

摘要

紅斑性狼瘡是一種自體免疫疾病，特點是具有種類繁多的自身抗體，攻擊各種細胞而造成多樣病症。其中皮膚紅斑狼瘡約佔全身性紅斑狼瘡病例之 70-85 %，照射紫外光及可見光皆會加速皮膚病變。山喜多 (MMF) 是一種黃甘單磷酸脫氫酶 (IMPDH) 抑制劑，在小鼠紅斑狼瘡動物模式及狼瘡腎炎病患中，MMF 具有顯著降低蛋白尿以及降低腎臟損傷的功效，用於治療其他皮膚疾病也具有顯著療效，但針對皮膚紅斑狼瘡的相關研究仍相當少。Desmoglein 3 (Dsg 3) 是表皮胞橋體的主要組成，是皮膚特有的自身抗原。NZB/W F1 是紅斑狼瘡的小鼠動物模式，具有和人類紅斑性狼瘡類似的自發性自體免疫疾病。為了解 MMF 對於皮膚紅斑狼瘡之療效，我們利用 UVB 引發 NZB/W F1 之皮膚病變，當紅斑狼瘡之病徵出現時，再持續以 MMF 治療。我們以免疫螢光染色法對小鼠進行狼瘡帶試驗 (lupus band test)，經 UVB 誘導的 NZB/W F1 在表皮真皮交界及真皮皆有顯著 IgG 免疫複合物沉積，但這樣的情形較少出現在經 MMF 治療的小鼠皮膚上。為進一步確定免疫複合物沉積與皮膚自身抗原有關，我們同樣利用免疫染色法偵測 Dsg 3 表現，發現經 UVB 誘導的 NZB/W F1 小鼠皮膚基底層 IgG 表現位置與 Dsg 3 表現位置相

符，但在經 MMF 治療後則無。基質金屬蛋白酶 MMP-2 及 MMP-9 的表達與皮膚中的免疫複合物沉積有關，因此我們藉由明膠電泳酵素分析法 (gelatin zymography) 及 *in situ* zymography 分析基質金屬蛋白酶 MMP-2 及 MMP-9 的表現活性，其中在經 MMF 治療後，酶原形式之 MMP-2 顯著降低。在這次的實驗中，我們成功建立了 UVB 誘導 NZB/W F1 狼瘡腎炎小鼠模式，其皮膚發炎、表皮真皮交界之免疫複合物沉澱及 Dsg 3 表現皆與人類相似。也驗證山喜多 (MMF) 可以藉由降低免疫複合物沉澱來減少皮膚基底層細胞損害。

Abstract

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by a wide variety of autoantibodies attacking various cells and causing a wide variety of signs and symptoms. Cutaneous lupus erythematosus (CLE) is a major feature of LE in 70–85% of patients. Ultraviolet light (UVA, UVB), and visible light can provoke lesions of CLE. Mycophenolate mofetil (MMF) is an inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH). In murine lupus models and lupus nephritis patients, MMF significantly reduces proteinuria and renal damage. Skin diseases have been shown to significantly improve with MMF treatment, but the reports on MMF treatment of skin manifestations of LE are still rare. Desmoglein 3 (Dsg 3), a major component of epidermal desmosomes, was identified as a skin-specific autoantigen. The New Zealand Black/White F1 (NZB/W F1) mouse is a murine model of SLE, which spontaneously develops an autoimmune disease that closely resembles human SLE. To investigate the therapeutic effects after MMF treatment in CLE, UVB-induced NZB/W F1 mice are continuously treated with MMF when the pathologic features of SLE are already present in these mice. The lupus

band test (LBT) was performed on the dorsal skin of the examined mice, IgG deposition was conspicuous at the dermal-epidermal junction and dermis in UVB-induced mice. Considering that NZB/W F1 skin have IgG deposition at the dermal-epidermal junction that is not sufficient for skin inflammation, skin-specific autoantigen, Dsg 3, plays a role in exacerbating or amplifying the skin disease. The IgG and Dsg 3 were co-located at the basal layer of UVB exposure skin of NZB/W F1 lupus mice by double immunofluorescence staining, whereas it was significantly reduced in mice with MMF treatment. Variations in matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), MMP-9 were correlated with immunocomplex deposition in skin manifestation. Gelatin zymography and *in situ* zymography are used to analyse the expression and activity of matrix metalloproteinases (MMPs). The pro-form of MMP-2 was significantly reduced after MMF treatment. In this study, we well established UVB-induced NZB/W F1 lupus mice model and identified the CLE. The skin inflammation, immunocomplex deposition at the dermal-epidermal junction and Dsg 3 expression were all mimic humanness. The therapeutic effects of MMF was directly reduced Ig deposition to attenuate damage of basal layer cells.

縮寫對照表 (Abbreviations)

ACLE	Acute cutaneous lupus erythematosus
ARA	American rheumatism association
BSA	Bovine serum albumin
CACLE	Chronic cutaneous lupus erythematosus
CSF-1	Colony stimulating factor 1
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DLE	Discoid lupus
Dsg 3	Desmoglein 3
ECM	Extracellular matrix
FITC	Fluorescein isothiocyanate
H&E stain	Hematoxylin and Eosin stain
HMGB-1	High mobility group box protein 1
ICAM-1	Inter-cellular adhesion molecule 1
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IMPDH	Inosine monophosphate dehydrogenase
LBT	Lupus band test

LTR	Lichenoid tissue reaction,
MMF	Mycophenolate mofetil
MMPs	Matrix metalloproteinases
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffer saline & Triton
PFA	Paraformaldehyde
SCLE	Subacute cutaneous lupus erythematosus
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SLE	Systemic lupus erythematosus
TNF- α	Tumour necrosis factor α
UVB	Ultraviolet radiation B
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1

第一章 緒論

第一節 全身性紅斑狼瘡與皮膚紅斑狼瘡

1. 全身性紅斑狼瘡

全身性紅斑狼瘡 (systemic lupus erythematosus, SLE) 是一種自體免疫疾病，好發於 20~40 歲之女性，屬於第三型過敏反應，特點是具有種類繁多的自身抗體，與抗原結合後形成免疫複合物，容易附著在基底膜，吸引嗜中性球引發炎症反應，且活化補體，破壞細胞，進而影響多系統器官而造成多樣病症，根據美國風濕病醫學會 (American rheumatism association, ARA) 於 1997 年修訂之紅斑狼瘡分類準則，所列 11 項診斷標準 (附錄一) 包括顴部皮疹 (malar rash) 即俗稱蝴蝶斑、圓盤狀皮疹 (discoid rash)、皮膚光敏性 (photosensitivity)、口腔或鼻咽潰瘍 (oral ulcers)、關節炎 (arthritis)、漿膜炎 (serositis)、腎功能障礙 (renal disorder)、神經系統功能異常 (neurologic disorder)、血液疾病 (hematologic disorder)、免疫失調 (immunologic disorder)、以及抗核抗體 (antinuclear antibody)，以上診斷標準中，病患如出現四項或更多症狀，即可診斷為紅斑狼瘡 (Hochberg, 1997)。在紅斑狼瘡患者及小鼠狼瘡模式中，皆有眾多細胞素網路 (cytokine network) 異常情形，此疾病中有些細胞激素被證實在病理生理學方面於某些 T

細胞、B 細胞及抗原呈現細胞 (antigen-presenting cell) 的功能障礙扮演關鍵角色。細胞激素主要參與細胞分化、成熟及活化細胞，對炎症反應具重大影響，在自體免疫疾病中，細胞激素不僅參與發生免疫調節畸變時的細胞增生，且在局部發炎反應的過程中，終致組織的損傷 (Sabry et al., 2006)。

治療紅斑狼瘡之療法仍具爭議性，現行各種治療方法包括皮質類固醇 (corticosteroids) 單一療法或配合免疫抑制劑如環孢靈 (cyclosporin A, CsA)、環磷醯胺 (cyclophosphamide)、硫唑嘌呤 (azathioprine) 和苯丁酸氮芥 (chlorambucil) 的使用 (Austin and Balow, 1999)，但長期使用類固醇治療易增加感染風險、造成不孕不育 (Buratti et al., 2001)；免疫抑制劑亦有立即性及累積性的不良影響，如骨髓抑制 (marrow suppression)、性腺毒性 (gonadal toxicity)、出血性膀胱炎 (hemorrhagic cystitis)、以及增加癌症風險 (Chan et al., 2000)。

2. 皮膚紅斑狼瘡

在全身性紅斑性狼瘡中，皮膚為自體免疫性攻擊的重要目標之一，皮膚紅斑狼瘡約佔全身性紅斑狼瘡病例之 70-85%，在全身性紅斑狼瘡中有 25-28% 的患者最早出現的病徵就是皮膚病變

(Pistiner et al., 1991)。皮膚紅斑狼瘡包括：慢性皮膚紅斑狼瘡 (chronic cutaneous lupus erythematosus, CCLE)，亞急性皮膚紅斑狼瘡 (subacute cutaneous lupus erythematosus, SCLE)，急性皮膚紅斑狼瘡 (acute cutaneous lupus erythematosus, ACLE) (Ghoreishi and Dutz, 2009)。最為常見之慢性皮膚紅斑狼瘡為圓盤紅斑狼瘡 (discoid lupus erythematosus, DLE)，特徵為錢幣狀病灶，在臉頰、鼻子及耳朵出現紅色鱗狀斑塊，患處並不發癢或疼痛，癒後患處可能留下色素沉澱且表皮變平變薄 (thinning and flattening epidermis)，如毛囊受損可能伴隨永久性毛髮脫落，從病理切片觀察圓盤紅斑狼瘡之皮膚可觀察到過度角化 (hyperkeratosis)，水腫 (edema)，在淺表及深層皆有淋巴球的浸潤 (lymphocytic infiltration)，基底膜 (basement membrane) 增厚等病變。皮膚紅斑狼瘡在臨床上有多種類型，共有的特性是在真皮發生嚴重的炎症反應，並造成表皮真皮交界處 (dermo-epidermal junction) 角質形成細胞的損傷，以及免疫複合物沉澱於表皮真皮交界處 (Crowson and Magro, 2001)，被稱為苔癬樣病變 (lichenoid tissue reaction, LTR) (Sontheimer and Gilliam, 1981; Weedon, 1982)。皮膚紅斑狼瘡之誘導分為兩個階段：(1) 啟動異常免疫反應 (2) 誘導組織損傷，在初期，紫外光、病毒、藥物及荷爾蒙這類環境因子

會觸發免疫系統，自體免疫的異常反應會造成組織的損傷。照射紫外光 (Kuhn et al., 2001; Lehmann et al., 1990; Walchner et al., 1997) 及可見光 (Sanders et al., 2003) 皆會加速紅斑狼瘡的光敏感性皮膚病變 (Cheong et al., 1994)。

3. 紅斑性狼瘡動物模式- NZB/W F1

在最近提及皮膚紅斑狼瘡的文獻中，用來研究皮膚紅斑狼瘡機制及治療方法的小鼠模式包括了 MRL/lpr, NZB/W F1, 及 BSXB 等品系。NZB/W F1 是研究紅斑狼瘡最佳的小鼠動物模式之一，係由 New Zealand Black (NZB) 及 New Zealand White (NZW) 品系小鼠雜交之第一子代，NZB 及 NZW 品系小鼠皆有遺傳上的自體免疫異常，NZB/W F1 小鼠具有遺傳自 NZB 小鼠的 B 細胞高度活化 (B cell hyperactivity)，且於一月齡可偵測到免疫球蛋白異常大量分泌，但其依賴 T 細胞的免疫反應比 NZB 小鼠更為顯著，可能是 IgM anti DNA 變成 IgG anti DNA 之成因 (Wallace and Hahn, 2007)，NZB/W F1 有和人類紅斑性狼瘡最為類似的自發性自體免疫疾病，包括抗雙股 DNA IgG 抗體 (IgG anti dsDNA)、抗染色質 (antichromatin)、抗核抗體 (antinuclear antibody, ANA)、及紅斑狼瘡細胞 (lupus erythematosus cell, LE

cell) 、B 細胞的高度活化 (hyperactivity) 、自體抗體 (autoantibodies) 、補體下降 (hypocomplementemia) 、腎小球腎炎 (nephritis) 、皮炎、關節炎、在皮膚真皮表皮交界處的免疫球蛋白沉積等。且與人類類似的是， NZB/W F1 雌性小鼠亦有較高的發病機率，NZB/W F1 小鼠通常於 5-6 月齡發病，此時可偵測到多種自體抗體，且於 10-12 月齡死於腎衰竭 (Perry et al., 2011) 。

4. 紫外光照射及皮膚病變

皮膚對陽光的異常反應是紅斑狼瘡的特徵之一，超過 70% 的患者皆具光敏感性 (photosensitivity) ，在 NZB/W F1 小鼠模式中，暴露在紫外光中 (UVB 照射) 會加速皮膚病變及免疫複合物堆積，但並不會加速全身性病變 (Horiguchi et al., 1987) 。在小鼠紅斑狼瘡之皮膚病變中，需要 T 細胞及 B 細胞參與 (Chan and Shlomchik, 1998) ，經證實， CD80 和 CD86 是關鍵的共刺激分子 (Kinoshita et al., 2000) 。長時間暴露在低量的 UVB 照射下會加速皮膚病變並且會加強皮膚狼瘡帶的強度，在血清中的 anti-DNA antibodies 亦會得到陽性反應，但腎小球腎炎並沒有受到紫外線照射的影響。

第二節 皮膚紅斑狼瘡評估指標因子

1. 免疫複合物沉澱-IgG, IgM

狼瘡帶測試 (lupus band test) ，是一種免疫螢光技術，偵測皮膚紅斑狼瘡患者之表皮真皮交界處免疫球蛋白 (IgG, IgM) 表現，免疫複合物易在皮膚膜狀結構沉澱，並與補體結合破壞細胞，進而造成皮膚病變 (Hedberg et al., 2010) ，自臨床角度來看，狼瘡帶測試為一敏感且具特異性之測試 (Eugene and Monroe, 1977)

2. 皮膚特有抗原-橋粒芯糖蛋白 3

胞橋體 (desmosome) 為表皮細胞、心肌細胞及某些其他類型細胞與細胞間的連接 (junction) ，表現於細胞膜上，且富含特定跨膜糖蛋白，特別是橋粒芯糖蛋白 (desmoglein, Dsg) 及橋粒芯膠蛋白 (desmocollin, Dsc) ，兩者皆屬於鈣離子依賴型細胞黏附分子—黏鈣素 (cadherin) 家族 (Schafer et al., 1994) ，其中橋粒芯糖蛋白有 Dsg 1、Dsg 2、及 Dsg 3 三種亞型。

天皰瘡 (pemphigus) 是一種自體免疫引起之皮膚病，與紅斑狼瘡皮膚病變近似，在尋常型天皰瘡 (pemphigus vulgaris) 患者中，自身抗體對抗 Dsg 3 而導致水泡，其肇因為位在表皮深層之基底層及基底上層之角質形成細胞 (keratinocyte) 間黏著 (cell-cell

adhesion) 受損，而表皮淺層則完好無損，經免疫螢光染色可見患者自身抗體結合到角質形成細胞表面，其中 Dsg 3 與表皮深層的免疫沉澱有關 (Amamai et al., 1996)。

在 NZB/W F1 小鼠模式中，除了出現表皮真皮交界處的免疫複合物沉澱造成皮膚的炎症，在皮膚的特異性自身抗原極有可能加劇及放大皮膚病變。橋粒芯糖蛋白 3 (desmoglein 3, Dsg 3) 是表皮細胞橋體最主要的組成，被認定為皮膚特有的自體抗原，而 anti-Dsg3 的 IgA 被發現與加重皮膚疾病最為相關 (Nishimura and Strominger, 2006)。

3. 明膠酶 — 基質金屬蛋白酶-2, 基質金屬蛋白酶-9

MMP-2 和 MMP-9 屬於明膠酶，可降解膠原蛋白 (collagen) 及層黏連蛋白 (laminin) (Kahari and Saarialho-Kere, 1997)，在細胞外基質 (extracellular matrix, ECM) 的轉換 (turnover) 中扮演重要角色 (Overall, 2002)。假如 MMPs 在微環境 (microenvironment) 中增加，會藉由降解膜及細胞外基質而使免疫複合物得以更容易留在膜上進而產生病變 (Overall and Butler, 2007)，過去文獻亦指出在皮膚紅斑狼瘡患者中，MMP-9 蛋白表現會受到炎症細胞的調控而上升 (Hedberg et al., 2010; Järvinen et al., 2007)。

第三節 新型免疫抑制藥-山喜多

1. 新型免疫抑制藥物-山喜多 (Mycophenolate mofetil, MMF, CellCept; Roche Laboratories)

山喜多 (MMF) 為 mycophenolic acid (MPA) 之前驅藥物 (prodrug)，MPA 在 1970s 被用於治療銀屑病，在 1970s 因大多數病人產生噁心、嘔吐、腹瀉、痙攣之副作用及誘發腫瘤之疑慮而停用 (Epinette et al., 1987)，直至數十年後 MMF 的出現，具較高生物有效性 (bioavailability) 且減少腸胃道副作用，在移植領域被使用在防止腎臟及心臟移植排斥反應及預防肝臟排斥反應 (Hartmann and Enk, 2005)，之後 MMF 開始被應用在治療各種皮膚炎症，包括牛皮癬、自體免疫疾病之水泡、皮炎及結締組織疾病 (Orvis et al., 2009)。

2. 山喜多作用機轉

MMF 是一種黃甘單磷酸脫氫酶 (inosine monophosphate dehydrogenase, IMPDH) 之抑制劑，黃甘單磷酸脫氫酶是參與從頭合成 (de novo) 鳥糞嘌呤的酵素 (Allison and Eugui, 1996; Lui et al., 2002)，具有兩種異構物，Type I 表現於大部分的細胞，Type

II 表現於活化的淋巴細胞。相較於 Type II，山喜多對於 Type I 具有五倍強效的抑制作用 (Kuiper-Geertsma and Derksen, 2003)，T 細胞與 B 細胞的增生極為依賴鳥糞嘌呤從頭合成，而其他類型細胞則可利用救援路徑 (salvage pathway) 進行增生 (Corna et al., 1997)，因此山喜多是一種具選擇性且有效的免疫抑制藥物，無致突變作用 (Allison and Eugui, 1996) 且較少引起性腺功能喪失及嚴重副作用 (Jonsson et al., 1999)。

3. 山喜多臨床療效

過去有研究及臨床報告指出，在小鼠動物紅斑狼瘡動物模式及狼瘡腎炎病患中，MMF 具有顯著降低蛋白尿以及降低腎臟損傷的功效 (Jonsson et al., 1999; Van Bruggen et al., 1998; Dooley et al., 1999; Glicklich and Acharya, 1998; Ramos et al., 2003)，且可能對難以治療的血液病變及皮膚病變有療效 (Mok, 2007)，但目前仍缺乏利用 MMF 治療紅斑狼瘡皮膚病變之相關研究。其他皮膚的疾病例如大皰型類天皰瘡、天皰瘡、牛皮癬、過敏性皮炎等，皆已證明經由 MMF 治療後有顯著療效 (Geilen et al., 2000; Nihtyanova et al., 2007)，MMF 在亞急性皮膚紅斑狼瘡也是成功治療皮膚病變的療法，使用硫唑嘌呤 (azathioprine) 及抗瘧疾藥

(antimalarials) 皆無效之兩例亞急性紅斑狼瘡病患在每日口服 MMF 治療後幾星期內皮膚病變便消失，且顯示良好耐受性，(Schanz et al., 2002)，然而山喜多在皮膚紅斑狼瘡之治療中所扮演的角色仍須更進一步的研究。

第四節 研究動機

雖然在 SLE 小鼠模式中，MMF 已被證明有效防止病變發展，但其治療 SLE 的確切的細胞及分子機制仍不清楚，尤其在皮膚狼瘡方面，更需進一步研究。為了深入了解 MMF 對皮膚紅斑狼瘡的療效，我們使用 NZB/W F1 小鼠作為模式動物，測量其蛋白尿指數確定發病後用 UVB 誘導 NZB/W F1 小鼠皮膚病變，並在皮膚出現肉眼病理特徵時持續以 MMF 做治療，犧牲後藉由觀察各評估指標因子來判定 MMF 對皮膚紅斑狼瘡之療效。

第二章 材料與方法

第一節 實驗材料

一. 動物模式與處理

1. NZB/W F1 小鼠

本實驗之實驗動物照護及使用皆依循美國國家衛生研究所指南及台中榮民總醫院動物研究準則。自 Jason Lab 購入 11 週齡雌性 NZB/W F1 小鼠，飼養於台中榮民總醫院動物房，每籠安置 4~5 隻，自由飲水及攝食，保持恆溫 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 及濕度 $60 \pm 10\%$ ，維持 12 小時之晝夜循環 (於 07:30–19:30 照明)，令其適應環境後，於 22 週齡蛋白尿顯現時進行實驗。將實驗動物隨機分為兩組，正常對照組以及山喜多治療組，兩組皆以紫外光誘導皮膚病變。

2. 蛋白尿測定

蛋白尿評估係藉由 URiSCAN® (YD Diagnostics, Yong-In, Korea) 蛋白尿試紙檢測，分為 0-4 四級，“0 級”表示無蛋白尿，“1 級”代表蛋白尿值介於 30-100 毫克/分升，“2 級”代表蛋白尿值介於 100-300 毫克/分升，“3 級”代表蛋白尿值介於 300-1000 毫克/分升，“4 級”代表蛋白尿值大於 1000 毫克/分升。

3. 皮膚紫外光照射

NZB/W F1 小鼠經背部剃毛後，利用紫外燈照射箱 (UV cross linker CL-1000, UVP Inc., Upland, USA) ，以 500 mJ/cm^2 UVB 每周照射兩次，持續照射 190 天。(Horiguchi et al., 1987)

4. 山喜多治療

經紫外光照射 50 天， NZB/W F1 小鼠出現皮膚紅斑狼瘡病徵，將實驗動物隨機分為兩組，控制組以及山喜多處理組，其中山喜多處理組利用山喜多 (Mycophenolate mofetil, MMF, CellCept; Roche Laboratories, Nutley, NJ) 每日管餵 60 毫克/公斤，持續至紫外光照射 190 天。

5. 犧牲及採樣

小鼠以高濃度 CO_2 進行安樂死，進行常規肉眼皮膚形態學檢查，背側皮膚一半以 10 % 中性福馬林溶液固定，製作石蠟切片並以蘇木紫及伊紅 (H&E stain) 染色進行病理觀察。另一半凍存於 -70°C ，另切背側中央寬度約 3-5 mm 之皮膚檢體以組織冰凍包埋劑包埋，以製作冷凍切片，依實驗需求以每片 5-8 μm 厚度進行免疫螢光染色。

二. 化學藥品、試劑與耗材

1. 免疫染色用抗體標示筆 (PAP pen, BioGenex, San Ramon, CA)
2. 10% 甲醛
3. 封片液 (Vectashield mounting medium with DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA)
4. 免疫載玻片 (Glass slides, SuperFrost Plus[®]; Menzel Gläser, Braunschweig, Germany)
5. 蓋玻片 (Cover glasses, Superior Marienfeld, Lauda- Königshofen, Germany)
6. 明膠酶/膠原蛋白酶試劑盒 (EnzChek gelatinase/collagenase assay kit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)
7. 組織冰凍切片包埋劑 (Tissue-freezing medium, Jung Tissue Freezing Medium; Leica Microsystems, Nussloch, Germany)
8. 病理切片刀 (Disposable microtome blades, Model 818; Leica Microsystems, Nussloch, Germany)
9. 蛋白尿試紙 (Urine strip, URiSCAN[®]; YD Diagnostics, Yong-In, Korea)

三. 重要器材與儀器

1. 電源供應器 (Power supply, MP-300V; Major Science, Taiwan)
2. 冷凍切片機 (Cryostat, Leica CM3050S; Leica Microsystems, Nussloch, Germany)
3. 雷射掃描共軛焦顯微影像系統 (Confocal Laser Scanning Microscope, Olympus FV 1000; Tokyo, Japan)
4. 紫外燈照射箱 (UV cross linker CL-1000, UVP Inc., Upland, USA)

第二節 實驗方法

一、組織免疫染色

1. 免疫球蛋白沉澱偵測

以小鼠背側皮膚進行狼瘡帶試驗 (lupus band test, LBT)。將厚度為 5 μm 之小鼠背側皮膚冷凍切片於室溫晾乾後以 4% PFA (paraformaldehyde/1X PBS) 固定，以 PBS 潤洗後與以 rhodamine 標記之抗鼠 IgG 抗體及以帶有 FITC 螢光標記之抗鼠 IgM 抗體作用，以帶有 DAPI 之封片液封片，並在雷射掃描共軛焦顯微鏡下觀察，平均每片隨機拍攝 3 至 5 個視野。

2. Dsg 3 與免疫複合物沉澱免疫雙染色

- 偵測NZB/W F1小鼠皮膚組織之橋粒芯糖蛋白 3

將厚度為 5 μm 之 NZB/W F1 小鼠背側皮膚冷凍切片於室溫晾乾後以 4 % PFA (paraformaldehyde/1X PBS) 覆蓋過組織，於室溫作用 3 分鐘固定，以 PBS 潤洗兩次，每次 10 分鐘，再使用免疫染色用抗體標示筆 (PAP pen, BioGenex, San Ramon, CA) 圈起組織，將一級抗體 goat anti dsg 3 (C-16) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA) 以 PBST 配製之 5% 脫脂牛奶稀釋 1 : 200 倍，覆蓋過組織後置於 4 °C 冰箱避光作用一夜，次日於室溫回溫 1 小時，以 PBS 潤洗兩次，每次 10 分鐘，再用二級抗體 donkey anti goat-FITC (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA) 以 PBST 配製之 5 % 脫脂牛奶稀釋 1:200 倍，覆蓋過組織後於室溫作用 1 小時，以 PBS 潤洗兩次，每次 10 分鐘，將 Texas Red[®] anti-mouse IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 抗體以 PBST 配製之 5% 脫脂牛奶稀釋 1:100 倍，覆蓋過組織後置於 4 °C 冰箱避光作用一夜，次日於室溫回溫 1 小時，以 PBS 潤洗兩次，每次 10 分鐘，以帶有 DAPI 之封片液封片，於雷射掃描共軛焦顯微鏡下觀察，平均每片隨機拍攝 3 至 5 個視野。

二、 原位明膠酶譜法 (*in situ* zymography)

將厚度為 8 μm 之小鼠背側皮膚冷凍切片於室溫晾乾後以 PBS 潤洗兩次，每次 10 分鐘，再使用免疫染色用抗體標示筆 (PAP pen, BioGenex, San Ramon, CA) 圈起組織，使用明膠酶/膠原蛋白酶試劑盒 (EnzChek gelatinase/collagenase assay kit, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 進行染色 (Hedberg et al., 2010)，以下步驟皆依循廠商之比例稀釋操作，將 DQ gelatin 試劑以 1.0 mL 二次水稀釋，於 50 °C 水浴超音波震盪 5 分鐘，再以 reaction buffer 稀釋 10 倍，覆蓋過組織後於 37 °C 避光作用 2 小時，以 PBS 潤洗一次以 4 % PFA (paraformaldehyde/1X PBS) 覆蓋過組織，於室溫作用 10 分鐘固定，以 PBS 潤洗一次，以帶有 DAPI 之封片液封片，於雷射掃描共軛焦顯微鏡下觀察，平均每片隨機拍攝 3 至 5 個視野。

三、 明膠電泳酵素分析法

取約 3 mm²之冷凍皮膚組織，以無菌器械剪碎後加入 600 μL 裂解緩衝液 (Pro-prep protein extraction solution, Intron Biotech, Seoul, Korea)，以 1 cc : 7.9 g 比例加入無菌 1.6 mm 鋼珠，使用磁珠攪拌機 (Bullet Blender, Next Advance, Averill Park, NY, USA) 以

5-6 單位速度攪拌 1 分鐘後至於冰上休息 3-5 分鐘避免過熱，重複 3-4 次使組織被充分打散，置於冰上作用 20 分鐘，用離心機 (Microfuge 22R, Beckman Coulter, Fullerton, CA) 在 4 °C 下以 12,000 rpm 離心 10 分鐘，吸取上清液作為原液，用牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 作標準曲線 (standard curve) 以校正濃度，以二次水稀釋原液並加入適量 protein assay dye (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 混合均勻後以分光光度計 (Beckman DU 7400 spectrophotometer) 偵測波長 595 nm 之吸光值，以二次水校正至相同濃度後取 12 µg 加入 5 X loading dye，於 95 °C 加熱 10 分鐘使蛋白變性，致於冰上冷卻後，進行 SDS-PAGE 膠體電泳，採用 0.1 % gelatin-8 % sepagating 膠體，以 80 伏特 (volt) 進行電泳，於 sepagating 膠體部分切換至 110 伏特，視蛋白分離狀態適時拆下膠體，將其浸泡於清洗液 (washing buffer) 中作用 20 分鐘兩次，再浸泡於反應液 (reaction buffer) 在 37 °C 環境下作用一夜，於次日以染色液作用 20 分鐘，再以褪色液退染兩次，每次 30 分鐘，當條帶可清楚看見時，利用掃描機 (Epson Perfection 3200 scanner, Epson, Long Beach, CA) 掃描後以電泳影像分析軟體 (Gel-Pro Analyzer 4.0, Media Cybernetics, Silver Spring, MD) 分析基質金屬蛋白酶之相對表現量。

四、統計分析

上述實驗所得實驗數據，皆採用 Sigma stat 3.5 電腦統計套裝軟體中之無母數分析 (nonparametric test) 之 Mannan-Whitney test 進行統計分析，客觀分析各實驗數據間是否達到顯著差異 ($p < 0.05$)。

第三章 結果

臨床發現與存活率

17 週齡之 NZB/W F1 小鼠所偵測到的蛋白尿自 1 級提高到 2 級，在 20 週齡時，約 50% 的 NZB/W F1 小鼠之蛋白尿達到 2 級，此時開始進行紫外光之照射 (day 1)，於照射 50 天時，可於小鼠背側皮膚觀察到輕度黑色素沉澱，此時開始隨機分為控制組及使用山喜多做治療之組別。在照射到 98 天左右，開始有部分 NZB/W F1 小鼠死亡，在最後經由紫外光照射 190 天，於肉眼觀察 NZB/W F1 小鼠背側皮膚可見控制組有明顯水腫及較多皺褶 (圖一 A)，山喜多處理組則較少此情形 (圖一 B)。控制組的 NZB/W F1 小鼠存活率顯著下降至 35.7% (5/14) (圖二 A)，而經由山喜多治療的 NZB/W F1 小鼠存活率則為 81.8% (9/11) (圖二 B)，在其中，控制組 NZB/W F1 小鼠有 78.6% 蛋白尿達 2 級，但經山喜多處理之 NZB/W F1 小鼠蛋白尿皆低於 2 級。

組織病理診斷

經紫外光誘導之 NZB/W F1 小鼠皮膚皆有皮下水腫及輕度淋巴球浸潤 (圖三 A)，在經由山喜多處理的 NZB/W F1 小鼠真皮得

以減少炎症細胞的浸潤 (圖三 B) 。控制組之 NZB/W F1 小鼠真皮的膠原蛋白密度相較於經山喜多處理之 NZB/W F1 小鼠有增加之情況，且控制組表皮有角化不全，山喜多處理組則少異常增生。

免疫複合物沉積

利用免疫螢光染色 IgG, IgM 偵測免疫複合物於表皮真皮交界處之沉澱，經控制組之 NZB/W F1 小鼠表皮真皮交界處可見明顯免疫複合物沉澱 (圖四 A-C)，但在經山喜多治療後之 NZB/W F1 小鼠身上較為減少 (圖四 D-F)。控制組及山喜多處理組間表皮真皮交界處的 IgG 表現量具有顯著差異 ($p < 0.05$) (圖五 A)，而 IgM 表現量，控制組較山喜多處理組有較高趨勢，但未達顯著差異 (圖五 B)。

免疫複合物沉積及橋粒芯糖蛋白 3 之表現

藉由 IgG 及 Dsg 3 (desmoglein 3, Dsg3) 抗體雙染免疫螢光染色偵測表皮真皮交界處 Dsg 3 與 IgG 表現，可見 IgG 表現於表皮真皮交界處 (圖六 A, E)，及 Dsg 3 於表皮及表皮真皮交界處之表現 (圖六 B, F)，並可觀察 IgG 與 Dsg 3 表現相符位置 (圖六

C-H) ，其中在未經山喜多治療之紫外光誘導皮膚病變 NZB/W F1 小鼠可觀察到於基底層有明顯 IgG 表現，以及表皮 Dsg 3 表現位置 (圖六 A-D) ，由 (圖六 C) 圖可見 Dsg 3 在表皮真皮交界處之表現位置，由 (圖六 D) 圖可見 Dsg 3 表現位置與 IgG 大量表達位置重疊部分，但在經山喜多處理之 NZB/W F1 小鼠身上則無觀察到此情況 (圖六 G, H) 。

明膠酶-基質金屬蛋白酶 2,9 (MMP-2 及 MMP-9) 表現

利用原位明膠酶譜法偵測 NZB/W F1 小鼠皮膚明膠酶之表現，可見經紫外光照射後於表皮與表皮真皮交界處有明顯明膠酶活性，且皮膚因水腫增厚，表皮亦異常增生 (圖七 A) ，而在經由山喜多處理後之 NZB/W F1 小鼠身上則有減弱情形 (圖七 B) ，利用影像分析螢光強度定量亦有顯著差異 ($P<0.001$) (圖七 C) 。進一步利用明膠電泳酵素分析法對 MMP-2 與 MMP-9 分析 (圖八 A) ，定量後可發現，在山喜多處理前後 MMP-9 之表現皆無明顯差異，但 MMP-2 表現量在山喜多治療前皆比治療後要來的高，其中酶原形式之 MMP-2 具有顯著差異 ($P<0.05$) (圖八 B) 。

第四章 討論

皮膚紅斑狼瘡在臨床上有多種類型，共有的特性是在真皮發生嚴重的炎症反應，並造成表皮真皮交界處的角質形成細胞損傷 (Crowson and Magro, 2001)。在初期，紫外光這類環境因子會觸發免疫系統，自體免疫的異常反應會造成組織的損傷。在最近提及皮膚紅斑狼瘡的文獻中，用來研究皮膚紅斑狼瘡機制及治療方法的小鼠模式包括了 MRL/lpr, NZB/W F1, 及 BSXB 等品系。在過去研究中指出，經反覆照射紫外光後，非肥胖型糖尿病小鼠會延緩清除細胞凋亡碎片 (apoptotic debris) 並產生大量自體免疫抗體。人類角質形成細胞在凋亡後會釋放出鈣網蛋白 (calreticulin) 與 C1 補體成分 C1q 作結合，進而增加細胞吞噬作用 (Taylor et al., 2000)。

在全身性紅斑狼瘡患者中，有 40% 被發現產生鈣網蛋白自體免疫抗體造成巨噬細胞吞噬功能減弱的情況。因此，有策略性的提高清除凋亡產生的細胞殘骸，例如去氧核糖核酸水解酶療法 (DNase therapy)，或許可用於治療皮膚紅斑狼瘡 (Yasutomo et al., 2001)。MRL/lpr 小鼠皮膚經紫外光照射會引發集落刺激因子 1 (colony stimulating factor 1, CSF-1) 上升，集落刺激因子是主要的巨噬細胞發育調結者，進而造成皮膚的白血球浸潤，此模式與人

類皮膚紅斑狼瘡類似 (Menke et al., 2008) 。

高遷移率族蛋白 1 (high mobility group box protein 1, HMGB1) 是一種與 DNA 結合之核蛋白，由單核球及巨噬細胞所釋放，是促進炎症反應的細胞激素。在正在發展的皮膚紅斑狼瘡病變中，HMGB1 的表現在人類皮膚經紫外光照射 48 小時後會達到高峰。在凋亡細胞中，含有 HMGB1 的核體被證明能夠誘導 IL-1, IL-6, IL-10 及 TNF 的分泌。對 MRL/lpr 小鼠或人類來說，血清中 HMGB1 的增加與疾病的發展有關 (Jiang and Pisetsky, 2008) 。

在 MRL/lpr 小鼠中，腫瘤壞死因子 TNF α 具有向上調節內皮細胞中的細胞間黏附因子 1 (inter-cellular adhesion molecule 1, ICAM-1) 以及血管細胞黏附因子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 在皮膚表現之作用 (Kuroiwa and Lee, 1998) ，這些因子不斷增加的情形對於皮膚病變的發展是必要的 (Norman et al., 2008) 。相較於正常人，紅斑狼瘡之病患的 B 淋巴球會自發性地生成較大量的免疫球蛋白，細胞白介素 6 (interleukin-6, IL-6) 能夠刺激 B 細胞分化，直接誘導 IgG-anti-DNA 抗體分泌，並且促進毒殺 T 細胞 (cytotoxic T cell) 的分化。紅斑狼瘡病患在經過 UVA 或 UVB 照射後會有釋放

IL-6 之反應，此反應可能促進皮膚的損傷 (Pelton et al., 1992) 。暴露在 UVB 下的皮膚病變會因干擾素相關的蛋白表現而延長並加劇 (Reefman et al., 2008) 。皮膚紅斑狼瘡患者的角質形成細胞會釋放出腫瘤壞死因子來刺激 IL-18 表現進而誘導細胞凋亡 (Wang et al., 2008) 。

MRL/lpr 小鼠之免疫球蛋白在表皮真皮交界處沉積的機率，在 5 月齡之後會提高到 80 % (Furukawa et al., 1984; Horiguchi et al., 1986) ，皮膚的膜狀結構能與染色質抗體複合物 (chromatin-IgG complex) 結合，向上調節皮膚膜狀結構之表現可能增加免疫複合物的結合能力，反之降低其表現對發生免疫複合物沉積的器官有益 (Hedberg et al., 2010) 。

在本實驗中，我們建立以 UVB 誘導皮膚病變的 NZB/W F1 小鼠模型，以蛋白尿測試確定發病，且在經由 MMF 治療的 NZB/W F1 小鼠蛋白尿指數有較低趨勢，存活率亦較未經 MMF 治療之小鼠要高。再以組織病理診斷確定其皮膚病變，包括皮膚炎症反應、皮下水腫、角化不全及異常增生、增厚，我們的結果顯示在經山喜多治療後，皮膚較少炎症細胞浸潤及水腫、異常增生。以狼瘡帶測試偵測在表皮真皮交界處的免疫複合物沉積，其中由於長時間誘導小鼠皮膚病變，主要之免疫複合物為 IgG ，且

在經過山喜多治療後， IgG 免疫複合物沉澱亦明顯減少。

過去治療紅斑狼瘡多使用類固醇作為全身性的治療，雖具顯著療效但許多患者為皮膚病變及副作用所苦，因此有必要尋求替代療法，山喜多是具選擇性且有效的免疫抑制劑，對性腺的影響較小。

由於自體免疫抗體的產生，橋粒芯糖蛋白 3 (desmoglein 3, Dsg 3) 表現致病性及免疫抗原性，但並沒有直接證據顯示 Dsg 3 在發展中的皮膚紅斑狼瘡具有致病作用，在過去研究 NZB/W F1 小鼠模式中，除了出現表皮真皮交界處的免疫複合物沉澱造成皮膚的炎症，在皮膚的特異性自身抗原極有可能加劇及放大皮膚病變。

為了解在皮膚紅斑狼瘡中免疫複合物沉澱與皮膚自身抗原 Dsg 3 是否有關，利用免疫螢光染色可見皮膚經紫外光照射的 NZB/W F1 小鼠，在基底層觀察到之 Dsg 3 的表現位置與 IgG 免疫複合物沉澱大量表現之部位相符合，但在經山喜多治療的小鼠身上則無此情形，可見免疫球蛋白確實與自身抗原 Dsg 3 結合。

利用原位明膠酶譜法偵測 MMP-2 及 MMP-9，可見經紫外光誘導的小鼠皮膚表皮真皮交界處有大量明膠酶活性，此情形在經山喜多處理的小鼠身上大為減少，印證明膠酶的表現極有可能影響皮膚基底膜構造且與免疫複合物沉澱有關，在進一步以明膠電泳法定量 MMP-2 及 MMP-9 之活性表現後，發現 MMP-9 表現量

並無明顯差異，酶原形式之 MMP-2 在以山喜多治療後有顯著減少情形，而活化態之 MMP-2 雖未達顯著差異，但 $P = 0.052$ ，因此我們推論山喜多影響的明膠酶類型主要為 MMP-2。

在本實驗中，我們建立以 UVB 誘導皮膚病變的 NZB/W F1 小鼠模型，NZB/W F1 小鼠以山喜多治療後降低蛋白尿指數並提高存活率，且減少皮膚炎症反應及水腫、異常增生情形，IgG 免疫複合物沉澱亦明顯減少，其中亦減少 IgG 免疫複合物與自身抗原 Dsg 3 的結合，山喜多亦降低明膠酶 MMP-2 之表現，由此驗證山喜多可藉由降低免疫複合物沉澱來減少皮膚基底層細胞損害，且可能與 MMP-2 的活性降低有關。

Reference

1. Allison, A.C. and Eugui, E.M. (1996) Purine metabolism and immunosuppressive effects of mycophenolate mofetil (MMF). *Clin Transplant. 10:77-84.*
2. Amagai, M., Koch, P.J., Nishikawa, T., and Stanley, J.R. (1996) Pemphigus vulgaris antigen (desmoglein 3) is localized in the lower epidermis, the site of blister formation in patients. *J Invest Dermatol. 106(2):351-5.*
3. Austin, H.A. and Balow, J.E. (1999) Natural history and treatment of lupus nephritis. *Semin Nephrol. 19:2-11.*
4. Buratti, S., Szer, I.S., Spencer, C.H., Bartosh, S., and Reiff, A. (2001) Mycophenolate mofetil treatment of severe renal disease in pediatric onset systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol. 28(9):2103-8.*
5. Chan, O. and Shlomchik, M.J. (1998) A new role for B cells in systemic autoimmunity: B cells promote spontaneous T cell activation in MRL-lpr/lpr mice. *J Immunol. 160:51-9.*
6. Chan, T.M., Li, F.K., Tang, C.S., Wong, R.W., Fang, G.X., Ji, Y.L., Lau, C.S., Wong, A.K., Tong, M.K., Chan, K.W., and Lai, K.N. (2000) Efficacy of mycophenolate mofetil in patients with diffuse

- proliferative lupus nephritis. Hong Kong-Guangzhou Nephrology Study Group. *N Engl J Med.* 343(16):1156-62.
7. Cheong, W.K., Hughes, G.R., Norris, P.G., Hawk, J.L. (1994) Cutaneous photosensitivity in dermatomyositis. *Br J Dermatol.* 131(2):205-8.
 8. Corna, D., Morigi, M., Facchinetti, D., Bertani, T., Zoja, C., and Remuzzi, G. (1997) Mycophenolate mofetil limits renal damage and prolongs life in murine lupus autoimmune disease. *Kidney Int.* 51(5):1583-9.
 9. Crowson, A.N. and Magro, C. (2001) The cutaneous pathology of lupus erythematosus: a review. *J Cutaneous Pathology.* 28(1):1-23.
 10. Dooley, M.A., Cosio, F.G., Nachman, P.H., Falkenhain, M.E., Hogan, S.L., Falk, R.J., and Hebert, L.A. (1999) Mycophenolate mofetil therapy in lupus nephritis: clinical observations. *J Am Soc Nephrol.* 10(4):833-9.
 11. Epinette, W.W., Parker, C.M., Jones, E.L., and Greist, M.C. (1987) Mycophenolic acid for psoriasis. A review of pharmacology, long-term efficacy, and safety. *J Am Acad Dermatol.* 17: 962–971.
 12. Eugene, W. and Monroe, M.D. (1977) Lupus Band Test. *Arch*

Dermatol. *113*:830-834.

13. Furukawa, F., Tanaka, H., Sekita, K., Nakamura, T., Horiguchi, Y., and Hamashima, Y. (1984) Dermatopathological studies on skin lesions of MRL mice. *Arch Dermatol Res.* *276*(3):186-94.
14. Geilen, C.C., Orfanos-Boeckel, H., Offermann, G., and Orfanos, C.E. (2000) Mycophenolate mofetil: a new immunosuppressive drug in dermatology and its possible uses. *Hautarzt.* *51*(2):63-9.
15. Ghoreishi, M. and Dutz, J.P. (2009) Murine models of cutaneous involvement in lupus erythematosus. *Autoimmun Rev.* *8*(6):484-7.
16. Glicklich, D. and Acharya, A. (1998) Mycophenolate mofetil therapy for lupus nephritis refractory to intravenous cyclophosphamide. *Am J Kidney Dis.* *32*:318-22.
17. Hartmann, M. and Enk, A. (2005) Mycophenolate mofetil and skin diseases. *Lupus.* *14* Suppl 1:s58-63.
18. Hedberg, A., Fismen, S., Fenton, K.A., Mortensen, E.S., and Rekvig, O.P. (2010) Deposition of chromatin-IgG complexes in skin of nephritic MRL-lpr/lpr mice is associated with increased local matrix metalloprotease activities. *Experimental Dermatology.* *19*: e265–e274.

19. Hochberg, M. C. (1997) Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 40(9):1725.
20. Horiguchi, Y., Furukawa, F., and Imamura, S. (1986) Ultrastructural observations of skin lesions in MRL mice--dermal infiltrations and capillary changes. *J Dermatol.* 13(6):440-7.
21. Horiguchi, Y., Furukawa, F., Ohshio, G., Horio, T., and Imamura, S. (1987) Effects of ultraviolet light irradiation on the skin of MRL/l mice. *Arch Dermatol Res.* 279:478–83.
22. Järvinen, T.M., Kanninen, P., Jeskanen, L., Koskenmies, S., Panelius, J., Hasan, T., Ranki, A., and Saarialho-Kere, U. (2007) Matrix metalloproteinases as mediators of tissue injury in different forms of cutaneous lupus erythematosus. *Br J Dermatol.* 157:970–980.
23. Jiang, W. and Pisetsky, D.S. (2008) The induction of HMGB1 release from RAW 264.7 cells by transfected DNA. *Mol Immunol.* 45(7):2038-44.
24. Jonsson, C.A., Svensson, L., and Carlsten, H. (1999) Beneficial effect of the inosine monophosphate dehydrogenase inhibitor mycophenolate mofetil on survival and severity of

- glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus (SLE)-prone MRLlpr/lpr mice. *Clin Exp Immunol.* 116(3):534-41.
25. Kahari, V.M., Saarialho-Kere, U. (1997) Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol.* 6:199–213.
26. Kinoshita, K., Tesch, G., Schwarting, A., Maron, R., Sharpe, A.H., and Kelley, V.R. (2000) Costimulation by B7-1 and B7-2 is required for autoimmune disease in MRL-Fas^{lpr} mice. *J Immunol.* 164:6046–56.
27. Kuhn, A., Sonntag, M., Richter-Hintz, D., Oslislo, C., Megahed, M., Ruzicka, T., and Lehmann, P. (2001) Phototesting in Lupus Erythematosus Tumidus—Review of 60 Patients. *Photochem Photobiol.* 73(5):532-536.
28. Kuiper-Geertsma, D.G. and Derksen, R.H. (2003) Newer drugs for the treatment of lupus nephritis. *Drugs.* 63(2):167-80.
29. Kuroiwa, T. and Lee, E.G. (1998) Cellular interactions in the pathogenesis of lupus nephritis: the role of T cells and macrophages in the amplification of the inflammatory process in the kidney. *Lupus.* 7(9):597-603.

30. Lehmann, P., Holzle, E., Kind, P., Goerz, G., and Plewig, G. (1990)
Experimental reproduction of skin lesions in lupus erythematosus by
UVA and UVB radiation. *J. Am. Acad. Dermatol.* 22:181-187.
31. Lui, S.L., Tsang, R., Wong, D., Chan, K.W., Chan, T.M., Fung, P.C.,
and Lai, K.N. (2002) Effect of mycophenolate mofetil on severity of
nephritis and nitric oxide production in lupus-prone MRL/lpr mice.
Lupus. 11(7):411-8.
32. Menke, J., Hsu, M.Y., Byrne, K.T., Lucas, J.A., Rabacal, W.A.,
Crocker, B.P., Zong, X.H., Stanley, E.R., and Kelley, V.R. (2008)
Sunlight Triggers Cutaneous Lupus through a CSF-1-Dependent
Mechanism in MRL-Fas^{lpr} Mice. *J Immunol.* 181, 7367 -7379.
33. Mok, C. C. (2007) Mycophenolate mofetil for non-renal
manifestations of systemic lupus erythematosus: a systematic review.
Scand J Rheumatol. 36(5):329-37.
34. Nihtyanova, S.I., Brough, G.M., Black, C.M., and Denton, C.P.
(2007) Mycophenolate mofetil in diffuse cutaneous systemic
sclerosis--a retrospective analysis. *Rheumatology (Oxford).*
46(3):442-5.
35. Nishimura, H. and Strominger, J.L. (2006) Involvement of a

- tissue-specific autoantibody in skin disorders of murine systemic lupus erythematosus and autoinflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(9):3292-7.
36. Norman, M.U., James, W.G., and Hickey, M.J. (2008) Differential roles of ICAM-1 and VCAM-1 in leukocyteendothelial cell interactions in skin and brain of MRL/*faslpr* mice. *J Leukoc Biol.* 84(1):68-76.
37. Orvis, A.K., Wesson, S.K., Breza, T.S.Jr., Church, A.A., Mitchell, C.L., and Watkins, S.W. (2009) Mycophenolate mofetil in dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 60(2):183-99; quiz 200-2.
38. Overall, C.M. (2002) Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Mol Biotechnol.* 22: 51–86.
39. Overall, C.M. and Butler, G.S. (2007) Protease yoga: extreme flexibility of a matrix metalloproteinase. *Structure.* 15:1159–1161.
40. Pelton, B.K., Hylton, W., and Denman, A.M. (1992) Activation of IL-6 production by UV irradiation of blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 89(2):251-4.

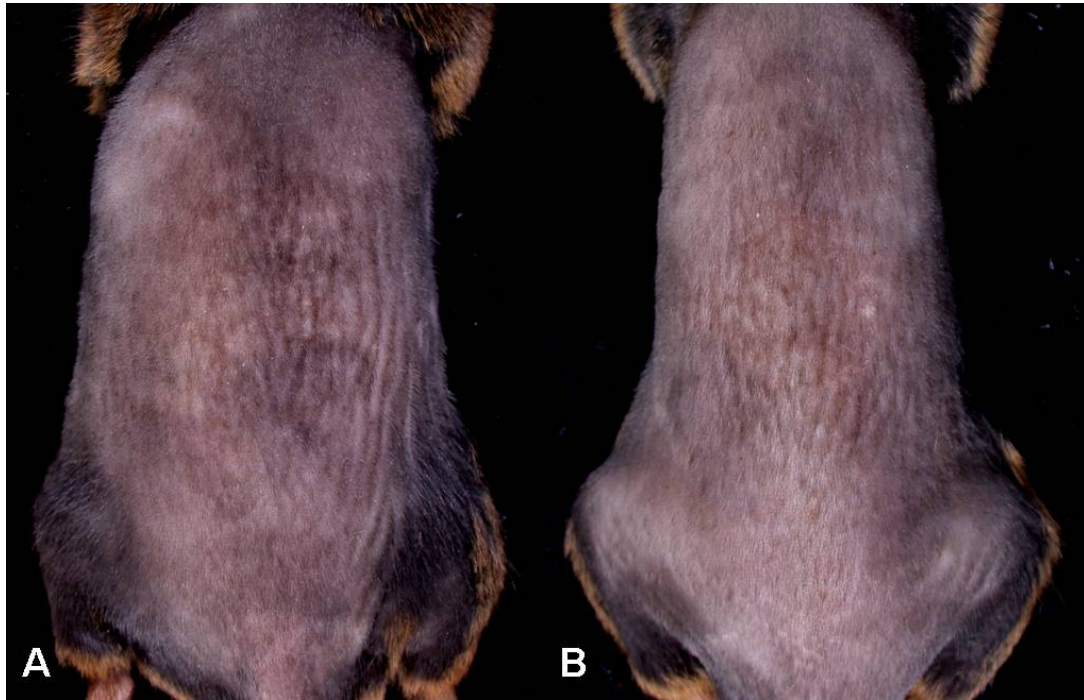
41. Perry, D., Sang, A., Yin, Y., Zheng, Y.Y., and Morel, L. (2011) Murine models of systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 271694.
42. Pistiner, M., Wallace, D.J., Nessim, S., Metzger, A.L., and Klinenberg, J.R. (1991) Lupus erythematosus in the 1980s: a survey of 570 patients. *Semin Arthritis Rheum.* 21:55–64.
43. Ramos, M.A., Pinera, C., Setien, M.A., Buelta, L., de Cos, M.A., de Francisco, A.L., Merino, R., and Arias, M. (2003) Modulation of autoantibody production by mycophenolate mofetil: effects on the development of SLE in (NZB x NZW) F1 mice. *Nephrol Dial Transplant.* 18(5):878-83.
44. Reefman, E., Kuiper, H., Limburg, P.C., Kallenberg, C.G., and Bijl, M. (2008) Type I interferons are involved in the development of ultraviolet B-induced inflammatory skin lesions in systemic lupus erythaematosus patients. *Ann Rheum Dis.* 67(1):11-18.
45. Sabry, A., Sheashaa, H., El-Husseini, A., Mahmoud, K., Eldahshan, K.F., George, S.K., Abdel-Khalek, E., El-Shafey, E.M., and Abo-Zenah, H. (2006) Proinflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-6) in Egyptian patients with SLE: its correlation with disease

- activity. *Cytokine*. 35(3-4):148-53.
46. Sanders, C.J.G., Van Weelden, H., Kazzaz, G.A.A., Sigurdsson, V., Toonstra, J., and Bruijnzeel-Koomen, C.A.F.M. (2003) Photosensitivity in patients with lupus erythematosus: a clinical and photobiological study of 100 patients using a prolonged phototest protocol. *Br J Dermatol*. 149(1):131-137.
47. Schafer, S., Koch, P.J., and Franke, W.W. (1994) Identification of the ubiquitous human desmoglein, Dsg2, and the expression catalogue of the desmoglein subfamily of desmosomal cadherins. *Exp Cell Res*. 211(2):391-9.
48. Schanz, S., Ulmer, A., Rassner, G., and Fierlbeck, G. (2002) Successful treatment of subacute cutaneous lupus erythematosus with mycophenolate mofetil. *Br J Dermatol* . 147(1):174-8.
49. Sontheimer, R.D. and Gilliam, J.N. (1981) Immunologically mediated epidermal cell injury. *Springer Semin Immunopathol*. 4:1-15.
50. Taylor, P.R., Carugati, A., Fadok, V.A., Cook, H.T., Andrews, M., Carroll, M.C., Savill, J.S., Henson, P.M., Botto, M., and Walport, M.J. (2000) A hierarchical role for classical pathway complement

- proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. *J Exp Med.* 192(3):359-66.
51. Van Bruggen, M.C., Walgreen, B., Rijke, T.P., and Berden, J.H. (1998) Attenuation of murine lupus nephritis by mycophenolate mofetil. *J Am Soc Nephrol.* 9:1407-15.
52. Walchner, M., Messer, G., and Kind, P. (1997) Phototesting and photoprotection in LE. *Lupus.* 6: 167-174.
53. Wallace, D.J. and Hahn, B.H. (Eds.). (2007). *Dubois' Lupus Erythematosus.* (7th ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
54. Wang, D., Drenker, M., Eiz-Vesper, B., Werfel, T., and Wittmann, M. (2008) Evidence for a pathogenetic role of interleukin-18 in cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 58(10):3205-15.
55. Weedon, D. (1982) The lichenoid tissue reaction. *Int J Dermatol.* 21: 203–6.
56. Yasutomo, K., Horiuchi, T., Kagami, S., Tsukamoto, H., Hashimura, C., Urushihara, M., and Kuroda, Y. (2001) Mutation of *DNASE1* in people with systemic lupus erythematosus. *Nature Genetics.* 28, 313-314.

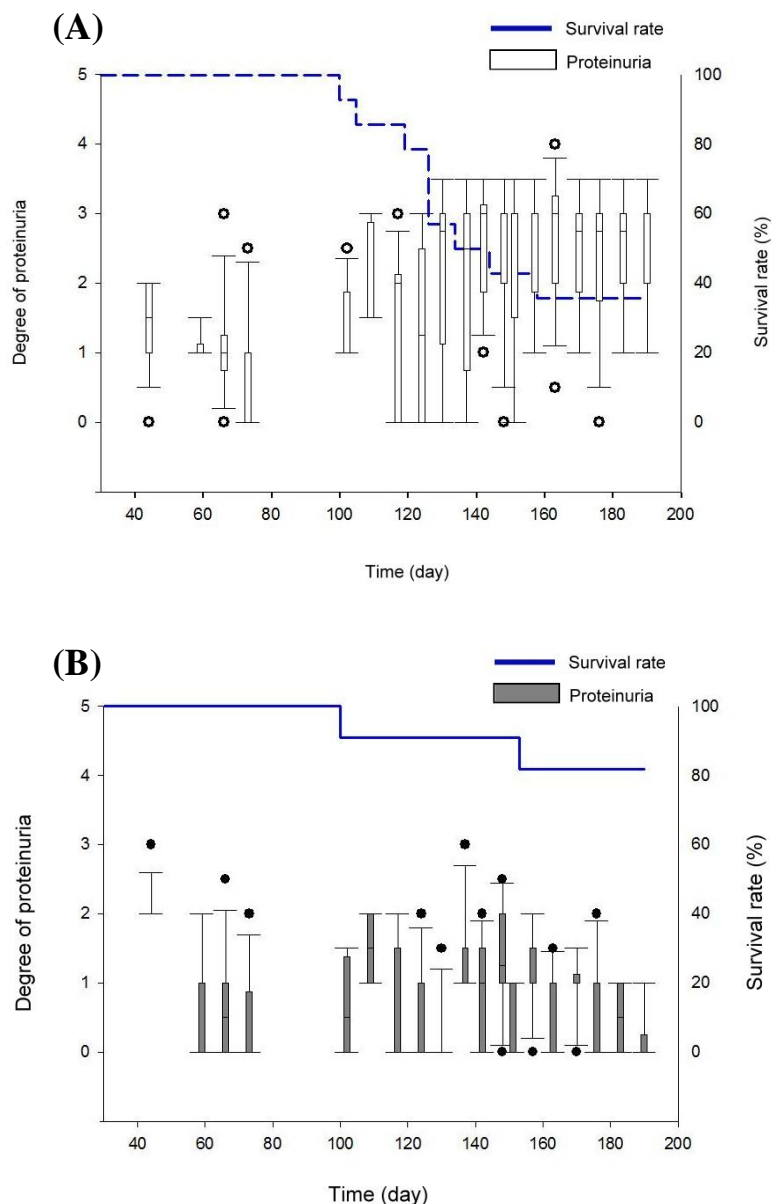
圖目

圖一、經紫外光誘導皮膚病變之 NZB/W F1 小鼠肉眼觀察 ...	44
圖二、 NZB/W F1 小鼠之蛋白尿指數與存活率	45
圖三、 NZB/W F1 小鼠經紫外光誘導之皮膚組織病理學檢查 ...	46
圖四、 以雷射掃描共軛焦顯微鏡觀察狼瘡帶免疫複合物沉澱 ...	47
圖五、免疫複合物在表皮真皮交界處之表現量	48
圖六、 Dsg 3 與 IgG 表現位置.....	49
圖七、 NZB/W F1 小鼠皮膚明膠酶表現	50
圖八、 山喜多處理對 NZB/W F1 小鼠皮膚之明膠酶 MMP2, MMP9 表現之影響	51



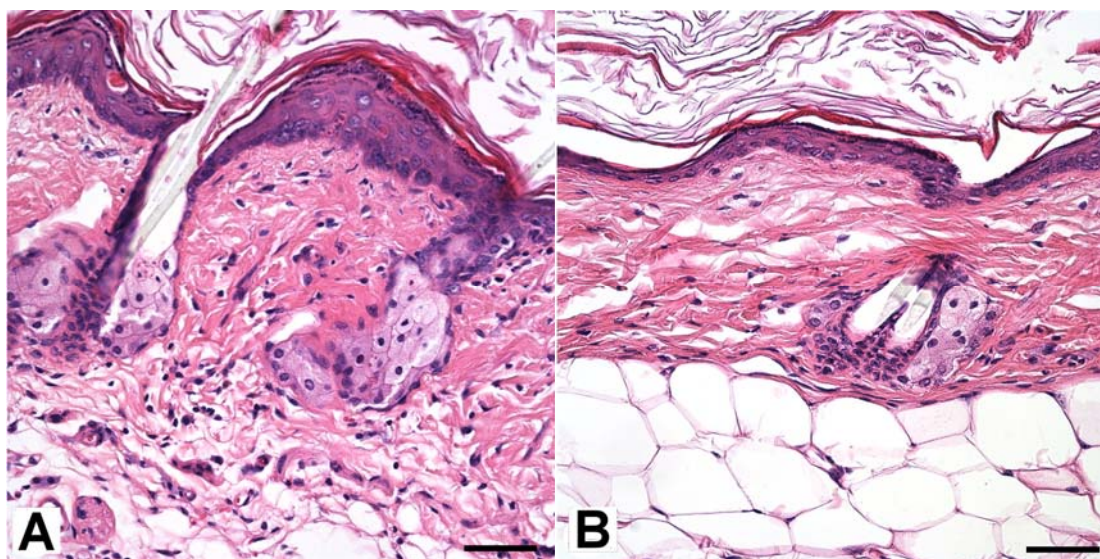
圖一、經紫外光誘導皮膚病變之 NZB/W F1 小鼠肉眼觀察

17 週齡之 NZB/W F1 小鼠背部剃毛後以紫外光誘導皮膚病變，每周照射 2 次，可於小鼠背側皮膚觀察到輕度黑色素沉澱，於照射 50 天時隨機分為控制組及使用山喜多處理組，持續至 190 天犧牲，(A) 控制組，可見較多皺褶且有水腫及黑色素沉澱 (B) 山喜多處理組。



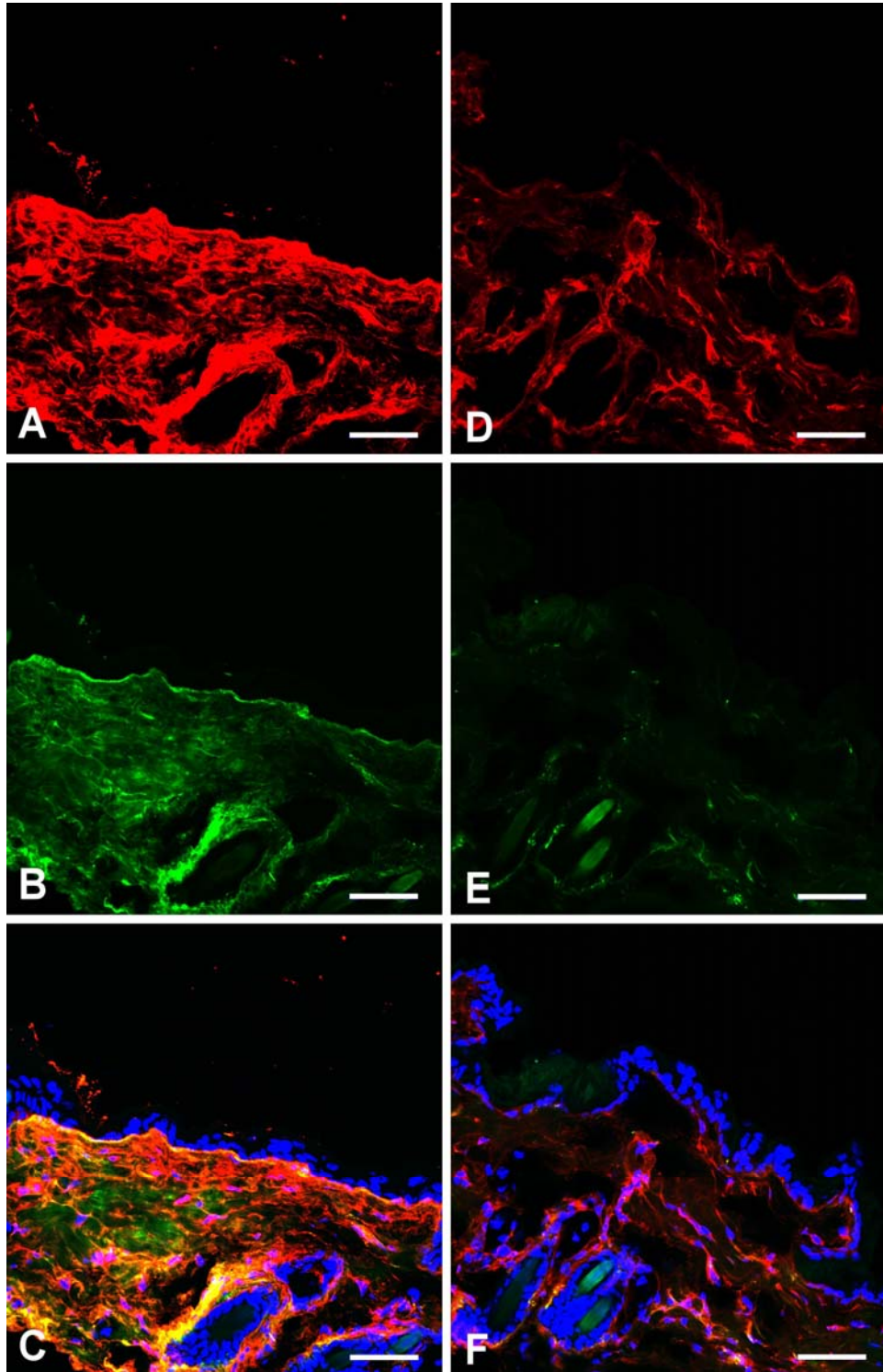
圖二、 NZB/W F1 小鼠之蛋白尿指數與存活率

NZB/W F1 小鼠自 day 0 以紫外光誘導至 day 190，於 day 50 隨機分為控制組 (n=14) 及山喜多處理組 (n=11)。(A) 控制組，小鼠存活率下降至 35.7% (5/14)，有 78.6% 蛋白尿達 2 級，(B) 山喜多處理組，小鼠存活率為 81.8% (9/11) 蛋白尿皆低於 2 級。



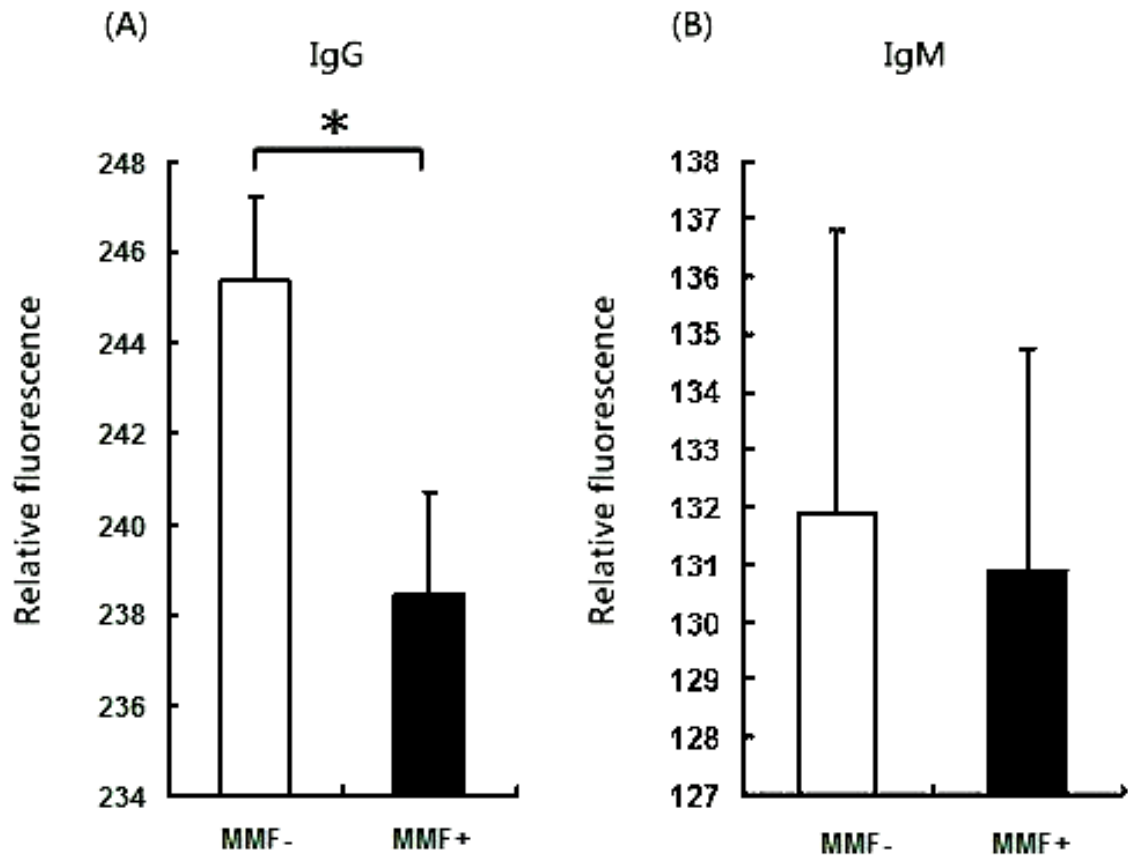
圖三、 NZB/W F1 小鼠經紫外光誘導之皮膚組織病理學檢查 (H&E stain)

(A) 控制組，可觀察到表皮角化不全、皮下水腫及淋巴球浸潤，(B) 山喜多處理組表皮較無異常增生，且較少淋巴球浸潤。(bar = 50 μm)



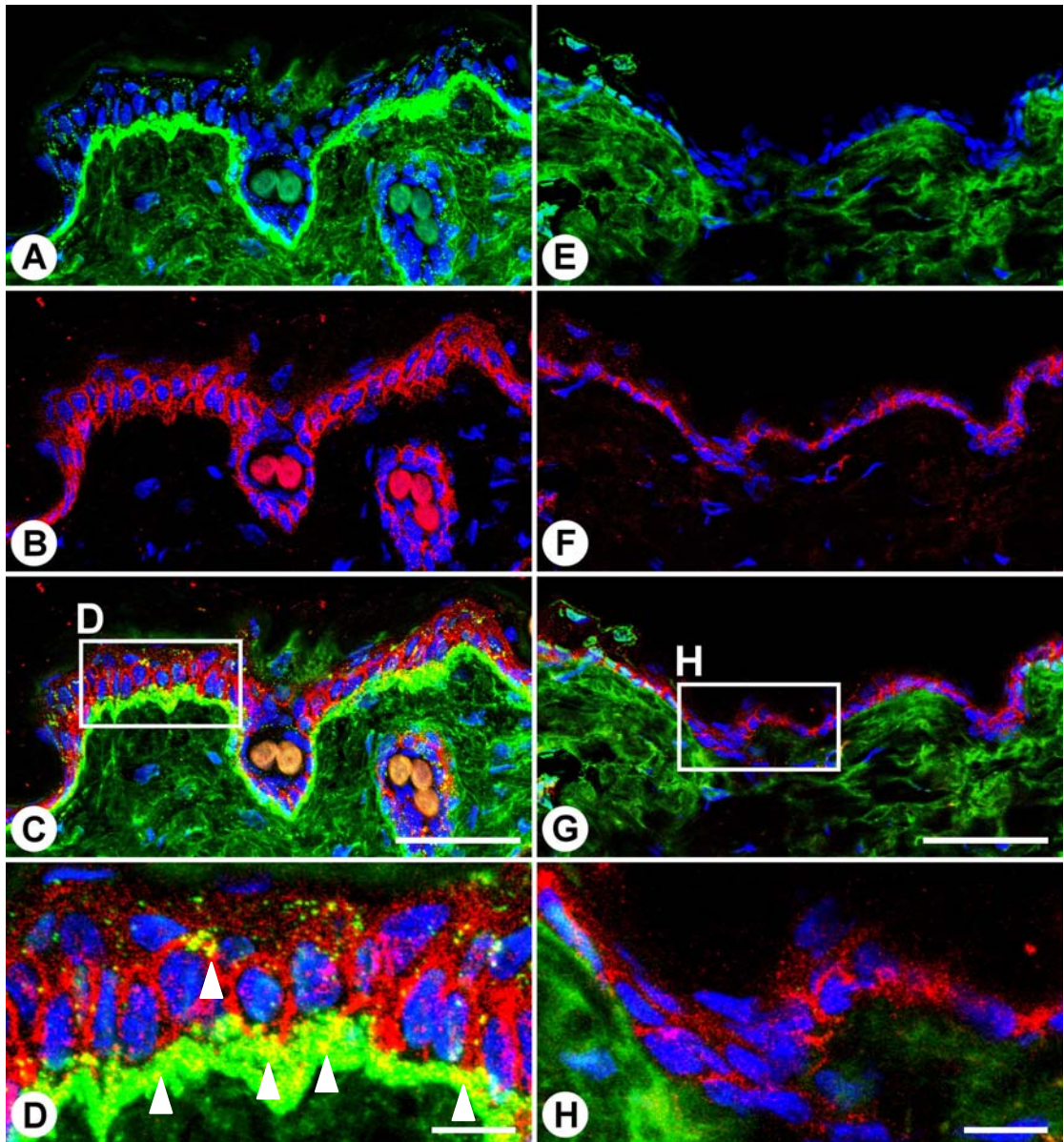
圖四、以雷射掃描共軛焦顯微鏡觀察狼瘡帶免疫複合物沉澱

(A-C) 控制組，(D-E) 山喜多處理組。 (A, D) IgG (紅色) ，(B, E) IgM (綠色) ，(C, F) IgG, IgM 及 DAPI (藍色) 合併圖像。(bar = 50 μ m)



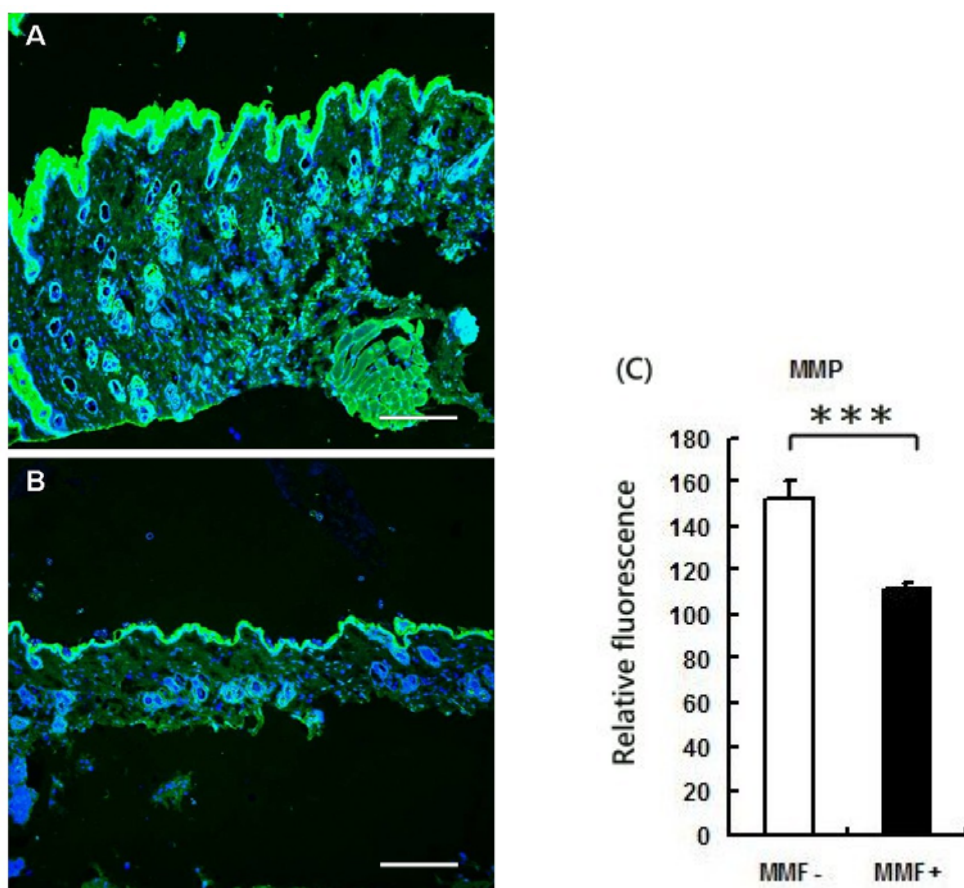
圖五、免疫複合物在表皮真皮交界處之表現量

以 IgG 及 IgM 螢光強度分析 NZB/W F1 小鼠表皮真皮交界處之免疫複合物表現。(A)為 IgG 表現量，控制組較山喜多處理組有較高趨勢，且具顯著差異，(B)為 IgM 表現量，控制組較山喜多處理組有較高趨勢，但未達顯著差異。各組 n = 6 隻，每隻 3-5 視野；*表 P < 0.05。



圖六、 Dsg 3 與 IgG 表現位置

以免疫螢光雙染色標示 IgG 及 Dsg 3 在經紫外光誘導後之 NZB/W F1 小鼠皮膚中的表現，(A-D) 控制組，(E-H) 山喜多處理組，(A, E) IgG 染色 (綠色)，(B, F) Dsg 3 染色 (紅色)，(C, G) IgG, Dsg 3 及 DAPI (藍色) 合併圖像。由 (B) 圖可見 Dsg 3 表現位置，由 (C, D) 圖可見 Dsg 3 表現位置與 IgG 大量表達位置重疊部分。由 (G, H) 圖可見在山喜多處理組之皮膚並無此情形。(bar = 50 μ m)



圖七、 NZB/W F1 小鼠皮膚明膠酶表現

利用原位明膠酶譜法偵測明膠酶，(A) 圖為控制組，可顯見明膠酶 (綠色) 於表皮及表皮真皮交界處大量表現，DAPI (藍色) 染色為細胞核位置，(B) 圖為山喜多處理組，(C) 為螢光強度分析 NZB/W F1 小鼠表皮及表皮真皮交界處之明膠酶表現，控制組較山喜多處理組有較高趨勢，且具有顯著差異；各組 $n=6$ 隻，每隻 3-5 視野；*表 $P<0.05$ ，**表 $P<0.01$ ，***表 $P<0.001$ 。(bar = 200 μm)

附錄一

美國風濕病醫學會 (American rheumatism association, ARA) 於
1997 年修訂之紅斑狼瘡分類準則 (Hochberg, 1997)

病徵	標準描述
1. 顴部皮疹	顴部兩側平坦或凸起之紅斑
2. 圓盤狀皮疹	紅色的圓盤狀突起斑痕，伴隨鱗片狀角化及毛囊堵塞，癒後患處可能萎縮變薄
3. 皮膚光敏性	病人具病史或由醫師診斷因陽光引起之不尋常皮疹
4. 口腔或鼻咽潰瘍	醫師診斷之無痛性口腔或鼻咽潰瘍
5. 關節炎	兩處以上周邊非侵蝕性關節炎，特點為壓痛、腫脹及積液
6. 漿膜炎	a. 胸膜炎 (具胸膜炎性疼痛病史，或由醫師聽診具磨擦音，或經證實有胸腔積液) 或 b. 心包膜炎 (心電圖紀錄及摩擦音及心包膜積液)
7. 腎功能障礙	a. 蛋白尿每日超過 0.5 g 或 >3+ 或 b. 尿沉渣出現細胞圓柱體
8. 神經系統功能異常	a. 無其他原因之癲癇 或 b. 無其他原因之精神病
9. 血液疾病	a. 溶血性貧血 或 b. 兩次以上白血球減少症 (< 4000 /mL) 或 c. 兩次以上淋巴細胞減少症 (< 1500 /mL) 或 d. 非藥物引起之血小板減少症 (< 100000 /mL)
10. 免疫失調	a. 血液中出现抗雙股 DNA 抗體 或 b. 抗 Sm 抗體 或 c. 抗磷脂抗體呈陽性，依據為： (1) 血清中抗心磷脂免疫球蛋白 G 或抗心磷脂免疫球蛋白 M 濃度異常 (2) 以標準法測定狼瘡抗凝血因子呈陽性反應 或 (3) 以梅毒螺旋體運動抑制試驗或螢光螺旋體吸收試驗 檢測至少六個月以上皆出現梅毒血清偽陽性反應
11. 抗核抗體	在任何時間點，未出現藥物引發狼瘡症候群之狀況下，利用免疫螢光法或其他等效試驗偵測到之抗核抗體效價異常

附錄二

明膠電泳酵素分析法製備

1. 0.1 % Gelatin - 8 % SDS PAGE

a. Separating gel	8 mL
1.5 M Tris-HCl buffer (pH 8.8)	2 mL
10 % Sodium dodecyl sulfate (SDS)	80 µL
10 % Ammonium persulfate (APS)	0.4 mL
30 % acrylamide-1.2%N, N' methylene-bis-acrylamide	2.15 mL
2 % Gelatin solution	0.4 mL
DDW	3 mL
Mix	
TEMED	5 µL
b. 4% Stacking gel	2.3 mL
0.5 M Tris-HCl buffer (pH 6.8)	0.65 mL
10 % Sodium dodecyl sulfate (SDS)	25 µL
10 % Ammonium persulfate (APS)	125 µL
30 % acrylamide-1.2%N, N' methylene-bis-acrylamide	0.35 mL
2 % Gelatin solution	0.4 mL
DDW	1.35 mL
Mix	
TEMED	4 µL
2. 10X Phosphate buffered saline (pH 7.4)	1000 mL
NaCl	80 g
KCl	2 g
KH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1.77 g
K ₂ HPO ₄	23.9 g
DDW add to	1000 mL
3. 5X Running buffer	1000 mL
Tris-base	15 g
Glycine	73.5 g
SDS	5 g
DDW add to	1000 mL

4. Sample buffer (5X loading dye)	50 mL
SDS	5 g
0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	10.4 mL
DDW	10 mL
Mix	
Glycerol	25 mL
Bromophenol blue	6.25 mg
DDW add to	50 mL
Store at -20 °C	
5. Washing buffer	1000 mL
Triton X-100	25 mL
DDW	1000 mL
6. Reaction buffer	50 mL
1% NaN ₃	500 μL
2.0 M Tris-HCl pH 8.0	1 mL
1.0 M CaCl ₂	500 μL
DDW add to	50 mL
7. 褪色液	1000 mL
Methanol	50 mL
Acetic acid	75 mL
DDW	875 mL