

國立臺灣大學醫學院解剖學暨細胞生物學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Anatomy and Cell Biology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

類澱粉神經病變的神經病理研究

Neuropathologic Study of Amyloid Neuropathy

王祥恒

Siang-Heng Wang

指導教授：謝松蒼 教授

Advisor: Sung-Tsang Hsieh, Ph.D.

中華民國 101 年 1 月

January, 2012

國立臺灣大學碩士學位論文  
口試委員會審定書

類澱粉神經病變的神經病理研究  
Neuropathologic Study of Amyloid Neuropathy

本論文係王祥恒君（學號 R98446003）在國立臺灣大學解剖學暨細胞生物學研究所完成之碩士學位論文，於民國一〇一年一月十一日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

謝松蒼

（簽名）

（指導教授）

曾昭榮

江正河

系主任、所長

謝松蒼代

（簽名）

## 致謝

感謝老師這兩年多來，在課業、研究及生活上的指導以及包容，讓我能順利完成碩士論文，以及實驗室的學長姐及學弟妹，在實驗上給我很多的支援和鼓勵。還有所上的老師以及大體老師們，在課業上的認真教學跟示範，讓我增長了很多知識。

感謝同班同學，這個小規模的班級，讓我們在忙碌之餘還能一起吃飯出遊培養感情。感謝東海羅浮群的好伙伴們，不時當我的應援團，給我加油打氣。感謝帶我一同爬山的好朋友們，讓我煩悶之時可以上山透透氣，欣賞美麗風景，感受大自然撫慰人心的力量。感謝慈濟永和新芽課輔團隊，讓我有機會提供一點力量，幫助需要幫助的孩童，盡一份實際且有意義的心意。感謝台灣生態登山學校亞成鳥計畫，讓我有機會學習借用大自然的力量來改變世界。感謝每位曾給我一個加油微笑的點頭之交。

感謝兩位摯友，崇儒和品翰，難兄難弟，不離不棄。感謝我的家人，提供一個溫暖的窩隨時等我回家，並支持我朝向理想邁進。

## 摘要

在許多種類的類澱粉神經病變 (amyloid neuropathy) 中，transthyretin (TTR) mutation 已知是導致家族性類澱粉多發性神經病變 (Familial amyloid polyneuropathy, FAP) 的主要原因，其中最常見的是 Val30Met，而在台灣的是 Ala97Ser。FAP 患者通常會在不自覺的情況下發現腳出現感覺麻木 (numbness) 和輕度癱瘓 (weakness) 的現象，可能還伴隨著腸胃不適的症狀，因此有些病人會到腸胃科去看診但是卻找不出原因。

台灣的案例在過去的研究已經發現，FAP 患者的腓腸神經 (sural nerve) 組織切片上，利用組織化學染色可發現血管的周圍會有 eosinophilic 現象以及容易有 Congo red 濃染的現象，利用 TTR 抗體進行免疫組織化學染色，可以在相同的位置觀察到免疫染色現象。而在葡萄牙亦有學者發現 FAP 患者的腓腸神經的神經內膜 (endoneurium) 裡有 cytokines 增加的情形，血管內皮細胞株若額外給予 fibrillar TTR，亦可使細胞產生 cytokines。但是至今對於如何導致神經退化的機制仍然不清楚。

根據前人的發現，本實驗假設 FAP 的腓腸神經內應該會有免疫細胞的浸潤現象，而血管可能會有發炎現象，若能發現免疫細胞浸潤現象，則希望能進一步探討此現象與神經退化程度是否有關，以及 FAP 病人的有髓鞘神經纖維與無髓鞘神經纖維的退化程度是否有所差異。

從型態學觀察後發現，FAP 腓腸神經內的有髓鞘神經纖維密度與表皮神經纖維密度有顯著正相關，顯示兩者的退化程度是相似的。經過免疫組織化學染色後，發現在 FAP 的腓腸神經內巨噬細胞及 T 細胞均有顯著的浸潤現象，而 T 細胞與神經退化程度均無呈現相關性，但是巨噬細胞與有髓鞘神經纖維呈現顯著正相關。在血管的周圍則是發現部分 FAP 腓腸神經內的血管有補體反應現象。

本實驗發現 Ala97Ser FAP 的腓腸神經有 T 細胞浸潤以及補體反應，顯示這可能是發炎性神經病變，且可能與血管有關，但是 TTR 堆積是否真的跟發炎有關，進而導致神經退化，則需要更進一步連結 TTR 堆積、補體反應、免疫細胞浸潤與神經退化程度之間的關係才能更有說服力。

關鍵詞：家族性類澱粉多發性神經病變、Ala97Ser、軸索退化、巨噬細胞、T 細胞



## Abstract

Familial amyloid polyneuropathy (FAP) due to mutations of transthyretin (TTR) constitutes important etiologies of amyloid neuropathy. In Portugal, Sweden, and Japan, the major mutation is Val30Met. In Taiwan, most FAP patients had Ala97Ser mutation. Neurological symptoms include numbness, weakness, dysautonomia, and diarrhoea.

Previous studies have documented increased cytokines in endoneurium of sural nerve biopsy. These studies raise several issues, for example, what are the sources of cytokines.

This study tested the hypothesis that whether the infiltration of immune cells was increased in sural nerve of FAP, and whether there is correlation between immune cell infiltration and nerve degeneration.

The myelinated fiber density of sural nerve was proportional to intraepidermal nerve fiber (IENF) density on skin biopsies. The infiltrations of macrophages and T cells in sural nerves of FAP was increased compared to that of control subjects. There was complement-deposition in blood vessels of some in FAP patients.

Keywords: Familial amyloid polyneuropathy (FAP), Ala97Ser, axonal degeneration, macrophage, T cell.

# 目錄

口試委員會審定書 .....	i
致謝 .....	ii
摘要 .....	iii
Abstract .....	v
目錄 .....	1
圖目錄 .....	2
表目錄 .....	3
前言 .....	4
實驗材料與方法 .....	9
結果 .....	14
討論 .....	19
參考文獻 .....	22
圖表及說明 .....	24



## 圖目錄

圖一 FAP 患者的腓腸神經的半薄切片觀察 .....	25
圖二 FAP 患者的有髓鞘神經纖維密度的定量結果 .....	27
圖三 FAP 患者的有髓鞘神經纖維密度與 IENF 密度之間的關係 .....	29
圖四 巨噬細胞在 FAP 患者的腓腸神經有浸潤現象 .....	31
圖五 FAP 患者的巨噬細胞浸潤密度的定量結果 .....	33
圖六 T 細胞在 FAP 患者的腓腸神經有浸潤現象 .....	35
圖七 FAP 患者的 T 細胞浸潤密度的定量結果 .....	37
圖八 腓腸神經沒有發現 B 細胞 .....	39
圖九 FAP 患者的腓腸神經的巨噬細胞、T 細胞、有髓鞘神經纖維與 IENF 之間的 關係 .....	41
圖十 FAP 患者的腓腸神經的 C3d 免疫染色結果 .....	43

## 表目錄

表一 FAP 患者的腓腸神經的 C3d 免疫染色結果 ..... 45



## 前言

家族性類澱粉多發性神經病變 (Familial amyloid polyneuropathy, FAP) 最初是由葡萄牙的 Andrade 醫師首先發表文章做出描述 (Andrade, 1952) ，在波蘭北方的一個小漁村裡，當地的居民多半都患有腳部疾病，症狀包括痛覺缺失 (analgesia) 、感覺缺失 (anaesthesia) ，以及輕度癱瘓 (paresis) ，且大部分都伴隨有腸胃不適症狀，包括腹瀉 (diarrhoea) 及括約肌功能異常 (disturbances of sphincters) ，部分患者甚至會有性功能障礙 (sexual disturbances) 及瞳孔大小異常 (anisocoria) 。於往生病患的檢體中更發現，近乎全身的器官組織都能發現類似透明物質的堆積 (hyaline substance) ，其中在腎的腎小球 (glomeruli) 、血管壁 (walls of the vessels) 、組織間質 (interstitial tissue) 及周邊神經的神經纖維 (nerve fibers) 附近數量較多。

本實驗室過去的研究已經發現，FAP 病患的表皮神經纖維 (intraepidermal nerve fiber, IENF) 與對照組相比，有顯著減少的現象，此發現可支持在臨床上所觀察到的感覺功能異常的現象 (Yang, et al., 2010) 。

### **Transthyretin (TTR)**

Transthyretin 的早期名稱之一為 thyroxine-binding prealbumin (TBPA) ，分子量大小為 15.9 kDa，由 147 個胺基酸 (amino acids) 組成，每個單體 (monomer) 有 1 個  $\alpha$ -helix 和 8 個  $\beta$ -strands。其功能目前所知甚少，已知的是與運送甲狀腺素 (thyroxine) 及運送維他命 A (retinol, vitamin A) 有關，在人體是由脈絡叢 (choroid plexus) 和肝 (liver) 製造，經由血液運送至體內其他部位 (Herbert, et al., 1986) (Schreiber, et al., 1997) 。

FAP 目前已知與 transthyretin 的突變非常有關係，正常情況下的 transthyretin 為四

聚物 (tetramer) 結構，但是帶有突變的 transthyretin 則會發生 misfolding，使其形成單體 (monomer)，最後容易形成纖維 (fibrils) (Jeffery W, 1998)。截至目前為止已知的突變種類已經超過 100 個，案例發生地點除了葡萄牙，也遍及瑞士、日本、美國以及台灣等地 (Planté-Bordeneuve, et al., 2011)，其中最常見的突變為 Val30Met，而在台灣目前發現的案例則均為 Ala97Ser (Liu, et al., 2008) (Yang, et al., 2010)，此突變位置位於一個  $\beta$ -strand 上，診斷時可以利用基因定序 (gene sequencing) 以及 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 進行雙重驗證來確診 (Yang, et al., 2010)。

### 組織染色 (Tissue Staining)

在 FAP 患者的組織切片中，若以 hematoxylin-eosin (H&E) 染色，容易發現有 eosinophilic 的現象，若以 Congo red 染色，在同樣位置則可觀察到濃染的 Congo red 顏色，台灣的 Ala97Ser FAP 患者的腓腸神經 (sural nerve) 組織切片，經 H&E 染色及 Congo red 染色後，可以在血管的周圍發現 eosinophilic 現象以及 Congo red 的顏色，若以 TTR 抗體進行免疫染色，則可以在上述相同的位置看到免疫染色反應 (Yang, et al., 2010)。亦有學者利用電子顯微性發現，Val30Met FAP 患者的腓腸神經的神經內膜 (endoneurium) 血管，在血管內皮 (endothelium) 和 basement membrane 之間有類澱粉堆積 (amyloid deposition) 的現象 (Mathis, et al., 2012)。

過去有學者發現，FAP 患者的腓腸神經利用免疫染色，可以觀察到神經內膜 (endoneurium) 內有 receptor for advanced glycation end-products (RAGE) 及其下游 nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B)、tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )、interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ )、inducible nitric oxide synthase (iNOS)，以及 caspase-3 的免疫染色現象 (Sousa, et al., 2001)。

## **Transthyretin 的細胞毒性 (Cytotoxicity of Transthyretin (TTR))**

學者過去也發現到，若在初代培養 (primary culture) 或細胞株培養 (cell line) 的神經細胞 (neuron)、許旺氏細胞 (Schwann cell)、血管內皮細胞 (endothelium) 的培養液 (culture medium) 裡加入 fibrillar TTR，可以使細胞產生 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、iNOS (Sousa, et al., 2001)。

## **巨噬細胞與細胞激素 (Macrophages and Cytokines)**

巨噬細胞在免疫功能上的主要角色是扮演抗原呈現細胞 (antigen-presenting cells (APCs)) 的角色，在吞噬病原體 (pathogens) 後，可利用 HLA (human leukocyte antigen) 將病原體的 epitope 表現至細胞膜上，以供活化 T cells 等免疫反應。

巨噬細胞在過去被認為當神經發生退化時，它可以清除神經退化後留下的殘骸以免阻礙神經再生，而若發生發炎性神經損傷時，巨噬細胞是調節其他調控因子的重要角色，它不僅調控了組織損傷的程度，也調控了整個病症的過程。來自巨噬細胞可促進發炎反應的 pro-inflammatory mediators 包括了 TNF- $\alpha$  及 IL-12 等，但也包括了可以抑制發炎反應的 anti-inflammatory mediators 包括了 TGF- $\beta$  和 IL-10 (Kiefer, et al., 2001)。而過去有學者發現在大鼠的脊髓 (spinal cord) 注射 recombinant rat TNF- $\alpha$ ，可觀察到此處的 blood-brain barrier (BBB) 被破壞 (Schnell, et al., 1999)。

鈣離子是細胞中訊息傳遞的重要因子之一，當特定蛋白質與鈣離子結合後，即可進行特定的訊息傳遞。與鈣離子結合的蛋白質之中，Iba1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1) 是一種 17-kD EF hand protein，表現於巨噬細胞 (macrophages) 和微膠細胞 (microglia) 中，當巨噬細胞被活化時，Iba1 會有增加的情形 (Ito, et al., 1998)。因此本實驗使用 Iba1 的抗體來標定巨噬細胞，當巨噬細胞活化時，即可

被 Iba1 抗體標定出來。

### **T 細胞和 B 細胞 (T cells and B cells)**

T 細胞的綜觀的功能是扮演 cell-mediated immunity 的角色，目前共被區分為 helper T cells、cytotoxic T cells、memory T cells、regulatory T cells 等。Helper T cells 可以幫助 B cells maturation，活化 cytotoxic T cells 和 macrophages。Cytotoxic T cells 則可以破壞被感染的細胞或腫瘤細胞。Memory T cells 則是在受到感染後，可以快速的增生並長時間地保存在體內，以供下一次再被感染時可以出來對抗感染源。而 regulatory T cells 又稱為 suppressor T cells，目的在當免疫反應告一段落時，抑制 T cell-mediated immunity。

CD45 又稱 protein tyrosine phosphatase, receptor type, C (PTPRC)。Protein tyrosine phosphatase (PTP) family 調控多種訊息，包括細胞生長、分化，為一穿膜糖蛋白 (transmembrane glycoprotein)。其中的 CD45 family 含有多種 isoforms，T 細胞活化時需要 CD45 的調控，本實驗使用 CD45 的抗體來標定出 T 細胞。

B 細胞的綜觀的功能是扮演 humoral immunity 的角色，主要功能是作為抗原呈現細胞以及產生抗體。

CD20 為一 activated-glycosylated phosphoprotein，在 B cells 活化成 plasma cells 時，CD20 參與在其中，本實驗使用 CD20 的抗體來標定出 B 細胞。

### **補體 (Complement)**

補體系統在免疫系統中的最終的目的是要在病原體 (pathogens) 的表面做上標記 (例如 C3b)，使得病原體可以容易地被吞噬作用所清除，或是使病原體產生穿孔

而無法存活。補體系統中的其中一個路徑：classic pathway 是必須由抗體與抗原結合後引發的，因此如果在組織中有補體系統活化，表示該處可能有抗體與抗原結合的免疫反應。

Light chain amyloidosis (AL) 是一種常見的類澱粉沉積症 (amyloidosis)，此病的神經檢體中亦可發現類澱粉堆積 (amyloid deposition) 的現象，而過去有學者發現此疾病的神經組織中，在類澱粉堆積處、血管的內皮細胞或血管壁上，可發現有補體的免疫染色現象，且在 FAP 亦有同樣現象 (Hafer-Macko, et al., 2000)。

本實驗使用 C3d 的抗體，而 C3d 為 C3b 的其中一個片段，因此亦可用來標記 C3b。

#### 研究目的 (Purpose of the Study)

先前的研究已經發現，在 FAP 病人的腓腸神經內看到 TTR 免疫染色，以及一些 pro-inflammatory cytokines 的表現，在免疫學的角度上，這些 cytokines 普遍被認為是來自巨噬細胞等免疫細胞，所以本研究懷疑是否 FAP 病人的腓腸神經內，免疫細胞的表現與對照組會有所不同。因此本研究使用特定標定抗體來檢視巨噬細胞 (Iba1)、T 細胞 (CD45)、B 細胞 (CD20) 在對照組與 FAP 之間的差異，並且探討神經退化程度是否與免疫細胞的增加呈現相關性。而在血管方面，過去只有發現 Ala97Ser FAP 患者的 TTR 會堆積在血管附近，但這些堆積是否對血管造成什麼影響則尚未有所報導，因此本研究亦想探討血管附近堆積 TTR 是否會導致發炎現象。

## 實驗材料與方法

### 個體取樣 (Subjects)

本研究取樣人數共 20 位，其中對照組共 3 位，平均年齡  $54.33 \pm 20.3$  歲 (mean  $\pm$  SD)，範圍：31~68 歲，FAP 病人 17 位，平均年齡  $61.25 \pm 3.6$  歲 (mean  $\pm$  SD)，範圍 56~70 歲。本研究的對照組樣本為無神經學症狀患者，但因外傷需進行神經重建治療而取得的檢體標本，整個過程需經由神經科醫師詳細問診，並進行神經學的相關檢查，評估為無任何神經方面的疾病或臨床上診斷為神經病變的可能性。FAP 患者的樣本，是由神經科醫師經感覺功能檢查 (quantitative sensory testing) 及神經傳導檢查 (nerve conduction studies) 確定有異狀，再經基因定序 (Yang, et al., 2010) 後發現其 TTR 帶有突變，即確診為 FAP 患者。

本研究基於醫學道德倫理規範，經國立台灣大學醫學院附設醫院倫理委員會審查通過，依據倫理委員會的標準程序，在捐贈者經過醫師說明檢體用途後，取得捐贈者的活體組織檢查同意書。

### 神經檢體取樣 (Nerve Biopsy)

捐贈者於簽署神經切片同意書後，以平躺的姿勢於皮下注射 1% lidocaine 使其局部麻醉或全身麻醉，接著在外踝 (lateral malleolus) 後方約 1 公分處，做一個切口以分離皮膚及皮下組織，在一小靜脈後方即可見腓腸神經 (sural nerve)，將其進行游離後，於上下兩端切斷後即可將神經取出，最後將傷口逐層 (cross bilayer) 縫合。捐贈者在取樣的過程中皆無明顯不適，傷口縫合後以紗布妥善包紮，與兩週後即可拆線。

## 型態觀察與有髓鞘神經纖維之定量 (Morphology Observation and Quantification of Myelinated Fibers)

腓腸神經 (sural nerve) 以刀片橫切成約 0.5 公分長，以戊二醛溶液 (5% glutaraldehyde) 固定 48 小時，再以磷酸鹽緩衝溶液 (0.1M phosphate buffer, 0.1M PB, pH7.4) 置換，保存於 4°C 冰箱。進行樹脂包埋時，先以鉻酸容易 (2% osmic acid) 固定 2 小時，接著以不同濃度酒精進行階段性脫水，再以環氧丙烷 (propylene oxide) 置換，最後以 Epon 812 resin 包埋成樹脂塊。樹脂塊以超微切片機 (Reichert ultracut E, Leica, Germany) 切成厚度 0.99 $\mu$ m 之半薄切片 (semi-thin sections)，再以甲苯胺藍溶液 (0.5% toluidine blue) 進行染色，封片後進行觀察。

半薄切片使用差異繞射顯微鏡 (differential interference contrast microscopy, DIC) (DM2500, Leica, Germany)，以 20 倍物鏡配合彩色電荷耦合元件 (color charge-coupled device) (DFC 490, Leica, Germany) 取得影像，再以 Adobe<sup>®</sup> Photoshop<sup>®</sup> 進行定量。進行神經內膜 (endoneurium) 面積測量之前，先以同樣 20 倍物鏡拍攝比例尺 (scale bar)，計算由 CCD 取得的比例尺上 1 $\mu$ m 長度與像素值 (pixels) 的換算公式。

取得之半薄切片影像使用套索工具圈出每個神經內膜 (endoneurium) 後，檢視其面積的像素值 (pixels)，代入換算公式後即可得知神經內膜 (endoneurium) 的面積為多少平方毫米 ( $\text{mm}^2$ )，再用計算工具計算所有有髓鞘神經纖維 (myelinated fibers) 的數量，以數量除以平方毫米即可得知有髓鞘神經纖維密度 (myelinated fiber density, No./  $\text{mm}^2$ )。

## 冷凍切片 (Cryostat Sectioning)

腓腸神經 (sural nerve) 以刀片橫切成約 0.5 公分長，以三聚甲醛溶液 (4%

paraformaldehyde) 固定 48 小時，再以磷酸鹽緩衝溶液 (0.1M phosphate buffer, 0.1M PB, pH7.4) 置換，保存於 4°C 冰箱。為了避免在冷凍切片的過程中，因低溫使組織內的水分凝固成結晶，導致組織的型態改變，檢體在組織切片前先以蔗糖溶液 (30% sucrose / 0.1M PB) 浸泡 24 小時，再以不同比例混合的蔗糖溶液與冷凍包埋劑 (optimal cutting temperature compound, OCT) (Shandon, Pittsburgh, PA, USA) 進行漸進式滲透。使用冷凍切片機 (cryostat microtome) (CM3050S, Leica, Germany) 時溫度需維持在 -25°C，將組織以 OCT 包覆在專用固定盤後靜置於冷凍切片機內。每個切片厚度為 10µm，切下後黏貼於覆有明膠 (gelatin) 的載玻片上，每個腓腸神經收集 300 個連續切片，平均分配在 50 個載玻片上，為了避免造成抽樣誤差及達成取樣的公平性，第 1 個切片與第 51 個切片黏貼於第 1 片載玻片上，第 2 個切片與第 52 個切片黏貼於第 2 片載玻片上，以此類推，因此每片載玻片上的每個相鄰切片，均相距 500µm，每一載玻片共收集 6 個切片。切片完成後在室溫陰乾，保存於 -80°C 冰箱。

### 免疫組織化學染色 (Immunohistochemistry)

將冷凍切片完成的組織玻片置於室溫回溫後，以緩衝溶液 (0.5M Tris buffer, pH7.6) 沾濕並使用染色專用的玻片夾 (Coverplate™)，夾入專用玻片架 (Sequenza®) (Shandon, Pittsburgh, PA, USA)。此染色法的原理是利用毛細現象，將染色過程中使用的溶液透過玻片夾上方開口加入，藉由毛細現象覆蓋於整個玻片。

首先以 0.5M Tris 沖洗 3 次共 15 分鐘，以脫去 OCT，接著以 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / methanol 溶液反應 30 分鐘，此步驟目的是為了去除組織中內生性的過氧化氫酶。再以 0.5M Tris 沖洗 3 次共 30 分鐘後，加入脫脂奶粉溶液 (0.1% Triton-Milk)，此步驟目的是為了防止抗體的非特定性結合 (non-specific binding)，並使細胞膜產生許多小孔，使抗體可以進入細胞內。接著加入一級抗體 (primary antibody)，並將整組玻

片架置於4°C環境下18~24小時。本實驗使用的一級抗體有：Ionized calcium-binding adapter molecule 1 antibody (Iba1, 1:250, Wako, Osaka, Japan) 、Human Leukocyte common antigen antibody (CD45, 1:50, Dako, Glostrup, Denmark) 、Human B-lymphocyte surface antigen B1 antibody (CD20, 1:50, Dako, Glostrup, Denmark) 。次日先以 0.5M Tris 沖洗 3 次共 30 分鐘後，加入二級抗體 (secondary antibody) ，整組玻片架置於室溫環境下 1 小時。本實驗使用的二級抗體有：biotinylated goat anti-rabbit IgG antibody (Vector, Burlingame, CA, USA) 、biotinylated horse anti-mouse IgG antibody (Vector, Burlingame, CA, USA) 。接著使用 0.5M Tris 沖洗 3 次共 30 分鐘後，加入 avidin-biotin complex (Vector, Burlingame, CA, USA) ，置放於室溫下 45 分鐘後，以 0.5M Tris 沖洗 3 次共 30 分鐘，免疫反應結果以 3,3-diaminobenzidine (DAB) (Sigma, St. Louis, MO) 呈色，並以不同濃度的酒精進行階段性脫水，封片進行觀察。

### 免疫螢光染色 (Immunofluorescence)

將冷凍切片完成的組織玻片置於室溫回溫後，以緩衝溶液 (0.5M Tris buffer, pH7.6) 沾濕並使用與免疫組織染色相同的染色專用玻片夾進行染色。首先以 0.5M Tris 沖洗 3 次共 15 分鐘後，加入一級抗體，並將整組玻片架置於 4°C 環境下 18~24 小時。本實驗使用的一級抗體有：Human C3d complement antibody (C3d, 1:4000, Dako, Glostrup, Denmark) 。次日先以 0.5M Tris 沖洗 3 次共 30 分鐘後，加入二級抗體及 Rhodamine labeled Ulex Europaeus Agglutinin I (UEA I) (Ulex, 1:100, Vector, Burlingame, CA, USA) ，整組玻片架置於室溫環境下 1 小時。本實驗使用的二級抗體有：Cy2-conjugated donkey anti-rabbit IgG antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) 。接著以 0.5M Tris 沖洗 3 次共 30 分鐘後，封片進行觀察。

## 巨噬細胞和 T 細胞浸潤之定量 (Quantification of Macrophages and T cells)

經免疫組織化學染色完成的玻片，使用差異繞射顯微鏡 (differential interference contrast microscopy, DIC) (DM2500, Leica, Germany) ，以 10 倍物鏡配合彩色電荷耦合元件 (color charge-coupled device) (DFC 490, Leica, Germany) 取得影像，再以 Adobe® Photoshop® 進行定量。進行神經內膜 (endoneurium) 面積測量之前，先以同樣 10 倍物鏡拍攝比例尺 (scale bar) ，計算由 CCD 取得的比例尺上 1 $\mu$ m 長度與像素值 (pixels) 的換算公式。

取得之影像使用套索工具圈出每個神經內膜 (endoneurium) 後，檢視其面積的像素值 (pixels) ，代入換算公式後即可得知神經內膜 (endoneurium) 的面積為多少平方毫米 (mm<sup>2</sup>) ，再用計算工具計算所有深棕色且呈現顆粒狀的細胞數量，以數量除以平方毫米即可得知巨噬細胞或 T 細胞密度 (Iba-1 or CD45 density, No./mm<sup>2</sup>)。

## 統計分析 (Statistical Analysis)

本實驗數據均使用生物定量統計軟體 GraphPad Prism® 5 進行分析。對照組與類澱粉神經病變患者其神經內膜 (endoneurium) 內的有髓鞘神經纖維密度 (myelinated fiber density) 、巨噬細胞密度 (Iba-1 density) 、T 細胞密度 (CD45 density) 數值均以平均值  $\pm$  標準偏差 (mean  $\pm$  SD) 表示，並以 t-test 個別做兩組間的數值比較，當  $p < 0.05$  時，則認為兩組在統計學上具有顯著差異 (significant differences)。

對於想要了解類澱粉神經病變患者的有髓鞘神經纖維密度 (myelinated fiber density) 、表皮內神經纖維密度 (intraepidermal nerve fiber density) 、巨噬細胞密度 (Iba-1 density) 、T 細胞密度 (CD45 density) 之間的相關性，以線性迴歸分析 (linear regression analysis) 來進行評估，當  $p < 0.05$  時，則認為兩組在統計學上具有顯著相關 (significant correlation) 。

## 結果

### 腓腸神經的半薄切片觀察及有髓鞘神經纖維密度定量

為了瞭解 FAP 患者之間，其神經退化程度是否有差異，以及神經退化的程度是否與免疫細胞浸潤的程度有關，因此以電子顯微鏡技術中的半薄切片 (semi-thin sections) 來觀察腓腸神經內的有髓鞘神經纖維 (myelinated fiber)。甲苯胺藍 (toluidine blue) 是鹼性染劑 (basic dye)，因此可以染上帶有負電荷的物質，例如細胞膜、去氧核糖核酸 (DNA) 等，而髓鞘質 (myelin sheath) 為許旺氏細胞 (Schwann cell) 的細胞膜所延伸出來，層層緊密環抱軸突 (axon) 的一結構，因此使用甲苯胺藍進行染色即可以很容易地觀察到髓鞘質 (myelin sheath) 呈現深藍色，而中間的軸突 (axon) 則呈現近乎白色的淡藍色，神經內膜 (endoneurium) 內的細胞外間質 (extracellular matrix) 則呈現淡藍色。

對照組的腓腸神經半薄切片，在 20 倍物鏡下即可以觀察到數量密集、彼此間緊密排列的有髓鞘神經纖維 (myelinated fiber) (圖一(A))，而 FAP 患者的有髓鞘神經纖維 (myelinated fiber) 數量則明顯的減少 (圖一(B))。在 40 倍物鏡下則可以觀察到，類澱粉神經病變患者的切片上有許多單獨存在、無伴隨著髓鞘質 (myelin sheath) 的許旺氏細胞 (Schwann cell) 的細胞核 (圖一(D))，而對照組則較少有此現象 (圖一(C))。

有髓鞘神經纖維密度 (myelinated fiber density) 經計算後，對照組為  $7115 \pm 599.5$  No./mm<sup>2</sup> (N = 3)，FAP 患者為  $1373 \pm 926.9$  No./mm<sup>2</sup> (N = 17)，經 Mann-Whitney U test 分析後顯示兩組間具有顯著差異 ( $p < 0.05$ )。

### 有髓鞘神經纖維密度與表皮內神經纖維密度之相關性

為了想了解 FAP 患者的有髓鞘神經纖維 (myelinated fiber) 和無髓鞘神經纖維

(unmyelinated fiber) 的退化程度是否相似或有差異，我們選擇比較有髓鞘神經纖維密度 (myelinated fiber density) 與表皮內神經纖維密度 (intraepidermal nerve fiber density, IENF density) 。

表皮內神經纖維 (IENF) 為無髓鞘神經纖維 (unmyelinated fiber) ，經由皮膚切片、免疫組織化學染色及定量，即可取得表皮內神經纖維密度 (IENF density) 的數據，相較於由腓腸神經進行超薄切片 (ultra-thin sectioning) 來取得無髓鞘神經纖維密度 (unmyelinated fiber density) 來得容易。

經由線性迴歸分析 (linear regression analysis) 後發現，FAP 患者的有髓鞘神經纖維密度 (myelinated fiber density) 與表皮內神經纖維密度 (IENF density) 具有顯著相關 ( $p < 0.05$ ) ( $N = 14$ ) ，且兩者為正相關，相關係數  $r^2 = 0.3958$  (圖三) 。此相關性顯示，FAP 患者中，有髓鞘神經纖維 (myelinated fiber) 和無髓鞘神經纖維 (unmyelinated fiber) 的退化程度是相似的。

#### 腓腸神經有巨噬細胞浸潤現象

神經退化後，細胞的殘骸 (debris) 會由巨噬細胞 (macrophages) 來進行吞噬並清除，而 Iba-1 為一種表現在巨噬細胞及微膠細胞 (microglia) 中，與特定鈣離子結合的蛋白質。藉由 Iba-1 的免疫組織化學染色來標定出巨噬細胞，可以了解對照組與類澱粉神經病變患者的巨噬細胞表現情形。

對照組的腓腸神經沒有發現 Iba-1 染色的現象 (圖四(A)) ，包括神經內膜 (endoneurium) 、神經束膜 (perineurium) 、神經外膜 (epineurium) 。類澱粉神經病變患者則發現有 Iba-1 染色的現象 (圖四(B)) ，在神經內膜 (endoneurium) 可以觀察到許多染上 Iba-1 的深棕色顆粒狀細胞，並且呈現散亂隨機分布 (圖四(D)) ，在神經束膜 (perineurium) 及神經外膜 (epineurium) 亦可發現呈現深棕色的細胞

(圖四(C))，神經外膜 (epineurium) 的血管附近很容易發現到深棕色的巨噬細胞，而神經束膜 (perineurium) 亦在血管附近較容易發現巨噬細胞。此觀察結果表示，相較於對照組，在 FAP 患者的腓腸神經內，巨噬細胞較為活躍，普遍隨機分布在神經內膜 (endoneurium) 內，且患者的腓腸神經中的血管附近較容易發現活躍的巨噬細胞，顯示巨噬細胞可能是自血管穿透出來再進入到神經組織。

呈現 Iba-1 免疫染色反應的巨噬細胞密度 (Iba-1 density) 經計算後，對照組為  $1.474 \pm 1.233 \text{ No./mm}^2$  (N = 3)，FAP 患者為  $354.2 \pm 113.7 \text{ No./mm}^2$  (N = 13)，經 Mann-Whitney U test 分析後顯示兩組間具有顯著差異 ( $p < 0.05$ ) (圖五)。

#### 腓腸神經有 T 細胞浸潤現象

前述結果發現 FAP 患者的腓腸神經有巨噬細胞浸潤現象，雖然神經退化本身亦會吸引巨噬細胞來清除殘骸，但相較於對照組，數量增加了百倍以上，可能意味著巨噬細胞的浸潤是因為有發炎反應。CD45 為一穿膜糖蛋白 (transmembrane glycoprotein)，在 T 細胞活化的過程中需要 CD45 的參與，而 T 細胞一旦活化即可促進免疫反應的活化。因此以 CD45 抗體來進行免疫組織化學染色，可以了解 T 細胞在對照組與 FAP 患者間的表現是否有差異。

對照組的腓腸神經沒有發現 CD45 的染色現象 (圖六(A))，包括神經內膜 (endoneurium)、神經束膜 (perineurium)、神經外膜 (epineurium)。FAP 患者則發現有 CD45 染色的現象 (圖六(B))，在神經內膜 (endoneurium) 可以觀察到染上 CD45 的深棕色顆粒狀細胞 (圖六(D))，呈現散亂隨機分布，有些 T 細胞亦會出現在血管附近 (圖六(E))，而在在神經束膜 (perineurium) 及神經外膜 (epineurium) 亦可發現呈現深棕色的 T 細胞 (圖六(B 和 C))，且較容易在血管附近發現。此觀察結果顯示 FAP 患者的腓腸神經確實有免疫反應活化的現象，且在血管附近較為活躍。T 細胞是透過細胞與細胞間接觸 (cell-cell contact) 而活化，因此血管附近可

能有某些物質可以與 T 細胞接觸進而活化 T 細胞。

呈現 CD45 免疫染色反應的 T 細胞密度 (CD45 density) 經計算後，對照組為  $0.0 \pm 0.0$  No./mm<sup>2</sup> (N = 3) ，FAP 患者為  $28.46 \pm 20.54$  No./mm<sup>2</sup> (N = 10) ，經 Mann-Whitney U test 分析後顯示兩組間具有顯著差異 ( $p < 0.05$ ) (圖七) 。

### 腓腸神經沒有發現 B 細胞

B 細胞在功能上是屬於 humoral immunity，因此本研究在對照組和 FAP 患者的腓腸神經均沒有發現 B 細胞 (圖八) 。

### 有髓鞘神經纖維、表皮內神經纖維、巨噬細胞、T 細胞之間的關係

FAP 患者的巨噬細胞密度和 T 細胞密度均較對照組增加，兩者之間的關係則透過線性迴歸分析 (linear regression analysis) 來評估，分析結果發現兩者並沒有顯著相關 ( $p > 0.05$ ) (N = 10) (圖九(A))，顯示巨噬細胞和 T 細胞可能沒有直接的相關性。

有髓鞘神經纖維密度 (myelinated fiber density) 與巨噬細胞的關係經線性迴歸分析後發現，兩者之間有顯著相關 ( $p < 0.05$ ) (N = 12) (圖九(B))，且兩者為正相關，相關係數  $r^2 = 0.4028$ ，此結果顯示出巨噬細胞較多的病患，其有髓鞘神經纖維也較多。有髓鞘神經纖維密度與 T 細胞的關係經線性迴歸分析後，發現兩者之間並無顯著相關 ( $p > 0.05$ ) (N = 9) (圖九(C))，顯示 T 細胞的增加與否與有髓鞘神經纖維沒有直接的相關性。

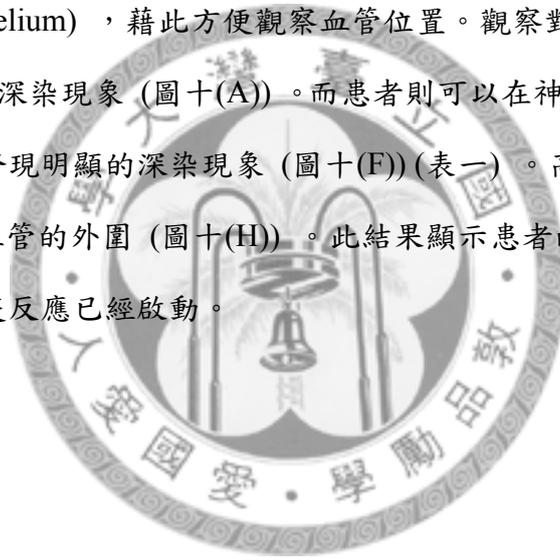
表皮內神經纖維密度 (IENF density) 與巨噬細胞的關係經線性迴歸分析後，發現兩者沒有顯著相關 ( $p > 0.05$ ) (N = 11) (圖九(D))，表皮內神經纖維密度與 T 細胞的關係經線性迴歸分析後亦無顯著相關 ( $p > 0.05$ ) (N = 9) (圖九(E))，顯示表皮內

神經纖維退化的程度與巨噬細胞、T 細胞可能都沒有直接的相關性。

### 腓腸神經的 C3d 免疫染色結果

前述 T 細胞的染色結果顯示在 FAP 患者的腓腸神經內有免疫反應活化的現象，免疫反應的啟動方式之一為抗體與抗原的結合，當抗體與抗原進行結合時，亦有可能引起補體反應。藉由 C3d 抗體進行免疫染色，可以知道是否有補體反應的活化。

對照組與 FAP 患者的腓腸神經在進行 C3d 染色時，皆同時使用 Ulex 來標定出血管的內皮細胞 (endothelium)，藉此方便觀察血管位置。觀察對照組的 C3d 染色結果，沒有發現明顯的深染現象 (圖十(A))。而患者則可以在神經內膜 (endoneurium) 裡部分血管的附近發現明顯的深染現象 (圖十(F)) (表一)。高倍物鏡下可觀察到 C3d 免疫染色是在血管的外圍 (圖十(H))。此結果顯示患者的血管外圍有補體活化的現象，表示免疫反應已經啟動。



## 討論

### 有髓鞘神經纖維和表皮內神經纖維的退化程度相近

本研究發現在腓腸神經中，FAP 患者的有髓鞘神經纖維較對照組顯著減少，與過去其他學者的研究結果相符 (Koike, et al., 2004)。而在 FAP 患者中，有髓鞘神經纖維的密度與表皮神經纖維密度有顯著相關，表示有髓鞘神經纖維與無髓鞘神經纖維的退化程度可能是相似的。雖然腓腸神經與表皮神經纖維不是在同一位置，表皮神經纖維並不能完整表達出腓腸神經的無髓鞘神經纖維的狀況，但是因為自皮膚取得切片進而取得表皮神經纖維密度的方式是較為容易的，且對於患者而言，取得皮膚切片後只需數個月的時間，皮膚就會自然恢復原狀，不影響生活品質，若採用截取腓腸神經，患者將失去神經遠端的感覺，患者碰到危險狀況時可能會不自知，因此採用表皮神經纖維密度的方式評估無髓鞘神經纖維，還是適合作為評估患者的神經退化指標。

### FAP 患者的免疫細胞浸潤

在其他沒有明顯發炎現象的神經損傷疾病中，例如糖尿病神經病變，亦可在腓腸神經內發現巨噬細胞，理由是神經若發生退化，巨噬細胞浸潤的目的之一即是為了清除神經退化後留下的殘骸，以免妨礙了神經的再生，本研究發現到 FAP 患者的腓腸神經有巨噬細胞浸潤的現象是符合過去的研究結果。

本研究還發現了 FAP 患者的腓腸神經有 T 細胞浸潤的現象，而 T 細胞的功能在於 cell-cell contact immunity，當 T 細胞被巨噬細胞活化後，T 細胞可分泌 cytokines 並透過旁分泌 (paracrine) 的方式，使鄰近的尚未被活化的 T 細胞 (naïve T cells) 活化，造成連鎖反應，因此 T 細胞浸潤表示神經內有發生免疫反應，T 細胞活化將會促進整個免疫反應的活化。

在觀察巨噬細胞和 T 細胞的染色結果時，亦發現這些免疫細胞容易出現在血管的周圍 (perivascular area) ，此現象推斷應該是因為免疫細胞來自血管鑽出，因此在血管的附近會較容易發現免疫細胞。

而本研究沒有發現 B 細胞，B 細胞是屬於 humoral immunity，主要目的是製造抗體，此發現表示 FAP 的免疫反應可能是 antibody-independent 。

### **FAP 患者的補體反應**

本研究發現到部分 FAP 患者的腓腸神經神經內膜 (endoneurium) 裡的血管有補體的免疫染色現象，而補體反應的啟動路徑之一是當抗體與抗原反應後，抗體的 Fc 端會接上補體，進而引起補體反應，最後使病原體 (pathogens) 的表面黏上許多“標籤”，這些標籤 (補體) 有相對應的補體受體 (complement receptors) ，不同的補體受體存在於不同的免疫細胞上，大部分是抗原呈現細胞 (antigen-presenting cells (APCs)) ，因此這些病原體可以被進行吞噬作用 (phagocytosis) 而被清除，而這些抗原呈現細胞則可以呈現出病原體的 epitope 進而去活化其他免疫細胞，免疫系統即可被活化。然而過去亦有學者發現，類澱粉神經病變 (amyloid neuropathy) 可發現 classical complement cascade 有 antibody-independent 的現象 (Hafer-Macko, et al., 2000) 。

本實驗發現 FAP 患者的腓腸神經有 T 細胞浸潤及補體反應，顯示免疫反應已被活化，因此可以推斷 Ala97Ser FAP 應該是發炎性神經病變，而 FAP 沒有發現 B 細胞，因此免疫反應可能有透過 antibody-independent classical complement cascade 。

### **巨噬細胞密度與神經退化程度的關係**

巨噬細胞在神經退化過程中是扮演好人還是壞人的角色，目前兩派都有支持者。

在神經退化的過程中需要巨噬細胞的參與，以清除退化時留下的殘骸。但是巨噬細胞活躍時產生出的 cytokines 亦可能造成微環境 (microenvironment) 裡其他細胞的細胞毒性 (cytotoxicity) 。過去有學者表示，巨噬細胞和 T 細胞除了會產生 pro-inflammatory cytokines，亦可製造 anti-inflammatory cytokines 和 neutrophins (Tabakman, et al., 2004) (Donnelly, et al., 2008) (Yong, et al., 2010) 。本研究發現 FAP 患者的腓腸神經的巨噬細胞密度與有髓鞘神經纖維密度呈現正相關，表示對於 Ala97Ser FAP 而言，巨噬細胞可能是扮演保護者的角色，但仍需要其他更充分的證據才能證明此一現象。

#### **TTR 堆積於血管與神經退化**

由於過去有學者發現，細胞培養的血管內皮細胞株 BAE1，在培養液裡加入 fibrillar TTR 後，可以使細胞產生 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  (Sousa, et al., 2001) ，這是否意味著 Ala97Ser FAP 患者腓腸神經的血管若有 TTR 的堆積，也可能會使血管產生 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ？組織間 TNF- $\alpha$  的增加會使 blood-brain barrier (BBB) 被破壞 (Schnell, et al., 1999) ，是否表示 TTR 可以較容易通過血管而滲透到組織間？而有 TTR 堆積的血管附近是否較容易發現免疫細胞？

若此以上假設成立，則可以進一步推論，可能是 TTR 堆積在血管上，造成發炎反應的開端，進而使血管通透性增加，使更多 TTR 和免疫細胞浸潤，進而造成神經退化。若要進行此研究，可以利用抗體做多重染色 (multiple staining) ，來檢視彼此之間的相關性。

## 參考文獻

Andrade (1952). A peculiar form of peripheral neuropathy: familiar atypical generalized amyloidosis with special involvement of the peripheral nerves. *Brain* 75: 408-27

Donnelly and Popovich (2008). Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Experimental Neurology* 209: 378-388

Hafer-Macko, et al. (2000). Complement activation in acquired and hereditary amyloid neuropathy. *Journal of the Peripheral Nervous System* 5: 131-139

Herbert, et al. (1986). Transthyretin: a choroid plexus-specific transport protein in human brain. The 1986 S. Weir Mitchell award. *Neurology* 36: 900-11

Ito, et al. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular Brain Research* 57: 1-9

Jeffery W (1998). The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. *Current Opinion in Structural Biology* 8: 101-106

Kiefer, et al. (2001). The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 64: 109-27

Koike, et al. (2004). Pathology of early- vs late-onset TTR Met30 familial amyloid polyneuropathy. *Neurology* 63: 129-38

Liu, et al. (2008). Transthyretin Ala97Ser in Chinese–Taiwanese patients with familial amyloid polyneuropathy: Genetic studies and phenotype expression. *Journal of the Neurological Sciences* 267: 91-99

Mathis, et al. (2012). Amyloid neuropathy mimicking chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Muscle & Nerve* 45: 26-31

Planté-Bordeneuve and Said (2011). Familial amyloid polyneuropathy. *The Lancet Neurology* 10: 1086-1097

Schnell, et al. (1999). Cytokine-induced acute inflammation in the brain and spinal cord.

J Neuropathol Exp Neurol 58: 245-54

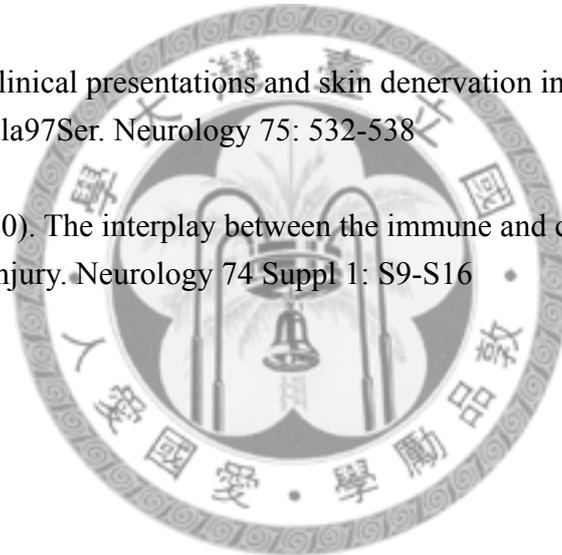
Schreiber and Richardson (1997). The Evolution of Gene Expression, Structure and Function of Transthyretin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 116: 137-160

Sousa, et al. (2001). Familial Amyloid Polyneuropathy: Receptor for Advanced Glycation End Products-Dependent Triggering of Neuronal Inflammatory and Apoptotic Pathways. *The Journal of Neuroscience* 21: 7576-7586

Tabakman, et al. (2004). Interactions between the cells of the immune and nervous system: neurotrophins as neuroprotection mediators in CNS injury. *Progress in Brain Research* Volume 146: 385-401

Yang, et al. (2010). Clinical presentations and skin denervation in amyloid neuropathy due to transthyretin Ala97Ser. *Neurology* 75: 532-538

Yong and Marks (2010). The interplay between the immune and central nervous systems in neuronal injury. *Neurology* 74 Suppl 1: S9-S16



圖表及說明

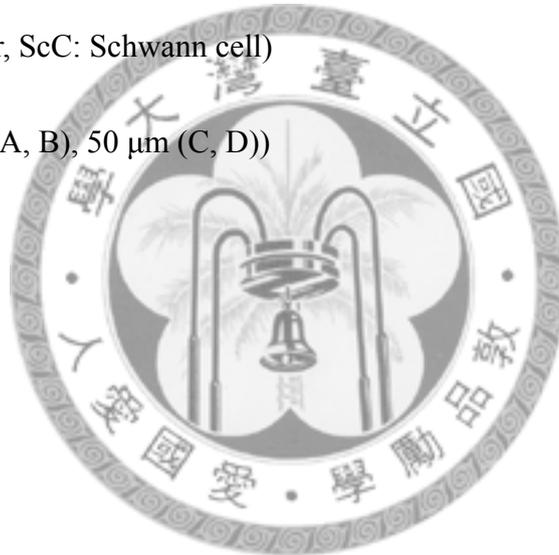


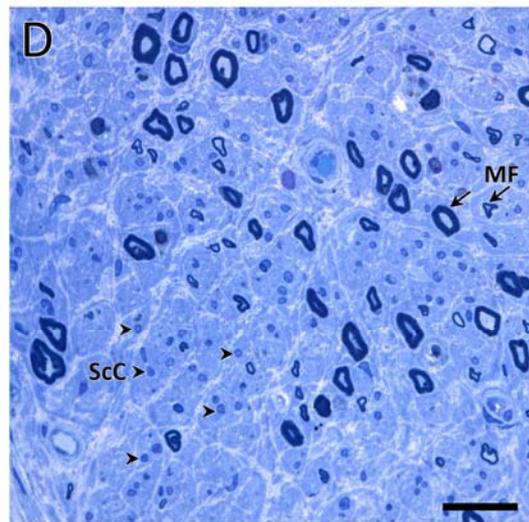
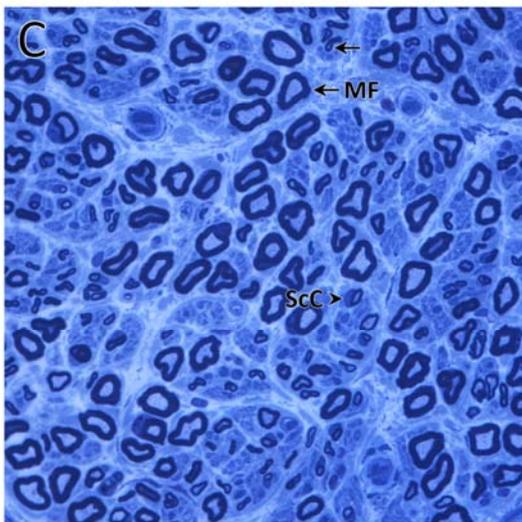
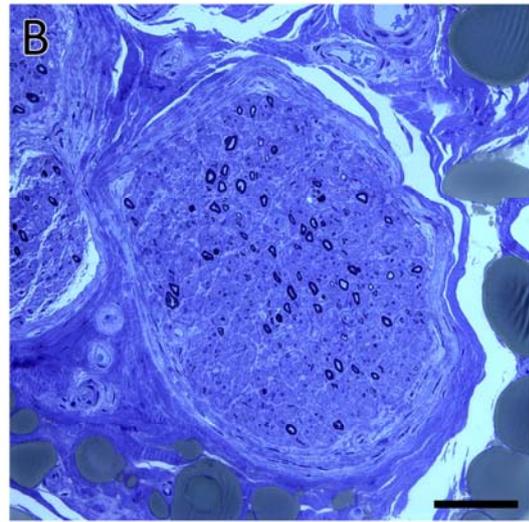
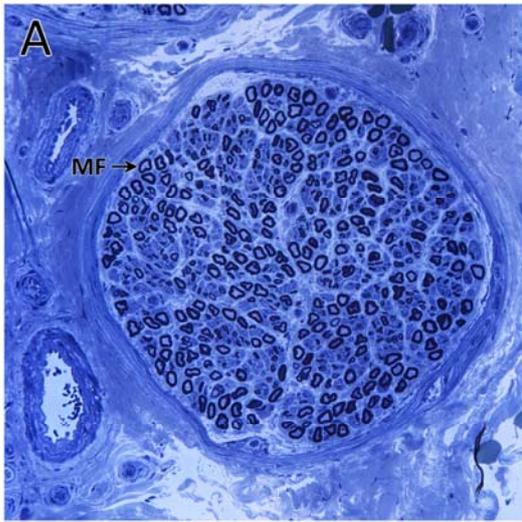
圖一 FAP 患者的腓腸神經的半薄切片觀察

對照組的腓腸神經橫斷面半薄切片 (A, C) , 在神經束 (nerve bundle) 內有密集且一個接著一個緊鄰的有髓鞘神經纖維 (myelinated fiber) 。FAP 患者的腓腸神經橫斷面半薄切片 (B, D) , 神經束內的有髓鞘神經數量則明顯的減少, 有髓鞘神經纖維之間的距離變得較疏遠。高倍鏡頭下 (C, D) , FAP 患者的腓腸神經 (D) 可以見到許多已經沒有連接著髓鞘膜 (myelin sheath) 的許旺氏細胞 (Schwann cells) , 顯示軸突 (axons) 退化後, 髓鞘膜 (myelin sheath) 也一併消失, 剩下許旺氏細胞 (Schwann cells) 的細胞本體。

(MF: myelinated fiber, ScC: Schwann cell)

(Scale bar = 100  $\mu\text{m}$  (A, B), 50  $\mu\text{m}$  (C, D))

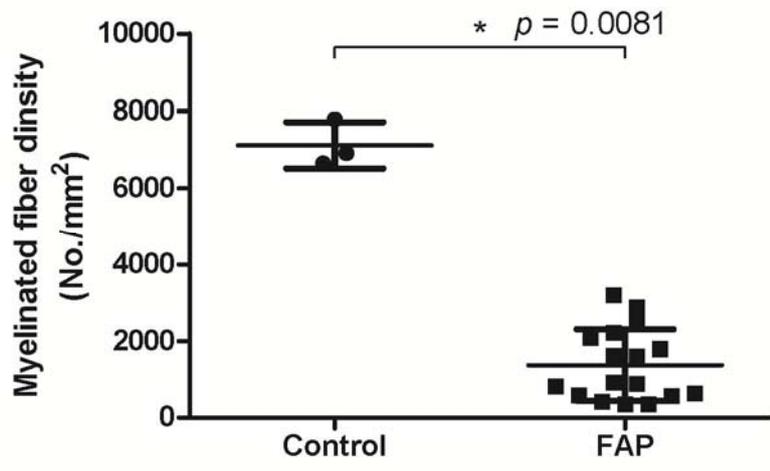




圖二 FAP 患者的有髓鞘神經纖維密度的定量結果

有髓鞘神經纖維密度 (myelinated fiber density) ，經 Mann-Whitney U test 統計後，顯示出 FAP 患者的有髓鞘神經纖維密度有顯著減少 ( $p < 0.05$ )，對照組的密度值  $7115 \pm 599.5 \text{ No./mm}^2$  (mean  $\pm$  SD) (N = 3) ，FAP 的密度值  $1373 \pm 926.9 \text{ No./mm}^2$  (mean  $\pm$  SD) (N = 17) 。

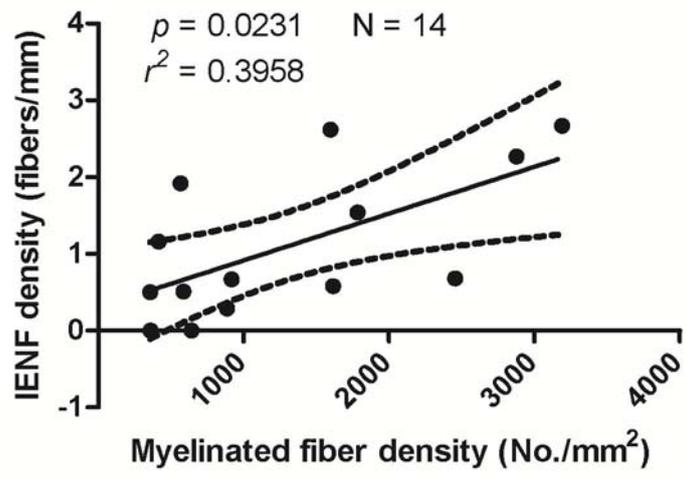




圖三 FAP 患者的有髓鞘神經纖維密度與 IENF 密度之間的關係

FAP 患者的有髓鞘神經纖維密度 (myelinated fiber density) 與表皮內神經纖維 (IENF; intraepidermal nerve fiber) ，經分析其相關性後發現，兩者之間呈現顯著正相關 ( $p < 0.05$  ,  $r^2 = 0.3958$  ,  $N = 14$ ) 。顯示有髓鞘神經纖維 (myelinated fiber) 與無髓鞘神經纖維 (unmyelinated fiber) 的退化嚴重程度可能一樣，兩者有同樣程度的退化現象。

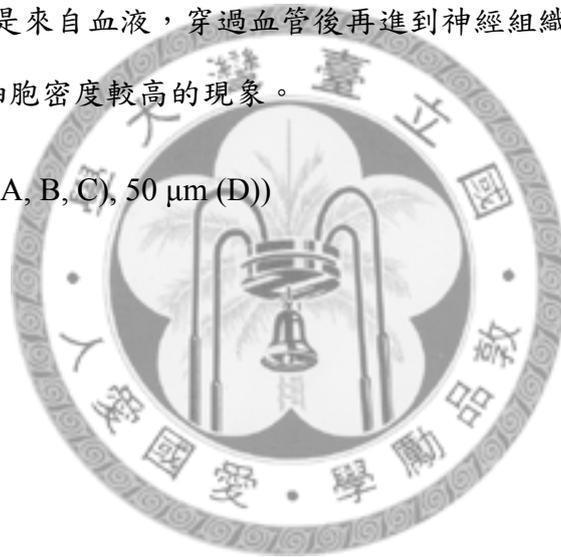


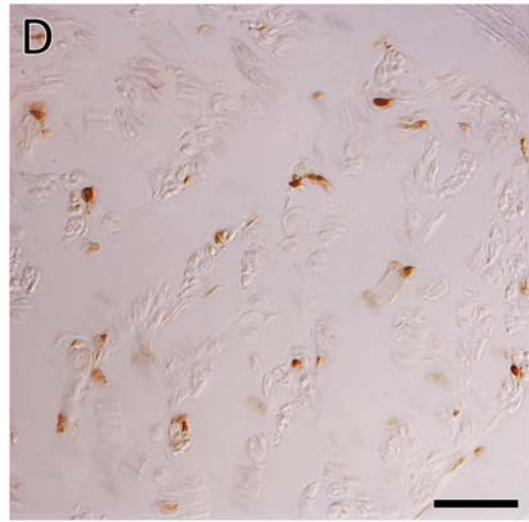
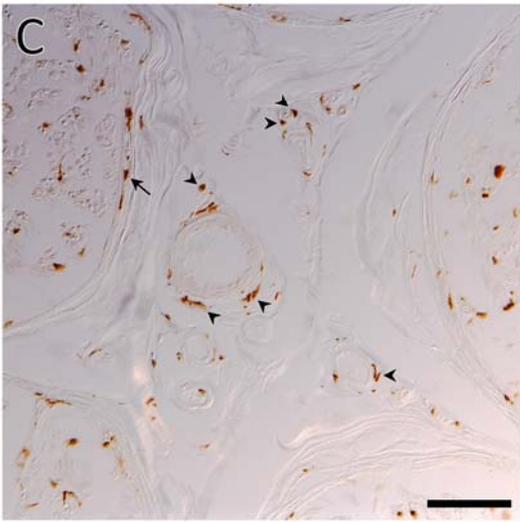
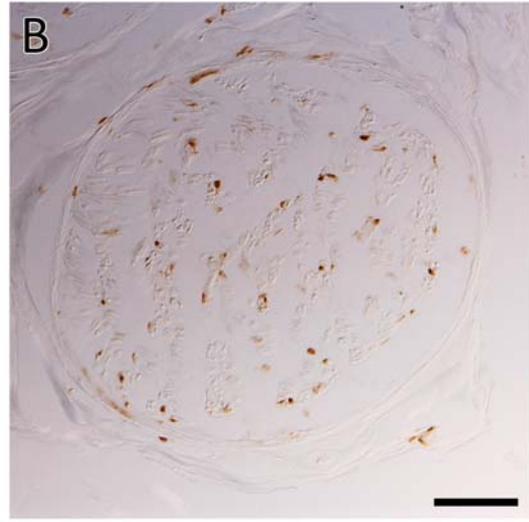
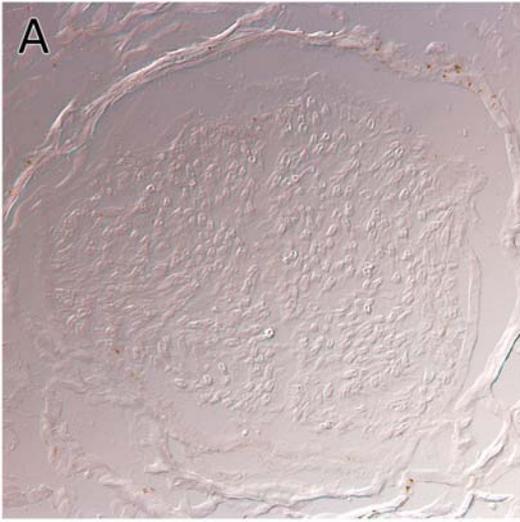


#### 圖四 巨噬細胞在 FAP 患者的腓腸神經有浸潤現象

對照組與 FAP 患者的腓腸神經橫斷面冷凍切片，經 Iba-1 免疫染色後，對照組的腓腸神經 (A)，在神經內膜 (endoneurium)、神經束膜 (perineurium)、神經外膜 (epineurium) 皆無免疫染色反應。FAP 患者的腓腸神經 (B~D)，在神經內膜 (endoneurium) 有許多隨機分布的顆粒狀細胞有免疫染色反應 (B, D)，在神經束膜 (perineurium) 中的血管附近容易發現形狀較為扁平的細胞有免疫染色反應 (C) (有尾箭頭處)，在神經外膜 (epineurium) 可觀察到血管的附近特別容易發現顆粒狀或扁平狀的細胞有免疫染色反應 (C) (無尾箭頭處)，此現象顯示巨噬細胞 (macrophages) 應該是來自血液，穿過血管後再進到神經組織中，所以在血管的附近可以觀察到巨噬細胞密度較高的現象。

(Scale bar = 100  $\mu$ m (A, B, C), 50  $\mu$ m (D))

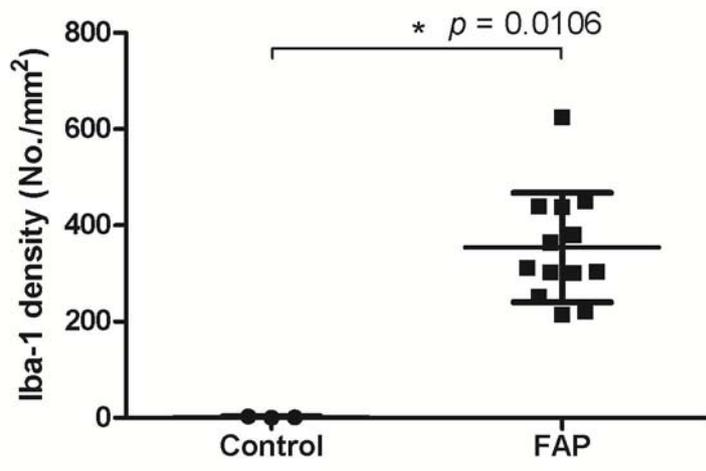




圖五 FAP 患者的巨噬細胞浸潤密度的定量結果

Iba-1 呈現免疫染色的細胞在計算數量後，經 Mann-Whitney U test 統計，顯示出 FAP 患者的巨噬細胞有顯著增加 ( $p < 0.05$ )，對照組的密度值  $1.474 \pm 1.233$  No./mm<sup>2</sup> (mean  $\pm$  SD) (N = 3)，FAP 的密度值  $354.2 \pm 113.7$  No./mm<sup>2</sup> (mean  $\pm$  SD) (N = 13)。



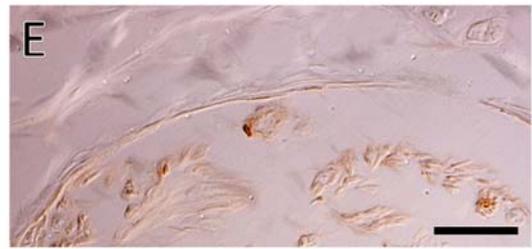
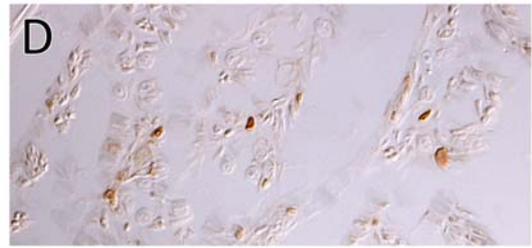
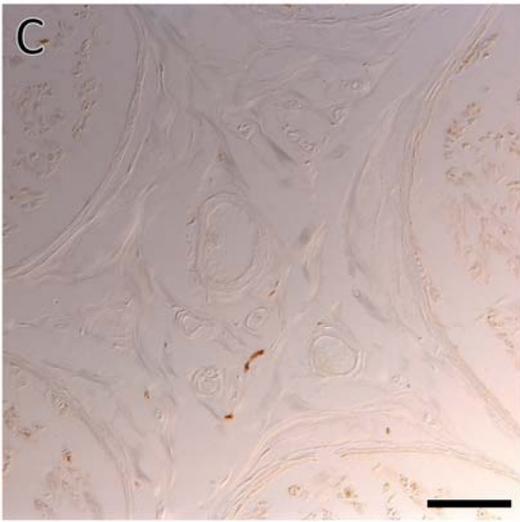
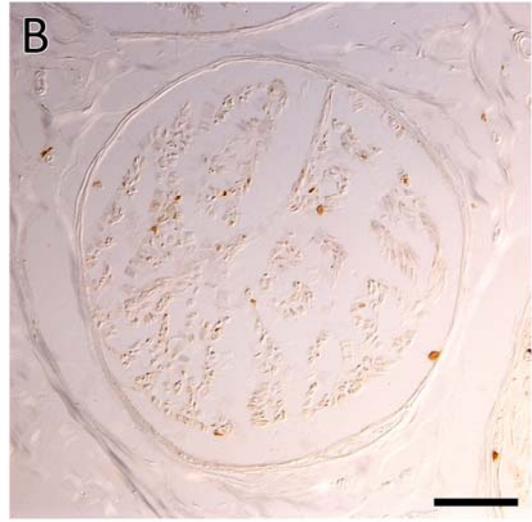
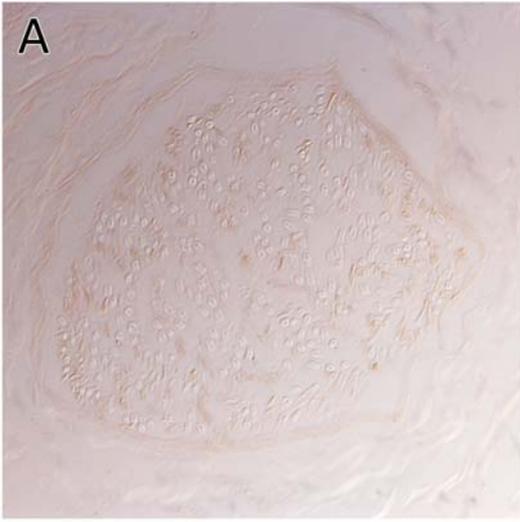


圖六 T細胞在 FAP 患者的腓腸神經有浸潤現象

對照組與 FAP 患者的腓腸神經橫斷面冷凍切片，經 CD45 免疫染色後，對照組的腓腸神經 (A)，在神經內膜 (endoneurium)、神經束膜 (perineurium)、神經外膜 (epineurium) 皆無免疫染色反應。FAP 的腓腸神經 (B~E)，在神經內膜 (endoneurium) 有零星分布的顆粒狀細胞有免疫染色反應 (B, D)，在血管的附近偶爾亦可見到有免疫染色反應的細胞 (E)，在神經束膜 (perineurium) 可觀察到少許有免疫染色反應的細胞出現在血管附近 (B 右下角)，在神經外膜 (epineurium) 可見到少量有免疫染色反應的細胞 (B, C)，且多出現在血管附近，此現象顯示 T 細胞應該是來自血液，經穿透血管後再進到神經組織內。

(Scale bar = 100  $\mu\text{m}$  (A, B, C), 50  $\mu\text{m}$  (D, E))

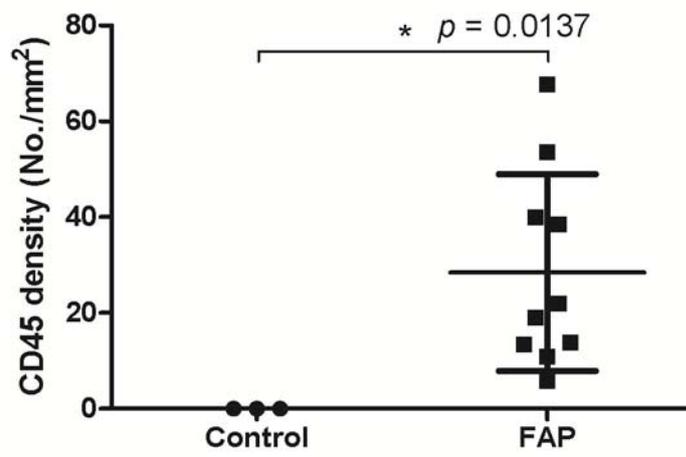




圖七 FAP 患者的 T 細胞浸潤密度的定量結果

CD45 呈現免疫染色的細胞在計算數量後，經 Mann-Whitney U test 統計，顯示出 FAP 患者的 T 細胞有顯著增加 ( $p < 0.05$ )，對照組的密度值  $0.0 \pm 0.0 \text{ No./mm}^2$  (mean  $\pm$  SD) (N = 3)，FAP 的密度值  $28.46 \pm 20.54 \text{ No./mm}^2$  (mean  $\pm$  SD) (N = 10)。



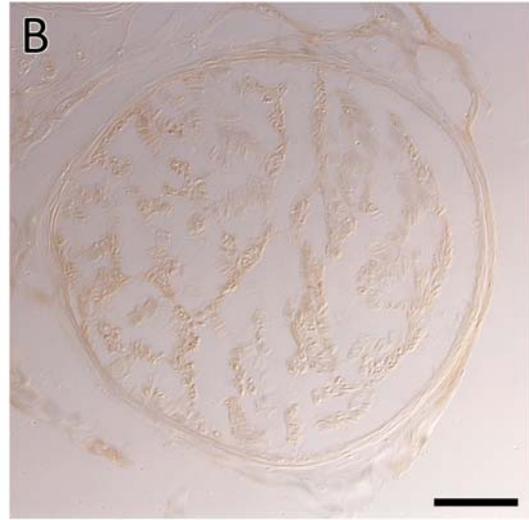
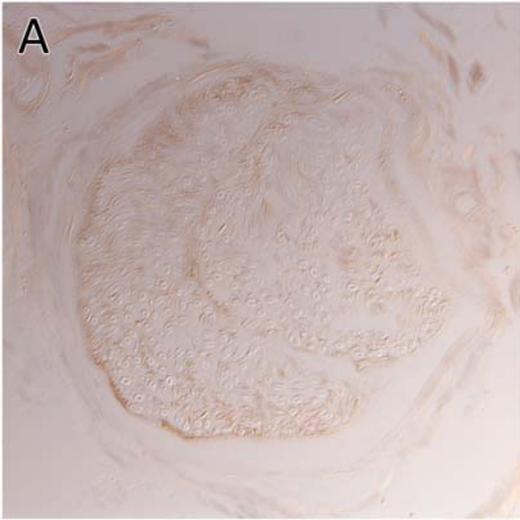


圖八 腓腸神經沒有發現 B 細胞

對照組與 FAP 患者的腓腸神經橫斷面冷凍切片，經 CD20 免疫染色後，對照組與 FAP 患者均無免疫染色現象。由於 B 細胞是屬於 humoral immunity，因此在組織內應該是不會有免疫染色反應。

(Scale bar = 100  $\mu$ m (A, B))





圖九 FAP 患者的腓腸神經的巨噬細胞、T 細胞、有髓鞘神經纖維與 IENF 之間的關係

(A) 巨噬細胞浸潤密度與 T 細胞浸潤密度之間的關係

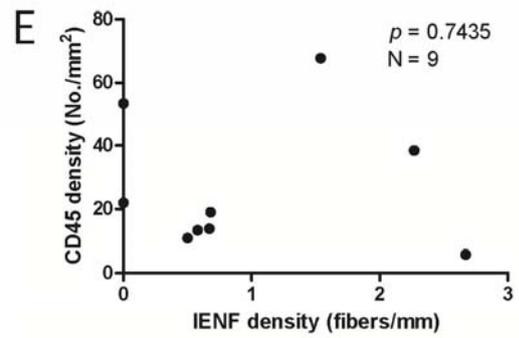
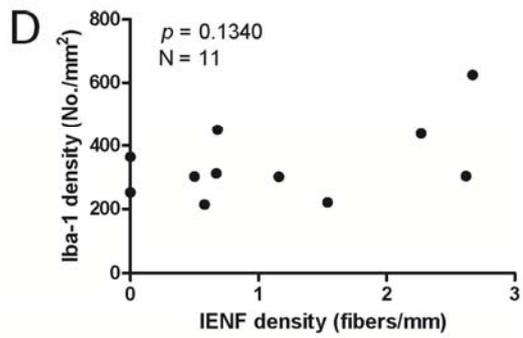
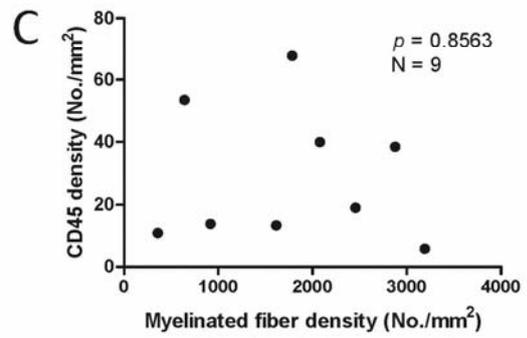
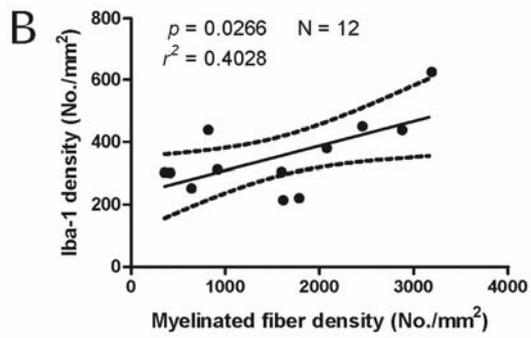
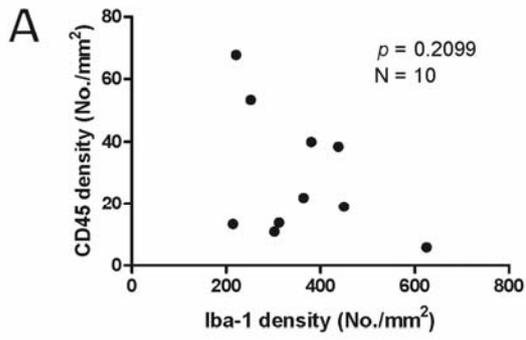
在 FAP 患者中，巨噬細胞與 T 細胞之間的相關性，經分析後顯示並無顯著相關性 ( $p = 0.2099$ ) ( $N = 10$ )，顯示巨噬細胞與 T 細胞之間可能沒有互相影響或其互相影響的程度不具有特別的重要性。

(B, C) 有髓鞘神經纖維密度與巨噬細胞密度、T 細胞密度之間的關係

在 FAP 患者中，巨噬細胞與有髓鞘神經纖維密度，經分析後顯示具有顯著正相關 (myelinated fiber vs. Iba-1 :  $p < 0.05$ ,  $r^2 = 0.4028$ ,  $N = 12$ )，而 T 細胞則無顯著相關性 (myelinated fiber vs. CD45 :  $p = 0.8563$ ,  $N = 9$ )，顯示巨噬細胞的增加與有髓鞘神經纖維的數量呈現正相關。

(D, E) 表皮內神經纖維 (IENF) 與巨噬細胞密度、T 細胞密度之間的關係

在 FAP 患者中，巨噬細胞與 T 細胞密度，經分析後顯示均與 IENF 沒有顯著相關性 (IENF vs. Iba-1 :  $p = 0.1340$ ,  $N = 11$ ; IENF vs. CD45 :  $p = 0.7435$ ,  $N = 9$ )，顯示這兩種免疫細胞與無髓鞘神經纖維 (unmyelinated fiber) 可能沒有直接的影響性。

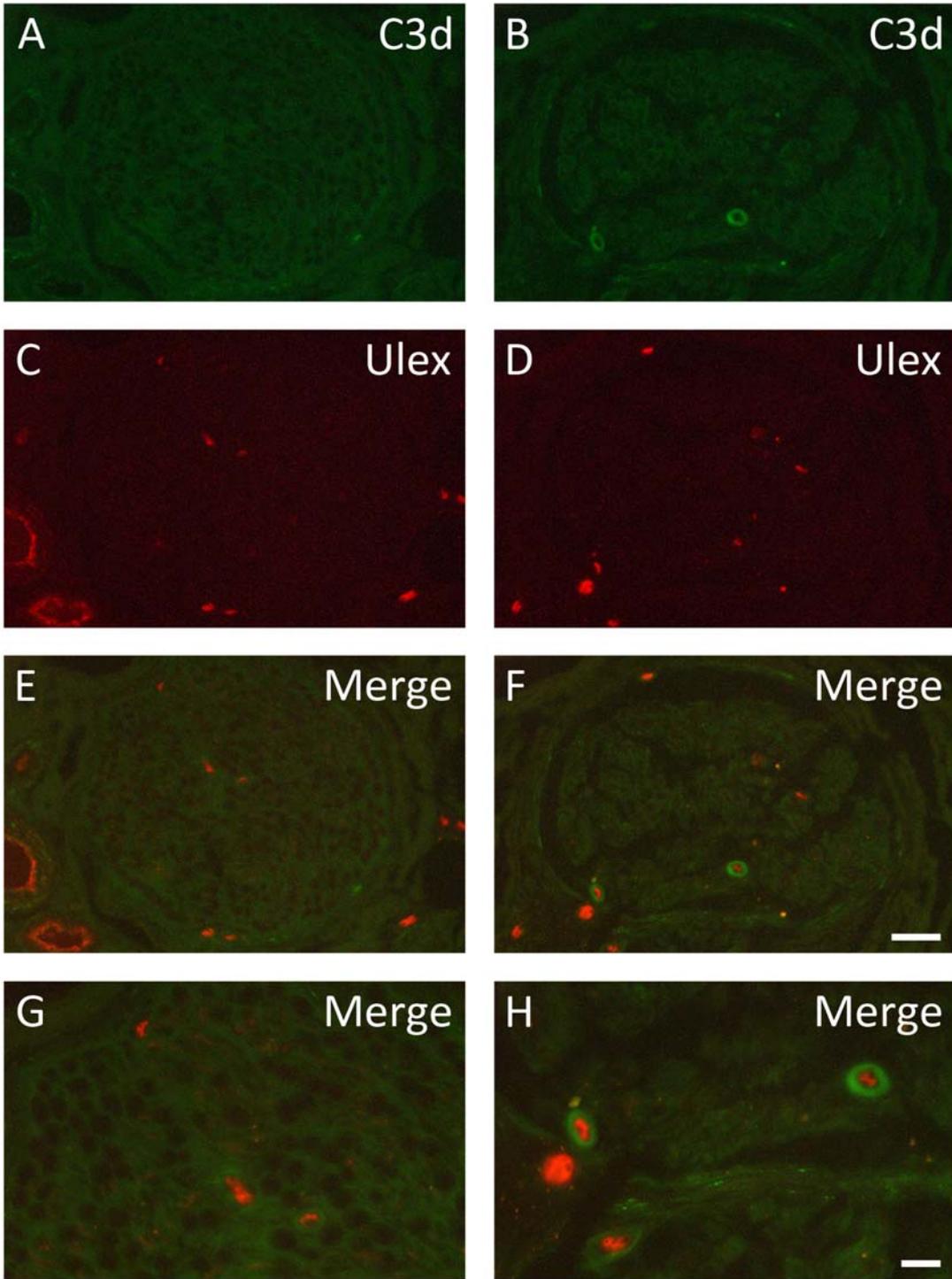


圖十 FAP 患者的腓腸神經的 C3d 免疫染色結果

對照組與 FAP 患者的腓腸神經橫斷面冷凍切片，經 C3d 免疫螢光染色後，以及使用 Ulex 來標定血管內皮細胞，對照組的腓腸神經 (A, C, E, G) ，其神經內膜 (endoneurium) 沒有免疫染色反應 (A) ，而 FAP 患者的腓腸神經，在神經內膜 (endoneurium) 中可發現到部分血管有 C3d 免疫螢光染色現象 (B, F) ，呈現整圈深染 (H) ，在神經束膜 (perineurium) 偶爾有部分深染情形 (B, H) ，顯示 FAP 患者的腓腸神經，在血管附近有補體反應正在進行，因此可以染上 C3d 抗體。

(Scale bar = 100  $\mu\text{m}$  (A, B), 30  $\mu\text{m}$  (C~F))





表一 FAP 患者的腓腸神經的 C3d 免疫染色結果

Diagnosis	Biopsy ID	C3d of Endoneurial Blood vessels
Control	N100	-
Control	N107	-
Control	N310	-
FAP	N148	-
FAP	N152	-
FAP	N172	-
FAP	N175	-
FAP	N177	-
FAP	N180	+
FAP	N181	-
FAP	N189	-
FAP	N215	+
FAP	N226	+
FAP	N239	+
FAP	N274	-
FAP	N281	-

+: 有免疫染色表現

-: 無免疫染色表現