

目錄

序論	2-3
----	-----

第一章：探討第三型脊髓小腦運動失調症在細胞模型的氧化 還原能力

中文摘要	5-6
英文摘要	7-8
前言	9-16
材料與方法	17-25
結果	26-37
討論	38-43
圖表	44-58

第二章：脊髓小腦運動失調症第十七型的細胞模型建立

中文摘要	60-61
英文摘要	62-63
前言	64-67
材料與方法	68-74
結果	75-80
討論	81-85
圖表	86-95
參考文獻	96-106
附錄	107-108

序論

脊髓小腦運動失調症 (spinocerebellar ataxias ; SCAs) 是一種晚發型的人類顯性遺傳神經退化性疾病。目前已有至少 25 種類型的脊髓小腦運動失調症被發現 (van de Warrenburg *et al.*, 2005)。其中位於轉譯區的類型有脊髓小腦運動失調症第一型、第二型、第三型、第六型、第七型及第十七型。這些類型主要是由於致病 DNA 序列上含有一段不正常的 CAG 三核苷酸擴增所致。這些 DNA 序列轉譯後的蛋白，會產生一段不正常擴增的多醯麩胺酸蛋白 (polyglutamine ; polyQ)。這種因多醯麩胺酸蛋白致病的疾病亦包含齒狀紅核蒼白球肌萎縮症 (Dentatorubral-Pallidouysian atrophy ; DRPLA) (Koide *et al.*, 1994)、亨汀頓舞蹈症 (Huntington's Disease ; HD) (Andrew *et al.*, 1993; Duyao *et al.*, 1993; Snell *et al.*, 1993) 及延髓肌萎縮症 (spinal and bulbar muscular atrophy ; SBMA) (La Spada *et al.*, 1991)。此外，核苷酸擴增位於非轉譯區的脊髓小腦運動失調症分別為第八型、第十型及第十二型，主要為其擴增序列位於 RNA 的非轉譯區上，推測可能為 RNA 發生錯誤而導致疾病產生 (Ranum and Day, 2002 ; Jasinska and Krzyzosiak, 2004 ; Broude and Cantor, 2003)。這些攜帶有多醯麩胺酸蛋白的疾病對於神經細胞的影響不盡相同 (van de Warrenburg,

2005)。而擴增的多醯麩胺酸蛋白則是這些疾病的共同致病機制，但真正的致病機轉到目前仍不清楚。這些疾病攜帶有 CAG 三核苷酸重複片段的 DNA 序列，在正常人與病人是不相同的，其相關致病基因位居不同的染色體上（Paulson *et al.*, 2000；van de Warrenburg *et al.*, 2005）。

第一章

探討第三型脊髓小腦運動失調症

在細胞模型的氧化還原能力

Studies of Glutathione and Antioxidant Enzyme

Activities in Cellular Models of

Spinocerebellar Ataxia Type 3 Disease

摘要

脊髓小腦運動失調症候群是一種體染色體顯性遺傳疾病，其中有六種亞型分別位於不同基因序列上的 CAG 三核苷酸（多麩酸胺）的重複序列所致，這六型分別為 SCA1、2、3、6、7 及 17。這些類型的疾病中，CAG 的重複序列會被轉錄轉譯成多麩酸胺。不正常的多麩酸胺會造成毒性的傷害，並且在細胞質與核內中產生堆積現象，導致細胞死亡。不過，多麩酸胺的突變是如何導致細胞死亡的詳細機制，至今仍不清楚。過去的研究指出，活氧分子或自由基會促進細胞的氧化壓力增加，是神經退化疾病重要的致病機制。一般相信，抗氧化系統中的非酵素及酵素分子，在哺乳類動物中樞神經系中扮演著移除氧化劑的角色，用以對抗神經退化疾病所產生的氧化壓力。我們過去的研究是利用 SCA3 疾病模型細胞株，在比較 SK-N-SH 及 SK-N-SH-MJD78（具有全長 78 個麩酸胺重複序列的 ataxin-3 蛋白）細胞時發現，含有全長突變蛋白的 SK-N-SH 對於 tBH 具有較高的敏感性。因此，本實驗藉由 GSH/GSSG 比例的改變，證實這種擁有全長突變蛋白的細胞株，其氧化壓力確實高於親代正常細胞株。此外，SK-N-SH-MJD78 與 COS-7-MJD78-GFP 細胞株在正常培養下，觸酶、穀胱甘肽還原酶與超氧化物歧化酶的活性均有明顯下降，穀胱甘肽還原酶的

蛋白質表達亦在突變細胞顯著下降。由於細胞遭受到氧化壓力時，粒線體 DNA 容易受到損害，因此從粒線體 DNA 複製數的結果發現，在攜帶有突變 ataxin-3 的早期代數 SK-N-SH-MJD 的確承受較大的氧化傷害。綜合上述結果，我們推論，突變 ataxin-3 蛋白可能會影響這些氧化還原酵素的活性，進而使突變細胞無法有效的移除 O_2^- 與 H_2O_2 ，以及促使粒線體 DNA 出現突變或缺失，導致粒線體功能缺失。因此，我們認為氧化壓力所引發的細胞傷害，在 SCA3 疾病細胞進入程序性死亡的過程中，應扮演非常重要的角色。

Abstract

Spinocerebellar ataxias (SCAs) are autosomal dominantly inherited disorders. Six kinds of spinocerebellar ataxias are caused by CAG trinucleotide repeat expansion in the coding region of the respective genes, including SCA1, 2, 3, 6, 7 and 17. In all cases, the CAG repeats are transcribed and translated into polyglutamine tracts. The nature of the toxic insult of the mutant proteins will cause aggregation in the nucleus and cytoplasm and eventually lead to cell apoptosis. A poly(Q) mutation and its biological consequences in each disease are unclear. It is known that oxidative stress, induced by reactive oxygen species (ROS) or free radicals, plays an important role in pathogenesis of neurodegenerative disorders. Nonenzymatic and enzymatic components in the antioxidative system play critical role(s) to against oxidative stresses in the mammalian central nervous system. Our previous study showed that human neuroblastoma SK-N-SH cells stably transfected full-length SCA3 with 78 CAG repeats was more sensitive to t-butyl hydroperoxide (tBH). Evidenced by alterations in GSH/GSSG ratios, my results demonstrated that the mutant SCA3 cells showed greater oxidative stress than the parent cells. In addition, both SK-N-SH-MJD78 and COS-7-MJD78 -GFP cell lines have the lower levels of catalase, glutathione reductase and superoxide dismutase when compared to the wild-type cell lines under the normal growth condition. Furthermore, the expression of glutathione reductase decreased in COS-7-MJD78-GFP mutant cells compared to that of COS-7-MJD26-GFP normal cells. It is known that when cells are under

oxidative stress, the mitochondrial DNA is prone to damage. Our results further demonstrated that mitochondrial DNA copy number of mutant cells is reduced when compared to that of the parent cells. Our results indicated that mutant ataxin-3 might influence the activity of enzymatic components to remove O_2^- and H_2O_2 efficiently, and promote mitochondrial DNA mutation or deletion, which leads to dysfunction of mitochondria. Therefore, we suggested that the cell damage caused by greater oxidative stress in SCA3 mutant cells plays an important role, at least in part, in the cell apoptotic pathway.

前言

脊髓小腦運動失調症第三型(Spinocerebellar ataxia type 3; SCA3) 又稱為 Machdo-Joseph 疾病(MJD), 在 1972 年從葡萄牙人身上發現, 其 *MJD* 基因是位於第 14 對染色體長臂上(14q24.3-q32)(Takiyama *et al.*, 1993), 是脊髓小腦運動失調症家族中最常見的亞型。正常人的 *MJD* 基因上的 CAG 重複數為 12 到 40 之間, 病人的重複數則為 50 到 84 之間 (Paulson *et al.*, 2000; van Alfen *et al.*, 2001)。正常 ataxin-3 蛋白目前發現具有兩種功能:(1) ataxin-3 含有泛激酶作用區域 (ubiquitin interaction motif), 可與泛激酶長鏈結合, 因而具有泛激酶結合蛋白 (polyubiquitin binding protein) 的功能 (Burnett *et al.*, 2003; Donaldson *et al.*, 2003; Chai *et al.*, 2004); (2) ataxin-3 具有泛激酶水解酶的能力, 協助蛋白送往蛋白解體 (proteasome) 作用 (Burnett *et al.*, 2003; Doss-Pepe *et al.*, 2003; Scheel *et al.*, 2003)。過去的研究也顯示, 若 ataxin-3 上具有一段不正常擴增的多醯麩胺酸蛋白, 這些不正常的蛋白片段會輾轉進入核內產生包涵物 (nuclear inclusion body) (Paulson *et al.*, 2000)。這些帶有不正常多醯麩胺酸蛋白擴增的蛋白會經由 caspase 或是泛激酶-蛋白解體的路徑, 裂解成具有毒性的多醯麩胺酸蛋白片段, 並輾轉進入核中堆積成核內包涵物 (Kaytor and

Warren, 1999 ; Ferrigno and Silver, 2000)。目前研究顯示，多醯麩胺酸蛋白所造成的堆積可能是為了保護細胞，避免受到多醯麩胺酸蛋白的毒害，進而將具有毒性的蛋白包裹形成堆積物 (Arrasate *et al.*, 2004)。但這些蛋白是進入核中產生堆積的機制，目前仍不明，一般相信，這些致病蛋白上的多醯麩胺酸蛋白片段改變整個蛋白的構形，並且影響下游的蛋白功能、蛋白與蛋白之間的交互作用、蛋白的摺疊，而導致正常的神經功能喪失 (Paulson *et al.*, 2000)。除核內包涵物在這些疾病的晚期階段被發現外，活氧分子 (Reactive oxygen species ; ROS) 的增加也被偵測到。活氧分子在正常細胞的粒線體呼吸作用、吞噬作用、不飽和脂肪酸代謝、排卵及受精過程，均可被大量產生 (Singh *et al.*, 2004)。活氧分子的過度產生而形成胞內氧化壓力，容易使細胞內單股、雙股 DNA、蛋白質及脂質的損害，嚴重則使細胞死亡，常見於老化及許多神經性退化疾病 (Cerutti, 1985 ; Halliwell *et al.*, 1992 ; Cerutti, 1994)。

從亨汀頓舞蹈症的研究顯示，當 COS-7、HeLa、SK-N-SH 等細胞表達有 74 個多醯麩胺酸蛋白的 Htt (Huntingtin) 突變蛋白時，會較表達正常 Htt 蛋白的細胞株，誘發更多的活氧分子及自由基 (Wytenbach *et al.*, 2002)。同時也發現，這些細胞表達不正常擴增多醯麩胺酸的 Htt 蛋白時，具有較低的還原態穀胱甘肽 (Glutathione ;

GSH) (Wytenbach *et al.*, 2002)。這種存在於自由基與穀胱甘肽之間的相對關係，指出當表達不正常擴增多醯麩胺酸的 Htt 蛋白時，會製造過多的活氧分子，促使還原型穀胱甘肽氧化成氧化態穀胱甘肽 (GS-SG; GSSG)，使細胞內氧化壓力增加 (Wytenbach *et al.*, 2002)。當哺乳類細胞處於熱休克、氧化壓力、化學治療藥劑及細胞介質 (cytokines) 的環境下時，Hsp27 會啟動抗氧化機制以對抗細胞凋亡，增加神經細胞的存活 (Garrido *et al.*, 1997; Huot *et al.*, 1996; Landry *et al.*, 1989; Lavoie *et al.*, 1995; Lewis *et al.*, 1999; Wagstaff *et al.*, 1999)。過去的研究顯示，當細胞表達不正常擴增多醯麩胺酸的 htt 蛋白時，外加短暫性表達的 Hsp27 蛋白可有效的抑制活氧分子，但並不會影響擴增突變蛋白的堆積 (Wytenbach *et al.*, 2002)。

在嗜中性反應 (Neutrophil activation)、高氧 (hyperoxia)、外毒物分子的氧化還原反應 (redox-active xenobiotics)、放射線的曝曬 (radiation exposure) 及局部貧血 (ischemia) 等環境，會刺激一連串的活氧分子產生，這些毒性分子可間接攻擊細胞內的結構性及遺傳性物質 (Harris, 1992)。因此細胞內需藉由抗氧化系統對抗這些活氧分子，抗氧化系統分為非酵素及酵素兩大類 (Raha and Robinson, 2000; 附錄一)。非酵素的成員有維他命 C (ascorbate; ascorbic acid; Vitamin C)、維他命 E (α -Tocopherol; Vitamin E)、 β -胡蘿蔔素 (carotenoids;

β -carotene) 及穀胱甘肽 (Glutathione; GSH) 四種 (Harris, 1992)。

維他命 C 在細胞質內進行抗氧化作用、維他命 E 則在細胞膜上進行初步作用及 β -胡蘿蔔素則作用於膜上的脂質，此三種作用分子均可作用於溶酶體，但這些分子均需藉食物補充 (Block *et al.*, 1992; Halliwell, 1994; Jacob, 1995; Singh *et al.*, 2004)。此外，穀胱甘肽則廣佈於細胞中，可由細胞自行合成。而酵素層級包含穀胱甘肽過氧化氫酶 (Glutathione peroxidase; GPx)、穀胱甘肽還原酶 (Glutathione reductase; GR)、觸酶 (過氧化氫酶; Catalase; CAT)、穀胱甘肽-硫-轉移酶 (glutathione-S-transferase; GST) 及超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase; SOD) (Çekiç *et al.*, 1999)。

穀胱甘肽 (Glutathione) 是一種由穀氨酸-甘氨酸-半胱氨酸 (Glutamate-Cysteine-Glycine) 共同組成硫醇類 (Thiol) 的三肽 (tripeptide)，可分為還原態及氧化態兩種，主要是細胞內的抗氧化劑，特別是中樞神經系統對抗氧化劑的防線 (Agarwal and Shukla, 1999)。穀胱甘肽可直接對抗活氧分子及自由基的氧化傷害，還原態穀胱甘肽可藉由分子上的硫醇基和活氧分子或自由基作用，即被氧化成氧化態的穀胱甘肽 (GS-SG, GSSG)。當 GSH/GSSG 比例上升時，表示內生性或外來性的氧化劑可以被有效的移除，其反應式如附錄二 (A) (Keelan *et al.*, 2001)。

穀胱甘肽過氧化氫酶 (Glutathione peroxidase, GPx) 是一種四聚體結構，因其酵素活化端位於 selenocysteine (Sec) 上，故又稱作 selenoenzyme (Cotgreave *et al.*, 1992)。穀胱甘肽過氧化氫酶需要以 Se 來維持其活性，在不同細胞中，其所需的 Se 濃度亦有不同。如在一個缺乏 Se 的鼠肝中，發現並不具有穀胱甘肽過氧化氫酶的活性 (Hafeman *et al.*, 1974)。穀胱甘肽過氧化氫酶可協助穀胱甘肽迅速和過氧化物結合，形成氧化態的穀胱甘肽及氫離子。當細胞遭受到氧化壓力時，可快速移除氧化物，其反應式如附錄二 (B) (Lawrance and Burk, 1976)。

穀胱甘肽還原酶 (Glutathione reductase, GR) 則是藉 NADPH 將氧化態穀胱甘肽還原成還原態穀胱甘肽，用來平衡還原態穀胱甘肽的濃度，其反應式如附錄二 (C) (Carlberg and Mannervik, 1981)。

觸酶 (Catalase) 具有以下兩種功能：催化 (catalytic activity) 及過氧化活性 (peroxidic activity)。在催化作用方面，可將過氧化氫催化成水及氧分子 (反應式如附錄二 (D))；此外，觸酶可將 H 離子的提供者進行氧化作用，這類的分子如甲醇及乙醇等，反應式如附錄二 (E) (Aebi, 1947)。

穀胱甘肽-硫-轉移酶 (glutathione-S-transferase; GST) 是一種利用穀胱甘肽當作基質，當細胞內或細胞外毒物 (xenobiotics) 經代謝

後的產物侵害細胞內的功能性分子時，GST 會催化穀胱甘肽上的硫醇基和這些毒物結合，增加水溶性進而排出體外。GST 的蛋白質序列上可分為兩個區域，一為穀胱甘肽結合的 N 端，另一為厭水性外毒物結合的 C 端 (Dirr *et al.*, 1994 ; Wilce *et al.*, 1995 ; Armstrong, 1997) 。 GST 與 CDNB (2, 4-Dinitrochlorobenzene) 反應式如附錄二 (F) 。

超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase、SOD) 是一種分佈甚廣的酵素，可破壞超氧化物自由基 (O_2^-)，生成過氧化氫及氧分子。超氧化物歧化酶可分為 Cu/Zn-SOD (SOD1)、Mn-SOD (SOD2) 和 Extracellular SOD (SOD3)。(1) Cu/Zn-SOD 存在於細胞質內協助調控自由基的轉換；(2) Mn-SOD 則存在於粒線體及葉綠體內協助自由基轉換；(3) Extracellular SOD 為協助細胞外的自由基轉換。意指 SOD 酵素可以在細胞質、粒線體及細胞膜上，將活氧分子及自由基有效地移除，其反應式如附錄二 (G) (Giuliano *et al.*, 2003) 。

過去的研究亦顯示動物體內的基礎代謝越快則越易產生活氧分子。這些過度產生的活氧分子容易造成蛋白質及 DNA 的傷害，隨著年紀增長而累積許多突變及缺失，這樣的情形特別是在粒線體 DNA 中被發現 (Nohl *et al.*, 1998 ; Lass and Sohal, 1999 ; Barja and Herrero, 2000) 。人類的細胞中約有上百至一千的粒線體，每個粒線體約有 2 至 10 個粒線體 DNA 複製數 (Calabrese *et al.*, 2005) 。此外，粒線體

DNA 較其他的核內 DNA 容易產生突變，主要因為粒線體 DNA 缺乏一些保護蛋白的保護（如組蛋白）及高效能修復系統（Richter and Schweizer, 1997）。因此，若將粒線體 DNA 和核內 DNA 一起放入高活氧分子或自由基的環境中，粒線體 DNA 的突變速度為核內 DNA 的 10 倍以上（Calabrese *et al.*, 2005）。目前已有超過 20 種粒線體 DNA 缺失形式存在於老化的人類組織中，其中帕金森氏症的病人腦中是最早被發表出這種粒線體 DNA 缺失（Ozawa *et al.*, 1990）。一般而言，當粒線體或粒線體 DNA 受到傷害時，細胞會進行粒線體或 DNA 的複製，然而粒線體 DNA 進行複製的第一步驟為轉錄，若受到過多外來的壓力時（如賀爾蒙或活氧分子），則會直接阻斷此轉錄反應，進而影響粒線體 DNA 的複製（Moraes, 2001）。所以在具有粒線體 DNA 缺失的病人組織中發現，粒線體的產生並不會伴隨著粒線體 DNA 複製數的增加（Moraes, 2001）。因此，粒線體 DNA 的複製數常被用來觀察細胞遭受到壓力時，其粒線體 DNA 受到傷害的程度

本實驗室過去的研究顯示攜帶有全長 SCA3/MJD-78Q 的 SK-N-SH-MJD78 突變神經細胞株，遭受到弱氧化劑（*t*-butyl hydroperoxide；tBH）的處理時，較正常的親代 SK-N-SH 細胞容易死亡。結果顯示攜帶有 MJD78Q 突變的 SK-N-SH 細胞比正常的 SK-N-SH 細胞遭受較大的氧化壓力（Wen *et al.*, 2003）。此外，我們觀察 SK-N-SH-MJD78 及

COS-7-MJD78-GFP 突變細胞株，均發現其 Hsp27 的表達量，與親代 SK-N-SH 及攜帶有全長正常 MJD26Q 蛋白的 COS-7-MJD26-GFP 細胞株比較，均顯著下降，顯示在我們的細胞模型中，突變細胞株利用 Hsp27 蛋白對抗活氧分子及自由基的能力下降 (Wen *et al.*, 2003; Wen *et al.*, 未發表)。然而對於含有突變蛋白的細胞株中，為何會呈現較大的氧化壓力，機制目前尚不清楚，因此我利用抗氧化系統中的非酵素及酵素層級，觀察 SCA3 細胞模型在正常培養下，其氧化還原的變化。此外，我亦利用粒線體 DNA 複製數觀察在 SK-N-SH 細胞株在有無突變 ataxin-3 的情況下，其數目的變化。

材料與方法

一、SCA3 細胞模型

SK-N-SH 是一種人類腫瘤神經細胞株（由台中榮民總醫院研究教學部徐士蘭博士提供），SK-N-SH-MJD78 則為實驗室構築的 SCA3 突變神經細胞株，可以長期穩定表達 78 個多醯麩胺酸全長突變 ataxin-3 蛋白（Wen *et al.*, 2003）。COS-7 是一種猴子腎臟纖維母細胞株，COS-7-MJD26Q-GFP、COS-7-MJD78Q-GFP 則為實驗室構築的 SCA3 正常與突變纖維細胞株（Wen *et al.*, 未發表），分別可以長期穩定表達 26 個多醯麩胺酸全長正常 ataxin-3 蛋白，及 78 個多醯麩胺酸全長突變 ataxin-3 蛋白。

二、穀胱甘肽的濃度測定

(1) 細胞培養及胞內外穀胱甘肽收集

於 6 公分培養皿中種入適量的細胞株，並培養於 37°C、5% CO₂ 環境下，使其於 2 天後約八分滿，分別收集胞外及胞內穀胱甘肽。(1) 胞外穀胱甘肽的收集：取出培養細胞兩天後的培養液 1.2 ml，並於 3000 rpm 轉速下離心 5 分鐘，避免殘留的細胞。將離心後的上清液取出 400 μ l 分裝兩管，並加入 400 μ l 的 10% PCA（Perchloric Acid），使 PCA 的末濃度為 5%。靜置 30 分鐘後，於室溫下以 8000 rpm 下離心

10 分鐘。分別取出 400 λ 的上清液加入 40 λ IAA (Iodoacetic Acid, 41.6 mg / 200 λ , 需新鮮配製, 並於 10 分鐘內使用完畢)。小心加入 KHCO₃ 中和酸性 (酸鹼值須達 9.0), 直至不起泡後, 於 4°C 下暗反應 15 分鐘。加入 440 λ 的 3% FDNB (2,4- dinitrofluoro-benzene, 以 100% 酒精稀釋成 3%) 混合均勻, 於 4°C 下隔夜, 使反應完全。若未馬上檢測, 則須在反應隔夜後, 以 13000 rpm 離心 30 分鐘, 取出上清液, 置入 -80°C 冰箱中保存。(2) 胞內穀胱甘肽的收集: 去除培養液, 以 1X PBS 小心清洗 3 次後, 將清洗液去除乾淨。加入 500 λ 的 5% PCA。靜置 30 分鐘後, 將上清液轉至離心管中, 於室溫下以 8000 rpm 下離心 10 分鐘。將離心後的上清液分別取出 400 λ 的上清液加入 40 λ IAA。小心加入 KHCO₃ 至不起泡後, 於 4°C 下暗反應 15 分鐘。加入 440 λ 的 3% FDNB 混合均勻, 於 4°C 下反應隔夜。若未馬上檢測, 則須在反應隔夜後, 以 13000 rpm 離心 30 分鐘, 取出上清液, 置入 -80°C 冰箱中保存 (Reed *et al.*, 1980)。

(2) 蛋白濃度測定

將去除 5% PCA 後的細胞刮下, 以 1ml 1N 的 NaOH 於 4°C 冰箱中靜置隔夜, 在以 Protein-assay kit (BioRad) 檢定蛋白濃度, 作為穀胱甘肽分析後的校正。

(3) HPLC 分析 (本分析方法由彰化基督教醫院郭珍菱協助分析)

注射 50 λ 穀胱甘肽檢體到 HPLC 系統中分析，結果依照穀胱甘肽標準品在 HPLC 系統中分析所得到的面積計算濃度，最後以 nmole/mg protein 表示。HPLC 系統：L-7100 intelligent pump，L-7400 UV-VIS detector (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)；Mobile phase: A: 80% methanol，B: 80% methanol + 20% stock solvent B (272 g CH₃COONa，621 ml CH₃COOH，189 ml d₂H₂O)；Detector wavelength: 365 nm；Sensitivity: 2.0 AUFS，HPLC column: #132-2043 Aminopropyl 5 μ mSn C1075 (CUSTOM LC, INC, America)。

穀胱甘肽計算公式如下：

$$\text{GSH(GSSG)濃度 (mM)} = \frac{[\text{sample area}]}{[\text{GSH(GSSG) standard area}]} \times 1.25 \times 8$$

$$\text{GSH(GSSG)濃度 (nmole/mg protein)} = \frac{[\text{GSH(GSSG)濃度 (mM)}]}{[50\lambda \times \text{protein} (\mu\text{g}/\lambda)]}$$

三、抗氧化酵素分析

(1) 細胞培養與檢體備置

在 9-cm 培養皿中，分別種入適量的細胞，於 37°C、5% CO₂ 環境下培養 2 天後約八分滿。將足量的細胞以 1X PBS 略為清洗兩次後，並加入 1 ml 的 1X PBS，以塑膠刮板將細胞刮下(避免使用 trypsin 收集)，於室溫 2000 rpm 的轉速離心 10 分鐘。去掉上清液後，加入 1080 μ l 的 20 mM PPB (Potassium Phosphate buffer, pH7.0)，接著加入 120 μ l 的 200 mM BHT (butylatedhydroxytoluene；以 100%酒精回溶)，立即放入-80°C，並於一個月內檢測完畢。檢測酵素前，將凍於-80°C 的檢體取出，於 4°C 下以 12500 rpm 離心 30 分鐘，取出上清液並分裝成 5 小管，分別檢測 GPx、GR、GST、CAT、SOD，若未立即檢測的酵素部分，則應迅速置入-80°C 保存至下次檢測時在取出，同一支檢體避免重複解凍。蛋白濃度測定則於分裝後取出 10 μ l 的檢體，以 Protein Assay Solution (Bio-rad) 檢定。此外，利用分光光度計檢測檢體在各酵素中的活性。將分光光度計 (Hitach, U2001) 接上冷水浴水流機，依照各種酵素的反應溫度控溫 1 小時以上。各種酵素使用的反應緩衝液需在冷水浴中控溫約半小時，使其溫度達平衡後方可使用。

(2) 胱甘肽過氧化氫酶活性測定

加入 800 λ 反應緩衝液 (Reaction Buffer : 100 mM Potassium Phosphate buffer、1 mM EDTA、1 mM NaN₃、0.2 mM NADPH、0.25 U/ml GSH reductase、1 mM GSH ; pH7.0) 於石英管，並加入 100 λ 檢體或 20 mM Potassium Phosphate buffer 反應 5 min 後，加入 100 λ 2.5 mM H₂O₂ 於分光光度計中 25°C 反應 3 min，檢測 NADPH 降解速度 (Lawrence and Burk, 1976)。

NADPH 的體積莫耳濃度吸光值為 $6.22 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

計算公式： $[(A_0 - A_{180} - \text{Blank})/3]/6220 \times [\text{TV}/(\text{SV} \times \text{pro.})]$

A : absorptivity

B : Blank absorbance

TV and SV : total and sample volume

pro. : protein concentration (mg/ml)

表示單位為 nmole NADPH/min/mg pro.

(3) 穀胱甘肽還原酶活性測定

加入 900 λ 反應緩衝液 (Reaction Buffer : 100 mM Potassium Phosphate buffer、1 mM MgCl₂、5 mM GSSG、0.1 mM NADPH NADPH ; pH7.0) 於石英管中，並加入 100 λ 檢體或 20 mM Potassium Phosphate buffer 於分光光度計中 25°C 反應 5 min，檢測 NADPH 降解速度 (Bellomo *et al.*, 1987)。

計算公式： $[(A_0-A_{300}-\text{Blank})/5]/6220 \times [TV/(SV \times \text{pro.})]$
表示單位為 nmole NADPH/min/mg pro.

(4) 穀胱甘肽-硫-轉移酶活性測定

加入 880 λ 反應緩衝液 (Reaction Buffer : 100 mM Potassium Phosphate buffer、1 mM GSH ; pH7.0) 於石英管中，並加入 100 λ 檢體或 20 mM Potassium Phosphate buffer 後，最後加入 20 λ 50 mM CDNB (2, 4-Dinitrochlorobenzene，溶於 100% EtOH)，於分光光度計中以 25 $^{\circ}\text{C}$ 反應 5 min，檢測 CDNB-conjugated form 形成速度 (Habig *et al.*, 1974)。

CDNB 的體積莫耳濃度吸光值為 $9.6 \text{ mL mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
計算公式： $[(A_{300}-A_0-\text{Blank})/5]/9.6 \times [TV/(SV \times \text{pro.})]$
表示單位為 nmole CDNB-conjugated-form/min/ mg protein

(5) 過氧化氫酶活性測定

加入 600 λ 反應緩衝液 (Reaction Buffer : 20 mM Potassium Phosphate buffer ; pH7.0) 於石英管中，並加入 100 λ 檢體或 20 mM Potassium Phosphate buffer，最後加入 350 λ 30 mM H_2O_2 ，於分光光度計中以 20 $^{\circ}\text{C}$ 反應 3 min，檢測 H_2O_2 降解速度 (Aebi, 1947)。

計算公式： $K/\text{mg pro.} = 1/180 \times [\text{LN}(A_0/A_{180}) - \text{LN}(\text{Blank})]/(\text{pro.} \times \text{SV})$
表示單位為 $\text{K}/\text{mg protein sec}^{-1}$

(6) 超氧化物歧化酶活性測定

Superoxide Dismutase Assay Kit (Cayman, catalog number: 706002)

配製 SOD 標準液

Tube	SOD stock buffer (λ)	1X sample buffer (λ)	SOD activity (U/ml)
A	0	100	0
B	2	98	0.025
C	4	96	0.050
D	8	92	0.100
E	12	88	0.150
F	16	84	0.200
G	20	80	0.250

200 λ Radical detector Buffer 加入 10 λ 檢體或是個別的 SOD 標準液後，再加入 20 λ 的 Xanthine oxidase 酵素液，小心混勻後以錫箔紙包好，利用震盪器於 25 rpm 下低速搖晃 20 分鐘。接著利用 ELISA 於 450 nm 及 25 $^{\circ}$ C 下檢測。

計算公式：

$$LR_x \text{ (linearized rate)} = ABS_x / ABS_0$$

$$\text{Ex: } LR_0 = ABS_0 / ABS_0 = 1$$

$$SOD \text{ (U/ml)} = x = (y-b)/a \times (0.23/0.01)$$

0.23 指全部體積；0.01 指檢體體積

最後以 SOD/protein (U/mg) 表示

四、西方點墨法分析穀胱甘肽還原酶

於正常培養下的 COS-7-MJD26-GFP 及 COS-7-MJD78-GFP 細胞株，利用塑膠刮板將細胞刮下後，進行細胞裂解並收取蛋白。蛋白以 Protein assay kit (Bio-Rad) 進行定量後，取 30 μ g 蛋白進行 12% SDS-PAGE 膠體電泳分析。上層膠於 90 伏特的電壓下，跑 30 分鐘；而下層膠則於 110 伏特電壓下，將 32.5 kD 分子量跑掉為止。將 SDS-PAGE 膠小心拆下後，以硝化纖維膜 (nitrocellulose membrane, HybondTM, Amersham Pharmacia Biotech) 進行轉漬。轉漬完成的硝化纖維膜浸泡於 5% 脫脂奶粉/TTBS 緩衝液中，於室溫下搖晃 1 小時，以進行膜上孔洞的填補。將 5% 脫脂奶粉/TTBS 緩衝液倒去，加入以 1% 脫脂奶粉/TTBS 緩衝液稀釋 2000 倍的 GR polyclonal 抗體 (ab16801, abcam)，於 4 $^{\circ}$ C 下搖晃隔夜。回收 1 抗後，以 TTBS 緩衝液於室溫下搖晃 5 分鐘，並重複 3 次。加入以 1% 脫脂奶粉/TTBS 緩衝液稀釋 20000 倍的 anti-rabbit IgG-HRP，於室溫下搖晃 1 小時。倒去二抗，以 TTBS 緩衝液於室溫下搖晃 5 分鐘，並重複 3 次。加入冷光呈色劑 (ECL, Pierce) 於室溫下搖晃 10 分鐘，倒去呈色劑後，以 X 光片 (Bio-Max, Kodak) 壓片，並以冷光強度調整壓片時間。

五、粒線體 DNA 基因複製數測定（本分析方法由彰化基督教醫院鄭文玲協助分析）

利用 PUREGENE kit 純化出粒線體 DNA 檢體，並且取 20 ng 檢體進行定量聚合酶連鎖反應（Q-PCR-LightCycler Instrument (Roche)）條件為 95°C/480 sec；95°C/10 sec，58°C/5 sec，72°C/14 sec，40 個循環。由於 PCR master mix reagent 中，Syber Green I 螢光物質會插入到雙股 DNA 上，隨著增幅反應（elongation）的執行，與目標基因 DNA 量的倍增，偵測器所能偵測到的螢光值則越強，最後利用軟體計算 ND1 基因及 β -globin 基因增量之 Ct 值 (Δ Ct)，即可推算出細胞之粒線體 DNA 基因複製數。此外以人類血癌細胞株 K562 DNA 作為內控制組（internal control）。定量聚合酶連鎖反應中，用以夾取粒線體 ND1 上的引子分別為（1）mtF：caacatacccatggccaacct，及（2）mtR：gggctactacaacccttcgct。因為無法確定抽到的 DNA 完全為粒線體 DNA，故以 β -globin 夾取核內 DNA，而核內 DNA 引子分別為（1） β -globinF：gaagagccaaggacaggtac，及（2） β -globinR：ggtgaacgtggatgaagttg。最後值 $(2^{[(ND1\ Ct) - (\beta\text{-globin}\ Ct) + 1]})$ 以 log 表示之。

結果

一、SK-N-SH 神經母細胞株與 SK-N-SH-MJD78 突變細胞株在不同環境培養下之穀胱甘肽表達

從實驗室過去對於 Hsp27 及弱氧化刺激的觀察中，發現攜帶有全長 78 個多醯麩胺酸突變蛋白的 SK-N-SH-MJD78 突變細胞株，抵抗氧化物的能力均顯著下降。為了了解含有突變 ataxin-3 細胞中，還原態的穀胱甘肽含量與不含突變蛋白細胞的差異，我們利用 GSH/GSSG 方法來檢測親代 SK-N-SH 及 SK-N-SH-MJD78 突變細胞株，在不同環境培養下的氧化壓力。在抗氧化系統中還原態的穀胱甘肽在抗氧化系統中，是最主要移除氧化物的分子，也是用來觀察氧化壓力的重要指標，當還原態的穀胱甘肽被轉換成氧化態的穀胱甘肽 (GSSG) 時，若無法迅速地被還原的話，則細胞易受到氧化物的攻擊。故當還原態穀胱甘肽的濃度高時，代表內生性或外來的氧化物可被立即地移除。將每次收下的親代 SK-N-SH 神經細胞株檢體作為控制組，比較親代 SK-N-SH 與繼代培養後之 SK-N-SH-MJD78 細胞株中穀胱甘肽相對含量，本實驗重複四次至 6 次。由圖一 (A) 發現在正常培養下，第 50 至 85 繼代培養之突變細胞株的 GSH/GSSG 約下降 95%，而第 120 至

160 繼代培養之突變細胞株的 GSH/GSSG 約下降 68%。另一方面，細胞培養於去除血清的培養基中，第 50 至 85 繼代培養之突變細胞株，其 GSH/GSSG 約下降 76%，而第 120 至 160 繼代培養之突變細胞株的 GSH/GSSG 約下降 88%。此外，細胞在遭受 1 μ M tBH 弱氧化劑刺激 24 小時下，發現第 50 至 85 繼代培養之突變細胞株的 GSH/GSSG 約下降 73%，而第 120 至 160 繼代培養之突變細胞株的 GSH/GSSG 約下降 67%。上述結果，經由 t-Test 分析結果發現 GSH/GSSG 比例在不同繼代培養之 SK-N-SH-MJD78 突變細胞株均較親代 SK-N-SH 神經細胞株顯著下降，顯示突變細胞株所承受的胞內氧化壓力大於親代細胞株。此外，由正常環境及無血清環境下看來，GSH/GSSG 的結果並不受血清影響。且在正常培養、無血清及氧化刺激環境下，親代 SK-N-SH 與突變細胞株的穀胱甘肽表達，並無顯著改變，弱氧化劑的濃度有可能尚未啟動抗氧化機制。

由於細胞中總穀胱甘肽含量 (GSH + 2GSSG) 可進一步了解 GSH/GSSG 的降低是否由於穀胱甘肽減少所致。圖一 (B) 顯示在正常培養下，第 50 至 85 繼代培養之突變細胞株的穀胱甘肽總含量約下降 78%，而第 120 至 160 繼代培養之突變細胞株的穀胱甘肽總含量約下降 61%。於去除血清後，第 50 至 85 繼代培養之突變細胞株的穀胱甘肽總含量約下降 67%，而第 120 至 160 繼代培養之突變細胞株的穀

胱甘肽總含量約下降 70%。此外，將細胞遭受 1 μ M tBH 弱氧化劑刺激 24 小時下，發現第 50 至 85 繼代培養之突變細胞株的穀胱甘肽總含量約下降 73%，而第 120 至 160 繼代培養之突變細胞株的穀胱甘肽總含量約下降 68%。顯示突變細胞株在不同環境培養下，其穀胱甘肽總含量均顯著低於親代細胞株，意指突變細胞株因穀胱甘肽的減少而較親代細胞株不易清除氧化物，而產生較大的胞內氧化壓力。在我們 SK-N-SH-MJD 細胞模型中，無論在 GSH/GSSG 或是穀胱甘肽總量的結果中，顯示攜帶有 78 個多醯麩胺酸的突變 ataxin-3 細胞株其氧化壓力明顯高於親代 SK-N-SH 細胞株。

二、SK-N-SH-MJD 細胞模型在穀胱甘肽過氧化氫酶的相對活性

從 SK-N-SH-MJD 細胞模型中，我們觀察到當 SK-N-SH 細胞株在含有突變的 ataxin-3 蛋白時，非酵素層次的穀胱甘肽有明顯下降。因此我們亦利用此細胞模型來觀察穀胱甘肽的下降是否和酵素層次的分子有關。將 SK-N-SH-MJD 細胞模型在正常培養下 48 小時，觀察當細胞株在含或不含有突變 ataxin-3 蛋白情況下，是否在酵素活性上有差異。這些酵素層次分子分別為穀胱甘肽過氧化氫酶、穀胱甘肽還原酶、觸酶、穀胱甘肽-硫-轉移酶及超氧化物歧化酶。

將每次收下的親代 SK-N-SH 細胞株檢體作為控制組，比較不同繼代培養之 SK-N-SH-MJD78 突變細胞株，在正常培養下穀胱甘肽過氧化氫酶活性的差異，本實驗重複三次。由圖二發現穀胱甘肽過氧化氫酶相對比例在繼代培養之 SK-N-SH-MJD78 突變細胞株較親代 SK-N-SH 細胞株顯著下降。在繼代培養第 40 至 70 代的突變細胞株約較親代細胞株下降 49%，繼代培養第 252 至 272 代的突變細胞株約較親代細胞株下降 39%。結果顯示，攜帶突變 ataxin-3 的 SK-N-SH-MJD78 和親代的 SK-N-SH 細胞相比較，在面對過多的過氧化氫時，透過穀胱甘肽過氧化氫酶將過氧化氫轉換成水及氧分子的能力下降。

三、SK-N-SH-MJD 細胞模型在穀胱甘肽還原酶的相對活性

觀察穀胱甘肽過氧化氫酶在 SK-N-SH-MJD 模型中的相對活性後，我們繼續檢視穀胱甘肽還原酶對於還原氧化態穀胱甘肽的能力，是否跟造成還原態穀胱甘肽濃度降低有關。從圖三發現，繼代培養第 40 代至 70 代的突變細胞株，較親代 SK-N-SH 正常細胞株約顯著下降 26% 的活性，顯示第 40 代至 70 代的突變細胞株還原氧化型穀胱甘肽的能力，較正常細胞差。但有趣的是，當突變細胞培養達第 250 代至 272 代時，其還原氧化態穀胱甘肽的能力較早期突變細胞株回復至與正常細胞相近，甚至有較高的傾向。結果顯示，在早期第 40 代至

70 代的突變細胞株中，其利用穀胱甘肽還原酶轉換氧化態穀胱甘肽成還原態穀胱甘肽的能力下降，故而無法維持足夠的還原態穀胱甘肽來移除過氧化氫。

四、SK-N-SH-MJD 細胞模型在觸酶的相對活性

除了觀察穀胱甘肽過氧化氫酶的活性外，我們同時也觀察觸酶（亦可分解過氧化氫；附錄二（D））在正常培養下的活性變化。從圖四發現，繼代培養第 40 代至 70 代的突變 SK-N-SH-MJD78 細胞株，其觸酶相對活性較親代 SK-N-SH 正常細胞株約顯著下降 48%。當突變細胞培養達第 250 代至 272 代時，其觸酶相對活性較親代 SK-N-SH 正常細胞株則仍顯著下降 56%。這個結果顯示，無論在早期或繼代培養達第 250 代至 272 代的突變細胞株中，其利用觸酶轉換過氧化氫形成水及氧分子的能力下降。上述結果顯示，攜帶有 78 個多醯麩胺酸全長 ataxin-3 的 SK-N-SH-MJD78，其觸酶活性均顯著低於親代，以致無法有效移除過氧化氫。

五、SK-N-SH-MJD 細胞模型在穀胱甘肽-硫-轉移酶的相對活性

細胞在代謝過程中所產生的親電子中心產物，或是經由食物吸收

外毒物的分子，均可以藉由穀胱甘肽-硫-轉移酶的催化，而與還原態穀胱甘肽產生共軛產物，此共軛產物即能容易地被胞內其他分子所辨識，透過水解作用釋放於細胞外。因此我們觀察當細胞有無攜帶突變 ataxin-3 情況下，其穀胱甘肽-硫-轉移酶的變化。從圖五發現，繼代培養第 40 代至 70 代的突變細胞株、第 250 代至 272 代的突變細胞株與親代 SK-N-SH 正常細胞株，在穀胱甘肽-硫-轉移酶相對活性中並無顯著差異。結果顯示，攜帶有 78 個多醯麩胺酸全長 ataxin-3 突變蛋白的 SK-N-SH-MJD78 其穀胱甘肽-硫-轉移酶移除內生性或外來毒物的能力，和親代 SK-N-SH 相似。

六、SK-N-SH-MJD 細胞模型在超氧化物歧化酶的相對活性

超氧化物歧化酶可協助細胞將活氧分子或自由基等轉換成過氧化氫，避免細胞直接受到這些有毒分子的攻擊。先前經由其他抗氧化酵素的探討，發現過氧化氫分子無法有效地在突變細胞中被移除。因此我們也想知道超氧化物歧化酶的活性，是否會在突變細胞中存在差異。從圖六發現，繼代培養第 40 代至 70 代的突變細胞株，其總超氧化物歧化酶相對活性較親代 SK-N-SH 正常細胞株約顯著下降 72%。當突變細胞培養達第 250 代至 272 代時，其總超氧化物歧化酶相對活性較親代

SK-N-SH 正常細胞株，也約顯著下降 69%。結果顯示，無論在早期或繼代培養達第 250 代至 272 代的突變細胞株中，其利用超氧化物歧化酶轉換過氧化氫形成水及氧分子的能力下降。綜合結果顯示，攜帶有突變 ataxin-3 的 SK-N-SH-MJD78，其超氧化物歧化酶活性，均顯著低於親代，以致無法有效轉換自由基或活氧分子成過氧化氫。

七、COS-7-MJD-GFP 細胞模型在正常培養下之穀胱甘肽表達

從 SK-N-SH-MJD 細胞模型中，我們觀察到當 SK-N-SH 細胞株在含有突變的 ataxin-3 蛋白時，無論在 GSH/GSSG 或穀胱甘肽總量的相對含量均有明顯下降。因此我們亦利用 COS-7-MJD-GFP 細胞模型在正常培養下 48 小時，觀察是否當 COS-7 細胞株在含有突變 ataxin-3 蛋白情況下，是否也會在 GSH/GSSG 或穀胱甘肽總量也有相同結果。

將收下的 COS-7-MJD26-GFP 正常細胞株檢體作為控制組，比較 COS-7-MJD78-GFP 突變細胞株在正常培養下的差異。此外，COS-7-GFP 為不含任何外來 ataxin-3 蛋白的細胞株。目前從兩次的結果中，我們發現 COS-7-MJD78-GFP 細胞株的 GSH/GSSG 相對比例與總穀胱甘肽含量，可能較 COS-7-MJD26-GFP 均有顯著下降的趨勢（結果未附）。此部分仍需增加樣本數，以確認我們的結果。

八、COS-7-MJD-GFP 細胞模型在抗氧化酵素的相對活性

從 SK-N-SH-MJD 細胞模型中，我們發現 SK-N-SH 細胞株在含有突變的 ataxin-3 蛋白時，無論在非酵素層次的穀胱甘肽，或是酵素層次的穀胱甘肽過氧化氫酶、穀胱甘肽還原酶、觸酶及超氧化物歧化酶均有顯著下降。而在 COS-7-MJD78-GFP 細胞株的 GSH/GSSG 相對比例與總穀胱甘肽含量，均可能顯著低於 COS-7-MJD26-GFP 細胞株的表達（結果未附）。因此，我們亦將 COS-7-MJD-GFP 細胞模型在正常培養下 48 小時，比較細胞株在有無突變 ataxin-3 蛋白情況下，是否在酵素活性上也有差異。

將每次收下的 COS-7-MJD26-GFP 正常細胞株檢體作為控制組，比較 COS-7-MJD78-GFP 突變細胞株，在正常培養下穀胱甘肽過氧化氫酶、穀胱甘肽還原酶、觸酶、穀胱甘肽硫-轉移酶及超氧化物歧化酶活性的差異，各項實驗重複三次。結果顯示，穀胱甘肽過氧化氫酶在 COS-7-MJD-GFP 細胞模型中並無顯著差異（圖七）。此外，穀胱甘肽過氧化氫酶將還原態穀胱甘肽轉換成氧化態穀胱甘肽後，在藉由穀胱甘肽還原酶轉換成還原態穀胱甘肽。在 COS-7-MJD78-GFP 突變細胞的穀胱甘肽還原酶活性顯著低於親代 COS-7-MJD26 細胞株（圖八）。此結果符合 SK-N-SH-MJD 細胞模型的發現，顯示含有突變 ataxin-3

的細胞株無法有效轉換氧化態穀胱甘肽，以致無法有效移除過氧化氫。除了穀胱甘肽過氧化氫酶外，觸酶是另一種協助細胞分解過氧化氫的酵素，從 SK-N-SH-MJD 細胞模型中發現，當 SK-N-SH 表達突變 ataxin-3 時，觸酶的活性較親代細胞株顯著下降，導致細胞無法有效地移除過氧化氫，此結果亦在 COS-7- MJD78-GFP 與 COS-7-MJD26-GFP 細胞株中觀察到（圖九）。除了還原態穀胱甘肽、穀胱甘肽過氧化氫酶及觸酶，可以降低過氧化氫對於細胞的傷害外，穀胱甘肽-硫-轉移酶是一種協助細胞移除內生性及外來毒物的酵素。從 SK-N-SH-MJD 細胞模型中發現，當 SK-N-SH 在有無突變 ataxin-3 的情況下，其穀胱甘肽-硫-轉移酶的活性並無差異，而此結果亦在 COS-7-MJD26-GFP 及 COS-7-MJD78-GFP 細胞株中觀察到（圖十）。而超氧化物歧化酶則將活氧分子或自由基等轉換成過氧化氫，避免細胞直接受到自由基的攻擊。從 SK-N-SH-MJD 細胞模型中發現，當 SK-N-SH 表達突變 ataxin-3 時，其超氧化物歧化酶相對活性較親代細胞株顯著下降，而此結果亦在 COS-7-MJD78-GFP 突變細胞株中觀察到（圖十一（A））。由於突變 ataxin-3 會導致粒線體促使細胞死亡（Tsai *et al.*, 2004），我們想進而觀察在粒線體內的超氧化物歧化酶相對活性。結果顯示在正常培養下，COS-7-MJD78-GFP 突變細胞株和 COS-7-MJD26-GFP 正常細胞株相比較，其粒線體形式的超氧化物歧化酶相對活性顯著

下降 28% (圖十一 (B))。這個結果顯示此突變細胞株利用粒線體內的超氧化物歧化酶，轉換過氧化氫的能力亦顯著降低。綜合結果顯示，在攜帶有突變 ataxin-3 的 SK-N-SH-MJD78 或 COS-7-MJD78-GFP 突變細胞株中，其穀胱甘肽還原酶、觸酶及超氧化物歧化酶活性，均顯著低於親代或正常細胞株，以致無法有效轉換自由基或活氧分子成過氧化氫，並且因觸酶及穀胱甘肽還原酶的降低，致使過氧化氫無法有效地移除，導致突變細胞內的氧化壓力增加。此外在 COS-7-MJD-GFP 細胞模型中，觀察總超氧化物歧化酶及粒線體形式的超氧化物歧化酶相對活性，發現突變 ataxin-3 可能藉由影響粒線體形式的超氧化物歧化酶的活性，導致粒線體中氧化壓力的增加。

九、COS-7-MJD26-GFP 與 COS-7-MJD78-GFP 細胞株在穀胱甘肽還原酶的蛋白表達

經過上述各酵素活性分析後，發現攜帶有突變 ataxin-3 的細胞在穀胱甘肽還原酶、觸酶及超氧化物歧化酶均有顯著下降。因此我們想了解在蛋白質層次分析下，這些酵素的蛋白表達量是否有差異。我分別觀察穀胱甘肽過氧化氫酶、穀胱甘肽還原酶、觸酶、穀胱甘肽-硫-轉移酶及三型超氧化物歧化酶的蛋白，在 COS-7-MJD26-GFP 與 COS-7-

MJD78-GFP 細胞中的表達。從圖十二的西方點墨法分析結果發現，除了穀胱甘肽還原酶在 COS-7-MJD78-GFP 突變細胞株較 COS-7-MJD26-GFP 正常細胞株有明顯下降外（如圖所示， β -actin 為蛋白控制組），其他酵素並無差異（結果未附）。顯示 COS-7-MJD78-GFP 突變細胞株的穀胱甘肽還原酶，不管在活性或是蛋白層次下均有下降，而影響其協助氧化態穀胱甘肽還原成還原態穀胱甘肽的能力。

十、親代 SK-N-SH 神經細胞株與 SK-N-SH-MJD78 突變細胞株在正常培養下之粒線體 DNA 複製數

自超氧化物歧化酶轉換而來的過氧化氫分子，若與鐵或銅離子作用，則形成氫氧根自由基。這類的自由基會造成脂質、蛋白質或粒線體 DNA 的傷害。因此，當粒線體 DNA 受到傷害時，粒線體會傾向堆積突變或缺失的粒線體 DNA。所以粒線體 DNA 複製數常用來觀察細胞遭受壓力（如氧化壓力）及觀察粒線體 DNA 缺失的指標（Moraes, 2001），所以我們也觀察粒線體 DNA 複製數在正常與不同繼代培養下的突變細胞中是否不同。我將細胞於正常培養下培養兩天，利用 PUREGENE 套組將 DNA 純化（包含粒線體 DNA）後，與彰化基督教醫院血管暨基因體中心合作，利用定量 PCR 分析粒線體 DNA 的含

量。本實驗重複 9~11 次。結果顯示 (圖十三)，早期繼代培養之突變細胞株粒線體 DNA 複製數較正常細胞株減少。顯示早期繼代之突變細胞株的粒線體 DNA 受到傷害時，尚未有效的回復。

討論

本實驗室過去對於 SCA3 疾病致病機轉的研究，曾利用兩種長期表達突變 ataxin-3 的細胞株，SK-N-SH-MJD-78 及 COS-7-MJD78-GFP，研究發現 Hsp27 在表達突變 ataxin-3 細胞中，均顯著下降，這可能顯示突變細胞對抗活氧分子的能力下降 (Wen *et al.*, 2003)。過去的研究利用弱氧化劑 (tBH) 處理親代 SK-N-SH 及突變 SK-N-SH-MJD78 細胞株，發現攜帶有突變 ataxin-3 的細胞株容易死亡，顯示突變細胞較親代細胞株承受較大的氧化壓力 (Wen *et al.*, 2003)。過去在許多漸進式神經退化性疾病的研究中發現，還原態穀胱甘肽在細胞體內無法達平衡，而致使病兆產生 (Ballatori *et al.*, 2005)。此外，穀胱甘肽對於基因表達的調控、細胞凋亡，及協助細胞在膜上轉移內生性及外來分子，也扮演很重要的角色 (Hammond *et al.*, 2001)。以往對於 SCA3 疾病致病機轉與細胞氧化還原能力的相關研究，並沒有系統性的報導。因此，我們希望藉由穩定表達突變 ataxin-3 的細胞株，進行一系列細胞氧化還原能力的研究，測量穀胱甘肽的結果中發現 (圖一 (A))，SK-N-SH 細胞株在攜帶有 78 個多醯麩胺酸突變 ataxin-3 細胞株在 GSH/GSSG 明顯較親代 SK-N-SH 細胞株下降，表示該細胞株在面對活氧分子或自由基的攻擊時，將這些分子立即移除的能力下