

編號：CCMP96-RD-201

以基因體研究平臺為基礎進行防治肝病相關中藥之研究(2-2)

侯庭鏞

中國醫藥大學

摘 要

研究目的：

中醫利用方劑及單味藥治療肝病已有長久的經驗，例如小柴胡湯、龍膽瀉肝湯、三黃瀉心湯等，都是常見的治肝病方劑。雖然這些中草藥療法已有長久的臨床使用經驗，不過許多中草藥的作用機制並不清楚，而且中草藥於新藥開發的應用仍有很大的發展空間。

研究方法：

本計畫主要利用 DNA 微陣列為工具，分析中草藥對細胞基因的生物活性反應，以建立一套完整的中藥生物活性基因圖譜資料庫，並將資料庫應用於中草藥之作用機轉、傳統中醫藥之現代藥性、新藥的開發及臨床前藥物安全性之分析。

結果與討論：

在中藥生物活性基因圖譜資料庫方面，我們已建立一套標準操作流程來執行，標準操作流程包括細胞加藥或是動物給予藥物的流程管控、萃取 RNA 時的細胞狀況管控、萃取 RNA 的質和量的管控、DNA 微陣列實驗以及數據分析過程的品質管控等。在中藥生物活性基因圖譜資料庫的建立及分析方面，我們已經進行健保常用方藥及肝病常用方藥之轉錄體學分析。將這些方藥給予小鼠，萃取肝臟和腎臟的 RNA 進行 DNA 微陣列分析，再藉由 Pathway 分析後，發現除了代謝相關的 pathways 以外，antigen processing and presentation pathways 及 IGF signaling pathways 也受到這些方藥的調控與影響。而在疾病相關性的分析方面，發現與方藥相關的前 30 名 MeSH disease terms 主要是與 diabetes-associated、cardiovascular 以及 hepatic 相關的疾病。另外，連結方藥與 Connectivity Map 的基因表現圖譜，發現方藥與抗癌、抗發炎以及抗氧化方面的西藥或化合物有較高的相似性。最後，我們分析毒理相關基因的表現，我們藉助 223 個化學藥物所構建的 toxicology-related cDNA 微陣列的資料庫，比對方藥處理至動物腎臟毒理代謝相關基因的表現情形，發現兩者趨勢不同且圖譜相距甚遠。因此，我們認為中醫方

藥在 toxicology-related genes 的基因圖譜表現上與化學藥物是有所區別的，也表示，中醫方藥處理至實驗動物後，其藥物在腎臟毒理方面是無顯著急性顧慮的。其他常用肝病方藥之生物活性基因圖譜正在持續擴充及分析中，未來預計開發新的生物資訊程式用以進行中藥方劑與疾病和西藥相關性的分析，進一步則期望能將中藥生物活性基因圖譜資料庫所含的大量資訊和既有的傳統中醫知識做整合與對應。

關鍵詞：肝病、中草藥、DNA 微陣列

Number: CCMP96-RD-201

Research and Development of Chinese Medicinal Herbs for Anti-Liver Diseases by the Genomic-Based Platform (2-2)

Tin-Yun Ho

China Medical University

ABSTRACT

Aim:

Although several herbal formulae and herbal components have been used in patients with liver diseases, their applications in new drug development remain to be discovered.

Method:

We applied microarray technology to analyze and explain the modern biological activities of medicinal herbs. The gene expression databases established in this project further provided the basis for the herb-activity relationship, modern definition of Traditional Chinese Medicine (TCM), new drug development, and preclinical drug safety analysis.

Results and Discussion:

The gene expression databases were established according to the standard operation protocols, including quality controls of drug treatment, cells, RNA extraction, microarray, *etc.* Microarray data have been used to establish and analyze the gene expression profiles of herbal formulae that are regularly used in the treatment of liver diseases in TCM. Mice were orally administered with herbal extracts, and the gene expression signatures from livers and kidneys were analyzed by DNA microarray. By Pathway analysis, we found that herbal formulae affected metabolism-related pathways as well as antigen processing and presentation pathways and IGF signaling pathways. Connectivity Map analysis showed that top 30 MeSH disease terms related to the gene expression signatures of herbal formulae were diabetes-associated diseases, cardiovascular diseases, and hepatic diseases. Moreover, the gene expression profiles of herbal formulae were similar to the ones of drugs or compounds with anti-cancer,

anti-inflammatory, and anti-oxidative abilities. Finally, clustering analysis of gene expression signatures from herbal formulae and toxicology-related database from 223 chemicals showed that herbal formulae and 223 chemicals belonged to two different clusters. These findings indicated that administration of herbal formulae did not induce acute nephro-toxicological effects in mice. In conclusion, the microarray-based gene expression database of herbs can provide a translation platform for TCM and scientific knowledge.

Keywords: liver diseases, Chinese medicinal herbs, DNA microarray

壹、前言

肝臟所引起的疾病，例如酒精性肝炎 (alcoholic liver disease, ALD)、肝炎 (hepatitis)、肝硬化 (cirrhosis) 與肝細胞腫瘤 (hepatocellular carcinoma, HCC) 等，嚴重影響人類健康生活，尤以 HCC 名列全球第五大癌症形成之危險因子 (Llovet et al., 2003)，亞洲與非洲地區統計出大約每 10 萬人中就有 500 個 HCC 的案例 (Llovet et al., 2003)；另外，肝病相關的酒精性肝炎在西方國家是導致死亡很常見的原因之一 (Lieber, 1993)。然而，中醫領域對於肝病的治療在早些年前已有許多研究，例如小柴胡湯 (sho-saiko-to or xiao-chai-hu-tang) 與龍膽瀉肝湯 (long-dan-tan) 是治療慢性肝病的常用藥方 (Chou et al., 2003; Hsu et al., 2006)。即使目前中醫對於治療肝病已有明確的方劑，但是，對其治療疾病的機轉仍然不明，因此，本計畫希望利用 DNA 微陣列技術 (microarray) 進一步導引分析其藥物的生物療效功能以及詮釋藥物治療的機轉。

DNA 微陣列技術在 1995 年就被大量使用於篩選基因的表現上，是解析基因的重要工具 (Schena et al., 1995)。DNA 微陣列技術在探討基因圖譜上可被應用於指紋分析圖譜 (fingerprints) 與癌症的搜尋研究；例如，給予不同環境生長的酵母菌經 DNA 微陣列技術分析後，發現其擁有不同的基因表現圖譜 (Gasch et al., 2000)，相關的研究已被應用於果蠅的基因體學研究計畫有關中樞神經系統發展的主題 (Altenhein et al., 2006)，並定義出免疫系統相關的調控行為 (Gilchrist et al., 2006)。DNA 微陣列技術在臨床上也被應用於腫瘤特性的研究與分型 (Sorlie et al., 2001; Pomeroy et al., 2002; Pittman et al., 2004)，或是比較經由藥物治療的細胞與組織的基因表現 (Perou et al., 2000; Ross et al., 2000; Scherf et al., 2000; Ramanathan et al., 2005; Bild et al., 2006)。此外，在藥物治療領域中，已有大量針對藥物治療疾病的相關基因表現圖譜被分析定義，進一步解釋其作用機轉。有此可知，目前 DNA 微陣列技術在 *in vitro* 表現圖譜分析的平台，可被大量應用於治療標的篩選 (Scherf et al., 2000; Gunther et al., 2003)。

中醫治療疾病的觀念實際應用了幾千年，臨床上中醫治療存在著體質個別差異的問題，至今仍無法釐清藥物作用的分子機轉。然而，近年來 DNA 微陣列技術被應用在探討方藥之間基因表現圖譜的差異，例如 PC-SPES 是由八個單味藥組成：黃芩 (*Scutellaria baicalensis*)、甘草 (*Glycyrrhiza glabra*)、靈芝 (*Ganoderma lucidum*)、板藍根 (*Isatis indigotica*)、三七 (*Panax pseudo-ginseng*)、菊花 (*Dendranthema morifolium*)、茜草 (*Rabdosia rebescens*) 與扇形棕櫚 (*Serenoa repens*)。PC-SPES 可作為前列腺癌患者的替代療法 (Kubota et al., 2000; Small et al., 2000)，而由基因表現圖譜也

顯示，干擾參與細胞週期、細胞結構與男性賀爾蒙反應基因的表現，可能是造成 PC-SPES 細胞毒性的原因 (DiPaola et al., 1998; Bonham et al., 2002)。另外，中藥方劑相關研究如六味地黃丸已被應用於抗老化之研究上，經由 DNA 微陣列明確指出，六味地黃丸可以與保護神經細胞、增強神經細胞分化以及神經生長相關基因有密切關聯，並藉由表現這些基因以增強記憶力之保存 (Hsieh et al., 2003; Rho et al., 2005)。薑黃素 (curcumin) 是薑黃 (*Curcuma longa*) 的主要組成分，可作為香料，使得咖哩具有特殊的味道與顏色，也可作為化妝品或是藥品製備過程中的材料。薑黃素在動物體內具有抑制腫瘤生成的活性 (Huang et al., 1988)。利用 DNA 微陣列技術分析其作用機轉，發現薑黃素抗癌的機制主要是藉由調控與癌細胞分化相關基因的表現，進而抑制癌細胞的生長 (Chen et al., 2004)。

中草藥的萃取液是由許多不同的化合物所組成，而每一種化合物擁有不同的生物活性，使得目前進行活性成分的分析仍屬不易。但是，藉由 DNA 微陣列技術可以高密度大量篩選不同方藥之間基因表現圖譜的差異，進一步對方藥之間做藥物作用機轉、生物療效功能或是副作用的分析定義。所以，DNA 微陣列相關技術分析工具對於傳統中草藥，除了應用於確認疾病的致病機轉外，在新藥開發平台以及藥物安全性使用的分析上，更具其發展的潛力與價值。

貳、材料與方法

一、寡核苷酸 DNA 基微陣列

寡核苷酸 DNA 基因微陣列 (Whole Genome OneArray™) 購自 Phalanx Biotech Group (Hsinchu, Taiwan)。Whole Genome OneArray™ 包含 32,050 個寡核苷酸探針，每個探針是由 60-mer 的寡核苷酸設計而成。這些探針中，2,820 個探針屬於 Biocarta 和 KEGG 資料庫有註解的基因，18,824 個探針用於補足所有 CGAP 資料庫有註解的基因，加入 3,276 個探針使得 Entrez gene probes collection 更完整，進一步補充 3,783 個屬於 Unigene v175 新註解的基因，最後，加入 2,265 個由實驗新定義出的探針和 1,082 個用於內部控制的探針，以建構成全部的 32,050 個寡核苷酸探針。

二、細胞培養

人類肝癌細胞株 (HepG2) 購自食品工業發展研究所 (Hsinchu, Taiwan)。HepG2 細胞分泌 α -fetoprotein 並且沒有 B 肝病毒基因體 (Knowles and Aden, 1983)。基因重組的 HepG2/AP-1 和 HepG2/NF- κ B 細胞分別帶有 AP-1 和 NF- κ B responsive elements 驅動的 luciferase 基因，其建構方法如之前報告所述 (Hsiang et al., 2005)。細胞培養在 75 平方公分的培養瓶中，內含添加 10% 去活化胎牛血清 (FBS) (HyClone, Logan, UT, USA)，100 μ g/ml streptomycin 和 100 unit/ml penicillin 的 Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)。而培養環境為 37°C，5% CO₂ 的培養箱。

三、藥物處理

甘草甜素 (glycyrrhizin)、水飛薊 (silymarin)、熊去氧膽酸 (ursodeoxycholic acid) 等中藥相關化合物購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)。其它相關中醫方藥購自 GMP 藥廠 (Taipei, Taiwan)。甘草甜素、水飛薊、熊去氧膽酸溶解於 dimethyl sulfoxide 並保存在 -30°C。在動物給藥部份，以中醫方藥餵食小鼠 28 天 (相當於 3 天療程的 10 倍人體劑量)，取小鼠身上各個器官組織，以 DNA 微陣列分析其基因所受到的波動及變化，進而導引對於特定疾病的治療上，能增加中藥選擇的適當性及投予的效果。

四、3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 分析

MTT 購自 Sigma 並溶解在 phosphate buffered saline (PBS) (137 mM NaCl, 1.4 mM KH₂PO₄, 4.3 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, pH 7.2) 中。細胞存活率以之前報告所述的 MTT 呈色法監測 (Lee et al., 2007)。將細胞培養在 96 孔盤。經過 24 小時，37°C 的培養之後，以不同濃度的化合物或藥

物加入細胞中，繼續培養 24 小時。然後，十分之一體積的 5 mg/ml MTT 加入培養基中。經過 4 小時，37°C 的培養之後，加入等量細胞培養體積，溶於異丙醇的 0.04 N HCl 以溶解 MTT 結晶而呈色。其 570 nm 波長的吸光值以 microplate reader 測得。細胞存活率 (%) 以 (藥物處理組細胞的 OD 值/溶液處理組細胞的 OD 值) 計算得到。以抑制 50% 細胞存活率的藥物濃度作為 TC₅₀ 劑量。

五、Total RNA 萃取

我們利用 RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) 進行細胞 total RNA 的萃取。接著，利用 Beckman DU800 分光光度計 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) 進行 total RNA 的定量。對於 A260/A280 比值大於 1.8 的樣品，進一步利用 Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 評估其 total RNA 品質。只有當樣品的 RNA integrity number 高於 8.0 時，才會用於下述的微陣列實驗分析。

六、微陣列實驗分析

5 µg 的 total RNA 樣品先利用 MessageAmp™ aRNA kit (Ambion)，經由試管內轉錄 (*in vitro* transcription) 的步驟加以放大。放大的 RNA (amplified RNA, 簡稱 aRNA) 再和 Cy5 染劑進行化學反應，並將 Cy5 染劑標定到 aRNA 上，使得 aRNA 成為帶有螢光標定的標的物。螢光標定完成後，利用蓋玻片和 Phalanx 公司所提供的雜合反應緩衝劑 (hybridization buffer)，將螢光標定的標的物與 Human Whole Genome OneArray™ 進行雜合反應。於 50 °C 下，經過一夜的雜合反應之後，藉由三次清洗步驟將非專一性結合的標的物從晶片上清除。接著將晶片以離心的方式使之乾燥，並利用 Axon 4000 掃描器 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 進行螢光強度的掃描。我們使用 genepix 4.1 軟體 (Molecular Devices) 對晶片上每一點的 Cy5 螢光強度進行分析。每一點的訊號經由扣除周圍背景值的方式校正其強度。我們刪除作為內在控制的探針 (probe) 或是訊雜比 (signal-to-noise ratio) 小於零的點。通過這些門檻的點藉由 R 程式的 limma package 進行歸一化 (normalization) (Smyth, 2005)。在 quinoclamine 的實驗中，我們分析歸一化所得的藥物代謝相關基因的表現變化倍率，以評估藥物安全性。我們由 “The Pharmacogenetics and Pharmacogenomics Knowledge Base” (<https://www.pharmgkb.org/index.jsp>) 網站得到 219 個藥物代謝相關基因。這些基因中，alcohol dehydrogenases, aldehyde dehydrogenases, 和 cytochrome P450 families 屬於 phase I 藥物代謝基因。而 phase II 藥物代謝基因包括 glutathione S-transferases, sulfotransferase families, 和 UDP glycosyltransferase families 等。此外，歸一化的資料分別使用 limma package (Smyth, 2005) 或 NIA Array Analysis tool (Sharov et al., 2005) 計算並尋找

表現有統計差異的基因。接著，將表現有差異的基因表單送到 Gene Ontology Tree Machine 網頁 (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/gotm/>) 進行 Gene Ontology 分析，以找出這些受調控的基因所影響的細胞行為模組。Gene Ontology Tree Machine 是一個在網路上使用，以基因群組 (gene set) 為分析基礎的資料探勘工具 (Zhang et al., 2005)。在三黃瀉心湯的實驗中，我們進一步使用 R 程式的 PGSEA package，從擷取自 Molecular Signature Database web site 的 522 個基因群組 (gene sets) 中，進行統計並找出表現有差異的基因群組 (http://www.broad.mit.edu/gsea/msigdb/msigdb_index.html) (Kim and Volsky, 2005)。這些表現有差異的基因群組中的基因再藉由 TIGR Multiexperiment Viewer (<http://www.tm4.org/index.html>; Eisen et al., 1998) 進行階層式叢集分析 (hierarchical clustering analysis) 用以展現這些基因在三黃瀉心湯與其單方成分的基因表現圖譜。最後，我們利用 BiblioSphere Pathway Edition 軟體 (Genomatix Applications, <http://www.genomatix.de/index.html>) 建構表現有差異基因之間的交互作用網路 (interaction network)。我們利用 BiblioSphere Pathway Edition 軟體分析 NF- κ B 下游基因與藥物所調控基因之間的交互作用網路。BiblioSphere Pathway Edition 軟體以知識庫分析為基礎，整合了文獻探勘 (literature mining)、基因註解分析和啟動子 (promoter) 序列分析來建構基因交互作用網路 (Seifert et al., 2005)。各部分實驗的重複數皆為三次。

參、結果

第一部份 利用 DNA 微陣列為工具，分析中草藥對細胞基因的生物活性反應，建立一套完整的中藥生物活性基因圖譜資料庫之實驗綱要規劃

中醫利用方劑及單味藥治療肝病已有長久的經驗，例如小柴胡湯、龍膽瀉肝湯、三黃瀉心湯等，都是常見的治肝病方劑。雖然這些中草藥療法已有長久的臨床使用經驗，不過許多中草藥的作用機制並不清楚，而且中草藥於新藥開發的應用仍有很大的發展空間。本研究主要利用 DNA 微陣列為工具，分析中草藥對細胞基因的生物活性反應，以建立一套完整的中藥生物活性基因圖譜資料庫，並將資料庫應用於中草藥之作用機轉、傳統中醫藥之現代藥性、新藥的開發及臨床前藥物安全性之分析。本研究藉由中草藥處理細胞或是動物組織的基因微陣列分析來建立基因表現圖譜資料庫(圖一)。此基因表現圖譜資料庫會藉由中草藥處理細胞或是動物組織的基因微陣列分析來建立。此基因資料庫將能夠提供標的療效的資訊、臨床前新藥之安全性分析、藥物活性成分關聯以及傳統中藥中草藥的新穎應用。

第二部份 利用 DNA 微陣列為工具，分析中草藥對細胞基因的生物活性反應，建立一套完整的中藥生物活性基因圖譜資料庫之標準流程設定

實驗室利用 DNA 微陣列為工具，分析中草藥對細胞基因的生物活性反應，藉此建立一套完整的中藥生物活性基因圖譜資料庫之標準流程。標準流程的設定為下列 5 大項目，包含細胞控管、RNA 的品管監控、中藥與細胞交互作用之原則、cDNA 之製備以及資料系統分析之細部參數等(圖二)。

- 一、細胞控管，包含細胞株訂購，必須符合食品工業發展研究所之品管、繼代次數須少於 20 代、繼代的比值= 1:2 及維持細胞型態的正確性。
- 二、RNA 的品管監控必須符合 total RNA 回收量座落於 30~40 $\mu\text{g per } 25\text{-cm}^2$ flask、RNA O.D 260/280 >1.8 及 Aglient 2100 Bioanalyzer RIN 8~10。
- 三、中藥與細胞交互作用之原則必須符合細胞型態與存活率之儘可能精準測量管控。
- 四、cDNA 之製備必須符合 cDNA 合成度 >13 ng/ μl 及標定的效率~15 /1000 nt。
- 五、資料系統分析之細部參數必須符合 PMT 電壓 < 900 V、MA 點過濾後 <75% 基因偏差、可用基因 >12,000 及過濾 SNR532 >0 & SNR635 >0。

第三部份 利用 DNA 微陣列為工具，分析中草藥對細胞基因的生物活性反應，建構中醫肝病相關方藥的生物活性資料庫，並將資料庫應用於中草藥之作用機轉、傳統中醫藥之現代藥性、新藥的開發及臨床前藥物安全性之分析。

一、中醫方藥的生物活性資料庫之建構(本項目之部分結果發表於 *Molecular Pharmacology* 及 *Journal of Ethnopharmacology*)

藉由中醫方藥處理細胞或動物體之後，以全基因體表現圖譜之分析為基礎，建構生物資訊資料庫的平台，用以比較中醫方藥之間的活性圖譜(圖三)。中藥包括複方、單味藥及重要中藥化合物，複方包含小柴胡湯、甘露飲、甘露消毒丹、加味逍遙散、知柏地黃丸、柴胡疏肝湯、柴胡清肝湯、茵陳蒿湯、茵陳五苓散、龍膽瀉肝湯與六味地黃丸、川芎茶調飲、小柴胡湯、小青龍湯、五苓散、六味地黃丸、加味逍遙散、辛夷清肺湯、桂枝湯、茵陳蒿湯、麻杏甘石湯、疏經活血湯、葛根湯、銀翹湯、豬苓湯以及獨活寄生湯；單味藥包含桂枝、葛根麻黃、柴胡、大黃、半夏、黃連、黃芩、厚朴、乾薑、當歸、甘草、梔子、茵陳蒿、吳茱萸、杜仲、丹參、川芎、益母草、肉蓯蓉、當歸、龜鹿以及黃耆等。中藥化合物則包括甘草甜素(glycyrrhizin)、水飛薊(silymarin)、熊去氧膽酸(ursodeoxycholic acid)、vanillin 以及 genipin 等。

二、常用肝病方劑之活性成分—甘草甜素、水飛薊、熊去氧膽酸於保肝作用的路徑

甘草甜素、水飛薊及熊去氧膽酸通常被廣泛的用在治療肝臟的失調，像是 C 型病毒肝炎的感染、初期的膽囊硬化、或是肝細胞癌等。在本研究中，我們使用微陣列分析這三種化合物對人類肝腫瘤細胞的基因表現圖譜。藉由 Pathway 的分析顯示，這三種化合物影響不同的生理路徑，也調節神經的傳遞、葡萄糖與脂肪的代謝。另外，這三種化合物共同影響 252 個基因的表現，而藉由 Network 分析，也發現 NF- κ B 為基因調節網路的中心，多數與 NF- κ B 相連的基因，包括 BID、SOD2 與 TAK1 基因等，都具有抗氧化或是抗凋亡的活性(圖四)。進一步的分析顯示，這三種化合物在無細胞毒殺的狀況下，都會抑制 NF- κ B 的活性。所以，這些結果顯示甘草甜素、水飛薊及熊去氧膽酸的保肝作用可能是藉由調控肝腫瘤細胞凋亡與抗氧化的方式，此外，參與保肝作用的關鍵分子即為 NF- κ B。

三、以肝病常用方劑為基礎，建構中醫肝病相關方藥的生物活性資料庫，並將資料庫應用傳統中醫藥之現代藥性分析

我們選取中醫常用肝病代表方劑，包括小柴胡湯、甘露飲、甘露消毒丹、加味逍遙散、知柏地黃丸、柴胡疏肝湯、柴胡清肝湯、茵陳蒿湯、茵陳五苓散、龍膽瀉肝湯與六味地黃丸等(表一)，利用 DNA 微陣列為工具，分析中草藥對細胞基因的生物活性反應。將其共同為上調或是下調的基因進行 MetaCore 的分析，在疾病病程關聯的結果中呈現出這些基因與許多肝臟疾病的形成有密切關聯，這些肝病包括了肝炎、藥物性慢性肝炎、中毒性肝炎等(表二)。進一步將中醫肝病相關方劑與肝臟疾病進行關聯，這些肝臟疾病包括肝炎、慢性肝炎、病毒性肝炎、肝腫瘤及肝硬化等，發現這些方劑對不同的肝病呈現不同的相關性，代表這些肝病方劑可能適用於

不同病程的疾病的治療上，而這項結果也可以做為中醫肝病方劑治療不同肝病之使用建議（表三）。

四、小柴胡湯、加味逍遙散、茵陳蒿湯和六味地黃丸與其它常用複方的比較

（一）中藥複方作用路徑的分析

我們以 DNA 微陣列分析，以闡釋並比較老鼠肝臟對小柴胡湯、加味逍遙散、茵陳蒿湯和六味地黃丸與其常用複方之活體反應。首先，我們利用“gene Set Test”分析經過中藥複方餵食後，實驗動物肝臟的哪些生物路徑受到轉錄調節。先依據分類排定生物路徑的次序，再作複方的 clustering（圖五）。多數複方對肝臟許多代謝相關路徑的積分是正的，代表多數複方均可上調許多代謝過程，而且小柴胡湯、加味逍遙散、茵陳蒿湯和六味地黃丸等常用肝病方劑具基因表現圖譜的群聚性。

（二）小柴胡湯、加味逍遙散、茵陳蒿湯和六味地黃丸與其常用複方對藥物代謝相關基因圖譜的影響

為了評估經過中藥處理之實驗動物的腎臟受藥物代謝影響的情形，我們分析屬於 phase I 與 phase II 藥物代謝酵素的基因表現程度。Phase I 藥物代謝基因包括 alcohol dehydrogenases、aldehyde dehydrogenases 以及 cytochrome P450 families；而 phase II 藥物代謝基因包括 glutathione S-transferases、sulfotransferase families 以及 UGT families。就大部份中藥複方而言，只有少數的 cytochrome P450 基因會被調控，而有一些 glutathione S-transferases 及 UGTs 基因被大部分的複方微幅上調（圖六）。這些發現顯示中藥複方的使用會影響到與抗氧化及與藥物排除有關的 phase I 及 phase II 藥物代謝基因。

（三）小柴胡湯、加味逍遙散、茵陳蒿湯和六味地黃丸與其常用複方對藥物毒理相關基因圖譜的影響

為了分析複方的使用是否具有腎毒性的潛能，我們比較 EDGE website 裡 toxicology-related cDNA microarray 的 1518 個基因在 223 個化學毒物與複方的基因表現圖譜之差異，此比較的結果以階層式叢集分析來呈現（圖七）。階層式叢集分析顯示，除了川芎茶調散之外的中藥複方，其表現出來的圖譜距離彼此都非常接近，並且複方均遠離大部分的化學毒物。進一步分析基因圖譜發現這些化學毒物與複方影響的基因表現模式是截然不同的。因此，根據基因表現圖譜，我們認為中藥複方在毒性相關基因的基因圖譜表現與化學毒物是有所區別的，代表中醫方藥處理至實驗動物後，其藥物在腎臟毒理方面是無顯著急性顧慮的。

肆、討論

在本研究中，我們應用微陣列工具進行分析，提供中醫藥在治療潛能的預測、臨床前藥物安全性的分析、藥物活性的關聯以及現代醫學的詮釋。我們利用 pathway analysis 找出在中藥中醫肝病相關方藥處理的肝組織當中調控生物事件的項目。此外，也找出大部分中藥複方所影響到的 pathways，包括 antigen processing、antigen presentation、IGF signaling 以及 glutathione metabolism，這些相關 pathways 及其基因群組皆受到中藥複方的調控與影響。為詮釋可能的治療標的方向，我們將中醫肝病相關方藥處理實驗動物肝臟的基因表現圖譜，進一步進行關於疾病病程以及藥性的分析。最後，我們將中藥複方有關藥物代謝相關基因表現圖譜與已建構之化學藥物的基因圖譜做比對，完成臨床前藥物安全性的基因表現檢測分析。

在 antigen processing 以及 antigen presentation 相關的 pathway 中，其相關的基因多屬於 major histocompatibility complex class I (MHC-I)，包括 H2-Q1、H2-Q2、H2-Q5、H2-Q6、H2-Q7、H2-Q8、H2-K1 以及 H2-T23，這些基因在中醫肝病相關方藥處理實驗動物肝臟中的表現多為上調之趨勢。MHC-I antigen presentation pathway 在幾乎所有種類的細胞均是活化的，以便提供一個在細胞表面呈現蛋白質一段特定胜肽的機轉，而該胜肽可隨時在細胞合成 (Jensen, 2007)。MHC-I antigens 在宿主免疫系統與癌細胞的交互作用中扮演很重要的角色，它們能夠呈現與腫瘤細胞有關的胜肽，作為抗原提供給毒殺型 T 細胞，以及調節自然殺手細胞的細胞毒殺活力 (Purcell and Elliott, 2008)。因此，由毒殺型 T 調控的 internal protein 可以偵測辨認並毒殺腫瘤細胞所釋放出來的抗原 (Jensen, 2007)。此外，由 MHC-I antigen 所獲得的最佳 peptide ligand，對病毒及癌細胞產生免疫能力而言是極為重要的 (Aptsiauri et al., 2007)。所以，實驗結果顯示中醫肝病相關方藥大部分都能夠經由 MHC-I antigen presentation pathway 來調節對病毒以及腫瘤細胞的免疫力。

除了 antigen processing 與 antigen presentation，insulin-like growth factor (IGF) 訊息傳遞路徑在基因圖譜的表現也屬於上調結果。此外，我們也發現在多數中藥複方處理的實驗動物肝臟中，IGF1 的基因表現呈現上調。更且，我們的分析顯示，中醫肝病相關方藥所調節的前 30 個疾病，皆與糖尿病相關疾病、心血管相關疾病以及肝病密切關聯。其中，排序前 30 的疾病種類裡，就有 6 個與 IGF1 的調控有關係，包括糖尿病、心肌梗塞、直腸癌、肝硬化以及動脈粥狀硬化。先前的研究有觀察到微循環 IGF1 的量與心肌梗塞的風險上升、第二型糖尿病以及動脈硬化病程的發展有關 (Vaessen et al., 2001; Schut et al., 2003; Yazdanpanah et al., 2006)。IGF1 gene microsatellite

複製多樣性在初期膽囊硬化所導致的骨質疏鬆症裡被發現，另外，IGF1 的增加或補充有益於膽囊硬化症的改善，它能夠抑制纖維化的發生以及作為肝臟的保護因子 (Lakatos et al., 2004; Tutau et al., 2008)。由上述結果顯示，中醫肝病相關方藥中，大多數的複方經由上調 IGF 訊息傳遞路徑以及 IGF1 基因，而與數種糖尿病相關疾病、心血管疾病以及肝病相關聯。

除了分析疾病的關連性外，我們進一步聯結至化學藥物的資料庫，分析中醫肝病相關方藥是否與化學藥物相關。藉由 The Connectivity Map 的分析，顯示中藥中醫肝病相關方藥與化學藥物，在抗癌、抗發炎、抗氧化以及降血糖存在著緊密的關聯性。在這些化學藥物中，fulvestrant 主要作為停經婦女 hormone receptor-positive 轉移性乳癌中拮抗雌激素的治療藥物 (Chia et al., 2008)。17-Allylamino-geldanamycin 可與 Hsp90 結合，在臨床前研究模式中，呈現抗癌活性及可預期的生物活性，且現在已進行多方面的 phase II 臨床試驗 (Stepczynska et al., 2001; Tsutsumi and Neckers, 2007)。Staurosporine 是 protein kinase C 的抑制劑，在人類神經母細胞瘤中能夠提高 cAMP-mediated reponse 的表現，且有治療癌症的潛能 (Sasaki et al., 1995; Stepczynska et al., 2001)。Sirolimus 是一個相當新的免疫抑制劑，它能夠抑制 cytokine-stimulated T 細胞的細胞週期 G1 phase 至 S phase 過程必需的訊息傳遞路徑，從而抑制 interleukin 所驅動的 T-cell 之增生。因此，Sirolimus 可以預防器官移植過程中所產生的排斥反應，以及應用在某些自體免疫的紊亂 (Ingle et al., 2000; Morelon et al., 2001)。白藜蘆醇 (resveratrol) 有許多有益健康的效用，如抗癌、抗老化、神經保護、抗氧化以及抗血管新生方面皆已報導過 (Cao et al., 2005; Marambaud et al., 2005; Baur and Sinclair, 2006; Baur et al., 2006)。Troglitazone 屬於 thiazolidinedione 類藥物，具有強氧化及抗發炎的作用，為胰島素的增敏劑，且是 peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) 的促進劑，擁有部分 PPAR γ 促進劑的活性 (Aljada et al., 2001; Ghanim et al., 2001)。基於基因表現圖譜的相似性，我們認為中醫肝病相關方藥在實驗動物體內可能具有抗癌、抗發炎、抗氧化以及抗糖尿病的作用。

中藥複方所調控之另一訊息傳遞路徑是 glutathione metabolism。此一路徑中一些 glutathione S-transferase (GST) 相關的基因，包括 Gstm1、Gstm5 以及 Gstm6，在多數中醫肝病相關方藥所處理的實驗動物的腎臟中是上調的；且其他基因如 Gstm3、Gsta2 與 Gstt1 在許多複方所處理的實驗動物的腎中也是上調的。在這一路徑中的 Glutathione peroxidase 相關基因如 Gpx3、Gpx4 以及 Gpx1，在許多複方處理的實驗動物腎臟中也是上調的。GSTs 被認為能夠促進 xenobiotics 的藥物代謝 phase II 的生物轉化反應，藥物、毒物以及化合物經常在 phase I 與 (或) phase II 藥物代謝時進行某些程度的結構

修飾，最終排出體外。這時，GSTs 藉由以還原態的 glutathione 與 xenobiotics 鍵結的方式促進這一類的代謝，以加速 xenobiotics 溶解於水溶性的胞內與胞外環境，並且以此方式排出體外 (Hayes et al., 2005)。此一活性對於內生性化合物如過氧化脂質的解毒作用以及 xenobiotic 類的代謝均是非常有用的 (Sharma et al., 2004)。Glutathione peroxidase 是擁有過氧化酶活性的酵素家族，其主要的生物角色為保護機體免於氧化的傷害，其生化功能是藉由還原 lipid hydroperoxides 至其相應的醇以及還原游離型的 hydrogen peroxide 成為水分子 (Margis et al., 2008)。因此，我們的發現暗示中藥複方可能經由 glutathione 的代謝途徑而涉及到抗氧化的過程。DNA microarray 已經被應用於評估藥物代謝及毒性 (Gerhold et al., 2001; Hayes et al., 2005)。在此，我們分析這中醫肝病相關方藥在 phase I 與 phase II 藥物代謝相關基因的表現。結果顯示，除了部分的 GST 基因在藥物代謝中呈現上調的趨勢之外，少數 cytochromes P450 與部份 UGT family 1 基因也是呈現上調的趨勢。Cytochromes P450 是 external monooxygenases, Monooxygenases 催化一個氧分子的氧原子進入一個基質，並伴隨著還原另一個氧原子進入水分子 ($\text{RH} + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$) (Bernhardt, 2006)。許多化學物質，包括藥物，能夠誘發或是抑制 cytochrome P450 酵素的機能，從而改變自己或其他化學物質的代謝 (Elbarbry et al., 2008)。UGT superfamily 包含了 UGT1 與 UGT2 這兩種主要的類型，以及 UGT1A、UGT2A 與 UGT2B 這三種亞型 (Mackenzie et al., 1997)。酵素 UGT 能夠催化 glucuronidation 的代謝反應而使得藥物分子更具親水性，藉此使得藥物分子易於排出體外 (Ouzzine et al., 2003)。在許多案例中，glucuronidation 經常能夠破壞 pharmacological activity，經由中藥複方上調 UGTs 可能可以加強 UGT-mediated glucuronidation，並促進藥物的排出體外。因此，我們的發現暗示，中醫肝病相關方藥會影響實驗動物腎臟中的藥物代謝。而且，DNA 微陣列已經被應用於評估藥物的毒性，且 EDGE 是一個共享的毒理基因體學資訊的標準資料庫，且被運用於發展高效能的化學分類及危險預測的演算系統 (Hayes et al., 2005)。所以，我們將中醫肝病相關方藥與 EDGE 的化學物的基因表現圖譜進行比較以闡明藥物毒性。我們的結果顯示，中醫肝病相關方藥與 EDGE 的化學物在毒性相關基因的基因表現圖譜呈現差異性。此結果建議中藥常見方藥對實驗動物的基因表現圖譜其並未具己之肝腎毒性基因表現圖譜。

伍、結論與建議

一、本計畫之新發現或新發明

利用 DNA 微陣列為工具，分析中草藥對細胞基因的生物活性反應，以建立一套完整的中藥生物活性基因圖譜資料庫，並將資料庫應用於中草藥之作用機轉、傳統中醫藥之現代藥性、新藥的開發及臨床前藥物安全性之分析。

本研究在中醫方藥的生物活性資料庫之建構方面，部分結果已發表於 *Molecular Pharmacology* (Liang et al., 2009) 及 *Journal of Ethnopharmacology* (Su et al., 2009)。

二、計畫對民眾具教育宣導或中醫藥從業人員之繼續教育成果

中醫利用方劑及單味藥治療肝病已有長久的經驗，例如小柴胡湯、龍膽瀉肝湯、三黃瀉心湯等，都是常見的治肝病方劑。雖然這些中草藥療法已有長久的臨床使用經驗，不過許多中草藥的作用機制並不清楚，而且長期服用中草藥對人體的毒性也仍待釐清。因此藉由本計畫的執行，期望可以了解肝病常用中草藥的作用機制及毒性，並進一步提供中醫臨床用藥的準則及提供民眾中草藥毒性的訊息。

三、計畫對醫藥衛生政策之具體建議

如何將傳統中醫的寶貴經驗利用現代科技的方式加以解釋及傳承，是一件很重要的事。本計畫藉助 DNA 微陣列為工具，分析中草藥對細胞基因的生物活性反應，希望可以藉由這些現代科技，解釋方劑組方的概念，並利用相同生物活性基因圖譜可能具有相同藥性的概念，提供中藥新藥開發之評估平台，此外也可以進一步藉由某些特定基因與毒性具相關性的概念，提供中藥潛在毒性之分析。

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 CCMP96-RD-201 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. Aljada A, Garg R, Ghanim H, Mohanty P, Hamouda W, Assian E, and Dandona P: Nuclear factor-kappaB suppressive and inhibitor-kappaB stimulatory effects of troglitazone in obese patients with type 2 diabetes: evidence of an antiinflammatory action? *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3250-6.
2. Aptsiauri N, Cabrera T, Garcia-Lora A, Lopez-Nevot MA, Ruiz- Cabello F, and Garrido F: MHC class I antigens and immune surveillance in transformed cells. *Int Rev Cytol* 2007; 256: 139-89.
3. Baur JA and Sinclair DA: Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 493-506.
4. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, and Sinclair DA: Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006; 444: 337-42.
5. Bernhardt R: Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J Biotechnol* 2006;124: 128-45. Epub 2006 Mar 3.
6. Bild AH, Yao G, Chang JT, Wang Q, Potti A, Chasse D, Joshi MB, Harpole D, Lancaster JM, Berchuck A, Olson JA Jr, Marks JR, Dressman HK, West M, and Nevins JR: Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature* 2006; 439: 353-357.
7. Bonham M, Arnold H, Montgomery B, and Nelson PS: Molecular effects of the herbal compound PC-SPEs: identification of activity pathways in prostate carcinoma. *Cancer Res.* 2002; 62: 3920-3924.
8. Cao Y, Fu ZD, Wang F, Liu HY, and Han R: Anti-angiogenic activity of resveratrol, a natural compound from medicinal plants. *J Asian Nat Prod Res* 2005; 7: 205-13.
9. Chen HW, Yu SL, Chen JJW, Li HN, Lin YC, Yao PL, Chou HY, Chein CT, Chen WJ, Lee YT, and Yang PC: Anti-invasive gene expression profile of curcumin in lung adenocarcinoma based on a high throughput microarray analysis. *Mol Pharmacol* 2004; 65: 99-110.
10. Chia S and Gradishar W: Fulvestrant: expanding the endocrine treatment options for patients with hormone receptor-positive advanced breast cancer.

- Breas 2008; 3: 16-21.
11. Dhavan R and Tsai LH: A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 749-759.
 12. DiPaola RS, Zhang H, Lambert GH, Meeker R, Licitra E, Rafi MM, Zhu BT, Spaulding H, Goodin S, Toledano MB, Hait WN, and Gallo MA: Clinical and biological activity of an estrogenic herbal combination (PC-SPES) in prostate cancer. *N Eng J Med* 1998; 339: 785-791.
 13. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, and Botstein D: Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14863-14868.
 14. Elbarbry FA, Marfleet T, and Shoker AS: Drug-drug interactions with immunosuppressive agents: review of the in vitro functional assays and role of cytochrome P450 enzymes. *Transplantation* 2008; 85: 1222-9.
 15. Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, and Brown PO. *Mol Biol Cell* 2000; 11: 4241-4257.
 16. Gerhold D, Lu M, Xu J, Austin C, Caskey CT, and Rushmore T: Monitoring expression of genes involved in drug metabolism and toxicology using DNA microarrays. *Physiol Genomics* 2001; 5: 161-70.
 17. Ghanim H, Garg R, Aljada A, Mohanty P, Kumbkarni Y, Assian E, Hamouda W, and Dandona P: Suppression of nuclear factor-kappaB and stimulation of inhibitor kappaB by troglitazone: evidence for an anti-inflammatory effect and a potential antiatherosclerotic effect in the obese. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1306-12.
 18. Gilchrist M, Thorsson V, Li B, Rust AG, Korb M, Kennedy K, Hai T, Bolouri H, and Aderem A: Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4. *Nature* 2006; 441: 173-178.
 19. Guan KL, Jenkins CW, Li Y, Nichols MA, Wu X, O'Keefe CL, Matera AG, Xiong Y: Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* 1994; 8: 2939-2952.
 20. Gunther EC, Stone DJ, Gerwien RW, Bento P, and Heyes MP: Prediction of clinical drug efficacy by classification of drug-induced genomic expression profiles in vitro. *Proc Nat. Acad Sci USA* 2003; 100: 9608-9613.
 21. Gyuris J, Golemis E, Chertkov H, Brent R: Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* 1993; 75: 791-803.
 22. Hayes JD, Flanagan JU, and Jowsey IR: Glutathione transferases. *Annu Rev*

- Pharmacol Toxicol 2005; 45: 51-88.
23. Hsiang CY, Wu SL, and Ho TY: Morin inhibited 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced hepatocellular transformation via activator protein 1 signaling pathway and cell cycle progression. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 1603-1611.
 24. Hsieh MT, Cheng SJ, Lin LW, Wang WH, and Wu CR: The ameliorating effects of acute and chronic administration of LiuWei DiHuang Wang on learning performance in rodents. *Biol Pharm Bull* 2003; 26: 156-161.
 25. Hsu LM, Huang YS, Tsay SH, Chang FY, and Lee SD: Acute hepatitis induced by Chinese hepatoprotective herb, xiao-chai-hu-tang. *J Chin Med Assoc* 2006; 69: 86-88.
 26. Huang MT, Smart RC, Wong CQ, and Conney AH: Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res* 1988; 48: 5941-5946.
 27. Ingle GR, Sievers TM, and Holt CD. Sirolimus: continuing the evolution of transplant immunosuppression. *Ann Pharmacother* 2000; 34: 1044-55.
 28. Jensen PE: Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat Immunol* 2007; 8: 1041-8.
 29. Kim SY and Volsky DJ: PAGE: parametric analysis of gene set enrichment. *BMC Bioinformatics* 2005; 86: 144.
 30. Knowles BB, and Aden DP: Human hepatoma derived cell line, process for preparation thereof, and uses therefor. *US Patent* 1983; 4, 393, 133.
 31. Kubota T, Hisatake J, Hisatake Y, Said JW, Chen SS, Holden S, Taguchi H, and Koeffler HP: PC-SPES: a unique inhibitor of proliferation of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Prostate* 2000; 42: 163-171.
 32. Lakatos PL, Bajnok E, Tornai I, Folhoffer A, Horvath A, Lakatos P, Habior A, and Szalay FL: Insulin-like growth factor I gene microsatellite repeat, collagen type Ialpha1 gene Sp1 polymorphism, and bone disease in primary biliary cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 753-9.
 33. Lee CH, Chen JC, HsiangCY, Wu SL, Wu HC, and Ho TY: Berberine suppresses inflammatory agents-induced interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α productions via the inhibition of I κ B degradation in human lung cells. *Pharmacol Res* 2007; 56: 193-201.
 34. Liang JA, Wu SL, Lo HY, Hsiang CY, and Ho TY: Vanillin inhibits matrix metalloproteinase-9 expression through down-regulation of nuclear factor-

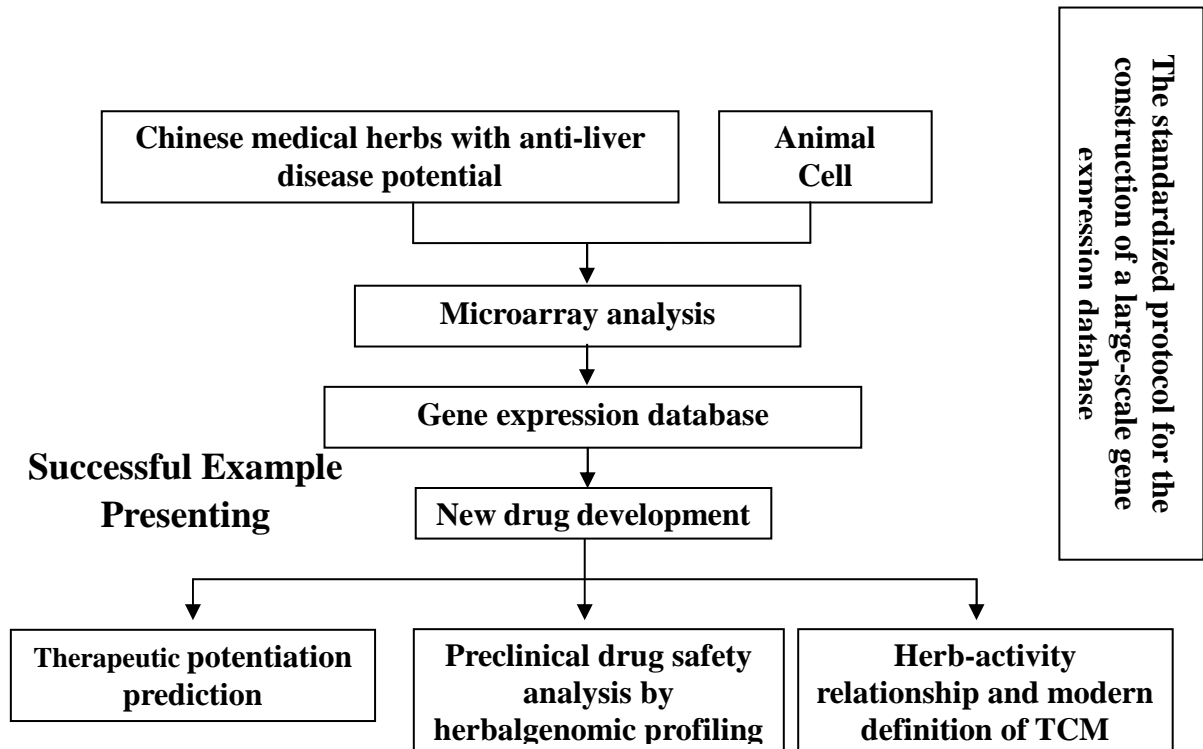
- κ B signaling pathway in human hepatocellular carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 2009; 75: 151-157.
35. Llovet JM, Burroughs A, and Bruix J: Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362: 1907-1917.
36. Mackenzie PI, Owens IS, Burchell B, Bock KW, Bairoch A, Bélanger A, Fournel-Gigleux S, Green M, Hum DW, Iyanagi T, Lancet D, Louisot P, Magdalou J, Chowdhury JR, Ritter JK, Schachter H, Tephly TR, Tipton KF, and Nebert DW: The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* 1997; 7: 255-69.
37. Marambaud P, Zhao H, and Davies P: Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. *J Biol Chem* 2005; 280 : 37377-82.
38. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, and Margis-Pinheiro M: Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS J* 2008; 275:3959-70. Epub 2008 Jul 4.
39. Morelon E, Mamzer-Bruneel MF, Peraldi MN, and Kreis H: Sirolimus: a new promising immunosuppressive drug. Towards a rationale for its use in renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 18-20.
40. Ouzzine M, Barré L, Netter P, Magdalou J, and Fournel-Gigleux S: The human UDP-glucuronosyltransferases: structural aspects and drug glucuronidation. *Drug Metab Rev* 2003; 35: 287-303.
41. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, and Akslen LA. *Nature* 2000; 406: 747-752.
42. Pittman J, Huang E, Dressman H, Horng CF, Cheng SH, Tsou MH, Chen CM, Bild A, Iversen ES, Huang AT, Nevins JR, and West M: Integrated modeling of clinical and gene expression information for personalized prediction of disease outcomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 8431-8436.
43. Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M, Sturla LM, Angelo M, McLaughlin ME, Kim JY, Goumnerova IC, and Black PM Lau C. *Nature* 2000; 415: 436-442.
44. Purcell AW and Elliott T: Molecular machinations of the MHC-I peptide loading complex. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 75-81.
45. Ramanathan A, Wang C, and Schreiber SL: Perturbational profiling of a cell-line model of tumorigenesis by using metabolic measurements. *Proc*

- Natl Acad Sci USA 2005; 102: 5992-5997.
46. Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou, CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, van de Rijn M, and Waltham M. Nat Genet 2000; 24: 227-235.
 47. Sasaki K, Tsukada T, Adachi I, and Yamaguchi K: Staurosporine potentiates cAMP-mediated promoter activity of the vasoactive intestinal polypeptide gene in rat pheochromocytoma PC12 cells. Biochem Biophys Res Commun 1995; 214: 1114-20.
 48. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science 1995; 270: 467-470.
 49. Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, Kohn KW, Reinhold WC, Myers TG, Andrews DT, Scudiero DA, Eisen MB, Sausville EA, Pommier Y, Botstein D, Brown PO, and Weinstein JN: A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. Nat Genet 2000; 24: 236-244.
 50. Schut AF, Janssen JA, Deinum J, Vergeer JM, Hofman A, Lamberts SW, Oostra BA, Pols HA, Witteman JC, and van Duijn CM: Polymorphism in the promoter region of the insulin-like growth factor I gene is related to carotid intima-media thickness and aortic pulse wave velocity in subjects with hypertension. Stroke 2003; 34: 1623-7.
 51. Seifert M, Scherf M, Epple A, and Werner T: Multievidence microarray mining. Trends Genet 2005; 21: 553-558.
 52. Sharma R, Yang Y, Sharma A, Awasthi S, and Awasthi YC: Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. Antioxid Redox Signal 2004; 6: 289-300.
 53. Sharov AA, Dudekula DB, and Ko MS: A web-based tool for principal component and significance analysis of microarray data. Bioinformatics 2005; 21: 2548-2549.
 54. Small EJ, Frohlich MW, Bok R, Shinohara K, Grossfeld G, Rozenblat Z, Kelly WK, Corry M, and Reese DM: Prospective trial of the herbal supplement PC-SPES in patients with progressive prostate cancer. J Clin Oncol 2000; 18: 3595-3603.
 55. Smyth GK Limma: linear models for microarray data. In: Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, and Huber W. Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor 2005; pp.

397–420.

56. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, and Jeffrey SS. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10869-10874.
57. Stepczynska A, Lauber K, Engels IH, Janssen O, Kabelitz D, Wesselborg S, and Schulze-Osthoff K: Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation. *Oncogene* 2001; 10: 1193-202.
58. Su SY, Hsieh CL, Wu SL, Cheng WY, Li CC, Lo HY, Ho TY, and Hsiang CY: Transcriptomic analysis of EGb 761-regulated neuroactive receptor pathway in vivo. *J Ethnopharmacol* 2009, in press.
59. Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Shinya N, Iwamatsu A, Nishida E: Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature* 2001; 410: 215-220.
60. Tsutsumi S and Neckers L: Extracellular heat shock protein 90: a role for a molecular chaperone in cell motility and cancer metastasis. *Cancer Sci* 2007; 98: 1536-9.
61. Tutau F, Rodríguez-Ortigosa C, Puche JE, Juanarena N, Monreal I, García Fernández M, Clavijo E, Castilla A, and Castilla-Cortázar I: Enhanced actions of insulin-like growth factor-I and interferon-alpha co-administration in experimental cirrhosis. *Liver Int* 2008.
62. Vaessen N, Heutink P, Janssen JA, Witteman JC, Testers L, Hofman A, Lamberts SW, Oostra BA, Pols HA, and van Duijn CM: A polymorphism in the gene for IGF-I: functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction. *Diabetes* 2001; 50 : 637-42.
63. Weishaupt JH, Neusch C, Bähr M: Cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) and neuronal cell death. *Cell Tissue Res* 2003; 312: 1-8.
64. Yazdanpanah M, Sayed-Tabatabaei FA, Janssen JA, Rietveld I, Hofman A, Stijnen T, Pols HA, Lamberts SW, Witteman JC, and van Duijn CM: IGF-I gene promoter polymorphism is a predictor of survival after myocardial infarction in patients with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* 2006; 155: 751-6.
65. Zhang B, Kirov S, and Snoddy J: WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: W741-748.

柒、圖、表

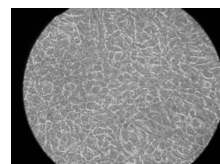


This project will integrate a large-scale database of gene expression profiles of medicinal herbs and molecular pharmacology

圖一、用 DNA 微陣列為工具，分析中草藥對細胞基因的生物活性反應，建立一套完整的中藥生物活性基因圖譜資料庫之實驗綱要規劃。

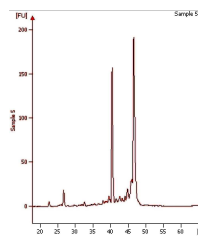
Cell

1. Cells must be purchased from CCRC.
2. Passage number in lab must be less than 20
3. Subculture ratio = 1:2. Cells reach 100% confluence 2 days later.
4. Morphological observation



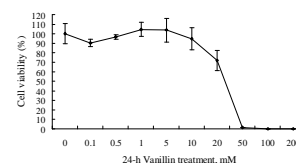
RNA

1. Cell morphology
2. Elution volume (20~25 μ l)
3. Total RNA: 30~40 μ g per 25-cm² flask
4. Concentration: 1.2~2.0 μ g/ μ l
5. O.D 260/280 >1.8 (in TE)
6. Aglient 2100 Bioanalyzer: RIN 8~10



Herb

1. Cells are 100% confluence during herb treatment
2. Morphological observation and cell viability

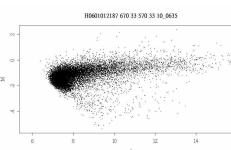


cDNA

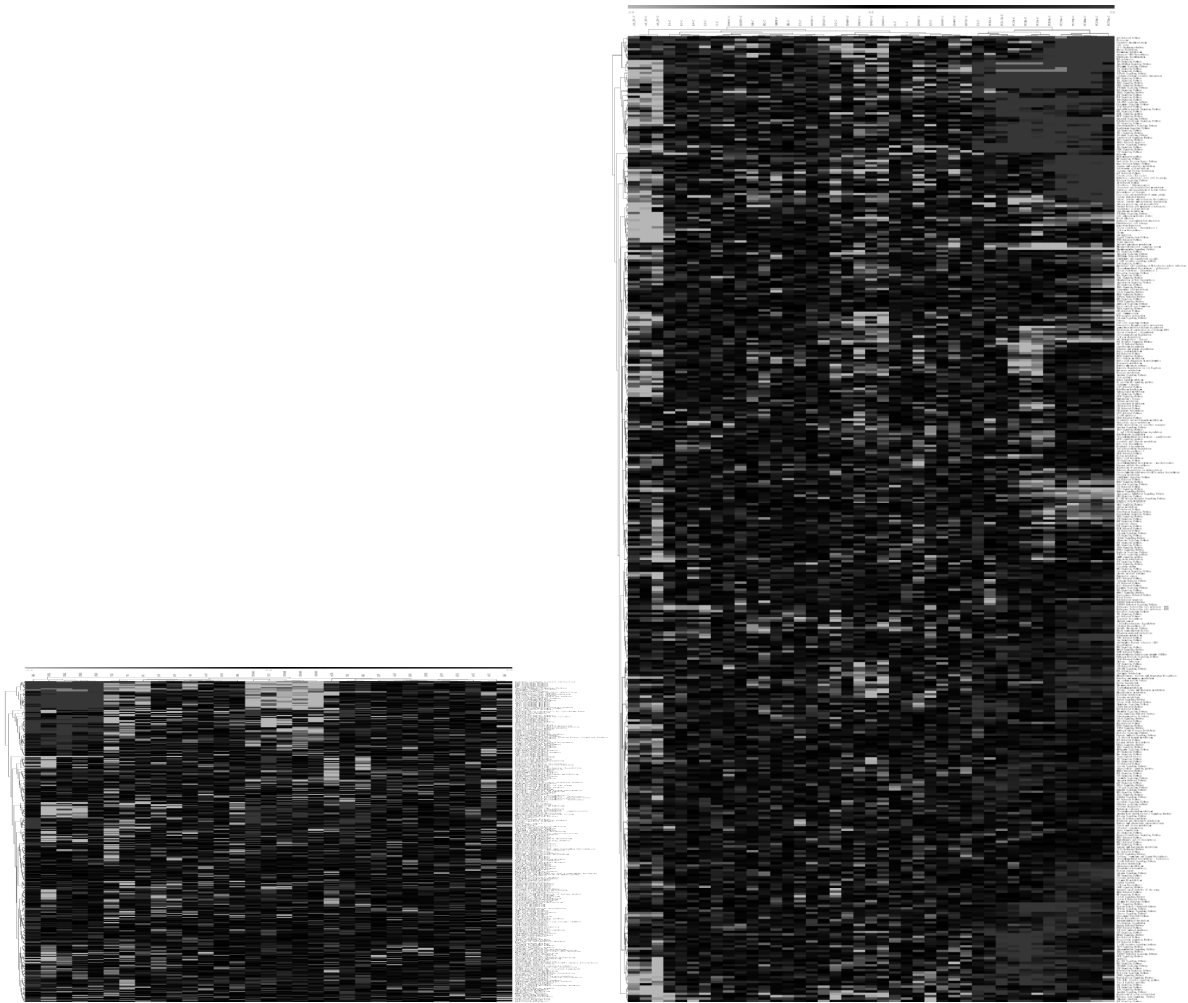
1. Elution volume: 70~80 μ l
2. Concentration: >13 ng/ μ l
3. Incorporation efficiency: ~15/1000 nt

Scan/Data analysis

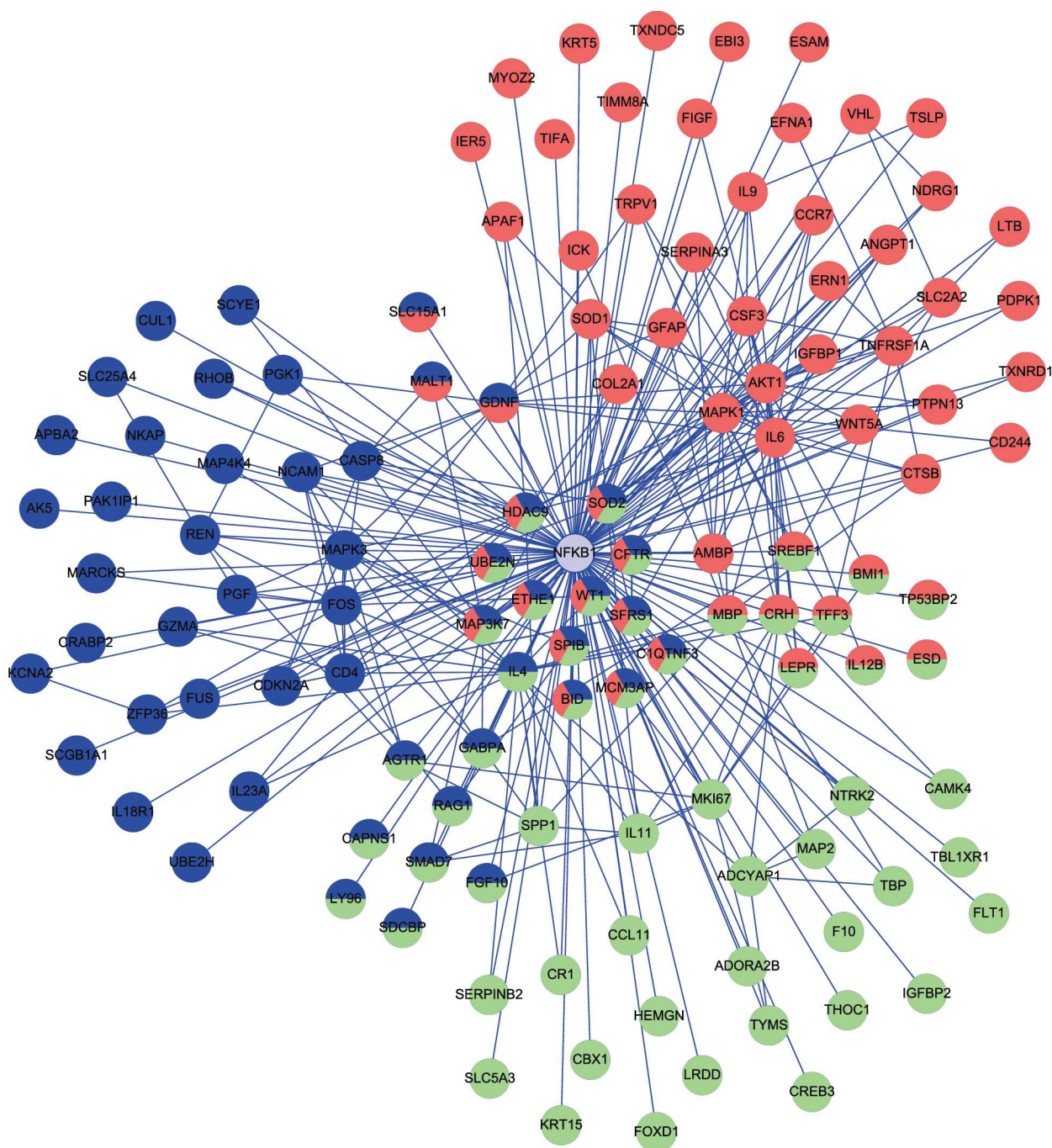
1. PMT voltage < 900 V
2. MA plot: after filtration < 75% genes biased
3. Usable genes > 12,000
4. Filtration: (1) exclude control genes; (2) Flags > 0; (3) SNR532 > 0 & SNR635 > 0



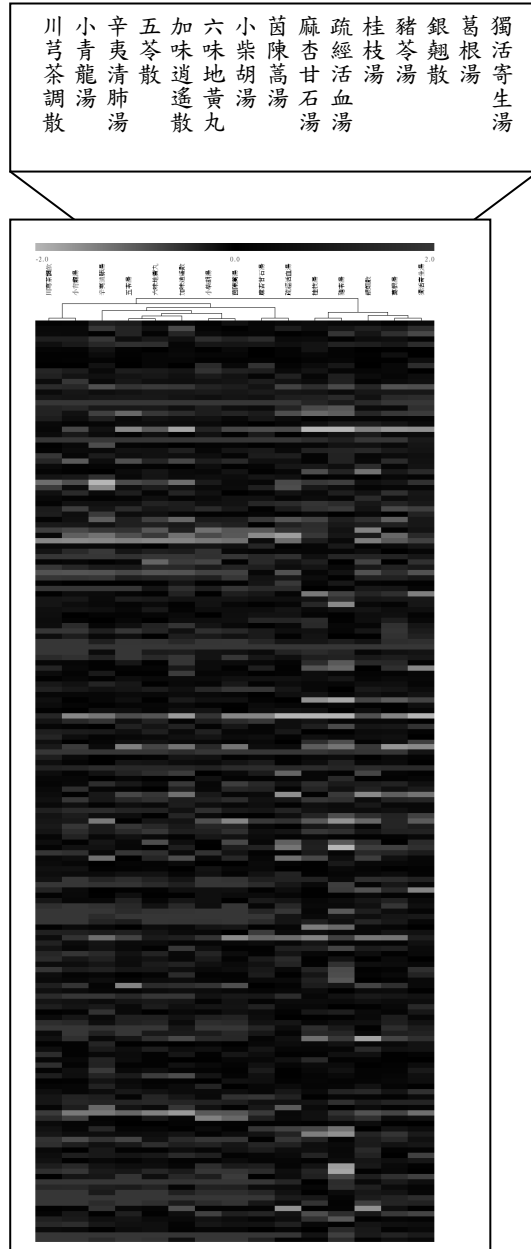
圖二、利用 DNA 微陣列為工具，分析中草藥對細胞基因的生物活性反應，建立一套完整的中生物活性基因圖譜資料庫之標準流程設定。



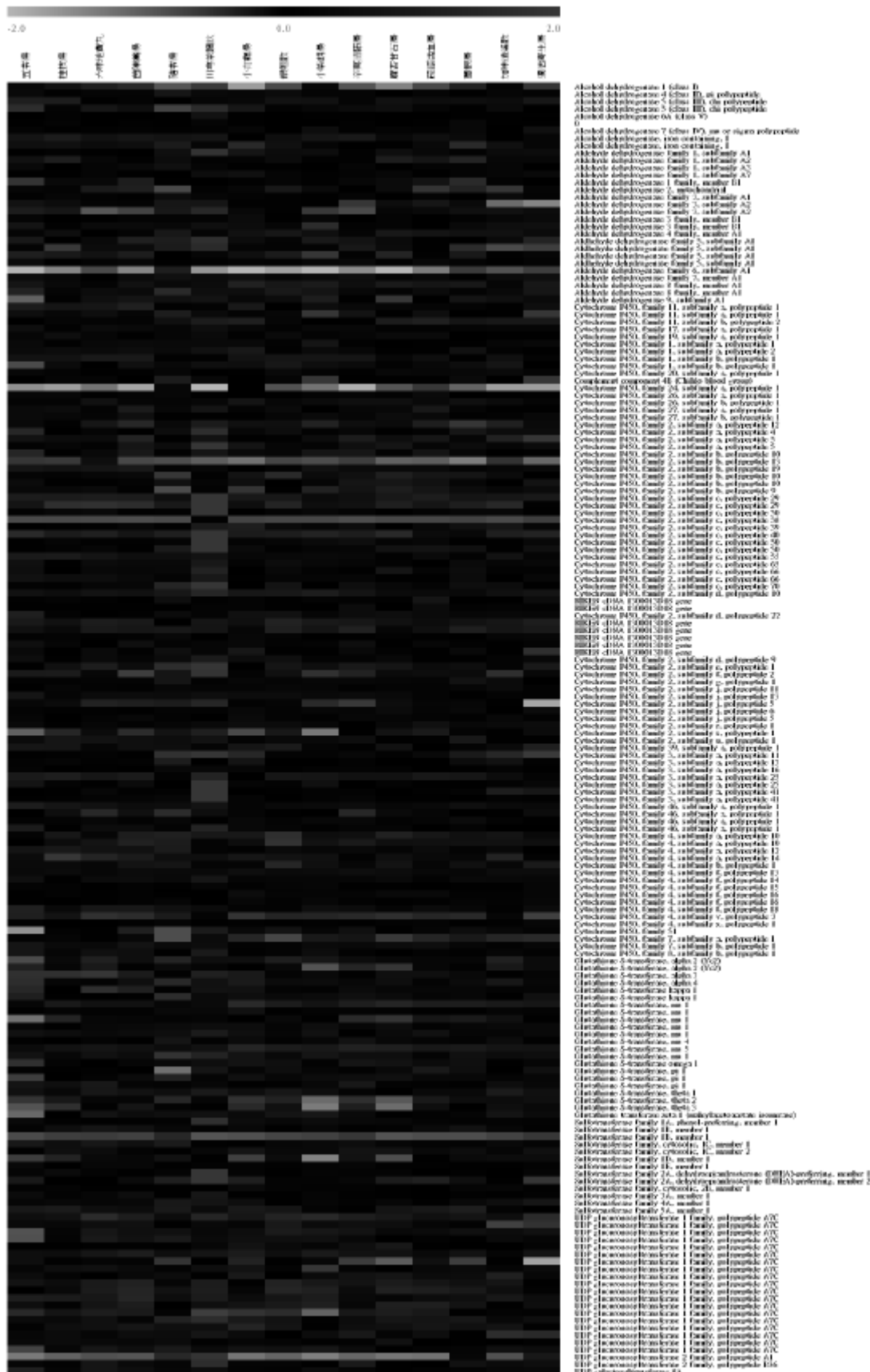
圖三、中醫方藥的生物活性資料庫之建構。藉由中醫方藥處理細胞或動物體之後，以全基因體表現圖譜之分析為基礎，建構生物資訊資料庫的平台，用以比較中醫方藥之間的活性圖譜。中藥包括複方、單味藥及重要中藥化合物，複方包含小柴胡湯、甘露飲、甘露消毒丹、加味逍遙散、知柏地黃丸、柴胡疏肝湯、柴胡清肝湯、茵陳蒿湯、茵陳五苓散、龍膽瀉肝湯與六味地黃丸、川芎茶調飲、小柴胡湯、小青龍湯、五苓散、六味地黃丸、加味逍遙散、辛夷清肺湯、桂枝湯、茵陳蒿湯、麻杏甘石湯、疏經活血湯、葛根湯、銀翹湯、豬苓湯以及獨活寄生湯；單味藥包含桂枝、葛根麻黃、柴胡、大黃、半夏、黃連、黃芩、厚朴、乾薑、當歸、甘草、梔子、茵陳蒿、吳茱萸、杜仲、丹參、川芎、益母草、肉蓯蓉、當歸、龜鹿以及黃耆等。中藥化合物則含括甘草甜素 (glycyrrhizin)、水飛薊 (silymarin)、熊去氧膽酸 (ursodeoxycholic acid)、vanillin 以及 genipin 等。



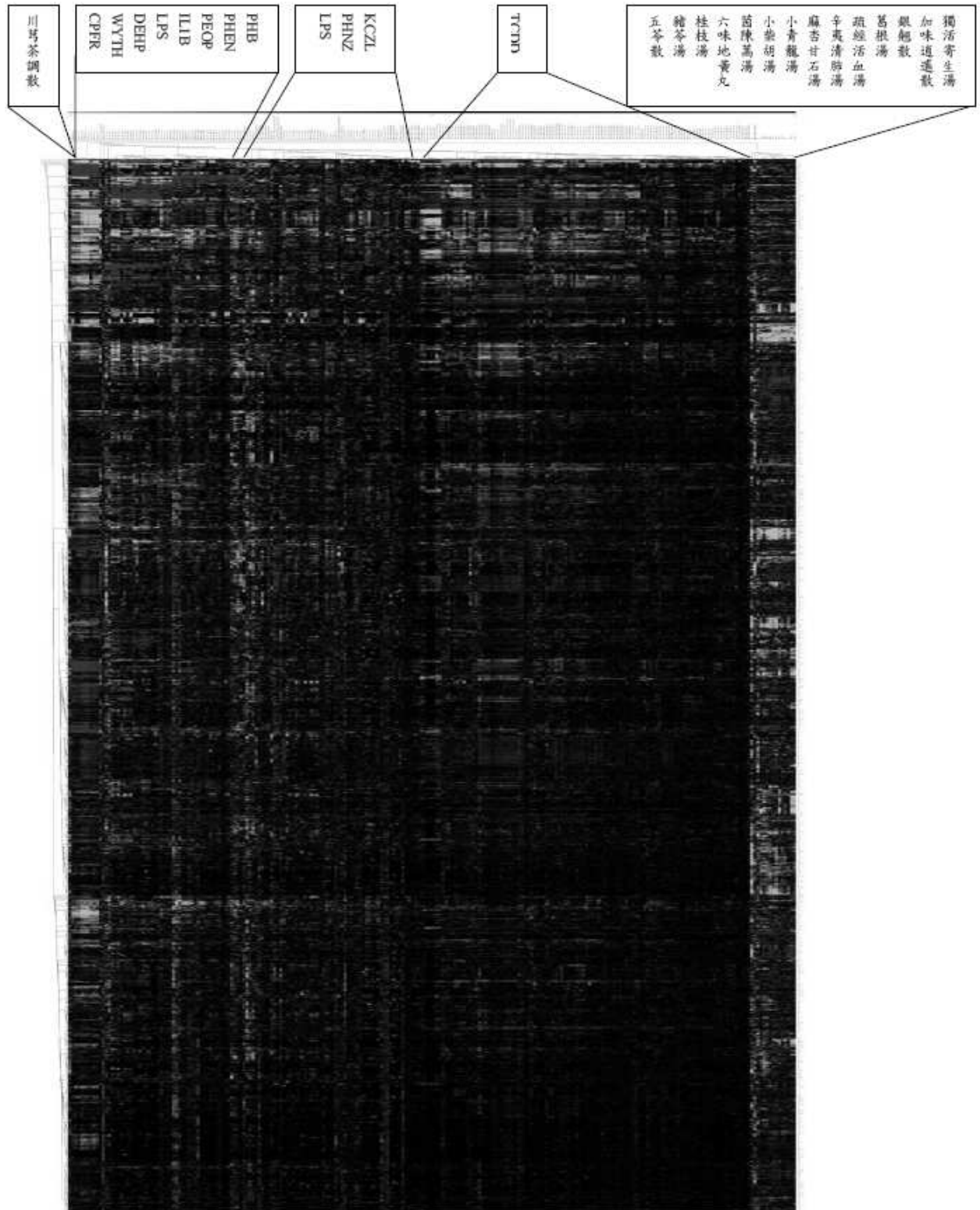
圖四、甘草酸、水飛薊、熊去氧膽酸的基因網路分析。藉由 BiblioSphere Pathway Edition 的軟體來分析，可得知不同的組成也將造成不同的基因表現。在這網路的展示與分類可以藉由 cytoscape 軟體來處理。甘草酸、水飛薊與熊去氧膽酸所調節的基因分別以藍、紅色與綠色來區分。NFKB1 與 TP53 經三個組成處理後並無不同的基因表現。



圖五、小柴胡湯、加味逍遙散、茵陳蒿湯和六味地黃丸與其它常用複方的生物事件分析 (biological event analysis)。



圖六、中醫常見複方的藥物代謝基因圖譜。基因依據分類進行 fold changes 的表列，可做藥物代謝之預測。



圖七、中醫常見複方對藥物毒理相關基因圖譜。毒性是與環境、藥物和基因表現資料庫(<http://edge.oncology.wisc.edu/edge.php>)中的藥物處理所影響的基因表現圖譜，進行叢集分析。藥物代謝基因依據分類進行 fold changes 的表列。

表一、肝病常用方劑之組成。

Chinese herbal formulae (Chinese name)	Ingredients
Long-dan-xie-gan-tang 龍膽瀉肝湯	<i>Gentiana scabra</i> , <i>Scutellaria baicalensis</i> , <i>Gardenia jasminoides</i> , <i>Alisma plantago</i> , <i>Plantago asiatica</i> , <i>Akebia trifoliata</i> , <i>Rhemannia glutinosa</i> , <i>Angelica sinensis</i> , <i>Bupleurum chinense</i> and <i>Glycyrrhiza uralensis</i>
Jia-wei-xia-yao-san (Dan-zhi-xia-yao-san) 加味逍遙散 (丹梔逍遙散)	<i>Paeonia suffruticosa</i> , <i>Gardenia jasminoides</i> , <i>Bupleurum chinense</i> , <i>Angelica sinensis</i> , <i>Paeonia lactiflora</i> , <i>Atractylodes macrocephala</i> , <i>Poria cocos</i> , <i>Mentha haplocalyx</i> , <i>Zingiber officinale</i> and <i>Glycyrrhiza uralensis</i>
Xiao-chai-hu-tang (Sho-saiko-to) 小柴胡湯	<i>Bupleurum chinense</i> , <i>Scutellaria baicalensis</i> , <i>Pinellia ternate</i> , <i>Zingiber officinale</i> , <i>Panax ginseng</i> , <i>Ziziphus jujube</i> and <i>Glycyrrhiza uralensis</i>
Yin-chen-wu-ling-san 茵陳五苓散	<i>Artemisia capillaries</i> , <i>Alisma plantago-aquatica</i> , <i>Poria cocos</i> , <i>Polyporus umbellatus</i> , <i>Cinnamomum cassia</i> and <i>Atractylodes macrocephala</i>
Chai-hu-qing-gan-tang 柴胡清肝湯	<i>Bupleurum chinense</i> , <i>Angelica sinensis</i> , <i>Paeonia lactiflora</i> , <i>Ligusticum wallichii</i> , <i>Trichosanthes kirilowii</i> , <i>Rhemannia glutinosa</i> , <i>Scutellaria baicalensis</i> , <i>Gardenia jasminoides</i> , <i>Forsythia suspensa</i> , <i>Arctium lappa</i> , <i>Ledebouriella divaricata</i> and <i>Glycyrrhiza uralensis</i>
Chai-hu-su-gan-tang 柴胡疏肝湯	<i>Bupleurum chinense</i> , <i>Paeonia lactiflora</i> , <i>Citrus aurantium</i> , <i>Ligusticum wallichii</i> , <i>Cyperus rotundus</i> and <i>Glycyrrhiza uralensis</i>
Gan-lu-xiao-du-dan 甘露消毒丹	<i>Talc</i> , <i>Artemisia capillaries</i> , <i>Akebia trifoliata</i> , <i>Scutellaria baicalensis</i> , <i>Forsythia suspensa</i> , <i>Fritillaria cirrhosa</i> , <i>Belamcanda chinensis</i> , <i>Acorus gramineus</i> , <i>Agastache rugosa</i> , <i>Mentha haplocalyx</i> and <i>Amomum cardamomum</i>
Gan-lu-yin 甘露飲	<i>Eriobotya japonica</i> , <i>Rhemannia glutinosa</i> (fresh and boiled), <i>Ophiopogon japonicus</i> , <i>Asparagus cochinchinensis</i> , <i>Dendrobium nobile</i> , <i>Scutellaria baicalensis</i> , <i>Artemisia capillaries</i> , <i>Citrus aurantium</i> and <i>Glycyrrhiza uralensis</i>
Liu-wei-di-huang-wan 六味地黃丸	<i>Rhemannia glutinosa</i> , <i>Cornus officinalis</i> , <i>Dioscorea opposita</i> , <i>Alisma plantago</i> , <i>Paeonia suffruticosa</i> and <i>Poria cocos</i>
Zhi-bai-di-huang-wan 知柏地黃丸	<i>Anemarrhena asphodeloides</i> , <i>Phellodendron amurense</i> , <i>Rhemannia glutinosa</i> , <i>Cornus officinalis</i> , <i>Dioscorea opposita</i> , <i>Alisma plantago</i> , <i>Paeonia suffruticosa</i> and <i>Poria cocos</i>

表二、肝病方劑節選 fold changes > 2.0 或 < 0.5 且共同上調或下調的基因，以 MetaCore 分析疾病相關之分類。

Disease	Observed	Total	p-value
Metabolism, Inborn Errors	77	463	3.30E-15
Metabolic Diseases	155	1392	2.83E-13
Hepatitis, Chronic, Drug-Induced	18	42	2.41E-11
Hepatitis, Toxic	18	42	2.41E-11
Liver Diseases	128	1131	2.46E-11
Nutritional and Metabolic Diseases	161	1548	2.83E-11
Hepatitis	61	428	2.28E-09
Hepatitis, Chronic	32	161	7.67E-09
Brain Diseases, Metabolic	32	162	8.99E-09
Lipid Metabolism, Inborn Errors	30	150	1.96E-08
Hyperlipidemia, Familial Combined	18	60	2.10E-08
Ischemia	68	532	2.52E-08
Hyperlipoproteinemia	18	61	2.81E-08
Brain Diseases, Metabolic, Inborn	30	154	3.68E-08
Genetic Diseases, Inborn	178	1935	4.54E-08
Digestive System Diseases	217	2489	5.84E-08
Brain Diseases	144	1498	1.14E-07
Hypoxia-Ischemia, Brain	16	55	2.08E-07
Brain Ischemia	16	55	2.08E-07
Hyperinsulinism	40	276	9.96E-07

表三、中醫肝病方劑與肝病基因圖譜的分析^a。

	Liver diseases	Hepatitis	Hepatitis, chronic	Hepatitis, viral, human	Hepatitis, toxic	Liver neoplasms	Liver neoplasms, carcinoma, hepatocellular	Liver cirrhosis
小柴胡湯	0.00E+00	1.99E-05	2.29E-03	1.73E-04	2.96E-01	1.44E-09	6.99E-10	3.22E-01
甘露飲	0.00E+00	1.95E-06	7.22E-02	1.62E-03	1.13E-04	2.48E-11	9.05E-10	1.91E-01
甘露消毒散	2.22E-14	5.84E-06	9.87E-01	3.31E-03	6.96E-02	7.97E-08	1.66E-06	1.00E+00
加味逍遙散	0.00E+00	1.03E-06	5.74E-03	4.00E-05	3.83E-03	4.22E-11	2.63E-10	3.40E-01
知柏地黃丸	8.35E-14	7.73E-05	2.81E-02	8.50E-03	4.64E-02	3.58E-09	2.75E-08	6.77E-02
柴胡疏肝湯	1.78E-14	1.36E-06	2.79E-01	2.10E-05	3.66E-04	1.95E-08	3.34E-07	6.11E-01
柴胡清肝湯	0.00E+00	5.11E-08	5.35E-03	5.26E-05	3.14E-03	2.13E-09	7.06E-08	1.57E-02
茵陳蒿湯	5.54E-12	2.09E-03	4.45E-01	5.09E-02	6.88E-02	9.32E-07	7.10E-06	7.00E-02
茵陳五苓散	0.00E+00	3.15E-07	2.60E-02	3.26E-04	2.50E-02	6.65E-10	1.43E-08	7.29E-02
龍膽瀉肝湯	0.00E+00	7.60E-07	9.14E-03	1.54E-04	1.28E-02	1.07E-14	1.24E-14	4.82E-02
六味地黃丸	0.00E+00	1.64E-08	3.61E-03	9.09E-06	1.69E-02	5.25E-11	1.20E-10	2.39E-03

^a 利用 R 程式 limma package 中的 geneSetTest 檢驗各 diseases 內包含的基因，其 fold changes 是否在所有基因中有較高的正或負向變化排名，並得出 p value。進一步由每個疾病的 p value 利用 R 程式的 multtest package 估計其偽陽率(false discovery rate, FDR)。