

嘉南藥理科技大學
碩士學位考試委員會審定書

本校 生物科技系 碩士班 黃聖淵 君
所提論文 高濃度葡萄糖對巨噬細胞 RAW 264.7 活化影響

Influence of high concentration of glucose on
activation of Macrophage RAW 264.7 cell

合於碩士資格水準，業經本委員會評審認可。

考試委員：沈立言 博士
台灣大學食品科技研究所 教授

沈立言

程中玉 博士
中正大學化學暨生物化學系 助理教授

程中玉

施美份 博士
嘉南藥理科技大學藥學系 副教授

施美份

指導老師：施美份 博士
嘉南藥理科技大學藥學系 副教授

施美份

系主任（所長）：

張復凱

中華民國 九十六 年 七 月



嘉南藥理科技大學 碩士論文全文電子檔案上網授權書

本授權書所授權之論文全文電子檔案，為本人於嘉南藥理科技大學，撰寫之碩士學位論文。(以下請擇一勾選)

- 同意立即開放
- 同意一年後開放，原因是：_____
- 同意二年後開放，原因是：_____
- 同意三年後開放，原因是：_____ 投稿

以非專屬、無償授權嘉南藥理科技大學圖書館和國家圖書館。基於推動「資源共享、互惠合作」之理念，於回饋本校與社會作為學術研究目的之用，得不限地域、時間與次數，以紙本、光碟、學位論文全文系統、網路或其他各種方法收錄、重製、與發行，或再授權他人以各種方法重製與利用，以提供讀者基於個人非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印。

研究生簽名：_____ 

論文名稱：高濃度葡萄糖對巨噬細胞 RAW 264.7 活化影響

指導教授：_____ 施美份 副教授

系所：_____ 生物科技所

學號：_____ G9415012

日期：民國 96 年 8 月 9 日

備註：

1. 本授權書請填寫並以黑色筆親筆簽名後，裝訂於各紙本論文封面後之次頁。
2. 讀者基於非個人營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印上列論文，應依著作權法有關規定辦理。

誌謝

時光匆匆流過，我的碩士生涯就要正式落幕了，兩年的碩士班看似漫長，實則如過眼雲煙轉瞬即逝。人生的美好不在於延續生命的永恆不滅，而在於瞬間璀璨所散發出來的繽紛光芒，雖然兩年時間匆匆而逝，但已在我的人生之中留下許多不可磨滅的奪目光采。

首先最要感謝的是施美份老師，從入學前的暑假一直到畢業的暑假，整整兩年寒暑的辛勤教導，雖然學生資質愚鈍，學如逆水行舟，時常未能如老師所期盼中的成長，但老師依然帶我一路勇往直前奮力不倦，不僅於實驗上給予指導，更教曉我做人做事的態度，如今輕舟已過萬重山，老師對我的照顧及付出，點滴在心，無限感激！

另外，要感謝實驗室已畢業的敏華學姊，對我在實驗技術上的細心及不吝指導。還有藥學系的紹彥學弟和老師的專任助理佳蓉，感謝你們給予我在實驗上的協助和提供寶貴的意見，俾使論文得以順利完成。

接著還要感謝在 F 棟、Q 棟 7 樓及 9 樓實驗室的同學們，阿邦、阿立、秀珍、佳蓉、學益、建安、敏修及碩士班各位同學等人，大家有緣聚首，謝謝你們平時的陪伴與分享實驗上的經驗和一些喜怒哀樂的瑣事，使我在碩士班兩年不感孤獨，並能於良好的心情全力以赴完成我的論文。

此外，還要特別感謝我的爸爸、媽媽及我的老友聖岡，如不是你們一直以來的鼓勵與支持，我也不可能有今天的小小成就。當然還要感謝這兩年對我不離不棄的伊廷，妳就像是我手心的太陽，總

在我忙碌無助時，適時給予我安定的力量，支持我一路走下去，謝謝妳！

最後，要感謝的人實在太多，如有被遺忘的朋友在此亦一併感謝，感謝大家於這兩年來對我的照顧。有些人的碩士生涯過的如黑白像片般愁雲慘淡，但我的碩士生涯用資訊豐富的高光譜影像來描述亦不為過，在此也祝福所有畢業的同學們都能夠在未來的路上綻放出各式各樣的光芒！

僅將誌謝獻給每一個曾經在我的人生路上給我鼓勵的你們。

中文摘要

長期性細菌感染以及常見性感染是糖尿病患者主要的併發症之一，這兩者皆與發炎細胞之活化具有相關聯性。然而，長期高濃度葡萄糖對於巨噬細胞活化作用，卻無太多相關性的研究。

因此，本研究以 LPS 刺激 RAW 264.7 巨噬細胞，作為一個實驗的模型，再以 15 mM 高濃度葡萄糖培養液去探討不同的培養時間，與正常 DMEM 培養下的 RAW 264.7 巨噬細胞，分別對於 LPS 刺激後的情形。實驗結果發現，RAW 264.7 巨噬細胞在 15 mM 高濃度葡萄糖培養 1 天（急性），7 天（中慢性）和 14 天（慢性）之後，basal NO 產生量會比正常細胞的多，而 LPS 刺激的 NO 產量卻明顯不如正常細胞。然而，在 iNOS protein 與 iNOS mRNA 的表現上，經長期慢性培養後，卻有反彈性大量增加的情形。

添加 15 mM 葡萄糖培養液培養 1 天及 14 天的 RAW 264.7 巨噬細胞，於 LPS 刺激後所產的促發炎細胞激素 TNF- α ，與正常 DMEM 培養的細胞相比較是沒有明顯差異。不過，LPS 刺激的 TNF- α 產量在經過 15 mM 葡萄糖培養液培養 7 天後的巨噬細胞卻明顯比正常 DMEM 培養的細胞的產量少。15 mM 葡萄糖培養後的 RAW 264.7 巨噬細胞，所產生的 IL-1 β 產量在 basal 值與正常 DMEM 培養的細胞相比，均有明顯大量誘發的情形。培養 1 天及 14 天 15 mM 高濃度葡萄糖，在添加 LPS 刺激後，所產生的 IL-1 β 濃度與正常 DMEM 培養的細胞相比，有較為明顯上升的情形。然而，在 IL-6 的表現量方面，經 LPS 刺激 15 mM 高濃度葡萄糖培養 1 天後的 RAW 264.7 巨噬細胞，與正常 DMEM 培養的細胞相比，有著

明顯上升的情形。有趣的是，在培養 7 天後，IL-6 的產量有被抑制的情況，而 14 天高葡萄糖培養後，卻又有一個回升的現象。

然而造成這些結果的原因，可能與細胞隨著高濃度葡萄糖長期培養後，而產生適應性和一個生理功能上正向調節（up-regulation）的情形。隨著葡萄糖培養之 RAW 264.7 巨噬細胞，經由 LPS 活化細胞後，所誘發的促發炎細胞激素（TNF- α , IL-6, IL-1 β ）皆與 iNOS protein 和 iNOS mRNA 的表現有著正相關性。

關鍵字：糖尿病、一氧化氮、發炎反應、高血糖症、細胞激素。

Abstract

One of major complications of diabetes is the frequency of infection and long-term duration of bacterial infections. Both conditions have been shown to be related to activation of inflammatory cells. However, the influences of macrophage activation by long-term exposure to high glucose, a situation that mimics the hyperglycemia of diabetics, have not been fully investigated.

We used a lipopolysaccharide (LPS) activated macrophage RAW 264.7 model to investigate effects of acute (1 day), sub-chronic (7 days), and chronic (14 days) 15 mM glucose treatment on activation of inflammatory cells. Basal NO production was higher in all glucose treated groups than that produced in normal cells. In contrast, LPS-induced NO production was sustained lower in the glucose treated cells than in the normal group. Interestingly, LPS-stimulated iNOS protein or iNOS mRNA expression in chronic glucose treated cells showed a more condensed bend than acute, sub-chronic or normal cells.

Treatment of RAW264.7 macrophages with 15 mM glucose for 1 and 14 days did not affect LPS-stimulated tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) production. However, the same treatment for 7 days suppressed TNF- α production. Basal interleukin-1 beta (IL-1 β) was increased significantly in high glucose treatment groups than that in normal control group. LPS-stimulated IL-1 productions were also increased except for 7-day treated group. Acute glucose challenge induced both basal and LPS-stimulated interleukin-6 (IL-6) production. These increases were both suppressed in sub-acute groups. Interestingly, chronic glucose treatment did not affect basal IL-6 production but the production was raised the LPS-stimulated condition.

These results shown that may be due to an up-regulation or adaptation change after cells exposed to glucose chronically. Pro-inflammatory cytokines, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 that mediate the activation of macrophage via LPS stimulation, are also shown a similar adaptive pattern as iNOS protein and mRNA expression in responding to glucose treatment.

Key words: Diabetes, Nitric Oxide (NO), inflammation, Hyperglycemia, cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6).

目錄

頁次

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
本文目錄.....	V
縮寫表.....	VIII
第一章、緒論.....	1
1-1. 糖尿病相關研究.....	1
1-2. 糖尿病的定義.....	2
1-2-1. 糖尿病的診斷.....	2
1-2-2. 糖尿病的分類.....	3
1-2-3. 糖尿病之流行病學.....	4
1-3. 糖尿病與感染.....	5
1-3-1. 糖尿病與其細胞免疫調節.....	6
1-3-2. 免疫反應與巨噬細胞.....	7
1-3-3. 細菌內毒素與巨噬細胞.....	7
1-3-4. 發炎反應與巨噬細胞.....	8
1-3-5. 一氧化氮 (Nitric Oxide).....	8
1-3-6. 腫瘤壞死因子 (TNF- α).....	9
1-3-7. 介白素-1 (IL-1).....	10
1-3-8. 介白素-6 (IL-6).....	10
1-3-9. 一氧化氮合成酶 (iNOS).....	11
1-4. 研究動機.....	12
第二章、材料與方法.....	14

2-1. RAW 264.7 巨噬細胞之培養.....	14
2-1-1. RAW 264.7 巨噬細胞之繼代培養.....	15
2-1-2. RAW 264.7 巨噬細胞之冷凍.....	16
2-1-3. RAW 264.7 巨噬細胞之解凍.....	17
2-2. 15 mM 高葡萄糖 DMEM 培養 RAW 264.7 巨噬細胞.....	17
2-3. 細胞計數 / 種植細胞.....	18
2-4. 亞硝酸鹽產物測定.....	19
2-5. TNF- α 濃度測定.....	20
2-6. IL-1 β 濃度測定.....	23
2-7. IL-6 濃度測定.....	25
2-8. 蛋白質抽取.....	27
2-9. 蛋白質濃度測定.....	28
2-10. 西方墨點法 (Western Blot).....	29
2-11. RNA 抽取.....	31
2-12. 反轉錄-聚合酶鏈反應 (RT-PCR).....	33
2-13. DNA 瓊膠製備/ DNA 電泳.....	34
2-14. 統計方法.....	35
第三章、結果.....	36
3-1. NO 產量試驗.....	36
3-2. iNOS protein assay by Western Blot.....	37
3-3. iNOS mRNA expression by RT-PCR.....	37
3-4. TNF- α 產量試驗.....	38
3-5. IL-6 產量試驗.....	39
3-6. IL-1 β 產量試驗.....	39

第四章、討論.....	41
第五章、結論.....	45
參考文獻.....	46
附錄.....	60
圖1.a 1 day glucose treatment on basal NO production.....	60
圖1.b 1 day glucose LPS stimulated NO production.....	61
圖1.c 7 day glucose treatment on basal NO production.....	62
圖1.d 7 day glucose LPS stimulated NO production.....	63
圖1.e 14 day glucose treatment on basal NO production.....	64
圖1.f 14 day glucose LPS stimulated NO production.....	65
圖2.a iNOS protein on basal expression by Western Blot.....	66
圖2.b iNOS protein on LPS stimulated expression by Western Blot.....	67
圖3.a iNOS mRNA expression by RT-PCR.....	68
圖4.a Effect glucose treatment on basal TNF- α production.....	69
圖4.b Effect glucose treatment on LPS stimulated TNF- α production...	70
圖5.a effects of glucose treatment on basal IL-6 production.....	71
圖5.b effects of glucose treatment on LPS-stimulated IL-6 production.	72
圖6.a effects of glucose treatment on basal IL-1 β production.....	73
圖6.a effects of glucose treatment on LPS stimulated IL-1 β production	74

縮寫表

IFG; impaired fasting glucose

IGT; impaired glucose tolerance

NDDG; National Diabetes Data Group

WHO; World Health Organisation

MRDM; Malnutrition-related diabetes mellitus

HLA; human leukocyte antigen

LPS; lipopolysaccharide

NO; Nitric Oxide

TNF- α ; tumour necrosis factor α

IL-1; interleukin-1

IL-6; interleukin-6

PDGF; platelet-derived growth factor

PAF; platelet-activating factor

NOS; Nitric Oxide Synthase

iNOS; inducible Nitric Oxide Synthase

第一章、緒論

1-1. 糖尿病之相關研究

隨著國人生活品質日漸的提高，醫療科技的進步，全人類壽命的延長，高齡人口快速增加，慢性病漸漸取代傳染性的疾病，而在慢性病之中的糖尿病，一直位居國人十大死因之中。根據衛生署 2005 年統計，糖尿病死亡率近二十年來有不斷成長的趨勢，從 1982 年每十萬人口 10.82 人，到 2003 年的 44.38 人，增加了 4.1 倍。過去十年來，糖尿病在十大死亡原因中都維持在第五位，但 2002 年上升至第四位，2003 年亦維持不墜。年齡 45 歲以上者糖尿病盛行率達到 11 %，也就是每 10 個人之中就有一个人罹患糖尿病⁽¹⁾。

過去的十年之中，有許多文獻報導指出肥胖與糖尿病及慢性發炎反應之間有著密不可分的正相關性⁽²⁾⁽³⁾。肥胖是因為過度的內臟脂肪堆積所造成的現象，從預估身體腹部的內臟脂肪，可以來推算罹患糖尿病的機率⁽⁴⁾，故肥胖是造成糖尿病的一個重要因素之一。當腰臀圍比增加時，腹部內的脂肪也就會相對增加，並促使血中游離脂肪酸也隨之增加，進而阻礙肝臟與胰島素的攝取及代謝，最後造成高胰島素血症⁽⁵⁾，引起高血壓⁽⁶⁾，導致糖尿病的產生。肥胖的人發生糖尿病的機率是非肥胖者的 2.9 倍⁽⁷⁾，男性與女性在脂肪堆積的程度上是有所差異的⁽⁸⁾，男性方面會隨著年齡的增加而增加，以 50 歲做分隔，為好發年齡⁽⁹⁾，女性則是在停經的前後做為分隔點。

1-2. 糖尿病的定義

根據美國糖尿病學會專家委員會 1997 年報告定義，糖尿病是由於胰臟 β 細胞所分泌胰島素的功能異常或是胰島素分泌和作用缺陷，以致生理功能代謝無法發揮降血糖的作用時，而引起的高血糖症狀，進而衍生出來的一種新陳代謝疾病。人體所攝取的食物，經過消化、吸收、轉化成葡萄糖之後，血液中的葡萄糖含量就會累積超出了正常範圍。病人臨床症狀為高葡萄糖血症，伴隨其他的臨床症狀為多尿、多渴、多吃、體重減輕、視力模糊、疲勞及容易感染等。

糖尿病的患者沒辦法像正常人一樣，他們會有代謝異常及慢性血糖升高的情況。是由於長期處在高血糖之中，使得組織蛋白和大分子物質受到糖化，或是由於長期的高血糖，產生過多的聚合化合物，均會使一些器官受損，亦時常伴隨著許多長期的併發症⁽¹⁰⁾，例如：眼睛、腎臟、神經、心血管，都會導致機能障礙甚至衰竭。

1-2-1. 糖尿病的診斷

糖尿病是一種多重原因的慢性疾病，雖然臨床表徵均以高血糖為主，但致病原因各異。目前糖尿病的診斷仍以血糖濃度測定為依據。依美國糖尿病學會對於糖尿病的診斷標準，就是空腹血糖偏高 (impaired fasting glucose; IFG)⁽¹¹⁾ 及葡萄糖耐受性障礙 (impaired glucose tolerance; IGT)⁽¹²⁾ 兩種情形。

前者是需整夜空腹 8 小時後抽血檢查，血糖介於 110 mg/ dL 與 126 mg/ dL 之間（達到 126 mg/ dL 以上就屬於糖尿病），後者則有賴整夜空腹 8 小時後接受口服葡萄糖耐量檢查兩小時血糖值，介於 140 mg/ dL 與 200 mg/ dL 之間（達到 200 mg/ dL 以上就屬於糖尿

病)。

1-2-2. 糖尿病的分類

世界衛生組織於 1980 年發佈了糖尿病的分類方法，完全採用美國國家糖尿病資料組 (National Diabetes Data Group; NDDG) 的分類方法，但到了 1985 年世界衛生組織 (World Health Organisation; WHO) 另外添增一個新的糖尿病類別，及營養失調糖尿病 (Malnutrition-related diabetes mellitus; MRDM)。

第一型糖尿病 (type 1 diabetes)：由於胰臟 β 細胞的破壞，導致胰島素缺乏，通常在 40 歲以前發生。其第一型糖尿病並患者的特徵是逐漸失去胰臟蘭氏小島的 β 細胞，最後導致循環中無胰島素存在，病因被認為與人類白血球抗原 (human leukocyte antigen; HLA) DQ、DR 最有關聯⁽¹³⁾，故第一型糖尿病的病因被認為和抗原表現有關的遺傳性自體免疫疾病。然而這類的病人因有抗胰島組織抗體，所引起 T 淋巴球浸潤，最後摧毀胰臟蘭小島。目前第一型糖尿病的所有病人皆須依賴補充胰島素來控制血糖。

第二型糖尿病 (type 2 diabetes)：初期為胰島素有阻抗性，後期為胰島素分泌不足，大多由於胰島素接受器的下調節 (down regulation) 造成胰島素接受器濃度降低，或是在細胞表面接受器之後，細胞內的葡萄糖代謝有缺陷。以上種種現象造成患者血中有足夠的胰島素，卻無法對於使細胞正常攝取葡萄糖。此類型糖尿病通常在 40 歲以後發生，患者多為肥胖者，血漿胰島素多為正常或偏高。

其他特異型：成人糖尿病患中，至多 2 % 是由胰臟疾病 (急性、慢性胰臟炎、胰臟癌等) 及藥物 (如利尿劑、避孕丸、類固醇

等)等引發的高血糖狀態，但符合現行糖尿病診斷標準，於是被歸類為其他類糖尿病。

1-2-3. 糖尿病之流行病學

隨著國人生活品質的提高，飲食及生活形態的改變，糖尿病已成為普遍分布全世界的慢性疾病，並且有逐漸增加的趨勢⁽¹⁰⁾。世界上約有兩億人口罹患糖尿病，再以開發國家中均排名主要十大死因之內⁽¹⁴⁾。在台灣地區 2005 調查顯示，患有糖尿病的人數約在 30 ~ 40 萬人口左右，位居國人十大死因中的第四名，而且逐年以 (+/-) 13.8 % 的年增率增加⁽¹⁾，顯示了對於糖尿病的控制及延緩其併發症的發展上仍有很大的改善空間。

糖尿病是一種慢性疾病，目前僅可控制而無法根治，其最擾人的是慢性併發症的問題。在第一型糖尿病中，主要微血管病變居多，例如：腎病變⁽¹⁵⁾、視網膜病變。而第二型糖尿病則是以心臟血管與腦中風方面居多⁽¹⁶⁾。

腎病變方面，糖尿病所引起的腎病變是造成尿毒症，亦是患者需要洗腎的主要原因。最先出現的臨床表現是蛋白尿，其後肌酸酐也逐漸上升，大約有三、四成的第一型糖尿病人最後演變為尿毒症，需要洗腎。在蛋白尿出現之前，其實腎臟已有變化，例如：血流增加，腎絲球過濾率增加，體積變大等。糖尿病與腎病變之間的關係在免疫學上是有著互相影響的情況，但在病理機轉上仍然不清楚⁽¹⁵⁾。

糖尿病視網膜病變在歐美等已開發國家中是造成失明的主要原因之一⁽¹⁷⁾。而視網膜病變在台灣地區現況而言，研究發現糖尿病併發視網膜病變盛行率在 25 % ~ 30 % 之間。所謂糖尿病視網膜病

變，是因為視網膜上佈滿纖細的微小血管，非常容易受到高血糖的破壞，糖尿病患中約有 10 % 到 12 % 的人，因此而失明⁽¹⁸⁾。其發生率與患者年齡及罹患糖尿病時間的長短有密切的關係⁽¹⁹⁾。有 25 ~ 30 % 胰島素依賴型（第 1 型）糖尿病患者發病 10 ~ 15 年後會有視網膜病變的徵象，而 23 % 的非胰島素依賴型（第 2 型）糖尿病患者發病 11 ~ 13 年後會有視網膜病變的徵象⁽²⁰⁾。糖尿病視網膜病變，初期稱為基底型，視網膜上出現血門管的小阻塞，造成局部的缺氧導致出血點及血管滲出物。此時病人多半無明顯症狀，若不及時檢查並加以控制，一旦隨著疾病進行演變成後期的增殖期，視網膜及視神經盤增殖出易破裂的新生血管，嚴重時便可能引起玻璃體大出血，甚至牽引視網膜剝離，導致視力大量減退而致失⁽¹⁸⁾。

1-3. 糖尿病與感染

感染一直以來為糖尿病患者最大的問題之一，也因此常使糖尿病患者受到足部截肢的命運⁽²¹⁾，而感染後所伴隨的現象就是發炎反應，在過去一些研究報導中^{(16) (22) (23)}指出糖尿病與發炎反應之間有著相正關聯性。發炎反應是人體第一道免疫反應，當人體受到感染、刺激或是受傷時，就會引發免疫性的發炎反應。臨床觀察發現糖尿病病人易罹患感染，而且一旦遭受感染，其病情常較嚴重，使得感染症成為糖尿病病人的重要致死原因。糖尿病併發感染的成因有二大類，其一為病人身體的抵抗力之缺陷，如血管病變造成血流供應不足、周邊神經病變和免疫力異常；其二為病人體內環境受到糖化關係而適合某些致病原之滋長。

細菌性感染方面以足部感染為糖尿病患者最常見的細菌感染之一，糖尿病合併周邊神經病變者容易造成足部潰瘍，這些潰瘍常合

併深部組織及骨頭之感染，如果未妥為處理，易導致截肢之命運。糖尿病患者罹患糖尿病 25 年內，有 10 % 會遭受截肢。糖尿病神經病變患者因對疼痛感覺差，而容易受創傷並產生局部合併症。另者，指溝炎也很容易造成感染擴散，皮膚黴菌感染造成皮膚傷口是細菌侵入的管道。穿刺傷造成感染也很常見。糖尿病足部感染常由多種細菌造成^{(24) (25)}，平均約為 2 ~ 5 種細菌，包括需氧菌和厭氧菌。需氧菌方面以革蘭氏陰性菌 (Gram-Negative Bacillus; G(-)) 最為常見，而單一細菌感染中以革蘭氏陽性菌 (Gram-Positive Bacillus; G(+)) 的金黃色葡萄球菌感染最常見，腸球菌次之。其他如厭氧菌之類桿菌 (Bacteroides)、綠膿桿菌⁽²⁶⁾ 及白色念珠菌亦可見。

其次為黴菌感染，主要發生於宿主免疫防衛系統不健全者，造成伺機性感染，也可能與一再重複使用抗生素有關⁽²⁴⁾。糖尿病病人最常見的致病性黴菌是白色念珠菌、平滑念珠菌 (Candida glabrata) 和接合黴菌 (Zygomycetes) 等。糖尿病病人易遭受感染的原因很多，除了血管病變所致的局部血流不足和周邊神經病變外，免疫防禦功能之缺陷亦扮演一部分角色⁽²⁷⁾。

1-3-1. 糖尿病與其細胞調節免疫

研究顯示糖尿病患者體外實驗的細胞調節免疫功能受到損害，例如：血糖控制不良的病患，其淋巴球對於植物血球凝集素刺激後，所產生的轉型能力（指由 monocyte 轉變為 macrophage）較正常人微弱⁽²⁸⁾。儘管血糖已受到控制的病患，其淋巴球遭受葡萄球菌抗原入侵時，轉型能力也較常人低下⁽²⁹⁾。

1-3-2. 免疫反應與巨噬細胞

免疫反應是身體抵禦外來感染的防禦機制。當病原體入侵時，會先引起自體的免疫發炎反應，其中巨噬細胞 (macrophage) 可藉由吞噬作用除去外來的入侵者。巨噬細胞是由骨髓所製造出來的單核球所成熟分化而成。他們的生命力比起一些多核細胞長，且具有吞噬細菌、病毒的能力，亦是在免疫系統上扮演一個重要的防禦角色⁽³⁰⁾。

巨噬細胞在吞噬作用發生之前，這些微小的外來物必須先附著在多形核球或巨噬細胞的表面上。這和一種可能包括碳水化合物的原始辨識機制有關，一個微粒附著到表面上後可能會啟動肌凝-肌動收縮系統 (actin-myosin contractile system) 而引起吞噬作用。首先形成偽足 (pseudopods)，然後當鄰接的受器接觸到微生物後，整個細胞膜就像拉上拉鍊般地包微粒，直到完全將微粒包起，形成食泡為止。大約在一分鐘內，細胞質內的容菌體便和食泡融合，釋出水解，如此便可使外來物致死。有研究報告指出，當巨噬細胞活化時，不僅會進行吞噬作用，同時也會釋放許多自由基物質 (例如：nitric oxide) 來毒殺入侵的外來物⁽³¹⁾⁽³²⁾。

1-3-3. 細菌內毒素 (endotoxin) 與巨噬細胞

巨噬細胞在一般生理下是未被活化的，它的生理功能是受限制的，須受到特定的刺激如：脂多醣體 (lipopolysaccharide; LPS) 或一些細胞激素 (cytokines) 刺激下，才會被活化作用⁽³³⁾。脂多醣體為革蘭氏陰性菌細胞壁的組成份之一 (革蘭氏陽性菌則無此成分)，巨噬細胞在 LPS 的誘發下會產生許多細胞激素，例如：interleukin-1

(IL-1) ， interleukin-6 (IL-6) 及 tumour necrosis factor (TNF) 等，這些細胞激素在生理上，均有重要的角色⁽³⁴⁾。

已知這些細胞激素可誘導巨噬細胞、平滑肌細胞 (smooth muscle cells)、上皮細胞 (epithelia) 等細胞 iNOS (inducible nitric oxide synthase) 的表現。但 LPS 的刺激只對巨噬細胞可誘發出 NO (nitric oxide)⁽³⁵⁾，其他如上皮細胞、平滑肌細胞及中性球 (neutrophils) 則無任何相關文獻提及其 LPS 對細胞的誘發作用。

1-3-4. 發炎反應與巨噬細胞

發炎反應是人體受傷時所引發的免疫反應之一，許多研究證實，在慢性發炎及感染之細胞組織會有一系列的細胞激素產生 (例如：IL-1, TNF- α)⁽³⁶⁾、酵素及訊息蛋白生成。iNOS 及 COX-2 分別可催化 NO 及 PGs (Prostaglandins) 大量產生時，不但造成組織發炎及併發敗血休克，亦使得慢性傳染病 (例如：肺結核) 和自體免疫疾病 (例如：風濕性關節炎) 等疾病症惡化⁽³⁷⁾。

1-3-5. 一氧化氮 (NO)

NO 可在許多細胞內產生，例如：巨噬細胞⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾⁽⁴⁰⁾、內皮細胞⁽⁴¹⁾、平滑肌細胞⁽⁴²⁾。當細胞受刺激後，會釋放出 NO 並賦予巨噬細胞具有細胞毒殺活性來對抗外來物的入侵，例如：病毒、細菌、黴菌、寄生蟲和腫瘤細胞⁽⁴³⁾。

NO 在生理上扮演的角色相當重要也相當多樣，例如：神經、免疫、新血管系統等調節均可見其參與，過多的 NO 也會導致敗血症休克、中風、血壓大量下降等疾病的產生⁽⁴⁴⁾。有研究報告指出，

活化後的巨噬細胞其殺菌及吞噬能力與 NO 的產生有關⁽⁴⁵⁾，而在嚴重的細菌感染情況下，巨噬細胞會產生大量的 NO 而導致敗血性休克^{(32) (46)}。此外在臨床上曾有研究指出抑制過量 NO 的產生，可治療敗血症⁽⁴⁷⁾。

1-3-6. 腫瘤壞死因子 (TNF- α)

在過去的二十年裡，肥胖的人持續增加。高卡路里的飲食、少量的運動，往往導致許多糖尿病（第二型）的產生。肥胖的人對游離脂肪酸的利用減少，易造成血脂中的游離脂肪酸堆積，血脂容量升高，進而促使巨噬細胞中一系列的促發炎反應（pro-inflammation），引發細胞激素大量的釋放，例如：腫瘤壞死因子 (TNF- α)⁽⁴⁸⁾。在生理或病理因子（如 LPS, IL-1 等）刺激的情況下，人類血液單核球^{(49) (50)} 及老鼠的巨噬細胞⁽⁵¹⁾ 中可引起腫瘤壞死因子的釋放。TNF- α 是一種促發炎細胞激素（pro-inflammatory cytokine），在人體內也扮演為與細胞增生（proliferation）、分化（differentiation）、細胞凋亡（apoptosis）有關的重要角色^{(52) (53)}。

TNF- α 亦屬於一種多元作用的細胞激素（pleiotropic cytokines），可影響許多發炎相關性的蛋白質表現，例如：發燒，加強 IL-1 β 產生等。TNF- α 作用在發炎細胞，主要藉由細胞膜表面之特殊接受體 TNFR1 (p55) 或是 TNFR2 (p75)^{(54) (55)} 二者，再經由不同之細胞內訊息傳遞，例如：mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 或是 NF κ B-I κ B 等路徑⁽⁵⁶⁾，進而造成轉錄因子（transcription factor）的活化及表現。

1-3-7. 介白素-1 (IL-1)

細胞激素 (cytokines) 或 interleukins 在各種不同組織與細胞中，扮演著調節細胞增生與分化的重要角色。其擁有多樣性與豐富性的特性，例如：一種細胞激素在不同的組織或是細胞中，有不同的機能與功能，或是數種不同的細胞激素在同一個組織或細胞裡，有相似的功能並且相互作用著。

IL-1 是由周邊血液中的活化單核球／巨噬細胞或組織中之單核球⁽⁵⁷⁾，巨噬細胞^{(58) (59)}，淋巴球^{(60) (61)}，嗜中性白血球⁽⁶²⁾，及纖維母細胞^{(58) (63)}所製造。IL-1 是最早被發現細胞激素之一，依其分子構造可分為兩種形態，IL-1 α 和 IL-1 β 。兩者之間具有 48 % 的構造同質性，生物活性上也互相類似⁽⁶⁴⁾。在一些刺激物質，例如：細菌抗原、脂多醣內毒素、淋巴動素 (lymphokine)、發炎物質等，均能刺激細胞產生 IL-1 的分泌^{(65) (66) (67) (68)}。

Duarte 等人在 2007 年對於第二型糖尿病患者因牙周病所引起的發炎反應中，檢測到 IL-1 β 、IL-6 等細胞激素皆有大量表現的情形，意味著 IL-1 β 與發炎反應有著正相關性⁽⁶⁹⁾。而在第一型糖尿病患者中，有很多多功能免疫的媒介者，例如：TNF- α 、IL-1 β 等都會造成胰臟 β 細胞自體免疫功能的破壞⁽⁷⁰⁾。

1-3-8. 介白素-6 (IL-6)

IL-6 是一種免疫蛋白，亦是一個多功能的細胞激素。最初在誘導 B 細胞成熟，在成為可分泌抗體的 B 細胞中被發現，因此稱為 B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2)^{(71) (72)}。但是後來在人工合成之重組蛋白 IL-6 及 IL-6 的抗體研究發現，IL-6 不僅僅作用於 B

細胞，另外也作用於 T 細胞、hepatocytes、hematopoietic progenitor cell 和 neuronal cell^{(71) (72) (73)}。

IL-6 其功能包括調節人體免疫反應、造血作用、急性期蛋白的合成及發炎反應⁽⁷⁴⁾。IL-6 也能夠增生如血小板的產生、血小板的活化及促進凝固作用⁽⁷⁵⁾。活化後的吞噬細胞、T 細胞、B 細胞、角質細胞、纖維母細胞、內皮細胞及神經膠細胞等都可分泌 IL-6⁽⁷⁶⁾。淋巴毒素 (lymphotoxin)、IL-1、TNF、血小板生長因子 (platelet-derived growth factor; PDGF)、血小板活化因子 (platelet-activating factor; PAF) 和顆粒性球抑制蛋白 (granulocyte-inhibitory protein) 等分裂原 (mitogens) 也會誘導 IL-6 的合成^{(77) (78) (79) (80)}。

IL-6 與 IL-1 β 、TNF- α 在第二型糖尿病患者中也扮演著一個調節發炎反應的角色⁽⁸¹⁾。文獻報導指出糖尿病合併視網膜病變的患者有明顯的 IL-6 上升表現⁽⁸²⁾。由第一型糖尿病之周邊血液中單核球分化而來的巨噬細胞受 LPS 刺激後所產生的 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 均會迅速地明顯的表現⁽⁸³⁾。

1-3-9. 一氧化氮合成酶 (Nitric Oxide Synthase, NOS)

一氧化氮為生理代謝 L-arginine 為 L-citrulline 時所產生的附加產物。而催化這個反應所需要的酵素之唯一一氧化氮合成酶 (Nitric oxide synthase, NOS)。現在已知的 NOS 共有三種異構形態，分別為組成性的 neuronal NOS (nNOS) 和 endothelial NOS (eNOS) 及誘發性的 inducible NOS (iNOS) 兩大類⁽⁸⁴⁾。

這兩大類的酵素調節機制和特性各不相同，組成性的 NOS 在生理方面扮演維持一般生理功能的角色，合成時需要鈣離子和調鈣蛋白 (calmodulin) 的存在⁽⁸⁵⁾，且生成一氧化氮的量很少。組成性的

NOS在作用時不會受到皮質固醇的影響，且受激發後生成一氧化氮的時間較快，作用維持時間相對也較短。誘發性 NOS (iNOS) 蛋白質分子量大約 130 KDa ，已知巨噬細胞、內皮細胞在 TNF- α 、LPS 及 INF- γ 刺激時，均可誘發出 iNOS 基因表現進而使細胞合成大量的 NO。在細胞表現 iNOS 時，NO 產生量的變化時常與 iNOS mRNA 量的改變相似，表示調控 iNOS 的表現，大部分是位於轉錄過程 (transcription)。

1-4. 研究動機

長期處於高血糖的糖尿病患者常伴隨著許多併發症和感染性問題，現今糖尿病也慢慢被歸類唯一種慢性發炎的症狀。過去的許多文獻中也提及到在高糖的環境下，會促使內皮細胞、巨噬細胞、白血球本身的一些活化現象，進而產生 interleukins 或 cytokines，例如：IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 。而 NO 的釋放則是賦予巨噬細胞作為毒殺外來物的手段之一。在文獻中大多利用外加葡萄糖液的方式來培養細胞，或是以糖尿病患者體內的發炎細胞（例如：血管內皮細胞、腎絲球、上皮細胞等）去觀察研究細胞受刺激後，所產生的 interleukins 或 cytokines 分泌情形，然而對於巨噬細胞類似的研究文獻卻是極少。

本實驗之主要目的是想藉由體外的模式去探討經由高濃度葡萄糖培養於不同的時間，對於巨噬細胞 RAW264.7 的活性影響，以及探討其所產生的 NO 與 iNOS 蛋白質及基因表現關係。已知巨噬細胞經由 LPS 活化後會釋出 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 等促發炎的細胞激素，而這些細胞激素亦可作為一種發炎性的指標。因此，本研究的

另一目的是想藉由模擬糖尿病之高糖環境的體外試驗模式，去探討高濃度葡萄糖對於巨噬細胞在釋放這些細胞激素能力的影響。

第二章 材料與方法

2-1. RAW 264.7 巨噬細胞之培養 (RAW 264.7 cell culture)

化學製劑、儀器設備：

1. 細胞株 RAW 264.7 (巨噬細胞，BCRC 60001)：由食品工業研究發展所 (Food Industry Research and Development Institute) 購得。
 2. FBS (HyClone, SH30071-03 胎牛血清)
 3. Non-essential amino acid (Biosera, B10K0293)：購自莫比爾，5 mL/ 15 mL 離心管分裝並凍至 -20°C 。
 4. Sodium pyruvate 100 mM (Gibical)：購自莫比爾，5 mL/ 15 mL 離心管分裝 並凍至 -20°C 。
 5. Penicillin (100 U/ mL) / streptomycin：購自伯昂 (Gibco, 15140-122)，5 mL/ 15 mL 離心管分裝 並凍至 -20°C 。
 6. HEPES buffer (1 M) 配製：HEPES powder 購自友和 (JT Baker-4153-01)，取 HEPES powder 59.58 g 溶於 150 mL Mini Q 中，調至 pH 7.2，之後再用 Mini Q 補足至 500 mL，滅菌爐滅菌後並放置 4°C 。
 7. (5 L) DMEM 基礎培養基配製：DMEM powder 購自莫比爾 (12800-017-1)，將 DMEM powder 倒入 4000 mL 的 Mini Q 中溶解均勻，取 18.5 g NaHCO_3 + Mini Q 溶解均勻，再將二者混合並補足體積至 5000 mL 於無菌操作台中過濾分裝 (500 mL 一瓶)。
- * DMEM 培養基配製：10 % 胎牛血清 (FBS) + 1 % non-essential amino acid + 1 M HEPES buffer + 1mM sodium pyruvate + penicillin

(100 U/ mL) / streptomycin(100 μ g/ mL) + DMEM solution (500 mL 一瓶) 。

8. 酒精 (70 %)
9. 無菌操作台
10. 水浴槽 (設定: 37 °C)
11. T25 Flask
12. 培養箱

實驗方法：

將所購買的細胞株 RAW 264.7，第一時間迅速放入水浴槽中回溫後，再以 (70 %) 的酒精噴灑、擦拭管壁及管口並移入無菌操作台內，並將冷凍管中的細胞液全數吸出並均勻注入已事先回溫的 DMEM 培養基中並培養在 T25 Flask，Flask 上面標上日期，代數之後並放置培養箱中培養 (培養條件：37 °C，5 % CO₂) 。

2-1-1. RAW 264.7 巨噬細胞之繼代培養 (RAW 264.7 cell subculture)

化學製劑、儀器設備：

1. DMEM 培養基
2. 酒精 (70 %)
3. T75 Flask：購自莫比爾代理商。
4. 15 mL 離心管：購自莫比爾代理商。
5. 無菌操作台
6. 培養箱

實驗方法：

將滿盤的細胞，更換新鮮 DMEM 培養基後，拍打至細胞懸浮於培養基中，再全數吸出到 15 mL 離心管裡，上下抽吸約 20 次至均勻後，注入已先回溫的 DMEM 培養基中培養，Flask 上面標上日期，代數之後並放置到培養箱中培養（培養條件：37 °C，5 % CO₂）。

2-1-2. RAW 264.7 巨噬細胞之冷凍 (RAW 264.7 cell froze)

化學製劑、儀器設備：

1. DMEM 培養基
2. DMSO (BIOCHROM KG)
3. 酒精 (70 %)
4. Trypan blue (BIOCHROM KG)
5. 15 mL 離心管
6. 培養箱 1.5 mL 冷凍管
7. 1.5 mL 微量離心管 (eppendorff)
8. 倒立式顯微鏡
9. 血球計數器 (chamber)：含蓋玻片。
10. 無菌操作台

實驗方法：

將滿盤的細胞，更換新鮮 DMEM 培養基後，拍打至細胞懸浮於培養基中，再全數吸出到 15 mL 離心管中，上下抽吸約 20 次混合均勻後，從 15 mL 離心管中取 50 μ L 細胞液與等量的 Trypan blue 50 μ L (1 : 1) 在微量離心管中混合均勻，注入至血球計數器 (chamber)

上的凹槽處（上下兩個凹槽都要注入）並蓋上蓋玻片後，於倒立式顯微鏡下觀看計數。計算後細胞以 2×10^5 / mL（含 10 % DMSO）注入到 1.5 mL 冷凍管中並放置到 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ，次日再以乾冰移置 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 存放。

2-1-3. RAW 264.7 巨噬細胞之解凍 (RAW 264.7 cell unfreeze)

化學製劑、儀器設備：

1. DMEM 培養基
2. 酒精 (70 %)
3. T25 Flask
4. 15 mL 離心管
5. 無菌操作台
6. 培養箱
7. 水浴槽（設定: $37\text{ }^\circ\text{C}$ ）

實驗方法：

從 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 拿出的細胞液，第一時間迅速放入水浴槽中回溫後，再以（70 %）的酒精噴灑，擦拭管壁及管口並移入無菌操作台內，將冷凍管中的細胞液全數吸出並均勻注入已事先回溫的 DMEM 培養基中培養，Flask 上面標上日期，代數之後並放置培養箱中培養（培養條件： $37\text{ }^\circ\text{C}$ ，5 % CO_2 ）。

2-2. 15 mM 高葡萄糖 DMEM 培養基培養 RAW 264.7 巨噬細胞

化學製劑、儀器設備：

1. 葡萄糖 (150 mM) 溶液配製：取 1.35 g 葡萄糖粉末溶 50 mL Mini Q 均勻溶解後過濾備用。

* 使用時，取 4 mL 葡萄糖液與正常 DMEM 培養基 46 mL 混合均勻後 (15 mM)，再以每一個 T 75 flask/ 10 mL 培養細胞。

2. DMEM 培養基

3. 培養箱

4. 50 mL 離心管

實驗方法：

將計算後配置好的 glucose solution (150 mM) 與 DMEM 培養基混合，更換到 T75 Flask 裡並放置培養箱中進行培養 (培養條件：37 °C，5 % CO₂)。RAW 264.7 須每天更換新鮮含 15 mM 高葡萄糖 DMEM 培養基，分別培養 7 天，14 天。

2-3. 細胞計數/ 種植細胞 (Cell Count/ Cell grow in the 96 well plate)

化學製劑、儀器設備：

1. Trypan blue

2. 酒精 (70 %)

3. 白槽 (滅菌過)

4. 八爪 pipette (300 μ L)

5. 血球計數器 (chamber)：含蓋玻片。

6. 倒立式顯微鏡

7. 1.5 mL 微量離心管 (eppendorff)

實驗方法：

以 DMEM 培養基培養的 RAW 264.7 細胞，更換新鮮 DMEM 培養基後拍打至細胞懸浮，再用無菌更換型 pipette 全數抽出至 50 mL 離心管中並上下抽吸約 20 次混合均勻，細胞液與 Trypan Blue (1:1) 混合後，注入至血球計數器 (chamber) 上的凹槽處 (上下兩個凹槽都要注入) 並蓋上蓋玻片後，於倒立式顯微鏡下觀看計數 (細胞計算方法：計數血球計數器上下兩處的各兩個大方格數的細胞量；細胞計數公式：(將上下兩處的細胞量相加總和) / 2 × 未知數 (X) × 2 × 10⁴ = 總培養基的體積量 (含細胞數 × 2 × 10⁵)。

計數及計算後，取細胞液與新鮮 DMEM 培養基混合均勻，再以八爪 pipette (調至 100 μL) 均勻的將細胞種至 96 well plate 中 (2.0 × 10⁴ / well)，並放置培養箱培養 (培養條件：37 °C，5 % CO₂)。隔天更換 15 mM 高葡萄糖 DMEM 培養基 1 天 (仿急性高糖環境)。

15 mM DMEM 培養基培養的 RAW 264.7 細胞，分別培養 6 天、13 天後，更換新鮮 15 mM DMEM 培養基後拍打至細胞懸浮，再用無菌更換型 pipette 全數抽出至 50 mL 離心管中並上下抽吸約 20 次混合均勻，細胞液與 Trypan Blue (1:1) 混合後，注入至血球計數器 (chamber) 上的凹槽處 (上下兩個凹槽都要注入) 並蓋上蓋玻片後，於倒立式顯微鏡下觀看計數。均勻種植在 96 well plate 中，並放置培養箱培養 (培養條件：37 °C，5 % CO₂)。隔天更換 15 mM 高葡萄糖 DMEM 培養基至隔天 (仿慢性 7 天、14 天高糖環境)。

2-4. 亞硝酸鹽產物測定 (NO Production test)

化學製劑、儀器設備：

1. LPS (LipoPolySaccharide) Stock (Fluka, FL-62326)：購自友和，
1 mg/ mL 分裝並凍至 -20°C 。

* LPS stock 裡取所需的 μL 數，經 10 X 稀釋後，以 $1\ \mu\text{L}/\text{well}$ 的體
與 $99\ \mu\text{L}/\text{well}$ 的 DMEM 培養基/ 15 mM 高葡萄糖 DMEM 培養基
混合，並注入至 96 well plate ($100\ \mu\text{L}/\text{well}$) 中進行培養。

2. Griess reagent (Sigma, SI-G4410)：購自友和。

3. DMEM 培養基/ 15 mM 高葡萄糖 DMEM 培養基

4. 培養箱

5. 白槽 (滅菌過)

6. 八爪 pipette ($300\ \mu\text{L}$)

7. 96well plate (coating/ un-coating)

實驗方法：

將培養 1 天 (24 hr)、7 天、或 14 天高葡萄糖 15 mM DMEM 培
養基的 RAW 264.7 加入含 LPS ($1\ \text{mg}/\text{mL}$) 新鮮 15 mM 高葡萄糖
DMEM 培養基後，放置培養箱培養 (培養條件： 37°C ，5 %
 CO_2)。培養於 6 hr, 12 hr, 18 hr, 24 hr 分別收集其上層液，加入等量
Griess reagent 反應 10 min 之後，用 ELISA reader 550 nm 測其 NO
值。

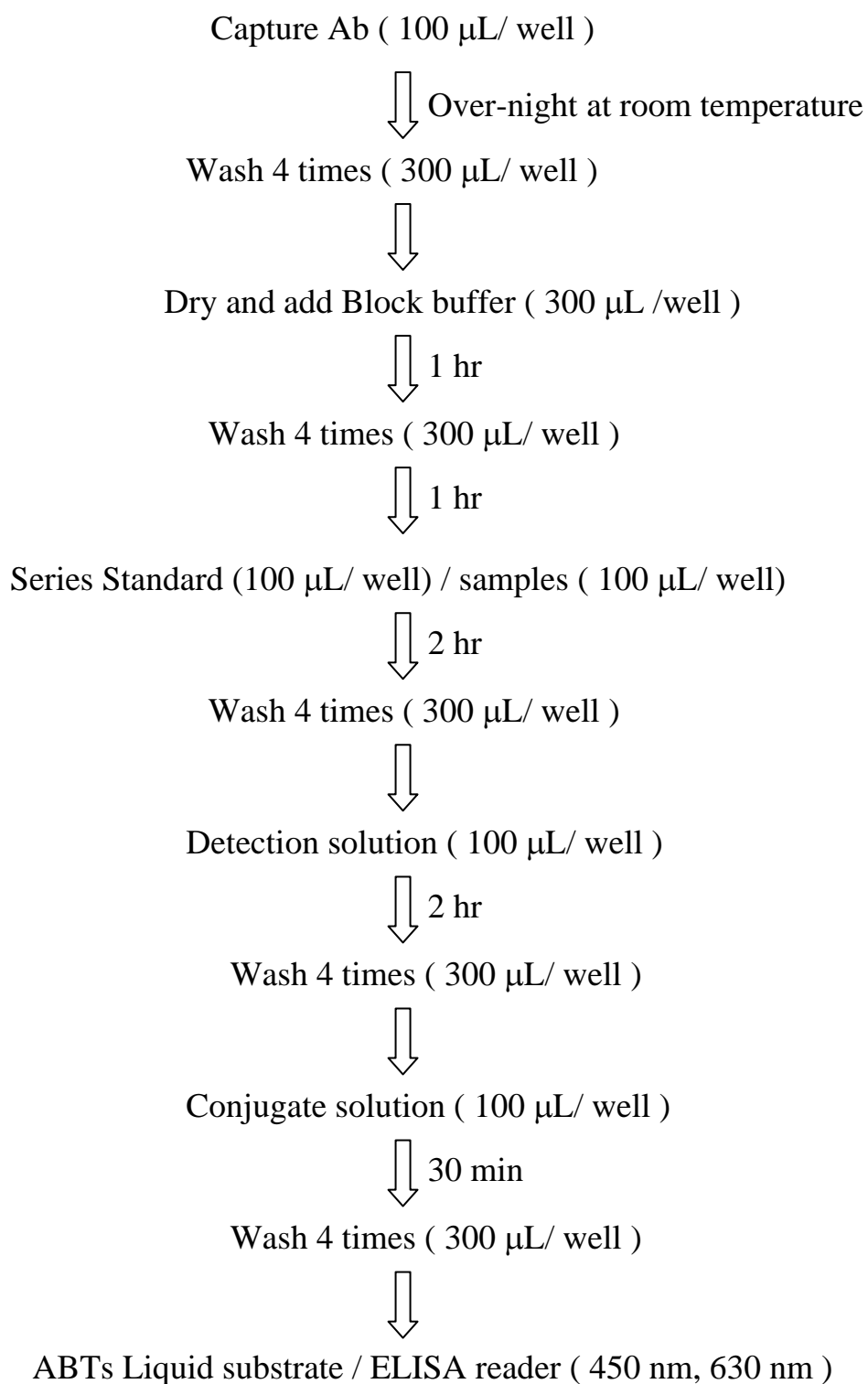
2-5. TNF- α 濃度測定 (TNF- α assay)

化學製劑、儀器設備：

TNF- α assay kits (CytoLab ELISA, 900K54) :

1. Capture Antibody : 分裝 500 μ L/ 1.5 mL 微量離心管
並凍至 -20°C 。
- * 使用時以 PBS (1 : 20) 稀釋，並以 100 μ L/ well 加入至 96 well plate 即可。
2. Standard stock : 3 ng/ ml
3. 1X-PBS 配製 : KH_2PO_4 , 0.245 g + $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.57 g +
NaCl, 4.25 g 溶於 Mini Q, 400 mL，調至 pH 值 7.2 後再補足 Mini Q 500 mL 。
4. Washing buffer 配製 : Tween 20 (2 %)+ 1X- PBS, 500 mL。使用時
以 300 μ L/ well 做清洗。
5. Block buffer 配製 : BSA powder 0.4 g 溶於 PBS 40 mL 後，用 0.2
孔徑的 filtre 過濾並放置 4°C 。
6. Diluent solution 配製 : BSA powder 0.5 g 溶於 PBST (即 Washing
buffer) 50 mL 後，用 0.2 孔徑的 filtre 過濾並放置 4°C 。
7. ABTs Liquid substrate : 購自友和 (SI-A3219) 。
8. Detection solution stock : 使用時以 Diluent (1 : 20) 稀釋，並以
100 μ L/ well 加入至 96 well plate 即可。
9. Conjugate solution : 使用時以 Diluent 稀釋 (1 : 2000) 並以 100 μ L/
well 加入至 96 well plate 即可。
10. LPS
11. 96 well plate (un-coating)
12. 八爪 pipette (300 μ L)
13. ELISA reader : 設定 450 nm/ 630 nm (雙波長)

實驗方法：



2-6. IL-1 β 濃度測定 (IL-1 β assay)

化學製劑、儀器設備：

IL-1 β assay kit (Biosource, CMC0813)：

1. Coat Antibody (IL-1 β , 0.125 mg/ 0.125 mL)：分裝 12.5 μ L/ eppendorff 1.5 mL (微量離心管) 並凍至 -20°C 。

* 使用時以 coating buffer A (1 : 800) 稀釋，並以 100 μ L/ well 加入至 96 well plate 即可。

2. Dection antibody (IL-1 β , 0.025 mg/ 0.125 mL)

* 使用時以 assay buffer (含 5 % 血清) 稀釋，並以 100 μ L/ well 加入至 96 well plate 即可。

3. Standard IL-1 β ：放至 -4°C 。

* 使用時以 (1 : 10) 稀釋至 1000 pg/ mL，並以 300 μ L/ well 加入至 96 well plate 即可。

4. Streptavidin-HRP (0.025 mg/ 0.125 mL)

* 使用時以 assay buffer 稀釋至 0.05 μ g/ mL，並以 100 μ L/ well 加入至 96 well plate 即可。

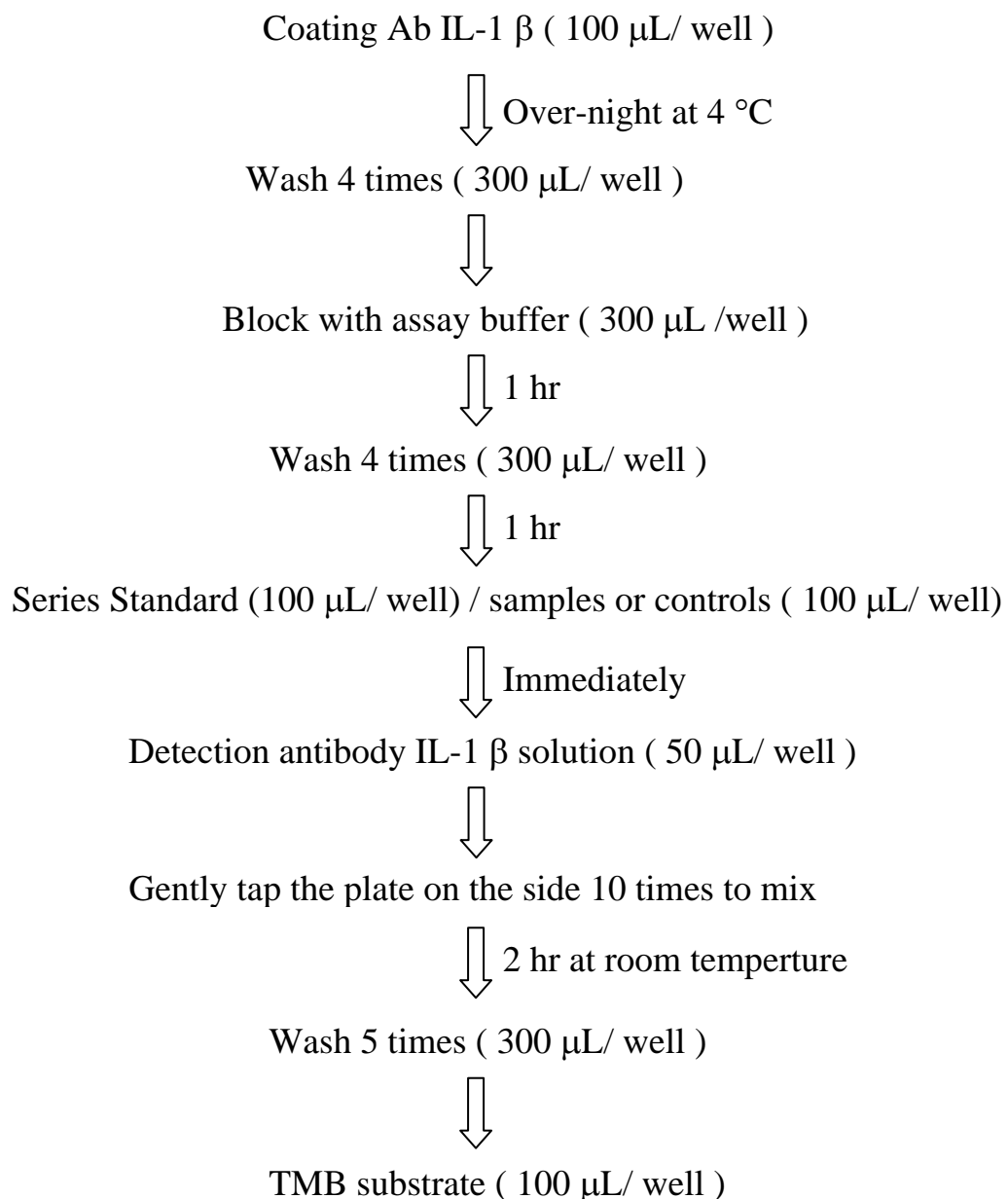
5. Coating buffer A (Biosource, CB07100) 配製：NaCl, 8 g + NaHPO₄, 11.3 g + KH₂PO₄, 0.2 g + KCl 0.2 g 溶於 1 L Mini Q，調 pH 值至 7.4。

6. Assay buffer (Biosource, DS98200) 配製：NaCl, 8 g + NaHPO₄, 11.3 g + KH₂PO₄, 0.2 g + KCl, 0.2 g + Bovine serum albumin (sigma, 9048-46-8), 5 g + Tween 20, 1 mL 溶於 1 L Mini Q，調 pH 值至 7.4。

7. Wash buffer (Biosource, WB01) 配製：NaCl, 9 g + Tween 20, 1 mL 溶於 1 L Mini Q 調 pH 值至 7.4。

8. Substrate solution (Biosource, SB01) : Tetramethylbenzidine (TMB)
和 Hydrogen Peroxide ◦
9. Stop solution (BioSource, SS01100) : H₂SO₄ (1.8 N)
10. 96 well plate (un-coating)
11. 八爪 pipette (300 μL)
12. ELISA reader : 設定 450 nm

實驗方法：



↓ 30 min in the dark at room temperture
Stop solution (100 μ L/ well)
↓ 30 min
ELISA reader (450 nm)

2-7. IL-6 濃度測定 (IL-6 assay)

化學製劑、儀器設備：

IL-6 assay kit (Biosource, CMC0063)：

1. Coat Antibody (IL-6, 0.125 mg/ 0.125 mL)：凍至 -20°C 。

* 使用時以 coating buffer B (1 : 800) 稀釋，並以 100 μ L/ well 加入至 96 well plate 即可。

2. Dection antibody (IL-6, 0.05 mg/ mL)

* 使用時以 assay buffer (含 5 % 血清) 稀釋，並以 100 μ L/ well 加入至 96 well plate 即可。

3. Standard IL-6：放至 -4°C 。

* 使用時以 (1 : 10) 稀釋至 1000 pg/ mL，並以 300 μ L/ well 加入至 96 well plate 即可。

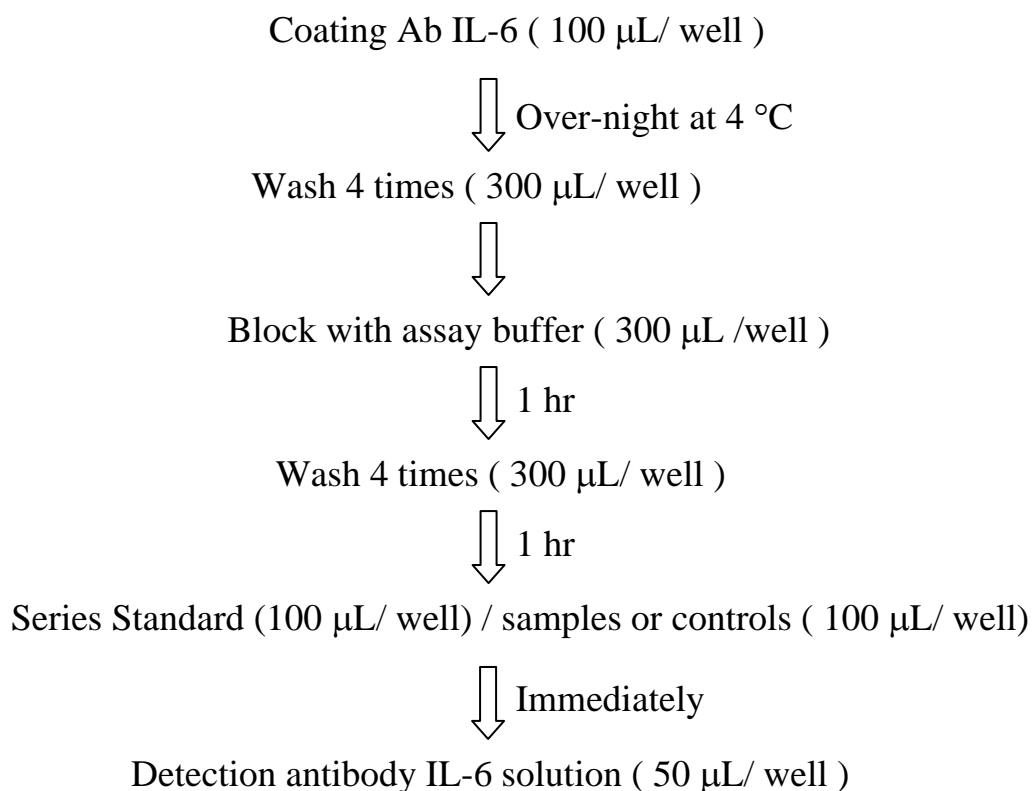
4. Streptavidin-HRP (0.025 mg/ 0.125 mL)

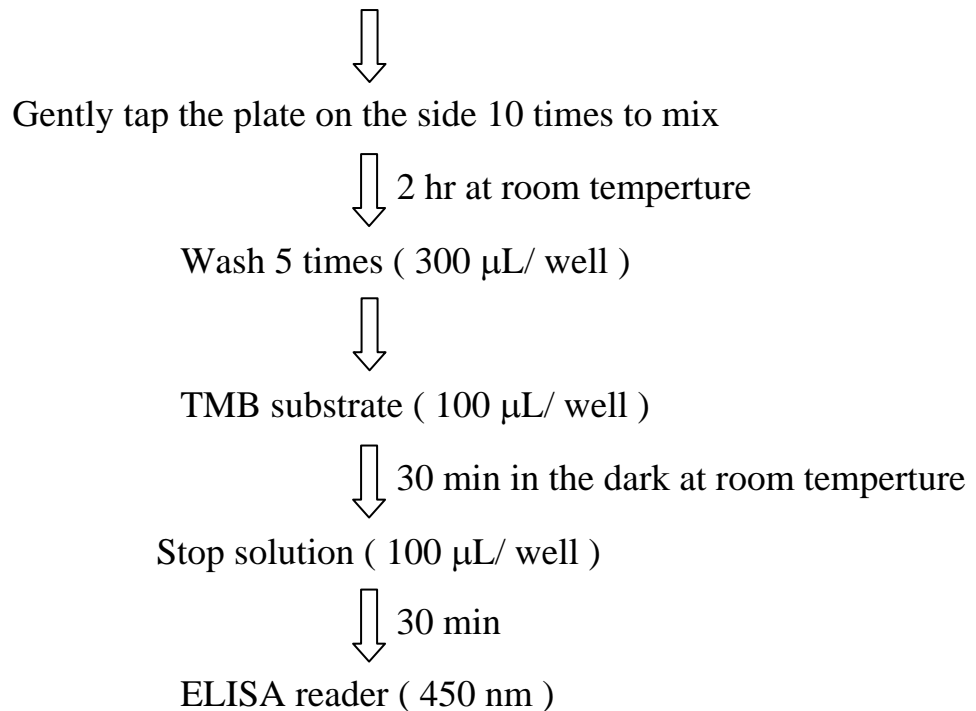
* 使用時以 assay buffer 稀釋至 0.05 μ g/ mL，並以 100 μ L/ well 加入至 96 well plate 即可。

5. Coating buffer B (Biosurce, CB01100) 配製：NaHCO₃, 4.3 g + NaCO₃, 5.3 g 溶於 1 L Mini Q，調 pH 值至 7.4。

6. Assay buffer (Biosource, DS98200) 配製 : NaCl, 8 g + NaHPO₄, 11.3 g + KH₂PO₄, 0.2 g + KCl, 0.2 g + Bovine serum albumin (sigma, 9048-46-8), 5 g + Tween 20, 1 mL 溶於 1 L Mini Q , 調 pH 值至 7.4 。
7. Wash buffer (Biosource, WB01) 配製 : NaCl, 9 g + Tween 20, 1 mL 溶於 1 L Mini Q 調 pH 值至 7.4 。
8. Substrate solution (Biosource, SB01) : Tetramethylbenzidine (TMB) 和 Hydrogen Peroxide 。
9. Stop solution (BioSource, SS01100) : H₂SO₄ (1.8 N)
10. 96 well plate (un-coating)
11. 八爪 pipette (300 μ L)
12. ELISA reader : 設定 450 nm

實驗方法 :





2-8. 蛋白質抽取 (Protein Extraction)

化學製劑、儀器設備：

1. 冰塊
2. 液態氮：購自雲山行。
3. 1X- PBS (細胞用) 配製： KH_2PO_4 , 0.245 g + $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.57 g + NaCl, 4.25 g 溶於Mini Q 400 mL，調至 pH 值 7.2，再補足Mini Q至 500 mL。
4. Incubation buffer：40 mM Tris-HCl (pH 7.4) + 1 mM EDTA + 150 mM NaCl。
5. 0.25 M Tris-HCl (pH 7.8)
6. 刮勺/ 酒精 (70 %)

7. 微量管離心機 (設定: 4 °C)
8. 水浴槽 (設定: 37 °C)
9. 無菌操作台
10. - 20 °C 冰箱
11. 1.5 mL 微量離心管 (eppendorff)

實驗方法：

RAW 264.7 細胞以 1X- PBS 清洗 3 次並於去除所有的 BPS 後，加入 Incubation buffer 1 mL 在室溫下反應 5 min ，並將細胞刮下到 1.5 mL 微量離心管放置冰上。爾後以 13000~14000 rmp 高速離心 (30 sec) ，去除上清液，再加入 50 μ L 4 °C 的 0.25 M Tris-HCl (pH 7.8) ，打散底部的細胞團塊再 spin down 。細胞以液態氮冷凍 (5 min) 及水浴鍋解凍 (5 min) 的方式，如此反覆 3 次循環 (約 30 min) 後打破細胞膜抽取其蛋白質，於 4 °C 下離心 13000 ~ 14000 rpm (5 min) ，並收集其上清液 (即蛋白質液) 至乾淨的微量離心管 (eppendorff) ，存放於 - 20 °C 備用。

2-9. 蛋白質濃度測定 (Protein Assay)

化學製劑、儀器設備：

1. Protein assay reagent (Bio-rad)
2. ELISA Reader: 波長 595 nm
3. Standard Curve

實驗方法：

將存放於 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 蛋白質液 (Stock) 先取 $3\text{ }\mu\text{L}$ 加入 $447\text{ }\mu\text{L}$ Mini Q 混合成 $500\text{ }\mu\text{L}$ 蛋白質水溶液，再從中取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 與 $200\text{ }\mu\text{L}$ 的 Protein assay reagent (1 : 20) 混合成蛋白質試劑混合液，並反應 15 min 後，將蛋白質試劑混合液以 ELISA Reader 波長 595 nm 測其吸光值，所得吸光值代入以血清白蛋白 (BSA) 所作成的 Standard Curve ($0.05\text{ mg/mL} \sim 0.5\text{ mg/mL}$) 來換算其濃度。

2-10. 西方墨點法 (Western blot)

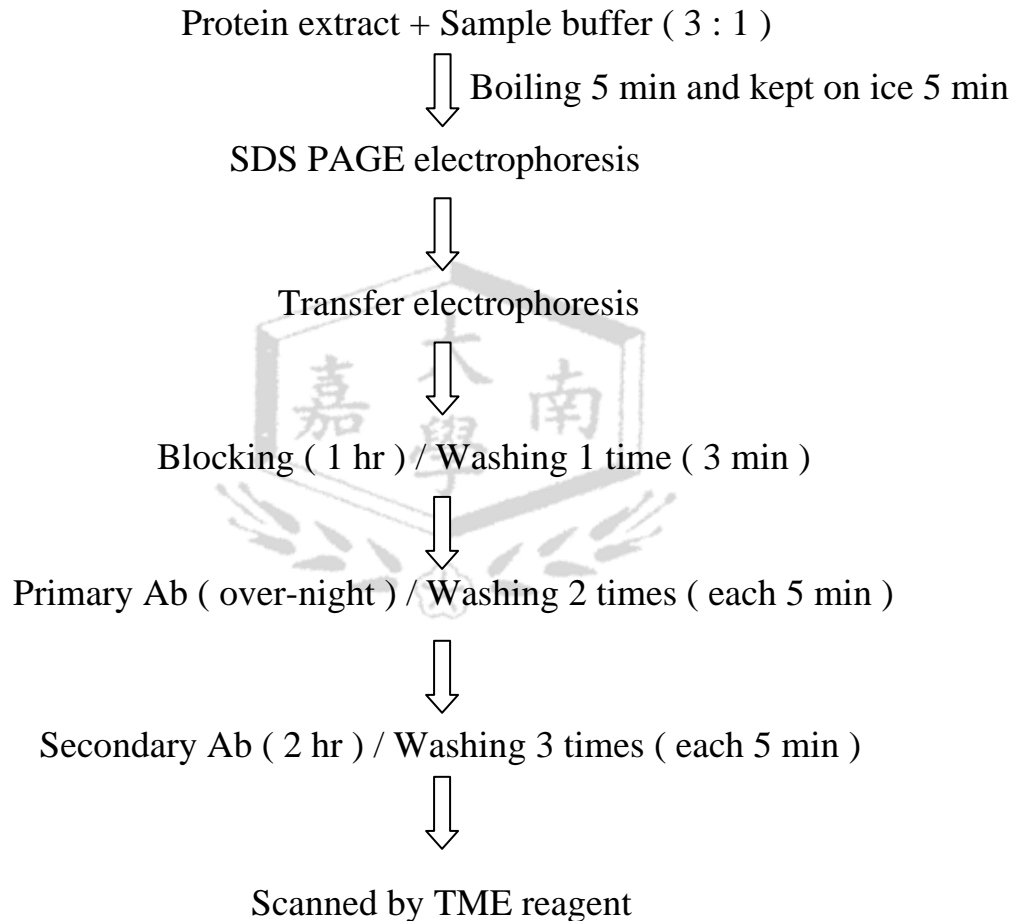
化學製劑、儀器設備：

1. Tris-base (Amresco, 0826-1KG)
 2. Glycine (Amresco, 0167-1KG)
 3. (1.5 M) Tris-HCl (pH 8.8) 配製：18.171 g Tris-base 溶於 100 mL Mini Q 中，調至 pH 值 8.8。
 4. (0.5 M) Tris-HCl (pH 6.8) 配製：9.0855 g Tris-base 溶於 100 mL Mini Q 中，調至 pH 值 6.8。
 5. APS solution 配製：APS powder (J.T.Baker, C04466)，1 g APS powder 溶於 1 mL Mini Q 中混合均勻。
 6. 10X- SDS-PAGE running buffer 配製：Tris-base 15 g + Glycine 72 g + SDS (J.T.Baker, 151-21-3) 5 g 溶於 500 μL Mini Q，使用時稀釋成 1 X。
 7. Acrylamide (Bio-rad, 161-0156)
- * 製膠：Separating Gel (10 %)：Mini Q 4.1 mL + 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 2.5 mL + SDS 10 % 100 μL + Acrylamide 3.3 mL + APS 100 μL + TEMED 4 μL 。

- Stacking Gel (4 %) : Mini Q 3.2 mL + 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 2.5 mL + SDS 10 % 100 μ L + Acrylamide 1.33 mL + APS 50 μ L + TEMED 10 μ L 。
8. 4X- Sample buffer loading dye : (1 M) Tris 2 ml + 10 % 2-mercaptoethanol (Sigma, 200-464-6) 1mL + SDS 0.8 g + Glycerol 5 g + Bromophenoblue 0.04 g 。
9. Block buffer 配製 : 脫脂奶粉 2 g 溶於 1X- PBS 40 mL 。
10. TEMED (Sigma, BP161-0800) : 購自汎泰 。
- * Blotting Transfer buffer 配製 : Tris-base 3.03 g + Glycine 14.4 g 溶於 Methanol 100 mL + Mini Q 900 mL 。
11. Primary Anti-body (Sigma) : 購自友和 (SI-N9657) 。
- * Anti mouse-iNOS 配製 : Anti mouse-iNOS 10 μ L + 1X-PBS 10 mL (1 : 10000) 。
12. Secondary Anti-body
- * HRP-Anti-mouse IgG Antibody (Jackson, 115-035-003-100) 配製 : Secondary Anti-body 10 μ L + 1X - PBS 10 mL (1 : 10000) 。
13. α -Tubulin Anti-body (Sigma) 配製 : 購自友和 (SI-T5168) , α -Tubulin Anti-body 3 μ L + 1X - PBS 12 mL (1:40000) 。
14. Washing buffer 配製 : Tween 20 (2 %) + 1X- PBS 500 mL 。
16. TMB membrane 呈色劑 (KPL, 50-77-03) : 購自岑祥 。
17. 冰塊
18. 加熱板 , 振盪板
19. PVDE membrane : 購自伯昂 (IPVH 00010) 。
20. Bio-read 製膠套組 : 厚片玻璃、薄片玻璃、製膠架、comb、(Bio-read) 電泳 (槽) 套組

21. 轉膜套組：轉膜槽，冰槽，轉模板（黑板/白板），海綿，轉膜用厚紙片。

實驗方法：



2-11. RNA 抽取 (RNA extraction)

化學製劑、儀器設備：

1. 1.5 mL 微量離心管 (eppendorff)
2. RNA isolation system Kit：購自騰達行代理商 (GS16780) (內附：Lysis buffer，DNA、蛋白質沈澱劑，RNA 溶解劑) 。

3. Incubation buffer : 4 °C 存放。
4. Isopropanol : 4 °C 存放。
5. nuclearase free water (Promega)
6. 冰塊
7. 酒精 (70 %)
8. 刮勺
9. 微量離心機
10. 分光光度計

實驗方法：

將所培養的細胞 (6 well plate)，去除培養基並加入 500 μ L 的 Incubation buffer，刮下細胞至微量離心管 (eppendorff)，以 1400 ~ 1600 rpm 10 min，去除上清液，加入 300 μ L Lysis buffer 並 vortex 30 sec，再以 13000 rpm 30 sec 後，取其上清液 300 μ L 至另一 eppendorff，再加入 100 μ L DNA / protein 沈澱劑，輕柔翻轉 20 次放置冰上 5 min，再次離心 (13000 rpm 8 min)，取上清液至新的微量離心管 (eppendorff) 再以相同的條件，離心 8 min。將上清液取至新的微量離心管 (eppendorff) 後加入 300 μ L Isopropanol 並輕柔翻轉 60 次，以 13000 rpm 8 min，所得之沈澱物為 total RNA (呈半透明狀)。去除上清液，加入酒精 (70 %) 清洗並輕柔翻轉 10 次，以 13000 rpm 5 min 後，去除上清液，spin down 去除剩餘殘液，放置無菌操作台裡風乾 (約 15 min)。此時可看見微量離心管底部的沈澱物由白色轉為透明，此時再加入 30 μ L RNA 溶解劑並放置冰上 30 min 後。輕柔混合均勻後，以分光光度計 260 nm / 280 nm 測其 RNA 濃度。測 RNA 濃度時，先將抽取後的 RNA (20 μ L) 中取 1 μ L +

999 μL nuclearase free water (1 : 1000)，並注入石英管中放入分光光度計機裡，測其濃度。

2-12. 反轉錄-聚合酶鏈反應 (Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction)

化學製劑、儀器設備：

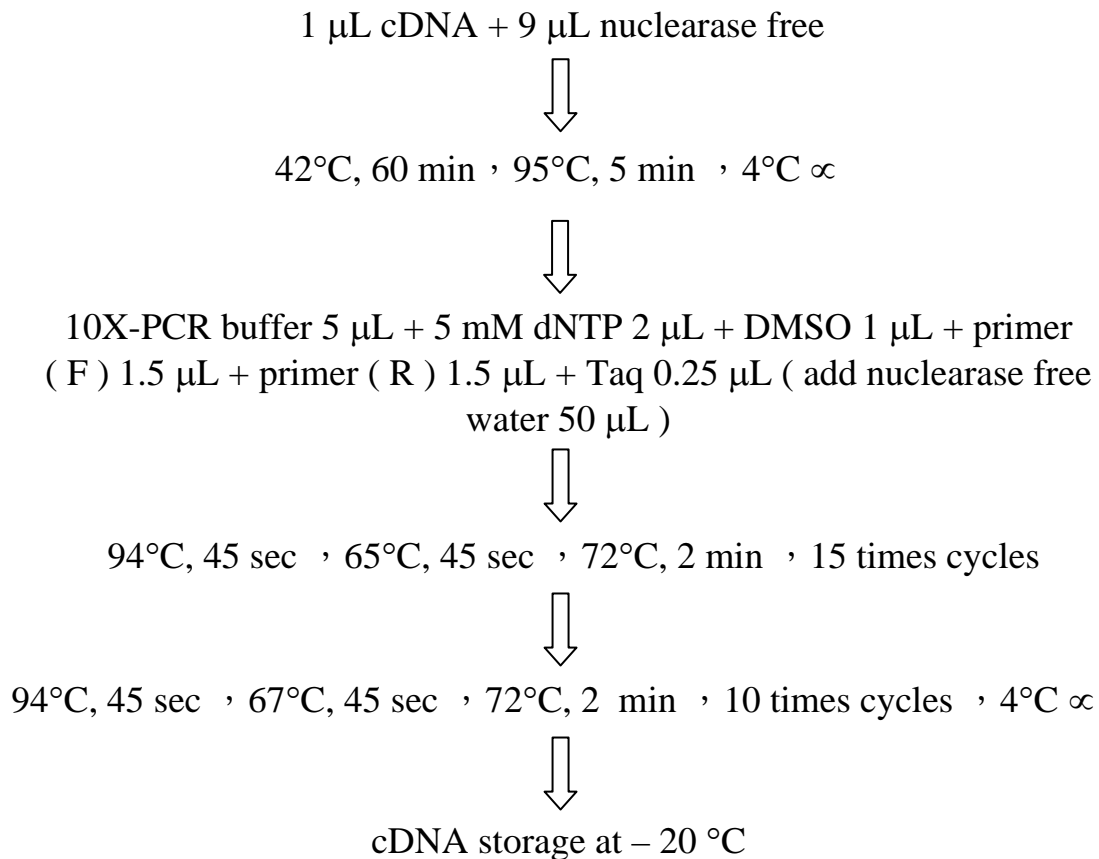
1. Random primer, 5X - RT buffer, 5 mM dNTP, RNase inhibitor, M-MLV-RT enzyme (Promega)：購自勁因 (RA1250) (- 20 $^{\circ}\text{C}$ 存放)。
2. 10X - PCR buffer, 5 mM dNTP, DMSO, primer (F), primer (R), Taq (Promega)：購自勁因 (RA1250)。
3. 分光光度計 (設波長為 260 nm, 280 nm)
4. 冰塊
5. 200 μL PCR 反應管
6. Nuclearase free water (Promega) (滅菌過)
7. PCR 反應器

實驗方法：

5X-RT buffer 4 μL + 5 mM dNTP 2 μL + RNase inhibitor 0.5 μL + RNA (2 μg / X μL) + 1 μL random primer 混合後再加入 M-MLV-RT 酵素 1 μL ，最後再用滅菌後的 nuclearase free water 補足體積至 20 μL 。

mRNA + random primer + M-MLV-RT





2-13. DNA 瓊膠製備/ DNA 電泳 (DNA Agarose gel preparing / DNA electrophoresis)

化學製劑、儀器設備：

1. SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen USA, 44747A)
2. Agarose powder (Invitrogen, 15510019) : 購自萊富。
3. 10X - TAE (Tris-Borate EDTA) buffer
4. 0.5X - TAE buffer
5. 6X-loading dye
6. 微波爐
7. DNA 電泳套組

8. DNA Marker (Biotech) : 購自友和。

9. Agarose 製膠板模組

實驗方法：

DNA Agrose gel (1 %) 配製：0.4 g Agrose，溶於 1X-TAE buffer 40 mL 中並加入 4 μ L DNA gel stain 混合均勻，放入微波爐中微波後，倒入模組中，放置室溫下冷卻。

DNA 電泳：將 Samples 從 -20°C 拿出，以 1 : 5 與 6X - loading dye 做混合並注入 DNA Agarose gel 中，放入 DNA 電泳槽，倒入 0.5X - TAE buffer 開始進行 DNA 電泳分析（由負極向正極泳動），約 20 min 後即可將 Agarose gel 用 UV 拍照存檔。

2-14. 統計分析

本實驗對於細胞分析中，各組數據均以平均值加減一個正負標準差 (mean \pm SD) 表示，並以 Student's *t*-test 作統計分析，(*p*) 值以 * $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ 和 *** $p < 0.001$ 表示顯著性差異。圖表以 Prism4.Document 和 Sigma Plot 9.0 繪製。

第三章、結果

3-1. NO 產量試驗

正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 巨噬細胞所釋放在 medium 裡的 NO 產量 (basal level) 並不會隨著時間而有所改變 (圖 1.a.)。反之, NO 產量在有添加 15 mM glucose DMEM 培養基的 RAW 264.7 培養 18 hr 後, 與正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 相比, 則開始有明顯增加的傾向 ($p < 0.01$)。

正常 DMEM 培養基所培養的 RAW 264.7 在 LPS 刺激之下, NO 產量隨培養時間延長而增加。這樣的情形同樣也在添加 15 mM glucose DMEM 培養基的 RAW 264.7 觀察到, 只是上升的濃度在每個時間點, 所測得的 NO 值都比前者為低 ($p < 0.01$) (圖 1.b.)。

隨著 15 mM glucose DMEM 培養基的 RAW 264.7 培養時間延長至 7 天 (中慢性), 發現 6 hr 後所測得的 NO basal 值, 與正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 相比, 在統計學上卻有顯著差異 ($p < 0.01$) (圖 1.c.)。同樣的, 在 LPS 刺激下, 有添加 15 mM glucose DMEM 培養基的 RAW 264.7 從 6 hr 到 24 hr, 可以看到所釋放出的 NO 值也有著明顯偏低的情形 ($p < 0.01$), 與正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 相比 (圖 1.d.)。

將添加 15 mM glucose DMEM 培養基時間延長至 14 天 (慢性), 從 medium 中所測得的 NO basal 值, 在各時間點與正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 相比, 有慢慢回升的情形 ($p < 0.01$) (圖 1.e.)。經由 LPS 刺激後, 同樣的發現在長期受 15 mM glucose DMEM 培養基的 RAW 264.7, 在時間點 24 hr 時, 所測得的 NO 釋

放濃度值，與正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 相比，有明顯下降的趨勢 ($p < 0.01$) (圖 1.f)。

3-2. iNOS protein assay by Western blot

已知細胞所釋放出來的 NO 與合成它的 iNOS 蛋白質有直接的相關性。在無添加 LPS 刺激之下，正常 DMEM 培養基與添加 15 mM glucose DMEM 培養基，所培養 (1 天，7 天，14 天) 的 RAW 264.7 並沒有明顯觀察到 iNOS 蛋白質 (分子量 130 KDa) 的表現 (圖 2.a)。

經由 LPS 所誘發出來的 iNOS 蛋白質表現中，15 mM glucose DMEM 培養基，培養 1 天 (急性) 和 7 天 (中慢性) 的 RAW 264.7 之 iNOS 蛋白質表現比正常 DMEM 培養基的 iNOS 表現來的少量，其結果與 NO production test 1 天、7 天的結果相符。但在 14 天 (慢性) 15 mM glucose DMEM 培養基之 RAW 264.7 的 iNOS 蛋白質濃度 (分子量 130 KDa) 表現卻出乎意料地，有相對明顯升高的情形 (圖 2.b)。

3-3. iNOS mRNA expression by RT-PCR

RAW 264.7 由 15 mM glucose DMEM 培養 1 天，7 天，14 天後，實驗結果中發現隨著 15 mM glucose DMEM 培養基培養的時間越久，basal iNOS mRNA 的濃度有慢慢增加的趨勢，而至 14 天 (慢性) 後卻有一個消失的現象。而經 LPS 刺激的 iNOS mRNA 濃度，在 15 mM glucose DMEM 培養 1 天 (急性) 後，有上升的情形。隨著 15mM glucose DMEM 培養 7 天 (中慢性) 的 iNOS mRNA 濃度

卻明顯轉淡至消失的情況，在 14 天（慢性） 15mM glucose DMEM 培養後的 iNOS mRNA 濃度（分子量 607 bp）又有著明顯倍增的現象（圖 3.a）。

3-4. TNF- α 產量試驗

TNF- α 為細胞發炎時所釋放出的一種發炎激素，不論是 basal 或是 LPS 刺激的 TNF- α 值會隨時間延長而同步增加，所以實驗中的 time courses 設為 0.5 hr、1 hr、1.5 hr，因為這是 basal 值及 LPS 刺激後，差異最大的時間點範圍。

在 basal TNF- α 濃度測定方面，培養含 15 mM glucose DMEM 培養基的 RAW 264.7 巨噬細胞 1 天（急性），測得的 TNF- α 濃度值在 1.5 hr，有明顯上升的情形。經 15 mM glucose DMEM 培養基培養 7 天（中慢性）後的 RAW 264.7 巨噬細胞，隨著時間的增加在 1 hr 及 1.5 hr 時有明顯的減少的情形。而長達 14 天（慢性）15 mM glucose DMEM 培養基培養後的 RAW 264.7 巨噬細胞，測得的 TNF- α 與正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 相比，則有大量提升的現象（圖 4.a.）。

添加 LPS 刺激後，在急性（acute）與慢性（chronic）15 mM glucose DMEM 培養基培養後的 RAW 264.7 巨噬細胞，所測得的 TNF- α 濃度，與正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 巨噬細胞之間並無明顯變化。反之，中慢性（sub-chronic）15 mM glucose DMEM 培養基培養後的 RAW 264.7 巨噬細胞，與正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 巨噬細胞相比，卻有一個明顯抑制的情形（圖 4. b.）。

3-5. IL-6 產量試驗

IL-6 爲人體內調節免疫及發炎反應的一種細胞激素。檢測 IL-6 釋放量時，因半衰期非常短，所以以 3 小時作爲一個檢測的時間點。在 basal 1 天（急性）含 15 mM glucose DMEM 培養基所培養的 RAW 264.7，有略微高於正常 DMEM 培養 RAW 264.7 的情況。經由 LPS 刺激後 15 mM glucose group，與正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 相比，有明顯增加的趨勢 ($p < 0.001$) (圖 5.a)。

在培養 7 天（中慢性）含 15 mM glucose DMEM 培養基所培養的 RAW 264.7 經 LPS 添加後，所釋放出的 IL-6 濃度，觀察到含 15 mM glucose 與正常 DMEM 所培養的 RAW 264.7 比較，並無差異性 (圖 5.b)。

將培養時間延長到 14 天（慢性）15 mM glucose DMEM 培養後發現，LPS 刺激後的 15 mM glucose group 之 IL-6 釋放量，與正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 相比，有明顯回升的現象 ($p < 0.01$) (圖 5.c)，但 14 天 15 mM glucose group 的 IL-6 釋放量，仍沒有比 1 天（急性）15 mM glucose group 多。

3-6. IL-1 β 產量試驗

IL-1 β 爲受發炎物質刺激後，所分泌出的一種細胞激素。檢測 IL-1 β 釋放量時，因半衰期非常短，所以以 3 小時作爲一個檢測的時間點。分別在培養於 15 mM glucose DMEM 培養基之 RAW 264.7 於 1 天（急性），7 天（中慢性），14 天（慢性）後，在 basal IL-1 β 的表現量，與正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 相比，皆有明顯增加的趨勢。($p < 0.001$) (圖 6.a)。

正常 DMEM 培養基與 15 mM glucose DMEM 培養基培養之 RAW 264.7 於 1 天，7 天，14 天後添加 LPS 刺激，結果發現 15 mM glucose DMEM 培養 1 天（急性），與其 basal 1 天（急性）和正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 所釋放出的 IL-1 β 表現量相比，並沒有太大的變化（ $p < 0.001$ ）。而 7 天（中慢性）IL-1 β 的表現量，則有略微抑制的情形。反之，14 天（慢性）與正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 相比，卻又有明顯回升增加的現象（ $p < 0.001$ ）（圖 6.b）。

第四章、討論

高血糖的併發症是一種與發炎相關的疾病⁽⁸⁶⁾。在過去的文獻中指出 NO 的產生對生物體是具有保護作用，因為它參與了生物的急性免疫發炎反應。低濃度的 NO 可以對抗外來的病原體⁽⁸⁷⁾，但 NO 對細胞的傷害是無選擇性的⁽⁸⁸⁾。所以若當 NO 濃度過高，則會對本體的細胞產生毒性，進而導致細胞突變，甚至死亡。可能原因是由於大量的 NO 抑制了 DNA 的合成，進而對粒腺體造成了傷害，使細胞膜失去完整性，最後走向細胞凋亡 (apoptosis)⁽⁸⁹⁾。在局部或全身的發炎反應中，例如：糖尿病、動脈硬化症等，也會產生高濃度的 NO⁽⁹⁰⁾，這也說明了高濃度葡萄糖與細胞產生 NO 釋放量和其機制有著正相關性。

曾有文獻提及當細胞在正常濃度的葡萄糖 (5.5 mM) 與高濃度葡萄糖 (25 mM) 所培養的環境中，隨著葡萄糖濃度越高，培養的時間越久，其 NO 釋放量則有明顯上升的現象⁽⁹¹⁾。然而在 LPS 急性的誘發之下，巨噬細胞所產生 NO 及 iNOS 蛋白質濃度也都有著上升的表現，但隨著高葡萄糖培養 48 hr 過後的巨噬細胞，其釋放細胞激素的能力有著降低的情形⁽⁹¹⁾。亦曾有其他相關研究指出，在高濃度葡萄糖培養下的巨噬細胞 (J774 macrophage cell line)，經 LPS 刺激後，NO 釋放量有減少的情況⁽⁹²⁾。這與本文對 NO 產生濃度測試，所得結果有雷同。在 NO production test 的圖中 (圖1.b)，我們證實了在添加 LPS 的刺激下，高濃度葡萄糖培養 1 天的 RAW 264.7 與正常 DMEM 培養基 (Normal) 的 NO 釋放濃度相比，並沒有太大的差異性。但隨著培養時間的延長至 14 天，其 NO 釋放的濃度有比

Normal 還要低的情形（圖1.d, 圖1.f）。

有研究報導顯示，飼養帶有糖尿病之大鼠 4 至 8 週後，未經任何刺激之情況下，取其腎絲球細胞，經 Western bolt 後並未偵測到任何的 iNOS protein 表現⁽⁹³⁾。此外有報導曾指出將血管平滑肌細胞培養在高葡萄糖的狀態下（72 hr）並以 IL-1 β 刺激（24 hr）後，活化 protein Kinase C β II isoform，發現 iNOS 及 NO production 皆有明顯的表現量產生⁽⁹⁴⁾。相同地在我們的 Western blot test 研究結果中顯示：隨著高葡萄糖濃度培養的時間越久，經由 LPS 刺激後 RAW 264.7 所產生出的 iNOS protein 表現有先下降（1 天）再上升（7 天及 14 天）的傾向（圖2.b）。

RT-PCR test（圖3.a）方面，在 basal 條件下經葡萄糖培養 RAW 264.7 後的 iNOS gene 表現有比 Normal 明顯的表現情形，14 天的結果除外。這可能的解釋是因長期葡萄糖培養細胞後，影響細胞內部的一些途徑改變（例如：NF-kappaB binding activity 的 down-regulation），與抑制了 iNOS 轉錄過程（transcription）和其本身的活性能力⁽⁹⁵⁾。另外在葡萄糖 1 天（急性）培養後，添加 LPS 刺激所誘發 iNOS gene 表現有明顯增加。隨著高葡萄糖培養的時間延長至 7 天 iNOS gene 濃度卻有一個抑制的表現，這與其他相關文獻所得結果相似^{(93) (95)}。然而我們的結果發現 14 天後 iNOS gene 的表現量又有一個明顯大量表現的情況。可能的原因是巨噬細胞的 iNOS gene 隨著長期高葡萄糖培養下，短暫抑制了其轉錄的表現然而在培養 14 天後恢復其轉錄（translation）機轉的運作，進而大量表現出 iNOS 蛋白質，與 Nakai 等人在 2004 年的研究指出人類角質細胞在長時間高濃度葡萄糖培養下，對高糖環境有著不同的適應性及恢復性⁽⁹⁵⁾。

當糖尿病患者中的巨噬細胞受外來物，如：LPS，刺激下所產

生的 TNF- α 、iNOS 和 IL-1 β 皆為扮演破壞 β cell 的重要角色⁽⁹⁶⁾⁽⁹⁷⁾。誘發性一氧化氮合成酶 (iNOS)，大部分存在於單核球或是巨噬細胞中。當有外來的刺激分子，例如：LPS、interferon- γ (INF- γ)、TNF- α 、interleukin-1 或其他的外來病原體入侵的情況下，iNOS 會被誘發出來，而產生大量 NO⁽⁹⁸⁾。Tang 等人在 2004 年文獻發表中更進一步證實，內皮細胞在高濃度葡萄糖環境會隨著時間的延長而造成一系列對產生 NO 途徑的損害⁽⁹⁹⁾。TNF- α 是一種促細胞發炎激素，它可藉由巨噬細胞、內皮細胞、纖維母細胞活化後而產生並可以刺激 NO 及一些內皮細胞激素的釋放⁽¹⁰⁰⁾。TNF- α 在高血糖症 (Hyperglycemia) 或是氧化壓力 (Oxidative stress) 下，也會被刺激而產生，進而導向 NF- κ B pathway⁽¹⁰¹⁾⁽¹⁰²⁾。曾有文獻指出利用間皮細胞培養在高濃度葡萄糖的環境下，會誘發 TNF- α 、IL-1 β 和其他細胞激素的產生⁽¹⁰³⁾，同時 TNF- α 在巨噬細胞、內皮細胞、平滑肌細胞中也會促使 iNOS 和 COX-2 的表現⁽⁸⁶⁾⁽¹⁰⁴⁾⁽¹⁰⁵⁾。在 TNF- α test (圖4.a, 圖4.b) 結果中發現，RAW 264.7 在高濃度葡萄糖培養下，所誘發的 basal TNF- α 有明顯上升的表現，這與文獻的結果相似。但在 LPS 刺激下，卻沒有如預期中有增加 TNF- α 產量的情形，這與 NO production test 的結果互相輝映，也意味著在 LPS 刺激後的 NO 釋放量會在葡萄糖作用之下減少，一部分的原因是 TNF- α 的產量下降。

許多文獻報導指出 IL-6 在糖尿病和心血管疾病中扮演著重要的角色⁽¹⁰⁶⁾⁽¹⁰⁷⁾⁽¹⁰⁸⁾⁽¹⁰⁹⁾⁽¹¹⁰⁾⁽¹¹¹⁾，也曾有研究報導發現在第一型及第二型糖尿病中 monocytes 對於 IL-6 的分泌濃度亦有增加的情形⁽¹¹¹⁾⁽¹¹²⁾。葡萄糖在現今被證實具有調節巨噬細胞的能力，有研究指出在高葡萄糖環境的刺激下會使得細胞增生⁽¹¹³⁾，進而釋放出細胞激素如：

TNF- α 、IL-6⁽¹¹⁴⁾⁽¹¹⁵⁾。在 IL-6 test (圖 5.a, 圖 5.b) 中, RAW 264.7 於高濃度葡萄糖培養下, 所誘發的 TNF- α 及 IL-6 皆有明顯上升的表現, 而這樣的情情也同時抑制了 TNF- α 的產生量⁽¹¹⁶⁾。在高葡萄糖環境下促使 IL-1 β 表現增加並藉由 NF- κ B pathway 的活化加速惡化了視網膜微血管細胞的凋亡⁽¹¹⁷⁾。在我們 IL-1 β test (圖 6.a, 圖 6.b) 中也發現了葡萄糖培養越久的 RAW 264.7 巨噬細胞所分泌 IL-1 β 的表現量也有著相對提高的情形。長期性的 IL-1 β 大量表現與糖尿病患者體內中的胰島素拮抗作用 (insulin resistance) 有著正相關性⁽¹¹⁸⁾。在高葡萄糖下會刺激促發炎反應的細胞激素表現量上升, 如: TNF- α 與 IL-1 β 而導致 transforming growth factor- β 1 (TGF β 1) mRNA 及蛋白質表現增加, 進而促使腹膜纖維化的產生⁽¹¹⁹⁾。

由於體內長期有著許多促發炎的細胞激素產生, 使得糖尿病患者有胰島素拮抗的問題, 以及感染後所引發的持續性的慢性發炎反應, 例如: TNF- α 表現上升的情況, 引起胰島素拮抗所造成的第二型糖尿病患者口中牙齦周圍感染 (牙周病) 及發炎反應⁽¹²⁰⁾, 以至於傷口不易修復。

第五章、結論

糖尿病所造成的傷口因感染後而不易修復，這與其發炎反應的不足，巨噬細胞分泌的細胞激素等有關。高濃度葡萄糖不論是急性（1 天）、中慢性（7 天）、或慢性（14 天）對於巨噬細胞的活化，均有明顯上升的趨勢，而且活化的作用似乎隨著高葡萄糖培養時間越久表現越明顯。

反之，LPS 活化 RAW 264.7 巨噬細胞的作用，卻在長期高濃度葡萄糖的影響下，所產生的 NO 濃度有減弱的現象，這與感染後不易啟動免疫功能抵抗微生物感染有著關聯性。而 iNOS 蛋白質，以及 iNOS gene 的表現卻有反彈性的增加。當細胞處在不正常的生理條件之下往往會出現 up-regulation 或 down-regulation，因此慢性的高葡萄糖培養對於細胞蛋白質的產量不同於其他期間的作用，似乎可以用此來解釋。實驗中發現 iNOS gene 和 iNOS 蛋白質的增加，卻沒有與 NO 釋放濃度有相關性。這意味著細胞所產生的 iNOS 在後轉錄過程（post-transcription）中，因高濃度葡萄糖長期醣化作用而受到阻斷，又或是長期的高濃度葡萄糖環境下，造成細胞的 NF- κ B pathway 出現 down-regulation 現象，進而影響 NO 的釋放濃度。

LPS 活化下的巨噬細胞，所分泌出的細胞激素，在長期慢性高葡萄糖培養的結果下，產生了較多的促發炎細胞激素（pro-inflammatory cytokines），與急性（1 天）高葡萄糖培養的結果相似，然而卻沒有與細胞被活化有正相關係（即 NO 產量未隨之增加）。這或許正是糖尿病患慢性心血管併發症的導致原因，也是糖尿病患容易遭受病原菌感染後不易復原的原因。

參考文獻

1. 行政院衛生署，台灣地區主要死因。台灣。行政院衛生署報 2005。
2. Kathryn EW, Gökhan SH. Inflammation, stress, and diabetes, review. *J Clin Invest.* 2005;115:1111-1119.
3. Pouliot M, Despres JP, Lemieux S, *et al.* Waist Circumference and Abdominal Sagittal Diameter: Best Simple Anthropometric Indexes of Abdominal Visceral Adipose Tissue Accumulation and Related Cardiovascular Risk in Men and Women. *The American Journal of Cardiology.* 1994;73:460-468.
4. Pouliot M, Despres JP, Lemieux S, *et al.* Waist Circumference and Abdominal Sagittal Diameter: Best Simple Anthropometric Indexes of Abdominal Visceral Adipose Tissue Accumulation and Related Cardiovascular Risk in Men and Women. *The American Journal of Cardiology.* 1994;73:460-468.
5. Despres JP, Purd'homme D, Pouliot M, *et al.* Estimation of Deep Abdominal Adipose-Tissue Accumulation from Simple Anthropometric Measurements in Men, *The American Journal of Clinical Nutrition.* 1991;54:471-477.
6. Seidell JC, Cigolini M, Charzewska J. Androgenicity in Relation to Body Fat Distribution and Metabolism in 38-Year-Old Women the European Fat Distribution Study. *J Clin Epi.* 1990;43:21-34.
7. Modan M, Halkin H. Hyperinsulinemia or Increased Sympathetic Drive as Links for Obesity and Hypertension. *Diabetes Care.* 1991;14:470-487.

8. Van IT. Health implication of overweight and obesity on the United States. *Annals Inter Med.* 1999;12:303-308.
9. Kvist H, Chowdjury B, Grangard U, *et al.* Total and visceral adipose-tissue volumes derived from measurements with computed tomography in adult men and women: Predictive Equation. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 1988;48:1351-1361.
10. Mykkanen L, Kuusisto J, Pyorala K. Increased risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in elderly hypertension subjects. *J of Hypertension.* 1994;12:1425-1432.
11. Köhler C, Temelkova-Kurktschiev T, Schaper F, *et al.* Prevalence of newly diagnosed type 2 diabetes, impaired glucose tolerance and abnormal fasting glucose in a high risk population. Data from the RIAD study using new diagnostic criteria for diabetes. *Dtsch Med Wochenschr.* 1999;124(37):1057-61.
12. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998;15(7):539-53.
13. Wilson JD, Foster DW. Williams textbook of endocrinology. 1992.
14. Thorsby E, Ronningen KS. Particular HLA-DQ molecules play a dominant role in determining susceptibility or resistance to type I diabetes mellitus. *Diabetologia.* 1993;36 (5):371-377.
15. Agras PI, Kink ST, Cengiz N, *et al.* Type 1 diabetes mellitus associated with nephritic syndrome. *Pediatr Endocrinol Metab.* 2006;19(8):1045-8.
16. Hotamisligil, GS. Inflammation, TNFalpha, and insulin resistance. In Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text. *New York, USA.* 1994;953–962.

17. 謝瑞玟、陳立人。糖尿病整體照護 - 視網膜病變篩檢流程之評估。 *中眼醫誌*。 2003;42(4):404-413 頁。
18. 陳涵翔糖。尿病視網膜檢查。 *糖尿病拾問*。 2002;7(1) : 49-50 頁。
19. Chen MS, Kao CS, Chang CJ, *et al.* Prevalence and risk factors of diabetes retinopathy among noninsulin- dependent diabetic subjects. *American Journal of Ophthalmol*, 1992;114:727-730.
20. Klein R. The Wisconsin epidemiologic study of diabetes retinopathy IX: four-year incidence and progression of diabetes retinopathy when age of diagnosis is less than 30 years. *Archives of Ophthalmology*. 1989;107:237-243.
21. Van Damme H, Limet R. Amputation in diabetic patients. *Clin Podiatr Med Surg*. 2007;24(3):569-82.
22. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993; 259:87-91.
23. Sethi JK, Hotamisligil GS. The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin. Cell Dev Biol*. 1999;10:19-29.
24. Smitherman KO, Peacock JE Jr. Infectious emergencies in patients with diabetes mellitus. *Med Clin North Am*. 1995;79:53-77.
25. Deresinski S. Infections in the diabetic patient: strategies for the clinician. *Infect Dis Reports*. 1995;1:1-12.
26. Rubin J, Yu VL. Malignant external otitis: insights into pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, and therapy. *Am J Med*. 1988;85:391-8.
27. Chang FY, Shaio MF. Decreased cell-mediated immunity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 1995;28:137-46.

28. MacCulish AC, Urbaniak SJ, Cambell CJ, *et al.* Phytohemagglutinin transformation and circulation lymphocyte subpopulations in insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes*. 1974;25:908-12.
29. Casey JJ, Heeter BJ, Klyshevich KA. Impaired response of lymphocytes of diabetic subjects to antigen of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 1977;136:495-501.
30. Didier H, Thierry R. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clinica Chimica Acta*. 2002;231:59-72.
31. Fukuto JM, Chaudhuri G. Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase: potential selective inhibition. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1995;35:165-94.
32. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:323-50.
33. Schwacha MG, Gudewicz PW, Snyder JA, *et al.* Depression of macrophage respiratory burst capacity and arachidonic acid release after Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Immunol*. 1993;150(1):236-45.
34. Sherry B, Tekamp Olson P, Gallegos C, *et al.* Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 beta. *J Exp Med*. 1988;168(6):2251-9.
35. Tseng CC, Hattori Y, Kasai K, *et al.* Decreased production of nitric oxide by LPS-treated J774 macrophages in high-glucose medium. *Life Sci*. 1997;60(7):99-106.
36. Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002; 13(4-5):413-21.
37. Sautebin L, Prostaglandins and nitric oxide as molecular targets for anti-inflammatory therapy. *Fitoterapia*. 2000;:S48-57.

38. Chan ED, Morris KR, Belisle JT, *et al.* Induction of inducible nitric oxide synthase-NO by lipopolysaccharide of *Mycobacter tuberculosis* is mediated by MEK-1-ERK MKK7-JNK, and NF- κ B signalling pathway. *Infect Immunol.* 2001;69: 2001-10.
39. Pan, MH, C T, Lin JH, *et al.* Suppression of lipopolysaccharide-induced nuclear factor- κ B activity by theaflavin-3, 3-digallate from black tea and other polyphenols through downregulation of I- κ B kinase activity in macrophage. *Biochem Pharmacol.* 2000;59: 357-367.
40. Stuehr DJ, Marletta, MA. Mammalian nitrite biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci.* 1985;82: 7738-7742.
41. Ignarro LJ, Buga GM, Woon KS, *et al.* Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci.* 1990;84: 9265-9269.
42. Gross SS, Levi R. Tetrahydrobiopterin synthesis. An absolute requirement for cytokine-induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 1992;267: 25122-25729.
43. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest.* 1991;21(4):361-74.
44. Lee BS, Kang HS, Pyun KH. Role of tyrosine kinase in the regulation of nitric oxide synthesis in murine liver cell: Modulation of I- κ B activity by tyrosine kinase. *Hepatology* 1997;25:913-919.
45. Drapier JC, Wietzerbin J, Hibbs JB Jr. Interferon- γ and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur J Immunol.* 1988;18(10):1587-92.

46. Morrison WI, Weiss R, Waxler-Morrison NE, Morrison BJ. Factors influencing oral health in long term care facilities. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1987;15(6):314-6.
47. Hon WM, Khoo HE, Mocchhaia S. Nitric oxide in septic shock: directions for future therapy. *Annals Acad Med.* 1998;27:414-421.
48. Steinberg GR. nflammation in Obesity is the Common Link Between Defects in Fatty Acid Metabolism and Insulin Resistance. *Cell Cycle.* 2007;11(8):6.
49. Lindemann RA, Economou JS. Actinobacillus actinomycetemcomitans and Bacteroides gingivalis activate human peripheral monocytes to produce interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J Periodontol.* 1988;59(11):728-30.
50. Bhakdi S, Klonisch T, Nuber P, *et al.* Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect Immun.* 1991;59(12):4614-20.
51. Kuwano K, Akashi A, Matsu-ura I, *et al.* Induction of macrophage-mediated production of tumor necrosis factor alpha by an L-form derived from Staphylococcus aureus. *Infect Immun.* 1993;61(5):1700-6.
52. Aggarwal BB, Natarajan K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur Cytokine Netw.* 1996;7(2):93.
53. Barnes, Karin. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 1997;336(15):1066-71.
54. Locksley R M, Killeen N, Lenardo M J. The TNF and TNF reeptor superfamilies: Integrating normalian Biology. *Cell.* 2001;104: 487-501.
55. Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today.* 1992;(5):151-3.
56. Hu WH, Johnson H, Shu HB. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kappaB and JNK

- activation and apoptosis through distinct pathways. *J Biol Chem.* 1999;274(43):30603-10.
57. Lindeman RA, Economou JS, Rothemel H. Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. *J Dent Res.* 1988;67(8):1131-5.
58. Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K. Detection of inflammatory cytokine messenger RNA (mRNA)-expressing cells in human inflamed gingiva by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. *Immunology.* 1992;76(1):42-7.
59. Matsuki Y, Yamamoto T, Hara K. Localization of interleukin-1 (IL-1) mRNA-expressing macrophages in human inflamed gingiva and IL-1 activity in gingival crevicular fluid. *J Peridontal Res.* 1993;28(1):35-42.
60. Scala G, Allavena P, Djeu JY, *et al.* Human large granular lymphocytes are potent producers of interleukin-1. *Nature.* 1984;3-9; 309(5963):56-9
61. Matsushima K, Procopio A, Abe H, Scala G, Ortaldo JR, Oppenheim JJ. Production of interleukin 1 activity by normal human peripheral blood B lymphocytes. *J Immunol.* 1985;135(2):1132-6.
62. Takeichi O, Saito I, Tsurumachi T, *et al.* Human polymorphonuclear leukocytes derived from chronically inflamed tissue express inflammatory cytokines in vivo. *Cell Immunol.* 1994;156(2):296-309.
63. Takada H, Mihara J, Morihashi I, *et al.* Production of cytokines by human gingival fibroblasts. *Periodontal Disease: Pathogens and host immune responses.* Quintessence Publishing. 1991;265-276.
64. Rupp EA, Cameron PM, Ranawat CS, *et al.* Specific bioactivities of monocyte-derived interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta are

- similar to each other on cultured murine thymocytes and on cultured human connective tissue cells. *J Clin Invest.* 1986;78(3):836-9.
65. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000.* 1997;14:9-11.
66. Kunkel SL, Chensue SW. Arachidonic acid metabolites regulate interleukin-1 production. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985;128(2):892-7.
67. Lindemann RA, Economou JS. Actinobacillus actinomycetemcomitans and Bacteroides gingivalis activate human peripheral monocytes to produce interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J Periodontol.* 1988;59(11):728-30.
68. Lindemann RA, Economou JS, Rothermel H. Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. *J Dent Res.* 1988;67(8):1131-5.
69. Duarte PM, de Oliveira MC, Tambeli CH, *et al.* Overexpression of interleukin-1beta and interleukin-6 may play an important role in periodontal breakdown in type 2 diabetic patients. *J Periodontal Res.* 2007;42(4):377-81.
70. Hermann C, Krikovszky D, Fust G, *et al.* Association between interleukin-6 polymorphism and age-at-onset of type 1 diabetes. Epistatic influences of the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta polymorphisms. *Eur Cytokine Netw.* 2005;16(4):277-81.
71. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood.* 1989;74:1.
72. Kishimoto T, Akira S, Taga T. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science.* 1992;258(5082):593-7.
73. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol.* 1993;54:1-78.

74. Ishihara K, Hirano T. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13(4-5):357-68.
75. Kerr R, Stirling D, Ludlam CA. Interleukin 6 and haemostasis. *Br J Haematol.* 2001;115(1):3-12.
76. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol.* 1993;54:1-78.
77. Elias JA, Lentz V. L-1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate fibroblast IL-6 production and stabilize IL-6 messenger RNA. *J Immunol.* 1990;145(1):161-6.
78. Van Damme J, Cayphas S, Van Snick J, *et al.* Lenaerts JP, Simpson RJ, Billiau A. Purification and characterization of human fibroblast-derived hybridoma growth factor identical to T-cell-derived B-cell stimulatory factor-2 (interleukin-6). *Eur J Biochem.* 1987;168(3):543-50.
79. Braquet P, Pignol B, Maisonneuve T, *et al.* Platelet-activating factor modulates interleukin-6 production by mouse fibroblasts. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1991;94(1-4):165-6.
80. Roth M, Nauck M, Yousefi S, *et al.* Platelet-activating factor exerts mitogenic activity and stimulates expression of interleukin 6 and interleukin 8 in human lung fibroblasts via binding to its functional receptor. *J Exp Med.* 1996;184(1):191-201.
81. Alexandraki K, Piperi C, Kalofoutis C, *et al.* Inflammatory process in type 2 diabetes: The role of cytokines. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1084:89-117.
82. Mocan MC, Kadayifcilar S, Eldem B. Elevated intravitreal interleukin-6 levels in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Can J Ophthalmol.* 2006;41(6):747-52.

83. Plesner A, Greenbaum C J, Guar L K, *et al.* Macrophages from High-Risk HLA-DQB1*0201/*0302 Type 1 Diabetes Mellitus Patients are Hypersensitive to Lipopolysaccharide Stimulation. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2002;56(5):522-529(8).
84. Furfine ES, Harmon MF, Paith JE, *et al.* Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases. Selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by S-methyl-L-thiocitrulline and S-ethyl-L-thiocitrulline. *J Biol Chem*. 1994;269(43):26677-26683.
85. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron*. 1992;8(1):3-11.
86. Yan SF, Ramasamy R, Naka Y, *et al.* Glycation, inflammation, and RAGE. A scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ Res*. 2003;93:1159- 1169.
87. Lin WW, Chen BC, Hsu YW, *et al.* Modulation of inducible nitric oxide synthase induction by prostaglandin E2 in macrophages: distinct susceptibility in murine J774 and RAW 264.7 macrophages. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 1999;58(2-4):87-101.
88. Chiou WF, Chen CF, Lin JJ. Mechanisms of suppression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells by andrographolide. *Br J Pharmacol*. 2000;129(8):1553-60.
89. Burney S, Tamir S, Gal A, Tannenbaum SR. A mechanistic analysis of nitric oxide-induced cellular toxicity. *Nitric Oxide*. 1997;1(2):130-44.
90. Stefanovic Racic M, Stadler J, Evans CH. Nitric oxide and arthritis. *Arthritis Rheum*. 1996;10(1):38-42.
91. Chen YJ, Hsu KW, Chen YL. Acute glucose overload potentiates nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated macrophages: the role of purinergic receptor activation. *Cell Biol Int*. 2006;30(10):817-22.

92. Tseng CC, Hattori Y, Kasai K. *et al.* Decreased production of nitric oxide by LPS-treated J774 macrophages in high-glucose medium. *Life Sci.* 1997;60(7):PL99-106.
93. Lee HY, Noh HJ, Gang JG, *et al.* Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression is increased in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated diabetic rat glomeruli: effect of ACE inhibitor and angiotensin II receptor blocker. *Yonsei Med J.* 2002;43(2):183-92.
94. Pcheco ME, Beltran A, Redondo J, *et al.* High glucose enhances inducible nitric oxide synthase expression. Role of protein kinase C-betaII. *Eur J Pharmacol.* 2006;24;538(1-3):115-23.
95. Nakai K, Kubota Y, Kosaka H. Inhibition of nuclear factor kappa B activation and inducible nitric oxide synthase transcription by prolonged exposure to high glucose in the human keratinocyte cell line HaCaT. *Br J Dermatol.* 2004;150(4):640-6.
96. Hirasawa K, Jun HS, Han HS, *et al.* Prevention of Encephalomyocarditis Virus-Induced Diabetes in Mice by Inhibition of the Tyrosine Kinase Signalling Pathway and Subsequent Suppression of Nitric Oxide Production in Macrophages. *J Virol.* 1999;73(10):8541-8548.
97. el Nawawy A, Soliman AT, el Azzouni O, *et al.* Interleukin-1-beta, tumour necrosis factor-alpha, islet-cell antibody, and insulin secretion in children with thalassemia major on long-term blood transfusion. *J Trop Pediatr.* 1996;42(6):362-4.
98. Kilbourn RG, Griffith OW. Inhibition of inducible nitric oxide synthase with inhibitors of tetrahydrobiopterin biosynthesis. *J Natl Cancer Inst.* 1992;84(21):1672.
99. Tang Y, Li GD. Chronic exposure to high glucose impairs bradykinin-stimulated nitric oxide production by interfering with the phospholipase-C-implicated signalling pathway in endothelial cells:

- evidence for the involvement of protein kinase C. *Diabetologia*. 2004;47(12):2093-104.
100. Vadlamani L, Iyengar S. Tumor necrosis factor alpha polymorphism in heart failure/ cardiomyopathy. *Congest Heart Fail*. 2004;10(6):289-92.
 101. Yerneni KK, Bai W, Khan BV, *et al*. Hyperglycemia- induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes*. 1999;48:855-864
 102. Mohamed AK, Bierhaus A, Schiekofer S, *et al*. The role of oxidative stress and NF-kappaB activation in late diabetic complications. *Biofactors*. 1999;10(2-3):157-67.
 103. Kang DH, Hong YS, Lim HJ, *et al* I. High glucose solution and spent dialysate stimulate the synthesis of transforming growth factor-beta1 of human peritoneal mesothelial cells: effect of cytokine costimulation. *Perit Dial Int*. 1999;19(3):221-30.
 104. Arias-Negrete S, Keller K, Chadee K. Proinflammatory cytokines regulate cyclooxygenase-2 mRNA expression in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;208:582-589.
 105. Di Rosa M, Ialenti A, Iannaro A, *et al*. Interaction between nitric oxide and cyclooxygenase pathways. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids*. 1996;54:229-238
 106. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol*. 2004;25:4 –7.
 107. McCarty MF. Interleukin-6 as a central mediator of cardiovascular risk associated with chronic inflammation, smoking, diabetes, and visceral obesity: down-regulation with essential fatty acids, ethanol and pentoxifylline. *Med Hypotheses*. 1999;52:465 –477.

108. Lindmark E, Diderholm E, Wallentin L, *et al.* Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or noninvasive strategy. *JAMA*. 2001;286:2107 –2113.
109. Pradhan AD, Manson JE, Rossouw JE, *et al.* Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease: prospective analysis from the Women’s Health Initiative observational study. *JAMA*. 2002;288:980 –987.
110. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, *et al.* Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*. 2000;101:1767 –1772.
111. Jain SK, Kannan K, Lim G, *et al.* Elevated blood interleukin-6 levels in hyperketonemic type 1 diabetic patients and secretion by acetoacetate-treated cultured U937 monocytes. *Diabetes Care*. 2003;26:2139 –2143.
112. Devaraj S, Jialal I. Alpha tocopherol supplementation decreases serum C-reactive protein and monocyte interleukin-6 levels in normal volunteers and type 2 diabetic patients. *Free Radic Biol Med*. 2000;29:790 –792.
113. Liu YJ, Saini A, Cohen DJ, *et al.* Modulation of macrophages proliferation by hyperglycemia. *Mol Cell Endocrinol*. 1995;114:187-192.
114. Morohoshi M, Fujisawa K, Uchumura I, *et al.* The effect of glucose and advanced glycosylation end products on IL-6 production by human monocytes. *Ann NY Acad Sci*. 1995;748:562-570.
115. Morohoshi M, Fujisawa K, Uchumura I, *et al.* Glucose-dependent interleukin-6 and tumour necrosis factor production by human peripheral blood monocytes in vitro. *Diabetes* 1996;45:954-959.

116. Hermann C, Krikovszky D, Fust G, *et al.* *Eur Cytokine Netw.* 2005;16(4):277-81.
117. Kowluru RA, Odenbach S. Role of interleukin-1beta in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol.* 2004;88(10):1343-7.
118. Lagathu C, Yvan-Charvet L, Bastard JP, *et al.* Long-term treatment with interleukin-1beta induces insulin resistance in murine and human adipocytes. *Diabetologia.* 2006;49(9):2162-73.
119. Kang DH, Hong YS, Lim HJ, *et al.* High glucose solution and spent dialysate stimulate the synthesis of transforming growth factor-beta1 of human peritoneal mesothelial cells: effect of cytokine costimulation. *Perit Dial Int.* 1999;19(3):221-30.
120. Engebretson S, Chertog R, Nichol A, *et al.* Plasma levels of tumour necrosis factor-alpha in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Clin Periodontol.* 2007;34(1):18-24.

1 day glucose treatment on basal NO production

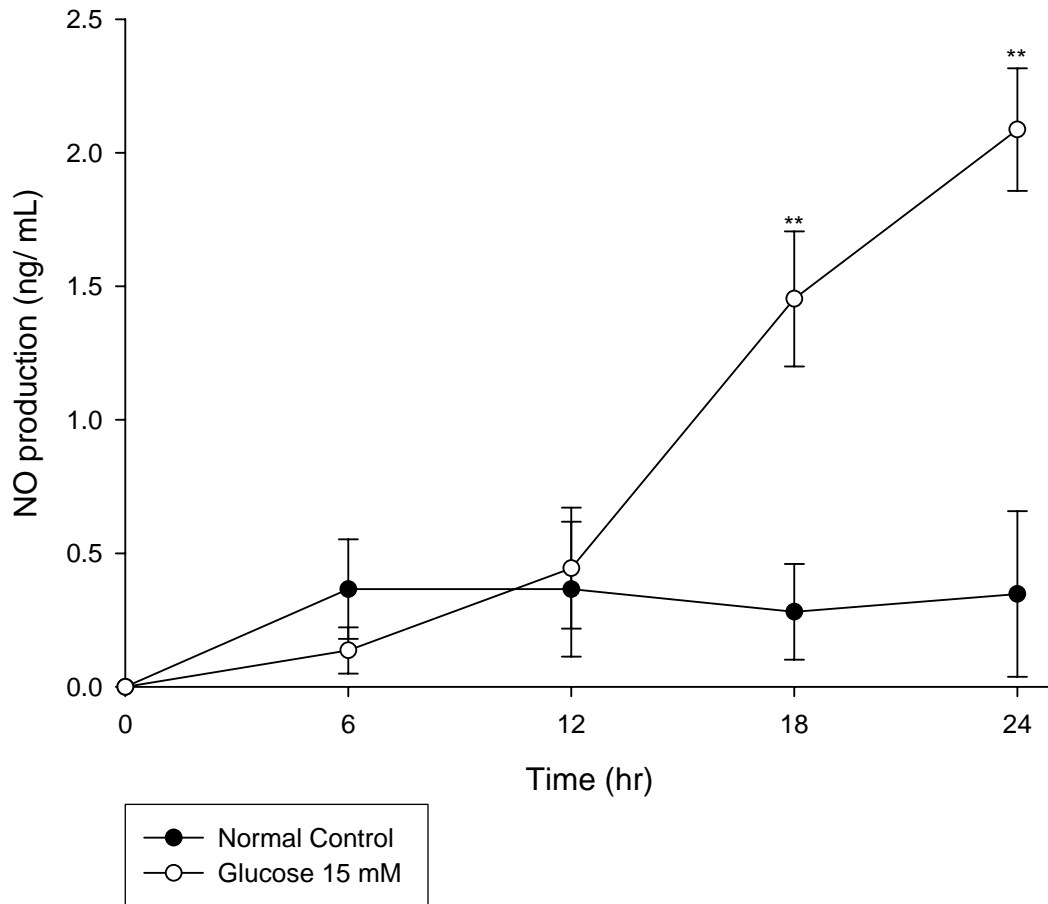


圖 1.a, RAW 264.7 培養於正常 DMEM 培養基 (Normal Control) 與 15 mM 高葡萄糖培養基 (Glucose 15 mM) 1 天後，於 6, 12, 18, 24 hr 測其 NO 濃度。 ** $p < 0.01$, 含 15 mM 高葡萄糖 DMEM 培養基的 RAW 264.7，在 18 hr 和 24 hr 與正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 相比。

1 day glucose LPS stimulated NO production

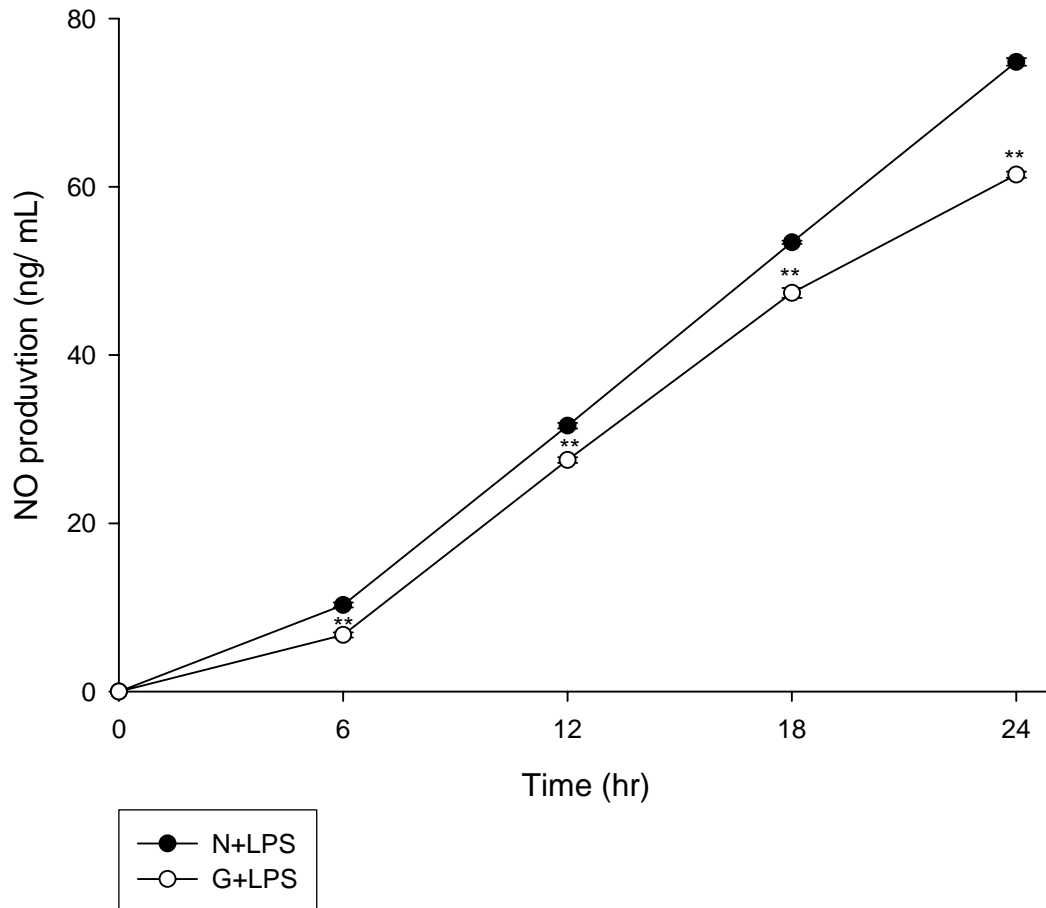


圖 1.b, RAW 264.7 培養於正常 DMEM 培養基 (Normal Control) 與 15 mM 高葡萄糖培養基 (Glucose 15 mM) 1 天後，添加 LPS 並於 6, 12, 18, 24 hr 測其 NO 濃度。 ** $p < 0.01$, 含 15 mM 高葡萄糖 DMEM 培養基的 RAW 264.7，與正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 相比。

7 days glucose treatment on basal NO production

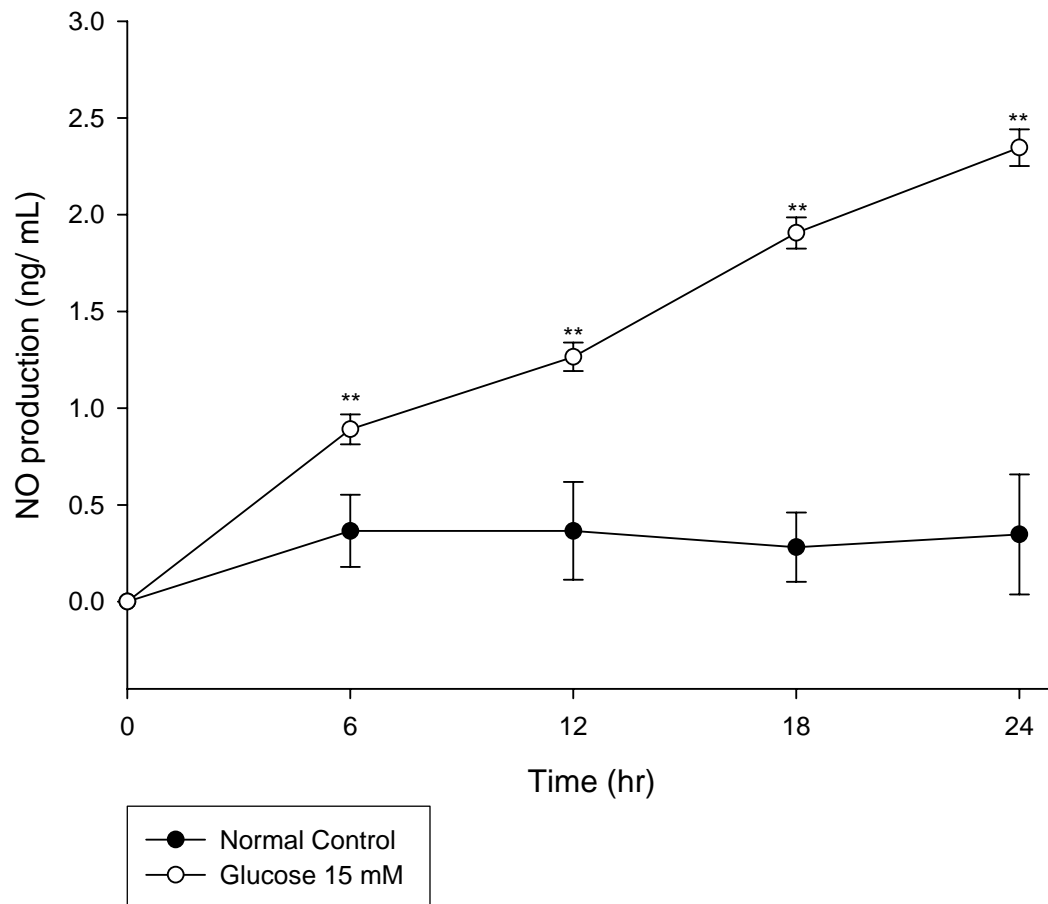


圖 1.c, RAW 264.7 培養於正常 DMEM 培養基 (Normal Control) 與 15 mM 高葡萄糖培養基 (Glucose 15 mM) 7 天後，於 6, 12, 18, 24 hr 測其 NO 濃度。 ** $p < 0.01$, 含 15 mM 高葡萄糖 DMEM 培養基的 RAW 264.7，與正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 相比。

7 days glucose LPS stimulated NO production

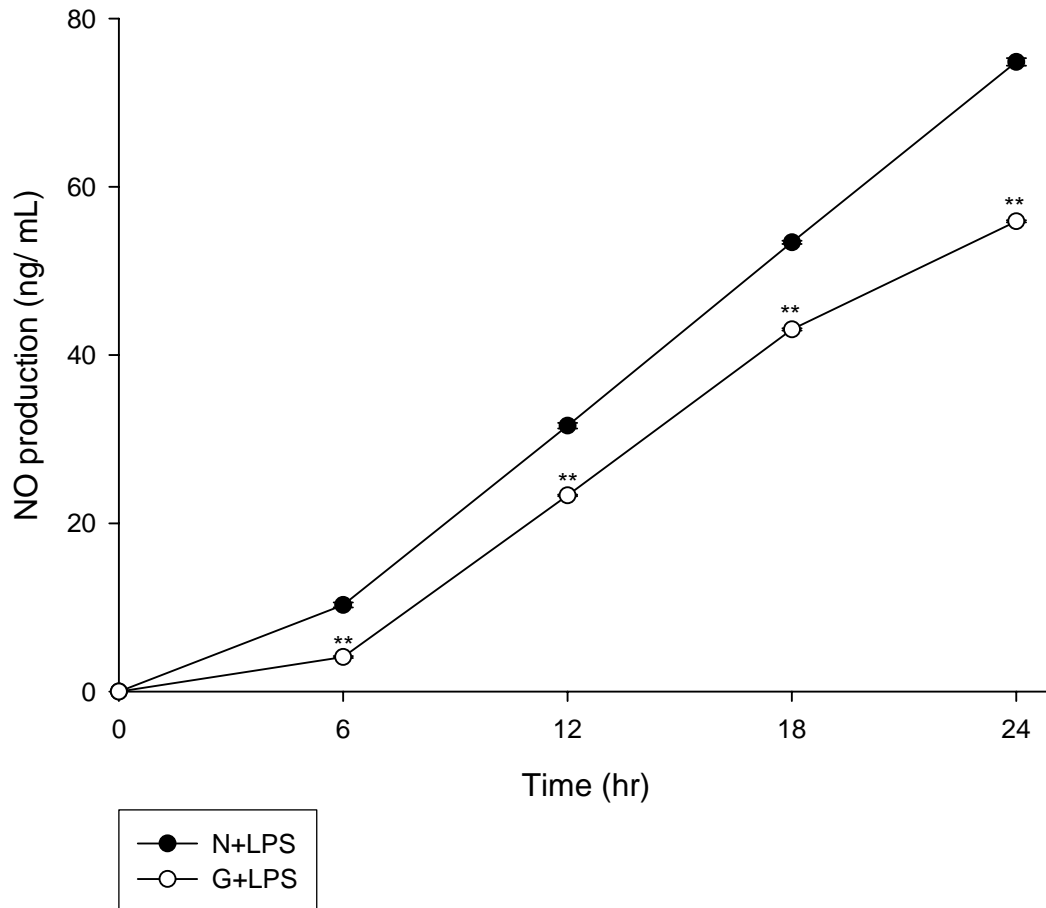


圖 1.d, RAW 264.7 培養於正常 DMEM 培養基 (Normal Control) 與 15 mM 高葡萄糖培養基 (Glucose 15 mM) 7 天後，添加 LPS 並於 6, 12, 18, 24 hr 測其 NO 濃度。 ** $p < 0.01$, 含 15 mM 高葡萄糖 DMEM 培養基的 RAW 264.7，與正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 相比。

14 days glucose treatment on basal NO production

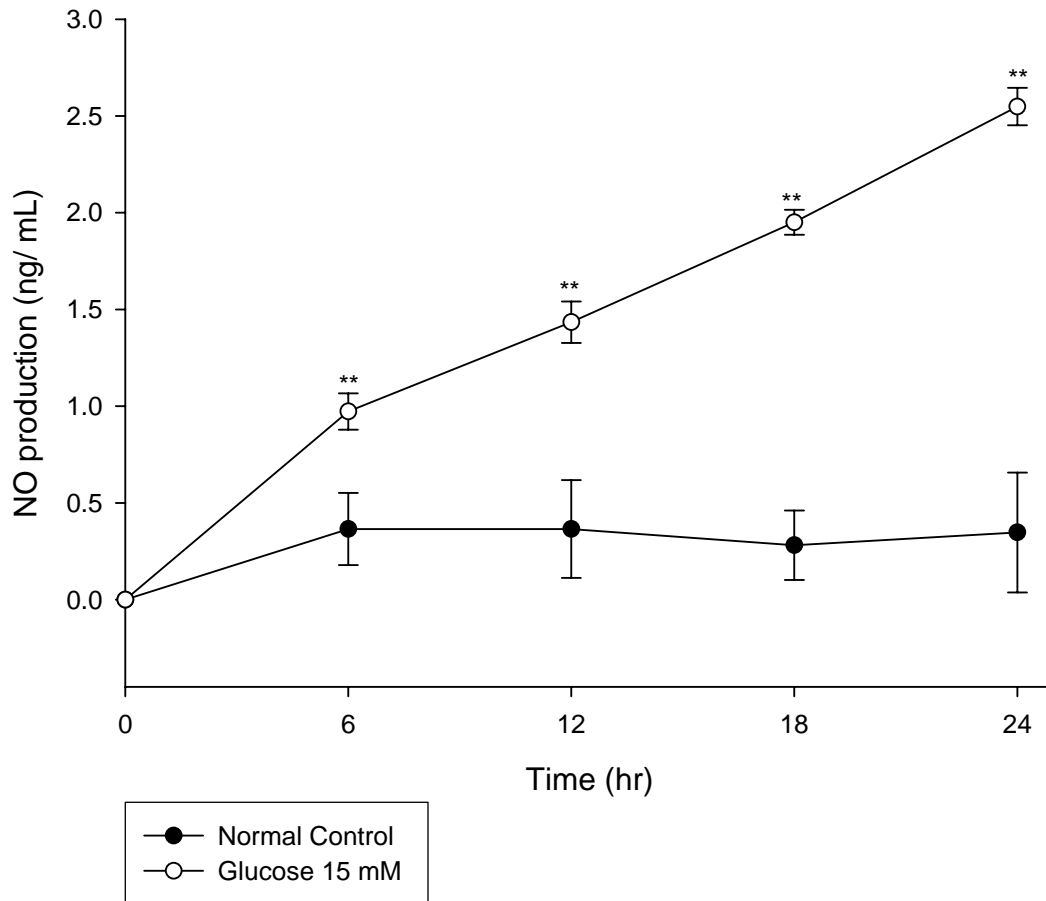


圖 1.e, RAW 264.7 培養於正常 DMEM 培養基 (Normal Control) 與 15 mM 高葡萄糖培養基 (Glucose 15 mM) 14 天後，於 6, 12, 18, 24 hr 測其 NO 濃度。 ** $p < 0.01$, 含 15 mM 高葡萄糖 DMEM 培養基的 RAW 264.7，與正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 相比。

14 days glucose LPS stimulated NO production

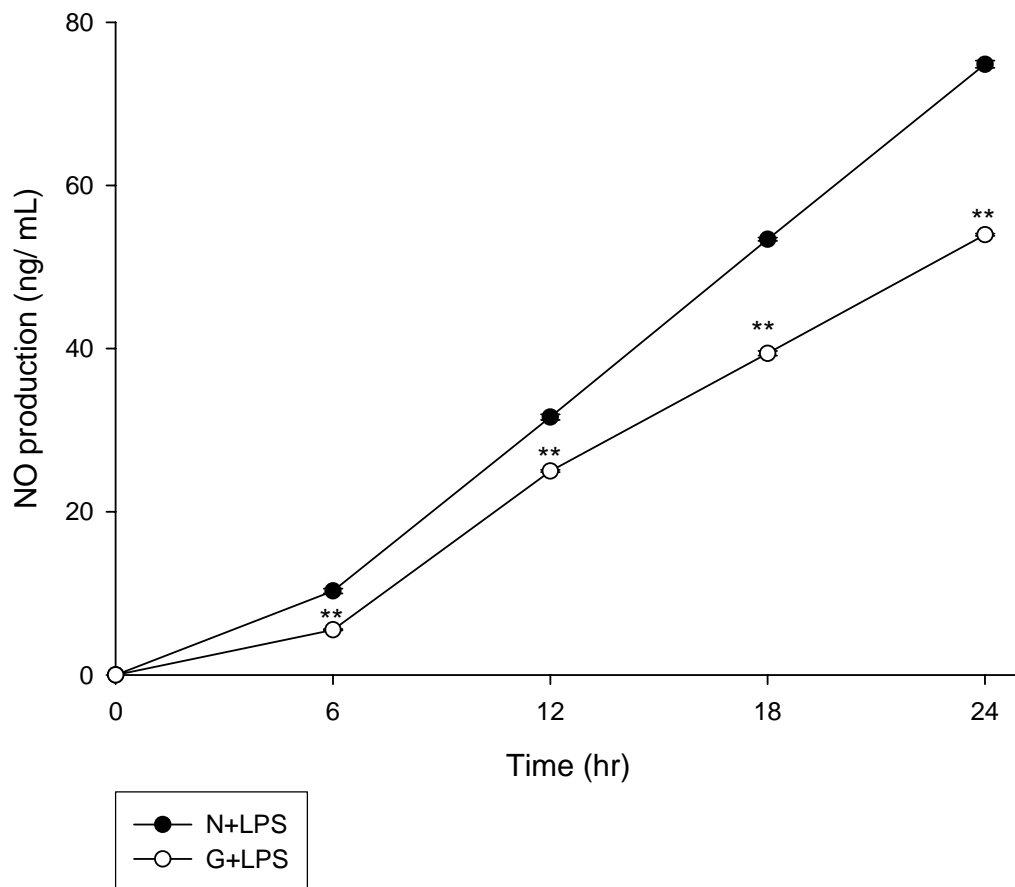


圖 1.f, RAW 264.7 培養於正常 DMEM 培養基 (Normal Control) 與 15 mM 高葡萄糖培養基 (Glucose 15 mM) 14 天後，添加 LPS 並於 6, 12, 18, 24 hr 測其 NO 濃度。** $p < 0.01$, 含 15 mM 高葡萄糖 DMEM 培養基的 RAW 264.7，與正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 相比。

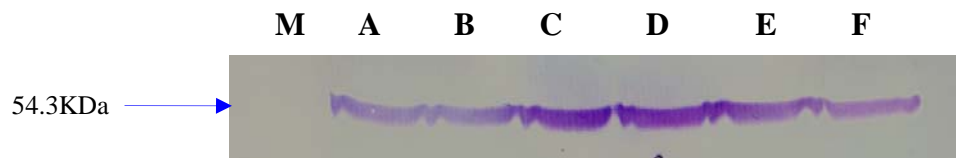
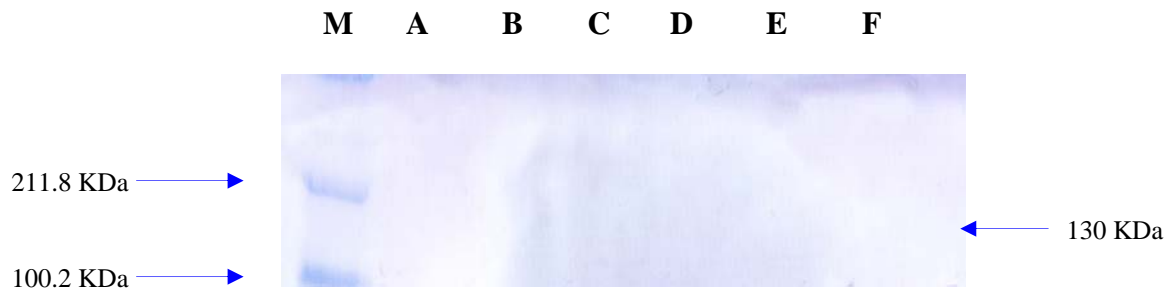


圖 2.a, RAW 264.7 培養於正常 DMEM 培養基與 15 mM 高葡萄糖培養基 1 天，7 天，14 天後，以 Western blot 呈現 iNOS (130 KDa) 蛋白質表現量。M: 250 KDa Marker. A, C, E: Normal Control. B: glucose 15mM (1 天) . D: glucose 15mM (7 天) . F: glucose 15mM (14 天) 。下圖為 Internal Control (α -tubulin) ，分子量 54.3 KDa 。

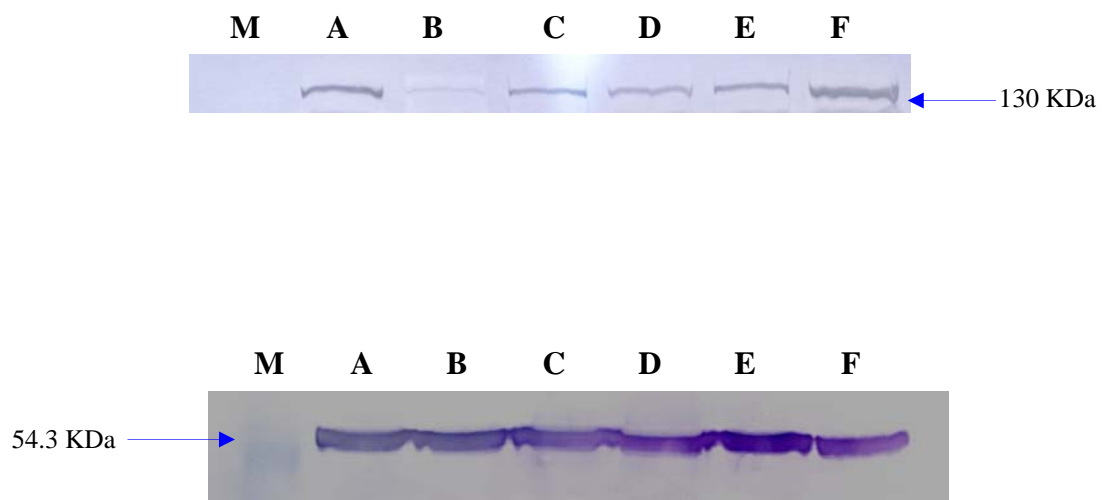
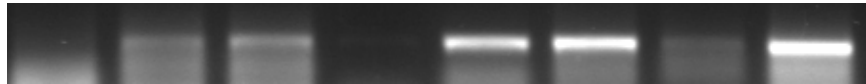


圖 2.b, RAW 264.7 培養於正常 DMEM 培養基與 15 mM 高葡萄糖培養基 1 天，7 天，14 天後添加 LPS，以 Western blot 呈現 iNOS (130 KDa) 蛋白質表現量。M: 250 KDa Marker. A, C, E: Normal+LPS. B: glucose (1 天) + LPS. D: glucose (7 天) + LPS. F: glucose (14 天) + LPS。下圖為 Internal Control (α -tubulin)，分子量 54.3 KDa。

iNOS (499bp)

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8
LPS	-	-	-	-	+	+	+	+
Days	-	1	7	14	-	1	7	14



β -actin (607bp)

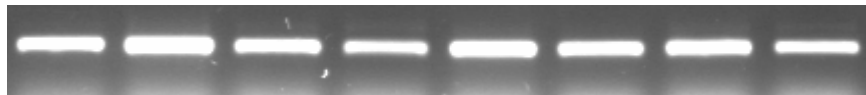


圖 3.a, RAW 264.7 培養於正常 DMEM 培養基與 15 mM 高葡萄糖培養基 1 天，7 天，14 天後，利用 RT-PCR 呈現 iNOS (499 bp) mRNA 表現量。**Lane: 1**. Normal. **Lane: 2**, glucose (1 天) . **Lane: 3**, glucose (7 天) . **Lane: 4**, glucose (14 天) 。 RAW 264.7 培養於正常 DMEM 培養基與 15 mM 高葡萄糖培養基 1 天，7 天，14 天後添加 LPS，以 RT-PCR 呈現 iNOS (499 bp) mRNA 表現量 **Lane: 5**, Normal + LPS. **Lane: 6**, glucose (1 天) + LPS. **Lane: 7**, glucose (7 天) + LPS. **Lane: 8**, glucose (14 天) + LPS。下圖為 Internal Control (β -actin)，分子量 607 bp 。

Effects of glucose treatment on basal TNF- α production

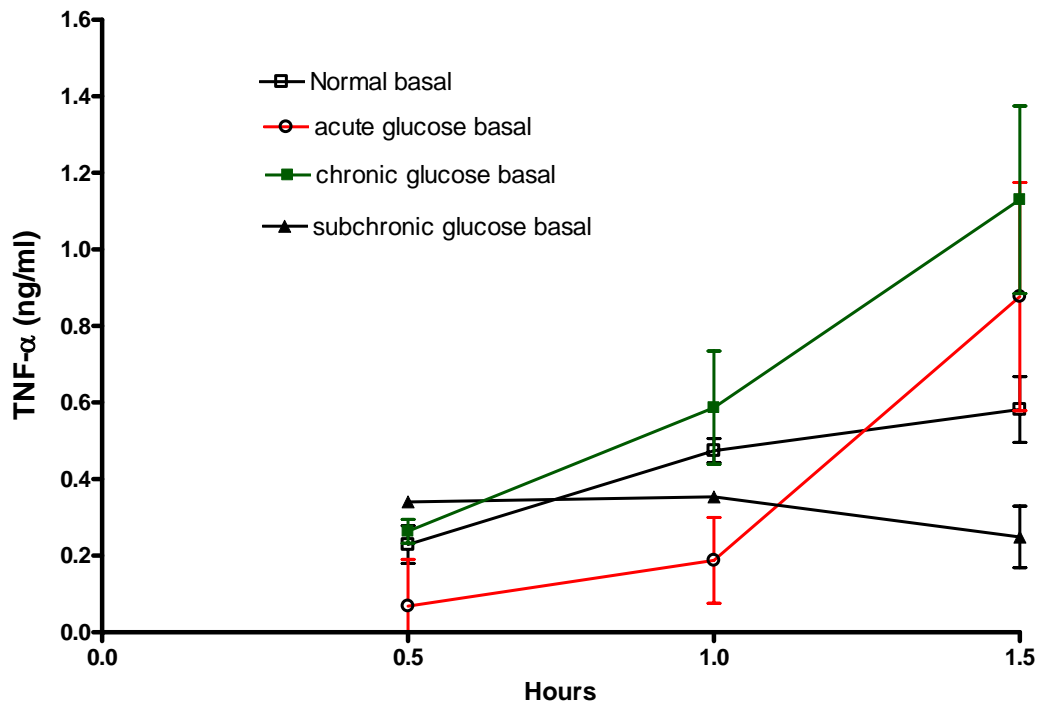


圖 4.a, RAW 264.7 培養於正常 DMEM 培養基 (Normal Control) 與 15 mM 高葡萄糖培養基 1 天 (acute) , 7 天 (sub-chronic) , 14 天 (chronic) 後 , 於 0.5 hr, 1 hr, 1.5 hr 測其 TNF- α 濃度。

Effects of glucose treatment on LPS-stimulated TNF- α production

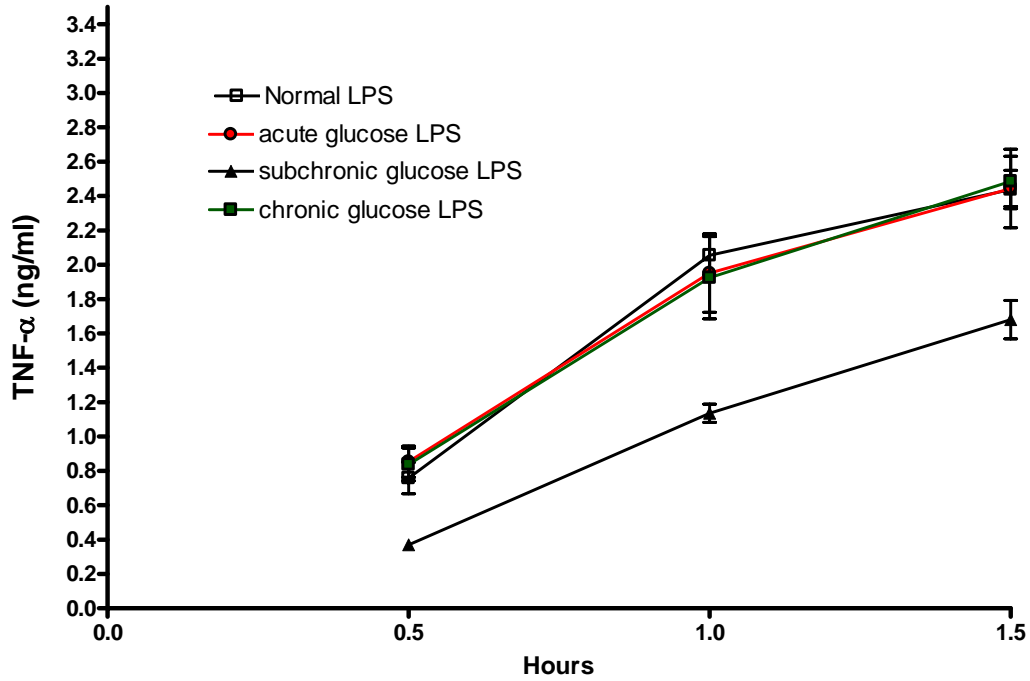


圖 4.b, RAW 264.7 培養於正常 DMEM 培養基 (Normal Control) 與 15 mM 高葡萄糖培養基 (Glucose 15 mM) 1 天 (acute) , 7 天 (sub-chronic) , 14 天 (chronic) 後 , 添加 LPS 並於 0.5 hr, 1 hr, 1.5 hr 測其 TNF- α 濃度。

Effects of glucose treatment on basal IL-6 production

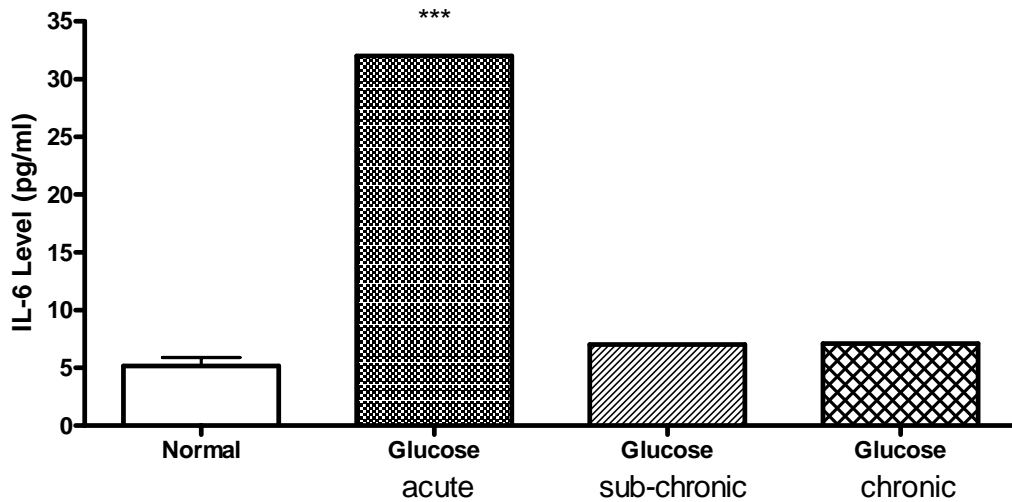


圖 5.a, RAW 264.7 培養於正常 DMEM 培養基 (Normal Control) (圖左) 與 15 mM 高葡萄糖培養基 (Glucose 15 mM) 培養 1 天, 7 天, 14 天後, 測其 IL-6 濃度 (圖右) 。*** $p < 0.001$ 含 15 mM 高葡萄糖 DMEM 培養基的 RAW 264.7, 與正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 相比。

Effects of glucose treatment on LPS-stimulated IL-6 production

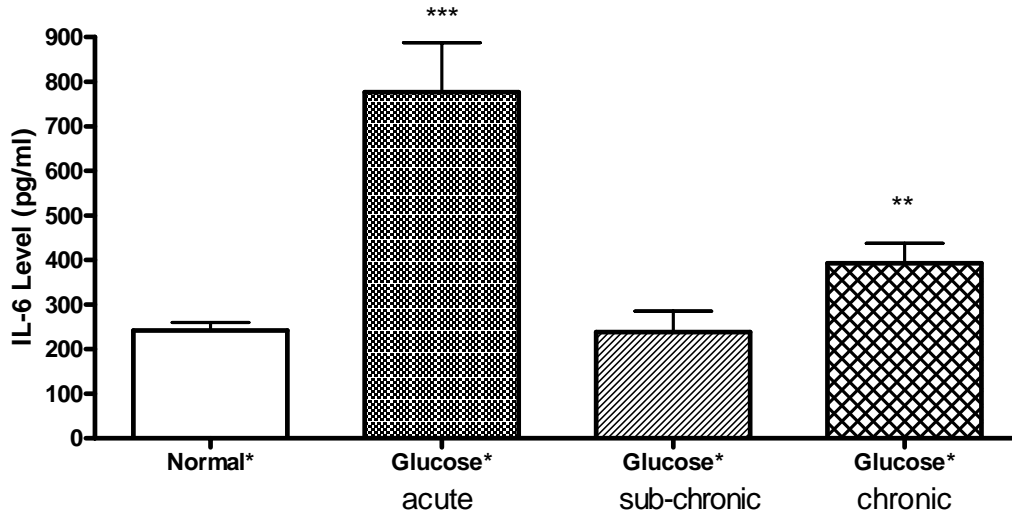


圖 5.b, RAW 264.7 培養於正常 DMEM 培養基 (Normal Control) (圖左) 與 15 mM 高葡萄糖培養基 (Glucose 15 mM) 培養 1 天, 7 天, 14 天後, 添加 LPS 測其 IL-6 濃度 (圖右)。*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ 含 15 mM 高葡萄糖 DMEM 培養基的 RAW 264.7, 與正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 相比。

Effects of glucose treatment on basal IL-1 β production

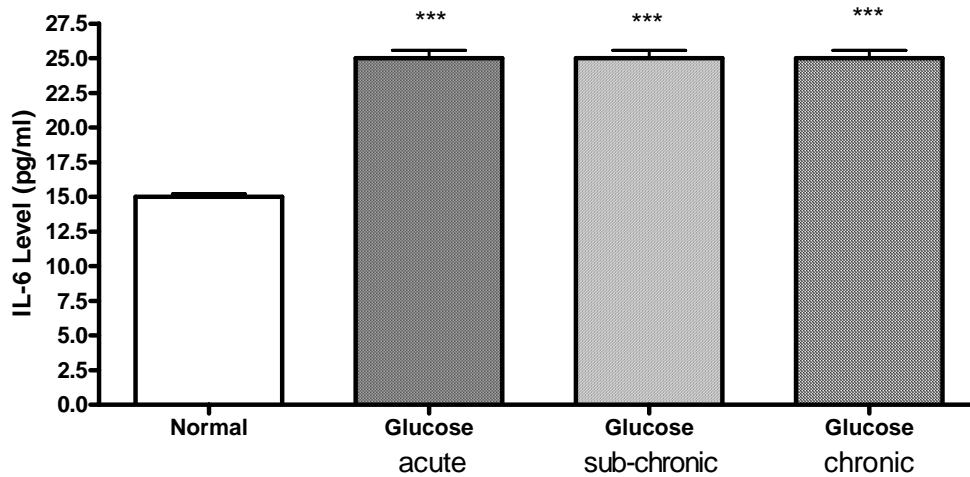


圖 6.a, RAW 264.7 培養於正常 DMEM 培養基 (Normal Control) 與 15 mM 高葡萄糖培養基 (Glucose 15 mM) 1 天， 7 天與 14 天後，測其 IL-1 β 濃度。*** $p < 0.001$ 含 15 mM 高葡萄糖 DMEM 培養基的 RAW 264.7，與正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 相比。

Effects of glucose treatment on LPS-stimulated IL-1 β production

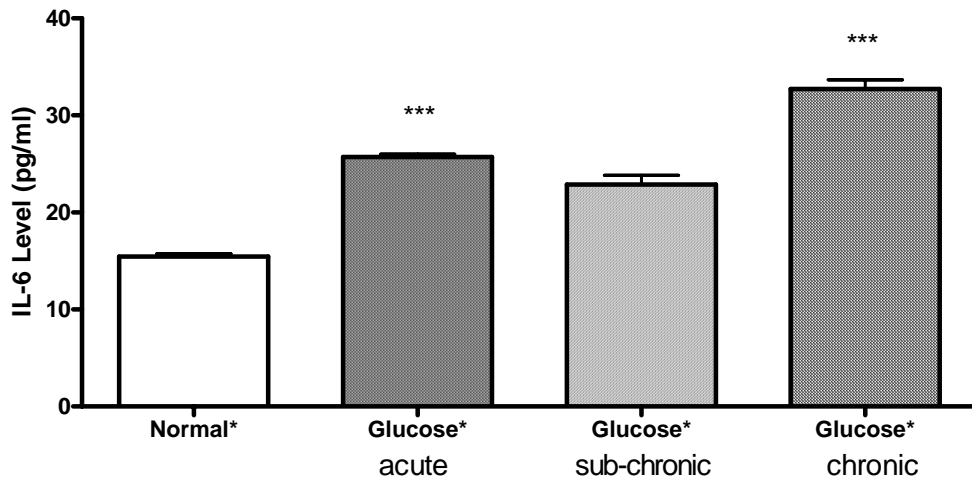


圖 6.b, RAW 264.7 培養於正常 DMEM 培養基 (Normal Control) 與 15 mM 高葡萄糖培養基 (Glucose 15 mM) 1 天， 7 天與 14 天後， 添加 LPS 測其 IL-1 β 濃度。 *** $p < 0.001$ 含 15 mM 高葡萄糖 DMEM 培養基的 RAW 264.7， 在 acute 和 chronic 與正常 DMEM 培養基的 RAW 264.7 相比。