

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

提昇私校研發能量專案計畫-自體免疫疾病中心--子計畫
二: Systemic lupus erythematosus (SLE) 之
Transglutaminase 2 蛋白質表現對 Apoptosis 之影響
(3/3)

研究成果報告(完整版)

計畫類別：整合型
計畫編號：NSC 95-2745-B-040-007-URD
執行期間：95年08月01日至96年07月31日
執行單位：中山醫學大學免疫學研究所

計畫主持人：蔡嘉哲

計畫參與人員：博士班研究生-兼任助理：謝雨帆
碩士班研究生-兼任助理：郭懿瑩

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 96 年 08 月 28 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

提升私校研發能量專案計畫—自體免疫中心—子計畫: Systemic lupus erythematosus (SLE) 之 Transglutaminase 2 蛋白質表現對 Apoptosis 之影響

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫
計畫編號：NSC 93-2745-B-040-001-URD
執行期間： 93 年 08 月 01 日至 96 年 07 月 31 日

計畫主持人：蔡嘉哲
共同主持人：
計畫參與人員： 郭懿瑩 謝雨帆

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：
 赴國外出差或研習心得報告一份
 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢
 涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學免疫所

中 華 民 國 96 年 07 月 31 日

中文摘要

自體免疫疾病的致病機轉到目前為止仍然不是很清楚，而凋亡小體無法被正確的辨識及清除一直被認為是造成自體免疫疾病的主要原因。因此，研究自體抗原的產生以及分析影響吞噬作用及清除凋亡細胞的因子，是本實驗主要的研究動機。Transglutaminase 2 (TG2) 是一種多功能酵素，能連結催化仰賴鈣離子的反應而造成蛋白質轉譯後修飾，最近的研究發現，TG2 是參與細胞凋亡的一個重要成員，甚至影響巨噬細胞辨識及清除凋亡小體。

實驗中利用 UVB 1650 J/m² 照射人類角質細胞株 (HaCaT) 製備凋亡小體，觀察細胞形態，發現細胞質皺縮，細胞表面出現小泡 (blebs)，隨時間點增加細胞呈現懸浮態，由 DNA ladder 的實驗發現 UVB 1650 J/m² 作用 12 小時後，染色質出現 DNA 片段化現象，以流式細胞儀分析 UVB 作用後 24 小時發現有 56.2 % 細胞進行細胞凋亡。TG2 的 mRNA 則在 UVB 1650J/m² 處理後 1 小時減少，之後隨時間增加，在 12 小時達到最高點，於 24 小時後再度減少。進一步分析吞噬過程中巨噬細胞吞噬能力和 TG2 之表現，結果發現，吞噬螢光乳膠微珠 (latex-beads) 時吞噬指數 (phagocytosis index ; PI) 和吞噬指數 (phagocytosis ratio ; PR) 在各時間點皆小於 5 %，且 TG2 mRNA 無顯著差異；吞噬 apoptotic cells 時，phagocytosis index 於 4 小時達到最高 (PI=43.5%)，phagocytosis ratio 則隨著時間增加直到 6 小時 (PR=43.5%)，且 TG2 mRNA 於 4 小時達到最高點，顯示凋亡小體會刺激巨噬細胞中 TG2 的表現。Recombinant TGF- β (rTGF- β 1) 與吞噬作用關係，研究結果發現 (1) rTGF- β 1 於 0~20ng/ml 劑量下不會造成細胞凋亡，(2) rTGF- β 1 會增加巨噬細胞中 TG2 mRNA 表現，其表現並與 rTGF- β 1 劑量成正比 ($p < 0.05$)，(3) rTGF- β 1 的劑量會增加 phagocytosis ratio ($p < 0.05$)，但 rTGF- β 1 對於吞噬作用時 TG2 mRNA 的表現無顯著差異。我們的結論認為凋亡小體會刺激巨噬細胞中 TG2 的表現。另外 rTGF- β 1 可增加 TG2 的表現且增加 phagocytosis ratio，並可能抑制凋亡小體誘發 TG2 產生的生物功能，全身性紅斑性狼瘡的致病機轉可能是其巨噬細胞對 apoptotic cells 無反應，使得 TG2 沒有增加而吞噬能力下降，導致清除凋亡細胞的能力下降。

關鍵詞:紅斑性狼瘡，吞噬作用，第二型組織型轉麩胺酶

Abstract

The mechanism of autoimmune disease remains unclear. Moreover, the deficiency of phagocytic cells to recognize and clear apoptotic body is a main factor of the induction of autoimmune responses. Therefore, it becomes important to study the mechanism involved in the production, recognition and clearance of apoptotic cells. Transglutaminase 2 (TG2) is a multifunctional enzyme with the function of cross-linking Ca^{2+} -dependent reactions which result in post-translational modification of substrate proteins. Results from several independent laboratories indicated that TG2 plays a potential role in cell apoptosis and also in the clearance of apoptotic body. In this study, we investigated the role of TG2 in the clearance of apoptotic cells in RAW264.7. After keratinocytes were irradiated with UVB 1650 J/m², cell apoptosis was analyzed by light microscopy, DNA fragmentation and flow cytometry. We observed the structure of small surface blebs in keratinocytes, and condensation of nuclear chromatin. DNA fragmentation was observed at 12h and 24h after keratinocytes irradiation. The cells at sub-G1 phase (56.2%) were detected at 24h by FACS. After irradiation, TG2 mRNA level was declined at 1hr, and increased at later time points (6-12h), but was repressed after 12 h. In the experiment of phagocytosis, it was found that RAW264.7 had higher ability to ingest apoptotic cells than latex-beads. TG2 mRNA level was also higher in phagocytosis with apoptotic cells than with latex-beads. The roles between TGF- β 1 and TG2 expression in phagocytosis were also further studies. Our results showed that rTGF- β 1 did not induce apoptosis of RAW264.7 at concentration of 0-20 ng/ml, and rTGF- β 1 was able to increase the level of TG2 expression in a dose -dependent way in RAW264.7 cells. Overall, our results demonstrated that apoptotic cells and rTGF- β 1 could induce TG2 expression and increase phagocytosis with apoptotic cells in RAW264.7 cells. The defect response of apoptotic cells to phagocytic cells following impairment of phagocytosis and clearance of apoptotic cells may play a role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus.

Keywords: SLE, Phagocytosis, Tissue transglutaminase

前言

自體免疫疾病是由多種因素所造成，對於其致病機制仍然不是很清楚，例如全身性紅斑性狼瘡 (systemic lupus erythematosus; SLE)、類風濕性關節炎 (rheumatoid arthritis; RA)。全身性紅斑性狼瘡是一種常見自體免疫疾病，主要的特徵是病人會產生自體抗體 (autoantibody)，對抗自己細胞內的蛋白和酵素，而導致發炎和組織破壞的慢性多系統性疾病 (chronic multisystemic disease)，目前致病的原因仍不清楚 (Tan and Kunkel, 1966)，但可能與遺傳免疫缺陷、病毒感染、UV 及藥物有關 (Andrade et al., 2005; Huber et al., 2006; Skiba et al., 2005)。在臨床上，SLE 病人由於 B 細胞的過度活化 (B lymphocyte hyperactivity) 會產生大量的自體抗體，包括了 DNA 抗體，抗 Ro/La 抗體，抗 U1 和 Sm 抗體等，這些不同的抗體會辨認不同的細胞、器官和組織，造成免疫系統的破壞或是和自體抗原形成免疫複合物 (immune complex)，沉積在血管壁、關節或是腎臟中，進而引起免疫反應造成組織的損傷 (Haq and Isenberg, 2002)。近年來的研究發現，在 SLE 病人血液細胞中出現凋亡小體增加以及清除凋亡小體機制缺陷的現象可能是造成自體免疫反應的原因之一 (Emlen et al., 1994; Lorenz et al., 1997; Perniok et al., 1998)。因此，我們想進一步探討清除凋亡細胞方面的機制與 SLE 的關聯性。

一、細胞凋亡

細胞的死亡通常可透過細胞壞死 (necrosis) 或細胞凋亡 (apoptosis) 兩種方式進行。細胞壞死大多為急性且嚴重的傷害所造成，並導致細胞快速破裂而死亡，細胞破裂的過程中會釋放出一些有害的物質，引發壞死細胞周圍的鄰近細胞產生許多免疫反應的物質，造成發炎反應的發生。另外，細胞凋亡，又稱作細胞程序性死亡 (Programmed Cell Death; PCD) 則為一種有計畫性的細胞死亡模式，是調整生物體內控制生長與死亡之間平衡的重要機制，當啟動一連串的自我毀滅機制後，細胞會以形成凋亡小體 (apoptotic bodies) 的形式進行崩解，最後被周圍的細胞所吞噬，此過程不會釋放引發免疫反應的物質，細胞凋亡主要是由於組織中的單一細胞群受到外來的傷害或內在基因的調節，進而導致細胞在生化及型態上發生變化，主要是造成細胞骨架破壞，細胞皺縮 (cell shrinkage)、細胞質濃縮 (chromatin condensation)、核內 DNA 發生片段化 (fragmentation)、細胞膜形成水泡狀 (membrane blebbing)，最後細胞膜會將染色質碎片和胞器包裹成凋亡小體 (Casciola-Rosen et al., 1995; Savill et al., 2002)。

二、細胞凋亡與吞噬作用、抗原清除在自體免疫疾病中所扮演之角色

在細胞凋亡過程中，細胞會出現型態上的變化，首先是染色質凝集，細胞核崩解，最後細胞體積縮小，一部分細胞質和核碎片進入由膜包被的 apoptotic bodies 或 apoptotic blebs (Majno and Joris, 1995)。這些細胞凋亡 (Apoptosis) 過程中所產生的凋亡小體 (apoptotic body) 被認為可能是的自體抗原 (autoantigen) 的主要來源之一，過去的研究發現，在 apoptotic body 的表面上可以被偵測到自體抗原存在，因而認為這些原本存在於細胞核內的自體抗原，在細胞凋亡的過程中由細胞核內轉移至細胞表面，使細胞內容物有重新分配的現象，而這些 apoptotic body 無法被正確辨認和清除造成堆積在體內持續引起發炎反應，是造成自體免疫疾病的可能原因 (Casciola-Rosen et al., 1994; Eguchi, 2001; LeFeber et al.,

1984; Miranda et al., 1998; Plotz, 2003)。目前的研究顯示，在細胞凋亡的過程中，有些自體抗原會聚集並濃縮，或是經由重新排列而表現在凋亡小體的表面，例如，在凋亡的角質細胞可觀察到 52kDa 的 ribosomal 蛋白 Ro 聚集在內質網 (endoplasmic reticulum; ER) 中 (Rosen and Casciola-Rosen, 1999); 細胞凋亡的過程中，phosphatidylserine (PS) 會由細胞內翻出細胞膜外 (Li et al., 2003; Peng et al., 2005)，其中與 PS 結合的蛋白質，例如 β 2-glycoprotein-1 也是自體抗原的一種 (Casciola-Rosen et al., 1996; Koopman et al., 1994; Levine et al., 1999; Somersan and Bhardwaj, 2001)，除此之外，其他的自體抗原蛋白還包括了 La、Sm、U1-70kDa、nucleosome 等 (Deshmukh et al., 2003)。MRL *lpr/lpr* 老鼠常被用來作為研究 SLE 疾病的動物模式，由於調控凋亡作用的 Fas 基因缺陷，而有大量淋巴球增生的現象，同時具有 SLE 疾病的腎絲球腎炎症狀。在臨床上，由 SLE 病人所分離的周邊血液細胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cell ;PBMC) 被發現有細胞凋亡的現象，同時，細胞凋亡的速度與疾病嚴重程度也成正相關性 (Pitidhamabhorn et al., 2006)。另外，有研究指出，在 SLE 患者的體內有凋亡細胞堆積的情形，此現象同時也伴隨著巨噬細胞吞噬能力低下 (Herrmann et al., 2000)，而這些凋亡的細胞被認為可能是自體抗原的來源之一。

吞噬作用 (phagocytosis) 在正常人體內是一種抵抗外來病原菌的防衛機制，同時也是一種維持體內細胞恆定的機制，其中巨噬細胞 (macrophage) 在清除凋亡小體的過程扮演重要的角色。在吞噬過程中，細胞需要被活化，同時，透過接受體 (receptor) 和配體 (ligand) 之間的辨識，啟動下游的訊息傳遞路徑進而進行吞噬作用 (Tauber, 2003)，進一步釋放出抗發炎的細胞激素或因子，例如 IL-10、TGF- β 和 PGE2，以抑制發炎反應產生，並抑制 pro-inflammatory cytokines TNF- α 、GM-CSF、IL-12、IL-1 β 及 IL-18 等細胞激素的表現 (Chung et al., 2006; Fadok et al., 1998)。在 SLE 動物模式實驗和人體實驗中發現，患有 SLE 者之巨噬細胞 (macrophage) 和單核球 (monocyte) 均出現細胞凋亡增加的現象，凋亡的 macrophage 或 monocyte 會自體活化 CD4⁺ T cells，進而攻擊其他尚未進行吞噬的巨噬細胞，並促使自體抗體的產生 (Kaplan et al., 2002; Richardson et al., 1992)。SLE 病人的血清被發現會引起 macrophage 或 monocyte 的凋亡，但是，這些血清引起凋亡現象的原因目前並不清楚 (Bengtsson et al., 2004; Ren et al., 2003)。因此，研究自體抗原如何產生及表現，將有助於幫助診斷及治療自體免疫疾病。

三、組織型轉麩胺酶 tissue Transglutaminase (tTG)

轉麩胺酶族 (Transglutaminases) 是一群具有催化轉胺反應，造成蛋白的聚合 (crosslinking) 或多胺類的嵌入的酵素。組織型轉麩胺酶 tissue Transglutaminase (tTG)，又稱第二型轉麩胺酶 (Transglutaminase type 2, TG2 (E.C. 2.3.2.13))，是一種多功能的酵素，其分子量約為 80kD 左右，能在仰賴鈣離子的反應下催化轉胺反應，造成蛋白質轉譯後修飾作用，並具有 crosslinking 的特性，主要影響兩主要胺基酸，glutamine 和 lysine，它與其他型不同的地方在於 TG2 也扮演 GTPase 角色及具有 serine/threonine kinase 的活性，與訊息傳遞有關 (Fesus and Piacentini, 2002; Piacentini et al., 2005)；另外，第二型轉麩胺酶還能促進細胞的黏附及展開、移動、血管生成及細胞凋亡。細胞表面的 TG2 能促使細胞和細胞基質 (Matrix) 作用，幫助血管新生和傷口癒合；此外，細胞表面的 TG2，利用 anti-TG2 抗體處理，可抑制其活性並影響細胞附著的功能 (Verderio et al., 1998)；近年來的研究發現 TG2 是參與細胞凋亡及凋亡小體形成的潛在因子，在 TG2 缺陷的小鼠模式中發現，會有自體抗體的產

生和腎絲球腎炎等類似 SLE 的症狀，同時，伴隨有 TGF- β 分泌量和吞噬能力低下的現象 (Rose et al., 2006; Szondy et al., 2003)；其中，TGF- β 在整個吞噬過程中，由活化的巨噬細胞中釋出，並可能與 TG2 的調控相關，進而影響吞噬作用 (Nunes et al., 1997; Nunes et al., 1995)。此外，亦有文獻指出，TG2 的過度表現會促使細胞進行凋亡，反之如果將 TG2 的表現抑制則不會有凋亡現象出現 (Fesus and Szondy, 2005)。有文獻指出 TG2 也參與 monocyte 分化為 macrophage 的過程，macrophage 表面的 TG2 與其 adhesion 和 migration 有關 (Akimov and Belkin, 2001)。因此，透過了解巨噬細胞的功能及清除自體抗原與 TG2 的相關研究，將有助於我們對自體免疫疾病的了解。

研究目的

自體免疫疾病的致病機轉到目前為止仍然不是很清楚，所以我們將研究細胞凋亡及吞噬作用與自體免疫疾病致病的關係，研究方向則針對 transglutaminase 2 (TG2) 在清除凋亡細胞所扮演之角色探討。在 2003 年文獻中提出在 TG2^{-/-} 的老鼠，會有吞噬凋亡細胞的缺陷，並且發現脾臟腫大、自體抗體形成、免疫複合物沉積及腎絲球腎炎情形 (Szondy et al., 2003)。因此我們懷疑 TG2 與吞噬凋亡細胞的缺陷有密切關係，或是 TG2 是否受到其他因子調控 (例如：TGF- β)。基於這些推測，本研究從建立巨噬細胞之吞噬開始，再進一步進行清除凋亡小體的實驗，以探討細胞中 TG2 與 apoptosis 的關係及吞噬過程中的表現情形，希望能對 TG2 與清除機制有所了解。

實驗材料及方法

一、材料

1. 材料及藥品

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)、RPMI-1640 medium、胎牛血清 (fetal bovine serum, 簡稱 FBS)、0.25% Trypsin-EDTA 購自於美國 GIBCOBRL 公司；細胞培養皿由瑞士 TPP 公司購得；4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)、dimethyl sulfoxide (DMSO)、PKH26-PCL fluorescent cell linker kit、Latex-Beads (2 μ m) 購自 Sigma 公司；phenol (pH 8.0)、phenol/chloroform/isoamylalcohol [25:24:1] 購自 USB 公司；Trizol Reagent、glycogen 購自於 Invitrogen；Oligo(dT)15 primer (cat.C1101)、Recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor (cat.N2511)、GoTag (green mix)、M-MLV Reverse transcriptase 購自 Promega 公司、Recombinant human TGF- β 1 (cat. 240-B) 購自 R&D 公司。

2. 細胞株來源

HaCaT 人類角質細胞株由中山醫學大學附設醫院楊仁宏醫師所贈與。

二、方法

1. 細胞培養

人類角質細胞株 (HaCaT) 培養在含 10% FBS、1% PSA 抗生素 (penicillin/streptomycin/amphotericin B) 的 RPMI-1640 培養液中，在 37 °C、5 % CO₂ 培養箱培養。老鼠巨噬細胞株 (RAW264.7) 則培養在含 10% FBS、1% PSA 抗生素的 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; GIBCO-BRL) 培養液 (內含 3.7g/l sodium bicarbonate) 中貼壁生長，在 37 °C、5 % CO₂ 培養箱培養，平均每 2~3 天更換培養液，直到細胞長滿再進行次培養。

解凍細胞，首先取 5 ml 新鮮的細胞培養液，置於 15 ml 離心管中備用。接著將細胞自液態氮桶取出，迅速放到 37°C 水浴槽中快速回溫，當細胞呈現半溶狀態時，再將冷凍管移至無菌操作台中將細胞液取出，與 5 ml 新鮮的細胞培養液混合均勻，再放入離心機中以 1200 rpm 離心 5 分鐘，之後，去除上清液，用手指輕彈離心管均勻打散細胞，再加入 10 ml 新鮮的細胞培養液混合均勻，最後將細胞移至 10 公分細胞培養皿置於含 5 % CO₂ 的 37°C 恆溫培養箱內培養。

細胞分盤，首先將培養皿中舊的細胞培養液吸出，加入 3 ml 不含血清的細胞培養液清洗二次，然後將培養液吸出，加入 1 ml 的 1×0.25 % trypsin- EDTA，置於 37°C 恆溫培養箱中作用 1-2 分鐘，之後用手拍打培養皿側邊幫助細胞滑落，再以 2 ml 新鮮的細胞培養液中中和 trypsin- EDTA，以此方式將細胞移至 15 ml 離心管中，依所需的細胞密度經計數後種入 10 公分的細胞培養皿中培養。

冷凍細胞，首先將培養皿中舊的培養液抽乾，加入不含血清的培養液 3ml 清洗兩次，然後將培養液吸出，加入 1 ml 的 1×0.25 % trypsin- EDTA，置於 37°C 恆溫培養箱中作用 1-2 分鐘，之後用手拍打培養皿側邊幫助細胞滑落，利用新鮮培養液中和，移至 50ml 離心管，以 1200rpm 離心 5 分鐘，之後去除上清液，利用手指輕彈拍散細胞，加入 10ml 新鮮培養液均勻混合後取 1ml 作細胞計數，定量 2×10^6 個細胞/管，細胞液與 DMSO 以 9:1 比例快速混合分裝各 1.5ml 至每個冷凍管中，先將冷凍管移至 4 °C 20 分鐘，再到 -20 °C 1 小時，最後移至 -80 °C，隔天再取出移至液態氮筒中儲存，以確保細胞的完整性。

2. UVB 誘發細胞凋亡

將 HaCaT 細胞株定量 1×10^6 個細胞密度培養在 10 公分培養盤中，待細胞生長完全貼附培養皿時，抽掉培養液，加入剛好覆蓋細胞的 PBS 量 (約 3 ml)，利用 spectroline UV crosslinker 以能量 UVB 1650 J/m² 照射，完成後，抽乾 PBS，再加入 RPMI-1640 新鮮細胞培養液，置於 5% CO₂、37°C 恆溫培養箱中繼續培養 24 小時，收細胞進行之後的實驗。

3. DAPI 螢光染色

當細胞發生凋亡時，會發生細胞核內 DNA 斷裂的情形，而使 DNA 內 AT 序列的凹槽裸露外翻，DAPI 染劑可辨認 DNA 裡 AT 序列的凹槽並與之結合，吸收光波長為 345 nm，螢光波長為 455 nm，因此可藉由此方法，利用螢光顯微鏡觀察細胞凋亡的情形。將細胞以 2×10^5 個細胞密度種於 3 公分的細胞培養皿中培養 24 小時，之後利用 UVB 誘發細胞凋亡，收 1, 6, 12, 24 小時的細胞，以 1×PBS 清洗細胞三次，加入 1 ml 4% paraformaldehyde 將細胞固定 30 分鐘後，再以 1×PBS 清洗細胞三次，加入 1 ml 的 DAPI 染劑 (1μg/ml)，於避光條件下作用 1 分鐘，1 分鐘後再以 1×PBS 清洗細胞二次，即可利用螢光顯微鏡觀察細胞核外觀上的變化。

4. 細胞凋亡 DNA 片段化實驗

人類細胞株 (HaCaT) 細胞收集後加入 lysis buffer (20mM Tris, 10mM EDTA, 0.2% Triton X-100) 並在冰上 4°C 作用 10 分鐘, 離心 12000rpm 5 分鐘, 取上清液至 1.5ml 的 eppendorf, 再加入 12.5 μ l 的 proteinase K (25mg/ml) 於 50°C 作用 6 小時, 之後利用加入 10mg/ml RNase 於 37°C 處理隔夜, 加入等體積飽和的 phenol (pH 8.0) 離心 12000rpm, 5 分鐘後, 取上清液, 再加入等體積 phenol/chloroform/isoamylalcohol [25:24:1] 混合均勻, 再離心 12000rpm, 5 分鐘, 取上清液部份加入使最終體積為 5mg/ml 的 glycogen 和等體積的 isopropanol 均勻混合置於 -20°C 靜置隔夜, 沉澱萃取 DNA, 隔天離心 12000rpm, 15 分鐘, 去上清液部份, 沉澱物靜置室溫風乾, 溶於 8 μ l sample buffer 並加入 2 μ l dye, 最後利用 2% agarose gel 電泳分析。

5. 流式細胞儀分析

將 2×10^6 的細胞以 PBS wash 兩次, 用 0.5mM EDTA 使細胞脫離培養皿, 收集細胞, 並離心 3000rpm, 10 分鐘, 去上清液, 拍散再利用 70% 酒精固定液固定, 置於 4°C 處理 12-16 小時, 上機前去掉細胞固定液, 經 PBS wash 後在室溫下避光染 PI (40 μ g/ml) 30 分鐘, 最後利用流式細胞儀分析細胞 sub-G1 phase。

6. RNA 製備

主要是利用 Trizol 試劑 (Invitrogen) 來抽取細胞 RNA。RNA 分離自 HaCaT 細胞及 RAW 264.7 細胞, 分別為經由 UVB 處理誘發 HaCaT 細胞凋亡及進行吞噬實驗後的 RAW 264.7 細胞。首先將直徑 10 公分細胞培養皿上的細胞加入 1 ml 的 Trizol 試劑, 靜置 5 分鐘, 然後均勻作用後吸取至 1.5 ml 之 eppendorf 中, 並加入 200 μ l 的 chloroform, 馬上手搖均勻混合, 室溫下靜置 3 分鐘, 然後於 4°C 離心 14000rpm 15 分鐘, 輕輕吸取透明的液相層部分至新的 eppendorf 中, 加入 500 μ l isopropyl alcohol 後, 均勻混合約 15 秒, 室溫下作用 10 分鐘, 然後 4°C 離心 14000rpm 10 分鐘, 去上清液後加入 1 ml 的 75% 酒精, 然後於 4°C 離心 8000rpm 5 分鐘, 去上清液, 將沉澱物自然風乾。最後將抽取的 RNA 樣本溶於經 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 處理過的二次水並定量 RNA 濃度, 然後儲存於 -80°C 備用。RNA 定量方法為取 1 μ l RNA 加 999 μ l DEPC (稀釋倍數 1000 倍), 使用 ULTROSPEC II E 分光光譜分析儀 (Biochrom) 於 OD_{260/280} 波長下測其吸光值並求出 RNA 濃度。其定量 RNA 所運用的公式為: $\mu\text{g/ml RNA} = \text{吸光值 (OD}_{260\text{nm}}) \times 40\mu\text{g/ml} \times \text{稀釋倍數}$ 。

7. 反轉錄聚合酶反應 (Reverse transcription – Polymerase chain reaction ; RT-PCR)

所有的工作都必須要在完全為 RT-PCR 的乾淨環境下執行。將 RNA 轉為 cDNA 是利用 total RNA (2 μ g) 及 promega RT-PCR 試劑完成。取 2 μ g RNA, 加入 1 μ l 的 Oligo dT (500 μ g/ml) 及 4 μ l dNTP (2.5mM), 最後加入適量的 DEPC water 使總體積為 12 μ l, 置於 65°C 反應 5 分鐘, 接著置於 4°C 冰上, 於每一個反應加入 6 μ l 的 5 \times Buffer 及 1 μ l 的 RNase inhibitor, 輕輕做混合的動作, 再置於 37°C 反應 2 分鐘, 之後迅速的加入 1 μ l 的 M-MLV Reverse transcriptase, 讓最終反應體積為 20 μ l, 置於 PCR 儀器中反應, 37°C 作用 50 分鐘, 70°C 作用 15 分鐘。經上述 RT 過程得到 cDNA 產物, 取 1 μ l 進行 PCR 反應。反應試劑包括 10 \times

Buffer、dNTP、Taq polymerase (TaKaRa)、dd-H₂O 及 TG₂ 和 GAPDH 特異性引子 (生工有限公司)。

引子 (primers) 敘述如下, **Human TG₂**: forward primer: 5'-CTCGTGGA

GCCAGTTATCAACAGCTAC, reverse primer: 5'-TCTCGAAGTTCAC

CACCAGCTTGTG; **Mouse TG₂**: forward primer: 5'-TGATGACCGGG

AGGACATCA, reverse primer: 5'-GATTCTCCAGGTAGAGATCTC; **Human GAPDH**: forward primer: 5'-CATGTTTCGTCATGGGTGTGA,

reverse primer: 5'-AGTGAGCTTCCCGTTCAGCT; **Mouse GAPDH**: forward primer: 5'-TCACTCAAGATTGTCAGCAA, reverse primer: 5'-A

GATCCACGACGGACACATT。PCR 反應的條件如下: 94°C 5 分鐘、54°C 1 分鐘、72°C 2 分鐘, 94°C 45 秒、58°C 45 秒、72°C 1 分鐘, 重複 28 圈 (cycle), 94°C 2 分鐘、54°C 1 分鐘、72°C 5 分鐘、最後停留於 4°C, PCR 的結果以 2% agarose gel 之電泳分析。

8. 凋亡細胞染色及螢光顯微鏡觀察

取 100 μ l PKH26 dye (1×10^{-3} M) 與 900 μ l absolute ethanol 均勻混合, 成為 1ml (100 μ M) 的 working stock dye solution, 避光備用。進行細胞染色前與 4ml diluent B 混合成為 5ml (20 μ M) 的 working solution。利用 PKH26-PCL 與細胞膜結合的特性, 收集凋亡細胞至 15ml 離心管中, 離心去上清液, 加入每 1×10^6 細胞數為 100 μ l (20 μ M) 的 PKH26 working solution, 均勻混合, 避光作用 10 分鐘, 之後加入等量含血清的細胞培養液中和染劑作用, 離心去上清液, 利用不含血清的細胞培養液清洗 3 次, 觀察沉澱物呈現淡粉紅色。凋亡細胞經染色後於螢光顯微鏡下觀察可見 PKH26-PCL 染上凋亡細胞之細胞膜的部分呈現紅色螢光。

9. 吞噬實驗

將老鼠巨噬細胞 (RAW 264.7) 以 5×10^5 個細胞密度培養在六公分培養皿內, 於 37°C 培養箱中培養至少 18 個小時直到細胞長至八分滿, 以不含血清的培養液沖洗三次, 之後將經由 PKH26-PCL 染色的凋亡細胞以 10:1 的比例加入與巨噬細胞共同培養, 置於 37°C、5% CO₂ 培養箱培養 1, 2, 4, 6 個小時, 收集各時間點, 以冰的 1x PBS 清洗三次, 清洗掉未被吞噬的凋亡細胞, 之後以顯微鏡觀察吞噬情況。

10. 吞噬指數 (phagocytosis index) 與吞噬比例 (phagocytosis ratio)

利用光學及螢光顯微鏡觀察, 平均觀察兩百倍下約六至十個視野, 統計巨噬細胞的吞噬能力, 主要分成兩種, phagocytosis index 是指計算視野中平均每一百顆巨噬細胞中有幾顆凋亡小體結合到巨噬細胞上 [公式 = (有結合的凋亡小體數量 / 巨噬細胞數量) \times 100%]; phagocytosis ratio 是指計算視野中每一百顆巨噬細胞中, 有幾顆是具有吞噬能力的 [公式 = (有結合凋亡小體的巨噬細胞數量 / 視野下巨噬細胞數量) \times 100%]。

11. Recombinant Human TGF- β 1 的製備

先製備溶於 H₂O 中濃度調為 2mg/ml 的 BSA 及 8mM HCl, 兩者以 1:1 比例均勻混合, 以 0.2 μ m filter 過濾, 取得 1ml 加入 2 μ g TGF- β 1 中, 得到 2 μ g/ml (2ng/ μ l) recombinant human TGF- β 1, 均勻混合並分裝凍於 -80°C 保存備用。

實驗結果

一、UVB 能量 1650 J/m^2 照射誘發細胞凋亡

自體免疫疾病的發生原因可能與遺傳因子、病毒感染或是與環境因子有關，其中環境因子部份則包括紫外線輻射、X 輻射線、壓力、成長因素... 等等，因此，我們選用紫外線輻射來探討其紫外線能量對人類角質細胞株所造成的影響。在 Casciola-Rosen 等人於 1994 年發表的論文中提出，經實驗證實利用 UVB 1650 J/m^2 的能量條件下處理 keratinocyte 達 6 個小時可使細胞凋亡。因此依照此條件下，我們想進一步探討在不同的時間點經由 UVB 1650 J/m^2 處理人類角質細胞 (HaCaT) 之細胞型態的變化 (如圖一 a)。圖一 a 中分別代表不同時間點 (0, 1, 6, 12, 24 小時) 下，在光學顯微鏡所觀察到的不同型態變化。控制組為正常人類角質細胞顯微鏡下的形態；接著為 UVB 處理後一個小時，在光學顯微鏡下可發現少數細胞，其細胞質部份開始皺縮，細胞膜開始呈現凹凸的水泡狀，並出現許多位在細胞表面的小泡 (blebs)；而 UVB 處理後六個小時，在光學顯微鏡下可發現細胞質皺縮的比例增加，在細胞表面的小泡增加的同時，細胞脫離培養皿，呈現懸浮型態；UVB 處理十二個小時後，在光學顯微鏡下發現細胞出現表面小泡的比例增加，並且脫離培養皿呈現懸浮型態的細胞增加約為細胞經 UVB 處理後六個小時的 2~3 倍量；最後為 UVB 處理後二十四小時的細胞型態，發現約有百分之六十到百分之七十比例的細胞呈現懸浮型態，而依舊貼附的細胞則皆呈現細胞皺縮的現象。由以上結果可發現人類角質細胞在受到 UVB 1650 J/m^2 能量照射下，隨著時間點的增加，看到凋亡小體 (apoptotic body) 的比例也隨之增加。

由於人類角質細胞在 UVB 照射下細胞型態有明顯的改變，呈現凋亡小體的型態，於是我們便想進一步看看細胞凋亡 (apoptosis) 的情形。我們首先選用 DNA 片段化 (DNA ladder) 的方式來鑑定細胞凋亡的情形，當細胞接收到死亡訊息時，會引起 DNA 內切酵素的產生，染色質 DNA 因 DNA 內切酵素的作用會將本身的 DNA 分解，造成所謂 DNA fragmentation 的現象。這個實驗中我們選用了兩種細胞株，包括人類角質細胞株 (HaCaT) 及人類子宮頸癌上皮細胞株 (HeLa)，實驗中以 HeLa cells 作為實驗的對照組。人類角質細胞和子宮頸癌上皮細胞皆使用 UVB 1650 J/m^2 能量照射，分別收集正常人類角質細胞及 UVB 1650 J/m^2 照射後 1、6、12、24 小時的細胞，進行 DNA fragmentation 實驗，同時與正常人類子宮頸癌細胞及相同 UVB 能量照射後 3、6、9 小時的細胞作比較 (如圖一 b)。實驗結果敘述如下：圖一 b 中左圖為 HeLa cells 在各時間下收集細胞所觀察到 DNA fragmentation 情形，結果發現在 3、6、9 小時皆能出現明顯的 DNA 片段化現象；圖一 b 右圖表示 HaCaT cells 在不同時間下觀察到的 DNA fragmentation 情形，結果發現在 12 及 24 小時出現明顯的 DNA 片段化現象。

進一步我們也利用流式細胞儀分析 HaCaT 細胞經 UVB 照射後 sub-G1 phase 的變化。人類角質細胞株 (HaCaT) 藉由 UVB 照射誘發細胞凋亡，照射後的細胞經 24 小時培養後，收集細胞並利用 PI 染色，以分析 sub-G1 phase 的比例，與正常未經照射的正常細胞株作比較 (如圖一 c)。由圖一 c 結果發現，正常細胞與經由 UVB 1650 J/m^2 照射下繼續培養 24 小時的細胞比較，分別為 3.53 % 及 56.2 %。實驗證明，在經過 UVB 1650 J/m^2 照射誘發細胞凋亡，並繼續培養 24 小時的人類角質細胞 sub-G1 phase 的比例較高 (56.2%)，而正常細胞 (控制組) 的 sub-G1 phase 比例則表現小於 5%，因此發現利用 UVB 1650 J/m^2 照射人類角

質細胞株確實會引起細胞凋亡的產生。

二、分析人類角質細胞株經 UVB 照射引起細胞凋亡，其細胞之 TG2 mRNA 的表現

在 2005 年 Fesus, L. 等人所發表的文獻曾提出 TG2 會參與細胞凋亡的過程並同時也具有平衡細胞死亡及存活的作用。另外在 2004 年 Dong-Myung Shin 等人的文獻中也研究細胞在受到紫外線的照射後，會影響 TG2 的酵素活性表現上升(Shin et al., 2004)。因此讓我們進一步想了解在人類角質細胞凋亡的過程中，細胞之 TG2 mRNA 的表現。實驗中，細胞在受到 UVB 的照射之後，依序收集培養 1、6、12、24 小時細胞的 RNA，藉由 RT-PCR 分析在各個時間點 TG2 mRNA 的表現（如圖二），TG2 在正常人類角質細胞株（HaCaT）具有固定的表現量，經 UVB 照射後再培養一個小時，發現細胞之 TG2 表現量明顯下降，接著 TG2 mRNA 表現量隨著培養時間點增加而增加，一直到十二個小時 TG2 表現量達到最高，之後開始下降。另外也觀察 TGF- β 的變化，在經 UVB 照射後再培養一個小時，TGF- β 的表現下降，接著在六小時增加，之後下降。

三、觀察經 UVB 1650J/m² 照射人類角質細胞後之上清液對巨噬細胞型態的影響及巨噬細胞中 TG2 mRNA 的表現

想了解巨噬細胞在進行吞噬作用的過程中 TG2 表現是否受到人類角質細胞經 UVB 照射後，再培養 24 小時的上清液影響，我們收集經 UVB 照射後細胞進行凋亡的上清液，及正常細胞培養液 (DMEM, 含 10%FBS)，分別與巨噬細胞株 (RAW264.7) 共同培養 4 小時，觀察 RAW264.7 的細胞型態及細胞中 TG2 mRNA 的表現，圖三 a 為細胞與正常細胞培養液共同培養之細胞型態，圖三 b 為與 supernatant 共同培養之細胞型態，觀察發現細胞在 supernatant 的培養下 4 小時後比與正常細胞培養液 (DMEM, 含 10%FBS) 的細胞較為活化，細胞型態出現明顯的突觸狀外觀並與要進行吞噬作用的巨噬細胞相似。進一步利用 RT-PCR 分析這兩種情形下，RAW264.7 細胞中 TG2 mRNA 的表現，定量分析後發現以 supernatant 培養的細胞中 TG2 mRNA 的表現與使用正常細胞培養液 (DMEM, 含 10%FBS) 的相比較無顯著差異(如圖三 c)。

四、利用螢光顯微鏡觀察老鼠巨噬細胞株(RAW264.7) 吞噬 Latex-Beads 及凋亡細胞的情形及吞噬能力

我們利用老鼠巨噬細胞株 (RAW264.7) 進行吞噬的實驗。我們將實驗分成兩組，一組為吞噬螢光 latex-beads，另一組為吞噬經 UVB 照射產生之凋亡細胞，利用吞噬螢光 latex-beads 作為正控制組，以判斷分化完成的巨噬細胞具有吞噬能力。實驗過程中，我們將經過 UVB 照射後的細胞先在細胞培養箱內培養二十四小時之後，再與分化完成的巨噬細胞共同培養進行吞噬作用，並於螢光顯微鏡下觀察。圖四同時分析老鼠巨噬細胞株 (RAW264.7) 在進行吞噬 latex-beads 及凋亡細胞之能力，利用商業購買的 latex-beads 與老鼠巨噬細胞 (RAW264.7) 作共同培養，觀察不同時間點巨噬細胞的吞噬能力。觀察前先將未結合上的多餘 beads 洗掉，避免顯微鏡下觀察的誤差，利用螢光顯微鏡與光學顯微鏡，觀察老鼠巨噬細胞株吞噬 latex-beads 的情形，螢光顯微鏡下的 latex-beads 呈現綠色螢光，計算顯微鏡下平均 100 顆巨噬細胞能吞噬或結合上多少數量的 latex-beads，此稱為 phagocytosis index，另外也計算具有吞噬能力的巨噬細胞所佔的比例，稱為 phagocytosis

ratio，在圖四(a)中，phagocytosis index 依時間點吞噬能力如下：1 小時 (0.35%)，2 小時 (1.75%)，4 小時 (2.95%)，6 小時 (3.05%)； phagocytosis ratio 依時間點計算具吞噬能力的巨噬細胞比例如下：1 小時 (0.35%)，2 小時 (1.75%)，4 小時 (2.95%)，6 小時 (3.05%)。另外也計算吞噬凋亡小體之能力，實驗中利用 PKH26-PCL 染凋亡的人類角質細胞 (HaCaT)，與老鼠巨噬細胞株 (RAW264.7) 作共同培養，觀察不同時間點老鼠巨噬細胞的吞噬能力。觀察前先將未結合上的凋亡細胞用 PBS 清洗兩次，避免顯微鏡下觀察的誤差，利用螢光顯微鏡與光學顯微鏡，觀察巨噬細胞吞噬的情形，經 PKH26-PCL 染色的 HaCaT 呈現紅色螢光，RAW264.7 則是不染色，計算顯微鏡下平均 100 顆巨噬細胞能吞噬或結合上多少量的凋亡細胞，即稱之為 phagocytosis index；另外計算顯微鏡下平均 100 顆巨噬細胞中有幾顆巨噬細胞是具有吞噬能力的，稱之為 phagocytosis ratio。圖四(b)為吞噬凋亡細胞的 phagocytosis index 及 phagocytosis ratio，0 小時為不進行吞噬的細胞，結果發現依序各個吞噬的時間，其 phagocytosis index 分別為：1 小時 (12.5%)、2 小時 (17.7%)、4 小時 (43.5%)、6 小時 (43.2%)；而計算吞噬凋亡細胞的 phagocytosis ratio，具吞噬能力的巨噬細胞比例分別為：1 小時 (12.6%)、2 小時 (17.1%)、4 小時 (37.1%)、6 小時 (43.5%)，由 phagocytosis index 來看，吞噬 1 小時到 4 小時，吞噬凋亡細胞的數量隨著吞噬作用的時間增加而增加，4 小時達到最高點 (43.5%)，在六小時 (43.2%) 則看到比例不再明顯增加。而在計算 phagocytosis ratio 則在開始進行吞噬作用 1 小時到 6 小時階段，吞噬能力與時間成正比。

五、以 RT-PCR 分析老鼠巨噬細胞株 (RAW264.7) 吞噬 latex-beads 及凋亡小體時，巨噬細胞之 TG2 mRNA 的表現

在文獻中有提到 TG2 是一個多功能性的蛋白質，除了與細胞凋亡有相關外，也跟吞噬的過程有密切關係，根據 Zsuzsa Szondy 等人在 2003 年論文中即指出在 TG2^{-/-}老鼠中發現清除凋亡細胞功能的缺陷。因此我們也想進一步探討 TG2 mRNA 在吞噬過程中的變化，首先我們利用老鼠巨噬細胞進行吞噬商業購買的 latex-beads，實驗過程中，先將 latex-beads 與預先定量分盤並且分化完全的老鼠細胞株 (RAW264.7) 以 10:1 的比例進行共同培養，依序收集吞噬 1、2、4、6 小時的細胞，使用 PBS 洗掉未結合的多餘 latex-beads，之後萃取 RNA，以老鼠巨噬細胞特異性的 TG2 引子，利用 RT-PCR 分析 TG2 mRNA 在這些時間點表現的情形 (如圖五 a、b)，由圖四中發現，收集各個吞噬 latex-beads 的時間點，TG2 mRNA 的變化量沒有顯著差異。同時進行分析在吞噬凋亡小體時，巨噬細胞中之 TG2 mRNA 的表現，將 UVB 照射後的人類角質細胞培養 24 小時，收集全部凋亡細胞與預先定量分盤且已分化完全的老鼠巨噬細胞兩者以 10:1 的比例共同培養進行吞噬作用，依序收集吞噬 1、2、4、6 小時的細胞，收細胞前先將未結合上的凋亡細胞經 PBS 洗掉，再萃取 RNA，以老鼠特異性的 TG2 引子，利用 RT-PCR 分析 TG2 mRNA 在這些時間點的表現。由圖五中，進行吞噬作用的電泳膠圖分析發現，隨著吞噬作用的時間增加，TG2 mRNA 的表現量也增加且與時間成正比關係，一直到 4 小時，TG2 mRNA 的表現達到高峰，隨後開始下降。

六、分析老鼠巨噬細胞株在經由不同劑量的重組型 TGF-β1 處理下對細胞的影響

首先我們想知道重組型的 TGF-β1 是否會造成細胞凋亡現象，先將老鼠巨噬細胞株 (RAW264.7) 處理不同濃度的重組性 TGF-β1，劑量分別為 2ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、

20ng/ml，分別培養 4 小時及 6 小時後收集細胞，利用流式細胞儀分析 RAW264.7 經不同劑量重組性 TGF- β 1 處理後 sub-G1 phase 的變化 (如圖六 a)。不同劑量的重組型 TGF- β 1 培養 4 小時，sub-G1 phase 的比例分別如下：控制組 (0.06%)、2ng/ml (2.43%)、5ng/ml (2.85%)、10ng/ml (2.79%)、20ng/ml (2.07%)；另外培養 6 小時的 sub-G1 phase 的比例分別如下：控制組 (1.75%)、2ng/ml (2.14%)、5ng/ml (2.17%)、10ng/ml (2.13%)、20ng/ml (2.85%)。由數據中表示，RAW264.7 在經由不同劑量重組型 TGF- β 1 的刺激後，這些劑量均沒有造成顯著的細胞凋亡現象 (sub-G1 < 5.0%)，確定了重組型 TGF- β 1 對巨噬細胞不會造成凋亡現象，進一步利用不同劑量的重組型 TGF- β 1 處理後，觀察重組型 TGF- β 1 對巨噬細胞的吞噬能力及 TG2 mRNA 的表現，將老鼠巨噬細胞株 (RAW264.7) 經由不同劑量的重組型 TGF- β 1 (2ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml) 的刺激後進行吞噬凋亡小體，想觀察其對巨噬細胞的吞噬能力的影響，收集吞噬作用 4 小時的細胞，經顯微鏡觀察並計算 phagocytosis index 及 phagocytosis ratio (如圖六 b)。phagocytosis index 在不同劑量的重組型 TGF- β 1 的處理下，分別為控制組 (122.59%)、2ng/ml (123.20%)、5ng/ml (126.99%)、10ng/ml (119.13%)、20ng/ml (146.46%)；另外 phagocytosis ratio 在不同劑量的重組型 TGF- β 1 的處理下，分別為控制組 (78.34%)、2ng/ml (80.38%)、5ng/ml (82.15%)、10ng/ml (86.17%)、20ng/ml (90.78%)。隨著 TGF- β 1 劑量的增加發現影響 phagocytosis ratio，對於 phagocytosis index 的影響則不大(如圖六 b)；另外，實驗中發現重組型 TGF- β 1 會影響未進行吞噬作用的巨噬細胞中 TG2 mRNA 的表現，且 TG2 mRNA 表現量與劑量 (2ng/ml ~ 10ng/ml) 成正比，在同樣劑量的影響下進行吞噬作用，發現 TG2 mRNA 有相同的表現趨勢，與劑量 (2ng/ml ~ 10ng/ml) 成正比。

討論

在我們的實驗中明顯的觀察到在 UVB 1650J/m² 能量照射下能使細胞型態的改變，典型的細胞骨架破壞，出現細胞皺縮 (cell shrinkage)、細胞質濃縮 (chromatin condensation)、核內 DNA 發生片段化 (fragmentation)、細胞膜形成水泡狀 (membrane blebbing) 的型態，與過去文獻中提到的人類角質細胞凋亡型態有相同的現象(Casciola-Rosen et al., 1994)。根據之前許多文獻中就曾經提出關於 UVB 的照射之下，會造成人類角質細胞的損傷及會產生許多體內自體抗原 (例如: Ro、La) 的表現，這些外在刺激下產生的自體抗原，往往是造成免疫系統中無法持續維持自身耐受性而造成疾病發生的主因(Furukawa, 1999; Reefman et al., 2006)，我們的實驗中就利用這樣的因素進一步想探討 UVB 1650J/m² 照射角質細胞而造成細胞凋亡的情形，另外，我們進一步的利用 UVB 1650J/m² 固定能量下，對不同的細胞株給予刺激，由我們的實驗中也得到證實，人類角質細胞株 (HaCaT) 與人類子宮頸癌上皮細胞株 (HeLa) 以同樣的 UVB 1650J/m² 能量刺激下，人類角質細胞對 UVB 1650J/m² 的抗性較強，我們收集 24 小時後的人類角質細胞進行後續的吞噬實驗，我們認為在不同的細胞對於所能承受或抵抗細胞凋亡的時間各有差異性。

過去 Zsuzsa Szondy 等人於 1997 年文獻中提出，在細胞凋亡的過程中，TG2 可能具有可穩定 apoptotic cell 結構的功能直到巨噬細胞進行吞噬作用(Szondy et al., 1997)。另外，TG2 過去也被認為可能與細胞外基質或細胞與細胞之間接觸相關(Akimov et al., 2000; Verderio et al., 2003)，因此，我們的實驗結果中 (如圖二)，人類角質細胞株為貼壁生長型的細胞株，在這情況下，TG2 mRNA 在貼壁生長型的人類角質細胞株具有高度表現量，隨後在當細胞

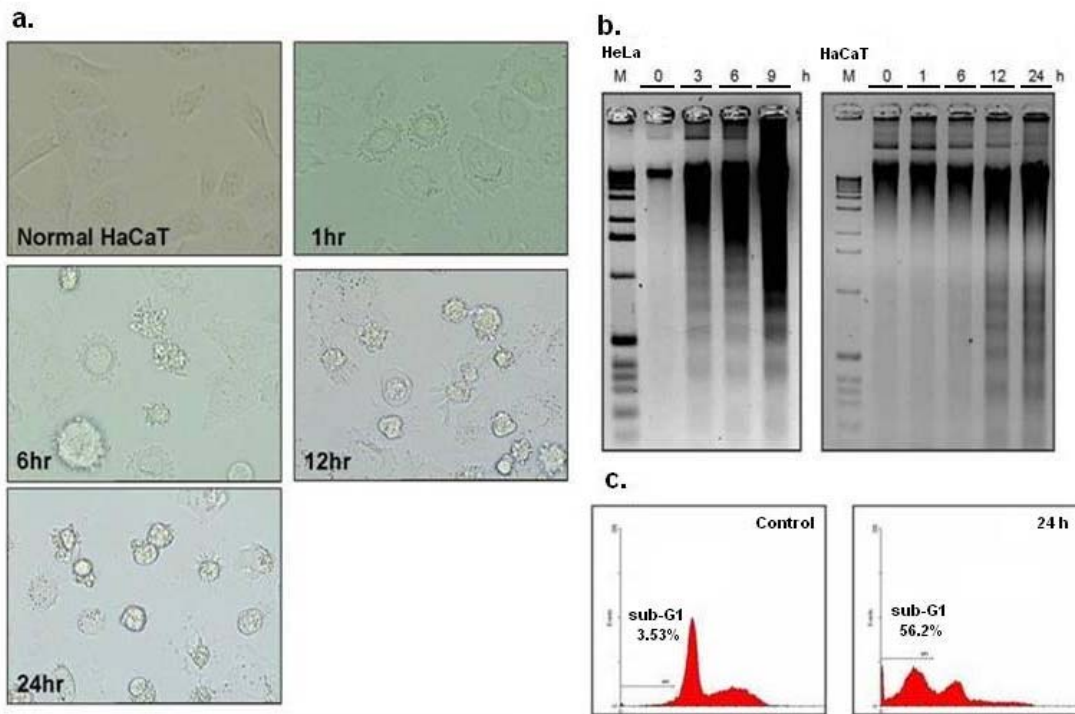
受到 UVB 1650J/m² 的刺激下，細胞受到外力的刺激，細胞與細胞之間的接觸被破壞，細胞型態改變，使 TG2 表現量下降。細胞受到 UVB 1650J/m² 照射造成細胞凋亡的過程中，可能因為 TG2 具有保護且穩定細胞結構的功能，直到凋亡小體被吞噬，所以我們觀察 1 小時到 12 小時的細胞表現 TG2 mRNA 呈現持續增加的趨勢，也意味著 TG2 mRNA 在細胞進行凋亡的過程中與調控細胞凋亡的機制有關聯性。接著在經 UVB 照射後再培養十二個小時，發現細胞之 TG2 表現量明顯下降，相似情形於 1997 年 FEBS 中有被提出，經輻射線處理讓細胞進行細胞凋亡的過程中，收集 0、6、12、24、48 小時的細胞，利用西方墨點法分析 TG2 蛋白質的表現，0 小時到 24 小時過程中表現持續增加，在 24 小時達最高點之後表現下降。在 Laszlo Fesus 及 Zsuzsa Szondy 於 2005 年文獻中也提到 TG2 被證實影響細胞的黏附、移動、存活以及細胞外基質的平衡，TG2 為一具多功能之分子，可催化蛋白質的 cross-linking，並具有 G-protein、蛋白質激酶和 protein disulphide isomerase 的活性，由我們的實驗結果中推想當細胞未能即時受到清除吞噬之下，且細胞持續進行 apoptosis 過程，角質細胞脫離培養皿，觀察到在細胞經 UVB 1650J/m² 照射後的 24 小時，TG2 的表現觀察到下降的情形，我們認為是細胞大量脫離培養皿時改變了本來的細胞黏附及展開的功能，在 TG2 mRNA 的變化我們認為可能與這些現象有密切的關係。

在吞噬的實驗中，我們觀察到細胞吞噬 latex-beads 與吞噬凋亡小體有明顯的不同，不論在吞噬能力上的比例（圖四）或 TG2 mRNA 的表現量上（圖五），都是在吞噬凋亡小體時表現較明顯，比例也較高，我們推想這些現象，認為 latex-beads 為帶有 FITC 的螢光乳膠粒子，其表面上不帶有任何與凋亡小體相同的“eat-me”訊號，在吞噬過程的辨識上多為隨機的進行吞噬。我們也由 RT-PCR 中分析，更進一步解釋巨噬細胞中的 TG2 mRNA 表現是屬於專一性對於吞噬凋亡細胞時才有顯著變化，實驗結果認為 TG2 mRNA 在吞噬凋亡小體的過程中確實有扮演重要的角色，現今研究在吞噬作用的過程，巨噬細胞對於凋亡小體的進入是會影響 TG2 的表現，而對於 latex-beads 的進入則無影響，推想可能是凋亡小體能刺激巨噬細胞中 TG2 mRNA 的表現增加，在過去文獻中也曾指出利用具野生型 TG2 的巨噬細胞及 TG2^{-/-}的巨噬細胞，進行吞噬野生型的凋亡小體及 TG2^{-/-}的凋亡小體，觀察發現當巨噬細胞中的 TG2 有缺陷時，其吞噬凋亡小體的能力顯著下降，相同情況下，TG2 有缺陷的巨噬細胞在吞噬 *L. monocytogenes*、*S. cerevisiae* 則不受到影響(Szondy et al., 2003)，更強調凋亡小體的清除與 TG2 表現有著密切的關係。

另一方面，在近幾年來的文獻中，提到 TG2 在許多清除功能有缺失而造成的疾病中扮演調控角色，利用 TG2^{-/-}老鼠的模式與正常表現 TG2 的老鼠做比較，證實 TG2^{-/-}老鼠有較嚴重的嗜中性球堆積，被認為可能是在發炎過程中，apoptotic neutrophils 的清除受到延遲的緣故，也討論到 TGF-β 與 TG2 的調控，實驗過程中發現利用外在重組的 TG2 可幫助 TGF-β 協助凋亡細胞被吞噬，但是過程中是不需要 TG2 的 transamidation activity，且外加 anti-TGF-β 則是會造成吞噬能力的下降(Rose et al., 2006)，由文獻中發現 TG2 功能的多元性，更是我們最想釐清的部份，根據過去文獻的指出，在我們的實驗中也直接外加重組型的 TGF-β1，希望釐清 TGF-β1 與 TG2 之間調控的關係，實驗中發現外加重組型的 TGF-β1 可以增加吞噬的能力，這與過去文獻中提出的外加 anti-TGF-β 則是會造成吞噬能力的下降有相呼應，但我們更進一步將吞噬能力分成兩大部分，即 phagocytosis index 及 phagocytosis ratio，結果中指出外加不同劑量重組型的 TGF-β1 對於 phagocytosis index 的影響不大，沒有顯著差異，但對於 phagocytosis ratio 則是呈現與劑量成正比情形（圖六），我們進而推測外加重組型的

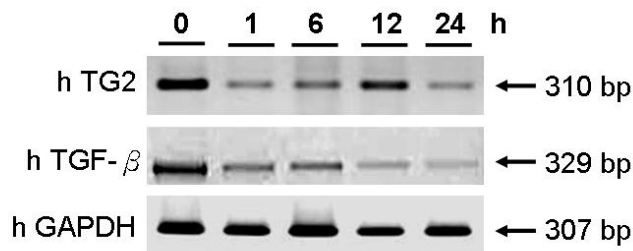
TGF- β 1 是影響巨噬細胞本身的調控，進而增加具有吞噬能力的巨噬細胞比例。進一步希望了解外加重組型的 TGF- β 1，不同劑量是否也同時影響巨噬細胞中 TG2 mRNA 表現，實驗結果可看出巨噬細胞中 TG2 mRNA 的表現有出現與外加 TGF- β 1 劑量成正比的情形，但若是同時也進行吞噬作用的情形下，與單獨巨噬細胞相比較下，吞噬作用的有無之間，其兩者的 TG2 mRNA 表現無顯著差異 (圖六)。由這些實驗數據中顯示外加 rTGF- β 1 劑量是能改變吞噬能力並影響 TG2 mRNA 的表現，但這些改變可能是因為巨噬細胞的功能受到影響，加強了巨噬細胞原本的吞噬功能;另一方面，在吞噬作用中加入 rTGF- β 1 觀察 TG2 的變化與只加 rTGF- β 1 的巨噬細胞中 TG2 相比較，兩組別之間無顯著差異，猜想 rTGF- β 1 可能抑制凋亡細胞誘發 TG2 產生的生物機能。透過實驗了解了 TGF- β 1 與 TG2 是與吞噬能力有相關聯的情形，更在研究中認為凋亡細胞可刺激巨噬細胞中 TG2 mRNA 表現增加，並使吞噬能力增加，推想在臨床上的全身性紅斑性狼瘡病人可能其巨噬細胞對於凋亡小體無法產生反應，或是病人體內所產生的凋亡小體無法讓巨噬細胞辨識，進而造成清除能力低下的情形，這之間的調控原因都是未來值得我們進一步深入研究的部份。至於 TG2 是利用與哪些分子做為一個橋樑，亦或是直接與細胞作用，進而影響吞噬作用，這都是還需要進一步探討的部份，另外，吞噬凋亡細胞的過程中，能釋放出的許多細胞激素，是否也扮演著調控 TG2 的作用，這部份也是將來可進行的研究方向。

圖表



圖一、UVB 能量 1650 J/m^2 照射誘發細胞凋亡

(a) 在不同時間點所觀察的人類角質細胞型態變化。(b) DNA 片段化分析人類子宮頸癌上皮細胞株 (HeLa) 及人類角質細胞株 (HaCaT) 細胞凋亡之現象。(c) 流氏細胞儀分析人類角質細胞株 (HaCaT) 受 UVB 誘發細胞凋亡之比例 (24h : sub-G1 56.2%)。



圖二、以 RT-PCR 分析人類角質細胞株經 UVB 照射引起細胞凋亡，其細胞之 TG2 mRNA 及 TGF- β 的表現

人類角質細胞株 (HaCaT) 在受到 UVB 1650 J/m^2 的照射後，分別繼續培養 1、6、12、24 小時，以 Reverse transcriptase-PCR 分析 TG2 及 TGF- β 在各個不同時間點上的表現情形。圖上 0 小時為人類角質細胞株未受到 UVB 1650 J/m^2 的處理，作為實驗上的控制組。M: 100 bp ladder ; h TG2 : human transglutaminase 2 (310bp) ; h GAPDH : human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (307 bp) ; h TGF- β : human transforming growth factor- β (329 bp)。

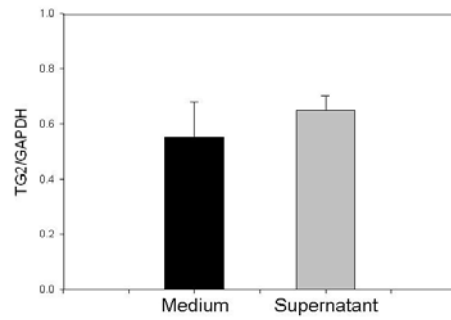
a. medium



b. Supernatant



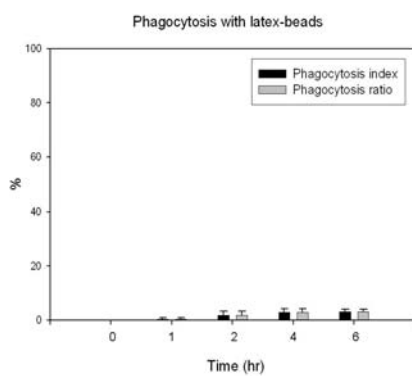
c.



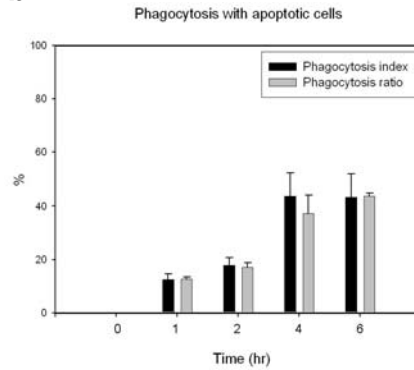
圖三、觀察經 UVB 1650J/m² 照射人類角質細胞後之上清液對巨噬細胞型態的影響及巨噬細胞中 TG2 mRNA 的表現

經 UVB 1650J/m² 照射後，收集培養 24 小時的上清液與巨噬細胞株 (RAW 264.7) 共同培養 4 小時，觀察 RAW264.7 細胞型態及 RAW264.7 cells 中 TG2 mRNA 的表現。(a) 以細胞培養液 (DMEM) 培養之細胞型態，作為實驗對照組，(b) 以培養 24 小時的上清液與 RAW264.7 共同培養之細胞型態，(c) RT-PCR 分析 RAW264.7 細胞經培養液 (DMEM) 或上清液 (Supernatant) 分別培養 4 小時後 TG2 mRNA 的表現。

a.



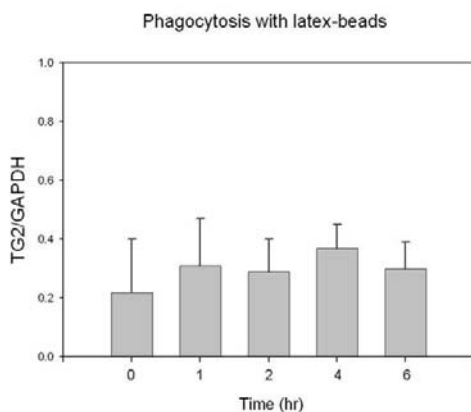
b.



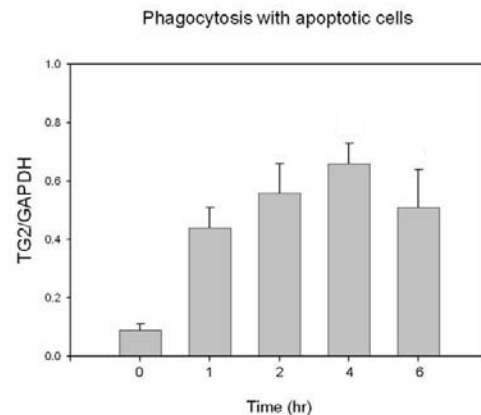
圖四、利用螢光顯微鏡觀察老鼠巨噬細胞株(RAW264.7) 吞嚥 Latex-beads 及凋亡細胞的情形及吞嚥能力

圖(a)為巨噬細胞吞嚥 latex-beads 的能力，黑色部分表示巨噬細胞吞嚥 latex-beads 的 phagocytosis index；灰色部份則表示巨噬細胞吞嚥 latex-beads 的 phagocytosis ratio；圖(b)為巨噬細胞吞嚥凋亡小體的能力，黑色部分表示巨噬細胞吞嚥凋亡小體的 phagocytosis index；灰色則表示巨噬細胞吞嚥凋亡小體的 phagocytosis ratio，圖中實驗每一時間點皆為三重複之數據，以求其平均值±SD 表示。

a.



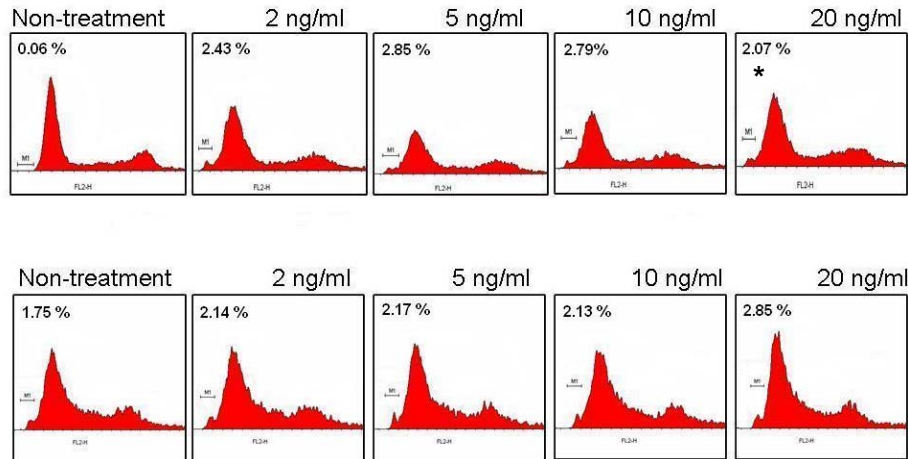
b.



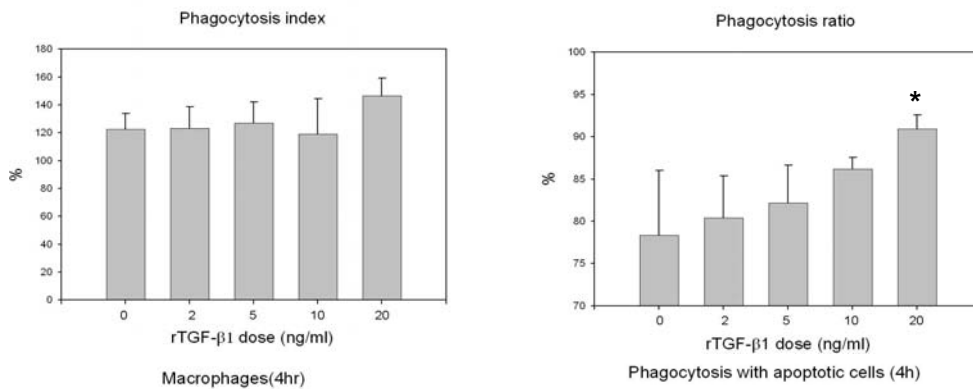
圖五、以 RT-PCR 分析老鼠巨噬細胞株 (RAW264.7) 吞嚥 latex-beads 及凋亡小體時，巨噬細胞之 TG2 mRNA 的表現

巨噬細胞吞嚥 Latex-Beads 及凋亡小體，收集吞嚥 1、2、4、6 小時的細胞，利用 RT-PCR 分析巨噬細胞在吞嚥 Latex-Beads 及凋亡小體時，各個時間點上 TG2 的表現情形。(a) latex-bead 量化圖 (b) 凋亡小體量化圖；圖中的數據代表三重複的實驗結果之平均值±SD 表示。

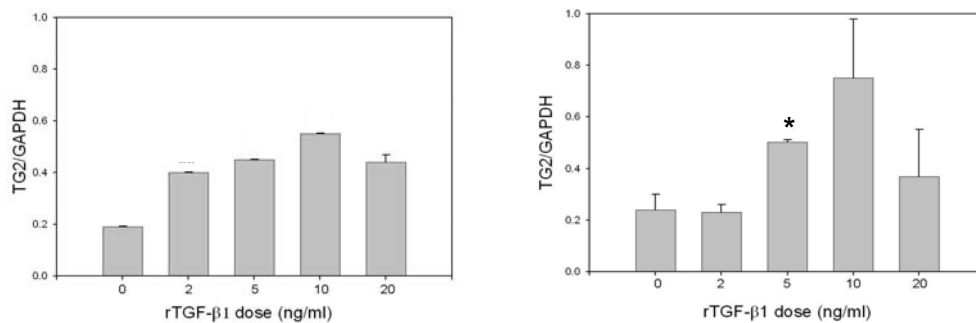
a.



b.



c.



圖六、分析老鼠巨噬細胞株經不同劑量的重組型 TGF-β1 處理下對細胞的影響

(a) 利用流式細胞儀分析 TGF-β1 與細胞凋亡之關係。使用不同劑量的 rTGF-β1 (2ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml) 處理巨噬細胞，培養 4 小時及 6 小時，收集細胞，分析 sub-G1 phase。(b) 經不同劑量 rTGF-β1 處理後，計算巨噬細胞的吞嚥能力。(c) RT-PCR 統計量化圖，圖中數據代表三重複實驗結果之平均值±SD 表示。

参考文献

- Akimov, S. S., and Belkin, A. M. (2001). Cell surface tissue transglutaminase is involved in adhesion and migration of monocytic cells on fibronectin. *Blood* 98, 1567-1576.
- Akimov, S. S., Krylov, D., Fleischman, L. F., and Belkin, A. M. (2000). Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin. *J Cell Biol* 148, 825-838.
- Andrade, F., Casciola-Rosen, L. A., and Rosen, A. (2005). Generation of novel covalent RNA-protein complexes in cells by ultraviolet B irradiation: implications for autoimmunity. *Arthritis Rheum* 52, 1160-1170.
- Bengtsson, A. A., Sturfelt, G., Gullstrand, B., and Truedsson, L. (2004). Induction of apoptosis in monocytes and lymphocytes by serum from patients with systemic lupus erythematosus - an additional mechanism to increased autoantigen load? *Clin Exp Immunol* 135, 535-543.
- Casciola-Rosen, L., Rosen, A., Petri, M., and Schliessel, M. (1996). Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1624-1629.
- Casciola-Rosen, L. A., Anhalt, G., and Rosen, A. (1994). Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* 179, 1317-1330.
- Casciola-Rosen, L. A., Anhalt, G. J., and Rosen, A. (1995). DNA-dependent protein kinase is one of a subset of autoantigens specifically cleaved early during apoptosis. *J Exp Med* 182, 1625-1634.
- Chung, E. Y., Kim, S. J., and Ma, X. J. (2006). Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells. *Cell Res* 16, 154-161.
- Deshmukh, U. S., Gaskin, F., Lewis, J. E., Kannapell, C. C., and Fu, S. M. (2003). Mechanisms of autoantibody diversification to SLE-related autoantigens. *Ann N Y Acad Sci* 987, 91-98.
- Eguchi, K. (2001). Apoptosis in autoimmune diseases. *Intern Med* 40, 275-284.
- Emlen, W., Niebur, J., and Kadera, R. (1994). Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 152, 3685-3692.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., and Henson, P. M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 101, 890-898.
- Fesus, L., and Piacentini, M. (2002). Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochem Sci* 27, 534-539.
- Fesus, L., and Szondy, Z. (2005). Transglutaminase 2 in the balance of cell death and survival. *FEBS Lett* 579, 3297-3302.
- Furukawa, F. (1999). Antinuclear antibody-keratinocyte interactions in photosensitive cutaneous lupus erythematosus. *Histol Histopathol* 14, 627-633.
- Haq, I., and Isenberg, D. A. (2002). How does one assess and monitor patients with systemic lupus erythematosus in daily clinical practice? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 16, 181-194.

Herrmann, M., Voll, R. E., and Kalden, J. R. (2000). Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Immunol Today* 21, 424-426.

Huber, L. C., Gay, S., Distler, O., and Pisetsky, D. S. (2006). The effect of UVB on lupus skin: new light on the role of apoptosis in the pathogenesis of autoimmunity. *Rheumatology (Oxford)* 45, 500-501.

Kaplan, M. J., Lewis, E. E., Shelden, E. A., Somers, E., Pavlic, R., McCune, W. J., and Richardson, B. C. (2002). The apoptotic ligands TRAIL, TWEAK, and Fas ligand mediate monocyte death induced by autologous lupus T cells. *J Immunol* 169, 6020-6029.

Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., and van Oers, M. H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84, 1415-1420.

LeFeber, W. P., Norris, D. A., Ryan, S. R., Huff, J. C., Lee, L. A., Kubo, M., Boyce, S. T., Kotzin, B. L., and Weston, W. L. (1984). Ultraviolet light induces binding of antibodies to selected nuclear antigens on cultured human keratinocytes. *J Clin Invest* 74, 1545-1551.

Levine, J. S., Koh, J. S., Subang, R., and Rauch, J. (1999). Apoptotic cells as immunogen and antigen in the antiphospholipid syndrome. *Exp Mol Pathol* 66, 82-98.

Li, M. O., Sarkisian, M. R., Mehal, W. Z., Rakic, P., and Flavell, R. A. (2003). Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. *Science* 302, 1560-1563.

Lorenz, H. M., Grunke, M., Hieronymus, T., Herrmann, M., Kuhnel, A., Manger, B., and Kalden, J. R. (1997). In vitro apoptosis and expression of apoptosis-related molecules in lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 40, 306-317.

Majno, G., and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146, 3-15.

Miranda, M. E., Tseng, C. E., Rashbaum, W., Ochs, R. L., Casiano, C. A., Di Donato, F., Chan, E. K., and Buyon, J. P. (1998). Accessibility of SSA/Ro and SSB/La antigens to maternal autoantibodies in apoptotic human fetal cardiac myocytes. *J Immunol* 161, 5061-5069.

Nunes, I., Gleizes, P. E., Metz, C. N., and Rifkin, D. B. (1997). Latent transforming growth factor-beta binding protein domains involved in activation and transglutaminase-dependent cross-linking of latent transforming growth factor-beta. *J Cell Biol* 136, 1151-1163.

Nunes, I., Shapiro, R. L., and Rifkin, D. B. (1995). Characterization of latent TGF-beta activation by murine peritoneal macrophages. *J Immunol* 155, 1450-1459.

Peng, Y., Kowalewski, R., Kim, S., and Elkon, K. B. (2005). The role of IgM antibodies in the recognition and clearance of apoptotic cells. *Mol Immunol* 42, 781-787.

Perniok, A., Wedekind, F., Herrmann, M., Specker, C., and Schneider, M. (1998). High levels of circulating early apoptotic peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 7, 113-118.

Piacentini, M., Amendola, A., Ciccocanti, F., Falasca, L., Farrace, M. G., Mastroberardino, P. G., Nardacci, R., Oliverio, S., Piredda, L., Rodolfo, C., and Autuori, F. (2005). Type 2 transglutaminase and cell death. *Prog Exp Tumor Res* 38, 58-74.

Pitidhamabhorn, D., Kantachuvesiri, S., Totemchokchayakarn, K., Kitiyanant, Y., and Ubol, S. (2006). Partial construction of apoptotic pathway in PBMC obtained from active SLE patients and the significance of plasma TNF-alpha on this pathway. *Clin Rheumatol* 25, 705-714.

Plotz, P. H. (2003). The autoantibody repertoire: searching for order. *Nat Rev Immunol* 3, 73-78.

Reefman, E., de Jong, M. C., Kuiper, H., Jonkman, M. F., Limburg, P. C., Kallenberg, C. G., and Bijl, M. (2006). Is disturbed clearance of apoptotic keratinocytes responsible for UVB-induced inflammatory skin lesions in systemic lupus erythematosus? *Arthritis Res Ther* 8, R156.

Ren, Y., Tang, J., Mok, M. Y., Chan, A. W., Wu, A., and Lau, C. S. (2003). Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 48, 2888-2897.

Richardson, B. C., Strahler, J. R., Pivrotto, T. S., Quddus, J., Bayliss, G. E., Gross, L. A., O'Rourke, K. S., Powers, D., Hanash, S. M., and Johnson, M. A. (1992). Phenotypic and functional similarities between 5-azacytidine-treated T cells and a T cell subset in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 35, 647-662.

Rose, D. M., Sydlaske, A. D., Agha-Babakhani, A., Johnson, K., and Terkeltaub, R. (2006). Transglutaminase 2 limits murine peritoneal acute gout-like inflammation by regulating macrophage clearance of apoptotic neutrophils. *Arthritis Rheum* 54, 3363-3371.

Rosen, A., and Casciola-Rosen, L. (1999). Autoantigens as substrates for apoptotic proteases: implications for the pathogenesis of systemic autoimmune disease. *Cell Death Differ* 6, 6-12.

Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C., and Haslett, C. (2002). A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2, 965-975.

Shin, D. M., Jeon, J. H., Kim, C. W., Cho, S. Y., Kwon, J. C., Lee, H. J., Choi, K. H., Park, S. C., and Kim, I. G. (2004). Cell type-specific activation of intracellular transglutaminase 2 by oxidative stress or ultraviolet irradiation: implications of transglutaminase 2 in age-related cataractogenesis. *J Biol Chem* 279, 15032-15039.

Skiba, B., Neill, B., and Piva, T. J. (2005). Gene expression profiles of TNF-alpha, TACE, furin, IL-1beta and matrilysin in UVA- and UVB-irradiated HaCat cells. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 21, 173-182.

Somersan, S., and Bhardwaj, N. (2001). Tethering and tickling: a new role for the phosphatidylserine receptor. *J Cell Biol* 155, 501-504.

Szondy, Z., Molnar, P., Nemes, Z., Boyiadzis, M., Kedei, N., Toth, R., and Fesus, L. (1997). Differential expression of tissue transglutaminase during in vivo apoptosis of thymocytes induced via distinct signalling pathways. *FEBS Lett* 404, 307-313.

Szondy, Z., Sarang, Z., Molnar, P., Nemeth, T., Piacentini, M., Mastroberardino, P. G., Falasca, L., Aeschlimann, D., Kovacs, J., Kiss, I., *et al.* (2003). Transglutaminase 2-/- mice reveal a phagocytosis-associated crosstalk between macrophages and apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7812-7817.

Tan, E. M., and Kunkel, H. G. (1966). Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 96, 464-471.

Tauber, A. I. (2003). Metchnikoff and the phagocytosis theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 897-901.

Verderio, E., Nicholas, B., Gross, S., and Griffin, M. (1998). Regulated expression of tissue transglutaminase in Swiss 3T3 fibroblasts: effects on the processing of fibronectin, cell attachment, and cell death. *Exp Cell Res* 239, 119-138.

Verderio, E. A., Telci, D., Okoye, A., Melino, G, and Griffin, M. (2003). A novel RGD-independent cell adhesion pathway mediated by fibronectin-bound tissue transglutaminase rescues cells from anoikis. *J Biol Chem* 278, 42604-42614.