

編號：CCMP93-RD-047

## 過敏性鼻炎針刺治療前後之微陣列分析

張恒鴻

長庚紀念醫院

### 摘 要

基因微陣列 (Microarray) 為近年來新發展的分類與鑑定的工具，本計畫微陣列實驗由長庚醫院及長庚大學的「基因體醫學研究核心實驗室」(Genomic Medicine Research Core Laboratory-GMRCL)，進行「過敏性鼻炎針刺治療前後之微陣列分析」，利用血液檢體進行 cDNA microarray，以測量針刺治療前後之免疫反應基因與過敏性鼻炎臨床資料的相關性。本計畫將探討針刺對過敏性鼻炎的分子生物學與免疫學上的機轉，患者進行針刺治療，在治療過程中，抽取病人血液檢體為材料，進行 microarray 以測量免疫反應基因的變化。

臨床上許多過敏性鼻炎患者，因為畏懼西醫藥物治療的副作用，而求助於傳統中醫藥以及針刺的幫助，針刺具有良好的治療與保健作用，從免疫的角度對針刺作用探討研究顯示，針刺可以調整體內各種不同的免疫物質趨于穩定和平衡，使之有利于人體生理機能，近年已有研究指出，以針刺治療氣喘或過敏性鼻炎，可以有效改善免疫反應。本計畫希望藉由結合中醫部門臨床醫師與 GMRCL 實驗室的豐富 Microarray 經驗，更深入探討針刺對過敏性鼻炎的作用機轉。以基因導向醫學觀點檢驗傳統中醫學常見之「同病異治」與「異病同治」。

預計針對 18-45 歲出現打噴嚏、流鼻水及鼻塞等三大症狀的患者，且治療前一個月未曾服用中藥或西藥者，給予針刺治療。病患將接受為期 4 週、每週 2 次，總計共 8 次的針刺治療。並在針刺前、針刺後 2 小時、針刺後 24 小時與接受第八次針刺療程後，對病患抽血 (總計進行 4 次，每次抽血 5mL)，進行周邊血液分析以及 Microarray 分析。Microarray 結果分析將研究：(I)過敏性鼻炎患者針刺治療前後，血液中基因表現的改變。(II)血液中基因表現的改變與特定血球數量的關連性。最後將會針對病患在治療前、中、後之臨床症狀做統計分析，並與 Microarray 結果分析做關聯對照，以獲得最後之結論。

關鍵詞：基因微陣列、過敏性鼻炎、針刺

Number: CCMP93-RD-047

# **The cDNA Microarray Analysis for Allergic Rhinitis Treatment in Traditional Chinese Medicine**

Hen-Hong Chang

Chang Gung Memorial Hospital

## **ABSTRACT**

This project "The cDNA Microarray analysis for allergic rhinitis treatment in Traditional Chinese Medicine" will be performed at Genomic Medicine Research Core Laboratory-GMRCL in Chung Gang University and Chung Gang memorial hospital. Allergic rhinitis patient will receive acupuncture treatment, blood sample was attained before and after the acupuncture therapy. Then we use cDNA microarray to analysis the immunomodulatory effects of acupuncture in the treatment of allergic rhinitis.

Many allergic rhinitis patients receive tradition Chinese medicine treatment, to avoid the side effect of anti-histamine. Acupuncture treatment is a suitable treatment for complex chronic disease such as allergic rhinitis. According to recent journal reports, acupuncture performed in accordance with the principles of traditional Chinese medicine would show significant immune-modulating effects . This project plan to combine the experience of clinical doctor and GMRCL cDNA Microarray for the mechanism of acupuncture on allergic rhinitis. The principles of traditional Chinese medicine such as "treating the same disease with different therapies", "treating different diseases with the same therapy" will be studied.

We plan to study the effects of acupuncture treatment for allergic rhinitis. All patient during 18-45 years old were treated 8 times for 20 minutes over a time

period of 4 weeks. Patients' general well-being and several peripheral blood parameters were determined before and after the acupuncture treatment. The cDNA microarray analysis would find the genomic change before and after the acupuncture treatment.

Keywords : cDNA microarray, allergic rhinitis, acupuncture

## 壹、前言

傳統中醫學對過敏疾病的診斷治療已經累積了豐富臨床經驗，本計畫希望藉由結合中醫部門臨床醫師與 GMRCL 實驗室的豐富 Microarray 經驗，深入探討針刺對過敏性鼻炎的作用機轉，以基因導向醫學觀點檢驗傳統中醫學的現代物質基礎。針刺在分子生物學與免疫學上的機轉仍待研究，本計畫將探討針刺對過敏性鼻炎的分子生物學與免疫學上的機轉，患者進行針刺治療，在治療過程中，抽取病人血液檢體為材料，進行 RNeasy MinElute kit 以測量免疫反應基因的變化。

人類過敏疾病的罹患率近二十年來，成倍數的增長，根據近年研究報告，過敏性鼻炎在成人以及兒童的盛行率分別約為 30% 和 40% (Skoner DP, 2001)。患有過敏性鼻炎的病患常會合併其他的過敏性疾病，如異位性皮膚炎、過敏性結膜炎、蕁麻疹以及過敏性氣喘，其家族成員中也常會患有過敏性疾病，這些過敏性疾病常嚴重影響生活品質。

2001 年世界衛生組織 WHO 正式發表有關過敏性鼻炎和氣喘之關連性文章 (Bousquet, 2001) 簡稱為 ARIA (allergic rhinitis and its impact on asthma) (Bachert et al., 2003)。認為氣喘和鼻炎常發生在同一個病人身上，所以提出「單一呼吸道，同一疾病」的觀念。這與傳統中醫學的觀點，「肺主皮毛」、「肺開竅於鼻」，有著相近的觀念。藉由探討針刺對過敏性鼻炎的作用機轉，可以基因導向醫學觀點檢驗傳統中醫學常見之「異病同治」觀念。

依據國外的文獻報導，International Rhinitis Management Working Group 曾經在 1994 年，結合世界數十位專家發表了 International Consensus Report on the diagnosis and management of rhinitis (Luno et al., 1994)，這是一篇有關鼻炎診治的重要臨床指引。而 Van Cauwenberge 為首的專家們，於 2000 年發表 Consensus statement on the treatment of allergic rhinitis (van Cauwenberge P, 2000) 明確地指出過敏性鼻炎簡單且有效的治療模式，做為給家庭醫師及專科醫師參考。

過敏反應若發生於鼻腔，會產生鼻癢、打噴嚏、流鼻水、鼻塞、鼻涕倒流、喉嚨有痰、慢性咳嗽等症狀 (van Cauwenberge P et al., 1999, Skoner DP, 2001)。最常見的症狀為連續性打噴嚏、流鼻水及鼻塞等三大症狀，並且鼻子、眼睛、喉嚨常有搔癢感，因此罹患過敏性鼻炎的病患常常喜歡揉眼睛、揉鼻子以及清喉嚨。若過敏反應發生於支氣管，會促使支氣管平滑肌收縮、黏膜腫脹、分泌物增加。大部份氣喘患者會有

胸悶、呼吸困難、咳嗽有痰及呼吸有喘鳴聲等症狀。過敏性鼻炎以往大致可分為兩類：「季節性 (Seasonal) 過敏性鼻炎」和「全年性 (Perennial) 過敏性鼻炎」。「季節性過敏性鼻炎」引起過敏的因素多為花粉與黴菌，這兩種過敏原須在春暖花開及潮濕的梅雨季才會大量繁殖，因此疾病的發生人在每年特定的季節。「全年性過敏性鼻炎」的發生率則常為全年性且會反覆發作，致病的過敏原比較廣泛，例如灰塵或塵蟎等。過敏性鼻炎的診斷包括：病史 (過敏體質及家族史)，理學檢查：前鼻鏡及內視鏡檢查，實驗室檢查：鼻分泌液及鼻黏膜的細胞圖、過敏原皮膚試驗、鼻腔激發試驗 (Nasal challenge tests)、血清特定 IgE 的測定。過敏性鼻炎的治療原則有：避免過敏原、藥物治療、免疫療法、衛教及後續的追蹤等。

和以往發表之臨床指引最大的不同處，在 ARIA 以實證醫學 (Evidence-based Medicine) 的觀點提出過敏性鼻炎實證醫學式的診斷及治療模式 (Pawankar, 2002)。根據 ARIA 新的分法 (以鼻炎症狀及生活品質做為參考變數)，以時間 (Duration) 分為 Intermittent 或 Persistent (傳統分法為 Seasonal 或 Perennial)；以症狀之嚴重度分為 Mild 或 Moderate/Severe 兩大類，並根據以上的新分法推薦出過敏性鼻炎的階梯式治療模式。

關於過敏性鼻炎之西醫生理病理機轉，依據近年來的文獻，主要是與 IgE/Mast cell/TH2 lymphocyte 免疫反應有關 (Bachert C et al., 1998; Benson M et al., 2001; Varga EM et al., 1999)，當過敏性鼻炎病患接觸過敏原之後，會出現：(1)Sensitization and memory, (2)Early phase, (3)Late phase 等三種反應 (Skoner DP, 2001; Valenta R, 2002)。Early phase 會讓病患產生打噴嚏、鼻癢、流鼻涕以及鼻塞等症狀，Late phase 則進一步讓病患產生疲倦、疲憊不堪、易惱怒等症狀 (Holgate ST. 2003)。

世界衛生組織于 2002 年 5 月 16 日首次公布了《2002 年至 2005 年世界衛生組織傳統醫藥及替代醫藥全球策略》【WHO TRADITIONAL MEDICINE STRATEGY 2002-2005】(World Health Organization, 2002)。世界衛生組織希望其實施能達到如下目的：(1)鼓勵各國政府開展對傳統醫藥/替代醫藥的規範化管理並將其納入本國的國家衛生保健系統。(2)促進傳統醫藥/替代醫藥的安全性、有效性及質量標準研究。(3)保證民眾對傳統醫藥/替代醫藥的可獲得性及費用的可承受性。(4)促進傳統醫藥/替代醫藥的合理使用。當世界衛生組織提出此重大主張之後，我們更應該對傳統中醫學投入更多的研究。

傳統中醫學對過敏性鼻炎的治療已經累積了豐富臨床經驗，臨床上許多過敏性鼻炎患者，因為畏懼西醫藥物治療的副作用，而求助於傳統中醫藥的幫助，並獲得良好成效 (Xue CC et al., 2003; 姚練武, 2002)。針刺具有良好的治療與保健作用，從免疫的角度對針刺作用探討研究顯示，針刺可以調整體內各種不同的免疫物質趨于穩定和平衡，使之有利于人體生理機能，近年已有研究指出，以針刺治療過敏性鼻炎，可以有效改善免疫反應 (Petti FB, 2002; 婁述; 2000)。雖然在中醫藥或針刺治療過敏性鼻炎已經有許多的學術報導，但大多數僅限於臨床實驗，缺少更深入的分子醫學研究 (婁述, 2000)。近年已有研究指出，運用傳統中藥治療過敏性鼻炎，可顯著增加 IL-10，但降低 IFN- $\gamma$  及 IL-5 的濃度，而嗜中性白血球環氧酶-2 訊息 RNA (COX-2mRNA) 的表現則受到抑制 (Yang SH et al., 2001; Yang SH et al., 2002)，以針刺治療氣喘或過敏性鼻炎，則可以有效降低 IL-10、IL-8 (Joos S et al., 2000; Petti FB et al., 2002; Jeong HJ et al., 2002)，且其臨床症狀亦改善。文獻報告指出針刺對抗發炎反應的作用，可能與 Neuropeptides (Substance P, Neurokinin A, Neuropeptide Y, Vaso-active intestinal peptide, Bradykinin, Calcitonin gene related peptide,  $\beta$ -Endorphin)，Cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ )，或其它 vaso-active substances (Nitric oxide, Eicosanoids, Serotonin) 等物質有關 (Zijlstra FJ, 2003; Bonta IL, 2002)，學者更進一步為針刺可能造成這些物質作用機轉提出假說。

基因微陣列 (Microarray) 為近年來新發展的分類與鑑定的工具，國內許多大型研究單位及學校都投入大量人力與資金進行 Microarray 技術的開發，本計畫 Microarray 實驗由長庚醫院及長庚大學的「基因體醫學研究核心實驗室」(Genomic Medicine Research Core Laboratory) 進行，核心實驗室已可利用血液檢體進行 cDNA microarray 以測量免疫反應基因與疾病臨床資料的相關性。而針刺在分子生物學與免疫學上的機轉仍待研究，本計畫將探討針刺對過敏性鼻炎的分子生物學與免疫學上的機轉，患者進行針刺治療，在治療過程中，抽取病人血液檢體為材料，進行 microarray 以測量免疫反應基因的變化。本計畫採用 Microarray 技術來探討針刺對過敏性鼻炎的分子生物學與免疫學上的效應及機能，將可為學者提供未來研究方向之參考。

## 貳、材料與方法

本計畫藉由結合長庚紀念醫院中醫部門臨床醫師與 GMRCL 實驗室的豐富 Microarray 經驗，以 cDNA Microarray 探討中醫針刺對過敏性鼻炎患者的血液 RNA 表現圖譜的影響，藉以瞭解中醫針刺在分子生物學上可能機轉。

核心實驗室所使用的 cDNA Probe 採用 7,334 個已定序 cDNA 菌株。依 UniGene Build 133 的統計 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene))，此 cDNA 菌株組中含有 6,000 個不同的基因，80% 以上的基因有相關分子生物學的資料。核心實驗室 microarray 晶片製作技術已完全成熟，每片晶片上佈陣 14,668 點 (7,334 基因重複二次)，目前每週進行 20-40 片晶片標定，提供將近 20 個實驗室使用，並協助資料分析。

針對 18-45 歲出現打噴嚏、流鼻水及鼻塞等三大症狀的患者，且治療前一個月未曾服用中藥或西藥者，經過說明同意參與試驗並簽署同意書後，由耳鼻喉科醫師確定診斷後納入試驗。病患接受針刺治療穴位為迎香、合谷、印堂、足三里等 (Petti FB, 2002)。每週進行 2 次針刺，在四週內總計針刺八次。並在第一次針刺前、第一次針刺後 2 小時、第一次針刺後 24 小時與第八次針刺後，對病患抽血 (每次抽血 5mL)，進行周邊血液分析以及 cDNA Microarray 分析。Microarray 針對 (1) 第一次針刺後 2 小時與第一次針刺前的血液 RNA，(2) 第一次針刺後 24 小時與第一次針刺前的血液 RNA，(3) 針刺後 4 週與第一次針刺前的血液 RNA，來分析針刺治療過程中的作用機轉。

其中 2.5mL 血液檢體由長庚醫院臨床病理科，進行血液分析，檢查項目包括 total white count, differential counts for neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils, basophils 及 IgE 等。

另外 2.5mL 血液檢體儲存在含有 RNA stability reagent 的 PAXgene™ Blood RNA Tubes 中，在林口長庚基因體醫學研究核心實驗室進行血液檢體 RNA 純化與 cDNA Microarray 分析。然後使用 PAXgene Blood RNA System (Qiagen, USA) 純化並儲存在 -80°C。然後使用 RNeasy MinElute kit (Qiagen, USA) 進行 RNA 純化。然後使用 Bioanalyzer 2,100 (Agilent, CA, USA) 進行 RNA 定性與定量分析。cDNA Microarray 每片玻片使用 2µg total RNAs 以 3DNA Array 900RP Detection kit (Genisphere, PA, USA) 進行螢光標定，再進行雜合反應後，以 ChipReader scanner (Virtek Vision, Canada) 讀取影像，影像檔以 GenePix ver 4.0 (Axon, USA) 影

像分析軟體，擷取每個基因所反應 Cy3 與 Cy5 螢光分子的數量。利用 Matlab 的程式語言 (MathWorks, Inc., MA, USA)，以局部線性迴歸方法 (Lowess) 針對不同的螢光強度作正規化調整，最後以 Cluster, TreeView 篩選出針刺治療前後有差異表現的基因。

臨床結果評估：針對接受針刺治療的過敏性鼻炎患者，為了解其臨床症狀改變與 cDNA Microarray 結果的相關性，針對臨床症狀採用「鼻結膜炎生命品質調查問卷」(Rhinoconjunctivitis and Rhinitis Quality of Life Questionnaire- RQLQ) 來評估其結果 (Juniper EF., 1991)。

## 參、結果

試驗總計收集 18 位過敏性鼻炎受試者(7 位男性與 11 位女性),接受耳鼻喉科專科醫師之確定診斷後再進行針刺治療,每位受試者在第一次針刺前、第一次針刺後 2 小時、第一次針刺後 24 小時、第八次針刺後,共進行 4 次抽血,進行周邊血液分析以及 cDNA Microarray 分析。

**臨床結果評估:** 7 位男性與 11 位女性過敏性鼻炎受試者參與針刺治療,年齡介於 23 到 42 歲之間。其中一位女性患者在完成第一週治療後,因上班時間無法配合而退出試驗。全程參與試驗的 17 位病患普遍感覺在第三次治療後,鼻部症狀(流鼻水、噴嚏、鼻癢、鼻涕倒流)開始出現進步現象,所有 17 位患者在完成全部治療療程後都覺得鼻部症狀明顯改善。鼻結膜炎生命品質調查問卷(RQLQ)統計顯示,在活動、睡眠、非鼻眼症狀、實際問題、鼻部症狀等類別有明顯改善,且有統計意義。(表一)

**IgE 結果評估:** 全程參與試驗的 17 位病患中,有 16 位患者收集到第一次針刺前與第八次針刺後的 IgE 血液分析,並無統計上的意義。(表二)

**RNA 純化:** 每位受試者在第一次針刺前、第一次針刺後 2 小時、第一次針刺後 24 小時、第八次針刺後,共進行 4 次抽血,其血液檢體先純化為 RNA,以進行後續之 cDNA Microarray 分析。除了第一週就退出試驗的 1 位患者,僅有第一次針刺前的血液純化 RNA,其餘 17 位受試者皆有 4 次抽血檢體的純化 RNA。每位患者抽血檢體純化後之 RNA,即使按照標準操作程序以同樣條件純化,依個人體質不同,仍會有質量差異很大的情形,為使計畫順利進行,僅挑選其中 RNA 質量適合者做 cDNA Microarray。

**cDNA Microarray 分析:** 收集八個志願正常人的血液 RNA, Pooled 在一起,作為對照組 RNA。每個患者血液的 RNA 檢體均與對照組 RNA 進行 cDNA Microarray 實驗 (Yang et al., 2002)。

**4 位受試者 microarray 初步結果:** 在受試者編號 1、4、5、6 的初步結果(如圖一)即已經發現在針刺後 2 小時,病患體內就開始啟動免疫相關反應,針刺後 24 小時則顯示出有上百個基因出現 1 倍以上變化,有數十個基因達到近 2 倍的變化。

**cDNA Microarray 完成數目:** 計畫總計完成 Microarray 分析比較對

像，在比較第一次針刺前與第一次針刺後 2 小時 Microarray 者為 1、4、6、17、16、19、10、13、8、3、7 號等 11 位受試者，在比較第一次針刺前與第一次針刺後 24 小時 Microarray 者為 1、4、6、5、17、16、19、10、13、8、3、7 號等 12 位受試者，在比較第一次針刺前與第八次針刺後 Microarray 者為 17、16、19、10、13、8、3、7 號等 8 位受試者。其中第 10 位受試者的 Microarray 以 Swapping 做了 2 次。而第 2 位受試者的 Microarray 採用 3DNA Array 350 Detection kit 做測試，與其它受試者採用 3DNA Array 900RP Detection kit 不同，因此未列入最後分析範圍內。

**基因選取：**以 Cluster 軟體分析資料，採用(i)80%數據存在(ii)至少 5 observations 其絕對值 $>0.3$  等兩項過濾參數之後，總計 1,248 個基因被選取。由針刺治療對患者造成的差異表現基因藉由 student t-test 來分析， $p\text{ value}<0.005$  的基因中，分別以(1)第一次針刺後 2 小時與第一次針刺前比較（圖二），(2)第一次針刺後 24 小時與第一次針刺前比較（圖三），(3)第八次針刺後與第一次針刺前比較（圖四）等，為排序比較基準，各選取 down-regulated 與 up-regulated 排序前 50 名的基因如圖示。在圖二、圖三、圖四中，代表 Y 軸的基因名稱則分別以 down-regulated 與 up-regulated 排序列在表三與表四。

**基因注解：**將這些相關的基因名稱，藉由 FatiGO (<http://fatigo.bioinfo.cnio.es>) 來分析，以（圖四）第八次針刺後與第一次針刺前比較為排序基準為例，與 down-regulated 有關基因的功能性注解如表五與 up-regulated 有關基因的功能性注解如表六。

在針刺治療的過程中，隨著治療時間與次數的增加，基因表現也隨之改變的現象也在本試驗中觀察到，以 RAB (member of RAS oncogene family-like 3) 及 EST clone (IMAGE: 4814010) 為例，如圖五。

## 肆、討論

在檢討 cDNA microarray 實驗過程後發現仍有許多待改進的地方，譬如雖然在 cDNA microarray 分析中發現針刺會對免疫相關因子產生影響，但畢竟只進行八次針刺治療，這與臨床病患都是一週接受 2 次針刺治療，且療程都是持續數週到數個月的情况不盡相同，且缺少後續追蹤療效訪察；以 cDNA microarray 分析，容易因為人與人之間的 variance 而產生誤差；cDNA microarray 有 cross-hybridization 的設計上問題；專家學者認為在 reference design, loop design 方面需要謹慎設計 (Yang YH, 2002)。

本計畫執行初期，將 2.5mL 血液檢體純化 RNA 後的結果，使用 Bioanalyzer 2,100 進行 RNA 定性與定量分析後，曾經發現不足以穩定的提供 2 $\mu$ g total RNAs 以繼續 3DNA Array 900RP Detection kit 步驟，以致花費不少時間檢測操作過程，經檢討後發現是 RNeasy MinElute kit 其中有試劑必須冷藏保存，但原廠的操作手冊並未註明，導致抽取純化 RNA 的質量出現問題，後來經代理商找到原廠發出的補充更正說明，訂正此一步驟後，即可以順利進行後續步驟。

本計畫 Microarray 實驗由長庚醫院及長庚大學的「基因體醫學研究核心實驗室」進行，核心實驗室早已可利用血液檢體進行 cDNA microarray 以測量免疫反應基因與疾病臨床資料的相關性。雖然許多大型研究單位及學校相繼投入大量人力與資金進行 Microarray 技術的開發，但是截至 2004 年二月為止，若以「Microarray」當關鍵字蒐尋 Medline，在找到 5,296 筆文獻記錄中，大多數為癌症相關研究，有 1,588 篇，相形之下與免疫有關者僅有 23 篇 (Benson M, 2004)，本計畫將是第一個藉由 microarray 探討針刺對過敏性鼻炎的分子生物學與免疫學上的作用，並結合臨床症狀療效評估的研究，在實驗過程所遭遇的困難比原先預期為多，如 RNA 純化問題、針刺的療效是否能反應在 Microarray 的結果上等等，在克服困難完成此計畫成果後，將可為學者提供極具參考價值之報告，並為後續研究奠立良好基礎。

我們分別依照針刺治療後 2 小時、針刺治療後 24 小時與針刺治療 4 週後，各與其針刺治療前比較的微陣列實驗結果中，分別將 Up-regulated 的基因與 Down-regulated 基因各依排序列出 50 個基因名稱 (見表三、表四)。在不同的時間點呈現出不同的基因表現變化，未來我們將對這些基因結合免疫學之觀點進一步探討及實驗驗證。在現階段初步

實驗中，已可從幾個基因為例看出此實驗方向值得進一步投入研究。如 Up-regulated 基因的 HSH2、PLA2G4D、Nos1 與 Down-regulated 基因的 IL1R1。

## 一、Up-regulated 基因中

### (一) HSH2D : hematopoietic SH2 domain containing

HSH2 與 T 細胞的活化及 Interleukin-2 (IL-2) 促進子 (promoter) 的活化有關。由於 T 細胞的活化需要 2 種信號器 (signals) : T 細胞接受器能夠識別的抗原及原始 T 細胞中 CD28 所提供的共同刺激信號。而 HSH2 正是這兩種信號傳遞路徑 (signaling pathways) 的目標 (Greene et al., 2003; Shapiro et al., 2004)。

### (二) PLA2G4D : phospholipase A2, group IVD (cytosolic)

cPLA (2) delta 與知名的 cPLA (2) subtypes 比較起來，具有獨特的存在型態，在乾癬創傷的發炎反應中具有重要的影響力 (Chiba H, et al. 2004)。

### (三) Nos1 : nitric oxide synthase 1, neuronal

Nos1 是能夠催化 nitric oxide 產生的酶 (Palomba L, et al. 2004)。

## 二、Down-regulated 基因中

### (一) IL1R1 : interleukin 1 receptor, type I

IL1R1 基因所產生的蛋白質是與 Interleukin 1 接受器家族有關的細胞激素接受器，這種蛋白是以下的接受器：interleukin alpha (IL1A)，interleukin beta (IL1B)，interleukin 1 receptor, type I (IL1R1/IL1RA)。此蛋白在許多由細胞激素所誘發出免疫與發炎反應中是重要的媒介 (Nishida M, et al. 2004; Murata M, et al. 2003)。

### (二) Dnase113 : deoxyribonuclease I-like 3

Dnase113 是  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  依賴性的 endonuclease，能夠催化單股及雙股 DNA 分裂，可能在 apoptotic 的 DNA fragmentation 中扮演某種角色。(Higami Y, et al. 2004)

除了以上舉例基因之外，微陣列實驗結果中出現許多的基

因，仍待進一步實驗確定其功能，但即使在美國最完備的 Entrez Gene 資料庫 (<http://www.pubmed.org>) 中蒐尋，最新的文獻期刊對這些基因的功能亦尚未完全了解，尚待學者們共同努力。

## 伍、結論與建議

本計畫為過敏性鼻炎患者進行針刺治療，在治療過程中，抽取病人血液檢體為材料，進行 Microarray 以測量免疫反應基因體的變化，並配合鼻結膜炎生命品質調查問卷做臨床結果評估，結果顯示針刺對過敏性鼻炎確實具有臨床療效，鼻結膜炎生命品質調查問卷 (RQLQ) 統計顯示，在活動、睡眠、非鼻眼症狀、實際問題、鼻部症狀等類別有明顯改善，且有統計意義。且隨著針刺療程次數增加，在 cDNA Microarray 的差異表現基因可看見顯著變化。在針刺後 2 小時，病患體內就開始啟動免疫相關反應，針刺後 24 小時則顯示出有上百個基因出現 1 倍以上變化，且有數十個基因達到近 2 倍的變化，在 4 週共八次的針刺治療後，基因的變化量有更明顯改變。

世界衛生組織的《2002 年至 2005 年世界衛生組織傳統醫藥及替代醫藥全球策略》，希望能鼓勵各國政府開促進傳統醫藥/替代醫藥的安全性、有效性及質量標準研究。藉由結合長庚醫院中醫部門臨床醫師及「基因體醫學研究核心實驗室」進行針刺治療過敏性鼻炎的 cDNA Microarray 實驗，可以基因導向醫學觀點檢驗傳統中醫學的現代物質基礎，並進而可以達到世界衛生組織要求的促進傳統醫藥/替代醫藥的合理使用。

## 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 CCMP93-RD-047 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. 姚練武，張國民，陳協雲。(2002)。中醫藥治療過敏性鼻炎進展。湖南中醫藥導報。8(2)，52-53。
2. 婁述，洪海國。(2000) 針刺治療過敏性鼻炎臨床進展和思考。針灸臨床雜誌，08期，p.55-57。
3. Bachert C. Wagenmann M. Holtappels G. (1998) Cytokines and adhesion molecules in allergic rhinitis. *American Journal of Rhinology*. 12(1): 3-8.
4. Bachert C. van Cauwenberge P. (2003) The WHO ARIA (allergic rhinitis and its impact on asthma) initiative. *Chemical Immunology & Allergy*. 82: 119-26.
5. Benson M. Adner M. Cardell LO. (2001) Cytokines and cytokine receptors in allergic rhinitis: how do they relate to the Th2 hypothesis in allergy?. *Clinical & Experimental Allergy*. Mar; 31(3): 361-7.
6. Benson M, Olsson M, Rudemo M, Wennergren G, Cardell LO. (2004). Pros and cons of microarray technology in allergy research. *Clin Exp Allergy*. 34(7): 1001-6.
7. Bonta IL. (2002). Acupuncture beyond the endorphin concept? *Med Hypotheses*. 58(3): 221-4.
8. Bousquet J. Van Cauwenberge P. Khaltaev N. (2001) Aria Workshop Group. World Health Organization. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *Journal of Allergy & Clinical Immunology*. Nov; 108(5 Suppl): S147-334.
9. Chiba H, Michibata H, Wakimoto K, Seishima M, Kawasaki S, Okubo K, Mitsui H, Torii H, Imai Y. (2004). Cloning of a gene for a novel epithelium-specific cytosolic phospholipase A2, cPLA2delta, induced in psoriatic skin. *J Biol Chem*. 279(13): 12890-7.
10. Greene TA, Powell P, Nzerem C, Shapiro MJ, Shapiro VS. (2003) Cloning and characterization of ALX, an adaptor downstream of CD28. *J Biol Chem*. 14; 278(46): 45128-34.
11. Higami Y, Tsuchiya T, To K, Chiba T, Yamaza H, Shiokawa D, Tanuma S, Shimokawa I. (2004). Expression of DNase gamma during Fas-independent apoptotic DNA fragmentation in rodent hepatocytes. *Cell Tissue Res*. 316(3): 403-7.

12. Holgate ST, Broide D. (2003). New targets for allergic rhinitis--a disease of civilization. *Nat Rev Drug Discov.* 2(11): 902-14.
13. Jeong HJ. Kim BS. Kim KS. Kim HM. (2002) Regulatory effect of cytokine production in asthma patients by SOOJI CHIM (Koryo Hand Acupuncture Therapy). *Immunopharmacology & Immunotoxicology.* May; 24(2): 265-74.
14. Joos S. Schott C. Zou H. Daniel V. Martin E. (2000) Immunomodulatory effects of acupuncture in the treatment of allergic asthma: a randomized controlled study. *Journal of Alternative & Complementary Medicine.* Dec; 6(6): 519-25.
15. Juniper EF. Guyatt GH. Development and testing of a new measure of health status for clinical trials in rhinoconjunctivitis. *Clinical & Experimental Allergy.* 21(1): 77-83, 1991 Jan.
16. Luno V.J. et al. (1994) International Consensus Report on the diagnosis and management of rhinitis. International Rhinitis Management Working Group. *Allergy.* 49(19 Suppl): 1-34.
17. Murata M, Bonassar LJ, Wright M, Mankin HJ, Towle CA. (2003) A role for the interleukin-1 receptor in the pathway linking static mechanical compression to decreased proteoglycan synthesis in surface articular cartilage. *Arch Biochem Biophys.* 413(2): 229-35.
18. Nishida M, Nasu K, Fukuda J, Kawano Y, Narahara H, Miyakawa I. (2004) Down-regulation of interleukin-1 receptor type 1 expression causes the dysregulated expression of CXC chemokines in endometriotic stromal cells: a possible mechanism for the altered immunological functions in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(10): 5094-100.
19. Palomba L, Persichini T, Mazzone V, Colasanti M, Cantoni O. (2004). Inhibition of nitric-oxide synthase-I (NOS-I)-dependent nitric oxide production by lipopolysaccharide plus interferon-gamma is mediated by arachidonic acid. Effects on NFkappaB activation and late inducible NOS expression. *J Biol Chem.* 279(29): 29895-901.
20. Pawankar R. (2002) Allergic rhinitis and its impact on asthma: an evidence-based treatment strategy for allergic rhinitis. *Asian Pacific Journal of Allergy & Immunology.* Mar; 20(1): 43-52.
21. Petti FB. Liguori A. Ippoliti F. (2002) Study on cytokines IL-2, IL-6, IL-10 in

- patients of chronic allergic rhinitis treated with acupuncture. *Journal of Traditional Chinese Medicine*. Jun; 22(2): 104-11.
22. Shapiro MJ, Powell P, Ndubizu A, Nzerem C, Shapiro VS. (2004) The ALX Src homology 2 domain is both necessary and sufficient to inhibit T cell receptor/CD28-mediated up-regulation of RE/AP. *J Biol Chem*. 24; 279(39): 40647-52.
  23. Skoner DP (2001). Allergic rhinitis: definition, epidemiology, pathophysiology, detection, and diagnosis. *J Allergy Clin Immunol*. 108(1 Suppl): S2-8.
  24. Valenta R (2002). The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nat Rev Immunol*. 2(6): 446-53.
  25. van Cauwenberge P. Watelet JB. Verhoye C. Wang D. Bachert C. (1999) The clinical expression of allergy in the nose. *Allergy*. Feb; 54(2): 93-102.
  26. van Cauwenberge P. Bachert C. Passalacqua G. Bousquet J. Canonica GW. Durham SR. Fokkens WJ. Howarth PH. Lund V. Malling HJ. Mygind N. Passali D. Scadding GK. Wang DY. (2000) Consensus statement on the treatment of allergic rhinitis. *European Academy of Allergology and Clinical Immunology*. *Allergy*. Feb; 55(2): 116-34.
  27. Varga EM. Jacobson MR. Till SJ. Masuyama K. O'Brien F. Rak S. Lund V. Scadding GK. Hamid QA. Durham SR. (1999) Cellular infiltration and cytokine mRNA expression in perennial allergic rhinitis. *Allergy*. Apr; 54(4): 338-45.
  28. World Health Organization.(2002). WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005. Available at: <http://www.who.int/medicines/library/trm/strategytrm.shtml>.
  29. Xue CC, Thien FC, Zhang JJ, Da Costa C, Li CG. (2003). Treatment for seasonal allergic rhinitis by Chinese herbal medicine: a randomized placebo controlled trial. *Altern Ther Health Med*. 9(5): 80-7.
  30. Yang SH. Hong CY. Yu CL. (2001) Decreased serum IgE level, decreased IFN-gamma and IL-5 but increased IL-10 production, and suppressed cyclooxygenase 2 mRNA expression in patients with perennial allergic rhinitis after treatment with a new mixed formula of Chinese herbs. *International Immunopharmacology*. Jun; 1(6): 1173-82.
  31. Yang SH. Hong CY. Yu CL. (2002) The stimulatory effects of nasal discharge

- from patients with perennial allergic rhinitis on normal human neutrophils are normalized after treatment with a new mixed formula of Chinese herbs. *International Immunopharmacology*. Nov; 2(12): 1627-39.
32. Yang, YH, and Speed, TP (2002). Design issues for cDNA microarray experiments. *Nature Reviews Genetics* 3, 579-588.
33. Zijlstra FJ, van den Berg-de Lange I, Huygen FJ, Klein J.(2003) Anti-inflammatory actions of acupuncture. *Mediators Inflamm*. 12(2): 59-69.

## 柒、圖表

表一 過敏性鼻炎患者針刺 RQLQ 量表統計結果

RQLQ 類別	第一次針刺前	第八次針刺後	改變量	p value
1.活動	3.35	1.99	-1.36	0.00**
2.睡眠	2.06	1.12	-0.94	0.012*
3.非鼻眼症狀	2.16	1.18	-0.98	0.02*
4.實際問題	3.37	1.49	-1.88	0.00**
5.鼻部症狀	3.35	1.68	-1.67	0.00**
6.眼部症狀	1.41	0.99	-0.42	0.19
7.情感	1.76	0.97	-0.79	0.08
總分	2.50	1.35	-1.15	0.00**

n=17 \* p<0.05 \*\* p<0.01

表二 過敏性鼻炎患者針刺前後 IgE 差異統計結果

	針刺前	針刺後一個月	改變量	p value
IgE	390.67	319.48	-71.19	0.162

n=16

表三 針刺 2、24 小時及 4 週後與 down-regulated 有關的基因名稱

	2 hour 排序 (圖二)	24 hour 排序 (圖三)	4 weeks 排序 (圖四)
1	DNASE1L3	HBA2	EEF1A1
2	ESTs	STARD7	DBT
3	VIPR2	WASF3	RPL28
4	ESTs	BTF3	REA
5	LOC133308	LOC133308	RPS3
6	SERPINC1	CARD8	EEF1A1
7	FZD9	THRAP4	RPS2
8	PRPF31	MTSG1	TTC14
9	FLJ10707	OXCT	LAMP1
10	ZBTB9	MBD1	RPS20
11	EAT2	PHF11	LOC285550
12	RPS3	LOC162427	RPLP2
13	VRK3	EAT2	ESTs
14	FOXP2	HBA2	TJP2
15	HPD	DNASE1L3	RPS27
16	RNF128	MGC11257	RPS2
17	LILRB2	HBZ	ESTs
18	ESTs	ATP1A1	RPS28
19	ESTs	FLJ33979	MGC11386
20	ESTs	ESTs	IL1R1
21	GSTM2	HBG2	RPLP1
22	ESTs	RNPEP	CDH1
23	ESTs	FOXP2	TUBB2
24	PTPN13	IL1R1	ITGB4BP
25	ACVR1	LOC126147	RPS2
26	PEA15	PTPN13	PGAM1
27	FLJ10618	ESTs	RPS11
28	ATP1A1	ESTs	RPS2
29	NOG	OAZ1	RPS27
30	RAB3GAP	ESTs	SDCCAG1

表三 針刺 2、24 小時及 4 週後與 down-regulated 有關的基因名稱 (續)

	2 hour 排序 (圖二)	24 hour 排序 (圖三)	4 weeks 排序 (圖四)
31	ESTs	TNFRSF11A	XPNPEP1
32	ESTs	COX10	RPS2
33	MBD1	ESTs	ESTs
34	ESTs	ESTs	GBF1
35	RNPEP	HIST1H2AM	WDR18
36	TDO2	JAG1	MGC10204
37	HIST1H2AM	IRF2	WASL
38	IRF2	ACVR1	ESTs
39	DGCR6	ESTs	ESTs
40	HBZ	SERPINC1	BTF3
41	DHCR24	TDO2	ESTs
42	RECK	RPS2	C21orf18
43	VPS39	FLJ10707	ESTs
44	MYO15B	CABP4	DKFZp434K1210
45	FLJ14001	RPS27A	IGKV1D-13
46	ZNF443	TCN1	RPL41
47	FLT4	ESTs	TCF3
48	APP	PLD1	RPS27
49	DKFZp762C1112	MAN1A2	ANGPTL2
50	COX10	IGKV1D-13	ESTs

ESTs (Expressed Sequence Tags): 表現序列標記

表四 針刺 2、24 小時及 4 週後與 up-regulated 有關的基因名稱

	2 hour 排序 (圖二)	24 hour 排序 (圖三)	4 weeks 排序 (圖四)
51	ESTs	ESTs	FLJ40722
52	ESTs	ESTs	TRO
53	KCNH3	ESTs	RBM17
54	PROM1	MGC42493	LOC342892
55	KIF3C	LOC147991	ESTs
56	NIT1	ESTs	ESTs
57	SAMD6	QRSL1	ADAM2
58	PSAP	MGC13024	MPHOSPH6
59	TBPL1	PSMC2	AHR
60	RIN1	ADFP	SARS
61	ERBB3	DKFZP564O1664	WRN
62	AHR	ESTs	HDGF
63	LGP2	ESTs	KIAA0895
64	ZNF500	SLC35F3	ESTs
65	LOC55971	LOC55971	SLC35E3
66	SLC28A1	GTSE1	LOC220074
68	MGC40157	FLJ40417	DKFZp762C2414
69	SPG7	FLJ12476	ZNF581
70	MTAC2D1	MYO10	DKFZp313M0720
71	ESTs	FLJ13105	ESTs
72	ESTs	ESTs	ESTs
73	ZYX	NUSAP1	ACDC
74	PTD012	FRA	ESTs
75	ACINUS	SLC28A1	SAMD6
76	FBXO36	PLXND1	DNASE2
77	ATE1	ZNF37A	MGC13024
78	CGI-85	C9orf41	AADAT
79	BAGE	HSH2	ESTs
80	HSPA1B	ESTs	NRF
81	RAB3GAP	ZNF500	ESTs

表四 針刺 2、24 小時及 4 週後與 up-regulated 有關的基因名稱 (續)

	2 hour 排序 (圖二)	24 hour 排序 (圖三)	4 weeks 排序 (圖四)
82	ESTs	DKFZP566M1046	SLC28A1
83	PLA2G4D	GSTT1	FLJ10330
84	DKFZp434K1210	ESTs	ESTs
85	TBX22	ESTs	RIN1
86	MYO10	MGC17791	STK36
87	ESTs	SNAP91	ESTs
88	PKD1-like	GTF2E2	NOS1
89	BCNP1	SAMD6	HRPT2
90	ESTs	ESTs	GTF2E2
91	ESTs	GPM6A	BNIP3L
92	TALDO1	FLJ11535	ACINUS
93	ZNF100	NR2C1	NR2C1
94	GTF2E2	ESTs	ESTs
95	MGC34774	STK36	PSMD1
96	ESTs	FLJ32334	ESTs
97	STK36	ESTs	ERBB3
98	HSH2	LOC220074	PLA2G4D
99	FLJ11535	DKFZp434A128	HSH2
100	S100A9	WRN	ESTs

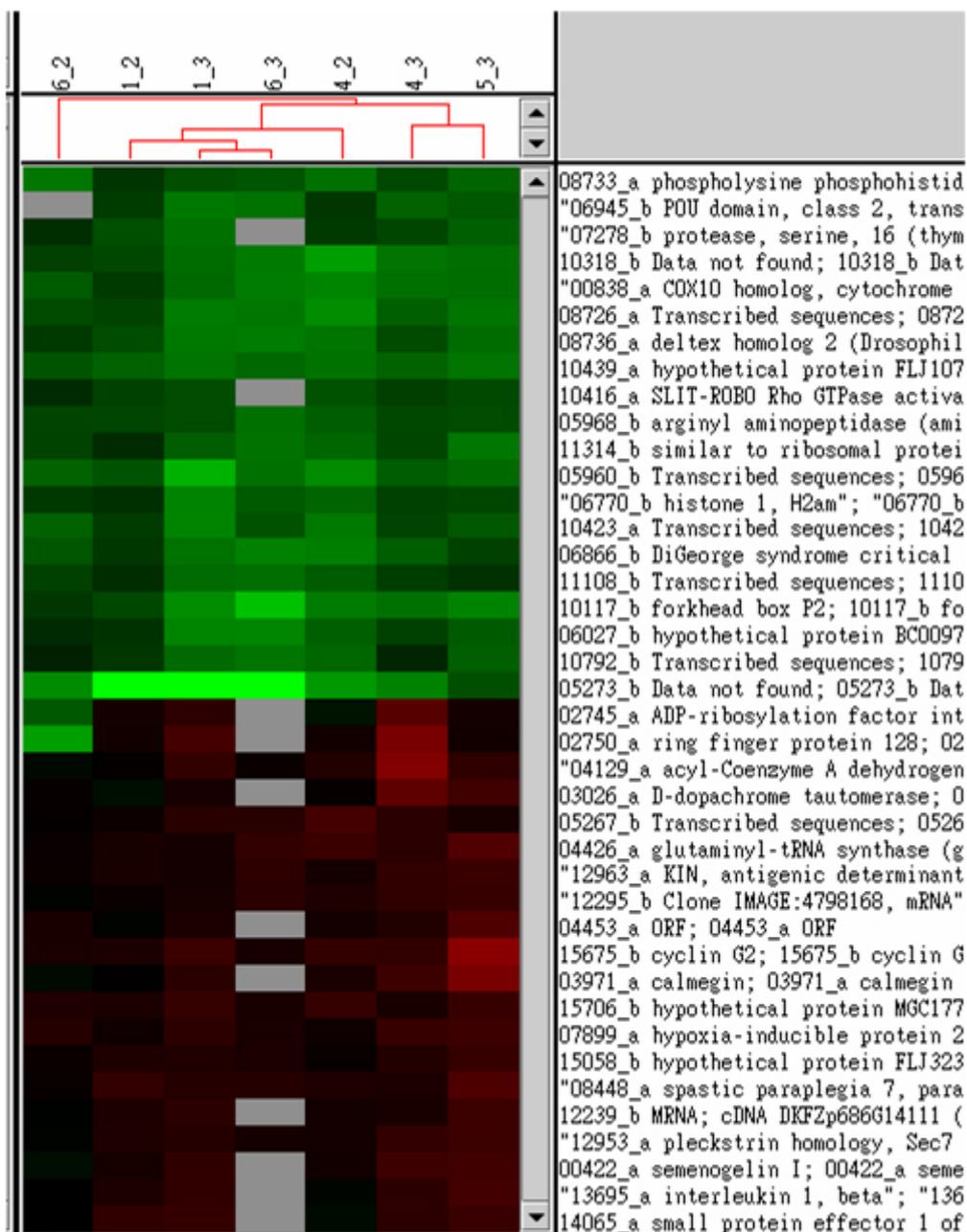
ESTs (Expressed Sequence Tags): 表現序列標記

表五 第八次針刺後與第一次針刺前比較為基準，down-regulated 有關基因

GO at level 3	process - Genes
<i>cell communication</i> (GO:0007154)	CDH1 IL1R1 RPS27
<i>metabolism</i> (GO:0008152)	TCF3 ITGB4BP RPL28 PGAM1 REA DBT BTF3 RPS27 MGC10204 RPS2 RPS3 RPLP1 WASL RPLP2 XPNPEP1
<i>death</i> (GO:0016265)	TUBB2
<i>regulation of physiological process</i> (GO:0050791)	TCF3 REA BTF3
<i>organismal physiological process</i> (GO:0050874)	IL1R1
<i>cellular physiological process</i> (GO:0050875)	TCF3 GBF1 RPS27 WASL TUBB2
<i>response to stimulus</i> (GO:0050896)	IL1R1

表六 第八次針刺後與第一次針刺前比較為基準，up-regulated 有關基因

GO at level 3	process - Genes
<i>reproduction</i> (GO:0000003)	ADAM2
<i>membrane fusion</i> (GO:0006944)	ADAM2
<i>cell communication</i> (GO:0007154)	HSH2 NOS1 ERBB3 HDGF AHR ADAM2 TRO RIN1
<i>embryo implantation</i> (GO:0007566)	TRO
<i>aging</i> (GO:0007568)	WRN
<i>metabolism</i> (GO:0008152)	DNASE2 GTF2E2 NOS1 NR2C1 ERBB3 AHR SLC28A1 ADAM2 SARS LOC342892 STK36 NRF WRN
<i>death</i> (GO:0016265)	DNASE2 BNIP3L AHR WRN
<i>regulation of physiological process</i> (GO:0050791)	GTF2E2 NR2C1 AHR LOC342892 NRF
<i>regulation of cellular process</i> (GO:0050794)	BNIP3L
<i>organismal physiological process</i> (GO:0050874)	NOS1 TRO
<i>cellular physiological process</i> (GO:0050875)	DNASE2 NOS1 BNIP3L PSMD1 MPHOSPH6 HDGF AHR SLC28A1 RIN1
<i>response to stimulus</i> (GO:0050896)	AHR



圖一 過敏性鼻炎受試者 microarray 初步結果。

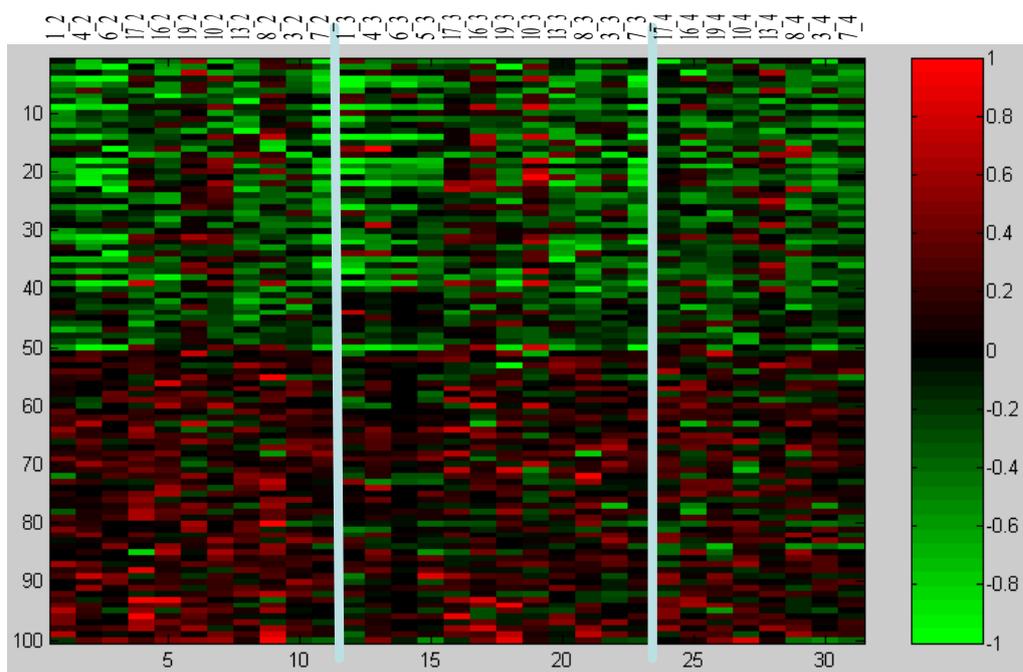
附圖中左上方：

1\_2：代表第一位受試者，針刺前與針刺後 2 小時之 Microarray 結果。

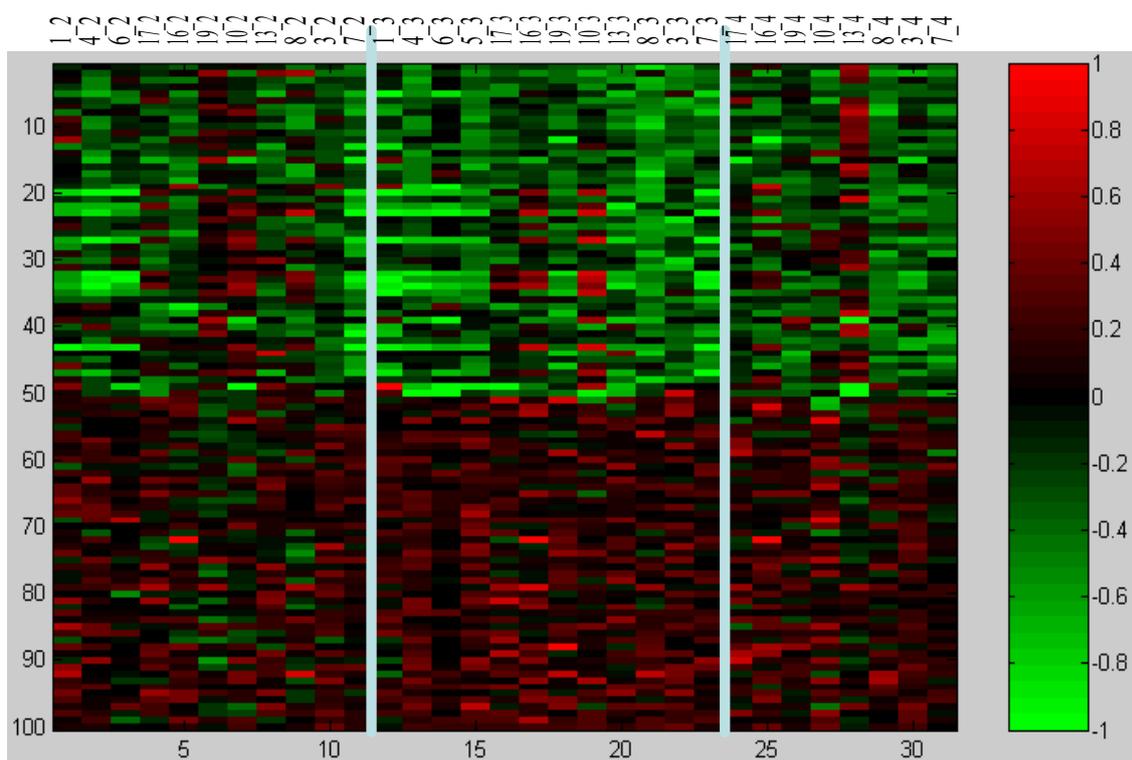
1\_3：代表第一位受試者，針刺後 2 小時與針刺後 24 小時之 Microarray 結果。

其餘之 4\_2, 4\_3, 6\_2, 6\_3, 5\_3 依此類推。

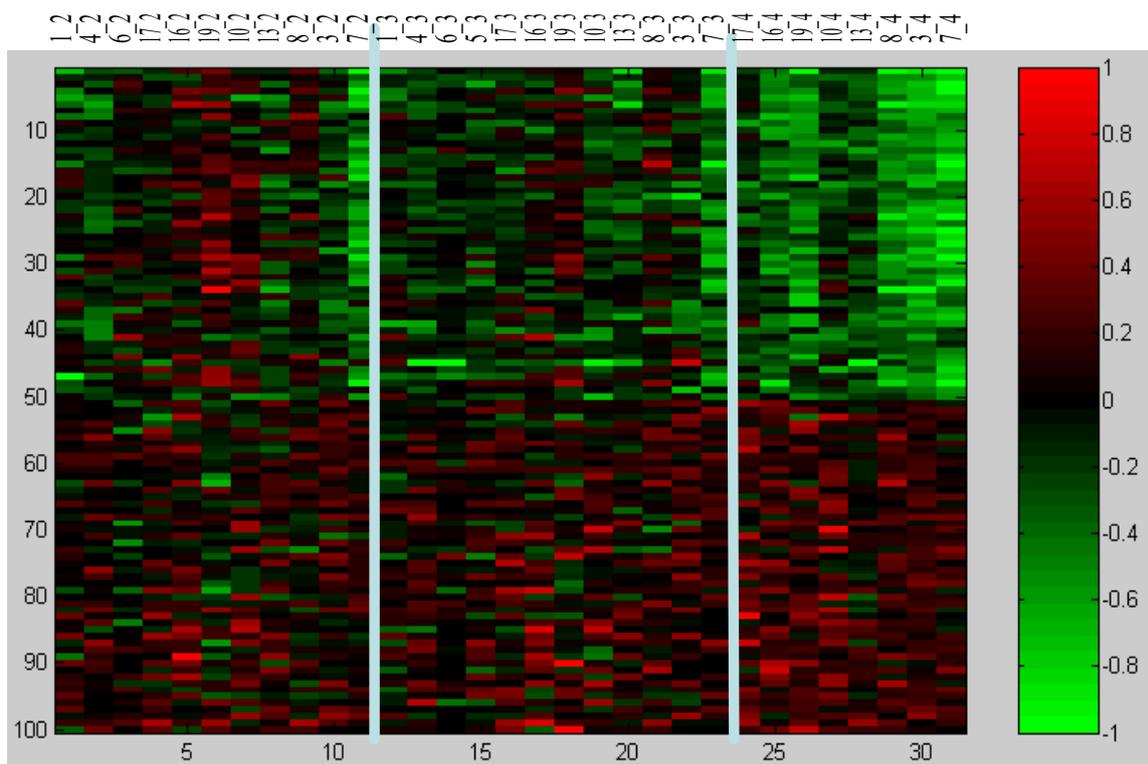
附圖中右方列出正向反應與負向反應基因的前 20 個。



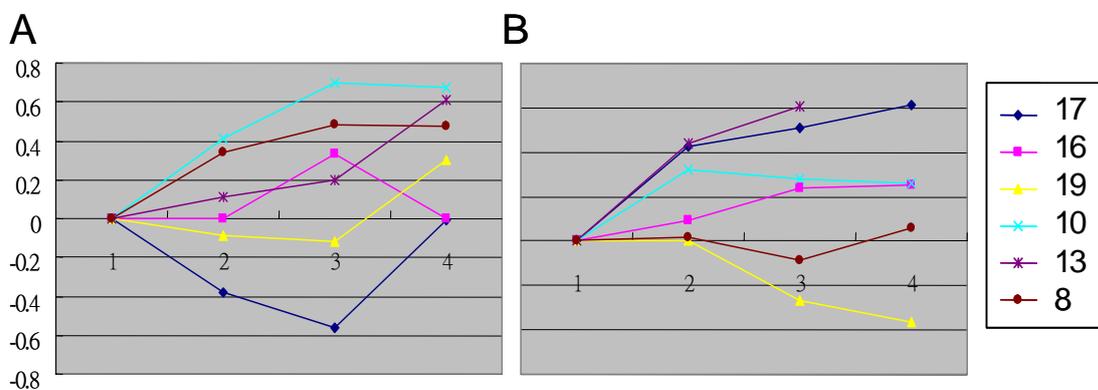
圖二 以第一次針刺後 2 小時與第一次針刺前比較為排序基準



圖三 以第一次針刺後 24 小時與第一次針刺前比較為排序基準



圖四 以第八次針刺後與第一次針刺前比較為排序基準



圖五 RAB ( member of RAS oncogene family-like 3 ) 及 EST clone ( IMAGE : 4814010 ) , 在 17 , 16 , 19 , 10 , 13 , 8 號受試者 , 隨針刺時間變化表現圖

