

國立臺灣大學牙醫專業學院臨床牙醫學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Clinical Dentistry

School of Dentistry

National Taiwan University

Master Thesis

藉由 Metformin 調節誘發性一氧化氮合成酶與一氧化氮
合成減緩根尖病變進展

Metformin Attenuate Periapical Lesion Progression via
Abolishing Inducible Nitric Oxide Synthase/ Nitric Oxide
Synthesis

周千瑜

Chien-Yu Chou

指導教授：賴向華博士

Advisor : Eddie Hsiang-Hua Lai, Ph.D.

中華民國 107 年 7 月

July, 2018



誌謝

兩年前一連串的意外，讓我進到了這個地方。兩年後另一個驚喜，讓我得以有機會提前將清單上的一件事完成。

謝謝我的指導教授賴向華醫師，除了在臨床上的悉心指導外，也時時關心我的生活；在我需要盡長女義務時，給了我完全的自由與支持，讓我毫無後顧之憂地在台北與台中、臨床與研究之間來回奔走。

謝謝林思洸醫師包容我、成全我提前口試，讓我能在備感壓力的三年級專注於臨床工作，期許自己能更完善地照顧病人。如果我在碩士生涯中學到該如何以嚴謹、科學的方法探索未知的領域，也將歸功於老師平日的指導和督促。

謝謝實驗室裡的大家，振寧學長是最可靠的存在，錢蕙學姐和芳育更是一起打拼、一起衝過終點線的好夥伴；翰偉學長是我深夜加班時最常出現、跟我說加油的人；庭安學姊甚至會留下來陪我直到實驗結束，在道別時給我一個鼓勵的擁抱。我也要謝謝科內的許多同學們，不管是出借學生證、幫忙報病例，或是單純聽我吐苦水，都帶給我許多正能量。另外要特別感謝蘇懿瑄學姊和書帆，兩位在我一開始進到實驗室時手把手地帶領我，謝謝她們無比的耐心。

很有趣的是，我的朋友們從我入學以來，每個人都已經自動做好心理準備要面對我的情緒崩潰，而我也確實依賴著他們。從大學時就是好夥伴的昭瑜，在我們兩人最後的口試關頭，數十年如一日地互相打氣。室友育華會在我晚歸時，從房間探頭出來告訴我，冰箱裡有一份要給我的晚餐。陳鉉和依婷會一邊吐槽、一邊鼓勵我。而有更多老朋友們，無論身在何方，或許是隔著幾站捷運、隔著幾座城市，甚至隔著一整片汪洋，我所得到的支持都沒有減少過。如果我成功走過這一路，你們的友誼一定是我最堅實的後盾。

千瑜 謹誌

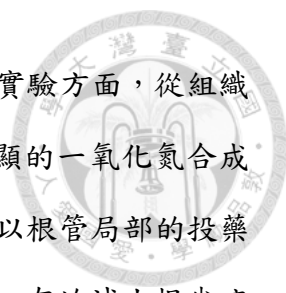
中文摘要



根尖病變 (periapical lesion) 是當牙髓腔暴露、細菌入侵，導致牙髓感染發炎、壞死，而後蔓延至根尖部位的齒槽骨，造成骨頭破壞形成的骨吸收性病灶。在病灶區域內，細菌釋放內毒素(Lipopolysaccharide, LPS)引發一連串的发炎反應，除了引發成骨細胞凋亡，也吸引免疫細胞聚集、巨噬細胞活化與蝕骨細胞分化，造成骨吸收情形更加嚴重。Metformin 是臨床上廣為被使用作為降血糖的藥物，但也具備抗發炎以及影響骨代謝的功能。先前的研究已經證明，發炎反應時產生的一氧化氮(Nitric oxide, NO)會誘發成骨細胞凋亡、刺激成骨細胞分泌膠原酶，加速根尖病變的進展；在動物實驗模型上也觀察到抑制一氧化氮的合成，可以減緩骨性吸收、縮小病灶範圍。另外，受到發炎因子刺激的成骨細胞也會分泌細胞趨化激素(C-C motif ligand 2, CCL2)，吸引巨噬細胞聚集浸潤，使骨吸收加劇。然而，對於發炎環境下，巨噬細胞產生一氧化氮後對於成骨細胞的刺激、以及 Metformin 在此機轉中扮演的抑制效果尚待闡明。

在本次研究中，利用人類類單核球細胞(MonoMac-6, MMC-6)在細菌內毒素刺激(LPS)後一氧化氮合成酶的活化以及一氧化氮的生成，透過西方點墨法與格里斯試劑(Greiss reagent)檢測一氧化氮合成酶的表現量與 Nitrite 濃度，並觀察 Metformin 在此路徑上是否具有抑制效果。另一方面，收集受到細菌內毒素刺激的 MMC-6 的 conditioning medium 後，觀察釋放至細胞培養液中的產物，是否會影響成骨細胞分泌 CCL2 的表現。最後，設計誘導根尖病變的大鼠模型，在經過標準的根管清創後給予 Metformin 治療，利用影像學分析以及組織免疫染色去探討對於根尖病灶的癒合狀況。

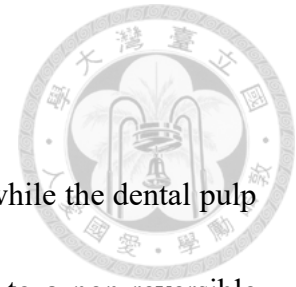
研究結果發現，在 LPS 刺激下，MMC-6 的一氧化氮合成酶會被活化，並產生高濃度的 Nitrite，而 Metformin 可以抑制一氧化氮合成酶的活性、和降低 Nitrite 的累積濃度。而受到 LPS 刺激後的 MMC-6 之 conditioning medium 會誘發成骨細



胞生成 CCL2，並且 Metformin 同樣可以對此有抑制效果。動物實驗方面，從組織切片染色的結果，我們觀察到在根尖發炎病變的區域中，有明顯的一氧化氮合成酶訊號和巨噬細胞浸潤。而影像學分析的結果顯示，Metformin 以根管局部的投藥方式可以減緩巨噬細胞浸潤、降低一氧化氮合成酶的活化程度，有效減小根尖病變的範圍。總結以上所述，在 *in vitro* 的研究中我們驗證”因細菌感染所誘發的 iNOS 上升使巨噬細胞產生大量 NO”可被 Metformin 抑制；而在 *in vivo* 的研究中，我們也發現局部投予 Metformin 能減緩大鼠根尖病變的發炎性骨吸收。透過本次實驗，我們發現 Metformin 可以抑制巨噬細胞 iNOS 的表現量、抑制成骨細胞分泌 CCL2、降低根尖病變區域巨噬細胞的浸潤，達到減緩根尖病變進展的效果。

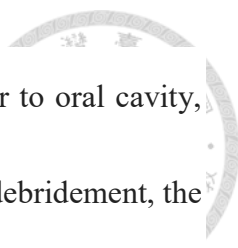
關鍵字：Metformin，iNOS，CCL2，根尖病變，成骨細胞，巨噬細胞

Abstract



Periapical lesion is an osteolytic lesion which is developed while the dental pulp is exposed to the oral environment, invaded by bacteria and lead to a non-reversible inflammation and destruction of periapical bone. Bacteria in the periapical lesion will cause a series of reaction including immune cell recruitment and infiltration, macrophage activation and osteoblast apoptosis. Previous studies show that nitric oxide (NO) produced by immune cells while inflammation progressed will cause the apoptosis of osteoblast and accelerate the progression of periapical lesion; it was also shown that inhibition of nitric oxide will attenuate periapical lesion progression. Furthermore, osteoblasts will produce C-C motif ligand 2 (CCL2) by the stimulation of lipopolysaccharide (LPS), lead to macrophage recruitment and exaggerated bone destruction. Metformin, a well-used anti-diabetic medication, has been shown to its anti-inflammatory effect and its ability to regulate bone metabolism. However, the effect of NO produced by macrophage on the osteoblast and the mechanism of Metformin attenuate the periapical lesion remain unclear.

In our study, we use human monocytic cell and osteoblastic cell to investigate the activation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and the production of NO by macrophage and the synthesis of CCL2 by osteoblast respectively. The rat model with



induced apical lesion were also designed by exposing the pulp chamber to oral cavity, and Metformin treatment was performed after standard root canal debridement, the healing of the apical lesion was investigated by imaging analysis and tissue immunostaining.

We found NO production and iNOS expression was increased in LPS-treated macrophage, the activated macrophage stimulate the secretion of CCL2 in osteoblast. Metformin inhibited NO and iNOS expression in macrophage and reduced CCL2 in osteoblast by conditioning medium from LPS-treated macrophage. In the *in vivo* part of our study, bone destruction was significantly less in the Metformin- treated group. The infiltration of macrophage around the lesion was inhibited and the expression of iNOS was also reduced in the Metformin-treated group.

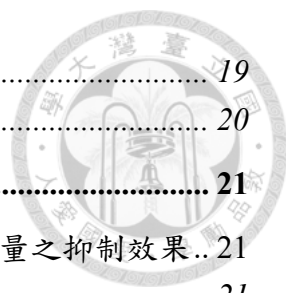
Our study suggest that LPS-induced iNOS expression and NO production were inhibited by Metformin both *in vitro* and *in vivo*. Metformin inhibited the cell-cell communication between macrophage and osteoblast in periapical lesion. Therefore, Metformin may be promising for clinical application in patients with periapical lesion.

Key words: Periapical lesion, Metformin, macrophage, osteoblast, iNOS, CCL2

目錄



誌謝	I
中文摘要	II
ABSTRACT	IV
第一章 導論	1
1.1 根尖發炎反應與根尖周圍病變(PERIAPICAL LESION).....	1
1.1.1 根尖病變發展過程.....	1
1.1.2 根尖周圍病變與細菌內毒素(Lipopolysaccharide, LPS).....	1
1.1.3 一氧化氮(NO)與 iNOS	2
1.1.4 NO、細胞凋亡與根尖周圍病變.....	3
1.1.5 趨化因子 CCL ₂ 與 monocyte 的浸潤.....	3
1.1.6 根尖病變的治療與根尖組織的修復.....	4
1.2 METFORMIN 與根尖病變治療.....	5
1.2.1 Metformin 概論.....	5
1.2.2 Metformin 與抑制發炎效果.....	7
1.2.3 Metformin 在牙科的應用.....	7
第二章 實驗目的	9
第三章 材料與方法	10
3.1 細胞培養.....	10
3.2 動物飼養.....	10
3.3 LPS 誘發細胞 iNOS 表現、NITRITE 生成和 CCL2 合成與 METFORMIN 對此路徑的影響.....	11
3.3.1 以西方點墨法測試巨噬細胞之細胞質 iNOS 蛋白表現量.....	11
3.3.2 Greiss Reagent 測試巨噬細胞之 Nitrite 生成量.....	13
3.3.3 Human MCP-1 ELISA kit 測試成骨細胞之 CCL2 蛋白質生成量.....	14
3.4 誘導根尖病變動物模型 (ANIMAL MODELS OF PERIAPICAL LESIONS)	15
3.5 免疫組織染色	17
3.6 統計分析.....	17
第四章 實驗結果	18
4.1 LPS 刺激巨噬細胞表現 iNOS 與 NO 的生成.....	18
4.2 METFORMIN 調節 LPS 刺激之巨噬細胞 iNOS 表現量與 NO 的生成.....	18
4.3 成骨細胞之 CCL2 基因表現量與 METFORMIN 調節其表現量之效果.....	19
4.4 局部投予 METFORMIN 於根尖病變大鼠模型之療效.....	19



4.4.1 於2D 以及3D 影像分析之結果.....	19
4.4.2 組織染色之結果.....	20
第五章 討論.....	21
5.1 LPS 刺激巨噬細胞之 iNOS 表現量與 METFORMIN 對其表現量之抑制效果..	21
5.1.1 LPS 刺激巨噬細胞之 iNOS 表現量與 Nitrite 生成.....	21
5.1.2 Metformin 抑制 LPS 刺激之巨噬細胞 iNOS 表現量與 Nitrite 生成.....	23
5.2 METFORMIN 抑制巨噬細胞與成骨細胞之交互作用並影響成骨細胞之 CCL2 基因表現量.....	24
5.3 局部投予 METFORMIN 於根尖病變大鼠模型之療效.....	25
5.3.1 Metformin 具有減緩根尖病灶進展之效果.....	25
5.3.2 Metformin 可以降低根尖病灶處細胞 iNOS 表現量與巨噬細胞浸潤現象.....	27
第六章 結論.....	29
第七章 未來展望.....	30
附圖.....	31




圖 一 大鼠根尖病變模型之建立.....	31
圖 二 LPS 誘發 MMC-6 之 iNOS 與 NITRITE 表現量.....	32
圖 三 METFORMIN 調節 LPS 誘發之 MMC-6 iNOS 與 NITRITE 表現量.....	33
圖 四 SNP 刺激 U2OS 產生 CCL2.....	34
圖 五 以 MMC-6 CONDITIONING MEDIUM 刺激 U2OS 之 CCL2 生成.....	35
圖 六 METFORMIN 調節 MMC-6 CONDITIONING MEDIUM 刺激 U2OS 之 CCL2 生成.....	36
圖 七 大鼠根尖病變模型於 2D、3D 影像之結果和分析.....	37
圖 八 大鼠根尖病變模型之組織切片染色.....	38
表 一 免疫組織染色之細胞數量.....	39

第一章 導論




1.1 根尖發炎反應與根尖周圍病變(*Periapical Lesion*)

1.1.1 根尖病變發展過程

當牙髓受到細菌感染後，將會引發一連串由牙髓到根尖的反應，從牙髓壞死、根尖發炎，乃至最後的根尖周圍病變；因根尖發炎反應所導致的根尖骨頭吸收，也是人體上最常見的骨性吸收病變之一。在牙髓暴露於細菌環境的初期，會有 PMN (polymorphonuclear neutrophil)、單核球細胞(monocyte)等免疫細胞聚集，隨著感染繼續進行、免疫細胞與根尖周圍的細胞會釋放更多的趨化因子，使該區域血管增生、細胞浸潤的現象也會更加明顯；當發炎過程從急性發炎轉為慢性發炎後，浸潤的細胞則將以巨噬細胞、T 細胞與 B 細胞等淋巴球和漿細胞為主。雖然根尖組織的細胞會分泌各種抗體以對抗發炎，但終究這些機制無法完全清除感染，最後終將走向牙髓壞死。在這個過程中，由細胞所分泌的發炎因子如 Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α)、reactive oxygen/nitrogen species 等等，也會進一步引發細胞的凋亡(apoptosis)。當整個發炎反應與細胞凋亡的過程進展到根尖周圍後，就會造成周圍骨頭的破壞，形成根尖周圍病變(periapical lesion)，或是稱為慢性根尖周圍炎(chronic apical periodontitis)。

1.1.2 根尖周圍病變與細菌內毒素(Lipopolysaccharide, LPS)

在根尖周圍病變這種細菌引起的骨頭吸收病灶中，有許多細菌的病理機轉是由細菌內毒素(LPS)所調控的，在過去許多研究中也被視為是最具有影響力的 osteolytic factor 之一，有許多研究都指出來自 *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*)




的細菌內毒素會抑制成骨細胞分化與骨頭的生成。早在 1992 年，Sundqvist G 等學者¹便提出，在根尖病變中，疾病嚴重程度和 LPS level 之間有正相關；而同時 Yamasaki 學者²的研究中也發現，在大鼠根尖周圍炎病變的動物模型中，在誘導形成根尖病變後，隨著病變發展的時間，LPS 濃度也逐漸提升；在 Mattison 學者³於 1982 年更進一步的研究中，觀察到直接將 LPS 置入牙髓腔內會引發強烈的根尖周圍骨頭破壞。

1.1.3 一氧化氮(NO)與 iNOS

一氧化氮(Nitric Oxide, NO)是一種自由基形態的訊息傳遞物質，由一氧化氮合成酶(NO synthase, NOS)將 L-arginine 轉化而來。一氧化氮合成酶在人體裡有三種不同的類型，分別為 inducible NOS(iNOS)、endothelial NOS(eNOS)與 neuronal NOS(nNOS)，但只有 iNOS 可以在 LPS、TNF- α 、IL-1 等刺激下產生大量高濃度的 NO。⁴

NO 在生成後，可以調控許多不同的生理反應，包括血管擴張、免疫反應和扮演神經傳遞物質的角色，而在感染刺激下所引發的高濃度 NO，也具有引起細胞凋亡、抑制粒線體呼吸作用等細胞毒殺性，可以抵抗病原細菌⁵。Xie 學者^{4,6}針對 NO 與牙周病進展的關係進行研究，發現由 Interferon-gamma (IFN- γ)、interleukin-1beta (IL-1 β)、TNF- α 和 LPS 等細菌產物刺激的 iNOS 和牙周病病灶的進展有密切關係。在根尖周圍炎方面，早在 1998 年，Takeichi 學者⁷就指出，在發炎反應下細胞所生成的 NO 在根尖病灶的形成過程中有一定的影響；Hama 學者⁸則是發現，在根尖周圍炎的病灶中，主要生成 NO 的細胞是巨噬細胞與多形性白血球，同時成骨細胞與蝕骨細胞也會有 iNOS 的表現，暗示 NO 在整個根尖病灶的發展過程扮演重要的角色。




過去針對 NO 在骨頭代謝、吸收性骨骼疾病中所扮演的角色的研究結果存在分歧，有些研究指出 NO 會促進蝕骨細胞(osteoclast)活化、成骨細胞(osteoblast)的細胞凋亡、促進骨頭的吸收⁹⁻¹¹，但也有持相反論調的學者，因此 NO 在細菌性引起的骨性吸收病灶所扮演的角色一直還沒有定論。

1.1.4 NO、細胞凋亡與根尖周圍病變

在牙髓壞死、根尖周圍骨頭也發生感染後，由感染、發炎引起的一連串反應將導致成骨細胞走向細胞凋亡，在可能影響細胞凋亡的調控因子中，包括 LPS、TNF- α 、Fas ligand 和 reactive oxygen/nitrogen 等，Nitric oxide 所扮演的角色一直有所爭議。Van't Hof 學者¹²認為 NO 可以調節骨頭代謝相關的細胞激素，連帶調控成骨細胞的活化和蝕骨細胞的分化；而在 Hama 學者⁸和 Takeichi 學者¹³的研究中，在根尖囊腫與根尖肉芽組織的切片中也觀察到大量表現出 iNOS 的細胞，後者也在其後續研究中檢視 NO 與其他發炎時產生的細胞激素在根尖囊腫中調控股頭代謝的機制。^{7,14} 本實驗室過去的研究則是發現 NO 會藉由引發成骨細胞凋亡而加劇牙根尖病變的進展，並且在動物實驗模型中，抑制 NO 的合成可以減緩成骨細胞凋亡、根尖周圍病變的範圍也會較小。^{9,10} 所以本研究將以此為出發點，探討除了傳統機械性根管銼針清創以外，利用代入藥物至根尖病灶位置後改變該處骨頭代謝與發炎反應可能的調控途徑。

1.1.5 趨化因子 CCL₂ 與 monocyte 的浸潤

除了成骨細胞的細胞凋亡外，在根尖周圍病變的組織切片中，我們也觀察到大量的巨噬細胞等發炎細胞浸潤與蝕骨細胞的活化，進而造成根尖周圍骨頭的破壞與吸收。由過去的研究，我們已經知道發炎性的骨吸收主要是蝕骨細胞所造成，




而蝕骨細胞主要由 monocyte/macrophage lineage 分化而來。¹⁵ 一般蝕骨細胞為多核、富含 lysosome 的細胞，活化時可以破壞硬骨。根尖周圍病變骨吸收的環境中，就常常觀察到 monocyte 的浸潤與蝕骨細胞的形成。Monocyte 這類型的免疫細胞的移動主要是靠著趨化因子(chemokines)的濃度梯度所吸引，其中 CCL2(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)會吸引 monocyte、T cell、nature killer cell 和 basophil 等免疫細胞聚集在病灶處，是主要造成 monocyte 浸潤的發炎分子之一。¹⁶

在發炎反應中，CCL2 會調節白血球離開血管、進入病灶區，同時也會吸引蝕骨細胞的單核球前趨細胞(osteoclast monocyte precursor)，並和 RANKL 作用引發蝕骨細胞分化，所以 CCL2 在根尖周圍齒槽骨吸收的發炎反應中扮演了關鍵的角色。¹⁷ 研究顯示在有根尖周圍病變的病人病灶處，成骨細胞有大量 CCL2 的分泌，而動物實驗模型也觀察到成骨細胞是製造 CCL2 的主要來源。¹⁸ 發炎環境中發炎因子 TNF- α 、IL-1 β 以及 IL-6 也會促進 CCL2 的分泌¹⁹，因此有不少文獻在探討透過抑制 chemokines、減少免疫細胞的浸潤來減緩根尖周圍骨頭吸收的進展。

1.1.6 根尖病變的治療與根尖組織的修復

早在 1965 年 Kakehashi 等學者²⁰ 的研究中，就已經指出發炎反應和細菌的關係。在他的實驗中，大鼠經過同樣的手術暴露出牙髓後，存在於無菌環境的牙齒非但沒有發炎的現象，也沒有根尖組織的破壞，破壞區域甚至出現修復性牙本質連接受損的齒質；相對的，暴露在一般有菌環境下的牙齒則呈現預期中的牙髓壞死以及根尖發炎的現象之後 Sundqvist 等學者¹ 也更進一步確立了細菌感染和根尖發炎兩者前因後果的關係。K Bolto 等學者²¹ 接著利用非侵入性的 Micro-CT 掃描方式證實小鼠在牙髓暴露於口腔環境後，細菌感染造成的發炎將導致根尖周圍的骨頭破壞，最後產生根尖周圍病變。故由諸多前人的研究可知，我們可得知控制發炎為根管治療的關鍵。



基於上述之控制發炎的目標，一般臨床治療感染的患齒，是以機械性的清創加上沖洗來達到消除或減少根管內細菌數量為目的。當此目標達成，即改為較被動的方式以 X 光片追蹤病灶癒合的情形。但是根據 Friedman 學者²²於 2004 年針對根管治療成功率的文獻回顧中可發現，儘管在還未出現根尖周圍病變的患齒在根管治療後，成功率可高達 92-98%；相對的，已經有根尖周圍病變的患齒，其治療後病變癒合的比例卻只有 74-86%，由此可知傳統的根管治療仍有所限制。而近年來對於細胞和各種調控因子的了解，我們發現藉由藥物去調控根尖病變區域骨頭的生成與吸收的可能性，如此在傳統的根管治療之後，即另有一加速病灶癒合的新方向。

1.2 Metformin 與根尖病變治療

1.2.1 Metformin 概論

二甲雙胍類藥物「metformin」是目前使用最廣泛的降血糖用藥。在治療治療第二型糖尿病上，此藥不但歷史悠久且是歐美相關糖尿病醫學會所建議之優先選擇的口服降血糖藥。Metformin 為一種雙胍類(biguanides)藥物，主要作用為抑制腸道對糖份的吸收、降低肝臟的糖質新生(gluconeogenesis)與促進糖份利用，同時避免刺激胰島素分泌，減少低血糖和體重增加的副作用；除此之外，Metformin 也可以降低心血管梗塞、中風等風險，對於心血管疾病控制帶來的益處不亞於對於糖尿病的疾病控制。Metformin 的主要藥物機轉為活化細胞內重要細胞代謝傳感器 AMPK (Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase)，藉著 AMPK 的活化，啟動異化作用產生 ATP，減少內臟脂肪及膽固醇的合成，並且抑制肝臟糖質新生。活化 AMPK 的方式，可能是經由輕微和短暫的抑制線粒體呼吸鏈複合物 I (mitochondrial respiratory chain complex I)，造成肝臟能量減少狀態，繼而激活

AMPK。Metformin 另有增加肝臟與週邊肌肉組織對胰島素的敏感性與降低腸道對葡萄糖的吸收的作用。由於 Metformin 並不直接作用於胰臟 β 細胞，因此在單獨使用時，造成低血糖的風險相當低。²³

此外，近來流行病學、臨床觀察與諸多體內、體外研究皆有初步證據顯示，透過一些非關胰島素增敏的直接、間接機轉，Metformin 對於某些惡性腫瘤的發生與預後有幫助。其中可能的直接機轉包括：1. Metformin 抑制粒線體功能，增加 AMP (adenosine monophosphate)，使 AMPK (AMP-activated protein kinase) 活性增加，而 AMPK 增加會抑制 mTOR (mammalian target of rapamycin) 的活性，抑制腫瘤細胞增生 (proliferation)，增加腫瘤細胞的凋亡。2. Metformin 可以減少乳癌細胞的人類上皮生長因子受器 2 (human epidermal growth factor receptor (HER) 2) 數目，進而抑制腫瘤幹細胞。3. 另一方面，可能的間接機轉包括：1. Metformin 可以改善組織胰島素抗性，減少血液裡的胰島素濃度，改善高胰島素血症。2. Metformin 可以減少肝臟的葡萄糖新生，增加肌肉組織吸收葡萄糖，因此可以改善高血糖現象。3. Metformin 可以減輕體重，因此可以減少脂肪組織分泌發炎物質。²⁴ 由於上述的直接作用，也指出了 Metformin 用於非糖尿病與非肥胖患者的癌症防治的希望。然而，針對這些 Metformin 不同的藥物效果的研究中，許多學者也發現在 Metformin 達到抑制發炎效果時，其藥物途徑可能不單只限於 AMPK pathway，Kelly 學者²⁵ 在 2015 年的研究中，發現 Metformin 可以抑制 LPS 刺激巨噬細胞後所引起的 IL- β 合成，其藥物路徑雖是透過抑制粒線體 complex 1，但使用 AMPK activator 藥物 A769662 卻無法模擬出相同的抑制效果，所以 Kelly 學者推測 Metformin 可能是透過 AMPK 以外的路徑達到抑制巨噬細胞因 LPS 所引起的反應。




1.2.2 Metformin 與抑制發炎效果

除了在糖尿病的廣泛使用外，近年來有許多研究報告針對其在不同細胞內抗發炎、以及影響骨頭代謝等功能提出相關的討論。Metformin 可以藉由調控人類內皮細胞、平滑肌細胞以及巨噬細胞內的 IL-1 β ，而抑制轉錄因子 NF- κ B 的產生，達到血管的抗發炎效果(vascular anti-inflammatory effect)。^{24,26} 在人類單核球內，也可以透過抑制 TNF- α 和 tissue factor (TF)來降低發炎。²⁷ 在全身性給藥途徑上，Metformin 也可以降低血漿中的 sICAM (soluble intercellular adhesion molecule)、VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)、C-reactive protein、MIF (macrophage migration inhibitory factor)等發炎因子去減緩發炎反應。^{28,29}

Zhang 學者³⁰ 在大鼠動物模型上，利用 LPS 誘發急性肺損傷(acute lung injury) 並投與 Metformin 觀察其療效，發現大鼠支氣管液裡 TNF- α 、IL-6 含量都會被 Metformin 抑制、進而減緩病灶區的發炎反應與組織破壞。雖然 Metformin 抑制發炎反應的機轉尚未完全明瞭，但該藥物的效果卻是有目共睹，近年來也開始有牙科領域的研究探討 Metformin 的治療效果。

1.2.3 Metformin 在牙科的應用

由於Metformin在諸多領域的治療潛力，近年來也有研究討論牙科方面的應用。在2013年Rao等學者³¹的臨床隨機試驗中，即有討論Metformin在牙周病的治療效果。其實驗將50個已經做過牙周基礎治療後的病人分成metformin治療組與安慰劑組，在3和6個月後測量bleeding index , probing depth, clinical attachment level的結果，以Metformin治療組都有更為顯著的改善。在這之後，Kanika等人³²的臨床隨機對照試驗，更以Metformin合併Platelet-Rich Fibrin (PRF)治療牙周病造成的intra-bony defect。結果顯示在接受基礎牙周病治療後的120位病人中，以Metformin合併PRF的組別，其probing depth的降低和intra-bony defect在影像學上的表現，皆比單獨以



Metformin, PRF, 以及只執行牙周翻瓣手術的組別有顯著較佳的進步。兩篇文獻在藥物給予的方式，有別與以往常見的口服或是肌肉注射，而選擇以局部給予的方式，具有提高目標區域藥物濃度且符合臨床應用的雙重優點，但是此方式對於根尖病變的治療目前仍缺乏相關研究。

對於根尖病變的治療，在 Liu 等人²⁶在 2012 年提出的動物實驗中誘導 40 隻大鼠的第一大白齒根尖病變，在以肌肉注射的方式給予 metformin 治療，在組織學的結果顯示根尖的骨頭喪失明顯少於以注射生理食鹽水的控制組。該學者認為 Metformin 可以透過調節 NF- κ B ligand 的 receptor activator 和 Osteoprotegerin 的比例，調節蝕骨細胞的細胞分化與成骨細胞的細胞凋亡，使根尖周圍炎病灶區的蝕骨細胞減少、病灶範圍變小，抑制根尖周圍炎的疾病進展。

綜合以上文獻我們可知，由於 Metformin 的諸多優點與其抗發炎、促進骨生成的效果，除了在糖尿病的治療之外，在諸多領域也皆具有優異的表現。而在牙科的治療方面，雖然有文獻提出局部投藥的方式成功治療牙周病，但對於根尖病變的治療卻缺乏相關的臨床試驗，在動物實驗中也只有以肌肉注射的方式進行，與臨床操作需求並不符合。在我們先前的研究已發現，Metformin 可能可以利用調控成骨細胞凋亡抑制根尖病變的進展，但除此之外，Metformin 在根尖病灶區域抑制骨頭吸收的機轉卻尚未明朗，這是我們進一步想要探討的目標。

第二章 實驗目的



綜合以上的文獻資料，我們知道根尖病變的產生主要是因為齒源性感染不斷地刺激，造成發炎反應從牙髓組織蔓延至牙根尖及周圍組織，進而造成牙根與骨頭的吸收。在過去的研究中，我們發現 LPS 可以誘發巨噬細胞與蝕骨細胞的活化、造成根尖周圍的骨頭破壞；同時，LPS 也會刺激單核球細胞裡的 iNOS 合成高濃度的 NO，在本實驗室過去的研究中則是發現 NO 會誘發成骨細胞的細胞凋亡，在動物實驗模型上會使根尖周圍病變的範圍更大；此外，在發炎環境的刺激下，成骨細胞也會產生 CCL2、吸引更多的巨噬細胞前來，加速根尖周圍病變的進展，但類似的機轉在巨噬細胞上，過去文獻並沒有加以探討。

另一方面，Metformin 這種臨床上廣被使用來降血糖的藥物，也同樣具有抗發炎的能力。發炎反應時所產生的 NO 與成骨細胞凋亡、巨噬細胞浸潤、蝕骨細胞活化和根尖病變的發展有關，且病變範圍越大，成骨細胞凋亡的數目越多、巨噬細胞浸潤的現象也越明顯。本實驗室過去的研究中已經發現 Metformin 可以抑制缺氧時活性氧分子的產生，並減緩成骨細胞凋亡，進一步影響動物模型根尖病變的病灶範圍。但 Metformin 在細菌感染的環境下，對於巨噬細胞浸潤的抑制效果卻還未知，因此在 *in vitro* 的實驗中，我們試著想了解 Metformin 是否可以調控因細菌感染而引起的巨噬細胞浸潤，同時也會建立根尖病變的動物模型，期望在 *in vivo* 的實驗中能得到進一步的印證。總結來說，本研究欲探討：

1. LPS 是否會引發巨噬細胞表現 iNOS？
2. Metformin 是否可以抑制因 LPS 所誘發的巨噬細胞 iNOS 表現量與 Nitrite 生成量？
3. LPS 刺激下的巨噬細胞是否影響成骨細胞生成 CCL2？
4. 局部投以 Metformin 對於根尖病變動物模型的治療成效？

第三章 材料與方法



3.1 細胞培養

我們使用兩種細胞做為本次的in vitro模型，分別為人類類單核球細胞 MonoMac-6(MMC-6)與人類類成骨細胞(U2OS)。

MONO-MAC-6 (MMC-6) 是屬於human monocyte-like cell，該細胞株取自人類男性急性類單核球性白血病。該細胞於十公分孔盤，以含 10% fetal calf serum 的 RPMI，培養於37度C，CO₂分壓5%的環境下。細胞繼代濃度為1 X 10⁶，待細胞生長至confluent state 時，再依實驗設計subculture。

U2OS為人類類成骨細胞(human osteoblastic cell，U-2 OS，ATCC[®]HTB96TM)，購置於台灣生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center,BCRC)，該細胞株取自人類女性骨肉瘤。該細胞於十公分孔盤，以含 10% fetalcalf serum 的 McCoy's 5A 1X (Iwakata & Grace Mod.)，培養於37度，CO₂分壓5%的環境下。待生長至 confluent state 時再依實驗設計subculture。

3.2 動物飼養

根尖病變動物模式利用20隻雄性6-week-old SD rats (200-250 mg) 進行誘導，詳細步驟如後續所述。動物實驗步驟經由台灣大學醫學院實驗動物中心同意，動物飼育流程依據台灣科技部公告的實驗動物操作進行守則進行。



3.3 LPS 誘發細胞 iNOS 表現、Nitrite 生成和 CCL2 合成與 Metformin

對此路徑的影響

3.3.1 以西方點墨法測試巨噬細胞之細胞質 iNOS 蛋白表現量

第一部分的實驗中，我們使用 MMC-6 細胞，待細胞生長至 confluent state 時以每盤 5×10^5 之細胞數 subculture 至 6-well 孔盤，讓細胞貼附一晚，於實驗前換 opti-MEM，我們觀察細菌內毒素 (LPS) 是否會誘發 MMC-6 iNOS 的表現，故 MMC-6 subculture 後分別給予細胞 0 小時、4 小時、8 小時、12 小時、24 小時的 $10 \mu\text{g/ml}$ LPS 刺激，每組皆將細胞收集下來萃取蛋白質，詳細步驟將如後續說明。

我們進一步觀察 Metformin 是否影響 LPS 所誘發的 MMC-6 iNOS 表現。MMC-6 依照上述發方法培養後分組 seeding 於 6-well 孔盤，讓細胞貼附一晚，於實驗前換 opti-MEM。細胞組別如下：control、LPS、Metformin、LPS+Metformin。5 mM 的 Metformin 會在 $10 \mu\text{g/ml}$ 細菌內毒素 (LPS) 刺激前 1 小時加入做前處理，經過 24 小時後將細胞收集下來萃取蛋白質。

【細胞質內蛋白質的萃取】

細胞以冷卻的 PBS 清洗兩次後，吸乾後加入適量的配置好的 RIPA lysis buffer，以細胞刮勺將 dish 上的細胞收集到 1.5 ml 微量離心管 (eppendorf tube)，短暫地以超音波震盪細胞，再以低溫離心 (12000 rpm ，20 分鐘， 4°C) 後收取上清液。

【蛋白質定量】

收取的蛋白質皆以 BCA 蛋白質測定組 (BCA Protein Assay Reagent, #23228, Pierce)，測定蛋白質濃度。測定濃度後取適量蛋白質與 $4\times$ sample loading dye 混合後於沸水水浴加熱 10 分鐘，之後置於冰上 10 分鐘後以西方點墨法分析。



【西方點墨法】

實驗所使用的為含有SDS-PAGE，丙烯醯胺 (polyacrylamide) 的電泳膠體，依據分析蛋白質分子量的不同，配置不同濃度的電泳膠體，一般而言介於6~15%之間。進行loading前的蛋白質先混合sample loading dye，以100°C的沸水加熱10分鐘，冰上靜置10分鐘，之後置入SDS-PAGE電泳槽進行電泳。待蛋白質分子於膠體內移動到適當位置，進行蛋白質的轉漬。

本實驗所使用的轉漬膜 (transfer membrane) 為Hydrophilic polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (FluoroTrans,#02179A,PALL)，將跑完電泳的膠片取下，使用溼式轉漬設備(Hofer)注入1 χ 轉漬緩衝液(Glycine 192 mM, Tris 25 mM, Methanol 20%, SDS 0.1%) 以電壓100伏特進行90~120分鐘，使全部蛋白質轉漬到轉漬膜上，完成後以5%的脫脂奶粉 (溶於TBST中) blocking一小時。取適當蛋白質與一級抗體比例於4⁰C中反應至隔天，一級抗體結束後以1 χ TBST (1X TBS + 0.25% tween-20) 緩衝液清洗一小時，每15~20分鐘更換一次1 χ TBST。接著再以二級抗體 (HRP-conjugated antibody) 於室溫下作用一小時，以1 χ TBST清洗一小時 (清洗條件同上)，最後加入ECL感應試劑 (Pierce, #34080)，於冷光儀感光 (GE /LAS4000)。

RIPA lysis buffer	
50 mM	Tris pH8.0
150 mM	NaCl
1%	NP-40
0.5%	Sodium deocycholate
Proteinase inhibitor cocktail (Roche, #04 693 132 001) 於細胞收集前加入	
2 χ Sample loading dye	
0.5 M	Tris-HCl
20%	Glycerol
10%	SDS
20%	β -ME
1%	Bromophenol blue



❖ 常用的一級抗體比例

抗體	比例	Catalog	Source
iNOS	1:1000	GTX130246	Genetex
GAPDH	1:10000	10494-1-AP	Proteintech

❖ 二級抗體比例

抗體	比例	Catalog	Source
Rabbit	1:3000/1:10000	QG221919	Thermo

3.3.2 Griess Reagent 測試巨噬細胞之 Nitrite 生成量

第二部分的實驗中，我們觀察在細菌內毒素(LPS)刺激下，MMC-6 細胞培養液中 Nitrite 的累積量。MMC-6 依上述方法培養後，以每盤 3×10^4 之細胞數 subculture 至 96-well 孔盤，讓細胞貼附一晚，於實驗前置換 opti-MEM。MMC-6 以 $10 \mu\text{g/ml}$ 細菌內毒素(LPS)進行 0、4、8、12、24 小時的刺激，每組皆將細胞培養液收下，加入同體積之 Griess reagent(Griess reagent(modified), #SLBQ7347V, Sigma-Aldrich, 1% sulfanilamide+ 0.1% naphthylethylenediamide 溶於 5%phosphoric acid)並均勻混合，於室溫靜置 15 分鐘，以波長 540 nm 偵測吸光值。同樣地，我們進一步觀察 Metformin 是否影響細菌內毒素(LPS)所誘發的 MMC-6 Nitrite 生成量。MMC-6 依照上述發方法培養後分組 seeding 於 96-well 孔盤。細胞組別如下: control、LPS、Metformin、LPS+Metformin。5 mM 的 Metformin 會在 $10 \mu\text{g/ml}$ LPS 刺激前 1 小時加入做前處理，經過 24 小時後將細胞液收集下來，以上述方法測量 Nitrite 濃度。

3.3.3 Human MCP-1 ELISA kit 測試成骨細胞之 CCL2 蛋白質生成量

第三部分的實驗中，我們首先測試 U2OS 經過 Nitrite 的刺激後，是否產生 CCL2，再針對 U2OS 和 MMC-6 兩種細胞，以 conditioning medium 方式，觀察 MMC-6 在細菌內毒素(LPS)刺激後，其細胞產物對於 U2OS 的 CCL2 表現量的影響。

U2OS 依上述方法培養後，以每盤 2×10^4 之細胞數 subculture 至 24-well 孔盤，讓細胞貼附一晚後置換 opti-MEM 做 starvation，starvation 24 小時後，置換 opti-MEM，加入 0.5 mM SNP(做為 NO donor)後，分別觀察 0 小時、12 小時與 24 小時其 CCL2 生成量。

Conditioning medium 的部分，MMC-6 依上述方法培養後，以每盤 3×10^4 之細胞數 subculture 至 96-well 孔盤，讓細胞貼附一晚，於實驗前置換 opti-MEM，以 10 $\mu\text{g/ml}$ 細菌內毒素(LPS)進行 0、4、8、12、24 小時的刺激，每組皆將細胞培養液收下，以 4 度 C、6000 rpm、5 分鐘進行離心並收取上清液做為 conditioning medium。

同時，U2OS 依上述方法培養後，以每盤 2×10^4 之細胞數 subculture 至 24-well 孔盤，讓細胞貼附一晚後置換 opti-MEM 做 starvation，starvation 24 小時後，移除 opti-MEM，加入前述之 conditioning medium，經過 24 小時刺激後，將細胞與細胞培養液分別收集下來，依上述方法萃取細胞質蛋白、並以 BCA 蛋白測定組進行蛋白質定量。細胞培養液則依 Human MCP-1 ELISA kit protocol (Human MCP-1 Platinum ELISA, BMS281, Invitrogen)，與稀釋後之 Assay buffer 依建議比例混合，加入 HRP 反應試劑反應 2 小時，以 washing buffer 沖洗孔盤後，依序加入 substrate solution 與 stop solution，待反應完全後以波長 450 nm 偵測吸光值。

我們也觀察經 LPS 與 Metformin 刺激過後之 MMC-6 細胞培養液做為 conditioning medium 刺激 U2OS 細胞。MMC-6 依照上述發方法培養後以每盤 3×10^4 之細胞數 subculture 至 96-well 孔盤，讓細胞貼附一晚，於實驗前置換 opti-MEM。細胞組別如下: control、LPS、Metformin、LPS+Metformin。5 mM 的 Metformin 會

在 10 µg/ml LPS 刺激前 1 小時加入做前處理，經過 24 小時後將細胞培養液收集下來，依前述方法進行離心，做為 conditioning medium。U2OS 依上述方法培養、subculture、starvation 後，加入 conditioning medium，24 小時後將細胞與細胞培養液分別收集下來，依前述方法萃取細胞蛋白質與進行 CCL2 的濃度測量。

3.4 誘導根尖病變動物模型 (*Animal Models of Periapical Lesions*)

【誘導根尖病變】

使用 20 隻 6-week-old SD rats(200-250 mg)，利用 1/4 round 在左邊及右邊 lower 1st molar 的 distal fossa 做 open chamber，深度控制在 2mm，接著再以#25 file 把殘餘在 chamber 內的 pulp tissue 去除，不特別做 root canal debridement，pulp cavity 以 normal saline 沖洗後先不充填，暴露在口腔內 4 週，再做進一步的處理。所有的大鼠皆進行以下手術步驟(如圖一)：

【手術步驟】

- 1) Root canal 做 mechanical debridement 至#45 file。依據我們以往的數據，4-week-old Wistar rat 接受與本計劃相同實驗步驟處置時，在 10-11 週時，它的 1st molar root length 約為 4-5 mm (由 cusp tip 到 apex)，因此把 file working length 訂為 4 mm。
- 2) 大鼠右側執行根管清創後，以 file 帶入 Metformin 於根尖處，最後 GI 用充填。
- 3) 大鼠左側則是清創後直接 GI 充填。
- 4) 將 SD rats 於手術後四週後犧牲。



【評估病變】

所有組別的 SD rat 以 CO₂ 犧牲後將下顎取下以放射線檢查，分別從 2D 影像 (periapical film, Digora system) 以及 3D 影像 (micro-CT, skyscan 1176) 評估其根尖病變的範圍及嚴重程度。分析軟體方面，在 2D 影像是使用 Adobe Photoshop 6.0 (Adobe Photoshop ®CC, cs 6.0) 分析病變病變大小，而 3D 的 microCT 是使用 CT-Analyser (Bruker, v.1.16) 軟體分析目標區域的立體空間。

❖ 影像學檢查之照射參數

Periapical film (Digora® : Soredex, Helsinki, Finland)

電壓: 70 kV

電流: 7 mA

曝射時間: 0.2 s

Cone 與 sample 距離: 12 cm

Micro-CT (skyscan 1176® : SKYSCAN, kontich, Belgium)

電壓: 90 kV

電流: 278 µA

解析度: 9 µm

Filter: 0.1 mm 厚度銅

掃描角度: 180°, 0.5°/pic



3.5 免疫組織染色

下顎骨在動物犧牲後去除皮膚及肌肉組織進行福馬林固定、脫鈣、石蠟包埋及切片，並分析後續組織病理情形。組織切片實驗前以 56°C 烘箱置放 20 分鐘，以 Xylene 脫臘 30 分鐘後覆水（以 100%，75%，50%酒精，2dH₂O 依序浸泡一分鐘），以 PBS 清洗 3 分鐘兩次後加入 pepsin (Pepsin solution, abcam, ab64201)於室溫下反應 60 分鐘使組織表面蛋白質抗原裸露，以 PBS 清洗兩次，室溫浸泡於 3%H₂O₂ 10 分鐘，再以 PBS 清洗 5 分鐘兩次。以 0.1% Triton-X 100 室溫處理 5 分鐘後以 PBS 清洗 5 分鐘兩次，以 CAS blocking buffer(CAS-Block™ Histochemical Reagent, ThermoFisher)室溫作用 15 分鐘後加入一級抗體 NOS2(1:50)、CD68(1:100)，置於 4°C 作用隔夜。

隔天於冷房取出後靜置室溫 30 分鐘，回溫後以 wash buffer (0.1% Tween-20 in PBS) 清洗五分鐘三次，加入 Envision Dual Link System peroxidase 室溫作用 15 分鐘，以 DAB 呈色後以二次水清洗，再加入 Hematoxylin 進行染色 5 分鐘，以 running water 清洗風乾後封片即可觀察。

❖ 常用的一級抗體比例

抗體	比例	Catalog	Source
iNOS	1:50	GTX130246	Genetex
CD68	1:100	MCA341	Bio-Rad

3.6 統計分析

我們使用 SPSS version 11.5 軟體進行統計分析，利用 one-way ANOVA 配合 Turkey 檢定法檢定實驗數據，*p* 值小於 0.05 者視為具有統計學上的顯著意義。

第四章 實驗結果



4.1 LPS 刺激巨噬細胞表現 iNOS 與 NO 的生成

MMC-6 依上述方法進行實驗，萃取細胞內蛋白質並進行定量，再透過西方點墨法分析細胞內 iNOS 的表現量。結果如圖二之(A)所示，我們發現在八小時時開始有較明顯的 iNOS 表現，並在 24 小時 iNOS 表現量達到最高，表示 MMC-6 在 LPS 刺激下的 iNOS 表現量具有 time-dependent 的趨勢。

在 NO 生成量的測量中，我們利用 Greiss reagent 分析細胞培養液中 Nitrite 的濃度。結果如圖二之(B)所示，我們發現在八小時時開始有較明顯的 Nitrite 累積，並在 24 小時 Nitrite 濃度達到最高，表示 MMC-6 在 LPS 刺激下的 NO 生成量也具有 time-dependent 的趨勢。

4.2 Metformin 調節 LPS 刺激之巨噬細胞 iNOS 表現量與 NO 的生成

MMC-6 依上述方法進行實驗，萃取細胞內蛋白質並進行定量，再透過西方點墨法分析細胞內 iNOS 的表現量。結果如圖三之(A)所示，我們發現 Metformin 可以抑制 LPS 所刺激的 iNOS 表現量，即使用 LPS 刺激 24 小時，有經過 Metformin pre-treat 的組別，其 iNOS 表現量較低。

在 NO 生成量的測量中，我們利用 Griess reagent 分析細胞培養液中 Nitrite 的濃度。結果如圖三之(B)所示，我們發現 Metformin 同樣可以抑制 LPS 所刺激的 NO 生成量；有經過 Metformin pre-treatment 的組別其細胞培養液中的 nitrite 濃度較低，表示 Metformin 除了抑制單核球細胞 iNOS 表現量，也會抑制其 NO 的生成。



4.3 成骨細胞之 CCL2 基因表現量與 Metformin 調節其表現量之效果

MMC-6 與 U2OS 上述方法進行實驗，收集 U2OS 之細胞蛋白質與細胞培養液，分別進行蛋白質萃取與 CCL2 ELISA 檢測。實驗結果顯示，在 SNP 的刺激下，U2OS 會產生 CCL2，且其生成量隨著刺激時間而增加，如圖四所示；利用 conditioning medium 的方式，我們發現經過 LPS 刺激後的 MMC-6，其細胞產物會刺激 U2OS 生成 CCL2，隨著 MMC-6 受到刺激的時間越長，其累積的細胞產物也會刺激 U2OS 產生更多的 CCL2，如圖五所示；在加入 Metformin 之後，受到調節的 MMC-6 也影響了 U2OS 的 CCL2 表現量，使 CCL2 的生成量降低，如圖六所示。

4.4 局部投予 Metformin 於根尖病變大鼠模型之療效

4.4.1 於 2D 以及 3D 影像分析之結果

圖七之(A)為大鼠控制組 (pathology debridement) 的第一大白齒，左邊為 2D 的 X 光影像結果，右邊為 MicorCT 於三個軸向的切面圖。圖七之(B)為大鼠加入 Metformin 組(debridement+Metformin)的第一大白齒，右邊同樣為 2D 的 X 光，左邊為 MicroCT 的 3D 影像。兩組比較的結果顯示，不論是在 2D 或是 3D 的影像方面，在根尖發炎的骨癒合情形皆是加入 Metformin 的第一大白齒較佳，根尖病變的範圍較小。

大鼠根尖病變的影像分析方面，分別用 2D 的軟體量化面積和 3D 的軟體量化體積後列於圖七之(C、D)。控制組於 X 光影像所得之平均面積為 $0.96 \pm 0.18 \text{ mm}^2$ ，MicroCT 之平均體積為 4.26 ± 0.75 ；Metformin 別於 X 光影像所得之平均面積為 $0.55 \pm 0.06 \text{ mm}^2$ ，MicroCT 之平均體積則為 2.54 ± 0.54 。



4.4.2 組織染色之結果

控制組與實驗組分別以 HE 染色以及 IHC 染色針對 iNOS、CD68 做分析，並定量 high-power-field 下各種 iNOS(+)及 CD68(+)的 macrophage 量。

以 HE 染色後，在控制組可以看到大量發炎細胞浸潤、聚集的狀況，且骨頭邊緣也有鋸齒狀的破壞出現。加入 Metformin 的實驗組則發炎的狀況較不顯著，且在 200 倍的視野下，可見根尖 Ap 周圍有空泡狀的聚集，應為外來的 foreign body 進入組織後所造成，在經過玻片製做過程後遂殘留成空洞，證明我們放置之 Metformin 顆粒確實有達到根尖位置。

iNOS 免疫組織染色後，在控制組(單純機械清創組)可以看到大量 iNOS(+)單核球細胞(mononuclear round cell)浸潤；加入 Metformin 的實驗組中，iNOS(+)單核球細胞顯著較少，表示 Metformin 可以抑制在細菌感染、發炎環境下，單核球細胞等免疫細胞之 iNOS 表現量，此結果與 in vitro 之結果相呼應。

CD68 做為 macrophage marker，針對 CD68 做免疫組織染色後，在控制組(單純機械清創組)的切片中可以觀察到有大量 CD68(+)細胞浸潤，表示有大量巨噬細胞聚集；在加入 Metformin 的實驗組中，則是觀察到 CD68(+)之細胞數顯著較少，表示其浸潤現象較控制組低，Metformin 對根尖周圍因細菌感染造成發炎、巨噬細胞浸潤的現象有抑制效果，此結果與 in vitro 中，Metformin 抑制 CCL2 生成量之結果相呼應。

(如圖八之(A-F)與表一)

第五章 討論



5.1 LPS 刺激巨噬細胞之 iNOS 表現量與 Metformin 對其表現量之抑制效果

5.1.1 LPS 刺激巨噬細胞之 iNOS 表現量與 Nitrite 生成

造成根尖周圍病變的一大主因為牙髓腔密閉無菌的狀態因為外傷或是齲齒而遭到破壞，使細菌入侵牙髓腔內引起血管增生、免疫細胞浸潤等發炎反應，最終進展到根尖區域骨頭的感染與破壞，故本實驗模擬根尖病變的區域，使 MMC-6 接受 LPS 刺激來模擬當環境處於感染狀態下，免疫細胞所產生的反應。我們利用 human monocyte-like cell MMC-6 作為實驗細胞，我們發現隨著時間增加，iNOS 表現量也逐漸遞增，在八小時時開始有較明顯的 iNOS 表現，並在 24 小時 iNOS 表現量達到最高。

過去有許多研究利用外加 LPS 模擬細菌感染後細菌內毒素對各種細胞的刺激。Kuo 學者³³在 2008 年的研究中，使用不同濃度的 LPS 對老鼠的 monocyte-like cell RAW264.7 做刺激，在 24 小時後用西方點墨法觀察細胞 iNOS 的表現量，發現 LPS 刺激 RAW264.7 的 iNOS 生成具有 dose-dependent 的效果，該學者所使用的 LPS 濃度為 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 、1 $\mu\text{g/ml}$ 、3 $\mu\text{g/ml}$ 。本實驗團隊在過去的研究中，則是使用 J774 作為細胞模型，使用 1 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ 、15 $\mu\text{g/ml}$ 濃度的 LPS 做為刺激濃度，在刺激 8 小時之後，同樣也是觀察到 LPS 對於 J774 的 iNOS 表現量為 dose-dependent。⁹ 在本次的實驗中，我們根據過去所得到的經驗，使用對細胞毒殺性較小的 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS 做為刺激濃度，分別在五個時間點觀察人類類單核球細胞 MMC-6 的 iNOS 表現量。我們發現 LPS 刺激 MMC-6 產生 iNOS 的表現量是




time-dependent，並且在 24 小時時表現量最高，所以在後續的實驗中，我們都選用 24 小時做為實驗時間長度。當隨著刺激時間越長，巨噬細胞產生的 iNOS 越多，細胞生成的 NO 自由基可能也會隨之累積，對周圍組織產生更大的破壞、加劇發炎反應，在我們所設計的實驗中也將驗證 NO 濃度的累積。

當細胞的 iNOS 受到活化，細胞會將 L-arginine 轉化成 NO 後釋放至細胞外，NO 為一種自由基，除了傳遞神經訊息以外，也會誘發周圍細胞的細胞凋亡；過去許多研究都著重在觀察 NO 如何誘發成骨細胞的凋亡，造成骨性病灶的範圍擴大，本次實驗反其道而行，希望可以觀察 NO 是如何刺激免疫細胞、從而加劇發炎反應，以期後續能夠進一步觀察藥物抑制該反應的機轉。實驗結果中我們發現如同先前 iNOS 的測試結果為 time-dependent，隨著時間增加，Nitrite 濃度也逐漸增加，並在 24 小時濃度最高，這個結果與細胞內 iNOS 表現量的結果互相呼應。

本實驗中我們利用 Greiss reagent 來測量細胞培養液中的 Nitrite 含量，主要因為氣體型態的 NO 較難以偵測，在細胞釋放出 NO 之後，NO 溶於液體中便會形成 Nitrite，這也是目前許多研究普遍使用的方法。^{9,10,33,34} 在本研究團隊過去的研究中，觀察到 LPS 刺激 J774 細胞產生 Nitrite 的效果為 dose-dependent⁹；在本次的實驗中則是再次驗證使用 MMC-6 也具有同樣效應，隨著 LPS 濃度提高、MMC-6 所產生的 NO 濃度也越高，並且在固定 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS 刺激下，隨著刺激時間增加，其 NO 濃度也增加，同時為 dose-dependent 與 time-dependent。雖然我們認為 nitrite 的濃度變化相比起 iNOS 的表現量，可能會因為表現順序的關係有時間上的延遲，但是當我們嘗試測試給予 MMC-6 48 小時的 LPS 刺激時，會因為 subculture 時所需達到的細胞濃度關係，在長時間培養後使細胞懸浮死亡的情形變得更加嚴重，反而無法準確呈現 Nitrite 所累積的濃度。

我們已經由之前的實驗得知，發炎反應的劇烈程度、巨噬細胞浸潤的數量和根尖病變的大小呈現正相關。在 Silva 學者³⁵的研究中，以小鼠為實驗動物模型，觀察到 NO 的濃度會影響根尖病變的進展；Chen 學者¹¹則是利用 NO 刺激成骨細




胞，發現 NO 會造成成骨細胞的粒線體功能受損、產生活性氧分子(Reactive oxygen species)而進一步導致成骨細胞的凋亡。根據這些研究，我們可以推測在根尖病變中，iNOS 的表現量和 NO 生成的濃度會影響根尖周圍骨頭的生成與吸收，所以本實驗由 LPS 刺激所誘發 MMC-6 的 iNOS 與 NO 表現可能也暗指了根尖病變中免疫細胞產生自由基造成周圍組織破壞的環境，而如何調控巨噬細胞所產生的發炎物質也為測試促進根尖病變癒合的實驗方向。

5.1.2 Metformin 抑制 LPS 刺激之巨噬細胞 iNOS 表現量與 Nitrite 生成

Metformin 藥物除了在臨床常用的糖尿病治療之外，因其用藥歷史悠久安全，且經濟實惠的優點，在近年許多的研究中，也針對其諸多其他疾病領域的治療潛力做進一步的發展，而其中抗發炎與進一步影響骨頭吸收代謝的效果更是越來越受到重視。在本次實驗結果發現 Metformin 可以抑制 LPS 所刺激的 iNOS 表現量，即使用 LPS 刺激 24 小時，有經過 Metformin pre-treat 的組別，其 iNOS 表現量較低。

在 Metformin 抑制 LPS 刺激所誘發的 iNOS 表現量的效果上，過去的研究有著不同的結果。Kato 學者³⁴在 2010 年的研究中，利用 100 ng/ml LPS 刺激 RAW264.7，發現該細胞 iNOS 的 mRNA 表現量有顯著提升，而加入 10 mM Metformin pre-treat 後，則是觀察到其 iNOS mRNA 表現量的下降。Pilon 學者³⁶在 2014 年的研究中則是指，使用 Metformin 可以抑制 LPS 刺激下巨噬細胞的 iNOS 蛋白質表現量，兩位學者的實驗結果皆與本次實驗結果相近。

在 Nitrite 累積濃度方面，我們發現 Metformin 同樣可以抑制 LPS 所刺激的 NO 生成量，表示 Metformin 除了抑制單核球細胞 iNOS 表現量，也確實會抑制其 NO 的生成。




前面所提及的 Kato 學者³⁴的研究中，該學者發現 Metformin 可以在 RAW264.7 細胞中抑制 LPS 所誘發的 Nitrite 生成；Pilon 學者³⁶則是在肌肉細胞、脂肪細胞與巨噬細胞中也發現類似的效果。Kelly 學者²⁵在 2015 年的研究中就提出，Metformin 可能藉由抑制 complex I 的路徑來抑制巨噬細胞因 LPS 刺激而產生的活性氧分子及 IL- β ，該藥物抑制發炎的藥物途徑可能並不是如同抑制肝醣代謝般以 AMPK 路徑為主，而該學者在實驗設計中，Metformin 的 pre-treat 時間為 1 小時。我們在設計實驗時參考了過去本實驗團隊的研究設計，分別測試了 pre-treat 1 小時與 3 小時，發現在本次實驗中，以 Metformin pre-treat 1 小時的抑制效果較佳，故在後續實驗皆以 1 小時為預處理時間。

5.2 Metformin 抑制巨噬細胞與成骨細胞之交互作用並影響成骨細胞之 CCL2 基因表現量

趨化激素 CCL2 會吸引 monocyte、T cell、nature killer cell 和 basophil 等免疫細胞聚集在病灶處，是主要造成 monocyte 浸潤的發炎分子之一。在發炎反應中 CCL2 的濃度隨之提高，而在發炎性骨吸收的病灶處，大量的單核球細胞與前趨細胞聚集、活化後，我們常常能夠看見大量巨噬細胞與蝕骨細胞的浸潤，導致骨性吸收更為嚴重，病灶範圍擴大。本實驗便是想要探討巨噬細胞在細菌感染環境下，刺激成骨細胞分泌 CCL2 的可能機轉。

首先我們測試 NO 能否刺激 U2OS 產生 CCL2，NO 本身即為一發炎因子，實驗結果也顯示，經由 SNP 做為 NO donor 所產生之 NO 可以刺激 U2OS 產生 CCL2。在 in vitro 實驗中，我們利用 conditioning medium 的方式來模擬生里環境中巨噬細胞對成骨細胞之影響，我們發現經過 LPS 刺激後的 MMC-6，其細胞產物會刺激 U2OS 生成 CCL2，表示兩種細胞具有細胞間訊息傳遞行為；而在加入 Metformin 之後，受到調節的 MMC-6 也連帶影響了 U2OS 的 CCL2 表現量，暗示 Metformin



可以影響巨噬細胞與成骨細胞間的交互作用。本研究團隊先前的研究中便觀察到，在發炎及缺氧的環境下，成骨細胞會分泌大量 CCL2、為主要分泌 CCL2 的細胞，同時，在根尖病變與發炎性關節炎兩種不同的動物疾病模型中，組織切片染色的結果也顯示在該病灶處有大量巨噬細胞浸潤。³⁷⁻³⁹ 本次實驗結果顯示，Metformin 可以調節巨噬細胞以外，也可以抑制巨噬細胞對成骨細胞的刺激，配合先前的研究中 Metformin 能夠抑制成骨細胞凋亡的結果，表示 Metformin 可以促進骨生成，同時也因影響巨噬細胞對成骨細胞的刺激而抑制成骨細胞分泌 CCL2、進一步減少巨噬細胞浸潤、減緩骨吸收進行。

5.3 局部投予 Metformin 於根尖病變大鼠模型之療效

5.3.1 Metformin 具有減緩根尖病灶進展之效果

本實驗的動物模型為大鼠。我們在大鼠下顎第一大白齒，以高速手機配合鑽針暴露出牙髓腔於大鼠口內，用來模擬齲齒窩洞造成牙髓暴露、細菌感染的環境，進而製造出根尖病變的模型。在成功製造出根尖發炎性骨吸收後，我們將控制組的白齒以目前臨床上治療根尖周圍炎的方式，進行根管清創後就直接封填窩洞；實驗組則在根管清創後，以根管銼針帶入 Metformin 至根尖位置，再進行窩洞封填隔絕外界環境的感染。本次實驗結果不論是 X 光影像所得之平均面積(控制組: 0.96 ± 0.18 V.S 實驗組: 0.55 ± 0.06 mm²)，或是 MicroCT 之平均體積(控制組: 4.26 ± 0.75 V.S 加藥組: 2.54 ± 0.54)，病灶範圍都是有加入 Metformin 的組別較小。而影像分析的結果發現，在細菌感染所引起的發炎性骨吸收，使用 Metformin 作為清創後的根管內用藥，有促進病灶區域骨頭癒合的治療效果。但必須強調的是，在處理根尖病變時，去除感染源仍是首要條件，所以傳統的根管治療過程，包括使

用機械性的根管銼針清創、沖洗液的化學性清創以及窩洞緻密封填以隔絕病原菌等，都是不能因為藥物的使用而忽略的步驟。



目前Metformin於臨床運用的投藥方式主要是口服，Metformin hydrochloride與藥物釋放控制聚合物結合，在服用後胃腸道分泌液會進入藥錠，使聚合物水解膨脹，藥物就會由藥錠中釋出，在肝臟經由AMPK活化hexokinase和pyruvate kinase來加強葡萄糖的吸收和分解，達到控制血糖的效果。然而口服方式的絕對生體可用率，即使在空腹狀態下Metformin 500毫克錠劑也大約只有40到60%，效率相對較低。對於其他領域療效的應用，常見的投藥方式另外還有肌肉或是腹膜腔下注射，例如Liu等人²⁶的動物實驗中，便是以肌肉注射的方式給予Metformin，討論其對大鼠根尖病變的治療效果，但若以臨床方向考量，肌肉注射的方式較不符合實際應用。本實驗採取局部投藥的方式，減少因消化過程喪失的生物體可用率，並且更容易提高病灶處的藥物濃度，符合臨床操作的雙重優點，讓這個療法更具未來實際應用的可行性。以根管銼針帶入Metformin是模擬臨床上放置根管用藥的方式，而組織圖上也可見藥物確實有到我們目標區域，並且實驗受限於大鼠口腔狹小、操作不易，如果是應用在人類身上，我們可以期待更佳的效果與操作便利性。

在牙科方面的臨床試驗中，2013年Rao等學者³¹與其後的Pradeep等人³²都是以局部投藥的方式，在牙根整平術後配合Metformin治療牙周病，追蹤的結果顯示相較於控制組，加了Metformin的組別在許多牙周病臨床的指標上都恢復得更好，尤其是垂直骨缺損的區域有明顯更多的牙周附連組織與骨生成的情形。這些實驗不但支持了局部投藥的可行性，也指出Metformin對於發炎性骨吸收的治療潛力，雖然與本實驗推測的機制不同，但也呼應我們*in vivo*的結果。




5.3.2 Metformin 可以降低根尖病灶處細胞 iNOS 表現量與巨噬細胞浸

潤現象

在大鼠動物模型中，我們將控制組與實驗組分別以 HE 染色以及 IHC 染色針對 iNOS、CD68 做分析，發現以 HE 染色後，在控制組可以看到大量發炎細胞浸潤、聚集的狀況，且骨頭邊緣也有鋸齒狀的破壞出現，加入 Metformin 的實驗組則發炎的狀況較不顯著；iNOS 免疫組織染色後，在控制組(單純機械清創組)可以看到大量 iNOS(+)單核球細胞浸潤，而加入 Metformin 的實驗組中，iNOS(+)單核球細胞顯著較少，表示 Metformin 可以抑制在細菌感染、發炎環境下，單核球細胞等免疫細胞之 iNOS 表現量。CD68 做為 macrophage marker，針對 CD68 做免疫組織染色後，在控制組(單純機械清創組)的切片中可以觀察到有大量 CD68(+)細胞浸潤，表示有大量巨噬細胞聚集；在加入 Metformin 的實驗組中，則是觀察到 CD68(+)之細胞數顯著較少，表示其浸潤現象較控制組低，Metformin 對根尖周圍因細菌感染造成發炎、巨噬細胞浸潤的現象有抑制效果。綜合以上的觀察，我們可以推測 Metformin 在 *in vivo* 的實驗中也能夠抑制發炎組織環境下巨噬細胞的浸潤以及細胞 iNOS 的表現量，可以進一步抑制該病灶區域的發炎反應以及 NO 自由基的累積，減緩該區域組織所受到的破壞。

Hama 學者⁸在 2007 年的研究中以免疫組織染色的方式觀察自病人身上取下的根尖肉芽組織，發現在根尖周圍炎的病灶區域浸潤的大量巨噬細胞、淋巴球、漿細胞與內皮細胞都有強烈的 iNOS 訊號，暗示 iNOS 產生的 NO 在根尖病變的形成和進展中具有一定的影響。而在本研究團隊過去的研究中發現，高濃度的 NO 在根尖周圍病變中，會誘使成骨細胞分泌 MMP-1 造成周圍結締組織的破壞、也會誘發成骨細胞的凋亡、加劇根尖病變的進展；而使用藥物如 L-NMMA 來抑制 iNOS 的表現、降低 NO 濃度，則是觀察到巨噬細胞浸潤的現象減少、成骨細胞的 MMP-1 生成量減少，以及根尖病變的骨頭破壞程度降低。¹⁰這樣的結果在本次實



驗中也得到驗證，使用 Metformin 所得到的效果與 L-NMMA 相近，都可以抑制細胞 iNOS 的表現與減少巨噬細胞的浸潤。除了在骨性病灶外，Zhang 學者³⁰利用 LPS 誘發 SD 大鼠產生急性肺損傷，並在誘發該疾病模型前，先以腹部注射方式投予 Metformin，發現 Metformin 可以抑制 LPS 刺激造成的肺部傷害、減少支氣管分泌物、降低 TNF- α 、IL-6 等發炎性細胞激素的分泌，同時也在大鼠的肺部組織切片下觀察到巨噬細胞與嗜中性白血球的浸潤現象被顯著抑制；雖然觀察的病變類型不同，但該研究結果也佐證我們對於 Metformin 抑制巨噬細胞浸潤的理論，大大提升 Metformin 這個藥物在不同類型病灶都能發揮功效的可能性。

總結以上實驗結果和討論可知，無論是在 *in vitro* 或是 *in vivo* 的實驗，我們都可以觀察到 Metformin 可以抑制在根尖感染環境中浸潤細胞的 iNOS 的表現量，偵測細胞內 iNOS 和細胞培養液中的 NO 結果也得以讓我們進一步推測 Metformin 是藉由抑制細胞內 iNOS 表現量，減少 NO 此自由基的累積。在 *in vivo* 的實驗中除了證實 Metformin 能夠減緩大鼠發炎性骨吸收、減緩巨噬細胞浸潤的療效，也發展了局部投藥的方式，以達臨床操作的需求，增加藥物未來實際應用的潛力。

第六章 結論



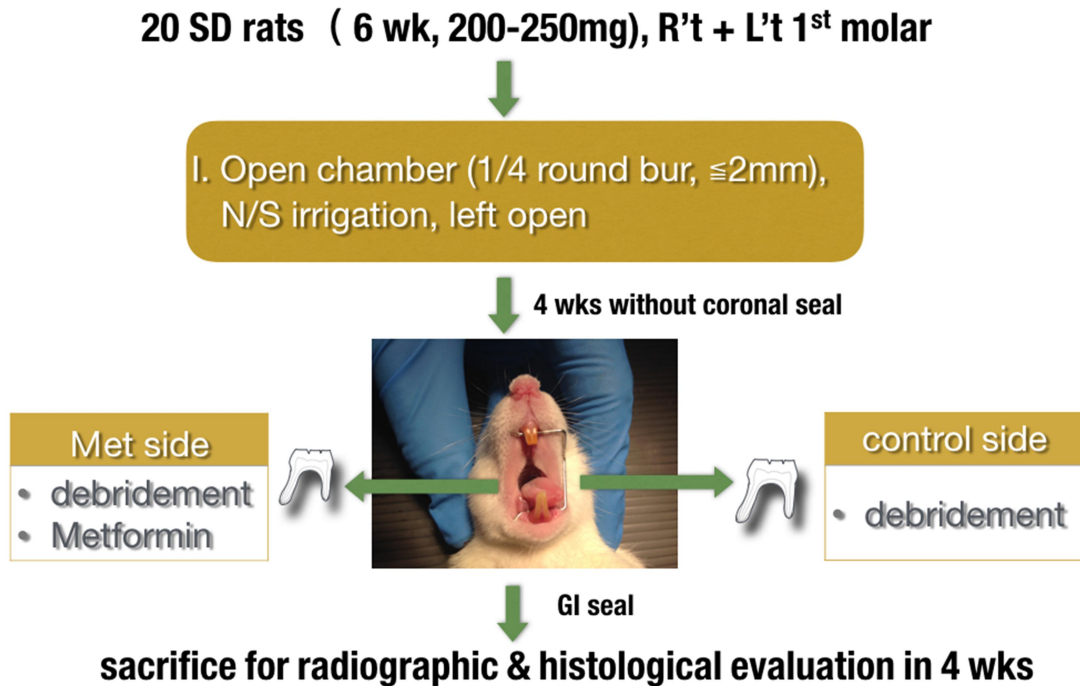
我們的研究透過對於巨噬細胞內 iNOS、巨噬細胞培養液中 Nitrite 含量以及以 conditioning medium 培養之成骨細胞其 CCL2 生成量的偵測，發現巨噬細胞受到 LPS 刺激後，和成骨細胞彼此有細胞間的訊息傳遞，並且 Metformin 可以影響該訊息傳遞，藉由調控巨噬細胞產生 NO、抑制成骨細胞分泌 CCL2 的機制進而去減緩根尖病變的進展。同時我們也透過大鼠根尖病變模型證實 Metformin 做為根管用藥的可行性。然而，我們也需要更多後續的研究來闡明這些機制，亦需要更多 3D 的影像樣本來觀察組織癒合的狀況，以證實幫助治療的可能性。

第七章 未來展望



Metformin 以局部給藥的方式減緩根尖病變為一符合臨床需求且具潛力的治療方式，本實驗已經初步證實其減緩根尖病灶進展的效果，但對於其藥物作用的作用機轉尚未完善討論，NO 在巨噬細胞和成骨細胞之間的作用也尚未確立。在未來的實驗中，應利用 NO inhibitor 的方式檢視 NO 在巨噬細胞與成骨細胞間細胞訊息傳遞所扮演的角色，並且針對藥的溶解度、作用時間及作用機制等設計相關測試以完善焗步給藥的模式。

附圖

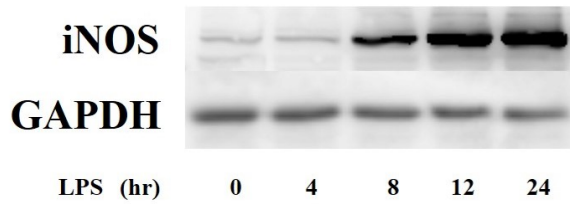


圖一 大鼠根尖病變模型之建立

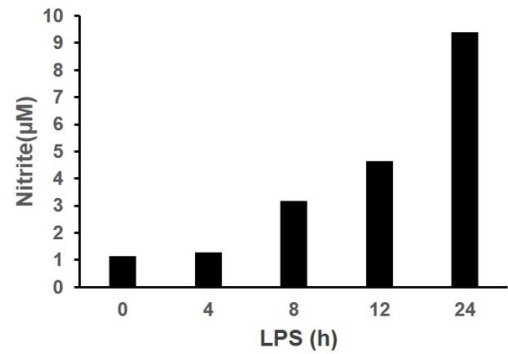
1. 20 隻 6-week-old SD rats (200-250 mg)，以 1/4 round 於左右兩側 lower 1st molar 之 distal fossa 做 open chamber，深度控制在 2mm。
2. 以 #25 file 把殘餘在 chamber 內的 pulp tissue 去除，不特別做 root canal debridement，pulp cavity 以 normal saline 沖洗後先不充填，暴露在口腔內 4 週。
3. Root canal 做 mechanical debridement 至 #45 file，working length 為 4 mm。
4. 大鼠右側執行根管清創後，以 file 帶入 Metformin 於根尖處，最後 GI 用充填。
5. 大鼠左側清創後，帶入不含 Metformin 之 paste 做為 placebo，再用 GI 充填。
6. SD rats 於手術後四週後犧牲。



A.



B.

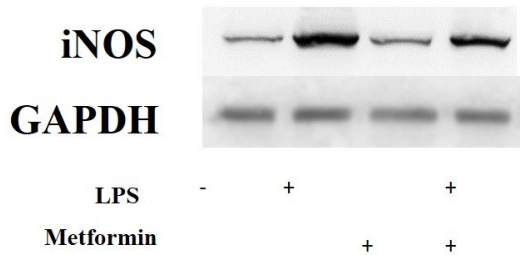


圖二 LPS 誘發 MMC-6 之 iNOS 與 Nitrite 表現量

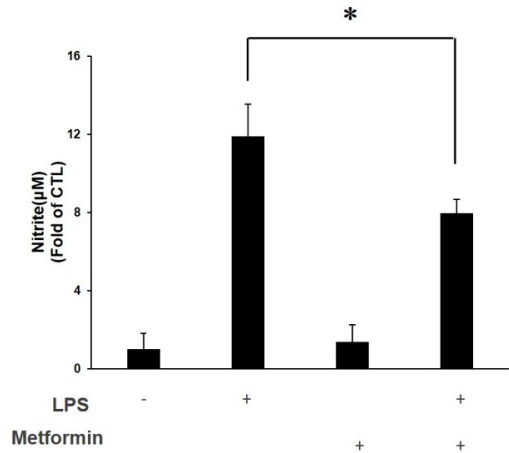
- A. 加入 10 μ g/ml LPS 刺激後，依照 0、4、8、12、24 小時的時間點所測得之 MMC-6 iNOS 表現量。可知隨著時間增加，iNOS 表現量上升，並且在刺激 24 小時後表現量最高。
- B. 加入 10 μ g/ml LPS 刺激後，依照 0、4、8、12、24 小時的時間點所測得之 MMC-6 細胞培養液中 Nitrite 濃度。可知隨著時間增加，Nitrite 濃度上升，並且在刺激 24 小時後表現量最高。



A.



B.



圖三 Metformin 調節 LPS 誘發之 MMC-6 iNOS 與 Nitrite 表現量

A. 以 Metformin 前處理 1 小時後給予細胞的 10µg/ml LPS 刺激，經過 24 小時後的結果發現 Metformin 可以降低 LPS 刺激所誘發的 iNOS 生成量。

B. 以 Metformin 前處理 1 小時後給予細胞的 10µg/ml LPS 刺激，經過 24 小時後的結果發現 Metformin 可以顯著降低 LPS 刺激所誘發的 Nitrite 生成量。LPS 組別為 11.88 ± 1.64 ，LPS + Metformin 組別為 7.94 ± 0.71 。(平均值 \pm 標準差)

*: $p < 0.05$

	CTL	LPS	Met	LPS+Met
Mean	1.00	9.18	1.27	6.14
SD	0.14	0.73	0.17	0.31

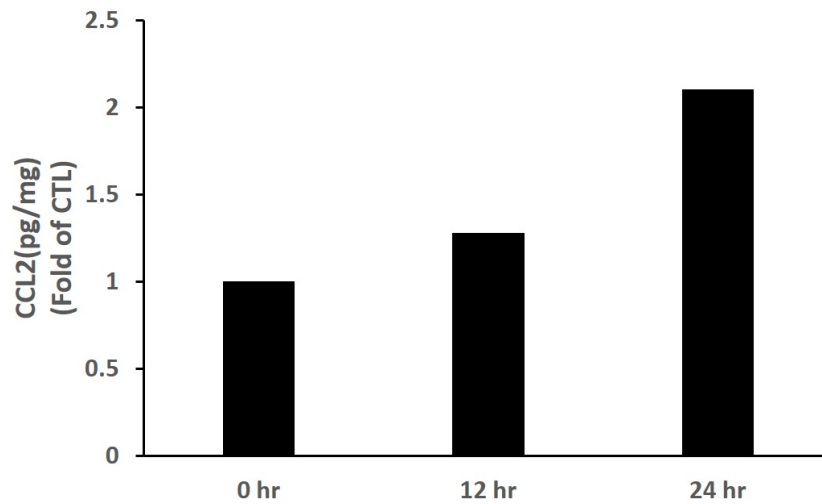
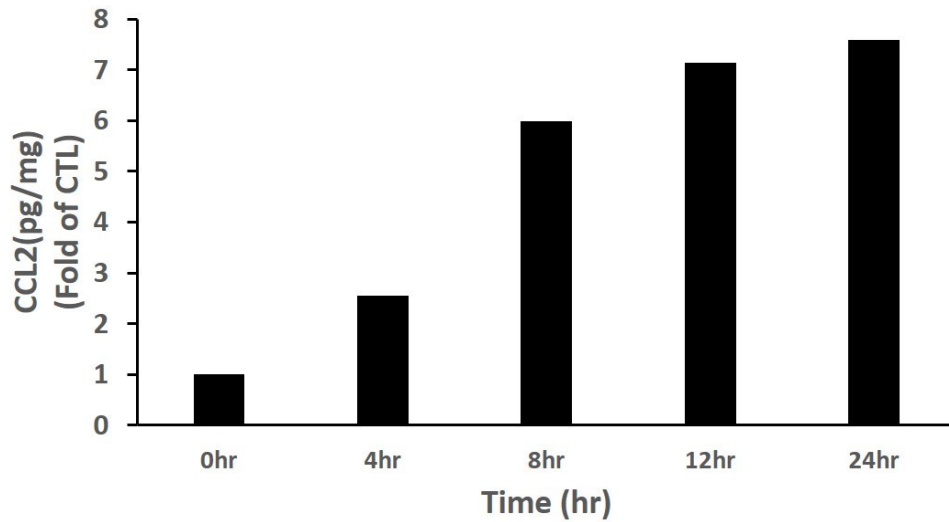


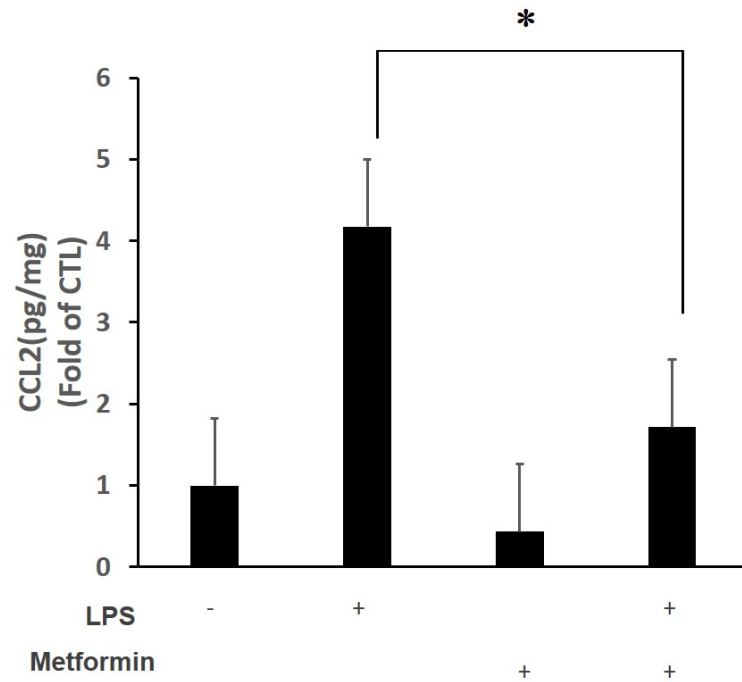
圖 四 SNP 刺激 U2OS 產生 CCL2

以 0.5 mM SNP 刺激 U2OS ，分別測量 0 小時、12 小時、24 小時其 CCL2 生成量。實驗結果發現，隨著時間，U2OS 之 CCL2 生成量也會增加。



圖五 以 MMC-6 conditioning medium 刺激 U2OS 之 CCL2 生成

MMC-6 以 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS 刺激 0、4、8、12、24 小時後，其 conditioning medium 刺激 U2OS 24 小時，U2OS 之 CCL2 生成量。可知從八小時開始有 CCL2 生成，其濃度在 24 小時達到最高。



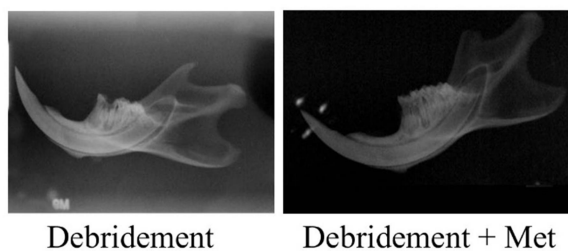
圖六 Metformin 調節 MMC-6 conditioning medium 刺激 U2OS 之 CCL2 生成

MMC-6 以 5mM Metformin 做 1 小時之預處理，再加入 10 $\mu\text{g/ml}$ 之 LPS 刺激 24 小時，其 conditioning medium 刺激 U2OS 24 小時，U2OS 之 CCL2 生成量。可知在有經過 Metformin 預處理的組別，其 CCL2 生成量受到抑制。其中 LPS 組別為 4.18 ± 1.60 ，LPS + Metformin 組別為 1.72 ± 0.61 。(平均值 \pm 標準差)

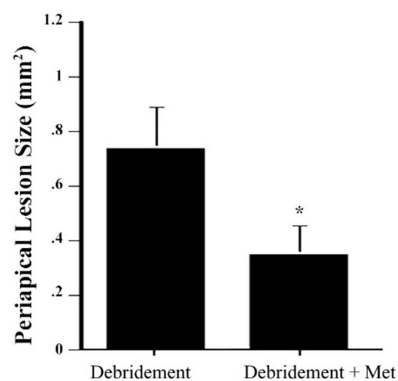
*: $p < 0.05$

	CTL	LPS	Met	LPS+Met
Mean	1.00	4.17	0.42	1.71
SD	0.199	0.921	0.076	0.352

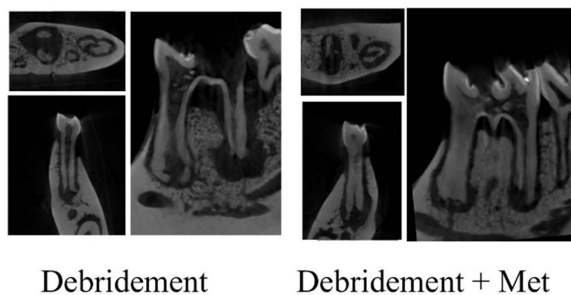
A.



C.



B.



D.

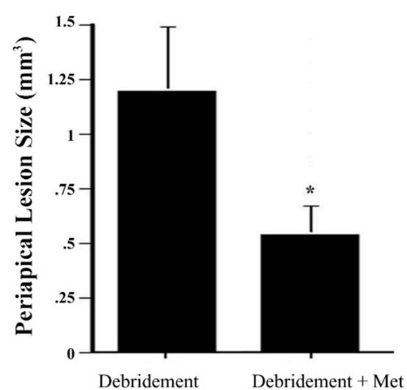


圖 七 大鼠根尖病變模型於 2D、3D 影像之結果和分析

A. 2D X 光影像結果。左側為控制組、右側為 Metformin 組。

B. 3D MicroCT 三個軸向的切面圖。左側為控制組、右側為 Metformin 組。

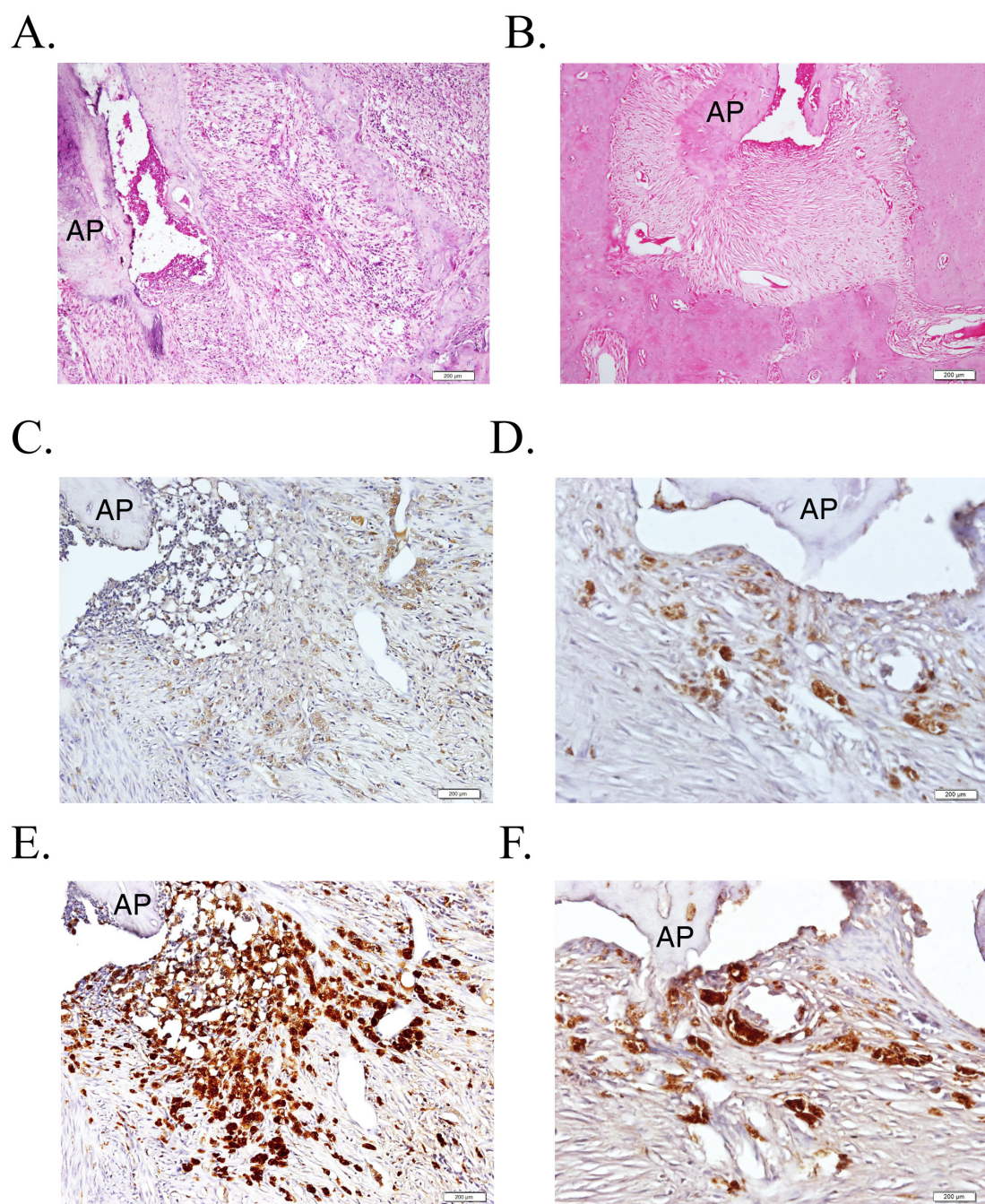
C. X 光影像由軟體分析出的平均面積。(平均值 ± 標準差)

Debridement 組別: 0.96 ± 0.18 ; Debridement + Metformin 組別: 0.55 ± 0.06 。

D. MicroCT 影像由軟體分析出的平均體積。

Debridement 組別: 4.26 ± 0.75 ; Debridement + Metformin 組別: 2.54 ± 0.54 。

*: 與 Debridement 組別相比 $p < 0.05$



圖八 大鼠根尖病變模型之組織切片染色

A. 控制組 HE 染色。B. 實驗組 HE 染色，可發現實驗組之骨吸收情形較少、組織破壞較少。C. 控制組 IHC 之 iNOS 染色。D. 實驗組 IHC 之 iNOS 染色，可發現實驗組之 iNOS(+)細胞數量顯著較少。E. 控制組 IHC 之 CD68 染色。F. 實驗組 IHC 之 CD68 染色，可發現實驗組之 CD68(+)細胞數量顯著較少。



表一 免疫組織染色之細胞數量

	機械清創組	機械清創+Metformin
100倍下視野 iNOS(+)-單核球細胞數量	76.3±19.8	38.2±11.5*
100倍下視野 CD68(+)-單核球細胞數量	102±31.3	38.4±9.9*

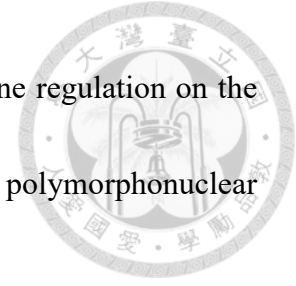
在誘發根尖病變大鼠模型上，觀察第二十天時，Metformin 對於單核球細胞 iNOS 和 CD68 的表現量。(平均值 ± 標準差)

*: 與機械清創組相比 $p < 0.05$

參考文獻 Reference



1. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol* 1992;7:257-262.
2. Yamasaki M, Nakane A, Kumazawa M, Hashioka K, Horiba N, Nakamura H. Endotoxin and gram-negative bacteria in the rat periapical lesions. *J Endod* 1992;18:501-504.
3. Mattison GD, Haddix JE, Kehoe JC, Progulsk-Fox A. The effect of *Eikenella corrodens* endotoxin on periapical bone. *J Endod* 1987;13:559-565.
4. Lappin DF, Kjeldsen M, Sander L, Kinane DF. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. *J Periodontal Res* 2000;35:369-373.
5. Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, Sitrin NF, Nussler AK, Hoffman EP et al. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1994;269:6765-6772.
6. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD et al. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992;256:225-228.



7. Takeichi O, Saito I, Okamoto Y, Tsurumachi T, Saito T. Cytokine regulation on the synthesis of nitric oxide in vivo by chronically infected human polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* 1998;93:275-280.

8. Hama S, Takeichi O, Saito I, Ito K. Involvement of inducible nitric oxide synthase and receptor for advanced glycation end products in periapical granulomas. *J Endod* 2007;33:137-141.

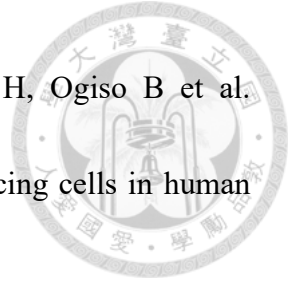
9. Lin SK, Kok SH, Kuo MY, Lee MS, Wang CC, Lan WH et al. Nitric oxide promotes infectious bone resorption by enhancing cytokine-stimulated interstitial collagenase synthesis in osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2003;18:39-46.

10. Lin SK, Kok SH, Lin LD, Wang CC, Kuo MY, Lin CT et al. Nitric oxide promotes the progression of periapical lesion via inducing macrophage and osteoblast apoptosis. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22:24-29.

11. Chen RM, Chen TL, Chiu WT, Chang CC. Molecular mechanism of nitric oxide-induced osteoblast apoptosis. *J Orthop Res* 2005;23:462-468.

12. van't Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *Immunology* 2001;103:255-261.

13. Takeichi O, Saito I, Hayashi M, Tsurumachi T, Saito T. Production of human-inducible nitric oxide synthase in radicular cysts. *J Endod* 1998;24:157-160.



14. Takeichi O, Hayashi M, Tsurumachi T, Tomita T, Ogihara H, Ogiso B et al.

Inducible nitric oxide synthase activity by interferon-gamma-producing cells in human radicular cysts. *Int Endod J* 1999;32:124-130.

15. Gravallesse EM, Harada Y, Wang JT, Gorn AH, Thornhill TS, Goldring SR.

Identification of cell types responsible for bone resorption in rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 1998;152:943-951.

16. Volejnikova S, Laskari M, Marks SC, Jr., Graves DT. Monocyte recruitment and

expression of monocyte chemoattractant protein-1 are developmentally regulated in remodeling bone in the mouse. *Am J Pathol* 1997;150:1711-1721.

17. Li X, Qin L, Bergenstock M, Bevelock LM, Novack DV, Partridge NC. Parathyroid

hormone stimulates osteoblastic expression of MCP-1 to recruit and increase the fusion of pre/osteoclasts. *J Biol Chem* 2007;282:33098-33106.

18. Rahimi P, Wang CY, Stashenko P, Lee SK, Lorenzo JA, Graves DT. Monocyte

chemoattractant protein-1 expression and monocyte recruitment in osseous inflammation in the mouse. *Endocrinology* 1995;136:2752-2759.

19. Williams SR, Jiang Y, Cochran D, Dorsam G, Graves DT. Regulated expression of

monocyte chemoattractant protein-1 in normal human osteoblastic cells. *Am J Physiol* 1992;263:C194-199.



20. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-349.

21. Balto K, Muller R, Carrington DC, Dobeck J, Stashenko P. Quantification of periapical bone destruction in mice by micro-computed tomography. *J Dent Res* 2000;79:35-40.

22. Friedman S, Mor C. The success of endodontic therapy--healing and functionality. *J Calif Dent Assoc* 2004;32:493-503.

23. Scheen AJ. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet* 1996;30:359-371.

24. Lei Y, Yi Y, Liu Y, Liu X, Keller ET, Qian CN et al. Metformin targets multiple signaling pathways in cancer. *Chin J Cancer* 2017;36:17.

25. Kelly B, Tannahill GM, Murphy MP, O'Neill LA. Metformin Inhibits the Production of Reactive Oxygen Species from NADH:Ubiquinone Oxidoreductase to Limit Induction of Interleukin-1beta (IL-1beta) and Boosts Interleukin-10 (IL-10) in Lipopolysaccharide (LPS)-activated Macrophages. *J Biol Chem* 2015;290:20348-20359.

26. Liu L, Zhang C, Hu Y, Peng B. Protective effect of metformin on periapical lesions in rats by decreasing the ratio of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin. *J Endod* 2012;38:943-947.




27. Isoda K, Young JL, Zirlik A, MacFarlane LA, Tsuboi N, Gerdes N et al. Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB in human vascular wall cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:611-617.

28. Caballero AE, Delgado A, Aguilar-Salinas CA, Herrera AN, Castillo JL, Cabrera T et al. The differential effects of metformin on markers of endothelial activation and inflammation in subjects with impaired glucose tolerance: a placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3943-3948.

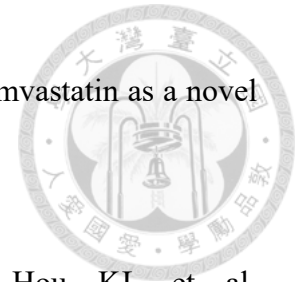
29. Morin-Papunen L, Rautio K, Ruukonen A, Hedberg P, Puukka M, Tapanainen JS. Metformin reduces serum C-reactive protein levels in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4649-4654.

30. Zhang X, Shang F, Hui L, Zang K, Sun G. The alleviative effects of metformin for lipopolysaccharide-induced acute lung injury rat model and its underlying mechanism. *Saudi Pharm J* 2017;25:666-670.

31. Rao NS, Pradeep AR, Kumari M, Naik SB. Locally delivered 1% metformin gel in the treatment of smokers with chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol* 2013;84:1165-1171.

- 
32. Pradeep AR, Nagpal K, Karvekar S, Patnaik K, Naik SB, Guruprasad CN. Platelet-rich fibrin with 1% metformin for the treatment of intrabony defects in chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol* 2015;86:729-737.
33. Kuo CL, Ho FM, Chang MY, Prakash E, Lin WW. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expression by 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside is independent of AMP-activated protein kinase. *J Cell Biochem* 2008;103:931-940.
34. Kato Y, Koide N, Komatsu T, Tumurkhuu G, Dagvadorj J, Kato K et al. Metformin attenuates production of nitric oxide in response to lipopolysaccharide by inhibiting MyD88-independent pathway. *Horm Metab Res* 2010;42:632-636.
35. Silva MJ, Sousa LM, Lara VP, Cardoso FP, Junior GM, Totola AH et al. The role of iNOS and PHOX in periapical bone resorption. *J Dent Res* 2011;90:495-500.
36. Pilon G, Dallaire P, Marette A. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase: a new mechanism of action of insulin-sensitizing drugs. *J Biol Chem* 2004;279:20767-20774.
37. Kok SH, Hou KL, Hong CY, Wang JS, Liang PC, Chang CC et al. Simvastatin inhibits cytokine-stimulated Cyr61 expression in osteoblastic cells: a therapeutic benefit for arthritis. *Arthritis Rheum* 2011;63:1010-1020.

38. Lin SK, Kok SH, Lee YL, Hou KL, Lin YT, Chen MH et al. Simvastatin as a novel strategy to alleviate periapical lesions. J Endod 2009;35:657-662.



39. Wu PH, Lin SK, Lee BS, Kok SH, Wang JH, Hou KL et al. Epigallocatechin-3-gallate diminishes cytokine-stimulated Cyr61 expression in human osteoblastic cells: a therapeutic potential for arthritis. Rheumatology (Oxford) 2012;51:1953-1965.