

國立臺灣大學醫學院臨床醫學研究所

碩士論文

Department of Graduate Institute of Clinical Medicine

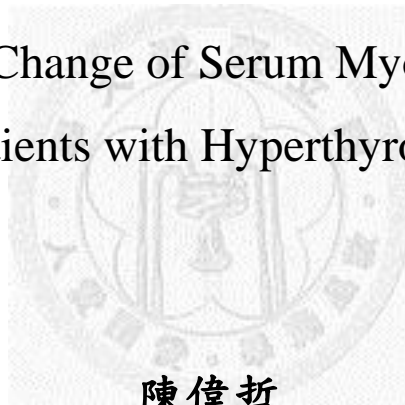
College of Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

血清中的肌肉生長抑制素於甲狀腺機能亢進的變化

The Change of Serum Myostatin
in Patients with Hyperthyroidism



陳偉哲

Chen, Wei-Che

指導教授：楊偉勛 教授

Advisor: Prof. Yang Wei-Shiung, Ph.D.

中華民國 101 年 7 月

July, 2012

致謝

能在這兩年完成碩士學業，很感謝很多很多人，謝謝能夠你們的指導、鼓勵、支援與陪伴。

首先最感謝的是我的恩師，楊偉勛教授。這兩年來從老師身上學到的不僅只是做學問的方法以及嚴謹的態度，更是感受到老師的親切與對學生指導的熱誠。並對於拙於入門的我，給予滿滿的耐心。在我在老師的帶領下，我逐漸知道做研究應有的方法，以及如何去寫好一篇論文。老師不僅在做學問上殷殷指導，給予我溫暖與關懷，這些感動都讓我銘記在心。在此要向老師表達無限的感激。

再來要感謝馬偕醫院內分泌新陳代謝科的王朝弘主任與簡銘男主任，感謝主任的支持以及鼓勵，讓我能兼顧工作與學業。很感謝馬偕醫院內分泌新陳代謝科的劉松臻醫師，學長是在單位裡，在工作與研究上的好搭檔，很高興有學長能夠互相切磋，幫忙收案，工作上相互支援。也很謝謝我的學弟妹世旻、明潔、毅欣，得有時幫我分攤一些臨床工作，十分辛苦。謝謝昱瑩幫我義務性地幫忙處理臨床收案的工作。謝謝志源及沛軒你們常常及時幫忙，並陪我度過那些忙亂煎熬的時候。

也要感謝台大醫院內分泌科曾芬郁老師幫忙收案，使得研究能夠順利進行完成。

將這份論文獻給我的家人，特別是我們將在十一月完婚的妻子，倩彤。謝謝妳一路上的支持、無怨無悔的付出與陪伴，沒有我的太太，我沒辦法渡過這兩年。

最後，感謝上帝的恩典與保守，一切榮耀歸於神。

目錄

致謝	1
目錄	2
表目錄	3
圖目錄	4
第一章 中文摘要.....	5
第二章 緒論.....	7
第一節 研究背景.....	7
第二節 研究目的.....	8
第三章 研究材料與方法.....	9
第四章 研究結果.....	11
第五章 討論.....	14
第六章 侷限與展望.....	16
第七章 論文英文摘要.....	18
第八章 參考文獻.....	19
第九章 圖表.....	22

表目錄

表一:受試者之統計學資料，臨床特徵及治療前的指標.....	22
表二: 將 BMI 以 21 kg/m ² 分為兩組，檢視 baseline 之 myostatin.....	23
表三: 將 BMI 以 21 kg/m ² 分為兩組，檢視 baseline 之 IGF-1.....	23
表四: 將 free T4 以 3.00 ng/dL 分為兩組，檢視 baseline 之 Myostatin.....	24
表五: 將 free T4 以 3.00 ng/dL 分為兩組，檢視 baseline 之 IGF-1.....	24
表六: 治療二十四週後，受試者之統計學資料，臨床特徵及指標.....	25
表七: 比較患者治療前後之血清 myostatin 與 IGF-1 濃度.....	25
表八: 校正後患者的 serum myostatin 前測值與後測比較.....	25
表九: Hyperthyroidism 組， corrected myostatin 和臨床指標的關連性.....	26
表十: 甲狀腺機能亢進治療前(corrected)myostatin 與 age 、sex 、BMI 、 free T4 、 GPT 、 Cre 做 multiple linear regression.....	26
表十一: 比較甲狀腺機能亢進治療前(Corrected)後 myostatin 增加與減少者...	27

圖目錄

圖一：控制組後測與前測的線性迴歸.....	28
-----------------------	----



1、 中文摘要

甲狀腺功能失調是最常見的內分泌疾病，甲狀腺功能亢進及甲狀腺功能低下都會造成肌肉病變及臨床上肌力的減退。本研究在於找出是否 myostatin、follistatin 及 IGF-1 是否參與甲狀腺功能失調所引發的肌肉病變，以及經過治療後肌肉力量的改善中 myostatin pathway 是否也有扮演重要的角色。

依診斷分為兩組：1.甲狀腺功能亢進之病患，甲狀腺功能亢進之定義為 Free T4 大於參考值及 TSH 小於參考值；2.對照組，甲狀腺功能正常，沒有排除條件者

於收案抽驗血液每次抽血量為 10ml，檢驗 Free T4、TSH。利用酵素免疫分析法(Enzyme-link immunosorbent assay, ELISA)，來定量 serum myostatin protein，及 IGF-1。

實驗組中，甲狀腺功能亢進者接受口服抗甲狀腺藥物治療二十四週，甲狀腺功能亢進組以 Carbimazole 每日 5mg 至 30mg 分一至三次使用，或 Propylthiouracil 每日 50mg 至 300mg 分一至三次使用。在試驗中持續使用，依患者狀況至少於每八週應抽血檢驗甲狀腺功能並回診，並依追蹤之血液 free T4、TSH 濃度調整劑量，完成試驗後應繼續治療。其間無禁止合併使用藥物。若治療 24 週未達成甲狀腺功能正常之個案可繼續進行抗甲狀腺口服藥物治療，或改以甲狀腺半全切除術(Subtotal thyroidectomy)治療，或放射碘治療。對照組則在收案後完成抽血檢驗後結案。

檢驗項目：1.Myostatin 及 IGF-1 需於接受治療前及接受治療後的第 24 週抽血時抽血檢驗；2. 於接受治療前及接受治療後的第 24 週抽血檢驗白蛋白 (albumin)、天門冬胺酸轉胺酶(Aspartate aminotransferase, AST)、丙胺酸轉胺酶 (Alanine amino-transferase ,ALT)與肌酸酐(Creatinine, Cre.)。

此研究包括 24 位甲狀腺機能亢進的患者以及 31 位對照組，對照組和實驗組以隨機的方式選取。甲狀腺機能亢進的患者相較甲狀腺正能的對照組血清的 myostatin 平均濃度沒有顯著差異但血清的 IGF-1 平均濃度增加。藥物治療二十四週後，血清的 myostatin 及 IGF-1 的平均濃度都沒有顯著改變。二十四個甲狀腺機能亢進的患者在藥物治療二十四週後，十一位個案血清的 myostatin 濃度減少而十三位個案為增加。



2、 緒論(Introduction)

【一】研究背景

Myostatin(MSTN)的存在於 1997 年被首度確認，在結構上是被認為是 transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily 的成員之一。在表現型上，觀察到其基因剔除小鼠表現出全身性而極顯著的骨骼肌增加，所以被認為是對橫紋肌的發展有負向調控的作用。Myostatin 存在於血清中，也存在於肌肉中做為所謂的 myokine -肌肉產生的激素(肌肉激素)，在全身或局部的肌肉發揮生理作用。[1]除了肌肉的發展外，它也被認為參與成體肌肉的恆定性，也就是當它於成體表現時，就可能造成肌肉萎縮。[2] 在研究中，將會分泌 myostatin 的腫瘤植入小鼠體內，小鼠發生了顯著的惡病質(Cachexia)。[3]

造成肌肉萎縮的疾病模式研究

Myostatin 至目前已有許多造成肌肉萎縮疾病的動物研究，如：將 S-180 腫瘤細胞(近似惡性腫瘤細胞)注入小鼠，可以看到小鼠的肌肉量的減少及 myostatin mRNA 的表現增加[4]；以 portacaval anastomosis 造成肝硬化的大鼠，發生骨骼肌減少及 myostatin protein 在肌肉中的量增加[5]；將大鼠的腎上腺切除，以牠做為 Addison's disease(腎上腺機能不全)的動物模組，則可以觀察到血清中 myostatin protein 的量增加[6]；將大鼠投以 dexamethasone 使之成為出現肌肉萎縮的 Cushing syndrome 庫欣氏症狀群，其肌肉的 myostatin 及 myostatin mRNA 的量皆會增加，並且是和 dexamethasone 的量呈現正相關[7]；鬱血性心衰竭模式的大鼠，當牠們出現肌肉萎縮的徵候時，骨骼肌與心肌的 myostatin protein 及 mRNA 的量也隨之增加[8]；予大鼠慢性低血氧狀態以做為慢性阻塞性肺病的動物模式，可以看到肌肉中的 myostatin protein 及 mRNA 量增加。[9]

在人體實驗中，觀察到感染 human-immunodeficiency virus(HIV)病毒而合併

出現肌肉萎縮的病人，血清中與肌肉中的 myostatin protein 量較健康的控制組增加。[10]有擴張性心肌病變心衰竭的患者，左心室組織的 myostatin protein 的量較正常無心衰竭的人類左心室組織有顯著的增加。[11] 對於慢性腎衰竭而接受血液透析治療的患者，肌肉萎縮的情況與 myostatin protein 在血清中的濃度有關。[12]

甲狀腺機能異常與肌肉病變

甲狀腺機能亢進或甲狀腺機能低下皆會出現肌肉神經機能問題。百分之六十七的甲狀腺機能亢進患者會出現神經肌肉症狀，而百分之六十二的甲狀腺機能低下患者會有至少一組肌肉群虛弱無力的臨床表現而與血液中的游離四碘甲狀腺素(free 4-Iodine thyroxine)的量有關。[13]

【二】研究目的

在我們的研究中，我們假說為血清中 myostatin 的濃度與甲狀腺機能亢進的肌肉病變有關。實驗為測量並比較甲狀腺機能亢進患者與健康的控制組血清的 myostatin 及 Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)，甲狀腺機能亢進患者於用抗甲狀腺藥物治療二十四週後再測量血清的 myostatin 及 IGF-1，以驗證我們的假說。

3、 研究材料與方法

研究材料

包括二十四位甲狀腺機能亢進患者，三十一位甲狀腺正能(euthyroidism, 甲狀腺機能正常)的控制組，年齡自 21 歲到 71 歲。收案自台大醫院內分泌科門診，同意加入研究的病患都簽署知情同意書，研究記錄病患的基本資料：年齡，性別，身高，體重，是否有其他全身性疾病，是否接受檢驗前兩週曾使用藥物影響肌肉力量或肌肉收縮。

於收案抽驗血液每次抽血量為 10ml，檢驗 Free T4、TSH。利用酵素免疫分析法(Enzyme-link immunosorbent assay, ELISA)，來定量 serum myostatin，follistatin 及 IGF-1。

實驗組中，甲狀腺功能亢進者接受口服抗甲狀腺藥物治療二十四週，以 Carbimazole 每日 5mg 至 30mg 分一至三次使用，或 Propylthiouracil 每日 50mg 至 300mg 分一至三次使用。在試驗中持續使用，依患者狀況抽血檢驗甲狀腺功能並回診，並依追蹤之血液 free T4、TSH 濃度調整劑量，完成試驗後應繼續治療。其間無禁止合併使用藥物。

對照組則在收案後完成抽血檢驗後結案。

檢驗項目：1.Myostatin 及 IGF-1 需於接受治療前及接受治療後的第 24 週時抽血檢驗；2. 於接受治療前及接受治療後的第 24 週抽血檢驗白蛋白(albumin)、天門冬胺酸轉胺酶(Aspartate aminotransferase, AST)、丙胺酸轉胺酶 (Alanine amino-transferase ,ALT)與肌酸酐(Creatinine, Cre.)。

排除條件：1. 其他全身性疾病，影響肌肉力量或肌肉收縮；2. 接受檢驗前兩週曾使用藥物影響肌肉力量或肌肉收縮。

實驗組條件：甲狀腺功能亢進之病患，甲狀腺功能亢進之定義為 Free T4 大於參

考值及 TSH 小於參考值

對照組條件: 甲狀腺功能正常, 沒有排除條件者。

酵素免疫分析法(ELISAs)定量 Myostatin 與 IGF-1

血清 myostatin 濃度測定是使用 competitive immunoassay kits 並依據廠商所提供 (Immunodiagnostik AG, Bensheim, Germany) protocol, 試驗的敏感性 (sensitivity) 為 270 pg/ml, the intra- and inter-assay 變異(variabilities)小於 10% and 15%。此檢測是以高專一性來定量 full-length myostatin peptide. 檢體解凍後以緩衝液稀釋為五倍, 混合 competitive myostatin antibody solution 後室溫下置於 coated wells 兩小時。沖洗後, 將 secondary antibody conjugated with peroxidase 加入, 靜置一小時後再加入 the substrate, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine(for peroxidase)。The absorption of each well 以 VersaMAX tunable microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) at 450 nm against 620 nm as a reference 讀取每個 well 吸收的光譜。以 The four-parameter logistic regression model 計算濃度。

血清的 IGF-1 濃度測量是用 ELISA kits according to the manufacturer's protocol (Mediagnost, Reutlingen, Germany), 敏感性為 0.09 ng/ml, 而 the inter- and intraassay variability 為 6.8% and 6.7%。

統計分析方法

檢驗結果最終以平均及正負標準差(mean \pm SD)呈現, 以 Student's test、Wilcoxon rank-sum test 或 Fisher's exact test 檢定統計顯著性, 相關性是以 Pearson correlation coefficients 作分析, 以線性迴歸分析 myostatin 前後測的線性關係, 以 P 小於 0.05 為可接受的統計顯著。統計分析計算是以統計軟體 STATA11 (StataCorp.) LP. Texas, USA)。

4、 實驗結果(Result)

患者與對照組統計學資料

實驗組與對照組的資料以平均質±標準差表示於表一。共有二十四個甲狀腺機能亢進的患者，其中九個男性與十五個女性；與三十一個甲狀腺正能對照組，包括四個男性與二十七個女性。在實驗組與對照組的年齡與體重沒有統計上的差異，而在血清中的 AST、ALT 與 Creatinine 則在兩組間有統計差異，但所有受測者皆無肝臟疾病、腎臟病及於及上述指標超過參考值的情況。甲狀腺機能亢進患者組的身體質量指數(Body Mass Index, BMI)相較對照組來的低($P=0.028$)。

患者與對照組肌肉發展相關指標統計學資料

我們於實驗中測量兩個肌肉發展相關指標：myostatin 及 IGF-1。在甲狀腺機能亢進患者組與控制組的血清 myostatin 濃度沒有顯著差異(16.74 ± 6.19 V.S. 16.48 ± 5.32 , $P= 0.392$)，但甲狀腺機能亢進患者血清的 IGF-1 濃度則顯著多於對照組(336.93 ± 102.81 V.S. 240.26 ± 85.87 , $P<0.001$)。進一步的做分組的分析，我們以 BMI 數值 21 將甲狀腺機能亢進患者分為兩組(如：表二、表三)，BMI 大於或小於 21 的患者其血清的 myostatin 及 IGF-1 濃度無組間之統計顯著差異，各別與對照組比較亦無顯著差異。以血清 free T4 濃度 3ng/dL 將甲狀腺機能亢進患者分為兩組(如：表四、表五)，free T4 大於或小於 3 的患者其血清的 myostatin 無組間之統計顯著差異，與對照組比較亦無顯著差異，但”free T4 大於 3 ng/dL”的患者血清 IGF-1 濃度顯著大於”free T4 小於 3ng/dL”的患者。

患者與對照組肌肉發展相關指標經過二十四週後統計學資料

甲狀腺機能亢進患者接受二十四週抗甲狀腺藥物治療後，與對照組再接受抽血檢驗，結果如表六。經過二十四週抗甲狀腺藥物治療後，兩組平均 BMI 無

統計差異，而甲狀腺機能亢進患者組平均 serum free T4 及 TSH 濃度回到甲狀腺正能(Euthyroidism)的狀況。實驗組治療二十四週後的平均血清 myostatin 濃度和二十四週後的對照組沒有差異，而平均血清 IGF-1 濃度顯著大於對照組仍顯二十四週後的對照組。

比較甲狀腺機能亢進患者治療前後的肉發展相關指標(表七)：myostatin 及 IGF-1，治療後的平均血清 myostatin 濃度顯著大於治療前(25.78±7.08 V.S 16.48±5.32, $P<0.001$)，治療後的平均血清 IGF-1 濃度則與治療前相當(336.93±102.81 V.S. 338.6 ±116.26, $P=0.452$)。但我們發現對照組二十四週後的平均血清 myostatin 濃度也顯著大於二十四週前(23.28±8.91 V.S 16.9 ±6.86, $P<0.001$)。因為實驗中 myostatin ELISA 是將包括治療前後的所有檢體一起執行，所以排除不同批檢體之間的操作失誤，而懷疑是二十四週前的檢體在冰存期間發生降解(degradation)。

校正降解的 myostatin 數據

因為這個緣故，我們將試驗結果做校正。我們將對照組的前測和後測做線性回歸，而得到回歸模式為(見圖一)：

$$\text{MSTN}(\text{before, control}) = \text{MSTN}(\text{after, control}) * 0.4674 + 6.0668 \quad (P < 0.001)$$

由於控制組血清的 myostatin 濃度在前後測應該是相當的，可以得到：

$$\text{MSTN}(\text{corrected, before, control}) \approx \text{MSTN}(\text{after, control}) = (\text{MSTN}(\text{before, control}) - 6.0668) / 0.4674$$

做為對照組的校正模型：

$$\text{MSTN}(\text{corrected, before, control}) = (\text{MSTN}(\text{before, control}) - 6.0668) / 0.4674$$

假設校正模型一樣可套用在實驗組：

$$\text{MSTN}(\text{corrected, before, patients}) = (\text{MSTN}(\text{before, patients}) - 6.0668) / 0.4674$$

得到校正後實驗組甲狀腺亢進患者前測血清 myostatin 濃度數據。以校正後的數據分析甲狀腺亢進患者治療前後的血清 myostatin 濃度(表八)，則得知治療

前後血清 myostatin 濃度並無顯著變化(21.42 ± 11.44 V.S. 25.58 ± 7.08 , $P=0.063$)。

以校正後的前測血清 myostatin 濃度做相關性的分析(表九)，可得治療前患者之血清 myostatin 濃度與年齡、BMI、血清 free T4 濃度、血清 ALT 濃度或血清 Cre 濃度僅呈低或極低相關。若以 multiple linear regression 分析，則發現治療前患者之血清 myostatin 濃度與年齡、BMI、血清 free T4 濃度、血清 ALT 濃度及血清 Cre 濃度並無呈顯著的線性關係(表十)。

肌肉發展相關指標變化的分析

若以前後測 myostatin 的增加或減少($\Delta\text{MSTN} > 0$ or $\Delta\text{MSTN} < 0$)來分兩組分析實驗組的資料(如表十一)。十三個患者其 serum myostatin 增加($\Delta\text{MSTN} > 0$)，而十一個患者 serum myostatin 減少($\Delta\text{MSTN} < 0$)。這兩組患者的年齡, BMI, 血清 ALT 濃度、血清 Cre.濃度、血清 free T4 濃度及血清 IGF-1 濃度無統計上顯著差異，但 myostatin 在治療後減少($\Delta\text{MSTN} < 0$)的患者其前測的血清 myostatin 濃度(經校正)比稱增加($\Delta\text{MSTN} > 0$)的患者顯著為高。

5、 討論(Discussion)

Myostatin 已經在被發現許多造成肌肉萎縮的疾病都有增加表現，也有許多疾病模式的實驗證實了 myostatin 在肌肉發生與維持上扮演負向調控的角色[3-9]，也包括了一些人體觀察性的研究[10,11,12]。然而，也有些研究呈現出不同的結果，如：將大鼠後肢不予承重七天後，可以看到大鼠後肢的比目魚肌(soleus muscle)萎縮超過百分之四十但 myostatin mRNA 沒有變化[14]。讓大鼠過度承受重量後，大鼠的蹠肌(plantaris muscle)變得肥大(hypertrophy)，但大部分的大鼠蹠肌的 myostatin protein 呈現顯著增加(myostatin 增加的大鼠數目多於減少者)[15]。同樣在這個實驗中，若以去神經聯結(denervation)使大鼠比目魚肌萎縮，則大多數的大鼠比目魚肌 myostatin 減少；另一個研究[16]，其老年的大鼠的腓腸肌去神經聯結後的第四天與第八天，出現了肌肉萎縮但 myostatin protein 與 myostatin mRNA 不變，十二個月後與二十七個月後，大部分個體 myostatin mRNA 減少但 myostatin protein 增加。在一個敗血症模式的動物實驗中[17]，敗血症的大鼠肌肉的 myostatin mRNA 減少但 myostatin protein 不變。其他和 myostatin 調控機制中相關的蛋白質 activin A、follistatin、及 phosphorylated Smad2 (p-Smad2)的量也沒有改變，因此推論 myostatin 的調控機制於敗血症造成的肌肉萎縮沒有作用。一樣在這個研究中，給大鼠 dexamethasone 後，myostatin mRNA 減少但 myostatin protein 沒有變化。而禁食的大鼠發生了肌肉萎縮，觀察到的是 myostatin mRNA and activin A protein 減少、 myostatin protein 增加而 follistatin and p-Smad2 沒有改變。這些都說明了並非所有的肌肉萎縮都是來自於 myostatin 的表現增加。

我們的研究中，甲狀腺機能亢進的患者相較甲狀腺正能的對照組血清的 myostatin 平均濃度沒有顯著差異但血清的 IGF-1 平均濃度增加。藥物治療二十四週後，血清的 myostatin 及 IGF-1 的平均濃度都沒有顯著改變。二十四個甲狀

腺機能亢進的患者在藥物治療二十四週後，十一位個案血清的 myostatin 濃度減少而十三位個案為增加。

在 2008 年，一個甲狀腺機能失調的動物研究[18]，投以抗甲狀腺藥物所造成甲狀腺機能低下的大鼠，其肌肉的 myostatin protein 及 myostatin mRNA 都是增加；而投以甲狀腺素所造成甲狀腺機能亢進的大鼠，其肌肉的 myostatin protein 及 myostatin mRNA 都沒有觀察到改變。另外，將甲狀腺素加至 C2C12 細胞，也沒有造成 myostatin mRNA 的表現改變。我們的人體觀察性研究，與上述的動物研究是呈現類似的情形。

關於 HG/IGH-1 axis 在甲狀腺機能亢進的研究，在 2001 年 Iglesia 發現甲狀腺機能亢進的患者的血清 IGF-1 與 Insulin-like growth factor binding protein-3(IGFBP-3)濃度與甲狀腺正能的控制組相當，在治療後血清中 IGF-1 及 IGFBP-3 則減少。而血清 Insulin-like growth factor binding protein-1(IGFBP-1)在甲狀腺機能亢進患者是顯著大於控制組，治療後也顯著的下降。在我們的研究，患者血清中 IGF-1 在治療前顯著高於控制組，治療後並沒有顯著改變。

在我們的研究，結果與原先的假說不符。這樣的狀況類似於前面所提及的幾個研究[14~18]，推測並甲狀腺機能亢進造成的肌肉萎縮不是由 myostatin 的表現增加所調節。但我們必須注意這個研究上的幾個問題或偏差。

六、侷限與展望

第一，樣本數有限，會影響試驗的有效性。第二，我們的實驗僅測量血清的 myostatin，然而 myostatin 也存在於肌肉，我們必須考慮肌肉中 myostatin 的生理效應。先前提到許多研究測量的包括肌肉中 myostatin protein 及 myostatin mRNA，myostatin protein 與 myostatin mRNA 也會出現不一致的情況[16,17]。另外肌肉中有存在著 myostatin 的拮抗激素(antagonistic hormone)，Follistatin。Myostatin 在肌肉萎縮的機制上恐怕更複雜，我們須檢驗更多項目。第三，甲狀腺機能亢進的患者代謝速度快，而可測得的 myostatin protein 的含量可能受度較快的代謝速度所影響。第四，我們的假說是依據甲狀腺機能亢進引起會肌肉病變。就先前的世代研究[20]，甲狀腺機能亢進患者有 67% 有神經肌肉症狀，62% 有至少一個肌肉群力量減弱的臨床表現。我們的研究中缺乏對肌力的測量以對應測量的生化指標。

我們的研究存在一個重大的爭議，來自於發現前測檢體可能存在降解。最初發現對照組前測血清 myostatin 濃度大於後測，因所有檢體一起操作 myostatin ELISA，所以排除不同批檢體間的操作失誤，而推論前測的檢體在冰存-20°C 下 24 週仍存在蛋白酶造成的降解。因為沒有 myostatin 冰存發生降解的資料，所以用對照組前測與後測的 myostatin 做線性迴歸得到的迴歸模式來較正實驗組的前測數據。但這樣的預測值並非真實的測量值，所以實驗組前後測的分析結果有效程度更應商榷。

總結而言，我們測量了甲狀腺機能亢進患者治療前與藥物治療後 24 週的血清 myostatin 與 IGF-1 濃度，發現血清 myostatin 濃度在甲狀腺機能亢進患者治療前與甲狀腺正能的對照組沒有顯著差異，而治療後也沒有顯著變化。甲狀腺機能亢進患者的血清 IGF-1 濃度在治療前顯著高於對照組，在治療後與治療前相比無顯著變化。未來的研究應該測量血清與肌肉的 myostatin, follistatin 及肌肉中

的 myostatin mRNA，並配合肌力的測量，以更完整的解釋 myostatin 在肌肉病變中的調控作用。



七、英文摘要

Abstract

Objectives: Myostatin, a negative regulator of skeletal muscle growth, may modulate muscle in myopathy after development.

Background: Both hypothyroidism and hyperthyroidism may cause signs and symptoms of neuromuscular dysfunction. We hypothesized that serum myostatin level might be related to myopathy in hyperthyroidism.

Method: We measure serum myostatin level in patients with hyperthyroidism and normal control, and check serum myostatin again after anti-thyroid drugs used in patients with hyperthyroidism for 24 weeks. .

Results There is no elevation of serum myostatin level but elevated serum IGF-1 level, compared to euthyroidism. After anti-thyroid medication for 24 weeks, no significant increase of serum myostatin protein levels was found and the serum IGF-1 level also had no obvious change. 11 of 24 patients have decrease of serum myostatin protein levels after medication for 24 weeks

Conclusions : There are no changes in myostatin level before and after medication. Serum IGF-1 increase in patients with hyperthyroidism and no change after treatment. Advanced measurement of serum and muscle myostatin protein, myostatin mRNA, follistatin and other muscle related markers in more cases could be done.

Key Words: Myostatin, IGF-1, myopathy, hyperthyroidism,

八、參考文獻

Reference

1. McPherron AC, Lawler AM, S.J. L. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 1997;387:83-90.
2. Joulia-Ekaza D, Cabello G. Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Exp Cell Res* 2006;312:2401-14.
3. Zimmers TA, Davies MV, Koniaris LG, et al. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* 2002;296:1486-8.
4. Liu CM, Yang Z, Liu CW, et al. Myostatin antisense RNA-mediated muscle growth in normal and cancer cachexia mice. *Gene Ther* 2008;15:155-60.
5. Dasarathy S, Dodig M, Muc SM, Kalhan SC, McCullough AJ. Skeletal muscle atrophy is associated with an increased expression of myostatin and impaired satellite cell function in the portacaval anastomosis rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G1124-30.
6. Hosoyama T, Tachi C, Yamanouchi K, Nishihara M. Long term adrenal insufficiency induces skeletal muscle atrophy and increases the serum levels of active form myostatin in rat serum. *Zoolog Sci* 2005;22:229-36.
7. Ma K, Mallidis C, Bhasin S, et al. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E363-71.
8. Shyu KG, Lu MJ, Wang BW, Sun HY, Chang H. Myostatin expression in ventricular myocardium in a rat model of volume-overload heart failure. *Eur J Clin Invest* 2006;36:713-9.
9. Hayot M, Rodriguez J, Vernus B, et al. Myostatin up-regulation is associated

with the skeletal muscle response to hypoxic stimuli. *Mol Cell Endocrinol* 2011;332:38-47.

10. Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, et al. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:14938-43.

11. George I, Bish LT, Kamalakkannan G, et al. Myostatin activation in patients with advanced heart failure and after mechanical unloading. *Eur J Heart Fail* 2010;12:444-53.

12. Han DS, Chen YM, Lin SY, et al. Serum myostatin levels and grip strength in normal subjects and patients on maintenance haemodialysis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011;75:857-63.

13. Duyff RF, Bosch JV, Laman DM, Loon BJP, Linssen WHJP. Neuromuscular findings in thyroid dysfunction: a prospective clinical and electrodiagnostic study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2000;68:700-5.

14. Carlson CJ, Booth FW, Gordon SE. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *The American journal of physiology* 1999;277:R601-6.

15. Sakuma K, Watanabe K, Sano M, Uramoto I, Totsuka T. Differential adaptation of growth and differentiation factor 8/myostatin, fibroblast growth factor 6 and leukemia inhibitory factor in overloaded, regenerating and denervated rat muscles. *Biochimica et biophysica acta* 2000;1497:77-88.

16. Baumann AP, Ibebunjo C, Grasser WA, Paralkar VM. Myostatin expression in age and denervation-induced skeletal muscle atrophy. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 2003;3:8-16.

17. Smith IJ, Aversa Z, Alamdari N, Petkova V, Hasselgren PO. Sepsis downregulates myostatin mRNA levels without altering myostatin protein levels in

skeletal muscle. *Journal of cellular biochemistry* 2010;111:1059-73.

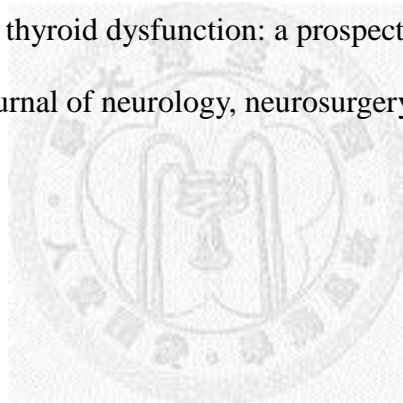
18. Carneiro I, Castro-Piedras I, Munoz A, Labandeira-Garcia JL, Devesa J, Arce VM. Hypothyroidism is associated with increased myostatin expression in rats.

Journal of endocrinological investigation 2008;31:773-8.

19. Iglesias P, Bayon C, Mendez J, Gancedo PG, Grande C, Diez JJ. Serum insulin-like growth factor type 1, insulin-like growth factor-binding protein-1, and insulin-like growth factor-binding protein-3 concentrations in patients with thyroid dysfunction. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 2001;11:1043-8.

20. Duyff RF, Van den Bosch J, Laman DM, van Loon BJ, Linssen WH.

Neuromuscular findings in thyroid dysfunction: a prospective clinical and electrodiagnostic study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2000;68:750-5.



九、圖表

表一 受試者之統計學資料，臨床特徵及治療前的指標

	Total	Hyperthyroidism	Euthyroidism	<i>P</i>
Number	55	24	31	ns
Age	39.92 ± 11.35	37.13 ± 12.07	42.10 ± 10.46	0.054
Sex (M : F)	M13 : F42	M9 : F15	M4 : F27	0.033
Height (cm)	162.00 ± 7.84	164.54 ± 8.67	160.01 ± 6.61	0.016
Weight (kg)	59.63 ± 9.79	59.30 ± 11.45	59.90 ± 8.47	0.412
BMI (Kg/m ²)	22.68 ± 3.05	21.80 ± 3.02	23.37 ± 2.95	0.028
Free T4 (ng/dL)	1.93 ± 1.33	3.18 ± 1.11	0.97 ± 0.18	<0.001
TSH (μIU/ml)	1.33 ± 4.63	0.006 ± 0.009	2.36 ± 6.02	0.030
AST (U/L)	22.82 ± 5.97	26.54 ± 3.65	19.93 ± 3.7	<0.001
ALT (U/L)	26.45 ± 18.82	26.67 ± 13.19	18.55 ± 10.67	<0.001
Creatinine (mg/dL)	0.71 ± 0.15	0.63 ± 0.15	0.77 ± 0.11	<0.001
Myostatin (μg/dL)	16.74 ± 6.19	16.48 ± 5.32	16.95 ± 6.86	0.392
IGF1 (ng/ml)	281.14 ± 102.05	336.93 ± 102.81	240.26 ± 85.87	<0.001

表二 將 BMI 以 21 kg/m² 分為兩組，檢視 baseline 之 myostatin

	Myostatin (μg/dL)	P (和 control 組比)
Hyperthyroidism BMI<21 n=11	16.9 ± 5.76	0.225
Hyperthyroidism BMI>21 n=13	16.12 ± 5.12	0.213
Control n=31	16.95 ± 6.86	
兩組相比 p=0.2935		

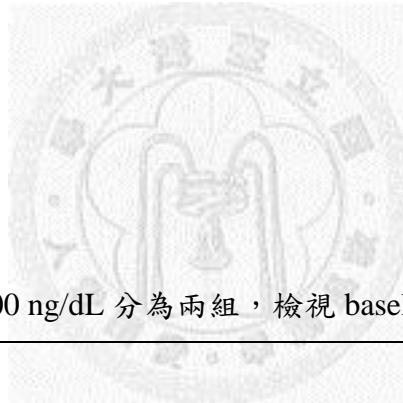


表三 將 BMI 以 21 kg/m² 分為兩組，檢視 baseline 之 IGF-1

	IGF-1 (ng/ml)	P (和 control 組比)
Hyperthyroidism BMI<21 n=11	346.54 ± 128.06	0.017
Hyperthyroidism BMI>21 n=13	328.80 ± 80.23	0.004
control	240.26 ± 85.87	
兩組相比 p=0.069		

表四 將 free T4 以 3.00 ng/dL 分為兩組，檢視 baseline 之 Myostatin

	Myostatin ($\mu\text{g/dL}$)	P (和 control 組比)
Hyperthyroidism FT4 < 3 n=11	16.24 \pm 6.04	0.383
Hyperthyroidism FT4 > 3 n=13	16.68 \pm 4.87	0.449
Control n=31	16.95 \pm 6.86	
兩組相比 p=0.115		



表五 將 free T4 以 3.00 ng/dL 分為兩組，檢視 baseline 之 IGF-1

	IGF-1 (ng/ml)	P (和 control 組比)
Hyperthyroidism FT4<3 n=11	330.47 \pm 105.65	0.003
Hyperthyroidism FT4>3 n=13	342.40 \pm 104.34	0.001
Control	240.26 \pm 85.87	
兩組相比 p=0.023		

表六 治療二十四週後，受試者之統計學資料，臨床特徵及指標

	Total	Hyperthyroidism	Euthyroidism	P
Weight (kg)	60.79 ± 9.54	61.07 ± 11.69	60.58 ± 7.68	0.426
BMI (Kg/m ²)	21.32 ± 2.84	22.42 ± 2.92	23.66 ± 2.70	0.053
Free T4 (ng/dL)	1.20 ± 0.75	1.51 ± 1.04	0.95 ± 0.20	0.002
TSH (μIU/ml)	3.40 ± 12.60	3.15 ± 12.00	3.60 ± 13.29	0.449
Myostatin (μg/dL)	24.28 ± 9.08	25.58 ± 7.08	23.28 ± 8.91	0.152
IGF-1 (ng/ml)	283.77 ± 106.18	338.69 ± 116.26	241.27 ± 75.17	<0.001

表七 比較患者治療前後之血清 myostatin 與 IGF-1 濃度

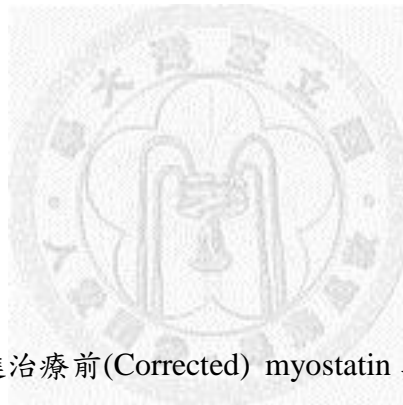
	Before treatment	On treatment	P
MSTN (μg/ml)	16.48 ± 5.32	25.58 ± 7.08	<0.001
IGF-1 (ng/ml)	336.93 ± 102.81	338.68 ± 116.26	0.452

表八 校正後患者的 serum myostatin 前測值與後測比較

	Before treatment (corrected)	On treatment	P
MSTN (μg/ml)	21.24 ± 11.44	25.58 ± 7.08	0.063

表九 Hyperthyroidism 組，corrected myostatin 和臨床指標的關連性

	和 corrected myostatin 的 correlation r
Age	0.021
BMI	0.0113
Free T4	0.1645
ALT	0.0755
Cre.	-0.0523
IGF-1	-0.2095



表十 甲狀腺機能亢進治療前(Corrected) myostatin 與 age、sex、BMI、free T4、GPT、Cre 做 multiple linear regression

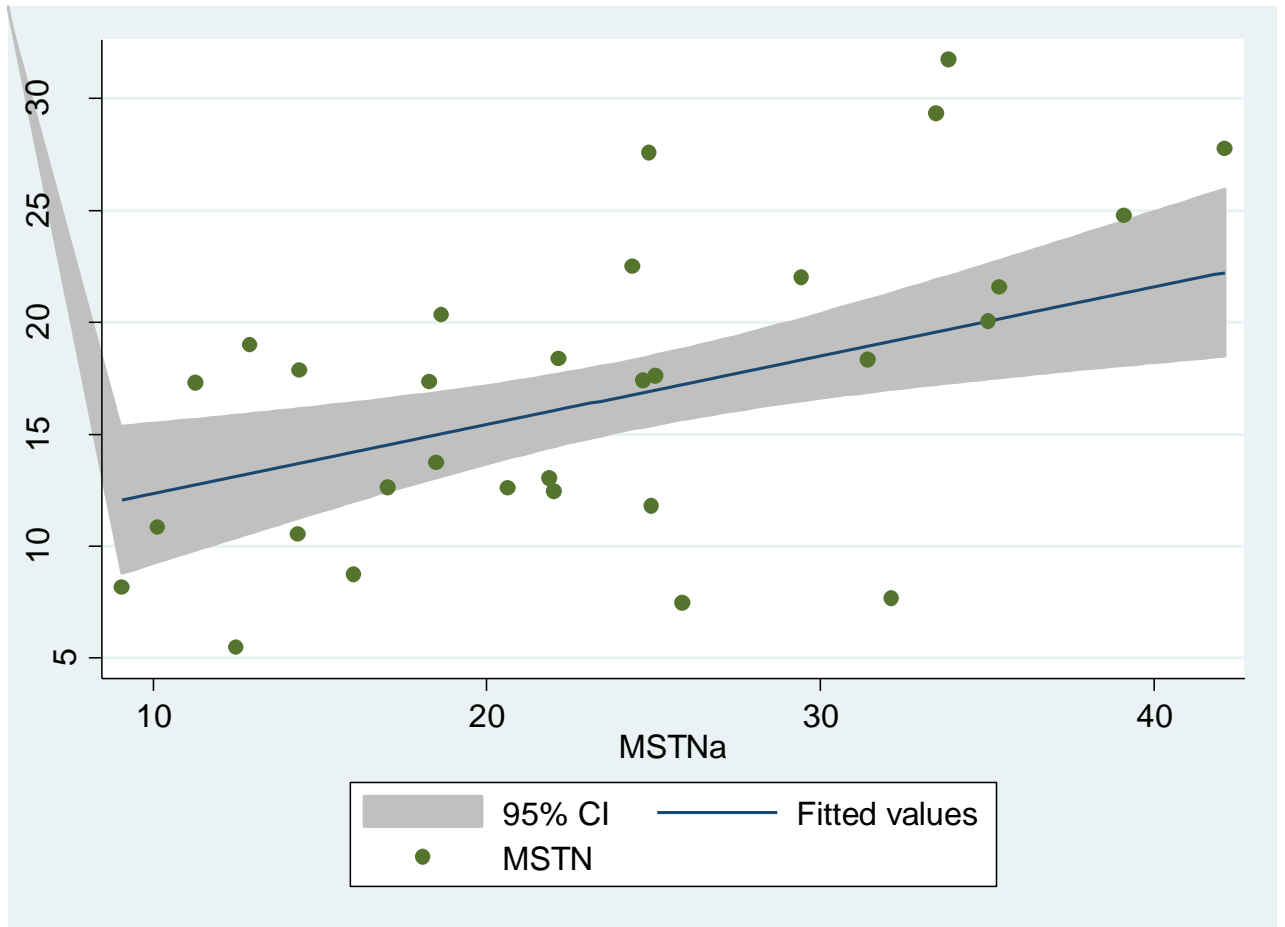
	Coefficiency	95% Confidence	P
Age	-0.013447	-0.4692241	0.951
Sex	26.05068	-5.835615	0.103
BMI	-0.4565568	-2.422567	0.63
Free T4	-1.057065	-7.459177	0.732
ALT	0.0907284	-0.3370014	0.66
Cre	-82.36874	-191.0832	0.128

表十一 比較甲狀腺機能亢進治療前(Corrected)後 myostatin 增加與減少者

	Δ MSTN(Co) >0	Δ MSTN(corrected) <0	<i>p</i>
Number	13	11	
Age	40 \pm 14.61	33.73 \pm 10.21	0.2963
BMI	21.66 \pm 2.79	21.94 \pm 3.40	0.6639
ALT	37.46 \pm 13.94	35.72 \pm 12.84	0.6423
Cre	0.67 \pm 0.16	0.58 \pm 0.13	0.1339
Free T4	2.95 \pm 1.16	3.45 \pm 1.05	0.2347
MSTN(c)	14.06 \pm 9.77	29.73 \pm 6.35	0.0007
IGF1	324.29 \pm 97.34	351.87 \pm 111.74	0.6224



圖一 控制組後測與前測的線性迴歸



以 linear regression 檢視 control 組，可得 Coeficincy=0.4674($p<0.0001$) ，
regression model 為 $mstn=mstna*0.4674+6.0668$ 。因若無 degradation ，
 $MSNTa=MSTN$ 。故視此 model 為 myostatin 冰存 6 個月 degrade 的預測