

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號: NSC 87-2314-B040-009

執行期限: 86 年 8 月 1 日 至 87 年 7 月 31 日

主持人: 蔡嘉哲 教授 中山醫學院醫學研究所

一. 中文摘要:

本計劃主要是研究各種不同自體免疫疾病抗嗜中性白血球細胞質抗體[anti-neutrophil-cytoplasmic-antibodies(ANCA)]的發生率及所對抗的抗原.在 Indirect immunofluorescence(IIF)的實驗中,不管以 polymorphonucleated neutrophils(PMNs)或 promyelocytic leukemia cells(HL-60 cells)當受質,得到類似的結果,二者有良好的 correlate。若以 HL-60 cells lysate 當作 substrate,因為此細胞只具有 primary granules,缺乏 secondary granules,因此光用此 stage 的細胞有些 Ab 是無法被偵測如 Lactoferrin(LF) Ab,但若將此細胞加入 1.25 % Dimethyl sulfoxide(DMSO),則此細胞可進行 terminal differentiation,這些更成熟的細胞便含有 secondary granules 足以去偵測 ANCA 的存在,得到的結果與 PMNs lysate 相似。使用 GST-PML、Myeloperoxidase(MPO)、LF、High motility group1&2(HMG1&2)免疫兔子,得到 polyclonal antibodies; GST-PML anti-sera 的螢光表現為 nuclear dot, MPO、LF、high mobility group(HMG1&2) anti-sera 的螢光表現為 perinuclear pattern。

LF Enzyme linked immunosorbant assay(ELISA)於各種疾病的陽性率: Systemic lupus erythematosus (SLE) 46.15%(24/52), Rheumatoid arthritis (RA) 10.26%(4/39), Repeative oral ulcer (ROU) 33.33%(2/6);Lysozyme(LZ) ELISA 於各種疾病陽性率: Sjogrens Syndrome(SS) 28 % (7/25), ROU 10 % (1/10), Polymyositis(PM) 18.18 % (2/11), Primary billiary cirrhosis(PBC) 12.5 % (1/8), Nuclear dot 23.81% (5/21), RA 6.06 % (4/66), SLE 28.66 % (47/164), Anti-Centromere -Ab(ACA) 22.22 % (12/54)。各種不同的 neutrophil cytoplasmic autoantigens 可出現 within different ANCA, pANCA 抗原除了 MPO 外,還有 LF、LZ; cANCA 抗原除了 Proteinase 3(PR3)外,還有 MPO、LF、LZ 此與以前報告不同。

關鍵詞: 自體免疫疾病, 抗白血球抗體(ANCA), PR3, MPO

Abstract:

Objective. To examine the different ANCA(antineutrophil cytoplasmic antibodies) in different autoimmune diseases and the specificity of ANCA.

Methods. Fifty-two sera from Systemic lupus erythematosus (SLE) patients, thirty-nine sera from Rheumatoid arthritis (RA) patients, ten sera from recurrent oral ulcer patients and twenty-five sera from Sjogren syndrome (SS) patient were examined for ANCA by immunofluorescence and ELISA.

Results. Using GST-PML、Myeloperoxidase(MPO)、LF、High motility group1&2 (HMG1&2) as antigens for immunization of rabbit, we got antisera against MPO, LF, and HMG1 and 2. These sera show a perinuclear pattern

on IF and kept for further use.

	POSITIVE(%) OF ANTILACTOFERRIN BY ELISA	POSITIVE (%) OF ANTI-ELASTASE BY ELISA
SLE	46.15 % (24/52)	28.66 % (47/164)
RA	10.26 % (4/39)	6.06 % (4/66)
ROU	33.33 % (2/6)	10.0 % (1/10)
SS		28.0 % (7/25)
PM		18.18 % (2/11)
PBC		12.5 % (1/8)
Dot		23.81 % (5/21)
ACA		22.22 % (12/54)

Conclusion. Anti-lactoferrin antibodies are found in patients with SLE, RA, and ROU. Anti-elastase antibodies are found in patients with all different autoimmune diseases. It is recommended that ELISA should be used for further defining ANCA. Different subtypes of ANCA can be in different autoimmune diseases.

Keywords: Autoimmune disease, ANCA(anti-neutrophil cytoplasmic antibodies), PR3(proteinase 3), MPO(myeloperoxidase)

二. 緣由與目的:

過去數年，在自體免疫疾病之研究，有極輝煌之研究結果。其中利用自體免疫疾病之血清，以分子生物之技術來研究細胞內抗原之構造及其機能，最為顯著。另一方面，自體抗體研究之進步，有助於臨床上之疾病診斷。過去十幾年來，有一種抗體 ANCA 出現在各種不同之血管炎或自體免疫疾病。因對這些病之形成有關，所以已成大家很有興趣的研究主題，包括 Wegener's granulomatosis(WG), Rheumatoid arthritis(RA), SLE, Ulcerative colitis, Crohn's disease, Rapidly progressive glomerulonephritis(RPGN), Microscopic polyangitis(MP) and Microscopic polyarteritis nodosa(MPN),及一些不明原因之疾病。ANCA 可分為 cANCA 及 pANCA。cANCA(cytoplasmic or classic ANCA)其抗原為 neutrophil 內 cytoplasmic azurophil granules 之 proteinase 3,而 pANCA 以 IF 則是在 perinuclear 之邊線反應，此種為 pANCA。其抗原就比較多，包括 myeloperoxidase, lactoferrin, cathepsin G 等，也出現在各種不同之疾病，如 WG, RA, SLE, UC, Crohn's disease, RPGN, MP 和 MPN。為了解台灣地區之 ANCA 抗體在不同疾病之分佈情形,所以著手於本計畫之進行。

三.結果與討論:

1.IF 的實驗以 PMNs 或 HL-60 cells 當受質，得到類似的結果二者有良好的相關性。兔子多株抗體，以 ethanol fixed PMNs 當作受質，MPO 抗體螢光集中在 perinuclear 處，但 segment 亦有，均勻沿著 perinuclear，而 LF 抗體螢光為多團聚集在 perinuclear 處，強弱皆有，HMG1 & 2 螢光較弱，若改用 formalin fixed PMNs 當作受質，則 MPO 抗體螢光跑到 cytoplasm, LF 抗體螢光跑到 cytoplasm,但 perimembrane 處明顯, HMG1& 2 抗體螢光消失；用 HL-60 cells 當受質亦得到類似結果。偵測兔子多株抗體之專一性: MPO 兔子多株抗體 2000×稀釋，分別加入 MPO 或 LF，結果加入 10 μl MPO,可完全抑制 HL-60 substrate 螢光之產生，但當加入 LF,不論量之多寡皆無法抑制 HL-60 substrate 螢光之產生；LF 兔子多株抗體 2000×稀釋，亦分別加入 MPO 或 LF，結果不論加入 MPO 多少，皆無法抑制 HL-60 substrate 螢光之產生，而加入 80μl 的 LF 卻只有部分抑制 HL-60substrate 螢光之產生，暗示 MPO 抗體為專一性的抗體，只對抗專一的 epitope，

而 LF 抗體為非專一性抗體，可能對抗其他不同 epitope。

2.以 PMNs lysate 當作 substrate，MPO Ab 會出現三條 band，分別為 55-63 kDa，10-15 kDa 和 79 kDa; LF 抗體在 70kDa 出現，HMG 1&2 抗體於 28-29 kDa 出現，若以 HL-60 cells lysate 當作 substrate，因為此細胞只具有初級顆粒，缺乏次級顆粒，但若將此細胞加入 1.25 % DMSO，則此細胞可分化成成熟的細胞(含有次級顆粒),足以去偵測 ANCA 的存在,得到的結果 PMNs lysate 相似。

3.ELISA 結果

(1)

	LF ELISA 於各種疾病陽性率	LZ ELISA 於各種疾病陽性率
SLE	46.15 % (24/52)	28.66 % (47/164)
RA	10.26 % (4/39)	6.06 % (4/66)
ROU	33.33 % (2/6)	10.0 % (1/10)
SS		28.0 % (7/25)
PM		18.18 % (2/11)
PBC		12.5 % (1/8)
Dot		23.81 % (5/21)
ACA		22.22 % (12/54)

(2)收集 37 支 ANCA(+)血清，用 ELISA 方法分析所對抗的抗原，其中 pANCA 佔 26 支，cANCA 佔 11 支分別來自於不同的疾病[p-ANCA: End Stage Renal Disease (ERSD),Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS),Rapidly Progressive Glomerulonephritis (RPGN), Idiopathic crescentic glomerulonephritis., Rheumatoid arthritis. Pulmonary fibrosis。 C-ANCA: Wegener's granulomatosis (WG), Renal failure, 不明原因血管炎]

(3)在 pANCA、cANCA 中所對抗的抗原及所佔的比例

抗原名稱	pANCA	cANCA
Myeloperoxidase (MPO)	42.3 % (11/26)	9.1 % (1/11)
Proteinase 3 (PR3)	30.8 % (8/26)	45.5 % (5/11)
Lactoferrin (LF)	15.4 % (4/26)	27.3 % (3/11)
Lysozyme (LZ)	7.6 % (2/26)	36.4 % (4/11)
High motility group1&2 (HMG1&2)	0 % (0/26)	0 % (0/11)

(4)在 WB 方面，MPO-ANCA 會於 59 kDa 出現一條 band，LF-ANCA 於 70 kDa 出現 band，但 PR3-ANCA 並未於 WB 上看到 band。

四.計畫結果自評:

本研究計畫原計畫以 PCR 來 clone 各種 ANCA 抗原之 DNA 如 Proteinase 3, MPO 等, 但至今尚未成功,仍繼續進行. 另 epitope of PR3 及 MPO 也將以 Rabbit 之血清和病人之血清來 define.

五.參考文獻:

- (1).Gross WL, Schmitt WH, Csernok E.: ANCA and associated disease:immuno-diagnostic and pathogenetic aspects. Clin Exp Immunol. 1993;91:1-2.
- (2).Falk RJ, Jennette JC: Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies with systemic vasculitis and idiopathic

- necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *New Engl. J. Med.* 1998;318:1651.
- (3) Ludemann J, Utecht B, Gross WL: Antineutrophil cytoplasm antibodies to Wegener's granulomatosis recognize an elastinolytic enzyme. *J. Exp. Med.* 1990;171:357.
 - (4) Targan SR, Landers CJ, Cobb L. et al. Perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies are spontaneously produced by mucosal B cells of ulcerative colitis patients. *Journal of immunology.* 1995;;155(6):3262-7.
 - (5) Matheson NR, Wong PS, and Travis J. Isolation and properties of human neutrophils myeloperoxidase. 1981;20:325-30.
 - (6) Broekroelofs J, Mulder AH, Nelis GF et al. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies(ANCA) in serum form patients with inflammatory bowel diseases(IBD). Relation to disease pattern and disease activity. *Digestive Disease & Science.* 1994;39(3):545-9.
 - (7) Cambridge G, Rampton DS, Stevens TR, McCarthy DA et al. Anti-neutrophil antibodies in inflammatory bowel disease activity: prevalence and diagnostic role. *Gut.* 1992;33(5):668-74.
 - (8) Kallenberg GGM, Cohen Tervaert JW, F. J. van der Woude et al. Autoimmunity to lysosomal enzymes: new clues to vasculitis and glomerulonephritis? *Immunology today.* 1991;12-2:61-64.
 - (9) Ewert BH, Jennette JC, Falk RJ. The pathogenic role of antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Am J Kidney Dis.* 1991;18:1188-195.
 - (10) Gross WL, Csernok E, Schmitt WH. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: immunobiological aspects. *Klin Wochenschr.* 1991; 69-13:558-66.
 - (11) Michiyuki Y, Sook-Jin Hur, Kazuya H. et al. Isolation and characterization of a cDNA coding for human myeloperoxidase. *Biochemistry and Biophysics* 1987; 1:147-155.
 - (12) Campanelli D, Melchior M, Fu Y et al. Cloning of cDNA for proteinase 3: a serine protease, antibiotic, and autoantigen from human neutrophils. *J. Exp. Med.* 1990;172(6):1709-1715.
 - (13) Malcolm S. and Richard C. Comparison of Histopaque-1119 method with the plasmagel method for separation of blood leukocytes for cytomegalovirus isolation. *J. Clin. Micro.* 1992;30(10):2722-24