

R  
008.8  
2816

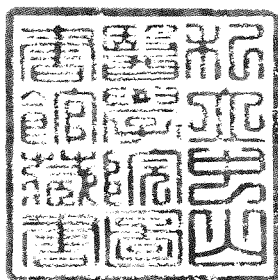
私立中山醫學院醫學研究所

碩士論文

P M L 與自體免疫疾病的關係

The relation between PML protein  
and autoimmune disease

指導教授：蔡嘉哲 博士 (Gregory Tsay)



研究生：徐聖曜 (Sheng-Yao Hsu)

中華民國八十七年一月

中山醫學院圖書館



C048583

參考書恕不外借

# 授權書

(博碩士論文)

授權書所授權之論文為本人在中山醫學院醫學研究所  
組 86 學年度第 1 學期所撰 碩士學位論文。

論文名稱：PML與自體免疫疾病的關係

同意本國網路或  
 不具學並重  
 同著委與製  
 意作員台發  
財產權之技術論文資料提要，予得國重製，圖成書館、本、人、業、學、校、及、行、政、院、之、權、限、地、域、時、間、與、數、次、錄、於、該、單、以、光、碟、形式、存、儲、及、發、行、權、限、不、受、時、空、之、限、制、並、得、以、重、製、或、修、正、其、中、之、任、何、部、分、以、供、本、校、教、育、及、研、究、之、用、其、他、權、利、均、歸、原、著、者、所、有、。

同意本資微佰至  
 不具中小之國  
 同著，製務  
 意作得。年  
財產權之論文全資資料，授予行政院國製家科學員會科學技  
權地究文間與次數以縮、博碩士重製文發行委並等論會得值文全該台文術  
限研論不之本不心組服。作得。年產權之論文全資資料，授予行政院國製家科學員會科學技  
之域報因後論時涉再文間、及公資數代等，授予、博碩士重製文發行委並等論會得值文全該台文術  
論、及公資數代等，授予、博碩士重製文發行委並等論會得值文全該台文術  
文、及公資數代等，授予、博碩士重製文發行委並等論會得值文全該台文術  
全、及公資數代等，授予、博碩士重製文發行委並等論會得值文全該台文術  
文、及公資數代等，授予、博碩士重製文發行委並等論會得值文全該台文術  
全、及公資數代等，授予、博碩士重製文發行委並等論會得值文全該台文術

同意本業人  
 不具校各  
 同著圖種  
 意作書方  
財產權之論文全資資料，授予教育指，送繳之圖書館及本  
權為製，學，術不，文研全資資料，授予教育指，送繳之圖書館及本  
之、學，術不，文研全資資料，授予教育指，送繳之圖書館及本  
權、製、學、術、不、文、研、究、時、間、與、地、域、之、限、制、並、得、以、重、製、或、修、正、其、中、之、任、何、部、分、以、供、本、校、教、育、及、研、究、之、用、其、他、權、利、均、歸、原、著、者、所、有、。

上述授權內容均無須訂立讓與及授權契約書。依本授權之發行權為非專屬性發行權利。依本授權所為之收錄、重製、發行及學術研發利用均為無償。

指導教授姓名：蔡嘉哲  
研究生簽名：徐聖曜 學號：R8301205  
日期：民國 87 年 2 月 日

附註：1. 上述同意與不同意之欄位若未勾選，本人同意視同授權。  
2. 授權第二項者，請再交論文一本予承辦人員。  
3. 本授權書已於民國85年4月10日送請著委會修正定稿。

# 簽署人須知

1. 依著作權法之規定，任何單位、個人、網路、光碟、微縮等方式之整合國內學術資料，妥當授權他人使用，如已簽署授權人專屬授權，則非獨占性之權利，即非專屬權利。授權人應取得授權人之同意，並不得轉授權他人。授權人應取得授權人之同意，並不得轉授權他人。
2. 著作權法之規定，任何單位、個人、網路、光碟、微縮等方式之整合國內學術資料，妥當授權他人使用，如已簽署授權人專屬授權，則非獨占性之權利，即非專屬權利。授權人應取得授權人之同意，並不得轉授權他人。授權人應取得授權人之同意，並不得轉授權他人。
3. 著作權法之規定，任何單位、個人、網路、光碟、微縮等方式之整合國內學術資料，妥當授權他人使用，如已簽署授權人專屬授權，則非獨占性之權利，即非專屬權利。授權人應取得授權人之同意，並不得轉授權他人。授權人應取得授權人之同意，並不得轉授權他人。
4. 著作權法之規定，任何單位、個人、網路、光碟、微縮等方式之整合國內學術資料，妥當授權他人使用，如已簽署授權人專屬授權，則非獨占性之權利，即非專屬權利。授權人應取得授權人之同意，並不得轉授權他人。授權人應取得授權人之同意，並不得轉授權他人。
5. 著作權法之規定，任何單位、個人、網路、光碟、微縮等方式之整合國內學術資料，妥當授權他人使用，如已簽署授權人專屬授權，則非獨占性之權利，即非專屬權利。授權人應取得授權人之同意，並不得轉授權他人。授權人應取得授權人之同意，並不得轉授權他人。

-----  
 研究生姓名：徐聖曜 聯絡電話：(01) 3387128  
 地址：高雄市苓雅一路374號之一  
 -----

本論文為中山醫學院授予醫學（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

台中榮民總醫院風濕免疫科主任

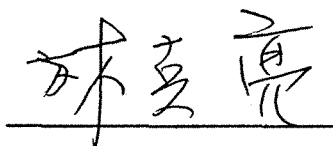
藍忠亮 博士



---

中山醫學院醫事技術學系系主任

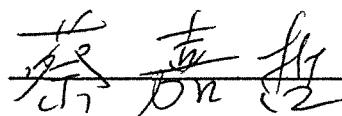
林克亮 博士



---

中山醫學院院長  
(論文指導教授)

蔡嘉哲 博士




---

中華民國八十七年元月

學生：徐聖曜 論文題目為：PML與自體免疫疾病的關係。  
其論文已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，並由其指導教授核閱後無誤。

指導教授：蔡嘉哲教授

簽名：



中華民國八十七年元月

## 誌 謝

記得剛要前來考中山醫學院醫學研究所，深怕台中不熟，半夜就從高雄開車至台中，翻遍地圖，找遍路標，終於來到中山的校門口，打開車窗在車內睡到天亮，也被蚊子一直叮到天亮。考取之後，開學第一堂課下課，與第一名考上的郭艾凌同學，兩個人站在校門口東張西望，不知如何能夠回家。後來我留一輛車在台中，要是剛好遇到郭，便送郭去車站坐車，因為有一種袍澤的情誼在。

接著我逐漸將工作、生活轉移至台中。在第一學期上課，我都坐在第一、第二排，做筆記又錄音，學分又修最多，同學都驚訝地說：「那有人這種用功法，你這樣不是就把學分修完等畢業嗎？」其實我只是盡量努力罷了！一直到蔡嘉哲院長的一堂課，告訴大家-「有些事要趁年輕時趕快去做，再過一、二十年，就算有理想想做，也可能因為種種考量而作罷。」，原本心中即想對分子生物技術有進一步的瞭解，因為蔡校長的一番鼓勵，我更下定決心要懇請蔡教授指導我，沒想到蔡教授一口就答應，使得我心中一直非常感激。

自此開始了我的實驗室生涯。因為必須爭取實驗進行的時間，晚上經常得在車內睡覺。鬧鐘一響，就到樓上實驗室；等待的時候，就回車內睡。幾經折騰，才慢慢有了結果。在中港院區的舊實驗室，晚上我常會遇到侯健隆同學，他常主動指導我，使我避免一些無謂的嘗試，同時預防了一些潛在的身體危險，非常的感謝！其他如曾博修、范廷佳、傅惠玲等同學，在研究期間，亦提供了相當寶貴的意見，在此一併致謝！

在第一階段實驗過程中，我受到台中榮總新陳代謝科徐山靜醫師的許多幫忙，提供我不下 50 ~ 60 位 IDDM 病人血清。此外，亦仰賴健保門診中心檢驗科陳賜安先生，徐醫師新陳代謝科檢驗室助理檢驗

師，以及台中榮總整型外科彭人楚總醫師及家醫科魏士杰總醫師兩位同學的協助。我還記得彭人楚這位壯得像條小牛的外科超人，在星期六半夜值班開一晚的外科急診刀後，清晨五點要我呼叫他，好配合榮總 IDDM 俱樂部小朋友的抽血大篩選，他一人在清晨抽了 20 ~ 30 位，然後一次送至我手上。令我十分感動並覺得歉疚。

當蔡教授指導我把論文重點放在第二階段時，舊的實驗室也開始搬到建設當中的大慶分院。我的轎車在搬完了實驗室器材後，也大修了一次。在第二階段的實驗中，我的父母徐松男、徐李秀雲也都加入幫忙的行列，別人是依靠同學、老師、男女朋友的協助，而我這從早期就一直經營進出口貿易及紡織業的父母，竟跟我從高雄到中山醫學院的實驗室裡幫忙，他們看我反覆的操作，總在旁幫忙提藥水、拿試管。我想，或許父親連「西方墨點法」都已偷偷學成了。這之間，百薰也提供了我許多意見並且幫了許多忙。他們賜給我若干睡眠的時間，我很感謝。

曾經在一次請教李宣佑教授時，他建議我從計畫性實驗中求結果，讓我看清一些實驗上的迷惘，我在此要致上謝意。最後我要再度感謝蔡嘉哲教授，提供了我這麼多的機會及指導，我常有聽蔡教授一席言，勝讀數年書的感受。我了解在實驗室的領域裡，有的人一味急功求結果，有的人則混混日子過生活；而在蔡教授的指導下，不僅釐清我對分子生物的看法，乃至於對人生態度的涵養，皆有正面的幫助。蔡教授的指導及耐心提攜是促使我完成此篇論文，居功厥偉者。在此，向所有愛護我、提攜我及給予我幫助的人，致上深深的謝意。

徐聖曜 謹誌於

中山醫學院醫學研究所

中華民國八十七年元月

# 目 錄

中文摘要.....	1
英文摘要.....	2
第一章 前言.....	3
第二章 材料與方法.....	12
材料.....	12
方法.....	12
一、免疫螢光染色法.....	13
二、純化PML.....	13
三、蛋白質濃度定量.....	15
四、聚丙烯醯氨板膠電泳法.....	16
五、轉印.....	17
六、西方墨點法.....	17
七、酵素免疫分析法.....	18
第三章 結果.....	20
第四章 討論.....	33
參考文獻.....	44



## 圖 表 次

圖 1.....	26
圖 2.....	27
圖 3.....	28
圖 4.....	29
圖 5.....	30
表 1.....	31
表 2.....	32

## 摘要

自體免疫疾病(Autoimmune disease)是因自身免疫系統出現問題，導致自體抗體(Autoantibody)的產生，此自體抗體不僅攻擊體內器官或組織，同時也導致疾病的形成。病人血清於間接免疫螢光反應中呈現 Nuclear dot 型態，稱為 nuclear domain(ND)10，也稱為 POD 或 Kr bodies。此類型螢光包含數個蛋白質，其中 PML 蛋白質是一不正常表現於 promyelocytic leukemia cells 之細胞成長抑制蛋白質。

本篇實驗中，我們用 PML 蛋白質，來與多種自體免疫疾病病人的血清共計 122 位相互反應，發現共有 10 位與 PML 蛋白呈陽性反應。其中原發性膽汁性肝硬化(PBC)有 2 位，混合性結締組織病(MCTD)有 1 位，全身性硬化症(SSc)有 1 位，全身性紅斑狼瘡(SLE)有 2 位，修格蘭症候群(SS)有 1 位，雷諾氏症候群(RP)有 1 位，不明原因關節炎有 1 位，資料不可考的 nuclear dot 陽性患者中有 1 位。這 10 位與 PML 蛋白反應呈陽性的病人血清，在免疫螢光染色法下，抗核抗體並不皆是呈現 nuclear dot 的螢光型態。其它 112 位各種自體免疫疾病病人，則沒有與 PML 呈現陽性反應之情形。

## ABSTRACT

The pathogenesis of autoimmune disease is due to some dysfunction in immune system and appearance of abnormal autoantibodies. Any kind of abnormal autoantibodies may attack specific or multiple organs and tissues; it results in disease formation. The serum of patients appears nuclear dot pattern in immunofluorescence examination. We also say nuclear dot to be POD or Kr bodies. There are many kinds of protein in the nuclear dot. One of them is PML. It is a kind of inhibitory protein in cell growth of promyelocytic leukemia cells.

In our experiment, we check anti-PML antibody in many kinds of autoimmune diseases. Anti-PML antibodies, detected in 10 of 122 patients, included in 2 primary biliary cirrhosis, 1 mixed connective tissue disease, 1 systemic sclerosis, 2 systemic lupus erythematosus, 1 Sjogren's syndrome, 1 arthritis of unknown cause and 1 positive nuclear dot. The 10 patients of positive response were not all nuclear dot pattern in immunofluorescent staining examination.

## 第一章 前言

免疫系統的主要功能在於保護生物體來對抗環境中各種有害物質，包括過敏原、毒物、微生物、寄生蟲等的侵襲。大多數脊椎動物，能有效地製造高效價抗異物抗體。生物體在演化中被高度保存下來的細胞成份，也能成為自體抗原(Autoantigen)而產生相當效價的自體抗體 (Autoantibody)。這些在生理狀態下所產生的自體抗體稱為自然性抗體 (Natural antibodies)，若是造成致病機轉的自體抗體則形成自體免疫疾病(Autoimmune disease) (1)。

至今之研究發現，會被自體抗體所認識的自體抗原，皆是在細胞內扮演著重要角色的酵素或其他分子，如 Topoisomerase I、Ribosomal nucleoprotein(RNP)、tRNA histidyl synthetase(Jo-1)、Histone、Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)、double-stranded DNA 等，所以自體抗體的研究和分子生物學的發展有密切關聯性。自體免疫疾病之成因極為複雜，綜合多方面的科學方法，進而從病人臨床表現、血清及分子層次之研究，是一件非常有意義的工作。

自體免疫疾病包含一群因自體免疫系統異常而產生之疾病，其病變可能廣泛散佈於全身各處，我們稱之為全身性自體免疫疾病(Multisystem autoimmune diseases)。有的只局限於一個器官之內，我們稱為器官專一性自體免疫疾病(Organ specific autoimmune diseases)。

全身性自體免疫疾病包括全身性紅斑狼瘡(Systemic lupus erythematosus; SLE)、修格蘭症候群(Sjogren's syndrome; SS)、類風濕性關節炎(Rheumatoid arthritis; RA)及硬皮症(Systemic sclerosis; SSc)等疾病。器官專一性自體免疫疾病常侵犯的目標器官，包括影響甲狀腺的葛里夫茲病(Graves' disease)及赫許莫得病(Hashimoto's thyroiditis)，影響腎上腺的有自體免疫性腎上腺炎(Autoimmune adrenalitis)及史密得症候群(Schmidt syndrome)，影響胰臟的則有胰島素依賴型糖尿病(Insulin dependent diabetes mellitus; IDDM)等。

我們如果檢查自體免疫疾病的病人血清，可發現各種不同的抗體。例如全身性紅斑狼瘡的病人有對抗 Smith antigen、U1-RNP、SS-A/Ro、SS-B/La、Double-strand DNA、Histone、Phospholipids、Ku及Proliferating cell nuclear antigen 等抗體；多發性肌炎或肌皮炎

(Polymyositis/Dermatomyositis)的病人有對抗 Transfer RNA synthetases (Anti-Jo-1), Signal recognition particle 等抗體; 休葛連氏症(SS)的病人有對抗 SS-A/Ro、SS-B/La、Nucleolar organizing region-90 等抗體; 而硬皮症(SSc)的病人則有對抗 Centromere、Topoisomerase I、RNA Polymerases 及 Fibrillarin 等抗體。

目前有關自體免疫疾病之致病機轉，一般相信和環境遺傳因子與免疫系統均有關聯，但詳細機轉仍未完全被了解。自體免疫疾病形成目前的理論包括免疫系統之異常而盲目自我攻擊; 本身細胞成分異常而成為自體抗原; 以及分子相似論 (Molecular Mimicry)。分子相似論乃指免疫系統對付外來抗原時, 與自身成份發生交叉反應所致。當這些抗體存在於病人血清中，會與細胞表面的抗原反應，或形成免疫複合體，隨著血流流經全身。一旦這些免疫複合體沉積在組織器官上，就會造成傷害。

自體免疫疾病常出現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、甚至於正常人。在環境因子方面，如長期暴露於含有有機溶劑 BENZENE 或 VINYL CHLORIDE 之氣體中，將可能導致硬皮症之發生。在遺傳因子方面，有部分全身性紅斑狼瘡

或胰島素依賴型糖尿病病人，有特定相同的主要組織相容性複體之基因型(MHC genotype);而硬皮症的部分病例則與染色體異常有關。而在免疫系統方面，若由於長期的免疫反應刺激，致使自體抗原與 T 細胞和 B 細胞間的活化不斷進行，將可能產生自體抗體。

除了自體抗體外，仍有其他因子會參與病變。例如血清中 Cytokines, Lymphokines 及 Growth Factors (GF)。其中包括 Tumor necrotic factor  $\gamma$  (TNF- $\gamma$ )、Interleukin-1 (IL-1)、IL-4、IL-6、IL-10、Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、Platelet-derived growth factor (PDGF) 及 transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )等。這些免疫細胞因子除了參與淋巴球和血管內皮細胞間之交互作用外，還可能具有細胞毒殺活性而引起血管病變，以及主導發炎組織修復之過程。例如全身性紅斑狼瘡之血管炎及硬皮症的系統性硬化，可為佐證(2)。近來也有學者提出 "Autogen" 的觀念，指出其有別於傳統的免疫反應。就如同 oncogen 有 Fas 及 oncogen bcl-2，並且知道它們參與細胞設定性死亡(Apoptosis)的過程 (3)。

現今最普遍檢驗自體抗體的方法，是利用間接免疫螢光染色法 (Indirect immunofluorescent staining)。我

們把抗核抗體標上螢光物質，然後再和細胞核內的抗原結合，觀察螢光物質在細胞核內的分布情形，就可以大約推測抗體結合到那一種細胞核內抗原。例如 Centromere pattern 表示抗體結合在染色體中節，Nucleolar pattern 表示抗體結合到核仁 (4)，Homogenous pattern 表示抗體結合到 histone (4)，Peripheral pattern (Rim pattern) 表示抗體結合在 double-stranded DNA 上(4)，Fine speckle pattern 表示抗體結合在 extractable nuclear antigen 上，這些抗原有很多種，如 Sm、RNP、SS-A/Ro、SS-B/La 等(4)。本篇論文所使用的 Promyelocytic leukemia (PML)抗核抗原，若把標上螢光物質的抗核抗體與其結合，在間接免疫螢光染色法下將呈現較特殊的 nuclear dot pattern (6)。

Nuclear dot 抗原乃細胞核在細胞間期有 4 到 12 個 dot 型態，其與細胞核基質密切相關，並且與 DNA 相鍵結(7)。有兩種 Epstein-Barr virus 的蛋白與兩種已在人體血清中被確認的主要 nuclear dots(NDs)，有高度同源性，這可能意謂 EBV 涉及與 ND 有關的自體免疫抗體的產生(7)。目前有許多關於 antinuclear antibodies 為 nuclear dot 的研究；如一病例報告發現一位患未分化結締組織疾病 (Undifferentiated connective tissue disease)患者,有



高價的 ANA, 細胞核在免疫螢光染色下, 出現 nuclear dot 的型態(8)。另外在原發性膽汁性肝硬化(Primary biliary cirrhosis; PBC)的患者其 ANA 也有些是呈現 nuclear dot 的型態 (9-15); 而在皮膚炎(Dermatomyositis)患者之 ANA 也曾報告有獨特 dot 之型態(16)。

Promyelocytic leukemia 蛋白簡稱為 PML, 也是種自體抗原, 可在若干原發性膽汁性肝硬化及少數其他的自體免疫疾病患者身上被發現。PML 蛋白涉及 acute promyelocytic leukemia 在染色體第 15 對及第 17 對的轉位(98-99), 其在螢光免疫染色下, 呈現 nuclear dot 的顆粒型態(14, 18)。PML 也是一腫瘤抑制蛋白(Tumor suppressor protein), 或稱生長抑制蛋白(Growth suppressor protein), 其基因位於第十五對染色體上(19)。PML 蛋白包含多種轉錄因子, 如 interleukin-2 受體的調節者(Rpt-1)、重組活化基因產物(RAG-1)等(20); 同時 PML 也是一種能束住 DNA 的蛋白質, 其有使染色體改變的效果, 所以被認為是一種 oncoprotein (21)。PML 因為是種 nuclear dot (ND)蛋白質, 所以又稱 nuclear bodies (NBs)(13)。在免疫螢光染色法下, 可見抗核抗體呈現 nuclear dot pattern 的螢光型態。

PML 之標記型在正常細胞是包括 5 到 10 個散佈球形核體，稱為 PODs (PML oncogenic domains)，然而 APL 患者之白血球細胞則是較小、更多的點形核體，這種情形則不為其他的瘤性 (neoplastic) 疾病所見到 (22)。PML 核體也是發炎作用與細胞增殖的標靶。曾經有研究用免疫組織化學法來比較正常細胞、發炎細胞及腫瘤細胞對 PML 表達的情形，發現內皮細胞 (endothelial cells)、巨噬細胞 (macrophages) 比其他細胞含高量的 PML 蛋白；若與正常組織比較，發炎組織—尤其是腫瘤組織其 PML 蛋白的含量更高，並且有顯著單核細胞 (mononuclear cells) 浸潤現象。(24)

若用含磷酸胺酸專一單株抗體 (phosphotyrosion-specific monoclonal antibody)，則可知 PML 為一磷蛋白 (phosphorprotein)(25)。為了研究 PML 蛋白的表達，是否與細胞週期有關，用鼻咽(喉)癌細胞 HeLa cell 來分析不同細胞週期的免疫螢光染色情形，並且用共軛焦顯微鏡 (confocal microscopy) 來了解 PML 表達的情形。結果發現，PML 蛋白的表達，在 S、G2、M 期很少；而在介於細胞分裂與 DNA 複製間的 G1 期則顯著增多(25)。

PML 正常上是核內多蛋白複合體之組成。有研究指出

PML 結構包含  $Zn^{+2}$  結合領域的位置稱為 RING finger，而這是由於蛋白質與蛋白質交互作用所形成之結果(26)。PML 的 RING finger 是富含 cysteine/histidine 的群集區域，其為能束住核酸的一種核蛋白(23)。另外也有研究顯示拓撲異構酵素 II (topoisomerase II) 之裂解位置與 PML 基因之 breakpoint clusters 密切相關 (27)，並且指出其與 DNA 之接觸位於置在核內基質，這些現象關係著遺傳重新組合而可能造成異常的轉錄。

PML 也是種轉譯(transcription)調節蛋白，共同集合成散狀核體，扮演自體免疫、腫瘤生成、以及病毒與宿主間的相互反應等角色。PML 基因屬於干擾素(IFN)受激基因(ISGs) 的生長族，它會受轉譯因子 ISGF3 的影響而向上調控。PML 的 mRNA 量及蛋白量都會受 IFNs 作用而有所影響(28)。另外有研究指出 PML 在干擾素 interferon- $\gamma$  作用之下，會誘導單核球及巨噬細胞的活動。

PML 是一種 70-kD 的蛋白質，這用西方墨點法可得知(5)。我們如果把 PML 的 cDNA 插入 glutathione-S-transferase (GST) 基因融合載體，置入特殊的 E. coli. 菌中，再經過培養與誘導的程序，就可以表達出 GST-PML 融合蛋白(5)。有研究指出 PML-1 cDNA 包含 2155 個核甘



酸，而 PML-1 蛋白則包含 560 個氨基酸(20)。用電腦輔助來分析 PML 蛋白的氨基酸序列，顯示出有 4 個主要的結構區域，這包括富含 proline 的 N 端、富含 cysteine 的區域、富含  $\alpha$ -helix 區、富含 serine 的 C 端(20)。proline 區域有一部份與轉錄的活化有關，而另有部份參與磷酸化；cysteine 區域包含 Rpt-1 及 RAG-1， $\alpha$ -helix 區也與磷酸化(phosphorylation)有關。這些區域可能在 oncogenesis 上，有其扮演之角色(23)。另外也有研究提到 PML 蛋白則包含 641 個氨基酸(32)。

## 第二章 材料與方法

實驗藥品、儀器與材料：

1. GST-PML  $\Delta$ Sma ( pGEX 3X ) in BL 21 ( DE3 ) pLysS E. coli. strain 。
2. Glutathione agarose beads
3. Factor Xa cleavage buffer ( 50mM Tris-HCL , pH7.5 ; 150mM NaCl ; 1mM CaCl<sub>2</sub> ) 。
4. Glutathione elution buffer ( 10mM Glutathione , 50mM Tris-Hcl pH=8.0 )
5. MRX microplate reader 購自 Dynatech laboratories 由岑祥公司代理 。

### 方法

抽取病人全血，並取得病人血清。本實驗我們用 122 位病人來做篩檢，其中原發性膽汁性肝硬化 (PBC) 有 9 位，混合性結締組織病 (MCTD) 有 1 位，全身性硬化症 (SSc) 有 7 位，全身性紅斑狼瘡 (SLE) 有 37 位，修格蘭症候群 (SS) 有 18 位，雷諾氏症候群 (RP) 有 6 位，不明原因關

節炎有 4 位，資料不可考的 nuclear dot 陽性患者 3 位，多發性肌炎 (PM) 有 6 位，多發性肌炎合併肌皮炎 (PM+DM) 有 3 位，胰島素依賴型糖尿病 (IDDM) 病人有 11 位，風溼性關節炎 (RA) 有 11 位，胎兒有先天性心臟病的孕婦有 1 位，腎病症候群有 1 位，類肉瘤症有 1 位，血管炎症候群有 3 位。

#### 一. 免疫螢光染色法 (immunofluorescent staining)

將血清以 phosphate buffered saline (PBS) 稀釋 80 倍，取 50ul 稀釋後的血清加入已附著上 Human laryngeal carcinoma cell (HEP-2 cell) 的載玻片上，於潮溼箱中室溫反應 40 分鐘。之後先以 PBS 沖洗，再將其浸入 PBS 溶液中 10 分鐘。取出後以擦手紙吸乾細胞面以外的 PBS，加入一滴標識抗體 (Fluorescein isothiocyanate conjugated secondary antibody; FITC)，再置入潮溼箱中反應 40 分鐘。接著以 PBS 沖洗後，再將其放入含 1-2 滴 even blue 之 PBS 溶液中，輕輕搖晃 10 分鐘後，用 mounting oil 封片並以螢光顯微鏡在 1000 倍下觀察。

#### 二. 純化 PML

首先取 GST-PML  $\Delta$  Sma (pGEX 3X) in BL 21 (DE3) pLysS E. coli. strain 單一菌落加 10c.c 之液狀培養基，

並加入 10 ul Ampicillin ( 50 mg/ml ) 液，再將培養基置於 37 °C 的培養箱至第二天。第二天再把培養基內液體倒入 1000 ml 之 LB 中，並加 1000ul Ampicillin ( 1000x dilute )，置於 37 °C 的培養箱內用機器搖晃 2~3 小時至 O.D. 值為 0.3~0.5。接下來先取 1 ml 菌液於 eppendorf 中 ( 尚未用 IPTG 誘導 )，爾後將 0.5mM IPTG 加入剩餘菌液，且用機器以 250 rpm 搖動 2 小時。

在沉澱菌體前，先取 1c.c 已誘導之菌液於 eppendorf 中，爾後在 5000rpm、4 °C、15 分鐘狀況下，用機器沉澱其餘量菌液。接著將菌液沉澱懸浮於 10 ml PBS 中，並在室溫下加 200ul Lysozyme ( 50mg/ml )，用機器搖 30 分鐘。在同樣 30 分鐘的時間內，用 50ml 的 3M NaCl 沖洗 column，以便去除非特異性物質並清潔 beads ( 約用掉 30~40ml 3M NaCl 即可 )。接著，勿讓 column 乾掉，最後須留至 2c.c 刻度，並加入藥品：MgCl<sub>2</sub> 150ul ( 1 M )、DNase 60ul ( 1 mg/ml )、Aprotinin 100ul ( protease inhibitor ; 2.2 mg prot./ml )、PMSF 5ul ( 0.0174 g/ml )、Triton-X-100 200ul 至菌液沉澱 PBS 懸浮液，Triton-X-100 會破損細胞膜，然後用超音波振盪器振盪至懸浮液變成清澈 ( 約 30 分鐘 )。爾後在 9000rpm，4 °C，10 分鐘的條件下離心，再將上清液加入 5ul EDTA

( 0.5M ) ，並經過 1.2 $\mu$ m milipore ，然後再將那 10c.c 之液體倒入至 column 中，並且在室溫下用機器搖晃 20 分鐘。

將搖晃完畢的 10C.C 菌液，先取出 100ul 於 eppendorf 中，並加入 100ul 稀釋 4 倍的 sample buffer ，其餘收集於 50c.c 之試管後通 column 。然後用 PBS 清洗 beads 直到通 column 後的液體在 280 nm 下 O.D. 值為 0.003 。

加入 3 ml Glutathione elution buffer (10mM Glutathione; 50mM Tris-HCl pH 8.0) 並旋轉 column 內之 beads 30 分鐘以淘出 GST-PML 。再加入 F actor Xa 10ul ，並且在 22-25 °C 的環境中用機器搖晃 2-16 小時，以便將 GST 與 PML 切開。接著將液體倒入 column 中，同時在室溫下用機器搖晃 15 分鐘。混合搖動一下，將其吸至 15c.c 的試管中，在 2000rpm 下用機器離心 5 分鐘。將上清液收至 15c.c 的試管中（同時也先取 100ul 上清液並加入 25ul 稀釋 4 倍的 sample buffer ），接著跑 SDS-PAGE 。

### 三. 蛋白質濃度定量

利用胎牛血清白蛋白做為標準液蛋白 ( 1.4mg/dl ) 分別以 1ul 、 5ul 、 10ul 、 30ul 、 50ul 及 100ul 混以 PBS



799ul、795ul、790ul、770ul、750ul及700ul，爾後再分別各加入200ul之染劑（dye）。將這些標準液分別測光密度（O.D.）值。同時也將GST-PML及GST檢體測其O.D.值，再用迴歸方程式（ $y=a+bx$ ），以BSA的量為x值，O.D.值為y值。先算出b值，接而代換出a值，再求出GST-PML及GST之濃度。

將求得的GST-PML及GST之濃度，以一定比例混以PBS，使每100ul之溶液中，有1ug之GST-PML及GST，以便在ELISA步驟時，盤內加入一定量的GST-PML及GST。

#### 四. 聚丙烯醯氨板膠電泳法（SDS-PAGE）

首先，組合電泳用具。而分離蛋白質所用的聚丙烯醯膠濃度為12.5%，將acrylamide、bis-acrylamide、Tris PH 8.7、SDS、TEMED、ammonium persulfate及d-H<sub>2</sub>O以一定比例混合，並除去水溶液氣泡，即成12.5% SDS-PAGE。在其上層則倒入5%的acrylamide stacking gel，並且馬上放Comb。十五分鐘後，取出comb，再加running buffer至電泳槽中，然後準備sample，並煮沸3分鐘。同時加入sample及低蛋白質分子量標準液，並通電80伏特讓其進入分離凝膠層，再調整電壓為140伏特，繼續電泳直到顏料跑到電泳槽電解液中，即告完成。

## 五. 轉印 ( TRANSFER )

經由 12.5 % SDS-PAGE gel 電泳分離的 PML 蛋白質，我們再將其轉印到醋酸纖維膜 (Nitrocellulose paper; NC paper) 上。其間過程乃先在轉印設備內倒入電解液，並將 SDS-PAGE PML gel 及醋酸纖維膜夾在一起，再將其置於轉印設備電解槽內，在 4 °C、0.23 安培下，通電 1 小時，即可轉印完成。

## 六. 西方墨點法(WESTERN BLOTTING)

將 12.5 % SDS-PAGE PML gel，轉印至醋酸纖維膜 (NC paper) 後，先泡製以 PBS 為溶劑的 5%脫脂奶粉液，將醋酸纖維膜泡在其中 30 分鐘，再將 NC paper 挑起並分割成寬 0.5 公分的長條，置放在 parafilm 上，再與患者血清 (以 5 %脫脂奶粉稀釋 50 倍) 反應 1.5 小時。以 PBS-TWEEN 洗 10 分鐘，三次。將 NC paper 放在 parafilm 上，加入第二次抗體 ( ALP conjugated goat anti-human Ig ; 以 5 %脫脂奶粉稀釋 2500 倍) 反應 1 小時。以 PBS-TWEEN 洗 10 分鐘，三次；以及 30 分鐘，一次。將 NC paper 挑起加入 15ml substrate buffer 以及 40ul BCIP (30mg/ml)，40ul NBT (30mg/ml) 使其呈色，呈色完畢後加入蒸餾水沖洗以終止其反應。

## 七. 酵素免疫分析法 ( ELISA )

將 GST-PML 及 GST 溶在 phosphate buffered saline ( PBS ) 內成 1 $\mu$ g/100ul 的濃度。將其 GST-PML 及 GST 溶液分別依序加入 microtiter plate 的小格子中，每個小格子加入的量為 100ul 。放入 4 °C 冰箱至隔天。

第二天，將 microtiter plate 裏小格子之溶液全力甩乾，再將每個小格子加入 Gelatin post-coating 200ul 。放入 4 °C 冰箱內至隔天。

第三天，將 microtiter plate 的每個小格子用蒸餾水洗三次，再泡製 5mg/ml dilute Ig serum (5mg/ml 之 BGG diluent 500ul+serum 2.5ul)。爾後每個小格子加入 200ul 的泡製液，並放入 37 °C 之控溫培養箱 40 分鐘。接著甩乾 microtiter plate 內小格子之溶液，並用蒸餾水洗三次。每個小格子再加入 "anti-Ig diluent 20ml + peroxidase-coating anti-Ig 20ul" 混合液 200ul ，然後第二度將 microtiter plate 放入 37 °C 控溫培養箱 40 分鐘。當取出 microtiter plate 將小格子中溶液甩乾後，此次用蒸餾水洗小格子六次。洗完後將每個小格子加入 200ul 由 "ABTs 1ml + McIlvaine's buffer (pH4.6) 9ml + 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.05ml" 所泡成的受質溶液，並將 microtiter plate 加以

搖晃至出現綠色，用 MRX microplate reader 讀一次 O.D. 值，至 O.D. 值約 1.2-1.5 時再讀一次，至一個半小時以後再讀 O.D. 值一次。

### 第三章 結果

我們用 rabbit anti-GST-PML 血清來做西方墨點法反應，可以發現約在 70 kD 的位置，出現一條藍紫色的 band (圖 1)。同樣在圖 14 裏，個案 27 是 rabbit anti-PML 自體抗體，個案 28 是 nuclear dot 陽性的控制組個案，我們也可以發現約在 70 kD 的位置，皆出現一條藍紫色的 band (圖 2)。

在純化 PML 抗原的過程中，我們用 SDS-PAGE 來分析各種不同的樣本。圖 15 裏左邊第一行是低分子量的標誌樣本，第二行是未經過誘導的樣本，第三行是已經過誘導的樣本，第四行是過 column 兩次的樣本，第五、六、七行是 PML 樣本，第八、九、十行是 GST 樣本。由此圖可見 GST 約在 27 Kd 的位置出現一條藍紫色的 band (圖 3)。

同樣在圖 16 裏，也是用 SDS-PAGE 來表示純化 PML 蛋白時，各不同階段 PML 的純化結果。上圖左邊第一行是低分子量的標誌樣本，第二行是未經過誘導的樣本，第三行是已經過誘導的樣本，第四行是過 column 兩次的樣本，後面其他行則是 GST 樣本。下圖左邊第一行也是低分子量的標誌樣本，第二行是已經過誘導的樣本，後面其他行則是

GST 樣本。由上圖第二行及下圖第三、四行可見 PML 約在 70 kD 的位置可出現一條明顯的藍紫色 band (圖 4)。

在這 122 位自體免疫疾病病人中取其血清，並且用西方墨點法或酵素免疫分析法來與 PML 蛋白相反應，總共有 10 位與 PML 蛋白呈陽性反應 (表一)，佔 8.2 %。這 10 位皆是女性，年齡從 36 歲到 53 歲，平均年齡為 44.6 歲。其中原發性膽汁性肝硬化 (PBC) 9 位中有 2 位與 PML 蛋白反應呈陽性，在受檢測的原發性膽汁性肝硬化患者中佔 22 %；混合性結締組織病 (MCTD) 的 1 位與 PML 蛋白反應呈陽性，在受檢測的混合性結締組織病患者中佔 100 %；全身性硬化症 (SSc) 7 位中有 1 位與 PML 蛋白反應呈陽性，在受檢測的全身性硬化症患者中佔 14.3 %；全身性紅斑狼瘡 (SLE) 37 位中有 2 位與 PML 蛋白反應呈陽性，在受檢測的全身性紅斑狼瘡病患者中佔 5.4 %；修格蘭症候群 (SS) 18 位中有 1 位與 PML 蛋白反應呈陽性，在受檢測的修格蘭症候群患者中佔 5.5 %；雷諾氏症候群 (RP) 6 位中有 1 位與 PML 蛋白反應呈陽性，在受檢測的雷諾氏症候群病患者中佔 16.7 %；不明原因關節炎 4 位中有 1 位與 PML 蛋白反應呈陽性，在受檢測的不明原因關節炎病患者中佔 25 %；其他 3 位資料不可考的 nuclear dot 陽性患者中有 1 位與 PML 蛋白反應呈陽性，佔 33.3 %。其他種類的自體免疫疾病病人

與 PML 蛋白反應則呈陰性，這包括 6 位多發性肌炎 (PM)，3 位多發性肌炎合併肌皮炎 (PM+DM)，11 位胰島素依賴型糖尿病人，12 位風溼性關節炎 (RA)，1 位胎兒有先天性心臟病的孕婦，1 位腎病症候群，1 位類肉瘤症以及 3 位血管炎症候群的患者 (表一)。在本篇實驗中，10 位用西方墨點法或酵素免疫分析法與 PML 蛋白呈陽性反應的患者血清，總共有 5 位在免疫螢光染色法，抗核抗體呈現 nuclear dot 的螢光型態 (圖 5)。

原發性膽汁性肝硬化 (PBC) 患者血清中有 2 位與 PML 蛋白反應呈陽性的病人，其中有 1 位是 53 歲女性，抗核抗體陽性 (ANA 160X +, cytoplasm)，抗粒腺體抗體陽性 (mitochondria 10X +)，抗 centromere 抗體陽性 (10X +)。臨床上，患者有慢性肝炎及肝硬化的表徵外，也有明顯的全身性搔癢，目前用 urso 1# tid 及 reduclyn 1# tid 治療。另外的 1 位原發性膽汁性肝硬化病人是 36 歲女性，抗核抗體陽性 (ANA 1280X +, nuclear dot)。臨床上也有明顯的全身性搔癢，目前用 urso 1# tid 及 B-complex 1# tid 治療。這 2 位原發性膽汁性肝硬化 (PBC) 患者血清，在西方墨點法或酵素免疫分析法下與 PML 蛋白反應呈陽性的病人，只有 1 位在免疫螢光染色法，抗核抗體呈現 nuclear dot 型態，佔 50% (表二)。

唯一的1位混合性結締組織病 (MCTD) 患者血清與PML 蛋白反應呈陽性，是位 41 歲女性，其抗核抗體陽性(ANA 1280X +, speckled)，抗 Ku 抗體陽性，抗 SS-A 抗體陽性。患者有多發性肌炎及硬皮症的情形，同時出現雷諾氏現象，目前用 prednisolone 1# qd 及 D-penicillamine 1# qd 治療。這唯一的1位混合性結締組織病 (MCTD) 患者血清，在西方墨點法或酵素免疫分析法下與 PML 蛋白反應呈陽性的病人，其血清在免疫螢光染色法，抗核抗體並沒有呈現 nuclear dot 型態 (表二)。

全身性硬化症(SSc)患者血清中有1位與PML 蛋白反應呈陽性的病人，是39歲女性，抗核抗體陽性(ANA 640X +, speckled)，抗 RNP 抗體陽性(16X +, diffusion)，抗 ENA 抗體陽性，患者有出現雷諾氏現象的表徵。這1位全身性硬化症患者血清，在西方墨點法或酵素免疫分析法下與PML 蛋白反應呈陽性的病人，在免疫螢光染色法下，抗核抗體並沒有呈現 nuclear dot 型態，佔0% (表二)。

全身性紅斑狼瘡(SLE)患者血清中有2位與PML 蛋白反應呈陽性的病人，其中有1位是42歲女性，抗核抗體陽性(ANA 160X +, nuclear dot)，抗 centromere 抗體陽性



(1280X +)，有習慣性流產的病史，但是抗 cardiolipin 抗體陰性。另外的 1 位全身性紅斑狼瘡病人是 38 歲女性，抗核抗體陽性(ANA 320X +，nuclear dot)。患者有明顯的臉頰紅斑及白血球缺乏的情形，同時也出現雷諾氏現象，目前用 Hopalet (100) 1# qd 及 plaquenil (200) 1# bid 治療。這 2 位全身性紅斑狼瘡患者血清，在西方墨點法或酵素免疫分析法下與 PML 蛋白反應呈陽性的病人，在免疫螢光染色法下，抗核抗體皆呈現 nuclear dot 型態，佔 100% (表二)。

修格蘭症候群 (SS) 患者血清中有 1 位與 PML 蛋白反應呈陽性的病人，是一位女性，其抗 SS-B 陽性。這 1 位修格蘭症候群患者血清，在西方墨點法或酵素免疫分析法下與 PML 蛋白反應呈陽性的病人，在免疫螢光染色法下，抗核抗體並沒有呈現 nuclear dot 型態，佔 0% (表二)。

雷諾氏症候群(RP)患者血清中有 1 位與 PML 蛋白反應呈陽性的病人，是 43 歲女性，抗核抗體陽性 (ANA +)，呈斑點狀，其抗核內核糖核蛋白抗體陽性(anti-RNP 16X+)。這 1 位雷諾氏症候群患者血清，在西方墨點法或酵素免疫分析法下與 PML 蛋白反應呈陽性的病人，在免疫螢光染色法下，抗核抗體並沒有呈現 nuclear dot 型態，佔 0% (表

二)。

不明原因關節炎患者血清中有 1 位與 PML 蛋白反應呈陽性的病人，是 52 歲女性，抗核抗體陽性 (ANA 640 + , nuclear dot)，有 B 型肝炎及 C 型肝炎的病史，目前用 plaquenil (200) 1# bid 治療。這 1 位不明原因關節炎患者血清，在西方墨點法或酵素免疫分析法下與 PML 蛋白反應呈陽性的病人，在免疫螢光染色法下，抗核抗體呈現 nuclear dot 型態，佔 100% (表二)。

資料不可考的 nuclear dot 陽性患者血清中有 1 位與 PML 蛋白反應呈陽性的病人，也是一位女性。這 1 位資料不可考的 nuclear dot 患者血清，在西方墨點法或酵素免疫分析法下與 PML 蛋白反應呈陽性的病人，在免疫螢光染色法下，抗核抗體呈現 nuclear dot 型態，佔 100% (表二)。

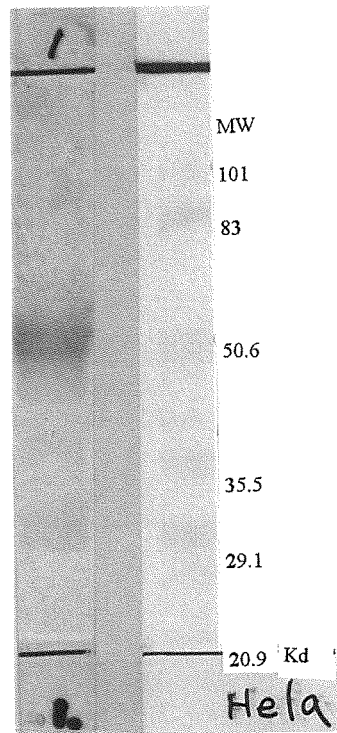


圖 1. 用 rabbit anti-GST-PML 血清來與 PML 做西方墨點法反應，可以發現約在 70 kD 的位置，出現一條藍紫色的 band 。

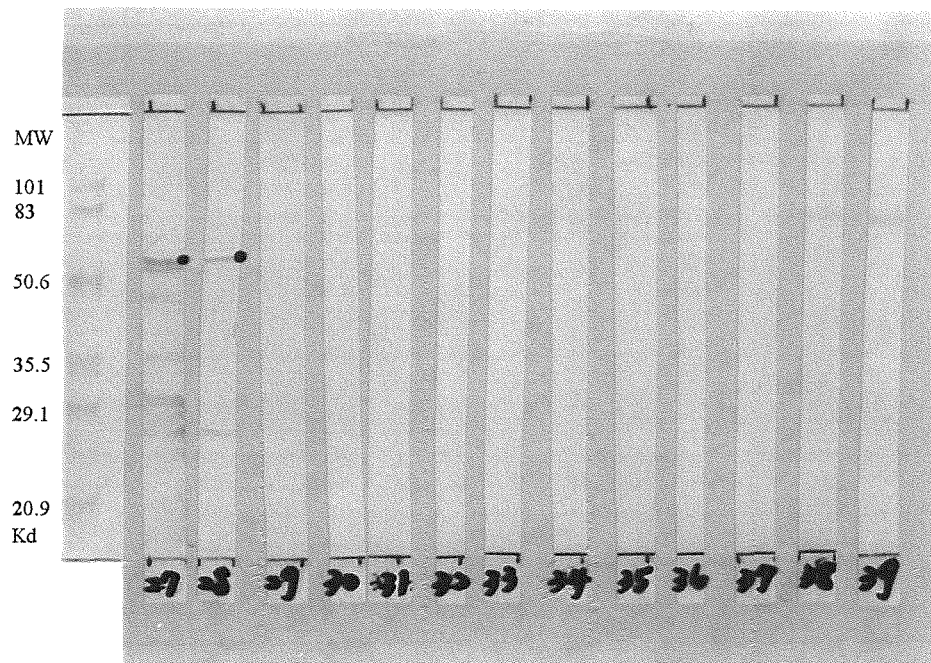


圖 2. 個案 27 是 rabbit anti-PML 自體抗體，個案 28 是 nuclear dot 陽性的控制組個案，可以發現約在 70 kD 的位置，皆出現一條藍紫色的 band 。

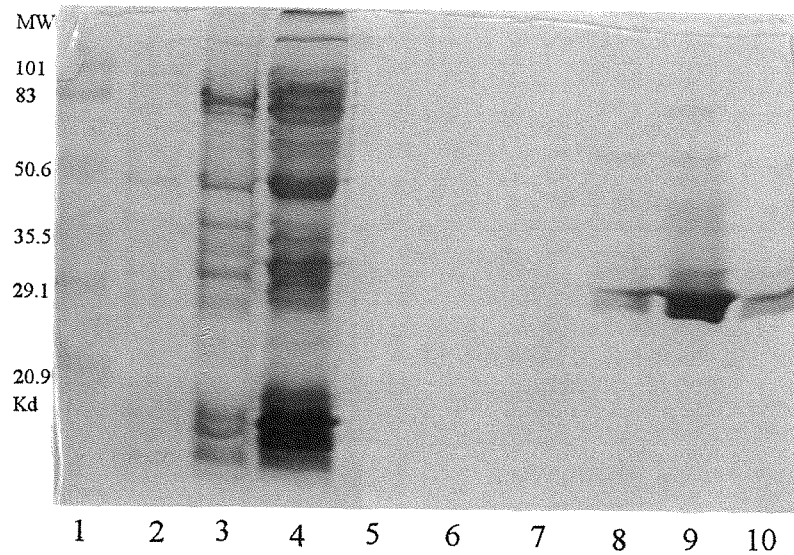


圖 3. 左邊第一行是低分子量的標誌樣本，第二行是未經過誘導的樣本，第三行是已經過誘導的樣本，第四行是過 column 兩次的樣本，第五、六、七行是 PML 樣本，第八、九、十行是 GST 樣本。由此圖可見 GST 約在 27 Kd 的位置出現一條藍紫色的 band。

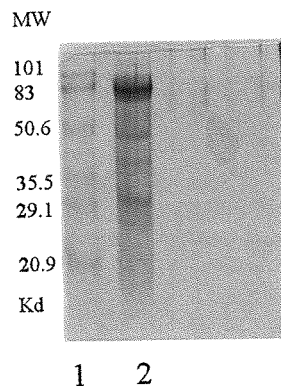
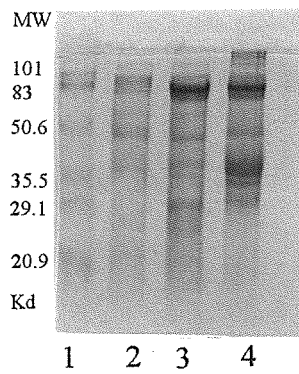


圖 4. 用 SDS-PAGE 來表示 PML 的純化結果。上圖左邊第二行是未經過誘導的樣本，第三行是已經過誘導的樣本，第四行是過 column 兩次的樣本。下圖左邊第二行是已經過誘導的樣本。由上圖第三、四行及下圖第二行可見 PML 約在 70 kD 的位置可出現一條明顯的藍紫色 band 。

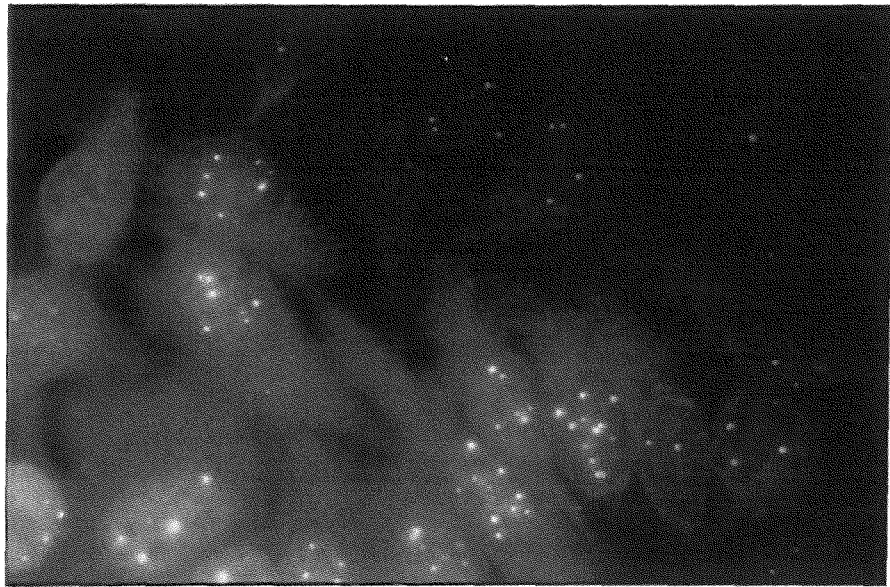


圖 5. 用免疫螢光染色法，抗核抗體呈現 nuclear dot 的螢光型態。

表 1. 病人血清與 PML 蛋白反應情形

疾病	PBC	MCTD	SSc	SLE	SS	RP	Arthritis (unclassified)	Nuclear dot (unknown cause)
總數	9	1	7	37	18	6	4	3
陽性	2	1	1	2	1	1	1	1
百分比	22%	100%	14.3%	5.4%	5.6%	16.7%	25%	33.3%
疾病	PM/DM	IDDM	RA	Woman with CHD fetus	NS	Sarcoidosis	Vasculitic syndrome	
總數	9	11	11	1	1	1	3	
陽性	0	0	0	0	0	0	0	



表 2. 陽性病人血清在免疫螢光染色下反應情形

疾病	PBC	MCTD	SSc	SLE	SS	RP	Arthritis (unclassified)	Nuclear dot (unknown cause)
總數	2	1	1	2	1	1	1	1
陽性	1	0	0	2	0	0	1	1
百分比	50%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	100%

## 第四章 討論

目前在世界對 PML 與自體免疫疾病相關的研究並不多，日本學者 Higuchi 等人曾發現在 anti-neutrophil antibody 陽性合併有銅缺乏及中性白血球缺乏的患者身上，promyelocytic leukemia cells 與患者血清的結合有增加的情形。

德國漢堡大學 Sternsdorf 等人 1995 年曾發表在核蛋白 (nucleoprotein) Sp100 陽性的 primary biliary cirrhosis (PBC) 病患及其他自體免疫疾病病患，大部份也都呈現核蛋白 PML 陽性的情形。所以作者認為由上述發現可知，PML 與 Sp100 類似，在 PBC 和其他的自體免疫疾病上，都扮演著自體抗原 (autoantigen) 的功能(14)。但是上述結果在活體外，則不直接存有此關係。

PML 並且呈現出 nuclear body (NB) 這種超結構顆粒的訊號(1)。Korioth 等學者曾提到像這樣病人血清於免疫螢光反應下所呈現的 nuclear dot 型態，被稱為 ND10 或 POD 或 Kr bodies，此結構裏包含了一些蛋白質，目前已知的除了 PML 及 Sp100 外，還有 NDP 52 等。它們可能與病毒感染及干擾素的治療反應有關(1、7、18、29-31)。

以往免疫螢光反應中呈現 nuclear dot 型態的自體抗體，甚至 anti-PML 的自體抗體主要在 PBC (primary biliary cirrhosis) 病人中發現(32, 33)。至於 Connective Tissue Disease (CTD)， Systemic Lupus Erythematosus (SLE)， Sjogren's Syndrome (SS)， Rheumatic Arthritis (RA)， Sarcoidosis， 以 Chronic liver disease 則少有 nuclear dot 型態的自體抗體，至於是否為 anti-PML 之自體抗體，仍鮮有文獻做詳細完整之介紹。

至目前為止， PML 與各種不同的自體免疫疾病間之關係，所知並不多。在 PBC 患者上，傳統是以存在 anti-mitochondrial antibody 為其特徵。如今是否 anti-PML antibody 也是扮演 PBC 致病因子，令人好奇！顯然在一些研究中， PML 是有著自體抗原的角色。在自體免疫疾病的研究，甚至臨床應用上， PML、 Sp100 或 NDP52 這些 nuclear dot pattern 的核蛋白將會出現很多的發揮的機會。

本實驗 GST-PML  $\Delta$  Sma 是 PML 蛋白 C 端的部分截取片斷，它包含 446 個胺基酸，在表達上它比完整的 GST-PML 蛋白容易的多。在經驗中 GST-PML  $\Delta$  Sma 基因融合載體在 BL 21 ( DE3 ) pLysS E. coli. Strain 中長得較好。在純化

PML 蛋白的過程中，雖然有經過 SDS-PAGE 及 Western blotting 確定是 PML 蛋白，可惜量並不多，不足以大量地使用 Western blotting 來篩選各種自體免疫患者的血清。為了篩檢更多自體免疫患者的血清，我們採用酵素免疫分析法 (ELISA)，將 microplate 附著上 GST-PML 來與血清反應。同時為了在往後純化 PML 蛋白的過程及進一步的實驗須要，我們採用將 GST-PML  $\Delta$  Sma (pGEX 3x) 融合蛋白用肌肉注射的方式注射入兔子體內，如此便可以得到多量的 anti-GST-PML  $\Delta$  Sma 抗血清。

在酵素免疫分析法實驗當中，用 MRX microplate reader 讀 O.D. 值時，碰到在短時間內，陽性控制組患者血清反應過度強烈的問題。如果我們將 ELISA 第一天的步驟裏，將加入的 GST-PML 及 GST 溶液之濃度再降低，將可減少因陽性控制組患者血清反應過度強烈所造成的誤差及資料上的損失。

本研究中 9 位原發性膽汁性肝硬化 (PBC) 的患者中，有 2 位 (22%) 患者的血清與 PML 蛋白反應呈陽性。原發性膽汁性肝硬化是種慢性自體免疫性肝病，其特徵在於肝內膽管的破壞及門脈的發炎與結疤。在有徵狀的患者中，90% 為女性，年齡一般 35 至 60 歲，最早出現的徵狀一般是搔

癢，經過數月至數年，隨後發生黃疸，最終發生肝細胞衰竭與門脈高血壓的徵象。在常規篩選試驗中，血清鹼性磷酸酵素升高到正常的 2 至 5 倍，測其抗粒腺體抗體陽性可支持診斷。先前有文獻提到於原發性膽汁性肝硬化患者身上檢測出抗 alpha-enolase 抗體(17)、抗 70 kD heat shock protein 抗體(34)、抗 pyruvate dehydrogenase (PDH) 抗體(35-38)、抗 Sm 抗體(35)、抗 Jo-1 抗體(35)、抗 collagen 抗體(35)、抗 myeloperoxidase (MPO) 抗體(35)、抗 ANA 抗體(39)、抗 centromere 抗體(40-42)、抗 52 Kd Ro 抗體(43)、抗 smooth-muscle 抗體(43)、抗 transfer ribonucleic acid (tRNA) 抗體(44)、抗 dihydrolipoamide dehydrogenase 抗體(45)、抗 nuclear lamin C 抗體(38)、抗 nuclear envelop-associated protein 抗體(46)等，至於原發性膽汁性肝硬化患者身上可檢測出抗 PML 自體抗體的報告目前還沒有，本篇研究是目前第一篇在原發性膽汁性肝硬化患者身上可檢測出抗 PML 自體抗體的報告。

唯一的 1 位混合性結締組織病 (MCTD) 患者(100 %)，其血清與 PML 蛋白反應呈陽性。混合性結締組織病是一種具有類似於系統性紅斑狼瘡、硬皮症、多發性肌炎和類風溼關節炎的混合性臨床表現為特徵，血中常有高滴度的抗核內核糖核蛋白(nuclear ribonucleoprotein; nRNP)抗體

的臨床綜合徵。發病年齡平均 37 歲，女性佔 80%。典型臨床特徵包括雷諾現象、多發性關節炎、手部腫脹或指(趾)硬化病、食道功能障礙、肺部病變和近端肌肉無力炎徵性肌病。半數以上的患者常有高滴度類風濕因子，也常有瀰散性  $\gamma$  高球蛋白血症。先前有文獻提到於混合性結締組織病患者身上檢測出抗 U small nuclear ribonucleoprotein 抗體(47)、抗 ribosomal protein L7 抗體(48)、抗 RA 33 抗體(49)、抗 TNF receptor 抗體(50)、抗 nuclear matrix 抗體(51)、抗 56K 抗體(52)、抗 phospholipid 抗體(53)等，至於混合性結締組織病患者身上可檢測出抗 PML 自體抗體的報告目前還沒有，本篇研究是目前第一篇在混合性結締組織病患者身上可檢測出抗 PML 自體抗體的報告。

7 位全身性硬化症 (SSc) 患者中，有 1 位(14%)患者的血清與 PML 蛋白反應呈陽性。全身性硬化症特徵為皮膚、血管及內臟器官的纖維化，女性發病率約為男性的三倍，約 95% 患者抗核抗體陽性，同時也約 95% 患者有雷諾氏現象。患者常有眼或口腔乾燥，有報告唇組織活檢 anti-SS-A (Ro) 及 anti-SS-B (La) 抗體陽性與乾燥症 (SS) 相一致 (54-56)。有相當數量患者有甲狀腺功能減退的情形，並且伴有高滴度的抗甲狀腺抗體。對此病具有高度特異性的抗核抗體為抗局部異構媒 I 抗體 (Scl-70)、抗核仁抗體

和抗染色體著絲點抗體。先前有文獻提到於全身性硬化症患者身上檢測出抗 Fc gamma R 抗體(29, 57-59)、抗 fibrillarin 抗體 (30, 60-61)、抗 DNA topoisomerase I 抗體(31, 60, 62-65)、抗 RNA polymerase I, II, III 抗體(60, 62, 63, 65-67)、抗 centromeric proteins 抗體(60, 62, 68-71)、抗 upstream binding factor 抗體(60)、抗 kinetochore 抗體(63)、抗 calpastatin 抗體(72)、抗 IL-6 抗體 (73)、抗 TNF receptor 抗體(74)、抗 IL-8 抗體(75)、抗 Wa 抗體(76-77)、抗 PM-Scl 抗體(78)、抗 PPIase 抗體(79)、抗 Th ribonucleoprotein 抗體(80)、抗 PCNA 抗體(81)、抗 reticulin 抗體(82)、抗 gp50 抗體(83)、抗 mitochondria 抗體(84, 85)、抗 eukaryotic ribosomal protein L7 抗體(86)、抗 Th/To 抗體(87)等，至於全身性硬化症患者身上可檢測出抗 PML 自體抗體的報告目前還沒有，本篇研究是目前第一篇在全身性硬化症患者身上可檢測出抗 PML 自體抗體的報告。

37 位全身性紅斑狼瘡(SLE) 患者身上，有 2 位(5%)患者的血清可檢測出 PML 抗體。全身性紅斑狼瘡由於病理性自身抗體和免疫複合物的沉積，使其組織和細胞受到損害。90%的病例為女性，尤常見於育齡婦女。美國風濕協會診斷標準包括血液系統，神經系統及腎臟病變的臨床表現

和實驗室檢查陽性外，還要有 ANA 陽性及狼瘡細胞，抗 ds-DNA 抗體、抗 Sm 抗體、VDRL 假陽性四項其中一項陽性，才足夠診斷。一般上，抗核抗體的檢出率為 95%，抗 DNA 抗體的檢出率為 70%，抗 Sm 抗體的檢出率為 30%，抗 RNP 抗體的檢出率為 40%，抗 Ro (SSA) 抗體的檢出率為 30%，抗 La (SSB) 抗體的檢出率為 10%，抗組蛋白抗體的檢出率為 70%，抗心肌磷酯抗體的檢出率為 50%。先前有文獻提到於全身性紅斑狼瘡患者身上檢測出抗 U1-nuclear ribonucleoprotein 抗體(87)、抗 ribosomal ribonucleoprotein 抗體 (87)、抗 proliferating cell nuclear antigen 抗體 (87)、抗 Ku 抗體(87)、抗 Ki/SL 抗體 (87)、抗 centromere 抗體(88) 、抗 56K/annexin XI 抗體(89) 、抗 rheumatoid factor 抗體(90)等，至於全身性紅斑狼瘡患者身上可檢測出抗 PML 自體抗體的報告目前還沒有，本篇研究是目前第一篇在全身性紅斑狼瘡患者身上可檢測出抗 PML 自體抗體的報告。

18 位修格蘭症候群(SS)患者中，有 1 位(5.6%)患者的血清可檢測出 PML 抗體。修格蘭症候群特徵為外分泌腺進行性破壞而引起黏膜和結膜的乾燥，其可獨立發生，也可伴發於其他自體免疫疾病。主要發生在 30 至 40 歲以上的女性，可累及任何器官，但以唾液腺和淚腺病變最明顯。



當出現乾燥性角膜結膜炎、口腔乾燥及唾液腺單核細胞浸潤三聯徵時，即可診斷。先前有文獻提到於修格蘭症候群患者身上檢測出抗 transcription factor (TF) 抗體(6)、抗 Fc gamma receptor 抗體(59, 91)、抗 SS-A 抗體(35)、抗 SS-B 抗體(35)、抗 RNP 抗體(35)、抗 nucleolar organizing region-90 抗體(87)、抗 p80-coilin 抗體(87)、抗 centromere 抗體(88)、抗 56K/annexin XI 抗體(89)、抗 SP3-1 抗體(92)、抗 rheumatoid factor 抗體(90)、抗 ANA 抗體(93) 等，至於修格蘭症候群患者身上可檢測出抗 PML 自體抗體的報告目前還沒有，本篇研究是目前第一篇在修格蘭症候群患者身上可檢測出抗 PML 自體抗體的報告。

6 位雷諾現象(RP)患者中，有 1 位(16.7%)患者的血清可檢測出 PML 抗體。雷諾現象乃手指、足趾小動脈陣發性血管收縮，有時鼻尖和耳垂也受累。冷刺激、情緒激動或精神創傷可誘發。局部皮膚蒼白或發紺，隨後皮膚轉暖發紅。蒼白或紫紺常伴有指(趾)發冷和麻木，而發紅常伴有疼痛和麻刺感。全身性硬化症及混合性結締組織病，皆可能有合併雷諾現象的情形。先前有文獻提到於雷諾現象(RP)患者身上檢測出抗 HI 抗體(86)、抗 centriole 抗體(94)、抗 human nuclear protein 抗體(95)、抗 centromere 抗

體(88)等，至於雷諾現象患者身上可檢測出抗 PML 自體抗體的報告目前還沒有，本篇研究是目前第一篇在雷諾現象患者身上可檢測出抗 PML 自體抗體的報告。

4 位不明原因關節炎患者中，有 1 位(25 %)患者的血清與 PML 蛋白反應呈陽性。先前有文獻提到於不明原因關節炎患者身上檢測出抗 double-stranded DNA 抗體(96-97)，至於不明原因關節炎患者身上可明確檢測出有抗 PML 自體抗體的報告目前還沒有，本篇研究是目前第一篇在不明原因關節炎患者身上可檢測出抗 PML 自體抗體的報告。

其他 3 位資料不可考的 nuclear dot 陽性患者中，有 1 位患者的血清與 PML 蛋白反應呈陽性，另外 1 位 nuclear dot 陽性患者，可能存在的是非抗 PML 蛋白的 nuclear dot 型自體抗體。

曾經有文獻提到在 PML 過度表達時，呈現 speckled nuclear pattern 的螢光型態(5)。如果將 retinoic acid 用於 acute promyelocytic leukemia (APL) 細胞，可見到 PML 的螢光型態由 nuclear dot pattern 改變成 speckled nuclear pattern 的螢光型態(5)。在本篇實驗中，2 位原發性膽汁性肝硬化患者血清，在西方墨點法下與 PML 蛋白

反應呈陽性的病人，只有 1 位在免疫螢光染色法，抗核抗體呈現 nuclear dot 的螢光型態，佔 50%。2 位全身性紅斑狼瘡患者血清，在西方墨點法下與 PML 蛋白反應呈陽性的病人，在免疫螢光染色法下，抗核抗體皆呈現 nuclear dot 的螢光型態，佔 100%。1 位不明原因關節炎患者血清，在西方墨點法下與 PML 蛋白反應呈陽性的病人，在免疫螢光染色法下，抗核抗體呈現 nuclear dot 的螢光型態，佔 100%。這 1 位資料不可考的 nuclear dot 患者血清，在西方墨點法下與 PML 蛋白反應呈陽性的病人，在免疫螢光染色法下，抗核抗體呈現 nuclear dot 的螢光型態，佔 100%。

2 位原發性膽汁性肝硬化患者血清，在西方墨點法下與 PML 蛋白反應呈陽性的病人，另外 1 位的抗核抗體，則是呈現 cytoplasm 螢光型態。1 位混合性結締組織病 (MCTD) 患者血清，在西方墨點法下與 PML 蛋白反應呈陽性的病人，其血清在免疫螢光染色法，抗核抗體呈現 speckled nuclear pattern 的螢光型態。1 位全身性硬化症患者血清，在西方墨點法下與 PML 蛋白反應呈陽性的病人，在免疫螢光染色法下，抗核抗體也是呈現 speckled nuclear pattern 的螢光型態。1 位修格蘭症候群患者血清，在西方墨點法下與 PML 蛋白反應呈陽性的病人，在免疫螢光染色法下，抗核抗體並沒有呈現 nuclear dot 的螢光型態。1 位雷諾氏症候

群患者血清，在西方墨點法下與 PML 蛋白反應呈陽性的病人，在免疫螢光染色法下，抗核抗體也是呈現 speckled nuclear pattern 的螢光型態。在本篇實驗中，10 位用西方墨點法或酵素免疫分析法與 PML 蛋白呈陽性反應的患者血清，總共有 5 位抗核抗體呈現 nuclear dot 的螢光型態，佔 50 %。

總括而言，從我們這篇的研究中可以發現，自體免疫疾病患者的血清與 PML 蛋白反應呈陽性者，在本研究計有原發性膽汁性肝硬化(PBC)、混合性結締組織病(MCTD)、全身性硬化症(SSc)、全身性紅斑狼瘡(SLE)、修格蘭症候群(SS)、雷諾氏症候群(RP)、不明原因關節炎等七種以上的自體免疫疾病。在研究中，10 位用西方墨點法或酵素免疫分析法與 PML 蛋白呈陽性反應的患者血清，在免疫螢光染色法下，抗核抗體以呈現 nuclear dot pattern 的螢光型態最多，但也有以 speckled nuclear pattern 及 cytoplasm pattern 的螢光型態呈現。所以我們認為，抗 PML 自體抗體可存於多種的自體免疫疾病，而且在免疫螢光染色法下，抗核抗體除了以 nuclear dot pattern 的螢光型態呈現，可能在不同的階段中，抗核抗體也會出現不同的螢光型態，至於其所扮演的機轉仍有待更進一步的研究。

## 參考文獻

- (1) Yu CL: The role of different autoantibodies in the diagnosis of systemic autoimmune disorders. *J Intern Med ROC*. 1996 ; 7(4), 316-323.
- (2) Postlethwaite AE: Connective tissue metabolism including cytokines in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 1994; 6, 616-620.
- (3) Mountz JD, Wu J, Cheng J, Zhou T: Autoimmune disease a problem of defective apoptosis. *Arthritis Rheum*. 1994; 37, 1415-1420.
- (4) 蔡嘉哲: 自體免疫疾病和抗核抗體 台灣醫界 1989 第 33 卷, 第 4 期 35-41.
- (5) Karsten W, Sophie R, Catherine L, Joop J, Teresa C, Maria CF, Angus L, and Anne D: Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR  $\alpha$  in acute promyelocytic leukemia cells 1994; 76, 345-356.
- (6) Kewei X, Eric JL, Michael S: Nuclear dot antigens may specify transcriptional domains in the nucleus. *Mol. Cell. Bio* 1993; 13, 6170-6179.
- (7) Xie, Kewei: Molecular characterization and immunological analysis of nuclear dot protein (transcription). *Biology, Molecular* (0307); *Biology, Cell* (0379). 1995; 55(7), 2555.
- (8) Zuber M, Miesel R, Brandl B: A patient with a high titer of antinuclear antibody and a functioning adrenal tumor. *Clin Rheumatol* 1995 Jan; 14(1), 100-103.
- (9) Chou MJ, SL, Chen TY, Tsay GJ: Specificity of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Ann Rheum Dis* 1995 Feb; 54(2), 148-151.

- (10) Evans J, Reuben A, Graft J: PBC 95k, a 95-Kiloalton nuclear autoantigen in primary biliary cirrhosis. *Arthritis Rheum* 1991 Jun; 34(6), 731-736.
- (11) Cassani F, Bianchi FB, Lenzi M, Volta U, Pisi E: Immunomorphological characterisation of antinuclear antibodies in chronic liver disease. *J Clin pathol* 1985 Jul; 38(7), 801-805.
- (12) Bernstein RM, Neuberger JM, Bunn CC, Callender ME, Hughes GR, Williams R: Diversity of auto-antibodies in primary biliary cirrhosis and chronic active hepatitis. *Clin Exp Immunol* 1984 Mar; 55(3), 553-536.
- (13) Andre C, Guillemin MC, Zhu J; Koken MH, Quignon F, Herue L, Chelbi Alik MK, Dhumea UX D, Wang ZY, Degos L, Chen Z, de The H; The PML and PML/RAR alpha domains form autoimmunity to molecular oncology and form retinoic acid to arsenc. *Exp Cell Res* 1996; 29(2), 253-260.
- (14) Sternsdorf T, Guldner HH, Szostecki C, Grotzinger T, Will H: Two nuclear dot-associated proteins, PML and SP100, are often co-autoimmunogenic in patients with primary biliary cirrhosis. *Scand J Immunol* 1995; 42(2), 257-268.
- (15) Moteki S, Leung PS, Coppel RL, Dickson ER, Kaplan MM, Munoz S, Gershwin ME: Use of a designer triple expression hybrid clone for three different lipoyl domain for the detection of antimitochondrial autoantibodies. *Hepatology* 1996; 24 (1), 97-103.
- (16) Chen Z, Maize JC, Silver RM, Dobson RL, Maricq HR, Ainsworth SK: Direct and indirect immunofluorescent findings in dermatomyositis. *J Cutan Pathol* 1985 Feb; 12(1); 18-27.

- (17) Akisawa N, Maeda T, Iwasaki S, Onishi S: Identification of an autoantibody against alpha-enolase in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 1997; 26(4), 845-851.
- (18) Korioto F, Gieffers C, Maul GG, Frey J: Molecular characterization of NDP Z, a novel protein of the nuclear domain 10, which is redistributed upon virus infection and interferon treatment. *J Cell Biol* 1995; 130(1), 1-13.
- (19) Dong S, Tong JH, Huang W, Chen SJ, Chen Z, Wang ZY, Geng JP, Qi: Molecular study on the chromosome 15 breakpoint in the translocation t ( 15;17 ) in acute promyelocytic leukemia ( APL ). *Sci China B* 1993; 36(9), 1101-1109.
- (20) Kakizuka A, Miller WH, Umesono K, Warrell RP, Frankel SR, Murty VVVS, Dmitrovsky E, Evans RM: Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic fuses RAR with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* 1991; 66, 663-674.
- (21) Michael L: Oncogenic conversion of transcription factors by chromosomal translocations. *Cell* 1991; 66, 619-622.
- (22) Dyck JA, Warrell RPJR, Evans RM, Miller WHjr: rapid diagnosis of acute promyelocytic leukemia by immunohistochemical localization of PML/RAR-alpha protein. *Blood* 1995; 86(3), 862-867.
- (23) Weis K, Rambaud S, Lavau C, Jansen J, Carvalho, Carmou-Fonseca M, Lamond A, Dejean A: Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR  $\alpha$  in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell* 1994; 76, 345-356.
- (24) Terris B, Baldin V, Dubois S, Degott C, Flejou JF, Henin D, Deje: PML nuclear bodies are general targets for inflammation and cell proliferation. *Cancer Res* 1995; 55(7), 1590-1597.

- (25)Chang KS, Fan YH, Andreeff M, Liu J, Mu ZM: The PML gene encodes a phosphoprotein associated with the nucleus matrix. *Blood* 1995; 85(12), 3646-3653.
- (26)Borden KL, Boddy MN, Lally J, O'Reilly Nj, Martin S, Howe K, Solomon E, Freemont PS: The solution structure of the Ring finger domain form the acute promyelocytic leukemia protooncprotein PMC. *EMBO J* 1995; 14(7),1532-1541.
- (27)Dong S, Geng JP, Tong JH, Wu Y ,Cai JR ,Sun GL, Chen SR, Wang ZY, Larsen CJ, Berger R, et al. : Gene Chromosomes. *Cancer* 1993;6(3),133-139.
- (28)Grotzinger T, Stersdorf T, Jensen K, Will H: Interferon-modulated expression of genes encoding the nuclear-dot associated protein SP 100 and promyelocytic leukemia protein (PML). *Eur J Biochem* 1996; 238(2), 554-560.
- (29)Szegedi, Czirjak L, Unkeless JC, Boros P: Serum cytokine and anti-Fc gamma R autoantibody measurements in patients with systemic sclerosis. *Acta Derm Venereol* 1996;76(1), 21-23.
- (30)Arnett FC, Reveille JD, Goldstein R, Pollard KM, Leaird K, Smith EA, Leroy EC, Fritzler MJ:Autoantibodies to fibrillarlarin in systemic sclerosis (scleroderma).An immunogenetic, serologic, and clinical analysis. *Arthritis Rheum* 1996; 39(7), 1151-1160.
- (31)Kuwana M, Fujii T, Mimori T, Kaburaki J: Enhancement of anti-DNA topoisomerase I autoantibody response after lung cancer in patients with systemic sclerosis. A report of two cases. *Arthritis Rheum* 1996; 39(4), 686-691.
- (32)Sternsdorf T, Guldner HH, Szosteki C, Grotzinger T, Will H: Two nuclear dot-associated proteins, PML and Sp 100, are often coauto immunogenic in patients with primary biliary cirrhosis. *Scand J Immunol* 1995; 42(2), 257-268.



- (33) Koken MH, Puvion Dutilleul F, Guillemin MC, Viron A, Linares Cruz G, Stuurman N, de Long L, Szostecki C, Calvo f, Chomienne C, et al: The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion. *EMBO J* 1994; 13(5), 1073-1083.
- (34) Shingai R, Maeda T, Onishi S, Yamamoto Y: Autoantibody against 70 KD heat shock protein in patients with autoimmune liver diseases. *J Hepatol* 1995; 23(4), 382-390.
- (35) Tishler M, Alosachie I, Barka N, Lin HC, Gershwin ME, Peter JB, Shoenfeld Y: Primary Sjogren's syndrome and primary biliary cirrhosis: differences and similarities in the autoantibody profile. *Clin Exp Rheumatol* 1995; 13(4), 497-500.
- (36) Leung PS, Chuang DT, Wynn RM, Cha S, Danner DJ, Ansari A, Coppel RL, Gershwin ME: Autoantibodies to BCOADC-E2 in patients with primary biliary cirrhosis recognize a conformational epitope. *Hepatology* 1995; 22(2), 500-513.
- (37) Matsui M, Nakamura M, Ishibashi H, Koike K, Niho Y: Human monoclonal antibodies from a patient with primary biliary cirrhosis that recognize two distinct autoepitopes in the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex. *Hepatology* 1993; 18(5), 1069-1077.
- (38) Wesierska Gadek J, Penner E, Hitchman E, Sauermann G: Antibodies to nuclear lamin C in chronic hepatitis delta virus infection. *HEPATOLOGY* 1990; 12(5), 1129-1133.
- (39) Goodman ZD, McNally PR, Davis DR, Ishak KG, Autoimmune cholangitis: variant of primary biliary cirrhosis. Clinicopathologic and serologic correlations in 200 cases. *Dig Dis Sci* 1995; 40(6), 1232-1242.

- (40) Whyte J, Hough D, Maddison PJ, McHugh NJ: The association of primary biliary cirrhosis and systemic sclerosis is not accounted for by cross reactivity between mitochondrial and centromere antigens. *J Autoimmun* 1994; 7(3), 413-424.
- (41) Moteki S, Yoshida H, Watanabe N, Sato K, Saito M: Antinuclear antibodies(ANA) in sera of aged subjects, with special reference to two cases with high titers of anticentromere antibody(ACA). *Rinsho Byori* 1991; 39(3), 273-277.
- (42) Bernstein RM, Callender ME, Neuberger JM, Hughes GR, Williams R: Anticentromere antibody in primary biliary cirrhosis. *Ann Rheum Dis* 1982 ; 41(6), 612-614.
- (43) Dorner T, Held C, Trebeljahr G, Lukowsky A, Yamaoto K, Hiepe F: Serologic characteristic in primary biliary cirrhosis associated with sicca syndrome. *Scand J Gastroenterol* 1994; 29(7), 655-660.
- (44) Shirai M, Watanabe S, Nishioka M: Autoantibody specific for transfer ribonucleic acid (Tran) in patients with autoimmune chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis. *Hepato-gastroenterology* 1991; 38(6), 543-546.
- (45) Maeda T, Loveland BE, Rowley MJ, Mackay IR: Autoantibody against dihydrolipoamide dehydrogenase, the E3 subunit of the 2-oxoacid dehydrogenase complex: significance for primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1991; 14(6), 994-999.
- (46) Lozano F, Pares A, Borche L, Plana M, Gallart T, Rodes J, Vives J: Autoantibodies against nuclear envelope-associated proteins in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1988; 8(4), 930-938.

- (47) Holyst MM, Hill DL, Hoch SO, Hoffman RW: Analysis of human T cell and B cell responses against U small nuclear ribonucleoprotein 70-kd, B, and polypeptides among patients with systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease. *Arthritis Rheum* 1997; 40(8), 1493-1503.
- (48) von Mikecz AH, Hemmerich Perter HH, Krawinkel U: Autoantigenic epitopes on eukaryotic L7. *Clin Exp Immunol* 1995; 100(2), 205-213.
- (49) Meyer O, Tauxe F, Fabregas D, Gabay C, Goycochea M, Haim T, Elias A, Kahn MF: Anti-RA antinuclear autoantibody in rheumatoid arthritis and mixed connective tissue disease: comparison with antikeratin and antiperinuclear antibodies. *Clin Exp Rheumatol* 1993; 11(5), 473-478.
- (50) Heilig B, Fiehn C, Brockhaus M, Gallati H, Pezzutto A, Hunstein W: Evaluation of soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors and TNF receptor antibodies in patients with systemic lupus erythematosus, progressive systemic sclerosis, and mixed connective tissue disease. *J Clin Immunol* 1993; 13(5), 321-328.
- (51) Deng JS, Fratto J, Elenitsas R: Antinuclear matrix antibody. Hidden antinuclear antibody in patients with connective tissue diseases. *Am J Clin Pathol* 1990 94(5), 606-612.
- (52) van Venrooij WJ, Wodzig KW, Habets WJ, de Rooij DJ, van de putte LB: Anti-56K: a novel, frequently occurring autoantibody specificity in connective tissue disease. *Clin Exp Rheumatol* 1989; 7(3) 277-282.
- (53) Komatireddy GY, Wang GS, Sharp GC, Hoffman RW: Antiphospholipid antibodies among anti-UI 70 Kda autoantibody positive patients with mixed connective tissue disease. *J Rheumatol* 1997; 24(2), 319-322.

- (54) Fox RI, Chan EK, Kang HI: Laboratory of patients with Sjogren's syndrome. *Clin Biochem* 1990; 25(3), 213-222.
- (55) Inagaki Y, Jinno Y, Hamasaki Y, Ueki H: Higher incidences of anti-SS-A/Ro and anti-SS-B/La autoantibodies in Japanese with autoimmune disorders—studies of antigens and antibodies using the immunoblotting method. *Arch Dermatol Res* 1989; 281(2), 89-94.
- (56) Osial TJ, Whiteside TL, Buckingham RB, Singh G, Barnes EL, Pierce JM, Rodnan GP: Clinical and serologic study Sjogren's syndrome in patients with progressive systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1983; 26(4), 500-508.
- (57) Szegedi A, Boros P, Chen J, Kaffina M, Bona C, Unkeless JC: An Fc gamma R III (CD16)-specific autoantibody from a patient with progressive systemic sclerosis. *Immunol Lett* 1993; 35(1), 69-76.
- (58) Boros P, Muryoi T, Spiera H, Bona C, Unkeless JC: Autoantibodies directed against different classes of Fc gamma R are found in sera of autoimmune patients. *J Immunol* 1993; 150(5), 2018-2024.
- (59) Lamour A, Le Corre R, Soubrane C, Khayat D, Youinou P: Anti-Fc gamma receptor autoantibodies from patients with Sjogren's syndrome do not react with native receptor on human polymorphonuclear leukocytes. *J Autoimmun* 1996; 9(2), 181-191.
- (60) White B: Immunologic aspects of scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 1995; 7(6), 541-545.
- (61) Okano Y, Steen VD, Medsger TA: Autoantibody to U3 nucleolar ribonucleoprotein (fibrillarin) in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1992; 35(1), 95-100.
- (62) Vazquez AD, Rothfield NF: Autoantibodies in systemic sclerosis. *Int Rev Immunol* 1995; 12(2-4), 145-157.

- (63) Lee B, Craft JE: Molecular structure and function of autoantigens in systemic sclerosis. *Int Rev Immunol* 1995; 12(2-4), 129-144.
- (64) Reveille JD, Durban E, Macleod SCMJ, Goldstein R, Moreda R, Altman RD, Arnett FC: Association of amino acid sequences in the HLA-DQB1 first domain with antitopoisomerase I autoantibody response in scleroderma (progressive systemic sclerosis). *J Clin Invest* 1992; 90(3), 973-980.
- (65) Harvey G, Black C, Maddison P, McHugh N: Characterization of antinucleolar antibody reactivity in patients with systemic sclerosis and their relatives. *J Rheumatol* 1997; 24(3), 477-484.
- (66) Okano Y, Steen VD, Medsger TA: Autoantibody reactive with RNA polymerase III in systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 1993; 119(10), 1005-1013.
- (67) Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Tojo T, Homma M: Autoantibody reactive with three classes of RNA polymerases in sera from patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest* 1993; 91 (4), 1399-1404.
- (68) Caramaschi P, Biasi D, Manzo T, Carletto A, Poli F, Bambara LM: Anticentromere antibody-clinical associations. A study of 44 patients. *Rheumatol Int* 1995; 14(6), 253-255.
- (69) McHugh NJ, Whyte J, Artlett C, Briggs DC, Stephens CO, Olsen NJ, Gusseva NG, Maddison PJ, Black CM, Welsh K: Anti-centromere antibodies (ACA) in systemic sclerosis patients and their relatives: a serological and HLA study. *Clin Exp Immunol* 1994; 96(2), 267-274.

- (70) McNeilage LJ, Whittingham S, McHugh N, Barnett AJ: A highly conserved 72000 dalton centromeric antigen reactive with autoantibodies from patients with progressive systemic sclerosis. *J Immunol* 1986; **137**(8), 2541-2547.
- (71) McCarty GA, Rice JR, Bembe ML, Barada FA: Anticentromere antibody. Clinical Correlations and association with favorable prognosis in patients with scleroderma variants. *Arthritis Rheum* 1983; **26**(1), 1-7.
- (72) Mimori T, Suganuma K, Tanami Y, Nojima T, Matsumura M, Fujii T, Yoshizawa T, Suzuki K, Akizuki M: Autoantibodies to calpastatin (an endogenous inhibitor for calcium-dependent neutral protease, calpain) in systemic rheumatic diseases. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 1995; **92**(16), 7267-7271.
- (73) Suzuki H, Takemura H, Yoshizaki K, Koishihara Y, Ohsugi Y, Okano A, Akiyama Y, Tojo T, Kishimoto T, Kashiwagi H: IL-6-anti-IL-6 autoantibody complexes with IL-6 activity in sera from some patients with systemic sclerosis. *J Immunol* 1994; **152**(2), 935-942.
- (74) Heilig B, Fiehn C, Brockhaus M, Gallati H, Pezzutto A, Hunstein W: Evaluation of soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors and TNF receptor antibodies in patients with systemic lupus erythematoses, progressive systemic sclerosis, and mixed connective tissue disease. *J Clin Immunol* 1993; **13**(5), 321-328.
- (75) Reitamo S, Remitz A, Varga J, Ceska M, Effenberger F, Jimenez S, Uitto J: Demonstration of interleukin 8 and autoantibodies to interleukin 8 in the serum of patients with systemic sclerosis and related disorders. *Arch Dermatol* 1993; **129**(2), 189-193.

- (76) Abe T, Yachi A, Ishii Y, Takeshima Y, Yonezawa K, Ishiboashi F, Tosaka M, Tanifuji J, Yoshida Y, Takano S, et al: An auto-  
psied case of progressive systemic sclerosis with anti Wa  
antibody who showed a rapid progression. *Ryumachi* 1992;  
32(5), 488-494.
- (77) Miyachi K, Takano S, Mimori T, Yamagata H, Mita S, Matsuoka Y,  
Irimajiri S, Tani K, Akizuki M, Homma M: A novel autoantibody  
reactive with a 48 kDa tRNA associated protein in patients  
with scleroderma. *J Rheumatol* 1991;18(3), 373-378.
- (78) Oddis CV, Okano Y, Rudert WA, Trucco M, Duquesnoy RJ, Medsger  
TA: Serum autoantibody to the nucleolar antigen PM-Scl.  
Clinical and immunogenetic associations. *Arthritis Rheum*  
1992; 35(10), 1211-1217.
- (79) Harigai M, Hara M, Takahashi N, Kitani A, Hirose T, Suzuki K,  
Kawakami M, Hidaka T, Kawaguchi Y, Ishizuka T, et al: Presence  
of autoantibodies to peptidylprolyl cistrans isomerase  
(cyclosporin A-binding protein) in systemic lupus erythe-  
matosus. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 63(1), 58-65.
- (80) Okano Y, Medsger TA: Autoantibody to Thibonucleoprotein  
(nucleolar 7-2 RNA protein particle) in patients with sys-  
temic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1990;33(12), 1822-1828.
- (81) Vivino FB, Maul GG: Histologic and electron microscopic  
characterization of the antiperinuclear factor antigen.  
*Arthritis Rheum* 1990; 33(7), 960-969.
- (82) Mahmud T, Peakman M, Senaldi G, McWhirter A, Black CM, Vergani  
D: 1990 Antireticulin antibody in systemic sclerosis. *Ann*  
*Rheum Dis* 1990; 49(3), 177-180.
- (83) Alderuccio F, Witherden D, Toh BH, Barnett A: Autoantibody  
to gp50, a glycoprotein shared in common between fibro-  
blasts and lymphocytes, in progressive systemic sclerosis.  
*Clin Exp Immunol* 1989 ; 78(1), 26-30.

- (84) Fregeau DR, Leung PS, Coppel RL, McNeilage LJ, Medsger TA, Gershwin ME: Autoantibodies to mitochondria in systemic sclerosis. Frequency and characterization using recombinant cloned autoantigen. *Arthritis Rheum* 1988; **31**(3), 386-392.
- (85) Alderuccio F, Toh SH, Barnett AJ, Pedersen JS: Identification and characterization of mitochondria autoantigens in progressive systemic sclerosis: identity with the 72000 dalton autoantigen in primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 1986; **137**(6), 1855-1859.
- (86) Yamauchi H, Iwamasa K, Yanagisawa K, Tamai T, Yasukawa M, Fujita S: Low titer cold agglutinin disease due to anti-HI antibody and a review of this disease in Japan. *Rinsho Ketsueki* 1995; **36**(4), 334-338.
- (87) Boros P, Muryoi T, Spiera H, Bona C, Unkeless JC: Autoantibodies directed against different classes of Fc gamma R are found in sera of autoimmune patients. *J Immunol* 1993; **150**(5), 2018-2024.
- (88) von Muhlen CA, Tan EM: Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995; **24**(5), 323-358.
- (89) Caramaschi P, Biasi D, Manzo T, Carletto A, Poli F, Bambrar LM: Anticentromer antibody-clinical associations. A study of 44 patients. *Rheumatol Int* 1995; **14**(6), 253-255.
- (90) Nishimori Y, Yamamoto Y, Okazaki K, Morita M, Onodera M, Kino J, Tamura S, Yamamoto Y: Identification of autoantibodies to a pancreatic antigen in patients with idiopathic chronic pancreatitis and Sjogren's syndrome. *Pancreas* 1994; **9**(3), 374-381.



- (91)Cai Y, Kitajima S, Etoh F, Kinoshita S, Okubo K, Hamasaki N: Autoantibody reactive with the human general transcription factor TFIIF in sera from patient with autoimmune disorders. *Clin Exp Immunol* 1997;109(3), 488-494.
- (92)Misaki Y, Pruijn GJ, van der Kemp AW, van Venrooij WJ: The 56K autoantigen is identical to human annexin XI *J Biol Chem* 1994; 269(6), 4240-4246.
- (93)Chen X, Sugai S, Nakasaki S, Ogawa Y, Takeshita S: Rheumatoid factor idiotypes in patients with Sjogren's syndrome. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 1966; 19(5), 468-476.
- (94)Terreri T, Niederhoff A, Zabel M, Blum U, Peter HH: Anticentriole antibodies and high neuron-specific enolase activity in a patient with Raynaud phenomenon, cerebrovascular lesions, and ischemic finger necrosis-afunctional. Relationship? *Immun Infekt* 1993; 21, 22-23.
- (95)Bischoff FR, Maier G, Tilz G, Ponstingl H: A 47-kDa human nuclear protein recognized by antikinetochore autoimmune sera is homologous with the protein encoded by RCC1, a gene implicated in onset of chromosome condensation. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 1990; 87(21), 8617-8621.
- (96)Borda IO, Meyer O, Cyna J, Haim T, Ryckewaert A: Determination of anti dsDNA antibodies by immunofluorescence using *Crithidia luciliae*. I--Diagnostic and prognostic value in systemic lupus erythematosus. Comparison with the farr radioimmunoassay. *Rev Rhum Mal Osteoar tic* 1984; 51(4), 185-191.
- (97)Nilson E, Biberfeld G: Demonstration of antibodies to double-stranded DNA by the *Crithidia luciliae* immunofluorescence test. *J Clin Lab Immunol* 1980; 3(3), 197-201.

- (98) Dong s, Geng JP Tong JH, Wu Y, Cai JR, Sun GL, Chen SR, Wang ZY, Larsen CJ, Berger R, et al. : Breakpoint cluster of the PML gene in acute promyelocytic leukemia primary structure of the reciprocal products of the PML-RARA gene in a patient with t(15;17). *Genes Chromosomes Cancer* 1993; 6(3), 133-139.
- (99) Dong s, Tong JH, Huang W, Chen SJ, Chen Z, Wang ZY, Geng JP, Qi: Molecular study on the chromosome 15 breakpoint in the translocation t ( 15;17 ) in acute promyelocytic leukemia ( APL ) . *Sci China B*.1993; 36(9), 1101-1109.