

編號：CCMP92-RD-024

## 利用 DNA 微陣列探討中藥麥門冬湯治療 氣喘之基因表現變化

許清祥

中國醫藥大學附設醫院

### 摘 要

**研究目的：**本研究利用微陣列生物晶片分析過敏性氣喘基因表現的差異與中醫哮喘熱證之間的相關性，以了解哮喘熱證表現背後的實質分子機轉，和中藥處方麥門冬湯治療氣喘的作用機轉。

**研究方法：**本研究收集 95 位合乎過敏性氣喘臨床診斷標準的病人，並根據中醫傳統理論對各種臨床症狀發生頻率與嚴重程度加以評分，作為熱證程度的評量。同時，採取病人週邊血中的白血球利用微陣列生物晶片的技術，分析其基因表現的變化。以無母數相關分析法（Spearman correlation）分析各基因的表現量與熱證評分間的相關性，同時亦比較病換服用麥門冬湯前後基因表現量的不同。

**主要發現：**結果發現 Thromboxan A2 receptor (TBXA2R) ( $P=0.010$ )、CD2 ( $P=0.043$ )、Interleukin-15 (IL-15) ( $P=0.043$ )、Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted (RANTES) ( $P<0.001$ )、SCYA4 (MIP-1  $\beta$  : macrophage inflammatory protein-1  $\beta$ ) ( $P=0.009$ )、SCYA17 (TARC : Thymus and activation-related chemokine) ( $P=0.002$ )，這些基因與熱證評分呈正相關，並具有統計上意義或顯著意義。將上述基因表現量與熱證評分進行多變項迴歸分析 (Multiples Linear Regression)，得出一回歸方程式：

Heat=0.49 (TBXA2R) +1.23 (Eotaxin) +0.93 (STAT2) +5.00 (GBP2) + 0.88 (Metallothionein) -3.25 (CD2) +2.24 (IL-15) - 12.59 (IL-18) + 6.50 (RANTES) - 2.24 (SCYA4) +1.19 (SCYA17), 該模式具顯著意義 ( $P<0.05$ ), 且可預測熱證評分準確性達 70.6%, 病患服用麥門冬湯後的基因表現變化則需進一步統計分析。

**結論及建議事項：**從上述結果中，我們發現哮喘熱證趨化激素如 RANTES、SCYA4、SCYA17 有最強的相關性，同時也與訊息傳導分子 TBXA2R、細胞激素 IL-15 及 IL-18、黏附分子 CD2 成正相關，這些基因必定在氣喘熱證的病理機轉中扮演重要角色。同時，這些基因與熱證評分進行多變項迴歸所得到的迴歸方程式，可以預測病人熱證的評分，以作為臨床判斷過敏性氣喘熱證程度方便且快速的客觀標準，也可用於治療的評估，至於能否用於篩選預測麥門冬湯有效病例有待進一步研究評估。

**關鍵詞：**過敏性氣喘、熱證、生物晶片、微陣列

CCMP92-RD-024

# **The analysis of gene expression in asthma patients treated with TCM by DNA microarray**

Hsu Ching-Hsiang

Chinal Medical University Hospital

## **ABSTRACT**

The pathogenesis of allergic asthma involves a very complicate immune response in which thousands of genes are expressed. “Zheng” is an unique theory of both diagnosis and treatment in traditional Chinese medicine (TCM). In this study, we try to analysis the correlation between heat “Zheng” score of allergic asthma patients and the differences of their gene expression in order to understand the molecular mechanism of heat “Zheng” in asthma. Therefore, we included 95 allergic asthma patients in our study. According to the theory of TCM, we decided their heat “Zheng” score via the frequency and severity of their clinical symptoms. At the same time, their peripheral monocytes were collected. So, we used microarray to detect the gene expression of patients’ peripheral lymphocytes which are involved in the pathogenesis of allergic asthma. Then, the results were analyzed by Spearman correlation statistics. We found Thromboxan A2 receptor (TBXA2R) ( $P=0.010$ )、CD2 ( $P=0.043$ )、Interleukin-15(IL-15) ( $P=0.043$ )、Regulated upon Activation, Normal T cell expressed and secreted (RANTES) ( $P<0.001$ )、SCYA4 (MIP-1 $\beta$  : macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ ) ( $P=0.009$ )、SCYA17 (TARC : Thymus and activation-related chemokine) ( $P=0.002$ ) , were positive correlated to heat “Zheng” score which were significant in statistics ( $P<0.05$ ). A regression

analysis was then performed. We obtained a formulation: Heat =0.49 (TBXA2R)+1.23(Eotaxin)+0.93(STAT2)+5.00(GBP2)+0.88(Metallothionein)–3.25(CD2)+2.24(IL15)–12.59(IL18)+6.50(RANTES)–2.24(SCYA4)+1.19(SCYA17), which allowed us to predict patient's heat “Zheng” score by the expression amount of those genes. The accuracy is 70.6%.

On the base of the results, we can conclude that signaling factor TBXA2R, cytokines IL-15 and IL-18, adhesion molecular CD2 and chemokins RANTES, SCYLA4, SCYA17 must play important roles in allergic heat “Zheng” of asthma pathogenesis. The regression formulation we obtained has great value of clinical application. It provides an objective evidence to diagnose allergic heat “Zheng” asthma and to estimate the efficacy of therapy. Further analysis of changes of gene expression profiles after Mai-Men-Dong-Tang therapy were under investigation. Changes of gene expression after Mai-Men-Dong-Tang therapy were remained to be elucidated in further study.

Key words: Heat Zheng, Allergic asthma, Biochip, Microarray.



## 壹、前言

過敏性氣喘是一種致病機轉極為複雜的疾病，主要由於呼吸道的慢性、反覆性發炎，造成呼吸道內壁組織損傷，從而產生包括基底膜增厚；平滑肌、微血管及分泌腺體增生；上皮杯狀細胞增加及間質膠原蛋白堆積等重塑（remodelling）<sup>1</sup>現象，並造成呼吸道敏感性提高<sup>2</sup>，易受各種化學或物理因素的刺激，而誘發可逆性的呼吸道收縮，引起喘鳴、呼吸困難、胸悶、咳嗽等症狀。此種慢性發炎反應同時牽涉了體液性（humoral）與細胞性（cellular）免疫兩大系統，以細胞免疫而言，多種細胞都參與其中，如肥大細胞（mast cell）、嗜伊紅性白血球（eosinophil）、第二型助手 T 淋巴球（TH<sub>2</sub>-like lymphocyte）、巨噬細胞（macrophage）、中性球（neutrophil）、上皮細胞（epithelial cell）等，而它們所分泌出的介質如細胞激素（cytokines）、趨化激素（chemokines）<sup>3</sup>及附著蛋白（adhesion proteins）<sup>4</sup>等，共同形成綿密精細的網絡，在發炎免疫反應的過程，扮演重要的角色。同時這些介質也會影響呼吸道平滑肌的張力、改變血管通透性、活化神經原、刺激黏液分泌，並使呼吸道產生結構性的變化<sup>5</sup>。因此，免疫細胞與其分泌之介質可作為臨床上監測過敏性氣喘嚴重度與治療成效評估的指標，從而作為選擇治療方式的參考。近日對過敏性氣喘分子機轉的研究，使我們了解這些免疫細胞之間的互動必須透過一連串精密的訊息傳導（signal transduction），其中包括細胞激素與其受體、G 蛋白（G protein）、蛋白激酶 C（protein kinase C）、腺嘌呤環化酶（adenine cyclase）、轉錄因子（transcription factors）形成訊息傳導徑路，而它們也成為治療氣喘的新標的。

傳統中藥有幾千年的使用經驗，然而卻缺乏一有系統的科學方法驗證，難以推廣給世人，以達到廣大治療之目的，其中麥門冬湯被用來治療呼吸道疾病以將近二千年，他的出處源自東漢張仲景所著【金匱要略】，臨床上亦常被用來治療氣喘，且有一定效果，原文為「火逆上氣、咽喉不利，止逆下氣者，麥門冬湯主之。」其組成有麥冬、人參、半夏、甘草、粳米、大棗，功能為清養肺胃、止咳平喘<sup>40</sup>。本研究團隊曾經報告於動物模式中證明麥門冬湯可以有效調節細胞間白素-4 的 RNA 和蛋白質表現量，降低血中 total IgE 和塵蹣特异性 IgE 抗體，並且抑制肥大細胞和嗜鹼性粒細胞脫顆粒作用，以及抑制組織胺分泌。

微陣列生物晶片（microarray）是以雜交（hybridization）為基礎，發展出用以偵測基因表現的技術，它可以同時快速、準確的分析數以千計的基因訊息，該技術是將大量探針分子（probe）固定在支持物上，與標記的樣品分子進行雜交，並用適當的偵測系統加以檢測，根據每個探針分子的雜交訊號強

度，得知樣品中基因表現的種類與數量。這種技術可運用於醫學基礎研究如病理機轉的研究，亦可作為臨床上疾病的篩檢、治療效果的評估<sup>6</sup>等。由於它能快速分析處理龐大而複雜的訊息，因此是目前研究非單一基因疾病如過敏性氣喘最有利的工具之一。

中醫理論的產生受當時自然科學發展水平的限制，主要是靠對生命表面現象的總體觀察，將對生理與疾病的觀察與認識歸類為各種證型，因此證型的研究是中醫基礎理論研究的重要環節。儘管證的定義尚未統一，但基本上證包含個體性、階段性、致病因素與機體反應能力的互相作用，其中機體反應能力大多與遺傳因素有關<sup>7</sup>。此意味著研究基因表現的差異性與 DNA 序列的多型性也許是了解中醫證型實質的一種方法。因此本研究利用微陣列晶片分析過敏性氣喘基因表現的差異與中醫哮喘熱證之間的相關性，以了解哮喘熱證表現背後的實質分子機轉，作為中醫證型診斷的客觀依據，並用統計顯著意義之基因型與熱症進行多變項迴歸分析，得知哪些基因型之表現數值可以用以預估熱症之診斷結果，也可提供臨床醫師快速方便的診斷參考及應用於治療成效的評估。另外透過此一研究平台技術和臨床雙盲試驗，可以評估麥門冬湯對氣喘的效果，並找出中藥調控氣喘相關基因之情形，我們想進一步藉此研究希望能提升傳統醫學辨證論治精神至另一新的水準。

## 貳、材料與方法

### 一、病患一般資料

95 個氣喘病患，年齡在 4-68 歲，平均年齡為 20.19 歲，其中男性 52 位，女性 43 位。診斷納入標準 (inclusion criteria)：(1) 典型氣喘病史；(2) 在沒有藥物治療的情況下肺功能中第一秒最大吐氣量 (forced expiratory volume in first second, FEV1) > 55%；(3) 可逆性呼吸道阻塞性疾病：在吸入支氣管擴張劑後 FEV1 增加 15% 以上；(4) 使用組織胺及支氣管收縮劑會造成支氣管收縮。排除標準 (exclusion criteria) (1) 有急性疾病的表現；(2) 有藥物濫用

或酗酒史；(3) 上呼吸道或下呼吸道的感染；(4) 嚴重腫瘤或進行性疾病。參與本研究之病患在進入研究前已被診斷為氣喘並接受藥物治療，進入本研究後仍持續治療。觀察紀錄以下醫療指標：(1) Aas Score<sup>9</sup>：根據病人近年來的臨床表現將其氣喘的嚴重度分為五個等級；(2) Medication Score：對病人使用藥物的種類與劑量給予評分；未使用藥物者=0，預防性藥物 beclomet 或 zaditen =1，支氣管擴張劑如吸入性 berotec 或 Theophylline =2，口服類固醇 5mg/day=3，10-20mg/day=4，>20mg/day=5；(3) FEV1；(4) IgE；(5) Dp-specific IgE；(6) 周邊血嗜伊紅球性白血球數目；(7) 嗜伊紅球性陽離子蛋白 (Eosinophil Cationic Protein；ECP)。

## 二、中醫熱證評量

依照臨床症狀：口渴喜飲、大便秘結、小便黃、面紅、唇紅、目赤、舌質紅、舌苔黃膩，由兩位具臨床經驗之中醫師根據其發生頻率與嚴重程度分別給予 0-2 分 (Table 1)，加總平均後作為各病患熱證程度的評量。

## 三、分離周邊血單核球細胞與純化 RNA

由病人周邊靜脈採血 5 ml 置於 EDTA 管，加入 Ficoll-Hypaque，離心 2500 rpm 20 分鐘，吸取中間層，加入已滅菌 PBS 洗滌，離心後將上清液倒掉，並加入已滅菌等張 PBS 再洗滌一次，離心 1500 rpm，10 min，將上清液倒掉，再以 300  $\mu$ l PBS 將血球懸浮。加入 1.5ml RNA LATER 保存於 -20°C，準備進行 RNA 抽取。離心 4°C，4000xg，15 min 取出血球，加入 1 ml TRIzol 試劑 (Life Technologies, Paisley, UK)，劇烈震盪以打破細胞，離心 14000 x g 15 分鐘後，加入 0.2 ml 三氯甲烷 ( $\text{CHCl}_3$ ) 劇烈震盪後，離心 14000 x g 15 分鐘，取上清液，加入 0.5ml 的異丙醇 (isopropanol)，靜置於 -20°C 20 分鐘使 RNA 沉澱，離心 4°C，14000xg，15 min，去除上清液，用 75% 乙醇潤濕，真空乾燥，並重新溶於除去 RNase 的水中，以分光光度計測量其濃度。

## 四、cDNA 製備與 Cy5 標定 (labeling)

取 8  $\mu$ l total RNA 加入 2  $\mu$ l oligo poly-dT (12-18-mer, Life Technologies 濃度為 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L) 為先驅子 (primer) 進行反轉錄，混合均勻，置於 70°C 10 分鐘，然後取出置於冰上 2 分鐘，再加入反轉錄標定混合液 (Reverse transcription labeling mixture)；Cy5-dUTP (1mM；3  $\mu$ l)；SuperScript II (200U/ $\mu$ l；2  $\mu$ l)；Rnasin (1  $\mu$ l)。將上述混合物置於 42°C 的培養箱中 2 小時進行反轉錄。加入 1.5  $\mu$ l 20mM EDTA，使 RT 反應停止。加入 1.5  $\mu$ l 500 mM 的氫氧

化納並於 70°C 加熱 10 分鐘分解 RNA，以鹽酸中和後，通過 ProbeQuant G-50 Micro Column 除去多餘未與 RNA 結合的 Cy5，得到以 Cy 5-dUTP 標記的 cDNA。避光保存於 -20°C。

## 五、微陣列晶片雜交法：

將所挑選的 96 個基因 clones<sup>8</sup>，包括與發炎反應有關的基因如細胞激素及其受體 (Cytokines Receptors)、訊息傳導分子 (Signaling molecules)、轉錄因子 (Transcriptional factor)、黏附分子 (Adhesion molecules)、代謝路徑 (Metabolic pathway)、趨化激素 (Chemokines and receptors) 等，經聚合酵素連鎖反應 (PCR) 放大後，將 PCR 產物溶於點片溶液 (spotting buffer) 中，即完成探針 (probe) 的配製。將探針於 95°C、3 分鐘進行變性 (denature) 後，利用點片機 (spotting machine) 將探針點於玻璃載體上，並利用紫外光將探針固定 (cross-link) 於載體上。

晶片先藉由 n-methyl-pyrididinone/ succinic anhydride/ sodium borate 及 5X SSC/0.1% SDS/1% BSA 兩個步驟的前處理，阻礙玻璃載體表面活性基團的作用，以減少非專一性的雜交產生，降低背景值。接著將 target (前述經 RT 且接上 Cy5 螢光基團的病人檢體) 與雜交溶液 (50% formamide/0.2% SDS/10X SSC) 等體積混合，95°C、5 分鐘加熱變性，並利用離心迅速冷卻後，滴於點片區域，於雜交槽 (hybridization chamber) 內 42°C 下雜交反應 18 小時。雜交反應完成後，利用 1X SSC/0.1% SDS、0.1X SSC/0.1% SDS 及 0.1X SSC 三種溶液進行清洗步驟，將多餘的樣品及非專一性的雜交去除。

## 六、訊號判讀

晶片清洗並吹乾後，將晶片放入螢光掃描機進行影像擷取及螢光值分析。將每個點螢光值對照探針相對位置配置圖，即可得知每個基因表現的強度。晶片上每個基因都有重複 (duplicate)，因此數據在計算時，是取兩者的平均值，若兩點差異過大、雜交結果背景值不均勻或螢光訊號過低而可能造成訊號分析誤判的情況時，便捨棄此組實驗結果，重新實驗以確保數據的正確性。

實驗結果所表示的數值是以各個基因表現量與 GAPDH 表現量的比值加以標準化 (normalization)，因此訊號的計算方式為：先利用 GenePix<sup>TM</sup> Pro3.0 (Axon Instruments, Inc.) 將各基因表現的螢光強度數值化後，扣除背景值，再除以 GAPDH 強度 (亦扣除背景值) 後，不同樣品間之基因表現差異再做比較。同時以 mouse cDNA (ATBS) 及 plants DNA (RbCL) 為 negative control。

## 七、統計方法

本研究資料乃利用 SPSS 8.01 版統計軟體進行統計分析比較，將各基因型之表現量與 GAPDH 基因型之比值，以無母數相關分析及多變項迴歸分析進行資料分析，藉以得知各基因型 (Gene Type) 之表現量比值與臨床醫療指標 (如 Aas Score、FEV<sub>1</sub>%、ECP、IgE...等) 及熱症之相關情形，並進一步利用各基因型之表現數值對熱症診斷結果進行預估，以提供臨床上診斷及評估之依據。進行各基因型及臨床醫療指標及熱症之相關情形分析後，發現多數基因型與肺功能指標 (FEV<sub>1</sub>%) 具有顯著相關情形 ( $P < 0.05$ )，故進一步將上述具統計顯著意義之基因型與熱症進行多變項迴歸分析，以便得知哪些基因型之表現數值可以用以預估熱症之診斷結果，以便更快速提供臨床醫學上之診斷依據，病患服藥前後各基因的表現量以 Mann-Whitney test 進行統計分析。

## 八、校正方法

1. 本實驗會進行下列步驟作為 QC：

- (1) 每個批次所製作的晶片，會抽取 1-2 片左右，利用 SYBR green II stain 進行染色，確定 probe 間之濃度為一致
- (2) 每個批次所製作的晶片，會抽取 1-2 片，利用 commercial 之 Human reference RNA (因其品質及濃度穩定) 進行 hybridization，確定晶片品質正常
- (3) 每個樣品進行雜交的區域裡面，所點上的 probe 為雙重複，因此訊號分析時會確定兩個訊號數值相近 (差異小於 10%)，此實驗數據才為可接受之結果

2. 當 microarray 實驗結果歸納出幾個特定基因時，會再利用 RT-PCR 對這些特定的基因進行驗證工作

## 參、結果

### 一、病患基本資料

本研究總共收集 95 個氣喘病患，年齡在 4-68 歲，平均年齡為 20.19 歲，其中男性 52 位，女性 43 位。經過初步分析，該樣本中熱證評分呈常態分布(Fig. 1)，而根據 Aas score，其氣喘嚴重程度大部分屬於輕度（mild）或輕度持續性（mild persistent）氣喘（Fig. 2），同時熱證評分與氣喘嚴重程度並無相關。

二、熱症及氣喘醫療指標與各基因表現之相關（Spearman Correlation）情形分析利用 SPSS 8.01 版統計軟體進行統計分析比較，將各基因型之表現量與 GAPDH 基因型之比值以無母數相關分析（Spearman Correlation），Table 2 是熱證評分與基因表現量的無母數相關分析的結果，Range 欄是 95 位病人基因表現量數值分布的範圍，Mean±SD 是基因表現量的均值級標準差，Heat 欄上方數值是該基因與熱證評分經無母數相關分析所得數值，下方則為其 p 值，Aas Score 欄上方數值是該基因與 Aas Score 經無母數相關分析所得數值，下方則為其 p 值，FEV<sub>1</sub> 欄上方數值是該基因與 FEV<sub>1</sub> 經無母數相關分析所得數值，下方則為其 p 值，ECP 欄上方數值是該基因與 ECP 經無母數相關分析所得數值，下方則為其 p 值。結果發現熱證評分與下列基因表現有明顯相關，統計上具有意義或顯著意義：TBXA2R=0.312（P=0.010），CD2=0.246（P=0.043），IL15=0.338（P=0.043），RANTES=0.414（P<0.001），SCYA4=0.315（P=0.009），SCYA17=0.373（P=0.002）。(Table 2)(Fig. 3)

這些基因中有些也與其他氣喘醫療指標有相關性，如與 Aas score<sup>9</sup> 相關的基因有：TBXA2R=0.202（P=0.050），GBP2=0.24（P=.019），Metallothionein=0.171（P=0.098），IL-15=0.255（P=0.013），RANTES=0.204（P=0.047），SCYA4=0.229（P=0.026），SCYA17=0.307（P=0.002）（Fig. 4）。與 FEV<sub>1</sub> 有關的基因有：TBXA2R=0.268（P=0.027），GBP2=0.242（P=0.046），Metallothionein=0.25（P=0.040），CD2=0.284（P=0.019），IL-15=0.372（P=0.002），SCYA4=0.282（P=0.020），SCYA17=0.291（P=0.016）。(Table 2)

本實驗室曾發現 ECP 與熱證之間呈顯著的正相關，而在本實驗中與 ECP 有關的基因有：Metallothionein=0.266（P=0.010），IL-18=0.227（P=0.029），RANTES=0.225（P=0.031）。(Table 2)

### 三、熱證線性迴歸模式

根據上述熱證評分與基因表現的相關性統計分析所獲得的結果，我們選取與熱證及氣喘醫療指標在統計上有顯著相關的基因，進行多變項迴歸分析，以便得知哪些基因型之表現數值可以用以預估熱症之診斷結果，並得出一迴歸方程式，以快速提供臨床醫學上之診斷參考。

迴歸分析之結果發現在熱症表現上，其線性迴歸模式為：

$$\text{Heat} = 0.49 (\text{TBXA2R}) + 1.23 (\text{Eotaxin}) + 0.93 (\text{STAT2}) + 5.00 (\text{GBP2}) + 0.88 (\text{Metallothionein}) - 3.25 (\text{CD2}) + 2.24 (\text{IL-15}) - 12.59 (\text{IL-18}) + 6.50 (\text{RANTES}) - 2.24 (\text{SCYA4}) + 1.19 (\text{SCYA17}),$$

該模式具顯著意義 ( $P < 0.05$ )，且可解釋約 70.6% 的變異量 (Table 3)。

### 肆、討論

由於過敏性氣喘的病理變化為一慢性炎症，因此我們挑選與發炎反應有關的 96 個基因如細胞激素及其受體 (Cytokines Receptors)、訊息傳導分子 (Signaling molecules)、轉錄因子 (Transcriptional factor)、黏附分子 (Adhesion molecules)、代謝路徑 (Metabolic pathway)、趨化激素 (Chemokines and receptors) 作為篩選的對象，結果發現 TBXA2R、CD2、IL-15、IL-18、RANTES、SCYA4 及 SCYA17 與熱證評分有顯著的正相關。這些基因與其他醫療指標如 Aas score<sup>9</sup>、肺功能第一秒最大吐氣量 (FEV1) 及嗜伊紅陽性離子蛋白 (ECP) 的關係也極為密切 (Table 2)，Aas score 及 FEV1 是臨床上評估過敏性氣喘病人嚴重程度的指標，而 ECP 在本實驗室先前的研究中發現其與過敏性氣喘熱證有顯著的相關性<sup>10</sup>，熱證評分越高的病人，呼吸道所分泌的 ECP 越多，可見這些基因在氣喘熱證的病理機轉中扮演重要角色。目前中醫對於證型的診斷都是根據臨床醫師對症狀的主觀判斷，而缺乏客觀的標準，常常出現意見分歧、各說各話的窘境，這樣的情形不僅阻礙了中醫的科學化與現代化，也讓中醫的研究面臨極大的困難，本研究所發現這些基因表現的差異，雖然無法完全了解整個過敏性氣喘熱證的病理機轉，卻能為中醫哮喘寒熱證型診斷提供基因

層次的客觀證據，希望能為明確定義中醫寒熱證型有所幫助。

我們將這些基因與熱證評分進行多變項迴歸，可得到一迴歸方程式以預測病人熱證的評分，準確率為 70.6% (Table 3)，以作為臨床判斷過敏性氣喘熱證程度的客觀標準，临床上只需採取病人少量的周邊血，利用生物晶片技術檢驗上述基因，即可快速方便的得出病人的熱證評分以作為診斷的依據，讓不熟悉中醫證型診斷的現代醫學臨床醫師也能方便的運用，以促進大家對中醫的了解及推廣對中醫的使用。同時，這項技術不只可用於診斷，也可用於治療的評估，在治療前後追蹤基因表現的改變，不僅可以客觀評量病人病情的變化，也可了解使用藥物的作用機轉，對藥物療效作出正確的評估，讓藥物的使用更加的精準，以提高療效。

本研究中發現與過敏性氣喘熱證相關基因包括訊息傳導分子 TBXA2R、細胞激素 IL-15 及 IL-18、黏附分子 CD2 及趨化激素 RANTES、SCYA4、SCYA17，當熱證越明顯，它們的表現量就越多，以下將討論他們在過敏性氣喘熱證中可能的病理作用。TBXA2R (thromboxane A2 receptor) 是花生四烯酸瀑布 (arachidonic acid cascade) 最終端的作用者 (effector)，也是訊息傳遞路徑的啟動者，它會使血管及呼吸道平滑肌收縮，在氣喘病理生理反應中扮演關鍵性的角色，中醫對哮喘熱證的描述有喉中哮鳴，聲如拽鋸，胸高息粗，張口抬肩，即強調呼吸道收縮的病理反應，與本研究的發現相符，亦即 TBXA2R 基因表現越多，哮喘熱證越明顯。目前也有以其為標的從事新藥研發，以降低氣喘病人氣管的過度反應性<sup>11</sup>。曾有研究指出，TBXA2R 單核苷酸的多型性 (single nucleotide polymorphism) 與支氣管哮喘有很強的關聯性<sup>12</sup>，足見其重要性而其影響在於基因的層次，也可能與遺傳及中醫的體質學說有關。

IL-15 是多功能的細胞激素，由巨噬細胞與上皮細胞分泌。其主要的生理功能為刺激肥大細胞的生長，同時會誘導嗜中性球釋放出 IL-8，而使嗜中性白血球及嗜伊紅性白血球產生趨化作用<sup>13</sup>。最近的研究顯示嗜中性白血球不只會出現在氣喘急性發作期，在慢性嚴重氣喘病人的呼吸道中也為數不少，而它所產生的脂肪性介質 (lipid mediator)、活性氧中間產物 (ROI: reactive oxygen intermediates) 及蛋白酶 (protease) 如彈力蛋白酶 (elastase) 也會造成氣流的阻滯，上皮細胞的損害與重塑<sup>14</sup>。除了上述促進 Th<sub>2</sub> 免疫反應的作用，它也與 Th<sub>1</sub> 媒介的肺部慢性發炎疾病有關，其作用與 IL-2 相似，能使 CD<sub>4</sub><sup>+</sup> 淋巴球增生，並能活化在細菌感染中扮演重要角色的嗜中性白血球。IL-18 是由巨噬細胞所分泌，它與 IL-12 的功能相似，能共同誘發迦瑪干擾素 (interferon- $\gamma$ ) 的產生，促進自然殺手細胞的細胞毒性，活化 T 細胞的增生屬於 Th<sub>1</sub> 細胞激素。然而研究顯示上述功能必須與 IL-12 共同完成，單獨只有 IL-18 並不能抑制 Th<sub>2</sub>



細胞激素的分泌，相反的，它雖然能抑制 IL-4 的表現，抑制嗜伊紅性白血球的生成，但是它卻會促進另一種 Th<sub>2</sub> 細胞激素 IL-5 的表現及呼吸道中嗜中性白血球的浸潤，可見 IL-18 在過敏性氣喘的病理機轉中扮演調節的角色，它的功能極為複雜，不能單純以 Th<sub>1</sub> 細胞激素來定位<sup>15</sup>。從這兩種細胞激素在過敏性氣喘熱證中大量的表現看來，顯然氣喘熱證與非熱證的差異並不在於 TH<sub>2</sub> 免疫反應，在熱證病人中 TH<sub>1</sub> 免疫反應也比非熱證病人更為活躍。

從本實驗結果看來，過敏性氣喘熱證與趨化激素有最強的相關性。在過敏性炎症病理機轉中，RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted) 在嗜伊紅性白血球的成熟、遷移與活化過程中扮演重要角色<sup>16</sup>。RANTE 屬於 CC 趨化激素 (CC chemokine)，在周邊嗜伊紅球中受補體 (C3b/iC3b) 及迦瑪干擾素刺激而分泌<sup>17</sup>。其他如 T 細胞上皮細胞及血小板也都會分泌 RANTES，在發炎反應中它能誘發黏附分子的產生，並使發炎細胞包括嗜伊紅白血球、記憶 T 細胞、單核球及血小板聚集<sup>18</sup>。SCYA17 (TARC: Thymus and activation-related chemokine) 是由氣管上皮細胞所分泌的 CC 趨化激素，它會與 Th<sub>2</sub> 細胞所分泌的 CCR4 形成特異性的結合，造成 T 淋巴球的遷移<sup>19</sup>。在氣喘免疫反應中，它受到阿法腫瘤壞死因子 (tumor necrosies factor- $\alpha$ ) 及迦瑪干擾素的調控而大量分泌，造成呼吸道的嗜伊紅性白血球浸潤 (eosinophilia) 及過度反應 (hyperresponsiveness)<sup>20</sup>。SCYA4 (MIP-1  $\beta$ : macrophage inflammatory protein-1  $\beta$ ) 也屬於 CC 趨化激素，它是受到嗜伊紅球所分泌的主要基礎蛋白 (major basic protein 簡稱 MBP) 的誘導而產生<sup>21</sup>。這些趨化激素在過敏性氣喘熱證病人中大量表現，造成呼吸道大量發炎細胞的浸潤，在本實驗室先前的動物實驗中發現氣喘熱證小鼠呼吸道中發炎細胞的浸潤明顯比寒證小鼠來的多<sup>22</sup>，可能也與趨化激素的表現有關。

## 伍、結論與建議

過去 1 年，我們已利用 cDNA 微陣列技術完成 95 個過敏氣喘病例 95 種基因表現的分析，已初步獲得成果，其中我們發現有 45 個基因極具進一步開發

研究得價值，同時我們也使用微陣列生物晶片探討過敏性氣喘中醫寒熱證型與基因表現的關係，可以進一步結合傳統醫學中對氣喘的診斷和治療特色，之前我們已建立了氣喘的寒熱證動物模型，並發現寒組、熱組、對照組動物的生理、病理及氣喘免疫反應有差異<sup>39</sup>。過去本實驗室為了進一步掌握〔熱證〕的分析，我們設計了熱證評分系統：“heat scoring system”使中醫師對熱證的評量趨於一致性，並增加再現性，本實驗室曾經測量氣喘血液中的嗜伊伊紅陽性離子蛋白（Eosinophil cationic protein），發現與傳統醫學中的寒熱有著極大的相關性，病患血清中若有大於 15 個/m/濃度的嗜伊紅陽性離子蛋白即會被中醫師分類為“熱證 1”病患，因此我們相信雖然無法確定熱證的確實定義，實驗數據卻能清楚指出有至少 2 群病患。因此，我們針對影響細胞激素 Th1/rh2 平衡的基因，用微陣列（microarray）的方武，試圖在過敏性氣喘的病人中，依中醫傳統辨證的方式探討熱證的病人其相關基因表現的差異，已獲得初步結果。

本研究發現上述基因與熱證評分有的證相關，然而其所代表病理上實質的意義仍需做進一步的探討。首先，為了臨床應用上的方便性考量，本實驗以病人周邊血中的白血球作為研究的材料，然而這並不能看出呼吸道中免疫反應的變化，若為真實反應出氣喘熱證病人的免疫致病機轉，進一步研究呼吸道中的各種基因表現是有其必要的。其次，我們所觀察的層面侷限於訊息 RNA 表現的情形，將來必須更進一步從基因的序列及其多型性，蛋白質的轉譯，免疫基因的生理病理功能，免疫分子間的交互影響等方面來做更多的探討，才能窺見氣喘熱證的實際面貌。然而，在解開氣喘熱證本質的漫長道路上，我們希望先為中醫的證型診斷在主觀的判斷之外，加入客觀的憑據，試圖為明確定義中醫寒熱證型作出努力。同時，這項研究也具有運用於臨床診斷及療效評估的價值。並希望將目前研究基因最有利的技術---生物晶片，應用在中醫基礎理論的研究，為傳統中醫理論研究邁入基因時代跨出一小步。

## 陸、參考文獻

1. Wilson JW, Bamford TL. Assessing the evidence for remodelling of the airway in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 14:229-47,2001.
2. National Heart, Lung and Blood Institute. Global Initiative for asthma. National Institutes of Health pub no 95-3659,1995.
3. Robinson DS, Durham SR, Kay AB. Cytokines in asthma. *Thorax* 48:845-53,1993.
4. Albelda SM. Endothelial and epithelial cell adhesion molecules. *Am J Respir Cell Mol Biol* 4:195-203,1991.
5. Horwitz RJ, Busses WW. Inflammation and asthma. *Clin Chest Med* 16:583-602,1995.
6. Debouck C, Goodfellow PN. DNA microarrays in drug discovery and development. *nature genetics supplement* 21:48-50,1999.
7. 李杰芬：基因組學發展對中醫證實質研究的啟示。上海中醫藥雜誌 2：11-13，2001。
8. Rogge L, Bianchi E, Biffi M, Bono E, Chang SYP, Alexander H, Santini C, Ferrari G, Sinigaglia L, Neeb M, Mous J, Sinigaglia F and Certa U. Transcript imaging of the development of human T helper cells using oligonucleotide arrays. *Nature Genetics* 25: 96-101,2000.
9. Asa K. Heterogeneity of bronchial asthma. Sub-populations--or different stages of the disease. *Allergy*. 36:3-14,1981.
10. 游明謙、許清祥、羅明謙、楊舒渝、李克成、張恆鴻：過敏性鼻炎中醫證型與血清嗜伊紅性陽離子蛋白之關係。中國醫藥學院雜誌 8：19-26，1999。
11. Hochino M, Sim J, Shimizu K, Nakayama H, Koya A. Effect of AA-2414, a thromboxane A2 receptor antagonist, on airway inflammation in subjects with asthma. *J ALLergy Clin Immunol*. 103:1054-61,1999.
12. Unoki M, Furuta S, Onouchi Y, Watanabe O, Doi S, Fujiwara H, Miyatake A, Fujita K, Tamari M, Nakamura Y. Association studies of 33 single nucleotide polymorphisms (SNP) in 29 candidate genes for bronchial asthma: positive association a T924C polymorphism in the thromboxane A2 receptor gene.

- Human genetics. 106:440-446,2000 .
- 13.Muro S, Taha R, Tsicopoulos A, Olivenstein R, Tonnel AB, Christodoulopoulos P, Wallaert B, Hamid Q. Expression of IL-15 in inflammatory pulmonary disease. J allergy clin immunol. 108:970-5,2001.
  - 14.Sampson AP. The role of eosinophils and neurophils in inflammation. Clin Exp allergy 30 Suppl 122-7,2000.
  - 15.Kodama T, Matsuyama T, Kuribayashi K, Nishioka Y, Sugita M, Akira S, Nakanishi K Okamura H. IL-18 deficiency selectively enhances allergen-induced eosinophilia in mice.J Allergy Clin Immunol 105:45-53,2000.
  - 16.Kayaba H, Chihara J. Eosinophils and related chemokines. Rinsho-Byori. 49:370-5,2001.
  - 17.Velazquez JR, Lacy P, Moqbel R. Replenishment of RANTES mRNA expression in activated eosinophils from atopic asthmatics. Immunology 99:591-9,2000.
  - 18.Chihara J. The roles of adhesion molecules, cytokines and chemokines in allergic inflammation.Rinsho-Byori 45:519-27,1997.
  - 19.Panina-Bordignon P, Papi A, Mariani M, Di Lucia P, Casoni G, Bellettato C, Buonsanti C, Miotto D, Mapp C, Villa A, Arrigoni G, Fabbri LM, Singaglia F.The C-C chemokine receptors CCR4 and CCR8 identify airway T cells of allergen-challenged atopic asthmatics. J Clin Invest. 107:1357-64,2001.
  - 20.Berin MC, Eckmann L, Broide DH, Kagnoff MF.Regulated production of the T helper 2-type T-cell chemoattractant TARC by human bronchial epithelial cells in vitro and in human lung xenografts.Am J Respir Cell Mol Biol. 24:382-9,2001.
  - 21.Shahan TA, Sorenson WG, Paulauskis JD, Morey R, Lewis DM.Concentration- and time-dependent upregulation and release of the cytokines MIP-2, KC, TNF, and MIP-1alpha in rat alveolar macrophages by fungal spores implicated in airway inflammation.Am J Respir Cell Mol Biol. 18:435-40,1998.
  - 22.呂春美、黃曉薇、賴銘淙、李明憲、許清祥,過敏性氣喘寒熱證型動物模型之建立。中醫藥雜誌 12:155-164, 2000.

## 柒、圖、表

Table 1. 熱證評分表

熱證	發生頻率或嚴重度	評分
口渴喜冷飲	時常	2
	偶爾	1
	無	0
大便秘結	時常	2
	偶爾	1
	無	0
小便黃	時常	2
	偶爾	1
	無	0
面紅	明顯	2
	稍微	1
	無	0
唇紅	明顯	2
	稍微	1
	無	0
目赤	明顯	2
	稍微	1
	無	0
舌質紅	明顯	2
	稍微	1
	無	0
舌苔	黃膩	2
	薄黃	1
	不黃	0

Table2. 熱證評分與基因表現量的無母數相關分析

Gene	Mean± SD	Range	Heat	Aas Score	FEV <sub>1</sub>	ECP
TBXA2R	8.65± 3.38	0.14- 264.70	<b>0.312</b> (.010) **	<b>0.202</b> (.050)* **	<b>0.268</b> (.027) **	<b>0.201</b> (.054)*
Eotaxin	0.03± 0.01	0.00- 1.43	-0.058 -0.64	-0.05 -0.613	0.055 -0.658	0.079 -0.456
STAT2	0.09± 0.03	0.00- 2.83	-0.14 -0.256	-0.085 -0.412	-0.022 -0.618	0.112 -0.289
<b>GBP2</b>	2.68± 0.92	0.14- 65.2	0.197 -0.108	<b>0.24</b> (.019) **	<b>0.242</b> (.046) **	0.144 -0.172
<b>Metallothionein</b>	6.68± 2.58	0.12- 202.25	0.197 -0.108	<b>0.171</b> (.098)* **	<b>0.25</b> (.040) **	<b>0.266</b> (.010) **
<b>CD2</b>	16.55± 7.51	0.48- 513.29	<b>0.246</b> (.043) **	0.14 -0.175	<b>0.284</b> (.019) **	<b>0.173</b> (.099)*
<b>IL-15</b>	0.48± 0.19	0.00-17.2	<b>0.338</b> (.005) **	<b>0.255</b> (.013) **	<b>0.372</b> (.002) **	<b>0.202</b> (.053)*
<b>IL-18</b>	4.39± 1.74	0.03± 122.35	<b>0.233</b> (.056)*	<b>0.189</b> (.066)*	<b>0.259</b> (.033) **	<b>0.227</b> (.029) **
<b>RANTES</b>	8.84± 3.37	0.57± 224.50	<b>0.414</b> (.000) **	<b>0.204</b> (.047) **	0.33 -0.006	<b>0.225</b> (.031) **
<b>SCYA4</b>	6.95± 2.77	0.18± 203.05	<b>0.315</b> (.009) **	<b>0.229</b> (.026) **	<b>0.282</b> (.020) **	<b>0.186</b> (.076)*
<b>SCYA17</b>	5.93± 2.31	0.07- 154.35	<b>0.373</b> (.002) **	<b>0.307</b> (.002) **	<b>0.291</b> (.016) **	0.171 -0.104

Note. \*\*  $P < 0.05$ , \*  $P < 0.1$

**Table 3. 熱證評分的回歸模式**

Model	Variable (Gene Type)	標準化係數 (Beta)	F Value (P value)	R square
Heat	TBXA2R	0.49		
	Eotaxin	1.23		
	STAT2	0.93		
	GBP2	5.00		
			<b>15.14</b>	0.706
	Metallothionein	0.88	<b>(&lt;0.001) **</b>	
	CD2	-3.25		
	IL-15	2.24		
	IL-18	-12.59		
	RANTES	6.50		
	SCYA4	-2.24		
	SCYA17	1.19		

**Note.** Heat = 0.49 (TBXA2R) + 1.23 (Eotaxin) + 0.93 (STAT2) + 5.00 (GBP2) + 0.88 (Metallothionein) - 3.25 (CD2) + 2.24 (IL-15) - 12.59 (IL-18) + 6.50 (RANTES) - 2.24 (SCYA4) + 1.19 SCYA17

**Note 2.** 該模式具顯著意義 (P<0.05)，且可解釋約 70.6% 的變異量

Fig. 1 熱證評分分布圖

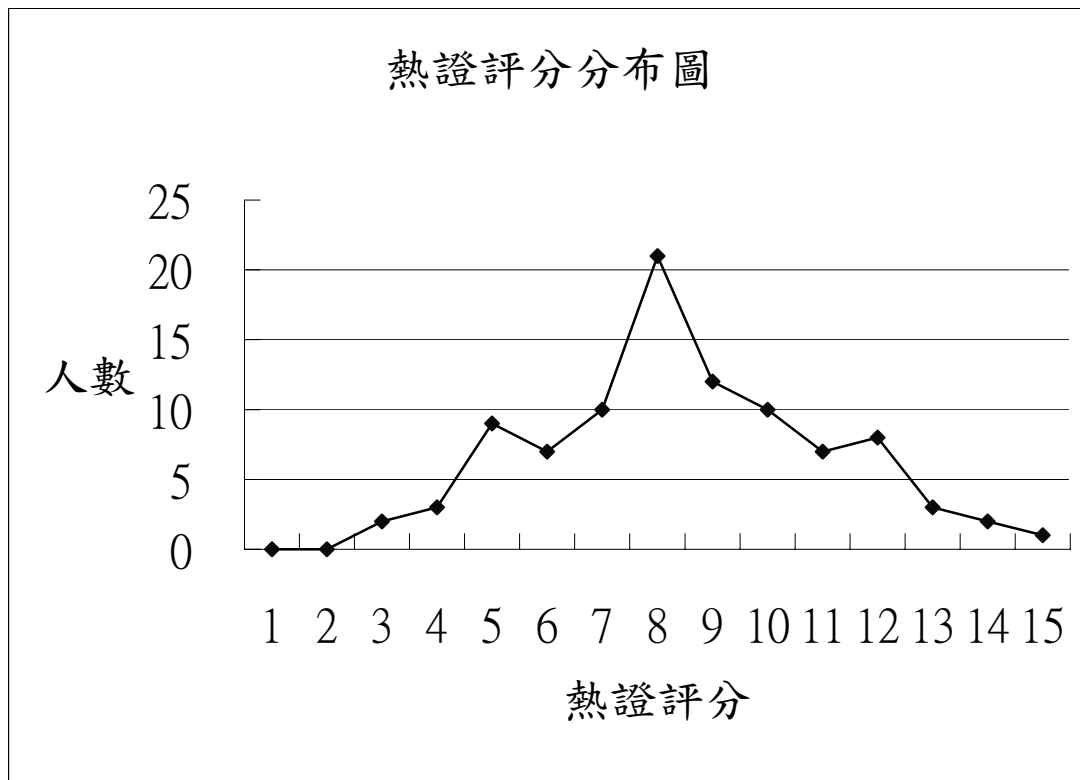
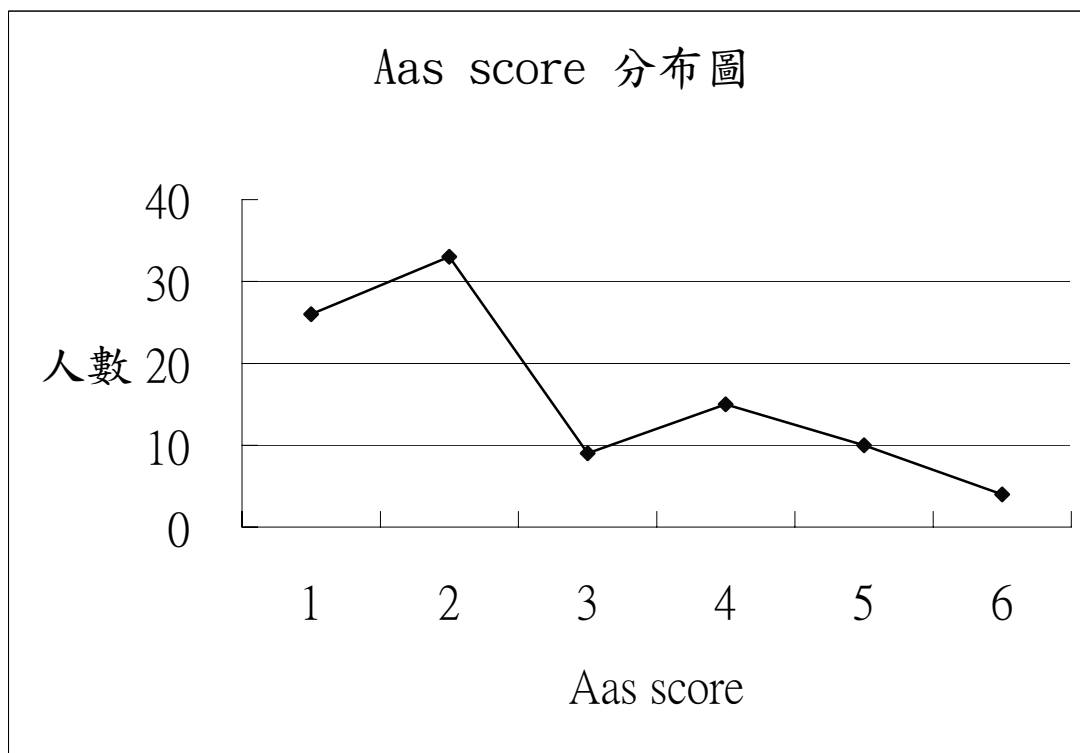
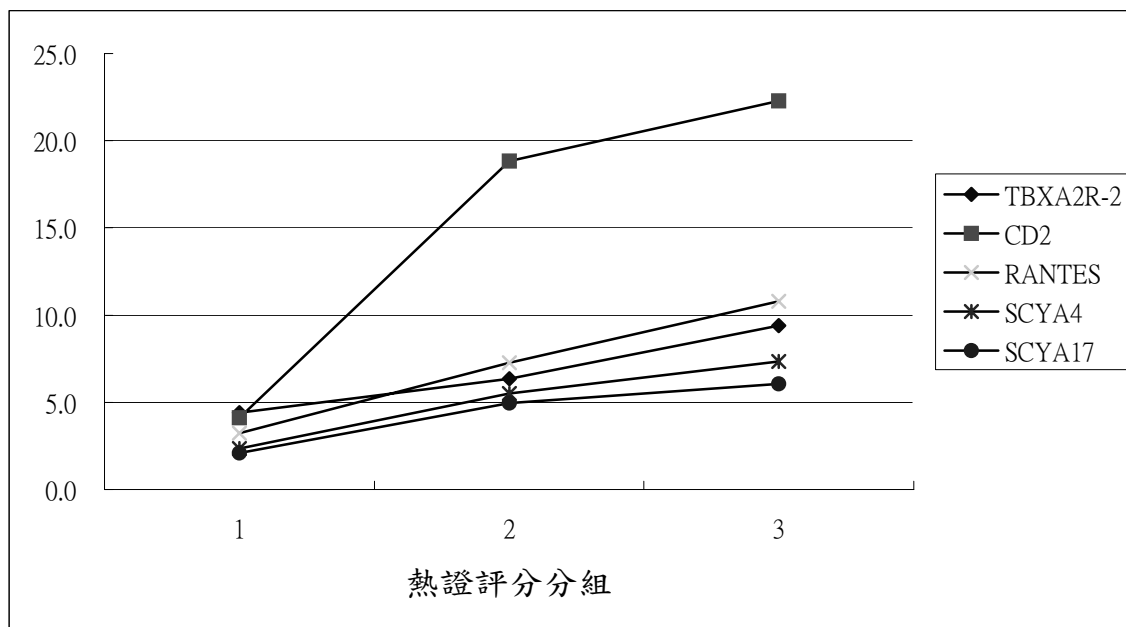


Fig. 2 Aas score分布圖





**Fig.3 熱證評分分組與基因表現量之無母數相關分析**



Note. 第 1 組為熱證證評分 2-5  
 第 2 組為熱證證評分 6-9  
 第 3 組為熱證證評分 10-14

**Fig. 4 Aas Score與基因表現量之無母數相關分析**

