

出國報告(出國類別：進修)

Milk fat globule-EGF factor 8 protein (Mfge8)與系統性紅斑狼瘡之相關性

服務機關：國防醫學院三軍總醫院

姓名職稱：黎亞綺、住院醫師

派赴國家：美國

出國期間：105年11月30日至106年5月31日

報告日期：106年6月7日

摘要

系統性紅斑狼瘡的致病原因複雜，臨床表徵遍及全身各個系統，職此次進修主要的研究，就是探討細胞凋亡的清除路徑對SLE的影響。細胞凋亡（apoptosis）是體內維持恆定的一種機制，SLE患者體內無法有效清除凋亡細胞，進而產生自體免疫抗體而致病。在apoptosis的過程中，細胞表面會表現出”eat-me”的訊號，吞噬細胞透過中介蛋白質「Milk fat globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8)」辨認到這個訊號後就會對此細胞進行吞噬作用；經動物實驗證實，缺乏MFG-E8的小鼠會表現類似SLE的症狀，MFG-E8缺乏或功能不足是否影響SLE疾病的發展是目前亟待解答的疑問，故我們設計了一系列的實驗來解答這個問題。

目次:

頁次

封面

----- 1

摘要

----- 2

目的

----- 4

過程

----- 4

心得建議

----- 8

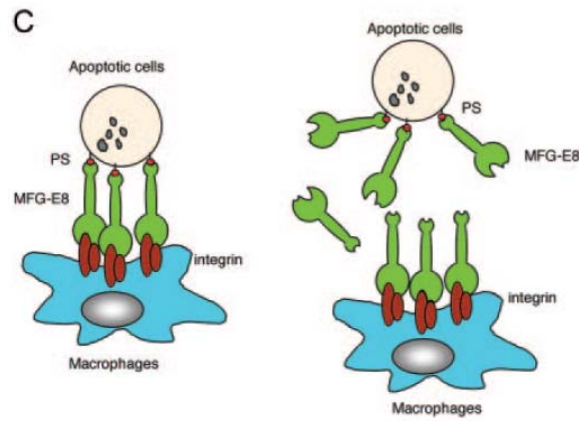
一、目的

職於三軍總醫院風濕免疫過敏科完成專科訓練後，為精進學識，申請赴美國短期進修，更深入地從基礎免疫學角度研究系統性紅斑狼瘡的致病機轉，培養設計實驗及獨立研究的能力，並與華盛頓大學風濕免疫科建立研究合作平台。

二、過程

華盛頓大學(University of Washington, UW)位於美國華盛頓州的西雅圖，是美國西岸最古老的大學，學校最著名的科系為 medicine 與 computer science，2015 年全美醫學院排名第 10 名，同時在臨床醫療類評比連續數年蟬聯全美第 1。華大的醫學院院區及建教合作研究機構遍及大西雅圖地區，很多華大醫學院的實驗室也位於非常出名的私人醫學研究機構如 Fred Hutchinson cancer research center, Institute for Systemic biology 及 Seattle Biomed 等等，華盛頓大學醫學院同時經由此固定的產、學、私募基金合作模式開發許多新藥，進一步藉由臨床試驗造福人類。

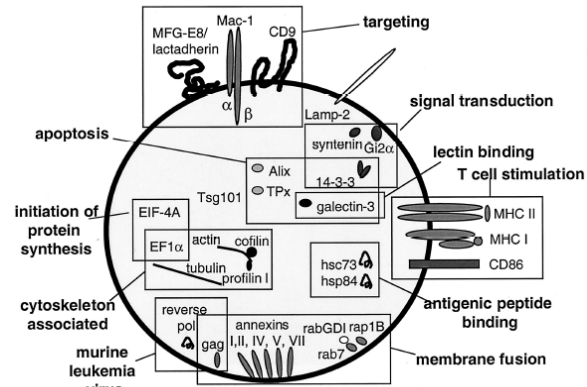
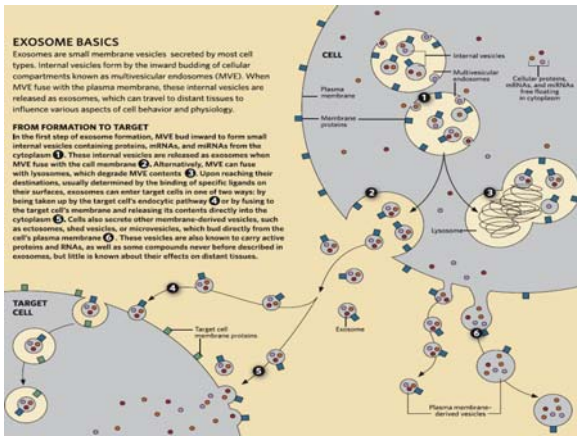
這次的研究主題是「系統性紅斑狼瘡 (Systemic Lupus Erythematosus, SLE) 的致病機轉。目前已知細胞凋亡 (apoptosis) 是體內維持恆定的一種機制，SLE 患者體內無法有效清除凋亡細胞，進而產生自體免疫抗體而致病。目前仍不清楚是什麼原因造成這種清除功能的障礙。在 apoptosis 的過程中，細胞表面會表現出”eat-me”的訊號 (phosphatidylserine)，吞噬細胞辨認到這個訊號後就會對此細胞進行吞噬作用，在吞噬細胞辨認凋亡細胞的過程中，需要一個中介的蛋白質「Milk fat globule epidermal growth factor 8 (MFG-E8)」：MFG-E8 是一種經活化的巨噬細胞所釋出的蛋白質，它可以協助辨認細胞凋亡的訊號，而促使凋亡的細胞被巨噬細胞吞噬，經動物實驗證實 (Hanayama et al. Science. 2004.)，缺乏 MFG-E8 的小鼠無法有效清除凋亡細胞，並表現出類似 SLE 的症狀 (自體免疫抗體生成、脾臟腫大、腎炎等)；而在 SLE 患者身上發現，體內的 MFG-E8 過高或過低皆會影響凋亡細胞的清除效率，可能的機轉如圖所示 (圖片摘錄自 J. Leukoc. Biol. 83: 1300 - 1307; 2008)。



Exosomes是一種直徑約 30~100 nm 的小囊泡，幾乎所有的動物細胞都會分泌 exosome，它們會將這些由膜包覆著蛋白質和遺傳物質的小囊泡釋放到體液（血液、尿液、淚液、脊髓液等）中，其內部有核糖核酸（mRNAs）、微 RNA（miRNAs）、脂質（lipids）和蛋白質（proteins）等組成，而其成份也隨著分泌的細胞來源和狀態而有所不同。相關的研究指出，小囊泡所攜帶的染色質會引發 anti-dsDNA antibody 的生成，並 SLE 患者血液中的 exosomes 濃度較健康受試者高，且這些 exosomes 會引起單核球釋放發炎物質（IFN- α ，TNF- α ，IL-1 β ，IL-6）。在 exosomes 的結構研究中發現，MFG-E8 是其含量最多的蛋白質，血液中測得的 MFG-E8 有可能都跟 exosome 有關。為確認 Exosome 上的 MFG-E8 功能異常是否會造成 SLE，我們想先知道 SLE 患者血液中的 exosomes 是否可測得 MFG-E8，另 MFG-E8 的濃度是否與疾病的嚴重度、自體抗體生成等相關。

Table 1 Extracellular vesicles				
Type and size	Biogenesis	Composition	Induction of release	Inhibition of release
Exosomes (50–100 nm)	Exocytosis of multivesicular bodies	MHC molecules and tetraspanins (CD63, CD9, CD81, CD82), ^{1,2,4} Alix, HSPs, TSG101, actin, tubulin, transferrin receptor, ⁷ miRNA and mRNA ¹³	Ionophores, ¹⁰⁴ calcium heparanase, ¹⁰⁵ T-cell-receptor activation, ¹⁰⁶ and P2X purinoreceptor 7 ¹⁰⁷	Proton-pump inhibitors, ¹¹⁰ inhibition of neutral sphingomyelinase, ¹¹¹ and rab27a and rab27b silencing ¹¹⁴
Microvesicles (100–1,000 nm)	Budding of plasma membrane	Actin and tubulin, ² β 1 integrins and VAMP3 ⁷ and microRNA ¹¹⁶	Calcium ionophores, ² thrombin receptor, glycoprotein VI collagen receptor, ⁴⁶ P2X purinoreceptor 7, ¹⁰⁸ and ARF6 overexpression ¹¹⁵	Calpeptin, ¹⁰⁹ inhibition of ARF6, ¹¹⁵ high KCl, ¹¹² quinine, ¹¹² calpain inhibitor E-64d, ¹¹² and methyl cyclodextrin ¹¹³
Apoptotic vesicles (100–5,000 nm)	Budding of plasma membrane during apoptosis	Any cellular components, including DNA ² and rRNA ¹¹⁶	Inducers of apoptosis	Inhibitors of apoptosis

Abbreviations: ARF6, ADP-ribosylation factor 6; HSPs, heat shock proteins; miRNA, microRNA; rRNA, ribosomal RNA; TSG101, tumour susceptibility gene 101; VAMP3, vesicle-associated membrane protein 3.



於是實驗的第一步驟，也就是這半年實驗中最困難的一步，就是從血液樣本中分離exosomes。由於exosomes的體積很小，標準的實驗過程是透過超高速離心機（ultracentrifugation）來進行分離，超高速離心耗費時間（10小時左右），需要的血液樣本量也較高，而新的分離方式是使用特殊的試劑，藉由membrane affinity原理來進行exosome的分離，這樣的試劑可以大幅減少實驗的消耗的時間，且可從很少量的血液進行分析，然而純化出的exosome濃度有待商榷。接下來的步驟是分析這些exosomes內的MFG-E8含量的高低，這一步的困難點在於患者體內的MFG-8雖然比健康受試者來得高，但平均來說，其濃度還是偏低（8.3- 44.2 ng/ml），需要敏感度相當高的ELISA來測定。這個實驗開啟了更多的可能性，exosome上的MFG-E8與SLE的關係還需要更多的實驗數據佐證。

Reference	Method
The ¹ ry 2001 JI	<u>Exosome production</u> , cells were cultured in complete medium depleted of contaminating vesicles and protein aggregates by overnight centrifugation at 110,000 xg. Supernatants were collected either 3 days after passage or 24 h after changing the medium of 3-day-old D1 cells culture. After UV treatment, exosome purification was performed as previously described by three successive centrifugations at 300 xg (5 min), 1,200 xg (20 min), and 10,000 xg (30 min) to pellet cells and debris, followed by centrifugation for 1 h at 110,000 xg. For large scale preparations of exosomes (biochemical analysis), the 1,200 and 10,000 xg centrifugations were replaced by filtration on 0.22 μm to eliminate large debris. As assessed by electron microscopy (EM), Western blotting with known exosomal markers, and protein pattern on Coomassie bluestained acrylamide gel.

<p>Theiry 2005 BCMD</p>	<p>Exosome isolation: Cells were cultured for 24 h in complete medium depleted from FCS-derived exosomes, as described. Supernatants of these cultures were filtered over 0.22 Am and centrifuged for 90 min at 100,000g to pellet exosomes. Proteins in the exosome preparations were quantified by Bradford assay (BioRad). Exosomes were routinely characterized by Western blotting using antibodies specific for exosomal proteins, such as MHC class I and II, CD86, MFG-E8, hsc70, tsg101. Exosomes were also observed by transmission electron microscopy.</p> <p>Ab for exosomes: ” rabbit antisera anti-mouse MHC class II a chain, or anti-mouse MHC class I (Dr. Ploegh, Boston USA), rat anti-CD86 (Pharmingen), anti-hsc70 (Stressgen) or antigp96 (Stressgen), goat anti-tsg101 (Santa Cruz Biotechnology).</p>
<p>Lee 2016 ART</p>	<p>Exosome isolation and quantification: Serum was prepared from fresh peripheral blood by centrifugation. Exosomes were purified from serum using ExoQuick (System Biosciences, CA, USA). 63 μL ExoQuick solution was added to 250 μL serum. After 30 min at 4 °C, exosomes were pelleted using centrifugation at 1500 g for 30 min. The pellets containing exosomes were resuspended in 50 μL sterile water. Exosomes were quantified using EXOCET Exosome Quantification Assay Kit and ELISA of exosome surface markers (EXOEL-CD63A-1 and EXOEL-CD81A-1; System Biosciences) according to the manufacturer’ s instructions. Of note, EXOCET measures enzymatic activity of acetylcholinesterases (AChE), which are enriched within exosomes. EXOEL-CD63A-1 and EXOEL-CD81A-1 are a direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)- based method to quantify CD63 and CD81.</p>

Methods	Characteristics	Good and bad
Differential ultracentrifugation	comprises a series of high speed spins (,100,000xg) to selectively sediment exosomes from solution	user intensive, contaminating cellular and protein debris <u>1.5×10^9 particles/mL</u>

Invitrogen Total Exosome Isolation Kit (Life Technologies, USA)	inducing precipitation of vesicles with poly-ethylene glycol or similar substances	less user intensive may also precipitate non-exosome debris <u>2×10^{11} and 3.5×10^{11} particles/mL</u>
ExoSpin Exosome Purification Kit (Cell Guidance Systems, USA)		
PureExo Exosome Isolation Kit	Isolated based on their buoyant density in viscous fluids samples are layered onto discontinuous sucrose or iodixanol gradients and subjected to high speed centrifugation (100,000 xg with exosomes recovered from the 1.10 - 1.20 g/mL fraction/s)	highly user intensive less prone to capture contaminating cellular debris <u>1×10^9 particles/mL</u>

三、心得及建議事項

美國風濕科的次專科訓練著重於門診及實驗室。每一位受訓醫師在主治醫師的指導下有自己的門診，而每位受訓醫師可選擇不同的訓練課程，有的是專責臨床、有的是專責教育、有的是專責研究，每個人都在自己的專業上有所發揮；而住院病人的照護全由內科醫師處理，次專科醫師只負責被照會，這樣的照護體系可以整合各個次專科而給予病人全人化的照護，並讓次專科醫師有更多的時間專注在臨床研究。科內的 case discussion 非常有趣，每星期會有一位主治醫師跟一位住院醫師分別報告一個複雜的案例，所有的參與人員互相提問討論，最後會歸納出一些方向，協助該醫師進行下一階段的治療或檢查，開會的過程當中，沒有老師或學生的區別，大家都是醫師，單單就案例做討論，這樣相互尊重一同學習的精神，很值得我們借鏡。

Journal club 的方式有兩種，一種是我較熟悉的方式：選一篇有代表性的 paper，由報告人

摘錄重點報告；另一種則是讓我頗為印象深刻的：每位參與 meeting 的人負責不同的期刊，大約每兩個月會輪到一次上台報告，報告的內容不需詳細，但要選取負責期刊中重要的文章，簡單地以圖表為大家做簡介，若台下的聽眾對某幾篇文章有興趣，可以待會後自行詳閱。方式一是深入的探討某篇文章，方式二是廣泛地搜尋文章並作重點的摘要，兩者併行可以兼顧 journal reading 的深度及廣度，我覺得非常有意義。

與客座演講者的互動也是令我印象深刻的一點，除了聽取大師們在 grand round 的演講外，科秘書會另外安排時間，也許安排個下午茶或午餐會，讓受訓的住院醫師或研究人員有機會跟老師詳談，聽取老師在專業上的建議，又或與老師交換彼此的研究心得：每位受邀的大師都很願意與學生分享自己的心路歷程，或最新的研究概念，這對正在接受次專科訓練的醫師，或研究正在起步發展的年輕學者們有莫大的幫助。

這次很幸運能在 Dr. Elkon 的實驗室中學習，他不僅在學術上有相傑出且豐富的成就，同時還非常有教學熱誠及耐心，讓我一邊從技術員手中學習實驗技術，一邊做報告整理既有的文獻資料，一邊發展自己負責的主題，期間合作的對象不僅限於實驗室裡的夥伴，甚至要跨實驗室、跨科部的向外尋求支援，這樣的經驗實屬難得，也讓我深深體會到為了探求科學的真相，需要結合的人力物力有多麼龐大！

此番六個月的美國行實屬難得，感謝科部能給予這樣的機會，讓我能放下臨床的工作專心學習基礎研究，在富有挑戰性的實驗室學習，paper reading 是做研究的基本功，提出問題→在已發表的文章中尋找蛛絲馬跡→修正所提的問題→訂定假說→設計實驗證實或推翻假說→進行實驗→彙整實驗結果→troubleshooting→repeat experiment→reading more papers，如此不斷的循環重複，找出滿意的答案後，再繼續解決其他的問題，因為在做研究的過程中總是會產生新的問題，一點都沒有鬆懈的時候啊！

這樣的進修機會除了能拓展眼界外，更重要的是可以促進跨國界的學術合作及交流，對本身的職涯規劃及科部的發展有絕對的幫助，短短半年的時間只是研究的開始，返台後將持續與華大的指導老師合作，盼望能更清楚 MFG-E8 的生理病理功能與 SLE 的致病機轉，以對新藥物發展或病患照護上盡一份心力。

