

# 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--總計畫:自體免疫疾病中心之  
建立(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-040-005-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

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11月01日

本整合行研究計畫是要在中山醫學大學建立自體免疫疾病中心，結合本校免疫所生命科學系及臨床相關醫師共同合作之計畫，包括總計劃及五個子計畫：

總計畫：Autoimmune disease center

子計畫一：Proteomic analyses of methylarginine modification in autoimmune diseases

子計畫二：The effect of transglutaminase 2 on apoptosis in systemic lupus erythematosus

子計畫三：Role of transglutaminase 2 in the clearance of apoptotic cells

子計畫四：The pathogenesis of rheumatoid arthritis: Protein deimination in antigen recognition and autoantibody generation, and the regulation and function of peptidylarginine deiminase IV

子計畫五：The role of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in autoimmune diseases

六計畫皆按照原先計畫進行，總計畫已把臨床病人之資料建立電子檔案，對分析病人及實驗室研究成果之比較有很大之幫助，我們收集60個SLE病人、120個RA病人、30個sjogren's syndrome之病人及其他之自體免疫疾病資料，包括生日、年齡、病史、用藥、診斷值、自體免疫疾病嚴重程度等等。各計畫之研究成果分述於下：

子計畫一：Proteomic analyses of methylarginine modification in autoimmune diseases

在此子計劃中，我們想要探討蛋白質精胺酸甲基化（分為對稱型或不對稱型雙甲基精胺酸）和自體免疫疾病的關係。許多蛋白質包含了甲基精胺酸，如：fibrillarin、部分的hnRNP蛋白、myelin basic protein以及SmD1、D3蛋白，而這些蛋白也已被發現是許多自體免疫疾病的自體免疫抗原。在這個計劃中，我們首先從紅斑性狼瘡病人中取得anti-Sm和anti-RNP自體免疫抗體血清，尋找抗血清中是否有因精胺酸甲基化差異而對蛋白質辨識差異之抗體，再利用蛋白質體學方法找出有甲基化的自體免疫抗原。我們用一位病人血清作西方點墨法時，發現低甲基化之細胞萃取蛋白和正常甲基化組比較，有數調訊號減低情況。將相關蛋白點挖出，以蛋白酶水解後作質譜分析，有二蛋白質ZNF9以及CARG binding protein含有典型精胺酸甲基化蛋白質中出現之RGG序列，我們建構此二蛋白GST-tag之重組蛋白，並證明此二蛋白在試管中可被精胺酸甲基轉移酶甲基化。將FLAG-tag之重組蛋白表現於HeLa細胞，FLAG-ZNF9蛋白可被對稱或非對稱雙甲基精胺酸的抗體辨識，同時於低甲基化條件下所得到的FLAG-ZNF9蛋白，其被anti-Sm自體免疫抗體辨識減低。將ZNF9蛋白中的RGG序列移除，則不會被甲基精胺酸的抗體及anti-Sm自體免疫抗體辨識。

子計畫二：The effect of transglutaminase 2 on apoptosis in systemic lupus erythematosus

由於自體免疫疾病的致病機轉到目前為止仍然不是很清楚，同時凋亡小體無法被正確的辨識及清除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，而TGF- $\beta$ 與TG2之間的關係也是本計劃中想討論的一個部分。由目前實驗中利用UVB 1650 J/m<sup>2</sup>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/m<sup>2</sup> 作用 12 小時後，染色質出現 DNA 片段化現象，以流氏細胞儀分析 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/m<sup>2</sup> 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- $\beta$  (rTGF- $\beta$  1) 與吞噬作用關係，研究結果發現 (1) rTGF- $\beta$  1 於 0~20ng/ml 劑量下不會造成細胞凋亡，(2) rTGF- $\beta$  1 會增加巨噬細胞中 TG2 mRNA 表現，其表現並與 rTGF- $\beta$  1 劑量成正比 ( $p<0.05$ )，(3) rTGF- $\beta$  1 的劑量會增加 phagocytosis ratio ( $p<0.05$ )，但 rTGF- $\beta$  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- $\beta$  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。

#### 子計畫三：Role of transglutaminase 2 in the clearance of apoptotic cells

本計劃就是要釐清第二型殼胺醯胺轉移酶在紅斑性狼瘡的致病機轉中的角色。在第一年我們檢測第二型殼胺醯胺轉移酶的表現。兩種類似紅斑性狼瘡症狀及一種對照組的老鼠將分為兩組，分別於 6 週齡及 24 週齡時採集巨嗜細胞及不同部位器官組織，包括心、肝、脾、肺、腎、肌肉。第二型殼胺醯胺轉移酶的表現將以反轉錄聚合酶鏈反應及免疫墨點法偵測。結果發現在狼瘡鼠中，雖然第二型殼胺醯胺轉移酶的表現在不同組織器官中的表現量不同，但是在紅斑性狼瘡小鼠發病前後並無不同。第二型殼胺醯胺轉移酶，本身為一個需鈣離子之轉胺甲醯轉移酶，也被證實牽涉在紅斑性狼瘡的致病基轉中。所以在第二年我們分析狼瘡鼠之巨嗜細胞的吞噬能力，與第二型殼胺醯胺轉移酶活性。結果發現類狼瘡鼠之巨嗜細胞的吞噬能力，跟對照之正常小鼠比較，有明顯的下降。而且跟第二型殼胺醯胺轉移酶活性有關。為了找出更確切的原因，第三年度則針對狼瘡模式小鼠的巨嗜細胞，找出可能造成吞噬能力下降的原因。我們的實驗結果發現，粒線體相關路徑的細胞凋亡蛋白，在狼瘡模式小鼠有較明顯增加。這些發現也說明小鼠之巨嗜細胞的吞噬能力較低是因為自身凋亡所致，而不是第二型殼胺醯胺轉移酶表現上的缺失所致。

已發表論文：

#### 子計畫四：The pathogenesis of rheumatoid arthritis: Protein deimination in antigen recognition and autoantibody generation, and the regulation and function of peptidylarginine deiminase IV

胜肽精胺酸脫亞氨酶 (Peptidylarginine deiminase; PADI) 作用屬於後轉譯反應，可將精胺酸胜肽 (peptidylarginine) 轉換成瓜胺酸胜肽 (citrulline)，其在免疫細胞的

分化及細胞凋亡扮演一個重要的角色。第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶單核苷酸多型性單

倍體與造成類風濕性關節炎嚴重程度具有相關性，其酵素活性增加會使得瓜胺酸蛋白量提高，進而增加自體抗體。在我們之前的研究證實了第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶會造成免疫細胞的凋亡 (Liu, et al, 2006 Apoptosis)。在這裡，我們研究類風濕性關節炎的危險因子：第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶單倍體 (SNP PADI4; S55G, A82V and A112G) 與其酵素活性的增加是否會誘導細胞凋亡的產生。在 Tet-On 系統 Jurkat T 細胞，當只加入 Ionomycin (Ion) 提高細胞內鈣離子並不會造成細胞凋亡，但加入四環素起始 Tet-On 系統 Jurkat T 細胞中的第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶基因高度表現會造成細胞生存能力減少，並增加細胞凋亡。在體外及體內胜肽精胺酸脫亞氨酶酵素活性分析，我們證明第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶單核苷酸多型性單倍體的酵素活性高於類風濕性關節炎非危險因子第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶單倍體 (第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶野生型)。同時發現第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶單核苷酸多型性單倍體優

於第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶野生型能夠誘發細胞凋亡。另外，第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶單核苷酸多型性單倍體給予 Ion 後所誘發的細胞凋亡更優於給予 Ion 的第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶野生型，並且會造成 Bcl-xL 蛋白減少與造成 Bax 蛋白增加，也能夠造成細胞色素 C 蛋白從粒線體釋放至細胞質。由西方墨點法的結果瞭解在誘發第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶單核苷酸多型性單倍體表現與給予 Ion 之後，引發的程式性細胞死亡過程會增加細胞凋亡體之凋亡蛋白酵素活性。綜合這些研究結果顯示給予 Ion 的第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶單核苷酸多型性單倍體的酵素活性增加，能夠增加經由粒線體的訊息路徑的細胞凋亡，並提供一個可信的解釋在於類風濕性關節炎

致病機轉與第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶單核苷酸多型性單倍體酵素活性增加之相關性。蛋白質脫亞氨化現象發生於細胞凋亡過程之中。然而少有研究探討第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶在細胞凋亡中所扮演的角色。因此，我們發現第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶會引發細胞凋亡及其機制，並已發表於 2006, Apoptosis (SCI: 4.49)。此外，我們已完成研發新的偵測胜肽精胺酸脫亞氨酶方法 (2005, Anal. Biochem.) 及發現 PADI IV SNP (S55G, A82V, A112G) 更易促使細胞凋亡的機制，並已發表於 2007, Apoptosis。因此第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶所造成的蛋白質脫亞氨化在自體抗原的形成、自體抗體的產生及致病機轉上扮演重要角色。在此，我將目標集中在臨床上蛋白質脫亞氨化在自體抗原及抗體的產生的影響和第四型胜肽精胺酸脫亞氨酶對細胞凋亡的作用，期望能對於類風濕性關節炎致病機轉、臨床診斷及治療上有所貢獻。

子計畫五：The role of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in autoimmune diseases

內質網是細胞合成及修飾分泌性蛋白例如  $\beta$  細胞之胰島素、免疫細胞之細胞激素、趨化因子或細胞膜蛋白例如接受器、MHC 分子，以及調控鈣離子的重要胞器。當這些功能調控失常就會引發內質網病變反應 (ER stress responses) 包括 (a) 引發

chaperon 基因表現，(b) 蛋白質合成降低，(c) 加速異常蛋白的分解，及 (d) 細胞凋亡 (ER stress-mediated apoptosis)。內質網病變引起的細胞凋亡主要靠 caspase 12 及 CHOP 所調控。之前本實驗室在利用內質網壓力的藥物 thapsigargin (抑制內質網鈣離子幫浦)、ionomycin (在細胞膜形成鈣離子通道)、tunicamycin (抑制蛋白質糖基化)、brefeldin A (抑制分泌性蛋白質運送)、DTT (抑制雙硫鍵形成) 刺激 HL-60 細胞能引發 ER stress 相關的基因之表現，經過比較之後，發現其誘導的基因表現不完全相同，顯示出有不同的活化路徑及基因表現調控機制。而以低劑量之 tunicamycin 處理血管內皮細胞之後，造成細胞對 cytokine 的發炎反應降低，因而促使本實驗室進一步研究內質網壓力與抗發炎反應之間的關係。

實驗目的：

1. 比較不同 ER stress 藥物對基因之表現之影響，以及基因表現之訊息調控路徑
2. 內質網壓力與抗發炎反應

實驗方法：

利用 ER stress 藥物、磷酸激活酶之抑制劑及 RT-PCR 技術分析 HL-60 細胞基因之表現。利用 glucosamine 研究其對 Hela 細胞造成的影響以及對 cytokine 的反應。

實驗結果：

(1) Thapsigargin、tunicamycin 可引發 ER stress 等基因之表現，ionomycin 卻無此作用。Thapsigargin、ionomycin 二者可能藉由鈣離子的效應誘發 p21、IL-8 之表現，tunicamycin 卻無此作用，而 Thapsigargin 單獨誘發和 ER stress 相關的蛋白酶表現，顯示其誘發三群基因：ER stress 調控基因，鈣離子調控基因，以及受此二者協同調控之基因。

(2) 以低劑量 tunicamycin 或 glucosamine 刺激 Hela 細胞 6 小時之後 IL-8 表現下降，對細胞激素 IFN- $\gamma$  所誘發 IP-10 的表現 (NF  $\kappa$  B 所調控) 明顯下降，而其他基因則較不受影響，使用訊息路徑抑制劑發現，細胞在 ER stress 的情形下，可能誘發新生蛋白，分別活化 GSK-3  $\beta$  導致 IL-8 表現下降，以及抑制 NF  $\kappa$  B 路徑的活化使 IFN- $\gamma$  所誘發 IP-10 的作用無法進行。

未來將利用 siRNA 干擾技術對 CHOP/GADD153 做專一性抑制，並探討 glucosamine 的抗發炎作用是否透過 CHOP 的下游產物來抑制 NF  $\kappa$  B 的活化，同時進行內質網壓力與僵直性脊椎炎細胞分子病理學的研究，利用 HLA-B27 細胞，研究是否因為內質網壓力導致免疫活化反應較差，是否可以用 CHOP/GADD153 siRNA 加以改善。此外也將研究具抗發炎效用之中草藥是否藉由產生內質網壓力而產生藥效。

在本計劃中已發表論文分列於下：

Liao, YF, Hsieh, HC, Liu, GY\* and Hung, HC. A Continuous spectrophotometric assay method for peptidylarginine deiminase type 4 Activity. *Anal. Biochem.* 347(2):176-81, 2005. (SCI: 2.37; CHEMISTRY, ANALYTICAL 16/70=22.8%) (Corresponding author)

Liu, GY\*, Liao, YF, Chang, WH, Liu, CC, Hsieh, MC, Hsu, PC, Tsay, GJ and Hung, HC. Overexpression of peptidylarginine deiminase IV features in apoptosis of haematopoietic cells. *Apoptosis* 11(2):183-196, 2006. (SCI: 4.54; BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY 51/261=19.5%) (First and corresponding author)

Peptidylarginine deiminase IV (PADI 4) of SNP induces apoptosis of acute T leukemia Jurkat cells: The enzyme activity of PADI 4 dominates cell death. 2006 (Submitted)

Characterization of the functional role of calcium binding effect in the regulatory mechanism of human peptidylarginine deiminase IV (PADI 4) and its SNP variants. 2006 (Submitted)

Tsai-Ching Hsu, Szu-Yi Chiang, Chih-Yang Huang, Gregory J Tsay, Chiao-Wen Yang, Chien-Ning Huang, and **Bor-Show Tzang\***. (2007) Beneficial effects of treatment with transglutaminases inhibitor cystamine on macrophage response in NZB/W F1 mice. Exp Biol Med (Maywood). 2007 Feb;232(2):195-203. (\***Correspondence**)