

國立臺灣大學醫學院微生物學研究所

碩士論文

Graduate of Microbiology, College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis



口腔鏈球菌所引起的感染性心內膜炎中

嗜中性白血球胞外網狀結構的形成

及其在自體抗體生成所扮演的角色

NET formation and its role in autoantibody production in
infective endocarditis caused by commensal oral
streptococci

古佩青

Pei-Cing Gu

指導教授：賈景山 博士

Advisor: Jean-San Chia, Ph.D

中華民國 102 年 7 月

July, 2013

國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文
口試委員會審定書

中文題目：口腔鏈球菌所引起的感染性心內膜炎中嗜中性白血球
胞外網結構的形成及其在自體抗體生成所扮演的角色。

英文題目：NET formation and its role in autoantibody
production in infective endocarditis caused by commensal
oral streptococci.

本論文係 王佩君 君 (學號 100445109) 在國立臺灣大學
微生物學所完成之碩 (博) 士學位論文，於民國 102 年 7 月 19 日
承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

賈景山 (簽名)

(指導教授)

李秉亨

陳信仁

系主任、所長

鄧述謨 (簽名)

誌謝

時光荏苒，光陰匆匆，充實的研究生活，結束了。R1509 像是我的第二個家，在這裡不但學習到許多實驗技術，還擁有了許多夥伴，可以互相討論實驗上的問題外，還能一起嘻嘻鬧鬧，一起做許多意想不到的誇張事，沒有你們就沒有現在的我。

首先，感謝賈景山老師，在實驗上常引導我思考，讓我在實驗設計及想法上學習到了很多，感謝許秉寧老師、陳俊任老師在擔任口試委員的時候，給予我許多建議，讓我的研究能夠更加的充實及完善。

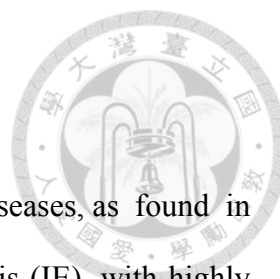
感謝筱菁學學姊，教導我實驗技術，並且幫助我調整實驗方向；感謝秋月學姊，不論在實驗上還是生活上，常常給予我許多建議及幫助；感謝惠婷學姊，在我訂東西忘記登記時的包容；感謝鴻偉學長，在動物實驗上的指導，讓我練就一身有效率的好本領，感謝宜婷及好 partner 高高，常常容忍我在旁邊大叫，在我遇到挫折時也給我很大的力量，讓我可以繼續走下去；感謝瀚遠和逸駿兩位小幫手，盡量配合我的時間進動物房幫忙，也常常幫我準備實驗需要的物品，讓我可以無後顧之憂的進行實驗；感謝孔奇、惠怡、怡如、派派、鏡文、杜杜、佳儒及茂霖，因為有你們在苦悶的研究生活中，增添了許多歡樂的色彩；另外，感謝其他在實驗上或是生活上曾經幫助過我的所有人。

最後要感謝我親愛的家人，讓我任性，讓我可以專心的做自己的事情，因為有你們的支持與鼓勵，我才可以堅持的走過兩年研究生活。



中文摘要

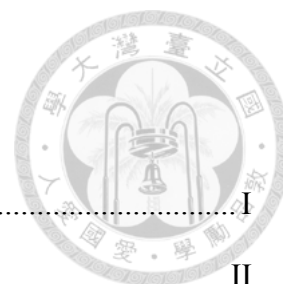
外來病原菌感染在自體免疫疾病的發生扮演的重要的角色，如：風濕熱 (rheumatic fever) 或 Guillaine-Barre' syndrome。感染性心內膜炎 (Infective endocarditis, IE) 是一種高死亡率，及高復發率的感染症，主要由葡萄球菌及口腔鏈球菌，如：轉糖鏈球菌 (*Streptococcus mutans*) 所引起。感染性心內膜炎患者常伴隨不正常的免疫學表現，如腎絲球腎炎、Osler nodes 及 Roth spots。由臨床的統計發現口鏈球菌引起之擴散性全身性感染的患者 (包含感染性心內膜炎患者)，體內可偵測到多種自體抗體的生成。近年來在全身性紅斑性狼瘡 (Systemic lupus erythematosus, SLE) 的研究指出，嗜中性白血球釋放的嗜中性白血球胞外網結構 (neutrophil extracellular traps, NETs) 可做為一種自體抗原刺激自體抗體的產生。實驗室先前的研究發現，NETs 會存在於感染性心內膜炎大鼠瓣膜的贅疣中。故本篇研究便是要去探討 NETs 在口鏈球菌引起之擴散性全身性感染 (包含感染性心內膜炎) 的患者的自體抗體生成中所扮演的角色。研究結果發現，在擴散性全身性感染 (包含感染性心內膜炎) 的患者可偵測到抗 NETs 抗體的生成；並且也在轉糖鏈球菌感染造成之菌血症及感染性心內膜炎大鼠體內偵測到抗雙股去氧核糖核酸抗體及抗牛心脂抗體生成。免疫螢光染色的結果顯示，擴散性全身性感染 (包含感染性心內膜炎) 的患者而非菌血症大鼠的血清可以和人類 NETs 反應。另一方面，利用特定抗血清去除大鼠的嗜中性白血球發現，感染性心內膜炎大鼠的贅疣上 NETs 的形成有減少的現象；在菌血症大鼠也發現，體內抗體生成的情形也有降低的情形。本篇的研究結果顯示，在口腔鏈球菌感染之全身性擴散性感染的病人中，NETs 在自體抗體產生扮演了重要的角色；而菌血症的大鼠中，轉糖鏈球菌的感染可以引起自體抗體的生成。



Abstract

Infections play important roles in triggering autoimmune diseases, as found in rheumatic fever or Guillaine-Barre' syndrome. Infective endocarditis (IE), with highly mortality and recurrent rates, is caused primarily by staphylococci and oral streptococci (including *Streptococcus mutans*). IE is frequently accompanied with immunopathological manifestations such as glomerulonephritis, Osler nodes, or Roth spots. Our previous study found that autoantibody production could be detected in patients with disseminated systemic infections caused by oral streptococci, including IE. Neutrophil extracellular traps (NETs) could act as autoantigens to induce autoantibody production in Systemic lupus erythematosus (SLE). We have also identified in the rat endocarditis model the existence of NETs in vegetations. The specific aim of this study is to investigate if NETs are involved in autoantibody production disseminated systemic infections and IE. The production of anti-NETs -dsDNA or -cadiolipin antibodies could be detectable in patients with disseminated systemic infections and also in the experimental rat models of bacteremia or IE. The serum from the patient, but not from the infected rats, could react with human NETs, suggesting the specificity of the anti-NETs antibody. By using specific anti-PMN antibody to deplete the neutrophils, the NETs formation was reduced in the rat IE experimental model and the autoantibody production was also reduced in the rats with bacteremia. Taken together, these data suggest NETs played important role in autoantibody production in patients with disseminated systemic infections, and the autoantibodies production was induced in rat with *S. mutans* infection.

目錄



口試委員審定書	I
誌謝	II
中文摘要	III
Abstract	IV
目錄	V
圖表目錄	VII
壹、 緒論	1
一、 轉糖鏈球菌 (<i>S. mutans</i>)	1
二、 感染性心內膜炎 (Infective endocarditis, IE)	1
三、 菌血症(Bacteremia)	3
四、 嗜中性白血球(Neutrophil)	3
五、 嗜中性白血球胞外網結構(Neutrophil extracellular traps, NETs)	4
六、 感染與自體抗體生成關係	6
七、 研究目的與實驗設計	6
貳、 實驗材料與方法	8
一、 檢體來源	8
二、 實驗動物	8
三、 轉糖鏈球菌之培養	8
四、 轉糖鏈球菌之轉型作用	8
五、 萃取轉糖鏈球菌細胞表面蛋白質	9
六、 分離轉糖鏈球菌染色體方法	9
七、 細菌處理及感染老鼠之方式	10
八、 實驗性心內膜炎之老鼠模式的建立	10
九、 全血球計數(Complete Blood Count, CBC)	11

十、	去除感染性心內膜炎大鼠體內嗜中性白血球方法	11
十一、	觀察感染性心內膜炎贅疣中 NETs 方法	12
十二、	菌血症老鼠動物模式的建立	13
十三、	去除菌血症老鼠體內嗜中性白血球方法	13
十四、	測定大鼠血清中抗雙股去氧核糖核酸(anti-dsDNA)抗體含量	13
十五、	測定大鼠血清中抗轉糖鏈球菌細胞壁蛋白抗體含量	14
十六、	測定大鼠血清抗牛心磷脂抗體(anti-cardiolipin)含量	15
十七、	測定大鼠血清尿素氮及尿酸含量	15
十八、	測定人類血清中抗轉糖鏈球菌染色體抗體含量	15
十九、	人類嗜中性球之分離與純化	16
二十、	體外模式誘發 NETs 及染色	16
二十一、	嗜中性白血球染色	17
二十二、	測定病人體內抗 NETs 抗體的含量	17
二十三、	本論文使用抗體一覽表	18
參、	結果	19
肆、	討論	24
伍、	參考文獻	29
附圖	55



圖表目錄



圖一、去除感染性心內膜炎大鼠模式之嗜中性白血球的實驗設計	39
圖二、菌血症大鼠模式圖	40
圖三、去除菌血症大鼠體內嗜中性白血球實驗設計	41
圖四、NETs 存在於感染性心內膜炎大鼠瓣膜的贅疣中	42
圖五、去除大鼠體內嗜中性白血球對於感染心內膜炎大鼠之影響	44
圖六、口腔鏈球菌引起之擴散性全身性感染患者血清之酵素連結免疫吸附測定	45
圖七、口腔鏈球菌引起之擴散性全身性感染患者血清之自體抗體和抗細菌染色體 的相關性分析	46
圖八、利用人類血清對嗜中性白血球、打洞嗜中性白血球及 NETs 做免疫螢光染色	48
圖九、利用人類血清 NETs 做免疫螢光染色	50
圖十、菌血症大鼠體內抗體生成之情形	51
圖十一、感染轉糖鏈球菌大鼠之腎功能血清生化分析	52
圖十二、去除嗜中性白血球的菌血症大鼠體內嗜中性白血球變化及抗體生成情況	54



壹、緒論

一、轉糖鏈球菌 (*S. mutans*)


轉糖鏈球菌(*S. mutans*)存在於人類口腔中，是革蘭氏陽性(Gram positive)的兼性厭氧菌，經由代謝醣類產生酸性物質侵蝕牙齒，是造成齲齒的主要致病菌 (Brinkmann, *et al.* 2004; Hamada and Slade 1980)。轉糖鏈球菌最早在 1924 年由 Clarke 等人從人類齲齒窩洞所分離出來，由於會在富含綿羊血之血液培養基形成不完全溶血(α -hemolysis)的草綠色菌落，故被分類為草綠色鏈球菌屬(viridans streptococci)。以顯微鏡觀察，不同於一般鏈球菌的球狀型態，轉糖鏈球菌呈現橢圓短桿狀的型態，因此被認為可能是鏈球菌的突變株，故被命名為 *S. mutans*。

轉糖鏈球菌又可依細菌表面醣類 serotype-specific rhamnose-glucose polymers (RGPs)分支的結構不同，又可被分類為 serotype c、e、f、k 四種血清型。RGPs 的主幹由 rhamnose 組成，分支分別為 α -1,2 (serotype c)、 β -1,2 (serotype e)和 α -1,3 (serotype f) glucosidic residues。本實驗室的研究是以血清型 c 型的轉糖鏈球菌為主要的研究對象。

血清型 c 型的轉糖鏈球菌中菌種 UA159 的基因組在 2002 年已經被完整的定序。轉糖鏈球菌具有一條環狀染色體，整個基因體包含了有 2,030,936 個鹼基對，其中 GC 的含量占了 36.82%，和低含量 GC 的菌種類似，整個基因組共包含了 1,963 個 ORFs (Open reading frames)，其中的 16%為轉糖鏈球菌特有的序列，21%和其他菌種有同源性，而 63%被認為為未知功能。進一步和其他已知基因組的革蘭氏陽性菌比對結果，發現轉糖鏈球菌基因組的 ORFs 和 *Streptococcus pneumoniae* 及 *Streptococcus pyogenes* 最為相似(Ajdic, *et al.* 2002)。

二、感染性心內膜炎 (Infective endocarditis, IE)


感染性心內膜炎的發生率約為每年約十萬人中有 3.6 人會得到疾病，死亡率約



10%至 30%。引起感染性心內膜炎的原因，是由於細菌及黴菌黏附在受損的心臟瓣膜上，進一步造成心臟發炎的疾病，主要的致病菌為革蘭氏陽性菌，其中包含了 *Staphylococci*、*Streptococci* 及 *Enterococci* 等細菌 (Ito 2006; Moreillon, *et al.* 1995)。在正常的生理狀況下，口腔中的草綠色鏈球菌不會造成人體的傷害，但是當口腔因手術或咀嚼造成傷口時，便有機會進入血液當中，造成暫時性的菌血症 (transient bacteremia)，再經由血流進入心臟，附著在先天有缺陷的心臟瓣膜或是人工瓣膜上，進一步刺激單核球 (monocyte) 釋放細胞激素 (cytokine) 及組織因子 (tissue factor)，活化並且促使血液中的血小板聚集，而細菌和發炎細胞、血液中血小板及纖維物質堆積在心臟瓣膜上，會形成一種贅生物，即在心臟形成之生物膜 (biofilm)，稱為『贅疣』 (vegetation) (Moreillon and Que 2004)。

感染性心內膜炎可以分為急性心內膜炎 (acute bacterial endocarditis) 及亞急性心內膜炎 (subacute bacterial endocarditis)。急性心內膜炎的病發展快速，通常持續數天到數週。主要致病菌為金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)，在病變部位可以觀察到大量聚集的纖維母細胞 (fibroblasts)、單核球及嗜中性白血球 (neutrophils) 等細胞，此型心內膜炎通常會形成較大但較脆弱的贅疣，故容易脫落，可能造成其他器官的栓塞現象 (embolic phenomenon)，進而引起高致死率併發症如：血栓、心臟衰竭及腎絲球腎炎等 (Ito 2006)。亞急性心內膜炎的感染症狀較輕微且病程通常持續數週到數月，草綠色鏈球菌為主要的致病菌，包含 *S. sanguinis*、*S. bovis*、*S. mutans*、*S. mitis* 等細菌。這類感染性心內膜炎的病人，大多是心臟瓣膜已有受損，而在心臟瓣膜形成無菌性贅疣之後，細菌才能附著上去 (Moreillon and Que 2004)。

臨床上的統計發現，高達 90% 的感染性心內膜炎患者體內可以偵測到有免疫複合物 (immune complexes) 的產生 (Bayer, *et al.* 1976; Hoiby, *et al.* 1986)，感染性心內膜炎的患者常見各種不正常的免疫學表現，包括了紅痛性節結 (Osler's nodes) (Yee and McAllister 1987) 及腎絲球腎炎 (glomerulonephritis) (Cabane, *et al.* 1979)，皆是由於免疫複合物的堆積引起的發炎反應所導致的症狀。另一方面，分析感染性心內膜炎病人的血清，可以偵測到多種的自體抗體，包含類風濕性因子 (rheumatoid



factor, RF)、抗磷脂抗體(anti-phospholipid antibodies)、抗細胞核抗體(anti-nuclear antibodies, ANAs)及抗嗜中性白血球細胞質抗體(anti-neutrophil cytoplasmic antibodies) (Asherson, *et al.* 1990; Bojalil, *et al.* 2012)。一般生理狀況，這些自體抗體是做為特定自體免疫疾病的標誌(marker)，在感染性心內膜炎患者體內偵測到的自體抗體的生成機制及在病程發展中的角色，目前仍不清楚。

三、 菌血症(Bacteremia)

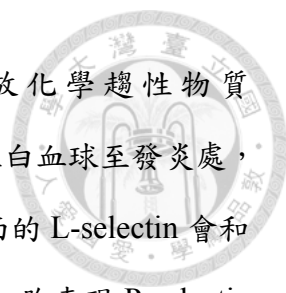
菌血症的定義為在血液循環的中出現細菌並且造成血液感染的情況。菌血症發生的頻率及強度會和組織損傷的性質與嚴重程度、微生物菌群的密度及感染傷口發炎程度有關。一般而言，人體的黏膜表面存在有密集的內源性微生物，例如：牙齦縫隙、口咽部、消化道及尿道和陰道，這些黏膜表面的創傷，會使得微生物可經由血流到達血液中，引起暫時性的菌血症。而口腔中正常菌叢可經由拔牙或牙科手術或是日常活動造成的傷口進入血流中，造成暫時性的菌血症，其中主要為草綠色鏈球菌引起暫時性的菌血症最為常見。

菌血症的發生對於感染性心內膜炎的發展是不可或缺的，口腔中的草綠色鏈球菌屬在正常人所引起的暫時性菌血症只會維持 15-30 分鐘，就會被免疫系統清除，並不會造成人體危害，然而，在有心血管疾病的人身上，例如：人工瓣膜修復或置換、先天性心臟病、風溼性心臟病、二尖瓣脫垂等，則會嚴重威脅生命(Wilson, *et al.* 2008)。

四、 嗜中性白血球(Neutrophil)

人類的血液循環系統中，嗜中性白血球為比例最高的白血球，其直徑大小約 12~15 μm ，具有 2~5 葉的分葉核，在周邊血中的生命週期約為 5 天，在人體的先天性免疫系統中扮演了重要的角色。

當受到細菌感染或是惡性腫瘤引起的急性發炎反應時，嗜中性白血球是第一線反應的免疫細胞，可以離開血管快速到達發炎部位。發炎部位的細胞如內皮細



胞 (endothelial cells) 及巨噬細胞 (macrophages) 主要透過釋放化學趨性物質 (chemokines), 如: C5a、interleukin-8 (IL-8), 吸引血液中的嗜中性白血球至發炎處, 此作用稱為『趨化作用』(chemotaxis)。接著, 嗜中性白血球表面的 L-selectin 會和內皮細胞上的受器結合, 並且緩慢滾動(rolling), 進而活化內皮細胞表現 P-selectin 及 E-selectin。另一方面, 受到發炎物質的刺激, 嗜中性白血球會表現 $\beta 2$ -integrins 和 endothelial cell intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) 及 ICAM-2 等具高親和力的分子, 增加內皮細胞及嗜中性白血球之間的作用; 嗜中性白血球也會藉由表現 CD31、CD54、CD44 及 CD47, 發炎組織中嗜中性白血球的數量上升, 同時釋放細胞激素(cytokine)活化其他免疫細胞增強發炎反應(Kobayashi and DeLeo 2009; Mayer-Scholl, *et al.* 2004)。

嗜中性白血球會表現不同的 Pattern recognition receptors (PRRs), 可以辨識外來病原菌的特殊構造, 如 lipopolysaccharide (LPS)、lipoprotein、lipoteicoid acid (LTA) 及 flagellin, 活化嗜中性白血球, 促進吞噬作用(phagocytosis)及 reactive oxygen species (ROS) 和釋放顆粒中的物質(degranulation) (Thomas and Schroder 2013)。

嗜中性白血球主要藉由氧化(oxygen-dependent)及非氧化(oxygen-independent)作用殺死外來病原菌。氧化作用是嗜中性白血球藉由 NADPH 氧化酶複合物 (NADPH oxidase)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase)及骨髓過氧化酵素 (myeloperoxidase)產生的過氧化物及超氧分子 ROS, 如: O_2^- 、 H_2O_2 、 OCl^- 、 OH^- 殺菌; 而非氧化作用則是嗜中性白血球利用細胞內 azurophil、specific granules、gelatinase、secretary granules 等顆粒物質, 直接毒殺病原菌。

五、嗜中性白血球胞外網結構(Neutrophil extracellular traps, NETs)

嗜中性白血球胞外網結構(NETs)最早於 2004 年由 Brinkmann 所發現, 當嗜中性白血球不論是受到革蘭氏陽性菌(*S. aureus*)或是革蘭氏陰性菌(*Salmonella typhimurium* 及 *Shigella flexneri*)的刺激下, 可釋出細胞內之去氧核糖核酸

(deoxyribonucleic acid, DNA) 防止感染擴散及利用抵抗微生物之物質(antimicrobial peptides)，如: LL-37、elastase、myeloperoxidase (MPO)、lactoferrin、defensin 及 Histone 等毒殺細菌(Brinkmann, *et al.* 2004)。

NETs 是嗜中性白血球經由一種不同於細胞凋亡(apoptosis)及細胞壞死(necrosis)的細胞死亡過程 NETosis，所產生的胞外結構。NETosis 的過程中，嗜中性白血球的細胞內會呈現大量的空泡化(vacuolization)，接著細胞內的染色質去濃縮化(chromatin decondensation)最後釋放 NETs (Remijsen, *et al.* 2011)。另外，除了微生物的刺激外，Phorbol myristate acetate (PMA)、LPS、IL-8 及 Tumor necrosis factor (TNF)等物質皆可刺激嗜中性白血球產生 NETs (Brinkmann, *et al.* 2004; Chuammitri, *et al.* 2009; Gupta, *et al.* 2005; von Kockritz-Blickwede, *et al.* 2008)。雖然目前對於詳細的 NETs 生成機制尚未被研究清楚，但許多研究證實 ROS (Sheppard, *et al.* 2005; von Kockritz-Blickwede, *et al.* 2008; Wilkie, *et al.* 2007)、自噬作用(autophagy) (Mitroulis, *et al.* 2010)及組蛋白瓜氨酸化(histone citrullination) (Neeli, *et al.* 2008; Wang, *et al.* 2009)對於調控 NETs 釋放扮演了重要的角色。

近年來在全身性紅斑性狼瘡(Systemic lupus erythematosus, SLE)的研究發現，SLE 患者體內的低密度顆粒球(low-density granulocytes, LDGs)在未經刺激的狀況下，就會釋放 NETs (Villanueva, *et al.* 2011)，而 NETs 和患者體內的 Anti-ribonucleoprotein antibodies 可以經由 Toll-like receptor 9 (TLR-9)及 TLR-7 刺激 plasmacytoid Dendritic cells (pDCs)活化產生 type I interferons (IFNs)(Garcia-Romo, *et al.* 2011; Villanueva, *et al.* 2011)，而 type I IFNs 可以刺激嗜中性白血球釋放 NETs，並且活化 B 淋巴球產生更多的自體抗體；此外，也有研究指出，體內具有 anti-NET antibodies 及 DNase1 抑制劑的 SLE 患者，NETs 就比較不容易被清除，且這些患者的也被發現具有較嚴重的腎炎的情況(Hakkim, *et al.* 2010)。除了 SLE 外 NETs 也和其他自體免疫疾病，如：Felty's syndrome (Dwivedi, *et al.* 2012)、Small-vessel vasculitis (SSV) (Kessenbrock, *et al.* 2009)、Rheumatoid arthritis (RA) (Khandpur, *et al.* 2013)等，自體抗體的生成及疾病發展有關。實驗室先前的研究，



在感染性心內膜炎大鼠模式心臟瓣膜的贅疣上發現到了 NETs 的結構，而對於感染性心內膜炎患者體內自體抗體的生成，NETs 是否扮演者自體抗原的來源，至今仍未被探討。

六、 感染與自體抗體生成關係

引起免疫系統對抗自體抗原的因素有很多，一般認為和本身的基因表現、身體賀爾蒙分泌及外在的環境因子有關，其中環境因子，往往和病毒、細菌還有其他不同的病原菌有關。最常見的機制為 Molecular mimicry，是指病原菌的抗原和宿主自體抗原結構相似，自身免疫系統在辨識這個抗原時，會產生對宿主細胞的交互作用，導致自體抗體的產生，像是 *S. pyogenes* 表面的 M protein 及 Glc NAc 的結構和宿主細胞的心臟及纖維細胞抗原類似，所以當宿主產生對抗細菌的 M protein 及 Glc NAc 抗體時，這些抗體往往也會攻擊宿主的心臟組織，而引起風濕熱(rheumatic fever)(Doria, *et al.* 2008)。

七、 研究目的與實驗設計

感染症造成自體免疫疾病的機制有許多，其中 Molecular mimicry 是最常見的機制，當病原菌所帶有的抗原結構和宿主自體抗原結構類相似時，就會導致對抗病原菌之抗體和宿主的自身抗原產生交叉反應，進而引起自體免疫疾病的發生，如：風濕熱(rheumatic fever)或 Guillaine-Barre' syndrome。在感染性心內膜炎患者發現常伴隨不正常的免疫學表現，如腎絲球腎炎、Osler nodes 及 Roth spots。由臨床統計發現，有百分之五十以上的口腔鏈球菌引起之擴散性全身性感染的患者(包含感染性心內膜炎患者)，體內可偵測到多種自體抗體的生成(附圖一)，但是其生成機制仍不清楚。近年來在許多自體免疫疾病，如 SLE、RA 及 SSV 等的研究發現，嗜中性白血球釋放的 NETs 可做為一種自體抗原刺激自體抗體的產生。在實驗室先前的研究，偵測到 NETs 會存在於感染性心內膜炎大鼠心臟瓣膜的贅疣中。本篇研究便是要去探討 NETs 在口鏈球菌引起之擴散性全身性感染(包含感染性心內膜炎)

的患者的自體抗體生成中所扮演的角色：並以抗血清去除大鼠體內嗜中性球，研究 NETs 對於轉糖鏈球菌引起的感染性心內膜炎大鼠瓣膜上贅疣的影響及菌血症大鼠體內自體抗體生成之情形。





貳、實驗材料與方法

一、 檢體來源

本實驗之檢體為 2001 至 2006 年之 50 例口腔鏈球菌引起之擴散性全身性感染的患者血清，其中 21 例為感染性心內膜炎患者、29 例為其他全身性感染患者，患者體內自體抗體生成情形，可參閱附圖(附圖一)。

所有檢體取得及使用均取得病人同意及簽署同意書並符合台大醫院研究倫理委員會規定。

二、 實驗動物

Wistar rat (Bltw:WI) 購自樂斯科(LASCO)飼養於台灣大學動物中心 9 樓 Clean conventional area。

三、 轉糖鏈球菌之培養

以接種環沾取腦心萃取 (Brain heart infusion, BHI; BD Bacto, USA) 培養基上的轉糖鏈球 GS5 菌落，取至 BHI 培養液中，培養隔夜於含有 95% N₂ 及 5% O₂ 之 37°C 厭氧箱中。GFP-tagged GS5 則是培養於至含 500 µg/ml spectinomycin 之 BHI 培養液中。

四、 轉糖鏈球菌之轉型作用

取隔夜培養的 GS5 以二十分之一的比例 (約 5×10^7 CFU/ml) 培養於含 5% 馬血清 (Horse serum) BHI 中 2~3 小時，直到 OD₅₅₀ 約 0.2~0.3 之間。以 3000 rpm (centrifuge 5810R, eppendorf) 離心，去上清液後以 300 µl 的 BHI 將菌體懸浮起來，並加入帶有綠色螢光蛋白基因 (Green fluorescen protein, GFP) 的 1 µl plasmid DNA (pDL278-GFP) 培養 30 分鐘，補回 BHI 至 1 ml 後培養 90 分鐘再以 3000 rpm


(Eppendorf 5424) 離心 5 分鐘，去除上清液至剩餘 100 μ l BHI，重新將菌體懸浮並均勻塗抹在具有 500 μ g/ml spectinomycin 之 BHI 培養基上，於厭氧箱中培養 48 小時後。最後用紫外光 (Ultraviolet, UV) 照射確認菌落是否發綠色螢光，以進行實驗。

五、 萃取轉糖鏈球菌細胞表面蛋白質

採用 Hamada 團隊於 1989 年發表的方法，將細菌培養於 4 L 的 TTY (2.25% tryptone / 0.6% tryptose / 0.6% yeast extract / 0.2% K_2HPO_4 / 0.2% Na_2CO_3 / 0.2% $NaCl$ / 1% glucose) 培養液中，於 37°C 的環境培養 16-18 小時，以 4°C 6000 rpm (Beakman) 狀態，離心 15 分鐘，將細菌全數離心，去除上清液後，利用 10 mM sodium phosphate buffer (NaPB, pH 6) 沖洗 3 次，並利用 8 M 尿素 (35 ml) 在室溫連續攪拌 1 小時後，在 4°C 以 10000 rpm (KUBOTA 1700) 離心 15 分鐘，取出上清液於透析膜 (dialysis bag) 中，再放入 10 mM NaPB 內於 4°C 進行透析，前三次每半小時換一次 10 mM NaPB 溶液，最後一次透析至隔日。接者，利用 60% 飽和硫酸銨鹽 (ammonia sulfate) 粉末將蛋白質沉澱，再於 4°C 以 10000 rpm (KUBOTA 1700) 離心 15 分鐘，去上清液後，以 10 mM NaPB 懸浮蛋白團塊，而後再於 10 mM NaPB 溶液中進行透析，直到去除硫酸銨鹽，得到粗製細菌表面蛋白。

六、 分離轉糖鏈球菌染色體方法

於厭氧箱培養 50 ml 轉糖鏈球菌 16 至 20 小時後，以 3500 rpm 4°C 離心 20 分鐘，去除上清液，加入 1 ml solution I (5 mM glucose / 10 mM EDTA / 25 mM Tris pH 8.0) 後，置入 -80°C 冰箱，待結凍後取出放入 37°C 水浴中，急速解凍，接者利用 solution I 將體積補至 5 ml，再加入 Lysozyme (5 mg/ml) 於 37°C 水浴反應 30 分鐘，加入 600 μ l 10% SDS (sodium dodecyl sulfate) 及 500 μ l Protease K (20 mg/ml) (invitrogn)，放入 55°C 水浴 1 小時，將溶液轉移到 15 ml 離心管後，加入 5 ml phenol 翻轉數次，以 3000 rpm 4°C 離心 15 分鐘，取出上層液，利用同體積 phenol/chloroform



(1:1)去除蛋白質，直到上清液變澄清後，將上清液取出，加入 1/10 倍體積的 5 M NaCl 及 2.5 倍體積之冰的 100%酒精，輕搖直到白色物質產生，3000 rpm 4°C 離心 10 分鐘後，去除上清液，再以 70%酒精洗一次，真空抽乾後以 1 ml 二次水回溶，接者加入 20 µg/ml RNase 於 37°C 水浴反應 30 分鐘後，利用同體積 phenol/chloform (1:1)洗數次，直到界面的物質減少為止，加入 1/10 倍體積的 5 M NaCl 及 2.5 倍體積之冰的 100 %酒精沉澱染色體，再以 70%酒精洗一次後，真空抽乾，以 500 µl 二次水回溶後，以 Nanodrop (Thermo)測定染色體濃度及純度。

七、 細菌處理及感染老鼠之方式

將在厭氧箱培養於 BHI 培養液中 16 至 20 小時的細菌，使其處於代謝旺盛階段(log phase)，以 3000 rpm 離心後去上清液，並以 1 倍 PBS 反覆沖洗 3 次，再將細菌懸浮於 1 ml 1 倍 PBS，接者利用超音波震盪(40W)間歇作用 3-5 分鐘後，以 1 倍 PBS 調整菌液混濁度於 OD550 約 1.495-1.505(菌量約為 10^9 CFU/ml)。將大鼠保定後，以 70 %酒精擦拭消毒大鼠尾巴，再使用帶有 26 號針頭的 1 ml 針筒吸取 1 ml 的菌液，由尾靜脈注射至老鼠體內，當看到針頭回血時，可將細菌慢慢打入，注射過程中見到血管由淺藍轉白，表示已成功將細菌注射入老鼠體內。

八、 實驗性心內膜炎之老鼠模式的建立

本實驗的建立是修改由 Santoro 及 Matthew 在 1978 年所設計之實驗。手術前，先將老鼠秤重，並以腹腔注射的方式施打舒泰:諾朋混合(500 µl 舒泰+280 µl 諾朋+220 µl 注射用水)麻醉劑至 Wistar 品系大鼠，施打劑量為 1 ml/kg，確認老鼠麻醉後，以麻繩固定四肢及頭部於手術操作台上，剃除頸部毛髮後擦拭碘酒及 70%酒精於該處，再以手術刀於老鼠左頸部縱切約 2 至 3 公分大小的切口，接者利用剪刀將頸部肌肉分開，挑出左頸動脈後以鑷子固定，再用動脈夾夾住左頸動脈，並以手術縫線綁死靠近頭部的一端，使用顯微剪刀於頸動脈剪出一個缺口，再將含有 0.2 mm 鋼絲的 PE10 導管由缺口至入頸動脈中直到被動脈夾阻擋，接著以手術

縫線打結固定含有導管的頸動脈後，用鑷子夾住含導管之頸動脈部位，並取走動脈夾。確認無失血情形後，將導管緩慢推入頸動脈，直至導管受阻或是鑷子夾住導管可以感受到心臟跳動。隨後將導管中的鋼絲抽出，以確認血流順暢及導管有無刺穿心臟。最後以手術縫線將導管與頸動脈打死結固定後剪去多餘導管部分至頸動脈插入處，並縫合切口。完成插管手術之老鼠須觀察 24 小時並給予正常進食及餵水。

九、 全血球計數(Complete Blood Count, CBC)

於不同時間點抽血時，抽取約 300 μ l 的血液(抗凝血劑 20% ethylenediamine-tetra acetic acid, EDTA)，再送至台大醫學院實驗動物中心進行全血球計數分析血球細胞種類及數量。

MEDONIC CA 530 可以快速分析全血檢體之血球數量及比例，包含：紅血球(RBC)、白血球(WBC)、淋巴球、顆粒性白血球及血小板(PLT)，另外也可偵測血容比(Hct)、血紅素(Hb)、MCV、MPV、MCH、MCHC....數值。

十、 去除感染性心內膜炎大鼠體內嗜中性白血球方法

(流程參圖一)

1. 實驗設計

將 300 μ l Rabbit Anti-rat PMN (Accurate Chemical) 以 1 倍的 PBS 將體積補至 1 ml (Riedemann, *et al.* 2004; Sir, *et al.* 2000)，在進行手術的前一天及手術後以腹腔注射的方式，注射入大鼠體內，並在插管手術後，注射 600,000 unit/kg 的盤尼西林於大鼠腹腔，避免手術後的老鼠受到其他細菌的感染。於插管後隔天感染帶有綠色螢光蛋白之轉糖鏈球菌 (10^9 CFU/ml)，並於感染前、感染後 3 小時及感染後 6 小時不同抽血時間前以肌肉注射的方式注射總量為 500 μ g/ml



的 spectinomycin，確保為轉糖鏈球菌的感染。

2. 定量血液中轉糖鏈球菌之方法

於大鼠感染細菌後，分別於 3 小時、6 小時及 24 小時從尾靜脈抽取約 100 μ l 血液，進一步和 100 μ l 的 1% triton X-100 混合均勻後，以超音波震盪(40W)震盪 3 次，依照不同時間點進行不同倍數的稀釋，再取 100 μ l 稀釋液至 BHI 培養基上，利用玻璃棒均勻塗開後，培養於厭氧箱 2 天後，計數菌落數。

3. 定量贅疣上轉糖鏈球菌菌數之方法

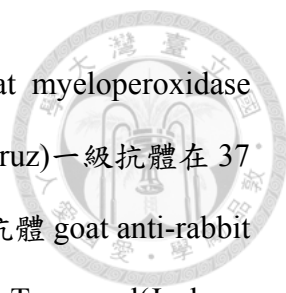
將老鼠以二氧化碳犧牲後，取出受損的心臟瓣膜及贅疣，秤重紀錄後，將其置入 500 μ l 的 1 倍 PBS 中，接者以超音波震盪(40W)震盪，直到打散贅疣，再將體積補至 1 ml，進而稀釋至適當倍數後，取 100 μ l 贅疣稀釋液至 MS (mitis salivarius agar, Bacto)培養基，再以玻璃棒均勻塗開，厭氧箱培養 2 天，計數菌落。

4. 定量脾臟及肝臟中轉糖鏈球菌菌數之方法

犧牲老鼠後，取出約 0.5 克的脾臟及肝臟，以研鉢磨碎，將磨碎的組織取至 15 ml 的離心管中，並將體積補至 5 ml 後，以超音波震盪(40W)震盪 5 分鐘，再依適當的稀釋倍數稀釋，用玻璃棒將 MS 培養基上的組織液均勻塗開，置於厭氧箱 48 小時後，紀錄菌落數。

十一、觀察感染性心內膜炎贅疣中 NETs 方法

取出感染性心內膜炎大鼠心臟瓣膜之贅疣，秤重紀錄後，再置於磨砂玻片上以 1 倍 PBS 清洗，接者以 4% paraformaldehyde 於 37°C 下作用 15 分鐘，以固定組織上蛋白質，1 倍 PBS 清洗 1 次，加入 5% BSA/2% Normal goat serum/0.1% Triton



X-100 於室溫處理 30 分鐘，再加 1: 50 倍稀釋的 rabbit anti-rat myeloperoxidase (R-1073-100, Novus)，或是 goat anti-rat elastase (sc-9521, santa cruz) 一級抗體在 37°C 染色 1 小時後，以 1 倍 PBS 清洗 3 次，再以 1: 200 稀釋的二級抗體 goat anti-rabbit Texas-red (Jackson ImmunoResearch) 或 donkey anti-goat Texas-red (Jackson ImmunoResearch) 於 37°C 染色 1 小時，以 1 倍 PBS 清洗 3 次，利用 hocheist 33258 (sigma) 於室溫下染色 10 分鐘，再以 1 倍 PBS 清洗 1 次，以 mounting oil 封片後，使用共軛焦顯微鏡觀察拍照並紀錄其厚度。

十二、 菌血症老鼠動物模式的建立

(流程參圖二)

以含有 2% 人類血漿之 BHI 培養液培養之轉糖鏈球菌，離心沖洗後，利用超音波震盪 (40W) 間歇作用 3-5 分鐘，再以 1 倍 PBS 調整菌液濃度於 OD550 約 1.495-1.505 (菌量約為 10^9 CFU/ml)。每周經由尾靜脈感染大鼠一次，並於感染前抽血，留取血清用做抗雙股去氧核糖核酸抗體及抗牛心脂抗體含量測定。

十三、 去除菌血症老鼠體內嗜中性白血球方法

(流程圖三)

將含有 2% 人類血漿之 BHI 培養液培養之轉糖鏈球菌感染大鼠，在感染前及感染後每天，以腹腔注射之方式，給予大鼠 300 μ l Rabbit Anti-rat PMN (Accurate Chemical) 以消耗大鼠的嗜中性白血球，於給予 antiserum 前、感染前、感染後一天、感染後三天、感染後五天及感染後七天抽血送 CBC 測定大鼠血液內嗜中性白血球的含量，同時留血清，測定抗雙股去氧核糖核酸抗體及抗轉糖鏈球菌細胞表面蛋白質抗體的含量。

十四、 測定大鼠血清中抗雙股去氧核糖核酸 (anti-dsDNA) 抗體含量



1. ALPHA DIAGNOSTIC ELISA 套組

將檢體先於 Working sample diluent (WSD)稀釋 5 倍後，再以 Low NSB sample diluent (LNSD)稀釋 20 倍，接者取 100 μ l 稀釋後的檢體及校正液至 dsDNA microwell strip plate 中，於室溫反應 1 小時後，以 wash solution 洗 4 次，每次 5 分鐘，將盤子拍乾後，加入 100 μ l 的 anti-rat IgG HRP 室溫反應 30 分鐘後，以 wash solution 洗 5 次，每次 5 分鐘，最後加入 100 μ l TMB 呈色 15 分鐘後，利用 100 μ l Stop solution 終止反應，再測定 OD450 吸光值。

2. 酵素連結免疫吸附分析法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

將 10 μ g/ml 小牛胸腺去氧核糖核酸(Sigma)溶於 1 倍的 SSC 溶液中後，並在每個平底 96 孔盤 (Nunc MaxiSorp®)的孔洞中加入 100 μ l，放至於 4°C 冰箱中 16-18 小時，再以 PBST 洗 1 次後，加入 200 μ l blocking buffer 置於 37°C 烘箱 2 小時後，用 PBST 洗 3 次，加入以 1:50 倍稀釋於 sample buffer 的大鼠血清 100 μ l 於 96 孔盤中，放置於 4°C 冰箱中 16-18 小時，以 PBST 洗 3 次後，加入 100 μ l 1:25000 倍稀釋的 goat anti-rat IgG HRP (Immunology Consultant Lab)，放置於 37°C 烘箱反應 2 小時，以 PBST 洗 3 次後，加入 100 μ l TMB 呈色後，利用 2 N H₂SO₄ 終止反應，讀取 OD450 吸光值。

十五、 測定大鼠血清中抗轉糖鏈球菌細胞壁蛋白抗體含量

以 ELISA coating buffer (carbohydrate buffer pH 9.6)將轉糖鏈球菌細胞壁蛋白以 5 μ g/ml 溶解，並取 100 μ l 於平底 96 孔盤(Nunc MaxiSorp®)的孔洞中，於 4°C 冰箱中放置 16-18 小時，以 PBST 洗 1 次後，加入 200 μ l blocking buffer 後，放置於 37°C 烘箱 2 小時，再用 PBST 洗 3 次，加入以 1:1000 倍稀釋於 sample buffer 的大鼠血清 100 μ l 於 96 孔盤中，置於 4°C 冰箱中 16-18 小時後，再以 PBST 洗 3 次，加入 100 μ l 1:25000 倍稀釋的 goat anti-rat IgG HRP (Immunology Consultant Lab)，



放置於 37°C 烘箱反應 2 小時，以 PBST 洗 3 次後，加入 100 μ l TMB 呈色後，以 2 N H₂SO₄ 終止反應，測定 OD450 吸光值。

十六、 測定大鼠血清抗牛心磷脂抗體(anti-cardiolipin)含量

先以 PBST 洗覆蓋有牛心磷脂的 96 孔盤(Varellisa®)1 次，加入 1:20 稀釋之大鼠血清，於 4°C 冰箱中放置 16-18 小時，以 PBST 洗 3 次後，加入 1:25000 倍稀釋的 goat anti-rat IgG HRP (Immunology Consultant Lab)，置於 37°C 烘箱反應 2 小時後，以 PBST 洗 3 次，加入 100 μ l TMB 呈色，再加入 2 N H₂SO₄ 終止反應，最後測定 OD450 吸光值。


十七、 測定大鼠血清尿素氮及尿酸含量

採集大鼠血液，待凝固後，取其血清，送至中研院小鼠診所進行血清生化測定。

Fuji Dri-Chem 4000i 的生化試片可進行 18 種例行檢查和 9 種選擇性的測試，例行檢查可檢測多種酵素的活性包括谷氨酰轉胺酶(r-GT)、谷草轉氨酶(GOT)、谷丙轉氨酶(GPT)、肌酸激酵素酶(CPK) 和鹼基磷酸酶(ALP)、乳酸去氫酵素(LDH)，及血液其他重要成份含量的測定，如血糖(GLU)、血尿素氮(BUN)、肌酸酐(CRE)、尿酸(UA)、總膽固醇(TCHO)、高密度脂蛋白(HDL)、三酸甘油脂 (TG)、總膽紅素(TBIL)、鈣 (Ca)、總蛋白質(TP)、白蛋白(ALB)、磷(IP)。而選擇性的測試則著重於一些特殊蛋白質如 C 反應蛋白(CRP)、血紅素(Hb)、血澱粉酶 (AMYL)、白胺酸氨基胜肽酵素(LAP)、激動異構酶(CKMB)、膽酯酶(CHE)、D 膽紅素(D-BIL)、及鎂(Mg)和氨(NH₃)的含量測定。

十八、 測定人類血清中抗轉糖鏈球菌染色體抗體含量

將轉糖鏈球菌染色體以 1 倍 SSC 溶液(1M NaCl/ 100mM sodium citrate, pH 7.0)稀釋成 5 μ g/ml，並加入 100 μ l 於平底 96 孔盤(Nunc MaxiSorp®)的孔洞中，放置於




4°C 冰箱中 16-18 小時後，利用 PBST 洗 1 次後，加入 200 μ l blocking buffer (Varelisa®) 放置於 37°C 烘箱 2 小時，再用 PBST 洗 3 次，加入以 1:10000 倍稀釋於 sample buffer (Varelisa®) 的人類血清 100 μ l 於 96 孔盤中，置於 4°C 冰箱中 16-18 小時後，再以 PBST 洗 3 次，加入 anti-human IgG HRP (Varelisa®) 100 μ l，置 37°C 烘箱 2 小時，以 PBST 洗 3 次後，加入 100 μ l TMB 呈色，再以 2 N H₂SO₄ 終止反應，偵測 OD450 吸光值。

十九、 人類嗜中性球之分離與純化

以含抗凝劑肝素(Heparin)之真空採血管抽取健康捐贈者的血液後，將血液取至 15 ml 離心管(greiner biotech)中，並補 HBSS (Hank' s Balanced Salt Solution)至 12 ml 混合均勻。另一方面，取 3 ml Histopaque-1119 (Sigma)及 3 ml Histopaque-1077 (Sigma)至 15 ml (evergreen)離心管中，配置 Histopaque density gradient，配置完成後利用滴管將血液加入，總體積為 10.5 ml，接者以 3000 rpm 離心 30 分鐘(KUBOTA 5800)。離心後可得分層細胞，由上而下依序為血漿層，單核球層(Mononuclear cell)、Histopaque-1077 溶液層、包含多型核球(polymorphonuclear, PMN)的顆粒性白血球層(Granulocyte) 及最下層之紅血球層。將顆粒性顆粒性白血球吸取至 HBSS 中以 3000 rpm (KUBOTA 5800)離心 10 分鐘清洗，去上清液後以 RPMI-1640 將細胞懸浮，再以 trypan blue 染色計算分離出之活細胞數。

二十、 體外模式誘發 NETs 及染色

先將 12 mm 的圓型玻片置於細胞培養 24 孔盤(Cellstar®)中，照射 UV 燈 30 分鐘，而後將以 RPMI-1640 重新懸浮的嗜中性白血以每個孔洞 2×10^5 細胞數加入，再將體積補到 300 μ l 後，靜置於 37°C、含 5%二氧化碳培養箱中 1 小時，使嗜中性白血球可貼附於玻片上，配置 600 nM Phorbol myristate acetate (PMA)(sigma)後，取 300 μ l 加入細胞液中，使得 PMA 最終濃度為 300 nM，於 37°C、含 5%二氧化



碳培養箱中作用 3 小時後，以 2% paraformadehy 固定(Brinkmann, *et al.* 2004)，以 1 倍 PBS 洗 1 次，加入 1:100 稀釋之人類血清，於 4°C 反應 16-18 小時後，再 1 倍 PBS 洗 3 次後，加入 1:1000 goat anti-human IgG FITC (sigma)於 37°C 染色 1 小時，以 1 倍 PBS 洗 3 次，加入 hoechst 33258 染色 5 分鐘後，1 倍 PBS 洗 1 次後，以 mounting oil 封片，最後使用共軛焦顯微鏡進行觀察。

二十一、嗜中性白血球染色

將 12 mm 的圓型玻片置於細胞培養 24 孔盤(Cellstar®)中，以照射 UV 燈 30 分鐘，而後將 RPMI-1640 重新懸浮的嗜中性白血球以每個孔洞 2×10^5 細胞數加入，靜置於 37°C、含 5%二氧化碳培養箱中 1 小時，使嗜中性白血球可貼附於玻片上，再以 2% paraformadehy 固定，1 倍 PBS 洗 1 次。加入 1% triton X-100 反應 5 分鐘(若染細胞表面則不需此處理)，1 倍 PBS 洗 1 次，以 1:100 稀釋之人類血清，於 4°C 反應 16-18 小時後，再 1 倍 PBS 洗 3 次後，加入 1:1000 goat anti-human IgG FITC (sigma)於 37°C 染色 1 小時，以 1 倍 PBS 洗 3 次，加入 hoechst 33258 染色 5 分鐘後，1 倍 PBS 洗 1 次後，以 mounting oil 封片，最後使用共軛焦顯微鏡進行觀察。

二十二、測定病人體內抗 NETs 抗體的含量

將 50 μ l 0.001% poly-lysine 加入細胞培養 96 孔盤(Biofil®) 中，於 37°C 放至 30 分鐘後倒掉，接者將懸浮於含 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)及 200 nM PMA 之 RPMI-1640 的嗜中性白血球，以每個孔洞 10^5 細胞數加入，並至於 37°C、含 5%二氧化碳培養箱中 3 小時後，以 2% paraformadehy 固定後，利用 1 倍 PBS 洗 1 次，加入 1% BSA blocking 1 小時後，用 PBST 洗 1 次，加入 1:100 稀釋之病人及正常人血清於 4°C 反應至隔日，PBST 洗 3 次後加入 1:2500 倍稀釋之 anti-human IgG-AP (Jackson ImmunoResearch) 37°C 作用 2 小時後，以 PBST 洗 3 次，利用 phosphatase substrate (sigma)呈色後，讀取 OD405。

二十三、 本論文使用抗體一覽表

Antibody	Conjugate	Note
Rabbit anti-rat myeloperoxidase	-	Novus(R-1073-100)
Goat anti-rat elastase	-	Santa cruz (sc-9521)
Goat anti-rabbit	Texas-red	Jackson ImmunoResearch
Donkey anti-goat IgG	Texas-red	Jackson ImmunoResearch
Goat anti-rat IgG	HRP	Immunology Consultant Lab
Goat anti-human IgG	FITC	Sigma
anti-human IgG	AP	Jackson ImmunoResearch



參、結果

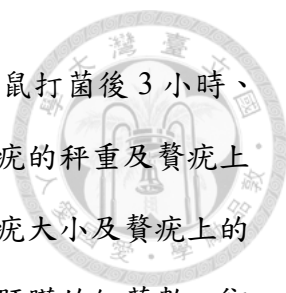
第一部分、NETs 在感染性心內膜炎瓣膜的贅疣中所扮演的角色

1. NETs 存在於感染性心內膜炎瓣膜的贅疣中

先前實驗室的研究以在贅疣的結構中發現了 Histone H₂B 的存在，為了進一步證實 NETs 確實存在於感染性心內膜炎瓣膜的贅疣中，選用 Myeloperoxidase (MPO) 作為 NETs 標誌，此標誌為嗜中性白血球中的顆粒性物質，為較專一性的標誌。針對感染性心內膜炎大鼠模式分離出的贅疣以 rabbit anti-MPO 單株抗體進行免疫螢光染色後，使用共軛焦顯微鏡觀察。紅色螢光為贅疣上 MPO 表現位置(圖四、A)，綠色螢光為表現綠色螢光蛋白的轉糖鏈球菌(圖四、B)，藍色螢光為聚集在贅疣細胞的 DNA(圖四、C)，MPO 及 DNA 共同表現的位置為 NETs 結構(圖四、D)，贅疣厚度 56.4 μm，DNA 大多出現於表現 MPO 的細胞上，顯示 DNA 是由嗜中性球所放出來，因此 NETs 確實存在於贅疣中。

2. 去除感染心內膜炎大鼠體內嗜中性白血球對贅疣的影響

為了探討 NETs 在感染性心內膜炎大鼠瓣膜上贅疣中所扮演的角色，在插管手術前以及感染轉糖鏈球菌前一天，利用 rabbit anti-rat PMN antiserum 消耗大鼠體內的嗜中性白血球，於感染前後抽血送 CBC，以觀察大鼠體內嗜中性白血球的數量變化，並將感染後 3 小時、6 小時及 24 小時的血塗菌，比較有無去除嗜中性白血球大鼠血液中轉糖鏈球菌的菌量；並在犧牲大鼠後取出脾臟、肝臟及受損之心臟瓣膜上之贅疣，秤重並定量菌數；另外，利用 Elastase 抗體對贅疣做免疫螢光染色，觀察 NETs 形成的情況(圖五)。由全血分析的結果顯示，相較於給予 PBS 的控制組，給予 anti-rat PMN antiserum 的大鼠，體內的嗜中性白血球的數量明顯的減少，而且在感染轉糖鏈球菌後 24 小時，還是維持在很少的數量，說明 anti-rat PMN antiserum 可以有效的消耗大鼠體內的嗜中性白血球(圖五、A)。然而血液中菌數定




量結果卻發現，無論是給予 anti-rat PMN antiserum 還是 PBS，大鼠打菌後 3 小時、6 小時及 24 小時血液中的菌量變化沒有顯著差異(圖五、B)；贅疣的秤重及贅疣上菌數定量結果顯示，有無 anti-rat PMN antiserum 處理的大鼠贅疣大小及贅疣上的菌量，兩者皆沒有顯著差異(圖五、C, D)；另外，定量在脾臟及肝臟的細菌數，卻發現相較於 PBS 的控制組大鼠，anti-rat PMN antiserum 組的大鼠脾臟及肝臟內的菌數都有大約 10 倍以上的差異(圖五、E, F)。以共軛焦顯微鏡觀察 Elastase 的免疫螢光染色結果，綠色螢光為轉糖鏈球菌，紅色螢光為 Elastase，藍色螢光為 DNA，Elastase 及 DNA 共同表現的位置為 NETs 結構，發現以 anti-rat PMN antiserum 處理的大鼠，其贅疣上 NETs 的形成有減少的情形，但是其厚度約 44 μm 和 PBS 的控制組的 40 μm 沒有顯著的差異(圖五、G)。由給予大鼠 anti-rat PMN antiserum 之結果可以推論，注射至腹腔之 anti-serum 確實可以減少周邊血的嗜中性白血球的數量，雖然不影響周邊血的菌量，但脾臟及肝臟的菌量卻有顯著的增加，顯示周邊血的細菌可經由血液被帶到組織中，另一方面，贅疣的大小及菌量並沒有因為 NETs 形成的減少而有所影響，NETs 在贅疣的成熟與形成的過程中不是最重要的影響因子。

第二部分、口腔鏈球菌引起之擴散性全身性感染的患者血清中抗體生成的情況

1. 口腔共生菌引起之擴散性全身性感染患者血清中抗 NETs 自體抗體量

於感染性心內膜炎大鼠的臟瓣膜上的贅疣中，以免疫螢光染色的方式確認 NETs 的確存在於贅疣中，但是在感染性心內膜炎或是其他由口腔鏈球菌引起之全身性感染的患者體內，NETs 是否為引起自體抗體產生的自體抗原仍不清楚。為了證明 NETs 和這些患者產生自體抗體的關係，於平底 96 孔盤以 PMA 刺激嗜中性白血球產生 NETs 後，分析 10 位感染性心內膜炎、10 位其他由口腔鏈球菌引起之全身性感染的患者及 10 位正常人各血清中抗 NETs 自體抗體量，結果顯示，感染



性心內膜炎患者及其他由口腔鏈球菌引起之全身性感染的患者體內抗 NETs 自體抗體量高於正常人，並且有顯著差異(圖六、A)。此結果表示 NETs 在口腔鏈球菌引起之擴散性全身性感染的患者體內可做為自體抗體的抗原，引發自體抗體的生成。

2. 測定口腔鏈球菌引起之擴散性全身性感染患者血清中抗轉糖鏈球菌染色體抗體

利用酵素連結免疫吸附分析法測定 10 位感染性心內膜炎、10 位其他由口腔鏈球菌引起之全身性感染的患者及 10 位正常人血清中抗轉糖鏈球菌染色體抗體，結果發現，感染性心內膜炎的患者血清中抗轉糖鏈球菌染色體抗體高於正常人其他全身性感染的患者，然而，正常人及其他全身性感染的患者血清中的抗轉糖鏈球菌染色體抗體量沒有顯著差異(圖六、B)。

3. 口腔鏈球菌引起之擴散性全身性感染患者血清中各種抗體生成之間的相關性分析

分析 20 位口腔鏈球菌引起之擴散性全身性感染患者(包含感染性心內膜炎患者)血清中各種抗體生成之間的相關性，由抗 NETs 抗體及抗雙股去氧核糖核酸抗體的相關性分析，可得相關性係數為 0.5887 ($p=0.0064$)，顯示具有中度正相關(圖七、A)。分析抗轉糖鏈球菌染色體抗體及抗 NETs 抗體的相關性，可得相關係數為 0.1783 ($p=0.4519$)，顯示無相關性(圖七、B)。抗轉糖鏈球菌染色體抗體及抗雙股去氧核糖核酸抗體的相關性分析，可得相關性係數為 0.1895 ($p=0.4363$)，顯示無相關性(圖七、C)。由相關性分析結果可知患者體內抗 NETs 抗體和抗雙股去氧核糖核酸抗體的生成有關，抗轉糖鏈球菌染色體抗體和抗 NETs 抗體的生成以及抗轉糖鏈球菌染色體抗體和抗雙股去氧核糖核酸抗體產生無相關性。

4. 口腔鏈球菌引起之擴散性全身性感染患者血清會與 NETs 作用

以免疫螢光染色方式，確認酵素連結免疫吸附分析法測定抗 NETs 抗體的結果，首先以 2 位正常人、2 位感染性心內膜炎患者及 2 位其他擴散性全身性感染患者對嗜中性白血球、打洞嗜中性白血球及 NETs 做免疫螢光染色，在以共軛焦顯微鏡觀察。結果顯示，這些人的血清不會和嗜中性白血球及打洞的嗜中性白血球反應，但是只對 NETs 染色出現陽性反應(圖八)。進一步以正常人、感染性心內膜炎患者，其他擴散性全身性感染患者各 6 位對 NETs 做免疫螢光染色，由染色結果可發現，正常人的血清對 NETs 有微弱的反應，而兩種病人的血清對 NETs 有明顯的反應且有些陽性反應的部分不和 DNA 有共同表現的現象(圖九)。

第三部分、轉糖鏈球菌感染的大鼠體內抗體生成情形及自體抗體的影響

1. 菌血症大鼠體內抗體生成情形

利用酵素連結免疫吸附分析法測定轉糖鏈球菌感染的菌血症大鼠，並且追蹤其體內自體抗體生成的情形，抗雙股去氧核糖核酸抗體結果顯示，相較於未感染的正常大鼠，菌血症大鼠血清中可以偵測到抗雙股去氧核糖核酸抗體的產生，且在感染後一週抗體的量達到高值(圖十、A)，進一步分析對其中 5 隻大鼠在感染一周內血清中抗雙股去氧核糖核酸抗體，及抗轉糖鏈球菌表面蛋白抗體產生情形，可以發現在感染後第 5 天大鼠血清中抗雙股去氧核糖核酸抗體就會達到高值(圖十、B)，而抗轉糖鏈球菌表面蛋白抗體會隨者感染次數增加而上升(圖十、C)。另一方面，偵測菌血症大鼠體內抗牛心脂抗體生成情形，發現相較於正常大鼠，菌血症老鼠中 5 隻內有 4 隻，隨者感染的時間增加，體內抗牛心脂抗體的量有增加的情形。結果顯示，轉糖鏈球菌的感染會造成自體抗體的產生。



2. 菌血症大鼠的腎功能分析

許多研究顯示，自體免疫疾病的患者以及動物模式體內的自體抗體會沉積在腎臟，引起腎炎的發生。酵素連結免疫吸附分析法測定轉糖鏈球菌感染的菌血症大鼠，發現菌血症大鼠體內有自體抗體生成的情形。進一步利用血清生化測定菌血症大鼠的腎功能，尿素氮及尿酸的測定結果顯示，隨者感染時間的增加，菌血症老鼠及正常老鼠的血清中尿素氮及尿酸量的沒有顯著差異(圖十一、A, B)，可知菌血症大鼠體內的自體抗體不會造成大鼠腎功能的缺損。

第四部分、NETs 對於菌血症老鼠產生抗體的影響


為了探討 NETs 對於菌血症大鼠產生自體抗體的影響，利用 rabbit anti-rat PMN antiserum 在感染轉糖鏈球菌前及感染後每日去除大鼠體內嗜中性白血球，並給予 antiserum、感染前、感染後一天、感染後三天、感染後五天及感染後七天抽血送全血分析，並留取血清做酵素免疫吸附分析。全血分析的結果顯示，在轉糖鏈球菌感染前，相較給予 PBS 的組別給予 antiserum 的老鼠體內的嗜中性白血球有顯著的減少，然而在感染後五天即使持續給予 antiserum，老鼠的嗜中性白血球回復到和給予 PBS 的組別一樣(圖十二、A)，而在全血分析的結果中也發現給予大鼠 antiserum 後會降低血液中淋巴球的數量，並且持續到感染後七天(圖十二、B)。以酵素免疫吸附分析血清中抗轉糖鏈球菌表面蛋白抗體，可以發現，給予 antiserum 的老鼠在感染後第 7 天血清內抗轉糖鏈球菌表面蛋白抗體相較於給予 PBS 的老鼠有顯著較低的現象(圖十二、C)；另一方面，抗雙股去氧核糖核酸抗體的偵測結果顯示，給予 antiserum 的大鼠再感染後第 5 天開始體內產生抗雙股去氧核糖核酸抗體的程度比給予 PBS 的大鼠低，且有顯著差異(圖十二、D)。由結果推論，給予大鼠 antiserum 不但會去除血液中嗜中性白血球也會去除血液中的淋巴球，而淋巴球的減少會影響大鼠體內抗體的生成。



肆、討論

1. NETs 在感染性心內膜炎瓣膜的贅疣中所扮演的角色


於 1975 年 Durack 的團隊利用電子顯微鏡觀察感染性心內膜炎的贅疣，在贅疣的結構中發現了細菌、血小板及纖維蛋白等物質。實驗室先前的研究也證實了，血小板確實會參與在轉糖鏈球菌引之感染性心內膜炎中贅疣的形成(Jung, *et al.* 2012)。而贅疣的組成物質不只於此，有研究指出，單核球會聚集在贅疣上，並釋放 Tissue factor 增強贅疣的形成(Bancsi, *et al.* 1996)，實驗室先前利用電子顯微鏡的觀察結果也發現有許多免疫細胞浸潤在贅疣中；另一方面，在李泐學長的研究中，利用 PI 及 Histone H₂B 的單株抗體對感染心內膜炎大鼠的贅疣免疫螢光染色的結果，發現了贅疣中同時有細菌的胞外去氧核糖核酸(extracellular DNA, eDNA)及 NETs 的存在，且給予大鼠 DNaseI 可以明顯降低贅疣的大小。在本研究中，利用不同的 NETs 標誌 Myeloperoxidase 對贅疣做免疫螢光染色也的確觀察到了 NETs 的存在。另一方面給予感染性心內膜炎大鼠 rabbit anti-rat PMN anti-serum 去除大鼠血液中的嗜中性白血球，在全血計數的結果顯示老鼠體內的嗜中性白血球確實有減少，周邊血的細菌定量結果和正常對照組沒有差異，但是脾臟及肝臟的菌量卻有顯著的增加，由於脾臟及肝臟為體內最大的含血器官，故細菌可經由血流被帶至這兩個器官當中。然而在共軛焦顯微鏡的觀察到發現到給予 antiserum 大鼠贅疣上 NETs 形成減少，但是贅疣的厚度、大小及菌量和給予 PBS 的對照組沒有差異。由於贅疣的結構中還有細菌、血小板、纖維蛋白及其他免疫細胞，而去除大鼠嗜中性白血球後，雖然減少贅疣上的 NETs，但並不影響其他贅疣的結構，然而在李泐學長的結果中，給予 DNase I 會明顯減少贅疣的大小，可能是因為 DNase I 可能同時分解細菌的 eDNA 及 NETs，而直接的影響贅疣的結構。由此結果可以推論 NETs 對贅疣的形成可能不是最重要的角色。許多研究指出，嗜中性白血球所釋放



的 NETs 可以抓住細菌(Brinkmann, *et al.* 2004)，還能刺激血小板及凝血因子的活化，並促使血小板、血漿中其他纖維蛋白的聚集形成血栓(Engelmann and Massberg 2013; Mitroulis, *et al.* 2010)；在 2007 年的研究也在深層靜脈栓塞(Deep vein thrombosis, DVT)之動物模式中，證實 NETs 從在於血栓當中(Fuchs, *et al.* 2007)，而構成贅疣和血栓的物質非常相似，NETs 在贅疣扮演的角色究竟為何，仍需再進一步的研究。

2. 口腔鏈球菌引起之擴散性全身性感染的患者血清中抗體生成的情況

近年來的研究發現 NETs 在許多自體免疫疾病，如 SLE、RA 等疾病中，可能為誘發自體抗體產生之自體抗原。而臨床的統計中也發現約有一半以上由口腔鏈球菌引起的擴散性全身性感染的患者體內有抗雙股去氧核糖核酸或是抗牛心脂抗體的產生，而免疫螢光染色的結果中顯示 NETs 確實存在於感染性心內膜炎大鼠模式辦模的贅疣中，故探討 NETs 是否引起為口腔鏈球菌引起之擴散性全身性感染的患者血清自體抗體產生之自體抗原，由酵素連結免疫吸附分析法測定病人血清中抗體生成的結果顯示，相較於正常人，病人體內都可以測到抗 NETs 抗體；然而，在測定抗轉糖鏈球菌染色體抗體的部分，卻發現到感染性心內膜炎患者體內抗轉糖鏈球菌染色體抗體的量高於其他全身性感染的患者及正常人。分析這些病人抗 NETs 抗體、抗雙股去氧核糖核酸抗體及抗轉糖鏈球菌染色體抗體之間的相關性可以發現，抗 NETs 抗體及抗雙股去氧核糖核酸抗體的生成之間具有中度的正相關，而抗轉糖鏈球菌染色體抗體和抗 NETs 抗體的生成以及抗轉糖鏈球菌染色體抗體和抗雙股去氧核糖核酸抗體的產生之間不具相關性，說明了這些病人體內之抗雙股去氧核糖核酸抗體及抗 NETs 抗體不是因為和鏈球菌的染色體交叉反應所產生的，而雙股去氧核糖核酸可能為抗 NETs 抗體所辨識的抗原之一。由病人及正常人血清對嗜中性白血球、打洞嗜中性白血球及 NETs 免疫螢光染色的結果發現，正常人及病人的血清不會對嗜中性白血球及打洞嗜中性白血球有反應；對於 NETs 正常



人有輕微的反應，病人接有較強反應，而且有些陽性反應的部分和 DNA 不具有共同表現的現象，結果證實，這些病人確實具有抗 NETs 抗體產生，而且這些抗體的抗原除了雙股去氧核糖核酸以外可能還包含其他 NETs 的結構，而抗 NETs 抗體其所辨識的抗原為及抗 NETs 抗體在口腔鏈球菌造成的全身性感染中的生理意義目前仍不清楚。

近年來的研究指出，RA 患者體內產生的 anti-citrullinated protein antibody (ACPAs)其抗原就是 NETs 成分中的 citrullinated histone，這些抗體會再刺激病人的嗜中性白血球產生 NETs，並且增強病人關節中的發炎反應，使病人的病情變得更加嚴重(Khandpur, *et al.* 2013; Pratesi, *et al.* 2013)，此種抗體在 SLE 的患者體內也可以被偵測到(Liu, *et al.* 2012)；而 SSV 患者體內所偵測到的 anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA)包含 anti-MPO 及 anti-protenase3 (PR3)被發現到可以刺激被 TNF- α 活化的嗜中性白血球產生 NETs，NETs 的結構中也確實含有 MPO 及 PR3 兩種物質，另外在疾病較嚴重之 SSV 患者的腎臟也被偵測到有 NETs 存在，顯示 NETs 和自體抗體的產生及疾病的嚴重程度有關(Kessenbrock, *et al.* 2009)。所以推論，在口腔鏈球菌引起之擴散性全身性感染患者體內的抗 NETs 抗體可能為 anti-citrullinated histone antibodies，因為細菌的染色體內沒有 histone 所以病人體內測到的到抗 NETs 抗體和抗轉糖鏈球菌染色體的抗體之間沒有相關性，另一方面也有可能為 ANCA，若要進一步確認抗 NETs 抗體的抗原，需要病人血清和 citrullinated histone、MPO 或 PR3 的單株抗體同時染色，看是否在相同部位共同表現；而這些抗 NETs 抗體和病人的疾病發展之間關係也仍不清楚。

一般在正常狀況下體內會一些自發性產生抗自身抗原的自體抗體，稱為 natural autoantibodies (NAbs)，體內的 NAbs 包含 IgM、IgG 及 IgA (Avrameas 1991; Avrameas and Ternynck 1993, 1995; Bouvet and Dighiero 1998)，這些抗體具有可辨識多種物質但是親和力(affinity)較差，由於這些特性，這些抗體可以清除並抵抗外來病原菌(Ochsenbein, *et al.* 1999; Ochsenbein and Zinkernagel 2000; Reid, *et al.* 1997)，另一方面這些抗體也可以幫忙清除體內凋亡(apoptotic)及老化(senescence)細胞(Hornig and



Lutz 2000; Peng, *et al.* 2005)。口腔鏈球菌感染的患者體內所偵測到的抗 NETs 抗體也有可能幫助 NETs 的清除，一方面避免 NETs 的存在傷害血管內皮細胞，一方面避免 NETs 成為自體抗原引起更多自體抗體的產生。

3. 菌血症大鼠體內抗體生成之情形

追蹤由轉糖鏈球菌感染的菌血症大鼠體內抗體生成結果發現，大鼠血清中抗雙股去氧核糖核酸抗體量在感染後一週左右就會達到高值，進一步去追蹤其中五隻大鼠體內抗雙股去氧核糖核酸抗體量，發現在感染後五天就會達到高值，顯示在這短時間內產生自體抗體的可能不是經由依賴 T 細胞(T dependent)的 B 細胞活化所形成。另一方面，由抗牛心脂抗體的結果顯示，大部分菌血症的老鼠隨者感染的時間增加，體內抗牛心脂抗體有上升的現象，許多細菌表面具有牛心脂的結構，故在細菌感染的情況常常偵測到牛心脂抗體的生成(Sene, *et al.* 2008)。

許多自體免疫疾病往往會因免疫複合物的堆積而造成腎絲球腎炎的發生(Andres 1969)，雖然在菌血症大鼠的血清中偵測到自體抗體的生成，血清生化的結果顯示菌血症大鼠的 BUN 及 UA 的數值和正常大鼠沒有顯著的差異，顯示菌血症大鼠體內自體抗體的量雖然有上升，但產生的量可能仍不足以引起腎臟病變。

4. NETs 對於菌血症老鼠產生抗體的影響

利用去除菌血症大鼠體內嗜中性白血球的方式，探討 NETs 在轉糖鏈球菌感染之菌血症大鼠體內自體抗體生成所扮演的角色。在感染轉糖鏈球菌前及感染後每天以腹腔注射之方是給予大鼠 rabbit anti-rat PMN antiserum，並且追蹤給予 antiserum 前、感染前、感染後一天、感染後三天、感染後五天及感染後七天，大鼠體內嗜中性白血球的數量及抗轉糖鏈球菌表面蛋白及抗雙股去氧核糖核酸抗體的量。全血分析的結果顯示 antiserum 在感染後三天以前都可以有效的降低大鼠血液中嗜中性白血球的數量，在感染後五天開始給予 antiseum 的大鼠體內的嗜中性

白血球有回升的現象，顯示大鼠對 antiserum 可能具有抗性，而給予大鼠 antiserum 也發現到會降低血液中淋巴球的數量，並且可持續到感染後七天。

嗜中性白血球在先天免疫系統中扮演第一線的防禦細胞，除了在先天性免疫系統具有重要的影響外，嗜中性白血球也被發現可以藉由分泌 B-cell activating factor (BAFF)及 A proliferation-inducing ligand (APRIL)等細胞激素，經由不依賴 T 細胞(T cell independent)的方式去刺激 B 細胞產生 IgM，並且可刺激 IgM 進行 class switching 形成 IgG 及 IgA (Huard, *et al.* 2008; Mackay and Schneider 2009; Scapini, *et al.* 2003; Schneider, *et al.* 1999)，而且脾臟 marginal zone 中的嗜中性白血球形成類似 NETs 的結構，幫助 B 細胞產生抗體(Puga, *et al.* 2012)。由實驗結果可以發現相較於給予 PBS 的大鼠，給予 antiserum 的大鼠體內產生抗轉糖鏈球菌抗體量在感後七天及抗雙股去氧核糖核酸的抗體再感染五天都有明顯較低的情形，此結果可能是由於 antiserum 降低大鼠體內淋巴球而導致抗體的生成受到影響。若要進一步探討 NETs 在菌血症大鼠是否影響抗體生成，可以給予大鼠 DNase I 瓦解 NETs 結構 (Bruns, *et al.* 2010)，或是給予大鼠 peptidylarginine deiminases (PAD)抑制劑 Cl-amidine 抑制 NETs 形成(Knight, *et al.* 2013)，觀察是否影響抗體的生成。



伍、參考文獻

Ajdic D, McShan WM, McLaughlin RE, Savic G, Chang J, Carson MB, *et al.* 2002.

Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 14434-14439.

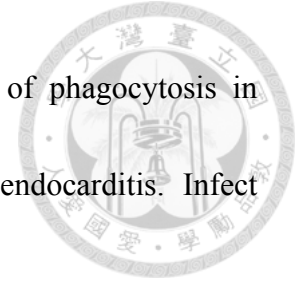
Andres GA 1969. Immune complexes and autoimmune diseases. Vox Sang 16: 345-350.

Asherson RA, Tikly M, Staub H, Wilmshurst PT, Coltart DJ, Khamashta M, *et al.* 1990. Infective endocarditis, rheumatoid factor, and anticardiolipin antibodies. Ann Rheum Dis 49: 107-108.

Avrameas S 1991. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. Immunol Today 12: 154-159.

Avrameas S, Ternynck T 1993. The natural autoantibodies system: between hypotheses and facts. Mol Immunol 30: 1133-1142.

Avrameas S, Ternynck T 1995. Natural autoantibodies: the other side of the immune system. Res Immunol 146: 235-248.



Bancsi MJ, Veltrop MH, Bertina RM, Thompson J 1996. Role of phagocytosis in activation of the coagulation system in *Streptococcus sanguis* endocarditis. *Infect Immun* 64: 5166-5170.

Bayer AS, Theofilopoulos AN, Eisenberg R, Dixon FJ, Guze LB 1976. Circulating immune complexes in infective endocarditis. *N Engl J Med* 295: 1500-1505.

Bojalil R, Mazon-Gonzalez B, Carrillo-Cordova JR, Springall R, Amezcua-Guerra LM 2012. Frequency and clinical significance of a variety of autoantibodies in patients with definite infective endocarditis. *J Clin Rheumatol* 18: 67-70.

Bouvet JP, Dighiero G 1998. From natural polyreactive autoantibodies to a la carte monoreactive antibodies to infectious agents: Is it a small world after all? *Infection and Immunity* 66: 1-4.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, *et al.* A 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532-1535.

Bruns S, Kniemeyer O, Hasenberg M, Amanianda V, Nietzsche S, Thywissen A, *et al.* 2010. Production of extracellular traps against *Aspergillus fumigatus* in vitro and in infected lung tissue is dependent on invading neutrophils and influenced by



hydrophobin RodA. PLoS Pathog 6: e1000873.

Cabane J, Godeau P, Herreman G, Acar J, Digeon M, Bach JF 1979. Fate of circulating immune complexes in infective endocarditis. Am J Med 66: 277-282.

Chuammitri P, Ostojic J, Andreasen CB, Redmond SB, Lamont SJ, Palic D 2009.

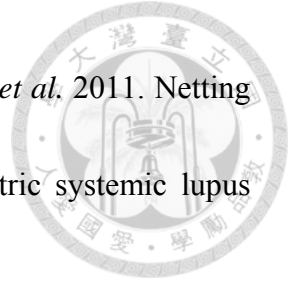
Chicken heterophil extracellular traps (HETs): novel defense mechanism of chicken heterophils. Vet Immunol Immunopathol 129: 126-131.

Doria A, Canova M, Tonon M, Zen M, Rampudda E, Bassi N, *et al.* 2008. Infections as triggers and complications of systemic lupus erythematosus. Autoimmun Rev 8: 24-28.

Dwivedi N, Upadhyay J, Neeli I, Khan S, Pattanaik D, Myers L, *et al.* 2012. Felty's syndrome autoantibodies bind to deiminated histones and neutrophil extracellular chromatin traps. Arthritis Rheum 64: 982-992.

Engelmann B, Massberg S 2013. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. Nat Rev Immunol 13: 34-45.

Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, *et al.* 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. J Cell Biol 176: 231-241.



Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, *et al.* 2011. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 3: 73ra20.

Gupta AK, Hasler P, Holzgreve W, Gebhardt S, Hahn S 2005. Induction of neutrophil extracellular DNA lattices by placental microparticles and IL-8 and their presence in preeclampsia. *Hum Immunol* 66: 1146-1154.

Hakkim A, Furnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, *et al.* 2010. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 9813-9818.

Hamada S, Slade HD 1980. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 44: 331-384.

Hoiby N, Doring G, Schiotz PO 1986. The role of immune complexes in the pathogenesis of bacterial infections. *Annu Rev Microbiol* 40: 29-53.

Hornig R, Lutz HU 2000. Band 3 protein clustering on human erythrocytes promotes binding of naturally occurring anti-band 3 and anti-spectrin antibodies. *Exp Gerontol* 35: 1025-1044.

Huard B, McKee T, Bosshard C, Durual S, Matthes T, Myit S, *et al.* 2008. APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. *J Clin Invest* 118: 2887-2895.



Ito HO 2006. Infective endocarditis and dental procedures: evidence, pathogenesis, and prevention. *J Med Invest* 53: 189-198.

Jung CJ, Yeh CY, Shun CT, Hsu RB, Cheng HW, Lin CS, *et al.* 2012. Platelets enhance biofilm formation and resistance of endocarditis-inducing streptococci on the injured heart valve. *J Infect Dis* 205: 1066-1075.

Kessenbrock K, Krumbholz M, Schonermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, *et al.* 2009. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* 15: 623-625.

Khandpur R, Carmona-Rivera C, Vivekanandan-Giri A, Gizinski A, Yalavarthi S, Knight JS, *et al.* 2013. NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* 5: 178ra140.

Knight JS, Zhao W, Luo W, Subramanian V, O'Dell AA, Yalavarthi S, *et al.* 2013. Peptidylarginine deiminase inhibition is immunomodulatory and vasculoprotective in murine lupus. *J Clin Invest* 123: 2981-2993.



Kobayashi SD, DeLeo FR 2009. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 1: 309-333.

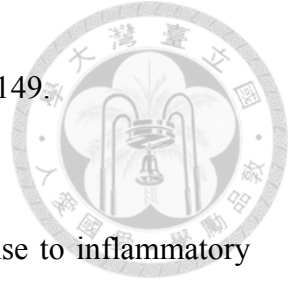
Liu CL, Tangsombatvisit S, Rosenberg JM, Mandelbaum G, Gillespie EC, Gozani OP, *et al.* 2012. Specific post-translational histone modifications of neutrophil extracellular traps as immunogens and potential targets of lupus autoantibodies. *Arthritis Res Ther* 14: R25.

Mackay F, Schneider P 2009. Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol* 9: 491-502.

Mayer-Scholl A, Averhoff P, Zychlinsky A 2004. How do neutrophils and pathogens interact? *Curr Opin Microbiol* 7: 62-66.

Mitroulis I, Kourtzelis I, Kambas K, Rafail S, Chrysanthopoulou A, Speletas M, *et al.* 2010. Regulation of the autophagic machinery in human neutrophils. *Eur J Immunol* 40: 1461-1472.

Moreillon P, Entenza JM, Francioli P, McDevitt D, Foster TJ, Francois P, Vaudaux P 1995. Role of *Staphylococcus aureus* coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis. *Infect Immun* 63: 4738-4743.



Moreillon P, Que YA 2004. Infective endocarditis. *Lancet* 363: 139-149.

Neeli I, Khan SN, Radic M 2008. Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils. *J Immunol* 180: 1895-1902.

Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, Suter M, Brombacher F, Hengartner H, *et al.* 1999. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 286: 2156-2159.

Ochsenbein AF, Zinkernagel RM 2000. Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol Today* 21: 624-630.

Peng Y, Kowalewski R, Kim S, Elkon KB 2005. The role of IgM antibodies in the recognition and clearance of apoptotic cells. *Mol Immunol* 42: 781-787.

Pratesi F, Dioni I, Tommasi C, Alcaro MC, Paolini I, Barbetti F, *et al.* 2013. Antibodies from patients with rheumatoid arthritis target citrullinated histone 4 contained in neutrophils extracellular traps. *Ann Rheum Dis* (*in press*)

Puga I, Cols M, Barra CM, He B, Cassis L, Gentile M, *et al.* 2012. B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the



marginal zone of the spleen. *Nat Immunol* 13: 170-180.

Reid RR, Prodeus AP, Khan W, Hsu T, Rosen FS, Carroll MC 1997. Endotoxin shock in antibody-deficient mice: unraveling the role of natural antibody and complement in the clearance of lipopolysaccharide. *J Immunol* 159: 970-975.

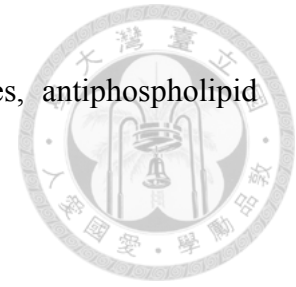
Remijnsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenabeele P, Vanden Berghe T 2011. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ* 18: 581-588.

Riedemann NC, Guo RF, Gao H, Sun L, Hoesel M, Hollmann TJ, *et al.* 2004. Regulatory role of C5a on macrophage migration inhibitory factor release from neutrophils. *J Immunol* 173: 1355-1359.

Scapini P, Nardelli B, Nadali G, Calzetti F, Pizzolo G, Montecucco C, *et al.* 2003. G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional B_LY_S. *J Exp Med* 197: 297-302.

Schneider P, MacKay F, Steiner V, Hofmann K, Bodmer JL, Holler N, *et al.* 1999. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med* 189: 1747-1756.

Sene D, Piette JC, Cacoub P 2008. Antiphospholipid antibodies, antiphospholipid syndrome and infections. *Autoimmun Rev* 7: 272-277.



Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJ, Banerjee A, Silliman CC 2005. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol* 78: 1025-1042.

Sir O, Fazal N, Choudhry MA, Gamelli RL, Sayeed MM 2000. Neutrophil depletion prevents intestinal mucosal permeability alterations in burn-injured rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R1224-1231.

Thomas CJ, Schroder K 2013. Pattern recognition receptor function in neutrophils. *Trends Immunol.* 34: 317-328.

Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, *et al.* 2011. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 187: 538-552.

von Kockritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, Heinemann K, Norrby-Teglund A, Rohde M, *et al.* 2008. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by

means of extracellular trap formation. *Blood* 111: 3070-3080.

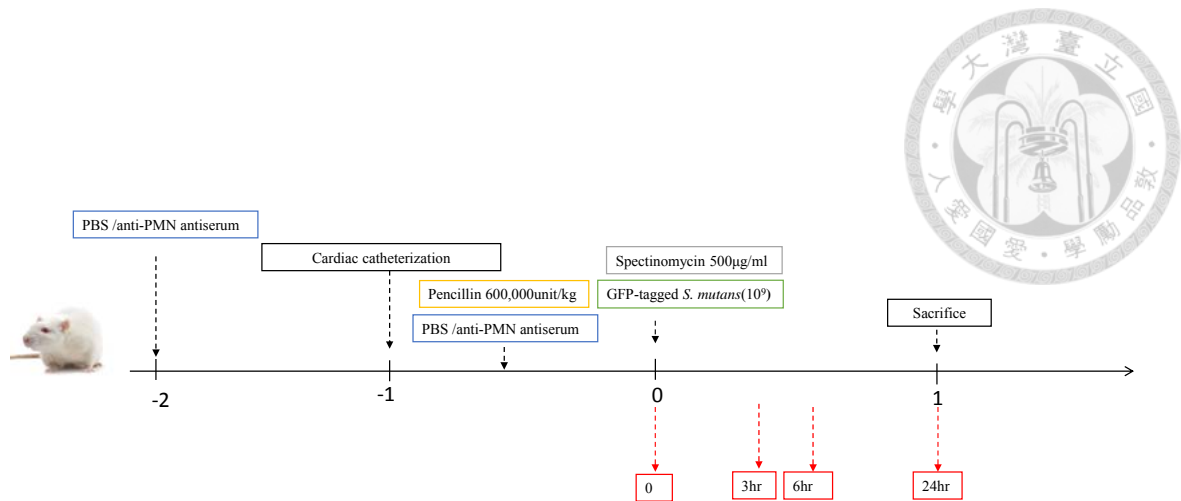


Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, *et al.* 2009. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol* 184: 205-213.

Wilkie RP, Vissers MC, Dragunow M, Hampton MB 2007. A functional NADPH oxidase prevents caspase involvement in the clearance of phagocytic neutrophils. *Infect Immun* 75: 3256-3263.

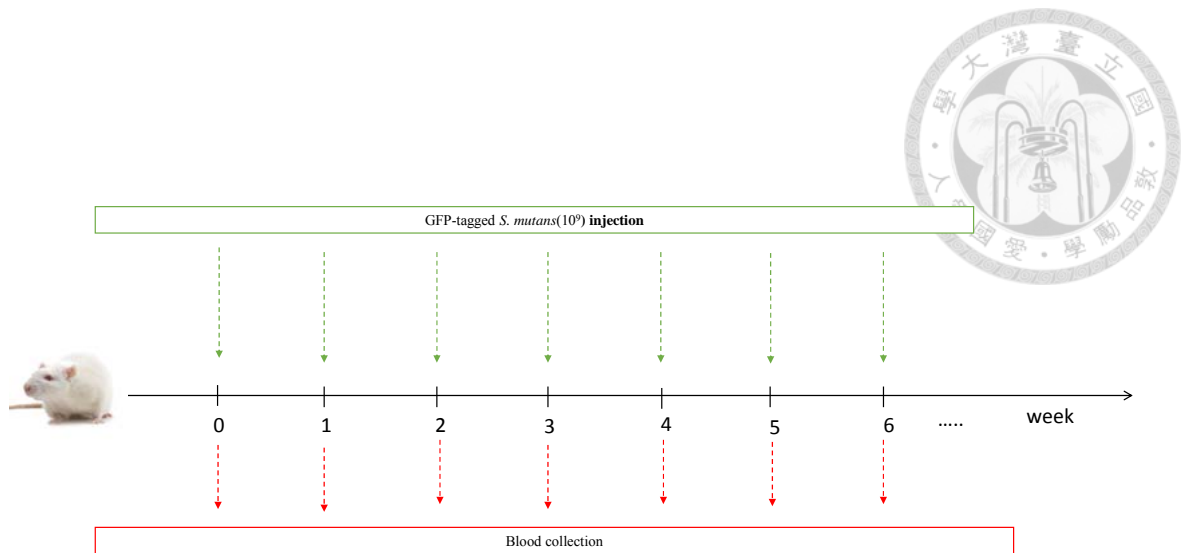
Wilson W, Taubert KA, Gewitz M, Lockhart PB, Baddour LM, Levison M, *et al.* 2008. Prevention of infective endocarditis: Guidelines from the American Heart Association. *Journal of the American Dental Association* 139: 3S-24S.

Yee J, McAllister CK 1987. The utility of Osler's nodes in the diagnosis of infective endocarditis. *Chest* 92: 751-752.



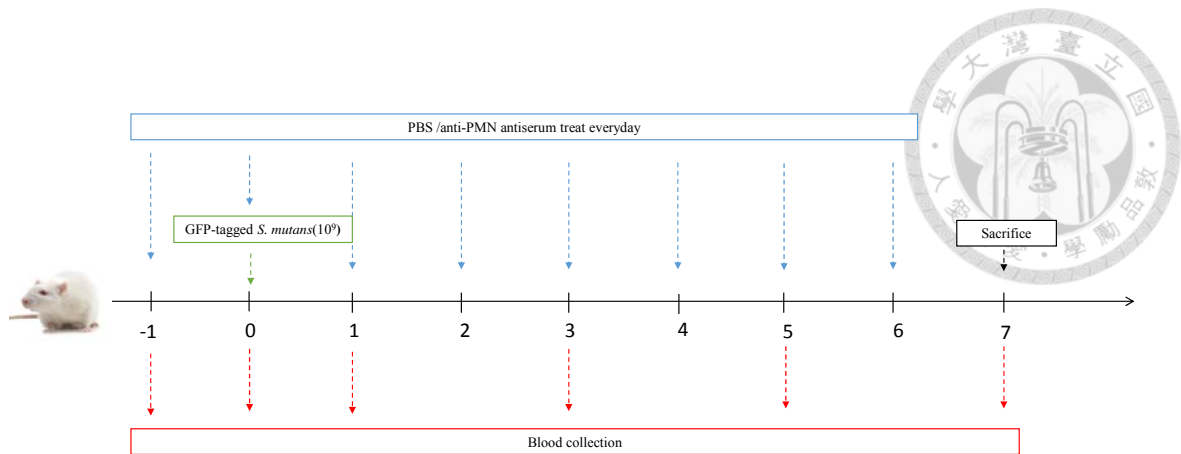
圖一、去除感染性心內膜炎大鼠模式之嗜中性白血球的實驗設計

在插管手術前一天(Day -2)以及感染轉糖鏈球菌前一天(Day -1)，以腹腔注射的方式利用 rabbit anti-rat PMN antiserum 去除大鼠體內的嗜中性白血球，以注射 PBS 的大鼠做為對照組，並在插管後注射 600,000 unit/kg 的盤尼西林於大鼠腹腔中，於插管後隔日(Day 0)以靜脈注射之方式將 10^9 CFU/ml 帶有綠色螢光蛋白之轉糖鏈球菌感染大鼠，並且給予 500 µg/ml 的 spectinomycin，於感染前後抽血送全血分析，觀察大鼠體內嗜中性白血球的數量變化，並定量感染後 3 小時、6 小時及 24 小時周邊血菌數，於犧牲大鼠後取出脾臟、肝臟及受損之心臟瓣膜上之贅疣，秤重並定量菌數；另外，也進一步對贅疣做免疫螢光染色，觀察 NETs 結構。



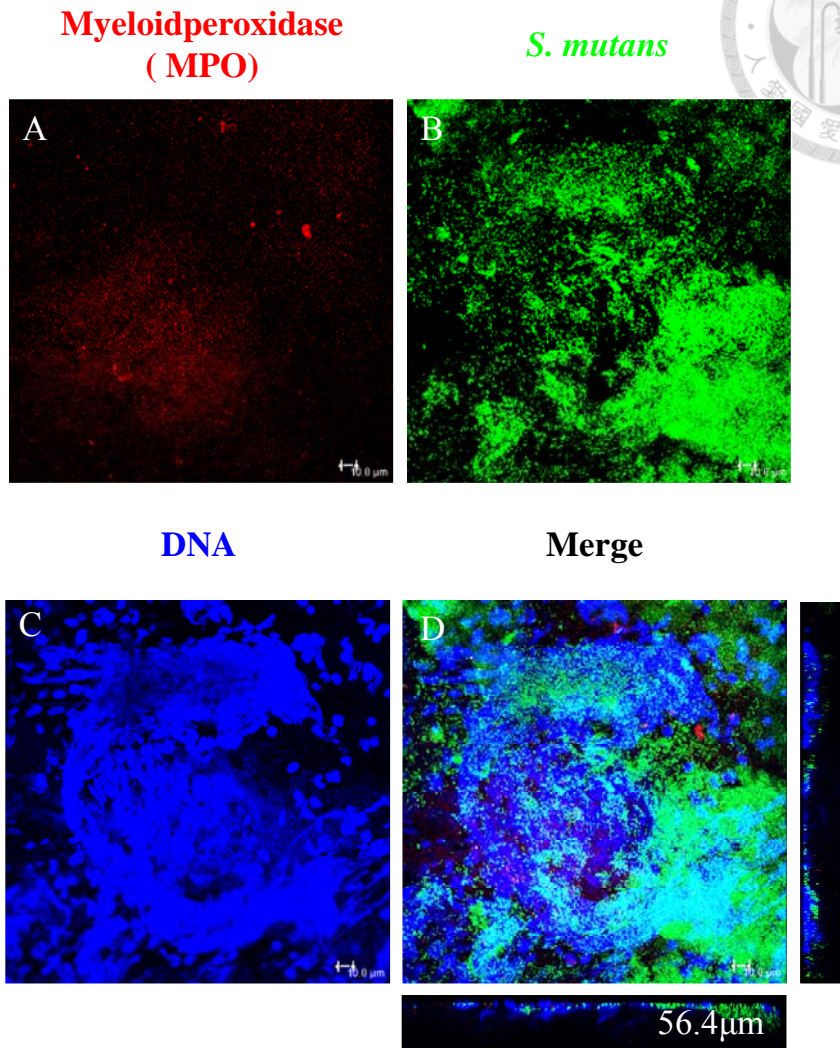
圖二、菌血症大鼠模式圖

以含有 2%人類血漿的 BHI 培養液，培養轉糖鏈球菌，每週以 10^9 CFU/ml 的量，以尾靜脈注射方式感染大鼠，並在感染前抽血，留取血清做分析，實驗進行至感染後 20 週。



圖三、去除菌血症大鼠體內嗜中性白血球實驗設計

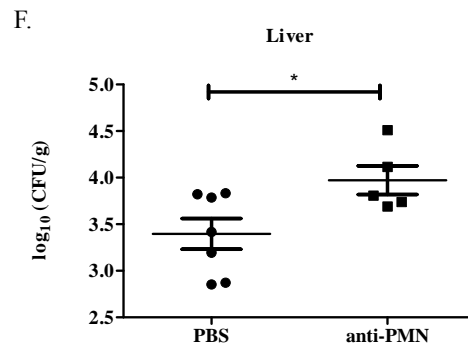
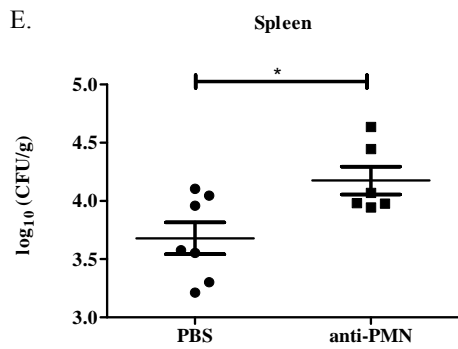
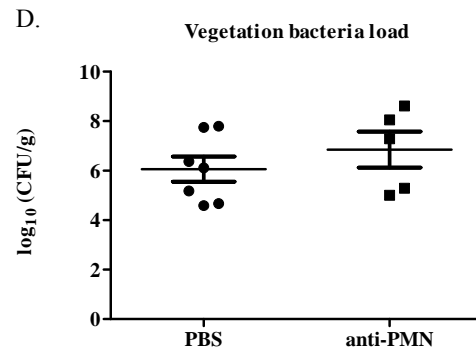
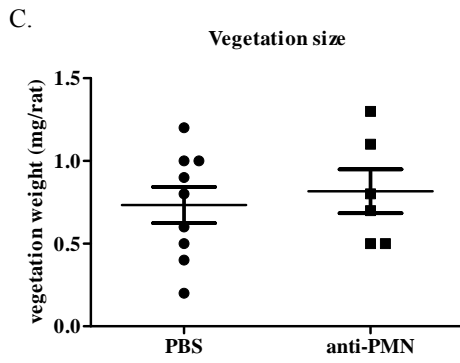
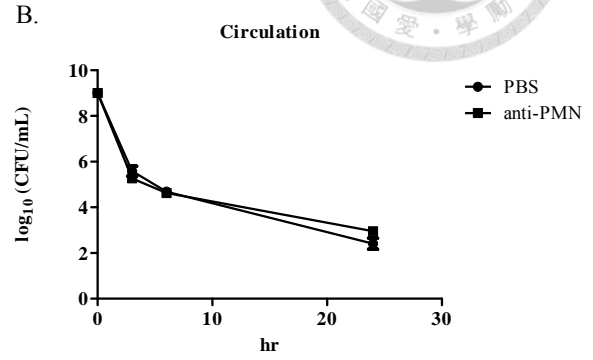
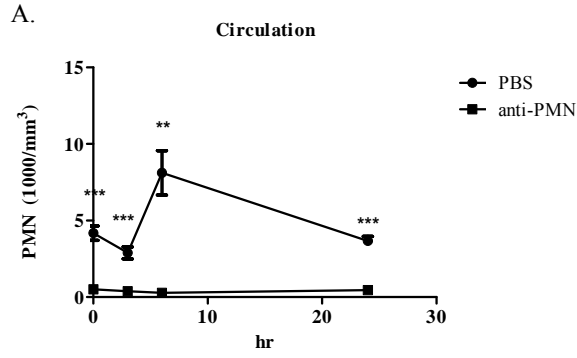
以含有 2%人類血漿的 BHI 培養液，培養轉糖鏈球菌，以 10^9 CFU/ml 的量，以尾靜脈注射方式感染大鼠，並在感染前一日(Day-1)至犧牲前一日(Day6)，每日於抽血前利用腹腔注射方式給予 rabbit anti-rat PMN，注射 PBS 做為對照組，並且分別在感染前一日(Day-1)、感染前(Day0)、感染後一日(Day1)、感染後三日(Day3)感染後五日(Day5)及、感染後七日(Day7)抽血，做全血分析以追蹤大鼠體內嗜中性白血球數量，並留取血清，做血清分析。

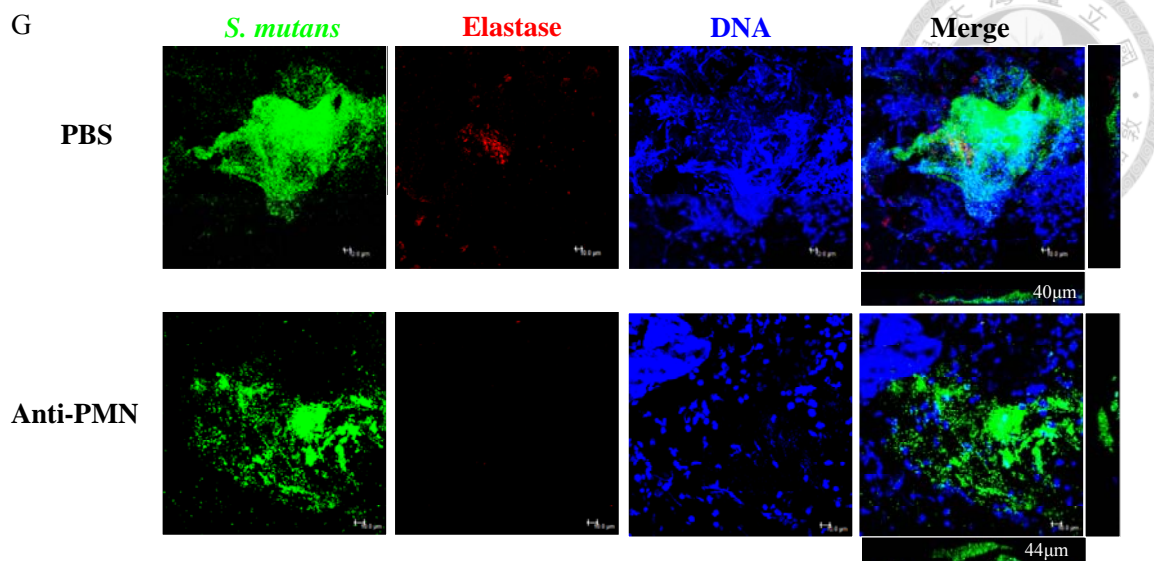


圖四、NETs 存在於感染性心內膜炎大鼠瓣膜的贅疣中

大鼠進行心臟插管手術後，以靜脈注射之方式將 10^9 CFU/ml 表現綠色螢光蛋白的轉糖鏈球菌感染大鼠，於感染 24 小時後，分離出受損瓣膜上之贅疣，以 rabbit anti-MPO 做螢光染色，且以 hoechst 染 DNA，再以共軛焦顯微鏡進行觀察。

- A. 紅色螢光為贅疣上 MPO 表現位置
 - B. 綠色螢光為表現綠色螢光蛋白的轉糖鏈球菌
 - C. 藍色螢光為聚集在贅疣細胞的 DNA
 - D. MPO 及 DNA 共同表現的位置為 NETs 結構，贅疣厚度 56.4 μm
- 放大倍數為 630X，scale bar 10 μm





圖五、去除大鼠體內嗜中性白血球對於感染心內膜炎大鼠之影響

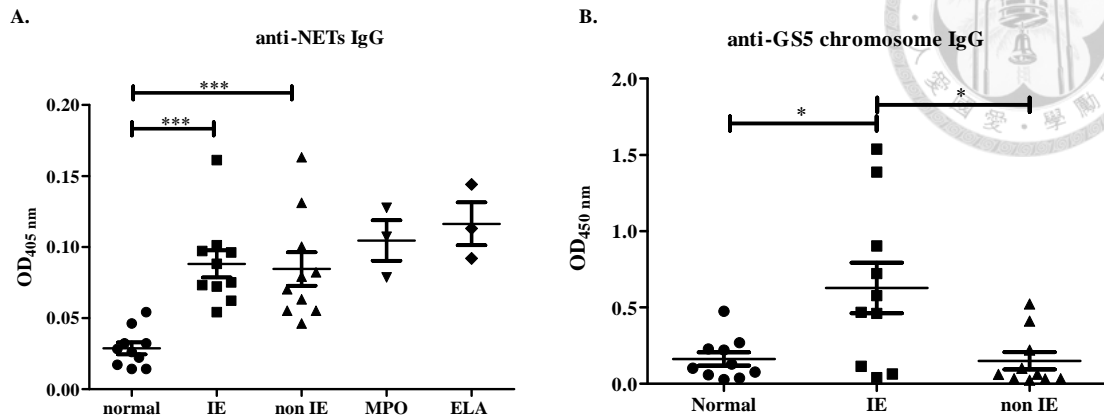
在插管手術前一天以及感染轉糖鏈球菌前一天，以腹腔注射的方式利用 rabbit anti-rat PMN antiserum 消耗大鼠體內的嗜中性白血球，於插管後隔日以靜脈注射之方式將 10^9 CFU/ml 帶有綠色螢光蛋白之轉糖鏈球菌感染大鼠，於感染前後抽血送 CBC，以觀察大鼠體內嗜中性白血球的數量變化，並定量感染後 3 小時、6 小時及 24 小時周邊血菌數，於犧牲大鼠後取出脾臟、肝臟及受損之心臟瓣膜上之贅疣，秤重並定量菌數；此外，以共軛焦顯微鏡觀察 Elastase 對贅疣的染色結果。

- A. 感染轉糖鏈球菌前後，大鼠週邊血 PMN 的數量。PBS 為給予 PBS 的控制組 (n=8)，anti-PMN 為給予 rabbit anti-rat PMN antiserum 的組別(n=5)
- B. 感染轉糖鏈球菌後 3 小時、6 小時及 24 小時周邊血菌量。PBS 控制組(n=9)，anti-PMN (n=6)
- C. 贅疣大小秤重。PBS 控制組(n=9)，anti-PMN (n=6)
- D. 贅疣的菌數定量。PBS 控制組(n=7)，anti-PMN (n=5)
- E. 脾臟中菌數定量。PBS 控制組(n=7)，anti-PMN (n=6)， $p=0.0209$
- F. 肝臟中菌數定量。PBS 控制組(n=7)，anti-PMN (n=5)， $p=0.0341$
- G. 共軛焦顯微鏡下，Elastase 免疫螢光染色觀察結果。

綠色為表現綠色螢光蛋白質的轉糖鏈球菌；紅色表示贅疣中表現 Elastase 的部位
藍色代表 DNA；Elastase 及 DNA 共同表現的位置為 NETs 結構

贅疣厚度：PBS 控制組 40 μm ，anti-PMN 44 μm

放大倍數為 630X，scale bar 為 10 μm 。

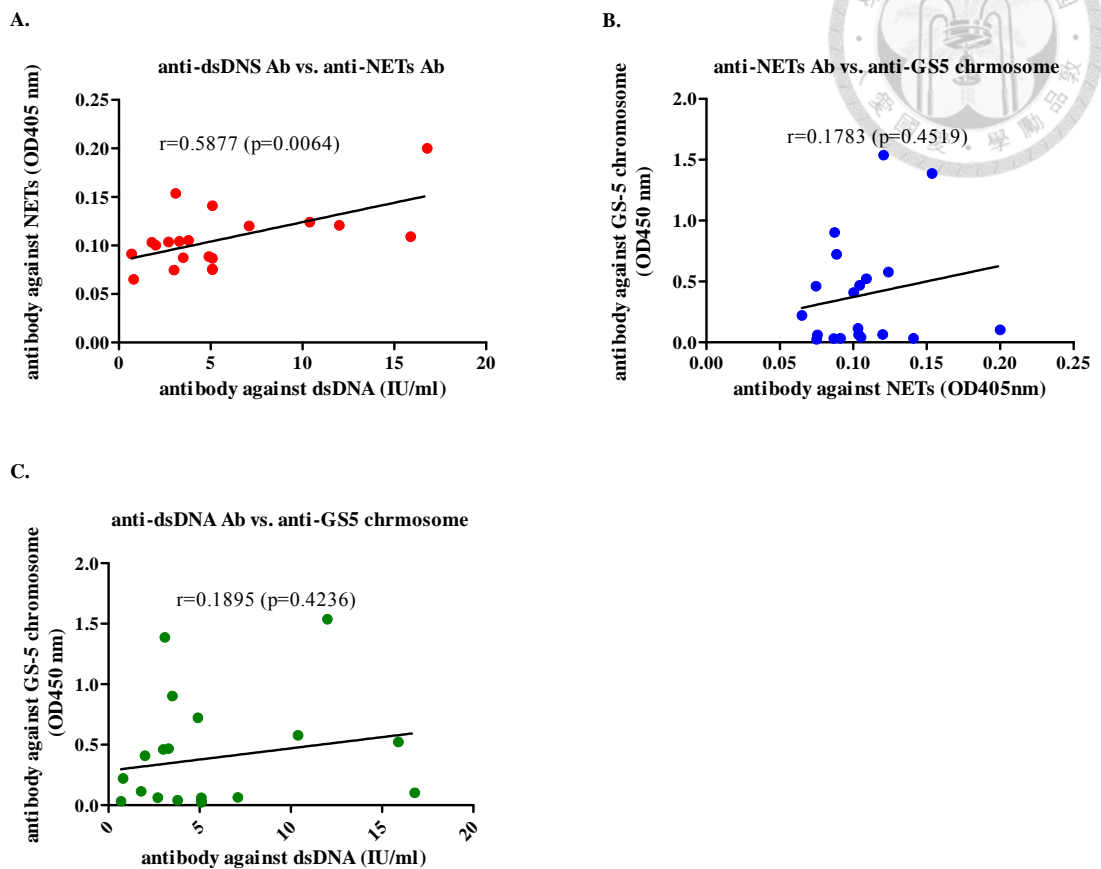


圖六、口腔鏈球菌引起之擴散性全身性感染患者血清之酵素連結免疫吸附測定

針對 10 位感染性心內膜炎患者(IE)、10 位其他擴散性全身性感染患者(non IE) 及 10 位正常人(Normal)，以酵素連結免疫吸附法測定血清中抗 NETs 抗體及抗轉糖鏈球菌染色質抗體(anti-GS5 chromosome)量。

A. 抗 NETs 抗體測定，MPO (myeloperoxidase)及 ELA (elastase)為測定 NETs 標誌，做為陽性對照

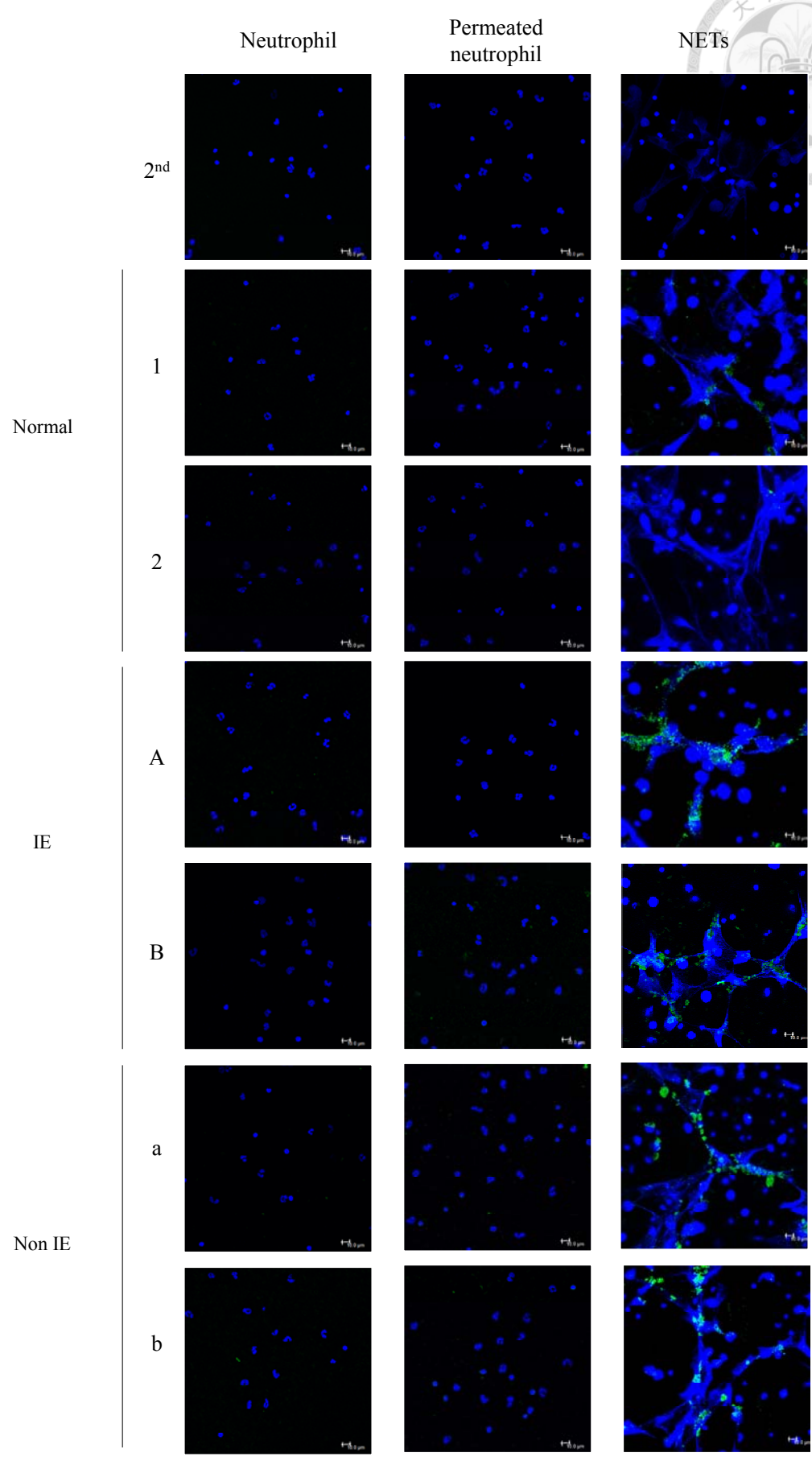
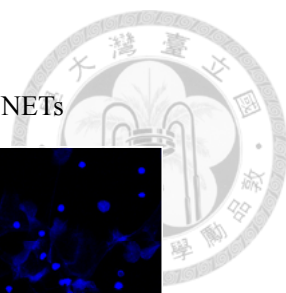
B. 抗轉糖細菌染色體測定

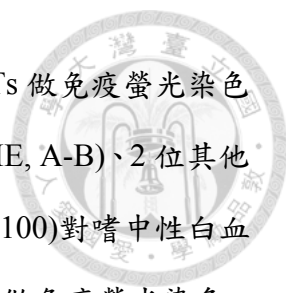


圖七、口腔鏈球菌引起之擴散性全身性感染患者血清之自體抗體和抗細菌染色體的相關性分析

針對 20 位口腔鏈球菌引起之擴散性全身性感染患者(包含感染性心內膜炎患者)血清中抗雙股去氧核糖核酸抗體(anti-dsDNA)、抗 NETs 抗體及抗轉糖鏈球菌染色體抗體做相關性分析之結果。

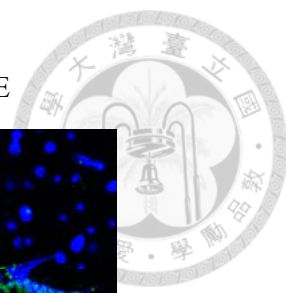
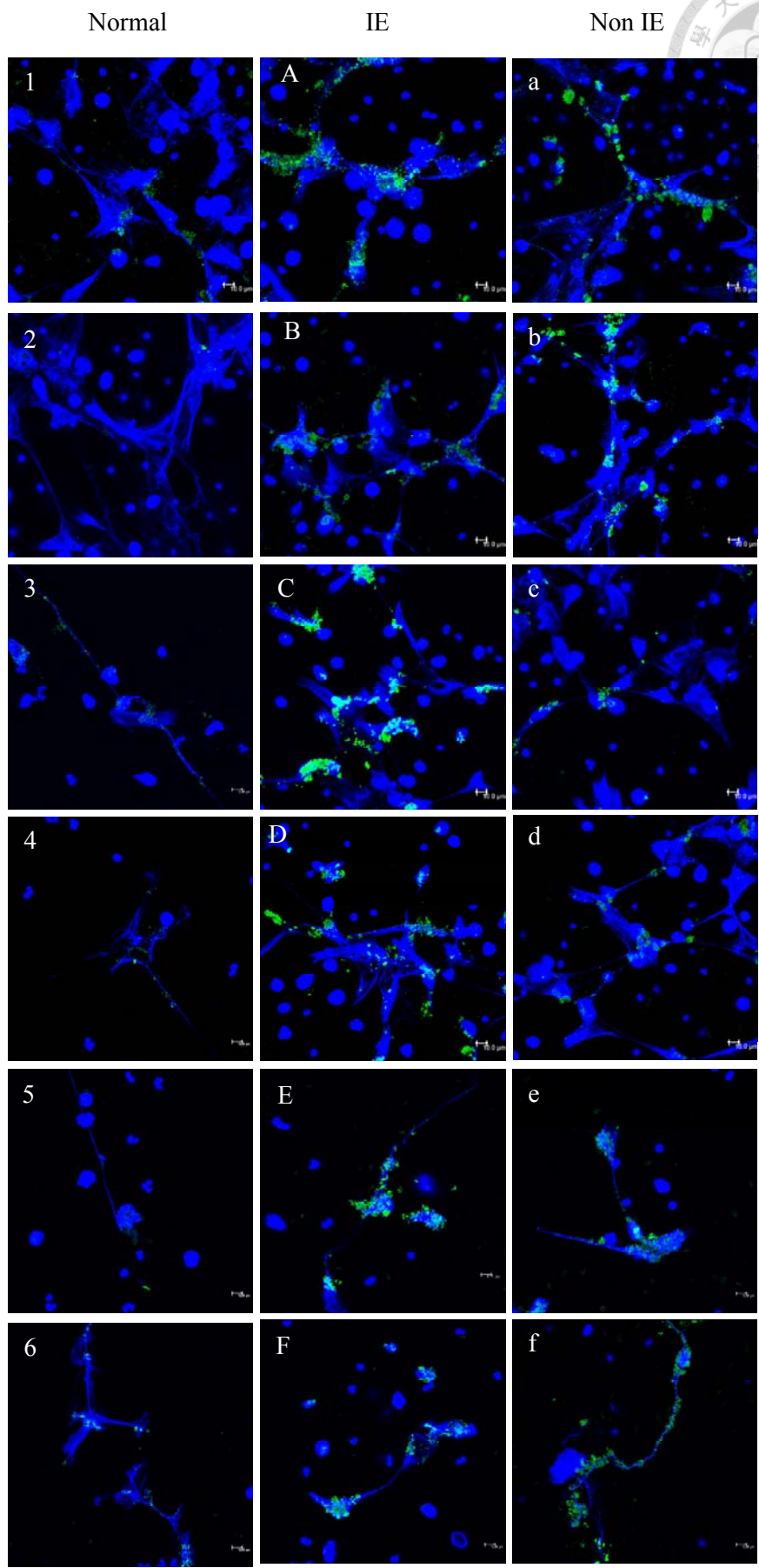
- A. 患者血清抗 NETs 抗體及抗雙股去氧核糖核酸抗體相關性分析，相關係數(r)為 0.5887, $p=0.0064$
- B. 患者血清抗轉糖鏈球菌染色體抗體及抗 NETs 抗體相關性分析，相關係數為 0.1783, $p=0.4519$
- C. 患者血清抗轉糖鏈球菌染色體抗體及抗雙股去氧核糖核酸抗體相關性分析，相關係數為 0.1895, $p=0.4263$





圖八、利用人類血清對嗜中性白血球、打洞嗜中性白血球及 NETs 做免疫螢光染色
分別取 2 位正常人(Normal, 1-2)、2 位感染性心內膜炎患者(IE, A-B)、2 位其他
擴散性全身性感染患者的血清(Non IE, a-b)以相同的稀釋倍數(1:100)對嗜中性白血
球(neutrophil)、打洞嗜中性白血球(permeated neutrophil)及 NETs 做免疫螢光染色，
再以共軛焦顯微鏡觀察。

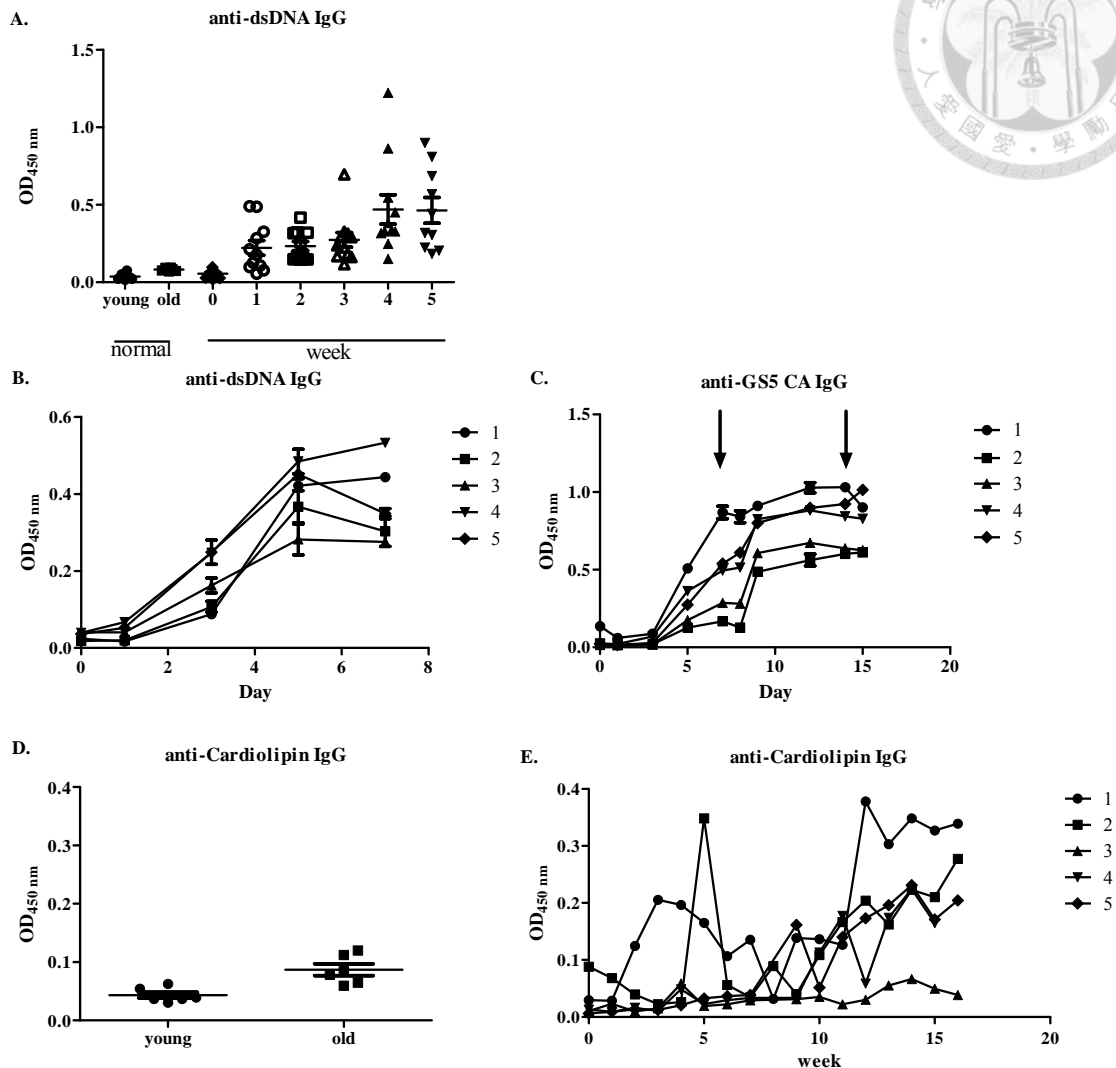
2nd 為二級抗體對照組；藍色螢光為 Hoechst 染色，藍色 DNA；綠色螢光代表
陽性反應。放大倍數為 630X，scale bar 為 10 μm 。



圖九、利用人類血清對 NETs 做免疫螢光染色

分別取 6 位正常人(Normal, 1-6)、6 位感染性心內膜炎患者(IE, A-F)、6 位其他擴散性全身性感染患者的血清(Non-IE, a-f)，對 NETs 做免疫螢光染色，再以共軛焦顯微鏡觀察。藍色螢光為 Hoecehst 染色，藍色 DNA；綠色螢光代表陽性反應。放大倍數為 630X，scale bar 為 10 μm 。

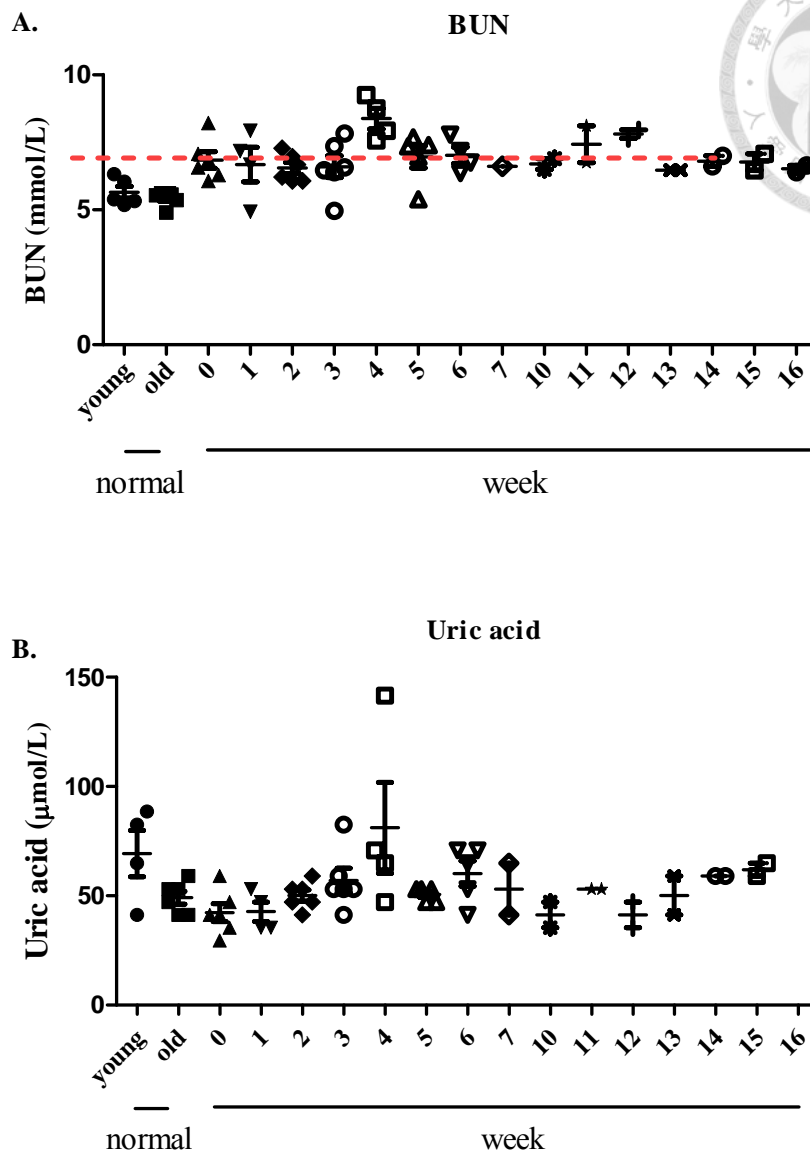




圖十、菌血症大鼠體內抗體生成之情形

以酵素連結免疫吸附法測定轉糖鏈球菌感染後，菌血症大鼠體內抗雙股去氧核糖核酸、抗轉糖鏈球菌表面蛋白質、抗牛心脂抗體的生成情況

- A. 感染轉糖鏈球菌前及感染後 5 週抗雙股去氧核糖核酸的程度，以 9 週大年輕大鼠(young)及大於 3 個月大(old)的大鼠做為未感染的正常對照組
- B. 感染轉糖鏈球菌一週內抗雙股去氧核糖核酸的程度
- C. 感染轉糖鏈球菌二週內抗轉糖鏈球菌表面蛋白質程度，箭頭所指為打菌時間點
- D. 未感染轉糖鏈球菌的 9 週大年輕大鼠(young)及大於 3 個月大(old)的大鼠血清中抗牛心脂抗體程度
- E. 感染轉糖鏈球菌前及感染後 16 週大鼠體內抗牛心脂抗體程度

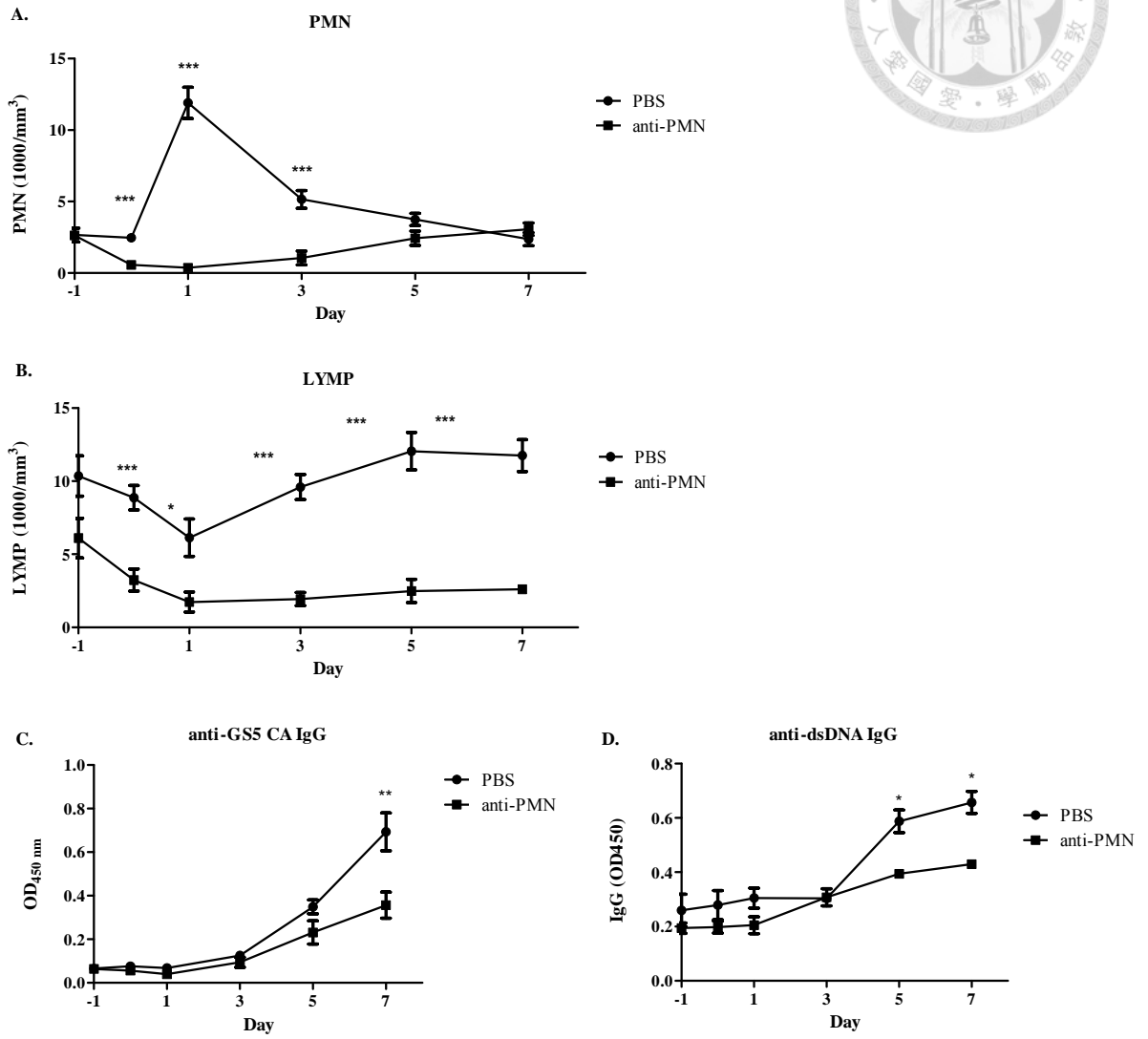


圖十一、感染轉糖鏈球菌大鼠之腎功能血清生化分析

分析菌血症大鼠血清中尿素氮(BUN)及尿酸(Uric acid)量，以觀察在轉糖鏈球菌感染後 16 週內菌血症大鼠腎功能，其中以 9 週大年輕大鼠(young)及大於 3 個月大(old)的大鼠做為未感染的正常對照組。

A. 尿素氮(BUN)的含量，單位為 mmol/L，虛線為參考值：6.9 mmol/L

B. 尿酸(Uric acid)的含量，單位為 $\mu\text{mol/L}$





圖十二、去除嗜中性白血球的菌血症大鼠體內嗜中性白血球變化及抗體生成情況

於感染轉糖鏈球菌前及感染後每日給予大鼠 rabbit anti-rat PMN antiserum 去除大鼠的嗜中性白血球，同時以給予 PBS 的大鼠做為對照組，並於給予 antiserum 前、感染前、感染後一日、感染後三日、感染後五日及感染後 7 日抽血送全血分析及留取血清做酵素連結免疫分析。

- A. 嗜中性白血球數量($1000/\text{mm}^3$)，感前、感染後一天及感染後三天給予 PBS 及給予 antiserum 組別有顯著差異($P < 0.001$)
- B. 淋巴球數量($1000/\text{mm}^3$)，感染前至感染後七天給予 PBS 及給予 antiserum 組別有顯著差異($P < 0.001$)
- C. 抗轉糖鏈球菌表面蛋白抗體程度，感染後七天給予 PBS 及給予 antiserum 組別有顯著差異($P = 0.0029$)
- D. 抗雙股去氧核糖核酸程度，感染後五天及七天給予 PBS 及給予 antiserum 組別有顯著差異($P = 0.0221$)

附圖



	Male-to-female ratio	Age	Anti-dsDNA no.(%)	APL (Antiphospholipid antibodies)			APL no.(%)	APL+ anti-dsDNA no.(%)
				AntiCardiolipin IgG-no.(%)	AntiCardiolipin IgM-no.(%)	Antib2-Glycoprotein I IgG-no.(%)		
All disseminated systemic infection (n=50)	1.63	53.4 ± 20.7	13 (26)	22 (44)	23 (46)	10 (20)	27 (54)	30 (60)
IE (n=21)	2	52.4 ± 22.1	5 (23.8)	9 (42.1)	9 (42.8)	5 (23.8)	11 (52.3)	12 (57.1)
other disseminated systemic infection (n=29)	1.23	54.2 ± 19.9	8 (27.5)	13 (44.8)	14 (48.2)	5 (17.2)	16 (55.1)	18 (62)

附圖一、口腔鏈球菌感染引起擴散性全身性感染之病人之統計分析

其中 21 位為感染性心內膜炎患者(IE)，29 位為其他擴散性全身性感染患者 (other disseminated systemic infection)。Anti-phospholipid antibodies 種類包含 Anti-cardiolipin IgG、Anti-cardiolipin IgM 及 Anti-β2-glycoprotein IgG；APL+ anti-dsDNA 為具有 Anti-phospholipid antibodies 或是 anti-dsDNA antibodies 的病人數目及比例。

資料來源：台大醫院感染科