

中山醫學院毒理學研究所碩士論文

Master Thesis, Institute of Toxicology,
Chung Shan Medical and Dental College

指導教授：吳文俊 博士 (Wen-Jun Wu, Ph. D.)

在老鼠模式中急性酒精暴露 對脾臟自然殺手細胞的影響

Effect of ethanol on splenic natural killer cells
in a mouse model for binge drinking

研究生：方韶瓏 撰
(Chao-Lung Fang)

中華民國八十九年七月



目錄

中文摘要

英文摘要

第一章 緒論

第一節 酒精	1
第二節 自然殺手細胞	3
第三節 急性酒精對自然殺手細胞的影響	5
第四節 糖皮質素與細胞凋亡	6
第五節 急性酒精中毒的老鼠模式	9
第六節 動物品種	10
第七節 研究動機	11

第二章 實驗方法

第一節 實驗動物	12
第二節 自然殺手細胞的製備	
一、脾臟細胞	12
二、骨髓細胞	13
三、周邊血液細胞	13
四、腹腔細胞	13
第三節 自然殺手細胞之純化	14
第四節 自然殺手細胞活性之分析	14
第五節 流式細胞儀分析自然殺手細胞數目	15
第六節 Annexin V 分析細胞凋亡	16
第七節 7-amino-actinomycin D 分析細胞凋亡	16

第八節 蛋白質樣品製備及定量分析	
一、蛋白質樣品製備	17
二、蛋白質定量分析	17
第九節 西方墨點法 (Western Blot)	
一、SDS PAGE 的製備	18
二、SDS PAGE 之電泳操作及轉漬	18
第十節 Caspase-3/ CPP32 活性分析	20
第十一節 結果分析	20
第三章 實驗結果	
第一節 急性酒精對老鼠脾臟細胞數目的影響	21
第二節 急性酒精對老鼠脾臟細胞發生細胞凋亡的影響	22
第三節 急性酒精對各組織中自然殺手細胞數目及活性的影響	23
第四節 急性酒精對老鼠脾臟自然殺手細胞發生細胞凋亡的影響	25
第五節 Caspase-3 在急性酒精誘導自然殺手細胞發生細胞凋亡之角色	28
第六節 Bax 在急性酒精誘導脾臟自然殺手細胞發生細胞凋亡之角色	31
第七節 Bcl-2 在急性酒精誘導脾臟自然殺手細胞發生細胞凋亡之角色	32
第四章 討論	33
第五章 參考文獻	39
附錄	
附表一、急性酒精中毒對神經系統的影響	67
附圖一、脾臟之自然殺細胞經純化後的百分比	68
附圖二、以 7-AAD 分析脾臟自然殺手細胞發生細胞凋亡及細胞壞死的	

圖與表

表一、酒精對各組織中自然殺手細胞數目的影響	55
表二、酒精對各組織中自然殺手細胞活性的影響	56
圖一、酒精在不同時間下對脾臟細胞數目的影響	57
圖二、酒精在不同時間下對脾臟細胞發生細胞凋亡的影響	58
圖三、酒精對脾臟自然殺手細胞發生細胞凋亡的影響	59
圖四、酒精對脾臟自然殺手細胞發生壞死的影響	60
圖五、酒精對脾臟自然殺手細胞之 caspase-3 活性的影響	61
圖六 RU486 對酒精誘發脾臟自然殺手細胞之 caspase-3 活性的影響	62
圖七、酒精對脾臟自然殺手細胞內 Bax 蛋白表現的影響	63
圖八、圖七之 Bax 蛋白經量化後的結果	64
圖九、酒精對脾臟自然殺手細胞內 Bcl-2 蛋白表現的影響	65
圖十、圖九之 Bcl-2 蛋白經量化後的結果	66

中文摘要

先前已有報導指出酒精具有抑制免疫反應的作用，因而顯著增加人類對於感染疾病及癌症的發生率。酒精在免疫系統的慢性影響已被廣泛的研究，但卻少有研究在急性酒精曝露的影響上，而且急性飲酒的習慣比慢性酒精中毒者更為普遍。對急性酒精中毒或是慢性酒精中毒者來說，酒精會損害先天性及後天性免疫反應，其中自然殺手細胞是人類先天性免疫系統中最重要的作用細胞。本研究以 B6C3F1 母鼠為實驗動物，32% (6.0 g/kg) 的酒精劑量為實驗劑量，測試在急性酒精曝露下，對脾臟自然殺手細胞數目的影響。結果發現酒精會脾臟誘導自然殺手細胞的凋亡因而造成自然殺手細胞數目的降低，並不是因為酒精誘導分泌的糖皮質素所造成自然殺手細胞的重新分配於各組織中。因為各組織中的自然殺手細胞數都顯著地降低。另外也使用 RU486 (糖皮質素的拮抗劑) 來探討糖皮質素在誘導脾臟自然殺手細胞發生細胞凋亡所扮演的角色，結果顯示 RU486 並不能完全抑制酒精所誘導之自然殺手細胞發生細胞凋亡。是故應有其他的機理涉及酒精誘導脾臟自然殺手細胞發生細胞凋亡。另有實驗評估 caspase-3、Bax 及 Bcl-2 在酒精誘導脾臟之自然殺手細胞發生細胞凋亡所扮演的 caspase-3 的活性，然而 Bax 及 Bcl-2 的角色。研究結果顯示酒精會活化蛋白表現量則不受酒精影響。

英文摘要 Abstract

Previous studies have shown that mouse splenic natural killer (NK) cell activity is decreased after a single dose of ethanol (EtOH) by gavage. Also, the percentage of splenic NK cells is decreased in EtOH-treated mice. This study focused on the fate of the missing splenic NK cells. EtOH can produce a stress response characterized by activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Glucocorticoids are known to alter lymphocyte trafficking, and it is possible that NK cell numbers in the blood or sites other than the spleen may increase following EtOH administration. However, the results showed that EtOH not only decreased splenic NK cells but also decreased NK cells derived from peripheral blood, bone marrow and peritoneal cavity. These results suggest that the decreased splenic NK cells in EtOH-treated mice are not caused by migration of splenic NK cells to the other sites tested here. The missing splenic NK cells probably die from glucocorticoid-induced apoptosis as a result of an EtOH-induced stress response. Administration of RU 486 (glucocorticoid antagonist) partially prevented the apoptosis of splenic NK cells induced by EtOH. Also, RU 486 only partially blocked the caspase-3 activity of splenic NK cells activated by EtOH. However, Bcl-2 and Bax protein expression in splenic NK cells were not significantly altered by EtOH.

Collectively, a single dose of EtOH can globally decrease NK cell population. The decreased splenic NK cells can be explained by apoptosis induced by EtOH. The glucocorticoids play a role in the apoptotic splenic NK cells induced by EtOH. Finally, these results suggest that EtOH-induced apoptosis of splenic NK cells is regulated by caspase-3 activity but not by Bcl-2 and Bax activity.

第一章 緒論

第一節 酒精 (Ethanol)

酒精 (Ethanol) 會降低大腦的抑制能力和判斷力 (附表一), 令飲者高估自己的能力, 導致危險駕駛及其他不智之舉。當血液中酒精濃度達 30 mg/100 ml, 發生交通意外事故的機會大為增加 (1)。酒醉即急性酒精中毒, 而酒的濃度、飲用的份量、是否空腹飲用、飲者體重及本身肝臟的功能, 都能決定酒精對身體的影響 (2)。當血中的酒精濃度逐漸升高時, 腦神經系統的各种機能也隨之受到抑制而降低, 使得視覺、痛覺、味覺、嗅覺的感覺漸漸麻痺, 若甚而影響到運動機能失調, 出現走路顛簸的現象時, 即已進入急性酒精中毒的狀態了。再者急性酒精中毒時, 最嚴重時會因腦幹機能的抑制導致呼吸系統麻痺而死亡 (3)。

在過去的研究顯示酒精具有抑制免疫反應的作用, 進而顯著增加人類感染疾病及罹患癌症的機會 (4-5)。也有一些學者發現, 酒精會幫助癌細胞的生長或是癌症的發展 (progression) (6-7)。另外有強烈證據支持飲用酒精的人會增加罹患乳癌、結腸癌、肺癌及前列腺癌的機率 (8-12), 在上述研究中, 有許多可能的因素例如: 抽煙、飲食

等等仍值得被考慮，雖然飲食、風土民情及社會狀態都會影響飲酒比率，但是不可否認的酒精在抑制免疫系統、增加人類感染疾病及罹患癌症上扮演關鍵性的角色（13）。

許多報告指出，慢性酒精中毒者會增加疾病的發生率，例如：呼吸道感染、肺炎、肺結核、腦膜炎、肝炎及癌症（4,6）。以動物模式研究發現慢性酒精中毒不僅會降低淋巴球數目及抑制淋巴球增生也會抑制免疫系統的功能，包括抗體反應、自然殺手細胞活性及巨噬細胞的功能（14-17），這可能造成酒精濫用者免疫系統的缺失進而較容易感染疾病及遭受致癌因子攻擊。雖然在動物模式中並沒有直接的證據證實酒精與癌症的發生有關，但確實有證據指出在致癌過程中酒精扮演一個啟始因子（initiator）的角色（6）。另外，酒精濫用是初期肝癌發展的一個重要因子（17）。

雖然酒精對免疫系統所造成的慢性傷害已被廣泛的研究，但關於急性酒精在免疫系統的影響卻少有研究。然而急性飲酒的習慣比慢性酒精中毒者更為普遍，而且在青少年中急性飲酒是個嚴重的問題（18）。美國地區在 1993 年約有一百五十萬的人因酒精的影響而發生了車禍（19），而其中有 37% 的人其血液中酒精的含量高於 0.2%（20）。另外約有 44% 的美國大學生有急性酒精中毒的經歷，而有 19% 是經常

喝酒的成癮者 (21)。這結果指出美國人容易因大量飲酒而造成較高的血液酒精含量，然而大部分的人並非是慢性酒精成癮者。國人交際應酬時常以喝酒來助興，八十七年行政院衛生署檢疫總所疫情資訊指出台灣地區成年男性喝酒的普遍率達 29% (22)，同樣地，約有 15% 的男性已在青春期即已建立了大量飲酒的習慣 (23)。遺憾的是國內無尚一份報告指出急性酒精中毒者的百分，但根據交通部統計處的 88 年 1-9 月台閩地區「酒後(醉)駕車」交通事故分析報告中發現其實國內大量飲酒者的人口比率相當高 (24)。因此，本論文將針對急性酒精中毒對免疫系統的影響作初步的研究。

第二節 自然殺手細胞 (natural killer cells, NK cells)

自然殺手細胞 (natural killer cells, NK cells) 是人類先天性免疫系統中相當重要的作用細胞，並可調控後天性免疫反應。人類的自然殺手細胞屬於單核球細胞的次群，將其定義為 $CD3^-$ 、 TcR^- 、 $CD16^+$ 和 $CD56^+$ ，不具吸附性，也不具吞噬性的大型顆粒淋巴球 (25-26) 並能夠以不需要組織相容性抗原 (major histocompatibility complex, MHC) 配合的方式來殺死腫瘤細胞及病毒感染細胞 (25, 27)。這種毒殺作用不需要以抗原刺激和輔助細胞幫忙的前處理方式來誘發毒殺能力

(28)，而此特性使自然殺手細胞能在致病原引起專一性反應前，即能有效做為宿主抵抗外來病原的入侵(26-27)。因此，自然殺手細胞被認為是宿主對抗病毒的第一道防線(27, 29)。

雖然自然殺手細胞在免疫系統中的確切角色尚未明顯，但是已有證據證實自然殺手細胞參與對抗腫瘤成長的免疫反應並執行監督職責、摧毀及防止惡性細胞的壯大及擴散、調節 B 細胞的增殖反應及免疫球蛋白的生成、骨髓移植的排斥反應和保護宿主免於微生物及病毒的感染(30-32)。學者們認為自然殺手細胞為原始性的毒殺性細胞用來保護宿主抵抗病原的侵害(33)。雖然有些 T 細胞和其它的白血球亦能以不需要組織相容性抗原配合的方式來進行毒殺作用(34)。但是在周邊血液系統裡，進行毒殺作用的細胞主要不是 T 細胞及 B 細胞而是自然殺手細胞(35)。在人類周邊血液系統中，自然殺手細胞約佔 10-15%(35)。儘管自然殺手細胞的數量不多，但是自然殺手細胞對宿主防禦病毒的感染特別重要(36)。

雖然抗原專一性免疫反應的毒殺性 T 細胞對清除病毒感染的細胞相當重要，但相對地，毒殺性 T 細胞對先前從未遭遇過的病原，誘發其毒殺作用的時間與自然殺手細胞相比是相當緩慢的(37)。因此在病毒引起抗原專一性免疫反應的初期，自然殺手細胞的角色是相當重

要的，例如：在自然殺手細胞缺乏的病人，的確很容易罹患及復發 varicella、 cytomegalovirus 和 herpes virus 所導致的疾病（36-37）。自然殺手細胞除了會主動毒殺標的細胞（target cells）外，也參與了體液性免疫反應，而且當外來抗原誘發產生抗原專一性免疫反應，自然殺手細胞還是持續地對宿主的防禦能力做出貢獻。由於自然殺手細胞上具有抗體的受器（CD16-Fc R）（38-39），因此自然殺手細胞可以進行抗體依賴性毒殺作用（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC），而將已結合上抗體的標的細胞殺死。藉此自然殺手細胞可與體液性免疫系統共同合作來消除病原體或是外來物。因此自然殺手細胞除了在早期的宿主防禦系統中扮演重要角色外，在抗體的合成以後，對宿主防禦系統的貢獻依然持續（40）。

第三節 急性酒精對自然殺手細胞的影響

對急性酒精中毒者或是慢性酒精中毒者來說，酒精會損害細胞性（cellular）及體液性（humoral）免疫反應（6）。自然殺手細胞在對抗腫瘤細胞、病毒及細菌上扮演重要的角色（41）。在體外試驗（*in vitro*）的結果發現，酒精濃度對自然殺手細胞活性的影響不一，雖然在低濃度下（0.5%, w/v），酒精會增加自然殺手細胞的活性（42-44），但

在高濃度下（0.8-10%，w/v），酒精反而會抑制自然殺手細胞的活性（45-47）。然而，有些研究指出，酒精在極低的濃度下（0.08-0.5%，w/v），會抑制自然殺手細胞的活性（48-49）。若以酒精代謝物（acetaldehyde and acetate）進行體外測試自然殺手細胞活性，結果發現這些酒精代謝物在正常生理濃度下不會抑制自然殺手細胞的活性（50）。若以 B6C3F1 老鼠進行急性酒精體內試驗（*in vivo*），發現酒精在單一劑量下（32%，5.0-7.0 g/kg）會抑制 50% 老鼠脾臟的自然殺手細胞活性（16），然而酒精在此老鼠血中濃度下只可直接抑制大約 15% 的自然殺手細胞活性（50）。以上結果顯示可能另有其它機制造成酒精抑制自然殺手細胞的活性例如：神經內分泌激素（neuroendocrine hormone）。Wu and Pruett 以注射拮抗劑的方式，證實了在飲用酒精的老鼠身上糖皮質素（glucocorticoids）及兒茶酚胺（catecholamines）會抑制自然殺手細胞的活性（51）。

已知緊迫反應（stress response）會降低自然殺手細胞的活性，而緊迫反應的特性是誘導糖皮質素的產生（52）。另有報導指出，在人類或是嚙齒動物身上，急性酒精中毒會誘導產生神經內分泌緊迫反應（neuroendocrine stress response）（53-54），而且酒精也會活化 hypothalamic-pituitary-adrenal（HPA）axis 增加血液中糖皮質素及兒茶

酚胺的含量（54-55），此情形在 B6C3F1 老鼠體內會進一步誘導胸腺細胞發生細胞凋亡（apoptosis）（53）。然而，尚未有研究指出酒精會誘導自然殺手細胞發生細胞凋亡。

第四節 糖皮質素與細胞凋亡（apoptosis）

許多的研究指出糖皮質素（glucocorticoids）會誘導淋巴組織或細胞走向細胞凋亡（apoptosis）（53, 56）。糖皮質素誘導細胞凋亡可藉由兩條不同的路徑。當增生的胸腺細胞以糖皮質素處理後，可啟動活化細胞凋亡的訊號啟動，包含細胞週期的改變；糖皮質素也會誘導未增生胸腺細胞走向細胞凋亡，且增生的胸腺細胞與未增生胸腺細胞兩者活化細胞凋亡訊號路徑有部分是相同的（57）。糖皮質素藉由與糖皮質素受器（glucocorticoid receptor, GR）結合引發訊號傳遞，糖皮質素受器是要與糖皮質素結合才能活化的特殊轉錄因子（transcription factor, Zn finger type）（58-59）。糖皮質素受器傳遞細胞凋亡訊號可經由基因的活化轉錄（transactivation）（60-61）、抑制基因表現（62）或是兩種路徑皆有。糖皮質素所調節的基因其中之一是 *c-myc*（63-65），在淋巴細胞株中或是白血球細胞株中，糖皮質素會抑制調控（downregulate）*c-myc* 而引發細胞凋亡（62-63）。例如：在人類白血

球細胞株 CEM-C7 中 *c-myc* 持續表現會防止糖皮質素誘導的細胞凋亡及 antisense *c-myc* 會引發細胞凋亡 (62)。糖皮質素的拮抗劑 RU-486 可阻止糖皮質素誘導的細胞死亡，這阻止的情況與增加 *c-myc* mRNA 的量有關 (63)。

另一個令人關心的機轉是抵抗由糖皮質素誘導的細胞凋亡。在白血病細胞 (leukemia cells) 表現缺失功能的糖皮質素受器 (66-69) 或是沒有表現糖皮質素受器功能 (70)，能抵抗糖皮質素誘導的細胞凋亡，所以糖皮質素受器的功能存在是必須的。抵抗糖皮質素誘導細胞凋亡的下游調控機轉尚未被清楚的定義出來，因為關於其訊號傳遞 (signaling cascade) 所知有限。其中訊號傳遞引人注意是關於 anti-apoptotic protein 的過表現，例如：Bcl-2，已被證實能抑制糖皮質素誘導的細胞凋亡 (71-74)。Bcl-2 能與 proapoptosis 蛋白結合例如：Bax、Bcl-xs 及 Bad 進而保護細胞免於走向細胞凋亡，其中 Bcl-2/Bax 的比率居一個很重要的角色 (75-76)，糖皮質素誘導的細胞凋亡會增加 Bax/Bcl-2 的比率 (77)。當 Bcl-2 的量很高時，Bcl-2 homodimers 及 Bcl-2/Bax heterdimers 佔優勢，細胞會存活。而當 Bcl-2 的量太低或是 Bax 的量太高，則 Bax homodimers 佔優勢，而導致細胞走向細胞凋亡 (77)。

研究指出在 T 細胞內糖皮質素的訊號傳遞會活化 caspase-3，而走向細胞凋亡(78-79)。在細胞凋亡中 caspase-3 扮演一個關鍵性的角色，caspase-3 能切除一些重要的蛋白例如：poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 進而造成細胞凋亡 (80)。Kunitaro 等人發現 C57BL/6 老鼠投予糖皮質素會造成胸腺細胞及脾臟細胞增加走向細胞凋亡的比率及增加 caspase-3 的活性 (81)。

第五節 急性酒精中毒的老鼠模式

在嚙齒動物模式中，過去為了研究酒精對神經性內分泌或是行為的影響，一般都以採用腹膜注射的方式。然而，有證據指出酒精會造成某些物質釋放於胃內，因而影響免疫反應 (82)。因此，從事免疫試驗分析上使用另一種適當方式將酒精送入胃組織內是必要的。所以本實驗使用小鋼管以口服的方式將酒精送入老鼠胃中。而且，這種方式比以腹膜注射的方式更接近人類飲用酒精的方式。急性酒精的動物模式由 Han 等人於 1993 年建立，是以 32% 的酒精單一劑量餵食老鼠 (53)。另外，酒精濃度的選用是重要的，因為 50% 或是更高的濃度會引起胃及十二指腸的發炎現象及壞死 (53)，這情形會干擾測試的

免疫反應。

雖然在此動物模式中，血中的酒精濃度會比人類酒精中毒者還要高，然而在在考量不同物種體內相同生理反應時，除血液中實際的酒精濃度外，不同的物種對酒精的吸收代謝率及物種對酒精的酒精的反應敏感度等因素亦需加以考量，例如：在老鼠身上要產生鎮定及致死的血液酒精含量是人類的兩倍（83-84），其次是老鼠代謝酒精的能力是人類的 2-3 倍，所以人類的酒精累積吸收量較老鼠為高（84-85）。再者，酒精的使用劑量像其他藥物一樣，應要考慮不同物種間差異，因此，以身體全身的表面積來決定劑量會比以身體的重量較合適（86）。雖然，在劑量使用上人類與老鼠之間有 12 倍的修正因子（87），但這似乎不能應用在酒精上面，在人類與老鼠只需小幅修正即可達到相同影響（84-86）。

第六節 動物品種

在本實驗中所使用的 B6C3F1 品系的老鼠是由美國國家毒理學會（National Toxicology Program, U.S.）選定做為免疫毒理實驗的實驗動物品種。此品系的老鼠提供許多抵抗感染或是癌症研究的免疫相關資料。B6C3F1 老鼠是由 C57BL/6 母鼠與 C3H 公鼠交配所產生的第一子

代，而且親代中 C57BL/6 品系已被廣泛使用於酒精的研究上。

第七節 研究動機

在先前的研究中已指出在急性酒精曝露的情況下會造成老鼠脾臟自然殺手細胞的數目及活性下降。因此本研究欲探討脾臟之自然細胞殺手數目下降的原因？是否酒精會活化 hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis 而增加血液中糖皮質素含量，而糖皮質素又會影響自然殺手細胞在體內各區的分佈情形，所以造成脾臟的自然殺手細胞從脾臟轉移到其他組織中？或是因為糖皮質素會誘導脾臟自然殺手細胞發生細胞凋亡，因此導致脾臟之自然殺手細胞的細胞數下降？本研究以糖皮質素的拮抗劑 (antagonist) RU486 來抑制糖皮質素與其受器結合，探討酒精誘導之糖皮質素是否會誘導脾臟自然殺手細胞發生細胞凋亡。若糖皮質素會誘導脾臟自然殺手細胞發生細胞凋亡，本研究將探討何種路線將被活化而導致自然殺手細胞發生細胞凋亡。

第二章 實驗方法

第一節 實驗動物

本實驗動物來字於國科會動物中心所提供的 C57BL/6 母鼠與 C3H 公鼠，於中山醫學院動物中心之 SPF (specific-pathogen free) 的環境下交配所產生的後代稱之為 B6C3F₁。本實驗所用之老鼠均為母鼠，且週齡約 8 - 10 週，體重約 20g~24g，飼養於濕度及溫度控制的房間，光照與黑暗各為 12 小時週期，飲水及飼料 (Labdiet) 均不加以限制。

第二節 自然殺手細胞的製備

一、脾臟細胞

取出老鼠脾臟，放在 3 ml 的 RPMI 1640 (Gibco) 培養液內，利用載玻片的粗糙面將脾臟磨碎，離心 5 分鐘後(轉速為 2000 rpm) 去除上清液，以 RPMI 1640 培養液清洗兩次，。取 20 μ l 的細胞液加至含有 10 ml azide free balanced electrolyte solution (ISOTON) 的小瓶中，同時加入三滴 RBC lysis buffer (J & S Medical Associates, Inc.) 以 Coulter counter (model Z1) 計算細胞數，將脾臟細胞調整

成 1×10^7 cells/ml 培養在 RPMI 1640 和 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco) 內。

二、骨髓細胞

從股骨取出骨髓細胞，取出骨頭，去除上面的皮膚和肌肉。切除骨頭的一端將骨髓露出，使用 23 號針頭將含有 FBS 的 RPMI 1640 培養液中注射入骨髓，將骨髓細胞沖出，離心 5 分鐘後(轉速為 2000 rpm) 去除上清液。計算細胞數，將骨髓細胞調整成 1×10^7 cells/ml 培養在含有 FBS 的 RPMI 1640。

三、周邊血液細胞

先用 forane (Abbott) 麻醉劑將老鼠麻醉，用含有 heparin 的抗凝固管收集血液以毛細管插入眼窩叢中取血。將血液加入 Histopaque-1077 (Sigma)，離心 30 分鐘轉速為 $400 \times g$ 。離心後用吸管抽出中間層含有周邊血液白血球，用 $1 \times$ PBS 清洗三次計算細胞數，將周邊血液白血球調整成 1×10^7 cells/ml 培養在 RPMI 1640 和 10% FBS 中。

四、腹腔細胞

使用 21 號針頭將 10 ml $1 \times$ PBS 注射入老鼠腹腔，輕拍腹腔約 30 秒，再使用 21 號針頭將腹水吸出，離心 5 分鐘後(轉速為 2000

rpm) 去除上清液。計算細胞數，將腹腔細胞調整成 1×10^7 cells/ml 培養在 RPMI 1640 和 10% FBS 中。

第三節 自然殺手細胞之純化

脾臟細胞利用磁性 column (Stem cell) 純化後，可得到純度 > 90% 的自然殺手細胞 (如附圖一)。將 1×10^8 脾臟細胞，加入 10 μ l 雞尾酒抗體 (cocktail antibody) 混和均勻，在 4 $^{\circ}$ C 下作用 15 分鐘，用含有 FBS 的培養液洗去未與細胞結合的抗體。之後再加入 100 μ l anti-biotin tetrameric 抗體附合物混和均勻，在 4 $^{\circ}$ C 下作用 15 分鐘。接著加入 60 μ l magnetic colloid 混和均勻，在 4 $^{\circ}$ C 下作用 15 分鐘。最後將此混合液通過帶有磁性的 column 以收集自然殺手細胞。

第四節 自然殺手細胞活性之分析 (NK cell activity assay)

取 1×10^7 個 YAC-1 細胞加至 0.6 ml 的 0.9% NaCl，同時加入 500 μ Ci 的 $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ (NEN) 標定，經過 90 分鐘 37 $^{\circ}$ C 的培養 (每隔 15 分鐘震盪 YAC-1 細胞)。然後用 Hanks' balanced salt solution (HBSS) (Simga) 清洗三次，洗淨未標定的 ^{51}Cr 。將製備好的脾臟細胞與 YAC-1 細胞依 100:1、50:1 及 25:1 的比率加入 96 孔圓底盤，每個 well 加入 100 μ l 的 YAC-1 cells 與老鼠脾臟細胞混合培

養。經過 37 °C 培養箱含 5% CO₂ 培養四個小時後，離心後取 100 μl 上清液以 γ -counter (PACKARD, COBRA AUTO -GAMMA) 測放射線強度。在經過以下公式換算後便可得知自然殺手細胞的活性：

NK cell cytotoxic activity specific release =

Exp：表示實驗組的 cpm 值

SP：自發性鉻的釋放量，定義為 100 μl YAC-1 細胞單獨與 100 μl 培養液培養四個小時後，離心後上清液所釋放出的 cpm 值。

Max：最大鉻釋放量，定義為 100 μl YAC-1 細胞單獨與 100 μl 2N HCl 培養四個小時後，離心後上清液所釋放出的 cpm 值。

以 Bryant 等人發表的計算方式計算 100:1、50:1 及 25:1 的平均數值(88, equation 10), 數值是代表每 10⁷ 作用細胞(effector cells) 的毒殺能力。其中 100:1 的自然殺手細胞毒殺百分比的值約在 15% 30% 之間, 與 Luster 等人用相同性別與品系做的結果相似(89)。

第五節 流式細胞儀 (Flow cytometry) 分析自然殺手細胞

數目

將製備好的效應細胞稀釋成 1×10⁶ cells/100 μl 於 flow cytometry buffer (PBS 含 0.1% bovine serum albumin 和 0.1%

sodium azide, pH 7.4),加入 96 孔圓底盤內。使用接合 phycoerythrin 的單株抗體 PK136 (Pharmingen) 標示自然殺手細胞。細胞與抗體在 4 °C 下作用 30 分鐘。使用 1×PBS 緩衝溶液 (0.8 % NaCl, 0.002% KCl, 0.14% Na₂HPO₄, 0.02% KH₂PO₄, pH 7.4) 離心洗去未標定的抗體 , 加入 ammonium chloride lysis buffer(8.26% NH₄Cl, 1% NaHCO₃, 0.06% EDTA, pH 7.0) 去除紅血球 , 用 200 μ l 1 % paraformaldehyde solution (Simga) 固定 , 再用 1×PBS 緩衝溶液清洗。將細胞懸浮於 200 μ l 的 flow cytometry buffer 中。以流式細胞分析儀 (Bencton-Dickinson) 分析每個樣品。

第六節 Annexin V 分析細胞凋亡

將要分析的脾臟細胞先加入 ammonium chloride lysis buffer 去除紅血球。再稀釋成 1×10^6 cells/100 μ l 於 flow cytometry buffer , 加入 96 孔圓底盤內。之後加入 fluorescein-isothiocyanate-labeled Annexin V (Kamiya Biochemical) 在 4 °C 反應 15 分鐘。對照組則不加入 fluorescein- isothiocyanate-labeled Annexin V。離心清洗後 , 用 200 μ l 1 % paraformaldehyde solution 固定 , 離心清洗後 , 將細胞懸浮於 200 μ l 的 flow cytometry buffer 中。以流式細胞分析儀

(Bencton-Dickinson) 分析每個樣品。

第七節 7-amino-actinomycin D (7-AAD) 分析細胞凋亡

此方法是參照 Ingrid 等人於 1994 年發表的方法，7-AAD 依其染色特性可用來區分活細胞、死細胞及凋亡細胞 (90 , 附圖二) 。

將脾臟細胞稀釋於 100 μ l flow cytometry buffer 含有 1×10^6 cells , 加入 96 孔圓底盤內。之後加入 phycoerythrin-labeled PK136 (Pharmingen) 在 4 反應 20 分鐘，離心清洗之後加入 20 μ g/ml 7-AAD(Simga)在避光下 4 反應 15 分鐘 對照組則不加入 7-AAD。用 200 μ l 1 % paraformaldehyde solution 固定，再用 1 \times PBS 緩衝溶液清洗未標定上的 7-AAD。最後將細胞懸浮於 200 μ l 的 flow cytometry buffer 中。以流式細胞分析儀 (Bencton-Dickinson) 分析每個樣品。

第八節 蛋白質樣品製備及定量分析

一、蛋白質樣品製備

脾臟之自然殺手細胞經純化後調成 1×10^7 cells/ml。加入 100 μ l cell lysis buffer (BioVision) 置於冰上 20 分鐘，離心 4 分鐘轉速為

11000g，取上清液做蛋白質濃度測定。

二、蛋白質定量分析

本實驗使用 Bio-Rad 試劑做蛋白質濃度測試。首先以 1:4 之比例混合 Bio-Rad reagent 和水成為 Bio-Rad working reagent, 並取待測物 5 μ l 與標準品 bovine serum albumin (BSA) 2.5 μ g、5 μ g、10 μ g、15 μ g、20 μ g 與已經稀釋的 1ml Bio-Rad working reagent 混合均勻後，以分光光度儀(HITACHI U1500)於波長 595nm 測吸光值，再與標準品 bovine serum albumin (BSA) 比較以求得待測物之蛋白質濃度 (μ g/ μ l)。

第九節 西方墨點法 (Western Blot)

一、SDS PAGE 的製備

本實驗選用 Bio-Rad 之器材製備 SDS PAGE，其步驟如下：首先製備 15% 的下膠，依序加入二次水 2.65ml、1.5M Tris pH 8.8 2.5ml、40% acrylamide-bis acrylamide (Bio-Rad) 3.75ml、10% SDS 0.1ml、1% ammonium persulfate (APS) (Bio-Rad) 1ml、TEMED (Bio-Rad) 30 μ l 混合均勻後，然後緩緩加入 1.5 mm 厚度的直立式電泳槽膠台座中，加到約佔膠台四分之三高度時，加無水酒精壓平下膠並靜置 30~40 分鐘後，再開始製備 3% 的上膠，依序加入二次水

3.675ml、0.5M Tris pH 6.8 1.5ml、40% acrylamide-bis acrylamide 0.45ml、10% SDS 0.06ml、1% ammonium persulfate (APS) 0.3ml、TEMED 15 μ l 升混合均勻後，緩緩加入直立式電泳槽膠台座中，然後將梳狀膠片 (comb) 放入，待凝固後小心取出梳狀膠片，所留下的凹槽可做為樣品加入之用。

二、SDS PAGE 之電泳操作及轉漬 (transfer blot)

將製備好的膠，先用 1 \times Tris-glycine running buffer (Bio-Rad) 填滿，再將每個 well 放入 20 μ g 的樣品，先用 140 volt 跑 10 分鐘，再用 120 volt 跑 80 分鐘，直到樣品接近底部即可停止。在膠快跑完的前 10 分鐘，準備一張大小恰當的 PVDF membrane (NEN)，先用甲醇漂洗 (約 15 秒)，再換成清水振盪 5 分鐘。將膠卸下後，同時與 PVDF membrane 及六片濾紙一起浸在 transfer 緩衝溶液中，震盪 5 分鐘。利用半乾式轉漬法通以電流 110 mA 60 分鐘，將膠上的蛋白轉移到 PVDF membrane 上。將轉漬好的 PVDF membrane 浸在含 5% 脫脂奶粉的 1 \times tween-tris buffered saline (TTBS) 緩衝溶液 (50 mM Tris, 0.2 % Tween 20, 150 mM NaCl, PH 7.5) 中，振盪 60 分鐘。在 blocking 的溶液中加入 histidine (0.1 μ g/30 ml TTBS-milk)，以避免 nonspecific band 產生。再加入可辨識欲觀察

之蛋白的一次抗體 anti-mouse Bax (200 倍稀釋) 或是 anti-mouse Bcl-2 (200 倍稀釋) 或是 anti-mouse β -actin (5000 倍稀釋) , 於 4 作用一夜。將處理完一次抗體之 PVDF membrane 用含 5% 脫脂奶粉的 1×TTBS 緩衝溶液清洗兩次 , 再用 1×TTBS 緩衝溶液清洗兩次 , 接著在室溫下用 anti-mouse IgG 之二次抗體反應 1 小時。將處理完二次抗體之 PVDF membrane 用含 5% 脫脂奶粉的 1×TTBS⁺緩衝溶液 (50 mM Tris, 0.5 % Tween 20, 300 mM NaCl, PH 7.5) 清洗兩次 , 再用不含脫脂奶粉 1×TTBS⁺緩衝溶液清洗兩次。最後用 1×PBS 緩衝溶液 (0.8 % NaCl, 0.002 % KCl, 0.14 % Na₂HPO₄, 0.02 % KH₂PO₄) 稍微洗一下 , 即可利用 E.C.L. 呈色劑 (NEN NEL104) , 將經過抗體作用之蛋白影像呈現在 X-光底片 (Kodak Science Imaging Film) 上。之後使用 Alpha Imager 2000 定量分析蛋白質的表現量。

第十節 Caspase-3/CPP32 活性分析

Caspase-3 的活性分析係使用 caspase-3/cpp32 colorimetric assay kit (BioVision) 。脾臟之自然殺手細胞經純化後 , 將細胞溶解取出 50 μ g 蛋白質稀釋到 50 μ l 的 cell lysis buffer 中放入 96 孔圓底盤中 ,

加入 50 μ l 的 2 \times reaction buffer, 在避光的情形下再加入 5 μ l 的 4mM DEVD-pNA 後, 在 37 $^{\circ}$ C 下, 反應 2 小時, 使用微孔盤讀值機(Bio-Red, model-550) 在 405 nm 波長讀取吸光值。

第十一節 結果分析

本實驗所獲得的實驗數據均以 ANOVA 分析法分析控制組平均值與處理組平均值的差異性。若只比較兩組的差異性則使用 Student's t test 加以分析。若比較兩組以上的差異則使用 Dunnett's test。P 值小於 0.05 則表示統計上有意義。

第三章 實驗結果

第一節 急性酒精對老鼠脾臟細胞數目的影響

根據 Wu 等人於 1994 年發表的論文指出,老鼠在 32%(6.0 g/kg) 的酒精劑量下處以十二小時,對老鼠的脾臟自然殺手細胞活性抑制最大(16)。因此以 32%(6.0 g/kg) 的酒精劑量為實驗劑量,以每組五隻老鼠分控制組(餵食水)及實驗組(餵食酒精)分三個時間點(三小時、六小時及十二小時)共四組進行實驗,探討酒精對脾臟細胞的細胞數影響。

實驗結果顯示控制組及實驗組的細胞數分別是 7.72×10^7 (控制組, 十二小時) 6.86×10^7 (三小時) 5.87×10^7 (六小時)及 5.18×10^7 (十二小時) (圖一)。結果以實驗組與控制組比較,發現脾臟細胞的細胞數有明顯的下降,分別下降了 11%(三小時)、23%(六小時)及 37%(十二小時),依時間而言,以十二小時下降的最多。因此酒精會減少脾臟細胞數,以餵食酒精十二小時後減少最多。

第二節 急性酒精對老鼠脾臟細胞發生細胞凋亡的影響

圖一的結果顯示酒精可降低脾臟細胞數目，本實驗將探討酒精是否會誘導致脾臟細胞發生細胞凋亡，而造成脾臟細胞數目減少？因此以 32% (6.0 g/kg) 的酒精劑量為實驗劑量，以每組五隻老鼠分控制組 (餵食水) 及實驗組 (餵食酒精) 分三個時間點 (三小時、六小時及十二小時) 共四組進行實驗。餵食後犧牲老鼠取出脾臟，以 Annexin V 分析法，分析脾臟細胞發生細胞凋亡的百分比。

結果顯示控制組及實驗組的細胞凋亡的百分比分別是 1.94% (控制組，十二小時)、4.70% (三小時)、5.74% (六小時) 及 2.62% (十二小時) (圖二)。以控制組為基準，三小時發生細胞凋亡的百分比是控制組的二點四二倍，而六小時發生細胞凋亡的百分比是控制組的二點九六倍，但十二小時發生細胞凋亡的百分比是僅是控制組的一點三五倍。以餵食酒精後六小時發生細胞凋亡的百分比最高。

第三節 急性酒精對各組織中自然殺手細胞數目及活性的影響

過去文獻指出酒精會活化 hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis 增加血液中糖皮質素及兒茶酚胺的含量 (54-55)，而糖皮質素曾被報導會影響淋巴細胞在體內各組織的分佈情形 (89)。所以接下來的實驗以 32% (6.0 g/kg) 的酒精劑量為實驗劑量，以每組五隻老鼠分控制組 (餵食水) 及實驗組 (餵食酒精) 在餵食十二小時後犧牲老鼠，取出脾臟細胞、腹腔細胞、週邊血液細胞及骨髓細胞，以 PK136 單株抗體標定自然殺手細胞，以流式細胞儀計算自然殺手細胞的百分比，此結果將可探討酒精是否會全面性的降低各組織中自然殺手細胞的數目，還是自然殺手細胞會由脾臟細胞轉移到其他的組織中。

結果發現老鼠餵食酒精十二小時後，各組織中自然殺手細胞的百分比很明顯下降 (表一)，分別下降了 22% (脾臟)、13% (週邊血液系統)、21% (骨髓) 及 40% (腹腔)，而且與控制組 (餵食水) 相比在統計上均具有顯著的意義。因此酒精會減少各組織中自然殺手細胞的百分比。

已知酒精會抑制老鼠脾臟之自然殺手細胞活性（16），因此本實驗將探討各組織中自然殺手細胞的活性是否也像脾臟的自然殺手細胞一樣會受抑制。本實驗以 YAC-1 細胞為標的細胞進行自然殺手細胞毒殺活性試驗。以 32%（6.0 g/kg）的酒精劑量為實驗劑量，以每組五隻老鼠分控制組（餵食水）及實驗組（餵食酒精）在十二小時後犧牲老鼠，取出脾臟細胞、腹腔細胞、週邊血液細胞及骨髓細胞，測試自然殺手細胞的毒殺能力。

結果顯示老鼠餵食酒精十二小時後，各組織中自然殺手細胞的毒殺能力很明顯下降（表二），分別下降成控制組的 55%（脾臟）、53%（週邊血液系統）、74%（骨髓）及 50%（腹腔），而且與控制組（餵食水）相較在統計上均具有顯著的意義。所以酒精不但會減少各組織中自然殺手細胞的百分比，也會抑制各組織中自然殺手細胞的毒殺能力。

第四節 急性酒精對老鼠脾臟自然殺手細胞發生細胞凋亡的影響

圖一和圖二的結果顯示酒精會導致脾臟細胞數目的下降的原因之一是誘導脾臟細胞發生細胞凋亡，表一的結果也指出酒精會減少各組織中自然殺手細胞的百分比。先前的研究顯示酒精誘發之糖皮質素會誘導胸腺細胞發生細胞凋亡（apoptosis）（54）。這種情形是否也會發生在自然殺手細胞上呢？如以糖皮質素的拮抗劑（antagonist）RU486 來抑制糖皮質素與其受器結合，如果 RU486 能抑制酒精誘導的細胞走向細胞凋亡，那麼就可證實酒精促使自然殺手細胞走向細胞凋亡是藉由誘發糖皮質素所引起的。本實驗之 RU486 需在餵食酒精前一個小時先餵食，先行與糖皮質素受器結合，進而抑制糖皮質素的作用。以 32%（6.0 g/kg）的酒精劑量為實驗劑量，六小時為時間點（圖二顯示此時間點細胞發生凋亡的百分比最高），分四組每組共五隻老鼠。第一組為控制組老鼠餵食水，第二組老鼠餵食 RU486（200 mg/kg，在過去文獻中指出使用這劑量能完全抑制糖皮質素的影響（51）），第三組老鼠餵食酒精，第四組老鼠餵食 RU486 及餵食酒精。餵食六小時後犧牲老鼠，取出脾臟細胞。以 PK136 單株抗體標定自然殺手細胞後，再以 7-AAD 分析

法，分析脾臟之自然殺手細胞發生細胞凋亡的百分比。

結果顯示控制組及實驗組的自然殺手細胞發生細胞凋亡的百分比分別是 0.048% (控制組)、0.052% (RU486 組)、0.122% (酒精組) 及 0.086% (RU486 和酒精組) (圖三)。以控制組為基準，RU486 組增加了零點零八倍，幾乎與控制組相近，因此 RU 486 本身並不會增加誘導自然殺手細胞發生細胞凋亡；酒精組增加了一點五四倍，RU486 和酒精組增加了零點七九倍。

由圖三的結果得知，RU486 和酒精組之自然殺手細胞發生細胞凋亡比酒精組下降了百分之三十。顯示 RU486 並不能完全抑制酒精所誘導的自然殺手細胞發生凋亡，所以酒精誘導的細胞凋亡，並不只有誘發糖皮質素這條路徑所產生，應該還有其他的路徑也會造成酒精誘導自然殺手細胞走向細胞凋亡。

因 7-AAD 的染色特性，本實驗亦可分析酒精對自然殺手細胞發生壞死的百分比。結果顯示控制組及實驗組的自然殺手細胞壞死的百分比分別是 0.066% (控制組)、0.058% (RU486 組)、0.128% (酒精組) 及 0.09% (RU486 和酒精組) (圖四)。以控制組為基準，RU486 組下降為控制組的零點八八倍，幾乎與控制組相近，因此 RU 486 本身並不會增加誘導自然殺手細胞發生壞死性細胞死

亡；酒精組增加成控制組的一點九四倍，RU486 和酒精組增加成控制組的一點三六倍。如比較有無給予 RU486 的酒精兩組，RU486 和酒精組比酒精組發生細胞壞死百分比下降了百分之三十。顯示 RU486 並不能完全抑制酒精所誘導的自然殺手細胞發生壞死。圖三與圖四之結果相似，因酒精可誘導自然殺手細胞發生細胞凋亡，這些細胞最終都走向壞死性死亡之路。

第五節 Caspase-3 在急性酒精誘導脾臟自然殺手細胞發生 細胞凋亡之角色

先前的實驗發現，在急性酒精的刺激下，會誘導脾臟之自然殺手細胞發生細胞凋亡。在細胞凋亡中 caspase-3 扮演一個關鍵性的角色，caspase-3 能切除一些重要的蛋白例如：poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 進而造成細胞凋亡 (83)。所以接下來的實驗要證明在急性酒精曝露下所誘導自然殺手細胞的細胞凋亡是否會活化 caspase-3 ? 以 32% (6.0 g/kg) 的酒精劑量為實驗劑量，以每組三隻老鼠分控制組 (餵食水) 及實驗組 (餵食酒精) 分三個時間點 (三小時、六小時及十二小時) 及皮下注射 25 mg/kg dexamethasone (人工合成的糖皮質素，在過去的文獻中指出在這劑量下會誘導細胞發生細胞凋亡 (91)) 共五組進行實驗。犧牲老鼠，純化脾臟的自然殺手細胞，利用 caspase-3/cpp32 colorimetric assay kit(BioVision)，測試 caspase-3 的活性表現。

結果發現 caspase-3 的活性表現分別是 0.131 (控制組，十二小時)、0.193 (三小時)、0.244 (六小時)、0.2574 (十二小時) 及 0.47420 (dexamethasone，十二小時) (圖五)。將實驗組與控制組相互比較發現，caspase-3 的活性依次上升為控制組的一點四七倍(三

小時)、一點七一倍(六小時)及一點九六倍(十二小時), caspase-3 的活性有隨著時間增加而上升, 其中又以餵食酒精十二小時後 caspase-3 活性上升最多將近為控制組的兩倍。

先前之實驗證實酒精會誘導脾臟的自然殺手細胞發生細胞凋亡, 有部分路徑是藉由刺激活化 hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis 分泌糖皮質素所引起的(圖三)。所以接著進行的實驗, 將探討是否 RU486 可抑制酒精所活化之 caspase-3 活性? 本實驗以 32%(6.0 g/kg)的酒精劑量為實驗劑量, 十二小時為時間點(圖五顯示此時間點 caspase-3 的活性最高), 分四組每組共三隻老鼠。第一組為控制組老鼠餵食水, 第二組老鼠口服給予 200mg/kg 之 RU486, 第三組老鼠餵食酒精, 第四組老鼠餵食 RU486 及酒精。RU486 需在餵食酒精前一個小時先餵食, 先行與糖皮質素受器結合, 才能進而抑制糖皮質素的作用。犧牲老鼠, 純化脾臟的自然殺手細胞後, 利用 caspase-3/cpp32 colorimetric assay kit, 測試 caspase-3 的活性表現。

結果發現 caspase-3 的活性表現分別是 0.1378 (控制組) 0.153 (RU486 組)、0.1952 (RU486 和酒精組)、0.263 (酒精組)(圖六)。將實驗組與控制組相互比較發現, caspase-3 的活性依次上升

為控制組的一點一一倍（RU486 組）、一點四二倍（RU486 和酒精組）及一點九一倍（酒精組）。結果顯示 RU486 並不會增加 caspase-3 的活性，如比較 RU486 和酒精組與酒精組之 caspase-3 的活性，發現 RU486 和酒精組較酒精組下降了百分之二十六，然而並沒有完全抑制 caspase-3 的活性。本實驗結果與圖三的結果相似，酒精所誘導的自然殺手細胞發生凋亡，並不只有誘發糖皮質素這條路徑所產生。

第六節 Bax 在急性酒精誘導脾臟自然殺手細胞發生細胞凋 亡之角色

先前的實驗發現酒精誘導的自然殺手細胞發生凋亡會活化 caspase-3 (圖五)。本實驗將探討是否 Bax 涉及自然殺手細胞之凋亡。本實驗以 32% (6.0 g/kg) 的酒精劑量為實驗劑量，以每組三隻老鼠分控制組 (餵食水) 及實驗組 (餵食酒精) 分三個時間點 (三小時、六小時及十二小時) 及皮下注射 25 mg/kg dexamethasone (人工合成的糖皮質素，會誘導細胞走向細胞凋亡) 共五組進行實驗。犧牲老鼠，純化脾臟的自然殺手細胞後，取出自然殺手細胞內的蛋白質，以西方點墨法偵測 Bax 蛋白質的表現量在 X 光底片上，以 β -actin 蛋白表現量當控制組 (圖七)。

圖七之蛋白質表現經量化後其 Bax/ β -actin 的比率平均值分別是 1.57 (控制組，十二小時)、1.89 (三小時)、2.01 (六小時)、1.67 (十二小時)、2.99 (dexamethasone，十二小時) (圖八)。結果發現給予酒精三小時後其 Bax/ β -actin 的比值僅上升為控制組的一點二倍，六小時組上升為一點二八倍，十二小時組上升為一點零六倍。在統計上只有 dexamethasone 組上升一點九倍具有意義，其他在統計上無意義。所以在急性酒精曝露下，自然殺手細胞之 Bax

蛋白質的表現量無顯著上升。

第七節 Bcl-2 在急性酒精誘導脾臟自然殺手細胞發生細胞 凋亡之角色

本實驗將探討酒精誘導的自然殺手細胞發生凋亡是否會抑制 Bcl-2？本實驗以 32% (6.0 g/kg) 的酒精劑量為實驗劑量，以每組三隻老鼠分控制組 (餵食水) 及實驗組 (餵食酒精) 分三個時間點 (三小時、六小時及十二小時) 及注射 25 mg/kg dexamethasone (人工合成的糖皮質素，會誘導細胞發生細胞凋亡) 共五組進行實驗。犧牲老鼠，純化脾臟的自然殺手細胞取出蛋白質，以西方點墨法偵測 Bax 蛋白質的表現量在 X 光底片上，用 β -actin 蛋白質表現量當控制組 (圖九)。

圖九之蛋白質表現經量化其 Bcl-2/ β -actin 的比率平均值分別是 0.57 (控制組，十二小時)、0.56 (三小時)、0.66 (六小時)、0.52 (十二小時)、1.12 (dexamethasone，十二小時) (圖十)。Bcl-2/ β -actin 的比值在控制組與酒精組比較均無統計上之明顯差別。只有 dexamethasone 組具有意義。所以在急性酒精曝露下，並不會改變脾臟自然殺手細胞內的 Bcl-2 蛋白質的表現量。

第四章 討論

綜合以上實驗結果，發現老鼠在急性酒精暴露下，會減少脾臟細胞及脾臟之自然殺手細胞的細胞數（圖一、表一）。其原因並非是酒精誘導分泌的糖皮質素導致在各組織中的淋巴細胞重新分配（92），因為在實驗中可觀察到在各組織中的自然殺手細胞的細胞數都有下降的趨勢（表一）。過去的文獻也指出老鼠在急性酒精暴露下會抑制脾臟自然殺手細胞的活性（16），本研究也觀察各組織中自然殺手細胞的活性，結果發現各組織中的自然殺手細胞活性如同細胞數一樣也呈現下降的趨勢（表二）。所以在急性酒精暴露下，老鼠體內各組織的自然殺手細胞的細胞數及活性皆會下降。

酒精已被證實在體外試驗會誘導胸腺細胞、脾臟 T 細胞及 B 細胞發生細胞凋亡（93-94），也確認在體內試驗下酒精會藉由不同的方式誘導細胞發生細胞凋亡（95-96）。本實驗之脾臟細胞數的減少是否因為脾臟細胞發生細胞凋亡所造成的，研究結果發現隨時間的增加，脾臟細胞發生細胞凋亡的百分比也相對的增加（圖二）。然而老鼠給予酒精十二小時後，脾臟細胞發生細胞凋亡的百分比並沒有增加，可能的原因是在給予酒精十二小時後可能有許多的脾臟細胞都走向細胞凋亡的後期，而被吞噬細胞所移除，此時已無較多的凋亡細胞可被 Annexin V 偵測到。

報導指出酒精會增加糖皮質素在血液中的含量 (54-55) , 而糖皮質素也被確認會誘導淋巴球發生細胞凋亡 (53, 56) 。本研究利用 RU486 (糖皮質素受器的拮抗劑) 來證實急性酒精中毒老鼠血液中的糖皮質素會誘導脾臟自然殺手細胞發生細胞凋亡。假如 RU486 能完全抑制酒精誘導的自然殺手細胞發生細胞凋亡 , 就可證實酒精所誘導的細胞凋亡是藉由增加血液中糖皮質素的濃度。但實驗發現 RU486 僅能抑制部分的細胞凋亡 (圖三) , 並不能完全抑制酒精所誘導的細胞凋亡。此結果顯示酒精可能會藉由其他的路徑誘導自然殺手細胞發生細胞凋亡。在過去的文獻中曾報導酒精會誘導嗜中性球 (neutrophil) 發生細胞凋亡乃藉由一氧化氮 (NO) 所引起 (95) 。另外也有文獻指出酒精促使巨噬細胞 (macrophage) 發生細胞凋亡是藉由 TGF- β 的作用 (96) 。在慢性酒精中毒的情況下 , 會增加 TNF- α 濃度進而影響唾腺細胞發生細胞凋亡 (97) , 在急性飲用酒精或是慢性酒精中毒情況下 , 也會增加肝細胞表現 TNF- α (98) 。還有在急性酒精中毒下 , 也會增加細胞內的氧化緊迫 (oxidative stress) 促使肝細胞進行細胞凋亡 (99) 。因此 , 酒精誘導的自然殺手細胞發生細胞凋亡 , 並非完全依賴糖皮質素這一條路徑。

已有文獻指出在體外試驗酒精本身會直接誘導胸腺細胞、脾臟

T 細胞及 B 細胞發生細胞凋亡 (93-94)。然而要觀察到此種結果，需要培養 12-17 小時以上才能得到。在本實驗中脾臟細胞發生細胞凋亡的時間為給予酒精後 3-6 小時，發生凋亡之脾臟細胞在酒精給予十二小時後已無法偵測到。綜合以上兩點，或許可推論酒精本身無法快速誘導細胞發生凋亡，這更能支持急性酒精中毒所誘導的自然殺手細胞發生細胞凋亡是糖皮質素或是其他的內分泌激素所引起的。另有研究指出飲用酒精後會增加體內某些內分泌激素的濃度例如：鴉片 (opioids)、兒茶酚胺 (catecholamines) 等等 (100, 54-55)。過去有文獻指出在老鼠體內兒茶酚胺會藉由淋巴球發生細胞凋亡來調控淋巴球的功能 (101)，而在氧化緊迫下會增加鴉片的分泌，進而誘導淋巴球細胞發生凋亡 (102)。另外是否還有些內分泌激素也會影響細胞進行細胞凋亡，還需要進一步探討。

曾有文獻報導指出在體內試驗情況下，酒精本身會誘導肝細胞增加表現 caspase-3 mRNA (103)。在本實驗中發現酒精誘導脾臟自然殺手細胞發生細胞凋亡，其 caspase-3 的活性會被活化 (圖五)。此結果與先前的研究相似，在 T 細胞內糖皮質素的訊號傳遞會活化 caspase-3，而造成 T 細胞的凋亡 (78-79)。另外給予健康老鼠糖皮質素，發現會增加胸線細胞及脾臟細胞 caspase-3 的活性 (81)。本

研究使用 RU486 (糖皮質素受器的拮抗劑) 來探討酒精所誘發的 caspase-3 的活性是否完全由糖皮質素所引起, 實驗結果發現給予 RU486 和酒精組能使 caspase-3 的活性部分下降(圖六), 所以 RU486 只抑制部分的 caspase-3 活性, 並不能完全抑制 caspase-3 的活性。本結果顯示酒精可能會媒介其他內分泌激素而誘導 caspase-3 活性。另有文獻指出糖皮質素可誘導淋巴細胞發生細胞凋亡, 其淋巴球之 caspase-3 活性並沒有被活化, 然而 caspase-6 之活性反增加 (104)。所以可能酒精所誘導的自然殺手細胞發生細胞凋亡, 會活化 caspase-6, 但在本實驗中並沒有就此做深入的探討。

一般而言, 細胞發生凋亡時會活化 Bax, 抑制 Bcl-2 的表現。Bcl-2 能與 proapoptosis 蛋白結合例如: Bax、Bcl-xs 及 Bad 進而保護細胞免於走向細胞凋亡 (75-76), 當 Bcl-2 的表現量高時細胞會存活。當 Bcl-2 的表現量太低或是 Bax 的表現量太高, 則導致細胞發生細胞凋亡。在本實驗中發現 Bax 蛋白表現量在酒精組與控制組相比均無統計上的意義, 其可能的原因在於酒精會活化其他的 proapoptosis 蛋白例如: Bcl-xs 及 Bad (105-106), 或是調控會引發細胞凋亡的基因或蛋白例如: c-myc 及 cyclin D (57)。這還需做進一步的探討, 以瞭解酒精誘導自然殺手細胞發生細胞凋亡的活化路

徑。

已有報導指出糖皮質素誘導的細胞凋亡會增加 Bax/Bcl-2 的比率 (77)。也有文獻指出 dexamethasone 誘導的 T 細胞凋亡會表現低量的 Bcl-2 (107)。然而在本研究中發現 dexamethasone 誘導的自然殺手細胞發生凋亡會有 Bcl-2 過表現的情形，另有研究發現在放射線照射或是糖皮質素處理後 B 細胞發生細胞凋亡，會有 Bcl-2 過表現的現象 (108)。Phong 等人則指出在胸腺內 Bcl-2 的表現並不能保護細胞不走向細胞凋亡之路 (109)。也有文獻指出在過表現 Bcl-2 的細胞株中，dexamethasone 誘導的細胞凋亡可能是藉由抑制蛋白質的合成 (110)。又酒精會刺激 prolactin 的分泌 (100)，而 prolactin 曾被報導會增加調控 (upregulate) Bcl-2 的表現 (111)。另外本實驗中，並沒有試驗另一個 Bcl-2 家族，如：Bcl-xL 的狀態，因有文獻報導 Bcl-xL 在控制細胞是否走向細胞凋亡上扮演重要的角色 (112-113)。

本研究發現酒精會降低體內各組織中的自然殺手細胞數目，其降低的原因在於酒精會造成自然殺手細胞發生細胞凋亡。另外也使用 RU486 來探討糖皮質素在酒精誘導自然殺手細胞發生細胞凋亡過程中所扮演的角色，結果顯示 RU486 並不能完全抑制酒精所導致的

自然殺手細胞的凋亡現象。酒精應可誘發其他的機制誘導脾臟自然殺手細胞發生細胞凋亡。本研究也評估 caspase-3、Bax 及 Bcl-2 在酒精誘導脾臟之自然殺手細胞發生細胞凋亡時所扮演的角色。結果顯示酒精會活化 caspase-3 的活性，然而 Bax 及 Bcl-2 的蛋白表現量則不受酒精影響。



第五章 參考文獻

1. Deshapriya EB. Iwase N. Are lower legal blood alcohol limits and a combination of sanctions desirable in reducing drunken driver-involved traffic fatalities and traffic accidents? *Accident Anal. Prev.* 1996, 28: 721-31.
2. Hills KS. Westaby D. Alcohol and the liver. *Br. J. Hosp. Med.* 1997, 57: 517-21.
3. Harper C. Kril J. An introduction to alcohol-induced brain damage and its causes. *Alcohol Alcohol. Supplement.* 1994, 2: 237-243.
4. MacGregor RR. Alcohol and immune defense. *JAMA.* 1986, 256: 1474-1479.
5. Jerrells TR. & Pruett SB., Immunotoxic effects of ethanol. In J. H. Dean, M. I. Luster, A. E. Munson, & I. Kimber (Eds.) , *Immunotoxicol. Immunopharmacol.* 1994, 323-347. New York: Raven Press.
6. Garro AJ. Espina N. & Lieber CS., Ethanol and cancer. *Alcohol Health and Research World*, 1992, 16: 81-86.
7. Kune GA. & Vitetta L., Alcohol consumption and the etiology of colorectal cancer: a review of the scientific evidence form 1957 to 1991. *Nutr. Cancer.* 1992, 18: 97-111.
8. Hayes RB. Brown LM. Schoenberg JB. Greenberg RS. Silverman D T. Schwartz A.G. Swanson G.M. Benichou J. Liff JM. Hoover RN. & Pottern LM. Alcohol use and prostate cancer risk in US blacks and whites. *Am. J. Epidemiol.* 1996, 143: 692-697.
9. Murata M. Takayama K. Choi BC. & Pak AW., A nested-control study on alcohol drinking, tobacco smoking, and cancer. *Cancer*

Detection and Prevention. 1996, 20: 557-565.

10. Dosemeci M. Gokmen I. Unsal M. Hayes RB. & Blair A. Tobacco, alcohol use, and risks of laryngeal and lung cancer by subsite and histologic type in Turkey. *Cancer Causes and Control*. 1997, 8: 729-737
11. Smith-Warner SA. Spiegelman D. Shiaw-Shyuan Y. van den Brandt PA. Folsom AR. Goldbohm A. Graham S. Holmberg L. Howe GR. Marshall JRAB. M. Potter JD. Speizer FE. Willett WC. Wolk A. & Hunter DJ. Alcohol and Breast Cancer in Women. *JAMA*. 1998, 279: 535-540
12. Baron JA. SandlerRS. Haile RW. Mandel JS. Mott LA. & Greenberg ER. Floate intake, alcohol consumption, cigarette smoking, and risk of colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst*. 1998, 90: 57-62.
13. Launoy G. Milan CH. Faivre J. Pienkowski P. Milan CI. & Gignoux M. Alcohol, tobacco and oesophageal cancer: effects of the duration of consumption, mean intake and former consumption. *Br. J. Cancer*. 1997, 75: 1389-1396.
14. Watson RR. Prabhala RH. Abril E. Smith TL. Changes in lymphocyte subsets and macrophage functions from high, short-term dietary ethanol in C57BL/6 mice. *Life Sci*. 1988, 43: 865-70.
15. Meadows GG. Blank SE. Duncan DD. Influence of ethanol consumption on natural killer cell activity in mice. *Alcohol., Clin. Exp. Res*. 1989, 13: 476-9.
16. Wu WJ. Wolcott RM. & Pruett SB. Ethanol decreases the number and activity of splenic natural killer cells in a mouse model for binge drinking. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 1994, 271: 722-729.
17. Caporaso N. Romano M. Marmo R. de Sio I. Morisco F. Minerva A.

- Coltorti M. Hepatitis C virus infection is an additive risk factor for development of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *J. Hepatol.* 1991, 12: 367-71.
18. Room R., Measuring alcohol consumption in the United States. In L. T. Kozlowski, H. M. Annis, H. D. Cappell, F. B. Glaser, M. S. Goodstadt, Y. Israel, H. Kalant, E. M. Sellers, & E. R. Vingilis(Eds.), *Research Advances in Drug and Alcohol Problems.* 1990, 39-80. New York: Plenum Press.
 19. Anonymous. Federal Bureau of Investigation. Uniform crime reports for the United States. 1993. U. S. Department of Justice. 1994.
 20. Wieczorek WF. Miller BA. & Nochajski TH. The limited utility of BAC for identifying alcohol-related problems among DWI offenders. *J. Stud. Alcohol.* 1992, 53: 415-419.
 21. Wechsler H. Davenport A. Dowdall G. Moeykens B. & Castillo S. Health and behavioral consequences of binge drinking in college. *JAMA.* 1994, 272: 1672-1677.
 22. 國人吸煙、喝酒、嚼檳榔及上下班使用交通工具之盛行狀況分析。行政院衛生署檢疫總所疫情資訊。中華民國八十七年。
 23. Chou P. Liou MY. Lai MY. Hsiao ML. and Chang HJ. Time trend of substance use among adolescent students in Taiwan, 1991-1996. *J. Formos. Med. Assoc.* 1999, 98: 827-831.
 24. 88年1-9月台閩地區「酒後(醉)駕車」交通事故分析。交通部統計處。中華民國八十八年。
 25. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* 1989, 47: 187-376
 26. Herberman RB. Ortaldo JR. Timonen T. Reynolds CW. Djeu JY. Pestka S. Stanton J. Interferon and natural killer (NK) cells. *Tex. Rep.*

- Biol. Med. 1981-82, 41: 590-5,
27. Ritz J. Schmidt RE. Michon J. Hercend T. Schlossman SF. Characterization of functional surface structures on human natural killer cells. *Adv. Immunol.* 1988, 42: 181-211
 28. Ritz J. The role of natural killer cells in immune surveillance [editorial]. *New Engl. J. Med.* 1989, 320: 1748-9.
 29. Janeway CA. Natural killer cells: a primitive immune system. *Nature.* 1989, 341: 108.
 30. Hatcher FM. Kuhn RE. Destruction of *Trypanosoma cruzi* by Natural killer cells. *Science.* 1982, 218: 295-296.
 31. Emery DL. Eugui EM. Nelson RT. Tenywa T. Cell-mediated immune responses to *Theileria parva* (East Coast fever) during immunization and lethal infections in cattle. *Immunology.* 1981, 43: 323-336.
 32. Oldham SB. Calmodulin: its role in calcium-mediated cellular regulation. *Miner. Electrolyte Metab.* 1982, 8: 1-12.
 33. Franceschi C. Cossarizza A. Monti D. Ottaviani E. Cytotoxicity and immunocyte markers in cells from the freshwater snail *Planorbium corneum* (L.) (Gastropoda pulmonata): implications for the evolution of natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 1991, 21: 489-93.
 34. Neville ME. Grimm E. Bonavida B. Frequency determination of K cells by a single cell cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods.* 1980, 36: 255-268
 35. LeFever AV. Piaskowski VD. Casper JT. Truitt RL. Kinetic analysis of human IL-2 activated cytotoxic cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 1991, 13: 147-68.
 36. Biron CA. Byron KS. Sullivan JL. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *New Engl. J. Med.* 1986, 320: 1731-5.

37. Bukowski JF. Welsh RM. Inability of interferon to protect virus-infected cells against lysis by natural killer (NK) cells correlates with NK cell-mediated antiviral effects in vivo. *J. Immunol.* 1985, 135: 3537-41.
38. Perussia B. Tutt MM. Qiu WQ. Kuziel WA. Tucker PW. Trinchieri G. Bennett M. Ravetch JV. Kumar V. Murine natural killer cells express functional Fc gamma receptor II encoded by the Fc gamma R alpha gene. *J. Exp. Med.* 1989, 170: 73-86.
39. Trinchieri G. O'Brien T. Shade M. Perussia B. Phorbol esters enhance spontaneous cytotoxicity of human lymphocytes, abrogate Fc receptor expression, and inhibit antibody- dependent lymphocyte-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 1984, 133: 1869-77.
40. Trinchieri G. Perussia B. Human natural killer cells: biologic and pathologic aspects. *Lab. Invest.* 1984, 50: 489-513.
41. Scott P. Trinchieri G. The role of natural killer cells in host-parasite interactions. *Anesthesiology.* 1995, 7: 34-40.
42. Kendall RA. Targan S. The dual effect of prostaglandin (PGE₂) and ethanol on the natural killer cytolytic process: effector activation and NK-cell-target cell conjugate lytic inhibition. *J. Immunol.* 1980, 125: 2770-7.
43. Rice SA. Dooley JR. Mazze RI. Metabolism by rat hepatic microsomes of fluorinated ether anesthetics following ethanol consumption. *Anesthesiology.* 1983, 58: 237-41.
44. Mufti SI. Prabhala R. Moriguchi S. Sipes IG. Watson RR. Functional and numerical alterations induced by ethanol in the cellular immune system. *Immunopharmacology.* 1988, 15: 85-93.
45. Ristow SS. Starkey JR. Hass GM. Inhibition of natural killer cell activity in vitro by alcohols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982,

105: 1315-1321.

46. Stacey NH. Inhibition of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by ethanol. *Immunopharmacology*. 1984, 8: 155-61.
47. Walia AS. Lamon EW. In vitro effects of ethanol and acetaldehyde on cell-mediated cytotoxicity. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1990, 325: 145-53.
48. Suthanthiran M. Solomon SD. Williams PS. Rubin AL. Novogrodsky A. Stenzel KH. Hydroxyl radical scavengers inhibit human natural killer cell activity. *Nature*. 1984, 307: 276-278.
49. Yeralan O. Jones JM. Effects in vitro of ethanol and acetaldehyde on natural killer activity from rats. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1990, 325: 165-72.
50. Wu WJ. Pruett SB. Suppression of splenic natural killer cell activity in a mouse model for binge drinking. I. Direct effects of ethanol and its major metabolites are not primarily responsible for decreased natural killer cell activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996, 278: 1325-30.
51. Wu WJ. & Pruett SB. Involvement of catecholamines and glucocorticoids in ethanol-induced suppression of splenic natural killer cell activity in a mouse model for binge drinking. *Alcohol., Clin. Exp. Res.* 1997, 21: 1030-1036.
52. Irwin M. Hauger RL. Jones L. Provencio M. Britton KT. Sympathetic nervous system mediates central corticotropin-releasing factor induced suppression of natural killer cytotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1990, 255: 101-7.
53. Han YC. Lin TL. Pruett SB. Thymic atrophy caused by ethanol in a mouse model for binge drinking: involvement of endogenous glucocorticoids. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1993, 123: 16-25.
54. Carson EJ. Pruett SB. Development and characterization of a binge drinking model in mice for evaluation of the immunological effects of

- ethanol. *Alcohol., Clin. Exp. Res.* 1996, 20: 132-138.
55. Redei E. Clark WR. McGivern RF. Ethanol induced alteration of immune function may involve hormones of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1990, 325: 313-320
 56. Nieto MA. Gonzalez A. Gambon F. Diaz-Espada F. Lopez-Rivas A. Apoptosis in human thymocytes after treatment with glucocorticoids. *Clin. Exp. Immunol.* 1992, 88: 341-4.
 57. King KL. Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol.* 1998, 60: 601-17.
 58. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 1988, 240: 889-95.
 59. Hollenberg SM. Evans RM. Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell.* 1988, 55: 899-906.
 60. Schwartzman RA. Cidlowski JA. Glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells. *Int. Arch. Allergy . Immunol.* 1994, 105: 347-54.
 61. Chapman MS. Askew DJ. Kuscuoglu U. Miesfeld RL. Transcriptional control of steroid-regulated apoptosis in murine thymoma cells. *Mol. Endocrinol.* 1996, 10: 967-978.
 62. Helmberg A. Auphan N. Caelles C. Karin M. Glucocorticoid-induced apoptosis of human leukemic cells is caused by the repressive function of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 1995, 14: 452-60.
 63. Rhee K. Bresnahan W. Hirai A. Hirai M. Thompson EA. c-Myc and cyclin D3 (CcnD3) genes are independent targets for glucocorticoid inhibition of lymphoid cell proliferation. *Cancer Res.* 1995, 55: 4188-95.
 64. Thulasi R. Harbour DV. Thompson EB. Suppression of c-myc is a

- critical step in glucocorticoid-induced human leukemic cell lysis. *J. Biol. Chem.* 1993, 268: 18306-18312.
65. Thompson EB. Thulasi R. Saeed MF. Johnson BH. Glucocorticoid antagonist RU 486 reverses agonist-induced apoptosis and c-myc repression in human leukemic CEM-C7 cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1995, 761: 261-75.
 66. Strasser-Wozak EM. Hattmannstorfer R. Hala M. Hartmann BL. Fiegl M. Geley S. Kofler R. Splice site mutation in the glucocorticoid receptor gene causes resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in a human acute leukemic cell line. *Cancer Res.* 1995, 55: 348-53 .
 67. Hala M. Hartmann BL. Bock G. Geley S. Kofler R. Glucocorticoid-receptor-gene defects and resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in human leukemic cell lines. *Int. J. Cancer.* 1996, 68: 663-8.
 68. Ashraf J. Thompson EB. Identification of the activation-labile gene: a single point mutation in the human glucocorticoid receptor presents as two distinct receptor phenotypes. *Mol. Endocrinol.* 1993, 7: 631-42.
 69. Powers JH. Hillmann AG. Tang DC. Harmon JM. Cloning and expression of mutant glucocorticoid receptors from glucocorticoid-sensitive and -resistant human leukemic cells. *Cancer Res.* 1993, 53: 4059-65.
 70. Geley S. Hartmann BL. Hala M. Strasser-Wozak EM. Kapelari K. Kofler R. Resistance to glucocorticoid-induced apoptosis in human T-cell acute lymphoblastic leukemia CEM-C1 cells is due to insufficient glucocorticoid receptor expression. *Cancer Res.* 1996, 56: 5033-8.
 71. Moreno MB. Memon SA. Zacharchuk CM. Apoptosis signaling pathways in normal T cells: differential activity of Bcl-2 and

IL-1 β -converting enzyme family protease inhibitors on glucocorticoid- and Fas-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 1996, 157: 3845-9.

72. Miyashita T. Mami U. Inoue T. Reed JC. Yamada M. Bcl-2 relieves the trans-repressive function of the glucocorticoid receptor and inhibits the activation of CPP32-like cysteine proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 233: 781-7.
73. Brunet CL. Gunby RH. Benson RS. Hickman JA. Watson AJ. Brady G. Commitment to cell death measured by loss of clonogenicity is separable from the appearance of apoptotic markers. *Cell Death & Differ.* 1998, 5: 107-15.
74. Benson RS. Dive C. Watson AJ. Comparative effects of Bcl-2 over-expression and ZVAD.FMK treatment on dexamethasone and VP16-induced apoptosis in CEM cells. *Cell Death & Differ.* 1998, 5: 432-9.
75. Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. *Trends Genet.* 1995, 11: 101-5.
76. Adams JM. Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 1998, 281: 1322-6.
77. Gohel A. McCarthy MB. Gronowicz G. Estrogen prevents glucocorticoid-induced apoptosis in osteoblasts in vivo and in vitro. *Endocrinology.* 1999, 140: 5339-47.
78. Huang ST. Cidlowski JA. Glucocorticoids inhibit serum depletion-induced apoptosis in T lymphocytes expressing Bcl-2. *FASEB J.* 1999, 13: 467-76.
79. Sun XM. MacFarlane M. Zhuang J. Wolf BB. Green DR. Cohen GM. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1999, 274: 5053-60.

80. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 1997, 326 (Pt 1): 1-16.
81. Fukuzuka K. Edwards CK 3rd. Clare-Salzler M. Copeland EM 3rd. Moldawer LL. Mozingo DW. Glucocorticoid-induced, caspase-dependent organ apoptosis early after burn injury. *Am. J. Physiol.* 2000, 278: R1005-18.
82. Elgebaly SA. Kozol RA. Kreutzer DL. Alcohol and immune system: role of gastric tissue. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1990, 325: 75-8.
83. Rall TW., Hypnotics and sedatives; ethanol. In A. G. Gilman, T. W. Rall, A. S. Nies, & P. Taylor (Eds.) , *Goodman and Gilman' s The Pharmacological Basis of Therapeutics.* 1990, 370-378. New York: Pergamon Press.
84. Finn DA. Bejanian M. Jones BL. Syapin PJ. & Alkana RL. Temperature affects ethanol lethality in C57BL/6, LS, and SS mice. *Pharmacol. Biochem. Behavior.* 1989, 34: 375-380.
85. Andrews LS. & Snyder R., Toxic effects of solvents and vapors. In M. O. Amdur, J. Doull, & C. D. Klaassen (Eds.) , *Casarett and Doull' s Toxicology.* 1991, 681-722. New york: Pergamon Press.
86. Tichy M. Trcka V. Roth Z. & Krivucova M. QSAR analysis and data extrapolation among mammals in a series of aliphatic alcohols. *Environ. Health Perspect.* 1985, 61: 321-328.
87. Freireich EJ. Gehan EA. Rall DP. Schmidt LH. & Skipper HE. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemother. Rep.* 1996, 50: 219-244.
88. Bryant J. DayR. Whiteside T. Herberman RB. Calculation of lytic units for the expression of cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.*

Methods. 1992, 146:91-103.

89. Luster MI. Munson AE. Thomas PT. Holsapple MP. Fenters JD. White KL. Lauer LD. Germolec DR. Rosenthal GJ. Dean JH. Methods evaluation. Development of testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: National Toxicology Program's guidelines for immunotoxicity evaluation in mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1988, 10:2-19.
90. Ingrid S. Christel HU. Birgitte K. Janis VG. A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* 1994, 170: 145-157.
91. Mann CL. Hughes FM Jr. Cidlowski JA. Delineation of the signaling pathways involved in glucocorticoid-induced and spontaneous apoptosis of rat thymocytes. *Endocrinology.* 2000, 141:528-38.
92. Cupps TR. and Fauci AS. Corticosteroid-mediated immunoregulation in man. *Immunol. Rev.* 1992, 65: 133-155.
93. Slukvin IL. and Jerrells TR. Different pathways of in vitro ethanol-induced apoptosis in thymocytes and splenic T and B lymphocytes. *Immunopharmacology.* 1995, 31: 43-57.
94. Ewald SJ. and Shao H. Ethanol increases apoptotic cell death of thymocytes in vitro. *Alcohol., Clin. Exp. Res.* 1993, 17: 359-365.
95. Singhal PC. Patel P. Nahar N. Franki N. Kapasi A. Reddy K. Shah N. Nwakoby IE. Mehrotra B. Ethanol-induced neutrophil apoptosis is mediated through nitric oxide. *J. Leuk. Biol.* 1999, 66: 930-6.
96. Neuman MG. Shear NH. Cameron RG. Katz G. Tiribelli C. Ethanol-induced apoptosis in vitro. *Clin. Biochem.* 1999, 32: 547-55.
97. Slomiany BL. Piotrowski J. Slomiany A. Chronic alcohol ingestion enhances tumor necrosis factor-alpha expression and salivary gland apoptosis. *Alcohol., Clin. Exp. Res.* 1997, 21: 1530-1533.

98. Gilian Z. Shi QY. Ming Y. Hui ZL. Rudura R. Anna MD., Alcohol and cytokine-inducible transcription factors. *Alcohol., Clin. Exp. Res.* 1996, 20: 1639-1645.
99. Kurose I. Higuchi H. Miura S. Saito H. Watanabe N. Hokari R. Hirokawa M. Takaishi M. Zeki S. Nakamura T. Ebinuma H. Kato S. Ishii H. Oxidative stress-mediated apoptosis of hepatocytes exposed to acute ethanol intoxication. *Hepatology.* 1997, 25: 368-378.
100. Emanuele MA. Tentler JJ. Kirsteins L. The effect of “binge” ethanol exposure on growth hormone and prolactin gene expression and secretion. *Endocrinology.* 1992, 131: 2077-2082.
101. Josefsson E. Bergquist J. Ekman R. Tarkowski A. Catecholamines are synthesized by mouse lymphocytes and regulate function of these cells by induction of apoptosis. *Immunol.* 1996, 88: 140-6, 1996
102. Yin D. Tuthill D. Mufson RA. Shi Y. Chronic restraint stress promotes lymphocyte apoptosis by modulating CD95 expression. *J. Exp. Med.* 2000, 191: 1423-8.
103. Deaciuc IV. Fortunato F. D’ Souza NB. Schmidt J. Lee EY. McClain CJ. Modulation of caspase-3 activity and Fas ligand mRNA expression in rat liver cells in vivo by alcohol and lipopolysaccharide. *Alcohol., Clin. Exp. Res.* 1999, 23: 349-356.
104. Miyashita T. Nasgao K. Krajewski S. Salvesen GS. Reed JC. Inoue T. Yamada M., Investigation of glucocorticoid-induced apoptotic pathway: processing of caspase-6 but not caspase-3. *Cell Death Differ.* 1998, 5: 1034-41.
105. Rieger J. Durka S. Streffer J. Dichgans J. Weller M. Gemcitabine cytotoxicity of human malignant glioma cell: modulation by antioxidants, Bcl-2 and Dexamethasone. *Eur. J. Pharmacol.* 1999, 365: 301-308.
106. Mok CL. Gil-Gomez G. William O. Coles M. Taga S. Tolaini M.

- Norton T. Kioussis D. Brady HJ. Bad can act as a key regulator of T cell apoptosis and T cell development. *J. Exp. Med.* 1999, 189: 575-586.
107. Montani MS. Tuosto L. Giliberti R. Stefanini L. Cundari E. Piccolelle E. Dexamethasone induced apoptosis in human T cell clones expressing Low levels of Bcl-2. *Cell Death Differ.* 1999, 6: 79-86.
 108. Ghislaine D. Chantal H. Myriam V. Jacques B. Marie-Paule D. p53, Bax and Bcl-2 in vivo Expression in the murine thymus after apoptogenic treatments. *Anticancer res.* 1998, 18: 3315-3522.
 109. Phong TL. Holden TM. Jane EC. In situ detection and characterization of apoptotic thymocytes in human thymus: Expression of Bcl-2 in vivo does not prevent apoptosis. *J. Immunol.* 1995, 154: 4371-4378.
 110. Se-te JH. and John AC. Glucocorticoids inhibit serum depletion-induced apoptosis in T lymphocytes expressing Bcl-2. *FASB J.* 1999, 13: 467-476.
 111. Weimann E. Baixeras E. Zamzami N. Kelly P. Prolactin blocks glucocorticoid induced cell death by inhibiting the disruption of the mitochondrial membrane. *Leuk. Res.* 1999, 23: 751-62.
 112. Lotern J. and Sachs L. Regulation of bcl-2, bcl-xL and bax in the control apoptosis by hematopoietic cytokines and dexamethasone. *Cell Growth Differ.* 1995, 6: 647-653.
 113. Chao DT. Linette GP. Boise LH. White LS. Thompson CB. Korsmeyer SJ. Bcl-xL and Bcl-2 repress a common pathway of cell death. *J. Exp. Med.* 1995, 182: 821-828.

表一、酒精對各組織中自然殺手細胞數目的影響

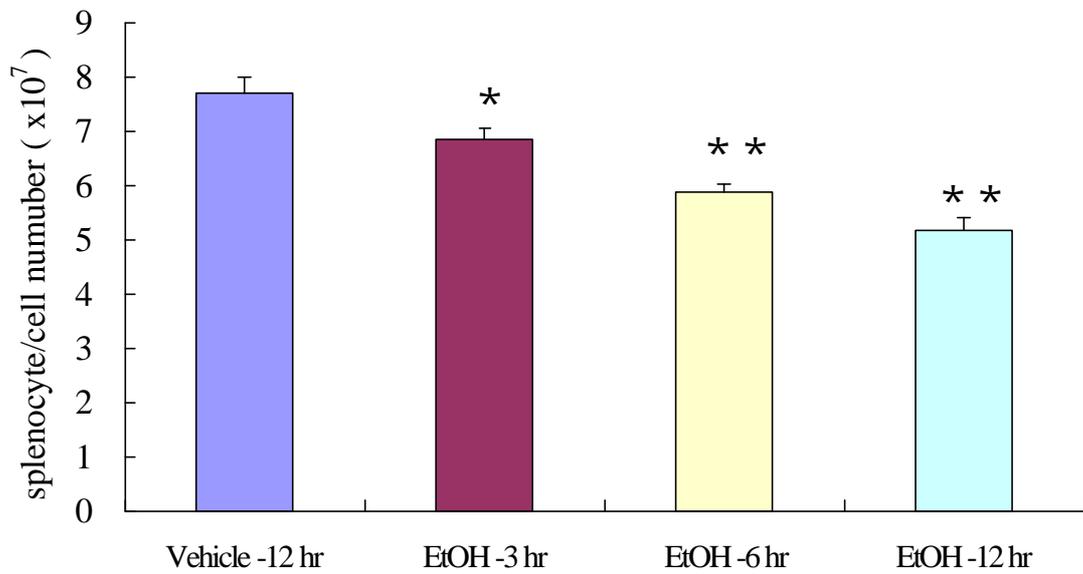
%	Spleen	Peripheral blood	Bone marrow	Peritoneal cavity
Vehicle	4.48±0.12	7.85±0.11	2.14±0.05	2.08±0.13
EtOH	3.49±0.15 ^{**}	6.80±0.14 [*]	1.69±0.07 ^{**}	1.23±0.03 ^{**}

老鼠給予單一劑量（32%，6 g/kg）的酒精（EtOH），在十二小時後犧牲老鼠，取出脾臟細胞、腹腔細胞、週邊血液細胞及骨髓細胞以 PK136 單株抗體標定自然殺手細胞，再以流式細胞儀計算自然殺手細胞的百分比。結果發現與控制組（Vehicle）相較處理酒精的老鼠之自然殺手細胞在各組織中的百分比均有下降。“*”表示 $P < 0.05$ ，“**”表示 $P < 0.01$ 。

表二、酒精對各組織中自然殺手細胞活性的影響

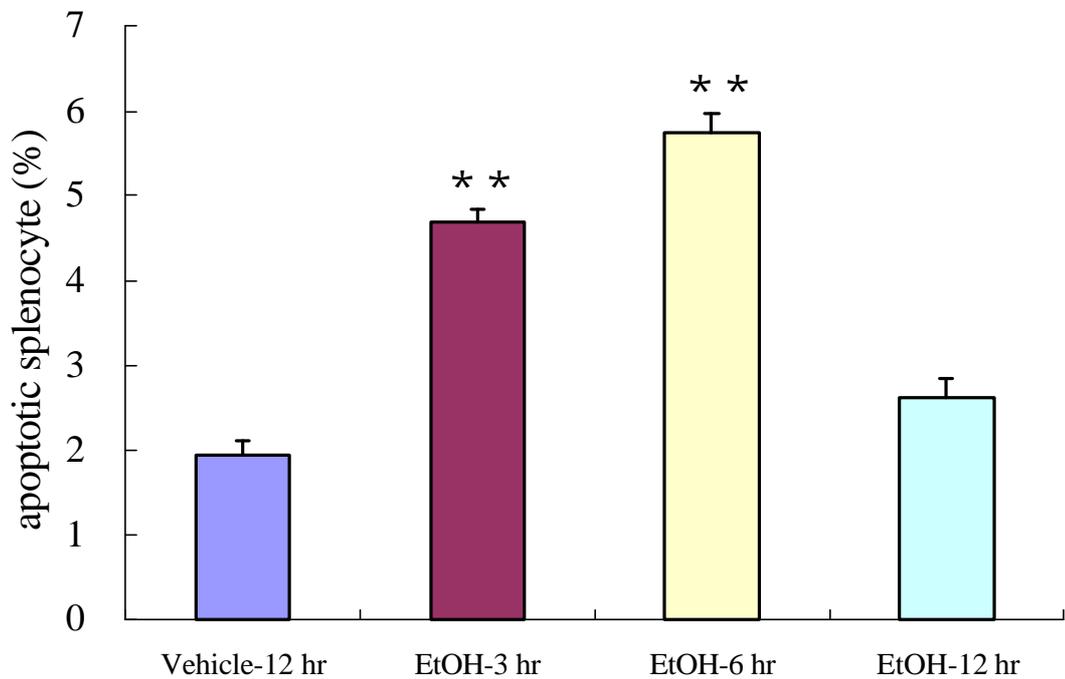
%	Spleen	Peripheral blood	Bone marrow	Peritoneal cavity
Vehicle	27.96±0.94	27.12±0.50	7.79±0.705	6.34±0.67
EtOH	15.29±0.79 ^{**}	14.29±1.20 ^{**}	5.80±0.93 [*]	3.20±0.40 ^{**}

老鼠給予單一劑量（32%，6 g/kg）的酒精（EtOH），在十二小時後犧牲老鼠，取出脾臟細胞、腹腔細胞、週邊血液細胞及骨髓細胞以 YAC-1 細胞評估自然殺手細胞的毒殺能力。以 Bryant 等人發表的計算方式計算 100:1、50:1 及 25:1 的平均數值（88，equation 10），每個數值（lytic unit/ 10^7 cells）代表每 10^7 個作用細胞毒殺的能力。結果發現與控制組（Vehicle）相較處理酒精的老鼠在各組織中的毒殺能力均有下降。“*”表示 $P < 0.05$ ，“**”表示 $P < 0.01$ 。



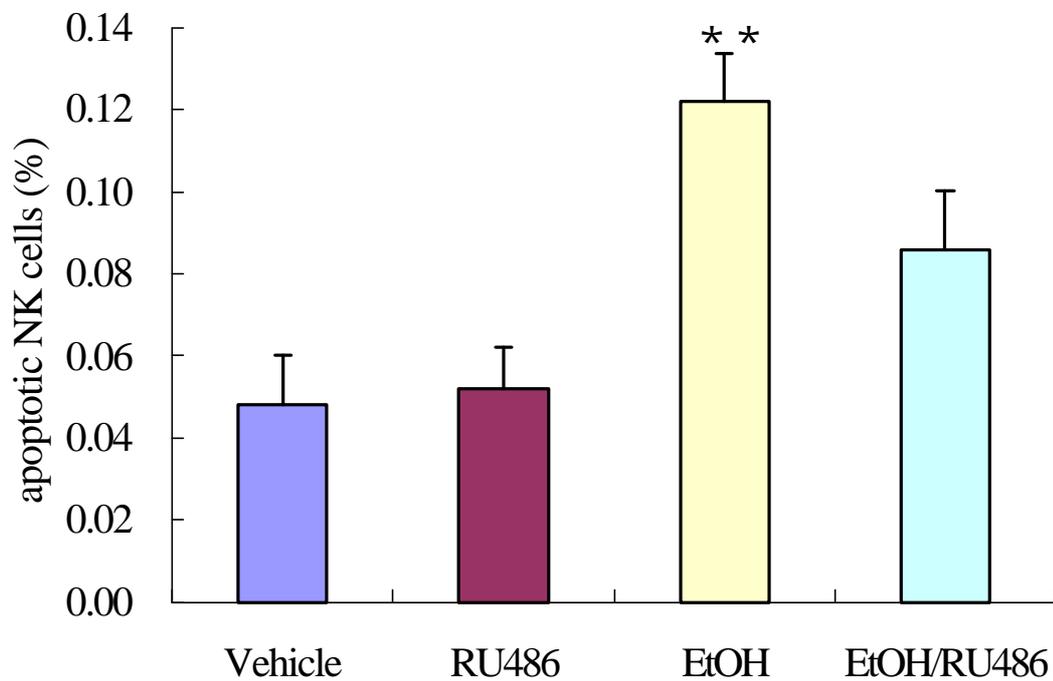
圖一、酒精在不同時間下對脾臟細胞數目的影響

老鼠給予單一劑量（32%，6 g/kg）的酒精（EtOH），在三小時、六小時及十二小時後犧牲老鼠，取出脾臟細胞，以 Coulter counter（model Z1）計算細胞數。結果發現酒精處理三小時、六小時及十二小時與控制組（Vehicle）相比脾臟細胞數有明顯下降。“*”表示 $P < 0.05$ ，“**”表示 $P < 0.01$



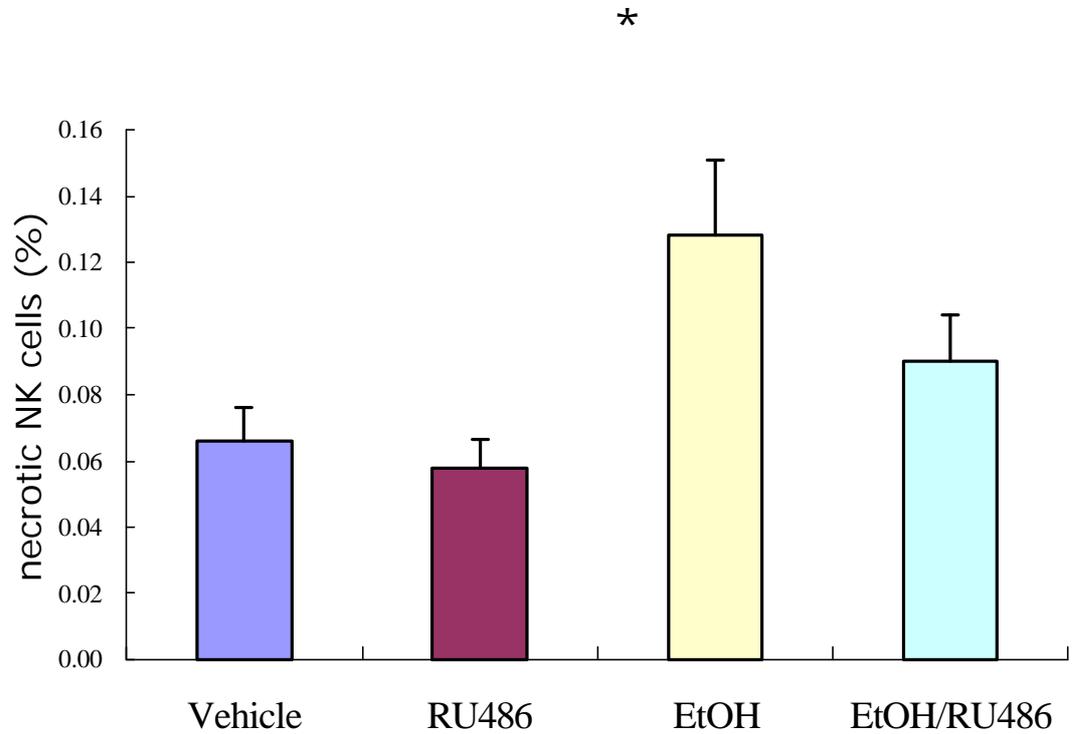
圖二、酒精在不同時間下對脾臟細胞發生細胞凋亡的影響

老鼠給予單一劑量（32%，6 g/kg）的酒精（EtOH），在三小時、六小時及十二小時後犧牲老鼠，取出脾臟細胞以 Annexin V 分析脾臟細胞發生細胞凋亡的百分比。結果發現酒精處理三小時及六小時與控制組（Vehicle）相比脾臟細胞發生細胞凋亡的百分比有明顯上升。“**”表示 $P < 0.01$ 。



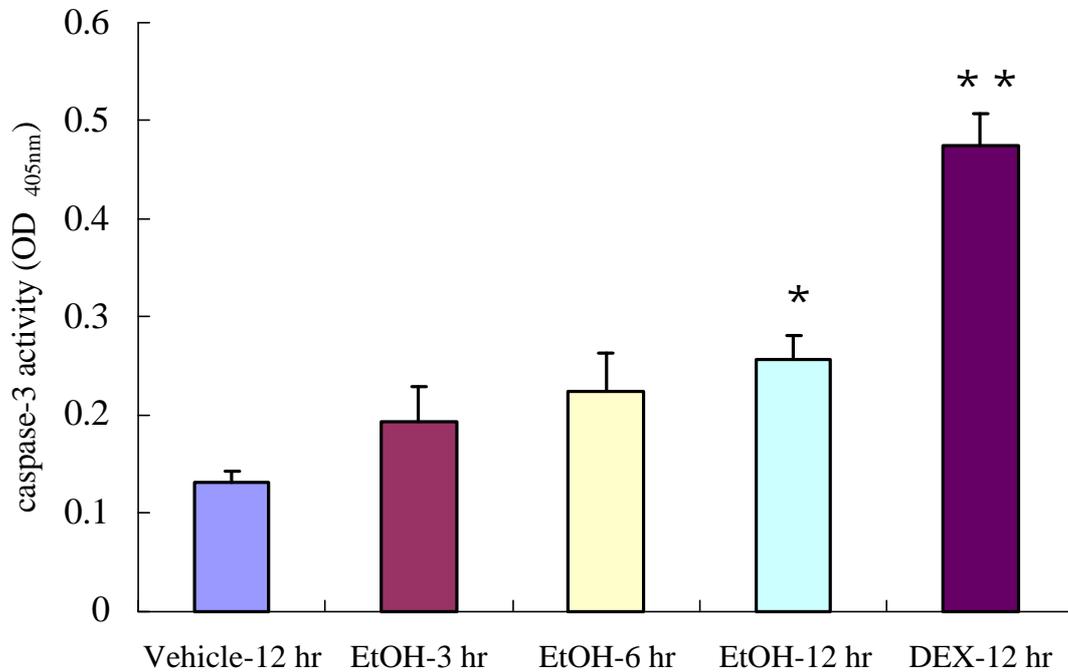
圖三、酒精對脾臟自然殺手細胞發生細胞凋亡的影響

老鼠給予單一劑量（32%，6g/kg）的酒精（EtOH），在六小時後犧牲老鼠，取出脾臟細胞以 PK136 單株抗體標定自然殺手細胞再以 7-AAD 分析自然殺手細胞發生細胞凋亡的百分比。結果發現酒精組與控制組（Vehicle）比較具有顯著的意義。“**”表示 $P < 0.01$ 。



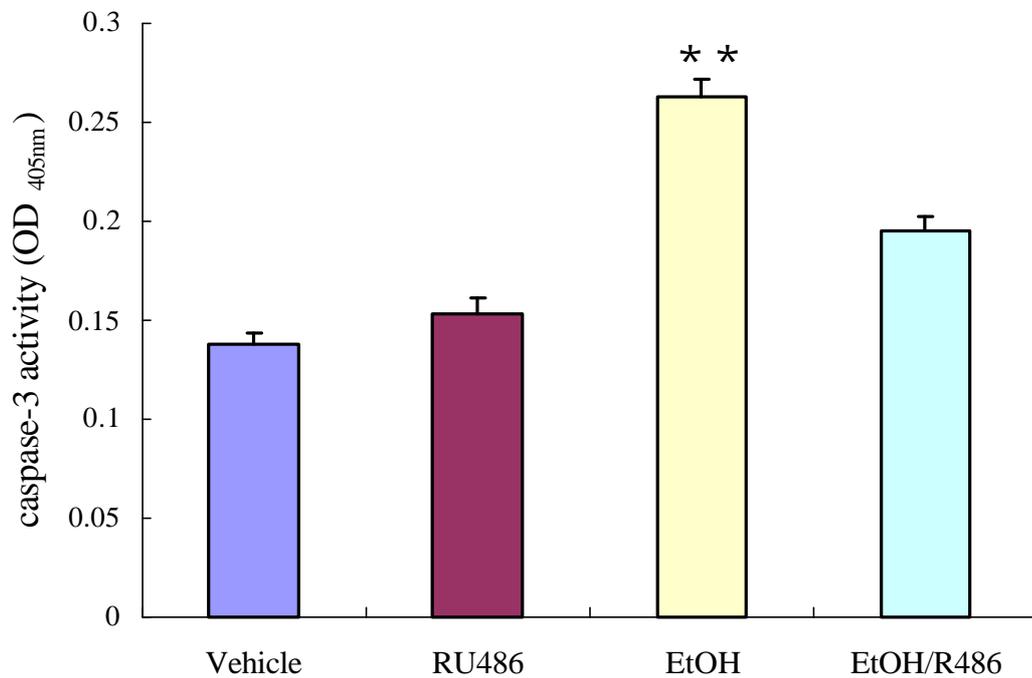
圖四、酒精對脾臟自然殺手細胞發生壞死的影響

老鼠給予單一劑量（32%，6 g/kg）的酒精（EtOH），在六小時後犧牲老鼠，取出脾臟細胞以 PK136 單株抗體標定自然殺手細胞再以 7-AAD 分析自然殺手細胞發生壞死性死亡的百分比。結果發現酒精組與控制組（Vehicle）比較具有顯著的意義。“*”表示 $P < 0.05$ 。



圖五、酒精對自然殺手細胞之 caspase-3 活性的影響

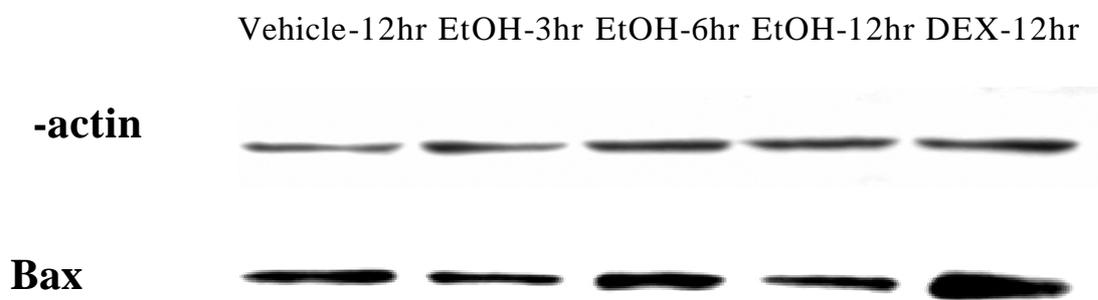
老鼠給予單一劑量（32%，6 g/kg）的酒精（EtOH），在三小時、六小時及十二小時後犧牲老鼠，純化出脾臟的自然殺手細胞，測試 caspase-3 活性。結果發現酒精處理十二小時與控制組（Vehicle）相比 caspase-3 活性有上升。然而老鼠給予 dexamethasone（DEX）十二小時後其 caspase-3 的活性有顯著上升。“*”表示 $P < 0.05$ ，“**”表示 $P < 0.01$ 。



圖六、RU486 對酒精誘發脾臟自然殺手細胞之 caspase-3 活性的影響

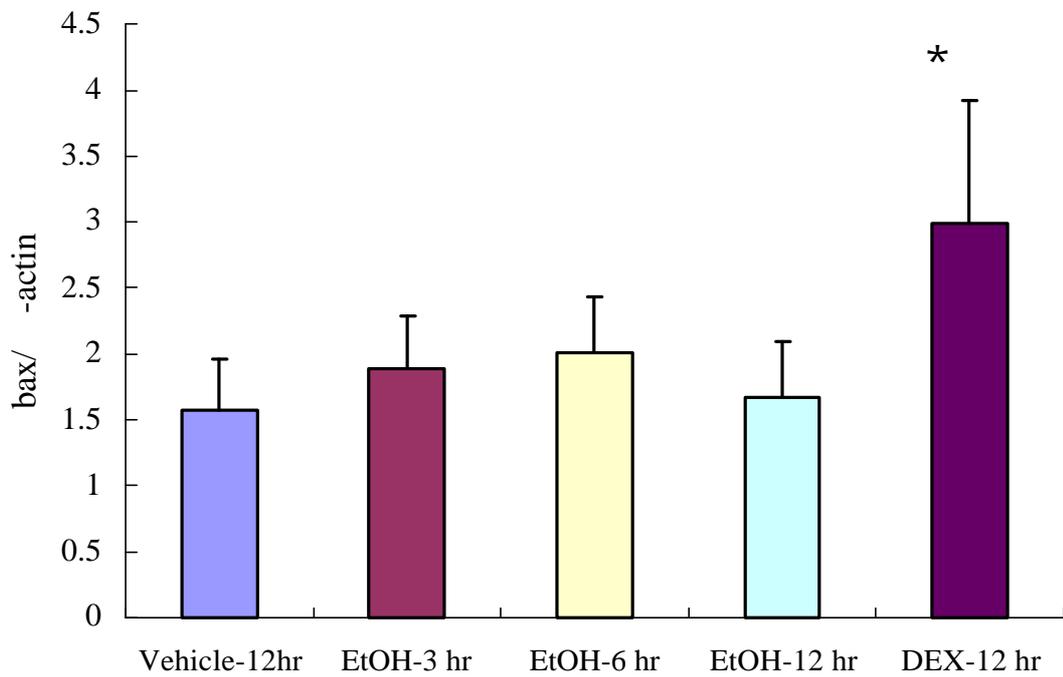
老鼠給予單一劑量 (32%, 6 g/kg) 的酒精 (EtOH) , 在十二小時後犧牲老鼠 , 純化出脾臟自然殺手細胞 , 測試 caspase-3 活性。酒精組與控制組 (Vehicle) 比較發現具有顯著的意義。

“ ** ”表示 $P < 0.01$ 。



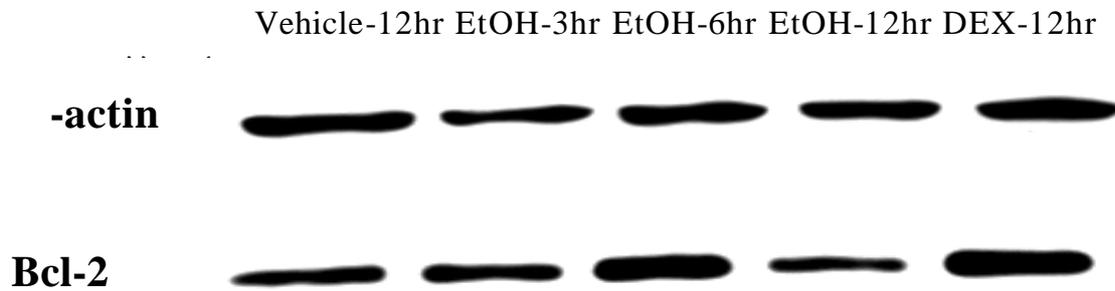
圖七、酒精對脾臟自然殺手細胞內 Bax 蛋白表現的影響

老鼠給予單一劑量（32%，6 g/kg）的酒精（EtOH），在三小時、六小時及十二小時後犧牲老鼠，純化出脾臟的自然殺手細胞，以西方點墨法偵測 Bax 蛋白的表現量在 X 光底片上，用 β -actin 蛋白表現量當控制組。另有一組老鼠注射 25 mg/kg dexamethasone（DEX）十二小時，當作活化 Bax 蛋白的陽性對照組。



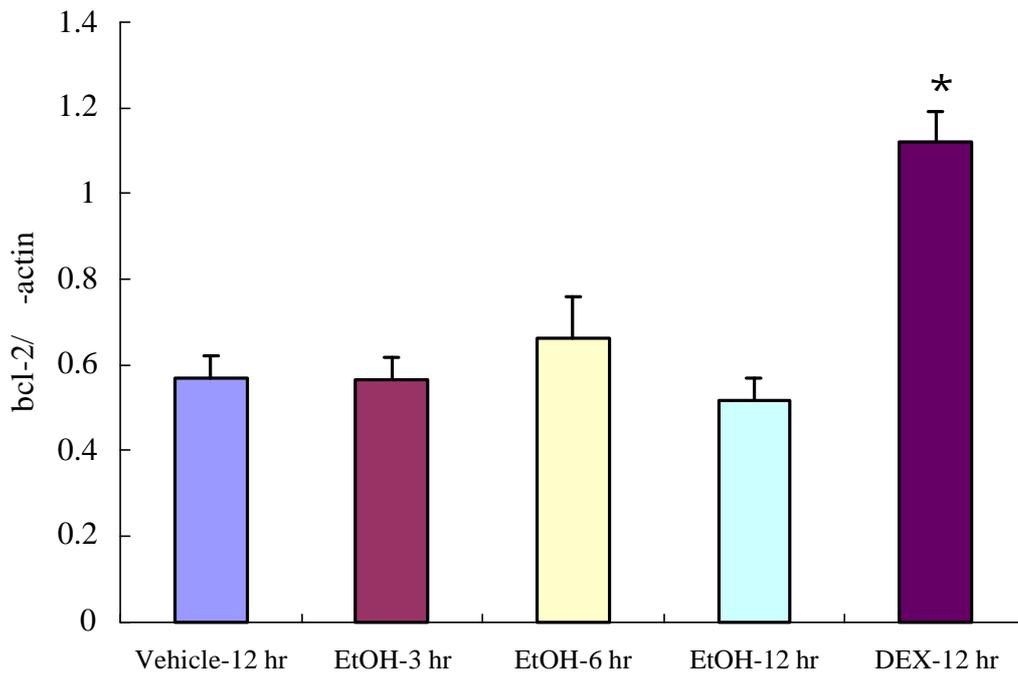
圖八、圖七之 Bax 蛋白經量化後的結果

將同組三隻老鼠的 Bax/actin 的比值平均，做成統計直方圖，只有 dexamethasone (DEX) 與控制組 (Vehicle) 相較在統計上有意義，其他組則無意義。“*”表示 $P < 0.05$ 。



圖九、酒精對脾臟自然殺手細胞內 Bcl-2 蛋白表現的影響

老鼠給予單一劑量 (32%, 6 g/kg) 的酒精 (EtOH) , 在三小時、六小時及十二小時後犧牲老鼠 , 純化出脾臟的自然殺手細胞 , 以西方點墨法偵測 Bcl-2x 蛋白的表現量在 X 光底片上 , 用 -actin 蛋白表現量當控制組。DEX-12hr 表示老鼠注射 25 mg/kg 的 dexamethasone (DEX) 達十二小時之久。



圖十、圖九之 Bcl-2 蛋白經量化後的結果

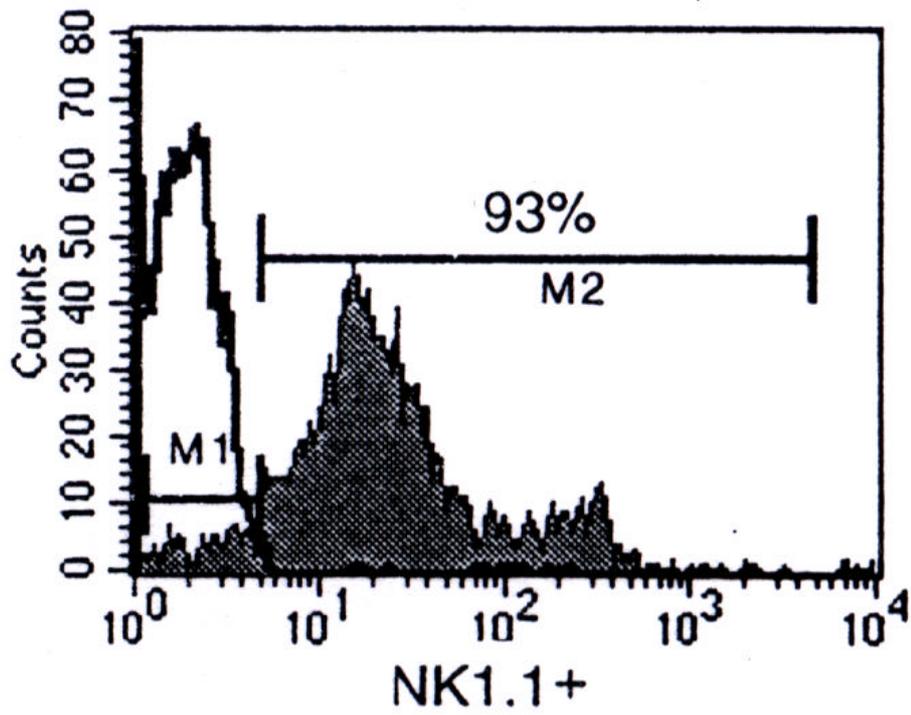
將同組三隻老鼠的 Bcl-2/ β -actin 的比值平均，做成統計直方圖，只有 dexamethasone (DEX) 與控制組 (Vehicle) 相較在統計上有意義，其他組則無意義。“*”表示 $P < 0.05$ 。

附表一、急性酒精中毒對神經系統的影響

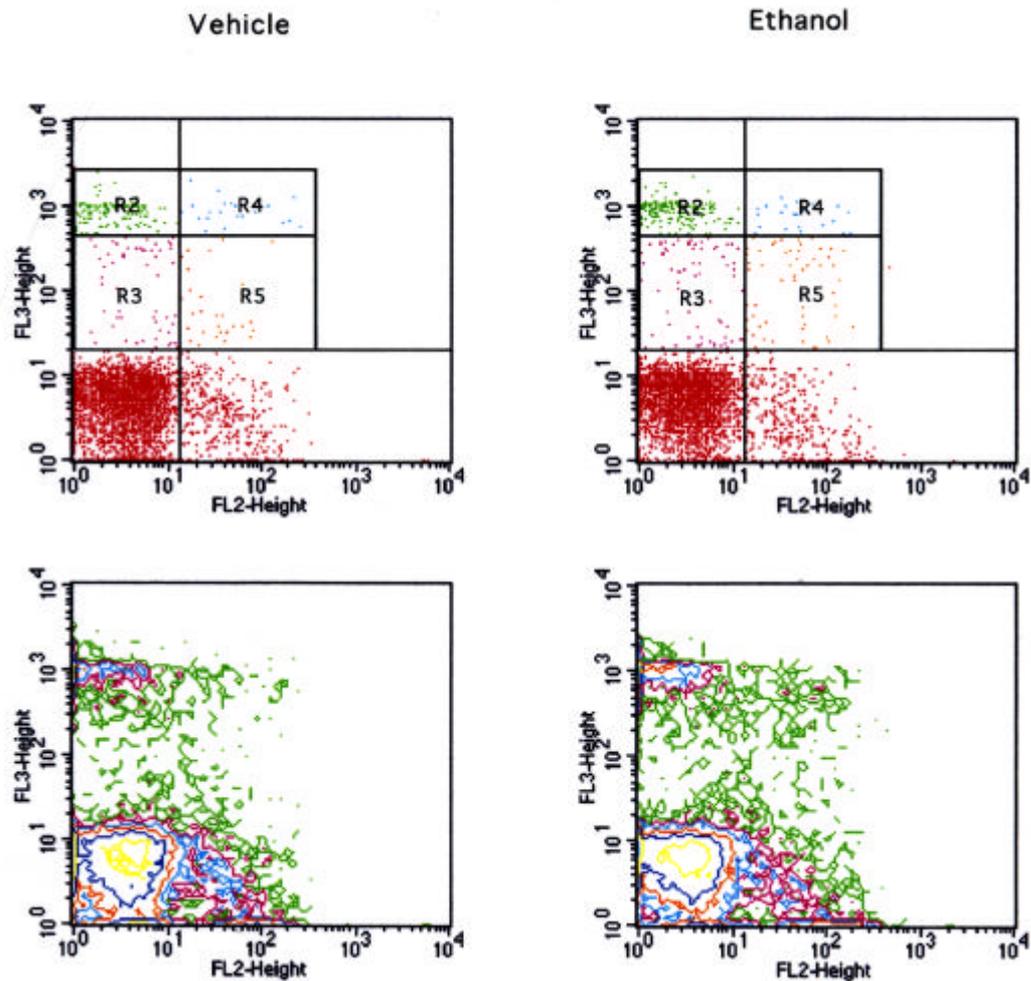
Stages of Acute Alcoholic Influence/Intoxication

BLOOD-ALCOHOL CONCENTRATION (g/100 ml)	STAGE OF ALCOHOLIC INFLUENCE	CLINICAL SIGNS/SYMPTOMS
0.01-0.05	Subclinical	No apparent influence Behavior nearly normal by ordinary observation Slight changes detectable by special tests
0.03-0.12	Euphoria	Mild euphoria, sociability, talkativeness Increased self-confidence; decreased inhibitions Diminution of attention, judgment, and control Beginning sensorimotor impairment Slowed information processing
0.09-0.25	Excitement	Loss of efficiency in finer performance tests Emotional instability; loss of critical judgment Impairment of perception, memory, and comprehension Decreased sensory response; increased reaction time Reduced visual acuity, peripheral vision, and glare recovery Sensorimotor incoordination; impaired balance
0.18-0.30	Confusion	Disorientation, mental confusion; dizziness Exaggerated emotional states (fear, rage, sorrow, etc.) Disturbances of vision (diplopia, etc.) and of perception of color, form, motion, dimensions Increased pain threshold Increased muscular incoordination; staggering gait; slurred speech
0.25-0.40	Stupor	Apathy, lethargy General inertia; approaching loss of motor functions Markedly decreased response to stimuli Marked muscular incoordination; inability to stand or walk Vomiting; incontinence of urine and feces
0.35-0.50	Coma	Impaired consciousness; sleep or stupor Complete unconsciousness; coma; anesthesia Depressed or abolished reflexes Subnormal temperature Incontinence of urine and feces Impairment of circulation and respiration
0.45+	Death	Possible death Death from respiratory arrest

SOURCE: Copyright © by Kurt M. Dubowski, Ph.D., DABFT, and reprinted with his permission.



附圖一、脾臟之自然殺手細胞經磁性 column 純化後的百分比。



附圖二、以 7-AAD 分析脾臟自然殺手細胞發生細胞凋亡及
細胞壞死的百分比

上圖為 dot plot

R2:發生細胞壞死的脾臟細胞

R3:發生細胞凋亡的脾臟細胞

R4:發生細胞壞死的自然殺手細胞

R5:發生細胞凋亡的自然殺手細胞

下圖為 contour plot