

# 行政院國家科學委員會專題研究計劃成果報告

計劃名稱：探討甲狀腺疾患病人與一氧化氮產量之關聯性  
Nitric oxide production in thyrotoxicosis and thyroid carcinoma patients.

計劃類別：個別型計劃 整合型計劃

計劃編號：NSC 89-2314-B-002-219

執行期間：88年08月01日至89年07月31日

計劃主持人：廖廣義 教授

處理方式：一年後可對外提供參考

執行單位：台大醫學院外科

中華民國 90 年 03 月 21 日

## 引言

一氧化氮(NO)在人體中操控與傳遞著許多重要的功能和訊息，如血小板凝集，各平滑肌的舒張；外來感染物、甲狀腺癌細胞的捕殺以及近年來在神經及細胞訊息傳遞上的許多發現。隨著被諾貝爾獎的肯定，NO的作用在世界各地正被熱烈的研究著，其中關於免疫系統、一氧化氮與癌症之間交互關係的研究亦是一重要項目。有報告指出 interleukin-2 的抗惡性腫瘤作用是來自 NO 產量的促進作用，以 interleukin-2 治療腫瘤時 NO 產量會與腫瘤的大小成反比，然而這些研究人員也推測 NO 對惡性腫瘤的作用有促進及對抗的雙重角色。類似的情形亦見於其他眾多報導中。例如 Jansson O.T.等人(1998 年)發現長腫瘤的個體其巨噬細胞 NO 產量會明顯下降，但是 Gardner T.E.等人(1995 年)的報告中，患有肺癌的病人的巨噬細胞使其可誘導型 NO 合成酵素(iNOS)含量提升，NO 產量有較健康人明顯上升，且不只發生在癌症的部位，而是因癌症引起的非特異性免疫發炎反應。這結果也和人類的單核球會因大腸癌細胞的刺激而產生 NO 來調控 MHC class I and class II 和吸附因子(adhesion molecules)的報導一致。在關於甲狀腺癌方面，曾有報導指出甲狀腺癌細胞株會分泌對嗜中性血球的趨向分子(Neutrophil chemotactic factors)，意味著甲狀腺癌細胞會對嗜中性血球刺激。而在我們分析甲狀腺癌病人的血漿時發現其 NO 產量明顯低於控制組病人的產量。這些不同的結果引發我們去思考有關癌症與免疫系統，一氧化氮的交互作用的問題，且在本計畫中，我們將深入研究甲狀腺功能變異與免疫系統及一氧化氮產量之間機轉調控。例如 Blum C.等人(1976 年)報告 TRH 可以調控嗜中性血球執行其防衛功能的酵素(myeloperoxidase, alkaline phosphatase)且改變其多項生理代謝使之趨向活化，甲狀腺亢進的病人其白血球數目會減少，吞噬及吸附能力降低而自由基分泌卻增加以及 Lopez-Moratalla 等人(1996 年)發現格雷夫氏症病人的單核球有被活潑而使可誘導型一氧化氮合成酵素表現(inducible nitric oxide synthase)等，顯示甲狀腺正常與否對免疫系統的影響。

由上敘述可知，免疫系統會因癌症及甲狀腺正常與否而被激強或壓制，而 NO<sup>-</sup> 產量與免疫系統的強弱與調控有極大關係。尤其是感受敏銳，分佈廣泛的嗜中性血球及其所分泌的 NO<sup>-</sup>。被激強的免疫系統除了對抗癌細胞外，也會有產生類似自體免疫性疾病副作用的疑慮。這些對病情可能會產生不同的影響。研究或進而調控在此時的免疫系統，可以提供監測甚至改善病情的契機，且對預後的狀況會產生重大影響，就有報導指出一氧化氮是調控甲狀腺功能的一重要因素，且可能是以重要的自體分泌(autocrine)或區域分泌(paracrine)角色來進行。而我們已初步發現甲狀腺癌病人的血漿 NO<sup>-</sup> 產量明顯低於控制組病人的。但是甲狀腺癌對嗜中性球 NO<sup>-</sup> 產量的影響及因此對病情和預後的影響卻仍未被研究清楚，因此在本計劃中我們計畫分離甲狀腺癌病人的嗜中性球，檢

測其殺菌、吞噬、趨附性(chemotaxis)、吸附性(adhesion)及活性氧自由基、NO<sup>-</sup>分泌等功能，來和正常人的比較。分析這些變化和甲狀腺癌或甲狀腺其他病症的交互關係，有無特異性，調控這些改變對預後的影響等，都被深入的地研究。

## 研究方法

### 一. 病患選擇:

選擇甲狀腺癌患者 30 名，良性甲狀腺腫瘤患者 30 名，原發性甲狀腺機能亢進 20 名；另外，對照組方面選擇甲狀腺癌患者之正常組織 20 名。

### 二. 標本採取:

在病患手術中，切取組織，兒組織則需注意不要取得出血組織，放在液態氮中保存。

### 三. 病人血液抽取:

1. 在門診中抽取在沒有服藥下之甲狀腺機能機能亢進症病人血液 21c.c.，並且在此病人開刀前再抽血 21c.c.。
2. 甲狀腺癌病人在手術前抽取血液 21c.c.。

### 四. 前處理:

1. 抽出實驗對象的血後，取 1ml 全血置於 -70°C 冷凍保存。
2. 將全血加入等量之 3% Dextran(in 0.9% NaCl) 均勻混合後，直立冰浴 30 分鐘。
3. 取出上層懸浮液(白血球和血漿)，以 1200rpm 離心 10 分鐘後，再用 dropper 吸取上層血漿，下層白血球含約 85% PMN 用來測定 NADPH-dependent oxidase complex 及 NO synthase 所釋放的 free radicals 活性。
4. 下層紅血球取出 1ml 加入 hemolysis solution(含 ATP)充分混合後，靜置 10 分鐘，在 4°C 下，以 13000rpm 離心 10 分鐘，倒掉上清液，pellet 加 wash solution 混合後放置 5 分鐘，在 4°C 下以 12500rpm 離心 10 分鐘，去掉上清液，再加入 wash solution 後，重複上列步驟再洗一次，pellet 加 1ml sucrose buffer 後，用來測定 superoxide dismutase(SOD)。

### 五. 微量元素測定:

將 1ml 全血以“冷凍解凍法”來破壞其細胞膜並釋放出微量元素，再加入定量去離子水稀釋後，以 3000rpm 離心 10 分鐘，取上清液，將上清液送至台北病理中心檢驗鋅和銅。

### 六. NO 的測定:

一氧化氮的測量方法是根據化學發光法(chemoilluminescence)的原理，將待測之溶液樣本和血漿與 2 倍體積的 95% 酒精混合、全血與 3 倍體積的 95% 酒精混合後，在 4°C 的溫度中靜置 30 分鐘以上，以 15000rpm 的轉速離心 20 秒使溶液中的蛋白沉澱，上清液注入一氧化氮分析儀(Nitric Oxide Analyzer, model 280，

Sievers Instruments)的反應槽，槽中的氯化鉍溶液會將待測溶液裡的  $\text{NO}^{2-}$ 、 $\text{NO}^-$  還原成氣體形式的 NO，藉由純度 99.999% 的氮氣攜入分析儀分析結果。每次更換還原劑氯化鉍都必需以不同濃度的  $\text{NaNO}_3$  注入一氧化氮分析儀來做標準曲線，溶液樣本的峰值再根據標準曲線來換算成濃度值。

#### 七.Superoxide dismutase(SOD)分析:

1. 將 1ml 紅血球加入 3ml 水及 1.6ml chloroform:ethanol mixture (3:5 v/v)充分混合 5 分鐘
2. 以 3000g 離心 10 分鐘後取上清液
3. 再以 12000g 離心 10 分鐘後取澄清液
4. 取澄清液用 Spectrophotometer 在 570mm 的波長下,測定 SOD 的活性
5. 澄清液中蛋白質含量之測定方法為: Coomassie Brilliant Blue Method.(dye reagent from Bio-Rad Laboratories, Inc. Melville, New York, U.S.A.)

#### 八.Nitro Blue Tetrazolium (NBT) Reduction:

參考 Beauchamp 等人 (1971)的方法,利用自由基(free radical)會將 Nitro Blue Tetrazolium(金黃色)還原成不溶性的藍黑色 formazan ,而可以在 O.D. 570nm 處測到吸光。藉此可已觀察 superoxide( $\text{O}_2^-$ )的產生。

#### 九.Nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) Production Assay:

參考 Spitzer(1994)等人的方法。將 macrophages 以 endotoxin (lipopolysaccharide , LPS)刺激後，會產生 nitric oxide (NO)。而 NO 的 half life 不長,很快就會變成 nitrite ( $\text{NO}_2^-$ )及 nitrate ( $\text{NO}_3^-$ )。因此將細胞以 LPS 刺激四十八小時，將其 supernatant 取出，加入 Griess reagent (1% Sulfanilamide , 0.1% naphthyl ethylene , diamine dihydrochloride) ，則在波長 550nm 處會有吸光,再對照  $\text{NaNO}_2$  所做的標準曲線 即可得知其所含 nitrite 量。而 nitrite 的量可以間接來表示細胞所產生 nitric oxide 的量。

#### 十.Phagocytosis assay:

參考 Wan (1993)等人的方法。將 macrophage 調成  $1 \times 10^6$  cells/ml 然後取  $100 \mu\text{l}/\text{Well}$  放進 96-well plate。待 1 小時後細胞貼於 plate，去上清液。加入  $100 \mu\text{l}$  含螢光之 latex bead，在作用不同時間後，去上清液加 0.1% trypan blue  $100 \mu\text{l}$  去細胞外面的螢光。Trypan blue 作用 1 分鐘後移去。然後用 microplate 螢光測定儀在 485nm

excitation 530nm emission 測細胞內螢光強度。

## 結果

我們研究結果顯示，在甲狀腺正常組織其 NO 濃度為  $5.4 \pm 3.4 \mu\text{M}$ ，甲狀腺癌組織之 NO 值為  $9.3 \pm 5.2 \mu\text{M}$ ，原發性甲狀腺機能亢進組織之 NO 值為  $12.9 \pm 6.0 \mu\text{M}$ ，甲狀腺節結組織之 NO 值為  $7.3 \pm 4.1 \mu\text{M}$  (Table 1)。在血液方面，正常人其 NO 濃度為  $27.7 \pm 6.5 \mu\text{M}$ ，甲狀腺癌病人之 NO 值為  $16.8 \pm 12.2 \mu\text{M}$ ，原發性甲狀腺機能亢進病人之 NO 值為  $13.2 \pm 7.2 \mu\text{M}$ ，甲狀腺節結病人之 NO 值為  $21.3 \pm 9.2 \mu\text{M}$  (Table 2)。

Cu 及 Zn 方面，我們研究結果顯示在正常甲狀腺組織其值分別為  $0.042 \pm 0.022 \text{mg/g}$ 、 $0.567 \pm 0.337 \text{mg/g}$ ，在甲狀腺癌組織之 Cu 及 Zn 值為  $0.028 \pm 0.009 \text{mg/g}$ 、 $0.417 \pm 0.188 \text{mg/g}$ ，原發性甲狀腺機能亢進組織之 Cu 及 Zn 值為  $0.075 \pm 0.009 \text{mg/g}$ 、 $0.555 \pm 0.218 \text{mg/g}$ ，甲狀腺節結組織之 Cu 及 Zn 值為  $0.034 \pm 0.017 \text{mg/g}$ 、 $0.580 \pm 0.149 \text{mg/g}$  (Table 3)。在正常人血液中其值分別為  $0.034 \pm 0.005 \text{mg/g}$ 、 $0.198 \pm 0.026 \text{mg/g}$ ，在甲狀腺癌組織之 Cu 及 Zn 值為  $0.039 \pm 0.007 \text{mg/g}$ 、 $0.181 \pm 0.052 \text{mg/g}$ ，原發性甲狀腺機能亢進組織之 Cu 及 Zn 值為  $0.040 \pm 0.005 \text{mg/g}$ 、 $0.205 \pm 0.074 \text{mg/g}$ ，甲狀腺節結組織之 Cu 及 Zn 值為  $0.037 \pm 0.008 \text{mg/g}$ 、 $0.200 \pm 0.046 \text{mg/g}$  (Table 4)。

Table 1. Tissue NO concentration of control and thyroid disease patients.

Tissue	n	( $\mu\text{M}$ )
Normal control	9	$5.4 \pm 3.4$
Papillary carcinoma	20	$9.3 \pm 5.2^*$
Graves' disease	4	$12.9 \pm 6.0$
Nodular goiter	20	$7.3 \pm 4.1$

\*:  $P < 0.05$ , vs normal control.

**Table 2. Blood NO concentration of control and thyroid disease patients.**

Blood	n	( $\mu$ M)
Normal control	127	27.7 $\pm$ 6.5
Papillary carcinoma	20	16.8 $\pm$ 12.2*
Graves' disease	34	13.2 $\pm$ 7.2*
Nodular goiter	10	21.3 $\pm$ 9.2

#: P&lt;0.001, vs normal control.

**Table 3. Tissue Copper and Zinc concentration of control and thyroid disease patients.**

Tissue	n	Cu(mg/g)	Zn(mg/g)
Normal control	4	0.042 $\pm$ 0.022	0.567 $\pm$ 0.337
Papillary carcinoma	8	0.028 $\pm$ 0.009	0.417 $\pm$ 0.188
Graves' disease	8	0.075 $\pm$ 0.009*	0.555 $\pm$ 0.218
Nodular goiter	34	0.034 $\pm$ 0.017	0.580 $\pm$ 0.149

#: P&lt;0.05, vs normal control.

**Table 4. Blood Copper and Zinc concentration of control and thyroid disease patients.**

Blood	n	Cu(mg/g)	Zn(mg/g)
Normal control	20	0.034 $\pm$ 0.005	0.198 $\pm$ 0.026
Papillary carcinoma	14	0.039 $\pm$ 0.007*	0.181 $\pm$ 0.052
Graves' disease	12	0.040 $\pm$ 0.005*	0.205 $\pm$ 0.074
Nodular goiter	17	0.037 $\pm$ 0.008	0.200 $\pm$ 0.046

#: P&lt;0.05, vs normal control.

\*: P&lt;0.005, vs normal control.

## 討論

甲狀腺疾病對甲狀腺對 NO 濃度影響。NO 是調節細胞生長的因素之一。在我們的研究結果中，甲狀腺癌病人組織的 NO 值明顯增加；在 NO 研究中有報告指出，NO 的增加會降低 P53(tumor suppressor gene)。所以，NO 產量的高低與甲狀腺癌之細胞的增殖有密切關係。此結果就可說明甲狀腺節結細胞生長的原因之一。

而在人體組織內 Cu 降低與 SOD 降低有關連，甲狀腺癌細胞可能與 Cu 的攝取機制的不正常導致 SOD 值的下降。SOD 值的降低，所以 free radical 相對增高；free radical 類似 growth factor 效果，所以與癌細胞不受控制的增殖也有密切關係。

Cu 可能有保護甲狀腺組織不會惡化；在甲狀腺組織內 Cu 及 SOD 的降低，使 free radical 相對增高，而得到癌症的機會也會增加。在各種甲狀腺疾病的組織酵素活性及 Cu、Zn 含量，研究結果甲狀腺癌的變化最為顯著，這些足以說明不受控制增殖的原因。這發現假如能補充 Cu 有利於抑制癌細胞生長的措施之一。

### Tissue-NO

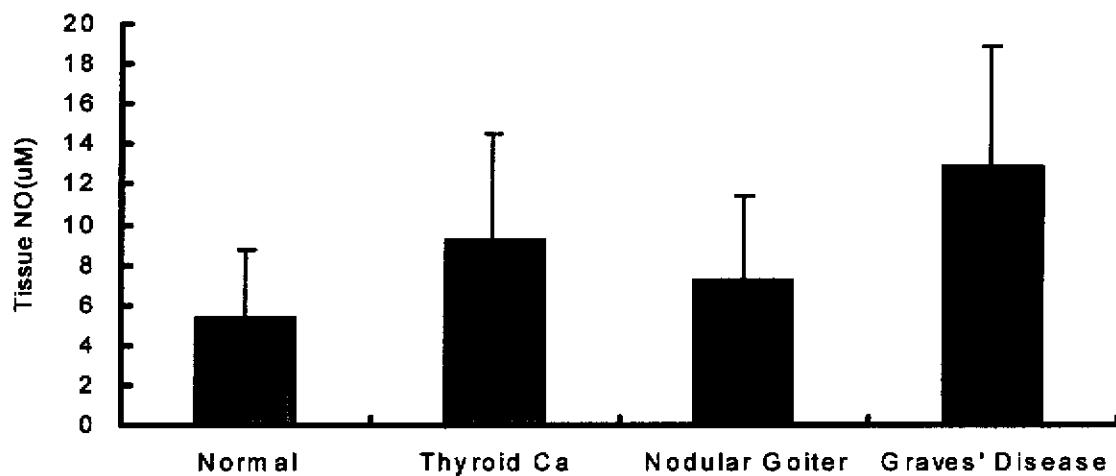


Fig. Tissue NO concentration of control and thyroid disease patients.

### Blood-NO

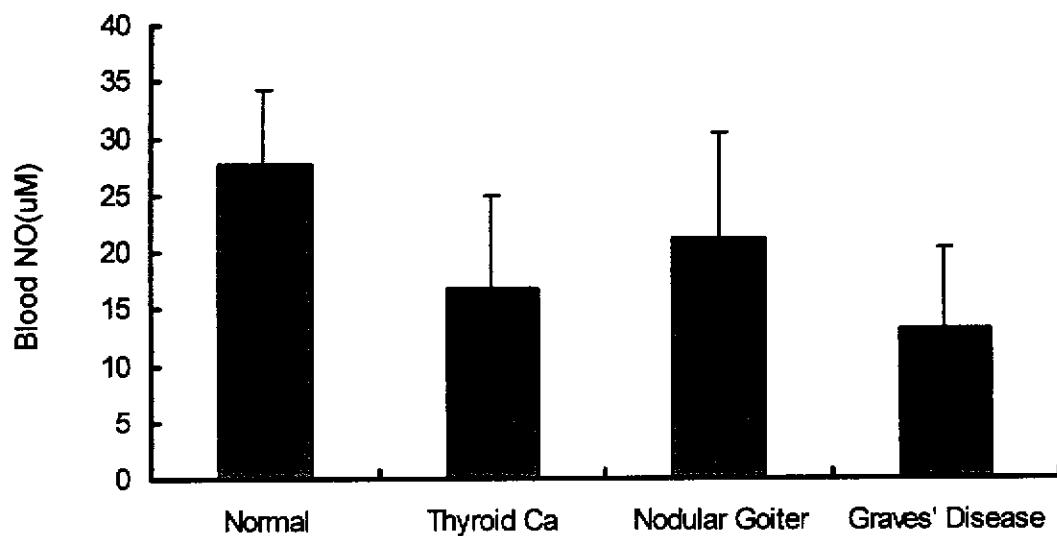
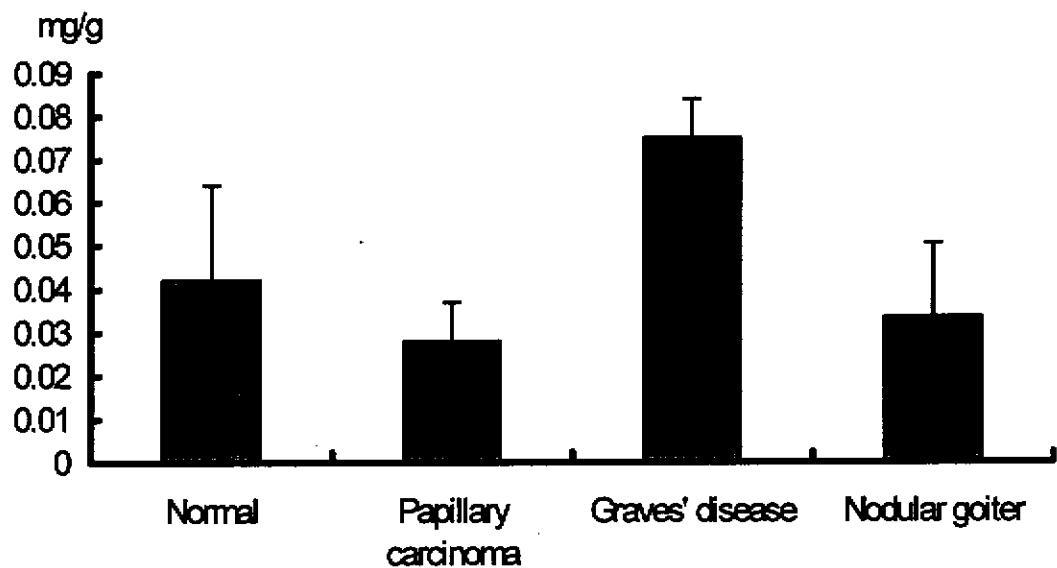
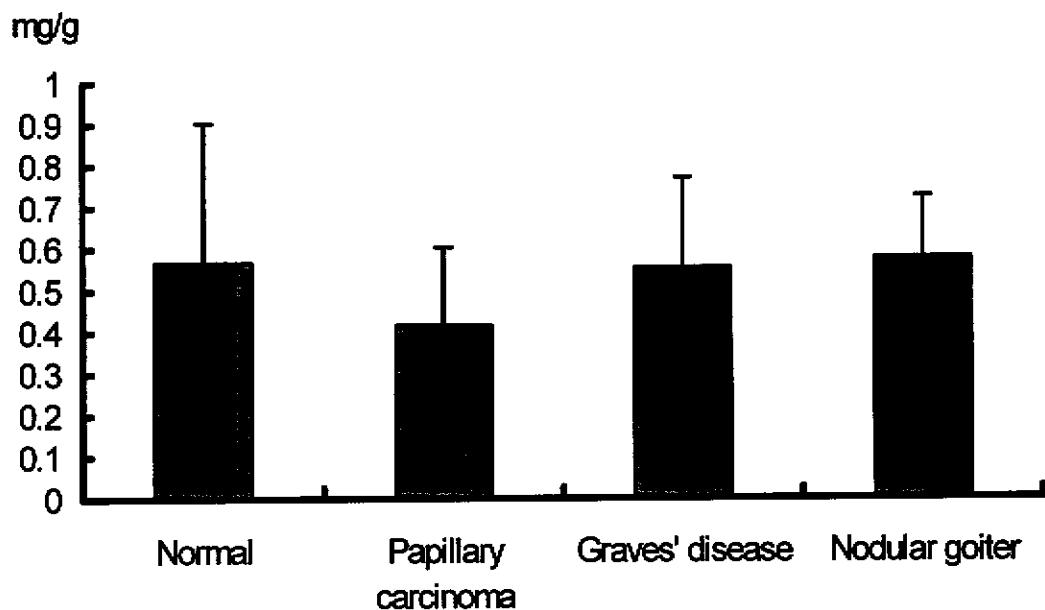


Fig. Blood NO concentration of control and thyroid disease patients.

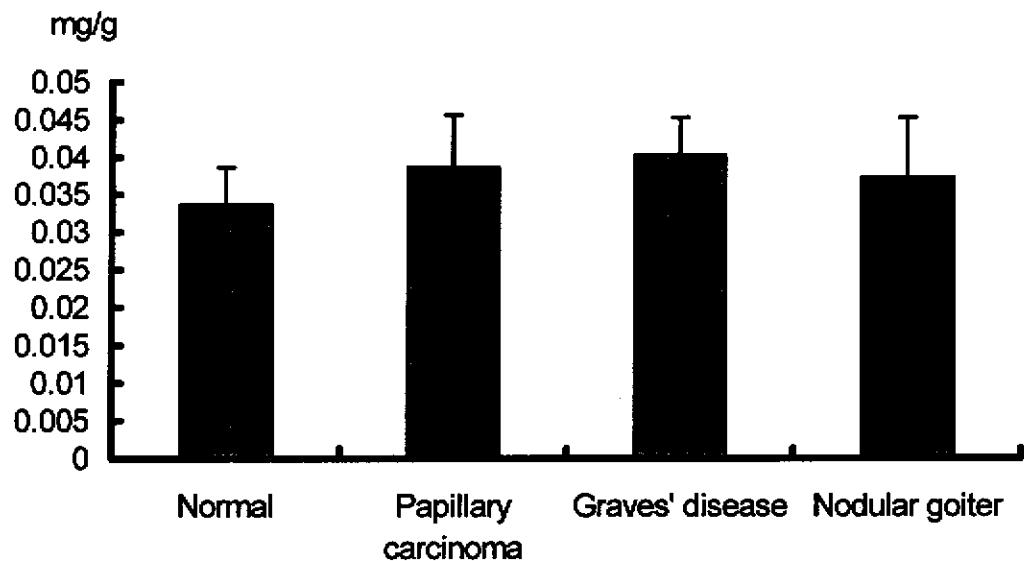
Tissue-Cu 比較圖



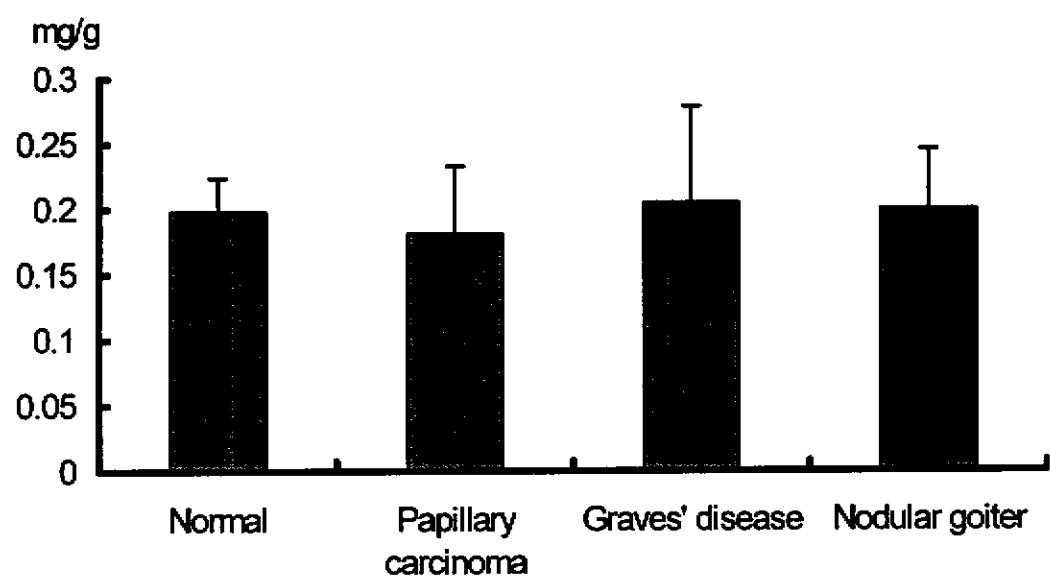
Tissue-Zn 比較圖



Blood-Cu比較圖



Blood-Zn比較圖



## References

1. Jansson OT, Morcos E., Brundin L., Bergerheim US, Adolfsson J., Wikund NP :Nitric oxide synthase activity in human renal cell carcinoma. *Journal of Urology.* 160(2):556-60,1998.
2. Gardner TE, Naama H., Daly JM :Peritoneal and splenic macrophage function in the tumor-bearing host. *Journal of Surgical Research.* 59(2):305-10,1995.
3. Liu CY, Wang CH, Chen TC, Lin HC, YU CT, Kuo HP :Increased level of exhaled nitric oxide and up-regulation of inducible nitric oxide synthase in patients with primary lung cancer. *British Journal of Cancer.* 78(4):534-41,1998.
4. Siedlar M., Marcinkiewicz J., Zembala M. :MHC class I and class II determinants and some adhesion molecules are engaged in the regulation of nitric oxide production in vitro by human monocytes stimulated with colon carcinoma cells. *Clinical Immunology & Immunopatholohy.* 77(3):380-4,1995.
5. Yoshida M., Matsuzaki H., Sakata K.,Takeya M., Kato K., Mizushima S., Kawakita M., Takatsuki K. :Neutrophil chemotactic factors produced by a cell line from thyroid carcinoma. *Cancer Research.* 52(2):464-9,1992.
6. Blum C., Grozdea J., Vergnes H. :[Cytochemical aspects of human polynuclear neutrophils under the in vitro and in vivo action of TRH]. *Comptes Rendus des Seances dela Societe de Biologie et de Ses Filiales.* 170(3):666-71,1976.
7. Hrycek A. :Functional characterization of peripheral blood neutrophils in patients with hyperthyroidism. *Folia Biologica.* 41(2):79-87,1995.
8. Lopez-Moratalla N., Calleja A., Gonzalez A., Perez-Mediavilla LA., Aymerich MS., Burrel MA., Santiago E. :Inducible nitric oxide synthase in monocytes from patients with Graves' disease. *Biochemical & Biophysical Research Communications.* 226(3):723-9,1996.
9. Haluzik M., Nedvidkova J., Kopsky V., Jahodova J., Horejsi B., Schreiber V. :The changes of the thyroid function and serum testosterone levels after long-term L-NAME treatment in male rats. *Journal of Endocrinological Investigation.* 21(4):234-