

貳、研究材料與方法

一、研究樣品

年齡取樣在 40 歲以上的正常人族群及帕金森式症患者之血液樣本由林口長庚紀念醫院神經內科吳逸如醫師與陳瓊美醫師所提供。選取的標準需包含兩個以上的 PD 典型症狀，並排除具有家族病史，或任何可能因腦部外傷、腦炎、服用抗精神性藥物等已知會引起 PD 候群的病例，在經由患者或家屬同意下進行採樣。同時也蒐集年齡、性別比率相當的正常人血液樣品及淋巴細胞株樣品，作為對照。

二、基因組 DNA (genomic DNA)的萃取

採用 STRATAGENE DNA Extraction Kit (Stratgene)，先將 4-6 ml 的全血置於 15 ml 離心管中，加入 solution I 至 15 ml，翻轉數次混合均勻，靜置於冰上 5-10 分鐘後，以 2000 rpm 離心 9 分鐘以沉澱細胞核，去上清液，再以 2 ml solution II 震盪使核沉澱懸浮，加入 10 μ l protease K，於 37°C 隔夜或作用數天；待 proteinase K 反應結束後，加入 0.8 ml solution III，冰浴 5 分鐘，離心 3400 rpm 5 分鐘；取上清液，加入 5 μ l RNase，37°C 水浴 15 分鐘，加入 2.5 ml isopropanol，搖晃使 DNA 析出；將析出的 DNA 轉移到微量離心管中，離心 14000 rpm 1

分鐘，沉澱 DNA；去上清液後，加入 0.5 ml 75%酒精清洗 DNA 沉澱物中的鹽類，離心 14000 rpm 1 分鐘，風乾後溶於適量 ddH₂O 中，以 OD₂₆₀ 吸光值測定 DNA 濃度，稀釋成 50 ng/μl 後，置於 4°C 冰箱備用。

三、聚合酵素連鎖反應(PCR)

參考文獻及網路的資料，設計引子對，以 PCR 放大包含 IL-1β 啓動子多型性 C-511T 的附近片段、IL-8 啓動子多型性 T-251A 的片段及 IL-6 啓動子多型性 G-174C 的片段。在一 25 μl 的 PCR 反應中包含了 100 ng 的 DNA、50 ng 的引子對、200 μM dNTP、適當濃度 MgCl₂ 和 0.5 U 的 *Taq* DNA 聚合酶(Promega)，PCR 反應以熱循環儀 (OmniGene, HYBRID)進行，反應條件如表一，反應完畢後以 1.8~2.0% 洋菜膠體電泳檢查片段大小是否正確。

四、基因型分析(genotyping)

比較 PD 族群與正常人族群在 IL-1β、IL-6 和 IL-8 基因的多型性及對偶基因頻率之比例(在需符合 Hardy-Weinberg equilibrium 規則下)，以採用雙尾 t-test 進行統計分析正常人與 PD 病患，並檢測其對偶基因頻率(allele frequency)比較正常人與 PD 患者的百分比例差異。

計算 PD 族群及正常人族群各基因的多型性對偶基因頻率，以

chi-square (χ^2) 檢測各多型性點是否符合哈溫平衡(Hardy-Weinberg equilibrium)、兩樣品群的對偶基因頻率是否具有顯著差異，並用 JMP 5.0 軟體計算 Odds ratio 的相對危險程度。

五、內生性 IL-1 β 、IL-8 mRNA 表現量檢測

白血球 mRNA 的樣品由林口長庚醫院神經內科所提供，利用 PAXgene Blood RNA Kit (QIAGEN) 抽取血液中的總 mRNA，經 DNase 的處理及定量後，進行逆轉錄反應(RT)轉成 cDNA 後，進行同步定量 PCR。

先利用 Primer Expression (Applied Biosystems) 軟體分別設計 IL-1 β 、IL-8 cDNA 及 β -actin 的引子對(表二)。同步定量 PCR 在總體積 25 μ l 進行，反應包括：cDNA 5 μ l、1X SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems) 12.5 μ l，各 400 nM 的 IL-1 β 引子對或 300 nM 的 IL-8 引子對(reverse、forward)、400 nM 的 β -actin 引子對及補足適量的 ddH₂O。在 ABI prism 7000 (Applied Biosystems) 進行反應，同步定量 PCR 的過程包括先以(50°C/2分鐘)破壞可能污染的 RNA，再以(95°C/10分鐘)一個循環使 cDNA 的雙股裂解。接著(95°C 15秒及 60°C 1分鐘) 40 個循環完成反應後，讀取 C_T 值。操作過程中，需避免污染以免影響 PCR 的準確性。

結果分析原理如下： C_T 值可反應出目標cDNA的最初量，且與最初量呈反比的比率。 C_T 值為樣品PCR反應突破threshold line (需選取在PCR呈現對數期增加之區域)所需要的循環數，即為 C_T 值；利用 C_T 值的高低比較IL-1 β 、IL-8不同基因型的表現量，以 β -actin RNA的表現量來當作內生性的控制組，運用相對定量的方式予以計算，計算公式為 $\Delta C_T = C_T(\beta\text{-actin}) - C_T(\text{IL-1}\beta\text{或IL-8})$ ，而IL-1 β 、IL-8相對於 β -actin RNA的表現量 = $2^{\Delta C_T}$ 。

六、淋巴細胞株 TNF- α mRNA 表現量檢測

(一) 淋巴細胞株培養

以TNF- α -1031及-863兩點之基因多型性做為選用淋巴細胞株的依據，經由年齡、基因型的配對選擇2株PD病患的淋巴細胞株(表三)。細胞株細胞培養於37 $^{\circ}$ C、含5% CO₂且溼度良好的培養箱中，培養液為含10%胎牛血清之RPMI 1640 (Gibco)。每隔2-3天加5或10 ml培養液至培養瓶中，待培養液到一定體積後，離心1200 rpm 5分鐘，去上清液後換至新培養瓶中，繼代培養。冰凍保存細胞時，將細胞以離心1200 rpm 5分鐘收集，棄上清液，加入1 ml含12.5% DMSO的培養液，置於冰上2小時、-20 $^{\circ}$ C 2小時及-70 $^{\circ}$ C 隔夜後，保存於液態氮中。

(二) 淋巴細胞處理

實驗時利用含10% FBS的RPMI培養 1×10^7 細胞在T25的培養瓶中，待細胞穩定6小時後，分別處理不同時間(2、6和24小時) 和不同濃度(0、0.1、1、10、100、1000 ng/ml)的lipopolysaccharides (簡稱LPS; Sigma, *Escherichia coli* O127:B8, L3137)，分別收集細胞並萃取RNA。

(三) 核糖核酸(RNA)的萃取與定量

Total RNA 是利用 TRIzol reagent 來萃取，詳細做法如下。首先將細胞離心 1200 rpm 轉 5 分鐘，去除上清液後，以 1 ml 的 TRIzol reagent 將細胞吸起置於 1.5 ml 微離心管中，在室溫中反應 3 分鐘後，加入 200 μ l 的 chloroform 使其充分混合並在室溫中反應 10 分鐘，之後離心 12000 g 15 分鐘取上清液，並和等體積的 isopropanol 充分混合後在室溫靜置 10 分鐘，再離心 12000 g 轉 10 分鐘，接著利 70%酒精清洗沉澱，在 4 °C 離心 2000 g 3 分鐘，去除上清液，風乾後，加入適量 DEPC-H₂O 溶解。以 OD₂₆₀ 吸收光譜下測量 Total RNA 的濃度。

(四) 反轉錄聚合酵素連鎖反應(Reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR)

以 SuperScript™ III reverse transcriptase (Invitrogen)合成 cDNA，

步驟如下：在 5 μ l 反應中加入 4 μ l RNA、0.5 μ l oligo dT 和 0.5 μ l dNTP，65°C 反應 5 分鐘後移至冰上。冰浴 2 分鐘後，加入 10 X RT 緩衝液 1 μ l、25 mM Mg^{2+} 2 μ l、0.1M DTT 1 μ l、RNase OUT 0.5 μ l、reverse transcriptase 0.5 μ l，於 53°C 反應 50 分鐘，即完成 cDNA 的製備，置於 85°C 5 分鐘以終止 RT 反應。冰浴後加入 10 μ l ddH₂O，置於 -20°C 保存。

取 PD 患者及正常人的 cDNA 濃度為 100 ng，置於 25 μ l 的 PCR 反應中，反應溶液中包含 50 ng 的引子對、適當濃度 $MgCl_2$ 、200 μ M dNTP 以及 0.5 U 熱穩定性 DNA 聚合酵素(Promega)；PCR 反應以熱循環儀(OmniGene，HYBAID)進行，反應條件為 94°C 6 分鐘使 DNA 雙股裂解，接以循環式(35 個)的裂解溫度 94°C 1 分鐘、適當的煉合溫度 1 分鐘及延長溫度 72°C 1 分 30 秒，最後以 72°C 作用 10 分鐘。並且利用 β -actin 做為內控制組，TNF- α 與 β -actin 引子對的反應時間及溫度列於表二。反應結束後取 5 μ l 產物以 1.8%的膠體電泳，來觀察反應產物的分子量大小及合成量的多寡。

(五) 同步定量 PCR (Real-time PCR)

利用Primer Expression (Applied Biosystems)軟體分別設計TNF- α cDNA及 β -actin的引子(表二)。同步定量PCR在總體積25 μ l進行，反應

包括：cDNA 5 μ l、SYBR green PCR master mix (Applied Biosystems) 12.5 μ l，各300 nM的TNF- α 引子(reverse、forward)、400nM的 β -actin 引子，再補以適當量的ddH₂O。在ABI prism 7000 (Applied Biosystems) 進行反應，同步定量PCR的過程包括先以50°C 2分鐘破壞可能污染的RNA，再以95°C 10分鐘一個循環使cDNA的雙股裂解。接著 95°C 15秒及60°C 1分鐘 40 個循環完成反應後，讀取C_T值。C_T值為樣品PCR反應突破threshold line所需要的循環數，需選取在PCR呈現對數期增加之區域，C_T值可反應出目標cDNA的最初量，且與最初量呈反比的比率。利用C_T值的高低比較不同細胞株TNF- α 表現量，以 β -actin RNA的表現量來當作內生性的控制組，計算公式為 $C_T = C_T (\beta\text{-actin}) - C_T (\text{TNF-}\alpha)$ ，而TNF- α 相對於 β -actin RNA的表現量 = $2^{\Delta C_T}$ 。

七、淋巴細胞株cytokine antibody array

(一) 淋巴細胞處理

以TNF- α -1031及-863兩點之基因多型性做為選用淋巴細胞株的依據，經由年齡、基因型的配對選擇2株PD病患和2株正常人的淋巴細胞株(表三)。使用含10% FBS的RPMI培養 1×10^7 細胞在T75的培養瓶中，細胞經6小時穩定培養後，換成新鮮無血清的RPMI，此四株細胞株各自分為實驗組及對照組，接著在每一實驗組中加入100 ng/ml

LPS，對照組則不做任何處理，待6小時後收集細胞培養液。

(二) Cytokine表現量檢測

收集的培養液以 Human Cytokine Antibody Array I kit (RayBiotech®) 進行檢測，此套系統可以利用抗體免疫反應對 46 種 cytokine 蛋白質表現量同時進行檢測，本研究選用可檢測人類細胞培養液中 cytokine 的試劑，測量實驗組與對照組培養液釋放出 cytokine，步驟如下：將含有八張帶有 46 種 cytokine 抗體的膜片，加入 2 ml 1X Blocking Buffer 放置室溫下 30 分鐘，除去 Buffer 後，分別加入 1 ml 實驗組及對照組的細胞培養液，於 4°C 靜置 over night，使 sample 內抗原與膜上的抗體充分結合，去除培養液再經過 3 次各 5 分鐘 Wash Buffer I 震盪清洗後，再以 Wash Buffer II 震盪清洗 5 分鐘，接著加入 1 ml 的 biotin-conjugated antibodies 至每張膜片上靜置 2 小時，去除後同樣經過 3 次各 5 分鐘 Wash Buffer I 震盪清洗後，再以 Wash Buffer II 震盪清洗 5 分鐘，然後加入 2 ml diluted HRP-conjugated streptavidin 於室溫下反應 2 小時，去除後再經過 3 次各 5 分鐘 Wash Buffer I 震盪清洗後，再以 Wash Buffer II 震盪清洗 5 分鐘。最後於每片膜上加入 Detection Buffer，注意此時必須避光並小心勿使膜片乾掉，以冷光分析儀(FUJI LAS-3000)曝光時間約 8~9 分鐘。