

國立臺灣大學醫學院醫學檢驗暨生物技術學系

碩士論文

Department of Clinical Laboratory Sciences and Medical Biotechnology

College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

探討過敏性紫斑症之Th1與Th17 cells

之角色及建立小鼠動物模式

The Role of Th1/Th17 Cells and Establishment of Mouse Model

in Henoch-Schonlein Purpura

任曉玉

Hsiao-Yu Jen

指導老師：莊雅惠 博士

Advisor : Ya-Hui Chuang, Ph.D.

中華民國九十九年七月

July, 2010

## 致謝

終於完成我的碩士論文了！首先要感謝我的指導老師—莊雅惠老師，很開心可以在莊老師實驗室學習，謝謝老師這兩年來的指導，不管是在實驗上或生活上都讓我獲益良多。這本論文的完成還要感謝我的口試委員們，江伯倫老師、楊曜旭老師以及胡忠怡老師，對於我的論文內容提出寶貴的意見，以及給我實驗方向的指引。

另外，我也要感謝江伯倫老師家的學長姐們給予我實驗上的幫助，尤其是慧姚學姐和凱莉學姐。接著我要感謝實驗室的同伴們，謝謝姿君學姊在實驗上的幫忙與指導，謝謝你每次都讓我煩你，謝謝希傑在實驗技術上的建議，謝謝學弟們：肇軒、佑儒、盈君在實驗上的幫忙以及給實驗室帶來歡笑。還要謝謝雅倩老師家的成員們：凱欣、嘉芸學姊、梓明學長、瑋廷、紋綺、彥君和 henda 學長，謝謝你們這兩年來的照顧，尤其是凱欣，謝謝你六年來的陪伴，也謝謝大家在我實驗不順時給我鼓勵打氣。

最後要感謝一路上支持我的家人，謝謝爸媽、哥哥、姐姐、大隻，謝謝你們！



## 中文摘要

過敏性紫斑症 (Henoch-Schonlein Purpura; HSP) 是孩童常見的全身性微血管發炎之自體免疫疾病。在體液性免疫方面，急性期病人的血清 IgA 升高，TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、TGF- $\beta$ 與 VEGF 亦升高，且出現多種 IgA 自體抗體 (IgA autoantibodies)，但在細胞免疫方面的研究則相當缺乏。此外，目前亦無動物模式可用於研究其致病機轉。在本研究探討 Th helper (Th)1 與 Th17 cells 之角色及嘗試破除免疫耐受性以建立自體免疫疾病之小鼠模式。

### 第一部分 探討過敏性紫斑症中 Th1 與 Th17 cells 之角色

Th1 與 Th17 cells 之角色在許多自體免疫疾病已被證實。在此我們探討 Th1 與 Th17 cells 在過敏性紫斑症之角色。首先我們測病人血清中 Th1 與 Th17 相關細胞激素 IL-17、IL-21、IL-23 與 IFN- $\gamma$  之表現量。結果顯示，相較於正常對照組，急性期過敏性紫斑症病人血清中 IL-17 表現量顯著增加，但 IFN- $\gamma$  並無差異。此外，急性過敏性紫斑症病人之週邊血單核球 IL-17-secreting T cells (Th17 cells) 與上清液中 IL-17 含量均比緩解期時增加；然而 IFN- $\gamma$ -secreting T cells (Th1 cells) 與上清液中 IFN- $\gamma$  則無明顯差異。由此推論，過敏性紫斑症可能是 Th17 主導的自體免疫疾病，而與 Th1 免疫反應較無相關。

### 第二部分 建立過敏性紫斑症小鼠動物模式

$\beta_2$ GPI 被認為是過敏性紫斑症的自體抗原之一，在我們以注射 human  $\beta_2$ GPI ( $h\beta_2$ GPI) 以建立小鼠疾病模式。將 human  $\beta_2$ GPI 混合於佐劑以腹腔注射致敏小鼠。結果顯示， $h\beta_2$ GPI 混合於 CFA/IFA 中致敏小鼠，小鼠可產生高量之 anti-mouse  $\beta_2$ GPI ( $m\beta_2$ GPI) IgG，但 anti- $m\beta_2$ GPI IgA 並無增加，病理檢驗結果亦未見血管發炎。再以  $h\beta_2$ GPI 與先前研究證實可以提高血清 IgA 的 Deoxynivalenol (DON) 同時致敏小鼠仍然只能引起 anti- $m\beta_2$ GPI IgG，而無 anti- $m\beta_2$ GPI IgA。改以 Alum 當佐劑仍

然無法引起小鼠anti-m $\beta_2$ GPI IgA反應。綜合言之，注射human  $\beta_2$ GPI可以打破免疫耐受性使小鼠產生anti-mouse  $\beta_2$ GPI IgG，但仍需其他方法以引發IgA反應。

由本研究的結果得知，過敏性紫斑症可能是 Th17 主導的自體免疫疾病，而與 Th1 免疫反應較無相關。另外，注射 human  $\beta_2$ GPI 可以打破小鼠免疫耐受性，若可建立此過敏性紫斑症之小鼠模式，則有利於後續更深入之研究。

**關鍵詞：**過敏性紫斑症、Th1 cells、Th17 cells、human  $\beta_2$ GPI



## **Abstract**

Henoch-Schonlein Purpura (HSP) is an autoimmune vasculitis that occurs mainly in childhood. At the acute stage of HSP, serum levels of IgA, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, TGF- $\beta$ , and VEGF were increased. In addition, a number of studies report that several IgA autoantibodies are associated with HSP. However, there were no reports regarding cellular immunity in HSP and no HSP animal models so far to explore the mechanism of HSP. Herein, the aims of this study are to investigate the role of Th1 and Th17 cells in HSP and try to establish a mouse model of HSP.

### **Part I : The role of Th1 and Th17 cells in Henoch-Schonlein Purpura**

Recently, various studies demonstrated that Th1 and Th17 are important in the pathogenesis of several autoimmune diseases, such as multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, and Crohn's disease. The role of Th1 and Th17 cells has not been investigated in HSP. Therefore, the aim of this study is to examine the role of Th1 and Th17 cells in HSP. Our results demonstrated that serum levels of IL-17 were significantly elevated in patients with acute stage of HSP compared with healthy controls, whereas serum levels of IFN- $\gamma$  remained unchanged. Furthermore, the percentage of Th17 cells and the cytokine levels of IL-17 were increased at the acute stage compared with those at the convalescent stage by using intracellular staining for Th1 and Th17 cell detection and ELISA for culture supernatant detection. However, the percentage of Th1 cells and IFN- $\gamma$  expression were not elevated at the acute stage of HSP. These results suggested that IL-17 rather than IFN- $\gamma$  play a crucial role in the pathogenesis of HSP.

### **Part II : Establishment of mouse model of Henoch-Schonlein Purpura**

$\beta_2$ -glycoprotein I ( $\beta_2$ GPI) are supposed to be an autoantigen of HSP because high levels of IgA anti- $\beta_2$ GPI antibodies were observed in patients with HSP. The specific aim of this study is to establish a mouse model of HSP. We firstly immunized naïve mice with human  $\beta_2$ GPI (h $\beta_2$ GPI) protein emulsified in adjuvant. Our results showed that h $\beta_2$ GPI-immunized mice had elevated serum levels of anti-m $\beta_2$ GPI IgG but not anti-m $\beta_2$ GPI IgA. In addition, the biopsies have not seen inflammation in the wall of capillaries. To induce a high serum level of IgA, we used h $\beta_2$ GPI and deoxynivalenol (DON), a mycotoxin can elevate serum IgA and mesangial IgA deposition in mice, or h $\beta_2$ GPI emulsified in aluminum to immunize mice. However, the serum levels of  $\beta_2$ GPI-specific IgA were not elevated in both strategies.

In conclusion, our results demonstrated that IL-17 may play an important role in the pathogenesis of HSP. Moreover, establishment of the mouse model of HSP can provide the further study to determine the mechanism of HSP.

**Keywords :** HSP, Th1 cells, Th17 cells, human  $\beta_2$ GPI

## 縮寫對照表

aCL	Anticardiolipin antibodies
AECA	Anti-endothelial cell antibodies
ANCA	Antineutrophil cytoplasmic antibodies
$\beta_2$ GPI	$\beta_2$ -glycoprotein I
CFA	Complete Freund's adjuvant
CIA	Collagen-induced arthritis
DON	Deoxynivalenol
EAE	Experimental autoimmune encephalomyelitis
EAU	Experimental autoimmune uveitis
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
HBSS	Hank's balanced saline solution
HSP	Henoch-Schönlein purpura
IBD	Inflammatory-bowel-disease
IFA	Incomplete Freund's adjuvant
IgA	Immunoglobulin A
IL-17	Interlukin 17
i.p.	Intraperitoneal
MS	Multiple sclerosis
PMA	Phorbol-myristate acetate
RA	Rheumatoid arthritis
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
Th	T helper
Th17 cells	IL-17-secreting T cells
Th1 cells	IFN- $\gamma$ -secreting T cells

## 目錄

致謝.....	i
中文摘要.....	ii
Abstract.....	iv
縮寫對照表.....	vi
圖表目錄.....	x
第一章 總論.....	1
1.1 過敏性紫斑症 ( Henoch-Schönlein purpura ; HSP ) 之背景介紹 .....	1
1.2 免疫學上之病理特徵.....	1
1.3 細胞激素 (cytokine) 在過敏性紫斑症中之作用 .....	2
1.4 過敏性紫斑症疾病生成之假說.....	2
第二章 探討過敏性紫斑症之 Th1 與 Th17 cells 之角色.....	4
2.1 研究背景.....	4
2.1.1 Th1 cells 及 Th17 cells .....	4
2.1.2 Th1 cells 與 Th17 cells 在自體免疫疾病中扮演之角色 .....	5
2.2 研究目的.....	6
2.3 實驗材料與方法.....	6
2.3.1 病人檢體及對照組.....	6
2.3.2 由全血分離 PBMC (Peripheral blood mononuclear cell).....	6
2.3.3 以 PBMC 培養 bulk T cells 與體外刺激 (in vitro stimulation) ....	6
2.3.4 流式細胞儀 (flow cytometry) 分析細胞表面與細胞內抗原 .....	7
2.3.5 以 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 測量血清與 上清液細胞激素之濃度.....	7
2.3.6 繪圖及統計分析.....	8
2.4 結果.....	8

2.4.1	急性過敏性紫斑症病人血清中 IL-17 之表現量增加 .....	8
2.4.2	急性期過敏性紫斑症病人之 IL-17 secreting T cells 與上清 液中 Th17 cytokines 之表現量上升 .....	8
2.5	討論.....	9
第三章 建立過敏性紫斑症小鼠動物模式.....		12
3.1	研究背景.....	12
3.1.1	自體免疫疾病之定義.....	12
3.1.2	Autoantigen 與過敏性紫斑症 .....	13
3.1.3	$\beta_2$ -glycoprotein I ( $\beta_2$ GPI)之簡介 .....	13
3.1.4	佐劑 (Adjuvant ; CFA/IFA 及 Aluminum).....	15
3.1.5	嘔吐素(Deoxynivalenol DON ; vomitoxin) .....	15
3.2	研究目的.....	15
3.3	實驗材料與方法.....	16
3.3.1	實驗用小鼠.....	16
3.3.2	$h\beta_2$ GPI 引發過敏性紫斑症小鼠模式之建立.....	16
3.3.3	血清樣品之收集.....	16
3.3.7	以 ELISA 測量血清中 anti- $h\beta_2$ GPI IgA 或 IgG.....	17
3.3.8	以 ELISA 測血清中 total IgA.....	17
3.3.9	脾臟細胞 (splenocyte)之細胞增生 .....	18
3.3.10	小鼠之病理切片 .....	18
3.3.11	以 <i>E. coli</i> 表現蛋白系統表現小鼠 $\beta_2$ GPI .....	18
3.3.12	SDS-PAGE 蛋白質電泳.....	21
3.3.13	Coomassie blue staining .....	21
3.3.14	西方墨點法 (Western blotting assay).....	21
3.3.15	繪圖及統計分析 .....	22
3.4	結果.....	22

3.4.1	以 <i>E. coli</i> 表現蛋白系統表現小鼠 $\beta_2$ GPI 蛋白 .....	23
3.4.2	以 <i>E. coli</i> 表現蛋白系統表現全長之小鼠 $\beta_2$ GPI 蛋白 .....	23
3.4.3	以 <i>E. coli</i> 表現蛋白系統表現小鼠 $\beta_2$ GPI 片段蛋白 .....	23
3.4.4	利用 h $\beta_2$ GPI 引發過敏性紫斑症之小鼠模式之建立.....	23
3.4.5	利用 h $\beta_2$ GPI 引發過敏性紫斑症小鼠模式之建立證明小鼠 產生 anti-mouse immune response.....	25
3.4.6	利用 h $\beta_2$ GPI 與 DON 引發過敏性紫斑症小鼠模式之建立 .....	26
3.4.7	利用 h $\beta_2$ GPI 與 Alum 引發過敏性紫斑症小鼠模式之建立.....	27
3.5	討論.....	27
第四章	總結.....	31
第五章	圖表.....	32
第六章	參考文獻.....	54
第七章	附錄.....	61



## 圖表目錄

圖 一、	過敏性紫斑症病人之血清中 IL-17 含量增加 .....	33
圖 二、	週邊血單核球之 IL-17 secreting T cells 、 IFN- $\gamma$ secreting T cells 、 IL-17 與 IFN- $\gamma$ 的測量在先培養 7 天後的情況下均比未培養所得測值高.....	34
圖 三、	急性期過敏性紫斑症病人之 IL-17 secreting T cells 之百分比與上清液中 IL-17 含量上升 .....	35
圖 四、	小鼠 $\beta_2$ GPI (m $\beta_2$ GPI) 氨基酸序列和 pET303/CT-His 輽體 .....	36
圖 五、	小鼠 $\beta_2$ GPI 以 E. coli 表現系統流程圖 .....	37
圖 六、	小鼠全長 $\beta_2$ GPI 蛋白之表現量少 .....	38
圖 七、	在 37°C 下，以 IPTG 誘發小鼠 $\beta_2$ GPI 片段蛋白 ( 氨基酸 1-133 ) 大量表現.....	39
圖 八、	h $\beta_2$ GPI 引發過敏性紫斑症小鼠模式之實驗程序 (1).....	40
圖 九、	以 h $\beta_2$ GPI 致敏小鼠後之血清產生高量之 anti-h $\beta_2$ GPI IgG .....	41
圖 十、	以 h $\beta_2$ GPI 經三次致敏小鼠後之小鼠脾臟細胞增生 .....	42
圖 十一、	以 h $\beta_2$ GPI 經四次致敏小鼠後之小鼠脾臟細胞增生 .....	43
圖 十二、	以 h $\beta_2$ GPI 經七次致敏小鼠後之小鼠脾臟細胞增生 .....	44
圖 十三、	h $\beta_2$ GPI 引發過敏性紫斑症小鼠模式之實驗程序 (2).....	45
圖 十四、	以 ELISA 方式測 h $\beta_2$ GPI 致敏小鼠後之敏感性比西方墨點法高 .....	46
圖 十五、	h $\beta_2$ GPI 致敏之小鼠，可以產生 anti-mouse $\beta_2$ GPI antibodies.....	47
圖 十六、	以 h $\beta_2$ GPI 致敏小鼠後之血清 anti-h $\beta_2$ GPI IgA 或 total IgA 無明顯差異 .....	48
圖 十七、	以 h $\beta_2$ GPI 經三次致敏後犧牲小鼠後沒有產生明顯之病理變化.....	49
圖 十八、	以 h $\beta_2$ GPI 與 DON 致敏小鼠後仍無法引起小鼠的 anti-mouse $\beta_2$ GPI IgA.....	50

圖 十九、以 h $\beta_2$ GPI 與 DON 經四次致敏後犧牲小鼠後沒有產生明顯之 病理變化.....	51
圖 二十、以 Alum 當 adjuvant 仍然無法引發小鼠 anti-mouse $\beta_2$ GPI IgG 與 IgA 反應 .....	52
表 一、人類 $\beta_2$ GPI 之 15 段胜肽 (peptide) .....	53



# 第一章 總論

## 1.1 過敏性紫斑症 (Henoch-Schönlein purpura ; HSP)之背景介紹

過敏性紫斑症是孩童最常見的全身性小血管發炎，其發生率每年10萬孩童約有13-20人會發病 (1)。此病好發於兒童期，大部份病人於3-5歲初次發病。90%的病人小於10歲 (2)，平均年齡為6歲 (3)，而男女發病比例約為2：1 (4)。雖然造成過敏性紫斑症之原因仍然不明，但通常是經由上呼吸道感染開始，故大部分病人在一月至三月發病或復發 (1, 4)。

## 1.2 免疫學上之病理特徵

依據American College of Rheumatology (ACR)所建立診斷過敏性紫斑症分類之標準，包括(1)明顯可觸摸之紫斑 (palpable purpura) (非血小板缺乏引起) (2)開始發病時年齡小於20歲(3)腹痛 (abdominal pain) (4)血管壁組織切片顯示有顆粒性白血球 (granulocytes)之沉積，符合以上標準至少兩項即可診斷是過敏性紫斑症 (4)。

在急性期的過敏性紫斑症病人，約有一半的病人血清之 Immunoglobulin A (IgA)升高 (4-6)，且此現象只在過敏性紫斑症病人發現，而其他的白血球聚集血管炎 (leukocytoclastic vasculitis)，例如過敏性血管炎 (hypersensitivity vasculitis)、皮膚白細胞破碎性血管炎 (cutaneous leukocytoclastic angiitis)等則無此現象 (7)。此外，皮膚病灶或若有腎絲球腎炎產生的腎臟之病理切片可見 IgA 免疫複合物 (IgA immune complex)沉積在微血管或腎小球之血管間部 (mesangium)內 (5-6)。

研究顯示病原菌會引起過敏性紫斑症之產生，目前研究最廣泛的是 A 群  $\beta$  溶血型鏈球菌 (group A  $\beta$ -hemolytic streptococcus; GAS)，研究結果發現約 20-50% 的急性期過敏性紫斑症病人曾被此細菌感染 (8-9)。其他病原菌，例如 Bartonella henselae、Parvovirua B19 等亦有研究報導與引起過敏性紫斑症有關 (10-11)。

### 1.3 細胞激素 (cytokine)在過敏性紫斑症中之作用

先前研究指出一些 proinflammatory cytokines 參與過敏性紫斑症之發病過程，例如 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 、interleukin (IL)-6、IL-8、transforming growth factor (TGF)- $\beta$  與 vascular endothelial growth factor (VEGF) (6)。

TNF- $\alpha$  為巨噬細胞 (macrophage)、renal mesangial cells 與內皮細胞 (endothelial cell)產生之細胞激素，其可刺激 endothelial fibroblasts 或 mesangial cells 分裂，也可刺激血管新生 (angiogenesis)，使腎小球的 mesangial regions 形成細胞外基質 (extracellular matrix)，導致腎小球硬化 (12)。IL-6 是由 T cells、巨噬細胞及內皮細胞產生，在與其他細胞激素協同下，刺激 renal mesangial cells 增生，合成大量細胞外基質，導致腎小球硬化。此外，IL-6 會活化 B cells，產生大量 IgA，形成 IgA 免疫複合物沉積在 renal mesangial cells 上，引起腎絲球腎炎的發生 (13)。IL-8 由單核細胞 (monocyte)、表皮細胞及內皮細胞產生，它會吸引和活化多形核嗜中性白血球 (polymorphonuclear neutrophils; PMN) 進而破壞腎小球 (13-14)。TGF- $\beta$  是多功能的細胞激素，其可調控多種細胞的增殖與分化，且為 B 細胞產生 IgA 的 class switch factor (15)。而 VEGF 則是由內皮細胞、巨噬細胞、纖維母細胞 (fibroblasts) 與平滑肌細胞 (smooth muscle cells) 產生，是選擇性內皮生長激素 (selective endothelial cell growth factor)，也可增加微血管滲透性，其亦為脈管生成 (vasculogenesis) 與血管新生 (angiogenesis) 重要的調控者 (6, 16)。研究發現在一些全身性微血管發炎的疾病中，例如 Kawasaki disease、Behcet's disease 與 Wegener's granulomatosis 等，VEGF 表現會增加 (17)。

先前研究發現在急性期的過敏性紫斑症病人其血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、TGF- $\beta$  與 VEGF 均高於緩解期病人與正常人，此外在急性期的過敏性紫斑症病人週邊血的 TGF- $\beta$  secreting T cells 也高於緩解期病人與正常人 (8)，認為上述細胞激素與過敏性紫斑症息息相關，但仍需更進一步之研究 (6)。

### 1.4 過敏性紫斑症疾病生成之假說

當病原菌經由氣管黏膜上皮進入後，經由抗原呈獻細胞 (antigen-presenting cell; APC) 吞噬後移動到淋巴組織 (lymphoid tissue)，再呈獻給 CD4<sup>+</sup> T cells，使之分化為 TGF-β-secreting CD4<sup>+</sup> T cells (TH3 cells)，分泌之 TGF-β 會促進 IgA isotype switching，進而使血清中 IgA 升高。而 IgA 可能會與內皮細胞結合，進而造成兩種可能的途徑：一為與補體作用後誘發內皮細胞的破壞；另一途徑是直接活化內皮細胞產生 IL-8，接著吸引和活化多形核嗜中性白血球後，使之分泌反應性氧代謝物 (reactive oxygen metabolites) 與顆粒蛋白酶 (granule proteases)，進而破壞內皮細胞 (6)。



## 第二章 探討過敏性紫斑症之Th1與Th17 cells之角色

### 2.1 研究背景

#### 2.1.1 Th1 cells 及 Th17 cells

1980 年代 Mosmann 團隊提出 effector CD4<sup>+</sup> T cells 依據其所分泌的細胞激素可分成兩個 subsets-Th1 與 Th2。Th2 cells 分泌 IL-4、IL-5 與 IL-13，與過敏反應和清除胞外病原菌 (extracellular pathogens)例如寄生蟲有關；Th1 cells 分泌大量 IFN- $\gamma$ ，與清除胞內病原菌 (intracellular pathogens)、cell-mediated 及 delayed-type hypersensitivity 有關 (18)。早期的研究顯示，因為 adoptive transfer pathogenic Th1 cells 至 naive 小鼠會造成其產生自體免疫疾病例如 experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) -- 多發性硬化症的一種動物實驗模式，且其分泌之 IFN- $\gamma$  在發炎組織有增加的情形，故認為 Th1 cells 是造成自體免疫疾病發病的主要原因 (19)。然而，在某些實驗條件下卻出現了與預期相反的結果，例如在 IFN- $\gamma$  或 IFN- $\gamma$  receptor-deficient 小鼠及 IL-12p35 或 IL-12 receptor- $\beta$ 2 deficient 小鼠，反而使 EAE 的疾病變嚴重 (20-22)。不過，IL-17-producing Th17 cells (Th17 cells)被鑑定出來後，有助於釐清以上的矛盾 (19)。

Th17 cells 分泌 IL-17、IL-17F、IL-21 與 IL-22 等細胞激素。TGF- $\beta$  與 IL-6 或 IL-21 是 Th17 cells 分化重要的因子 (differentiation factor) (23-24)，而 IL-23 則是 Th17 cells 的生長因子 (growth factor) 與 stabilization factor (23)。此外，Th17 cells 不會表現 T-bet 或 GATA-3，而是會表現 orphan nuclear receptor (ROR  $\gamma$  t) 的轉錄因子 (transcription factor)，且是透過調控 STAT3 表現 signalingROR  $\gamma$  t (25)。IL-17 除了由 Th17 cells 分泌外，尚可由其他的細胞，例如  $\gamma\delta$ T cells、NKT cells、NK cells、neutrophils 與 eosinophils 產生 (26-28)，因為 IL-17 可由先天性免疫系統 (innate immune system) 或後天性免疫系統 (adaptive immune system) 的細胞產生，故認為 IL-17 是連接先天性免疫與後天性免疫反應的橋樑 (23)。IL-17 會誘發組織反應而吸引 neutrophils 至發炎的組織，而且 IL-17 引起的發炎

不具有保護能力卻有引起自體免疫疾病的風險 (23)。IL-21 是經由活化的 T cells (activated T cells)產生 (29)，而大部分之 IL-21 是由 Th17 cells 產生 (30-31)。分化之 Th17 cells 會分泌高量 IL-21，而 IL-21 又為 Th17 cells 分化過程之重要因子，所以認為由 Th17 cells 產生之 IL-21 又可增加 Th17 cells 數目，且維持 Th17 responses 與在組織發炎扮演重要角色 (30-32)。先前研究指出在自體免疫糖尿病 (autoimmune diabetes)或慢性發炎性腸病 (chronic inflammatory bowel disease) 中 IL-21 是誘發 autoimmunity 的重要因素 (33)。

### 2.1.2 Th1 cells 與 Th17 cells 在自體免疫疾病中扮演之角色

一般而言，器官特異性自體免疫疾病 (organ-specific autoimmune diseases) 多與傾向 Th1 免疫反應有關。EAE 模式中，移植 Th1 cells 至小鼠後會誘發小鼠產生 EAE (34)，在 EAE 疾病嚴重時的中樞神經發炎組織中有大量 IFN- $\gamma$  產生而疾病緩解時 IFN- $\gamma$  則下降。另外，collagen-induced arthritis (CIA) 小鼠給予 IL-12 後會使其疾病加重 (35)。然而，有些研究團隊利用 blocking IFN- $\gamma$  方式，不管是以中和抗體 (neutralize antibodies) 或剔除 IFN- $\gamma$  基因的小鼠 (delete IFN- $\gamma$  gene) 却會使 EAE 或 CIA 疾病變嚴重 (20, 36)。同樣的，IL-12p35 deficient 小鼠的 EAE 疾病變嚴重 (21, 37)。雖然很多研究顯示 Th1 cells 在自體免疫疾病扮演重要角色，但是單獨 Th1 cells 仍然無法完全解釋自體免疫疾病之發病過程。

近幾年發現 Th17 cells 會誘發組織發炎與產生自體免疫疾病 (19, 34-35)。某些自體免疫疾病例如類風濕性關節炎 (Rheumatoid arthritis; RA) (38)、多發性硬化症 (multiple sclerosis; MS) (39)、乾癬 (psoriasis)、發炎性腸病 (inflammatory-bowel-disease; IBD) (24, 40) 等的病人之血清或發炎組織中 IL-17 表現量會增加。在 IBD 病人血清及黏膜中之 IL-17 增加與疾病的活動程度有關 (40)，同樣的，在 SLE 病人血漿之 IL-17 增加也與疾病的活動程度有關 (41)。但過敏性紫斑症與 Th17 cells 之間關係則仍未知。

## 2.2 研究目的

過敏性紫斑症為一自體免疫疾病，近年來有許多研究探討 Th1/Th17 免疫反應與自體免疫之間的關係，但過敏性紫斑症與 Th1/Th17 免疫反應之間關係則仍未知。在此主要探討 Th1/Th17 免疫反應在過敏性紫斑症中之角色。

## 2.3 實驗材料與方法

### 2.3.1 病人檢體及對照組

血清細胞激素測量之病人檢體男女共 30 人（男孩 15 人；女孩 15 人），年齡介於 3~17 歲；對照組男女共 30 人（男孩 15 人；女孩 15 人），年齡介於 13~14 歲。細胞培養實驗之病人檢體來自台大兒童醫院，男女共 23 人，年齡介於 3~19 歲；對照組男女共 8 人，年齡介於 19~23 歲。此研究經過台大醫院倫理委員會審議通過，並取得受試者或法定代理人同意。

### 2.3.2 由全血分離 PBMC (Peripheral blood mononuclear cell)

將 heparin 全血置於 15 ml 離心管中，2500 rpm 室溫離心 5 分鐘後，取上層血漿並保存於-80°C；下層血球以 HBSS (Hank's balanced salt solution) 補至原來體積，混合均勻後，沿管壁緩慢加入含有 Histopaque (Cat. NO. 1077-1，Sigma Aldrich，St. Louis，MO，USA) 的 15 ml 離心管 (blood : Histopaque=2 : 1)，1500 rpm 室溫離心 30 分鐘（下降速度改為慢速）；取出界面層細胞至新離心管，加入 HBSS 混合均勻後，2000 rpm 室溫離心 10 分鐘，再以 HBSS 洗一次，1500 rpm 室溫離心 5 分鐘，最後加入 10 ml RPMI-10%FBS 混合均勻後，進行細胞計數，並將細胞數調整為  $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。

### 2.3.3 以 PBMC 培養 bulk T cells 與體外刺激 (in vitro stimulation)

將 PBMC 分離後，以  $1 \times 10^6/\text{well}$  細胞數，養在 24 well 培養盤中，每個 well 加入 1 ml 調整好之細胞液，再加入  $1\mu\text{g}/\text{ml}$  LEAF<sup>TM</sup> purified anti-human CD3 Ab

(Cat. NO. 317303 , Biolegend , San Diego , CA , USA) 、 1 $\mu$ g/ml LEAF<sup>TM</sup> purified anti-human CD28 Ab (Cat. NO. 302913 , Biolegend) 及 IL-2 (10U/ml) 刺激細胞，培養 7 天後，再加入 50ng/ml phorbol-myristate acetate (PMA ; Cat. NO. P-1585 , Sigma Aldrich) 與 1 $\mu$ g/ml ionomycin (Cat. NO. I-0634 , Sigma Aldrich) 刺激 18 小時後，收集細胞與上清液。

#### 2.3.4 流式細胞儀 (flow cytometry) 分析細胞表面與細胞內抗原

利用螢光標的抗體結合到細胞表現的特異性抗原上，透過流式細胞儀儀器，對細胞表現之特異性抗原加以分析。

將細胞分裝成  $1 \times 10^6$ /管，6000 rpm 室溫離心 2 分鐘，將細胞團塊拍散後，加入 50  $\mu$ l 0.2% BSA in PBS (Cat. NO. A3059 , Sigma-Aldrich) ，加入欲分析之抗體 (PerCP/Cy5.5 conjugated anti-human CD3 Ab ; Cat. NO. 300429 , Biolegend )，4°C 作用 30 分鐘，再加 1 ml 0.2% BSA in PBS 沖洗細胞，6000 rpm 室溫離心 2 分鐘，去除上清液，加入 350  $\mu$ l 0.2% BSA in PBS 後可上機分析。

若欲分析之分子為細胞內，則於細胞表面抗原之抗體染色後進行細胞內抗原染色 (PE conjugated anti-human IL-17 Ab ; Cat. NO. 512305 , Biolegend) 、 APC conjugated anti-human IFN-  $\gamma$  Ab ; Cat. NO. 317415 , Biolegend) 。細胞內抗原染 IL-17 及 IFN-  $\gamma$  則利用 BD Cytofix/Cytoperm<sup>TM</sup> Plus Fixation/Permeabilization Kit (Cat. NO. 8750 , BD Biosciences , San Jose , CA , USA) ，實驗步驟皆依照產品所附之說明書。

#### 2.3.5 以 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 測量血清與上清液細胞激素之濃度

過敏性紫斑症及對照組之血清與上清液，利用 eBioscience ELISA kit 分別定量 IL-17 (Cat. NO. 88-7176-22) 、 IL-21 (Cat. NO. 88-7216-22) 、 IL-23 (Cat. NO. 88-7237-22) 及 IFN-  $\gamma$  (Cat. NO. 88-7316-71) (eBioscience , San Diego , CA , USA)

之濃度，實驗步驟皆依照產品所附之說明書操作。

### 2.3.6 繪圖及統計分析

繪圖及統計分析均使用 GraphPad Prism 4 軟體，繪製圖以 mean 與 SEM 表示；統計方法為軟體內建之 Mann-Whitney test， $\alpha$  值設定在 0.05。\*,  $p<0.05$

## 2.4 結果

### 2.4.1 急性過敏性紫斑症病人血清中 IL-17 之表現量增加

過敏性紫斑症為一自體免疫疾病，但過敏性紫斑症與 Th1/Th17 免疫反應之間關係則仍未知，在此我們測病人血清中和 Th17 相關的細胞激素 IL-17、IL-21 與 IL-23 之表現量。結果顯示，相較於正常人對照組，急性過敏性紫斑症病人之血清中 IL-17 表現量顯著增加( $p<0.05$ ) (圖一 A)，而血清中 IL-23 及 IL-21 之表現量並無差異 (圖一 B, C)。此外，我們也測量病人血清中 Th1 相關的細胞激素 IFN- $\gamma$  (圖一 D)之表現量，結果顯示，過敏性紫斑症病人與正常人對照組並無明顯差異。

### 2.4.2 急性期過敏性紫斑症病人之 IL-17 secreting T cells 與上清液中 Th17 cytokines 之表現量上升

接著我們探討在過敏性紫斑症病人的 Th1/Th17 cells 之表現量。首先，我們利用正常人的週邊血單核球經 PMA 與 ionomycin 刺激 18 小時收集細胞與上清液。利用流式細胞儀對表現特異性抗原細胞加以分析，結果顯示，IL-17-secreting T cells ( $CD3^+IL-17^+$ )之百分比約為 0.6% (圖二 A)，而 IFN- $\gamma$ -secreting T cells ( $CD3^+IFN-\gamma^+$ )百分比約為 1% (圖二 C)。且上清液之 IL-17 含量約為 20 pg/ml (圖二 B)，而 IFN- $\gamma$  含量約為 250 pg/ml (圖二 D)。由以上結果得知 Th1/Th17 cells 與其分泌之細胞激素的量很低，因此我們改用細胞培養方式經 anti-CD3、anti-CD28 與 IL-2 培養 7 天後，再以 PMA 與 ionomycin 刺激 18 小時，收集細胞與上清液。利用流式細胞儀對細胞表現之特異性抗原加以分析，結果顯示，

IL-17-secreting T cells (圖二 A)與 IFN- $\gamma$ -secreting T cells (圖二 C) 之百分比皆升高，且上清液中之 IL-17 與 IFN- $\gamma$  之含量也變高，因此後續實驗皆以細胞培養方式以測量過敏性紫斑症病人的 Th1/Th17 cells 之表現量。

相較與緩解期過敏性紫斑症病人，急性期過敏性紫斑症病人之 IL-17 secreting T cells 之百分比上升 (圖三 A)，且 IL-17 之含量亦上升 (圖三 B)，然而 IFN- $\gamma$ -secreting T cells 與 IFN- $\gamma$  之含量在急性與緩解期過敏性紫斑症病人無明顯差異。由此實驗可知，IL-17 secreting T cells 與 Th17 cytokines 在急性期的過敏性紫斑症病人會增加，而緩解期則下降。

## 2.5 討論

過敏性紫斑症是孩童常見的全身性微血管發炎之自體免疫疾病。近年來有許多研究探討 Th1/Th17 免疫反應與自體免疫之間的關係，在此我們主要探討 Th1/Th17 免疫反應在過敏性紫斑症中之角色。首先，我們的結果顯示，急性過敏性紫斑症病人之血清中 IL-17 顯著增加，但 IFN- $\gamma$  並無差異。此外，急性過敏性紫斑症病人之週邊血單核球之 IL-17 secreting T cells 百分比與上清液中 IL-17 含量均比緩解期時增加；然而 IFN- $\gamma$ -secreting T cells 百分比與上清液中 IFN- $\gamma$  則無明顯差異。由此可推論，過敏性紫斑症可能是 Th17 主導的自體免疫疾病，而與 Th1 免疫反應較無相關。

先前研究指出在某些自體免疫疾病中，Th1 與 Th17 cells 皆扮演重要角色，以人類 multiple sclerosis 與其小鼠 EAE 模式為例，Hania et al. 指出 IFN- $\gamma$ -producing cells 與 IL-17-producing cells 皆參與 EAE 及 multiple sclerosis 的病變過程，且會被吸引到中樞神經系統發炎組織中 (42)。然而，Langrish et al. 却認為不是 Th1 而是 Th17 cells 為 EAE 的 pathogenic T cells (43)。而在我們的實驗結果發現，Th17 cells 在急性期過敏性紫斑症病人增加，但是 IFN- $\gamma$  並無明顯差異，因此我們認為過敏性紫斑症可能為 Th17 主導的自體免疫疾病，與 Th1 較無相關。另外，研究指出一些自體免疫疾病，例如 ulcerative colitis(UC)、Crohn's

disease (CD) (40)與 systemic lupus erythematosus (SLE)病人 (44)的血清中 IL-17 含量增加；Fujino et al.發現在 active UC 與 CD 的血清中 IL-17 之含量顯著增加，且 active CD 之 IL-17 含量較 inactive CD 顯著增加，他們認為 IL-17 與疾病的活動程度有關 (40)。我們的實驗結果與之類似，亦即急性期病人之 Th17 cells 與 IL-17 高於緩解期病人，故我們認為 IL-17 可能在過敏性紫斑症病人之疾病生理學扮演重要角色。因為過敏性紫斑症血清中 IgA 升高，而 IgA 可能會與內皮細胞結合後，直接活化內皮細胞產生 IL-8，而 IL-6(13)與 TGF- $\beta$  的增加，會促進 Th17 cells 的產生且分泌 IL-17，進而可能會誘發組織反應而吸引 neutrophils 至發炎的組織(23)，使之分泌反應性氧代謝物與顆粒蛋白酶，進而破壞內皮細胞(6)。

我們的實驗結果顯示，急性過敏性紫斑症病人之血清 IL-17 升高。而在一些自體免疫疾病中，例如 psoriasis 病人之皮膚病灶的 Th17 相關因子，如 ROR $\gamma$ t、IL-17、IL-22 與 IL-23 mRNA 皆增加 (45-47)；在 multiple sclerosis 病人 cerebrospinal fluid (CSF)之單核球細胞之 IL-17 mRNA 表現量增加，且高於週邊血之 IL-17 mRNA 表現量 (48)。若我們利用過敏性紫斑症病人的皮膚組織切片或腎臟組織切片探討 IL-17 之表現量，可能也會比週邊血之 IL-17 表現量高，進而可以研究其造成過敏性紫斑症之免疫機轉。

我們的結果顯示，在急性期過敏性紫斑症病人的 Th17 cells 百分比雖比緩解期高，但沒有達到顯著差異 (圖三)，而上清液中 IL-17 含量則達到顯著差異。由於我們測到的 Th17 cells 百分比是以流式細胞儀分析 IL17 $^+$ CD3 $^+$ 百分比，是得到有多少 T cells 會分泌 IL-17 的細胞亦即 Th17 cells；而以 ELISA 方式測上清液中 IL-17 含量所得到的結果是細胞總共分泌 IL-17 之含量，因此我們得知雖然 Th17 cells 較少，但是可分泌很多的 IL-17。另外，IL-23 為 Th17 cells 的生長因子與 stabilization factor，但是我們的實驗結果卻顯示，在正常人與過敏性紫斑症病血清中測值均低於可測量範圍，也許應該用更敏感的方法測量，例如 cytometric beads array。此外，IL-23 是由 innate immune cells 分泌，例如 DCs 與巨噬細胞，因此，可以利用病人週邊血單核球培養 DCs 後，收取上清液測 IL-23 表現量。

總而言之，我們的結果發現在急性期過敏性紫斑症病人之血清中 IL-17 含量增加，且 Th17 cells 表現量亦增加，因此 Th17 cells 在過敏性紫斑症扮演重要角色。未來需要增加過敏性紫斑症病人樣本數，進而可以探討在過敏性紫斑症病人之血清中 IL-17 增加之原因及 IL-17 在過敏性紫斑症病人之免疫機轉。



## 第三章 建立過敏性紫斑症小鼠動物模式

### 3.1 研究背景

#### 3.1.1 自體免疫疾病之定義

自體免疫疾病之定義為疾病由良性的自體免疫 (benign autoimmunity) 進展到致病的自體免疫 (pathogenic autoimmunity)。依據 Koch 假說，可以將自體免疫疾病定義為：以自體抗體 (autoantibody) 或細胞免疫的形式產生自體免疫反應，且可鑑定相對應之抗原 (antigen)；且以此抗原或其相似物致敏動物可引發相似之自體免疫反應與疾病症狀。Rose 與 Bona 將自體免疫病的發生分為三種：直接證明 (direct proof)、間接證明 (indirect evidence) 和間接證據 (circumstantial evidence) (49)。

直接證明意即需要由病人傳播疾病的病理特徵給另一人，或病人傳給動物，亦即直接給予正常的接受者自體抗體而使之產生疾病。例如 Harrington 從自發性血小板缺乏紫斑症 (idiopathic thrombocytopenic purpura) 病人的血漿注射自己，結果迅速產生了嚴重但短暫的血小板缺乏且血小板有被破壞的現象 (50)；有自體免疫疾病的母親之 pathogenic IgG 自體抗體透過胎盤傳給胎兒，例如葛瑞夫茲病 (Graves' disease) 和重症肌無力 (myasthenia gravis) 等；或給予新生小鼠從天疱瘡 (pemphigus) 病人血清中純化之免疫球蛋白後，新生小鼠會產生類似人類天疱瘡的皮膚水泡 (blister) 痘變等 (51)。

間接證明是利用動物模式再產生 (reproduction) 類似人類的疾病，例如利用抗原類似物 (antigen analogue) 致敏動物使之產生類似人類橋本氏甲狀腺炎 (Hashimoto's thyroiditis) 和多發性硬化症 (multiple sclerosis)。

當以上兩種證明都無法適用時，則歸類為間接證據，也就是具有一些特殊的情況，例如有家族史、在目標器官或組織有淋巴球的浸潤、MHC class II antigen 的異常和利用免疫抑制劑可以改善病情等。

### 3.1.2 Autoantigen 與過敏性紫斑症

如同其他自體免疫疾病，過敏性紫斑症病人之血清中可測得多種自體抗體，然而較特殊的是出現多種 IgA 自體抗體 (IgA autoantibodies)，例如抗嗜中性白血球細胞質抗體 (antineutrophil cytoplasmic antibodies; ANCA) (52)、 IgA 類風濕因子 (IgA rheumatoid factor) (8, 53)、 IgA 抗牛心脂抗體 (IgA anticardiolipin antibodies; IgA aCL) (8, 53)與 IgA 抗內皮細胞抗體 (IgA anti-endothelial cell antibody; AECA) (54)等。

### 3.1.3 $\beta_2$ -glycoprotein I ( $\beta_2$ GPI)之簡介

$\beta_2$ GPI是大小約為 50 kDa 的一種醣蛋白 (glycoprotein)，為 anticardiolipin antibodies (aCL)結合至 cardiolipin 之主要輔助因子 (55-56)。 $\beta_2$ GPI是由肝臟與胎盤製造，其在血漿含量約 150-300 $\mu$ g/ml (56)。 $\beta_2$ GPI為單鏈 (single-chain)蛋白，含有 326 個胺基酸與 5 個 repeating sequences 又稱為 short consensus repeats (SCRs)、complement control protein (CCP) 或 Sushi domains。 $\beta_2$ GPI 的晶體結構呈現 J-shaped，包含呈直線形的第 1-4 SCRs 與第 5 SCRs 多的出 hydrophobic lysine-rich loop 以嵌入脂質膜 (phospholipid membrane)，此外，第 5 個 SCRs 也含有磷脂結合位 (phospholipid-binding site) (55-57)。另外，研究發現  $\beta_2$ GPI 在哺乳類動物具有高度保留序列，在人類、牛、狗與小鼠蛋白質約有 60-80% 胺基酸序列是一樣且都含有 5 個 SCRs (55)。

#### 3.1.3.1 $\beta_2$ GPI 的生物功能

$\beta_2$ GPI 可與帶負電荷的分子結合，例如磷脂 (phospholipids) (如 cardiolipin 和 phosphatidylserine)、肝素 (heparin) 與一些脂蛋白等，亦可與活化之血小板的細胞膜和內皮細胞結合。已經有研究指出  $\beta_2$ GPI 會經由抑制內因性凝固路徑的活性 (contact activation of the intrinsic coagulation pathway)、血小板凝血酶原酶活性 (platelet prothrombinase activity) 和 ADP-mediated platelet aggregation 影響血液凝固

與血小板功能。然而， $\beta_2$ GPI在生物體內的確切功能與其作用機制仍不清楚 (58)。

Free或monomeric  $\beta_2$ GPI對於帶負電荷的磷脂有較低的親和力 (affinity)，而anti- $\beta_2$ GPI antibodies會與dimeric  $\beta_2$ GPI結合，而誘使其構造改變，增加dimeric  $\beta_2$ GPI結合至細胞表面磷脂的親和力 (58)。 $\beta_2$ GPI也會與細胞表面上的受器(receptor)-apolipoprotein E receptor 2 (apoER2)結合，造成apoER2的磷酸化，促使體內平衡趨向於pro-thrombotic狀態，增加anti- $\beta_2$ GPI antibodies產生血栓(thrombosis)的可能性 (55, 58)。

### 3.1.3.2 $\beta_2$ GPI在疾病上扮演之角色

抗磷脂抗體可能干擾 $\beta_2$ GPI正常的抗凝血作用，而引起血栓。研究指出在血栓與抗磷脂症候群中， $\beta_2$ GPI被認為是抗磷脂抗體最相關的antigenic target，因此認為anti- $\beta_2$ GPI antibodies在臨床診斷血栓上比aCL antibodies更具有特異性 (58)。近幾年研究顯示，anti- $\beta_2$ GPI antibodies為動脈血栓 (arterial thrombosis)重要的指標，尤其是在全身性紅斑狼瘡 (systemic lupus erythematosus; SLE)和抗磷脂症候群病人形成動脈血栓與動脈硬化的過程中， $\beta_2$ GPI與anti- $\beta_2$ GPI antibodies扮演重要的角色 (58)。

$\beta_2$ GPI可能與脂質 (lipid)分子作用形成可引起疾病的複合物 (pathogenic complex)。例如氧化的LDL (oxLDL)在動脈硬化症扮演重要角色， $\beta_2$ GPI會與氧化的LDL結合形成 $\beta_2$ GPI/oxLDL複合物，此複合物被巨噬細胞吞噬後刺激產生anti- $\beta_2$ GPI/oxLDL antibodies進而促使動脈粥樣硬化的形成。由於在一些全身性自體免疫疾病病人中，例如全身性紅斑狼瘡、全身性硬化症 (systemic sclerosis)和抗磷脂症候群之anti- $\beta_2$ GPI/oxLDL antibodies有增加的情形，因為氧化的LDL是highly proinflammatory且為不穩定的物質，因此會引起一系列氧化副產物的產生，是內皮細胞的細胞毒素，進而造成促凝血內皮表面的破壞 (59)。

### 3.1.3.3 $\beta_2$ GPI在過敏性紫斑症中可能扮演之角色

過敏性紫斑症病人血清中aCL (anticardiolipin antibodies)升高，而 $\beta_2$ GPI為aCL與cardiolipin結合之主要輔助因子 (8, 60)，推測 $\beta_2$ GPI可能在過敏性紫斑症中扮演某種角色，且先前研究發現在過敏性紫斑症病人中其anti- $\beta_2$ GPI IgA antibody與anti-cardiolipin IgA antibody或anti-endothelial cell IgA antibody皆有高度相關，且在一些恢復期的過敏性紫斑症之病人發現其血清中anti- $\beta_2$ GPI IgA antibody明顯下降，以上研究結果使我們認為 $\beta_2$ GPI可能是過敏性紫斑症的自體抗原之一。

### 3.1.4 佐劑 (Adjuvant； CFA/IFA 及 Aluminum)

佐劑是不具有抗原特性，但是若與抗原注射至體內即可增強免疫反應與延長抗原作用時間 (61)。Freund's adjuvant 是油性佐劑，其與抗原混合形成 water-in-oil 乳狀物稱為 Incomplete Freund's Adjuvant (IFA)；若含有死的分枝桿菌則稱為 Complete Freund's Adjuvant (CFA)。Freund's adjuvant 可以誘發產生很強的免疫反應，包括體液性免疫與細胞性免疫反應 (61)。Aluminum 佐劑則是透過靜電力 (electrostatic forces) 與抗原結合，雖然效果比油性佐劑較差，但仍然在注射入動物體內後可使抗原持續到 7 週 (62)，且認為 aluminum 是誘發 Th2 反應 (61-62)。

### 3.1.5 嘔吐素(Deoxynivalenol DON； vomitoxin)

DON 或名嘔吐素是一種黴菌毒素 (mycotoxin)，由新月菌 (*Fusarium graminearum*) 黴菌類產生，通常在穀物類發現此類黴菌，尤其是小麥、玉米與大麥等農作物 (63)。研究發現利用B6C3F1小鼠為實驗用小鼠，以餵食方式給予小鼠嘔吐素後，其血清產生高量之IgA，且同時伴隨血清之IgA免疫複合物增加、腎小球有mesangial IgA之沉積與血尿 (hematuria)之發生 (63-65)，其疾病特徵類似人類的IgA nephropathy (65).

## 3.2 研究目的

目前並無過敏性紫斑症之動物模式，故關於此疾病之研究一直有所侷限，在

此我們注射自體抗原的方式免疫小鼠，期望產生過敏性紫斑症之小鼠疾病模式。由於先前研究發現過敏性紫斑症病人血液中 IgA 升高，而研究發現給予小鼠 DON 可使之血清 IgA 升高，此外，我們推測  $\beta_2$ GPI 為過敏性紫斑症疾病之自體抗原，故我們計劃以  $\beta_2$ GPI 與 DON 引發小鼠產生高量之 anti- $\beta_2$ GPI IgA antibody，希望進而誘發小鼠產生類似人類過敏性紫斑症之疾病。

### 3.3 實驗材料與方法

#### 3.3.1 實驗用小鼠

選用 8 至 9 週大之 C57BL/6 及 BALB/c 雌性小鼠，購自台灣大學醫學院動物中心，並由台大醫學院動物中心代養。

小鼠飼養於塑膠籠位，內鋪設厚實墊料，每籠飼養小鼠數量在 6 隻以下，給予充足食物及飲水，動物房內溼度  $60\pm10\%$ ，溫度為  $21\pm2^\circ\text{C}$ ，並有適當光週期（日照時間：每日八時至二十時）。動物照護與動物操作流程經國立台灣大學動物委員會（Animal Committee of National Taiwan University）核定。

#### 3.3.2 h $\beta_2$ GPI 引發過敏性紫斑症小鼠模式之建立

C57BL/6 或 BALB/c 小鼠以腹腔注射 (intraperitoneally； i.p.)  $10 \mu\text{g}$  h $\beta_2$ GPI (Cat. NO. B2GI-0001, Haematologic Technologies Inc., Essex Junction, VT, USA) 混合於 adjuvant : CFA (Cat. NO. SI-F5881, Sigma Aldrich) 或 aluminum hydroxide (alum ; Cat NO. 77161, Pierce Chemical, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) 中致敏小鼠，之後每隔兩週以  $2 \mu\text{g}$  h $\beta_2$ GPI 混合於 adjuvant (IFA ; Cat. NO. SI-F5506, Sigma Aldrich) 或 alum boost 小鼠，另外，以腹腔注射  $40 \mu\text{g}$  DON (Cat. NO. D0156, Sigma Aldrich) 致敏小鼠，詳細步驟見圖八、十三、十八與二十。

#### 3.3.3 血清樣品之收集

實驗進行後每隔兩週對小鼠進行眼窩採血 (retro-orbital) 以收集小鼠血液，取

量約為 100  $\mu$ l，室溫靜置 2~4 小時後，先以 7500 rpm 離心 5 分鐘，再以 7000 rpm 離心 10 分鐘，收集血清，於-20°C 保存。

### 3.3.7 以 ELISA 測量血清中 anti-h $\beta_2$ GPI IgA 或 IgG

Human  $\beta_2$ GPI 以 TBS coating buffer 稀釋至 10  $\mu$ g/ml，在 ELISA 盤每 well 中加入 50  $\mu$ l, 4°C 靜置過夜，隔天以 TBS 沖洗 1 次；加入 150  $\mu$ l blocking buffer (0.3% gelatin in TBS)，室溫靜置 1 小時，以 TBS 沖洗 5 次；加入 50  $\mu$ l 血清（以 0.1% gelatin in TBS 稀釋；IgA ,1：3200; IgG, 1：5000），室溫靜置 1.5 小時後，以 TBS 沖洗 7 次；加入 50  $\mu$ l HRP conjugated anti-mouse IgA (以 0.1% gelatin in TBS 稀釋 1：20000；Cat. NO. 62-6720，Zymed laboratories，Carlsbad，CA，USA)或 IgG (以 0.1% gelatin in TBS 稀釋 1：100000；Cat. NO.62-6520，Zymed laboratories)，室溫靜置 1 小時，以 TBS 沖洗 10 次；加入 50  $\mu$ l tetramethylbenzidine substrate (TMB；Cat. NO. 01016-1，Clinical Science Products，Mansfield，MA，USA)呈色，最後加入 50  $\mu$ l 1N  $H_2SO_4$  終止反應，再以 ELISA reader (SpectraMaz M5<sup>e</sup>，Cisbio Bioassays，Bedford，MA，USA)讀取 OD450nm 減去 OD540nm 吸光值。

### 3.3.8 以 ELISA 測血清中 total IgA

goat anti-mouse IgA (Cat. NO. 62-6400，Zymed laboratories) 以 carbonate coating buffer 稀釋 1:10000，在 ELISA 盤每 well 中加入 100  $\mu$ l，4°C 靜置過夜，隔天以 PBST 沖洗 1 次；加入 200  $\mu$ l blocking buffer (1% BSA in PBS)，室溫靜置 1 小時，以 PBST 沖洗 5 次；加入 100  $\mu$ l 血清（以 1% BSA in PBS 稀釋；1:5000），室溫靜置 2 小時後，以 PBST 沖洗 7 次；加入 HRP conjugated anti-mouse IgA (1：20000) (Cat. NO. 62-6520，Zymed laboratories)，室溫靜置 1 小時，以 PBST 沖洗 10 次；加入 100  $\mu$ l TMB 呈色，最後加入 100  $\mu$ l 1N  $H_2SO_4$  終止反應，再以 ELISA reader (SpectraMaz M5<sup>e</sup>，Cisbio Bioassays)讀取 OD450nm 減去 OD540nm 吸光值。

### 3.3.9 脾臟細胞 (splenocyte)之細胞增生

利用脾臟細胞，以  $3 \times 10^5$ /well 細胞數，養在 96 well 圓底盤上，以 human  $\beta_2$ GPI peptide (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 及 human  $\beta_2$ GPI protein (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  及 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 刺激，總體積為 200  $\mu\text{l}$ ，細胞培養基為 RPMI-10%FBS，細胞刺激培養 4 天後，加入 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  之 [ $^3\text{H}$ ]-thymidine 培養 18 小時，以 cell harvest 機器收集細胞至濾紙上，濾紙風乾後再以  $\beta$  counter 計算 [ $^3\text{H}$ ]-thymidine 含量。

### 3.3.10 小鼠之病理切片

小鼠犧牲後，開取腹腔，取下腎臟、肺、肝臟、脾臟與腸後，剪取部份放入切片卡夾，固定於 10% 福馬林，包埋於 paraffin，並切下 5  $\mu\text{m}$  厚度製作成玻片，以 hematoxyline-eosin (H&E) 染色，於光學顯微鏡下，觀察病理變化。

### 3.3.11 以 *E. coli* 表現蛋白系統表現小鼠 $\beta_2$ GPI

利用 pET303/CT-His 表現系統表現小鼠  $\beta_2$ GPI，其含有多重選殖位 (multiple cloning site) 可供限制酶切割 (*XhoI*；Cat. NO. R0146S, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA 及 *XbaI*；Cat. NO. R0145S, New England Biolabs)，且可將小鼠  $\beta_2$ GPI 基因接合進去。此表現系統有 6x His-Tag 特性，使用  $\text{Ni}^{2+}$  affinity column (ProBond<sup>TM</sup> resin purification system；Cat. NO. K850-01, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 將我們的目標蛋白質由 cell extract 中分離出。

#### 3.3.11.1 *E.coli* 表現系統

藉由 PCR 反應得到小鼠  $\beta_2$ GPI 之 PCR 產物，將 *XhoI* 及 *XbaI* 切割過之小鼠  $\beta_2$ GPI DNA 及 vector DNA 以適當比例混合並加入 T4 ligase 進行 DNA 接合反應 (DNA ligation)，室溫反應隔夜後，將接合反應液對 *E.coli* DH5 $\alpha$  進行轉殖 (transformation)，以得到帶有質體之菌株。以 colony PCR 方式挑選帶有質體之轉殖株，之後以 1% 洋菜膠電泳分析，再以限制酶切割做確認，而後以基因定序做

最後確認。將帶有小鼠  $\beta_2$ GPI 基因之質體轉殖入 *E.coli* BL21，再以 IPTG (Cat. NO. I-6758，Sigma Aldrich) 誘發小鼠  $\beta_2$ GPI 蛋白表現並純化之。

### 3.3.11.2 小鼠 $\beta_2$ GPI 基因片段與 pET303/CT-His 質體製備

利用 tip 挑單一菌落 (colony)，放入含有 100 $\mu$ g/ml Ampicillin (Cat. NO. A-9518，Sigma Aldrich) 的 LB 培養液中，置於 37°C 的水平震盪培養箱中 16~18 小時。再利用 Mini plasmid kit (Cat. NO. PD300，Geneaid，Sijhih City，Taipei County，Taiwan) 抽取 plasmid DNA，實驗步驟皆依照產品所附之說明書。

將純化的小鼠  $\beta_2$ GPI DNA 或 vector，加入 NEB4 (10X)、BSA (100X)、限制酶 *XhoI* 及 *XbaI*，最後補 ddH<sub>2</sub>O 使總體積為 50  $\mu$ l，於 37°C 作用 1.5 小時，之後以 1% 洋菜膠電泳分析，並經 EtBr 染色後以 UV 觀察結果。

將經限制酶作用後之 pET303/CT-His expression vector 及 insert 小鼠  $\beta_2$ GPI DNA 以 1:3 的量比例加入 10X ligation buffer、T4 ligase 及補 ddH<sub>2</sub>O 至總體積為 10  $\mu$ l 進行接合反應，室溫反應隔夜。

### 3.3.11.3 質體轉殖 (transformation) 入 *E.coli* DH5 $\alpha$ 與 BL21

取勝任細胞 DH5 $\alpha$  解凍 1/3 後加入接合反應液，均勻混合後，先置於冰上 30 分鐘後轉至 42°C 水浴 90 秒熱休克處理，再置回冰上 10 分鐘，均勻混合後，立即塗佈在含有 Ampicillin 之 LB (Cat. NO. L3022，Sigma Aldrich) 培養基上，於 37°C 培養箱培養 12~18 小時。

取勝任細胞 BL21 解凍 1/3 後加入 plasmid 溶液，均勻混合後，先置於冰上 30 分鐘後轉至 42°C 水浴 90 秒熱休克處理，再置回冰上 2 分鐘，均勻混合後加入 1 ml SOC medium，於 37°C 水平震盪培養箱培養 1 小時，取 100  $\mu$ l 塗佈在含有 Ampicillin 之 LB 培養基上，於 37°C 培養箱培養 16~18 小時，剩下的菌液經 5800 rpm 離心 3 分鐘後，去掉 800  $\mu$ l 上清液，管內剩 100  $\mu$ l 塗佈在含有 Ampicillin 之 LB 培養基上，於 37°C 培養箱培養 16~18 小時。

### 3.3.11.4 IPTG 誘發蛋白表現

小量誘發蛋白表現：自含有 Ampicillin 之 LB 培養基上挑取單一菌落，加入含有 Ampicillin (100 $\mu$ g/ml) 的 LB 培養液中，置於 37°C 水平震盪培養箱培養 16~18 小時。菌液：LB 培養液以 1：10 比例加入錐形瓶，於 37°C 水平震盪培養箱培養至 OD<sub>600</sub> 達 0.4~0.6，加入不同濃度的 IPTG (最終濃度為 0.1, 1, 10mM)，於 37°C 水平震盪培養箱進行蛋白質表現 1~8 小時，期間收取 1 ml 菌液及測 OD<sub>600</sub>，以 5800 rpm 離心 3 分鐘，分為上清液及細胞團塊。細胞團塊加入 50  $\mu$ l PBS 將細胞打散後，freeze and thaw 三次 (將細胞懸浮液放入液態氮中直到細胞液變白，馬上將細胞取出，再放入 37°C 水浴槽，直到細胞懸浮液溶解，來回此動作三次)。以超音波打破細菌 (100% amplitude; 0.5 sec/cycle)，在冰上操作共打 30 秒週期，即可將細胞懸浮液保存於 -20°C 冰箱。

大量誘發蛋白表現：實驗步驟依照小量誘發蛋白表現。最後得到細胞懸浮液，以 12000 rpm 離心 25 分鐘，分為上清液及沉澱物 (inclusion body)。沉澱物加入 denaturing binding buffer (含 8M urea) 將其溶解後，置於冰上反應 30 分鐘，以 12000 rpm 離心 25 分鐘後，收取上清液即可進行蛋白質純化或保存於 -20°C 冰箱。

### 3.3.11.5 小鼠 $\beta_2$ GPI 蛋白質之純化

配置 Ni<sup>2+</sup>管柱：取 2 ml ProBond<sup>TM</sup> resin 於 10 ml 純化管柱，待所含之液體 (20% 酒精) 流至將乾，取 6 ml 滅菌水通入管柱內，待所含之液體流至將乾，取 6 ml denaturing binding buffer (含 8 M urea) 注入，待所含之液體流至將乾，再取 6 ml denaturing binding buffer (含 8 M urea) 注入，待所含之液體流至將乾。將溶解在含有 8 M urea 的 binding buffer 蛋白通入已準備好的純化管柱，在 4°C 下輕輕搖晃 1 小時，再以含有 8 M urea 的 binding buffer 及 wash buffer (pH6, 20 mM imidazole; pH5, 20 mM imidazole; pH5, 40mM imidazole) 清洗後，利用不同濃度 imidazole elution buffer (350mM imidazole, 500 mM imidazole, 1 M imidazole) 把蛋白沖提出

來，每 1 ml 收集一管，以 Pierce® BCA protein assay kit 定量蛋白質 (Cat. NO. 23227, Thermo Fisher Scientific)，再以 SDS-PAGE 鑑定純度。

### 3.3.12 SDS-PAGE 蛋白質電泳

利用 12% SDS separating gel solution 及 5% stacking gel 進行蛋白質電泳，蛋白質樣品以 100°C 乾浴加熱 10 分鐘，加熱完畢短暫離心後置於冰上，將樣品灌注至 SDS-PAGE 膠之凹槽內，以 80V 進行電泳至樣品游動至 separating gel 改以 120V 進行電泳。

### 3.3.13 Coomassie blue staining

拆卸電泳架把膠取下，置入裝有適量 Coomassie blue solution (PageBlue™ protein staining solution ; Cat. NO. R0571 , Fermentas Burlington , Ontario , Canada) 的小盒中，微波 30 秒，蓋上盒蓋避免 methanol 蒸發，於室溫下以震盪器反應隔夜後，把 Coomassie blue solution 倒掉，以 ddH<sub>2</sub>O 洗去多餘染液，加入適量 ddH<sub>2</sub>O 微波 30 秒，於室溫下以震盪器反應直至膠片背景褪染至透明無色即完成。將玻璃紙潤濕後置於玻璃板上，放上膠片，上面再覆蓋一層潤濕之玻璃紙，最後以夾子固定玻璃紙封片待膠乾。

### 3.3.14 西方墨點法 (Western blotting assay)

打開電泳夾板鋪上以 transfer buffer 浸潤之海綿，海綿上依序覆上濾紙、PVDF membrane、SDS-PAGE 膠、濾紙、海綿 (以上皆以 transfer buffer 浸潤)，將夾板夾好架上轉印用電泳架，並對好正負極位置，與冰盒一起裝入電泳槽，將 transfer buffer 注滿整個電泳槽，以 300mA 電流轉印 60 分鐘。取出轉印完成之 PVDF membrane，置入裝有適量之阻隔緩衝液 (blocking buffer; 5% skim milk in TBS) 的小盒中，於室溫下以震盪器反應 1 小時。以阻隔緩衝液製備適當稀釋倍數之一

級抗體 (Mouse anti-His-Tag antibody ; Cat. NO. MCA1396GA , AbD Serotec , Kidlington , UK)。取一塑膠袋剪開三邊，放上 blocking 完成之 PVDF membrane ，以熱熔機封住塑膠袋的兩邊，將一級抗體自開口注入，小心地去除塑膠袋內位於 PVDF membrane 上的氣泡，以免影響抗體檢測，再以熱熔機封住開口。將其於 4°C 下以震盪器反應隔夜後，取出 PVDF membrane ，置入裝有 washing buffer (TBST) 小盒中，於室溫下以震盪器作用 3 次，每次 10 分鐘。如上述步驟製備二級抗體 (Goat anti-mouse IgG HRP conjugate ; Cat. NO. 62-6520 , Zymed laboratories) ，於室溫下以震盪器反應 1 小時。反應完畢取出 PVDF membrane ，置入裝有 washing buffer 小盒中，於室溫下以震盪器作用 3 次，每次 10 分鐘。取 1 ml oxidizing reagent 和 1 ml enhanced luminal reagent ，均勻沖淋整片 PVDF membrane ，之後即可利用 Fujifilm LAS 4000 照相，再用 Multi Gauge analysis software Version 3 分析結果。

以純化後之小鼠  $\beta_2$ GPI 蛋白質為樣品灌注至 SDS-PAGE 膠之凹槽內，接著進行轉印和 blocking 後，將 PVDF membrane 切成 2mm 大小，再以 h $\beta_2$ GPI 引發過敏性紫斑症小鼠之血清，以阻隔緩衝液稀釋成 1:100 (二級抗體為 IgG) ，稀釋成 1:25 (二級抗體為 IgA) ，將其於 4°C 下以震盪器反應隔夜後，以 washing buffer 浸潤整個 PVDF membrane ，於室溫下以震盪器作用 4 次，每次 10 分鐘。製備二級抗體 (Goat anti-mouse IgG HRP conjugate) 以阻隔緩衝液稀釋 (1:10000) 或 Goat anti-mouse IgA HRP conjugate (1:1000) ，於室溫下以震盪器反應 1 小時。反應完畢取出 PVDF membrane ，以 washing buffer 浸潤整個 PVDF membrane ，於室溫下以震盪器作用 4 次，每次 10 分鐘。如上述步驟呈色及分析。

### 3.3.15 繪圖及統計分析

繪圖及統計分析均使用 GraphPad Prism 4 軟體，繪製圖以 mean 與 SEM 表示；統計方法為軟體內建之 Mann-Whitney test ，  $\alpha$  值設定在 0.05 。 \* , p<0.05

## 3.4 結果

### 3.4.1 以 *E. coli* 表現蛋白系統表現小鼠 $\beta_2$ GPI 蛋白

因為本實驗是利用 human  $\beta_2$ GPI 致敏小鼠，為了確定致敏的小鼠產生 anti-mouse immune response，故我們以 *E. coli* 表現蛋白系統表現小鼠  $\beta_2$ GPI 蛋白以利檢測致敏小鼠是否產生自體抗體。

### 3.4.2 以 *E. coli* 表現蛋白系統表現全長之小鼠 $\beta_2$ GPI 蛋白

如圖五利用 pET303/CT-His 輽體（圖四 B），以 *E. coli* 表現蛋白系統表現小鼠  $\beta_2$ GPI 全長蛋白（圖四 A），詳細實驗步驟見實驗材料與方法。實驗結果顯示，在 37°C 以不同濃度之 IPTG（最終濃度為 0.1、1 與 10mM）誘發小鼠  $\beta_2$ GPI 全長蛋白表現，誘發時間為 1、2、4 及 6 小時，以決定最佳 IPTG 濃度與時間，經 Coomassie blue 染色，結果並無明顯的 band 出現（圖六 A），再進一步做西方墨點法分析確認有誘發小鼠  $\beta_2$ GPI 全長蛋白表現（圖六 B），由此得知小鼠  $\beta_2$ GPI 全長蛋白表現的量非常少。

### 3.4.3 以 *E. coli* 表現蛋白系統表現小鼠 $\beta_2$ GPI 片段蛋白

因為小鼠  $\beta_2$ GPI 全長蛋白不易表現，因此我們先表現片段蛋白（含有 1-133 個胺基酸（圖四 A 畫底線）。實驗方法如上述，在 37°C 以不同濃度之 IPTG（最終濃度為 0.1、1 與 10mM）誘發小鼠  $\beta_2$ GPI 蛋白表現，誘發時間為 2、4、6 及 8 小時，以決定最佳 IPTG 濃度與時間，經 Coomassie blue 染色，結果在 2、4、6 及 8 小時有明顯的 band 出現（圖七 A），再進一步做西方墨點法分析，結果顯示，在不同時間及不同之 IPTG 最終濃度下皆有誘發小鼠  $\beta_2$ GPI 蛋白表現（圖七 B），故選用 IPTG 最終濃度為 1mM 誘發 6 小時以作為之後大量表現蛋白時用的條件並純化之。

### 3.4.4 利用 h $\beta_2$ GPI 引發過敏性紫斑症之小鼠模式之建立

誘發小鼠產生類似人類過敏性紫斑症之疾病之實驗程序如（圖八），實驗小

鼠包含 BALB/c 與 C57BL/6 小鼠兩種品系，各分為實驗組與對照組，實驗組小鼠以腹腔注射 h $\beta_2$ GPI 混合於 CFA 中致敏小鼠，之後則以腹腔注射給予 h $\beta_2$ GPI 混合於 IFA 中致敏小鼠；對照組小鼠則以腹腔注射給予 PBS。每隔兩週將小鼠眼窩採血取得血清以測量 anti-h $\beta_2$ GPI IgG 或 IgA，並在第 6、8 及 14 週犧牲小鼠，小鼠犧牲後，取脾臟細胞用於細胞增生實驗。

#### 3.4.4.1 以 h $\beta_2$ GPI 致敏 C57BL/6 及 BALB/c 小鼠產生高量之 anti-h $\beta_2$ GPI IgG 但無明顯 anti-h $\beta_2$ GPI IgA 產生

由結果顯示（圖九），在 C57BL/6 小鼠，隨著致敏小鼠時間的增加，小鼠體內產生之 anti-h $\beta_2$ GPI IgG 亦增加，在第 4 週達到最高值（圖九 A）。同樣地，在 BALB/c 小鼠，隨著致敏小鼠時間的增加，小鼠體內產生之 anti-h $\beta_2$ GPI IgG 亦增加，且在第 4 週達到最高值（圖九 B），表示只需要三次致敏小鼠即可使小鼠產生高量之 anti-h $\beta_2$ GPI IgG。而在 C57BL/6 小鼠及 BALB/c 小鼠體內之 anti-h $\beta_2$ GPI IgA，實驗組及對照組間並無明顯差異（圖九 C, D）。

#### 3.4.4.2 以 h $\beta_2$ GPI 致敏 C57BL/6 及 BALB/c 小鼠產生後之小鼠脾臟細胞增生

為了探討 autoreactive T cell 辨識  $\beta_2$ GPI peptide 之 epitopes，因此我們利用 15 段 human  $\beta_2$ GPI peptides (表一)及 human  $\beta_2$ GPI protein 刺激小鼠脾臟細胞增生，由實驗結果顯示，小鼠經 3 次致敏後之細胞增生實驗，C57BL/6 及 BALB/c 小鼠對於第八段 human  $\beta_2$ GPI peptide 皆有反應（圖十 A, B），而 human  $\beta_2$ GPI protein 只有在 BALB/c 小鼠有反應（圖十 B）。小鼠經 4 次致敏後之細胞增生實驗，C57BL/6 及 BALB/c 小鼠對於第一段 human  $\beta_2$ GPI peptide 皆有反應（圖十一 A），且相較於小鼠經 3 次致敏後之細胞增生，經 4 次致敏後之細胞增生後對於 human  $\beta_2$ GPI peptide 的反應較大，亦即 CPM 值較高，同樣地，human  $\beta_2$ GPI protein 只有在 BALB/c 小鼠有反應（圖十一 B）。而小鼠經 7 次致敏後之細胞增生實驗，反應較之前強（圖十二），但是只有第一段反應較大，故推測  $\beta_2$ GPI peptide 的第八

段與第一段可能是 autoreactive T cell 會辨識之 epitopes。

綜合以上結果，我們發現 BALB/c 小鼠產生 anti-h $\beta_2$ GPI IgG 效果比 C57BL/6 好，因此後續的實驗皆選用 BALB/c 小鼠為模式。

### 3.4.5 利用 h $\beta_2$ GPI 引發過敏性紫斑症小鼠模式之建立證明小鼠產生 anti-mouse immune response

實驗程序如（圖十三），BALB/c 小鼠分為 2 組；group 1：以腹腔注射給予 PBS 與 CFA 致敏小鼠，之後則以 IFA 致敏小鼠；group 2：以腹腔注射 h $\beta_2$ GPI 混合於 CFA 中致敏小鼠，之後則以腹腔注射 h $\beta_2$ GPI 混合於 IFA 中致敏小鼠。在第 0、2、4、6 與 7 週眼窩採血取得血清以測量 anti-h $\beta_2$ GPI IgG、IgA 與 total IgA 之濃度，且以西方墨點法確定致敏的小鼠血清有產生 anti-mouse immune response。在第 14 週犧牲小鼠，小鼠犧牲後，取下腎臟、肺、脾臟與腸做病理切片觀察病理變化。



#### 3.4.5.1 以 h $\beta_2$ GPI 致敏 BALB/c 小鼠後之血清中 anti-h $\beta_2$ GPI IgG 升高

小鼠在不同週數抽取血清以 ELISA 方式測其 anti-h $\beta_2$ GPI IgG 濃度。結果顯示，隨著時間的增加，group 2 之 anti-h $\beta_2$ GPI IgG 含量亦增加（圖十四 A），而 group 1 沒有，此可證明小鼠致敏成功。而以西方墨點法測其血清中 anti-h $\beta_2$ GPI IgG 的結果顯示，只有在第 4 週之小鼠有產生 anti-h $\beta_2$ GPI IgG（圖十四 B），由此結果得知，ELISA 方式的敏感性比西方墨點法高。

#### 3.4.5.2 h $\beta_2$ GPI 致敏小鼠後，產生 anti-mouse $\beta_2$ GPI antibodies

我們以西方墨點法確定致敏的小鼠可產生 anti-mouse  $\beta_2$ GPI antibodies。結果顯示，在第 7 與 14 週，以腹腔注射 h $\beta_2$ GPI 混合於 CFA 或 IFA 的第 3 與第 4 隻小鼠有產生 anti-mouse  $\beta_2$ GPI IgG（圖十五），由此可證明以 h $\beta_2$ GPI 致敏小鼠可以打破小鼠免疫耐受性小鼠，產生 anti-mouse  $\beta_2$ GPI antibodies。

### **3.4.5.3 以 h $\beta_2$ GPI 致敏 BALB/c 小鼠後之血清 anti-h $\beta_2$ GPI IgA 或 total IgA 無明顯增加**

我們取得小鼠在不同週數抽取之血清測 anti-h $\beta_2$ GPI IgA，結果顯示，兩組間沒有差異，且並沒有隨著致敏時間增加而增加（圖十六 A）。此外，小鼠血清 total IgA 會隨著時間增加而增加（圖十六 B）。

### **3.4.5.4 以 h $\beta_2$ GPI 經三次致敏小鼠後犧牲小鼠後並沒有產生明顯之病理變化**

以腹腔注射 PBS 混合於 CFA 或 IFA 致敏小鼠與以腹腔注射 h $\beta_2$ GPI 混合於 CFA 或 IFA 致敏小鼠後，在第 14 週犧牲小鼠，小鼠犧牲後取下腎臟、肺、脾臟與腸，以 hematoxyline-eosin (H&E)染色，於光學顯微鏡下，觀察病理變化。結果顯示，致敏小鼠並沒有產生血管發炎之現象（圖十七）。

### **3.4.6 利用 h $\beta_2$ GPI 與 DON 引發過敏性紫斑症小鼠模式之建立**

因為上述實驗仍然無法使致敏小鼠產生 anti-h $\beta_2$ GPI IgA，而先前研究發現給予小鼠 DON 可使之血清 IgA 升高，故我們同時加入  $\beta_2$ GPI 與 DON 以致敏小鼠，希望小鼠產生高量 anti- $\beta_2$ GPI IgA antibody。實驗程序如圖十八 A，以腹腔注射 h $\beta_2$ GPI 混合於 CFA 致敏 BALB/c 小鼠，再另外以腹腔注射 DON 致敏小鼠，之後每隔兩週則以 h $\beta_2$ GPI 混合於 IFA boost 小鼠，另外再以腹腔注射 DON，每隔一週再以腹腔注射 DON in PBS boost 小鼠。每隔兩週將小鼠眼窩採血取得血清以測 autoantibody。

### **3.4.6.1 以 h $\beta_2$ GPI 與 DON 仍無法引起小鼠的 anti-mouse $\beta_2$ GPI IgA 反應**

實驗結果顯示，小鼠之血清中有 anti-human  $\beta_2$ GPI IgG 反應（結果未呈現），但沒有產生 anti-human  $\beta_2$ GPI IgA（結果未呈現）。此外，在第 4 週的第 1 與第 2 隻小鼠就開始有 anti-mouse  $\beta_2$ GPI IgG 產生（圖十八 B），且可持續到第 14 週。但是，小鼠並沒有產生明顯之 anti-mouse  $\beta_2$ GPI IgA 反應（圖十八 C）。

### 3.4.6.2 以 h $\beta_2$ GPI 經四次致敏小鼠後犧牲小鼠後並沒有產生明顯之病理變化

以腹腔注射 h $\beta_2$ GPI 混合於 CFA 致敏 BALB/c 小鼠，再另外以腹腔注射 DON 致敏小鼠，之後每隔兩週則以 h $\beta_2$ GPI 混合於 IFA boost 小鼠，另外再以腹腔注射 DON，每隔一週再以腹腔注射 DON in PBS boost 小鼠。在第 15 週犧牲小鼠，小鼠犧牲後取下腎臟、肺、脾臟與腸，以 hematoxyline-eosin (H&E)染色，於光學顯微鏡下，觀察病理變化。結果顯示，致敏小鼠並沒有產生血管發炎之現象（圖十九）。

### 3.4.7 利用 h $\beta_2$ GPI 與 Alum 引發過敏性紫斑症小鼠模式之建立

因為上述實驗仍然無法使致敏小鼠產生 anti-mouse  $\beta_2$ GPI IgA，故改用 Alum 當 adjuvant，期望小鼠產生 anti-mouse  $\beta_2$ GPI IgA。實驗程序二十 A，以腹腔注射 10 $\mu$ g h $\beta_2$ GPI 混合於 Alum 致敏 BALB/c 小鼠，之後每隔兩週以 2 $\mu$ g h $\beta_2$ GPI 混合於 Alum boost 小鼠。每隔兩週將小鼠眼窩採血取得血清以測 autoantibody。

### 3.4.7.1 以 Alum 當 adjuvant 仍然無法引發小鼠 anti-mouse $\beta_2$ GPI IgA 反應，也无法產生 anti-mouse $\beta_2$ GPI IgG

實驗結果顯示，小鼠有產生 anti-human  $\beta_2$ GPI IgG，但沒有產生 anti-human  $\beta_2$ GPI IgA (圖二十 B)。另外，以純化後之小鼠  $\beta_2$ GPI 片段蛋白為樣品灌注至 SDS-PAGE 膠凹槽內，進而利用西方墨點法證明可以打破小鼠免疫耐受性，結果顯示，小鼠無法產生 anti-mouse  $\beta_2$ GPI IgG (圖二十 C)，且亦沒有 anti-mouse  $\beta_2$ GPI IgA 反應 (圖二十 D)。

## 3.5 討論

之前研究證明  $\beta_2$ GPI 是過敏性紫斑症的自體抗原之一 (Yang et al., unpublished data)，因此我們利用 h $\beta_2$ GPI 致敏小鼠後，期望可以打破小鼠免疫耐受性後產生 anti-mouse  $\beta_2$ GPI IgG。我們的實驗結果顯示，小鼠在第 7 週產生

anti-mouse  $\beta_2$ GPI antibody，且可持續到第 14 週，也證明了此策略可使小鼠 break tolerance 後產生自體免疫反應。由於急性期過敏性紫斑症病人的血清 IgA 升高，故我們希望小鼠亦可產生高量之 IgA，如此可與 antiphospholipid syndrome (APS) 之小鼠模式做區別。因此我們同時加入 DON 及以 aluminium 當 adjuvant 後卻無法引起小鼠 anti- $\beta_2$ GPI IgA 產能能力。

在此我們注射小鼠 human  $\beta_2$ GPI 之小鼠 HSP 動物模式是根據抗原模擬 (antigen mimicry)作用試圖打破小鼠耐受性產生自體免疫反應。因為在人類與小鼠之  $\beta_2$ GPI 蛋白質約有 70% 氨基酸序列是一樣，因此我們利用 human  $\beta_2$ GPI 透過抗原模擬方式致敏小鼠，我們的實驗結果顯示，小鼠可產生 anti-mouse  $\beta_2$ GPI 自體抗體。此結果與 Blank et al 團隊的研究相似 (60)，因為  $\beta_2$ GPI 亦為 APS 之自體抗原之一，在 APS 小鼠模式中，可以利用直接透過 tail vein 或 i.p. 方式注射自體抗體 antiphospholipid antibodies (aPL) 至正常小鼠，或利用自體抗原  $\beta_2$ GPI 致敏正常小鼠進而誘發小鼠產生 APS。此外，Gharavi et al. 以 aluminium 為 adjuvant 可使 NIH/Swiss 小鼠產生 anti- $\beta_2$ GPI IgG 抗體 (66)。而我們的實驗以 aluminium 當 adjuvant 混合於 h $\beta_2$ GPI 致敏小鼠後，小鼠沒有產生 anti-mouse  $\beta_2$ GPI IgG 抗體，可能是因為樣本數太少 ( $n=4$ )，也可能是因為選用的小鼠不一樣，若增加樣本數，小鼠產生 anti-mouse  $\beta_2$ GPI IgG 的機率可能會變高，或者因為我們只表現片段小鼠  $\beta_2$ GPI 蛋白 (1-133 氨基酸)，小鼠可能對此片段蛋白沒有反應，而有可能是另外片段蛋白 (133-326 氨基酸) 才是小鼠會認的 epitope。總之，我們的實驗證明了注射 human  $\beta_2$ GPI 可以打破免疫耐受性使小鼠產生 anti-mouse  $\beta_2$ GPI IgG，但小鼠並沒有產生血管發炎之現象，未來也許可以測小鼠產生之自體抗體是否會產生 anti-endothelial cell antibody，進一步證明小鼠是否會有病理變化。

我們利用兩種小鼠品系，C57BL/6 及 BALB/c 小鼠以 human  $\beta_2$ GPI 致敏，結果顯示，BALB/c 小鼠產生之 anti-human  $\beta_2$ GPI 反應較穩定。在 Katzav et al. 的研究中亦發現不同品系的小鼠對抗原的反應亦不同 (67)。可能因為 C57BL/6 及 BALB/c 小鼠間某些免疫反應不同，例如 C57BL/6 主要產生 Th1 response，而

BALB/c 主要是產生 Th2 response (68)。另外，我們利用兩種佐劑：CFA 與 Alum 混合於  $\beta_2$ GPI 致敏小鼠，結果顯示，以 CFA 為佐劑效果較 Alum 好，因為以 CFA 為佐劑使小鼠產生較高量之 anti-human  $\beta_2$ GPI 抗體，且會引發小鼠產生 anti-mouse  $\beta_2$ GPI 抗體，可能是因為 Freund's adjuvant 可以誘發產生很強的免疫反應，包括體液性免疫與細胞性免疫反應，而 Alum 則是透過靜電力與抗原結合，效果比油性佐劑較差 (61)。

Pestka et al. 利用 B6C3F1 小鼠，以餵食方式給予 25 ppm 的 DON 持續給 24 週，結果顯示，血清中 IgA 在第 4 週開始明顯增加並持續至第 24 週，且在腎小球有 mesangial IgA 之沉積，同時，他們也發現小鼠有血尿與蛋白尿的產生，類似人類的 IgA nephropathy (63)。在我們的實驗中，我們以腹腔注射方式給予小鼠 DON，但小鼠無法產生高量之 IgA；推測可能原因是由於 IgA 主要是腸道免疫的免疫球蛋白，因此可能需要利用餵食方式給予小鼠 DON，且需要連續給予小鼠 DON，小鼠才會產生 IgA。也許給予小鼠 DON 的量不足導致小鼠無法產生高量之 IgA。此外，因為 CD40L 是 T-cell-dependent class switching 需要的因子，在 in vitro 實驗，其與 TGF- $\beta$  的共同作用引發 IgA class switching (69)，未來也許可以利用 CD40L 與 TGF- $\beta$  的作用使 IgA class switching。再者，由於以鏈球菌細胞壁注入大鼠體內後，血清會產生很高量之 IgA (70)，且已有研究顯示 20-50% 的急性期過敏性紫斑症病人發現 A 群  $\beta$  溶血型鏈球菌的存在，因此也許也可以利用鏈球菌細胞壁為 adjuvant 以致敏小鼠，期望小鼠血清會產生高量之 IgA。也可利用 IgA nephropathy 之動物模式的 ddY 小鼠 (71) 或 hyper IgA (HIGA) 小鼠 (72) 為動物模式。

我們以 E.coli 表現系統表現全長之小鼠  $\beta_2$ GPI 的量非常少，不利於後續的純化；因為小鼠  $\beta_2$ GPI 與 human  $\beta_2$ GPI 皆含 326 個胺基酸，因此將小鼠  $\beta_2$ GPI 依據 Hattori et al. (73) 的方法分段，目前純化了第一段小鼠  $\beta_2$ GPI (胺基酸 1-133) 以證明致敏小鼠血清之 autoantibody 是 anti-m $\beta_2$ GPI antibody，我們的結果證實了小鼠對  $\beta_2$ GPI 片段蛋白質有反應。而大量表現小鼠  $\beta_2$ GPI 片段蛋白質之結果顯示，除

了偵測到目標蛋白外 (17kD)，還偵測到大小約 34kD 的蛋白，可能是形成 dimer 蛋白，因為分子量大小為目標蛋白的 2 倍。但因為純化後之小鼠  $\beta_2$ GPI 片段蛋白質濃度太低，故無法以 ELISA 方式測小鼠血清中 autoantibody。本實驗利用西方墨點法證明小鼠有產生 anti-m $\beta_2$ GPI antibody，由於 ELISA 方式以 human  $\beta_2$ GPI 蛋白 coating 的濃度是 0.5  $\mu\text{g}/\text{well}$ ，而我們利用西方墨點法的 mouse  $\beta_2$ GPI 蛋白濃度為 0.5 ng/lane，兩種方式利用的蛋白濃度相差 1000 倍，而西方墨點法是偵測 denatured 蛋白，其結果可看到 band、分子量大小、亦可排除偽陰性 (false positive) 且特異性較 ELISA 高，可進一步確定偵測到的蛋白為目標蛋白；但是 denatured 蛋白可能會將原本 native 蛋白的一些 epitopes 遮蔽，且因為 ELISA 敏感性較高 (圖十四)，因此若利用 ELISA 方式測小鼠血清中 autoantibody，應該會有較高的數值。

總之，我們的實驗證明了給予小鼠 human  $\beta_2$ GPI 可使之產生 anti-mouse  $\beta_2$ GPI IgG，但尚無法使其產生高量之 anti- $\beta_2$ GPI IgA。若可建立此過敏性紫斑症之小鼠模式，則有利於後續更深入之研究。

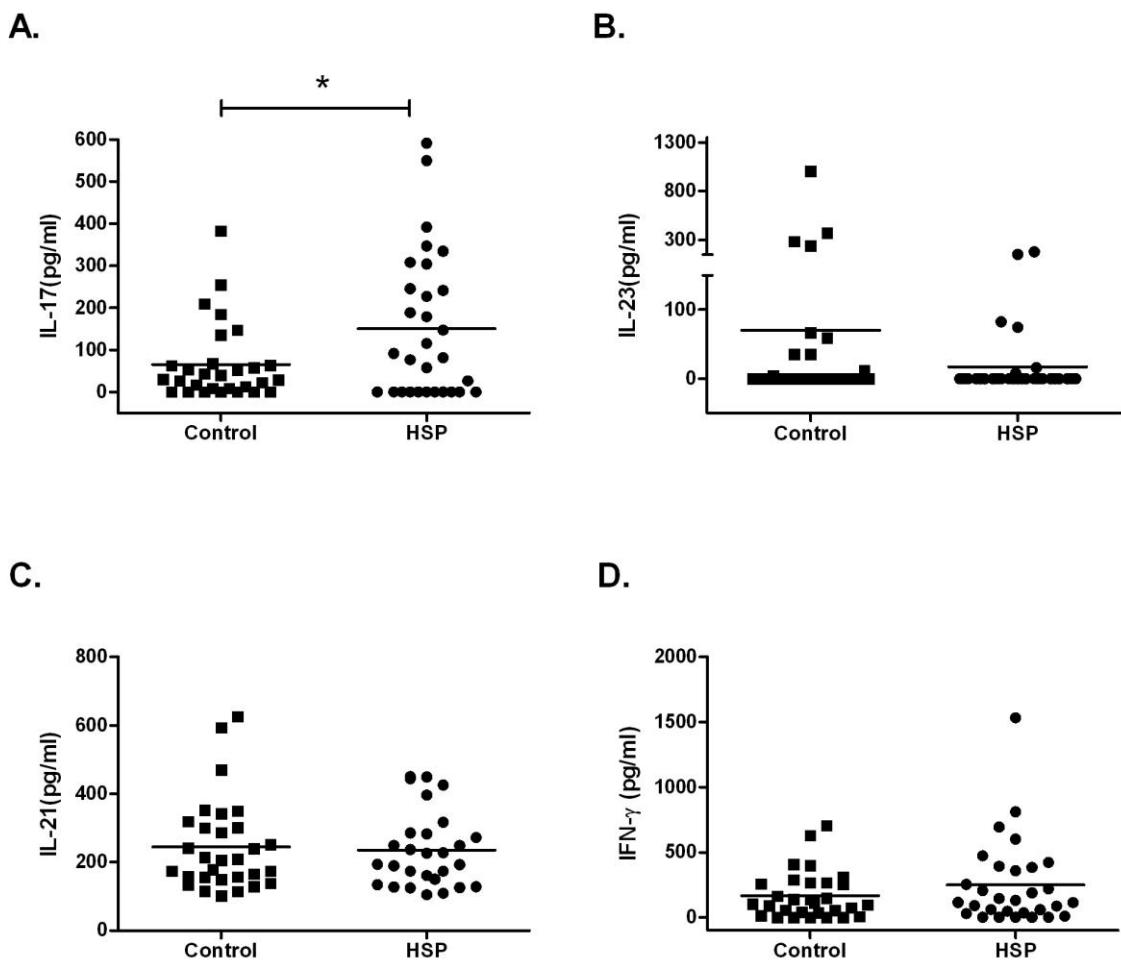


## 第四章 總結

過敏性紫斑症是孩童最常見的全身性小血管發炎，在急性期過敏性紫斑症病人血清之 IgA 量很高，在我們的實驗結果發現，急性過敏性紫斑症病人之血清中 IL-17 含量增加，且急性過敏性紫斑症病人之週邊血單核球之 IL-17 secreting T cells 與上清液中 IL-17 含量較緩解期均增加，但是 IFN- $\gamma$  則無差異，由此可推論，過敏性紫斑症可能是 Th17 主導的自體免疫疾病。另外，我們認為  $\beta_2$ GPI 可能是過敏性紫斑症的自體抗原之一，因此我們以 human  $\beta_2$ GPI 致敏小鼠，進而誘發小鼠產生類似人類過敏性紫斑症之疾病。目前我們的結果發現，小鼠產生了 anti-human  $\beta_2$ GPI IgG，也產生了 anti-mouse  $\beta_2$ GPI IgG 反應，此證明了注射 human  $\beta_2$ GPI 可以打破小鼠免疫耐受性產生自體免疫反應。若可建立此過敏性紫斑症之小鼠模式，則有利於後續更深入之研究。

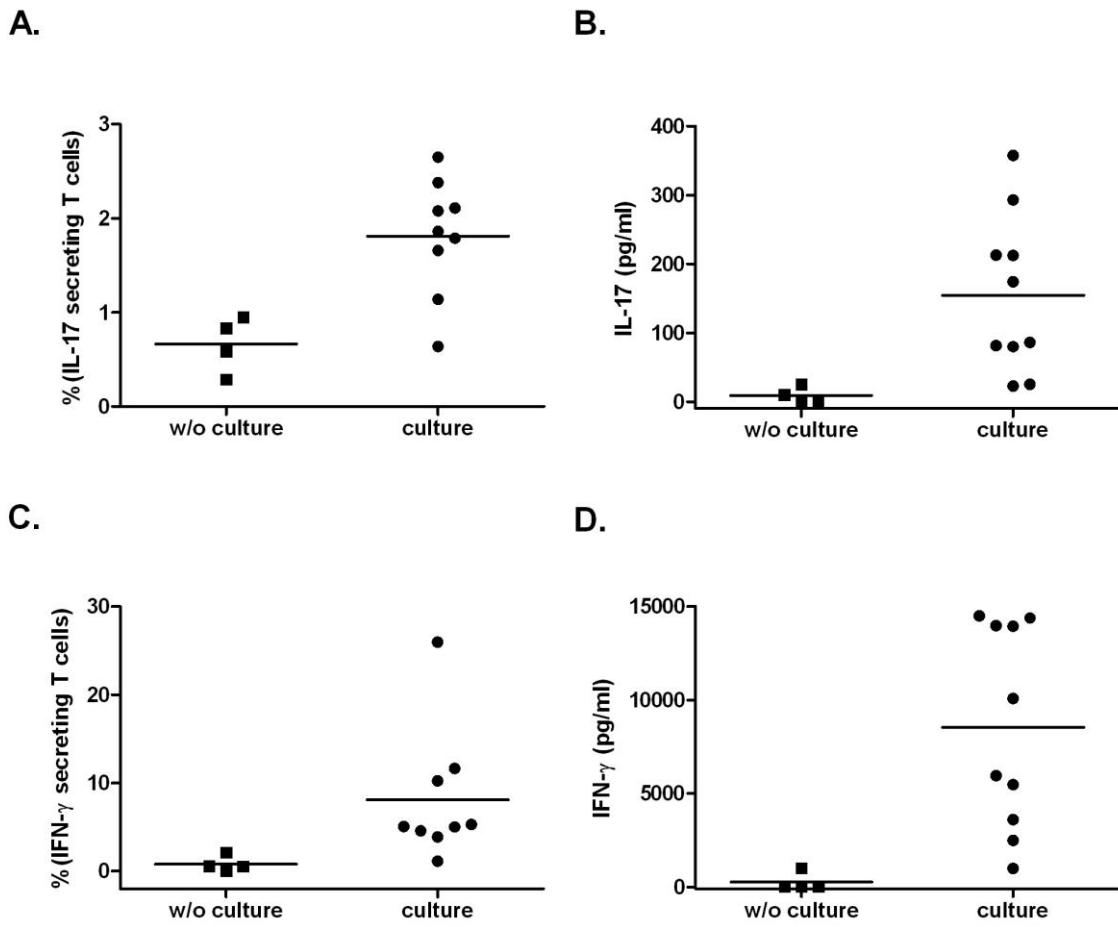






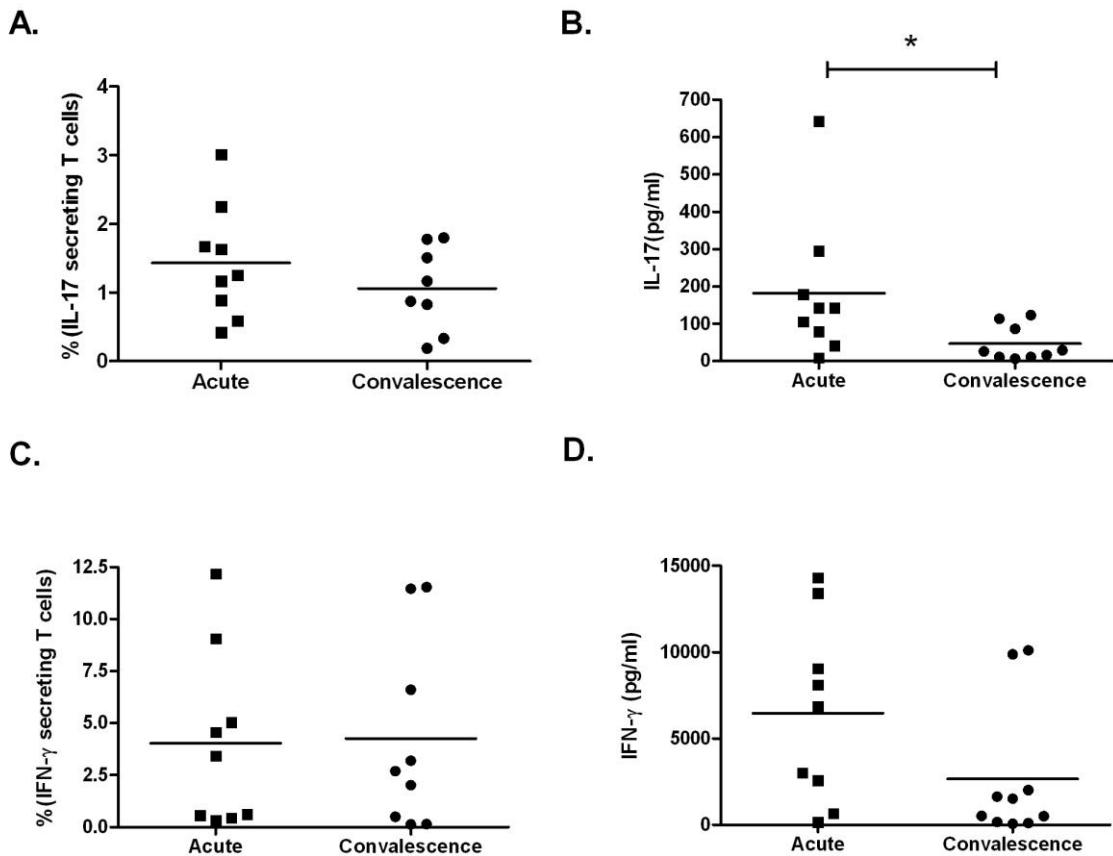
圖一、過敏性紫斑症病人之血清中 IL-17 含量增加。

以 ELISA 定量過敏性紫斑症病人與對照組之血清中 (A)IL-17，(B) IL-23，(C) IL-21，及 (D)IFN- $\gamma$  之濃度。\*, p<0.05。



圖二、週邊血單核球之 IL-17 secreting T cells、IFN- $\gamma$  secreting T cells、IL-17 與 IFN- $\gamma$  的測量在先培養 7 天後的情況下均比未培養所得測值高。

正常人之週邊單核細胞培養 7 天後再刺激 18 小時 (culture) 及只刺激 18 小時 (w/o culture) 後以流式細胞儀分析 (A)IL-17 secreting T cells ( $IL-17^+CD3^+$ ) 百分比與 (C)IFN- $\gamma$  secreting T cells ( $IFN-\gamma^+CD3^+$ ) 百分比。並以 ELISA 定量其上清液中 IL-17 (B) 和 IFN- $\gamma$  (D) 之濃度。



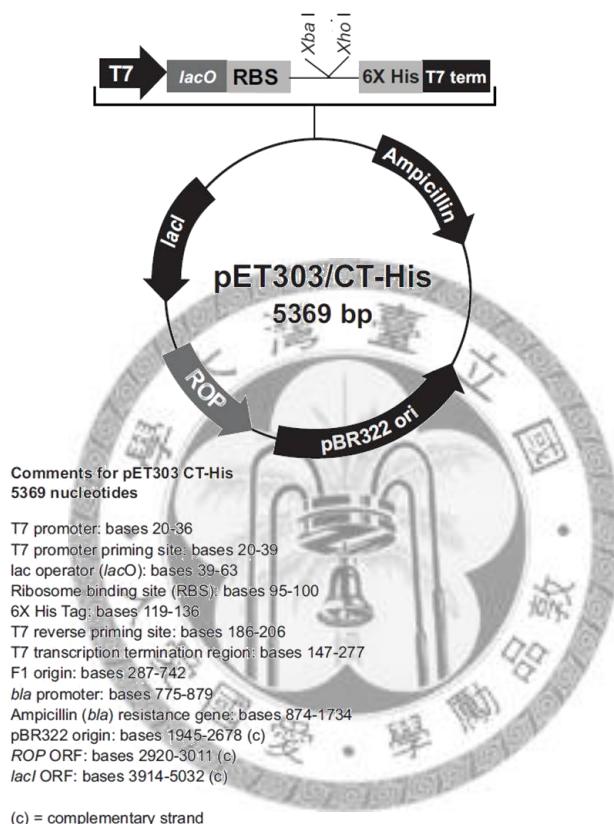
圖三、急性期過敏性紫斑症病人之 IL-17 secreting T cells 之百分比與上清液中 IL-17 含量上升。

急性期與緩解期過敏性紫斑症病人之週邊單核細胞培養 7 天後再刺激 18 小時後以流式細胞儀分析 (A)IL-17 secreting T cells ( $IL-17^+CD3^+$ )百分比與 (C) IFN- $\gamma$  secreting T cells ( $IFN-\gamma^+CD3^+$ )百分比。以 ELISA 定量其上清液中 IL-17 (B) 和 IFN- $\gamma$  (D) 之濃度。\*, p<0.05。

A.

GRICPKPDDLPFATVPLKTSYDPGEQIVYSCKPGYVSRGGMRRFTCPLTGMWPINTLRCVPRVCPFAGIL  
ENGIVRYTSFEYPKNISFACNPGLNGTSSSKCTEEGKWSPDIPACARITCPPPPV/PKFALLKDYRPSAGN  
NSLYQDTVVFKCLPHFAMIGNDTVMCTEQGNWTRLPECLEVKCPFPPRPENGYVNYPAKPVLLYKDKATF  
GCHEYKLDGPEEAECTKTGTWSFLPTCRESCKLPVKKATVLYQGMRVKIQEQFKNGMMHGDKIHFYCKN  
KEKKCSYTVEAHC RDGTIEIPSCFKEHSSLAFWKTDASELTPC

B.



圖四、小鼠  $\beta_2$ GPI (m $\beta_2$ GPI) 肽氨基酸序列和 pET303/CT-His 載體。

(A) 小鼠  $\beta_2$ GPI 全長之肽氨基酸序列(含有 326 個肽氨基酸)，劃線為小鼠  $\beta_2$ GPI 片段肽氨基酸序列(1-133)；(B)pET303/CT-His 載體。利用此載體表現系統表現小鼠  $\beta_2$ GPI，以限制酶切割 (*XhoI* 及 *XbaI*) 將小鼠  $\beta_2$ GPI 基因接合進去 (如箭號所示)，其帶有抗 Ampicillin 基因，故可用 Ampicillin 篩選 clone；其帶有 T7 lac promoter，可將蛋白表現，且帶有 6x His Tag，可用  $Ni^{2+}$  column 純化蛋白。

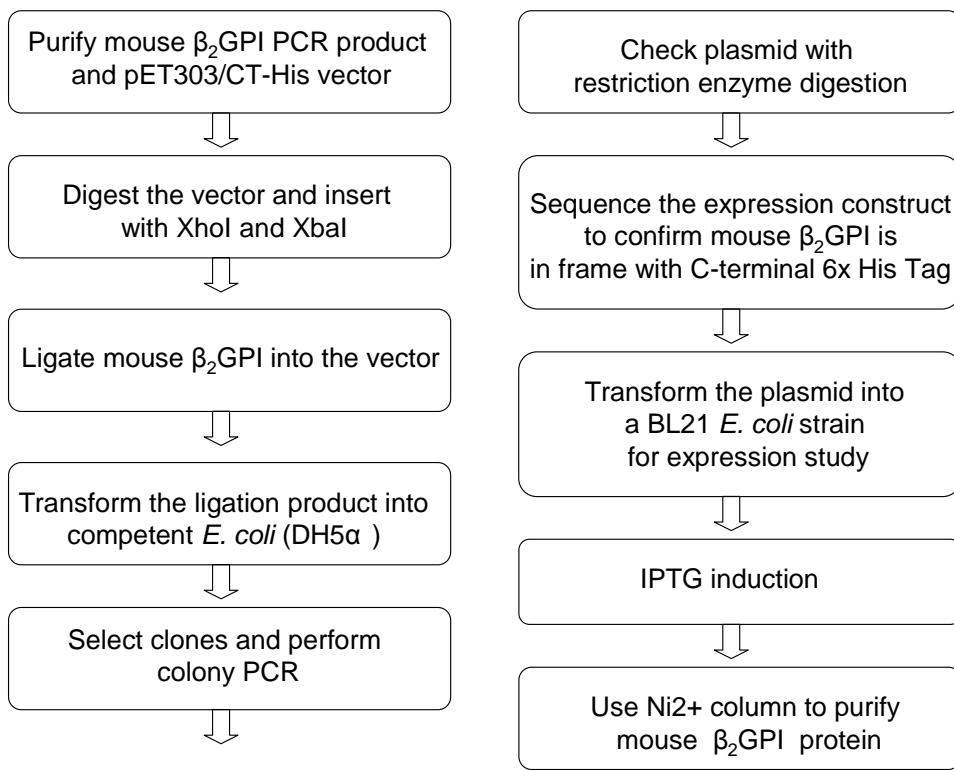
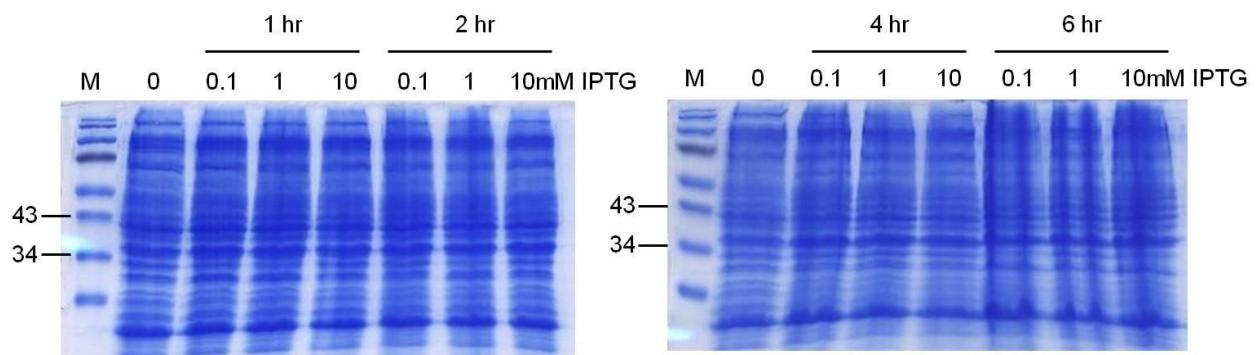


圖 五、小鼠  $\beta_2$ GPI 以 *E. coli* 表現系統流程圖。

首先將純化小鼠  $\beta_2$ GPI PCR 產物與 pET303/CT-His 輽體，再利用 *XhoI* 及 *XbaI* 限制酶切割過之小鼠  $\beta_2$ GPI DNA 及 vector DNA 以適當比例混合並進行 DNA 接合反應，室溫反應隔夜後，將接合物轉殖於 *E.coli* DH5 $\alpha$ ，以得到帶有質體之菌株。接著以 colony PCR 方式挑選帶有質體之轉殖株，之後以 1% 洋菜膠電泳分析，再以限制酶切割做確認，而後以基因定序做最後確認。將帶有小鼠  $\beta_2$ GPI 基因之質體轉殖入 *E.coli* BL21，再以 IPTG 誘發小鼠  $\beta_2$ GPI 蛋白表現以  $Ni^{2+}$  column 純化之。

**A.**



**B.**

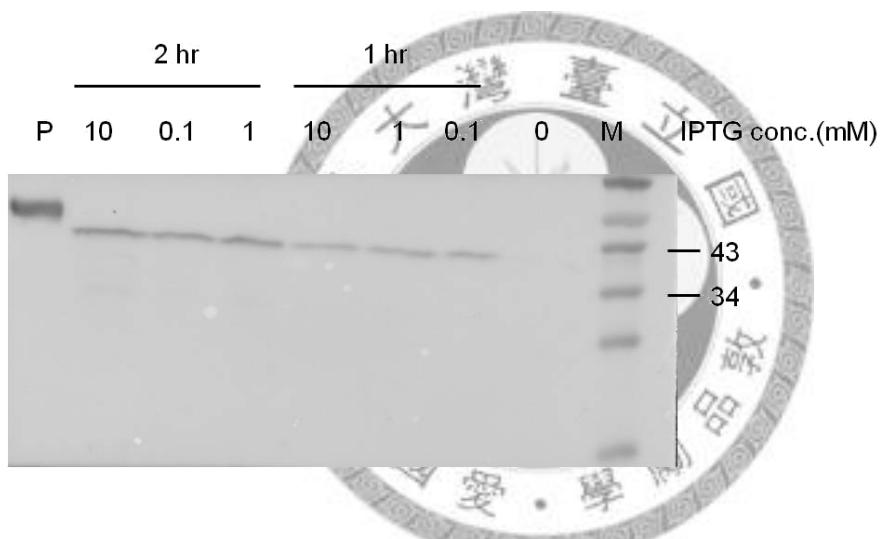
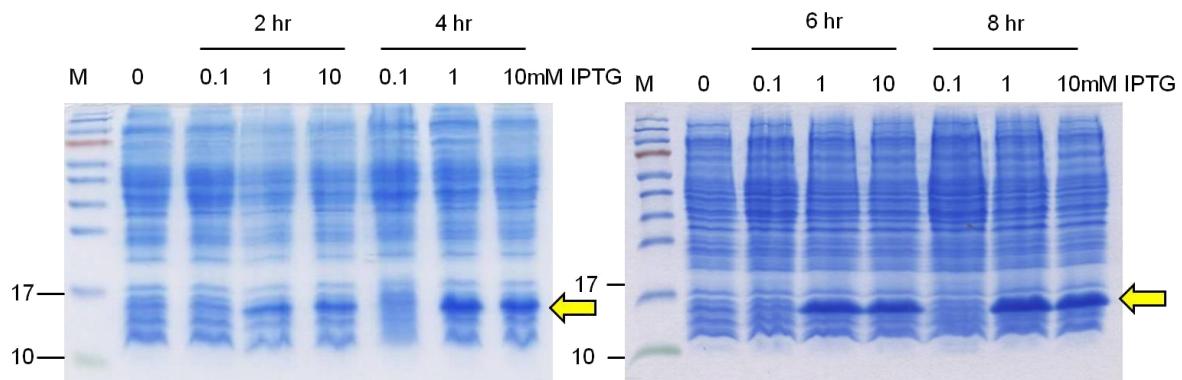


圖 六、小鼠全長  $\beta_2$ GPI 蛋白之表現量少。

在  $37^\circ\text{C}$  以 IPTG 誘發小鼠  $\beta_2$ GPI 全長蛋白（分子量約 38kD）表現之 SDS-PAGE，利用 IPTG 最終濃度為 0.1、1 和 10mM 誘發小鼠  $\beta_2$ GPI 蛋白表現，誘發時間為 1、2、4 與 6 小時 (A)；再利用 (B) 西方墨點法確認有誘發小鼠  $\beta_2$ GPI 蛋白表現。P 為 positive control，以含有 His Tag 的蛋白為樣品。

A.



B.

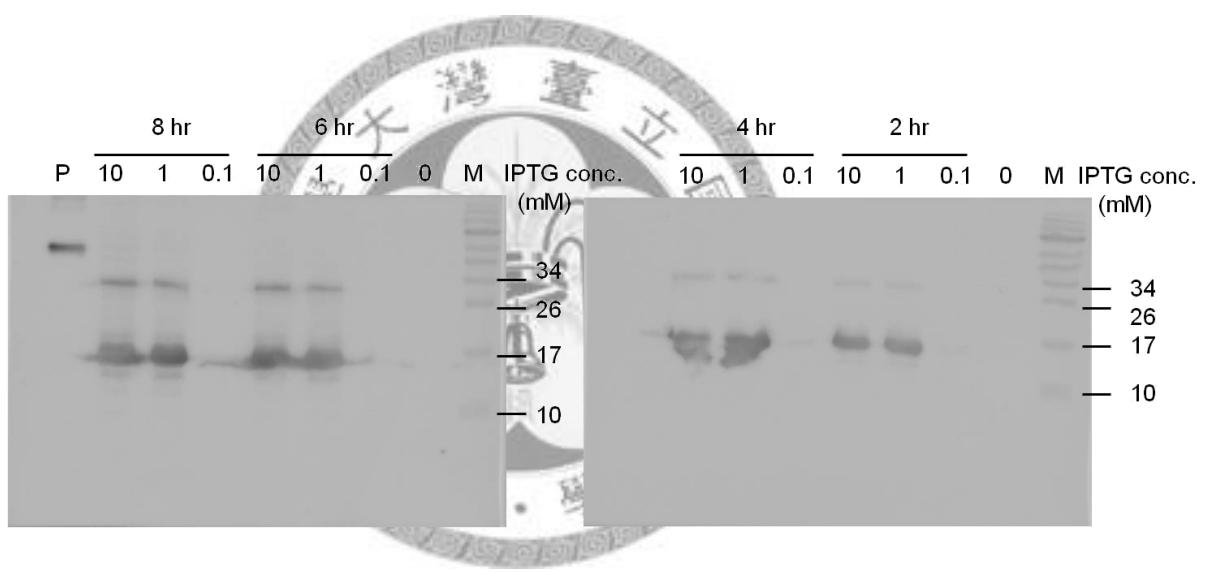


圖 七、在 37°C 下，以 IPTG 誘發小鼠  $\beta_2$ GPI 片段蛋白(胺基酸 1-133)大量表現。

在 37°C 以 IPTG 誘發小鼠  $\beta_2$ GPI 片段蛋白 (分子量約 17kD) 表現之 SDS-PAGE，利用 IPTG 最終濃度為 0.1、1 和 10mM 誘發小鼠  $\beta_2$ GPI 蛋白表現，誘發時間為 2、4、6 與 8 小時 (A)。再利用 (B) 西方墨點法確認有誘發小鼠  $\beta_2$ GPI 蛋白表現，故之後選用 1mM IPTG 誘發 6 小時表現蛋白並純化之。P 為 positive control，以含有 His Tag 的蛋白為樣品。

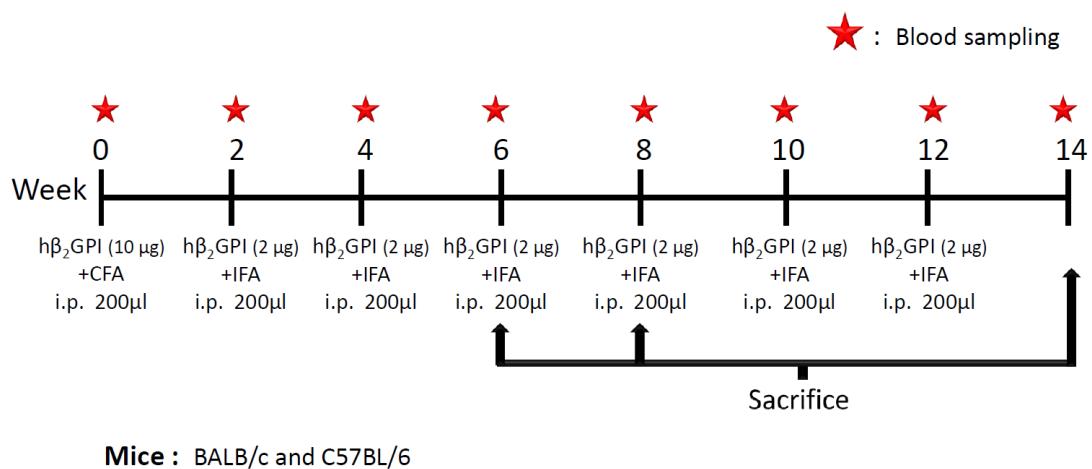
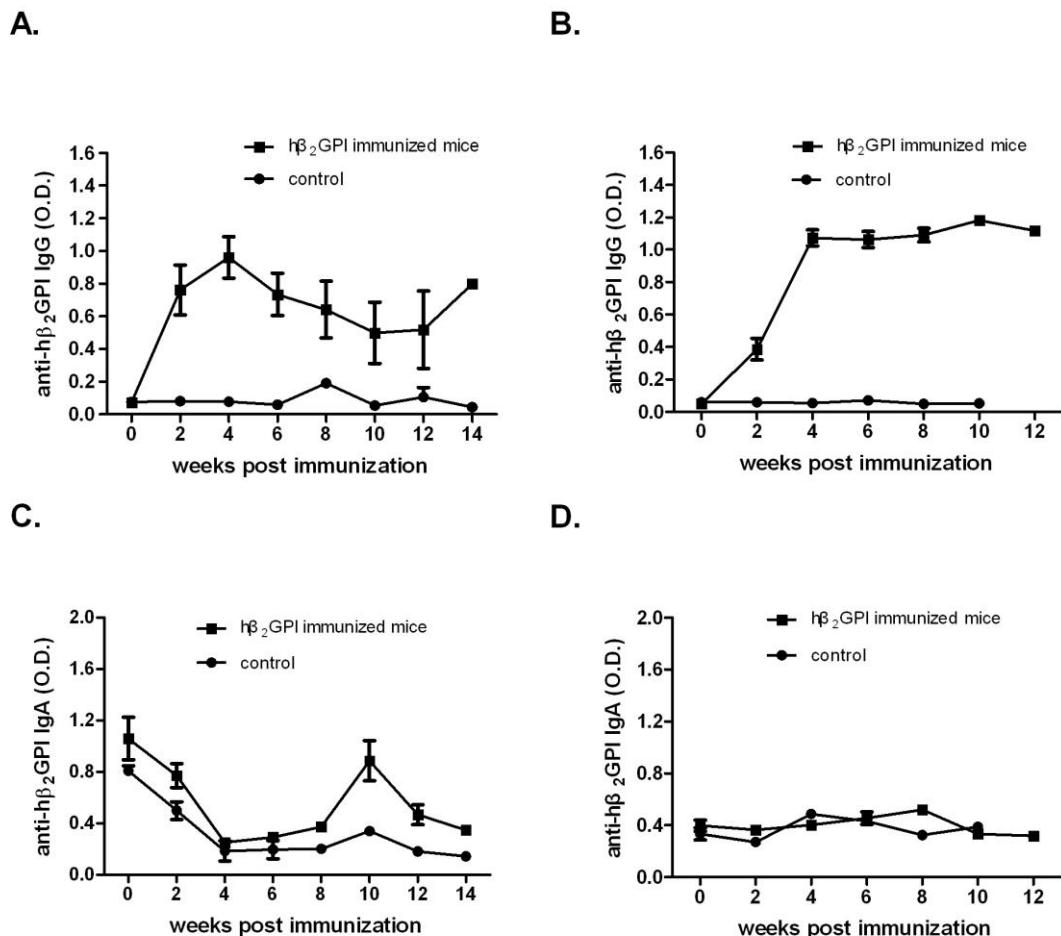


圖 八、  $h\beta_2\text{GPI}$  引發過敏性紫斑症小鼠模式之實驗程序 (1)。

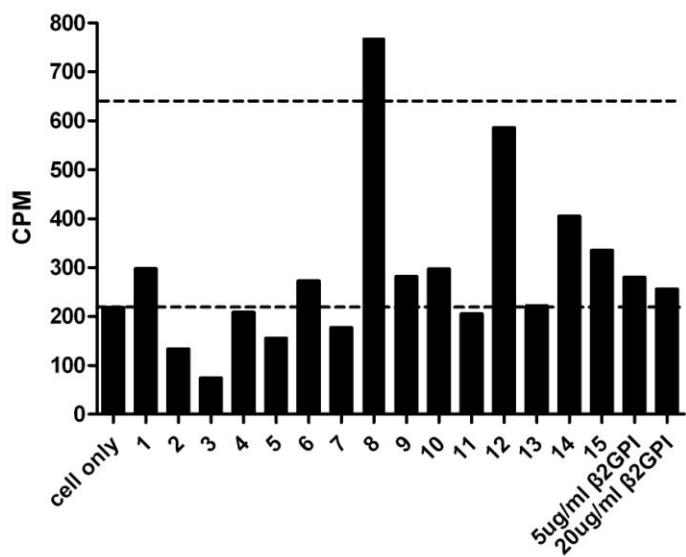
BALB/c 及 C57BL/6 小鼠，以腹腔注射 10  $\mu\text{g}$   $h\beta_2\text{GPI}$  混合於 CFA 中致敏小鼠 (200  $\mu\text{l}$ )，之後每隔兩週以 2  $\mu\text{g}$   $h\beta_2\text{GPI}$  混合於 IFA boost 小鼠 (200  $\mu\text{l}$ )，每兩週採血以取得血清測量 anti- $h\beta_2\text{GPI}$  IgG 或 IgA。並在第 6、8 及 14 週犧牲小鼠；小鼠犧牲後，取脾臟細胞做細胞增生實驗。對照組小鼠則以腹腔注射 PBS。對照組 n=2；實驗組 n=4。



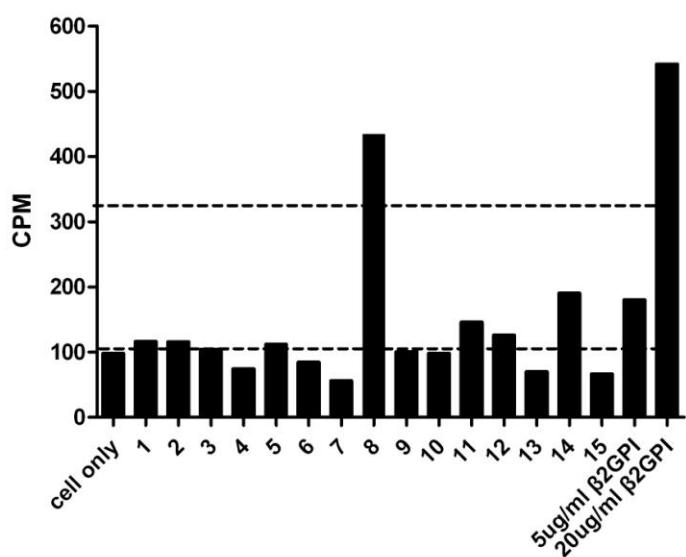
圖九、以 h $\beta_2$ GPI 致敏小鼠後之血清產生高量之 anti-h $\beta_2$ GPI IgG。

C57BL/6 (A, C)與 BALB/c (B, D) 小鼠血清中 anti-h $\beta_2$ GPI IgG (A, B) 及 IgA (C, D) 的量。小鼠不同週數的血清稀釋 (IgG 1:5000；IgA 1:3200) 後，利用 ELISA 測得 anti-h $\beta_2$ GPI IgG 或 IgA。對照組 n=2；實驗組 n=4。

### A. C57BL/6



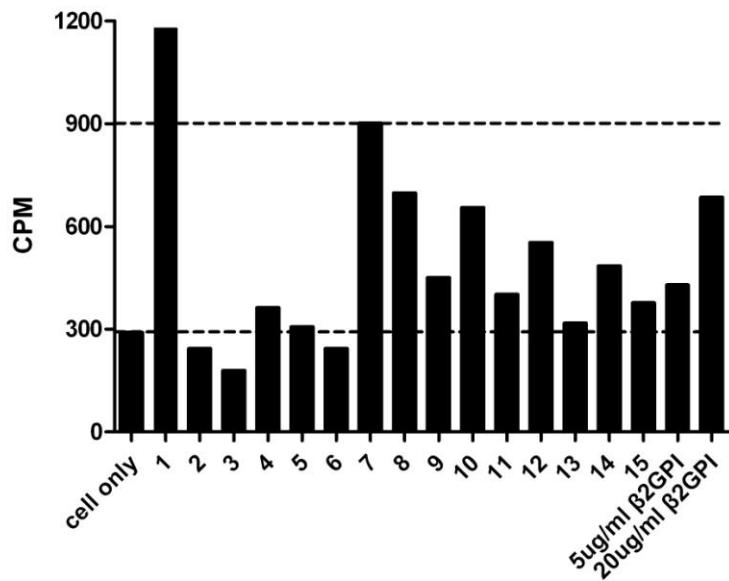
### B. BALB/c



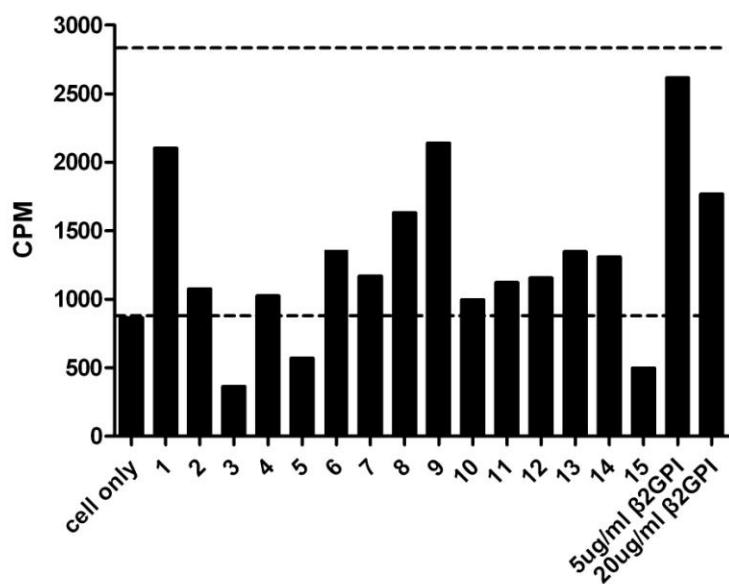
圖十、以 hβ<sub>2</sub>GPI 經三次致敏小鼠後之小鼠脾臟細胞增生。

C57BL/6 (A)小鼠或 BALB/c (B)小鼠，經三次致敏後，取得小鼠之脾臟細胞以 β<sub>2</sub>GPI 體外 (in vitro)刺激四天後，加入[<sup>3</sup>H]-thymidine16~18 小時後以 β counter 計算[<sup>3</sup>H]-thymidine 含量 (以 CPM 表示)。橫線表示以 cell only 為基線及 cell only 3 倍的 CPM。n=1。

### A. C57BL/6



### B. BALB/c



圖十一、以 h $\beta_2$ GPI 經四次致敏小鼠後之小鼠脾臟細胞增生。

C57BL/6 (A)小鼠或 BALB/c (B)小鼠，經四次致敏後，取得小鼠之脾臟細胞以  $\beta_2$ GPI 體外 (in vitro)刺激四天後，加入 $[^3\text{H}]$ -thymidine 16~18 小時後以  $\beta$  counter 計算 $[^3\text{H}]$ -thymidine 含量 (以 CPM 表示)。橫線表示以 cell only 為基線及 cell only 3 倍的 CPM。 $n=1$ 。

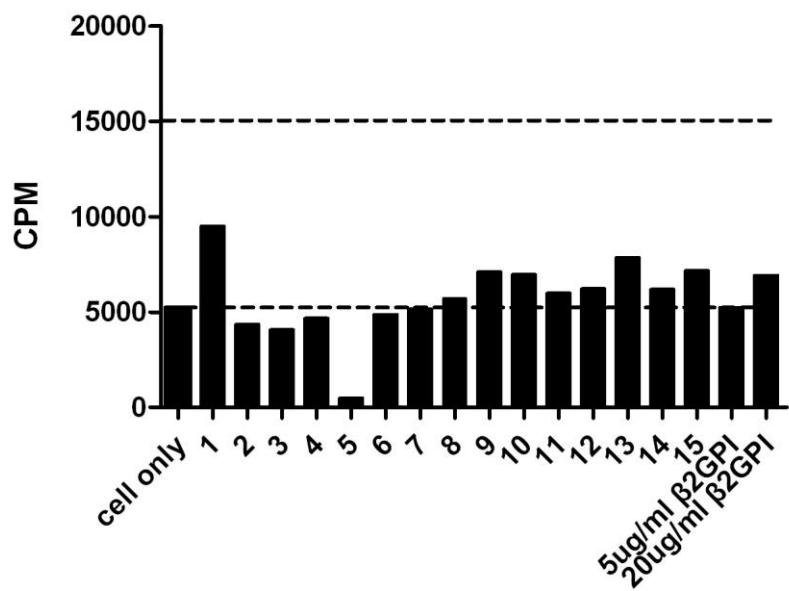


圖 十二、以 h $\beta_2$ GPI 經七次致敏小鼠後之小鼠脾臟細胞增生。

C57BL/6 小鼠，經七次致敏後，取得小鼠之脾臟細胞以  $\beta_2$ GPI 體外 (in vitro) 刺激四天後，加入 [ $^3$ H]-thymidine 16~18 小時後以  $\beta$  counter 計算 [ $^3$ H]-thymidine 含量 (以 CPM 表示)。橫線表示以 cell only 為基線及 cell only 3 倍的 CPM。n=1。

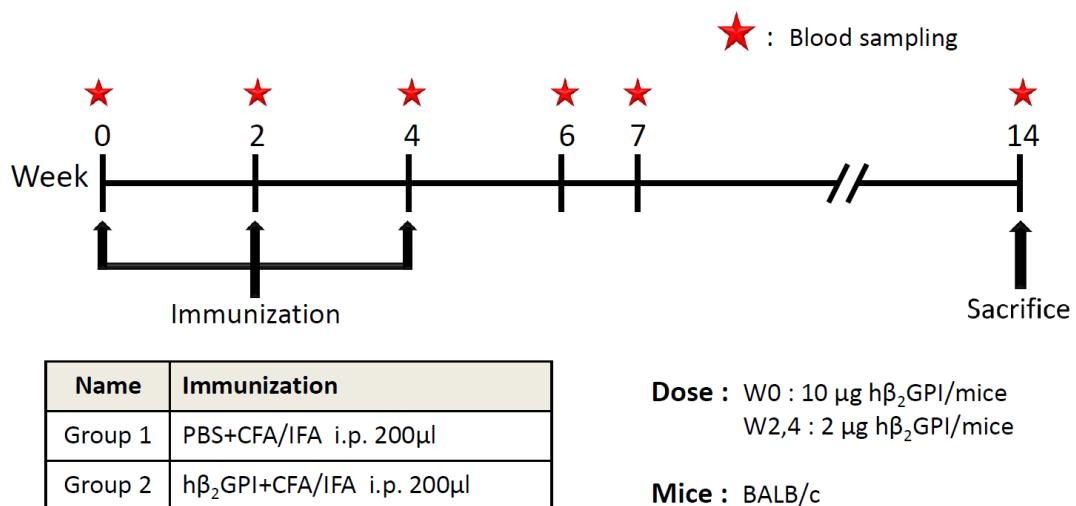
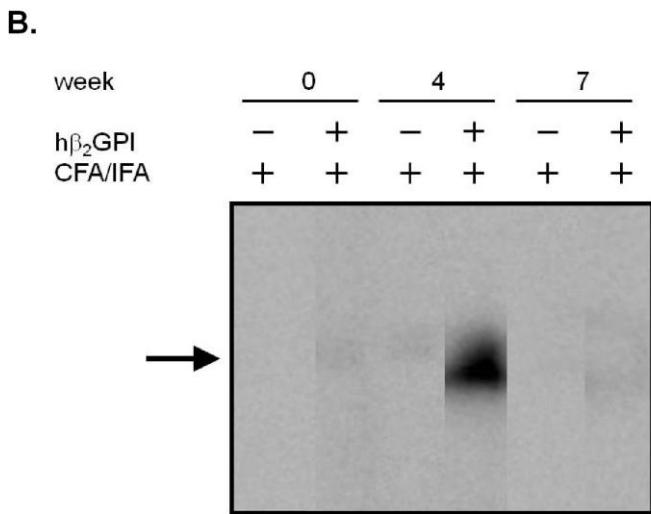
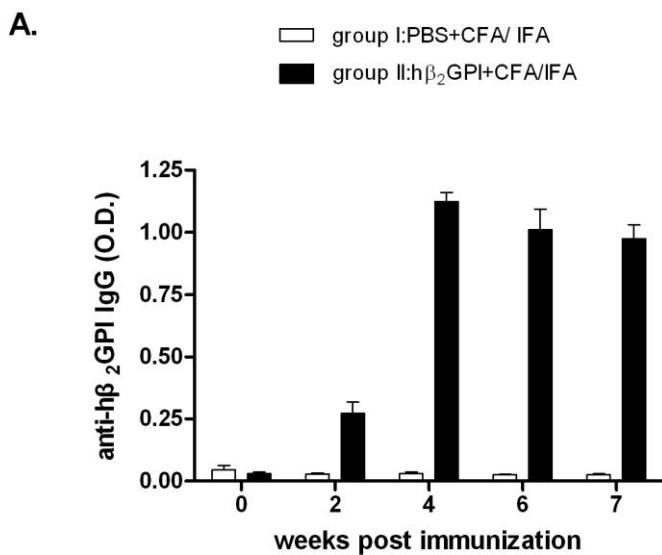


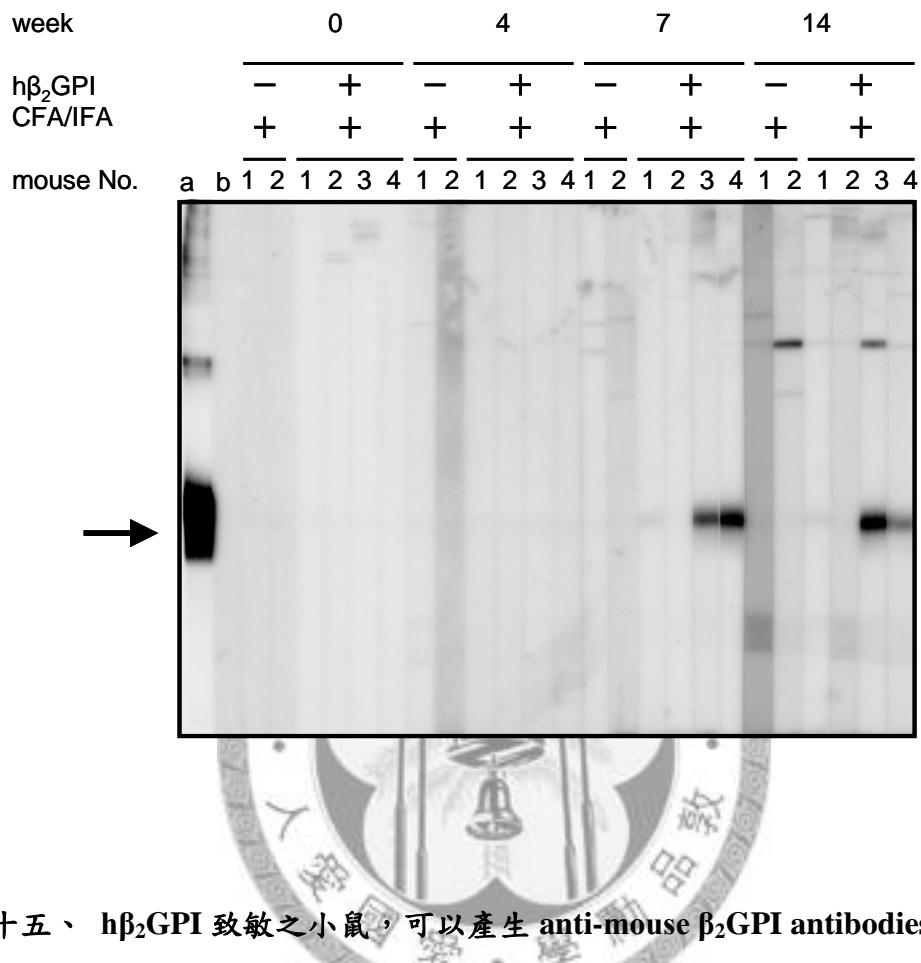
圖 十三、  $h\beta_2$ GPI 引發過敏性紫斑症小鼠模式之實驗程序 (2)。

BALB/c 小鼠分為 2 組；group 1：以腹腔注射給予 PBS 與 CFA 致敏小鼠，之後則以 IFA 致敏小鼠；group 2：以腹腔注射 10  $\mu$ g  $h\beta_2$ GPI 混合於 CFA 中致敏小鼠 (200  $\mu$ l)，之後則以腹腔注射 2  $\mu$ g  $h\beta_2$ GPI 混合於 IFA 中致敏小鼠 (200  $\mu$ l)。在第 0、2、4、6 與 7 週眼窩採血取得血清以測量血清中 anti- $h\beta_2$ GPI IgG、IgA 及 total IgA。在第 14 週犧牲小鼠；小鼠犧牲後，取下腎臟、肺、脾臟與腸做病理切片觀察病變變化。group I n=2；group II n=4。



圖十四、以 ELISA 方式測  $h\beta_2$ GPI 致敏小鼠後之敏感性比西方墨點法高。

(A)小鼠在不同天數抽取血清 1:5000 稀釋後，利用 ELISA 測得 anti- $h\beta_2$ GPI IgG。group I n=2；group II n=4。(B)以 0.5ng/lane 的 human  $\beta_2$ GPI 為樣品灌注至 SDS-PAGE 膠之凹槽內，接著轉印和 blocking 後，再以圖十三之小鼠血清以阻隔緩衝液 1:100 稀釋後為一級抗體，而二級抗體為 anti-mouse IgG。在第 4 週以腹腔注射  $h\beta_2$ GPI 混合於 CFA 或 IFA 的小鼠有產生 anti- $h\beta_2$ GPI IgG。



圖十五、 h $\beta_2$ GPI 致敏之小鼠，可以產生 anti-mouse  $\beta_2$ GPI antibodies。

以純化後之小鼠  $\beta_2$ GPI 片段蛋白為樣品灌注至 SDS-PAGE 膠之凹槽內，接著轉印和 blocking 後，再以圖十三之小鼠血清為一級抗體，而二級抗體為 anti-mouse IgG。在第 7 與 14 週，以腹腔注射 h $\beta_2$ GPI 混合於 CFA 或 IFA 的第 3 與第 4 隻小鼠有產生 anti-m $\beta_2$ GPI IgG。(a)為 positive control，以 anti-His Tag antibody 為一級抗體；(b)為 negative control，只加二級抗體。

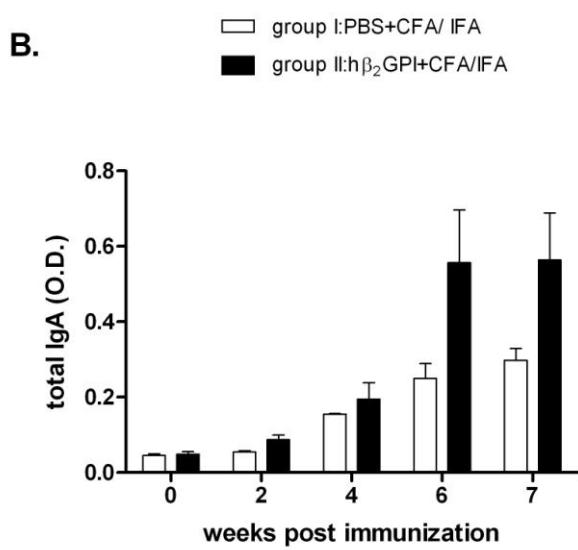
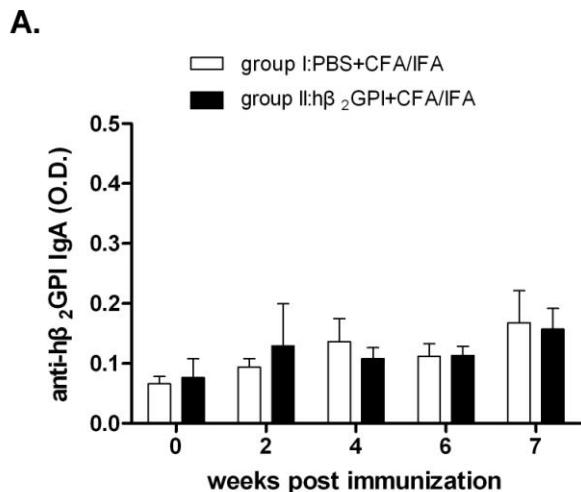
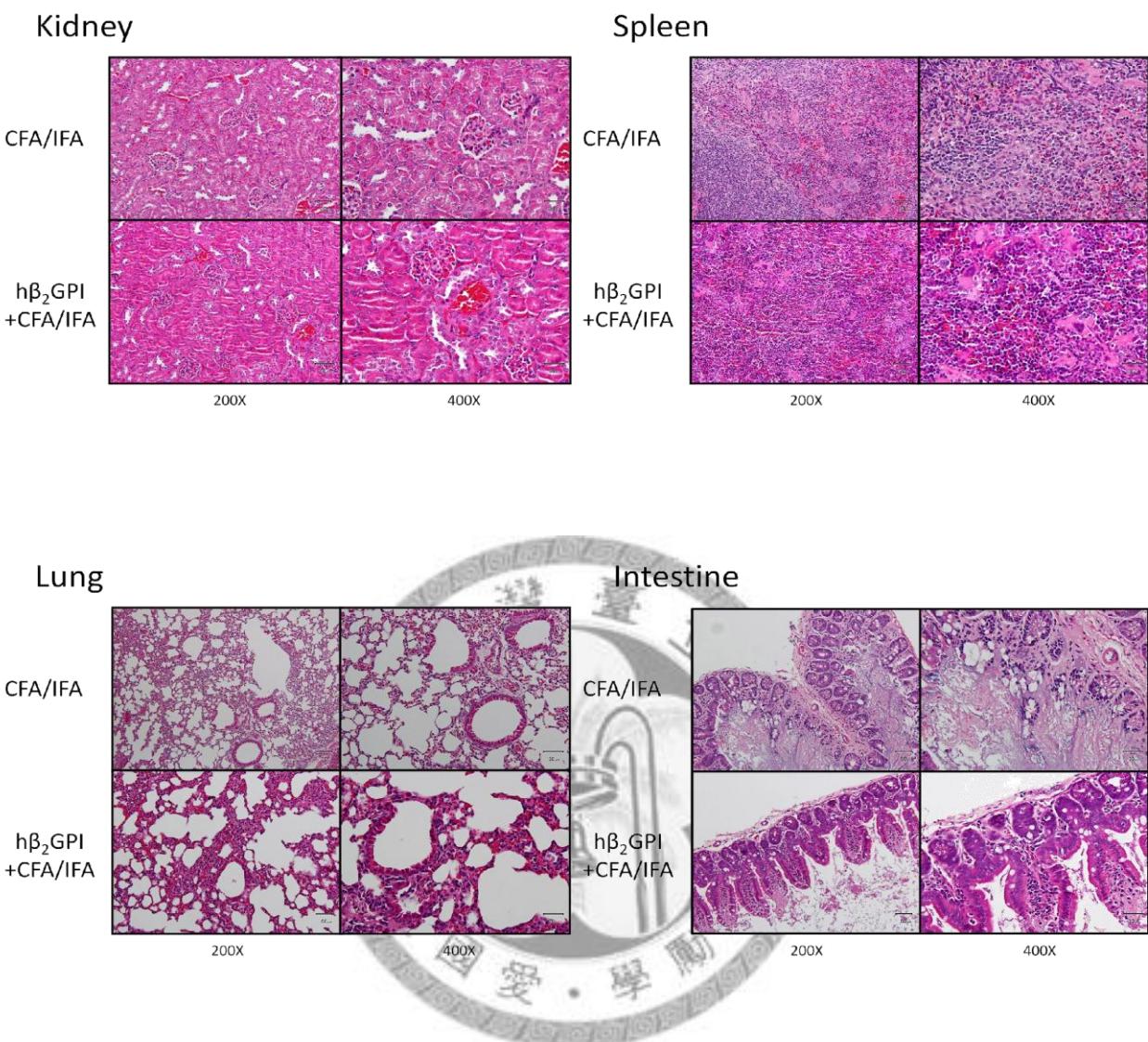


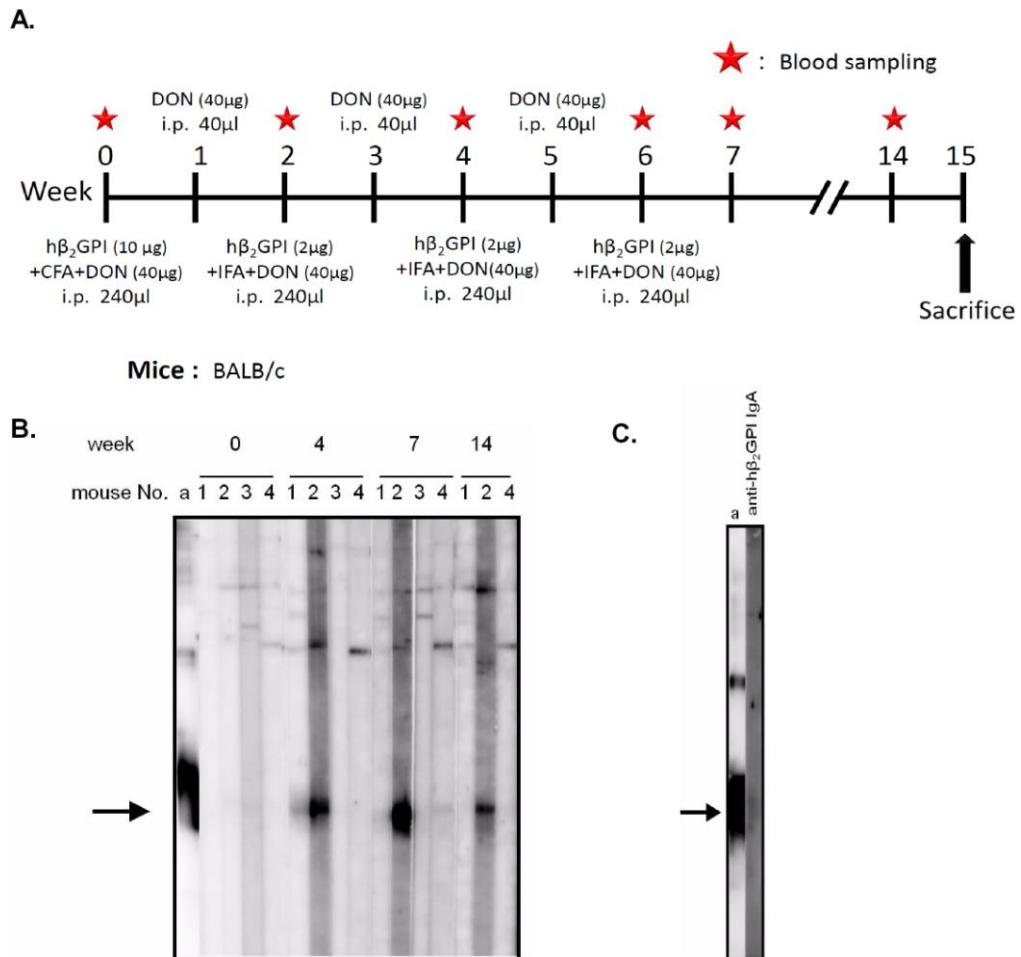
圖 十六、以  $h\beta_2$ GPI 致敏小鼠後之血清 anti- $h\beta_2$ GPI IgA 或 total IgA 無明顯差異。

小鼠在不同天數抽取血清 1:3200 稀釋 (anti- $h\beta_2$ GPI IgA)或以 1:5000 稀釋 (total IgA)後，利用 ELISA 測得 anti- $h\beta_2$ GPI IgA (A) 與 total IgA (B)。group I n=2；group II n=4。



圖十七、以 h $\beta_2$ GPI 經三次致敏後犧牲小鼠後沒有產生明顯之病理變化。

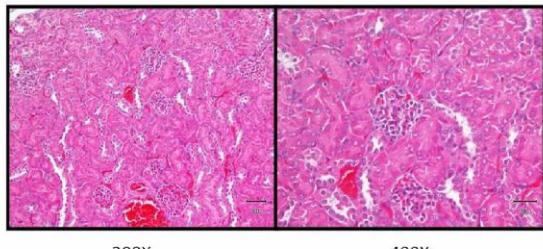
以腹腔注射 PBS 與 CFA 或 IFA 致敏小鼠與以腹腔注射 h $\beta_2$ GPI 混合於 CFA 致敏小鼠後之病理變化。



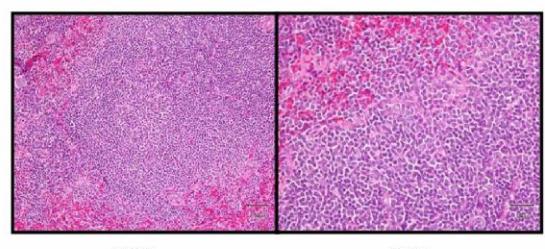
圖十八、以 h $\beta_2$ GPI 與 DON 致敏小鼠後仍無法引起小鼠的 anti-mouse  $\beta_2$ GPI IgA。

(A)以腹腔注射 10 $\mu$ g h $\beta_2$ GPI 混合於 CFA 致敏 BALB/c 小鼠，再另外以腹腔注射 40 $\mu$ g DON 致敏小鼠，之後每隔兩週以 2 $\mu$ g h $\beta_2$ GPI 混合於 IFA boost 小鼠，再以腹腔注射 40 $\mu$ g DON，每隔一週再以腹腔注射 40 $\mu$ g DON in PBS boost 小鼠。每隔兩週將小鼠眼窩採血以取得血清。(B)以純化後之片段小鼠  $\beta_2$ GPI 蛋白為樣品灌注至 SDS-PAGE 膠凹槽內，接著轉印和 blocking 後，以 (A)小鼠之血清以阻隔緩衝液 1:100 稀釋後為一級抗體，而二級抗體為 anti-mouse IgG。(C)以小鼠血清 1:25 稀釋後，二級抗體為 anti-mouse IgA。(a)為 positive control，anti-His Tag antibody 為一級抗體。n=4。

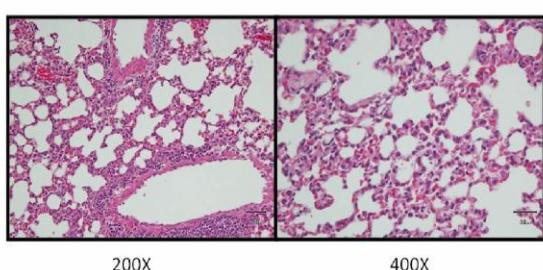
Kidney



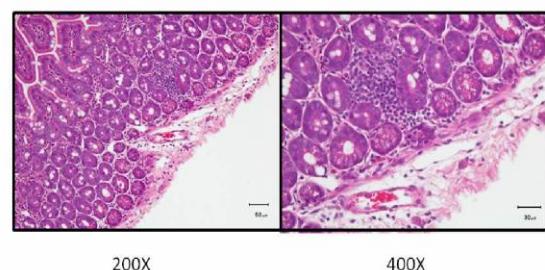
Spleen



Lung

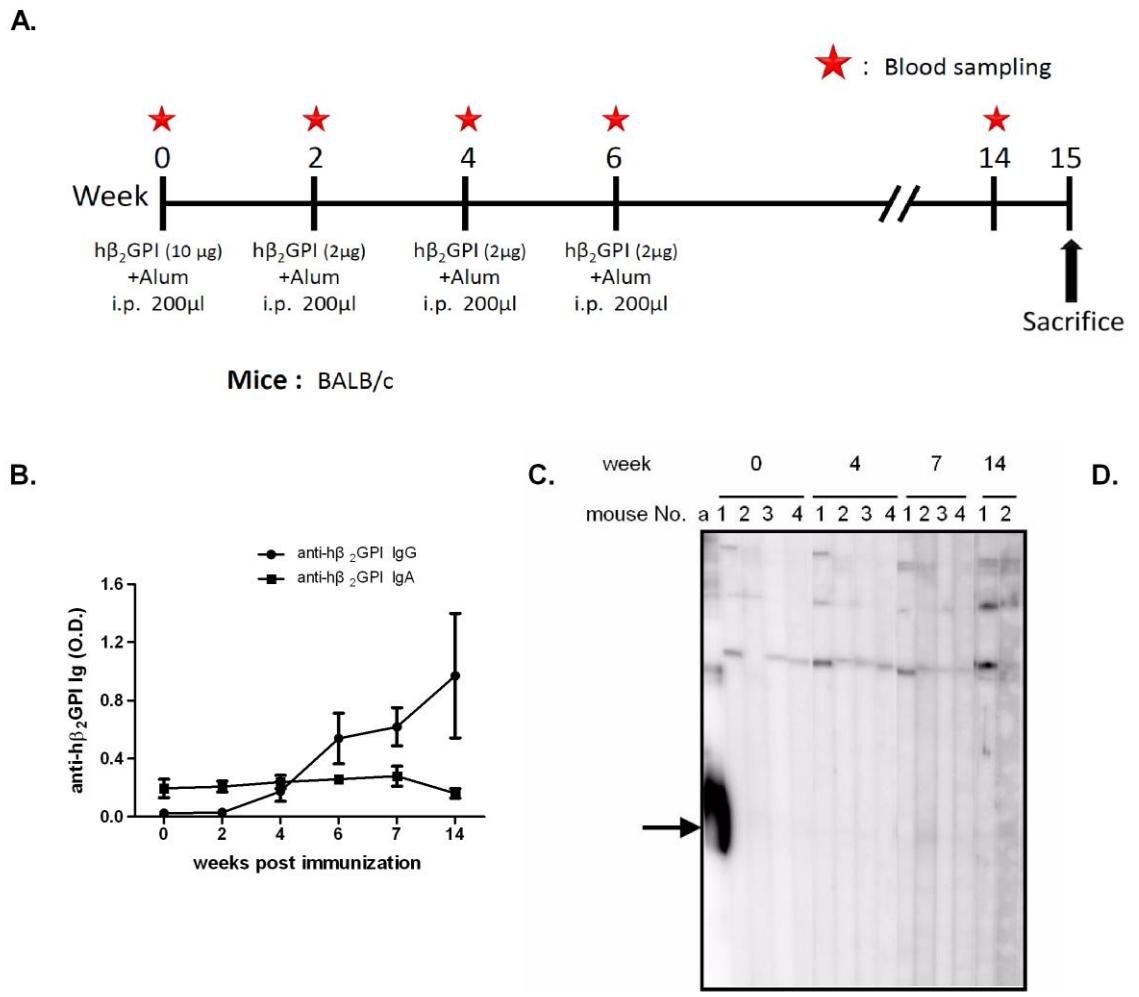


Intestine



圖十九、以  $h\beta_2GPI$  與 DON 經四次致敏後犧牲小鼠後沒有產生明顯之病理變化。

以腹腔注射  $h\beta_2GPI$  與 DON 混合於 CFA 或 IFA 致敏小鼠後之病理變化。



圖二十、以 Alum 當 adjuvant 仍然無法引發小鼠 anti-mouse  $\beta_2$ GPI IgG 與 IgA反應。

(A)以腹腔注射 10 $\mu$ g h $\beta_2$ GPI 混合於 Alum 致敏 BALB/c 小鼠，之後每隔兩週以 2 $\mu$ g h $\beta_2$ GPI 混合於 Alum boost 小鼠。每隔兩週將小鼠眼窩採以血取得血清。

(B)小鼠之血清稀釋後，以 ELISA 測得 anti-h $\beta_2$ GPI IgG 與 IgA。(C)以純化後之片斷小鼠  $\beta_2$ GPI 蛋白為樣品灌注至 SDS-PAGE 膠凹槽內，接著轉印和 blocking 後，以 (A)小鼠之血清以阻隔緩衝液 1:100 稀釋後為一級抗體，而二級抗體為 anti-mouse IgG。(D)以小鼠血清 1:25 稀釋後，二級抗體為 anti-mouse IgA。(a)為 positive control，anti-His Tag antibody 為一級抗體。n=4。

表一、人類  $\beta_2$ GPI 之 15 段胜肽 (peptide)

Peptide No.	h $\beta_2$ GPI peptide
1	MISPVLILFSSFLCHVAIAG <u>R</u> TCPKPDD
2	<u>R</u> TCPKP <u>D</u> DLPFSTVVPLKTFYEPGEEITYSCK
3	KPGYVSRGGMRKFICPLTGLWPINTLK
4	<u>K</u> CTPRFCPFAGILENGAVR
5	<u>R</u> YTTFEYPNTISFSCNTGFYLNG <u>A</u> DSAK
6	<u>DS</u> AKCTEEG <u>K</u> WSPELPVCAP
7	<u>K</u> WSPELPVCAP <u>I</u> ICPPPSIPTFATL <u>R</u> VYK
8	<u>R</u> VYKPSAGNNNSLYRD <u>T</u> AVFECLPQHAMFGND
9	<u>D</u> TITCTTHGNWTKLPEC <u>R</u> EVKCP <u>F</u> PSRP <u>D</u>
10	<u>R</u> PDNGFVNYP <u>A</u> KPTLYYKD
11	KATFGCHDGYSLDGPEEIECTKLGNWSAMPSCKASCKVP VKKATVYYQGERVKIQEK
12	FKNGMLHGDKVSFFCKN <u>K</u> EK
13	<u>K</u> EKKCSYT <u>D</u> AQC <u>I</u> DGTI
14	<u>D</u> GTIEVPKCF <u>K</u> EHSSLAFWK
15	<u>K</u> EHSSLAFWKTDASDVKPC

由生技公司合成的人類  $\beta_2$ GPI (含有 326 個胺基酸)隨機切成 15 段胜肽 (No.1-15)，底線表示重疊

## 第六章 參考文獻

1. Yang Y-H, Hung C-F, Hsu C-R, Wang L-C, Chuang Y-H, Lin Y-T, Chiang B-L. 2005. A nationwide survey on epidemiological characteristics of childhood Henoch-Schönlein purpura in Taiwan. *Rheumatology* 44: 618-22
2. Ozen S. 2002. The spectrum of vasculitis in children. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 16: 411-25
3. Saulsbury FT. 1999. Henoch-Schönlein purpura in children: report of 100 patients and review of the literature. *Medicine* 78: 395-409
4. Roberts PF, Waller TA, Brinker TM, Riffe IZ, Sayre JW, Bratton RL. 2007. Henoch-Schönlein purpura: A review article. *Southern Medical Journal* 100: 821-4
5. Saulsbury FT. 2001. Henoch-Schönlein purpura. *Current Opinion in Rheumatology* 13: 35-40
6. Yang Y-H, Chuang Y-H, Wang L-C, Huang H-Y, Gershwin ME, Chiang B-L. 2008. The immunobiology of Henoch-Schönlein purpura. *Autoimmunity Reviews* 7: 179-84
7. Casanueva B, Rodriguez-Valverde V, Luceno A. 1988. Circulating IgA producing cells in the differential diagnosis of Henoch-Schönlein purpura. *Journal of Rheumatology* 15: 1229-33
8. Yang Y-H, Huang M-T, Lin S-C, Lin Y-T, Tsai M-J, Chiang B-L. 2000. Increased transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ )-secreting T cells and IgA anti-cardiolipin antibody levels during acute stage of childhood Henoch-Schönlein purpura. *Clinical & Experimental Immunology* 122: 285-90
9. Saulsbury FT. 1999. Henoch-Schönlein purpura in children: report of 100 patients and review of the literature. *Medicine* 78: 395-409
10. Ayoub EM, McBride J, Schmiederer M, Anderson B. 2002. Role of Bartonella henselae in the etiology of Henoch-Schönlein purpura. *Pediatric Infectious Disease Journal* 21: 28-31
11. Heegaard ED, Taaning EB. 2002. Parvovirus B19 and parvovirus V9 are not associated with Henoch-Schönlein purpura in children. *Pediatric Infectious Disease Journal* 21: 31-4
12. Ha T-S. 2005. The role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in Hennoch-Schönlein purpura. *Pediatric Nephrology* 20: 149-53
13. Horii Y, Muraguchi A, Iwano M, Matsuda T, Hirayama T, Yamada H, Fujii Y, Dohi K, Ishikawa H, Ohmoto Y. 1989. Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis. *Journal of Immunology* 143: 3949-55

14. Cockwell P, Brooks CJ, Adu D, Savage COS. 1999. Interleukin-8: A pathogenetic role in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis. *Kidney International* 55: 852-63
15. Yang Y-H, Lai H-J, Kao C-K, Lin Y-T, Chiang B-L. 2004. The association between transforming growth factor- $\beta$  gene promoter C-509T polymorphism and Chinese children with Henoch-Schönlein purpura. *Pediatric Nephrology* 19: 972-5
16. Ribatti D. 2005. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *British Journal of Haematology* 128: 303-9
17. Topaloglu R, Sungur A, E B, Besbas N, U S, Bakkaloglu A. 2001. Vascular endothelial growth factor in Henoch-Schönlein purpura. *Journal of Rheumatology* 28: 2269-73
18. Mosmann TR, Coffman RL. 1989. TH1 and TH2 Cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology* 7: 145-73
19. Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. 2010. Th1 and Th17 cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1183: 211-21
20. Ferber I, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman C. 1996. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Journal of Immunology* 156: 5-7
21. Gran B, Zhang G-X, Yu S, Li J, Chen X-H, Ventura ES, Kamoun M, Rostami A. 2002. IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *Journal of Immunology* 169: 7104-10
22. Zhang G-X, Gran B, Yu S, Li J, Siglienti I, Chen X, Kamoun M, Rostami A. 2003. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor- $\beta$ 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. *Journal of Immunology* 170: 2153-60
23. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. 2009. IL-17 and Th17 cells. *Annual Review of Immunology* 27: 485-517
24. McGeachy MJ, Cua DJ. 2008. Th17 Cell Differentiation: The Long and Winding Road. *Immunity* 28: 445-53
25. Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, Dong C. 2007. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of

- inflammatory helper T cells. *Journal of Biological Chemistry* 282: 9358-63
26. Lockhart E, Green AM, Flynn JL. 2006. IL-17 production is dominated by {gamma}{delta} T cells rather than CD4 T cells during mycobacterium tuberculosis infection. *Journal of Immunology* 177: 4662-9
27. Ferretti S, Bonneau O, Dubois GR, Jones CE, Trifilieff A. 2003. IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *Journal of Immunology* 170: 2106-12
28. Starnes T, Robertson MJ, Sledge G, Kelich S, Nakshatri H, Broxmeyer HE, Hromas R. 2001. Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. *Journal of Immunology* 167: 4137-40
29. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, Johnston J, Madden K, Xu W, West J, Schrader S, Burkhead S, Heipel M, Brandt C, Kuijper JL, Kramer J, Conklin D, Presnell SR, Berry J, Shiota F, Bort S, Hambly K, Mudri S, Clegg C, Moore M, Grant FJ, Lofton-Day C, Gilbert T, Raymond F, Ching A, Yao L, Smith D, Webster P, Whitmore T, Maurer M, Kaushansky K, Holly RD, Foster D. 2000. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408: 57-63
30. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK. 2007. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. *Nature* 448: 484-7
31. Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, Ma L, Schluns K, Tian Q, Watowich SS, Jetten AM, Dong C. 2007. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448: 480-3
32. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littman DR. 2007. IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nature Immunology* 8: 967-74
33. Fina D, Sarra M, Fantini MC, Rizzo A, Caruso R, Caprioli F, Stolfi C, Cardolini I, Dottori M, Boirivant M, Pallone F, MacDonald TT, Monteleone G. 2008. Regulation of gut inflammation and Th17 cell response by interleukin-21. *Gastroenterology* 134: 1038-48.e2
34. Basso AS, Cheroutre H, Mucida D. 2009. More stories on Th17 cells. *Cell Research* 19: 399-411
35. Dardalhon V, Korn T, Kuchroo VK, Anderson AC. 2008. Role of Th1 and

- Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *Journal of Autoimmunity* 31: 252-6
36. Matthys P, Vermeire K, Mitera T, Heremans H, Huang S, Billiau A. 1998. Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of collagen-induced arthritis in IFN-gamma; receptor-deficient mice. *European Journal of Immunology* 28: 2143-51
37. Gutcher I, Urich E, Wolter K, Prinz M, Becher B. 2006. Interleukin 18-independent engagement of interleukin 18 receptor-alpha is required for autoimmune inflammation. *Nature Immunology* 7: 946-53
38. Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, Miossec P. 1999. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis & Rheumatism* 42: 963-70
39. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L. 2002. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nature Medicine* 8: 500-8
40. Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. 2003. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 52: 65-70
41. Wong CK, Lit LCW, Tam LS, Li EKM, Wong PTY, Lam CWK. 2008. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: Implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. *Clinical Immunology* 127: 385-93
42. Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N, Duquette P, Prat A. 2009. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing Th17 cells in multiple sclerosis. *Annals of Neurology* 66: 390-402
43. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* 201: 233-40
44. Zhao X-F, Pan H-F, Yuan H, Zhang W-H, Li X-P, Wang G-H, Wu G-C, Su H, Pan F-M, Li W-X, Li L-H, Chen G-P, Ye D-Q. 2010. Increased serum interleukin 17 in patients with systemic lupus erythematosus. *Molecular Biology Reports* 37: 81-5
45. Lee E, Trepicchio WL, Oestreicher JL, Pittman D, Wang F, Chamian F, Dhodapkar M, Krueger JG. 2004. Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *The Journal of Experimental Medicine* 199: 125-30

46. Teunissen MBM, Koomen CW, de Waal Malefyt R, Wierenga EA, Bos JD. 1998. Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 111: 645-9
47. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron J-C, Kastelein RA, Cua DJ, McClanahan TK, Bowman EP, de Waal Malefyt R. 2007. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nature Immunology* 8: 950-7
48. Matusevicius D, Kivisakk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, Link H. 1999. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 5: 101-4
49. Rose NR, Bona C. 1993. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunology Today* 14: 426-30
50. Beardsley DS. 2002. Pathophysiology of immune thrombocytopenic purpura. *Blood Reviews* 16: 13-4
51. Anhalt G, Labib R, Voorhees J, Beals T, Diaz L. 1982. Induction of pemphigus in neonatal mice by passive transfer of IgG from patients with the disease. *The New England Journal of Medicine* 306: 1189-96
52. Ozaltin F, Bakkaloglu A, Ozen S, Topaloglu R, Kavak U, Kalyoncu M, Besbas N. 2004. The significance of IgA class of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in childhood Henoch-Schönlein purpura. *Clinical Rheumatology* 23: 426-9
53. Saulsbury FT. 1992. Heavy and light chain composition of serum IgA and IgA rheumatoid factor in Henoch-Schönlein purpura. *Arthritis & Rheumatism* 35: 1377-80
54. Yang Y-H, Wang SJ, Chuang Y-H, Lin Y-T, Chiang B-L. 2002. The level of IgA antibodies to human umbilical vein endothelial cells can be enhanced by TNF-alpha treatment in children with Henoch-Schönlein purpura. *Clinical & Experimental Immunology* 130: 352-7
55. Miyakis S, Giannopoulos B, Krilis SA. 2004. Beta 2 glycoprotein I-function in health and disease. *Thrombosis Research* 114: 335-46
56. Bas de Laat H, Derkzen RHWM, de Groot PG. 2004.  $\beta_2$ -Glycoprotein I, the playmaker of the antiphospholipid syndrome. *Clinical Immunology* 112: 161-8
57. Sodin-Semrl S, Rozman B. 2007.  $\beta_2$ -Glycoprotein I and its clinical significance: From gene sequence to protein levels. *Autoimmunity Reviews* 6: 547-52
58. Shoenfeld Y, Meroni P-L, Gershwin ME. 2007. *Autoantibodies*. Boston:

Elsevier

59. Lopez LR, Simpson DF, Hurley BL, Eijimatsuura. 2005. OxLDL/ $\beta_2$ GPI complexes and autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, and antiphospholipid syndrome: pathogenic implications for vascular involvement. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1051: 313-22
60. Blank M, Faden D, Tincani A, Kopolovic J, Goldberg I, Gilburd B, Allegri F, Balestrieri G, Valesini G, Shoenfeld Y. 1994. Immunization with anticardiolipin cofactor (Beta-2-glycoprotein I) induces experimental antiphospholipid syndrome in naive mice. *Journal of Autoimmunity* 7: 441-55
61. Jiao X-d, Cheng S, Hu Y-h, Sun L. 2010. Comparative study of the effects of aluminum adjuvants and Freund's incomplete adjuvant on the immune response to an *Edwardsiella tarda* major antigen. *Vaccine* 28: 1832-7
62. Stils HF. 2005. Adjuvants and antibody production : dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J* 46: 280-93
63. Dong W, Pestka JJ. 1993. Persistent dysregulation of IgA production and IgA nephropathy in the B6C3F1 mouse following withdrawal of dietary vomitoxin (Deoxynivalenol). *Fundamental and Applied Toxicology* 20: 38-47
64. Pestka JJ. 2003. Deoxynivalenol-induced IgA production and IgA nephropathy-aberrant mucosal immune response with systemic repercussions. *Toxicology Letters* 140-141: 287-95
65. Pestka JJ, Moorman MA, Warner RL. 1989. Dysregulation of IgA production and IgA nephropathy induced by the trichothecene vomitoxin. *Food and Chemical Toxicology* 27: 361-8
66. Gharavi AE, Sammaritano LR, Wen J, Elkon KB. 1992. Induction of antiphospholipid autoantibodies by immunization with beta 2 glycoprotein I (apolipoprotein H). *The Journal of Clinical Investigation* 90: 1105-9
67. Katzav A, Litvinjuk Y, Pick CG, Blank M, Shoenfeld Y, Sirota P, Chapman J. 2006. Genetic and immunological factors interact in a mouse model of CNS antiphospholipid syndrome. *Behavioural Brain Research* 169: 289-93
68. Zhang F, Liang Z, Matsuki N, Van Kaer L, Joyce S, Wakeland EK, Aune TM. 2003. A murine locus on chromosome 18 controls NKT cell homeostasis and Th cell differentiation. *Journal of Immunology* 171: 4613-20
69. Zan H, Cerutti A, Dramitinos P, Schaffer A, Casali P. 1998. CD40 engagement triggers switching to IgA1 and IgA2 in human B cells through induction of endogenous TGF-beta: evidence for TGF-beta but not IL-10-dependent direct  $S\mu \rightarrow S\alpha$  and sequential  $S\mu \rightarrow S\gamma$ ,  $S\gamma \rightarrow S\alpha$  DNA recombination. *Journal of Immunology* 161: 5217-25

70. Wachsmann D, Klein JP, Scholler M, Frank RM. 1985. Local and systemic immune response to orally administered liposome-associated soluble *S. mutans* cell wall antigens. *Immunology* 54: 189-93
71. Imai H, Nakamoto Y, Asakura K, Miki K, Yasuda T, Miura AB. 1985. Spontaneous glomerular IgA deposition in ddY mice: An animal model of IgA nephritis. *Kidney International* 27: 756-61
72. Miyawaki S, Muso E, Takeuchi E, Matsushima H, Shibata Y, Sasayama S, Yoshida H. 1997. Selective breeding for high serum IgA levels from noninbred ddY mice: Isolation of a strain with an early onset of glomerular IgA deposition. *Nephron* 76: 201-7
73. Hattori N, Kuwana M, Kaburaki J, Mimori T, Ikeda Y, Kawakami Y. 2000. T cells that are autoreactive to beta2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome and healthy individuals. *Arthritis & Rheumatism* 43: 65-75





# 常見溶液與試劑配方與來源

## 一、細胞等張溶液

### 1. Hank balanced salt solution (HBSS) Sigma-Aldrich H2387

將粉末泡開成 1×濃度後，進行高溫高壓滅菌 (autoclave) 後，再利用 NaHCO<sub>3</sub> 將溶液 pH 值調成 7.2-7.4。

### 2. Phosphate buffered saline (PBS)

以下為 10× PBS 的配方：

NaCl	80g	<u>Amresco 0241</u>
KCl	2g	<u>Merck 529552</u>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.4g	<u>J.T.Baker JTB-3246-01</u>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14.4g	<u>Bionovas AS0930</u>

之後調整 pH 值至 7.2-7.4，加 ddH<sub>2</sub>O 至一升。

將 10× PBS 稀釋 10 倍後即為可使用之 1× PBS。



### 3. Tris buffered saline (TBS)

以下為 10× TBS 的配方：

Tris-base	60.5g	<u>JT-Baker JT-4099-02</u>
NaCL	90g	<u>Amresco 0241</u>

之後調整 pH 值至 7.4，加 ddH<sub>2</sub>O 至一升。

將 10× TBS 稀釋 10 倍後即為可使用之 1× TBS。

## 二、細胞培養液

### RPMI-1640 complete medium

RPMI-1640 medium	1L	<u>Thermo SH30027.02</u>
Foetal bovine serum	100ml (10%)	<u>Biological industries 04-001-1A</u>
		<u>Lot no. 215538</u>
1.5M Hepes	10ml (15mM)	<u>Amresco 0511</u>
200mM L-Glutamine	10ml (2mM)	<u>Biological industries 03-020-1B</u>
PSA (如下列所示)	10ml	<u>Biological industries 03-033-1B</u>
1000 U/ml Penicillin	(10 U/ml)	
10 mg/ml Streptomycin	(0.1 mg/ml)	
0.025mg/ml Amphotericin	(0.25 µg/ml)	

### 三、 麻醉藥

Pentobarbital sodium ; C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>3</sub> SCI pharmtech 051100  
(旭富製藥科技)

每 5mg 粉末加入 1ml PBS( 濃度為 5 mg/ml ), 並利用 0.22µm filter (TPP 99722) 過濾後即可使用。注射劑量為 50 mg/kg , 一般六至八週大小鼠體重約為 20g , 故約注射 200µl 麻醉藥。

### 四、 ELISA 所需試劑

#### 1. anti-hβ<sub>2</sub>GPI IgA 或 IgG coating buffer 與 wash buffer

1× TBS                          1L

#### 2. total IgA coating buffer

carbonate coating buffer 配方 :

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.8g	<u>Merck 106392</u>
NaHCO <sub>3</sub>	1.46g	<u>和光純藥工業株氏會社 198-01315</u>

NaN<sub>3</sub> 0.1g Ferax Art.-Nr.11 112 25194

調整 pH 值至 9.6，加 ddH<sub>2</sub>O 至 500ml。

### 3. Washing buffer (PBST)

0.05% Tween-20 in PBS 配方：

Tween-20 500μl Sigma-Aldrich P5927

1× PBS 1L

### 4. Stop solution

2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 配方：

97% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 55.56ml 和光純藥工業株氏會社 192-04696

ddH<sub>2</sub>O 944.44ml

配製時於冰上操作，將 55.56ml 的 97% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 緩緩加入約 800ml 之 ddH<sub>2</sub>O，

過程需小心硫酸放出之高熱與潑灑之問題。

將 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 以 ddH<sub>2</sub>O 稀釋為 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。

## 五、細胞表面與細胞內抗原染色所需試劑

### 0.2% BSA in PBS

BSA 0.2g Sigma-Aldrich A3059

1× PBS 100ml

## 六、SDS-PAGE 與西方墨點法所需試劑

### 1. 12% SDS-PAGE separating gel solution

ddH<sub>2</sub>O 3.3ml

40% acrylamide mix	4ml	<u>Bionovas AA0230</u>
1.5M Tris (pH8.8)	2.5ml	<u>JT-Baker JT-4099-02</u>
10% SDS	0.1ml	<u>Jersey Lab. supply 151-21-3</u>
10% ammonium persulfate	0.1ml	<u>Amersco 0486</u>
TEMED	0.004ml	<u>Bionovas AT0170</u>

## 2. 5% SDS-PAGE stacking gel solution

ddH <sub>2</sub> O	2.5ml	
40% acrylamide mix	0.83ml	<u>Bionovas AA0230</u>
0.5M Tris (pH6.8)	1.25ml	<u>JT-Baker JT-4099-02</u>
10% SDS	0.05ml	<u>Jersey Lab. supply 151-21-3</u>
10% ammonium persulfate	0.05ml	<u>Amersco 0486</u>
TEMED	0.005ml	<u>Bionovas AT0170</u>

## 3. SDS-PAGE running buffer

以下為 5× running buffer 的配方：

Tris-base	15.1g	<u>JT-Baker JT-4099-02</u>
Glycine	72g	<u>Uni-reagent UR-Gly-001</u>
SDS	5g	<u>Jersey Lab. supply 151-21-3</u>

加 ddH<sub>2</sub>O 至一升。

將 5× running buffer 稀釋 5 倍後即為可使用之 1×running buffer。

## 4. Transfer buffer

Tris-base	3.028g	<u>JT-Baker JT-4099-02</u>
-----------	--------	----------------------------

Glycine	14.4g	<u>Uni-reagent UR-Gly-001</u>
Methanol	200ml	<u>Mallinckrodt MA-3016-08</u>
加 ddH <sub>2</sub> O 至一升。		

#### 5. Blocking buffer (5% skim milk in TBST)

Skim milk	5g	<u>安佳</u>
TBST	100ml	

#### 6. Washing buffer (TBST)

0.05% Tween 20 in TBS 配方：

Tween-20	500μl	<u>Sigma-Aldrich P5927</u>
TBS	1L	

