

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

Bcl-3 基因在敗血症患者的表現以及與預後的關連性 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2314-B-002-137-
執行期間：95年08月01日至96年07月31日
執行單位：國立臺灣大學醫學院內科

計畫主持人：蔡子修
共同主持人：余忠仁
計畫參與人員：此計畫無參與人員：無

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 96 年 11 月 08 日

Bcl-3 基因在敗血症患者的表現以及與預後的關連性

目錄

報告內容

一、前言	第一頁
二、研究目的	第二頁
三、文獻探討	第二頁
四、研究方法	第三頁
五、結果	第五頁
六、討論	第六頁

參考文獻	第七頁
------	-----

計畫成果自評	第十頁
--------	-----

報告內容

一、前言

敗血症(sepsis)一直是重症病患的主要死因，嚴重敗血症病患的 30 天死亡率大約是 30%，並隨著合併器官衰竭和敗血性休克而明顯上升。在美國每年因敗血症及其合併症造成病患死亡的個數超過二十萬人。由此可知，敗血症無論是在發生率、死亡率或是所耗費的醫療資源方面都是一個相關重要的問題且不容忽視。

以往，敗血症被認為是病原體的特殊分子結構活化宿主的免疫細胞，進而引發細胞內一些調控途徑的變化，最後產生許多細胞激素和發炎媒介物。過度的發炎反應會導致宿主器官的傷害，進一步可能造成多器官衰竭(multiple organ failure)和宿主的死亡。通常這樣過度的發炎反應需要抗發炎媒介物質來調控(down-regulation)，這樣的抗發炎反應通常是淋巴球細胞和負責呈現抗原的樹突狀細胞(dendritic cell)經由細胞凋亡來達成。但是在敗血症中，這樣的調控機制可能也會失去控制，過度的淋巴球細胞凋亡可能會造成免疫系統的癱瘓(immunoparalysis)，使宿主無法消滅入侵的病原體或者是增加後來院內感染的機會，這樣的情形在嚴重敗血症愈是明顯。

所以本研究中，我們嘗試利用分子生物的方法去分析和淋巴球細胞凋亡有關的基因在敗血症中的表現。也同時研究基因的表現量與疾病嚴重度及預後的關聯性。

二、研究目的

根據之前基因微陣列分析中的研究，我們發現敗血症病患的抗淋巴球細胞凋亡基因 BCL3 的表現是高於健康的對照組，但是對於病患淋巴球細胞凋亡的影響以及基因表現強度對於疾病的預後並未相當清楚。

在本研究中我們嘗試利用嚴重敗血症病患之初期周邊血液單核細胞，以同步定量聚合酶連鎖反應(Real-time Polymerase Chain Reaction)的技術來測量這些嚴重敗血症病患其 BCL3 基因表現的差異，並分析 BCL3 基因表現強度對周邊血液淋巴球數量的影響，以及病患的疾病嚴重性和死亡率的關聯性。

三、文獻探討

Hotchkiss 等人[Hotchkiss-1999]在解剖因敗血症死亡的病人中，發現細胞凋亡的現象可以在不同的組織和器官中發生，而其細胞凋亡的程度也在不同種類的細胞或組織有所差異，像是在腸胃道的上皮細胞、周邊血液及脾臟中的淋巴球以及與免疫反應有關的樹突狀細胞都有很明顯細胞凋亡現象，特別是因為敗血症併發休克的病例，其周邊血液的淋巴球發生細胞凋亡的狀況更是厲害。Hotchkiss 等人[Hotchkiss-2003]進一步對凋亡淋巴球細胞的種類作免疫組織染色分析可以發現減少的細胞主要是 B 淋巴球細胞、CD4 T 淋巴球細胞及樹突狀細胞，而 CD8 T 淋巴球細胞、自然殺手細胞(natural killer cells)及巨噬細胞並沒有明顯細胞凋亡的現象發生，其中淋巴球細胞及樹突狀細胞在後天免疫反應(adaptive immunity)扮演相關重要的角色。雖然在敗血症中淋巴球細胞過度凋亡的機制到目前還不是很清楚，但是淋巴球在於調整敗血症的發炎反應具有重要的影響，而過度和持續的細胞凋亡會造成淋巴球低下(lymphopenia)，不但對敗血症的全身性發炎反應會造成調控失序，也將進一步造成宿主的免疫力下降而使宿主無法消滅入侵的病原體或者增加後來發生院內感染的機會。Le Tulz 等人[Le Tulzo-2002]在臨床上的觀察也發現在敗血症早期血液淋巴球細胞凋亡的嚴重度和病人的預後有關，其中包括了簡明急性生理功能評分方法(Simplified Acute Physiology Score II, SAPS II)、Logistic Organ Dysfunction Score (LOD)、須要使用呼吸器的天數和須要住在加護病房的天數。

近年來，數個預防淋巴球細胞凋亡的策略被運用在動物敗血症上並檢視這些策略對於敗血症存活率的影響，其中包括 Hotchkiss 等人[Hotchkiss-1999]利用帶有過度表現抗細胞凋亡蛋白 Bcl-2 基因轉殖小鼠，發現這樣的老鼠在敗血症發生時有比較少的淋巴球細胞凋亡，並且比對照組有較佳的存活率。進一步將這些過度表現 Bcl-2 的淋巴球細胞轉殖(adoptive transfer)到對照組的老鼠，也發現對老鼠的存活率有正面的影響。由以上的臨床觀察和動物實驗可以知道：由細胞凋亡而造成免疫細胞的損耗對於敗血症這樣高致命性的疾病可能是一個非常重要的致病原因。由於在敗血症中淋巴球細胞過度凋亡的機制到目前為止所知還是有限，Hotchkiss 等人在敗血症病人死亡後的脾臟組織中發現凋亡的淋巴球細胞中凋亡蛋白酵素-3(Caspase-3)的活性比起其他無敗血症的重症病人有明顯的增加，我們知道 Caspase-3 是在細胞凋亡調控路徑的下游 (downstream pathway)

[Opferman-2003]，至於上游路徑(upstream pathway)，目前認為可以經由 Caspase-8 所媒介的死亡接受體路徑(death receptor pathway)或 Caspase-9 所媒介的粒腺體媒介路徑(Mitochondrial-mediated pathway) [Hotchkiss-2005]，至於其它的調控以及相關基因的表現目前仍待研究。因此，對於分析和淋巴球細胞凋亡有關的調控基因在敗血症中的表現，及其對於敗血症的影響，絕對是此疾病的研究中一項重要的領域。回顧文獻上，除了在動物早期內毒素敗血症中，發現細胞凋亡現象比較多的肝臟及脾臟，其細胞中 Bcl-2 蛋白的表現量變少外，其他重要的抗細胞凋亡的基因表現仍是一項未知的課題。

在 Mitchell 等人[Mitchell-2001]的研究中發現，B-cell CLL/lymphoma 3 基因(基因簡稱 BCL3)，其所編碼的蛋白質能作用於核轉錄因子(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)，對於受抗原刺激活化後 T 淋巴球的生存(activated T cell survival)具有重要的抗細胞凋亡作用(anti-apoptotic activity)。另外在研究發現 BCL3 基因可以經細菌的內毒素分子(lipopolysaccharide, LPS)刺激誘導，它的作用和 IL-10 的表現有關，並影響了晚期敗血症的免疫反應的調整。

在 Tsai 等人[Tsai-2004]的敗血症病患基因微陣列分析研究(Microarray analysis)中，BCL3 基因無論在格蘭氏陰性菌敗血症(Gram negative sepsis)或格蘭氏陽性菌敗血症(Gram positive sepsis)病患的周邊血液單核細胞中的表現都比健康的對照組來得高。所以我們利用分生的方法去分析敗血症病人其 BCL3 基因的表現對淋巴球細胞凋亡的影響。也同時研究 BCL3 基因的表現強度與疾病嚴重度的關聯性。

四、研究方法

(一) 檢體及臨床資料收集

我們收集敗血症病患的周邊血液檢體。受試者的臨床資料，包含性別、年齡、其他同時罹患之疾病、感染部位、血液及其他部位檢體培養結果及相關臨床資料等皆詳加記錄。另外我們收集健康檢查的民眾當作對照組。

(1) 嚴重敗血症組

在排除淋巴瘤及慢性淋巴母球細胞白血病的病患後，我們選取符合嚴重敗血症定義、大於 18 歲之重症病患，經說明同意後，於加護病房住院 24 小時之內抽取周邊血液 10 毫升，並追蹤後續之病程和微生物培養結果，將證實為感染引起的重症病患檢體納入研究。

敗血症的診斷是依據 1992 年國際敗血症會議之定義，必須符合兩個部分：臨床上懷疑有感染的證據合併全身性發炎反應症後群(Systemic inflammatory response syndrome)，SIRS 的判斷為以下四項需符合兩項以上：體溫高於攝氏 38 度或低於 36 度、呼吸急促(每分鐘大於 24 次)、心跳速每分鐘大於 90 次、白血球數大於每立方公釐 12000 個或小於每立方公釐 4000 個。而嚴重敗血症的定義為敗血症的病患在臨床上出現一個或一個以上的器官功能失調。

(2) 無敗血症對照組

至台大健康管理中心接受健檢且大於 40 歲的成人，經說明同意後抽血 10 毫升。

(二) 周邊血液單核細胞的分離

抽出的全血以含抗凝血劑乙二胺四醋酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)的試管收集，立即以 Ficoll-Paque 密度梯度離心法(Ficoll-Paque density gradient centrifugation)分離出周邊血液單核細胞(Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC)，最後將周邊血液單核細胞溶在 TRIzol 試劑中，儲存於攝氏零下 80 度保存備用。

(三) 核糖核酸(Ribonucleic acid, RNA)的萃取

(1)細胞均質化成懸浮液：將 TRIzol 試劑加入周邊血液單核球時反覆抽吸，以分解細胞成均質懸浮液，將此均質懸浮液在攝氏 4 度下以 12000g 的速度離心 10 分鐘，接著移至一乾淨的微離心管。(2) 核糖核酸萃取：在均質懸浮液中加入氯仿(chloroform, 每毫升 TRIzol 加入 200 微升)，用力搖晃 15 秒後靜置室溫 3 分鐘，接著在攝氏 4 度下以 12000g 的速度離心 15 分鐘，此時核糖核酸萃取已被萃取至上清液中。(3) 核糖核酸沉澱。(4) 核糖核酸洗滌。(5) 核糖核酸再溶解。

(四) 同步定量聚合酶連鎖反應(Real-time Polymerase Chain Reaction)

此同步定量聚合酶連鎖反應主要用於定量核糖核酸的表現量，使用的儀器為 ABI Prism® 7500。首先配置 Master Mix 試劑，包括 5 微升 5X TaqMan EZ buffer、5 微升 25 毫摩爾的 Mn(OAc)₂ 溶液、0.75 微升 dNTP(dUTP 濃度為 20 毫摩爾；dATP、dGTP 及 dCTP 濃度為 10 毫摩爾，Applied Biosystems)、1.25 微升之 BCL3 引子/探針(TaqMan 產品編碼 Hs00180403)、1 微升的 AmpErase® UNG 及 0.25 微升的 rTth DNA polymerase。

之後再以 50ng 之總核糖核酸(total RNA)加入配置好的 Master Mix 試劑，並加入二乙基焦碳酸水使總體積達 25 微升，之後於攝氏 50 度反應 2 分鐘、攝氏 60 度反應 30 分鐘、攝氏 95 度反應 5 分鐘，再進行 40 個循環之連鎖反應，每一個循環為攝氏 95 度反應 15 秒及攝氏 60 度反應 1 分鐘。本實驗所使用之探針(TaqMan probe, Applied Biosystems)的螢光報告(reporter dye)為 FAMTM。

不同檢體中的基因強度主要以相對定量的(Relative quantitation)方法作比較，以 TBP(TATA BOX binding protein)基因的表現量當作參考校正值，算出每一個檢體的待測基因和參考基因(TBP)之螢光表現時的循環數差{ ΔCt (BCL3 Ct - TBP Ct)}，再以 $2^{-\Delta Ct}$ (BCL3 Ct - TBP Ct)法計算出敗血症組和對照組的基因表現量。

(五) 統計數據分析

兩組之間的臨床資料，以 Student unpaired t test 來分析 continuous 的數據，然後用 χ^2 test 來分析 categorical 的數據。在兩組病人之間出現不同的 BCL3 基因的表現強度，用 χ^2 test 或者 Fisher exact test 來比較。利用 Kaplan-Meier 存活曲線分析不同 BCL3 基因表現之敗血症病人 28 天存活機率。利用克氏比例風險回歸模式(Cox proportional hazards regression model)分析獨立之 28 天存活率預後因子(independent prognostic factor)。

五、結果

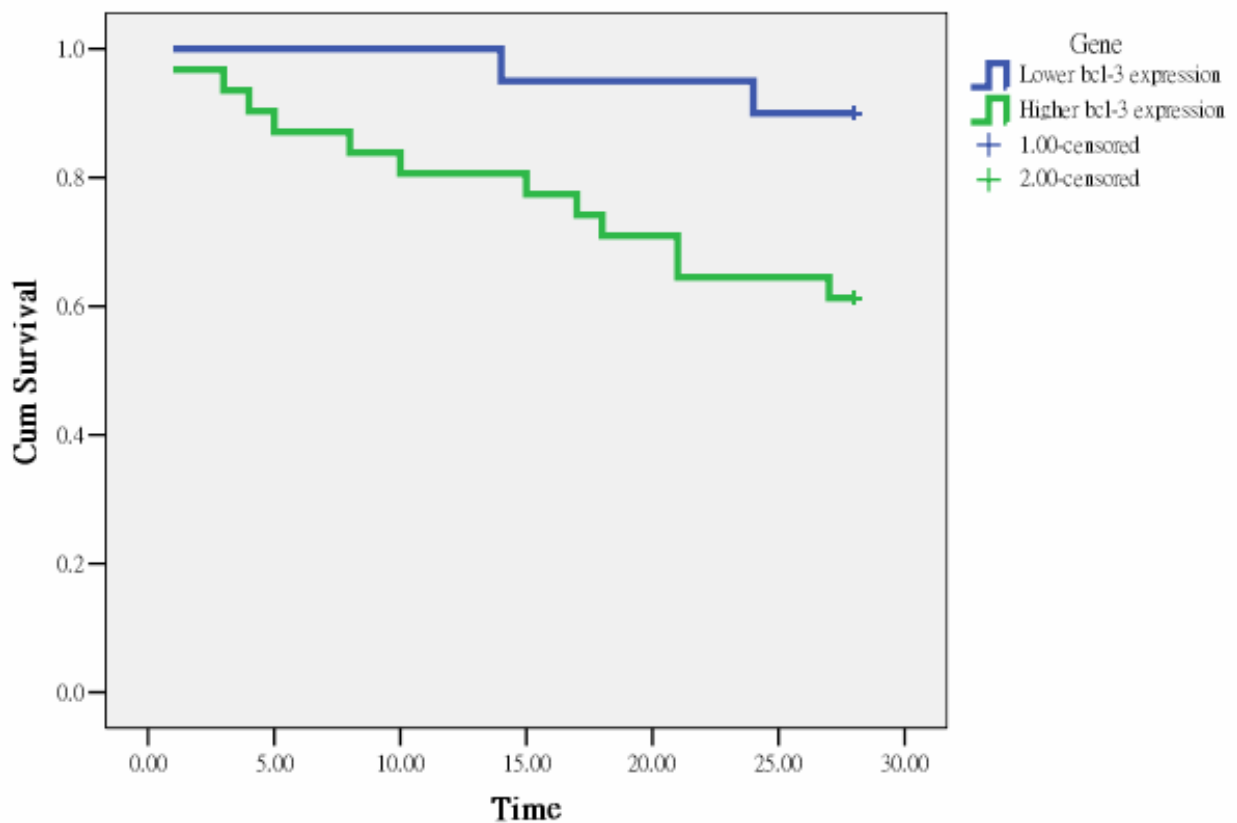
(一) 受試者與對照組統計學資料與臨床表徵

本研究共收集 51 位嚴重敗血症病人。此外，健康的對照組 9 人。在敗血症組，其中血液培養呈陽性者有 23 人，革蘭氏陽性菌感染有 7 人，革蘭氏陰性菌感染有 16 人。感染的部位主要為肺部、腹腔感染以及泌尿道感染。而在同時罹患之其他疾病(co-morbidities)方面，敗血症組 46 人(90.2%)有其它方面的疾病。在疾病嚴重度及預後的方面，在加護病房第一天的 APACHE II 及 SOFA 分數分別為 22.9 ± 8.8 和 9.4 ± 3.2 ，因呼吸衰竭而使用呼吸器有 39 人(76.5%)，因嚴重敗血症導致需要透析治療者有 16 人(31.4%)，整體死亡率在 28 天時為 27.5%，在 90 天時為 35.3%，而住院中的死亡率(In-hospital mortality)則為 43.1%。在 BCL3 基因表現量的分析發現，敗血症組是健康組的 16 倍。即使是沒有同時罹患其他疾病的敗血症病患，他們 BCL3 基因表現量也是比較高，是健康組的 22 倍，兩組間是達到統計學上顯著的差異(P 值小於 0.05)。在敗血症疾病初期，患者的周邊血液淋巴球低下(lymphopenia)是非常普遍的(75.5%)，這樣的情形在一週後會有所改善(52.3%)。

(二) BCL3 基因表現量之分析(BCL3 gene analysis)

本研究利用以 BCL3 基因與 TBP(TATA BOX binding protein)基因的表現量相差 16 倍為臨界點分類病患(即 $2^{-\Delta Ct(BCL3 Ct - TBP Ct)}$ 為 16 當作 cuff-off point)，大於此值為高 BCL3 基因表現組(n=31)；小於此值為低 BCL3 基因表現組(n=20)。在年齡、性別、同時罹患之其他疾病、血液培養呈為陽性者的比例、感染的部位及入加護病房第一天淋巴球低下的狀況，兩組病患並沒有顯著的差異。而在加護病房第一天 APACHE II 計分，高 BCL3 基因表現組為 21.8 ± 7.9 ；低 BCL3 基因表現組為 24.5 ± 9.9 ，兩組病患在統計學上並無差異(P 值為 0.3)。但是在高 BCL3 基因表現組的病人，在一週後會有較少病人(37.5%)持續淋巴球低下的狀況，在低 BCL3 基因表現組則為高達 70.0%(P 值為 0.032)。在疾病嚴重度及預後的統計分析上，兩組病患達到顯著的差異包括：BCL3 基因表現強的病人在疾病初期有較高的 SOFA 計分(入加護病房第一天： 10.2 ± 3.4 vs. 8.2 ± 2.3 ，P 值為 0.022；入加護病房第 48 小時： 8.9 ± 4.4 vs. 6.5 ± 3.6 ，P 值為 0.048)，比較少的前 28 天無休克天數(Shock-free day, 14.5 ± 12.0 vs. 22.2 ± 9.2 ，P 值為 0.021)和前 28 天存活天數(28-day survival days, 22.0 ± 9.2 vs. 27.1 ± 3.2 days, P 值為 0.022)以及較高的前 28 天死亡率(38.7% vs. 10.0%)。利用 Kaplan-Meier 存活曲線分析兩組前 28 天的存活率，也顯示高 BCL3 基因表現組有較高的死亡率(P 值為 0.025)。然而在 90 天的死亡率(41.9% vs. 25.0%)及住院中的死亡率(In-hospital mortality, 48.4% vs. 35.0%)，兩組病患在統計學上並無差異。

另外利用克氏比例風險回歸模式(Cox proportional hazards regression model) 28 天存活分析，將基因表現，性別、年齡、同時罹患之其他疾病、APACHE II 分數、SOFA 分數、功能失調的器官數目、透析治療及呼吸器的使用等變數均加入回歸分析再來比較，如所示，結果發現：基因表現在回歸分析的模式下仍具有顯著的意義(Hazard ratios=26.1, P=0.024)，而 APACHE II 分數及不需要使用呼吸器的天數也仍具有顯著的意義(Hazard ratios=1.156, P=0.014；Hazard ratios=0.865, P=0.025)。



以『Kaplain-Meier 存活曲線』分析，BCL3 基因表現比較強組及 BCL3 基因表現比較弱組之 28 天存活率，P 值為 0.025。

六、討論

敗血症是一個致病機轉複雜的疾病，即使是相同的致病菌，相同的感染部位，臨床上的表現及結果在不同的病人可能會有相當的差異[Stuber -1996&2003]。在評估病人的預後方面，一些臨床指標的評分表，如 APACHE II 或 SOFA 計分量表，的確可以幫助臨床醫師去做判斷，但是利用相關基因的分析，除了有助於疾病的風險分類之外，還可能運用在治療策略的選擇上[Tabrizi -2001] [Texereau-2004]。

在之前的文獻[Annane-2005]，敗血症中過度的發炎反應會導致宿主器官的傷害，這樣過度的免疫反應通常需要抗發炎媒介物質來做適當的調控(down-regulation)，這樣的抗發炎反應通常是淋巴球細胞和負責呈現抗原的樹突狀細胞經由細胞凋亡來達成。而在 Hotchkiss 等人[Hotchkiss-2003]的研究中，發現在嚴重敗血症中過度的淋巴球細胞凋亡可能會造成免疫系統的癱瘓(immunoparalysis)，除了無法消滅入侵的病原菌外，進一步還會增加後來院內感染的機會。綜合以上的結論，過度的發炎或抗發炎反應可能都不利於敗血症的患者[Mahidhara -2000]。

本研究所分析的 BCL3 基因在過去的研究中，主要是經由核轉錄因子- κ B 調節途徑的活化，核轉錄因子- κ B 被活化後，會進入細胞核內促進基因的轉錄，進一步避免受抗原刺激後活化 T 細胞的死亡(activation-induced cell death, AICD) [Mitchell-2001]

[Hildeman-2002]。在這個研究中的確可以發現在嚴重的感染情形下 BCL3 基因的表現是明顯增加的，雖然敗血症組跟健康的對照組在年齡及同時罹患之其他疾病方面有些差距，不過目前除了淋巴癌及慢性淋巴母球細胞白血病外，並沒有文獻提到 BCL3 基因的表現跟這些因子有關。在本研究中也的確發現在 BCL3 基因表現較強的病人，其周邊血液淋巴球低下的恢復會比基因表現比較弱的病人來得快，證實了此基因對於敗血症中淋巴球細胞存活的影響。而這些淋巴球恢復較迅速的患者，的確在臨床上表現出較嚴重的器官功能失調，這可能是反映出這些恢復淋巴球可能會加重全身性發炎反應(Systemic inflammatory response)，由於本研究中並未測量病患血中的細胞激素(cytokine)及不同種類淋巴球的數量，兩者之間的關連性還須要進一步的研究。在本研究中 BCL3 基因的表現量對於初期血液淋巴球細胞的數量影響並不明顯，代表初期血液淋巴球細胞的凋亡可能是受到其他的因素所調控。在 Haendeler 等人[Haendeler-1996]的研究中提出，利用內毒素注射動物引起的敗血性休克中，網狀內皮組織中細胞的凋亡是和 Bcl-2 表現量的減少有明顯的關連。其他可能會造成敗血症初期淋巴球凋亡的原因還有腫瘤壞死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、Fas 單體(Fas ligand)及介白素-2(Interleukin-2)等 [Oberholzer-2001]。至於在本研究中 BCL3 基因表現較低的病人，雖然在病程早期(前一個月)因敗血症造成的器官功能失調程度和死亡率都來得比較輕微，可是由後續追蹤可以發現這組病人的死亡往往是發生在更後面的住院過程中，可能的原因包括了因持續的淋巴球低下所導致免疫力受損而增加後續院內感染的機會。

目前有許多正在進行的臨床實驗，嘗試利用細胞凋亡阻斷劑來治療敗血症，其中包含了凋亡蛋白酶抑制劑(Caspase inhibitor)、CD95 小干擾核糖核酸(small interfering RNA, siRNA)及抗病毒藥物(antiretroviral protease inhibitor)等，目前在敗血症的動物實驗中可以觀察到初步的療效[Weaver_-2005] [Hotchkiss-2006]。但是近來也有報告提出凋亡蛋白酶抑制劑用在治療初期敗血症時可以造成超急性腫瘤壞死因子引發的循環休克(hyper-acute TNF-induced shock)及器官衰竭[Cauwels-2003]，這樣的現象讓我們推論適當的治療時機之重要性，特別是 hyper-inflammatory 或 hypo-inflammatory 兩種不同的免疫時期對藥物反應需要進一步的釐清。在本研究中，淋巴球在敗血症初期的恢復是與更嚴重的器官功能失調有相關，這樣的結果是否代表細胞凋亡阻斷劑不適合用於敗血症早期則是需要進一步探討的問題。

對基礎研究與臨床上之比較，如何正確有效地在統計學上之分析，其中主要問題包括如何取捨高低值作為臨界點(cut-off point)，由於之前並未有文獻可以參考，本研究利用以 BCL3 基因與 TBP(TATA BOX binding protein)基因的表現量相差 16 倍為臨界點分類病患，此值為和無敗血症對照組相較後敗血症組基因表現量之算數平均值，而未來在測試這基因表現量的臨界點，可能還需要更多病患的前瞻性臨床試驗(prospective study)。另外，在本研究中我們利用周邊血液單核細胞(PBMC)來測量基因表現量，由於 PBMC 主要是來自血液中的單核球及淋巴球細胞，雖然在鏡檢下 buffy coat 主要是淋巴球，不過還是會有少量的單核球，在測驗淋巴球 BCL3 的表現時可能會受到單核球的雜訊(noise)影響，這個部分將來可能需要單獨把單核球分離出來。

參考文獻

1. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet* 2005; 365: 63-78.
2. Abraham E. The International Sepsis Forum's controversies in sepsis: how will sepsis be treated in 2051? *Crit Care* 2002; 6:277-8.
3. Cauwels A, Janssen B, Waeytens A, *et al.* Caspase inhibition causes hyperacute tumor necrosis factor-induced shock via oxidative stress and phospholipase A2. *Nat Immunol* 2003; 4: 387-93.
4. Ge B, Li O, Wilder P, *et al.* NF-kappa B regulates BCL3 transcription in T lymphocytes through an intronic enhancer. *J Immunol* 2003; 171:4210-8.
5. Haendeler J, Messmer UK, Brüne B, *et al.* Endotoxic shock leads to apoptosis in vivo and reduces Bcl-2. *Shock* 1996; 6: 405-9.
6. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, *et al.* Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999; 27: 1230-51.
7. Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, *et al.* Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 354-9.
8. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, *et al.* Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 14541-6.
9. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, *et al.* Apoptosis cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999; 27:1230-51.
10. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Karl IE. Role of Apoptotic Cell Death in Sepsis. *Scand J Infect Dis* 2003; 35:585-92.
11. Hotchkiss RS, Osmon SB, Chang KC, *et al.* Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. *J Immunol* 2005;174: 5110-8.
12. Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 813-22.
13. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, *et al.* Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* 2002; 18:487-94.
14. Lin MT, Albertson TE. Genomic polymorphism in sepsis. *Crit Care Med* 2004; 32: 569-79.
15. Lowe PR, Galley HF, Abdel-Fattah A, *et al.* Influence of interleukin-10 polymorphism on interleukin-10 expression and survival in critically ill patients. *Critical Care Medicine* 2003; 31: 34-8.
16. Mahidhara R, Billiar TR. Apoptosis in sepsis. *Crit Care Med* 2000; 28: 105-13.
17. Mitchell TC, Hildeman D, Kedl RM, *et al.* Immunological adjuvants promote activated T cell survival via induction of Bcl-3. *Nat Immunol* 2001; 2:397-402.

18. Na SY, Choi JE, Kim HJ, *et al.* Bcl3, an IkappaB protein, stimulates activating protein-1 transactivation and cellular proliferation. *J Biol Chem* 1999; 274: 28491-6.
19. Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, *et al.* Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *FASEB J* 2001; 15: 879-92.
20. Opferman JT, Korsmeyer SJ. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol* 2003; 4: 410-5.
21. Parrino J, Hotchkiss RS, Bray M. Prevention of immune cell apoptosis as potential therapeutic strategy for severe infections. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 191-8.
22. Stuber F, Petersen M, Bokelmann F, *et al.* A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 1996; 24: 381-4.
23. Stuber F. Another definite candidate gene for genetic predisposition of sepsis: Interleukin-10. *Crit Care Med* 2003; 31: 314-5.
24. Tsai HC, Yu CJ, Yang PC. Differentiate gram positive from gram negative sepsis: gene expression analysis in peripheral blood mononuclear cells from patients with early sepsis. 2004
25. Tabrizi AR, Zehnbauer BA, Freeman BD, *et al.* Genetic markers in sepsis. *J Am Coll Surg* 2001; 192: 106-17.
26. Texereau J, Pene F, Chiche JD, *et al.* Importance of hemostatic gene polymorphisms for susceptibility to and outcome of severe sepsis. *Crit Care Med* 2004; 32: 313-9.
27. Wunderink RG, Waterer GW. Genetics of sepsis and pneumonia. *Curr Opin Crit Care* 2003; 9: 384-9.
28. Weaver JG, Tarze A, Moffat TC, *et al.* Inhibition of adenine nucleotide translocator pore function and protection against apoptosis in vivo by an HIV protease inhibitor. *J Clin Invest* 2005; 115:1828-38.

計畫成果自評

本研究嘗試利用與敗血症相關的基因去預測疾病的臨床預後，已初步觀察到基因表現強弱對於臨床病程的影響。此研究顯示在嚴重敗血症初期 BCL3 基因表現量雖然對於病患初期周邊血液淋巴球低下沒有明顯的影響，但 BCL3 基因表現比較強的病人，他們周邊血液淋巴球低下的恢復會比基因表現較弱的病人來得快速，這對於短期的預後有較不利的影響，這樣的結果可能代表在嚴重敗血症初期仍是以過度的發炎反應為主，未來在高危險族群的病人可以根據基因研究的結果作為治療策略上的調整，本研究也提供凋亡淋巴球細胞在疾病初期恢復對於敗血症的影響，這將有利於未來臨床實驗利用細胞凋亡阻斷劑來治療嚴重敗血症之適當時機的一個很好依據。達到針對嚴重敗血症在不同的病程所發生的免疫反應失調，運用適當的專一性治療。