

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

葛瑞夫茲氏病中甲狀腺細胞增生及機能亢進之訊息傳遞路徑之探討

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 89-2314-B-040-040-

執行期間：89年8月1日至90年7月31日

計畫主持人：黃建寧 講師 中山醫學大學醫學系

共同主持人：王朝鐘 教授 中山醫學大學生化所

計畫參與人員：彭瓊琿 講師 弘光技術學院

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：中山醫學大學醫學系

中華民國 90 年 10 月 27 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

葛瑞夫茲氏病中甲狀腺細胞增生及機能亢進之訊息傳遞路徑之探討

計畫編號：NSC 89-2314-B-040-040-

執行期間：89年8月1日至90年7月31日

計畫主持人：黃建寧 講師 中山醫學大學醫學系

共同主持人：王朝鐘 教授 中山醫學大學生化所

計畫參與人員：彭瓊瑋 講師 弘光技術學院

一、中文摘要

葛瑞夫茲氏病之症狀包括甲狀腺機能亢進、眼病變、脛前黏液水腫等，為一嚴重之自體免疫疾病。患者血清中含有甲促素 (TSH) 受體抗體，其作用於甲促素受體因而引發甲狀腺機能亢進。於正常狀態下，甲促素與甲促素受體作用會引發多種訊息傳遞路徑，包括 adenylyl cyclase/cAMP, phospholipase A2 (PLA₂)/arachidonic acid (AA) 及 phospholipase (PLC)/Ca²⁺ 等訊號。同時葛瑞夫茲氏病人的免疫球蛋白亦具有 adenylyl cyclase/cAMP、phosphatidylinositol cascade 及 PLA₂ 訊息傳遞的功能。對於甲促素的研究 cAMP、PKC、PLC/Ca²⁺ 的下游活化路徑，國外的研究目前並不多，而葛瑞夫茲氏病所引發的甲狀腺細胞內訊息傳遞研究，目前則停留在 AMP、PKC、PLC/Ca²⁺ 等，其下游活化路徑則無相關研究。

本計畫共分析 27 個葛瑞夫茲氏病的甲狀腺檢體，10 個甲狀腺良性結節及 10 個正常的甲狀腺組織。由這些甲狀腺檢體所分離的蛋白質，利用 western blot 進行一系列訊息傳遞蛋白的表達研究，得到以下結果：1) 蛋白質 Raf、Jun、Myc、STAT1-p、p38-p、Akt、Akt-p、Cdc2、Bad-p 及 IAP 的表達量在葛瑞夫茲氏病、甲狀腺結節及正常甲狀腺組織中並無顯著差異；2) 相較於甲狀腺結節及正常甲狀腺組織，MEK-1、Erk-2、PI3-K、Cdc42 的表達量在部分葛瑞夫茲氏病的甲狀腺組織中為前者的 2 至 8 倍左右。由此得知，葛瑞夫茲氏病的甲狀腺增生，主要經由此兩條 signal pathways:

Raf--MEK-1---Erk-2 及 PI3-K---Cdc42。本實驗的發現將有助於瞭解葛瑞夫茲氏病之分子作用機轉，亦有助於新藥的開發，或可因而免除病人反覆發病及開刀之苦。

關鍵詞：葛瑞夫茲氏病、甲狀腺增生、細胞訊息傳遞路徑

Abstract

Graves' disease is a potentially severe autoimmune disease, characterized by combinations of either hyperthyroidism, ophthalmopathy, or pretibial myxedema. The serum of patients with Graves' disease contains TSH receptor antibodies (TSHRab) that act on TSH receptor, resulting in goiter and hyperthyroidism. Physiologically, TSH regulates thyroid function by transducing the signal through multiple pathways, including adenylyl cyclase/cAMP, phospholipase A₂ (PLA₂)/arachidonic acid (AA), and phospholipase C (PLC)/Ca²⁺ signals. In the literature, Graves' immunoglobulin (IgGs) had been revealed to stimulate signal transduction pathways involving adenylyl cyclase/cAMP, phosphatidylinositol cascade and PLA₂. Many distinct signaling pathways such as signaling network downstream to cAMP, PKC, and PLC/Ca²⁺ are actively investigated, but little is known about the downstream signaling network of the cAMP, PLC/Ca²⁺ and PLA₂ pathways in the thyroid

cells elicited by Graves' IgGs.

In this report, by using western blot we investigate the activities of different kinase in 27 Graves' thyroid tissues, 10 benign thyroid nodules and 10 normal thyroid tissues. The results show that: 1) there is no significant difference between the expression amount of proteins such as Raf, Jun, Myc, STAT1-p, p38-p, Akt, Akt-p, Cdc2, Bad-p, IAP and the three groups; 2) compared to those of thyroid nodules and normal thyroid tissues, the expression amount of protein MEK-1, Erk-2, PI3-K and Cdc42 increase 2 to 8 folds in some Graves' thyroid tissues. Hence, two major signal pathways are newly disclosed: Raf---MEK-1---Erk-2 and PI3-K---Cdc42, which are involved in the thyroid hyperplasia in Graves' disease. The dissection of the molecular mechanism in our finding will clarify the pathogenesis of Graves' disease. We believe that the realization of disease entity might give a new insight into novel therapeutic development, and finally to prevent disease relapse and thyroid surgery.

Keywords : Graves' disease, TSH receptor antibody (TSHRAbs), signal transduction

計畫緣由與目的

- 一、葛瑞夫茲氏病為一嚴重之自體免疫疾病，其症狀包括甲狀腺機能亢進、脛前黏液水腫等。目前已知甲狀腺機能亢進乃由於甲促素（TSH）受體抗體作用於甲促素受體之結果。
- 二、於正常狀態下，甲促素與甲促素受體作用會引發多種訊息傳遞路徑，包括 adenylyl cyclase/cAMP, phospholipase A2 (PLA2) /arachidonic acid (AA) 及 phospholipase (PLC)/Ca²⁺ 等訊號。同時甲促素受體活化後作用於 G 蛋白

之次元蛋白包括 Gs (adenylyl cyclase pathway)、Gq (PLC pathway) 及 Gi (PLA2 pathway)。而在下游的訊息傳遞路徑的研究中則發現經由 Gi-PKC 及 cAMP 之相互作用，甲促素可調節 c-jun N-terminal kinase (JNK) 之活性。

- 三、於葛瑞夫茲氏病人血清中發現不同病人的甲促素受體抗體可作用於甲促素受體上之不同 epitope，甲促素受體抗體可活化 cAMP，而導致甲狀素、甲狀腺球蛋白之釋放，及細胞增生。根據先前的研究，葛瑞夫茲氏病人的免疫球蛋白顯示具有 adenylyl cyclase/cAMP、phosphatidylinositol cascade 及 PLA2 訊息傳遞的功能，且不同的區域受到結合將會調節其後引發之訊息傳遞。這些研究顯示，釐清甲促素與甲促素受體抗體之不同作用路徑，將有助於瞭解葛瑞夫茲氏病之作用機轉。

結果與討論

在徵求病人同意後，我們共取得有 27 個葛瑞夫茲氏病的甲狀腺檢體，它們來自於葛瑞夫茲氏病的病人接受手術；另有 10 個甲狀腺結節及 10 個正常的甲狀腺組織，它們因甲狀腺結節接受手術。由這些甲狀腺檢體所分離的蛋白質，我們利用 western blot 進行一系列訊息傳遞蛋白的表達研究，得到以下結果：1) 蛋白質 Raf、Jun、Myc、STAT1-p、p38-p、Akt、Akt-p、Cdc2、Bad-p 及 IAP 的表達量在葛瑞夫茲氏病、甲狀腺結節及正常甲狀腺組織中並無顯著差異；2) 相較於甲狀腺結節及正常甲狀腺組織，MEK-1、Erk-2、PI3-K、Cdc42 的表達量在部分葛瑞夫茲氏病的甲狀腺組織中為前者的 2 至 8 倍左右。由此得知，葛瑞夫茲氏病的甲狀腺增生，主要經由此兩條 signal pathways: Raf---MEK-1---Erk-2 及

PI3-K---Cdc42。此研究中 Akt 和 Akt-p 的表現不如預期，但由過去的文獻來看，PI3-K---Cdc42---Bad-p 應是可能的路徑，Bad-p 的表現雖無差異，但仍值得將來繼續觀察。

計畫結果自評

本研究目的乃著重於瞭解葛瑞夫茲氏病之甲狀腺細胞上所引發之細胞訊息傳遞路徑。我們探討了甲狀腺組織中 cAMP 及 PLC/Ca²⁺下游傳遞路徑之各種 kinase 之活性，包括 Raf、MEK-1、Erk-2、Jun、Myc、STAT1-p、p38-p 等、以及 PI3-K、Cdc42、Akt、Akt-p、Cdc2、Bad-p 及 IAP 的表達量。本實驗發現，葛瑞夫茲氏病甲狀腺增生之訊息傳遞主要經由兩條 signal pathways: Raf---MEK-1---Erk-2 及 PI3-K---Cdc42。其中 PI3-K 的表現增加，更顯示甲狀腺細胞增生之訊息傳遞可能經由 Cdc42 pathway 使細胞增生；或經由「抗細胞凋亡」路徑使細胞存活。本實驗之重要性在於提供將來研究葛瑞夫茲氏病免疫球蛋白作用於甲狀腺細胞訊息傳遞之進一步研究，明瞭其詳細分子機轉，亦將有助於新藥的開發，或可因而免除病人反覆發病或開刀之苦。

參考文獻

1. Terry F, Davies. Graves' disease. The Thyroid. 7 edition, Lippincott-Raven, 1996.
2. Rees Smith B., Hall R., Thyroid stimulating immunoglobulins in Graves' disease, Lancet 2 (1974) 427-431.
3. Pastan I., Macchia V., Mechanism of thyroid-stimulating hormone action. Studies with dibutyl 3'-5'-adenosine monophosphate and lecithinase C. J. Biol. Chem, 242 (1967) 5757-5761.
4. Field J.B., Ealey P.A., Marshall N.J., Cockcroft S., Thyroid-stimulating

hormone stimulates increasing in inositol phosphates as well as cyclic AMP in the FRTL-5 rat thyroid cell line, Biochem. J. 247 (1987) 519-524.

5. Domont J.E., Jauniaux J.C., Roger P.P., The cyclic AMP-mediated stimulation of cell proliferation, Trend Biochem. Sci. 14 (1989) 67-71.
6. Laurent E., Mockel J., Van Sande J., Graff I., Dumont J.E., Dual activation by thyrotropin of the phospholipase C and cyclic AMP cascades in human thyroid, Mol. Cell. Endocrinol. 52 (1987) 273-278.
7. Ginsberg J., Protein kinase C as a mediator of TSH and thyroid autoantibody action, Autoimmunity 13 (1992) 51-59.
8. Hara T., Namba H., Takamura N., Yang T.T., Nagayama Y., Fukata S., Kuma K., Ishikawa N., Ito K., Yamashita S., Thyrotropin regulates c-Jun N-terminal kinase (JNK) activity through two distinct signal pathways in human thyroid cells, Endocrinol. 140 (1999) 1724-1730.
9. Volpe R., Autoimmunity in the endocrine system, Monogr. Endocrinol. 20 (1981) 1-187.
10. VanSande J., Lejeune C., Ludgate M., Munro D.S., Vassart G., Dumont J.E., Mockel J., Thyroid stimulating immunoglobulins, like thyrotropin activate both the cyclic AMP and the PIP2 cascades in CHO cells expressing the TSH receptor, Mol/ Cell. Endocrinol. 88 (1992) R1-R5.
11. Di Cerbo A., Dirolamo M., Guardabasso V., DeFilippis V., Corda D., Immunoglobulins from Graves' patients

- stimulate phospholipase-A2 in FRTL5 thyroid cells, *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 74 (1992) 585-592.
12. Medina DL., Toro MJ., Santisteban P., Somatostatin interferes with thyrotropin-induced G₁-S transition mediated by cAMP-dependent protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase, *J Biol Chem* 275 (2000) 15549-56.
 13. Phelps E., Wu P., Bretz J., Baker JR. Jr., Thyroid cell apoptosis: A new understanding of thyroid autoimmunity, *Endocrinol Metab Clin NA* 29 (2000) 375-88.
 14. De Vita G., Berlingieri MT., Visconti R., Castellone MD., Viglietto G., Baldassarre G., Zannini M., Bellacosa A., Tsiichlis PN., Fuco A., Santoro M., AKT/protein kinases B promotes survival and hormone-independent proliferation of thyroid cells in the absence of dedifferentiating and transforming effects, *Cancer Research* 60 (2000) 3916-20.
 15. Gire V., Marshall C., Wynford-Thomas D., PI-3-kinase is an essential anti-apoptotic effector in the proliferative response of primary human epithelial cells to mutant RAS, *Oncogene* 19 (2000) 2269-76.
 16. Tang Y., Zhou H., Chen A., Pittman RN., Field J., The Akt proto-oncogene links Ras to Pak and cell survival signals, *J Biol Chem* 275 (2000) 9106-9.