

編號：CCMP93-RD-105

## 利用 cDNA 微陣列來建構一個分子生物層級的中草藥分析平台 (3-3)

許志樸

國立清華大學

### 摘要

中醫藥已經有數千年的使用經驗，其療效也記載於各種中藥的古籍之中。中藥的精華之一是使用複方來治療疾病，然而即使是單方也含有數以百計的有機與無機化合物。如果缺乏標準化的鑑定，吾人將無法更有效、安全的使用中草藥。因此，我們需要建立一個標準化的程序，來鑑定中草藥的品種以及批次間的化學與生物活性的一致性。

本研究第三年，依據先前的經驗進一步更仔細的對冬蟲夏草萃取液的有機化學圖譜 (Organic chemical fingerprint) 進行分析，得到更完整的有機化學指紋圖譜。並以統計分析來區分各種樣本間的相似程度。對於微陣列指紋圖譜 (Microarray fingerprint) 也以統計的方法確認資料的信度以及進一步篩選出冬蟲夏草標記基因群 (Marker genes)。為了以實驗驗證微陣列結果的可信度，我們進行同步定量聚合反應 (Real-time quantitative PCR)，而且以統計的分析來比較此兩種結果之間的一致性。

關鍵詞：冬蟲夏草、cDNA 微陣列、分子基因圖譜、化學指紋圖譜、標記基因群

Number: CCMP93-RD-105

# Constructing a Chinese Medicine Molecular Analysis Platform by Utilizing cDNA Microarray (3-3)

Jih-Yang Hsu

National Tsing-Hua University

## ABSTRACT

The traditional Chinese medical formulas have been in clinical use for thousands of years and their therapeutic effects were documented in ancient Chinese pharmacopoeias. One of the salient features of the traditional Chinese medicine is the use of combination herbal formula. However, even a single medicinal herb contains hundreds of organic and inorganic compounds. Lack of standardization poses a major challenge for the safe and effective use of traditional Chinese herbal medicine. Therefore, it is essential to establish a standardization protocol to ensure the authenticity as well as assess the chemical and biological consistency of these multi-component herbal formulas.

In the third year, we have performed a detailed investigation on the chemical profiles of *Cordyceps* extracts. Final chemical fingerprints of various *Cordyceps* samples are constructed. In addition, microarray results are further confirmed by real-time PCR and the consistency between these two sets of data are evaluated by statistical methods. As the end of the third year, we have demonstrated that an integrated fingerprinting platform is established. This platform holds great potential for future application on the study of traditional Chinese herbal formulas.

Keywords : *Cordyceps sinensis*, cDNA microarray, molecular genetic fingerprinting, chemical fingerprinting, marker genes, standardization

## 壹、前言

中草藥之成分極為複雜，中草藥的成份複雜，對於單味藥或傳統方劑的生產品質需要做有效的監控。另外，對其藥理機制，需要在分子生物學的層次做定量的了解，以達到實驗科學的客觀驗證。由於醫學科技的進步，中醫藥科學化已經是時代的趨勢。本計畫之目的即是要利用 cDNA 微陣列 (cDNA Microarray) 來建立一個分子生物層級的中草藥分析技術平台。希望藉此計畫的完成，確立一套以科學化的方法來分析中草藥對細胞基因表現圖譜 (Gene Expression Pattern) 之影響，並進而歸納出相對於該中草藥之標記基因 (Marker Genes)。希望能據此以定量的方式，可靠且有效的了解中草藥之藥理機制。經由此技術平台的建立，將來對各種中草藥的分析研究，皆可依循本計畫所建立之規範 (包含中草藥有機/無機成份之標準化、中草藥對細胞株在分子生物層級的分析，以及所應用的統計分析方法) 一一加以研究。

本計畫第一年的研究中，我們已經利用高效液相層析法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 以及感應耦合電漿質譜儀 (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer, ICPMS) 來有效評估中草藥的製造品質，以精密的監控每一次實驗時中草藥的品質。本計畫第二年的研究利用 cDNA 微陣列技術初步篩選出青海及西藏出產的天然冬蟲夏草之標記基因。此外，也依據 cDNA 微陣列的結果重新檢討並改進有機與無機化合物標準化的流程。在本計畫第三年的研究中，依據前兩年的研究成果為基礎，接著我們將利用統計分析的方法進一步以更嚴謹的定義歸納出冬蟲夏草的標記基因。依據此結果，將這些基因以多重複的方式點印在晶片上，並利用 cDNA 微陣列技術，進一步深入探討冬蟲夏草對細胞基因表現圖譜之影響，並以統計的方法加以分析。

## 貳、材料與方法

### 一、紫外光/可見光光譜儀分析

我們使用 HITACHI 雙光束全自動掃描紫外/可視光分光光譜儀來進行冬蟲夏草萃取液的吸收光譜掃描。掃描的範圍從波長 190nm 到 1,100nm。因為冬蟲夏草萃取液對上述範圍的光波只有在紫外光的範圍內有吸收波峰，所以在本研究報告中只有顯示 220nm 到 370nm 範圍內的吸收圖。

### 二、高效液相層析儀分析

中草藥方劑含有許多不同的有機及無機成分。此外，在製備的過程中常帶有非活性成分的雜質及其他干擾因子。為了把大部分的雜質去除，在進行高效液相層析法分析之前必須先經過前處理的步驟。一般而言，高效液相層析法因具有分離完全、樣品用量少、靈敏度高、再現性好、分析時間短及操作簡單等優點。因此為達到有效監控中草藥方劑品質的目的。

HPLC 的分析是使用 HITACHI L-2130 的幫浦及使用 HITACHI L-7400 的紫外光偵測器。分離管柱為 VERCOPAK 公司的 Inertsil 7 ODS-3 C18 (4.6mm x 250mm, 5 $\mu$ m 粒徑)。移動相使用 20mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，流速為每分鐘 1mL。我們取 20 $\mu$ L 的冬蟲夏草萃取液注入 HPLC 分析儀內並分別以 230nm、260nm 以及 310nm 等三個紫外光波長來偵測冬蟲夏草萃取液內所含的有機化合物圖譜。

### 三、同步定量聚合鏈反應分析

本研究的同步定量聚合鏈反應是委請：基因體醫學國家型科技計畫-微陣列及基因表現分析核心實驗室來執行，使用的儀器為 ABI Prism 7900-HT。實驗所使用的試劑為直接向 ABI 公司訂購的 TaqMan AOD probe set。實驗過程是依據 ABI 公司所提供的條件來進行同步定量聚合鏈反應。

## 參、結果

### 一、冬蟲夏草樣本的有機化學圖譜分析

我們將樣本依據產地以及部位進一步區分為：青海子（QFB）、青海蟲體（QW）、青海全蟲（QCS）、西藏子座（TFB）、西藏蟲體（TW）及西藏全蟲（TCS）等 6 種。蟲體的頭部因為包含有子實體與蟲體，所以被去除，不屬於上述的任何樣品之中。這些樣本經過研磨成細粉後以 90°C 的高溫水萃 2 小時，取得冬蟲夏草萃取液來進行一系列的實驗。

為了先初步觀察冬蟲夏草樣本萃取液的大略有機化合物在紫外光與可見光波長範圍的吸收狀況，我們使用紫外光/可見光光譜儀來做全波長掃描。所得的結果如圖 1 所示，冬蟲夏草萃取液只有在紫外光波長範圍內有吸收。因此，接下來的光譜圖只有在紫外光波長範圍 220nm 到 370nm。如圖 2 與圖 3 所示，冬蟲夏草子實體（包含青海 QFB 以及西藏 TFB）有兩個主要吸光波峰，分別為 260nm 以及 310 nm。冬蟲夏草蟲體（包含青海 QW 以及西藏 TW）則只有一個主要吸光波峰，為 260nm。因為全蟲包含子實體與蟲體兩個部分，因此在 260nm 以及 310nm 都有主要吸光波峰，但其 310nm 的主要吸光波峰高度則明顯低於子實體。此結果顯示子實體所含的化合物與蟲體所含的化合物，並不完全相同。

為了進一步分析冬蟲夏草萃取液有機化合物圖譜，我們進行了 HPLC 的分析。參考自紫外光吸收光譜的結果，我們選取 230nm、260 nm、以及 310nm 波長的吸收來偵測其 HPLC 層析圖。230nm 的 HPLC 層析圖顯示（圖 4-圖 5）：在滯留時間（Retention time）第 10 分鐘時蟲體萃取液（QW 與 TW）有一明顯的吸收波峰，而子實體萃取液（QFB 與 TFB）只有一小吸收波峰。蟲體、子實體與全蟲萃取液在 260nm 的 HPLC 層析圖（圖 6-圖 7）則並無明顯差異。310nm 的 HPLC 吸收圖譜（圖 8-圖 9）顯示：在滯留時間第 9.3 分鐘時子實體萃取液有一個明顯的主要吸收波峰，其大小約為 500 到 800mV。而在蟲體 310nm 吸收圖譜的相對位置只有一個小吸收波峰，其大小只有 50mV 左右。這個結果證實了前述紫外光吸收光譜的結果，並且進一步指出子實體與蟲體在 310nm 的吸收差異，主要源自於單一個吸收波峰。從這個吸收波峰的完整性來判斷，這可能是單一種有機化合物。綜合這三種不同波長的 HPLC 層析圖，除了以上所指出的明顯差異之外，

蟲體、子實體與全蟲萃取液的 HPLC 層析圖間並無十分顯著的不同。從巨觀而言，要分辨出這 6 種冬蟲夏草萃取液的有機化學圖譜的異同，並不容易。因此，我們將上述 3 種不同波長的 HPLC 吸收圖譜做一綜合分析。從這些吸收波峰中，依據在各圖譜中的波峰面積，我們選取出 15 個主要吸收波峰，作為不同冬蟲夏草萃取液的有機化學圖譜。依據其吸收面積佔總吸收面積的比率，我們將此數值以階層式叢集法 (Hierarchical clustering) 進行分析，結果顯示 (圖 10)：產地間有機化合物圖譜的差異大於部位間的差異。

## 二、以迴圈設計的統計分析

### (一) 以迴圈設計估計基因表現差異

對於任何一個基因而言，雖然我們想研究的是基因表現差異之比值，但是經由基因晶片實驗我們只能可以得到其螢光之強度。我們所看到的螢光強度是綜合了染劑的效應及基因表現值與系統誤差所造成的。因為螢光強度與基因表現成正比關係，故可將其寫成公式一：

$$\begin{aligned} G &= g \cdot t_A \cdot 2^{\varepsilon_1} & \varepsilon_1 &\sim N(0, \sigma_G^2) \\ R &= r \cdot t_B \cdot 2^{\varepsilon_2} & \varepsilon_2 &\sim N(0, \sigma_R^2) \end{aligned} \quad (\text{公式一})$$

G、R：分別為紅、綠螢光強度

t<sub>A</sub>、t<sub>B</sub>：一玻片上雜和反應兩樣本之基因表現量

g、r：一玻片上雜和反應兩樣本之螢光染劑效應

ε<sub>1</sub>、ε<sub>2</sub>：兩樣本之誤差

$$\begin{aligned} Y &= \log \text{ratio} \cong \log_2 \left( \frac{R}{G} \right) \\ Y &= \log_2 \left( \frac{R}{G} \right) = \log_2 \frac{r \cdot t_B \cdot 2^{\varepsilon_2}}{g \cdot t_A \cdot 2^{\varepsilon_1}} \\ &= \log_2 \left( \frac{r}{g} \right) + \log_2 \left( \frac{t_B}{t_A} \right) + (\varepsilon_2 - \varepsilon_1) \\ &= \gamma + \lambda + \varepsilon \end{aligned} \quad (\text{公式二})$$

對某一晶片上的某一基因而言 (如公式二)，其中

Y：某一基因螢光強度比

$\gamma$  : 某一基因之兩染劑效應比

$\lambda$  : 某一基因表現比

$\varepsilon$  : 某一基因之誤差

但是我們知道迴圈設計可由數片實驗之數據來估計出更準確之基因表現。如本實驗共計八個樣本，就可由 16 片之結果來推估出來，如公式三：

$$\begin{aligned} \bar{t} &= (t_1 t_2 t_3 t_4 t_5 t_6 t_7 t_8)^{1/8} && \text{(公式三)} \\ \therefore \gamma &= \log_2 \left( \frac{r}{g} \right) \\ \lambda_i &= \log_2 \left( \frac{t_i}{t} \right), i = 1, 2, 3, \dots, 8 \\ \therefore \lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \lambda_4 + \lambda_5 + \lambda_6 + \lambda_7 + \lambda_8 &= \log \frac{t_1 t_2 t_3 t_4 t_5 t_6 t_7 t_8}{(\bar{t})(\bar{t})(\bar{t})(\bar{t})(\bar{t})(\bar{t})(\bar{t})(\bar{t})} = 0 \end{aligned}$$

我們分別去看某基因在這 16 片的 Y 值可由公式二改寫成公式四

$$\begin{aligned} Y_1 &= \gamma + \log(t_2/t_1) + \varepsilon_1 = \gamma + \log(t_2/\bar{t}) - \log(t_1/\bar{t}) + \varepsilon_1 \\ Y_1 &= \gamma + \lambda_3 - \lambda_1 + \varepsilon_1 \\ Y_2 &= \gamma + \lambda_2 - \lambda_3 + \varepsilon_2 \\ Y_3 &= \gamma + \lambda_4 - \lambda_2 + \varepsilon_3 \\ Y_4 &= \gamma + \lambda_5 - \lambda_4 + \varepsilon_4 \\ Y_5 &= \gamma + \lambda_7 - \lambda_5 + \varepsilon_5 \\ Y_6 &= \gamma + \lambda_6 - \lambda_7 + \varepsilon_6 \\ Y_7 &= \gamma - (\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \lambda_4 + \lambda_5 + \lambda_6 + \lambda_7) - \lambda_6 + \varepsilon_7 \\ Y_8 &= \gamma + \lambda_1 + (\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \lambda_4 + \lambda_5 + \lambda_6 + \lambda_7) + \varepsilon_8 \\ Y_9 &= \gamma + \lambda_7 - \lambda_1 + \varepsilon_9 \\ Y_{10} &= \gamma + \lambda_2 - \lambda_7 + \varepsilon_{10} \\ Y_{11} &= \gamma - (\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \lambda_4 + \lambda_5 + \lambda_6 + \lambda_7) - \lambda_2 + \varepsilon_{11} \\ Y_{12} &= \gamma + \lambda_5 + (\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \lambda_4 + \lambda_5 + \lambda_6 + \lambda_7) + \varepsilon_{12} \\ Y_{13} &= \gamma + \lambda_3 - \lambda_5 + \varepsilon_{13} \\ Y_{14} &= \gamma + \lambda_6 - \lambda_3 + \varepsilon_{14} \\ Y_{15} &= \gamma + \lambda_4 - \lambda_6 + \varepsilon_{15} \\ Y_{16} &= \gamma + \lambda_1 - \lambda_4 + \varepsilon_{16} && \text{(公式四)} \end{aligned}$$

16片之 Y 可以簡寫成一個 Y 的矩陣行列式 (公式五)

$$Y = X \cdot \beta + \varepsilon \quad (\text{公式五})$$

$$\begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ Y_3 \\ Y_4 \\ Y_5 \\ Y_6 \\ Y_7 \\ Y_8 \\ Y_9 \\ Y_{10} \\ Y_{11} \\ Y_{12} \\ Y_{13} \\ Y_{14} \\ Y_{15} \\ Y_{16} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & -1 & -1 & -1 & -2 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 2 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ -1 & -2 & -1 & -1 & -1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 2 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} \lambda_1 \\ \lambda_2 \\ \lambda_3 \\ \lambda_4 \\ \lambda_5 \\ \lambda_6 \\ \lambda_7 \\ \gamma_1 \\ \gamma_2 \\ \gamma_3 \\ \gamma_4 \\ \gamma_5 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \varepsilon_1 \\ \varepsilon_2 \\ \varepsilon_3 \\ \varepsilon_4 \\ \varepsilon_5 \\ \varepsilon_6 \\ \varepsilon_7 \\ \varepsilon_8 \\ \varepsilon_9 \\ \varepsilon_{10} \\ \varepsilon_{11} \\ \varepsilon_{12} \\ \varepsilon_{13} \\ \varepsilon_{14} \\ \varepsilon_{15} \\ \varepsilon_{16} \end{bmatrix}$$

(公式六)

其中  $\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \lambda_4 + \lambda_5 + \lambda_6 + \lambda_7 + \lambda_8 = 0$

$$[X] = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & -1 & -1 & -1 & -1 & -2 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ 2 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ -1 & -2 & -1 & -1 & -1 & -1 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 2 & 1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} \lambda_1 \\ \lambda_2 \\ \lambda_3 \\ \lambda_4 \\ \lambda_5 \\ \lambda_6 \\ \lambda_7 \\ \gamma_1 \\ \gamma_2 \\ \gamma_3 \\ \gamma_4 \\ \gamma_5 \end{bmatrix} = (X' \cdot X)^{-1} \cdot X' \cdot Y$$

(公式七)



兩樣本之基因表現對數比公式為：

$$\log \frac{t_i}{t_j} = \lambda_i - \lambda_j \quad (\text{公式八})$$

上述公式七之行列式欲有解則  $X'$  需不存在（由於解此聯立方程式需 12 個已知數，故要有 12 片以上有值才可以計算出）。由上述公式可以求出每一個基因經由這 16 片實驗所求出之這八個樣本之基因相對表現量，並且可以得到實驗誤差  $\sigma$  及批次染劑效應因子  $\gamma_1-\gamma_5$ 。

## (二)F 檢定

利用 F-檢定來看在不同的虛無假設  $H_0$  下，每一基因是否推翻虛無假設而有顯著差異<sup>(35)</sup>。虛無假設依不同之條件共有 15 個分述如下， $H_{01}$  為估計基因表現在青海與西藏兩產地是否有差異； $H_{02}$  為估計基因表現在子座與菌核兩部位是否有差異； $H_{03}$  為估計基因表現在菌核與全蟲兩部位是否有差異； $H_{04}$  為估計基因表現在青海全蟲兩樣本與控制組間是否有差異； $H_{05}$  為估計基因表現在青海樣本與所有控制組間是否有差異； $H_{06}$  為估計基因表現在西藏所有樣本與控制組間是否有差異； $H_{07}$  為估計基因表現在青海子實體與控制組間是否有差異； $H_{08}$  為估計基因表現在青海菌核與控制組間是否有差異； $H_{09}$  為估計基因表現在青海全蟲樣本 1 與控制組間是否有差異； $H_{010}$  為估計基因表現在青海全蟲樣本 2 與控制組間是否有差異； $H_{011}$  為估計基因表現在西藏子座與控制組間是否有差異； $H_{012}$  為估計基因表現在西藏菌核與控制組間是否有差異； $H_{013}$  為估計基因表現在西藏全蟲與控制組間是否有差異； $H_{014}$  為估計基因表現在青海全蟲樣本 1 與青海全蟲樣本 2 間是否有差異； $H_{015}$  為估計基因表現在所有冬蟲夏草樣本與控制組間是否有差異。

$$\begin{aligned}
 H_{01} &: \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \lambda_4}{4} - \frac{\lambda_5 + \lambda_6 + \lambda_7}{3} = 0 \\
 H_{02} &: \frac{\lambda_1 + \lambda_5}{2} - \frac{\lambda_2 + \lambda_6}{2} = 0 \\
 H_{03} &: \frac{\lambda_1 + \lambda_5}{2} - \frac{\lambda_3 + \lambda_4 + \lambda_7}{3} = 0 \\
 H_{04} &: \frac{\lambda_3 + \lambda_4}{2} - \lambda_8 = 0 \\
 H_{05} &: \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \lambda_4}{4} - \lambda_8 = 0 \\
 H_{06} &: \frac{\lambda_5 + \lambda_6 + \lambda_7}{3} - \lambda_8 = 0 \\
 H_{07} &: \lambda_1 - \lambda_8 = 0 \\
 H_{08} &: \lambda_2 - \lambda_8 = 0 \\
 H_{09} &: \lambda_3 - \lambda_8 = 0 \\
 H_{010} &: \lambda_4 - \lambda_8 = 0 \\
 H_{011} &: \lambda_5 - \lambda_8 = 0 \\
 H_{012} &: \lambda_6 - \lambda_8 = 0 \\
 H_{013} &: \lambda_7 - \lambda_8 = 0 \\
 H_{014} &: \lambda_3 - \lambda_4 = 0 \\
 H_{015} &: \frac{\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \lambda_4 + \lambda_5 + \lambda_6 + \lambda_7}{7} - \lambda_8 = 0
 \end{aligned}
 \tag{公式九~二十三}$$

F 值的公式及計算過程如下：

$$\begin{aligned}
 \underline{\beta} &= \lambda_1, \lambda_2, \lambda_3, \lambda_4, \lambda_5, \lambda_6, \lambda_7, \gamma_1, \gamma_2, \gamma_3, \gamma_4, \gamma_5 \\
 F &= \frac{(SSEr - SSEf) / s}{(SSEf) / n - k} \\
 SSEf &= \|Y - X\hat{\lambda}\|^2 = \|\hat{\varepsilon}\|^2
 \end{aligned}
 \tag{公式二十四}$$

*SSEr* 為在  $H_0$  假設下的誤差平方和；而 *SSEf* 為完整模式下誤差平方和，兩者差異越大越傾向推翻虛無假設。*S* 為在假設下減少的自由度，在上述的  $H_0$  下， $s = 1$ ； $n$  為樣本數； $k$  為參數  $\underline{\beta}$  個數。若  $H_0$  為真，*F* 值將接近 1；若  $H_0$  為假，*F* 值將比 1 大很

多。F 值越大代表差異越顯著。

### (三) 篩選冬蟲夏草標記基因群

我們用來篩選冬蟲夏草標記基因所採用的虛無假設為  $H_0: (\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \lambda_4 + \lambda_5 + \lambda_6 + \lambda_7/7) - \lambda_8 = 0$ ，這個虛無假設可以特別選取出平均在七種不同冬蟲夏草處理之後比起控制組（不處理）之基因表現差異最大的基因出來。以這種選取方法選出的基因可將整體基因中因處理冬蟲夏草而在大多數樣本中皆有差異的基因選出，而且我們利用 F-檢定來評判這些基因是否在統計上具有顯著差異。我們選取出 F 值最大的 100 個基因當作「初步的冬蟲夏草標記基因群」，這 100 個基因之 F 值最小為 21.1，依照統計學查表可知在我們的實驗狀況下 F 值大於 4 就具有統計上的顯著差異，而這 100 個基因的 F 值最小為 21.1，遠大於統計上的顯著差異 F 值。因此，我們對這 100 個冬蟲夏草標記基因的選取結果深具信心。

本研究中我們所定義的「冬蟲夏草標記基因群」是一群受冬蟲夏草樣本顯著調控的基因，而且無論樣本的產地或部位不同，其受調控的方式（上調或下調）都應該相同。從圖 11 的叢集分析結果，我們的確發現這 100 個冬蟲夏草標記基因在經過不同的冬蟲夏草樣本處理後，基因表現皆一致上調或下調。因此，這個結果證明了利用嚴謹的實驗設計與統計分析，我們有能力從三千多個可分析的基因群中篩選出 100 個受到顯著調控的基因群，而且經這個標記基因群的共同受調控方式符合生物學上的預期。在本論文中將只針對  $H_0: (\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \lambda_4 + \lambda_5 + \lambda_6 + \lambda_7/7) - \lambda_8 = 0$  這個虛無假設討論，我們也列出其他 14 種虛無假設都有其特殊的篩選目的，其結果也相當值得更進一步的探討。由此可知，微陣列晶片實驗的結果蘊藏了相當多的「寶藏」，就等待實驗者如何利用好的工具來挖掘與琢磨。

## 三、同步定量聚合鏈反應分析

一般基因晶片實驗之結果會以其他核酸定量之方法來評估其準確度，北方墨點法及同步定量聚合反應為最常用之方法。同步定量聚合反應分析利用即時螢光定量，結合 PCR 的靈敏度為目前最精準的核酸定量及基因表現偵測技術之一。

我們從上述 100 種冬蟲夏草標記基因群中選出 CD69、STAT1、CGI-01、STAT5A、PRDX1、PLAB、LST1、SLC3A2 以及持家基因 (House-keeping gene)  $\beta$ -actin 等 9 種基因進行同步定量聚合反應，來驗證微陣列實驗的結果。將基因晶片實驗所選取出之標記基因，向 ABI 公司訂購 TaqMan AOD primer set。共進行 9 個基因、8 個樣本、三重複。經由位於陽明大學的同步定量聚合反應核心實驗室進行反應後得到數據。其中 PLAB 基因的同步定量聚合反應結果的  $C_T$  值大於 34，已經屬於同步定量聚合反應的可信範圍外，所以 PLAB 基因的數據被排除。

由同步定量聚合鏈反應可得知各基因之  $C_T$  值，可以分別求出每種基因的實驗組 (受不同冬蟲夏草萃取液處理過) 對控制組 (無冬蟲夏草萃取液處理) 之基因表現相對值 ( $\Delta C_T$  值)。7 種基因的  $\Delta C_T$  值分別與持家基因  $\beta$ -actin 的  $\Delta C_T$  值比較，得到  $-\Delta \Delta C_T$  值 (相當於 log ratio)。我們將同步定量聚合反應的結果 ( $-\Delta \Delta C_T$  值) 與微陣列的結果 (log ratio) 作圖比較，由圖 12 到圖 18 的結果可知：同步定量聚合反應與微陣列的結果相當接近。由於此兩種結果的計算方式不同，所以這兩種數據的誤差計算方式也不同。為了使同步定量聚合反應與微陣列的數據誤差可以比較，許文郁教授提供以下的公式來做為兩種數據間的誤差傳遞公式。

公式二十五為同步定量聚合反應結果與誤差的計算。其中  $x_1$ 、 $x_2$  與  $x_3$  代表基因 A 在樣本 1 之三重複  $C_T$  值； $x_1'$ 、 $x_2'$  與  $x_3'$  代表持家基因在樣本 1 之三重複  $C_T$  值； $y_1$ 、 $y_2$  與  $y_3$  代表 A 基因在控制組之三重複  $C_T$  值， $y_1'$ 、 $y_2'$  與  $y_3'$  代表持家基因在控制組之三重複  $C_T$  值。由公式二十六可以求得基因 A 在樣本 1 對控制組之  $\Delta C_T$  值與其誤差傳遞後之誤差估計值 ( $\log_2 \text{ratio} \pm \text{SEM}$ )。

	A 基因	持家基因
樣本一	$X_1, X_2, X_3$ $(\mu_x, S_x^2)$	$X_1', X_2', X_3'$ $(\mu_{x'}, S_{x'}^2)$
控制組	$Y_1, Y_2, Y_3$ $(\mu_y, S_y^2)$	$Y_1', Y_2', Y_3'$ $(\mu_{y'}, S_{y'}^2)$

$$[(\mu_x - \mu_{x'}) - (\mu_y - \mu_{y'})] \pm \sqrt{\frac{(\sigma_x^2 + \sigma_{x'}^2 + \sigma_y^2 + \sigma_{y'}^2)}{3}}$$

(公式二十五)

所得的誤差數值可與微陣列結果來比較，微陣列結果與誤差的計算可寫成公式二十六：

$$(\lambda x - \lambda y) \pm \sigma \tag{公式二十六}$$

經由以上數值的計算，兩種方法的誤差結果都已經以誤差槓 (error bar) 表示在圖圖 12 到圖 18 中。

為了進一步分析同步定量聚合反應與微陣列實驗結果之間的一致性，我們做進一步的數值相關性分析 (Correlation analysis)，圖 19 顯示這兩種方法所得的結果間的相關係數  $R=0.83$  及  $R^2=0.69$  (n=49)。

## 肆、討論

### 一、冬蟲夏草樣本的有機化學圖譜分析

依據紫外光/可見光光譜的結果，冬蟲夏草子實體與蟲體之間有化學成分的差異。子實體在 260nm 以及 320nm 各有一個主要的吸收波峰，而蟲體只在 260nm 有主要的吸收波峰。經由進一步的 HPLC 分析發現：在 310nm 的波段，子實體與蟲體間主要化學組成的差異在於單一主要吸收峰。這個結果顯示：單一化學物質造成子實體與蟲體間 310nm 紫外光光譜的差異。本研究團隊對於此結果正在進行更深入的化學分析，希望能進一步了解這個物質的分子成分。依據上述的結果我們推論可能造成子實體與蟲體之間此種化學成分差異的原因如下：

因為子實體生長於地面上，會受到陽光的照射，而且冬蟲夏草是產自 3,000 到 5,000 公尺的高原上，其所可能接受到的紫外光更為強烈。地表附近的生物體受到紫外光的傷害最主要是來自 UVB 的波段（280nm 到 320nm 之間）。已經有期刊論文指出：為了避免紫外光照射導致生物體的傷害，某些真菌類生物會製造可吸收 UVB 波段的化學物質。本研究結果顯示：冬蟲夏草子實體含有單一化學物質對於 UVB 波段（310nm）的紫外光有強烈的吸收。因此，我們推論：冬蟲夏草可能會製造某種化學成分來吸收 UVB 波段的紫外光，其功能之一為避免強烈的紫外光照射導致菌絲體的傷害。此推論是否真確仍待接續的研究來驗證。有趣的是，我們的發現與清朝趙學敏【本草綱目拾遺】中的論述有其相似之處：「夏草冬蟲乃感陰陽二氣而生，夏至一陰生，故靜而為草，冬至一陽生，故動而為蟲，以其得陰陽之氣全也，故能治諸虛百損。」亦即冬蟲夏草的子實體與蟲體內的菌絲可能因生長環境的差異（子實體為地上部；蟲體為地下部）而含有不同的化學組成，因此造成不同的生物效應。

由 230nm、260nm 以及 310nm 的 HPLC 層析圖中，我們選出了 15 個主要吸收波峰，並依據每個吸收波峰相對於整體層析圖的面積比率來代表各種冬蟲夏草樣本的有機化合物圖譜。類似的分析方法也曾經被其他研究人員用來做為鑑別物種或產地的依據。經過階層式叢集分析之後，結果顯示：不同冬蟲夏草萃取液之間的差異可被分類為兩個主要的群組，其中 TFB、TCS 與 TW 被歸類為同一組；而 QFB、QCS 與 QW 被歸類為另一組。此結果指出：雖然本研究發現子實體

與蟲體樣本間有化學組成的差異，但是整體而言，不同產地所造成的化學組成差異大於不同部位所造成的差異。這個結論可以間接支持清朝汪昂【本草備要】所記載的：「冬蟲夏草，甘平，保肺益腎，止血化痰，已勞嗽。四川嘉定府所產者最佳，雲南、貴州所產者次之。」中關於產地的差異可能造成療效的不同。但是化學組成的不同並不能直接推論就一定會造成生物反應的差異。因此，希望對生物反應做評估就需要進一步以生物系統來進行實驗。微陣列圖譜分析 (Microarray fingerprinting) 或稱為基因表現反應圖譜分析 (Responsive gene expression profiling) 就是以此為目的。

## 二、迴圈設計的統計分析

### (一) 評估系統之可信度

數據經由迴圈計算之後，第一步先評估系統之可信度。由系統內控制組 (兩相同之樣本 QCS) 之基因表現差異值之分佈遠小於其他樣本的處理相對於不處理控制組之基因表現差異值可知，本研究結果基因表現差異倍數數值雖小，但在統計上是顯著且有意義的。在本研究中我們充分運用統計學的運算以及迴圈設計的優點來選取可靠基因群以及冬蟲夏草標記基因群。對每個基因除了利用兩相同樣本之差異及迴圈設計所評估出的系統誤差  $\sigma$  之外，還利用 F-檢定針對我們有興趣的假設進行檢定。F-檢定包含了參考的點數與自由度等因子為一綜合性的檢定方法。雖然在本實驗之數據分析系統中無法得出直接比較的基因表現差異倍數，但是在 16 片玻片經過迴圈計算之後的結果與直接對應到的兩樣品的基因表現差異倍數結果差異不大，因此基因表現差異倍數數值雖小卻是十分可信的。

### (二) 冬蟲夏草樣本間之相關性

本研究同時也希望以基因調控的層次來評估不同產地與部位的冬蟲夏草樣本間之相關性。當我們篩選出 100 個冬蟲夏草標記基因後，可以利用這群基因的受調控程度來進行評估。在基因微陣列實驗中，如果兩個樣本間的相似程度愈高，則標記基因群的整體受調控程度也會愈接近。在統計學上可以用叢集分析法來計算此種相關性。因此我們將這 100 個冬蟲夏草標記基因以 Michael Eisen 教授的 Cluster 程式進行叢集分析，來計算七個冬蟲夏草樣本間的相關性，結果如圖 11。此圖為二方向叢集分析

的圖示結果，基因間以 Correlation 方式分析，樣本間則以 Kendall's Tau 方式分析。結果顯示：青海的四個樣本被分成一類（藍色框框），而西藏的三個樣本歸為另一類（紅色框框），而兩個相同的青海全蟲（內部控制組：QCS-1 與 QCS-2）樣本間的關係則最接近。由實驗結果可知：1. 在七個冬蟲夏草樣本中，內部控制組 QCS-1 與 QCS-2 樣本間的關係最接近，因此理論上 QCS-1 與 QCS-2 經過計算後應該最接近。實際的叢集分析結果也證實了這一點。這表示本研究的基因晶片操作與統計計算上的可信度夠高，所以能將此結果真實的呈現。2. 不同產地的樣本能被明顯的區分為兩大群。這表示產地之間的差異的確造成明顯的功能性（基因調控）差異。這個結果也反映了從 HPLC 層析圖上所觀察到的：產地的差異大於部位的差異。因此我們利用兩種不同的實驗方法得到相同的結論。3. 部位的差異在圖 5.2 中並沒有一致的結果。在青海的樣本中，全蟲（QCS）與菌核（QW）較為接近，而在西藏的樣本中，子座（TFB）與菌核（TW）較為接近。這表示部位之間的差異對這個基因群的調控並不如產地之間明顯。雖然如此，將來我們仍可以再利用不同的虛無假設，挑選出受到不同部位而有不同調控的基因。

雖然我們從生物活性指標實驗中看到處理冬蟲夏草後細胞增殖抑制效果最強的是子座（子實體）的部份，但對基因表現的影響則可由前述結果可知三部位差異並無預期強烈，反而是產地所造成的影響較強。且 HPLC 層析圖的結果亦可以發現產地所造成的影響較強為支持叢集分析之結果之證據。為何產地所造成的影響較強呢？這可能是由於不同產地的土壤中含有不同的微量元素比例及成分，而生物在成長過程中吸收到不同的微量元素比例及成分，而這些微量重金屬往往少量就會對人體造成十分重要的影響<sup>(37)</sup>。因此我們推論冬蟲夏草產地的因素對基因表現造成的影響比起部位的因素更加明顯，不過仍需要以其他實驗來支持我們的推論。

### 三、冬蟲夏草標記基因與可能的藥理機制

由晶片結果可知，以冬蟲夏草萃取液處理 KG-1 細胞後會調節數種功能相關之基因群的表現。我們取前 50 個冬蟲夏草標記基因來進行分析，大致上分為四類功能基因群，分別為：（一）免疫/發炎反應相關基因群；（二）與抗氧化作用相關基因群；（三）與細胞內醣



類代謝相關基因群；（四）與細胞遷移/附著相關基因群。與免疫/發炎反應相關基因群，例如 CD69、STAT1、TIA1、PLAB、IL1B、DUSP-4、ITGB1、STAT5A、PTE1、PAG、RIPK2、POU2F2、TRGV9 等。與抗氧化作用相關基因群，例如 PRDX1、PRDX2 等。與細胞內醣類代謝相關基因群，例如 GSK3B、PKM2 等。與細胞遷移/附著相關基因群，例如 CD98、ITGB1、ZYG、LST1 等。由實驗結果可知冬蟲夏草會活化及抑制數個免疫/發炎反應相關基因的表現，接下來分別對這幾個基因做深入的討論。

### （一）CD69 基因表現上調

CD69 基因（F 值名次 1）會產生出 CD69 抗原，其結構為細胞表面的醣蛋白（Glycoprotein）作用為訊息傳遞接受器，為早期 T 細胞活化抗原且與淋巴球之增殖有關。可於活化的白血球細胞上發現如 T、B、NK 細胞、嗜中、酸性球與 Langerhans 細胞，並與淋巴球、單核球、血小板活化有關，可促進  $Ca^{2+}$  流入、合成 cytokines 及其 receptor、誘導 c-myc 及 c-fos 表現、促進 NK 媒介之細胞溶解。

CD69 在最近的研究報導指出與自體免疫有關，利用第二型膠原蛋白所誘導產生的自體免疫關節炎在 CD69 之基因剔除老鼠（CD69<sup>-/-</sup>Knock Out Mice）身上會產生特別嚴重的自體免疫疾病。當 CD69 基因被剔除時，一些與發炎反應相關之細胞素如 IL1- $\beta$  便會表現增加，產生局部性的發炎反應造成自體免疫更加嚴重，因此 CD69 被認為是一種會抑制自體免疫反應的基因。目前有關冬蟲夏草萃取物對於自體免疫反應有緩解效應之相關研究有兩篇。本研究結果發現在經冬蟲夏草水萃液處理後 CD 69 基因表現出現明顯的上調（Up Regulation），由此可推測冬蟲夏草水萃液處理確實會對 KG-1 細胞造成某種免疫作用的調節，可能會緩解自體免疫反應。且 CD 69 多於活化的白血球細胞上發現，由此可推測冬蟲夏草也許與免疫活化有關。

### （二）IL1- $\beta$ 基因表現下調

IL1- $\beta$  基因（F 值名次 14）在本研究中有明顯的下調（Down Regulation），IL1- $\beta$  為發炎反應細胞素由單核球、巨噬細胞、B 細胞、樹突狀細胞所分泌，在抗發炎反應與抗原呈現過程中各有其特殊之作用如活化 Th 細胞、促進 B 細胞成熟、加強活化 NK

細胞、使 ICAMs 表現增加及趨化巨噬細胞及嗜中性球。

在冬蟲夏草的一篇相關研究指出，以冬蟲夏草的一種 CS-19-22 萃取液處理被脂多醣 (lipopolysaccharide, LPS) 活化後的肺泡灌洗液細胞 (Bronchoalveolar Lavage Fluids cells, BALF)，經酵素免疫分析後發現會降低 IL1- $\beta$ 、IL-6、IL-8、IL-10 及 TNF- $\alpha$  之表現，與本研究之結果一致。IL1- $\beta$  為一種很重要的發炎反應細胞素，在經冬蟲夏草水萃液處理後分泌會被抑制，由此可推測冬蟲夏草可能會有抑制細胞發炎反應之傾向<sup>(44)</sup>。

### (三) STAT1 基因表現上調，STAT5A 基因表現下調

STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription) 轉錄活化子與轉錄訊息傳遞者，它是細胞裡不可或缺的轉錄活化與訊息傳遞者。基因要能表現出蛋白質，必須經過轉錄。換句話說，當基因的 DNA 序列要轉錄成 RNA 核酸分子時，需要叫做聚合酶 (polymerase) 的酵素進行合成作用，而轉錄因子 (transcription factor) 正是控制聚合酶運作與否的關鍵，同時也決定了哪些基因需要被表現。STAT1 基因作用為訊息傳遞及轉錄活化因子 (signal transducer and activator of transcription 1)，世界第一份指出 STATs 與調控細胞成長或死亡有關的文獻發現細胞接受外來生長因子 (growth factor) 或細胞因子 (cytokine) 訊號後 Stat1 蛋白便在細胞內活躍起來並誘導細胞週期抑制蛋白 (cell cycle inhibitor) 活化，間接達到控制細胞分裂的效果。之後同一團隊又發現了 Stat5 在免疫系統 T 細胞的增生與活化所需的訊息傳遞路徑上扮演了重要的角色<sup>(46)</sup>。因此可以推測冬蟲夏草可能會造成訊息傳遞反應而影響細胞之生理。

### (四) 與抗氧化作用相關基因群

PRDX1、PRDX2 分別為過氧化氧化還原酶 (peroxiredoxin 1、peroxiredoxin2)。過氧化氧化還原酶作用為抗氧化 (antioxidant) 可以減少氧化劑如過氧化氫對細胞造成的傷害過氧化氧化還原酶在生理反應中扮演保護角色被認為藉由抗氧化作用。在本研究中 SOD1 (過氧化歧化酶) 基因之表現亦有顯著差異，但因內部控制組誤差較大一點而被剔除出 100 個冬蟲夏草標記基因。由此可知在經冬蟲夏草處理後會使得抗氧化作用相關基因群表現上調。而過去研究冬蟲夏草之相關文獻有數篇指出冬蟲夏草具抗氧

化之功用。本結果與過去研究結果一致。

#### (五) 與細胞內醣類代謝相關基因群

PKM2 基因為丙酮酸激酶 (Pyruvate kinase) 在細胞醣解過程中扮演了重要的角色，能催化磷酸烯醇丙酮酸 (phosphoenolpyruvate, PEP) 將磷酸基轉移給 ADP 形成 ATP 與丙酮酸 (pyruvate)。GSK3B 基因為肝醣合成激酶 (glycogen synthase kinase 3 beta) 可以影響數種調節蛋白包括肝醣合成酶、MYB、轉錄因子 JUN 等。

冬蟲夏草有數篇文獻指出與糖尿病有關，將冬蟲夏草水萃液餵食糖尿病模式鼠可以改善病情及增加存活率。本研究找出數個跟醣類代謝有關之基因，與過去研究結果一致。

#### (六) 與細胞遷移/附著相關基因群

ZYX 基因製造 zyxin、TUBA6 基因製造微管蛋白 (tubulin)、SLC3A2 (CD98) 與 ITGB1 (CD29) 皆與與細胞遷移/附著相關。但目前無相關文獻指出與冬蟲夏草處理之相互關係。

而標記基因中有數個基因如 PTE1、PAG、RIPK2、POU2F2、IL1B、ITGB1、TRGV9、PRDX2 皆為會對壓力反應 (response to stress) 的基因。此外本研究亦看到數個熱休克蛋白 (heat shock protein) 基因表現上調，熱休克蛋白通常在細胞受到刺激及外加壓力下會產生出來以修復細胞之正常生理。因此可以推測冬蟲夏草可能作用機制為給予一個壓力的刺激而使細胞 (身體) 處於戰備狀態以對外來入侵之病菌進行快速之反應，藉由這種方法以達成免疫調節之目標。

### 四、同步定量聚合鏈反應分析

由圖 12 到圖 18 的結果可以得知：同步定量聚合反應與微陣列的結果相當接近。本研究的微陣列實驗總共有 7 種冬蟲夏草樣本 (其中 QCS1 與 QCS2 為相同的樣本做為內部控制組)，選出 8 種基因中進行同步定量聚合反應。在扣除同步定量聚合反應不可信的數據 (PLAB 基因) 之後，總共有 49 筆數據。以這 49 筆數據做進一步的數值相關性分析 (Correlation analysis)，圖 19 顯示這兩種方法所得的結果間的相關係數  $R=0.83$  及  $R^2=0.69$  ( $n=49$ )。目前與微陣列相關的期刊論文中，有如此分析的並不多，我們查詢了其中一篇發表於 *Physiological Genomics* 期刊的論文有做類似的分析，作者從 32 筆數據做相關性分

析得到相關係數為  $R=0.63$  及  $R^2=0.39$  ( $n=32$ )。由於我們使用迴圈設計來進行微陣列實驗，使得實驗組的數據在整組實驗中的比重增加。此外，在迴圈中額外加入一個相同的樣本做為內部控制組，可藉以評估數據的可信。

## 伍、結論與建議

晶片實驗之結果上仍需要以其他相關之技術來確認實驗之正確性，如正在進行之即時聚合酶鏈鎖反應（Real-Time PCR）等才會成為確定的冬蟲夏草標記基因。利用本研究模式我們已經初步篩選出冬蟲夏草的標記基因，據此結果我們將能評估不同產地或不同部位的冬蟲夏草之間功能性的異同，並且進一步探討冬蟲夏草可能的藥理機制。

在建立起一個研究冬蟲夏草的模式之後，未來有許多工作可以進行更深入的研究。例如未來可以將標記基因點印於玻片上製備出冬蟲夏草晶片以進行快速的冬蟲夏草鑑定分類及品質控制。或是可與其他產地的野生蟲草及一般市面販售之菌絲體加入一起比較，建立起更完整的冬蟲夏草分類圖譜。由於本研究著重為整個模式之建立，因此先選用培養及控制方便之細胞株著手研究，但細胞株不能就全然的代表真正在人體的分子作用機制，未來可以用培養樹突細胞來進行更具生理意義之研究。希望未來能藉由這個成功研究冬蟲夏草的模式進而建立一個中草藥對細胞基因表現影響之分子層級的科學化分析平台，使得中草藥的藥效能被國際接受。

## 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-105 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. Li M., Regulation of immune gene synthesis in mice by cixichunbao granule. *Zhong Yao Tong Bao.* 11 (12), 52-4 (1986).
2. Hong M., Effects of aging and ginsenoside on atrial natriuretic peptide gene expression. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 71 (3), 140-3 (1991).
3. Tian ZG., Yang GZ., Promoting effect of panaxatriol ginsenoside on gene expression of human interleukin-1. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 14 (2), 159-61 (1993).
4. Kim MY., Lee KY., Lee SK., Inductive effect of ginsenoside-Rg1 on tyrosine aminotransferase gene expression in rat primary hepatocyte cultures. *Biochem Mol Biol Int.* 34 (4), 845-51 (1994).
5. Kang SY., Lee KY., Lee SK., Ginsenoside-Rg1 regulates the induction of tyrosine aminotransferase gene transcription in rat hepatocyte cultures. *Biochem Biophys Res Commun.* 205 (3), 1696-701 (1994).
6. Chung E., Lee KY., Lee YJ., Lee YH., Lee SK., Ginsenoside Rg1 down-regulates glucocorticoid receptor and displays synergistic effects with cAMP. *Steroids.* 63 (7-8), 421-4 (1998).
7. Liu M., Zhang JT., Immunoregulatory effects of ginsenoside Rg1 in aged rats. *Yao Xue Xue Bao.* 30 (11), 818-23 (1995).
8. Chang JY., Yang TY., Chang CP., Chang JG., The effect of “chi-han (hot nature)” Chinese herbs on the secretion of IL-1 beta and TNF-alpha by mononuclear cells. *Kaohsiung J Med Sci.* 12 (1), 18-24 (1996).
9. Yonekura K., Kawakita T., Saito Y., Suzuki A., Nomoto K., Augmentation of host resistance to *Listeria monocytogenes* infection by a traditional Chinese medicine, ren-shen-yang-rong-tang (Japanese name: ninjin-youei-to). *J Immunopharmacol Immunotoxicol.* 14 (1-2) 165-90 (1992).
10. Ma J., Li Y., Ye Q., Li J., Hua Y., Ju D., Zhang D., Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. *J Agric Food Chem.* 48 5220-5 (2000).
11. Peng HW., Huang YT., Chen CF., Tsai TH., Validation of liquid chromatographic method in herbal medicine analysis. *J Chin Med.* 8(4) 237-44

- (1997).
12. Liu SY., Woo SO., Koh HL., HPLC and GC-MS screening of Chinese proprietary medicine for undeclared therapeutic substances. *J Pharm Biomed Ana.* 24 983-92 (2001).
  13. Olsson I., Gullberg U., Ivhed I., Nilsson K., Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U-937 by 1 alpha,25-dihydroxycholecalciferol. *Cancer Res.* 43 (12 Pt1) 5862-7 (1983).
  14. Harris P. and Ralph P., Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J Leukocyte Biology* 37(4) 407-22 (1985).
  15. Jacobs JP., Jones CM., Baille JP., Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* 227(254) 168-70 (1970).

## 柒、圖

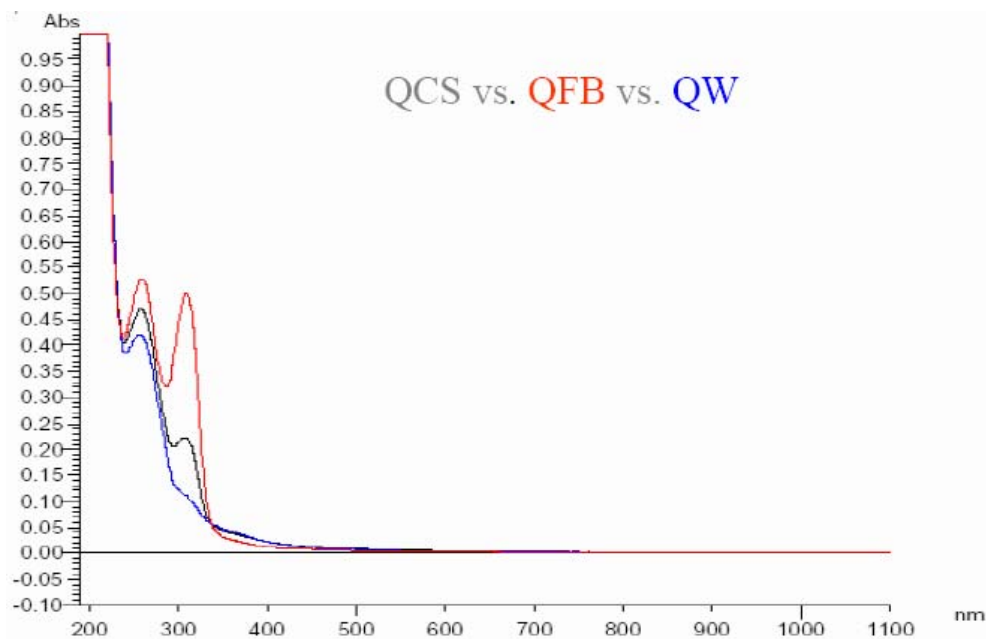


圖 1 冬蟲夏草萃取液的紫外光與可見光的全光譜掃描圖。(在之後的圖示中我們都會使用以下的英文簡稱來代表各種冬蟲夏草的樣本。QCS：青海全蟲萃取液；QFB：青海子實體萃取液；QW：青海蟲體萃取液；TCS：西藏全蟲萃取液；TFB：西藏子實體萃取液；TW：西藏蟲體萃取液。)



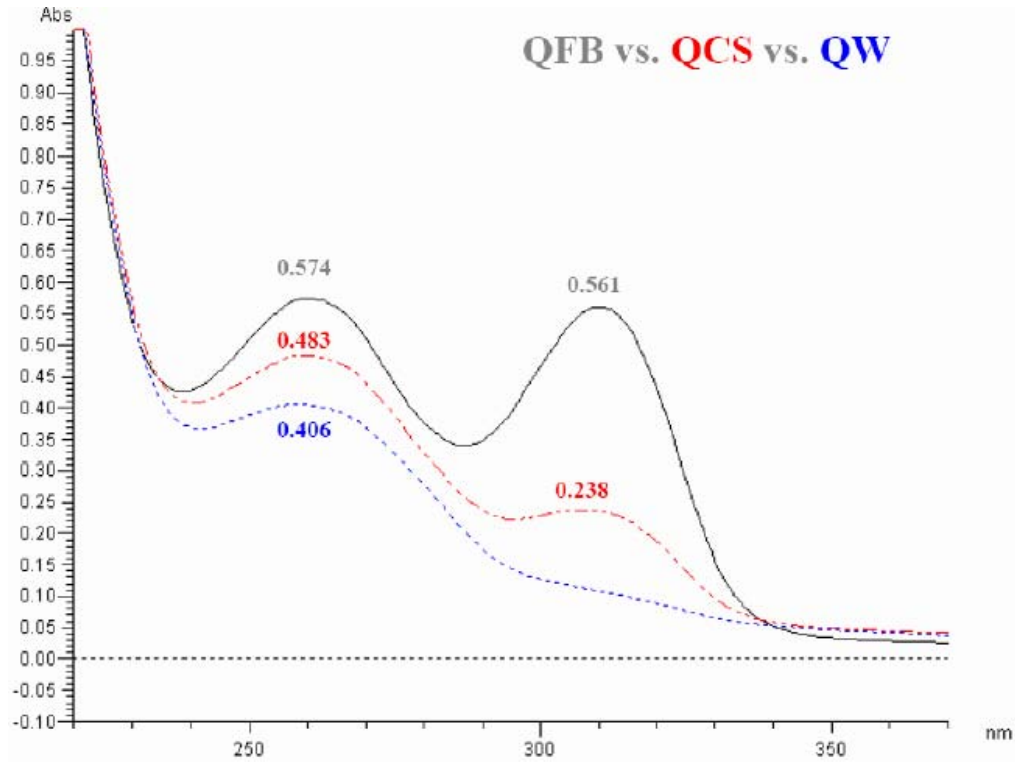


圖 2 青海冬蟲夏草樣本的紫外光吸收光譜圖 (220nm 到 370nm)。

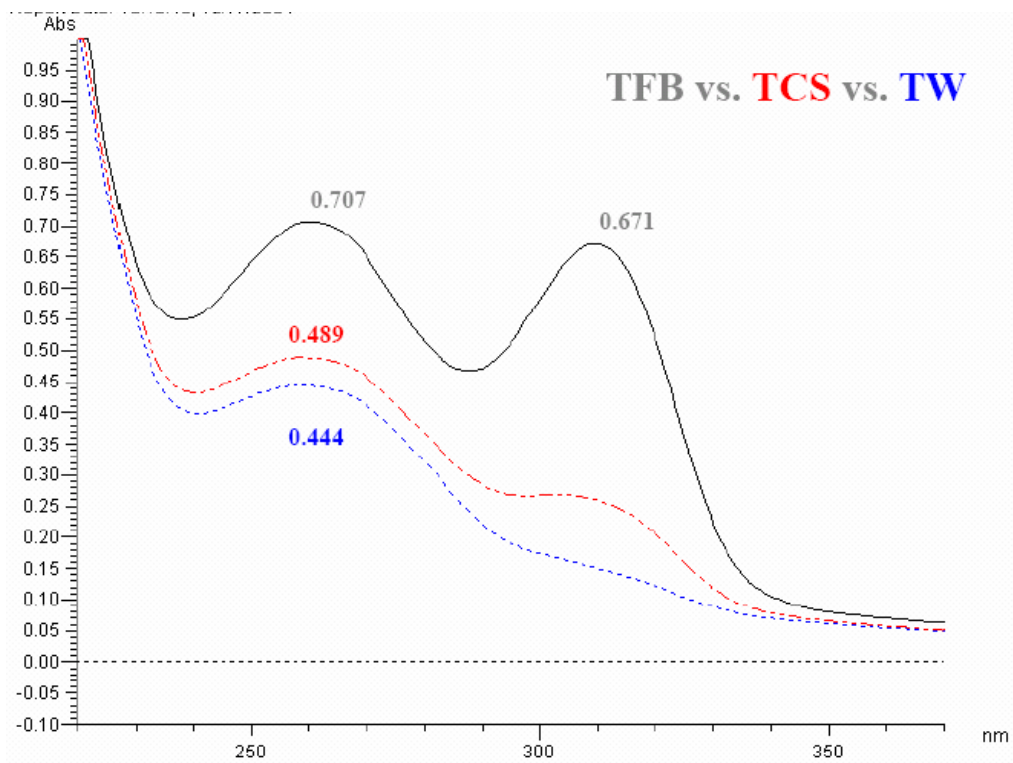


圖 3 西藏冬蟲夏草樣本的紫外光吸收光譜圖 (220nm 到 370nm)。

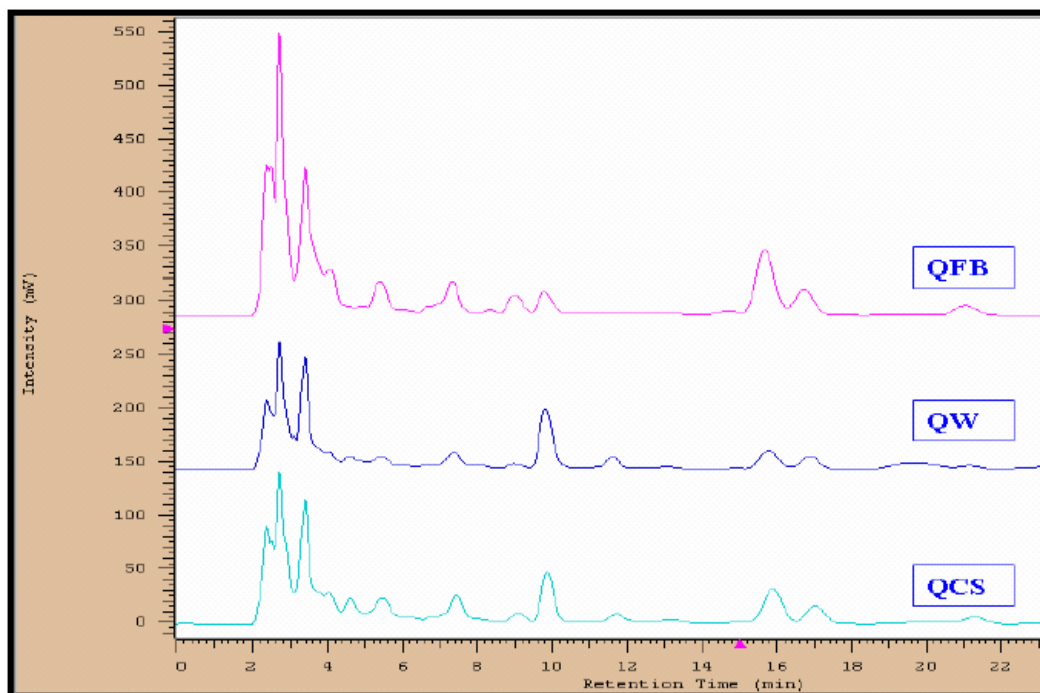


圖 4 青海冬蟲夏草樣本在 230nm 波長的 HPLC 層析圖。

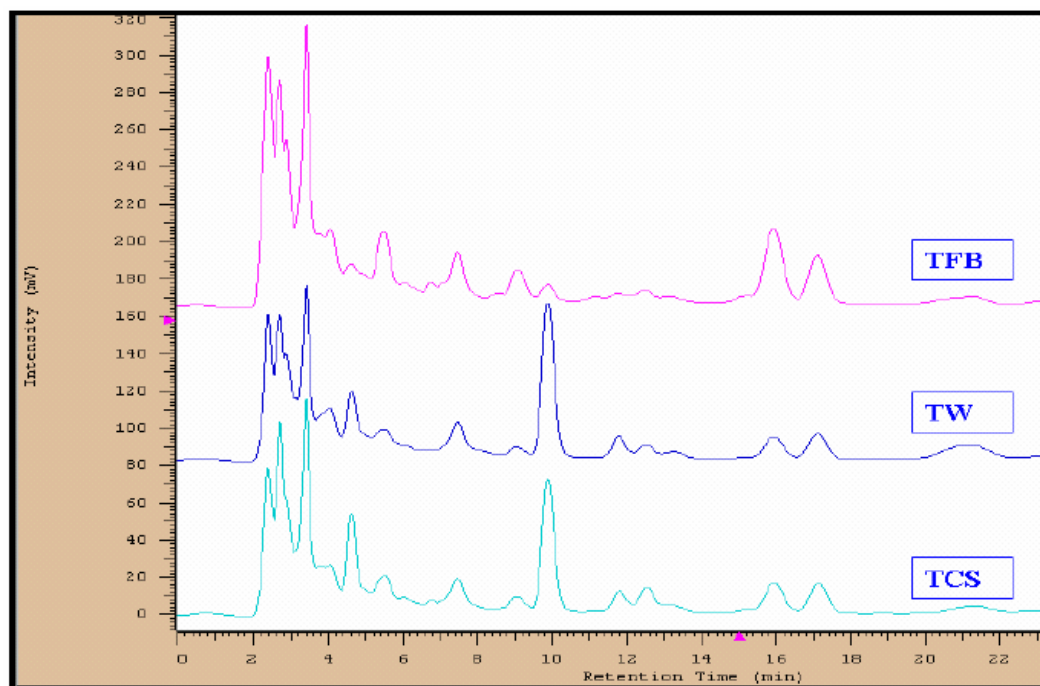


圖 5 西藏冬蟲夏草樣本在 230nm 波長的 HPLC 層析圖。

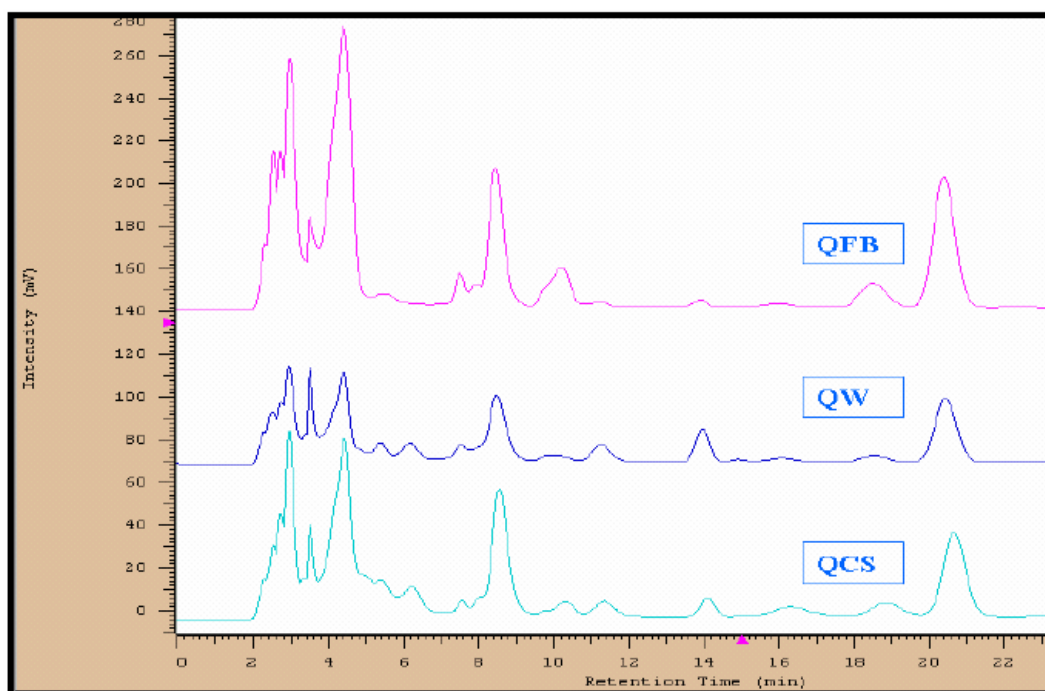


圖 6 青海冬蟲夏草樣本在 260nm 波長的 HPLC 層析圖。

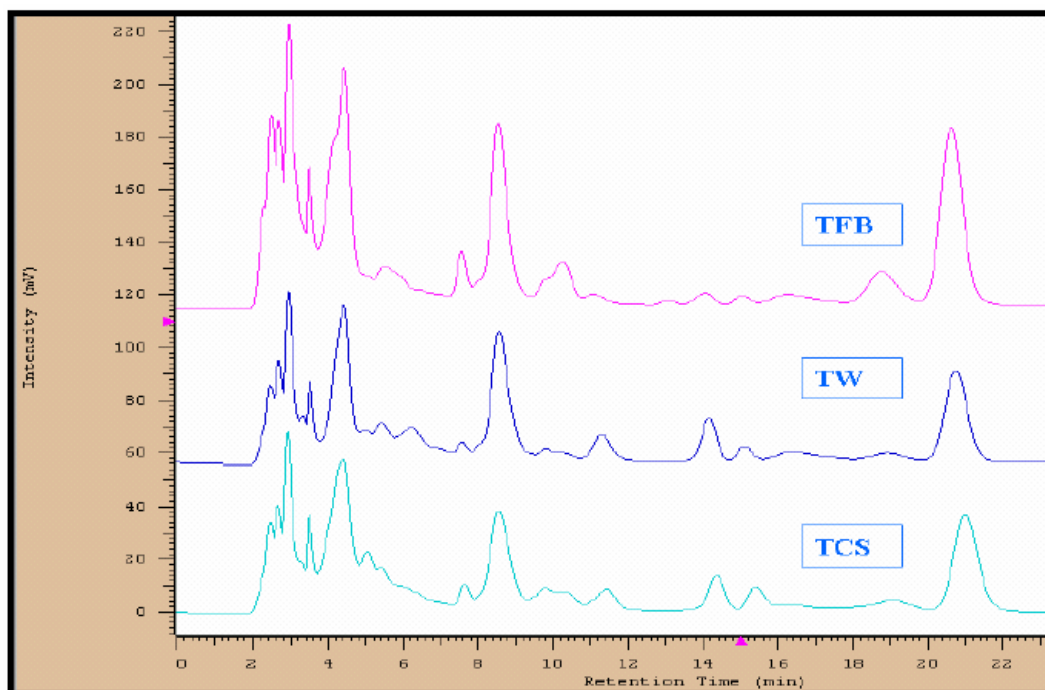


圖 7 西藏冬蟲夏草樣本在 260nm 波長的 HPLC 層析圖。

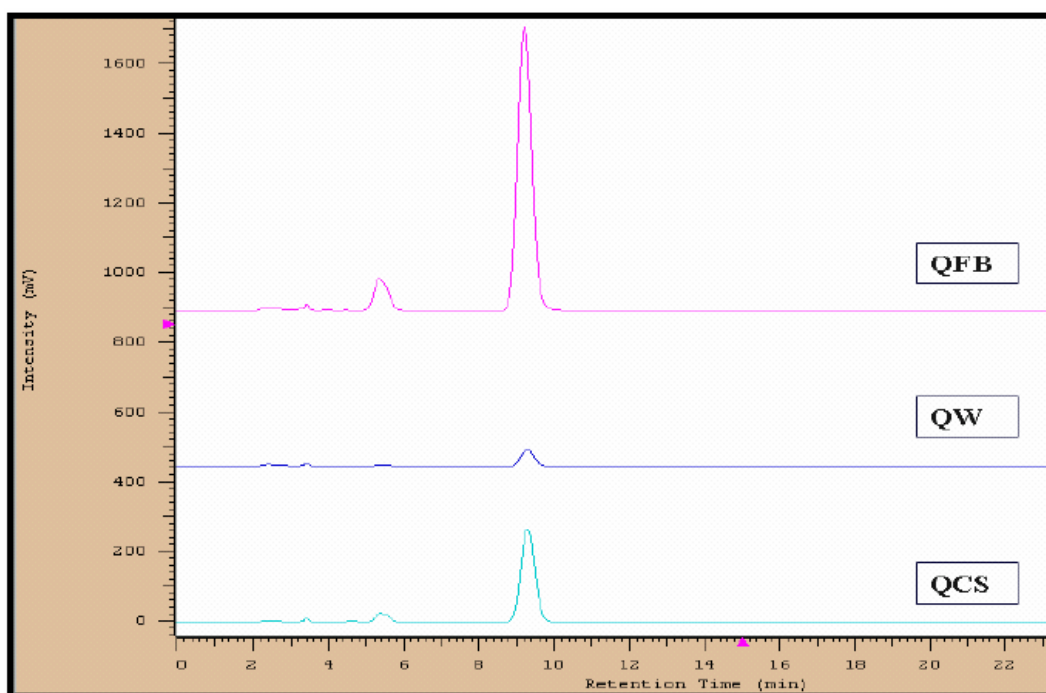


圖 8 青海冬蟲夏草樣本在 310nm 波長的 HPLC 層析圖。

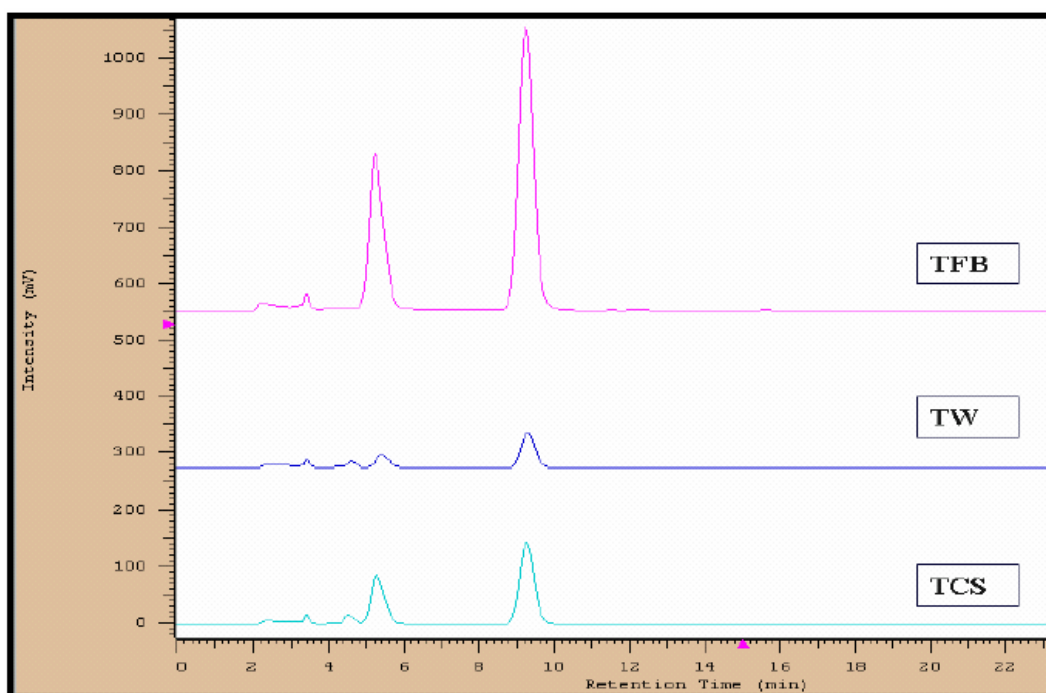


圖 9 西藏冬蟲夏草樣本在 310nm 波長的 HPLC 層析圖。

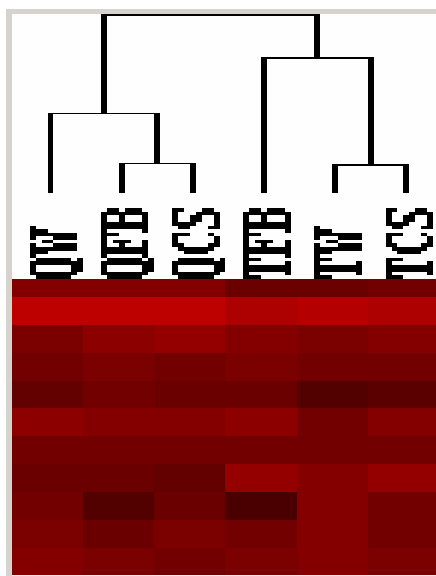


圖 10 以階層式叢集法 (Hierarchical clustering) 分析各種冬蟲夏草萃取液的有機化學圖譜。

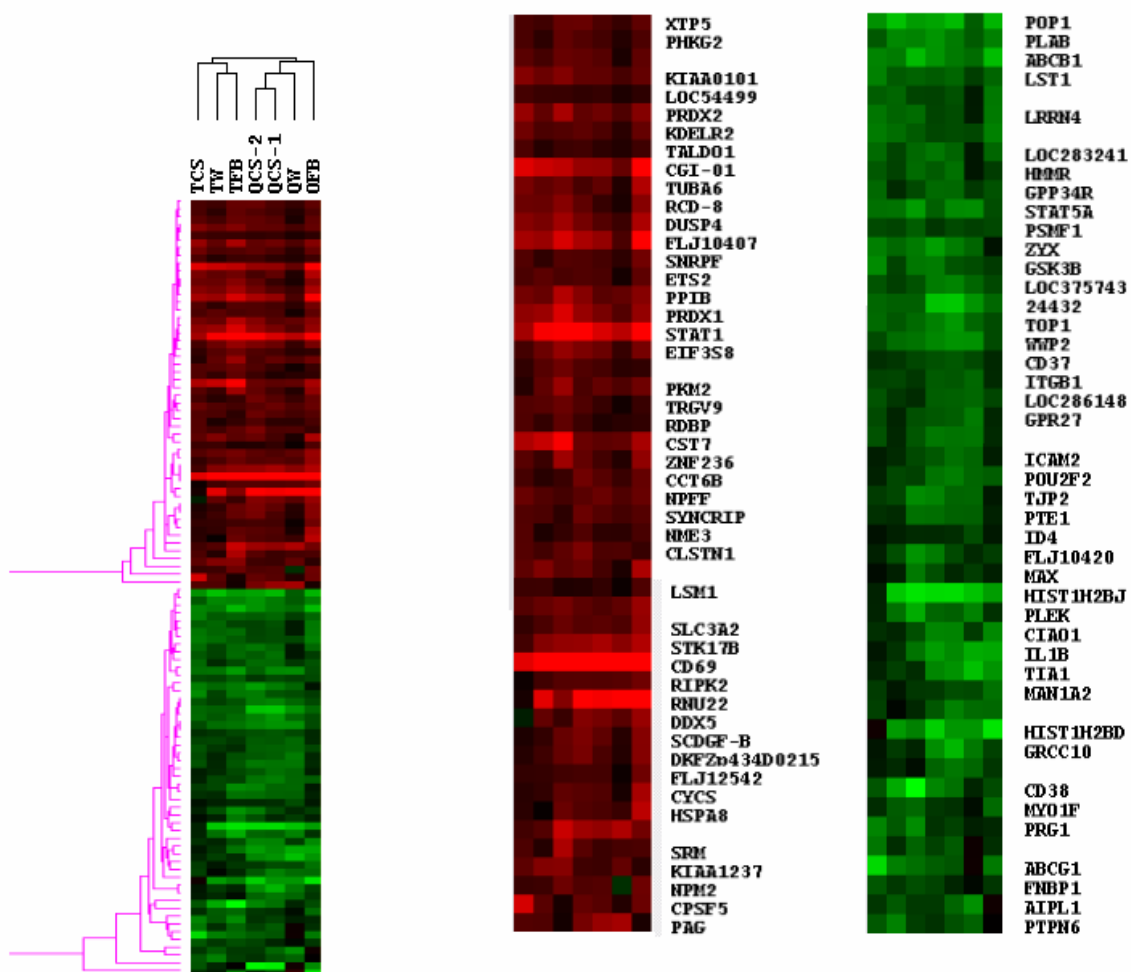


圖 11 100 個冬蟲夏草標記基因的微陣列圖譜之叢集分析圖。

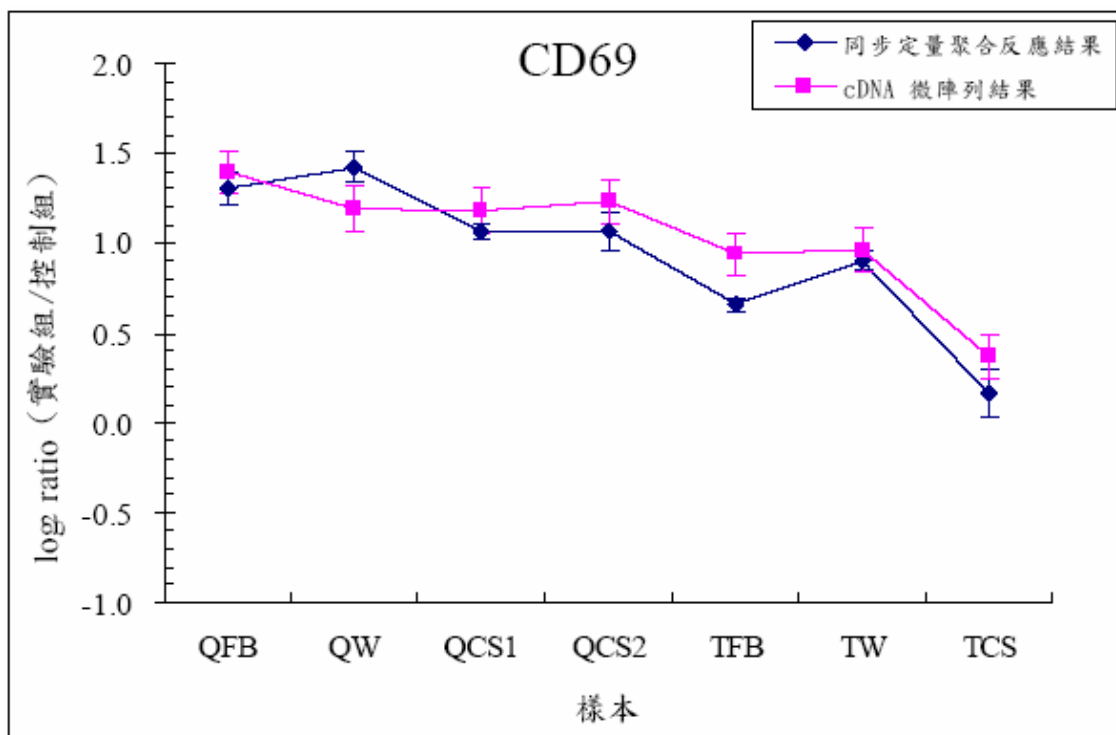


圖 12 CD69 基因的同步定量聚合反應與 cDNA 微陣列結果比較圖。

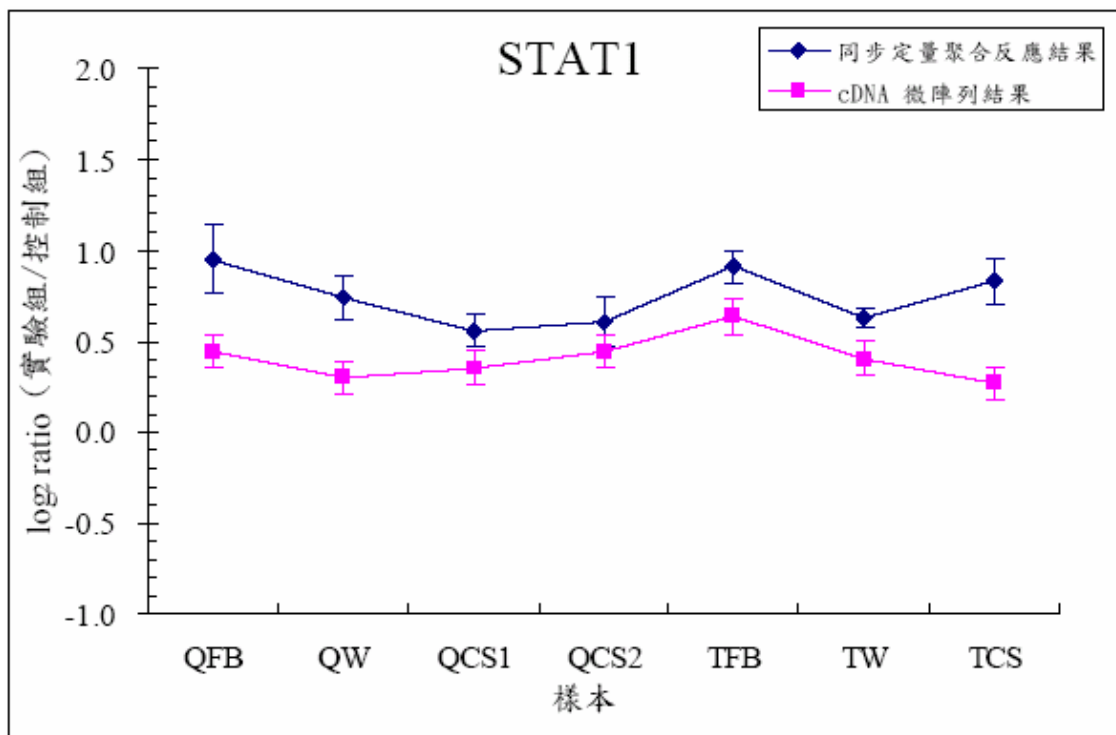


圖 13 STAT1 基因的同步定量聚合反應與 cDNA 微陣列結果比較圖。

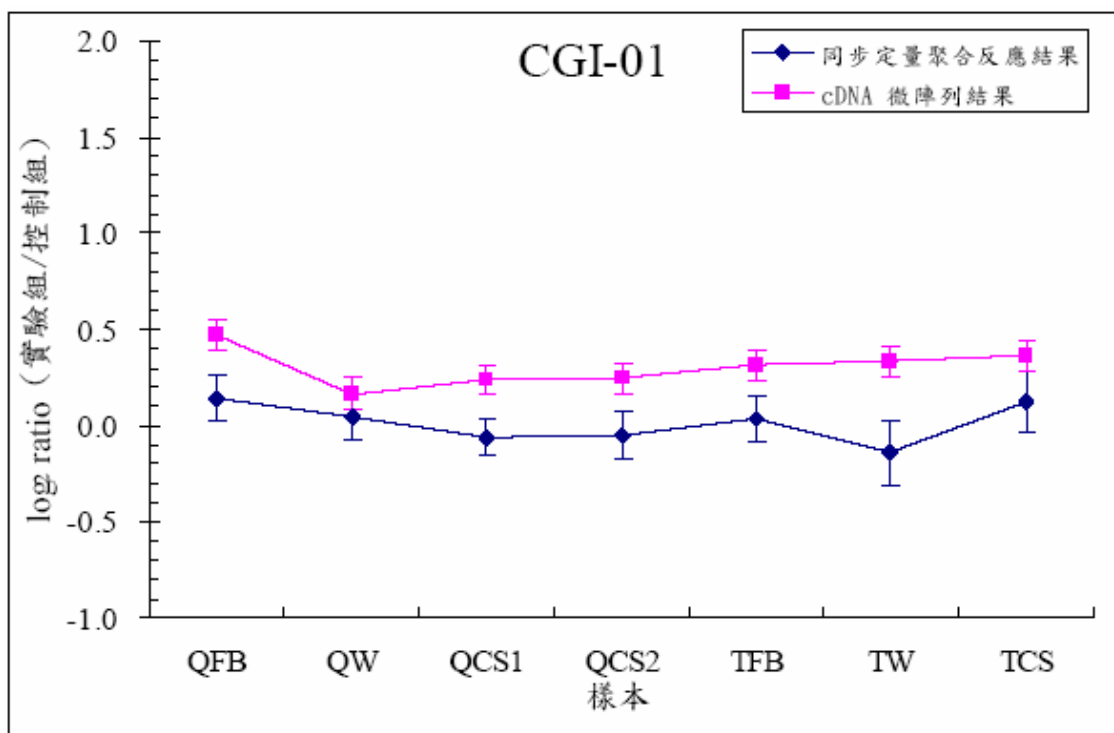


圖 14 CGI-01 基因的同步定量聚合反應與 cDNA 微陣列結果比較圖。

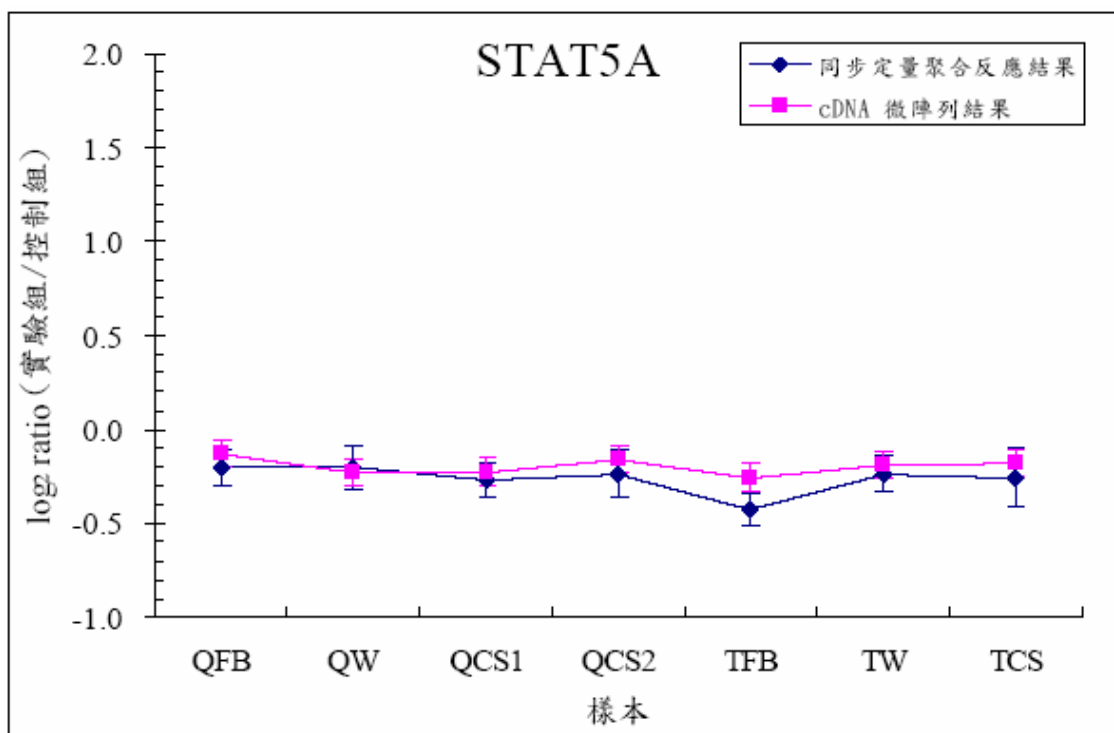


圖 15 STAT-5A 基因的同步定量聚合反應與 cDNA 微陣列結果比較圖。

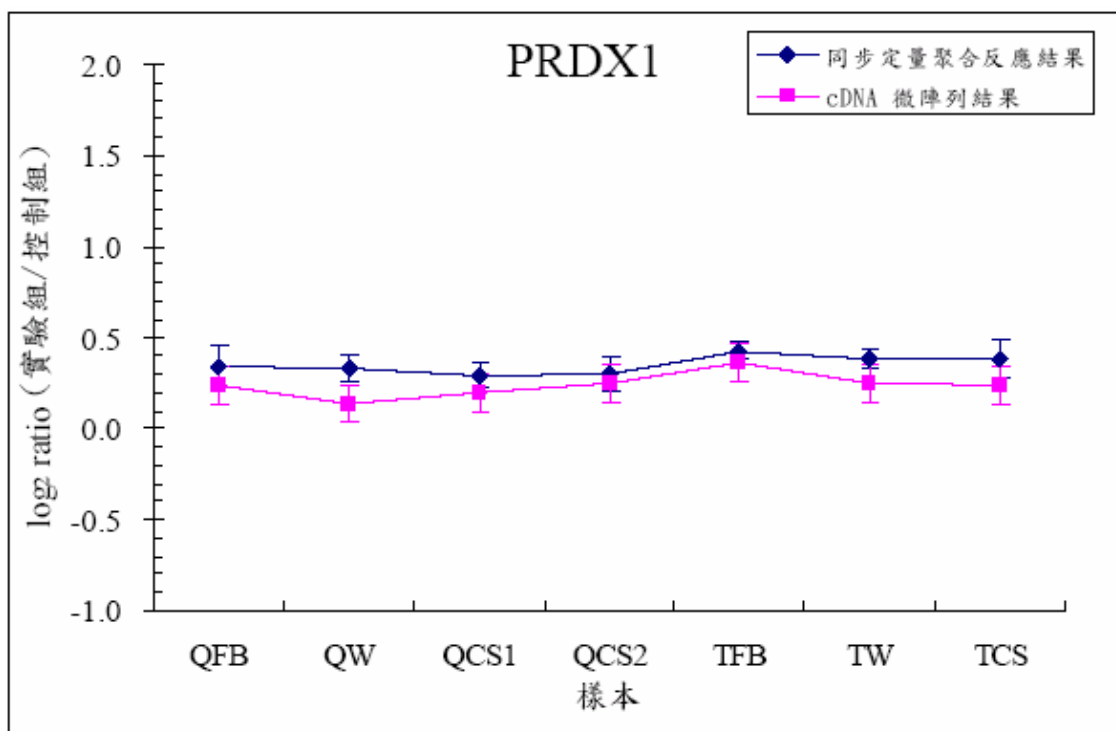


圖 16 PRDX-1 基因的同步定量聚合反應與 cDNA 微陣列結果比較圖。

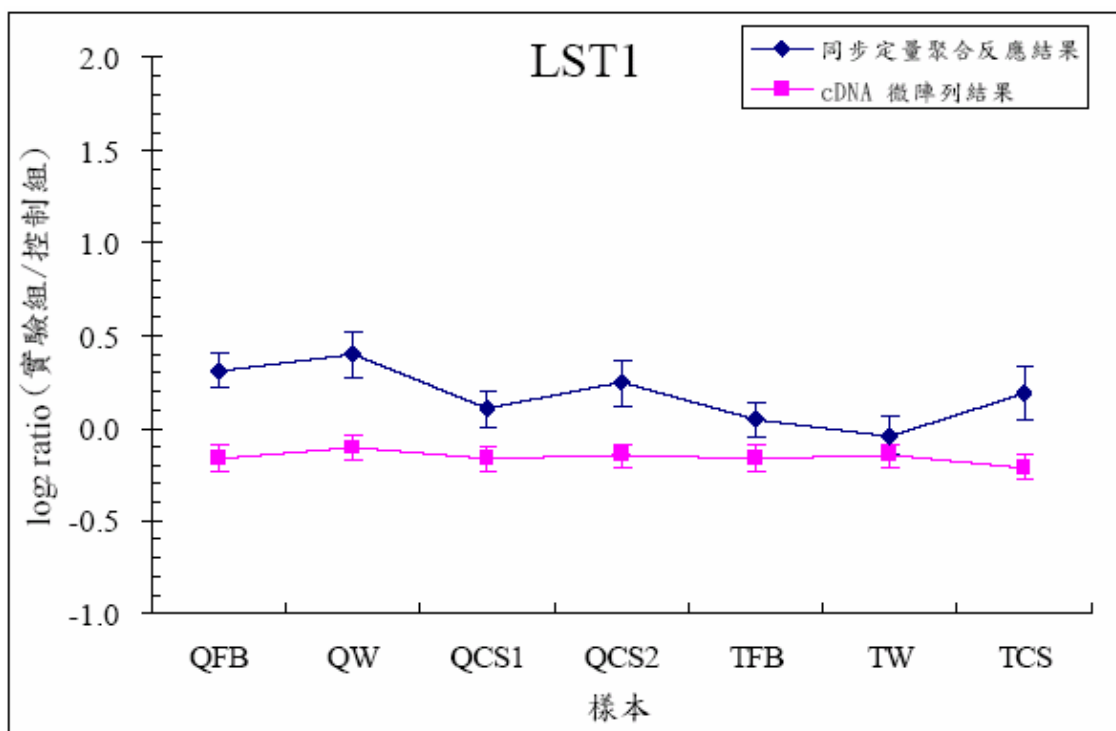


圖 17 LST1 基因的同步定量聚合反應與 cDNA 微陣列結果比較圖。



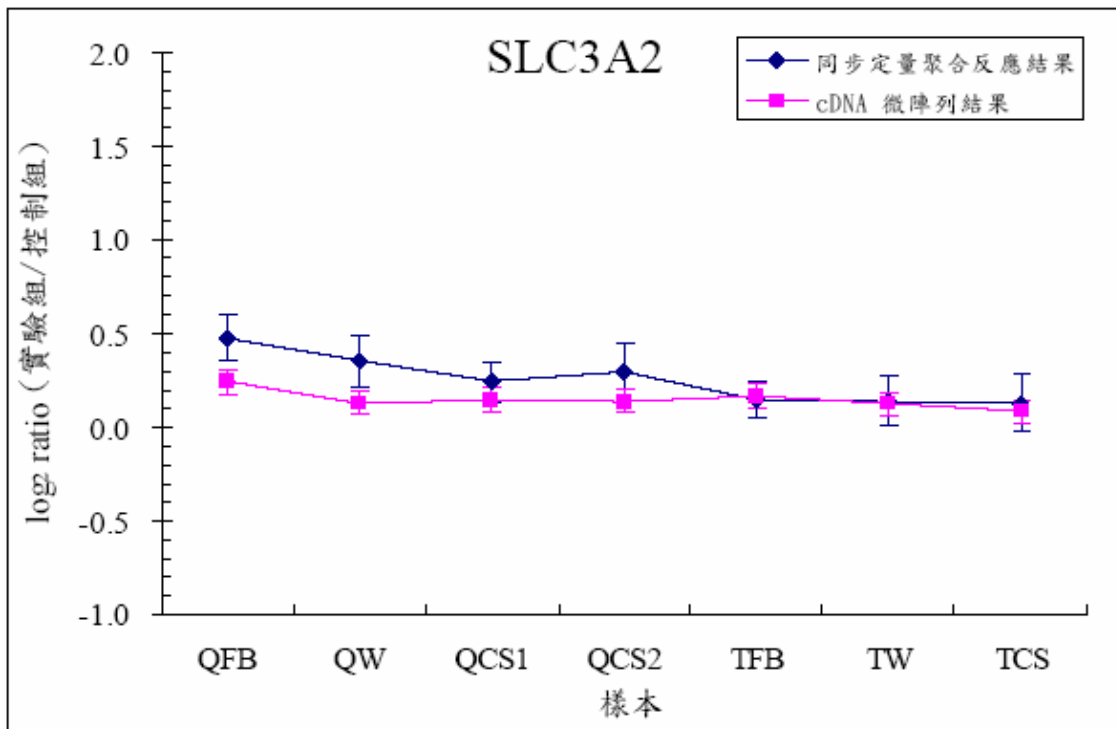


圖 18 SLC3A2 基因的同步定量聚合反應與 cDNA 微陣列結果比較圖。

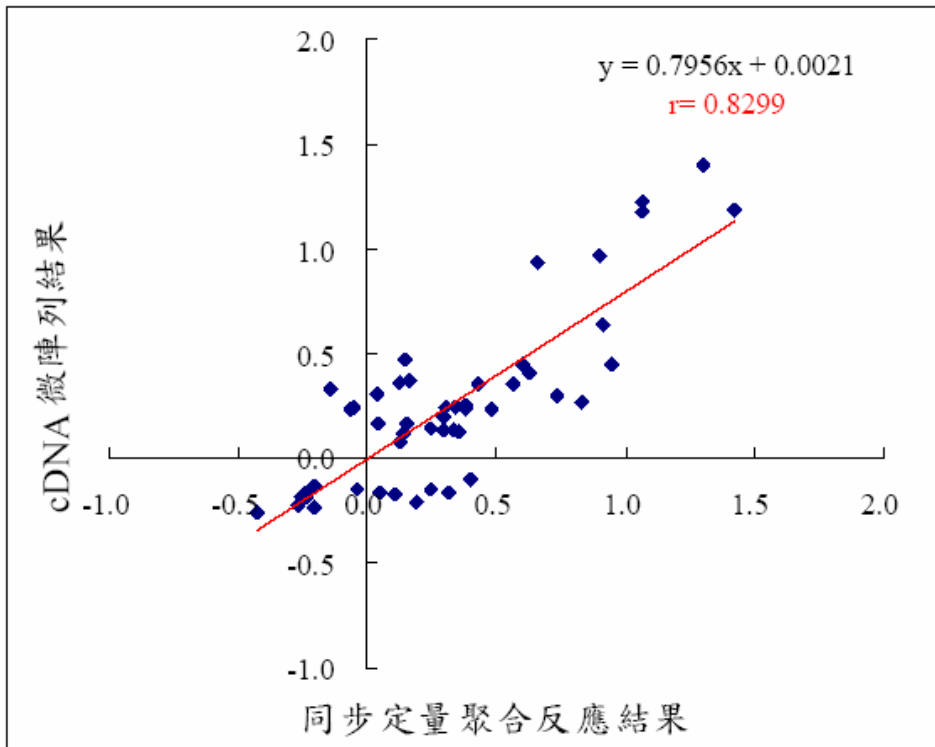


圖 19 七種基因的同步定量聚合反應與 cDNA 微陣列結果之數值相關性分析圖。

