

R  
008.8  
44131

私立中山醫學院醫學研究所

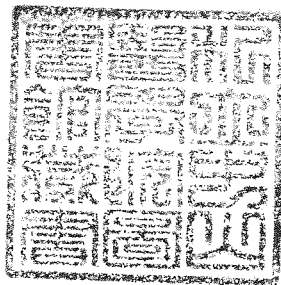
碩士論文

指導教授：蔡嘉哲博士

共同指導教授：羅俊民博士

利用電阻抗感測硬皮症病人血清及干擾素  
Interferon  $\alpha$ -2b 對皮膚纖維母細胞  
微運動之影響

**Electrically Monitoring The Micromotions of Fibroblasts Cultured with  
Sera from Systemic Sclerosis Patients and Treated with Interferon  $\alpha$ -2b**



研究生：黃建寧 撰

中華民國八十四年十二月

中山醫學院圖書館



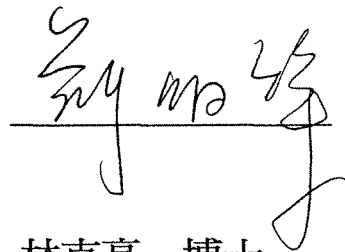
C034333

本論文為中山醫學院授予醫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

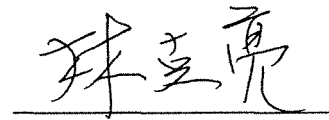
成功大學醫學院醫學系

劉明輝 副教授

Handwritten signature of Liu Minghui in black ink, written over a horizontal line.

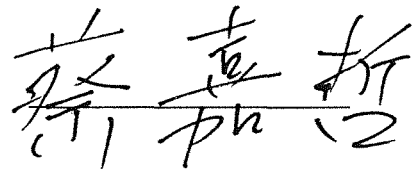
中山醫學院醫學研究所副教授

林克亮 博士

Handwritten signature of Lin Keliang in black ink, written over a horizontal line.

中山醫學院醫學研究所教授  
( 論文指導教授 )

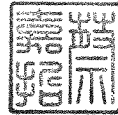
蔡嘉哲 博士

Handwritten signature of Cai Jia zhe in black ink, written over a horizontal line.

中華民國 八十五年 一月

學生黃建寧論文題目為”利用電阻抗感測硬皮症病人血清及干擾素 **Interferon  $\alpha$ -2b** 對皮膚纖維母細胞微運動之影響”，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：蔡嘉哲博士 簽名：



中華民國八十五年一月

## 誌 謝

兩年多的碩士班研究生涯，雖轉眼即過，然而每一想起能回母校重當學子，再深探醫學知識之堂奧，心中便充滿無限的感激。這些日子受到師長、學長及同學們的熱切指導，使我無論於知識、組織分析能力、實驗技術甚或待人處世方面上，均獲益良多。

論文能順利完成付梓，首先要感謝兩位指導教授蔡嘉哲博士及羅俊民博士的諄諄教導；感謝口試委員劉明輝教授、林克亮博士對此篇論文的審查指正；感謝於這段期間，吳子卿醫師、陳滋彥醫師、林中生教授的鼓勵支持及同儕王富年醫師、陳通明醫師、簡順添醫師、林光維醫師、陳長庚醫師的體諒配合；同時也感謝王朝鐘教授、李宣佑教授、鄭敏雄教授、巫堂鑒醫師的鼓勵指教及熱心提供實驗室空間與樣品材料；感謝王怡鈞學長、李淑玲、黃惠珮學姐、鄭自君同學的實驗指導；再者則要感謝同甘共苦的實驗室伙伴們，再靜、博修、靜玉、奉微、秀容、郁雯及學弟們的幫忙，沒有他們的協助，實驗將無法如此順利進行。

最後，謹以此論文獻給我的母親、岳父、岳母、家人及我摯愛的妻子瓊瑋和可愛的女兒敏俐，在日子最艱苦的時後，是他們的包容與鼓勵，引導我向前邁進；看到敏俐健康活潑的笑容，深覺一切付出都是值得。由衷感謝。

黃建寧 謹誌於

中山醫學院醫學研究所

中華民國八十五年一月

# 目 錄

	頁次
中文摘要 (Chinese Abstract) .....	1
英文摘要 (English Summary) .....	4
第一章 自體免疫疾病 .....	7
第二章 硬皮症特論 .....	11
第一節 硬皮症之臨床分類 .....	11
第二節 硬皮症之病理機轉 .....	12
第三節 硬皮症病人皮膚之纖維母細胞 .....	14
第四節 硬皮症之治療 .....	16
第三章 細胞-基質間之阻抗感測器 (Electrical Cell-Substrate Impedance Sensor, ECIS) 其設計背景及其感測特性 ..	19
第四章 材料與方法 .....	21
第一節 ECIS 技術 .....	21
§ 4-1-1 黃金薄膜電極之製作 .....	21
§ 4-1-2 內裝擴大器及數據處理裝置 .....	23
§ 4-1-3 ECIS 感測之數學模式 .....	26
§ 4-1-4 ECIS 感測數據之處理法 .....	30
第二節 藥品與材料 .....	31
第三節 儀器 .....	32
第四節 實驗方法 .....	33
§ 4-4-1 皮膚來源、處理法及纖維母細胞之培養 .....	33
§ 4-4-2 使用 ECIS 感測細胞阻抗及微運動 .....	33
§ 4-4-3 Interferon(IFN $\alpha$ -2b)對纖維母細胞微運動之影響	34
§ 4-4-4 數據之解析 .....	35
第五章 結果 .....	36
§ 5-1 硬皮症病人和正常人皮膚纖維母細胞之比較 .....	36
§ 5-2 細胞之附著與微運動 .....	36
§ 5-3 電腦模擬之資料分析 .....	37

§ 5-4 細胞間阻抗 Rb 及細胞腹面與基質間之平均高度 h ...	38
§ 5-5 正常與硬皮症纖維母細胞微運動之比較 .....	38
§ 5-6 硬皮症病人血清對纖維母細胞之影響 .....	39
§ 5-7 疾病活動性 (Disease activity) 對 纖維母細胞微運動之影響 .....	40
§ 5-8 SLE 及 SS 病人血清對纖維母細胞微運動之影響 .....	42
§ 5-9 干擾素 IFN $\alpha$ -2b 對纖維母細胞微運動之影響 .....	42
第六章 討論 .....	56
第七章 結論 .....	69
參考文獻 .....	71

圖表：

	頁次
表一	13
圖 1	14
表二	17
圖 2	22
圖 3	24
圖 4	25
圖 5	27
表三	40
表四	41
表五	43
圖 6	44
圖 7	45
圖 8	46
圖 9	46
圖 10	47
圖 11	48
圖 12	49
圖 13	50
圖 14	51
圖 15	52
圖 16	53
圖 17	54
圖 18	55
圖 19	60
圖 20	61
圖 21	62

## 摘要 ( Abstract )

硬皮症 (**Systemic Sclerosis; Scleroderma ; SSc**)是一種全身性之自體免疫疾病(**Autoimmune disease**)，主要之特徵在於廣泛性的結締組織纖維化(**Connective tissue fibrosis**)以及全身多處器官退化。其致病之機轉目前仍不完全明瞭。一般認為有三大因素參與：

- (1)免疫系統之改變，此包括自體抗體產生及 **T** 細胞之激活；
  - (2)內皮細胞活化而導致的微血管壁損傷；
  - (3)活化之纖維母細胞異常增生大量的細胞間質蛋白質。
- 此各因素間互相作用之影響，最後終於產生纖維化。

爲了瞭解硬皮症病人血清及干擾素 **IFN  $\alpha$ -2b** 對纖維母細胞的影響，本研究應用了一種新的生物監測裝置，稱爲細胞-基質間之電阻抗感測器 (**ECIS; Electrical Cell-Substrate Impedance Sensor**)，此裝置乃於西元 1984 年由 **Dr.Giaever** 和 **Keese** 所發明，其主要原理爲讓細胞生長在已鍍上黃金薄膜電極的培養皿上，使形成一完整之單層細胞薄層 (**Monolayer cells**)，然後供給一微量交流電壓連續測量此間之電阻抗變化，經過資料計算及分析後，可定量地得知細胞間阻抗 (**Rb**)，細胞腹面與基質間的平均高度 **h** 以及細胞微運動之反應變化。目前已確知細胞之微運動與其代謝活動狀態及程度有關。

將取自硬皮症病人和正常人皮膚的纖維母細胞依一定的細胞密度 ( **$1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>**) 培養在 **ECIS** 培養皿中，使用含數種不同病人血清 [包含硬皮症、系統性紅斑性狼瘡(**Systemic lupus**



erythematosus;SLE)、修格連氏症候群(Sjogren's syndrome;SS)以及正常人的血清]的培養基加以培養後，可利用 ECIS 系統分別測量其 Rb、h 及微運動之變化。另外本實驗亦做了 IFN  $\alpha$  -2b 對纖維母細胞微運動影響之研究。

本研究結果顯示：

- (1)硬皮症纖維母細胞之局部微運動較諸正常之纖維母細胞活躍；
- (2)硬皮症纖維母細胞具有較大之細胞間阻抗 ( $Rb = 2.7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ )，與較低之細胞平均高度 ( $h = 150.7 \text{nm}$ )；而正常纖維母細胞之 Rb 值則顯然較小 (為  $0.8 \Omega \cdot \text{cm}^2$ )，而其 h 值則顯然較高 (為  $303.75 \text{nm}$ )；
- (3)硬皮症病人之血清具有抑制正常纖維母細胞微運動之作用，且其抑制效果，與供與該血清之硬皮症病人之疾病活動程度成正相關。然此相同之血清對同是硬皮症之纖維母細胞則無抑制作用；
- (4)干擾素 IFN  $\alpha$  -2b 之濃度為 1000 u/ml 時，對硬皮症纖維母細胞之微運動有抑制效果，且不影響其細胞形態；相對之下，對正常之纖維母細胞並不會影響其微運動與外形。

由此證知硬皮症病人之血清中含有某種抑制因子，影響到硬皮症纖維母細胞之微運動，同時，硬皮症纖維母細胞因為一直處於被激活的狀態，故對其本身之血清失去敏感性。而至於其具有較高的 Rb，則可能基因於其細胞緊密接合之故；而其具有較低之 h 值則可能與細胞活動力旺盛，因而附著深入基質有關。至於 IFN  $\alpha$  -2b，因其具有抑制硬皮症纖維母細胞微運動或其代謝活動力之故，由此研究結果推測其於硬皮症

之治療，應當有效。總之，透過 **ECIS** 系統，吾人對硬皮症纖維母細胞之生物特性已有進一步之認識，此結果將有助於對硬皮症致病機轉之瞭解，從而尋求有效之治療途徑。

## **ABSTRACT**

**Systemic sclerosis (SSc) is one kind of the autoimmune disorders, characterized by generalized connective tissue fibrosis and degenerative changes in the blood vessels, skin, skeletal muscle, and certain internal organs, etc.. Its pathogenesis is still poorly understood. However, some events are supposed to be involved:**

- (1) The immunologic changes, including the autoimmune event trigger and the T-cell activation;**
- (2) The vascular wall lesion resulted from endothelial cell activation or injury; and**
- (3) The overproduction of the extracellular matrix proteins produced by activated fibroblasts.**

**While each event may in reality interact with each other via mediations of cytokines and/or growth factors, the complex final fibrosis emerges.**

**To investigate the influences of sera from systemic sclerosis patients and interferon ( IFN )  $\alpha$  -2b on the fibroblast micromotions in tissue culture, we utilized a newly developed electrical biosensor called Electrical Cell-Substrate Impedance Sensor ( ECIS ) to study the cell behavior changes. The ECIS was originally developed in 1984 by Dr. Giaever and Keese, who used**

alternating current signals to detect cell attachment, cell morphological changes and cellular micromotions by continuously monitoring impedance fluctuations from cultured cell lines on small gold film electrode. It has been reported that the cellular micromotions are directly reflecting the cellular metabolism. Furthermore, while data calculation and analysis were performed from the derived model, the junction resistance between the adjacent cells called  $R_b$ , and the height between basal cell surface and substratum named  $h$  were also quantified.

Dermal fibroblasts were obtained from patients with SSc and normal controls, and cultured in medium containing fetal bovine serum or sera from SSc, systemic lupus erythematosus (SLE), Sjogren's syndrome (SS) patients or normal individuals. Confluent cells were exposed to IFN  $\alpha$ -2b for 24 hours in some experiments. Both the micromotions and the junctional resistance ( $R_b$ ) were measured with ECIS system, whereas the change in cell morphology was examined by a phase-contrast microscope.

The results reveal that :

- (1) The micromotions of SSc fibroblasts (SF) were more active than those of normal fibroblasts (NF);
- (2) The  $R_b$  and  $h$  level were  $2.7 \Omega \cdot \text{cm}^2$  and  $150.7 \text{ nm}$  ; and,  $0.8 \Omega \cdot \text{cm}^2$  and  $150.7 \text{ nm}$  for SF and NF respectively;

- (3) SSc sera can inhibit the micromotions of NF but not those of SF; the inhibitory effect of SSc sera on fibroblast micromotions was positively correlated with disease activity; sera from SLE and SS patients have no inhibitory effect on micromotions of SF;**
- (4) IFN  $\alpha$ -2b can inhibit the micromotions of SF but not those of NF at the concentration of 1000 u/ml without affecting the cell morphology.**

**The evidences show that certain inhibitory factors might exist in the SSc sera, thus SF lost its sensitivity due to being persistently activated per se. The higher Rb level of SF is considered to be due to their characteristic tight cell junction; while the lower h level due to their capability to attach deeply into the substratum because of their energetic metabolic activity. Consequently, IFN  $\alpha$ -2b therapy is expected to be beneficial for treatment of SSc because of its capability to inhibit the cellular micromotions as well as metabolic activity of SF in vitro. The high light of using the ECIS technology has already opened a new approach to the study of SSc.**

## 第一章 自體免疫疾病

自體免疫疾病(**Autoimmune diseases**)包含一群因自體免疫系統發生異常而產生之疾病，其病變可能廣泛散布於全身各處，如皮膚、肌肉、關節、腎臟、及心臟等，我們稱之為全身性自體免疫疾病(**Multisystem autoimmune diseases**)，此中包括類風濕性關節炎(**Rheumatoid arthritis; RA**)、系統性紅斑性狼瘡(**Systemic lupus erythematosus; SLE**)、修格連氏症候群(**Sjogren's syndrome; SS**)以及硬皮症(**SSc**)等；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**)，其常侵犯之器官，包括甲狀腺、腎上腺以及胰臟等。而本論文則以硬皮症為研究對象。

目前有關自體免疫疾病之致病機轉仍不十分清楚。一般相信和環境、遺傳因子與免疫系統均有關聯。在環境因子方面，如長期暴露於含有有機溶劑之氣體中，例如 **benzene** 或 **vinyl chloride**，將有可能導致硬皮症的發生【1】；在遺傳因子方面，如部分 **SLE** 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**)；又如硬皮症，有部份病例則與染色體異常有關【2】；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，這些抗體會對抗本身擔任重要生物功能的酵素或結構蛋白質，Ehrlich 特將之命名為恐怖的自體毒物 (**Horror autotoxicus**) 【3】，可見一旦自我防禦系統崩潰，廣泛性或局部性的組織傷害就會出現【4】。除此之外，在發炎反應發生時所產生的各種 **cytokines** 或 **growth factors (GF)** 等，它們的減少或增加，也與自體免疫疾病之形成有關【5-7】。近來更有學者提出 "**Autogen**" 的觀念，指出它們有別於傳統的免疫反應，就如同 **oncogen** 導致惡性腫瘤一般，它們的存在將直接造成自體免疫疾病。目前發現的 **autogen** 有 **Fas** 及 **oncogen bcl-2**，已知它們參與細胞設定性死亡 (**Apoptosis**) 的過程【8-9】。

由檢查自體免疫疾病的病人血清中可發現各種不同的抗體【10】，例如 **SLE** 的病人有對抗 **Smith antigen**、**U1-nRNP**、**SS-A/Ro**、**SS-B/La**、**double-strand DNA**、**histons**、**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**、**signal recognition particle** 等抗體；**SS** 的病人有對抗 **SS-A/Ro**、**SS-B/La**、**nucleolar organizing**

**region-90** 等抗體；而硬皮症的病人則有對抗 **centromere**、**topoisomerase I**、**RNA polymerases** 及 **fibrillarin** 等抗體。有關它們的形成，總括來說是因為體內失衡導致免疫系統對抗本身主要細胞成分而產生抗體，至於目前的理論則包括

- (1) 本身細胞成分異常而成為自體抗原；
- (2) 免疫系統之異常而盲目自我攻擊【11】；以及
- (3) 分子相似論 (**Molecular Mimicury**)，此為免疫系統對付外來抗原時與自身成分發生交叉反應所致【12】。當這些抗體存在於病人血清中時，會與細胞表面之抗原反應，或與抗原形成免疫複合體，隨著血液流經全身，而一旦它們沉積在組織器官上時，即造成傷害【13】。

惟除了自體抗體之外，仍有其它之因子參與病變。例如血清中含有種類眾多的 **cytokines**、**lymphokines** 及 **growth factors (GF)**，此中包括 **tumor necrotic factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )**、**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- $\beta$ )**【6-7,14-15】等等，此等免疫細胞因子除了參與淋巴球和血管內皮細胞(**Endothelial cells**)之間之交互作用外，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，其中藉著調控纖維母細胞的功能所造成的組織纖維化，將進一步影響組織器官功能，諸如 **SLE** 的血管炎 (**Vasculitis**)，硬皮症的系統性硬化等，可為佐證。

在自體免疫疾病的致病過程中，組織細胞受到活化之後產生之功能異常自亦不容忽視，例如 **RA** 病人關節囊中滑膜細胞 (**Synovial cells**) 被激活後之增殖；自體免疫性血管炎中血管內皮細胞受到活化後造成之管壁傷害；或是硬皮症纖維母細胞擁有大量增生 **collagen** 或間質 (**Extracellular matrix ; ECM**) 蛋白質的能力等，在在顯示研究此等細胞的行為特性，將有助於對疾病的瞭解。

誠然自體免疫疾病之成因極為複雜，綜合生物、臨床醫學、生化、病理、免疫、細胞、組織等之各種研究正方興未艾，舉凡病人的臨床表現、血清及病變組織之病理或分子層次之觀察，正利用各種方法加緊研究中，此亦為本研究刻正努力的方向。

## 第二章 硬皮症特論 ( **Systemic sclerosis** )

### 第一節 硬皮症之臨床分類

#### (**Clinical classification of SSc**)

硬皮症 (**Systemic sclerosis; SSc; Scleroderma**) 是結締組織纖維化和全身多處器官退化所造成的全身性自體免疫疾病，它最大的特徵為皮膚、血管、關節、骨骼肌肉及內臟器官包括腸胃道、肺臟、心臟和腎臟等之纖維化。其臨床診斷之主要依據為肢體近端皮膚變硬或指 (趾) 皮硬化，指端點狀結痂或兩側性肺基底部分間質性纖維化等，根據其臨床特徵又可分為兩型：一為瀰漫性皮膚硬化症 (**Diffuse cutaneous scleroderma**)，特徵為其肢體、面部和軀幹皮膚迅速形成對稱性增厚，且常發生合併腎臟、心臟、肺臟等疾病，於血清中檢出 **anti-topoisomerase I antibody** 之比率甚高；另一型則為局限性皮膚硬化症 (**Limited cutaneous scleroderma**)，特徵為手指、四肢遠端及面部對稱性皮膚增厚，且常合併 **CREST** 症候群，其中包括鈣鹽沉著 (**C; Calcinosis**)、雷諾氏現象 (**R; Raynaud's phenomenon**)、食道吞嚥困難 (**E; Esophageal dysmotility**)、指 (趾) 皮硬化 (**S; Sclerodactyly**) 以及毛細血管擴張 (**T; Telangiectasia**) 等，血清中則常可檢出 **anti-centromere antibody** 【16-17】。

此種病例分佈於世界各地，以美國為例，每年每百萬人中約有二十個新病例出現，女性比男性人數多 2 - 3 倍，病人多在嚴重發病數年後，由於腎衰竭或呼吸衰竭而死亡【16-18】。

## 第二節 硬皮症之病理機轉 (Pathogenesis of SSc)

如同其它自體免疫疾病一樣，硬皮症的致病機轉迄今仍未解開，一般而言有下列三方面的討論【19-20】：

- (1) 細胞間質異常增生：由於發炎反應中產生之一些因子激使纖維母細胞活化，導致其功能異常而大量產生 collagen【21-22】、fibronectin【23】、glycosaminoglycan【24】及 prolyl 4-hydroxylase【25】等而造成纖維化；纖維母細胞的活化於本病病理機轉上扮演極重要的角色。
- (2) 內皮細胞及微血管壁損傷：由於一些具"內皮細胞毒性"之因子存在，如 granzyme 1【26】、免疫複合體、抗體、或被激化之免疫細胞附著，(如 T cells、monocytes)，均可能導致血管損傷。
- (3) 免疫系統之改變：包括 T cells、B cells 之超高活性 (Hyperactivity)，CD +4 T cells、血清中 IL-2 及 IL-2 接受體 (Soluble IL-2

**receptor ; sIL-2R)**水平顯著升高【20】，以及多種自體抗體之檢出(表一)。

表一.硬皮症之自體抗體

**(Autoantibodies of systemic sclerosis).**

Anticentromere antibodies  
Antinuclear antibodies (speckled, nucleolar, others)  
Antinucleolar antibodies  
    RNA polymerase I  
    Fibrillarin (U3 RNA protein complex)  
    Nucleolar 4-65 RNA  
    U2 RNA protein complex  
Polymyositis-systemic sclerosis overlap (Pm/Sci)  
Antitopoisomerase I (formerly Scl-70)  
Anticollagen type IV (basement membrane structure)  
Antilaminin (basement membrane attachment protein)  
Antiribonucleoprotein (RNP)  
JO-1  
SS-A (Ro), SS-B (La)  
Ku

摘錄自 Arthritis and allied condition 12th Edition,

Chapter 74:1293-1299. LeRoy EC, LEA & FEBIGER, 1993.

總括而言，由於不明原因的刺激，激發 T 細胞之免疫反應，因而促使淋巴球附著於內皮細胞上並釋出 **granzyme 1**，微血管壁受損，導致通透性增加，以及一些參與纖維化之 **cytokines** 釋出，激活纖維母細胞，致使細胞間質異常增生，造成纖維化，而活化的細胞間質表現再度刺激 T 細胞，如此週而復始，纖維化即愈趨嚴重【20】，其可能之活化途徑簡示如圖1。

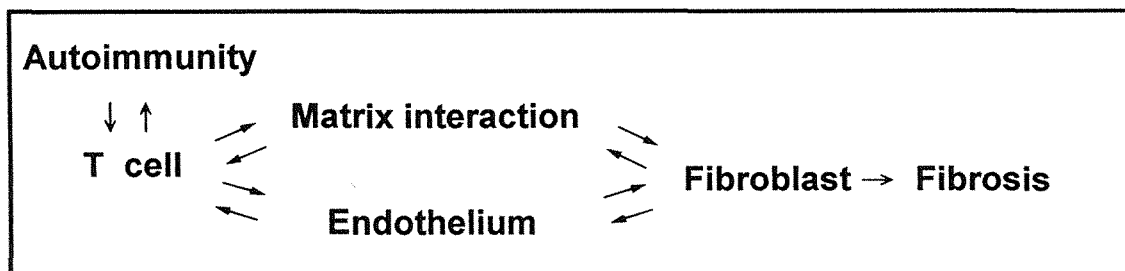


圖1. Proposed activation cycle for systemic sclerosis.

(摘錄自Arthritis and allied condition 12th Edition, Chapter 74:1293-1299. LeRoy EC, LEA&FEBIGER, 1993.)

### 第三節 硬皮症病人皮膚之纖維母細胞

#### (Dermal fibroblasts of SSc patients)

纖維母細胞乃是由間葉 (Mesenchymal) 分化生成之間質 (Stromal) 細胞，具有遷移 (Migration)、趨化性 (Chemotaxis)、細胞附著 (Attachments) 及合成間質蛋白質和酵素等功能【27】，其於傷口癒合和組織纖維化之過程中，均為不可或缺之角色。Bayreuther 等人指出，纖維母細胞有七種亞型【28】，其中之肌纖維母細胞 (Myofibroblasts) 據推測與硬皮症之發生有關【29-30】。而於研究上，因其具有靠依附基質生長 (Anchorage-dependent growth) 及增生密度控制 (Density-dependent inhibition of

**proliferation**) 之特性，且因同株繁殖 (**Clonal propagation**) 其原有特徵形態容易改變，因此惟有早期幾代 (約 3 至 6 代) 能使用於研究【31】。

有一些因子可能會影響纖維母細胞之趨化活性：例如發炎細胞或血小板所釋出的 **cytokines** (**TGF- $\beta$** 、**leukotrienes**、**PDGF** 等)；以及細胞間質蛋白質之吸引 (如 **collagen I**、**II**、**IV**、**collagen fragments**、**fibronectin**、**fibronectin fragments**、**elastin** 等)。而已活化之硬皮症纖維母細胞則偏好附著於某些間質蛋白質，如 **fibronectin**、**laminin**、**collagen I**、**IV** 等【32】，此些現象可能與於纖維母細胞之細胞表面，對這些蛋白質的接受體 (如  **$\beta 1$  integrin**) 之表現增加有關【33】。此外，已發現硬皮症皮膚之纖維母細胞較諸正常之纖維母細胞產生更多之 **collagen**、**fibronectin** 等【21-23】，顯示其有別於正常之遺傳表型 (**Phenotype**)，而正處於一種活化狀態。另由其基因表現亦可看出，硬皮症纖維母細胞確能表現出更多之  **$\alpha 1(I)$  collagen**、**TGF- $\beta$  collage gene I**、**III** 以及 **fibronectin** 之 **messenger-RNA**【20-21；34-38】，經由這些基因調控，產生更多的 **collagen** 或生長因子。從過去文獻也得知，血清中許多物質的含量多寡，包括 **collagen** 的代謝產物、各種 **GF**、

**cytokines** 的濃度高低，以及免疫因子的表現，都與硬皮症纖維母細胞的活息息相關。

#### 第四節 硬皮症之治療 ( **Treatments of SSc** )

硬皮症因病因複雜，迄今仍為一個無法完全治癒之疾。目前於臨床上之治療方針乃是針對其疾病階段、內臟器官受波及之程度或從可能之致病機轉上給與投藥。而其預後之評估則基於皮膚侵犯等級評量 (**Skin score measurements**) 以及病人之主訴和醫師之客觀評估而定【39】。

藥物治療方面則包括針對血管疾病之血管擴張劑，如 **Ca<sup>++</sup>-channel blockers**、**ACE inhibitors** 等；針對抗免疫反應之免疫抑制劑如 **cyclophosphamide**、**cyclosporine-A**、**antithymocyte globulin** 等；針對抗纖維化反應之藥物，包括 **D-penicillamine**、**colchicine**、**IFN- $\alpha$** 、**IFN- $\gamma$** 、等；以及針對抗發炎反應的皮質素類固醇 (**Corticosteroids**) 及非固醇抗炎藥 (**NSAIDs**)等 (表二)【16,40-41】。雖然種類繁多，惟限於缺乏大規模前瞻性之控制試驗，迄今仍無單一之藥物或藥物之組合能提供一個滿意之預後。因此有關硬皮症的治療，今後仍有賴醫界及生物學家們之共同努力。

表二. Current approaches to therapy for systemic sclerosis.

Treatment	Mechanism of action	Examples	Comments	Efficacy in clinical trials	
				Uncontrolled	Controlled
1. Vasodilator (a) Oral	Calcium channel blockers: ACE inhibitors: Others	Nifedipine retard, diltiazem	Response is idiosyncratic	Yes	?
		Captopril, enalapril	In DcSSc may be renoprotective	Yes	?
Fish oil, vitamin E, epogam		Innocuous agents with some symptomatic benefits	Yes	Yes	
(b) Intravenous	Prostanoids	Prostacyclin, PGE	Benefit persists up to 4 months, can be given prophylactically for winter-time protection from digital ulceration	Yes	?
2. Immunomodulatory (a)	Non-selective immunosuppressives:	Cyclophosphamide, Chlorambucil, azathioprine	Particularly in lung fibrosis	Yes	No
		(b)	Selective immunosuppressives:	Cyclosporin-A	Improves skin sclerosis (? increases renal crisis)
		Antithymocyte globulin	Anecdotal benefit	Yes	?
		Plasmapheresis	Extracorporeal photoactivated 8-methylpsoralen to inhibit activated T-cells	Yes	In progress
		Photopheresis			
		Human gammaglobulin			
3. Antifibrotic	D-Penicillamine Interferon Colchicine	$\alpha$ or $\gamma$	Inhibits collagen fibril cross-linking	Yes	In progress
			Reduces fibroblast collagen production	Yes	?
			Inhibits fibroblast collagen release	No/yes	?
4. Anti-inflammatory	Corticosteroids	Prednisolone Methylprednisolone	Beneficial for myositis, arthralgia, lung disease	Yes	?
	NSAIDs		For arthralgia, tendinitis, pericarditis		

Yes = proven benefit  
No = proven no benefit  
? = inconclusive/conflicting results

(摘錄自 Br J Rheumatol 1995; 34: 3-7.)



**IFNs** 是由單核球所分泌的干擾素，具有抗病毒 (**Anti-viral**)、抗增殖 (**Anti-proliferation**) 及免疫調節效果 (**Immunomodulatory effect**)，目前應用於治療慢性活動性肝炎【42】、**mutiple sclerosis**【43】、**RA**【44-45】以及 **discoid LE**【46】等。許多文獻亦報告，無論在實驗室或臨床上，**IFN- $\alpha$**  對硬皮症的改善確有療效【47-49】。

### 第三章 細胞-基質間之阻抗感測器 (**Electrical Cell-Substrate Impedance Sensor, ECIS**) 其設計背景及其感測特性

往昔研究細胞之行爲或其形態之變化，多利用錄影、緩時放影法 (**Cinematographic time lapse method**)，此方法之缺點爲較費時，且其獲得之訊息多屬巨觀之變化。迄至西元1984年 **Giaever** 和 **Keese** 等人合作設計了一個新的生物活動監測器，方始能得微觀之探討。其原理乃是利用交流電對細胞所產生的電阻訊號來監測培養皿上之細胞行爲，此一技術稱爲『細胞-基質間之電阻抗感測法』(**Electrical Cell-Substrate impedance Sensor**)，簡稱爲 **ECIS**法【50-62】。整個實驗設計的核心乃在於於在培養皿上鍍上一層黃金薄膜電極，然後將一定數目之細胞 ( $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>) 培養於其上，此時若供應一微量交流電壓，並連續測量其阻抗變化時，即可觀察當細胞附著於培養皿上或伸展時，由於細胞本身會影響電流大小與方向，故分析其阻抗之改變，即可定量地得知細胞之形態與運動之變化。又因阻抗的變動極爲敏感，故一旦外界之環境如溫度、酸鹼度、化學藥物或其它生物環境因子改變時，即可立即得知細胞形態和運動之反應。另外根據報告，這些微電流對細胞本身

之外形與分裂週期並無可測量得到之影響，因此 **ECIS** 應是一種非侵入性之監測技術。

於此模式設計中，細胞必須以單層 (**Monolayer**) 生長於培養皿上，而表皮細胞、內皮細胞及纖維母細胞恰好均具有此特性。如前所述，纖維母細胞於硬皮症的致病機轉上佔有重要之角色，利用新發展之 **ECIS** 技術以感測硬皮症纖維母細胞之特性，應具有突破性。

至於細胞行爲，其與基質間之交互作用一直有多方面之研究。以纖維母細胞爲例，其由懸浮之狀態附著到基質上時，約需花 **30** 分鐘之時間，其後細胞會變扁，再伸展開來。接著，利用細胞質內的細胞骨骼 (**Cytoskeleton**) 如微絲 (**Microfilaments**)，以每小時數微米 (**Few micrometers**) 之速度向四周爬行。此種細胞之行動 (**Motility**) 常見發生於傷口癒合、細胞組織恆定之維持、對抗外侵物質、或早期之胚胎發育中。

組織纖維化一般被認爲是傷處過度修復之結果，因此推論透過研究纖維母細胞的局部運動，應可獲得組織纖維化之相關訊息。

## 第四章 材料與方法

### (Materials and methods)

#### 第一節 ECIS 技術 (The ECIS technology)

已如第三章之簡介，ECIS 於 1984 年由 Giaever 及 Keese 合作開發以來，其裝置與模式已發展成研究細胞微觀之生理反應與微運動中深具潛力之一種新技術

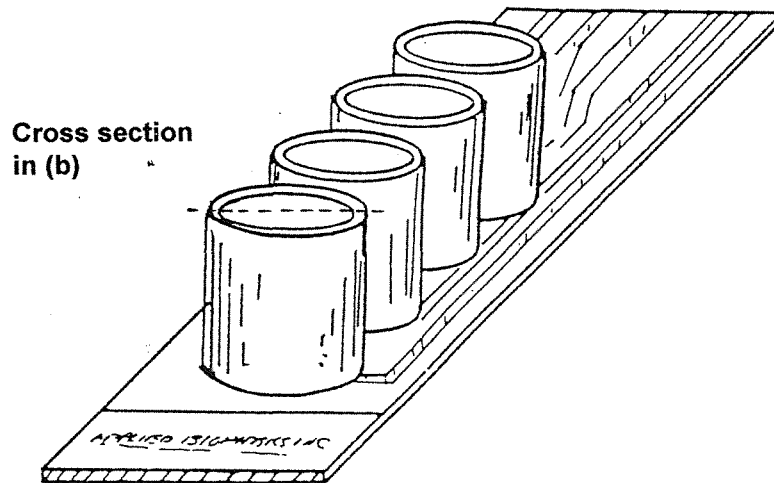
【50-62】。於此就其有關之裝置、操作、理論與數據處理法介紹如下。

##### § 4-1-1 黃金薄膜電極之製作

##### (Gold electrode fabrication)

黃金薄膜電極之製造，根據 Giaever 及 Keese 所提出之方法【62】，整個系統含 5 個小培養皿，每個培養皿中各鍍上一層厚 50 nm、直徑 250 ~ 280  $\mu\text{m}$  之圓形黃金薄膜電極（如圖 2），此電極再藉由另一個大電極與一擴大器相連，阻抗之變化即由此線路記載至電腦上。此外，培養皿在最候製造完成之前，需以紫外線照射 12 分鐘以上，以使黃金電極產生親水性，而能使細胞易於附著。此電極之面積約  $10^{-3} \text{ cm}^2$ ，以如此微小之面積，才能使細胞於其上所產生之阻抗變化呈現最大，而不致於被培養基本身產生之阻抗所干擾影響。

(a)



(b)

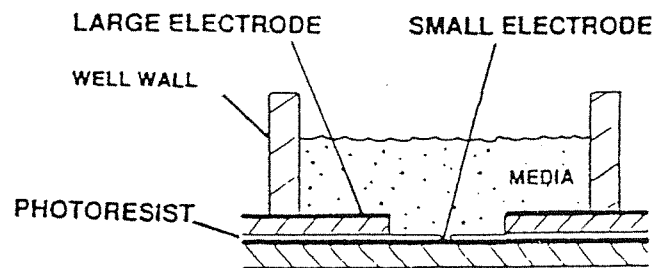


圖 2. Construction of the electrode system.  
(a) Alignment of cultivation wells with electrode.  
(b) Cross section of cultivation well and the electrode deposition.

## § 4-1-2 內裝擴大器及數據處理裝置

### (The circuit connections)

**ECIS** 之裝置如圖 3。它應用 **4000 赫茲 (Hz)** 之頻率及 **1 伏特 (V)** 之交流電壓，經過一百萬歐姆 (**1 M  $\Omega$** ) 之電阻器，以產生穩定的電流通過細胞，而於黃金薄膜電極上產生之電位差，則使用數位化擴大器監測 (**Lock-in amplifier**)，將所得之入相及出相 (**in and out-of phase**) 之電壓資料全部儲存至個人電腦上，經過分析處理，再將此些資料，根據需要轉換成各種電腦圖形。電腦同時亦控制擴大器之電流輸出，並於實驗過程中切換至不同電極記錄結果。

全套 **ECIS** 之設備包括 **5-well gold fabricated plate** (由 **Giaever** 實驗室所提供)、**digital lock-in amplifier (EG & G Princeton Applied Research Model 5301 lock-in amplifier)**、及 **486 DX-66 IBM compatible personal computer** 等。

亦即，於監測纖維母細胞微運動時，即將含黃金薄膜電極之培養皿，和 **lock-in amplifier** 與 **PC** 連接，應用 **1 V**、**4000 Hz** 的交流電通過 **1M  $\Omega$**  之電阻器，以供給穩定之電流，其裝置如圖 3 及圖 4 所示。

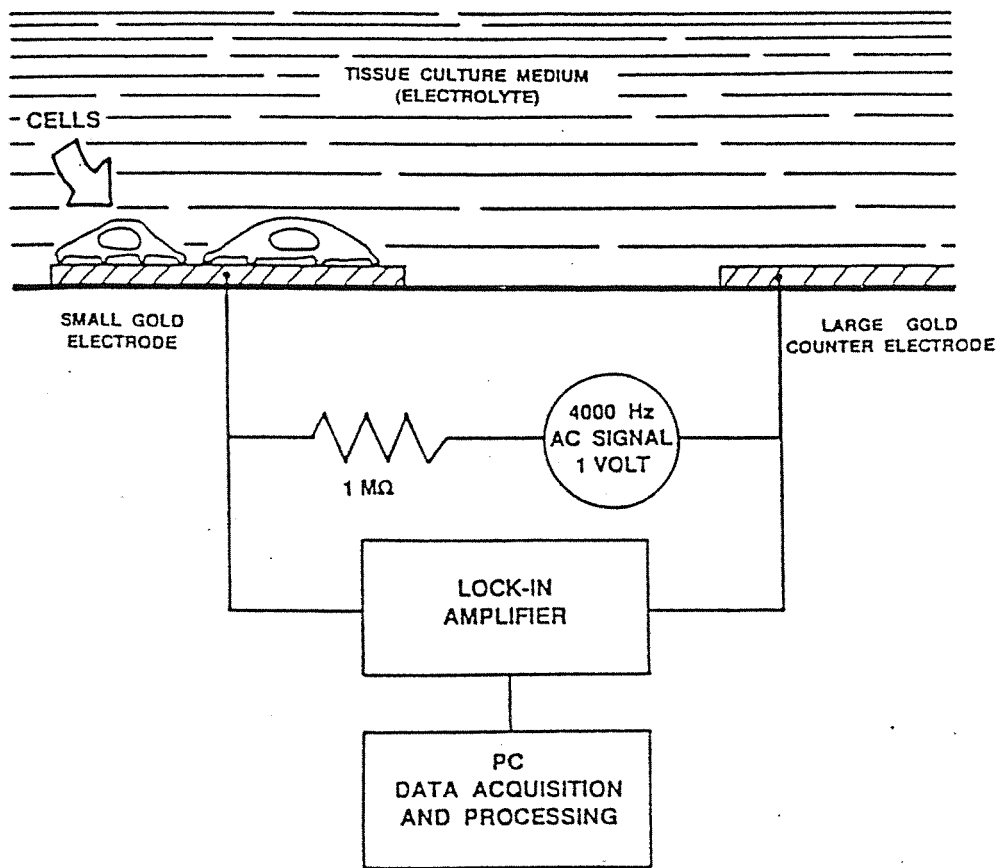
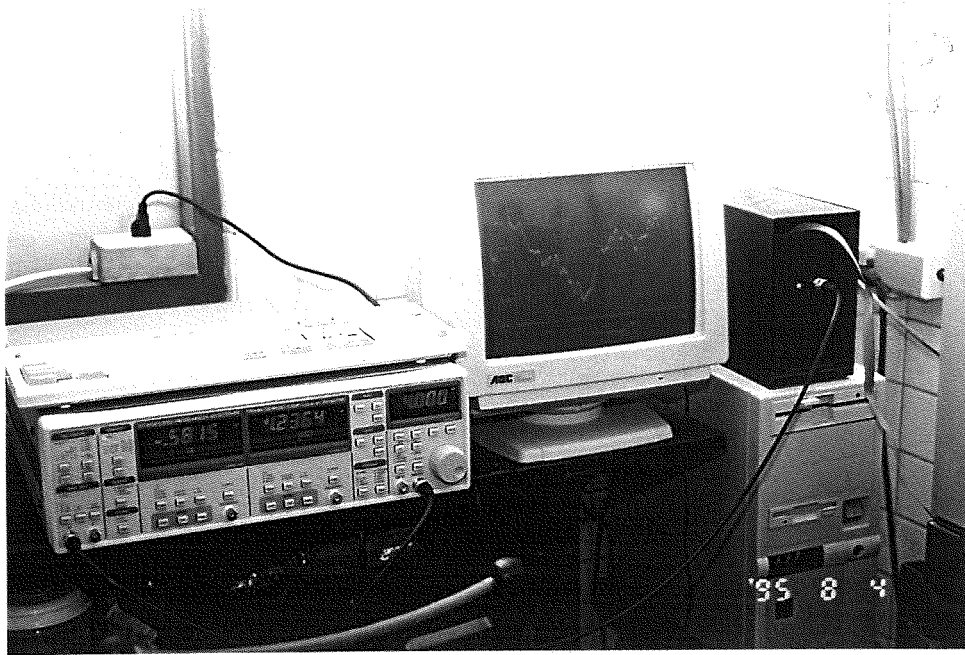


圖 3. Schematic setup and block diagram of ECIS.

a



b

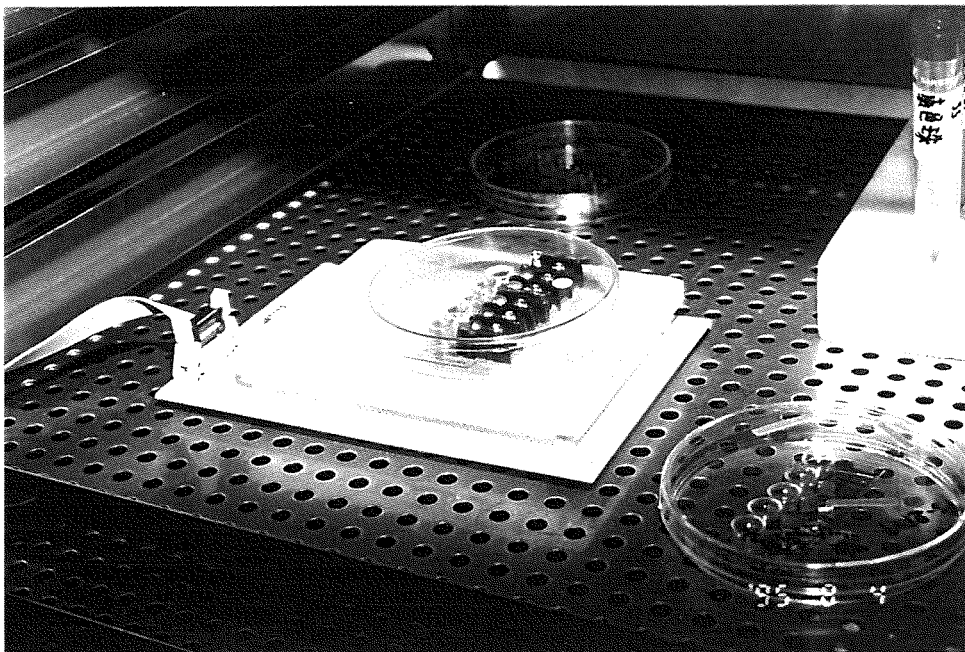


圖 4. ECIS Setup. (a)The lock-in amplifier and PC. (b)The ECIS wells in incubator.



### § 4-1-3 ECIS 感測之數學模式 (The cited model of ECIS)

當細胞於電極上附著、伸展或移動時，因細胞膜之故，它會阻礙電流之行進而產生阻抗變化。細胞的活動有振幅大小，且隨時間而變，而根據 **Giaever** 等人的實驗，這些阻抗變化主要基因於細胞腹面與基質間之平均高度 **h** 隨著細胞活動而變動之結果。亦即，它即時反應著細胞的"垂直運動"，而有別於用傳統照相方法所偵測得知之細胞"水平運動"，因細胞垂直運動之變化介於數個 **nm** 左右，肉眼無法觀察，因此吾人將之稱為細胞微運動 (**Cell micromotions**)，其只能經由精密之 **ECIS** 技術及電腦分析所測得；且藉由頻率掃描 (**Frequency scan**) 之結果分析，尙能獲得細胞腹面與基質間之平均距離 (**h**) 及相鄰細胞間連接處之平均阻抗 (**J u n c t i o n r e s i s t a n c e ; R b**) 【55】，進一步獲得細胞形態之相關訊息。

過去文獻指出，纖維母細胞並非完全平鋪地附著於基質上【63】，它利用偽足抓住基質，亦即，細胞腹面和基質之間存有一些距離 (**h**)。當微量電流 (約 **1 μamp**) 通過細胞時，系利用培養基作為電解質 (以 **DMEM** 為例，其具有一定之電阻係數  $\rho = 54 \Omega \cdot \text{cm}$ )，而電流所流經之方向，經實驗數據與各種模型之電腦模式圖形互相配

合調適之後，以 **Two-parameter model** 為最有可能，也就是說，電流分別為穿過細胞或由細胞與基質間之空隙穿出細胞間隙（圖 5）【55】。

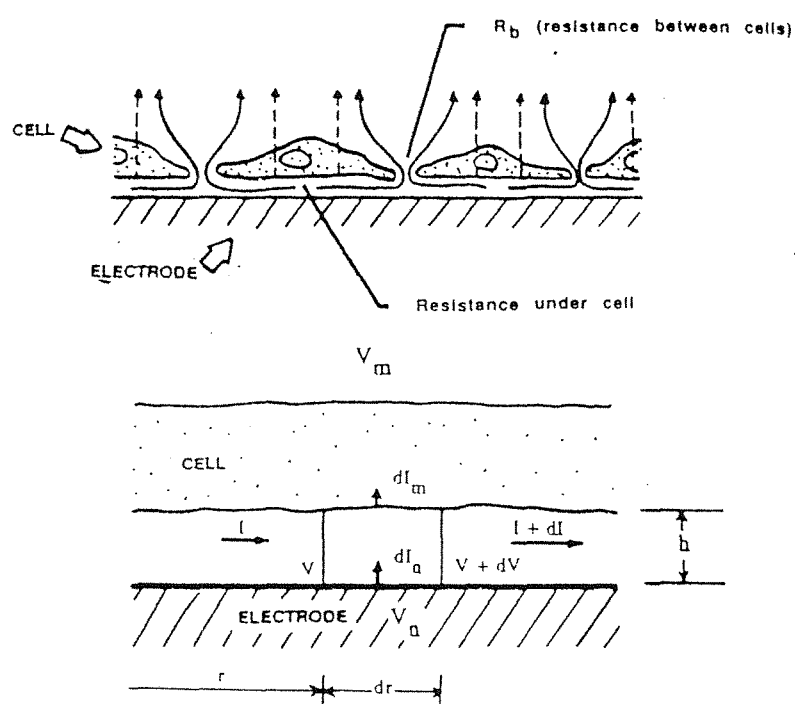


圖 5. A diagrammatic model for ECIS measurement.  
(摘錄自 Proc Natl Acad Sci USA 1991;88: 7896-7900.)

本研究乃是沿用西元 1991 年 **Giaever** 和 **Keese** 所提出之模式 (圖 5)，並應用此一模式中所導出於黃金薄膜電極上經細胞覆蓋之後所產生之阻抗變化之對應公式(1)、(2)及(3)，進行電腦模擬【55】。

$$\frac{1}{Z_c} = \frac{1}{Z_n} \left( \frac{Z_n}{Z_n + Z_m} + \frac{\frac{Z_m}{Z_n + Z_m}}{\frac{i\gamma r_c I_0(\gamma r_c)}{2 I_1(\gamma r_c)} + 2R_b \left( \frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m} \right)} \right) \quad \text{----- (1)}$$

式中

$$\gamma r_c = r_c \sqrt{\frac{\rho}{h} \left( \frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m} \right)} = \alpha \sqrt{\frac{1}{Z_n} + \frac{1}{Z_m}} \quad \text{----- (2)}$$

又

$$\alpha = r_c (\rho/h)^{1/2} \quad \text{----- (3)}$$

其中

**C** : capacitance of cell membrane

**I<sub>m</sub> (amp)** : transcellular current through the cell surface

**I<sub>n</sub> (amp)** : total current across the cell-covered electrode

**$R_b$  ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) : junction resistance between adjacent cells over a unit cell area.**

**$V_m$  (volt) : potential inside the cell**

**$V_n$  (volt) : applied voltage across the cell**

**$Z_c$  ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) : impedance of the cell-covered electrode.**

**$Z_m$  ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) : membrane impedance of the cells.**

**$Z_n$  ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ) : impedance of the cell-free electrode.**

**$h$  (nm) : mean height between basal cell surface and substratum.**

**$i$  :  $(-1)^{1/2}$**

**$r$  : radius of electrode**

**$r_c$  ( $\mu\text{m}$ ) : mean cell radius.**

**$\rho$  ( $\Omega \cdot \text{cm}$ ) : resistivity of the cell culture medium.**

**$\mathcal{Y}$   $I_0$  and  $I_1$  are modified Bessel functions of the first kind of order 0 and 1.**

#### § 4-1-4 ECIS 感測數據之處理法 (Data analysis of ECIS)

於使用固定頻率掃描記錄纖維母細胞微運動之同時，也使用不同的頻率作頻率掃描 (**Frequency scans**)，由此可得到對應之阻抗變化，將之製成曲線圖形，存於電腦。其次，再利用上述模式的電腦程式分析，做數據裁配 (**Data fitting**)，調整數個參數值，繪出電腦預測圖形以符合實驗曲線。此中之參數包括 **Rb**、 $\alpha$  及細胞電容量 **C**。完成之後可得 **Rb** 和  $\alpha$  值，再由公式(3)  
$$\alpha = rc(\rho/h)^{1/2}$$
，即可求得 **h** 值。

另一分析法為 **Fast Fourier Transform**，可分析隨機取樣和具振盪 (**Oscillating**) 特性的資料，由此可得到任一時間內細胞微運動之資訊。在每次實驗中，必需計算 **5120** 次之數據以繪出 **Power spectra** (為 **Fourier coefficients** 之平方) 之圖形，據此所繪出之對照曲線可更清楚地顯示出不同細胞微運動之差異  
【58】。



## 第二節 藥品與材料 (Reagents and materials)

培養細胞所使用之藥品：

**Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; high glucose, with L-glutamine, 110 mg/L sodium pyruvate; without sodium bicarbonate; GIBCO) ,**

**Fetal bovine serum (FBS ; GIBCO)**

**Antibiotic-Antimycin (prepared with 10000 u/ml penicillin G sodium, 10000  $\mu$ g/ml streptomycin sulfate and 25  $\mu$ g/ml amphotericin B as Fungizone in 0.85% saline; GIBCO)**

**PSN Antibiotic Mixture (prepared with 5 mg penicillin G, 5 mg streptomycin sulfate and 10 mg neomycin sulfate in 0.85% saline; GIBCO)**

**0.05% Trypsin/0.53mM EDTA-4Na (In HBSS without  $Ca^{++}$  and  $Mg^{++}$ ;GIBCO)**

**0.25% Trypsin (In HBSS without  $Ca^{++}$  and  $Mg^{++}$ ;GIBCO)**

**Interferon  $\alpha$ -2b (Schering Corporation,USA)**

血清之來源：

本實驗所使用之血清包括一位正常人的血清，以及數位已經被診斷為具有自體免疫疾病病人之血清。這些病人中有一位罹患 **SLE**，一位是 **SS** 病人；另三位是硬皮症病人，名字分別為 **Huang**、**Tang** 及 **Lin**，他們都屬於瀰漫性皮膚硬化症，且根據臨床記錄觀察，以 **Huang** 之病情最嚴重，併發有心臟、食道、肺臟及腎臟之侵犯；**Tang** 次之，合併有食道及肺臟之侵犯；而 **Lin** 則無合併內臟器官之疾患。

### 第三節 儀器與器具 (Instruments)

器具包括 **flask (Nunc)**、**24-well plate (Nunc)**、離心機(**KUBOTA KN-70**)、相位差顯微鏡(**ZEISS ID03**)、恆溫培養箱 (**37°C, 5%CO<sub>2</sub>; NAPCO-6100**)、**Water Bath(MODEL, DSB-1000)**。

**ECIS** 系統(如前)。

## 第四節 實驗方法 (Methods)

### § 4-4-1 皮膚來源、處理法及纖維母細胞之培養 (Source of skin biopsy and culture of human fibroblasts)

使用無菌技術將取自正常人之皮膚 (Foreskin) 以及硬皮症病人硬化之皮膚 (約 3-5 mm)，於室溫浸泡於 10% PSN 3 分鐘，然後移至 1% PSN 再泡 3 分鐘消毒乾淨，用 10 號解剖刀將皮膚切碎，平均分裝至 T-25 flask 內。接著將 flask 反面倒置，加入 5 ml cDMEM medium (DMEM + 10% FBS + 1% PSN)，培養於含 5% CO<sub>2</sub>、37°C 的恆溫培養箱中，經 24 小時後將 flask 小心置回正面繼續培養。當纖維母細胞長滿時 (Confluent)，用 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA 分拆細胞，並依 1:2 之 flask 比例分裝。如前所述，於本實驗中所使用之細胞為第 3 至第 6 代。

### § 4-4-2 使用 ECIS 感測細胞阻抗及微運動 (Impedance and micromotion monitoring)

使用 ECIS 感測細胞阻抗及微運動之實驗，其一般需要之細胞數目為每平方公分  $1 \times 10^5$  個。將此數目之細胞，先用含 10% FBS 之培養基使其完全穩定地附著於裝有黃金薄膜電極之培養皿上，利用 ECIS 測量細胞阻



抗及微運動後，換成含 5% 正常人血清的培養基繼續培養，24 小時後再測量一次其微運動，作為控制組，然後再換成含 5% 病人血清的培養基，於 24 小時後再測之，如此重覆上述步驟，每次約偵測 2-3 小時。而所有之操作過程，細胞均持續培養在含 5% CO<sub>2</sub>、37°C 的恆溫培養箱中。細胞之種類有正常人及硬皮症病人之纖維母細胞；而病人之血清則為硬皮症、SLE 及 SS 病人的血清。本實驗之目的，在於利用 ECIS 技術感測硬皮症、SLE 及 SS 病人之血清對正常人或硬皮症纖維母細胞之微運動所產生之影響。

#### § 4-4-3 Interferon(IFN $\alpha$ -2b)對纖維母細胞微運動之影響 (Effects of IFN $\alpha$ -2b on fibroblast micromotions)

以 4-4-1 節之方法培養細胞，於加入 IFN  $\alpha$ -2b 前測量其微運動 2 小時，其次於加入後 24 小時再測量其微運動。在 5 個長滿細胞之 well 中，分別加入 IFN  $\alpha$ -2b，所使用之濃度則分別為 0、100、1000、5000 及 10000 u/ml。實驗所用之細胞則為正常人或硬皮症之纖維母細胞。另外，所有過程並均使用相位差顯微鏡觀察其外形變化及生長情形。

#### § 4-4-4 數據之解析 (Data analysis)

如前所述，經頻率掃描後，根據模式導出的公式（本章 4-1-3），做電腦模擬找出適當之  $Rb$ 、 $\alpha$  及  $C$  值，利用電腦繪圖，並經由 **Fast Fourier Transform** 之計算，得到 **Power Spectrum** 之對照曲線。

## 第五章 結果 (Results)

### § 5-1 硬皮症病人和正常人皮膚纖維母細胞之比較 (Comparison between normal and SSc fibroblasts)

硬皮症病人與正常人皮膚之纖維母細胞，於形態上一般並無任何差異 (圖 6 a、b)。然由其初級組織培養 (Primary culture) 所需之時間觀之，前者開始生長之時間約需一個星期左右，於每三至四天更換新培養基之情況下，數量增加仍極為緩慢，第一次長滿 (Confluent) 整個 T-25 flask 之時間約需 40 天之久；而後者開始生長之時間只要 4 天，其數量增加迅速，只需約一個星期之時間即能長滿。此種起始生長不易之情形，推測應與硬皮症病人之皮膚已產生纖維化、硬化之現象有關。

### § 5-2 細胞之附著與微運動 (Cell attachments and micromotions)

將正常或硬皮症皮膚之纖維母細胞培養至 3-6 代時，以  $1 \times 10^5 / \text{cm}^2$  之細胞濃度分拆至 ECIS 培養皿中，啟動 ECIS 系統。當細胞於培養基質上由懸浮狀態至附著及伸展時，可獲得細胞對黃金薄膜電極產生電壓變化之圖形。細胞開始培養之時間為 0 起算，當入相電位差達到最大時，即表示細胞完全附著，正常纖維母細胞完全附著

之時間大於 2 個小時，(圖 7a)；而硬皮症纖維母細胞則通常少於 2 個小時，(圖 7b)，由結果顯示硬皮症纖維母細胞之微運動較諸正常之纖維母細胞明顯很多。

### § 5-3 電腦模擬之資料分析

#### (Data analysis from cited model)

根據 **Giaever** 提出之模式 (圖 5)【55】，作電腦模擬後，可獲知有關細胞形態之資訊。如前，把正常之纖維母細胞培養在 **ECIS** 培養皿中時，以各種不同頻率掃描後，得一實驗曲線，依 4-1-4 節所述，再調整  $\alpha$ 、**Rb** 及 **C** 值由電腦程式繪出圖形，然後找出符合實驗曲線的  $\alpha$  及 **Rb** (細胞間阻抗) 值，進而由公式  $\alpha = rc (\rho / h)^{1/2}$  得知細胞腹面與基質間的平均高度 **h**。一般我們從調整 **Rb** 開始，圖 8 顯示當設定參數  $\alpha = 3.2$ 、電容 **C** =  $2 \mu F / cm^2$  時，**Rb** 為 0.2、0.5、1、3、5  $\Omega \cdot cm^2$  時，所造成之圖形變化，當 **Rb** 增加時，低頻區之阻抗會增加，而高頻區之阻抗會減少。圖 9 則顯示當 **C** =  $2 \mu F / cm^2$ 、**Rb** =  $0.8 \Omega \cdot cm^2$ ，調整  $\alpha = 1、2、3、4、5$  時所造成的圖形變化。

#### § 5-4 細胞間阻抗 $R_b$ 及細胞腹面與基質間之平均高度 $h$ ( $R_b$ and $h$ levels)

頻率掃描、調整參數後，針對正常之纖維母細胞，可得圖 10a、b 之圖形。圖 10a 為標準化阻抗變化，圖 10b 為標準化電容變化，裁配參數得細胞間阻抗  $R_b = 0.8 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 、 $\alpha = 3.2$ 、 $C = 2 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ 、由估計  $r_c = 24 \mu\text{m}$  及公式  $\alpha = r_c (\rho/h)^{1/2}$  ( $\rho = 54 \Omega \cdot \text{cm}$ )，可求得細胞間與基質間之平均高度  $h = 303.75 \text{nm}$ 。至於硬皮症病人之纖維母細胞，圖 11a 為標準化阻抗變化，圖 11b 為標準化電容變化， $R_b$  為  $2.7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ， $\alpha = 5.3$ 、 $C = 1.7 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ 、估計  $r_c = 28 \mu\text{m}$ ，求得  $h$  為  $150.7 \text{nm}$ 。硬皮症之纖維母細胞顯然有較大之  $R_b$  及較低之  $h$  值。

#### § 5-5 正常與硬皮症纖維母細胞微運動之比較 (Micromotions of normal and SSc fibroblasts)

欲觀察細胞之局部運動，需施予  $4000 \text{Hz}$ 、 $1 \text{V}$  之交流電壓，如此可得到最大之訊號反應。圖 12 為正常與硬皮症纖維母細胞某一時段微量運動之比較。上面曲線為硬皮症纖維母細胞移動所造成之電壓變化，振幅改變明顯比正常纖維母細胞（下面之曲線）移動所造成的為大，表示硬皮症纖維母細胞之微量運動，較諸正常之纖維母細胞

大了許多。同時由其所產生之電位差高低比較，硬皮症纖維母細胞亦大於正常，此與硬皮症纖維母細胞具有較大 **Rb** 之結果互相吻合。

### § 5-6 硬皮症病人血清對纖維母細胞之影響

#### (Effects of SSc sera on fibroblast micromotions)

爲了瞭解硬皮症病人血清對纖維母細胞之影響，當使纖維母細胞培養於 **ECIS** 系統上時，將含 **10% FBS** 之培養基換爲含 **5%** 正常人血清之培養基，經過至少 **24** 小時之觀察後，發現不論是正常或病人之纖維母細胞，其形態與微運動均不受影響。反之，當再將培養基換爲含 **5%** 硬皮症病人血清之培養基時 (病人 **Huang**)，正常的纖維母細胞其微運動明顯受到抑制，如圖 **13a** 所示，下面之曲線爲正常之纖維母細胞在病人血清中之運動變化，電壓改變振幅顯然變小；而由 **Fast Fourier Transform** 所得之圖形 **13b**，則更清楚顯示，正常的纖維母細胞於正常人血清中之活動性 (上面之曲線)，較諸於病人血清中明顯爲大。此種抑制效果亦隨血清濃度由 **5%、2.5%、1%、0.5%** 呈現劑量遞減，顯見硬皮症病人之血清內，定含某種抑制因子之存在。反之，硬皮症的纖維母細胞於硬皮症病人血清中之微運動，並無受到任何影響干擾。其比較如表三。

表三. The effect of shift of medium on the fibroblast micromotions. (\*)

Shift of medium	Micromotions	
	Normal fibroblasts	Scleroderma fibroblasts
DMEM+10% FBS		
↓		
DMEM+5% normal sera	N.E.	N.E.
↓		
DMEM+5% SSc sera	↓ ↓	N.E.
DMEM+5% normal sera		
↓		
DMEM+5% SLE sera	N.E.	N.E.
DMEM+5% normal sera		
↓		
DMEM+5% SS sera	N.E.	N.E.

\* N.E. : no effect; ↓ ↓ : activity reduced.

### § 5-7 疾病活動性對纖維母細胞微運動之影響

#### (Influence of disease activity on fibroblast micromotions)

實驗步驟同前，使用三個硬皮症病人之血清，觀察其對纖維母細胞微運動之影響。結果顯示病情越嚴重者，其血清對微運動之抑制越大，記錄如表四。顯示硬皮症病人血清對纖維母細胞微運動之抑制程度，與病人疾病之活動性有關。

表四. The Inhibitory Effects of Scleroderma Sera on Fibroblast  
Micromotions in Relation to Disease Severity (\* )

Patient	Huang	Tang	Lin	Normal
Age	70	67	50	30
Gender	Male	Female	Male	Male
Skin affected	Face, trunk, extremities	Face, trunk, extremities	Face, trunk	None
Involved organs	Heart, lung, GI tract, kidney	Lung, GI tract	None	None
Micromotions inhibited by patient's sera	+++	++	+	--

\* : Inhibitory effects observed from the data by the fast Fourier  
transform analysis.



§ 5-8 SLE 及 SS 病人血清對纖維母細胞微運動  
之影響 (Effects of SLE and SS patients sera on  
fibroblast micromotions)

實驗步驟同前，觀察 SLE 及 SS 病人血清對纖維母細胞微運動之影響。結果發現此兩種病人之血清，並無抑制纖維母細胞微運動之能力(表三)。

§ 5-9 干擾素  $IFN\ \alpha\ -2b$  對纖維母細胞微運動之  
影響  
(Effects of  $IFN\ \alpha\ -2b$  on fibroblast micromotions)

將濃度分別為 0、100、1000、5000、10000 u/ml 之  $IFN\ \alpha\ -2b$  加入長有正常或硬皮症纖維母細胞之 ECIS 培養皿中，測其對纖維母細胞微運動之影響，結果記錄如表五。當其濃度為 100 u/ml 時，二者皆無影響；而在濃度為 1000 u/ml 時，硬皮症纖維母細胞之微運動明顯受到抑制，如圖 14a 中電壓改變振幅變小，及圖 14b 中 Power Spectrum 之比較曲線，均可發現其活動性之降低。但當  $IFN\ \alpha\ -2b$  之濃度大於 5000 u/ml 時，二者之活動性則均受到明顯抑制。於此同時，藉由顯微鏡之觀察，在  $IFN\ \alpha\ -2b$  1000 u/ml 之作用下，二者之纖維母細胞均無形態之改變 (圖 15a、b；圖 16a、b)；反之，當濃度為 5000 或 10000 u/ml 時，

細胞則有破裂、變形之情況發生 (圖 17 a、b ; 圖 18 a、b)。由此些結果可以獲知，於干擾素  $IFN \alpha - 2b$   $1000 u/ml$  之作用下，正常纖維母細胞微運動及外形均不受影響；而硬皮症之纖維母細胞則在其外形不受影響之狀態下，減低了其微運動。

表五. The inhibitory effects of  $IFN \alpha - 2b$  on fibroblast micromotions. (\*)

IFN $\alpha - 2b$ ( u/ml )	Fibroblast micromotions	
	Normal	SSc
100	N.E.	N.E.
1000	N.E.	↓ ↓
5000	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓
10000	↓ ↓ ↓	↓ ↓ ↓

\*: N.E.: no effect; ↓ ↓ : activity reduced moderately;

↓ ↓ ↓ : activity reduced severely.

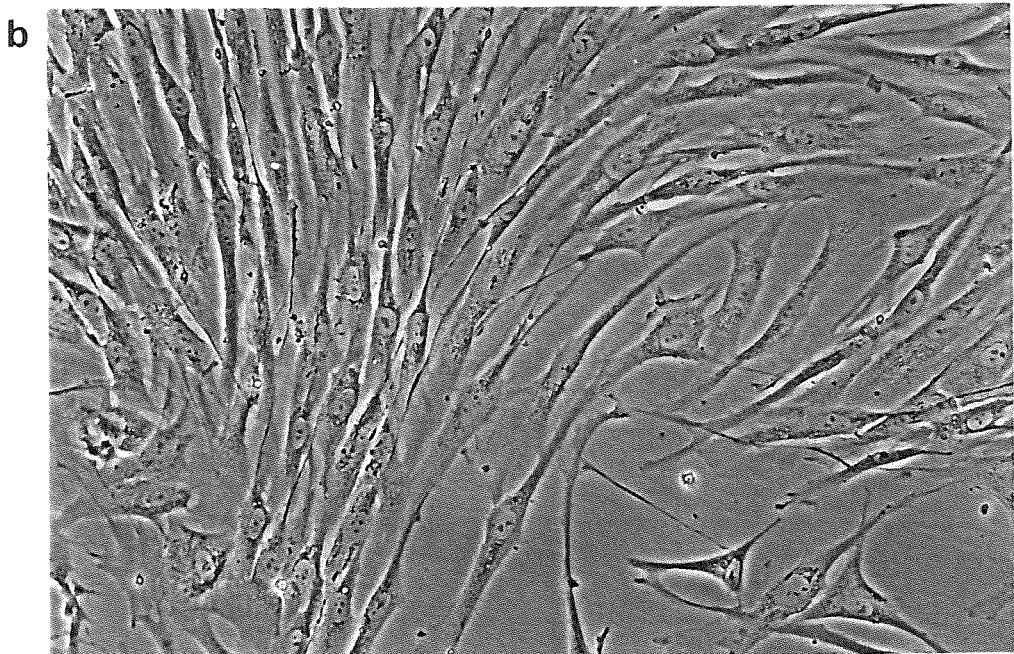
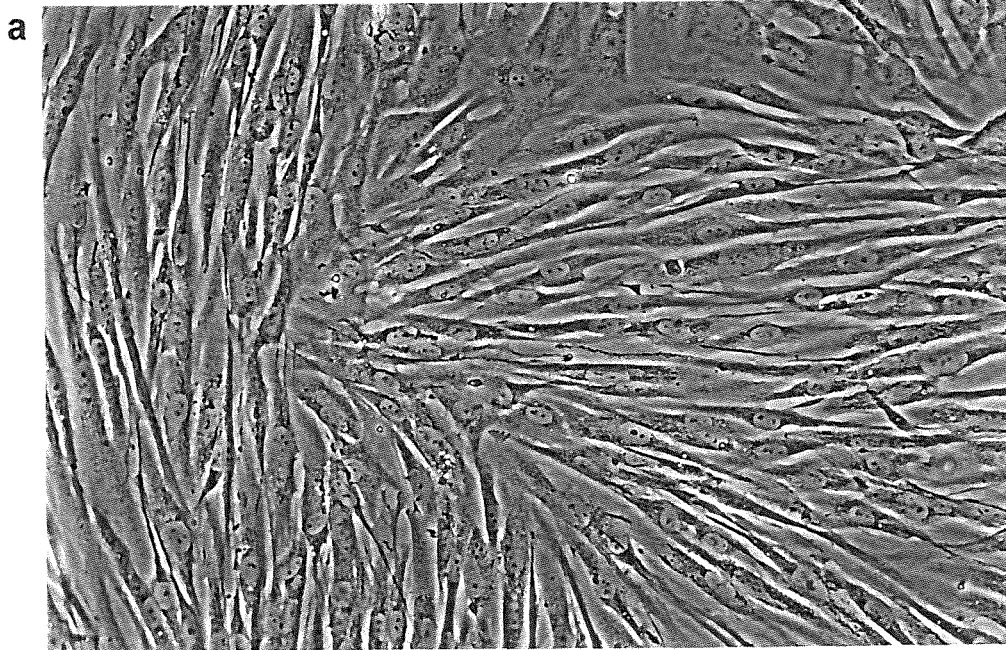
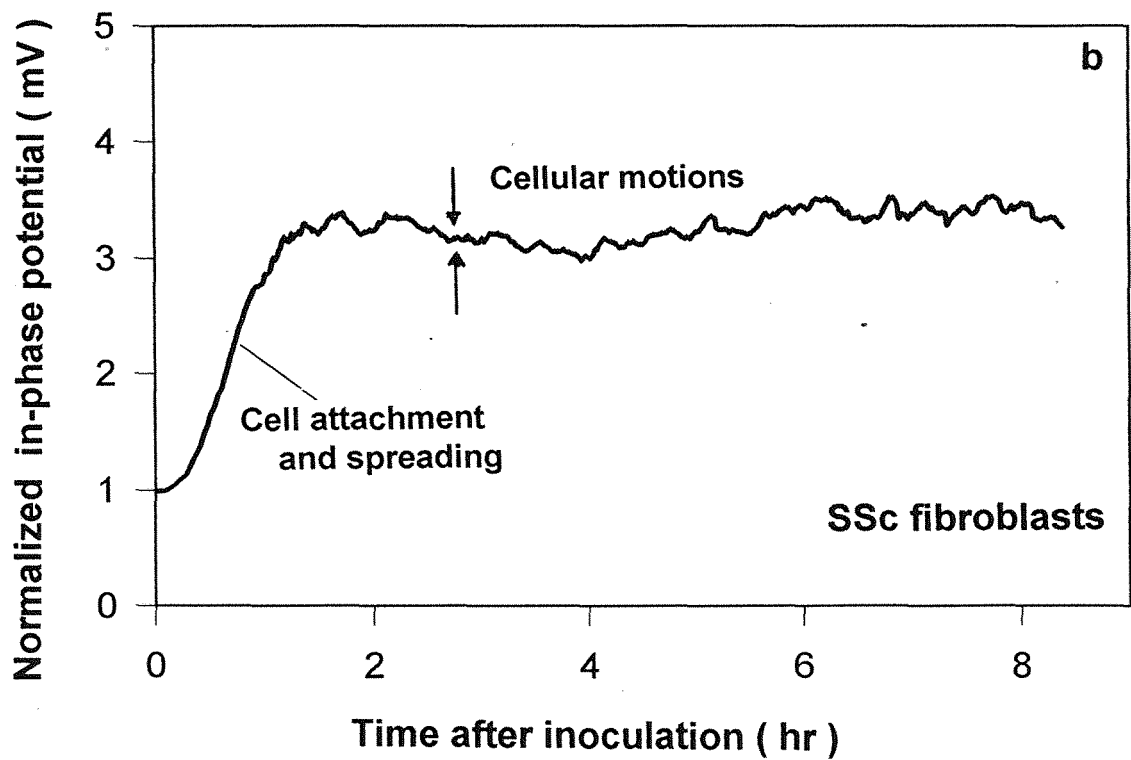
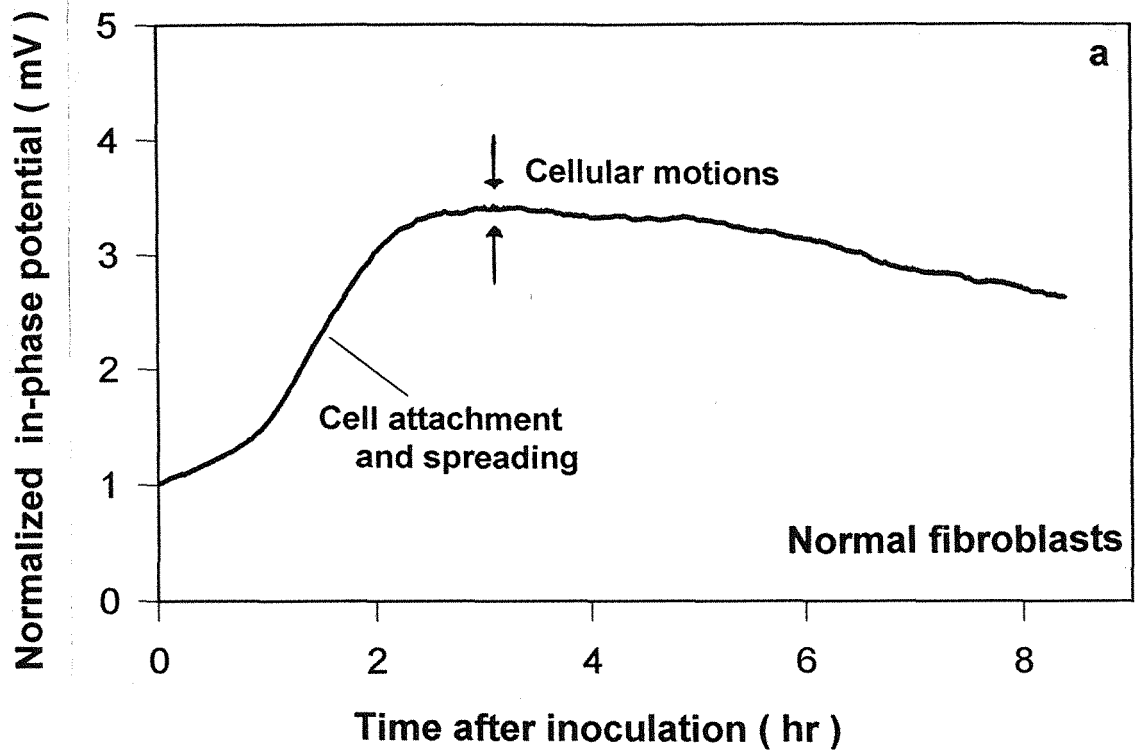
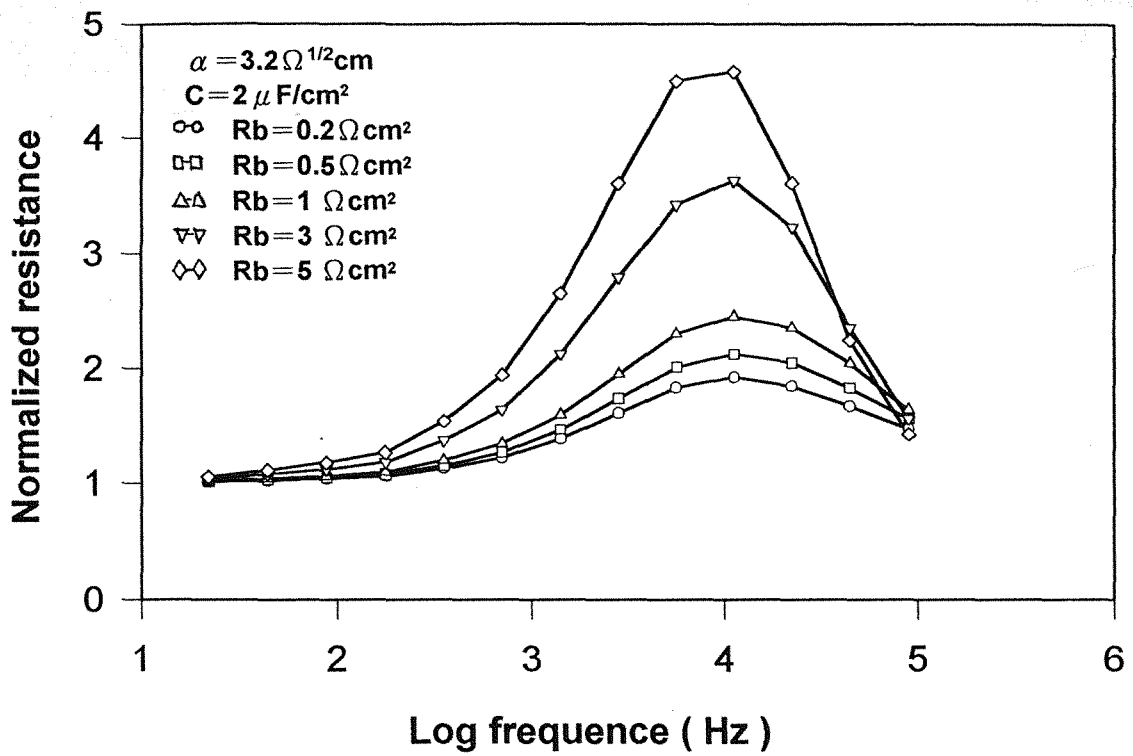


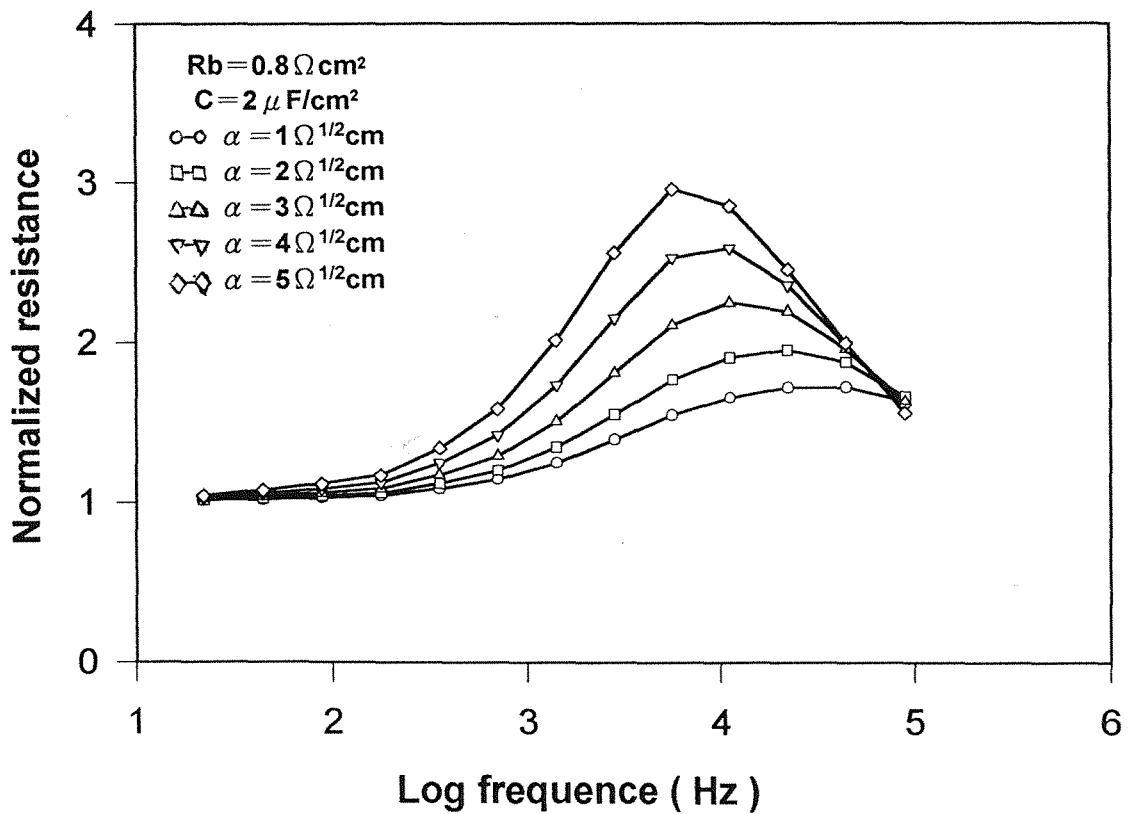
圖 6. Adhesion of fibroblasts on plastic substrata observed by phase-contrast microscope. (a)Normal fibroblasts;(b)SSc fibroblasts. ( $\times 200$ ).



**Figure 7.** Impedance changes elicited by (a) normal and (b) SSc fibroblasts.



8. Model calculations for different values of junction resistance  $R_b$ .



9. Model calculations for different values of parameter  $\alpha$ .

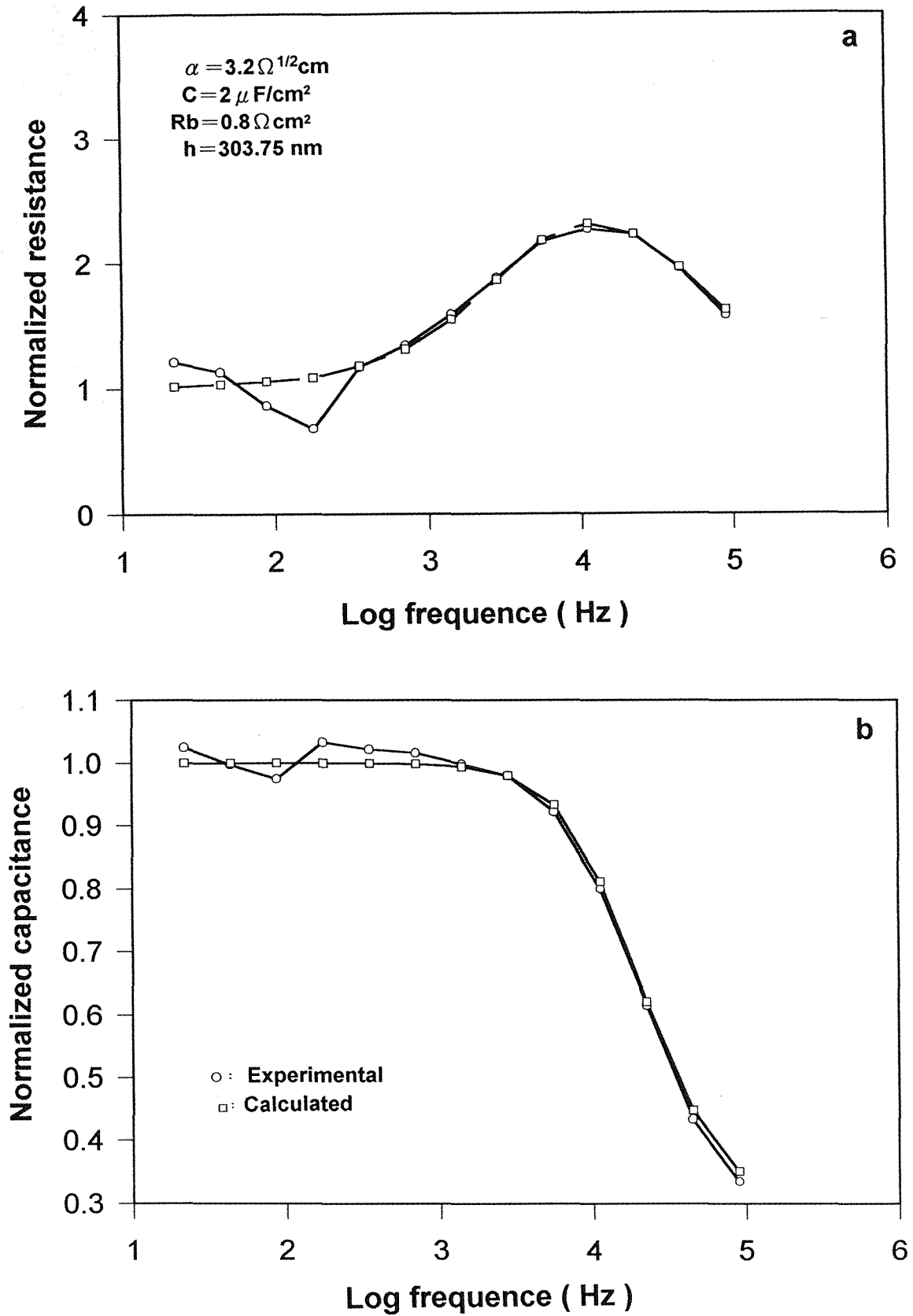
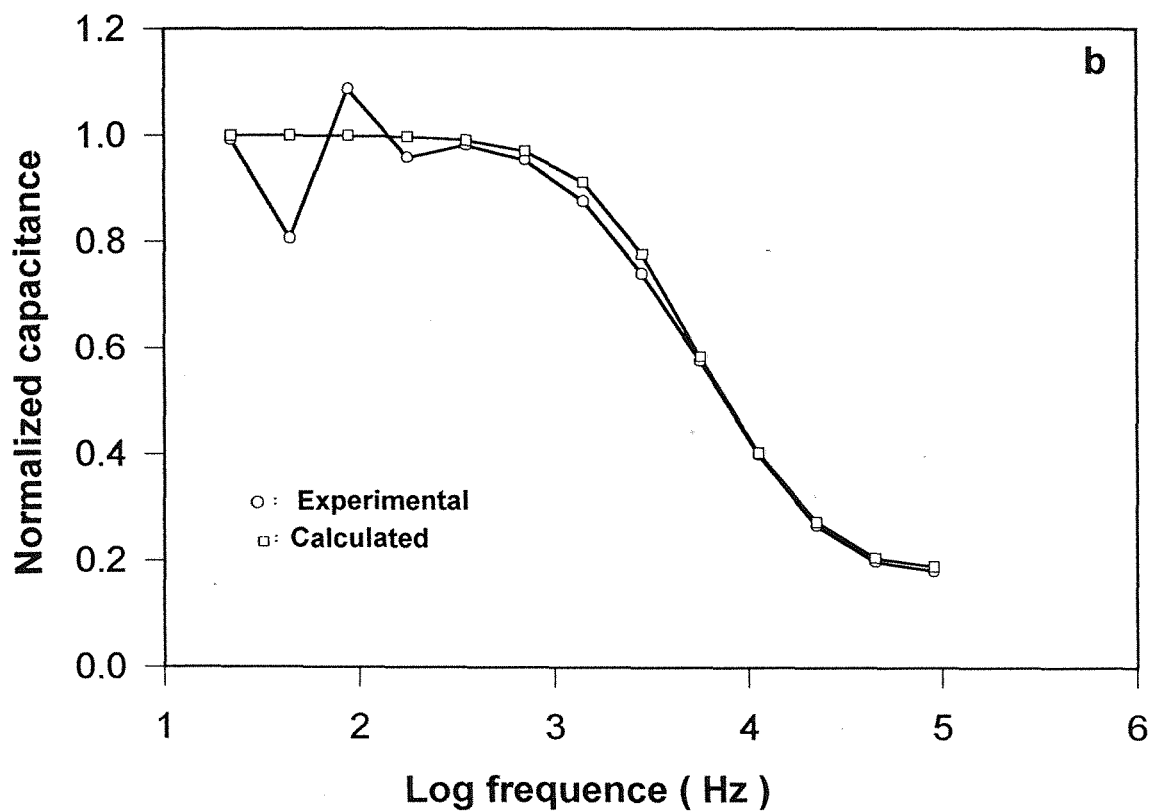
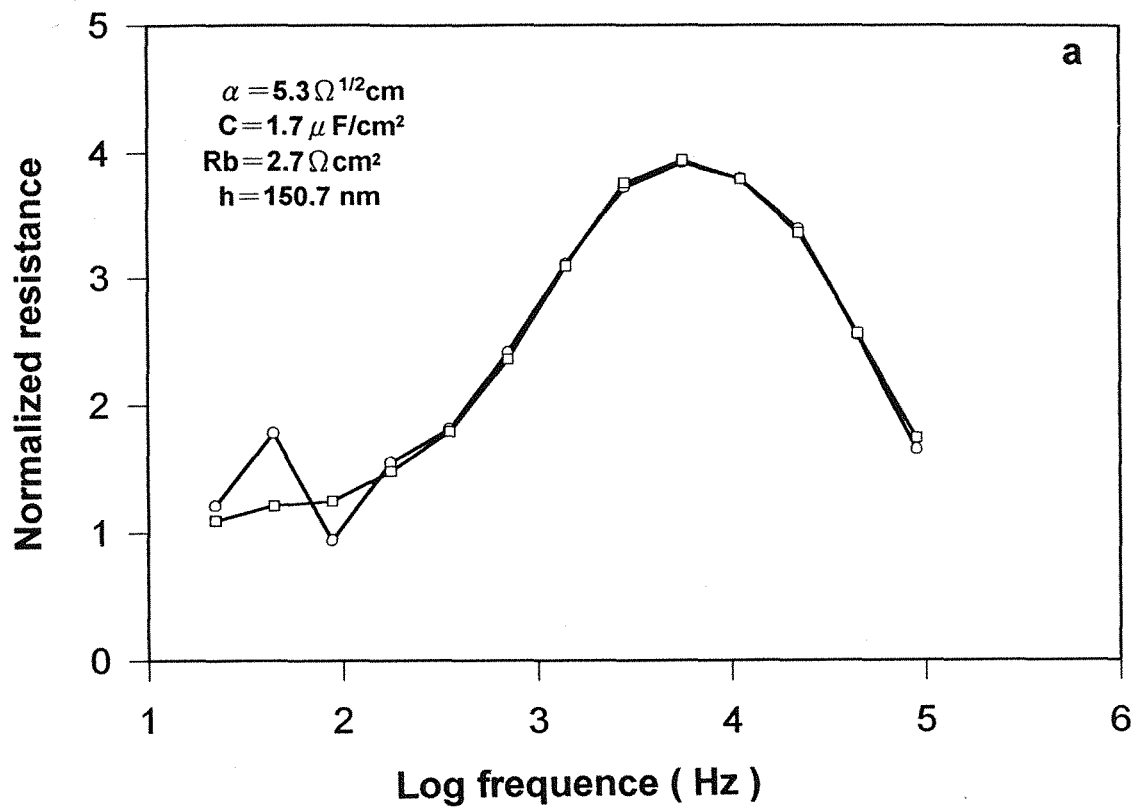
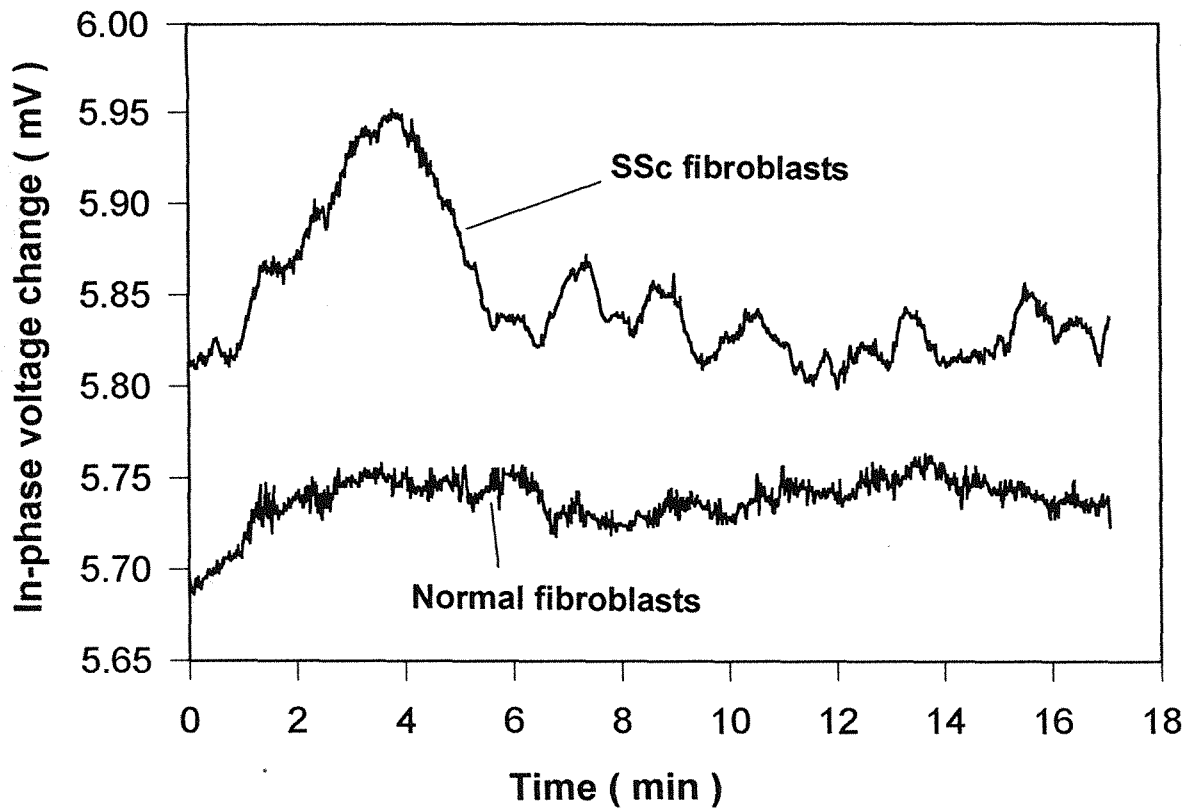


Figure 10. (a) Normalized resistance and (b) normalized capacitance of normal fibroblasts obtained from frequency scan measurement.



11. (a) Normalized resistance and (b) normalized capacitance of SSc fibroblasts obtained from frequency scan measurement.



**圖12. The in-phase voltage change of normal and SSc fibroblasts cultured in 10% FBS- DMEM medium.**



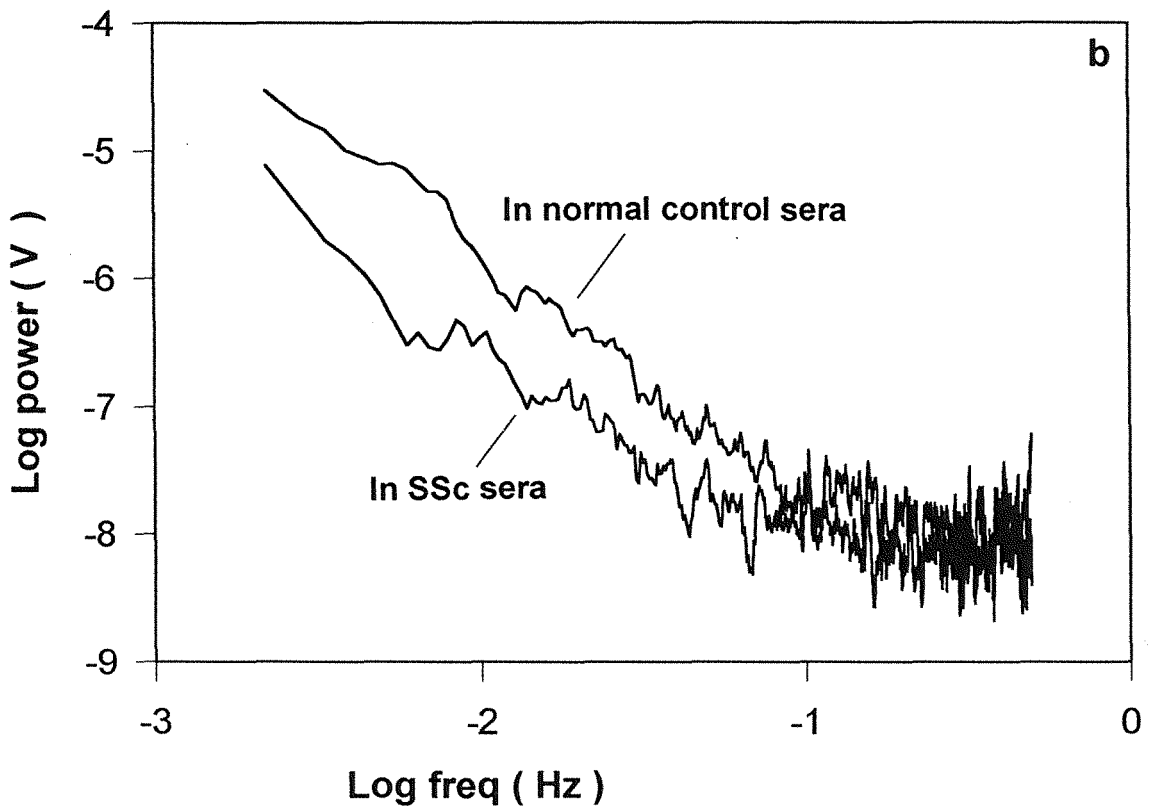
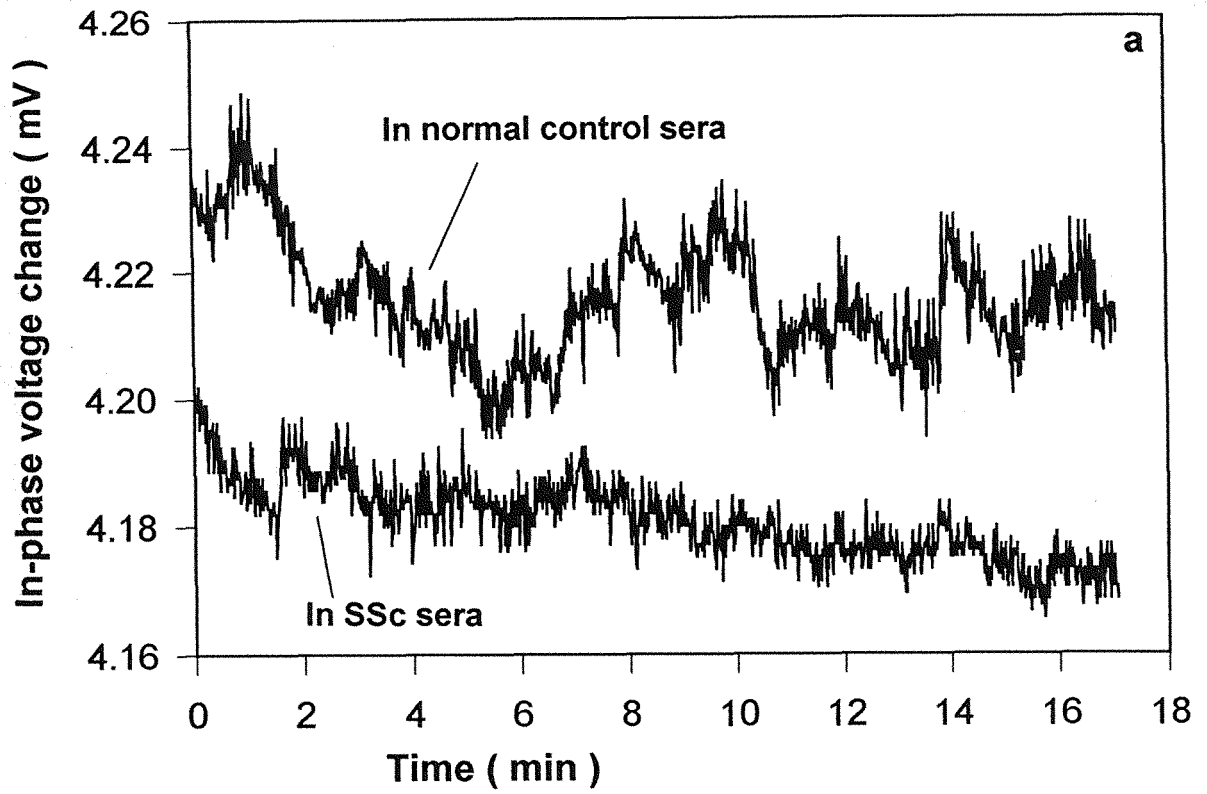


圖13. (a)The in-phase voltage change and (b) the power spectrum from fast Fourier transform of normal fibroblasts cultured in different sera.

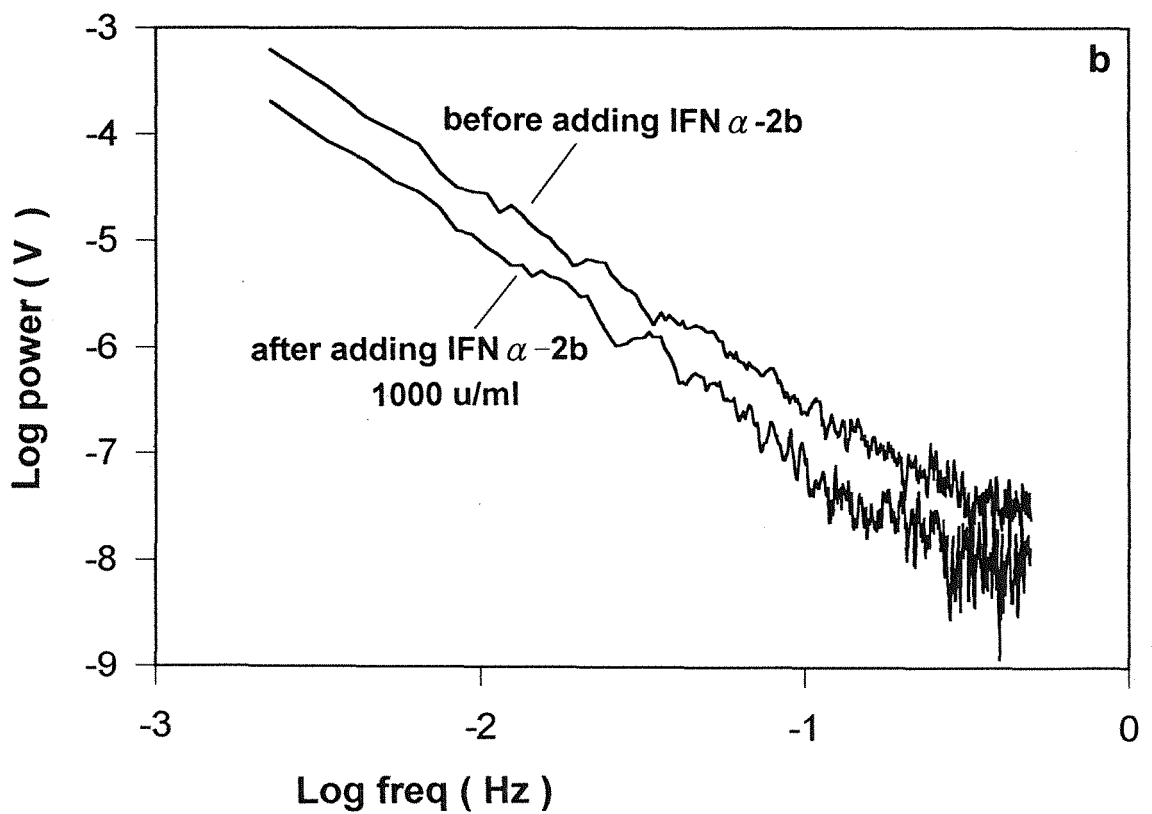
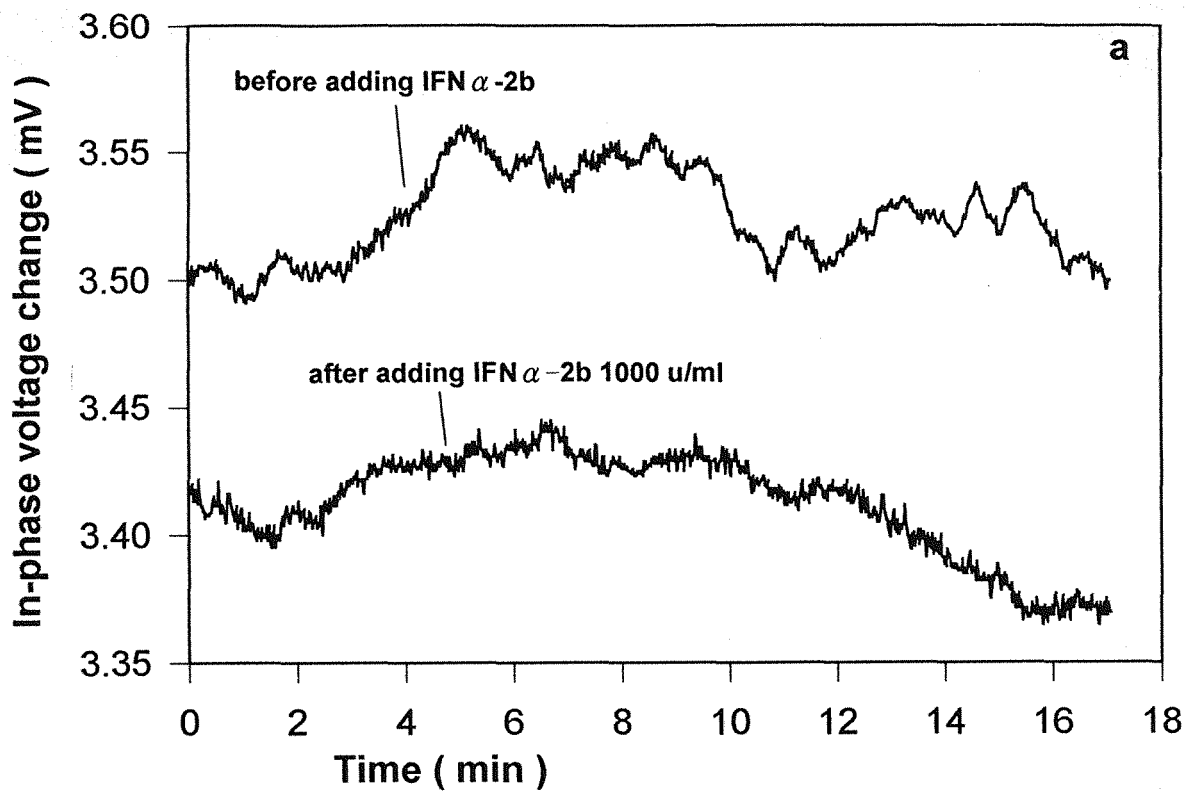
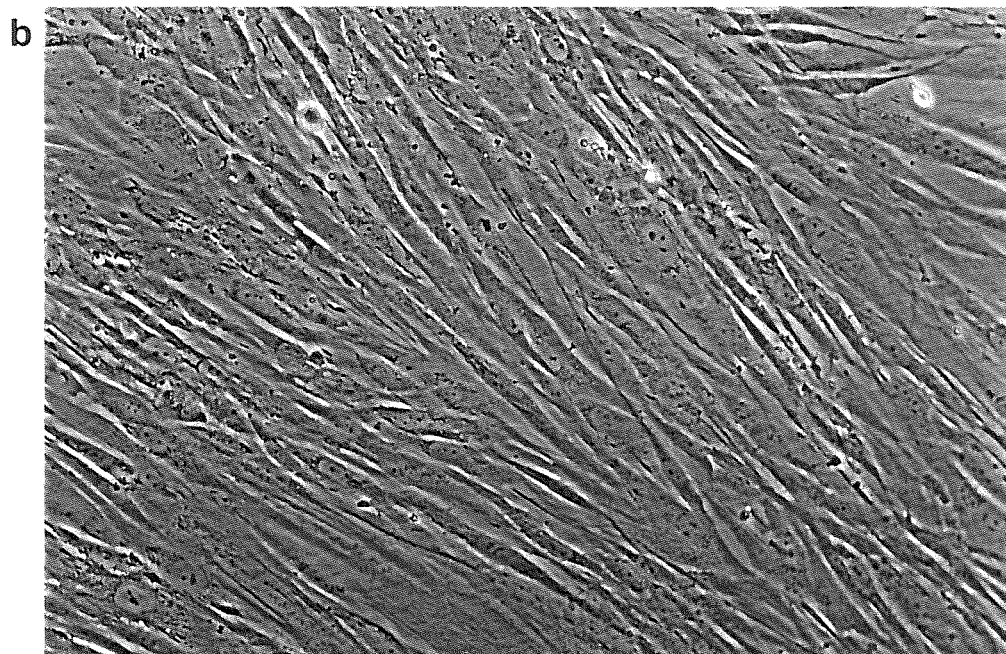
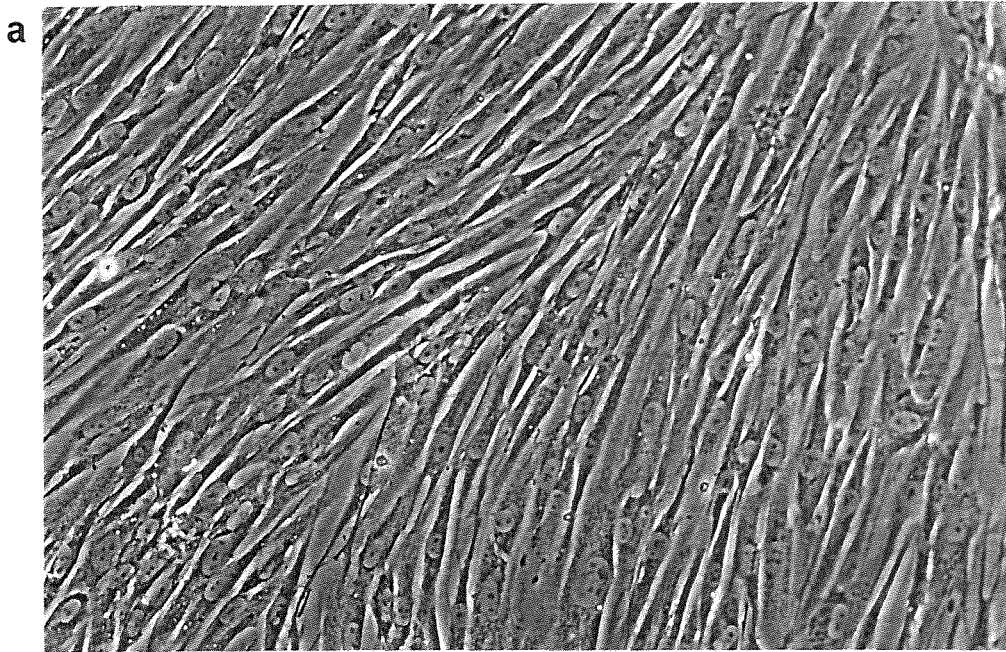


圖14. (a) The in-phase voltage change and (b) the power spectrum of SSc fibroblasts treated with IFN  $\alpha$ -2b.



**图15.** Normal fibroblasts observed by phase-contrast microscope. ( $\times 200$ ). (a) Before adding and (b) After treating with IFN  $\alpha$ -2b 1000 u/ml.

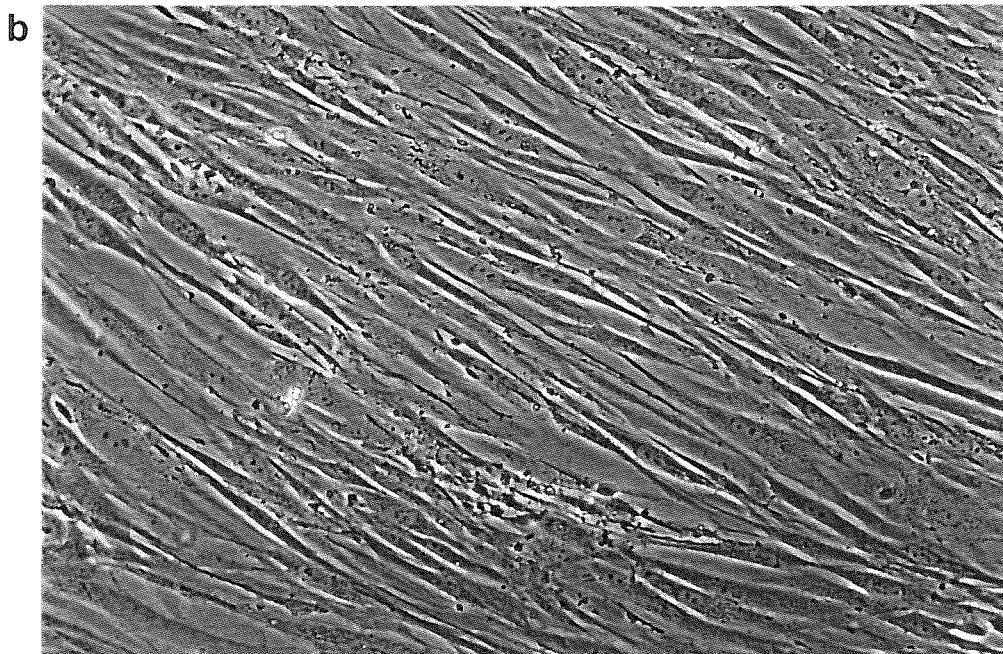
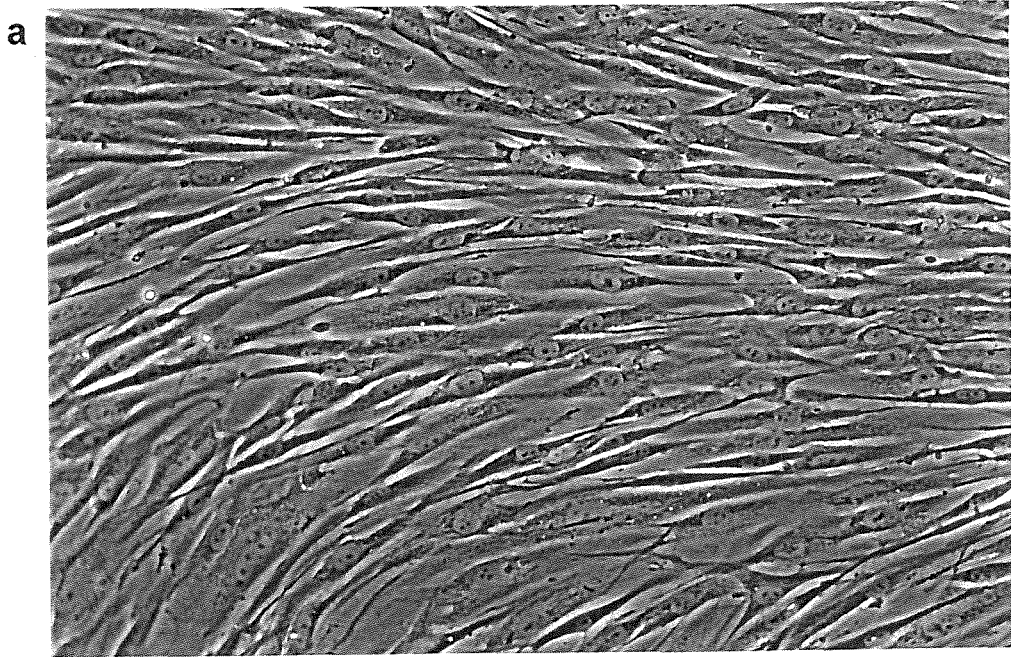


圖16. SSc fibroblasts. (a) Before adding and (b) After treating with IFN  $\alpha$ -2b 1000 u/ml.



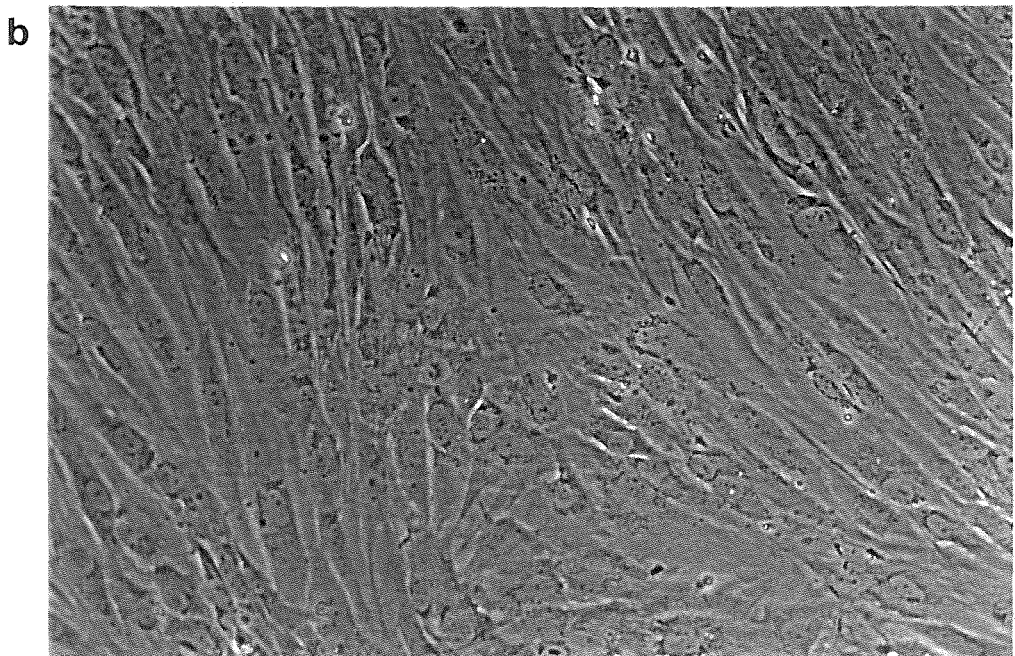
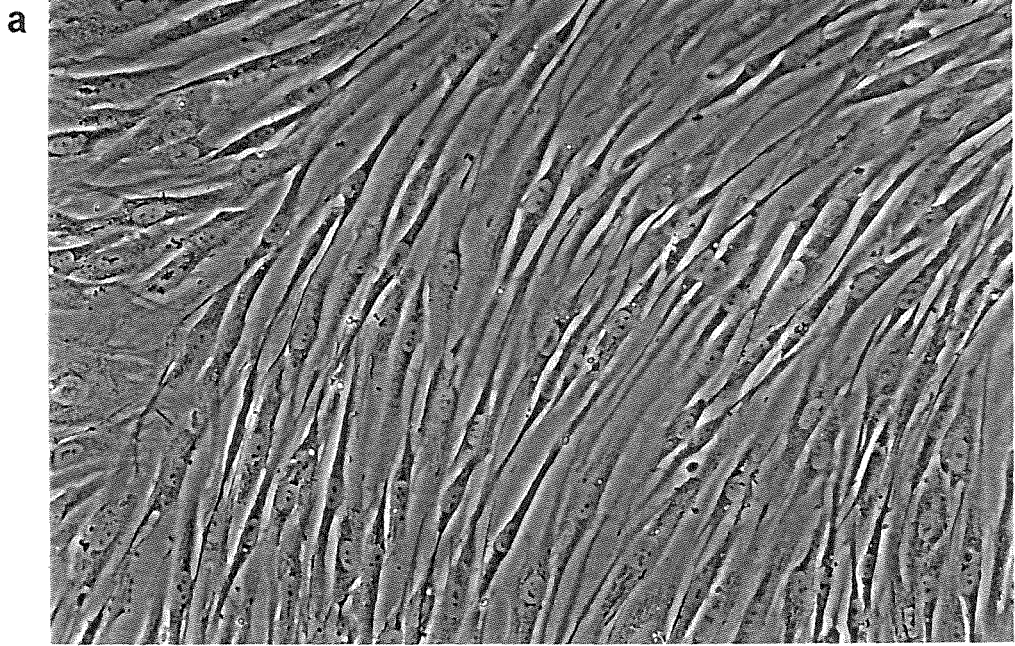
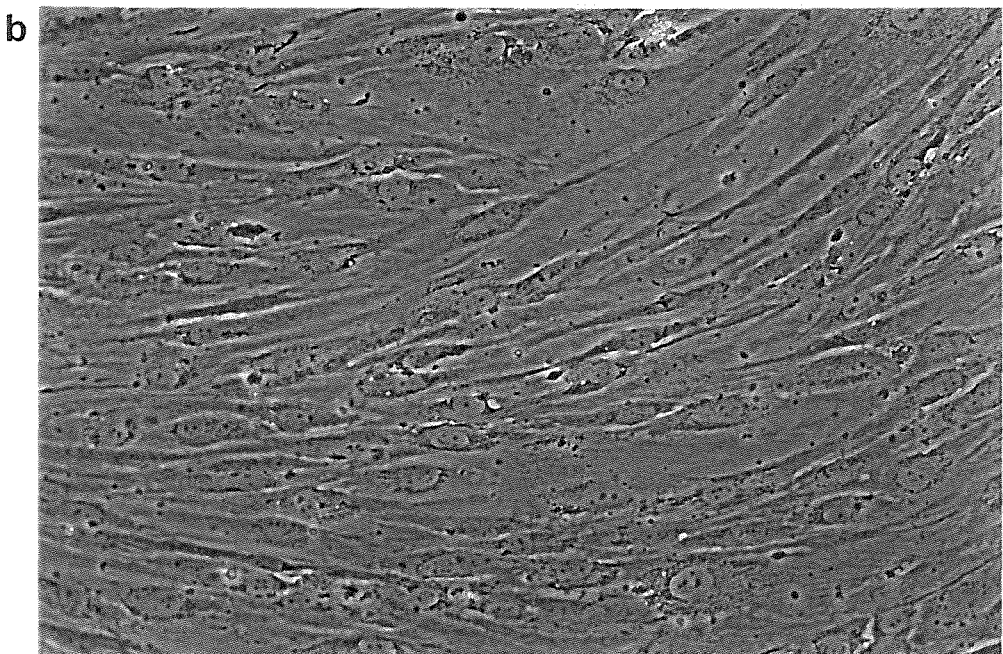
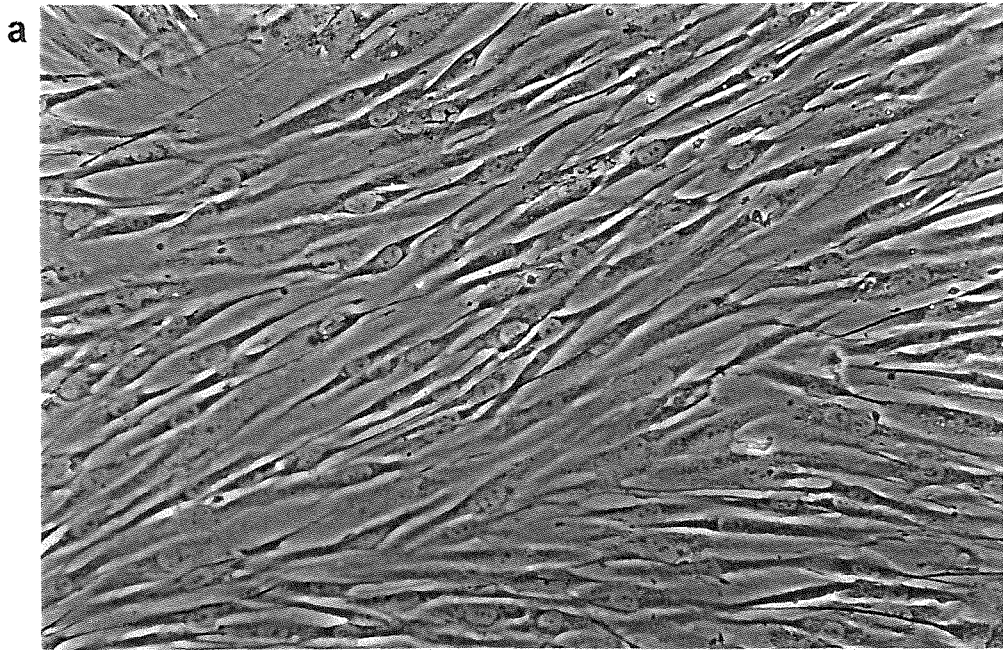


圖17. Normal fibroblasts. (a) Before adding and (b) After treating with IFN  $\alpha$ -2b 5000 u/ml.



**圖18. SSc fibroblasts. (a) Before adding and (b) After treating with IFN  $\alpha$ -2b 5000 u/ml.**

## 第六章 討論 (Discussion)

由上面之實驗，可以摘要得以下結果：

1. 硬皮症纖維母細胞之初級組織培養時間較諸正常者為長，而且生長緩慢，但於拆解細胞之過程中，它從懸浮狀態至與基質間之附著時間，則比正常快速。此外，其局部微運動亦較諸正常之纖維母細胞活躍。
2. 硬皮症纖維母細胞擁有較大之細胞間阻抗 ( $R_b = 2.7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ )，與較低之細胞平均高度 ( $h = 150.7 \text{ nm}$ )；而正常纖維母細胞之  $R_b$  值則顯然較小為  $0.8 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ，而其  $h$  值較高為  $303.75 \text{ nm}$ 。
3. 硬皮症病人之血清具有抑制正常纖維母細胞微運動之作用，然此相同之血清對同是硬皮症之纖維母細胞則無抑制作用。
4. 硬皮症病人血清對正常纖維母細胞微運動之抑制效果，與供應該血清之硬皮症病人之疾病活動程度成正相關。
5. SLE 和 SS 的病人血清對正常纖維母細胞之微運動，並無抑制效果。
6. 干擾素  $\text{IFN } \alpha - 2b$  於濃度為  $1000 \text{ u/ml}$  時，對硬皮症纖維母細胞之微運動有抑制效果，且不影響其外形；相對之下，對正常之纖維母細胞並不影響其微運動與外形。

由上之結果証知，硬皮症病人與正常人之纖維母細胞，於外形上雖無差異，但卻具有不同之生物特性。過去的研究指出，硬皮症之纖維母細胞比正常的含有更大量之第一和第三型的 **collagen** 及 **fibronectin**、**glycosaminoglycan**、**prolyl 4-hydroxylase** 等【21-25】。亦有文獻報告，只有某些選擇性之細胞株落才能大量表現 **collagen**，此乃因硬皮症纖維母細胞具有異質性遺傳表型之緣故 (**Heterogeneous phenotype**)【64-65】，而具此表型之纖維母細胞，可能在組織修復之過程中，從仍為正常細胞之狀態，因受到各種 **cytokines** 之影響【34-36】，或於基因調節層次發生變化【38】而被激活，因此成為活化型之纖維母細胞【66-67】。Kirk TZ 等人則利用  $\alpha$ -**smooth muscle (sm) actin** 之測定，證明此硬皮症活化型之纖維母細胞為"肌纖維母細胞" (**Myofibroblasts**)【30】。**Myofibroblasts** 於其它疾病中亦曾被發現，如膽道纖維化 (**Biliary fibrosis**) 病人之肝門纖維母細胞 (**Portal fibroblasts**) 即屬此型【68】。此外，由於 **myofibroblasts** 具備較豐富之微絲束 (**Microfilament bundles**)，因此其亦具收縮結締組織及實質器官 (**Parenchymal organs**) 之能力【69】。而過去藉由三度空間 **collagen gel** 系統之建立【70-71】，亦使吾人得知纖維母細胞對基質之收縮拉力 (**Retraction force**) 與  $\alpha$ -**sm actin** 之存在有關



【72】，因此，硬皮症纖維母細胞對 **collagen gel** 有較大之拉力亦可想而知了【73】。於此同時，**collagen gel** 之收縮亦受細胞移動 (**Cell migration**) 之影響，增加細胞之間之互動 (**Cell-cell interaction**) 可提高此收縮力【74】。從本研究結果發現，硬皮症纖維母細胞之微運動大於正常之纖維母細胞，推測此乃可能與 **myofibroblasts** 本身之細胞特性有關。目前已知細胞之微運動與細胞之代謝息息相關【57-58】，但是，擁有較明顯之局部微運動，是否就代表具有較多之細胞間互動呢？微運動與細胞收縮力之間的關係究竟為何呢？均需要進一步之實驗驗證釐清。

過去 **Giaever** 等人研究 **WI-38/VA13 cells**，其乃正常人類肺臟纖維母細胞 **WI-38** 細胞株經 **Monkey cancer virus** 感染之後所得之轉型 (**Transformed**) 細胞株。於培養皿上預先加入含各種不同蛋白質之培養基，再放入 **WI-38/VA13**，結果發現以加入 **Fibronectin** 之培養皿中，細胞所產生之起始電壓增加最快、最大，表示在此實驗中 **Fibronectin** 為最能使細胞附著之蛋白質 (圖 19)【51、54】，此結果與使用其它方法所得之情形互相吻合【75】。此外，為去除因各個電極差異所造成之誤差，圖 19 中縱座標之值，為每個測量之電位差除以原點 (無細胞時電極之電位差) 所得到的標準化值 (**Normalized data**)。再者，由頻率掃描、電

腦分析後，可得 **WI-38/VA13** 及 **WI-38** 之阻抗及電容曲線如圖 **20 a、b** 【55】。至於細胞微運動所產生之電壓變化曲線則如圖 **21** 【52】，**WI-38/VA13 cells** 引起之電壓振幅變化較諸 **WI-38 cells** 為大，亦即前者之局部微運動大於後者，此可能與癌細胞本身易於轉移之特性有關。圖 **21 c** 也顯示經 **Formalin** 殺死的細胞並無電壓之變化，可知電壓之改變的確基因於細胞運動所致。而經過裁配參數之結果，可得 **WI-38** 和 **WI-38/VA13** 之 **Rb** 值分別為 **0.35** 和 **1.1  $\Omega \cdot \text{cm}^2$** ；細胞腹面與基質間之平均高度 **h** 則分別為 **113nm** 和 **13.3 nm** 【55】。**Rb** 和 **h** 值於細胞生物學上扮演之角色為何，目前尚不清楚，據推測可能與細胞之種類、相鄰細胞間之緊密接合程度或與細胞、基質間之附著有關。

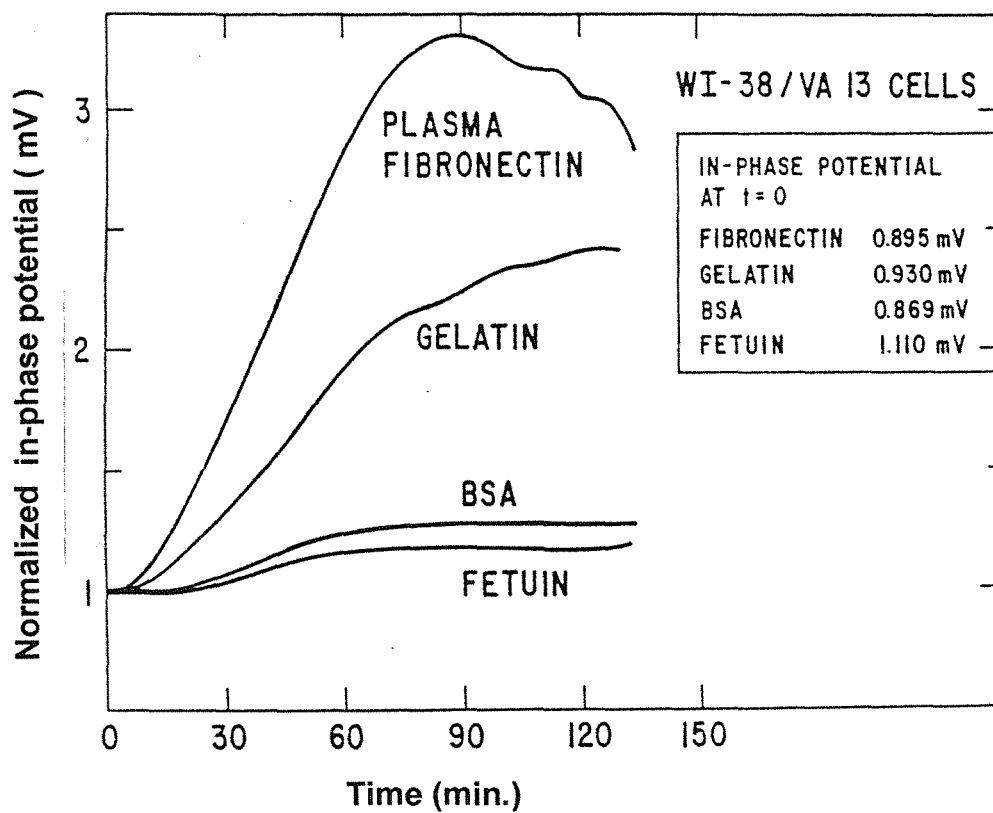


圖 19. WI38 VA13 cells were added to an electrode system. Each of the small electrodes had been coated with a specific protein (bovine serum albumin, gelatin, bovine fetin, or human plasma fibronectin). (摘錄自 Bio Technique 1991; 11: 504-511.)

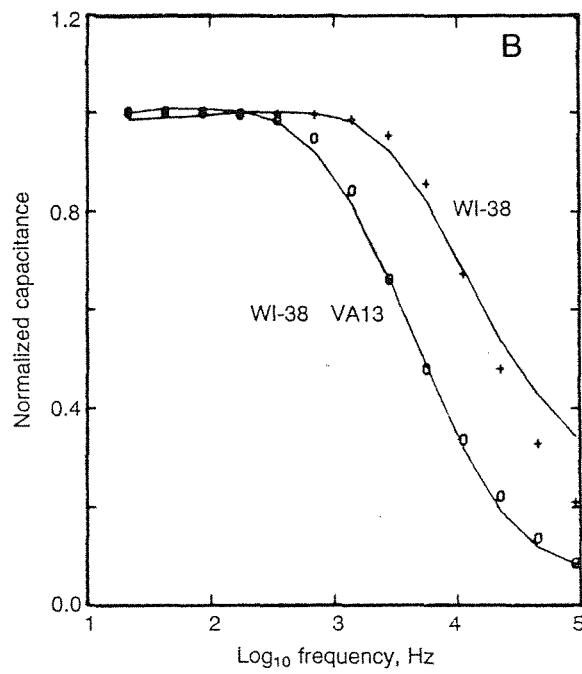
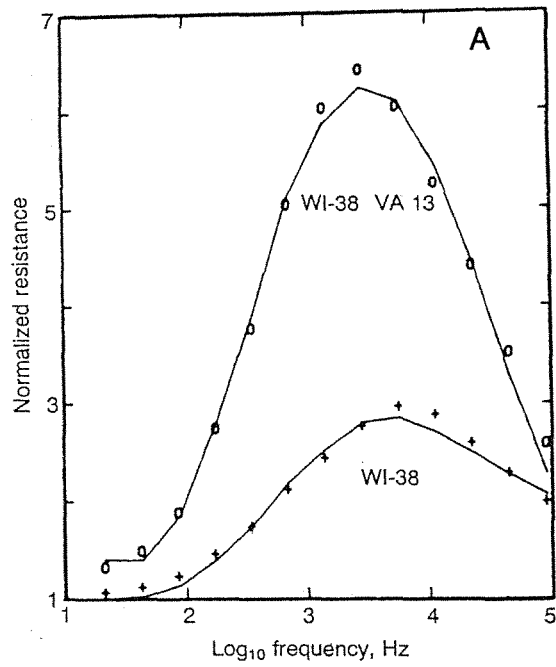


圖 20. Impedance as a function of frequency for a small electrode of area  $1.06 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ . (A) Normalized resistances, (B) Normalized capacitances for WI-38 and WI38 VA13 respectively.

(摘錄自 Proc Natl Acad Sci USA 1991;88: 7896-7900.)

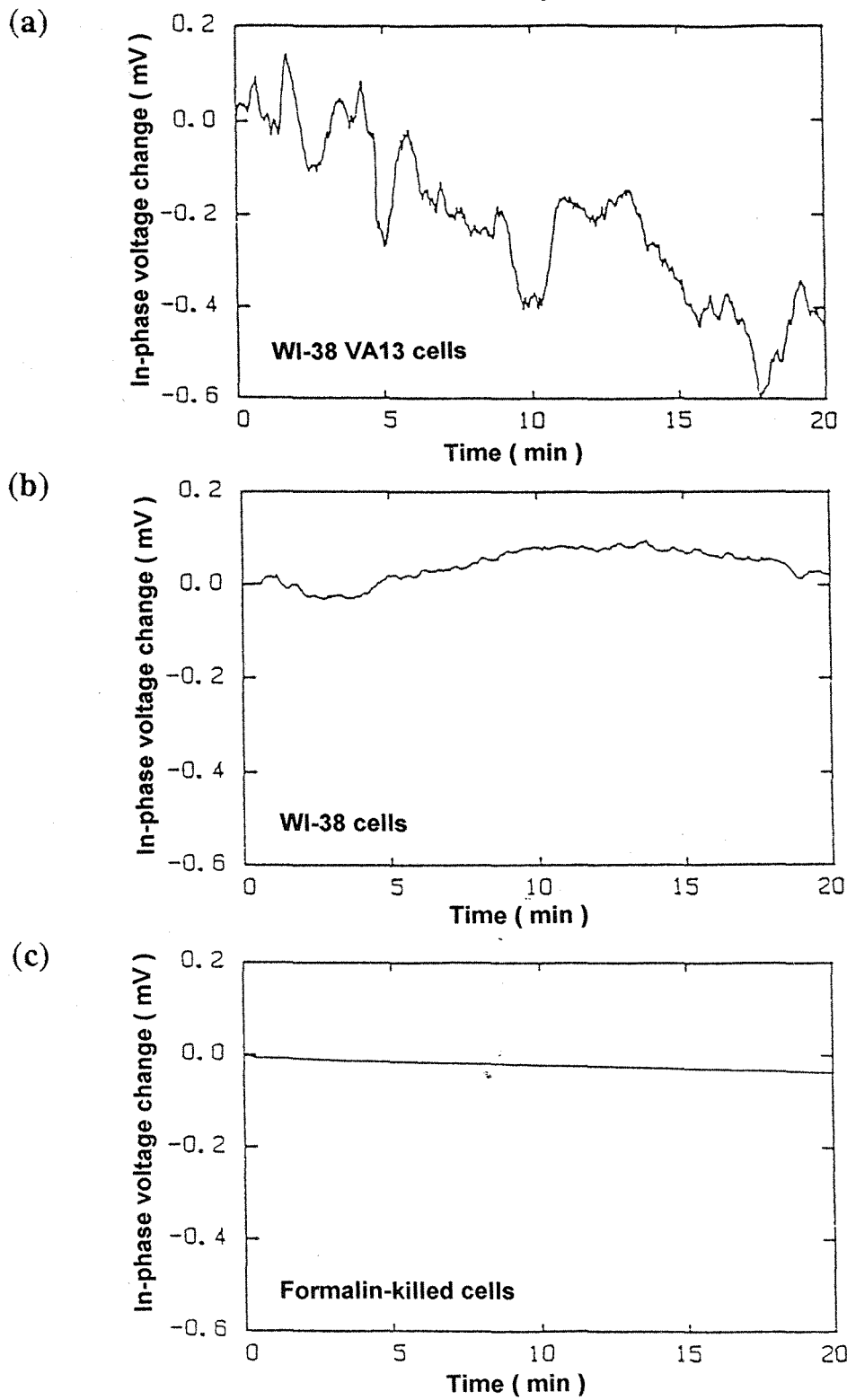


圖 21. In-phase voltage changes of transformed (a), normal (b) and killed (c) cells.

(摘錄自 Physica D 1989; 39: 128-133)

至於硬皮症纖維母細胞之 **Rb** 值較大、而 **h** 值較小於正常之纖維母細胞，根據以上之推測，可能乃因二者分屬不同亞型之故，而 **Rb** 值愈大，可能基因於細胞間之接觸愈趨緊密之故；**h** 值則可能與細胞之附著有關，硬皮症纖維母細胞因具有旺盛之代謝程度而較活躍之故，因而可能較深入地附著於基質中，所以其 **h** 值相對顯得較低。由硬皮症與正常的纖維母細胞及 **WI-38** 和 **WI-38/VA13** 各擁有不同之 **Rb** 及 **h** 值判斷【55】，未來利用 **ECIS** 系統，當可辨認各個細胞之形態特性，同時也對細胞運動、細胞間之訊息傳遞以及疾病之致病機轉，提供一個新的研究領域。

**ECIS** 感測系統靈敏度極高，對外加之環境條件改變，能立顯反應。當移去培養基中之 **glucose** 成分時，細胞引起之電壓變化轉小；當再度加入 **glucose** 後，電壓振幅變大，可見細胞之微運動與細胞之代謝息息相關【57-58】。溫度亦會影響細胞微運動，**WI-38/VA13** 於  $27^{\circ}\text{C}$  之環境下明顯比在  $37^{\circ}\text{C}$  中安靜【58】。而當 **pH** 值升高或  $\text{Ca}^{2+}$  離子濃度下降時，則會使細胞間之阻抗 (**Rb**) 受到影響而減少【60】。另外如加入 **Thrombin** 至內皮細胞中，亦將導致其 **Rb** 變小【56】。而血清中之成份如何影響纖維母細胞之微運動，以下將作進一步探討。

血清中含有非常多的物質，特別從硬皮症病人之血清中，可檢出有些因子較正常者為高，如 **CD4+**、**CD25+**、**CD71+**、**HLA-DR Ia**、**IL-2**、**soluble IL-2 receptor**、**IL-4**、**IL-6** 及 **TNF- $\alpha$**  等【76-79】，此些因子之升高，代表免疫反應已被激活而使得 T 淋巴細胞處於活化狀態。B 淋巴細胞的活化，則可從 **Gamma globulin**、**IgG level** 及血清中含有各種自體抗體看出端倪【80】。此外，著名的促纖維化因子 -- **TGF- $\beta$** ，於血清中亦有較高濃度【81-82】。而代表血管壁受傷使得內皮細胞受損或活化後釋放出的因子，則包括 **von Willebrand factor antigen**【83】、**endothelin**【84】、**thrombomodulin**【85】、**T-PA**【86】、**endothelial leucocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1)**【87】、**intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1)**【88】等。

。另外  **$\beta$ -thromboglobulin**【89】和 **platelet factor 4**【90】之血清濃度升高，與 **PDGF** 於病灶皮膚之表現增加，則顯示血小板的處於活化狀態【34】。至於纖維母細胞，由其在血清中之代謝產物含量升高，如 **PIIINP**【91】、**laminin PI fragments**【92】、**hyaluronate**【93】及 **prolyl 4-hydroxylase**【25】等，則可知纖維母細胞已處於活化狀態。

已知此中有些因子對皮膚纖維化有以下之影響：

- (1) **PDGF** 會促進纖維母細胞之生長；
- (2) **TGF- $\beta$**  乃為纖維母細胞之趨化性因子，其同時也促進 **collagen** 和其他間質蛋白質之大量增生【94】，不過，它卻抑制纖維母細胞之增殖 (**Proliferation**)；
- (3) **IL-1**、**IL-4** 則同時具有促進纖維母細胞增殖和 **collagen** 增生之作用【95】；反之，
- (4) **IFN- $\gamma$**  抑制上述二種作用【96】，同時其亦具抑制細胞移動和趨化性之能力【27】，不過，它在硬皮症病人血清中之濃度卻反而降低【79】。

從本實驗結果中，發現硬皮症病人的血清對正常纖維母細胞之微運動具有抑制作用，據以推知於此血清中，應有某種抑制因子之存在，且由 **SLE** 和 **SS** 病人之血清不具抑制作用判斷，此抑制因子應具有專一性，為硬皮症病人所特有。然而，其究竟為上述所記載之血中成分之一亦或為許多因子之加成作用，仍待進一步確認。過去文獻報告，硬皮症之病人血清具有 **Endothelial cytotoxic activity**，能抑制內皮細胞之遷移 (**Migration**)【97】；從硬皮症之病人血清中純化出之 **IgG**，則具抑制 **topoisomerase I** 之功能【98】；而當 **TNF** 與 **IL-1** 或 **IFN- $\gamma$**  同時作用在纖維母細胞時，則有抑制其增殖之作用【99】；不過培養於硬皮症病人血清中的纖維母



細胞，其生長曲線卻意外的不受影響【100】。此外，若由纖維母細胞表面接受體之立點觀之，硬皮症纖維母細胞之細胞表面目前確知已有 **ICAM-1**【101】、**IL-1** 接受體之表現【102】，表示 T 細胞與纖維母細胞之間之溝通頻繁【103】；而有  $\beta 1$ 、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$  **integrin** 的表現，則顯示硬皮症纖維母細胞易與 **collagen**、**fibronectin** 及 **laminin** 等附著【33】。然儘管如此，目前吾人仍只能推論抑制因子的確存在，其本質究竟如何，仍待進一步實驗驗證。

此外，有一結果亦值得探討，即硬皮症的病人血清對硬皮症纖維母細胞之微運動，並無抑制作用，此結果與過去之文獻互相呼應。報告指出，相對於正常之纖維母細胞，硬皮症病人的纖維母細胞不因 **TGF- $\beta$**  之存在，而增加對間質蛋白質之附著能力【104】，對其它生長因子如 **PDGF**、**EGF** 或 **cytokines** 如 **Oncostatin M** 等，也呈不反應狀態【105-106】，此種現象顯示硬皮症纖維母細胞在本質上，經長期處於這些因子作用之環境下，已表現出一種活化的狀態了。

如前文所述，某些代表免疫反應、內皮細胞、血小板及纖維母細胞被激活後所釋出之因子，據研究亦反應疾病之活動程度【107】，其中以 **IL-2**、**sIL-2R**、**ICAM-1**、**E-selectin** 及 **P-selectin** 等特別明顯【108-

**111】**，其於血清中之濃度升高，反應著硬皮症病人之皮膚侵犯程度越大、罹病時間越長、或是疾病正處於活躍之發病時期。而從本實驗結果中得知，硬皮症病人血清對纖維母細胞微運動之抑制程度，恰好與病人之疾病嚴重程度成正相關，由此觀之，病人病情越重，其抑制因子之抑制效果越大，或是數量越多。因此纖維母細胞微運動受血清抑制之程度，吾人認為亦可作為疾病活動之標記 **(Marker)** 之一。

至於治療硬皮症方面，迄今尚無有效之根治方式，有關這方面藥物之研究，大部份乃是針對其可能之致病機轉，亦即從抗結締組織之纖維化著手，干擾素 **(IFN)** 乃為其中之一。其中尤其是 **IFN  $\gamma$**  和 **IFN  $\alpha$** ，透過其 **Anti-proliferative** 及 **Immunomodulatory effect** 之機制，當其作用於纖維母細胞之培養時，可以明顯地減少細胞之增殖，降低 **collagen** 之生成，以及減低 **pro  $\alpha$  1(I) collagen mRNA** 之表現【47-48，112】。其中以 **IFN  $\gamma$**  之效果較強，於濃度 **100 u/ml** 時即有明顯作用；而 **IFN  $\alpha$**  則在濃度 **1000 u/ml** 時顯出明顯效果【48】。過去文獻中藥物作用細胞之時間大部分為 **3-4** 天左右，但利用 **ECIS** 系統則可縮短至 **24** 小時內獲知藥物效果。從實驗結果中發現，經過 **24** 小時的作用，**100 u/ml** 之 **IFN  $\alpha$  -2b** 並不影響硬皮症及正常纖維母細胞之微運動；而當藥物為 **1000 u/ml** 之濃度

時，則明顯抑制硬皮症纖維母細胞之微運動，正常細胞則反之不受影響。於此同時透過相位差顯微鏡之觀察，上述之纖維母細胞於形態上並無發生改變。然而當 **IFN  $\alpha$ -2b** 之濃度大於 **5000 u/ml** 時，二者不但在微運動上受到明顯抑制，且其形態亦發生了變形、破裂。由此可得幾點結論：

- (1) 對纖維母細胞而言，**IFN  $\alpha$ -2b** 於濃度 **1000 u/ml** 以下，應屬安全劑量範圍；
- (2) 應用 **ECIS** 技術於微運動之測量，**IFN  $\alpha$ -2b** 對纖維母細胞之作用可提前至 **24** 小時得知；
- (3) 纖維母細胞之微運動可作為藥物作用之指標之一；
- (4) 雖然 **IFN  $\alpha$ -2b** 抑制纖維母細胞微運動之分子機制尚不明瞭，但根據臨床及基礎之研究【**41, 47-49**】，加諸本實驗之印證，可推知 **IFN  $\alpha$ -2b** 能夠抑制硬皮症纖維母細胞旺盛之代謝活力，其對硬皮症纖維化之改善，應具效果。

## 第七章 結論 (Conclusion)

本研究獲致幾項結論：

- (1) 硬皮症纖維母細胞之局部微運動及代謝活力較諸正常之纖維母細胞活躍；
- (2) 硬皮症纖維母細胞具有較大之細胞間阻抗 ( $R_b = 2.7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ )，與較低之細胞平均高度 ( $h = 150.7 \text{ nm}$ )；而正常纖維母細胞之  $R_b$  值顯然較小(為  $0.8 \Omega \cdot \text{cm}^2$ )，而其  $h$  值則顯然較高 (為  $303.75 \text{ nm}$ )；
- (3) 硬皮症病人之血清中具有某種抑制因子，因而能抑制正常纖維母細胞之微運動，且其抑制效果，與供與該血清之硬皮症病人之疾病活動程度成正相關。然因硬皮症纖維母細胞長期處於激活狀態，故此相同之血清對同是硬皮症之纖維母細胞反無抑制作用；
- (4) 干擾素  $IFN \alpha - 2b$  對硬皮症纖維母細胞之微運動及代謝活力具抑制效果，其對硬皮症之治療應屬有效。

誠然，硬皮症之產生極為複雜。但透過對其瞭解，對人體許多疾病的部分致病機轉卻有見微知著之效果，如肝硬化、糖尿病腎病變、肺纖維化等，其共同特徵即為結締組織之纖維化【7】，而扮演此主要角色則為纖維母細胞，縱觀其增殖、基因表現、collagen 增生以及發炎反應中 GF、cytokines 之影響，實已涵蓋了纖維化成因中之最重要部份。而於此篇論文中，吾人提出另一種研究

技術 -- **ECIS**，對纖維母細胞進行細胞行為之探討，並研究硬皮症病人血清對其微運動之影響，此所得結果，則為另一研究領域之開端，吾人深信，藉由對纖維母細胞生物特性之瞭解，能有助於瞭解硬皮症之致病機轉，從而尋求可能之治療途徑。

## 參考文獻 (References)

1. Walder BK : Do solvents cause scleroderma? *Int. J. Dermatol* 1983 ; 22:157-158.
2. Tsay GJ, Lan JL, Li SY : Chromosome studies in systemic sclerosis with consideration of antibodies to topoisomerase I. *Ann Rheum Dis* 1992; 51:624-626.
3. Textbook: Immunol Biology. Janeway Travers. 1994, BLACKWELL
4. Atkinson JN : Some thoughts on autoimmunity. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 301-305.
5. Postlethwaite AE : Connective tissue metabolism including cytokines in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 1994; 6: 616-620.
6. Border WA, Noble NA : Transforming growth factor  $\beta$  in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286-1292.
7. Kovacs EJ, Dipietrol LA : Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J.* 1994; 8: 854-861.
8. Norman Talal : Oncogenes, autogenes, and rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1421-1422.
9. Mountz JD, Wu J, Cheng J, Zhou T : Autoimmune disease -- a problem of defective apoptosis. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1415-1420.
10. von Muhlen CA, Tan EM : Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995; 24: 323-358.
11. Roitt I, Brostoff J, Male D : Immunology. Third Edition, 1993.
12. Behar SM, Porcelli SA : Mechanisms of autoimmune disease induction -- the role of the immune response to microbial pathogens. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 458-476.

13. Reichlin M : Short analytical review -- cell injury mediated by autoantibodies to intracellular antigens. Clin Immunol Immunopathol 1995; 76: 215-219.
14. Piela-Smith TH, Korn JH : Lymphocyte modulation of fibroblast function in systemic sclerosis. Clin Dermatol 1994; 12: 369-377.
15. Postlethwaite AE : Early immune events in scleroderma. Rheum Dis Clin North Am 1990; 16 : 125-140.
16. Systemic sclerosis (scleroderma), localized forms of scleroderma, and calsinosis. Arthritis and allied condition. 12th Edition, Vol 2: 1253-1291. Thomas A. Medsger, JR.; LEA & FEBIGER 1993.
17. Leroy EC, Black C, Fleischmajer R *et al* :Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. J Rheumatol 1988; 15: 2, 202-205.
18. Steen VD, Medsger TA : Epidemiology and natural history of systemic sclerosis. Rheum Dis Clin North Am 1990; 16: 1-10.
19. Leroy EC, Trojanowska M, Smith EA : The pathogenesis of scleroderma (systemic sclerosis, SSc). Clin Exp Rheumatol 1991; 9: 173-177.
20. Leroy EC : A brief overview of the pathogenesis of scleroderma (systemic sclerosis). Ann Rheum Dis 1992; 51: 286-288.
21. Jimenez SA, Feldman G, Bashey RI *et al* : Co-ordinate increase in the expression of type I and type III collagen genes in progressive systemic sclerosis fibroblasts. Biochem J 1986; 237: 837-843.
22. Kawaguchi Y : IL-1  $\alpha$  geneexpression and protein production by fibroblasts from patients with systemic sclerosis. Clin Exp Immunol 1994; 97: 445-450.

23. Kawaguchi Y, Harigai M, Kitani A *et al* : Effect of prolyl 4-hydroxylase inhibitor on fibroblast collagen production in vitro : an approach to the treatment of systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1992; 19: 1710-1715.
24. Duncan MR, Wilson TJ, Judy Van De Water *et al* : Cultured fibroblasts in Avian scleroderma, an autoimmune fibrotic disease, display an activated phenotype. *J Autoimmunity* 1992; 5: 603-615.
25. Kawaguchi Y, Kitani A, Hera M *et al* : Cytokine regulation of prolyl 4-hydroxylase production in skin fibroblast culture from patients with systemic sclerosis : contribution to collagen synthesis and fibrosis. *J Rheumatol* 1992; 19: 1195-1201.
26. Kahaleh MB : The molecular mechanism of endothelial cell (EC) injury in scleroderma (SSc) : identification of granzyme 1 ( a product of cytolytic T cell ) in SSc sera [abstract]. *Arthritis Rheum* 1990; 33 ( suppl ) : 67.
27. Heckmann M, Krieg T : Biological and pharmacological modulations of fibroblast functions. *Skin Pharmacol* 1989; 2: 125-137.
28. Bayreuther K, Rodemann HP, Hommel R *et al* : Human skin fibroblasts *in vitro* differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 5112-5116.
29. Gabbiani G : The biology of the myofibroblast. *Kidney Int* 1992; 41: 530-532.
30. Kirk TZ, Mark ME, Chua CC *et al* : Myofibroblasts from scleroderma skin synthesize elevated levels of collagen and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP- 1) with two forms of TIMP-1. *J Biol Chem* 1995; 270: 3423-3428.
31. Pathogenesis of systemic sclerosis. *Arthritis and allied condition*. 12th Edition, Vol 2: 1293-1299. Leroy EC ; LEA & FEBIGER 1993.
32. Sollberg S, Mauch C, Eckes B, Krieg T : The fibroblast in systemic sclerosis. *Clin Dermatol* 1994; 12: 379-385.



33. Gruschwitz M, Driesch P, Kellner I *et al* : Expression of adhesion proteins involved in cell-cell and cell-matrix interactions in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27: 169-177.
34. Gay S, Jones RE, Huang GQ *et al* : Immunohistologic demonstration of platelet-derived growth factor (PDGF) and sis-oncogene expression in scleroderma. *J Invest Dermatol* 1989;92: 301-303.
35. Kulozik M, Hogg A, Lankat-Buttgereit *et al* : Co-localization of transforming growth factor  $\beta$  2 with  $\alpha$  1(I) procollagen mRNA in tissue sections of patients with systemic sclerosis. *J Clin Invest* 1990; 86: 917-922.
36. Gruschwitz M, Muller PU, Sepp N *et al* : Transcription and expression of transforming growth factor type beta in the skin of progressive systemic sclerosis: A mediator of fibrosis? *J Invest Dermatol* 1990; 94: 197-203.
37. Benoit de Crombrughe, Vuorio T, Karsenty G *et al* : Transcriptional control mechanisms for the expression of type I collagen genes. *Ann Rheum Dis* 1991; 50: 872-876.
38. Varga J, Jimenez SA : Modulation of collagen gene expression: Its relation to fibrosis in systemic sclerosis and other disorders. *Ann Intern Med* 1995; 122: 60-62.
39. Pope JE, Bellamy N : Outcome measurement in scleroderma clinical trials. *Semin Arthritis Rheum* 1993; 23: 22-23.
40. Frank HJ, van den Hoogen, Levinus BA, van de Putte : Treatment of systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 1994; 6: 637-641.
41. Black CM, Denton CP : The management of systemic sclerosis. *Br J Rheumatol* 1995; 34: 3-7.

42. Castilla A, Prieto J, Fausto N : Transforming growth factors  $\beta$  1 and  $\alpha$  in chronic liver disease : Effects of interferon alfa therapy. N Engl J Med 1991; 324: 933-940.
43. Knobler RL : Systemic interferon therapy of multiple sclerosis: The Pros. Neurology 1988; 38: 58-61.
44. Peddinani MV, Savery F, Hang LM : Human leukocyte interferon in the treatment of rheumatoid arthritis. Clin Ther 1986; 9: 39-43.
45. Stephenson ML, Krane SM, Amento EP *et al* : Immune interferon inhibits collagen synthesis by rheumatoid synovial cells associated with decreased levels of procollagen mRNA. FEBS Lett 1985; 180: 43-50.
46. Nicolas JF, Thivolet N, Kanitakis J *et al* : Response of discoid and cutaneous lupus erythematosus to recombinant interferon alpha 2a. J Invest Dermatol 1990; 95: 142s-145s.
47. Ducan MR, Berman B : Persistence of a reduced-collagen-producing phenotype in cultured scleroderma fibroblasts after short-term exposure to interferons. J Clin Invest 1987; 79: 1318-1324.
48. Kahari VM, Heino J, Vuorio T *et al* : Interferon- $\alpha$  and interferon- $\gamma$  reduce excessive collagen synthesis and procollagen mRNA levels of scleroderma fibroblasts in culture. Biochim Biophys Acta 1988; 968: 45-50.
49. Stevens BW, Vancheeswaran R, Black CM *et al* : Alpha interferon-2a ( Roferon-a ) in the treatment of diffuse cutaneous systemic sclerosis: a pilot study. Bri J Rheumato 1992;31: 683-689.
50. Giaever I, Keese CR : Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 3761- 3764.

51. Giaever I, Keese CR : Use of electric fields to monitor the dynamical aspect of cell behavior in tissue culture. IEEE Proc Biomed Engng 1986; 33: 242-247.
52. Giaever I, Keese CR : Fractal motion of mammalian cells. Physica D 1989; 39: 128-133.
53. Kowolenko M, Keese CR, Lawrence DA, Giaever I : Measurement of macrophage adherence and spreading with weak electric field. J Immunol Methods 1990; 127: 71-77.
54. Mitra P, Keese CR, Giaever I : Electric measurements can be used to monitor the attachment and spreading of cells in tissue culture. BioTechniques 1991; 11: 504-511.
55. Giaever I, Keese CR : Micromotion of mammalian cells measured electrically. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 7896-7900.
56. Tiruppathi C, Malik AB, Del Vecchio PJ, Keese CR, Giaever I : Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: Assessment of endothelial barrier function. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 7919-7923.
57. Giaever I, Keese CR : A morphological biosensor for mammalian cells. Nature 1993; 366: 591-592.
58. Lo CM, Keese CR, Giaever I : Monitoring motion of confluent cells in tissue culture. Exp Cell Res 1993; 204: 102-109.
59. Ghosh PM, Keese CR, Giaever I: Monitoring electroporation in the plasma membrane of adherent mammalian cells. Biophys J 1993; 64: 1602-1609.
60. Lo CM, Keese CR, Giaever I : pH changes in pulsed CO<sub>2</sub> incubators cause periodic changes in cell morphology. Exp Cell Res 1994; 213: 391-397.

61. Smith TJ, Wang HS, Hogg MG, Henrikson RC, Keese CR, Giaever I : Prostaglandin E2 elicits a morphological change in cultured orbital fibroblasts from patients with Graves ophthalmopathy. Proc Natl Sci USA 1994; 91: 5094-5098.
62. Giaever I, Keese CR : Toxic? Cells can tell. Chemtech 1992; 116-125.
63. Izzard CS, Lochner LR : Formation of cell-to-substrate contacts during fibroblast motility: An interference-reflection study. J Cell Sci 1980; 42: 81-116.
64. Whiteside TL, Patricia MF, Buckingham RB : Heterogeneous synthetic phenotype of cloned scleroderma fibroblasts may be due to aberrant regulation in the synthesis of connective tissues. Arthritis Rheum 1988; 31: 1221-1229.
65. Maxwell DB, Grotendorst CA, Grotendorst GR, Leroy EC : Fibroblast heterogeneity in scleroderma: C1q studies. J Rheumatol 1987; 14: 756-759.
66. Botstein GR, Sherer GK, Leroy EC : Fibroblast selection in scleroderma. Arthritis Rheum 1982; 25: 189-195.
67. Needleman BW, Ordonez JV, Taramelli D *et al* : In vitro identification of a subpopulation of fibroblasts that produces high levels of collagen in scleroderma patients. Arthritis Rheum 1990; 33: 842-852.
68. Tang L, Tanaka Y, Marumo F *et al* : Phenotypic change in portal fibroblasts in biliary fibrosis. Liver 1994; 14: 76-82.
69. Sappino AP, Schurch, Gabbiani G : Differentiation repertoire of fibroblastic cells: Expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. Lab Invest 1990; 63: 144-161.
70. Harris AK, Stopak D, Wild P : Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. Nature 1981; 290: 249-251.

71. Delvoye P, Wiliquet P, Leveque JL *et al* : Measurement of mechanical forces generated by skin fibroblasts embedded in a three-dimensional collagen gel. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 898-902.
72. Arora PD, Mcculloch CA.G. : Dependence of collagen remodelling on  $\alpha$ -smooth muscle actin expression by fibroblasts. *J Cell Physiol* 1994; 159:161-175.
73. Gillery P, Maquart X, Lecorre Y *et al* : Variability in the retraction of collagen lattices by scleroderma fibroblasts - relationship to protein synthesis and clinical data. *Clin Exp Dermatol* 1991; 16: 324-330.
74. Andujar MB, Melin M, Guerret S, Grimaud JA : Cell migration influences collagen gel contraction. *Submicrosc Cytol Pathol* 1992; 24: 145-154.
75. Pierschbacher M, Ruoslahti E : Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 1984; 309: 30-33.
76. Kahaleh BM : Soluble immunologic products in scleroderma sera. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; 58: 139-144.
77. Kantor TV, Friberg D, Medsger TA Jr *et al* : Cytokine production and serum levels in systemic sclerosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 65: 278-285.
78. Bruns M, Herrmann K, Haustein UF : Immunologic parameters in systemic sclerosis. *Int J Dermatol* 1994; 33: 25-32.
79. Needleman BW, Wigley FM, Stair RW : Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor  $\alpha$ , and interferon  $\gamma$  levels in sera from patients with scleroderma. *Arthritis Rheum* 1992;35: 67-72.
80. Famularo G, Giacomelli R, Alesse E *et al* : Polyclonal B lymphocyte activation in progressive systemic sclerosis. *J Clin Lab Immunol* 1989; 29: 59-63.

81. Keystone EC, Lok C, Appleton B *et al* : Elevated serum levels of TGF  $\beta$  in patients with scleroderma. *Arthritis Rheum* 1992; 35 (supple): S206 [abstract] .
82. Higley H, Persichitte K, Chu S *et al* : Immunocytochemical localization and serological detection of TGF  $\beta$  1: association with type I procollagen and inflammatory cell markers in diffuse and limited systemic sclerosis, morphoea and Raynaud's phenomenon. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 278-288.
83. Greaves M, Malia RG, Ward M *et al* : Elevated von Willebrand factor antigen in systemic sclerosis: Relationship to visceral disease. *Br J Rheumatol* 1988; 27: 281-285.
84. Vancheeswaran R, Magoulas T, Efrat G *et al* : Circulating endothelin-1 levels in systemic sclerosis-- A marker of fibrosis or vascular dysfunction? *J Rheumatol* 1994; 21: 1838-1844.
85. Takahashi H, Ito S, Hanano M *et al* : Circulating thrombomodulin as a novel endothelial cell marker: Comparison of its behavior with von Willebrand factor and tPA. *Am J Hematol* 1992; 41: 32-39.
86. Mannucci PM, Aberg M, Nilsson IM, Robertson B : Mechanism of plasminogen activator and factor VIII increase after vasoactive drugs. *Br J Haematol* 1975; 30: 81-87.
87. Carson CW, Beall LD, Hunder GG *et al* : Serum ELAM 1 is increased in vasculitis, scleroderma and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1993; 20: 809-814.
88. Sfikakis PP, Tesar J, Baraf H *et al* : Circulating intercellular adhesion molecule-1 in patients with systemic sclerosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 68: 88-92.
89. Kahaleh BM, Osborn I, Leroy EC : Elevated levels of circulating platelet aggregates and beta thromboglobulin in scleroderma. *Ann Intern Med* 1982; 96: 610-612.

90. Lima J, Fonolosa V, Fernandez-Cortuo J *et al* : Platelet activation, endothelial cell dysfunction in the absence of anticardiolipin antibodies in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1991; 18: 1833-1836.
91. Black M, Mcwhirter A, Harrison NK *et al* ; Serum type III procollagen peptide concentrations in systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon: Relationship to disease activity and duration. *Br J Rheumatol* 1989; 28: 93-103.
92. Herrman K, Schulze E, Heckmann M *et al* : Type III collagen aminopropeptide and laminin PI levels in serum of patients with silicosis-associated and idiopathic systemic scleroderma. *Br J Dermatol* 1990; 123: 1-7.
93. Horslev-Petersen K, Ammitzboll T, Engstroem-Laurent A *et al* : Serum and urinary aminoterminal type III procollagen peptide in progressive systemic sclerosis: Relationship to sclerodermal involvement, serum hyaluronan and urinary collagen metabolites. *J Rheumatol* 1988; 15: 460-464.
94. Raghow R, Postlethwaite AE, Keski-Oja J *et al* : Transforming growth factor- $\beta$  increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin messenger RNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts. *J Clin Invest* 1987; 79: 1285-1288.
95. Goldring MB, Krane SM : Modulation by recombinant interleukin 1 of synthesis of type I and III collagens and associated procollagen mRNA levels in cultured human cells. *J Biol Chem* 1987; 262: 16724-16729.
96. Gillery P, Serpier H, Polette M *et al* : Gamma-interferon inhibits extracellular matrix synthesis and remodeling in collagen lattice cultures of normal and scleroderma skin fibroblasts. *Euro J Cell Biol* 1992; 57: 244-253.
97. Drenk F, Deicher H R.G. : Pathophysiological effects of endothelial cytotoxic activity derived from sera of patients with progressive systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1988; 15: 468-474.

98. Samuels DS, Tojo T, Homma M, Shimizu N : Inhibition of topoisomerase I by antibodies in sera from scleroderma patients. *FEBS Letters* 1986; 209: 231-234.
99. Elias JA : Tumor necrosis factor interacts with interleukin-1 and interferons to inhibit fibroblast proliferation via fibroblast prostaglandin-dependent and -independent mechanisms. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 652-658.
100. Feghali CA, Boulware DW, Levy LS : Mechanisms of pathogenesis in scleroderma. II. Effects of serum and conditioned culture medium on fibroblast function in scleroderma. *J Rheumatol* 1992; 19: 1212-1219.
101. Cho MM, Jimenez SA, Johnson BA *et al* : In vitro cytokine modulation of intercellular adhesion molecule-1 expression on systemic sclerosis dermal fibroblasts. *Pathobiology* 1994; 62: 73-81.
102. Kawauchi Y, Harigai M, Suzuki K *et al* : Interleukin 1 receptor on fibroblasts from systemic sclerosis patients induces excessive functional responses to interleukin 1  $\beta$  . *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 190: 154-161.
103. Shi-Wen X, Panesar M, Vancheeswaran R *et al* : Expression and shedding of intercellular adhesion molecule 1 and lymphocyte function-associated antigen 3 by normal and scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1689-1697.
104. Majewski S, Hunzelmann N, Schirren CG *et al* : Increased adhesion of fibroblasts from patients with scleroderma to extracellular matrix components: In vitro modulation by IFN- $\gamma$  but not by TGF- $\beta$  . *J Invest Dermatol* 1992; 98: 86-91.
105. Takehara K, Soma Y, Igarashi A *et al* : Response of scleroderma fibroblasts to various growth factors. *Arch Dermatol Res* 1991; 283: 461-464.



106. Duncan MR, Hasan A, Berman B : Oncostatin M stimulates collagen and glycosaminoglycan production by cultured normal dermal fibroblasts: Insensitivity of sclerodermal and keloidal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 128-133.
107. Matucci-Cerinic M, Pignone A, Biagini M, Lotti T : Markers of disease activity in systemic sclerosis. *Clin Dermatol* 1994; 12: 291-297.
108. Kahaleh MB, Leroy CE : Interleukin-2 in scleroderma: Correlation of serum level with extent of skin involvement and disease duration. *Ann Intern Med* 1989; 110: 446-450.
109. Degiannis D, Seibold JR, Czarnecki M *et al* : Soluble interleukin-2 receptors in patients with systemic sclerosis: Clinical and laboratory correlations. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 375-380.
110. Patrick MR, Kirkham BW, Graham M, Harrison LC : Circulating interleukin 1  $\beta$  and soluble interleukin 2 receptor: Evaluation as markers of disease activity in scleroderma. *J Rheumatol* 1995; 22: 654-658.
111. Gruschwitz MS, Hornstein OP, Peter von den Driesch : Correlation of soluble adhesion molecules in the peripheral blood of scleroderma patients with their in situ expression and with disease activity. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 184-189.
112. Unemori EN, Bauer EA, Amento EP : Relaxin alone and in conjunction with interferon- $\gamma$  decreases collagen synthesis by cultured human scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1992; 99: 337-342.

《 授 權 書 》

本人所撰(著)八十四 學年度第一學期私立中山醫學院

大學 學院

醫學

研究所 博(碩)

士學位論文(論文名稱:利用電阻抗感測硬皮症病人血清及)


干擾素 Interferon α-2b 對皮膚纖維

母細胞微運動之影響。

之提要

同意  不同意

開放供學術利用。

姓名: 黃建寧 

立書人: 地址: 台中市文心南路390號5樓之一

身分證統一編號: 2121799299

聯絡電話: (04)3819368

中華民國

捌拾伍

年

壹

月

叁拾

日