

參、結果

一、SCA8 基因 CTG 重複之遺傳資料庫建立

目前已分析 80 位正常人(160 條染色體)以及 18 位運動失調症患者(36 條染色體)、93 位失智症患者(186 條染色體)、99 位帕金森氏症患者(198 條染色體)以及 63 位其他神經相關疾病患者(126 條染色體，包括舞蹈症患者、肌張力異常症、泛發性路易體疾病)，顯示在這些族群中，SCA8 基因 CTG 重複的數目 92% 以上分佈在 18~36 個之間(圖三)，最多為 18 次 CTG 重複，在正常人族群所佔比例為 26.3%，運動失調症患者族群比例為 22.2%，失智症患者族群比例為 19.4%，帕金森氏症患者族群比例為 27.3%，其他神經相關疾病患者族群比例則為 27.0%；各族群間(CTG)_n 分佈情形之詳細結果列於表二。

在此研究中，我們發現有八個擴增的對偶基因：包括一位正常人(85 次重複)、三位 PD 患者(66，87，87 次重複)、一位泛發性路易體疾病(Diffuse Lewy body disease)患者(97 次重複)、一位肌張力異常症(dystonia)患者(70 次重複)以及兩位 SCA 患者(88 及 95~185 次重複)，其(CTG)_n 重複的情形經定序分析後列為表三。在 SCA 患者 4998 樣品發現了，經過培養後 CTG 重複發生不穩定之現象而有多種重複序

列出現。

二、淋巴細胞中 *SCA8*、*KLHL1* 基因的表現

針對 *β -actin*、*SCA8*、*KLHL1* 基因的 cDNA，設計跨表現子的引子：actin809、actin-ex5-R (exons 4-5)、SCA8-7F、SCA8-8R (exons D2-C)、KLHL1-F、KLHL1-R (exons 2-4) (圖四 A、B)，利用 RT-PCR 來檢視淋巴細胞中 *SCA8*、*KLHL1* 基因的表現。如圖四 D、F 所示，在正常人(GJL、1727、1729、1907、1908、2105)及 CTG 重複擴增病患(4998、4999、844、3183、1150、5011)淋巴細胞中，*SCA8*、*KLHL1* 基因均有表現，但表現量相較於 *β -actin* 來的低許多。

三、外遺傳研究(epigenetic studies)

(一)Methylation specific PCR assay (MSP)

淋巴細胞株(GJL、4998、4999、844、1150、3183、CHC74、CTS83)及白血球(H1177、H1227、H1347、H1354、H1173) DNA，經由可辨別甲基化與否之 *SCA8-U*、*SCA8-M* 引子對(圖二、表一)，所進行的 PCR 反應，結果顯示於表四。淋巴細胞 DNA (樣品 GJL)中經 *SssI*

methylase 處理過後，作為甲基化 DNA 的正控制組。大部分之樣品(包括正常人及 *SCA8* 基因 3'端 CTG 擴增者)，在兩組 PCR 反應後，均可看見 PCR 產物的出現，但各樣品兩組 PCR 產物相對量差異很大(data not shown)。

(二)Restriction enzyme based-methylation assay (RE-PCR)

圖五 A 顯示未經酵素切割(T)、*HpaII* 切割(H)、*MspI* 切割(M)的基因組 DNA，*HpaII*、*MspI* 皆辨識 CCGG，但 *HpaII* 僅切割未甲基化的序列，*MspI* 則不論甲基化否都會切割。圖五 B、C、D、E 中，未添加酵素切割的模版(T)為 PCR 反應的正控制組，*MspI* 切割的模版(M)為 PCR 反應的負控制組，*HpaII* 切割的模版(H)為實驗組，藉比較未添加酵素切割組和 *HpaII* 切割組的 PCR 產物強度，可回推 DNA 樣品的甲基化情形。以圖五 B 為例，H1387 樣品甲基化程度最低(0%)，而其他三個樣品 H1410、H1265、H1415 的甲基化程度分別為 87%、77%、37%。圖五中各 DNA 樣品甲基化程度，詳列於表五，各樣品的 *SCA8* 基因的 CTG 重複區域的 PCR 分析則顯示於圖六。

四、淋巴細胞株的氧化壓力研究

(一)WST-1 細胞增生檢測

圖七 A 顯示三位正常人(1729、1908、2105)及三位 *SCA8* 基因 CTG 重複擴增患者(4999、844、3183)淋巴細胞株經過氧化劑 TBH 處理後的 WST-1 細胞增生檢測結果，可以發現各淋巴細胞株的生長速度不同，會影響所讀到的值。進一步將每株細胞未經藥物處理(0 μM)之數值作為 100%，進行標準化，來比較氧化劑 TBH 處理的效應。如圖七 B 所示，50 μM 氧化劑 TBH 的處理使 1729、3183 細胞的生存率顯著下降(89.0%)，100 μM 的 TBH 處理後各細胞的生存率皆顯著下降(86.9%~73.9%)，但此氧化劑處理的效應，在正常人(86.9%~76.1%)與患者(81.8%~73.9%)間並無顯著差異。

(二) Trypan blue 排除檢測

圖八 A 顯示上述三位正常人(1729、1908、2105)及三位 *SCA8* 基因 CTG 重複擴增患者(4999、844、3183)淋巴細胞株經過氧化劑 TBH 處理後的 Trypan blue 排除檢測，沒有 TBH 處理的細胞，死亡率大約在 12.1%~19.8% 之間，經過藥物處理後的細胞死亡率則為 21.2%~37.3%。進一步以未經 TBH 處理之細胞死亡率為 100%，進行標準化，如圖八 B 所示，各細胞株經 TBH 處理後，細胞的死亡率顯

著上升，如 50 μM 者為 128.1%~252.4%，100 μM 者為 164.2%~256.7%，即細胞的死亡率隨藥物濃度上升而有增高趨勢，但此上升幅度在正常人(128.1%~222.3%)與患者(157.6%~256.7%)間並無顯著差異。

(三) Superoxide dismutase assay

三位正常人(1729、1908、2105)及三位 *SCA8* 基因 CTG 重複擴增患者(4999、844、3183)淋巴細胞株經過氧化劑 TBH 處理後的 superoxide dismutase 活性變化情形，顯示於圖九。以各細胞株未經 TBH 處理的 superoxide dismutase 活性設為 100%，進行標準化後，正常人細胞株 1908 經過 TBH 處理後酵素活性顯著上升(2.69%)，正常人 1729 細胞株及患者細胞株 4999、844 則是些微上升(1.36%、0.31%、0.02%)，正常人細胞株 2105 及患者細胞株 3183 則是些微下降(0.06%、0.74%)。