

編號：CCMP95-RD-201-1

以系統生物學研究平台探討中草藥防治敗血症之病理生理與治療機轉-以靈芝為例，結合基因體學、蛋白質體學與生物資訊學之研究

汪貴珍

國立中國醫藥研究所

摘要

敗血症是因感染而引起的複雜發炎反應，具高罹患率與死亡率；研發安全性高的防治藥物，實刻不容緩。本計畫利用系統生物學—基因體學、蛋白質體學及生物資訊學，以細胞與動物模型配合生化與病理藥理學分析，建立並驗證敗血症之系統生物平台與網絡建構，同時研究中草藥防治敗血症之分子、細胞到活體動物各層面的系統性藥理機制。

運用大鼠 cDNA 微陣列、二維電泳膠、介質輔助雷射脫附/游離飛行時間式質譜儀，以及細胞激素蛋白質陣列等分析，透過生物資訊學資料庫：生物訊息路徑 (BioCarta)、生物代謝路徑 (KEGG) 及基因註解與分類 (Gene Ontology) 進行注解；並以西方墨點法、qRT-PCR、siRNA 及 microRNA 等實驗，建立並驗證特定的訊息傳遞或功能路徑。

實驗結果顯示血管內皮細胞受到細菌內毒素刺激後，直接或間接改變 NF- κ B 上游 *Pias1* 基因及 SPA6 蛋白質的活性，及其下游基因 (*IL-1RN*、*IL-1 β* 及 *CD4*) 及蛋白質 (*IL-6* 及 *MCP-1*) 的表現；並引起抗發炎 (*IL-1RN*)、抗細胞程式性死亡 (*Rbpsun*) 及抗氧化 (*Mpo*、*PRDX1*、*SODM*、*FRIH* 及 *FRIL1*) 基因及蛋白質的表現。針對特定標的基因與蛋白質研究，發現靈芝、肝炎草、厚葉鐵線蓮、金絲草等中草藥成分具有保護作用。其中，靈芝的部分純化物具有雙向的免疫調節作用，肝炎草與金絲草之抗發炎活性成分為新化合物，厚葉鐵線蓮成分具選擇性抗炎作用。

關鍵詞：系統生物學、基因體學、蛋白質體學、生物資訊學、敗血症、新藥開發

Evaluation of Pathophysiological and Therapeutic Mechanisms of Herbal Medicines in the Prevention and Treatment of Sepsis by Systems Biology Research Platform: Studies on *Ganoderma lucidum* with a Combination of Genomics, Proteomics and Bioinformatics

Guei-Jane Wang

National Research Institute of Chinese Medicine

ABSTRACT

Sepsis describes a complex inflammatory response with high incidence and mortality that results from the infection and innate immune activation. Systems biology, including microarray, proteomics and bioinformatics, was used to establish the pathophysiological platform.

In the present study, the methods, including cDNA microarray, 2-DE and MALDI-TOF MS/MS, cytokine protein array and bioinformatic tools, combining with BioCarta, KEGG and Gene Ontology, were used to establish the systemic platform and the specific molecular detecting markers of sepsis. The effects of herbal medicines on gene and protein network were also examined by Western blotting, qRT-PCR, siRNA, microRNA, ELISA and other molecular biology analysis in *in vivo* and *in vitro* models.

In conclusion, the results showed that the proinflammatory cytokines (*IL-1b* and *IL-6*) and chemokine (*MCP-1*) can be up-regulated by lipopolysaccharide (LPS) through the activation of the NF- κ B signaling and transcription regulators (*SPA6* and *Pias1*) which can also regulate the activity of the NF- κ B signaling pathway. Interestingly, the endothelial cells can also up-regulate the mediators of anti-inflammation (*IL-1RN*), antiapoptosis (*Rbpsun*), and antioxidation (*Mpo*, *PRDX1*, *SODM*, *FRIH*, and *FRIL1*) to protect themselves against LPS treatment. The bioactive components have been isolated and identified from *Ganoderma lucidum*, *Murdannia bracteata*, *Clematis crassifolia*, *Pogonatherum crinitum* etc. Among them, *G. lucidum*

produced two-way immunomodulation in macrophages. The naturally new ingredients from *M. bracteata*, *C. crassifolia* and *P. crinitum* have potential in the prevention and treatment of disorders caused by inflammatory diseases.

Keywords: systems biology, genomics, proteomics, bioinformatics, sepsis, therapeutic drug development.

壹、前言

敗血症是因外傷、燒傷或病原菌感染而引起免疫系統活化的複雜發炎反應，亦是醫院重症加護病房常見的急症，引起敗血性休克和多重器官功能異常症候群等嚴重的臨床徵狀，其高罹患率與高死亡率，一直是醫藥界棘手的難題，研發安全性高的防治藥物，實刻不容緩。雖然目前對敗血症相關的研究不遺餘力，但目前臨床治療仍以抗生素、類固醇與支持性療法為主，敗血症之高罹患率，常為加護病房主要死因之一；研發安全性高的防治藥物，實刻不容緩。血管內皮細胞和巨噬細胞是人體對抗外界刺激或病原菌的防線之一，在發炎反應的生理及病理調控，扮演相當重要的角色。近年來，由於基因體學、蛋白質體學及生物資訊學的快速發展，使得發炎反應、敗血症或其他複雜疾病的研究，已從個別的致病標的，擴展為全面性的系統生物學研究，以巨觀的角度探討複雜或成因不明的疾病，可獲得整體性較深入的資料，對於疾病的防治，提供更多的貢獻。

長久以來，靈芝在傳統醫學上被視為滋補強壯、固本扶正的珍貴中草藥。研究報告指出，靈芝所含的特殊多醣體成分，可藉由增加抗體、誘導干擾素與增加免疫細胞，以強化免疫系統。我們先前的實驗結果顯示，靈芝萃取物也具有抑制細胞發炎的活性；另外，肝炎草、厚葉鐵線蓮、金絲草、咸豐草、小本山葡萄、黃金珠等多種中草藥的活性物質，也具有高度的潛力可預防及治療敗血症。因此，本計畫利用系統生物學研究平台—結合高通量之基因體學、蛋白質體學及生物資訊學，並配合生物化學技術與病理藥理學分析，以細胞模型與動物模型，探討敗血症之發炎病程之基因體與蛋白質體的全面性病理變化，並利用本研究群已研發之生物資訊學分析軟體，整合龐大的生物資料，建立敗血症基因體與蛋白質體鑑定指標之系統生物平台。進一步以 Western blotting、qRT-PCR、siRNA 及 microRNA 等實驗，驗證此系統生物平台的網絡建構，並建立特定的訊息傳遞或功能路徑為分析敗血症之鑑定標的。同時研究具有免疫調節活性的中草藥，其防治敗血症之分子、細胞到活體動物各層面的系統性藥理機制。另可藉由微脂體包覆等技術，提高中草藥活性成分的生體可用率，建立防治敗血症並開發新藥的研究模式。

本計畫提供敗血症防治的新研究方向，以實驗室現有的設備和專門技術，可以順利地進行深入的研究，研發之系統生物研究平台模式(圖一)，亦可作為其他疾病模式或中草藥物開發的借鏡。

貳、材料與方法

一、建立敗血症基因體學與蛋白質體學之細胞模型

(一)細胞培養

分離及培養巨噬細胞、血管內皮細胞與平滑肌細胞，以 propidium iodide、von Willebrand factor 或 α -actin 單株抗體鑑定後，置於二氧化碳培養箱(5 % CO₂ & 95 % 室內空氣，37 °C)。處理細菌內毒素，定量細胞釋出之發炎物質、蛋白質及基因之表現。並且以此三種細胞模型進行靈芝等十多種中草藥活性成分之活性測試，以及基因微陣列與二維電泳分析。

(二)細胞培養存活率測定

alamaBlue 試劑在氧化態時，可被存活的細胞吸收，並由粒腺體酵素還原。將細胞種在組織培養盤，加入 alamaBlue 試劑(10%)，培養 3 小時，用 automatic microplate reader 測波長 570 nm、595 nm 的吸光值，並計算二者的差值，觀察細胞存活率與增生作用。

(三)基因體 cDNA 微陣列分析

1. 抽取細胞總核糖核酸：樣品加入chloroform/TRIZOL，將含有RNA之上層取出。利用RNeasy cleanup kit純化細胞內總核糖核酸。
2. 總核糖核酸品質分析：總核糖核酸的品質與定量則利用光譜分析儀與Agilent Bioanalyzer 2100之RNA 6000 NanoLabChip Kit進行鑑定。
3. 合成標記Cy3與Cy5的cDNA：分別加入Cyanine 3-dCTP或Cyanine 5-dCTP進行標記。以Bioanalyzer分析cDNA合成是否完整。
4. 純化標記的cDNA：使用PCR purification kit將互補去氧核糖核酸探針純化，利用光譜分析儀定量。
5. 雜交：98°C加熱2分鐘，並以大於12,000 g離心5分鐘，緩慢加入Hybridization solution。置於65°C的水浴槽內，反應17小時。
6. 清洗與掃描：微陣列載片取出後，經浸泡、攪拌、沖洗、離心後，以Agilent DNA Microarray Scanner掃描。
7. 影像資料分析：以Agilent Feature Extraction進行數據分析。基因改變的比率是以兩組經過演算法計算後的染劑常規化數據相除所得。

(四)蛋白質體學研究

1. 細胞處理：細胞膜碎片以C-lysis-buffer溶解，離心後取上清液部分，作為細胞疏水性的蛋白質部分。

2. TCA沉澱：將含有蛋白質的樣品溶液與溶液I混合後，置於-20°C吸去上清液後再次離心吸去上清液，置於室溫中約30分鐘，使樣品乾燥。
3. 蛋白質濃度測定：依據Bradford法，蛋白質標準檢量線為BSA，所有樣品均稀釋檢量線濃度範圍。
4. 一維等電位聚焦分析：將樣本蛋白質調至固定濃度，利用導電度儀量測樣品導電度，導電度儀以0.05% NaCl當作標準品校正。
5. 二維電泳分析：二維電泳槽中以10°C、10 mA，通電1小時，再以45 mA通電4~5小時，直至bromophenol blue 接近二維電泳膠底部。
6. 蛋白質固定與染色：將二維膠片放入400 mL Fix solution (10 % methanol and 7 % acetic acid)搖晃30 分鐘，以固定膠內之蛋白質。
7. 二維電泳膠掃描及影像比對：由影像掃瞄系統(Amersham Pharmacia Typhoon 9200)所得圖檔利用軟體進行影像比對分析。
8. MALDI-TOF質譜儀分析：以ACTH為外在標準品，針對其中有較強的質譜訊號再進入Tendom Mass進行氨基酸序列的分析。
9. 資料庫搜尋系統：利用 Mascot Search內的 Peptide Mass Fingerprint與MS/MS Ion Search兩個質譜分析資料軟體進行分析。

(五)生物資訊學分析

以三次獨立實驗之三重覆數據進行 one-way ANOVA 分析。Pairwise comparison($P = 0.05$)則為執行 Tukey's honestly significantly different (HSD)test w-procedure。Hierarchical clustering 分析，採用兩種軟體(Cluster 3.0 data clustering software 與 Java Treeview visualization software)，以顯示 clustering 的結果。功能性分類(functional classification)則用 BGSSJ 資料庫 (<http://bgssj.sourceforge.net/>)。Pathway annotation，使用 CGAP Gene Information；生物訊息路徑，使用 BioCarta (<http://www.biocarta.com/>)或 KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>)。

二、確認敗血症病理平台之基因與蛋白質網絡並建立特定細胞訊息傳遞分子與藥理路徑

(一)西方墨點分析法

細胞經受試藥物處理後，以蛋白質溶解液萃取，離心(3000 rpm, 20 min, 4°C)後，製備細胞均質液，再以蛋白質分析套組定量蛋白質的濃度。取適量蛋白質分離、轉漬、blocking 後，以細胞訊息傳遞

蛋白質之一級抗體、二級抗體處理，加入 ECL 試劑以冷光顯相。感光底片經掃瞄後，以 Labscan 軟體處理定量。

(二)基因表現分析(RT-PCR, Real-time PCR)

以 TRIzol 將細胞刮下，加入 chloroform/TRIzol，離心後將含 RNA 部分與 isopropyl alcohol TRIzol 混合，離心後沉澱物以 DEPC-H₂O 回溶，用光譜分析儀 OD₂₆₀、OD₂₈₀ 分析總核糖核酸的濃度及品質。總核糖核酸使用 0.2 µg 進行反應(SuperScript™ One-Step RT-PCR)，RT 條件為：50°C，30 分鐘；94 °C，2 分鐘；PCR 定為 30 個循環，分別為：94°C，15 秒；55°C，30 秒；68°C，40 秒；最後以 68 °C，7 分鐘反應後，維持在 4 °C。再以 agarose/TBE buffer 進行電泳。Real-time PCR 實驗，採用與 RT-PCR 相同的方式純化總核糖核酸，將總核糖核酸轉為 cDNA 後，以 LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green 1 進行。cDNA 分別以 x1, x5, x25, x125, x625 及不含 cDNA 的溶液進行相對定量的檢量線，以便求出 mRNA 的表現量。

Primers	Sense (forward)	Antisense (reverse)	Size (bp)	放大次數
MCP-1	5-CCTGCTGCTACTCATTAC	5-TCTCACTTGGTCTGGTCC	191	30
MIP-3 α	5-TGAGAATGGCCTGCAAGCAT	5-TCCATTGGACAAGACCACTG	425	30
CINC-1	5-TTCTTCCCCTCAACACCTTC	5-TGGAGAAAAGAAGATAGATTGC	308	30
CINC-2	5-CACTGAAGAGTTACGATGTCA	5-TGAGGCTCCATAAATGAAAGA	309	35
CINC-3	5-CCTGGAAAGGAAGAACATGGG	5-ACCTCCCAACTACATAAGTAA	300	30
Fractalkine	5-ATTTTCCAAGACAGAGGACC	5-GAAGAGTAGACCAAGAAAGG	240	30
VEGF	5-GACCCTGGTGGACATCTCCAGGA	5-GGTGAGAGGTCTAGTCCCGA	514, 462, 330	33
iNOS	5-TGTCTCTGGGTCTCTGGTCAAA	5-TGGCTTGCCCTTGGAAGTTTCTC	384	30
GAPDH	5-TCCACCACCTGTTGCTGTA	5-ACCACAGTCCATGCCATCAC	452	25

(三)蛋白質陣列(protein array)實驗

蛋白質陣列(RayBio[®])加入 blocking buffer，待測樣品液於室溫與蛋白質陣列雜化 1 至 2 小時，更換為洗滌緩衝溶液 II 沖洗 2 次。於室溫加入一次抗體(Biotin-Conjugated Anti-Cytokines) 1 至 2 小時後，再用洗滌緩衝溶液 I & II 沖洗，加入 HRP-conjugated streptavidin。加入預先混合之偵測緩衝溶液，使用 X-光片曝光適當之時間，儲存蛋白質陣列於-20~-80°C。

(四)以 sodium nitroprusside 溶液清除一氧化氮活性之測定

將 sodium nitroprusside 與受試藥物或其溶劑在室溫光照下培養 30, 60, 90, 120 及 150 分鐘，以 Griess 試劑在波長 550 nm 測量 nitrite

濃度。本實驗以 NaNO_2 (0~100 μM) 做一濃度標準檢量曲線。

(五) 誘導型一氧化氮合成酶(iNOS)分析及代謝產物含量測定

將細胞種於 24-well 培養盤，12 小時後以不含 FCS 之 MEM 培養，再 12 小時後更換為 2%FCS 之 MEM，並且給予刺激劑及受試藥物。24 小時後收集上清液進行 nitrite 之測定。Nitrite 的測定是以 Griess 試劑進行呈色反應，細胞上清液加入同體積之 1% sulfanilamide 及 0.1% naphthylenediamine (in 5% phosphoric acid)，用 ELISA microplate reader 在波長 550 nm 進行吸光值測定與濃度的換算。以 NaNO_2 (0~100 μM) 做一濃度標準檢量曲線。

(六) ELISA 分析

將配置的各种濃度標準品與細胞培養液轉置於 96 孔盤，室溫下培養 2 小時後，加入 biotinylated antibodies 培養，再加入 horseradish peroxidase-Streptavidin 溶液，靜置 45 分鐘，再加入 tetramethylbenzidine，樣品會由透明轉為水藍色，最後加入 2N H_2SO_4 5 分鐘，此時樣品會由水藍色轉為黃色。最後以微孔盤讀值機 (ELISA reader) 波長 450 nm 測量吸光值 $\text{OD}_{(450)}$ 。每次實驗皆有三重覆並且與標準檢量線比較，以測得樣品濃度之計算。

三、中草藥活性成分萃取

針對內毒素誘發之特定基因或蛋白質為篩選標的物，實驗結果顯示，靈芝、肝炎草、厚葉鐵線蓮、金絲草、咸豐草、小本山葡萄、黃金珠等多種中草藥，有阻斷或抑制作用，顯示此些中草藥具有發展為敗血症的防治藥物的潛力。因此，在中草藥基源確認後，以化學技術萃取其活性成分，並分離具療效的純化合物或質量確定的混合物。依生物活性追蹤法，用甲醇、正己烷、二氯甲烷、乙烯乙酯、正丁醇進行主成分萃取，以管柱層析、薄層色層分析法、高壓液相層析法、氣相層析儀和氣相層析質譜儀、氣相色譜串聯質譜儀、液相層析串聯質譜儀進行分離、鑑定與分析萃取物中各種成分，再配合核磁共振儀、紅外光譜儀、X 射線衍射、元素分析儀等鑑定其化學結構。並進行生物活性及毒性等試驗，對於作用效價高的活性成分，則研究細胞到活體動物各層面的系統性藥理機制。

參、結果

一、內毒素對細胞模型的作用

血清(FCS)含有多種生長因子及營養素，往往造成實驗分析的干擾。本實驗以 ELISA 定量分析分泌性蛋白質 fractalkine，藉以探討 LPS 對內皮細胞 fractalkine 的誘發作用並建立適當的 FCS 培養環境。實驗結果顯示：在不含 FCS 的培養液，nitrite 的累積量由 0.18 ± 0.07 增加為 $7.17 \pm 0.30 \mu\text{M}$ ；含有 2% FCS，nitrite 的累積量由 0.18 ± 0.05 增加到 $16.97 \pm 2.64 \mu\text{M}$ ；然而在含有 10% FCS 的培養狀態時，nitrite 的累積量由 0.40 ± 0.06 只有增加到 $12.79 \pm 1.52 \mu\text{M}$ ，並不及 2% FCS 的培養環境。另以 0% FCS 培養，LPS 處理 24 小時後，細胞培養液中 fractalkine 由 $339 \pm 157 \text{ pg/ml}$ 增加為 $9,171 \pm 1,924 \text{ pg/ml}$ 。在 2% FCS 培養液，fractalkine 由 $365 \pm 100 \text{ pg/ml}$ 增為 $9,721 \pm 1,299 \text{ pg/ml}$ 。當 10% FCS 培養時，雖然基礎值升高($813 \pm 552 \text{ pg/ml}$)，fractalkine 亦增加為 $10,111 \pm 924 \text{ pg/ml}$ 。LPS 明顯增加 fractalkine 的分泌，但不同濃度的 FCS 並不影響 fractalkine 的分泌。

二、內毒素引起轉錄體的改變作用

細胞處理 LPS ($100 \mu\text{g/ml}$) 6 小時後，刪除表現不正常或背景值過高的數值之後，分別有 11,318 (4533-A01)及 12,128 (4533-A02) 個可信賴的基因表現數據。兩組基因表現均同時有意義的點共有 9,139 個 (佔 59.8%，其中屬於 Incyte EST 的基因點有 3,554 個，非 Incyte EST 的點有 5,585 個)。在實驗數據的判斷上，以處理 LPS 後的 mRNA 表現除以控制組的比率 (Ratio) 為表現的差異，其中 Ratio 在兩組實驗中均大於兩倍的基因共有 318 個，定義為基因表現增加或被誘發的部分；兩組表現 Ratio 小於 0.5 的 158 個基因，視為基因減少或抑制的部分 (Chinnaiyan et al., 2001)。

三、內毒素引起細胞模型蛋白質體的改變作用

以二維電泳技術，觀察細胞在 LPS 處理後蛋白質體的改變。蛋白質樣品以 pH 3-10NL 的 18 公分 IEF 電泳膠條進行等電點聚集，再以 20×20 公分的 SDS-PAGE (10-18%) 依蛋白質分子量進行分離。經 SYPRO Ruby 染色後，可得到實驗組與控制組之蛋白質二維電泳膠圖譜。使用影像掃描系統 (Amersham Pharmacia Typhoon 9200) 所得之圖檔以影像比對軟體 (PDQuest 7.1, Bio-Rad) 進行分析。各組二維電泳膠圖譜分別進行三至四次獨立的實驗，建立較完整蛋白質點的數據資訊，包括：分子量、pI 值、密度及三維立體圖形等。具有顯著變化的蛋白質點進行膠內水解，並利用質譜進行蛋白質身分鑑定。

四、基質輔助激光解析電離飛行時間質譜(MALDI-TOF)分析結果

利用 MALDI-TOF MS 產生質譜圖 (圖二)及 txt 檔案進行質譜資料之網

路搜尋。如：蛋白質點 spot 46，其 MI403810.txt 檔案包含蛋白質經胰蛋白酶水解後，由質譜儀 MALDI-TOF 產生的前 50 支主要的肽分子量。將.txt 檔輸入 Mascot 內的 Peptide MassFingerprint 分析，可對應到 P07895 (SODM)，並且獲得相當完整的質譜資訊，其氨基酸序列的覆蓋率為 40%。搜索分數為 70 (分數大於 50 即表示為該一蛋白質， $p < 0.05$) (圖三)。同時也以包含 MALDI-TOF 所產生的五支主要 peaks 的氨基酸序列的 MI403810.pkl 輸入 Mascot Search 內的 MS/MS Ion Search，搜尋結果顯示有兩組數據對應到 P07895 (SODM)，並且可以獲得相當完整的資訊，其覆蓋率為 13%。搜索分數為 134 (分數大於 22 即表示為該一蛋白質， $p < 0.05$) 可以確定為 SODM (圖四)。

每一段肽的氨基酸序列均可進一步的分析其完整氨基酸序列的詳細質譜資料，如：Mr (expt) = 1768.8663，分析其氨基酸序列為”K.HHATYVNNLNVTEEK.Y”。

另外亦可將氨基酸序列”LLQDSVDFSLADAINTEFK”輸入 NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)之 Protein: protein-protein BLAST (blastp) 分析，其比對的結果總具有此一相同氨基酸序列的蛋白質共有 11 種，其中 9 種蛋白均為不同物種的 SODM。其餘的 2 種蛋白質均為尚未命名的蛋白質產物 (unnamed protein product)。

五、內毒素引起細胞模型分泌性蛋白質的變化

細胞在內毒素處理 24 小時後，由於細胞培養液中分泌性蛋白質量稀少，不足夠進行 genomics 或 proteomics 分析，所以利用蛋白質陣列分析其中所含的蛋白質，並將二重複實驗之兩次獨立實驗結果積分定量。結果顯示與發炎反應有關的細胞激素 IL-6 明顯增加，另外亦有數種 chemokines 也明顯增加，包括：MCP-1 (Small inducible cytokine A2, CCL2)、MIP-3 α (small inducible cytokine A20, CCL20)、CINC-2 (cytokine-induced neutrophil chemoattractant-2；或稱為 macrophage inflammatory protein-2- β , MIP2B)、CINC-3 (cytokine-induced neutrophil chemoattractant-3；或稱為 macrophage inflammatory protein 2, MIP2)、LIX (small inducible cytokine B5, SCYB5)、fractalkine (CX3CL1) (圖五)。

六、生物資訊學軟體的分析

由於 cDNA 微陣列所附的基因資料為 GeneBank 的 IDs，其中部分屬於大鼠，約有一半基因 ID 屬於小鼠或人類。因為目前大鼠尚無完整的基因資料庫，因此是利用小鼠或人類相關的基因來設計探針 (引子)，然後在大鼠的細胞或組織中進行選殖，因此 cDNA 微陣列上所有的 clones 均來自大鼠。為利用現有已經的資料庫資訊，因此將基因轉換為人類的 UniGene ID 作為資料搜尋的依據。BGSSJ 註解 153 個基因或蛋白質可區分為 537 個分類。

其中共有 27 個基因與 13 個蛋白質透過註解被分類在”response to external stimulus”。“Immune response”是目前研究 LPS 誘發的生理反應的主要方向。透過 BGSSJ 的分析，發現有 13 個基因與 10 種蛋白質被歸類於免疫反應。其中在”inflammatory response”共有 6 個基因 (*Il1b*、*Ccl21b*、*Fgg*、*Fcgr3*、*Aif1* 及 *Ahsg*) 與 5 種蛋白質 (LIX、MIP-3 α 、MCP-1、CINC-2 及 CINC-3)。分析經過及結果請參閱圖六、圖七。

七、mRNA 與蛋白質之確認及可能之訊息傳遞機制

藉由 RT-PCR 分析內毒素處理後 mRNA 的表現，對 iNOS、VEGF、chemokines (MCP-1、MIP-3 α 、CINC-1、CINC-2、CINC-3 及 fractalkine) 及 GAPDH 進行分析確認。除了 VEGF 在未刺激的狀態下已有表現，其餘基因都是在受到內毒素刺激後才會被誘發出來。利用西方墨點法針對 iNOS、SODM 等蛋白質進行確認實驗；而細胞分泌的蛋白質是以 ELISA 進行定量。並利用各種阻斷劑，包括：SB203580 (p38 阻斷劑)、U0126 (ERK 阻斷劑) 及 PDTC (NF- κ B 阻斷劑)等，探討訊息傳遞路徑。

預處理各種阻斷劑，LPS 刺激細胞 24 小時後，SB203580 (p38 阻斷劑)、U0126 (ERK 阻斷劑)及 PDTC (NF- κ B 阻斷劑)顯著減少 nitrite 的產生與累積(圖八)。LPS 刺激細胞釋放之 fractalkine 則受 SB203580 (p38 阻斷劑)及 U0126 (ERK 阻斷劑)的作用而顯著的減少，而其餘的阻斷劑並不會影響 fractalkine 的釋出(圖九)。分析經過及結果請參閱圖十。

八、靈芝及其他十多種中草藥活性成分之作用

用已建立之細胞模型，篩選靈芝及其他十多種中草藥之活性成分。靈芝(*Ganoderma lucidum*)經分離、純化與鑑定，得到 12 個粗萃物、2 個部分純化物及 7 個純化合物，具有抑制細胞增生的作用(Wang et al., 2008)，其雙向的免疫調節作用正投稿中。肝炎草(*Murdannia bracteata*)分離純化得到 4 個新化合物；其中 bracteanolide A 抗發炎作用最好，抑制 iNOS 但不影響 eNOS 的活性指標-乙醯膽鹼之舒張作用(Wang et al., 2007)。厚葉鐵線蓮(*Clematis crassifolia*)葉部純化之 ibotanolide B、calceolarioside B、*trans*-caffeic acid 與 anemonin (圖十一)在巨噬細胞有抑制發炎的作用。其中又以 anemonin 的作用最好，抑制 iNOS 蛋白質及 mRNA 的表現(圖十二)，濃度相關性的恢復細菌內毒素造成之血管反應性降低，且不影響 eNOS (圖十三) (Lee et al, 2008)。金絲草(*Pogonatherum crinitum*)分離得到 8 個抗發炎活性化合物(圖十四、十五、十六)，無細胞毒性(Wang et al., 2008)。另外，咸豐草(*Bidens chilensis*)純化之 8 個活性化合物，小本山葡萄(*Vitis thunbergii*)有 11 個活性化合物，黃金珠(*Carpesium nepalense*)之 1 個主要活性化合物，以及其他多種中草藥，均分別針對內毒素處理細胞模型之特定基因及蛋白質標的物與其訊息傳遞，正進行研究分析(圖十七、十八、十九、二十)。

肆、討論

一、內毒素引起細胞模型分泌性蛋白質的作用

(一)本實驗中，控制組釋放出 TIMP-1 及 VEGF 兩種蛋白質。TIMPs 具有抑制 matrix metalloproteinases (MMPs) 的活性，但在腫瘤轉移及發炎反應時，MMPs 與 TIMPs 的平衡關係失衡(Gatsios *et al.*, 1996)，但 LPS 處理並未顯著改變 TIMP-1 的分泌。VEGF 在正常或病態時的血管新生調控都扮演重要的角色，包括引發細胞的增生，促進細胞移動，增加血管內壁的通透性及抑制細胞程式性死亡。處理 LPS 使 VEGF 增加約兩倍，透過 RT-PCR 實驗，也可以發現 VEGF mRNA 的表現也有增加的現象。

(二)IL-6 在免疫反應與發炎作用都扮演相當重要的角色。人類內皮細胞株 (EA.hy926) 被 TNF- α 及 IL-1 β 刺激，會使 IL-6 的表現明顯增加 (Galley *et al.*, 1999)。根據臨床研究，敗血症或敗血性休克的病患，其血液中 IL-6 的濃度與病情的進展呈現出正相關的關聯性(Souter *et al.*, 2001)。

(三)趨化激素(chemokines)具有顯著之吸引白血球移動(trafficking)、補充(recruiting)及往返(recirculation)的能力。有 6 種趨化激素，會明顯的被 LPS 刺激而分泌。透過 cDNA 轉錄體分析也發現，趨化激素 *Ccl21b* 及趨化激素接受器 *Cxcr3* 及 *Ccr10* 其 mRNA 的表現都有增加的趨勢。臨床急性呼吸窘迫症候群 (acute respiratory distress syndrome; ARDS) 病患，其趨化激素及趨化激素接受器的表現具有相當重要的關聯性，並且趨化激素接受器的專一性拮抗劑在未來 ARDS 的治療上，將扮演相當重要的角色(Puneet *et al.*, 2005)。透過 RT-PCR 的分析，也發現這些趨化激素：CC 家族的 *MCP-1* 及 *MIP-3 α* 。CXC 家族的 *CINC-1*、*CINC-2* 及 *CINC-3* 和新發現的 CX3C 家族的 *fractalkine*，這些趨化激素的 mRNA 都有顯著的上升現象。

二、轉錄體與蛋白質體的功能性分類與註解

(一)轉錄體及蛋白質體實驗數據以 BioCarta 與 KEGG 資料庫分析，可獲得準確且詳細之生物訊息傳遞與代謝作用路徑的資訊，但其相對廣度與註解的範圍則較低。

(二)利用 BGSSJ 以 GO 資料庫分析實驗數據，可以提供更廣泛及更完整的基因或蛋白質的註解(Ashburner *et al.*, 2000)。透過系統生物學的研究模式，可以有效的對於 LPS 誘發的生理及病理各種訊息傳遞路徑的變化，甚至路徑-路徑之間的交互關係的改變進行完整的分析 (Calvano *et al.*, 2005)。

- (三)本實驗中，受 LPS 刺激後發生改變的 152 個基因與 22 個蛋白質資料，以相對應人類的 UniGene IDs 作為輸入 BGSSJ 的格式進行註解，分析結果共有 153 個基因或蛋白質可被 BGSSJ 所註解(註解率為 89.9%)，歸類於 537 個不同的分類。其中共有 27 個基因與 13 個蛋白質透過註解被分類在”response to external stimulus”。其可再分類為“response to stress”、“response to external stimulus”及 “response to biotic stimulus”及各分類之交集的數目。
- (四)透過 BGSSJ 分析，有 13 個基因與 10 種蛋白質與免疫反應有相當密切的關係。除了發炎反應，LPS 誘發的生理反應中”Immune response”亦受到相當重視，也是研究的主要方向。透過基因為陣列分析，有 6 個基因 (*Il1b*、*Ccl21b*、*Fgg*、*Fcgr3*、*Aif1* 及 *Ahsg*) 與發炎直接關聯；而在蛋白質的陣列分析上，有 5 種蛋白質 (LIX、MIP-3 α 、MCP-1、CINC-2 及 CINC-3) 被歸類於發炎反應。

三、LPS 誘發 NF- κ B 活化與細胞自我保護反應的可能訊息路徑

- (一)ArrayXPath 為直接分析訊息傳遞路徑的生物資訊學工具，其可依據 BioCarta 及 KEGG 資料庫，而提供相當嚴謹的數學統計與生物路徑分析，包含各個路徑分析的分數 (*P*-value, pathways scores) 及各個不同路徑之間的分數 (*Q*-value, significance for any individual pathway)。提供研究者得到更完整與可行性的分析方式的。
- (二)本研究以 BGSSJ 與 ArrayXPath 分析 LPS 刺激後轉錄體與蛋白質體的實驗資料，ArrayXPath 分析以 *P*-value 與 *Q*-value 均小於 0.05 為其訊息傳遞路徑之間之顯著改變，發現 LPS 與 NF- κ B 的活性調控有密切關係。
- (三)在根據 BGSSJ 與 ArrayXPath 分析，受到 LPS 刺激，許多基因及蛋白質產生直接或間接的改變，而調控 NF- κ B 路徑。包括上游的基因 (*Pias1*) 及蛋白質(*SPA6*)，與 NF- κ B 活化後的下游基因(*IL-1RN*、*IL-1 β* 及 *CD4*)及蛋白質(*IL-6* 及 *MCP-1*)的表現。引發的可能生物訊息傳遞路徑包括：“Signal transduction through IL-1R”、“Msp/Ron receptor signaling pathway”、“LDL pathway during atherogenesis”及”IL-5 signaling pathway”)，以及造成的特定的生理及病理上的改變 (例如：細胞增生、動脈粥狀硬化、發炎反應及細胞程式性死亡)。
- (四)透過這些分析工具，也發現許多基因及蛋白質扮演抗氧化、抗發炎及抗細胞程式性死亡作用。其中，與自我保護功能有關的 mRNA 為 *Rbpsuh* 及 *Mpo*；蛋白質包括：PRDX1、SODM、FRIH 及 FRIL1。其中 IL-1 β 、IL-6 及 MCP-1 的 mRNA 或蛋白質表現量增加，在人類冠狀動脈內皮細胞也有類似的發現(Zeuke *et al.*, 2002)。這三種細

胞激素都屬於”Msp/Ron receptor signaling pathway”及”LDL pathway during atherogenesis”。其中，Ron (transmembrane receptor kinase)為 transmembrane receptor kinase，參與組織傷害時所引起的發炎反應(Wang *et al.*, 2002)，而 Msp (macrophage-stimulating protein)可以透過細胞膜上的 Ron 參與組織傷害時所引起的發炎反應(Wang *et al.*, 2002)。atherogenesis 是一種慢性的血管發炎反應。

(五)IL-1 β 、CD4 及 IL-6 參與調控”IL-5 訊息路徑”。在發炎狀態，T 細胞會釋放 IL-1 β 及 IL-6 以便進一步活化嗜鹼細胞(eosinophil)。而人類免疫缺乏病毒(HIV-1)可透過 CD4 與趨化激素共同接受器(chemokine coreceptors；CCR3、CCR5 及 CXCR4)，進而感染及穿透單核球細胞 (mononuclear cells) (Chi *et al.*, 2000)。

(六)大鼠及人類內皮細胞之 IL-1RN (IL-1 receptor antagonist，內生性拮抗性胜肽)，會受到 LPS 的刺激而增加其 mRNA 表現(Dewberry *et al.*, 2000; Eisenberg *et al.*, 1990)，但其調控機制目前仍不清楚。

(七)透過 BGSSJ 分析，*Pias1* (protein inhibitor of activated STAT1)及 *Rbpsuh* (recombining binding protein suppressor of hairless, RBP-J)都被歸類於“transcription regulator activity”，並且參與 NF- κ B 訊息路徑的調控。*Pias1* 是 PIAS 蛋白家族的一員，可藉由抑制 DNA 結合的作用，使轉錄因子 STAT1 (Liu *et al.*, 1998)及 NF- κ B (Liu *et al.*, 2005)的活性受到抑制。而 LPS 刺激細胞造成 NF- κ B 活化，可能與 *Pias1* 的表現受到抑制有關。*Rbpsuh* 是一種 DNA 結合蛋白，與 NF- κ B 的下游結合區域相重疊，進而調控 IL-6 的表現 (Vales and Friedl, 2002)。在人類內皮細胞 Notch4-Rbpsuh 的活化，可以抑制 LPS 所誘發的 apoptosis (MacKenzie *et al.*, 2004)。因此，*Rbpsuh* 的活化可能具有保護作用。

(八)LPS 刺激晚期，細胞所產生自我保護的作用包括：抗發炎作用 (*IL-1RN*)、抗細胞程式性死亡(*Rbpsun*)及抗氧化作用(*Mpo*、*PRDX1*、*SODM*、*FRIH* 及 *FRIL1*) (Rivollier *et al.*, 2006)。

二、靈芝及其他十多種中草藥活性成分之作用

(一)靈芝之 2 個部分純化物具有特別的雙向之免疫調節作用，並且也抑制細胞增生。

(二)厚葉鐵線蓮、黃金珠的抗發炎純化物，具有新藥研發之潛力。其中部分化合物已完成動物實驗，也已進行 cDNA 微陣列實驗與蛋白質陣列實驗，系統性分析正進行中。

(三)肝炎草、厚葉鐵線蓮、金絲草、小本山葡萄、咸豐草等活性成分，均分別針對特定基因及蛋白質標的物與其訊息傳遞，研究分析中。

伍、結論與建議

本研究透過系統生物學之細胞與動物模型，對於複雜的發炎反應，不但可利用人類基因解碼後所獲得的資料，並且亦可進一步應用於其他疾病、物種及藥物開發的研究。對於解決複雜的生物醫學議題，提供一個新的思考方向。PSA6、cathepsin B、IL-6、MCP-1、MIP-3 α 、CINC-2、CINC-3、LIX 及 Fractalkine，在發炎反應進展過程中，扮演了相當重要的角色。相對地，peroxiredoxin 1、SODM、FRIH 及 FRIL1 參與細胞的自我保護功能，這些生物標記分子具有相當的潛力作為藥物開發或治療途徑的標的，傳統使用臨床療效顯著之清熱解毒消炎中草藥，亦是發展預防性或治療性藥物的重要選擇。

誌謝

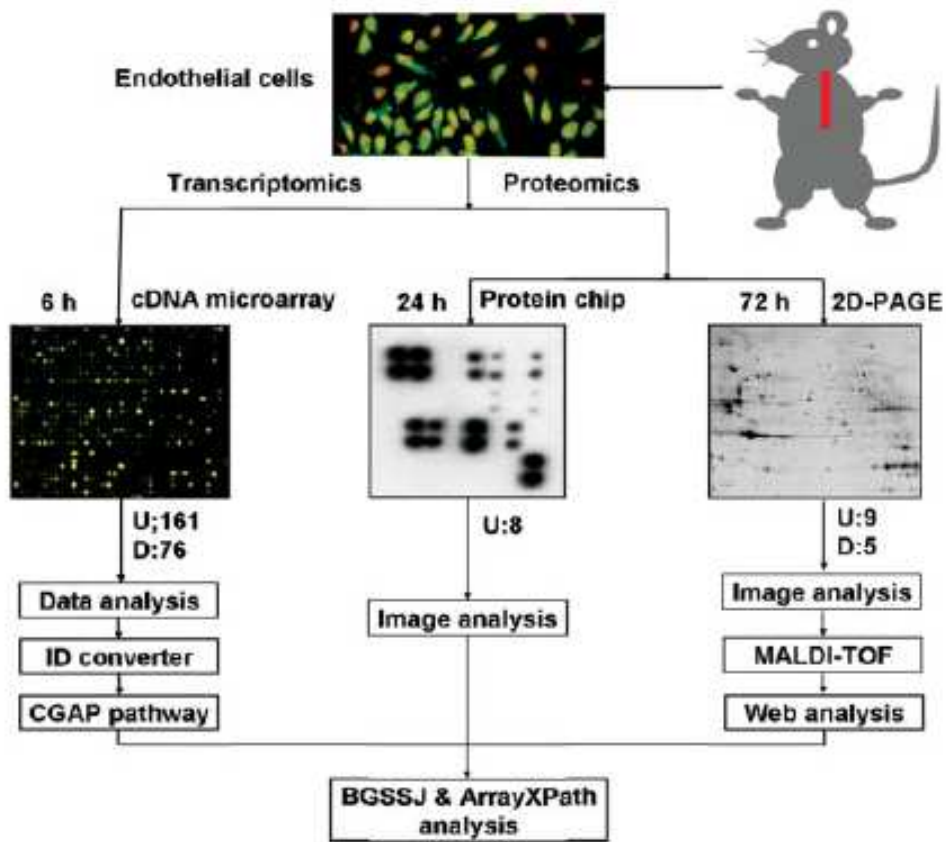
本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會計畫編號 CCMP95-RD-201-1 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

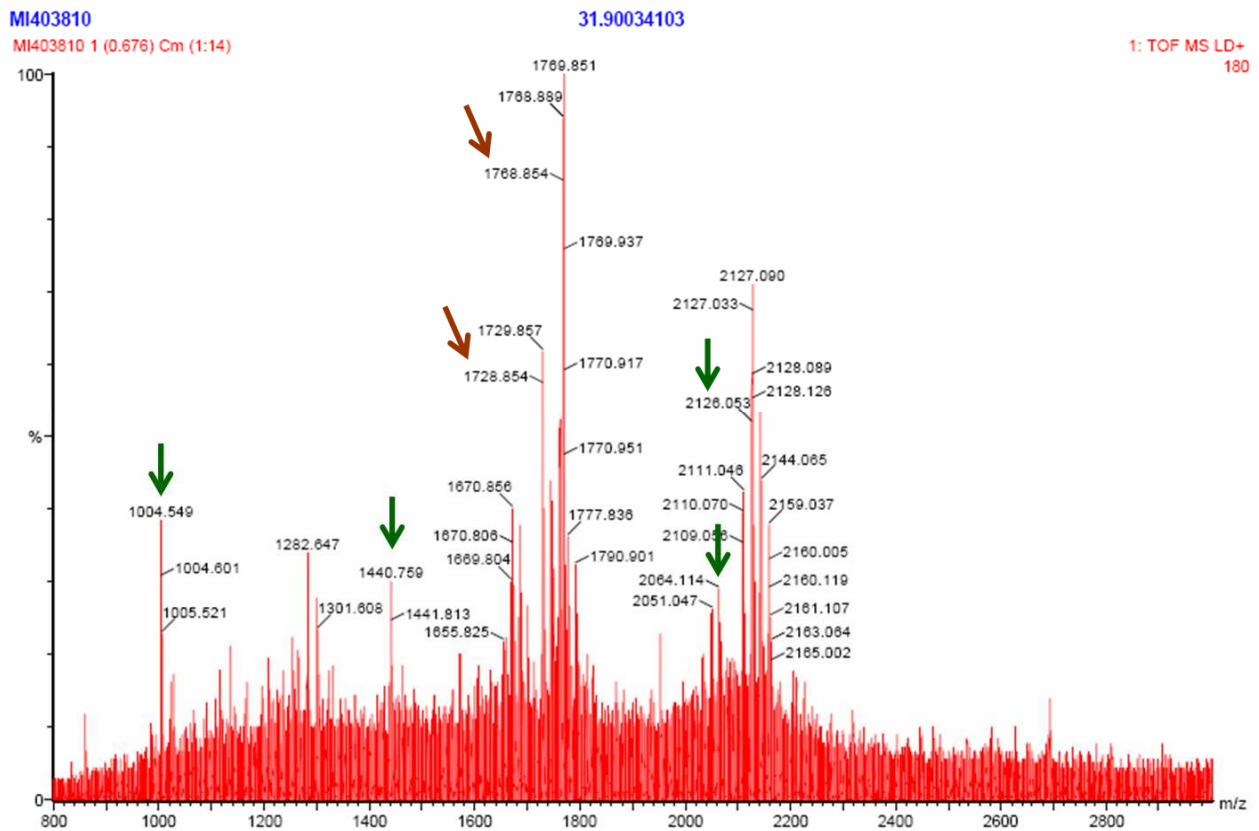
1. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G: Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 2000; 25: 25-29.
2. Calvano SE, Xiao W, Richards DR, Felciano RM, Baker HV, Cho RJ, Chen RO, Brownstein BH, Cobb JP, Tschoeke SK, Miller-Graziano C, Moldawer LL, Mindrinos MN, Davis RW, Tompkins RG, Lowry SF: A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature* 2005; 437: 1032-1037.
3. Chi D, Henry J, Kelley J, Thorpe R, Smith JK, Krishnaswamy G: The effects of HIV infection on endothelial function. *Endothelium* 2000; 7: 223-242.
4. Chinnaiyan AM, Huber-Lang M, Kumar-Sinha C, Barrette TR, Shankar-Sinha S, Sarma VJ, Padgaonkar VA, Ward PA: Molecular signatures of sepsis: multiorgan gene expression profiles of systemic inflammation. *Am J Pathol* 2001; 159: 1199-1209.
5. Dewberry R, Holden H, Crossman D, Francis S: Interleukin-1 receptor antagonist expression in human endothelial cells and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2394-2400.
6. Eisenberg SP, Evans RJ, Arend WP, Verderber E, Brewer MT, Hannum CH, Thompson RC: Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature* 1990; 343: 341-346.
7. Galley HF, Nelson SJ, Dhillon J, Dubbels AM, Webster NR: Effect of the nitric oxide inhibitor, L-N(G)-monomethylarginine, on accumulation of interleukin-6 and interleukin-8, and nuclear factor-kappaB activity in a human endothelial cell line. *Crit Care Med* 1999; 27: 908-912.
8. Gatsios P, Haubeck HD, Van de Leur E, Frisch W, Apte SS, Greiling H, Heinrich PC, Graeve L: Oncostatin M differentially regulates tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-3 gene expression in human synovial lining cells. *Eur J Biochem* 1996; 241: 56-63.
9. Lee TH, Huang NK, Lai TC, Yang ATY, Wang GJ: Anemonin, from *Clematis crassifolia*, potent and selective inducible nitric oxide synthase inhibitor. *J Ethnopharmacol* 2008; 116: 518-527.
10. Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Chang DD, Shuai K:

- Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 10626-10631.
11. Liu B, Yang R, Wong KA, Getman C, Stein N, Teitell MA, Cheng G, Wu H, Shuai K: Negative regulation of NF-kappaB signaling by PIAS1. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 1113-1123.
 12. MacKenzie F, Duriez P, Wong F, Nosedà M, Karsan A: Notch4 inhibits endothelial apoptosis via RBP-Jkappa-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 2004; 279: 11657-11663.
 13. Puneet P, Mochhala S, Bhatia M: Chemokines in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288: L3-15.
 14. Rivollier A, Perrin-Cocon L, Luche S, Diemer H, Strub JM, Hanau D, van Dorsselaer A, Lotteau V, Rabourdin-Combe C, Rabilloud T, Servet-Delprat C: High expression of antioxidant proteins in dendritic cells: possible implications in atherosclerosis. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5: 726-736.
 15. Souter PJ, Thomas S, Hubbard AR, Poole S, Romisch J, Gray E: Antithrombin inhibits lipopolysaccharide-induced tissue factor and interleukin-6 production by mononuclear cells, human umbilical vein endothelial cells, and whole blood. *Crit Care Med* 2001; 29: 134-139.
 16. Vales LD, Friedl EM: Binding of C/EBP and RBP (CBF1) to overlapping sites regulates interleukin-6 gene expression. *J Biol Chem* 2002; 277: 42438-42446.
 17. Wang GJ, Chen DH, Huang YJ, Lin YL: Ganoderma lucidum attenuates the proliferation of hepatic stellate cells by blocking PDGF receptor in rat HSC-T6 cells. *Phytother Res* (In press)
 18. Wang GJ, Chen SM, Chen WC, Chang YM, Lee TH: Selective inducible nitric oxide synthase suppression by new bracteanolides from *Murdannia bracteata*. *J Ethnopharmacol* 2007; 112: 221-227.
 19. Wang GJ, Chen YM, Wang TM, Lee CK, Chen KJ, Lee TH: Flavonoids with iNOS inhibitory activity from *Pogonatherum crinitum*. *J Ethnopharmacol* (In press)
 20. Wang MH, Zhou YQ, Chen YQ: Macrophage-stimulating protein and RON receptor tyrosine kinase: potential regulators of macrophage inflammatory activities. *Scand J Immunol* 2002; 56: 545-553.
 21. Zeuke S, Ulmer AJ, Kusumoto S, Katus HA, Heine H: TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. *Cardiovasc Res* 2002; 56: 126-134.

柒、圖、表



圖一、利用系統生物學模式探討內毒素對內皮細胞作用之流程圖。圖中各項上之箭頭方向表示利用該研究方式所獲得之增加或誘發(U)；及減少或抑制(D)，而箭頭旁之數字代表受到 LPS 刺激後，發生顯著性改變的 mRNA 或蛋白質的數目。



圖二、Spot 46的蛋白質點利用MALDI-Q-TOF 質譜儀分析後的PMF圖譜。箭頭(綠色及褐色)所指的peaks表示為對應到SODM蛋白質的指紋圖譜；褐色箭頭表示此一胜肽片段再經由MS/MS分析後確定為SODM的部份胜肽的胺基酸序列。

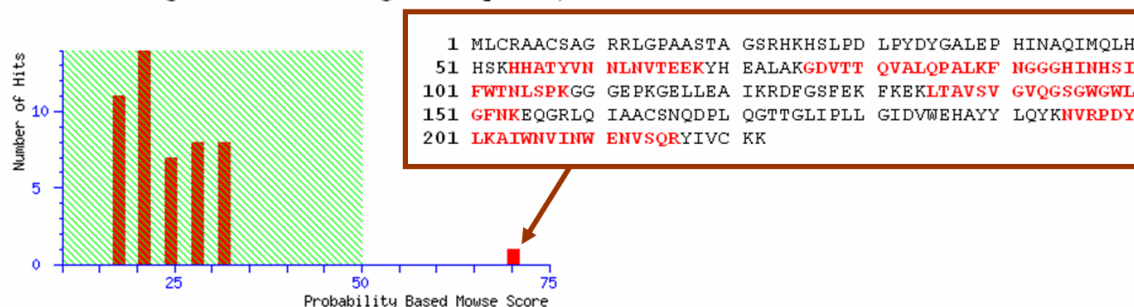


Mascot Search Results

User : james_tseng
 Email : james_tseng@ms35.url.com.tw
 Search title :
 MS data file : D:\document\Exp\Mass\931013_EC(MI403798-811)\MI403810.txt
 Database : SwissProt 50.3 (228670 sequences; 83849098 residues)
 Taxonomy : Rattus (5257 sequences)
 Timestamp : 20 Jul 2006 at 06:40:23 GMT
 Top Score : 70 for **SODM_RAT**, (P07895) Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial

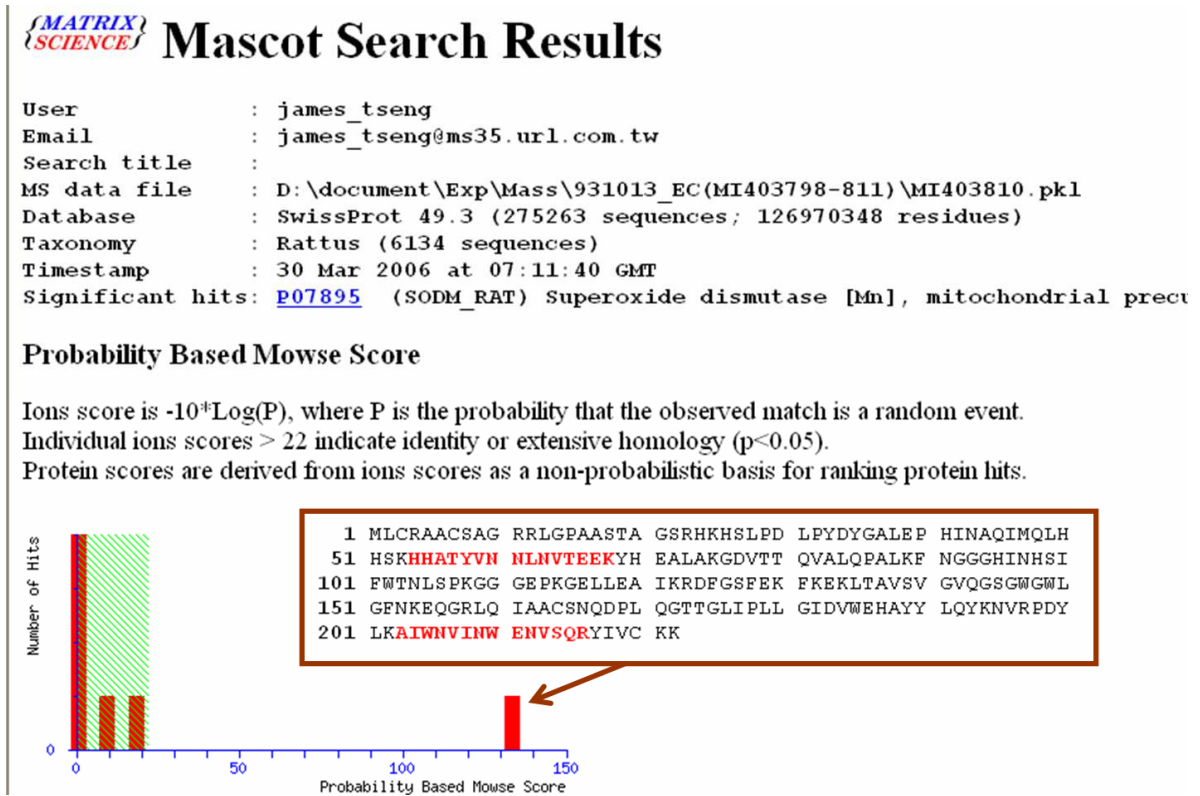
Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Protein scores greater than 50 are significant ($p < 0.05$).



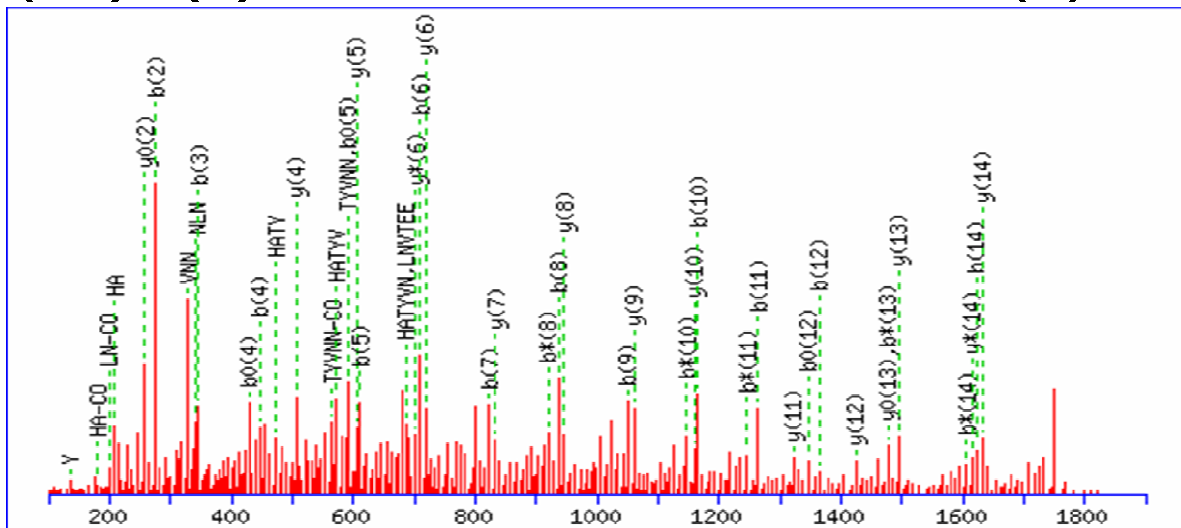
圖三、利用Mascot之PMF分析Spot 46的PMF圖譜的搜索結果。共有6根peaks指向SODM_RAT，總分數為70分並且其PMF所包含的胜肽胺基酸序列的覆蓋率為40%。

(A)

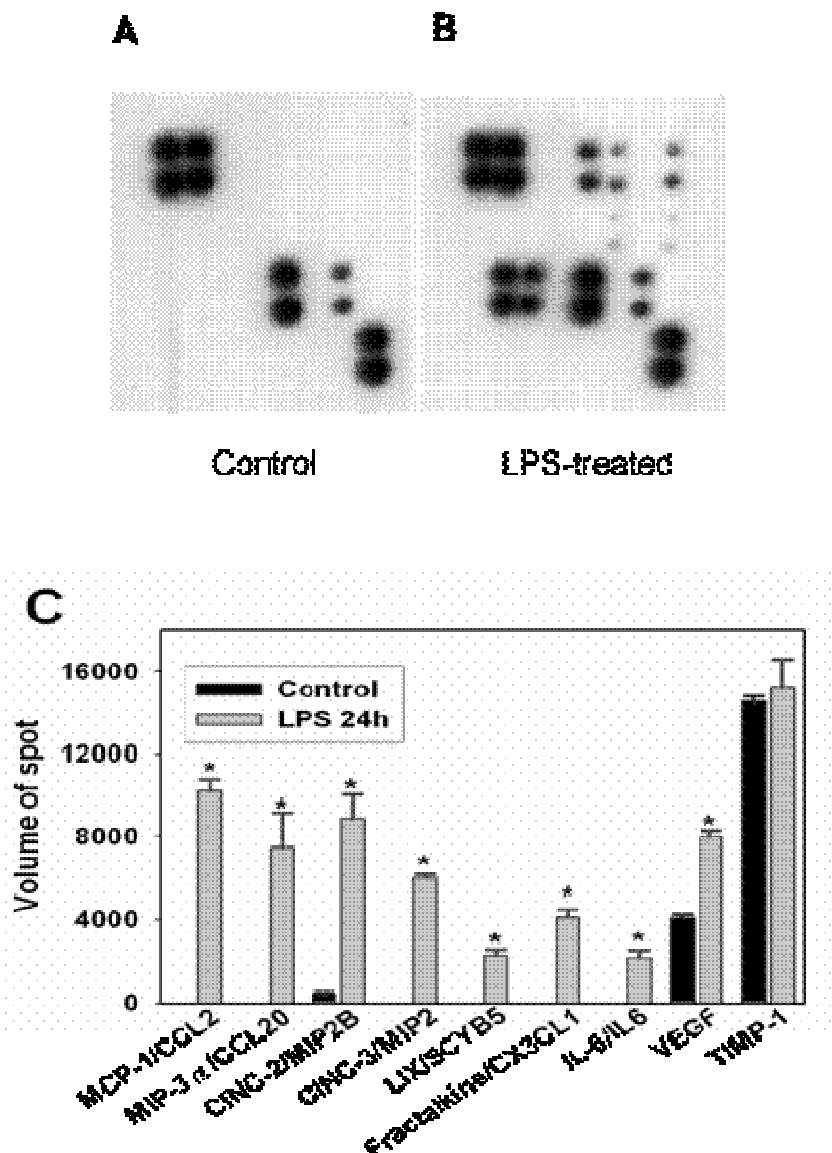


(B)

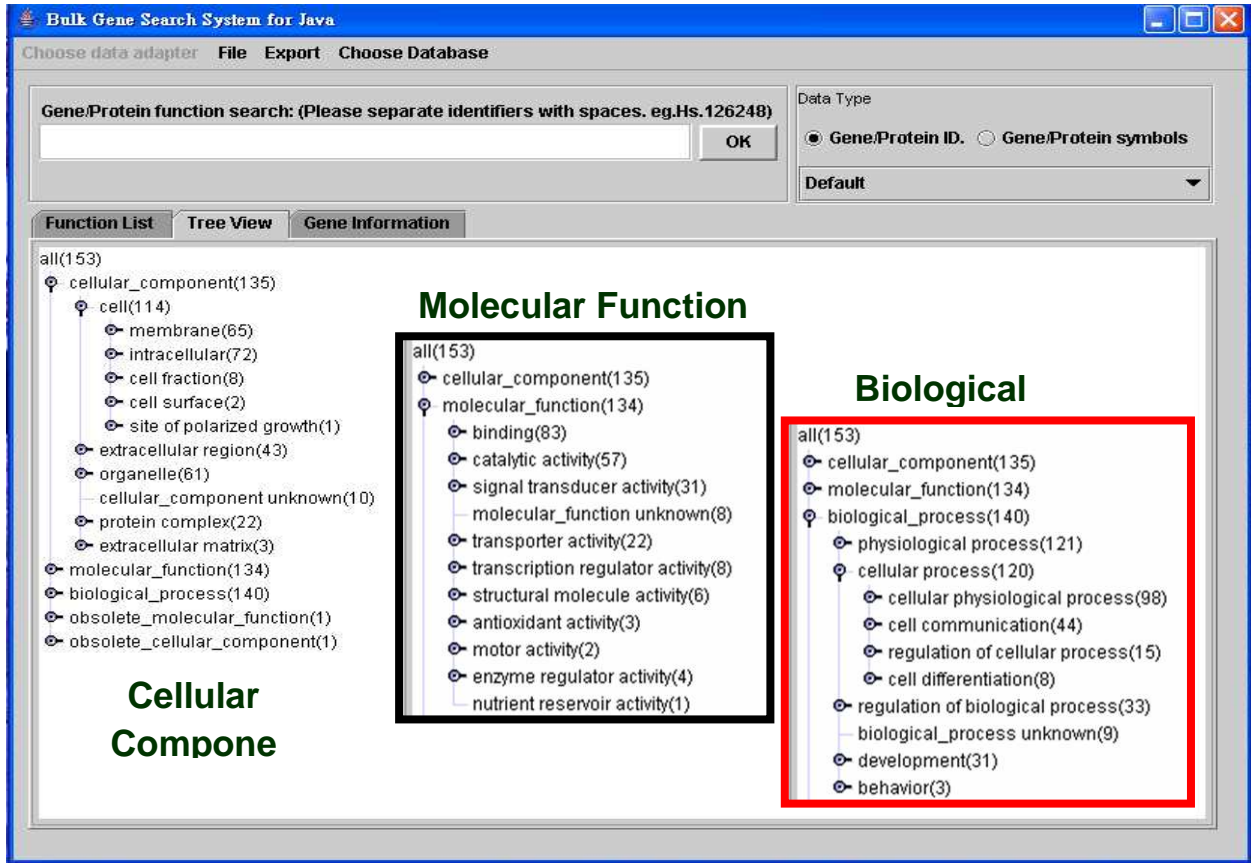
(KE)E-(E)-T- V- N- L- N -N-V - Y-T-A - H(H)



圖四、利用Mascot之MS/MS Ion Search分析Spot 46之MS/MS圖譜的搜索結果。(A) 共有2根peaks指向SODM_RAT蛋白質，總分數為134分並且其氨基酸序列的覆蓋率為13%。(B)為Mr=1768.8663的胜肽片段的詳細氨基酸序列分析後之質譜圖譜，可以判定此一胜肽片段的氨基酸序列為”K.HHATYVNNLNVTEEK.Y”。



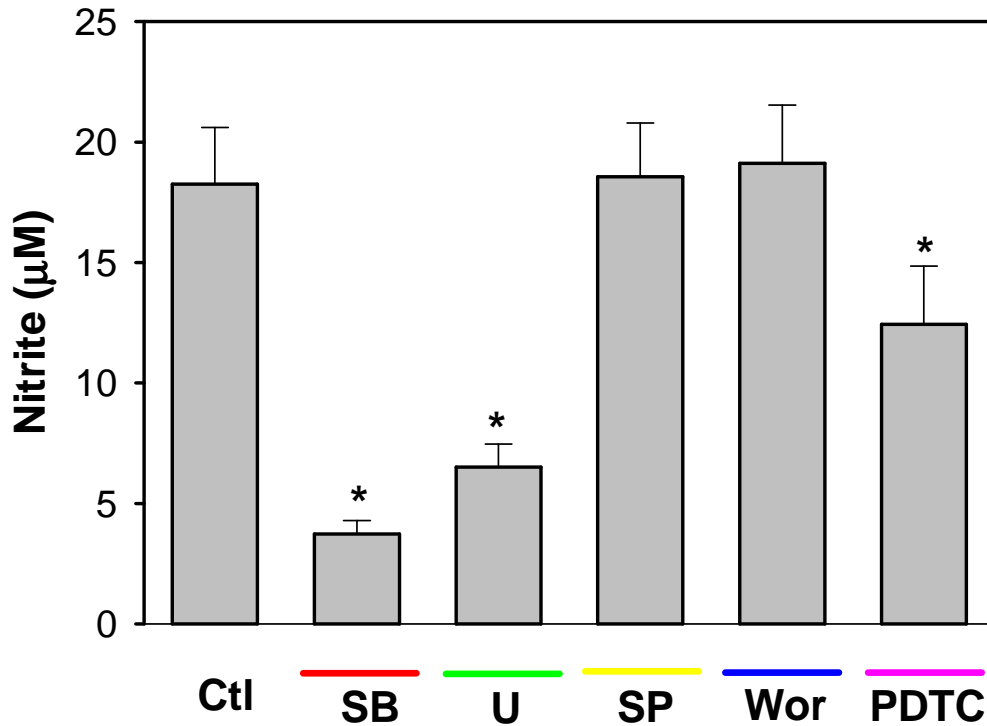
圖五、以蛋白質陣列分析內皮細胞分泌的蛋白質 (A)為控制組之蛋白質陣列實驗結果，其中有兩種蛋白質(TIMP-1及VEGF)在未受到LPS刺激時即可自內皮細胞分泌。(B)為內皮細胞受到LPS刺激後之細胞培養液經蛋白質陣列實驗結果，共有9種蛋白質可以被偵測，其中除了TIMP-1的表現量不受LPS影響外，VEGF約上升兩倍，其餘蛋白質均受到LPS作用後才會表現。(C)實驗結果之統計圖，以平均值±標準誤表示。共進行兩次獨立實驗，每此實驗為二重複，共有四次實驗數據進行分析。*表示與無LPS刺激時之控制組比較，經Student's t-test分析後 $P < 0.05$ 。



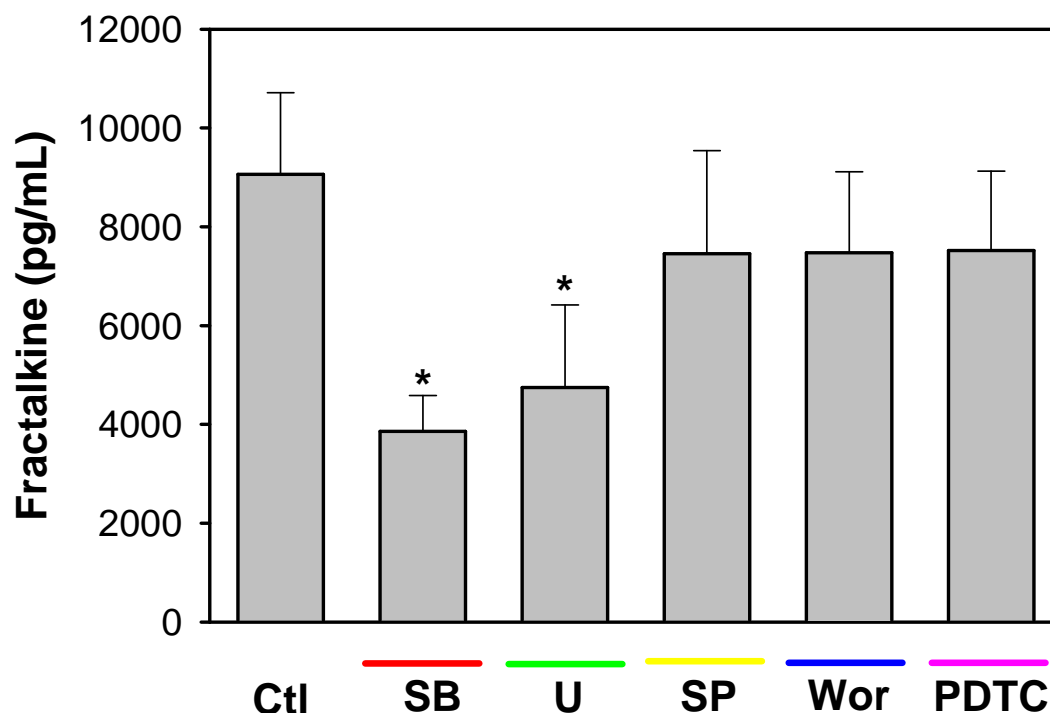
圖六、以BGSSJ註解及分析基因體與蛋白質體數據。將152個基因的IDs利用基因註解軟體(BGSSJ)進行分析，依據Gene Ontology(GO)分類，將133個基因分類為五個部分，分別為：Cellular component：118個基因，Molecular function：113個基因，Biological process：120個基因，Obsolete molecular function：1個基因 (Rad50, RAD50 homolog)，Obsolete cellular component：1個基因 (Tnni3, Troponin I)。

Spot No. ^{a)}	Protein Name	Accession No. ^{b)}	Entry Name	Mr/pI (Exp)	Mr/pI (Cal)	MS/MS score ^{c)}	Protein Ratio ^{d)}	mRNA Ratio ^{e)}
Cytosol proteins								
37	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	P27605	HPRT_RAT	30000/6.10	24462/6.07	123	3.10±0.87	—
45	Peroxiredoxin 1	Q63716	PRDX1_RAT	26000/7.60	22095/8.27	75	3.64±1.23	0.98
47	Peroxiredoxin 1	Q63716	PRDX1_RAT	26000/8.00	22095/8.27	124	1.47±0.18	—
85	Peroxiredoxin 1	Q63716	PRDX1_RAT	24500/7.80	22095/8.27	89	2.53±0.61	—
48	Transgelin	P31232	TAGL_RAT	26000/9.30	22457/8.88	40	0.41±0.04	1.47
Membrane proteins								
19	Ferritin heavy chain	P19132	FRIH_RAT	23000/5.50	20982/5.85	77	33.3±17.4	—
41	Ferritin light chain	P02793	FRIL1_RAT	18000/6.10	20662/5.98	231	3.67±1.36	1.95
Cytoskeleton proteins								
3C	Vimentin	P31000	VIME_RAT	63800/5.00	53569/5.06	335	—	—
3	Vimentin	P31000	VIME_RAT	6600/5.000	53569/5.06	162	0.58±0.11	—
54	Vimentin	P31000	VIME_RAT	63000/4.90	53569/5.06	261	0.46±0.09	—
55	Vimentin	P31000	VIME_RAT	62900/5.00	53569/5.06	226	0.36±0.08	—
63	Tropomyosin beta chain	P58775	TPM2_RAT	44000/4.30	32938/4.63	265	0.36±0.19	0.93
64	Tropomyosin 1 alpha chain	P04692	TPM1_RAT	43000/4.30	32675/4.71	38	0.45±0.23	1.08
30	PDZ and LIM domain protein 1	P52944	PDLI1_RAT	40000/7.00	35503/6.56	89	0.46±0.20	—

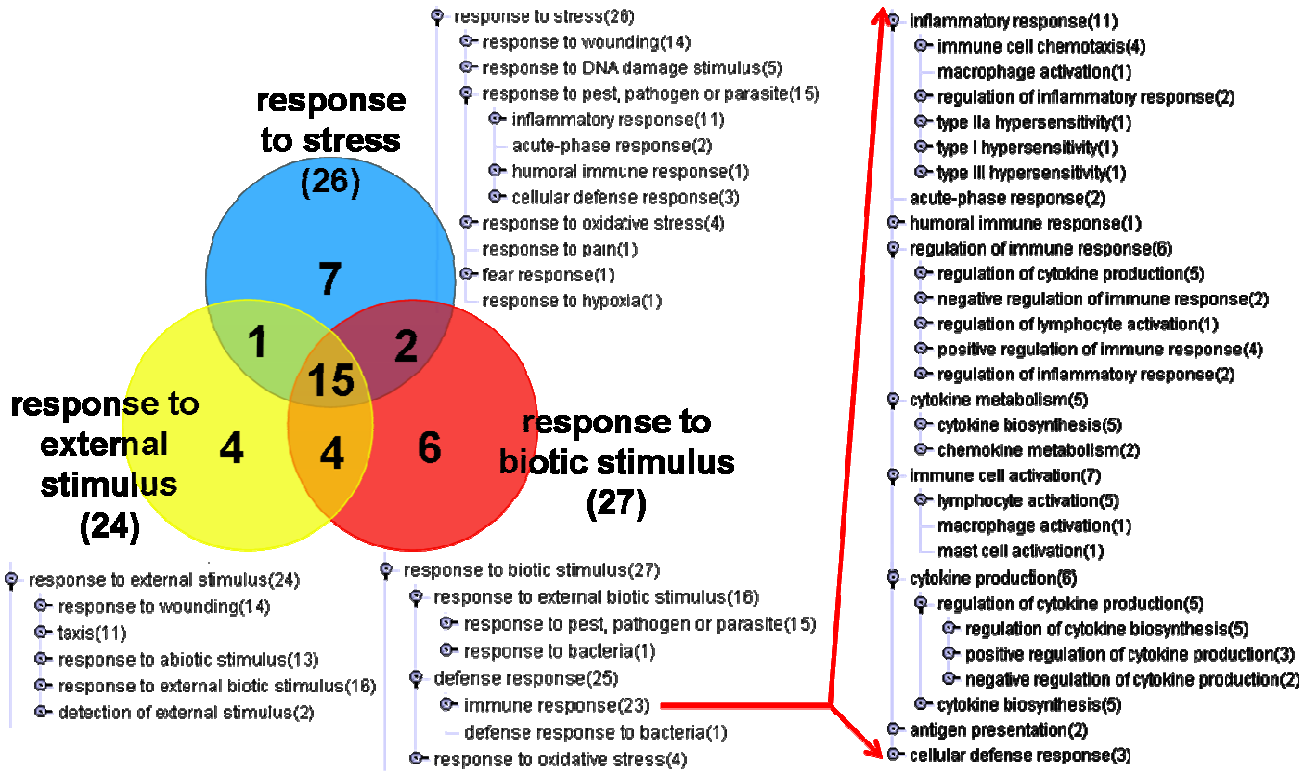
圖七、以BGSSJ註解及分析蛋白質體數據。以生物資訊程式BGSSJ進行分析，將發生變化的22個蛋白質輸入BGSSJ進行分析(註解率為89.9%)，分別為：Cellular component：17個蛋白質，Molecular function：21個蛋白質，Biological process：20個蛋白質。



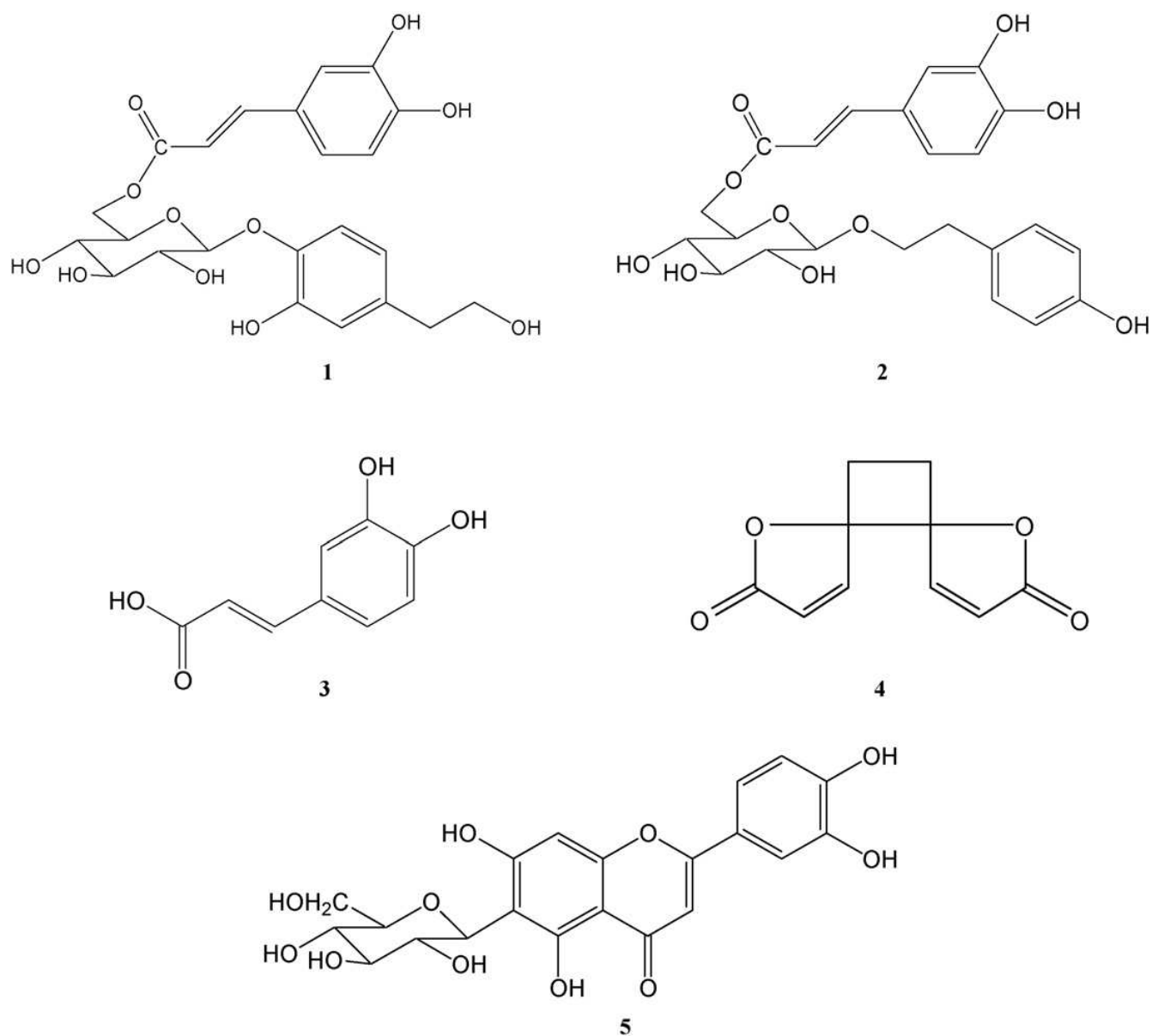
圖八、各種阻斷劑對LPS誘發iNOS表現的作用。預處理各種阻斷劑1小時後，再給予LPS (100 µg/mL)在2 % FCS之MEM培養液下培養內皮細胞，經24小時後收集細胞培養液。測定培養液中nitrite的濃度。阻斷劑包括：SB203580 (SB, p38阻斷劑，10 µM)、U0126 (U, ERK阻斷劑，10 µM)、SP600125 (SP, JNK阻斷劑，10 µM)、Wortmannin (W, PI3K/Akt阻斷劑，1 µM)及PDTC (NF-κB阻斷劑，100 µM)實驗結果以平均值±標準誤表示，共進行4~6次獨立實驗。*表示與單純處理LPS之控制組比較，經Student's t-test分析後 $P < 0.05$ 。



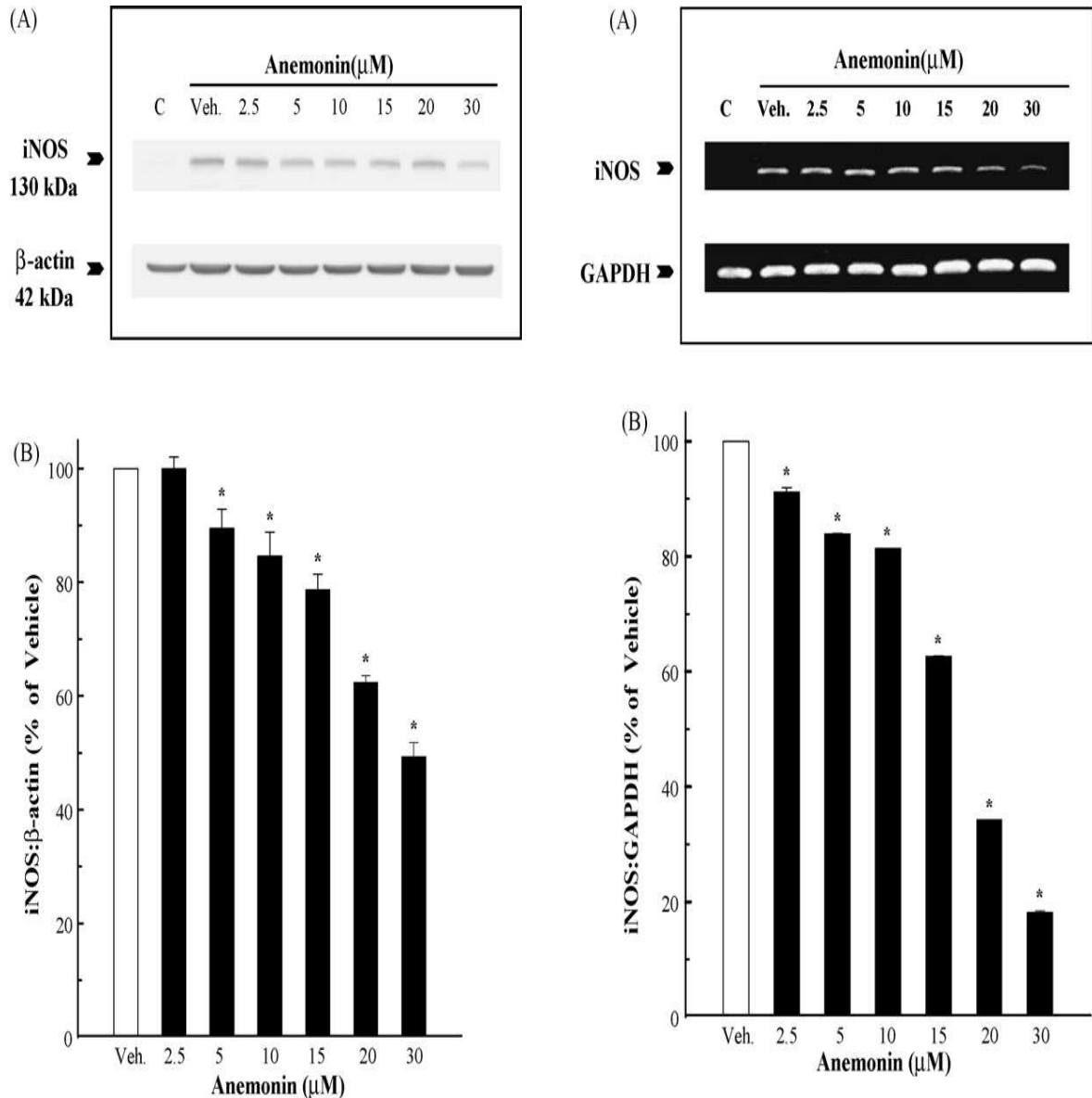
圖九、各種阻斷劑對於LPS誘發fractalkine表現的作用。預處理各種阻斷劑1小時後，再給予LPS (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)在2 % FCS之MEM培養液下培養內皮細胞，經24小時後收集細胞培養液。測定培養液中fractalkine的濃度。阻斷劑包括：SB203580 (SB, p38阻斷劑，10 μM)、U0126 (U, ERK阻斷劑，10 μM)、SP600125 (SP, JNK阻斷劑，10 μM)、Wortmannin (W, PI3K/Akt阻斷劑，1 μM)及PDTC (NF- κB 阻斷劑，100 μM)實驗結果以平均值 \pm 標準誤表示，共進行4~6次獨立實驗。*表示與單純處理LPS之控制組比較，經Student's t-test分析後 $P < 0.05$ 。



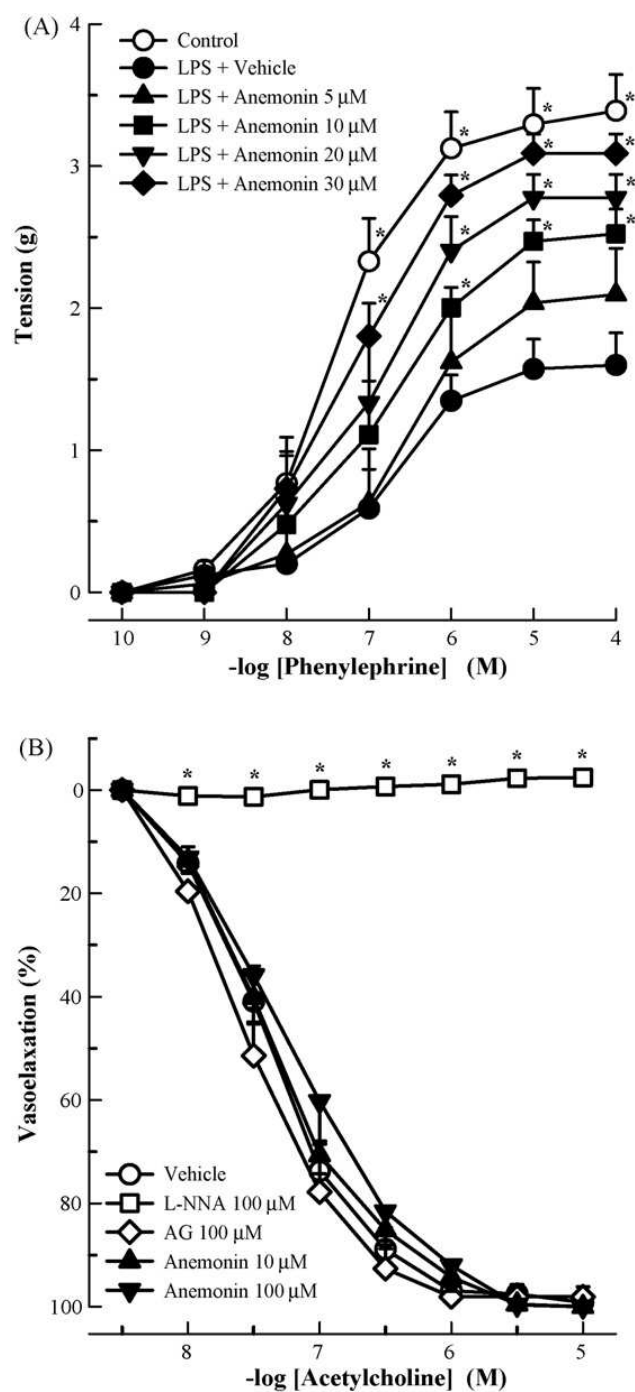
圖十、以 BGSSJ 註解及分析之文式圖。153 個基因或蛋白質被 BGSSJ 所註解，區分於 537 個不同的分類。其中共有 27 個基因與 13 個蛋白質透過註解被分類在“response to external stimulus”。文氏圖 (Venn Diagram) 表示次一層分類 “response to stress”、“response to external stimulus” 及 “response to biotic stimulus” 及各分類之交集的數目。目前研究 LPS 誘發的生理反應當中 “Immune response” 是相當受到重視，也是研究的主要方向。透過 BGSSJ 的分析，發現有 13 個基因與 10 種蛋白質被歸類於免疫反應。其中在 “inflammatory response” 共有 6 個基因 (*Il1b*、*Ccl21b*、*Fgg*、*Fcgr3*、*Aif1* 及 *Ahsg*) 與 5 種蛋白質 (*LIX*、*MIP-3α*、*MCP-1*、*CINC-2* 及 *CINC-3*) 被歸類於發炎反應。



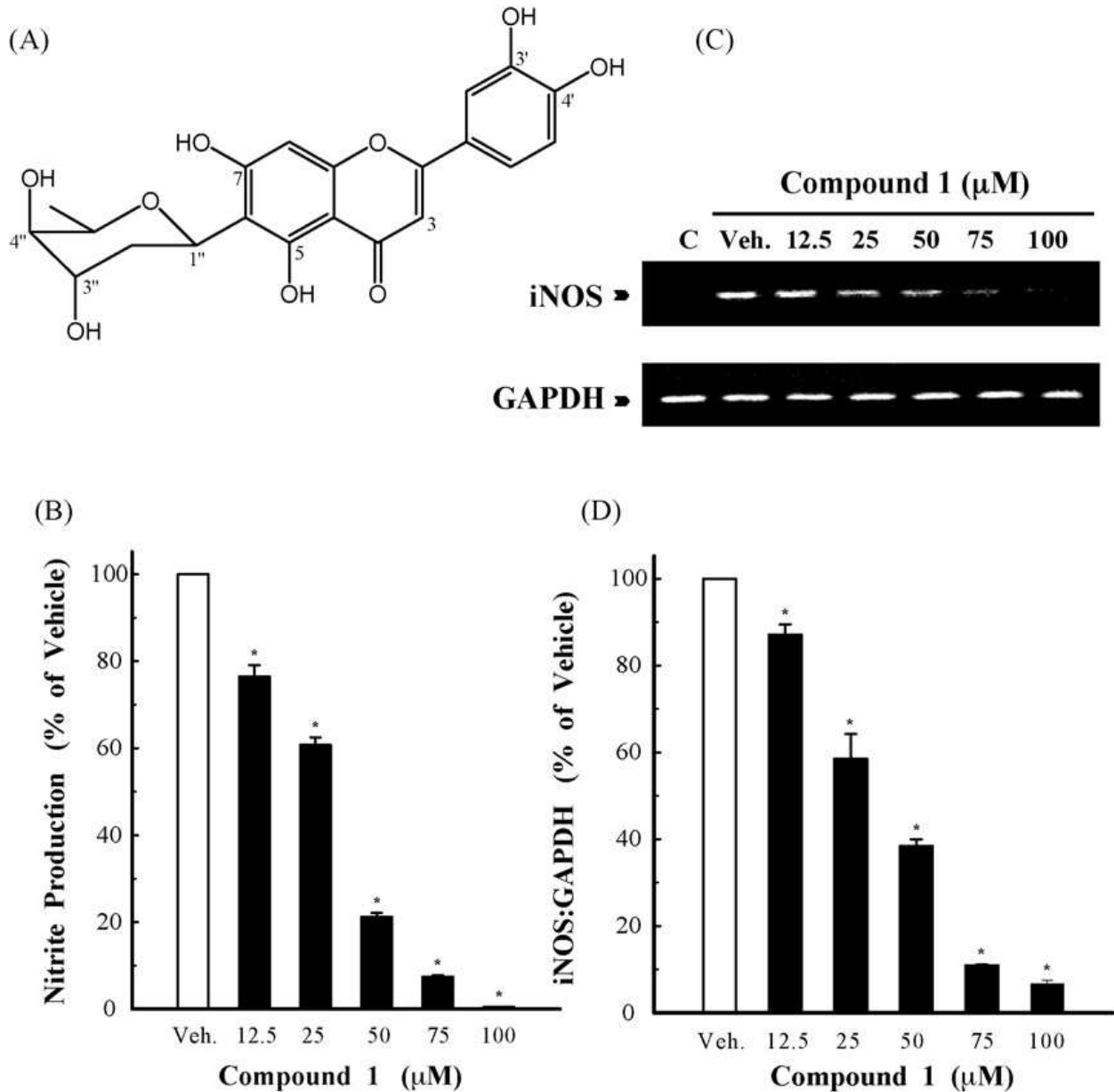
圖十一、厚葉鐵線蓮成分之構造式。五各化合物分別為： ibotanolide B (1), calceolarioside B (2), *trans*-caffeic acid (3), anemonin (4) and 3',4',5,7-tetrahydroxy-6-C-glucopyranosylflavone (5)。



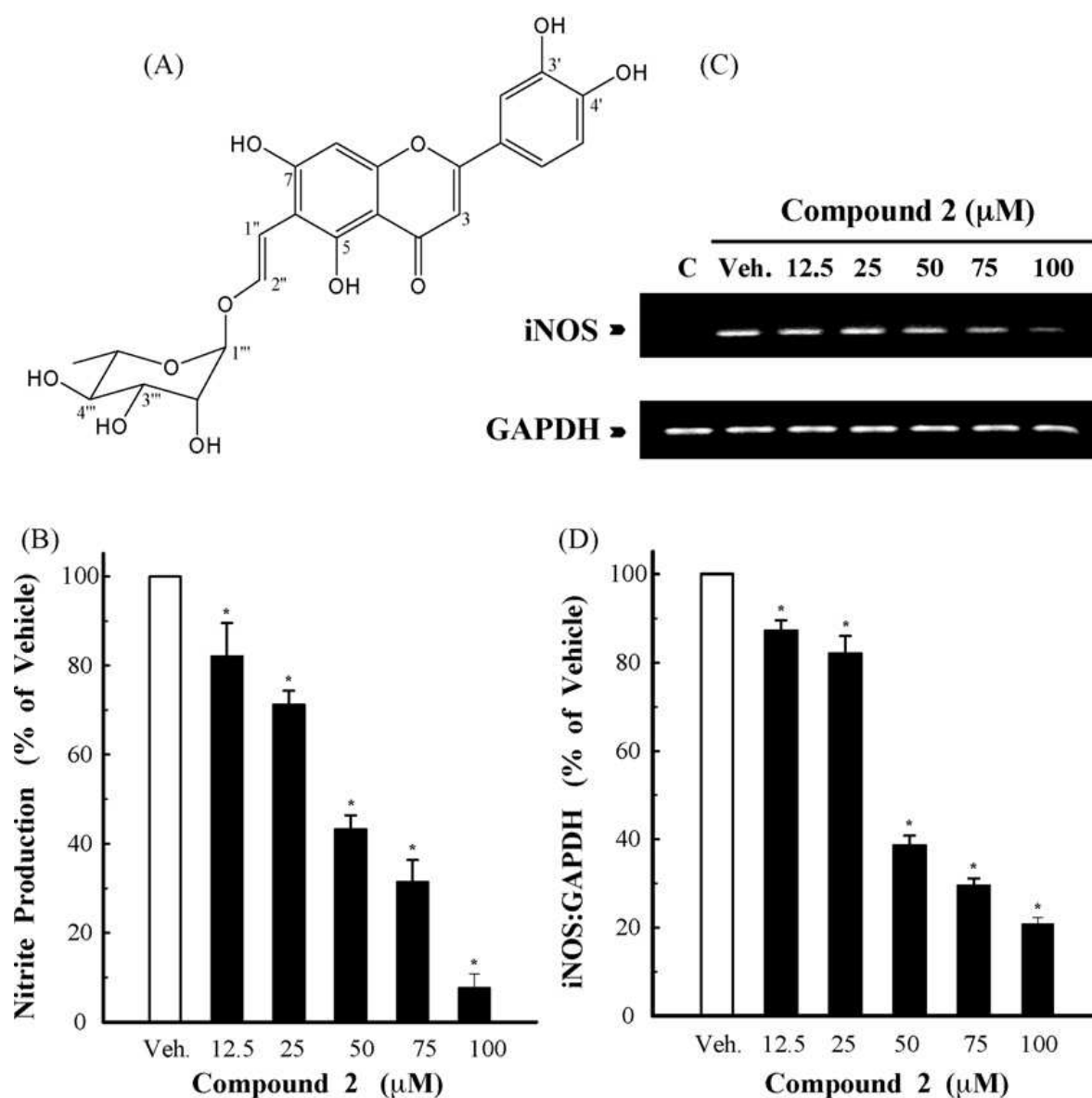
圖十二、左圖(A)厚葉鐵線蓮成分 anemonin 濃度相關性抑制 iNOS 蛋白質的表現。左圖(B) 為 anemonin 抑制 iNOS 蛋白質表現的量化結果。右圖(A)厚葉鐵線蓮成分 anemonin 濃度相關性抑制 iNOS mRNA 的表現。右圖(B)為 anemonin 抑制 iNOS mRNA 表現的量化結果。
*表示與對照組比較，經 Student's t-test 分析後 $P < 0.05$ 。



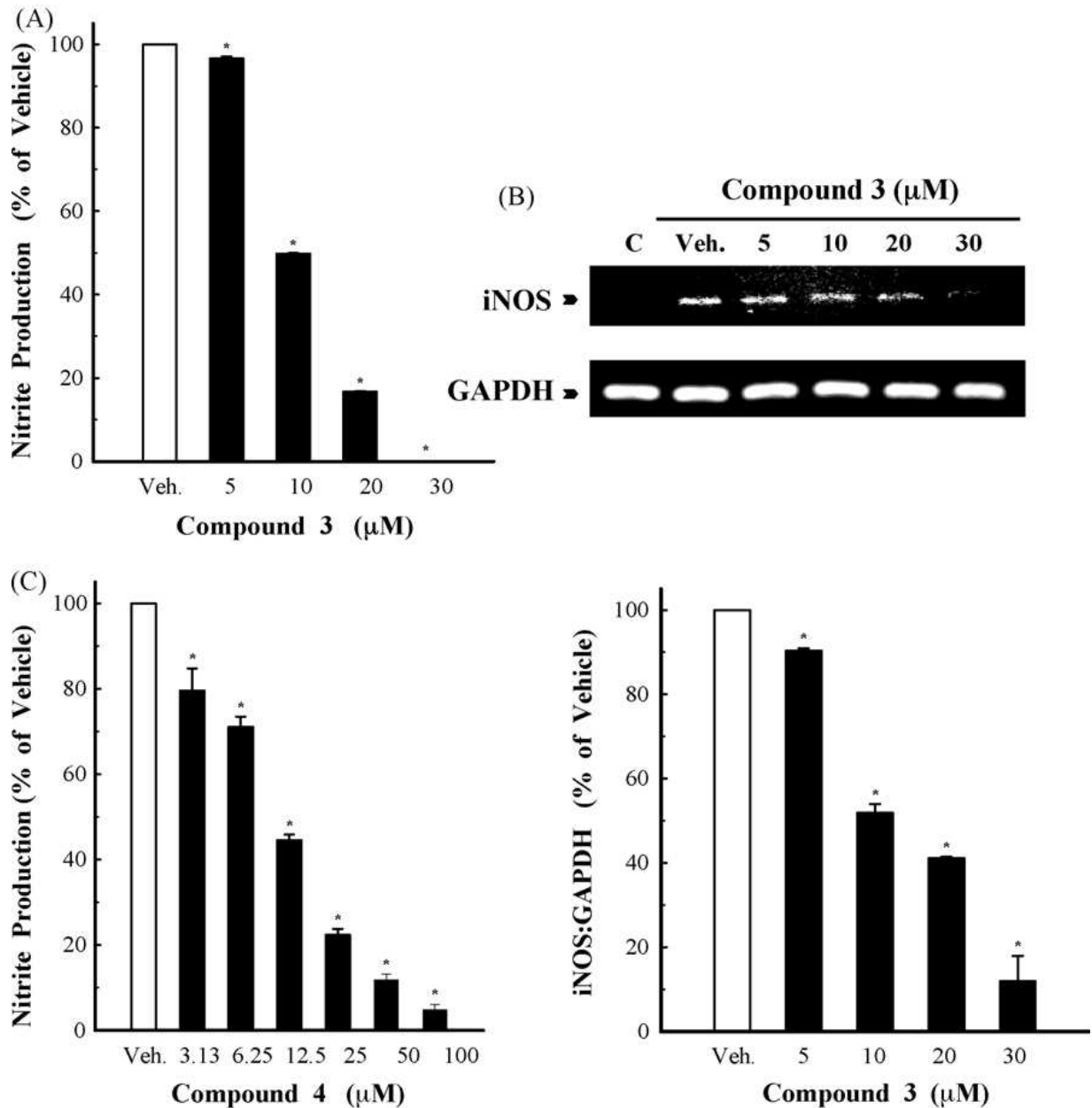
圖十三、(A)厚葉鐵線蓮成分anemonin在去除內皮細胞血管環處理LPS (300 ng/ml)後，對phenylephrine (1 nM- 100μM)引起收縮的作用。*表示與對照組比較，經Student's t-test分析後 $P < 0.05$, $n = 6-7$ 。(B)預處理anemonin(10, 100μM)、L-NNA(100μM)、aminoguanidine (AG, 100μM)20分鐘，對 acetylcholine (10 nM-10 M) 引起舒張作用的影響。*表示與對照組比較，經Student's t-test分析後 $P < 0.05$, $n = 4-5$ 。



圖十四、(A)金絲草成分化合物1 (luteolin 6-C- β -boivinopyranoside) 之構造式。(B)化合物1濃度相關性抑制一氧化氮之產生。化合物1 (12.5–100 μ M)明顯抑制LPS (20 ng/ml)噬菌細胞株(RAW 264.7 cells)誘發iNOS所產生之一氧化氮。(C)化合物1濃度相關性抑制iNOS mRNA的表現。(D)化合物1抑制iNOS mRNA表現的量化結果。*

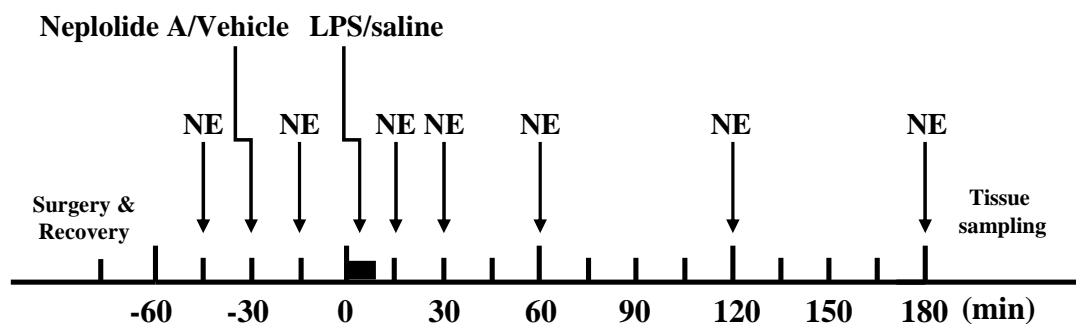


圖十五、(A)金絲草成分化合物2 (6-*trans*-(2''-*O*- α -rhamnopyranosyl)ethenyl-5,7,3',4'-Tetra hydroxyflavone) 之構造式。(B) 化合物2濃度相關性抑制一氧化氮之產生。化合物2 (12.5–100 μ M)明顯抑制LPS (20 ng/ml)噬菌細胞株(RAW 264.7 cells)誘發iNOS所產生之一氧化氮。(C) 化合物2濃度相關性抑制iNOS mRNA的表現。(D) 化合物2抑制iNOS mRNA表現的量化結果。*表示與對照組比較，經Student's t-test分析後 $P < 0.05$ 。

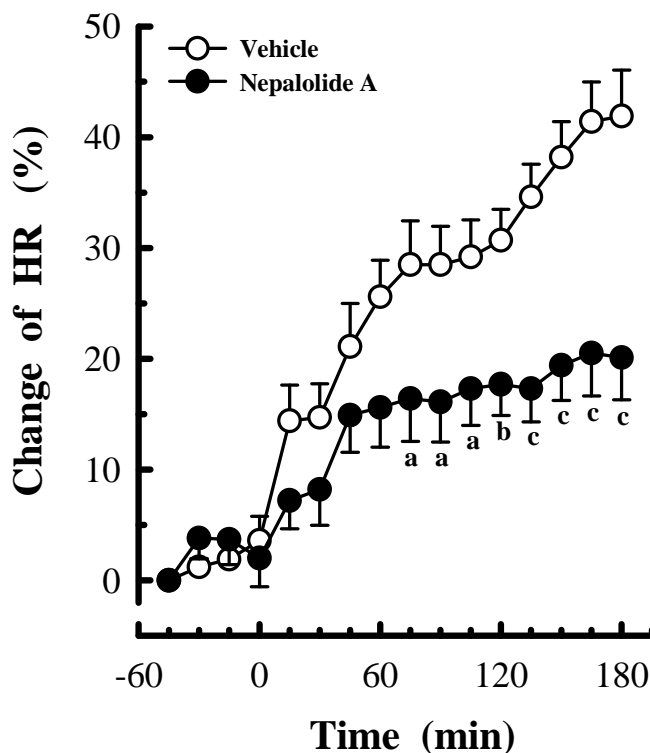


圖十六、(A)金絲草成分化合物3 (luteolin)與化合物4 (kaempferol)之構造式。
 (B)化合物3濃度相關性抑制iNOS mRNA的表現。化合物3 (5–30 μM)明顯抑制LPS (20 ng/ml)在噬菌細胞株(RAW 264.7 cells)引起之iNOS mRNA的表現。(C)化合物3抑制iNOS mRNA表現的量化結果。
 *表示與對照組比較，經Student's t-test分析後 $P < 0.05$ 。

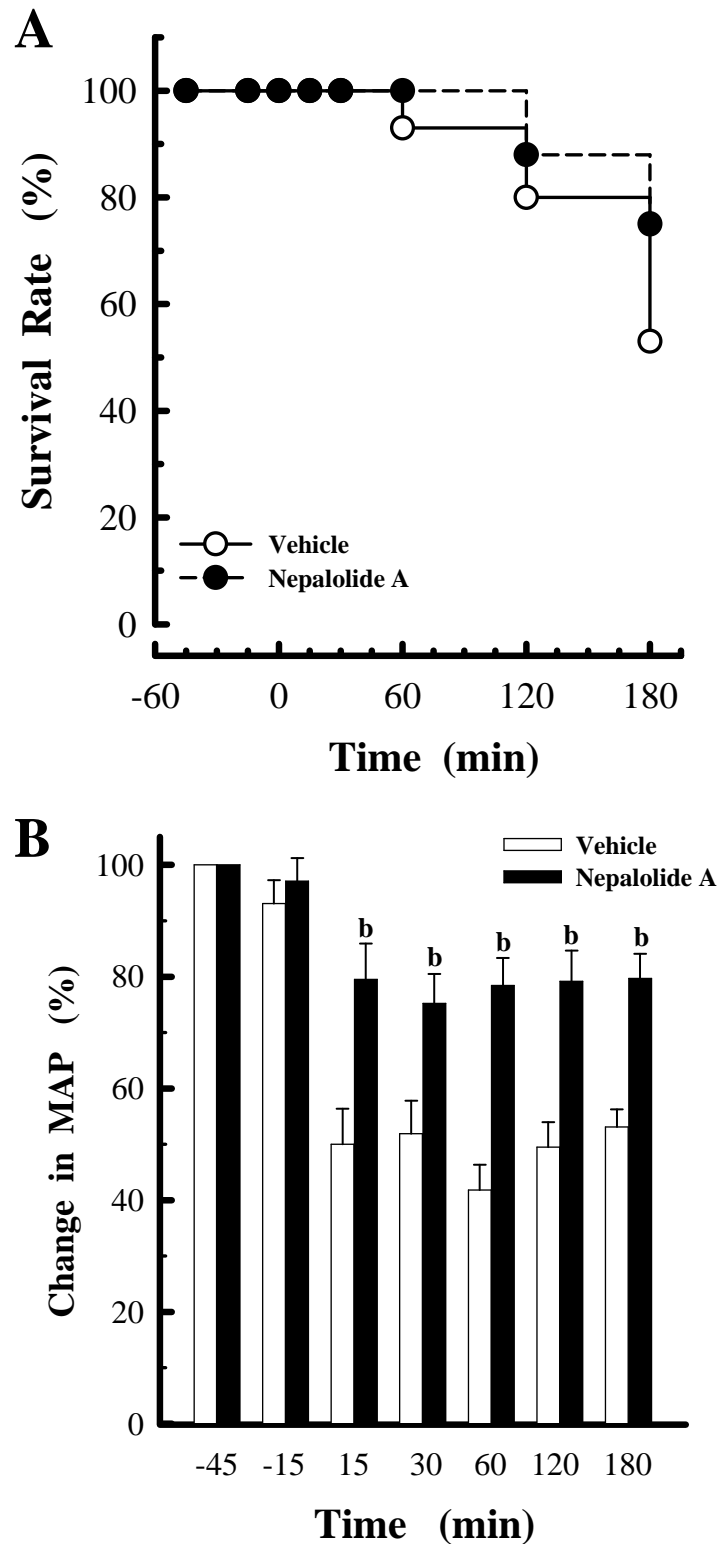
A



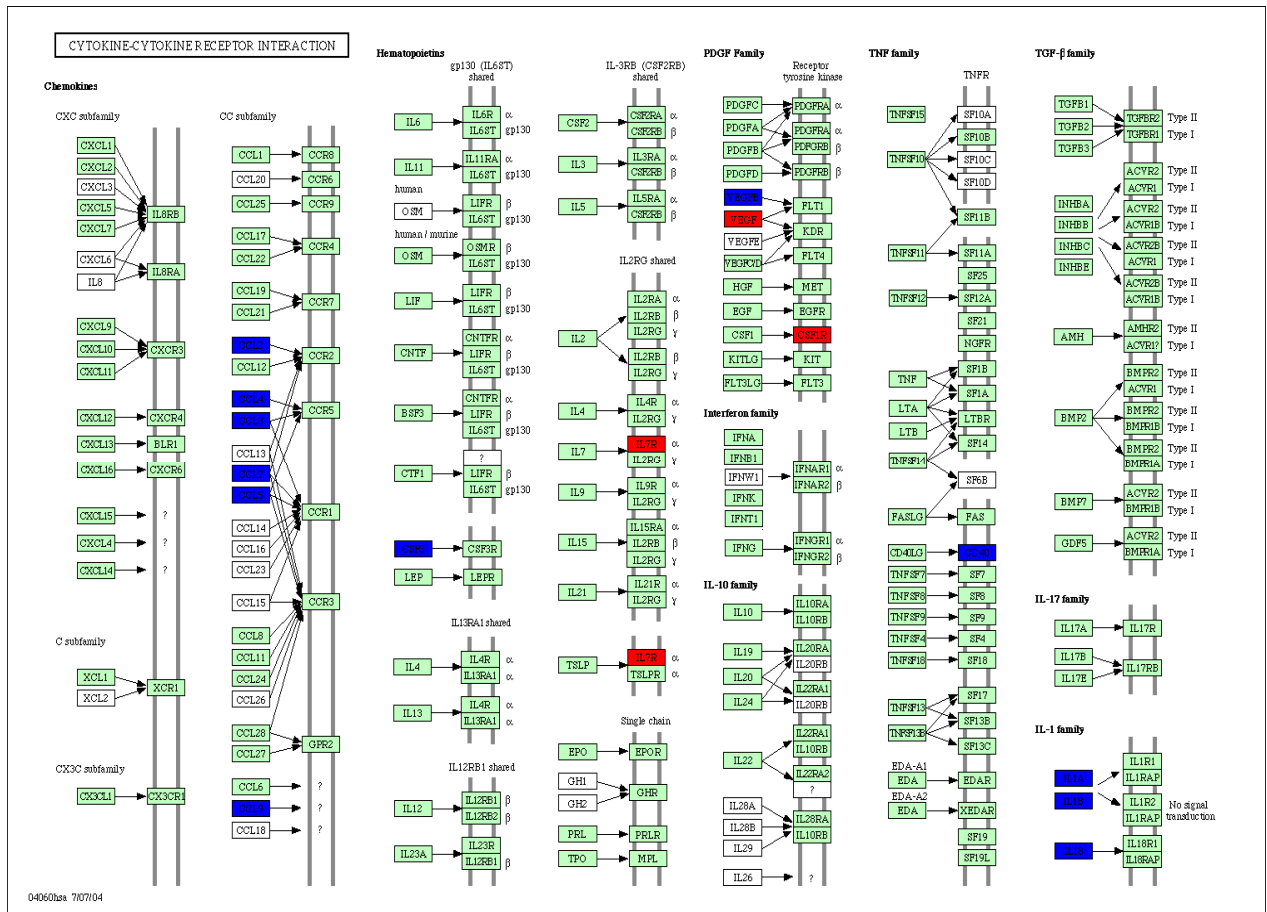
B



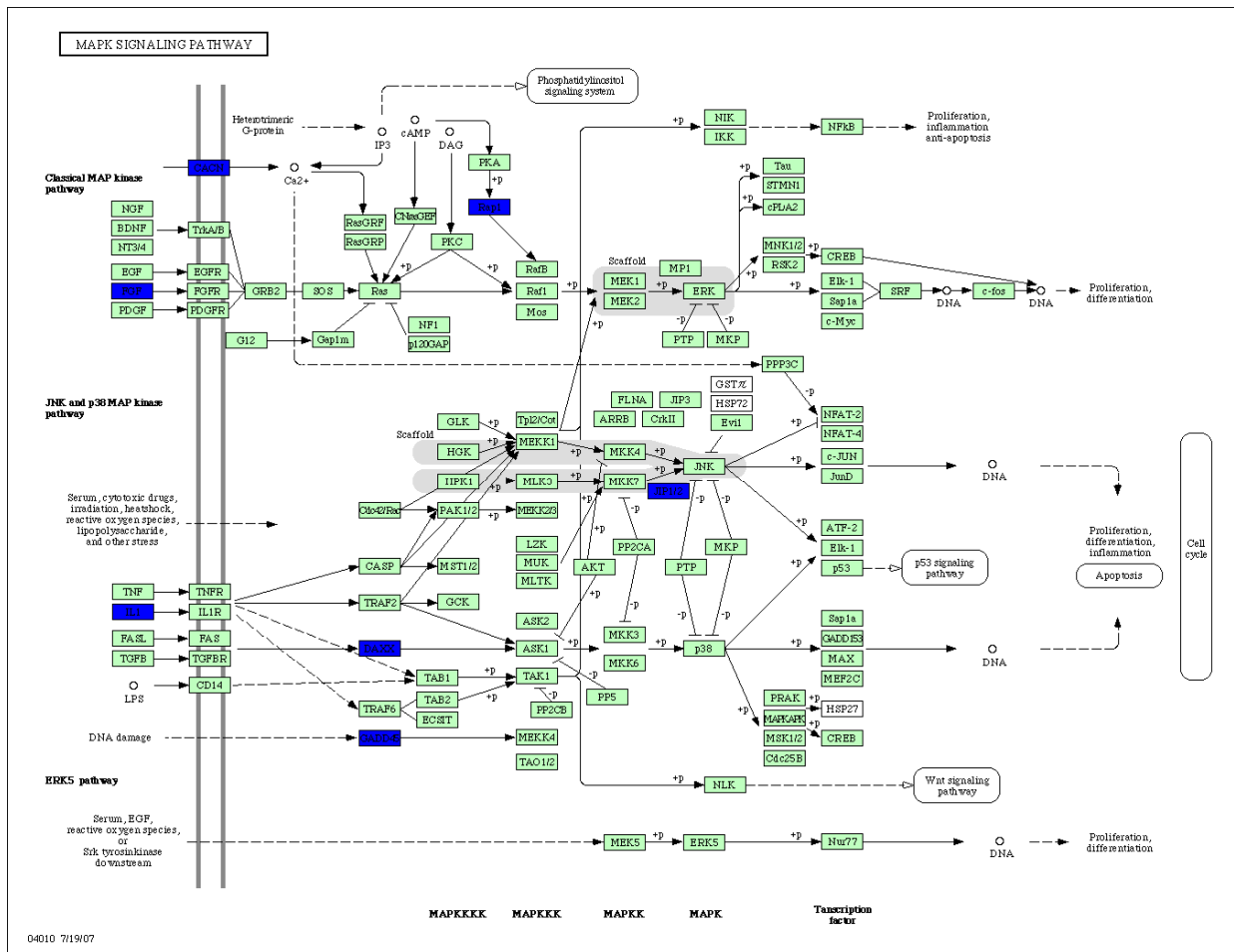
圖十七、(A)動物模型之實驗設計。對照組在時間點”零”靜脈注射生理食鹽水。黃金珠活性成分(10 mg/kg)或其溶劑靜脈注射後30分鐘，輸注LPS (5 mg/kg, i.v.)；Norepinephrine (NE, 1 mg/kg)在箭頭所示之處靜脈注射。(B) 黃金珠成分在麻醉大鼠抑制LPS引起之心搏過速作用。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$ 表示與對照組比較，經Student's t-test分析的結果。



圖十八、(A) 黃金珠成分改善LPS引起之大鼠存活率降低。(B) 預處理黃金珠成分減少LPS引起之血管反應性降低。^b $P < 0.01$ 表示與對照組比較，經Student's t-test分析的結果。



圖十九、經基因微陣列分析(KEGG database)，黃金珠成分引起“cytokine-cytokine receptor interaction”路徑之 *IL1A*、*CSF3*、*CCL2* 等 12 個基因的表現增加，*CSF1R*、*IL7R*、*VEGF* 等 3 個基因的表現減少。



圖二十、經基因微陣列分析(KEGG database)，黃金珠成分引起“MAPK signaling”路徑之 *IL1*、*FGF*、*CACN* 等 7 個基因的表演減少。

