

國立臺灣師範大學生命科學系 碩士論文

**Nrf2 與神經退化性疾病：啟動子多型性  
與以氧化壓力為目標的治療策略**

**NFE2-related factor 2 (Nrf2) in  
neurodegenerative disease: promoter  
polymorphism and therapeutic strategy  
targeting oxidative stress**

研究生：巫逸琦

Yi-Ci Wu

指導教授：李桂楨 博士

Guey-Jen Lee-Chen

中華民國一〇一年八月

## 致謝

在師大兩年的求學生涯中，每天都過著豐富充實的生活，感謝師大提供豐富的資源，讓我有機會在完善的研究環境中充實自我。

本研究的完成，首先要感謝恩師李桂楨老師，感謝您的細心與耐心的指導，即便是對於基礎不穩固的我，您都願意給我學習的機會，在您深厚的學術教養與專業的指導下，讓我在研究過程中受益良多，更讓我有堅持下去與努力的勇氣，您的堅持與毅力更讓我佩服萬分。並感謝林口長庚紀念醫院神經內科的陳瓊美醫師及吳逸如醫師給予指導與建議，以及撥空為我口試，給與研究上寶貴的見解，讓論文得以更加完善。也感謝林口長庚紀念醫院所提供血液樣本的提供者及論文中的部分影像與其分析由使用臺師大分子影像核心實驗室設施取得，核心實驗室部分經費為國科會補助，特此致謝。

在研究生涯中，我也仰賴許多人的指導與幫助。感謝實驗室的學長姊麗卿學姊、怡辰學姊、志信學長、春嫻學姊、淑婷學姊、慈蓬學姊、詩涵學姊、佩茹學姊、文騰學長、允麟學長、修嘉學長、明慧學姊、婉玲學姊、可蓁學姊、于婷學姊、德嫻學姊、芷英學姊在實驗上耐心的協助與建議；還有我的同學品睿、奕澂、鈺翔，你們的陪伴讓

我覺得自己絕非孤軍奮戰；還有炫江、均如、映伶、旻羲、雅婷、雅貞、信豪、紫綾、執中、胤榮、楷涵、怡綺、舒琇等，感謝你們平時給我的歡笑與幫助，當我在研究上遇到挫折時，感謝你們在實驗上的建議與給我加油打氣，因為有你們更豐富了我的碩士生活。也感謝謝秀梅老師與李冠群老師在學習上的建議與藥品器材的協助感謝您們的鼓勵與幫助，讓我得以順利完成實驗。

最後，謹將此篇論文獻給我最親愛的家人：爸爸、媽媽及妹妹，有你們做為我最強而有力的精神支柱，並給予我無限的包容與體諒，我才能無後顧之憂的完成碩士學業，謝謝您們！

# 目錄

目錄.....	I
中文摘要 .....	IV
<b>Abstract.....</b>	<b>V</b>
圖表目錄 .....	VI
<b>壹、緒論 .....</b>	<b>1</b>
一、神經退化性疾病.....	1
(一)帕金森氏症(PD) .....	1
(二)脊髓小腦萎縮症 .....	2
(三)第三型脊髓小腦萎縮症(MJD/SCA3) .....	3
二、Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 .....	4
(一)Nrf2 基因與抗氧化活性 .....	4
(二)氧化壓力與神經性疾病 .....	5
(三) Nrf2 基因多型性與疾病風險 .....	6
<b>貳、研究目的 .....</b>	<b>8</b>
<b>參、研究材料與方法 .....</b>	<b>9</b>
一、分子遺傳研究.....	9
(一)研究樣品 .....	9
(二)聚合酶連鎖反應(PCR).....	9

(三)限制性片段長度多型性(RFLP).....	10
(四)統計分析相對罹病危險程度.....	10
(五)多型性點間的連鎖不平衡(LD)分析.....	11
二、細胞分生研究.....	11
(一)細胞培養.....	11
(二)細胞存活率測定(MTT assay).....	11
(三)基因轉染(transfection).....	12
(四)活細胞影像分析.....	13
(五)蛋白質萃取.....	14
(六)西方轉漬法(Western blot).....	15
(七)RNA 萃取.....	16
(八)反轉錄 PCR(RT-PCR).....	17
(九)同步定量 PCR(Real-time PCR).....	17
<b>肆、結果.....</b>	<b>19</b>
一、Nrf2 啓動子與帕金森氏症(PD)分子遺傳研究.....	19
(一)樣品群.....	19
(二)多型性及連鎖不平衡檢測.....	19
(三)多型性基因型、等位基因頻率及單套型分析.....	20
二、誘導式 SCA3 細胞株建立.....	21

三、以抗氧化為治療策略的藥物篩檢 .....	23
<b>伍、討論 .....</b>	<b>26</b>
一、Nrf2 啓動子多型性與 PD 相關性.....	26
二、誘導式 SCA3 細胞株建立.....	27
三、以抗氧化為治療策略的藥物篩檢 .....	28
<b>陸、參考文獻 .....</b>	<b>30</b>
<b>柒、附錄圖表 .....</b>	<b>42</b>

## 中文摘要

Nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2)-related factor 2 (Nrf2)是 basic leucine zipper (bZIP)的轉錄因子，可調節抗氧化路徑基因的活化，並維持細胞內氧化還原的平衡。氧化壓力的增加與許多神經性退化性疾病有相關性。舉例來說，帕金森氏症(PD)的致病機制就會受到氧化壓力的影響，增強 Nrf2 的活化會對於神經細胞有保護性的功效。在 polyQ 不正常擴增的脊髓小腦萎縮症中，擴增的 CAG 三核苷酸轉譯出的 polyQ 蛋白，聚集在細胞內增加細胞內的氧化壓力。本論文先以 PCR-RFLP 技術，對 Nrf2 基因啓動子-653 A/G、-651 G/A 和-617 C/A 多型性，進行帕金森氏症患者(n = 480)與年齡、性別配合的正常人(n = 526)的病例-對照組研究。結果多型性基因型、等位基因頻率、單套型等均並未發現相關性。另外，本研究建立誘導式 ATXN3/Q<sub>14-75</sub> 的 Flp-In SH-SY5Y 細胞株，添加 retinoic acid 誘導分化後，表現具有病理特徵的 ATXN3/Q<sub>75</sub> 融合蛋白會形成聚集，並伴隨神經纖維生長減緩。藉高通量影像分析及免疫轉漬分析，此細胞株處理中草藥 NH004、NH008、NH021 及 NH008 某組成份衍生物 NH008-1 可活化 Nrf2 的表現，並降低 ATXN3/Q<sub>75</sub> 融合蛋白的聚集，故可能發展為有潛能的治療策略。

關鍵字：Nrf2、氧化壓力、聚集、多型性、ATXN3

## Abstract

Nuclear factor-erythroid 2 (NF-E2)-related factor 2 (Nrf2) is a member of the basic leucine zipper transcription factors that regulate the expression of many antioxidant pathway genes and maintains cellular redox homeostasis. Increased oxidative stress is involved in the pathogenesis of many neurodegenerative diseases. For example, oxidative stress has been implicated as a major contributing factor in Parkinson's disease (PD) and varying efficiency in the oxidative protection by Nrf2 may influence PD pathogenesis. In polyQ-mediated spinocerebellar ataxias, the expansions of translated CAG repeats in the disease genes result in long polyQ tracts in the respective proteins, leading to accumulation of aggregated polyQ proteins and increased oxidative stress. In this study, PCR-RFLP test was developed to examine the frequency of Nrf2 -653 A/G, -651 G/A and -617 C/A promoter polymorphisms in a larger cohort of PD (n = 480, 49.2% female, age at onset  $61.8 \pm 11.2$  years) and age- and gender-matched controls (n = 526, 50.5% female, age  $60.3 \pm 13.1$  years). No association between polymorphic genotype, allele or haplotype and PD was observed. In addition, Flp-In SH-SY5Y cells with ATXN3/Q<sub>14-75</sub> expression in an inducible fashion were established. In retinoic acid-induced differentiated SH-SY5Y cells, the expressed ATXN3/Q<sub>75</sub> formed aggregates, accompanying with reducing neurite outgrowth. By combining high content image analysis and immunoblotting, treatment of ATXN3/Q<sub>75</sub> cells with Chinese herbs NH004, NH008, NH021 and NH008 derivative NH008-1 activate Nrf2 expression, accompanying decreasing ATXN3/Q<sub>75</sub> aggregates. Thus NH004, NH008, NH021 and NH008-1 may be potential therapeutic strategies for polyQ-mediated disease.

Keywords: Nrf2, oxidative stress, aggregate, polymorphism, ATXN3

## 圖表目錄

圖一、Nrf2 基因啓動子-653(A/G)、-651(G/A)、-617(C/A)多型性的位置。.....	42
圖二、Nrf2 基因啓動子多型性檢測。.....	43
圖三、誘導式 SCA3 細胞株建立流程圖。.....	44
圖四、誘導 ATXN3/Q <sub>14~75</sub> -EGFP 細胞株之 RNA 及蛋白表現分析。.....	46
圖五、ATXN3/Q <sub>14~75</sub> -EGFP 細胞株之融合蛋白聚集分析。.....	47
圖六、ATXN3/Q <sub>14~75</sub> -EGFP 細胞株之融合蛋白聚集及 ATXN3/Q <sub>75</sub> -EGFP 細胞株神經纖維生長分析。.....	48
圖七、神經瘤細胞株 SH-SY5Y 處理中草藥及其組成份衍生物之 MTT 分析。.....	50
圖八、ATXN3/Q <sub>75</sub> -EGFP 細胞株處理中草藥及其組成份衍生物之抗氧化功能檢測及 polyQ 聚集分析。.....	51
表一、Nrf2 基因啓動子 PCR-RFLP 的條件.....	52
表二、Nrf2 多型性的 SNPSpD 連鎖不平衡檢測.....	53
表三、Nrf2 啓動子的多型性基因型、等位基因頻率與疾病相關性之分析結果.....	54

表四、Nrf2 啓動子的多型性單套型與疾病相關性之分析結果....55

表五、脊髓小腦萎縮症之三十種亞型.....56

## 壹、緒論

### 一、神經退化性疾病(Neurodegenerative disease)

神經退化性疾病包含有阿茲海默症(Alzheimer's disease)、帕金森氏症(Parkinson's disease)、亨丁頓舞蹈症(Huntington's disease)、縮性脊髓側索硬化症(Lateral sclerosis)、脊髓小腦萎縮症(Spinocerebellar ataxia)等。和本論文研究相關的帕金森氏症及脊髓小腦萎縮症分別敘述如後。

#### (一)帕金森氏症(Parkinson's disease)

帕金森氏症(Parkinson's disease；簡稱 PD)是一種漸進性的神經退化性疾病，此病症最早在 1817 年由英國醫師 James Parkinson 所描述，故後來以其姓名命名之。

PD 是第二常見的神經退化性疾病，這個常見的疾病大約影響了約 1% 超過 60 歲以上的人口(Conley and Kirchner, 1999; Litvan et al., 2007)。臨床主要的病徵有靜止性震顫(resting tremor)、僵直

(rigidity)、行動遲緩(bradykinesia)、步伐不穩(postural instability)等(Conley and Kirchner, 1999)。

PD 患者主要的病理特徵是在大腦紋狀體(striatum)黑質緻密部(substantia nigra pars compacta)的多巴胺神經元(dopaminergic neuron)神經細胞的死亡或退化，這是因由紋狀體黑質(substantia nigra)中的神經傳導物質—多巴胺(dopamine)分泌不足而引起的(Dauer and Przedborski, 2003)，但它的致病機制還尚未明瞭(Dawson and Dawson, 2003; Tansey et al., 2008)。

根據過去的研究指出多巴胺神經元損傷，富含相當高的氧化壓力(oxidative stress)，細胞活性氧(reactive oxygen species)的生成增加活化了細胞死亡的訊號(death signaling)，像是細胞凋亡(apoptosis)，最終使多巴胺神經元死亡而導致疾病的發生(No et al., 2010)。

## **(二)脊髓小腦萎縮症(Spinocerebellar ataxia)**

脊髓小腦萎縮症(Spinocerebellar ataxia；簡稱SCA)是一種體染色體顯性遺傳(autosomal dominant inheritance)的神經性退化性疾病，主要的病徵是脊髓及小腦功能的失調(Schöls et al., 2004; Soong and

Paulson, 2007; Teive, 2009)。到目前為止，已經有三十種亞型的脊髓小腦萎縮症被報導出來(Durr, 2010)。

脊髓小腦萎縮症中，第一型(SCA1) (Orr et al., 1993)、第二型(SCA2) (Pulst et al., 1996)、第三型(SCA3) (Kawaguchi et al., 1994)、第六型(SCA6) (Zhuchenko et al., 1997)、第七型(SCA7) (David et al., 1997)及第十七型(SCA17) (Koide et al., 1999)，都是由於特定基因編碼區域(coding region)的 CAG 三核苷酸不正常擴增，表現的突變蛋白包含擴增的多麩醯胺(polyglutamine；簡稱 polyQ)，在細胞核和細胞質中形成聚集(aggregation) (Zoghbi and Orr, 2000; Duenas et al., 2006)。另外，脊髓小腦萎縮症第八型(SCA8) (Koob et al., 1999)、第十型(SCA10) (Matsuura et al., 2000)及第十二型(SCA12) (Holmes et al., 1999)，則是在特定基因的非編碼區域(non-coding region)出現三或五核苷酸不正常擴增，進而導致疾病的發生。

### **(三)第三型脊髓小腦萎縮症(MJD/SCA3)**

第三型脊髓小腦萎縮症(Spinocerebellar ataxia type 3；簡稱 SCA3)又稱爲 Machado-Joseph disease (MJD)，是脊髓小腦萎縮症中最常見的一型，占有 SCA 疾病的 15~45 % (Paulson, 2007)。

SCA3 患者的致病原因是 ATNX3 蛋白的 C-端編碼區域 polyQ 的擴增(Kawaguchi et al., 1994)。ATNX3 蛋白具 N-端高度保守性的結構(Masino et al., 2003)。在神經瘤細胞中，N-端被切除的、包含擴增 polyQ 的 C-端蛋白，因不正常的折疊而形成聚集，並包藏正常的 ATNX3 蛋白，引起致病機轉(Haacke et al., 2006)。

ATNX3 基因位於人類染色體 14q32.1 的位置上，在正常人族群中，CAG 三核苷酸的重複分佈為 13~36 次，患者 ATNX3 基因上的 CAG 重複擴增可高達 68~79 次(Kawaguchi et al., 1994)。臨床上 CAG 重複的次數愈多病情愈加嚴重(Kawaguchi et al., 1994; Schöls et al., 1995; Hsieh et al., 1997)。SCA3 臨床上的病理特徵包括漸進性的運動失調(progressive ataxia)、眼外肌的麻痺(ophthalmoplegia)、肌張力的異常或僵硬(dystonia or rigidity)、肌肉萎縮(amyotrophy)、錐狀體徑路的病徵(pyramidal signs)等(Kawaguchi et al., 1994; Rüb et al., 2004)。

## 二、Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2

### (一) Nrf2 基因與抗氧化活性

Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 簡稱 NFE2L2 或 Nrf2，是 basic leucine zipper (bZIP)的轉錄因子(transcription factor) (Moi et al., 1994)，與 kelch-like ECH associating protein 1 (Keap1)結合，在細胞質形成複合體(dimer)的不活化態(Itoh et al., 1999)。受到氧化壓力(oxidative stress)的刺激，Nrf2 和 Keap1 會分開形成單體(monomer)而活化，進入到細胞核與 small Maf 結合形成二聚體(heterdimer)，並連接到 antioxidant response element (ARE)上，活化第二相解毒酵素(phase 2 detoxification enzymes) (Rushmore et al., 1991; Itoh et al., 1997; Jaiswal, 2004)，如血紅素氧化酶(heme oxygenase 1；簡稱 HMOX1) (Alam et al., 2000)、NAD(P)H 泛醌氧化還原酶(NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1；簡稱 NQO1) (Jaiswal, 2000)、麩胺基硫轉移酵素(glutathione S-transferase；簡稱 GST) (Rushmore et al., 1990; Nguyen and Pickett, 1992)、伽瑪 - glutamylcysteine 合成酶(gamma-glutamylcysteine synthetase；簡稱  $\gamma$ -GCS) (Wild et al., 1999)、硫氧化還原蛋白(thioredoxin) (Kim et al., 2001)、含鐵蛋白(ferritin) (Orino et al., 2001)等。

## (二)氧化壓力與神經性疾病

氧化壓力與 PD 的發病機制是有相關聯性的，起因於老化造成多巴胺神經元細胞內活性氧(reactive oxygen species)的生成增加，產生過多的活性氧使得細胞無法排除及修復所造成的傷害形成氧化壓力，進一步的活化細胞死亡的訊號(death signaling)，促使細胞凋亡(apoptosis) (Beal, 2002; Klein and Ackerman, 2003)。

此外，polyQ 的擴增所引起氧化壓力也會影響疾病的致病機轉，根據先前 HD 的研究證實 polyQ 擴增的 huntingtin 蛋白突變會誘發氧化壓力的產生(Browne et al., 1999)。增加的氧化壓力會損害 HD 小鼠的 DNA (Bogdanov et al., 2001)。熱休克蛋白 27 可防止 polyQ 毒性並抑制 huntingtin 增加的氧化壓力(Wytenbach et al., 2002)。氧化壓力促進 polyQ 擴增的 huntingtin 突變蛋白在細胞內形成聚集並誘發細胞的死亡(Goswami et al., 2006)。此現象也在 SCA3 的研究中發現，細胞具有 polyQ 擴增的 ATXN3 蛋白，此細胞對於氧化壓力較為敏感及耐受性較差(Wen et al., 2003)。

### (三) Nrf2 基因多型性與疾病風險

根據先前瑞典及波蘭的 PD 族群對於 Nrf2 基因及其啓動子(promoter)的單套型(haplotype)進行研究分析，瑞典族群中發現啓動

子-653A/G、-651 G/A、-617 C/A 爲 AGC 的單套型，在抗氧化的功能上對於 PD 的致病機制具有保護性的功效(von Otter et al., 2010)。

在-653A/G、-651 G/A 啓動子上有 MZF1 轉錄因子的連結位置，-617 C/A 啓動子上有 ARE-like 轉錄因子的連結位置(圖一)。而在基因多型性研究上發現啓動子-617 C/A 爲 A 的等位基因(allele)較容易引起急性肺損傷，啓動子功能的研究也發現-617 C/A 啓動子爲 CC 之基因型(genotype)其啓動子的活性較好(Marzec et al., 2007)。

## 貳、研究目的

過去的研究證實氧化壓力的產生與神經退化性疾病有相關聯性。本論文的分子遺傳研究部分以調節抗氧化活性的 Nrf2 為主題，探討 Nrf2 基因啓動子，在 PD 患者與正常人中-653 A/G、-651 G/A、-617 C/A 多型性的分佈，分析這些多型性基因型、單套型與 PD 罹病機率的相關性。在治療神經退化性疾病抗氧化活性藥物篩選部分，因過去的研究發現 polyQ 的擴增會造成細胞內的氧化壓力，本篇研究建立穩定誘導表現 ATXN3/Q<sub>14</sub>-EGFP 及 ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 的 SCA3 Flp-In SH-SY5Y 細胞模式，以此細胞模式進行藥物篩檢，觀察 polyQ 蛋白聚集的情況、神經纖維生長情形，以及利用西方轉漬法檢測 Nrf2 蛋白的表現，以及活化下游第二相酵素 NQO-1、HMOX-1 表現的情況，期待發現有效藥物能活化 Nrf2/ARE 路徑，以達到抗氧化的目標來治療神經退化性疾病。

## 參、研究材料與方法

### 一、分子遺傳研究

#### (一)研究樣品

分子遺傳研究所使用的 PD 患者與正常人血液的基因組 DNA 樣品是由林口長庚紀念醫院神經內科的陳瓊美醫師及吳逸如醫師所提供。樣品都是經由診斷後，並且徵求患者或家屬同意進行血液採樣。PD 樣品選取的標準為：含有兩個以上 PD 典型症狀才納入為病人樣品，並研究其年齡及性別的相對比率，並排除因腦外傷、腦炎或服用抗精神性藥物等所引起帕金森氏症候群的樣品，同時也蒐集相對數量的正常人樣品，作為對照組。

#### (二)聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction；簡稱 PCR)

取 100 ng 的染色體 DNA，置於 25  $\mu$ l PCR 反應溶液中反應，反應溶液包含 50 ng 的引子、200  $\mu$ M dNTP、2 mM  $MgCl_2$ 、10% DMSO 及 1 U 的 *Taq* DNA 聚合酶(Promega)，在反應條件為 94 $^{\circ}C$  6 分鐘使雙股 DNA 裂解，94 $^{\circ}C$  裂解溫度 30 秒、65 $^{\circ}C$  煉合溫度 30 秒、72 $^{\circ}C$  延

長溫度 30 秒，以 40 個循環作反應，最後再以 72°C 作用 10 分鐘，放大 Nrf2 基因的啓動子-653 A/G、-651 G/A、-617 C/A 多型性點的片段。PCR 產物並以 1.5% 洋菜膠體電泳檢查片段大小。

(三) 限制性片段長度多型性 (Restriction fragment length polymorphism；簡稱 RFLP) 分析

取適量的 PCR 產物，分別加入 *Bse*RI、*Afe*I、*Nae*I 限制酵素，針對-653 A/G、-651 G/A、-617 C/A 多型性基因型作檢測，與反應溶液均勻混合，在 37°C 水浴槽中反應到隔天。所有樣品經離心後，以 1.5 ~ 2.0 % 洋菜膠體電泳檢查 DNA 的片段大小。

(四) 多型性點間的連鎖不平衡(linkage disequilibrium，簡稱 LD)分析

利用線上軟體 SNPSpD (<http://genepi.qimr.edu.au/general/daleN/SNPSpD/>) (Nyholt, 2004)，分析各兩個多型性點間的連鎖不平衡 (linkage disequilibrium，簡稱 LD) 關係，得到調整後第一型統計誤差為 5% 的顯著性閾值，作為判別顯著性的  $\alpha$  值。配合 LDMAX 軟體計算 Lewontin's 標準化不平衡係數  $D'$ 、 $\Delta^2$  值與  $\lambda_s$  值，用以判斷各 SNP 間高或低的連鎖不平衡關係(Stephens et al., 2001)。

## (五)統計分析相對罹病危險程度

分別計算所有病人與正常人的樣品多型性基因型數目，並利用 Chi-square test ( $\chi^2$ ) 檢測各多型性點是否符合哈溫平衡 (Hardy-Weinberg equilibrium)，並比較多型性基因型、等位基因的頻率及單套型檢測，在帕金森氏症族群與正常人族群間，是否有顯著差異，並計算出罹病的相對危險程度(odd ratio)。

## 二、細胞分生研究

### (一)細胞培養

培養人類神經瘤宿主細胞株(Flp-In SH-SY5Y clone S11，李麗卿博士建構)於37°C、5% CO<sub>2</sub>的細胞培養箱中，所使用的培養液為含有 10% FBS、1.0 mM sodium pyruvate、1.5 g/l sodium bicarbonate、100 U/ml penicillin、100 U/ml streptomycin的DMEM/F12 (Gibco)，並含有抗生素200 µg/ml G418和5 µg/ml blasticidin S，待細胞生長至7~8分滿，以稀釋五倍的方式進行細胞繼代培養。

### (二)細胞存活率測定(MTT assay)

接種  $5 \times 10^4$  的 SH-SY5Y 細胞於 48 孔細胞培養盤中，每孔中含有 500  $\mu$ l 之 DMEM/F12 培養液，第二天，以檢測中草藥 NH004、NH008 及 NH021，加入 5、10、15、20、25、30 mg/ml 等濃度，以及 NH008 某組成份衍生物 NH008-1 與化合物 resveratrol，加入 100 nM、1  $\mu$ M、10  $\mu$ M、100  $\mu$ M、1 mM 等濃度，隔天，加入 5 mg/ml 的 MTT (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) (Sigma) 染活細胞，作用 2 小時後，使用 ELISA reader 測 OD<sub>570</sub>。每種藥物處理實驗進行兩至三次，每次實驗進行三重複。

### (三) 基因轉染(transfection)

接種  $6 \times 10^5$  的細胞於 6 孔細胞培養盤中，隔天進行轉染。其方法為：取 6  $\mu$ l 脂質 T-Pro (Invitrogen)，加入 250  $\mu$ l OptiMEM 培養液 (Gibco)，混合均勻。接著取 0.5  $\mu$ g pOG44 質體與 4.5  $\mu$ g pcDNA5/FRT/TO/ATXN3/Q<sub>14-75</sub>-EGFP 質體(陳婉玲建構)，加入 250  $\mu$ l OptiMEM 培養液，混合均勻。接著將已作用 5 分鐘的 T-Pro - OptiMEM 混合液加入質體 DNA - OptiMEM 混合液。20 分鐘後將上述 500  $\mu$ l 的 T-Pro - 質體 DNA - OptiMEM 混合液，加入至 6 孔細胞培養盤的細胞中培養 6 小時。之後以不含抗生素、含 10% FBS 的

DMEM/F12 培養液補足至 2 mL，培養 2 天後，改以含篩選的抗生素 100 µg/ml hygromycin B 及 5 µg/ml blasticidin S 培養液，進行誘導式 SCA3 細胞株的篩選。

#### (四)活細胞影像分析

誘導表現檢測：以加入 5 µg/ml doxycycline 誘導 ATXN3/Q<sub>14-75</sub>-EGFP 融合蛋白表現 2~6 天後，將細胞培養盤取出加入 100 ng/ml Hoechst 33342 細胞核染劑，處理 30 分鐘，隨後利用活細胞影像儀觀察螢光蛋白的表現情形及蛋白聚集表現的分佈情況。

神經性狀分析：接種  $2 \times 10^5$  顆細胞於 6 孔盤中，每孔含有 DMEM/F12 的培養液 2 ml (另含 100 µg/mL hygromycin B 及 5 µg/ml blasticidin S)，並以 10 µM retinoic acid 誘導分化。第二天，加入 5 µg/ml doxycycline，誘導 ATXN3/Q<sub>14-75</sub>-EGFP 融合蛋白表現 7、14、21 天後，將細胞培養盤取出加入 Hoechst33342 處理 30 分鐘，隨後利用高通量(high content)活細胞影像儀進行拍照，並統計分析 ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 融合蛋白聚集表現的分佈百分比、以及誘導分化後神經纖維生長情形。

藥物篩檢：接種  $2 \times 10^5$  顆細胞於 6 孔盤中並誘導分化。隔天，加入檢測中草藥 NH004、NH008 及 NH021 ( $10 \mu\text{g/ml}$ )，以及 NH008 某組成份衍生物 NH008-1 與化合物 resveratrol ( $500 \text{ nM}$ ) 前處理 8 個小時後，培養 24 小時後，加入  $5 \mu\text{g/ml}$  doxycycline 誘導 ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 融合蛋白表現。培養 6 天後，將細胞培養盤取出加入 Hoechst33342 處理 30 分鐘，隨後利用高通量活細胞影像系統進行拍照，每孔約拍攝 16 個視野，統計分析 4000~6000 顆細胞，分析 ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 融合蛋白聚集表現的分佈百分比。

#### (五)蛋白質萃取

包括上述的 ATXN3/Q<sub>14~75</sub>-EGFP 穩定誘導表現 2 天或經檢測中草藥 NH004、NH008 及 NH021 ( $1/2 \text{ IC}_{50}$ )，以及 NH008 某組成份衍生物 NH008-1 與化合物 resveratrol ( $10 \mu\text{M}$ ) 前處理 8 個小時後，誘導 ATXN3/Q<sub>14~75</sub>-EGFP 融合蛋白表現 24 小時後，以 1,500 rpm 離心收集細胞，加入適量的 RIPA lysis buffer ( $50 \text{ mM Tris-HCl}$ , pH 7.4 -  $150 \text{ mM NaCl}$  -  $1 \text{ mM PMSF}$  -  $1 \text{ mM EDTA}$  -  $5 \mu\text{g/ml aprotinin}$  -  $5 \mu\text{g/ml leupeptin}$  -  $1\% \text{ Triton X-100}$  -  $1\% \text{ sodium deoxycholate}$  -  $0.1\% \text{ SDS}$ )及 protease inhibitor，超音波震盪 10 次，使細胞融破，並置於冰上作用

30 分鐘。隨後以 4°C、14,000 g 離心 30 分鐘，將上清液移至新的離心管，置於-80°C 保存。

#### (六)西方轉漬法(Western blot)

以 Bio-Rad Protein Assay 進行蛋白質定量。取 25  $\mu$ g 的蛋白質，加入 sample buffer (50 mM Tris, pH 6.8 - 2% SDS - 10% glycerol - 2.5%  $\beta$ -mercaptoethanol - 0.005% bromophenolblue)，將樣品進行沸水浴 10 分鐘，隨後立即至於冰上。接著進行 10% SDS-聚丙烯醯胺電泳 (SDS-PAGE)，依分子量大小的不同分離蛋白質。電泳完畢後，以 XCell II<sup>TM</sup> Blot Module (Invitrogen)加入 transfer buffer (25 mM Tris - 0.2 M glycine - 20% methanol)，放置於 4°C 冰箱，以 200 mA、轉漬 2 小時，將蛋白質轉漬到硝化纖維膜(nitrocellulose transfer membrane)上。轉漬完成的硝化纖維膜浸泡膜於 blocking buffer (10% skim milk)，在室溫作用 2 小時或置於 4°C 冰箱作用到隔天。完成 blocking 後，以 TBST (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 - 150 mM NaCl - 0.05 % Tween-20)清洗硝化纖維膜。接著加入一級抗體 GFP (1:500 稀釋，Santa cruz)、Nrf2 (1:200 稀釋，Santa cruz)、NQO-1 (1:1500 稀釋，Sigma)、HMOX1 (1:500 稀釋，BD)、 $\beta$ -actin (1:5000 稀釋，Millipore)、GAPDH (1:1000 稀釋，MDBio)於室溫下作用 2 小時或置

於 4°C 冰箱作用至隔天。再以 TBST 清洗膜三次，每次約 10 分鐘。接著加入 horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-mouse IgG (H&R) (1:5000 稀釋，Gene Tex)或 goat anti-rabbit IgG (1:5000 稀釋，Gene Tex)二級抗體，於室溫作用 2 小時。之後再以 TBST 清洗膜三次，每次約 10 分鐘。最後加入冷光呈色試劑(Millipore)呈色，以冷光儀及 ImagerReader LAS-4000 軟體偵測蛋白表現情形。

#### (七) RNA 萃取

將 6 孔細胞培養盤取出，以 PBS 清洗細胞，加入 500  $\mu$ l TRIzol 將細胞在培養盤中沖散，並收集至微量離心管，上下翻轉後放置於冰上 5 分鐘。再加入 1/5 倍體積的 chloroform 混合，上下翻轉使之混合均勻，並放置於冰上作用 5 分鐘。接著以 4°C、13,000 rpm 離心 15 分鐘，以分離 RNA、DNA 及蛋白質。小心吸取上清液中的 RNA 移至新的離心管，並取 0.8 倍體積至 1 倍體積異丙醇混合均勻，放置於-20°C 冰箱作用至少 2 小時。取出後以 4°C、13,000 rpm 離心 15 分鐘，沉澱 RNA 及去除上清液，加入 70%的酒精 (以 DEPC-ddH<sub>2</sub>O 稀釋) 400  $\mu$ l 潤洗，並以 13,000 rpm 離心 1 分鐘。去除上清液後，置於室溫中風乾。接著再將 RNA 回溶於 40  $\mu$ l 的 DEPC-ddH<sub>2</sub>O。最後，以 NanoDrop ND-1000 測定 RNA 濃度，至於-80°C 冰箱保存。

#### (八)反轉錄 PCR (Reverse transcription PCR ; 簡稱 RT-PCR)

取出 6.25  $\mu\text{g}$  的 RNA，加入 RNase-free DNase 0.5U (TaqMan)去除樣品中的 DNA，並以 DEPC-ddH<sub>2</sub>O 補足至 25  $\mu\text{l}$ ，置於 37°C 水浴槽中反應 30 分鐘，再以 65°C 水浴槽中反應 15 分鐘。接著利用 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)進行反轉錄作用，其方法如下：樣品取 1.5  $\mu\text{l}$  RNA、0.6  $\mu\text{l}$ 、25X dNTPs、1.5  $\mu\text{l}$  10X random primers、1.5  $\mu\text{l}$  10X reverse transcription buffer、4.65  $\mu\text{l}$  nuclease-free H<sub>2</sub>O、0.75  $\mu\text{l}$  MultiScribe™ reverse transcriptase。反應條件為：25°C 反應 10 分鐘、37°C 反應 2 小時、85°C 反應 5 分鐘。反應完成後的 cDNA 樣品，放置於-80°C 冰箱中保存。

#### (九)同步定量 PCR (Real-time PCR ; 簡稱 qPCR)

同步定量 PCR 使用 EGFP 的螢光探針 PN4331348 (Applied Biosystems)偵測誘導表現 ATXN3/Q<sub>14-75</sub>-EGFP 基因的表現量，並使用 HuHPRT 的螢光探針 4326321E (Applied Biosystems)作為控制組，反應溶液配製如下：取 100 ng cDNA、7.5  $\mu\text{l}$  2X master mix、0.75  $\mu\text{l}$  20X probe、1.75  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O，將樣品放入 ABI Real-time PCR system 作

反應，記錄 Ct 值變化， $\Delta Ct = Ct$  (目標基因 target gene) – Ct (內部對照基因 endogenous control gene)， $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (對照組) –  $\Delta Ct$  (實驗組)，帶入公式  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  計算相對倍率。

## 肆、結果

### 一、Nrf2 啓動子與帕金森氏症的分子遺傳研究

#### (一)樣品群

參與 Nrf2 基因啓動子多型性分析的 PD 患者共 480 位，其中女性佔 236 位、男性佔 244 位。患者平均年齡爲 66.6 歲。控制組共分析了 526 位正常個體，其中女性佔 263 位、男性佔 263 位。正常人平均年齡爲 60.3 歲。

#### (二)多型性及連鎖不平衡檢測

圖二顯示 -653 A/G、-651 G/A、-857 C/A 多型性的定序(圖二 A)及 PCR-RFLP 檢測(圖二 B)。-653 A>G 此多型性會使限制酶 *Bse*RI (GAGGAG)切位消失，經由表一所設計的引子對增幅 Nrf2 啓動子 450 bp 片段，酵素切割使得 314 bp 和 136 bp 的兩個片段轉變爲 450 bp 片段。-651 G>A 此多型性會新增限制酶 *Afe*I (AGCGCT)切位，經由表一所設計的引子對增幅 Nrf2 啓動子 200 bp 片段，酵素切割使得 200 bp 片段轉變爲 174 bp 和 26 bp 的兩片段。-617 C>A 此多型性會

使限制酶 *NaeI* (GCCGGC)切位消失，經由表一所設計的引子對增幅 *Nrf2* 啟動子 450 bp 片段，酵素切割使得 292 bp 和 158 bp 的兩片段轉變為 450 bp 片段。

表三顯示 PD 患者和正常人族群的基因型、等位基因頻率。此三個多型性的基因頻率皆呈現哈溫平衡(data not shown)。利用 SNPSpD 線上軟體連鎖不平衡相關矩陣(Linkage disequilibrium correlation matrix)，分別計算出 -653、-651、-617 多型性點的特徵值(eigenvalue,  $\lambda_s$ )，特徵值愈大表示多型性點間具有高度相關性(Cheverud, 2001)，若所有多型性點間完全相關，則第一特徵值會與多型性點的數目相同(Nyholt, 2004)。表二中顯示三個特徵值皆介於 1.70~0.39 之間，且第一特徵值( $\lambda_{-653}=1.70$ )也小於多型性點的數目，顯示這三個多型性點並非完全連鎖。

LDMAX 軟體進一步分析各多型性點間的連鎖不平衡程度。雖然  $D'$ 值接近 1 (0.88~0.94)，小的  $\Delta^2$  values (0.02~0.37)顯示此區域發生過重組，尤其在 -653 A/G 與 -617 C/A 位點間連鎖不平衡非常弱。

### (三)多型性基因型、等位基因頻率及單套型分析

如表三所示，-653 A/G、-651 G/A、-617 C/A 的多型性基因型與等位基因頻率，在 PD 族群與正常人族群間皆未達顯著差異(基因型  $P = 0.221\sim 0.586$ 、等位基因  $P = 0.180\sim 0.960$ )。-653 AA/AG/GG、-651 GG/GA、-617 CC/CA/AA 基因型的 PD 患者平均發病年齡分別為  $63.4\pm 10.7/61.5\pm 11.1/60.8\pm 11.8$ 、 $61.8\pm 11.1/61.8\pm 11.7$ 、 $60.8\pm 11.8/62.8\pm 10.4/62.3\pm 11.0$ 。不同基因型者發病年齡沒有顯著差異( $P = 0.146\sim 0.999$ )。按年齡分層分析 Nrf2 多型性，在 PD 族群與正常人族群間，亦未觀察到顯著差異(data not shown)。

-653、-651、-617 三個多型性點的單套型分析檢測顯示於表四。-653/-651/-617 最常見的單套型為 GGC，在 PD、正常人族群分別為 50.2%、49.8%。三個多型性點所組成的七種單套型，在 PD 族群與正常人族群間皆未達顯著差異( $P = 0.468$ )。依據多型性基因型、等位基因及單套型頻率，分析 PD 的罹患風險，亦未達到顯著差異( $P = 0.156\sim 0.966$ )。

## 二、誘導式 SCA3 細胞株建立

圖三顯示誘導式 SCA3 細胞株的建構。Flp-In SH-SY5Y 神經瘤宿主細胞上有 TetR(Tet repressor)基因、blasticidin S 抗生素篩選基因，

及 FRT (Flp Recombinase Target)序列、G418 抗生素篩選基因(圖三 A)。表現載體 pcDNA5/FRT/TO 包含 FRT 序列與不具啓動子及轉譯起始碼的 hygromycin B 篩選基因(圖三 B)。將 pOG44 質體(提供 Flp recombinase) 與 pcDNA5/FRT/TO/ATXN3-EGFP 質體(陳婉玲建構)共轉入 Flp-In SH-SY5Y 神經瘤宿主細胞，使 ATXN3/Q<sub>14~75</sub>-EGFP 的基因片段單一置入細胞的染色體上，且 SV40 啓動子及轉譯起始密碼與 hygromycin 篩選基因相連(圖三 C)。進行 hygromycin B、blasticidin S 抗生素篩選，建立誘導式 SCA3 的神經細胞模式。置入的片段將由 Met 開始轉譯出爲包含 Q<sub>14~75</sub> 的 ATXN3 C-端 105~166 個氨基酸序列(圖三 D 藍色標示處)。

上述建構的 SCA3 神經細胞，加入 doxycycline 誘導置入基因表現，在 2 天後，檢測 ATXN3/Q<sub>14~75</sub>-EGFP RNA 及蛋白的表現。如圖四所示，ATXN3/Q<sub>14~75</sub>-EGFP 在 RNA 上的誘導表現約 3~20 倍。蛋白分析亦可見 ATXN3/Q<sub>14~75</sub>-EGFP 融合蛋白的表現，但 ATXN3/Q<sub>14</sub>-EGFP 融合蛋白的表現量較 ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 弱。

上述建構的 SCA3 神經細胞添加 retinoic acid (10  $\mu$ M)誘導神經分化後，第二天，加入 doxycycline (5  $\mu$ g/ml)誘導 ATXN3/Q<sub>14~75</sub>-EGFP 融合蛋白表現。在 6 天後，觀察融合蛋白聚集的情形(圖五 A)。如圖

五 B 所示，活細胞螢光影像顯微鏡觀察可看到 ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 融合蛋白形成聚集(箭頭標示處)，而 ATXN3/Q<sub>14</sub>-EGFP 融合蛋白不會形成聚集。圖五 C 顯示高通量活細胞影像系統分析蛋白聚集的結果。未誘導神經分化的細胞，約有 0.4% 細胞觀察到 ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 融合蛋白聚集，誘導神經分化後約有 0.8% 細胞觀察到 ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 融合蛋白聚集，未誘導、誘導神經分化兩者有顯著的差異( $P < 0.05$ )。

進一步觀察 retinoic acid 誘導神經分化 14 或 21 天，ATXN3/Q<sub>14-75</sub>-EGFP 融合蛋白聚集的情形。結果發現 ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 融合蛋白的聚集會隨著時間的延長至 14 或 21 天而顯著增加(圖六 A， $P = 0.042\sim 0.020$ )。高通量活細胞影像系統拍照(圖六 B)與分析後，具有 ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 融合蛋白聚集的細胞所表現的神經性狀，包括神經纖維全生長(total outgrowth)、數目(process)、分支(branch)、平均生長強度(mean outgrowth intensity)等，顯著低於不具有 ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 融合蛋白聚集的細胞(圖六 C， $P = 0.011\sim 0.000$ )。

### 三、以抗氧化為治療策略的藥物篩檢

以化合物 resveratrol 為正控制組，利用上述建立的誘導式 SCA3 細胞株，檢測中草藥 NH004、NH008、NH021 及 NH008 某組成份衍生物 NH008-1 為抗氧化的治療策略。中草藥 NH004、NH008、NH021 與 NH008 某組成份衍生物 NH008-1 及化合物 resveratrol，在 SH-SY5Y 細胞的 IC<sub>50</sub> 分別為 14.24 mg/ml、>30 mg/ml、21.29 mg/ml、0.11 mM、0.37 mM (圖七)。以 10 μM (resveratrol、NH008-1) 或 1/2 IC<sub>50</sub> 中草藥 (NH004、NH008 及 NH021) 前處理 8 小時後，加 doxycycline 誘導 ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 融合蛋白表現，於 24 小時後，以西方轉漬法，分析 Nrf2、NQO1 及 HMOX1 等蛋白表現情形。如圖八 A 所示，ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 融合蛋白表現後，Nrf2 表現量顯著降低至 70% ( $P = 0.037$ )，中草藥 NH004、NH008、NH021 與 NH008 某組成份衍生物 NH008-1 及化合物 resveratrol，前處理能顯著提升表現量至 98%、106%、117%、94%、101% 等 ( $P = 0.048 \sim 0.004$ )。Nrf2 下游抗氧化基因表現情形，前處理中草藥 NH004 及 NH021 能誘導 NQO1 的表現，且 NH004 也誘導 HMOX1 的表現。

進一步藉高通量活細胞影像系統，在 retinoic acid 誘導神經分化的情況下，分析中草藥 NH004、NH008 及 NH021 (10 μg/ml)，以及 NH008 某組成份衍生物 NH008-1 與化合物 resveratrol (500 nM) 前處理

8 小時後，培養 24 小時後，誘導 ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 融合蛋白表現 6 天，ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 融合蛋白聚集的情形。如圖八 B 所示，NH004、NH008、NH021 與 NH008 某組成份衍生物 NH008-1 及化合物 resveratrol 前處理皆顯著降低 ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 融合蛋白的聚集 (85.0%、76.0%、94.6%、93.5%、93.4%， $P = 0.038\sim 0.001$ )。

## 伍、討論

### 一、Nrf2 啓動子多型性與 PD 相關性

氧化壓力被認為與 PD 致病機制相關(Abou-Sleiman et al., 2006; Zhou et al., 2008; Schapira and Jenner, 2011; Surmeier et al., 2011)。在病人及大鼠 PD 模式皆可觀察到氧化壓力的增加及抗氧化能力的減弱(Sofic et al., 2006; Nakabeppu et al., 2007; Shamoto-Nagai et al., 2007; Vali et al., 2007)。最近的研究亦指出，星狀細胞 Nrf2 的表現，可保護 MPTP 誘導的神經毒性(Chen et al., 2009)。因此 Nrf2 可能發展為 PD 治療策略。先前日本及美國族群的候選遺傳研究及基因體相關性研究，並未發現 Nrf2 多型性與 PD 相關(Maraganore et al., 2005; Mizuta et al., 2006)。然而歐洲波蘭人及瑞典人的研究顯示有一 Nrf2 單套型，對 PD 具保護性(von Otter et al., 2010)。此單套型包含本研究的三個位於啓動子的多型性(rs35652124、rs6706649、rs6721961)及四個位於介入子(intron)的多型性。本研究並未發現這些啓動子多型性或其單套型與臺灣人 PD 風險相關(表三、四)。雖然 Nrf2 -617 C/A 多型性會影響啓動子活性(Marzec et al., 2007)，本研究亦未發現此多型性影響臺灣人 PD 感受性。

不同族群基因體差異可能解釋上述對 PD 的不同感受性。以 rs35652124 (-653 A/G) 為例，在 dbSNP 資料庫中，rs35652124 A 等位基因頻率在北京的中國人為 0.458，與本研究的 0.492 (PD) 及 0.488 (正常人) 相近。相反的，rs35652124 A 等位基因頻率在白種人為 0.292，與波蘭人 (PD 0.336、正常人 0.260,  $P = 0.053$ ) 及瑞典人 (PD 0.267、正常人 0.303,  $P = 0.564$ ) 的研究報告 (von Otter et al., 2010) 相近。另外，單套型 AGC 是波蘭人 (PD 0.408、正常人 0.408)、瑞典人 (PD 0.475、正常人 0.470) 的主要單套型 (von Otter et al., 2010)。本研究最常見的單套型為 GGC，在 PD、正常人族群分別為 50.2%、49.8%，而單套型 AGC 在 PD、正常人族群分別為 16.8%、15.8%。以上顯示 Nrf2 啟動子結構及其單套型在種族間顯著差異。另外，不同地區的環境因子也可能在 PD 風險上扮演角色。

## 二、誘導式 SCA3 細胞株建立

SCA3 是一種 polyQ 的疾病，由於擴增的 polyQ 蛋白具毒性，故建立穩定誘導的 SH-SY5Y 神經瘤細胞，以表現正常及病人的 ATXN3/Q<sub>14-75</sub>-EGFP 融合蛋白，進行藥物篩檢。所建立的 SCA3 SH-SY5Y 細胞模式，以 qPCR 定量誘導 2 天的 RNA 倍數 (3~20 倍)，並以西方轉漬分析誘導的融合蛋白 (圖四)。穩定誘導 6 天後，以活細

胞螢光顯微鏡亦觀察到 ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 融合蛋白因不正常摺疊而形成聚集，且 retinoic acid 的誘導神經分化，可顯著增加 ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 融合蛋白的聚集(圖五)。此 ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 融合的蛋白聚集，亦隨著時間的延長至 14、21 天而顯著的增加，並伴隨神經纖維全生長、數目、分支、平均生長強度等神經性狀的降低(圖六)。此結果顯示擴增 polyQ 蛋白的聚集會抑制神經性狀發生。

### 三、以抗氧化為治療策略的藥物篩檢

中草藥普遍的被應用在疾病的防禦與治療研究上。如富含多酚的光果甘草(*Glycyrrhiza inflata* B)，具有抗發炎(Kolbe et al., 2006)、抗氧化(Haraguchi et al., 1998)及抗癌(Yoon et al., 2007)的活性。又如薑黃(Curcumin)，具抗發炎、抗氧化的多酚類，在 *in vitro* 及 *in vivo* 的 AD 實驗中，薑黃被證實可以減少及抑制 amyloid- $\beta$  (A $\beta$ )蛋白聚集形成(Frautschy et al., 2001; Lim et al., 2001; Ono et al., 2004; Yang et al., 2005; Garcia-Alloza et al., 2007; Abdenour et al., 2011)。此外，類黃酮(flavonoids)亦具有神經保護性的功效，包括保護 PC12 小鼠神經瘤細胞避免 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所誘導的細胞死亡(Dajas et al., 2003)、抗氧化活性以維持腦部的氧化還原平衡(Pollard et al., 2006; Spencer, 2009)，及促進 PC12 細胞的神經纖維生長(Guo et al., 2007)。

以化合物 resveratrol (10  $\mu$ M)為正控制組，本研究以中草藥 NH004、NH008 及 NH021 (1/2  $IC_{50}$ )，以及 NH008 某組成份衍生物 NH008-1 (10  $\mu$ M)處理 SCA3 細胞，觀察其活化 Nrf2/ARE 路徑上的蛋白表現，發現皆可提升 Nrf2 的表現，NH004、NH021 並能誘導第二相執行抗氧化的 NQO1、HMOX1 的活化(圖八 A)。進一步以 ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 融合蛋白聚集為參數，發現 NH004、NH008、NH021 (10  $\mu$ g/ml)及 NH008 某組成份衍生物 NH008-1 (500 nM)可顯著抑制 ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 融合蛋白的聚集(圖八 B)。故推論中草藥 NH004、NH008、NH021 及 NH008 某組成份衍生物 NH008-1 皆有潛力發展為治療 polyQ 聚集疾病的新穎藥物。

## 陸、參考文獻

- Abdenour B, Doggui S, Dao L, Ramassamy C. (2011) Challenges associated with curcumin therapy in Alzheimer's disease. *Expert Rev Mol Med* 13:1-15.
- Abou-Sleiman PM, Muqit MMK, Wood NW. (2006) Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 7:207-219.
- Alam J, Wicks C, Stewart D, Gong P, Touchard C, Otterbein S, Choi AM, Burow ME, Tou J. (2000) Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells. Role of p38 kinase and Nrf2 transcription factor. *J Biol Chem* 275:27694-27702.
- Beal MF. (2002) Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med* 32:797-803.
- Bogdanov MB, Andreassen OA, Dedeoglu A, Ferrante RJ, Beal MF. (2001) Increased oxidative damage to DNA in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* 79:1246-1249.
- Browne SE, Ferrante RJ, Beal MF. (1999) Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain Pathol* 9:147-163.
- Chen PC, Vargas MR, Pani AK, Smeyne RJ, Johnson DA, Kan YW, Johnson JA. (2009) Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Critical role for the astrocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:2933-2938.

- Cheverud JM. (2001) A simple correction for multiple comparisons in interval mapping genome scans. *Heredity* 87:52-58.
- Conley SC, Kirchner JT. (1999) Parkinson's disease--the shaking palsy. Underlying factors, diagnostic considerations, and clinical course. *Postgrad Med* 106:39-42, 45-36, 49-50 *passim*.
- Dajas F, Rivera-Megret F, Blasina F, Arredondo F, Abin-Carriquiry JA, Costa G, Echeverry C, Lafon L, Heizen H, Ferreira M, Morquio A. (2003) Neuroprotection by flavonoids. *Braz J Med Biol Res* 36:1613-1620.
- Dauer W, Przedborski S. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889-909.
- David G, Abbas N, Stevanin G, Dürr A, Yvert G, Cancel G, Weber C, Imbert G, Saudou F, Antoniou E, Drabkin H, Gemmill R, Giunti P, Benomar A, Wood N, Ruberg M, Agid Y, Mandel JL, Brice A. (1997) Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nat Genet* 17:65-70.
- Dawson T, Dawson V. (2003) Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 302:819-822.
- Duenas AM, Goold R, Giunti P. (2006) Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain* 129:1357-1370.
- Durr A. (2010) Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. *Lancet Neurol* 9:885-894.
- Frautschy SA, HuW, Kim P, Miller SA, Chu T, Harris-White ME, ColeGM. (2001) Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal of

- Abeta-induced cognitive deficits and neuropathology. *Neurobiol Aging* 22: 993-1005.
- Garcia-Alloza M, Borrelli LA, Rozkalne A, Hyman BT, Bacskai BJ. (2007) Curcumin labels amyloid pathology in vivo, disrupts existing plaques, and partially restores distorted neurites in an Alzheimer mouse model. *J Neurochem* 102: 1095-1104.
- Goswami A, Dikshit P, Mishra A, Mulherkar S, Nukina N, Jana NR. (2006) Oxidative stress promotes mutant huntingtin aggregation and mutant huntingtin-dependent cell death by mimicking proteasomal malfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 342; 184-190.
- Guo Y, Li Y, Xu J, Li N, Yamakuni T, Ohizumi Y. (2007) Clerodane diterpenoids and flavonoids with NGF-potentiating activity from the aerial parts of *Baccharis gaudichaudiana*. *Chem Pharm Bull* 55:1532-1534.
- Haacke A, Broadley SA, Boteva R, Tzvetkov N, Hartl FU, Breuer P. (2006) Proteolytic cleavage of polyglutamine-expanded ataxin-3 is critical for aggregation and sequestration of non-expanded ataxin-3. *Hum Mol Genet* 15:555-568.
- Haraguchi H, Ishikawa H, Mizutani K, Tamura Y, Kinoshita T. (1998) Antioxidative and superoxide scavenging activities of retrochalcones in *Glycyrrhiza inflata*. *Bioorg Med Chem* 6:339-347.
- Holmes SE, O'Hearn EE, McInnis MG, Gorelick-Feldman DA, Kleiderlein JJ, Callahan C, Kwak NG, Ingersoll-Ashworth RG, Sherr M, Sumner AJ, Sharp AH, Ananth U, Seltzer WK, Boss MA, Vieria-Saecker AM, Epplen JT, Riess O, Ross CA, Margolis RL.

- (1999) Expansion of a novel CAG trinucleotide repeat in the 5' region of PP2R2B is associated with SCA12. *Nat Genet* 23:391-392.
- Hsieh M, Tsai AF, Lu TM, Yang CY, Wu HM, Li SY. (1997) Studies of the CAG repeat in the Machado-Joseph disease gene in Taiwan. *Hum Genet* 100:155-162.
- Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y. (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 236:313-322.
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 13:76-86.
- Jaiswal AK. (2000) Regulation of genes encoding NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Free Radic Biol Med* 29:254-262.
- Jaiswal AK. (2004) Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med* 36:1199-1207.
- Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I, Kimura J, Narumiya S, Kakizuka A. (1994) CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8:221-228.
- Kim YC, Masutani H, Yamaguchi Y, Itoh K, Yamamoto M, Yodoi J. (2001) Hemin-induced activation of the thioredoxin gene by Nrf2. *A*

differential regulation of the antioxidant responsive element by a switch of its binding factors. *J Biol Chem* 276:18399-18406.

Klein JA, Ackerman SL. (2003) Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest* 111:785-793.

Koide R, Kobayashi S, Shimohata T, Ikeuchi T, Maruyama M, Saito M, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S. (1999) A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: a new polyglutamine disease? *Hum Mol Genet* 8: 2047-2053.

Kolbe L, Immeyer J, Batzer J, Wensorra U, tom Dieck K, Mundt C, Wolber R, Stäb F, Schönrock U, Ceilley RI, Wenck H. (2006) Antiinflammatory efficacy of licochalcone A: correlation of clinical potency and in vitro effects. *Arch Dermatol Res* 298:23-30.

Koob MD, Moseley ML, Schut LJ, Benzow KA, Bird TD, Day JW, Ranum LP. (1999) An untranslated CTG expansion causes a novel form of spinocerebellar ataxia (SCA8). *Net Genet* 21:379-384.

Lim GP, Chu T, Yang F, Beech W, Frautschy SA, Cole GM. (2001) The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci* 21:8370-8377.

Litvan I, Halliday G, Hallett M, Goetz CG, Rocca W, Duyckaerts C, Ben-Shlomo Y, Dickson DW, Lang AE, Chesselet MF, Langston WJ, Di Monte DA, Gasser T, Hagg T, Hardy J, Jenner P, Melamed E, Myers R, Parker D Jr, Price DL. (2007) The etiopathogenesis of

- Parkinson disease and suggestions for future research. Part I. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:251-257.
- Maraganore DM, de Andrade M, Lesnick TG, Strain KJ, Farrer MJ, Rocca WA, et al. High-Resolution Whole-Genome Association Study of Parkinson Disease. *The American Journal of Human Genetics*. 2005;77:685-93.
- Marzec JM, Christie JD, Reddy SP, Jedlicka AE, Vuong H, Lancken PN, Aplenc R, Yamamoto T, Yamamoto M, Cho HY, Kleeberger SR. (2007) Functional polymorphisms in the transcription factor NRF2 in humans increase the risk of acute lung injury. *FASEB J* 21:2237-2246.
- Masino L, Musi V, Menon RP, Fusi P, Kelly G, Frenkiel TA, Trottier Y, Pastore A. (2003) Domain architecture of the polyglutamine protein ataxin-3: a globular domain followed by a flexible tail. *FEBS Lett* 549:21-25.
- Matsuura T, Yamagata T, Burgess DL, Rasmussen A, Grewal RP, Watase K, Khajavi M, McCall AE, Davis CF, Zu L, Achari M, Pulst SM, Alonso E, Noebels JL, Nelson DL, Zoghbi HY, Ashizawa T. (2000) Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. *Nat Genet* 26:191-194.
- Mizuta I, Satake W, Nakabayashi Y, Ito C, Suzuki S, Momose Y, Nagai Y, Oka A, Inoko H, Fukae J, Saito Y, Sawabe M, Murayama S, Yamamoto M, Hattori N, Murata M, Toda T. (2006) Multiple

candidate gene analysis identifies  $\alpha$ -synuclein as a susceptibility gene for sporadic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 15:1151-1158.

Moi P, Chan K, Asunis I, Cao A, Kan YW. (1994) Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9926-9930.

Nakabeppu Y, Tsuchimoto D, Yamaguchi H, Sakumi K. (2007) Oxidative damage in nucleic acids and Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 85:919-934.

Nguyen T, Pickett CB. (1992) Regulation of rat glutathione S-transferase Ya subunit gene expression. DNA-protein interaction at the antioxidant responsive element. *J Biol Chem* 267:13535-13539.

No H, Bang Y, Lim J, Kim S, Choi H, Choi H. (2010) Involvement of induction and mitochondrial targeting of orphan nuclear receptor Nur77 in 6-OHDA-induced SH-SY5Y cell death. *Neurochem Int* 56:620-626.

Nyholt DR. (2004) A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other. *Am J Hum Genet* 74: 765-769.

Ono K, Hasegawa K, Naiki H, Yamada M. (2004) Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta amyloid fibrils in vitro. *J Neurosci Res* 75:742-750.

Orino K, Lehman L, Tsuji Y, Ayaki H, Torti SV, Torti FM. (2001) Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J* 357:241-247.

- Orr HT, Chung MY, Banfi S, Kwiatkowski TJ Jr, Servadio A, Beaudet AL, McCall AE, Duvick LA, Ranum LP, Zoghbi HY. (1993) Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet* 4:211-226.
- Paulson HL. (2007) Dominantly inherited ataxias: lessons learned from Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Semin Neurol* 27:133-142.
- Pollard SE, Kuhnle GG, Vauzour D, VafeiAdou K, Tzounis X, Whiteman M, Rice-Evans C, Spencer JPE. (2006) The reaction of flavonoid metabolites with peroxynitrite. *Biochem Biophys Res Commun* 350:960-968.
- Pulst SM, Nechiporuk A, Nechiporuk T, Gispert S, Chen XN, Lopes-Cendes I, Pearlman S, Starkman S, Orozco-Diaz G, Lunkes A, DeJong P, Rouleau GA, Auburger G, Korenberg JR, Figueroa C, Sahba S. (1996) Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat Genet* 14:269-276.
- Rüb U, Brunt ER, de Vos RA, Del Turco D, Del Tredici K, Gierga K, Schultz C, Ghebremedhin E, Bürk K, Auburger G, Braak H. (2004) Degeneration of the central vestibular system in spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) patients and its possible clinical significance. *Neuropathol Appl Neurobiol* 30:402-414.
- Rushmore TH, King RG, Paulson KE, Pickett CB. (1990) Regulation of glutathione S-transferase Ya subunit gene expression: identification of a unique xenobiotic-responsive element controlling inducible

expression by planar aromatic compounds. Proc Natl Acad Sci USA 87:3826-3830.

Rushmore TH, Morton MR, Pickett CB. (1991) The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. J Biol Chem 266: 11632-11639.

Schapira AH, Jenner P. (2011) Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. Mov Disord 26:1049-1055.

Schöls L, Vieira-Saecker AM, Schöls S, Przuntek H, Epplen JT, Riess O. (1995) Trinucleotide expansion within the MJD1 gene presents clinically as spinocerebellar ataxia and occurs most frequently in German SCA patients. Hum Mol Genet 4:1001-1005.

Schöls L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O. (2004) Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. Lancet Neurol 3:291-304.

Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Hashizume Y, Yoshida M, Osawa T, Riederer P, Naoi M. (2007) In parkinsonian substantia nigra, alpha-synuclein is modified by acrolein, a lipid-peroxidation product, and accumulates in the dopamine neurons with inhibition of proteasome activity. J Neural Transm 114:1559-1567.

Sofic E, Sapcanin A, Tahirovic I, Gavrankapetanovic I, Jellinger K, Reynolds GP, Tatschner T, Riederer P. (2006) Antioxidant capacity in postmortem brain tissues of Parkinson's and Alzheimer's diseases. J Neural Transm Suppl 2006:39-43.

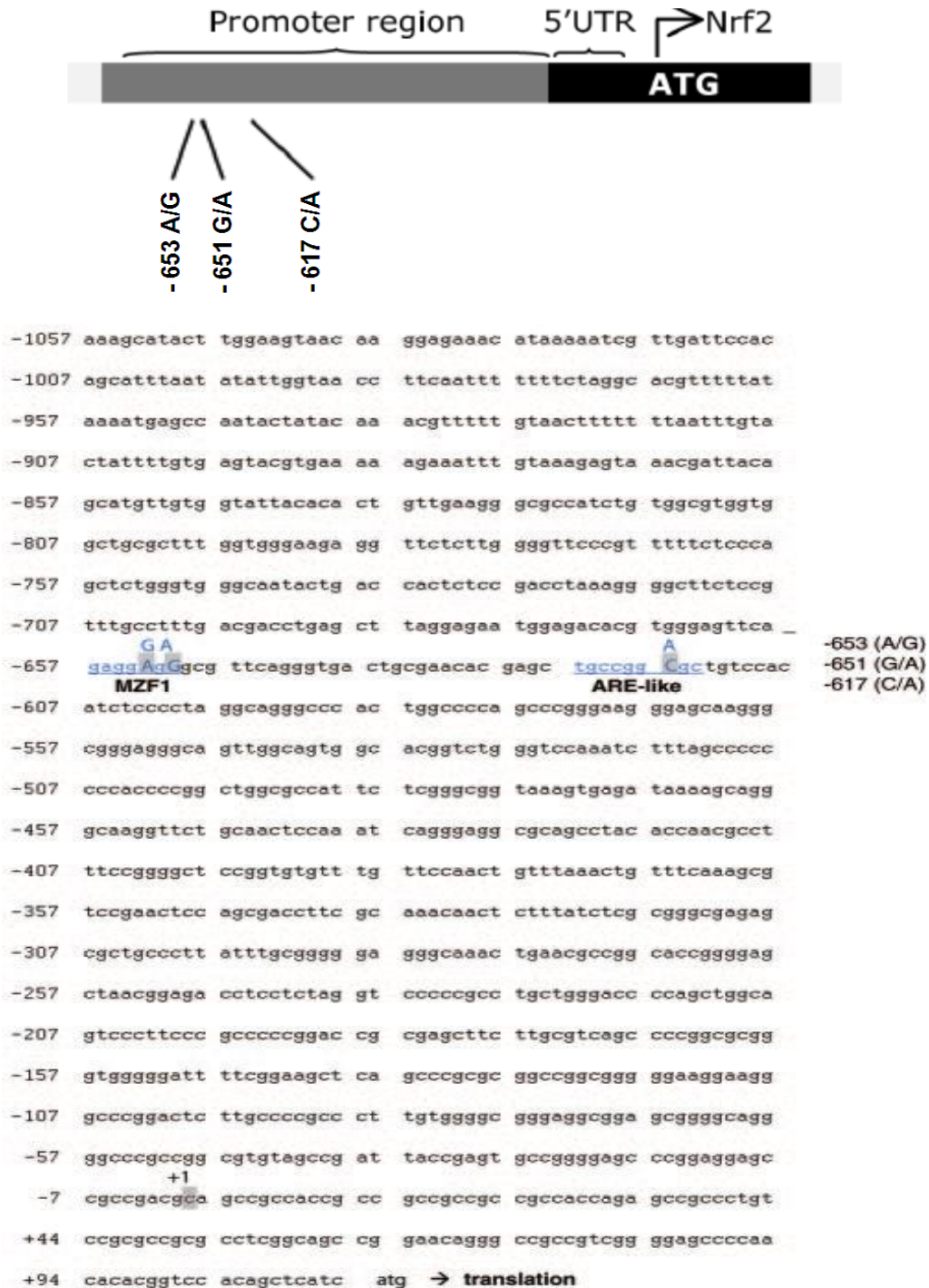
- Soong BW, Paulson HL. (2007) Spinocerebellar ataxias: an update. *Curr Opin Neurol* 20:438-446.
- Spencer JP. (2009) Flavonoids and brain health: multiple effects underpinned by common mechanisms. *Genes Nutr* 4:243-250.
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68: 978-989.
- Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Goldberg JA. (2011) The origins of oxidant stress in Parkinson's disease and therapeutic strategies. *Antioxid Redox Signal* 14:1289-1301.
- Teive HAG. (2009) Spinocerebellar ataxias. *Arq Neuropsiquiatr* 67:1133-1142.
- Tansey MG, Frank-Cannon TC, McCoy MK, Lee JK, Martinez TN, McAlpine FE, Ruhn KA, Tran TA. (2008) Neuroinflammation in Parkinson's disease: is there sufficient evidence for mechanism-based interventional therapy? *Front Biosci* 13:709-717.
- Vali S, Mythri RB, Jagatha B, Padiadpu J, Ramanujan KS, Andersen JK, Gorin F, Bharath MM. (2007) Integrating glutathione metabolism and mitochondrial dysfunction with implications for Parkinson's disease: a dynamic model. *Neuroscience* 149:917-930.
- von Otter M, Landgren S, Nilsson S, Celojevic D, Bergström P, Håkansson A, Nissbrandt H, Drozdik M, Bialecka M, Kurzawski M, Blennow K, Nilsson M, Hammarsten O, Zetterberg H. (2010) Association of Nrf2-encoding NFE2L2 haplotypes with Parkinson's disease. *BMC Med Genet* 11:36-45.

- Wen FC, Li YH, Tsai HF, Lin CH, Li C, Liu CS, Lii CK, Nukina N, Hsieh M. (2003) Down-regulation of heat shock protein 27 in neuronal cells and non-neuronal cells expressing mutant ataxin-3. *FEBS Lett* 546:307-314.
- Wild AC, Moinova HR, Mulcahy RT. Regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase subunit gene expression by the transcription factor Nrf2. (1999) *J Biol Chem* 274:33627-33636.
- Wytenbach A, Sauvageot O, Carmichael J, Diaz-Latoud C, Arrigo AP, Rubinsztein DC. (2002) Heat shock protein 27 prevents cellular polyglutamine toxicity and suppresses the increase of reactive oxygen species caused by huntingtin. *Hum Mol Genet* 11:1137-1151.
- Yang F, Lim GP, Begum AN, Ubeda OJ, Simmons MR, Ambegaokar SS, Chen PP, Kaye R, Glabe CG, Frautschy SA, Cole GM. (2005) Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem* 28:5892-5901.
- Yoon G, Kang B, Cheon S. (2007) Topoisomerase I inhibition and cytotoxicity of licochalcones A and E from *Glycyrrhiza inflata*. *Arch Pharm Res* 30:313-316.
- Zhou C, Huang Y, Przedborski S. (2008) Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann N Y Acad Sci* 1147:93-104.
- Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns WB, Subramony SH, Zoghbi HY, Lee CC. (1997) Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small

polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet* 15:62-69.

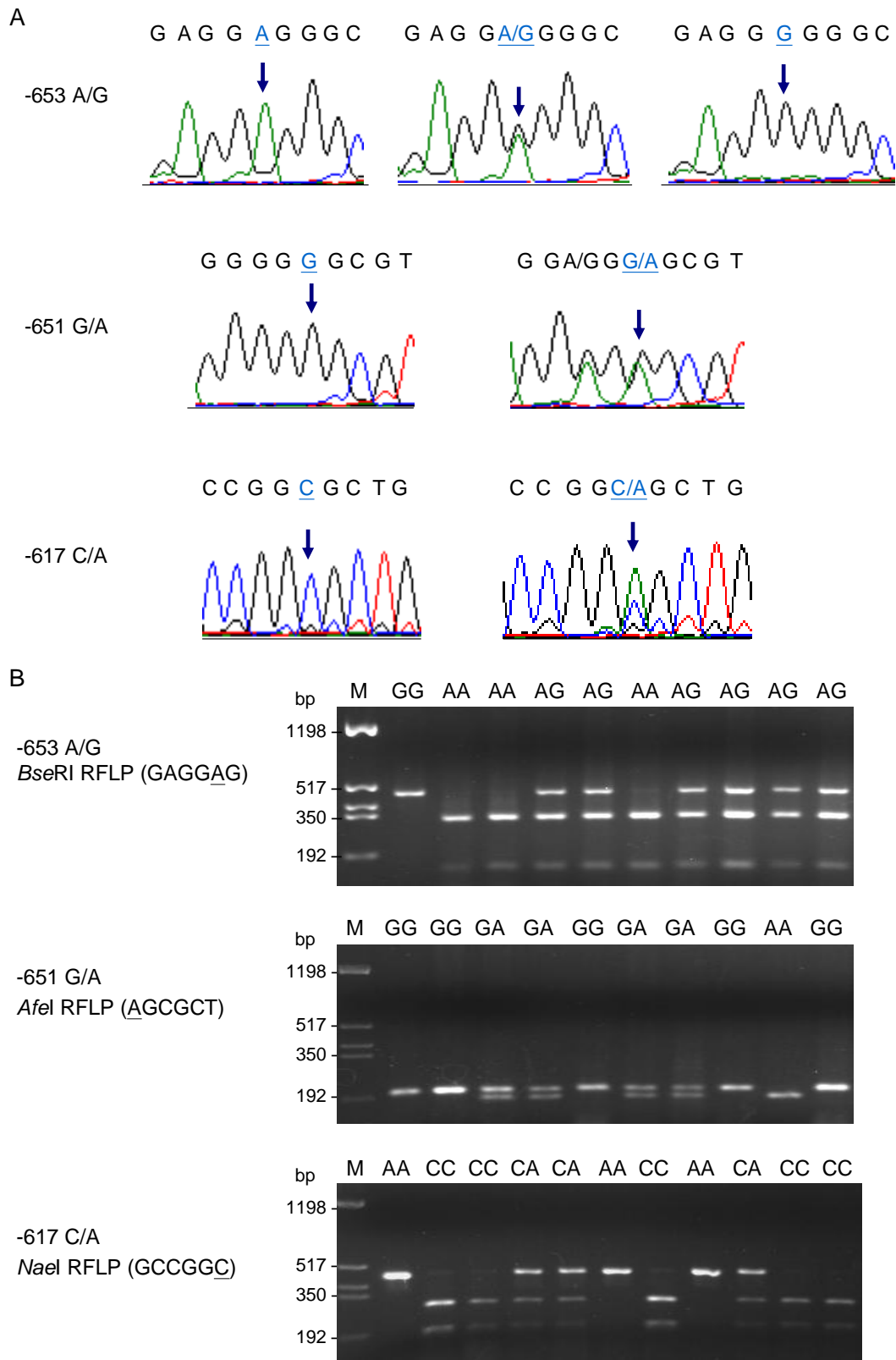
Zoghbi HY, Orr HT. (2000) Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci* 23:217-247.

## 柒、附錄圖表

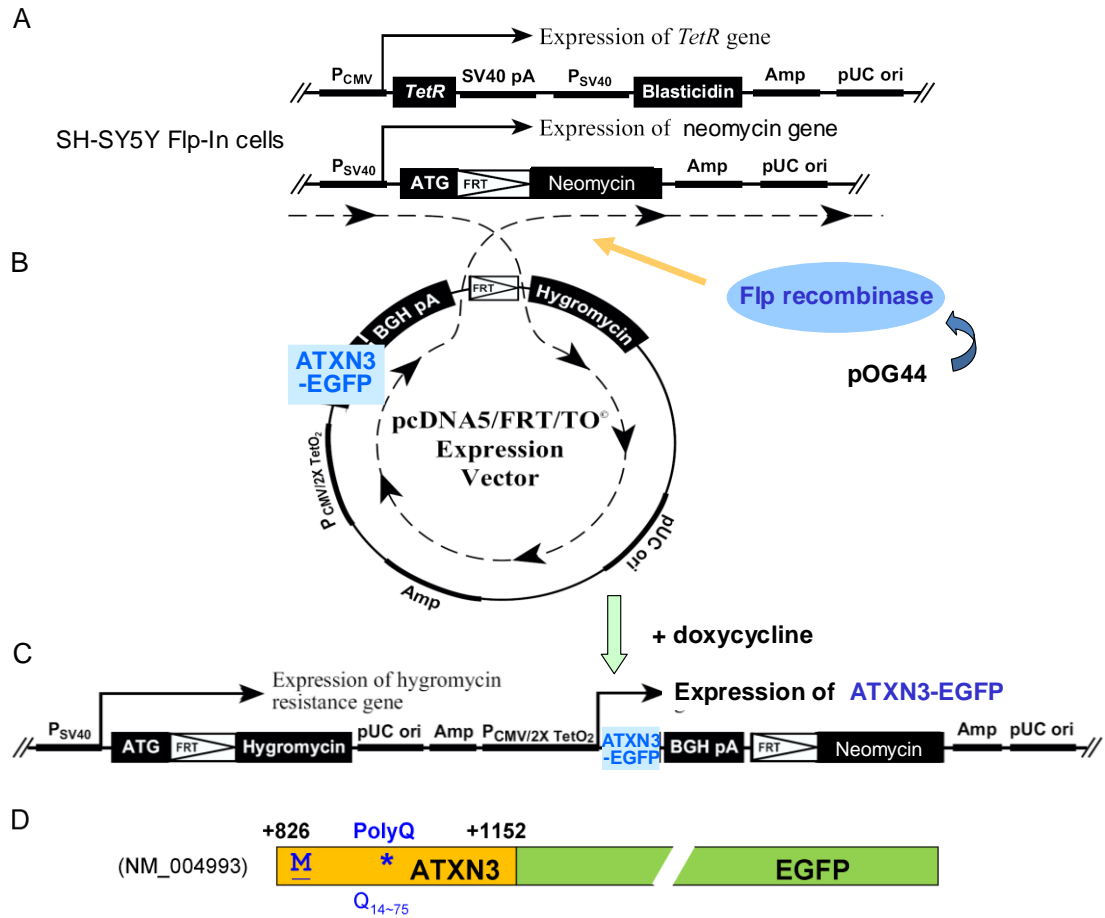


圖一、Nrf2 基因啓動子-653 A/G、-651 G/A、-617 C/A 多型性的位置

(圖形出自 Marzec et al., 2007; van Otter et al., 2010)。



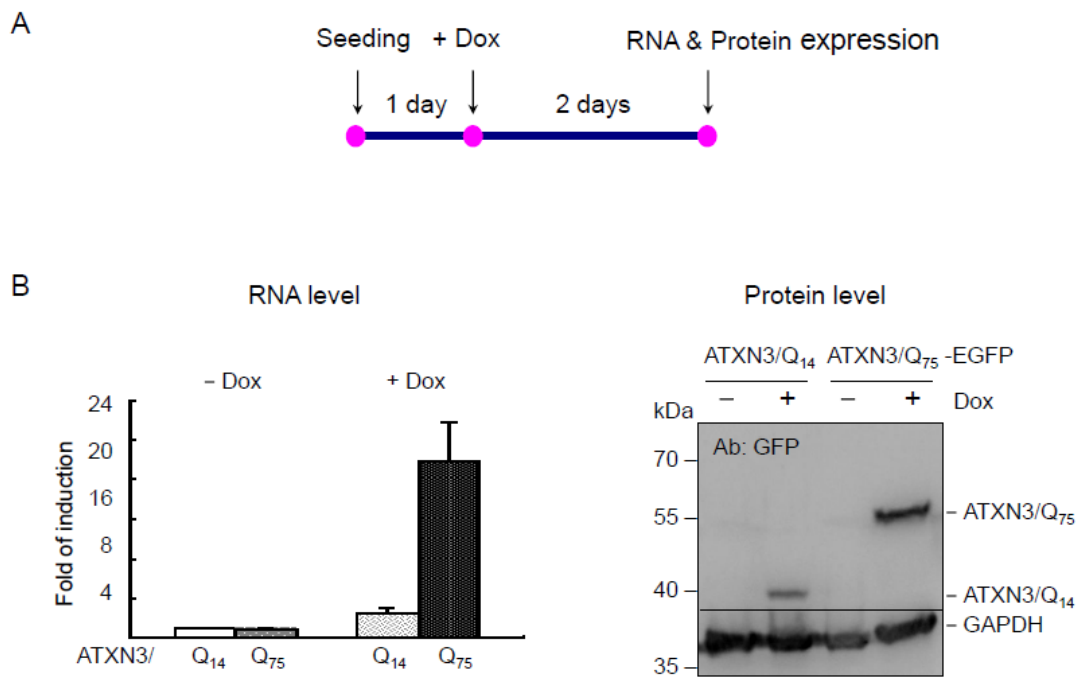
圖二、Nrf2 基因啓動子多型性檢測。(A) Nrf2 基因啓動子的多型性定序。(B) Nrf2 基因啓動子多型性的 PCR-RFLP 檢測。



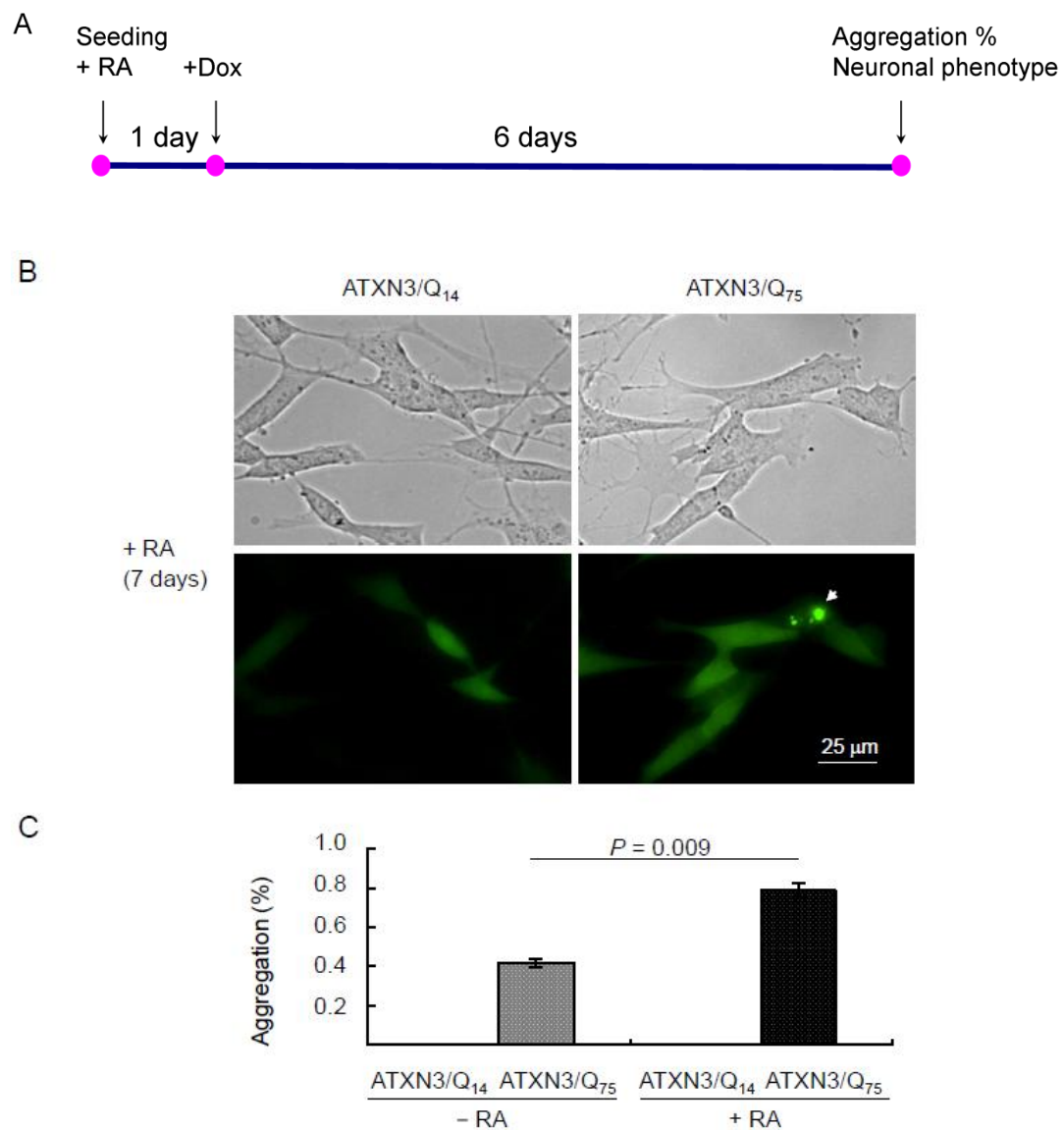
**Translation**=MESIFHEKQEGSLCAQHCLNLLQGEYFSPVELSSIAHQ L  
 DEEERMMAEGGVTSedyRTFLQQPSGNMDDSGFFSIQVVISNALKVWGLELI  
 LFNSPEYQRLRIDPINERSFICNYKEHWFTVRKLGKQWFNLNSLLTGPELIS  
 DTYLALFLAQLQQEGYSIFVVKGDLPDCEADQLLQMI RVQQMHRPKLIGEEL  
 AQLKEQRVHKTDLERVLEANDGSGMLDEDEEDLQRALALSRQEIDMEDEEAD  
 LRRAIQLS **MQGSSRNISQDMTQTSGTNLTSEELRKRREAYFEKQQQKQQQQQ**  
**QQQQQ**GDLSGQSSHP CERPATSSGALGSDLG DAMSEEDMLQAAVTMSLETVR  
 NDLKTEGKK

圖三、誘導式 SCA3 細胞株建立流程圖。(A) Flp-In SH-SY5Y 神經瘤宿主細胞上有 TetR(Tet repressor)基因、blasticidin S 抗生素篩選基因，及 FRT (Flp Recombinase Target)序列、G418 抗生素篩選基因。(B) 將 pOG44 質體 (提供 Flp recombinase) 與 pcDNA5/FRT/TO/ATXN3/Q<sub>14-75</sub>-EGFP 質體(陳婉玲建構) 共轉入 Flp-In SH-SY5Y 宿主細胞。(C)藉同源性重組將 ATXN3/Q<sub>14-75</sub>-EGFP

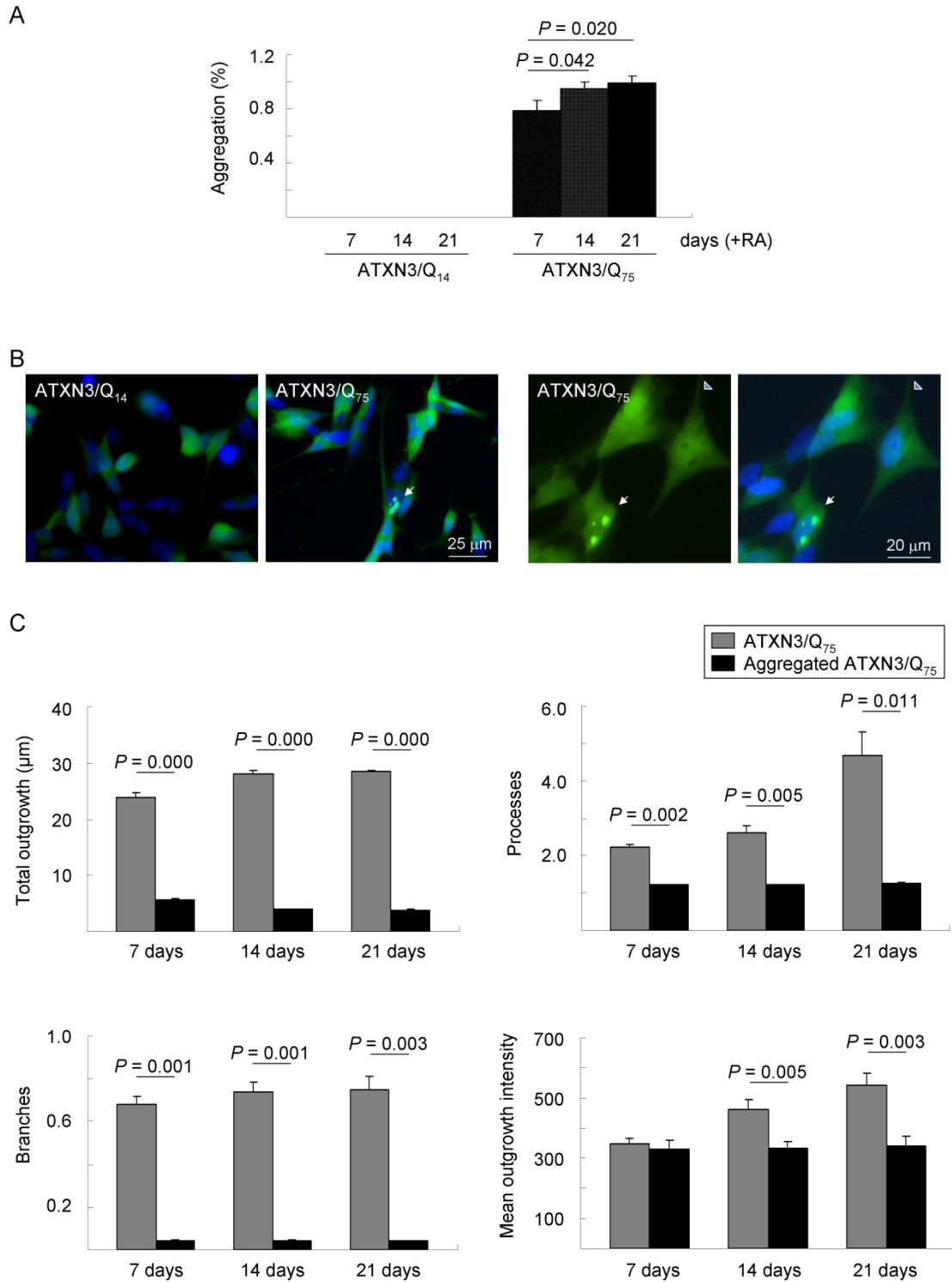
融合基因置入 Flp-In SH-SY5Y 神經瘤宿主細胞染色體上。(D)ATXN3 基因的全長，建構所包含 ATXN3/Q<sub>14~75</sub> 的片段序列(藍色標示處)，置入的片段將由 Met 開始轉譯出為包含 Q<sub>14~75</sub> 的 C-端 105~166 個氨基酸序列。



圖四、誘導 ATXN3/Q<sub>14~75</sub>-EGFP 細胞株之 RNA 及蛋白表現分析。(A) 實驗流程圖。(B) 誘導 2 天後，qPCR 同步定量誘導性 ATXN3/Q<sub>14~75</sub>-EGFP RNA 的表現，及西方轉漬法觀察誘導性 ATXN3/Q<sub>14~75</sub>-EGFP 融合蛋白表現。

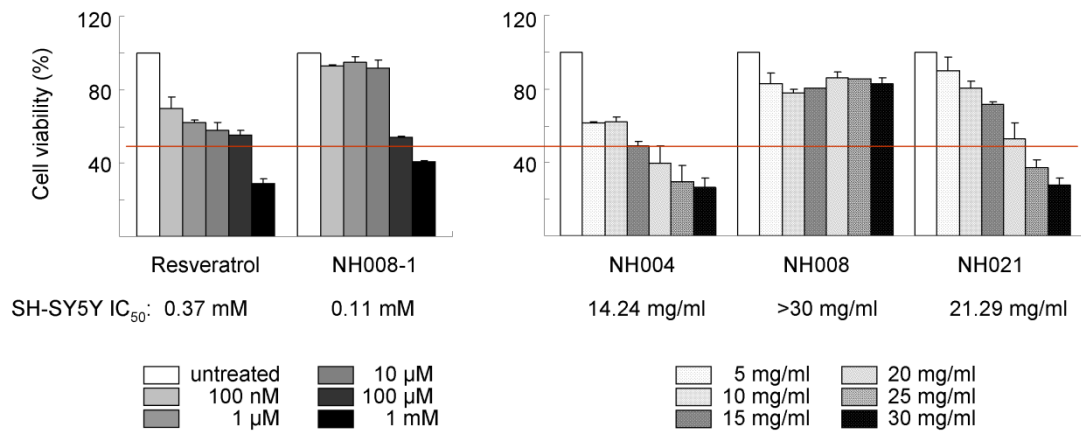


圖五、ATXN3/Q<sub>14-75</sub>-EGFP 細胞之融合蛋白聚集分析。(A)實驗流程圖。(B)誘導 7 天後，以活細胞螢光影像顯微鏡觀察蛋白聚集的情形。(C) 以高通量活細胞影像系統分析，未誘導神經分化及誘導神經分化 7 天後，ATXN3/Q<sub>14-75</sub>-EGFP 蛋白聚集的情形。

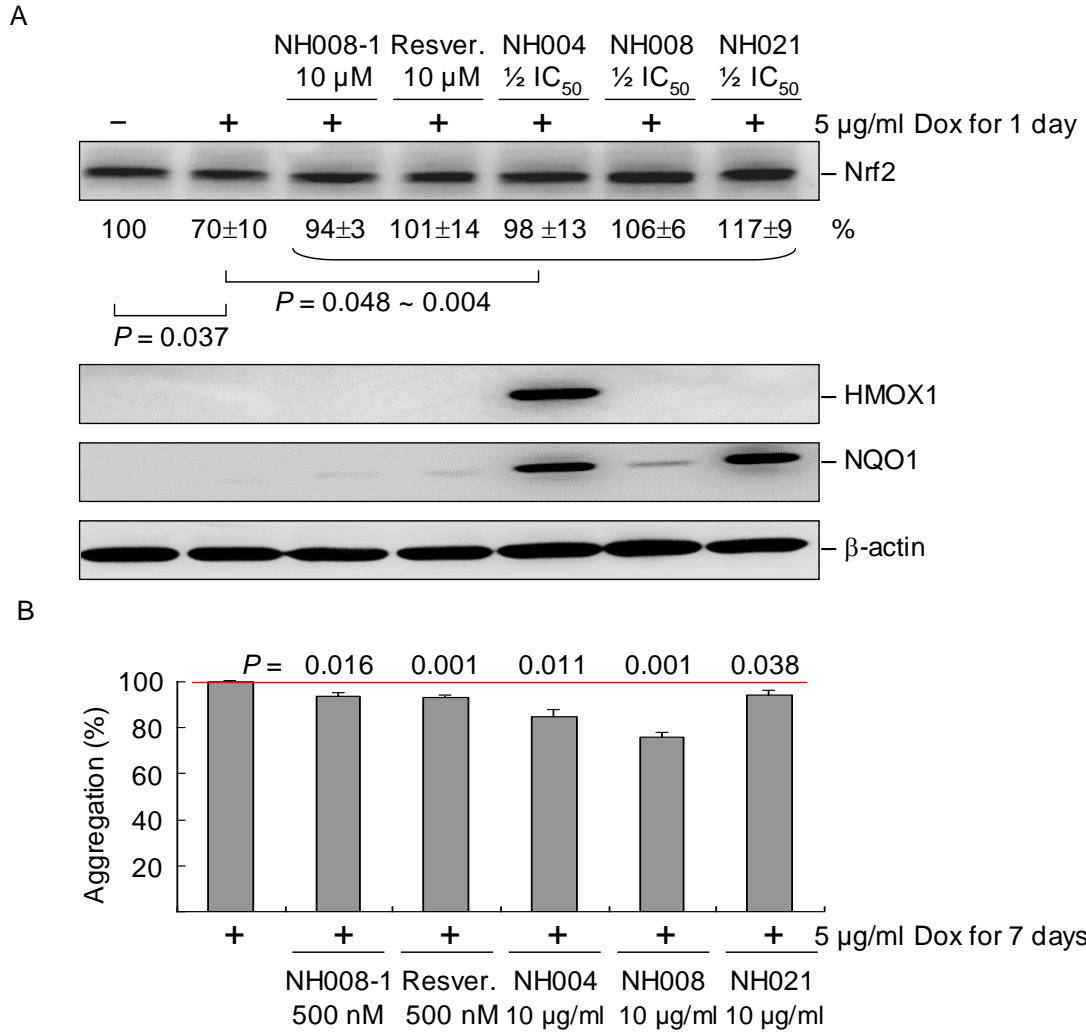


圖六、ATXN3/Q<sub>14~75</sub>-EGFP 細胞株之融合蛋白聚集及 ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 細胞株神經纖維生長分析。(A) ATXN3/Q<sub>14~75</sub>-EGFP 細胞連續觀察 7、14 及 21 天，以高通量活細胞影像系統分析

ATXN3/Q<sub>14~75</sub>-EGFP 融合蛋白的聚集，ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 融合蛋白的聚集會隨時間的延長有顯著性增加的情形。(B) ATXN3/Q<sub>14~75</sub>-EGFP 細胞觀察 7 天，以活細胞螢光影像顯微鏡觀察 ATXN3/Q<sub>14~75</sub>-EGFP 融合蛋白的聚集與神經纖維生長情形。(C) ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 細胞以染 Hoechst 33342 表示細胞數的神經纖維生長情形[全生長(total outgrowth)、數目(process)、分支(branch)、平均生長強度(mean outgrowth intensity)]，含 ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 融合蛋白的聚集之細胞神經纖維生長有顯著性的降低。



圖七、神經瘤細胞株 SH-SY5Y 處理中草藥及其組成份衍生物之 MTT 分析。處理中草藥 NH004、NH008 及 NH021 以 5、10、15、20、25、30 mg/ml 等濃度，處理 NH008 某組成份衍生物 NH008-1 與 resveratrol 以 100 nM、1 μM、10 μM、100 μM、1 mM 等濃度，檢測細胞存活率。



圖八、ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 細胞株處理中草藥及其組成份衍生物之抗氧化功能檢測及 polyQ 聚集分析。(A)西方轉漬法分析 Nrf2/ARE 路徑上的蛋白表現，以中草藥 NH004 及 NH021 處理組能誘導 NQO1 的表現，且 NH004 處理組也誘導 HMOX1 的表現。(B) polyQ 聚集分析，中草藥 NH004、NH008 及 NH021，以及 NH008 某組成份衍生物 NH008-1 與 resveratrol 前處理皆顯著降低 ATXN3/Q<sub>75</sub>-EGFP 融合蛋白的聚集。

表一、Nrf2 基因啓動子 PCR-RFLP 的條件

SNP	引子對	煉合溫度(°C)/ MgCl <sub>2</sub> (mM)	RFLP 選用酵素 判別片段(bp)
-651 G/A	F: ATCTGTGGCGTGGTGGCTGCGCTTTGG R: AGCTCGTGTTTCGCAGTCACCCTGAGCG	65 °C / 2 mM	<i>AfeI</i> ( <u>AGCGCT</u> ) (200 / 174, 26)
-653 A/G	F: GGGTTCCCGTTTTTCTCCCAGCTCTGGGTG R: TGTTTGCGAAGGTCGCTGGAGTTCGGACGC	65 °C / 2 mM	<i>BseRI</i> (GAGG <u>AG</u> ) (314, 136 / 450)
-617 C/A			<i>NaeI</i> (GCCGG <u>C</u> ) (292, 158 / 450)

註：下標橫線表示限制酶切位辨識的突變及多型性鹼基。

表二、Nrf2 多型性的 SNPSpD 聯鎖不平衡檢測  
 (<http://gump.qimr.edu.au/general/daleN/SNPSpD/>)

		D'		
		A-653G	G-651A	C-617A
$\Delta^2$	A-653G	<b>1.70</b>	0.94	0.94
	G-651A	0.05	<b>0.91</b>	0.88
	C-617A	0.37	0.02	<b>0.39</b>

註：對角線上三個數據分別代表-653、-651、-617 的特徵值( $\lambda_s$ )。

表三、Nrf2 啓動子的多型性基因型、等位基因頻率與疾病相關性之  
分析結果

Subgroup		<u>PD</u>		<u>Control</u>		Odds ratio (95% CI)	<i>P</i>
		No.	(%)	No.	(%)		
<b>All</b>	<b>N=</b>	<b>480</b>		<b>526</b>			
-653	AA	119	24.8	114	21.7	1.04 (0.73~1.49)	0.813
	AG	234	48.8	285	54.2	0.82 (0.61~1.11)	0.199
	GG	127	26.5	127	24.1	1.00	
Allele	A	472	49.2	513	48.8	1.02 (0.85~1.21)	0.857
	G	488	50.8	539	51.2	1.00	
-651	GG	434	90.4	461	87.6	1.00	
	GA	45	9.4	64	12.2	0.75 (0.50~1.11)	0.156
	AA	1	0.2	1	0.2	1.06 (0.04~26.85)	0.966
Allele	G	913	95.1	986	93.7	1.00	
	A	47	4.9	66	6.3	0.77 (0.52~1.13)	0.181
-617	CC	243	50.6	274	52.1	1.00	
	CA	202	42.1	207	39.4	1.10 (0.85~1.43)	0.470
	AA	35	7.3	45	8.6	0.88 (0.54~1.41)	0.588
Allele	C	688	71.7	755	71.8	1.00	
	A	272	28.3	297	28.2	1.01 (0.83~1.22)	0.960

註：Odds ratio 的計算是以最常見的基因型/等位基因定為 1.00 做為  
比較的標準。Odds ratio > 1.00 表示有較高的疾病罹患風險，Odds  
ratio < 1.00 表示有較低的疾病罹患風險。

表四、Nrf2 啓動子的多型性單套型與疾病相關性之分析結果

Haplotype	<u>PD</u>		<u>Control</u>		Odd ratio (95% CI)	<i>P</i>
	No.	(%)	No.	(%)		
<b>-653/-651/-617</b>						
AGC	162	16.8	166	15.8	1.01(0.82~1.36)	0.653
AGA	264	27.5	285	27.1	1.00(0.82~1.33)	0.963
AAC	45	4.6	61	5.8	0.80(0.53~1.20)	0.281
AAA	1	0.1	2	0.2	0.54(0.03~5.70)	0.618
<b>GGC</b>	483	50.2	524	49.8	1.00	
GGA	5	0.6	11	1.1	0.49(0.15~1.37)	0.193
GAC	0	0.0	3	0.3		

註：單套型 Odds ratio 的計算是最常見的單套型 GGC 作為比較的標準。

表五、脊髓小腦萎縮症之三十種亞型(參考資料出自 Durr, 2010)

	Gene	Mutations	Key symptom in addition to cerebellar ataxia
<b>Polyglutamine expansions SCAs</b>			
SCA1	ATXN1	CAG repeat	Early swallowing and respiratory signs
SCA2	ATXN2	CAG repeat	Slow eye movements
SCA3	ATXN3	CAG repeat	..
SCA6	CACNA1A	CAG repeat	..
SCA7	ATXN7	CAG repeat	Visual loss
SCA17	TBP	CAG repeat	Dementia
DRPLA	ATN1	CAG repeat	Epilepsy
<b>Non-coding expansion SCAs</b>			
SCA8	ATXN8 and ATXN8OS	CTG repeat	..
SCA10	ATXN10	ATTCT	..
SCA12	PPP2R2B	CAG repeat	..
SCA31=16qlinked	BEAN-TK2	TGGAA repeat	..
<b>Conventional mutations SCAs</b>			
SCA5	SPTBN2	Missense, in-frame deletion	..
SCA11	TTBK2	Frameshift	..
SCA13	KCNC3	Missense	Mental retardation
SCA14	PRKCG	Missense	Myoclonus
SCA15/16	ITPR1	Missense, deletion	..
SCA20	..	Duplication	Dysphonia
SCA27	FGF14	Missense, frameshift	..
SCA28	AFG3L2	Missense	Ptosis
<b>Loci (test unavailable)</b>			
SCA4	..	..	Sensory neuropathy
SCA18	..	..	Sensory neuropathy
SCA19	..	..	..
SCA21	..	..	Mental retardation
SCA22	Allelic to SCA19?	..	Mental retardation
SCA23	..	..	..
SCA25	..	..	Sensory neuropathy
SCA26	..	..	..
SCA30	..	..	..

SCA=spinocerebellar ataxia. ..=unknown.

**Table 1: Genes and mutations that cause autosomal dominant cerebellar ataxias, according to locus and mutation type**