

編號：CCMP93-RD-054

中醫理論寒藥對人體白血球影響的 分子機轉探討

陳光偉

中國醫藥大學中國醫學研究所

摘 要

我們在去年度以黃芩、黃連、黃柏培養人類腎細胞 HEK293，分析其所影響的基因上升或下降比現。今年度我們擬以志願者口服以上三項中藥後檢測在體內的基因影響。我們的實驗方法是以三名志願者服用黃芩每天 12 克，連續 7 天後，比較服藥前後的白血球基因表現，我們得到黃連、黃柏以同樣方式進入後續研究，我們得到其基因資料後再比較其去年的體外實驗資料，再往後的研究中我們將利用蛋白質體學的領域來研究其蛋白質的表現，以檢視其基因蛋白的互相關連性，在檢視基因蛋白的正確表現後可利用來規劃檢驗中藥的品質或新藥的開發。

關鍵詞：中醫、中藥、體質、寒熱、DNA 微陣列、質譜儀、SNP

Number : CCMP93-RD-054

The study of the molecular mechanism in cold herb to human white blood cells

Guang-Wei Chen

China Medical University

ABSTRACT

In last year, we get the gene expression in HEK293 cells that treated by cold Herbs (黃芩, 黃連, 黃柏). This year we will arrange same methods in vivo. Three volunteers received 黃芩 12g for 7 days. We get the white blood pre and post medication then we sent to microarray for research the differentiation of pre and post medication. At last we try to get the difference in vivo and vitro data, also we will take the research in proteomic for compared the genomic and proteomic. The same condition will apply to another Herbs then may be used to new drugs discovery.

Keywords: Herbs, Chinese medicine, body character, cold and heat, DNA Microarray, SNP

壹、前言

國內外有關中醫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（如人蔘、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）；但利用多種有相同的藥性中藥來研究其與基因表現的關係，進而研究中醫辨證法的研究，則未有所聞。

本實驗室在過去幾年中與中研究生醫所白果能博士、徐松焜博士合作，利用 DNA 微陣列研究陸續完成了桂附八味丸與六味地黃丸的基因調控的差別，大蒜成份 DADS 與大腸癌細胞的基因表現影響，肉桂、乾薑、附子三種熱性藥對人類腎細胞 HEK293 cell 的基因表現影響，黃芩、黃連、黃柏三種寒性藥對人類腎細胞 HEK293 cell 的基因表現影響。所以，今年度我們將進入人體試驗我們將把黃芩、黃連、黃柏三種寒藥利用口服方式投藥後，利用 DNA 微陣列方法檢測這三種寒藥對人體白血球的基因表現影響。

貳、材料與方法

本計劃在經過本校人體試驗委員會評審通過後開始進行，首先是徵求 3 名志願者，以黃芩為第一次的實驗藥物，黃芩每天每次 4 克口服（順天科學中藥）連續 7 天結束療程。療程前及療程後各抽血 100 cc 分離其白血球並抽取 mRNA 後送 DNA 微陣列分析服藥前後的基因變化、每次的晶片分析以三片為準則，同樣方法對黃連、黃柏亦同，以得到基因的不同表現之後，比較其兩兩不同寒藥間，如黃芩與黃柏、黃柏與黃連、黃連與黃芩間的同異（前三十名及後三十名基因的表現）。我們得到以上的資料後再與上年度體外細胞培養資料比較。我們從體外的實驗資料希望能得到結果，讓我們知道寒藥群的中藥那些會加強或減低那些基因的功能，進而我們可以從中藥的寒性中藥的功能評估或新藥的開發來研究及發展。受試者服用中藥後血液的分析方法如下：

（一）受試者服藥前後的血液準備

志願 3 名於研究前做完整的病例詢問如家族史、疾病史等，在正常生活情形下，服用中藥黃連每日 12 克，分三次服用連續七天後抽血研究。同樣情形在經過一週的休息後再次服用黃芩、黃柏。

（二）全量 RNA 抽取法

服藥前及服藥第七天後，抽靜脈血 50cc，於培養皿中加入 1ml 之 4M GITC homogenization buffer (5.3 M guanidine-HCL; 1.5 Triton-X100; 2.5mM Tris-HCL, pH 7.5; 0.25mM EDTA) 以溶解細胞，以均質器打破細胞，再利用 25 號針頭之針筒將大分子 DNA 打斷，每 0.5 毫升細胞溶解液分裝於微量離心管，以等體積於細胞溶解液之苯酚 (phenol, 與 water saturate, pH 4.0)、0.1ml 氯仿 (chloroform) 與 0.5 μ l 醋酸鈉溶液 (2M, sodium acetate, pH 4.8) 並於冰上反應 15 分鐘，經於 4 $^{\circ}$ C 離心 (20,000 \times g) 20 分鐘後收集上清液，並以兩倍體積之絕對酒精沉澱之，經微量離心並去除上清液後半乾燥 RNA 並以 50 μ l 之 DEPC 處理過之去離子水溶劑之，並以分光光度計定量。

（三）純化 mRNA Dynal beads

1. 取含有 75 μ g 的 total RNA 溶液，將此溶液體積以 DEPC water 調整至 100 μ l。
2. 取 100 μ l Binding beffer 加入此 RNA 溶液，混合均勻後置於 65 $^{\circ}$ C 2 分鐘，再迅速置於冰上。

3. 此時取 200 μ l (約含有 1mg) 的 Dynabeads Oligo (dT) 25 移至一新的離心管，將此管置於 Dynal MPC 磁座上。
4. 30 秒後，待 Dynabeads 均被磁附在管底，移除上清液，取下離心管並加入 100 μ l Binding buffer，混合均勻，將此管置於 Dynal MPC 上。
5. 重複步驟 4，移除上清液，取下離心管置再加入 100 μ l Binding beffer，取步驟 2 之 RNA 溶液混合均勻，並將此管置於 roller machine 上，在室溫下轉動 5 分鐘，使 mRNA 吸附於 Dynabeads 上。
6. 將離心管置於 Dynal MPC 上，待 Dynabeads 均被磁附在管底，移除上清液，加以 200 μ l Washing Buffer B，混合均勻，將此管置於 Dynal MPC 上。
7. 重複步驟 6，移除上清液，加入 20 μ l DEPC water，與 Dynabeads 混合均合，將離心管置於 75 $^{\circ}$ C 水浴中 2 分鐘，迅速置於 Dynal MPC 上，待 Dynabeads 均被磁附在管底，即可移出純化之 mRNA 溶液 (估計約 2 μ g)。

(四) 標示互補 DNA 與微陣列晶片雜交反應

將 50 μ l 之 RNA 以反轉錄標示試劑組標示藥物反應組與對照組之樣品，將 RNA 與 oligo (dT) 引子於 70 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘後，加入含螢光或酵素標定之核酸、反應緩衝液與反轉錄 (4 μ l MgCl₂, 25mM; 2 μ l 10 \times RT-buffer; 2 μ ldNTP, 10mM each; 0.5 μ l Rnasin, 50 U/ μ l; and 0.5 μ l AMV-RT, 30 U/ μ l) 後於 42 $^{\circ}$ C 反應 1 小時，反應結束後將樣品以 72 $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘終止反轉錄反應必保存於 -20 $^{\circ}$ C 備用。將以反轉錄探針，經加熱 90 $^{\circ}$ C 兩分鐘後迅速加入 cDNA 微陣列晶片，於 65 $^{\circ}$ C 恆溫水槽反應隔夜，經雜交反應後以沖洗緩衝液(0.5 \times SSC, 0.01% SDS) 清洗晶片，再經由序列的高專一性沖洗緩衝液 (0.5 \times SSC, 0.01% SDS; 0.06 \times SSC) 清洗非專一性雜教樣品後，以晶片掃瞄器 (Genepix 4000B Array scanner) 與晶片分析軟體 (Genepix pro 4.0 Array Analysis Software) 分析之。

參、結果

黃連口服共同下調 8 倍基因

Gene Name	Gene Title_Affymetrix
243141_at	hypothetical protein MGC26963
237403_at	growth factor independent 1B (potential regulator of CDKN1A, translocated in CML)
234897_s_at	---
228325_at	KIAA0146 protein
228195_at	hypothetical protein MGC13057
228181_at	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1
227180_at	hypothetical protein FLJ23563
223809_at	regulator of G-protein signalling 18
222923_s_at	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 3
220832_at	toll-like receptor 8
220751_s_at	chromosome 5 open reading frame 4
218711_s_at	serum deprivation response (phosphatidylserine binding protein)
216015_s_at	cold autoinflammatory syndrome 1
214469_at	histone 1, H2ae
214349_at	Homo sapiens transcribed sequences
213338_at	Ras-induced senescence 1
212531_at	lipocalin 2 (oncogene 24p3)
212148_at	pre-B-cell leukemia transcription factor 1
211506_s_at	---
210773_s_at	formyl peptide receptor-like 1
210517_s_at	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12
210254_at	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3 (hematopoietic cell-specific)
208792_s_at	clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J)

208791_at	clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J)
208601_s_at	tubulin, beta 1 /// tubulin, beta 1
207550_at	myeloproliferative leukemia virus oncogene
207085_x_at	colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage)
206414_s_at	development and differentiation enhancing factor 2
206207_at	Charot-Leyden crystal protein
205513_at	transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)
205463_s_at	platelet-derived growth factor alpha polypeptide
204627_s_at	integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)
203680_at	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta
202859_x_at	interleukin 8
202007_at	nidogen (enactin)
201904_s_at	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like
201110_s_at	thrombospondin 1
201108_s_at	thrombospondin 1
201044_x_at	dual specificity phosphatase 1
201005_at	CD9 antigen (p24)
1565162_s_at	microsomal glutathione S-transferase 1
1558214_s_at	catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa
1555745_a_at	lysozyme (renal amyloidosis)
1555214_a_at	C-type (calcium dependent, carbohydrate-recognition domain) lectin, superfamily member 12
1554892_a_at	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3 (hematopoietic cell-specific)
1554175_at	triggering receptor expressed on myeloid cells 5

黃連口服共同上調 8 倍基因

Gene Name	Gene Title_Affymetrix
244539_at	Homo sapiens transcribed sequences
240626_at	Homo sapiens transcribed sequences
215639_at	SH2 domain containing 3C

肆、討論

黃連體內的實驗 2 倍差上調的基因有 70 個基因，2 倍差下調的有 252 個基因，如果定為 8 倍差則上調有 3 個基因，下調有 8 個基因，這個現象與體外的研究，有其共通性就是寒性。中藥對細胞的上調功能較少而大部份的功能為下調抑制為主。在體內 8 倍差與體外前 30 名基因上下調都沒找到相同基因，但在體內 2 倍差體外前 200 倍的基因不論上下調則有許多共同之表現。

伍、結論與建議

我們連續兩年來利用基因晶片的方法來探討中藥寒性藥物對人類細胞基因的影響。結論是寒藥對人類的細胞其下調的影響比上調的影響還大，也就是說寒藥大部份的功能是抑制減低其功能，使其代謝減緩及功能降低，雖然我的基因 cluster 分類亦可看到其影響功能的不同，例如比較明顯影響的有鈣離子結合傳遞類，細胞激素合成類巨噬細胞白血球活化類，ATP 合成類較有影響。利用這些經驗與資料，我們建議可以從中藥對人體體質寒熱的區別作一更深入的基因比較。

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-054 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. Chen JJ, Wu R, Yang PC, Huang JY, Sher YP, Han MH, Kao WC, Lee PJ, Chiu TF, Chang F, Chu YW, Wu CW, Peck K. Related Articles Profiling expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection. *Genomics*. 1998 Aug 1; 51(3):313-24.
2. Gening LV, Klincheva SA, Gusev AS, Surovoy AY, Potapov VK. SSCP screening of individual aptamers. *Biotechniques* 2001 Oct; 31(4):828, 830, 832, 834.
3. Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH, Aebersold R. Related Articles Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol*. 1999 Oct; 17(10):994-9.
4. Izumoto S, Ohnishi T, Kanemura H, Arita N, Maruno M, Moriuchi T, Suzuki S, Yoshimine T. PTEN mutations in malignant gliomas and their relation with meningeal gliomatosis. *J Neurooncol* 2001 May; 53(1):21-6.
5. Oda Y, Nagasu T, Chait BT. 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.

