

一、IL-1 β 基因

本研究分析了 391 位 PD 患者的 IL-1 β 基因多型性，其中女性約佔 46.8%，患者年齡分佈在 42 ~ 99 歲，平均年齡為 69.3 歲，PD 患者中具有發病年齡紀錄的共 333 位，發病平均年齡為 62.7 歲。控制組共分析了 213 位正常個體，其中女性約佔 40.8%。年齡則分佈在 40 ~ 94 歲，平均年齡為 61.2 歲。本研究將具有發病年齡紀錄的樣本再分出三群：>50 歲、>60 歲、>70 歲，與相同年齡區間的正常人做比較。

(一) IL-1 β 啟動子多型性分析

本研究針對 IL-1 β 啟動子上游區第 511 個核苷酸的 C→T 置換 (C-511T)，分析 IL-1 β -511 C>T 的多型性(圖一)，在 PD 患者和控制組的基因型頻率顯示於表四，此一多型性的基因頻率呈現哈溫平衡。其基因型頻率對偶基因頻率的分佈在 PD 患者和控制組之間並無顯著的差異性($P > 0.05$)。

再進行相對危險性檢測(odds ratio 分析)是以族群中較常見的基因型作為比較的基礎，分析不同基因型的同型合子及異型合子的罹患 PD 的相對危險性利用。因此將全部 PD 患者與控制組-511 CT 基因型

做為參考基點時(此為最常見的基因型)來檢測其他基因型(-511 CC ; -511 TT)的 Odds ratio。Odds ratio 檢測的結果，IL-1 β CC 基因為 1.09 (95% CI 0.73-1.61, $P=0.678$)，基因型 TT 為 0.89 (95% CI 0.58-1.39, $P=0.610$)。再將 PD 患者族群與控制組以年齡分為三群，分別為>50 歲、>60 歲及>70 歲，但此三群 IL-1 β 基因多型性分佈並無顯著差異(表四)。再以性別做為分群依據，顯示-511/C 同型合子女性 PD 族群高於控制組的趨勢，但並未達顯著差異($P=0.062$)，而此多型性分佈在男性 PD 族群相較控制組間並未發現有增加的趨勢(表五)。

(二) PD 患者內生性 IL-1 β mRNA 表現量

圖二表示以同步定量 PCR 分析 29 個 PD 病患的白血球表現 IL-1 β mRNA 結果，並依多型性的基因型分群。在 IL-1 β -511 C>T 的取代中，分析兩種 CC、TT 同型合子與一種 CT 異型合子的 IL-1 β mRNA 平均表現量，經 t -test 統計後並不具有差異性，CC 為 0.069 (0.013 ~ 0.259)、CT 為 0.042 (0.000 ~ 0.152)和 TT 為 0.060 (0.025 ~ 0.094)。由圖中可見 IL-1 β -511 基因多型性似乎並不影響內生性 IL-1 β mRNA 表現量。

二、IL-8 基因

參與 IL-8 基因的多型性分析的 PD 患者共 317 位，其中女性約佔 45.1%，患者年齡分佈在 42 ~ 99 歲，平均年齡為 69.2 歲。PD 患者中具有發病年齡紀錄的共 270 位，發病年齡分佈在 62.8 歲。控制組共分析了 136 位正常個體，其中女性佔 39.7%，年齡則分佈在 40 ~ 94 歲，平均年齡為 60.9 歲。

(一) IL-8 啓動子多型性分析

IL-8 啓動子區域上游第 251 個核苷酸的 T→A 置換(T-251A)分析，PD 患者和控制組的基因型頻率顯示於**表六**，此多型性的基因頻率呈現哈溫平衡。在全部樣本中無論是整體或個別的基因型在 PD 族群和控制組間並無顯著的差異。接著以 IL-8 -251 TA 基因型做為參考基點時(此為 PD 最常見的基因型)來檢測其他基因型(-251 TT；-251 AA)的 odds ratio。Odds ratio 檢測的結果，IL-8 TT 基因為 0.82 (95% CI 0.54-1.27, $P=0.390$)，基因型 AA 為 0.97 (95% CI 0.52-1.89, $P=0.938$)，亦並未發現此基因多型性在 PD 族群與控制組具有差異性。**表六**中 PD 患者族群與控制組以年齡分為三群，分別為>50 歲、>60 歲及>70 歲，但此三群 IL-8 基因多型性分佈並無顯著差異。

另外根據 2004 年 Owen 等人對於 IL-8 T-251A 基因多型性的研究中，將發病年齡為 60 歲以下的愛爾蘭 PD 患者定為早發性 PD 患者

(Early Onset-PD; EO-PD)，並指出帶有 IL-8 -251TT 的 EO-PD 患者比起對照組具有較高的頻率，因此本研究也將台灣族群分出<60 歲患者族群，與同年齡區段的控制組做相關性分析，但仍並未發現兩者間具有顯著性差異(data not show)。而再以性別做為分群依據，亦無觀察到 PD 患者與控制組之間有顯著的差異(表七)。

(二) PD 患者內生性 IL-8 mRNA 表現量

圖四表示以同步定量 PCR 分析 29 個 PD 病患的白血球表現 IL-8 mRNA 結果，並依多型性的基因型分群。在 IL-8 T>A 的取代中，AT 異型合子與 TT 同型合子平均表現量比較，分別是 0.007 (0.000 ~ 0.020) 和 0.008 (0.003 ~ 0.021)，由於罕見基因型同型合子-251AA 的樣本數過少，在 29 個樣本中只有一個樣本，因此無法進行統計分析，因此無法比較此基因型進行分析比較。但由圖中看來 IL-8 -251TT、TA 和 AA 三種基因型並不影響內生性 IL-8 mRNA 表現量。

三、IL-6 基因多型性分析

IL-6 G>C 的多型性(圖五)在 PD 患者和控制組的基因型頻率顯示於表八，大部分族群皆為-174 GG 基因型，而 GC 及 CC 這兩種基因型相當稀少，僅有檢測出一位 PD 患者帶有 GC 的基因型。因此認

為基因型 GC 和 GG 的 odds ratio 則因台灣 PD 族群中較少出現，而無法進行檢測，故推測 IL-6 -174 G>C 基因多型性可能與台灣 PD 族群發病並無相關性。

四、淋巴細胞株經 LPS 誘導後 TNF- α mRNA 的表現情形

由於 IL-1 β 、IL-8 和 IL-6 這三個啓動子上游的基因多型性皆未找到與 PD 有相關的結果，因此接下來的實驗將方向放在經由實驗室已找出在 TNF- α 啓動子-1031C 的對偶基因可能造成個體對 PD 的易感受性，且由於聯鎖的關係，連帶地造成-1031C/-863A 單套型也與 PD 的易感受性有關的結果(馮，2006)。因此對於帶有 TNF- α -1031TT/-863CC 和-1031CC/-863AA 基因型的淋巴細胞株，先進行不同濃度及時間的 LPS 處理，找出誘導淋巴細胞產生發炎狀況的最適濃度。

選用兩個分別帶有 TNF- α -1031TT/-863CC 和-1031CC/-863AA 的細胞株(ND0519、ND1830)，分別以不同時間(2、6 和 24 小時)與不同濃度(0、0.1、1、10、100 和 1000 ng/ml)的 LPS 處理，再以 RT-PCR 和 Real-time PCR 方式比較 TNF- α mRNA 表現量的差異。以 RT-PCR 進行初步定量(圖六、七)，但因 PCR cycle 飽和度的關係，很難看出各組之間的差異。因此將 cDNA 進行 Real-time PCR 做更精準的定量

分析，在圖八 ND0519 不論以何種濃度處理在 2 小時相較於 6 和 24 小時，發現有偏高 TNF- α 表現，隨時間拉長有逐漸下降的趨勢，在 6 小時的處理中可見 10 ng/ml 相較於其他濃度的表現量為高，到更高濃度 100 和 1000 ng/ml 的處理卻又有下降的趨勢。在 ND1830 這組的 2 小時的處理 TNF- α 的表現量不如 ND0519，但是在 6 小時的處理發現有相同的趨勢，表現量隨濃度增加逐漸上升達到 100 和 1000 ng/ml 也有下降的趨勢。而且在兩個細胞株的表現量在 24 小時的處理中看不出有受到濃度的影響。因此認為經過六小時與 100 ng/ml 濃度的 LPS 處理為較適當之處理濃度，避免過長或是不足的時間及濃度的處理，而引發細胞死亡或發炎反應未達最適狀況。

五、淋巴細胞株Cytokine Antibody Array表現量檢測

圖九、十為 Cytokine Antibody Array 的實驗部分，是以濃度 100 ng/ml 的 LPS 做處理，在圖九為男性 PD 患者(ND1298)及男性控制組(ND1908)的淋巴細胞株，檢測實驗組 100 ng/ml 的 LPS 處理和對照組細胞培養液所含 protein array 表現量，圖中可見以 LPS 誘發細胞發炎的實驗組比起對照組，cytokine array 的表現量有明顯上升的現象，圖十中女性的細胞株亦有相近的結果，經過 multi Gauge version 2.2 軟體定量各細胞激素表現量後，在 LPS 處理後，顯示男性與女性 PD 患

者 Thrombopoietin、EGF 和 TNF- β 均有明顯上升的情況(表九)，以粗黑體表示的為 PD 患者相較於正常人表現量上升的細胞激素。