

R  
000.8  
2815

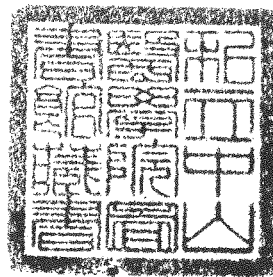
私立中山醫學院醫學研究所

碩士論文

指導教授:蔡嘉哲博士  
共同指導教授:李天翎博士

# 硬皮症病人血清確認皮膚纖維母 細胞進行膜泡外分泌的自體抗原

*Autoantigens From Ectocytosis Of Skin Fibroblasts Are  
Recognized By Scleroderma Sera*



研究生:徐再靜撰

中華民國八十四年 六月

中山醫學院圖書館



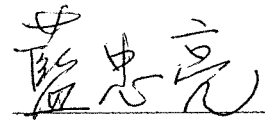
C032784

本論文為中山醫學院授予理學碩士學位之  
必備條件之一，經中山醫學院醫學研究所碩  
士論文考試委員會審查合格及口試通過。

口試委員

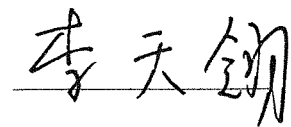
台中榮民總醫院  
免疫風濕科主任

藍忠亮 博士



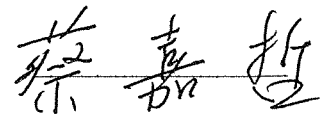
私立中山醫學院牙醫學系  
(論文共同指導教授)

李天翎 博士



私立中山醫學院醫學研究所  
(論文指導教授)

蔡嘉哲 博士



中華民國八十四年六月

## 誌 謝

兩年來的碩士班求學生涯，雖然短暫，但是無論在知識、實驗技術方面，或做人處事方面，從師長、學長姐和同學們的慷慨相授，實在獲益良多，而且充實不少。

能順利完成學業及這篇論文，首先要感謝指導教授蔡嘉哲博士和李天翎博士，這兩年來細心的教導與支持；更感謝口試委員藍忠亮主任，對這篇論文的審查與指正。感謝從事研究期間，李宣佑老師、廖克剛老師、李輝老師、林瑞生老師、林克亮老師等提供實驗室空間、器材，和相關知識，得以順利完成實驗。再者，感謝實驗室的工作伙伴李淑玲學姐、黃建寧醫師、助理奉微、秀容、郁雯、靜玉，在實驗上給與的幫忙，以及瑞玲、大貞、珍容、梅林、威志、明衡、健隆、柏年、玉雲、秀芬等學長姐、學弟妹們的幫忙與關心，謝謝。

最後，謹以此論文獻給我深愛的爺爺、家人和博修，您們無時無刻的叮嚀、鼓勵和包容，是我永遠的支柱，感激不盡。謝謝您們。

徐再靜                      謹誌於

中山醫學院醫學研究所

中華民國八十四年六月三十日

## 目 錄

	頁次
中文摘要 .....	I
英文摘要 .....	III
第一章 前 言 .....	1
第二章 研究背景 .....	6
第一節 硬皮症 .....	6
第二節 collagen gel .....	10
第三節 ectocytosis .....	12
第四節 硬皮症纖維母細胞與collagen gel的關係 .....	14
第三章 材料和方法 .....	16
第四章 結果 .....	24
第五章 討論 .....	42
參考文獻 .....	48
附錄 .....	63

圖表：

表一	5
圖 1.	30
圖 2.	31
圖 3.	32
圖 4.	33
圖 5.	34
圖 6.	35
圖 7.	36
圖 8.	37
圖 9.	38
圖 10.	39
圖 11.	40
圖 12.	41

## 摘要

硬皮症是一種全身性自體免疫疾病，主要特徵是其纖維母細胞會過度的分泌膠原。從過去的文獻，已知 Topo I (Topoisomerase I) 抗體及抗中節抗體在硬皮症的特異性，同時也發現在硬皮症病人，其染色體之斷裂有增加的現象，這些結果顯示硬皮症的發生與細胞內的抗原有密切的關係。至於這些細胞內的抗原如何進到細胞間質或血液循環中，並進一步引發自體免疫抗體的機轉，則尚無任何理論或實驗能以解釋。

如果將纖維母細胞培養在固定的collagen gel內時，細胞會附著並且伸展於纖維之中，呈現兩極伸長的形態。再經過一些時間，纖維母細胞便開始將膠原纖維重整，收縮collagen gel，使gel的厚度變薄，並使其中的細胞處於張力緊繃的狀態。但若以外力解除此一張力，則會引發一連串的反應，其中包括了一種特殊的膜泡外分泌(ectocytosis)，可將細胞內的物質包於膜質小泡內分泌至細胞外。

所以，我們的實驗便利用此一模式，設計將硬皮症病人纖維母細胞培養在 collagen gel 內48小時，然後以外力解除細胞緊繃的張力，促使纖維母細胞進行膜泡外分泌(ectocytosis)。經由利用低速和超高速的離心，將此過程分泌的膜質小泡分離而收集。再經由 SDS-PAGE以及和80位自體免疫疾病及10位正常人的血清進行免疫點

墨法分析,結果顯示三種分子為硬皮症血清特別認識,其分子量及陽性反應頻率分別為12-14Kd(19/43),32-34Kd(31/43),77-80Kd(23/43)。其中32-34Kd經進一步研究後証實為annexins。這是一種新的發現,這些結果顯示細胞內分子可能擔任硬皮症的病因角色,同時代表ectocytosis可能是呈現出自體抗原給免疫系統認識的一個新的機轉。

## ABSTRACT

Scleroderma is a systemic autoimmune disorder characterized by fibrosis and over-production of extracellular matrix components by some population of fibroblasts. Most of the intracellular disorders in sclerotic fibroblasts are still not elucidated in detail.

Previously, we have known the roles and the specificity of topoisomerase I antibodies and anticentromere antibodies in patients with scleroderma. And also found an increased occurrence of chromosome breakages in patients with scleroderma. These results indicate that there are some relationships between the pathogenesis of scleroderma and intracellular autoantigens.

Ectocytosis, the release of sorted cellular proteins in the form of enriched membrane vesicles, can be triggered by relaxing the tension posed upon fibroblasts.

In the present study, we are tempted to test the possibility that if proteins ectocytosed from non-immune cells might be an alternative source of autoimmunogens.



The fibroblasts from scleroderma patients were cultured in a three-dimensional, histotypic matrix composed of type I collagen fibrils. Membrane vesicles released by triggered ectocytosis were isolated, resolved by SDS-PAGE, and immunoblotted with sera from 80 autoimmune patients and 10 normal volunteers. Three major polypeptides 12-14Kda, 32-34Kda, 77-80KDa, are prominent bands on SDS-PAGE and immunoblots. Among which, the 32-34Kda polypeptide has been further identified as annexins, the lipid-, actin-binding, and calcium-dependent proteins. Our data suggest that ectocytosis from non-immune cells might play an important role in the generation of autoantigens.

## 第一章 前言

自體免疫疾病發生的機轉至今仍不明瞭，只了解和環境及遺傳因子有關—特別是主要組織相容性複體的基因型(MHC genotype)。自體免疫反應通常是持續存在，而且會造成組織的長期損傷。目前相信T細胞、毒殺性T細胞反應和不適當巨噬細胞的活化，都會造成廣泛性的組織損傷。若有外在T細胞幫助參與時，則也會引發傷害的抗體對抗自己抗原的反應產生。也就是說，如果當宿主自體辨識系統崩潰，轉而產生抗體對抗宿主本身時，就會產生嚴重的組織損傷。Ehrlich 曾將此命名為一恐怖的自體毒物(horror autotoxicus)。所以，一旦自我的耐受性失調或被超越，則這個“恐怖的自體毒物”引發的組織損傷，就會出現〔1〕。

與自體免疫有關的疾病，有的只局限在一個範圍之內，有的則廣泛散佈於全身各處，我們分別稱之為器官專一性自體免疫疾病和全身性自體免疫疾病。器官專一性疾病常侵犯的器官，包括甲狀腺、腎上腺、胃和胰臟。而全身性自體免疫疾病(包括所謂的風濕性疾病)，

則常侵犯皮膚、腎臟、關節和肌肉等處〔2〕。而本篇論文所要研究的主要對象，即是屬於全身性自體免疫疾病的硬皮症(scleroderma)。

自體抗體(autoantibodies)是由於體內免疫系統對於自身的組織細胞成分發生反應而產生的抗體。它常出現於種種免疫系統異常或過敏性疾病病人的血清中，也可出現於慢性肝病、感染、血液疾病，甚至正常人。其產生的原因有三種：(1)為體內的組織細胞受到外來因素，例如感染、藥物或內在因素的影響而發生改變，結果使正常的免疫反應細胞對它發生反應而產生的抗體；(2)為體內的免疫反應細胞本身呈現異常，對正常的組織細胞發生免疫反應，而產生抗體；(3)為外來抗原(例如細菌或病毒)和體內的組織細胞具有共同抗原，體內正常的免疫反應細胞對這些外來抗原發生免疫反應所產生的抗體，能與體內正常的組織細胞成分發生交叉反應所致〔3〕。

自體抗體的種類很多，視其對應抗原而異。有對應於細胞的自體抗體；有對應於蛋白質的自體抗體；也有對應於細胞內各種成分的自體抗體。某一種抗體可能

同時出現於許多種疾病，而某一種疾病也可能同時產生許多種抗體，所以自體抗體並不一定具有「特定性」。但是，有些自體抗體在某一特殊疾病的出現率特別高時，這就具有代表性和診斷的價值〔3〕。目前，已知較具代表性的自體抗體和其相關的自體免疫疾病〔4〕有下列幾種：

Goodpasture's syndrome — anti-basement membrane antibodies

SLE(全身性紅斑狼瘡) — anti-dsDNA,  
anti-ssDNA,  
anti-Sm,  
anti-SSA/Ro(50%),  
anti-SSB/La(15%)

Sjogren's syndrome — anti-SSA/Ro,  
(修格連氏徵候群) anti-SSB/La

MCTD(混合型結締組織病) — anti-RNP

Scleroderma/CREST — anti-Scl-70,  
anti-centromere

Polymyositis(多發性肌炎)— anti-PM1,  
anti-Jo-1

據了解，目前所發現的這些自體抗原，都是人體內相當重要的酵素(例如 topoisomerase I, RNA polymerase)或高度保留的分子(例如 histone, DNA)【如表一】。但是，是什麼原因引起自身抗體的攻擊，到目前為止，仍然是一個不可思議的謎題。所以，致力找尋引發自體免疫疾病產生的原因，是科學家們所積極努力研究的方向。

Disease	Identity and structure of antigen	Function of antigen
Lupus	Sm -common proteins of small nuclear ribonucleoprotein particles (snRNP), U1,U2,U4-U6 snRNPs	Splicing of precursor messenger RNA
Lupus	PCNA-Auxiliary protein of DNA polymerase delta	DNA replication-leading strand synthesis
Lupus and mixed connective tissue disease	U1 snRNP-specific proteins of U1 RNP particle	Splicing of pre-mRNA
Lupus and scleroderma	NOR-90-Nucleolus organizer region proteins	RNA pol I transcription
Scleroderma	Scl-70-DNA topoisomerase I	Relaxation of supercoiled DNA
Scleroderma (CREST*)	Centromere-associated proteins of 17,80, and 140 kD	Spindle attachment in cell mitosis
Dermatomyositis	Transfer RNA (tRNA <sup>his,thr,ala</sup> ) synthetases	Ribosomal protein synthesis

\* CREST is the acronym for a subset of scleroderma characterized by Calcinosis, Raynaud's phenomenon, Esophageal dysmotility, Sclerodactyly, and Telangiectasia.

表一、已知構造、功能的自體抗原和出現的自體免疫疾病之關係

(摘錄自 J.Exp.Med. 1994, Vol.179, p1083-86.)

## 第二章 研究背景

### 第一節 硬皮症

#### § 1.1 定義

硬皮症(scleroderma)是一種侵犯皮膚和多處器官的結締組織慢性疾病，同時也是一種全身性的自體免疫疾病。其特徵為皮膚、血管及包括胃腸道、肺臟、心臟和腎臟等內臟器官的纖維化。該病可分為兩型，一型稱為瀰漫性皮膚硬化症，其特徵為肢體近端和遠端、面部及軀幹皮膚迅速形成對稱性增厚。另一型稱為局限性皮膚硬化症，其表現為手指、四肢遠端和面部對稱性皮膚增厚。此型常有CREST綜合症的特徵：

【C(calainosis)為鈣鹽沉著；R(Raynaud's phenomenon)為雷諾氏現象(是由於寒冷或精神感動，引起肢端間歇蒼白或紺色發作、充血等反應)；E(esophageal dysmotility)為食道吞嚥困難；S(sclerodactyly)為指(趾)皮硬化；T(telangiectasia)為毛細血管擴張】。雖然雷諾氏現象可能是全身性硬皮症的首要癥狀，但絕大多數僅有雷諾氏

現象的患者並不發生結締組織病〔5〕。此外，罹患此病的女性比男性人數多2-3倍，通常在嚴重的數年後，因腎疾而死亡〔6〕。

## § 1.2 病因

其病因到目前為止仍不清楚，但是從最近病理、免疫、分子生物等相關發表的文獻中，了解到硬皮症病人皮膚纖維母細胞不正常的功能，可能是造成硬皮症纖維化的主要原因〔7-10〕。在早先的文獻報告曾指出，在體外(*in vitro*)培養時(早期的幾代)，硬皮症皮膚纖維母細胞會比正常人皮膚纖維母細胞產生多量的膠原(collagen)〔7,11〕, glycosaminoglycan〔12〕 fibronectin〔11〕, 及 prolyl 4-hydroxylase (一種膠原合成時所須的酵素)〔13〕。儘管如此，對於造成硬皮症纖維母細胞這種不正常改變的機轉，仍然是不明瞭的。

## § 1.3 實驗室檢查

在臨床檢驗上，通常是利用間接免疫螢光法，觀察病人血清對抗HEP-2 cell的情形，此項檢查稱為抗核



抗體(antinuclear antibody, ANA) [4-5]。而抗核抗體於硬皮症病人中出現的比例為30%-80%，但當操作及分析準確時，這比例甚至可達95%以上[4-5]，其出現的形態主要以speckle type為主[5-6]。

#### § 1.4 自體抗原與自體抗體

至目前為止，在硬皮症病人中被發現的自體抗體，所對抗的自體抗原共有七種，分別為 Scl-70, Centromere, 和一些核內的物質：RNA Pol I, Fibrillarin, PM-Scl, To, 及NOR-90等[4]。

(1) Scl-70, 即 DNA topoisomerase I, 分子量為100kDa的天然蛋白質，而70kDa是100kDa分解的產物。70%的瀰漫性硬皮症病人的血清中會有對抗此 Scl-70的抗體出現(即anti-Scl-70)。此anti-Scl-70抗體對於硬皮症的特異性相當高，因此在臨床上是作為診斷全身性硬皮症的標記抗體[14-19]。

- (2) Centromere(染色體中節), 分子量為17,80, 和140kDa的蛋白質。此抗染色體中節抗體(anti-centromere), 70-80%出現在CREST的病人中〔20-27〕。
- (3) RNA Pol I, 位於核仁, 約4%的硬皮症病人有此 anti-RNA Pol I 抗體出現〔28-29〕。
- (4) Fibrillarin, 和 U3 RNP 有關, 分子量為34kDa的蛋白質, 8%的硬皮症病人有此 anti-fibrillarin抗體出現〔30-31〕。
- (5) PM-Scl, 由分子量20kDa至110kDa中的11種蛋白質組成。3%的硬皮症病人有此anti-PM-Scl抗體出現〔32-33〕。
- (6) To, 位於核仁, 分子量為40kDa, 和7-2及8-2 RNA形成複合物〔34-36〕。
- (7) NOR-90, 位於核仁, 其分子量為90kDa〔37〕。

## 第二節 collagen gel

### § 2.1 與單層細胞(monolayer)培養的比較

在一般體外(in vitro)的細胞培養和實際上體內(in vivo)的細胞之生長情況是有所出入的，特別是於體外培養細胞時，缺乏一個胞外基質(ECM, extracellular matrix)的環境。因此，我們的研究便利用一個具有胞外基質(ECM)環境的三度空間培養系統[38-42]—type I collagen gel, 進行主要的細胞培養。

### § 2.2 細胞培養於gel中的情形

從文獻中我們知道，將纖維母細胞培養在固定的collagen gel內時，細胞會附著(attach)並展開於纖維(fibrils)之中，呈現兩極伸長的形態[43-45]。而經過一些時間，纖維母細胞便會將膠原纖維重整，並且開始收縮collagen gel[46]。而collagen gel的收縮則被相信是和重要的傷口癒合[48-49]、纖維化、疤痕收縮及結締組織發育等類似的一個過程[46-47]。Collagen gel的收縮是一種活化細胞的過程



，而其收縮的速率是和細胞的數目、collagen的濃度，以及血清的濃度有關〔45, 49-50〕，但是和collagen的合成或分解是沒有關係〔51〕。在這個模式培養下，纖維母細胞是生長於類似實際皮膚組織的環境中。關於膠原纖維重整的機轉，則被認為是由於纖維母細胞在collagen gel中的伸展、遷移時牽引的力量所造成〔47〕。

### § 2.3 緊張-鬆弛的模式 (stress-relaxation)

我們知道在正常的傷口癒合上，組織收縮時會產生張力〔52-54〕。而張力的產生被相信是和細胞調節有關，但是細胞是如何在組織收縮時產生張力的力量，仍然不很清楚。而纖維母細胞本身是一種會產生張力的細胞，所以當纖維母細胞培養在穩定的collagen gel中時，能夠產生張力牽引〔54-55〕。在1991年Mochitate et al.發表的文章中〔56〕曾指出：將緊張的collagen gel鬆弛——是唯一適合學習組織器官調節細胞形態以及生物合成功能的一種模式。而這緊張鬆弛的結果是在沒有任何酵素和藥物的參與下，細胞

形態所進行的一種快速的改變。所以，此一模式亦是可以用來分析關於組織器官改變時，細胞開始變化的情形。同時，在1992年Tomasek et al.發表的文章〔54〕也曾指出：纖維母細胞會產生張力於所附著的collagen gel中，但是一旦將張力解除，則纖維母細胞便會收縮而使得collagen gel也迅速收縮，而這纖維母細胞的收縮是須要actin細胞骨架的參與。

### 第三節 膜泡外分泌(Ectocytosis)

#### § 3.1 命名

在早期幾年，曾有科學家發現，當加入一些不同的藥物到細胞外培養液時，會造成哺乳類細胞的細胞膜剝落、分離，但是卻不致於使細胞溶解的情形發生〔57-60〕。另外，也有的發現這細胞膜剝離的現象會主動的發生在正常以及腫瘤的細胞上〔61〕。而在1991年STEIN and LUZIO發表的文章〔57〕，曾經指出：當補體C9插入MAC(complement membrane attack complexes)之後，細胞膜剝離的現象就會隨之而發生

。並且有證據顯示內生性的細胞表面蛋白質和細胞膜上的脂質也會跟隨至剝離的小泡(vesicles)上——這個過程是不同於已知的胞泌(exocytosis)以及胞噬(endocytosis)的分泌方式,所以另外命名為膜泡外分泌(ectocytosis),以和前述兩者加以區分。經由ectocytosis剝離的小泡,是一種從真核細胞表面分泌的right-side-out的膜質小泡(vesicles)。

### § 3.2 機轉

在1993年Lee et al.發表的文章[62],發現到將含有纖維母細胞的collagen gel培養2-5天後,經過機械性的張力弛放5分鐘,會引發一種膜泡外分泌(ectocytosis)的過程。這和以往我們所認知的胞泌作用(exocytosis)是有所不同的。我們知道:exocytosis是細胞將其胞內的物質分泌到胞外的一種方式,但是這些被分泌到胞外的物質,是直接被釋放到細胞外,並沒有受到任何細胞膜的包圍保護。但是膜泡外分泌(ectocytosis)所釋放到細胞外的物質是一種受到細胞膜包圍保護,大約直徑為200nm, right-side-out的膜質小泡[62]。

另外，ectocytosis也可說是一種逆行的胞嚥(endocytosis)過程。它是一種細胞膜先向外形成budding，然後漸漸圍繞形成一個柄狀物，最後才和細胞膜脫離的一種分泌方式。同時，在Lee et al.的文章[62]也發現：在這張力弛放後，引發的膜泡外分泌的膜質小泡(vesicles)之內含有 actin, annexin II, VI和 $\beta 1$  integrin receptors。

#### 第四節 硬皮症纖維母細胞與 collagen gel的關係

從利用三度空間的collagen gel培養硬皮症纖維母細胞的一些研究報告，我們知道硬皮症纖維母細胞的不正常，可能和此疾病的纖維化有密切的關係。硬皮症纖維母細胞和正常人的纖維母細胞培養在collagen gel中時，經由SEM或TEM的觀察，這兩者在形態上並沒有任何的差異[63]。但重要的是這個gel培養模式，提供了一個在單層細胞培養下所沒有，一個類似組織的生存環境(ECM)[38-42]，使其能夠充分表現在形態上和生化上的特徵[63]。另外，我們也知道硬皮症纖維

母細胞會較正常纖維母細胞產生大量的膠原〔64〕，而這大量的膠原增生，很可能就是因為硬皮症纖維母細胞調節失常，因而引起纖維化的原因。所以，我們的研究便利用 collagen gel，培養硬皮症纖維母細胞。

過去我們實驗室已發現 Topoisomerase I 抗體〔71-74〕及抗中節抗體〔66〕在硬皮症的特異性，同時我們也發現在硬皮症病人，其染色體之斷裂有增加的現象，這些結果顯示硬皮症的發生與細胞內的抗原有密切的關係。又因為知道將 collagen gel 張力弛放後，會有一種膜泡外分泌(ectocytosis)的過程產生，將胞內的一些物質分泌至胞外。而經由這過程分泌的物質是否和硬皮症被引發的機轉有關，則是引發我們著手於本研究的主要動機。



## 第三章 材料與方法

### 一· 實驗材料

培養細胞用藥品，如DMEM、MEM、FBS、PSN、Antibiotic antimyosin、HEPES、DPBS(-)、Trypsin-EDTA、0.25%Trypsin、T-25, T-80 flasks(Nunc)、24-well plate(Nunc)購自岑祥(代理GIBCO、Nunc)；type I collagenase、Leupeptin、Pepstatin A、Benzamidine、ascorbic acid、EDTA、Annexins(32.5 and 35KDa, A-2699) 均購自誠心堂(代理SIGMA)；Vitrogen 100 購自昇佶(代理CELTRIX)；<sup>125</sup>I-Protein A 購自豐記；fluorescein conjugated goat anti-human IgG, IgM和IgA 購自Behring；蛋白質分離試劑均購自SIGMA, Merck，或日本和光。蛋白質電泳和轉印試藥、器具皆購自Bio-Rad公司；超高速離心機機型為L-8, Rotor為type SW-55(Beckman)；Densimeter、照相和分析軟體-GPTools v3.0購自常春藤。

## 二·實驗方法

### 1. 自體免疫疾病病人和正常人的血清

本實驗所使用的血清包括有10位正常人的血清及經過臨床風濕病專科醫師的確立診斷之具有自體免疫疾病病人80位的血清，包括硬皮症(Scleroderma)病人43位，紅斑性狼瘡(SLE)病人18位，修格連氏徵候群(Sjogren Syndrome)病人13位，以及原發性膽汁性肝硬化(PBC, Primary biliary cirrhosis)病人6位等。

### 2. 皮膚處理及纖維母細胞的培養

首先，將取得於硬皮症病人硬化的皮膚(約3mm)及正常人的皮膚(foreskin)消毒乾淨(將無菌的檢體浸泡於10%PSN, 3分鐘→1%PSN, 3分鐘)。用解剖刀(No:10)將皮膚切碎成細小的片段，平均分裝至T-25 flasks內。然後將flasks反面倒置(即瓶口朝下)，加入5ml cDMEM medium(DMEM+10%FCS+1%PSN)，於37°C的5% CO<sub>2</sub>恆溫箱中培養24小時，然後再將

flasks倒置回正面(即瓶口朝上)繼續培養。當纖維母細胞長滿(confulent),用0.05%trypsin/0.53mM EDTA拆細胞,依1:2比例分裝。在這個實驗當中,我們所使用的細胞代數是從第3代到第6代。

### 3. Collagen gel 製備[63]

Collagen gel是由 4/5 的collagen solution和 1/5 的fibroblast suspencion所組成。而Collagen solution是由Vitrogen 100 [70], 0.1N NaOH, 10X MEM,和DMEM 依一定比例所配製。其中(Vitrogen)final=1.5mg/ml,

$$\begin{aligned} (10X MEM)vol &= (0.1N NaOH)vol \\ &= 1/8 \text{所需}(Vitrogen 100)vol \\ (DMEM)vol &= (collagen solution)vol - (10x \\ &MEM)vol - (0.1N NaOH)vol - \text{所需} \\ &(Vitrogen 100)vol。 \end{aligned}$$

而fibroblast suspencion的細胞數目,必須是 1 gel中含有 $1 \times 10^5$  cells。最後將配製完成collagen solution 和 fibroblast suspencion混合均勻

。然後加 200ul/well 至 24-Well plate，於 37 °C 的 5% CO<sub>2</sub> 恆溫箱中培養 1 小時，使 Collagen gel 固定在 24-Well 上。此時再加入 2ml 的培養液(含 DMEM + 10% FCS + 1% PSN + 50ug/ml Vit. C)，於 37 °C 的 5% CO<sub>2</sub> 恆溫箱中培養 48 小時。

#### 4. 分離膜質小泡 (vesicles) [63]

將培養 48 小時，附著於 24-well plate 上的 collagen matrice 用匙勻張力弛放 5 分鐘，即可有膜質小泡經膜泡外分泌過程被分泌出。用 DPBS(-) 清洗 10 分鐘，再加入 200ul/well 0.05% trypsin / 0.53mM EDTA，於 37 °C 的 5% CO<sub>2</sub> 恆溫箱中作用 10 分鐘。接著，用 type I collagenase (sigma type I, 4mg/ml in Ca<sup>2+</sup>-HEPES buffer) 250ul/well，於 37 °C 的 5% CO<sub>2</sub> 恆溫箱中作用 40 分鐘。最後，用 FCS, 10ul/well 中止所加入酵素的作用。接著，將溶解後的液體收集在一起，首先經過低速離心 1000 rpm，10 分鐘的處理，然後將離心後得到的上清液收集在一

起，加入 protease inhibitor (包括 10  $\mu$ M Leupeptin, 10  $\mu$ g/ml Pepstasin A, 0.5 mM Benzamidine, 5 mM EDTA), 再繼續利用超高速離心機 (Beckman, L-80) 離心 35000 rpm, 4 °C, 1 小時。而最後被分離出的這些沉澱物 (pellets) --- 即是在 ectocytosis 時所釋放的 vesicles。

## 5. SDS-PAGE

本實驗中，分離蛋白質所用的聚丙烯醯膠濃度是 15% [66-67]。方法是將 30% acrylamide, 2% bis, 1M Tris PH 8.7, 20% SDS, TEMED, 10% ammonium persulfate 和 d-H<sub>2</sub>O 成比例混合配製，然後用 isobutyl alcohol 壓平並去除氣泡，水平靜置 1 小時，此即 15% SDS-PAGE。待凝膠後，在其上層加入 5% stacking solution (30% acrylamide, 2% bis, 1M Tris PH 6.9, 20% SDS, TEMED, 10% ammonium persulfate 和 d-H<sub>2</sub>O)，並隨即插入齒模，水平靜置 5 分鐘。凝膠後，將 vesicles 和 sample

buffer混合均勻，加熱 $100^{\circ}\text{C}$ ，5分鐘。同時放入 $10\text{ul}$ 的低蛋白質分子量標準液， $100$ 伏特通電 $1.5$ 小時，直到染料跑到電泳槽電解液中，即完成電泳。之後，以coomassie blue染色 $2$ 小時，然後用methanol/acetic acid 脫色至透明，包覆予玻璃紙曬乾保存即可。

## 6. 免疫點墨法 (IMMUNOBLOT)

將經由SDS-PAGE分離的vesicles，轉印至醋酸纖維膜上〔67-68〕。經 $8$ 伏特/公分， $4^{\circ}\text{C}$ ， $1$ 小時轉印，取出醋酸纖維膜，將其切割成 $13$ 長條（每條寬 $0.5$ 公分），浸泡在含 $5\%$ 脫脂奶粉的PBS溶液中搖晃 $30$ 分鐘—blocking。然後加入正常人和病人血清（primary antibodies， $1:100x$ 稀釋於含 $5\%$ 脫脂奶粉的PBS溶液），作用 $1.5$ 小時，然後用PBS-tween清洗 $10$ 分鐘三次，再加入 $^{125}\text{I}$ -Protein A（secondary antibodies）作用 $1$ 小時，然後再用PBS-tween清洗 $10$ 分鐘三次， $20$ 分鐘二次，放在通風處風乾，整齊黏貼在濾紙上，以保鮮膜封好，放入片夾並裝入底片，自動放射顯影，使感光於X光片（ $-70^{\circ}\text{C}$ ， $24$ 小時）。

## 7. Preclearing experiment

將購自於sigma 的annexins powder (sigma, A-2699, annexin 32.5 and 35kd), 用PBS稀釋成10ug/ul的濃度, 然後取 20ul, 40ul, 100ul的annexins和硬皮症病人血清(以PBS 1:100x稀釋)先於37 °C作用30分鐘。然後1000rpm離心5分鐘, 取上清液再和經由SDS-PAGE分離後轉印至醋酸纖維膜上的vesicles進行免疫點墨法(immunoblot)分析。

## 8. PI 染色

將含有正常纖維母細胞的collagen gel, 於37 °C培養48小時, 然後用匙勻使其張力弛放5分鐘。之後, 用4%PFA, 1ml/well固定30分鐘, 然後用PBS清洗, 5分鐘兩次。之後加入染料 PI, 染1分鐘, 再用PBS清洗, 5分鐘兩次, 最後用dd-H<sub>2</sub>O清洗, 5分鐘兩次。然後放於載玻片上, 蓋上蓋玻片, 壓平、去除水分, 再以指甲油封片, 保存在4 °C。然後利用螢光顯微鏡(ZEISS)觀察(Rhodamine)。

## 9. 掃描式電子顯微鏡(SEM)的觀察

將收集到的 vesicles (來自於 22 個 collagen gel) 溶於 300  $\mu$ l DPBS(-) 中, 取 15  $\mu$ l 滴至已預先覆有 0.1% poly-L-lysine 的圓形蓋玻片 (直徑為 12 mm) 上, 靜置 2 小時。然後用 DPBS(-) 清洗, 接著用新鮮配製的固定液 (2% glutaraldehyde, 4% PFA, 1% tannic acid in 0.1M cacodylate buffer 和 0.1M sucrose, pH7.4) 固定 60 分鐘, 然後用 0.1M cacodylate buffer 和 0.1M sucrose, pH7.4 清洗數次。再用 1% osmium tetroxide in 0.1M cacodylate buffer 0.1M sucrose, pH7.4 固定 60 分鐘, 然後用 d-H<sub>2</sub>O 清洗數次, 再用新鮮過濾配製的溶液 (1% thiocarbonylhydrazide) 處理 15 分鐘, 然後用 d-H<sub>2</sub>O 清洗數次, 再 1% osmium tetroxide in d-H<sub>2</sub>O 浸潤 15 分鐘, 然後用 d-H<sub>2</sub>O 清洗數次, 再重複浸潤各一次 (1% thiocarbonylhydrazide 和 1% osmium tetroxide), 然後用 d-H<sub>2</sub>O 清洗數次, 接著進行脫水, 各 5 分鐘 (30%, 30%, 50%, 50%, 70%, 70%, 90%, 90%, 95%, 95%, 100% ethanol), 最後再以 100% ethanol, 10 分鐘 2 次。風乾, 黏於載物座, 利用掃描式電子顯微鏡 (SEM) 觀察。



## 第四章 結果

### 一. 硬皮症病人和正常人纖維母細胞培養之比較

將取自於硬皮症病人前臂硬化的皮膚，培養在T-25 flasks內。經過1星期左右，硬皮症病人的纖維母細胞才開始生長。在每四天更換新的培養液下，大約經過40天的培養，病人的細胞才佈滿整個 T-25 flask內。而取自於正常人皮膚培養的纖維母細胞，則只須經過四天左右，細胞就開始生長。同樣的，在經由每四天更換新的培養液下，正常人的纖維母細胞大約只須經過7-8天的培養，就佈滿了整個flask。這兩種來自不同病人及正常人的纖維母細胞，在形態上，可說是沒有甚麼差異【圖1.A, B】。但是，從初級組織培養(primary culture)兩者細胞生長所須的時間看來，我們發現硬皮症病人較正常人的纖維母細胞生長所須的時間來的久。而這原因很可能是因為硬皮症病人的皮膚已產生硬化、纖維化，而使得初級組織培養時，細胞新生不易。

## 二. 細胞在Collagen Gel內經Stress-Relaxation的觀察

將培養在T-25 flasks內的硬皮症病人纖維母細胞【圖1.B】，培養至3-6代的時候，轉移培養至3-D collagen gel中，於37 °C培養48小時。此時細胞呈伸長、雙極的形態【圖2.A】。培養48小時後，將其張力弛放5分鐘，從外觀上即可見gel收縮【圖3】，同時細胞因為受到張力一鬆弛的作用，會迅速形變，成為橢圓至圓形的形態【圖2.B】。而也因為張力緊繃的細胞受到張力的弛放，一種膜泡外分泌的過程(ectocytosis)發生：將細胞內的物質，包於膜質小泡(vesicles)內分泌至細胞外，而這個現象在我們以外力將 collagen gel張力弛放5分鐘後，經PI染料染色後，用1000倍的螢光顯微鏡(Rhodamine)觀察【圖4】，可清楚看到一些來自細胞內的物質，被包於膜質小泡(vesicles)內，分泌至細胞外。

爲了進一步研究這些膜泡的成份，我們利用低速離心1000rpm，將細胞分離，然後利用35000rpm的超高速離心，把在低速離心得到的上清液再予以離心，使分離出

經由膜泡外分泌過程(ectocytosis)分泌的膜質小泡(vesicles)。

### 三、掃描式電子顯微鏡下的膜質小泡(vesicles)

將收集到的膜質小泡(vesicles)固定在含有poly-L-lysine的蓋玻片上，再經過一些電顯檢體處理的步驟，最後以掃描式電子顯微鏡(SEM)觀察【圖5】。結果發現這些經由超高速離心得來的膜質小泡(vesicles)，在20000倍的放大下，可清楚的看見小泡表面的確是包覆有細胞膜的成分。所以，我們相信一定有一個膜泡外分泌的過程(ectocytosis)，會將細胞內的物質，包於膜質小泡(vesicles)內，然後分泌至細胞外。

### 四.SDS-PAGE 分析

我們將低速離心分離的硬皮症病人的纖維母細胞(total cells),及超高速離心後所收集到的膜質小泡(vesicles)，用15% SDS-PAGE來分析【圖6】。結果發現來自病人和正常人纖維母細胞所分泌的膜質小泡(vesicles)，在某些帶(band)的表現上，有著顯著的不同。

## 五. 硬皮症病人血清認識膜質小泡抗原的頻率

爲了了解這經由膜泡外分泌的膜質小泡，是否帶有自體抗原的成份，接著我們將收集到的膜質小泡(vesicles)，用15%SDS-PAGE分離，然後轉印到醋酸纖維膜(NC-paper)上，進行免疫點墨法分析。結果，我們很驚訝的發現----這些來自於膜泡外分泌(ectocytosis)的膜質小泡(vesicles)，居然能和硬皮症病人的血清產生反應【圖7】。我們總共篩檢了43位硬皮症病人。結果發現在分子量77-80kd, 32-34kd, 12-14kd三個部分，有較普遍性的結合。其所佔的比例分別是44%(19/43), 72%(31/43), 和53%(23/43)【圖8】。由於在分子量32-34kd的部分，病人血清反應的頻率佔有較高的比例，於是我們將著眼點先放在分子量32-34kd的區域上。

## 六. 正常人和其他自體免疫疾病病人血清認識膜質小泡抗原的頻率

爲了了解其他自體免疫疾病病人的血清和正常人的血清是否對於這些膜質小泡(vesicles)也有反應發

生，所以我們繼續篩檢了18位紅斑性狼瘡(SLE)病人，13位乾燥症(Sjogren Syndrome)病人，及6位原發性膽汁性肝硬化(PBC, Primary biliary cirrhosis)病人和10位正常人，進行西方點墨法分析【圖9】。結果我們發現在分子量32-34Kd的部分，18位紅斑性狼瘡(SLE)病人當中有3位呈現陽性反應；13位乾燥症(Sjogren Syndrome)的病人當中有3位呈現陽性的反應；6位原發性膽汁性肝硬化的病人當中有2位呈現陽性反應；而10位正常人的血清則在分子量32-34Kd的部分，並沒有任何結合的情形發生【圖10】。

## 七. 硬皮症病人血清經Annexin處理前後的比較

在1992年Kraus et al所發表的文章中〔69〕，曾經指出annexins可被自體抗體所認識。又在1994年Misaki發表的文章〔70〕，發現annexin XI亦為一種自體抗原。在1993年Lee et al所發表的文章〔63〕指出正常人的纖維母細胞，當進行ectocytosis時分泌的vesicles，其中含有actin, annexin II和VI, and  $\beta 1$  integrin

receptors。爲了了解硬皮症病人的纖維母細胞，在經由 ectocytosis 過程分泌的膜質小泡 (vesicles)，是否也含有 annexins，所以，我們將買來的 annexins 粉末 (sigma T-2699，含有分子量 32.5KD, 35KD 兩種)，先用 PBS 稀釋成 10ug/ul 的濃度。然後取 20 $\mu$ l, 40 $\mu$ l, 100 $\mu$ l 分別和硬皮症病人的血清 (用 PBS 以 1:100 倍稀釋) 作用。然後，離心取上清液，再進行免疫點墨法分析【圖11】。結果發現隨之加入的 annexins 的量增加，則硬皮症病人的血清和膜質小泡 (vesicles) 抗原，在分子量 32-34kd 區域的結合就有遞減的情形發生。同時，我們也利用濃度測定儀 (densitometer) 測量這個 immunoblot 的 32-34kd 的區域，結果【如圖12】顯示在分子量 32-34kd 區域的帶 (band)，確實有遞減的情形。

由以上的實驗結果，我們相信這個來自於膜泡外分泌 (ectocytosis) 的膜質小泡 (vesicles)，含有 ---- annexins。同時，我們也認爲 49% (39/80) 的自體免疫疾病病人的血清中是含有 anti-annexins 抗體的。

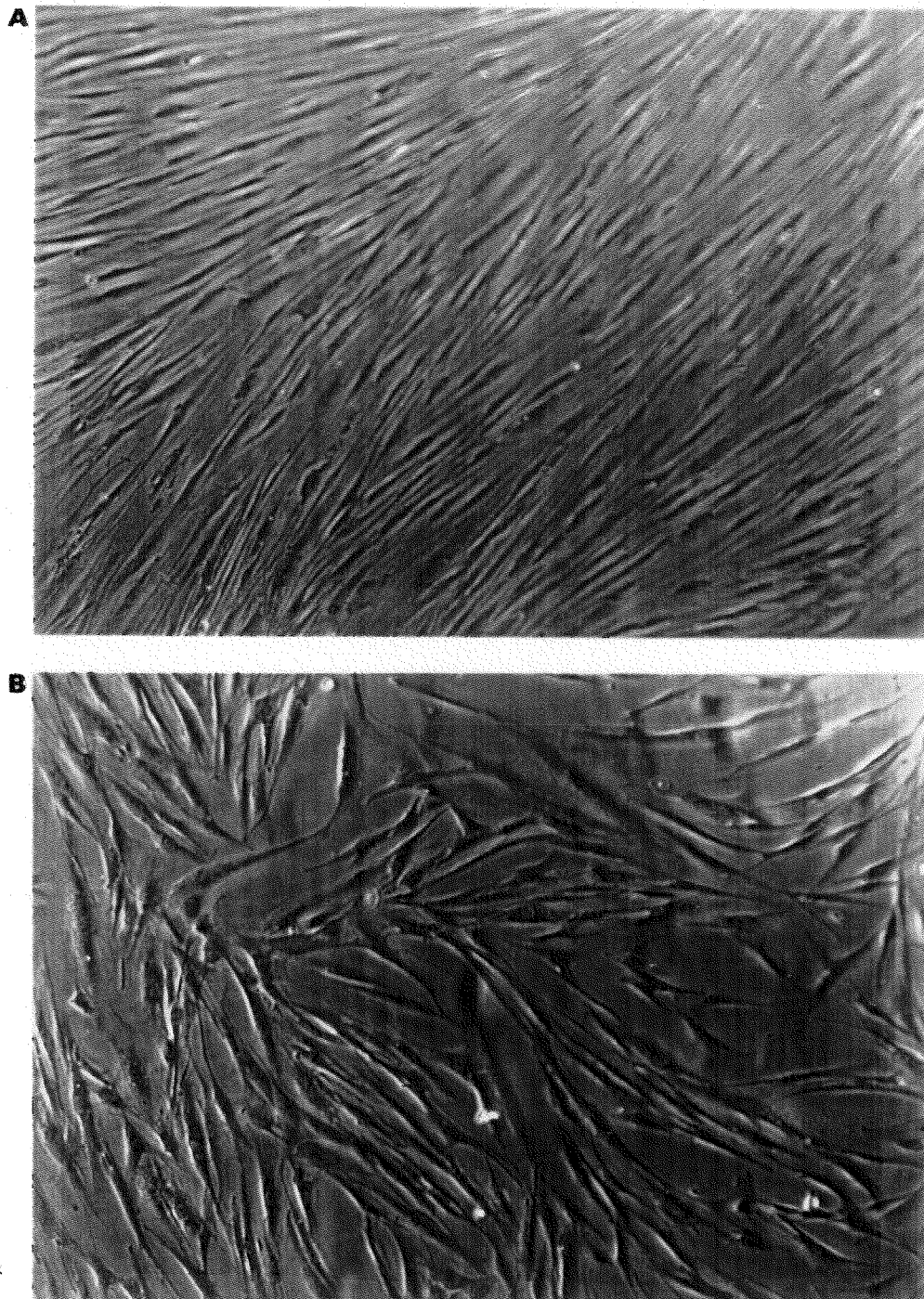


圖 1 . Adhesion of fibroblasts on plastic substrata observed by phase-contrast microscopy. A: normal cell ; B: sclerodema cell. X 200

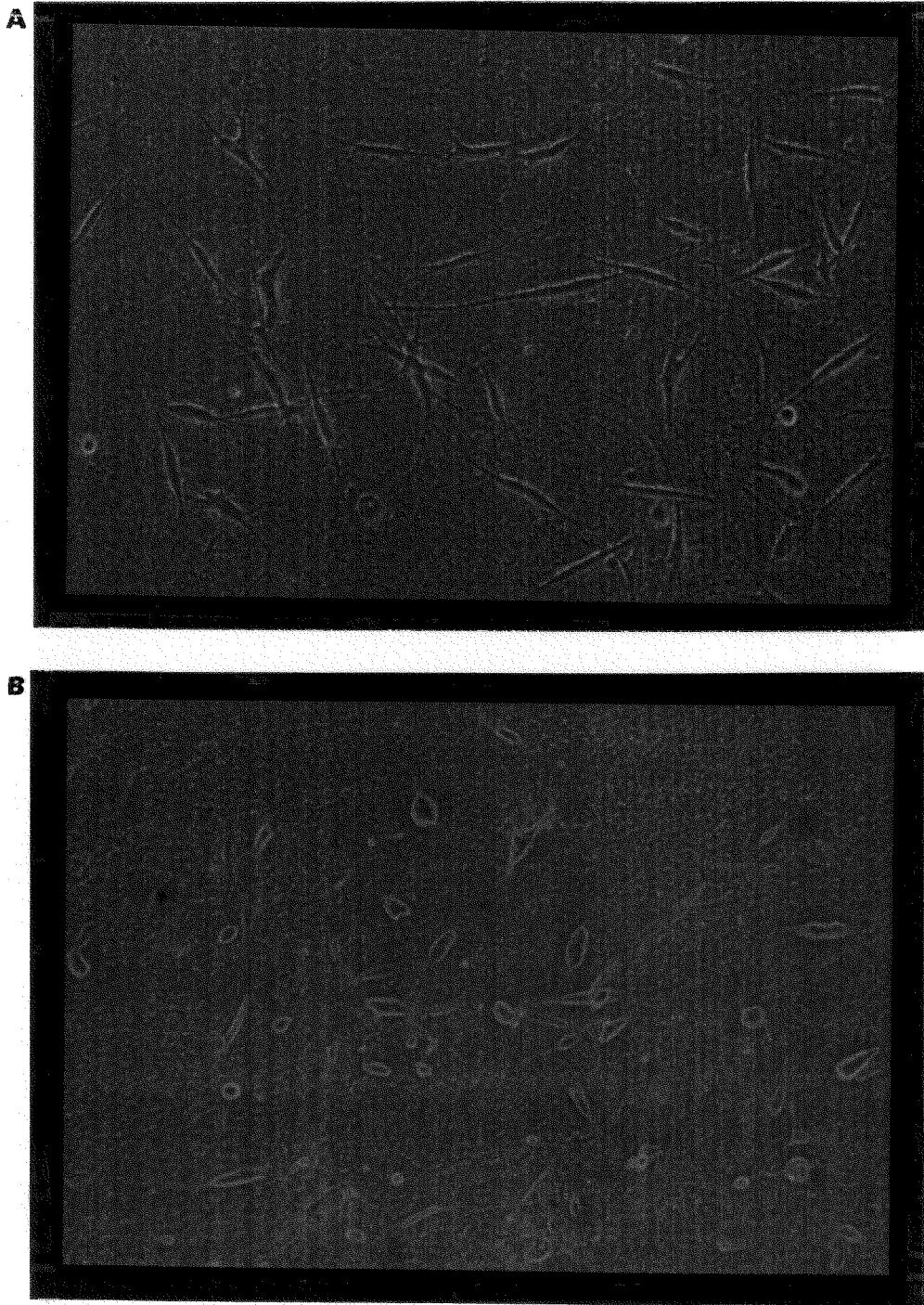


圖 2 . Human fibroblasts on collagen substrata observed by phase-contrast microscopy. A: In adhesion ; B: Dislodged 5 minutes. X 200



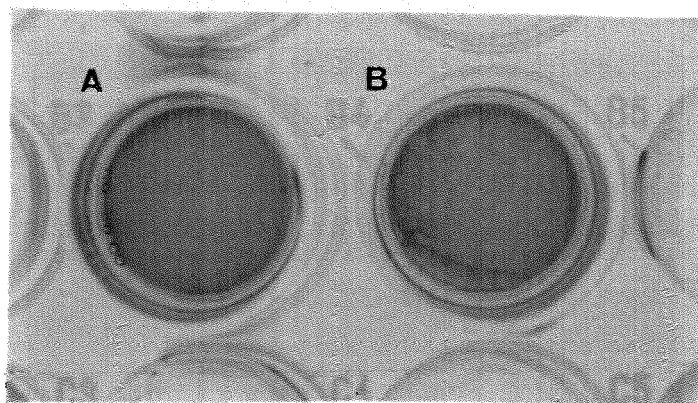


圖 3 . The appearance of collagen substrata. A: 48hrs attach  
B: Dislodged 5 minutes.

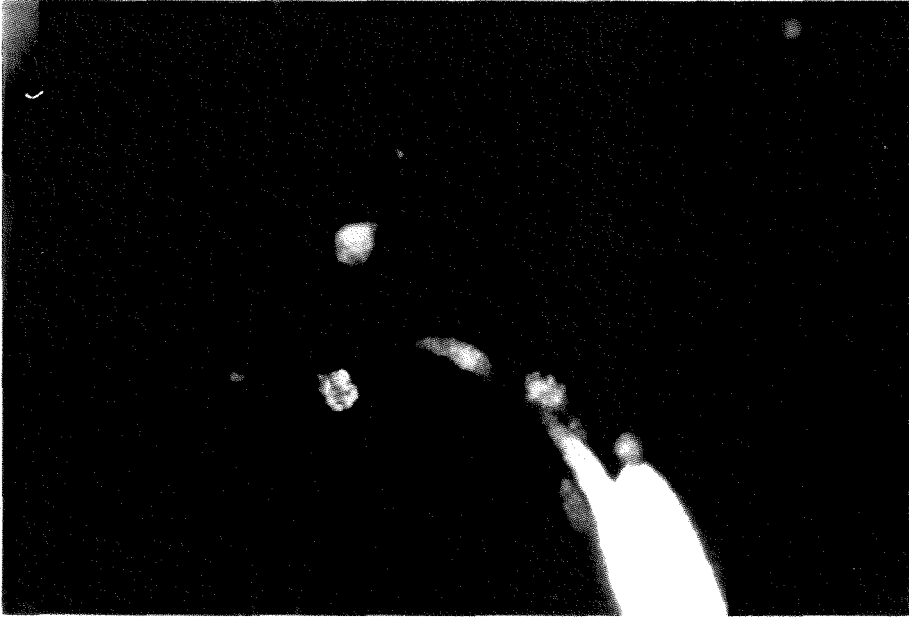


圖 4 . PI staining of dislodged collagen substrata.

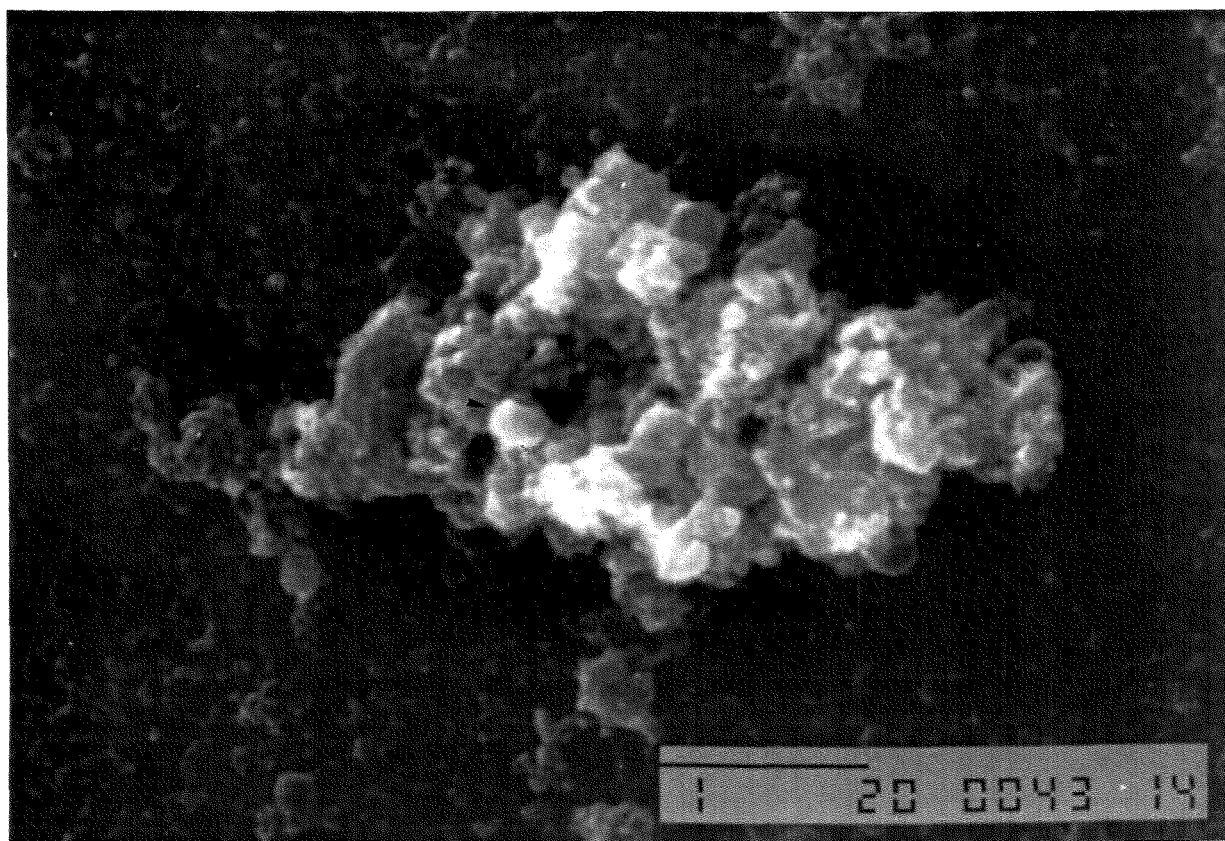


圖 5 . An aggregation of isolated vesicles observed under SEM. X20000

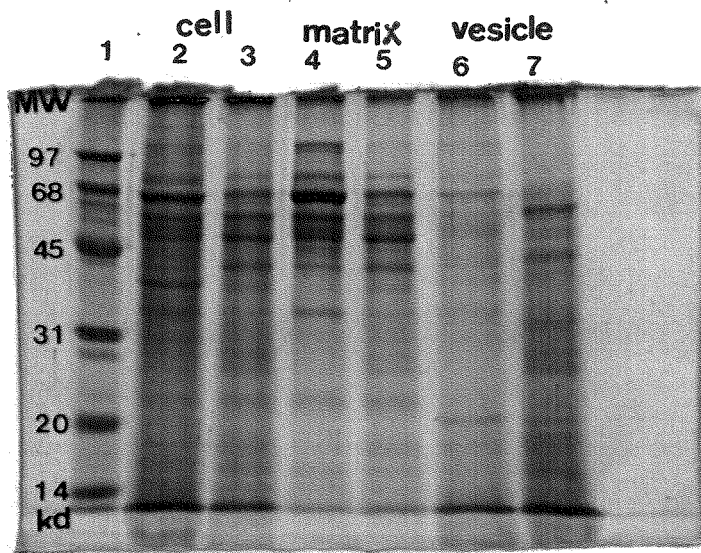


圖 6 . Coomassie blue staining of total cell(lane 2,3);matrix(lane 4,5) and vesicles(lane 6,7) on 15% SDS-PAGE.

lane 1:low molecular standard markers

lane 2,4,6:from normal fibroblasts

lane 3,5,7:from scleroderma fibroblasts

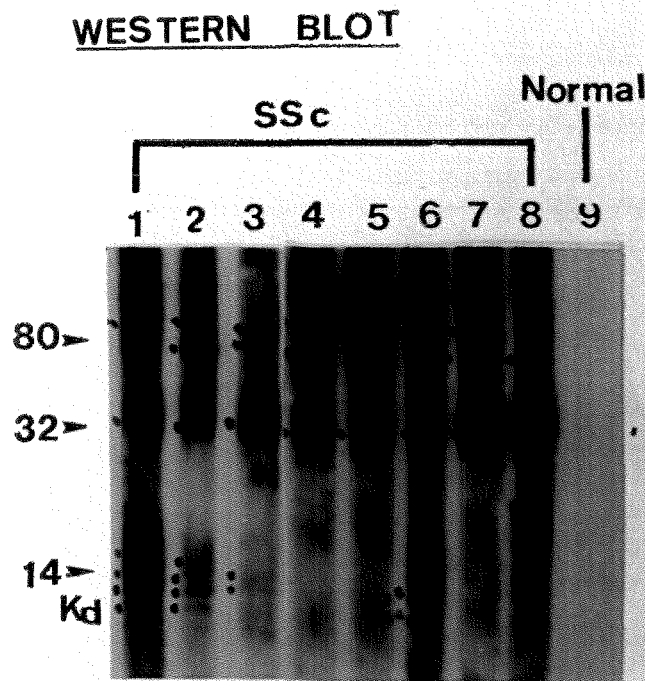


圖 7 . Western blotting assay of scleroderma serum with vesicles from ectocytosis.

lane 1-8:scleroderma serum

lane 9:normal individual

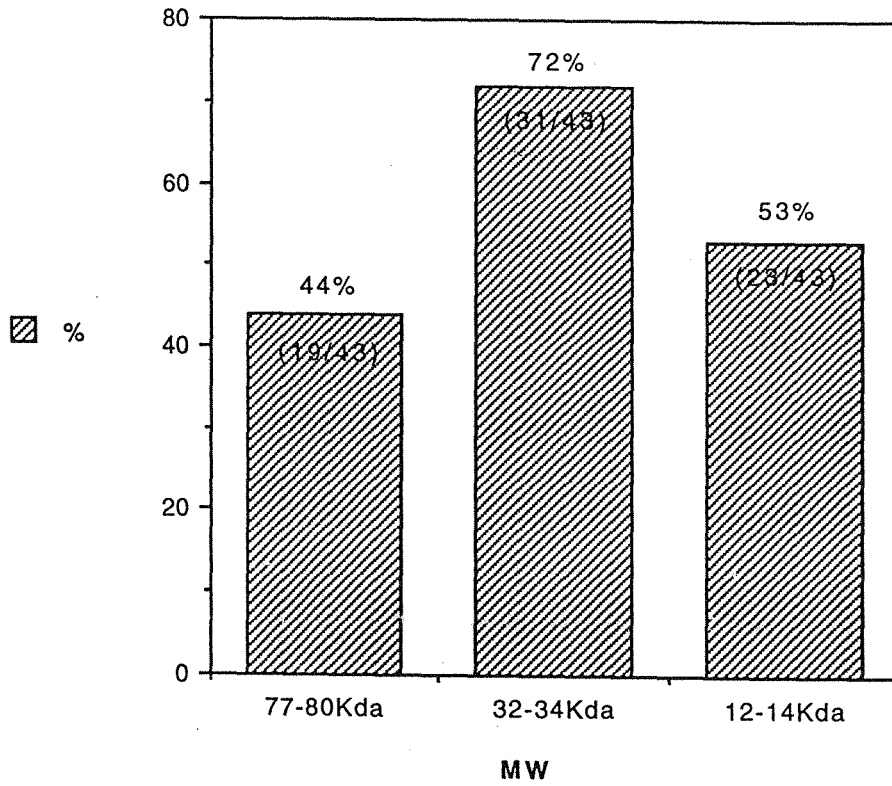


圖 8 . 由硬皮症病人 vesicles 中得到的 77-80kd, 32-34kd, 12-14kd 三種蛋白質與 43 位硬皮症病人血清產生抗原抗體反應之頻率

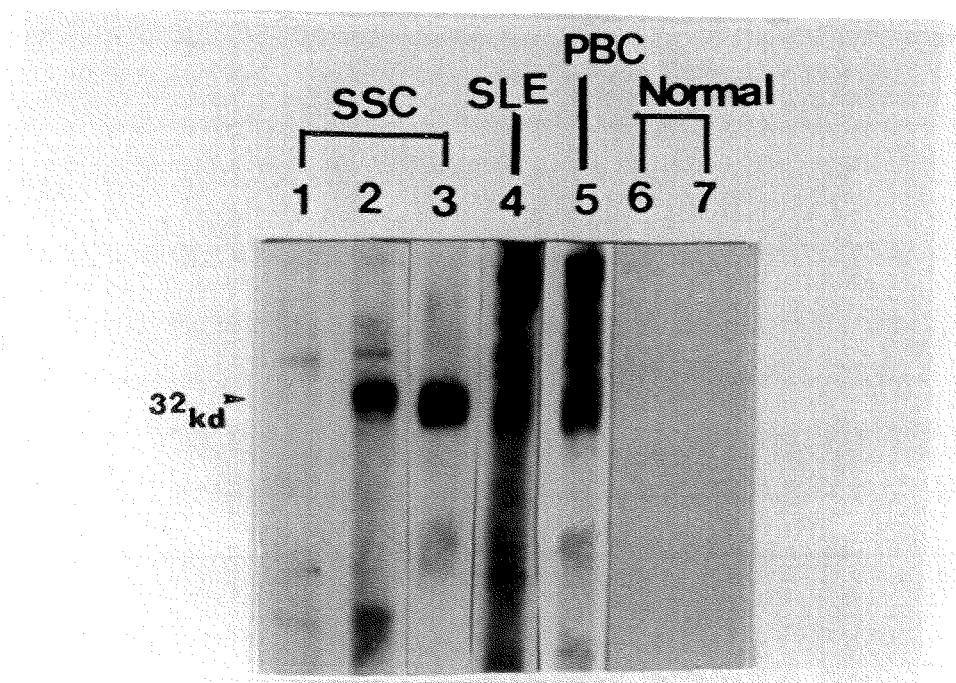


圖 9 . Western blotting assay of autoimmune patients serum with vesicles from ectocytosis.

lane 1-3:scleroderma serum

lane 4:SLE

lane 5:PBC

lane 6-7:normal individuals

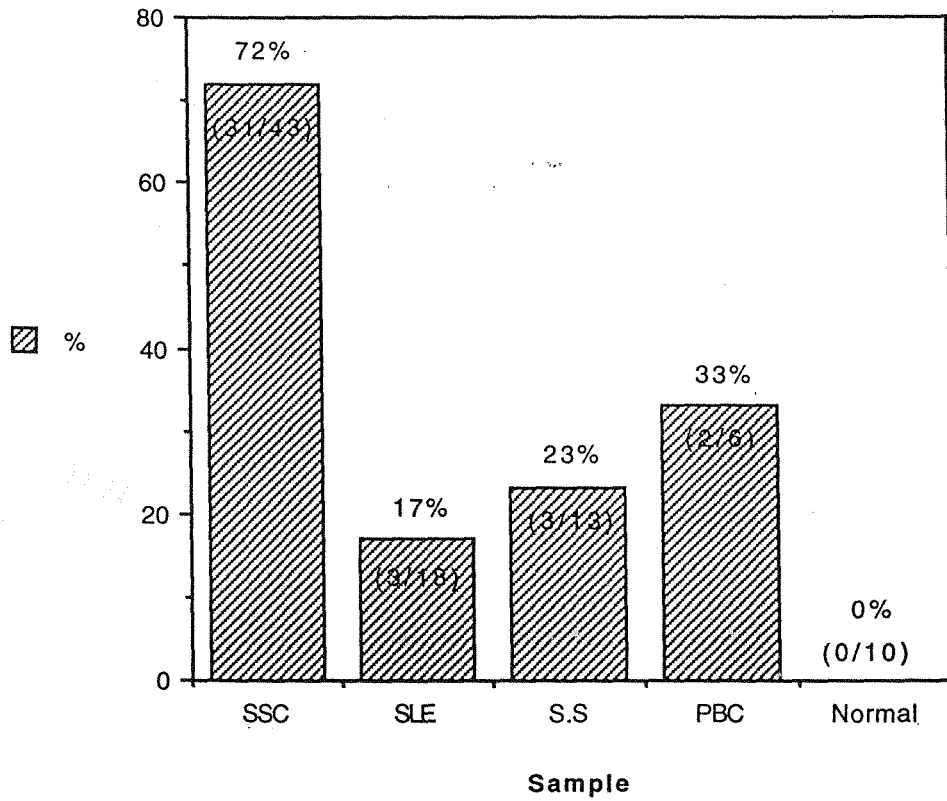


圖 10 . 80位自體免疫疾病病人和10位正常人血清認識32-34kd polypeptides自體抗原的頻率



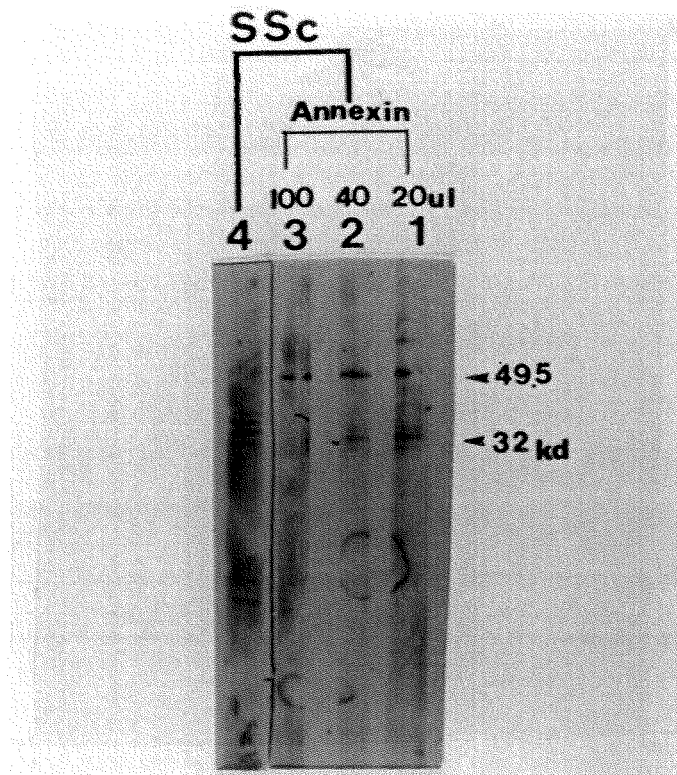


圖 1 1 . Effect of the scleroderma sera was preabsorbed by annexins before western blotting.

lane 1. added annexins 20ul

lane 2. added annexins 40ul

lane 3. added annexins 100ul

lane 4. without added annexins

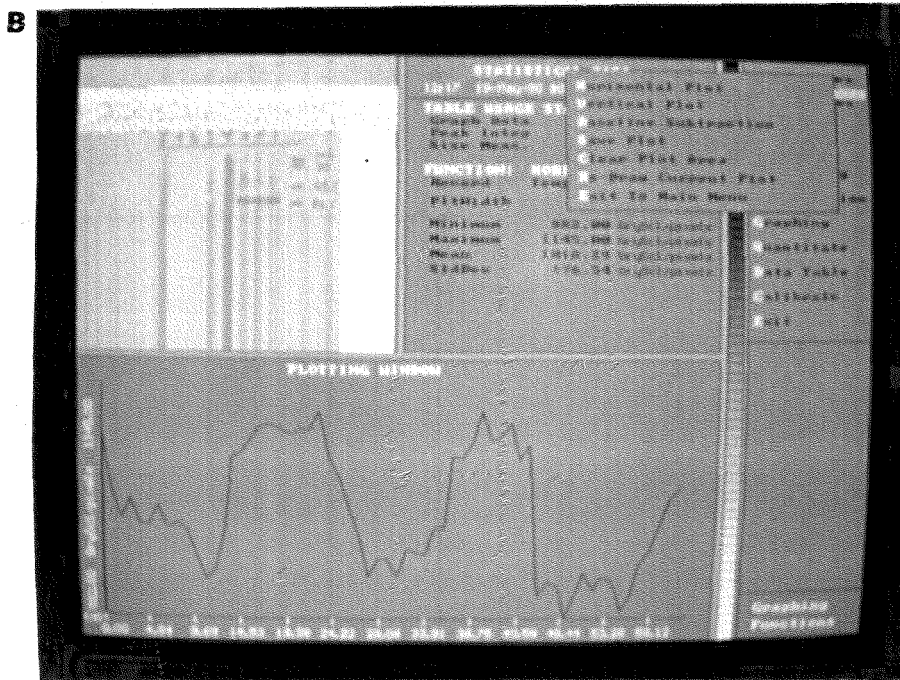
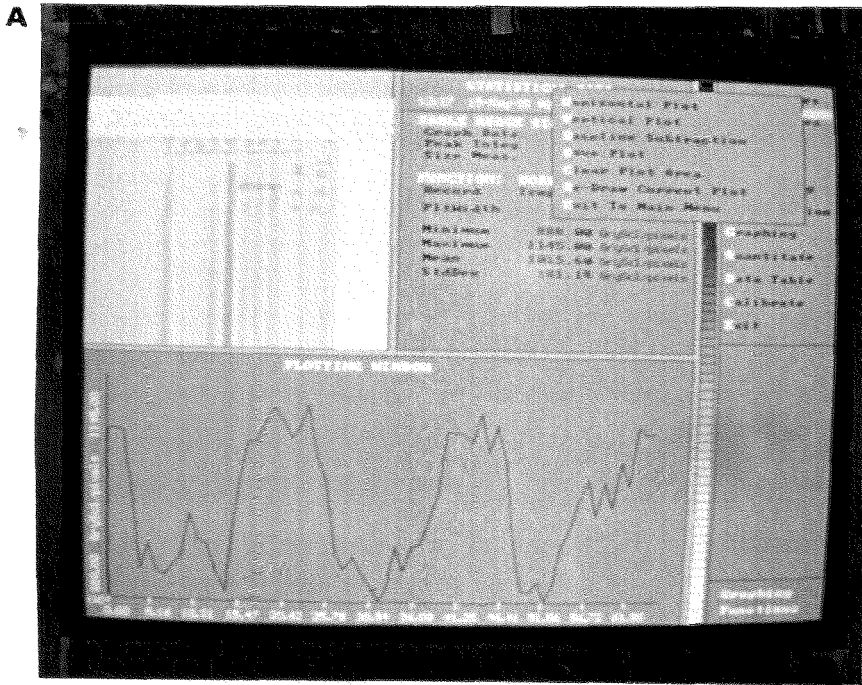


圖 1 2 . Densitometer of the 圖.11

A: control(49.5kd左右) ; B. 32-34kd band

## 第五章 討論

就以上實驗的結果，我們歸納為下列二點：

第一：以硬皮症病人的纖維母細胞於膜泡外分泌過程(ectocytosis)分泌的膜質小泡(vesicles)作為抗原，和自體免疫疾病病人的血清進行免疫點墨法分析，結果在分子量77-80kd, 32-34kd, 12-14kd有明顯的結合。

第二：其中在分子量32-34kd的區域，經由我們的實驗結果發現是annexins, 一種須要依靠鈣離子(calcium)才能和細胞骨架(cytoskeleton)及磷脂表面物質(phospholipid surfaces)結合的蛋白質。

基質小泡(matrix vesicles), 是一種被細胞膜包圍(membrane-bound), 呈圓形或卵圓形, 由細胞而來的微小構造。在1967年首次被描述出現在礦質化的組織內。之後, 基質小泡又陸續在體外(in vitro)及體內(in vivo)的實驗被證明出現在動物或人類之正常或病態鈣化的地方[76]。除了在軟骨細胞有基質

小泡外，也發現當紅血球細胞膜收縮時，在其細胞表面會突出一些膜泡(blebs)，然後脫離、形成小泡〔75〕。基質小泡的發生有：(1)細胞進行芽體生成；(2)形成的構造被擠出；(3)細胞退化或分解；(4)次成分分泌和胞外的組合等假說。如果用生化分析這些基質小泡，發現含有一些酵素(例如鹼性磷酸酶、中性蛋白酶)和annexins等成分。目前我們所知的annexins扮演的角色主要有胞泌的調節；膜和細胞骨架之間的連接；和參與著膜的融合；以及血液凝固的調節等等〔73〕。

細胞除了在分泌的過程釋放小泡，另外也發現當細胞移動時，其尖端的微絲(microfilaments)會從細胞摘除，而自形成一小泡，而這和一些細胞發生的細胞碎裂(clasmatosis)過程，可說是相似的〔74〕。

從本篇研究的模式，利用富含膠原纖維的—collagen gel培養纖維母細胞，使細胞受張力的緊繃。之後，用外力使細胞鬆弛，則此時的細胞即進行膜泡外分泌(ectocytosis)。我們將張力弛放的collagen gel,用PI染色，結果看到於細胞周圍有圓形的膜質小泡

被染上。我們知道PI主要是染核酸的成分，所以這些被染上的小泡，是從細胞而來的物質。若將分泌的小泡(vesicles)收集，利用掃描式電子顯微鏡觀察，則可清楚的看到這些小泡的表面是包覆著膜的構造，而不是偽陽性的結果。所以，這個膜泡外分泌過程(ectocytosis)，應該是可信，而且存在於細胞代謝機轉的。

硬皮症的主要特徵是皮膚的纖維化，所以在研究的方向上，大家也就從硬化的皮膚纖維母細胞著手，進行分析。結果可分為兩部分，一部分是認為硬化的纖維母細胞較正常的纖維母細胞含有大量的第一和第三型的collagen; glycosaminoglycan; fibronectin 及 prolyl 4-hydroxylase 等成分，而使得纖維母細胞大量生長而造成纖維化〔10〕。而另一部分是硬皮症的纖維母細胞具有異質性表現(heterogeneity)，也就是說，選擇性的某些細胞株落會大量表現collagen而非一起表現而導致纖維化〔77-78〕。

在我們的實驗，利用硬皮症纖維母細胞進行膜泡外分泌的膜質小泡為抗原，分別和正常人及自體免疫病

人的血清進行免疫點墨法分析，結果發現和病人有陽性結合的反應。尤其是72%(31/43)的硬皮症病人於分子量32-34Kd有顯著的陽性反應。於是，這使我們相信，細胞進行膜泡外分泌(ectocytosis)可能亦是一種細胞將其胞內的物質送出細胞外的一條路徑。

又同時發現這在分子量32-34Kd的區域是annexins，而這結果又和Hirata et al[79],Goulding et al[80]發現自體免疫病人血清含有anti-annexin抗體及1992年Kraus et al發表的文章[68]—發現在發炎、惡性腫瘤及自體免疫疾病病人的血清中，會有anti-annexins抗體的出現，有著同樣的發現—annexins是一種自體抗原。另外，在1994年Misaki et al[69]也發現annexin XI亦是一種自體抗原。所以，我們對於這annexins自體抗原，應該更加以認知、研究才是。之前，我們曾提到annexins的角色功能，其中和膜的融合有相關性。而這和我們證明細胞進行膜泡外分泌所分泌的膜質小泡含有annexins，有呼應的結果。

雖然對於Ectocytosis的現象之描述報導逐漸增多，但是對這種分泌方式的生理功能、作用機轉尚未完全明瞭。至於分泌出來的這些vesicles的命運，是被再吸收抑或進入體循環，也仍然是一個難解的謎題。但是，從我們的實驗結果發現：經由膜泡外分泌(ectocytosis)將胞內物質分泌到胞外的機轉，可能是為何自體抗原能被血液中的自體抗體認識而攻擊的一種途徑了。

至目前為止，我們對於自體免疫疾病發生的機轉還不是十分的清楚，而僅僅了解在自體免疫疾病的病人身上，會產生一些自體抗體來攻擊一些在生理上扮演相當重要的角色之自體抗原，例如：topoisomerase I；centromere；ds-DNA；ribonucleoprotein等等。如今，居然得以利用collagen gel模示，捕捉硬皮症病人纖維母細胞在ectocytosis過程所分泌的物質，被同樣為硬皮症病人及其它自體免疫疾病病人的血清所認識，不難想像這個原本認為類似於傷口癒合的

機轉，可能也參與著自體抗原被因此而呈現於細胞外的過程。

自體免疫疾病的產生，一直是令人好奇的。如今我們發現ectocytosis分泌出的物質可引起自體抗體相結合，而這和目前已發現的自體抗原大都存在細胞內，但卻得以至細胞外、至血清中被抗體認識的機轉，不免有合理的相關。所以，我們相信除了本篇發現的----annexins 自體抗原外，必定還有其它自體抗原出現在此vesicles內，例如本篇發現另外兩個區域，分子量為77-80Kd和12-14Kd。所以我們未來的研究方向，是繼續進行這個實驗，尋找出一些已知或著未知，但是經由此ectocytosis分泌的自體抗原。



## 參考文獻

1. Textbook: Immunol Biology. Janeway Travers.  
1994, BLACKWELL(藝軒圖書出版社代理)
2. Textbook: Immunology/second edition Ivan Roitt,  
John Athan Brostoff, David Male 主編 (藝軒圖書出版  
社代理)
3. 臨床內科學(第二版) 診斷篇 謝博生、林肇堂、楊泮池、  
江福田主編 (金名圖書公司出版)
4. TAN, E. M. (1989). Antinuclear antibodies: diagnostic  
makers for autoimmune disease and probes for  
cell biology. Adv. Immunol. vol. 44, 93-151.
5. Harrison's 內科學 主編陳肇真 (合記圖書出版社 )
6. 臨床血清免疫學/郭雅音編著何敏夫校閱, 1992年9月  
藝軒圖書出版社
7. Jimenez SA, Feldman G, Bashey RI, Bienkowski R,  
Tosenbloom J. Co-ordinate increase in the expression  
of type I and type III collagen genes in progressive  
systemic sclerosis fibroblasts. Biochem J 1986; 237:  
837-843.

8. Trojanowska M, Wu L, LeRoy EC. Elevated expression of c-myc proto-oncogen in scleroderma fibroblasts. *Oncogene* 1988;3:477-481.
9. Yamakagee A, Kikuchi K, Smith EEA, LeRoy EC, Trojanowska M. Selective unregulation platelet-derived growth factor  $\alpha$  receptors by transforming growth factor  $\beta$  in scleroderma fibroblasts. *J. Exp Med* 1992;175:1227-1234.
10. Kawaguchi Y. IL-1 $\alpha$  gene expression and protein production by fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Clin. Exp. Immunol.* 1994;97:445-450.
11. Kawaguchi Y, Harigai M, Kitani A *et al.* Effect of prolyl 4-hydroxylase inhibitor on fibroblast collagen production *in vitro*: an approach to the treatment of systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1992;19:1710-1715.
12. Whiteside TL, Ferrarini M, Hebda P, Buckingham RB. Heterogeneous synthetic phenotype of cloned scleroderma fibroblasts may be due to aberrant regulation in the synthesis of connective tissue. *Arthritis Rheum* 1988;31:1221-1229.

13. Kawaguchi, Y., Kitani A, Hera M *et al.* Cytokine regulation of prolyl 4-hydroxylase production in skin fibroblast culture from patients with systemic sclerosis: contribution to collagen synthesis and fibrosis. *J Rheumatol* 1992;19:1195-1201.
  
14. Douvas, A.S., Achteen, M., and Tan, E.M. Identification of a nuclear protein (Scl-70) as a unique target of human antinuclear antibodies in scleroderma. *J. Biol. Chem.* 1979;254,10514-10522.
  
15. Shero, J.H., Bordwell, B., Rothfield, N.F., and Earnshaw, W.C. Autoantibodies to topoisomerase I are found in sera from scleroderma patients. *Science* 1986;231:737-740.
  
16. Maul, G.G., French, B.T., Van Venrooij, W.J., and Jimenez, S.A. Topoisomerase I identified by scleroderma 70 antisera: Enrichment of topoisomerase I at the centromere in mouse mitotic cells before anaphase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1986;83:5145-5149.
  
17. Guldner, H.H., Szostecki, C., Vosberg, H.P., Lakomek, H.J., Penner, E., and Bautz, F.A. Scl-70 autoantibodies from scleroderma patients recognize a 95KD protein identified as DNA topoisomerase I. *Chromosoma* 1986;94,132-138.

18. Tan, E.M., Rodman, G.P., Garcia, I., Moroi, Y., Fritzler, M., and Peebles, C. Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. Anticentromere antibody and its relationship to CREST syndrome. *Arthritis Rheum.* 1980;23:617-625.
  
19. Jarzabek-horzelska, M., Balszczyk, M., Jablonska, S., Chorzelski, T., Kumar, V., and Beutner, E.H. Scl-70 antibody—a specific marker of systemic sclerosis. *Br. J. Dermatol.* 1986;115:393-401.
  
20. Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M.J., Steigerwald, J., and Tan, E.M. Autoantibody to centromere(kinetochore) in scleroderma sera. *Proc. Natl. Sci. Acad. U.S.A.* 1980;77:1627-1631.
  
21. Fritzler, M.J., Kinsella, T.D., and Garbutt, E. The CREST syndrome: A distinct serologic entity with anticentromere antibodies. *Am. J. Med.* 1980;69:520-526.
  
22. Brenner, S., Pepper, D., Berne, M.E., Tan, E.M., and Brinkley, B.R. Kinetochore structure, duplication and disruption and distribution in mammalian cells: Analysis by human autoantibodies from scleroderma patients. *J. Cell. Biol.* 1981;91:95-102.

23. Moroi, Y., Hartman, A.L., Nakane, P.K., and Tan, E.M.  
Distribution of Kinetichore (centromere)  
antigen in mammalian cell nuclei. *J. Cell Biol.*  
1982;90:254-259.
24. Cox, J.V., Schenk, E.A., and Olmssted, J.B. Human  
antacentromere organization. *Cell* 1983;35:331-339.
25. Guldner, H.H., Lakomek, H.J., and Bautz, F.A. Human  
antacentromere sera recognize a 19.5KD nonhistone  
chromosomal protein from Hela cells. *Clin. Exp.*  
*Immunol.* 1985;58:13-20.
26. Earnshaw, W.C., Bordwell, B.J., Marino, C.C., and Rothfield,  
N.F. Three human chromosomal autoantigens are  
recognized by sera from patients with antacentromere  
antibodies. *J. Clin. Invest.* 1986;77:426-430.
27. Earnshaw, W.C., Sullivan, K.F., Machlin, P.S., Cooke, C.A.,  
Kaiser, D.A., Pollard, T.D., Rothfield, N.F., and Cleveland,  
D.W. Molecular cloning of cDNA for CENP-B, the major  
human centromere autoantigen. *J. Cell Biol.* 1987;  
104:817-829.

28. Reimer, G., Rose, K.M., Scheer, U., and Tan, E.M.  
Autoantibody to RNA polymerase I in scleroderma sera.  
J.Clin. Invest. 1987; 79: 65-72.
29. Reimer, G., Raska, I., Tan, E.M., and Scheer, U. Human  
autoantibodies: Probes for nucleolus structure and  
function. Virchows Arch. B. 1987; 54: 131-143.
30. Reimer, G., Pollard, K.M., Penning, C.A., Ochs, R.L.,  
Lischwe, M.A., Busch, H., and Tan, E.M. Monoclonal  
autoantibody from NZB/NZW F1 mouse and some human  
scleroderma sera target a Mr 34,000 nucleolar protein  
of the U3-ribonucleoprotein particle. Arthritis Rheum.  
1987; 30: 793-800.
31. Ochs, R.L., Lischwe, M.A., Spohn, W.H., and Busch, H.  
Fibrillarin: A new protein of the nucleolus identified  
by autoimmune sera. Biol. Cell 1985; 54: 123-134.
32. Mathews, M.B., and Bernstein, R.M. Myositis autoantibody  
inhibits histidyl-tRNA synthetase: A model for  
autoimmunity. Nature (London) 1983; 304: 177-179.

33. Yaang, D.C.H., Dang, C.V., and Arnett, F.C. Rat liver histidyl-tRNA synthetase. Purification and inhibition by the myositis-specific anti-Jo-1 autoantibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1984;120:15-21.
34. Reddy, R., Tan, E.M., Henning, D., Nohga, K., and Busch, H. Detection of nucleolar 7-22 ribonucleoprotein and a cytoplasmic 8-2 ribonucleoprotein with autoantibodies from patients with scleroderma. *J. Biol. Chem.* 1983;258:1383-1386.
35. Hashimoto, C., and Steitz, J.A. Sequential association of nucleolar 7-2 RNA with two different autoantigens. *J. Biol. Chem.* 1983;258:1379-1382.
36. Reimer, G., Scheer, U., and Tan, E.M. Immunolocalization of 7-2 Ribonucleoprotein in the granular component of the nucleolus. *Exp. Cell Res.* 1988;176(1):117-28.
37. Rodriguez-Sanchez, J., Gelpi, C., Juarez, C., and Hardin, J. A. A new autoantibody in scleroderma that recognizes a 90-kDa component of the nucleolus organizing region of chromatin. *J. Immunol.* 1987;139:2579-2584.

38. C. Mauch, and T. Krieg. Fibroblast-matrix interactions and their role in the pathogenesis of fibrosis. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 1990; 16(1):93-107.
39. Nakagawa, S., Pawelek, P., and Grinnell, F. Extracellular matrix organization modulates fibroblast growth and growth factor responsiveness. *Exp. Cell Res.* 1989;182: 572-582.
40. Elsdale, T., and Bard, J. J. *Cell Biol.* 1972;54:626-637.
41. Grinnell, F., and Bennett, M. H. Fibroblast adhesion on collagen substrata in the presence and absence of plasma fibronectin. *J. Cell Sci.* 1981;48:19-34.
42. Tomasek, J. J., Hay, E. D., and Fujiwara, K. Collagen modulates cell shape and cytoskeleton of embryonic corneal and fibroblasts—distribution of actin, alpha-actin, and myosin. *Dev. Biol.* 1982;92:107-122.
43. Tomasek, J. J., Akiyama, S. K. Fibroblast-mediated collagen gel contraction does not require fibronectin- $\alpha 5 \beta 1$  integrin interaction. *Anatomical Record* 1992;234:153-60.



44. Elsdale, T.R., and J.B.L. Bard. Collagen substrata for studies of cell behavior. *J. Cell Biol.* 1972;41:298-311.
45. Tomasek, J.J., and E.D. Hay. Analysis of the role of microfilaments and microtubules in acquisition of bipolarity and elongation of fibroblasts in hydrated collagen gels. *J. Cell Biol.* 1984;99:536-549.
46. Bell, E., B. Ivarsson, and C. Merrill. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1979;76:1274-1278.
47. Stopak, D., and A.K. Harris. Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction. *Dev. Biol.* 1982;90:383-398.
48. Bellows, C.G., Melcher, A.H., Bhargava, U., and Aubin, J.E. Fibroblasts contracting three-dimensional collagen gels exhibit ultrastructure consistent with either contraction or protein secretion. *J. Ultrastruct. Res.* 1982;78:178-192.

49. Ehrlich, H.P., and Wyler, D.J. Fibroblast contraction of collagen lattices in vitro: inhibition by chronic inflammatory cell mediators. *J. Cell Physiol.* 1983; 116: 345-351.
50. Buttle, D.J., and H.P. Ehrlich Comparative studies of collagen lattice contraction utilizing a normal and transformed cell line. *J. Cell Physiol.* 1983; 116: 159-166.
51. Guidry, C., and F. Grinnel Studies on the mechanism of hydrated collagen gel reorganization by human skin fibroblasts. *J. Cell Sci.* 1985; 79: 67-81.
52. Abercrombie, M., M.H. Flint, and D.W. James Collagen formation and wound contraction during repair of small excised wounds in the skin of rats. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1954; 2: 264-274.
53. Highton, D.I.R., and D.W. James The force of contraction of full thickness wounds of rabbit skin. *Br. J. Surg.* 1964; 51: 462-466.

54. Tomasek, J. J., Haaksma, C. J., Eddy, R. J., and Vaughan, M. B. Fibroblast contraction occurs on release of tension in attached collagen lattices: Dependency on an organized actin cytoskeleton and serum. *The Anatomical Record* 1992;232:359-368.
55. Harris, A. K., P, Wild. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature* 1981;290:249-251.
56. Mochitate, K., Pawelek, P., and Grinnell, F. Stress relaxation of contracted collagen gels: Distribution of actin filament bundles, release of cell surface fibronectin, and down-regulation of DNA and protein synthesis. *Exp. Cell Res.* 1991;193:198-207.
57. Stein, J. M., Luzio, J. P. Ectocytosis caused by sublytic autologous complement attack on human neutrophils. *Biochem. J.* 1991;274:381-384.
58. Holdsworth, G., and Coleman, R. *Biochem. J.* 1976;158:493-95.
59. Hoeri, B. J., and Scott, R. E. The Affinity labeling of amino acids in or about the active center of DNA-dependent DNA polymerase I. *Virchows Archiv. B Cell Pathol.* 1978;27:335-345.

- 60.Scott.RE.,and Macrcklein.P.B. Plasma membranes vesiculation in 3T3 and SV3T3 cells.J.Cell Sci. 1979;35:245-252.
- 61.Black.PH.Shedding from the cell surface of normal and cancer cells. Adv.Cancer Res.1980;32:75-199.
- 62.Lee,T.L.,Lin,Y.C.,Mochitate,K.,and Grinnell,F. Stress-relaxation of fibroblasts in collagen matrices triggers ectocytosis of plasma membrane vesicles containing actin,annexins II and VI,and  $\beta 1$  integrin receptors.J.Cell Sci.1993;105:167-177.
- 63.Mayes,M.D.,Walker,E.R.,Frederickson,R.G.,Prince,R.K., and Dibartolomeo,A.G. The characterization of normal and scleroderma skin fibroblassts cultured in a collagen gel matrix. J.Rheumatol 1988;15:268-275.
- 64.Laemmli UK:Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-685.
- 65.Lee SL,Tsay GJ,Tsai RT. Anticentromere antibodies in subjects with no apparent connective tissue disease. Annal of the Rheumatic Disease.1993;52:586-589.

66. Towbin H, Stachelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1979; 76: 4350-4354.
67. Kraaus, M., Romisch, J., Bastian, B., Paques, E.P., and Hartmann, A.A. Detection of human anti-annexin autoantibodies by enzyme immunoassay. J. Immunoassay 1992; 13(3): 411-439.
68. Misaki, Y., Pruijn, Ger J.M. et al. The 56K autoantigen is identical to human annexin XI. J. Biol Chem. 1994; 269(6): 4240-4246.
69. Guidry, C., and Grinnell, F. Studies on the mechanism of hydrated collagen gel reorganization by human skin fibroblasts. J. Cell Sci. 1985; 79: 67-81.
70. Tsay G.J., Fann RH, Hwang J. Specificity of anti-Scl-70 antibodies in scleroderma: increase sensitivity of detection using purified DNA topoisomerase I from calf thymus. J. Rheumatology. 1990; 17: 1314-1319.

71. Tsay G.J., Lan J.L., Li S.Y. Chromosome studies in systemic sclerosis with consideration of antibodies to topoisomerase I. *Annals of the Rheumatic Disease*. 1992;51:624-626.
72. Tsay G.J., Lee S.L., Juan, C.C. Recombinant topoisomerase I from protein used for determination of autoepitope recognized by sera from patients with scleroderma. The 2nd International workshop, Molecular and Cell Biology of autoantibodies and autoimmunity, San Diego. 1991; September 19-21.
73. Brian R. Genge, Licia N. Wu, Huston Adkisson IV, and Roy E. Wuthier: Matrix vesicle annexins exhibit proteolipid-like properties. *J. Biol. Chem.* 1991; vol. 266:10678-685.
74. F. Doljanski and M. Kapeller: Cell surface shedding—the phenomenon and its possible significance. *J. Theor. Biol.* 1976; vol. 62:253-270.
75. John E. Hale and Roy E. Wuthier: The mechanism of matrix vesicle formation. *J. Biol. Chem.* 1987; vol. 262:1916-1925.

76. Albert I. Rabinovitch and H. Clarke Anderson: Biogenesis of matrix vesicles in cartilage growth plates. 1976; vol. 35:112-116.
77. Sandra Bordin, R. C. Page, A. S. Narayanan: Heterogeneity of normal human diploid fibroblasts: isolation and characterization of one phenotype. 1984; vol. 223:171-173.
78. David B. Maxwell, Cynthia A. Grotendorst, Gray R. Grotendorst and E. Carwile Leroy: Fibroblast heterogeneity in scleroderma: Clq studies. J. Rheumatology. 1987; 14:756-759.
79. Hirata, F., del Carmine, R., Nelson, C. A., Axelrod, J., Schiffmann, E., Warabi, A., de Blas, A. L., Nirenberg, M., Manganiello, V., Vaughan, M., Kumagai, S., Green, I., Decker, J. L., and Steinberg, A. D. 1981; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. vol. 78:3190-3194.
80. Goulding, N. J., Podgorski, M. R., Hall, N. D., Flower, R. J., Browning, J. L., Pepinsky, R. B., and Maddison, P. M. 1989; Ann. Rheum. Dis. vol. 48:843-850.

## 附錄

## 1. DMEM(DULBECCO'S MODIFIED EAGLE MEDIUM)

per liter(with dd-H<sub>2</sub>O)

DMEM powder 1 PK

NaHCO<sub>3</sub> 3.7g/L

adjust the pH to 7.2

sterilized by filtration through a 0.2 um filter

## 2. MEM(MINIMUM ESSENTIAL MEDIUM)

per liter(with dd-H<sub>2</sub>O)

MEM powder 1 PK

NaHCO<sub>3</sub> 2.2g/L

adjust the pH to 7.2

sterilized by filtration through a 0.2 um filter

3. Ca<sup>++</sup>-Hepes buffer, pH 7.2:

NaCl(MW 58.44) 130mM 1.52g

Hepes(MW 238.3) 20mM 0.95g

Ca-acetate(MW 158.2) 10mM 0.32g

Bring up to 200ml with distilled water, adjust pH to 7.2

Filter and store at 4C



4. Pepstain A  
stock soln. 1mg/ml in methanol  
working soln. 1  $\mu$ g/ml  
per 1ml 1  $\mu$ l
5. Leupeptin  
stock soln. 1mg/ml in distilled  
water  
working soln. 1  $\mu$ g/ml  
per 1ml 1  $\mu$ l
6. EDTA  
stock soln. 0.5M in distilled  
water, pH 8.5  
working soln. 5mM  
per 1ml 1  $\mu$ l
7. Benzamidine  
stock soln. 0.1M in distilled  
water  
working soln. 0.5mM  
per 1ml 1  $\mu$ l

8.0.5M phosphate buffer

per liter

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 56.8g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 15.6g

adjust the pH to 7.4

9. Phosphate-buffer saline (PBS)

per liter

NaCl 8.16g

Thimerosal 0.5g

0.5M phosphate buffer 20ml

adjust the pH to 7.2

10. PBS-Tween

per liter

NaCl 8.16g

Thimerosal 0.5g

0.5M phosphate buffer 20ml

adjust the pH to 7.2

final add Tween 20 to 0.05%

\* Tween 20: Polyoxyethylene Sorbitan  
Monolaurate

11. 15% Running gel  
per 30ml

30% acrylamide	15ml
2% N'N'-bis-methylene-acrylamide	1.3ml
1M Tris pH 8.7	11.25ml
20% SDS	0.15ml
d-H <sub>2</sub> O	2.35ml
TEMED	30 $\mu$ l
10% ammonium persulfate	105 $\mu$ l

12. 5% stacking gel  
per 20ml

30% acrylamide	10ml
2% N'N'-bis-methylene-acrylamide	0.87ml
1M Tris pH 6.9	7.5ml
20% SDS	0.1ml
d-H <sub>2</sub> O	1.57ml
TEMED	16.7 $\mu$ l
10% ammonium persulfate	66.7 $\mu$ l

\*TEMED:  
N,N,N,N'-tetramethylethylenediamine

13. 20% SDS(Sodium dodecyl sulfate)  
100g SDS in 500ml H<sub>2</sub>O  
Heat to 68C to assist dissolution

14. 5X Running buffer  
0.25M Tris-HCl  
192mM Glycine  
0.1% SDS  
adjust the pH to 8.3

15. 2X LSB(Laemmli's Sample buffer)  
10% Glycerol  
5%  $\beta$ -mercaptoethanol  
3% SDS  
62.mM Tris pH 6.8  
0.05% Bromophenol blue

16. Transfer Buffer  
25mM Tris-base  
192mM Glycine  
20% Methanol  
adjust the pH to 8.1-8.4

17.(1) Stain solution

Methanol:H<sub>2</sub>O:acetic acid=5:5:1v/v

per 100ml

add 0.1g Coomassie blue R-250

(2) Destain solution

Methanol:H<sub>2</sub>O:acetic acid=5:5:1v/v

18.(1) Fast-stain solution

per liter

Coomassie blue R-250 0.4g

Perchloric acid 35ml

d-H<sub>2</sub>O 965ml

(2) Destain solution

5% acetic acid

《 授 權 書 》

本人所撰(著)

83

學年度第二學期

私立中山醫學院

大學  
學院

醫學研究所 碩

士學位論文(論文名稱:

硬皮症病人血清確認皮膚纖維)  
母細胞進行膜泡外分泌的自体抗原

之提要

同意  
 不同意

開放供學術利用。

姓名: 涂再靜



立書人: 地址: 中和市國光街109巷12弄8號

身分證統一編號: 4220233218

聯絡電話: (02) 955-0862

中華民國

84 年

6 月

30 日