

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

過氧化體增生接受子 γ 在葛雷夫氏症眼病變 扮演角色之研究

計畫類別：☒個別型計畫 ☐整合型計畫

計畫編號：NSC 89 - 2314 - B - 002 - 075

執行期間：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

計畫主持人：黃天祥 台大醫院內科

共同主持人：呂鋒洲 台大醫學院生化學科

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：台大醫院內科及台大醫學院生化學科

中 華 民 國 89 年 11 月 7 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

過氧化體增生接受子 γ 在葛雷夫氏症眼病變扮演角色之研究

The study of role of PPAR γ in Graves' ophthalmopathy

計畫編號：NSC 89-2314-B-002-075

執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：黃天祥

執行機構及單位名稱：台大醫院內科

共同主持人：呂鋒洲

執行機構及單位名稱：台大醫學院生化學科

協同主持人：周介仁

執行機構及單位名稱：台大醫院眼科

計畫參與人員：楊美齡

執行機構及單位名稱：台大醫學院生化學科

e-mail：huang@ha.mc.ntu.edu.tw

一、中文摘要

葛瑞夫茲氏眼病變，簡稱甲狀腺眼病變，是一種自體免疫性的疾病，病人在眼球外周圍肌肉組織，眼球後結締及脂肪組織會大量增生，並且眼球組織浸潤在大量的免疫性細胞中，主要為 CD4⁺ 型之 T 淋巴球及吞噬細胞。眼球後纖維母細胞可抑制 T 淋巴球的 APO-1 蛋白表現量，進而保護 T 淋巴球能免於計畫性細胞死亡，使免疫反應得以持續進行；自葛瑞夫茲氏眼病變的病人取得之眼球後纖維母細胞，在適當的荷爾蒙存在下，具有分化成脂肪細胞的能力。由我們的實驗得知，不罹患葛瑞夫茲氏眼病變的病人與葛瑞夫茲氏眼病變的病人之纖維母細胞的過氧化體增生接受子 γ 形式，其蛋白質含量及與過氧化體增生接受子核酸序列的結合能力並無不同。但訊息傳遞活化轉錄因子 3，在葛瑞夫茲氏眼病變的病人之纖維母細胞的蛋白質含量，卻明顯比較少。

關鍵詞：葛瑞夫茲氏眼病變、眼球後纖維母細胞、過氧化體增生接受子

Abstract

Graves' Ophthalmopathy (GO), the most frequent extrathyroidal manifestation of Graves' disease, remains a pathogenetic enigma and a therapeutic dilemma. Support for the concept that GO is of autoimmune origin comes from the associated histopathological

changes. There is an increased volume of the extraocular muscles and orbital connective and adipose tissues; the extraocular muscles are edematous due to increased production of the hydrophilic glycosaminoglycans (GAGs) in the orbital tissue; a marked infiltration of immunocompetent cells is detectable. Orbital fibroblasts may contribute to perpetuate the ongoing immune reaction in the orbit by protecting infiltrating T cells from apoptosis. Orbital fibroblasts include a subpopulation of cells (preadipocytes), which, under particular hormonal stimulation, differentiate into adipocytes and may contribute to the increased volume of retroorbital adipose tissue. In the present study, we succeed to isolate fibroblasts from minced explants of connective tissue removed in the course of transantral orbital decompression surgery for GO. Using Western blotting and Electrophoretic gel mobility shift assays, the protein level and the DNA binding affinity on PPAR response element (PPRE) of nuclear PPAR γ in the cultured Graves' and normal orbital fibroblasts are not changed significantly. But the protein amount of signal transducer and activator of transcription (STAT3) is decreased in the cultured Graves' orbital fibroblasts than in the normal orbital fibroblasts.

Keywords: Graves' Ophthalmopathy, Orbital Fibroblast, Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ

二、緣由與目的

典型的葛瑞夫茲氏病(Graves' disease)的臨床表現包括瀰漫性甲狀腺腫併甲狀腺機能亢進症、眼病變、脛前黏液水腫和甲狀腺肢端病變。至於葛瑞夫茲氏眼病變(Graves' Ophthalmopathy)，簡稱甲狀腺眼病變(thyroid eye disease)，是一種自體免疫性的疾病。在病理學上的觀察得知，葛瑞夫茲氏眼病變的病人，眼球外周圍肌肉組織(extraocular muscles)，眼球後結締及脂肪組織會大量增生，並且眼球組織浸潤在大量的免疫性細胞(immunocompetent cells)中，主要為CD4+型之T淋巴球及吞噬細胞(macrophage)。其致病機轉目前被認為可能是可以和甲促素受器(TSH receptor)反應的T細胞，認知到眼肌肉或眼球後結締組織的纖維母細胞上的甲促素受器，與之作用，然後分泌各種細胞激素，刺激它增生和分泌黏多醣(Glycosaminoglycans)(1-2)。

眼球後纖維母細胞(orbital fibroblast)在葛瑞夫茲氏眼病變的病理發展上，也扮演了部份的重要角色，包括在免疫反應進行時，抑制T淋巴球的APO-1蛋白表現量，進而保護T淋巴球能免於計畫性細胞死亡(apoptosis)，使免疫反應得以持續進行(3-6)；自葛瑞夫茲氏眼病變的病人取得之眼球後纖維母細胞，在適當的荷爾蒙存在下，具有分化成脂肪細胞的能力(7)，這可能是眼球後脂肪組織大量增生的原因之一。

前脂肪細胞，在分化前看起來類似脂肪組織基質中的類纖維母細胞的前脂肪細胞(fibroblastic preadipose cell)，分化啟動後，首先細胞失去纖維母細胞的形態而變圓，伴隨細胞骨架及細胞外間質的改變，因此細胞骨架(cytoskeletal)蛋白actin，tubulin的減少及collagen合成的增加先開始，接著才是三酸甘油酯(triglycerol)的累積。

過氧化體增生接受子(Peroxisome

Proliferator Activated Receptor)，目前分為 α ， β 及 γ 三種形式，其中 γ 形式(PPAR γ)，在脂肪細胞分化的過程中，扮演了很重要的角色。當老鼠的纖維母細胞株(如C3H10T1/2，3T3-L1等)，受到外界的刺激(如Dexamethasone)，會引起PPAR γ 的表現，此一轉錄調節因子會與Retinoid-like Receptor(RXR α)形成異構體(heterodimer)，與特定的DNA結合(Peroxisome Proliferator-Responsive Element---PPRE)，使得許多脂肪細胞特有的基因活化(Adipocyte-specific gene)，如aP2，Phosphoenolpyruvate Carboxyl Kinase等，而導致脂肪細胞的分化(8-9)。

因此本研究計劃的目標，在評估人類眼球後纖維母細胞分化成脂肪細胞的過程中，過氧化體增生接受子 γ 形式(PPAR γ)，是否在葛瑞夫茲氏眼病變病理發展過程中，扮演一個很重要的角色。

三、結果與討論

由病人進行眼科手術時，取得部分眼球後組織，浸泡在含有抗生素的生理食鹽水中，儘可能快速的將眼球後組織以剪刀剪碎，培養在六公分培養皿內，約7至10天後，可看到已有部份纖維母細胞貼在培養皿底部，且細胞邊緣已長出(outgrowth)，此時將組織取出，換上新鮮的培養液，待二至三星期細胞邊緣已發展良好且長滿，即可分盤(subculture)。由圖一可看出，培養出的纖維母細胞，具有典型的紡錘型形狀，且細胞邊緣也發展良好，圖一A,B為不罹患葛瑞夫茲氏眼病變的病人之纖維母細胞，圖一C,D為葛瑞夫茲氏眼病變的病人之纖維母細胞，其中圖一D為細胞長滿時的情況。

接下來將纖維母細胞的核蛋白(nuclear extract)抽出，以泳動阻滯電泳(Electrophoretic gel mobility shift assays)方法，分析其核蛋白是否有與過氧化體增生

接受子核酸序列(PPRE)的結合能力。由圖二可看出，不罹患葛瑞夫茲氏眼病變的病人之纖維母細胞與葛瑞夫茲氏眼病變的病人之纖維母細胞的核蛋白，兩者皆有與過氧化體增生接受子核酸序列的結合能力，但兩者並無不同。

再以西方墨點法(Western blotting)，分析其蛋白質含量，由圖三 A 可看出，不罹患葛瑞夫茲氏眼病變的病人之纖維母細胞與葛瑞夫茲氏眼病變的病人之纖維母細胞的過氧化體增生接受子 γ 形式(PPAR γ)之含量並無不同。但若分析其訊息傳遞活化轉錄因子 3(signal transducer and activator of transcription, STAT3)，在葛瑞夫茲氏眼病變的病人之纖維母細胞的蛋白質含量，明顯比不罹患葛瑞夫茲氏眼病變的病人之纖維母細胞少得多(由圖三 B)。

四、計畫成果自評

本計畫在一開始即遭遇到不少困難，首先眼球後組織的取得十分不容易，常常只能取到很少的組織。再者，在初期培養眼球後纖維母細胞成功的機率約只有百分之二十至三十，經過一段時間的摸索，更改了部份策略，才能夠培養出細胞型態良好的纖維母細胞，並且大大的提高了成功機率。

但由結果可知，不罹患葛瑞夫茲氏眼病變的病人與葛瑞夫茲氏眼病變的病人之纖維母細胞的過氧化體增生接受子 γ 形式(PPAR γ)，其含量及與過氧化體增生接受子核酸序列的結合能力並無不同。這與我們當初所預期的結果並不相同，我們推測其原因可能是這些葛瑞夫茲氏眼病變的病人都有接受糖皮素(glucocorticoid)的治療，糖皮素是一種抗發炎藥，可抑制發炎反應，並降低眼球後纖維母細胞分泌及合成黏多醣(2)，因此病人屬於不活動的病程時期。另外，由文獻得知，以此種方法培養眼球後纖維母細胞，在葛瑞夫茲氏眼病變的病人，其分化成脂肪細胞的能力，個體差異很大，平均不超過百分之五至十(7)。因此

病人的選擇條件與樣本數的多寡可能需要小心評估。

而檢測另一種與發炎反應息息相關的轉錄因子，由初步結果得知，在葛瑞夫茲氏眼病變的病人之纖維母細胞的訊息傳遞活化轉錄因子 3 (signal transducer and activator of transcription, STAT3)(10)，其蛋白質含量比較少，或許訊息傳遞活化轉錄因子 3 在葛瑞夫茲氏眼病變的病理發展過程中，扮演了部份的角色。

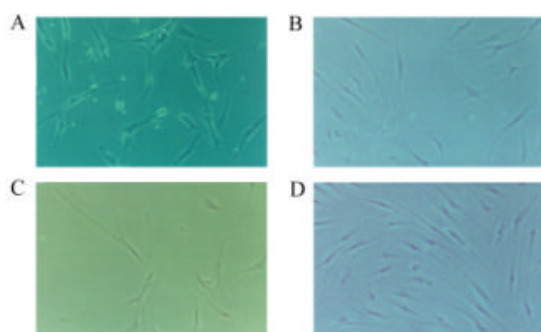
五、參考文獻

1. Felz MW, Stein PP (1999) The many 'faces' of Graves' disease. Part 1. Eyes, pulse, skin, and neck provide important clues to diagnosis. *Postgraduate Medicine* 106:57-64.
2. Bartalena L, Pinchera A, Marcocci C (2000) Management of Graves' ophthalmopathy : reality and perspectives. *Endocrine Reviews* 21:168-199.
3. Burch HB, Wartofsky L (1993) Graves' ophthalmopathy : current concepts regarding pathogenesis and management. *Endocrine Reviews* 14:747-793.
4. Bahn RS, Heufelder AE (1993) Pathogenesis of Graves' ophthalmopathy. *New England Journal of Medicine* 329:1468-1475.
5. Weetman AP, Cohen S, Gatter KC, Fells P, Shine B (1989) Immunohistochemical analysis of the retrobulbar tissues in Graves' ophthalmopathy. *Clinical and Experimental Immunology* 75:222-227.
6. Davies TF (1995) Seeing T cells behind the eye. *European Journal of Endocrinology* 132 : 264-265.
7. Sorisky A, Pardasani D, Gagnon A, Smith TJ (1996) Evidence of adipocyte

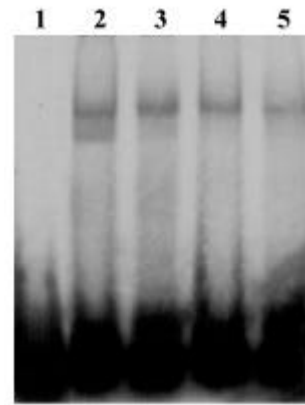
differentiation in human orbital fibroblasts in primary culture. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81:3428-3431.

8. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J (1996) The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1302:93-109.
9. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM (1995) Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Current Opinion in Genetics and Development* 5:571-576.
10. Booz GW, Baker KM (1995) Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovascular Research* 30:537-543.

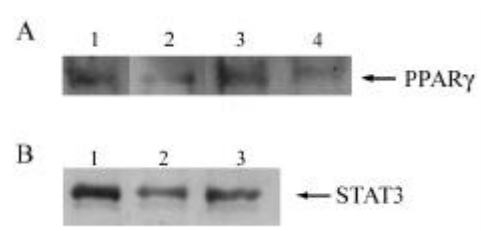
六、圖表說明



圖一 自組織培養出的眼球後纖維母細胞的細胞型態。圖一 A,B 為不罹患葛瑞夫茲氏眼病變的病人的纖維母細胞，圖一 C,D 為葛瑞夫茲氏眼病變的病人的纖維母細胞，其中圖一 D 為細胞長滿時的情況。



圖二 不罹患葛瑞夫茲氏眼病變的病人的纖維母細胞與葛瑞夫茲氏眼病變的病人的纖維母細胞核內蛋白，與過氧化體增生接受子核酸序列的結合能力並無不同。所用的探針為 Acyl-CoA oxidase 的過氧化體增生接受子核酸序列(ACOX-PPRE)。Lane 2 及 3 為不罹患葛瑞夫茲氏眼病變的病人的纖維母細胞的核內蛋白。Lane 4 及 5 為葛瑞夫茲氏眼病變的病人的纖維母細胞的核內蛋白。



圖三 自組織培養出的眼球後纖維母細胞內的過氧化體增生接受子 γ 形式及訊息傳遞活化轉錄因子 3 的蛋白質表現量。圖 A 為過氧化體增生接受子 γ 形式的蛋白質表現量，Lane 1 及 2 為不罹患葛瑞夫茲氏眼病變的病人的纖維母細胞，Lane 3 及 4 為葛瑞夫茲氏眼病變的病人的纖維母細胞。圖 B 為訊息傳遞活化轉錄因子 3 的蛋白質表現量，Lane 1 為不罹患葛瑞夫茲氏眼病變的病人的纖維母細胞，Lane 2 及 3 為葛瑞夫茲氏眼病變的病人的纖維母細胞。