

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(2-1)

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。

結果與結論：

在中草藥之新藥開發的應用上，我們已將中藥組成份以 TC_0 及 TC_{50} 的劑量處理肝細胞，再進行 DNA 微陣列分析。藉助 Gene Ontology 的程式運算，我們發現許多中藥組成份所影響的基因，大多坐落於細胞週期及細胞凋亡等兩種群組，進一步利用 *k*-means clustering 進行基因波動圖譜的分群，發現隨著中藥組成份劑量的上升，受 activator protein 1 調節的基因，會呈現表現下降的趨勢。這些結果顯示，某些中藥組成份確實具有相類似的基因圖譜，而藉助與臨床上治療肝病常用之西藥的基因表現圖譜進行比對，將有助於中藥新藥的開發。在藥物安全性的分析方面，由我們分析的天然化合物中，發現某些蔥醌類化合物會降低 phase II 藥物代謝相關基因（例如：UDP glycosyltransferase...等）的表現，代表這類化合物可能會減緩藥物的排泄，增加藥物於體內存留的時間。在中藥方劑及單味藥的現代藥性方面，我們分析三黃瀉心湯及其單味藥的基因表現圖譜，發現這些藥物主要藉助 p53, p53 activated 及 DNA damage 等訊息傳導路徑，展現很獨特的抗細胞增殖模式，而利用 network analysis，發現這些藥物影響的基因都與核心分子 p53

有關，進一步利用 hierarchical clustering 分析，發現三黃瀉心湯之組成份—黃連所影響的基因波動圖譜非常類似於三黃瀉心湯所影響的基因波動圖譜，代表傳統醫學認為黃連為三黃瀉心湯之君藥的合理性，而這個結果也是首次利用現代生物技術，揭露中藥方劑及單味藥的相關性。

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 (2-1)

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 apply microarray technology to analyze and explain the modern biological activities of medicinal herbs. The gene expression databases established in this project can further provide 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:

Microarray data have been used for the development of new drugs. For examples, we treated human hepatocytes with herbal compounds at the dosages of TC_0 and TC_{50} , and analyzed microarray data by Cluster and Gene Ontology Tree Machine. Our results indicated that most herbal compounds affected clusters of genes involved in cell cycle and apoptosis. Genes down-regulated by herbal compounds were grouped into three gene ontology categories, including regulation of cellular process, cell cycle, and death. Furthermore, *k*-means clustering analysis showed that a cluster of activator protein 1-regulated genes was down-regulated by herbal compounds. Microarray data have also been used for the evaluation of drug safety. For examples, we found that the expressions of genes (UDP glycosyltransferases) involved in phase II drug metabolism were reduced during anthraquinone compounds treatments. These findings suggested that anthraquinone compounds may slow down the excretion of drugs, leading to

increase the half-life of drugs. Furthermore, microarray data have been used for the modern definition of Traditional Chinese Medicine. For examples, San-Huang-Xie-Xin-Tang (SHXXT) has been used for the treatment of liver diseases for years. Gene set enrichment analysis indicated that SHXXT and its herbal components displayed a unique anti-proliferation pattern via p53, p53 activated, and DNA damage signaling pathways in HepG2 cells. Network analysis showed that most SHXXT-affected genes were regulated by a central molecular, p53. Additionally, hierarchical clustering analysis showed that Rhizoma Coptis shared a similar gene expression profile with SHXXT. These findings may explain why Rhizoma Coptis is the principal herb that exerts the major and leading effects in the herbal combination SHXXT in TCM. Moreover, this is the first time to reveal the relationship between formulae and their herbal components in TCM by microarray analysis and bioinformatics tools.

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，實驗室希望利用 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)。然而，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 所提供之八個單味藥資料：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*)。將這些單味藥治療於前列腺癌上 (Kubota et al., 2000; Small et al., 2000)，且進一步分析比對基因表現

圖譜，導引出所影響的基因群組並定義出基因影響下游之訊息傳遞路徑 (DiPaola et al., 1998; Bonham et al., 2002)。另外，中藥方劑相關研究如六味地黃丸 (YMJ or 或 LiuWei Dihuang Wang)，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)；常用食材中的薑，其重要的主成份薑黃 (*Curcuma longa*) 被研究發現具有抗癌的效果 (Huang et al., 1988)，利用 DNA 微陣列技術分析其作用機轉，發現薑黃抗癌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)。

中草藥的萃取包含許多自然藥物的分子成份，擁有不同的生物活性，目前對於定義其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 基因微陣列

人類寡核苷酸 DNA 基因微陣列 (Human Whole Genome OneArray™) 購自 Phalanx Biotech Group (Hsinchu, Taiwan)。Human 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, 2820 個屬於 Biocarta 和 KEGG 資料庫有註解的基因, 18,824 個設計用於補足所有 CGAP 資料庫有註解的基因, 而 3276 個加入使得 Entrez gene probes collection 完整。探針組成內容更進一步由 3783 個屬於 Unigene v175 新註解的基因補充。最後, 加入 2265 個由實驗新定義出的探針和 1082 個用於內部控制的探針建構成全部的 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 tissue culture flasks 中, 內含添加 10% 去活化小牛血清 (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

香草醛 (vanillin) 購自 Sigma (St. Louis, MO, USA)。三黃瀉心湯、大黃、黃芩和黃連藥粉購自 GMP 藥廠股份有限公司 (Taipei, Taiwan)。1,4-naphthoquinone 分讓自連金城老師實驗室。香草醛和 1,4-naphthoquinone 溶解於 dimethyl sulfoxide 並保存在 -30°C。而 100 公克的三黃瀉心湯, 大黃, 黃芩和黃連藥粉溶於 500 ml 的水並置於 4°C 一夜。隔天, 收集水相部分並置於 121°C 中進行高溫高壓滅菌 15 分鐘, 滅菌過的液體密封置於 -70°C。加藥前, 細胞培養在 25 平方公分的 tissue culture flasks 中 24 小時。當細胞到達 100% 滿度時, 加入不同濃度的香草醛 (0, 1, 5, or 25 mM), 1,4-naphthoquinone (0, 1, 2, or 4 μ M) 或 TC₅₀ 劑量的三黃瀉心湯, 大黃, 黃芩和黃連。在萃取 total RNA 之前, 加藥的細胞存放於 37°C, 5% CO₂ 的培養箱中 24 小時。

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 (香草醛，1,4-naphthoquinone，三黃瀉心湯，大黃，黃芩或黃連) 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，才會用於下述的基因微陣列實驗分析。

六、基因微陣列實驗分析

5 µg 的 total RNA 樣品先利用 MessageAmpTM 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 OneArrayTM 進行雜合反應 (hybridization)。於 50°C 下，經過一夜的雜合反應之後，藉由三個清洗 (wash) 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 Cy3 或 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 1,4-naphthoquinone 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 (第一與第三部分實驗; Smyth, 2005) 或 NIA Array Analysis tool (第二部分實驗; 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 (簡稱 GO) 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 (data mining) 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)。在 1,4-naphthoquinone 的實驗中，我們利用 BiblioSphere Pathway Edition 軟體分析 NF- κ B 下游基因與 1,4-naphthoquinone 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。

七、AP-1和NF- κ B活性分析

於 37°C 下，HepG2/AP-1 和 HepG2/NF- κ B 細胞培養在 25 平方公分的 tissue culture flasks 中 24 小時，以 DMEM 清洗，再以不同濃度的化合物或藥物 (香草醛，1,4-naphthoquinone，三黃瀉心湯，大黃，黃芩或黃連) 處理 24 小時。然後，細胞以冰的 PBS 清洗，再以 350 μ l Triton lysis buffer (50mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 1mM dithiothreitol, pH 7.8) 溶解並收集其溶解產物。接著，混合 20 μ l 的細胞溶解產物和 100 μ l 的 luciferase reagent (470mM luciferin, 33.3mM dithiothreitol, 270mM coenzyme A, 530mM ATP, 20mM tricine, 1.07mM (MgCO₃)₄ Mg (OH)₂, 2.67mM MgSO₄, 0.1mM EDTA, pH 7.8)，並以 luminometer (FB15, Zylux Corp., Maryville, TN, USA) 偵測冷光活性。相對冷光活性以藥物處理組細胞的 relative luciferase unit (RLU) 除以未處理組細胞的 RLU 來計算。

八、西方墨點法分析

HepG2/AP-1 細胞利用添加 0.1% FBS 的 DMEM 培養在 25 平方公分的 tissue culture flasks 中 24 小時以降低磷酸化的 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) 的基準量，再以不同濃度的香草醛處理。然後，細胞以冰的 PBS 清洗，再以 250 μ l sample buffer (62.5mM Tris-HCl, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% glycerol, 50mM dithiothreitol, 0.1% bromophenol blue, pH 6.8) 溶解並收集其溶解產物。細胞溶解產物的蛋白質濃度利用 Bradford method 加以測定。15–20 μ g 的蛋白質以 10% SDS-polyacrylamide 膠電泳分離，並將蛋白質轉移到硝化纖維素膜。硝化纖維素膜在 blocking buffer (20mM Tris-HCl, 140mM NaCl, 0.1% Tween 20, 5% skim milk powder, pH 7.6) 中進行 blocking，並以 primary 抗 c-Jun N-terminal kinases (JNKs)，抗磷酸化的 JNKs，抗 p38，抗磷酸化的 p38，抗 extracellular signalregulated protein kinases (ERKs)，或抗磷酸化的 ERKs 抗體 (Cell Signalling, Beverly, MA, USA) 進行探測。有結合的抗體利用 horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse 的抗體進行反應，接著以化學冷光 (ECL system, Amersham, Buckinghamshire, UK) 偵測。最後以自動射線照相術拍照。

九、即時性定量 PCR

被 1,4-naphthoquinone 下調的 UDP glycosyltransferase 基因更一步利用即時性定量 PCR (qPCR) 證實。RNA 樣本在 420C 利用 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) 進行逆轉錄反應 30 分鐘。定量 PCR 以底下條件進行：50°C，2 分鐘；95°C，10 分鐘；95°C，15 秒和 60°C，1 分鐘進行 40 個循環。所使用的試劑包括 1 μ l 經逆轉錄的 cDNA，2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 和 500 nM 的正反向引子。每個基因的測定在 Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR system 上進行 3 重複，而表現量的倍率變化則利用 comparative CT 方法計算得到。底下提供基因代號以及正向 (F) 和反向 (R) 引子的序列：GAPDH, F-ACACCCACTCCTCCACCTTT/R-TAGCCAAATTCGTTGTCAT ACC; UGT1A5, F-CAACGGGAAGCCACTATCTCAGG/R-CCACAATTCCA TGTTCTCCAGAAGC; UGT2A1, F-CATTGCTCACATGAAGGCCAAAGG/R-GCGCTAAGCAAATCCACACTTGTC; UGT2B4, F-CCACTGCAAACCTGCCAAACC/R-TCTTCTGACGTGTTACTGACCATCG; UGT2B7, F-TTGCCGATCAACCTGATAACATTGC/R-AGCAAGTCTGTACTCGACATTGTG; UGT 2B15, F-GGAAATGGAAGAGTTTGTGCAGAGC/R-GGATCTGGGCAAGG GCTGATG; UGT2B11, F-TGCTTGTCATAAGGCAGACATCATC/R-TGAGG TGACTGTACTGGCATCTTC。

參、結果

一、利用基因表現圖譜分析天然化合物之作用機轉—以香草醛 (vanillin) 為例

(一) 香草醛對 HepG2 細胞之細胞毒性分析

利用 MTT 試驗分析香草醛對細胞的毒性。圖一呈現香草醛濃度在 10 mM 範圍內並不影響到 HepG2 細胞的活性，當香草醛濃度增至 20 mM 時，HepG2 細胞的活性會逐漸受到抑制；香草醛濃度 25 mM 則是 HepG2 細胞的 TC_{50} 。之後，實驗室選擇不同濃度的香草醛 (1、5 與 25 mM) 為標的。

(二) 利用基因微陣列分析由香草醛調節的基因之表現圖譜

基因微陣列分析的基因共有 30968 個，香草醛濃度為 1、5 與 25 mM 作用 HepG2 細胞後，受到影響的下調基因包括基因 26、119 與 213；上調的基因則有基因 28、84 與 347，並將上述基因送至 web site 進行 Gene Ontology (GO) 的分析。GO 分析結果顯示香草醛濃度為 5 mM 時，會影響細胞四大類主要的生物功能，從中再計算 P value 小於 0.01 具顯著差異之細胞生物功能約有 47 個，多與 cell cycle 以及 apoptosis 有關 (圖二)。以不同濃度的香草醛作用 HepG2 細胞的 GO 分析，結果呈現香草醛在不影響細胞活性的濃度 (1 與 5 mM) 下，與 cyclin-dependent protein kinase activity 以及 apoptosis 相關；而在香草醛具細胞毒性的濃度 (25 mM) 下則與細胞的 G2 phase 有重要關聯。香草醛作用 HepG2 細胞所影響的負調節基因包含三大類，包括 cellular process、cell cycle 與 cell death 相關的基因包含 S100A6、CCNA2、MYBL2、BIRC5、AURKB 與 PLK1 (表一)。另外，在上述基因中 S100A6、BIRC5、AURKB、PLK1 以及 UBE2C 則與 cancer progress 有關。這些結果暗示著香草醛很可能是藉由影響細胞週期來進行抗癌的機制。

(三) 受香草醛影響的基因關聯性之 network 分析

將受到香草醛作用後影響之基因送至 network 分析，發現其主要影響的中心上游基因為 Fos。然而，Fos 是轉錄因子 AP-1 主要的 component 之一，由 network 分析的結果可以確認 Fos 基因是調控香草醛所影響之基因群組中的上游中心點 (圖三)。

(四) 香草醛作用 HepG2 細胞之 AP-1 活性

將含 AP-1 轉錄因子之 HepG2 細胞給予濃度各為 1、5 以及 25 mM 之香草醛，並於 24 小時後觀察 AP-1 的活性。結果顯示，當香草醛濃度為 25 mM 時，造成細胞毒性的同時也強烈下降了 AP-1 的活性；然而，進一步發現，當香草醛濃度在 5 mM 時，HepG2

細胞在擁有正常的細胞存活率的情況下，明顯下降了 AP-1 的活性（圖四），這個結論表示香草醛會抑制 HepG2 細胞的 AP-1 活性。

(五) 構建香草醛抑制 AP-1 活性之訊息傳遞路徑

AP-1 的活性受到 MAPKs 訊息傳遞路徑的影響，包括了 ERKs、p38、以及 JNKs 等路徑。利用西方墨點分析 AP-1 上游主要的訊息傳遞路徑，結果發現，ERKs 會隨著香草醛濃度的增加而減少，表示，香草醛抑制 AP-1 活性主要是藉由 ERKs 訊息傳遞路徑來作用（圖五）。

二、利用基因表現圖譜分析天然化合物對肝臟代謝藥物的影響——以 1,4-naphthoquinone 為例

(一) 1,4-Naphthoquinone 抑制 NF- κ B 活性與細胞存活率

我們在測試 100 個 1,4-Naphthoquinone 的衍生化合物中找出 5 個具有抑制 NF- κ B 活性的化合物，其分別利用 NF- κ B reporter gene system 與 MTT 測試 NF- κ B 的 IC₅₀ 以及 TC₅₀。其中，抑制結果最明顯的化合物是 1,4-Naphthoquinone，其 IC₅₀ 與 TC₅₀ 值分別為 5.1 μ M 與 5.9 μ M（表二）。接著，我們將 1,4-Naphthoquinone 進行寡核苷酸 DNA 微陣列分析其基因的表現圖譜。

(二) 1,4-Naphthoquinone-regulated genes 與 NF- κ B 之交互作用

在 Michael Zhang Lab website 分析中可知約有 100 標的基因與 NF- κ B 相關。將這些表現有差異且與 NF- κ B 有關連的基因群組進一步作 network analysis（圖六）以及 geneSetTest，分析與 NF- κ B 之間相關的交互關係（表三）。基因 CCNA2、CDK5、CDKN2C（p18）、CDKN3（CDI1）以及 PLK1，與細胞凋亡或細胞週期生長表現的影響有關（Pagano et al., 1992; Dhavan et al., 2001; Weishaupt et al., 2003; Guan et al., 1994; Gyuris et al., 1993; Toyoshima-Morimoto et al., 2001; van Vugt et al., 2004）。

(三) 基因差異性與 Gene ontology 的分析

將表現有差異之基因送至 Gene ontology 可以知道這些基因所歸屬的 GO term。結果呈現，表現上調之基因總數有 220 個，表現下調的基因總數則是有 147 個，而其中兩者都受到調控的基因數則有 123 個。我們選擇這 123 個同時受到上調與下調之基因進行 Gene ontology 的分析（圖七），歸類出這些基因所屬的 GO term，發現這些 GO term 與細胞週期或是細胞凋亡有關（表四）。

(四) 1,4-Naphthoquinone 藥物代謝相關基因之分析

將利用藥物代謝的相關基因分期分析，其中表現倍率 > 1.8 或是 < -1.8 的基因有 ADH7、ALDH1A2、ALDH3A2、LDH6A1、CYP11B2、CYP1B1、CYP4B1、CYP26B 以及 CYP26C1，與 phase

I 藥物代謝相關；基因 GSTP1、GSTA5、SULT1A1、UGT2B7、UGT2B11、以及 UGT2B15 則是與 phase II 的藥物代謝有關(圖八)。

(五) Real-time quantitative PCR 的分析

我們選擇與 UDP glycosyltransferase 相關的基因進行 Real-time quantitative PCR 的分析，這些基因在 1,4-Naphthoquinone 作用下都擁有的下調能力的共通性，因此，進一步利用 Real-time quantitative PCR 的分析方式驗證這些基因是否都為下調反應(圖九)。

三、利用基因表現圖譜分析中醫方劑治療肝病之機轉及其組方概念—以三黃瀉心湯為例

(一) 三黃瀉心湯 (SHXXT) 及其化合物之 HepG2 細胞毒性試驗

三黃瀉心湯是中藥複方，包含大黃、黃芩與黃連三個單味藥，MTT 試驗中三黃瀉心湯、大黃、黃芩與黃連在 HepG2 的 TC_{50} 表現分別是 3.66、0.15、4.79、與 0.80 mg/ml (表五)。

(二) 經 DNA 微陣列分析 p53 基因受到三黃瀉心湯之調控

DNA 微陣列由 PGSEA package 的 bioconductor program 程式分析出，經過三黃瀉心湯作用 HepG2 細胞後表現增強之基因，自 Molecular Signature Database web site 下載的基因總數有 522 個，分屬 4 個基因群組 (gene set)，其 P 值小於 0.01。而三黃瀉心湯、大黃、黃芩與黃連則分別與這四個基因群組 21、21、34 以及 25 有關。進一步分析這些基因群組，發現與 p53 基因訊息傳遞、p53 基因的活化以及 DNA damage 訊息傳遞有關 (表六)。

(三) 階層式叢集分析

利用 TIGR Multiexperim 階層式叢集分析可排列出三黃瀉心湯、大黃、黃芩與黃連之間表現相近的基因排序，找出四個藥方之間基因表現的關聯性。由階層式叢集分析可得知三黃瀉心湯與黃連的基因表現圖譜是較雷同的；而三黃瀉心湯與黃芩的基因表現圖譜相似度較低。因此，我們認為三黃瀉心湯與其單味藥之間的基因表現是相似的 (圖十)。

(四) 三黃瀉心湯基因群組之 Network analysis

經三黃瀉心湯所調控之基因群組列於表七，以 BiblioSphere Pathway Edition software 連結出基因群組中與調控 p53 基因訊息傳遞路徑有關的基因進行 Network analysis。結果呈現 p53 基因是 Network analysis 的中心點，也表示大部分的基因表現都與 p53 基因有關連。此外，基因 ATM、BAX、BBC3、BNIP3、GADD45G、SFN、ERCC1 與 XPC 也不同治療方式中表現了相同的基因圖譜(圖十一)。

肆、討論

一、利用基因表現圖譜分析天然化合物之作用機轉—以香草醛 (vanillin) 為例

香草醛為"芳香化濕"中藥之重要植化成份，而"芳香化濕"類中藥為防治肝病常用中藥之一，因此本計畫先分析香草醛之作用機轉。經由 GO 分析出香草醛濃度為 1 mM 與 5 mM 時會影響細胞的 cell cycle 以及 apoptosis，香草醛濃度為 25 mM 時則是與細胞的 G2 phase 有關，這些影響細胞行為模式的基因可再由 GO 分為三大群組，包括 regulation of biological process、cell cycle 以及 apoptosis，而在 GO terms 中的基因也與 cell cycle regulation、cancer processing 以及 transcription regulation 相關聯。

進一步分析 GO terms 的基因，經由香草醛作用與 cell cycle-related 有關的負調控基因包括 S100A6、CCNA2、MYBL2、BIRC5、AURKB 與 PLK1，這些基因也在其他相關文獻中指出與 cell cycle 有關，例如基因 S100A6 的下游產物 calcyclin 參與了細胞的分化 (Breen et al., 2003)；基因 CCNA2 下游產物 Cyclin A2 也已知與細胞週期 G1/S 以及 G2/M 的轉錄相關 (Pagano et al., 1992; Noben-Trauth et al., 1996)。另外，基因 BIRC5、AURKB 與 PLK1 也分別被發現與參與了不同時期的 cell cycle 以及染色體濃縮有關 (Li et al., 1998; Kaitna et al., 2000)。

另外，在 cancer progression 中也發現基因 S100A6 與早期胰臟癌的發生有關聯；基因 PLK1 與 BIRC5 也與腫瘤的形成有關 (Holtrich et al., 1994; Sato et al., 2006)；而基因 MCM4、MCM5、HMGA1 與 MIF 與不同時期腫瘤的形成相關。因此，我們可以藉由微陣列的資料分析，找出香草醛作用 HepG2 細胞影響之負調控基因，進一步分析並印證這些負調控基因抗腫瘤形成的機制。接著，我們再將這些負調控相關的基因利用 network analysis 找出基因之間的關聯性與重要性。結果在 network 分析出的基因中心找到一個重要的基因 Fos。Fos 是轉錄因子 AP-1 的重要成員之一，而 AP-1 與很多生物功能的訊息傳遞 (Angel and Karin et al., 1991; Shaulian and Karin, 2002) 或是腫瘤的形成有關 (Mathas et al., 2002; Zhong et al., 2005)。AP-1 的活化需經由 MAPK 訊息傳遞路徑，負調控基因中的基因 S100A6 與 CALR 則是會抑制 AP-1 的活性，因此，我們認為香草醛是由抑制 AP-1 活性的方式進而達成抗腫瘤形成的機制。

轉錄因子 AP-1 目前已知有另一個強抑制劑 curcumin，所以，我們進一步分析 curcumin 與香草醛的作用機制。Curcumin 抗腫瘤的機轉是以抗氧化

的作用為主 (Awasthi et al., 2000; Nishinaka et al., 2007)，自香草醛分析出的負調控基因中發現基因 ETV5、GSTP1 與 DDIT3 與 curcumin 抑制肺部腫瘤細胞相同，基因 ETV 會導引細胞進行 apoptosis；基因 GSTP1 與 DDIT3 則已知與抑制 AP-1 活性有關 (Tsai et al., 2007; Qiao et al., 2002)。所以，香草醛進一步藉由 DNA 微陣列、Gene ontology 以及 network 的分析，找出香草醛作用細胞後之負調控基因以及基因的訊息傳遞路徑，導引出香草醛可能於抗腫瘤中主要的作用機制是與抗氧化與去除自由基的機轉為主。

二、利用基因表現圖譜分析天然化合物對肝臟代謝藥物的影響—以 1,4-naphthoquinone 為例

NF- κ B 在許多研究文獻中已知與細胞生長週期、細胞凋亡發炎及癌症有關係，是這些免疫反應上游的重要轉錄因子之一。2006 年有文獻發現一個 1,4-Naphthoquinone 的衍生之藥化合物 plumbagin 會抑制 NF- κ B 的活性並增強 TNF 的活性 (Sandur et al., 2006)。NF- κ B 活性的抑制與許多訊息傳遞路徑息息相關，例如 IkappaBalpha kinase、IkappaBalpha phosphorylation、IkappaBalpha degradation、p65 phosphorylation 以及 p65 nuclear translocation，其上游與調控 NF- κ B 活性相關的基因則與 TNF、TNFR1、TRAF2、NIK、IKK-beta 以及 p65 有關連。

我們利用這 100 多個 1,4-Naphthoquinone 的衍生化合物測試其抑制 NF- κ B 的活性，其中有 5 個藥化合物脫穎而出，又以 1,4-Naphthoquinone 的抑制結果最為明顯。進一步對這些受到 1,4-Naphthoquinone 影響的基因送至 network 進行分析，結果呈現，其基因影響中確實以 NF- κ B 為主，而這些受到影響的基因中與 NF- κ B 密切關連的又有 CCNA2、CDK5、CDKN2C、CDKN3、GADD45A 與 PLK1，也發現這些基因與細胞生長週期或是細胞凋亡有關。

接著，進一步分析直接影響 NF- κ B 活性相關訊息傳遞路徑，包括了許多酵素，例如 CK、CDK、CCNA2、CDKN3 以及 GADD (Zerbini et al., 2004; Zerbini et al., 2005)。在與細胞週期影響相關的基因則有 PLK1 (Masuda et al., 2003; van Vugt et al., 2004)，與 NF- κ B 基因表現相關的基因多與細胞的生長週期或是細胞凋亡有關連。

另外，在與藥物代謝相關的基因群中我們發現與 UDP glycosyltransferases 的相關基因第二階段的藥物代謝中會被 1,4-Naphthoquinone 抑制其基因的表現。為了進一步確認藥物代謝基因是否都被抑制，進一步作 qPCR 的分析。最後，我們可得知，利用 DNA 微陣列分析等生物系統分析工具可以證實 1,4-Naphthoquinone 是能夠影響 NF- κ B

活性的抑制劑。Quinone 類化合物為防治肝病常用中藥之重要植化成份之一，由本計畫利用系統生物學數據分析的結果呈現，naphthoquinone 具有抗炎症及抗癌症潛能，但其對肝臟的藥物代謝行為會產生干擾，因此在未來其它的試驗，尤其是臨床試驗，須多留意用藥安全。

三、利用基因表現圖譜分析中醫方劑治療肝病之機轉及其組方概念—以三黃瀉心湯為例

我們將中藥複方三黃瀉心湯及其所含之三個單味藥大黃、黃芩與黃連作用 HepG2 細胞後，進行 DNA 微陣列的分析，列出這四個藥方的基因表現圖譜，並進一步將有表現差異的基因作分群，發現可分為三大基因群組 (Gene set)。三個基因群組都與 p53 基因訊息傳遞或是 DNA damage 有關連，同時，HepG2 細胞經過三黃瀉心湯及其三個單味藥的作用後，基因表現圖譜也是類似的，因此，在進一步將這些基因送至 network analysis 剖析，network analysis 結果也呈現三黃瀉心湯調控之基因中心是以 p53 基因為主。接著，將這些與 p53 基因相關連的基因訊息傳遞路徑進一步作註解。

三黃瀉心湯的相關研究中也有文獻指出三黃瀉心湯與抗癌有關係，其機轉可能藉由抗細胞凋亡或是調控細胞週期來抑制肝癌腫瘤組織的形成 (Mootha et al., 2003)。然而，在 Gene set 分析結果中可知道三黃瀉心湯作用 HepG2 細胞與 p53 基因的調控有著重大關連，經由三黃瀉心湯治療的 HepG2 細胞，其 p53 基因的表現呈現上調的趨勢，其下游與細胞凋亡或是細胞週期相關的基因表現也是同時被上調的。藉由 three enriched gene sets 分析中誘發由 p53 基因調控之下游基因分別是 CDKN1A、CDKN2A、GADD45A、GADD45G、SFN 與 ATM。

P53 基因的 promoter 有 FAS、BBC3 (PUMA)、與 BAX，其中 BAX 已知與細胞的凋亡以及誘發調控 p53 基因的表現有關 (Ligr et al., 1998; Miyashita et al., 1994; Miyashita and Reed, 1995)。另外，BAX 與 BBC3 也被研究出對不同癌細胞中的作用，包括了調控 p53 基因表現、癌細胞的分化或是細胞週期等 (Nakano and Vousden, 2001; Yu et al., 2001; Yu et al., 2003)。

此外，由 enriched gene sets 分析出的基因中，其所影響之細胞生物行為分別詮釋如下，基因 PIG8 參與細胞的生長並與細胞凋亡有關 (Gu et al., 2000); 基因 CDKN1A 的基因產物則與 p53 基因之細胞轉錄過程有關 (Li et al., 1994); INK4a 的基因產物 p16 與抑制腫瘤生長有關 (Stott et al., 1998)。另外，基因 GADD45A 會結合 p21 進行交互作用調節 DNA 的配對，並阻止其進入 DNA 合成的階段 (Smith et al., 1994; Kearsley et al., 1995)。

在 DNA damage 方面，蛋白質 ATM 會直接結合 p53 基因影響 DNA 配

對導致 DNA 受到傷害 (Savitsky et al., 1995; Banin et al., 1998)。另外，也發現 DNA damage 或是 DNA repair 相關的基因，包括 GADD45A、GADD45G、SFN、ERCC1 與 XPC，也是與影響 DNA 配對有關。

以上結果總論，三黃瀉心湯會調控 p53 基因相關的訊息傳遞路徑，造成細胞內 DNA 的傷害，進而導引腫瘤細胞通往細胞凋亡的路徑，抑制腫瘤細胞的生長。利用 DNA 微陣列分析、gene set analysis 以及 network analysis 進一步指出受影響之基因群組，分別為為影響 p53 基因訊息傳遞路徑、p53 基因活化以及 DNA damage 相關的基因群組，再進一步予以分類說明各個基因所調控影響的生物功能，這也是將中藥方劑與其成份組成中的單味藥做比較，第一次發現方劑與單味藥在治療過後，彼此之間的基因表現圖譜是相近似的，這也充分說明，傳統中草藥可以藉由現代生物系統工具進一步分析其藥物對生物療效特性的探討，由此實驗進一步得知中藥的單味藥，在生物療效中是與方劑相同的。

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。

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. Angel P, and Karin M: The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1072: 129–157.
2. Awasthi S, Pandya U, Singhal SS, Lin JT, Thiviyanathan V, and Seifert Jr WE: Curcumin-glutathione interactions and the role of human glutathione S-transferase P1-1. *Chem Biol Interact* 2000; 128: 19–38.
3. Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, and Ziv Y: Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. 1998; *Science* 281: 1674-1677.
4. 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.
5. 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.
6. Breen EC, and Tang K: Calcyclin (S100A6) regulates pulmonary fibroblast proliferation, morphology, and cytoskeletal organization in vitro. *J Cell Biochem* 2003; 88: 848–854.
7. 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.
8. Dhavan R, Tsai LH: A decade of CDK5. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 749-759.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Gu Z, Flemington C, Chittenden T, and Zambetti GP: Ei24, a p53 response gene involved in growth suppression and apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 233-241.
 14. 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.
 15. 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 Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 9608-9613.
 16. 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.
 17. Holtrich U, Wolf G, Brauninger A, Karn T, Bohme B, and Rubsamen-Waigmann H: Induction and down-regulation of PLK, a human serine/threonine kinase expressed in proliferating cells and tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 1736-1740.
 18. 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.
 19. 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.
 20. 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.
 21. 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.
 22. Kaitna S, Mendoza M, Jantsch-Plunger V, and Glotzer M: Incenp an aurora-like kinase form a complex essential for chromosome segregation and efficient completion of cytokinesis. *Curr Biol* 2000; 10: 1172-1181.
 23. Kim SY and Volsky DJ: PAGE: parametric analysis of gene set enrichment. *BMC Bioinformatics* 2005; 86: 144.

24. Knowles BB, and Aden DP: Human hepatoma derived cell line, process for preparation thereof, and uses therefor. US Patent 1983; 4, 393, 133.
25. 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.
26. 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.
27. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, and Marchisio PC: Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998; 396: 580–584.
28. Li Y, Jenkins CW, Nichols MA, and Xiong Y: Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* 1994; 9: 2261-2268.
29. Ligr M, Madeo F, Fröhlich E, Hilt W, Fröhlich KU, and Wolf DH: Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast. *FEBS Let* 1998; 438: 61-65.
30. Llovet JM, Burroughs A, and Bruix J: Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362: 1907-1917.
31. Masuda Y, Nishida A, Hori K, Hirabayashi T, Kajimoto S, Nakajo S, Kondo T, Asaka M, Nakaya K: Beta-hydroxyisovalerylshikonin induces apoptosis in human leukemia cells by inhibiting the activity of a polo-like kinase 1 (PLK1). *Oncogene* 2003; 22: 1012-1023.
32. Mathas S, Hinz M, Anagnostopoulos I, Krappmann D, Lietz A, and Jundt F: Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF- κ B. *EMBO J* 2002; 21: 4104–4113.
33. Miyashita T, and Reed JC: Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995; 80: 293-299.
34. Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Lieberman DA, Hoffman B, and Reed JC: Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994; 9: 1799-1805.
35. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstråle M, Laurila E, Houstis N, Daly MJ, Patterson N, Mesirov JP, Golub TR, Tamayo P, Spiegelman B, Lander ES, Hirschhorn JN, Altshuler D, and Groop LC: PGC-1 α -responsive genes

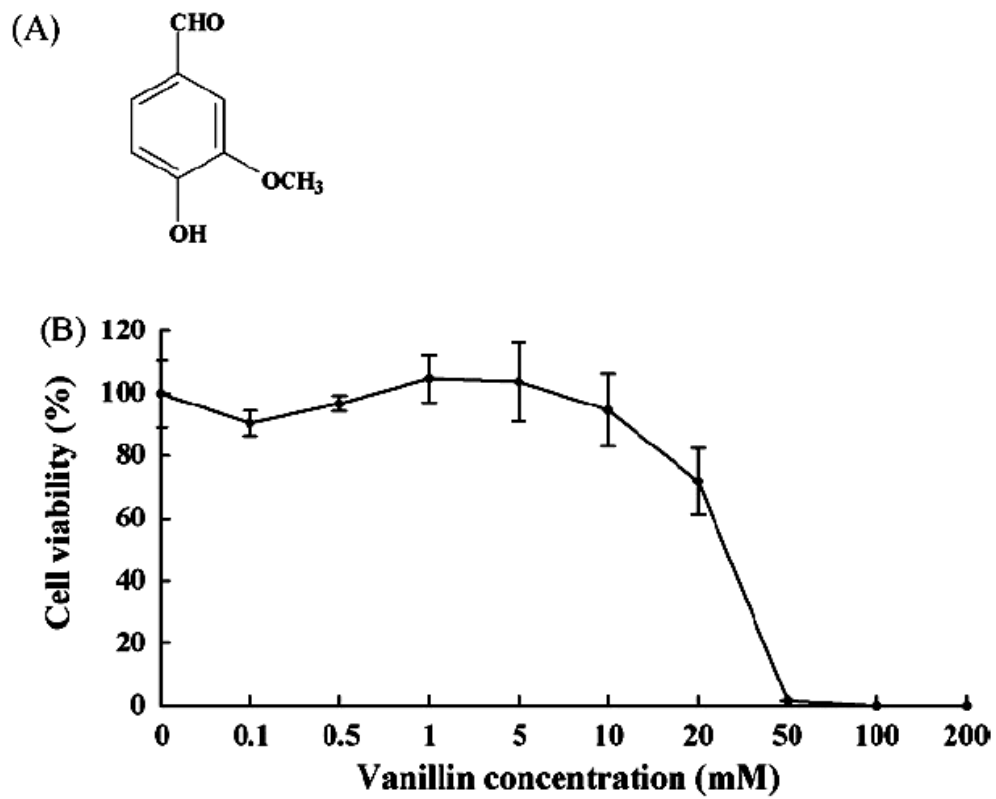
- involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 2003; 34: 267-273.
36. Nakano K, and Vousden KH: PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 2001; 7: 683-694.
37. Nishinaka T, Ichijo Y, Ito M, Kimura M, Katsuyama M, and Iwata K: Curcumin activates human glutathione S-transferase P1 expression through antioxidant response element. *Toxicol Lett* 2007; 170: 238-247.
38. Noben-Trauth K, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Sonoda G, and Testa JR: Mybl2 (Bmyb) maps to mouse chromosome 2 and human chromosome 20q 13.1. *Genomics* 1996 ;35 :610-612.
39. Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, and Draetta G: Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO J* 1992; 11: 961-971.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. Qiao D, Im E, Qi W, and Martinez JD: Activator protein-1 and CCAAT/enhancer-binding protein mediated GADD153 expression is involved in deoxycholic acid-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1583: 108-116.
44. 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.
45. 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.
46. Sandur SK, Ichikawa H, Sethi G, Ahn KS, Aggarwal BB: Plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) suppresses NF-kappaB activation and NF-kappaB-regulated gene products through modulation of p65 and IkappaBalpha kinase activation, leading to potentiation of apoptosis induced by cytokine and chemotherapeutic agents. *J Biol Chem* 2006; 281: 17023-17033.

47. Sato F, Abraham JM, Yin J, Kan T, Ito T, and Mori Y: Polo-like kinase and survivin are esophageal tumor-specific promoters. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342: 465–4671.
48. Savitsky K, A Bar-Shira, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite , Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NG, Taylor AM, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS, and Shiloh Y: A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 1995; 268: 1749-1753.
49. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467-470.
50. 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.
51. Seifert M, Scherf M, Epple A, and Werner T: Multievidence microarray mining. *Trends Genet* 2005; 21: 553–558.
52. 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.
53. Shaulian E, and Karin M: AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 2002; 4: E131–136.
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. Smith ML, Chen IT, Zhan Q, Bae I, Chen CY, Gilmer TM, Kastan MB, O'Connor PM, and Fornace AJ: Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 1994; 266: 1376-1380.
56. 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.
57. 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.

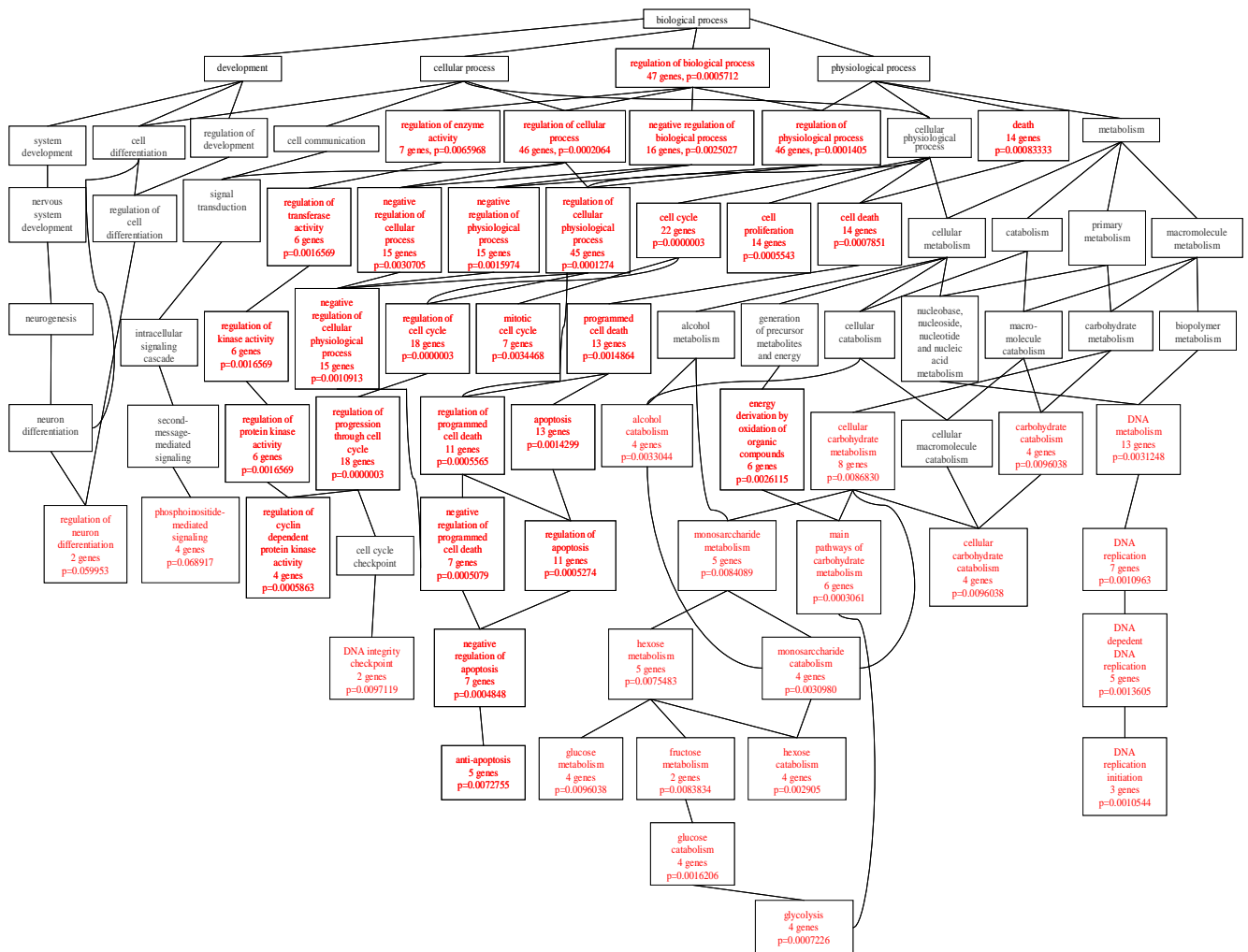
58. Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Shinya N, Iwamatsu A, Nishida E: Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature* 2001; 410: 215-220.
59. Tsai CW, Chen HW, Yang JJ, Sheen LY, and Lii CK: Diallyl disulfide and diallyl trisulfide up-regulate the expression of the pi class of glutathione S-transferase via an AP-1-dependent pathway. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 1019–1026.
60. van Vugt MA, van de Weerd BC, Vader G, Janssen H, Calafat J, Klompmaker R, Wolthuis RM, Medema RH: Pololikekinase-1 is required for bipolar spindle formation but is dispensable for anaphase promoting complex/Cdc20 activation and initiation of cytokinesis. *J Biol Chem* 2004; 279: 36841–36854.
61. Weishaupt JH, Neusch C, Bähr M: Cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) and neuronal cell death. *Cell Tissue Res* 2003; 312: 1-8.
62. Yu J, Wang Z, Kinzler KW, Vogelstein B, and Zhang L: PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 1931-1936.
63. Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, and Vogelstein B: PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 2001; 7: 673-682.
64. Zerbini LF, Libermann TA: Life and death in cancer. GADD45 alpha and gamma are critical regulators of NF-kappaB mediated escape from programmed cell death. *Cell Cycle* 2005; 4: 18-20.
65. Zerbini LF, Wang Y, Czibere A, Correa RG, Cho JY, Ijiri K, Wei W, Joseph M, Gu X, Grall F, Goldring MB, Zhou JR, Libermann TA: NF-kappa B-mediated repression of growth arrest- and DNA-damage-inducible proteins 45alpha and gamma is essential for cancer cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 13618-13623.
66. 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.
67. Zhong CY, Zhou YM, Douglas GC, Witschi H, and Pinkerton KE: MAPK/AP-1 signal pathway in tobacco smoke-induced cell proliferation and squamous metaplasia in the lungs of rats. *Carcinogenesis* 2005; 26: 2187–2195.

柒、圖表

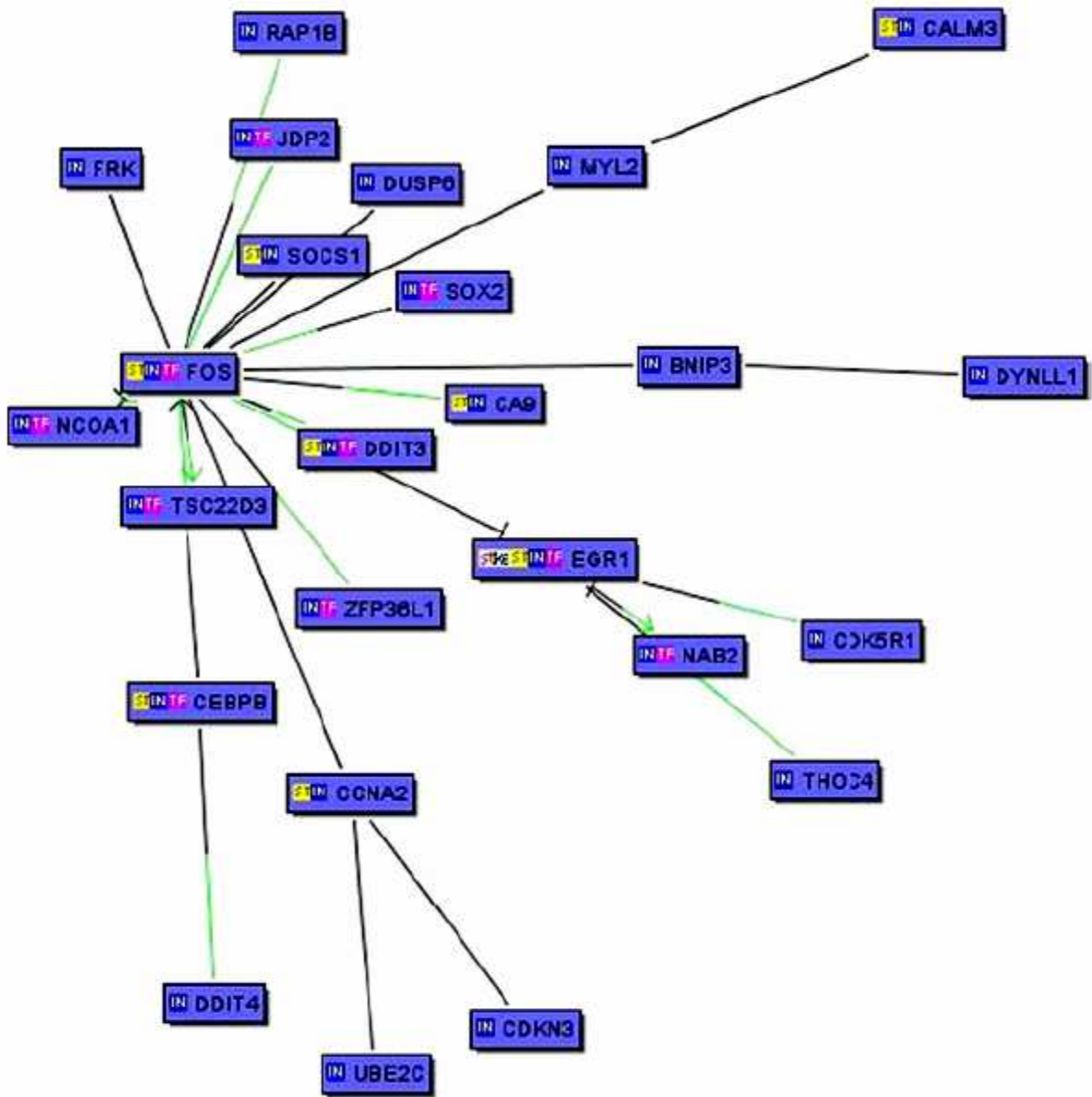


圖一、香草醛 (Vanillin) 對 HepG2 細胞的毒性分析。

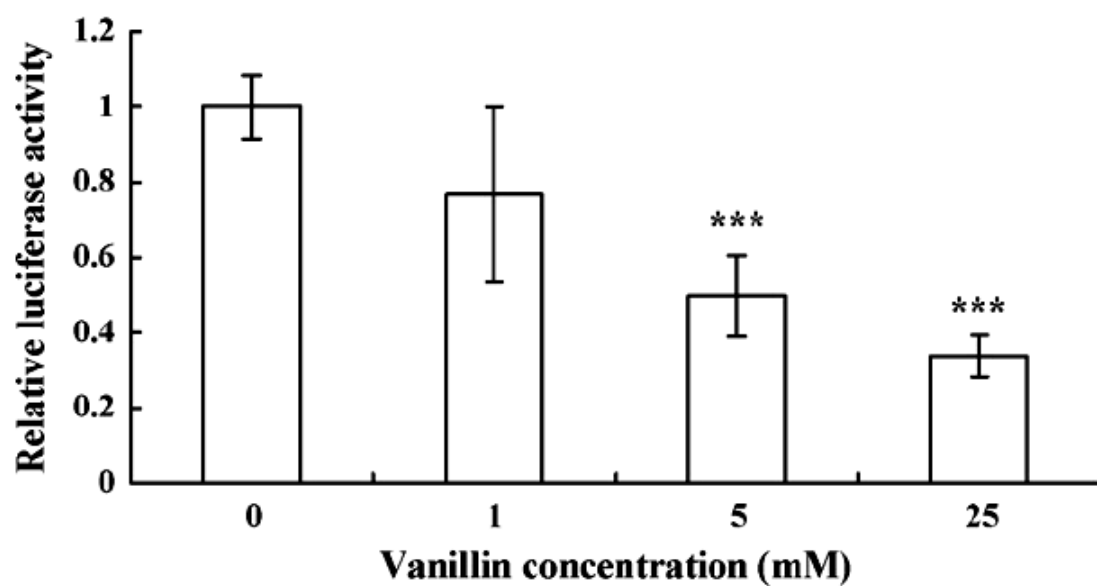
(A) 香草醛的結構。(B) 毒性分析。



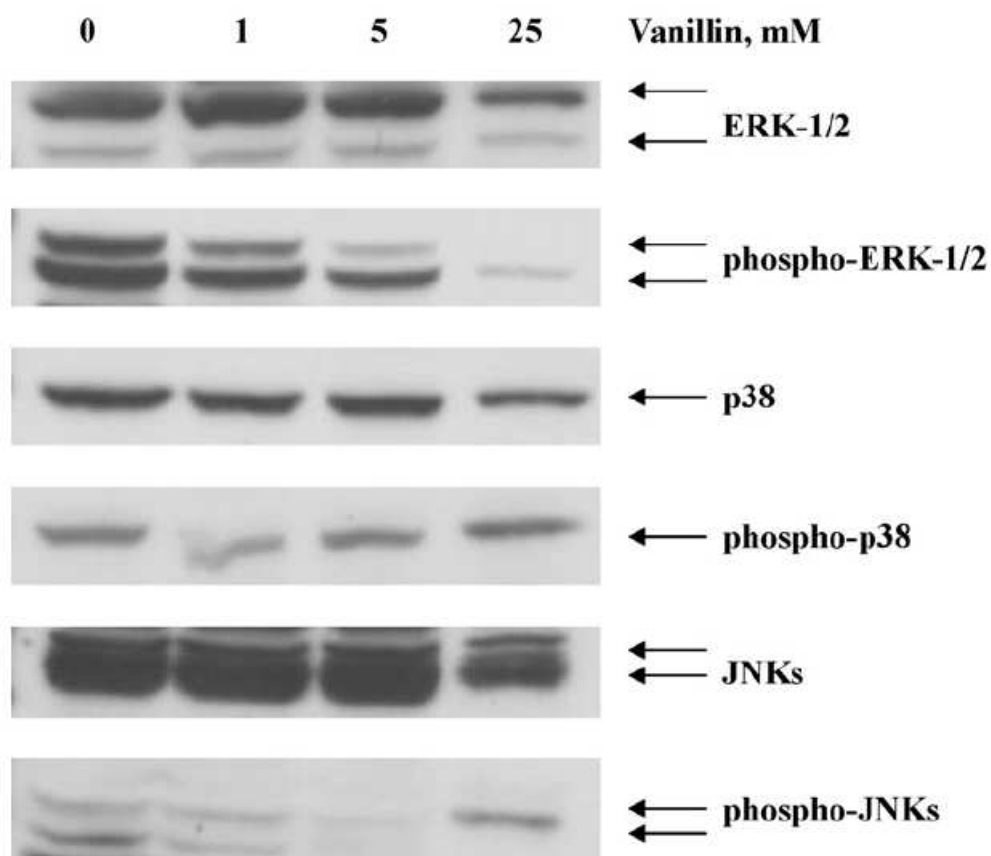
圖二、利用 Gene ontology 分析香草醛調控之基因類別。



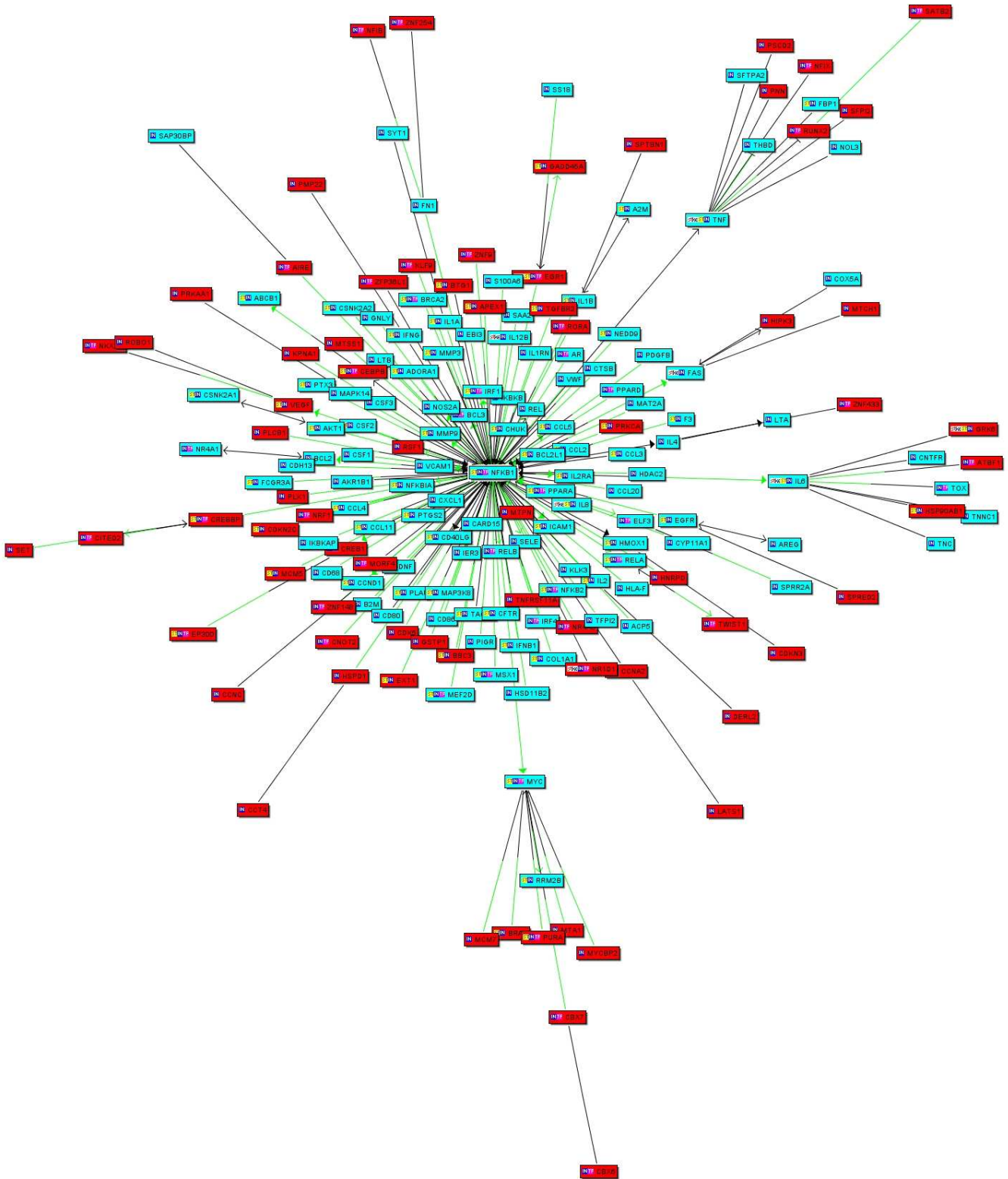
圖三、利用 Network 分析香草醛調控之基因。



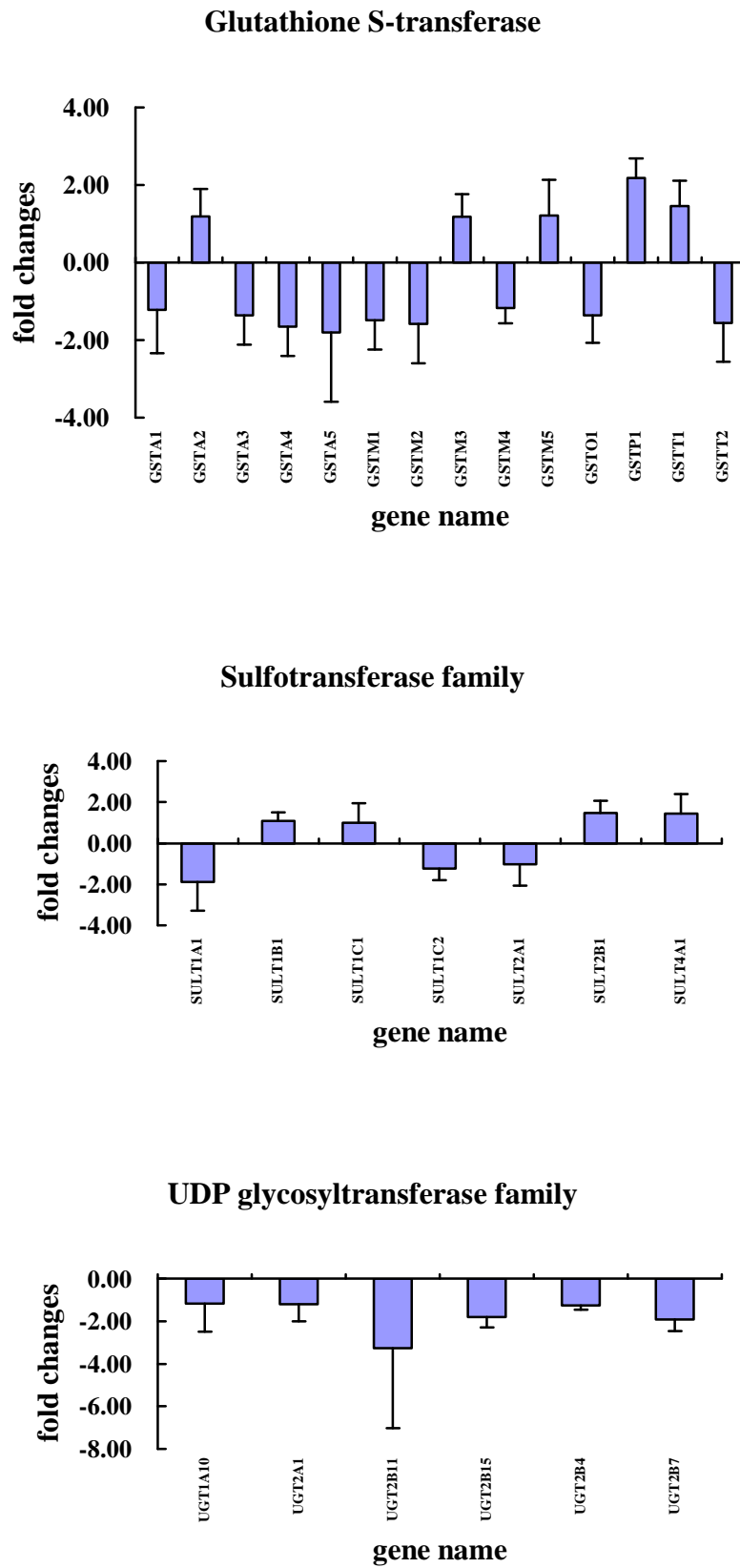
圖四、香草醛抑制 HepG2 細胞 AP-1 活性的效應。



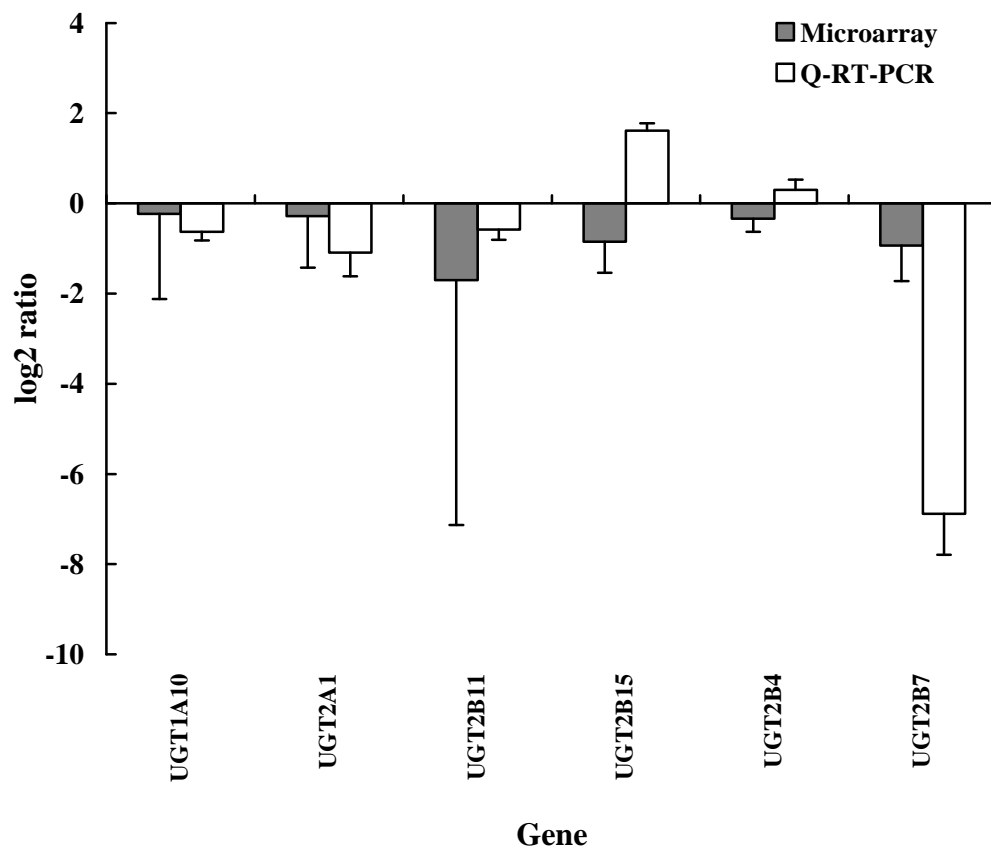
圖五、香草醛影響之細胞訊息傳遞路徑。



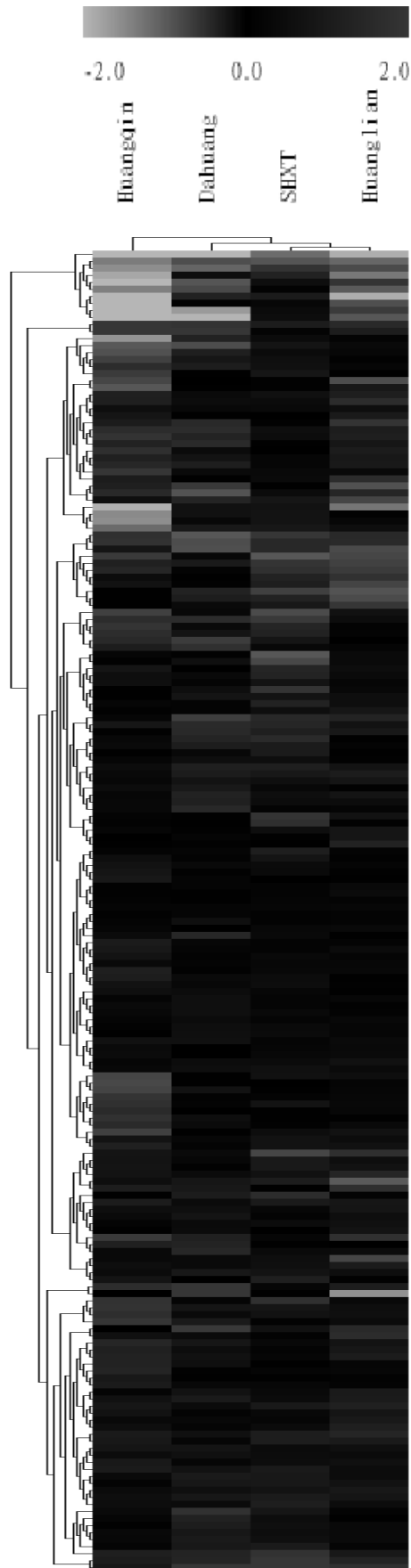
圖六、受 1,4-naphthoquinone 調控且與 NF-κB 關聯基因之 Network analysis。



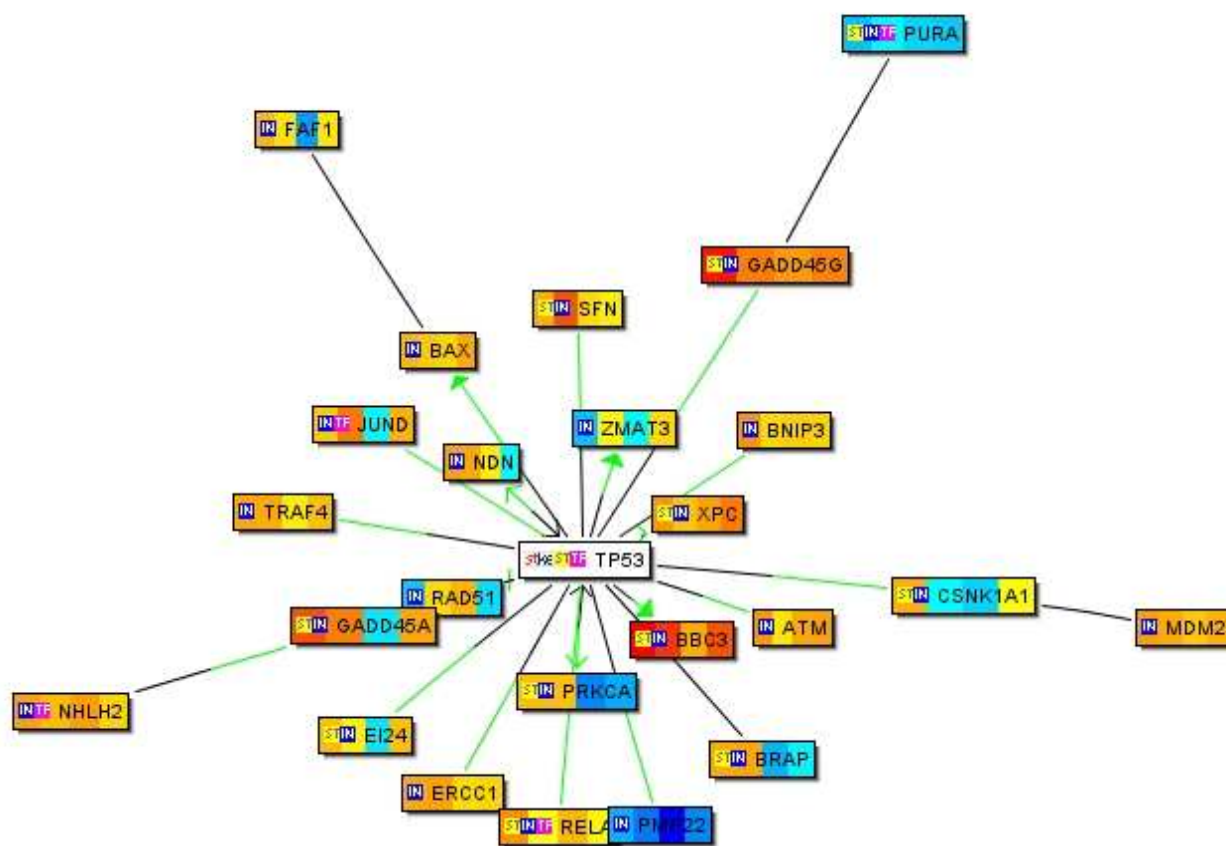
圖八、受 1,4-naphthoquinone 影響之藥物代謝相關基因的分析。



圖九、利用 qPCR 分析受 1,4-naphthoquinone 影響之 UDP glycosyltransferase 相關基因的表現量。



圖十、三黃瀉心湯與其單味藥之 Hierarchical clustering 分析。



圖十一、受三黃瀉心湯調控基因之 Network analysis。

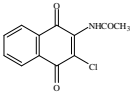
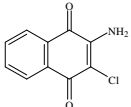
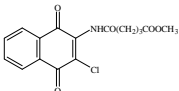
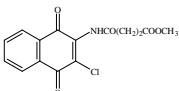
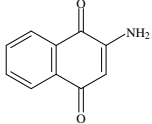
表一、受香草醛干擾之基因列表。

| Gene symbol | Description | 1 mM vanillin | | 5 mM vanillin | | GO terms |
|-------------|---|---------------------------|----------------------|---------------------------|----------------------|---|
| | | Fold changes ^a | p-Value ^b | Fold changes ^a | p-Value ^b | |
| MCM5 | Minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (<i>S. cerevisiae</i>) | -2.65 ± 0.17 | 0.0092 | -3.61 ± 0.72 | 0.0015 | Regulation of cellular process/cell cycle |
| CCNA2 | Cyclin A2 | -2.11 ± 0.25 | 0.0354 | -3.36 ± 0.44 | 0.0018 | Regulation of cellular process/cell cycle |
| S100A6 | S100 calcium binding protein A6 (calcyclin) | - | - | -2.85 ± 0.92 | 0.0074 | Regulation of cellular process/cell cycle |
| MIF | Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor) | -2.30 ± 0.59 | 0.0273 | -2.39 ± 0.36 | 0.0135 | Regulation of cellular process/death |
| PLK1 | Polo-like kinase 1 (<i>Drosophila</i>) | - | - | -2.43 ± 0.76 | 0.0153 | Regulation of cellular process/cell cycle |
| EMP3 | Epithelial membrane protein 3 | - | - | -2.27 ± 0.42 | 0.0159 | Regulation of cellular process/death |
| DUSP6 | Dual specificity phosphatase 6 | - | - | -2.13 ± 0.35 | 0.0175 | Regulation of cellular process/cell cycle |
| TCF19 | Transcription factor 19 (SC1) | - | - | -2.06 ± 0.06 | 0.0178 | Regulation of cellular process/cell cycle |
| KIFC1 | Kinesin family member C1 | - | - | -2.11 ± 0.16 | 0.0183 | Cell cycle |
| NAB2 | NGFI-A binding protein 2 (EGR1 binding protein 2) | -2.42 ± 0.11 | 0.0112 | -2.03 ± 0.04 | 0.0185 | Regulation of cellular process |
| CALR | Calreticulin | - | - | -2.05 ± 0.29 | 0.0194 | Regulation of cellular process/death |
| YWHAH | Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide | - | - | -2.03 ± 0.38 | 0.0234 | Regulation of cellular process/cell cycle/death |
| UBE2C | Ubiquitin-conjugating enzyme E2C | -1.98 ± 0.13 | 0.0413 | -1.96 ± 0.06 | 0.0239 | Regulation of cellular process/cell cycle |
| HMGAI | High mobility group AT-hook 1 | - | - | -2.01 ± 0.32 | 0.0239 | Regulation of cellular process |
| PCNA | Proliferating cell nuclear antigen | - | - | -2.05 ± 0.28 | 0.0239 | Regulation of cellular process/cell cycle |
| MCM4 | Minichromosome maintenance deficient 4 (<i>S. cerevisiae</i>) | - | - | -2.19 ± 0.70 | 0.0239 | Regulation of cellular process |
| AURKB | Aurora kinase B | - | - | -2.22 ± 0.88 | 0.0243 | Cell cycle |
| ANXA1 | Annexin A1 | - | - | -2.03 ± 0.43 | 0.0245 | Regulation of cellular process/death |
| HMGAI2 | High mobility group AT-hook 2 | - | - | -1.96 ± 0.07 | 0.0245 | Regulation of cellular process |
| CDKN3 | Cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase) | - | - | -2.00 ± 0.22 | 0.0247 | Regulation of cellular process/cell cycle |
| LGALS1 | Lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1) | - | - | -1.91 ± 0.05 | 0.0263 | Regulation of cellular process/death |
| CKS2 | CDC2 8 protein kinase regulatory subunit 2 | - | - | -1.92 ± 0.03 | 0.0263 | Regulation of cellular process/cell cycle |
| SOCS1 | Suppressor of cytokine signaling 1 | - | - | -1.90 ± 0.23 | 0.0318 | Regulation of cellular process |
| ETV5 | Ets variant gene 5 (ets-related molecule) | - | - | -2.01 ± 0.63 | 0.0334 | Regulation of cellular process |
| CDC45L | CDC45 cell division cycle 45-like (<i>S. cerevisiae</i>) | - | - | -1.94 ± 0.49 | 0.0335 | Regulation of cellular process/cell cycle |
| CKS1B | CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B | - | - | -1.81 ± 0.31 | 0.0435 | Cell cycle |
| MYBL2 | v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)-like 2 | - | - | -1.98 ± 0.55 | 0.045 | Regulation of cellular process/cell cycle/death |
| SERPINE2 | Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2 | - | - | -1.76 ± 0.07 | 0.0454 | Regulation of cellular process |
| ECT2 | Epithelial cell transforming sequence 2 oncogene | - | - | -1.81 ± 0.17 | 0.0458 | Regulation of cellular process |
| BIRC5 | Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin) | -2.51 ± 0.07 | 0.0092 | -1.76 ± 0.03 | 0.0459 | Regulation of cellular process |

^a Fold changes are means ± S.D. of duplicate assays.

^b The statistical analysis was performed by moderated *t*-statistics. Genes with *p* < 0.05 after fdr adjustment are listed.

表二、Naphthoquinone 類似物之結構及細胞毒殺濃度。

| Structure | IC ₅₀ for | TC ₅₀ for |
|--|----------------------|----------------------|
| | NF-κB inhibition | Cell viability |
|  | 40 μM | 46 μM |
|  | 5.1 μM | 5.9 μM |
|  | 18 μM | 35.5 μM |
|  | 35 μM | 62 μM |
|  | 40 μM | 50 μM |

表三、受 1,4-naphthoquinone 干擾之基因列表。

| Gene Symbol | Description | fold changes | SD | P value |
|-------------|--|--------------|------|----------|
| ATBF1 | AT-binding transcription factor 1 | -1.34 | 0.07 | 8.50E-06 |
| BTG1 | B-cell translocation gene 1, anti-proliferative | -1.40 | 0.11 | 5.74E-04 |
| CBX6 | chromobox homolog 6 | -2.00 | 0.54 | 1.80E-05 |
| CBX7 | chromobox homolog 7 | -1.54 | 0.13 | 1.58E-04 |
| CCNA2 | cyclin A2 | -2.21 | 0.13 | 5.05E-06 |
| CDK5 | cyclin-dependent kinase 5 | -1.47 | 0.25 | 3.27E-04 |
| CDKN2C | cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4) | -1.83 | 0.16 | 2.48E-05 |
| CDKN3 | cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase) | -2.86 | 0.47 | 1.77E-05 |
| CITED2 | Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2 | -4.44 | 0.80 | 3.20E-08 |
| DERL2 | Der1-like domain family, member 2 | -1.49 | 0.28 | 1.90E-04 |
| EGR1 | early growth response 1 | -3.89 | 0.65 | 1.24E-08 |
| EXT1 | exostoses (multiple) 1 | -2.74 | 0.37 | 5.94E-07 |
| GRK6 | G protein-coupled receptor kinase 6 | -2.08 | 0.37 | 3.24E-04 |
| HNRPUL1 | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1 | -1.42 | 0.14 | 5.24E-04 |
| KNTC1 | kinetochore associated 1 | -2.01 | 0.30 | 1.16E-04 |
| MCM5 | MCM5 minichromosome maintenance deficient 5, cell division cycle 46 (S. cerevisiae) | -1.49 | 0.16 | 9.53E-05 |
| MCM7 | MCM7 minichromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae) | -2.27 | 0.31 | 2.34E-06 |
| MEF2C | MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide C (myocyte enhancer factor 2C) | -2.55 | 0.61 | 3.72E-06 |
| MTCH1 | mitochondrial carrier homolog 1 (C. elegans) | -1.58 | 0.21 | 3.70E-04 |
| MTPN | myotrophin | -1.43 | 0.15 | 1.52E-04 |
| MTSS1 | metastasis suppressor 1 | -1.84 | 0.11 | 1.36E-04 |
| NFIB | nuclear factor I/B | -2.58 | 0.28 | 2.65E-06 |
| NFIX | nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor) | -2.58 | 0.50 | 9.59E-07 |
| NKX2-2 | NK2 transcription factor related, locus 2 (Drosophila) | -3.42 | 0.38 | 3.09E-06 |
| NR4A3 | nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3 | -3.69 | 0.45 | 2.95E-05 |
| PLCB1 | phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific) | -2.45 | 0.30 | 5.94E-06 |
| PLK1 | polo-like kinase 1 (Drosophila) | -1.92 | 0.45 | 1.18E-04 |
| PMP22 | peripheral myelin protein 22 | -2.46 | 0.28 | 5.33E-06 |
| PSCD2 | pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 2 (cytohesin-2) | -1.24 | 0.10 | 3.33E-04 |
| PURA | purine-rich element binding protein A | -1.82 | 0.36 | 1.07E-04 |
| ROBO1 | roundabout, axon guidance receptor, homolog 1 (Drosophila) | -1.58 | 0.22 | 9.70E-05 |
| SATB2 | SATB family member 2 | -1.38 | 0.07 | 5.95E-04 |
| SPRED2 | sprouty-related, EVH1 domain containing 2 | -1.56 | 0.23 | 1.26E-04 |
| SPTBN1 | spectrin, beta, non-erythrocytic 1 | -1.71 | 0.06 | 3.95E-08 |
| TWIST1 | twist homolog 1 (acrocephalosyndactyly 3; Saethre-Chotzen syndrome) (Drosophila) | -1.60 | 0.20 | 6.45E-05 |
| ZFP36L1 | zinc finger protein 36, C3H type-like 1 | -1.77 | 0.18 | 4.12E-05 |
| ZNF254 | zinc finger protein 254 | -2.16 | 0.99 | 5.08E-04 |
| ZNF433 | zinc finger protein 433 | -3.00 | 0.07 | 7.11E-05 |

表四、受 1,4-naphthoquinone 干擾之細胞週期相關基因列表。

| Cell cycle | | single channel | | | dual channel | | |
|-------------|--|----------------|------|----------|--------------|------|----------|
| Gene Symbol | Description | Fold changes | SD | P value | Fold changes | SD | P value |
| CCNA2 | cyclin A2 | -2.21 | 0.13 | 5.05E-06 | -1.76 | 0.23 | 1.39E-03 |
| CCNC | cyclin C | 1.89 | 0.39 | 3.45E-04 | 1.73 | 0.22 | 1.29E-04 |
| CDKN3 | cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase) | -2.86 | 0.47 | 1.77E-05 | -2.90 | 0.92 | 1.06E-04 |
| CGRRF1 | cell growth regulator with ring finger domain 1 | 1.91 | 0.80 | 5.54E-04 | 1.29 | 0.13 | 3.82E-03 |
| EXT1 | exostoses (multiple) 1 | -2.74 | 0.37 | 5.94E-07 | -2.40 | 0.02 | 1.67E-04 |
| GADD45A | growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha | 2.92 | 0.31 | 1.38E-08 | 2.70 | 0.37 | 5.58E-06 |
| KNTC1 | kinetochore associated 1 | -2.01 | 0.30 | 1.16E-04 | -1.77 | 0.02 | 3.19E-03 |
| LATS1 | LATS, large tumor suppressor, homolog 1 (Drosophila) | 3.66 | 1.35 | 8.87E-05 | 2.04 | 0.14 | 2.80E-04 |
| MCM7 | MCM7 minichromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae) | -2.27 | 0.31 | 2.34E-06 | -2.08 | 0.06 | 1.56E-04 |
| MTSS1 | metastasis suppressor 1 | -1.84 | 0.11 | 1.36E-04 | -2.34 | 0.49 | 1.70E-04 |
| PAFAH1B1 | platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform Ib, alpha subunit 45kDa | -2.44 | 0.40 | 3.82E-05 | -2.00 | 0.22 | 4.50E-04 |
| PLCB1 | phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific) | -2.45 | 0.30 | 5.94E-06 | -3.33 | 1.14 | 4.05E-05 |
| PLK1 | polo-like kinase 1 (Drosophila) | -1.92 | 0.45 | 1.18E-04 | -1.91 | 0.46 | 2.11E-03 |
| PRKCA | protein kinase C, alpha | 2.02 | 0.35 | 2.24E-05 | 1.92 | 0.02 | 3.23E-04 |
| STAG1 | stromal antigen 1 | 2.18 | 1.01 | 8.52E-05 | 1.45 | 0.40 | 2.54E-03 |
| ESCO2 | establishment of cohesion 1 homolog 2 (S. cerevisiae) | -2.00 | 0.25 | 1.18E-06 | -3.85 | 2.40 | 7.10E-04 |
| GNL3 | guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar) | 2.07 | 0.30 | 3.63E-06 | 1.78 | 0.23 | 9.35E-05 |

表五、三黃瀉心湯及其單味藥之組成比例與 TC₅₀ 之結果。

| | Pharmacognosical Name | Ratio | TC ₅₀ |
|-----------|-----------------------|-------|------------------|
| Dahuang | Radix et Rhizoma Rhei | 1 | 0.15 mg/ml |
| Huanglian | Rhizoma Coptis | 1 | 0.80 mg/ml |
| Huangqin | Radix Scutellariae | 1 | 4.79 mg/ml |
| SHXT | - | - | 3.66 mg/ml |

表六、三黃瀉心湯及其單味藥之 z Scores 分析。

| Gene Set Name | P53_UP ¹ | DNA_DAMAGE_SIGNALLING ² | p53_signalling ³ |
|-----------------|---------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| SHXT_z (p) | 8.82 (9.49E-11) | 7.15 (4.19E-10) | 6.19 (3.03E-08) |
| Dahuang_z (p) | 3.08 (0.0051) | 3.65 (0.000731) | 3.20 (0.002878) |
| Huangqin_z (p) | -0.50 (0.349474) | 1.53 (0.122978) | -0.04 (0.397707) |
| Huanglian_z (p) | 3.61 (0.001211) | 4.46 (4.26E-05) | 3.00 (0.005119) |

¹Target genes up-regulated by p53 are from Kannan et al. (2001).²Genes involved in DNA damage signaling are from gene ontology (<http://www.geneontology.org/>).³Genes involved in p53 signaling are from BioCarta (<http://www.biocarta.com/index.asp>).

表七、受三黃瀉心湯調控之基因列表。

| Gene Name | SHXT | | | Dahuang | | | Huangqin | | | Huanglian | | |
|--|-------|------|--------|---------|------|--------|----------|------|--------|-----------|------|--------|
| | FC | SD | P | FC | SD | P | FC | SD | P | FC | SD | P |
| Target genes up regulated by p53 | | | | | | | | | | | | |
| BAX | 1.65 | 0.29 | 0.0048 | 1.47 | 0.30 | 0.0288 | 1.35 | 0.29 | 0.0917 | 1.84 | 0.33 | 0.0005 |
| BBC3 | 6.25 | 0.16 | 0 | 4.38 | 0.82 | 0 | 1.80 | 0.27 | 0.0016 | 3.47 | 0.18 | 0 |
| GADD45A | 3.59 | 1.79 | 0 | 2.50 | 1.56 | 0.0052 | -1.27 | 0.96 | 0.4137 | 1.87 | 1.10 | 0.0508 |
| MDM2 | 1.99 | 0.92 | 0.0088 | 1.79 | 1.12 | 0.0404 | 1.45 | 0.82 | 0.1636 | 1.73 | 0.99 | 0.0458 |
| NDN | 1.96 | 0.53 | 0.0195 | 1.87 | 0.67 | 0.0371 | 1.14 | 0.63 | 0.8705 | -1.04 | 0.10 | 0.8829 |
| NHLH2 | 1.96 | 0.79 | 0.0049 | 1.61 | 0.55 | 0.0364 | 2.02 | 0.79 | 0.0032 | 1.37 | 0.52 | 0.1744 |
| NINJ1 | 1.63 | 0.16 | 0.0131 | 1.55 | 0.17 | 0.0277 | -2.87 | 1.27 | 0 | 1.07 | 0.18 | 0.7403 |
| SCRIB | -1.77 | 0.23 | 0.0024 | -1.06 | 0.16 | 0.7534 | -1.64 | 0.79 | 0.0027 | 1.57 | 0.32 | 0.0171 |
| Genes involved in DNA damage signaling | | | | | | | | | | | | |
| ATM | 2.12 | 1.30 | 0.0042 | 1.19 | 0.87 | 0.451 | 1.85 | 1.12 | 0.0156 | 1.97 | 1.28 | 0.0107 |
| BAX | 1.65 | 0.29 | 0.0048 | 1.47 | 0.30 | 0.0288 | 1.35 | 0.29 | 0.0917 | 1.84 | 0.33 | 0.0005 |
| BBC3 | 6.25 | 0.16 | 0 | 4.38 | 0.82 | 0 | 1.80 | 0.27 | 0.0016 | 3.47 | 0.18 | 0 |
| BNIP3 | 2.15 | 0.67 | 0.006 | 1.33 | 0.25 | 0.2889 | 1.41 | 0.29 | 0.2076 | 1.38 | 0.82 | 0.4039 |
| ERCC1 | 1.85 | 0.63 | 0.0316 | 1.96 | 1.32 | 0.0469 | 1.29 | 0.42 | 0.3703 | 1.36 | 0.34 | 0.2566 |
| GADD45A | 3.59 | 1.79 | 0 | 2.50 | 1.56 | 0.0052 | -1.27 | 0.96 | 0.4137 | 1.87 | 1.10 | 0.0508 |
| GADD45G | 5.44 | 3.11 | 0 | 2.54 | 1.32 | 0 | 2.06 | 1.16 | 0.0011 | 2.45 | 1.27 | 0 |
| MDM2 | 1.99 | 0.92 | 0.0088 | 1.79 | 1.12 | 0.0404 | 1.45 | 0.82 | 0.1636 | 1.73 | 0.99 | 0.0458 |
| PURA | -1.94 | 0.47 | 0.0005 | -1.06 | 0.31 | 0.7699 | -1.56 | 0.49 | 0.0167 | -1.70 | 0.52 | 0.0044 |
| RAD51 | -1.71 | 0.35 | 0.0067 | 1.30 | 0.28 | 0.1718 | 1.69 | 0.37 | 0.0069 | -1.43 | 0.28 | 0.0743 |
| XPC | 2.12 | 1.06 | 0.0042 | 1.53 | 0.75 | 0.0871 | 1.93 | 0.89 | 0.0095 | 2.58 | 1.39 | 0.0004 |
| Genes involved in p53 signaling | | | | | | | | | | | | |
| ATM | 2.12 | 1.30 | 0.0042 | 1.19 | 0.87 | 0.451 | 1.85 | 1.12 | 0.0156 | 1.97 | 1.28 | 0.0107 |
| BAX | 1.65 | 0.29 | 0.0048 | 1.47 | 0.30 | 0.0288 | 1.35 | 0.29 | 0.0917 | 1.84 | 0.33 | 0.0005 |
| BBC3 | 6.25 | 0.16 | 0 | 4.38 | 0.82 | 0 | 1.80 | 0.27 | 0.0016 | 3.47 | 0.18 | 0 |
| BRAP | 1.81 | 0.30 | 0.0025 | 1.91 | 0.35 | 0.001 | -2.26 | 0.53 | 0 | -1.12 | 0.36 | 0.5169 |
| CSNK1A1 | 1.77 | 0.68 | 0.0356 | -1.01 | 0.44 | 0.973 | -1.56 | 0.97 | 0.0727 | 1.04 | 0.47 | 0.8599 |
| EI24 | 1.60 | 0.17 | 0.0209 | 1.12 | 0.16 | 0.5765 | -1.28 | 0.47 | 0.1555 | 1.57 | 0.63 | 0.0473 |
| FAF1 | 1.64 | 0.43 | 0.0093 | 1.24 | 0.33 | 0.2497 | -2.96 | 1.16 | 0 | 1.19 | 0.36 | 0.3636 |
| GADD45A | 3.59 | 1.79 | 0 | 2.50 | 1.56 | 0.0052 | -1.27 | 0.96 | 0.4137 | 1.87 | 1.10 | 0.0508 |
| MDM2 | 1.99 | 0.92 | 0.0088 | 1.79 | 1.12 | 0.0404 | 1.45 | 0.82 | 0.1636 | 1.73 | 0.99 | 0.0458 |
| PMP22 | -2.29 | 0.28 | 0 | -4.61 | 1.31 | 0 | -17.50 | 6.45 | 0 | -3.76 | 0.88 | 0 |
| PRKCA | 1.60 | 0.24 | 0.0115 | 1.57 | 0.28 | 0.016 | -3.81 | 0.58 | 0 | -2.44 | 0.78 | 0 |
| RELA | 2.22 | 1.99 | 0.0332 | -1.00 | 0.67 | 0.6251 | 1.67 | 1.11 | 0.0831 | 1.07 | 0.75 | 0.55 |
| SFN | 1.78 | 0.30 | 0.002 | 3.51 | 0.78 | 0 | 1.30 | 0.14 | 0.1526 | 1.13 | 0.23 | 0.5252 |
| TRAF4 | 1.88 | 0.60 | 0.0004 | 1.83 | 0.69 | 0.0009 | 1.14 | 0.48 | 0.4991 | 1.60 | 0.54 | 0.0086 |
| WIG1 | -1.93 | 0.28 | 0.0342 | 1.06 | 0.32 | 0.8805 | -1.05 | 0.26 | 0.8616 | 1.31 | 1.09 | 0.8246 |

