

編號：CCMP93-RD-048

# 過敏性鼻炎患者中醫體質類型與基因及蛋白質表現之相關性研究

徐松鋁

中央研究院 生物醫學科學研究所

## 摘 要

中醫的診斷利用人體在疾病的表現狀況，將人的體質分成寒、熱；虛、實；表、裡等等類別，利用屬性不同之中藥將不平衡的身體調至平衡以治療疾病。數千年來，體質特性與相關疾病間的關係及其治療方法均已詳細的紀錄在中醫的典籍裡，不同中藥的藥性與其對人體的影響也有詳細記載。人類基因序列已公布，許多分子生物的技術與資訊提供很好的方法來分析細胞的整體表現，突破以往以一個基因為主的研究方式。這種以大量基因表現分佈的研究方式與中醫的診斷方式，利用個體的特徵來診斷疾病有相似之處。

本研究延續 92 年的計畫，以 2D-gel 蛋白質分析的技術研究中醫寒性或熱性體質患者的蛋白質表現，以及服用不同屬性寒熱中藥之影響，進而探討蛋白質表現之相關基因。作為尋找體質「寒熱」類型相關之分子依據。研究採用臨床試驗模式，164 名經西醫確診為過敏性鼻炎患者，隨機分為二組分別服用寒或熱性中藥方二個月，在服藥前後分別接受中醫體質分型、西醫臨床及實驗室評估，其中包括血清蛋白質分析。以了解寒熱不同體質患者之基因相關蛋白質表現、寒熱不同中藥方對不同體質患者基因相關蛋白質表現之影響。

研究之結果顯示：性別、時序及藥物對體質表現會產生影響，服用體質調節藥方藥後均可改善過敏性鼻炎患者臨床表現。在病人服用中藥前後的蛋白質比對中，我們發現有二個點的差異與服用寒與熱藥物有正相關，經蛋白質定序後，發現為血紅蛋白  $\alpha$  與  $\beta$ ，部分服用寒藥的病患會增加，服用熱藥

者會減少。另外有許多蛋白質的差異，部分已完成定序，而在體質類型變化、蛋白表現變化、藥物作用時間之關聯仍應再做分析。

關鍵詞：過敏性鼻炎、中醫、體質、臨床試驗、二維電泳膠蛋白質分析

Number:CCMP93-RD-048

# **The Study of the Relationship Between Gene and Protein Expression and the Chinese Medical Constitutional Types in the Patients of Allergic Rhinitis**

Song-Kun Shyue

Institute of Biomedical Science, Academia Sinica

## **ABSTRACT**

In Chinese medicine, the patients' constitutional types are classified according to their manifestation in disease circumstances, and different types of Chinese herbs are used to treat the patients by correcting the unbalanced status of body. In recent years, instead of studying single gene, many molecular biological information and techniques provide many tools to analyze the whole genome expression of the cell. These methods can be used to investigate the protein and mRNA expression in large quantities at the same time and shows a gene or protein expression character of each individual, which is similar to the Chinese medical diagnostic method that they make use of the characteristics of individual for diagnosis.

This grant is a continuation of grant of year 92. In order to find out the related genes for the "cold" and "hot" constitutional types in the future, we started with the 2D-gel protein analytical methods to study the protein expression of the two groups of patients, which belongs the "hot" and "cold" constitutional types respectively. And we also study the effects of the "cold" and "hot" types of Chinese herbs in this study. We performed the clinical trial and 164 patients were included in our study after being diagnosed as "Allergic rhinitis" by professional ENT doctor. The patients were grouped randomly into 2 groups, and each took the

“cold” or “hot” Chinese medical remedy for 2 months respectively. The patients were examined for Chinese medical constitutional typing and western medical clinical and laboratory evaluation before and after taking the remedies.

The results indicated the constitutions were affected by the gender, seasons and types of medicine. The patients' signs and symptoms were improved after taking the Chinese medical remedies. The expression of the protein before and after taking the remedies was positively correlated with the effects of the “hot” and “cold” remedy in 2 proteins which were identified to be hemoglobin  $\alpha$  and  $\beta$ . Many protein expression differences were detected and their protein sequences were identified. The correlation among the changes of the constitutional types, protein expression and the effects of the remedy intervention period still need further analysis.

Keywords: Allergic rhinitis, Chinese Medicine, Constitution, 2D-gel protein analytical, Clinical trial

## 壹、前言

中醫臨床上觀察人體的特質與疾病狀況，將人的體質分成寒、熱；虛、實；表、裡等等類別，再利用中藥將不平衡的身體調至平衡以治療疾病。數千年來，體質特性與相關疾病間的關係及其治療方法均已詳細的紀錄在中醫的典籍裡，不同中藥的藥性與其對人體的影響也有詳細記載。近幾年，人類基因序列已公布，許多分子生物的技術與資訊提供很好的方法來分析細胞的整體表現，突破以往以一個基因為主的研究方式。這種以大量基因表現分佈的研究方式與中醫的診斷方式，利用個體的症狀來診斷病因有相似之處。若能將中醫的理論結合基因體技術，將可以利用中醫數千年的研究結晶來做各種疾病的研究，同時結合中西醫的觀點來研究複雜的基因與蛋白表現與疾病症狀的關係。

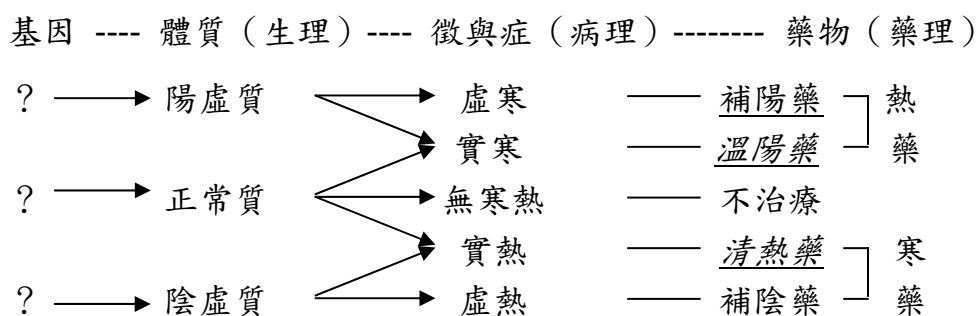
國內外有關基因及蛋白質體相關技術應用於中醫藥的研究，絕大部分均集中在研究藥物對特定基因調控的關係，以找出特殊治療功能的藥材，並分離其有效物質。研究特殊藥物（如人參、金線蓮）與基因表現的有少數實驗室在進行（如中研院生物農業研究所），但研究中醫辨證論治方法或體質類型與基因表現關係之研究尚在嘗試階段，也尚未見相關論文發表。而為了配合國內中醫現代化與中草藥生物科技產業之政策發展，也為了能找出掌握與運用數千年中醫藥臨床經驗之成果，以中醫證型或體質為主題之研究是重要的基礎工作。

### 一、中醫對疾病與治療之認識

在先前的研究中，我們曾探討了中醫特色的體質學說，並認為在疾病診治上，中西醫最大之不同，在於中醫重視個體之差異性，即所謂「體質」之差異，在同一種疾病中可分析出不同診斷類型，使用不同治療藥物，由於這種個體差異性，發展出中醫獨特之「辨證論治」學說。因此在探討疾病病機上，我們認為它應包括三個要件：一為刺激因素，即誘發疾病發病的原因；二為反應條件，即在刺激因素作用下，身體的反應能力及狀況；三為時間因素，為前兩個因素之相互作用時間，也就是病程，隨著疾病之發展，它包含了潛伏期、前驅期、疾病期、和恢復期四個階段。由於臨床之目的，在於解決病患完整的問題，因此「病」與「人」自然是醫療上所必須兼顧的。從文獻回顧上，不難發覺現代醫學對於疾病之研究成果是相當可觀的，而傳統中醫卻突出於病人的體質照顧上，從系統性紅斑狼瘡患者與正常人群的

體質研究中，我們印證了體質在疾病中扮演的重要角色。

中醫體質理論中最基本之分型為陰陽（或俗稱之寒熱類型），陰陽分為廣義（屬性分類）與狹義（生物物理的涵義指人體之質、能）兩種，臨床醫學上體質分類傾向以狹義來定義，以作為人體在各種刺激因素作用下，生理及病理反應之質能基礎。同樣的，寒熱指人體在各種物理、化學、生物等因素（如氣候、飲食、微生物）作用下，所表現之體質反應特性。其關係表示如下：



補陽藥與補陰藥是強化體質實質的藥，清熱藥與溫陽藥是調節體質功能表現的藥，因此與基因表現最直接相關的是陰陽之體質類型，而體質類型統括以寒或熱屬性為外在表現型，藥物反映之結果也以寒熱為表現型，因此作為銜接基因及蛋白體研究與中西醫臨床表現之基礎研究應以陰陽（寒熱）為標的。

## 二、中醫體質概念與基因及蛋白質研究之結合

近幾年人類基因的解碼發現人與人之間有非常多的 DNA 序列不同<sup>1</sup>，（即單一核苷酸鹼基差異，Single Nucleotide polymorphism, SNP），這些不同被認為與人的各種表現，包括膚色、體型、體質、長相、健康狀態、個性等等有相關。中醫疾病或生理表現中體質的不同也可能與 SNP 有相關，要研究相關的 SNP 必須知道與各個症狀有關連的基因，再從基因的 DNA 序列去尋找是否有任何 SNP 與症狀或體質有關。沒有相關基因為起點，則無法從為數  $2.7 \times 10^9$  的基因序列中去尋找。相關基因可以利用家族基因遺傳(linkage analysis)的研究來找出可能的基因位置，但每一個症狀都可能與數個基因有關，且分析會因家族遺傳的顯著性（有顯著症狀的家族不好找）與中醫體質認定的不穩定性（體質的表現不一定是顯性或隱性模式可以解釋），而有潛在的問題。

因此由研究基因表現的不同與體質類性之關聯性可能是一個比較有效且快速的方法。

目前科學家已經在模擬不同器官及組織下，基因如何來產生蛋白質與其交互作用，並使用新的技術來同時研究許多基因或蛋白質，比如說把許多基因物質點在基因晶片(gene chips)上，來同時研究這些基因的運作模式，以了解癌症，過敏性疾病，自體免疫等免疫系統疾病的變化<sup>2-5</sup>，科學家也建立了 SNP(single-nucleotide polymorphisms)資料庫<sup>6</sup>，這些多態性分析可作為一種基因遺傳頻率的指標，而 SNP 因人而異，故可用來追蹤一些致病的基因如何在家族或族群之間流傳的過程，及為何某些特定人群對於某特定疾病有易感性。然而在生物體裡，真正進行生理功能的是蛋白質，而不是 DNA。已有許多具潛力的技術可同時研究數量龐大的蛋白質，包括類似於研究 DNA 的方法，將蛋白質點在晶片上，這些研究結果代表蛋白質質體學時代(proteomics)的來臨，也就是說未來可以鑑定及了解每個蛋白質的特性、結構，及蛋白質間的協同作用模式<sup>7-8</sup>。

這種以大量基因或蛋白質表現分佈的研究方式來觀察生物體的整體反應性，與中醫的診斷方式中，利用個體的症狀來診斷病機有相似之處，若能同時結合中西醫的觀點來研究複雜的基因與蛋白表現與疾病症狀的關係，其結果將可以用來建立中西醫之間的橋樑。

### 三、中醫體質及寒熱用藥之研究

在體質類型與臨床表現研究上，本研究群曾分析 250 位在台中榮民總醫院所記錄之系統性紅斑狼瘡患者及 141 位正常對照組之資料，以探討系統性紅斑狼瘡患者之中醫體質特性，及體質類型與西醫臨床特徵之關係<sup>9</sup>。結果顯示在體質特性的探討上，本地一般國人之體質頻率以痰濕質及陰虛質患者最高；系統性紅斑狼瘡患者之體質傾向為陰虛質、瘀滯質和血虛質。我們亦發現：腎病症候群與血虛體質之關係最密切；光敏感和陰虛體質最密切；口瘡與氣虛體質最密切；而胸腹部症狀及神經症狀則與陽虛體質較相關。此外，蝴蝶斑、口乾眼乾、雷諾氏現象及關節炎等症狀，歸於中醫病理性產物造成之痰濕與瘀滯體質，在關係上並與陰虛及血虛質較接近。

而在過敏性鼻炎患者體質研究中，我們也曾對 84 位過敏性鼻炎志願患者進行臨床試驗研究，隨機分組給予寒熱不同藥性中藥方。結果

顯示本地患者以陰虛、氣虛及痰濕型為多，經中藥桂枝湯及知柏地黃丸體質治療一個月後，臨床表現及耳鼻喉科理學檢查在兩組均獲得改善，而體質分型與治療藥物之分析中亦發現桂枝湯對於陽氣虛型及陰血虛型患者均有改善體質及病症之效果，而知柏地黃丸僅對陰血虛型患者體質及病症具改善作用，顯示方藥與辨證類型間具有特殊之關係，值得進一步研究。

我們另外也分析寒與熱藥方對基因表現的關係，利用桂附八味丸與六味地黃丸分別處理 293 細胞，並利用 microarray 來研究其基因表現的不同。實驗結果發現有許多基因表現增加，也有許多基因表現被抑制。其中增加與被抑制的最明顯的有 20 個基因。其中 cytochrome oxidase Vib (COXV1B) 的表現增加最高，COXV1b 在粒腺體裡會促進能量代謝，促進呼吸鏈複合物 V (ATPase) 合成 ATP，增加身體細胞能源，與預期的藥效相同。另外，有一些與訊息傳遞的基因的表現增加，如 AKT 與 MAPKK3，這兩個基因表現的增加可能與熱藥對細胞的功能有相關，它們下游所調控的基因很多，其正確性與對基因調控的目標需要進一步的實驗去證明。許多 EST 的基因被八味丸調控，其中的功能可能與細胞的新陳代謝速度或能量提供有關，需進一步確認與探討。DNA 微陣列的比較結果，桂附八味丸與六味地黃丸對基因表現的差異並不是很大，考慮其原因可能是因為桂附八味丸中含有六味地黃丸之全部組成，也包含有寒藥與熱藥，由於寒藥與熱藥可能相反的調節，使附子與肉桂的影響會相對的減少。

為了有較高的基因表現差別，我們也利用單味藥來處理細胞，並且因為增加與減少的基因相當的多，為了找到真正相關基因，需要比較不同的中藥與濃度的分析結果，才能找到有代表性的基因。為了研究熱藥對基因的影響，我們利用肉桂、附子、乾薑來處理 293 細胞並與沒有處理的細胞做比對。在兩次微陣列的實驗結果中，三個藥物的基因表現情況差異很大，共同調控的基因較少，此基因表現的不同可能是由於不同中藥的「歸經」不同所造成，也可能是因為實驗上的誤差，為了要有較正確的結果，需再進行多次實驗再做比對。

而利用寒藥黃連、黃芩、黃柏來處理細胞，進行二次的微陣列分析，結果顯示黃連與黃柏對細胞的生長有顯著的影響，在 1 mg/ml 的狀態下，黃連會造成細胞的大量死亡，而經黃柏處理過的細胞，生長速度會變慢。此結果可能會與藥物的毒性有關，而不能反映出寒藥的真正藥性，所以需要利用較低的劑量重做。



#### 四、過敏性鼻炎簡介及中醫治療之探討

過敏性鼻炎在台灣的發生率為 15~20%，幾乎每五位民眾中，就有一位患有過敏性鼻炎。過敏性鼻炎的病理機轉基本上與鼻過敏相同（Nasal Hyperreactivity）相同<sup>10-11</sup>，包含了兩個部分，即免疫反應機制及神經反應機制<sup>12</sup>，前者是眾所熟悉經由特殊抗原誘發立即型與遲發型反應；後者則由自主神經系統功能障礙所形成，其反應範圍應綜合了內分泌、循環及其它系統（因此也有學者將之稱為應激反應 Stress Response）<sup>13</sup>，此二機轉應同時存在於多數患者。過敏性鼻炎與其他鼻過敏不同之處，在於它由特殊過敏原所激發，然而鼻過敏形成後則臨床表現均頗為類似。

在本病之臨床診斷上，仍有許多爭議，患者主要以鼻塞、流涕、噴嚏、鼻癢、及眼睛癢等五項鼻過敏症狀來表現<sup>14-16</sup>；血液及鼻液檢驗可能出現嗜伊紅性白血球及 IgE（或 Specific IgE）上升<sup>17</sup>，亦可能不上升；皮膚試驗可測驗對過敏原之反應，但陽性結果亦可能為其他過敏性疾病或潛在過敏性疾病<sup>18</sup>；耳鼻喉科理學檢查較為學者接受，以蒼白浮腫的鼻黏膜，水樣性鼻液以及眼周及結膜症狀為代表<sup>19</sup>，但在複合其他鼻炎或不典型患者亦難做判斷。因此，在本研究中將以病患五項臨床症狀，以及理學檢查表現較為典型之患者為對象。

對於過敏性鼻炎患者之藥物治療<sup>20</sup>，根據發病機轉，目前西醫治療大多採用 Antihistamine、Decongestans、Anticholinergics、Cromolyn Sodium，及 Corticosteroid 等藥物，而免疫療法及外科手術亦為考慮採用之方式，但療效仍未盡理想。

中醫藥對過敏性鼻炎之治療研究中，有許多值得探討之處。大陸學者總結研究結果認為本病為本虛標實，與肺、脾、腎三臟之虛弱相關，認為經辨證治療後均可獲得良好療效<sup>21</sup>，其常見證型包括：

- （一）營衛不和、風寒襲肺型，以桂枝湯加減。
- （二）清陽不升、脾失健運型，以補中益氣湯合玉屏風散加減。
- （三）肺經化熱型，以清肺脫敏湯（黃芩、桑白皮、旱蓮草等）加減。
- （四）腎陽不足型，以金匱腎氣丸加減。
- （五）肝熱型，以截敏烏梅丸（烏梅、柴胡、五味子、蜂蜜等）加減。

在國內學者採用之方劑，亦多為治風寒入肺或表虛補氣之劑，如小青龍湯、玉屏風散、辛夷散等，慢性患者則採用明代張石頑及日本

大塚敬節的論點以溫補腎氣為主；而馬光亞教授則依外寒引動內熱為理論依據，提出養陰平肝為主之治法進行加減<sup>22</sup>。有關近四十年大陸中醫界針對過敏性鼻炎患者進行臨床試驗較具代表性之研究成果<sup>23-29</sup>，彙整如表一以做參考。

表一、中醫方劑治療「過敏性鼻炎」療效比較

研 究 單 位	使 用 藥 物 或 方 劑	病案數	有效率
遼寧中醫研究所	玉屏風散	48 例	93.7%
遼河油田第一職工醫院	黃耆建中湯	30 例	99.9%
河北省工醫學院附屬醫院	寧金沖（桂枝、當歸、防風、荊芥等）	265 例	96%
中國醫科大學附屬第一醫院	黃耆、黨參、丹參、川芎、當歸、木通等（益氣活血）	100 例	95%
河北省內邱縣侯家庄醫院	黃耆、黨參、白朮、女貞子、補骨脂（益氣補腎）	46 例	100%
河北省衡水地區醫院	敏鼻湯（黃連、黃芩、銀花、地黃、赤芍、蒼耳子、辛夷）	100 例	93%
遼寧中醫學院、北鎮縣中醫醫院	蒼耳子散合玉屏風散加減	50 例	96%
上海醫科大學附屬眼耳鼻喉科醫院	耆桂沖劑	61 例	61%
河北省邢台地區衛生學校	辛蒼合劑	47 例	95.7%
河南省南陽地區醫院	感冒清	61 例	90.2%
瀋陽市中心醫院	以黃耆、荊芥為主	25 例	100%

依據中醫八綱辨證之原則：陰陽、寒熱、表裏、虛實似乎兩兩相對立，而不同的治法自然應對應於不同辨證類型患者，且直觀上傳統醫學治療方劑與加減法固然可以靈活變化，而辨證與論治方向似乎屬於嚴謹之對應，因此，從理論分析上或從許多研究樣本分析上，都可見到許多的矛盾結果。這是一個頗值得關切的問題，在研究方法上，它顯示出中醫診治過程中，一些重要的觀察變項，似乎不像我們所熟知的現代醫學研究模式中，變項間的相關性那麼單純或獨立。由於在中醫現代化研究中，仍未有學者觸及此一問題，因此，我們也希望藉由本研究對中醫臨床思路及診治決策做一探索。

## 五、本研究的目的是

本計畫的主要目的為尋找與中醫體質寒與熱有關的蛋白質，未來再從蛋白質或有關蛋白質表現的基因中尋找人群中可能的基因序列差異（即 SNP），並研究所發現的 SNP 與症狀的關連性。人群中 SNP 的資料庫已建立，並已有超過百萬筆的 SNP 被發現，但許多研究顯示，不同種族或族群的 SNP 可能都有所不同 (The International SNP Map Working Group, 2001)，雖然不同族群可能體質類型分佈有所差異，我們仍必須先尋找與體質類型之關聯性。我們認為利用體質類型與基因表現的關係可以研究：一、個體差異，以作為更精確的診斷工具。二、提供中醫辨證論治的分子科學證據。三、可更深入的了解中醫理論，並從中推展出更有效中醫治療方法與藥方。四、拓展分子醫學領域，相關基因與疾病的發生或進展有極大的關連性，可用來研究疾病發生的機制與治療疾病的方法。五、中醫藥物與方劑之藥性或藥效的評估。

就發展策略而言，在國際間中醫藥研究的激烈競爭中，運用基因及蛋白體技術來發展中醫藥研究已於全球開展，特別是海峽對岸擁有較多的中醫藥人才，發掘中醫藥研究題材遠較其他先進國家為優勢，更是中藥材主要原產地；因此在藥材產地條件較劣勢下，針對中醫理論來發展研究基礎工具是首要工作，這也是本研究計畫所思考之方向。而針對診療工具的發展研究及評估系統的妥善建立，對提昇中醫醫療品質與開發更寬廣深入的研究領域也將是重要之突破。

## 貳、材料與方法

### 一、研究方法

本研究包括觀察研究及臨床試驗。前者以問卷及醫師記錄分析過敏性鼻炎患者中醫體質類型，以西醫評估記錄患者臨床表現及實驗室分析資料，觀察過敏性鼻炎患者中醫體質診斷及患者臨床表現之特性及關係。後者採用隨機分組及雙盲試驗，患者採用隨機分組給藥試驗，基本上醫師及患者皆不知其體質類型與服用中藥種類，以檢定中醫診治模式。計畫經中國醫藥大學附設醫院及台中榮民總醫院人體試驗委員會審查通過後始開始執行。

### 二、取樣對象

患者來源為中國醫藥大學附設醫院耳鼻喉科門診，與台中榮民總醫院耳鼻喉科門診病患經該科專科醫師診斷符合本研究收案條件之過敏性鼻炎患者，由中醫師充分說明研究目的及進行方式後，同意參與本研究及簽署同意書之患者始納入本研究計畫。

### 三、執行方法

#### (一) 過敏性鼻炎患者之觀察記錄：

經耳鼻喉科專科醫師（研究過程所有病患之西醫確診及追蹤評估均由同一位醫師執行）確診為本病患者後，並排除接受西醫手術、西藥治療、民俗及其他中藥治療、及其他非過敏性疾病患者後納入本研究觀察對象。全部患者接受中醫體質問卷調查、西醫理學檢查、並抽血 10ml 進行實驗室血清蛋白質分析。

#### (二) 過敏性鼻炎患者之臨床試驗

患者編號依亂數表隨機分為二組，分別給予寒性與熱性中藥方劑，每日三次分別於飯前服用，每位患者連續服藥二個月，最後再做一次追蹤記錄及檢查。

#### (三) 記錄內容

每位患者之問卷記錄包含三部分，分別為基本資料、西醫資料及中醫資料。

- 1.基本資料有姓名、性別、身高、體重、年齡、家族史、過敏性疾病史等。
- 2.西醫資料有五項鼻過敏症狀、病程、耳鼻喉科理學檢查資料等。
- 3.中醫資料有問診、舌診、脈診、望診以及體質診斷類型。

#### (四) 診斷及評估方式

- 1.中醫體質診斷分型：依據系統性紅斑狼瘡患者及正常人之體質調查研究之統計結果修正何裕民等於中國大陸進行體質調查之分型標準。並合併陰虛質、血虛質為陰血虛質（代表熱性體質），合併氣虛質、陽虛質為陽氣虛質（代表寒性體質）。
- 2.過敏性鼻炎患者診斷及評估：研究中對過敏性鼻炎患者採用之診斷標準包括病史、鼻鏡檢查、實驗室指標。

(1) 病史：患者具有流鼻水、打噴嚏、鼻塞、眼鼻癢感等症狀，且病史出現超過三個月以上，以排除上呼吸道之急慢性症狀。

(2) 鼻鏡檢查：鼻腔及下鼻甲黏膜呈蒼白水腫，有水樣性鼻液。

(3) 實驗室檢查：追蹤血清中蛋白質表現。

符合上述條件之患者，並排除罹患其它急慢性疾病，以免影響對過敏性鼻炎之評估，將上述資料設計成表以進行記錄。

- 3.此外過敏性鼻炎患者治療之療效判斷，依大陸中西結合委員會制定之過敏性鼻炎中西醫結合診療療效判斷標準進行評估<sup>18</sup>，其標準如下：

(1) 自覺症狀：鼻癢、噴嚏、鼻塞、流涕、眼癢等五項症狀，依輕重分成四個等級，治療前後根據自我感覺，按以下等級記分：

3 分為嚴重—症狀對生活作息有明顯干擾

2 分為中等—症狀對生活作息有輕度干擾

1 分為輕度—有這個症狀，但自覺對生活作息沒有影響，常不以為意

0 分為無症—沒有這個症狀

(2) 鼻腔檢查：蒼白鼻黏膜、黏膜水腫、水樣性鼻液、結膜炎、眼胞腫、黑眼圈、流眼淚、中耳炎等八項檢查徵象，依輕重分成四個等級（0 分為正常、1 分為輕度、2 分為中度、3 分為重度變化）。治療前後由同一位專科醫師，按等級記分。

將以上自覺症狀及鼻腔檢查共 13 項項目之分數總和，作為療效判斷標準，範圍由 0 至 39 分。

#### (五) 病人血液樣品的收集

將病患之血液樣品進行初步處理，分離血清與白血球後分別儲藏。其中血清蛋白用於基因體分析以研究蛋白含量的差異。

#### (六) 處方組成與製備

##### 1. 桂枝湯：

(1) 出自於漢代張仲景《傷寒雜病論》<sup>30</sup>，其組方比例為（桂枝：白芍：生薑：大棗：甘草 = 3：3：3：2：2）。

(2) 藥物基源如下：

桂枝：樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia Presl.* 的嫩枝。

白芍：毛茛科多年生草本植物芍藥 *Paeonia lactiflora Pall.* 的乾燥根。

生薑：薑科多年生草本植物薑 *Zingiber officinale Rosc.* 的根莖。

大棗：鼠李科落葉灌木 *Ziziphus jujuba Mill.* 的成熟果實。

甘草：豆科多年生草本植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis Fisch.* 的乾燥根及根莖。

##### 2. 知柏地黃湯：

(1) 出自《刪補名醫方論》<sup>31</sup>。其組方比例為(知母：黃柏：山茱萸：山藥：茯苓：澤瀉：地黃：丹皮 = 2：2：4：4：3：3：8：3)。

(2) 藥物基源如下：

知母：百合科多年生草本植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge. 的根莖。

黃柏：芸香科落葉喬木黃柏 *Phellodendron amurense* Rupr. 除去栓皮的樹皮。

山茱萸：山茱萸科落葉小喬木植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc 除去果核的果肉。

山藥：薯蕷科多年生蔓生草本植物薯蕷 *Dioscorea opposita* Thunb. 的乾燥根莖。

茯苓：多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* Wolf 的菌核。

澤瀉：澤瀉科多年生沼澤植物澤瀉 *Alisma orientalis* Juzep. 的塊莖。

地黃：玄參科多年生草本植物地黃 *Rehmannia glutinosa* Liboch. 的根經加工蒸曬而成。

丹皮：毛茛科多年落葉小灌木牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的根皮。

### 3. 基源鑑定及製備

委由順天科學中藥廠附屬台灣必安研究所執行，並依科學中藥製劑流程，將同一方劑所有藥材一次煎煮、濃縮，真空噴霧造粒後，加以鋁箔包裝，每包裝含 3 克濃縮粉粒，包裝後分別標為 A 與 B(前者為知柏地黃湯，後者為桂枝湯)。

## 四、研究樣本血清之二維電泳膠分析

二維電泳膠系統(2D gel)分離蛋白質的原理是利用蛋白質極性與分子量大小的不同來將蛋白質做二維的分離，此系統已發展多年，實驗步驟依中研院生化所基因體核心實驗室的方法進行。我們取不同體質研究樣本的血清，將其中的血清白蛋白分離出來，與血清白蛋白無關的蛋白質則再除去其中的免疫球蛋白，之後用 TCA/acetone 沈澱法來

去除其中的鹽類、脂類、核酸等其他雜質。125 ul 的血清萃取物中約含 150 ug 的蛋白，混合以 230 ul 的 IEF 溶液，經離心後取 350 ul 置放於 IPGphor (Amersham Pharmacia) 的 IPG stript 上，經由已設定好的電壓與時間週期分離。將已分離好的 IPG stript 置放於 13% 的 SDS-PAGE 膠上(18.5 x 18.5 cm x 1.5 mm, PROTEAN II Multi-Cell XL 系統)，經過兩次不同溶液浸泡後，在 10 °C 或室溫下，用 10mA/gel 跑 16 個小時。所得到的膠片經固定、染色 (silver stain)、除色、清洗後，用高解析度的掃描器建立蛋白質分佈的電子檔。

不同藥物處理病人的蛋白質分佈經比對後，需要分析的蛋白質將可以利用自動取膠機器 (Spot Cutter, Bio-Rad, or Ettan Spot Pick, Amersham Pharmacia) 來將特定蛋白挖取出，或利用塑膠滴管的尖端將所要的蛋白質切取出。切出來的膠含需要分析的蛋白，經過清洗、乾燥、蛋白酵素切成較小片段，再用萃取與純化。所得到的濃縮蛋白質可以點在 MALTI-TOF 的盤子上，再作定性分析。若蛋白質不純，無法用 MALTI-TOF 來定序，將利用 LC/MS/MS 的技術來分析定序。由 MALTI-TOF 或 LC/MS/MS 的分析結果，可以知道該蛋白的可能序列，再與基因蛋白質資料庫做比對，即可知道選定的蛋白序列。所確認的蛋白將利用西方點墨法 (Western Blot) 來做確認，將從可以買到抗體的蛋白開始，以確認實驗的準確度。

## 五、分析方法

- (一) 將患者資料輸入電腦資料庫，使用 SPSS 統計軟體執行分析。
- (二) 以卡方檢定法檢定患者臨床症狀、體質類型、與耳鼻喉科理學檢查結果之關係。
- (三) 寒與熱藥對細胞蛋白質表現差異的分析：

由二維電泳膠系統所分析蛋白質表現結果，可以用來比較寒與熱藥對蛋白質表達的影響、比較不同體質類型的蛋白之同異，以及熱藥與寒藥對不同體質類型蛋白質表達的影響，再經由統計歸納的原理篩選出各藥性的共同調節基因。



## 參、結果

### 一、收案情形

患者來源為中國醫藥大學附屬醫院耳鼻喉科門診患者，完成收案 61 例，在去年執行收案之初，因遭逢 SARS 風波，而延宕收案進度，後又因為中藥含馬兜鈴酸事件導致民眾服用中藥的意願降低，所以收案數未能達到理想目標。自九十二年七月至九十三年四月為止，經執行研究醫師說明後，簽署參與臨床試驗同意書加入之研究個案 61 例，其中完整服用兩個月中藥寒熱方劑者共 36 例，不合作者 4 例，退出者 21 例，退出研究之原因包括參與其他研究接受其他免疫治療、對中藥毒性之顧慮、因工作或搬遷未能按時追蹤複診與抽血。

因應審查委員的意見本案需有不同臨床中心的樣品做比對，本年度再加入由台中榮民總醫院耳鼻喉科門診病患，希望能由多數病人的資料加入，可以增加分析結果的可信度。台中榮民總醫院耳鼻喉科門診患者，2004 年 4 月至 2005 年三月共完成收案 103 例，完成個案 52 例，總共目前完成 88 例，追蹤收案仍進行中。

### 二、過敏性鼻炎患者之基本資料

#### (一) 中國醫藥大學附屬醫院耳鼻喉科門診患者

研究個案之基本資料如表二，其中性別男性 34 例，女性 27 例。平均年齡  $30.4 \pm 15.9$  歲，平均身高  $162 \pm 10.4\text{cm}$ ，平均體重  $56.9 \pm 14.4\text{kg}$ ，平均病程： $154 \pm 121$  月。有過敏性疾病家族史(三等親)者有 50 人，占 81.9%，家族中平均有 1.8 名親屬患有過敏性疾病，包括過敏性鼻炎、氣喘、異位性皮膚炎、蕁麻疹或免疫風濕性疾病。過敏症狀全年發作的患者有 42 人(68.85%)。過敏症狀在春季好發的有 3 人(4.91%)，在秋季好發的有 2 人(3.27%)，在冬季好發的有 11 人(18.03%)，在夏季好發的有 2 人(3.27%)。合併罹患氣喘者有 7 人(13.11%)，異位性皮膚炎者有 10 人(16.39%)，蕁麻疹者有 12 人(19.67%)，其他過敏性疾病有一人(1.63%)。

表二、過敏性鼻炎患者臨床基本資料—1

(中國醫藥大學附屬醫院耳鼻喉科門診患者)

全部61位患者	
Frequency (mean±S.D.)	
年齡	30.4±15.9
身高	162±10.4
體重	56.9±14.4
病程	154±121
男性比	55.73%
家族史	81.9%
症狀全年表現	68.85%
症狀表現季節性	31.14%
氣喘病史	13.11%
異位性皮膚炎病史	16.39%
蕁麻疹病史	19.67%
其它過敏疾病史	1.63%

## (二) 台中榮民總醫院耳鼻喉科門診患者

性別：男性 60 例，女性 43 例。平均年齡  $28.36 \pm 12.85$  歲，平均身高  $165 \pm 8.3$ cm，平均體重  $60.51 \pm 13.03$ kg，平均病程： $93.22 \pm 70.92$  月。有過敏性疾病家族史(三等親)者有 73 人，占 70.8%，家族中平均有 1.16 名親屬患有過敏性疾病，包括過敏性鼻炎、氣喘、異位性皮膚炎、蕁麻疹或免疫風濕性疾病。過敏症狀全年發作的患者有 74 人(71.8%)。過敏症狀在春季好發的有 8 人(7.7%)，在秋季好發的有 6 人(5.82%)，在冬季好發的有 17 人(16.5%)，在夏季好發的有 4 人(3.8%)。合併罹患氣喘者有 10 人(9.7%)，異位性皮膚炎者有 13 人(12.6%)，蕁麻疹者有 11 人(10.67%)，其他過敏性疾病有 0 人(0%)。

表二、過敏性鼻炎患者臨床基本資料—2  
(台中榮民總醫院醫院耳鼻喉科門診患者)

全部103患者	
Frequency (mean±S.D.)	
年齡	28.36±12.85
身高	165±8.3
體重	60.51±13.03
病程	93.22±70.92
男性比	58.25%
家族史	70.8%
症狀全年表現	71.8%
症狀表現季節性	38.2%
氣喘病史	9.7%
異位性皮膚炎病史	12.6%
蕁麻疹病史	10.67%
其它過敏疾病史	0%

### 三、過敏性鼻炎患者之中醫基本體質分型

在 92 年至 93 年 4 月其間，中國醫藥大學附屬醫院耳鼻喉科門診患者收數的 61 位過敏性鼻炎患者，依表三所列之診斷要項分為陰血虛及陽氣虛二類，分別為具有陰血虛體質 21 例(34.42%)，具有陽氣虛體質 16 例(26.22%)，不具陰血虛或陽氣虛者 10 例(16.39%)，同時具陰血虛及陽氣兩虛者 14 例(22.95%)。

在 93 年的計畫中我們利用相同的問卷，選擇 10 項陰虛（熱）體質相關症狀：頭暈、眼花、耳鳴、心悸、失眠、肢麻、五心煩熱、盜汗、口乾咽乾、急躁易怒等；及 10 項陽虛（寒）體質相關症狀：神疲乏力、懶言音弱、氣短、嗜睡、頭暈、自汗、疼痛喜暖、便軟或瀉、

畏寒肢冷、夜尿頻清等。再依出現的頻率給分數，分別為：

1 分：從來沒有出現

2 分：偶而有出現

3 分：時常有出現

4 分：一直都有出現

依病人所回答的分數，熱性體質相關項目積分為 10-20 分者，不具熱性體質，21-40 分者：具熱性體質。寒性體質相關項目積分為 10-20 分者：不具寒性體質，21-40 分者：具寒性體質。

若是用新的分類分析中國的資料，則體質分布為具有陰血虛體質 4 例(6.6%)，具有陽氣虛體質 5 例(8.2%)，不具陰血虛或陽氣虛者 26 例(42.62%)，同時具陰血虛及陽氣兩虛者 26 例(42.62%)，從這裡發現，用新的分類，中國病人和榮總病人分布比較接近(如下分析)，偏於陰陽兩虛或尋常質。

台中榮民總醫院醫院耳鼻喉科門診患者的 103 個病人中，具有陰血虛體質 11 例(10.67%)，具有陽氣虛體質 17 例(16.50%)，不具陰血虛或陽氣虛者 37 例(35.92%)，同時具陰血虛及陽氣兩虛者 38 例(36.89%)。

表三、中醫體質問卷診斷表<sup>9</sup>

體質類型	症 狀	體 徵
尋常質	( )下述症狀不充足	( )體徵不充足
陰虛質	( )五心煩熱 ( )口乾咽乾 ( )急躁易怒 ( )盜汗 ( )失眠 以上至少具備 2 項	( )面紅升火 ( )舌紅少苔 ( )脈細數 以上至少具備 1 項
血虛質	( )頭暈目眩 ( )視糊眼花 ( )耳鳴 ( )心悸 ( )肢體麻木感 ( )失眠 以上至少具備 3 項	( )脈細弱 ( )舌淡 ( )面色萎黃或白 ( )唇甲色淡 以上至少具備 2 項
氣虛質	( )頭昏 ( )短氣 ( )自汗 ( )嗜睡 ( )頭暈目眩 ( )懶言音弱 ( )倦怠乏力 以上至少具備 3 項	( )面色無華 ( )舌淡胖齒痕 ( )脈虛 以上至少具備 2 項
陽虛質	( )畏寒肢冷* ( )喜按喜暖 ( )便軟或瀉 ( )尿頻清長 * 加上其他至少具備 1 項	( )面白無華 ( )脈沉弱或遲 ( )身目浮腫 ( )舌淡胖苔滑 以上至少具備 2 項
痰濕質	( )胸悶 ( )痰多 ( )納呆 ( )倦怠 ( )嗜睡 ( )口黏 ( )頭重身重 以上至少具備 2 項	( )舌苔厚膩 ( )脈濡滑 以上至少具備 1 項
瘀滯質	( )疼痛常作 ( )痞脹作悶 ( )身體容易瘀血烏青 以上至少具備 1 項	( )膚色晦暗或口唇紫暗 ( )肌膚甲錯 ( )脈澀 ( )舌暗瘀點瘀斑 以上至少具備 2 項

說明：症狀及體徵須同時具備規定之項目才符合該體質類型之診斷

#### 四、不同體質患者的臨床症狀表現

##### (一) 中國醫藥大學附屬醫院耳鼻喉科門診患者

以卡方檢定法檢定患者體質類型與性別、家族史、病程、症狀表現時間、氣喘病史、異位性皮膚炎病史、蕁麻疹病史，以及過敏臨床症狀、耳鼻喉科理學檢查結果之關係，如表四。結果顯示陰血虛體質與性別、症狀全年表現、症狀季節表現與西醫鼻腔理學檢查 intranasal finding 相關，氣喘病史與陽虛體質相關，P 值小於 0.05，其餘皆無相關。

表四、體質與臨床症狀表現之關係檢定 1

(中國醫藥大學附屬醫院耳鼻喉科門診患者)

體質類型	陰血虛	陽氣虛
性別	0.011*	0.240
家族史	0.120	0.984
病程	0.205	0.511
症狀全年表現	0.027*	0.301
症狀季節表現	0.030	0.078
氣喘病史	0.341	0.054*
異位性皮膚炎病史	0.560	0.331
蕁麻疹病史	0.768	0.382
鼻塞	0.857	0.163
噴嚏	0.431	0.706
流涕	0.970	0.403
鼻癢	0.813	0.101
眼睛癢	0.843	0.655
Nasal symptoms	0.565	0.369
Intranasal finding	0.024*	0.661

\*  $p < 0.05$

## (二) 台中榮民總醫院耳鼻喉科門診患者

用相同的分析方法，配合新的證型分類，將病人分成熱性體質與不具熱性體質，及寒性體質與不具寒性體質，所得到的資料如表五所列，結果顯示陰血虛（熱）體質與性別、症狀季節表現與過敏性鼻炎症狀嚴重度（除鼻塞外）有顯著相關；陽氣虛（寒）體質與過敏性鼻炎症狀嚴重度（除鼻塞、流涕外）有顯著相關， $p$  值小於 0.05，其餘皆無顯著相關。血液中所含免疫球蛋白的含量與分佈與證型沒有相關。

表五、體質與臨床症狀表現之關係檢定 2  
(台中榮民總醫院醫院耳鼻喉科門診患者)

體質類型	陰血虛	陽氣虛
性別	0.036*	0.841
鼻塞	0.15	0.163
噴嚏	0.001*	0.038*
流涕	0.014*	0.198
鼻癢	0.002*	0.015*
眼睛癢	0.006*	0.024*
總積分	0.000*	0.009*
季節（服藥前）	0.038*	0.080
季節（服藥後）	0.660	0.919

\*  $p < 0.05$

## 五、中藥對體質的影響

### (一) 服藥後體質的改變

完整服用兩個月中藥寒熱方劑者共 87 例。我們將中國醫藥大學的病例（36 例）與榮總（51 例）的分別作統計分析，結果如表六與表七所列：

表六、中國醫藥大學病患服用藥物前後體質類型之變化情形

服用知柏地黃丸前後體質類型之變化情形 (19人)

服藥後體質 (人數) 服藥前體質 (人數)				
	陰血虛質 (2)	陽氣虛質 (0)	陰陽兩虛質 (6)	尋常質 (11)
陰血虛質 (6)	1	0	0	5
陽氣虛質 (1)	1	0	0	0
陰陽兩虛質 (6)	0	0	6	0
尋常質 (6)	0	0	0	6

服用桂枝湯前後體質類型之變化情形 (17人)

服藥後體質 (人數) 服藥前體質 (人數)				
	陰血虛質 (4)	陽氣虛質 (3)	陰陽兩虛質 (6)	尋常質 (4)
陰血虛質 (3)	1	0	2	0
陽氣虛質 (1)	1	0	0	0
陰陽兩虛質 (8)	1	1	4	2
尋常質 (5)	1	2	0	2

兩組藥物合併前後體質類型之變化情形

服藥後體質 (人數) 服藥前體質 (人數)				
	陰血虛質 (6)	陽氣虛質 (3)	陰陽兩虛質 (12)	尋常質 (15)
陰血虛質 (9)	2	0	2	5
陽氣虛質 (2)	2	0	0	0
陰陽兩虛質 (14)	1	1	10	2
尋常質 (11)	1	2	0	8



表七、台中榮民總醫院病患服用藥物前後體質類型之變化情形

## 服用知柏地黃丸前後體質類型之變化情形

服藥後體質 (人數) 服藥前體質 (人數)	陰血虛質 (1)	陽氣虛質 (4)	陰陽兩虛質 (7)	尋常質 (13)
陰血虛質 (1)	0	0	0	1
陽氣虛質 (6)	0	1	2	3
陰陽兩虛質 (11)	1	3	5	2
尋常質 (7)	0	0	0	7

## 服用桂枝湯前後體質類型之變化情形

服藥後體質 (人數) 服藥前體質 (人數)	陰血虛質 (1)	陽氣虛質 (5)	陰陽兩虛質 (5)	尋常質 (15)
陰血虛質 (2)	0	0	0	2
陽氣虛質 (4)	1	3	0	0
陰陽兩虛質 (8)	0	1	5	2
尋常質 (12)	0	1	0	11

## 兩組藥物合併體質類型之變化情形

服藥後體質 (人數) 服藥前體質 (人數)	陰血虛質 (2)	陽氣虛質 (9)	陰陽兩虛質 (12)	尋常質 (28)
陰血虛質 (3)	0	0	0	3
陽氣虛質 (10)	1	4	2	3
陰陽兩虛質 (19)	1	4	10	4
尋常質 (19)	0	1	0	18

## (二) 中藥對過敏性鼻炎症狀表現的影響

由表八至表十可看到體質調節中藥方對過敏性鼻炎臨床表現的影響，可以看到臨床症狀都由嚴重、中度、輕度，轉變至中度、輕度，及無症狀。不論服用知柏地黃丸或桂枝湯之患者臨床症狀之積分均下降 27% 及 29%。

表八、中國醫藥大學病患服用藥物前後臨床症狀表現的影響

知柏地黃丸對鼻炎臨床症狀表現的影響 (n=19)

症狀	鼻塞		噴嚏		流涕		鼻癢		眼睛癢	
服藥	前	後	前	後	前	後	前	後	前	後
積分	58	40	51	37	57	36	52	33	41	32

\*積分＝無症狀個案數×1＋輕度個案數×2＋中等個案數×3＋嚴重個案數×4

桂枝湯對鼻炎臨床症狀表現的影響 (n=17)

症狀	鼻塞		噴嚏		流涕		鼻癢		眼睛癢	
服藥	前	後	前	後	前	後	前	後	前	後
積分	50	31	47	33	49	29	45	27	43	27

\*積分＝無症狀個案數×1＋輕度個案數×2＋中等個案數×3＋嚴重個案數×4

服用體質調節中藥方對鼻炎臨床表現的影響

	知柏地黃丸 (n=19)		桂枝湯 (n=17)	
	服藥前	服藥後	服藥前	服藥後
臨床症狀積分	259	178	234	147
積分下降數	81		87	
積分下降率	31.27%		37.17%	

表九、台中榮民總醫院病患服用藥物前後臨床症狀表現的影響

知柏地黃丸對鼻炎臨床症狀表現的影響 (n=25)

症狀	鼻塞		噴嚏		流涕		鼻癢		眼睛癢	
服藥	前	後	前	後	前	後	前	後	前	後
積分	71	61	72	53	76	59	65	49	59	41

\*積分＝無症狀個案數×1＋輕度個案數×2＋中等個案數×3＋嚴重個案數×4

桂枝湯對鼻炎臨床症狀表現的影響 (n=26)

症狀	鼻塞		噴嚏		流涕		鼻癢		眼睛癢	
服藥	前	後	前	後	前	後	前	後	前	後
積分	88	69	73	58	83	59	65	47	58	47

\*積分＝無症狀個案數×1＋輕度個案數×2＋中等個案數×3＋嚴重個案數×4

服用體質調節中藥方對鼻炎臨床表現的影響

	知柏地黃丸 (n=25)		桂枝湯 (n=26)	
	服藥前	服藥後	服藥前	服藥後
臨床症狀積分	343	264	367	280
積分下降數	79		87	
積分下降率	23%		23%	

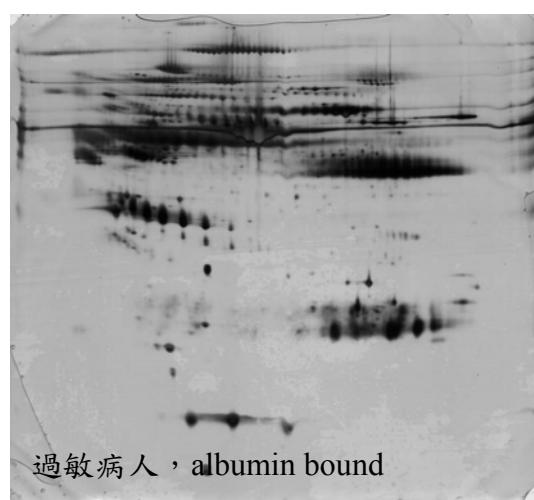
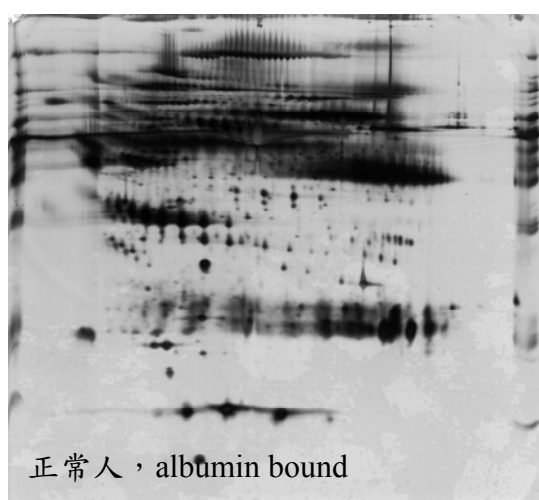
表十、服用體質調節中藥方對鼻炎臨床表現的影響 (所有病患)

	知柏地黃丸 (n=44)		桂枝湯 (n=43)	
	服藥前	服藥後	服藥前	服藥後
臨床症狀積分	602	442	601	427
積分下降數	160		174	
積分下降率	26.6%		29.0%	

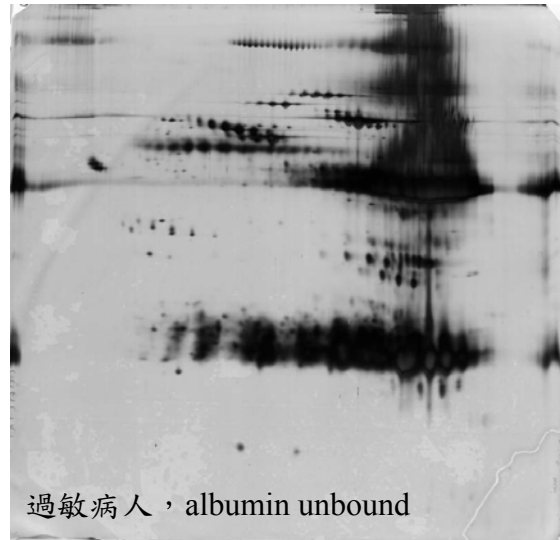
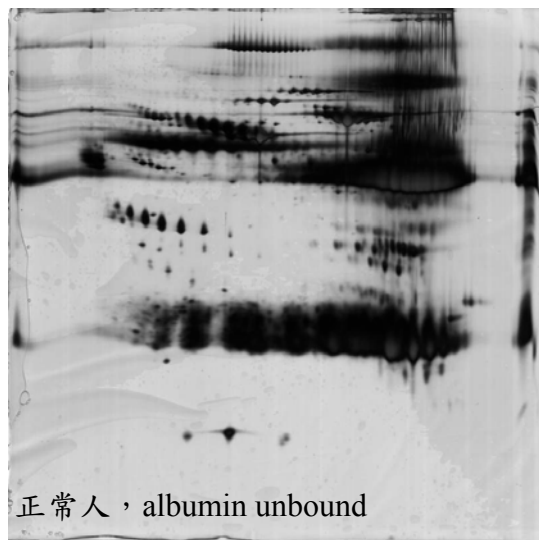
## 六、二維電泳膠蛋白質操作步驟之建立與改進

經過多次的實驗與中研院生化所陳水田老師的協助，我們已經找到較佳的分離血清白蛋白（Albumin）的方式。血清白蛋白佔血清中的大部分蛋白，它的存在會嚴重干擾到其他蛋白質的分析，實驗發現，利用會與酸性蛋白結合的物質可將血清白蛋白有效的抓住，並分離出來，但同時也會與其他酸性蛋白質結合。為了要更清楚的分析蛋白質，所分離出來的血清蛋白部分需要用 2D-gel 來分離，結果顯示，其中含有非常多的非血清白蛋白（圖一）。另外，血清白蛋白分離柱所不能抓住的蛋白中含有大量的免疫球蛋白（圖二），若將其中的免疫球蛋白（Immunoglobulin, Ig）另外分離開來，可以發現免疫球蛋白分離柱所抓住的蛋白質很少，且將免疫球蛋白分離後可以得到較好的解析度（圖三）。因為血清白蛋白分離柱所含的蛋白質最多，並且初步實驗結果分析發現，該蛋白質部分有較多的蛋白質種類，而且有許多點在病患樣品中有不一樣，我們實驗就直接先分析該部分。白蛋白分離柱無法結合的蛋白將在隨後分析。

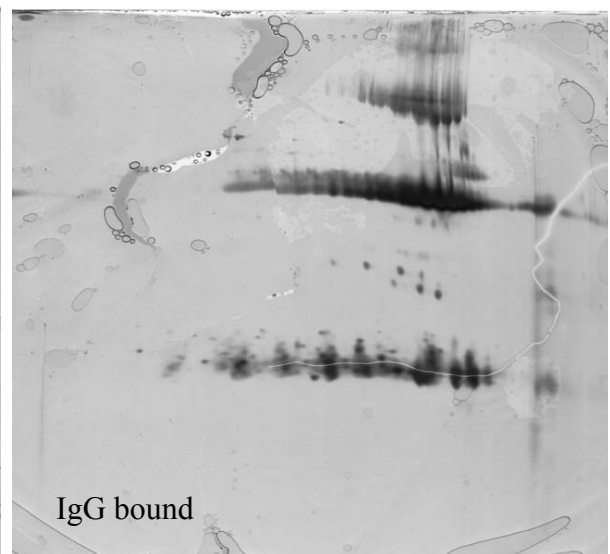
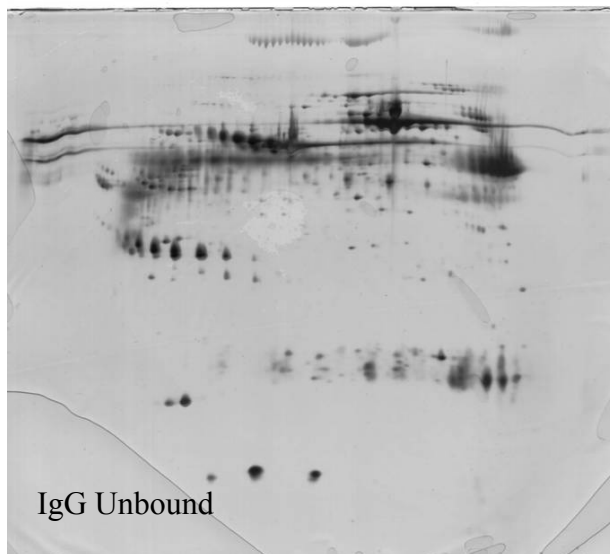
為了得到較佳的解析度，我們試著用 8% 的電泳膠來分離蛋白，初步結果顯示，可以將 25kDa 至 50kDa 的蛋白質分的較清楚（圖四）。考慮到每一個血漿樣品需要多跑一個電泳膠，需要兩倍的經費，基於預算考量，將只針對有體質變化較大，或特殊變化的病人作分析。



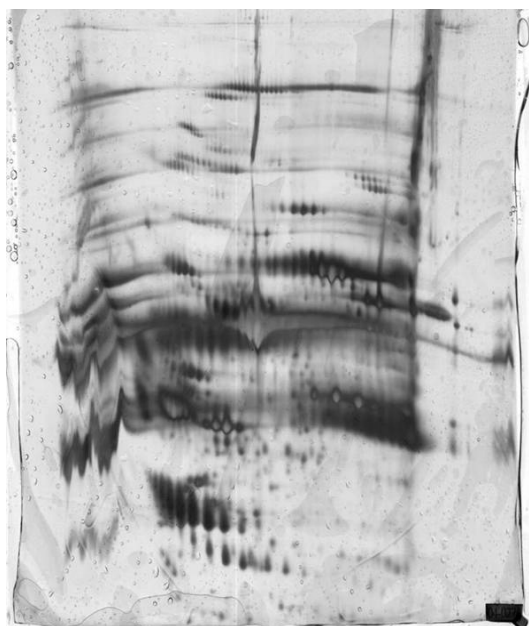
圖一 血清蛋白分離柱結合並分離下來的蛋白質，用 2D-gel 分離開來的結果。蛋白質用銀染劑來呈色。



圖二 無法與血清蛋白分離柱結合的蛋白質，用 2D-gel 分離開來的結果。蛋白質用銀染劑來呈色。



圖三 無法與血清蛋白分離柱結合的蛋白質，用 IgG 柱分離的結果。蛋白質用銀染劑來呈色。



圖四 與血清蛋白分離柱結合的蛋白質，用 8% 電泳膠分離，再用銀染劑來呈色。

## 七、分離小分子蛋白質之技術建立與改進

在做 2D 分析時，SDS-PAGE 的濃度決定分析蛋白質的範圍，一般使用 12% 的膠來分析，但實驗結果發現 20kDa 的蛋白質會跑出膠而無法分析。Dr.陳水田的實驗室建議使用 25kDa 的超過濾膜來過濾出蛋白質，希望將較小的分子分離出以作另外的分析。我們嘗試著用 25kDa 的超過濾膜來過濾出蛋白質，但發現所得到的蛋白質含量很低，且只含有部分的蛋白質，其分子量超過 30kDa，無法如預期將小於 25kDa 的蛋白質分離出來。為了獲得較好的解析度與較多的蛋白質，我們決定用 13% 的 SDS-PAGE 來作分析，在 2D 的膠上面可以多得到 2 到 5 個蛋白質的點。

## 八、過敏病人使用藥物前後的血清中蛋白質的 2D 分析與比對

比較病人服用藥物前後的血清中的蛋白質的 2D 分佈，我們得到以下結果：

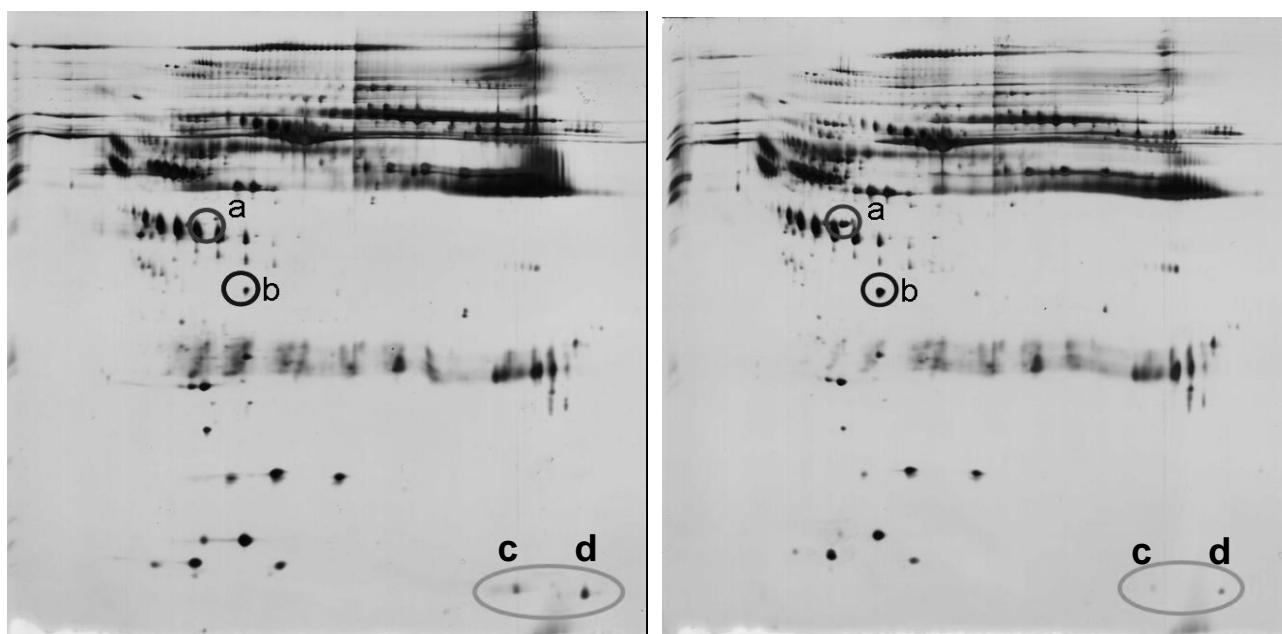
- (一) 我們發現大部分的病人其服藥前後的蛋白質變化不大 (圖五與圖六)，遠小於個體之間的差異。其服藥前後的蛋白質分佈的比對也顯示兩次的 2D 分析的可重複性很高，在不同的 2D 分析上，蛋白質位置的再現性很好。
- (二) 幾乎每一個病人的蛋白質都有不一樣，但在有變化的蛋白質中，有數點的變化較頻繁，其中又有三個點在服用熱藥的病人中有

顯著的共同改變（點 a, c 與 d, 於圖五-1 與五-2），其中 c, d 兩點的蛋白質變化在服用寒藥的病人樣品上發現有逆相關，即服用含藥的病人其蛋白質會增多，正好與服用熱藥的病人相反（圖六）。a 點的變化並沒有 c, d 兩點的一致，有一個服用寒藥的病人其 a 點的蛋白質也增加，且服用寒藥的病人其 a 點蛋白質的含量並沒有減少。大部分的人的點 b 也有變化，但其與體質及服用藥物的關係需較多的資料作比對。病人 c 與 d 的變化情形列於表十；若不考慮沒有變化的病人，可以很顯著的看出服用熱藥的病人，該兩點的變化傾向於減少，反之，服用寒藥者有升高的傾向。但若把沒有變化的病人一起考慮進來則沒有顯著變化。需多一些病人的樣品，才能知道是否有相關。

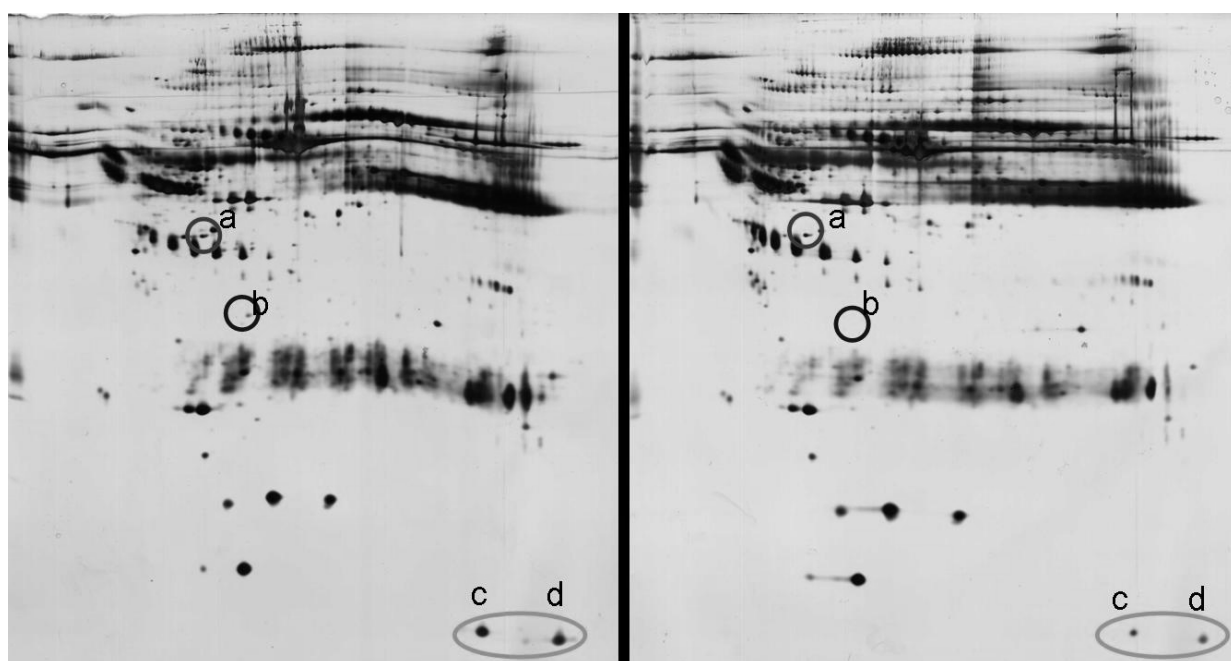
- （三）經 LC/MS/MS 的分析與蛋白質定序，圖六的 c 與 d 兩點為 hemoglobin  $\alpha$  與  $\beta$ 。其他有變化的蛋白質已經有部分竟定序出來，詳見圖七。
- （四）許多的蛋白質量的變化，在各個病人中可以發現，但尚未找到其中的變化顯著的關連性，需較多的結果來做比對在以找尋與服用冷藥與熱藥對體質改變的相關蛋白質，並利用統計方法來分析其相關的機率。

表十一、服用藥物與蛋白質變化的關係

	增加	減少	沒變化
熱藥	2	5	4
寒藥	10	3	7

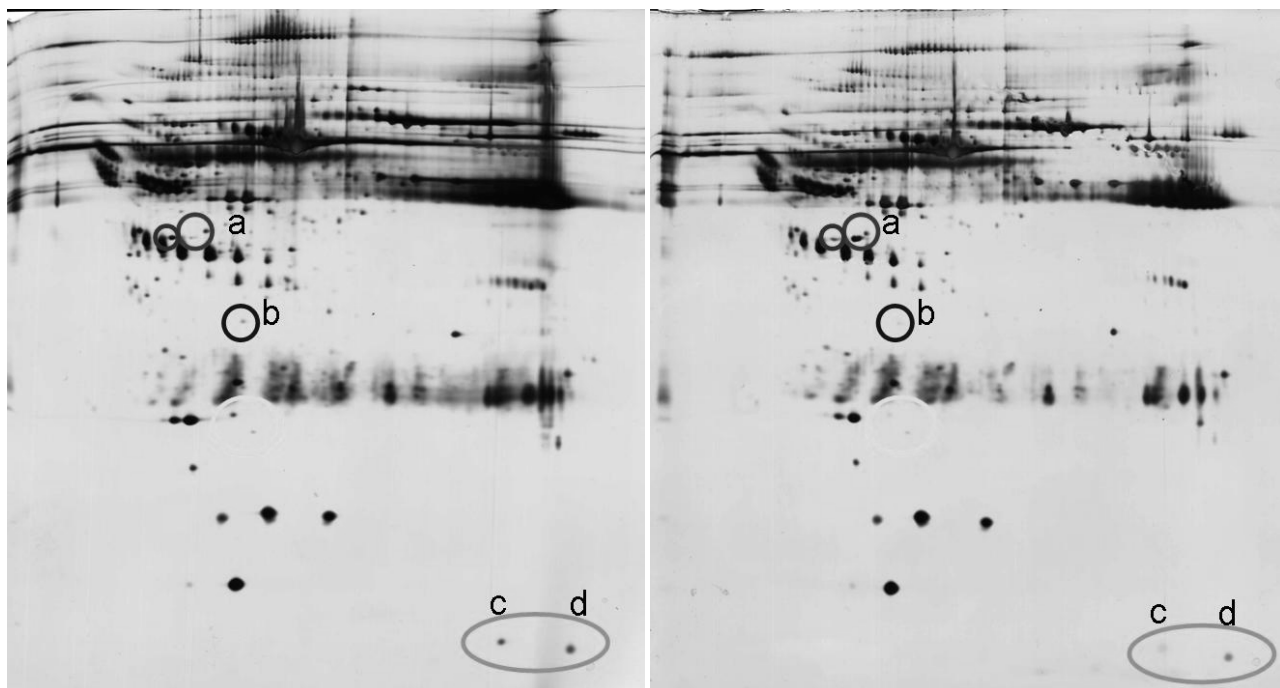


5-1

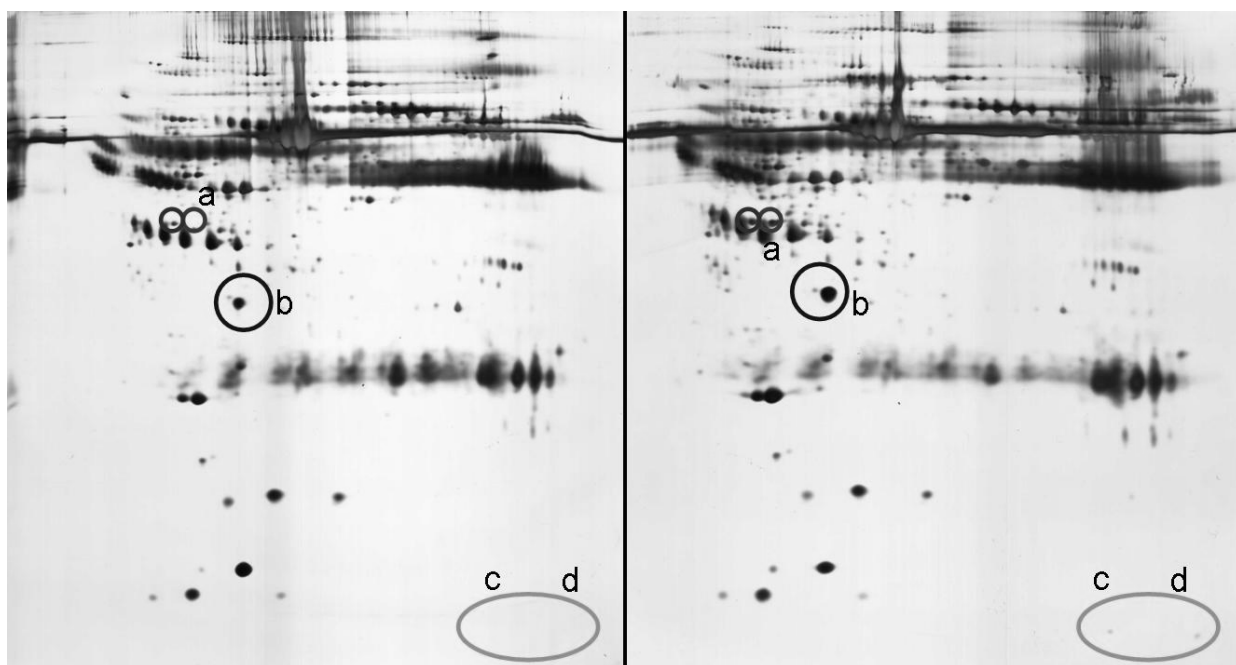


5-2

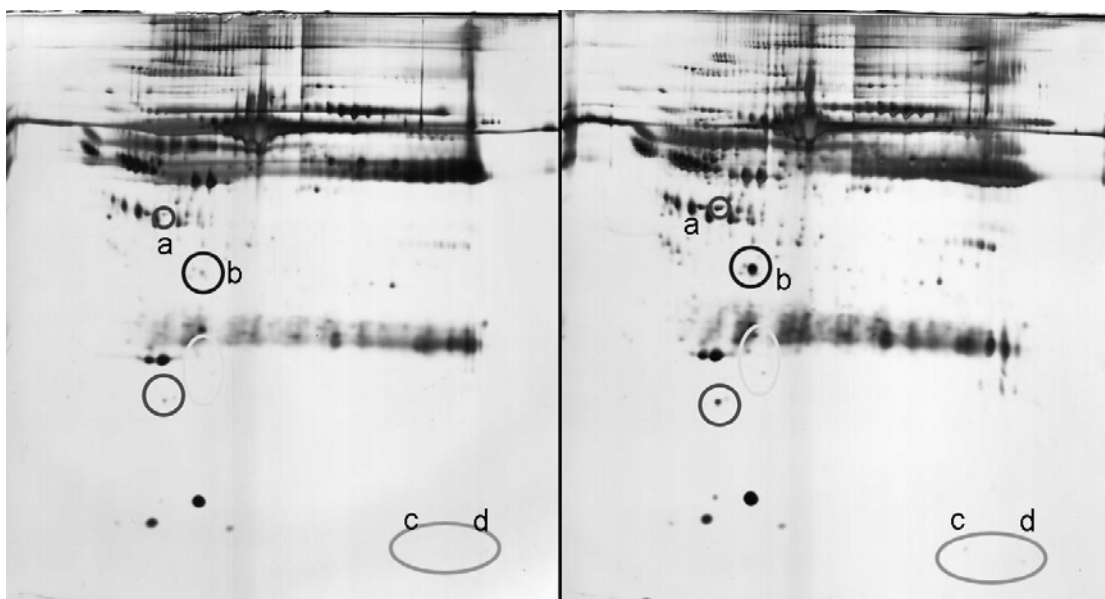




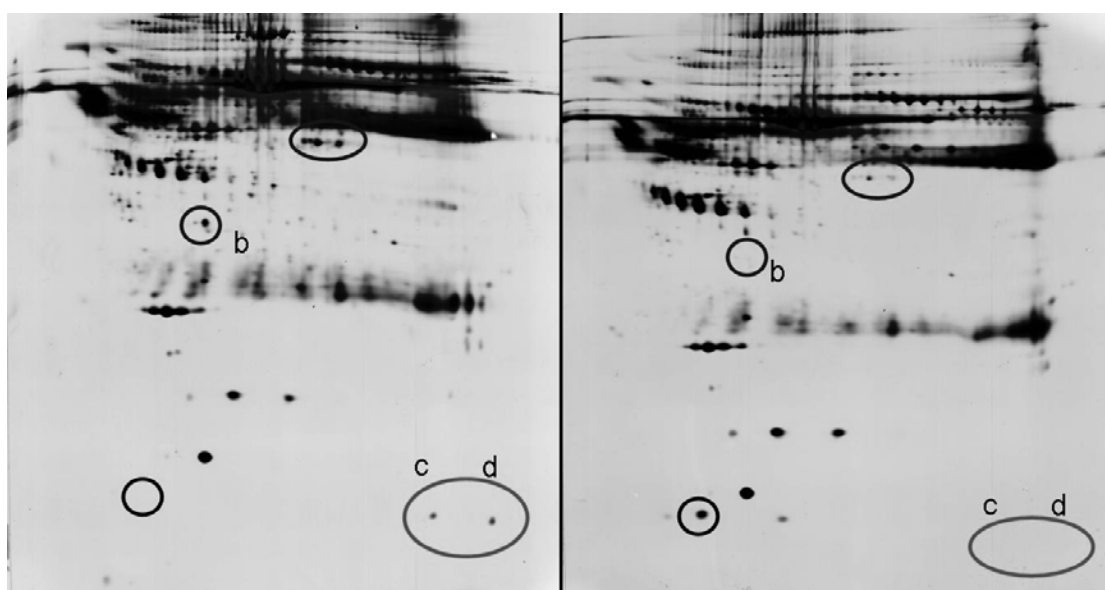
5-3



5-4

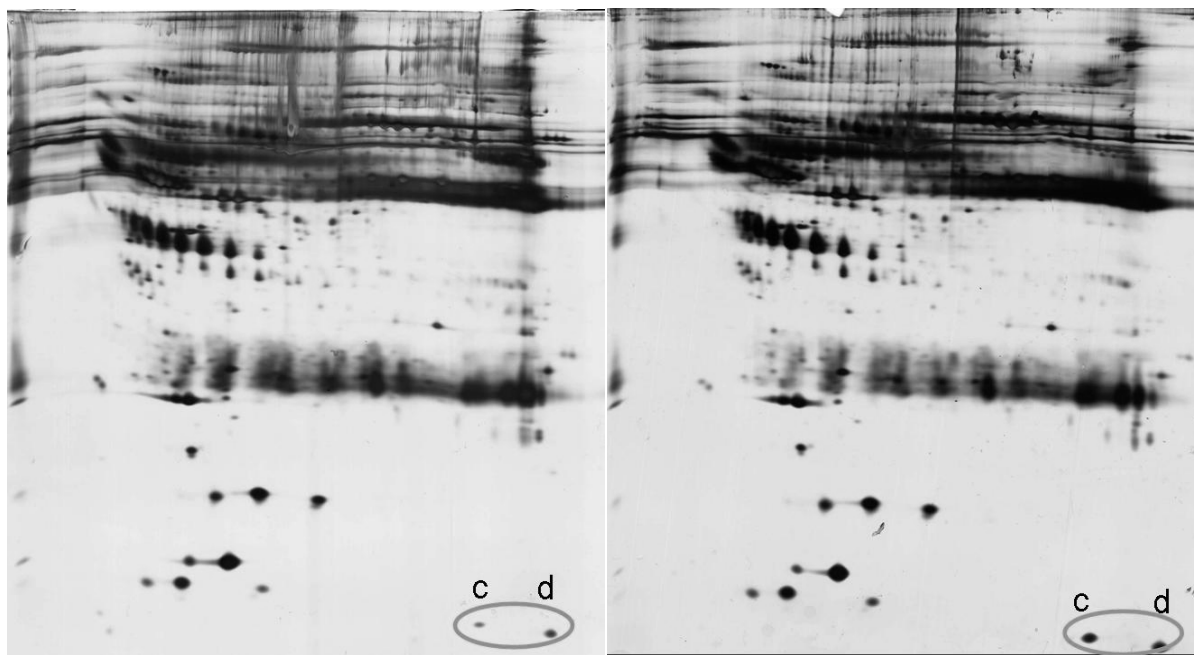


5-5

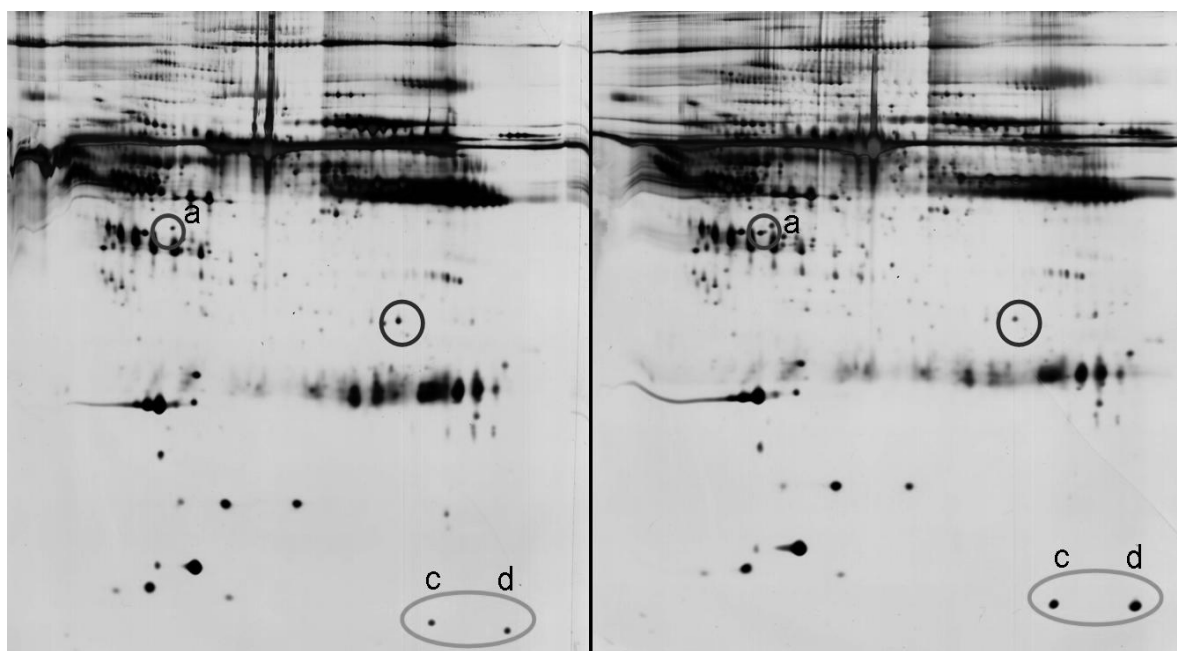


5-6

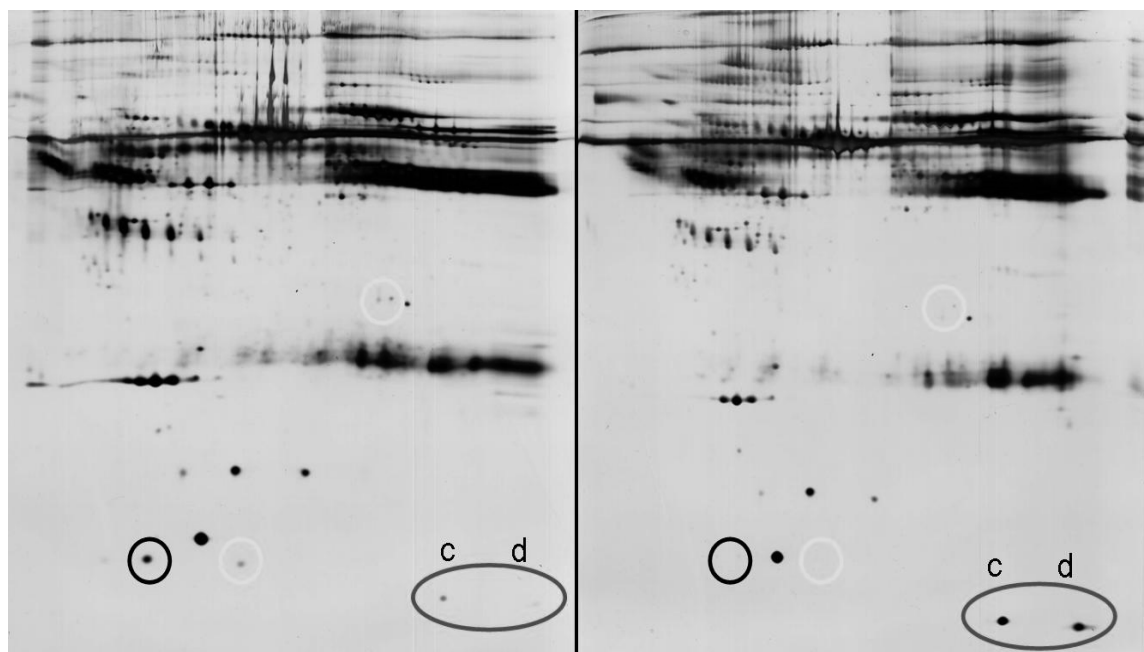
圖五 病人服用熱藥前後蛋白質分佈的比較：  
左圖為服用藥物前，右圖為服用藥物後。  
病人編號：5-1: AR10; 5-2: AR12; 5-3: AR13; 5-4: AR17; 5-5: AR18;  
5-6: AR21。線框內為蛋白質分佈不同的部分。其中的點c與d在  
處理熱藥的病人有很強的相關性。



6-1

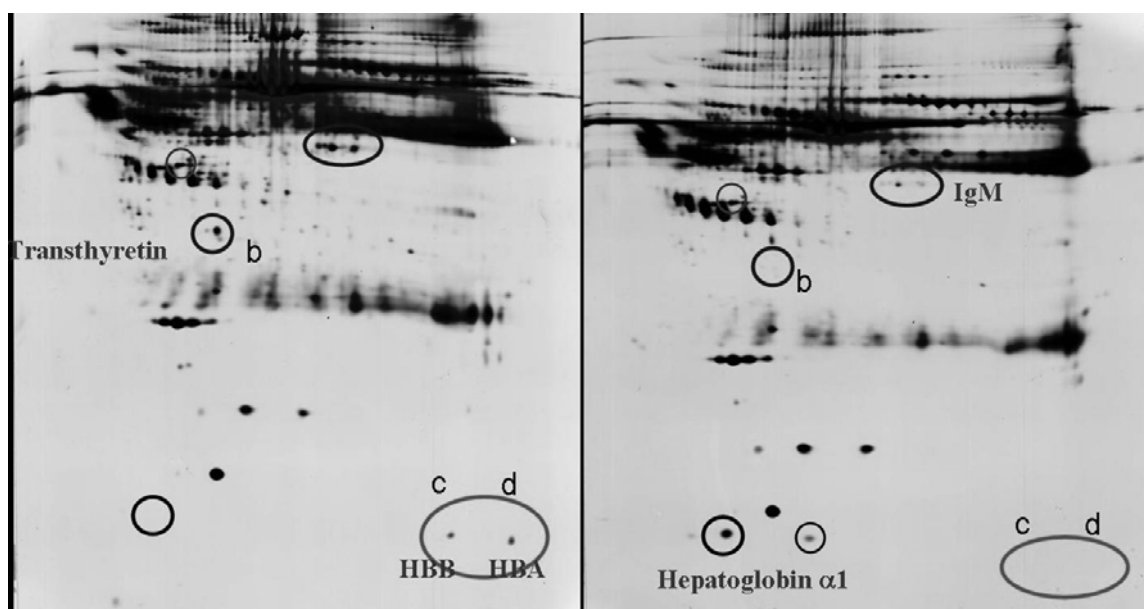


6-2



6-3

圖六 病人服用寒藥前後蛋白質分佈之比較：  
左圖為服用藥物前，右圖為服用藥物後。  
病人編號：6-1: AR14; 6-2: AR19; 6-3: AR20。線框內為蛋白質分佈不同的部分。其中的點 c 與 d 在處理寒藥的病人有很強的相關性。



圖七 病人服用寒藥前後蛋白質分佈之比較與經定序後的蛋白質

## 肆、討論

本研究無可避免的也同許多臨床研究一樣，遭遇許多困難，如體質證型以及臨床疾病發病狀況受季節時間影響，原應進行全年之收集，以及增大收集樣本，以進行完整分析，然而在第一年計畫中開始收案於夏天，無法取得不同季節樣本資料，加上本地患者多重的就醫模式，使得樣本收集受到限制，而限於時間，以及一些醫療的意外事件，如開始收案之初，即遭逢 SARS 風波，而延遲開始收案時間，後又因為媒體報導含馬兜鈴酸中藥腎毒性及中草藥肝毒性事件導致民眾服用中藥的意願降低以及收案樣本流失，所以完成收案數未能達到理想目標。在陽氣虛型體質與陰血虛型體質的蛋白質比對中，我們只針對服用藥物前後的病人的蛋白質差異作比對，個體之間的蛋白質差異太大，因樣品數不夠，無法有效的比對，但可以作為陽氣虛型體質與陰血虛型體質相關蛋白質的參考，我們將利用統計方法來分析其與不同體質間相關的機率。此外在蛋白質表現與體質類型改變上，事實上仍存在一個時間落差，許多蛋白表現已出現變化但體質類型變化仍未顯現，代表藥物作用時間不夠，或蛋白質改變出現後之作用時間不夠。本研究樣本數較少有兩個原因：其一，第一年遭逢 SARS 收案甚少，第二年才補足較多樣本；其二，蛋白質體分析成本甚高，但計畫能提供之經費甚為拮据，未免中醫藥基因體計畫僅有中藥計畫，因此在中研院生醫所支持下繼續執行此計畫，自然須顧慮有限之樣本數。而整體國家基因體計畫有許多計畫為先趨性探索或試驗，必然有其風險，本計畫獲得之經驗將可提供未來繼續研究之基礎。

本計畫採雙盲實驗，此設計的主要目的（優點）不在驗證中醫藥療效，而是藉由多組條件差異較小之交叉分析，來觀察體質與藥性傾向性，進而比對出中醫寒熱體質與藥性理論之趨勢，並尋找出相應之蛋白質基礎。若依照傳統中醫辨證用藥，反而無法做細微之變數比對，同時要取得各類狀況之足夠代表樣本數反而更不容易。在國內從未有人對過敏性鼻炎個種體質類型或證型之出現率進行過普查，因此無法預估研究收案可能之狀況，我們在計畫執行前針對執行此中醫基因體計畫之構想與可行性進行過報告與審查，並已將相關試驗設計之基本假設與理由說明於總計畫與分年計畫書中，而蛋白質分析之複雜結果，也是預估可能遭遇之風險。

本實驗在病人的執行上有一些需要解決問題（缺點）：因為要符合雙盲實驗的設計精神，病人服用的藥物也是隨機給予，如此會造成病人服用不同體質的藥物，可能會有較不明顯的治療效果，更有可能會有反效果，如此會造成病人的流失與降低回診意願。所分析的蛋白質分佈的結果也可能因此受到

影響。雖然依病人的狀況給藥的分析方法與計畫的原始設計理念不合，但此經驗可以用於未來實驗設計上。在未來的計畫可以以治療過敏性鼻炎加上體質相關基因體的研究，可以先依體質分類，再分成服用安慰劑與治療組，如此可以避免心裡的因素及安慰劑的效果，再加上分析蛋白質變化時，可以用以集中比較病人服用適合體質藥物的變化，以目前的設計，服用不適合體質的藥物，其蛋白質變化可能會受到體質與藥物衝突的影響。但是此設計所需要收集的病人數目需要增加許多以達統計上的意義。

雖然在完成收案數上無法達成預期目標，但因本計畫主要目標在尋找與體質類型及中藥寒熱屬性之相關蛋白，在基本分組人數可提供藥性與藥效分析之所需，以及臨床上之觀察體質變化趨勢之樣本得以產生，即可藉由研究設計之多重觀察得到我們期望找出之可能蛋白。很幸運的，在本研究中雖然收案數較少，藉由不同體質與服用不同中藥方之前後比對，我們的確看到預期會出現的結果。由於仍有部分病例仍可收案，相關之統計分析仍將持續進行。因應第一年計畫成果審查委員的建議，本案需有不同臨床中心以及不同季節病患的樣本做比對，本年度再加入由台中榮民總醫院耳鼻喉科門診病患，希望能由多數病人的資料加入，可以增加分析結果的可信度，再次分析之結果可使目前結果再做確認。

由研究結果來看，性別、季節對體質表現的影響並不小於疾病，甚至大於藥物本身對病人的影響。可能原因為本研究所選擇的疾病種類過敏性鼻炎，並非致病因素造成病理表現效應強大之疾病，而是人體生理反應明顯之疾病，所以性別、季節氣候變化等影響生理較大之因素，就與體質的表現有很強之相關。

從文獻上來看，過敏性鼻炎患者中醫體質類型大約可歸類為陽氣虛與陰血虛二大型，大陸學者多主張前者，而台灣則以陰虛或氣陰虛為主。由於本研究目的不在評估中藥方治療過敏性鼻炎之療效，而是在驗證中醫體質類型與中藥方藥性之相對應，以及找出決定或參與此種關係之內在機制。由於現代醫學發展至今這種問題之重點已經被全球學者鎖定在基因相關之蛋白質表現上，因此我們認為藉由研究體質證型與方藥相關之設計，以及日益成熟之蛋白質分析技術之改進將可找出關鍵性之分子機轉。

在檢定不同方藥治療模式上，我們選擇的是中醫思路上一般認為兩個較為相反的治療藥劑，一為桂枝湯，係張仲景為營氣運行不足而設；一為知柏地黃湯，為六味地黃丸加味，為肝腎陰虛有火而設。患者經隨機分組，依基本資料分析，兩群患者無差異性，然而從中醫觀點，體質的分佈必不均勻，在中國醫藥大學所收集的病患，服用桂枝湯者的陰陽兩虛的病患較多，而服

用知柏地黃丸者以陰血虛質較多(表六)，兩群患者中醫體質類型分佈並不一致，換言之，仍應是不同的兩個群體。

從服用寒熱藥對體質調節效果來看，在服藥前後，體質上沒有明顯變化的病人佔大多數，這代表服用體質調節藥方藥兩個月，其對身體之效應可能尚未造成臨床表現型的顯著改變。而從服藥後體質類型轉差的患者來看，由陰血虛質轉為陰陽兩虛質的有 2 位，其中一位其服用桂枝湯，這個結果與中醫理論及臨床經驗不符，我們查閱病歷發現其一患者有心二尖瓣膜脫垂之生理特質，其出現陽氣虛體質可能為勞累誘發，另一患者服用知柏地黃丸則可能與氣候變化有關，顯示原有診斷指標的確存在診斷率之問題，當患者體質仍在潛在狀態時可能無法測出而有偽陽性或偽陰性之問題，不過本研究在找出體質特性之趨勢，這種較低機率之狀況不需顧慮。服藥後體質類型轉好的包括：由陰陽兩虛質變為尋常質(陰陽較平衡)的有 6 位，服用知柏地黃丸 2 位，桂枝湯 4 位。由陰血虛變為尋常質的有 8 位，服用知柏地黃丸 6 位，桂枝湯 2 位。服藥後體質類型轉變成不同類型的包括：由陽氣虛質變為陰血虛質的有 3 位，服用知柏地黃丸 1 位，桂枝湯 2 位。這些變化均與中醫理論及臨床經驗相符。

體質調節中藥方對過敏性鼻炎臨床表現的影響，可以看到臨床症狀都由嚴重、中度、輕度，轉變至中度、輕度，及無症狀。不論服用知柏地黃丸或桂枝湯之患者臨床症狀之積分均下降三分之一左右。由此顯示對過敏性鼻炎之治療除針對病理機轉所擬定具藥理作用之治療外，體質調節對生理功能改變之協助，應是另一種值得考慮之方向。

在二維電泳膠蛋白質操作步驟之建立與改進上，在本年度研究中，利用 2D 來分析血清中的蛋白質技術已經在本實驗室建立，經過數次的實驗及與 Dr.陳水田與其實驗室助理的討論，我們已經將作 2D 分析的標準操作步驟(SOP)建立，可以有效的、可重複的將血清中的蛋白質分離至最佳解析度以做蛋白質表現的比對。這個 SOP 的缺點為每一個病人的檢體必須經過兩種分離柱的分離，雖然會增加分析的解析度，但會損失一些蛋白質，其操作過程也較繁瑣，需要一個能專心操作的助理來完成。

病人服用寒藥與熱藥前後的蛋白質比對中，我們發現至少有三個點的差異與服用藥物有正相關，尤其是圖六中的 c 與 d 兩點，在服用熱藥與寒藥的病人中發現，熱藥會使其減少，但寒藥會使其增加。經 LC/MS/MS 的分析與蛋白質定序，圖六的 c 與 d 兩點為 hemoglobin  $\alpha$  與  $\beta$ 。這兩個蛋白質與體質的關連性將會比對更多的 2D 結果，以確定它們的可信度。並將分離出來做蛋白質定序的分析，來研究其與體質的關係。

根據研究結果，體質相關蛋白質可能包括部分小分子蛋白，而我們發現所使用的 2D 膠為固定濃度，小於 20kDa 的蛋白質會跑出膠而無法分析。我們將所使用的膠的濃度提高到 13% 但能留住的小分子量的蛋白質有限，若使用梯度為 8-18% 的膠，必須向廠商購買，2D 結果的再現性才會高，但其成本將增加很多，但因低分子量的蛋白質的濃度不高，所能增加解析的蛋白質並不多；我們嘗試著用 25kDa 的超過濾膜來過濾出蛋白質，但因為血清的濃度或黏滯性太高，無法有效的將小分子的蛋白質分離出來。如何用最低的成本有效的將小分子的蛋白質分離出來，以作進一步的分析，為 2D 分析的一個研究方向。為了能解析 25kDa 至 50kDa 的蛋白質的解析度，我們嘗試用 8% 的電泳膠來分離蛋白質，能解析的蛋白質有增加，但仍有限，基於經費的考量，將針對較有意義的樣品作多一次的分析比對。

從本年度研究結果，我們將繼續將所找到與寒與熱可能有相關的蛋白質從 2D 的膠中分離開、純化出來，利用 MALTI-TOF 做蛋白質的定序。若蛋白質不純，無法用 MALTI-TOF 來定序，將利用 LC/MS/MS 的技術來分析。因為蛋白質的量需求較大，需重新用較多的蛋白質以 2D 膠分析，以分離出較大量的蛋白質作定序分析。此外陸續完成之收案，將可進行更多病人的 2D 蛋白質分析，並做服用藥物前後的蛋白質分佈的比對，也需同時考慮病人的體質情況，以確定已經找到的蛋白質的差異性，並尋找其他與寒熱體質有相關的蛋白質。最後所得到的相關蛋白質再做蛋白質定序，可能的話再比對有過敏性鼻炎的病人的血清的蛋白質的分佈與正常人的差異，希望能找出與過敏性體質有相關的蛋白質，比對時將病人的體質先分成熱與寒體質，再做分析比對，希望分類能對分析有所幫助。



## 伍、結論與建議

從研究結果我們有幾點結論：

- 一、性別、季節及服用藥物的種類對體質表現會產生影響。
- 二、服用體質調節藥方藥後體質類型轉變情形與中醫理論及臨床經驗相符，服用體質調節方藥後均可改善過敏性鼻炎患者臨床表現。
- 三、在病人服用中藥前後的蛋白質比對中，我們發現 hemoglobin  $\alpha$  and  $\beta$  與服用藥物有正相關，寒藥會使病人的這兩個蛋白增加，熱藥則會減少，但與病人的體質沒有直接關係。
- 四、在體質類型變化、蛋白表現變化、藥物作用時間之關聯仍應再做分析。

## 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-048 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. JJ Chen, R Wu, PC Yang, JY Huang, YP Sher, MH Han, WC Kao, PJ Lee, TF Chiu, F Chang, YW Chu, CW Wu, K Peck. Related Articles Profiling expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection. *Genomics*. 1998 Aug 1;51(3): 13-24.
2. SP Gygi, B Rist, SA Gerber, F Turecek, MH Gelb, R Aebersold. Related Articles Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol*. 1999 Oct;17(10):994-9.
3. CM Huang, HA Shui, YT Wu, PW Chu, KG Lin, LS Kao, ST Chen. Proteomic analysis of proteins in PC12 cells before and after treatment with nerve growth factor: increased levels of a 43-kDa chromogranin B-derived fragment during neuronal differentiation. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001, 15;92(1-2):181-92.
4. S Izumoto, T Ohnishi, H Kanemura, N Arita, M Maruno, T Moriuchi, S Suzuki, Yoshimine T. PTEN mutations in malignant gliomas and their relation with meningeal gliomatosis. *J Neurooncol* 2001 May;53(1):21-6
5. Y Oda, T Nagasu, BT Chait. Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome. *Nat Biotechnol*. 2001 Apr;19(4): 379- 82.
6. The International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001;409, 928-933
7. Zhou H, Watts JD, Aebersold R. Related Articles A systematic approach to the analysis of protein phosphorylation. *Nat Biotechnol*. 2001 Apr; 19(4):375-8.
8. YY Wang, KH Khoo, ST Chen, CC Lin, CH Wong, CH Lin. Studies on the immuno-Modulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analyses of a fucose-Containing glycoprotein fraction responsible for the activities. *Bioorg Med Chem*. 2002 Apr; 10(4):1057-1062.
9. 蘇奕彰：系統性紅斑狼瘡患者之中醫體質研究，中國醫藥學院博士論文，台中，1995。
10. Eva R. Weeke: Epidemiology of allergic diseases in children. *Rhinology, Suppl.* 1992;13:5-12.

11. Peter McMenamin: Costs of hay fever in the United States in 1990. *Annals of Allergy*.1994;73:35-39.
12. Nobuo Kubo, Tadami Kumazawa: Functional Disturbances of the Autonomic Nerve in Nasal Hyperreactivity. *Acta Otolarygol, Suppl.* 1993; 500:97-108.
13. George P. Chrousos, Pilip W. Gold: The Concepts of Stress and Stress System Disorder, *JAMA*.1992;267:1244-1251.
14. Bonnie Sibbald, Elizabeth Rink: Epidemiology of Seasonal and Personal Rhinitis: Clinical Presentation and Medical History. *Thorax*.1991; 46: 895-901.
15. Elizabeth F. Juniper, Gordon H. Guyatt: Development and Testing of a New Measure of Health Status for Clinical Trial in Rhinoconjunctivitis. *Clinical and Experimental Allergy*.1991;21:77-83.
16. Elizabeth F. Juniper, Gordon H. Guyatt, Jerry Dolovich: Assessment of quality of life in adolescents with allergic rhinoconjunctivitis: Development and testing of a questionnaire for clinical trials. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*.1994;93:413-421.
17. H. Klementsson: Eosinophils and the Pathophysiology of allergic rhinitis. *Clinical and Experimental Allergy*.1992;22:1058-1064.
18. Robert A. Barbee, Walter Kaltenborn, Michael D. Lebowitz, Benjamin Burrows: Longitudinal Changes in Allergen Skin Test Reactivity in a Community Population Sample. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*.1987; 79:16-25.
19. Anil K. Badhwar, Howard M. Druce: Allergic Rhinitis. *The Medical Clinics of North America*.1992;76:789-801.
20. Eli O. Meltzer: An Overview of Current Pharmacotherapy in Perennial Rhinitis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*.1995;95; 1097-1111.
21. 胡熙明：建國 40 年中醫藥科技成就，中醫古籍出版社，北京，1989；p.423-424。
22. 馬光亞：臨床辨證與經驗實錄，知音出版社，台北，1993；p.167-169。
23. 余增福：複方蒼耳子滴鼻劑治療鼻部疾病 1194 例，中西醫結合雜誌，1985；5:750。
24. 上海市辛芩沖劑協作組：辛芩沖劑治療過敏性鼻炎 367 例臨床總結，上海中醫藥雜誌，1984；7:20。
25. 李凡成：分型治療變態反應性鼻炎 100 例總結，新中醫，1986；18:25-27。

- 26.陳可冀：實用中西藥臨床治療手冊，中國醫藥科技出版社，北京，1993；p.761-763。
- 27.陳貴廷，楊思澍：實用中西醫結合診斷治療學，中國醫藥科技出版社，北京，1991；p.1934-1938。
- 28.何欲民，高欽穎，嚴清，張曄，吳亦樵，李紅升：從體質調研結果探討因時因地制宜治則，中醫雜誌，1986；5:47-50。
- 29.林文森，石志興，馬思明，張志堯，周文洛：補氣固表治療變態反應性鼻炎的臨床研究，中西醫結合雜誌，1989；5:263-265。
- 30.劉渡舟：傷寒論校注，人民衛生出版社，北京，1991；p.51。
- 31.吳謙：醫宗金鑑，中國中醫藥出版社，北京，1994；p.345。