

壹、緒論

一、帕金森氏症(Parkinson's disease; PD)

帕金森氏症(Parkinson's disease；以下簡稱為 PD)是一種與年齡相關的神經退化性疾病，典型發病的年齡通常在 50 歲以上(Barbosa et al., 1997)。PD 主要臨床上的特徵為靜止顫抖(resting tremor)、僵直(rigidity)、行動遲緩(bradykinesia)、步履及姿勢不穩定(gait instability)等(Mizuno et al., 1998)。PD 病理特徵為在中腦黑質區緻密區(substantia nigra pars compacta; SNpc)的多巴胺神經細胞(dopaminergic neuron)大量死亡，使黑質區投射到紋狀體的多巴胺神經纖維萎縮(Adams et al., 2001)，導致多巴胺產量下降。由於多巴胺神經路徑是負責身體運動協調的主要路徑(the nigrostriatal pathway)，因而導致病患行動失調的疾病，另一個特徵是微小膠細胞活化(microglial activation)，這是中樞神經系統與免疫反應有關的神經膠細胞。

但目前 PD 發病原因仍無定論，其神經退化機制仍不明確，有研究指出遺傳因素、感染與免疫失調和環境因素(如殺蟲劑 rotenone) (Gao et al., 2003)和各因素之間交互作用都可能對此疾病的進程發展具有影響，這也是目前被廣為接受的理論。

二、病因學

偶發性的 PD 病因至今未明，有研究顯示隨著年齡增加黑質細胞數量會減少(Gibb and Lees, 1991)，推測年齡增加可能是 PD 的重要危險因素之一，但亦有研究指出僅由黑質細胞的老化仍不足以引起 PD，應還有其他因素共同影響。隨著腦炎後帕金森氏症的病例研究及 MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)誘發帕金森氏症候群(MPTP-induced parkinsonism)的發現，環境毒素的致病理論開始被許多人所接受，隨後各種 PD 相關基因的發現，如 α -synuclein、parkin、UCH-L1、DJ-1、PINK1、LRRK2，更開啓了遺傳基因與環境產生交互作用的多因子理論－先天遺傳上某些基因的缺陷或多型性，造成個體對環境因子的感受性反應較大，因而引起 SNpc 多巴胺神經細胞的退化導致 PD 的產生(Daurer and Przedborski, 2003; Bertram and Tanzi, 2005)。

(一) 環境因素

1983 年 Langston 等人首次發現四位毒癮者使用 MPTP 後，會發生類似 PD 的臨床病徵，隨後經死亡病例解剖以及各項動物實驗發現，使用 MPTP 後的檢體其 SNpc 內多巴胺神經細胞會有大量死亡的現象(Langston, 1987)，因此證實 MPTP 這類的外在毒性因子可能是引

發 PD 的病因之一。MPTP 為一種高度親脂性的化學物質，可通過血腦屏障(blood-brain barrier)進入中樞神經系統，並會在神經膠細胞中被 MAO-B (monoamine oxidase B) 轉化為 MPDP⁺ (1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium)與 MPP⁺ (methylphenylpyridine)，其中 MPP⁺ 為活化的毒性分子，藉由多巴胺神經細胞回收系統(dopamine neuronal uptake system)進入多巴胺神經細胞中與細胞內的神經黑色素(neuromelanin)結合，抑制粒線體電子傳遞鏈的 complex I，干擾細胞產生 ATP，而使神經細胞受到損害死亡產生 PD 的病徵(D'Amato et al., 1986; Snyder and D'Amato, 1986; Daurer and Przedborski, 2003)。除了 MPTP 外，巴拉刈(paraquat)、毒魚酮(rotenone)這些常用來做為除草劑或是殺蟲劑的化學物質也被證實為毒害粒線體的環境毒素(Daurer and Przedborski, 2003)。

除了上述化學藥劑已被證實會對神經毒害外，一般飲食中需攝取的微量金屬元素，如：錳、鐵、銅等，一旦攝取過量也會造成神經毒害，甚至導致 PD 的病症(Montgomery, 1995; Lai et al., 1999)。目前已知錳元素可藉由通過血腦屏障、血腦脊液屏障(blood-CSF barrier)及直接由鼻腔經嗅神經的方式進入腦中，長期曝露在高濃度錳的空氣中，會造成吸入性的神經毒害，包含二氧化錳礦工、乾電池工廠工人、精鍊工廠工人及焊工等皆是高危險族群，且其對神經的毒性可能與其他

微量元素(如：鐵、鋅等)的交互作用有關(Crossgrove and Zheng, 2004)；亞鐵離子(Fe^{2+})及亞銅離子(Cu^+)在細胞中會催化 H_2O_2 形成具有高破壞性的 OH^\bullet 自由基，當其累積過多時會造成細胞中的 DNA、蛋白質和脂質構造的傷害，尤其是細胞膜上的不飽和脂肪酸，經一連串的脂質過氧化作用後會造成細胞膜的傷害，使得細胞內的物質外漏，使細胞變形或壞死(Halliwell and Chirico, 1993)。鐵蛋白(ferritin)為細胞內主要的鐵離子儲積蛋白，含量高意味著體內鐵質堆積過多，曾有研究發現 PD 病患腦內神經細胞、神經膠細胞及內皮細胞中的鐵蛋白含量有增加的情形(Schipper, 1998)。

不論是化學藥劑的影響或微量金屬的堆積，甚至是體內產 Interferon- gamma ($\text{IFN-}\gamma$), interleukine-2 (IL-2), tumor necrosis factor beta ($\text{TNF-}\beta$), tumor necrosis factor alpha ($\text{TNF-}\alpha$) 這些細胞激素 (cytokines)、NO、異常的粒線體電子傳遞過程等，都陸續被證實會造成基底核(basal ganglia)部位的氧化傷害(Jenner, 2003)。Schipper 提出「自由基－粒線體－金屬」理論(free radical-mitochondrial-metal theory)來闡述氧化壓力、鐵離子沉澱和粒腺體功能喪失等原因與神經退化性疾病的關係(Schipper, 2004)。

相對於 MPTP、巴拉刈、毒魚酮這些環境毒素對 PD 高致病率的影響，在一些病例-對照組(case-control)或同生群(cohort)研究中卻發現

抽煙、喝咖啡這些外在因子也有較低的 PD 致病風險(Hernan et al., 2002)，其確實的生理機制仍待進一步的研究。但目前推測抽煙與罹患 PD 成負相關的原因可能與煙草內的 nicotine 會刺激多巴胺神經細胞釋放多巴胺有關(Barbeau et al., 1986)，亦可能是煙草裡的某種物質可保護黑質不受 dopamine autoxidation 所產生的自由基氧化(Shahi and Moochhala, 1991)，以及抑制 MAO-B 的酵素活性使 MPP⁺減少形成(Morens et al., 1995)；咖啡中的咖啡因則會抵消 adenosine 在腦中的抑制作用，並會抑制 MPTP 的毒性(Ascherio et al., 2001)。

(二) 遺傳因素

阿茲海默症(Alzheimer's disease; 以下簡稱AD)和PD同為與年齡成正相關的漸行性神經退化性症病，並已證實家族性的遺傳病史在AD中是繼年齡外第二個重要的危險因子，陸續有3個基因(APP、PSEN1、PSEN2)超過160個突變被報導出與早發性的AD有關。相較於遺傳因素在AD中的重要性，其在PD中所扮演的角色就顯得較為模糊，因家族性帕金森氏症病人約僅佔所有PD患者的5%到10%，而這些家族性PD患者通常在較年輕時發病(<50歲)，疾病進展較快且臨床上及病理上的特徵都較不典型(Bertram and Tanzi, 2005; Tanner et al., 1999)。

儘管如此至今至少仍有 5 個基因座被證實與早發性家族性 PD 發病的高危險性有關，包含 4q21 的 α -synuclein (Polymeropoulos et al., 1997)、6q25 的 parkin (Kitada et al., 1998)、1p36 的 DJ-1 (Bonifati et al., 2003)、1p35-p36 的 PINK1 (Valente et al., 2004)、12q12 的 LRRK2 (Zimprich et al., 2004)。

三、中樞神經發炎與帕金森氏症的相關性

當身體組織受到傷害或感染時，組織將產生一連串變化以保護其本身免於傷害，這一連串的變化統稱為發炎反應。通常發炎反應可能包含血管擴張、局部細胞腫脹以及細胞激素的釋放。除了造成局部組織產生紅、腫、熱、痛等現象外，部份細胞激素可以經由血液循環達到腦部，影響中樞神經系統，甚至致使氧化壓力增加影響腦部神經細胞的生理功能。而在腦組織中的神經膠細胞(glia cell)與星狀細胞(astrocyte)也多具有白血球的此項功能，部分神經退化性疾病也多已經證實與細胞激素的活化有關。

多數研究者認為微小膠細胞(microglia cells)扮演著神經病理的感受器(sensor)，並且會像周邊免疫細胞同樣產生細胞激素(cytokines)，細胞激素在周邊組織主要功能是做為發炎反應的媒介者(mediator)與調節者。當神經細胞受到傷害時會釋放出一些分子(如細胞激素)，可

引起微小膠細胞的活化，清除損傷或死亡的細胞組織並會藉由細胞素活化星狀細胞、改變血腦屏障壁通透性，進而影響中樞神經系統的免疫狀態，其最終目的都是為了將已受到傷害的神經細胞清除。這一連串複雜的保護機制如果調控失當，或引起神經傷害的原因未排除，或因形成強大的氧化壓力，就有可能導致長期慢性的中樞發炎反應。

TNF α and IL-1 β 可直接或間接引起血腦障壁的通透性改變 (Moynagh et al., 1994; Tsao et al., 2001)，leukocyte就可透過這些分子侵入中樞神經系統，使周邊的免疫系統產生的反應有機會影響中樞神經而產生交互關係。IL-1 β 也可以調控微小膠細胞產生其他細胞激素 (Griffin et al., 1998; Friedman, 2001)。另外IL-1 β 、IFN- γ 也會促使人類的星狀細胞產生的NOS-2表現量增加，而使NO的產量上升(Liu et al., 2001)。

針對PD患者的發炎特徵及氧化壓力的研究中，也有與細胞激素有關的報告。在PD患者的腦部及腦脊髓液內產生比對照組表現更多量的促發炎細胞激素(inflammatory cytokines)，如TNF- α ，IL-1 β ，IL-2和IL-6 (Blum-Degen et al., 1995)。在PD患者活化的膠細胞上IFN- γ 、IL-1 β 、TNF- α 的表現增加，可引起膠細胞上的Fc ϵ psilonR II/CD23抗原表現，誘導inducible NO synthase (iNOS)增加，接著釋放NO，使病

人腦部的氧化壓力增加(Hunot et al., 1999) 。而促發炎細胞激素的過量表現，也會使多巴胺神經細胞對於氧化壓力更具敏感性，而參與黑質區的神經退化狀況(Owen, 2004)。

四、促發炎細胞激素啓動子基因多型性與帕金森氏症

(一) IL-1 β

間白素-1 (interleukin-1; IL-1)主要由單核球、巨噬細胞及樹狀突細胞(dendritic cell)所分泌，其主要的功能包括誘導急性期蛋白質的合成、引發發燒、活化B細胞及T細胞、刺激巨噬細胞、引發內皮細胞上的白血球附著等。

當中樞神經系統受到損傷時，IL-1 β 扮演調控細胞反應的角色。在臨床或實驗的腦部受到缺血性的損傷都會使IL-1 β 誘發產生(Rothwell et al., 1997)；另一方面，在IL-1 β 會促使以手術方式切斷通往紋狀體的神經纖維PD動物的多巴胺的神經纖維長出芽端，因此IL-1 β 也具有多效性(pluripotential)的神經生長促進因素的功能(Wang et al., 1994)；在特定表現的IL-1 β 基因可能扮演著保護PD病人的多巴胺神經細胞的角色，IL-1 β 基因啓動子區域上的基因多型性差異，可能與PD患者延遲或提早發病具有關聯性(Nishimura et al., 2000)。因此

IL-1 β 似乎同時具有神經毒性(neurotoxic)和神經保護(neuroprotective)的雙重角色。

IL-1依功能差異可分為IL-1 α 、IL-1 β 及IL-1 receptor antagonist (IL-1ra)，三者的基因皆位在人類第二號染色體長臂(2q12-21)上，其中IL-1 α 、IL-1 β 是典型的促發炎細胞激素，可由巨噬細胞(macrophage)或B細胞分泌，然後作用於T細胞、B細胞或組織細胞，這些標的細胞具有IL-1 receptor 1，當IL-1 α 、IL-1 β 與之結合後，可活化receptor；IL-1ra亦會與IL-1 receptor 1結合，但並不活化receptor，因此會與IL-1 α 、IL-1 β 競爭，是IL-1 α 、IL-1 β 的拮抗劑。

在誘發發炎的狀況下，位於細胞激素基因上游的啓動子區域，其基因序列的單一核苷酸多型性(single nucleotide polymorphisms；SNPs)的遺傳變異，會影響基因的轉錄的調節，進而影響細胞激素之產量。而在基因多型性方面，IL-1 β 啓動子上游區第 511 個核苷酸的 C→T 置換(C-511T)，有研究報導-511C 為 IL-1 β 低產量的對偶基因(EI-Omar et al., 2000)，尚有研究指出 IL-1 β -511T 基因多型性差異可能與 PD 患者延遲發病具有關聯性，因而認為 IL-1 β 對於患者可能具有保護作用(Nishimura et al., 2000)，而在芬蘭地區的研究結果顯示的 PD 患者帶有 IL-1 β -511C 基因多型性的比例顯著高於對照組(Mattila et al.,

2002)，顯示 IL-1 β 基因可能對於 PD 發病扮演著重要的角色。

(二) IL-6

間白素-6 (Interleukin-6；IL-6)基因位於人類第七條染色體的短臂(7p-21)，並且在IL-6 -174C的基因多型性被報導對AD為具有高風險的基因型(Bagli et al., 2000)。並有研究指出IL-6啓動子區域上的基因多型性與延遲 AD 發病及降低 AD 患病的風險具有相關性(Papassotiropoulos et al., 1999)。

在動物離體實驗中，腦中的星狀細胞所產生的IL-6表現可以調控微小膠細胞的增生，以及刺激具有免疫保護作用的細胞激素產生之功能(Cardenas and Bolin, 2003)。此外，IL-6也被認為具有保護血腦屏障壁的作用 (Krizanac-Bengez et al., 2003)。在以MPTP處理的PD動物模式中，IL-6基因缺失的小鼠所受到的神經毒性傷害、減少多巴胺神經死亡在程度上遠大於對照組的小鼠(Cardenas and Bolin, 2003)。因此IL-6被認為是可能具有神經保護作用的促發炎細胞激素。

(三) IL-8

間白素-8 (Interleukin-8；IL-8)主要由單核球和巨噬細胞分泌，IL-8為化學激素(chemokine)族群的成員之一，扮演T細胞及嗜中性白

血球活化因子的角色，可刺激白血球滲透。在腦細胞內，特別是具有大量的化學激素的接受器的神經細胞(Miller and Meucci, 1999)。

IL-8基因位於人類第四條染色體上(4q13-21)，在多型性方面，IL-8啓動子區域上游第251個核苷酸的T→A置換(T-251A)，亦有研究指出帶有IL-8 -251T基因多型性之PD患者的比例顯著低於對照組，因此IL-8多型性變異被認為可能會影響PD發病年齡(Owen, 2004)。此外，目前已被報導可能與家族性遺傳PD患者有關的突變因子如 α -synuclein、UCH-L1以及PARK4基因分別位於染色體4q-21-23, 4p14-15和4p-15上(Skipper and Farrer, 2002)，與IL-8同位於一條染色體且距離相近，可能與IL-8啓動子區域的基因多型性具有關聯性(Owen, 2004)。

五、研究動機與目的

在正常情況下，人體腦部內的促發炎細胞激素的表現量是相當低的。然而當腦部發生損傷或是產生神經退化疾病時，促發炎細胞激素的產量會大量增加，在腦部形成強大的氧化壓力，可能導致長期慢性的中樞發炎反應，最後引發神經細胞的死亡造成神經退化現象。因此本研究在探討促發炎細胞激素 IL-1 β 、IL-6、IL-8 基因啓動子多型性是否與個體對 PD 的易感受性有關。並在以 LPS 誘發淋巴細胞發炎反應的

狀況下，探討帶有患病風險較高的 TNF- α -1031CC 基因型的 PD 淋巴細胞株，其 TNF- α 表現量，及用 cytokine protein array 的技術，檢視多種細胞激素的表現量，來篩檢其他可能會影響 PD 發病因素的細胞激素。