

2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090010

參展科別 醫學與健康科學

作品名稱 **How do antihypertensive agents decrease the high mortality rate of sepsis and septic shock?**
(探討抗高血壓藥物如何降低敗血症的致死率)

得獎獎項

就讀學校 臺北市立建國高級中學

指導教師 童禕珊

作者姓名 鍾昫恩

關鍵詞 Antihypertensive agent (抗高血壓藥)、
Sepsis (敗血症)、Atenolol

作者簡介



我是建國中學數理資優班鍾昀恩，從高一下開始每周三堂課的獨立研究課程時間，加上寒暑假數個星期的白天都待在醫院的實驗室，這讓我體會到做研究的挑戰以及研究結果的來之不易，更學會到蒐集整理資料的技巧、以及如何設計實驗和實驗的方法。

能獨立完成此專題研究，是我人生中一個重要的里程碑，同時也帶給自己永難忘懷的人生體驗與學習經歷，也謝謝生物童老師、實驗室王主任、洪博士及學姊們的指導。對於努力付出所帶來的成就感與喜悅，我已深深地將其銘刻於心中！

摘要

過去已知敗血症患者使用 β 受體阻滯劑能有效改善心律、酸鹼參數、降低死亡率，在嚴重敗血症和敗血性休克的急性期，持續使用 β 受體阻滯劑可降低 90 天內的死亡率。然而，其中的分子機轉仍不明。我們先前利用健保資料庫進行大數據分析並以動物實驗驗證，發現 β 受體阻滯劑中的 atenolol 能顯著減少敗血症的致死率。此研究中，我們以 LPS (脂多糖) 作為敗血症誘導劑，並利用西方墨點法及逆轉錄聚合酶鏈式反應等生物技術，來探討其中可能的保護機轉，結果發現 atenolol 可減緩肺部上皮細胞的 EMT (上皮間質轉換) 及先天免疫巨噬細胞的過度活化。因此，atenolol 似乎能減緩 LPS 造成肺部的傷害，未來有望應用至臨床，以克服敗血症所造成的高死亡率。

Abstract

In the past, it is known that the use of beta-blockers in sepsis patients can effectively improve heart rate, acid-base parameters, and decrease fatality rate. Also, in the acute phase of severe sepsis and septic shock, continuous use of beta-blockers can reduce blood pressure within 90 days, the molecular mechanism of which, however, is still unknown. By means of national health insurance research database to carry out big data analysis and animal experiment to verify, we found that the atenolol in beta-blockers can significant decrease the fatality rate of sepsis. In this study, we used lipopolysaccharide (LPS) as sepsis inducing agent with western blot and bio-techniques such as reverse transcription-PCR to discover the possible defensive mechanism. It turned out that atenolol can alleviate epithelial–mesenchymal transition (EMT) and activation of macrophages in the innate immune system. Accordingly, atenolol seems to be able to reduce the lung damage caused by LPS, which is expected to be applied on clinical application and overcome the high fatality rate caused by sepsis.

壹、前言

一、研究動機

敗血症 (sepsis) 的致死率很高，是每年都會影響數百萬人的主要醫療保健問題。敗血症是病原體進入身體後，經血液循環擴散到全身，同時引發身體免疫炎症反應，產生大量細胞激素，導致的全身性發炎反應。病人只要受病菌感染，若未做適當的處置，就有可能引發敗血症。敗血症因其感染途徑、感染種類繁多而複雜，其臨床症狀也不盡相同。儘管現代醫療技術已有了長足的進步，但是敗血症的發病率及死亡率卻始終居高不下。據統計敗血症約有 30% 的死亡率，如果病情惡化至敗血性休克，死亡率更可能高達 80%。因此我想尋找是否有治療或減緩敗血症的方法，並進行了相關文獻探討。

(一)、敗血症的定義

2001 年國際上主要相關醫學會將敗血症定義為全身性發炎反應症候群(systematic inflammatory reaction syndrome, SIRS)，其中症狀包括體溫不正常(小於 36°C 或大於 38°C)、心跳速度過大(大於 90 次/分鐘)、呼吸急促(大於 20 次/分鐘或 PaCO₂ 小於 32mmHg)及白血球數量異常(週邊血液白血球數目大於 12000 或小於 4000)，當病人發生上述四個症狀中的二個或二個以上症狀時，即稱為「SIRS」。然而對一般在醫院中的病人而言，許多與感染沒有直接相關的症狀亦有可能被診斷為 SIRS，因此在醫學上敗血症的診斷並沒有足夠的特異性。根據 2016 年所重新定義的敗血症指南並據以發展出的快速器官衰竭計分法(quick sequential organ failure assessment, quick SOFA)診斷標準，其中包含意識障礙、低血壓(收縮壓小於 100mmHg)、呼吸急促(大於 22 次/分鐘)和臨床感染證據，只要有其中 3 項(須包含臨床感染證據)就能定義為敗血症。

(二)、敗血症的致病機轉

敗血症是由與特定入侵病原體和宿主免疫系統狀態有關的多種因素共同引起的。宿主系統一旦檢測到病原體，宿主的全身免疫系統就會被激活。免疫細胞不僅會識別病原

體的相關分子，還會識別來自受損組織損傷相關的分子。敗血症的早期階段以炎症過度（有時導致細胞因子風暴）為特徵，隨後可能是免疫系統功能長期下降，這些任何一個階段都被證明是會致命的。而其中受影響較大的是白血球（此處取巨噬細胞）及上皮細胞（取肺部上皮細胞）。

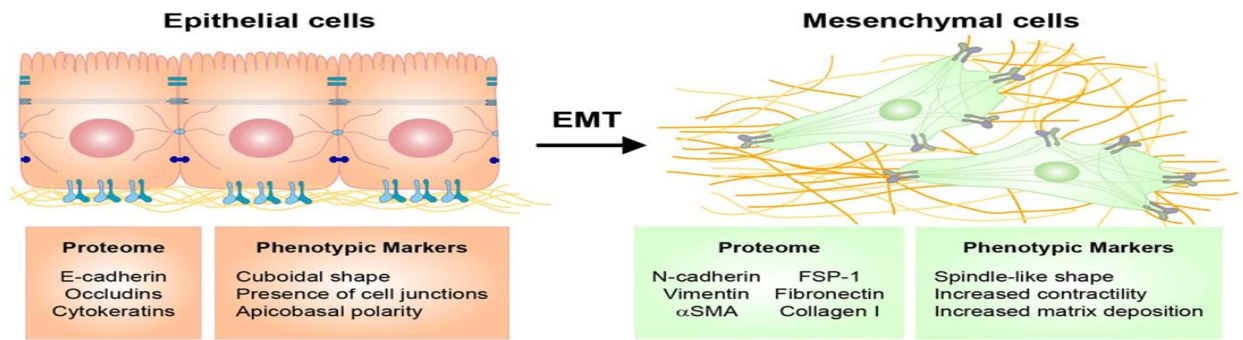
1. 肺部上皮細胞與 EMT

肺部上皮細胞是由物理和化學屏障組成，以維持肺部功能。肺部上皮細胞會暴露在各種環境挑戰中，例如微生物製劑、空氣有毒成分或導致炎症和纖維化的微粒等。被激活的肺部上皮細胞可以通過釋放各種防禦機制（例如防禦素 defensins 和粘蛋白 mucins 的釋放）以及調節流體的運輸，來調節肺部的屏障功能。肺部上皮細胞還具有釋放多種介質和粘附分子的能力，這些分子可以介導並激活遷移性炎症和免疫細胞。但當肺部上皮細胞受到病原或外來物嚴重的刺激後，會導致肺部細胞受損，改變細胞極性並失去彼此間的黏附，並分化為多種細胞類型的多能基質細胞，如獲得遷移和侵襲性而成為間質細胞，此過程稱為上皮-間質轉換 (epithelial mesenchymal transition, EMT)。其中能影響產生 EMT 的蛋白質有：

- (1) Fibronectin（纖維連蛋白）為一種細胞外基質，纖維連蛋白在傷口癒合過程中起作用，當傷口出現後，FN 會出現在傷口血漿中，產生止血、保護損傷組織的作用。在傷口修復過程中，FN 促使吞噬細胞吞噬異物，促進成纖維細胞分泌蛋白酶，分解蛋白雜質。纖維連蛋白亦是胚胎發育過程中重要的物質，可以促使胚胎發育過程中的細胞黏附和遷移。
- (2) STAT3 受細胞生長因子調節，可經由 JAK-STAT 通路磷酸化為 pSTAT3 並使得細胞外化學信號傳送至 DNA 轉錄啟動因子上，從而促使 DNA 轉錄，為一重要之信號途徑（圖二）。
- (3) 核因子活化 B 細胞 κ 輕鏈增強子(NF κ B)是一種控制 DNA 轉錄的蛋白複合體。平時 I κ B 會附著於其上，當其接收到細胞激素(Cytokine)、細菌和病毒的感染、氧化自由基(reactive oxygen species)和生長刺激因子(mitogens)時，會啟動反應。反

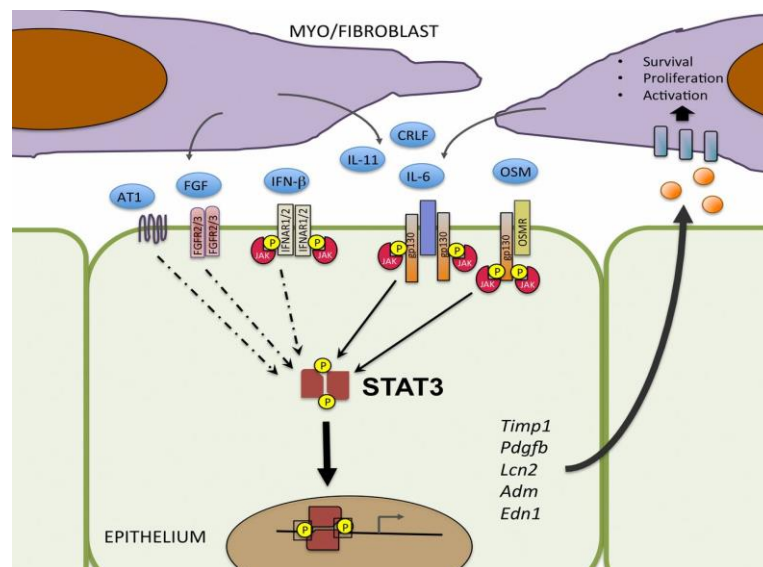
應時，外界活化因子(activators)會使 IKK 複合體活化，使活化的 IKK 複合體接著磷酸化的 I κ B(pI κ B)，使 I κ B 與 NF κ B 分離，之後 I κ B 會被分解。而活化的 NF κ B 則會進入細胞核與基因結合，吸引共活化因子(coactivator)促進轉錄進而影響基因的表現 (圖三)。

- (4) AKT 蛋白激酶，作用於葡萄糖代謝、細胞增殖、細胞凋亡等的一種絲胺酸蛋白激酶。其中，AKT1 存在於各細胞當中，且被發現在多種腫瘤細胞中扮演重要的角色，AKT2 則主要參與在胰島素訊號傳遞中，可以用來轉運葡萄糖，而 AKT3 則存在於腦中，但其相關作用還有待探討(圖四)。
- (5) TGF- β (transforming growth factor type β) 與 Type II receptor 結合，並吸引 Type I receptor 形成二聚體(Type II receptor 平常為活化狀態，Type I receptor 平常則為活化狀態)，Type II 的 serine kinase domain 會磷酸化 Type I 的 serine kinase domain，Type I 被活化後會磷酸化 SMAD2，SMAD2 蛋白可與 SMAD4 蛋白結合，促進胞外基質表現、抑制增生、促進分化等基因表現。
- (6) SMAD Smad 是 TGF β 家族信號傳導的下游因子，介導 TGF β 信號從胞質中傳入細胞核，特異性調節 TGF β 基因的表達。最近的研究發現與 Smad 結合的蛋白因子，包括轉錄因子、活化因子和抑制因子等在 Smad 特異性識別和調控 TGF β 靶基因表達的過程中起著十分重要的作用。同時，Smad 通過與不同蛋白因子相結合形成複合體調控 TGF β 靶基因和表達可能是 TGF β 具有多種生物學功能的分子基礎。
- (7) Cleaved PARP：PARP 是存在於多數真核細胞中的一個多功能蛋白質翻譯後修飾酶，可通過識別結構損傷的 DNA 片段而被啟動，是 DNA 損傷的感受器。同時，PARP 又是細胞凋亡核心成員胱天蛋白酶(caspase)的切割受質。因此，它在 DNA 損傷修復與細胞凋亡中發揮著重要作用。
- (8) phospho extracellular regulated protein kinases(pERK)：參與細胞增殖與分化、細胞形態維持、細胞骨架的構建、細胞凋亡和細胞的癌變等多種生物學反應。

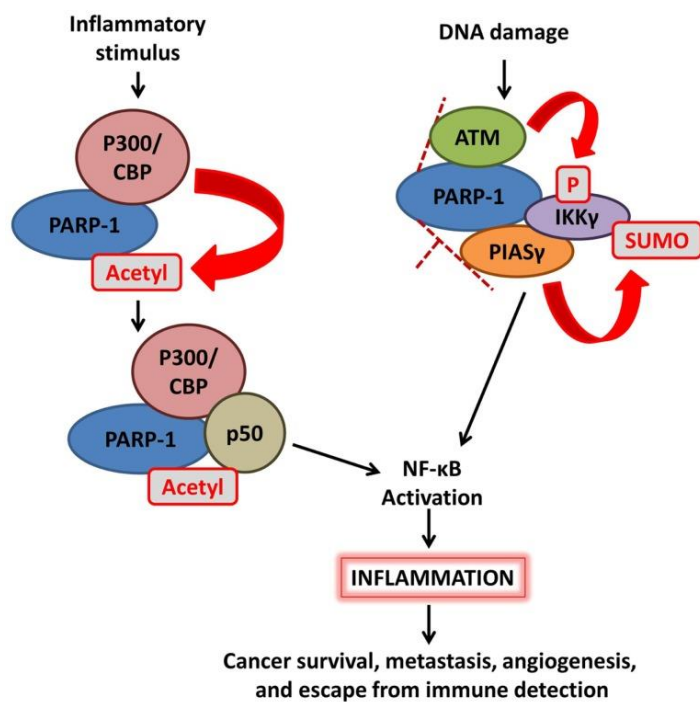


圖一、EMT 的過程(O' Connor and Gomez, Clinical and Translational Medicine 2014, 3:23)

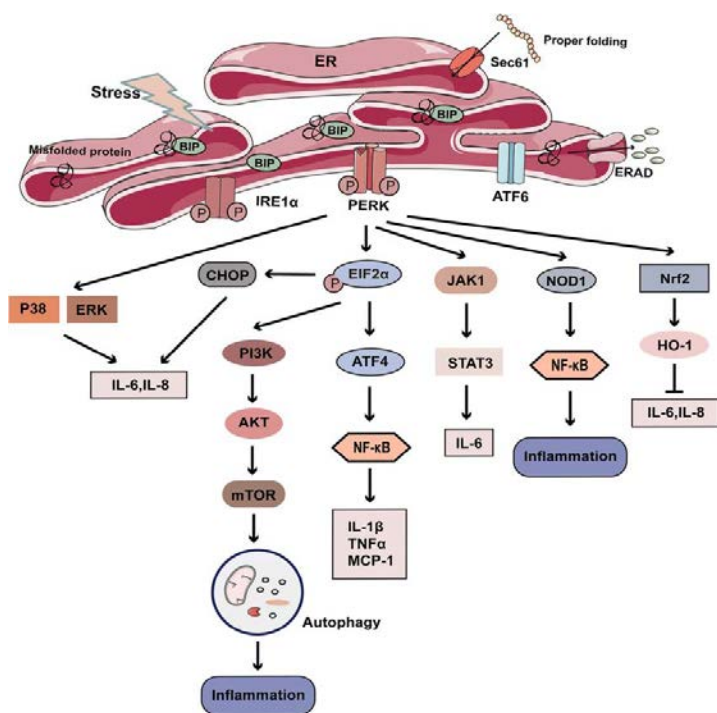
EMT 是一個複雜的動態過程，會發生在發育過程、傷口癒合、器官纖維化和癌症的轉移等。如圖一所示，EMT 會使 Claudins、Occludins、E-cadherin、Cytokeratin 等上皮蛋白表達下降，細胞外基質水解酶 MMP-2、MMP-9 蛋白表達上調，導致細胞外成分發生降解、細胞間緊密連接鬆解。另一方面，EMT 會增加波形纖維蛋白 (Vimentin) 或纖維連蛋白 (fibronectin) 的表達，細胞骨架肌動蛋白微絲 (F-actin) 重新組合，細胞骨架重構導致細胞外形演變為紡錘形纖維細胞樣，這些改變會使得細胞的遷徙和侵襲能力增加，並降低上皮細胞對肺部的屏障力。



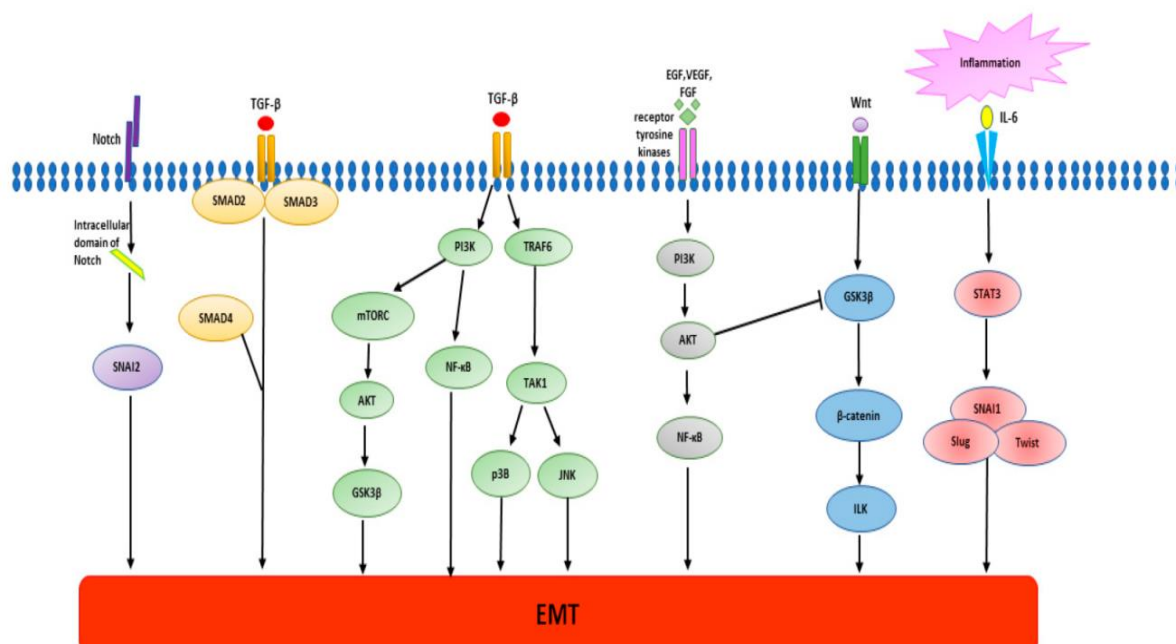
圖二、STAT3 與 EMT 之關係 (Jeremy S. Duffield. (2016). Beyond EMT: Epithelial STAT3 as a Central Regulator of Fibrogenesis, from <https://jasn.asnjournals.org/content/27/12/3502>)



圖三、NFκB 如何影響發炎反應 (Weaver AN, Yang ES(2013). Beyond DNA Repair: Additional Functions of PARP-1 in Cancer. From <https://europepmc.org/article/med/24350055>)



圖四、AKT 如何影響發炎反應 (Springer Verlag, Applied Microbiology and Biotechnology)



圖五、多種產生 EMT 的路徑圖(Rohit Gundamaraju et al.(2020). Endogenous Anti-Cancer Candidates in GPCR, ER Stress, and EMT. Retrieved February 19, 2021, from <https://www.mdpi.com/2227-9059/8/10/402/htm>)

2. 巨噬細胞

敗血症造成的全身性發炎反應使免疫細胞活化去清除病原菌，但過度活化的免疫系統同時也會對身體造成很大的影響，過多釋出的細胞激素除了造成免疫細胞不斷的活化之外，也可能造成心跳過速或者呼吸急促等等症狀。而其中巨噬細胞可由單核球細胞(monocyte)分化而成，為一種吞噬細胞，可參與脊椎動物的先天性免疫和細胞免疫，主要功能為以固定細胞或游離細胞的形式，對死亡細胞、細胞殘片及病原體進行吞噬作用。而在肺部則固定存在大量的肺部巨噬細胞(pulmonary alveolar macrophages; PAM)為下呼吸道免疫的第一道防線，受刺激的巨噬細胞會透過細胞外信號調節激酶 (ERK)、STAT3 及 NF κ B 的活性來促進炎症反應。細胞外調節蛋白激酶被磷酸化(Phosphorylation)後會由細胞質轉位到核內，進而介導一些蛋白質的轉錄活化，並參與細胞增殖與分化、細胞形態維持、細胞骨架的構建、細胞凋亡等等。而常見由巨噬細胞分泌釋放之發炎細胞激素有：IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等，抗發炎細胞激素有 IL10，分述如下：

- (1) IL-1 β : 活化 T、B、NK 細胞、參與發炎反應、增加細胞間黏附分子(ICAM)的表現和作用在下視丘、刺激嗜中性白血球的趨化作用(chemotaxis)、破壞局部組織使免疫細胞更容易進入等。
- (2) IL-6 : 引起發炎反應與刺激肝細胞製造急性期蛋白、促使 B 細胞的生長、分化及抗體的產生、活化 T 細胞和幫助造血生成作用等。
- (3) TNF- α : 活化血管內皮細胞與增加血管的通透性、促進 IgG、補體與細胞進入組織並增加體液流入淋巴結、與 IL-1 可協同作用於各個免疫反應等。
- (4) IL-10 : 是一種抗發炎細胞激素，抑制 Th1，防止免疫反應過度擴大，也抑制 Th2，防止抗體過度產生。另一方面，IL-10 亦會參與 B cell 活化後的分裂與分化。

(三)、敗血症的治療

敗血症的高致死率並不單純是病菌感染，而是感染所造成體內免疫反應，引起一連串細胞激素分泌，進而造成身體器官之功能失調。所幸近幾年來，許多臨床研究提供了敗血症新的治療方向，讓我們對敗血症治療有些許突破。以下簡述治療的重點：

1. 早期目標之治療

對於嚴重敗血症或敗血性休克患者之早期，應給予積極性治療，2016 指南建議 3 小時內給予每公斤 30 毫升的晶狀液體做為主要復甦輸液，達成平均動脈壓 65mmHg 為理想的血壓目標。另外，輸血應嚴格遵守血紅素 7mg/dL 以下才輸血的原則，避免高比例的器官損傷與死亡。

2. 抗菌藥物使用

強調以綜合聯合抗生素治療(combination therapy)與多重抗生素治療(multidrug therapy)的協同用藥方式治療。並運用前降鈣素原(procalcitonin, PCT)此類生物指標，來判斷病菌的控制情況，以提早採取降級抗生素的使用，好減少副作用及提高病人的預後。

3. 升壓劑與類固醇使用的限制

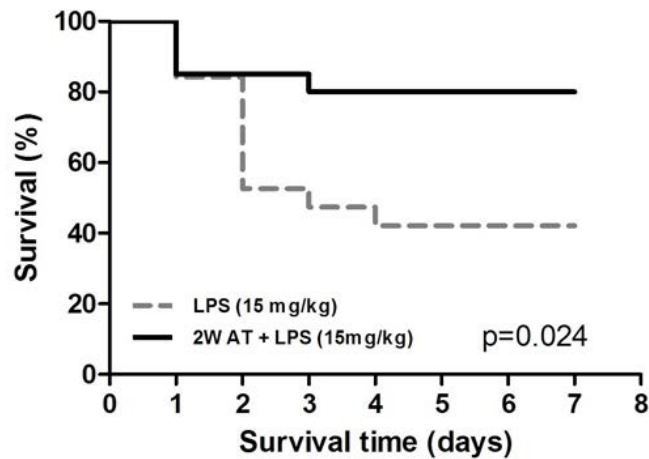
由於敗血症是個急症，多年來敗血症的治療一直是在嘗試以廣效抗生素作為緊急處置的第一步驟，但隨之引來諸如耐藥性與真菌感染等後遺症，甚至造成器官損傷與病人存活的直接影響。因此，積極尋找其他替代或輔助方法以避免上述之許多人們常見的憾事，就成為醫學界共同的願景及努力的目標。對於敗血症低血壓病人建議優先採用正腎上腺素。對於升壓劑無效的敗血性休克病人，建議使用類固醇中的氫化可體松(hydrocortisone)，但不可常規使用。 β 受體阻滯劑是治療冠心病和慢性心力衰竭患者的主要手段之一。近年來，臨床上對敗血症患者使用 β 受體阻滯劑的興趣也日益增厚。敗血反應是一系列極其複雜的事件，涉及炎症和抗炎過程、體液和細胞反應，以及心臟循環異常。在這種情況下，使用 β 受體阻滯劑可以平衡敗血症引起的心血管變化，但在代謝、免疫和凝血功能上，也可能具有重要的影響。最近的一項開放式的隨機二期研究顯示，利用艾司洛爾(Esmolol)選擇性阻斷 β 受體的作用，對敗血症患者具有保護的功能。

(四)、Atenolo 對細胞激素及老鼠存活率的影響

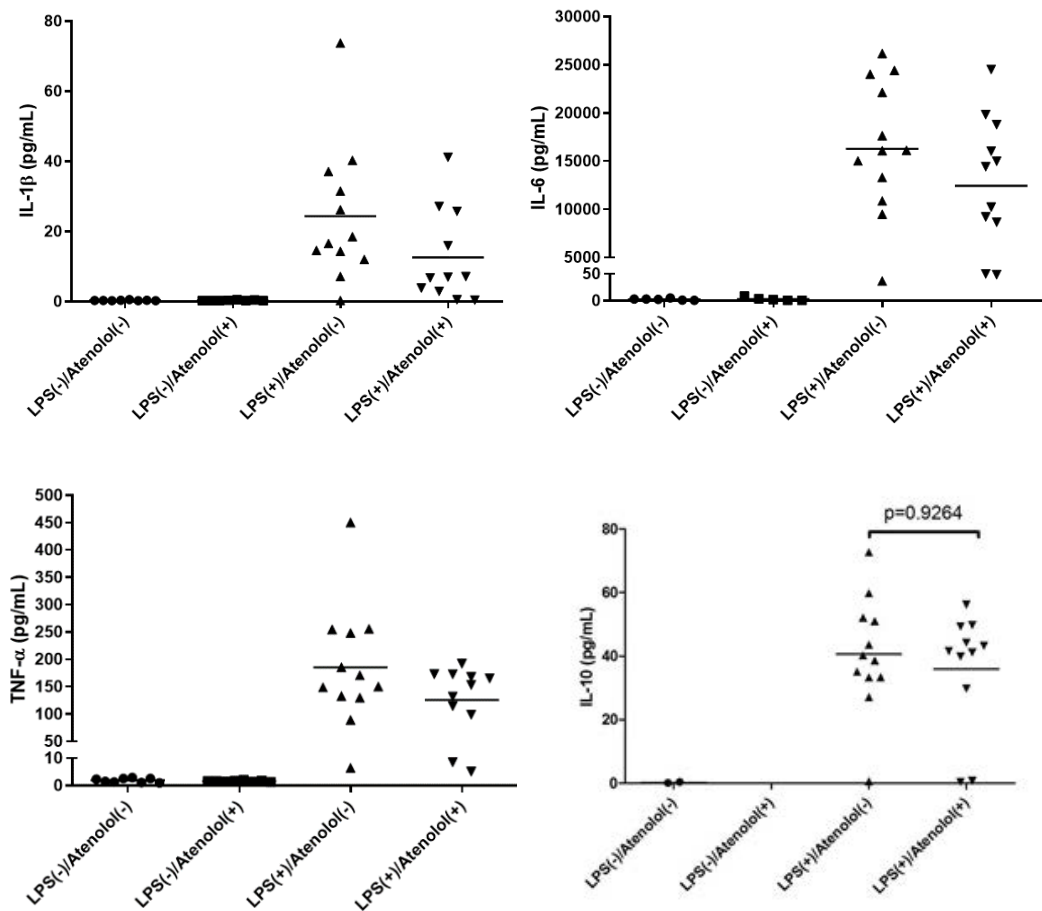
先前本實驗室藉由全民健保大數據的分析，發現部分高血壓藥可以減少病人敗血症的致死率，尤其以 β 受體阻滯劑 Atenolol 效果更為顯著。過去已知將細菌性內毒素的主要成分脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS)，注射至小鼠體內會引起許多臨床上敗血性休克的症狀，如血壓下降、血管對收縮劑產生低反應性、心肌功能降低、周邊組織血流量減少等現象，因此本實驗室便以 LPS (lipopolysaccharide，脂多醣) 注射至 C57BL/6J 小鼠 (6-8 weeks old)作為敗血症的動物模式，探討 Atenolol 在活體中是否能減緩 sepsis 的致病程度。

實驗結果發現小鼠預先餵食 Atenolol 能降低 LPS 引發敗血症的致死率 (圖六)。分析小鼠支氣管肺泡灌洗液亦發現，Atenolol 能降低 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 等促進發炎的細胞激素濃度 (圖七)。藉由小鼠實驗以及其他相關文獻推論，LPS 不但會造成上皮細胞的受損，使上皮細胞之間的黏附力被破壞並促使細胞產生 EMT，LPS 也會刺激肺部固定存在的巨噬細胞大量活化並分泌大量細胞激素，吸引更多發炎相關細胞進駐，使肺部產生過

度發炎現象，而 Atenolol 的使用可能會藉由降低發炎細胞激素的產生，改善敗血症之高致死率。本研究將進行一系列的實驗，來探討 Atenolol 如何減緩敗血症病人肺部所產生的發炎反應，希望找出 Atenolol 降低敗血症致死率的相關分子機制，並在未來能以此機轉開發新一代藥物。



圖六、Atenolol 對於給予 LPS 隻小鼠存活率的影響



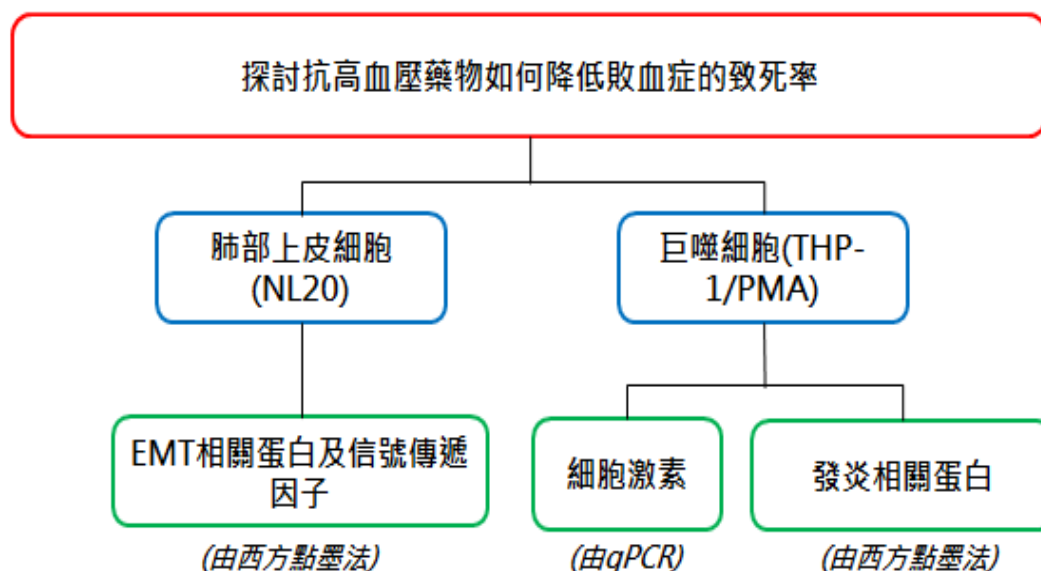
圖七、敗血症小鼠是否給予 Atenolol 前後細胞激素濃度圖

二、研究目的

在先前實驗室藉由全民健保大數據的分析，發現部分高血壓藥可以減少病人發生敗血症的機率，尤其以 β 受體阻滯劑 Atenolol 效果更為顯著，且在動物模式中以 LPS 模擬格蘭氏陰性菌感染所造成之敗血症，同樣也觀察到預先餵食 Atenolol 的小鼠能降低 LPS 引發敗血症的致死率，但是實際的機制卻仍然尚未明瞭。因此我們將以細胞實驗來從事以下兩項研究：

- (一)、探討 Atenolol 可否減緩 LPS 促進正常肺部上皮細胞的上皮間質轉換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)
- (二)、探討 Atenolol 是否具有影響 LPS 活化先天免疫巨噬細胞(macrophage)的作用

希望透過以上的實驗，我們可以了解 Atenolol 是否會透過減少上皮細胞的 EMT 或者避免巨噬細胞的過度活化，來減緩 LPS 引起的敗血症。



圖八、研究概念圖

貳、研究方法與過程

一、研究設備及器材

(一)、儀器

1. 光譜分析儀



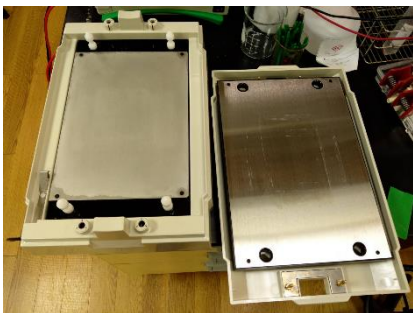
<https://www.labwrench.com/equipment/2125/biotek-synergy-html>

2. Vortex 混和機

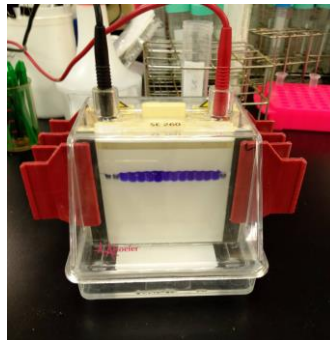


<https://www.scientificindustries.com/vortex-genie-2.html>

3. Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (半乾轉機)



4. 電泳槽



5. Orbital Shaker



(<https://www.lab666.com.tw/product-info.asp?id=114>)

6. 冷光影像儀



7. 離心機



(<https://m.guidechem.com/com-guide128668/prodetail3654633.html>)

8. Nanodrop



(<https://www.biocompare.com/Product-Reviews/41290-ND-1000-UV-Vis-Spectrophotometer-From-NanoDrop-Technologies/>)

9. 即時定量聚合酶鏈結反應儀



10. 細胞培養箱



(<https://www.pojet-ind.com.tw/product-detail-417485.html>)

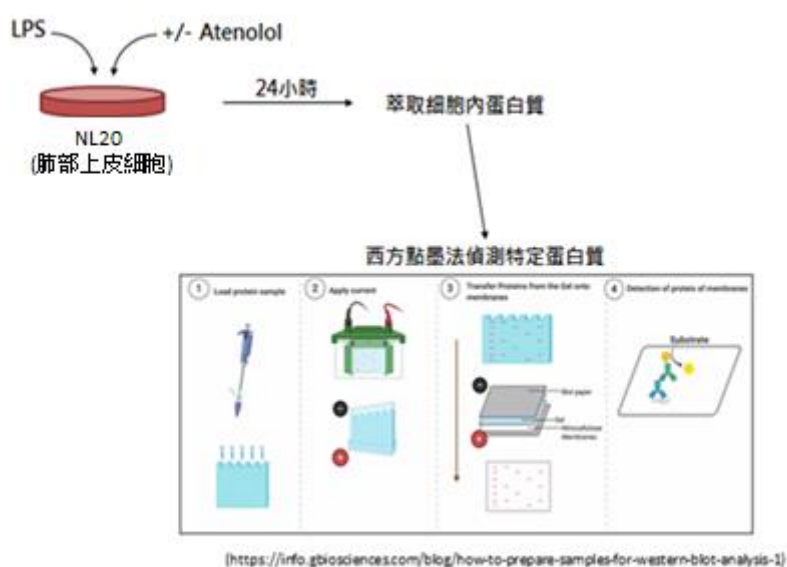
(二)、耗材

- 1.細胞培養液(F12, RPMI medium)
- 2.細胞培養皿
- 3.Eppendorf (微量離心管)
- 4.15ml 離心管
- 5.四連排 (qPCR 管)
- 6.Tips (10/ 200/1000ul)

二、研究過程及方法

實驗一、Atenolol 可否影響 LPS 引起之肺部上皮細胞的上皮間質轉換(EMT)？

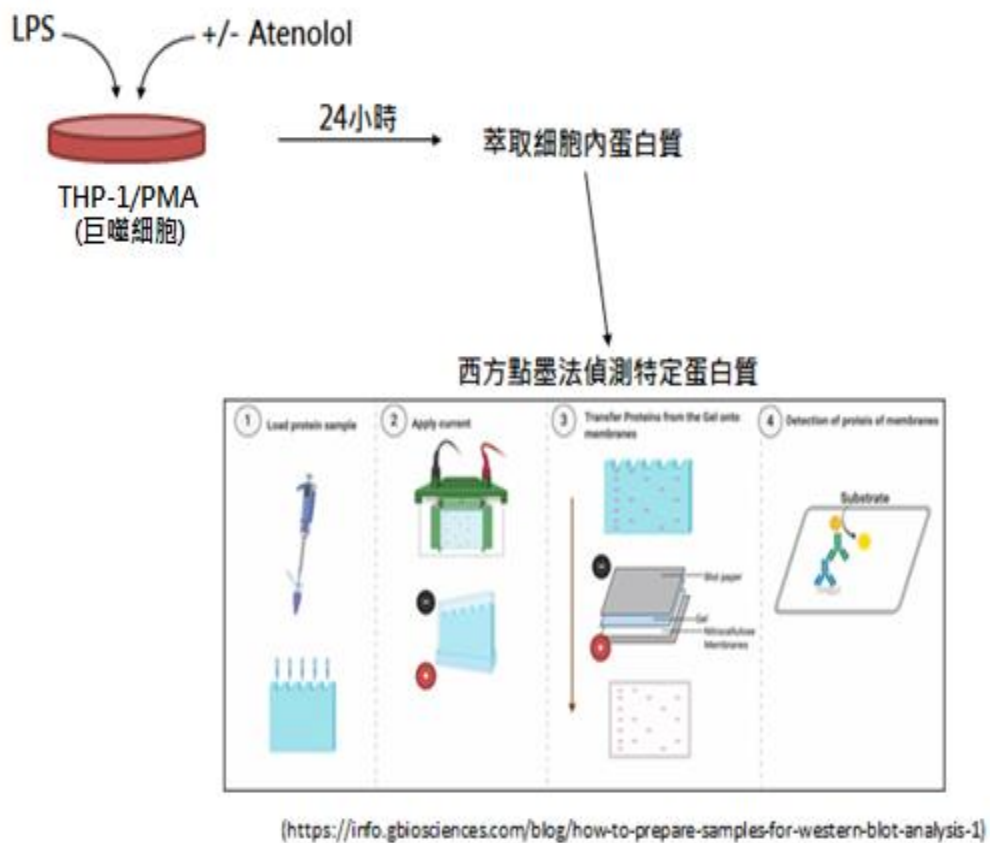
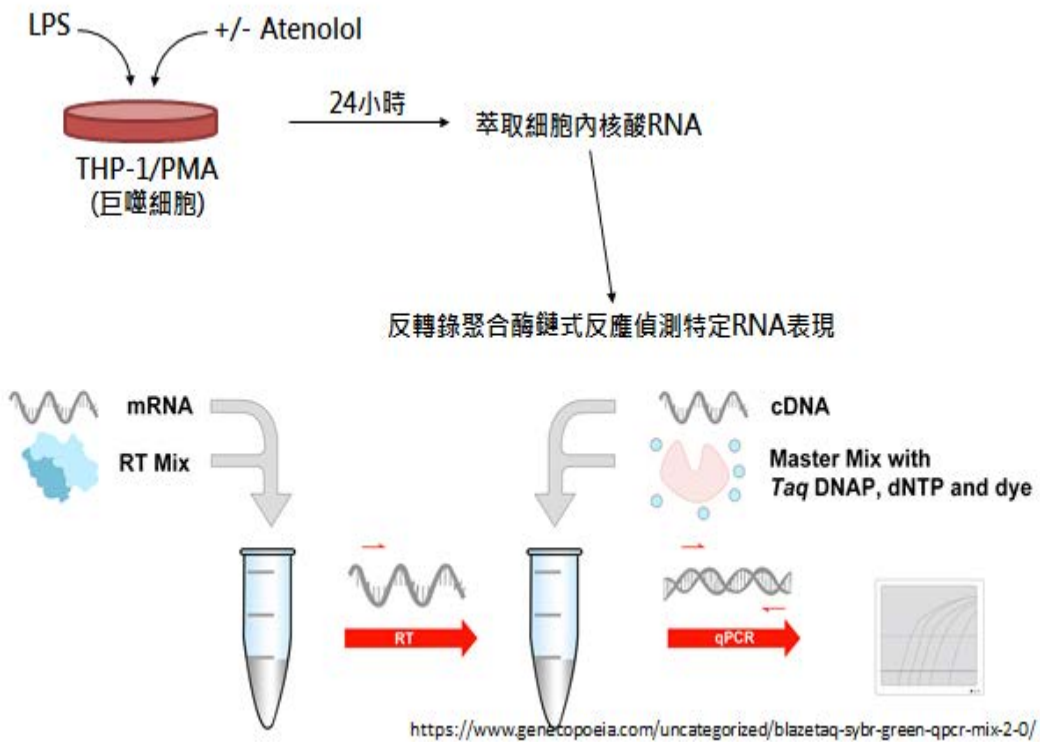
人類肺部上皮細胞是維持肺部屏障主要的細胞。本實驗是使用 NL20(人類肺部上皮細胞株)，利用 LPS 模擬感染所造成之敗血症，分為不給予 LPS 組和給予 LPS 組，LPS 組再分別加入不同濃度的 Atenolol (0, 0.3, 1, 3, 10 μ M)處理 24 小時，最後以西方點墨法測定 EMT 相關蛋白 fibronectin 及訊息傳遞蛋白 pSTAT3、pNF κ B、pAKT 和 pSMAD 之量的變化 (圖九)。



圖九、實驗一流程圖

實驗二、Atenolol 是否具有影響 LPS 活化先天免疫巨噬細胞(macrophage)的作用？

先天免疫的巨噬細胞 (macrophage) 為肺部免疫細胞的最大族群，約占 70%。本實驗是使用 THP-1 (人類單核球細胞株) 先以 PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate)處理，使之分化為巨噬細胞 (macrophage)，利用 LPS 模擬感染所造成之敗血症，將分化後的巨噬細胞分為不給予 LPS 組和給予 LPS 組，再分別加入不同濃度之 Atenolol (0, 0.3, 1, 3, 10 μ M)處理 24 小時，以 qPCR 測量其細胞激素(cytokine)表現量的變化，由此判斷 Atenolol 是否可以影響 LPS 活化先天免疫的巨噬細胞 (圖十)。此外，其細胞凋亡蛋白 cPARP 和發炎相關訊息傳遞蛋白 pNF κ B、pERK、pSTAT3，也以與實驗一相同的流程進行西方點墨法測定量之變化。(圖十)



圖十、實驗二流程圖

其他相關實驗方法分述如下：

(一)、細胞培養(Cell culture)

細胞生長於 37°C，5%CO₂ 的細胞培養箱中，於顯微鏡下觀察細胞型態，確定細胞生長形狀是否正常，生長密度是否適當。NL20 為支氣管上皮細胞，會貼附於培養皿上生長，以 F12 culture medium 培養，THP-1 為單核細胞，懸浮生長於 RPMI culture medium 中。當 NL20 細胞株生長密度達到 80%，以緩衝溶液 PBS 清洗一次後，再加入 1ml Dissociation buffer 後，放入細胞培養箱中反應 5 分鐘，以顯微鏡觀察細胞是否脫離，以 F12 culture medium 中和 dissociation buffer 作用，經過細胞計數之後重新培養適當濃度的細胞。

(二)、西方墨點法(Western Blot)

1. 實驗原理

此即蛋白轉漬法，利用聚丙烯醯胺凝膠 (SDS-PAGE) 電泳分析特定蛋白質之含量。利用電泳將不同分子量之蛋白分開，分子量大者移動距離較小。之後將已分離的蛋白轉漬至硝化纖維素膜 (Nitrocellulose Blotting Membrane, NC membrane) 上，利用抗原和抗體的特異性反應，檢測目標蛋白。先加入第一抗體使之和目標抗原結合後，再加入第二抗體使之與已和第一抗體結合的抗原結合。最後加入呈色劑並用冷光影像系統檢測並觀察蛋白量的變化。

2. 實驗步驟 (簡易實驗流程如圖九、圖十)

- (1) 將細胞培養液去除，以緩衝溶液 PBS 清洗一次，再以適量的緩衝溶液 RIPA(包含 protease inhibitor and phosphatase inhibitor)刮下細胞移至 eppendorf 離心 14000rpm 十分鐘，離心後將上清液轉至到新的 eppendorf，即為細胞蛋白。
- (2) 將細胞蛋白定量後，再以 protein sample dye 處理，使蛋白質變性，並以 100°C 處理 5 分鐘，置於室溫冷卻後，可放置-20°C 保存。
- (3) 電泳凝膠分為上層的濃縮膠及下層的分離膠，先將下層膠(緩衝液 SDS pH 8.8)加入鑄膠器中，加入丙醇使膠呈水平狀，待其凝固後，移除丙醇並加入上層膠(緩

衝液 SDS pH6.8)，並放入齒梳，待其凝固。

- (4) 上膠凝固後，將樣本一一注入齒模中，將膠加滿 Running Buffer，電泳 80V、120 分鐘。
- (5) 電泳完成後，將上膠切除，將下膠泡入 Transfer Buffer 搖晃 30 分鐘進行緩衝溶液置換。
- (6) 本實驗室以半乾式轉印，由於蛋白質帶負電，會由負極往正極移動，因此樣本(下膠)需放於負極而硝化纖維素膜(Nitrocellulose Blotting Membrane, NC membrane)靠近正極，再將先以浸潤過的濾紙分別包覆在正負極最外面，同時避免整個裝置系統中產生氣泡，固定電壓 25V 轉漬 60 分鐘。
- (7) 轉漬完成後，根據 marker 截取所需之片段(依據分子量大小截取)，由於轉漬完成後 NC membrane 除了待測蛋白之外的空白區域，而抗體本身也是蛋白質，很容易吸附上去，因此須先以 5%脫脂牛奶(泡在 0.1%Tween20 的緩衝溶液，TBST)進行 blocking 一小時後，再加入一級抗體後於冷房 shaker 過夜。
- (8) 將一級抗體移除後，TBST 緩衝液清洗三次，每次五分鐘，加入第二抗體並等待 60 分鐘，後用 TBST 緩衝液三次，每次五分鐘，加入呈色劑，最後用冷光影像系統觀察其特定蛋白之含量。

(三)、萃取 RNA

1. 實驗原理

本實驗用 GENEzol Reagent 裂解細胞並同時加入有機溶劑分層，分層後 RNA 會存在於水中，再利用異丙醇沈澱回收。

2. 實驗步驟

- (1) 加入適量 GENEzol Reagent 並混合均勻，放置室溫五分鐘。
- (2) 將 GENEzol Reagent 轉至到微量離心管，並加入適量分層有機溶劑，混合均勻後離心 14000 轉速 15 分鐘。
- (3) 將分層後的上層(水層)轉至新的微量離心管，再加入等體積的異丙醇並混合均勻，再靜置室溫 10 分鐘。

- (4) 離心 14000 轉速 10 分鐘，去除上清液後，以 70%酒精洗一次。
- (5) 去除酒精後，室溫靜置風乾 10-15 分鐘，再以不含 RNase 的水回溶 RNA。
- (6) 至 Nanodrop 儀器定量所抽取的 RNA。
- (7) 以 PrimeScript RT reagent kit 將 RNA 反轉錄成 cDNA，並保存於-20°C 冰箱。

(四)、即時定量聚合酶連鎖反應

1. 實驗原理

即時定量聚合酶連鎖反應(qPCR)，藉由 PCR 擴增原理將 DNA 放大的同時並進行定量之實驗。其中使用的是非專一性化學物質(SYBR Green)，SYBR Green I 是與雙股 DNA 的 minor groove 結合釋放出螢光，因此在 PCR 過程中可在每一個循環的 extension 步驟結束時測量螢光的強弱，就可知每 PCR cycle 中產生了多少 PCR product。但 SYBR Green I 的缺點是會跟所有的雙股 DNA 結合，所以無法分辨特異性產物與非特異性產物。

2. 實驗步驟（簡易實驗流程如圖十）

本實驗使用 TOOLS 2xSYBR qPCR Mix Kit。

- (1) 配製 DNA sample：加入 ddH₂O 將 DNA sample 濃度稀釋為 5ng/λ。
- (2) 配製 5uM Forward primer：取 9 λ ddH₂O 至 eppendorf，再加入 1 λ 50uM Forward primer stock。

- (3) 配製 5uM Reverse primer：取 9 μ l ddH₂O 至 eppendorf，再加入 1 μ l 50uM Reverse primer stock。

Component	20uL volume	Final concentration
TOOLS 2xSYBR qPCR Mix	10uL	1X
Forward primer	0.6uL	0.3uM
Reverse primer	0.6uL	0.3uM
cDNA template	2uL	
RNase-free ddH ₂ O	Up to 20uL	

表一：cDNA mixture

- (4) 先將 TOOLS 2xSYBR qPCR Mix、Forward primer 與 Reverse primer 先配製成 mixture，再將此 mixture 分裝至四連排中。
- (5) 將相對應組別的 cDNA 加入相對應的四連排中。
- (6) 將配置好的四連排放入儀器中進行設定。

Stage	Cycle	Temperature °C	Time	Step
Initial denaturation	1x	95	15min	Initial denaturation
PCR	40x	95	10sec	Denaturation
		60	20sec	Annealing/Extension
Melting/Dissociation Curve Stage				

表二：Melting/Dissociation Curve Stage（註：每次 Annealing/Extension 時會進行一次螢光偵測）

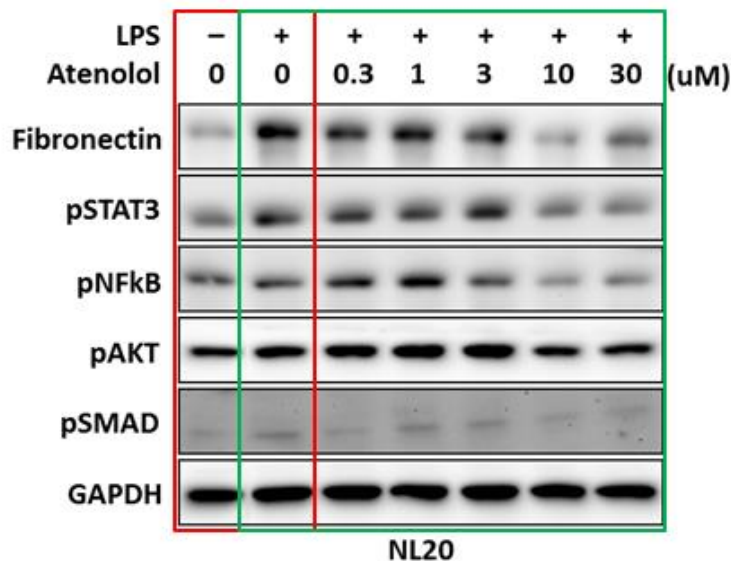
參、研究結果與討論

一、研究結果

(一)、Atenolol 可否影響 LPS 引起之肺部上皮細胞的上皮間質轉換(EMT)？

已知 LPS 可以誘導細胞 TGF- β 1 的表達，隨後導致肺部上皮細胞產生 EMT，進而增加肺部結構的通透性，導致發炎細胞的聚集；然而抑制 TGF- β 1、Smad 2/3 或 STAT3 的活化可以逆轉該 EMT。因此我們取用 NL20 (肺部上皮細胞)，給予 LPS 刺激，並以西方點墨法偵測 EMT 相關因子(包含 fibronectin、STAT3、NF κ B、AKT、SMAD2/3)，觀察 Atenolol 對 NL20 細胞產生 EMT 的影響。

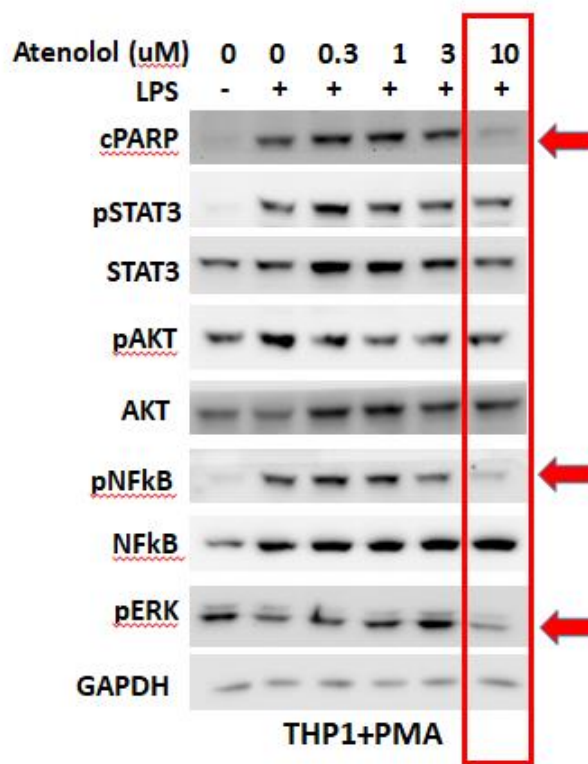
我假設 Atenolol 可以減緩 LPS 引起之肺部上皮細胞的上皮間質轉換，並以 Western blot 進行分析，初步結果如下 (圖十一)。在 LPS 刺激下，STAT3、NF κ B、AKT、SMAD 等 EMT 相關因子會被活化 (磷酸化 phosphorylation)，並造成間質蛋白 fibronectin 增多。以 10 和 30 μ M 兩種濃度的 Atenolol 處理下，可以顯著減少 LPS 刺激所引起的 fibronectin 表現及 pSTAT3、pNF κ B 和 pSMAD 等分子活化，而 pAKT 則僅有輕微減少。又前述之蛋白質之量皆與 EMT 的產生呈正相關，因此在 Atenolol 藥物處理下，隨著濃度的增加會逐漸減緩肺部上皮細胞受 LPS 刺激所引起的 EMT。



圖十一、Atenolol 對正常肺部上皮細胞 NL20 的影響

(二)、Atenolol 是否具有影響 LPS 活化先天免疫巨噬細胞(macrophage)的作用？

已知 LPS 可誘導巨噬細胞產生發炎相關蛋白質，其中 pNFkB、pERK 皆為會促進發炎反應的蛋白，而 cPARP 是細胞凋亡的標記蛋白。因此我們取用 PMA 刺激分化後的巨噬細胞，給予 LPS 刺激，並以西方點墨法偵測細胞凋亡蛋白 cPARP 及炎症相關因子(包含 pSTAT3、pNFkB、pERK)，觀察 Atenolol 對巨噬細胞發炎反應的影響。如圖十二所示，因前述蛋白質含量和發炎反應呈正相關，因為可以判斷 Atenolol 應可以減緩 LPS 造成的發炎反應，並減少巨噬細胞受 LPS 刺激所引發的細胞凋亡。

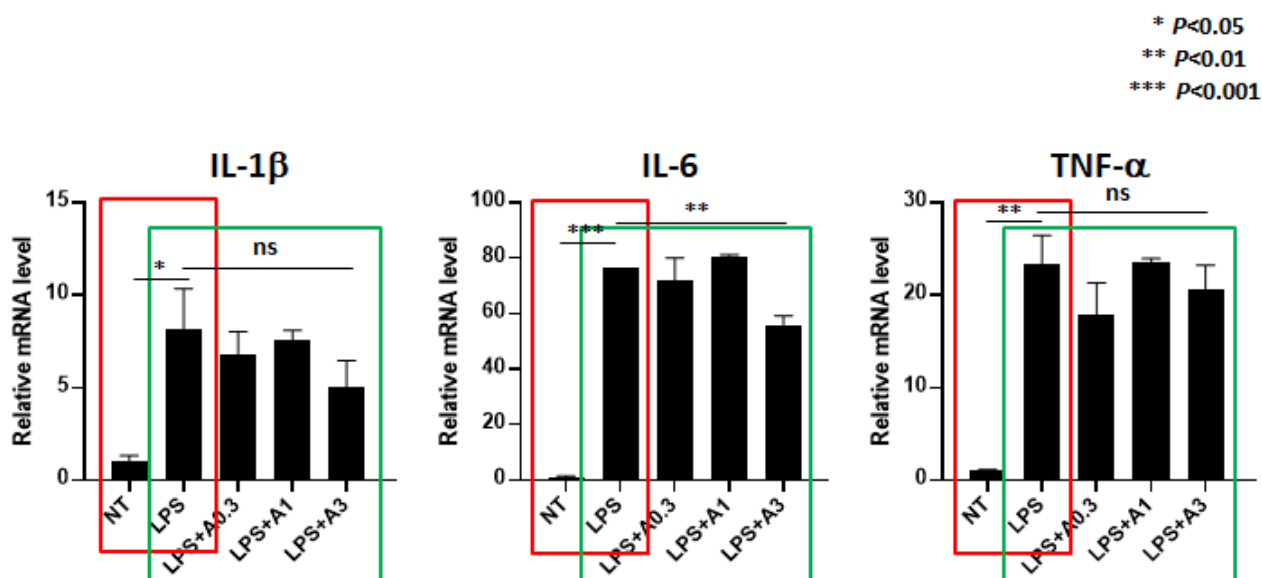


圖十二、Atenolol 對巨噬細胞發炎反應的影響

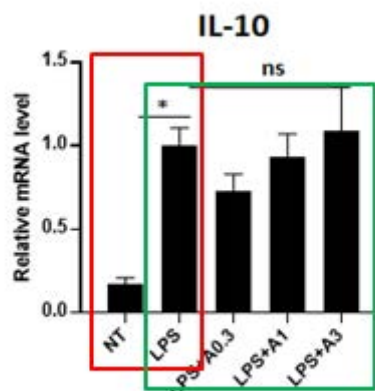
當巨噬細胞受到外來物入侵時會被活化，釋出發炎細胞激素 (cytokine)，如 IL-1b、IL-6 及 TNF-a 等，進而引起發炎反應。我們利用 RT-qPCR 實驗分析巨噬細胞表現細胞激素量之變化，探討 Atenolol 可否減緩 LPS 活化巨噬細胞。結果如圖十三所示，在 LPS 的刺激下，巨噬細胞內的 IL-1b、IL-6 及 TNF-a 等發炎細胞激素會大量被表現，而在

Atenolol 處理下，隨著藥物濃度的增加，會逐漸減緩巨噬細胞受 LPS 刺激後細胞激素的表現，但仍維持一定程度的活化。

另外，當釋放 IL-10 細胞激素時，會減緩發炎反應，我們同樣利用 RT-qPCR 實驗分析巨噬細胞表現細胞激素量之變化，探討 Atenolol 可否減緩 LPS 活化巨噬細胞。結果如圖十四所示，在 LPS 刺激下，巨噬細胞中 IL-10 會增加，可能是引起發炎的同時，細胞可藉由抗發炎細胞激素的表現來削弱發炎反應，而隨著 Atenolol 的處理，對 IL-10 的表現量沒有顯著影響。



圖十三、Atenolol 對 macrophage 發炎細胞激素表現量的影響 (IL-1 β 、IL-6、TNF- α)



圖十四、Atenolol 對 macrophage 抗發炎細胞激素表現量影響 (IL-10)

二、討論

肺部之中存在許多不同細胞，彼此之間有不同功能互相交互作用，在正常的情况下，肺部受感染後促使上皮細胞凋亡，上皮細胞會釋出細胞機素，接著活化肺部巨噬細胞以清除感染源。在先前實驗室的動物實驗有發現 β 受體阻滯劑 Atenolol 能夠提高經過 LPS 所刺激的小鼠存活率。所以我利用細胞實驗來尋找可能的機制，結果在支氣管肺部上皮細胞中發現，Atenolol 確實能夠減少 EMT 的機制，同時觀察到支氣管肺部上皮細胞的 DNA 轉錄因子 pSTAT3、pNF κ B 有下降的趨勢，並能使得肺部巨噬細胞的細胞激素表現減少以及減少發炎相關蛋白 cPARP、pNF κ B、pERK 等亦有下降趨勢，避免其過度活化。

本研究目的之一是探討當人體肺部上皮細胞因感染造成敗血症進而產生 EMT 時，抗高血壓藥物 Atenolol 是否可以減少其 EMT 之傾向，從而判斷其是否可以減少敗血症所造成肺部細胞之損傷。由圖十一可以知道在給予 Atenolol 之後，EMT 相關蛋白 Fibronectin 有下降的趨勢，因此與假設符合。另外，肺部上皮細胞中 DNA 轉錄因子 pSTAT3、pNF κ B 的下降，除了使 EMT 相關途徑被抑制之外，也可減少一些細胞激素的產生。其中之二是探討 Atenolol 是否可以使人體巨噬細胞之細胞激素分泌量以及發炎相關蛋白（促進發炎反應者）減少，因當感染產生敗血症時，炎症反應會促使巨噬細胞產生大量細胞激素，可能會引起細胞激素風暴造成敗血性休克死亡。因此透過研究巨噬細胞細胞激素的表現量及發炎蛋白脂表現量，可以判斷 Atenolol 是否可以減緩其炎症反應。由圖十二可知再給予 Atenolol 後，其細胞凋亡標記蛋白 cPARP 及發炎相關蛋白 pNF κ B、pERK 等皆有較顯著的下降。由圖十三可以發現 LPS 確實會造成巨噬細胞大量產生發炎相關的細胞激素，而其中 IL-6 隨著 Atenolol 濃度增加有下降趨勢，但仍維持在一定水準之上。圖十四的結果也顯示 LPS 可以刺激抗發炎細胞激素 IL-10 的表現，但 Atenolol 的處理沒有減緩 IL-10 的趨勢。綜合以上結果可見，Atenolol 雖可減少巨噬細胞的過度炎症反應，卻又不會使其失去清除病原菌的免疫功能。

Kaiquan Tan 等作者在 2019 Critical Care 所發表的一篇回顧中探討在敗血病之前使用 β 受體阻滯劑是否會影響敗血病所造成的致死率，此回顧搜集了多篇文獻進行統計分析，預先使

用 β 受體阻滯劑會減少敗血性休克的死亡率且在敗血病中持續使用 β 受體阻滯劑亦會減少其死亡率，與我所做的實驗假設與動物模式結果相符，但此篇回顧也提及預先使用 β 受體阻滯劑可以減少敗血症致死率的相關機制都尚未被發現，因此在此實驗中所探討 NL20 與 THP1 細胞中的機制有其參考意義。

在 2015 年 Filippo Sanfilippo 等作者的另一篇回顧中，探討另一種 β 受體阻滯劑 Esmolol 與敗血病之間的關係，其中有 5 篇中服用 Esmolol 的病人皆有心跳速率減慢的現象，但其他對病人的影響則各有其不同，並且由於母數差異大，因此結果較缺乏說服力。且其中一篇文章發現是否服用 β 受體阻滯劑似乎對死亡率沒有顯著影響。其中本實驗與該篇研究相似處為皆使用 β 受體阻滯劑作為預期可行的治療藥物；而該研究是使用 Esmolol，而本實驗是使用 Atenolol，因此初步推斷，並不是每種 β 受體阻滯劑都有減緩敗血症狀之效果，由於 β 受體阻滯劑影響 sepsis 之機制仍然未知，或許將來能以兩種藥物之間的差異來探討其中機制，而能夠更精準的克服敗血病所造成的高死亡率。

本實驗之重要性為當病人發生敗血症甚至發生敗血性休克時，我們希望有藥物可以用以治療或減緩其過度炎症反應，只可惜其中機轉尚不明確，因此若可以找出確切機轉，將有機會往敗血症的新型藥物發展。本實驗只以肺部上皮細胞及巨噬細胞為材料進行研究，雖然有發現可能的相關機制，但難以代表肺部整個複雜的微環境，若可以再加上更多其他種人體細胞或者進行規劃更完善的動物實驗，可能可以加強證明之前提出之假設。未來更希望可以找出將此類藥物的確切機轉，並開發 Atenolol 的相關衍生物，使其減少 β 受體阻滯劑的主要功能(如：降血壓)，並留下其減緩敗血症炎症反應之效果，有朝一日便有機會可成為抗敗血症之藥物，並將其推廣到臨床治療。

肆、結論與應用

長期以來，雖然都有文獻提及 β 受體阻滯劑可以減少敗血症致死率的數據統計，卻一直沒有相關機制的研究證明，故本次研究實驗設計能夠提供一個研究方向，雖然只是肺部單一種類細胞的研究，但也有初步的結果，而細胞研究結果所發現的機制也能夠提供將來研究方向一些參考。

未來我希望可以針對更多種敗血症會影響到的細胞做相關實驗，例如將實驗細胞範圍擴展至其他器官，並希望有機會可以使用其他種降血壓藥探討其是否可以減緩 LPS 引起之敗血症。

伍、參考文獻

1. Chao, J., Donham, P., Rooijen, N. V., Wood, J.G., and Gonzalez, N.C. (2011). Monocyte Chemoattractant Protein-1 Released from Alveolar Macrophages Mediates the Systemic Inflammation of Acute Alveolar Hypoxia. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 45(1),53-61. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20813992/>
2. Dial, S., Nessim, S. J., Kezouh, A., Benisty, J., Suissa, S. (2014). Antihypertensive agents acting on the renin-angiotensin system and the risk of sepsis. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 78(5):1151-8. DOI: 10.1111/bcp.12419.
3. Filippo Sanfilippo , Cristina Santonocito , Andrea Morelli , Pierre Foex (2015). Beta-blocker use in severe sepsis and septic shock: a systematic review. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26121122/>
4. Hanif, K., Bid, H. & Konwar, R. (2010). Reinventing the ACE inhibitors: some old and new implications of ACE inhibition. *Hypertension Research*, 33, 11–21. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/hr.2009.184>

5. Kaiquan Tan, Martin Harazim, Benjamin Tang, Anthony Mclean and Marek Nalos (2019). The association between premorbid beta blocker exposure and mortality in sepsis—a systematic review. *Critical Care*,23, Article number: 298. Retrieved from <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2562-y>
6. Khanna, A., English, S. W., Wang, X. S., Ham, K., Tumlin, J., Szerlip, H., ... Boldt, D. W. (2017). Angiotensin II for the Treatment of Vasodilatory Shock. *The New England Journal of Medicine*, 377,419-430. DOI: 10.1056/NEJMoa1704154
7. Madalena Coutinho Cruz , Luís Reis (2017). β -blockers in septic shock: are we there yet? *Rev Bras Ter Intensiva*, 29(1),1-3. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5385978/>
8. Marshall, Richard P. (2003). The pulmonary renin-angiotensin system. *Current Pharmaceutical Design*,9(9),715-22. DOI: 10.2174/1381612033455431.
9. Mortensen, E. M., Nakashima, E., Cornell,J., Copeland, L. A., Pugh, M. J., Anzueto, A., ... Fine, M. J. (2012). Population-based study of statins, angiotensin II receptor blockers, and angiotensin-converting enzyme inhibitors on pneumonia-related outcomes. *Clinical Infectious Diseases*, 55(11),1466-73. DOI: 10.1093/cid/cis733.
10. Nakamura, T., Kawachi, K., Saito, Y., Saito, T., Morishita, K., Hoshino, J., ... Kurabayashi, M. (2009). Effects of ARB or ACE-inhibitor administration on plasma levels of aldosterone and adiponectin in hypertension. *International Heart Journal*,50(4),501-12. DOI: 10.1536/ihj.50.501.
11. Podowski, M., Calvi, C., Metzger, S., Misono, K., Poonyagariyagorn, H., Lopez-Mercado, A., ... Neptune, E. (2012). Angiotensin receptor blockade attenuates cigarette smoke–induced lung injury and rescues lung architecture in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(1),229-240. DOI: 10.1172/JCI46215.
12. Rhodes, A., Evans, LE., Alhazzani, W., et al. (2017). Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Critical Care Medicine*,45(3),486-552. DOI: 10.1097/CCM.0000000000002255
13. Şahan, A.G., Yılmaz, A., Taşlıyurt*, T., Doruk, S., İnönü Köseoğlu, H. İ., Şıvgın, H., Sağcan, M.

- (2014). Antiinflammatory effect of telmisartan on chronic obstructive pulmonary disease: 8-isoprostane concentration in exhaled breath condensate. *Cumhuriyet Medical Journal*, 36, 178-183. DOI: <http://dx.doi.org/10.7197/1305-0028.2087>
14. Tumlin, J. A., Murugan, R., Deane, A. M., Ostermann, M., Busse, L. W., Ham, K. R., ... Bellomo, R. (2018). Outcomes in Patients with Vasodilatory Shock and Renal Replacement Therapy Treated with Intravenous Angiotensin II. *Critical Care Medicine*,46(6),949-957. DOI: 10.1097/CCM.0000000000003092.
15. Wacker, C., Prkno, A., Brunkhorst, F.M., et al. (2013). Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*,13(5),426-435. DOI: 10.1016/S1473-3099(12)70323-7
16. ZHOU Shaling,LING Guang-hui,XIA Yun-cheng,et al. Epithelial to mesenchymal transition play a role in peritoneal fibrogenesis [J], *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Nephrology*, 2009.10(7):645-648

【評語】 090010

EMT 與敗血症之間的相關性不明。結果尚在初步階段，作用機轉除用生化方式研究發炎反應外，可進一步用 cell-based approach 研究。使用抗血壓藥物是否有優於使用抗生素來控制敗血症尚不明確。類似的實驗，已經有多個實驗室報導，可以再加入另外一個細胞株做為研究比較適合。