

中國醫藥大學
醫學研究所
碩士學位論文

以去氧核糖核酸之多形性來描繪葛瑞夫茲氏病
Genetic Polymorphisms in Graves' Disease Patients

指導教授：蔡輔仁 教授

共同指導教授：陳汶吉 副教授

研究生：陳榮興

中華民國九十三年五月

中文摘要

葛瑞夫茲氏病是一種常見的自體免疫性甲狀腺疾病，它的發生機轉在於甲促素受體抗體的產生；抗原肽和人類白血球抗原分子的呈現以及多種細胞激素的作用在這個免疫反應過程中都扮演極重要的角色。白血球介素-1、白血球介素-6和腫瘤壞死因子- α 屬於發炎性細胞激素，除此之外，這些蛋白質激素也具有調節免疫反應的功能；抗原肽運載體是內質網膜上的一個蛋白質，負責細胞質內抗原肽的運送，與抗原肽和人類白血球抗原分子的呈現有關。本研究的目的是在於探討調控這些蛋白質生成的基因其核酸變異與葛瑞夫茲氏病易感性之間的關聯。

單核酸多形性是尋找複雜疾病關聯基因的一個方法，去氧核糖核酸上單一核酸的不同可能改變基因的表現或蛋白質的生成而影響疾病的發生，葛瑞夫茲氏病的發生學在這方面的研究不少，許多基因已被發現與疾病有關，但是仍未得到完整的答案。本研究篩檢的基因多形性包括：白血球介素-1 β 基因啟動子區-305多形性、白血球介素-1 β 基因第5表現序列區多形性、白血球介素-1受體拮抗者基因第2插入序列區多形性、白血球介素-6基因啟動子區-572多形性、腫瘤壞死因子- α 基因啟動子區-308多形性及抗原肽運載體基因第333和第637密碼子多形性。

本研究是利用以聚合酶鏈反應為基礎的限制片段長度多形性的實驗方法來進行的。實驗結果顯示白血球介素-1 β 基因啟動子區 CC 同源合子基因型態和 C 對偶基因(風險對比值分別是 2.558 和 1.589)及抗原肽運載體 1 基因第 637 密碼子 AG 異型合子基因型態和 G 對偶基因(風險對比值 2.745)與葛瑞夫茲氏病的易感性有明顯的關聯；白血球介素-1 β 基因第 5 表現序列區 E1/E2 多形性、白血球介素-1 受體拮抗者基因第 2 插入序列區前後銜接重複變異數多形性、白血球介素-6 基因啟動子區 C/G 多形性、腫瘤壞死因子- α 基因啟動子區 A/G 多形性以及抗原肽運載體 1 第 333 密碼子 A/G 多形性則與葛瑞夫茲氏病的發生無關。

雖然正相關並不代表此基因一定會在臨床上造成疾病，但是它可以應用於危

險因子間交互作用的探討，計量基因與環境因子間的交互作用可以計算出那些因子可以提高發生葛瑞夫茲氏病的危險性。由於細胞激素涵蓋的範圍很廣，而抗原肽運載體的功能及其與葛瑞夫茲氏病發生之間的關聯性仍未完全確定，因此，進一步更廣泛深入的探討是有必要的。

英文摘要

Graves' disease (GD) is a common autoimmune thyroid disease. Its pathogenesis involves the production of thyrotropin receptor antibody (TRAb) through a cascade of immune reactions. The presentation of cytosolic peptide antigen with HLA molecule at the cellular surface and the activities of cytokines participate in these procedures. Interleukin-1 (IL-1), IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) not only are proinflammatory cytokines, but also have immunoregulatory activities; on the other hand, transporter associated with antigen processing (TAP) is responsible for cytosolic peptide transport and contributes to the presentation of endogenous antigen with HLA molecule. The aim of this study, therefore, investigates the relationship between the nucleotide variations in genes encoding cytokines and TAP and the susceptibility to GD.

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are useful in identification of associated genes with complex diseases. An alteration of a single nucleotide in a gene may interfere with the gene expression and protein production, and consequently, the susceptibility to disease. The study of genetic correlation with GD using SNPs analysis has been undergoing, but, however, is not complete. Further search of candidate genes for GD is necessary. Thus, this study screened the position polymorphisms of IL-1 β gene promoter (-350), IL-1 β gene exon 5, IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene intron 2, IL-6 gene promoter (-572), TNF- α gene promoter (-308) and TAP1 gene codons 333 and 637.

Polymerase chain reaction (PCR)-based restriction analyses were used in this study. The results demonstrated positive correlation between CC homozygous genotype/C allele in IL-1 β gene promoter (odds ratios: 2.558 and 1.589, respectively) and AG heterozygous genotype/G allele in TAP1 gene codon 637 (odds ratio: 2.745 for G

allele) with the susceptibility to GD. However, there were no statistical difference in polymorphisms of IL-1 β gene exon 5, IL-1Ra gene intron 2, IL-6 gene promoter, TNF- α gene promoter and TAP1 gene codon 333 between GD patients and normal controls.

Although positive association does not necessarily imply that carrying the genes will develop clinical disease, it worth to be further studied for the interaction of genes and some risk factors. Documenting gene-environmental interactions may identify groups at highest risk for the development of GD. Thus, it is helpful to understand the candidate genes through studies of genetic polymorphisms. As cytokines are a large group of proteins and the association between the TAP and the susceptibility to GD is still unclear, further study is necessary to understand the genetic predisposition to GD.

致謝辭

首先要感謝蔡輔仁教授在專業領域上的指導及其所領導的實驗室團隊在研究工作上的協助。

其次要感謝陳汶吉教授在課業問題上及各方面都能不厭其煩的提供援助。

感謝新陳代謝科張淳堆主任及所有同仁在臨床工作上的支援；也感謝研究所內所有授課老師的教導。

最後，感謝內人--淑蘭，及兩位女兒--中瑩及中慧在精神上的支持與鼓勵！

目 錄

中文摘要	1
英文摘要	3
誌謝辭	5
目錄	6
表目錄	7
圖目錄	8
論文正文	9
參考文獻	34
圖表附錄	46
簡單自述	61
授權書聲明	62

表目錄

表一、各組基因多形性聚合酶鏈反應的相關條件和限制酶的選擇

表二、葛瑞夫茲氏病病患與對照組白血球介素-1 β 基因啟動子區、第 5 表現序列區及白血球介素-1 受體拮抗者基因第 2 插入序列區基因型態分布頻率

表三、葛瑞夫茲氏病病患與對照組白血球介素-1 β 基因啟動子區、第 5 表現序列區及白血球介素-1 受體拮抗者基因第 2 插入序列區對偶基因分布頻率

表四、葛瑞夫茲氏病病患與對照組白血球介素-6 基因啟動子區基因型態及對偶基因分布頻率

表五、葛瑞夫茲氏病病患與對照組腫瘤壞死因子- α 基因啟動子區基因型態及對偶基因分布頻率

表六、葛瑞夫茲氏病病患與對照組抗原肽運載體 1 基因第 333 密碼子基因型態及對偶基因分布頻率

表七、葛瑞夫茲氏病病患與對照組抗原肽運載體 1 基因第 637 密碼子基因型態及對偶基因分布頻率

圖目錄

圖一、去氧核糖核酸萃取結果瓊膠電泳圖

圖二、白血球介素-1 β 基因啟動子區以聚合酶鏈反應放大後限制片段長度多形性瓊膠電泳分析圖

圖三、白血球介素-1 β 基因第 5 表現序列區以聚合酶鏈反應放大後限制片段長度多形性瓊膠電泳分析圖

圖四、白血球介素-1 β 受體拮抗者基因第 2 插入序列區以聚合酶鏈反應放大後瓊膠電泳分析圖

圖五、白血球介素-6 基因啟動子區以聚合酶鏈反應放大後限制片段長度多形性瓊膠電泳分析圖

圖六、腫瘤壞死因子- α 基因啟動子區以聚合酶鏈反應放大後限制片段長度多形性瓊膠電泳分析圖

圖七、抗原肽運載體 1 基因第 333 密碼子以聚合酶鏈反應放大後限制片段長度多形性瓊膠電泳分析圖

圖八、抗原肽運載體 1 基因第 637 密碼子以聚合酶鏈反應放大後限制片段長度多形性瓊膠電泳分析圖

論文正文

前言

葛瑞夫茲氏病(Graves' disease)，又稱做巴塞杜氏病(von Basedow's disease)，是一個常見的自體免疫疾病，也是造成甲狀腺機能亢進症的最主要原因，大約有60%到90%的甲狀腺機能亢進症是由此病所引起(1-3)。文獻上可考的第一個葛瑞夫茲氏病病例是由 Caleb Parry 於 1786 年所描述的一位婦女，此病人在產後發生甲狀腺腫及心悸(4)。在這之後雖然仍有其他的病例被觀察到，不過，一直到了 1835 年，才由 Robert Graves 對此病做一個完整、系統性的整理及報告，也並因此而被命名為 Graves' disease (5)。在西方國家，此病的發生率約為每年每千人 0.5 例，盛行率則為 2%；好發於 40 歲到 60 歲的年紀，男女比例約為 1/10 到 1/5；亞洲人的發生率與西方人大約相同，黑人的發生率則較低(6)。

葛瑞夫茲氏病的臨床表徵包括：甲狀腺腫、甲狀腺毒症(thyrototoxicosis)、浸潤性眼病變及偶而可見的局部性黏液水腫。甲狀腺腫通常是兩側瀰漫性的腫大，觸摸時會有震顫感，聽診時則有雜音；組織病理學檢查可見甲狀腺濾泡肥大及增生合併有柱狀多皺摺的上皮細胞和少許的膠質，發炎細胞—特別是淋巴細胞—的浸潤非常明顯。甲狀腺毒症常見的症狀及徵候，依出現比例的高低包括(7)：症狀—緊張(99%)、流汗過多(91%)、怕熱(89%)、心悸(89%)、倦怠(88%)、體重減輕(85%)、心搏快速(82%)、呼吸困難(75%)、虛弱無力(70%)、食慾增加(65%)、眼睛不適(54%)及排便次數增加(33%)；徵候—心搏快速(100%)、甲狀腺腫(100%)、皮膚溫熱潮濕(97%)、震顫(97%)、甲狀腺部位雜音(77%)、各種眼部徵候(71%)及心房纖維顫動(10%)。浸潤性眼病變依美國甲狀腺學會的分類(8)可分為 7 個等級—0)無症狀及徵候；1)無症狀但有輕微徵候：上眼瞼退縮、凝視、眼瞼遲滯、及眼球凸出但小於 22 毫米；2)軟組織的牽涉，包括症狀及徵候；3)眼球凸出且大於 22 毫米；4)眼外肌的牽涉；5)眼角膜的牽涉及 6)視神經的牽涉，並造成視覺喪失。局部性黏液水腫發生的機率僅有 5%到 10%，通常出現在兩側

脛前部位(pretibial myxedema)及足背，皮膚會呈現青紫色的硬結或斑塊(9)。此病在實驗診斷學方面的依據包括——、甲狀腺機能試驗：血清甲狀腺激素(T3/T4或 free T3/free T4)濃度增高及甲促素(thyrotropin, TSH)濃度降低；二、血清甲促素受體抗體(thyrotropin receptor antibody, TRAb)：95%的病患血清可以檢測到此種抗體的存在(10, 11)；三、血清抗微粒體 microsome (或抗甲狀腺過氧化酶 thyroid peroxidase)及抗甲球蛋白 thyroglobulin 抗體：80%以上的病患呈陽性反應(12)；四、24 小時碘-131 攝取：有助於診斷的確定，特別是血液檢查結果不明確時，增高的值代表甲狀腺機能亢進症及五、甲狀腺超音波檢查：可以幫助確定甲狀腺腫大。

葛瑞夫茲氏病的病理發生機轉目前已經研究得非常清楚：病人體內存在著有甲促素受體抗體，這些抗體屬於 G 群的免疫球蛋白，大部份的這些抗體一旦結合到了甲促素受體(thyrotropin receptor, TSH receptor)以後，一方面會抑制甲促素與其受體的結合，一方面則可經由活化腺苷酸環化酶(adenylate cyclase)，加強環腺苷酸(cAMP)的生成，以發揮其刺激性的作用，促進甲狀腺濾泡的生長和甲狀腺素的過度分泌，造成甲狀腺機能亢進症(13-15)。甲促素受體抗體的主要來源是甲狀腺內的淋巴細胞，另有一部份來自頸部淋巴結及骨髓。這些抗體的形成過程是依賴 T 細胞的作用而進行的：浸潤在組織內的 T 細胞先釋放出干擾素- γ ，刺激甲狀腺細胞表現出第 2 型人類白血球抗原(human leukocyte antigen, HLA class II)分子，經由樹狀細胞(dendritic cells)和 B 細胞提供的 CD80 和 CD86 以及 T 細胞提供的 CD28 等共同刺激分子(costimulatory molecules)的作用，促進甲狀腺細胞呈現出抗原(如：甲促素受體)給已被活化的 T 細胞；一旦甲促素受體被呈現出來以後，甲狀腺細胞會進一步表現出 CD40 和 CD54 等分子，再加上甲狀腺內發炎細胞分泌的白血球介素-1 (interleukin-1)、白血球介素-6 (interleukin-6)、和腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)以及其他細胞激素(cytokines)的協同作用，這些被活化的 T 細胞將會加速刺激 B 細胞的增殖和分化，以及隨後抗體的形成(16-18)。由此可知，甲促素受體抗體的形成是一連串複雜的免疫學和生

化學的過程，參與的因素很多，人類白血球抗原分子的表現、抗原(甲促素受體)的呈現、和細胞激素的作用在葛瑞夫茲氏病的發生學上，都佔有相當重要的地位；至於浸潤性眼病變和局部性黏液水腫的發生機轉，目前仍在持續研究中。

葛瑞夫茲氏病的易感性(susceptibility)是由遺傳、環境及個體內在等多重因素所決定的，這些因素的結合會增強 T 細胞和 B 細胞對甲促素受體的自我反應性，經由上述的作用機轉，進而引起疾病的發生。葛瑞夫茲氏病是一種多基因性疾病，因此沒有任何單一基因可以決定此病的發生。截至目前為止，最能被確認與葛瑞夫茲氏病有相關聯的基因當數人類白血球抗原基因。人類白血球抗原基因與葛瑞夫茲氏病的關聯性因人種不同而有差別，在白種人，HLA-DR3 和 HLA-DQ*0501 對偶基因會增加葛瑞夫茲氏病的易感性，而 HLA- DRB1*0701 則具有保護性的作用，可以減低其發生率(19, 20)；在香港的研究發現：中國人如果攜帶有 HLA-DQB1*0303 對偶基因者，其罹病率會增加(21)；而台灣的研究則顯示 HLA- A*0207 對偶基因會增加其易感性，HLA-A*3303 -B*5801 -DRB1*0301 會減低其發病的機會(22)。除了 HLA 基因以外，細胞毒殺 T 淋巴細胞抗原-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen-4, CTLA-4)基因也是一個重要的候選(candidate)基因(19, 20, 23)，但仍未獲得一致的公認。至於其他的基因，如：GD-1 (14q31)、GD-2 (20q11.2)、GD-3 (Xq21)及甲促素受體(TSHr)基因與葛瑞夫茲氏病的關聯性也都還沒有得到確認(24-27)。以上這些基因或許與葛瑞夫茲氏病的發生有關係，但都各只能解釋不到 5%的可能性(28)，顯示仍然有相當多的基因與葛瑞夫茲氏病的易感性有關聯，值得進一步去探討。另一方面，遺傳因素固然與葛瑞夫茲氏病的發生有關係，但是在荷蘭的一份研究發現：同卵雙胞胎發生葛瑞夫茲氏病的一致性僅 20%左右(29)，反應出其他非遺傳因素的影響。引發葛瑞夫茲氏病的環境及個體內在因素包括有：性別(女性)、壓力、抽煙、碘攝取、鋰鹽治療、抗病毒治療及抗 T 細胞抗體(Campath-1H monoclonal antibody)治療(30-34)；這些因素是如何引致葛瑞夫茲氏病的發生，目前仍未完全清楚。

基因遺傳與葛瑞夫茲氏病關聯性的研究，主要是以單核酸多形性(single

nucleotide polymorphisms, SNPs)來做分析的。單核酸多形性是人類基因多樣性最豐富的一種型式(35)，代表了每個不同的人與人之間某個基因上單一鹼基(base)的不同。這個基因上鹼基的不同可以造成表現序列(exon)區上密碼子(codon)以及蛋白質上氨基酸的不同、促進子(promoter)的不同、插入序列(intron)的不同、或者只是單純鹼基的不同，是尋找常見複雜疾病基因遺傳最好的資源。利用高精準的去氧核糖核酸定序程式去獲得大量數據，把疾病相關的基因多形性分布的資料收集後，再透過統計及公式之計算(36)，可以了解各種基因之變異所佔的可能發生率，葛瑞夫茲氏病的特性就很適合使用這個方法去探討。

單核酸多形性在人口上有特定的比例，且比傳統遺傳學上使用的微衛星重複序列數(microsatellite)多樣性穩定(35)，不會因世代的傳遞而消失；因此它不只代表可能的氨基酸組成改變及蛋白質功能改變，而影響了此基因的功能，並且與環境的互動上產生不同的反應能力，因而影響疾病的發生，它也可能連鎖了某個疾病的基因，使病患容易得病；因此在這幾年被應用於檢測複雜性疾病，廣泛使用成基因組上的遺傳標記(marker)，以搜尋可能的疾病病因或其連鎖基因，如骨質疏鬆症、癌症、高血壓以及自體免疫疾病，包括甲狀腺疾病(37)。這些疾病到目前為止，與單一致病因子相關性都不高，無法以傳統的突變分析方法來檢查。

基於上述原理，以單核酸多形性分析族群遺傳學的方式可以提供我們一個新的研究方法。但是它需要很多對平均分布的標記去檢驗人口中該多形性的比例，要找尋一些穩定、快速和精確的標記並不是件容易的工作，但當累積大量資料後，適合的標記就會逐步出現；出現之後，統計工作可以幫忙分析疾病的相關基因、疾病與環境之間的互動、藥物治療疾病時不同反應與基因多形性的關係、研發新藥，甚至可以來預測某族群的得病機率與種族遷移的分布。

雖然如此，以單核酸多形性的方式來尋找疾病基因的連鎖關係仍然是相當困難的，它並非萬靈丹，需要大量的病人數以排除誤差，要考慮基因在生殖時有重組的現象，同時人類的基因實在太多了，無法一一檢測，何況疾病本身可能就很複雜，這些都會增加研究的困難度(38)。葛瑞夫茲氏病的基因遺傳學研究在這

一方面仍未能有完整的答案，因此尋找一組穩定且完整包含葛瑞夫茲氏病的相關基因多形性是一件刻不容緩的工作。

據估計，人類有 3 萬到 5 萬個基因，因此要得到合適的基因做為疾病易感性的標記有如大海撈針一般，相當困難；因此，從已知的研究報告和推測與其發病機轉有關的基因中去尋找多形性是比較容易的方法。本研究所選用的基因共有白血球介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)基因、白血球介素-1 受體拮抗者 (interleukin-1 receptor antagonist, IL-1Ra)基因、白血球介素-6 (interleukin-6, IL-6) 基因、腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)基因和抗原肽運載體 1 (transporter associated with antigen processing 1, TAP1)基因；其理論基礎，如下所述：

一、白血球介素-1 β 基因

白血球介素-1 是一種細胞激素。細胞激素是一大群由白血球以自體分泌 (autocrine)或傍分泌(paracrine)方式所釋放出來的非酵素性多肽類(polypeptide)激素，主要是作用在造血細胞，具有調節發炎及免疫反應的功能，因此與自體免疫疾病的發生有密切的關係。如以功能來做區分，細胞激素可分成四大類：發炎性細胞激素(inflammatory cytokines)、免疫調節細胞激素(immunoregulatory cytokines)、化學激動素(chemokines)及生長因子和其他介素。白血球介素-1、白血球介素-6 和腫瘤壞死因子- α 都屬於第一大類—發炎性細胞激素。

白血球介素-1 家族包含三個成員：白血球介素-1 α (interleukin-1 α , IL-1 α)、白血球介素-1 β 和白血球介素-1 受體拮抗者，這三種細胞激素的基因各不相同，但都位於第 2 染色體的長臂上。白血球介素-1 β 的構造和功能都與白血球介素-1 α 相似，而且是人體內白血球介素-1 的主要成分；白血球介素-1 β 是由前驅物 pro-interleukin-1 β (pro-IL-1 β)轉化而來的，pro-IL-1 β 一旦被形成後，會先停留在細胞質內，並不具有生物活性，必須經由轉化酶 caspase IL-1 β -converting enzyme (ICE, caspase 1)的作用，分解成具活性的白血球介素-1 β 後，再釋放到細胞外。白血球介素-1 β 的最主要來源是單核性吞噬細胞，主要功用在於引致發

燒、急性期蛋白質(纖維蛋白原 fibrinogen、血清類澱粉質 A serum amyloid A、血紅素結合素 haptoglobin、C 反應蛋白質 CRP)的合成和造成惡病質等發炎反應；除此之外，白血球介素-1 β 也具有調節多種免疫學反應的功能，包括刺激本身及其他多種細胞激素的產生、T 細胞的活化、B 細胞的增殖和免疫球蛋白的形成；因此，白血球介素-1 β 被認為與多種的發炎性及免疫性疾病，包括：敗血症、粥狀動脈硬化、白血病、類風濕性關節炎和第 1 型糖尿病有關(39)。而 Kawabe (1989 年)等人和 Miyazaki (1989 年)等人也都發現了白血球介素-1 β 和葛瑞夫茲氏病的發生有明顯的關聯(40, 41)。白血球介素-1 β 基因促進子區和第 5 表現序列區的多形性曾被用來篩檢類風濕性關節炎的易感性(42)，不過其與葛瑞夫茲氏病的關聯性，迄今仍未被發現。

二、白血球介素-1 受體拮抗者基因

白血球介素-1 受體拮抗者在功能上是白血球介素-1 α 和白血球介素-1 β 的對抗者，它和白血球介素-1 受體結合後並不產生訊息，因而阻斷白血球介素-1 的功能。白血球介素-1 受體拮抗者第 2 插入序列區的多形性已被發現與多種的自體免疫疾病，如類風濕性關節炎、全身性紅斑狼瘡、潰瘍性結腸炎和簇狀禿髮 (alopecia areata)有密切的相關性(43-45)，至於其與葛瑞夫茲氏病相關性的研究則很有限，且仍有爭論。雖然 Blakemore 等人(46)認為：在白種人，白血球介素-1 受體拮抗者第 2 插入序列區的多形性與葛瑞夫茲氏病的發生有關係，但 Cuddihy (47)等人和 Muhlberg (48)等人則無得到相同的發現。

三、白血球介素-6 基因

白血球介素-6 除了由單核細胞製造以外，也可由其他多種型態的細胞製造並釋放出。單核細胞在接受白血球介素-1 及腫瘤壞死因子的刺激後會加速白血球介素-6 的表現，而白血球介素-4 及白血球介素-13 則抑制它的製造。白血球介素-6 是一個多功能性的細胞激素，除了與白血球介素-1 一樣，會參與發炎反應並與宿主防禦有關以外，也會引發腎上腺皮質刺激素及其他腦下垂體前葉激素，如泌乳素、生長激素和黃體生成素的分泌；另外它也會因為影響破骨細胞的功能，而與

骨質疏鬆症有關；某些惡性腫瘤，例如多發性骨髓瘤的發生也與其有關聯。白血球介素-6 在免疫學上也具有相當重要的地位，它會促進 T 細胞的生長和分化，因此缺乏此種激素的病人，其胸腺細胞和周邊血液 T 細胞的數目都會減少，細胞毒殺 T 細胞對濾過性病毒的反應也會減退；除此之外，白血球介素-6 也是 B 細胞生長和分化及抗體生成的一個重要促進因子，所以白血球介素-6 的缺乏將會影響 B 細胞對抗原的反應和抗體的生成，因而會影響自體免疫疾病，例如類風濕性關節炎(49)的易感性。一些研究也指出葛瑞夫茲氏病病患血液白血球介素-6 的濃度會明顯增高，而且與甲促素受體抗體的形成有直接的關係(50, 51)。

白血球介素-6 基因位於第 7 染色體(7p21)上，其啟動子區的多形性已被發現和多種發炎性疾病，如多發性骨髓瘤、粥狀動脈硬化和幼年型慢性關節炎的發生有關(52-54)；不過，令人意外的是：截至目前為止，仍然沒有這個基因與葛瑞夫茲氏病相關聯的報告，因此進一步的研究是需要的。

四、腫瘤壞死因子- α 基因

腫瘤壞死因子- α 的主要來源是單核吞噬細胞，除此之外，T 細胞、自然殺手細胞(NK cells)和肥胖細胞(mast cells)也都會製造這種細胞激素；干擾素- γ 可以促進腫瘤壞死因子- α 的製造和加強它的功能。腫瘤壞死因子- α 是發炎反應的主要生理媒介者(mediator)，在格蘭氏陰性菌製造的脂多醣(lipopolisaccharide, LPS)刺激下，它會被製造、釋放出來，並啟動一連串的發炎反應，因而被認為是敗血性休克的重要媒介者；腫瘤壞死因子- α 同時也會增加細胞對內皮的黏連性，這種現象對細胞是有害的，反映著感染微生物體後免疫反應過程對宿主組織的傷害性。腫瘤壞死因子- α 在免疫學上的作用包括向上調節第 1 型人類白血球抗原、活化吞噬細胞，並引導單核吞噬細胞製造白血球介素-1、白血球介素-6 及腫瘤壞死因子- α 本身，因此對細胞性免疫和體液性免疫都具有重要的調節功能。利用反轉錄酶聚合酶鏈反應(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) 及免疫組織化學技術，可以明顯的在葛瑞夫茲氏病病患的甲狀腺偵測到腫瘤壞死因子- α 與腫瘤壞死因子- α 訊息者核糖核酸(mRNA)，顯示這個激素與葛瑞夫茲

氏病的重要關聯性(55-57)。

腫瘤壞死因子- α 基因位於第 6 染色體(6p21.3)，其啟動子區的多形性已被研究的很多，且與多種發炎性與自體免疫性疾病有關(58)。基於這個激素的生理作用與其基因的所在位置，腫瘤壞死因子- α 基因的多形性應該與葛瑞夫茲氏病的發生有密切關聯；不過，相關的文獻並不多見，目前僅知 Kula 等人曾經在 2001 年報告過在波蘭人有此關聯性的存在(59)。

五、抗原肽運載體 1 基因

抗原肽運載體是一種多次膜穿越的蛋白質，負責將細胞質內經蛋白酶分解過後的抗原肽(antigen peptide)進一步的修飾並轉運到內質網腔內，在內質網腔內，這些抗原會被負載到新生成的第 1 型人類白血球抗原分子上，如此形成的複合體再被運送到細胞膜表面，呈現給細胞毒殺 T 細胞，並進而引發一連串的免疫反應步驟。事實上，這種運載體是由兩個構造相似的次單位—抗原肽運載體 1 (TAP1) 和抗原肽運載體 2 (TAP2) 所組成的一個異形雙聚合體(heterodimer)；任一次單位的缺陷均會使得細胞質內被蛋白酶分解過後的抗原肽無法再進一步的被處理，因此也就無法被運送到內質網腔內，內質網腔內的第 1 型人類白血球抗原分子在缺乏抗原肽與之結合的情況下就會退化掉，而無法呈現在細胞表面，因而導致免疫系統功能的障礙。一個罕見的疾病 type 1 bare lymphocyte syndrome (BLS)，包括 CD8 淋巴細胞的減少合併支氣管擴張、支氣管肺炎、鼻竇炎及鼻息肉，即是由於抗原肽運載體的缺陷所造成的(60, 61)。

抗原肽運載體 1 和抗原肽運載體 2 分別由不同的基因 *TAP1* 和 *TAP2* 所傳遞密碼而生成的，這兩個基因都位於第 6 染色體第 2 型人類白血球抗原基因的區域(region)內，介於 HLA-DP 和-DQ 兩個部位(loci)之間。鑑於抗原肽運載體基因的所在和抗原肽運載體的功能特性，我們可以推論某些抗原肽運載體基因的對偶基因應該會和許多致病原以及自體免疫的易感性有關；不過，在實際上，有關抗原肽運載體基因多形性與自體免疫疾病關聯性的報告並不多，這些疾病包括異位性皮膚炎、第 1 型糖尿病，及類風濕性關節炎等(62-64)。相同的，這 2 個基因的多

形性在葛瑞夫茲氏病的研究報告也很少；不過，在不同的人種，如白種人(Rau, 1997 年)、黑人(Ofosu, 1998 年)及黃種人(Cai, 2002 年)，都曾經發現抗原肽運載體基因多形性與葛瑞夫茲氏病的關聯性(65-67)。

研究目的

葛瑞夫茲氏病是一個非常普遍而常見的疾病，其致病基因是多重性的，且尚未被完全確認，仍有相當大的領域值得去進一步探討。臨床上，大部分的疾病，包括葛瑞夫茲氏病都是在症狀表現得很明顯了以後才被診斷出來，因而耽擱了治療的時機和效果，如果能預先偵測出某些與疾病相關的候選基因來當作「標記」，對於疾病的確認、治療及預後都將有莫大的助益。多種細胞激素的作用及抗原肽的運送和呈現與葛瑞夫茲氏病的發生有密切的關聯，但其基因多形性與疾病之間的關係則仍未完全清楚，有一部分已被發現與葛瑞夫茲氏病的易感性有關，但仍未被完全確認(如白血球介素-1 受體拮抗者基因等)，一部分則被認為與葛瑞夫茲氏病的發生無關(如白血球介素-6 基因等)。因此，這個研究計畫以聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction)為基礎的限制酶(restriction enzyme)分析法來測試白血球介素 1- β 基因啟動子區及第 5 表現序列區、白血球介素-1 受體拮抗者基因第 2 插入序列區、白血球介素-6 基因啟動子區、腫瘤壞死因子- α 基因啟動子區以及抗原肽運載體 1 基因第 333 密碼子和第 637 密碼子的單核酸多形性，藉以評估特定的基因型態和對偶基因與葛瑞夫茲氏病易感性的相關聯性。

材料與方法

壹、儀器設備與實驗試劑

一、本研究所使用之大型儀器設備和其廠商名稱與產地如下：

- 1、分光光度計(spectrophotometer)：Beckman DU-640 (Palo Alto, USA)。
- 2、恆溫循環水槽系統：Hotech 631-D (Hotech, Taiwan)。
- 3、聚合酶鏈反應機器：Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 2400 (Foster City, CA, USA)。
- 4、自動去氧核糖核酸(DNA)定序儀：ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)。
- 5、高速離心機：Beckman Model J2-21 (Palo Alto, USA)。
- 6、離心機：Kubota 5800, Kubota 1300 (Japan), Biofuge 12000 (Germany)。
- 7、冷凍乾燥機：Dura-Dry (FTS system, New York, USA)。
- 8、瓊膠電泳系統：Cosmo Bio. Mupid-2 mini gel migration through (Japan)。
- 9、核酸染色照相系統：Evergene gel analysis system (England, UK)。

二、主要實驗試劑

- 1、去氧核糖核酸抽取試劑：Genomaker (Bloosm, Taipei)。
- 2、聚合酶：Perkin Elmer Taq polymerase (Foster City, CA, USA)。
- 3、去氧核糖三磷酸(dNTPs)：New England Biolabs (Beverly, USA)。
- 4、限制酶：New England Biolabs (Beverly, USA)。
- 5、Genescan-350 TAMRA (6-carboxyl-tetramethylrhodamine, red) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)。

貳、實驗方法

本研究是以聚合酶鏈反應為基礎的限制酶分析法來進行的。這個方法的基本原理是先用不同組的引子(primers)，以聚合酶鏈反應的方式來放大所需的去氧核糖核酸片段，之後再加入限制酶(限制片段長度多形性 restriction fragment length

polymorphism, RFLP) ,最後藉由瓊膠電泳法(gel electrophoresis)加入 ethidium bromide (EtBr, 是一種橙色染料, 也是一種強力誘變劑, 它會插入去氧核糖核酸的氮基間, 尤其是雙股者), 在紫外線下使之呈色, 藉以得知所測試的基因型, 以供分析。整個實驗方法大致分成四個步驟: 一、病患蒐集, 二、去氧核糖核酸萃取, 三、聚合酶鏈反應及四、限制酶反應、核酸電泳及照相。

一、病患蒐集

於門診蒐集 95 位(21 位男性及 74 位女性)葛瑞夫茲氏病的病患, 這些病患都是居住在中台灣地區的漢族人, 年齡在 17 歲到 71 歲之間(平均 35.3 ± 10.5 歲), 除了葛瑞夫茲氏病以外, 沒有罹患其他的急慢性疾病, 且都不抽煙; 葛瑞夫茲氏病的診斷標準包括: 甲狀腺機能亢進症(症狀、徵候、及實驗室檢查均符合), 瀰漫性甲狀腺腫(理學檢查及超音波檢查均符合), 和陽性的血清抗甲狀腺成份(甲促素受體、微粒體、和甲球蛋白)抗體, 及合併有或無瀰漫性眼病變。對照組分別包含 163 位(白血球介素 1- β 基因和白血球介素-1 受體拮抗者基因)、60 位(白血球介素-6 基因和腫瘤壞死因子- α 基因)、和 105 位(抗原肽運載體 1 基因) 40 歲以上, 性別、地域及種族都相當的健康成年人, 這些對照組的成員都沒有甲狀腺腫而且甲狀腺機能正常, 沒有甲狀腺機能亢進症和其他自體免疫疾病的過去史和家族史, 也都不抽煙。每位參與本研究的受試者均經過詳細的說明, 並取得其書面同意書。

二、去氧核糖核酸萃取

實驗中的每位病患及健康成人對照組均於早上 8 時至 10 時抽血, 以 EDTA (N,N,N,N,-ethylenediaminetetraacetic acid)抗凝管收集 3 至 5 ml 的血液標本, 於室溫下, 以 1500 rpm 離心 15 分鐘, 分離上層血漿與下層濃縮血球, 利用下層濃縮血球來萃取去氧核糖核酸。去氧核糖核酸的萃取分成 2 大步驟:

(一)分離淋巴球(isolation of lymphocyte)

- 1、將血液檢體置於 Kubota 5800 離心機中以 1100 rpm 的速度離心 10 分鐘。
- 2、取其中間(buffy-coat)層至 15 ml 紅頭試管中。

- 3、以 1:3 比例加入紅血球溶解緩衝液(RBC-lysis buffer)。
- 4、以 Vortex 震盪儀震動 30 秒。
- 5、置於碎冰中 15 分鐘。
- 6、以 450 G 正常離心 17 分鐘。
- 7、加入 1 ml Geno-Maker (WB kit, Wako)，再震盪一次。
- 8、置於室溫 5 分鐘。
- 9、移至小試管(ependorf)，再加入氯仿(chloroform) 500 μ l 使蛋白質沉澱。
- 10、震盪後在攝氏 4 度下，使用 Kubota 1300 離心機，以 12000 rpm 之速度離心 5 分鐘。
- 11、將上清液(supernatant)小心的移至新的小試管(微量離心管，ependorf)中，並避免抽吸到紅血球層。

(二)提取去氧核糖核酸

- 1、加入異戊醇(isopropanol) 600 μ l 至滿，使去氧核糖核酸沉澱，輕微震盪可見到絲狀(silk-like)去氧核糖核酸。
- 2、以微量離心機 Biofuge 在 12000 rpm 的速度下離心 3 分鐘。
- 3、吸光所有上清液。
- 4、以 1 ml 75%酒精輕輕沖洗(rinse)兩次。
- 5、置乾(air dry)。
- 6、加入 100 μ l 純水，置於攝氏 37 度下 30 分鐘。
- 7、取 2 μ l 進行瓊膠電泳觀看初步去氧核糖核酸萃取的成果(圖一)，確定去氧核糖核酸萃取成功後，便進入聚合酶鏈反應步驟。

三、聚合酶鏈反應

- (一)不同組的聚合酶鏈反應是將下列物質混合：全量 25 μ l 之基因組去氧核糖核酸為模板(template)，2-6 pmole 的兩股引子，2.5 μ l 10 倍緩衝溶液(buffer solution)，3 μ l dNTPs 2.5 mM，1 倍的 Taq 聚合酶緩衝液(polymerase buffer，1.5 mM MgCl₂)，0.25 單位的 AmpliTaq DNA polymerase (Perkin Elmer)。本實

驗檢測白血球介素 1 相關基因多形性、白血球介素-6 基因多形性、腫瘤壞死因子- α 基因多形性和抗原肽運載體 1 基因多形性所採用的引子序列分別是根據 Cantagrel (42)等人、Chung (68)等人、Galbraith (69)等人和 Saiki (70)等人的報告。

(二)將上述混合物置於 1.5 ml 聚合酶鏈反應專用試管混合均勻後，放入以電腦程式控制熱循環溫度的聚合酶鏈反應器(GeneAmp PCR system 2400)，進入聚合酶鏈反應程序。

每個不同基因多形性分析所使用的引子序列和反應條件整理如附表一。

四、限制酶反應、核酸電泳及照相

通常以 10 μ l 的各組聚合酶鏈反應產物中加入限制酶，在反應體積為 1.5 μ l 的 10 倍緩衝液中作用；反應後以 3%瓊膠於 100 伏特電壓下進行電泳分析限制片段長度多形性，再以 ethidium bromide 染色，並在紫外線(UV)燈光下照相存檔，據以判別其結果。各受測試基因限制酶反應的情形，概述如下，並整理於附表一：

(一)白血球介素-1 β 基因啟動子區

白血球介素-1 β 基因啟動子區多形性是位於上游-511 的位置，這個位置的核酸可能是 C 或 T，聚合酶鏈反應的產物以 *Ava*I 切割後，C 對偶基因在電泳上會是 190 bp 和 114 bp 長，而 T 對偶基因則是不可切割的 304 bp 長。

(二)白血球介素-1 β 基因第 5 表現序列區

白血球介素-1 β 基因第 5 表現序列區多形性以 *Taq*I 來切割，E1 等級是 135 bp 加 114 bp 長，E2 等級則是 249 bp 長。

(三)白血球介素-1 受體拮抗者基因第 2 插入序列區

白血球介素-1 受體拮抗者基因第 2 插入序列區的 86 bp 前後銜接重複變異數(variable number tandem repeat, VNTR)分成：I 等級是 410 bp、II 等級是 240 bp、III 等級是 500 bp、IV 是 325 bp，而 595 bp 的長度則是 V 等級。

(四)白血球介素-6 基因啟動子區

白血球介素-6 基因啟動子區多形性是位於上游-572 的位置，這個位置的核酸

可能是 C 或 G，聚合酶鏈反應的產物以 *Bsr*BI 切割後，G 對偶基因在電泳上會是 201 bp 和 95 bp 長，而 C 對偶基因則是不可切割的 296 bp 長。

(五) 腫瘤壞死因子- α 基因啟動子區

腫瘤壞死因子- α 基因啟動子區-308 核酸上含有 A/G 鹼基的多形性，聚合酶鏈反應後的產物以 *Nco*I 切割，A 對偶基因會是 97 bp 和 20 bp 長，而 G 對偶基因則是 117 bp 長。

(六) 抗原肽運載體 1 基因第 333 密碼子

抗原肽運載體 1 基因第 333 密碼子核酸上含有 A/G 鹼基的多形性，聚合酶鏈反應後的產物以 *Dpn*II 切割，A 對偶基因(ATC)會是 118 bp、74 bp 和 28 bp 長，而 G 對偶基因(GTC)則是 146 bp 和 74 bp 長。

(七) 抗原肽載體 1 基因第 637 密碼子

抗原肽運載體 1 基因第 637 密碼子核酸上含有 A/G 鹼基的多形性，聚合酶鏈反應後的產物以 *Acc*I 切割，A 對偶基因(GAC)會是 132 bp 和 51 bp 長，而 G 對偶基因(GGC)則是不可切割的 183 bp 長。

參、電腦資料處理

本實驗的統計以微軟公司出品的視窗軟體和試算軟體 EXCEL 來初步進行卡方檢定(chi-square test)運算，以分析基因型態與對偶基因分布頻率的差異性，但是當卡方檢定中標本數少於 30、其中單一數值低於 1 或者是 1/5 以上的數值低於 5 時，則採用費雪氏精確檢定(Fisher's exact test)；風險對比值(odds ratios, OR)和 95%信賴區間(confidence interval, CI)被用來測試特定基因組中多形性與疾病易感性的關聯性；當 p 值低於 0.05 時，兩組之間的差異即被視為有顯著性。

結果

一、白血球介素-1 β 基因啟動子區多形性

瓊膠電泳圖分析顯示可切割的 CC 同源合子、不可切割的 TT 同源合子和 CT 異型合子(圖二)。以卡方檢定分析基因型態分布頻率(表二)顯示:CT 異型合子的比例在病患組(51.6%)與對照組(47.9%)是大約相當的,但是與對照組相比較,病患組有較高的 CC 同源合子比例(30.5%,對照組為 20.8%)和較低的 TT 同源合子比例(17.9%,對照組為 31.3%),具有明顯統計學上的差異($p=0.038$);如以 TT 同源合子的頻率當作 1,則 CC 同源合子的風險對比值為 2.588 (95%信賴區間:1.205—5.430)。在對偶基因分布頻率的分析(表三),也可發現病患組有較高的 C 對偶基因比例(56.3%,對照組為 44.8%)和較低的 T 對偶基因比例(43.7%,對照組為 55.2%),統計學上的差異($p=0.011$,卡方檢定)非常明顯;C 對偶基因的風險對比值為 1.589 (95%信賴區間:1.094—2.309)。

二、白血球介素-1 β 基因第 5 表現序列區多形性

瓊膠電泳圖分析顯示可切割的 E1/E1 同源合子、不可切割的 E2/E2 同源合子和 E1/E2 異型合子(圖三)。在基因型態分布頻率(表二)上,病患組與對照組的 E1/E1、E1/E2 和 E2/E2 分別是 94.7%、5.3%和 0.0%以及 95.1%、4.3%和 0.6%,不具有明顯統計學上的差異($p=0.851$,費雪氏精確檢定);在對偶基因分布頻率的分析(表三),病患組與對照組的 E1 和 E2 對偶基因的比例也大約相同,分別是 97.4%和 2.6%與 97.2%和 2.8%,同樣不具有明顯統計學上的差異($p=0.930$,費雪氏精確檢定)。

三、白血球介素-1 受體拮抗者基因第 2 插入序列區多形性

瓊膠電泳圖分析顯示 I/I 同源合子、I/II 異型合子、II/II 同源合子和 IV/IV 同源合子(圖四)。這 4 種基因型態在病患組與對照組的分布頻率分別為 91.6%、7.4%、1.0%和 0.0%與 89.6%、9.2%、0.6%和 0.6%,在統計學上不具有明顯的差異($p=0.897$,費雪氏精確檢定,表二);3 種對偶基因 I、II 和 IV 的分布頻率則分

別是 95.3%、4.7%和 0.0%與 94.2%、5.2%和 0.6%，在統計學上也不具有明顯的差異($p=0.849$ ，費雪氏精確檢定，表三)。在本實驗中，並無發現”III”和”V”這 2 個等級的對偶基因。

四、白血球介素-6 基因啟動子區多形性

瓊膠電泳圖分析顯示可切割的 GG 同源合子、不可切割的 CC 同源合子和 CG 異型合子(圖五)。在基因型態分布頻率(表四)上，病患組以及對照組的 CC、CG 和 GG 分別是 62.1%、34.7%和 3.2%以及 65.0%、28.3%和 6.7%，不具有明顯統計學上的差異($p=0.516$ ，費雪氏精確檢定)；在對偶基因分布頻率的分析(表四)，病患組以及對照組的 C 和 G 對偶基因的比例分別是 79.5%和 20.5%以及 78.2%和 20.8%，也不具有明顯統計學上的差異($p=0.930$ ，卡方檢定)。

五、腫瘤壞死因子- α 基因啟動子區多形性

瓊膠電泳圖分析顯示可切割的 GG 同源合子、不可切割的 AA 同源合子和 AG 異型合子(圖六)。在基因型態分布頻率(表五)上，病患組與對照組的 AA、AG 和 GG 分別是 0.0%、10.5%和 89.5%與 3.3%、15.0%和 81.7%，不具有明顯統計學上的差異($p=0.132$ ，費雪氏精確檢定)；在對偶基因分布頻率的分析(表五)，病患組以及對照組的 A 和 G 對偶基因的比例則分別是 5.3%和 94.7%以及 10.8%和 89.2%，也不具有明顯統計學上的差異($p=0.075$ ，卡方檢定)。

六、抗原肽運載體 1 基因第 333 密碼子多形性

瓊膠電泳圖分析顯示可切割的 AA 同源合子、不可切割的 GG 同源合子和 AG 異型合子(圖七)。表六顯示病患組與對照組的 AA、AG 和 GG 基因型態分布頻率分別是 52.6%、42.1%和 5.3%與 58.2%、32.3%和 9.5%，統計學上不具有明顯的差異($p=0.253$ ，卡方檢定)；對偶基因 A 和 G 在這 2 組的分布頻率則分別是 73.7%和 26.3%與 74.3 和 25.7%，也不具有明顯統計學上的差異($p=0.075$ ，卡方檢定)。

七、抗原肽運載體 1 基因第 637 密碼子多形性

瓊膠電泳圖分析顯示可切割的 AA 同源合子、不可切割的 GG 同源合子和

AG 異型合子(圖八)。病患組與對照組的 AA、AG 和 GG 基因型態分布頻率(表七)分別是 63.2%、34.7%和 2.1%與 85.7%、12.4%和 1.9%，以費雪氏精確檢定分析可發現有明顯統計學上的差異($p < 0.0001$)。這 2 組的 A 和 G 對偶基因分布頻率(表七)分別是 80.5%和 19.5%與 91.9%和 8.1%，也同樣具有明顯統計學上的差異($p = 0.0008$ ，卡方檢定)；G 偶基因的風險對比值為 2.745 (95%信賴區間：1.482—5.085)。

討論

利用聚合酶鏈反應及限制片段長度多形性方法，本研究偵測葛瑞夫茲氏病病患白血球介素-1 相關基因、白血球介素-6 基因、腫瘤壞死因子- α 基因及抗原肽運載體 I 基因單核苷酸多形性與疾病易感性之間的關聯性。實驗結果發現白血球介素-1 受體拮抗者基因第 2 插入序列區 86 bp 前後銜接重複變異數多形性和白血球介素-1 β 基因第 5 表現序列區、白血球介素-6 基因啟動子區(-572)、腫瘤壞死因子- α 基因啟動子區(-308)及抗原肽運載體 I 基因第 333 密碼子單一核苷酸的變異與葛瑞夫茲氏病的發生無關，但是白血球介素-1 β 基因啟動子區及抗原肽載運體 I 基因第 637 密碼子單核苷酸多形性與葛瑞夫茲氏病的易感性在統計學上有明顯的關聯性。白血球介素-1 β 基因啟動子區的單核苷酸多形性是發生在上游-511 的位置，與對照組相比較，葛瑞夫茲氏病病患有較高的 CC 同源合子基因型態和 C 對偶基因的比例；理論上，這個位置單一核苷酸的變異可能改變 IL-1 β 基因的表現、IL-1 β 的製造和隨後的免疫反應，因此影響到葛瑞夫茲氏病的發生；白血球介素-1 受體拮抗者基因曾被認為與葛瑞夫茲氏病的發生有關(47)，不過，據我們所知，截至目前為止，並無白血球介素-1 β 基因與葛瑞夫茲氏病有相關聯性的報告，本實驗的結果提供了這方面最原始初步的資料。另一方面，特定的抗原肽運載體對偶基因已被發現與包括葛瑞夫茲氏病在內的多種自體免疫疾病有關(62-67)，本實驗也進一步證實抗原肽運載體 I 基因單一位置核苷酸多形性與葛瑞夫茲氏病之間的關聯性；葛瑞夫茲氏病病患與對照組比較，在此基因第 637 密碼子位置有明顯較高的 AG 異型合子基因型態和 G 對偶基因比例。因此，白血球介素-1 β 基因和抗原肽運載體 I 基因都適合做為遺傳上的標記以預測葛瑞夫茲氏病的發生。

葛瑞夫茲氏病是由於甲促素受體抗體對甲狀腺的刺激作用而造成的，甲促素受體抗體是一種免疫球蛋白 G 抗體(71)，它的產生依賴於 T 淋巴細胞的雙重功能。一般而言，多種物質：包括細菌毒素、組織受傷及各種外在或內在抗原

的刺激，會導致人體 CD4⁺輔助 T (Th) 淋巴細胞產生 2 種類型(Th1 及 Th2) 細胞激素的製造；Th1 細胞製造干擾素- γ 、白血球介素-2 和腫瘤壞死因子- β ，並促進細胞性免疫的活性，Th2 細胞則製造白血球介素-4、-5、-6、-9、-10 及-13，並提供適當的援助以促進體液性免疫反應和抗體的生成。Th1 細胞激素會抑制 Th2 細胞激素所媒介的反應，相反的，Th2 細胞激素也會抑制 Th1 細胞激素所引導的反應步驟(72, 73)，抗體的形成與否即決定於這兩者之間的平衡是否能夠維持。白血球介素-1 基本上是屬於發炎性細胞激素，但是它也具有調節免疫的功能；它對淋巴細胞而言，是一種激活因子，可以刺激白血球介素-2、-4、-6 和干擾素- γ 的生成(39)，因此，對 Th1 和 Th2 兩種類型的細胞反應，都有相當程度的作用。

白血球介素-1 的活性會影響 Th1/Th2 兩種類型細胞激素平衡性的改變，這種關聯性曾被多位學者研究過，例如 Manetti 和其同事在玻管內實驗中即發現阻斷或中和白血球介素-1 的活性會減低白血球介素-4 的生成，而藉由 T 淋巴細胞以增加干擾素- γ 和白血球介素-1 受體拮抗者的生成，則可以促進 CD4⁺T 細胞表現出 Th1 類型的細胞激素分泌(74)；此外，Chensue 等人在活體內實驗也發現白血球介素-1 受體拮抗者的匱乏會促使 Th1 的反應型態偏移至 Th2 類型(75)。依此觀之，白血球介素-1 的作用比較偏向促進 Th2 反應途徑並抑制 Th1 反應步驟，因此有助於抗體的形成，而與葛瑞夫茲氏病的發生有很密切的關聯。截至目前為止，雖然仍未有白血球介素-1 促進甲促素受體抗體生成的直接證據，但是在實際的觀察中，Miyazaki 等人發現：甲狀腺濾泡週邊上皮細胞白血球介素-1 的存在和血清抗微粒體抗體的指數成正相關性(41)，而後者又能反映甲狀腺的免疫活性和甲促素受體抗體的生成(76)；這些結果進一步提供了白血球介素-1 β 促進葛瑞夫茲氏病發生的間接證據。

本實驗的結果顯示白血球介素-1 β 基因啟動子區的多形性與葛瑞夫茲氏病的易感性有明顯的關聯性，而第 5 表現序列區的多形性則與之無關。Smith 等人(1992 年)、Watanade 等人(1994 年)和 karpe 等人(1998 年)曾經注意到基因啟

動子區多形性與基因表現和臨床疾病—如：高脂血症—之間的相關性(77-79)，因此，我們可以推論白血球介素-1 β 基因啟動子區的單核酸多形性可以藉由干擾轉錄因子(transcription factors)與啟動子的結合，影響基因的表現和白血球介素-1 β 的生成，進而改變免疫反應和抗體的形成，最後決定疾病的發生；不過這個假設仍需要進一步完整的探討白血球介素-1 β 基因啟動子區多形性在白血球介素-1 β 製造過程中扮演的角色究竟如何，以及白血球介素-1 β 在葛瑞夫茲氏病病患體內免疫反應和疾病發生過程中影響的程度如何，才能得到確認。除了這個原因以外，白血球介素-1 β 基因多形性也可能透過另外兩個機轉以影響葛瑞夫茲氏病的發生：1)白血球介素-1 β 基因多形性可能透過基因重組連鎖不平衡(linkage disequilibrium)的方式而與葛瑞夫茲氏病的發生有關；由於白血球介素-1 β 基因位置是在2q12-14 (80)，非常接近CTLA-4基因的所在2q33 (81)，而後者是一個與葛瑞夫茲氏病易感性很有關聯的候選基因，白血球介素-1 β 基因可能因此而與葛瑞夫茲氏病的發生有間接的關聯性。2)白血球介素-1 β 除了具有免疫學上的功能以外，也可以直接影響甲狀腺的生物活性；它可以是一個化學物質或是類似內分泌激素的因子，因而可以影響甲狀腺細胞的分化、增殖和功能(40, 81)，因而與疾病的發生有直接的關聯性。

白血球介素-1 β 受體拮抗者基因是目前頗受注意與葛瑞夫茲氏病發生可能有關聯的基因，至於兩者是否真有相關，目前仍有爭論。利用聚合酶鏈反應偵測白血球介素-1受體拮抗者基因第2插入序列區前後銜接重複變異數的多形性，Blakemore (1995年)及其同事發現：在英國人，葛瑞夫茲氏病病患，與一般人比較，在白血球介素-1受體拮抗者基因多形性分析中，有較高的等位基因頻率和攜帶率(46)，因此認為兩者是有關聯的；不過，一樣是針對白種人的研究，Cuddily等人和Muhlberg等人在美國和德國的葛瑞夫茲氏病病患身上則無法得到相同的結論(47, 48)，而本實驗的數據也顯示台灣葛瑞夫茲氏病的發生與白血球介素-1受體拮抗者基因多形性是無關的。不同地區的研究為何會有不同的結果，目前並不清楚，或許就像人類白血球抗原基因一樣，白血球介素-1受體拮

抗者基因多形性在不同人種或種族之間會有不同的湊整性(pooling)。由於白血球介素-1 抗體拮抗者可以拮抗白血球介素-1 的作用，而且其基因的多形性也被用來篩檢自體免疫疾病的易感性，如類風濕性關節炎，或當作疾病嚴重程度的指標，如全身性紅斑狼瘡、簇狀禿髮、和第 1 型糖尿病(43, 45, 82)；因此，收集更多的病人數做進一步的分析，以釐清白血球介素-1 受體拮抗者基因多形性與葛瑞夫茲氏病易感性之間的關係是有必要的。

白血球介素-6 的作用是多重性的，在葛瑞夫茲氏病的發生學上也佔有相當程度的重要性；在受到了白血球介素-1 的刺激而產生了以後，白血球介素-6 可以協同其他細胞激素及因子，促進甲促素受體抗體的生成和疾病的發生；事實上，白血球介素-6 和週邊淋巴細胞的結合也確與血清甲促素受體抗體及甲狀腺激素濃度成正相關性(51)。因此，白血球介素-6 基因的表現，應該是會影響疾病的發生，不過，目前並未出現白血球介素-6 基因多形性與葛瑞夫茲氏病有關聯的研究報告。本實驗也發現葛瑞夫茲氏病病患其白血球介素-6 基因啟動子區-572 的單核酸多形性，在基因型態及對偶基因分佈比例上，都與正常健康人相似，顯示這個位置單一核酸的變異可能並不影響基因的表現，或者是基因表現的差異在程度上並未到足以影響抗體的生成和疾病的發生。

腫瘤壞死因子- α 基因多形性與葛瑞夫茲氏病之間的關聯性曾經被研究過，Kula 等人(2001 年)利用聚合酶鏈反應/*Nco*I 限制片段長度多形性分析 156 位葛瑞夫茲氏病病患和 80 位正常健康人腫瘤壞死因子- α 上游啟動子區-308 的單核酸多形性，結果發現病患組與對照組比較，有較高的 A 對偶基因分佈比例(24.7% : 9.3%， $p < 0.0001$ ；風險對比值：4.38)，AG 異型合子基因型態的頻率也較高(41.8% : 13.6%)，顯示這個基因位置單核酸多形性與葛瑞夫茲氏病的發生有關聯性(59)。本實驗的結果則顯示這個位置的 A/G 多形性並沒有影響到葛瑞夫茲氏病的發生。由於兩個實驗的對照組在基因型態和對偶基因分佈的頻率上是大約相同的，但是在病患組則有很大的差異，這是否代表著這個疾病的發生機制，在不同的種族是不完全相同的。

抗原肽運載體包含 2 個次單位：抗原肽運載體 1 及抗原肽運載體 2，這 2 個次單位構造大約相同，都各自由 1 個較長的厭水性多次穿越內質網膜的功能領域和 1 個較短的在細胞質部分結合有腺苷三磷酸的功能領域所組成，2 個不同次單位的厭水性功能領域會結合在一起，但在中間形成 1 個孔洞，以允許抗原肽通過內質網膜，至於在細胞質內的這一個功能領域，則負責抗原肽的選擇和結合，並由腺苷三磷酸提供能量，促使運載體發生結構性的改變，以方便抗原肽的輸送(83)。任一次單位任一功能領域上的氨基酸替換都可能改變載運體的三級結構，並因此而影響其將抗原肽轉運至內質網腔內的功能(84)。

抗原肽運載體 1 基因的多形性是在 19 世紀初首次被發現的(83)。最主要的核酸變異發生在第 333 和第 637 密碼子(cDNA：1069 和 1982)的位置，這 2 個密碼子傳遞密碼所形成的氨基酸分別位於運載體的膜穿越功能領域和腺苷三磷酸結合的功能領域內(84, 85)。抗原肽運載體的主要功能在轉運抗原肽至內質網內與第 1 型人類白血球抗原分子結合，此複合物最後會一起呈現在細胞表面給細胞毒殺 T 淋巴細胞，以引導免疫反應的進行。抗原肽運載體 1 基因多形性與葛瑞夫茲氏病之間的關聯性曾經在高加索人(Rau, 1997 年)及中國人(Cai, 2002 年)身上被發現過(65, 67)。這 2 個研究進行的方式是相似的，而且所篩檢的都是雙形性(dimorphic)抗原肽運載體 1 基因對偶基因的多形性，所獲致的結果也大約相同：與對照組相比較，病患組 TAP1*0301 對偶基因[纈氨酸 Val(GTC)-333/天門冬氨酸 Asp(GAC)-637]的比例較高，而 TAP1*0401 [異白氨酸 Ile(ATC)-333/甘氨酸 Gly(GGC)-637]的比例則較低；除此之外，Rau 等人也另外發現：在第 333 密碼子單一位置的核酸變異上，葛瑞夫茲氏病病患與正常人比較，有較高的 GTC (纈氨酸)和較低的 ATC (異白氨酸)比例。本實驗所進行的方式與上述 2 個研究是不一樣的，我們分別針對抗原肽運載體 1 基因第 333 和第 637 密碼子這 2 個位置分別做單核酸多形性篩檢，而不是做雙形性對偶基因的分析，所得到的結果，也是不一樣的：兩組受測試者在第 333 密碼子 GTC/ATC 的基因型態和對偶基因分佈的比例是一樣的，但是葛瑞夫茲氏病病患在第 637 密碼子 GA 異型合子基因型態

和 G 對偶基因(GGC, 甘氨酸)分布頻率比對照組高, 而 AA 同源合子基因型態和 A 對偶基因(GAC, 天門冬氨酸)的比例則較低。在不同的實驗得到不同的結果, 其原因無法確知, 或許是反應不同人種及不同種族之間基因分佈的不同。抗原肽運載體 1 基因第 637 密碼子傳遞密碼所形成的氨基酸是位於抗原肽運載體細胞質部分腺苷三磷酸結合部位非常接近結合抗原肽的位置(83,84), 由於天門冬氨酸與甘氨酸在結構上及生物活性上的差異性極大, 前者擁有較複雜、極性且帶電價的支鏈, 而後者的支鏈卻只有一個氫原子(86), 因此, 理論上, 當天門冬氨酸被替換成甘氨酸以後, 抗原肽運載體 1 的結構就會發生改變, 因而影響其選擇抗原肽的功能, 隨後的抗原肽運送和人類白血球抗原分子的呈現也就可能被影響。由於抗原肽運載體基因多形性對抗原肽選擇及輸送的影響程度究竟如何, 一些研究報告並未有一致的結論(84, 87, 88), 因此這個「單一密碼子單一核酸多形性影響抗原肽運載體結構及功能」的假說仍需要更進一步的測試, 才能闡明抗原肽運載體 1 多形性在人類白血球抗原媒介的免疫反應中所扮演的角色和影響力。

本實驗的結果證實了抗原肽運載體 1 基因多形性與葛瑞夫茲氏病易感性之間的關聯性, 究竟這種相關性是如何產生的? 是基因多形性直接的功能性作用, 或只是單純的連鎖不平衡的關係而已, 仍有待進一步探討。抗原肽運載體 1 基因是位於第 6 染色體人類白血球抗原基因區域內, 由於這個區域內的基因大多有連鎖不平衡的現象發生(89, 90), 因此抗原肽運載體 1 基因多形性極有可能是透過「和某些人類白血球抗原基因-DQ、-DP, 或甚至-DR 的特定對偶基因發生連鎖不平衡」這個機轉而間接的影響了葛瑞夫茲氏病的發生。但是第一種可能性也是不能排除的, 在這方面, 可以有 2 個解釋: 1) 第 1 型人類白血球抗原分子與細胞毒殺 T 淋巴細胞—而不是輔助性 T 細胞—的連結, 可能與葛瑞夫茲氏病的病理發生機轉有關。Bene 等人(1983 年), Warford 等人(1984 年)和 Misaki 等人(1985 年)分別在不同時間觀察到葛瑞夫茲氏病病患甲狀腺內壓抑性/細胞毒殺性 (suppressor/cytotoxic) 而不是誘導性/輔助性(inducer/helper) T 淋巴細胞的浸潤 (91-93); 由於細胞毒殺 T 淋巴細胞可以直接作用在甲狀腺上皮細胞及造成濾泡

胞膜的改變，因此會加速血液循環中的免疫複合體沉積在甲狀腺內或是藉由促使甲球蛋白的滲透釋出而引導免疫複合體在甲狀腺內的生成(91)。細胞毒殺 T 淋巴細胞所引導的免疫反應需要先辨認出細胞表面上呈現出來的第 1 型人類白血球抗原分子和抗原肽，並因此而被活化，再啟動其後一連串的化學反應。抗原肽運載體 1 負責將抗原肽輸送到內質網內與第 1 型白血球抗原分子結合，此複合體才得以呈現在細胞表面給細胞毒殺 T 淋巴細胞，因此抗原肽運載體 1 基因多型性可能經由這個途徑影響到葛瑞夫茲氏病的易感性。2) 抗原肽運載體 1 媒介的途徑也可能運送細胞質內抗原負載到第 2 型人類白血球抗原分子。抗原肽運載體一般是被認定專一性的與第 1 型人類白血球抗原分子的呈現有關；不過，Malnati 等人(1992 年)發現某些第 2 型白血球抗原分子和內源性細胞質內抗原肽的呈現也需要這個運載體的存在(94)；由於抗原肽和第 2 型人類白血球抗原分子的呈現，在葛瑞夫茲氏病的發生學上具有決定性的重要性，因此，這個發現提供了抗原肽運載體 1 基因多形性影響葛瑞夫茲氏病發生的進一步證據。

結論：由於缺乏預測標記，大部分的葛瑞夫茲氏病病患都是在臨床症狀很明顯了以後才被診斷出來的；因此，如果有理想的標記以預先偵測葛瑞夫茲氏病的發生，並儘早提供適當的治療，在療效及預後上都將有莫大的助益。本研究發現白血球介素-1 β 基因啟動子區多形性和抗原肽運載體 1 基因第 637 密碼子多形性可以當做遺傳標記來篩檢葛瑞夫茲氏病的易感性。實驗結果顯示：在白血球介素-1 β 基因啟動子區-511 呈現 CC 基因型態或 C 對偶基因者以及抗原肽運載體 1 基因第 637 密碼子上單一核酸由 GAC(天門冬氨酸)替換成 GGC(甘氨酸)者都比較容易發生葛瑞夫茲氏病。由於細胞激素是一個範圍很大的蛋白質群體，大部分的成員都參與免疫反應的調節步驟，其他細胞激素的基因應該也會和葛瑞夫茲氏病的發生有關，因此，更廣泛的探測其他細胞激素基因將有助於早期診斷葛瑞夫茲氏病；而由於抗原肽運載體與葛瑞夫茲氏病易發性之間的關聯性仍缺乏直接證據，而且抗原肽運載體 1 對人類白血球抗原分子媒介免疫反應的影響也未完全清

楚，因此，進一步的研究以闡明抗原肽運載體 1 基因多形性在葛瑞夫茲氏病發生學上所扮演的角色，也是必要的。鑑於本研究的實驗發現，我們預期未來將會有更多的遺傳標記被尋找出來，經由適當的分析統合這些研究結果，必能提供臨床醫師相當程度的幫助。

參考文獻

1. Brownlie BE, Welle JE. The epidemiology of thyrotoxicosis in New Zealand: incidence and geographical distribution in North Canterbury, 1983-1985. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1990;33:249-259.
2. Reinwein D, Benker G, Konig MP, Pinchera A, Schatz H, Schleusner A. The different types of hyperthyroidism in Europe: results of prospective study of 924 patients. *J Endocrinol Invest* 1988;11:193-200.
3. Williams I, Ankrett VO, Lazarus JH, Volpe R. Aetiology of hyperthyroidism in Canada and Wales. *J Epidemiol Community Health* 1983;37:245-248.
4. Weetman AP. Graves' disease 1835-2002. *Horm Res* 2003;(suppl 1):114-118.
5. Graves RJ. Clinical lectures delivered at the Meath Hospital during the session 1834-1835. Lecture XII. Newly observed affection of the thyroid. *London Med Surg* 1835;7:515-523.
6. Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;84:223-243.
7. Williams RH. Thiouracil treatment of thyrotoxicosis. *J Clin Endocrinol* 1946;6:1-22.
8. Werner SC. Classification of the eye changes of Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1969;29:982-984.
9. McKenzie JM, Zakarija M, Bonnyns M. Graves' disease. *Med Clin North Am* 1975;59:1177-1192.
10. Rapoport B, Greenspan FS, Filetti S, Pepetone M. Clinical experience with a human thyroid cell bioassay for thyroid stimulating immunoglobulin. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;58:332-338.

11. Zakarija M, McKenzie JM, Banovac K. Clinical significance of assay of thyroid-stimulating antibody in Graves' disease. *Ann Intern Med* 1980;93:28-32.
12. Mori T, Kriss JP. Measurements by competitive binding bioassay of serum anti-microsomal and anti-thyroglobulin antibodies in Graves' disease and other thyroid disorders. *J Clin Endocrinol* 1971;33:688-698.
13. Paschke R, Lugate M. The thyrotropin receptor in thyroid diseases. *N Engl J Med* 1997;337:1675-1681.
14. Larsen PR, Alexander NM, Chopra IJ, Hay ID, Hershman JM, Kaplan MM, Mariash CN, Nicoloff JT, Oppenheimer JH, Solomon DH, et al. Revised nomenclature for tests of thyroid hormones and thyroid-related proteins in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;64:1089-1094.
15. Di Paola R, Menzaghi C, De Filippis V, Corda D, Di Cerbo A. Cyclooxygenase-dependent thyroid cell proliferation induced by immunoglobulins from patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:670-673.
16. Bottazzo GF, Pujol-Borrell R, Hanafusa T, Feldmann M. Role of aberrant HLA-DR expression and antigen presentation in induction of endocrine autoimmunity. *Lancet* 1983;2:1115-1119.
17. Marelli-Berg FM, Weetman A, Fresca L, Deacock SJ, Imami N, Lombardi G, Lechler RI. Antigen presentation by epithelial cells induces anergic immunoregulatory CD45RO+ T cells and deletion of CD45RA+ T cells. *J Immunol* 1997;159:5853-5861.
18. Weetman AP, DeGroot L. Autoimmunity to the thyroid gland. In *Thyroid disease manager*. Chicago: Endocrine Education, 1999. (See NAPS document no. 05570 for 30 pages, c/o microfiche Publications, 248 Hempstead Tpke., West Hempstead, NY 11552.) (See <http://www.thyroidmanager.org>.)

19. Heward JM, Allahabadia A, Daykin J, Carr-Smith J, Daly A, Armitage M, Dodson PM, Sheppard MC, Barnett AH, Franklyn TA, Cough SC. Linkage disequilibrium between the human leukocyte antigen class II region of the major histocompatibility complex and Graves' disease: replication using a population case control and family-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3394-3397.
20. Chen Q-Y, Huang W, She J-X, Baxter F, Volpe R, Maclaren MK. HLA-DRB1*08, DRB1*03/DRB3*0101, and DRB3*0202 are susceptibility genes for Graves' disease in North American Caucasians, whereas DRB1*07 is protective. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3182-3186.
21. Wang GW, Cheng SH, Dorman JS. The HLA-DQ associations with Graves' disease in Chinese children. *Clin Endocrinol* 1999;50:493-495.
22. Hwang SM, Wu TJ, Lee TD, Yang EK, Shaw CK, Yeh CC. The association of HLA -A, -B, and -DRB1 genotypes with Graves' disease in Taiwanese people. *Tissue Antigens* 2003;61:154-158.
23. Brix TH, Kyvik KO, Hegedus L. What is the evidence of genetic factors in the etiology of Graves' disease? A brief review. *Thyroid* 1998;8:627-634.
24. Tomer Y, Barbesino G, Greenberg DA, Concepcion E, Davis TF. Linkage analysis of candidate genes in autoimmune thyroid disease. III. Detailed analysis of chromosome 14 localizes Graves' disease-1 (GD-1) close to multinodular goiter-1 (MNG-1). *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:4321-4327.
25. Tomer Y, Barbesino G, Greenberg DA, Concepcion ES, Davis TF. A new Graves' disease-susceptibility locus maps to chromosome 20q11.2. *Am J Hum Genet* 1998; 63:1749-1756.

26. Barbesino G, Tomer Y, Concepcion ES, Davis TF, Greenberg DA. Linkage analysis of candidate genes in autoimmune thyroid disease. II. Selected gender-related genes and the X-chromosome. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:3290-3295.
27. de Roux N, Shields DC, Misrahi M, Ratanachaiyavong S, McGregor AM, Milgrom E. Analysis of the thyrotropin receptor as a candidate gene in familial Graves' disease. *J Clin Endocrin Metab* 1996;81:3483-3486.
28. Davies TF. Editorial: autoimmune thyroid disease genes come in many styles and colors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3391-3393.
29. Brix TH, Christensen K, Holm NV, Harvald B, Hegedus L. A population based study of Graves' disease in Danish twins. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;48:397-400.
30. Chiovato L, Pinchera A. Stressful life events and Graves' disease. *Eur J Endocrinol* 1996;134:680-682.
31. Bartelena L, Bogazzi F, Tanda ML, Manetti L, Dell'Unto E, Martino E. Cigarette smoking and the thyroid. *Eur J Endocrinol* 1995;133:507-512.
32. Barclay ML, Brownlie BEW, Turner JG, Welle JE. Lithium associated thyrotoxicosis: a report of 14 cases, with statistical analysis of incidence. *Clin endocrinol (Oxf)* 1994;40 759-764.
33. Gilquin J, Viard J-P, Jubault V, Sert C, Kazatchkine MD. Delayed occurrence of Graves' disease after immune restoration with HAART: highly active antiretroviral therapy. *Lancet* 1998;352:1907-1908.
34. Coles AJ, Wing MG, Smith S, Coraddu F, Greer S, Taylor C, Weetman A, Hale G, Chatterjee K, Waldmann H, Compston A. Pulsed monoclonal antibody treatment and autoimmune thyroid disease in multiple sclerosis. *Lancet* 1999;354:1691-1695.

35. Kwok PY, Gu Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? *Molecular Medicine Today* 1999;5:538-53.
36. Marth GT, Korf I, Yandell MD, Yeh RT, Gu Z, Zakeri H, Stitzel NO, Hillier LD, Kwok PY, Gish WR. A general approach to single-nucleotide polymorphism discovery. *Nat Genet* 1999;23:452-6.
37. Pratt RE, Dzau VJ. Genomics and hypertension: concepts, potentials, and opportunities. *Hypertension* 1999;33:238-47.
38. Lander N. Genetic variations can point the way to disease gene. *Nature* 1999;401:734.
39. Dinarello CA, Wolff SM. The role of interleukin-1 in disease. *N Engl J Med* 1993;328:106-113. Review.
40. Kawabe Y, Eguchi K, Shimomura C, Mine M, Otsubo T, Ueki Y, Tezuka H, Nakao H, Kawakami A, Migita K, Yamashita S, Matsunaga M, Ishikawa N, Ito K, Nagataki S. Interleukin-1 production and action in thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;68:1174-1183.
41. Miyazaki A, Hanahusa T, Itoh N, Miyagawa J, Kono N, Tarui S, Kiyotaki C, Yoshizaki K. Demonstration of interleukin-1 β on perifollicular endothelial cells in the thyroid glands of patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;69:738-744.
42. Cantagrel A, Navaux F, Loubet-Lescoulié P, Nourhashemi F, Enault G, Abbal M, Constantin A, Laroche M, Mazieres B. Interleukin-1beta, interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: relationship to occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 1999; 42:1093-2000.

43. Blakemore AIF, Tarlow JK, Cork MJ, Gordon C, Emery P, Duff GW. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism as a disease severity factor in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1994;37:1380-1385.
44. Mansfield JC, Holden H, Tarlow JK, Di Giovine FS, McDowell TL, Wilson AG, Holdsworth CD, Duff GW. Novel genetic association between ulcerative colitis and the anti-inflammatory cytokine interleukin-1 receptor antagonist. *Gastroenterology* 1994;106:637-642.
45. Tarlow JK, Clay FE, Cork MJ, Blakemore AIF, McDonagh AJG, Messenger AG. Severity of alopecia areata is associated with a polymorphism in the interleukin-1 receptor antagonist gene. *J Invest Dermatol* 1994;103:387-390.
46. Blakemore AIF, Watson PF, Weetman AP, Duff GW. Association of Graves' disease with an allele of the interleukin-1 receptor antagonist gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:111-115.
47. Cuddihy RM, Bahn RS. Lack of an association between alleles of interleukin-1 α and interleukin receptor antagonist genes and Graves' disease in a North American Caucasian population. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:4476-4478.
48. Muhlberg T, Kirchberger M, Spitzwig C, Herrmann F, Heberling H J, Heufelder AE. Lack of association of Graves' disease with the A2 allele of the interleukin-1 receptor antagonist gene in a white Europe population. *Eur J Endocrinol* 1998; 138:686-690.
49. Houssiau FA, Devogelear J-P, Van Damme J, de Deuxchaisnes CV, Van Snick J. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:784-788.

50. Salvi M, Girasole G, Pedrazzoni M, Passeri M, Giuliani N, Minelli R, Braverman LE, Rote E. Increased serum concentrations of interleukin (IL-6) and soluble IL-6 receptor in patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2976-2979.
51. Corrales JJ, Orfao A, Lopez A, Mories MY, Miralles JM, Ciudad J. Analysis of IL-2 and IL-6 binding to peripheral blood lymphocytes in Graves' disease: relationship with disease activity. *Cytometry* 1997;30:118-123.
52. Dao DD, Sawyer JR, Epstein J, Hoover RG, Barlogie B, Tricot G. deletion of the retinoblastoma gene in multiple myeloma. *Leukemia* 1994;8:1280-1284.
53. Chapman CM, Beilby JP, Humphries SE, Palmer LJ, Thompson PL, Hung J. Association of an allelic variant of interleukin-6 with subclinical carotid atherosclerosis in an Australian community population. *Eur Heart J* 2003; 24:1494-1499.
54. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma level, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998;102:1369-1376.
55. Heulder AE, Bahn RS. Detection and localization of cytokine immunoreactivity in retro-ocular connective tissue in Graves' ophthalmopathy. *Eur J Clin Invest* 1993; 23:10-17.
56. Aust G, Heuer M, Laue S, Lehmann I, Hofmann A, Heldin NE, Scherbaum WA. Expression of tumor necrosis factor- mRNA and protein in pathological thyroid tissue and carcinoma cell lines. *Clin Exp Immunol* 1996;105:148-154.

57. Hiromatsu Y. In situ studies of orbital tissue from patients with thyroid associated ophthalmopathy. *Orbit* 1996;15:147-158.
58. Allen RD. Polymorphism of human TNF- promoter: random variation or functional diversity? *Mol Immunol* 1999;36:1017-1027.
59. Kula D, Jurecka-Tulaja B, Gubala E, Krawczyk A, Szpak S, Jarzab M. Association of polymorphism of L Talpha and TNF genes with Graves' disease. *Folia Histochem Cytobiol* 2001;39(suppl 2):77-78.
60. de la Salle H, Zimmer J, Fricker D, Angenieux C, Cazenave JP, Okuba H, Plebani A, Tongio MM, Dormoy A, Hanau D. HLA class I deficiencies due to mutations in subunit 1 of the peptide transporter TAP1. *J Clin Invest* 1999;103:R9-R13.
61. Moins-Teisserenc HT, Gadola SD, Cella M, Dunbar PR, Exley A, Blake N, Baykal C, Lambert J, Bigliardi P, Willensen M, Jone M, Buechuer S, Colona M, Gross WL, Cerundolo V. Association of a syndrome resembling Wegener's granulomatosis with low surface expression of HLA class-I molecules. *Lancet* 1999;354:1598-1963.
62. Kuwata S, Yanagisawa M, Saeki H, Nakagawa H, Etoh T, Tokunaga K, Juji T, Shibata Y. Polymorphisms of transporter associated with antigen processing genes in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94:565-574.
63. Ma L, Penfornis A, Wang X, Schoenfeld D, Tuomilehto-Wolf E, Metcalfe K, Hitman G, Faustman D. Evaluation of *TAP1* polymorphisms with insulin dependent diabetes mellitus in Finnish diabetic patients. *Hum Immunol* 1997;53:159-166.
64. Singal DP, Ye M, Qiu X, D'Souza M. Polymorphisms in the TAP2 gene and their association with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1994;12:29-33.

65. Rau H, Nicolay A, Usadel KH, Finke R, Donner H, Walfish PG, Badenhoop K. Polymorphisms of TAP1 and TAP2 genes in Graves' disease. *Tissue antigens* 1997; 49 :16-22.
66. Ofofu MH, Brown C, Cheatham W, Henry L, Austin C. TAP1 polymorphism identified in African-American Graves' disease patients. *Immunol Invest* 1998;27: 281-289.
67. Cai M, Yan L, Cheng H, Ding H, Fu Z. Antigen transporter gene polymorphism and predisposition to Graves' disease: a preliminary analysis. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2002;41:758-761.
68. Chung HW, Seo JS, Hur SE, Kim HL, Kim JY, Jung JH, Kim LN, Park BL, Shin HD. Association of interleukin-6 promoter variant with bone mineral density in pre-menopausal women, *J Hum Genet* 2003;48:243-248.
69. Galbraith GH, Pendey JP. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gene polymorphism in alopecia areata. *Hum Genet* 1995;96:433-436.
70. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SI, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491.
71. Kriss JP, Pleshakov V, Chien JR. Isolation and identification of the long-acting thyroid stimulator and its relation to hyperthyroidism and circumscribed pretibial myxedema. *J Clin Endocrinol* 1964;4:1005-1028.
72. Romagnani S. Th1 and Th2 in human diseases. Short analytic review. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;80:225-235.
73. Kocjan T, Wraber B, Repnik U, Hojker S. Changes in Th1/Th2 cytokine balance in Graves' disease. *Eur J Physiol* 2000;400(supp 1):94-95.

74. Manetti R, Barak V, Piccinni MP, Sampognaro S, Parronchi P, Maggi E, Dinarello CA, Romagnani S. Interleukin-1 favours the in vitro development of the type 2 helper (Th2) human T-cell clones. *Res Immunol* 1994;145:93-100.
75. Chensue SW, Bienkowski M, Eessalu TE, Warming KS, Hershey SD, Lukacs NW, Kunkel SL. Endogenous IL-1 receptor antagonist protein (IRAP) regulates Schistosome egg granuloma formation and the regional lymphoid response. *J Immunol* 1993;151:3654-3662.
76. Massart C, Guilhem I, Gibassier J, Allanni H, Nicol M. Comparison of thyroperoxidase and microsomal antibody assays in sera from patients with Graves' disease. *Clin Chem* 1991;37:1777-1780.
77. Smith JD, Brinton EA, Breslow JL. Polymorphism in the human apolipoprotein A-1 gene promoter region. Association of the minor allele with decreased production rate in vivo and promoter activity in vitro. *J Clin Invest* 1992; 89:1796-1800.
78. Watanabe J, Hayashi SI, Kawariji K. Different regulation and expression of human CYP2E1 gene due to the *RsaI* polymorphism in the 5' flank region. *J Biochem* 1994;116:321-326.
79. Karpe F, Lundahl B, Ehrenborg E, Eriksson P, Hamsten A. A common functional polymorphism in the promoter region of the microsomal triglyceride transfer protein gene influences plasma LDL levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:756-761.
80. Bensen JT, Dawson PA, Mychaleckyj JC, Bowden DW. Identification of a novel human cytokine gene in the interleukin gene cluster on chromosome 2q12-14. *J Interferon Cytokine Res* 2001;21:899-904.

81. Krogh Rasmussen A, Bech K, Feldt-Rasmussen U, Poulsen S, Holten I, Ryberg M, Dinarello CA, Siersbaek-Nielsen K, Friis T, Bendtzen K. Interleukin-1 affects the function of cultured human thyroid cells. *Allergy* 1988;43:435-441.
82. Mandrup-Poulsen T, Pociot F, Molvig J, Shapiro L, Nilsson P, Emdal T, Roder M, Kjems LL, Dinarello CA, Nerup J. Monokine antagonism is reduced in patients with IDDM. *Diabetes* 1994;43:1242-1247.
83. Momburg F, Neefjes JJ, Hammerling GJ. Peptide selection by MHC-encoded TAP transporters. *Curr Opin Immunol* 1994;6:32-37.
84. Colonna M, Bresnahan M, Bahram S, Strominger JL, Spies T. Allelic variants of the human putative peptide transporter involved in antigen processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3932-3936.
85. Powis SH, Tonks S, Mockridge I, Kelly AP, Bodmer JG, Trowsdale J. Alleles and haplotypes of the MHC-encoded ABC transporters TAP1 and TAP2. *Immunogenetics* 1993;37:373-380.
86. Karp G. The chemical basis of life. In: Karp G. *Cell and molecular biology: concepts and experiments*, 3rd ed., NY, John Wiley & Sons Inc., 2002, p32-82.
87. Daniel S, Caillat-Zucman S, Hammer J, Bach JF & van Endert PM. Absence of functional relevance of human transporter associated with antigen processing polymorphism for peptide selection. *J Immunol* 1997;159:2350-2357.
88. Quadri SA, Singal DP. Peptide transport in human lymphoblastoid and tumor cells: effect of transporter associated with antigen presentation (TAP) polymorphism. *Immunol Lett* 1998;61:25-31.
89. van Endert PM, Lopez MT, Patel SD, Monaco JJ, McDevitt HO. Genomic polymorphism, recombination, and linkage disequilibrium in human major

- histocompatibility complex-encoded antigen –processing genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11594-11597.
90. Carrington M, Colonna M, Spies T, Stephens JC, Mann DL. Haplotypic variation of the transporter associated with antigen processing (TAP) genes and their extension of HLA class II region haplotypes. *Immunogenetics* 1993;37: 266-273.
91. Bene MC, Derennes V, Faure G, Thomas JL, Duheille J, Leclere J. Graves' disease: in situ localization of lymphoid T cell subpopulations. *Clin Exp Immunol* 1983;52: 311-316.
92. Warford A, McLachlan SM, Malcolm AJ, Young ET, Farndon JR, Rees Smith B. Characterization of lymphoid cells in the thyroid of patients with Graves' disease. *Clin Exp Immunol* 1984;57:626-632.
93. Misaki T, Konishi J, Nakashima T, Iida Y, Kasagi K, Endo K, Uchiyama T, Kuma K, Torizuka K. Immunohistological phenotyping of thyroid infiltrating lymphocytes in Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis. *Clin Exp Immunol* 1985;60:104-110.
94. Malnati MS, Marti M, LaVaute T, Jaraquemada D, Biddison W, DeMars R, Long EO. Processing pathways for presentation of cytosolic antigen to MHC class II-restricted T cells. *Nature* 1992;357:702-704.

附表

表一、各組基因多形性聚合酶鏈反應的相關條件和限制酶的選擇

基因名稱	多形性位置	引子序列及反應時間	聚合酶鏈 反應產物	限制酶	限制酶反 應產物
白血球介 素-1β	啟動子區	5'-TGGCATTGATCTGGTTCATC-3'	304 bp	<i>Ava</i> I	190 bp
		5'-GTTTAGGAATCTGGACCAGA-3'			114 bp
		95 × 30", 55 × 30" and 72 × 30"			
白血球介 素-1β	第 5 表現序 列區	5'-GTTGTCATCAGACTTTGACC-3'	249 bp	<i>Taq</i> I	135 bp
		5'-TTCAGTTCATATGGACCAGA-3'			114 bp
		95 × 30", 55 × 30" and 72 × 30"			
白血球介 素-1 受體 拮抗者	第 2 插入序 列區	5'-CTCAGCAACACTCCTAT-3'	410 bp: I		
		5'-TCCTGGTCTGCAGGTAA-3'	240 bp: II	VNTR	
		95 × 30", 58 × 30" and 72 × 30"	325 bp: IV		
白血球介 素-6	啟動子區	5'-GCAAAGTCCTCACTGGGAGGA-3'	296 bp	<i>Bsr</i> BI	201 bp
		5'-TCTGACTCCATCGCAGCCC-3'			95 bp
		95 × 30", 60 × 30" and 72 × 45"			
腫瘤壞死 因子-α	啟動子區	5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3'	117 bp	<i>Nco</i> I	97 bp
		5'-ACACTCCCCATCCTCCCGGCT-3'			20 bp
		95 × 30", 60 × 30" and 72 × 45"			
抗原肽運 載體 1 子	第 333 密碼 子	5'-CACCCCTGAGTGATTCTCT-3'	220 bp	<i>Dpn</i> II	146 bp
		5'-ACTGAGTCTGCCAAGTCT-3'			118 bp
		94 × 15", 60 × 20" and 72 × 20"			74 bp
抗原肽運 載體 1 子	第 637 密碼 子	5'-CCCTATCCAGCTACAACC-3'	183 bp	<i>Acc</i> I	132 bp
		5'-AACGCCACTGCCTGTCGCT-3'			51bp
		95 × 35", 60 × 15" and 72 × 30"			

表二、葛瑞夫茲氏病病患與對照組白血球介素-1 β 基因啟動子區、第5表現序列區及白血球介素-1受體拮抗者基因第2插入序列區基因型態分布頻率

基因型態	病患組 人數 = 95 (%)	對照組 人數 = 163 (%)	<i>p</i> 值
白血球介素-1 β 基因 啟動子區*			0.038*
-511*T/-511*T	17 (17.9%)	51 (31.3%)	
-511*C/-511*T	49 (51.6%)	78 (47.9%)	
-511*C/-511*C	29 (30.5%)	34 (20.8%)	
白血球介素-1 β 基因 第5表現序列區			0.851**
E1/E1	90 (94.7%)	155 (95.1%)	
E1/E2	5 (5.3%)	7 (4.3%)	
E2/E2	0 (0.0%)	1 (0.6%)	
白血球介素-1受體拮抗 者基因第2插入序列區			0.897**
I/I (410/410)	87 (91.6%)	146 (89.6%)	
I/II (410/240)	7 (7.4%)	15 (9.2%)	
II/II (240/240)	1 (1.0%)	1 (0.6%)	
IV/IV (325/325)	0 (0.0%)	1 (0.6%)	

*卡方檢定

**費雪氏精確檢定

*風險對比值：C/T = 1.884 (95%信賴區間 = 0.957–3.708) , C/C = 2.558 (95%信賴區間 = 1.205–5.430)

表三、葛瑞夫茲氏病病患與對照組白血球介素-1 β 基因啟動子區、第5表現序列區及白血球介素-1受體拮抗者基因第2插入序列區對偶基因分布頻率

對偶基因	病患組 總數 = 190 (%)	對照組 總數 = 326 (%)	<i>p</i> 值
白血球介素-1 β 基因 啟動子區*			0.011*
對偶基因 T	83 (43.7%)	180 (55.2%)	
對偶基因 C	107 (56.3%)	146 (44.8%)	
白血球介素-1 β 基因 第5表現序列區			0.930*
E1	185 (97.4%)	317 (97.2%)	
E2	5 (2.6%)	9 (2.8%)	
白血球介素-1受體拮抗 者基因第2插入序列區			0.849**
I (410 bp)	181 (95.3%)	307 (94.2%)	
II (240 bp)	9 (4.7%)	17 (5.2%)	
IV (325 bp)	0 (0.0%)	2 (0.6%)	

*卡方檢定

**費雪氏精確檢定

*風險對比值：對偶基因 C = 1.589 (95%信賴區間 = 1.094–2.309)

表四、葛瑞夫茲氏病病患與對照組白血球介素-6 基因啟動子區基因型態及對偶基因分布頻率

	病患組 人數 = 95 (%)	對照組 人數 = 60 (%)	<i>p</i> 值
基因型態			0.516*
CC	59 (62.1%)	39 (65.0%)	
CG	33 (34.4%)	17 (28.3%)	
GG	3 (3.3%)	4 (6.7%)	
對偶基因			0.953**
C	151 (79.5%)	95 (79.2%)	
G	39 (20.5%)	25 (20.8%)	

*費雪氏精確檢定

**卡方檢定

表五、葛瑞夫茲氏病病患與對照組腫瘤壞死因子- α 基因啟動子區基因型態及對偶基因分布頻率

	病患組 人數 = 95 (%)	對照組 人數 = 60 (%)	<i>p</i> 值
基因型態			0.132*
AA	0 (0.0%)	2 (3.3%)	
AG	10 (10.5%)	9 (15.0%)	
GG	85 (89.5%)	49 (81.7%)	
對偶基因			0.075**
A	10 (5.3%)	13 (10.8%)	
G	180 (94.7%)	107 (89.2%)	

*費雪氏精確檢定

**卡方檢定

表六、葛瑞夫茲氏病病患與對照組抗原肽運載體 1 基因第 333 密碼子基因型態及對偶基因分布頻率

	病患組 人數 = 95 (%)	對照組 人數 = 105 (%)	<i>p</i> 值
基因型態			0.253*
GG	5 (5.3%)	10 (9.5%)	
AG	40 (42.1%)	34 (32.3%)	
AA	50 (52.6%)	61 (58.2%)	
對偶基因			0.891*
G	50 (26.3%)	54 (25.7%)	
A	140 (73.7%)	156 (74.3%)	

*卡方檢定

表七、葛瑞夫茲氏病病患與對照組抗原肽運載體 1 基因第 637 密碼子基因型態及對偶基因分布頻率

	病患組 人數 = 95 (%)	對照組 人數 = 105 (%)	<i>p</i> 值
基因型態			<0.0001*
GG	2 (2.1%)	2 (1.9%)	
AG	33 (34.7%)	13 (12.4%)	
AA	60 (63.2%)	90 (85.7%)	
對偶基因			0.0008**
G [#]	37 (19.5%)	17 (8.1%)	
A	153 (80.5%)	193 (91.9%)	

*費雪氏精確檢定

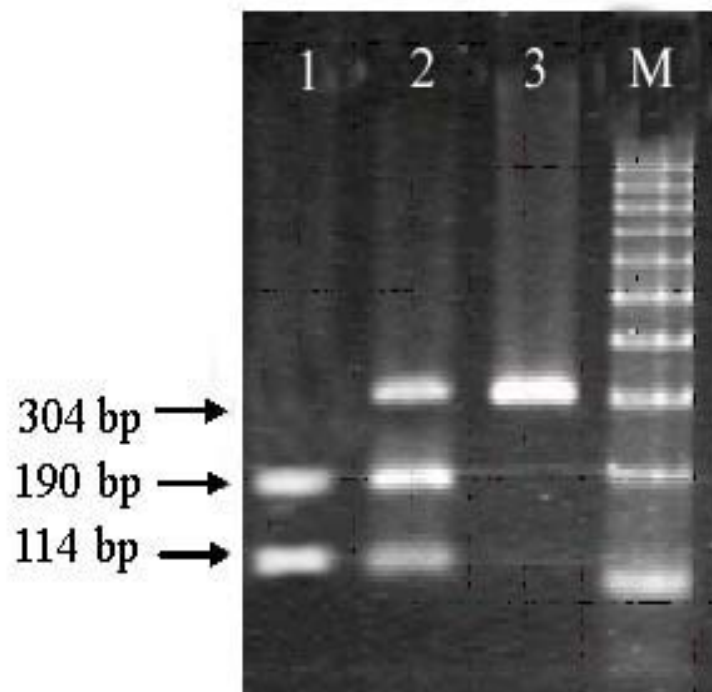
**卡方檢定

[#]風險對比值：對偶基因 G = 2.745 (95%信賴區間 = 1.482–5.085)

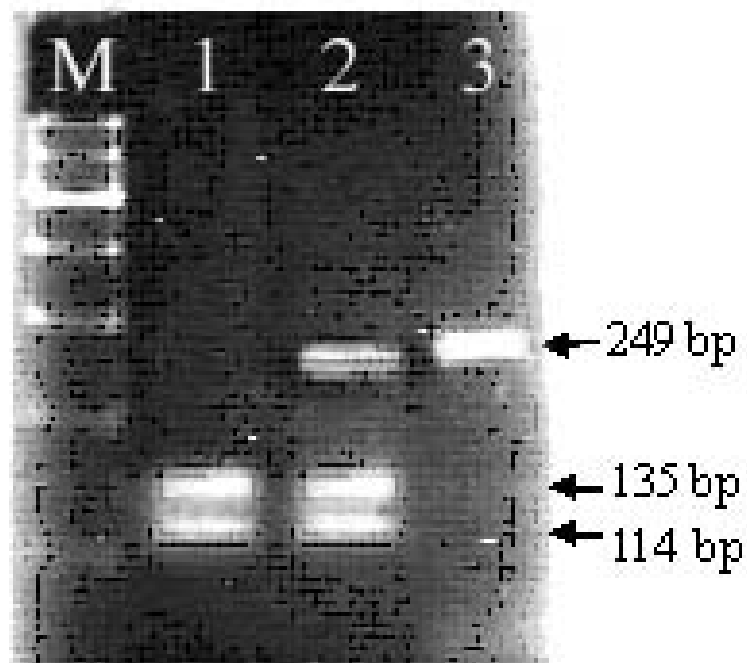
附圖



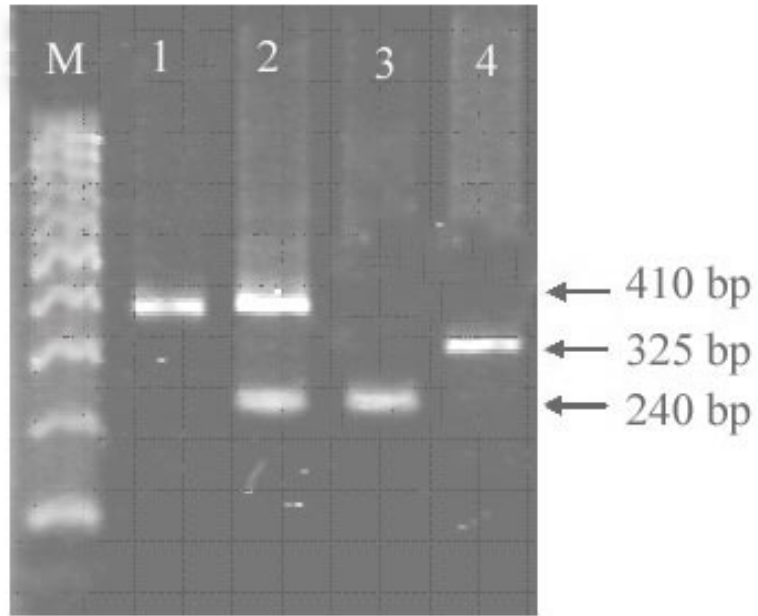
圖一、去氧核糖核酸萃取結果瓊膠電泳圖。1、2 及 3 代表成功的萃取，4 則為無效的萃取；M 是鹼基長度的標記，梯度為 100 bp。



圖二、白血球介素-1 β 基因啟動子區以聚合酶鏈反應放大後限制片段長度多形性瓊膠電泳分析圖。限制酶 *Ava*I 將 C 對偶基因切割成 190 bp 和 114 bp 2 個片段，T 對偶基因則為 1 個不可切割的 304 bp 片段；圖形上端的 1、2 和 3 分別代表 CC 同源合子、CT 異型合子和 TT 同源合子，M 是鹼基長度的標記，梯度為 100 bp。

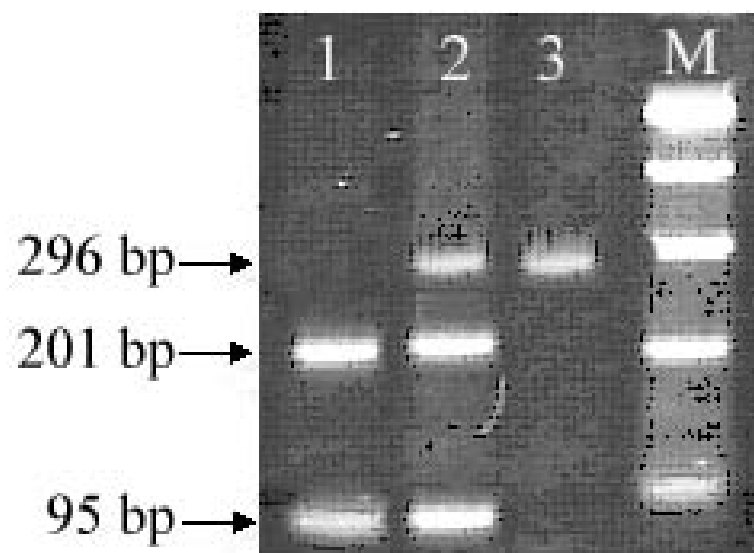


圖三、白血球介素-1 β 基因第5表現序列區以聚合酶鏈反應放大後限制片段長度多形性瓊膠電泳分析圖。限制酶 *TaqI* 將 E1 對偶基因切割成 135 bp 和 114 bp 2 個片段，E2 對偶基因則為 1 個不可切割的 249 bp 片段；圖形上端的 1、2 和 3 分別代表 E1/E1 同源合子、E1/E2 異型合子和 E2/E2 同源合子，M 是鹼基長度的標記，梯度為 100 bp。

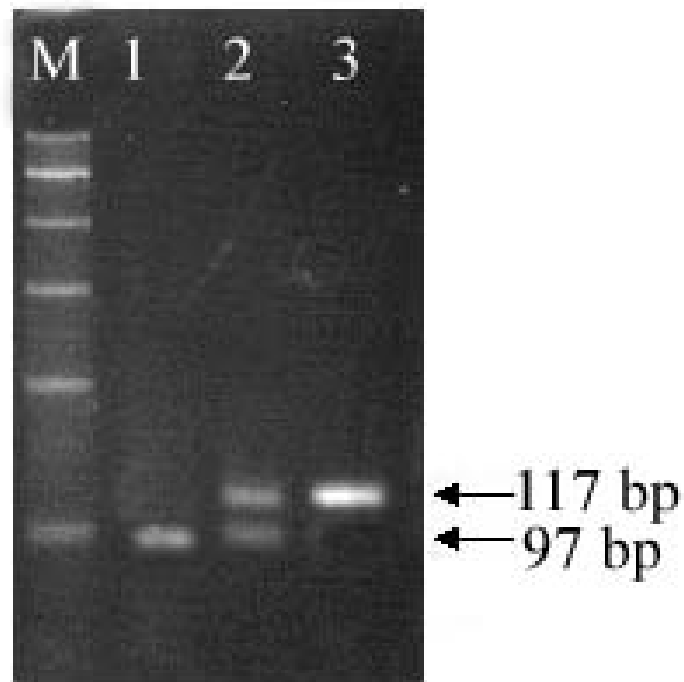


圖四、白血球介素-1 β 受體拮抗者基因第2插入序列區以聚合酶鏈反應放大後瓊膠電泳分析圖。本實驗結果得到 I 對偶基因：410 bp、II 對偶基因：240 bp 和 IV 對偶基因：325 bp。圖形上端的 1、2、3 和 4 分別代表 I/I 同源合子、I/II 異型合子、II/II 同源合子和 IV/IV 同源合子，M 是鹼基長度的標記，梯度為 100 bp。

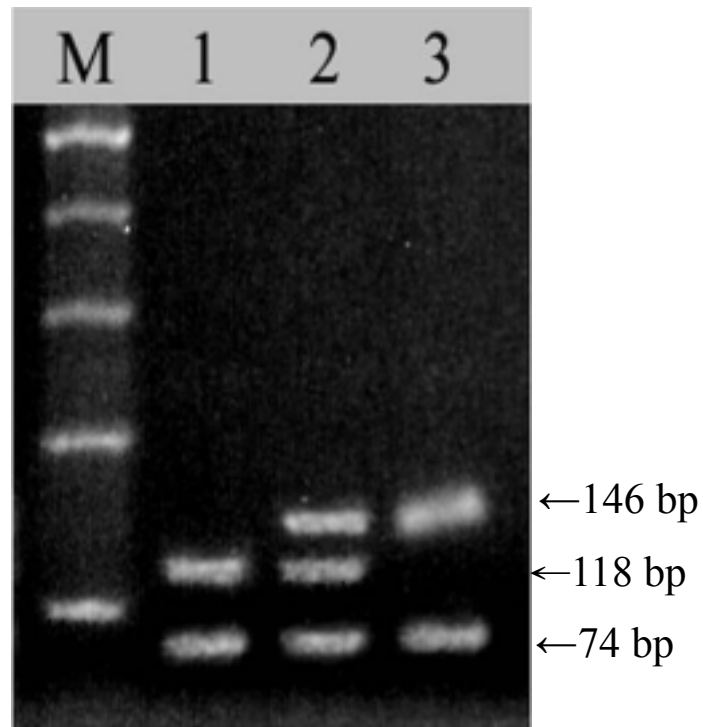




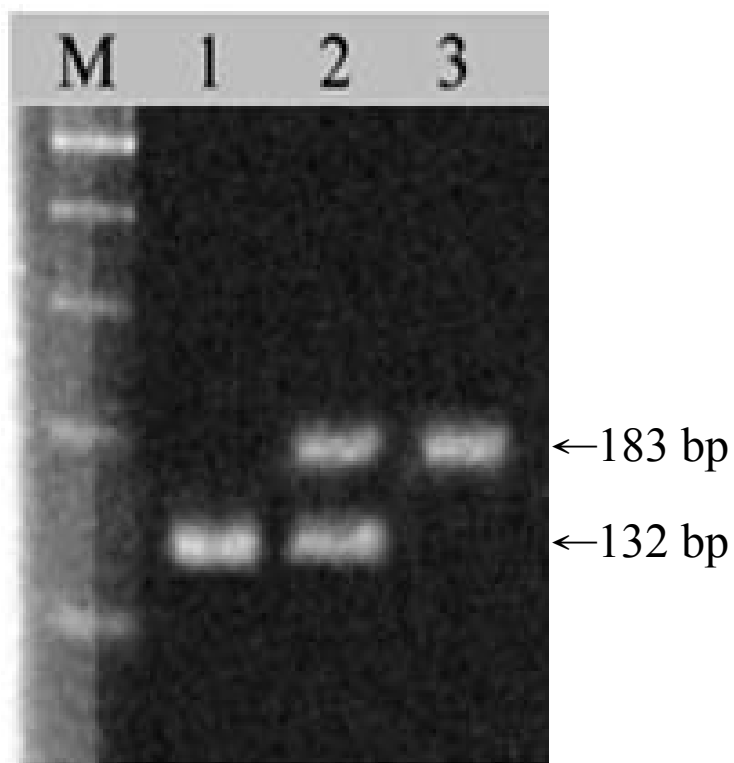
圖五、白血球介素-6 基因啟動子區以聚合酶鏈反應放大後限制片段長度多形性瓊膠電泳分析圖。限制酶 *Bsr*BI 將 G 對偶基因切割成 201 bp 和 95 bp 2 個片段，C 對偶基因則為 1 個不可切割的 296 bp 片段；圖形上端的 1、2 和 3 分別代表 GG 同源合子、CG 異型合子和 CC 同源合子，M 是鹼基長度的標記，梯度為 100 bp。



圖六、腫瘤壞死因子- α 基因啟動子區以聚合酶鏈反應放大後限制片段長度多形性瓊膠電泳分析圖。限制酶 *Nco*BI 將 G 對偶基因切割成 97 bp 和 20 bp 2 個片段，A 對偶基因則為 1 個不可切割的 117 bp 片段；圖形上端的 1、2 和 3 分別代表 GG 同源合子、AG 異型合子和 AA 同源合子，M 是鹼基長度的標記，梯度為 100 bp。



圖七、抗原肽運載體 1 基因第 333 密碼子以聚合酶鏈反應放大後限制片段長度多形性瓊膠電泳分析圖。*DpnII* 將聚合酶鏈反應產物切割成 118 bp、74 bp 和 28 bp 3 個片段(A 對偶基因, ATC)或 146 bp 和 74 bp 2 個片段(G 對偶基因, GTC); 圖形上端的 1、2 和 3 分別代表 AA 同源合子、AG 異型合子和 GG 同源合子, M 是鹼基長度的標記, 梯度為 100 bp。



圖八、抗原肽運載體 1 基因第 637 密碼子以聚合酶鏈反應放大後限制片段長度多形性瓊膠電泳分析圖。限制酶 *AccI* 將 A 對偶基因(GAC)切割成 132 bp 和 51 bp 2 個片段，G 對偶基因(GGC)則為 1 個不可切割的 183 bp 片段；圖形上端的 1、2 和 3 分別代表 AA 同源合子、AG 異型合子和 GG 同源合子，M 是鹼基長度的標記，梯度為 100 bp。

簡單自述

本人於民國七十二年畢業於中國醫藥學院中醫系，民國七十四年進入中國醫藥學院附設醫院，任職於內科部，民國七十八年升任內分泌新陳代謝科主治醫師。自從投身醫界以來，即全力從事臨床工作，以服務病人為職志，不敢怠忽；於工作之暇，則不忘充實自己，空閒時總是讀書自修，並隨時閱覽醫學期刊及參加各種醫學研討會，以吸收新知。近年來，醫學知識快速擴充，特別是分子生物學進展更甚，讓人有望塵莫及之感，更讓人有醫學浩瀚，自己所學不足之歎。有感於若仍只依靠平時自學，效果有限，實有深造之必要，乃毅然決然於民國 91 年報考中國醫藥學院(大學)醫學研究所，並僥倖獲得錄取。在這兩年內，來回奔波於醫院與學校兩地之間，一邊工作、一邊讀書，雖然辛苦，但過程還算順利，在各科老師的教導之下也收穫頗豐。由於平時即對分子生物學有極高的興趣，因此在修學期間選定葛瑞夫茲氏病病患的基因多形性為研究題材，在指導教授蔡輔仁博士的細心指導之下，研究工作終能獲得不錯的成績。畢業之後，仍將一本照顧病人之初衷，並希望能將這兩年所學運用到臨床上，以造福病患。