

國立臺灣大學醫學院臨床醫學研究所

博士論文

Graduate Institute of Clinical Medicine

College of Medicine

National Taiwan University

doctoral dissertation



左心室舒張功能不全之分子及臨床研究

Molecular Mechanisms and Clinical Studies of Left
Ventricular Diastolic Dysfunction

吳卓鏞

Cho-Kai Wu

指導教授：江福田教授

蔡佳醞副教授

Advisor: Fu-Tien Chiang, Professor

Chia-Ti Tsai, Associate Professor

中華民國 102 年 11 月

November, 2012



國立臺灣大學博士學位論文
口試委員會審定書

左心室舒張功能不全之分子及臨床研究

Molecular Mechanisms and Clinical Studies of Left
Ventricular Diastolic Dysfunction

本論文係吳卓鍇君（學號 D98421008）在國立臺灣大學
臨床醫學研究所完成之博士學位論文，於民國 102 年 10 月
23 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：

(指導教授)

吳卓鍇

李怡宏

楊嘉華

符國基

楊景勳

系主任、所長

高嘉辰



致謝

在四年半的心臟科生涯之中能完成博士學位及研究均有賴於周遭大家的幫忙與協助。首先最感謝我的兩位恩師，江福田教授，這數年來從老師身上學到的不僅只是做學問的方法以及嚴謹的態度，更能感受到老師的親切與對學生指導的熱誠，開始做博士班研究時，不知從何下手，老師始終指引了整體的方向，使我不致迷失，更努力支援讓我能回到台大醫院總院服務，安心順利的完成基礎與臨床研究，在此要向老師表達無限的感激。蔡佳醞老師，在我剛畢業，對研究一無所知時帶領我進入基礎研究的領域，其後一路指導我至今，讓我在博士班學習的路上一路順遂，並且亦師亦友的和我討論工作生活上的種種困難，該當如何處理，讓我獲益匪淺。感謝林俊立教授，對我心臟科的生涯規劃提供莫大的幫助。感謝黃瑞仁老師，對於我臨床工作的指導，以及在雲林分院時期的照顧與鼓勵。另外，特別感謝林昭維學長提供最重要的啟發與資料處理，教導我如何開始一項研究，也感謝任光對於所有研究論文的分析，繪圖與經費協助。此外也要感謝助理林淑君小姐、謝嘉珊小姐及林宜樺小姐在實驗技術方面的協助，沒有他們的幫忙，就沒有我今日的成果。此外，更要感謝臨床所的老師們及諸位口試委員對論文的指導與修正。

感謝曾春典教授，心臟科全體同仁對我的支持，有了景齡、富群、建鈞、勝南這些好伙伴以及佳玲有求必應的支援，才能讓我安心的完成我的研究。

最後謹將這份論文獻給我的家人，將我含辛茹苦扶養長大的雙親，總是事事包容並盡一切努力協助我的岳父岳母，以及在這幾年來一路陪著我，給予我生活上所有支援與歡笑的摯愛，我的太太-尹岑，讓我忘卻一切煩惱的寶貝女兒-苡寧，沒有妳們無怨無悔的付出與支持，我沒辦法渡過這數年。



目錄

目錄.....	i
圖目錄.....	iv
表目錄.....	vi
中文摘要.....	viii
Abstract.....	xi
縮寫對照表.....	xiv
第一章 緒論	1
第一節 心衰竭的重要性.....	1
第二節 正常收縮功能心衰竭與左心室舒張功能不全.....	1
第三節 鈣離子通道在心臟舒張功能不良的角色.....	8
第四節 臨床族群中和 HFpEF 或左心室舒張功能相關的 biomarkers.....	12
第五節 研究目的與假說.....	17
第二章 研究方法及材料	19
第一節 TNF- α 及 IL-6 可能透過 transcription level 的抑制，影響 SERCA2 的表現.....	19
第二節 探討 TNF- α 可能影響 SERCA2 的機轉(pathway)，是否直接影響心臟舒張功能以及是否可以被藥物所反轉-細胞及動物實驗模式.....	21
第三節 探討臨床 DHF 病患，加護病房嚴重發炎反應的病患，發炎反應物質與心臟舒張功能的關係以及預後的影響.....	24
第四節 一般族群中 subclinical inflammation 是否會影響左心室舒張功能的產生，可能的機轉如何?.....	28
第五節 新的左心室纖維化標的- CTGF 和 DHF 的相關性以及可能影響機轉.....	31
第三章 研究結果	34



第一節 TNF- α 及 IL-6 可能透過 transcription level 的抑制，影響 SERCA2 現.....	34
第二節 探討 TNF- α 可能影響 SERCA2 的機轉(pathway)，是否直接影響心臟舒張功能以及是否可以被藥物所反轉-細胞及動物實驗模式.....	35
第三節 探討臨床 DHF 病患，加護病房嚴重發炎反應的病患，發炎反應物質與心臟舒張功能的關係以及預後的影響.....	37
第四節 一般族群中 subclinical inflammation 是否會影響左心室舒張功能的產生，可能的機轉如何?.....	39
第五節 新的左心室纖維化標的- CTGF 和 DHF 的相關性以及可能影響機轉.....	41
第四章 討論.....	44
第一節 TNF- α 及 IL-6 可能透過 transcription level 的抑制，影響 SERCA2 現.....	44
第二節 探討 TNF- α 可能影響 SERCA2 的機轉(pathway)，是否直接影響心臟舒張功能以及是否可以被藥物所反轉-細胞及動物實驗模式.....	46
第三節 探討臨床 DHF 病患，加護病房嚴重發炎反應的病患，發炎反應物質與心臟舒張功能的關係以及預後的影響.....	49
第四節 一般族群中 subclinical inflammation 是否會影響左心室舒張功能的產生，可能的機轉如何?.....	52
第五節 新的左心室纖維化標的- CTGF 和 DHF 的相關性以及可能影響機轉.....	57
第五章 結論及展望.....	61
第六章 論文英文簡述.....	66
第七章 參考文獻.....	74

第八章 圖表.....	85
第九章 附錄.....	133





圖 目 錄

圖 2-1 如何量測二尖瓣流入血流, E 波以及 A 波.....	85
圖 2-2 診斷舒張性心衰竭的流程圖(2007 年歐洲心臟科學會共識).....	86
圖 2-3 預設體脂肪影響左心室舒張功能的結構方程模式圖.....	87
圖 2-4 如何由心臟核磁共振造影 T1 量測細胞外體積.....	88
圖 3-1 TNF- α 及 IL-6 在 HL-1 心肌細胞上, 以轉錄調控的方式來減少 SERCA2 基因的表現, 影響促進子, mRNA, 乃至於蛋白質濃度的整體表現.....	89
圖 3-2 HL-1 心肌細胞中的 TNF- α 及 IL-6 對 SERCA2 鈣離子通道電流的影響.....	90
圖 3-3 重症病患血清(PAT)相較於對照組(CTL)血清作用在 HL-1 心肌細胞上, 對於 SERCA2 蛋白質濃度以及 mRNA 量的影響.....	91
圖 3-4 心肌細胞的 TNF- α 經由 SERCA2 基因啟動子區域中的 NF- κ B 反應單元區來調控 SERCA2 鈣離子通道的表現.....	92
圖 3-5 TNF- α 誘導的訊息傳遞子及轉錄活化子.....	93
圖 3-6 TNF- α 誘導的訊息傳遞子及轉錄活化子, 經由 NF- κ B 反應單元活化下游的反應路徑, 導致 NF- κ B p65 次單元體轉化入細胞核中.....	94
圖 3-7 TNF- α 對 HL-1 心肌細胞中 SERCA2 鈣離子通道表現的影響受到 NF- κ B 蛋白抑制劑 PDTC 所阻斷.....	95
圖 3-8 TNF- α 對 HL-1 心肌細胞中 SERCA2 鈣離子通道表現的影響受到已知的 TNF- α 抑制劑, simvastatin 所阻斷.....	96
圖 3-9 TNF- α 經由 NF- κ B 反應單元抑制 SERCA2 表現的路徑在動物實驗中因使用 simvastatin 所阻斷.....	97
圖 3-10 血漿中的 TNF- α 上升影響心臟的舒張功能路徑, 在動物實驗中因使用 simvastatin 所阻斷.....	98



圖 3-11 整體模式圖顯示 TNF- α 抑制 SERCA2 表現同時導致心臟舒張功能不良的訊息傳導方式.....99

圖 3-12 以純粹舒張性心衰竭病患為例，血漿中的 TNF- α 及 IL-6 和心臟超音波下，各項心臟舒張功能指標的相關性.....100

圖 3-13 以嚴重燒傷病患為例，血漿中的 TNF- α 及 IL-6 和心臟超音波下，各項心臟舒張功能指標，以及燒傷面積的相關性.....101

圖 3-14 在嚴重燒傷的群體上，根據左心室舒張功能 Kaplan-Meier 圖.....102

圖 3-15 以結構方程分析得到的機轉路徑模式圖.....103

圖 3-16 在舒張性心衰竭病患上，血漿中 connetive tissue growth factor(CTGF)和心臟超音波下，各項心臟舒張功能指標的相關性.....104

圖 3-17 心臟核磁共振造影下的細胞外體積(ECV)和血漿中的 connetive tissue growth factor(CTGF)相關性.....105

圖 3-18 舒張性心衰竭的動物模式與正常動物血行動力以及超音波型態的差異...106

圖 3-19 組織中 CTGF 和心臟舒張功能的相關性.....107

圖 3-20 拉力刺激心肌細胞後，觀察釋放到培養液中的 CTGF 濃度.....108



表 目 錄

表一 群體一中實驗組與對照組之間的基本資料，超音波型態與血清中的 激素濃度.....	109
表二 群體二加護病房嚴重病患的基本資料與血漿中激素濃度.....	111
表三 群體三燒傷病患的基本資料以及血漿中的激素濃度.....	113
表四 在群體二嚴重疾病病患轉入轉出加護病房前後的血漿中 Interleukin-6, tissue necrosis factor-alpha, 以及心臟超音波變化.....	115
表五 群體三燒傷病患轉出轉入加護病房前後的血漿中 Interleukin-6, tissue necrosis factor-alpha, 以及心臟超音波舒張功能指標.....	116
表六 以 Cox regression 模式分析影響燒傷病患住院死亡率的因素.....	117
表七 群體一中實驗組與對照組的基本資料與心臟超音波資料.....	118
表八 群體二正常腎臟功能與腹膜透析病患的基本資料，心臟超音波資料與血漿中 的激素濃度	120
表九 Pearson bivariate 相關分析脂肪組織與臨床資料的相關性.....	122
表十 多變項迴歸分析決定和左心室舒張功能不良發生的相關因子.....	123
表十一 根據結構方程做路徑分析.....	125
表十二 多變項迴歸分析決定腹膜透析病患和左心室舒張功能不良發生的 相關因子.....	126
表十三 將舒張性心衰竭(DHF)病患依照舒張功能的嚴重程度分組，條列 DHF 病患 以及對照組基本資料，血漿中的 CTGF 濃度.....	127
表十四 線性多變項分析在舒張性心衰竭病患中影響心臟超音波 E/e' 數值 的因素.....	129
表十五 主動脈狹窄手術與對照組的狗在手術前後(兩個禮拜)的基本資料，血行動 力變化，心臟超音波資料.....	130

表十六 線性多變項分析在動物模式中影響心臟超音波 E/e'數值的因素.....132





中文摘要

本研究的目的，主要在於發炎反應物質(proinflammatory cytokines)和左心室舒張功能不良(left ventricular diastolic dysfunction)發生的可能分子機轉。首先研究血漿中的蛋白質對於舒張性心衰竭發生機制的影響，過去的研究顯示 SERCA2(sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase)是影響舒張性心衰竭生成最重要的鈣離子通道，過去的研究也顯示 SERCA2 的功能跟質量都明顯的影響舒張性心衰竭的發生率。我們的初步研究顯示，血漿中的 angiotensin II 對於 SERCA2 促進子(promoter)的影響程度不及 tissue necrosis factor ($TNF-\alpha$) 或者 interleukin-6 (IL-6) 等前發炎反應物質，因此以心肌細胞模式研究 $TNF-\alpha$ 或者 IL-6 影響 SERCA2 表現的訊息傳導模式。我們使用 HL-1 心肌細胞，複製促進子前 1754 核苷酸片段，藉由質體導入 HL-1 心肌細胞中，接著分別研究 $TNF-\alpha$ 或者 IL-6 對於促進子的影響，直接刺激 HL-1 細胞對於 mRNA，蛋白質總量的改變。結果發現 $TNF-\alpha$ 或者 IL-6 可以抑制 SERCA2 促進子的活性乃至於 mRNA，蛋白質的量，甚至改變鈣離子通道回收鈣離子的能力(鈣離子電流坡度變得平緩)。接著研究影響 SERCA2 最強的激素- $TNF-\alpha$ 可能抑制 SERCA2 的機制，同樣使用 HL-1 細胞，加入 $TNF-\alpha$ 後研究下游可能的機轉，結果首次發現， $TNF-\alpha$ 藉由 Nuclear Factor-KappaB (NF- κ B) 反應單元結合蛋白機轉抑制 SERCA2 基因的表現，同時進一步抑制左心室的舒張功能。我們同時也在動物模式中驗證上述細胞模式所發現的機轉，以 lipopolysaccharide(LPS) 刺激大鼠，引發血漿中的 $TNF-\alpha$ 上升後上升後，同樣會經由上述的機轉使得大鼠的左心室舒張功能變差，但使用 NF- κ B 抑制劑-PDTC 或者 simvastatin 來抑制發炎反應卻可以在細胞模式中使得此機轉阻斷，SERCA2 的量回升。同樣在動物模式下，利用口服的 simvastatin 給予大鼠服用，抑制血漿中的 $TNF-\alpha$ 上升，對比對照組的老鼠發現，經由抑制 NF- κ B 反應單元結合蛋白機轉不僅使得 SERCA2 的量回升，也同樣可以改善左心室的舒張功能不良。



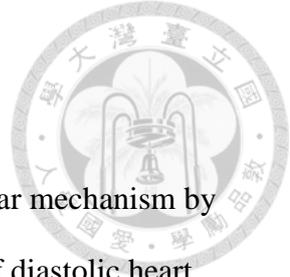
臨床的研究上，也研究血漿中的前發炎反應物質如 TNF- α 或者 IL-6 上升和左心室舒張功能各項指標的相關性。首先，我們研究血漿中的 TNF- α 或者 IL-6 和心臟超音波下各項標準的評估左心室舒張功能的指標。第一個研究的群體是單純舒張性心衰竭的病患，第二個群組則引入 30 位加護病房的病患同時具有左心室舒張功能不全者。我們發現在單純舒張性心衰竭病患血漿中的 TNF- α 或者 IL-6 和超音波下的左心室舒張功能指標有顯著的相關性(各項指標 $P < 0.01$)，同時在嚴重的病患血漿中的發炎反應指數上升，左心室舒張功能也明顯地變差，當病患狀況改善時，發炎指數和左心室舒張功能也平行的發生改善。接著引入了極端發炎反應的病患也就是 56 位嚴重燒傷的病患，在這樣的族群當中，發現不僅發炎指數更顯著地和左心室舒張功能的超音波指標明顯的相關，同時經過迴歸分析校正之後，左心室舒張功能在這樣的病患更是影響預後的一項獨立因子(HR = 3.99, p = 0.038)。

以上為住院病患具有高發炎反應的患者，為了評估一般族群中前發炎反應是否與左心室舒張功能不全的發生有關，我們選擇臨床門診比較常見，血漿中可能前發炎反應會較正常人高的族群，第一個族群選取了 102 位肥胖的族群，血漿中的發炎指數顯著的上升，同時以斷層掃描定義內臟脂肪(visceral fat)的多寡，以心臟超音波評估病患是否有左心室舒張功能不全。使用結構方程分析後發現，內臟脂肪主要可以透過發炎反應的產生來導致左心室舒張功能不全的發生，而不是因為脂肪滲透引起心臟功能不全的發生。另外一個族群則選取腹膜透析的病患，我們比較發炎反應，腹膜透析，左心室舒張功能不全三者之間的關係，發現發炎反應本身是和左心室舒張功能不全發生一項獨立的因子，腹膜透析也是和左心室舒張功能不良發生一項顯著的相關因素，同時兩者有交互作用存在，此交互作用可以額外的增加舒張性心臟功能不良發生的機會。最後，我們也研究新的血漿中和組織纖維化相關的激素 connective tissue growth factor (CTGF)，我們利用臨床上台灣



舒張性心衰竭群體資料，左心室肥厚的狗模式，心肌細胞模式三種不同的模式來分析，第一次發現血漿中的 CTGF 和嚴重舒張性心衰竭的心臟超音波 E/E' 有明顯的相關性存在，另外以核磁共振(MRI)評估左心室的舒張功能也發現，心臟纖維化的程度也和血漿中的 CTGF 明顯的相關，在動物模式上，組織的 CTGF 和心臟纖維化的程度經過兩週後平行的上升了，同時 CTGF 的濃度和血壓的變動有顯著的相關性存在，更是回歸分析後影響心臟舒張功能不良發生的獨立因素。

總結而言，本研究利用動物、細胞模式及基礎分生研究來證實前發炎反應物質 (TNF- α) 和舒張性心衰竭發生的可能分子機轉，進而發現 simvastatin 可以阻斷 TNF- α 訊息傳遞，有治療舒張性心衰竭的效果，再不同程度的發炎反應病患身上驗證了 TNF- α 等前發炎反應物質和左心室舒張功能指標的相關程度，並推論出內臟脂肪，腹膜透析都可以透過發炎反應或者交互作用引起左心室的舒張功能不全發生，另外也驗證了新的纖維化指標 CTGF 可以作為預估左心室舒張功能不全，或者新的治療方法的依據。



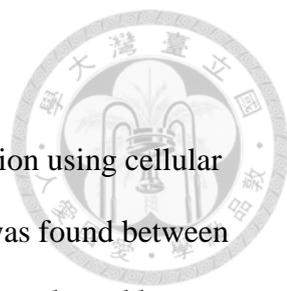
Abstract

The aim of the present doctoral thesis is to investigate the molecular mechanism by which proinflammatory cytokines are involved in the pathogenesis of diastolic heart failure (DHF). We try to find the mechanism by which inflammatory cytokines influence cardiac diastolic function. We realized that the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) is essential to the regulation of intracellular calcium levels in cardiac and is crucial for the development of DHF. Our pilot study reveal that Angiotensin II does not appear to exert an effect on SERCA2 levels in cardiomyocytes, but pro-inflammatory cytokines such as tissue necrosis factor- α (TNF- α) or IL-6 have even greater effect over SERCA2 expression in cardiomyocyte models. Regarding TNF- α or IL-6 and SERCA2 signal transduction, we investigated whether TNF- α or IL-6 modulates SERCA2 calcium current through transcriptional regulation, using a HL-1 cells model. We cloned a 1754 bp promoter fragment of rat SERCA2 gene and amplified by polymerase chain reaction (PCR). We determined that TNF- α or IL-6 decreased SERCA2 mRNA, protein levels and SERCA2 promoter activities, which resulted in an attenuation calcium transient. Accordingly, in the following study, we explored the pathway of TNF- α on the transcriptional regulation of SERCA2 cardiomyocytes. We first found that TNF- α decreased SERCA2 gene expression and induced left ventricular (LV) diastolic dysfunction through Nuclear Factor-KappaB (NF- κ B) Element - Binding Protein - Dependent Pathway. We also used an in vivo rat model of hyper-TNF- α to verify the results obtained in the cellular study. The upstream NF- κ B dependent pathway was critical for TNF- α - induced decreased transcription of SERCA2 gene. The NF- κ B blocker (PDTC) and pre-incubation of simvastatin inhibited TNF- α - induced NF- κ B dependent pathway and augmented expression of



SERCA2 gene which in turns lead to improvement of LV diastolic function in a in-vivo rat model of LPS injection.

Regarding clinical studies, to evaluate the association between cytokines (TNF- α or IL-6) and left ventricular dysfunction indices, first, we sought to assess plasma levels of IL-6 and TNF- α in patients with DHF, including critically ill patients. We included several groups of patients. The first group consisted of pure DHF patients, and the second group enrolled 30 consecutive patients with left ventricular diastolic dysfunction that were admitted to the intensive care units (ICUs). Significant correlations ($p < .01$ for each) were found for TNF- α , IL-6 and cardiac diastolic dysfunction indices. Cytokine levels were also correlated with diastolic function in critical ill patients, and diastolic function improved significantly in association with decrease of cytokines. We later included 56 critically burned patients and we found that there was a significant correlation between LV diastolic dysfunction and in-hospital mortality in critically burned patients (HR = 3.99, $p = 0.038$) after risk factors adjusted. Regarding the patients in the general population with higher inflammatory status, we further included 2 other groups of patients to prove the above hypothesis. First we we included 102 obese adults. In this study, we found a significant association between LV diastolic dysfunction and fat content as measured by CT. With the analysis, we verified that fat deposition acts mainly through inflammation to affect LV diastolic dysfunction and less by its own effect (e.g. fat infiltration of LV). We also tried to establish the association between inflammation and LV diastolic dysfunction in peritoneal dialysis (PD) and non-PD patients. We established that an interaction between PD and inflammation, especially TNF- α , was also shown to further aggravate LV diastolic dysfunction. Finally, we investigated an emerging marker for tissue fibrosis, connective tissue



growth factor (CTGF) and its association with cardiac diastolic function using cellular and animal models and clinical human data. Significant correlation was found between plasma CTGF and E/e' in DHF patients. Severity of cardiac fibrosis evaluated by CMRI also correlated with CTGF. In the cell model, stretch increased secretion of CTGF from cardiomyocytes. In the canine model, myocardial tissue CTGF expression and fibrosis significantly increased after 2 weeks of aortic banding.

In conclusions, the present doctoral thesis combined animal, cell models and molecular studies to demonstrate how cytokines (including $TNF-\alpha$, IL-6 and CTGF) are involved in the pathogenesis of cardiac fibrosis, SERCA2 regulation, which are important substrates of DHF. Current study also discovered that simvastatin could block $TNF-\alpha$ signal transduction which could be beneficial for the treatment of DHF. By testing the association of $TNF-\alpha$ and LV diastolic dysfunction parameters in patients with different severities of DHF, we could conclude that both visceral fat, PD could interact with inflammation, which in turns, lead to the development of LV diastolic dysfunction. Finally, we provided evidence that CTGF could be a marker for LV diastolic dysfunction and also targets of treatment.



Abbreviations and Acronyms (縮寫)

HFpEF= heart failure with preserved systolic function

DHF = diastolic heart failure

LVEF = left ventricular ejection fraction

LVEDV = left ventricular end-diastolic volume

E/E' : E=early mitral valve flow velocity; E' = tissue Doppler early diastolic length

NT-proBNP = N-terminal-probrain natriuretic peptide

LAVI = left atrium volume index

LVMI= left ventricular mass index

ACE= angiotensin converting enzyme

ARB= angiotensin receptor blocker

SHF = systolic heart failure

LCC = L-type calcium channel

RYR2 = the cardiac isoform of ryanodine receptor

SERCA2 = sarcoplasmic reticulum calcium channel pump 2

NCX = sodium-calcium channel

PLN = phospholamban

TNF- α =tissue necrosis factor-alpha

IL-6 = interleukin-6

VLDL = very low-density lipoprotein)

LDL= low-density lipoprotein

TG= triglyceride

HDL =high-density lipoprotein

CTGF = connective tissue growth factor

PDTC = ammonium pyrrolidinedithiocarbamate

ELISA = high-sensitivity enzyme-linked immunosorbent assays

PD= peritoneal dialysis





第一章 緒論 (Introduction) – 背景與文獻回顧

第一節 心衰竭的重要性

心衰竭是各種心臟疾病的最終結果，像是瓣膜性心臟病和冠狀動脈疾病，病情最後的結果，就是變成慢性心衰竭。不論是心臟收縮或是舒張的過程中出現異常，都有可能造成心臟衰竭。根據統計，心衰竭的盛行率逐年上升(McCullough, Philbin et al. 2002)，這樣的原因一部分是因為年齡組成的老化，另一部分則是因為藥物治療的大進步(Weber, Brilla et al. 1993)。

美國 Framingham 研究指出，心衰竭不論是發生率或是盛行率都是隨著年齡的上升而增加。經年齡校正過後，美國心衰竭的盛行率為男性每千人 24 人，女性則為每千人 25 人(Hanatani, Yoshiyama et al. 1995)。在芬蘭，75-86 歲的老年，心衰竭的盛行率為 8.2%。而在葡萄牙大於 25 歲的成年中，心衰竭的盛行率 4.36%(Goette, Staack et al. 2000)。在台灣，利用金山地區所進行的世代追蹤研究指出，心衰竭的發生率為 5.5% (Huang, Chien et al. 2007)。而就發生率而言，美國 Framingham 研究指出，經年齡校正過的心衰竭發生率為男生每年每千人 7.2 案例，女生則為 4.7 案例。這發生率隨著年齡的上升而增加。在大於 75 歲以上的成年，發生率則為每千人 40 案例。就死亡率而言，新診斷的心衰竭病人中，六個月的死亡率為 14%(Jeunemaitre, Soubrier et al. 1992)，因心衰竭住院的病人中，死亡率為 10%，而這些病人一年的死亡率為 32%。以上的流行病學可知，心衰竭在現今的醫療環境之下仍然是非常重要的一個疾病與衛生議題。

第二節 正常收縮功能心衰竭(heart failure with preserved systolic function)與左心室舒張功能不全

1.2.1 正常收縮功能心衰竭定義及診斷

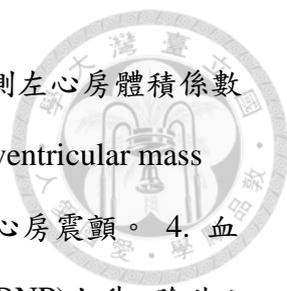
在心衰竭的病人中，有一部分的病人，他們心臟的收縮功能是正常的。這些



人早期被區分為舒張性心衰竭，目前新的名稱為正常收縮功能心衰竭(heart failure with preserved systolic function, HFpEF)。這些病人心臟的收縮力在超音波的測量下和一般族群差不多，所以稱為正常收縮功能，但臨床上卻有心衰竭的症狀，比如肺水腫發作，腳腫，氣促等符合 Framingham criteria 定義的心衰竭。這類的病人往往左心室的舒張功能是不正常，也往往因為長期心臟舒張功能不全，導致水分無法回流至左心房，左心室內，導致左心房終端壓力上升而最終表現心衰竭的症狀。在這樣的病患引起心臟舒張功能不全機制很多，過去認為最有可能的原因便是糖尿病，高血壓和動脈硬化。糖尿病及高血壓都可以導致動脈及心肌的硬化，血管壁因為高血壓之張力而受損，也可能因血糖高造成糖化代謝物的堆積，進一步纖維化，最終的結果就是動脈硬化，而動脈硬化可能藉由壓力的反彈，造成心臟後負荷的上升，增加心肌細胞的氧氣需求，並同時減少舒張時流入冠狀動脈的血流，最終造成了心臟舒張功能的惡化。如果仔細探究其病理機制，最主要可以分為四大類包括一、心肌舒張不良(impaired relaxation)，二、增加心肌硬化 (increased passive stiffness)，三、心包膜疾病 (pericardial disease)，心肌疾病 (endocardial disease)，以及四、神經賀爾蒙的影響 (neurohormonal regulation)(Angeja and Grossman 2003)。在診斷方面，舒張性心衰竭的診斷基本上包含了 1.正常或輕度異常的左心室收縮功能，2.臨床上心衰竭的表現或症狀，3.左心室舒張功能不良的證據。目前已有研究指出，隨著人口逐漸老化，目前約有接近百分之五十的心臟衰竭患者皆屬於”相對”正常收縮功能(relatively preserved systolic left ventricular function)之心臟衰竭，而且此類病患跟收縮性心臟衰竭相比並不會有較佳的預後。近年來，由於新藥物的開發，使得收縮性心衰竭的預後有了明顯的改善，但是因為針對正常收縮功能之心臟衰竭的藥物發展上並沒有顯著的突破，所以預後在近年來也沒有顯著的改善。至於何謂超音波下心臟的收縮功能不良？在 2001 年的美國心臟科學院及學會規範 (American College of Cardiology/American Heart Association guideline)對於舒張性心衰竭的定義是：有明顯的心臟衰竭症狀，同時



有正常的左心室射出率 (left ventricular ejection fraction, LVEF)，且在超音波檢查下沒有明顯的瓣膜疾病，再加上有左心室舒張不良的證據三樣條件。歐洲的團體則認為在超音波下有左心室舒張，填充不良的證據則可認定為明顯左心室舒張不良的證據(1998)。至於在超音波的檢查上，美國超音波學會已訂立可以用二尖瓣的流入血流型態 (mitral valve inflow E/A ratio)，流入血流的減速率 (deceleration time)，組織都卜勒的型態 (tissue Doppler Em/Am)，肺靜脈流入血流的都卜勒型態 (Pulmonary vein inflow S/D/A flow pattern)(Reich, Duncan et al. 2003)，來作為病人有舒張性障礙的標準。根據最新對於舒張性心衰竭的定義，在 2007 年歐洲心臟學會指引中對 HFpEF 的診斷定義做了新的調整，在診斷 HFpEF 上整合了 LVEF，left ventricular end-diastolic volume (LVEDV)，左心室舒張功能指標，左心室肥厚，左心房大小，以及血中的 natriuretic peptides 等，而訂立出新的診斷流程圖(Takahashi, Murakami et al. 2000; Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008)。大體而言，正常的左心室的射出分率(LVEF)是指大於 50% 或者左心室舒張末期容積指數(LVEDV index <97 ml/m²)被視為正常左心室功能的臨界指標。測量 LVEDV 常常會過度計算，所以需依照美國超音波或者歐洲超音波學會的準則小心測量。另外在測量 LVEF 上，並不需要在診斷心衰竭的 72 小時內做測量，在 HFpEF 的病患，LVEF 以及左心室的大小，大體上不會因為急性症狀而有所改變。歐洲心臟學會指引中，對舒張功能不全的測量，提供了更客觀的量測方法。在侵入性的檢查方面，包括測量肺部微血管的 wedge pressure >12 mmHg，左心室末舒張壓(Left ventricular end diastolic pressure >16 mmHg)，左心室舒張的時間常數(τ >48ms)，左心室硬化係數 ($b > 0.27$) 等。而在非侵入性的檢查，目前首推心肌的組織都卜勒(tissue doppler, $E/E' > 15$)(E =early mitral valve flow velocity; E' = tissue Doppler early diastolic lengthening velocity)，如果 E/E' 在 8~15 之間時，需要加上其他超音波的客觀標準如下：1. 二尖瓣血流都卜勒(病患 50 歲以上， E/A 比值<0.5，deceleration time > 280 ms)或肺靜脈血流 ($Ard-Ad >30$ ms) (Ard : duration of atrial reverse pulmonary vein flow velocity;



Ad: duration of atrial mitral valve flow velocity)。2. 以超音波量測左心房體積係數上升(Left atrial volumn index >40 ml/m²)或左心室質量係數(Left ventricular mass index:女性大於 122 g/m²; 男性 >149 g/m²)。3. 心電圖顯示為心房震顫。4. 血清中 brain natriuretic peptide (BNP)或 N-terminal-proBNP (NT-proBNP)上升。除此之外，由於 HFpEF 的診斷偽陽性較高，所以新的 guideline 也提供了排除 HFpEF 的流程圖(圖 1-2)，如果病患僅只是呼吸困難，但是血液中的 BNP <100 pg/ml 或 NT-proBNP <120 pg/ml，心衰竭的診斷，便因為 BNP 具有高度的陰性預測值而可以排除。另外如果病患的心臟收縮功能正常，LVED volume index <76 ml/m²，病患並沒有心房震顫，沒有左心房擴大(left atrium volume index, LAVI <29 ml/m²)，沒有左心室肥大(left ventricular mass index, LVMI: female <96 g/m²; male <116 g/m²)，同時 tissue Doppler shortening velocity >6.5 cm/s 且 E/E' >8 ，基本上 HFpEF 的診斷便可以排除(如圖 1-2)。總而言之，綜合目前現行的規範，舒張性心衰竭的公認的指標為，臨床上有明顯心衰竭的症狀，加上正常的左心室射出率，沒有其他瓣膜或者心包膜疾病，加上超音波可證明有舒張功能不全的證據便可以診斷病人為舒張性心衰竭(Takahashi, Murakami et al. 2000; Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008)。

1.2.2 HFpEF 治療的瓶頸與目前藥物治療的臨床研究結果

過去 20 年當中，收縮性心衰竭的預後因為使用藥物的關係而有了長足的進展。但是舒張性心衰竭，相對的，即使使用相同的藥物，卻並沒有在預後方面有明顯的進步。在著名的 CHARM-Alternative study，以及最近的 I-PRESERVE 研究(Massie, Carson et al. 2008)都發現在 HFpEF 及對照組身上同時使用 angiotensin receptor blocker (ARB)並不會影響預後，這樣的結果和收縮性心衰竭有很大的差異，原因可能在於心肌的再塑(remodeling)以及訊息傳遞在兩者是不同的。收縮性心衰竭(SHF)的病患在心肌的再塑通常是偏心圓(eccentric)，同時低 LV 質量容積比(mass/volume)，但 HFpEF 則是同心圓式(concentric)的心肌再塑，而有高的 LV 質

量容積比。而心肌細胞在 SHF 會失去心肌微束(microfilaments)，而在 HFpEF，卻是以心肌肥大來表現。接下來討論各種藥物的使用在兩種不同心衰竭(systolic heart failure, SHF VS HFpEF or DHF) 的差別。

在血管收縮素轉化酵素抑制劑 (angiotensin converting enzyme inhibitor, ACE inhibitor)應用於心肌梗塞後病患的研究上，PREAMI trial 研究的對象是: LVEF>40%，NYHA class I-II 的病患，結果發現，病患使用 8 mg 的 perindopril 後可以減少 eccentric LV 的再塑。但是這樣的結果卻沒有辦法應用在一般 HFpEF 的病患，因為其心肌是 concentric 的再塑(van Heerebeek, Borbely et al. 2006)。另外由 Aronow 所做的研究發現，enalapril 應用於 AMI 後，LVEF>50%的病患，相較於 hydralazine+isosorbide dinitrate 的組合可以有效的改善死亡率，但同樣的，藥物施用的族群仍然是以 eccentric LV 再塑為主的族群 (a cardiothoracic ratio >0.55 or an echocardiographic LV end-diastolic dimension index >2.7 cm/m²)。PEP-CHF study，則是第一個針對 DHF 的 ACE inhibitor 隨機對照研究(Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008)。研究的對象是以年紀在 70 歲以上，LVEF>40%，心臟超音波下發現 LA 擴大，LV 肥大，或者 mitral flow Doppler velocity 異常的心衰竭病患，結果發現在死亡率及住院率都沒有明顯的差異。同樣的 OPTIMISE-HF registry(包括 76%高血壓以及 62%女性病患)，也發現在 DHF 的族群出院後使用 ACE inhibitors 對於病患在 60-90 天的再住院率並沒有明顯的差異。在香港所做的 DHF 研究設計和之前的研究不一樣，研究的對象分為 1. 僅使用利尿劑，2. 使用利尿劑加上 ramipril，3. 利尿劑加上 irbesartan，結果發現三組的住院率及運動耐受力的改變是沒有差異的，但是發現加用 ACE inhibitor or ARB 的族群，有比較低的 NT-proBNP 的數值，同時以心臟超音波追蹤的研究也發現，mitral annular velocity 的 S (systolic)及 E' (early diastolic)都上升。最後在 ALLHAT trial 當中(Davis, Kostis et al. 2008)，發現 chlorthalidone 相較於 lisinopril 可以減少新發生 DHF 的機會，但是對於 SHF 的新發生率，兩者的效果卻是差不多的。目前的假設是。當病患處於前症狀期

(presymptomatic)，心肌的再塑已由不同的基因決定不同疾病(DHF or SHF)的變化以及表現，這樣的假設，和目前我們初步對於 DHF 的特定基因發現是不謀而合的。

在 ARB 的研究上更為多采多姿。在一項以心臟超音波下 LV 舒張功能不良同時運動時血壓上升的病患為對象的研究上(mitral flow velocity Doppler evidence of diastolic LV dysfunction)，Losartan 相較於安慰劑或者 hydrochlorothiazide 可以改善運動的耐受性，以及生活品質。但不同的，valsartan 對於高血壓以及心臟超音波下心臟舒張功能異常(TDI evidence of diastolic LV dysfunction)的族群研究卻發現，valsartan 相較於其他的降血壓藥物，並沒有辦法改善 TDI 下的 E' (early diastolic mitral annular lengthening velocity)值。第一個大規模針對 DHF 族群使用 ARB 的預後以及心衰竭住院率的研究首推 CHARM-preserved trial，蒐羅了 3023 個 DHF 的病患分別使用 candesartan 以及安慰劑，結果雖然發現使用 ARB 的族群可以減少心血管疾病死亡率以及心衰竭住院的機會，可是所參與研究的族群 56%是以缺血性心血管疾病為主，只有 23%是由高血壓引起 DHF，且男性佔了大部分，和傳統認知的 DHF 仍有很大的差異。以心臟超音波的結果來分析，在 CHARM-preserved 所蒐集的病患 LV mass /LV volume 的比率為 1.4，和正常族群的 1.3 相去不遠，可是和 DHF 定義的 1.7 倍卻有很大的差異。至於 Irbesartan 則在 I-PERSERVE trail 以及 Hong Kong diastolic heart failure study 作為和安慰劑對照的用藥。結果發現 irbesartan 並不能改善 DHF 的住院率。I-PERSERVE 的研究對象是女性為主(60%)，高血壓佔多數(88%)，同時超音波的研究也發現左心室肥大(30%)，和一般認知的 DHF 較為接近。

相對於 ACE inhibitor 及 ARB，更少的有力證據支持乙型阻斷劑(β -blocker)在 DHF 病患上的使用。一項由 Dobre 等作者所做的 registry 研究上，針對心肌梗塞後，但心臟收縮功能正常的病患，發現乙型阻斷劑約可減少 43%的死亡率，但是同樣的，這樣的族群心肌的 remodeling 是以 eccentric 為主，和 DHF 所認知的 concentric 變化有所不同。針對典型 HFpEF 病患較有代表性的研究如 SWEDIC trial 是以超音波



的 wall motion score 來排除可能因為心肌梗塞造成的 dyskinetic 變化，同時也以年齡來校正 mitral or pulmonary venous flow velocity Doppler。謹慎的將典型 HFpEF 的病患挑選出來後，分成以 carvedilol 治療六個月的族群和對照組做比較，結果發現無論是症狀，或者超音波下的 diastolic indices 都沒有改善。

其他的藥物如 aldosterone antagonist，毛地黃以及鈣離子阻斷劑都被應用於評估對 HFpEF 的治療效果。在小規模使用 spironolactone 對於 DHF 病患的研究上，每天使用 25 mg 的藥物，似乎可以改善左心室後壁的厚度，左心房的容積和 strain，strain rate 等舒張功能指數，但是對於臨床上運動功能並沒有顯著的改善，大規模的隨機試驗仍在進行當中。針對 digoxin 和竇性心率的心衰竭病患研究當中，無論是 SHF 或是 DHF，digoxin 都可以改善住院率，但都不會改善整體的死亡率。另外鈣離子阻斷劑(verapamil)，則被報導過在肥厚性心肌病變的病患上，可以改善左心室的收縮率以及舒張功能。最後，初步的研究顯示 statin 的治療對於 DHF 的預後是有利的(Fukuta, Sane et al. 2005)。Statin 的使用有助於左心室肥厚的改善，減少心肌纖維化，在 DHF 病患上使用，可以明顯的減少死亡率，而在同樣的族群分析上，無論是 ACE inhibitor，ARB，乙型阻斷劑，或是鈣離子阻斷劑都沒有辦法改善整體死亡率。Statin 對於 SHF 病患的治療在 CORONA trial 中顯示是沒有明顯效果的。但是相反的對於治療 DHF 或是 HFpEF 的病患，卻似乎有實質上的助益。這樣的結果可用以下的機制來解釋：DHF 和 SHF 無論是心肌結構，或者功能上的變化是不一樣的，DHF 主要是以心肌肥厚，心肌硬化增加，抑或是血糖轉化成 free fatty acid 出現異常為主。綜合上述的文獻回顧以及過去的研究可以發現，由於 HFpEF 相對傳統心衰竭是新興卻盛行率高，影響健康經濟重大的疾病，由於對於疾病機制的了解到近年來才有共識，因此診斷的原則也在近年的 guideline 才有一致的準則，過去大規模的臨床試驗很少(僅只有 3~4 個)，而且這些臨床試驗對於 HFpEF 的定義也不符合最新歐洲指引的定義，也因為這些的限制，使得目前的臨床研究沒有具體的發現對於 HFpEF 確定有好處而且是一定須要使用的藥物。在 2012 年美國

心臟學會的 guideline 針對 HFpEF 的建議上，class I 的處理準則只包括合理的控制血壓血糖，以利尿劑處理病患 fluid overload 的症狀，避免生活的危險因子(高鹽，高血脂)等，主要的限制便是**缺乏正確診斷，大規模，長期的臨床追蹤研究**。總結而言，上述許許多多的藥物研究以及臨床試驗發現，HFpEF 的病患目前並沒有一個有效的藥物如同一般的心衰竭一樣，可以確定的改善病患的預後，因為這是一個特殊的疾病，目前對於其機制了解的依然有限，正確的診斷標準也是在近年來才比較確立，所以過去並沒有依照正確診斷所做的長期追蹤研究。初步的研究結果看來，似乎依然是 ACE inhibitor/ARB 類的藥物，以及 statin 類的藥物對於這個疾病的長期預後是有幫助的。

第三節 鈣離子通道在心臟舒張功能不良的角色

1.3.1 分子機制，鈣離子通道以及心臟功能

在正常的心臟收縮的時候，鈣離子由 L-type calcium channel (LCC) 流入心肌細胞中，便會促進心肌細胞內的 sarcoplasm 釋放儲存的鈣離子，釋放鈣離子的主要通道蛋白是 ryanodine receptor (RyR2, the cardiac isoform of RyR)。鈣離子釋放的結果會使細胞內鈣離子的濃度由 0.1–0.2 μM 提高至 2.0–10.0 μM 大量的鈣離子和肌小節(sarcomere)中肌動蛋白(actin)的 troponin complex 結合，actin 上面原本被 tropomyosin 抑制的活動區(active site)便暴露出來，可以和 ADP 結合，actin 滑動，促使心肌細胞收縮(Lipskaia, Chemaly et al. 2010)。由上述機制可以發現，LCC 通道以及 RYR2 的鈣離子通道和心肌的收縮功能會有明顯的相關。而當心肌細胞收縮完畢，當心肌需要舒張的時候，此時鈣離子需要脫離原本結合的區塊，一開始的步驟也是由 RYR2 鈣離子通道的關閉開始，鈣離子和 actin 分離，主要是回收至 sarcoplasm 內或者少部分鈣離子經由耗能反應直接通過 sodium-calcium channel (NCX channel)排出細胞外(約佔所有鈣離子代謝的 25%)，回收至 sarcoplasm 的過程需透過鈣離子幫浦(sarcoplasmic reticulum calcium channel pump 2, SERCA2)，大概



佔了 75% 的鈣離子是由這個幫浦回收至 sarcoplasm 內。因此 SERCA2 對於細胞鈣離子的穩定具有兩種主要功能: (1) 回復 sarcoplasmic 內的鈣離子儲存以供下次心臟肌肉的收縮使用。(2) 回收鈣離子，讓心肌細胞可以舒張。因此由上述可知，SERCA2 一開始的功能不良，可能影響心肌細胞的舒張功能，如果有進一步的功能損壞，就有可能造成心肌細胞的收縮功能也產生了破壞(Bers 2008; Del Monte and Hajjar 2008; Kawase and Hajjar 2008)。最後，鈣離子系統也受到 β -adrenergic 訊息傳遞系統的調控(β AR)，透過磷酸化 phospholamban 蛋白，可以解除這個蛋白對於 SERCA2 的抑制，並加速鈣離子的回收代謝。在緊急狀況或者是慢性心衰竭時， β AR 會受到刺激，引起下游的 adenylate cyclase 活化，再加強 LCC 或者是 RYR2 等鈣離子通道的反應。如果是慢性心衰竭的長期刺激之下，久而久之，細胞內的鈣離子濃度便會上升，相對的鈣離子濃度受到刺激的強度變化就會下降，引起刺激-反應的不協調，也就會引起心肌細胞的功能產生不良的變化。在上述的機制當中，和心臟的舒張功能最相關的便是 SERCA2 的鈣離子通道。SERCA 有三種不同的 isoform，由三種不同的基因所轉錄，在轉錄的過程中經由不同的切割方式形成不同種的 mRNA 片段，其中 SERCA2 基因是特定在心臟表現的基因，也和正常心臟的功能有很大的關連性，特別是左心室的舒張功能。

1.3.2 文獻回顧 – SERCA2 及心臟舒張功能研究

SERCA2 鈣離子通道經由基因剔除或者高表現的老鼠實驗模型證明了作用，在 transgenic mice 的模型當中，心肌細胞中 SERCA2 的表現量是一般老鼠的 1.5~2 倍，結果發現這樣的動物模型，無論收縮或者心臟舒張的能力都比起一般的老鼠來的改善，同時也沒有發現其他的病灶，顯示高表現的 SERCA2 並不會引起併發症(He, Giordano et al. 1997; Baker, Hashimoto et al. 1998; Vetter, Rehfeld et al. 2002)。相反的，如果是基因剔除的老鼠，則可能會引起致命的病變，homozygous(-/-)的基因剔除老鼠在早期發育的時候就會死亡(Periasamy, Reed et al. 1999)，如果是 hetrozygous (+/-) 的老鼠，會有 35% 的 SERCA2 蛋白的減少，也會在成鼠之後產生心臟衰竭，以及



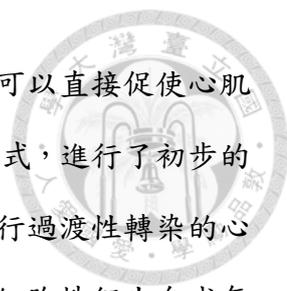
心肌細胞內鈣離子過多的現象。在心臟沒有明顯病變的情況之下，也會因為血行動力的變化，而導致早期的心臟衰竭產生(Schultz Jel, Glascock et al. 2004)，這樣的老鼠無論是收縮或者是舒張功能都產生明顯的缺損。SERCA2 對於舒張性心衰竭的影響是在舒張功能不良最早期的影響因子。以第一型糖尿病鼠產生舒張性心衰竭的模式為例(Basu, Oudit et al. 2009)，Basu et al 利用 Akita^(Ins2WT/C96Y) 轉殖基因鼠代表第一型糖尿病患者併發舒張性心衰竭的機制。這樣的老鼠的心肌經切片顯示並沒有發生組織間的纖維化(interstitial fibrosis)，超音波觀察型態也發現，老鼠的心肌並沒有肥厚，進一步染色做下游的分析發現，主要影響的是 SERCA2 蛋白的含量，經由 Akt/PKB 的機轉影響到心肌細胞中 SERCA2 的含量，進而引起心臟的舒張功能不良。更早的研究也發現，如果是組織中的 SERCA2 發生變性，被不良的 SERCA2 所取代，即使是蛋白的量是充足的也將會影響到整體心臟的舒張功能(Ver Heyen, Heymans et al. 2001)。依照過去所做的研究顯示，SERCA2 整體的質與量些微的變化都可能引起早期舒張功能的改變，在動物模式顯示，經過長時間的 SERCA2 的數量減少，即使心肌沒有發生具體的病變，也可以造成舒張功能不良，因此 SERCA2 蛋白的調控，實為影響及控制心臟舒張功能的決定步驟。

1.3.3 心肌細胞模式 SERCA2 的調控機制及初步研究結果

SERCA2 蛋白可能受到許多鈣離子幫浦相關蛋白的調控。近年來 ryanodine receptor 被指出可能和 SERCA2 結合成巨分子結構而調控鈣離子的回收，另外 Calreticulin 蛋白，也在胞內同時和 SERCA2 交互作用也和 S100A 結合影響到 SERCA2 的功能(Kiewitz, Acklin et al. 2003; Ihara, Kageyama et al. 2005)，最後，phospholamban (PLN) 蛋白及 sarcolipin 也被發現會和 SERCA2 在細胞質以及穿膜部分的區塊作結合而能抑制 SERCA2 幫浦的作用(Asahi, Nakayama et al. 2003; Bhupathy, Babu et al. 2007)。在此簡述最重要的調控蛋白 PLN 調控 SERCA2 的機制如下：在 1970s 年代起發現 SR (sarcoplasm) 的磷酸化可以調控 SERCA2 的功能，後來發現被磷酸化的受體是 PLN 而非 SERCA2，PLN 可能受到 cAMP-dependent



protein kinase A or protein kinase C 的磷酸化(Kranias 1985)，PLN 依附在 SERCA2 受器上，一旦受到磷酸化就會聚合在一起形成 pentamer，原本 PLN 對於 SERCA2 的功能有抑制的作用，當磷酸化之後，鈣離子的通透就會增加(MacLennan, Kimura et al. 1998)。事實上許多 PLN 磷酸化相關的機制也與 SERCA2 的調控有密切的關係，甚至 PLN 基因的突變，轉殖鼠都會影響到 SERCA2 的功能以及心肌細胞的收縮力。而 PLN 主要的去磷酸化蛋白，Protein Phosphatase 1(PP1)(Carr, Schmidt et al. 2002)，如果是基因轉殖鼠具有加強能力的 PP1 就會引起 PLN 的去磷酸化，對於 SERCA2 的抑制能力就會增加，這一類的老鼠不僅是基礎的收縮力比較不好，受到刺激時心臟的收縮力增幅也比較小。後續的研究也就串聯在這樣的機制上面進行，heat-shock protein 20(HSP-20)，也被證明會調控 PLN-PP1 這樣的機轉，透過減弱 PP1 的抑制能力，當過度表現 HSP-20 的功能時，心肌細胞的收縮力也會加強，SERCA2 的功能也隨之而上升。最後談到 S100A1 蛋白(Remppis, Greten et al. 1996; Kiewitz, Acklin et al. 2003)，這個蛋白是連結 PLN，SERCA2 的重要蛋白，也會受到胞內的鈣離子濃度而影響表現，過去的研究也證明，如果天生缺乏 S100A1 的調控，就會引發嚴重的心臟功能不良。上述的許多蛋白不僅是在心臟衰竭的研究上，作為基因治療的一個基礎(Yamada, Ikeda et al. 2006; El-Armouche, Wittkopper et al. 2008)，同時也是引響心臟舒張功能很重要的一個機轉。由上述可知，SERCA2 可以受到許多的蛋白所調控，當然也會直接受到些血清中的激素所影響，舉例來說，在幼鼠心肌培養出的心肌細胞上，加入 angiotensin II，被證明可以抑制 SERCA2 的表現，可是在成鼠的心肌上卻不如此的明顯(Ju, Scammel-La Fleur et al. 1996)，一些重要的發炎反應前驅物質如 tissue necrosis factor-alpha (TNF- α)，也在很早期就證明可以影響到心肌細胞中 SERCA2 的表現(Kubota, Bounoutas et al. 2000)，甚至之後的研究也發現，TNF- α 甚至可以透過 DNA 的修飾來影響 SERCA2 的功能以及活性(Kao, Chen et al. 2010)。相同的 interleukin-6 (IL-6)是許多發炎反應機轉中的中間作用媒介，也被發現可以透過對於促進子(promoter)的影響，使得 SERCA2 的表

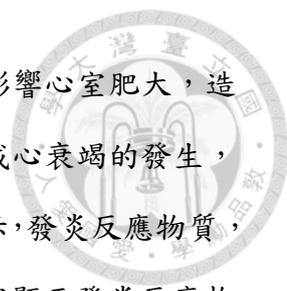


現減少(Villegas, Villarreal et al. 2000)。為了解血清中的何種激素可以直接促使心肌細胞中的 SERCA2 受到最大的影響，我們以 HL-1 心肌細胞為模式，進行了初步的實驗，簡述如下。首先我們使用 HL-1 心肌細胞進行其他需要進行過度性轉染的心肌細胞實驗。由美國紐奧良路易西安那大學所取得的 HL-1 心房細胞株衍生自成年小鼠心房組織 (Tsai-Claycomb et al., 1998)，可依製造商說明以使用 LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) 進行過度性轉染實驗。根據 GFP 螢光顯示，轉染成功率為 60~80%。細胞轉染後 24 小時，接著進行激素刺激與西方墨點分析等實驗。標準化的 luciferase 活性以雙 luciferase 報告者質體分析系統測量，並且用自動冷光儀讀取。SERCA2 的蛋白質濃度利用西方墨點分析，SERCA2 mRNA 的濃度直接用 real-time PCR 的方式測定濃度。首先我們利用聚合酶連鎖反應複製一段 1754bp 老鼠 SERCA2 鈣離子通道蛋白基因啟動子片段，在設計前引子及後置引子，把將近 1.8kb 的聚合酶連鎖反應產物從 *BglII* 與 *HindIII* 切點次轉殖入 pGL3Basic 載體，再把這樣的載體轉殖入 HL-1 心肌細胞，接著再用上述的各種激素來刺激。在初步的實驗當中 (Wu-JRAAS)，發現 Angiotensin II 並不會影響到心肌細胞中 SERCA2 的啟動子表現，也不會影響到蛋白質的含量或者是 mRNA 的表現量。但相對的，如果是發炎反應的物質，比如 TNF- α ，IL-6 則對啟動子的功能有明顯的抑制作用。由上述的初步實驗顯示，發炎反應前驅物質如 TNF- α 或者 IL-6 對於 HL-1 心肌細胞中 SERCA2 的量可能有明顯的抑制的作用，也可能透過這樣的機制，影響到心肌細胞的舒張功能，合理的假設是這些激素可能透過訊息傳遞，影響到啟動子的表現，進而造成 SERCA2 的轉錄轉譯功能受到抑制，鈣離子通透減弱，心臟的舒張功能也受到影響，透過藥物來阻斷這樣的訊息傳遞，或可以改善心臟的舒張功能。

第四節 臨床族群中和 HFpEF 或左心室舒張功能相關的 biomarkers

1.4.1 發炎反應物質與左心室舒張功能之關聯性

過去在心臟衰竭的研究方面，特別提到免疫發炎反應與心臟衰竭的治療可能相



關，過去的研究也顯示發炎反應物質可能影響心臟的收縮力，影響心室肥大，造成心肌細胞的凋亡，甚至進一步影響左心室的重塑而進一步造成心衰竭的發生，尤其系統循環的IL-6以及TNF- α 最受到重視。近年來的研究顯示，發炎反應物質，包括TNF- α and IL-6都和心肌細胞的功能退化有關，也有研究顯示發炎反應物質的濃度高低和心肌功能的退化程度，疾病的分期甚至是可以量化而互相比較的，而濃度的高低和收縮性心衰竭的預後也是息息相關。這些激素的濃度高低可以由影響心肌的收縮力，細胞外間質的堆積而影響到心肌細胞的整體功能(Hirota, Yoshida et al. 1995; Krown, Page et al. 1996; Deswal, Petersen et al. 2001)。近年來一項基因轉殖老鼠的實驗顯示，如果特別在心臟表現此類激素的功能，將造成早期心肌細胞的肥大，同時整體的收縮功能也將在心臟擴大以後受到影響，但是在收縮功能不良之前，激素(IL-6)過度表現的老鼠，首先表現的是心臟舒張出現了變化(Haugen, Chen et al. 2007)。如同前述，發炎反應物質可能透過許多的機制影響心臟舒張功能的不良表現，舉心肌細胞纖維化，鈣離子回收功能不良(主要影響SERCA2)，抑或是活化心肌細胞的凋亡都是可能的機制。儘管如此，臨床是針對DHF以及血清中發炎反應激素濃度高低的研究卻是很有限的。舉例來說，一項小規模的臨床研究發現(Kosmala, Derzhko et al. 2008)，如果病患是穩定型心絞痛的病患(stable angina)，針對不同嚴重程度的冠狀動脈疾病病患，血清中的TNF- α ，IL-6的濃度會和病患的左心室舒張功能有關，舒張功能不良的病患血清中的激素指數較高，但是這個研究並沒有校正各項可能的干擾因子，也沒有去比較激素和舒張功能各項指標的相關性。另外一個臨床研究是針對在心臟衰竭的病患上(Chrysohoou, Pitsavos et al. 2009)，慢性發炎反應和左心室舒張功能的相關性研究，結果發現如果是新診斷的心臟衰竭病患，其左心室的舒張功能指標，和慢性發炎反應物質的濃度有顯著的相關。同樣的，這個研究是針對在特殊的族群，也是一個小規模的研究，除此之外，在臨床的族群之中，沒有特殊疾病但發炎反應高的族群便是體脂肪過高的族群，我們可以用胰島素抵抗性的產生來表達體脂肪過高，



或者肥胖所引發的病態生理機轉。由於胰島素本身可以抑制身體內脂肪組織分解出游離性的脂肪酸(free fatty acid)，因此當胰島素阻抗性產生的時候，身體內就會產生過多的游離性脂肪酸。過多的游離性脂肪酸不但會增加肝臟製造血糖的程度，也會增加極低密度脂蛋白(VLDL, very low-density lipoprotein)、低密度脂蛋白(LDL, low-density lipoprotein)以及三酸甘油酯(TG, triglyceride)的濃度。但是體內高密度脂蛋白(HDL, high-density lipoprotein)的濃度卻是降低的。也因此過多的游離性脂肪酸會增加動脈粥狀硬化(atherosclerosis)的形成。另外游離性脂肪酸也會抑制肌肉組織儲存體內血糖的以及肝醣形成的功能，所以當身體內有過多的血糖還有游離性脂肪酸的時候，胰臟就會增加胰島素的製造，而產生高胰島素血症(hyperinsulinaemia)(Eckel, Grundy et al. 2005)。高胰島素血症會導致交感神經的活化、內皮素-1(endothelin-1)的產生還有鈉離子的再吸收(Kim, Montagnani et al. 2006)，所以這類型的患者常常會伴隨著高血壓的產生。另外在脂肪組織分解出游離性脂肪酸的同時，脂肪組織也會產生特殊的細胞激素，像是 TNF- α 、IL-6 以及 PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) 等等(Kim, Montagnani et al. 2006)。這些細胞激素除了會增加身體內游離性脂肪酸以及血糖的濃度外，也會增加肌肉組織對於胰島素的抗性。更要緊的是，這些細胞激素會幫助肝臟產生血纖維蛋白原(fibrinogen)，使得患者的血管產生血栓前期(prothrombic state)、血管發炎(vascular inflammation)以及血管內皮不正常(endothelial dysfunction)的狀態，進而誘發血栓的形成而導致心血管疾病的產生。所以說胰島素阻抗性會引起糖尿病、肥胖、高血脂以及高血壓並且引起血管內皮不正常而誘發心血管疾病的產生，因此這個惡性循環是否會如上述透過發炎反應進而引起左心室舒張功能的改變更是臨床是讓人感興趣的議題。總結上述的研究，並沒有具體針對臨床上看到的舒張性心衰竭病患血清中的激素和各種舒張功能指標的相關性研究，另外針對可能引起左心室舒張功能不良的臨床探討也顯得不足，究竟在臨床的族群之中，發炎反應物質是不是能引起心臟舒張功

能不良的發生，或者只是伴隨出現的指標沒有辦法用現有的資訊回答。

1.4.2 和 DHF 相關新興的生物標記(biomarkers)

為了可以早期診斷 DHF，並且找出治療的標的，近年來血清中的生物標記成為研究者所感興趣的指標。生物標記除了在過去研究可能引起心臟舒張功能不良的 RAS 系統激素，以及我們所感興趣的血清中的發炎反應物質外，還有一些新興的指標可以作為後續研究的標的。舉例來說，Galectin-3，是由活化的巨嗜細胞分泌，可以調節許多生物體上的功能，而導致心衰竭的產生(Yang, Rabinovich et al. 2008)。過去的研究指出，無論是慢性或者急性心衰竭的病患，血清中的 Galectin-3 指數都可能隨之上升。在 DHF 的研究上，近年來的研究發現，Galectin-3 和心臟的舒張功能指標相關(van Kimmenade, Januzzi et al. 2006)，最近的研究也指出，Galectin-3 和 DHF 族群病患的預後也有明顯的關係(de Boer, Lok et al. 2011)，因此，這類的激素也變為研究的基礎，甚至研發藥物的標的。另外，近年來備受強調和 DHF 相關的生物標記便是 connective tissue growth factor(CTGF)，CTGF 被認為是一種分泌的蛋白，身體中很多的組織受到刺激均會分泌，可以再刺激下游的細胞例如纖維母細胞(fibroblasts)活化(Shi-Wen, Leask et al. 2008)。系統性的疾病血清中的 CTGF 往往會隨之上升，比如再過去的研究之中發現，肝硬化的病患，血清中的 CTGF 和纖維化的程度有明顯的正比關係，過去的研究顯示，CTGF 和心衰竭的重要指標 pro-BNP 有一個微妙的平衡關係，平時 pro-BNP 會和 CTGF 有相抗衡的作用，當平衡存在時，CTGF 的分泌不至於過量，也不會引起系統的纖維化發生，可是當心衰竭的症狀加劇時，比如說血行動力不穩定，高血壓無法控制的狀況下，或者 fluid overload 發生時，CTGF 便會活化，刺激心臟的纖維母細胞分泌下游的纖維化酵素，刺激心臟的纖維化，進而導致心肌肥厚，舒張性的心臟病變(Koitabashi, Arai et al. 2007)。而臨床的研究也發現，舒張性心衰竭的病患，其組織中的 CTGF 染色的確比對照組來的高的許多(Koitabashi, Arai et al. 2007)。由這樣的機轉可以發現，CTGF 在心臟的纖維化方面扮演了啟動的角色，也可能可以作為一個治療的目標。後續



的研究也發現使用 micro-RNA 來抑制 CTGF，的確可以使得心臟肥厚的程度改善，也可以避免下游的心臟纖維化發生(Duisters, Tijssen et al. 2009)。因此除了一些血清中的激素可能可以透過影響 SERCA2 等的鈣離子，迅速的影響到心臟的舒張功能之外，DHF 的產生需要透過許多不同的機制，其中一項很重要的指標便是心臟纖維化的程度，在影響心臟的纖維化方面，最上游可能影響的生物標記便是 CTGF，但是血清中 CTGF 和纖維化程度的相關性，是否會受到血行動力的影響，和心臟舒張功能程度的相關，這些重要的議題則沒有被探討過，闡述這些相關性可以幫助我們了解是否可以用血清中的 CTGF 來找到早期的 DHF 病患，進而加以積極的治療。

1.4.3 總結及研究展望

總結上述的各項敘述，DHF 的發生和 RAS 的基因多型性經過去的實驗證明在臺灣人的族群上有明顯的相關性，在心肌細胞的測試之上，發現對於影響 DHF 發生最重要的鈣離子通道蛋白-SERCA2 的 promoter 功能影響最明顯的激素是 TNF- α 、IL-6 等發炎反應前期激素，臨床上血清中的 TNF- α 、IL-6 是否和左心室的舒張功能相關，過去鮮少有研究探討過。除此之外，可能影響 DHF 發生另外一個很重要的因素就是心臟的纖維化，特別是 CTGF 這個生物標記的影響。

針對 DHF 病患或者左心室舒張功能不良的發生有幾個目前所未知，且是我們一序列的研究之後所感興趣的議題。(1) 在基因的層面，RAS 基因多型性，過去我們的研究指出可能和 DHF 的發生有相關性，這些基因多型性是否和疾病的預後有關，甚至具有特殊 RAS 基因型的病患，對於 RAS 系統抑制劑的反應會不會較其他病患不同。(2) TNF- α 、IL-6 等發炎反應激素是透過甚麼樣的機制影響心肌細胞 SERCA2 的表現，是否會因此而改變心臟的舒張功能，利用藥物的作用來抑制這樣的發炎反應激素，是否也可以阻斷這樣的機制，甚至改善心臟的舒張功能。(3) 臨床上 TNF- α 、IL-6 這樣的發炎反應激素和舒張功能指標的相關性如何？慢性發炎的病患，如肥胖的族群，特殊洗腎的族群，是否也會因為這樣的機制使得心臟舒張功能不

良提早發生? (4) CTGF 被認為是心臟纖維化的指標，血清中的 CTGF 是否可代表系統纖維化的程度，進而反應心臟的纖維化以及舒張功能衰退的程度。另外是否血行動力的變化也將影響 CTGF 的變化?



第五節 研究目的與假說- 本博士班包括下列五大部分之研究:

研究一. TNF- α 及 IL-6 可能透過 transcription level 的抑制，影響 SERCA2 的表現

先前的研究發現，TNF- α 及 IL-6 等發炎反應物質似乎對於 SERCA2 的促進子影響較強，因此本研究的目的是希望測試不同濃度，不同時間點的發炎反應物質對於 SERCA2 的促進子，mRNA，蛋白質的表現，決定影響的層面，同時也測量鈣離子的電流經過激素作用後的影響，確定 SERCA2 的功能是否有所改變。參考過去の間接證據，假設這些激素都可能透過 transcription level 直接影響 SERCA2 質與量的表現。

研究二. 探討 TNF- α 可能影響 SERCA2 的機轉(pathway)，是否直接影響心臟舒張功能以及是否可以被藥物所反轉-細胞及動物實驗模式

初步的研究發現 TNF- α 對於促進子的影響最為明顯，本研究的目的是在探討 TNF- α 可能影響促進子的機轉，並找到結合在促進子的作用位置(binding site)，了解詳細的機轉可以幫助我們使用藥物來改變整體的機制，提升 SERCA2 的質與量，進一步研究藥物是否可以改善心臟的舒張功能。研究的假設是 TNF- α 可能透過 NF- κ B 或者活化 MAP kinase 等可能的機轉影響到 SERCA2 促進子的表現，透過直接降低 TNF- α 的 level 或者阻斷可能的 pathway 均有可能提升心肌細胞的 SERCA2 含量，甚至可以改善心臟的舒張功能

研究三. 探討臨床 DHF 病患，加護病房嚴重發炎反應的病患，發炎反應物質與心臟舒張功能的關係以及預後的影響

依循上述基礎的機制探討，本研究的目的是希望探討實際臨床的 DHF 族群發炎

反應與各項心臟舒張功能的指標之間的相關性(心臟超音波下各項心臟舒張功能指標)。觀察是否因為發炎反應上升，牽動臨床舒張功能的改變，也希望能收羅臨床上高發炎反應的住院病患，包括加護病房(ICU)的病患治療前後心臟舒張功能的改變，以及燒燙傷病房極高發炎指數的傷患心臟舒張功能是否為影響預後的獨立因子。本研究亦假設心臟的各項舒張功能指標都會在高發炎反應的病患上呈現與發炎指數更為相關的關係，同時經過治療後，心臟舒張功能也會得到改善，另外心臟舒張功能更可能是影響病患預後的獨立因子。

研究四. 一般族群中 subclinical inflammation 是否會影響左心室舒張功能的產生，可能的機轉如何?

推行上述的機制到一般族群中，研究目的希望看到常見的發炎反應較高的一般族群如體脂肪較高的族群，甚或是台灣常見的腹膜透析族群，已知發炎指數較一般常人高，是否也會影響左心室的舒張功能產生。根據上述的假說，也會發現發炎指數和左心室舒張功能之間的相關性，假說如下：肥胖的病患可能因為體脂肪引起發炎指數上升，腹膜透析病患則因為腹膜透析的長期刺激，引起兩者之間的交互作用(interaction)，使得左心室舒張功能出現的機會因此而上升。

研究五. 新的左心室纖維化標的 CTGF 和 DHF 的相關性以及可能影響機轉

扣除掉鈣離子通道的影響，本研究的目的希望探討左心室纖維化的上游可能影響因子，CTGF 在左心室舒張功能不良的細胞及動物模式是否明顯的上升，研究在細胞模式中是否很敏感的受到拉力的影響，同時研究在動物模式是否很靈敏的依存血行動力的變化而有改變。另外也希望在臨床的族群中觀察血清中的 CTGF 是否可以作為判斷早期左心室舒張功能不良的一個良好指標。研究假說是，CTGF 被發現可能為心肌細胞分泌並刺激下游的纖維化產生，因此極可能會是最早期受到拉力因素，或者血壓上升影響心肌分泌的一個敏感的指標，在臨床族群也可能看到血清中的 CTGF 和左心室舒張功能的各項指標有相關性，甚至組織纖維化的程度也透過血清分泌的 CTGF 來表現。



第二章 研究方法及材料 (Materials and Methods)

第一節 TNF- α 及 IL-6 可能透過 transcription level 的抑制，影響 SERCA2 的表現

HL-1 細胞培養與過度性轉染

由於新生心臟心肌細胞的低轉染率 (約 10%)，我們使用 HL-1 心肌細胞進行其他需要進行過度性轉染的心肌細胞實驗。由美國紐奧良路易西安那大學所取得的 HL-1 細胞株衍生自成年小鼠心房組織 (Claycomb, Lanson et al. 1998)，可依製造商說明以使用 LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) 進行過度性轉染實驗，過去許多實驗已經證明此細胞雖為心房組織取出，不過離子通道特性，蛋白質表現均可代表整體心臟之功能 (Tang, Tian et al. 2012)，故在本論文中以此細胞代表心臟細胞之舒張功能細胞模式。根據 GFP 螢光顯示，轉染成功率為 60~80%。細胞轉染後 24 小時，接著進行 Luciferase 融合質體嵌入與西方墨點分析等實驗。每 0.5 μ g luciferase 報告者質體和 0.5 μ g pRL-TK 載體進行共轉染，pRL-TK 載體為當作內部控制。轉染後 24 小時將細胞進行下一步實驗。標準化的 luciferase 活性以雙 luciferase 報告者質體分析系統測量，並且用自動冷光儀讀取。

建構 SERCA2 啟動子-Luciferase 融合質體

利用聚合酶連鎖反應複製一段 1754bp 老鼠 SERCA2 基因啟動子片段，使用根據已發表的老鼠心肌細胞 *ATPase, Ca⁺⁺ transporting* 基因序列 (GenBank accession number NW_047375) 設計而來的前置引子與後置引子：(5'-

AGAGAGGTCATGACCTTC-3' [-1720 to -1703] 與

5'-GAGGAGACGGGAGGTGGCGTC-3' [+14 to +34])

把將近 1.8kb 的聚合酶連鎖反應產物從 BglIII 與 HindIII 切點次轉殖入 pGL3Basic 載體 (Tsai, Wang et al. 2007)。HL-1 的心肌細胞轉殖入 SERCA2 啟動子-Luciferase 融合質體或者是單純 pGL3Basic 載體作為對照組。同時另一組 HL-1 細胞僅加入 pRL-TK 載體 (Promega Corporation) 作為內對照組。確定轉殖成功之後，便加入不



同濃度的 TNF- α (50pg/mL, 500pg/mL, 5ng/mL, 50ng/mL) 或者 IL-6(100pg/mL, 1ng/mL, 10ng/mL, 100ng/mL) 刺激細胞達 24 小時，以冷光儀測定 Luciferase 的表現量。

利用 Fluo-3 染料染色與共軛焦雷射掃描顯微鏡作細胞內鈣離子記錄

利用 Fluo3-AM 螢光染料來測量細胞內鈣離子濃度 $[Ca^{2+}]_i$ 。細胞在含有 10 μ M Fluo 3-AM、且以 dimethyl sulfoxide (最後濃度 0.1%) 與 pluronic F-127 (最後濃度 <0.025%) 溶解的 DMEM 中放置 15 分鐘。然後，蓋玻片用標準細胞外溶液浸潤後移至記錄盒。利用反式共軛焦雷射掃描顯微鏡 (LSM 510, Carl Zeiss, Jena, Germany) 來測量 Fluo-3 螢光。至於螢光激發，則使用 488-nm 波帶的氬雷射。使用 long-pass 過濾套組來記錄螢光放射。每 1.5 毫秒獲取線掃描影像。利用共軛焦設備的時間軟體裝置來作影像處理。鈣離子量用 F/F₀ 來表示，F₀ 代表靜止態或舒張期的 Fluo-3 螢光；鈣離子濃度利用公式 $C=Kd \times R / (Kd / C_0 + 1 - R)$ (Chen et al., 1993) 來計算，R 表示 F/F₀、Kd 表示(=1.1 μ mol/L)細胞質內 Fluo-3 的解離常數、C₀ (=150 nmol/L) 表示靜止態的鈣離子量。實驗在 30 \pm 0.5 $^{\circ}$ C 進行。同樣加入便加入 TNF- α (5ng/mL) 或者 IL-6(10ng/mL) 刺激細胞之後測定鈣離子通道的表現量。

RNA 萃取與實時定量反轉錄聚合酶連鎖反應

在 HL-1 細胞加入 TNF- α (5ng/mL) 或者 IL-6(10ng/mL) 刺激細胞 0,2,6,12 或者 24 小時之後測定 SERCA2 的 mRNA 表現量。利用 TRIZOL 方法萃取細胞總 RNA，接著用 RQ1 RNase-free Dnase 以及 M-M μ LV transcriptase with oligo-dT primers 來進行反轉錄。利用 SYBR 綠色染料將單股 cDNA 擴增 (ABI-Prism 7900, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)。同時測定細胞內 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA 當作內控制組。對老鼠 SERCA2 而言，前置引子為 5'-CCATCTGCTTGTCCATGTC ACT-3'，後置引子為 5'-CAAATGGTTTAGGAAGCGGTTACT-3'。對 GAPDH 而言，前置引子為 5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3'，後置引子為 5'-GATGCAGGGATGATGTTC-3'，



所有的實驗，不同的時間點都進行三次，取平均值。

蛋白質萃取、西方墨點分析

使用 $1 \times 10^6 / 3.5 \text{ cm}^2$ 大小的培養皿來培養 HL-1 細胞，24 小時不加入血清培養，接著我們使用嚴重敗血症患者的血清，或者 TNF- α (5 ng/mL)，IL-6 (10 ng/mL) 等激素來刺激細胞，分不同時間點收集蛋白 (0, 2, 6, 12, 24 小時)，另外也使用正常人的血清當作對照組加入細胞中。細胞質蛋白、西方墨點分析的實驗步驟依照先前文獻所述進行 (Tsai, Wang et al. 2007)。本次實驗所使用的 SERCA2 一級抗體是山羊抗 SERCA2 多株抗體 (sc-8094, Santa Cruz)，HRP 接合的山羊抗體當作二級抗體 (Santa Cruz)，也使用兔抗 GADPH 多株抗體 (Lab Frontier, Seoul, Korea) 來偵測 GADPH 表現，接著使用 HRP 接合的兔抗 IgG 抗體作為二級抗體 (Santa Cruz)。

統計分析

數據以平均值附加標準差的形式來呈現，並且使用 Student *t* test 來分析個別的樣品。小於 0.05 的 P 值視為統計上有意義。

第二節 探討 TNF- α 可能影響 SERCA2 的機轉 (pathway)，是否直接影響心臟舒張功能以及是否可以被藥物所反轉-細胞及動物實驗模式

材料與試劑

Simvastatin 由美國默沙東藥廠 (MSD, Rahway, NJ, USA) 友善地提供。TNF- α 購自 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)。SERCA2 抗體是 polyclonal 羊抗體，抗 IKK α / β 蛋白是 polyclonal 兔抗，抗 I κ B- α 抗體是 monoclonal 鼠抗購自 Santa Cruz biotechnology (USA)。另外上述抗體的二抗採用 horseradish peroxidase 結合的羊抗，購自 Santa Cruz biotechnology (USA)。對照組的抗 GADPH 蛋白採用 polyclonal 兔抗，購自 Lab Frontier, Seoul, Korea。萃取核蛋白使用 monoclonal 的鼠抗來對抗 nucleolin，購自 Enzo lift science (10 Executive Blvd Farmingdale, NY 11735, USA) 偵測的方式用 ECL reagents (Millipore Chemiluminescent HRP substrate; Pierce

Chemical Co., Rockford, IL, USA), 偵測核內的 NF- κ B p65 蛋白抗體購自 Abcam, (1 Kendall Square, Suite B2304 Cambridge, MA 02139-1517 USA)。雙 luciferase 分析套組、pGL3Basic 與 pRL-TK 載體購自 Promega Corp. (Madison, WI, USA), LipofectAMINE 2000 試劑購自 Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA, USA)。Fluorescent dyes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)、Fluo-3 AM、與發散劑 pluronic F-127 購自 Molecular Probes (Eugene, OR, USA)。免疫沉著實驗中, NF- κ B p65 次單元體的抗體採用 polyclonal 兔抗(Abcam, 1 Kendall Square, Suite B2304 Cambridge, MA 02139-1517 USA), 偵測則使用結合 FITC 的羊抗(West Grove, PA, USA 19390), 染色用的 DAPI(Sigma)用來染核, Texas-Red-phalloidin (Invitrogen Corporation , Staley Rd. Grand Island, NY ,USA)則用來染心肌纖維骨幹來區分心肌細胞以及纖維母細胞。

HL-1 細胞培養與過渡性轉染

HL-1 心肌細胞如同先前描述(Claycomb, Lanson et al. 1998)。HL-1 心肌細胞的過渡轉染及 luciferase 質體分析系統也如上面的實驗所述。轉染後 24 小時將細胞進行下一步實驗。標準化的 luciferase 活性以雙 luciferase 報告者質體分析系統測量, 並且用自動冷光儀讀取。

建構 SERCA2 啟動子-Luciferase 融合質體

利用聚合酶連鎖反應複製一段 1754bp 老鼠 SERCA2 基因啟動子片段, 如同前面一個實驗所述的方式, 把將近 1.8kb 的聚合酶連鎖反應產物從 BglII 與 HindIII 切點次轉殖入 pGL3Basic 載體(Wu, Lee et al. 2011)。HL-1 的心肌細胞轉殖入 SERCA2 啟動子-Luciferase 融合質體或者是單純 pGL3Basic 載體作為對照組。利用同樣的策略, 將另外 2 個刪除構築質體利用 2 個前置引子製造出來: (5'-TTCAGATCTGAAGCCAAAGCCAAGCTACC-3' [+34 to -480], 以及 5'-TTCAGATCTGCAAGCCAAGGACACCAGTC-3' [+34 to -846]), 兩者具有共同的后置引子: 5'-GAGGAGACGGGAGGTGGCGTC-3' [+14 to +34], 確定轉殖成功之



後，便加入不同濃度的 TNF- α (0.01, 0.1, 1 μ M) 刺激細胞達 24 小時，以冷光儀測定 Luciferase 的表現量。

RNA 萃取與實時定量反轉錄聚合酶連鎖反應

RNA 萃取，實時定量，以及反轉錄聚合酶連鎖反應測定 SERCA2 濃度的步驟如前所述，在 HL-1 細胞加入 TNF- α (100 ng/mL) 伴隨 simvastatin (1, 5 μ M) 或者 ammonium pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC, 20 μ M) 或者食鹽水，刺激細胞 0, 0.5, 2, 16 或者 24 小時之後測定 SERCA2 的 mRNA 表現量。所有的實驗，不同的時間點都進行三次，取平均值。

蛋白質萃取、西方墨點分析

使用 $1 \times 10^6 / 3.5 \text{ cm}^2$ 大小的培養皿來培養 HL-1 細胞，24 小時不加入血清培養，接著我們 TNF- α (0, 1, 5, 50, 100 ng/mL) 伴隨 simvastatin (1, 5 μ M) 或者食鹽水，刺激細胞 0, 0.5, 2, 16 或者 24 小時之後測定細胞質中 IKK, p-IKK, I κ B 以及 SERCA2 蛋白的表現量，同時也測定細胞核內 NF- κ B 蛋白的表現量。都使用 GAPDH 當作對照組。細胞質蛋白、西方墨點分析的實驗步驟依照先前文獻所述進行 (Tsai, Wang et al. 2007)。

NF- κ B 中的 P65 螢光染色分析

HL-1 心肌細胞加入 TNF- α 100ng/ml 或者 0.1% DMSO 一起培養 72 小時。使用 4% paraformaldehyde 以及 1% Triton X-100 固定細胞之後，對 NF- κ B p65 次單元體染色。在 incubation 的過程中，加入 DAPI 以成色細胞核，Texas-Red-phalloidin conjugate，來染細胞纖維骨幹。然後使用數位相機鏡頭 (Olympus epifluorescence microscope) 搭配 60 倍放大的油鏡來成像。影像經由灰階轉換成亮色螢光由 Adobe Photoshop 成影。

大鼠的發炎反應以及舒張性功能不良模式

24 隻 200~300 克大小的 Wistar 大鼠分成 2 組，其中 12 隻腹腔注射 LPS (10mg/kg) 連續三天，根據我們初步的結果及過去研究的報導可以誘導發生高發炎反應的左



心室舒張功能不全模式(Terashita, Kawamura et al. 1992; Xu, Wang et al. 1992)。使用的 LPS 是 Escherichia coli, 0127:B8, phenol extraction (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 63178 UNITED STATES)。其他的 12 隻作為對照組(注射食鹽水)。注射製劑之後，所有的老鼠都維持 12 小時日夜交替模式，溫度維持在攝氏 21~24 度。老鼠血清中的 TNF- α 用 high-sensitivity enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)的方式測量(McKinley Place NE, Minneapolis, USA, R&D systems)。除了正常飲食之外，對照組或者實驗組的老鼠分別依據注射 LPS 的有無，再選取一半的老鼠給予水或者 simvastatin (5 mg/kg per day for 7 days)。經過三天之後，幫大鼠做超音波檢測，接著犧牲老鼠，用 Langendorff 的方式灌流心臟五分鐘後收集檢驗，動物實驗均經由台灣大學醫學院動物中心許可進行。

大鼠的心臟超音波量測

大鼠的心臟超音波均在以 pentobarbital (40 mg/kg; i.p.)麻醉大鼠後進行，使用 Sonos 7500 心臟超音波 (Hewlett-Packard, Andover, MA, USA)搭配 12-MHz 的探頭進行。測量的項目包括包括胸骨旁長軸切面測量舒張末期的心室中隔，心室徑，心室後壁及收縮末期的心室中隔，心室徑，心室後壁之厚度，也用都卜勒的方式，計算收縮末期的二尖瓣膜進入血流流速包括早期填充期，E 波，和晚期舒張填充期，A 波，也會量測 E 波的減速時間。另外使用組織都卜勒的方式測量 E' 的數值來代表心臟的舒張功能(Lang, Bierig et al. 2005; Salemi, Bilate et al. 2005)。

大鼠舒張性功能不良之訊息傳遞分析

處理過的老鼠心臟使用 Nonide P40 (NP-40)為基礎的試劑來萃取純化心臟的蛋白，接著使用西方點墨法(方法如前述)來決定 I κ B 的代謝，IKK，p-IKK，SERCA2，以及 GAPDH 的濃度。

第三節 探討臨床 DHF 病患，加護病房嚴重發炎反應的病患，發炎反應物質與心臟舒張功能的關係以及預後的影響

本研究是橫斷面研究的方式來探討血漿中發炎反應物質在舒張性心衰竭的病患上和心臟超音波指標的關聯性，同時以縱向追蹤的方式探討發炎反應物質跟臨床狀況改變的相關性，以及對於心臟舒張功能不良指標的關聯，最後觀察在嚴重發炎的患者，心臟舒張功能是否為影響預後的一個主要因素。

實驗的設計和研究對象的選取

實驗對象包括三個不同群體的患者，**群體一**：收集台大醫院心臟科 2007 至 2009 年入院做心導管檢查的病患以及一部份健康檢查的病患。同意加入研究的病患都簽署知情同意書，研究記錄病患的基本資料：年齡，性別，身高，體重，是否有高血壓，是否有糖尿病，抽煙與否，在做超音波檢查的半年內是否使用血管收縮素轉化劑阻斷劑，乙型阻斷劑 (beta-blocker)，鈣離子阻斷劑 (calcium channel blocker)。高血壓及糖尿病的定義如第一部分實驗所述。所有病人都做 M-mode 二維心臟超音波併用都卜勒測量，紀錄的項目亦如同前面實驗所敘述，另外，我們也用都卜勒的方式，計算各項舒張功能及心臟功能指標。**舒張性心衰竭的定義**：採用歐洲心臟科學會 2007 年最新的共識(Paulus, Tschope et al. 2007)(圖 2-2)，符合 NYHA 心衰竭症狀 II~III 以上，沒有排除條件，以都卜勒超音波為主要診斷工具， $E/E' > 15$ 或者如果 E/E' 在 8~15 之間時，需要加上其他超音波的客觀標準，二尖瓣血流都卜勒(病患 50 歲以上， E/A 比值 < 0.5 ， $deceleration\ time > 280\ ms$)，另外就是收縮功能正常，也就是左心室心搏輸出率 $\geq 50\%$ 。本研究經由台大醫院倫委會審核並通過，病人也都有簽署同意書。所有加入實驗的病患都測量血清中的發炎指標，包括 $TNF-\alpha$ 及 $IL-6$ 。**排除條件**：有心肌梗塞病史或有明顯冠狀動脈疾病 (冠狀動脈狹窄大於 50%， $coronary\ artery\ stenosis > 50\%$)，中度以上的瓣膜疾病，心肌病變，心包膜疾病，慢性肺病，腎衰竭，心電圖顯示寬 QRS 波 ($> 120ms$)，慢性心房震顫 (chronic atrial fibrillation)。**實驗組 VS 對照組條件**：對照組選擇沒有排除條件，無心衰竭症狀，超音波顯示沒有心臟舒張功能不良證據者，同時根據性別，年齡(差距五歲以內)，和實驗組做 1:2 的對照。**群體二**：另外選擇 30 位加護病房(ICU)的



患者，在進入加護病房時，測量左心室的舒張功能，超音波的測量指標如上述，同時予以監測血漿中的發炎反應物質。病患若有中度以上的瓣膜疾病，心肌病變，心包膜疾病，慢性肺病，腎衰竭，心電圖顯示寬 QRS 波 (>120ms)，慢性心房震顫，或者在加護病房的治療過程中死亡均予以排除。在病患轉出加護病房後當天，也予以監測血漿中的發炎反應物質的改變，同時重新測量左心室的舒張功能，觀察心臟舒張功能的改變程度。**群體三：**選擇發炎反應最強烈的燒燙傷病患 56 名，總燒傷面積需大於 10%(TBSA>10%)進入燒燙傷加護病房時，測量左心室的舒張功能，超音波的測量指標如上述，病患若有中度以上的瓣膜疾病，心肌病變，心包膜疾病，慢性肺病，腎衰竭，心電圖顯示寬 QRS 波 (>120ms)，慢性心房震顫，或者非燒燙傷等因素入住加護病房均予以排除。對照組選擇沒有排除條件，無心衰竭症狀，超音波顯示沒有心臟舒張功能不良證據者，同時根據性別，年齡(差距五歲以內)，和實驗組做對照。紀錄病患的各項指標，包括臨床指標，燒燙傷面積，追蹤病患住院時間長短以及預後。同樣的，在病患轉出加護病房後當天，也予以監測血漿中的發炎反應物質的改變，同時重新測量左心室的舒張功能，觀察心臟舒張功能的改變程度。超音波定義左心室舒張功能不良的定義如同群體一，採用歐洲心臟科最新的定義(Paulus, Tschope et al. 2007)。

測定血漿中的 TNF- α 及 IL-6

的病患，皆在沒有明顯感染，發炎反應的情況下接受抽血，經過 12hr 的禁食之後，經由前臂靜脈抽血，經由標準程序分離離心之後，測定血漿中的 TNF- α 及 IL-6，使用高敏感度的酵素免疫吸收法(high-sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)，IL-6 選用 catalog no. HST600B; R & D Systems, Minneapolis, MN, USA 測定，TNF- α 選用 catalog no. HSTA00D; R & D Systems 測定。以 IL-6 為例，最小偵測的範圍是 0.016 to 0.110 pg/mL，TNF- α 則是 0.038 to 0.191 pg/mL。整體的偵測變異範圍試驗間，以及試驗外以 IL-6 為例是 6.5-9.6% 及 6.9-7.8%，TNF- α 則是 7.4-10.6% 及 3.1-8.5%。



心臟超音波

所有病人都做 M-mode 二維心臟超音波併用都卜勒測量，紀錄左心房大小 (Left atrium diameter)，左心室舒張末期收縮直徑 (Left ventricular end diastolic diameter, LVEDD)，左心室收縮末期直徑 (Left ventricular end systolic diameter, LVESD)，室中隔和左心室後壁厚度 (Interventricular septum, IVS and Left ventricular posterior wall diameter, PWD)。用都卜勒超音波測量二尖瓣血流和流速遞減時間 (mitral inflow E/A ratio and deceleration time)。另外加做組織超音波檢查 (tissue Doppler examination)，測定病患二尖瓣環中隔之組織都卜勒 (Tissue Doppler) 來評估左心室的舒張功能，主要是計算 E' 和 A' 波之比值，以及二尖瓣 E 血流波和 E' 波比值。此外同時根據公式計算左心室質量指數 (Left ventricular mass index)。另外，我們也用都卜勒的方式，計算收縮末期的二尖瓣膜進入血流流速。

統計數據分析

分析數據的軟體是 SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)，連續變項用平均值±標準差表示，類別變項則是用表格和所占的比例來表現。並且分別用學生 t-test 和 the Chi-square 來計算實驗組和對照組連續變項和類別變項的組間差異性。使用 Kolmogorov-Smirnov 試驗來計算數據是否為平均分布。如果是平均分布就用學生 t-test 如果不是的話就用 Mann-Whitney U test 來計算組間差異性。激素和舒張性心衰竭超音波指標的相關性利用 Pearson's correlation coefficient 或者 Spearman's correlation test 來測定。計算燒燙傷以及加護病房病患超音波以及激素改變與否，則使用 paired-t test 來比較轉出加護病房前後的差異。接下來計算左心室舒張功能是否影響燒燙傷病患的存活，根據存活的資料，分別計算出 2 個組的死亡人數，總追蹤時間，及死亡率。接下來可以畫出 2 個組的 Kaplan-Meier 存活曲線，以及用 Log-rank test 來比較 2 個組間的存活曲線在統計上有無顯著的差異。利用 Cox proportional hazard model 來試著計算左心室舒張功能不良 (LVDD) 和總死亡風險的危險比 (Hazard ratio)。將可能的干擾因子如年紀，主要併發症，燒燙傷面積，吸入

性肺炎，等等加入模式分析。在所有的研究中，定義 P 值 <0.05 為統計上顯著的指標。



第四節 一般族群中 subclinical inflammation 是否會影響左心室舒張功能的產生，可能的機轉如何？

為研究一般族群中是否臨床不明顯，但是血漿中的發炎指數依然可以透過我們在基礎實驗發現的機制影響心臟的舒張功能，我們選取了台灣最常見的一般大眾族群中可能有比較高血漿中發炎指數的族群，便是肥胖，體脂肪較高的族群，以及台灣地區常見的腹膜透析病患，觀察血漿中的發炎反應物質是否和體脂肪，腹膜透析有交互作用，以及可能影響的機制。

(1) 實驗的設計和研究對象的選取

實驗對象包括 2 個不同群體的患者，**群體一(體脂肪高的患者)**:收集台大醫院雲林分院 life study 由 2006 年起收集的一般 30 歲以上的體脂肪過高病患。研究記錄病患的基本資料：年齡，性別，身高，體重，是否有高血壓，是否有糖尿病，抽煙與否。高血壓及糖尿病的定義如第一部分實驗所述。所有病人都做 M-mode 二維心臟超音波併用都卜勒測量，紀錄的項目亦如同前面實驗所敘述，另外，我們也用都卜勒的方式，計算各項舒張功能及心臟功能指標。**舒張性心臟功能不良的定義**: 採用歐洲心臟科學會 2007 年最新的共識(Paulus, Tschope et al. 2007), 如前所述。另外就是所有的受試者都接受腹部斷層掃描，作為評估體脂肪的黃金標準。本研究經由台大醫院倫委會審核並通過，病人也都有簽署同意書。所有加入實驗的病患都測量血清中的發炎指標，包括 TNF- α 及 IL-6。**排除條件**: 有心肌梗塞病史或有明顯冠狀動脈疾病(冠狀動脈狹窄大於 50%，coronary artery stenosis $>50\%$)，中度以上的瓣膜疾病，心肌病變，心包膜疾病，慢性肺病，腎衰竭，心電圖顯示寬 QRS 波 ($>120\text{ms}$)，慢性心房震顫 (chronic atrial fibrillation)，慢性發炎反應的患者。**實驗組 VS 對照組條件**: 對照組選擇沒有排除條件，無心衰竭症狀，超音波顯示沒

有心臟舒張功能不良證據者。**群體二(腹膜透析病患)**: 另外選擇 101 位接受腹膜透析穩定達六個月以上的病患以及 120 位腎臟功能正常，年紀性別相近的對照組。排除的條件如同前面群體一，所有的受試者皆接受心臟超音波，測量左心室的舒張功能，超音波的測量指標如上述，定義左心室舒張功能不良的方式如同群體一。另外也同時予以監測血漿中的發炎反應物質。

測定血漿中的 TNF- α 及 IL-6

群體二中所有受試者，皆在沒有明顯感染，發炎反應的情況下接受抽血，經過 12hr 的禁食之後，經由前臂靜脈抽血，經由標準程序分離離心之後，測定血漿中的 TNF- α 及 IL-6，如同前面的實驗，使用 ELISA 的方式測定，kit 的品牌及特異性如同前述。

測定血漿中的各項生化指標

針對群體一的血糖，高密度以及低密度的膽固醇，三酸甘油脂，以及發炎指數 C 反應蛋白(CRP)，都採用自動分析儀來做分析(Toshiba TBA 120FR; Toshiba Medical Systems, Tokyo, Japan)，血漿中的胰島素指數則用 AxSYM autoanalyzer (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)來分析。另外胰島素阻抗性的模式則用空腹血糖(mmol) X 空腹的胰島素指數(μ U/ml))/22.5 來代表(Matthews, Hosker et al. 1985)。

心臟超音波

所有病人都做 M-mode 二維心臟超音波併用都卜勒測量，紀錄左心房大小 (Left atrium diameter)，左心室舒張末期收縮直徑 (Left ventricular end diastolic diameter, LVEDD)，左心室收縮末期直徑 (Left ventricular end systolic diameter, LVESD)，心室中隔和左心室後壁厚度 (Interventricular septum, IVS and Left ventricular posterior wall diameter,PWD)。用都卜勒超音波測量二尖瓣血流和流速遞減時間 (mitral inflow E/A ratio and deceleration time)。另外加做組織超音波檢查 (tissue Doppler examination)，測定病患二尖瓣環中隔之組織都卜勒(Tissue Doppler)來評估左心室的舒張功能，主要是計算 E' 和 A' 波之比值，以及二尖瓣 E 血流波和 E' 波比值。此外同時根據公式計算左心室質量指數 (Left ventricular mass index)。另外，我們



也用都卜勒的方式，計算收縮末期的二尖瓣膜進入血流流速。

統計數據分析

分析數據的軟體是 SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)，連續變項用平均值±標準差表示，類別變項則是用表格和所占的比例來表現。並且分別用學生 t-test 和 the Chi-square 來計算實驗組和對照組連續變項和類別變項的組間差異性。使用 Kolmogorov-Smirnov 試驗來計算數據是否為平均分布。如果是平均分布就用學生 t-test 如果不是的話就用 Mann-Whitney U test 來計算組間差異性。激素和舒張性心衰竭超音波指標的相關性利用 Pearson's correlation coefficient 或者 Spearman's correlation test 來測定。在群體一，使用回歸分析的方式來計算和左心室舒張功能不良相關的指標，使用不同的模式，分別將可能的影響因子如體脂肪分布，血漿中的生化指標，發炎反應指數，年紀，性別，等放入模式之中。在所有的研究中，定義 P 值 <0.05 為統計上顯著的指標。另外也採用結構方成模式來做分析，首先根據過去的研究定義出可能的影響模式圖(圖 2-3)。依照此模式圖可以推斷，身體的脂肪分布可能透過發炎反應來造成後續的左心室舒張功能不良產生。因此脂肪的絕對指數以及發炎反應指數被定義為 latent variable，而脂肪分布指數則採用斷層掃描計算的脂肪單位數據，身高體重計算的 BMI，代表發炎反應的數據包括 CRP，低密度膽固醇，胰島素阻抗性等，利用兩次的回歸來校正，其他的其他可能影響因子如年紀，性別等則當作干擾因子引入。使用的軟體是 AMOS 17.0.0 (AMOS Development, Crawfordville, IL)，如果群體數字符合模式的指標(goodness of fit)大於 0.9，non-normed fit index >0.90 ，同時 root mean square error of approximation ≤ 0.05 則認定整體的模式是成立的。針對群體二，要比較正常腎功能族群，腹膜透析族群兩者的左心室舒張功能和發炎指數相關性有無差異，使用 Fisher r-to-z transformation (<http://faculty.vassar.edu/lowry/rdiff.html>)。依然利用不同的回歸方式來分析臨床因子和左心室舒張功能不良的發生之間的相關性。模式一先評估發炎指數(TNF- α or IL-6)，或者腹膜透析(PD)是否和 LVDD 的產生有關，另外再導入兩

者交互作用的因子(TNF- α X PD 或者 IL-6 x PD)進入模式二，無論模式一，模式二皆校正可能的干擾因子(如前述)。



第五節 新的左心室纖維化標的- CTGF 和 DHF 的相關性以及可能影響機轉

(1) 研究對象

對象: 研究以醫院為基礎的病例對照研究(hospital-based case control study)，收集台大醫院心臟科2007至2011年門診或者住院，臨床有心衰竭表現的病患共1283人，舒張性心衰竭的定義為2007歐洲心臟科共識(如前所述)，收羅進入台灣舒張性心衰竭群組(Taiwan Diastolic Heart Failure Registry, TDHFR)，共125名患者。同意加入研究的病患都簽署知情同意書，研究記錄病患的基本資料：年齡，性別，身高，體重，是否有高血壓，是否有糖尿病，抽煙與否，在做超音波檢查的半年內是否使用血管收縮素轉化劑阻斷劑，乙型阻斷劑(beta-blocker)，鈣離子阻斷劑(calcium channel blocker)。另外選取30名對照組和實驗組性別，年齡相近。所有病人都做M-mode二維心臟超音波併用都卜勒測量，紀錄項目如前實驗所述。本實驗當中定義嚴重舒張性功能不良病患為E/E'大於15的病患，E/E'在8~15之間為輕微舒張性功能不良病患。

(2) 血漿中的 CTGF 以及 NT-proBNP 測定

的病患，皆在沒有明顯感染，發炎反應的情況下接受抽血，經過12hr的禁食之後，經由前臂靜脈抽血，經由標準程序分離離心之後，測定血漿中的CTGF及NT-proBNP，CTGF使用ELISA測定，選用USCN Life Science & Technology Company, Missouri City, TX, USA的kit。偵測的範圍是0.156 to 10 ng/mL，整體的偵測變異範圍試驗間，以及試驗外均<12%。NT-proBNP則是利用免疫法測定，選用的是Elecsys 1010分析儀(Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)。

以心臟核磁共振 T1 來評估心臟纖維化程度

額外隨機選取25名DHF的病患以及10名對照組來接受心臟MRI的評估，使用

3.0-T CMRI scanner (Trio, Siemens, Erlangen, Germany), 在顯影劑(0.1mmole/kg of Gd-DTPA)注射十分鐘前, 以及十分鐘後用 T1 標記成像(如圖 2-4)。T1 的分析方式是 modified Look Locker Inversion Recovery (MOLLI) pulse sequence 的分析方式, 在九個心跳週期切割 7 個影像(TR/TE/FA=740ms/1.1ms/35°, inversion time increment=80ms, matrix=256x192, slice thickness=6mm, spatial resolution=1.41mm, and GRAPPA acceleration factor=2), 另外用五個短軸切面來涵蓋左心室的區塊, 另外再把每個短軸的區塊區分成六等分, 然後根據心跳, 血比容來計算新細胞外體積比(extracellular volume fraction, ECV), 將每個個體的做平均代表心臟的舒張功能。

動物舒張性心衰竭模式-以高壓力大型動物模式為例

在本實驗中選用狗的胸主動脈狹窄模式來模擬慢性壓力上升導致左心室舒張功能不良模式, 選用 12 隻 1,2 歲大的狗, 9 隻進行胸主動脈狹窄, 方法參考過去的實驗所述(26), 使用 0.15 mL/kg fentanyl-droperidol 麻醉, 插管之後, 維持麻醉的藥物是 sufentanyl (0.15 mg/kg·min) 及 1% isoflurane, 然後切開股動脈, 置入 4-Fr 的 pigtail 導管, 進行左胸切開, 氣球引導主動脈狹窄, 使得立即的壓力差(氣球前後)達 50mmHg, 氣球留置兩個禮拜之後再進行同樣的量測方式, 量測左心室壓力, 氣球前後主動脈壓力, 並在實驗前後均進行心臟超音波評估。實驗後犧牲狗, 用 Masson trichrome 染色, 量化心肌間質組織的含量(extracellular matrix, ECM)²⁷。ECM 在每個區塊的定義為 ECM%, 計算的公式如下: $\text{total pixel number of ECM areas} / \text{total pixel number of the whole field} \times 100\%$ 。

狗的心臟超音波評估

實驗前後都進行心臟超音波量測, 使用的機型為(Sonos 7500; Hewlett-Packard, Andover, MA, USA), 進行 M-mode 二維心臟超音波併用都卜勒測量, 量測的項目包括胸骨旁長軸切面測量舒張末期的心室中隔, 心室徑, 心室後壁及收縮末期的心室中隔, 心室徑, 心室後壁之厚度, 也用都卜勒的方式, 計算收縮末期的二尖



瓣膜進入血流流速包括早期填充期，E 波，和晚期舒張填充期，A 波，也會量測 E 波的減速時間。

動物心臟檢體 CTGF 測定

細胞組織使用 50 mmol/L HEPES (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA 以及蛋白酶抑制劑均質化，移除雜質，使用 12000g 離心兩分鐘，測定蛋白質濃度 Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)，接著萃取等量的蛋白質之後，使用西方點墨法測定蛋白質的含量(如前實驗及過去所報導方法)以及 GAPDH 的含量作為對照 28。

細胞張力模式代表舒張性心衰竭時壓力刺激及細胞分泌 CTGF 濃度測定

培養 HL-1 細胞，方式如同第二部分所述，然後使用 Flexercell FX-4000 Tension Plus 來拉扯培養細胞的基底膜，對心肌細胞製造壓力衝擊。將 3×10^6 的細胞種在 6 個孔洞的培養皿上，1HZ 的頻率拉扯 2, 6, 24 小時，接著測定培養液中的 CTGF 含量，使用 ELISA 方法測定(USCN Life Science & Technology Company)。

統計分析

分析數據的軟體是 SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)，連續變項用平均值±標準差表示，類別變項則是用表格和所占的比例來表現。並且分別用 Student t-test 和 the Chi-square 來計算實驗組和對照組連續變項和類別變項的組間差異性。使用 Kolmogorov-Smirnov 試驗來計算數據是否為平均分布。如果是平均分布就用 Student t-test 如果不是的話就用 Mann-Whitney U test 來計算組間差異性。激素和舒張性心衰竭超音波指標的相關性以及和心臟核磁共振 ECV 的關聯性利用 Pearson's correlation coefficient 或者 Spearman's correlation test 來測定。同樣使用 Fisher r-to-z transformation 來看不同程度的舒張功能不良病患之間的差異。使用線性回歸方程來分析各種臨床因子和左心室舒張功能不良(以 E/E' 表示)的發生之間的相關性。



第三章 研究結果

第一節 TNF- α 及 IL-6 可能透過 transcription level 的抑制，影響 SERCA2 的表現

TNF- α 及 IL-6 對 SERCA2 鈣離子通道的轉錄調控

由於 TNF- α 及 IL-6 抑制 SERCA2 鈣離子通道 mRNA 是經由轉錄機制而成的，我們研究這些激素是否改變促進子的活性。轉染成功之後，發現螢光的活性約為對照組的 20 倍。(圖 3-1A) 接著研究 TNF- α 及 IL-6 是否改變 SERCA2 基因的表現量，當我們在 HL-1 細胞加入 TNF- α (5 ng/mL) 或者 IL-6 (10 ng/mL) 24 小時之後，螢光表現的活性明顯的減少了。(control, 1.000; TNF- α , 0.837 ± 0.095 ; $p = .041$ 及 control, 1.000; IL-6, 0.777 ± 0.366 ; $p < .001$) (圖 3-1A)。另外也研究是否跟加入激素的濃度呈現正相關的關係，同樣的發現，TNF- $\alpha \geq 5$ ng/mL 或者 IL-6 ≥ 10 ng/mL 的濃度都可以顯著的影響 SERCA2 促進子的活性。(圖 3-1B)

心臟細胞中 TNF- α 及 IL-6 對 SERCA2 鈣離子通道表現的作用

TNF- α 以及 IL-6 抑制 SERCA2 的 mRNA 表現與作用時間及其濃度具有相關性，同時也會減少 SERCA2 鈣離子通道蛋白質的量。SERCA2 mRNA 的量在使用 TNF- α (5 ng/mL) 加入心臟細胞後，兩小時就出現了變化，顯著的效果改變持續 24 小時。(1 for TNF- α at 0 h [Control] vs. 0.83 ± 0.15 , 0.69 ± 0.08 , 0.75 ± 0.12 , and 0.69 ± 0.12 for TNF- α 2 h, TNF- α 6 h, TNF- α 12 h, and TNF- α 24 h; $p = .01$ for control vs. TNF- α 24 h) (圖 3-1C)。另一方面，SERCA2 mRNA 的含量也在加入 IL-6 (10 ng/mL) 兩小時開始顯著減少，最明顯的變化發生在六小時左右，同樣的 24 小時之後 SERCA2 的 mRNA 含量顯著的減少。(1 for IL-6 0 hours [Control] vs. 0.99 ± 0.17 , 0.94 ± 0.23 , 0.99 ± 0.21 , and 0.78 ± 0.11 for IL-6 2 h, IL-6 6 h, IL-6 12 h, and IL-6 24 h; $p = .03$ for control VS IL-6 24 h) (圖 3-1D)。類似上述的效果也發生在蛋白質的層面，西方點



莫法的結果和 mRNA 的改變呈現一致的變化(圖 3-1E)。

TNF- α 及 IL-6 刺激對心臟細胞 SERCA2 通道電流與鈣離子脈動的作用

心肌細胞表現出典型的 SERCA2 鈣離子通道電流，當使用 TNF- α (5 ng/mL; 24 h) 以及 IL-6 (10 ng/mL; 24 h) 刺激細胞之後，可以發現鈣離子通道回流出現迅速的上升以極緩慢的舒張回收期，代表分子層面的心肌舒張功能不良(Priebe and Beuckelmann 1998)。經過計算之後，發現鈣離子的減緩期(decay phase)在加入激素刺激之後明顯的減緩，(i.e., Tau 值變大)，和對照組比較起來(113.5 ± 6.2 ms)，在 HL-1 細胞加入 TNF- α (141.4 ± 4.2 ms) 以及 IL-6 (137.4 ± 5.8 ms) 之後，明顯的 decay phase 延長。(p = .028 and .019 for TNF- α and IL-6 vs. control; N = 6 preparations for each group)(圖 3-2)

重症病患血清直接減少心臟細胞中 SERCA2 的表現

在實驗中我們收了加護病房病患的血清(如第四部分所述)，我們直接將重症病患的血清以及對照組(沒有疾病，性別年齡相近)的血清加入 HL-1 心肌細胞中，同樣的經過 24 小時之後，可以發現，加入重症病患血清的細胞，無論是 SERCA2 mRNA 的含量(圖 3-3A)，或者蛋白質的含量(圖 3-3B)都顯著的減少了，顯示重症病患的血清可能因為發炎反應的激素對於 SERCA2 抑制的效果，而使得上述的表現發生。

第二節 探討 TNF- α 可能影響 SERCA2 的機轉(pathway)，是否直接影響心臟舒張功能以及是否可以被藥物所反轉-細胞及動物實驗模式

TNF- α 對 SERCA2 基因的轉錄調控與 NF- κ B 反應單元及 NF- κ B 反應單元結合蛋白有關

使用 TFSEARCH version 1.3 來找尋 clone 出來的 SERCA2 基因促進子上面可能的 putative consensus sequences 和 transcriptional factor 結合之處(圖 3-4A)。根據過去的研究可以證實，TNF- α 對於 clone 出來的促進子區域有和作用時間，作用濃度比例上升的抑制作用(Wu, Lee et al. 2011)。當 clone 出來的促進子包含 +100 to -870 時，

TNF- α 仍然對於促進子存有比例的抑制作用(圖 3-4C),可以發現剛好包含了 NF- κ B 的可能的結合位置(-507~ -870),如果 clone 的促進子沒有包含這個區塊,作用便消失了,暗示著 TNF- α 需要有 NF- κ B 反應單元,與 NF- κ B 反應結合蛋白方可以對 SERCA2 基因產生調節作用(圖 3-4B)。

TNF- α 對 SERCA2 基因的轉錄調控經由 NF- κ B 反應單元且此作用受到

Simvastatin 與 PDTC 抑制

我們使用不同濃度的 TNF- α 作用(1, 5, 50, or 100ng/mL)30 分鐘,或者 2, 16, 24 小時後發現,用最大濃度的 TNF- α 作用(100ng/ml)對於增加 IKK α/β 的磷酸化,或者減少 I κ B- α 的濃度存有最大的效果。然而 IKK 的總量並沒有受到影響(圖 3-5A,B),TNF- α 的效果最早在 30 分鐘就發揮作用,而且對於 IKK α/β 的磷酸化的增加,I κ B- α 的濃度的代謝的效果一直持續 24 小時之久(圖 3-5C,D)。萃取核內的蛋白發現,TNF- α 對於核內 NF- κ B 的增加存在著與作用濃度等比例的效果,加入 TNF- α 100ng/ml 後,核內 NF- κ B 的量上升最多(圖 3-6A)。同時也對於核內 NF- κ B 的次單元體 p65 做染色,在對照組(加入食鹽水)發現,細胞核,細胞質,或者核的周圍都沒有染色,相對的,如果加入 TNF- α 三十分鐘之後,核內發現有 NF- κ B 的次單元體 p65 螢光染色呈色(圖 3-6B),以上的結果代表 TNF- α 依賴著 NF- κ B 反應單元結合蛋白路徑的活化來抑制 SERCA2 基因促進子的表現。如果在加入 TNF- α 的同時加入了 NF- κ B 反應蛋白的抑制物 PDTC (1, 20 μ M) 或者 simvastatin (1, 5 μ M)後,可以發現 TNF- α 經由 NF- κ B 反應單元結合蛋白抑制 SERCA2 基因的路徑,會隨著作用時間,濃度等比例的被 PDTC 或者 simvastatin 所抑制(圖 3-7A,B)(圖 3-8A-C)。

動物模式下 TNF- α 對 SERCA2 基因的轉錄調控機制,且受到 Simvastatin 抑制

在實驗動物上測量血漿中的 TNF- α 後發現,注射 LPS72 小時的大鼠,血漿中的 TNF- α 約上升 10 倍(圖 3-9A),同時伴隨著心肌細胞達 70% SERCA2 蛋白的減少(圖 3-9B)。檢驗大鼠心肌細胞的 NF- κ B 反應單元結合蛋白路徑發現,相較於對照組,

實驗組的 IKK α/β 蛋白磷酸化明顯增加，以及 I κ B- α 蛋白代謝明顯的減少，暗示在動物模式上顯現在細胞模式同樣的結果，TNF- α 依賴著 NF- κ B 反應單元結合蛋白路徑的活化來抑制 SERCA2 基因促進子的表現。給予大鼠口服 simvastatin(2.5mg/kg/day)來抑制 TNF- α 七天後，發現給藥的大鼠組織中的 SERCA2 濃度明顯上升，同時組織中 IKK α/β 蛋白磷酸化的程度受到抑制，以及 I κ B- α 蛋白代謝也受到抑制(圖 3-9C-E)。同樣顯示 simvastatin 可以在動物模式上阻斷 TNF- α 依賴著 NF- κ B 反應單元結合蛋白 - 抑制 SERCA2 基因促進子途徑。

動物模式的心臟舒張功能不良受到 TNF- α 產生，且因給予 Simvastatin 改善

以心臟超音波可以量測實驗動物及對照組的心臟收縮功能和組織都卜勒的 E' 代表心臟的舒張功能(圖 3-10A,B)，結果發現三組(LPS, LPS+Simvastatin, Control)的收縮功能沒有差別(圖 3-10C)，另外發現心臟舒張功能會因為注射 LPS 後變差，E' 指數下降，E/E' 上升(圖 3-10D,E)。但先給予實驗動物七天的口服 simvastatin 後可以發現，心臟的舒張功能獲得明顯的改善(圖 3-10D,E)。以上實驗整體的機制以圖 3-11 表示，TNF- α 依賴著 NF- κ B 反應單元結合蛋白路徑的活化來抑制 SERCA2 基因促進子的表現，同時造成左心室舒張功能不良，這樣的路徑是可以被 PDTC 或者 simvastatin 來阻斷改善心臟的舒張功能。

第三節 探討臨床 DHF 病患，加護病房嚴重發炎反應的病患，發炎反應物質與心臟舒張功能的關係以及預後的影響

病人的基本特性

群體一：如表一所述，對照組與實驗組兩組之間的性別，年齡乃至於用藥等基本性質均沒有統計上顯著的差異。心臟超音波型態的差異也在表 3-5 陳述，兩組之間的收縮功能，左心房大小，心臟質量指數，左心室舒張及收縮容積都沒有差異。而在舒張功能的指數方面，DHF 的族群有明顯較長的都卜勒超音波 deceleration time，較短的 E/A 比值，以及較長的組織都卜勒 E/Em 比。實驗組有明顯較高的發炎指數

[TNF- α (DHF, 5.38 \pm 1.68 pg/mL; control, 2.61 \pm 1.40 pg/mL; $p < .001$); IL-6(DHF, 4.99 \pm 1.75 pg/mL; control, 2.54 \pm 1.74 pg/mL; $p < .001$)。群體二：加護病房的病房的群體在入住加護病房時有明顯較高的發炎指數，包括 TNF- α 以及 IL-6(表二)，計算疾病嚴重度的 Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II 指數為 18.9 \pm 5.3，所有的病患都在入住加護病房以及狀況好轉轉到一般病房前後進行心臟超音波以及血中發炎指數檢查，前後平均的天數是 15.4 \pm 6.1 days。群體三：56 名燒燙傷病患依據有無左心室舒張功能不良分組如表三，兩組之間的基本資料如性別，年齡，疾病，腎臟功能等地指數都沒有差別，但是左心室舒張功能不良的病患具有明顯較大的燒燙傷面積(TBSA)，較高的發炎指數[對照組:IL-6: 319.2 (SD, 182.1) pg/ml 實驗組:626.1(SD, 253.6) pg/ml, $p < 0.001$; 以及 TNF- α : 39.2 (SD, 25.1) pg/ml versus 73.4 (SD, 24.8) pg/ml, $p < 0.001$]。

血漿中的發炎指數和左心室舒張功能的關聯性

群體一當中 DHF 病患血漿中前發炎指數和左心室舒張功能不良的各項指數相關性如圖 3-12A-F，顯示發炎指數和各項舒張功能的心臟超音波指標如 E/A，E/Em，DT 都有明顯的相關性存在。群體二當中可見，經過治療之後，發炎指數(TNF- α 以及 IL-6)，明顯的下降了($p < 0.001$)，心臟的舒張功能的各項指標也在經過治療之後有明顯的改善(表四)。群體三當中，首先發現，TBSA 和發炎指數有明顯的相關性存在，而在發炎反應極高的病患族群中，心臟舒張功能的各項指標和發炎指數的相關性是比其他族群都還要高的(圖 3-13A-H)。同樣的，不論是發炎反應，或者是舒張功能的各項指標，都在病患整體情況改善之後明顯的下降(表五)。

在燒傷病患中，左心室舒張功能和預後的關聯性

在群體三當中，左心室舒張功能不良的病患有七名死亡，相對來說沒有舒張功能不良的群體只有一名死亡。大部分的病患都是因為感染重症導致多重器官衰竭死亡，以 Kaplan-Meier 圖來看可以發現，左心室舒張功能不良的病患死亡率明顯上升(圖 3-14)。接下來研究左心室舒張功能不良是不是影響預後的一個獨立的因子，



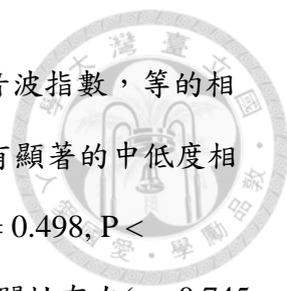
將病患的性別，疾病，TBSA，吸入性損傷等因素都校正之後，發現左心室舒張功能在嚴重發炎反應的群體當中，可以獨立的增加四倍左右的死亡率。(hazard ratio, 3.92; 95% confidence interval, 1.04-14.69; $p = 0.034$)(表六)

第四節 一般族群中 subclinical inflammation 是否會影響左心室舒張功能的產生，可能的機轉如何？

病患基本資料

群體一，102 個病患當，有 32 名符合左心室功能不良的診斷，剩餘的 70 名當作對照組。兩組的基本資料列在表十一中，如同過去研究所發現的，左心室舒張功能不良的族群主要以女性為主，年紀比較老，有較高的高血壓以及高血脂的比率。同時這組的病患體重比較重，也有明顯比較高的發炎指數(CRP)。在超音波的結構型態部分，實驗組的左心室舒張末期容積，較厚的左心室壁，也有比較高的左心室質量指數，同時左心房的舒張末期容積也顯著地擴大($P < 0.05$)(表七)。以舒張功能的指標來看，左心室舒張異常的病患有較長的等容積舒張時間(isovolumic relaxation time)，較長的二尖瓣流速減緩時間(mitral inflow deceleration time)($P < 0.05$)，mitral inflow E/A 比減少($P < 0.0001$)，同時組織都卜勒也顯示 E' 下降($P < 0.0001$)。以斷層掃描分析體脂肪分布的結果來看，舒張功能不良的族群有較高的總脂肪含量，內臟脂肪(visceral fat)，腹腔脂肪(peritoneal fat)以及後腹腔脂肪(retroperitoneal fat)的含量(all $p < 0.05$)。**群體二**：從 2007 年至 2009 年收羅了對照組包含 120 個正常腎功能的族群，以及 101 個接受腹膜透析(PD)大於六個月穩定的病患。所有腹膜透析的病患接受傳統的 glucose-based lactate-buffered 腹膜透析液(UltraBag; Baxter Healthcare SA, Singapore)。兩組病患的差異如表八所列，PD 的族群比較年青，有較高的高血壓的比率，同時也有顯著較高的發炎指數(TNF- α 以及 IL-6)。

體脂肪分布和臨床資料的相關性



群體一當中分析總脂肪，內臟脂肪和各項生化指數，心臟超音波指數，等的相關性。年紀，血壓的高低，HOMA，三酸甘油脂，和內臟脂肪有顯著的中低度相關性($r=0.45, P<0.0001$; $r=0.25, P<0.01$; $r=0.37, P<0.0005$; $r=0.498, P<0.0001$)(表九)。此外BMI和發炎指數則和內臟脂肪則有高度的相關性存在($r=0.745, P<0.0001$; $r=0.697, P<0.0001$)。HDL則和內臟脂肪分布則有負相關的關係存在($r=-0.41, P=0.0001$)。以超音波的型態來看，左心房的大小和內臟脂肪有中度的相關性($r=0.47, P<0.0001$)，而E/A比值則有負相關存在($r=-0.25, P=0.0166$)。

左心室舒張不良，發炎反應，以及脂肪分布的相關性

左心室舒張功能不良的族群有明顯較高的發炎指數，我們做多變項的迴歸分析，控制了年紀，性別，體重，糖尿病，高血壓，HOMA，左心室質量比等影響因子之後，依然發現CRP和左心室舒張功能不良有顯著的相關性(OR: 1.42, 95% CI: 1.15 - 1.76, $P=0.0019$; 表十)。接著研究脂肪的分布是否和左心室舒張功能不良有關，一樣使用迴歸分析之後，發現內臟及腹腔脂肪也是獨立影響左心室舒張功能不良發生的因子(adjusted OR: 1.29, 95% CI: 1.06 - 1.57, $P=0.0132$ and adjusted OR: 1.45, 95% CI: 1.1 - 1.92, $P=0.0107$)。最後將發炎反應和脂肪的影響共同放入迴歸分析當中，CRP仍然保有顯著的相關性(OR: 1.32, 95% CI: 1.01 - 1.72, $P=0.043$ and OR: 1.30, 95% CI: 1.01 - 1.69, $P=0.049$)，可是內臟脂肪或者腹腔脂肪的影響就變得不顯著，顯示脂肪對於左心室舒張功能不良的影響可能是透過發炎反應，或者CRP。為驗證上述假說，我們以結構方程的方式來進行路徑分析，結果顯示，脂肪的效力和發炎反應有顯著的相關($B=1.133, p<0.001$)，同時發炎反應也顯著地可以引起左心室舒張功能不良($B=0.373, p<0.001$)。The goodness of fit index, non-normed fit index, 和 root mean square error of approximation for the fitness model 分別為 0.944, 0.929 及 0.046，顯示整體的結構符合我們假設的路徑(圖 3-15，表十一)

(4) 發炎指數和左心室舒張功能的關聯性

首先分析心臟超音波下各項舒張功能指標和血漿中激素的相關性，明顯的發現，

腹膜透析的病患，血漿中激素和心臟超音波下心臟舒張功能的相關性較對照組(正常腎臟功能)來的明顯，相對而言，正常腎臟功能的對照組兩者之間就沒有相關性存在。群體二當可以發現，無論是實驗組或者對照組，左心室舒張功能不良的族群都有較高的發炎指數。我們使用多變相回歸分析校正年紀，性別，BMI，糖尿病，高血壓，腹膜透析，TNF- α 或 IL-6 之後，發現在腹膜透析的群體當中，發炎反應物質依然和左心室舒張功能不良的發生有關(TNF- α : OR: 2.6, 95% CI: 2.0-3.35, $P < 0.001$ 以及 IL-6: OR: 1.56, 95% CI: 1.25-2.26, $P = 0.01$)(表十二)。

(5) 腹膜透析，發炎指數之間的交互作用及導致左心室舒張功能的機轉

接下來研究在群體二當中，激素以及腹膜透析之間的交互作用是否會更進一步的導致左心室舒張功能不良。我們導入了兩個交互作用的因子 PD*IL-6 以及 PD*TNF- α ，發現即使校正了兩者的影響，發炎指數仍然和左心室舒張功能不良的發生有關(TNF- α : OR: 1.62, 95% CI: 1.27-2.06, $P < 0.001$ 及 IL-6: OR: 1.30, 95% CI: 1.01-1.54, $P < 0.03$,表十二)，每一單位的 TNF- α 差別約會增加 1.62 倍左心室舒張功能不良發生的機會，而 IL-6 則是 1.30 倍。此外我們也發現發炎指數的上升和腹膜透析之間有交互作用存在，這樣的交互作用將更進一步的增加左心室舒張功能不良發生的機會(PD*TNF- α : OR: 1.45, 95% CI: 1.13-1.79, $P = 0.004$ 以及 PD*IL-6: OR: 1.12, 95% CI: 0.65-1.56, $P = 0.07$,表十二)。暗示者兩者之間存有協同的機制，發炎指數上升同時又接受腹膜透析的病患將會增加 1.45 倍發生左心室舒張功能不良的機會。

第五節 新的左心室纖維化標的 CTGF 和 DHF 的相關性以及可能影響機轉

病患基本資料

DHF 的病患依照不同疾病的嚴重程度基本資料如表十三，嚴重及輕中度 DHF 的病患在基本資料上沒有統計上顯著的差異，除了使用的藥物，以及血清中的 NT-proBNP 的數值，125 個 DHF 病患當中，有 29 名符合嚴重 DHF 的診斷，剩餘

的 96 名為輕中度 DHF 群組。在血清中的 NT-proBNP 數值方面，嚴重 DHF 群組顯著的上升(565.3 ± 472.9 pg/mL VS 183.9 ± 135.5 pg/mL, $p = 0.003$)。另外病況嚴重的病患使用 ACE inhibitors 以及利尿劑的比率也明顯的比較多。心臟超音波的特徵型態也如同表十三，左心室的大小，末期舒張及收縮容積也是兩組沒有差別，嚴重 DHF 的病患左心房明顯的擴大，有較長的 mitral flow deceleration times 以及在組織都卜勒有較大的 E/e' 比值。

血漿中的 CTGF 在不同嚴重度舒張性心衰竭的意義

檢驗在一般族群當中血漿的 CTGF 的平均指數為 6.0 ± 1.6 ，明顯的比 DHF 族群低，另外在嚴重 DHF 群組有顯著較高的 CTGF 指數(嚴重 DHF: 73.8 ± 31.1 pg/mL vs. 輕微 DHF: 30.1 ± 33.4 pg/mL; $p < 0.001$; 表十三)。接著分析 CTGF 和 DHF 群組間的關係，發現 CTGF 的指數和組織都卜勒 E/e' 數值，以及 mitral inflow DT 都有明顯的相關 ($r = 0.75$, $p < 0.001$ and $r = 0.51$, $P = 0.01$; 圖 3-16A, B)。同時 CTGF 和血漿中的 NT-proBNP 也有顯著的相關性($r = 0.33$, $p < 0.01$)。我們使用階梯式的多變項分析，發現血漿中的 CTGF 仍然和舒張性心衰竭的指標 E/e' 有明顯的相關存在($B = 0.083$, $p < 0.001$; 表十四)。相對應的，如果我們選取 CTGF 來當作獨立的變項，研究使 CTGF 上升的原因則會發現 E/e' 是影響 CTGF 指標最顯著的獨立因子($B = 5.482$, $SE = 0.574$, $p < 0.001$)。

心臟核磁共振造影的細胞外體積和血漿中 CTGF 的相關性

過去的研究證明，心臟的核磁共振(CMRI)的 T1 mapping 是非侵入性檢查中研究心臟纖維化一個很好的指標，同時計算細胞外體積(ECV)也可以準確的代表心臟纖維化的程度(Flett, Hayward et al. 2010; Lee, Liu et al. 2011)。圖 3-17A 代表一個 DHF 病患纖維化的程度和一個對照組間 ECV 比率的不同，顯示 DHF 病患的 ECV 顯著的上升。在我們選取的實驗組與對照組可以發現，DHF 病患具有顯著比較高的 ECV 指數(圖 3-17B)。另外也發現在 DHF 族群中，血漿中的 CTGF 和 ECV 有顯著的相關性($r = 0.70$, $p < 0.001$)(圖 3-17C)。代表 CTGF 確實可以預測左心室的纖維化程



度。

左心室舒張功能不良的動物模式血行動力以及超音波的型態特徵

9 隻實驗狗接受主動脈狹窄手術比對上三隻對照組實驗狗。血行動力的變化以及超音波的型態如表十五，主動脈近端的壓力經過狹窄手術之後顯著的上升(圖 3-18A)，經過手術後兩週，兩者的左心室收縮功能差不多，但是手術的狗明顯的在左心室中膈，後壁，以及整體的質量都上升了(圖 3-18B，表十五)。組織都卜勒的超音波顯示 E/e' 比值經過手術之後約上升為對照組的 1.5 倍，顯示手術後製造了左心室舒張功能不良的動物模式(圖 3-18C)。

組織中的 CTGF 和左心室舒張功能不良的嚴重度線性相關

犧牲兩組的動物後，直接測定左心室組織的 CTGF，如同我們在人體上的發現，實驗組的狗的心臟中的 CTGF 經過兩個禮拜後顯著的上升了(圖 3-19A)，另外組織中的 CTGF 濃度和超音波下的心臟舒張功能不良指數 E/e' 有明顯的相關存在($r = 0.40$, $p < 0.001$)(圖 3-19B)，同時在主動脈狹窄的狗的主動脈壓力的上升多寡和 CTGF 有明顯的線性關係($r = 0.80$, $p < 0.001$)。校正過所有影響左心室舒張功能不良的因素之後(左心室質量....等)，組織中的 CTGF 和心臟舒張功能不良指數 E/e' 依然有明顯的相關性($B = 9.8$, $p = 0.04$; 表十六)。另外也使用 Masson's trichrome stain 來測量動物心臟的 extracellular matrix ECM(圖 3-19C)，在主動脈狹指的狗的 ECM 累積量明顯的上升(ECM percentage $5.1 \pm 0.6\%$ for the sham dogs vs $8.7 \pm 2.4\%$ for the aortic banding dogs, $p < 0.05$)。

細胞經張力刺激後分泌 CTGF

接著用細胞張力的方式模擬在動物實驗中壓力增加對於心臟肌肉的刺激，和對照組(沒有經過張力刺激)相比較，經由拉力刺激之後，心肌細胞分泌的 CTGF 明顯的上升，經過 24 小時持續的張力刺激之後，CTGF 上升的量達 42%(圖 3-20, $p < 0.05$)。

第四章 討論 (Discussion)



第一節 TNF- α 及 IL-6 可能透過 transcription level 的抑制，影響 SERCA2 的表現

主要發現

TNF- α 及 IL-6 減少了 SERCA2 鈣離子通道的基因轉錄，並減緩了 SERCA2 鈣離子通道電流脈動的強度。另外臨床上高發炎反應病患的血清，可以直接減少心肌細胞中 SERCA2 的濃度，可能透過血清中的發炎反應物質如 TNF- α 及 IL-6 的直接影響。

發炎反應物質，SERCA2 以及 DHF

本研究中發現 TNF- α 及 IL-6 可以經由基因轉錄的層面影響 SERCA2 的含量，也證明此類的發炎反應激素可以改變鈣離子通道的功能，影響到細胞層面的舒張功能。在臨床上，鈣離子功能不良是影響，導致 DHF 發生的最主要因素。過去的研究指出，SERCA2 基因功能的改變可以引起心臟收縮，舒張的功能都出現問題(He, Giordano et al. 1997)。同時日前的研究也指出 TNF- α 及 IL-6 都可能和心肌功能不良有關。鈣離子功能不良包括 SERCA2 的功能表現改變，鈉鈣離子交換通道(Na⁺/Ca²⁺exchanger)(NCX)或者 phospholamban 的濃度都被探討過和心肌的舒張功能最有關聯。至於 TNF- α 及 IL-6 也可能是透過其他的離子通道影響來造成心肌的舒張功能不良是本研究所無法排除的。另外 TNF- α 及 IL-6 本身也可以透過多重的機制來影響到心肌的舒張功能不良。首先，TNF- α 可以影響調控 β adrenergic receptor 的功能，而導致到心肌的收縮末期時間延長，造成心肌舒張時發生障礙，影響到心臟的舒張功能(Gulick, Chung et al. 1989)。其二，TNF- α 及 IL-6 都可以影響到心肌的一氧化氮(nitric oxide, NO)的濃度，心肌中 NO 的濃度下降，乳突肌的功能不良，整體的舒張也受到影響(Finkel, Oddis et al. 1992)。另外兩種激素都被報導過，長時間的作用可以影響到心肌間質的堆積，心肌間質堆積的後果便是使得心臟的硬度增加，舒張功能受到影響(Prabhu 2004)。本研究則在細胞的層面第一次發現兩



種激素都可以在短時間的作用，透過基因轉錄的層面來影響到 SERCA2 蛋白的質跟量，因為作用迅速，並沒有通過長時間交互作用的影響也的確可以改變到鈣離子通道的整體功能，所以本研究的發現暗示激素本身可能和純粹的 DHF 發生有關。在本實驗當中，SERCA2 蛋白或者 mRNA 的比率減少約為 30-40% 左右。過去的研究顯示，SERCA2 蛋白的含量減少會顯著的影響到心臟的舒張功能。在過去的研究中發現，如果是功能不良的心肌，SERCA2 的含量約較正常的心肌減少 30% (Hasenfuss, Reinecke et al. 1994)。在另外一個研究高膽固醇對於心肌影響的研究當中可以發現，SERCA2 在四天左右的飲食調整後下降約為 17%，在臨床上就已經發生了左心室的舒張功能不良 (Huang, Walker et al. 2004)。而在過去許多的研究顯示，SERCA2 的改變量在 17-40% 左右都將會影響到心臟的舒張功能 (Abe, Ohga et al. 2002; Seki, Nagai et al. 2003)，所以本實驗當中，SERCA2 下降的程度可以轉化到臨床的表現，足以造成臨床舒張性心衰竭的產生。另外我們的研究也發現，鈣離子的回收變得不平緩，過去的研究也證實，臨床上鈣離子通道回收功能不良，可以很準確的對照上左心室的舒張功能 (Halow, Figueredo et al. 1999)，因此在本研究中可以用鈣離子的螢光探測來顯示”細胞”層面的心臟舒張功能改變。

臨床涵義

近年來發現，在臨床上的嚴重疾病將會引起系統性發炎指數上升，此類的病患心臟的舒張功能也隨之改變，更重要的是在某些族群 (Ikonomidis, Nikolaou et al. 2010)，左心室舒張功能不良也是導致不良預後的一個獨立因子。在我們目前的研究中發現，發炎反應物質可以透過促進子的調節引起 SERCA2 的量下降，同時我們也直接的用高發炎反應病患的血清來做測試，一樣可以發現心肌的 SERCA2 下降了，臨床上代表的涵義可以直接顯示，嚴重疾病的病患血清中的高發炎反應物質，特別是像本研究當中的 TNF- α 及 IL-6 都可能導致心肌中的 SERCA2 含量下降，也因為 SERCA2 的下降是導致左心室舒張功能不良的最重要鈣離子通道，這樣的變化也會導致此類病患在疾病的早期就發生左心室的舒張功能不良，也可能



引起更不良的預後。及早阻斷這樣的 pathway 是否可以改善左心室的舒張功能將在後續的研究中探討。

此研究的侷限

本篇研究我們使用了 HL-1 心房細胞，而非初級心室心肌細胞培養，因為目前初級心室心肌細胞培養無法穩定的進行藥物刺激和過度轉染的實驗。而 HL-1 細胞的表現特性已經被廣泛地研究，且都顯示了 HL-1 細胞與心室心肌細胞非常的相像 (Claycomb, Lanson et al. 1998)。另外，在本研究當中 TNF- α 及 IL-6 改變 SERCA2 仍為可能的相關機轉，到目前為止仍然無法確立調控的機制，要研究詳細的機制需要透過更進一步的研究方可證實，細部的 pathway 將留在第三部分做說明，因此可能引起心臟舒張功能不良的變化，在這部分仍為假設，我們在研究當中也沒有發現 SR 當中的鈣離子含量或者釋放有改變，僅發現鈣離子的回收功能不良，但在臨床的心臟衰竭病患，SERCA2 的功能改變是長久持續的變化，最終將會導致 SR 的鈣離子含量不足。在我們的研究當中僅只有使用激素在細胞上作用 24 小時，所以無法觀測到長期的變化，但是 SERCA2 的功能不良已經顯現出來，長期下來也將導致 SR 的鈣離子含量減少，以及鈣離子的釋放功能改變。

第二節 探討 TNF- α 可能影響 SERCA2 的機轉(pathway)，是否直接影響心臟舒張功能以及是否可以被藥物所反轉-細胞及動物實驗模式

主要發現

本研究首先在細胞以及動物模式驗證 TNF- α 依賴 NF- κ B 反應單元結合蛋白路徑的活化來抑制 SERCA2 基因促進子的表現，NF- κ B 反應單元結合蛋白對於 TNF- α 調控 SERCA2 是必需而重要的。在細胞模式加入 NF- κ B 的抑制劑 PTDC 可以阻斷 NF- κ B 反應單元結合蛋白路徑同時使得 SERCA2 的量回升。預先在細胞模式加入 simvastatin 同樣的可以使得 SERCA2 的量回升，減少 TNF- α -NF- κ B 反應單元結合蛋白路徑對於 SERCA2 的抑制。同樣的在動物模式預先給予 simvastatin



也可以使得心臟中的 SERCA2 回升，並且心臟的舒張功能得到改善。

在心肌細胞中 TNF- α 依賴 NF- κ B 作為訊息傳遞的媒介

TNF- α 在各種不同的心臟細胞都有表現，特別是心肌細胞。過去曾經報導的訊息傳遞途徑 transcription factors 包括 integrins, Akt, NF- κ B, Erk1/2 以及 agene-expression of Bcl-2 family members(Boltzen, Eisenreich et al. 2012)。在第二部分的實驗中，我們驗證了 TNF- α 可以明顯的減少心肌細胞 SERCA2 的表現，也抑制鈣離子的回收。但過去對於心肌細胞 TNF- α 如何抑制 SERCA2 的途徑卻鮮少探討。最近的一項研究顯示，TNF- α 可以增加細胞中的甲基酶濃度，增加 SERCA2 促進子的 DNA 甲基化(methylation)，因而可以抑制 SERCA2 的表現(Kao, Chen et al. 2010)。然而上述實驗的限制在於 DNA 的甲基酶無法作為治療的目標而此途徑上下游的作用反應單元結合蛋白也沒有清楚的探討，使得臨床的運用上出現困難。過去對於 TNF- α - NF- κ B 的作用模式在不同的細胞均有探討，比如心肌細胞及靜脈內皮細胞等(Oock, Ahn et al. 2012; Shiraki, Oyama et al. 2012)。本研究的重點在於不僅只是完整呈現 TNF- α 可以經由 NF- κ B 來影響 SERCA2 的表現進而改變心臟舒張功能，另外也使用治療的藥物在體內，體外的模式均驗證了這樣的機制是可以使用藥物來反轉，同時改善臨床的舒張功能，可以做為日後治療的憑據。

TNF- α 導致心臟舒張功能不良，同時其作用可以因使用 simvastatin 而反轉

過去許多研究都發現 TNF- α 和心臟舒張功能不良有關，許多臨床上血漿中 TNF- α 指數過高的病患也容易發生心臟舒張功能不良(Lee, Lin et al. 2011; Wu, Lee et al. 2011; Lin, Wu et al. 2012)。依照我們現在的研究可以證實可能影響的途徑，足以解釋臨床觀察的結果。在研究中使用 statin，臨床也證明了 statin 是對於發炎反應，特別是 TNF- α 的血漿指數有明顯的抑制效果，甚至小規模的研究也足以證明 statin 對於心臟的舒張功能可以達到某種程度的改善，這種效果是獨立於血脂肪的抑制效果的(Mannheim, Herrmann et al. 2011)。最近的研究也顯示，對於舒張性心



衰竭的病患使用 statin，似乎可以改善病患的預後(Fukuta and Little 2008)。在我們的研究中，使用 statin 可以阻斷 TNF- α - NF- κ B 路徑的表現，其一合理的解釋是 statin 可以降低 TNF- α 的濃度，其二，simvastatin 本身也可以直接作用在 NF- κ B，因而減少心肌細胞的纖維化(Zhang, Xu et al. 2010)。而 rosuvastatin 也被報導過可以抑制 Ang II - NF- κ B 途徑，減少 NF- κ B 的表現(Kang and Mehta 2009)。我們目前的研究也找到一個新的作用途徑，證明 statin 可以影響，增進細胞核內鈣離子蛋白的功能，促進鈣離子的回收進而改善心臟的舒張功能。

臨床應用

本研究主要和臨床可以結合的發現是高發炎反應(TNF- α 上升)，可以經由 NF- κ B 途徑影響到 SERCA2 的表現，形成左心室舒張功能不良，並且可以運用 statin 等藥物來改善。許多臨床的族群都顯示，左心室舒張功能是影響預後的一個主要因子(Wu, Yang et al. 2012)，同時高發炎反應的病患，更是發生左心室舒張功能不良的好發族群。可能的機制如同下述幾個部分的討論。目前沒有好的藥物可以來改善左心室舒張功能不良，日前的研究顯示代謝徵候群是引起左心室舒張功能不良的一個主要的因素(Qin, Siwik et al. 2012; Wu, Yang et al. 2012)。經由我們的研究，可以代表此類的病患常有較高的發炎指數，而可能進一步影響到心臟的舒張功能，如果可以找出此類特別的病患，加以使用 statin 的藥物積極的改善系統發炎反應，或可以抑制本研究中的機轉，進而改善心臟的舒張功能，增進病患的長期預後。

本研究局限

SERCA2 基因的表現由許多因子決定，無法單一用 TNF- α 刺激來決定表現與否，同樣的，舒張性心衰竭的發生也不是單純的僅與 SERCA2 的功能相關，也和心臟的纖維化，高血壓病變等因素相關。因此除了 TNF- α 與 SERCA2 表現的機制外，張力的刺激，組織纖維化，局部 TNF- α paracrine 的作用等等的交互作用都有待後續的研究來證實。另外我們使用的 HL-1 心肌細胞，僅有部分的功能是和人類的心肌細胞可以互相比較的，但在本研究中也運用了臨床動物的實驗來證明我們研究



的機制是可以推展到體內的模式的。

第三節 探討臨床 DHF 病患，加護病房嚴重發炎反應的病患，發炎反應物質與心臟舒張功能的關係以及預後的影響

主要發現

在此部分的研究當中，以三個臨床上高風險的族群為研究的對象，首先第一次發現，經由最新的歐洲心臟科嚴格的條件限制後所選取的 DHF 病患，血清中的發炎指數，包括 TNF- α 及 IL-6 都以心衰竭病患較高，同時兩者在血清中的指數都和心臟超音波下評估心臟舒張功能的各項指標有顯著的相關性存在。另外在加護病房中的病患，血清中的發炎指數約為一般病患的數十倍之高，這些發炎反應都因病患臨床症狀進步而有所改善，同樣的，心臟的舒張功能指標，也在病患遭受厲害的發炎反應時有較不良的指標，這些指標也會隨著症狀的改善有顯著的進步。除此之外，我們也選取了臨床上最厲害發炎反應的族群，也就是燒燙傷的族群，在這樣的族群中，發炎反應的指數，以 TNF- α 及 IL-6 來代表，和心臟超音波下評估心臟舒張功能的各項指標的關聯性更為明顯，同時這些指標也都隨著臨床的進步而有所改善，心臟的舒張功能不良更在校正之後顯示是燒燙傷病患影響預後最重要的因子之一。

舒張性心衰竭和收縮性心衰竭的不同之處

在本研究當中，各種嚴重急症的患者，心臟的舒張功能開始發生變化，可是整體的收縮能力卻不受影響，兩者之間的成因在基礎的機制方面是不一樣的。隨著病患年紀的增長，無論是發生收縮性或者舒張性心衰竭的比率也隨之上升(Cowie, Mosterd et al. 1997)。有些理論基礎認為，心肌缺氧時，首先發生的變化是心臟舒張功能異常，接著才出現心臟收縮性不良的狀況(Nesto and Kowalchuk 1987; Miyamoto, Rose et al. 1999)。但在臨床的研究卻發現，冠狀動脈疾病引起的缺氧性心臟疾病，以局部的心肌受影響為主，並非如同現今所認為的舒張性心衰竭反而



是以系統的纖維化，心肌肥厚為表現。近年來的研究也發現兩者在實質上有下列幾點的差別，所以兩者應視為不同的病徵，治療的方向也應該有所區分。首先在結構上，收縮性心衰竭(SHF)大部分以局部的病變為主，心肌肥厚，纖維化往往是局部的病灶，相對而言，DHF 的病患是整體，同心圓式的心肌增厚。在分子的機轉上，近年來發現許多的致病機制是在 DHF 所獨有的。Borbe'ly et al 在動物模式下發現，在心肌細胞中，肌小節連接的重要骨架物質，titin 如同一種兩端連接不同肌小節的橋樑，心臟舒張時，titin 便像彈簧一般逐漸彈回原有的位置，而肌小節本身的長度則不受影響(Borbely, Falcao-Pires et al. 2009)。然而 titin 的去磷酸化，會導致 titin 轉變成硬化的 N2B isoform，這是在 DHF 病患中所獨特發生的變化，titin 的 isoform 越多，心肌的舒張功能變更加的不良，反之在 SHF 則較少看到這樣的現象(Neagoe, Kulke et al. 2002; Makarenko, Opitz et al. 2004)。再者，組織間質(matrix)的代謝在兩者也是不一樣的，DHF 的病患因抑制 matrix metalloproteinases 的蛋白減少，使得 matrix metalloproteinases 的功能被活化，因而使得 matrix 的代謝減少，堆積增加，心肌的硬化程度隨之上升，相反的，在擴大性心衰竭(dilated cardiomyopathy)的病患上，matrix 的代謝反而是不正常的上升的(Spinale, Coker et al. 2000)。以上的研究都是針對心肌的架構，或者間質的堆積影響 DHF 的機制。另外以第一型糖尿病病患為例，血清中的進階糖化末期產物(advanced glycation end Products)的濃度也顯著地和 DHF 的各項指標相關(Berg, Snorgaard et al. 1999)。以動物模式來做分析，發現此類產物的產生越快越多，DHF 的嚴重度，發生比率也顯得越高，顯示在血清中的某些物質可以代表系統的反應，間質堆積的嚴重性，而獨立影響到心臟的舒張功能。

極高發炎(燒燙傷病患)，心臟舒張功能的影響

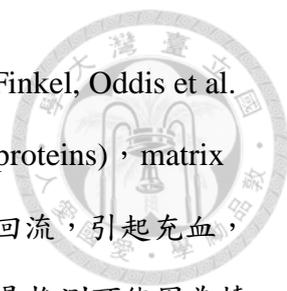
結至目前為止，在燒燙傷病患上研究心臟功能，特別是舒張功能的研究極少，在本研究上，第一次以最新的歐洲心臟科嚴格定義來尋找純粹心臟舒張功能不良的病患，同時證明心臟舒張功能不良在燒燙傷病患是獨立影響預後的指標。在燒



燙傷病患的治療上，往往需要大量補充輸液，不僅可能加重舒張功能不良的比率，也會在原本就有舒張功能不良的病患易引起肺積水，呼吸衰竭等併發症。甚至因為心臟的前負荷過重，引起後負荷的輸出不良，加上嚴重的發炎反應，自易引起多重的器官失調，因此就我們目前的研究佐證，在此類高發炎反應的病患上，應該更小心的監測心臟的舒張功能，根據我們的分子機制研究，這樣的病患心臟的舒張功能不良的比率出現的較高，也會導致預後不佳，所以對於此類病患的監測應該更小心謹慎。在過去針對高發炎反應病患的研究並沒有發現可以有效的改善病患的預後(O'Riordain, O'Riordain et al. 1996; Budagov and Ulianova 2004)，因為發炎反應物質往往因為疾病的嚴重程度(在本研究是燒傷面積)而影響釋放的多寡。針對發炎反應的治療往往不能對症下藥，找到真正的致病機轉。但本研究的結果顯示某些特定的族群，燒傷面積在控制之下，左心室的舒張功能是影響預後指標，同時很可能是因為高發炎反應引起的。所以如果發炎反應較高的病患，其他條件與對照組相同，特別是早期的左心室舒張功能不良已經出現的情況下，應該可以考慮治療發炎反應本身，減少心臟功能的惡化，進而改善組織間液的堆積，根據本研究的結果，應該可以改善敗血症，呼吸衰竭等併發症的產生，進而改善病患的預後。

高發炎反應可能影響左心室舒張功能的其他機轉

在早期的研究中曾經報導，左心室的收縮功能在燒燙傷後可能受到影響(Baxter and Shires 1968; Adams, Baxter et al. 1982)，過去的研究顯示，TNF- α 因為燒燙傷的緣故大幅增加，同時也刺激免疫反應的改變。甚至有人提出前發炎反應的激素如 TNF- α ，IL-6 等，可以活化 p38 mitogen-activated protein kinase 的上游反應，也可能因此影響到心臟的收縮功能(Horton 2004)。接下來的研究顯示，燒燙傷本身就可以活化 α 1-adrenergic pathway 進而使得 RhoA/Rho-kinase 受到刺激活化，後續的反應將影響到長期心肌組織的排列，也是影響心臟舒張功能的開端(Ballard-Croft, Maass et al. 2002)。除此之外，前發炎反應物質也可能直接影響心肌中 NO 的釋放，



改變乳突肌的功能，影響到心臟血液的排空，抑制心臟的功能(Finkel, Oddis et al. 1992)。最後 Horton et al 也在研究中指出熱休克蛋白(heat shock proteins)，matrix metalloproteinase 都可能受到燒燙傷活化，影響到腸道中的淋巴回流，引起充血，最後造成心肌抑制因子的釋放(Horton 2004)。上述的種種機制都是推測可能因為燒燙傷影響到心肌功能的原因，目前我們的研究來看，大部分燒燙傷引起病患心臟功能的變化其實是以舒張功能的改變為主，僅只有少部分是影響到病患心臟的收縮力，透過上述的機轉，將首先改變病患的舒張功能，除此之外，我們的研究也發現，鈣離子通道可能是影響到心臟功能表現的第一個危險因子及可能的機制。

此研究的侷限

首先在臨床的病患族群中沒有證明心肌中的 SERCA2 受到影響，因此沒有辦法在臨床的族群上面證明假說的機制。其二，在臨床的族群中，只能表述發炎反應物質與心臟舒張功能的關聯性，至於是否可以用抑制發炎反應的方式改善臨床病患的舒張功能甚至減少舒張性心衰竭的發生有待後續的研究證明。

第四節 一般族群中 subclinical inflammation 是否會影響左心室舒張功能的產生，可能的機轉如何？

主要發現

在此部分的研究當中，以兩個臨床上在門診族群中，以 subclinical inflammation 的族群為研究的對象，我們以一般族群為例，第一次發現體內脂肪，血中發炎指數，與左心室舒張功能的關係，我們先以迴歸分析，發現體內脂肪和左心室舒張功能的關聯性會因為校正發炎指數後消失，再建立了結構方程，確立在一般族群當中，發炎指數，內臟脂肪和左心室舒張功能之間的關聯性如同我們的假設。由這樣的結果可以推斷，脂肪對於左心室舒張功能的影響大部分是經由發炎反應，而不是直接經由脂肪浸潤而來。除此之外，我們也選取了在門診族群當中，臨床上較害發炎反應的族群，也就是腹膜透析的族群，在這樣的族群中，發炎反應指



數，以 TNF- α 及 IL-6 來代表，和心臟超音波下評估心臟舒張功能的各項指標的關聯性較腎功能正常的對照組更為明顯，另外，腹膜透析和發炎指數存在交互作用，同時有高發炎反應的病患，加上腹膜透析的影響，將更可能發生左心室的舒張功能不良，臨床上可以理解原本易發生發炎反應的病患，因為受到腹膜透析本身的刺激，將更進一步影響到血中或者心肌的發炎反應，而導致心臟的舒張功能又更惡化。

體內脂肪與左心室功能的關聯性

腹腔內脂肪過去被認為是獨立於全身的脂肪分布之外，另外可以反應全身動脈硬化的程度，過去許多的研究都曾探討肥胖或者體脂肪分布不均勻與心臟結構變化的關聯性(Redfield, Jacobsen et al. 2003; Wong, O'Moore-Sullivan et al. 2004; Ammar, Redfield et al. 2008)。但是有關於內臟脂肪分布與左心室變化的研究卻是極少數，以 2002 年的研究為例，作者分析了 28 位正常血壓，肥胖的病患，都以斷層掃描來評估內臟脂肪的多寡，接著用超音波來評估左心室的各項型態，作者的結論是內臟脂肪的上升也和較大的左心室大小，左心室質量上升，以及左心室的 isovolumic relaxation time 延長相關(Morricone, Malavazos et al. 2002)。另外過去的研究也提到，作者引入了 27 位肥胖的病患，發現內臟脂肪的上升和血清中的發炎反應物質明顯的相關，而這樣的發炎反應物質上升也和左心室的厚度，容積比，都卜勒超音波下的左心室 isovolumic relaxation time 延長都有某種程度的相關。綜括上述的研究可以發現，內臟脂肪的上升很有可能和循環的發炎反應物質有關，這樣的相關性很可能再進一步影響到心臟的舒張功能，可是過去的研究並沒有經過良好的設計，明確的定義左心室舒張功能來確立這樣的機制存在。在我們現在的研究當中以過去的假說為骨幹，設計了結構方程來確認這樣的機制的確存在於一般族群的肥胖患者當中，甚至可以作為下一步治療的依據。在健康的肥胖族群當中，最近的研究致力於探討左心室舒張功能可能發生的原因，心臟內三酸甘油脂的上升被發現隨著年紀而增加，也被驗證和左心室舒張功能的發生



有相關聯性(van der Meer, Rijzewijk et al. 2008)。進一步的研究發現，因為心肌吸收(uptake)，氧化三酸甘油脂的能力在不同個體間的差距，引起三酸甘油脂在心肌內的堆積量產生了差異，也因為這樣使得心肌內的三酸甘油脂浸潤，進而導致左心室舒張功能不全發生。過去的研究以核磁共振來測量 epicardial fat 的含量，發現 epicardial fat 的含量和心臟內的三酸甘油脂浸潤明顯的相關(Kankaanpaa, Lehto et al. 2006)，心臟超音波的研究也發現，直接測量 epicardial fat 可以代表左心室浸潤的脂肪多寡(Malavazos, Di Leo et al. 2010)。因此不難假設，或許體內脂肪可以代表總體脂肪對於發炎反應的影響，epicardial fat 或許更可以代表心臟內浸潤的脂肪多寡，而可以獨立的影響左心室的舒張功能。

發炎反應在一般肥胖族群導致左心室舒張功能不良

我們的研究顯示，內臟脂肪的分布透過發炎反應影響心臟的舒張功能。事實上最近的研究結果也發現，系統循環的發炎反應物質可以抑制心肌的收縮能力，也可以再塑細胞外物質的堆積(Prabhu 2004)，如果以 transgenic 老鼠的實驗來看，如果過度表現發炎反應，一開始心臟將變得肥厚，但心臟的收縮能力是正常的(Bryant, Becker et al. 1998)，臨床的研究也發現，在收縮能力正常，但舒張能力異常的族群當中，直接測量心肌內的發炎指數有明顯的增加(Kapadia, Yakoob et al. 2000; Nagueh, Stetson et al. 2001)。由這樣的結果不難發現，如果發炎指數上升(受到體脂肪增加，不正常氧化的影響)，很可能進一步浸潤心臟，引起局部的發炎反應上升，造成如同上述所說的，三酸甘油脂不正常的氧化，堆積，這樣的機制已被確切證明會使得左心室的舒張功能發生異常。

結構方程分析

引起發炎反應上升的因素眾多，在本研究當中，運用結構方程的概念，將胰島素阻抗性，脂肪的異常都定義為發炎反應的因素之一，依照過去的研究(Lin, Kuo et al. 2008)可以發現，兩者都可以讓發炎指數上升因此也可以定義為發炎指數的一環，相對的高血壓的病患過去也有研究發現發炎指數有可能會上升，可是兩者的關聯



性不清楚，因此定義為其他影響因子，Hoekstra et al 的研究則發現，高血壓和 CRP 的關係並不明確而且微弱，所以在結構方程式中沒有引入(Hoekstra, Geleijnse et al. 2005)，要明確地證明本研究肥胖的病患符合假設的機制，便需要明確的在結構方程的分析中輸入各個變相及其定位，如同分析圖所述，我們依照過去的研究，明確地找出可能影響左心室舒張功能的影響因子(Ommen, Nishimura et al. 2000; Lester, Tajik et al. 2008)，在結構方程中定位其角色，再依照過去發現會直接引起發炎指數上升的因素(如胰島素阻抗，膽固醇異常)，在方程中輸入其位置，因此一項一項地將複雜的機制建構出來，方能確立整體的變化符合假設的機制。

腹膜透析病患發生左心室舒張功能不良的機制

在北美以及歐洲的分析可以發現，超過 50% 透析的病患是因為各種的心血管疾病死亡(Foley, Parfrey et al. 1998)，除了傳統的因子如高血壓，糖尿病，脂肪異常等因素之外，目前被廣泛接受的是發炎反應在各種心血管疾病的成因當中佔了極重要的定位。雖然過去沒有大規模的研究顯示舒張性心衰竭在腹膜透析病患中的比率，但因為發炎反應大幅的上升，高血壓的比率偏高，腎素血管收縮素系統的活化，可以理解的是舒張性功能不良的比率在這樣的族群當中是明顯的較多(London 2003; Schiffrin, Lipman et al. 2007; Bajraktari, Berbatovci-Ukimeraj et al. 2009; Wu, Luo et al. 2010)。過去的研究許多都證明發炎反應本身可以導致收縮性的心臟衰竭增加。但卻少有研究證實舒張性心衰竭也和發炎反應的激素有相關(Dinh, Futh et al. 2009; Melendez, McLarty et al. 2010)，由於在腹膜透析的族群發炎指數明顯的上升，特別是 TNF- α 以及 IL-6，兩者都可以在局部心肌顯示出 paracrine 的作用，刺激纖維母細胞增生，分泌 collagen，而導致心肌的硬度增加，舒張功能出現異常(Sciarretta, Paneni et al. 2009)。除此之外，TNF- α 尚會導致心肌的凋亡，直接抑制心臟的收縮力(Ing, Zang et al. 1999)，心肌的凋亡將導致纖維化的形成，如同心肌梗塞後壞死的心肌，整體的變化將改變心臟的再塑，使得舒張功能變差，因此腹膜透析病患原本因為各項併發症使得血清中的發炎指數上升，局部心肌的發炎反應增加，加

上腹膜透析本身便是發炎反應極大的來源，兩者的交互作用將更進一步誘發不良因子的堆積，而導致舒張功能異常的比率更高，因此在這樣的族群，要進行腹膜透析前應優先考慮是否改變其他的方式來透析，或者提早使用抑制發炎反應的藥物避免惡性循環的產生。

Statin 類藥物對於高發炎反應併透析病患可能的助益

Statin(3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors)主要的功能是降低血液中的膽固醇，也同時存有明顯的抑制發炎的效果，如同最近的 Jupitar 研究發現，在降低發炎反應的同時也同時改善了病患的整體預後。除了可以降低透析病患的膽固醇外，過去也的確發現 statin 可以慢性腎衰竭或者末期腎病便患者血漿中的發炎激素(Stenvinkel, Rodriguez-Ayala et al. 2006; Kumar, Raftery et al. 2007; Mantuano, Santi et al. 2007; Paraskevas 2008)。由這樣的觀點來看使用 statin 或可以經由改善血清中的激素變化來改善心臟的舒張功能。過去對於 statin 使用在末期腎衰竭病患的研究如 Die Deutsche Diabetes Dialyse Studie or 4D) 研究(Wanner, Krane et al. 2005)，整體的死亡率在兩組沒有差別(RR 0.93, 95% CI 0.79-1.08; p=0.33)，但使用 atorvastatin 可以明顯的改善心血管疾病發生的風險(RR 0.82, 95% CI 0.68-0.99; p=0.03)。另外在 AURORA study (A study to evaluate the Use of Rosuvastatin in Subjects on Regular Hemodialysis: An Assessment of Survival and Cardiovascular Events)，無論是死亡率或者心血管疾病的風險都沒有改變(Fellstrom, Jardine et al. 2009)。但是如果就發炎反應上升的群體來看，statin 對於預後(包括死亡率或者心血管事件)是有明顯的助益的。因此，對於透析的病患，就這樣的假設及觀點，應該可以挑出發炎反應特別高的族群加以使用 statin 來治療，降低血清中的發炎指數，一方面可因上述的機制改善心臟的舒張功能，也可能改善各面相的預後指標。

此研究的侷限

本研究的優勢在於使用斷層掃描精確的定義內臟脂肪，並且引用最新的心臟舒張功能不良的指標來找出獨特的群體患者。侷限在於(1)通常使用結構方程需要 200



或者更大的群體方能找出相關的因素，在本研究當中，人數接近兩百人，但結果相當的符合假設的機制，當然有可能存有其他的路徑造成上述的變化，因為人數不足而沒有辦法產生有意義的結果。(2)在肥胖族群中代表發炎指數的激素是CRP，沒有同時監測 TNF- α 或 IL-6，也可能在分析上產生不同樣的結果。(3)我們使用的資料是橫斷面的，可是預期的結果是縱斷面的，也就是使用橫斷面的族群希望發現發炎反應可能導致心臟舒張功能不良，雖然結構方程導向很有可能符合這樣的機制，但後續的縱斷面相隨機分派的研究仍有待進行。(4)進行超音波分析時應該使用 valsalva maneuver，方可以把一些 pseudonormal mitral inflow 病患找出來，並引入舒張性心衰竭這一群組。(5)有關於腹膜透析的病患，因為是由一般族群及洗腎族群來做比較，除了同樣是橫斷面的分析外，也有可能其他的因素導致心臟結構的變化，比如次發性高血壓等。此外，要確立是否發炎反應在腹膜透析的群組當中的確可以使得左心室舒張功能發生變化，需要於後續的研究當中選取特殊病患，抑制血清中的發炎反應(如使用 stain)，來觀看預後的發展，方可確立。

第五節 新的左心室纖維化標的 CTGF 和 DHF 的相關性以及可能影響機轉

主要發現

心肌的 CTGF 在早期心臟舒張功能不良的表現

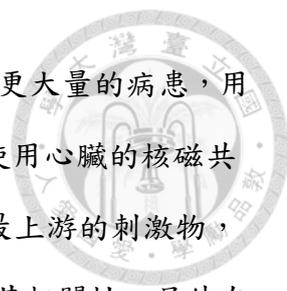
本研究主要發現 CTGF 是心臟舒張功能早期的一項指標，不僅組織中的 CTGF 和組織纖維化的程度有明顯的相關性，血漿中的 CTGF 更和心臟的舒張功能改變明顯的相關。在本研究中，我們在人類的群體上發現，血漿中的 CTGF 和 NT-proBNP 的濃度有明顯的相關性存在，同時在不同嚴重程度的舒張性心衰竭病患可以和心臟舒張功能的各項指標相關。在動物的模式上，經過兩個禮拜的高壓力刺激，CTGF 和心臟舒張功能的改變明顯相關，而且是很敏感的反應中心血行動力的變化，我們也利用細胞模式證實，心肌細胞會因為壓力的改變刺激分泌 CTGF。因為這些變化都模擬了早期的 DHF 的改變，顯示 CTGF 是反應 DHF 早期變化的一項主要的



指標，結合過去的研究可以證明，CTGF 是心肌再塑上游的一個產物，經由抑制 CTGF 可以早期的改變 DHF 病患的預後。加以我們證明血漿中的 CTGF 可以代表局部心肌纖維化，舒張性心臟功能不良的程度，所以經由測量血漿中的 CTGF 將有助於我們決定如何來治療此類的患者。

血漿中的 CTGF 可以早期偵測舒張性心衰竭，並可代表疾病的嚴重度

舒張性心衰竭的機制和一般心衰竭的成因不盡相同，近年來的證據顯示 DHF 和傳統的收縮性心衰竭機制不同因此治療方法也應該不一樣。研究顯示，早期的 DHF 最早的變化可能是纖維化的產生，因此許多新的治療方法開始針對纖維化的機制使用藥物調控，也產生不錯的效果(Benjamin 2012; Miyazaki, Ikeda et al. 2012; Zhang, Edgley et al. 2012)。CTGF 被認為是前纖維化的激素，可以調控細胞外間質的堆積，也可能代表心臟纖維化的程度或作為治療的一項依據(Blom, Goldschmeding et al. 2002; Shi-Wen, Leask et al. 2008)。CTGF 的活化可以刺激下游心肌的肥厚，或者纖維化基因的表現。過去的研究顯示，CTGF 不像其他的骨架蛋白，collagen 是單純由纖維母細胞分泌，是可以直接由心肌細胞分泌至系統中(Kemp, Aggeli et al. 2004; Koitabashi, Arai et al. 2007)。而我們的研究也基於此點出發，首先利用拉扯細胞 24 小時短暫的時間，證明心肌細胞的確會受到刺激後顯著的分泌 CTGF，接著假設釋放的 CTGF 將使得系統的濃度增加，因而可以在血漿中檢測到濃度上升，同時和心臟的舒張功能，纖維化的程度有明顯的相關。也因為不僅是由 fibroblasts 分泌，使得壓力的變化容易改變 CTGF 的濃度，因而也能在疾病的早期就反應出變化，確立是 DHF 一個敏感的血漿指標(在研究中比 proBNP 靈敏度更強)。過去的研究顯示，血漿中的 CTGF 和許多系統疾病相關，比如肝硬化，腎病變(Tong, Chen et al. 2009; El Mesallamy, Ahmed et al. 2012)。Koitabashi et al 首先經由動物的模式假設血漿中的 CTGF 或可以代表心臟纖維化的程度(Koitabashi, Arai et al. 2007)。接著作者收羅了 52 個心衰竭的病患，發現血漿中的 CTGF 和 NYHA 的心衰竭程度，過去的病史，血漿中的 proBNP 以及超音波下的 E/e' 都有相關存在



(Koitabashi, Arai et al. 2008)。和過去研究不同的是，我們收羅了更大量的病患，用最新嚴格的定義這類的病患為純粹舒張性心衰竭的病患，同時使用心臟的核磁共振精準地測量心臟的纖維化程度，確立血漿中的 CTGF 的確是最上游的刺激物，可以調控 collagen 的形成，因而可以在純粹 DHF 的群體上顯現其相關性。另外在我們的研究上可以發現在輕微 DHF 的病患上 CTGF 主要和 mitral inflow E/A 比，或者 E-wave deceleration time 相關。因為在早期的 DHF，主要稱為不正常舒張期 (abnormal relaxation phase)，心臟超音波主要的表現正是 mitral inflow E/A 延長，或者 E-wave deceleration time 增加。相對的，在後期的病患，如同我們所收羅的嚴重 DHF 病患，組織都卜勒 E/e' 就可以代表左心房的填充壓，主要反應疾病的嚴重度，因此也在嚴重 DHF 的病患發現 CTGF 和 E/e' 有明顯的相關性，所以本研究中 CTGF 無論是在輕微或者嚴重程度的 DHF 都可以靈敏的反應出疾病的嚴重性。

CTGF 在心肌中表現的機制

CTGF 在心肌中的作用可能是 autocrine 或者是 paracrine 的方式，可以經由心肌分泌，刺激纖維母細胞活化，再更進一步地使得心肌分泌更大量的 CTGF，經由這樣的循環使得心臟纖維化的程度更形嚴重(Koitabashi, Arai et al. 2007)。然而詳細的機轉仍然未明，在正常生理的狀況下，胎兒早期心臟的發育中 CTGF 的濃度相當高，到晚期的胎兒才慢慢下降至正常值(Chuva de Sousa Lopes, Feijen et al. 2004)。如果是基因剔除 CTGF 的老鼠也會在出生後立即死亡無法存活，但外觀上並沒有發現明顯的心臟結構異常(Ivkovic, Yoon et al. 2003)。因此可推斷的是 CTGF 是心臟早期發育所必需的分泌物質，最近的研究以在心肌特定表現 CTGF 的 transgenic 老鼠模式來看，CTGF 可以刺激 Akt/GSK-3 β and p70S6 kinase 的機轉，接著反而可以活化心肌因為缺氧再灌流引起的傷害(Chuva de Sousa Lopes, Feijen et al. 2004)。另外 Gravning et al 也以同樣的 transgenic 老鼠來研究，發現高表現的 CTGF 可以防止因為心肌梗塞後的心臟再塑，甚至可以因此改善心臟的功能(Gravning, Orn et al. 2012)。在這樣的情況下 CTGF 在局部的心臟反而存有保護心肌的作用。因此綜合



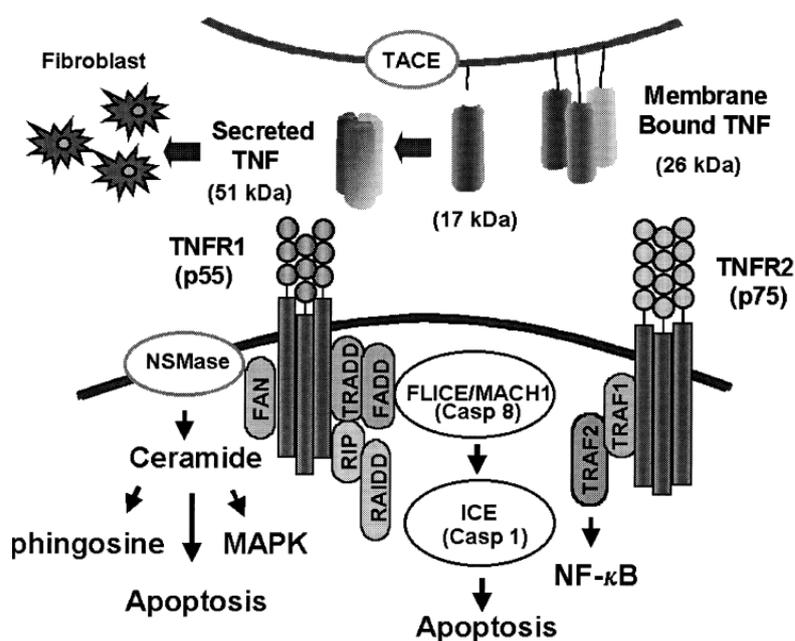
上述的表現可以發現，CTGF是早期心臟發育，或者心肌需要再生時所必須的蛋白，過度抑制反而會傷害的心臟的發育或者再塑，相反的，如果長期過度表現 CTGF，也會因為過度增生而使得心臟纖維化上升，引起心臟不正常的肥厚產生舒張性心臟衰竭。因此，運用標的治療(target therapy)來治療病患時，應該考慮抑制的程度，或可以由本研究的發現，偵測血漿中的 CTGF 來評估系統的 CTGF 表現的程度，調控在最合理的範圍，才能對病患帶來最大的助益。

此研究的侷限

本研究的侷限有下列幾點，首先在 DHF 的病患上沒有組織的 CTGF 濃度可以做為比較，因為在臨床研究上面，取得組織是不符合倫理的考量。另外在動物實驗上，我們採用的是過度壓力刺激的模式，引起心臟舒張功能不良的機制有許多種，如心肌缺氧等，是否 CTGF 在不同的模式中都扮演相同類似的角色尚有待證明。另外有關血漿中 CTGF 和病患預後的關係也需要長期的追蹤研究來證實相關性，心臟的纖維化是需要監測不同的 collagen 代謝產物來驗證，本研究沒有檢驗這麼多項血漿中的產物，因此無法了解其中的相關性。

第五章 結論及展望 (Conclusions and Perspectives)

在本研究中我們將最有可能影響到心肌舒張功能的鈣離子蛋白 SERCA2 的促進子 clone 出來，在第一部分的研究當中使用不同的激素來刺激，同時研究發現在多種血漿激素之中，以 TNF- α 及 IL-6 對於 SERCA2 基因促進子的影響最強，超過 angiotensin II 的影響，特別是 TNF- α 對於細胞的刺激是持續而且穩地的。在這部分的研究更進一步的發現 TNF- α 或 IL-6 加入心肌細胞後，無論是在 SERCA2 的促進子，mRNA，蛋白的層面都達到約 30~40% 左右量的抑制減少，同時也發現 SERCA2 的功能(以鈣離子回收的功率代表)，同樣的也顯著被 TNF- α 或 IL-6 所抑制，甚至我們也將嚴重感染病患，血漿中富含 TNF- α 及或 IL-6 的臨床檢體加入心肌細胞，同樣驗證了可以使得細胞中的 SERCA2 表現下降，因而推測 TNF- α 或 IL-6 可以經由轉錄的層面來抑制 SERCA2 基因的表現，從而在細胞層面抑制心肌的舒張功能。本研究的展望在於發現發炎反應在心臟舒張功能不良扮演的重要角色，同時也找出可能影響心臟舒張功能的機制，舒張性心衰竭在過去的大規模臨床試驗並沒有發現一個有效的藥物可以改善預後，也沒有發現有效的藥物可以明顯的改善病患的心臟舒張功能。本研究的啟發找出最可能影響 SERCA2 功能的激素-前發炎反應物質，抑制該物質是否能改善心肌細胞，臨床心臟的舒張功能便是其後所需要研究的課題，甚至在臨床的病患也可以據此觀察發炎反應物質和舒張功能的相關性，從而找出高發炎反應並舒張功能不良者加以治療，觀察功能乃至於預後的改善程度，除此之外，TNF- α 或 IL-6 影響 SERCA2 表現的下游機制過去鮮少被探討過，如下圖所示，有許多可能的路徑，找出真正



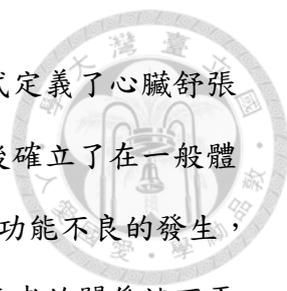
影響 SERCA2 表現的單一機轉有助於新治療模式的發現，更可以驗證此一作用機轉是否存在。

因此在第二部分的研究承接上述的展望，我們在心肌細胞發現 TNF- α 可以經由 IKK 的磷酸化， $I\kappa B-\alpha$ 的代謝，使得的 p65 次單元體活化進入細胞核，結合在 SERCA2 促進子的-522 到-513 處，雖然 TNF- α 在各種細胞中可以活化 NF- κ B 反應單元結合蛋白途徑已有很多的報告，NF- κ B 反應單元結合蛋白但在心肌細胞中經由此途徑抑制 SERCA2 基因的表現，我們是第一個發現，另外，我們也在動物模式之中驗證了這個機轉存在於生物體的舒張性心衰竭模式上，為了確立治療是否能反轉此機轉來改善心臟的舒張功能，我們在心肌細胞中分別加入了 NF- κ B 反應單元結合蛋白抑制劑以及 simvastatin 來抑制 TNF- α 的表現，同時也給予舒張性心衰竭模式鼠 simvastatin，也驗證了抑制 TNF- α -NF- κ B 機轉的確可以改善心肌細胞中 SERCA2 的濃度，從而使得心臟的舒張功能改善。這樣的結果在臨床上有重要的意義，首先在目前沒有藥物可以改善心臟的舒張功能的情況下，發現了無論是細胞模式或者生物體模式，抑制前發炎反應物質的表現的確可以改善心臟的舒張功能，因此在臨床發炎反應稍高，合併舒張性心衰竭的病患也期望可以運用同樣的治療方法來改善病患無藥可醫的窘境。當然，如何調整藥物的使用劑量，使



用藥物的時機都是應用在臨床所需要解決的課題。除此之外，我們的研究也顯示了，在生物體上預先使用 statin 藥物來抑制發炎反應可以改善心臟的舒張功能。目前在臨床的研究上顯示，如果是發炎反應極度嚴重的病患，使用發炎反應抑制劑並不能有效的改善病患的預後，可以想見的是此時影響預後的因素是多重的，臨床上預期要治療病患的舒張功能應該要找單純發炎反應高引起心臟舒張功能不良的例子，而不是選擇多重併發症，嚴重發炎反應的病患。本研究的展望是在臨床上血漿中發炎反應較高，可是並沒有明顯症狀的患者，使用發炎反應抑制劑來降低系統的發炎反應，如同有名的 Jupiter 研究的設計，來觀察是否能改善病患的心臟舒張功能，甚至進一步的改善此類病患的長期預後。再者，我們由這個研究了解了 TNF- α 主要影響 SERCA2 的途徑是經由 TNF- α 的 receptor 1 途徑，目前已知的 TNF- α 抑制劑是非選擇性的，因此在臨床上運用受到了侷限。日前研發出選擇性的 TNF- α receptor 1 抑制劑可以有效的阻斷下游的反應，更專一的抑制 TNF- α 的功能，也是我們期望可以在未來使用在舒張性心衰竭病患的新藥物。

在臨床的研究方面，主要以四個族群的病患為代表，首先研究加護病房發炎反應高合併舒張性心臟功能不良的病患，發現治療前後的前發炎反應物質明顯的下降，同時也伴隨著心臟舒張功能的明顯進步。接著選用臨床上發炎反應最強的病患，也就是燒燙傷的族群，可以清楚地發現在這樣的族群當中，前發炎反應物質 TNF- α 或者 IL-6 和心臟各項舒張功能的關係最明顯而且清楚，顯示兩者之間在發炎反應越強的病患上越強烈，另外再將所有的因素考慮進去之後發現，心臟的舒張功能不良便是在燒燙傷病患一個獨立影響預後的因素，因此奠立可能的機轉在於高發炎反應本身可能導致心臟舒張功能不良的發生，而引起水分堆積，組織癒合不良等更進一步的不良預後，因此影響到這類病患整體的存活率。為了推至一般門診的族群，之後又引入了兩個族群，就是一般常見體脂肪過高肥胖的病患，以及台灣常見的腹膜透析的病患，也是在門診常見的族群中，系統發炎反應較高的族群。首先在肥胖的族群當中，用最標準的方式定義體脂肪，內臟脂肪，腹膜



腔脂肪，也就是用斷層掃描的方式來檢測，同時用最準確的方式定義了心臟舒張功能不良，在這部分的研究同時也引入了結構方程的分析，最後確立了在一般體脂肪過高的病患上，內臟脂肪可以透過發炎反應而導致心臟舒張功能不良的發生，去除掉這部分的因素，脂肪的高低和心臟舒張功能不良的發生兩者的關係就不再顯著。另外在腹膜透析的病患上，回歸分析後也同樣發現，發炎反應在這類的病和顯著的和發生心臟舒張功能不良有關，更重要的是發炎反應和腹膜透析兩者有加成的作用，發炎反應越高合併腹膜透析的病患，會更進一步的增加心臟舒張功能不良發生的機會。

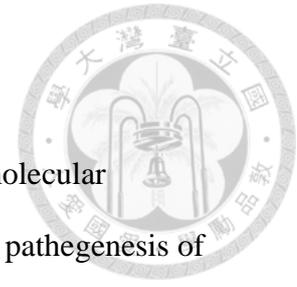
由上述的四個族群可以了解由嚴重發炎反應病患乃至於門診常見的族群，系統發炎反應的高低的確某種程度的和心臟舒張功能不良或者舒張性心衰竭的發生有關。其原因除了我們在基礎實驗所發現的機制之外，也可能存在其他相關的機制。可是在未來的治療可以預期的，選擇特定高發炎反應的病患，加以治療，可以觀察心臟舒張功能的進步。或者更高層次的選擇曾經發生舒張性心衰竭的病患，監測其系統發炎反應的高低，予以特殊的治療改善發炎反應，當可以預期心臟的舒張功能會得到改善，減少病患的併發症。為了確立上述的機制，在未來的研究當可以設計隨機，雙盲的臨床試驗，針對舒張性心衰竭的病患，比如腹膜透析合併系統高發炎反應的病患，選擇實驗組加以治療，觀察心臟舒張功能的各項指標改善的情況，來驗證是否有上述的機制存在，同時可以收集病患的各項檢體，期能找出其他的機制，尋找治療上的突破。

最後一部分，我們希望能找出發炎反應的下游，除了鈣離子的影響之外，組織纖維化是否能有最明顯的 marker，最上游的刺激物質可以供臨床治療監測或者加以改善的，在這部分的研究當中確立了血漿中的 connective tissue growth factor 和超音波下的心臟舒張功能指標有相關性，而且是在舒張功能越嚴重的病患和組織都卜勒等黃金指標的相關性更強，同時也和心臟 MRI 下的組織纖維化程度明顯的相關。我們也運用動物實驗證實，這項纖維化的最上游指標和血壓的變化明顯的



相關，心臟稍微出現舒張功能不良的前期反應，組織中的 CTGF 便開始上升，細胞的實驗也的確證明，受到拉力的初步刺激，就可以使得心肌細胞分泌 CTGF，所以血漿中的 CTGF 指標可以做為早期監測治療舒張性心衰竭的憑據，同時可以代表心臟纖維化的程度，在臨床運用的展望便在於監測更大規模的舒張性心衰竭病患，確立診斷的標準數值，更可以期待使用新的藥物來治療這一類的病患，目前在動物實驗上已經證實，使用 microRNA 的治療方式抑制 CTGF 的表現，可以預防心臟肥大的出現，不過在臨床上仍沒有資料，雖然藥物要運用在人體還有一段距離，未來我們可行的方向，應該是監測 CTGF，及早對 CTGF 已經上升的病患加以使用傳統的治療，如使用 ACE inhibitor，積極的控制血壓血脂等方式，觀察 CTGF 的改善是否和臨床徵狀的改善有相關存在，作為改善舒張性心衰竭治療方針的基石。

第六章 論文英文簡述 (Summary)



The aim of the present doctoral thesis is to investigate the detailed molecular mechanism by which proinflammatory cytokines are involved in the pathogenesis of diastolic heart failure (DHF). We realized that the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) is essential to the regulation of intracellular calcium levels in cardiac, smooth and skeletal muscles. In cardiomyocytes, free calcium increases during systole and induces mechanical contraction by binding to the troponin complex. Subsequently calcium is removed from the cytosol primarily by the action of SERCA during diastolic relaxation. It has also been shown that increasing activity of SERCA2 improves ventricular diastolic relaxation in animal and human models. However, our pilot study reveal that AngiotensinII does not appear to exert an effect on SERCA2 levels in cardiomyocytes, but pro-inflammatory cytokines such as $\text{TNF-}\alpha$ or IL-6 have even greater effect over SERCA2 expression in cardiomyocyte models. Therefore, we explored the effect of IL-6 and $\text{TNF-}\alpha$ on the transcriptional regulation and function of SERCA2 in cardiomyocytes in the subsequent study.

Regarding $\text{TNF-}\alpha$ or IL-6 and SERCA2 signal transduction, we investigated whether $\text{TNF-}\alpha$ or IL-6 modulates SERCA2 calcium current through transcriptional regulation, using a HL-1 cells model. We cloned a 1754 bp promoter fragment of rat SERCA2 gene and amplified by polymerase chain reaction (PCR). We determined that $\text{TNF-}\alpha$ or IL-6 decreased SERCA2 mRNA, protein levels and SERCA2 promoter activities, which resulted in an attenuation calcium transient. $\text{TNF-}\alpha$ or IL-6 also significantly decreased promoter activity of SERCA2 gene in a concentration- and time-dependent manner. We also treated HL-1 cardiomyocyte with sera from critically illness patients and also demonstrated a significant decrease of SERCA2 expression comparing to the controls. In summary, we explored the possible mechanism, and found that inflammatory cytokines

had a direct effect on SERCA2 at the transcription level. Due to the strong correlation between heart diastolic function and SERCA2 expression, we hypothesized that plasma levels of TNF- α and IL-6 are associated with DHF through downregulation of SERCA2. The above experiment found that TNF- α decrease Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA2) gene expression, and attenuated diastolic calcium re-uptake in cardiomyocyte.

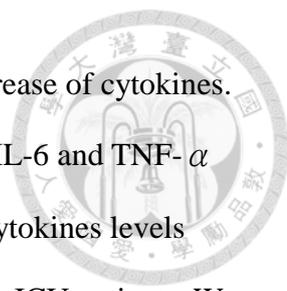
Accordingly, in the following study, we explored the effect of TNF- α on the transcriptional regulation of SERCA2 cardiomyocytes. We used a murine cell line which continuously divides and maintains a differentiated cardiac phenotype to study the detailed signaling mechanisms by which TNF- α regulates the expression of SERCA2 protein. We first found that TNF- α decreased SERCA2 gene expression and induced left ventricular (LV) diastolic dysfunction through Nuclear Factor-KappaB (NF- κ B) Element – Binding Protein – Dependent Pathway. By inhibition of TNF- α or NF- κ B to block the pathway, we also discovered an improvement of SERCA2 level and LV diastolic function. We also used an in vivo rat model of hyper-TNF- α to verify the results obtained in the cellular study. In summary, we first demonstrated that TNF- α decreased the transcription of SERCA2 through a NF- κ B binding element in the promoter region of SERCA2 gene both in vivo and in vitro. The upstream NF- κ B dependent pathway was critical for TNF- α – induced decreased transcription of SERCA2 gene. The NF- κ B blocker (PDTC) and pre-incubation of simvastatin inhibited TNF- α – induced NF- κ B dependent pathway and augmented expression of SERCA2 gene which in turns lead to improvement of LV diastolic function from an in vivo rat model of LPS injection. LV diastolic function has recently been found to play an important role for prognosis in different populations. Therefore, our results may implicate the therapeutic effect of statins or NF- κ B inhibitors to prevent TNF- α –

induced NF- κ B generation in cardiomyocytes and further ameliorate diastolic function, although the statin concentrations used in the present study may be high compared with clinically relevant concentrations and are known to have other pleiotropic effects.

Though the cell and animal models in our current studies represented acute illness with high inflammation, subclinical inflammatory status induced by adiposity or metabolic syndrome are also known to be potentially associated with the development of LV diastolic dysfunction. Previous study suggested that reduction in myocardial oxidative stress and related protein modifications might be able to prevent the so-called

“metabolic heart disease.” Our current studies may conclude that use of statin might be able to treat LV diastolic dysfunction which resulted from chronic inflammatory status.

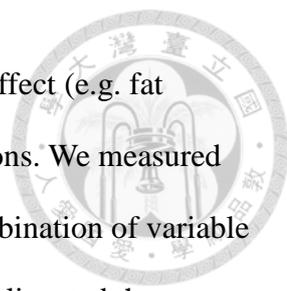
Regarding clinical studies, to evaluate the association between cytokines (TNF- α or IL-6) and left ventricular dysfunction indices, first, we sought to assess plasma levels of IL-6 and TNF- α in patients with DHF, including critically ill patients. We included 2 groups of patients including the first group consisted of pure DHF patients admitted to the cardiovascular ward of National Taiwan University Hospital and its affiliated hospital for coronary angiography or a health examination and the second group enrolled 30 consecutive patients with left ventricular diastolic dysfunction that were admitted to the intensive care units (ICUs) of National Taiwan University Hospital. A control population for study group 1 consisted of risk-factor matched controls with no symptoms of HF failure and no objective evidence of diastolic dysfunction. The results showed that patients with DHF had significantly higher plasma levels of TNF- α and IL-6 than the controls. Significant correlations ($p < .01$ for each) were found for TNF- α and E/Em ($r = 0.87$) and E/A ($r = -0.69$), and for IL-6 and E/Em ($r = 0.80$) and E/A ($r = -0.65$). Cytokine levels were also correlated with diastolic function in critical ill patients,



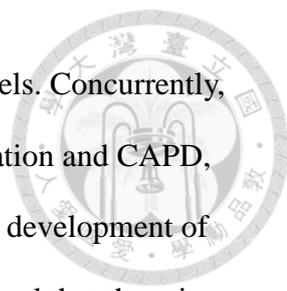
and diastolic function improved significantly in association with decrease of cytokines. We first demonstrated that the levels of pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α were higher in non-complicated DHF patients and improvement of cytokines levels along with cardiac diastolic function after treatment of the disease for ICU patients. We may conclude that while there is little information regarding the medical management of DHF, a better understanding of the nature of inflammatory activation in patients with DHF may lead to improvement of outcomes by applying novel therapies aimed at limiting inflammatory reactions, particularly in the setting of patients in intensive care units. We later included 56 critically burned patients who admitted the intensive care unit and performed transthoracic echocardiography to evaluate LV diastolic function. The total body surfaced area of burned patients was proportional to serum level of interleukin-6 and TNF- α ($p < 0.001$ for each). Significant correlations were found for tumor necrosis factor-alpha and decelerating time, E/A, and E/Em ($r^2 = 0.59, 0.45,$ and $0.52; p < 0.001$ for each), and for interleukin-6 and decelerating time, E/A, and E/Em ($r^2 = 0.63, 0.60,$ and $0.62; p < 0.001$ for each). Diastolic function improved significantly in association with decrease of cytokines after burned patients transferred to general ward ($p < 0.001$). Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and sera from critically burned patients downregulated the expression of the SERCA2 gene in HL-1 cardiomyocytes. There was a significant correlation between LV diastolic dysfunction and in-hospital mortality in critically burned patients ($HR = 3.99, p = 0.038$) after risk factors adjusted. With the above experiment, we showed that the levels of the proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α correlated to LV diastolic dysfunction parameters in burn patients, and found that the sera of these patients inhibited SERCA2 mRNA levels. Moreover, improvement in LV diastolic dysfunction was correlated with a decrease in TNF- α and IL-6 serum levels and also was associated with the clinical outcomes of burn patients.

This study found a significant correlation between the hyper-activating immunoinflammatory system after burn injuries and the development of LV diastolic dysfunction which improved as inflammation declined. More importantly, the development of LV diastolic dysfunction had a strong correlation with mortality in this specific group of patients.

Regarding the patients in the general population with higher inflammatory status, we further included 2 other groups of patients to prove the above hypothesis. First we included 102 otherwise-healthy adults. The participants were classified as having LV diastolic dysfunction by echocardiographic findings. Serum C-reactive protein (CRP) and lipid profile were also measured. The homeostasis model of insulin resistance (HOMA) was calculated. Central obesity was assessed by computerized tomography at the L4 level. In a multivariate regression analysis, the relationship between visceral adipose tissue (VAT) and LV diastolic dysfunction became insignificant when CRP was introduced into the model, although CRP itself was significantly associated with LV diastolic dysfunction (OR: 1.32, 95% CI: 1.01~1.72, $p=0.04$). A significant correlation was also found between VAT and CRP ($r = 0.70$; $p < 0.001$). We then performed path analysis as illustrated by the structural equation model. This proved our hypotheses that VAT might affect LV diastolic dysfunction through the effect of CRP (total fat load with inflammation ($B = 1.133$, $p < 0.001$) and that inflammation might affect LV diastolic dysfunction ($B = 0.373$, $p < 0.001$). In this study, we found a significant association between LV diastolic dysfunction and fat as measured by CT in a sample of the general population. There were strong associations among visceral fat, inflammation, and LV diastolic dysfunction in adjusted logistic regression models. In order to propose a potential biological pathway, we constructed a structural equation model and performed a path analysis. With this analysis, we verified that fat deposition acts mainly through

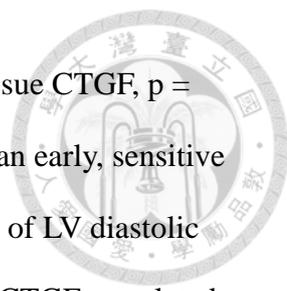


inflammation to affect LV diastolic dysfunction and less by its own effect (e.g. fat infiltration of LV). The strength of this study is in its precise definitions. We measured central obesity by CT and defined LV diastolic dysfunction by a combination of variable echocardiographic parameters. In conclusion, for the first time, we delineated the complex relationship among central obesity, inflammation, and LV diastolic dysfunction using SEM. We showed that greater amounts of visceral adipose tissue were associated with low-grade inflammation, which may lead to subclinical LV diastolic dysfunction in non-diabetic, otherwise-healthy subjects. We also tried to establish the association between inflammation and left ventricular (LV) diastolic dysfunction in peritoneal dialysis (PD) and non-PD patients. We also tested the above association and whether inflammation interacts with PD to increase LV diastolic dysfunction risks. 120 subjects with normal creatinine levels and 101 PD patients were recruited. Echocardiographic parameters were assessed in all patients and LV diastolic dysfunction were indentified by echocardiography. Blood was sampled at the baseline for measurement of inflammation markers, including tissue necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6). Subjects with LV diastolic dysfunction had higher proinflammation cytokines levels in both groups. Inflamed markers correlated significantly with echocardiography parameters for LV diastolic dysfunction in patients receiving PD. In a multivariate regression analysis adjusting for all the factors associated with LV diastolic dysfunction, inflammation is still significantly associated with left ventricular diastolic dysfunction (TNF-alpha, OR: 2.6, 95% CI: 2.0~3.35, $p < 0.001$; IL-6, OR: 1.26, 95% CI: 1.25~1.26, $p = 0.01$). In addition, the interaction of PD and inflammation significantly contributed to the development of LV diastolic dysfunction (PD*TNF- α : OR: 1.45, 95% CI: 1.13 - 1.79, $P = 0.004$). We find there is a significant correlation between inflammatory cytokines and LV diastolic dysfunction in PD patients and the correlation



was significantly stronger than in subjects with normal creatinine levels. Concurrently, we also notice that there is an interaction between systemic inflammation and CAPD, especially TNF- α and CAPD, which had a synergistic effect for the development of LV diastolic dysfunction in CAPD subjects. From this study, we showed that there is a significant correlation between LV diastolic dysfunction and serum inflammatory cytokines (TNF- α , and IL-6) in patients receiving CAPD. An interaction between CAPD and inflammation, especially TNF- α , was also shown to further aggravate LV diastolic dysfunction. Hence it is reasonable that the association between LV diastolic dysfunction and CAPD was at least in part due to the excess of plasma cytokines, which suggests increase of systemic inflammation.

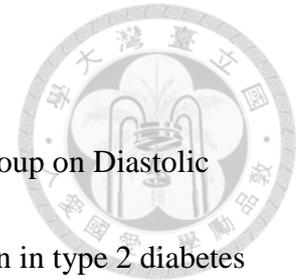
Finally, we investigated an emerging marker for tissue fibrosis, connective tissue growth factor (CTGF) and its association with cardiac diastolic function using cellular and animal models and clinical human data. We recruited a total of 125 patients with a diagnosis of DHF from 1283 patient of the Taiwan Diastolic Heart Failure Registry. The severity of DHF was determined by tissue doppler imaging (E/e'). Cardiac magnetic resonance imaging (CMRI) was used to evaluate myocardial fibrosis. Stretch of cardiomyocytes on flexible membrane base serves as a cellular phenotype of cardiac diastolic dysfunction (DD). A canine model of DD was induced by aortic banding. Significant correlation was found between plasma CTGF and E/e' in DHF patients. Severity of cardiac fibrosis evaluated by CMRI also correlated with CTGF. In the cell model, stretch increased secretion of CTGF from cardiomyocytes. In the canine model, myocardial tissue CTGF expression and fibrosis significantly increased after 2 weeks of aortic banding. Notable, the expression of CTGF paralleled the severity of LV DD ($r=0.40$, $p<0.001$ for E/e') and hemodynamic changes ($r=0.80$, $p<0.001$). After adjusting for confounding factors, CTGF levels still correlated with diastolic parameters in both



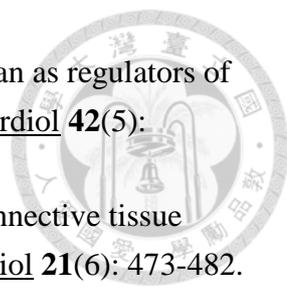
human and canine models (human plasma CTGF, $p < 0.001$; canine tissue CTGF, $p = 0.04$). We demonstrated that the level of plasma CTGF was not only an early, sensitive marker for the diagnosis of DHF but also correlated with the severity of LV diastolic dysfunction as well as the severity of cardiac fibrosis. We found that CTGF correlated with echocardiographic parameters for diastolic dysfunction along with plasma NT-proBNP at different stages of human DHF. Accordingly, in the animal model, we also demonstrated that cardiac CTGF increased significantly as early as 2 weeks of pressure overload. Moreover, the expression of CTGF paralleled the severity of LV diastolic dysfunction and the subtle, incremental blood pressure changes. In the cellular model, we also found that CTGF secretion increased after 24 h of stretch stimulation (mimicking pressure overload stimulation). Our study implies that the CTGF level may directly reflect the changes of LV diastolic function and serve as a platform to monitor the effect of treatment.

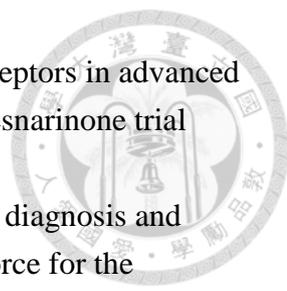
In conclusions, the present doctoral thesis combined genetic association studies, molecular studies and clinical studies to demonstrate how cytokines (including RAS system, TNF- α , IL-6 and CTGF) are involved in the pathogenesis of cardiac fibrosis, SERCA2 regulation, which are important substrates of DHF. We first showed the association between RAS genetic variants and the prognosis of DHF. Second, we further investigated the possible molecular mechanisms by which TNF- α is involved in the pathogenesis of SERCA2 regulation. Third, we found that inflammatory status correlated with clinical diastolic indices closely from patients with severe inflammation to subclinical inflammatory status and LV diastolic dysfunction it self is an independent prognostic marker for severe illness patients. Finally, we proved CTGF to be a useful tool to non-invasively evaluate the status and severity of LV diastolic function using cellular and animal models and clinical human data.

第七章 參考文獻

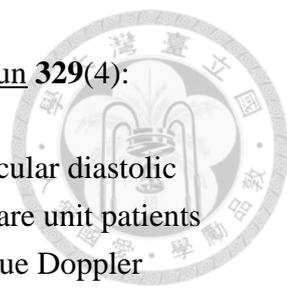


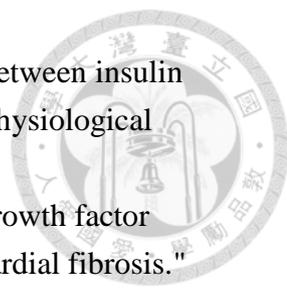
- (1998). "How to diagnose diastolic heart failure. European Study Group on Diastolic Heart Failure." Eur Heart J **19**(7): 990-1003.
- Abe, T., Y. Ohga, et al. (2002). "Left ventricular diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus model rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **282**(1): H138-148.
- Adams, H. R., C. R. Baxter, et al. (1982). "Contractile function of heart muscle from burned guinea pigs." Circ Shock **9**(1): 63-73.
- Ammar, K. A., M. M. Redfield, et al. (2008). "Central obesity: association with left ventricular dysfunction and mortality in the community." Am Heart J **156**(5): 975-981.
- Angeja, B. G. and W. Grossman (2003). "Evaluation and management of diastolic heart failure." Circulation **107**(5): 659-663.
- Asahi, M., H. Nakayama, et al. (2003). "Regulation of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ adenosine triphosphatase by phospholamban and sarcolipin: implication for cardiac hypertrophy and failure." Trends Cardiovasc Med **13**(4): 152-157.
- Bajraktari, G., M. Berbatovci-Ukimeraj, et al. (2009). "Predictors of increased left ventricular filling pressure in dialysis patients with preserved left ventricular ejection fraction." Croat Med J **50**(6): 543-549.
- Baker, D. L., K. Hashimoto, et al. (1998). "Targeted overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase increases cardiac contractility in transgenic mouse hearts." Circ Res **83**(12): 1205-1214.
- Ballard-Croft, C., D. L. Maass, et al. (2002). "Activation of stress-responsive pathways by the sympathetic nervous system in burn trauma." Shock **18**(1): 38-45.
- Basu, R., G. Y. Oudit, et al. (2009). "Type 1 diabetic cardiomyopathy in the Akita (Ins2WT/C96Y) mouse model is characterized by lipotoxicity and diastolic dysfunction with preserved systolic function." Am J Physiol Heart Circ Physiol **297**(6): H2096-2108.
- Baxter, C. R. and T. Shires (1968). "Physiological response to crystalloid resuscitation of severe burns." Ann N Y Acad Sci **150**(3): 874-894.
- Benjamin, I. J. (2012). "Targeting endoglin, an auxiliary transforming growth factor beta coreceptor, to prevent fibrosis and heart failure." Circulation **125**(22): 2689-2691.
- Berg, T. J., O. Snorgaard, et al. (1999). "Serum levels of advanced glycation end products are associated with left ventricular diastolic function in patients with type 1 diabetes." Diabetes Care **22**(7): 1186-1190.
- Bers, D. M. (2008). "Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes." Annu Rev Physiol **70**: 23-49.

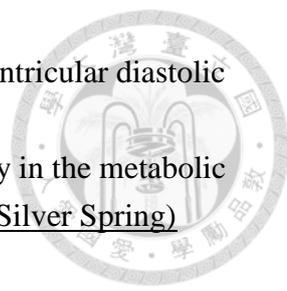
- 
- Bhupathy, P., G. J. Babu, et al. (2007). "Sarcolipin and phospholamban as regulators of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase." J Mol Cell Cardiol **42**(5): 903-911.
- Blom, I. E., R. Goldschmeding, et al. (2002). "Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy?" Matrix Biol **21**(6): 473-482.
- Boltzen, U., A. Eisenreich, et al. (2012). "Alternatively spliced tissue factor and full-length tissue factor protect cardiomyocytes against TNF-alpha-induced apoptosis." J Mol Cell Cardiol **52**(5): 1056-1065.
- Borbely, A., I. Falcao-Pires, et al. (2009). "Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium." Circ Res **104**(6): 780-786.
- Bryant, D., L. Becker, et al. (1998). "Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor-alpha." Circulation **97**(14): 1375-1381.
- Budagov, R. S. and L. P. Ul'ianova (2004). "[Role of interleukin-6 (IL-6) in the pathogenesis of combined radiation/thermal injuries]." Radiats Biol Radioecol **44**(4): 398-402.
- Carr, A. N., A. G. Schmidt, et al. (2002). "Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function." Mol Cell Biol **22**(12): 4124-4135.
- Chrysohoou, C., C. Pitsavos, et al. (2009). "Chronic systemic inflammation accompanies impaired ventricular diastolic function, detected by Doppler imaging, in patients with newly diagnosed systolic heart failure (Hellenic Heart Failure Study)." Heart Vessels **24**(1): 22-26.
- Chuva de Sousa Lopes, S. M., A. Feijen, et al. (2004). "Connective tissue growth factor expression and Smad signaling during mouse heart development and myocardial infarction." Dev Dyn **231**(3): 542-550.
- Claycomb, W. C., N. A. Lanson, Jr., et al. (1998). "HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 2979-2984.
- Cowie, M. R., A. Mosterd, et al. (1997). "The epidemiology of heart failure." Eur Heart J **18**(2): 208-225.
- Davis, B. R., J. B. Kostis, et al. (2008). "Heart failure with preserved and reduced left ventricular ejection fraction in the antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial." Circulation **118**(22): 2259-2267.
- de Boer, R. A., D. J. Lok, et al. (2011). "Predictive value of plasma galectin-3 levels in heart failure with reduced and preserved ejection fraction." Ann Med **43**(1): 60-68.
- Del Monte, F. and R. J. Hajjar (2008). "Intracellular devastation in heart failure." Heart Fail Rev **13**(2): 151-162.

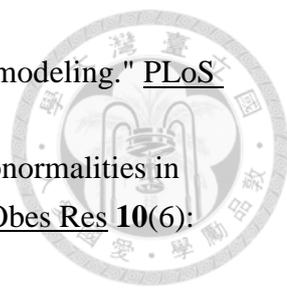
- 
- Deswal, A., N. J. Petersen, et al. (2001). "Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST)." Circulation **103**(16): 2055-2059.
- Dickstein, K., A. Cohen-Solal, et al. (2008). "ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)." Eur Heart J **29**(19): 2388-2442.
- Dinh, W., R. Futh, et al. (2009). "Elevated plasma levels of TNF-alpha and interleukin-6 in patients with diastolic dysfunction and glucose metabolism disorders." Cardiovasc Diabetol **8**: 58.
- Duisters, R. F., A. J. Tijssen, et al. (2009). "miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling." Circ Res **104**(2): 170-178, 176p following 178.
- Eckel, R. H., S. M. Grundy, et al. (2005). "The metabolic syndrome." Lancet **365**(9468): 1415-1428.
- El-Armouche, A., K. Wittkopper, et al. (2008). "Phosphatase inhibitor-1-deficient mice are protected from catecholamine-induced arrhythmias and myocardial hypertrophy." Cardiovasc Res **80**(3): 396-406.
- El Mesallamy, H. O., H. H. Ahmed, et al. (2012). "Clinical significance of inflammatory and fibrogenic cytokines in diabetic nephropathy." Clin Biochem **45**(9): 646-650.
- Fellstrom, B. C., A. G. Jardine, et al. (2009). "Rosuvastatin and cardiovascular events in patients undergoing hemodialysis." N Engl J Med **360**(14): 1395-1407.
- Finkel, M. S., C. V. Oddis, et al. (1992). "Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide." Science **257**(5068): 387-389.
- Flett, A. S., M. P. Hayward, et al. (2010). "Equilibrium contrast cardiovascular magnetic resonance for the measurement of diffuse myocardial fibrosis: preliminary validation in humans." Circulation **122**(2): 138-144.
- Foley, R. N., P. S. Parfrey, et al. (1998). "Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease." Am J Kidney Dis **32**(5 Suppl 3): S112-119.
- Fukuta, H. and W. C. Little (2008). "Observational studies of statins in heart failure with preserved systolic function." Heart Fail Clin **4**(2): 209-216.
- Fukuta, H., D. C. Sane, et al. (2005). "Statin therapy may be associated with lower mortality in patients with diastolic heart failure: a preliminary report." Circulation **112**(3): 357-363.
- Goette, A., T. Staack, et al. (2000). "Increased expression of extracellular

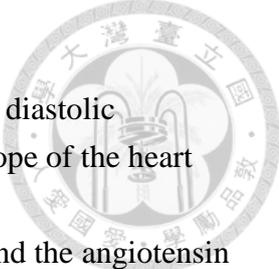
- signal-regulated kinase and angiotensin-converting enzyme in human atria during atrial fibrillation." J Am Coll Cardiol **35**(6): 1669-1677.
- Gravning, J., S. Orn, et al. (2012). "Myocardial connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction." PLoS One **7**(12): e52120.
- Gulick, T., M. K. Chung, et al. (1989). "Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(17): 6753-6757.
- Halow, J. M., V. M. Figueredo, et al. (1999). "Role of slowed Ca(2+) transient decline in slowed relaxation during myocardial ischemia." J Mol Cell Cardiol **31**(9): 1739-1748.
- Hanatani, A., M. Yoshiyama, et al. (1995). "Inhibition by angiotensin II type 1 receptor antagonist of cardiac phenotypic modulation after myocardial infarction." J Mol Cell Cardiol **27**(9): 1905-1914.
- Hasenfuss, G., H. Reinecke, et al. (1994). "Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium." Circ Res **75**(3): 434-442.
- Haugen, E., J. Chen, et al. (2007). "Parallel gene expressions of IL-6 and BNP during cardiac hypertrophy complicated with diastolic dysfunction in spontaneously hypertensive rats." Int J Cardiol **115**(1): 24-28.
- He, H., F. J. Giordano, et al. (1997). "Overexpression of the rat sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation." J Clin Invest **100**(2): 380-389.
- Hirota, H., K. Yoshida, et al. (1995). "Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(11): 4862-4866.
- Hoekstra, T., J. M. Geleijnse, et al. (2005). "Relationship of C-reactive protein with components of the metabolic syndrome in normal-weight and overweight elderly." Nutr Metab Cardiovasc Dis **15**(4): 270-278.
- Horton, J. W. (2004). "Left ventricular contractile dysfunction as a complication of thermal injury." Shock **22**(6): 495-507.
- Huang, C. H., K. L. Chien, et al. (2007). "Impact of heart failure and left ventricular function on long-term survival--report of a community-based cohort study in Taiwan." Eur J Heart Fail **9**(6-7): 587-593.
- Huang, Y., K. E. Walker, et al. (2004). "Cardiac systolic and diastolic dysfunction after a cholesterol-rich diet." Circulation **109**(1): 97-102.
- Ihara, Y., K. Kageyama, et al. (2005). "Overexpression of calreticulin sensitizes

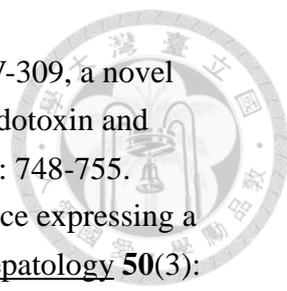
- 
- SERCA2a to oxidative stress." Biochem Biophys Res Commun **329**(4): 1343-1349.
- Ikonomidis, I., M. Nikolaou, et al. (2010). "Association of left ventricular diastolic dysfunction with elevated NT-pro-BNP in general intensive care unit patients with preserved ejection fraction: a complementary role of tissue Doppler imaging parameters and NT-pro-BNP levels for adverse outcome." Shock **33**(2): 141-148.
- Ing, D. J., J. Zang, et al. (1999). "Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak, and Bcl-x." Circ Res **84**(1): 21-33.
- Ivkovic, S., B. S. Yoon, et al. (2003). "Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development." Development **130**(12): 2779-2791.
- Jeunemaitre, X., F. Soubrier, et al. (1992). "Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen." Cell **71**(1): 169-180.
- Ju, H., T. Scammel-La Fleur, et al. (1996). "Altered mRNA abundance of calcium transport genes in cardiac myocytes induced by angiotensin II." J Mol Cell Cardiol **28**(5): 1119-1128.
- Kang, B. Y. and J. L. Mehta (2009). "Rosuvastatin attenuates Ang II--mediated cardiomyocyte hypertrophy via inhibition of LOX-1." J Cardiovasc Pharmacol Ther **14**(4): 283-291.
- Kankaanpaa, M., H. R. Lehto, et al. (2006). "Myocardial triglyceride content and epicardial fat mass in human obesity: relationship to left ventricular function and serum free fatty acid levels." J Clin Endocrinol Metab **91**(11): 4689-4695.
- Kao, Y. H., Y. C. Chen, et al. (2010). "Tumor necrosis factor-alpha decreases sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase expressions via the promoter methylation in cardiomyocytes." Crit Care Med **38**(1): 217-222.
- Kapadia, S. R., K. Yakoob, et al. (2000). "Elevated circulating levels of serum tumor necrosis factor-alpha in patients with hemodynamically significant pressure and volume overload." J Am Coll Cardiol **36**(1): 208-212.
- Kawase, Y. and R. J. Hajjar (2008). "The cardiac sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase: a potent target for cardiovascular diseases." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **5**(9): 554-565.
- Kemp, T. J., I. K. Aggeli, et al. (2004). "Phenylephrine and endothelin-1 upregulate connective tissue growth factor in neonatal rat cardiac myocytes." J Mol Cell Cardiol **37**(2): 603-606.
- Kiewitz, R., C. Acklin, et al. (2003). "Ca²⁺ -dependent interaction of S100A1 with the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ -ATPase2a and phospholamban in the human heart." Biochem Biophys Res Commun **306**(2): 550-557.

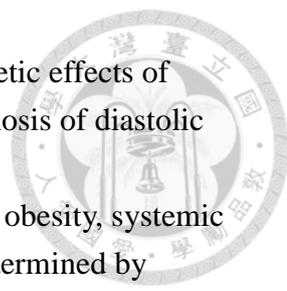
- 
- Kim, J. A., M. Montagnani, et al. (2006). "Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms." Circulation **113**(15): 1888-1904.
- Koitabashi, N., M. Arai, et al. (2007). "Increased connective tissue growth factor relative to brain natriuretic peptide as a determinant of myocardial fibrosis." Hypertension **49**(5): 1120-1127.
- Koitabashi, N., M. Arai, et al. (2008). "Plasma connective tissue growth factor is a novel potential biomarker of cardiac dysfunction in patients with chronic heart failure." Eur J Heart Fail **10**(4): 373-379.
- Kosmala, W., R. Derzhko, et al. (2008). "Plasma levels of TNF-alpha, IL-6, and IL-10 and their relationship with left ventricular diastolic function in patients with stable angina pectoris and preserved left ventricular systolic performance." Coron Artery Dis **19**(6): 375-382.
- Kranias, E. G. (1985). "Regulation of calcium transport by protein phosphatase activity associated with cardiac sarcoplasmic reticulum." J Biol Chem **260**(20): 11006-11010.
- Krown, K. A., M. T. Page, et al. (1996). "Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. Involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death." J Clin Invest **98**(12): 2854-2865.
- Kubota, T., G. S. Bounoutas, et al. (2000). "Soluble tumor necrosis factor receptor abrogates myocardial inflammation but not hypertrophy in cytokine-induced cardiomyopathy." Circulation **101**(21): 2518-2525.
- Kumar, S., M. Raftery, et al. (2007). "Anti-inflammatory effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors (statins) in peritoneal dialysis patients." Perit Dial Int **27**(3): 283-287.
- Lang, R. M., M. Bierig, et al. (2005). "Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology." J Am Soc Echocardiogr **18**(12): 1440-1463.
- Lee, J. J., S. Liu, et al. (2011). "Myocardial T1 and extracellular volume fraction mapping at 3 tesla." J Cardiovasc Magn Reson **13**: 75.
- Lee, J. K., H. H. Lin, et al. (2011). "Differential association of proinflammatory cytokines with left ventricular diastolic dysfunction in subjects with and without continuous ambulatory peritoneal dialysis." Nutr Metab Cardiovasc Dis.
- Lester, S. J., A. J. Tajik, et al. (2008). "Unlocking the mysteries of diastolic function: deciphering the Rosetta Stone 10 years later." J Am Coll Cardiol **51**(7): 679-689.

- 
- Lin, C. Y., C. K. Wu, et al. (2012). "Prognostic significance of left ventricular diastolic function in burn patients." Shock **37**(5): 457-462.
- Lin, L. Y., H. K. Kuo, et al. (2008). "Confirming a biological pathway in the metabolic syndrome--insight from the NHANES 1999-2002." Obesity (Silver Spring) **16**(12): 2676-2681.
- Lipskaia, L., E. R. Chemaly, et al. (2010). "Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase as a therapeutic target for heart failure." Expert Opin Biol Ther **10**(1): 29-41.
- London, G. M. (2003). "Cardiovascular disease in chronic renal failure: pathophysiologic aspects." Semin Dial **16**(2): 85-94.
- MacLennan, D. H., Y. Kimura, et al. (1998). "Sites of regulatory interaction between calcium ATPases and phospholamban." Ann N Y Acad Sci **853**: 31-42.
- Makarenko, I., C. A. Opitz, et al. (2004). "Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts." Circ Res **95**(7): 708-716.
- Malavazos, A. E., G. Di Leo, et al. (2010). "Relation of echocardiographic epicardial fat thickness and myocardial fat." Am J Cardiol **105**(12): 1831-1835.
- Mannheim, D., J. Herrmann, et al. (2011). "Simvastatin preserves diastolic function in experimental hypercholesterolemia independently of its lipid lowering effect." Atherosclerosis **216**(2): 283-291.
- Mantuano, E., S. Santi, et al. (2007). "Simvastatin and fluvastatin reduce interleukin-6 and interleukin-8 lipopolysaccharide (LPS) stimulated production by isolated human monocytes from chronic kidney disease patients." Biomed Pharmacother **61**(6): 360-365.
- Massie, B. M., P. E. Carson, et al. (2008). "Irbesartan in patients with heart failure and preserved ejection fraction." N Engl J Med **359**(23): 2456-2467.
- Matthews, D. R., J. P. Hosker, et al. (1985). "Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man." Diabetologia **28**(7): 412-419.
- McCullough, P. A., E. F. Philbin, et al. (2002). "Confirmation of a heart failure epidemic: findings from the Resource Utilization Among Congestive Heart Failure (REACH) study." J Am Coll Cardiol **39**(1): 60-69.
- Melendez, G. C., J. L. McLarty, et al. (2010). "Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats." Hypertension **56**(2): 225-231.
- Miyamoto, M. I., G. A. Rose, et al. (1999). "Abnormal global left ventricular relaxation occurs early during the development of pharmacologically induced ischemia." J Am Soc Echocardiogr **12**(2): 113-120.
- Miyazaki, Y., Y. Ikeda, et al. (2012). "Heart failure-inducible gene therapy targeting

- 
- protein phosphatase 1 prevents progressive left ventricular remodeling." PLoS One **7**(4): e35875.
- Morricone, L., A. E. Malavazos, et al. (2002). "Echocardiographic abnormalities in normotensive obese patients: relationship with visceral fat." Obes Res **10**(6): 489-498.
- Nagueh, S. F., S. J. Stetson, et al. (2001). "Decreased expression of tumor necrosis factor-alpha and regression of hypertrophy after nonsurgical septal reduction therapy for patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy." Circulation **103**(14): 1844-1850.
- Neague, C., M. Kulke, et al. (2002). "Titin isoform switch in ischemic human heart disease." Circulation **106**(11): 1333-1341.
- Nesto, R. W. and G. J. Kowalchuk (1987). "The ischemic cascade: temporal sequence of hemodynamic, electrocardiographic and symptomatic expressions of ischemia." Am J Cardiol **59**(7): 23C-30C.
- O'Riordain, M. G., D. S. O'Riordain, et al. (1996). "Dosage and timing of anti-TNF-alpha antibody treatment determine its effect of resistance to sepsis after injury." J Surg Res **64**(1): 95-101.
- Ock, S., J. Ahn, et al. (2012). "Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand is a novel inducer of myocardial inflammation." Cardiovasc Res **94**(1): 105-114.
- Ommen, S. R., R. A. Nishimura, et al. (2000). "Clinical utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of left ventricular filling pressures: A comparative simultaneous Doppler-catheterization study." Circulation **102**(15): 1788-1794.
- Paraskevas, K. I. (2008). "Statin therapy in peritoneal dialysis patients: effects beyond lipid lowering." Int Urol Nephrol **40**(1): 165-170.
- Paulus, W. J., C. Tschope, et al. (2007). "How to diagnose diastolic heart failure: a consensus statement on the diagnosis of heart failure with normal left ventricular ejection fraction by the Heart Failure and Echocardiography Associations of the European Society of Cardiology." Eur Heart J **28**(20): 2539-2550.
- Periasamy, M., T. D. Reed, et al. (1999). "Impaired cardiac performance in heterozygous mice with a null mutation in the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 2 (SERCA2) gene." J Biol Chem **274**(4): 2556-2562.
- Prabhu, S. D. (2004). "Cytokine-induced modulation of cardiac function." Circ Res **95**(12): 1140-1153.
- Priebe, L. and D. J. Beuckelmann (1998). "Simulation study of cellular electric properties in heart failure." Circ Res **82**(11): 1206-1223.
- Qin, F., D. A. Siwik, et al. (2012). "The polyphenols resveratrol and S17834 prevent the structural and functional sequelae of diet-induced metabolic heart disease in

- 
- mice." Circulation **125**(14): 1757-1764, S1751-1756.
- Redfield, M. M., S. J. Jacobsen, et al. (2003). "Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic." JAMA **289**(2): 194-202.
- Reich, H., J. A. Duncan, et al. (2003). "Interactions between gender and the angiotensin type 1 receptor gene polymorphism." Kidney Int **63**(4): 1443-1449.
- Remppis, A., T. Greten, et al. (1996). "Altered expression of the Ca(2+)-binding protein S100A1 in human cardiomyopathy." Biochim Biophys Acta **1313**(3): 253-257.
- Salemi, V. M., A. M. Bilate, et al. (2005). "Reference values from M-mode and Doppler echocardiography for normal Syrian hamsters." Eur J Echocardiogr **6**(1): 41-46.
- Schiffrin, E. L., M. L. Lipman, et al. (2007). "Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system." Circulation **116**(1): 85-97.
- Schultz Jel, J., B. J. Glascock, et al. (2004). "Accelerated onset of heart failure in mice during pressure overload with chronically decreased SERCA2 calcium pump activity." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(3): H1146-1153.
- Sciarretta, S., F. Paneni, et al. (2009). "Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and inflammatory processes in the development and progression of diastolic dysfunction." Clin Sci (Lond) **116**(6): 467-477.
- Seki, S., M. Nagai, et al. (2003). "Impaired Ca²⁺ handling in perfused hypertrophic hearts from Dahl salt-sensitive rats." Hypertens Res **26**(8): 643-653.
- Shi-Wen, X., A. Leask, et al. (2008). "Regulation and function of connective tissue growth factor/CCN2 in tissue repair, scarring and fibrosis." Cytokine Growth Factor Rev **19**(2): 133-144.
- Shiraki, A., J. Oyama, et al. (2012). "The glucagon-like peptide 1 analog liraglutide reduces TNF-alpha-induced oxidative stress and inflammation in endothelial cells." Atherosclerosis **221**(2): 375-382.
- Spinale, F. G., M. L. Coker, et al. (2000). "A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure." Circulation **102**(16): 1944-1949.
- Stenvinkel, P., E. Rodriguez-Ayala, et al. (2006). "Statin treatment and diabetes affect myeloperoxidase activity in maintenance hemodialysis patients." Clin J Am Soc Nephrol **1**(2): 281-287.
- Takahashi, N., H. Murakami, et al. (2000). "Association of a polymorphism at the 5'-region of the angiotensin II type 1 receptor with hypertension." Ann Hum Genet **64**(Pt 3): 197-205.
- Tang, Y., X. Tian, et al. (2012). "Abnormal termination of Ca²⁺ release is a common defect of RyR2 mutations associated with cardiomyopathies." Circ Res **110**(7): 968-977.

- 
- Terashita, Z., M. Kawamura, et al. (1992). "Beneficial effects of TCV-309, a novel potent and selective platelet activating factor antagonist in endotoxin and anaphylactic shock in rodents." J Pharmacol Exp Ther **260**(2): 748-755.
- Tong, Z., R. Chen, et al. (2009). "Susceptibility to liver fibrosis in mice expressing a connective tissue growth factor transgene in hepatocytes." Hepatology **50**(3): 939-947.
- Tsai, C. T., D. L. Wang, et al. (2007). "Angiotensin II increases expression of alpha1C subunit of L-type calcium channel through a reactive oxygen species and cAMP response element-binding protein-dependent pathway in HL-1 myocytes." Circ Res **100**(10): 1476-1485.
- van der Meer, R. W., L. J. Rijzewijk, et al. (2008). "The ageing male heart: myocardial triglyceride content as independent predictor of diastolic function." Eur Heart J **29**(12): 1516-1522.
- van Heerebeek, L., A. Borbely, et al. (2006). "Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure." Circulation **113**(16): 1966-1973.
- van Kimmenade, R. R., J. L. Januzzi, Jr., et al. (2006). "Utility of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide, galectin-3, and apelin for the evaluation of patients with acute heart failure." J Am Coll Cardiol **48**(6): 1217-1224.
- Ver Heyen, M., S. Heymans, et al. (2001). "Replacement of the muscle-specific sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoform SERCA2a by the nonmuscle SERCA2b homologue causes mild concentric hypertrophy and impairs contraction-relaxation of the heart." Circ Res **89**(9): 838-846.
- Vetter, R., U. Rehfeld, et al. (2002). "Transgenic overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase improves reticular Ca²⁺ handling in normal and diabetic rat hearts." FASEB J **16**(12): 1657-1659.
- Villegas, S., F. J. Villarreal, et al. (2000). "Leukemia Inhibitory Factor and Interleukin-6 downregulate sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA2) in cardiac myocytes." Basic Res Cardiol **95**(1): 47-54.
- Wanner, C., V. Krane, et al. (2005). "Atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis." N Engl J Med **353**(3): 238-248.
- Weber, K. T., C. G. Brilla, et al. (1993). "Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors." Cardiovasc Res **27**(3): 341-348.
- Wong, C. Y., T. O'Moore-Sullivan, et al. (2004). "Alterations of left ventricular myocardial characteristics associated with obesity." Circulation **110**(19): 3081-3087.
- Wu, C. K., J. K. Lee, et al. (2011). "Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 are associated with diastolic heart failure through downregulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase." Crit Care Med **39**(5): 984-992.

- 
- Wu, C. K., J. L. Luo, et al. (2010). "Demonstrating the pharmacogenetic effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors on long-term prognosis of diastolic heart failure." Pharmacogenomics J **10**(1): 46-53.
- Wu, C. K., C. Y. Yang, et al. (2012). "The relationship among central obesity, systemic inflammation, and left ventricular diastolic dysfunction as determined by structural equation modeling." Obesity (Silver Spring) **20**(4): 730-737.
- Xu, T., T. Wang, et al. (1992). "Centrally acting endogenous hypotensive substances in rats subjected to endotoxic shock." Life Sci **51**(23): 1817-1821.
- Yamada, M., Y. Ikeda, et al. (2006). "Inhibition of protein phosphatase 1 by inhibitor-2 gene delivery ameliorates heart failure progression in genetic cardiomyopathy." FASEB J **20**(8): 1197-1199.
- Yang, R. Y., G. A. Rabinovich, et al. (2008). "Galectins: structure, function and therapeutic potential." Expert Rev Mol Med **10**: e17.
- Zhang, J., Y. Xu, et al. (2010). "Effect of simvastatin on collagen I deposition in non-infarcted myocardium: role of NF-kappaB and osteopontin." Can J Physiol Pharmacol **88**(11): 1026-1034.
- Zhang, Y., A. J. Edgley, et al. (2012). "FT011, a new anti-fibrotic drug, attenuates fibrosis and chronic heart failure in experimental diabetic cardiomyopathy." Eur J Heart Fail **14**(5): 549-562.



第八章 圖表

圖 2-1

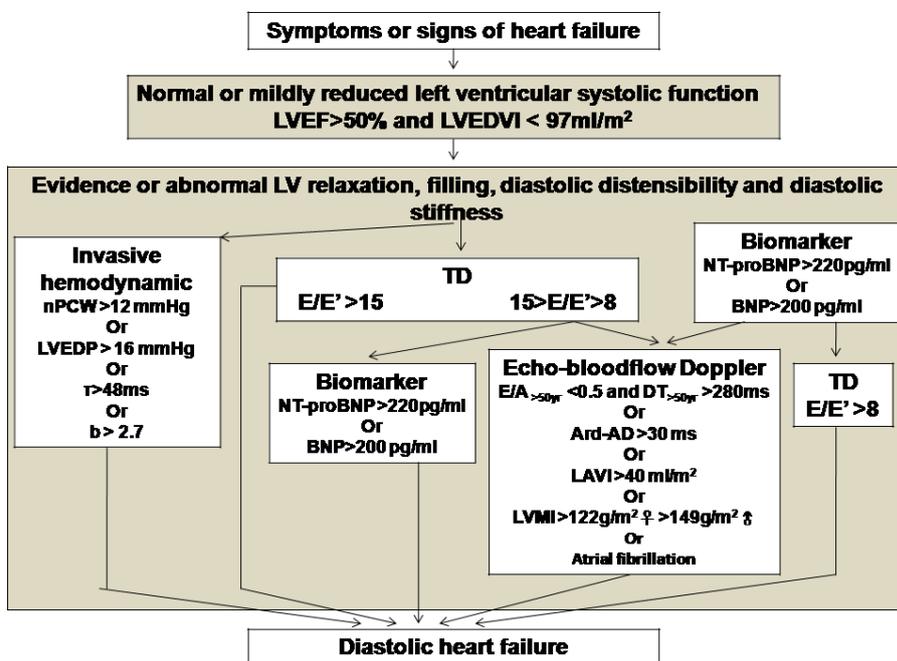


圖 2-1，測量二尖瓣流入血流 E, A 以及 deceleration time 的方法

本圖為都卜勒所擷取的正常的二尖瓣流入血流，其中 E 波代表早期的二尖瓣舒張期流入血流，代表左心室的快速填充期，A 波則代表晚期的二尖瓣流入血流，代表心房的收縮力，減速時間則是由 E 波波峰至零點線的減速度波。



圖 2-2 診斷舒張性心衰竭的流程圖(2007 年歐洲心臟科學會共識)



Abbreviation : LVEDVI, left ventricular end-diastolic volume index; mPCW, mean pulmonary capillary wedge pressure; LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure; τ , time constant of left ventricular relaxation; b, constant of left ventricular chamber stiffness; TD, tissue Doppler; E, early mitral valve flow velocity; E' , early TD lengthening velocity; NT-proBNP, N-terminal pro-brain natriuretic peptide; BNP, brain natriuretic peptide; E/A, ratio of early (E) to late (A) mitral valve flow velocity; DT, deceleration time; LVMI, left ventricular mass index; LAVI, left atrial volume index, Ard, duration of reverse pulmonary vein atrial systole flow; Ad, duration of mitral valve atrial wave flow

Paulus, W. J., C. Tschope, et al. (2007). *Eur Heart J* **28**(20): 2539-2550.

圖 2-3

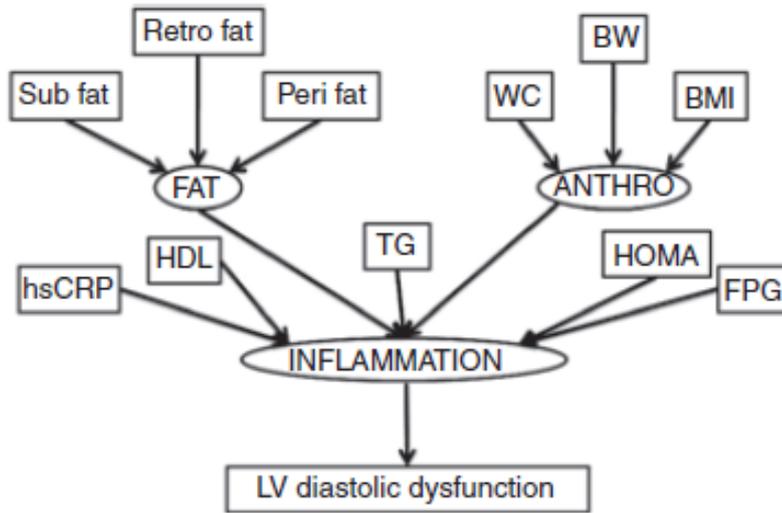


圖 2-3 預設的結構方程模式圖，來表示脂肪，發炎反應，左心室舒張功能可能的連結及干擾因子，其中未提及的干擾因素如年齡，性別均有校正。並用三種不同組成的脂肪，如皮下脂肪，腹膜脂肪，後腹腔脂肪等代表總脂肪量，身體因素如體重，腹圍等均加以考慮，可能導致發炎反應的因素如胰島素耐受性，空腹血糖，發炎反應指數等。

圖 2-4

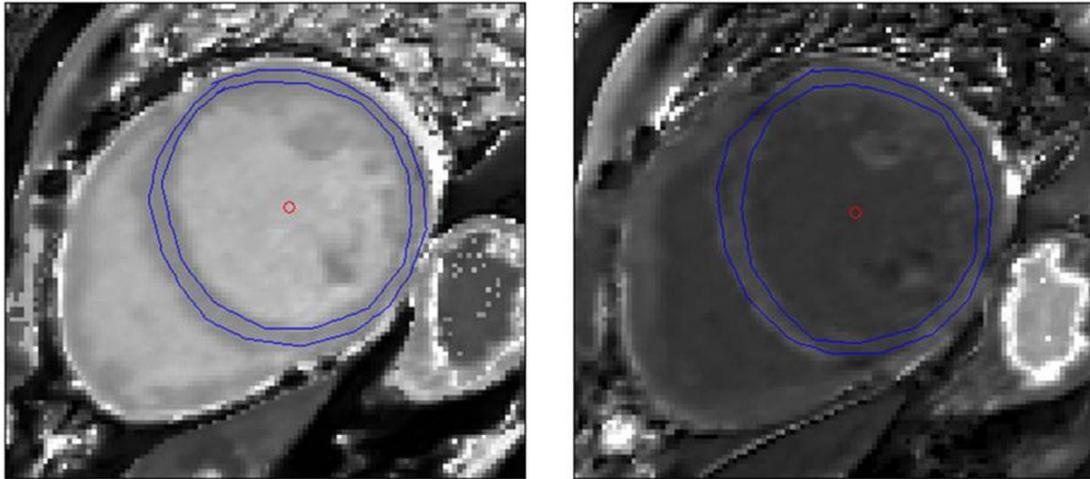
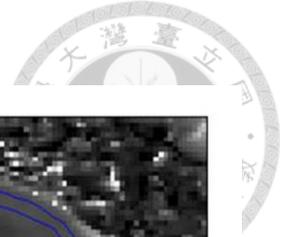


圖 2-4，心臟核磁共振造影，計算細胞外體積，我們選用 T1 期，打造影劑前後，將心包膜及心內壁的區塊圈選，用五個短軸掃描的左心室代表整體左心室的體積，接著計算其中的細胞外體積比率。

圖 3-1

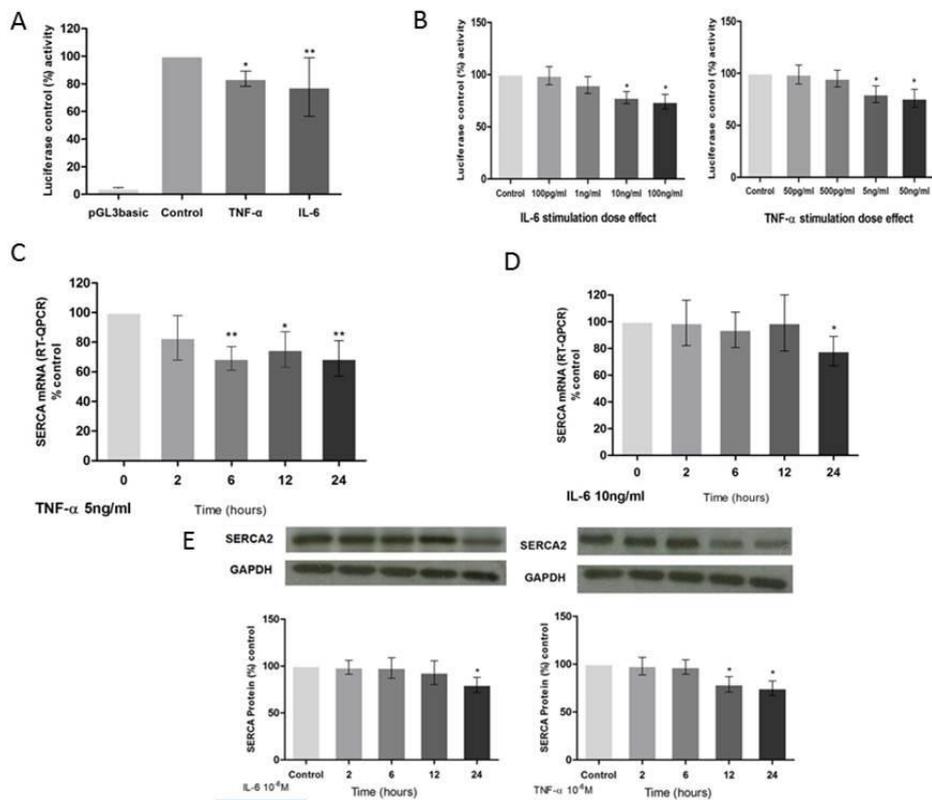


圖 3-1，TNF- α 及 IL-6 在 HL-1 心肌細胞上，以轉錄調控的方式來減少 SERCA2 基因的表現，影響促進子，mRNA，乃至於蛋白質濃度的整體表現。A 和 B，將 SERCA2 基因促進子 1754-bp 片段經由質體引入心肌細胞之後，用 TNF- α 及 IL-6 或對照組刺激，觀察螢光的表現量。C 和 D，無血清培養之心肌細胞中，在指定的時間點，加入指定濃度的 TNF- α 及 IL-6 處理。利用定量實時反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-QPCR) 來分析 SERCA2 鈣離子通道 mRNA 的表現量。利用西方墨點法及內部控制組 GAPDH 分析 SERCA2 鈣離子通道的表現量。數據代表三個實驗的平均值加減標準差。* $P < 0.05$ 相較於控制組；** $P < 0.01$ 相較於控制組。

圖 3-2

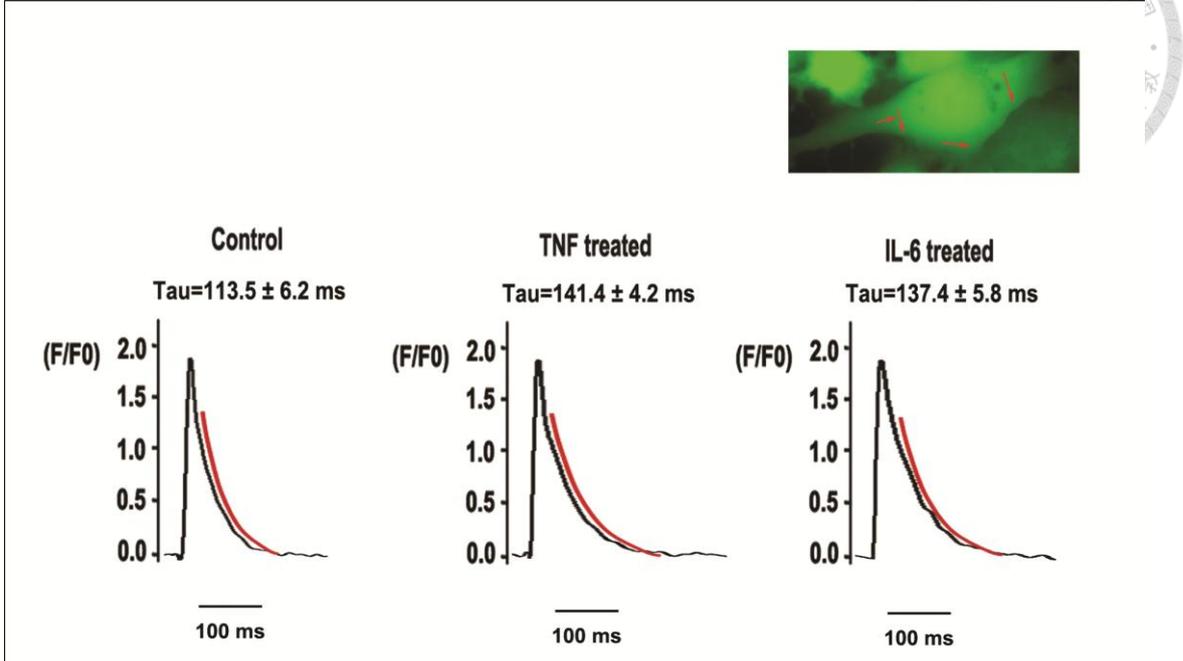


圖 3-5，HL-1 心肌細胞中的 TNF- α 及 IL-6 對 SERCA2 鈣離子通道電流的影響。控制組、TNF- α (5ng/ml, 24 h)處理、IL-6(10ng/ml,24h)處理。處理細胞的鈣離子脈動圖，紅線的部分代表鈣離子回收的坡度，可見到以 TNF- α 及 IL-6 處理過的細胞回收的電流較平緩。二維的插圖代表可見鈣離子電流回收的記錄區域。每組紀錄 6 次取平均值後記錄。

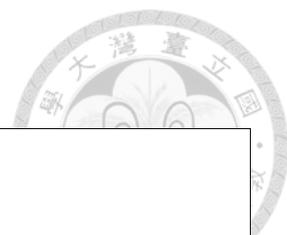


圖 3-3

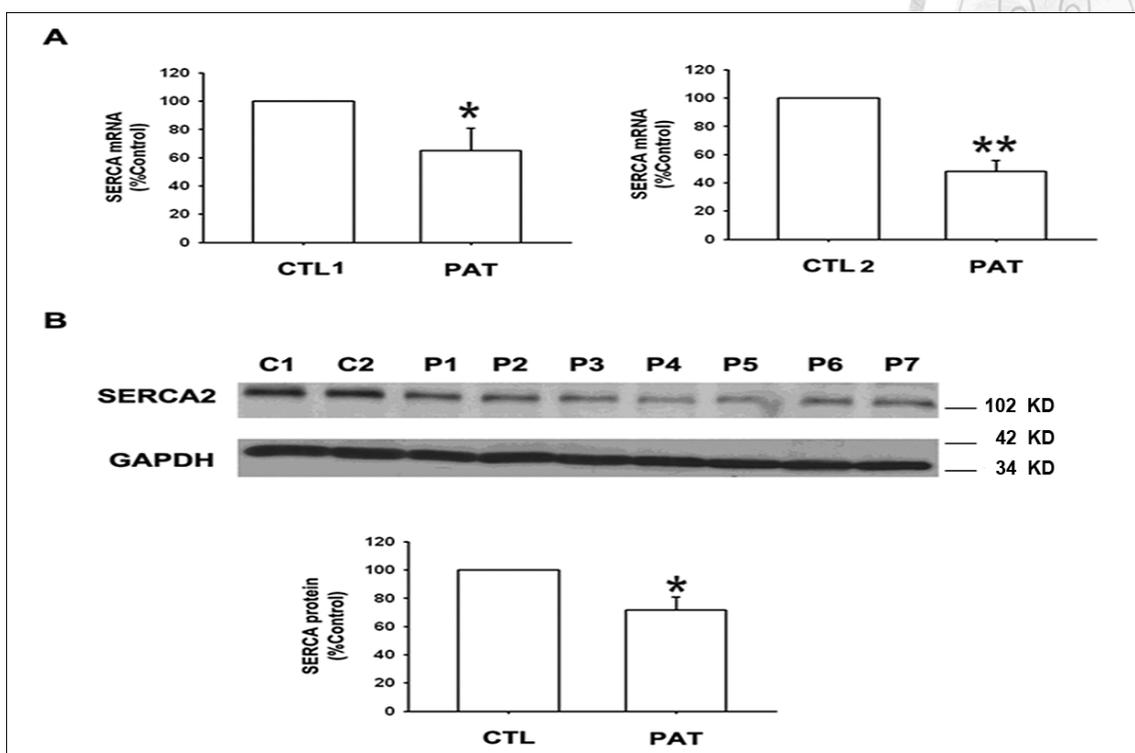


圖 3-3，重症病患血清(PAT)相較於對照組(CTL)血清作用在 HL-1 心肌細胞上，對於 SERCA2 蛋白質濃度以及 mRNA 量的影響。A 和 B，無血清培養之心肌細胞中，加入重症病患或對照組血清 24h 後，利用定量實時反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-QPCR)來分析 SERCA2 鈣離子通道 mRNA 的表現量。利用西方墨點法及內部控制組 GAPDH 分析 SERCA2 鈣離子通道的表現量。數據代表三個實驗的平均值加減標準差。* $P < 0.05$ 相較於控制組；** $P < 0.01$ 相較於控制組。



圖 3-4

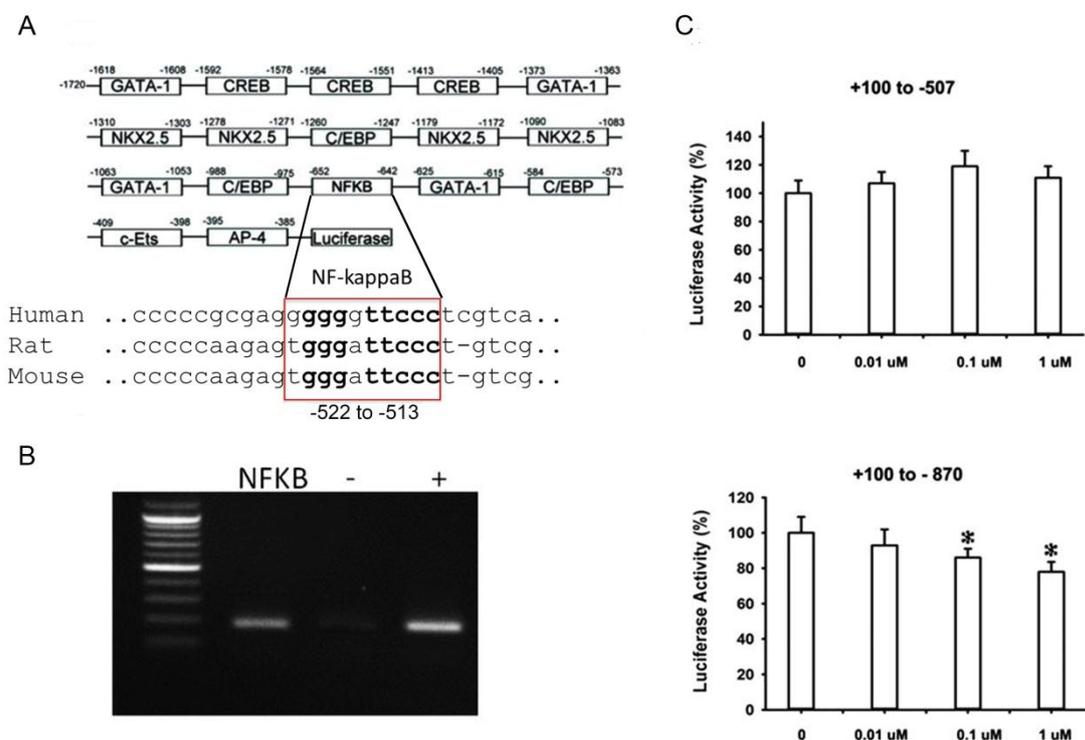


圖 3-4，心肌細胞的 TNF- α 經由 SERCA2 基因啟動子區域中的 NF- κ B 反應單元區來調控 SERCA2 鈣離子通道的表現。將 SERCA2 鈣離子通道基因啟動子與 pGL3Basic luciferase 報告者融合質體，與內部控制組 pRL-TK 載體一同過渡轉染至心肌細胞。再利用載體 (控制組)或 TNF- α 刺激之後測量其 luciferase 活性。A,概圖顯示了 SERCA2 鈣離子通道 α 1C 次單元基因啟動子上推測的轉錄分子結合區域。推測可能的 NF- κ B 反應單元區(-522 to -513)，在人類，大鼠及小鼠的序列均是一致的。B, 分別以 NF- κ B 作用，以及用 DNA 的對應抗體及對照組作用，確定指定可能 NF- κ B 反應單元區。C,將兩段啟動子(+100 to -870 及+100 to -507)刪減構築質體過渡轉染至心肌細胞中，並用指定濃度的 TNF- α 處理 30 分鐘。數據代表三個實驗的平均值加減標準差。* $P < 0.05$ 相較於控制組。

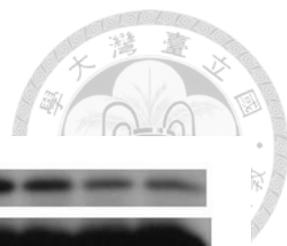


圖 3-5

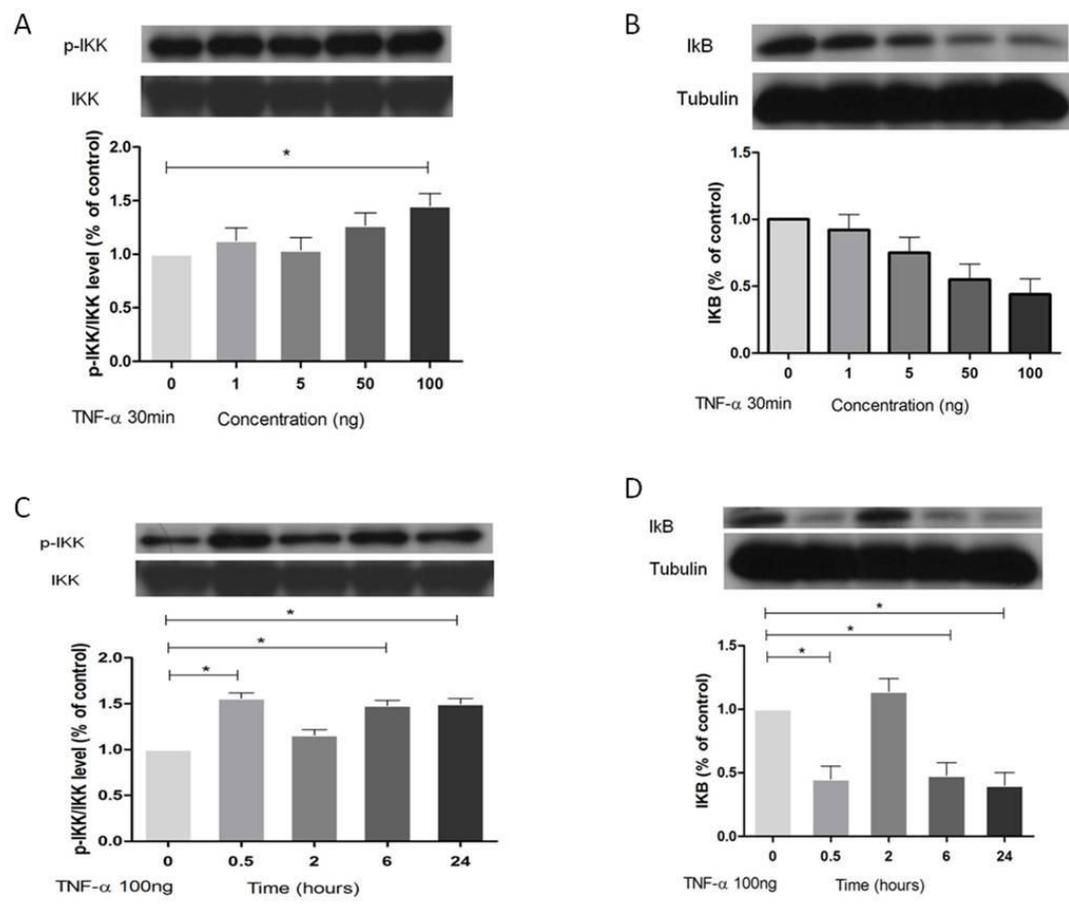


圖 3-5，TNF- α 誘導的訊息傳遞子及轉錄活化子。A 和 B，無血清培養之心肌細胞中，加入指定濃度的 TNF- α 處理 30 分鐘後。利用西方墨點法及內部控制組 Tubulin 分析心肌細胞質內磷酸化的 IKK/總 IKK，以及 I κ B 的表現量。C 和 D，無血清培養之心肌細胞中，加入指定濃度的 TNF- α (100ng/ml)處理在指定的時間點，利用西方墨點法及內部控制組 Tubulin 分析心肌細胞質內磷酸化的 IKK/總 IKK，以及 I κ B 的表現量。數據代表三個實驗的平均值加減標準差。*P<0.05 相較於控制組。



圖 3-6

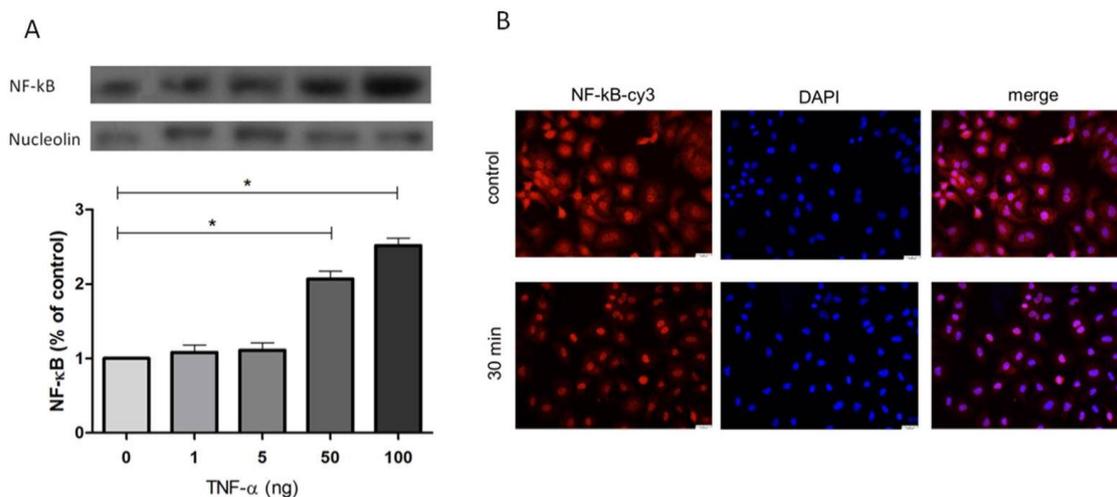


圖 3-6, TNF- α 誘導的訊息傳遞子及轉錄活化子, 經由 NF- κ B 反應單元活化下游的反應路徑, 導致 NF- κ B p65 次單元體轉化入細胞核中。A, 無血清培養之心肌細胞中, 30 分鐘後, 加入指定濃度的 TNF- α (100ng/ml)處理, 萃取細胞核中的蛋白質。利用西方墨點法及內部控制組 Nucleolin 分析心肌細胞核內 NF- κ B 的表現量。B, 在心肌細胞分別加入 TNF- α (100ng/ml)及對照組後, 固定, 使用免疫螢光法針對 NF- κ B p65 次單元體染色, 並使用 DAPI 針對細胞核染色, 數據代表三個實驗的平均值加減標準差。*P<0.05 相較於控制組。



圖 3-7

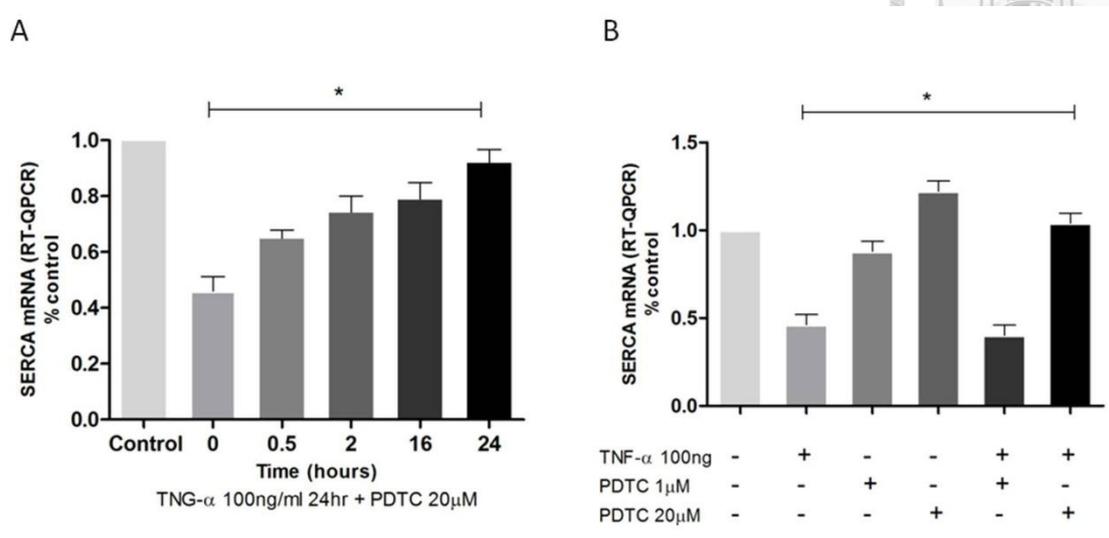


圖 3-7, TNF- α 對 HL-1 心肌細胞中 SERCA2 鈣離子通道表現的影響受到 NF- κ B 蛋白抑制劑 PDTC 所阻斷。A, 無血清培養之心肌細胞中, 加入指定濃度的 TNF- α (100ng/ml)處理, 同時加入 NF- κ B 蛋白抑制劑 PDTC(20 μ M), 作用不同的時間(0.5, 2, 16, 24 小時)。利用定量實時反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-QPCR)來分析 SERCA2 鈣離子通道 mRNA 的表現量。B, 無血清培養之心肌細胞中, 加入指定濃度的 TNF- α (100ng/ml)處理, 同時加入 NF- κ B 蛋白抑制劑 PDTC(1,20 μ M)或對照組, 作用 24 小時。利用定量實時反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-QPCR)來分析 SERCA2 鈣離子通道 mRNA 的表現量。數據代表三個實驗的平均值加減標準差。
*P<0.05 相較於控制組。



圖 3-8

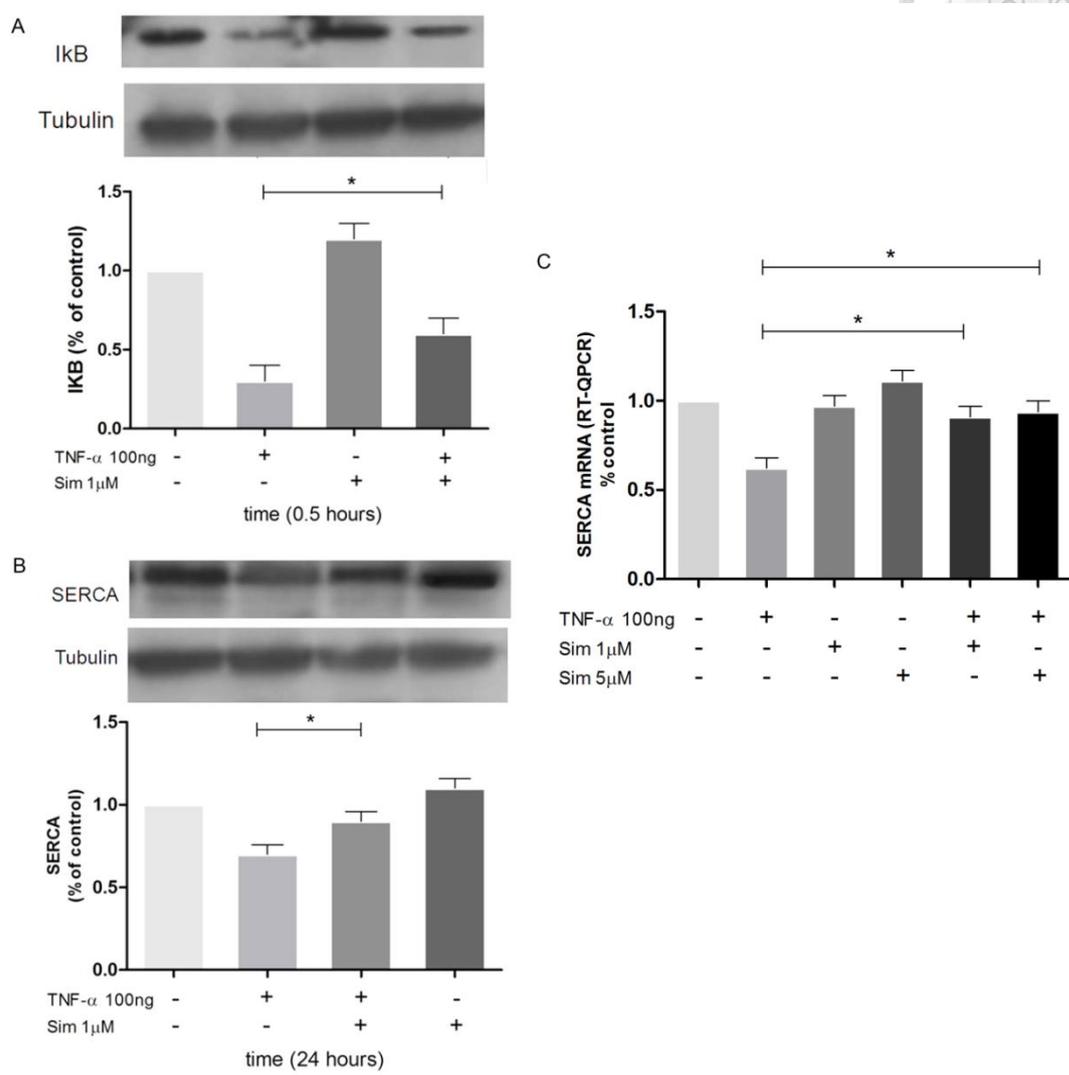


圖 3-8，TNF- α 對 HL-1 心肌細胞中 SERCA2 鈣離子通道表現的影響受到已知的 TNF- α 抑制劑，simvastatin 所阻斷。無血清培養之心肌細胞中，加入指定濃度的 TNF- α (100ng/ml)處理或對照組，同時加入 simvastatin(10^{-6} mol/L)或對照組，作用不同的時間 24 小時。然後以西方點墨法(western blot)偵測(A) I κ B，(B)SERCA2 鈣離子通道的表現量。C，無血清培養之心肌細胞中，加入指定濃度的 TNF- α (100ng/ml)處理或對照組，同時加入 simvastatin(1×10^{-6} mol/L, 5×10^{-6} mol/L)或對照組，作用不同的時間 24 小時。利用定量實時反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-QPCR)來分析 SERCA2 鈣離子通道 mRNA 的表現量。數據代表三個實驗的平均值加減標準差。* $P < 0.05$ 相較於控制組。

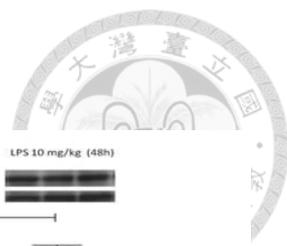


圖 3-9

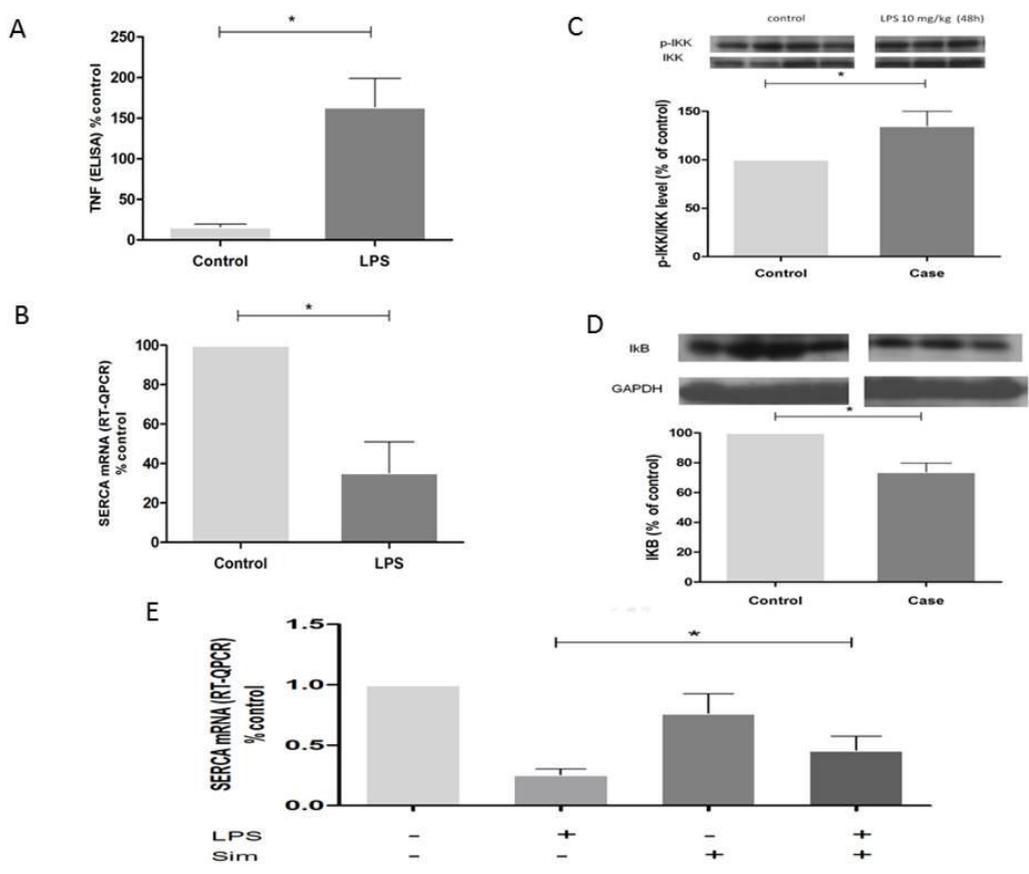


圖 3-9，TNF- α 經由 NF- κ B 反應單元抑制 SERCA2 表現的路徑在動物實驗中因使用 simvastatin 所阻斷。A，Wister 大鼠經由腹腔注射 LPS 或者食鹽水 72 小時(對照組)之後，抽取血清，用 ELISA 方式測量血清中的 TNF- α 濃度。B，Wister 大鼠經由腹腔注射 LPS 或者食鹽水 72 小時(對照組)之後，犧牲大鼠，取得左心室檢體，萃取 mRNA，利用定量實時反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-QPCR)來分析 SERCA2 鈣離子通道 mRNA 的表現量。Wister 大鼠經由腹腔注射 LPS 或者食鹽水 72 小時(對照組)之後，犧牲大鼠，取得左心室檢體，萃取蛋白質，以西方點墨法偵測 C，磷酸化 IKK/IKK 總量比值以及 D，心肌中的 I κ B 表現量。E，Wister 大鼠在經由腹腔注射 LPS 或者食鹽水，前七天服用 simvastatin(2.5mg/kg/day)或者對照劑之後，犧牲大鼠，取得左心室檢體，萃取 mRNA，利用定量實時反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-QPCR)來分析 SERCA2 鈣離子通道 mRNA 的表現量。數據代表三個實驗的平



均值加減標準差。*P<0.05 相較於控制組。

圖 3-10

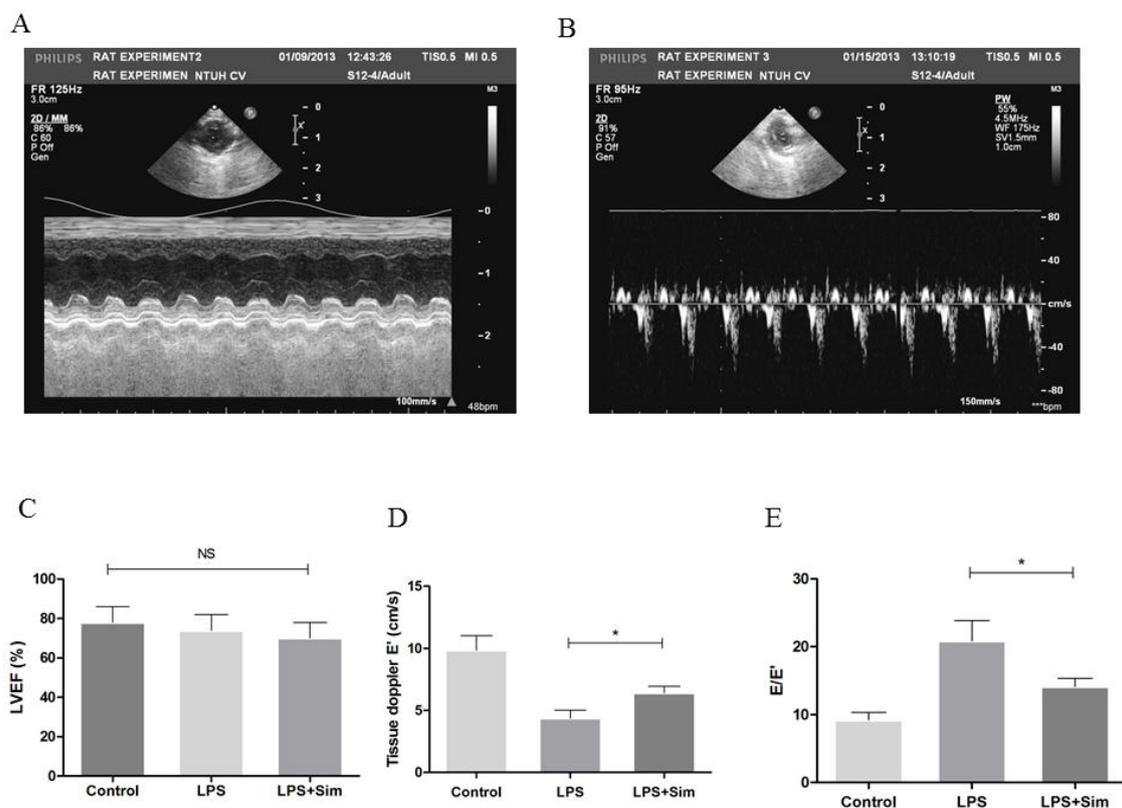


圖 3-10，血漿中的 TNF- α 上升影響心臟的舒張功能路徑，在動物實驗中因使用 simvastatin 所阻斷。Wister 大鼠在經由腹腔注射 LPS 或者食鹽水，前七天服用 simvastatin(2.5mg/kg/day)或者對照劑之後予以麻醉，膠布貼成平躺姿勢，以 12HZ 探頭測量心臟的收縮功能(A)，以組織都卜勒量測心臟的舒張功能(B)，實驗動物分成三組：對照組，注射 LPS 並服用 simvastatin 組以及單純注射 LPS 組。分別比較三組之間的心臟收縮功能(C)，組織都卜勒 E'(D)以及二尖瓣流入血流除以組織都卜勒比值, E/E'(E)。*P<0.05。



圖 3-11

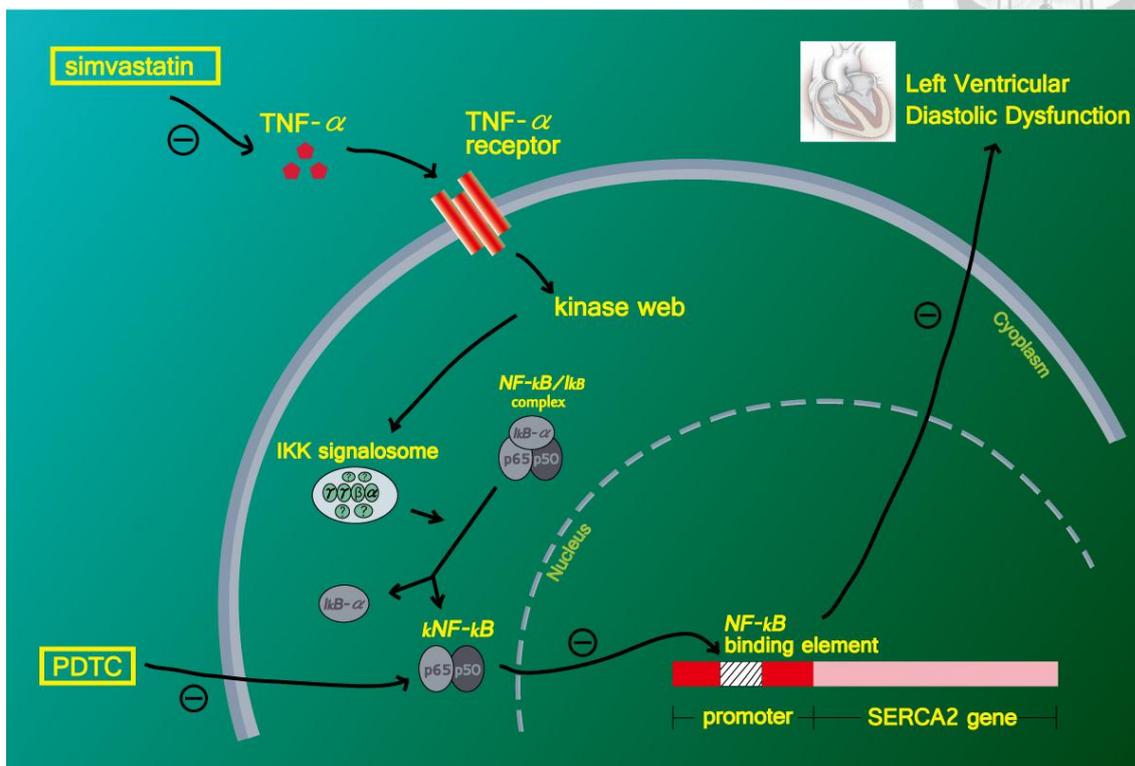


圖 3-11，整體模式圖顯示 TNF- α 抑制 SERCA2 表現同時導致心臟舒張功能不良的訊息傳導方式。TNF- α 首先作用在接受器上，使得 IKK 磷酸化上升，細胞質中 I κ B 下降，NF- κ B 反應蛋白解離出 p65 次單元體，進入核內作用在 SERCA2 鈣離子蛋白的促進子-522 to -513 的 NF- κ B 反應單元作用區上，使得 SERCA2 表現下降，進而導致左心室舒張功能不良發生，此路徑可以因為使用 NF- κ B 抑制劑減少 NF- κ B 表現而阻斷，也可因為提前使用 simvastatin 下降 TNF- α 濃度而阻斷，進而改善 SERCA2 鈣離子蛋白的表現，使得左心室舒張功能進步。



圖 3-12

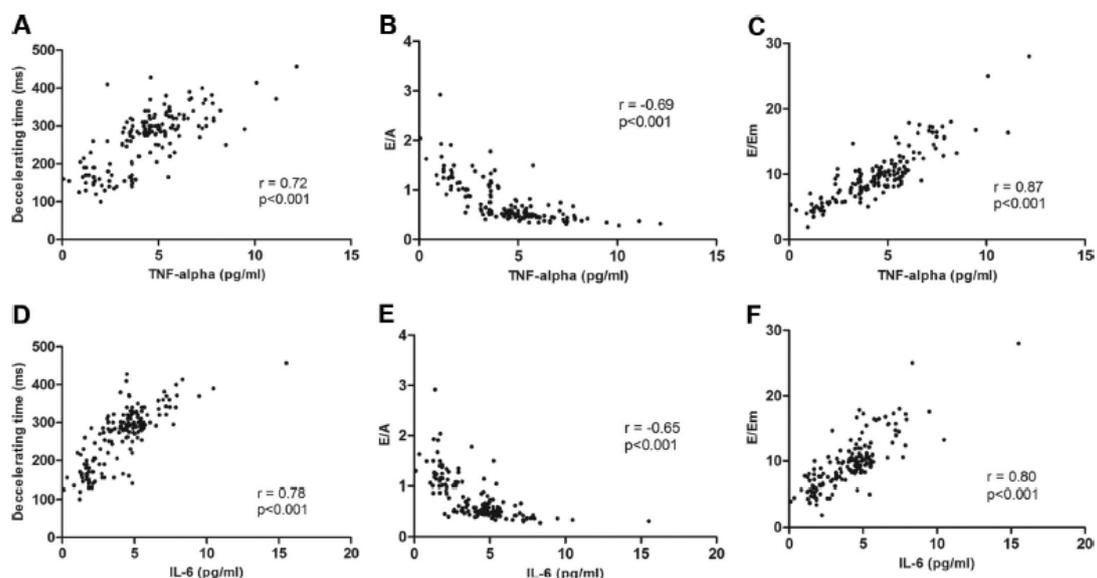


圖 3-12, 以純粹舒張性心衰竭病患為例, 血漿中的 TNF- α 及 IL-6 和心臟超音波下, 各項心臟舒張功能指標的相關性。A, TNF- α 和二尖瓣流入血流減速時間(DT)的相關性($r=0.72$, $p<0.001$)。B, TNF- α 和二尖瓣流入血流 E 除以心房經二尖瓣流入血流 A 的相關性($r=-0.69$, $p<0.001$)。C, TNF- α 和 E 除以組織都卜勒下早期舒張期延長流速(Em)的相關性($r=0.78$, $p<0.001$)。D, IL-6 和 DT 的相關性($r=0.72$, $p<0.001$)。E, IL-6 和 E/A 的相關性($r=-0.65$, $p<0.001$)。F, IL-6 和 E/Em 的相關性($r=0.80$, $p<0.001$)。



圖 3-13

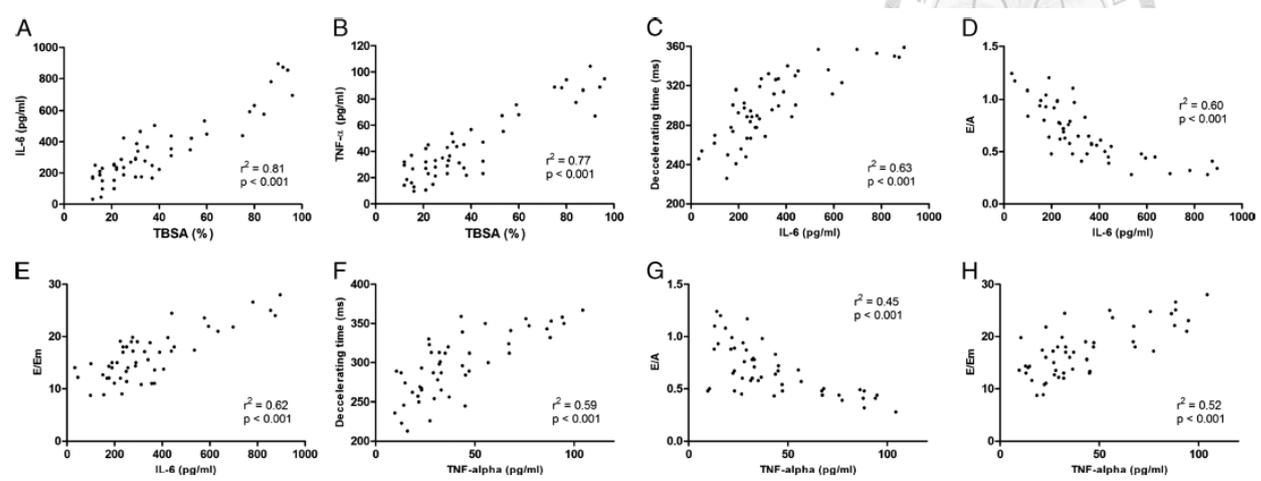


圖 3-13，以嚴重燒傷病患為例，血漿中的 TNF- α 及 IL-6 和心臟超音波下，各項心臟舒張功能指標，以及燒傷面積的相關性。A，IL-6 和燒傷面積(TBSA)的相關性 ($r=0.81$, $p<0.001$)。B，TNF- α 和 TBSA 的相關性($r=0.77$, $p<0.001$)。C，IL-6 和二尖瓣流入血流減速時間(DT)的相關性($r=0.63$, $p<0.001$)。D，IL-6 和二尖瓣流入血流 E 除以心房經二尖瓣流入血流 A 的相關性($r=-0.60$, $p<0.001$)。E，IL-6 和 E 除以組織都卜勒下早期舒張期延長流速(Em)的相關性($r=0.62$, $p<0.001$)。F，TNF- α 和 DT 的相關性($r=0.59$, $p<0.001$)。G，TNF- α 和 E/A 的相關性($r=-0.45$, $p<0.001$)。F，TNF- α 和 E/Em 的相關性($r=0.45$, $p<0.001$)。

圖 3-14

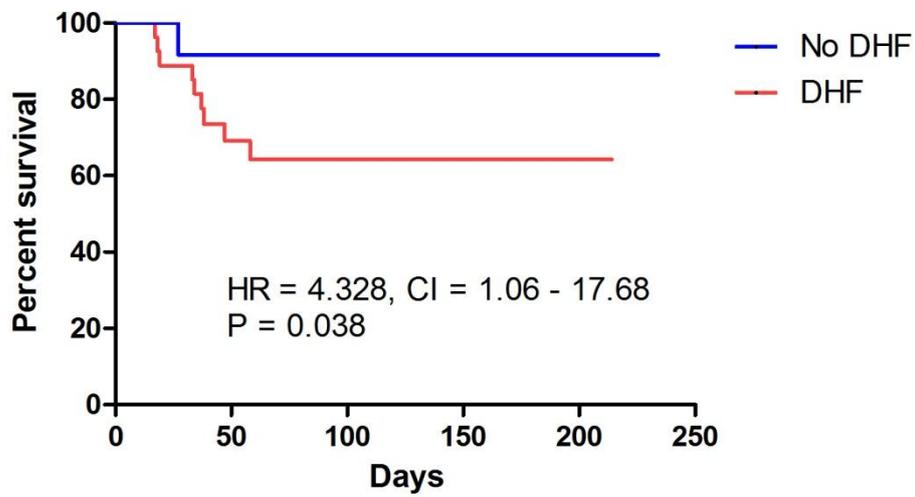


圖 3-14，在嚴重燒傷的群體上，根據左心室舒張功能不良與否繪製 Kaplan-Meier 圖。Kaplan-Meier 圖顯示，左心室舒張功能不良使得燒傷病患死亡率明顯上升約四倍，(Hazard ratio, 3.92；95%信賴區間 1.04-14.69; p=0.034)。



圖 3-15

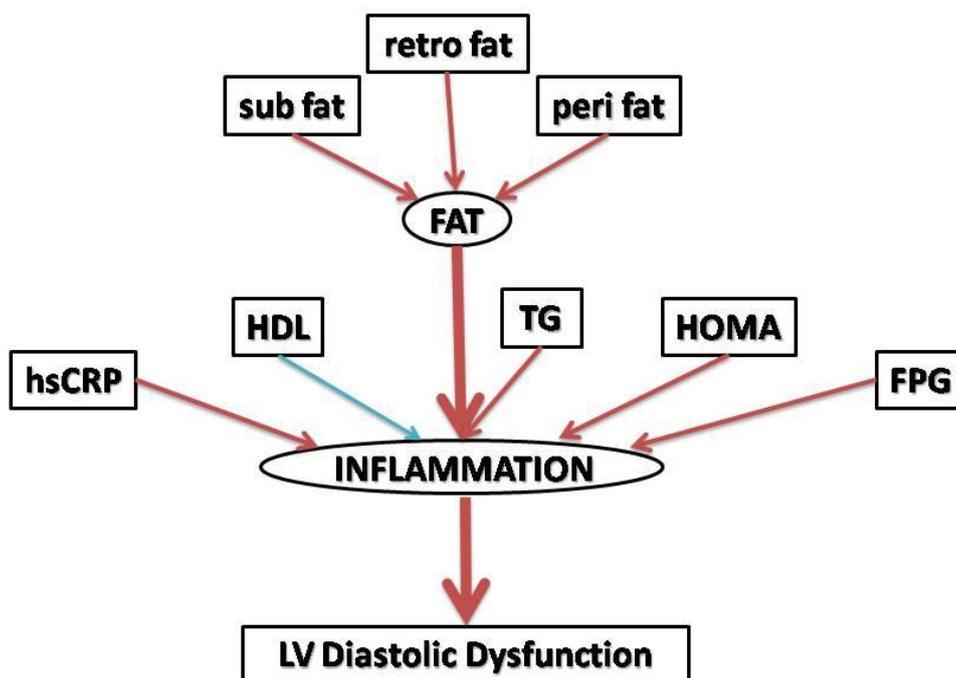


圖 3-15，以結構方程分析得到的機轉路徑模式圖。分析過程均校正年齡，性別的影響。FPG，空腹血糖；HDL，高密度膽固醇；HOMA，胰島素阻抗性；hsCRP，高敏感性 C 發炎反應蛋白；peri fat，腹膜脂肪；retro fat，後腹腔脂肪；sub fat，皮下脂肪；TG，三酸甘油脂；紅線代表正向相關，藍線則代表負向相關，整體的機制說明在群體上符合體內脂肪引起發炎反應上升，進而導致左心室舒張功能不良的機制。



圖 3-16

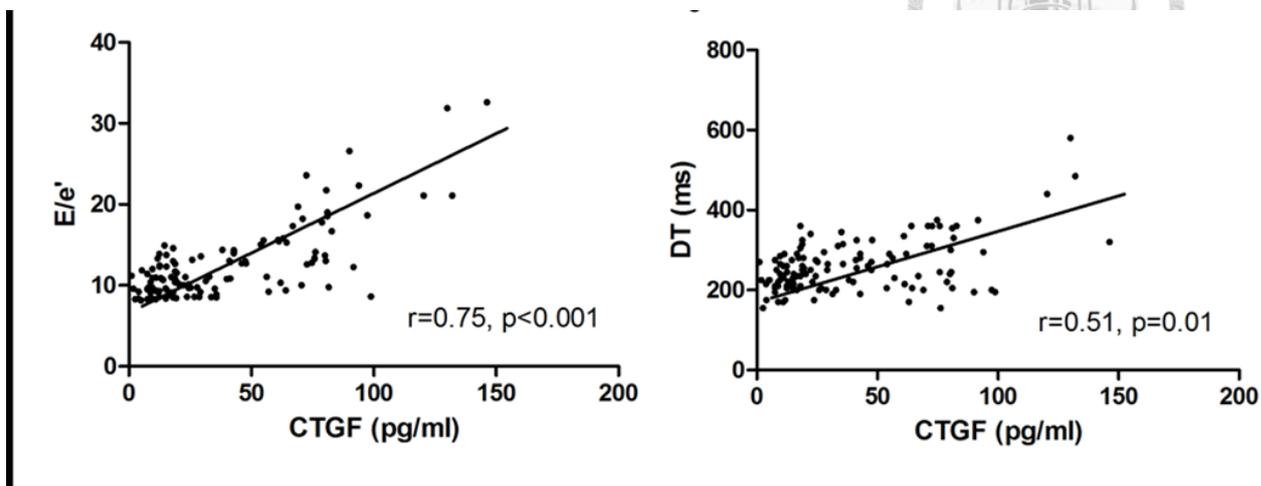


圖 3-16，在舒張性心衰竭病患上，血漿中 connective tissue growth factor(CTGF)和心臟超音波下，各項心臟舒張功能指標的相關性。A，CTGF 和二尖瓣收縮期流入血流(E)除以組織都卜勒下早期舒張期延長流速(e')的相關性($r=0.75, p<0.001$)。B，CTGF 和二尖瓣流入血流減速時間(DT)的相關性($r=0.51, p=0.01$)。

圖 3-17

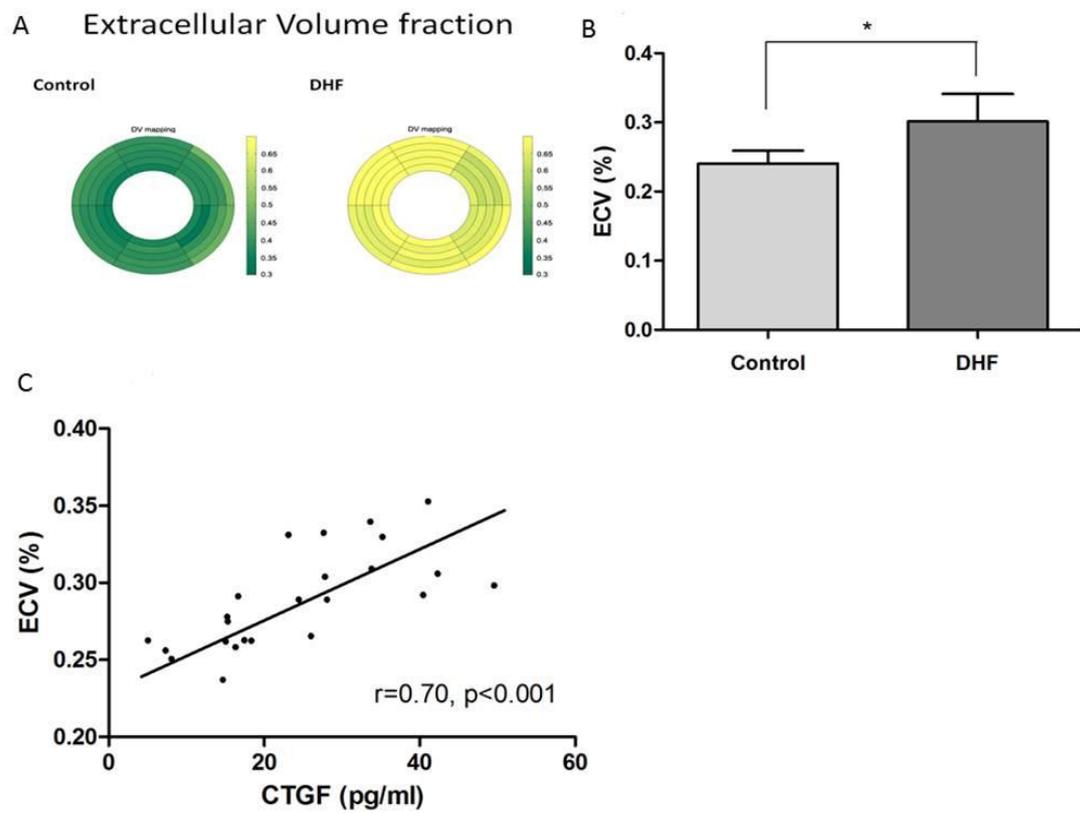


圖 3-17，心臟核磁共振造影下的細胞外體積(ECV)和血漿中的 connective tissue growth factor(CTGF)相關性。A，短軸下細胞外體積的分布圖顯示正常對照組與舒張性心衰竭病患 ECV 的差別。B，心臟核磁共振造影分析舒張性心衰竭病患(n=25)以及正常對照組(n=10)的差別，顯示舒張性心衰竭病患的 ECV 顯著的上升。C，舒張性心衰竭病患血漿中的 CTGF 和心臟核磁共振 ECV 的關聯性。



圖 3-18

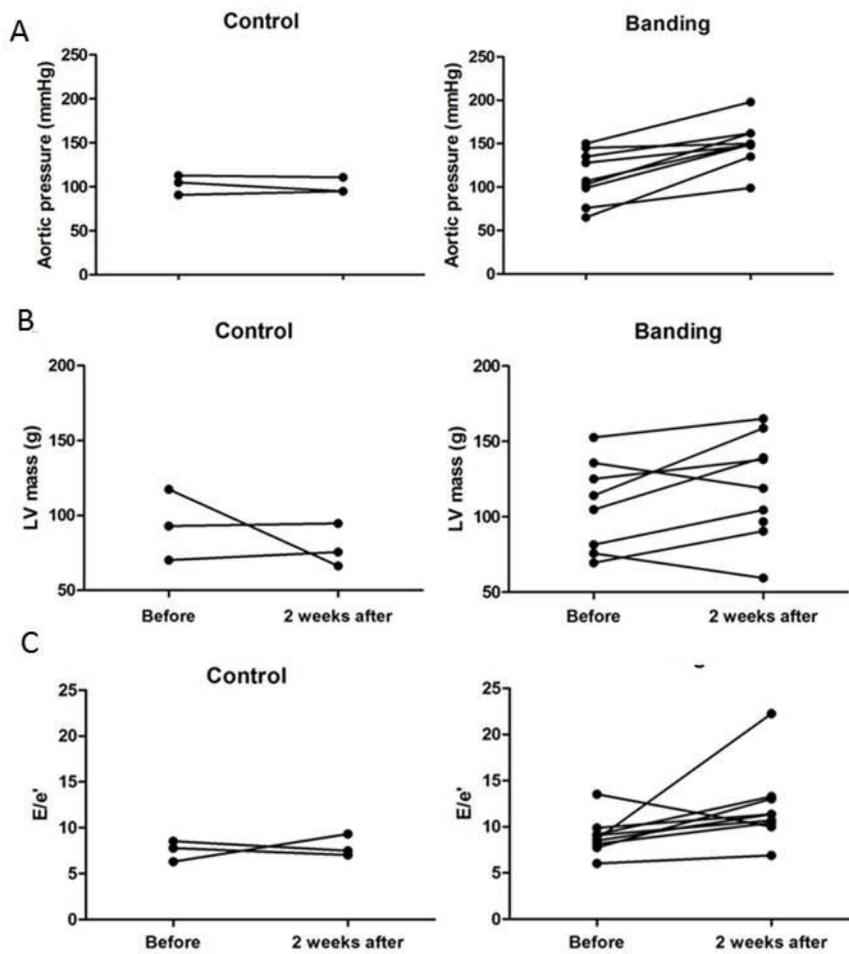


圖 3-18，舒張性心衰竭的動物模式與正常動物血行動力以及超音波型態的差異。1~2 歲的狗分成主動脈綁束(aortic banding, n=9)以及對照組(n=3)兩組，比較基準與主動脈綁束後兩週的(A)近端與遠端主動脈壓力差，(B)左心室質量變化，(C)心臟超音波下 E/e' 的變化。



圖 3-19

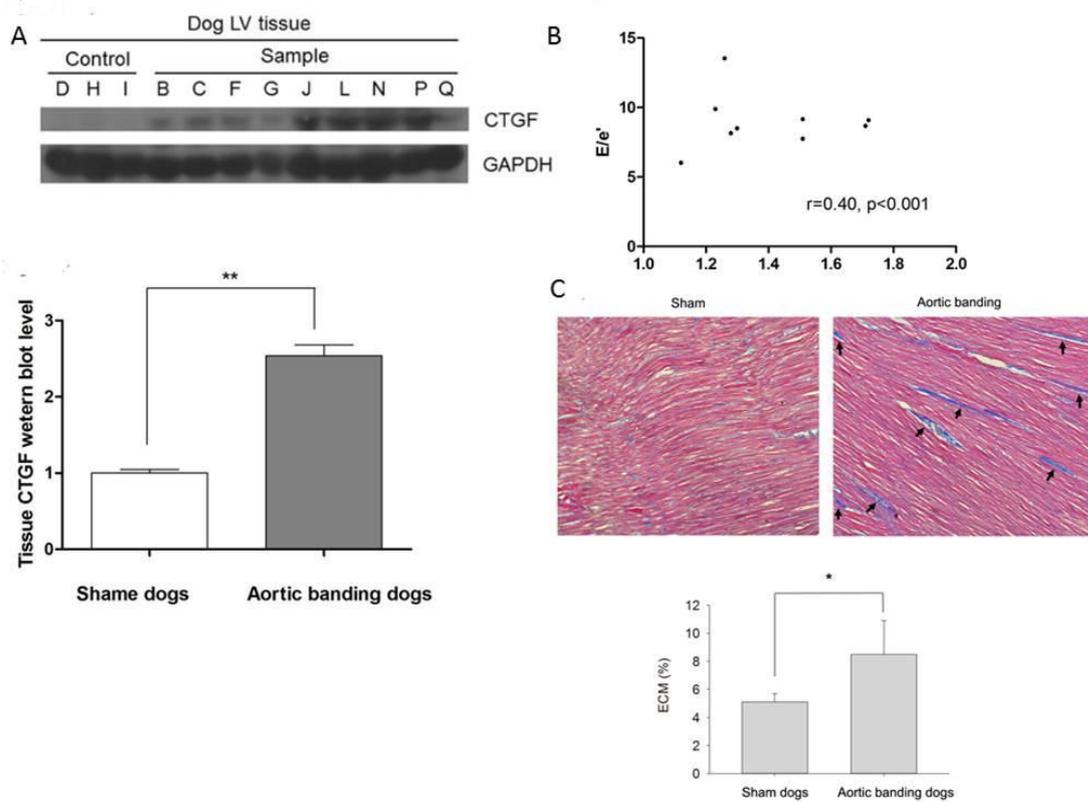


圖 3-19，組織中 CTGF 和心臟舒張功能的相關性。A，以西方點墨法偵測主動脈綁束的狗(n=9)以及對照組(n=3)心肌中的 CTGF 含量。B，在主動脈綁束的舒張性心臟功能不良的狗上比較心肌中的 CTGF 含量與超音波下的心臟舒張功能指標 E/e' 的相關性。C，Masson's trichrome 染色的狗左心室組織切面顯微照片，顯示舒張功能不良的狗有較對照組明顯的細胞外間質堆積及單核細胞浸潤，上圖放大倍率是 200 倍。*P<0.05 相較於對照組。



圖 3-20

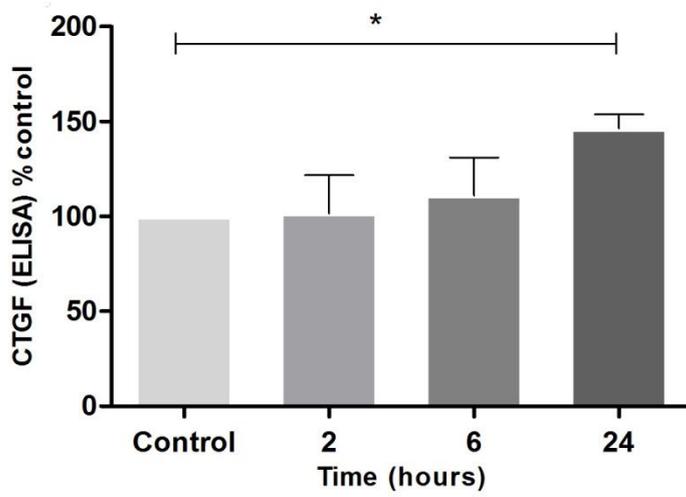


圖 3-20，拉力刺激心肌細胞後，觀察釋放到培養液中的 CTGF 濃度。以拉力刺激心肌細胞後，分別刺激的時間為 2,6,24 小時，相較於對照組，以 ELISA 測定培養液中的 CTGF 濃度。* $P < 0.05$ 相較於對照組。

表一. 群體一中實驗組與對照組之間的基本資料, 超音波型態與血清中的激素濃度

	DHF (<i>n</i> = 110)	Control (<i>n</i> = 50)	<i>p</i>
Age (years)	72.44 ± 9.86	72.16 ± 9.62	0.88
Sex (M/F)	52/58	26/29	1.00
BMI (kg/m ²)	25.1 ± 4.7	25.1 ± 2.8	0.97
Diabetes mellitus (%)	32 (29)	18 (36)	0.72
Hypertension (%)	76 (69)	39 (78)	0.65
Creatinine (mg/dL)	1.35 ± 0.71	1.37 ± 0.76	0.91
Smoking (%)	31 (28)	20 (40)	0.29
WBC (/mm ³)	7.3 ± 2.0	7.6 ± 2.0	0.47
Cholesterol (mg/dL)	196.2 ± 38.2	202.6 ± 38.6	0.38
Triglyceride (mg/dL)	137.8 ± 89.7	128.8 ± 101.3	0.62
Low density cholesterol (mg/dL)	126.9 ± 39.8	128.2 ± 35.8	0.86
Anti-hypertension therapy			
ACEI + ARB (%)	30 (27)	12 (22)	0.28
β-blocker (%)	24 (22)	16 (29)	0.44
Calcium channel blocker (%)	38 (35)	20 (36)	0.79
Echocardiographic data			
LA diameter (mm)	37.3 ± 6.0	36.6 ± 4.8	0.51
LVEF (%)	67.6 ± 8.0	68.6 ± 5.2	0.35
LVEDD (mm)	45.9 ± 5.9	47.0 ± 4.8	0.24
LVESD (mm)	28.6 ± 5.7	29.6 ± 4.4	0.26
DT (cm/s)	304.9 ± 43.9	189.1 ± 64.2	<0.001
E/A	0.53 ± 0.17	1.17 ± 0.44	<0.001
E/Em	11.15 ± 3.65	6.88 ± 2.57	<0.001

Cytokine levels

Interleukin 6 (pg/mL)	4.99 ± 1.75	2.54 ± 1.74	<0.001
Tissue necrosis factor- α (pg/mL)	5.38 ± 1.68	2.61 ± 1.40	<0.001

Continues variables are presented as mean \pm SD while categorical variables are presented as frequencies.

DHF, diastolic heart failure; BMI, body mass index; BP, blood pressure; ACEI, angiotensin-converting enzyme blocker; ARB, angiotensin II type I receptor blocker; LA, left atrium; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVEDD, left ventricular end diastolic dimension; LVESD, left ventricular end systolic dimension; DT, mitral flow deceleration time; E/A, early mitral valve flow velocity (E) divided by late mitral flow velocity (A); E/Em, E divided by early diastolic (Em) lengthening velocities in tissue Doppler imaging.



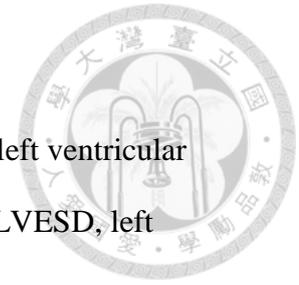
表二. 群體二加護病房嚴重病患的基本資料與血漿中激素濃度 (n = 30)

Age (years)	65.6 ± 12.3
Sex (M/F)	17/13
BMI (kg/m ²)	24.1 ± 5.5
Diabetes mellitus (%)	16 (53)
Hypertension (%)	18 (60)
Creatinine (mg/dL)	2.5 ± 1.8
Smoking (%)	10 (33)
WBC (/mm ³)	19.6 ± 7.7
Cholesterol (mg/dL)	187.2 ± 45.1
Triglyceride (mg/dL)	135.9 ± 86.2
Low density cholesterol (mg/dL)	134.7 ± 35.1
Cause of critical illness	
Pneumonia with respiratory failure (%)	10 (33)
Sepsis (%)	16 (53)
Myocardial infarction (%)	4 (13)
Echocardiographic Data	
LA diameter (mm)	36.9 ± 6.6
LVEF (%)	56.9 ± 7.1
LVEDD (mm)	49.3 ± 8.7
LVESD (mm)	30.2 ± 7.5
Cytokine levels	
Interleukin-6 (pg/mL)	83.3 ± 49.2
Tissue necrosis factor- α (pg/mL)	38.9 ± 20.4

Continues variables are presented as means ± SD while categorical variables are

presented as frequencies.

BMI, body mass index; BP, blood pressure; LA, left atrium; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVEDD, left ventricular end diastolic dimension; LVESD, left ventricular end systolic dimension.



表三. 群體三燒傷病患的基本資料以及血漿中的激素濃度(n=56)*

	No LV diastolic dysfunction (23)	LV diastolic dysfunction (n=33)	<i>P</i>
Age (years)	51.6 ± 11.2	53.1 ± 12.8	0.21
Sex(M/F)	13/8	23/10	0.51
BMI (kg/m ²)	25.2 ± 4.5	23.9 ± 3.2	0.70
Diabetes mellitus, N (%)	3 (13)	4 (12)	0.76
Hypertension, N (%)	4 (17)	5 (15)	0.69
Creatinine, mg/dL	1.31 ± 0.17	1.53 ± 0.10	0.34
Smoking, N (%)	6 (26)	5 (15)	0.39
WBC, mg/dl	22467 ± 4956	24423 ± 5147	0.65
Cholesterol, mg/dl	197.3 ± 31.1	209.0 ± 27.4	0.14
Triglyceride, mg/dl	138.7 ± 82.4	129.3 ± 96.2	0.34
Low density cholesterol, mg/dl	129.2 ± 38.5	134.1 ± 36.9	0.64
Burn parameter			
TBSA, %	41.3 ± 19.2	67.2 ± 22.8	<0.001
Inhalation injury, N (%)	11 (47)	14 (42)	0.64
Echocardiographic Data			
LA diameter (mm)	34.1 ± 6.4	36.1 ± 7.9	0.43
LV ejection fraction (%)	72.1 ± 7.5	68.3 ± 14.2	0.35
DT	297.6 ± 39.2	329.7 ± 29.4	0.006
E/A	0.68 ± 0.22	0.43 ± 0.18	0.027
E/Em	18.6 ± 4.3	20.1 ± 5.1	0.041
Cytokine levels			

Interleukin 6 (pg/ml)	319.2 ± 182.1	626.1 ± 253.6	<0.001
Tissue necrosis factor – alpha (pg/ml)	39.2 ± 25.1	73.4 ± 24.8	<0.001

*All values are mean (± standard error) unless otherwise indicated.

BMI, body mass index; WBC, white blood cell; TBSA, total burn surface area; LA, left atrium; LV, left ventricular; E, mitral inflow E wave; A, mitral inflow A wave; Em, Peak annular early diastolic velocity of the lateral mitral annulus in tissue Doppler imaging.

表四. 在群體二嚴重疾病病患轉入轉出加護病房前後的血漿中 Interleukin-6, tissue necrosis factor-alpha, 以及心臟超音波變化

	In Intensive Care	After Transfer to	
	Unit	General Ward	<i>p</i>
Interleukin-6 (pg/mL)	83.3 ± 49.2	17.6 ± 9.6	<.0001
Tissue necrosis factor-α (pg/mL)	38.9 ± 20.4	20.9 ± 12.6	.0002
DT	284.7 ± 48.3	263.2 ± 31.8	.019
E/A	0.48 ± 0.16	0.6 ± 0.27	.045
E/Em	17.0 ± 4.4	13.1 ± 6.5	.003

DT, mitral flow deceleration time; E/A, early mitral valve flow velocity (E) divided by late mitral flow velocity (A); E/Em, E divided by early diastolic (Em) lengthening velocities in tissue Doppler imaging.

表五. 群體三燒傷病患轉出轉入加護病房前後的血漿中 Interleukin-6, tissue necrosis factor-alpha, 以及心臟超音波舒張功能指標

	In the Burn	After Transfer to	<i>P</i>
	Intensive Care Unit	the General Ward	
Interleukin-6 (pg/ml)	279.1 ± 152.3	18.9 ± 8.3	<0.001
Tissue necrosis factor-alpha (pg/ml)	36.9 ± 22.1	11.7 ± 7.8	<0.001
DT	301.5 ± 35.6	294.4 ± 33.1	0.028
E/A	0.65 ± 0.25	0.78 ± 0.31	0.039
E/Em	18.1 ± 5.6	15.6 ± 4.3	0.016

DT, mitral flow deceleration time; E/A, early mitral valve flow velocity (E) divided by late mitral flow velocity (A); E/Em, E divided by early diastolic (Em) lengthening velocities in tissue Doppler imaging.

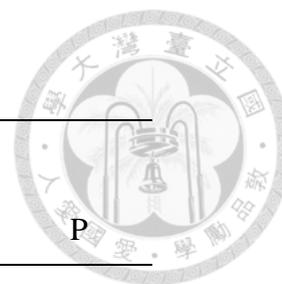
表六. 以 Cox regression 模式分析影響燒傷病患住院死亡率的因素

	Odds ratio	95% Confidence interval	P
Age	1.43	0.82 ~ 2.24	0.63
DM	1.14	0.93 ~ 1.21	0.51
HTN	1.21	0.76 ~ 1.69	0.76
TBSA	6.21	3.48 ~ 11.83	0.002
Inhalation injury	1.94	1.36 ~ 2.78	0.23
LV diastolic dysfunction	3.99	1.05 ~ 15.28	0.038

DM, diabetes mellitus; HTN, hypertension; TBSA, total burn surface area.



表七. 群體一中實驗組與對照組的基本資料與心臟超音波資料



	Control Subjects (n= 70)	Case Subjects (n = 32)	P
Baseline characteristics			
Age, y	50±10.6	61±8.1	<0.0001*
Women, n (%)	51 (71.4)	18 (56.2)	0.1511
Smoking, n (%)	6 (10.3)	5 (16.1)	0.6513
HTN, n (%)	8 (13.8)	14 (45.2)	0.0026*
HR, /min	72±9.6	73±7.1	0.8246
Fasting plasma glucose, mg/dL	93.58±17.71	92.77±8.98	0.813
Total Cholesterol, mg/dL	192±33.67	204.61±38.98	0.1149
HDL, mg/dL	51±14.06	47.06±8.49	0.1039
LDL, mg/dL	115.79±34.55	132.13±37.76	0.0427*
TG, mg/dL	111.79±72.68	139.94±89.66	0.1128
Body Length, cm	159±7.4	162±7.6	0.1457
Body Weight, kg	59±9.7	65±11.5	0.0078*
BMI, kg/m ²	23±2.7	25±3.2	0.0105*
WC, cm	79±7.2	86±8.7	0.0003*
Creatinine, mg/dL	1.01±0.17	1.05±0.15	0.2521
hsCRP, mg/L	1.8±2.6	7.3±6.3	<0.0001*
HbA1c, %	5.72±0.64	5.65±0.35	0.4647
HOMA	1.29±1.12	1.27±1.19	0.9596
Echocardiographic characteristics			
Interventricular septum thickness	8.16±1.55	9.03±1.89	0.021*
LV posterior wall thickness	8.38±1.42	10.03±1.33	<0.0001*
LV end diastolic diameter	44.83±4.53	47.03±4.53	0.0314*

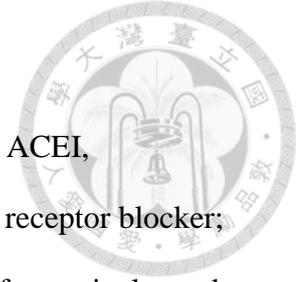
LV end systolic diameter	28.02±3.3	28.9±3.57	0.2442
LA diameter	30.5±5.15	34.39±6.75	0.0031*
LV ejection fraction	67.34±5.83	89.26±115.21	0.2984
E	77.88±13.94	73.26±18.77	0.1913
A	61.02±17.38	80.65±17	<0.0001*
E/A	1.37±0.46	0.95±0.37	<0.0001*
DT	196.09±43.46	222.61±54.3	0.0139*
Em	10.74±2.6	6±2.41	<0.0001*
E/Em.	7.65±2.25	13.3±3.64	<0.0001*
IVRT	90.86±17.86	99.65±22.16	0.0454*
LV mass index	47.81±22.87	43.42±29.92	0.4415
Adipose tissue distribution			
Total Fat, cm ²	259.97±94.82	308.86±102.51	0.0268*
Subcutaneous Fat, cm ²	176.97±69.41	175.71±66.22	0.9342
Visceral Fat, cm ²	82.99±40.99	133.14±55.23	<0.0001*
Peritoneal Fat, cm ²	45.79±26.19	79.26±38.38	0.0001*
Retroperitoneal Fat, cm ²	37.20±17.77	53.88±22.30	0.0002*
Visceral/Subcutaneous Fat ratio	0.50±0.27	0.83±0.46	0.0007

Abbreviations: BMI, body mass index; WC, waist circumflex; DM, diabetes; HTN, hypertension; HOMA, homeostasis model of insulin resistance; hsCRP, high sensitivity C-reactive protein; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein; TG, triglyceride; LA, left atrial diameter; LV, left ventricular; E, mitral inflow E wave; A, mitral inflow A wave; DT, mitral inflow deceleration time; Em, Peak annular early diastolic velocity of the lateral mitral annulus in tissue Doppler imaging; IVRT, interventricular relaxation time. *p 值<0.05 和對照組比較

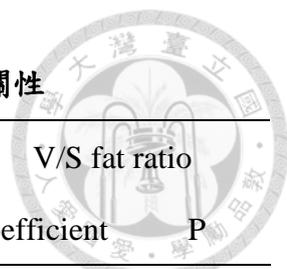
表八. 群體二正常腎臟功能與腹膜透析病患的基本資料，心臟超音波資料與血漿中的激素濃度

	Group1 (n=120)	Group 2 (n=101)
Age (years)	72.3 ± 9.6	68.7 ± 8.9
Sex(M/F)	46/75	42/59
BMI (kg/m ²)	24.8 ± 3.8	23.5 ± 3.1
Diabetes mellitus (%)	24.8	19.8
Hypertension (%)	71.1	79.2
Smoking (%)	32.2	24.8
WBC	7179 ± 2030	7406 ± 2039
Cholesterol	197.9 ± 37.4	200.6 ± 51.8
Triglyceride	138.0 ± 94.8	153.6 ± 109.3
Low density cholesterol	126.7 ± 37.3	115.3 ± 33.6
Anti-hypertension therapy		
ACEI + ARB (%)	28.1	34.7
β-blocker (%)	34.7	41.6
Calcium channel blocker (%)	38.0	47.5
Echocardiographic Data		
LA diameter (mm)	35.4 ± 6.1	36.0 ± 5.9
LVEF (%)	66.3 ± 8.4	60.7 ± 10.7
LVEDD (mm)	46.1 ± 6.1	49.8 ± 7.2
LVESD (mm)	28.7 ± 5.8	31.1 ± 7.3
Cytokine levels		
Interleukin 6 (pg/ml)	3.40 ± 2.88	37.58 ± 7.85
Tissue necrosis factor – alpha (pg/ml)	4.78 ± 2.24	13.5 ± 3.5

LV, left ventricle; BMI, body mass index; WBC, white blood count; ACEI, angiotensin-converting enzyme blocker; ARB, angiotensin II type I receptor blocker; LA, left atrium; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVEDD, left ventricular end diastolic dimension; LVESD, left ventricular end systolic dimension.



表九. Pearson bivariate 相關分析脂肪組織與臨床資料的相關性



	Total Fat		Visceral Fat		V/S fat ratio	
	coefficient	P	coefficient	P	coefficient	P
Age	0.268867	0.0108*	0.454318	<0.0001*	0.430137	<0.0001*
HTN	0.219374	0.0389*	0.251869	0.0173*	0.162006	0.1293
BMI	0.769374	<0.0001*	0.745376	<0.0001*	0.303755	0.0038*
HOMA	0.431448	<0.0001*	0.374128	0.0003*	0.0427	0.6911
Creatinine	0.034147	0.7507	0.30635	0.0035*	0.387397	0.0002*
HL	0.175653	0.0997	0.083238	0.438	0.052248	0.6268
Total Cholesterol	0.135631	0.205	0.074809	0.486	0.042355	0.6935
HDL	-0.17203	0.107	-0.41591	0.0001*	-0.41279	0.0001*
LDL	0.154089	0.1494	0.140621	0.1887	0.120881	0.2591
TG	0.32966	0.0016*	0.498749	<0.0001*	0.342601	0.001*
hsCRP	0.435864	<0.0001*	0.69769	<0.0001*	0.563643	<0.0001*
LA	0.347517	0.0008	0.474247	<0.0001*	0.306712	0.0035*
LV ejection Fraction	0.1239	0.2475	0.1901	0.0743	0.1718	0.1074
E/A	-0.17043	0.1103	-0.2534	0.0166*	-0.27409	0.0093*
E/Em	0.187716	0.0781	0.314697	0.0027*	0.297839	0.0046*
LV mass index	-0.0963	0.3693	-0.14159	0.1857	-0.14888	0.1638

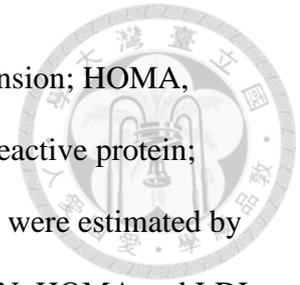
Abbreviations: BMI, body mass index; DM, diabetes; HTN, hypertension; HOMA, homeostasis model of insulin resistance; hsCRP, high sensitivity C-reactive protein; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein; TG, triglyceride; LA, left atrial diameter; LV, left ventricular; E, mitral inflow E wave; A, mitral inflow A wave; Em, Peak annular early diastolic velocity of the lateral mitral annulus in tissue Doppler imaging. *p 值<0.05 和對照組比較

表十. 多變項迴歸分析決定和左心室舒張功能不良發生的相關因子

	Odds ratio	95% Confidence interval	P
Model 1			
Age	1.08	1.01 ~ 1.15	0.0343*
Gender	0.4	0.08 ~ 2.13	0.2888
BMI	1.05	0.77 ~ 1.42	0.7747
DM	0	0 ~ Inf	0.9949
HTN	3.6	0.84 ~ 15.43	0.0882
HOMA	0.54	0.24 ~ 1.21	0.1363
hsCRP	1.42	1.15 ~ 1.76	0.0019*
LDL	1	0.98 ~ 1.02	0.9932
LV mass index	1	0.97 ~ 1.02	0.9151
Model 2			
Visceral Fat	1.29	1.06 ~ 1.57	0.0132*
Model 3			
Peritoneal Fat	1.45	1.1 ~ 1.92	0.0107*
Model 4			
Retroperitoneal Fat	1.5	0.96 ~ 2.34	0.0785
Model 5			
Visceral Fat	1.12	0.87 ~ 1.45	0.364
hsCRP	1.32	1.01 ~ 1.72	0.0434*
Model 6			
Peritoneal Fat	1.23	0.85 ~ 1.78	0.268
hsCRP	1.3	1.01 ~ 1.69	0.049*



Abbreviations: BMI, body mass index; DM, diabetes; HTN, hypertension; HOMA, homeostasis model of insulin resistance; hsCRP, high sensitivity C-reactive protein; LDL, low density lipoprotein; LV, left ventricular. ORs and 95% CIs were estimated by logistic regression. Model 2-4 adjust for age, gender, BMI, DM, HTN, HOMA and LDL. Model 5 and model 6 additionally adjust for hsCRP.





表十一. 根據結構方程做路徑分析

Path Analysis			B	P-value
FAT	-->	INFLAMMATION	1.133	<0.001
INFLAMMATION	-->	LV Diastolic dysfunction	0.373	<0.001
Factor Loading			Λ	P-value
FAT	-->	Subcutaneous Fat	0.735	
FAT	-->	Retroperitoneal Fat	0.837	<0.001
FAT	-->	Peritoneal Fat	0.888	<0.001
INFLAMMATION	-->	hsCRP	0.667	
INFLAMMATION	-->	HDL	-0.544	<0.001
INFLAMMATION	-->	TG	0.692	<0.001
INFLAMMATION	-->	HOMA	-0.023	0.839
INFLAMMATION	-->	FPG	0.096	0.328
Model Fitness				
GFI				0.944
NFI				0.929
RMSEA				0.046

*均校正性別，年齡

Abbreviations: HOMA, homeostasis model of insulin resistance; hsCRP, high sensitivity C-reactive protein; LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein; TG, triglyceride; FPG, fasting plasma glucose; LV, left ventricle; GFI, goodness of fit index; NFI, non-normed fit index; RMSEA, root mean square error of approximation.

表十二. 多變項迴歸分析決定在腹膜透析病患中和左心室舒張功能不良發生的相關因子

	Odds ratio	95% Confidence interval	P
Model 1			
TNF-alpha	2.6	2.0 ~ 3.35	<0.001
Model 2			
IL-6	1.26	1.25 ~ 1.26	0.01
Model 3			
TNF-alpha	1.62	1.27 ~ 2.06	<0.001
TNF-alpha x CAPD	1.45	1.13 ~ 1.79	0.004
Model 4			
IL-6	1.30	1.01 ~ 1.54	0.03
IL-6 x CAPD	1.12	0.65 ~ 1.56	0.07

Abbreviations: IL-6, interleukin 6; TNF-alpha, TNF-alpha. ORs and 95% CIs were estimated by logistic regression. All models were adjusted for age, gender, BMI, DM, hypertension and the main effect of peritoneal dialysis during case selection.

表十三. 將舒張性心衰竭(DHF)病患依照舒張功能的嚴重程度分組，條列 DHF 病患以及對照組基本資料，血漿中的 CTGF 濃度

	Control (n = 30)	Mild DHF (n = 96)	Severe DHF (n = 29)	p*
Age (years)	63.23 ± 9.04	67.67 ± 8.22	70.48 ± 9.30	0.12
Sex (M/F)	11/19	41/55	7/22	0.08
BMI (kg/m ²)	25.9 ± 2.4	26.5 ± 3.1	27.3 ± 5.1	0.29
Diabetes mellitus (%)	0	20 (21)	11 (38)	0.16
Hyperlipidemia (%)	0	47 (49)	9 (31)	0.19
NYHA Fc	-	2.09 ± 0.36	2.69 ± 0.66	<0.001**
Antihypertensive therapy				
ACEI + ARB (%)	0	39 (41)	19 (66)	0.02**
β-Blocker (%)	0	69 (72)	23 (79)	0.30
CCB (%)	0	69 (72)	23 (79)	0.48
Nitrates (%)	0	9 (9)	6 (6)	0.11
Statin (%)	0	22 (23)	6 (21)	0.51
Diuretics (%)	0	56 (58)	24 (82)	0.01**
Aldactone	0	34 (35)	8 (28)	0.61
Echocardiographic data				
LA diameter (mm)	-	36.6 ± 8.5	41.1 ± 2.4	0.03**
LVEF (%)	-	67.6 ± 8.0	68.6 ± 5.2	0.35
LVEDVI (ml/m ²)	-	71.5 ± 20.8	69.7 ± 14.9	0.66
LVEDD (mm)	-	45.3 ± 4.9	45.1 ± 5.1	0.86
LVESD (mm)	-	28.1 ± 4.5	27.7 ± 4.8	0.70
DT (cm/s)	-	247.3 ± 49.9	273.6 ± 97.1	0.05**
E/A	-	0.85 ± 0.30	0.94 ± 0.45	0.22
E/e'	-	10.55 ± 1.70	18.66 ± 4.94	<0.001**
LVMI	-	187.78 ± 44.94	198.83 ± 47.76	0.25
Cytokine levels				
NT-proBNP (pg/mL)	-	183.9 ± 135.5	565.3 ± 472.9	0.003**
CTGF (pg/mL)	6.0 ± 11.6	30.1 ± 33.4	73.8 ± 31.1	<0.001**

Continuous variables are presented as mean ± SD, while categorical variables are

presented as frequencies.

DHF, diastolic heart failure; NT-proBNP, N-terminal pro-brain natriuretic peptide; BMI, body mass index; NYHA, New York Heart Association; ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin II type I receptor blocker; LA, left atrium; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVEDVI, left ventricular end-diastolic volume index; LVEDD, left ventricular end-diastolic dimension; LVESD, left ventricular end-systolic dimension; DT, mitral flow deceleration time; E/A, early mitral valve flow velocity (E) divided by late mitral flow velocity (A); E/e', E divided by early diastolic (e') lengthening velocities in tissue Doppler imaging; LVMI, left ventricular mass index; CTGF, connective tissue growth factor. p 值代表嚴重 DHF 和輕微 DHF 之間的比較，
*p < 0.05 , ** , p < 0.005.

表十四. 線性多變項分析在舒張性心衰竭病患中影響心臟超音波 E/e'數值的因素

Variables	B	SE	p
Age	0.034	0.037	0.04*
NYHA Fc	1.485	0.685	0.03*
Diabetes	-0.369	0.756	0.626
Gender	-1.414	0.603	0.02*
LV mass	-0.005	0.007	0.44
Diuretics	-0.034	0.64	0.96
ACEI/ARB	0.466	0.652	0.48
Ln(NTpro-BNP)	0.043	0.288	0.88
CTGF	0.083	0.011	<0.001*

NYHA Fc, New York Heart Association, heart failure function class; LV, left ventricular; ACEI, angiotensin-converting enzyme inhibitor; ARB, angiotensin II receptor blocker; Ln(NTpro-BNP), natural logarithm of N-terminal pro-brain natriuretic peptide; CTGF, connective tissue growth factor. B and SE were estimated by multiple linear regression. *, $p < 0.05$.

表十五. 主動脈狹窄手術與對照組的狗在手術前後(兩個禮拜)的基本資料, 血行動力變化, 心臟超音波資料

Baseline characteristics	Banding (n = 9)	Sham (n = 3)	p
Age	2.0 ± 0.83	1.83 ± 0.29	0.62
BW	13.9 ± 2.2	12.8 ± 2.8	0.58
Hemodynamic parameters			
Before aortic banding			
Aortic pressure	112.0 ± 29.8	103 ± 11.1	0.47
LV pressure	122.8 ± 33.9	105.7 ± 7.5	0.19
LV end-diastolic pressure	7.44 ± 3.9	7.0 ± 4.4	0.87
Femoral artery pressure	124.6 ± 31.1	119.7 ± 4.0	0.67
2 weeks after aortic banding			
Aortic pressure	150.3 ± 26.0	100.3 ± 9.2	<0.01*
LV pressure	136.7 ± 43.9	104 ± 10.6	0.06
LV end-diastolic pressure	17.2 ± 7.4	5.3 ± 3.1	0.03*
Femoral artery pressure	125.4 ± 37.5	104.3 ± 8.3	0.17
Echocardiographic parameters			
Before aortic banding			
AO/LA	0.88 ± 0.1	1.09 ± 0.4	<0.01*
LV ejection fraction	0.76 ± 0.13	0.79 ± 0.09	0.74
LV septal wall thickness	7 ± 1.3	6.6 ± 0.57	0.45
LV posterior wall thickness	7.4 ± 1.2	7.6 ± 0.8	0.73
LV end-diastolic diameter	32.2 ± 3.8	31.5 ± 2.9	0.76
LV end-systolic diameter	19.2 ± 4.8	18.5 ± 2.6	0.76
E/e'	8.9 ± 2.0	7.5 ± 1.1	0.17
E/A	1.35 ± 0.42	0.99 ± 0.08	0.04*
DT	127.6 ± 36.2	126.3 ± 44.3	0.96
LV mass	100.7 ± 34.8	93.5 ± 23.6	0.71
2 weeks after aortic banding			
LV ejection fraction	0.79 ± 0.16	0.84 ± 0.03	0.43
LV septal wall thickness	9.2 ± 2.0	6.8 ± 0.4	<0.01*
LV posterior wall thickness	10.1 ± 2.6	7.3 ± 0.3	0.01*

LV end-diastolic diameter	28.5 ± 6.3	28.8 ± 2.3	0.9
LV end-systolic diameter	16.2 ± 6.0	15.7 ± 1.7	0.8
E/e'	12.2 ± 4.2	7.9 ± 1.2	0.02*
LV mass	111.2 ± 37.5	78.9 ± 14.5	0.05*
E/A	1.36 ± 0.19	1.81 ± 0.35	0.15
DT	107.5 ± 27.5	114.3 ± 16.9	0.63

BW, body weight; LV, left ventricular; AO; aortic root diameter; LA, left atrium; DT, mitral flow deceleration time; E/A, early mitral valve flow velocity (E) divided by late mitral flow velocity (A); E/e', E divided by early diastolic (e') lengthening velocities in tissue Doppler imaging. Initial hemodynamic and echocardiographic data denote the parameters before aortic banding, whereas final hemodynamic and echocardiographic data described the parameters at 2 weeks after aortic banding or sham operation. *, $p \leq 0.05$.

表十六. 線性多變項分析在動物模式中影響心臟超音波 E/e'數值的因素

Variables	B	SE	p
LV mass	0.037	0.032	0.28
LV ejection fraction	-5.89	9.3	0.54
Aortic pressure	-0.014	0.038	0.72
CTGF	9.8	5.1	0.04*

LV, left ventricular; CTGF, connective tissue growth factor. B and SE were estimated by multiple linear regression. *, $p \leq 0.05$

第九章 附錄 - 博士班期間相關論文



1. **Wu CK (first author)**, Huang YT, Lin HH, Yang CY, Lien YC, Lee JK, Huang JW, Hung KY. Dissecting the mechanisms of left ventricular **diastolic dysfunction** and inflammation in peritoneal dialysis patients *PLoS One*. 2013 May 13;8(5):e62722
2. Lin CY, **Wu CK (equal-first author)**, Yeong EK, Lin HH, Huang YT, Lee JK, Lin YH, Chiang FT, Tang YB, Tsai CT. Prognostic significance of left ventricular **diastolic function** in burn patients. *Shock*. 2012 May;37(5):457-62.
3. Lee JK, Lin HH, Tsai CT, Chen JJ, Kuo CC, Lien YC, Lin JW, Huang JW, Hwang SW, Hwang JJ, Tseng CD, Chiang FT, Chen JJ, **Wu CK (corresponding author)**. Differential association of proinflammatory cytokines with left ventricular **diastolic dysfunction** in subjects with and without continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012 Nov;22(11):974-80
4. **Wu CK (first author)**, Yang CY, Lin JW, Hsieh HJ, Chiu FC, Chen JJ, Lee JK, Huang SW, Li HY, Chiang FT, Chen JJ, Tsai CT. The Relationship Among Central Obesity, Systemic Inflammation, and Left Ventricular **Diastolic Dysfunction** as Determined by Structural Equation Modeling. *Obesity (Silver Spring)*. 2012 Apr;20(4):730-7
5. **Wu CK (first author)**, Lee, JK, Chiang CT, Yang CH, Hwang JJ, Lin JL, Tseng CD, Chen JJ, Tsai CT. Plasma levels of TNF- α and IL-6 are associated with **diastolic heart failure** through downregulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase. *Critical Care Medicine*. 2011 May;39(5):984-92
6. **Wu CK (first author)**, Tseng CD, Huang YT, Hsieh CS, Tsai WS, Lin JL, Chiang FT, Tsai CT. Angiotensin II does not influence expression of **sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ + ATPase** in atrial myocytes. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2009 Sep;10(3):121-6.
7. **Wu CK (first author)**, Wang YC, Chang SN, Lee JK, Su MY, Yeh HM, Su MJ, Chen JJ, Chiang FT, Hwang JJ, Lin JL, Tsai CT. Connective tissue growth factor and **cardiac diastolic dysfunction** – human data from the Taiwan Diastolic Heart Failure Registry (TDHFR) and molecular basis by cellular and animal models. *Eur J Heart Fail*. 2013 (accepted)