

李青蓓<sup>1</sup> 莊銀清<sup>1,2</sup>

奇美醫學中心<sup>1</sup> 醫學研究部<sup>2</sup> 內科部

### 前 言

抗生素具有抑菌生長與殺菌功能，臨床上用於細菌感染病人的治療。但是，對於嚴重細菌感染病人經抗生素治療後，使用抗生素治療，仍有 20-50% 病人不治死亡。1975 年 Rusmin 等人指出，革蘭氏陰性菌體被分解後產生大量內毒素 (endotoxin)，細胞壁 (cell wall)，脂多醣體 (lipopolysaccharide, LPS) 等成分，造成宿主體內免疫發炎的啟動，並且導致敗毒性休克 (septic shock)，造成病人死亡率增加 [1]。另有文獻提出，抗生素若能兼具抗發炎療效與免疫調節功能 (immunomodulatory)，也許可降低臨床敗血症病人死亡率 [2]，因此探討抗生素抗發炎反應機制之重要性，更不可忽視。本文將以抗生素抗發炎反應相關研究，及如何選擇動物與細胞實驗模式作為抗生素抗發炎研究模式，行一系列探討與分析。

### 發炎反應之細胞激素表現

正常狀態下，人體之細胞激素會適量分泌。反之，當宿主被細菌感染時，活化巨嗜細胞，單核球 (monocyte) 與其他細胞，分泌前發炎性細胞激素，與分泌抗發炎性細胞激素，形成體內回饋機制，維持宿主免疫恆定 [3]。細菌性發炎反應之動物與細胞實驗模式，目前多以此二群激素量的增減，評估抗生素發炎反應與免疫調節的療效。

屬於前發炎性細胞激素 (proinflammatory cytokine) 的介白素 1 (interleukin 1, IL-1) 與腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor, TNF)，在發炎反應時期刺激巨嗜細胞或組織單核球大量表現，並啟動下游的細胞激素表現 [4]。再者，巨嗜細胞亦會產生大量一氧化氮 (nitric oxide, NO)。NO 有殺菌功能，但對細胞具有毒性，造成組織細胞的損傷。因此，可作為嚴重發炎相關指標 [5]。

介白素 6 (interleukin 6, IL-6)、介白素 1 接受器結抗劑 (IL-1 receptor antagonist, IL-1ra)、可溶性的 TNF 接受器與介白素 10 (IL-10)，屬於抗發炎性激素 (anti-inflammatory cytokine)。IL-6 是一種廣效性細胞激素，功能包括有免疫調節、調節急性發炎反應與促進血球生成等。研究指出，IL-6 可抑制大量的 TNF 與 IL-1 $\beta$  表現，另外 IL-6 可放大 TNF receptor 表現，抑制 TNF 產生，目前 IL-6 目前被歸類為抗發炎性細胞激素 [6]。

### 抗生素抗發炎之相關研究

文獻指出，取人體週邊血液單核球細胞 (peripheral blood mononuclear cells)，以脂多醣體 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激單核球，再添加 fosfomycin (FOM) 與 clarithromycin (CAM) 處理，結果顯示，FOM 與 CAM 皆會抑制 IL-1 與 TNF 表現，並且 FOM 會放大 IL-6 與 IL-10 表現，CAM 僅只放大 IL-10 表現，作者推測，此二抗生素皆具有抗發炎功效 [3]。

不同抗生素在人類單核球與淋巴球實驗模式中，可增強或抑制細胞激素表現 (表一)。文獻指出當人類單核球與淋巴球受刺激後，加入 ampicillin/sulbactam 與 cefamandole，會誘導 IFN- $\gamma$  產生，此外 clindamycin 則會誘導 TNF 與 IL-6 釋放。此外，lincomycin 誘導 IL-4 表現。teicoplanin 引發 TNF，IL-1 $\beta$  及 IL-6 細胞 激素表現。endotoxin 處理人類全血，加入 teicoplanin 反應，結果造成 IL-8，TNF 與 IL-1 $\beta$  表現量會降低。E. coli 或 Staphylococcus aureus 感染細胞後，經 cephalosporin 處理，組織胺表現量會增加。反之，IL-6 與 TNF 表現量減少。erythromycin 與 roxithromycin 可抑制 TNF 釋放，但 ofloxacin，penicillin G，minocycline 與 josamycin 則無法抑制 TNF 表現。cefodizime 在人類支氣管上皮細胞(human bronchial epithelial cells)，會增加 GM-CSF 釋放，但不影響 IL-8 的產生。ceftriaxone 與 ceftazidime 在人類單核球細胞模式中，沒有任何細胞激素產生受到 影響。cefodizime 降低 TNF 與 IL-6 表現，刺激 IL-8 釋放。LPS 刺激單核球再以 vancomycin 處理，TNF 表現量下降。以 cefotaxime 處理 24 小時後，IL-1~90 與 IL-8 則 顯著上升。低濃度 cefotaxime 可降低 LPS 刺激產生的 IL-8 表現，反之 fleroxacin 可 增幅 IL-8 的產生[7]。

動物實驗模式中，注射過量內毒素於小鼠體內，再給予 macrolide 類抗生素 治療，不僅 TNF 量降低，且小鼠存活率增加[8]。IL-10 具有抑制 TNF，IL-1，IL-6， IL-8 的產生，具有調節發炎反應之功能。文獻指出，以致死劑量的內毒素注射小 鼠，再給予 IL-10，小鼠存活率增加[9]。

## 體內與體外研究模式之策略分析

### 一、細胞培養(cell culture)

細胞培養可分為兩種，即體外細胞株培養(in vitro)與活體細胞培養(ex vivo) 兩種。體外細胞株培養模式主要是短時間研究方法，不僅對於抗生素在細胞的免 疫調節作用的了解，更對抗生素在不同組織器官是否有與不同作用機轉與角色做 深入探討。再者，亦可比較不同抗生素抗發炎作用，與其他相關基因與蛋白質分 子之分析等。但基於細胞培養時間長短限制之虞，無法更進一步檢測抗生長時 間治療後之免疫調節變化。針對發炎反應相關研究中，實驗細胞株(cell lines)多 以巨嗜細胞(macrophage)為主，其功能與特徵，詳列於 表二。目前最常見的細胞 株，為 RAW264.7，來自 BALB/c 品系小鼠腹部抽取之巨嗜細胞，可產生 IL-1， IL-6， TNF- $\alpha$  TNF- $\gamma$ ，NO，CP-10，PGE2 等細胞激素與化學激素(chemokines)， 並具有吞噬能力(phagocytosis)[10]。

活體細胞培養歸屬長時間研究的方法。此模式除了可應在抗生素抗細菌性發 炎免疫機制分析之外。再者，活體細胞較細胞株培養時間更長，較無時間長短限 制，可更深入探討長程免疫反應調節回饋機制之變化。此外，細胞來源於動物或 人類活體本身取出後直接培養，細胞仍保有原有的生理本質，趨近人體免疫。前 文獻指出，就抗生素免疫調節相關之研究而言，目前較常使用活體細胞株培養作 為研究模式。

細胞培養研究模式優勢在一種檢體可做數種分析，取得實驗數據容易；再 者，細胞僅單一型態，實驗環境單純，減低複雜性免疫反應與生理變異。因此數 據誤差減低且容易分析。其次，選定適當細胞種類進行研究，有利了解抗生素在 多組織器官之抗發炎免疫機制[11]。此外，細胞培養不僅可作為動物實驗前之模 擬實驗，且基於人道考量，更可減少實驗動物使用量。

相對的，本模式之缺點在於，僅止了解局部性免疫反應，無法探索全身免疫反應之變化；再者，不同來源的細胞，有物種(species)間免疫性，健康與生病個體之不同，造成細胞代謝活性與細胞對藥物攝取量與體內累積量不同的顧慮。總之，要以細胞培養作為實驗模式，須依照研究目的，慎選所需研究模式，以利實驗進行與結果分析[12]。

## 二、體內動物實驗(animal models or In vivo)

動物實驗之研究目的，最主要在依動物存活率可直接評估抗生素之療效。進一步，可了解藥物的免疫調節功能。最趨近人體免疫之實驗模式是動物實驗模式最大優點，因此有關醫藥上抗生素的使用，最終會以動物實驗結果作為參考範疇。但本模式之缺點在於，動物個體間的變化及其免疫複雜性，生理與病理結果有變異性，不易控制；再者，因無法單獨分析抗生素抗發炎機制，若為了有效了解抗生素抗發炎之化學路徑(chemical pathways)及免疫機制，目前實驗模式仍以細胞模式為主軸[11]。

## 三、臨床研究(clinical study)

臨床研究方面，主要優勢在於，可依病人療程變化，評估抗生素免疫調節療效。臨床病人作為研究模式，因個體變異性更大，分析更不易。如：給予抗生素治療後，偵測病人體內血清細胞激素表現，會因為病人體內許多其他因子，影響細胞激素量表現，導致更大的變異，因此臨床上相關性參數之建立，較為罕見。其他缺點，與動物模式相同，皆須考慮個體間差異之問題。如何選擇所需的實驗模式，可參考抗生素抗發炎效應研究模式圖(圖一)。

## 結語

目前多數抗生素治療多侷限於細菌感染，鮮少提出其他功能，因此無法充分發揮藥物最大用途。探討抗生素抗發炎與相關免疫機制之研究，以巨環內酯(macrolides)類抗生素研究較為透徹，目前已被證實具抗發炎療效。現今，仍有大多數的抗生素免疫調節(immunomodulatory)機制尚未清楚，慎選擇實驗模式對於深入探討相關研究，有極大的助益。抗生素用藥機制的研究與動物與臨床療效的證實，亦可作臨床舊藥新用的參考。

表一 抗生素對細胞激素誘導釋放之效應

Antibiotic	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	IL-1	IL-4	IL-6	IL-8	GM-CSF
Ampicillin/Sulbactam	↑						
Cefamandole	↑						
Clindamycin		↑			↑		
Cefodizime		↓			↓	↑ 0	↑
Ceftriaxone		0			0	0	0
Cefotaxime			↑			↑ ↓	
Erythromycin		↓					
Fleroxacin						↑	
Josamycin		0					
Lincomycin				↑			
Minocycline		0					
Ofloxacin		0					
Pencillin G		0					
Roxithromycin		↓					
Teicoplanin		↑ ↓	↑ ↓		↑	↓	
Vancomycin		↓					

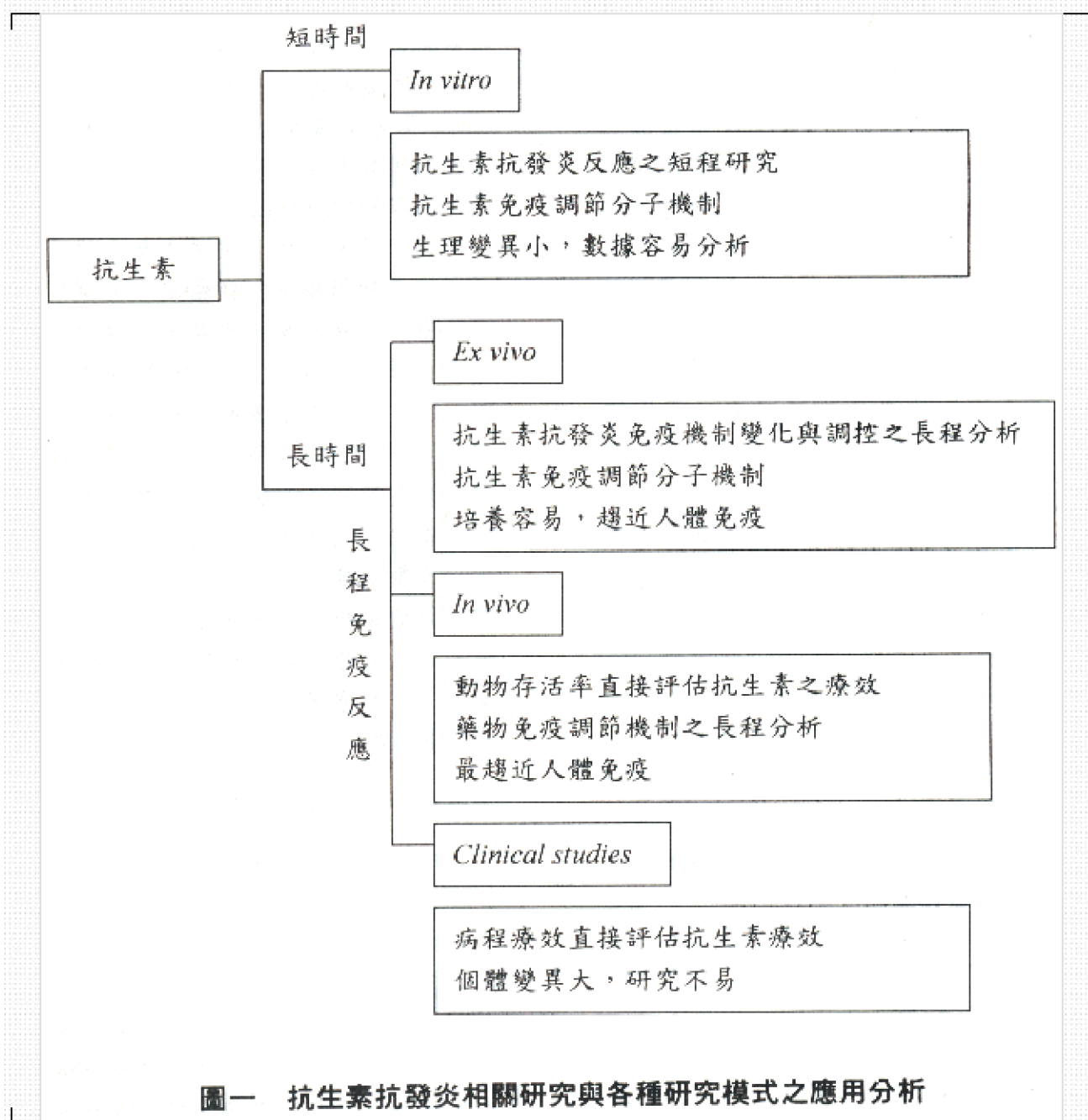
↑ 表現量上升，↓ 表現量下降，0 表現量不變

摘自：J Chemother 2001;13:159-72.

表二 單核球與巨嗜細胞株之功能與特徵

cell line	cytokines and chemokines	phagocytosis and antitumor activity	growth factors and Protease
IC021	IL-1, TNF $\alpha$ , PGE2, PAF, NO	Phagocytic, tumoricidal	VEGF, TGF $\beta$
J774A.1	IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , TNF $\gamma$ , NO, PGD2, C3	Phagocytic, tumoricidal	PDGD, HEP-I, HEP-II
M1	IL-1, TNF $\alpha$	Phagocytic (Inducible), nontumoricidae	
MH-S	IL-1, TNF $\alpha$	Phagocytic	MMP-13
RAW264.7	IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , TNF $\gamma$ , NO, CP-10, PGE2, NO	Phagocytic	VEGF, uPA, MMP-9
WEHI-3	IL-1, IL-3, IL-6, TNF $\alpha$ , NO	-	-
WEHI-274.1	IL-3	Phagocytic	-
WEHI-265	CP-10, MPIF		

摘自：Arthritis Rheum 2000;41:1779-89.



### 參考文獻

1. Rusmin S, DeLuca PP: Effect of antibiotics and osmotic change on the release of endotoxin by bacteria retained on intravenous inline filters. *Am J Hosp Pharm* 1975;32:378-80.
2. Frieling JT, Mulder JA, Hendriks T, et al: Differential induction of pro- and anti-inflammatory cytokines in whole blood by bacteria: effects of antibiotic treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1439-43.
3. Morikawa K, Watabe H, Araake M, et al: Modulatory effect of antibiotics on cytokine production by human monocytes in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1366-70.
4. Klein B, Brailly H: Cytokine-binding proteins: stimulating antagonists. *Immunol* 1995;16:216-20.

5. Chiou WF, Chou CJ, Ko HC, et al: Effects of six anti-inflammatory Chinese herbs on LPS/IFN  $\gamma$  : induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. *J Chin Med* 2000;11:87-94.
6. Tilg H, Trehu MB, Atkins CA, et al: Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor P55. *Blood* 1994;83:113-8.
7. Holzheimer RG: Antibiotic induced endotoxin release and clinical sepsis: a review. *J Chemother* 2001;13:159-72.
8. Ianaro A, Ialenti A, Maffia P, et al: Anti-inflammatory activity of macrolide antibiotics. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;292:156-63.
9. Howard M, Muchamuel S, Andrade S, et al: Interleukin-10 (IL-10) protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med* 1993;177:1205-8.
10. Yagnik DR, Hillyer P, Marshall D, et al: Noninflammatory phagocytosis of monosodium urate monohydrate crystals by mouse macrophages. *Arthritis Rheum* 2000;43:1779-89.
11. Salyers AA, Whitt DD: *Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach*. 2nd ed. 2002;24-30.
12. Labro MT: Anti-inflammatory activity of macrolides: a new therapeutic potential? *J Antimicrob Chemother* 1998;41:37-46.