

# 烏腳病患者血清 IgG 抗體對培養血管內皮細胞之毒殺作用

高英賢<sup>1</sup> 張基隆<sup>2</sup> 余家利<sup>3</sup>  
陳國熏<sup>1</sup> 方甘棠<sup>4</sup> 余幸司<sup>1,\*</sup>

YING-HSIEN KAO<sup>1</sup>, KEE-LUNG CHANG<sup>2</sup>, CHIA-LI YU<sup>3</sup>, GWO-SHING CHEN<sup>1</sup>

KAN-TANG FANG<sup>4</sup>, HSIN-SU YU<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 高雄醫學大學醫學院皮膚科, 80708 高雄市十全一路100號

Department of Dermatology, College of Medicine, Kaohsiung Medical University, No. 100, Shih-Chuan 1st Road, Kaohsiung 80708.

<sup>2</sup> 高雄醫學大學醫學院生化學科

Department of Biochemistry, College of Medicine, Kaohsiung Medical University, Kaohsiung.

<sup>3</sup> 國立臺灣大學醫學院醫學系及分子醫學研究所

Department of Medicine and Institute of Molecular Medicine, College of Medicine, National Taiwan University, Taipei.

<sup>4</sup> 高雄市立民生醫院皮膚科

Department of Dermatology, Kaohsiung Municipal Ming Sheng Hospital, Kaohsiung.

\* 通訊作者Correspondence author. E-mail: dermyu@cc.kmc.edu.tw

**目標：**烏腳病為發生於台灣西南沿海之地區性末梢循環障礙，其臨床症狀與動脈硬化症及血管閉塞性脈管炎類似。烏腳病之病因被認為與當地深井水中所含之高濃度砷及腐質物質有關。早期之烏腳病患肢可見皮膚小血管內皮細胞之破壞，其致病機轉尚不明，本研究探討烏腳病患者血液中是否有破壞血管內皮細胞之因子存在。**方法：**由烏腳病患者及正常人血清分離純化IgG與培養人類血管內皮細胞作用後，分別進行細胞存活試驗。此外，分別以ELISA及流體細胞測定儀測定血管內皮細胞釋出von Willebrand factor及ICAM-1表現之改變情形。**結果：**(1) 烏腳病患者IgG (BFD-IgG) 與血管內皮細胞之結合能力明顯地大於正常人之IgG (N-IgG)；(2) 濃度高於100 µg/mL的BFD-IgG對血管內皮細胞有破壞能力，其細胞毒性與作用濃度成正比，而N-IgG則無此作用；(3) 100 µg/mL濃度的BFD-IgG並無刺激血管內皮細胞釋出von Willebrand factor及ICAM-1表現之作用。**結論：**本研究結果顯示免疫機轉在烏腳病之致病過程中扮演重要角色，我們認為患區居民中會產生抗血管內皮細胞IgG抗體者為潛在之烏腳病患者。(中華衛誌 1999；18(附冊 1)：140-147)

**關鍵詞：**烏腳病、IgG抗體、內皮細胞、細胞毒殺作用。

## IgG Antibodies from patients with blackfoot disease induce vascular endothelial cells cytotoxicity *in Vitro*

**Objectives:** A unique peripheral vascular disorder called "blackfoot disease" is endemic in a limited area on the south-west coast of Taiwan. Clinically, the signs and symptoms of blackfoot disease (BFD) are similar to those of arteriosclerosis and thromboangiitis obliterans. A destruction of vascular endothelial cells (ECs) takes place at an early stage in the affected limbs. Currently the cause of BFD is believed to be artesian drinking water containing a high concentration of arsenic and/or humic substances, although the mechanism of EC destruction is not entirely understood. The purpose of the present study was to examine the factors related to EC damage in BFD. **Methods:** We investigated the cytotoxic effects of purified IgG collected from patients with BFD (BFD-IgG) and from normal controls (N-IgG) on cultured ECs using cellular viability test. In addition, we detected the release of von Willebrand factor (vWF) and the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) by methods of ELISA and flow cytometry, respectively. **Results:** The results revealed that (1) EC binding activity of BFD-IgG was significantly higher than that of N-IgG; (2) BFD-IgG, at a concentration higher than 100 µg/mL but not N-IgG, induced concentration-dependent EC cytotoxicity; (3) BFD-IgG at a concentration of 100 µg/mL stimulated neither the release of von Willebrand factor nor the expression of intercellular adhesion molecule-1 by EC. **Conclusions:** These findings strongly suggested that immunological mechanism played a significant role in the pathogenesis of BFD. We propose that only persons who produce the IgG anti-endothelial cell antibody are potential victims of BFD. (*Chin J Public Health. (Taipei); 1999;18(suppl 1):140-147*)

**Key words:** blackfoot disease, IgG antibody, endothelial cell, cytotoxicity.

## 前 言

烏腳病為發生於台灣西南沿海之地區性末梢循環障礙疾病，其病徵常見於肢端，特別是足部常見的壞疽性病變[1]。臨床及病理上烏腳病的症狀類似動脈硬化症(arteriosclerosis)及血管閉塞性脈管炎(thromboangiitis obliterans)，然而卻又較這二者嚴重[2]。病理學研究顯示30%的烏腳病患者屬於血管閉塞性脈管炎，而另外70%顯示為閉塞性動脈硬化(arteriosclerosis obliterans)病理特徵[3]。在這兩種病變之初期患者患病部位均可發現血管內皮細胞被破壞之現象[4,5]。

烏腳病之病因被認為與當地深井水中所含之高濃度砷(arsenic)[1,6]及腐質物質(humic substances) [7]有關。1968年的統計資料顯示當地居民烏腳病盛行率(prevalence rate)為千分之8.9 [1]，然而由烏腳病患區偏低的盛行率可推論，烏腳病之病因並非全然與患區井水中之毒性物質有關。本研究之目的即在比較烏腳病患者與正常人血清中，是否存有可破壞血管內皮細胞之特異性因子。在本研究中我們純化烏腳病患者及正常人之IgG，並作用於培養人類內皮細胞，其結果發現僅有烏腳病患者之IgG在體外試驗中對人類內皮細胞具有破壞作用。

## 方 法

### 一、病人的選取

我們採取烏腳病流行地區12名烏腳病患者血清，烏腳病患者在採血時均屬紅斑期(erythematous stage)，其中4人有罹患潰瘍(ulceration)及壞疽之病史。此外，同時採取12名非流行地區年齡及性別相符的健康者血清作為正常對照組。所有的研究對象並無高血壓及糖尿病，烏腳病患者在採血之前並未接受任何治療。由病患的臨床實驗診斷數據顯示全血血球計數(complete blood cell count)、血清電解質濃度(serum electrolytes concentration)、血清生化學檢驗(serum biochemistry)，除了一名病患血清GOT、GPT值偏高外均在正常值內。血清免疫學之定量分析亦顯示均在正

常範圍，其IgG為 $1440.2 \pm 52.7$  mg/dL，IgM為 $112.4 \pm 37.2$  mg/dL，IgA為 $226.1 \pm 32.3$  mg/dL，IgE為 $72.7 \pm 32.3$  I.U./mL，C3為 $98.3 \pm 24.2$  mg/dL，C4為 $31.1 \pm 11.2$  mg/dL。

### 二、烏腳病患者及正常對照組之IgG純化

血清以膠體過濾層析方法(gel filtration chromatography)分離。分別以磷酸緩衝液(50mM phosphate buffer saline, pH 7.2)，30 ml/hr的流速通過 $1.5 \times 90$  cm之Sephacryl S-300 (Sigma, St. Louis, MO) 管柱，收集之第二部份濾液(含IgG)再以protein A-Sepharose 4B親合性管柱吸收後，以pH 2.5之醋酸鈉緩衝液沖提出IgG，並立刻以1N之氫氧化鈉中和至pH 7.2。此IgG經蒸餾水適當的透析並且冷凍乾燥後，以protein assay kit (Bio-Rad, Richmond, CA) 定量其濃度 [8]。

### 三、血管內皮細胞之培養及辨認

血管內皮細胞分離自人類臍靜脈，其培養方法參照Jaffe等所敘述 [9]。培養之血管內皮細胞可從其細胞形態之特徵及第八因子相關蛋白(factor VIII-related protein) 之存在與否作辨認 [10]。第八因子相關蛋白抗原之染色方法以免疫螢光抗體間接法(indirect immunofluorescence)為之 [11]。使用於實驗之血管內皮細胞則介於第二代與五代之間。

### 四、抗血管內皮細胞IgG抗體之偵測

以各種不同濃度之烏腳病患者IgG (BFD-IgG) 及正常人IgG (N-IgG) 與血管內皮細胞在37°C下培養48小時。此抗血管內皮細胞IgG抗體對血管內皮細胞之結合活性之偵測方法是參照先前文獻報告之cELISA方法 (cellular enzyme-linked immunosorbent assay) 為之 [12]。而抗血管內皮細胞抗體之相對效價則以490 nm之吸光值表示。

### 五、烏腳病患者及正常對照組之IgG對血管內皮細胞之作用

血管內皮細胞以 $1 \times 10^4$  cells/well之細胞

密度培養在96孔細胞培養盤中(Nunc, Roskilde, Denmark)。在每孔加入100  $\mu$ L各種不同作用劑量之BFD-IgG或N-IgG, 培養48小時後收集不含細胞之上清液並保存於-20 $^{\circ}$ C。作用後之細胞則用來進一步之實驗。

#### 六、XTT細胞增殖性偵測法 (XTT cell proliferation assay)

此測定是以購買之細胞增殖性試劑組 (cell proliferation kit, XTT, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany), 參照原廠之實驗步驟為之。此試劑可用來偵測IgG對血管內皮細胞增殖性的影響。其最終產物formazan物質之測量是以490 nm波長之吸光度減去690 nm校正波長之吸光度表示。並以下列公式計算細胞存活率(cell survival rate):

$$\text{survival (\%)} = (\text{實驗組吸光值} \div \text{正常對照組吸光值}) \times 100\%$$

#### 七、以ELISA方法偵測血管內皮細胞 von Willebrand factor之釋出

以購買之ELISA試劑組 (Diagnostic Stago, Asnieres, France) 進行血管內皮細胞 von Willebrand factor釋出的偵測。每組實驗組以  $1 \times 10^6$ 個血管內皮細胞經BFD-IgG或N-IgG作用48小時後, 取不含細胞之培養上清液進行此ELISA試驗。

#### 八、血管內皮細胞ICAM-1分子之免疫螢光染色

血管內皮細胞表面ICAM-1分子的偵測是利用免疫螢光抗體間接法為之。分別使用 mouse anti-human ICAM-1 IgG抗體 (Boehringer Mannheim GmbH) 和 goat anti-mouse IgG-FITC 抗體 (KPL, Gaithersburg, MD) 為初級抗體和二級抗體。經螢光染色之懸浮細胞再以流體細胞測定儀 (FACScan, Beckton and Dickinson, San Jose, CA) 測定, 分析結果以計算10,000個細胞之平均螢光強度表示, 其可作為細胞表面分子ICAM-1表現之指標。

#### 九、研究數據之統計與分析

每組以三倍數(triplicate)計量之測量數據以平均值 $\pm$ 標準差 (Mean $\pm$ SD) 方式表示。而實驗組與對照組數據之間的差距是以非配對學生氏t試驗(unpaired Student's t test)分析, 分析結果以 $p < 0.05$ 為具有統計學上的意義。

## 結 果

#### 一、血管內皮細胞之辨識

培養至長滿之單層血管內皮細胞可從其典型的細胞形態作簡易的判斷, 細胞呈六角或類似立方體之形狀, 且排列緊密的細胞中可見形狀大而圓的細胞核。經過血管第八因子相關蛋白抗原免疫螢光抗體間接法染色之後, 在細胞核周圍細胞質可觀察到呈顆粒狀之螢光染色。

#### 二、純化IgG抗體對血管內皮細胞之結合活性

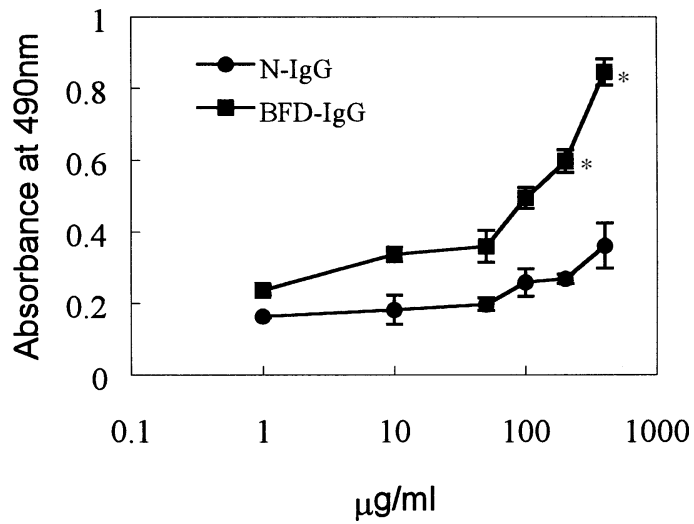
以cellular ELISA法可偵測BFD-IgG及N-IgG對血管內皮細胞之結合活性與作用濃度有關聯(見圖一)。烏腳病病患IgG與正常對照組相較之下, 其結合活性有統計學意義的偏高現象 ( $p < 0.05$ )。

#### 三、純化IgG抗體對血管內皮細胞之破壞作用

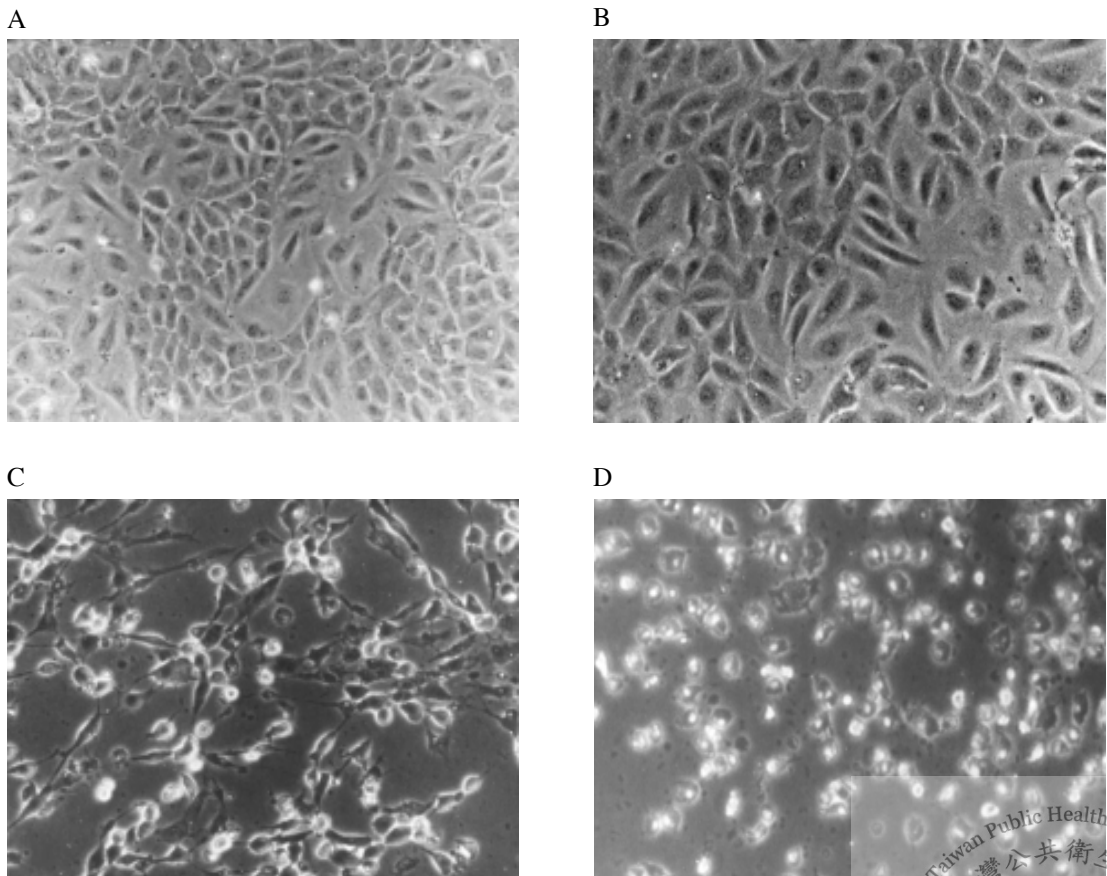
血管內皮細胞在經過BFD-IgG與N-IgG 48小時的培養之後, BFD-IgG低於100  $\mu$ g/mL的作用濃度並不會對血管內皮細胞之細胞形態造成明顯變化(見圖二-B)。然而在200或400  $\mu$ g/mL的作用濃度可明顯地觀察到, BFD-IgG會破壞血管內皮細胞之細胞形態(見圖二-C,D), 其破壞的程度與作用濃度成正比, 而N-IgG則無此作用(見圖二-A)。

#### 四、以XTT細胞增殖性測定法偵測BFD-IgG對血管內皮細胞之細胞毒性

由圖三中顯示, 經BFD-IgG作用之血管內皮細胞呈明顯之細胞毒性反應, 而N-IgG則無此現象。作用濃度低於100  $\mu$ g/mL之BFD-

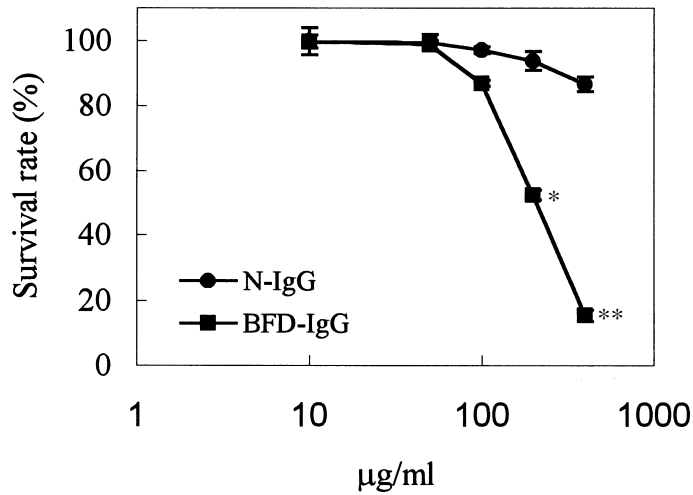


圖一、以cellular ELISA偵測純化IgG對血管內皮細胞之結合活性。  
(\*表示 $p < 0.05$ )

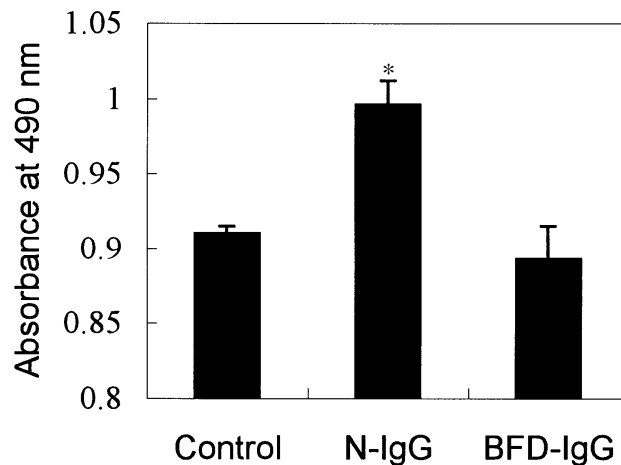


圖二 以不同濃度之N-IgG與BFD-IgG作用於血管內皮細胞後之細胞形態學變化。(A)N-IgG 400μg/mL ; (B)BFD-IgG 100μg/mL ; (C)BFD-IgG 200μg/mL ; (D)BFD-IgG 400μg/mL。(放大倍率75×)





圖三 以XTT細胞增殖性測定法偵測BFD-IgG對血管內皮細胞之細胞毒性。  
(\* 表示 $p < 0.05$  ; \*\* 表示 $p < 0.01$ )



圖四 以ELISA偵測經N-IgG和BFD-IgG刺激後，血管內皮細胞釋出vWF因子量的改變情形。(\* 表示與control比較時 $p < 0.05$ )

IgG對血管內皮細胞並無明顯細胞毒殺效應，經100、200、400  $\mu\text{g/mL}$ 各種濃度作用之後的細胞存活率 (survival rate) 與未經任何處理之細胞比較，分別為 $86.91 \pm 1.26\%$ 、 $52.42 \pm 2.02\%$ 和 $15.32 \pm 1.52\%$ 。

分子釋出(見圖四)與細胞表面ICAM-1分子表現(見表一)與未經任何處理之細胞比較，均呈明顯增加( $p < 0.05$ )。而經BFD-IgG作用後無此刺激效應。

## 討 論

先前與烏腳病有關的流行病學和動物實驗研究指出，烏腳病流行地區深井水中所含

### 五、純化IgG對血管內皮細胞釋出vWF與ICAM-1表現之刺激效應

經N-IgG作用後，血管內皮細胞的vWF

表一 以Flow cytometry偵測經N-IgG和BFD-IgG刺激血管內皮細胞後， ICAM-1分子表現的改變情形。( \* 表示與NC比較時 $p < 0.05$  )

	Fluorescent intensity
NC	1253.60±135.74
N-IgG	3073.37±255.55 *
BFD-IgG	1300.27±146.63

高濃度砒及腐質物質極可能是烏腳病的致病因子(etiological factor) [1,13,14,15]，然而對致病因子經由何種致病機轉對血管內皮細胞傷害仍然不太明瞭。由先前之研究報告得知未罹患循環障礙之當地居民之皮膚微循環有缺陷存在 [16,17]。在烏腳病發病初期病變可觀察到患部血管內皮細胞有變性現象 [4,5]，這些研究均顯示血管內皮細胞的破壞對烏腳病發病有極重要的相關性。在這篇研究中我們證實BFD-IgG與血管內皮細胞的結合活性明顯地高於N-IgG，並且與作用濃度有密切的關聯。在細胞形態學的觀察與XTT細胞增殖性試驗 [18] 的結果可明顯地看出濃度高於100  $\mu\text{g/mL}$ 的BFD-IgG作用於血管內皮細胞所產生的細胞毒性與作用濃度成正比。呂氏等 [14] 的研究曾將腐質物質打入老鼠體內，此物質會誘發老鼠產生類似烏腳病的症狀。而我們的研究顯示除了毒性物質的直接作用外，BFD-IgG對血管內皮細胞所產生的細胞毒性可更進一步地解釋烏腳病的可能致病機轉，也就是說烏腳病的發病與病人之免疫機轉有關，只有體內會產生抗血管內皮細胞IgG抗體(anti-endothelial cell antibody)的當地居民才可能會罹患烏腳病。

在此研究中，我們亦針對休止狀態的血管內皮細胞經刺激後會釋出von Willebrand factor因子及表現血管內皮細胞與白血球附著分子(endothelial leukocyte adhesion molecules)的特性 [19] 作測試。vWF是血管內皮細胞內典型的細胞基質組成成分，其在血管內皮細胞內生成後大部分儲存在Weibel-Palade body中，在血管管壁遭破壞時釋出而增加血小板對管壁的附著。正常生理狀態下有少量的

vWF可釋放到血漿中與凝血第八因子(factor VIII)結合而延長第八因子的半衰期 [20]。相關的研究指出vWF在體外試驗可促使細胞微絲(microfilaments)及附著斑(adhesion plaques)的組成，導致血管內皮細胞附著性的增加 [21]。此外，ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1)則是對嗜中性白血球及淋巴球免疫功能表現的重要附著性結合分子(adhesive ligands)，其與此二種細胞能穿移(transmigration)通過培養單層血管內皮細胞的現象有關 [22,23]。由於100  $\mu\text{g/mL}$ 的BFD-IgG對血管內皮細胞無明顯的毒性效應，我們選定這個濃度作為評估BFD-IgG對血管內皮細胞的刺激效應(並非毒性效應)。其結果指出BFD-IgG對血管內皮細胞釋出vWF與ICAM-1的表現並無刺激效應。這些發現與我們先前觀察在烏腳病的發病初期僅有少數單核球浸潤於病灶部位的現象不謀而合 [4,5]。

在此研究中，我們證實低濃度(100 $\mu\text{g/mL}$ )的正常人IgG(N-IgG)可以誘發血管內皮細胞vWF因子的釋出與ICAM-1分子的表現。相較之下，儘管BFD-IgG與血管內皮細胞有較高的結合性，卻無類似N-IgG的刺激效應。再者，作用濃度高於100  $\mu\text{g/mL}$ 的BFD-IgG對血管內皮細胞的細胞毒性效應與BFD-IgG的作用濃度成正比，N-IgG則無此現象。由這些研究結果我們可歸納出BFD-IgG與N-IgG之間主要有三點差異性：(1) BFD-IgG對血管內皮細胞有較高的結合性；(2) 濃度高於100  $\mu\text{g/mL}$ 的BFD-IgG對血管內皮細胞有破壞能力，其細胞毒性與作用濃度成正比，而N-IgG則無此作用；(3) 100 $\mu\text{g/mL}$ 作用濃度的BFD-IgG並無刺激血管內皮釋出von Willebrand factor及ICAM-1表現之作用。然而，我們仍不太明瞭BFD-IgG對血管內皮細胞產生細胞毒性的作用機轉。推測其可能的機轉是BFD-IgG會經由誘發血管內皮細胞的程式死亡機轉(apoptotic mechanism)而對血管內皮細胞產生上述的毒性現象。然而此假說仍待進一步的研究來證實。

綜觀以上研究結果，我們可確認烏腳病患者體中IgG抗體會導致血管內皮細胞被破壞。然而此IgG抗體對血管內皮細胞的專一性

及其抗原性決定因子(antigenic determinants) 仍待進一步的研究。

## 致 謝

本研究之順利完成要感謝行政院衛生署提供經費補助。(計劃編號: DOH 85-TD-138)

## 參考文獻

1. Tseng WP, Chu HM, How SW, Fong JM, Lin CS, Yeh S. Prevalence of skin cancer in an endemic area of chronic arsenicism in Taiwan. *J Natl Cancer Inst* 1968;**40**:453-63.
2. Tseng WP. Blackfoot disease in Taiwan: a 30-year follow-up study. *Angiology* 1989;**40**:547-58.
3. Yeh S, How SW. A pathological study on the blackfoot disease in Taiwan. Reports, Institute of Pathology, National Taiwan University 1963;**14**:25-73.
4. Yu HS. Blackfoot disease and chronic arsenism in southern Taiwan. *Int J Dermatol* 1984;**23**:258-60.
5. Yu HS, Sheu HM, Ko SS et al. Studies on blackfoot disease and chronic arsenism in southern Taiwan: with special reference to skin lesions and fluorescent substances. *J Dermatol* 1984;**11**:361-70.
6. Chen KP, Wu HY. Epidemiologic studies on blackfoot disease. 2. A study of source of drinking water in relation to the disease. *J Formosan Med Assoc* 1962;**61**:611-8.
7. Lu FJ, Irgolie KJ, Lin CW, Ling KH, Tung TC. Fluorescent compounds in drinking well water of blackfoot disease endemic areas. *J Formosan Med Assoc* 1982;**81**:1087-100.
8. Yu CL, Chang KL, Hong ST, Chiang BN, Han SH, Wang SR. Detective helper T cell function in IgM rheumatoid factor synthesis in patients with ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol* 1989;**18**:43-9.
9. Jaffe EA, Nachman RL, Becher CG, Minick R. Culture of human endothelial cells

derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973;**52**:1745-56.

10. Davison PM, Bensch K, Karasek MA. Isolation and growth of endothelial cells from the microvessels of the newborn human foreskin in cell culture. *J Invest Dermatol* 1980;**75**:316-21.
11. Masuzawa M, Suzuki Y, Nishiyama S, Nishioka K, Ryan TJ. Guinea pig endothelial cells in culture. *J Dermatol* 1984;**11**:371-7.
12. Walker KW, Llull R, Balkian GK et al. A rapid and sensitive cellular enzyme-linked immunoabsorbent assay (cELISA) for the detection and quantitation of antibodies against cell surface determinants. 1. A comparison of cell fixation and storage techniques. *J Immunol Methods* 1992;**154**:121-30.
13. Chen CJ. Blackfoot disease. *Lancet* 1990;**336**:442.
14. Lu FJ. Blackfoot disease: arsenic or humic acid? *Lancet* 1990;**336**:115-6.
15. Lu FJ. Fluorescent humic substances and blackfoot disease in Taiwan. *Appl Organomet Chem* 1991;**4**:191-5.
16. Yu HS, Chang CH, Chen GS, Yang SA, Yu CL. Study of dynamic microcirculatory problems in blackfoot disease - emphasizing its differences from arteriosclerosis. *J Biomed Sci* 1995;**2**:183-8.
17. Tseng CH, Chong CK, Chen CJ, Tai TY. Dose-response relationship between peripheral vascular disease and ingested inorganic arsenic among residents in blackfoot disease endemic villages in Taiwan. *Atherosclerosis* 1996;**120**:125-33.
18. Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/for-mazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 1988;**48**:4827-33.

19. Goerdt S, Pober JS. Endothelium: differentiation and activation. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freeberg IM, Austen KF eds. *Dermatology in General Medicine* 4th. New York: McGraw-Hill. 1992;375-89.
20. Verweij CL. Biosynthesis of human von Willebrand factor. *Haemostasis* 1988;**18**: 224-45.
21. Dejana E, Lampugnani MG, Giorgi M et al. Von Willebrand factor promotes endothelial adhesion via an arg-gly-asp-dependent mechanism. *J Cell Biol* 1989;**109**:367-75.
22. Oppenheimer-Marks N, Davis LS, Lipsky PE. Human T lymphocyte adhesion to endothelial cells and transendothelial migration. Alteration of receptor use relates to the activation status of both the T cell and the endothelial cell. *J Immunol* 1990;**145**:140-8.
23. Van Epps DE, Potter J, Vachula M, Smith CW, Anderson DC. Suppression of human lymphocyte chemotaxis and transendothelial migration by anti-LFA-1 antibody. *J Immunol* 1989;**143**:3207-10.