

國立臺灣大學醫學院臨床醫學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Clinical Medicine

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

CpG-ODN 可增強經培養之鼻腔表皮細胞的細胞激素分泌
—模擬慢性鼻竇炎急性發作的模式

CpG-ODN Augments Cytokines Release of Cultured Nasal
Epithelial Cells: A Model of Chronic Rhinosinusitis
with Acute Exacerbation

林志峰

Chih-Feng Lin

指導教授：葉德輝(Te-Huei Yeh) 助理教授

許權振(Chuan-Jen Hsu) 教授

賈景山(Jean-San Chia) 教授

中華民國九十九年一月

January, 2010

國立台灣大學碩士學位論文
口試委員審定書

CpG-ODN 可增強經培養之鼻腔表皮細胞的細胞
激素分泌-模擬慢性鼻竇炎急性發作模式

CpG-ODN Augments Intranasal Cytokines Release
of Cultured Nasal Epithelial Cells: A Model of
Chronic Rhinosinusitis with Acute Exacerbation

本論文係林志峰君 (P96421001) 在國立臺灣大學醫學院臨床醫學研究所完成之碩士學位論文，於民國九十九年一月二十七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： 許權振 葉信輝 賈崇山
(簽名)

(指導教授)

林韋勳

系主任、所長 高嘉宏 (簽名)

致謝 Acknowledgement

這篇論文能夠順利完成，實在要感謝很多師長的幫忙。首先，感謝我的指導老師葉德輝教授及許權振教授。在研究所求學的過程中，從實驗過程、口頭報告到論文寫作，在各個關鍵時刻，兩位教授總是對我不吝指導。在台大醫院耳鼻喉部，不論在臨床工作或學術研究，兩位教授一直是我學習的榜樣，尤其是兩位教授對研究執著的精神，即知即行的態度，更是我最好的學習榜樣，能夠在這樣的環境下完成碩士學位及論文，真是我莫大的榮幸。

感謝台大醫學院免疫所賈景山教授，提供許多實驗的資源，對於我做實驗的細節和遭遇的問題，熱心幫忙解決，並提醒做科學嚴謹的態度，對我在學術研究的幫助真是不可勝數。

謝謝楊偉勛教授對實驗細節的指正及對論文寫作提供寶貴的建議。

謝謝台大醫院雲林分院同仁的支持以及院內研究計劃的經費。

感謝胡賦強老師主持的統計諮詢門診的幫忙，我也要感謝老師的學生秀瑜，花了相當多的時間處理我的資料。

感謝台大臨床醫學研究所所裡諸位老師的指導；還有同學們的協助與扶持，都將會是難忘的回憶。

最後，我還要由衷感謝我的父母及家人，總是默默的付出。感謝我的妻子鼓勵我，體諒我必須在台北和雲林兩地奔波，度過假日還要做研究及上課的辛苦日子；謝謝我的父母以及兄長，你們的幫忙提供我精神上最大的支持。

謝謝你們！

林志峰

中華民國九十九年一月三十一日

中文摘要

研究背景：慢性鼻竇炎定義為鼻腔及鄰近鼻竇黏膜的感染或發炎。臨床上，慢性鼻竇炎患者可能會出現化膿性鼻涕、鼻塞、面部腫脹和嗅覺喪失等症狀。抗生素、以生理食鹽水沖洗、類固醇和抗白三烯素(anti-leukotrienes)等藥物，可以減輕症狀。不過，頻繁地急性發作及症狀復發常發生在這些病人身上，並造成結構和功能上不可逆的一些改變。目前慢性鼻竇炎急性發作的病理生理學尚不清楚，使得處理上尤具挑戰性。CpG-ODN，是一串連續序列，包含數個未甲基化的胞嘧啶(cytosine)和鳥嘌呤核苷(guanosine)，在大部分細菌和病毒的基因體較常見。CpG-ODN 被認為是細菌生物膜(biofilm)結構的一個主要元件，會造成慢性、持久性的感染。臨床上，不易治療的、常復發的慢性鼻竇炎與生物膜的形成有關；生物膜的持續存在，亦可能導致慢性鼻竇炎手術的效果不佳。CpG-ODN 在慢性鼻竇炎病人體內的分子生物學意義仍不清楚，我們希望研究 CpG-ODN 的免疫調節作用，並釐清慢性鼻竇炎病人體內生物膜所含有的 CpG-ODN 之分子生物學意義。

研究假說：

1. CpG-ODN 的存在可能使鼻腔及鼻竇黏膜保持低量細胞激素的產生，並在慢性鼻竇炎的持久性發炎中扮演重要角色。
2. 在慢性鼻竇炎的急性發作時期，CpG-ODN 會對鼻腔表皮細胞的免疫發炎反應，有加乘的作用，因而增強鼻內細胞激素的釋放，對慢性鼻竇炎急性發作的嚴重程度及後續的併發症，具有關鍵的影響。

研究材料與方法：共二十名診斷為慢性鼻竇炎經手術的病人納入研究。手術前至少一個月，他們都未接受任何治療。本研究排除具過敏體質、支氣管哮喘、過敏性鼻炎的病人。病人經手術後，收集其鼻息肉的上皮細胞，並以氣液介面(air-liquid interface)進行培養，以模擬實際鼻腔黏膜表皮的生理狀況。在培養二十一天以後，分別以 CpG-ODN, interleukin-1 β (IL-1 β) 和 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 刺激鼻上皮細胞，或是同時加入這些製劑。經 24 小時刺激後，收集培養基的細胞液，並立即儲存在-80°C。其後，以酵素免疫分析法(ELISA)進行 IL-6、IL-8 及 Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 的測量，並以 RT-PCR 的方法驗證。

結果：

1. 在此培養系統中，CpG-ODN 只造成 MCP-1 的增加；而在文獻上，MCP-1 被認為和許多慢性細菌性感染相關。所以 CpG-ODN 的存在可能使鼻腔及鼻竇粘膜保持某些低量細胞激素的產生，並在慢性鼻竇炎的持久性發炎中扮演重要角色。
2. 以外加的 IL-1 β 和 TNF- α 去刺激鼻上皮細胞，會造成 IL-6、IL-8 及 MCP-1 等細胞激素的大量釋放；模擬鼻腔黏膜在一個急性發作的狀況。其中，尤其以外加的 IL-1 β ，相對於 TNF- α ，更能造成 IL-6、IL-8 及 MCP-1 等細胞激素的大量釋放。
3. 在 IL-1 β 和 TNF- α 的存在下，CpG-ODN 能更加乘 IL-6 及 MCP-1 等細胞激素釋放的反應，而這樣的一個作用，可以模擬慢性鼻竇炎病人在急性發作時期，CpG-ODN，會加乘這些細胞激素大量釋放的效果，而對疾病的嚴重程度及後續的併發症，具有關鍵的影響。

結論： CpG-ODN 和鼻竇炎的慢性化相關。清除具有 CpG-ODN 的生物膜，對於慢性鼻竇炎的治疗是絕對有益處的。在模擬慢性鼻竇炎急性發作時期，CpG-ODN 會增加鼻內細胞激素的釋放，而使症狀加劇或造成併發症；因此治療時，針對 CpG-ODN 須盡可能移除這些有害的發炎物質；而在已發炎的狀況下，可以考慮使用短效的免疫抑制劑，以停止這細胞激素大量釋放的惡性循環。

關鍵詞： 慢性鼻竇炎，急性發作，鼻腔表皮細胞，細胞激素，CpG-ODN。

英文摘要(Abstract)

Background :

Chronic rhinosinusitis (CRS) is defined as inflammation and infection involving the nasal mucosa and the adjacent sinus cavities. Clinically, the patients with CRS may suffer from symptoms of mucopurulent discharge, nasal obstruction, facial pain, and hyposmia. Antibiotics, saline irrigations, steroids, and anti-leukotrienes may be given for symptoms relief. However, episodes of recurrence or acute exacerbation occurred to these patients, and caused some irreversible changes in airway structure and function. The pathophysiology of frequent acute exacerbation in these patients is still unclear, making treatments particularly challenging.

CpG-ODN refers to sequences that include an unmethylated cytosine and guanosine, which are relatively common in the genomes of most bacteria and DNA viruses. CpG-ODN had been implicated as a major structural component of bacterial biofilm, and contributed to the persistence of chronic infection. Clinically, recalcitrant CRS is associated with biofilm formation, and biofilm may cause the unfavorable outcomes of surgery for CRS. However, the molecular significance of CpG-ODN in CRS is still unclear. We aim to investigate the immune-modulation effects of CpG-ODN, and elucidate the role of biofilm in CRS.

Hypothesis :

1. The existence of CpG-ODN may maintain a low profile of cytokines production in the sinus mucosa, and play a role in the persistence of inflammation in chronic rhinosinusitis.
2. During CRS with acute exacerbation, CpG-ODN synergistically up-regulate the immuno-reactions of pro-inflammatory mediators, augments intranasal cytokines release, and contribute to the complications and severity of CRS with acute exacerbation.

Materials and Methods:

Twenty patients who are diagnosed as CRS and underwent surgery were included prospectively. None of them receives any treatment at least one month before operation. The one who has atopy, asthma, or allergic rhinitis was previously excluded. The nasal epithelial cells harvested from nasal polyps were collected for ALI (air-liquid interface) culture. At the end of culture (Day 20 after confluence), CpG-ODN , IL-1 β , and TNF- α were added in single regimen or in combination to stimulate the nasal epithelial cells. After 24 hours-treatment, the culture medium of each well was collected and immediately stored at -80°C for later IL-6,IL-8 and MCP-1 measurement using ELISA.

Statistical analysis :

The paired samples test was used for evaluation of differences between experiments and controls. ANOVA was used when there is a multiple sample comparison. *P* values less than 0.05 was considered significant.



Results :

1. A model mimicking the in vivo microenvironment of stable CRS was created.
2. Intrinsic IL-1 β and TNF- α levels were undetectable in this model, and IL-6 , IL-8 ,MCP-1 levels were detectable during 21-days culture period, with a trend toward homogeneity .
3. Extrinsic IL-1 β and TNF- α were used to stimulate the cultured nasal epithelial cells, to initiate a condition resembles CRS with acute exacerbation. IL-1 β induced IL-6,IL-8 and MCP-1 expressions in a dose-dependent fashion, while TNF- α only induced these cytokines release insignificantly.

4. CpG-ODN induced MCP-1 expression with a dose-dependent fashion, but not in IL-6 and IL-8.
5. CpG-ODN synergistically potentiate IL-6,IL-8, and MCP-1 release in the presence of IL-1 β and TNF- α .

Conclusion :

CpG-ODN is associated with the chronicity of CRS. Elimination of such substances in the management of CRS is mandatory. CpG-ODN augments intranasal cytokines release in patients with acute exacerbated sinusitis. Strategies such as local debridement or short-term immuno-suppressants are needed to stop the vicious circle.

Key words: chronic rhinosinusitis, acute exacerbation, nasal epithelial cells, cytokines, CpG-ODN.



目錄

論文口試委員審定書.....	2
致謝.....	3
中文摘要.....	4
英文摘要.....	6
目錄.....	9
圖目錄.....	10
表目錄.....	11
論文正文.....	12
第1章 緒論.....	13
第2章 研究方法與材料.....	18
第3章 結果.....	21
第4章 討論.....	26
第5章 展望.....	30
參考文獻.....	31
圖表附錄.....	34



圖目錄

圖1 . CpG-ODN.....	34
圖2. 培養的第1天，以光學顯微鏡觀察細胞(40倍放大).....	34
圖3. 培養的第1天，以光學顯微鏡觀察細胞(400倍放大).....	35
圖4. 培養的第21天，以光學顯微鏡觀察細胞(40倍放大).....	36
圖5. 培養的第21天，以光學顯微鏡觀察細胞(400倍放大).....	37
圖6. 培養的第21天，以掃描式電子顯微鏡觀察細胞.....	38
圖7. 經三周之培養，以雷射掃描式共軛焦顯微鏡(Laser Scanning Confocal Microscope) 觀察鼻腔表皮細胞組織.....	39
圖8. 在這3周的培養時期，依時序每周以雷射掃描式共軛焦顯微鏡(Laser Scanning Confocal Microscope)觀察鼻腔表皮細胞組織.....	40
圖9. IL-8 基礎分泌量，在3周的培養期裡的變化.....	41
圖10. 以不同濃度的CpG-ODN去刺激鼻腔表皮細胞，IL-6 的分泌量.....	42
圖11. 以不同濃度的CpG-ODN去刺激鼻腔表皮細胞，IL-8 的分泌量.....	43
圖12. 以不同濃度的CpG-ODN去刺激鼻腔表皮細胞，MCP-1 的分泌量.....	44
圖13. 以不同濃度的IL-1 β 去刺激鼻腔表皮細胞，IL-6 的分泌量.....	45
圖14. 以不同濃度的IL-1 β 去刺激鼻腔表皮細胞，IL-8 的分泌量.....	46
圖15. 以不同濃度的IL-1 β 去刺激鼻腔表皮細胞，MCP-1 的分泌量.....	47
圖16. 以不同濃度的TNF- α 去刺激鼻腔表皮細胞，IL-6 的分泌量.....	48
圖17. 以不同濃度的TNF- α 去刺激鼻腔表皮細胞，IL-8 的分泌量.....	49
圖18. 以不同濃度的TNF- α 去刺激鼻腔表皮細胞，MCP-1 的分泌量.....	50
圖19. 在IL-1 β 的存在下，加CpG-ODN刺激細胞，IL-6的分泌量.....	51
圖20. 在IL-1 β 的存在下，加CpG-ODN刺激細胞，IL-8的分泌量.....	52
圖21. 在IL-1 β 的存在下，加CpG-ODN刺激細胞，MCP-1的分泌量.....	53
圖22. 在TNF- α 的存在下，加CpG-ODN刺激細胞，IL-6的分泌量.....	54
圖23. 在TNF- α 的存在下，加CpG-ODN刺激細胞，IL-8的分泌量.....	55
圖24. 在TNF- α 的存在下，加CpG-ODN刺激細胞，MCP-1的分泌量.....	56
圖25. 不同刺激狀況下，IL-6的分泌.....	57
圖26. 不同刺激狀況下，IL-8的分泌.....	58

圖27. 不同刺激狀況下，MCP-1的分泌.....59

表目錄

表一. 各種刺激條件下，細胞激素的分泌.....60



第1章 緒論

1.1 慢性鼻竇炎的簡介

1.1.1 慢性鼻竇炎的定義

1.1.2 慢性鼻竇炎的診斷及臨床症狀

1.1.3 慢性鼻竇炎的分類

1.1.4 慢性鼻竇炎的病理生理學

1.1.5 慢性鼻竇炎的治療方式

1.1.6 慢性鼻竇炎在治療上常遭遇的問題

1.1.7 慢性鼻竇炎病人鼻腔累積的細胞激素

1.1.8 慢性鼻炎急性發作時的細胞激素表現

1.2 CpG-ODN的簡介

1.2.1 CpG-ODN的定義

1.2.2 CpG-ODN的應用

1.2.3 CpG-ODN和慢性鼻竇炎的關係

1.3 研究目的及研究假說

1.3.1 研究目的

1.3.2 研究假說



第1章 緒論

1.1 慢性鼻竇炎的簡介

1.1.1 慢性鼻竇炎的定義

慢性鼻竇炎(Chronic rhinosinusitis)定義為鼻腔及鄰近鼻竇黏膜的感染或發炎，時間超過12周，(Fokkens, Lund, and Mullol 2007; Meltzer et al. 2006; Meltzer et al. 2004; Rosenfeld 2007)。造成慢性鼻竇炎的成因很多，包含感染(細菌、黴菌及病毒)、過敏、宿主本身因素和環境因素等等；然而，截至目前，仍無單一成因能完整解釋整個慢性鼻竇炎疾病的病理生理學(Chan and Kuhn 2009)，而臨床所見亦諸多分歧。

1.1.2 慢性鼻竇炎的臨床症狀及診斷

慢性鼻竇炎臨床症狀包含鼻蓄膿、鼻塞、臉部疼痛或壓力感，以及嗅覺低下或喪失。慢性鼻竇炎的診斷除臨床症狀以外，尚須包含鼻竇內視鏡檢及影像學檢查(鼻竇 X 光或電腦斷層檢查)方能確立診斷(Benninger et al. 2003)。

1.1.3 慢性鼻竇炎的分類

臨床上，慢性鼻竇炎可粗分為以下幾類：慢性鼻竇炎合併鼻息肉(chronic rhinosinusitis with nasal polyposis)、慢性鼻竇炎未合併鼻息肉(chronic rhinosinusitis without nasal polyposis)、過敏性黴菌性鼻竇炎(allergic fungal sinusitis)、復發性鼻竇炎(recurrent acute rhinosinusitis)等等，然而這些分類的病理生理學尚未明瞭，有時亦有合併存在或病因重疊的情況(Chan and Kuhn 2009; Rosenfeld 2007)。

1.1.4 慢性鼻竇炎的病理生理學

慢性鼻竇炎的致病機轉仍不清楚，一般咸認是當鼻腔內黏膜受各種因素(如感冒時病毒感染，過敏時抗原刺激等)，引起發炎反應時，黏膜因發炎介質作用引起水腫，導致原本窄小的鼻竇開口更為阻塞，使分泌物儲積在鼻竇內。發炎介質也可使鼻腔黏膜用以清除異物的黏膜纖毛運動失常，此種情況有利於細菌的滋長，於是形成次級感染。感染後，上述的步驟繼續惡化，形成惡性循環。

1.1.5 慢性鼻竇炎的治療方式

目前沒有單一的治療方式能夠徹底根治慢性鼻竇炎。常用的方式包含使用抗生素、抗黴菌藥物、類固醇和抗白三烯素(anti-leukotrienes)等藥物治療以及生理食鹽水沖洗鼻腔等，有時亦合併使用上述療法，其目標著重在減少鼻腔黏膜腫脹，重建鼻腔及鼻竇的通氣及過濾、加溫功能，並清除有害病原菌等(Thomas et al. 2008; Fokkens et al. 2005; Scadding et al. 2008)。然而，對於那些藥物治療無效或難治性(refractory)的慢性鼻竇炎，開刀治療常是被使用的方式，尤其近二十多年來鼻竇內視鏡手術的進步，微創(minimal invasive)手術的概念也改變了傳統鼻竇手術的方式(Stammberger. 1991)。

1.1.6 慢性鼻竇炎在治療上常遭遇的問題

即使給予慢性鼻竇炎病患各種方式的藥物治療，對於那些藥物治療無效或難治性(refractory)的慢性鼻竇炎病患，亦給予手術治療，然而，臨床上仍有一些病患，對於治療無效，而反覆急性發作(Mahoney and Metson 2009)。對於這樣一個臨床上棘手的問題，有一些學術理論被提出來解釋，包含超級抗原(superantigen)的活化(Bernstein et al. 2003; el-Fiky et al. 2009; Seiberling, Grammer, and Kern 2005)、嗜酸性白血球(eosinophil)的浸潤(Matsuwaki et al. 2008)、黴菌的效應(Healy et al. 2008)，以及生物膜(biofilm)的作用等等(Zhang et al. 2009; Cohen et al. 2009)，都有可能造成鼻腔及鼻竇黏膜的反覆性發炎；然而，其真正的致病原因及分子機轉尚未明瞭。

1.1.7 慢性鼻竇炎病人鼻腔累積的細胞激素

慢性鼻竇炎病人，在鼻腔局部組織會累積有害刺激物質和細胞激素，如 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-8、MCP-1 等(Kuehnemund et al. 2004);鼻腔黏膜因發炎介質作用引起水腫，導致原本窄小的鼻竇開口更為阻塞，惡性循環下形成慢性鼻竇炎。這些細胞激素的累積，可能和慢性鼻竇炎的持久性感染或發炎相關，亦會使得鼻腔黏膜組織易於受到二次感染或是急性發作。

1.1.8 慢性鼻竇炎急性發作時的細胞激素表現

在慢性鼻竇炎急性發作時，這些累積的細胞激素會被大量釋放出來，如 IL-6、IL-8、MCP-1、IL-1 β 、TNF- α 、RANTES、和 IFN- γ 等(Das et al. 2005)，顯示出一個高免疫反應的狀態。

態(hyper-immune responses)；此外，分析慢性鼻竇炎急性發作時的鼻涕分泌物，亦發現 IL-8 及 TNF- α 的表現量上升(Repka-Ramirez et al. 2002)，顯見慢性鼻竇炎急性發作時，這些細胞激素會大量被釋出，可能造成日後反覆發作及鼻息肉的形成。

1.2 CpG-ODN 的簡介

1.2.1 CpG-ODN 的定義

CpG-ODN，是一串連續序列，包含數個未甲基化的胞嘧啶(cytosine)和鳥嘌呤核苷(guanosine)，如圖一，在大部分細菌的基因體 DNA 中，常包含這種 central cytosine-guanosine (CG) core 的序列，會對免疫細胞起刺激反應。此外，在一些 DNA 病毒和酵母菌的基因體中，也有此種 unmethylated CpG-ODN，能夠刺激免疫細胞。然而，這樣的序列，在脊椎動物的基因體會被抑制及甲基化(Krieg 2006)。

1.2.2 CpG-ODN 的應用

臨床上，CpG-ODN 在各個領域都有非常廣泛的應用：

1. 感染症的治療：

能夠增強固有免疫反應(innate immunity)，活化 Th1 細胞免疫及細胞激素的釋放，以對抗病毒與細胞內細菌(Klinman 2004)。此外，亦能提高抗原特异性(antigen-specific)免疫反應(Krieg 2006)。

2. 氣喘及過敏症的治療：

CpG-ODN 會抑制 Th2 的免疫反應和 IgE 的產生。另外，會減少呼吸道嗜酸性白血球(eosinophil)及全身性的 IgE 增加，防止呼吸道的破壞(Fonseca and Kline 2009; Kline and Krieg 2008)。

3. 癌症的合併治療：

CpG-ODN 和單株抗體(monoclonal antibody)或其他化療藥物的合併使用，可以增強抗體的細胞毒殺作用，以及 CD4 或 CD8 T 細胞仲介的細胞毒殺作用(Krieg 2004)。

1.2.3 CpG-ODN 和慢性鼻竇炎的關係

生物膜(biofilm)是一個複雜的混合物，其中包括大分子細胞外多醣(poly-saccharides)，

蛋白質和細菌或病毒的 DNA。這樣的一個結構，會有很強的抗藥性，並能躲避宿主免疫細胞的攻擊。CpG-ODN，常見於大部分細菌和 DNA 病毒的基因體中，被認為是生物膜(biofilm)的一個主要成分(Whitchurch et al. 2002)，而和許多持久性和慢性細菌性感染相關。在臨床上，生物膜的形成也被認為和一些頑固性慢性鼻竇炎相關(Cohen et al. 2009; Kilty and Desrosiers 2008)，此外，生物膜的持續存在，也被認為是手術治療慢性鼻竇炎的失敗因子之一(Psaltis et al. 2008; Zhang et al. 2009)。然而，CpG-ODN 在慢性鼻竇炎病人體內的免疫學及分子生物學意義則仍不清楚。

1.3 研究目的及假說

1.3.1 研究目的：本研究的目的有下列幾項：

1. 建立一個鼻腔上皮細胞培養模型，以模仿鼻腔內黏膜表皮相似的顯微環境(microenvironment)。
2. 測量此細胞培養模型下表皮細胞的基礎細胞激素分泌量，以模擬鼻腔內的基礎細胞激素分泌。
3. 研究 CpG-ODN 在此細胞培養模型下，對前述基礎細胞激素分泌量的影響；以模擬慢性鼻竇炎病人鼻腔內，CpG-ODN 或生物膜(biofilm)的存在，對慢性鼻竇炎疾病的生理意義。
4. 以 IL-1 β 和 TNF- α 去刺激此細胞培養模型，以模擬慢性鼻竇炎急性發作，並測量上述細胞激素的分泌改變量。
5. 在 IL-1 β 和 TNF- α 的存在下，加入 CpG-ODN 去刺激此細胞培養模型，以模擬慢性鼻竇炎的急性發作時期，CpG-ODN 或生物膜(biofilm)的存在，對整個鼻腔免疫反應，發揮何種免疫調節(immune-modulation)作用。

1.3.2 研究假說：本研究的假說有下列幾項：

1. CpG-ODN 的存在可能使鼻腔及鼻竇黏膜保持低量細胞激素的產生，並在慢性鼻竇炎的持久性發炎中扮演重要角色。
2. 在慢性鼻竇炎的急性發作時期，CpG-ODN 會對鼻腔及鼻竇黏膜的免疫發炎反應，有加乘的作用，因而增強鼻內細胞激素的釋放，對慢性鼻竇炎急性發作的嚴重程度及後續的併發症，具有關鍵的影響。



第 2 章 研究方法與材料

2.1 研究材料

2.2 研究方法

2.2.1 細胞培養

2.2.2 以酵素免疫吸附試驗(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

檢測各種細胞激素的濃度

2.2.3 以刺激物刺激細胞後檢測各種細胞激素的濃度

2.3 統計方式



第 2 章 研究方法與材料

2.1 研究材料

本研究以表皮細胞為研究材料。20 位被診斷為慢性鼻竇炎合併鼻息肉的病患，接受功能性鼻竇內視鏡手術後，其鼻息肉表皮細胞被取出分離後進行細胞培養。手術前 1 個月內，病患沒有接受任何藥物治療；此外，合併過敏體質，哮喘，過敏性鼻炎等疾病的病人都被排除在本研究之外。這 20 位病人的鼻息肉表皮細胞被取出分離後，採用氣-液介面(air-liquid interface)進行培養。每位病人的表皮細胞被分在 12 個小的培養皿中，共 240 個。經過三周的培養後，共有 189 個培養皿內的細胞仍存活著；我們將測量此細胞培養模型下的基礎細胞激素分泌量。我們在這些培養皿上層，加入不同的刺激藥物，包含 CpG-ODN, IL-1 β 和 TNF- α 後，再測量下清液細胞激素的分泌量，以研究這些刺激物質，對於鼻腔免疫反應，有何種免疫刺激或調節的作用；並藉以研究 CpG-ODN 在慢性鼻竇炎病患鼻腔中，其存在的生理意義；以及慢性鼻竇炎的急性發作時期，CpG-ODN 的存在，對整個鼻腔免疫反應，發揮何種免疫調節的作用。

2.2 研究方法

2.2.1 細胞培養

1. 慢性鼻竇炎病人的鼻息肉經功能性鼻竇內視鏡手術後取出。
2. 取出之檢體以 DMEM/F12 溶液沖洗。
3. 之後以 20ml 之 DMEM/F12 溶液，內含 0.1% pronase 及 100 IU/ml penicillin-streptomycin，在 4°C 下浸泡一整夜。
4. 分離出鼻腔表皮細胞。
5. 以 1500 轉/分，進行離心的步驟，並加入 2 ml 純胎牛血清，以中和酵素的作用。
6. 再次離心。
7. 將細胞再次懸浮於 DMEM/F12 及 BEGM 混合溶液中。之後，於 37°C 下，將此含細胞之溶液置於一塑膠培養皿以去除纖維細胞，並純化此細胞溶液為鼻腔表皮細胞溶液。
8. 以第一型膠原蛋白(type I collagen)覆蓋培養皿的生長界面(growth surface) 後，以氣-液介面(air-liquid interface)進行細胞之培養。

9. 每兩天換一次培養溶液(medium)，並觀察細胞的生長狀態。
10. 經過3周的培養，在這些培養皿內加入不同的刺激藥物去刺激鼻腔表皮細胞，再測量細胞激素的分泌量。

2.2.2 以酵素免疫吸附試驗(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 檢測各種細胞激素的濃度。

基於先前的文獻回顧，我們對培養皿內的下清液進行下列數種細胞激素進行酵素免疫吸附試驗檢測，包含 IL-6、IL-8、MCP-1、IL-1 β 和 TNF- α 。以 IL-8 為例，此酵素免疫吸附試驗組購自 R&D 公司，依據使用指示，標準濃度測量曲線(15.6~ 1000 pg/ml)可以先獲得，至於實驗樣本可以內插法得到實驗之濃度，必要時進行濃度稀釋，並進行重複試驗。

2.2.3 以刺激物刺激細胞檢測各種細胞激素的濃度

我們以合成的 CpG-ODN (5' -ggGGGACGATCGTCgggggG-3') (Parilla et al. 2006)，濃度 0.3~10 μ M，以及 IL-1 β (0.1~10 ng/ml) 和 TNF- α (0.3~3 ng/ml) 去刺激細胞，加入刺激物在培養基的上層，之後 24 小時，收集各個培養基中的下清液，並立即存放在 -80 $^{\circ}$ C 冷凍，以酵素免疫吸附試驗檢測各種細胞激素的濃度。

2.3 統計方式

使用 paired samples test 比較經刺激後各培養皿細胞激素和基礎分泌的差異，對於多變異項實驗組，則使用變異數分析(ANOVA)檢定； p 值小於 0.05 視為統計上有顯著意義；使用 SPSS 15.0 為統計軟體。

第 3 章 結果

3.1 建立一個鼻腔上皮細胞培養模型，以模仿鼻腔內的顯微環境
(microenvironment)

3.1.1 以光學顯微鏡及掃描式電子顯微鏡觀察經培養的鼻腔表皮細胞

3.1.2 以雷射掃描共軛焦顯微鏡觀察經培養的鼻腔表皮細胞

3.2 測量此細胞培養模型下的基礎細胞激素分泌量

3.3 測量 CpG-ODN 對細胞激素分泌量的影響

3.4 測量 IL-1 β 和 TNF- α 對細胞激素分泌量的影響

3.5 在 IL-1 β 和 TNF- α 存在下，測量 CpG-ODN 對細胞激素分泌量的影響

3.6 不同刺激狀況下，IL-6 的分泌

3.7 不同刺激狀況下，IL-8 的分泌

3.8 不同刺激狀況下，MCP-1 的分泌

3.9 關於實驗結果的總結



第 3 章 結果

3.1 建立一個鼻腔上皮細胞培養模型，以模仿鼻腔內的顯微環境 (microenvironment)。

3.1.1 以光學顯微鏡及掃描式電子顯微鏡觀察經培養的鼻腔表皮細胞

經過三周的培養，鼻腔表皮細胞會增生、複製，在培養皿形成一單層之鼻腔表皮組織，並有纖毛的分化，如圖 2~6。

3.1.2 以雷射掃描共軛焦顯微鏡觀察經培養的鼻腔表皮細胞

經過三周的培養，使用雷射掃描共軛焦顯微鏡觀察經培養的鼻腔表皮細胞，可見一緻密且有纖毛分化之鼻腔表皮細胞組織，如圖 7。此外，在這 3 周的培養時期，鼻腔表皮細胞會朝向一個更良好分化的趨勢，而有更多的纖毛細胞產生，如圖 8。

3.2 測量此細胞培養模型下的基礎細胞激素分泌量

以酵素免疫吸附試驗(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 檢測各種細胞激素的濃度。我們對培養皿內的下清液進行下列數種細胞激素進行酵素免疫吸附試驗檢測，包含 IL-6、IL-8、MCP-1、IL-1 β 和 TNF- α ；吾人發現，在此細胞培養模型下，鼻黏膜表皮細胞不會分泌 IL-1 β 和 TNF- α 這種前發炎介質(pro-inflammatory mediators)，顯見這是一個慢性、穩定的鼻腔黏膜表皮系統，足以模仿慢性鼻竇炎病人鼻腔內的相似顯微環境(microenvironment)；而對 IL-6、IL-8 和 MCP-1 等細胞激素，則有穩定的分泌。

此外，吾人亦發現 IL-6、IL-8 和 MCP-1 等細胞激素的分泌，在這 3 周的培養期裡，其分泌會趨於一個穩定的濃度；以 IL-8 的分泌為例，即使在不同的病人檢體，即使初始培養時，各組鼻腔表皮細胞對 IL-8 的分泌，呈現相當不一致的結果，但是到了培養後期(第 21 天)，各組鼻腔表皮細胞對 IL-8 的基礎分泌濃度，則呈現相當穩定一致的結果(4025 \pm 105 pg/mL，24 小時；N=12)，如圖 9。相同的，到了培養後期，各組鼻腔表皮細胞對 IL-6 的 24 小時基礎分泌濃度約為 105 \pm 6 pg/mL(N=5)；而 MCP-1 則為 277 \pm 13 pg/mL(N=10)。

吾人將以 IL-6、IL-8 和 MCP-1 等細胞激素當成生物性指標 (biomarker)，在後續的實驗裡比較有加刺激藥物的組別，其鼻腔表皮細胞分泌 IL-6、IL-8 和 MCP-1 等細胞激素，和基礎分泌濃度的差異。

3.3 測量 CpG-ODN 對細胞激素分泌量的影響

以 CpG-ODN 去刺激鼻腔表皮細胞，而後偵測鼻腔表皮細胞分泌 IL-6、IL-8 和 MCP-1 等細胞激素，和基礎分泌濃度的差異，以模擬慢性鼻竇炎病人鼻腔內，生物膜(biofilm)的存在，對慢性鼻竇炎疾病的生理意義。

吾人發現 CpG-ODN 只會造成 MCP-1 濃度的增加，而 IL-6 和 IL-8 的分泌，則無顯著差異，如圖 10~12。

3.4 測量 IL-1 β 和 TNF- α 對細胞激素分泌量的影響

以外加之 IL-1 β 和 TNF- α 去刺激鼻腔表皮細胞，而後偵測鼻腔表皮細胞分泌 IL-6、IL-8 和 MCP-1 等細胞激素，和基礎分泌濃度的差異。我們發現，IL-1 β 會造成 MCP-1、IL-6 和 IL-8 的分泌的顯著增加，如圖 13~15；而 TNF- α 則否，如圖 16~18。

3.5 在 IL-1 β 和 TNF- α 存在下，測量 CpG-ODN 對細胞激素分泌量的影響。

以外加之 IL-1 β 和 TNF- α ，合併 CpG-ODN，去刺激鼻腔表皮細胞，而偵測鼻腔表皮細胞分泌 IL-6、IL-8 和 MCP-1 等細胞激素，和只有 IL-1 β 存在時，分泌濃度的差異；吾人發現，在 IL-1 β 的存在下，以 CpG-ODN 刺激鼻腔表皮細胞，會造成 IL-6 和 MCP-1 分泌的顯著增加，IL-8 則否，如圖 19~21。而在 TNF- α 的存在下，以 CpG-ODN 刺激鼻腔表皮細胞，會造成 MCP-1 分泌的顯著增加，IL-6 和 IL-8 則否，如圖 22~24。

3.6 不同刺激狀況下，IL-6 的分泌

經由上述實驗，吾人亦可得知，外加的 IL-1 β 會造成鼻腔表皮細胞 IL-6 分泌的增加，並且有一個很好的劑量相對關係 (dose-dependent fashion)，而 CpG-ODN 及 TNF- α 則否。

此外，在 IL-1 β 的存在下，以 CpG-ODN 刺激鼻腔表皮細胞，會造成 IL-6 分泌的顯著增加，有明顯的加乘效果 (synergistic effect)，而 TNF- α 則否，見圖 25。

3.7 不同刺激狀況下，IL-8 分泌

外加的 IL-1 β 會造成鼻腔表皮細胞 IL-8 分泌的增加，並且有一個很好的劑量相對關係 (dose-dependent fashion)，而 CpG-ODN 及 TNF- α 則否。此外，在 IL-1 β 和 TNF- α 的存在下，以 CpG-ODN 刺激鼻腔表皮細胞，不會造成 IL-8 分泌的顯著增加，見圖 26。

3.8 不同刺激狀況下，MCP-1 的分泌

外加的 IL-1 β 和 CpG-ODN 會造成鼻腔表皮細胞 MCP-1 分泌的增加，並且有一個很好的劑量相對關係 (dose-dependent fashion)，而 TNF- α 則否。此外，在 IL-1 β 和 TNF- α 的存在下，以 CpG-ODN 刺激鼻腔表皮細胞，皆會造成 MCP-1 分泌的顯著增加，見圖 27。

3.9 關於實驗結果的總結

根據以上實驗結果，做成以下的結論：

1. 我們成功建立了一個鼻腔上皮細胞培養模型，以模仿慢性鼻竇炎病人鼻腔內的相似顯微環境(microenvironment)；經過三周的培養後，鼻腔表皮細胞會增生、複製，在培養皿形成一單層之鼻腔表皮組織，並有纖毛的分化。
2. 我們測量此細胞培養模型下的基礎細胞激素分泌量，發現在此細胞培養模型下，鼻黏膜細胞不會分泌 IL-1 β 和 TNF- α 這種前發炎介質(pro-inflammatory mediators)，顯見這是一個慢性、穩定性的鼻腔黏膜系統，足以模仿慢性鼻竇炎病人鼻腔內的相似顯微環境(microenvironment)；而對 IL-6、IL-8 和 MCP-1 等細胞激素，則有穩定的分泌，並趨於一個穩定的濃度。
3. 以 CpG-ODN 去刺激鼻腔表皮細胞，而後偵測鼻腔表皮細胞分泌 IL-6、IL-8 和 MCP-1 等細胞激素，比較其和基礎分泌濃度的差異，以模擬慢性鼻竇炎病人鼻腔內，以 CpG-ODN 為主成分之生物膜(biofilm)的存在，對慢性鼻竇炎疾病的生理意義。吾人發現 CpG-ODN 只會造成 MCP-1 濃度的增加，而 IL-6 和 IL-8 的分泌，則無顯著差異。
4. 以外加之 IL-1 β 和 TNF- α 去刺激鼻腔表皮細胞，而後偵測鼻腔表皮細胞分泌 IL-6、IL-8 和 MCP-1 等細胞激素，和基礎分泌濃度比較差異，以模擬慢性鼻竇炎急性發作時，大量有害細胞激素被釋放出來的情形。我們發現，IL-1 β 會造成 MCP-1、IL-6 和 IL-8 的分泌的顯著增加，而 TNF- α 則否。
5. 在 IL-1 β 和 TNF- α 存在下，測量 CpG-ODN 對細胞激素分泌量的影響。
以外加之 IL-1 β 和 TNF- α ，合併 CpG-ODN，去刺激鼻腔表皮細胞，而後偵測鼻腔表皮細胞分泌 IL-6、IL-8 和 MCP-1 等細胞激素，和基礎分泌濃度比較差異，以模擬慢性鼻竇炎的急性發作時期，以 CpG-ODN 為主成分之生物膜(biofilm)的存在，對整個鼻腔免疫反應，發揮何種免疫調節(immune-modulation)作用。吾人發現，在 IL-1 β 的存在下，以

CpG-ODN 刺激鼻腔表皮細胞，會造成 IL-6 和 MCP-1 分泌的顯著增加，IL-8 則否。而在 TNF- α 的存在下，以 CpG-ODN 刺激鼻腔表皮細胞，會造成 MCP-1 分泌的顯著增加，IL-6 和 IL-8 則否。

6. 將以上結論統整，可做成 Table 1。

7. 在此慢性鼻竇炎鼻腔表皮細胞培養的模式中，顯見 IL-1 β 是最強的細胞激素刺激劑，對於日後發展慢性鼻竇炎相關的預防或治療策略，如免疫抑制劑等等，IL-1 β 應是最好的標的物 (target)。



第 4 章 討論

4.1 CpG-ODN

4.2 IL-1 β

4.3 TNF- α

4.4 IL-6

4.5 IL-8

4.6 MCP-1

4.7 總結



第 4 章 討論

4.1 CpG-ODN

CpG-ODN，常見於大部分細菌和 DNA 病毒的基因體中，被認為是生物膜(biofilm)的一個主要成分(Whitchurch et al. 2002)，而和許多持久性和慢性細菌性感染相關。在臨床上，生物膜的形成也被認為和一些頑固性慢性鼻竇炎相關(Cohen et al. 2009; Kilty and Desrosiers 2008)，此外，生物膜的持續存在，也被認為是手術治療慢性鼻竇炎的失敗因子之一(Psaltis et al. 2008; Zhang et al. 2009)。在我們的研究裡，CpG-ODN 只會造成 MCP-1 濃度的增加，而 MCP-1 被認為和許多慢性、持久性細菌感染相關(Hall et al. 2005)，因此，我們的研究正和許多臨床上的觀察相符合，那就是 CpG-ODN，也就是生物膜的主成分，和鼻竇炎的慢性化、以及持久性感染相關；而在慢性鼻竇炎急性發作時期，CpG-ODN 的存在，會加乘這些細胞激素大量釋放的效果，而對疾病的嚴重程度及後續的併發症，具有關鍵的影響。至於 CpG-ODN 作用所經的路徑或是機制，可能是透過或是未透過 Toll-like receptor 9 (TLR-9 dependent 或 TLR-9 independent)這一個路徑來做後續的訊息傳導(Whitchurch et al. 2002; Fuxman Bass et al. 2008; Lin et al. 2007)。關於訊息傳導的進一步研究可以考慮使用 chloroquine(TLR-9 訊息傳導的抑制劑)，或 TLR9 small interfering RNA (siRNA)來加以印證(Parilla et al. 2006)。

4.2 IL-1 β

IL-1 β 是一種前發炎性物質 (pro-inflammatory mediator)，多在疾病的急性期反應，會造成發燒等全身性反應。此外，研究顯示，IL-1 β 在急性鼻竇炎時期，會被大量釋放出來，而在鼻息肉的檢體裡，亦可見到 IL-1 β 的釋放(Otto and Wenzel 2008; Rudack et al. 1998)；在我們的研究裡，此細胞培養系統，不會分泌 IL-1 β 這種前發炎性物質(pro-inflammatory mediator)，顯見這是一個慢性、穩定性的鼻腔黏膜系統。若以外加的 IL-1 β 刺激經培養的鼻腔表皮細胞，確實可以造成 IL-6、IL-8 及 MCP-1 等細胞激素的釋放，並有很好的劑量－反應關係 (dose-dependent fashion)，顯見在此系統裡，IL-1 β 是最強的細胞激素刺激劑，對於日後發展慢性鼻竇炎相關的預防或治療策略，如免疫抑制劑等等，IL-1 β 應是最好的標的物 (target)。

4.3 TNF- α

TNF- α 亦是一種發炎性物質(pro-inflammatory mediator)，會活化中性顆粒球(neutrophil)，並激化 TH1 細胞免疫反應，對於上皮細胞活化和細胞凋亡，亦有引導的作用；而在鼻息肉的檢體裡，亦可見到 TNF- α 的產生(Otto and Wenzel 2008)。在我們的研究裡，此細胞培養系統，不會分泌 TNF- α 這種前發炎性物質(pro-inflammatory mediators)，顯見這是一個慢性、穩定性的鼻腔黏膜系統。然而，以外加的 TNF- α 刺激經培養的鼻腔表皮細胞，卻不能造成 IL-6、IL-8 及 MCP-1 等細胞激素有意義的增加釋放，我們認為，也許是 TNF- α 劑量的關係，或是 TNF- α 刺激鼻腔表皮細胞，是經由其他的機制而來，而這些關係，則有賴後續的研究。

4.4 IL-6

IL-6 是一種多功能的發炎性細胞激素，能夠調節先天免疫和後天性免疫反應。在急性鼻竇炎的鼻腔分泌物中，亦可見到 IL-6 的過度釋放(Holgate and Polosa 2008; Hunter 2005; Beadling and Slifka 2006)。在我們的研究裡，鼻腔表皮細胞在 3 周的培養期裡，會穩定地釋放 IL-6；然而，在 IL-1 β 的存在下，IL-6 會被大量釋出，和臨床所見急性鼻竇炎的鼻腔分泌物中，IL-6 會過度釋放相呼應。

4.5 IL-8

IL-8 是很強的中性顆粒球(neutrophil)激活物，可引發鼻息肉的產生，在急性鼻竇炎的鼻腔分泌物中，亦可見到 IL-8 的過度釋放(Otto and Wenzel 2008; Rudack, Stoll, and Bachert 1998)。在我們的研究裡，鼻腔表皮細胞在 3 周的培養期裡，會穩定地釋放 IL-8；然而，在 IL-1 β 的存在下，IL-8 會被大量釋出，和臨床所見急性鼻竇炎的鼻腔分泌物中，IL-8 會過度釋放相呼應。中性顆粒球(neutrophil)積聚在鼻黏膜組織後，將釋放大量酵素及胜肽(lysozyme, lactoferrin, cathepsin G, protease, cathelicidins, and defensins)(Ooi, Wormald, and Tan 2008)，而對疾病的嚴重程度及後續的併發症，具有關鍵的影響。

4.6 MCP-1

MCP-1 會刺激刺激單核細胞(monocyte)、嗜鹼粒細胞(basophil)、記憶 T 細胞(memory T cells)、天然殺手細胞(natural killer)細胞和嗜酸性粒細胞(eosinophil)，會加強 Th1 免疫反應，並與許多慢性細菌性感染相關(Hall et al. 2005)。在我們的研究裡，CpG-ODN 能夠刺激 MCP-1 的產生，而和鼻竇炎的慢性化相關。此外，在 IL-1 β 的存在下，MCP-1 亦會被大量釋出。而在 IL-1 β 及 TNF- α 存在下，模擬慢性鼻竇炎急性發作時期，CpG-ODN 的存在，會加乘 MCP-1 的大量釋放，吸引單核細胞(monocyte)、嗜鹼粒細胞(basophil)、記憶 T 細胞(memory T cells)、天然殺手(nature killer)細胞和嗜酸性粒細胞(eosinophil)到局部鼻腔組織；嗜鹼粒細胞(basophil)會釋放組織胺(histamine)，前列腺素(prostaglandin)和白三烯素(leukotrienes)；嗜酸性粒細胞(eosinophil)會釋放神經毒素(eosinophil-derived neurotoxin)和白三烯素(leukotrienes)；天然殺手細胞(natural killer)細胞會增強抗體依賴性細胞毒殺作用(antibody-dependent cellular cyto-toxicity, ADCC)(Ooi, Wormald, and Tan 2008; Hall et al. 2005)，而對疾病的嚴重程度及後續的併發症，具有關鍵的影響。

4.7 總結

1. CpG-ODN 的存在使鼻腔及鼻竇黏膜保持低量細胞激素的產生，並在慢性鼻竇炎的持久性發炎中扮演重要角色。
2. 在慢性鼻竇炎的急性發作時期，CpG-ODN 會對鼻腔表皮細胞產生的免疫發炎反應，有加乘的作用，因而增強鼻內細胞激素的釋放，對慢性鼻竇炎急性發作的嚴重程度及後續的併發症，具有關鍵的影響。
3. CpG-ODN 和鼻竇炎的慢性化相關。清除這類生物膜的存在對於慢性鼻竇炎的治療是絕對有益處的。在模擬慢性鼻竇炎急性發作時期，CpG-ODN 會增加鼻內細胞激素的釋放，而使症狀加劇或造成併發症；因此，治療時須盡可能移除這些有害的發炎物質，甚或使用短效的免疫抑制劑，以停止這細胞激素大量釋放的惡性循環。

第 5 章 展望

鼻腔表皮細胞是呼吸道與外界物質接觸的第一線，它的免疫防線包含表皮纖毛細胞的黏膜纖毛運動、細胞分泌抗菌物質、以及分泌細胞激素吸引白血球進駐局部鼻腔組織並構成績發性免疫等。任何鼻腔疾病的產生，包含慢性鼻竇炎，都須先破壞鼻腔表皮細胞，才會產生。本研究以鼻腔表皮細胞為材料，研究慢性鼻竇炎的急性發作，在一些細胞激素的測量上，確實得到和臨床觀察相符的結果。然而，鼻腔的免疫反應不單只有鼻腔表皮細胞的作用，後續各種外來物質的刺激、所經過的受器(receptor)，以至於訊息的傳導、宿主的免疫反應等，是一個很繁複的反應，都有賴於後續實驗的研究，才能一一釐清。

此外，本研究以慢性鼻竇炎合併鼻息肉的病患檢體標本，取出鼻腔表皮細胞進行培養，以模擬一個慢性、穩定性鼻竇炎病人的鼻腔生理狀況，在臨床上並不能代表所有病人的實際生理狀況；而以 IL-1 β 及 TNF- α 刺激鼻腔表皮細胞，藉以模擬慢性鼻竇炎急性發作，也忽略了其他可能存在的免疫趨化物質。另外，若能得到正常鼻腔表皮細胞的基礎細胞激素分泌濃度，和慢性鼻竇炎鼻腔表皮細胞組相對照，更能確切明瞭慢性鼻竇炎病患和正常人在鼻腔基礎細胞激素分泌的差異，所以在實驗設計方面，還有改善的空間。

慢性鼻竇炎的病理生理學，至今仍不清楚；而頑固難治的慢性鼻竇炎，合併反覆的急性發作，在臨床上更是一個難解的問題。在本研究中，我們以鼻腔表皮細胞做為研究材料，並模擬慢性鼻竇炎急性發作的情況下，測量各種細胞激素的表現量，得到了和臨床觀察相符的結果。這樣實驗模式的建立，將有助於我們更了解慢性鼻竇炎急性發作的病理生理學，對於後續的研究，以及日後發展相關鼻腔疾病的免疫治療策略，應該都有一定的應用價值。

參考文獻

- Beadling, C., and M. K. Slifka. 2006. Regulation of innate and adaptive immune responses by the related cytokines IL-12, IL-23, and IL-27. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 54 (1):15-24.
- Benninger, M. S., B. J. Ferguson, J. A. Hadley, D. L. Hamilos, M. Jacobs, D. W. Kennedy, D. C. Lanza, B. F. Marple, J. D. Osguthorpe, J. A. Stankiewicz, J. Anon, J. Denny, I. Emanuel, and H. Levine. 2003. Adult chronic rhinosinusitis: definitions, diagnosis, epidemiology, and pathophysiology. *Otolaryngol Head Neck Surg* 129 (3 Suppl):S1-32.
- Bernstein, J. M., M. Ballow, P. M. Schlievert, G. Rich, C. Allen, and D. Dryja. 2003. A superantigen hypothesis for the pathogenesis of chronic hyperplastic sinusitis with massive nasal polyposis. *Am J Rhinol* 17 (6):321-6.
- Chan, Y., and F. A. Kuhn. 2009. An update on the classifications, diagnosis, and treatment of rhinosinusitis. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 17 (3):204-8.
- Cohen, M., J. Kofonow, J. V. Nayak, J. N. Palmer, A. G. Chiu, J. G. Leid, and N. A. Cohen. 2009. Biofilms in chronic rhinosinusitis: a review. *Am J Rhinol Allergy* 23 (3):255-60.
- Das, S., O. P. Palmer, W. D. Leight, J. B. Surowitz, R. J. Pickles, S. H. Randell, and C. A. Buchman. 2005. Cytokine amplification by respiratory syncytial virus infection in human nasal epithelial cells. *Laryngoscope* 115 (5):764-8.
- el-Fiky, L. M., N. Khamis, D. Mostafa Bel, and A. M. Adly. 2009. Staphylococcal infection and toxin production in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy* 23 (3):264-7.
- Fokkens, W., V. Lund, C. Bachert, P. Clement, P. Hellings, M. Holmstrom, N. Jones, L. Kalogjera, D. Kennedy, M. Kowalski, H. Malmberg, J. Mullol, D. Passali, H. Stammberger, and P. Stierna. 2005. EAACI position paper on rhinosinusitis and nasal polyps executive summary. *Allergy* 60 (5):583-601.
- Fokkens, W., V. Lund, and J. Mullol. 2007. European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007. *Rhinol Suppl* (20):1-136.
- Fonseca, D. E., and J. N. Kline. 2009. Use of CpG oligonucleotides in treatment of asthma and allergic disease. *Adv Drug Deliv Rev* 61 (3):256-62.
- Fuxman Bass, J. I., M. L. Gabelloni, M. E. Alvarez, M. E. Vermeulen, D. M. Russo, A. Zorreguieta, J. R. Geffner, and A. S. Trevani. 2008. Characterization of bacterial DNA binding to human neutrophil surface. *Lab Invest* 88 (9):926-37.
- Hall, D. J., M. E. Bates, L. Guar, M. Cronan, N. Korpi, and P. J. Bertics. 2005. The role of p38 MAPK in rhinovirus-induced monocyte chemoattractant protein-1 production by monocytic-lineage cells. *J Immunol* 174 (12):8056-63.

- Healy, D. Y., J. G. Leid, A. R. Sanderson, and D. H. Hunsaker. 2008. Biofilms with fungi in chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 138 (5):641-7.
- Holgate, S. T., and R. Polosa. 2008. Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* 8 (3):218-30.
- Hunter, C. A. 2005. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol* 5 (7):521-31.
- Kilty, S. J., and M. Y. Desrosiers. 2008. The role of bacterial biofilms and the pathophysiology of chronic rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 8 (3):227-33.
- Kline, J. N., and A. M. Krieg. 2008. Toll-like receptor 9 activation with CpG oligodeoxynucleotides for asthma therapy. *Drug News Perspect* 21 (8):434-9.
- Klinman, D. M. 2004. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immunoprotective agents. *Expert Opin Biol Ther* 4 (6):937-46.
- Krieg, A. M. 2004. Antitumor applications of stimulating toll-like receptor 9 with CpG oligodeoxynucleotides. *Curr Oncol Rep* 6 (2):88-95.
- Krieg, A. M. 2006. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 5 (6):471-84.
- Kuehnemund, M., C. Ismail, J. Brieger, D. Schaefer, and W. J. Mann. 2004. Untreated chronic rhinosinusitis: a comparison of symptoms and mediator profiles. *Laryngoscope* 114 (3):561-5.
- Lin, C. F., C. H. Tsai, C. H. Cheng, Y. S. Chen, F. Tournier, and T. H. Yeh. 2007. Expression of Toll-like receptors in cultured nasal epithelial cells. *Acta Otolaryngol* 127 (4):395-402.
- Mahoney, E. J., and R. Metson. 2009. Palliative care for the patient with refractory chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Clin North Am* 42 (1):39-47, vii-viii.
- Matsuwaki, Y., T. Ookushi, D. Asaka, E. Mori, T. Nakajima, T. Yoshida, J. Kojima, S. Chiba, N. Ootori, and H. Moriyama. 2008. Chronic rhinosinusitis: risk factors for the recurrence of chronic rhinosinusitis based on 5-year follow-up after endoscopic sinus surgery. *Int Arch Allergy Immunol* 146 Suppl 1:77-81.
- Meltzer, E. O., D. L. Hamilos, J. A. Hadley, D. C. Lanza, B. F. Marple, R. A. Nicklas, A. D. Adinoff, C. Bachert, L. Borish, V. M. Chinchilli, M. R. Danzig, B. J. Ferguson, W. J. Fokkens, S. G. Jenkins, V. J. Lund, M. F. Mafee, R. M. Naclerio, R. Pawankar, J. U. Ponikau, M. S. Schubert, R. G. Slavin, M. G. Stewart, A. Togias, E. R. Wald, and B. Winther. 2006. Rhinosinusitis: developing guidance for clinical trials. *J Allergy Clin Immunol* 118 (5 Suppl):S17-61.
- Meltzer, E. O., D. L. Hamilos, J. A. Hadley, D. C. Lanza, B. F. Marple, R. A. Nicklas, C. Bachert, J. Baraniuk, F. M. Baroody, M. S. Benninger, I. Brook, B. A. Chowdhury, H. M. Druce, S. Durham, B. Ferguson, J. M. Gwaltney, Jr., M.

- Kaliner, D. W. Kennedy, V. Lund, R. Naclerio, R. Pawankar, J. F. Piccirillo, P. Rohane, R. Simon, R. G. Slavin, A. Togias, E. R. Wald, and S. J. Zinreich. 2004. Rhinosinusitis: Establishing definitions for clinical research and patient care. *Otolaryngol Head Neck Surg* 131 (6 Suppl):S1-62.
- Ooi, E. H., P. J. Wormald, and L. W. Tan. 2008. Innate immunity in the paranasal sinuses: a review of nasal host defenses. *Am J Rhinol* 22 (1):13-9.
- Otto, B. A., and S. E. Wenzel. 2008. The role of cytokines in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 16 (3):270-4.
- Parilla, N. W., V. S. Hughes, K. M. Lierl, H. R. Wong, and K. Page. 2006. CpG DNA modulates interleukin 1beta-induced interleukin-8 expression in human bronchial epithelial (16HBE14o-) cells. *Respir Res* 7:84.
- Psaltis, A. J., E. K. Weitzel, K. R. Ha, and P. J. Wormald. 2008. The effect of bacterial biofilms on post-sinus surgical outcomes. *Am J Rhinol* 22 (1):1-6.
- Repka-Ramirez, S., K. Naranch, Y. J. Park, D. Clauw, and J. N. Baraniuk. 2002. Cytokines in nasal lavage fluids from acute sinusitis, allergic rhinitis, and chronic fatigue syndrome subjects. *Allergy Asthma Proc* 23 (3):185-90.
- Rosenfeld, R. M. 2007. Clinical practice guideline on adult sinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 137 (3):365-77.
- Rudack, C., U. Hauser, M. Wagenmann, C. Bachert, and U. Ganzer. 1998. [Cytokine pattern in various forms of sinusitis]. *Laryngorhinootologie* 77 (1):34-7.
- Rudack, C., W. Stoll, and C. Bachert. 1998. Cytokines in nasal polyposis, acute and chronic sinusitis. *Am J Rhinol* 12 (6):383-8.
- Scadding, G. K., S. R. Durham, R. Mirakian, N. S. Jones, A. B. Drake-Lee, D. Ryan, T. A. Dixon, P. A. Huber, and S. M. Nasser. 2008. BSACI guidelines for the management of rhinosinusitis and nasal polyposis. *Clin Exp Allergy* 38 (2):260-75.
- Seiberling, K. A., L. Grammer, and R. C. Kern. 2005. Chronic rhinosinusitis and superantigens. *Otolaryngol Clin North Am* 38 (6):1215-36, ix.
- Thomas, M., B. P. Yawn, D. Price, V. Lund, J. Mullol, and W. Fokkens. 2008. EPOS Primary Care Guidelines: European Position Paper on the Primary Care Diagnosis and Management of Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2007 - a summary. *Prim Care Respir J* 17 (2):79-89.
- Whitchurch, C. B., T. Tolker-Nielsen, P. C. Ragas, and J. S. Mattick. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295 (5559):1487.
- Zhang, Z., D. Han, S. Zhang, Y. Han, W. Dai, E. Fan, Y. Li, and D. Wang. 2009. Biofilms and mucosal healing in postsurgical patients with chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy* 23 (5):506-11.



圖 1 . CpG-ODN

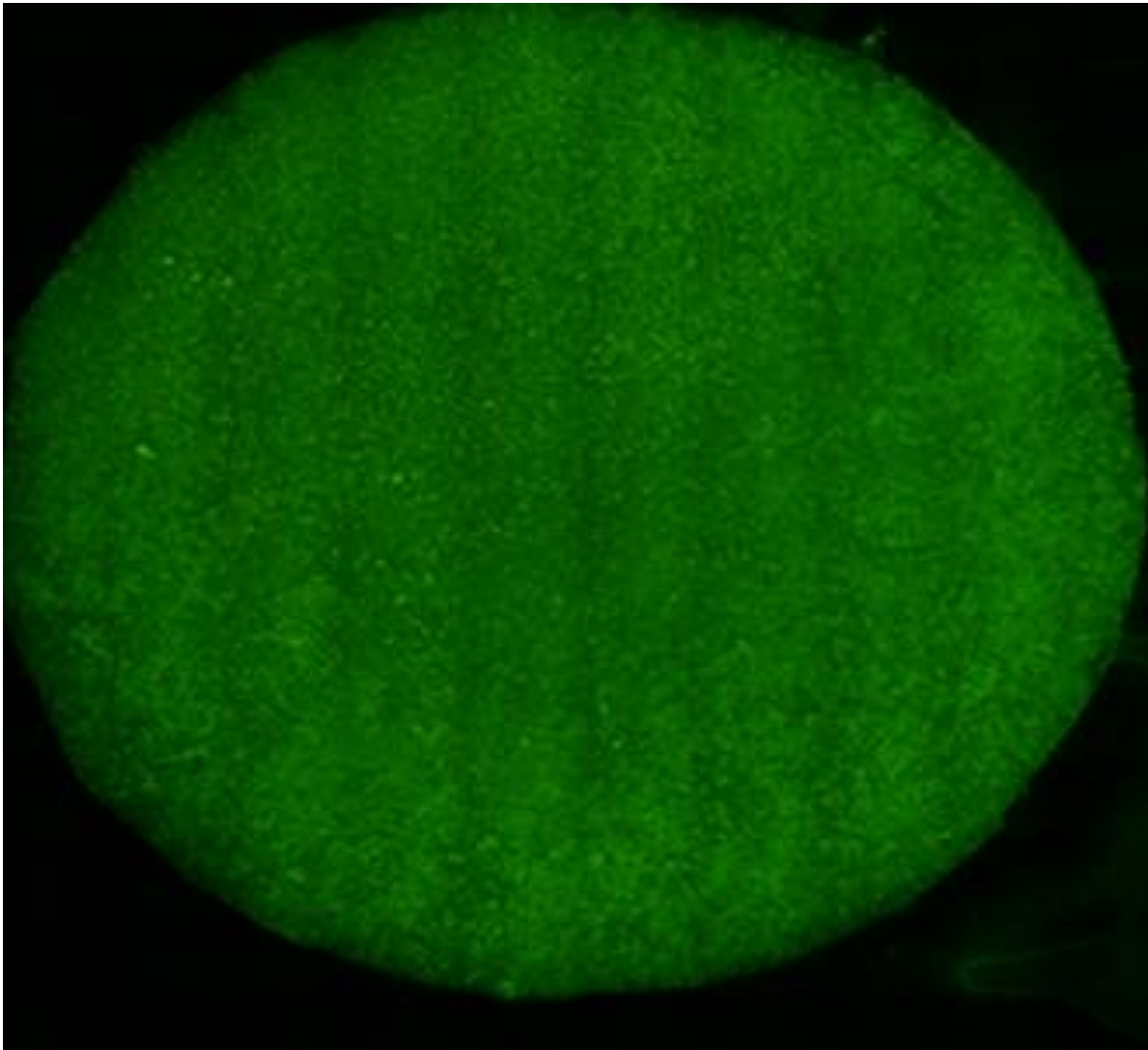


圖2. 培養的第1天，以光學顯微鏡觀察，細胞呈現稀疏排列的狀況(40倍放大)。

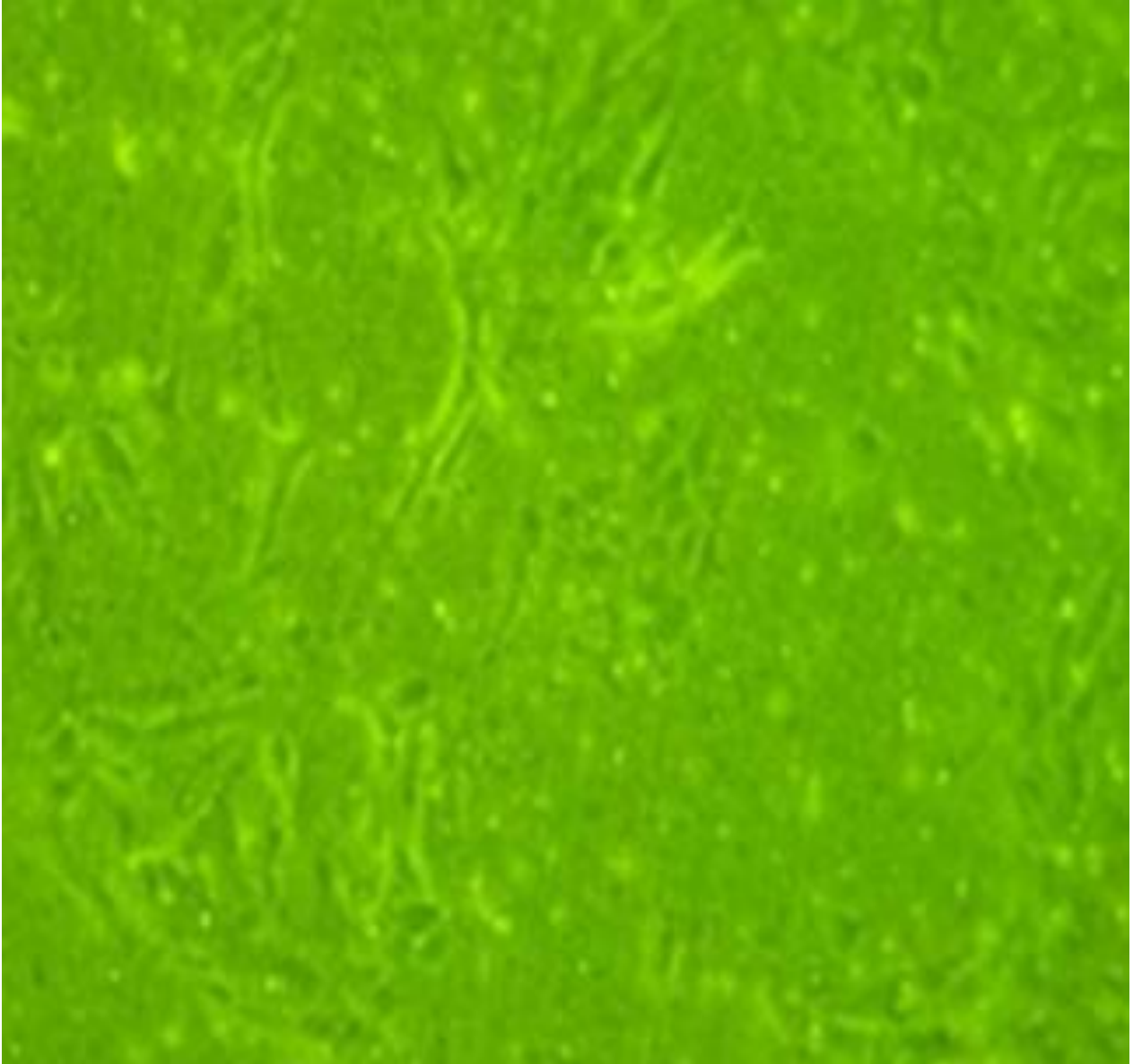


圖3. 培養的第1天，以光學顯微鏡觀察，細胞呈現稀疏排列的狀況(400倍放大)。

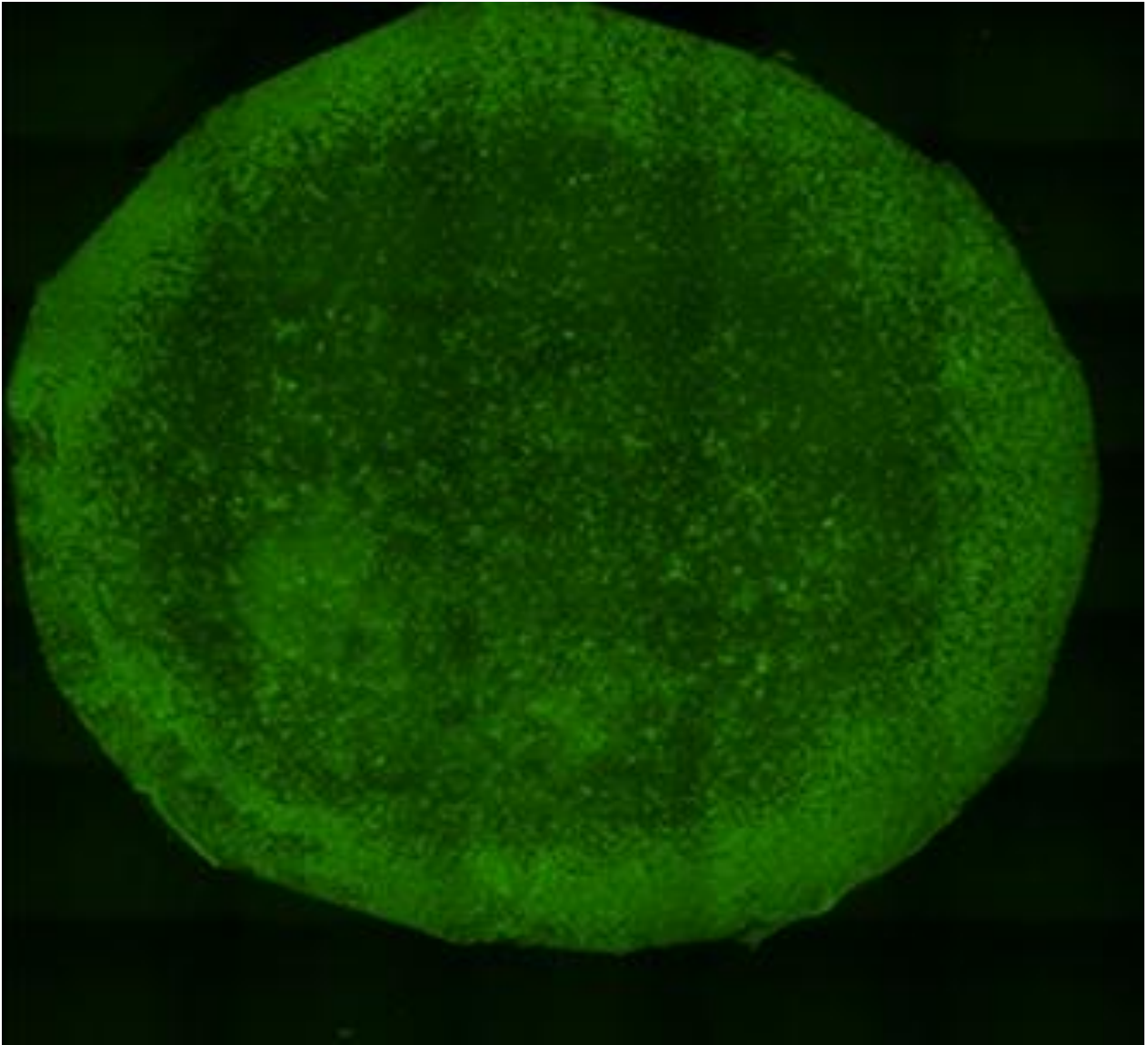


圖 4. 培養的第 21 天，以光學顯微鏡觀察，細胞經過增生、複製，而呈現緊密排列的狀況(40 倍放大)。

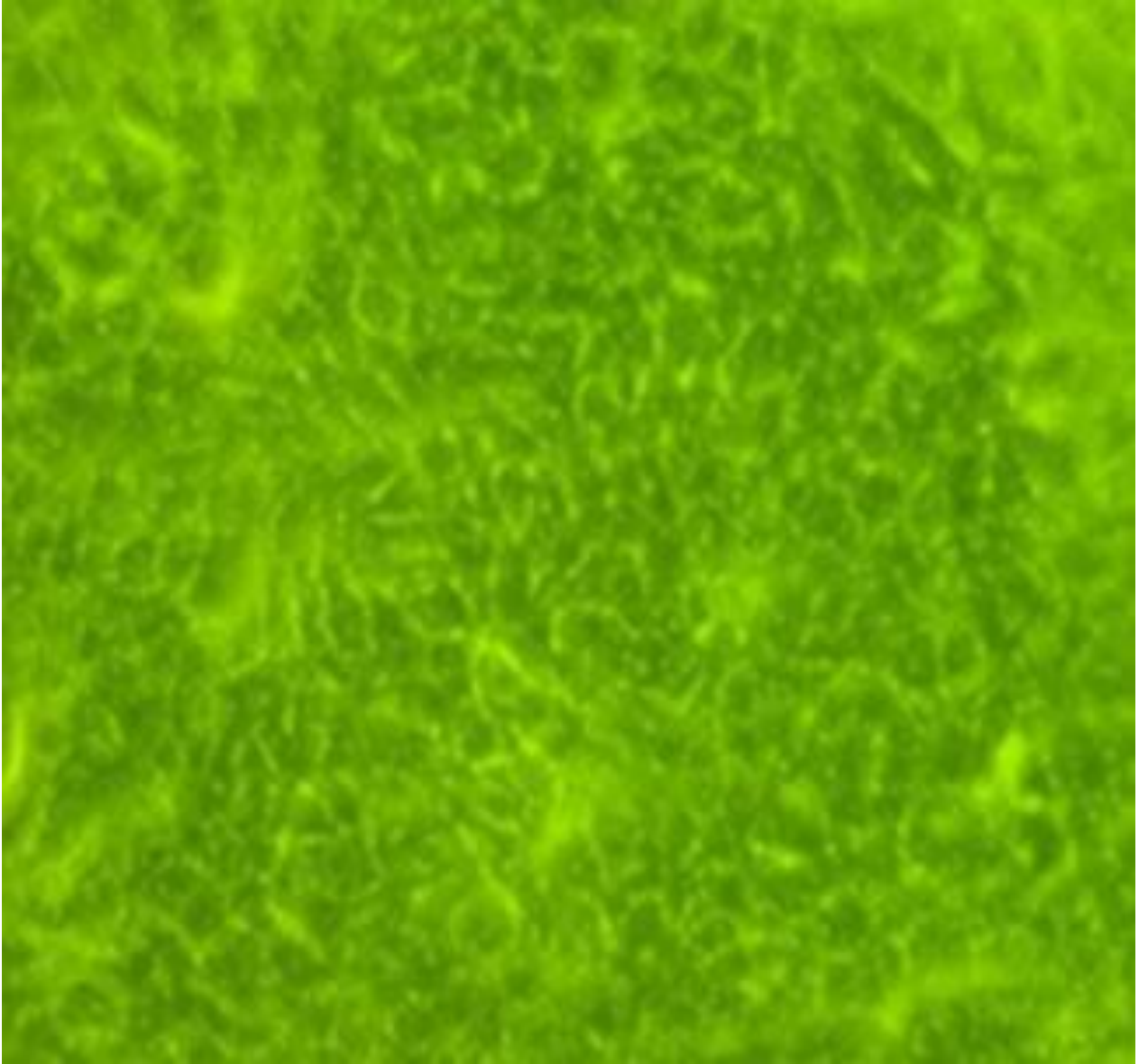


圖 5. 培養的第 21 天，以光學顯微鏡觀察，細胞經過增生、複製，而呈現緊密排列的狀況(400 倍放大)。

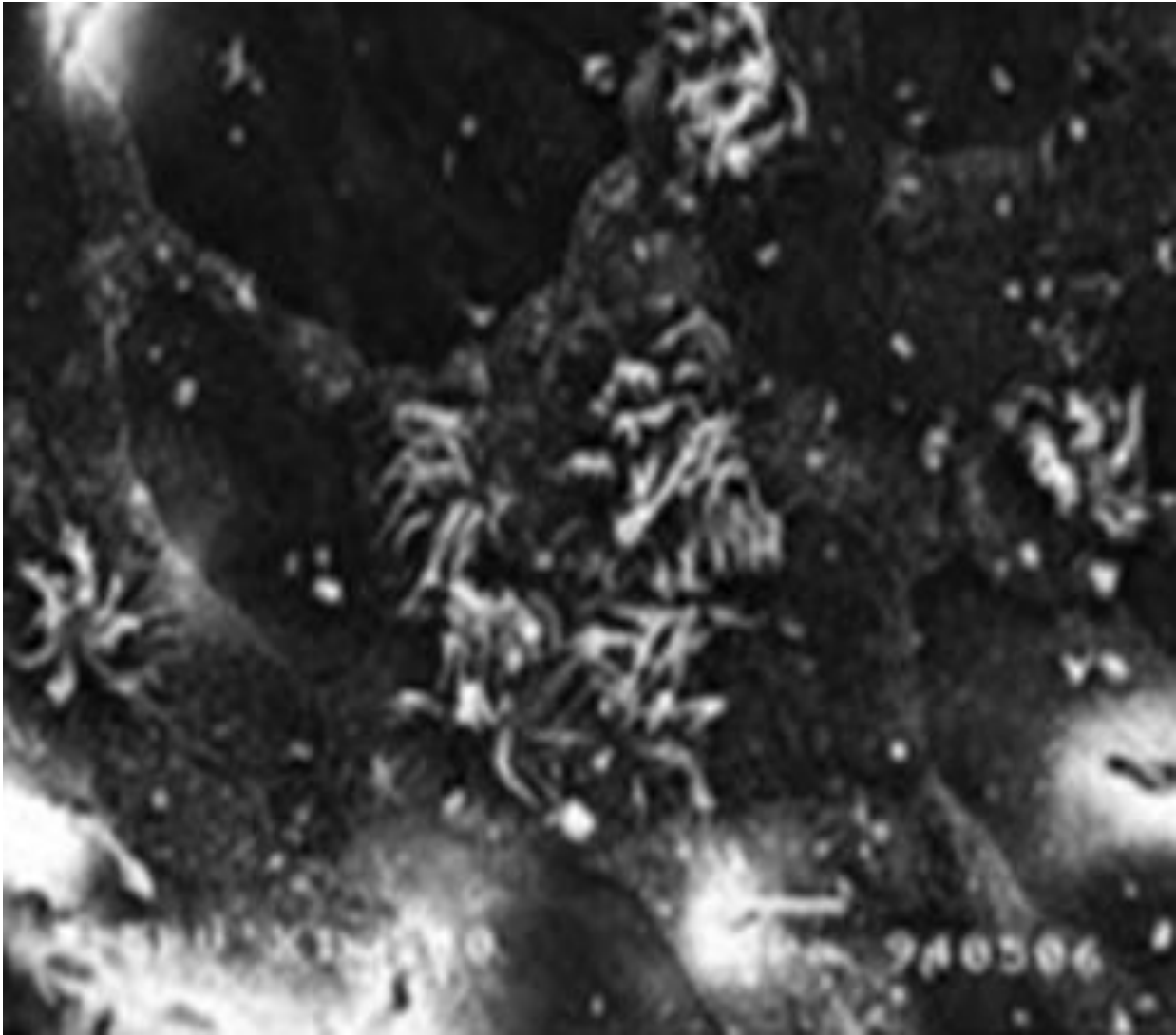


圖 6. 培養的第 21 天，以掃描式電子顯微鏡觀察，此鼻腔表皮組織，有纖毛的分化。

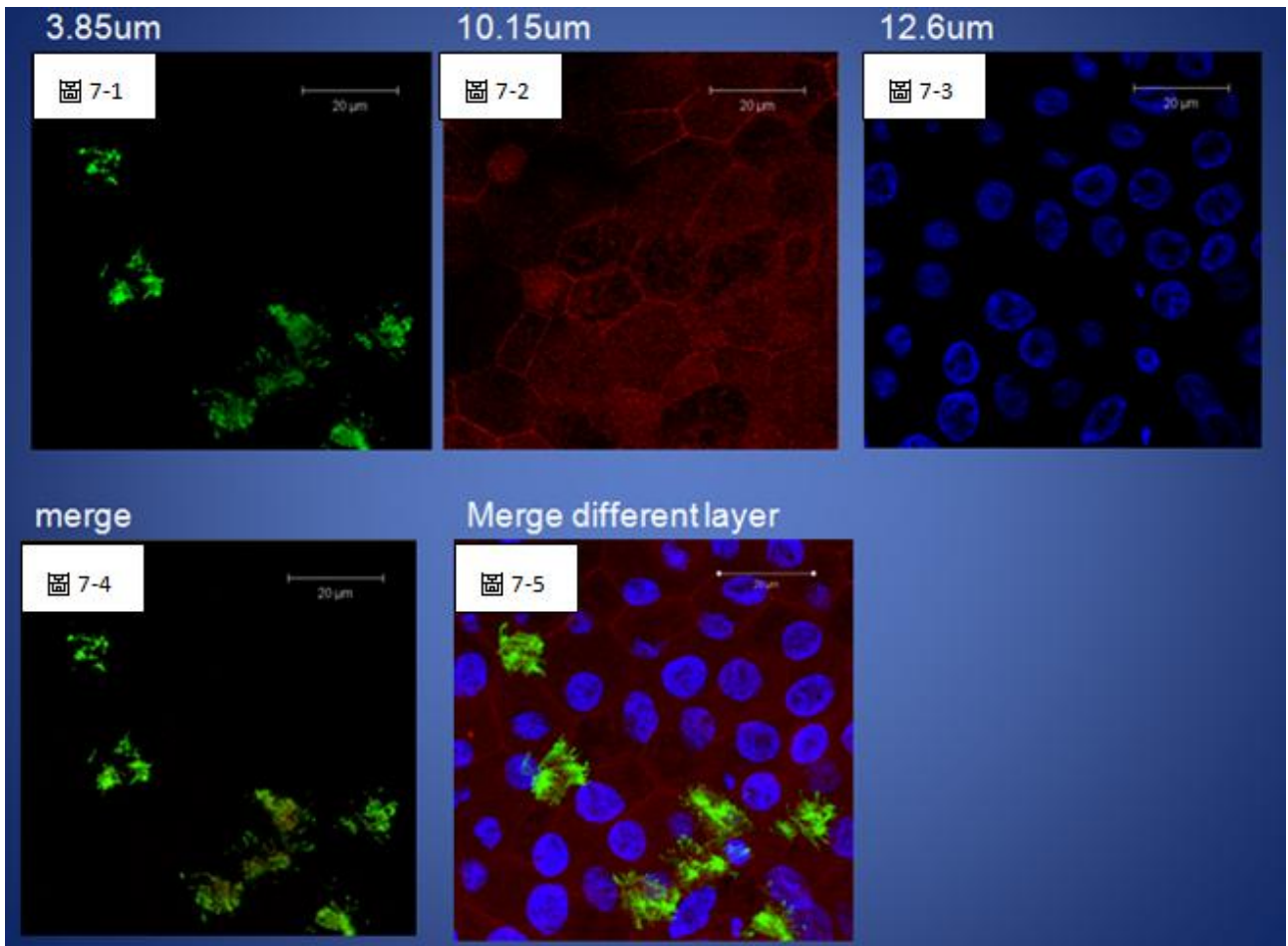


圖 7. 經三周之培養，以雷射掃描式共軛焦顯微鏡(Laser Scanning Confocal Microscope)觀察鼻腔表皮細胞組織。圖 7-1，在深度為 $3.85 \mu\text{m}$ 處觀察，以綠色代表纖毛。圖 7-2，在深度為 $10.15 \mu\text{m}$ 處觀察，以紅色代表細胞壁。圖 7-3，在深度為 $12.6 \mu\text{m}$ 處觀察，以藍色代表細胞核。圖 7-4 和 7-5，融合影像，可得一緻密且有纖毛分化之鼻腔表皮細胞組織。

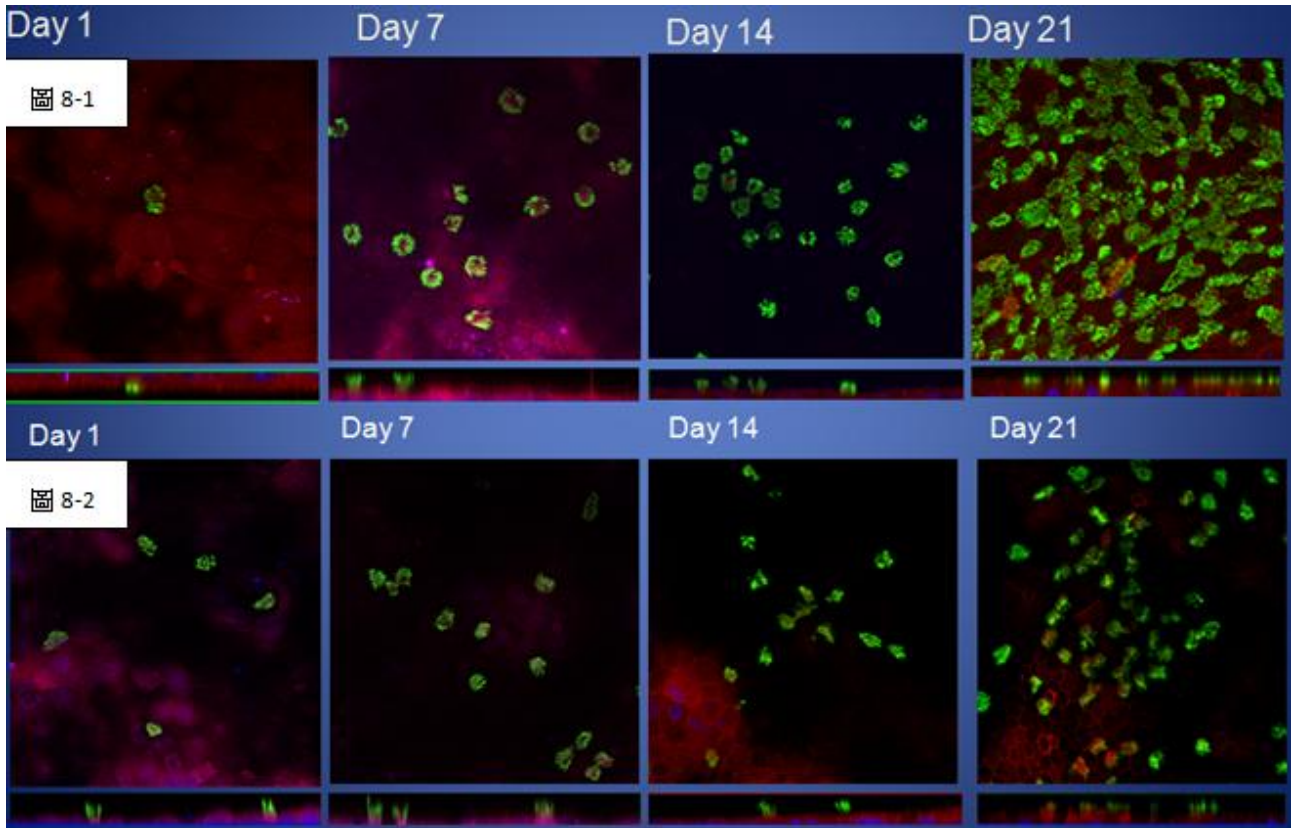


圖 8. 在這 3 周的培養時期，依時序每周以雷射掃描式共軛焦顯微鏡(Laser Scanning Confocal Microscope)觀察鼻腔表皮細胞組織；圖 8-1，上排，第一組病人經此 3 周的培養期，鼻腔表皮細胞會朝向一個更良好分化的趨勢，而有更多的纖毛細胞產生；圖 8-2，下排，第二組病人亦呈相同趨勢。

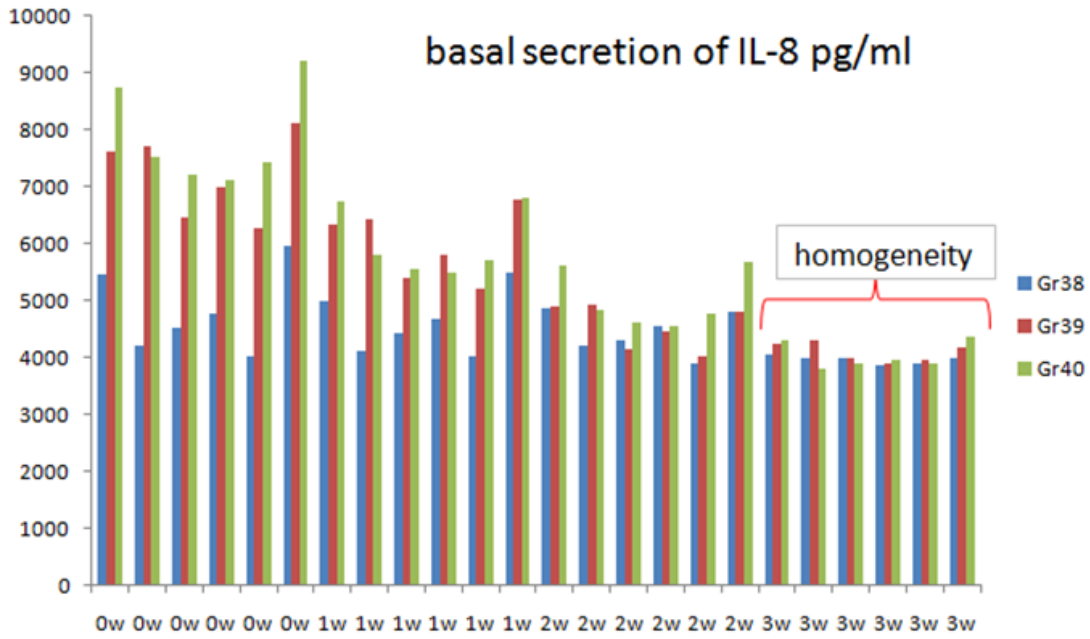


圖 9. IL-8 基礎分泌量，在 3 周的培養期裡的變化。經 3 周的培養後，各個培養皿中的鼻腔表皮細胞，其 IL-8 基礎分泌量趨於一致。(0W:培養初期，1W:第 1 周，2W:第 2 周，3W:第 3 周；Gr38~40 表鼻腔表皮細胞為不同來源的 3 個病人)。



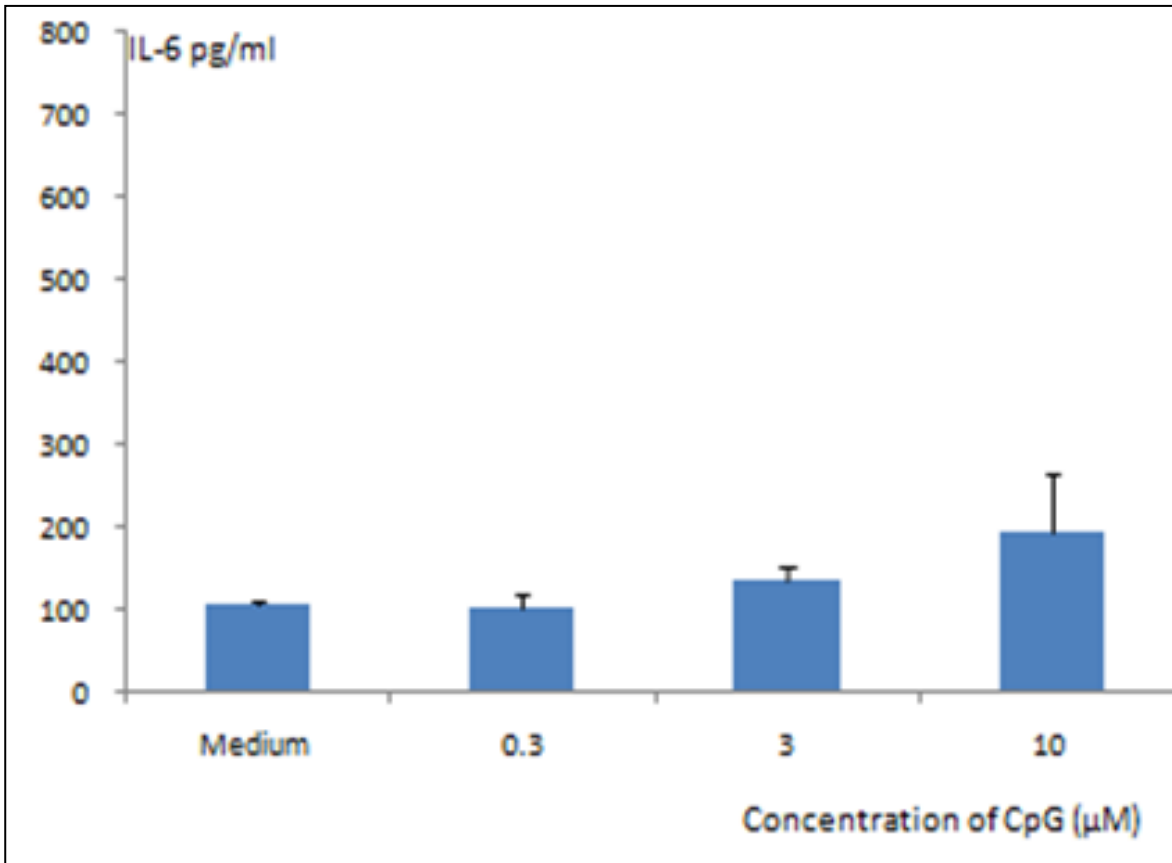


圖 10. 以不同的 CpG-ODN 濃度(0.3~10 μM)去刺激鼻腔表皮細胞，相對於未加 CpG-ODN 者(Medium), IL-6 的分泌，無顯著差異(N=3)。

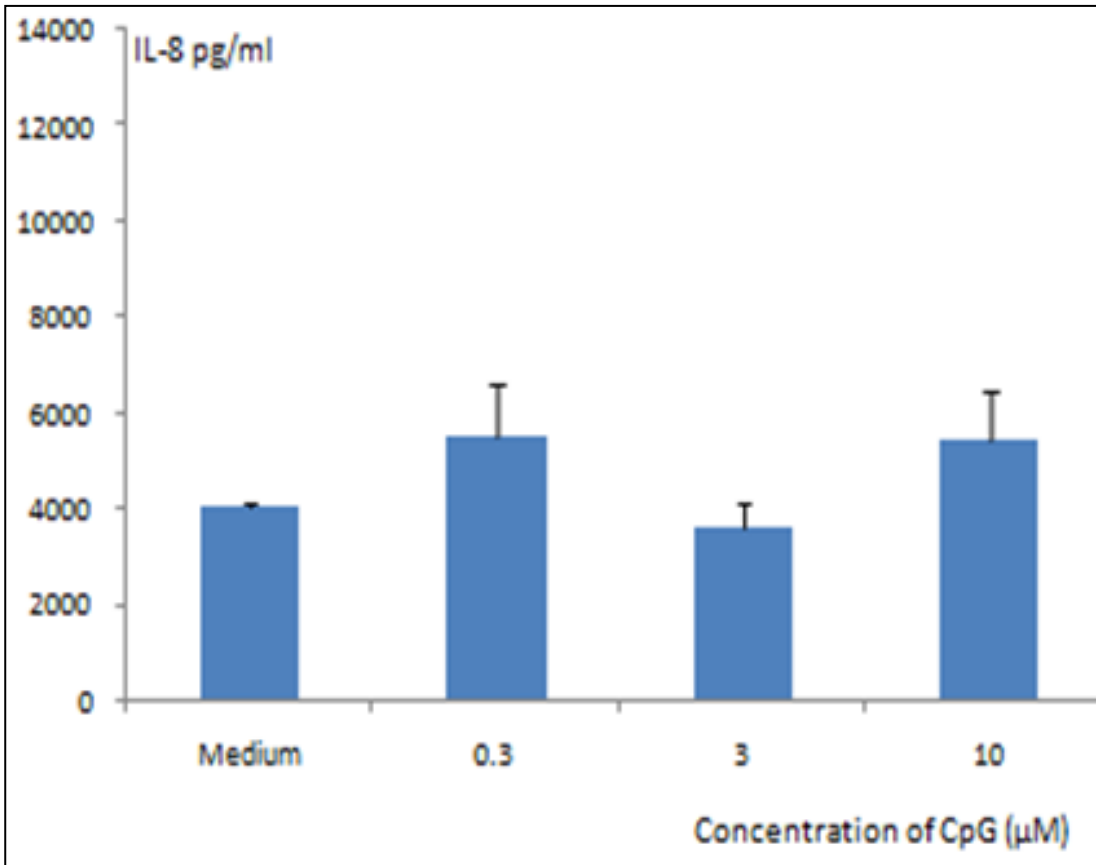


圖 11. 以不同的 CpG-ODN 濃度(0.3~10 μM)去刺激鼻腔表皮細胞，相對於未加 CpG-ODN 者(Medium), IL-8 的分泌，無顯著差異(N=9)。

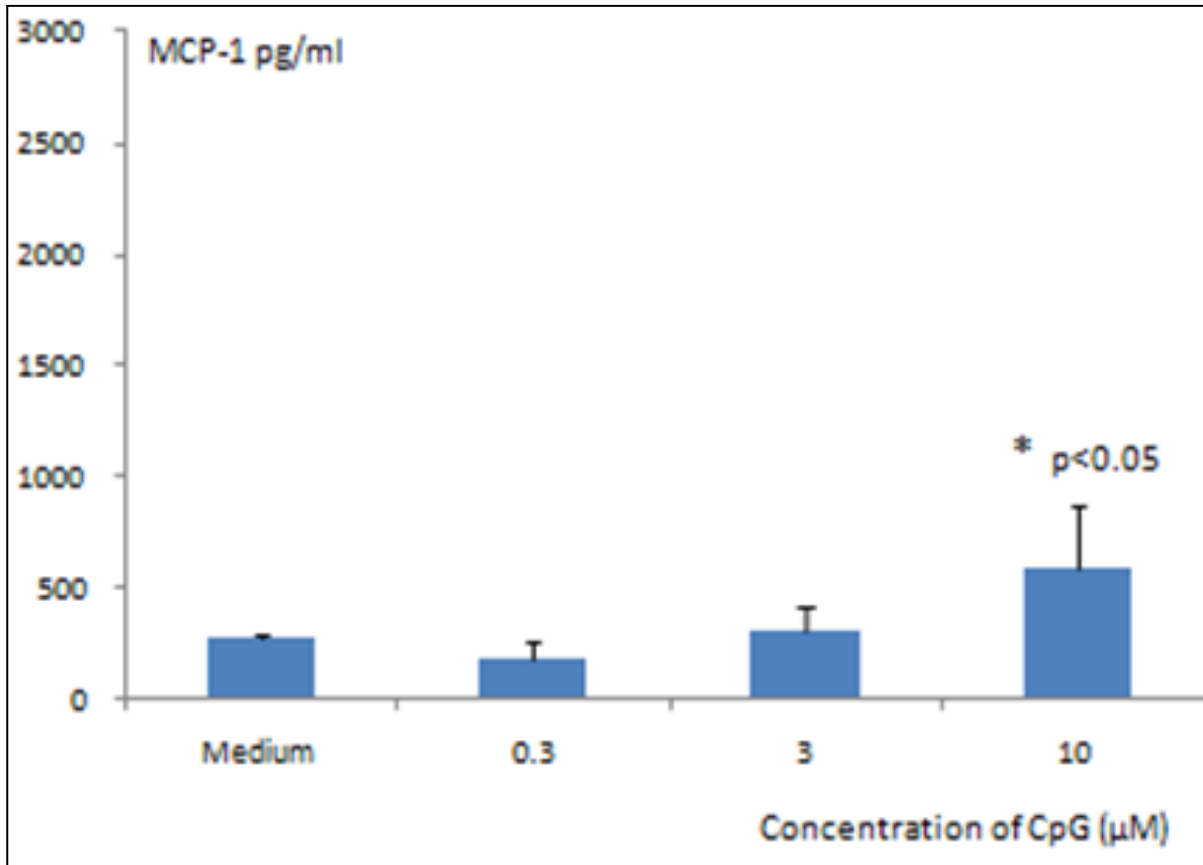


圖12. 以不同的CpG-ODN濃度(0.3~10 μM)去刺激鼻腔表皮細胞，相對於未加CpG-ODN者(Medium), MCP-1 的分泌，具顯著差異， $p < 0.05$ (N=8)。

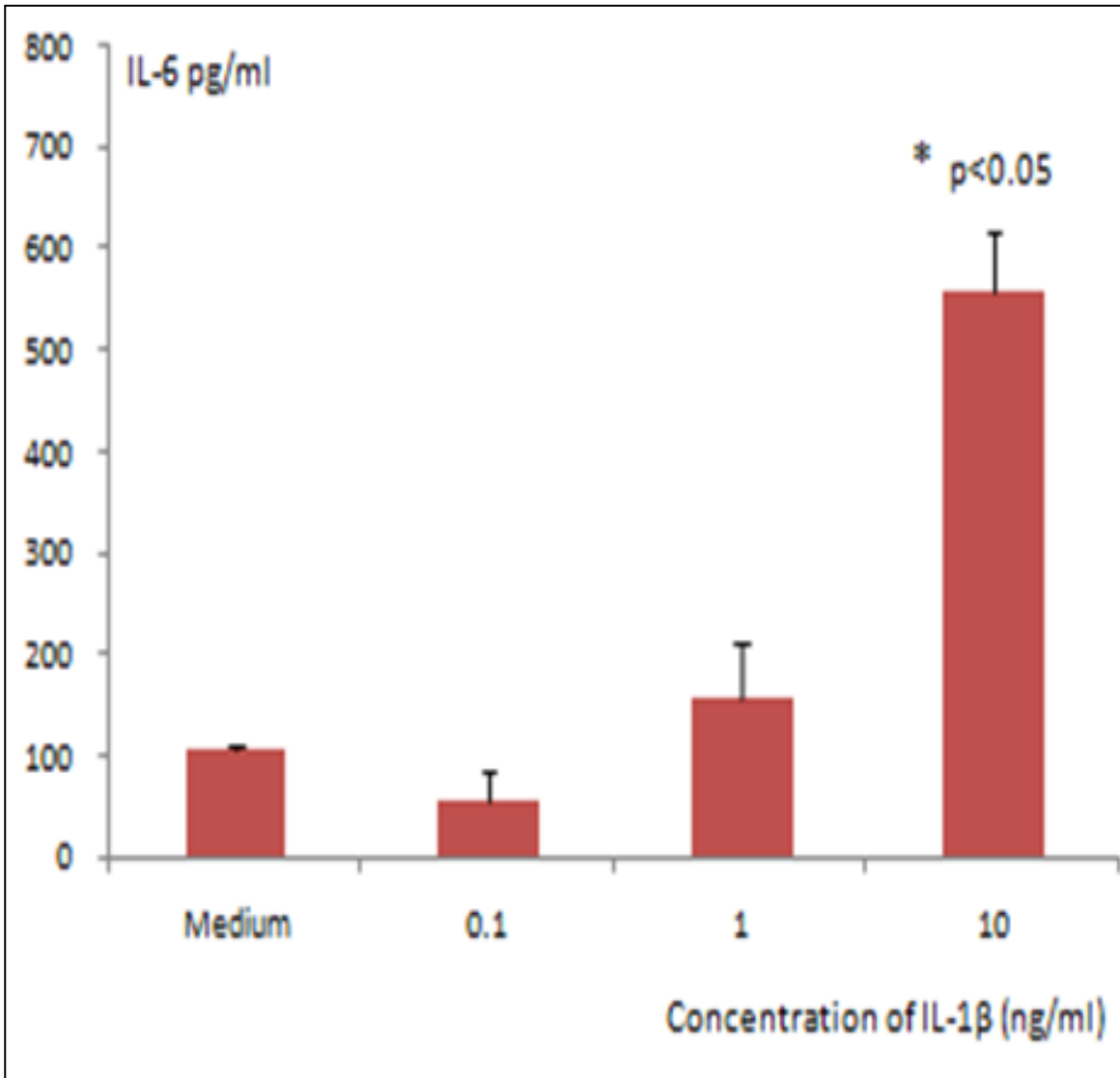


圖 13. 以不同的 IL-1 β 濃度(0.1~10 ng/ml)去刺激鼻腔表皮細胞，相對於未加 IL-1 β 者(Medium), IL-6 的分泌，具顯著差異， $p < 0.05$ ($N=5$)。

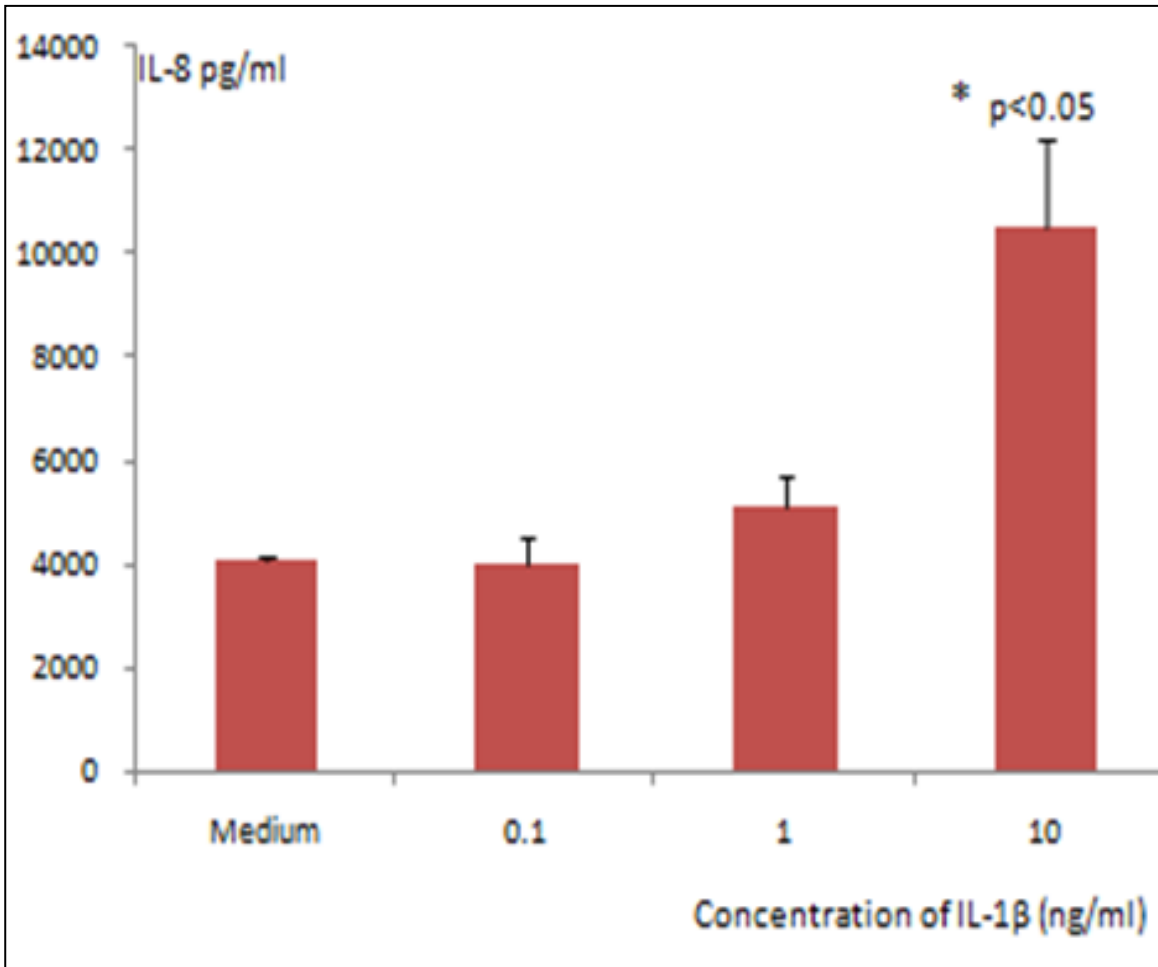


圖 14. 以不同的 IL-1 β 濃度(0.1~10 ng/ml)去刺激鼻腔表皮細胞，相對於未加 IL-1 β 者(Medium), IL-8 的分泌，具顯著差異， $p < 0.05$ (N=13)。

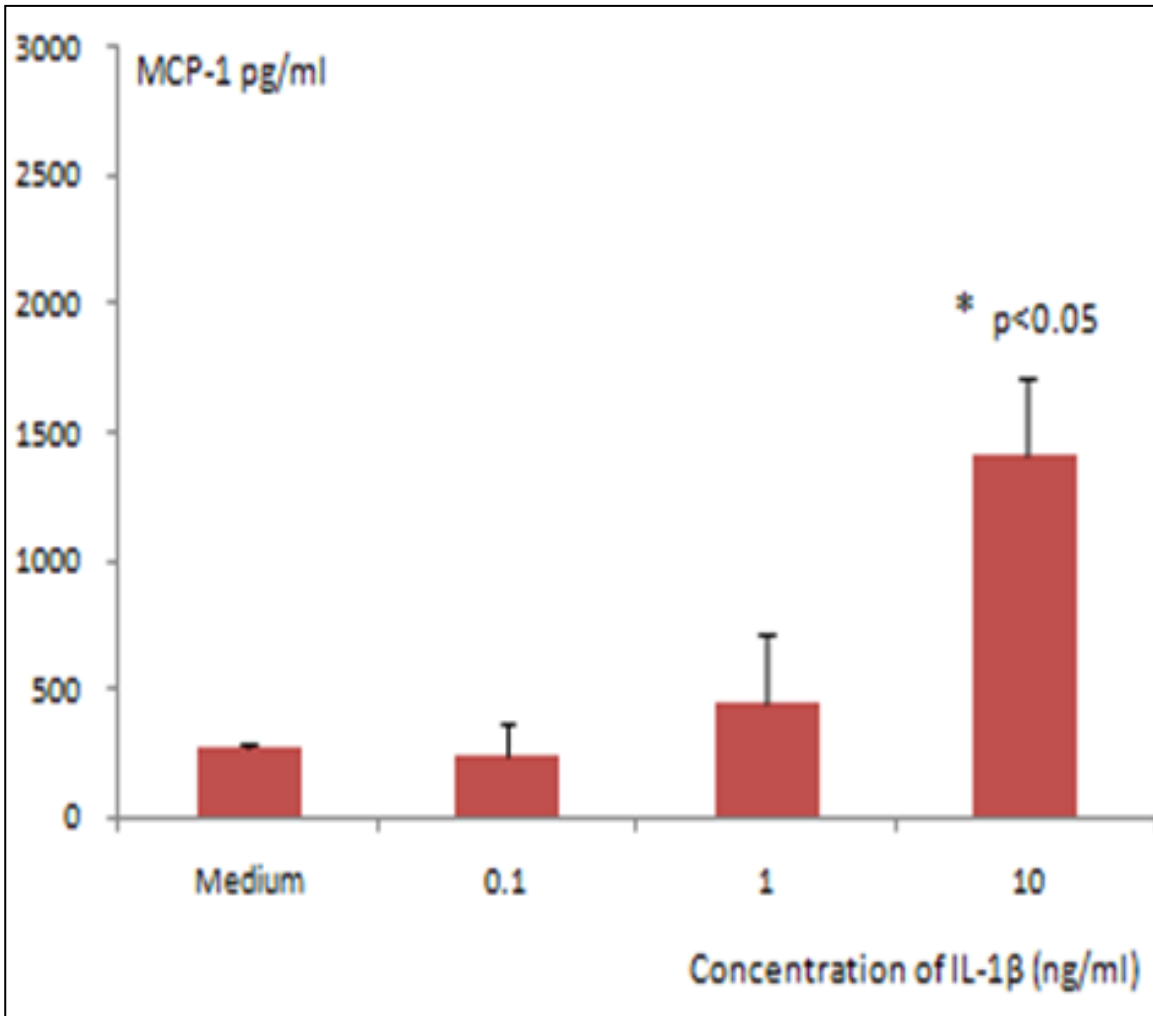


圖 15. 以不同的 IL-1 β 濃度(0.1~10 ng/ml)去刺激鼻腔表皮細胞，相對於未加 IL-1 β 者(Medium), MCP-1 的分泌，具顯著差異， $p < 0.05$ (N=9)。

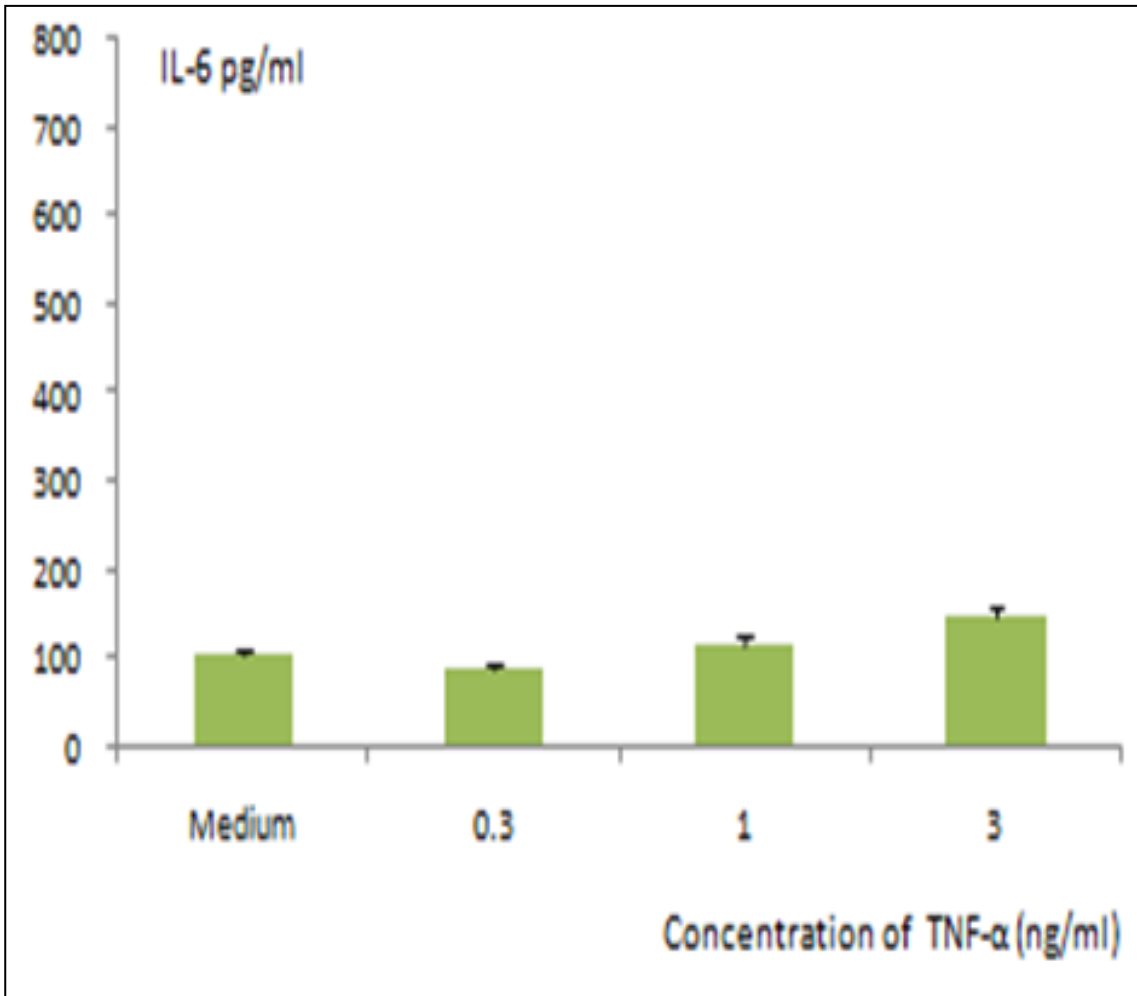


圖 16. 以不同的 TNF- α 濃度(0.3~3 ng/ml)去刺激鼻腔表皮細胞，相對於未加 TNF- α 者(Medium), IL-6 的分泌，無顯著差異(N=3)。

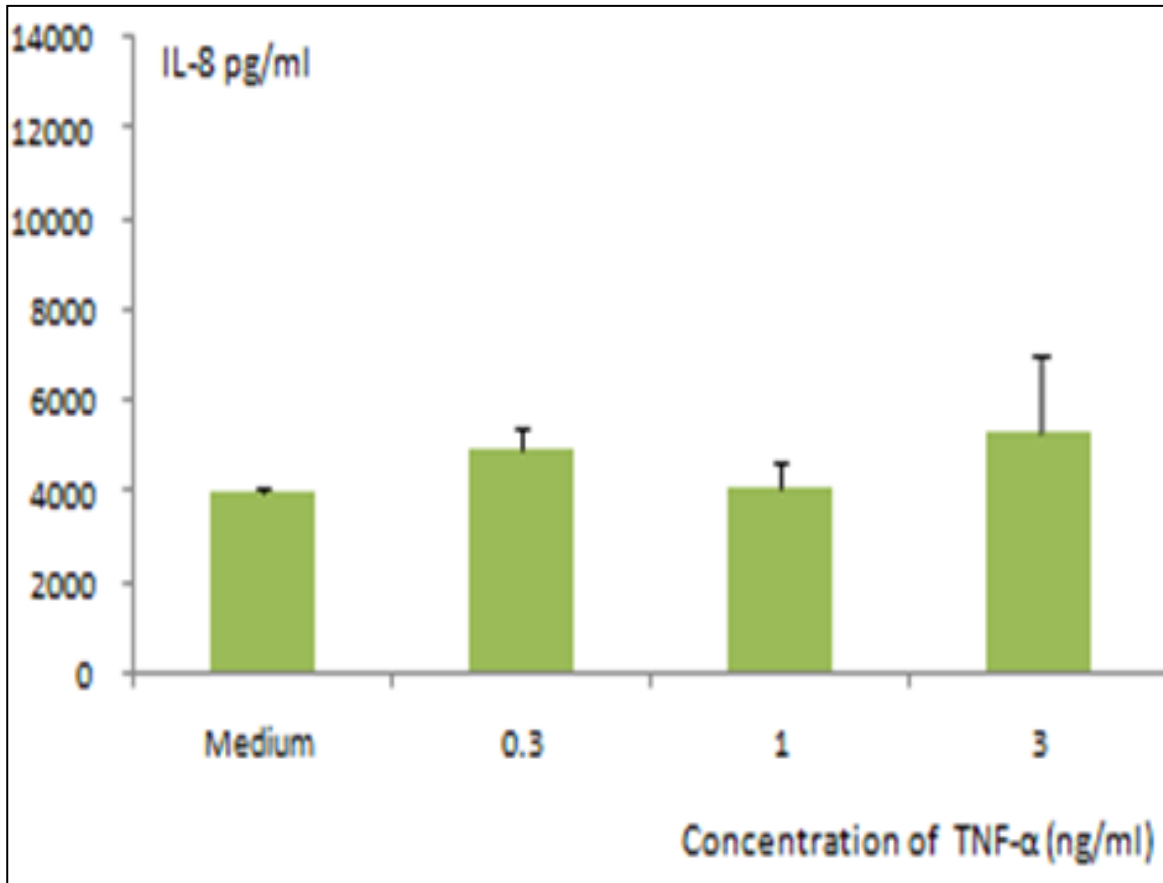


圖 17. 以不同的 TNF- α 濃度(0.3~3 ng/ml)去刺激鼻腔表皮細胞，相對於未加 TNF- α 者(Medium), IL-8 的分泌，無顯著差異(N=6)。

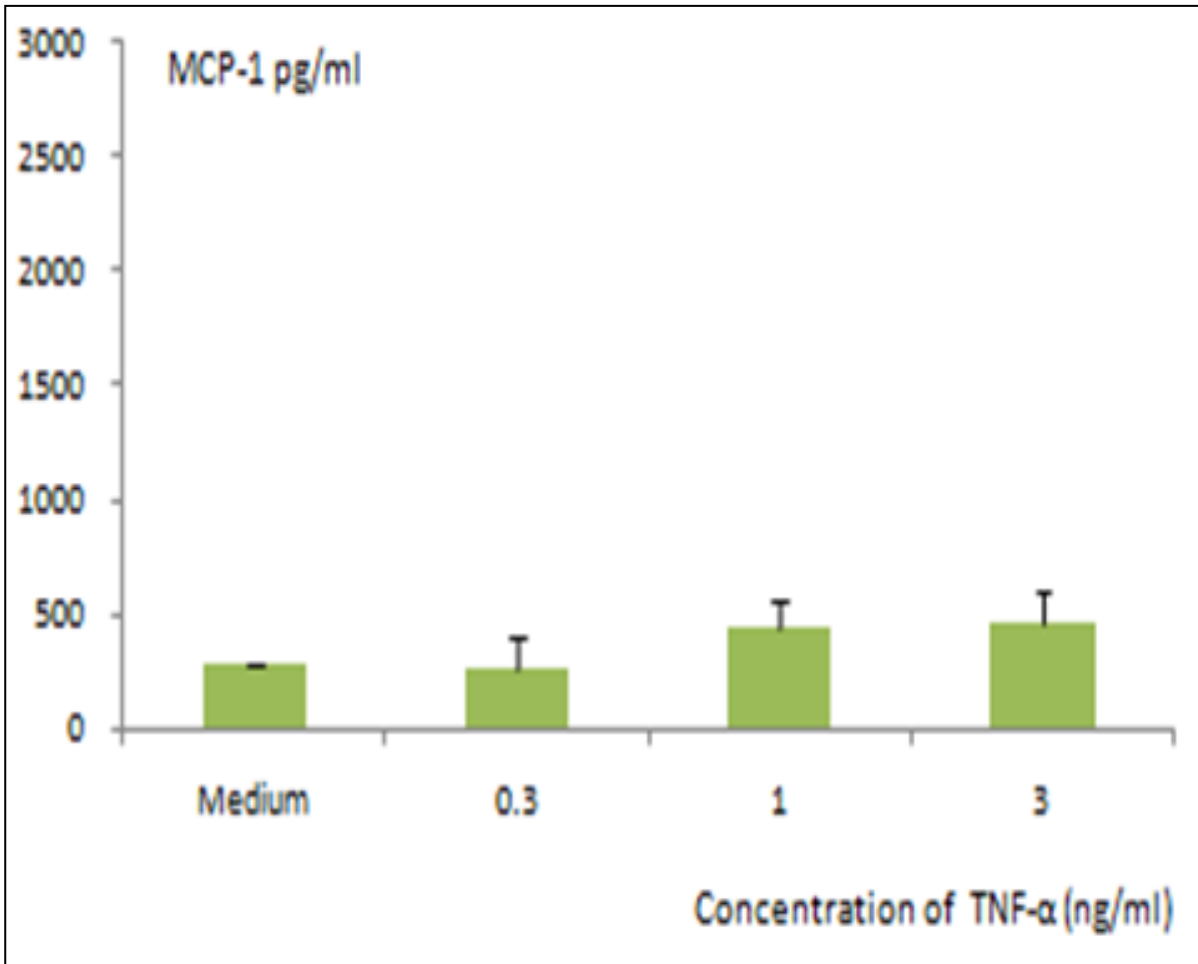


圖 18. 以不同的 TNF- α 濃度(0.3~3 ng/ml)去刺激鼻腔表皮細胞，相對於未加 TNF- α 者(Medium), MCP-1 的分泌，無顯著差異(N=7)。

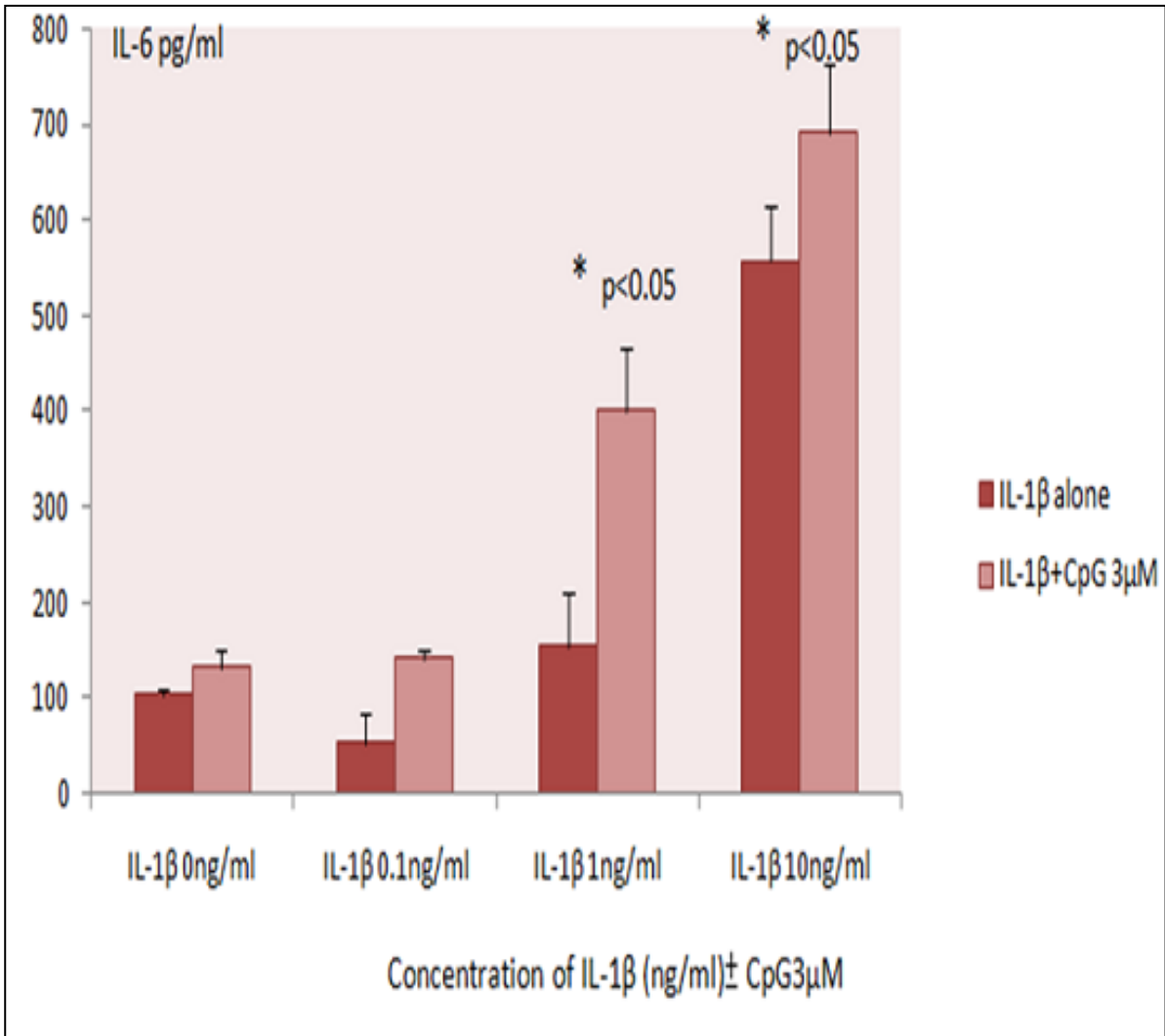


圖 19. 在 IL-1 β 的存在下，加以 CpG-ODN(3 μ M) 刺激鼻腔表皮細胞，相對於只有 IL-1 β 存在者，IL-6 的分泌呈顯著增加， $p < 0.05$ (N=5)。

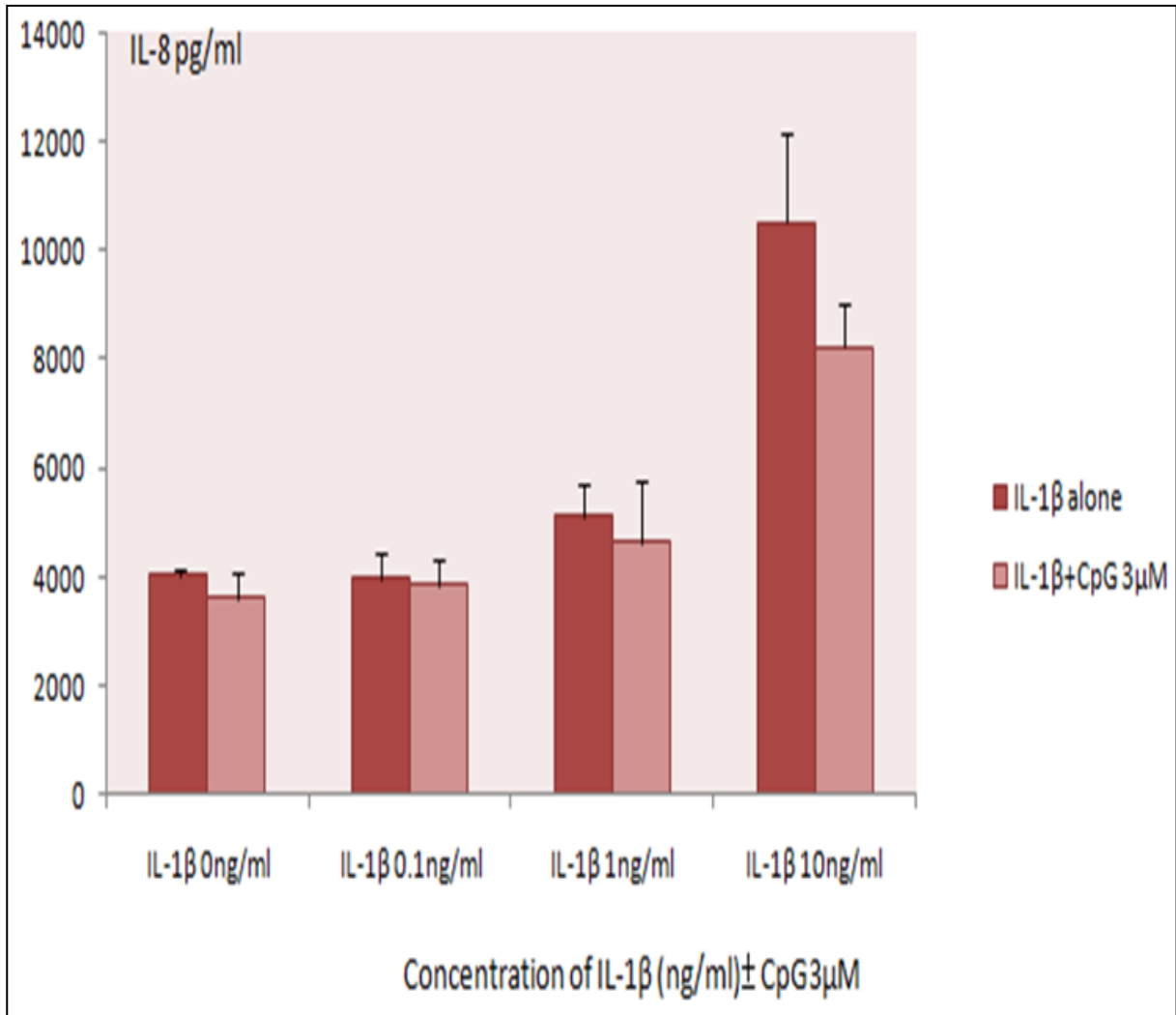


圖 20. 在 IL-1 β 的存在下，加以 CpG-ODN (3 μ M) 刺激鼻腔表皮細胞，相對於只有 IL-1 β 存在者，IL-8 的分泌未顯著增加 (N=10)。

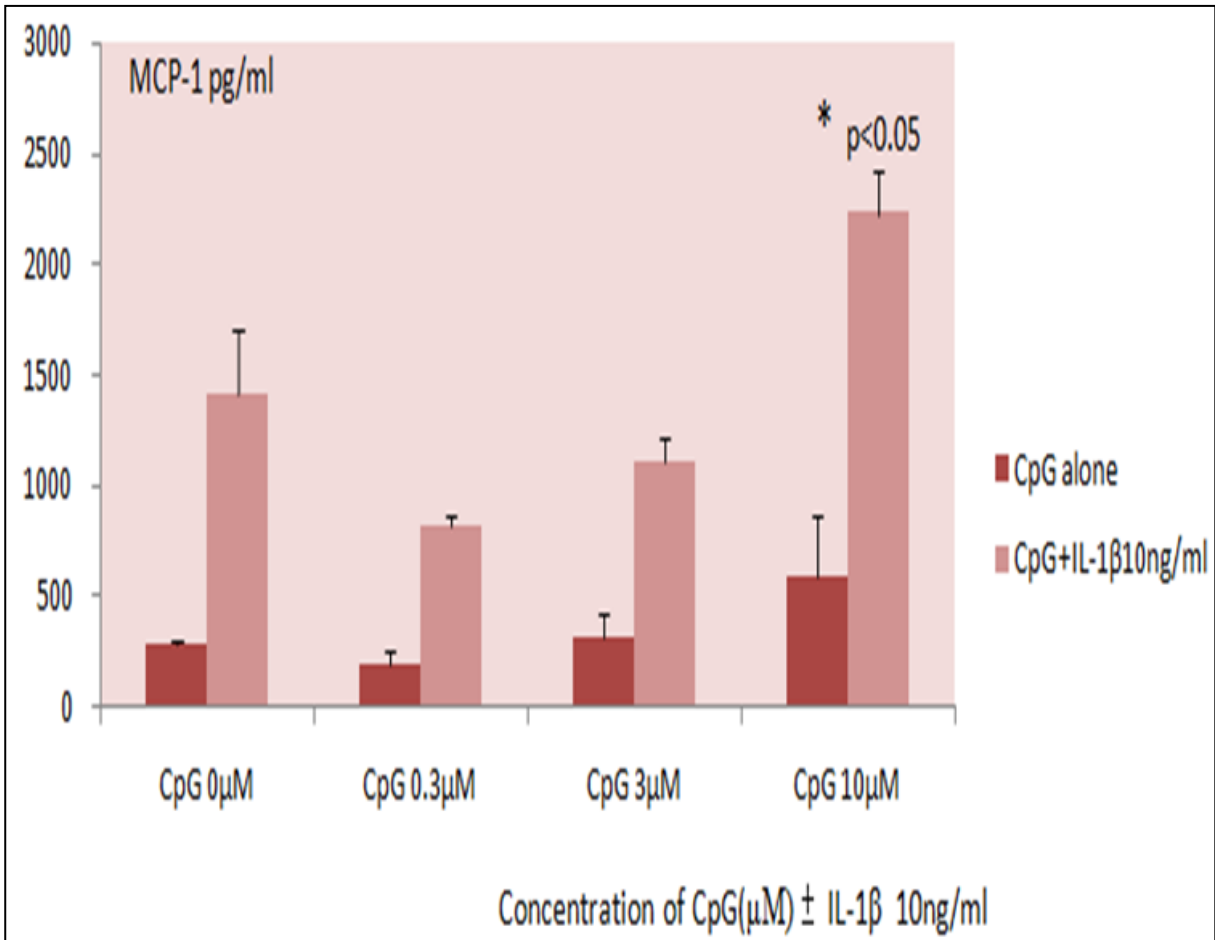


圖 21. 在 IL-1 β (10ng/ml) 的存在下，加以 CpG-ODN (0~10 μ M) 刺激鼻腔表皮細胞，相對於只有 CpG-ODN 存在者，MCP-1 的分泌具顯著增加， $p < 0.05$ (N=8)。

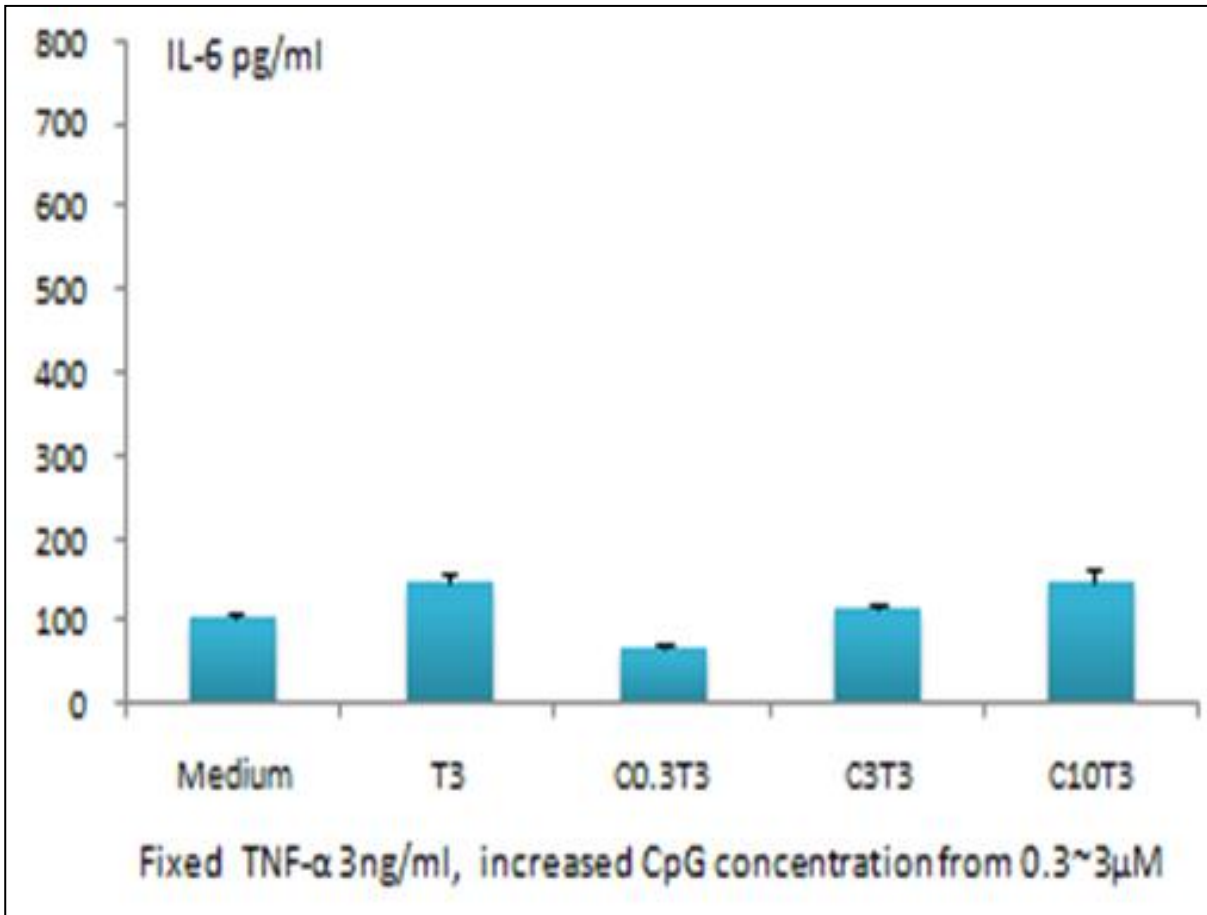


圖 22. 在 TNF- α (3ng/ml) 的存在下，加以 CpG-ODN (0.3~10 μ M) 刺激鼻腔表皮細胞，相對於只有 TNF- α (3ng/ml) 存在者，IL-6 的分泌未顯著增加 (N=3)。

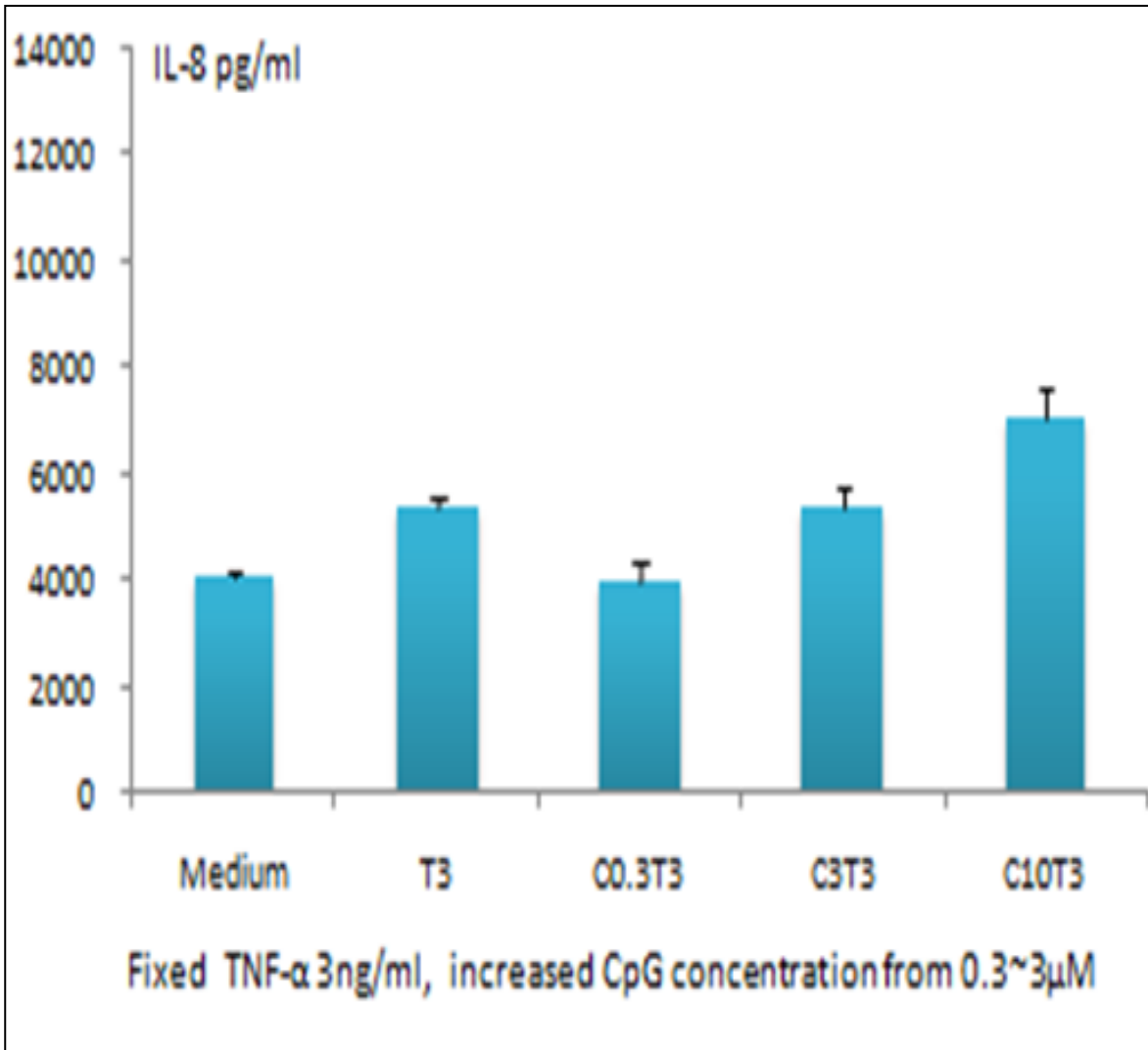


圖 23. 在 TNF- α (3ng/ml) 的存在下，加以 CpG-ODN (0.3~10 μ M) 刺激鼻腔表皮細胞，相對於只有 TNF- α (3ng/ml) 存在者，IL-8 的分泌未顯著增加 (N=4)。

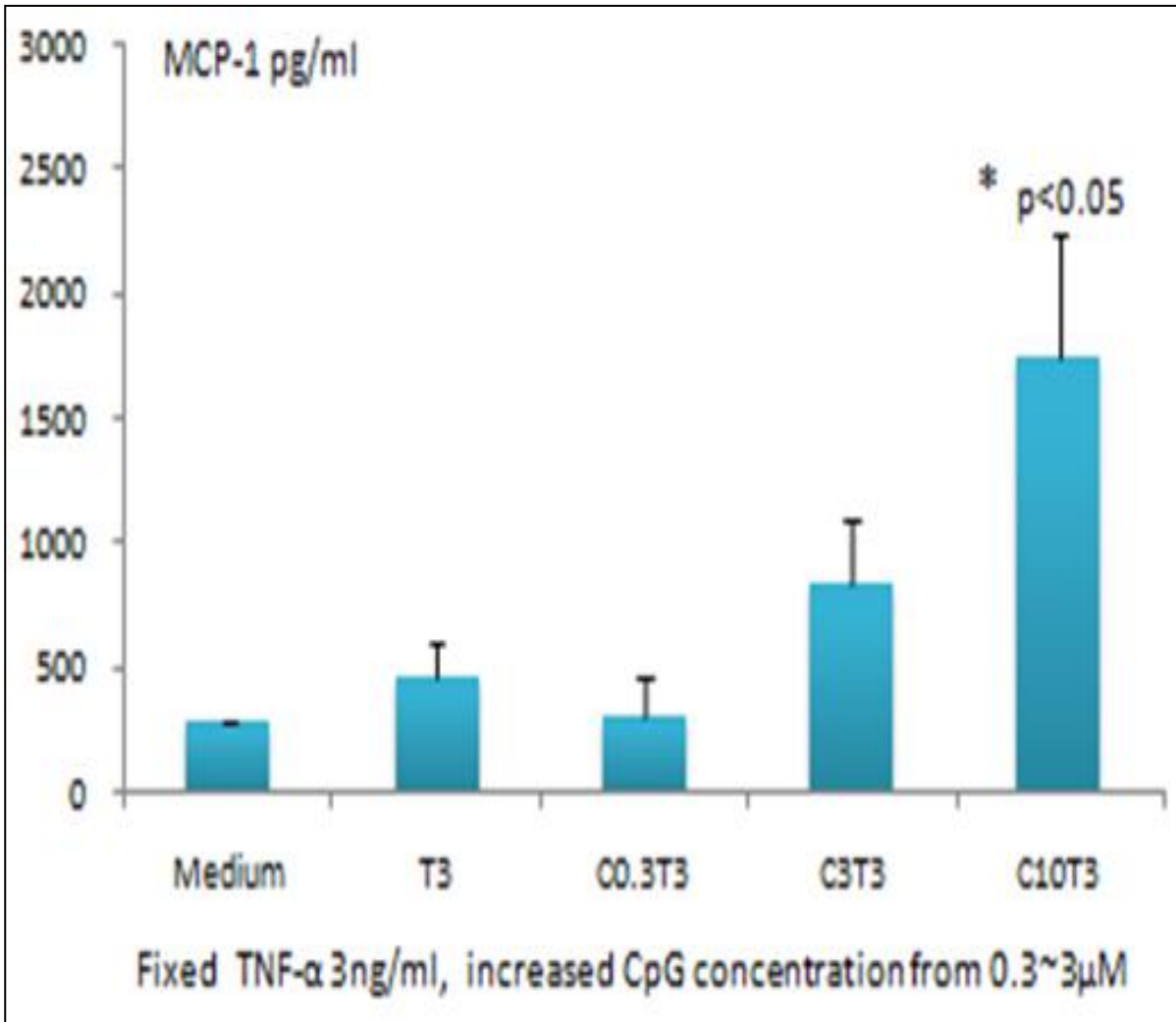


圖 24. 在 TNF- α (3ng/ml) 的存在下，加以 CpG-ODN (0.3~10 μ M) 刺激鼻腔表皮細胞，相對於只有 TNF- α (3ng/ml) 存在者，MCP-1 的分泌具顯著增加， $p < 0.05$ (N=4)。

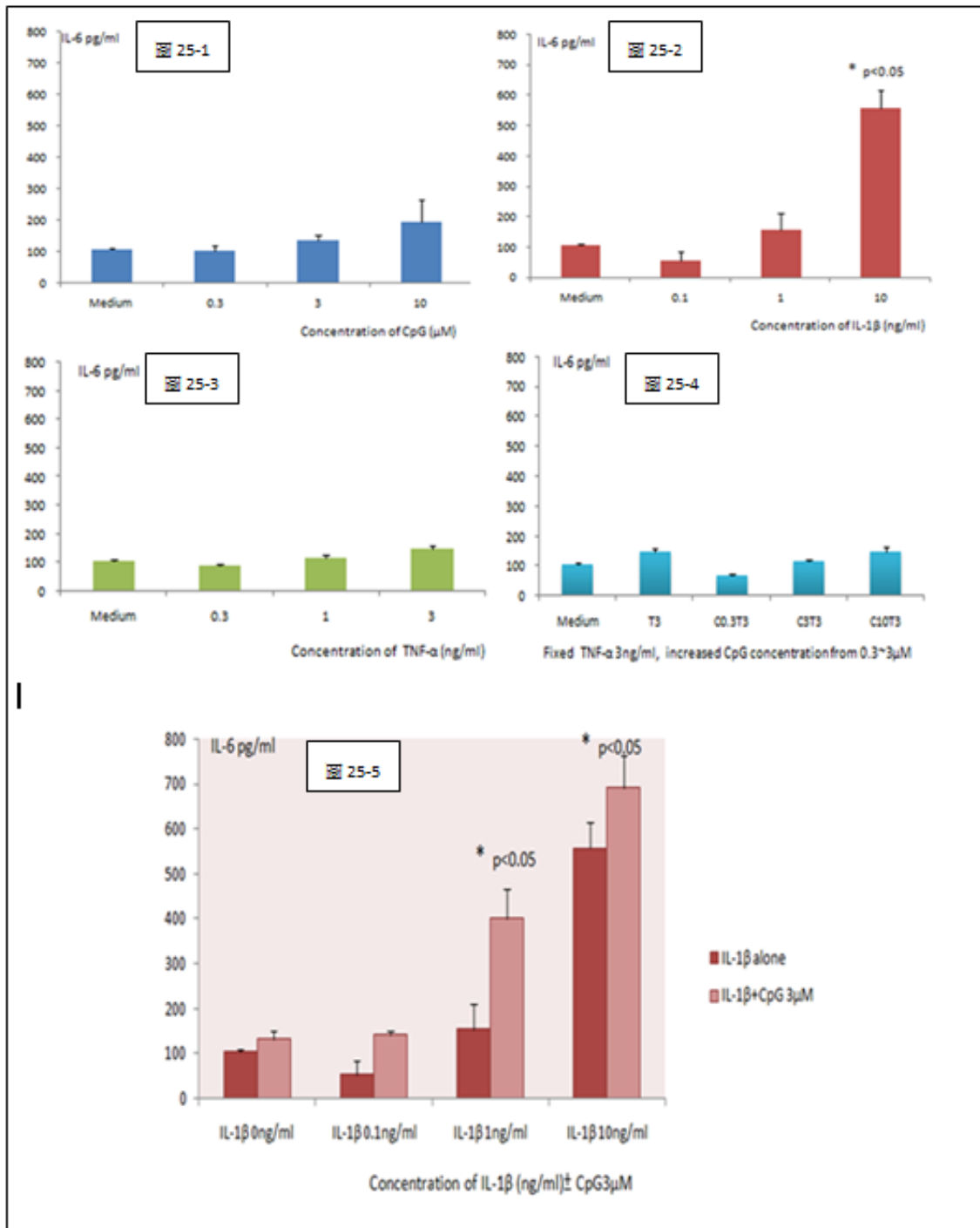


圖 25. 不同刺激狀況下，IL-6 的分泌。圖 25-1，以不同的 CpG-ODN 濃度去刺激鼻腔表皮細胞，IL-6 的分泌，無顯著差異。圖 25-2，以不同的 IL-1 β 濃度去刺激鼻腔表皮細胞，IL-6 的分泌，具顯著差異， $p < 0.05$ 。圖 25-3，以不同的 TNF- α 濃度去刺激鼻腔表皮細胞，IL-6 的分泌，無顯著差異。圖 25-4，在 TNF- α 的存在下，加 CpG-ODN 刺激鼻腔表皮細胞，IL-6 的分泌未顯著增加。圖 25-5，在 IL-1 β 的存在下，加 CpG-ODN 刺激鼻腔表皮細胞，IL-6 的分泌呈顯著增加， $p < 0.05$ 。

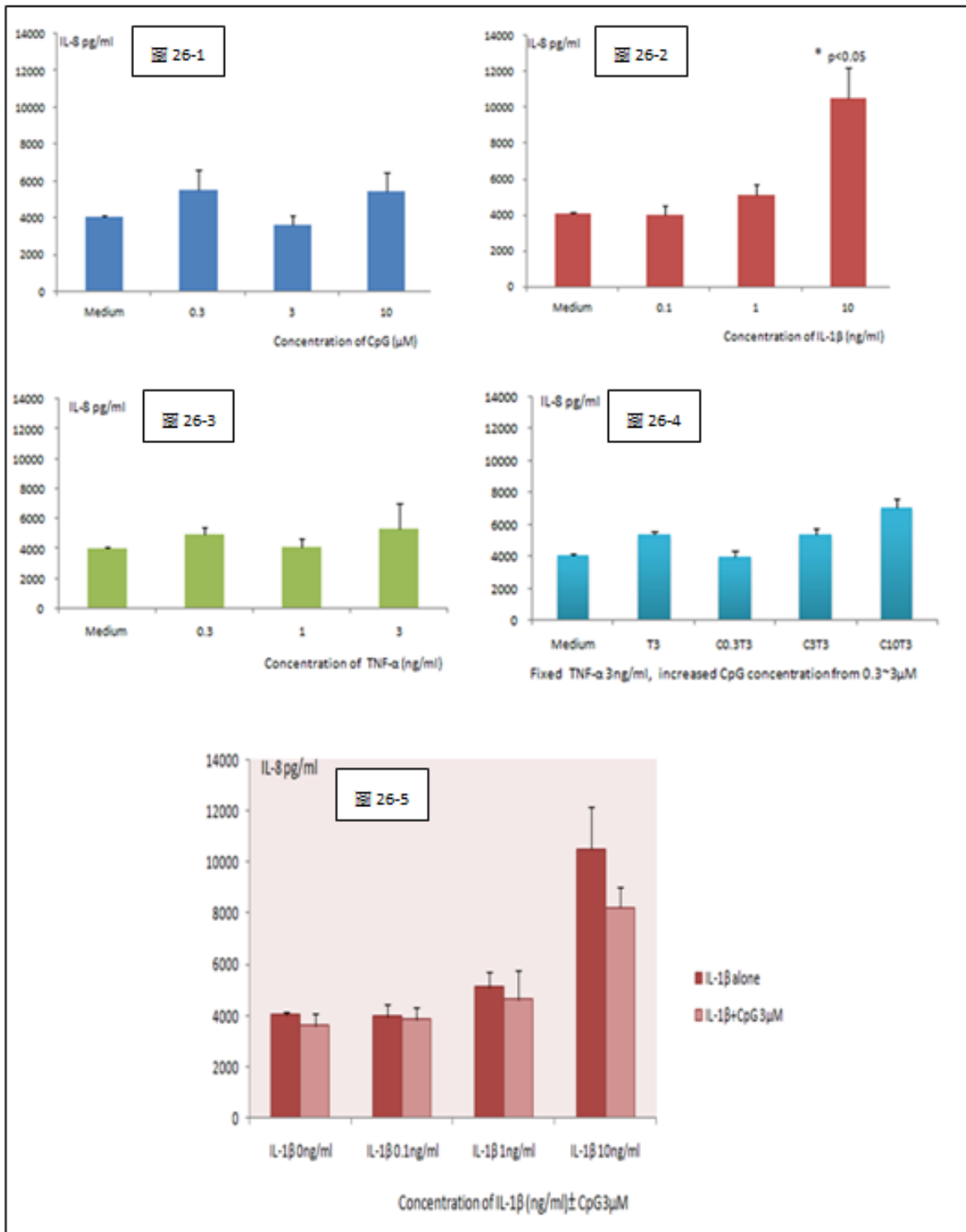


圖 26. 不同刺激狀況下，IL-8 的分泌。圖 26-1，以不同的 CpG-ODN 濃度去刺激鼻腔表皮細胞，IL-8 的分泌，無顯著差異。圖 26-2，以不同的 IL-1 β 濃度去刺激鼻腔表皮細胞，IL-8 的分泌，具顯著差異， $p < 0.05$ 。圖 26-3，以不同的 TNF- α 濃度去刺激鼻腔表皮細胞，IL-8 的分泌，無顯著差異。圖 26-4，在 TNF- α 的存在下，加 CpG-ODN 刺激鼻腔表皮細胞，IL-8 的分泌未顯著增加。圖 26-5，在 IL-1 β 的存在下，加 CpG-ODN 刺激鼻腔表皮細胞，IL-8 的分泌未顯著增加。

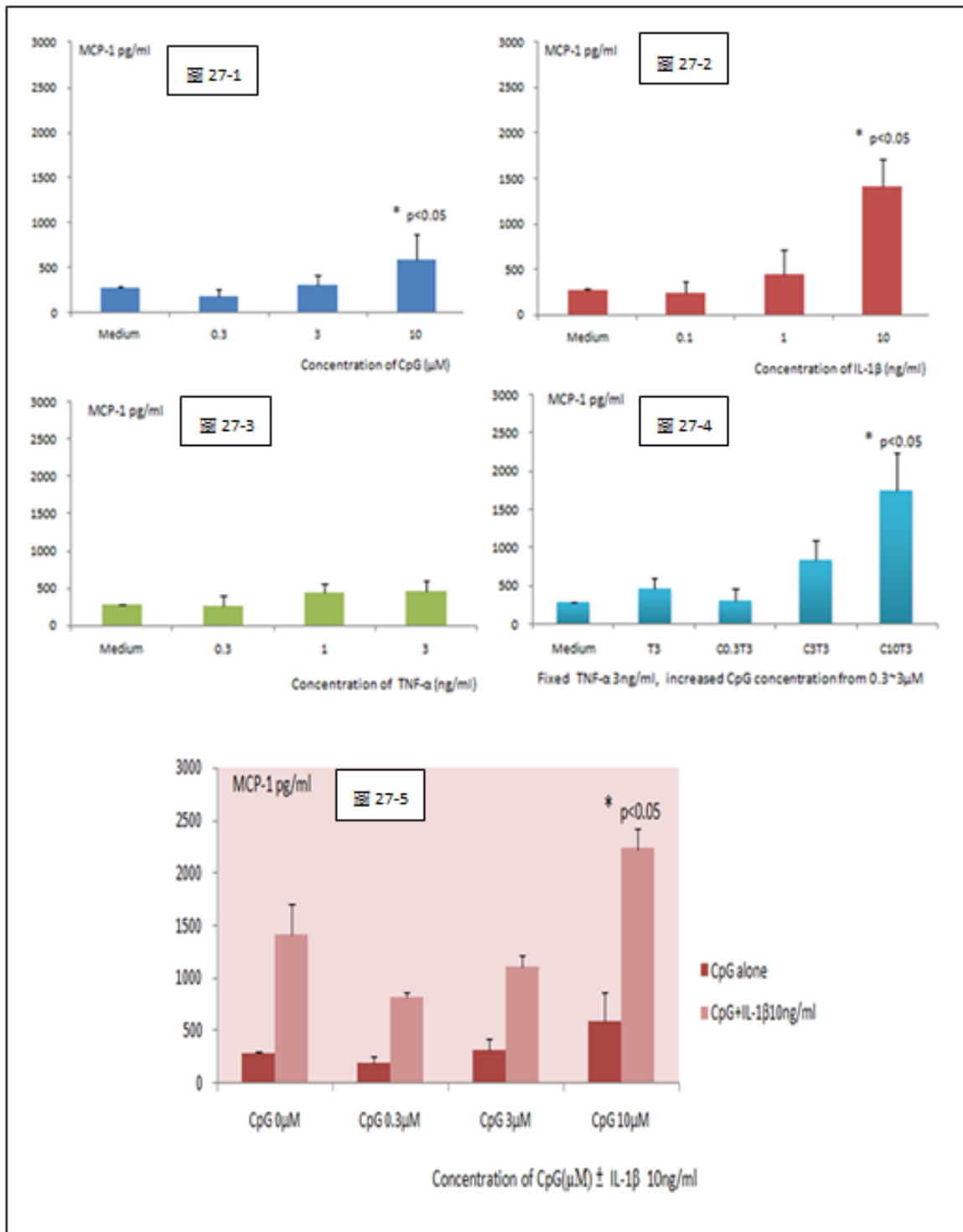


圖 27. 不同刺激狀況下，MCP-1 的分泌。圖 27-1，以不同的 CpG-ODN 濃度去刺激鼻腔表皮細胞，MCP-1 的分泌，具顯著差異， $p < 0.05$ 。圖 27-2，以不同的 IL-1 β 濃度去刺激鼻腔表皮細胞，MCP-1 的分泌，具顯著差異， $p < 0.05$ 。圖 27-3，以不同的 TNF- α 濃度去刺激鼻腔表皮細胞，MCP-1 的分泌，無顯著差異。圖 27-4，在 TNF- α 的存在下，加 CpG-ODN 刺激鼻腔表皮細胞，MCP-1 的分泌，具顯著差異， $p < 0.05$ 。圖 27-5，在 IL-1 β 的存在下，加 CpG-ODN 刺激鼻腔表皮細胞，MCP-1 的分泌，具顯著差異， $p < 0.05$ 。

Table 1, 各種刺激條件下, 細胞激素的分泌。

	CpG-ODN	IL-1 β	TNF- α	CpG+IL-1 β	CpG+TNF- α
IL-6	—	↑	—	↑↑	—
IL-8	—	↑	—	—	—
MCP-1	↑	↑	—	↑↑	↑↑

