

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

肺炎克雷伯氏菌造成嚴重社區感染性肺炎的細菌分析及糖  
尿病動物肺部感染的致病機轉研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2314-B-040-033-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：中山醫學大學醫學系微生物及免疫學科

計畫主持人：盧敏吉

共同主持人：邱乾順

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 17 日



# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 國科會專題研究計畫成果報告撰寫格式說明

### Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC 91-2314-B-039-008

執行期限：92年8月1日至93年7月31日

主持人：盧敏吉

中山醫學大學醫學系內科及微生物與免疫科

#### 一、中文摘要

在台灣，糖尿病(diabetes mellitus, DM)病人容易感染克雷伯氏肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)，由KP造成的院內感染與社區性肺炎具有快速的臨床病程與高死亡率，而KP的黏性特質(mucoviscosity)被認為是重要的致病因子。肺臟中常駐的肺泡巨噬細胞(alveolar macrophage, AM)，具有吞噬與殺菌的功能，是肺臟抵抗外來微生物的第一道防線。為探討黏性特質(mucoviscosity)與糖尿病在不同群(cluster) KP間之致病作用，本研究中，將6週齡的C57BL/6J小鼠腹腔注射 streptozotocin，以誘發糖尿病，並持續飼養至30週，將不同 cluster 低黏性(hypo-mucoid)與高黏性(hyper-mucoid)，且基因相似度高達98%成對的KP，分別以菌量 $1 \times 10^4$  cfu感染正常與糖尿病小鼠，於20或40小時將其犧牲。為研究KP在肺部與血液中清除的情形，將小鼠左肺均質(homogenize)，同時收集小鼠心臟血液，進行細菌培養；將小鼠右肺進行支氣管灌流術(bronchoalveolar lavage)分離巨噬細胞，探討KP入侵肺部後引起AM的凋亡(apoptosis)與吞噬(phagocytosis)情形。結果顯示，在hypo-mucoid KP的感染中，DM小鼠肺部或血液內的KP菌量比在正常小鼠的肺或血液內明顯增多；正常小鼠分別感染成對KP時，hyper-mucoid KP在肺中的菌量比hypo-mucoid KP顯著增加。而在宿主防禦方面，DM小鼠的巨噬細胞對KP具有正常的吞噬能力，凋亡現象也與正常小鼠一致。為進一步研究AM與hypo-或hyper-mucoid KP之間是否存在著不同的交

互作用(interaction)，因此利用老鼠的巨噬細胞株(RAW 264.7 cell line)感染hypo-或hyper-mucoid KP，比較KP對巨噬細胞的存活力(viability)與凋亡(apoptosis)之作用，同時也比較KP對巨噬細胞的附著(adhesion)與在巨噬細胞內的KP存活量(macrophage-associated KP)，結果發現，hyper-mucoid KP對巨噬細胞具較高的黏著量，甚至可以進入巨噬細胞中存活約一小時；而利用轉移子突變(mini-Tn10 transposon mutagenesis)方式將hyper-mucoid KP的黏性去除，再予以感染巨噬細胞，則失去其原先的高黏著量，也無法在巨噬細胞內存活。經由本篇的研究結果，說明了黏性特質影響細菌與巨噬細胞間的交互作用，KP的黏性特質是一個獨立致病因子，hyper-mucoid KP具有較高的致病力；然而，DM此因子一旦存在，便使hypo-mucoid KP的致病力加成，不僅如此，hypo-mucoid KP可能存在著有別於黏性特質的致病因子。

**關鍵詞：**肺炎克雷伯氏菌，糖尿病，社區感染性肺炎，敗血症，肺泡巨噬細胞，細胞凋亡

#### Abstract

Diabetic (DM) patients are susceptible to *Klebsiella pneumoniae* (KP) infection, resulting in community- and hospital-acquired pneumonia and a high mortality rate in Taiwan. In the lungs, alveolar macrophages (AM) are pivotal for the defense against KP invasion. To investigate the effect of mucoviscosity and diabetes on virulence of KP between divergent cluster, in this study, C57BL/6J

male mice was intraperitoneally injected with streptozotocin at 6 wk and DM was successfully induced with a blood sugar of  $\geq 300$  mg/dl at 8 wk. At 30 wk, the diabetic mice were instilled intratracheally with hypo- or hyper-mucoid KP from divergent cluster, and sacrificed 20 hr or 40 hr later. To study the clearance of KP in the lung and blood, the KP burden was determined by culturing the homogenate of left lung and the intra-cardiac blood. The lung burden of hyper-mucoid KP, after 20 hr of infection, was greater than that of hypo-mucoid one in control mice. Besides, the hypo-mucoid KP burden in the lung or blood of infected diabetic mice was more than that of control ones. The phagocytic ability and apoptosis of AM from right lung was assessed by Gram stain and FACScan analysis, respectively. The results showed that AM from diabetic mice possess normal phagocytic ability and their percentage of apoptosis was similar to that of control mice. Furthermore, to study the interaction between hypo-/hyper-mucoid KP and macrophage cell line, RAW 264.7 cells were infected with hyper- or hypo-mucoid KP. It showed that there was no difference in the percentages of cell apoptosis. However, hyper-mucoid KP adhere and invade into RAW 264.7 cells easier than hypo-mucoid one, and it survived longer in the host cell. Additionally, mini-Tn10 transposon mutagenesis was introduced into wild type KP and resulted in a mutant KP with hypo-mucoid phenotype. RAW 264.7 cells were infected by this mutant KP, and thereafter, the adhesion and invasion of the mutant KP was decreased. These results suggested that the mucoid property was not only a key factor for KP to adhere and to invade macrophages, but also an independent KP virulent factor. On the other hand, DM played an important role for the infection by hypomucoid KP possibly making animals susceptible to hypo-mucoid KP infection.

Keywords : *Klebsiella pneumoniae*, sepsis, diabetes, community-acquired pneumonia, alveolar macrophages, apoptosis,

## 二、計畫目的

先前的研究發現，cluster A 的 KP 是造成台灣 KP 肝膿瘍的主要族群(Lau et al., 2000)；而我們實驗室由不同疾病的檢體，收集近五百株 KP 進行 PFGE (pulse field gel electrophoresis) 分群，分析出相似的 cluster A KP，以及其他的 cluster B、C...

等，也有不屬於 cluster 內的 KP。在台灣，KP 造成的社區性肺炎的死亡率高達 54 % (Ko et al., 2002)，然而造成 KP 呼吸道感染的致病機制及 DM 病人對 KP 的高感受性和 KP 的致病因子，仍尚未清楚。

近年來，許多學者針對 KP 的黏性特質進行研究，發現經過突變而成為 hypo-mucoid KP 便不具致病力 (Fang et al., 2004)。由於目前皆以突變的 KP 菌株研究 KP 的黏性，為避免因突變而影響 KP 某些未知的生物特性或功能，本實驗選擇以野生型 (wild type) 臨床分離菌株，亦即由 cluster A、B、C 中挑選出基因相似度最高、黏性特質差異最大的成對 KP (paired KP) 進行黏性的致病研究。為探討不同 cluster KP 的黏性特質在糖尿病與正常血糖動物的致病力，將來自不同 cluster 的成對 KP 分別感染正常與糖尿病小鼠的肺部，觀察 20 或 40 小時後動物肺部 KP 的清除情形，同時進一步探討 KP 是否有散佈至血液中；更進一步，也將成對的 KP 分別感染老鼠的巨噬細胞株，探討 KP 與巨噬細胞之間的交互作用 (interaction)；藉由來自不同 cluster 的成對 KP 進行體內 (*in vivo*) 試驗與體外試驗 (*in vitro*)，比較黏性特質及糖尿病的致病作用，試圖找出 KP 的致病機制。

## 三、結果

### 第一節 體內試驗 (*in vivo*)

#### 1-1. DM 小鼠實驗模式之建立

為探討 KP 在肺部感染時，糖尿病 (DM) 是否為致病因子，故須建立 DM 小鼠模式。將 6 週齡 C57BL/6J 小鼠分為兩組，控制組 (Con) 則予檸檬酸鹽緩衝液注射；糖尿病組 (DM) 予連續四天低劑量 STZ 腹腔注射，以破壞蘭氏小島之  $\beta$ -cell 而誘發糖尿病，當第 8 週隨機血糖大於 300 mg/dl 時便定義其為糖尿病鼠。

#### 1. 小鼠血糖

結果圖三顯示第八週時，控制組隨機血糖為  $117.5 \pm 2.1$  mg/dl，DM 組則為  $320.3 \pm 5.8$  mg/dl，符合 DM 定義且 DM 組血糖明顯較控制組高 ( $P < 0.05$ ;  $n = 46$ )。為使 DM 小鼠長期處在

高血糖的生理情況下，將二組一起飼養至 30 週齡才進行實驗；於二十八週時測其血糖，控制組隨機血糖為  $118.9 \pm 1.9$  mg/dl，DM 組則為  $411.3 \pm 8.5$  mg/dl，DM 組血糖明顯較控制組高並持續至 28 週 ( $P < 0.05$ ； $n = 46$ )。此外，DM 小鼠其 28 週的血糖較第 8 週時有顯著性的上升 ( $P < 0.05$ )。

## 2. 小鼠體重

圖四結果顯示於第十週時，DM 小鼠體重為  $20.2 \pm 0.2$  克，正常小鼠體重  $21.4 \pm 0.2$  克，其體重明顯較正常小鼠輕 ( $P < 0.05$ ； $n = 46$ )，此現象一直持續至小鼠週齡 30 週，於實驗進行前 DM 小鼠體重為  $23.0 \pm 0.2$  克，正常小鼠體重  $28.0 \pm 0.2$  克，兩者有統計學上之顯著差異。

除了血糖大於 300 mg/dl、體重減輕之外，DM 小鼠於飼養半年間也呈現多尿、多喝的現象。

### 1-2. KP1004n (hypo-mucoid) 與 KP1004m (hyper-mucoid) 之肺部感染

#### 1. KP1004n (hypo-mucoid) 與 KP1004m (hyper-mucoid) 在正常與 DM 小鼠肺及血液中之菌量

為比較 KP1004 其黏性(mucoid)在正常與 DM 小鼠肺部感染的差異，因此於感染後 20 小時進行肺部 KP 菌量培養。圖五 A. 顯示在低黏性(hypo-mucoid) KP 感染時，正常小鼠肺部 KP 之 cfu+1 取 log 後為 0，DM 小鼠為  $\log \text{cfu}+1 = 4.0 \pm 0.7$ ，較正常小鼠顯著增加 ( $P < 0.05$ ； $n = 3$ )，而高黏性(hyper-mucoid) KP 在兩組肺部感染之菌量則無統計上的差異(正常組為  $\log \text{cfu}+1 = 3.3 \pm 0.3$ ，DM 組為  $\log \text{cfu}+1 = 4.1 \pm 0.6$ ； $n = 4$ )。正常小鼠感染 KP1004n 與 KP1004m，肺部的菌量以 hyper-mucoid KP 明顯高許多 ( $P < 0.05$ ； $n = 3$ )。

為進一步探討黏性特質、糖尿病對 KP1004n 與 KP1004m 由肺部散佈至血液中的影響，因而取小鼠心臟之血液進行細菌培養。圖五 B. 結果顯示：hypo-mucoid KP 感染時，正常小鼠血液 KP 之 cfu+1 取 log 後為 0，DM

小鼠為  $\log \text{cfu}+1 = 0.4$ ，hyper-mucoid KP 感染正常鼠之  $\log \text{cfu}+1$  為 0，DM 鼠為 0.3，以上在血液中菌量皆無統計上之顯著差異( $n = 3$ )。

## 2. DM 小鼠肺泡巨噬細胞 (AM) 吞噬 hyper-mucoid KP 的能力

由於先前實驗發現，DM 小鼠肺部清除 hyper-mucoid KP 的能力不受 DM 影響。為了證實 DM 小鼠的肺泡巨噬細胞 (AM) 與正常小鼠一樣，皆擁有正常的吞噬能力，因而將 AM 自感染 20 小時的小鼠右肺沖出並染 Gram stain，計數每個 AM 胞內的 KP 數量。結果圖六表示，正常小鼠 =  $17.6 \pm 1.7$  KP/AM，DM 小鼠 =  $15.3 \pm 1.2$  KP/AM，兩者相較 ( $n = 5$ ) 並無顯著差異。

### 1-3. Cluster A 的 paired KP (hypo-mucoid : KP1084/hyper-mucoid : KP1112) 肺部之感染

#### 1. Cluster A 的 paired KP 在正常與 DM 小鼠肺及血液中之菌量 (20 小時)

為比較 cluster A 其黏性 (mucoid) 在正常與 DM 小鼠肺部感染的差異，將肺部感染後 20 小時進行 KP 菌量培養。圖七 A. 顯示，hypo-mucoid KP 在正常鼠肺部菌量  $\log \text{cfu}+1 = 4.8 \pm 0.2$ ，DM 鼠  $\log \text{cfu}+1 = 4.2 \pm 0.2$ ；hyper-mucoid KP 感染，正常鼠  $\log \text{cfu}+1 = 6.3 \pm 0.4$ ，DM 鼠  $\log \text{cfu}+1 = 5.4 \pm 0.3$ 。在正常小鼠 paired KP 感染中，hyper-mucoid KP 在肺中之菌量比 hypo-mucoid KP 顯著較多 ( $P < 0.05$ ； $n = 5$ )。

為探討黏性特質或糖尿病會影響 cluster A KP 由肺部進入至血液中，故取小鼠心臟血液進行細菌培養。圖七 B. 結果表示，hypo-mucoid KP 感染時，DM 小鼠血液中的細菌量是正常小鼠的 500 倍 (正常組  $\log \text{cfu}+1 = 0.3 \pm 0.3$ ，DM 組  $\log \text{cfu}+1 = 2.3 \pm 0.6$ ； $P < 0.05$ ， $n = 4$ )。hyper-mucoid KP 感染時，正常小鼠血液中的細菌量  $\log \text{cfu}+1 = 2.4 \pm 0.8$ ，DM 小鼠  $\log \text{cfu}+1 = 1.4 \pm 0.5$ 。此外，在正常小鼠 paired KP 感染中，hyper-mucoid KP 在血液中菌

量較 hypo-mucoid KP 明顯增高 ( $P < 0.05$ ;  $n = 4$ ) ; 而在 DM 小鼠 paired KP 感染中, hyper-mucoid KP 在血液中的菌量較 hypo-mucoid KP 有減少的趨勢 ( $P = 0.075$ ) 。

2. Cluster A 的 paired KP 對正常與 DM 小鼠肺泡巨噬細胞 (AM) 引發之凋亡

為探討黏性、糖尿病二者是否會加重肺泡巨噬細胞的凋亡, 將 AM 自感染 20 小時的小鼠右肺沖出, 並染細胞死亡偵測試劑, 依據未感染的對照組 (sham group) 其細胞族群 (AM 佔 95% 以上) 之條件, 圈選已感染小鼠的 AM 族群, 以流式細胞儀分析其凋亡。圖八結果表示, hypo-mucoid KP 感染時, 正常鼠的 AM 凋亡百分比為  $12.5 \pm 2.6\%$ , DM 小鼠為  $8.5 \pm 1.3\%$ ; hypo-mucoid KP 感染時, 正常鼠的 AM 凋亡百分比為  $9.9 \pm 1.9\%$ , DM 小鼠為  $10.4 \pm 1.7\%$ , 以上四者間 ( $n = 4$ ) 皆無差異。

3. Cluster A 的 paired KP 在正常與 DM 小鼠肺及血液中之菌量 (40 小時)

20 小時的肺部感染造成正常與 DM 小鼠病程變化之不同, 欲了解在感染 40 小時是否有一致的感染進程, 因此將小鼠肺部感染 40 小時後, 取其左肺與血液進行細菌培養。圖九 A. 顯示, 感染 hypo-mucoid 或 hyper-mucoid KP 之正常與 DM 小鼠其肺部細菌量取 log 依序為  $\log \text{cfu} + 1 = 5.5 \pm 0.9, 5.3 \pm 1.4, 5.5 \pm 0.9, 5.1 \pm 0.5$ , 彼此間並無統計上的差異 ( $n = 3$ )。其血液菌量 ( $\log \text{cfu} + 1$ ) 依序如下,  $4.1 \pm 0.6, 2.5 \pm 0.8, 4.9 \pm 0.8, 3.5 \pm 0.3$ , 如圖九 B. 所示, 彼此間並無統計上的差異 ( $n = 3$ )。

1-4. Cluster B 的 paired KP (hypo-mucoid : KP1008/hyper-mucoid : KP2002) 肺部之感染

cluster B 的 paired KP 在正常與 DM 小鼠肺及血液中之菌量

為研究不同 cluster 間是否具相同的感染現象, 故挑選 cluster B paired KP 感染正常與 DM 小鼠肺部, 欲了解 paired KP 在肺中的生長情況, 因此將

感染 20 小時的肺部進行細菌培養。得到結果圖十 A. 所示, hypo-mucoid 組正常小鼠肺部細菌量 ( $\log \text{cfu} + 1$ ) 為  $3.5 \pm 0.02$ , DM 鼠為  $4.7 \pm 0.1$ , DM 組肺中的細菌量較控制組多 ( $P < 0.05$ ;  $n = 3$ ); hyper-mucoid 組正常小鼠肺部細菌量 ( $\log \text{cfu} + 1$ ) 為  $5.2 \pm 0.8$ , DM 鼠為  $4.8 \pm 1.1$  ( $n = 3$ )。欲探求黏性特質或 DM 可促使 KP 入侵至血液中, 將感染小鼠血液作細菌培養, 其結果圖十 B., hypo-mucoid 組正常小鼠血中細菌量  $\log \text{cfu} + 1 = 1.2 \pm 0.7$ , DM 鼠  $\log \text{cfu} + 1 = 1.1 \pm 0.5$ ; hyper-mucoid 組正常小鼠血中細菌量 ( $\log \text{cfu} + 1$ ) 為  $2.1 \pm 0.5$ , DM 鼠為  $1.3 \pm 0.6$ 。在 DM 小鼠 paired KP 感染中, hyper-mucoid KP 在血液中的菌量較 hypo-mucoid KP 多 ( $P < 0.05$ ;  $n = 3$ )。

1-5. Cluster C 的 paired KP (hypo-mucoid : KP1283/hyper-mucoid : KP1284) 肺部之感染

cluster C 的 paired KP 在正常與 DM 小鼠肺及血液中之菌量

為了解 cluster C 與 cluster A、B 間, 其肺及血中 KP 的清除是否相同, 因而採之前相同做法。圖十一 A. 顯示: 感染 hypo-mucoid 或 hyper-mucoid KP 之正常與 DM 小鼠其肺部細菌量 ( $\log \text{cfu} + 1$ ) 依序為  $3.7 \pm 0.3, 5.1 \pm 0.8, 5.1 \pm 0.3, 6.0 \pm 0.3$ ,

在正常小鼠 paired KP 感染中, hyper-mucoid KP 在肺中菌量較 hypo-mucoid KP 明顯增加 ( $P < 0.05$ ;  $n = 3$ )。圖十一 B. 顯示血液中的 KP 量 ( $\log \text{cfu} + 1$ ) 依序如下:  $2.1 \pm 0.8, 2.9 \pm 0.3, 2.9 \pm 0.5, 0.5 \pm 0.5$ , 由此得知在 hyper-mucoid KP 肺部感染中, DM 鼠血液中的菌量比正常鼠少 ( $P < 0.05$ ;  $n = 4$ )。

## 第二節 體外試驗 (*in vitro*)

由於正常小鼠在來自不同 cluster KP 感染時, hyper-mucoid KP 在肺中之菌量皆比 hypo-mucoid KP 顯著增加, 為進一步研究 AM 與 hypo-/hyper-mucoid KP 之間是否存在著不同的交互作用 (interaction), 因此

利用老鼠的巨噬細胞株感染不同 cluster KP，以模擬在肺泡中，AM 與 KP 交互作用的情形。

## 2-1. Hypo-/hyper-mucoid KP 所造成之細胞毒性 (cytotoxicity) 與所誘發之細胞凋亡 (inducing-apoptosis)

### 1. Trypan blue 細胞存活力測試

將  $1 \times 10^6$  的巨噬細胞分別以 MOI=10 感染 hypo-mucoid、hyper-mucoid KP 45 分鐘或不感染作為控制組 (blank)，放置 1 小時之後以 Trypan blue 評估巨噬細胞的存活力。其被 Trypan blue 染上的結果如下，控制組 (blank) 為  $3.2 \pm 0.1\%$ ，hypo-mucoid 組為  $6.1 \pm 1.0\%$ ，hyper-mucoid 組為  $7.3 \pm 0.9\%$ ，hypo-mucoid KP 與控制組相比，沒有任何統計上的差異，只有 hyper-mucoid KP 較具細胞毒性 (cytotoxicity;  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ )。

### 2. DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) 核染色

細胞感染後，放置 12 小時，染 DAPI stain，以評估細胞凋亡的百分比。圖十二顯示細胞凋亡百分比依序，控制組 (blank) 為  $4.7 \pm 0.6\%$ ，hypo-mucoid 組為  $7.4 \pm 0.7\%$ ，hyper-mucoid 組為  $8.7 \pm 0.4\%$ 。兩種 KP 感染所誘發之細胞凋亡皆較控制組高 ( $P < 0.05$ ;  $n = 3$ )，而兩種 KP 間所誘發的凋亡沒有任何差異。

## 2-2. Hypo-/hyper-mucoid KP 對 RAW cells 的附著 (adhesion) 及 KP 在巨噬細胞內的存活 (macrophage-associated KP) 評估

### 1. KP 的附著 (adhesion)

為評估黏性特質是否可減少 KP 對巨噬細胞的附著，因此將  $1 \times 10^6$  的巨噬細胞分別以 MOI=10 感染 hypo-mucoid、hyper-mucoid KP 45 分鐘，培養黏附胞外的細菌。將培養出的 cfu+1 取 log 之後，如圖十三 A. 表示 hyper-mucoid KP 比 hypo-mucoid 組具有較高的附著 (adhesion) 細菌數 (hypo-:  $\log \text{cfu}+1 = 3.8 \pm 0.3$ , hyper -:  $\log \text{cfu}+1 = 5.1 \pm 0.05$ ;  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ )。

### 2. KP 在巨噬細胞內的存活

### (macrophage-associated KP)

由於 hyper-mucoid KP 具較高的黏附力，為研究其是否能進一步入侵巨噬細胞內，將細胞感染後，以  $100 \mu\text{g/ml}$  gentamicin 殺死胞外之細菌後，將細胞打破與刮下，培養其胞內的 KP 菌量。其結果如圖十三 B.，hypo-mucoid 組為  $\log \text{cfu}+1 = 0.5 \pm 0.5$ ，hyper-mucoid 組為  $\log \text{cfu}+1 = 3.7 \pm 0.03$ ，hyper-mucoid 比 hypo-mucoid KP 在巨噬細胞內存活的細菌數較多 ( $P < 0.05$ ;  $n = 5$ )。

## 2-3. 突變株與野生株 KP (mutant/wild type KP) 對 RAW cells 的附著 (adhesion) 及 KP 在巨噬細胞內的存活 (macrophage-associated KP) 評估

### 評估

先前的實驗以 paired KP 方式感染細胞株，hyper-mucoid KP 具較高的附著力與在巨噬細胞內存活的 KP 數較多，雖然兩者黏性差異大，但有可能是其他基因調控附著與入侵力，因為基因相似度 98%，無法證實完全是黏性特質導致結果的不同，故將 hyper-mucoid KP (KP1112) 以 mini-Tn10 transposon mutagenesis 方式，挑選出完全具低黏性的突變菌株 (KPG6)，分別感染巨噬細胞株，評估 mutant (KPG6) 與 wild type KP (KP1112) 對 RAW cells 的附著及在 RAW cells 內存活的細菌數。

### 1. KP 附著 (adhesion)

用 MOI=1、MOI=10 感染細胞株，以之前所述方式得到以下結果圖十四 A.：感染 45 分鐘後，MOI=1 其附著菌量 ( $\log \text{cfu}+1$ ) 依序： $1.1 \pm 1.1$ 、 $4.0 \pm 0.1$ ，wild type 具有較高的附著菌量 ( $P < 0.05$ ;  $n = 3$ )；MOI=10 其附著菌量 ( $\log \text{cfu}+1$ ) 依序： $2.6 \pm 1.3$ 、 $4.8 \pm 0.08$ ；當 MOI=10 時，wild type KP 比 MOI=1 時有較高之附著力 ( $P < 0.05$ )。若將細胞感染後放置一小時，扣除 RAW cells 內存活的細菌數後，MOI=1 其附著菌量 ( $\log \text{cfu}+1$ ) 依序為  $2.1 \pm 1.0$ 、 $4.1 \pm 0.1$ ，MOI=10 則是 wild type 具較高之附著力 (mutant:  $\log \text{cfu}+1 = 3.5 \pm 0.3$ , wild type:  $\log \text{cfu}+1$

=  $4.8 \pm 0.1$ ;  $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ); wild type KP 於 MOI=10 時, 具較高之附着力 ( $P < 0.05$ ), 如圖十四 B. 所示。

## 2. KP 在巨噬細胞內的存活 (macrophage-associated KP)

依 MOI= 1、MOI= 10 感染細胞株, 以先前所述方式得到以下結果如圖十五, 感染後以  $100\mu\text{g/ml}$  gentamicin 作用 1 小時, MOI=1 菌量無任何統計上之差異 (mutant:  $\log \text{cfu}+1 = 0$ , wild type:  $\log \text{cfu}+1 = 0.9 \pm 0.9$ ); MOI=10 菌量 ( $\log \text{cfu}+1$ ) 依序為  $0.9 \pm 0.9$ 、 $3.6 \pm 0.2$ , wild type KP 在巨噬細胞內具較多存活的細菌數 ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ); wild type 在 MOI=10 時比 MOI=1 有較多存活的 KP 數 ( $P < 0.05$ ,  $n = 3$ )。

## 四、討論與計畫成果自評

DM 普遍被認為是一種獨立致病因子, DM 病人對感染具有高感受性, 很容易導致下呼吸道感染。但近年來, 卻有學者提出不同看法, 根據 Koziel 等人(1995)提出, DM 並非是呼吸道感染的獨立致病因子, 而是 DM 會增加呼吸道對特定微生物的感受性, 例如對金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 與革蘭氏陰性菌等。在以金黃色葡萄球菌感染 BB 大鼠的實驗指出, 長期處在高血糖生理狀況下的 BB 大鼠, 其肺泡巨噬細胞的殺菌能力下降 (Sima et al., 1988)。另外, Amano 等人(2000)則以急性高血糖的小鼠模式, 由肺部感染 *Pseudomonas aeruginosa* ( $1 \times 10^7$  cfu/mouse), 發現糖尿病小鼠 24 小時的死亡率高達 90%, 而正常鼠死亡率則為 0%, 此結果與本研究的初步存活率實驗一致。在初步的存活率試驗中, 予正常與 DM 小鼠肺部感染 cluster A 的 paired KP ( $1 \times 10^4$  CFU/mouse), 於感染 72 小時後, 感染 hyper-muoid KP 的正常及 DM 小鼠與感染 hypo-muoid KP 的 DM 小鼠死亡率約 40% 左右, 以上三者感染後 120 小時內全部死亡; 但是感染 hypo-muoid KP 的正常小鼠, 於 72 小時的存活率約有 80%, 乃至 120 小時仍有 60% 的存活率 (控制組  $n = 5$ , DM 組  $n = 6$ ), 以上死亡率的結果與 KP 感染後 20 小時, 肺及血液中 KP 菌量結

果成正比。在 cluster A 中, hyper-muoid KP 感染不論正常或 DM 小鼠, 其肺與血液中有大量的 KP 菌量並且 cfu 相似, 因此兩者的死亡率相當, 也證實了高黏性的 KP 具有高致病力, 而 DM 對 hyper-muoid KP 在兩組小鼠 KP 菌量的清除中並無太大影響。在 hypo-muoid KP 的感染中, 結果卻不然, 以感染 20 小時後的肺部菌量而言, 兩者並無差異, 但是血液中卻有極大的差異; 正常鼠血液中僅有少量 KP, 而 DM 鼠血液中菌量卻是正常鼠的 500 倍左右, 配合初步死亡率實驗結果說明了 DM 鼠比正常鼠對 hypo-muoid KP 較具致病性與死亡率, 也闡明了在 hypo-muoid KP 的感染裡, DM 扮演著關鍵的角色。相同的結論出現在 cluster B、C 與 KP1004 的 hypo-muoid KP 感染中, 但其間的差異卻是上述三者肺部 KP 菌量有所差異, 亦即上述三者感染小鼠肺部 20 小時後, 雖然血液中並無差異, 但是 DM 鼠肺部的 KP 菌量皆比正常鼠明顯增加, 代表 DM 鼠對 hypo-muoid KP 感染之高感受性。至於, cluster A hypo-muoid KP 在血液中有差異, 在肺中則無差異的結果與其它 cluster 不同, 原因有可能在於不同 cluster 間有不同的感染進程, 與不同的致病行為, 由於皆挑選 20 小時觀察 KP 的清除狀況, 因此來自不同 cluster hypo-muoid KP 會有不太相同的菌量, 但是趨勢與結論卻是共同的, 由此可知, 藉由 DM 此因子, 可加成 hypo-muoid KP 之致病力。

DM 病人之所以被視為對感染具高感受性, 其原因可能是免疫功能上的缺損, 例如嗜中性白血球吞噬功能、殺菌功能與驅化能力下降, 其所分泌的 IL-6, IL-8 等細胞激素減少 (Helene et al., 2001) 或者巨噬細胞分泌 MIP-2、INF- $\gamma$  的量降低 (Mosci et al., 1993)。於 2002 年 Thomas 等學者提出, 予 INF- $\gamma^{-/-}$  小鼠肺部感染 KP, 其肺部與血液中 KP 的菌量比正常鼠高出一百倍, 且具有較高的死亡率; 根據另一項實驗也發現肺泡巨噬細胞分泌 MIP-2 的量減少會增加小鼠對 *Pseudomonas aeruginosa* 肺部感染之感受性 (Amano et al., 2000)。在 hypo-muoid KP 肺部感染中, 藉由 DM 可加成其致病性, 原因可能在於 DM 造成肺



泡巨噬細胞分泌細胞激素的能力缺損、殺菌功能與吞噬能力下降或是巨噬細胞的凋亡增加；其中，因 DM 引起的細胞激素分泌改變、殺菌與吞噬能力下降已被較多學者研究，在巨噬細胞凋亡方面卻較少被探討。然而，在本實驗中，藉由流氏細胞儀之凋亡分析，結果則排除了因肺泡巨噬細胞凋亡，而造成 DM 鼠對 hypo-mucoid KP 具高感受性的可能，因為不論正常鼠或 DM 鼠感染 hypo-mucoid 與 hyper-mucoid KP，其肺泡巨噬細胞的凋亡皆無差異。在肺泡巨噬細胞凋亡方面，有研究利用低劑量肺炎雙球菌(*pneumococci*)感染小鼠肺部，使小鼠處於極輕度感染，發現若以凋亡抑制劑(caspase inhibitor)抑制巨噬細胞凋亡，則會增加小鼠菌血症的機率，因此提出巨噬細胞的凋亡可以促進宿主對肺炎雙球菌的清除(Dockrell, 2003)，其結果與本實驗不同。但值得注意的是，本實驗所用的細菌為革蘭氏陰性菌，菌量會造成小鼠較嚴重的感染，此外，動物模式也有所不同，本實驗使用正常與 DM 兩種小鼠，因此結果會有所不同。關於肺部感染時，黏性與 DM 二者在 AM 凋亡與細菌清除能力間造成之影響，需要進一步探討。

將正常與 DM 鼠感染來自不同 cluster 的 hyper-mucoid KP，DM 鼠與正常鼠肺部的 KP 菌量沒有差異，亦即兩者肺部菌量的清除類似，因此 DM 小鼠肺部對 hyper-mucoid KP 的清除能力與正常小鼠一樣；類似的比較實驗可在脾臟巨噬細胞(splenic macrophage)體外試驗中看到，以 STZ 誘發 DM 小鼠，取出脾臟巨噬細胞予以感染白色念珠菌(*Candida albicans*)，比較兩組殺菌能力，發現 DM 小鼠之脾臟巨噬細胞清除黴菌的能力比正常鼠佳(Mosci et al., 1993)。為了進一步證實清除 hyper-mucoid KP 能力相同導因於 DM 鼠與正常鼠，擁有相同的吞噬功能，因此評估 AM 吞噬 hyper-mucoid KP 的能力，結果發現 DM 鼠吞噬 KP 的數量與正常鼠相同，而在 Lu 等學者(2002)的研究也支持這樣的結果，藉由支氣管灌流術將正常與 DM 鼠之 AM 沖出，並予 beads 與 *E. coli* 之吞噬，兩種小鼠吞噬 beads 與 *E. coli* 的能力一致。因此，DM 小鼠的肺泡巨噬細胞對

KP 具有正常的吞噬能力。

黏性特質一直被視為與 KP 的致病力有關，而高黏性的 KP 具有較高的致病力。本實驗於正常小鼠給予高、低黏性的 KP 肺部感染中也證實了相同的結果，正常小鼠肺部對 hyper-mucoid KP 的清除比 hypo-mucoid KP 減少許多，在不同 cluster 間皆有相似的情形；於初步的存活率實驗中，指出感染 hypo-mucoid KP 的正常小鼠有較高的存活率。為研究 KP 黏性與致病性間的關聯，有許多學者利用不同的突變方式去除 KP 的黏性，其中，有研究指出 *galU* 基因缺損的 KP 不能利用半乳糖而無法合成莢膜多糖體(CPS)，也無法產生黏性，因此其對 BALB/c 小鼠不具任何致病性(Lai et al., 2001)；另一方面，Fang 等學者(2004)，利用 mini Tn5 轉移子突變(transposon mutagenesis)方式使 KP 黏性降低，以  $1 \times 10^6$  cfu 感染正常小鼠腹部，發現感染低黏性突變株的正常小鼠於沒有任何致病現象，而感染野生型菌株(wild type)則在 12 小時後立即死亡，以上結果與本實驗結果相符。但是，上述研究與本實驗不同的是，其皆使用突變方式將細菌的黏性降低，因此感染正常鼠的低黏性菌株並非臨床所分離的野生株；本實驗選擇臨床分離的野生型成對 KP，兩者基因相似度 98%，但黏性差異大，藉此研究 KP 的黏性特質，以避免因突變而影響 KP 某些未知的生物特性或功能；雖是如此，但成對 KP 基因 98% 的相似度，似乎無法完全說明黏性特質是致病關鍵，因而本實驗中也利用 mini -Tn10 轉移子突變方式將 hyper-mucoid KP (KP1112) 突變為 hypo-mucoid KP (KPG6)，使之有莢膜，但黏性很低(string -)，再予之感染正常鼠肺部( $1 \times 10^4$  cfu/mouse)，其感染 20 小時後肺部與血中皆無 KP 菌量，並且可存活下，而感染野生型 (KP1112) 的正常鼠，其肺與血中皆有很多菌量，也無法存活(n=3，結果未列)。由以上結果可知，高黏性的 KP 對免疫功能健全的生物體而言具有致病力，亦即 KP 的黏性特質是一個獨立致病因子。

相較於高黏性 KP，低黏性 KP 卻被視為較不具致病力，因此較少被研究，然而本實驗的結果卻指出，DM 可以加成其致

病力；另外，值得注意的是，cluster B、C 之 hypo-mucoid KP 能由肺部散佈至血液中，而 cluster A 之低黏性 KP 即使較難在血液中散佈，在肺中也有不少細菌量，此種細菌行為與突變株低黏性 KP (KPG6) 感染有所不同，突變株以相同菌量感染正常鼠，在肺與血液中，突變株會被清除掉且毫無致病力，這意味著臨床分離之野生型 hypo-mucoid KP 可能具有別於黏性特質的致病因子存在。根據我們先前的研究，由不同疾病的檢體，收集近五百株 KP 進行黏性測試 (string test)，其中，hypo-mucoid KP 佔了全部的四分之三，而 hyper-mucoid KP 只佔四分之一。由此，野生型 hypo-mucoid KP 是不容忽視的一群。

正常小鼠在來自不同 cluster KP 感染時，hyper-mucoid KP 在肺中之菌量皆比 hypo-mucoid KP 顯著增加，由於肺泡巨噬細胞會居留在富含空氣的表面，直接與入侵肺部的細菌接觸 (Simon et al., 1977)，為進一步研究造成上述結果的原因，因此利用老鼠的巨噬細胞株感染不同 cluster KP，以模擬在肺泡中，AM 與 KP 的互動情形。在先前的實驗，大部分學者大多採用肺上皮細胞研究 KP 對宿主的黏著與入侵，於 2002 年 Cortés 等學者，將臨床分離出較不具莢膜與經突變無莢膜之 KP 感染肺上皮細胞，結果發現莢膜較薄或是無莢膜 KP 黏附力比厚莢膜菌株更強，其進入宿主胞內之菌數也較多，但是將其感染小鼠卻沒有任何致病力，說明了肺上皮細胞具有防禦細菌入侵的能力，而厚莢膜 KP 可避掉此種防禦機制而能致病。在本實驗中，具高黏性 KP 莢膜較厚，低黏性 KP 莢膜較薄，以相同的條件感染巨噬細胞，所做出的結果卻相反，高黏性 KP 的附著量較多，進入宿主胞內的菌量也較多，與上述實驗一致的是厚莢膜 KP 致病力高。其間的差異可能是本實驗選用巨噬細胞株，並非肺上皮細胞株，而不同的細胞株具有不同的接受器 (receptor)，因此造成 KP 有不同的黏附菌量。先前有一項研究，作者使用四株不同的細胞株進行 KP 的感染，比較 KP 莢膜對不同細胞株附著的影響，發現厚莢膜的野生型 KP 僅對 A-549 細胞株附著能力差，但對 HT-29-MTX 10 細胞株之附著力

比無莢膜的 KP 還強 (Sabine et al., 1999)。另外，在 Fang (2004) 等學者以 RAW 264.7 細胞株感染野生型及 *magA* 突變型 KP 所得結果與本實驗不同，野生型菌株被巨噬細胞吞噬較少，而 *magA* 突變型 KP 則吞噬進去較多，在三十分鐘內皆被消化分解，是以宿主防禦行為為出發點；而本實驗則試圖以細菌行為切入，發現感染後一小時，仍有 KP 在巨噬細胞內存活，且存活的皆是高黏性 KP，而低黏性 KP 在巨噬細胞內較少，具推測有可能是被吞噬後，莢膜較薄、黏性較低，細菌較不易形成菌體間的聚集或連結 (interconnection)，因而很快被消化分解，而高黏性 KP 則反之，具有外層多醣體網 (exopolysaccharide web) 可彼此連結 (interconnection) 因而黏性大，也因此造成 KP 附著菌量高，即使被吞噬也較難被分解。此外，高附著量並非代表 KP 全部與巨噬細胞結合 (binding)，有可能只有部分細菌和巨噬細胞結合，但因外層多醣體網造成細菌彼此連結，因而造成高附著量，也因此高黏性 KP 突變後，便失去原先高附著菌量。

曾有學者提出：不同的宿主因子對感染具有不同的感受性，因此其研究使用 C57BL/6J 與 BALB/c 小鼠感染 *Burkholderia pseudomallei*，其結果顯示 BALB/c 對感染具較高之感受性 (Liu et al., 2002)。為了排除不同小鼠品系，有不同的感受性而造成實驗結果之不同，因此本實驗也使用 BALB/c 糖尿病動物模式，將 cluster A 的 paired KP 依先前條件 ( $1 \times 10^4$  cfu/mouse) 感染正常與糖尿病 BALB/c 小鼠，其結果與 C57BL/6J 糖尿病動物模式實驗結論相似，但 BALB/c 小鼠肺與血液中的菌落數比 C57BL/6J 小鼠略多。

在本篇研究中，藉由感染巨噬細胞株的細胞實驗中，說明 KP 的黏性特質影響細菌與巨噬細胞的交互作用，或許因此 hypo-mucoid KP 與 hyper-mucoid KP 有不同的細菌行為，而引發不同的宿主反應；在感染糖尿病小鼠肺部的動物實驗得知，KP 的黏性特質是一個獨立致病因子；此外，DM 在 hypo-mucoid KP 感染中扮演著重要的角色，其可加成 hypo-mucoid KP 之致病力。