細胞激素 IL6 上升之反應及抑制部份血液中抗發炎細胞激素 IL10 上升之反應;也降低血液中部份氧化壓力。但並未明顯降低血液 G6PD 活性增加之情形。相對地,出血休克後,肝臟組織氧化壓力先增後降;肝臟組織 G6PD 也是先增後降。林格氏液復甦介入降低肝臟組織之氧化壓力;也抑制肝臟組織 G6PD 對出血休克後之增加反應;這個反應異於血液中之情形。

英文摘要

Key words: Multiple organ failure (MOF), Hemorrhagic shock, Glucose-6-phosphate dehydrogenase, Glutathione, Cytokines

Background:

Trauma-induced massive hemorrhage lead to development of tissue hypoxemia and ischemia/reperfusion injury. Cellular injury and oxidative stress initiate post-injury priming of neutrophils and subsequent severe SIRS response. During the hemorrhage shock with or without immediate resuscitation, rat animal model, we had observed that the up-regulation of G6PD gene expression disappeared after immediate resuscitation compared with no immediate resuscitation group. We hypothesize that G6PD provides reducing power, NADPH for reduction of GSSG to GSH to eliminate free radicals and reduce oxidative stress. However, G6PD also provide NADPH to generate more free radicals via Nox pathway. So G6PD may play an important role in the early shock with ischemia and reperfusion injury and subsequent immune response, development of multiple organ failure (MOF).

Methods:

108 mature SD male rats will be randomized into three groups (Gr.I: control group; Gr.II : hemorrhagic shock without resuscitation(HS); Gr.III: hemorrhagic shock with resuscitation(HS+R)). Rat hemorrhagic shock model /c fixed pressure model would be performed . The animals will be sacrificed by euthanasia and the whole blood and liver tissue will be collected at 0, 1.5, 4, 8, 12, and 24 hours after the initiation of experiment. The whole blood sample and liver tissue will be collected and frozen until further studies. G6PD activity, GSH and GSSG will be

analyzed in blood and liver tissues. The plasma levels of inflammation cytokine IL6 and anti-inflammation cytokine IL10 would be tested.

Result and Discussion:

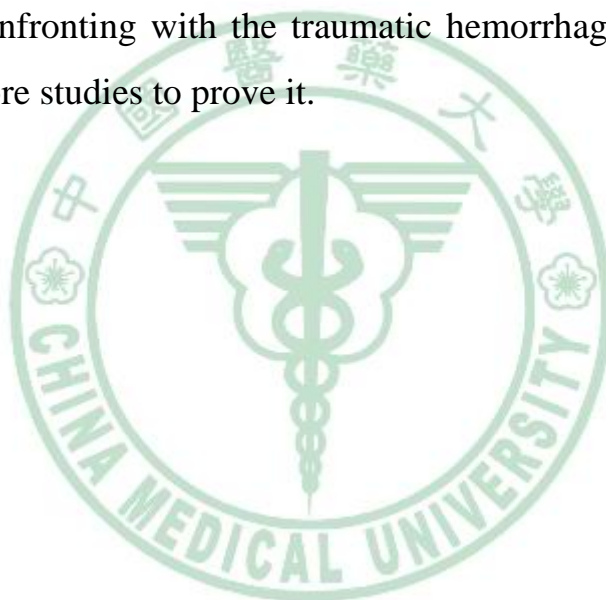
Blood G6PD activity increased early in HS group and HS+R group rats, compared with control group rats. There is significant difference of blood G6PD activity between shock group and control group and between HS+R group and control group. Resuscitation dose not alter the increasing response of blood G6PD activity. Liver tissue G6PD measured by Western blot method increased early and sharply in HS group and lasted for about 4 hours. Then it dropped markedly and it was below the level of control group latter. Resuscitation suppressed the increasing response of liver tissue G6PD markedly and it made obvious different response between the blood and liver tissue.

Shock episode induced change of blood oxidative stress status; whole blood GSH and whole blood GSH/GSSG ratio responded and went down early; it lasted for 12-24 hours. Resuscitation improved partial oxidative stress in blood. Oxidative stress condition also changed by shock episode in liver tissue and its response to the oxidative stress was differed from the whole blood. Increase of liver tissue GSH noted but delayed till the time-8-12-hour point. Resuscitation did not alter or change the liver tissue GSH in the early 12 hours, compared with the control group.

Inflammation cytokine IL6 and anti-inflammation cytokine IL10 increased markedly after shock episode in the early several hours but they disappeared after the time-12-hour point. Resuscitation made the increase of IL6 disappeared after shock episode in the early several hours. But IL10 still increased but less obvious than shock group after resuscitation given in the early several hours.

Conclusion:

The traumatic hemorrhagic shock episode changed the oxidative stress condition in blood and liver tissue. It also changed the blood G6PD enzyme activity and liver tissue G6PD. However, the G6PD response of liver tissue was different from the response of blood while confronting with the traumatic hemorrhagic shock episode. Resuscitation dose not alter the change of blood G6PD activity. But it dose alter the G6PD response in liver tissue. Therefore, we supposed that the response and the mechanism of G6PD and GSH were different between the blood and liver tissue while confronting with the traumatic hemorrhagic shock episode. But it needs more studies to prove it.



致謝

離開學校工作多年之後再次學習，一邊進修一邊還要兼顧工作，這個過程是辛苦也是甜美地。很感謝這段期間老婆紹怡無怨無悔的支持與鼓勵。也很心疼犧牲了許多陪伴小孩的機會。家裡在這段期間又多了兩位小寶貝。現在坐在這裡，爸爸承諾會好好補償妳們的。

這個寶貴的進修機會非常感謝指導教授陳瑞杰副院長的指導。有你的指導與鞭策，我才有機會參與這個實驗；也才有機會學習如何著寫壹個研究計劃與完成。

完成這個實驗過程是艱辛地。承蒙諸多師長的相助與指導。感謝陳卓昇老師及鄭宜昌醫師慨然借我使用實驗室及其設備並指導；讓我能順利完成動物實驗。感謝長庚大學趙崇義教授，鄭美玲教授及其實驗室同仁對於後續生化實驗的指導與協助。還要感謝統計中心吳宏達老師及林保萱技師在統計上的協助。

最感謝我的助理兆暉在資源貧乏的情況下，協助我完成這個實驗。想到我們到處張羅實驗的過程及往返臺中與長庚的路程；我想我們應該在這其中學習到許多寶貴的經驗；也會終生難忘。所以兆暉謝謝了。祝你早日在波蘭學成歸國。最後，感謝振宏及黃志揚老師實驗室在後續實驗上給與的協助。

完成這個學習是興奮的，但是不是結束。它已經開啟壹扇門，值得我們繼續進一步研究。我會努力。謝謝大家。



目錄	
書名頁
口試委員審定書 I
中文摘要 II
英文摘要 IV
致謝 VII
目錄 IX
圖表目錄 X
第一章 前言 1
第二章 研究方法 14
第三章 研究結果 26
第四章 討論 46
第五章 結論 57
附錄圖表 60
參考文獻 69

圖表目錄	頁
表一 三組實驗大白鼠年齡及體重比較.....	26
表二 三組實驗大白鼠死亡率比較	26
表三 實驗不同時序時間點測定全血 G6PD 活性結果.....	28
表四 實驗不同時序時間點西方點墨法測定肝臟 G6PD 結果	29
表五 實驗不同時序時間點測定肝臟之 GSH 結果.....	31
表六 實驗不同時序時間點測定肝臟之 GSSG 結果.....	33
表七 實驗不同時序時間點測定肝臟之 GSH/GSSG ratio 結果	35
表八 實驗不同時序時間點測定血液之 GSH 結果.....	37
表九 實驗不同時序時間點測定血液之 GSSG 結果.....	39
表十 實驗不同時序時間點測定血液之 GSH/GSSG ratio	41
表十一 實驗不同時序時間點測定血液之細胞激素 IL6 結果	43
表十二 實驗不同時序時間點測定血液之細胞激素 IL-10 結果	45
表十三 肝臟葡萄糖-六-磷酸去氫酶/氧化壓力之變化.....	55
表十四 血液葡萄糖-六-磷酸去氫酶 / 氧化壓力 / IL-6 及 IL-10 之變化.....	55
圖一 動物實驗.....	60
圖二 實驗不同時序時間點測定之血液 G6PD 比較曲線	61
圖三 實驗不同時序時間點西方點墨法測定肝臟 G6PD 結果	29
圖四 實驗不同時序時間點西方點墨法測定肝臟之 G6PD 曲線圖	62

圖五	實驗不同時序時間點測定血液 GSH 比較曲線圖	63
圖六	實驗不同時序時間點測定血液 GSH/GSSG Ratio 比較曲線圖	64
圖七	實驗不同時序時間點測定肝臟 GSH 比較曲線圖	65
圖八	實驗不同時序時間點測定肝臟 GSH/GSSG Ratio 比較曲線圖	66
圖九	實驗不同時序時間點測定血液細胞激素 IL-6 比較曲線圖	67
圖十	實驗不同時序時間點測定血液細胞激素 IL-10 比較曲線	68



第一章 前言-研究背景與文獻探討

第一節 研究背景

外傷至今仍然是青年及成人意外死亡的主要原因，而外傷所引起的傷亡，依據 Trunkey¹ 在 1983 年所提出的報告，可歸納為創傷後立即性、早期、及晚期三個主要的時間分佈；其中定義創傷後 60 分鐘內所發生的死亡為立即性死亡，其造成死亡的主要原因為頭部外傷所造成的神經傷害及創傷出血性休克¹；而早期死亡主要發生在創傷後壹小時至四小時間，主要原因為大量出血所造成；晚期死亡大部份發生在創傷後壹週後，原因主要為組織器官嚴重創傷後，所誘發的厲害發炎反應及後續進一步免疫失控及免疫失調所造成的感染及多重器官衰竭。因此在臨床上如何立即有效的處理大量出血，矯正休克的情形，預防進一步的感染及多重器官衰竭併發症發生就成為降低嚴重外傷休克病人的關鍵因素。如何進一步了解出血性休克傷害及多重器官衰竭之機轉是在處理嚴重創傷患者所要面對的嚴肅課題。

第二節 文獻探討

[出血性休克]

由外傷所引起的大量出血，將會導致組織器官組織灌流的降低，缺血缺氧之現象，進而造成休克之情形，如果無法及時有效的處理，

則會造成器官功能的衰竭。並且同時引發免疫系統的活化並釋放大量的細胞激素；進而引起全身性的發炎反應，更進一步造成全身性免疫症候群現象之發生，誘發凝血機能障礙等等；最終導致導致多重器官功能衰竭而死亡²⁻³。

嚴重創傷大量出血造成心輸出量及血壓的下降，因而使得系統性循環氧氣的輸送(DO₂)降低，進而導致周邊細胞缺氧狀態之發生。此時周邊組織細胞對於缺氧的反應以提高氧氣的使用效能來代償 (rise in oxygen extraction ratio)⁴；但若無法及時恢復所需之組織灌流，以維持細胞活性所需，將從有氧呼吸轉變成無氧呼吸。最終無法維持細胞之活性，導致細胞的死亡，以及超氧/過氧離子產物的形成。這些情形將進一步激化系統性發炎的反應⁵。

創傷出血性休克所造成的局部組織傷害及其後所誘發的系統性發炎，將可藉由交感神經及腎上腺的反應導致局部微循環的改變。局部微循環的組成包括微小動脈, 微血管, 以及微小靜脈；它是組織器官的氧氣及營養代謝的功能單位。局部組織藉由 NO 的作用造成局部血管的擴張及微血管通透性增加⁶⁻⁷。相對地, 經由 endothelin 的作用卻引起局部血管收縮；伴隨發炎反應所誘發的細胞激素 (cytokine) 的作用，血小板的凝集，將加重局部組織微循環的障礙與失常⁶⁻⁷。進一步將導致組織細胞缺氧，代謝酸物質的堆積，造成組織器官的傷害。

局部組織缺氧，將會造成細胞內 ATP 降解，終究造成 hypoxanthine 的大量產生，導致細胞重要訊息傳遞物質 cyclic AMP 的缺乏，以及胞內 Ca 的上升，導致細胞代謝活動無法進行，進而造成細胞的死亡或凋亡的發生⁸。

另一方面，在局部微循環一氧化氮(NO)作用下，血管擴張帶來的局部組織再灌流(reperfusion)的傷害將更甚於組織缺氧所造成之傷害。組織缺氧的傷害導致細胞中的 hypoxanthine 經由 Xanthine oxidase 的作用；hypoxanthine 會被降解轉化成 Xanthine 或 Uric acid。在這個過程中，伴隨再灌流所帶來的氧氣，將形成超氧化物 Superoxide($O_2^{\cdot -}$)；而超氧化物 Superoxide($O_2^{\cdot -}$)可被 Superoxide dismutase 進一步還原成 Hydrogen peroxide (H_2O_2)以及 hydroxyl radical($OH^{\cdot -}$)。這些自由基產物將會破壞細胞內鈣離子(Ca^{2+})的恆定，同時造成細胞膜的損傷，脂質氧化以及 DNA 損害，進一步造成組織更嚴重的傷害⁹⁻¹⁰。

[創傷出血性休克導致免疫系統的改變]

創傷出血性休克急性期的免疫反應是複雜而無法以單一反應路徑來解釋。身體組織受到創傷出血或是損傷，參與並協調急性期免疫反應的包括免疫系統、心血管系統、內分泌系統、及神經系統。急性期參與免疫反應的免疫系統包括細胞激素及免疫細胞¹¹。細胞激素及其

介質或是其接受體,二十多年來已被認定可做為外傷病患死亡及殘疾的預測指標。血液中高濃度的細胞激素代表嚴重且厲害的發炎反應;炎性介質所引發的過度系統性發炎反應,及其誘發的系統性抗發炎反應,兩者失衡對對宿主產生傷害;並將導致嚴重的器官失調(organ dysfunction)¹²。

當嚴重損傷(如外傷性出血性休克)發生時多型性中性白血球(PMN)將先被激化;並分泌許多介質,包括細胞激素,引發系統性炎性反應(Systemic inflammatory response syndrome, SIRS)。之後進一步刺激巨嗜細胞(Macrophage)及淋巴球(Lymphocyte)參與反應。引發更激烈的SIRS反應或CARS(Compensated anti-inflammatory response syndrome)反應。並導致補體系統、凝血系統的活化,造成內皮細胞及實質器官的損傷。如果此種反應持續激化,終致器官衰竭而死亡。

目前常見細胞激素可分為三類:分別為正炎性((proinflammatory)細胞激素,如TNF- α 、IL-1、IL-6及IL-8;抗炎性(Anti-inflammatory)細胞激素,如IL-4、IL-10、IL-13及TGF- β ;及溶解性細胞激素接受體(Soluble cytokine receptor),如IL-22RA2(IL-22 receptor- α 2)。

外傷性出血性休克導致正炎性與抗炎性細胞激素在血中濃度的變化,TNF- α 最早產生,並促使其他細胞激素的分泌,但因其半衰期很

短故很快在血中的濃度即降下來，研究顯示 TNF- α 血中濃度在外傷性出血性休克後 1-2 小時內即達到最高值，並在 4 小時內降下來。IL-6 及 IL-10 則隨之升高，IL-6 血中濃度在 4 小時內即達高峰，但 4 小時及降下來；IL-10 最慢升高，在 4 小時血中濃度仍在高點，在 12-24 小時仍可在血中維持相當顯著的濃度。TNF- α 血中濃度之所以很快降低一方面因其半衰期很短，另外據信是因為受到 IL-6 及 IL-10 的抑制，而 IL-6 及 IL-10 則是因 TNF- α 刺激巨嗜細胞而使分泌增加。巨嗜細胞也可因自助神經系統釋出 catecholamine 的刺激產生 IL-10，但 catecholamine 卻可抑制 TNF- α 及 IL-6 的分泌。因此 IL-6 在血中的濃度於 4 小時內降低，這與用 LPS 誘發敗血症，IL-6 能維持高血中濃度超過 24 小時是明顯不同的。

[創傷出血性休克導致肝臟組織局部循環的改變及氧化壓力的傷害]

嚴重外傷常常造成大量出血，而創傷出血性休克造成明顯且急性肝臟功能的傷害或衰竭，確切的傷害原因是什麼機制，目前並不是非常清楚，不過肝臟血流循環的下降，與後續缺血(ischemia)-再灌流(reperfusion)的現象；進而導致的超氧/過氧自由基的產生與氧化壓力的傷害，以及初始嗜中性血球(Neutrophile)所誘發的發炎反應均可能扮演重要的角色¹³⁻¹⁵。創傷出血性休克造成肝臟血流灌注之不足，導致肝臟局部血流發生缺血-再灌流現象，引起肝臟局部組織內皮素

(endothelin)及一氧化氮(Nitric oxide, NO)的不平衡,將導致其局部微循環(microcirculation)的失衡。肝內 NFkB 的活化濃度上升導致促進發炎細胞激素(cytokines)及細胞間黏連分子(Intercellular adhesion molecule, ICAM)的產生,導致嗜中性血球(Neutrophile)的招募與集中,進而刺激產生大量過氧/超氧自由基的產生¹⁶。

Kupffer cells 組成了肝內血管中絕大部份,接近 80%-90%的 macrophage。因此在肝臟的缺血-再灌流傷害中;Kupffer cell 在急性期扮演重要的角色。當 Kupffer cell 被激化後,它可產生發炎反應的介質,其中包括細胞激素(cytokines)及過氧/超氧自由基;進而這些胞激素及自由基可再一步激化其它的 Kupffer cell,或鄰近的肝細胞(Hepatocyte),血管內皮細胞(endothelial cell),其它發炎細胞(ex. Neutrophile)¹⁷⁻¹⁸。

多核球免疫細胞與 Kupffer cell 在肝臟缺血-再灌流傷害中均扮演重要角色。經缺血前處理的模型中,Kupffer cell 可產生超氧/過氧自由基。而經缺血前處理的模型中,亦可發現,可降低肝細胞對於發生缺血、再灌流過程中 Kupffer cell 所產生的自由基所帶來的傷害¹⁹⁻²⁰。

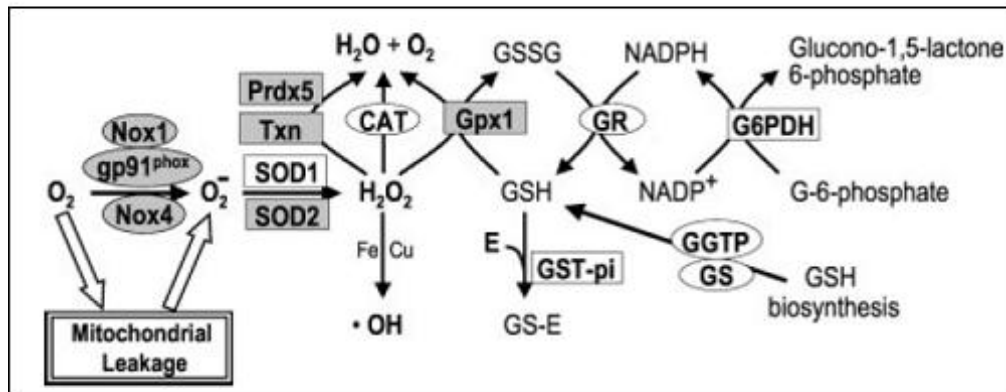
經由抑制 Kupffer cell 功能的模型中(經由注射 Gadolinium chloride 達成)發現可減弱肝臟再灌流的傷害,相對地,在增加 Kupffer cell

活性功能的模型中加重此一傷害。而分離自大白鼠肝臟缺血-再灌流模型中的 Kupffer cell 可發現分泌大量的過氧/超氧 自由基。而將 Kupffer cell 與肝細胞一起培養於缺氧-再給氧的模型環境所釋放的酵素 Lactc dehydrogenase 遠大於單獨培養在同一模型狀況下的肝細胞(hepatocyte)²¹⁻²³。

由此可見在休克情形下，肝臟經由 Kupffer cell 所產生的過氧/超氧自由基, 在接續而來的急性期缺血-再灌流傷害, 系統性發炎反應症候群應扮演很重要的角色。

[創傷出血性休克肝臟局部循環缺血-再灌流傷害及調節氧化壓力功能的角色]

創傷出血性休克對於急性肝臟組織的傷害，可能源自於休克肝臟組織 Kupffer cells (KC)釋放大量過氧/超氧自由基，造成休克後組織產生大量氧化壓力所造成之傷害。而調節氧化壓力的狀態決定於抗氧化壓力路徑的作用。細胞內大部份對抗調節氧化壓力的酵素, 例如 Glutathione peroxidase (Gpx) ， Glutathione reductase (GR) , catalase (CAT) ，調節氧化壓力的過程均直接或間接的需要 NADPH 的參與。NADPH 是源自於五碳糖磷酸化路徑過程中的產物, 而此路徑最重要的速率限制決定酵素就是葡萄糖-六-磷酸去氫酶(G6PD)。這些酵素的相關關係如下圖。



Generation of ROS by NAD(P)H oxidases (Noxs) and mitochondrial leakage and the antioxidant defense machinery against damage by ROS.

Am J of Pathology, 2003; 163: 6

因此，肝臟對於調節氧化壓力，可透過激化酵素 G6PD 的活性表現來達成。除此之外，在休克缺氧的肝臟組織給予 GSH 可減輕 KC 所產生的過氧/缺氧自由基，進而保護休克缺氧的肝臟組織進一步遭受再灌流傷害

24。

而經由 NADPH oxidase (Nox) 或是 Nitric oxide synthase 路徑形成過氧自由基的過程也必須利用到輔酶 NADPH。在心臟衰竭的研究²⁵，NADPH oxidase 使用胞內 NADPH 產生超氧化物，而心肌中的 G6PD 酵素活化可形成過量的超氧化物。心肌內的 G6PD 酵素活化促進心肌內 NADPH 的量上升，造成心肌內超氧化物產生相關酵素利用這些 NADPH 製造出大量過氧/超氧自由基，增加心肌內之氧化壓力，與心臟衰竭形成之病理機轉有關係。

經由 LPS-激化的肝臟 Kupffer cell 可刺激 glucose transporter (GLUT1) 及 G6PD 酵素的活性上升表現，而這與其超氧化物(ex. Superoxide anion, hydrogen peroxide) 及一氧化氮(NO) 產生有關。相對地; 肝臟竇狀小管(Sinusoid) 中的內皮細胞經由 LPS-激化後所產生的這些 GluT1 及 G6PD 酵素的反應卻導致對抗氧化壓力的能力上升 26。

因此，當肝臟組織細胞遭逢缺血-再灌流的傷害時，G6PD 與其五碳糖代謝路徑的中間產物 NADPH 在其維持組織細胞氧化物及抗氧化物的恆定扮演重要的角色。

運用基因體 Micro-array 技術及大白鼠創傷血性休克模型，肝臟基因表現改變的研究顯示，在休克缺血時期肝臟組織在細胞性的基因表現，粒腺體活性相關及能量產生相關的基因表現有明顯改變。而休克後經復甦處理過的大白鼠肝臟組織，這些基因表現的改變情形，並無明顯改變，只有一個例外，那就是與能量產生，代謝相關的酵素 G6PD 這個基因的改變會消失。或許代謝相關的酵素 G6PD 在創傷休克所造成接續的組織缺血-再灌流傷害及氧化壓力傷害，以及後續系統性發炎與多重器官衰竭之形成機轉會扮演重要的角色。

(Dr 陳國科會計劃 NSC91-2314-B-182A-106, Aug. 2002)

[創傷出血性休克大白鼠之動物實驗模型]

過去許多研究機構，學者致力於嚴重出血的研究；但在這個領域以人體研究出血性休克有其困難度。因為在危及生命的狀況下，立即給予適當急救處置是必要的，因此經常無法配合研究的目的設計其條件及需求；使得臨床實驗多所限制。而以動物模型研究，則較能控制各項變因，使得研究單純化，也可配合研究的目的來設計其需求條件。不過研究動物畢竟不同於人體，研究設計的狀況也不一定符合現況，因此不能以研究的結果直接應用於臨床。但是常常被使用來研究出血性休克的病理機轉；研究的資料也可作為出血性休克臨床介入性治療的基礎。目前研究外傷性出血性休克主要模型可分為非控制性出血模型(Uncontrolled hemorrhage model)及控制性出血模型(Controlled hemorrhage model)兩種²⁷⁻²⁹。

非控制性出血模型(Uncontrolled hemorrhage model)是以誘導脾臟損傷，斷尾，或主動脈撕裂等方式造成出血性休克。此模式適合用來研究輸液治療的時機、種類及輸液量。影響實驗變數包括創傷種類、休克時間及輸液種類。優點是可以適切的反應臨床狀況，同時也造成組織損傷；缺點是出血量無法控制。而控制性出血模型(Controlled hemorrhage model)較能精確地控制休克的程度。但臨床狀況常常並非如此，因此較難反應臨床現實狀況。但是因為此種模型容易操作，因

此廣為研究者所喜好。控制性出血模型又可分為固定血容模型(fixed-volume model)及固定血壓模型(fixed-volume model)兩種模型：

A. 固定血容模型(fixed-volume model)

以固定出血量誘導休克，通常根據實驗動物體重來決定，並藉由動脈導管監測血壓。廣泛運用在出血性休克後新陳代謝及組織病理學的變化、存活率及治療效果方面的研究。影響實驗的變數包括誘發休克之速度、休克時間(1-2 小時)、休克嚴重程度、使用麻醉藥種類及輸液種類。優點是可以評估休克代償機轉；缺點則是低血壓的程度無法維持一定；且須另外以傷口模擬創傷狀態。

B. 固定血壓模型(fixed-volume model)

從動脈導管抽血以達到所設定的休克狀態血壓；並藉由動脈導管及血壓監測器監測血壓。此方式之研究範圍及變數影響與固定血容模型相同。優點是低血壓的程度、期間及出血量可被控制及監測。但是仍無法完全模擬臨床狀況。不過容易控制實驗條件，因此本實驗採用此模型作為模擬出血性休克的模型。

第三節 研究目的

創傷出血性休克造成組織器官缺血-再灌流傷害，而自由基的形成與氧化壓力之傷害在組織器官後續系統性發炎與多重器官衰竭扮演重要角色。儘管系統性發炎與多重器官衰竭之詳細機轉仍不清楚;過去也有人嘗試使用不同抗發炎介質來治療創傷出血性休克造成的多重器官衰竭;但是效果並不理想。

對於創傷出血性休克引起的後續系統性發炎反應及急性期的缺血-再灌流的氧化壓力傷害應該是後續造成的多重器官衰竭的關鍵。對於創傷出血性休克由文獻探討可知葡萄糖-六-磷酸去氫酶與缺血-再灌流自由基的形成與氧化壓力調節，維持平衡組織器官之氧化還原壓力息息相關。過去對慢性病或是細胞老化的領域有許多葡萄糖-六-磷酸去氫酶的研究。但是對於創傷出血性休克的缺血-再灌流氧化壓力傷害的調節，很少有針對葡萄糖-六-磷酸去氫酶的研究。

因此我們嘗試以大白鼠創傷出血性休克模型試圖研究在創傷出血性休克急性期造成的傷害機轉。

1. 創傷出血性休克, 急性期缺血-再灌流傷害中, 肝臟及血液的氧化壓力以及抗氧化壓力酵素(還原型 (GSH)與氧化型麩氨基硫(GSSG))之變化。

2. 創傷出血性休克, 急性期缺血-再灌流傷害中, 肝臟及血液調節氧化壓力關鍵酵素 Glucose-6-phosphate dehydrogenase 活性改變角色之探討。
3. 創傷出血性休克, 急性期缺血-再灌流傷害, 血液中發炎及抗發炎相關細胞激素 IL-6 及 IL-10 改變之探討。



第二章 研究方法

第一節 研究材料及研究設計

壹、動物實驗設計- 大白鼠創傷出血性休克模式

本實驗所採用出血性休克模型是使用固定血壓之出血性休克模型 (fixed-pressure hemorrhage)，在第二組及第三組中，出血性休克的誘發是以從左股動脈抽 60 分鐘血，在十分鐘內讓平均動脈壓下降至 40 ± 5 毫米汞柱，並以抽血及輸血方式維持此血壓 60 分鐘。休克維持以後，第二組不給予急救；而第三組則給予輸血及輸液急救（原抽血量均被完全輸回，並加同一體積輸血量之林格氏液予以輸注），急救應於十分鐘內完成。第一組除了接受剖腹、動靜脈插管及給予基本輸液外，在實驗期間並不誘發出血性休克及復甦急救。急救期後實驗物之動靜脈插管給予拔除，並將血管結紮，令其甦醒。所有實驗動物至其規劃實驗終了時間點時，均給予安樂死以進行抽血及取得肝臟組織。

一、實驗動物準備

本實驗研究的大白鼠 (Sprague-Dawley rats) 來自中華民國國家科學委員會國家實驗動物繁殖及研究中心，實驗研究的大白鼠全部為雄性。所有購入的動物先飼養於中國醫藥大學動物中心，室溫維持在 23°C ，並保持固定光照週期（光-暗週期：各 12 小時），大白鼠飼養至年齡 9-11 週大，體重約 300 公克，才進行實驗。大白鼠在實驗前不限

制日常飲食。實驗前三天實驗動物送至實驗室以適應實驗室的環境。實驗前 15 分鐘穩定實驗動物生理狀況並以溫度控制器維持實驗動物體溫 ($37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$) 直至實驗完成。

二、麻醉方式

以腹膜內注射 Pentosol (25-40mg/kg)，直到大白鼠被適當麻醉。

三、導管準備

以 Polyethylene tubes(PE-50) 進行動靜脈插管，包括插入右股靜脈以作為輸液輸注之用。另一 Polyethylene tubes(PE-50) 導管插入右股動脈並以 Cardiomax-II model 85(Columbus Instruments International Co. Ohio, USA)持續監測平均動脈壓。插入左股動脈以作為抽血要成出血性休克及輸血急救之用。所有實驗動物在實驗中均給予林格氏液輸注 (10 毫升/公斤/小時)，以補充體液喪失。

四、動物實驗步驟

步驟 (Trauma/Hemorrhagic shock/Resuscitation) :

- 準備期 (30分鐘)：包括剖腹手術 (從恥骨到劍突沿腹中線切開大白鼠腹部曝露腸部內臟後，立即將傷口縫合)、儀器準備及動靜脈插管，完成以上步驟開始實驗計時。
- 穩定期 (10分鐘)：完成準備期後，將大白鼠靜置並監測其血壓以穩定10分鐘生理徵象。

- 誘發出血性休克：10 分鐘內從大白鼠靜脈導管抽血(2.5 毫升/公斤體重)，平均動脈壓維持在 40 ± 5 毫米汞柱。
- 休克維持期 (60分鐘)：藉抽血或將血回輸維持平均動脈壓在 40 ± 5 毫米汞柱；持續60分鐘。
- 復甦急救 (Resuscitation) 期：將抽出之血(2.5毫升/公斤體重)加上靜脈輸液(lactated Ringer's solution) (5毫升/公斤體重) 輸回實驗動物血管內。
- 恢復期：移除導管、血管結紮、動物甦醒。

動物甦醒後依其預定時程在第 0, 1.5, 4, 8, 12, 24 小時予以安樂死方式犧牲各次組大白鼠，並立即從死亡大白鼠以心臟穿刺方式取得血液檢體並採集肝臟組織。恢復期期間若大白鼠死亡而接近預定時程，立即以上述方式取得血液及肝臟組織以供研究。

貳 實驗設計

一、實驗動物分組

雄性大白鼠 Sprague-Dawley 鼠(體重 300-350 公克)隨機分為三組：

第一組：控制組 (只施行剖腹手術，Sham operation)

第二組：出血性休克組 (剖腹手術+出血性休克)

第三組：復甦組 (剖腹手術+出血性休克+輸血及輸液急救)

第二組及第三組大白鼠如前面所敘述施以創傷出血性休克。第二組大白鼠在休克期維持 60 分鐘結束後,不施以任何急救措施;定義為休克組。第三組大白鼠在休克期維持 60 分鐘結束後,則施以復甦液(以出血抽出之全血加上林格氏液(lactated Ringer's solution))急救;定義為復甦組。第一組大白鼠則僅施行創傷剖腹手術;而不施以任何出血休克或復甦液急救;定義為控制組。

所有大白鼠在恢復期拔除導管、甦醒後,均將分別在次組預定時間點(分別在實驗開始第 0, 1.5, 4, 8, 12 及 24 小時; 預定每次組 6 隻大白鼠)被麻醉犧牲;並取得血液、血清及肝臟組織;以進行實驗。若大白鼠在實驗進行中死亡,則立即取得血液、血清及肝臟組織;以進行實驗。

二、血清收集與儲存

在老鼠被犧牲後及採用心臟穿刺的方式收集全血。並以含 EDTA 之試管收集血液並立即離心(速度:3000 轉/分,共 10 分鐘),將上清液收集於抗凍離心管(1.5cc),在儲存於-70°C 冰箱中直至實驗分析之進行。

細胞激素 IL-6 及 IL-10 的血中活性以 ELISA 方式檢測,其操作方式如製造廠商所附之使用說明書(R&D Systems, Inc, USA)

三、肝臟組織取得與貯存

1. 肝臟組織取得步驟如下：

從恥骨到劍突沿腹中線切開老鼠腹部，切下肝臟中葉一體節（重量> 1公克），並在中葉近端以3-0 絲線結紮血管止血。

2. 將肝臟組織置入標本瓶並迅速置入液態氮鋼瓶中，再送至-70°C的冷凍庫中冷藏直到實驗分析。

四、血中葡萄糖-六-磷酸去氫酶活性之分析

葡萄糖-六-磷酸去氫酶活性之分析如文獻所述³⁰：以分光光度計在波長340 nm 之下偵測Glucose-6-phosphate 被NADP⁺還原之程度來定量其活性。簡述如下：全血檢體在攝氏4°C 下先經500x 3 g 離心10分鐘。之後再將其置入1公撮萃取緩衝液中(20 mM Tris. HCl (pH 7.5)/ 3 mM MgCl₂/ 1 mM EDTA/ 0.02%(w/v)-mercaptoethanol/ 1 mM-ACA) 。立即將之放入冰浴中並以聲裂法將之碎解。之後再以12,000x 3 g在攝氏4°C 下離心10分鐘。經由上述程序處理之檢體(含50毫克蛋白質)與1毫升之反應緩衝液(50 mM Tris. HCl (pH 8), 50 mM MgCl₂, 4 mM NADP⁺, 4 mM glucose-6-phosphate) 混合作用。再以分光光度計在波長340 nm 之下偵測其還原程度定量其活性。

五、細胞激素之分析

IL-6及IL-10的測量是採用商業用的成套試劑ELISA (R&D system)，取100 μ l 血清和100 μ l 的分析稀釋液加入每個well 內 (R&D system ELISA)，室溫培育兩個小時。以wash Buffer 洗去未結合的物質，再加入抗欲測之細胞激素的多株抗體200 μ l (conjugated with Horseradish peroxidase)，於室溫培育兩個小時，以wash Buffer 洗去未結合的物質，再加入200 μ l substrate solution [H2O2+tetramethylbenzidine mixture(1:1)]到每一個well 內，室溫避光培育20 分鐘，最後加入50 μ l Stop solution (2N sulfuric acid) 終止呈色反應。以光學比色計測定吸光值 (OD450nm)，求得已知濃度樣品之標準曲線，再定量待測物濃度。每個檢體測量兩次而分析時的變異性小於10%。

六:利用高效能液相層析(High Performance Liquid Chromatography) 技術測量還原型(GSH)與氧化型麩胱甘肽(GSSG)含量

HPLC 是一種利用物質在移動相(mobile phase)與固定相 (stationary phase)分佈性質不同之原理來分離物質的方法；可以直接利用 HPLC 來快速分析且具有高靈敏度偵測全血及組織中氧化型與還原型麩胱甘肽的含量。

高效能液相層析-電化學偵測技術(High Performance Liquid

Chromatography-electrochemical detection)利用物質帶有 functional group, 提供物質能量使其發生氧化還原反應而產生電子流, 可以偵測電子流並加以定量而得到物質之含量.

本實驗使用 ESA CouArray HPLC-ECD sytem 來偵測全血中氧化型(GSH)與還原型麩胱甘肽(GSSG)的含量.

六.一

A. 高效能液相層析試劑(HPLC Reagent)

a. L-glutathione reduced form: Sigma G6529

b. Glutathione oxidized form: Sigma G4376

c. S-methylglutathione: Sigma 4139

B. 高效能液相層析(HPLC)

a. HPLC-ECD:

Model 5600A CouArray system/Model 542 Autosampler/Model 582

Pump

b. HPLC-UV detector

HPLC machine (Water 2695)/ UV detector (Water 2487).

六.二

高效能液相層析(HPLC)試劑配製

a. 移動相溶液(mobile phase buffer)

取 1M Sodium phosphate (12g NaH₂PO₄ 加水至 100ml) 10ml 加入 3mM octane sulfonic acid (0.070287g octane sulfonic acid 加水至 100ml) 混合均勻, Sodium phosphate pH 值調整至 2.7 後再加入 acetonitrile (CAN), 最後以 0.2um membrane filter 過濾, 抽真空去除其中之氣體, 完成含 10mM phosphate、0.3mM octane sulfonic acid、10% ACN、pH 2.7 之移動相溶液。

b. 5% meta-phosphoric acid

5g meta-phosphoric acid 溶於 100ml distilled water 後再次以 0.2um membrane filter 過濾。

c. GSH 及 GSSG 標準品 (GSH 100mM; GSSG 100mM)

分別將 GSH 30.733mg/ml 及 GSSG 61.26mg/ml 及 32.125mg 標準品 加入 5% meta-phosphoric acid 中。

六.三

高效能液相層析實驗條件(HPLC experimental condition)

a. Column: Intersil ODS-3, 5uM, 4.6*250mm.

b. Mobile phase:A:10mM NaH₂PO₄

0.3mM octane sulfonic acid

pH2.7

B:10mM NaH₂PO₄

0.3mM octane sulfonic acid

10% ACN pH2.7

A:B 49%:51%

c. Column oven: 35°C

d. Injection volumn: 20 λ

e. Running time: std. 20min. sample 30min.

f. Flow rate:1.0 mL/min.

g. UV detection: 200nm.

六.四

高效能液相層析(HPLC)檢體處理

a. 全血檢體:

將全血檢體 100ul 於褐色管中加入 5% meta-phosphoric acid 300ul

並混合均勻, 置入冰浴中 15-30 分鐘;之後將其取出離心

(13000rpm, 4°C, 10min.); 離心後取其上清液;利用 filter (0.2 μ m)

過濾雜質後上機(HPLC-ECD).

b. 肝臟組織

將肝臟組織 0.2g 加入 9 倍體積的 Tris buffer 後進行組織均質

研磨, 取均質後之 liver suspension 200ul 加入 5%

meta-phosphoric acid 200ul 並混合均勻, 置入冰浴中 15-30 分鐘;

之後將其取出離心(13000rpm, 4°C, 10min.); 離心後取其上清液;

利用 filter (0.2um)過濾雜質後上機(HPLC-UV detector).

七:利用西方點墨法 (Western blot) 定量肝臟葡萄糖-六-磷酸去氫酶

七.一:西方點墨法 (Western blot)

1. 電泳分離與轉漬

將待分析之肝臟組織樣品以 12% SDS-PAGE 進行電泳分離 (Amersham Bioscience SE 250 Mini-format Vertical Gel Electrophoresis Units)。在電泳結束前 20 分鐘, 需先準備 Hybond-P PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (Amersham Bioscience) 及 4 張 3 MM 濾紙 (Whatman), 而 PVDF membrane 需先以 100% 甲醇浸泡約 10 秒鐘後, 再以去離子水洗去膜上的甲醇, 由於 PVDF membrane 具有很強的蛋白質結合力, 因此操作時必須戴手套, 以防止非專一性蛋白質的污染, 之後將其浸泡於 Transfer buffer (25 mM Tris-HCl, 0.2 M Glycine, 20% methanol) 中, 而 3 MM 濾紙也同樣浸泡於 Transfer buffer。將電泳分離後之膠體與 PVDF membrane 一同放入轉漬的卡夾中, 上下各夾兩張 3 MM 濾紙及海綿, 以三明治方式夾起, 置於轉漬裝置 (Amersham Bioscience TE 22 Mighty Small™ Tank Transfer Unit) 中, 於 300 mA 電流下 (Amersham Bioscience Electrophoresis Power Supply EPS601) 進

行轉漬 1 小時。

2. 偵測

將轉漬後之 PVDF membrane 浸於含 5% blocking reagent 之 TBST (20 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.6) buffer 中，室溫下低速振盪 1 小時，之後用 TBST 清洗 PVDF membrane，於室溫下低速振盪清洗 2 次，每次 5 分鐘。清洗完畢後將 PVDF membrane 浸泡於 3000 倍稀釋的一級抗體 G6PD Antibody 中，室溫下低速振盪 1 小時，再以 TBST 清洗 PVDF membrane，於室溫下低速振盪清洗二次，每次 5 分鐘。清洗完畢後將 PVDF membrane 浸泡於 2000 倍稀釋的二級抗體 (Anti-Mouse IgG HRP Conjugate) 中，室溫下低速振盪 1 小時，之後再以 TBST 清洗 PVDF membrane，於室溫下低速振盪清洗一次 15 分鐘後，再清洗三次，每次 5 分鐘。最後再將 PVDF membrane 放置於 ECL plus detection reagents (Amersham Bioscience) 中 1 分鐘，取出 PVDF membrane 置於塑膠袋中，將氣泡趕走後壓片，1 ~ 30 分鐘後沖片。

第二節 統計方法

各組之間的比較是使用 one-way analysis of variance (ANOVA) 統計方式分析。所有的數據均以平均值±標準差(Means±SD)表示。P 值<0.05 即表示有統計學上的意義。以上統計均使用市售軟體 SPSS 第十版在電腦上執行。



第三章 研究結果

壹:年齡及體重(表一)

三組在年齡及體重之間無明顯差異。

(表一) 年齡及體重

	控制組	休克組	復甦組
年齡 (週)	9-12	9-12	9-12
體重(公克)	328.2±21.0	324.4±18.1	328.0±19.6
(range)	(300-372)	(300-358)	(300-364)
p 值	0.663		

貳:不同組別死亡率

本次大白鼠創傷休克模式，實驗方式採取出血休克維持平均動脈壓 40±5mmHg 持續壹小時模式進行，共進行 111 隻大白鼠；控制組進行 36 隻，無死亡隻數；休克組進行 40 隻，有 5 隻死亡，其中有 2 隻死亡時間點接近檢體採集點，取得檢體列入進一步實驗，死亡率為 12.5%；休克及復甦組進行 35 隻，無死亡隻數。

(表二) 不同組別死亡率

	0Hr	1.5Hr	4Hr	8Hr	12Hr	24Hr	死亡率
控制組	6	6	6	5	6	7	0/36 (0%)
休克組	7	6	6	6	6	6	5/40 (12.5%)
復甦組	6	6	6	6	6	5	0/35 (0%)

註:HS group 40 隻實驗大鼠,其中有 5 隻在採集檢體前死亡;5 隻中有 2 隻死亡時間點接近採集點取得檢體列入進一步實驗

參: 不同時序時間點測定全血葡萄糖-六-磷酸去氫酶活性結果

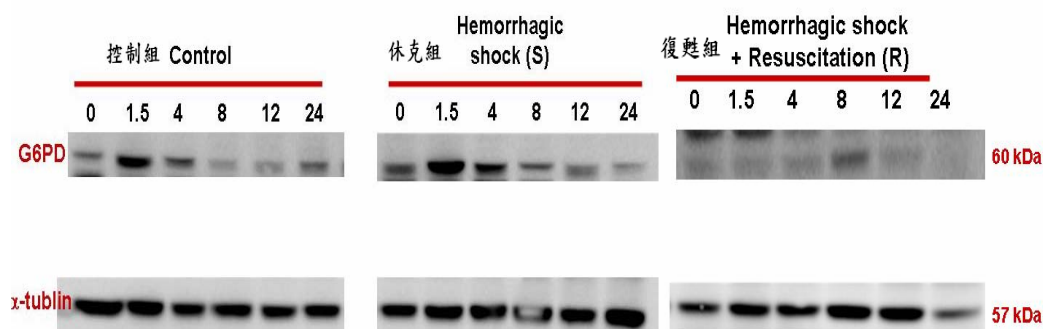
三組血液不同時序時間點所測定之 G6PD 活性結果如下表;

- 血液 G6PD 活性使用 ANOVA 變異數分析比較三組之差異,三組間有統計上顯著差異 $p=0.005$ (控制組 vs 休克組: $p=0.02$; 控制組 vs 復甦組: $p=0.08$; 休克組 vs 復甦組: $p=0.94$)。
- 血液 G6PD 活性依時間分成六組,(0 小時、1.5 小時、4 小時、8 小時、12 小時、24 小時),使用 ANOVA 變異數分析比較三組之差異. 在 8 小時 ($p=0.027$)、24 小時 ($p=0.008$) 這兩組在統計上可以看出有差異,進行 Tukey' s 事後檢定,在 8 小時在控制組 vs 休克組及控制組 vs 復甦組有統計上顯著差異; 24 小時這一組在控制組 vs 休克組有統計上顯著差異,在控制組 vs 復甦組接近統計上顯著差異。
- 使用 ANOVA 變異數分析比較血液 G6PD 活性在三組中不同時間點之差異,休克組及復甦組波動較大,但並未達統計上顯著差異。

(表三)不同時序時間點測定全血葡萄糖-六-磷酸去氫酶結果

全血葡萄糖-六-磷酸去氫酶 (u/gHb)				
時間(T)	控制組	休克組	復甦組	P 值
0	10.21±0.45 (9.58 - 10.74)	9.05±1.61 (6.72 -10.82)	10.30±1.57 (8.01-11.95)	0.200
1.5	10.05±1.23 (8.70-11.92)	10.64±1.31 (9.38-12.65)	11.42±2.82 (9.14-17.03)	0.482
4	9.72±0.95 (8.96-11.48)	11.03±1.36 (9.97-13.44)	10.37±1.55 (8.57-12.95)	0.255
8	9.33±1.01 (8.34-10.77)	11.37±1.69 (10.01-14.57)	11.30±0.75 (10.00-12.07)	0.027
12	9.74±0.67 (8.54-10.36)	10.47±2.66 (5.52-12.83)	10.26±1.89 (6.93-11.96)	0.800
24	8.74±1.82 (6.19-11.03)	11.45±1.28 (10.25-13.61)	10.86±0.62 (9.98-11.42)	0.008
P 值	0.257	0.150 (T0-T8:0.176) (T0-T24:0.151)	0.741	0.005 控制組 vs 休克組: 0.02 控制組 vs 復甦組: <0.01 休克組 vs 復甦組: 0.94

肆：肝臟不同時序時間點之 G6PD 酵素西方點墨法結果



圖三 實驗不同時序時間點西方點墨法測定肝臟檢體之 G6PD 酵素定量結果

以 Gel-Pro Analyzer 4.0 及 SPSS 軟體將結果定量分析；三組間在統計上有意義顯著差異($p: 0.01$)。

(表四) 肝臟 G6PD 酵素西方點墨法定量結果

肝臟 G6PD 酵素西方點墨法結果			
	控制組	休克組	復甦組
0	430.66	276.53	309.43
1.5	496.61	1471.00	121.14
4	300.64	575.93	73.89
8	328.13	156.89	100.77
12	296.50	170.09	139.04
24	320.70	86.59	102.39

伍：肝臟不同時序時間點所測定之 GSH 結果

三組肝臟不同時序時間點所測定之 GSH 結果如下表；

- 肝臟 GSH 使用 ANOVA 變異數分析比較三組之差異，三組間並未達統計上顯著差異。

肝臟 GSH 依時間分成六組，(0 小時、1.5 小時、4 小時、8 小時、12 小時、24 小時)，使用 ANOVA 變異數分析比較三組之差異。只在 4 小時 ($p=0.046$) 這組在統計上可以看出有差異，進行 Tukey' s 事後檢定，在 4 小時休克組 vs 復甦組有統計上顯著差異；控制組 vs 休克組接近統計上顯著差異。

- 使用 ANOVA 變異數分析比較 GSH 在三組中不同時間點之差異，控制組濃度較平穩，無統計上顯著差異。休克組明顯降低後增加 ($p<0.001$)，復甦組緩步下降後上升 ($p=0.033$)，兩者均達統計上顯著差異。

(表五)不同時序時間點測定肝臟之 GSH 結果

肝臟 GSH (μM)				
時間(T)	控制組	休克組	復甦組	P 值
0	5006 \pm 1445.6 (2640.6-7032)	4714.51 \pm 116 (3220.4-6816)	5424.95 \pm 791 (4752.80-6903)	0.560
1.5	5374 \pm 1689.1 (3230.8-8343)	4414.94 \pm 155 (2752.8-6933)	4384.95 \pm 168 (1424.30-6187)	0.510
4	4426 \pm 1713.1 (2097.2-6671)	2514.11 \pm 116 (1279.9-4319)	4850.28 \pm 174 (2556.90-7462)	0.046
8	4640 \pm 2004.1 (1573.8-6857)	3349.77 \pm 134 (1965.8-5494)	3653.2 \pm 789 (1985.74-4728)	0.330
12	5354 \pm 1668.3 (2968.0-7189)	4997.65 \pm 152 (2300.2-6273)	5038.73 \pm 164 (3486.38-8093)	0.917
24	5438 \pm 1616.0 (3937.9-8130)	6694.88 \pm 163 (4481.5-8793)	6640.91 \pm 136 (5086.22-8345)	0.293
P 值	0.857	0.000 (T0-T4:0.081) (T1.5-T24:0.082) (T4-T12:0.047) (T4-T24:0.000) (T8-T24:0.003) (T0-T24:0.151)	0.033 (T8-T24:0.016)	0.265

陸： 肝臟不同時序時間點所測定之 GSSG 結果

三組肝臟不同時序時間點所測定之 GSSG 結果如下表；

- 肝臟 GSSG 使用 ANOVA 變異數分析比較三組 GSSG 差異，三組間接近統計上顯著差異 ($p=0.051$) (控制組 vs 休克組： $p=0.012$ ；控制組 vs 復甦組： $p=0.066$ ；休克組 vs 復甦組： $p=0.96$)。
- 肝臟 GSSG 依時間分成六組，(0 小時、1.5 小時、4 小時、8 小時、12 小時、24 小時)，使用 ANOVA 變異數分析比較三組 GSSG 濃度差異。在 4 小時 ($p=0.103$)、24 小時 ($p=0.062$) 這兩組在統計上接近統計上顯著差異，進行 Tukey' s 事後檢定，在 4 小時在控制組 vs 復甦組接近統計上顯著差異；24 小時這一組在控制組 vs 休克組接近統計上顯著差異。
- 各別分析 GSSG 濃度在三組中不同時間點濃度差異，使用 ANOVA 變異數分析比較每一組 GSSG 濃度差異，控制組及復甦組濃度無統計上顯著差異。休克組明顯隨時間持續下降達統計上顯著差異 ($p<0.005$)。

(表六)不同時序時間點測定肝臟之 GSSG 結果

肝臟 GSSG (uM)				
時間(T)	控制組	休克組	復甦組	P 值
0	504.67±208.78 (258.40-792.58)	474.14±111.12 (292.32-640.88)	415.27±267.77 (126.32-742.82)	0.740
1.5	333.99±137.50 (124.96-511.80)	387.99±119.03 (252.98-592.00)	382.52±281.42 (173.60-875.66)	0.869
4	419.31±194.23 (262.82-782.18)	381.51±55.10 (326.62-453.72)	254.88±97.13 (143.54-422.24)	0.103
8	295.72±116.06 (178.64-478.34)	246.26±93.41 (144.66-401.48)	267.57±147.94 (171.52-535.58)	0.801
12	450.76±181.45 (223.84-706.42)	266.38±114.71 (155.78-463.82)	344.20±176.92 (189.64-675.28)	0.171
24	514.75±142.71 (304.30-742.92)	299.04±176.59 (171.38-650.04)	347.42±153.85 (247.04-615.28)	0.062
				0.051
				控制組 vs 休克組:
		0.012		0.115
P 值	0.857	(T0-T8:0.017)	0.704	控制組 vs 復甦組
		(T0-T12:0.035)		0.066
				休克組 vs 復甦組:
				0.958

柒：肝臟不同時序時間點所測定之 GSH/GSSG ratio 結果

三組肝臟不同時序時間點測定之 GSH/GSSG ratio 結果如下表；

- 肝臟 GSH/GSSG ratio 結果，使用 ANOVA 變異數分析比較三組之差異，三組間未達到統計上顯著差異 ($p=0.277$)。
- 肝臟 GSH/GSSG ratio 依時間分成六組，(0 小時、1.5 小時、4 小時、8 小時、12 小時、24 小時)，使用 ANOVA 變異數分析比較三組 GSH/GSSG ratio 差異。在 4 小時 ($p=0.01$)、24 小時 ($p=0.024$) 這兩組在統計上達到統計上顯著差異，進行 Tukey's 事後檢定，在 4 小時在休克組 vs 復甦組達統計上顯著差異；24 小時這一組在控制組 vs 休克組達統計上顯著差異。
- 各別分析 GSH/GSSG ratio 在三組中不同時間點濃度差異，使用 ANOVA 變異數分析比較每一組之 GSH/GSSG ratio 差異，控制組及復甦組無統計上顯著差異。休克組明顯隨時間持續上升達統計上顯著差異 ($p<0.005$)。

(表七)不同時序時間點測定肝臟之 GSH/GSSG ratio 結果

肝臟 GSH/GSSG Ratio				
時間(T)	控制組	休克組	復甦組	P 值
0	12.44±8.21 (3.33-27.22)	10.53±3.5 (5.03-14.27)	20.24±14.28 (6.4-41.99)	0.188
1.5	20.77±14.42 (7.21-44.07)	11.78±3.93 (7.17-16.86)	15.55±9.8 (4.88-29.08)	0.343
4	13.43±8.69 (2.68-24.67)	6.76±3.66 (3.72-13.22)	19.76±5.67 (12.41-24.41)	0.010
8	18.76±10.84 (3.29-32.95)	16.11±10.70 (5.92-35.74)	17.10±8.76 (5.94-26.84)	0.908
12	14.91±9.24 (4.20-28.51)	22.15±12.00 (6.78-40.27)	17.97±9.11 (5.16-28.24)	0.484
24	11.28±4.64 (6.51-19.33)	28.23±14.02 (6.89-48.9)	22.18±9.77 (8.77-30.88)	0.024
		0.002 T1.5-T24:0.036		
P 值	0.486	T0-T24:0.015 T4-T12:0.058 T4-T24:0.003	0.893	0.277

捌：血液不同時序時間點所測定之 GSH 結果

三組大白鼠血液不同時序時間點所測定之 GSH 結果如下表：

- 血液 GSH 使用 ANOVA 變異數分析比較三組差異，三組間有統計上顯著差異 $p < 0.001$ （控制組 vs 休克組： $p < 0.001$ ；控制組 vs 復甦組： $p = 0.88$ ；休克組 vs 復甦組： $p < 0.001$ ）。
- 血液 GSH 依時間分成六組，（0 小時、1.5 小時、4 小時、8 小時、12 小時、24 小時），使用 ANOVA 變異數分析比較三組血液 GSH 差異。在 1.5 小時（ $p < 0.001$ ）、12 小時（ $p < 0.01$ ）、24 小時（ $p < 0.05$ ）這三組在統計上達統計上顯著差異，在 4 小時這組統計上接近統計上顯著差異（ $p < 0.1$ ）；進行 Tukey's 事後檢定，在 1.5 小時控制組 vs 休克組、休克組 vs 復甦組達統計上顯著差異，控制組 vs 復甦組接近統計上顯著差異；在 12 小時控制組 vs 休克組、休克組 vs 復甦組達統計上顯著差異；在 24 小時這一組休克組 vs 復甦組達統計上顯著差異；在 4 小時這一組控制組 vs HS group 接近統計上顯著差異。
- 各別分析 GSH 在三組中不同時間點濃度差異，使用 ANOVA 變異數分析比較每一組之 GSH 濃度差異，控制組較平穩，無統計上顯著差異。休克組明顯下降後微幅上升（ $p < 0.001$ ），復甦組先上升後下降，然後再上升（ $p < 0.05$ ），兩者均達統計上顯著差異。

(表八)不同時序時間點測定血液之 GSH 結果

血液 GSH (μM)				
時間(T)	控制組	休克組	復甦組	P 值
0	1085.67 \pm 176.74 (848.00-1272.00)	916.00 \pm 211.99 (644.00-1244.00)	906.67 \pm 221.26 (570.00-1168.00)	0.256
1.5	1071.00 \pm 83.99 (948.00-1160.00)	758.33 \pm 83.55 (652.00-842.00)	1221.33 \pm 165.67 (1090.00-1548.00)	<0.0001
4	979.00 \pm 107.38 (794.00-1096.00)	705.33 \pm 89.14 (566.00-824.00)	852.00 \pm 301.77 (432.00-1104.00)	0.077
8	856.80 \pm 164.52 (628.00-1004.00)	592.33 \pm 115.54 (486.00-738.00)	759.67 \pm 288.69 (318.00-1138.00)	0.131
12	999.33 \pm 268.66 (522.00-1264.00)	545.67 \pm 189.44 (308.00-792.00)	1017.33 \pm 285.57 (470.00-1280.00)	0.008
24	1041.14 \pm 151.54 (806.00-1248.00)	812.00 \pm 282.23 (354.00-1112.00)	1182.00 \pm 240.20 (1050.00-1610.00)	0.046
				0.000
		0.008		控制組 vs 休克組:
P 值	0.285	(T0-T8:0.030)	0.026	0.00
		(T0-T12:0.009)	(T1.5-T8:0.042)	控制組 vs 復甦組
				0.88
				休克組 vs 復甦組:
				0.000

玖：血液不同時序時間點所測定之 GSSG 結果

三組血液不同時序時間點所測定之 GSSG 結果如下表：

- 血液 GSSG 使用 ANOVA 變異數分析比較三組差異，三組間接近統計上顯著差異 ($p=0.053$) (控制組 vs 休克組： $p=0.058$ ；控制組 vs 復甦組： $p=0.151$ ；休克組 vs 復甦組： $p=0.91$)。
- 血液 GSSG 依時間分成六組，(0 小時、1.5 小時、4 小時、8 小時、12 小時、24 小時)，使用 ANOVA 變異數分析比較三組 GSSG 差異。各時間點均無統計上顯著差異。
- 各別分析 GSSG 在三組中不同時間點差異，使用 ANOVA 變異數分析比較每一組之 GSSG 濃度差異，各組均無統計上顯著差異。

(表九)不同時序時間點測定血液之 GSSG 結果

血液 GSSG (uM)				
時間(T)	控制組	休克組	復甦組	P 值
0	11.35±4.48 (4.56-16.24)	12.14±5.34 (4.36-18.16)	13.06±6.38 (7.84-23.8)	0.894
1.5	12.01±6.43 (2.66-19.94)	12.67±4.55 (6.12-18.26)	9.92±4.38 (6.52-17.92)	0.642
4	8.95±5.50 (2.54-16.14)	14.09±5.12 (7.84-22.00)	17.19±10.36 (9.22-37.00)	0.183
8	7.74±3.90 (2.40-11.98)	14.19±8.15 (3.14-25.60)	11.44±5.58 (2.36-19.14)	0.268
12	12.16±5.07 (6.58-20.20)	14.19±5.89 (9.22-24.60)	14.03±12.39 (4.58-38.60)	0.899
24	8.56±4.80 (2.58-15.46)	13.90±5.75 (5.68-21.40)	11.48±2.53 (8.22-14.94)	0.155
				0.053
				控制組 vs 休克組:
				0.058
P 值	0.537	0.979	0.677	控制組 vs 復甦組
				0.151
				休克組 vs 復甦組:
				0.910

拾：血液不同時序時間點所測定之 GSH/GSSG ratio 結果

三組血液不同時序時間點所測定之 GSH/GSSG ratio 結果如下表；

- 使用 ANOVA 變異數分析比較三組血液 GSH/GSSG ratio 差異，三組間有統計上顯著差異 $p=0.001$ （控制組 vs 休克組： $p=0.001$ ；控制組 vs 復甦組： $p<0.1$ ；休克組 vs 復甦組： $p=0.212$ ）。
- 血液 GSH/GSSG ratio 依時間分成六組，（0 小時、1.5 小時、4 小時、8 小時、12 小時、24 小時），使用 ANOVA 變異數分析比較三組血液 GSH/GSSG ratio 差異。在 4 小時（ $p=0.63$ ）、12 小時（ $p=0.094$ ）這兩組統計上接近顯著差異，進行 Tukey' s 事後檢定，在 4 小時控制組 vs 休克組、控制組 vs 復甦組統計上接近顯著差異；在 12 時這一時間點休克組 vs 復甦組統計上接近顯著差異。
- 使用 ANOVA 變異數分析比較血液 GSH/GSSG ratio 在三組中不同時間點差異，各組均無統計上顯著差異。

(表十)不同時序時間點測定血液之 GSH/GSSG ratio 結果

血液 GSH/GSSG Ratio				
時間(T)	控制組	休克組	復甦組	P 值
0	111.70±52.01 (74.75-185.96)	102.90±75.42 (36.34-210.55)	84.74±44.82 (31.93-138.01)	0.734
1.5	146.58±141.24 (47.54-414.29)	67.62±27.22 (40.55-111.44)	136.23±39.42 (86.38-177.30)	0.257
4	174.48±145.00 (49.19-431.50)	55.82±20.99 (34.06-85.20)	66.61±40.50 (13.84-114.97)	0.063
8	164.61±148.15 (52.42-418.33)	72.79±81.33 (21.25-235.03)	119.88±152.39 (16.61-427.12)	0.521
12	98.87±50.96 (25.84-173.25)	47.50±29.89 (12.52-85.90)	117.95±71.40 (12.18-213.97)	0.094
24	186.96±152.49 (65.96-410.14)	71.31±40.84 (16.54-136.97)	104.89±19.04 (84.64-133.09)	0.133
				0.001
				控制組 vs 休克組:
				0.001
P 值	0.770	0.519	0.650	控制組 vs 復甦組
				0.098
				休克組 vs 復甦組:
				0.212

拾壹：血液不同時序時間點所測定之細胞激素 IL6 結果

三組血液不同時序時間點所測定之細胞激素 IL6 結果如下；

- 使用 ANOVA 變異數分析比較三組血液之細胞激素 IL-6 差異，三組間有統計上顯著差異 $p=0.021$ （控制組 vs 休克組： $p=0.042$ ；控制組 vs 復甦組： $p=1.0$ ；休克組 vs 復甦組： $p=0.044$ ）。
- 血液之細胞激素 IL6 依時間分成六組，（0 小時、1.5 小時、4 小時、8 小時、12 小時、24 小時），使用 ANOVA 變異數分析比較三組血液之細胞激素 IL6 差異，在 1.5 小時（ $p=0.057$ ）統計上接近顯著差異。
- 使用 ANOVA 變異數分析比較血液之細胞激素 IL6 在三組中不同時間點差異，各組均無統計上顯著差異。

(表十一) 不同時序時間點測定血液之細胞激素 IL-6 結果

血液細胞激素 IL-6 (ng/ml)				
時間(T)	控制組	休克組	復甦組	P 值
0	1.12±2.54 (0.00-6.29)	8.26±13.81 (0.00-38.17)	0.28±0.55 (0.00-1.37)	0.21
1.5	0.96±1.50 (0.00-3.28)	15.39±19.13 (0.00-39.41)	0.56±1.19 (0.00-2.96)	0.057
4	1.59±2.04 (0.00-4.69)	136.99±227.51 (0.00-582.67)	2.65±4.45 (0.00-11.41)	0.156
8	0.38±0.71 (0.00-1.65)	67.30±135.59 (0.09-342.88)	0.85±1.02 (0.00-2.44)	0.300
12	0.00±0.00 (0.00-0.01)	4.55±8.22 (0.00-20.78)	0.15±0.29 (0.00-0.73)	0.203
24	0.00±0.00 (0.00-0.00)	0.06±0.15 (0.00-0.36)	0.09±0.20 (0.00-0.44)	0.51
				0.021 控制組 vs 休克組:
P 值	0.346	0.203	0.250	0.042 控制組 vs 復甦組
				1.0 休克組 vs 復甦組:
				0.044

拾貳：血液不同時序時間點所測定之細胞激素 IL-10 結果

三組血液不同時序時間點所測定之細胞激素 IL-10 結果如下；

- 使用 ANOVA 變異數分析比較三組血液之細胞激素 IL-10 差異，三組間有統計上顯著差異 $p=0.008$ （控制組 vs 休克組： $p=0.005$ ；控制組 vs 復甦組： $p=0.282$ ；休克組 vs 復甦組： $p=0.242$ ）。
- 血液之細胞激素 IL-10 依時間分成六組，（0 小時、1.5 小時、4 小時、8 小時、12 小時、24 小時），使用 ANOVA 變異數分析比較三組之差異。在 8 小時（ $p=0.078$ ）統計上接近顯著差異，在 1.5 小時（ $p=0.008$ ）及 4 小時（ $p=0.028$ ）統計上有顯著差異。
- 使用 ANOVA 變異數分析比較血液之細胞激素 IL-10 在三組中不同時間點差異，控制組及休克組統計上有顯著差異。

(表十二) 不同時序時間點測定血液之細胞激素 IL-10 結果

血液細胞激素 IL10 (pg/ml)				
時間(T)	控制組	休克組	復甦組	P 值
0	790.80±1521.65 (0.00-3844.44)	867.68±1246.07 (5.71-3308.25)	2530.83±3757.63 (0.00-9900.00)	0.377
1.5	1558.23±961.15 (316.84-2748.88)	4449.3±2047.04 (1319.90-7522.22)	2393.47±859.22 (1441.84-3529.50)	0.008
4	568.58±386.65 (145.75-1241.38)	3938.94±3233.17 (1155.87-8172.22)	1395.19±1227.88 (346.35-3139.50)	0.028
8	386.22±262.24 (36.19-620.13)	1862.05±1700.90 (175.26-4425.00)	637.86±533.02 (318.88-1715.75)	0.078
12	215.55±236.19 (19.74-650.13)	493.84±867.17 (30.39-2247.63)	283.13±275.46 (75.75-743.88)	0.659
24	104.40±186.63 (0.00-507.00)	237.29±435.34 (0.00-1119.50)	87.45±94.00 (0.00-206.38)	0.617
		0.000		0.008
		T0-T1.5:0.014		控制組 vs 休克組:
	0.030	T0-T4:0.049		0.005
P 值	T1.5-T12:0.05	T1.5-T12:0.008	0.076	控制組 vs 復甦組
	T1.5-T24:0.021	T1.5-T24:0.004		0.282
		T4-T12:0.027		休克組 vs 復甦組:
		T4-T24:0.015		0.242

第四章 討論

第一節 結果討論

壹、年齡及體重與組別死亡率(表一, 二)

三組大白鼠在年齡分佈於9-12週，而體重均介於300-372公克之間；兩者在三組間並無明顯差異。本次大白鼠創傷休克模式，實驗方式採取出血休克維持平均動脈壓 $40\pm 5\text{mmHg}$ 持續壹小時模式進行，共進行111隻大白鼠；控制組進行36隻，無死亡隻數；休克組進行40隻，有5隻死亡，其中有2隻死亡時間點接近檢體採集點，取得檢體列入進一步實驗，死亡率為12.5%；休克及復甦組進行35隻，無死亡隻數。

貳、大白鼠創傷出血性休克血中葡萄糖-六-磷酸去氫酶活性之改變

經創傷出血性休克後，休克組及復甦組的大白鼠血中葡萄糖-六-磷酸去氫酶(G6PD)的活性在實驗的24小時中均明顯高於控制組的大白鼠。不管是休克組或復甦組；這血中葡萄糖-六-磷酸去氫酶(G6PD)的活性，在創傷出血性休克一發生就明顯開始上升並持續維持高於控制組。之前運用基因體 Micro-array 方法及大白鼠創傷血性休克模型的研究(Dr 陳國科會計劃 NSC91-2314-B-182A-106, Aug. 2002)顯示：肝臟葡萄糖-六-磷酸去氫酶的基因表現在休克缺血時期有明顯改變而上升；相對地，休克後經復甦處理的大白鼠，肝臟葡萄糖-六-磷酸去氫

酶基因表現上升的情形會消失。然而，在本實驗中復甦組大白鼠血中葡萄糖-六-磷酸去氫酶並未相同於肝臟基因表現的情形，而未與休克組大白鼠血中的葡萄糖-六-磷酸去氫酶的活性有明顯意義的差異。但仍可觀察到復甦組大白鼠血中葡萄糖-六-磷酸去氫酶活性依就高於控制組;且在休克後第四小時點之後均低於復甦組而界於控制組與休克組之間。而在創傷出血性休克發生後在 24 小時中呈現這樣的趨勢(附錄圖二)。

大白鼠的血液中葡萄糖-六-磷酸去氫酶活性在創傷出血性休克後不久即見到調節反應活性向上的情形。而林格氏液復甦液給與並未改變這樣的活性向上調節的反應。

參、大白鼠創傷出血性休克肝臟葡萄糖-六-磷酸去氫酶之變化

經創傷出血性休克後，利用西方墨點法分析各組肝臟組織並同時進行量化發現，休克組大白鼠肝臟葡萄糖-六-磷酸去氫酶 (G6PD) 之含量在創傷出血性休克後 4 小時中非常明顯高於控制組及復甦組的大白鼠;形成壹個尖峰。4 小時之後，休克組大白鼠肝臟葡萄糖-六-磷酸去氫酶(G6PD)明顯下降;甚至低於控制組的大白鼠。

相對地，復甦組大白鼠肝臟葡萄糖-六-磷酸去氫酶 (G6PD) 在創傷出血性休克後不久即見到低於控制組及休克組的大白鼠;而且持

續至 24 小時之久。這個現象與之前運用基因體 Micro-array 方法及大白鼠創傷血性休克模型研究 (Dr 陳國科會計劃 NSC91-2314-B-182A-106, Aug. 2002) 的結果是一致地。肝臟葡萄糖-六-磷酸去氫酶的基因表現在休克缺血時期有明顯改變而上升;而休克後經復甦處理的大白鼠,肝臟葡萄糖-六-磷酸去氫酶的基因表現上升的情形會消失。這個反應與本實驗中大白鼠的血中葡萄糖-六-磷酸去氫酶的活性改變並未相同。(附錄圖三)。

大白鼠肝臟中葡萄糖-六-磷酸去氫酶之蛋白含量在創傷出血休克後不久即見到明顯調節反應向上之情形;但創傷出血休克後 4 小時這個向上調節反應的情形即消失。林格氏液復甦液給與使得大白鼠肝臟中葡萄糖-六-磷酸去氫酶之表現量在創傷出血休克後大量增加之情形明顯消失。

肆、大白鼠創傷出血性休克肝臟還原型 (GSH)與氧化型麩氨基硫 (GSSG)之改變(附錄圖七,八)

還原型麩氨基硫(GSH)是一種含自由硫基的三胜肽;也是肝臟中清除過氧化基的主要酵素;接受過氧化基後被氧化成氧化型麩氨基硫 (GSSG)。因此還原型麩氨基硫(GSH)可看作肝細胞抗過氧化基 (anti-oxidant) 能力的指標³¹⁻³³。而氧化型麩氨基硫(GSSG)藉由

五碳糖磷酸化路徑中 6-磷酸葡萄糖水解酶 (G6PD) 作用產生的 NADPH, 可再度被還原成還原型麩氨基硫(GSH) 。

實驗中肝臟中休克組的還原型麩氨基硫(GSH) 明顯地在四小時點降至低點且是最低點。而且在這第四小時點與其它兩組(復甦組及控制組)有明顯且有意義之差異。之後休克組的肝臟還原型麩氨基硫漸漸回升而在 24 小時點達到高點;幾乎回復實驗休克前的狀態甚而更高。相對地;在整個創傷出血休克及後續 24 小時的過程中, 控制組肝臟中的還原型麩氨基硫呈現平穩而無明顯變化。復甦組肝臟中的還原型麩氨基硫也呈現相對平穩;不過延遲地在第 8 小時點仍可見相對較低之還原型麩氨基硫;且介於休克組與控制組之間。

個別大白鼠肝臟中的麩氨基硫貯存量有所差異。不過還原型麩氨基硫面對過氧自由基而被氧化成氧化型麩氨基硫;而氧化型麩氨基硫如果有足夠能量提供(五碳糖磷酸化路徑經 6-磷酸葡萄糖水解酶作用產生的 NADPH), 會接著被還原成還原型麩氨基硫。因此, 將還原型麩氨基硫與氧化型麩氨基硫的比值(GSH/GSSG ratio) 與還原型麩氨基硫一樣視為抗過氧化基 (anti-oxidant) 能力的指標; 或者視為組織細胞氧化壓力的指標。檢視本實驗中三組大白鼠肝臟的還原型麩氨基硫與氧化型麩氨基硫的比值(GSH/GSSG ratio) 時序變化曲線, 其變化與單獨肝臟還原型麩氨基硫(GSH) 所呈現的時序變化曲線其趨勢

是雷同地。不過 GSH/GSSG ratio 在三組的差異仍然較單獨肝臟還原型麩氨基硫更明顯。

經創傷出血休克，休克組大白鼠肝臟中的還原型麩氨基硫 (GSH) 或者還原型麩氨基硫與氧化型麩氨基硫比值 (GSH/GSSG ratio) 在 4 小時內明顯低於復甦組及控制組；意味著休克組大白鼠肝臟中的氧化壓力在創傷出血休克早期數小時內明顯大於復甦組及控制組。面對創傷出血休克早期缺血-再灌流傷害；氧化壓力大增；肝臟中的還原型麩氨基硫將被大量氧化成氧化型麩氨基硫。而休克的進行，肝臟組織灌流不足；肝臟中的能量耗盡，無法及時補充；將使得氧化型麩氨基硫無法再被還原成還原型麩氨基硫。因此可理解為何休克組大白鼠肝臟中的還原型麩氨基硫 (GSH) 或者還原型麩氨基硫與氧化型麩氨基硫比值 (GSH/GSSG ratio) 在 4 小時內明顯降低。創傷出血休克後及時給與復甦液，回復組織灌流。所以復甦組大白鼠面對休克早期的氧化壓力，因肝臟仍有餘力提供能量，所以因過氧化基被消耗的還原型麩氨基硫 (GSH) 可被及時還原補充。而這可以解釋為何在創傷出血休克早期，復甦組及控制組大白鼠的還原型麩氨基硫 (GSH) 或者還原型麩氨基硫與氧化型麩氨基硫比值 (GSH/GSSG ratio) 在 4 小時內差異不大。

大白鼠肝臟對於休克需要數小時(4 小時?) 的反應時間來代償氧化壓力的傷害以及誘發還原型麩氨基硫 (GSH) 不足的反應。因此，休

克組大白鼠肝臟中的還原型麩氨基硫(GSH)或者還原型麩氨基硫與氧化型麩氨基硫比值(GSH/GSSG ratio)在 4 小時後急速上升。在實驗 24 小時點見到休克組肝臟中的還原型麩氨基硫(GSH)或者還原型麩氨基硫與氧化型麩氨基硫比值(GSH/GSSG ratio)達到高點甚至高於復甦組及控制組。而復甦組肝臟的還原型麩氨基硫與氧化型麩氨基硫比值(GSH/GSSG ratio)在實驗 24 小時點也見到高於控制組。

大白鼠肝臟對於創傷出血休克, 氧化壓力傷害以及麩氨基硫的反應與血液中 6-磷酸葡萄糖水解酶活性 (G6PD)之反應明顯不同。出現 4-8 小時的延遲代償反應。肝臟 6-磷酸葡萄糖水解酶在創傷出血休克後 1.5-4 小時後急速上升, 使得輔酶 NADPH 得以充份提供, 是否因此肝臟的 GSH 在 12-24 小時後急速上升, 所以進一步回頭抑制肝臟 6-磷酸葡萄糖水解酶, 因而在 12-24 小時後肝臟 6-磷酸葡萄糖水解酶明顯下降。

伍、大白鼠創傷出血性休克血液還原型 (GSH)與氧化型麩氨基硫 (GSSG)之改變(附錄圖五,六)

經創傷出血性休克, 休克組大白鼠的血液還原型麩氨基硫從休克開始就降低而且持續走低; 在實驗 12 小時點見到低點。相對地, 控制組大白鼠的血液還原型麩氨基硫變化相對平穩且沒有明顯降低。休克

組與控制組有明顯差異。比較起來，復甦組大白鼠的血液還原型麩氨酸硫變化呈現上下振盪；在實驗 4-8 小時點走低而介於休克組與控制組間；與控制組較接近而沒有明顯差異。

相較於血液氧化型麩氨酸硫(GSSG)，血液還原型麩氨酸硫(GSH)的變化趨勢與血液還原型麩氨酸硫與氧化型麩氨酸硫比值(GSH/GSSG ratio) 的變化趨勢較為一致。休克組大白鼠的血液還原型麩氨酸硫與氧化型麩氨酸硫比值(GSH/GSSG ratio) 從休克開始就降低而且維持低比值；與休克組與控制組有明顯差異。比較起來，復甦組大白鼠的血液還原型麩氨酸硫與氧化型麩氨酸硫比值(GSH/GSSG ratio) 變化介於休克組與控制組間。相對地，復甦組大白鼠的血液還原型麩氨酸硫變化與控制組差異不明顯差異。因此對於復甦介入大白鼠創傷出血性休克的治療，以還原型麩氨酸硫與氧化型麩氨酸硫比值(GSH/GSSG ratio) 來評估其血液中的氧化還原壓力比單獨用血液的還原型麩氨酸硫來作為指標更合適。而觀察到復甦介入大白鼠創傷出血性休克的治療可改善急性期 24 小時部份血液中的氧化還原壓力。

陸、大白鼠創傷出血性休克血液細胞激素 IL-6 及 IL-10 之改變

(附錄圖九, 十)

大白鼠血液中細胞激素 IL-6 在創傷出血休克後不久(在 1.5 小時時間點)即見到大幅上升;並維持數小時之久;在創傷出血休克後 4 小時時間點達到高點。相對地,在復甦組及控制組大白鼠血液中細胞激素 IL-6 並未上升。可見單獨復甦液給與可明顯抑制血液中發炎細胞激素 IL-6 之活化。

休克組及復甦組大白鼠血液中細胞激素 IL-10 在創傷出血休克後不久(在 1.5 小時時間點)即見到大幅上升;休克組明顯高於復甦組。不過休克組大白鼠血液中細胞激素 IL-10 在創傷出血休克後上升時間維持較久。單獨復甦液給與可使大白鼠血液中細胞激素 IL-10 明顯較休克組提早下降(在 8 小時時間點回到與控制組無差異);明顯降低創傷出血休克後大白鼠血液中細胞激素 IL-10 之反應。休克組大白鼠血液中細胞激素 IL-10 遲至創傷出血休克後 12 小時時間點回到與控制組無差異。

這些情形與過去一些研究結果相似。創傷出血休克導致發炎細胞激素 $TNF-\alpha$ 最先反應並促進其它細胞激素的分泌;在創傷出血休克後 1-2 小時血液中細胞激素 $TNF-\alpha$ 即達到高點;並在 4 小時內降下來。而我們實驗結果也顯示在創傷出血休克後很快地大白鼠血液中細胞激素 IL-10 立即反應上升並可維持 12 小時。而這與其它文獻報告血液中細胞激素 IL-10 在創傷出血休克後血中濃度可持續維持 12 小時以上相

當顯著濃度是一致地。我們實驗結果也顯示在創傷出血休克後，單獨復甦液給與僅可降低大白鼠血液中細胞激素 IL-10 之反應。相對地，單獨復甦液給與可明顯抑制大白鼠血液中細胞激素 IL-6 之上升反應。

柒、綜合討論

休克組大白鼠肝臟葡萄糖-六-磷酸去氫酶 (G6PD) 在創傷出血休克後, 前四小時定量先明顯上升, 然後轉而下降。檢視肝臟組織的氧化壓力, 以負的還原型/氧化型麩氨基硫比值(-GSH/GSSG Ratio)為指標; 休克組大白鼠在創傷出血休克後, 肝臟組織的氧化壓力變化反應與休克組大白鼠葡萄糖-六-磷酸去氫酶的反應趨勢是一致地; 也是先上升而後下降。以林格氏液復甦液處理可以明顯降低復甦組大白鼠肝臟組織的氧化壓力; 同時也消除了大白鼠肝臟組織在創傷出血休克後葡萄糖-六-磷酸去氫酶向上增加之變化。甚至其比控制組大白鼠肝臟組織的葡萄糖-六-磷酸去氫酶還低。推論林格氏液復甦液處理創傷出血休克, 有抑制大白鼠肝臟組織在休克後葡萄糖-六-磷酸去氫酶大量表現。

相對地, 在本實驗中觀察到創傷出血休克後, 休克組大白鼠血液中的葡萄糖-六-磷酸去氫酶調節反應及血液中氧化壓力變化情形與肝臟組織的反應大不相同。休克組及復甦組大白鼠在創傷出血休克後不久就持續觀察到其血液中葡萄糖-六-磷酸去氫酶活性上升, 且持續維持高檔。而復甦組大白鼠血液中葡萄糖-六-磷酸去氫酶活性, 經林格式

液復甦後雖然略微下降且低於休克組大白鼠;但其差異並不明顯。創傷出血休克後，大白鼠血液中葡萄糖-六-磷酸去氫酶活性的變化,對於林格氏復甦液給予的反應與肝臟組織的反應也是大不相同。

表十三 肝臟葡萄糖-六-磷酸去氫酶/氧化壓力之變化

表十四 血液中葡萄糖-六-磷酸去氫酶/氧化壓力/發炎及抗發炎細胞激素之變化

表:肝臟葡萄糖-六-磷酸去氫酶 /氧化壓力之變化

	葡萄糖-六-磷酸去氫酶 G6PD	氧化壓力 = GSH/GSSG Ratio
休克組	先↑↑再↓	先↑↑再↓
復甦組	↓	—
控制組	—	—

表:血液中葡萄糖-六-磷酸去氫酶 /氧化壓力/發炎及抗發炎細胞激素之變化

	葡萄糖-六-磷酸去氫酶 G6PD	氧化壓力 = GSH/GSSG Ratio	發炎細胞激素 IL-6	抗發炎細胞激素 IL-10
休克組	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
復甦組	↑↑	↑	—	↑
控制組	—	—	—	—

進一步討論創傷出血休克後大白鼠血液中的氧化壓力，在休克後休克組大白鼠血液中氧化壓力明顯上升且持續維持高的氧化壓力。然而林格氏液給與的復甦動作可改善部分復甦組大白鼠血液中的氧化壓力;且休克組大白鼠在創傷出血休克後，血液中發炎的細胞激素 IL-6 及抗發炎細胞激素 IL-10 均明顯上升，且維持數小時後即明顯下降。然而林格氏復甦液給與可明顯抑制血液中發炎的細胞激素 IL-6 上升之反應，但只能部份壓抑抗發炎細胞激素 IL-10 上升之反應。

第二節 研究限制

研究中幾個研究限制值得進一步探討。首先，研究分組的實驗室數值存在廣泛的差異。可能是由於大白鼠的個別差異造成的。在每個時間點，每組偏小的樣本數，存有實驗室數值廣泛差異，將導致統計資料更多的影響。若要消除或降低實驗研究的偏差，每組大白鼠更大的樣本應被列入考慮。



第五章 結論

創傷出血性休克誘發血液及肝臟葡萄糖-六-磷酸去氫酶的反應及調節;不過血液與肝臟的反應並不相同。創傷出血性休克後從 1.5 小時時間點,大白鼠血液中葡萄糖-六-磷酸去氫酶活性明顯上升;林格氏液復甦介入未抑制血中葡萄糖-六-磷酸去氫酶活性上升反應。肝臟葡萄糖-六-磷酸去氫酶在創傷出血性休克後從 1.5 小時時間點即明顯增加;但創傷出血性休克後 4 小時點向上調節反應情形消失。林格氏液復甦液給抑制大白鼠肝臟葡萄糖-六-磷酸去氫酶在休克後向上調節反應。

創傷出血性休克後肝臟與血液氧化壓力的變化有所不同。創傷出血性休克誘發血液及肝臟氧化壓力的改變可由血液中還原型麩胱氨酸與氧化型麩胱氨酸的比值(GSH/GSSG ratio) 的曲線變化看出。休克後血液氧化壓力的改變在非常早期即發生;在 1.5 小時時間點即明顯增加。而復甦介入可改善血液中部份氧化壓力。而創傷出血性休克後肝臟氧化壓力先明顯增加;在 4 小時時間點達到尖峰;之後在 8-12 小時時間點後下降(創傷出血性休克後肝臟組織的還原型麩胱氨酸在休克後 8-12 小時時間點觀察到明顯上升)。林格氏液復甦介入明顯降低創傷出血性

克後肝臟的氧化壓力 (跟控制組比較，復甦介入並無明顯改變休克初期 12 小時肝臟組織的還原型麩氨基硫)。

休克初期的數小時內，血液中發炎細胞激素 IL6 和抗發炎細胞激素 IL10 顯著增加；但 12-hour 後消失。林格氏液復甦介入抑制 IL6 增加。但休克後經林格氏液復甦初期幾小時， IL-10 仍然增加，但是低於休克組。所以林格氏液復甦介入無法完全, 只部份抑制血液中 IL-10 上升。

創傷出血性休克改變並增加血液及肝臟氧化壓力；同時改變並調節血液及肝臟葡萄糖-六-磷酸去氫酶。但是兩者在創傷出血休克後之調節反應是有所不同。創傷出血休克後，肝臟氧化壓力先增加而後下降；肝臟葡萄糖-六-磷酸去氫酶也是先增後降。復甦介入降低肝臟氧化壓力；也抑制肝臟葡萄糖-六-磷酸去氫酶休克後之增加；甚至轉而下降。這是否暗示肝臟葡萄糖-六-磷酸去氫酶面對創傷出血休克後之反應與發炎反應較有關係？然而本實驗缺乏直接證據可以直接說明。創傷出血休克後，血液氧化壓力大增；同時血液葡萄糖-六-磷酸去氫酶活性增加；血液發炎細胞激素 IL-6 及抗發炎細胞激素 IL-10 也增加。復甦介入抑制血液 IL-6 上升及抑制部份血液 IL-10 上升；降低血液部份氧化壓力。但是復甦介入並未明顯降低血液葡萄糖-六-磷酸去氫酶

活性之增加。是否血液葡萄糖-六-磷酸去氫酶面對創傷出血休克後之調節反應與肝臟葡萄糖-六-磷酸去氫酶有所不同？需進一步實驗釐清。

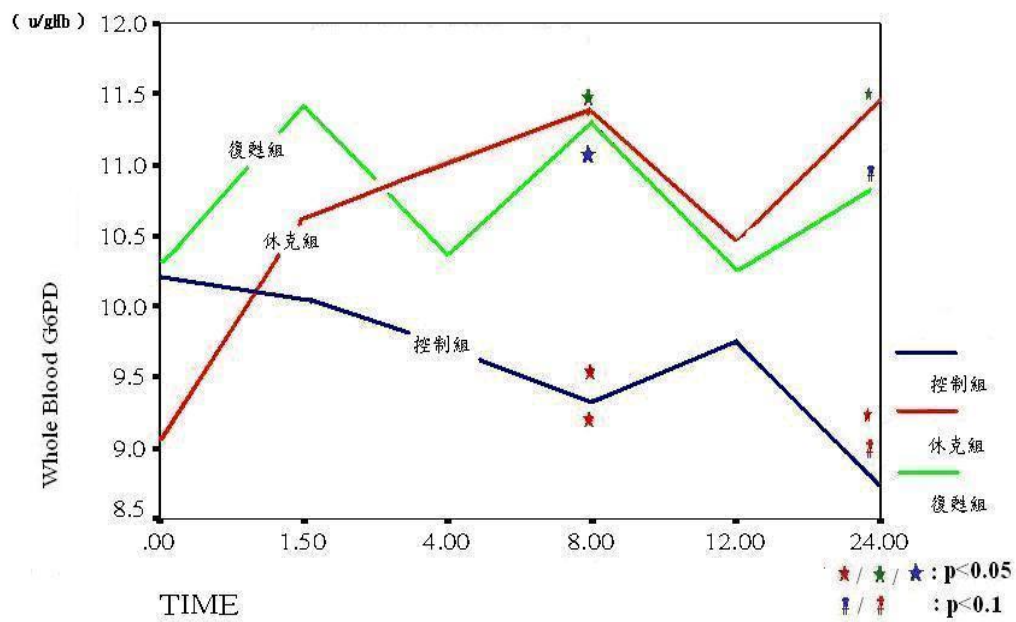


圖表

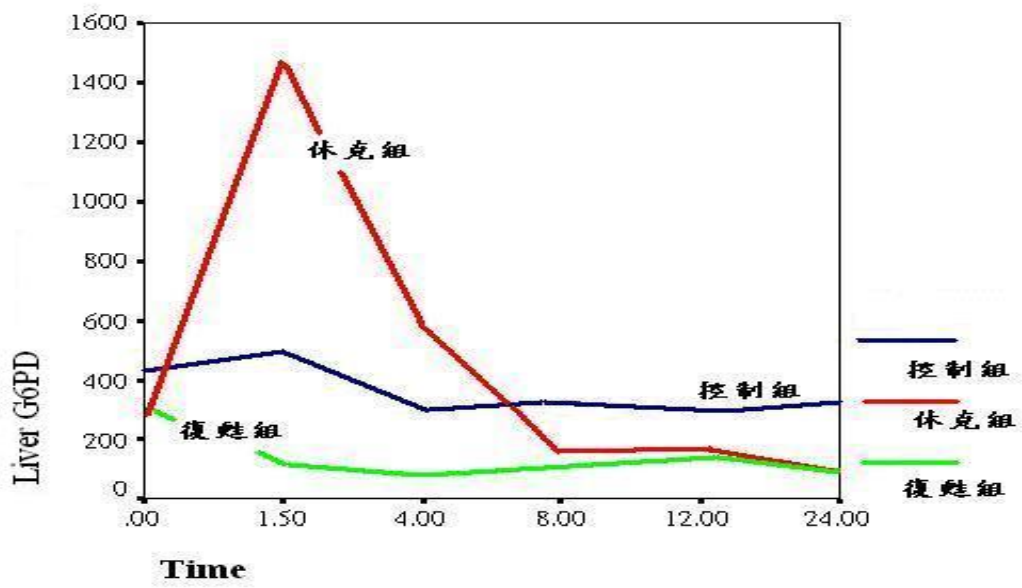
圖一 動物實驗



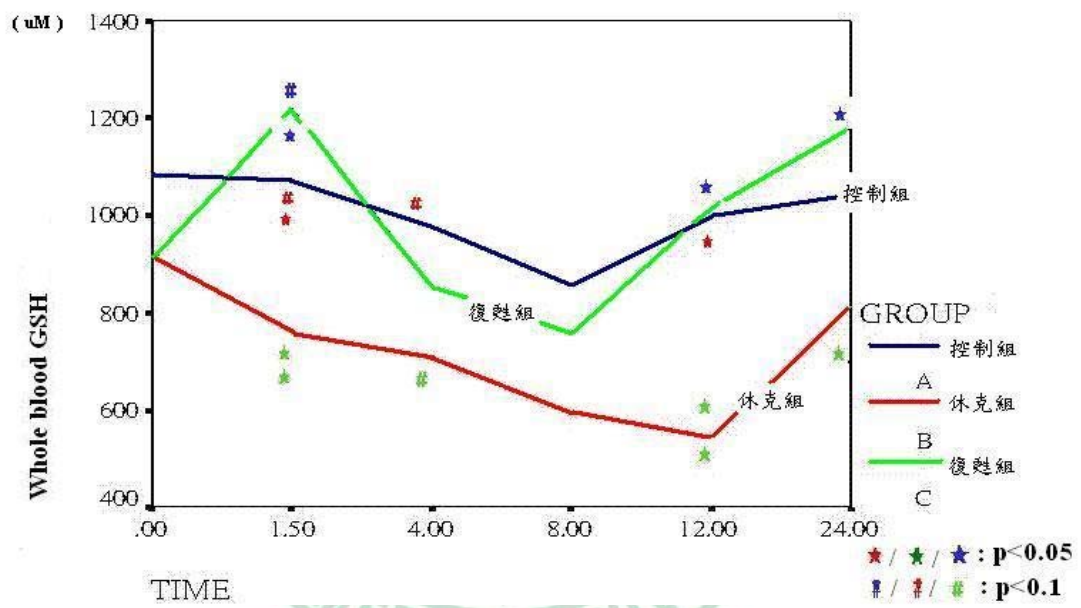
圖二 實驗不同時序時間點測定之血液 G6PD 比較曲線



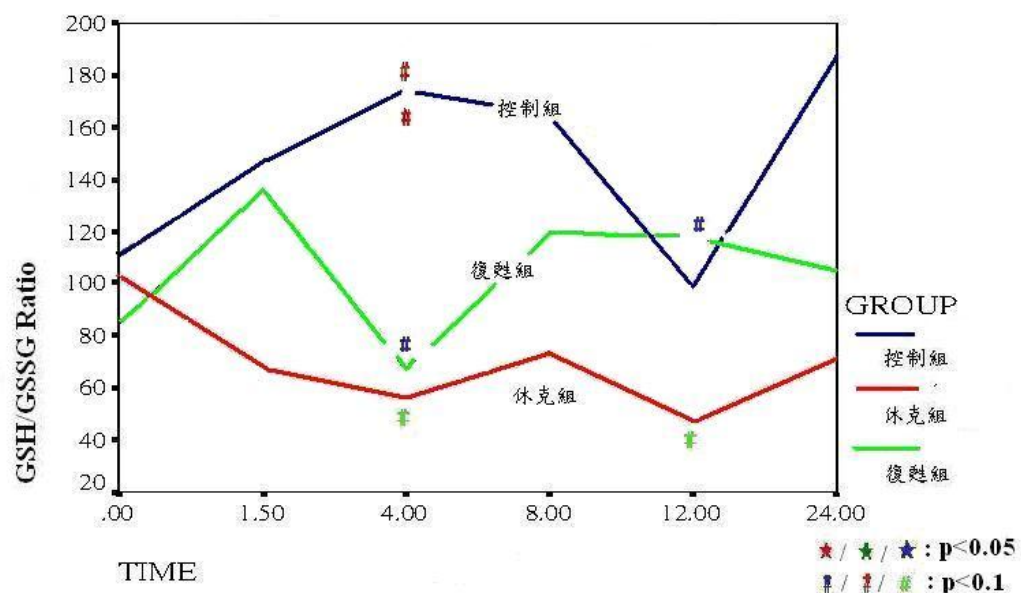
圖四 實驗不同時序時間點西方點墨法測定肝臟之 G6PD 曲線圖



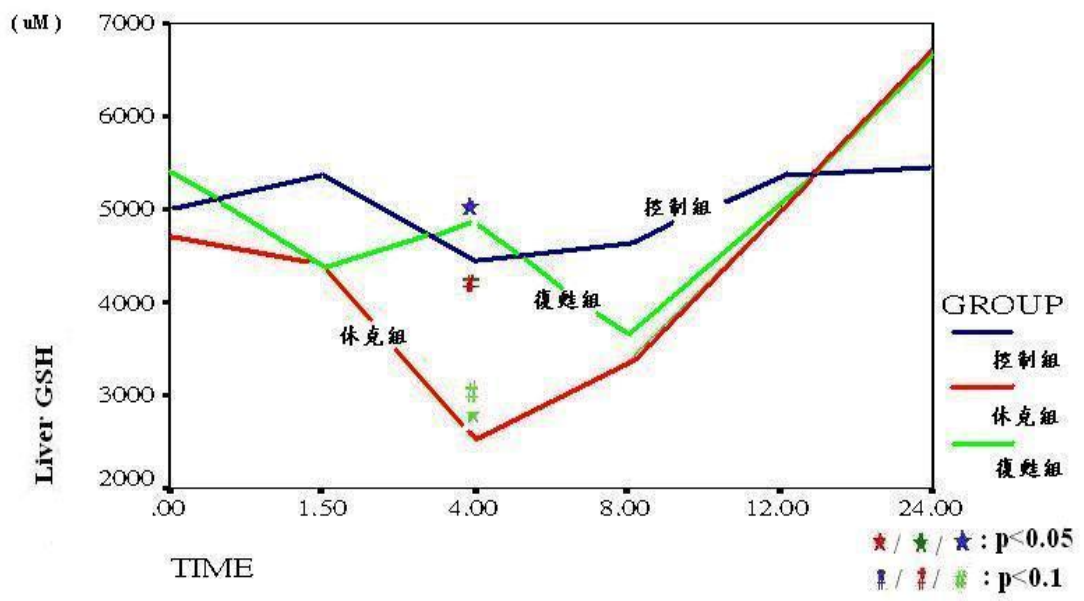
圖五 實驗不同時序時間點測定血液 GSH 比較曲線圖



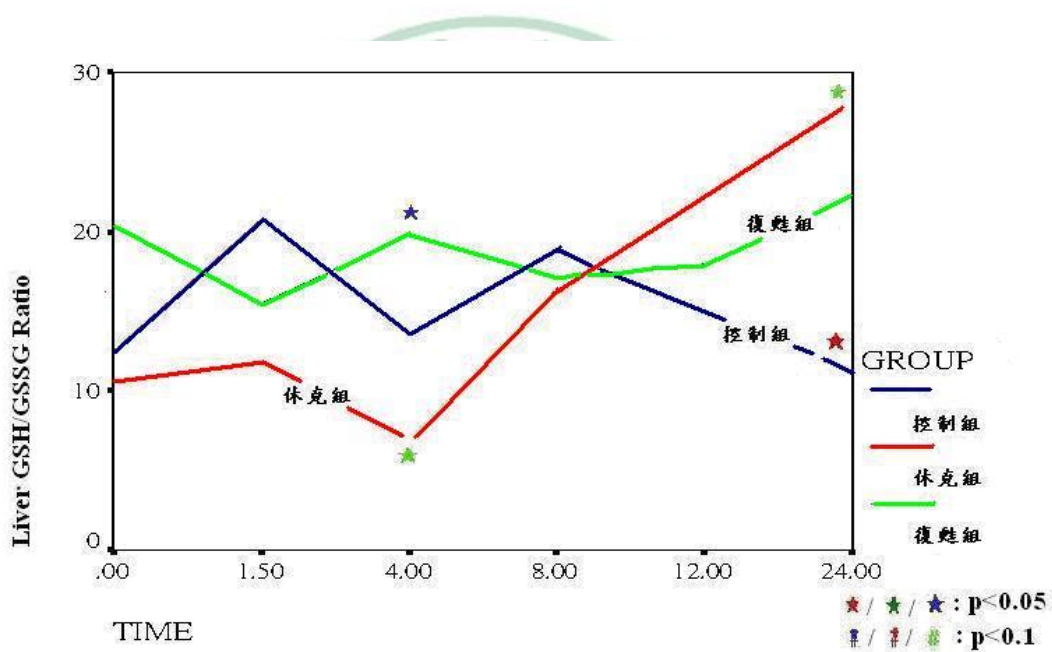
圖六 實驗不同時序時間點測定血液 GSH/GSSG Ratio 比較曲線圖



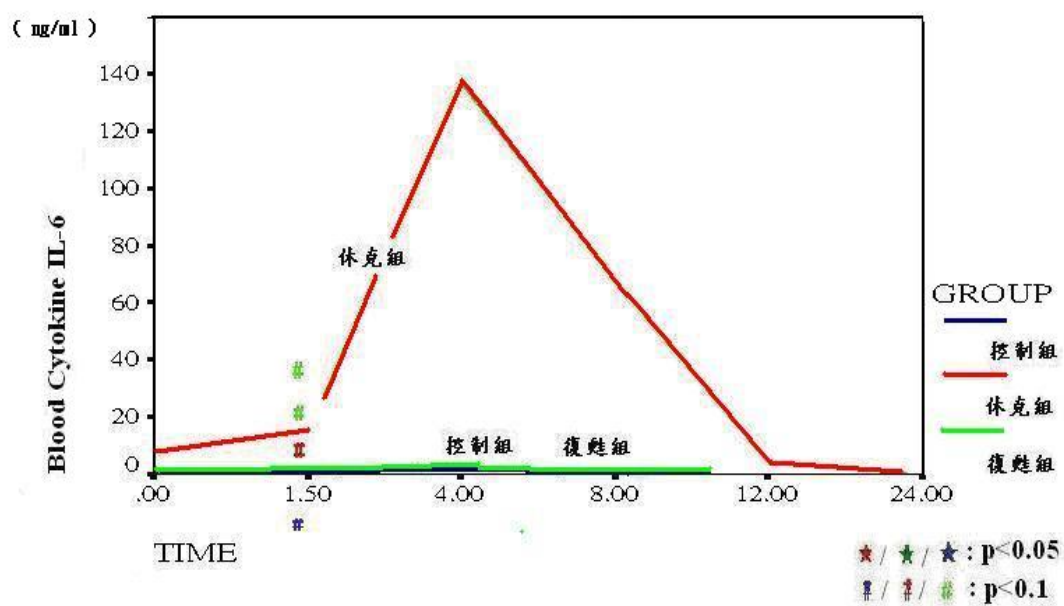
圖七 實驗不同時序時間點測定肝臟 GSH 比較曲線圖



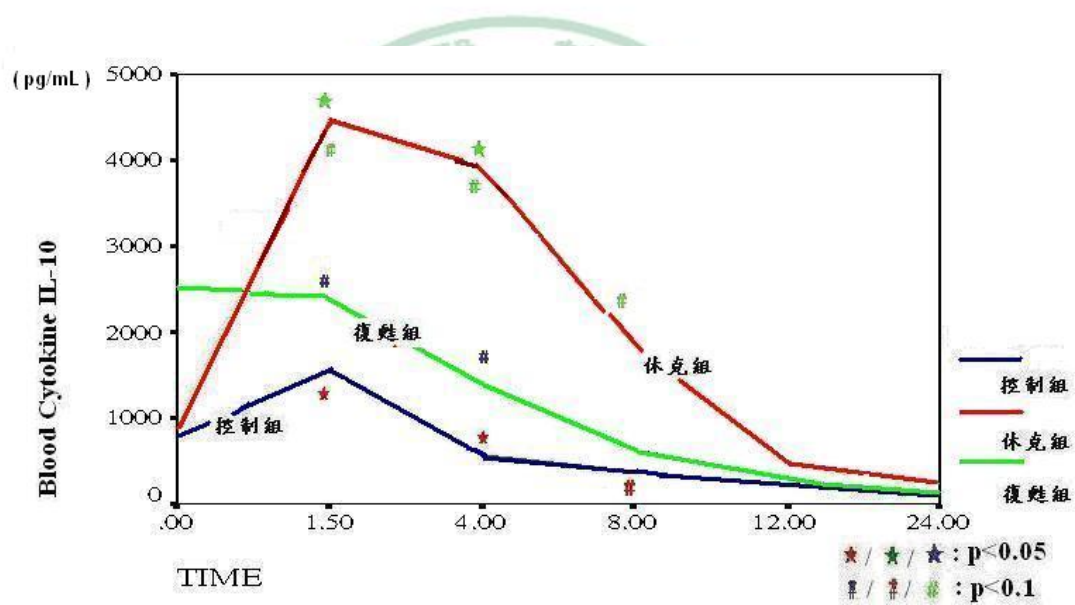
圖八 實驗不同時序時間點測定肝臟 GSH/GSSG Ratio 比較曲線圖



圖九 實驗不同時序時間點測定血液細胞激素 IL-6 比較曲線圖



圖十 實驗不同時序時間點測定血液細胞激素 IL-10 比較曲線



參考文獻

1. Trunkey DD. Trauma. Accidental and intentional injuries account for more years of life lost in the U.S. than cancer and heart disease. Among the prescribed remedies are improved preventive efforts, speedier surgery and further research. *Sci Am* 249: 28-35, 1983.
2. Chaudry IH, Ayala A, Ertel W, and Stephan RN. Hemorrhage and resuscitation: immunological aspects. *Am J Physiol* 259: R663-678, 1990.
3. Maier RV. Pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome--endotoxin, inflammatory cells, and their mediators: cytokines and reactive oxygen species. *Surg Infect (Larchmt)* 1: 197-204; discussion 204-195, 2000.
4. Adachi H, Strauss W, Ochi H, and Wagner HN, Jr. The effect of hypoxia on the regional distribution of cardiac output in the dog. *Circ Res* 39: 314-319, 1976.
5. Gutierrez G, Reines HD, and Wulf-Gutierrez ME. Clinical review: hemorrhagic shock. *Crit Care* 8: 373-381, 2004
6. Ray CJ, Abbas MR, Coney AM, and Marshall JM. Interactions of adenosine, prostaglandins and nitric oxide in hypoxia-induced vasodilatation: in vivo and in vitro studies. *J Physiol* 544: 195-209, 2002
7. Bateman RM, Sharpe MD, and Ellis CG. Bench-to-bedside review: microvascular dysfunction in sepsis--hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Crit Care* 7: 359-373, 2003

8. Singer M, De Santis V, Vitale D, and Jeffcoate W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet* 364: 545-548, 2004
9. Cristofori L, Tavazzi B, Gambin R, Vagnozzi R, Vivenza C, Amorini AM, Di Pierro D, Fazzina G, and Lazzarino G. Early onset of lipid peroxidation after human traumatic brain injury: a fatal limitation for the free radical scavenger pharmacological therapy? *J Investig Med* 49: 450-458, 2001
10. Kong SE, Blennerhassett LR, Heel KA, McCauley RD, and Hall JC. Ischaemia-reperfusion injury to the intestine. *Aust N Z J Surg* 68: 554-561, 1998
11. Chow CC, Clermont G, Kumar R, Lagoa C, Tawadrous Z, Gallo D, Betten B, Bartels J, Constantine G, Fink MP, Billiar TR, and Vodovotz Y. The acute inflammatory response in diverse shock states. *Shock* 24: 74-84, 2005
12. DeLong WG, Jr., and Born CT. Cytokines in patients with polytrauma. *Clin Orthop Relat Res* 57-65, 2004
13. Peitzman AB, Billiar TR, Harbrecht BG, Kelly E, Udekwu AO, and Simmons RL. Hemorrhagic shock. *Curr Probl Surg* 32: 925-1002, 1995
14. Britt LD, Weireter LJ, Jr., Riblet JL, Asensio JA, and Maull K. Priorities in the management of profound shock. *Surg Clin North Am* 76: 645-660, 1996
15. Kaplan JE, and Saba TM. Humoral deficiency and reticuloendothelial depression after traumatic shock. *Am J Physiol* 230: 7-14, 1976

16. Faist E, Baue AE, Dittmer H, and Heberer G. Multiple organ failure in polytrauma patients. *J Trauma* 23: 775-787, 1983
17. Goris RJ, te Boekhorst TP, Nuytinck JK, and Gimbrere JS. Multiple-organ failure. Generalized autodestructive inflammation? *Arch Surg* 120: 1109-1115, 1985
18. Edmiston CE, Jr., and Condon RE. Bacterial translocation. *Surg Gynecol Obstet* 173: 73-83, 1991
19. Deitch EA, Maejima K, and Berg R. Effect of oral antibiotics and bacterial overgrowth on the translocation of the GI tract microflora in burned rats. *J Trauma* 25: 385-392, 1985
20. Rush BF, Jr., Sori AJ, Murphy TF, Smith S, Flanagan JJ, Jr., and Machiedo GW. Endotoxemia and bacteremia during hemorrhagic shock. The link between trauma and sepsis? *Ann Surg* 207: 549-554, 1988
21. Alexander JW, Boyce ST, Babcock GF, Gianotti L, Peck MD, Dunn DL, Pyles T, Childress CP, and Ash SK. The process of microbial translocation. *Ann Surg* 212: 496-510; discussion 511-492, 1990
22. Deitch EA, Xu D, Franko L, Ayala A, and Chaudry IH. Evidence favoring the role of the gut as a cytokine-generating organ in rats subjected to hemorrhagic shock. *Shock* 1: 141-145, 1994
23. Mainous MR, Ertel W, Chaudry IH, and Deitch EA. The gut: a cytokine-generating organ in systemic inflammation? *Shock* 4: 193-199, 1995
24. Tamion F, Richard V, Lyoumi S, Daveau M, Bonmarchand G, Leroy J, Thuillez C, and Lebreton JP. Gut ischemia and mesenteric synthesis of

- inflammatory cytokines after hemorrhagic or endotoxic shock. *Am J Physiol* 273: G314-321, 1997
25. Gupte SA, Levine RJ, Gupte RS, Young ME, Lionetti V, Labinsky V, Floyd BC, Ojaimi C, Bellomo M, Wolin MS, and Recchia FA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH fuels superoxide production in the failing heart. *J Mol Cell Cardiol* 41: 340-349, 2006
 26. Spolarics Z. Endotoxemia, pentose cycle, and the oxidant/antioxidant balance in the hepatic sinusoid. *J Leukoc Biol* 63: 534-541, 1998
 27. Majde JA. Animal models for hemorrhage and resuscitation research. *J Trauma* 54: S100-105, 2003
 28. Hauser CJ. Preclinical models of traumatic, hemorrhagic shock. *Shock* 24 Suppl 1: 24-32, 2005
 29. Lomas-Niera JL, Perl M, Chung CS, and Ayala A. Shock and hemorrhage: an overview of animal models. *Shock* 24 Suppl 1: 33-39, 2005
 30. Bautista JM, Mason PJ, and Luzzatto L. Purification and properties of human glucose-6-phosphate dehydrogenase made in *E. coli*. *Biochim Biophys Acta* 1119: 74-80, 1992
 31. Meister A. New aspects of glutathione biochemistry and transport--selective alteration of glutathione metabolism. *Nutr Rev* 42: 397-410, 1984
 32. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 263: 17205-17208, 1988

33. Hsu YP, Chen RJ, Fang JF, Lin BC, Huang TL, Cheng ML, Chiu DT, and Tsay PK. Increased susceptibility to oxidant injury in hepatocytes from rats with intra-abdominal hypertension. *J Trauma* 57: 569-575, 2004

