

編號：CCMP94 -RD-049

利用基因晶片系統以及體外細胞培養系統來分析中草藥冬蟲夏草對人類樹突狀細胞免疫功能的影响(2)

許志樸

國立清華大學 原子科學系

摘要

中草藥在臨床上的運用已經累積了數千年的經驗。然而，以科學實驗的方法來驗證其對細胞或生物體的影響，仍處於起步階段。近年來，由於醫學科技的進步，中草藥科學化已經是時代的趨勢。為達到此一目標，首先要建立一套以科學實驗的方法，來評鑑中草藥在中醫典籍內所標示的療效。本計畫之目的是要利用基因晶片技術及樹突狀細胞為實驗架構的體外細胞培養系統，來分析中草藥冬蟲夏草對人類樹突狀細胞免疫功能的影响。希望藉著觀察冬蟲夏草對樹突狀細胞免疫功能及其基因表現圖譜之影响，進一步有效且可靠的了解冬蟲夏草對增強免疫功能的可能藥理機制。

本研究計畫將建立樹突狀細胞的體外細胞培養系統，並利用此一系統來分析中草藥冬蟲夏草對樹突狀細胞免疫功能的影响。在第一年我們建立人類樹突狀細胞體外培養系統、冬蟲夏草的鑑定、冬蟲夏草的品質控管、冬蟲夏草對樹突狀細胞分化與成熟之影响及人類基因晶片的測試實驗。由樹突狀細胞的細胞表面分子得知，冬蟲夏草水萃液會抑制未成熟的樹突狀細胞及成熟過程的樹突狀細胞表面分子的表現。本年度是計畫的第二年，我們如預期順利的完成了冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分泌細胞激素的測定、冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞吞噬能力測定，以及利用統計分析來設計基因晶片實驗，並完成數據的分析。我們發現冬蟲夏草水萃液會抑制樹突狀細胞分泌TNF- α 、IL-12及吞噬能力。利用基因晶片我們也找到了許多參與免疫調節與發

炎反應的基因，未來將進一步分析並利用其他的免疫實驗確認結果並配合基因表現圖譜的結果找出其相關免疫調控機制。

關鍵詞：中草藥，基因晶片技術，樹突狀細胞，冬蟲夏草，基因表現

編號：CCMP94 -RD-049

Using Gene Chip Technology and *ex vivo* Cell Culture System to Analyze the Dendritic Cell Immune Function Affected by Chinese Herbal Medicine--*Cordyceps sinensis*(2)

Ian C. Hsu

National Tsing-Hua University, Department of Atomic Science

ABSTRACT

The Chinese herbal medicine has been administered in traditional Chinese therapy for well over two thousand years. However, the pharmacological study of Chinese herbs on biological objects is still in its infancy. Modernization of Chinese medicine has provoked great interests from bio-medical researchers globally. The objective of this proposal is to analyze the dendritic cell immune function affected by *Cordyceps sinensis* using cDNA micorarray technology and dendritic cell-based *ex vivo* cell culture system. The effects of *Cordyceps sinensis* on cellular immune responses will be measured. Specifically, global gene expression profiles on dendritic cells will be examined with or without the influence of *Cordyceps sinensis*. These gene expression patterns will be further analyzed in order to study possible pharmacological mechanisms mediated by *Cordyceps sinensis*.

In the first year, we established a dendritic cell-based *ex vivo* cell culture system and accomplished phylogenic as well as chemical fingerprinting analysis on *Cordyceps* sample. The effects of *Cordyceps sinensis* water extract on the differentiation/maturation process of dendritic cells were being examined. We also performed a mock experiment to test the microarray system. Our results indicate that

Cordyceps sinensis may inhibit the differentiation process of immature and mature dendritic cells. This year is the second year. We have examined the effect of *Cordyceps sinensis* water extract on the cytokine secretion and phagocytic activity of dendritic cells. Statistical approaches were applied for the design of microarray experiment and for data analysis. We found that *Cordyceps sinensis* water extract decreased LPS-induced TNF- α and IL-12 production and phagocytic activity on dendritic cells. In addition, microarray analysis has identified a number of immune-related and inflammatory-related genes are differentially regulated by *Cordyceps sinensis*. Next year, we will carry out more related biological experiments and microarray experiments to further confirm this observation and try to characterize its underlying molecular mechanisms.

Keywords : Chinese Herbal Medicine , Gene Chip Technology , Dendritic Cells ,*Cordyceps sinensis* , Gene Expression

壹、前言

中草藥及天然藥物對於治療疾病與維護人體健康的重要性，已經逐漸被海內外醫界所肯定。例如美國於 1947 年通過的 Dietary Supplement Health and Education Act 中放寬對天然藥物的管制，此舉使得美國保健品市場上，各種含有天然藥物成份的商品大量湧現，也蔚為一股美國大眾食品保健的風潮。中醫累積了數千年的經驗，在治療疾病上有其獨特的理論體系。中醫對人體的臨床經驗比現今使用之動物實驗更能直接地反應出藥物對人體的作用。近年來傳統中國醫藥愈來愈受到一般民眾所認同以及政府與醫界的肯定和重視，為了加速中草藥之科學化，應利用現代科技來加以評鑑，客觀地對於各種中草藥，以科學實驗的方法來衡量其對人體生理的影響，使其更能對整個人類社會產生貢獻。

冬蟲夏草為傳統中藥中之珍貴藥材。清初（西元1757年）吳儀洛所編『本草從新』中首見“冬蟲夏草”之名。至西元1832年趙學敏所編『本草綱目拾遺』中對冬蟲夏草有更詳盡的補述，謂其“出四川江油縣化林坪，夏為蟲冬為草，長三寸許，下跌六足，脰以上絕類蠶，羌俗採為上藥，功與人參同”又如“冬在土中身活如老蠶，有毛能動，至夏則毛出土上，連身俱化為草，若不取至冬復化為蟲”。而將其視為神奇的生物，並且是高貴的藥材。其實所謂的“冬蟲夏草”

“蟬花”“白殭蠶”等都是昆蟲寄生性真菌，近代學者將其列於冬蟲夏草屬（*Cordyceps*）中[1]。一般所謂的冬蟲夏草專指寄生於蝙蝠蛾幼蟲所形成的蟲菌複合體。真菌於冬季前後侵入蟲草蝙蝠蛾的幼蟲體內，待菌絲充滿體內，蟲即僵死。到了夏季，從死蟲的頭頂上長出菌座，露出土面，地下部分則形成菌核。子實體和菌核採收後就是名貴的滋補品—冬蟲夏草。

冬蟲夏草屬於子囊菌綱，麥角菌目，麥角菌科，蟲草屬。棲息於西藏、喜馬拉雅山、四川省、雲南省、青海省等內地，標高3000~4000公尺高山地帶，寄生於蝙蝠蛾的幼蟲。每年5~8月間雪溶後自土中掘出帶菌柄之蟲體，除去外層泥土，曬乾再噴酒使軟，整理平整後，用微火烘乾，而成中醫視為滋肺補腎的高貴藥材。謂其味甘酸、性平、氣香、無毒、入肺腎二經。有強壯、益肺腎、補精髓、保肺氣、實理、補虛、解毒、止血、化痰之功效[1]。

根據近年來對於冬蟲夏草於藥理及臨床應用方面的研究，可歸納為下列幾個大項：

一、肝臟方面：

冬蟲夏草菌絲水萃液可誘發小鼠肝臟的代謝呈現高能量狀態[2]。冬蟲夏草可以增加小鼠肝臟重量，增強肝臟內Kupffer細胞之吞噬功能與產生細胞激素IL-1 (interlukin-1)、干擾素IFN (interferon) 和腫瘤壞死因子TNF (tumor necrosis factor) 的能力[3, 4]。冬蟲夏草具有增強免疫力之功能，故被應用於治療慢性B型肝炎病患，有改善肝功能，並可顯著提高患者血漿白蛋白、降低 γ 球蛋白 (γ -globulin) 的含量[5]。

二、腎臟方面：

冬蟲夏草可保護腎小管近曲小管，減輕gentamycin之毒性，使aminoglycoside和kanamycine所引起之急性腎衰竭獲得改善[6, 7]。冬蟲夏草能夠改善adriamycin引起的腎功能衰竭，包含促進血紅素的生成、改善蛋白尿症狀，對減輕腎絲球的傷害相當有幫助[8]。冬蟲夏草能夠改善腎衰竭病患的腎功能、降低腎組織損傷、促進腎小管細胞的再生與腎小管的過濾功能的修復，冬蟲夏草對腎臟的功效可能與下列機制有關：(a) 促進老鼠的腎上腺皮質細胞分泌腎上腺皮質酮 (corticosterone) [9]。(b) 保護腎小管細胞鈉幫浦的活性[7]。(c) 減輕腎小管細胞脂質過氧化的損傷和鈣離子之含量[7]。冬蟲夏草能減輕cyclosporin A對腎移植病人的腎毒性[10]，並可以促進脾臟的淋巴球分裂，增加其產生細胞激素IL-2之能力。隨著腎功能的改善，其BUN (blood urea nitrogen) 與肌酸酐 (creatinine) 的量也明顯下降[11]。

三、心血管系統方面：

冬蟲夏草富含腺嘌呤核苷 (adenosine)，能抑制血小板的凝集[12]。在兔子體內試驗中，冬蟲夏草的醇萃液能抑制主動脈內皮表面形成血栓與血小板凝集之數目[13]。冬蟲夏草的萃取物可降低大白鼠之血壓，並增加血管舒張活性和動脈血流量[14, 15]，冬蟲夏草的醇萃液物可增強天竺鼠對鈉鉀離子幫浦抑制劑 (ouabain) 所產生心律不整之耐受性[16]。

四、抗癌作用方面：

冬蟲夏草及其萃取物的成份具有冬蟲夏草素 (cordycepin)、冬蟲夏草多醣體 (polysaccharides) 和其它腫瘤生長抑制劑，故冬蟲夏草及其萃取物能夠抑制多種腫瘤細胞株K562、Vero、Wish、Calu-1、Raji、

Jurkat、WM-1341、HL-60、RPMI-8226及U937等細胞的生長[17-19]。老鼠植入腹水癌細胞株Ehrlich ascites carcinoma細胞和纖維瘤細胞株Meth A fibrosarcoma 細胞後，冬蟲夏草水萃液可提高老鼠之存活率與存活時間[20]。冬蟲夏草可以活化殺手細胞（NK cells），減少黑色素瘤細胞株B16細胞在老鼠肺臟形成之株落 [21]。在C57BL/6J老鼠植入肺癌細胞株Lewis lung carcinoma細胞及黑色素瘤細胞株B16細胞後，冬蟲夏草水萃液能夠降低這些腫瘤細胞株轉移到肝臟的程度[22]。冬蟲夏草可以增加人類肝腫瘤細胞株HA22T/VGH細胞表面分子MHC-II（major histocompatibility complex class-II）的表現量，並提高免疫系統監測癌細胞的效率[23]。

五、免疫系統方面：

（一）對淋巴球的影響：

冬蟲夏草能夠增強老鼠週邊血液與脾臟的幫助型T細胞（T helper cell）的數量及存活率，提高幫助型T細胞對抑制型T細胞（T suppressor cell）數量的比值，降低幫助型T細胞受免疫抑制劑prednisolone acetate及cyclophosphamide造成之免疫抑制作用 [24]。可延長小鼠同種異體移植（allograft）皮膚的存活期，其效果類似cyclosporin A[25]

（二）對吞噬細胞的影響：

冬蟲夏草水萃液可促進人類周邊血液單核細胞（human blood mononuclear cells, PBMC）產生干擾素IFN- γ 、腫瘤壞死因子TNF- α 和細胞激素IL-1，其可以活化人類單核球細胞株U937細胞的成熟分化與吞噬能力[17]。冬蟲夏草水萃液也可活化肝臟巨噬細胞Kupffer細胞吞噬功能與產生細胞激素IL-1、干擾素IFN和腫瘤壞死因子TNF[5]。

（三）對自然殺手細胞（NK cells）的影響：

提高自然殺手細胞的活性，拮抗cyclophosphamide所引起之自然殺手細胞活性降低[24]。冬蟲夏草能提高小鼠、正常人、白血病患者體內自然殺手細胞活性，增加淋巴球細胞表面分子CD16的表現與毒殺白血細胞株K562細胞之能力 [26]。

六、自體免疫疾病方面：

冬蟲夏草可以抑制NZB/NZW F1及MRL-lpr/lpr品系之小鼠產生

anti-dsDNA抗體，增加小鼠的存活率，延長小鼠壽命，並減輕自體免疫系統侵犯腎臟的程度[27-28]。

七、呼吸系統方面：

冬蟲夏草甲醇萃取液能抑制細胞激素IL-1 β 、細胞激素IL-6、腫瘤壞死因子TNF- α 、細胞激素IL-8 mRNA之表現，並活化細胞激素IL-12和干擾素IFN- γ mRNA的表現，使體內免疫反應偏向細胞性免疫反應，抑制B細胞產生IgG2、IgE[29]。促進支氣管平滑肌擴張，並抑制血小板凝集，使氣喘發作時的幫助型T細胞第二型（T_{H2}）免疫反應轉向幫助型T細胞第一型（T_{H1}），降低氣喘的嚴重程度，具有平喘的效果[30-31]。

八、抗氧化方面：

增加老鼠超氧歧化酶（superoxide dismutase, SOD）的生成與活性，促丙二醛（malondialdehyde, MDA）生成量降低，SOD具有清除自由基與降低脂質過氧化的功能，故能保護細胞、避免組織傷害[32]。

九、其他相關的功能：

冬蟲夏草萃取液對正常小鼠有降低血糖、降低血清中膽固醇與三酸甘油酯含量的功能[33]。抗菌作用方面，冬蟲夏草對結核桿菌的生長有抑制效果[34]。冬蟲夏草能活化老鼠睪丸間質細胞株Leydig細胞分泌睪固酮（testosterone）[35]。

樹突狀細胞（dendritic cell, DC）最早是在真皮中被發現，稱之為蘭氏細胞。直到1973年Steinman等人從老鼠的脾臟、淋巴結、Peyer's patch分離出一種較大之星形細胞，由相位差顯微鏡下可觀察到此細胞具有許多偽足，因其特殊之形態，故將之命名為樹突狀細胞[36-37]。1992年，Inaba等人發現了從小鼠的骨髓培養出大量樹突狀細胞的技術後[38]，吸引了研究人員大量的投入樹突狀細胞的研究，使得樹突狀細胞的功能在過去幾年內已被逐漸解開謎團。

樹突狀細胞為最有效率的抗原呈獻細胞，其能有效的刺激B細胞及T細胞反應，對於引發專一性免疫反應有著舉足輕重的影響力。樹突狀細胞在免疫系統中扮演著警衛的角色，平時以具有高度吞噬能力之未成熟狀態存在於周邊組織中待命，一但組織遭遇到外來病原菌侵襲，便會將入侵之細菌、病毒等外來物吞噬後將之帶到附近之淋巴器

官，同時樹突細胞亦會因為病原菌所釋出之一些物質例如脂多醣（Lipolysaccharide, LPS）之影響而達到成熟的狀態[39-40]，而樹突狀細胞將處理後之抗原呈獻，進而活化淋巴器官中之抗原專一性輔助型及毒殺型T細胞，最後達成清除病原菌之目的 [40]。

在樹突狀細胞分化的過程中，大致上可以分成三階段，樹突狀細胞的先驅細胞（precursor DC, pre-DC）、未成熟的樹突狀細胞（immature DC, iDC）以及成熟的樹突狀細胞（mature DC, mDC）。在不同的階段中，除了細胞外觀上的差異外，在細胞表面的MHC-I、II、costimulatory factor等表面分子的表現、抗原吞噬能力、與細胞移動相關的接受器及分泌細胞激素的情形等也會不同[40]。大致上，未成熟的樹突狀細胞其吞噬抗原的能力較高，而成熟的樹突狀細胞其與細胞活化及抗原呈獻能力有關的MHC及costimulatory分子的表現較未成熟的樹突狀細胞高[40]。所以一般對樹突狀細胞的鑑定是以抗體作細胞表面分子的染色，以流式細胞儀分析。其中常用來鑑定樹突細胞的細胞表面分子，例如：與細胞黏附及活化功能有關的CD11c、CD80及CD86；與抗原呈獻的活性有關的MHC-II及接受T細胞活化訊號的CD40 [40-41]。樹突狀細胞細胞表面標記的表現，代表著功能上的差異，如抗原的吞噬、細胞的遷移、抗原的呈獻，都可藉由細胞表面標記的表現來做評估[40]。目前證實由人類血液中的單核球（monocyte）可以經由體外的培養，利用 granulocyte/macrophage colony-stimulating factor（GM-CSF）及細胞激素IL-4刺激，可使單核球衍生為樹突狀細胞[42]。

近年來，生醫科技在高速自動化分析（High-Throughput Analysis）上有快速的進展，再加上人類基因體計畫已接近完成，使得許多原本在傳統生化實驗室中需要數年的時間才有可能得到的資訊，利用高速自動化分析則可以在數日之內取得同樣，甚至更多的資訊，其中基因晶片系統就是屬於這一類的分析系統。生物體絕大多數的生理現象都可說是和基因表現有密不可分的關係，例如：各類酵素及賀爾蒙之產生與否或其產量的多寡等，與其基因之表現量有密切關係。更進一步說，細胞的分化（例如：皮膚細胞長成皮膚、肝臟細胞長成肝臟、甚至人之胚胎細胞長成人等）、細胞的正常分裂與否（例如：正常細胞與癌細胞）、細胞受外來刺激（例如：藥物、毒素、微生物、輻射及其它之物理或化學之刺激）之反應，以及生物體組織之其它健康狀況，都是由其相關的基因之表現控制。換句話說，我們可由研究其相關的基因之表現而得知上述問題之端倪。傳統研究基因表現的方法一次只能同時研究最多十來個基因之表現行為，對於人類約三萬多個基

因而言，要找出相關的基因，傳統的方法的確猶如大海撈針一般。而使用基因晶片研究基因表現，則一次能同時研究上萬個基因之表現行為。

根據文獻及先前研究的經驗，冬蟲夏草的水萃液對於免疫系統的巨噬細胞具有活化的作用[43]。然而，樹突狀細胞與巨噬細胞同為抗原呈獻細胞且抗原呈獻能力遠高於巨噬細胞，目前尚無利用冬蟲夏草於樹突狀細胞的研究報告，遂本計劃的目的是要利用現代化的尖端生物科技—基因晶片技術和目前相當受重視的免疫系統調節細胞—樹突狀細胞，為實驗架構，來分析中草藥珍品—冬蟲夏草對細胞免疫功能的影响。本計畫的執行結合了國內對於冬蟲夏草、微量分析、樹突狀細胞、基因晶片技術及生物統計等各相關領域的專家與權威，希望藉著觀察冬蟲夏草對樹突狀細胞基因表現圖譜的影响，進一步有效且可靠的了解，冬蟲夏草對調節樹突狀細胞免疫功能之可能機制，針對冬蟲夏草於樹突狀細胞之免疫調節功效做全盤性的評估。

本計畫原規劃為三年計畫，該年度為計畫執行的第二年。在第一年我們已經順利完成(1)人類樹突狀細胞的體外培養系統之建立。(2)冬蟲夏草樣本的品種鑑定。(3)冬蟲夏草樣本的萃取、成份分析與批次鑑定。(4)冬蟲夏草水萃液與脂多醣的劑量選擇。(5)冬蟲夏草水萃液對於樹突狀細胞分化成熟之影响。(6)冬蟲夏草水萃液對於樹突狀細胞分化成熟之影响。(7)人類基因晶片的製備與測試(Mock)實驗。

在本計畫第一年已經順利建立冬蟲夏草對於樹突狀細胞之影响評估平台。而本計畫第二年(本年度)之目的主要有兩個部分，一是要進一步從細胞生理學的層面，探討冬蟲夏草對於樹突狀細胞吞噬能力以及分泌細胞激素的影响。另一部分則是要進行基因晶片的研究，建立冬蟲夏草對於樹突狀細胞基因表現之影响評估平台，目標在觀察研究冬蟲夏草對於樹突狀細胞基因表現之影响。

貳、材料與方法

一、人類單核球衍生之樹突狀細胞 (human monocyte-derived dendritic cells) 的培養

本方法乃是參考Romani等人的作法經修飾後所得[42]。樹突狀細胞的來源是由人體血液中的單核球細胞分化衍生而來。本計畫向新竹捐血中心申請研究用全血，利用密度1.077的白血球分離液 (Ficoll Paque, Amersham Pharmacia)，將全血中的周邊血液單核細胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) 分離。人體周邊血液單核細胞取出之後，利用紅血球溶解液 (red blood cell lysis buffer, e-Bioscience)，去除殘餘的紅血球，再使用緩衝溶液 (Hanks's balanced salt solution, Gibco) 清洗三次。利用磁珠抗體分離 (Magnetic cell sorting, MACS) 的方法，使用人類單核球分離試劑 (human monocyte isolation kit II, Miltenyi Biotec) 純化人類單核球，最後利用流式細胞儀確認單核球的純度 > 90%。純化後的人類單核球，以無菌操作技術將細胞植入24孔細胞培養皿內，濃度為 5×10^5 個/well，細胞培養液RPMI-1640 (Gibco) 內含細胞激素IL-4 (Recombinant human interleukin-4, Peprotec) 1000 unit 和 GM-CSF (Recombinant human granulocyte macrophage colony stimulating factor, Peprotec) 500 unit 置於細胞培養箱內培養，37°C，5% CO₂。每隔兩天換一次培養液。其中單核球經過細胞激素IL-4和GM-CSF培養六天之後，即被誘導分化為未成熟樹突狀細胞。

二、利用酵素聯結免疫吸附分析法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 測定細胞激素 (Cytokine) 之產量。

樹突狀細胞培養第六天，將細胞數調整為 2×10^5 個/well，以無菌操作技術將細胞植入96孔細胞培養皿內，細胞培養液RPMI-1640內含細胞激素IL-4 (Peprotec) 1000 unit和GM-CSF (Peprotec) 500 unit。分別加入細菌的脂多醣及不同濃度的冬蟲夏草水萃液刺激。刺激兩天後，收取細胞培養之上清液進行酵素聯結免疫吸附分析法，分別測其TNF- α 及IL-12的量 (e-Bioscience)。

三、利用流式細胞儀分析樹突狀細胞吞噬能力之影響。

樹突狀細胞培養第六天，將細胞數調整為 1×10^6 個/well，以無菌操

作技術將細胞植入24孔細胞培養皿內，細胞培養液RPMI-1640內含細胞激素IL-4（Peprotec）1000 unit和GM-CSF（Peprotec）500 unit。分別加入細菌的脂多醣及不同濃度的冬蟲夏草水萃液刺激。刺激兩天後，收取細胞進行吞噬能力的測試。先將細胞移至FACS tube（Partec），細胞數調整為 10^6 個，100 μ l/tube，置於冰上10分鐘。之後每管各加入10 μ l，濃度為10 mg/ml之 FITC-Dextran（Sigma）。將細胞置於37°C 水浴槽內，反應兩小時。Control則繼續置放於冰上。反應結束後，各管加入3 ml 1x PBS 清洗五次，最後將每管細胞溶於0.5 ml 1x PBS中，以流式細胞儀（CyFlow, Partec）進行分析。

四、以統計學的方法來設計基因晶片的實驗。

在實驗設計與統計分析方面，我們這個研究團隊包括有清華大學統計所許文郁教授，這對我們在基因晶片實驗的設計以及實驗結果的分析方面有極大的幫助。本計畫我們採用迴圈設計（Loop design），迴圈設計較傳統參應對照的設計（reference design）的優點在於可增加整體實驗誤差的估計、提昇結果的準確性及節省晶片使用量等。此外，我們在每個迴圈設計中，重複操作其中一個樣品以做為內部控制組（Internal control），可以有效的評估系統的誤差（圖一）。

五、人類樹突狀細胞RNA的抽取實驗

樹突狀細胞培養第六天，分別加入細菌的脂多醣及不同濃度的冬蟲夏草水萃液處理。刺激兩天後，將樹突狀細胞離心600 g，10分鐘，去除上清液。以10 ml 滅菌之PBS 緩衝液清洗樹突狀細胞兩次。離心600 g，10 分鐘，去除上清液。以RNeasy mini kit（Qiagen）進行細胞RNA的抽取與純化。再以Agilent RNA 6000 LabChip kit（Agilent）來鑑定RNA之品質，本實驗在基因晶片所使用的RNA經確認後，RNA品質良好（圖二）。

六、人類基因晶片的製備與實驗

本實驗室擁有台灣第一套Brown型基因晶片系統，由史丹佛大學P. Brown所發展的系統，以我們目前的製程可以在一片22 mm x75 mm 大小的玻片上點印超過三萬點的探針（圖三）。本實驗室以48根狹縫針（圖四）進行點印工作，目前將7334種克隆（clone），以每種四重覆的方式點印在玻片（GAPS-II, Corning）上，另外我們加入已知紅綠螢光比值的外加指示控制基因（doping control）作為品管控制，所

以目前我們的基因晶片共有32448點的探針。其詳盡方法如下：

（一）玻片備製與探針基因點印

由於DNA為帶負電物質，利用電荷正負相吸原理我們使用GAPS-II玻片，其將玻片上鍍有一層帶正電的amino group，再藉由機械手臂將已經由PCR放大的探針DNA點印在玻片上。每點約含有0.5-2.5 nl產物，直徑約為120-200 μm ，玻片上點印的密度約可達6000 spots/ cm^2 。點印完成的玻片先進行預掃描（Pre-scan），以確認點印結果的好壞。玻片會經由蒸氣處理（Rehydration），使得所點印的DNA分佈能更均勻且點的邊界能更圓滑，之後再經過UV-交叉結合（UV-Crosslinking）的處理，增強DNA探針與玻片的黏合。最後再經由阻斷結合溶液（Blocking Solution）將玻片表面上未點印DNA部分的正電中和，以避免在雜合過程中造成非專一性的結合（Non-Specific Binding）。

（二）標的cDNA製備、螢光標定與雜合反應

本實驗利用非直接標記（Indirect labeling）的方法進行螢光標定（Array 900TM, Genisphere），此方式可分為兩步驟進行（圖五）。首先將樣品之RNA抽出後加入帶有3 DNA擷取序列（Capture sequence）的引子與寡腺苷鏈（Poly-A）互補，進行反轉錄合成一股新的cDNA。接著將合成之cDNA覆蓋在已點上探針基因的玻片上，置入特製雜合反應夾（Hybridization Chamber）內，於65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴槽中反應18小時，使得標的物與探針充分完成雜合反應。核酸序列互補的基因會藉由氫鍵鍵結配對，未配對的標的物再經由清洗步驟將之去除，此處為第一次雜合反應。由於合成之標的cDNA 帶有3 DNA擷取序列（Capture sequence），我們再加入與擷取序列互補之序列與之進行第二次雜合反應，而此擷取序列的互補序列上額外帶有鍵結螢光染劑分子的小包裹。接著洗去未配對的染劑。

（三）影像掃描

反應完成之玻片經清洗處理後，利用掃描系統（Axon Scanner）掃描玻片上的螢光訊號。此系統包含一組紅光雷射（波長635 nm）激發Cy5螢光染劑，一組綠光雷射（波長532 nm）激發Cy3螢光染劑。激發出來的螢光分別以紅光濾光片（波長670 nm）測量Cy5發散光強度、綠光濾光片（波長570 nm）測量Cy3

發散光強度。最後以光電倍增管 (PMT) 將光訊號轉成電訊號而放大成直接讀取之訊號。

(四) 影像數據分析

取得影像檔之後，利用 GenePix Pro 6.0 軟體 (Axon Instruments) 進行圈點工作並分析影像檔。接著利用所得的資料，選取表現有顯著差異的基因。首先去除被軟體標示為壞點的基因，再依強度值依賴之區域權數迴歸配適處理 (Intensity Dependent Lowess Fit Normalization)，繼而以片中的針與針之關係來進行間距歸一化 (Within Slide Pinwise Scaling Normalization)；其次，排除訊雜比 (signal to noise ratio, SNR；在此定義 SNR 為 (訊號值-背景值)/背景值的標準差) 小於3的基因。此分析條件依實際數據的不同，將做適當調整。

七、基因晶片的實驗數據資料庫

我們這個研究團隊近年來努力，已經建立了基因晶片的實驗數據資料庫 (MBPL Microarray Database <http://140.114.106.16/base/>) (圖六)。有了這個資料庫，我們將能更快速、有效的分析數以百萬計的基因晶片實驗結果，並且能符合國際上一流期刊接受發表基因晶片論文時所要求的 MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment) 準則。

八、統計分析方法

利用 SPSS 套裝軟體，採用 paired student's T test，來分析實驗組與對照組之間的差異。當 $p < 0.05$ 表示兩組間有顯著差異；當 $p < 0.01$ 表示兩組間有極顯著差異。

參、結果

本計畫第一年已經順利建立冬蟲夏草對於樹突狀細胞之影響評估平台。而第二年 (本年度) 之目的主要有兩個部分，一是要進一步從細胞生理學的層面，探討冬蟲夏草對於樹突狀細胞吞噬能力以及分泌細胞激素的影響。另一部分則是要進行基因晶片的研究，建立冬蟲夏草對於樹突狀細胞基因表現之影響評估平台，目標在觀察研究冬蟲

夏草對於樹突狀細胞基因表現之影響。以下為本年度執行的結果。

一、冬蟲夏草水萃液對人類樹突狀細胞分泌細胞激素之影響

本實驗樹突狀細胞的來源是由人體血液中的單核球細胞分化衍生而來。本計畫向新竹捐血中心申請研究用全血，利用白血球分離液將全血中的周邊血液單核細胞分離後，再利用人類單核球 (Monocyte) 會貼附的特性純化單核球，單核球經過細胞激素 IL-4 和 GM-CSF 培養六天之後，即被誘導分化為未成熟樹突狀細胞。根據文獻指出，脂多醣會促使未成熟的樹突狀細胞轉為成熟的樹突狀細胞，而樹突狀細胞可藉由細胞表面標記的表現來判定其成熟度與功能性的表現[40]。本實驗分別探討冬蟲夏草水萃液對未成熟樹突狀細胞及樹突狀細胞分化成熟的之影響。

樹突狀細胞會分泌 TNF- α 、IL-10、IL-12 等細胞激素來調控免疫反應，例如活化 T cells、NK cells、增加血管通透性、促進血液凝集及促使巨噬細胞 NO 之合成等[40]。我們針對 TNF- α （與發炎反應有關，為發炎的指標）及 IL-12（與 T 細胞的活化有關）[40]，這兩種細胞激素進行探討。

在冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞之影響方面，樹突狀細胞培養第六天，分別給予不同劑量的冬蟲夏草水萃液，5、10、15、20 $\mu\text{l/ml}$ ，刺激兩天後，收取細胞上清液，利用酵素聯結免疫吸附分析法測量樹突狀細胞分泌 TNF- α 及 IL-12 的量。結果顯示，未成熟的樹突狀細胞其分泌 TNF- α 及 IL-12 的量極少，偵測不到，在加入冬蟲夏草水萃液後並無顯著改變（圖七）。

在冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟之影響方面，樹突狀細胞培養第六天，分別給予脂多醣 1 $\mu\text{g/ml}$ 及不同劑量的冬蟲夏草水萃液，5、10、15、20 $\mu\text{l/ml}$ ，刺激兩天後，收取細胞上清液，利用酵素聯結免疫吸附分析法測量樹突狀細胞分泌 TNF- α 及 IL-12 的量。結果顯示，冬蟲夏草水萃液會抑制成熟的樹突狀細胞分泌 TNF- α （圖七-A）及 IL-12（圖七-B），且隨著劑量增加其抑制效果更為顯著。

二、冬蟲夏草水萃液對人類樹突狀細胞吞噬能力之影響

樹突狀細胞為最有效率的抗原呈獻細胞，其能有效的刺激 B 細胞及 T 細胞反應，對於引發專一性免疫反應有著舉足輕重的影響力，故評估樹突狀細胞的吞噬能力是一個重要的指標。在本實驗，我們分別

探討冬蟲夏草水萃液對未成熟樹突狀細胞及樹突狀細胞分化成熟的之影響。

在冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞之影響方面，樹突狀細胞培養第六天，分別給予不同劑量的冬蟲夏草水萃液，5、10、15、20 $\mu\text{l/ml}$ ，刺激兩天後，利用流式細胞儀測量樹突狀細胞的吞噬能力。結果顯示，冬蟲夏草水萃液會抑制未成熟的樹突狀細胞的吞噬能力，且隨著劑量增加其抑制效果更為顯著（圖八）。

在冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟之影響方面，樹突狀細胞培養第六天，分別給予脂多醣1 $\mu\text{g/ml}$ 及不同劑量的冬蟲夏草水萃液，5、10、15、20 $\mu\text{l/ml}$ ，刺激兩天後，利用流式細胞儀測量樹突狀細胞的吞噬能力。結果顯示，樹突狀細胞其成熟後吞噬能力降低，較未成熟的樹突狀細胞吞噬能力弱，在加入冬蟲夏草水萃液後並無顯著改變（圖八）。

三、以迴圈設計的統計分析：

（一）以迴圈設計估計基因表現差異：

對於任何一個基因而言，雖然我們想研究的是基因表現差異之比值，但是經由基因晶片實驗我們只能得到其螢光之強度。我們所看到的螢光強度是綜合了染劑的效應及基因表現值與系統誤差所造成的。因為螢光強度與基因表現量成正比關係，故可將其寫成公式一：

$$\begin{aligned} G &= g \cdot t_A \cdot 2^{\varepsilon_1} & \varepsilon_1 &\sim N(0, \sigma_G^2) \\ R &= r \cdot t_B \cdot 2^{\varepsilon_2} & \varepsilon_2 &\sim N(0, \sigma_R^2) \end{aligned} \quad (\text{公式 1})$$

G、R：分別為紅、綠螢光強度

t_A 、 t_B ：一玻片上雜和反應兩樣本之基因表現量

g 、 r ：一玻片上雜和反應兩樣本之螢光染劑效應

ε_1 、 ε_2 ：兩樣本之誤差

$$\begin{aligned} Y &= \log \text{ratio} \cong \log_2 \left(\frac{R}{G} \right) \\ Y &= \log_2 \left(\frac{R}{G} \right) = \log_2 \frac{r \cdot t_B \cdot 2^{\varepsilon_2}}{g \cdot t_A \cdot 2^{\varepsilon_1}} \\ &= \log_2 \left(\frac{r}{g} \right) + \log_2 \left(\frac{t_B}{t_A} \right) + (\varepsilon_2 - \varepsilon_1) \\ &= \gamma + \lambda + \varepsilon \end{aligned} \quad (\text{公式 二})$$

對某一晶片上的某一基因而言（如公式二），其中

Y ：某一基因螢光強度比

γ ：某一基因之兩染劑效應比

λ ：某一基因表現比

ε ：某一基因之誤差

但是我們知道迴圈設計可由數片實驗之數據來估計出更準確之基因表現。如本實驗共計五個樣本，就可由10片之結果來推估出來，如公式三：

$$\begin{aligned}\bar{t} &= (t_1 t_2 t_3 t_4 t_5)^{1/5} \\ \therefore \gamma &= \log_2 \left(\frac{r}{g} \right) \\ \lambda_i &= \log_2 \left(\frac{t_i}{\bar{t}} \right), i = 1, 2, 3, 4, 5 \\ \therefore \lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \lambda_4 + \lambda_5 &= \log \frac{t_1 t_2 t_3 t_4 t_5}{(\bar{t})(\bar{t})(\bar{t})(\bar{t})(\bar{t})} = 0\end{aligned} \quad (\text{公式三})$$

我們分別去看某基因在這10片的 Y 值，可藉由公式二將10片之 Y 簡寫成一個 Y 的矩陣行列式（公式四）。

$$\begin{aligned}Y &= X \cdot \beta + \varepsilon \\ \begin{bmatrix} Y_1 \\ Y_2 \\ Y_3 \\ Y_4 \\ Y_5 \\ Y_6 \\ Y_7 \\ Y_8 \\ Y_9 \\ Y_{10} \end{bmatrix} &= \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 1 \\ 0 & -1 & 0 & 1 & 1 \\ -1 & -1 & -1 & -2 & 1 \\ 2 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ -1 & 1 & 0 & 0 & 1 \\ -1 & -2 & -1 & -1 & 1 \\ 1 & 1 & 2 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & -1 & 1 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & -1 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \lambda_1 \\ \lambda_2 \\ \lambda_3 \\ \lambda_4 \\ \gamma \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \varepsilon_1 \\ \varepsilon_2 \\ \varepsilon_3 \\ \varepsilon_4 \\ \varepsilon_5 \\ \varepsilon_6 \\ \varepsilon_7 \\ \varepsilon_8 \\ \varepsilon_9 \\ \varepsilon_{10} \end{bmatrix} \quad (\text{公式四})\end{aligned}$$

其中 $\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \lambda_4 + \lambda_5 = 0$ ，令 X 為關係矩陣，如公式五。

$$[X] = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 1 \\ 0 & -1 & 0 & 1 & 1 \\ -1 & -1 & -1 & -2 & 1 \\ 2 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ -1 & 1 & 0 & 0 & 1 \\ -1 & -2 & -1 & -1 & 1 \\ 1 & 1 & 2 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & -1 & 1 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & -1 & 1 \end{bmatrix} \quad (\text{公式五})$$

利用最小平方方法即可將所有的 λ 值估計出，如公式六。

$$\begin{bmatrix} \lambda_1 \\ \lambda_2 \\ \lambda_3 \\ \lambda_4 \\ \lambda_5 \\ \gamma \end{bmatrix} = (X'.X)^{-1}.X'.Y \quad (\text{公式六})$$

兩樣本之基因表現對數比公式則為：

$$\log \frac{t_i}{t_j} = \lambda_i - \lambda_j$$

上述公式五之行列式欲有解則 X' 需不存在（由於解此聯立方程式需6個已知數，故要有6片以上有值才可以計算出）。由上述公式可以求出每一個基因經由這10片實驗所求出之這五個樣本之基因相對表現量，並且可以得到實驗誤差 σ 及批次染劑效應因子 γ 。

（二）F-檢定：

在我們實驗中共分成五個組別：【1】迴圈設計第一組，L1（control 即冬蟲夏草水萃液 0 $\mu\text{l/ml}$ ）。【2】迴圈設計第二組，L2（control 即冬蟲

夏草水萃液0 $\mu\text{l/ml}$ ，與L1為相同RNA，我們設計為內部控制組)。【3】迴圈設計第三組，L3 (CS20即冬蟲夏草水萃液20 $\mu\text{l/ml}$)。【4】迴圈設計第四組，L4(LPS即脂多醣1 $\mu\text{g/ml}$)。【5】迴圈設計第五組，L5(LPS+CS即脂多醣1 $\mu\text{g/ml}$ 加冬蟲夏草水萃液20 $\mu\text{l/ml}$) (圖一)。

我們利用F-檢定來看在不同的虛無假設下，每一基因是否推翻虛無假設而有顯著差異。虛無假設依不同之條件共有14個分述如下， H_{00} 為估計基因表現在各個組間是否有差異； H_{01} 為估計基因表現在兩個未處理的樹突狀細胞 (control-1及control-2) 間是否有差異，該兩組為實驗設計中的內部控制組，此結果可用於評估實驗誤差； H_{02} 為估計基因表現在冬蟲夏草水萃液處理過的樹突狀細胞與未處理的樹突狀細胞 (control-1) 間是否有差異； H_{03} 為估計基因表現在脂多醣處理過的樹突狀細胞與未處理的樹突狀細胞 (control-1) 間是否有差異； H_{04} 為估計基因表現在脂多醣及冬蟲夏草水萃液處理過的樹突狀細胞與未處理的樹突狀細胞 (control-1) 間是否有差異； H_{05} 為估計基因表現在冬蟲夏草水萃液處理過的樹突狀細胞與未處理的樹突狀細胞 (control-2) 間是否有差異； H_{06} 為估計基因表現在脂多醣處理過的樹突狀細胞與未處理的樹突狀細胞 (control-2) 間是否有差異； H_{07} 為估計基因表現在脂多醣及冬蟲夏草水萃液處理過的樹突狀細胞與未處理的樹突狀細胞 (control-2) 間是否有差異； H_{08} 為估計基因表現在冬蟲夏草水萃液處理過的樹突狀細胞與兩組未處理的樹突狀細胞 (control-1與control-2取平均值) 間是否有差異； H_{09} 為估計基因表現在脂多醣處理過的樹突狀細胞與兩組未處理的樹突狀細胞 (control-1與control-2取平均值) 間是否有差異； H_{10} 為估計基因表現在脂多醣及冬蟲夏草水萃液處理過的樹突狀細胞與兩組未處理的樹突狀細胞 (control-1與control-2取平均值) 間是否有差異； H_{11} 為估計基因表現在脂多醣及冬蟲夏草水萃液處理過的樹突狀細胞與脂多醣處理過的樹突狀細胞間是否有差異； H_{12} 為估計基因表現在脂多醣及冬蟲夏草水萃液處理過的樹突狀細胞與冬蟲夏草水萃液處理過的樹突狀細胞間是否有差異； H_{13} 為估計基因表現在脂多醣處理過的樹突狀細胞與冬蟲夏草水萃液處理過的樹突狀細胞間是否有差異 (公式七)。

$$H_{00} : L_1 = L_2 = L_3 = L_4 = L_5$$

$$H_{01} : L_1 - L_2 = 0$$

$$H_{02} : L_3 - L_1 = 0$$

$$H_{03} : L_4 - L_1 = 0$$

$$H_{04} : L_5 - L_1 = 0$$

$$H_{05} : L_3 - L_2 = 0$$

$$H_{06} : L_4 - L_2 = 0$$

$$H_{07} : L_5 - L_2 = 0$$

$$H_{08} : L_3 - \frac{L_1 + L_2}{2} = 0$$

$$H_{09} : L_4 - \frac{L_1 + L_2}{2} = 0$$

$$H_{010} : L_5 - \frac{L_1 + L_2}{2} = 0$$

$$H_{011} : L_5 - L_4 = 0$$

$$H_{012} : L_5 - L_3 = 0$$

$$H_{013} : L_4 - L_3 = 0$$

(公式七)

F 值的公式及計算過程如下：

$$\beta = \lambda_1, \lambda_2, \lambda_3, \lambda_4, \lambda_5, \gamma$$

$$F = \frac{(SSEr - SSEf) / s}{(SSEf) / n - k}$$

$$SSEf = \|Y - X\hat{\lambda}\|^2 = \|\hat{\varepsilon}\|^2$$

$SSEr$ 為在虛無假設下的誤差平方和；而 $SSEf$ 為完整模式下誤差平方和，兩者差異越大越傾向推翻虛無假設。 S 為在假設下減少的自由度，在上述的虛無假設下， $s=1$ ； n 為樣本數； k 為參數 β 個數。若虛無假設為真， F 值將接近 1；若虛無假設為假， F 值將比 1 大很多。 F 值越大代表差異越顯著。本實驗所採用的 F 檢定門檻為 $p < 0.00001$ (Bonferroni Methods)。

四、基因晶片實驗結果：

(一) 基因晶片數據的前處理

我們利用基因晶片雷射掃描器 (4100A, Axon Instruments) 取得影像檔之後 (圖九), 利用 GenePix Pro 6.0 軟體 (Axon Instruments) 進行圈點工作, 我們採用不規則圈點的方式 (避免點不規則所造成的誤差), 並分析影像檔 (圖十)。接著利用所得的資料, 選取表現有顯著差異的基因。首先去除被軟體標示為壞點的基因, 再依強度值依賴之區域權數迴歸配適處理 (Intensity Dependent Lowess Fit Normalization), 排除訊雜比 (signal to noise ratio, SNR; 在此定義 SNR 為 (訊號值-背景值)/背景值的標準差) 小於 3 的基因。此分析條件依實際數據的不同, 將做適當調整。我們採用訊號值大於背景值加 3 倍標準差 (+3 SD) 的標準圈出點, 接著再以訊號大於紅光與綠光背景值 5 倍、每一個點之各像素 (Pixels) 訊號強度之變異係數 (CV%) 小於 100% 及點的直徑大於 75 μm 為篩選標準而定義出有表現之點。

(二) 基因晶片數據的前處理—MA 圖以及數據標準化 (Normalization)

我們實驗的迴圈設計中共使用十片基因晶片探討五個樣本間的差異, 在完成雜合反應 (Hybridization) 之後, 經由雷射掃描儀來掃描基因晶片, 我們得到 32448 個點【含 7334 個 clones 四重覆、管家基因 (house keeping genes) 做為陽性對照組、阿拉伯芥的基因做為陰性對照組, 此外我們特別在片子上有點印特定的植物 cDNA, 伴隨實驗進行, 我們加入已知濃度的 RNA 進行雜合反應, 做為實驗的外加控制組 (doping control), 可評估實驗的品質】的數據。其中每一個點都含有紅色螢光以及綠色螢光的強度值 (Intensity)。某一個點 X 的兩種螢光的強度值分別代表 X 基因在實驗組與控制組兩種不同環境下, 相對的基因表現量。同理, 某一個點 X 的紅色螢光強度 (以 R 來表示) 與綠色螢光強度 (以 G 來表示) 的比值 (Ratio): R/G 代表在實驗組與控制組兩種不同環境下, X 基因的相對基因表現比值。然而, 此種未經過處理的原始數據本身帶有先天上的系統誤差, 並不能視為最終的結果。此種系統誤差包括了: (1) 紅色螢光染劑與綠色螢光染劑的標示效率 (labeling efficiency) 不同; (2) 雷射掃描儀對於兩種螢光染劑的偵測效率不同; (3) 其他的系統誤差。因此, 基因晶片的數據必須經過前處理的步驟來消除這些系統誤差。

首先, 我們將原始數據中紅色與綠色螢光強度的比值取以 2 為底的對數, 將這兩個對數值相減得到一個 M 值 (M 代表 Minus, $M = \log_2 R - \log_2 G$)。M 值可以用來觀察原始數據中紅綠螢光強度差異倍數 (基

因表現差異倍數)的分布情形。接著，將原始數據中紅色與綠色螢光強度的幾何平均值取以 2 為底的對數，由此得到一個 A 值 ($A = 1/2 \log_2 R + 1/2 \log_2 G$)。A 值可以用來觀察原始數據螢光強度的散佈情形。由同一點的 M 與 A 值可以再座標圖 (A 為 X 軸; M 為 Y 軸) 上得到一個點。扣除螢光強度與背景值差異小的點與壞點之後，可以用電腦軟體畫出一個 M-A 圖。依據原始數據畫出的 M-A 圖可以用來初步評估晶片數據是否有明顯的問題，並且可以用來與經過標準化處理後的 MA 圖做比較，評估標準化處理是否有效的消除了系統誤差。

局部加權散佈圖修勻法 (Locally Weighted Scatterplot Smoother, Lowess) 是一種目前受到大部分基因晶片實驗室所採用的數據標準化的方法。由於從基因晶片所得到的數據十分龐大，從 MA 圖上很難以肉眼來辨認其是否為線性模型。局部加權散佈圖修勻法適用於由許多點所組成的散佈圖。大致說來，局部加權散佈圖修勻法是以加權迴歸對前幾點配一線段，然後再對接下來的幾點配適另一線段，等等。最後將這些線段連接起來，並加以修勻，則可得到 Y 對 X 的一條曲線。利用此種方法可以有效的去除前述紅色與綠色螢光差異造成的系統誤差，使得微陣列的數據更為可信。如果在龐大的微陣列實驗數據中，大部分的基因表現沒有明顯差異，則大部分數據的紅、綠螢光亮度的比例應該是 1 比 1。只要點印在晶片上的基因種類夠多，對於大多數的生物樣本而言此種假設都會成立。我們實驗室所點印的基因種類超過七千種，因此會符合此種假設。在上述的前提成立的狀況之下，經過局部加權散佈圖修勻法做過標準化處理之後的 MA 圖應該是會對 Y 軸為 0 的線對稱。此外，為了消除不同針之間的所導入之誤差，我們則採用『對針局部加權散佈圖修勻法』 (Pin-wise Locally Weighted Scatterplot Smoother, Pin-wise Lowess) 針對每根針採用局部加權散佈圖修勻法，如此即可修正低訊號時紅色與綠色螢光非線性的差異，又可消除不同針所造成的誤差 (圖十一)。

(三) 有意義的基因選定

經由上述基因晶片數據的前處理，以及數據標準化後，我們採用訊號值大於背景值加 3 倍標準差 ($+3 \text{ SD}$) 的標準圈出點，接著再以訊號大於紅光與綠光背景值 5 倍、每一個點之各像素 (Pixels) 訊號強度之變異係數 (CV%) 小於 100% 及點的直徑大於 $75 \mu\text{m}$ 為篩選標準而定義出有表現之點。將這些有表現的點透過 F-檢定 (門檻為 $p < 0.00001$)

「Bonferroni Methods」)，篩選出在各個虛無假設下（公式七）有表現差異的基因數（表一）。

（四）利用階層式群集分析（Hierarchical Clustering Analysis）找出實驗各組間的相關性

我們用來篩選基因所採用的虛無假設 $H_0: L1=L2=L3=L4=L5$ ，經由這個虛無假設可以選取出在五個實驗樣本中有表現差異的基因，進而利用群集分析的方法，我們找出五個樣本間的相關性。我們目前使用美國加州大學柏克萊分校 Michael Eisen 教授所提供的免費軟體 Cluster 來做運算。同時我們研究團隊的成員也正在自己寫程式，希望不久之後就能將各種群集分析的方法整合到本實驗室已經在使用中的微陣列資料庫內。計算出五個實驗樣本間的距離之後，再用 Michael Eisen 教授所提供的免費的繪圖軟體 TreeView 呈現結果（圖十二）。

結果顯示，兩個未處理的樹突狀細胞樣本間（control-1 及 control-2）的距離相近；脂多醣及冬蟲夏草水萃液處理過的樹突狀細胞與脂多醣處理過的樹突狀細胞距離相近。而有處理的三組樣本（冬蟲夏草水萃液、脂多醣及脂多醣及冬蟲夏草水萃液）則與未處理的樹突狀細胞樣本間有差異（圖十二）。

此外，我們使用迴圈設計計算的結果，進一步比較各個樣本間所帶來的生物效應。我們將 H_{08} （冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞基因表現之影響）、 H_{09} （成熟的樹突狀細胞與未成熟的樹突狀細胞基因表現之差異）、 H_{10} （冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟其基因表現之影響）、 H_{11} （冬蟲夏草水萃液對成熟的樹突狀細胞基因表現之影響）、 H_{12} （冬蟲夏草水萃液在成熟與未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異）、 H_{13} （成熟的樹突狀細胞與冬蟲夏草水萃液處理未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異）（公式七）間的聯集基因，利用群集分析的方法，找出各個樣本間所帶來的生物效應之相關性（圖十三）。

結果顯示，（1）成熟的樹突狀細胞與未成熟的樹突狀細胞基因表現之差異【 H_9 】和冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟其基因表現之影響【 H_{10} 】，兩者在基因表現上所造成的生物效應相近。（2）成熟的樹突狀細胞與未成熟的樹突狀細胞基因表現之差異【 H_9 】、冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟其基因表現之影響【 H_{10} 】和冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞基因表現之影響【 H_8 】，三組在基因表現上所造成的生物效應較其他三組相關性較大。（3）冬蟲夏草水萃液

在成熟與未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異【H₁₂】和成熟的樹突狀細胞與冬蟲夏草水萃液處理未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異【H₁₃】，兩者在基因表現上所造成的生物效應相近。(4) 冬蟲夏草水萃液對成熟的樹突狀細胞基因表現之影響【H₁₁】，在基因表現上所造成的生物效應較其他各組相關性較小。(圖十三)。

(五) 全面性的評估冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞基因表現之影響

本實驗採用迴圈設計 (Loop design)，迴圈設計較傳統參應對照的設計 (reference design) 的優點在於可增加整體實驗誤差的估計、提昇結果的準確性及節省晶片使用量等。此外，我們在每個迴圈設計中，重複操作其中一個樣品，以做為內部控制組 (Internal control)，可以有效的評估系統的誤差 (圖一)。我們利用各種篩點條件、迴圈設計、統計檢定所找出有意義的基因，配合實驗設計，我們可以全面性的評估冬蟲夏草對於樹突狀細胞基因表現的影響，列舉如下：(1) 探討冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞基因表現之影響。(2) 評估成熟的樹突狀細胞與未成熟的樹突狀細胞基因表現之差異。(3) 評估冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟其基因表現之影響。(4) 評估冬蟲夏草水萃液對成熟的樹突狀細胞基因表現之影響。(5) 評估冬蟲夏草水萃液在成熟與未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異。(6) 評估成熟的樹突狀細胞與冬蟲夏草水萃液處理過之未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異 (圖十四)。藉由實驗設計，我們探討冬蟲夏草水萃液由未成熟的樹突狀細胞到成熟的樹突狀細胞之影響，如此一來，才可全盤了解冬蟲夏草對於樹突狀細胞免疫功能之影響，以下將就各部分之實驗結果詳細說明。

(六) 探討冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞基因表現之影響

根據 H₈:L3-((L1+L2)/2)這個虛無假設所選出的基因即代表冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞基因表現之影響。經由嚴謹的實驗設計與可靠的統計分析篩選出 1202 個受到顯著調控的基因 (表一)，其中在正調控最顯著的前 20 個基因依序為 FACN1、INDO、ID2、TXN、CPE、BIRC3、PPP1R16B、TOMM34、CDKN1A (兩個不同片段之 clone 對應到此基因)、NUP160、FLJ10458、SAT、ISG20、CD83、FAM14A、FLJ20758、BASP1、NFKB1、C9orf60；在負調控最顯著的前 20 個基因依序為 MS4A6E、RNASE6、AIF1、CCL13、FOLR2、LGMN、RNASE1、NPL、TREM2、RPL3、KIAA1539、CTSC、LIPA、

GEM、PDE6A、CCL18(兩個不同片段之 clone 對應到此基因)、CCL7、SPRR1A、FUCA1 (圖十五)。

自從生物基因體序列 (genomic sequence) 相繼解碼後發現，在不同真核生物中有大部分基因擁有相同的主要生物功能 (biological functions)。此即表示若在真核生物某物種上得到某基因或蛋白質的知識可以用來解釋其他物種所對應的基因或蛋白質。因此 gene ontology 聯盟建立了一套動態的 ontologies 來解釋真核生物的基因或蛋白質在細胞內所扮演的角色等知識，目前 gene ontologies 含三大 ontology ——生物過程 (biological process)，分子層次功能 (molecular function) 及細胞內元件 (cellular component)，基因或蛋白質都可由此三層次以控制詞彙註解，如此，則生物學家可用已有的文獻及基因體序列比較資訊，將真核生物的基因或蛋白質作註解與分類，所以稱 gene ontology 為生物學統一化的工具，原因在此[44]。

藉由基因本體論 (Gene ontology) 資料庫 (FatiGO, <http://www.fatigo.org/>) [44]，我們將篩選出1202個受到顯著調控的基因進一步尋找進階的基因功能註解。結果顯示，在冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞基因表現有顯著調控的1202個基因在ontology 資料庫之生物過程類可發現參與免疫系統調節與發炎反應方面的基因有明顯增加，在我們片子上7334個clones，其中免疫系統調節佔8.28%與發炎反應佔2.37% (圖十六)。然而在分析冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞基因表現有顯著調控的1202個基因，其中免疫系統調節佔14.63%與發炎反應佔6.10% (圖十七)，相較於我們片子上7334個clones (圖十六)，其中免疫系統調節方面的基因增加6.35%；發炎反應方面的基因增加3.73%。結果顯示，冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞在免疫系統調節與發炎反應的基因調控上是很重要的。

我們進一步根據Gene ontology的結果，分析參與免疫系統調節與發炎反應相關的基因。在免疫系統調節方面，共有48個基因，正調控有19個；負調控有29個 (表二)。在發炎反應相關的基因，共有20個基因，正調控有7個；負調控有13個 (表三)。

(七) 探討成熟的樹突狀細胞與未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異

根據 $H_9:L4-((L1+L2)/2)$ 這個虛無假設所選出的基因即代表成熟的樹突狀細胞與未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異。經由嚴謹的實驗設計與可靠的統計分析篩選出 1486 個受到顯著調控的基因 (表一)，其中在正調控最顯著的前 20 個基因依序為 INDO、FSCN1、

FAM14A、BF、ID2、MT1G、RPL37、TXN、ISG20、BIRC3、WARS、IL8、NUP160、CD83、ACAT2、CXCL10、KIAA0363、APOBEC3B、POLD1、G0S2；在負調控最顯著的前 20 個基因依序為 RNASE1、MS4A6E、RNASE6、TREM2、CCL13、KIAA1539、AIF1、LGMN、NPL、LIPA、CTNNAL1（兩個不同片段之 clone 對應到此基因）、GEM、CD1B、TGFB1、FUCA1、RPL3、CTSC、CD1C（兩個不同片段之 clone 對應到此基因）（圖十八）。

同上述F段所使用的分析方法，藉由基因本體論資料庫，我們將篩選出1486個受到顯著調控的基因進一步尋找進階的基因功能註解。結果顯示，在ontology 資料庫之生物過程類可發現參與免疫系統調節與發炎反應方面的基因有明顯增加，其中免疫系統調節佔13.29%與發炎反應佔4.90%（圖十九），相較於我們片子上7334個clones（圖十六），在免疫系統調節方面的基因增加5.01%；發炎反應方面的基因增加2.53%。結果證實，成熟的樹突狀細胞與未成熟的樹突狀細胞在免疫系統調節與發炎反應的基因調控上是有很大的差異。

我們進一步根據Gene ontology的結果，分析參與免疫系統調節與發炎反應相關的基因。在免疫系統調節方面，共有57個基因，正調控有25個；負調控有32個（表四）。在發炎反應相關的基因，共有21個基因，正調控有9個；負調控有12個（表五）。

（八）探討冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟其基因表現之影響

根據 $H_{10}:L5-((L1+L2)/2)$ 這個虛無假設所選出的基因即代表冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟其基因表現之影響。經由嚴謹的實驗設計與可靠的統計分析篩選出 1318 個受到顯著調控的基因（表一），其中在正調控最顯著的前 20 個基因依序為 INDO、FSCN1、BF、TXN、BIRC3、ID2、G0S2、ISG20、IL8、WARS、ACAT2、GADD45A、CPE、CD83、NUP160、FAM14A、TOMM34、CDKN1A（兩個不同片段之 clone 對應到此基因）、RPL37；在負調控最顯著的前 20 個基因依序為 CCL13、RNASE1、MS4A6E、TREM2、RNASE6、KIAA1539、LGMN、CCL8、CTSC、CCL7、RPL3、NPL、CTNNAL1（兩個不同片段之 clone 對應到此基因）、AIF1、CD1B、LIPA、GEM、CCL18、CD14（圖二十）。

同上述F段所使用的分析方法，藉由基因本體論資料庫，我們將篩選出1318個受到顯著調控的基因進一步尋找進階的基因功能註解。結果顯示，在ontology 資料庫之生物過程類可發現參與免疫系統

調節與發炎反應方面的基因有明顯增加，其中免疫系統調節佔14.79%與發炎反應佔6.03%(圖二十一)，相較於我們片子上7334個clones(圖十六)，其中免疫系統調節方面的基因增加6.51%；發炎反應方面的基因增加3.66%。結果顯示，冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟，在免疫系統調節與發炎反應的基因調控上是有很大的差異。

我們進一步根據Gene ontology的結果，分析參與免疫系統調節與發炎反應相關的基因。在免疫系統調節方面，共有54個基因，正調控有22個；負調控有32個(表六)。在發炎反應相關的基因，共有22個基因，正調控有9個；負調控有13個(表七)。

(九) 探討冬蟲夏草水萃液對成熟的樹突狀細胞其基因表現之影響

根據 H₁₁:L5-L4 這個虛無假設所選出的基因即代表冬蟲夏草水萃液對成熟的樹突狀細胞基因表現之影響。經由嚴謹的實驗設計與可靠的統計分析篩選出 319 個受到顯著調控的基因(表一)，其中在正調控最顯著的前 20 個基因依序為 LTBP1、MGC39821、WDFY1、ELL2、TEBP、SPP1、MGC27085、PGAM2、WIRE、LOC148206、TRA2A、FLJ12895、CD109、C6orf93、ShrmL、PRLR、ARIH1、TPMT、C6orf61、FDFT1；在負調控最顯著的前 20 個基因依序為 MT1G、FAM14A、CCL8、CXCL10、NDP、CCL18(兩個 clone 各四重覆都出現)、MFNG、FLJ33641、POLD1、CCL13、CCL7、RPL37、ADAM2、SPRR1A、FLJ10326、CTSC、HLA-DQA1、OAS1、HBA2(圖二十二)。

同上述F段所使用的分析方法，藉由基因本體論資料庫，我們將篩選出319個受到顯著調控的基因進一步尋找進階的基因功能註解。結果顯示，在ontology 資料庫之生物過程類可發現參與免疫系統調節與發炎反應方面的基因有明顯增加，其中免疫系統調節佔16.25%與發炎反應佔5%(圖二十三)，相較於我們片子上7334個clones(圖十六)，其中免疫系統調節方面的基因增加7.97%；發炎反應方面的基因增加2.63%。結果顯示，冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟，在免疫系統調節與發炎反應的基因調控上是有很大的差異。

我們進一步根據Gene ontology的結果，分析參與免疫系統調節與發炎反應相關的基因。在免疫系統調節方面，共有13個基因，正調控有1個；負調控有12個(表八)。在發炎反應相關的基因，共有4個基因，皆為負調控(表九)。

(十) 探討冬蟲夏草水萃液在成熟與未成熟的樹突狀細胞間基因表現

之差異

根據 H12:L5-L3 這個虛無假設所選出的基因即代表冬蟲夏草水萃液在成熟與未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異。經由嚴謹的實驗設計與可靠的統計分析篩選出 364 個受到顯著調控的基因（表一），其中在正調控最顯著的前 20 個基因依序為 ACAT2、IL8、IL1RN、RIPK2、MT1G、G0S2、CLDN1、WARS、LTBP1、GBP2、MGC39821、SPRR1A、RNF128、WDFY1、CACNA2D4、WIRE、PMAIP1、RARRES3、CCL4、INDO；在負調控最顯著的前 20 個基因依序為 CCL13、RNASE1、TREM2、CCL8、KIAA1539、TNFRSF11A、TGFB1、CYP1B1、CCL7、MSMA4、NAGA、RNASE6、DKFZP564J0863、PPP1R16B、CTSC、GRWD1、TUBA6、ANKRD12、C9orf60、RPL3（圖二十四）。

同上述F段所使用的分析方法，藉由基因本體論資料庫，我們將篩選出364個受到顯著調控的基因進一步尋找進階的基因功能註解。結果顯示，在ontology 資料庫之生物過程類可發現參與免疫系統調節與發炎反應方面的基因有明顯增加，其中免疫系統調節佔16.50%與發炎反應佔6.80%（圖二十五），相較於我們片子上7334個clones（圖十六），其中免疫系統調節方面的基因增加8.22%；發炎反應方面的基因增加4.43%。結果顯示，冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟，在免疫系統調節與發炎反應的基因調控上是有很大的差異。

我們進一步根據Gene ontology的結果，分析參與免疫系統調節與發炎反應相關的基因。在免疫系統調節方面，共有17個基因，正調控有8個；負調控有9個（表十）。在發炎反應相關的基因，共有7個基因，正調控有3個；負調控有4個（表十一）。

（十一）探討成熟的樹突狀細胞與冬蟲夏草水萃液處理未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異

根據 H₁₃:L4-L3 這個虛無假設所選出的基因即代表成熟的樹突狀細胞與冬蟲夏草水萃液處理未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異。經由嚴謹的實驗設計與可靠的統計分析篩選出 598 個受到顯著調控的基因（表一），其中在正調控最顯著的前 20 個基因依序為 MTIG、FAM14A、NDP、MFNG、ACAT2、SPRR1A、CXCL10、IL8、IL1RN、FLJ33641、CLDN1、RPL37、RIPK2、GBP2、POLD1、FLJ10326、WARS、INDO、IFITM1、CD86；在負調控最顯著的前 20 個基因依序為 RNASE1、CPE、TNFRSF11A、DKFZP564J0863、TGFB1、

PPP1R16B CYP1B1、C9orf60、CCL13、PPP4R2、SCG2、ARG1、ACPP、ROM1、RCHY1、SLC22A3、SPP1、CLC、C9orf86、NAGA（圖二十六）。

同上述F段所使用的分析方法，藉由基因本體論資料庫，我們將篩選出364個受到顯著調控的基因進一步尋找進階的基因功能註解。結果顯示，在ontology 資料庫之生物過程類可發現參與免疫系統調節與發炎反應方面的基因有明顯增加，其中免疫系統調節佔16.02%與發炎反應佔5.52%（圖二十七），相較於我們片子上7334個clones（圖十六），其中免疫系統調節方面的基因增加7.74%；發炎反應方面的基因增加3.15%。結果顯示，冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟，在免疫系統調節與發炎反應的基因調控上是有很大的差異。

我們進一步根據Gene ontology的結果，分析參與免疫系統調節與發炎反應相關的基因。在免疫系統調節方面，共有29個基因，正調控有22個；負調控有7個（表十二）。在發炎反應相關的基因，共有10個基因，正調控有9個；負調控有1個（表十三）。

我們將以上選取方法選出的基因可將冬蟲夏草對於樹突狀細胞在免疫功能的調節有全盤性的認知。本研究中所使用的迴圈設計我們將一樣的樣本重覆做為內部控制組（internal control），可以有效的評估系統的誤差（圖一）。經由上述各種篩點條件、迴圈設計、統計檢定所找出有意義的基因，在虛無假設 $H_2:L_1=L_2$ 下，僅出現2個的基因（表一）。

在整個迴圈運算中有效的基因共4484個（表一），代表本實驗的誤差率僅有0.04%，足以證明我們的研究的可靠性與嚴謹度。

基因晶片研究基因表現能一次同時研究上萬個基因之表現行為，但是分析的工作是最繁雜、最耗費時間的。本實驗的所得到的數據相當龐大，我們僅列出初步的成果，本計畫預定為三年計畫，該年度為第二年的成果，我們已經按照原先進度順利完成，在下年度我們將更進一步的探討，並利用同步定量聚合酶連鎖反應（Real-time PCR）分析來驗證基因晶片實驗的結果。由此可知，基因晶片實驗的結果蘊藏了相當多的「寶藏」，就等待實驗者如何利用好的工具來挖掘與琢磨。

肆、討論

樹突狀細胞為最有效率的抗原呈獻細胞，其能有效的刺激B細胞及T細胞反應，對於引發專一性免疫反應有著舉足輕重的影響力[40]。未成熟的樹突狀細胞在人體內扮演警衛的角色，四處巡邏，當外來病原入侵時，未成熟的樹突狀細胞會將外來的病原吞噬，而轉移(migration)到淋巴器官進行抗原呈獻，促使淋巴細胞增生，對抗入侵的病原。在轉移到淋巴器官進行抗原呈獻的同時，未成熟的樹突狀細胞會轉型為成熟的樹突狀細胞。未成熟的樹突狀細胞以及成熟的樹突狀細胞。除了細胞外觀上的差異外，在細胞表面的MHC-I、II、costimulatory factor等表面分子的表現、抗原吞噬能力、與細胞移動有關的接受器及分泌細胞激素的情形等也會不同[40]。在本計畫第一年的成果中，我們發現冬蟲夏草水萃液會抑制未成熟的樹突狀細胞及成熟過程的樹突狀細胞，其CD11c、CD40、CD80、CD86、CD205及MHC-II等表面分子的表現，隨著濃度增加其抑制細胞表面分子的表現越顯著。CD11c、CD80及CD86與細胞黏附及活化功能相關；CD80、CD86及MHC-II與抗原呈獻的活性相關；CD40與接受T細胞活化訊號相關；CD205則為樹突狀細胞專一的細胞表面分子。藉由此結果可以初步得知，(1) 由細胞表面分子CD205、CD11c的結果可以確定本實驗所培養的樹突狀細胞純度很高。(2)冬蟲夏草水萃液會抑制未成熟的樹突狀細胞及成熟過程的樹突狀細胞其細胞活性及抗原呈獻的能力。但是這些結果仍需進一步實驗驗證，在第二年（本年度）的計畫中，我們利用其他的免疫實驗以及完整的基因晶片實驗進一步探討冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞免疫功能之影響，以下就實驗結果分點探討：

一、冬蟲夏草水萃液對人類樹突狀細胞分泌細胞激素之影響

樹突狀細胞會分泌TNF- α 、IL-10、IL-12等細胞激素來調控免疫反應，例如活化T cells、NK cells、增加血管通透性、促進血液凝集及促使巨噬細胞NO之合成等[40]。本實驗針對TNF- α （與發炎反應有關，為發炎的指標）及IL-12（與T細胞的活化有關）[40]，這兩種細胞激素進行探討。在未成熟的樹突狀細胞方面，因為未成熟的樹突狀細胞分泌TNF- α 及IL-12的量極少，偵測不到，在加入冬蟲夏草水萃液後，並無顯著差異。但是在成熟的樹突狀細胞方面，我們發現冬蟲夏草水萃液會抑制樹突狀細胞分泌TNF- α 及IL-12，隨著劑量增加，抑制的現象更為顯著。這樣的結果意味著冬蟲夏草水萃液會抑制發炎

反應與T細胞的活化。Shahed在2001發現，冬蟲夏草水萃液會抑制大鼠腎臟細胞細胞凋亡與發炎反應相關的基因表現，他們利用同步定量聚合酶連鎖反應（Real-time PCR）的方法發現冬蟲夏草水萃液顯著的抑制TNF- α 基因的表現量[45]，此結果也呼應我們的發現。此外，我們進一步分析在基因晶片得到的結果，利用套裝軟體PathwayAssist（Stratagene），將我們在評估冬蟲夏草水萃液對成熟的樹突狀細胞基因表現上與免疫系統調節相關的基因（表八）進行分析，尋找這些基因間直接的關聯性。結果發現，雖然我們的clone中並無TNF- α 的基因，但是在我們找到的基因中，CCL7、CCL8、CXCL10及HLA-DQA1都是在TNF- α 的基因下游，而這些基因在冬蟲夏草水萃液對成熟的樹突狀細胞基因表現上皆為負調控（圖二十八），這個結果也可以做為冬蟲夏草水萃液抑制TNF- α 基因表現的佐證。

二、冬蟲夏草水萃液對人類樹突狀細胞吞噬能力之影響

樹突狀細胞為最有效率的抗原呈獻細胞，故評估樹突狀細胞的吞噬能力是一個重要的指標。在本實驗，我們分別探討冬蟲夏草水萃液對未成熟樹突狀細胞及樹突狀細胞分化成熟的之影響。在未成熟樹突狀細胞方面，我們發現冬蟲夏草水萃液會抑制樹突狀細胞的吞噬能力，隨著劑量增加，抑制的現象更為顯著。在成熟的樹突狀細胞方面，根據文獻上的記載，成熟的樹突狀細胞吞噬能力較未成熟樹突狀細胞弱[40]，在給予冬蟲夏草水萃液後並無發現有顯著差異。以細胞生理的層面來看，成熟的樹突狀細胞已經準備轉移到淋巴器官進行抗原呈獻作用，所以其吞噬能力已經喪失。

三、利用階層式群集分析找出實驗各組間的相關性

在我們實驗中共分成五個組別：【1】迴圈設計第一組，L1（control 即冬蟲夏草水萃液 0 μ l/ml）。【2】迴圈設計第二組，L2（control 即冬蟲夏草水萃液 0 μ l/ml，與 L1 為相同 RNA，我們設計為內部控制組）。【3】迴圈設計第三組，L3（CS20 即冬蟲夏草水萃液 20 μ l/ml）。【4】迴圈設計第四組，L4（LPS 即脂多醣 1 μ g/ml）。【5】迴圈設計第五組，L5（LPS+CS 即脂多醣 1 μ g/ml 加冬蟲夏草水萃液 20 μ l/ml）（圖一），其中 L1 與 L2 是相同的 RNA 樣本，我們利用一樣的樣本在迴圈設計內做為內部控制組。在我們用來篩選基因所採用的虛無假設 H_0 :L1=L2=L3=L4=L5，經由這個虛無假設可以選取出在五個實驗樣本中有差異的基因，利用階層式群集分析找出實驗各組間的相關性（圖

十二)。結果顯示，兩個未處理的樹突狀細胞樣本間 (control-1 及 control-2) 的距離相近，符合我們預期。此外，脂多醣及冬蟲夏草水萃液處理過的樹突狀細胞 (LPS+CS20) 與脂多醣處理過的樹突狀細胞 (LPS) 距離相近。此結果顯示，成熟與未成熟的樹突狀細胞在基因表現上，差異較冬蟲夏草水萃液帶來的影響大，這樣的結果也是符合預期的，畢竟在成熟與未成熟的樹突狀細胞間的細胞生理與功能是不同的，相對的基因表現的差異一定較冬蟲夏草水萃液帶來的改變大。

我們進一步使用迴圈設計計算的結果，比較各個樣本間所帶來的生物效應。將 H_{08} (冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞基因表現之影響)、 H_{09} (成熟的樹突狀細胞與未成熟的樹突狀細胞基因表現之差異)、 H_{10} (冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟其基因表現之影響)、 H_{11} (冬蟲夏草水萃液對成熟的樹突狀細胞基因表現之影響)、 H_{12} (冬蟲夏草水萃液在成熟與未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異)、 H_{13} (成熟的樹突狀細胞與冬蟲夏草水萃液處理過之未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異) 間的聯集基因 (公式七)，利用群集分析的方法，找出各個樣本間所帶來的生物效應之相關性 (圖十三)。

結果顯示，(1) 成熟的樹突狀細胞與未成熟的樹突狀細胞基因表現之差異【 H_9 】和冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟其基因表現之影響【 H_{10} 】，兩者在基因表現上所造成的生物效應相近。此結果也符合上述推論，成熟與未成熟的樹突狀細胞在基因表現上差異較冬蟲夏草水萃液帶來的影響大。(2) 成熟的樹突狀細胞與未成熟的樹突狀細胞基因表現之差異【 H_9 】、冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟其基因表現之影響【 H_{10} 】和冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞基因表現之影響【 H_8 】，三組在基因表現上所造成的生物效應較其他三組相關性較大。因為這三組的生物效應皆是與未處理的樹突狀細胞樣本做比較，我們可以理解無論是脂多醣促使樹突狀細胞成熟或是冬蟲夏草水萃液帶來的刺激，其與未處理的樹突狀細胞樣本相比，帶來的生物效應必然很大，所以無論是脂多醣或是冬蟲夏草水萃液之間所帶來的差異都無法比有刺激與沒刺激間影響大。(3) 冬蟲夏草水萃液在成熟與未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異【 H_{12} 】和成熟的樹突狀細胞與冬蟲夏草水萃液處理未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異【 H_{13} 】，兩者在基因表現上所造成的生物效應相近。此結果顯示，脂多醣帶來的生物效應較冬蟲夏草水萃液所帶來的生物效應大，符合上述推論，成熟與未成熟的樹突狀細胞在基因表現上差異較冬蟲夏草水

萃液帶來的影響大。(4) 冬蟲夏草水萃液對成熟的樹突狀細胞基因表現之影響【H₁₁】，在基因表現上所造成的生物效應較其他各組相關性較小。此結果也顯示出，成熟與未成熟的樹突狀細胞在基因表現上，差異較冬蟲夏草水萃液帶來的影響大。

四、探討冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞基因表現之影響

根據 H₈:L3-((L1+L2)/2)這個虛無假設所選出的基因即代表冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞基因表現之影響。經由嚴謹的實驗設計與可靠的統計分析篩選出 1202 個受到顯著調控的基因（表一）。進一步利用基因本體論（Gene ontology）資料庫分析，結果顯示，冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞在免疫系統調節與發炎反應的基因調控上是很重要的。我們進一步根據 Gene ontology 的結果，分析參與免疫系統調節與發炎反應相關的基因。利用套裝軟體 PathwayAssist（Stratagene），評估冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞基因表現上，與免疫系統調節與發炎反應相關的基因進行分析，尋找這些基因間直接的關聯性。結果發現，正調控的基因與 Immune response、Peptide transport、Antigen processing、Immunity、Mutagenesis、Synthesis、Proliferation、Assemble、Polymerize 有關（圖二十九）。負調控的基因與 Exocytosis、Angiogenesis、Death、Maturation、Secretion、Focal contact、Apoptosis、Proliferation、Motility、Differentiation、Regulation of signal transduction、Granzyme、Chemokine activity 有關（圖三十）。

五、探討成熟的樹突狀細胞與未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異

根據 H₉:L4-((L1+L2)/2)這個虛無假設所選出的基因即代表成熟的樹突狀細胞與未成熟的樹突狀細胞基因表現之影響。經由嚴謹的實驗設計與可靠的統計分析篩選出 1486 個受到顯著調控的基因（表一）。進一步利用基因本體論（Gene ontology）資料庫分析，結果顯示，成熟的樹突狀細胞與未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異，在免疫系統調節與發炎反應的基因調控上是很重要的。我們進一步根據 Gene ontology 的結果，分析參與免疫系統調節相關與發炎反應的基因。利用套裝軟體 PathwayAssist（Stratagene），評估成熟的樹突狀細胞與未成熟的樹突狀細胞間，與免疫系統調節與發炎反應相關的基因進行分析，尋找這些基因間直接的關聯性。結果發現，正調控的基因與 Acute-phase response、Major histocompatibility complex、Inflammation、Cell survival、Death、Proliferation、Differentiation、Apoptosis、

Maturation、Assemble、Polymerize、Nucleotide-excision repair、Tumor necrosis factor、Cytokine activity、Transcription factor 有關(圖三十一)。負調控的基因與 Proliferation、Differentiation、Motility、Focal contact、Remodeling、Regulation of signal transduction、Chemokine activity、Secretion、Integrin、Trypsin 有關(圖三十二)。

六、探討冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟其基因表現之影響

根據 $H_{10}:L5-((L1+L2)/2)$ 這個虛無假設所選出的基因即代表冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟其基因表現之影響。經由嚴謹的實驗設計與可靠的統計分析篩選出 1318 個受到顯著調控的基因(表一)。進一步利用基因本體論(Gene ontology)資料庫分析,結果顯示,冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟其基因表現之影響,在免疫系統調節與發炎反應的基因調控上是很重要的。我們進一步根據 Gene ontology 的結果,分析參與免疫系統調節與發炎反應相關的基因。利用套裝軟體 PathwayAssist (Stratagene),評估冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟,其基因表現與免疫系統調節與發炎反應相關的基因進行分析,尋找這些基因間直接的關聯性。結果發現,正調控的基因與 Acute-phase response、Major histocompatibility complex、Inflammation、Cell survival、Death、Proliferation、Differentiation、Apoptosis、Maturation、Assemble、Polymerize、Nucleotide-excision repair、Tumor necrosis factor、Cytokine activity、Transcription factor 有關(圖三十三)。負調控的基因與 Proliferation、Differentiation、Motility、Focal contact、Regulation of signal transduction、Chemokine activity、Secretion、Integrin 有關(圖三十四)。

七、探討冬蟲夏草水萃液對成熟的樹突狀細胞基因表現之影響

根據 $H_{11}:L5-L4$ 這個虛無假設所選出的基因即代表冬蟲夏草水萃液對成熟的樹突狀細胞基因表現之影響。經由嚴謹的實驗設計與可靠的統計分析篩選出 319 個受到顯著調控的基因(表一)。進一步利用基因本體論(Gene ontology)資料庫分析,結果顯示,冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟其基因表現之影響,在免疫系統調節與發炎反應的基因調控上是很重要的。我們進一步根據 Gene ontology 的結果,分析參與免疫系統調節與發炎反應相關的基因。利用套裝軟體 PathwayAssist (Stratagene),評估冬蟲夏草水萃液對成熟的樹突狀細胞,其與免疫系統調節與發炎反應相關的基因進行分析,尋找這些基

因間直接的關聯性。結果發現，正調控的基因與 Regulation of signal transduction、Chemokine activity、Motility 有關（圖三十五）。負調控的基因與 Proliferation、Immune response、Pathogenesis、Demyelination、Chemokine activity、Secretion 有關（圖三十六）。

八、探討冬蟲夏草水萃液在成熟與未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異

根據 H₁₂:L5-L3 這個虛無假設所選出的基因即代表冬蟲夏草水萃液在成熟與未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異。經由嚴謹的實驗設計與可靠的統計分析篩選出 364 個受到顯著調控的基因（表一）。進一步利用基因本體論（Gene ontology）資料庫分析，結果顯示，冬蟲夏草水萃液在成熟與未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異，在免疫系統調節與發炎反應的基因調控上是很重要的。我們進一步根據 Gene ontology 的結果，分析參與免疫系統調節與發炎反應相關的基因。利用套裝軟體 PathwayAssist（Stratagene），評估冬蟲夏草水萃液在成熟與未成熟的樹突狀細胞間基因表現，其與免疫系統調節與發炎反應相關的基因進行分析，尋找這些基因間直接的關聯性。結果發現，正調控的基因與 Acute-phase response、Major histocompatibility complex、Inflammation、Cell survival、Death、Proliferation、Differentiation、Apoptosis、Maturation、Assemble、Polymerize、Nucleotide-excision repair、Tumor necrosis factor、Cytokine activity、Transcription factor 有關（圖三十七）。負調控的基因與 Antigen presentation、Secretion、Endocytosis、Mobilization、Motility、Inflammation、CC Chemokine、Chemokine activity 有關（圖三十八）。

九、探討成熟的樹突狀細胞與冬蟲夏草水萃液處理過之未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異

根據 H₁₃:L4-L3 這個虛無假設所選出的基因即代表成熟的樹突狀細胞與冬蟲夏草水萃液處理未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異。經由嚴謹的實驗設計與可靠的統計分析篩選出 598 個受到顯著調控的基因（表一）。進一步利用基因本體論（Gene ontology）資料庫分析，結果顯示，成熟的樹突狀細胞與冬蟲夏草水萃液處理未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異，在免疫系統調節與發炎反應的基因調控上是很重要的。我們進一步根據 Gene ontology 的結果，分析參與免疫系統調節與發炎反應相關的基因。利用套裝軟體 PathwayAssist

(Stratagene)，評估成熟的樹突狀細胞與冬蟲夏草水萃液處理未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異，其與免疫系統調節與發炎反應相關的基因進行分析，尋找這些基因間直接的關聯性。結果發現，正調控的基因與 Differentiation、Secretion、Accumulation、Regulation of signal transduction、Mutagenesis、Immune response、Proliferation、Synthesis、Inflammation、Motility、Degranulation、Immunity、Antigen processing、Mobilization、Cytokine activity、CC Chemokine、Chemokine activity、Integrin 有關（圖三十九）。負調控的基因則與 Secretion 有關（圖四十）。

本計畫為探討冬蟲夏草水萃液對人類樹突狀細胞免疫功能的影響，我們先前也完成冬蟲夏草水萃液對人類白血病細胞株（KG-1 cell line）的基因表現做過完整的評估（詳見行政院衛生署中醫藥委員會研究成果報告，DOH91-TD-1159、CCMP92-RD-116、CCMP93-RD-105 利用 cDNA 微陣列來建構一個分子生物層級的中草藥分析平台），審查委員建議我們比較冬蟲夏草水萃液對腫瘤細胞株與樹突狀細胞的基因表現差異，根據目前整理出來之數據完成初步比對，我們經基因晶片迴圈設計計算，將兩個實驗所得到之有效基因取出，比對這兩個實驗的數據。其中在本次實驗冬蟲夏草對未成熟的樹突狀細胞基因表現之影響（根據 $H_0: L3 - ((L1 + L2)/2)$ 這個虛無假設所選出的基因即代表冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞基因表現之影響。），所得到 1202 個受到顯著調控的基因（表一）與先前探討冬蟲夏草水萃液對人類白血病細胞株（KG-1 cell line）的基因晶片實驗所選出有表現差異的 136 個基因做比較，其中交集的基因有 56 個（圖四十一），比例並不高。我們進一步將兩次實驗所得到基因表現量最高之正負調控各 100 個基因進行比對，其中交集的基因只有 7 個，佔 3.5%（圖四十二），交集的比例相當低。結果顯示腫瘤細胞株與樹突狀細胞在基因表現上的確有很大的差異。基本上，KG-1 cell line 為 $CD34^+$ 的早期血球母細胞，並且是一種癌細胞株，可不斷快速分裂。而本實驗所使用的樹突狀細胞，乃經由細胞激素刺激正常血液中的單核球（Monocyte）所衍生而來，本身並無分裂能力，故兩種不同特性的細胞對冬蟲夏草水萃液的反應不同是可預期的結果。

審查委員建議我們在延續實驗中可探討 Pharmacokinetics、pharmacodynamic 的功效。本計畫協同主持人江啟勳教授目前已經在進行冬蟲夏草水萃液的餾分收集（fraction collect）分析實驗，未來我們將以本實驗所得到的結果，找出有效成份的餾分（major fraction

component)，並尋求藥物分析專家合作，找出有效的成份。此部分我們希望在本計畫結束後進一步朝向此方向進行探討，未來我們將進一步與藥理學專案更密切的合作，並朝委員建議的方向進行。此外，審查委員也建議我們注意冬蟲夏草之有效成份是否可被腸胃吸收，尤其療效更應注意其血液濃度。本計畫協同主持人江啟勳教授近年來著重於冬蟲夏草水萃液對於抗癌以及腫瘤免疫調節機制的研究，在此部分，我們將利用江啟勳教授所建立之小鼠體內試驗平臺，針對審查委員的建議，未來我們將進一步與藥理學專案更密切的合作，做進一步的實驗。待有效的成份驗證後我們也希望由原形物與代謝物的觀點進行探討。

審查委員也建議我們應確認基因晶片的結果。我們使用以下兩種方式來確認基因晶片的結果：(一) 利用 dye swap 的結果做系統自我評估，在我們實驗的迴圈設計中，我們共使用十片基因晶片分析五個生物樣本，【1】迴圈設計第一組，L1 (control 即冬蟲夏草水萃液 0 $\mu\text{l/ml}$)。【2】迴圈設計第二組，L2 (control 即冬蟲夏草水萃液 0 $\mu\text{l/ml}$ ，與 L1 為相同 RNA，我們設計為內部控制組)。【3】迴圈設計第三組，L3 (CS20 即冬蟲夏草水萃液 20 $\mu\text{l/ml}$)。【4】迴圈設計第四組，L4 (LPS 即脂多醣 1 $\mu\text{g/ml}$)。【5】迴圈設計第五組，L5 (LPS+CS 即脂多醣 1 $\mu\text{g/ml}$ 加冬蟲夏草水萃液 20 $\mu\text{l/ml}$) (圖一)，其中 L1 與 L2 是相同的 RNA 樣本，我們利用一樣的樣本在迴圈設計內做為內部控制組。所以透過分析相同樣本的內部控制組，可以清楚的地確認實驗的準確性。我們將相同樣本的內部控制組與各實驗組間的基因表現分佈做比較 (比較通過有意義的基因選定條件之基因，詳參第 28 頁)，結果顯示，相同樣本的內部控制組其基因表現的分佈相當小且接近 0，相反的，實驗組的分佈則較大，這樣的結果驗證了本實驗的結果相當準確 (圖四十三)。此外，我們的迴圈設計中也有三組螢光標示顏色對調 (dye swap) 的結果，也可以用來評估實驗的再現性。第一組 dye swap 實驗，L1 對 L2；L2 對 L3，其中 L1、L2 是完全相同的樣本，經由 hypothesis 2 及 hypothesis 5 計算。我們將表現量正負調控各前 100 個基因進行比較，其中有 179 個基因交集，比例佔 89.5%。進一步分析這 179 個交集的基因，我們可以看到 100% 正負調控的一致性及很好的重複性 (圖四十四)。第二組 dye swap 實驗，L1 對 L4；L4 對 L2，其中 L1、L2 是完全相同的樣本，經由 hypothesis 3 及 hypothesis 6 計算。我們將表現量正負調控各前 100 個基因進行比較，其中有 186 個基因交集，比例佔 93%。進一步分析這 186 個交集的基因，我們一樣

可以看到 100%正負調控的一致性及很好的重複性（圖四十五）。第三組 dye swap 實驗，L1 對 L5；L5 對 L2，其中 L1、L2 是完全相同的樣本，經由 hypothesis 4 及 hypothesis 7 計算。我們將表現量正負調控各前 100 個基因進行比較，其中有 188 個基因交集，比例佔 94%。進一步分析這 188 個交集的基因，我們一樣可以看到 100%正負調控的一致性及很好的重複性（圖四十六）。(二) 在下一年度的計畫中，我們也將利用 Real-time PCR 進行確認。

審查委員建議以冬蟲夏草之水萃物對樹突狀細胞處理，觀察到 TNF- α 、IL-12 及吞噬能力的降低，報告中列舉受調節的基因，乃是由基因晶片測出，但為何不用其他方法，再次確認由基因晶片獲得的結果。本計畫全程為三年計畫，本年度我們已經依預期進度，順利的完成預定工作項目。本計畫在規劃時已安排 Real-time PCR 進行確認，原訂在第三年的計畫中，將利用同步定量聚合酶連鎖反應（Real-time PCR）分析來驗證基因晶片實驗的結果。且先前研究也使用 Real-time PCR 確認， $R>0.9$ 顯示我們的晶片結果與 Real-time PCR 的結果相關性很高（詳見行政院衛生署中醫藥委員會研究成果報告，DOH91-TD-1159、CCMP92-RD-116、CCMP93-RD-105 利用 cDNA 微陣列來建構一個分子生物層級的中草藥分析平台）。同時我們也會針對 TNF- α 、IL-12 及吞噬能力相關的基因，利用同步定量聚合酶連鎖反應進一步驗證。

另外，審查委員也提及以酵素聯結免疫及分析方法，測量樹突狀細胞分泌 TNF- α 、IL-12，其結果受冬蟲夏草水萃液抑制。如何證明它不是由於 total cellular function 降低？根據我們所得到的結果，在冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞之影響方面，樹突狀細胞培養第六天，分別給予不同劑量的冬蟲夏草水萃液，5、10、15、20 $\mu\text{l/ml}$ ，刺激兩天後，收取細胞上清液，利用酵素聯結免疫吸附分析法測量樹突狀細胞分泌 TNF- α 及 IL-12 的量。結果顯示，未成熟的樹突狀細胞其分泌 TNF- α 及 IL-12 的量極少，偵測不到，在加入冬蟲夏草水萃液後並無顯著改變（與未處理冬蟲夏草水萃液組相較，圖七）。其中，未成熟的樹突狀細胞其分泌 TNF- α 及 IL-12 的量極少，偵測不到，這樣的結果與先前相關的研究是一致的[46-48]，因為未成熟的樹突狀細胞尚未被激活。在冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟之影響方面，樹突狀細胞培養第六天，分別給予脂多醣 1 $\mu\text{g/ml}$ 及不同劑量的冬蟲夏草水萃液，5、10、15、20 $\mu\text{l/ml}$ ，刺激兩天後，收取細胞上清液，利用酵素聯結免疫吸附分析法測量樹突狀細胞分泌 TNF- α 及 IL-12 的

量。結果顯示，冬蟲夏草水萃液會抑制成熟的樹突狀細胞分泌TNF- α （與給予脂多糖1 $\mu\text{g/ml}$ 但未處理冬蟲夏草水萃液組相較，圖七-A）及IL-12（與給予脂多糖1 $\mu\text{g/ml}$ 但未處理冬蟲夏草水萃液組相較，圖七-B），且隨著劑量增加其抑制效果更為顯著。在這部分我們也發現成熟的樹突狀細胞（與給予脂多糖1 $\mu\text{g/ml}$ ）會分泌TNF- α 及IL-12，這樣的結果與先前相關的研究也是一致的[40, 46-48]。初步的結果顯示，冬蟲夏草水萃液會抑制成熟的樹突狀細胞分泌TNF- α 及IL-12（與control ratio值相比），但是不排除total cellular function是否降低，在第三年的計畫中，我們將利用同步定量聚合酶連鎖反應（Real-time PCR）分析來驗證基因晶片實驗的結果。同時我們也會針對TNF- α 、IL-12及吞噬能力相關的基因，利用同步定量聚合酶連鎖反應進一步驗證，確認它不是由於total cellular function降低。

最後，審查委員也提及本研究發現冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分泌TNF- α 、IL-12及吞噬能力有抑制能力，與先前國立陽明大學陳裕仁教授的研究[17]相反，做何解釋？先前陳教授利用冬蟲夏草所分離出的多醣體萃取物（PSCS）刺激 monocyte 後的 conditional media（PSCS-MNC-CM）來培養人類白血病細胞株（U937 cell line）發現，冬蟲夏草所分離出的多醣體萃取物會抑制人類白血病細胞株（U937 cell line）生長、促進人類白血病細胞株（U937 cell line）分泌TNF- α 及增強吞噬能力[17]。這樣的結果很有趣，其中幾個部分的做法與本實驗不同，詳述如下：（1）處理方式不同，我們直接使用冬蟲夏草水萃液處理樹突狀細胞，而陳教授利用冬蟲夏草所分離出的多醣體萃取物刺激 monocyte 後的 conditional media（PSCS-MNC-CM）來培養人類白血病細胞株（U937 cell line）。（2）細胞株（cell line）不同，本實驗採用正常人血液單核球細胞所衍生之樹突狀細胞（Human monocytes-derived dendritic cells），而陳教授則使用腫瘤細胞株人類白血病細胞株（U937 cell line）。（3）劑量不同，因為本實驗所使用的細胞為正常的細胞，故我們採用冬蟲夏草水萃液之劑量以不影響細胞生長為原則（細胞存活率>90%），而陳教授採用冬蟲夏草所分離出的多醣體萃取物（PSCS）的劑量則會抑制細胞生長。基於以上理由，我們不意外這樣的差異造成結果的不一致。此外，我們先前也完成冬蟲夏草水萃液對人類白血病細胞株（KG-1 cell line）的基因表現做過完整的評估，結果顯示腫瘤細胞株與樹突狀細胞在基因表現上的確有很大的差異（詳見第 47 頁），因此這樣的結果我們相信是有可能的。

本計畫全程為三年計畫，本年度我們已經依預期進度，順利的完

成預定工作項目。我們完成了冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分泌細胞激素的測定、冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞吞噬能力測定，以及利用統計分析來設計基因晶片實驗，並完成數據的分析。但是我們仍須更進一步的探討冬蟲夏草對於樹突狀細胞免疫調控的影響。未來在第三年的計畫中，我們將更進一步找到冬蟲夏草對於樹突狀細胞免疫調控的機制，並探討冬蟲夏草處理過的樹突狀細胞對 T 細胞之影響。同時，我們也將利用同步定量聚合酶連鎖反應（Real-time PCR）分析來驗證基因晶片實驗的結果。此外，有鑑於生物重覆性（Biological replicate）的重要性，我們也預期希望在第三年的計畫中，取用另一批的冬蟲夏草樣本，進行一樣的基因晶片迴圈設計實驗，這樣的結果可以避免冬蟲夏草樣本間的誤差。未來我們找到的標記基因，可做為天然冬蟲夏草的標準，可以評估市售冬蟲夏草培養的菌絲體產品在效用上與天然冬蟲夏草間的評估指標。

伍、結論與建議

本計畫全程為三年計畫，我們於第一年完成了以下幾項目標：(1) 建立人類樹突狀細胞的體外培養系統。(2) 完成冬蟲夏草的水萃液之製備、品種鑑定。(3) 完成冬蟲夏草的成份分析，建立有機/無機化合物的標準化品管控制。(4) 完成評估冬蟲夏草對於樹突狀細胞分化成熟之影響。(5) 執行人類基因晶片的製備，並完成系統與技術的測試實驗。

在本年度我們完成了(1) 評估冬蟲夏草對於樹突狀細胞分泌細胞激素之影響。(2) 評估冬蟲夏草對於樹突狀細胞吞噬能力之影響。(3) 以統計學的方法來設計基因晶片的實驗。(4) 人類基因晶片的製備。(5) 利用基因晶片技術探討冬蟲夏草對於樹突狀細胞基因表現之影響。(6) 利用生物統計分析基因晶片之結果，並利用群集分析找出不同品種的冬蟲夏草對於樹突狀細胞基因表現特有之基因表現圖譜。此成果報告中，我們已將上述的結果一一呈現。

本計畫全程總目標為是要利用現代化的尖端生物科技—基因晶片技術和目前相當受重視的免疫系統調節細胞—樹突狀細胞，為實驗架構，來分析中草藥珍品—冬蟲夏草對細胞免疫功能的影響。希望藉著觀察冬蟲夏草對樹突狀細胞基因表現圖譜的影響，進一步有效且可靠的了解，冬蟲夏草對調節樹突狀細胞免疫功能之可能機制，針對冬

蟲夏草於樹突狀細胞之免疫調節功效做全盤性的評估。希望能在接下來第三年的計畫中，順利完成冬蟲夏草對於樹突狀細胞免疫調節功效全盤性的評估。

本計畫核定執行經費遠低於實際所需經費，對於基因晶片的實驗及人類樹突狀細胞的培養都屬於昂貴的實驗，雖然目前的經費狀況並不是很充裕，我們仍然以其他經費來支援，盡力完成既定之研究內容。特此報告說明，再次感謝貴委員會支助。

陸、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 CCMP94-RD-049）提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

柒、參考文獻

1. 許瑞祥。人工培養冬蟲夏草屬之性質及代謝之探討。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。1984。
2. Manabe N, Sugimoto M, Azuma Y, et al. Effects of the mycelial extract of cultured *Cordyceps sinensis* on *in vivo* hepatic energy metabolism in the mouse. Jpn J Pharmacol 1996, 70:85-88.
3. Liu P, Zhu J, Huang Y, et al. Influence of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. and rat serum containing same medicine on IL-1, IFN and TNF produced by rat Kupffer cells. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 1996, 21:367-369.
4. Nakamura K, Yamaguchi Y, Kagota S, et al. Activation of *in vivo* Kupffer cell function by oral administration of *Cordyceps sinensis* in rats. Jpn J Pharmacol 1999, 79:505-508.
5. Zhou L, Yang W, Xu Y, et al. Short-term curative effect of cultured *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. Mycelia in chronic hepatitis B. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 1990, 15:53-55.
6. Li LS, Zheng F, Liu ZH. Experimental study on effect of *Cordyceps sinensis* in ameliorating aminoglycoside induced nephrotoxicity. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi 1996, 16:733-737.
7. Zhen F, Tian J, Li LS. Mechanisms and therapeutic effect of *Cordyceps*

- sinensis* (CS) on aminoglycoside induced acute renal failure (ARF) in rats. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi 1992, 12:288-291.
8. 李立仁。冬蟲夏草菌萃取液對大白鼠腎上腺皮質細胞皮質酮分泌功能及脂肪滴形態的影響。國立台灣大學解剖學研究所碩士論文。1996。
 9. Wang SM, Lee LJ, Lin WW, Chang CM. Effects of a water-soluble extract of *Cordyceps sinensis* on steroidogenesis and capsular morphology of lipid droplets in cultured rat adrenocortical cells. J Cell Biochem 1998, 69:483-489.
 10. Xu F, Huang JB, Jiang L, Xu J, Mi J. Amelioration of cyclosporin nephrotoxicity by *Cordyceps sinensis* in kidney-transplanted recipients. Nephrol Dial Transplant 1995, 10:142-143.
 11. Cheng Q. Effect of *Cordyceps sinensis* on cellular immunity in rats with chronic renal insufficiency. Chung-Hua I Hsueh Tsa Chin (Chinese Medical Journal) 1992, 72:27-29.
 12. Ikumoto T, Sasaki S, Namba H, Toyama R, Moritoki H, Mouri T. Physiologically active compounds in the extracts from tochukaso and cultured mycelia of *Cordyceps* and *Isaria*. Yakugaku Zasshi 1991, 111:504-509.
 13. Zhao Y. Inhibitory effects of alcoholic extract of *Cordyceps sinensis* on abdominal aortic thrombus formation in rabbits. Chung-Hua I Hsueh Tsa Chin (Chinese Medical Journal) 1991, 71:612-615.
 14. 張佩靖。人工培養冬蟲夏草菌絲對大白鼠血管作用之探討。國立陽明大學藥理學研究所碩士論文。1996。
 15. Chiou WF, Chang PC, Chou CJ, Chen CF. Protein constituent contributes to the hypotensive and vasorelaxant activities of *Cordyceps sinensis*. Life Sci 2000, 66:1369-1376.
 16. Mei QB, Tao JY, Gao SB, Xu GC, Chen LM, Su JK. Antiarrhythmic effects of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 1989, 14:616-618.
 17. Chen YJ, Shiao MS, Lee SS, Wang SY. Effect of *Cordyceps sinensis* on the proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells. Life Sci 1997, 60:2349-2359.
 18. Kuo YC, Lin CY, Tsai WJ, Wu CL, Chen CF, Shiao MS. Growth inhibitors against tumor cells in *Cordyceps sinensis* other than

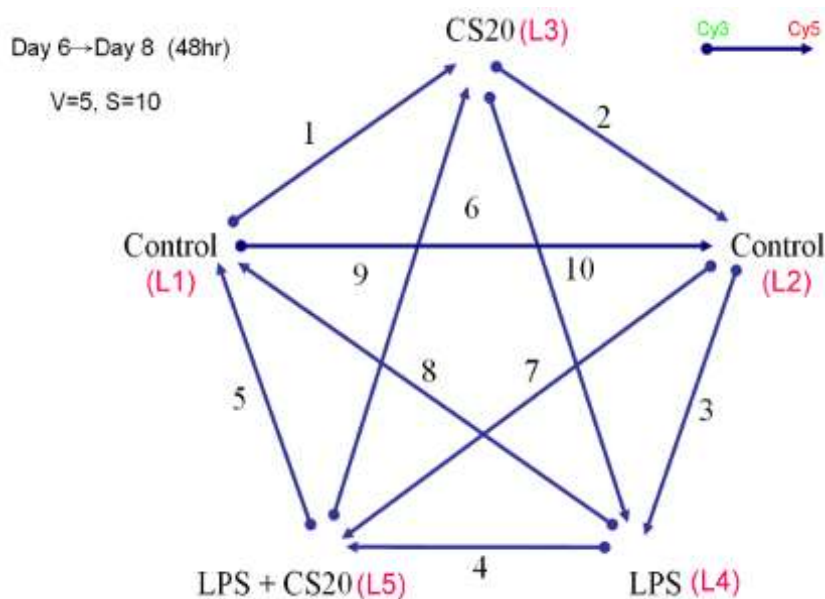
- cordycepin and polysaccharides. *Cancer Invest* 1994, 12:611-615.
19. Bok JW, Lerner L, Chilton J, Klingeman HG, Towers GH. Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Phytochemistry* 1999, 51:891-898.
 20. Yoshida J, Takamura S, Yamaguchi N, Ren LJ, Chen H, Koshimura S, Suzuki S. Antitumor activity of an extract of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. against murine tumor cell lines. *Jpn J Exp Med* 1989, 59:157-161.
 21. Xu RH, Peng XE, Chen GZ, Chen GL. Effects of *Cordyceps sinensis* on natural killer activity and colony formation of B16 melanoma. *Chin Med J* 1992, 105:97-101.
 22. Nakamura K, Yamaguchi Y, Kagota S, Shinozuka K, Kunitomo M. Activation of in vivo Kupffer cell function by oral administration of *Cordyceps sinensis* in rats. *Jpn J Pharmacol* 1999, 79:505-508.
 23. Chiu JH, Ju CH, Wu LH, Lui WY, Wu CW, Shiao MS, Hong CY. *Cordyceps sinensis* increases the expression of major histocompatibility complex class II antigens on human hepatoma cell line HA22T/VGH cells. *Am J Chin Med* 1998, 26:159-170.
 24. Chen GZ, Chen GL, Sun T, Hsieh GC, Henshall JM. Effects of *Cordyceps sinensis* on murine T lymphocyte subsets. *Chin Med J* 1991, 104:4-8.
 25. Zhu XY, Yu HY. Immunosuppressive effect of cultured *Cordyceps sinensis* on cellular immune response. *Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 1990, 10:485-487.
 26. Liu C, Lu S, Ji MR. Effects of *Cordyceps sinensis* on in vitro natural killer cells. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 1992, 12:267-269.
 27. Chen JR, Yen JH, Lin CC, Tsai WJ, Liu WJ, Tsai JJ, Lin SF, Liu HW. The effects of Chinese herbs on improving survival and inhibiting anti-ds DNA antibody production in lupus mice. *Am J Chin Med* 1993, 21:257-262.
 28. 楊令瑀。研究臺灣兒童狼瘡性腎炎及以冬蟲夏草單純天然物H1-A治療之可行性及機制。國立陽明大學臨床醫學研究所碩士論文。1999。
 29. Kuo YC, Tsai WJ, Wang JY, Chang SC, Lin CY, Shiao MS. Regulation of bronchoalveolar lavage fluids cell function by the

- immunomodulatory agents from *Cordyceps sinensis*. Life Sci 2001, 68:1067-1082.
30. 許毓芬。篩選可抑制血小板活化因子以治療氣喘之冬蟲夏草天然物。國立陽明大學傳統醫藥學研究所碩士論文。1994。.
 31. 錢震莊。以棕色挪威鼠為模式探討冬蟲夏草天然物對卵白蛋白誘發氣喘後期氣管收縮與脂多醣體誘發急性肺傷害之療效。輔仁大學生物學系碩士論文。1995。
 32. Shin KH, Lim SS, Lee SH, Lee YS, Cho SY. Antioxidant and immunostimulating activities of the fruiting bodies of *Paecilomyces japonica*, a new type of *Cordyceps* sp. Ann NY Acad Sci 2001, 928:261-273.
 33. Kiho T, Yamane A, Hui J, Usui S, Ukai S. Polysaccharides in fungi. XXXVI. Hypoglycemic activity of a polysaccharide (CS-F30) from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis* and its effect on glucose metabolism in mouse liver. Biol Pharm Bull 1996, 19: 294-296.
 34. Kneifel H, Konig WA, Loeffler W, Muller R. Ophiocordin, an antifungal antibiotic of *Cordyceps ophioglossoides*. Arch Microbiol 1977, 113: 121-130.
 35. Huang BM, Hsu CC, Tsai SJ, Sheu CC, Leu SF. Effects of *Cordyceps sinensis* on testosterone production in normal mouse Leydig cells. Life Sci 2001, 69: 2593-2602.
 36. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: morphology, quantitation, tissue distribution. J Exp Med 1973, 137:1142-1162.
 37. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: functional properties *in vitro*. J Exp Med 1974, 139:380-397.
 38. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte /macrophage colony stimulating factor. J Exp Med 1992, 176:1693-1702.
 39. De Smedt T, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De Baetselier P, Urbain J, Leo O, Moser M. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide *in vivo*. J Exp Med

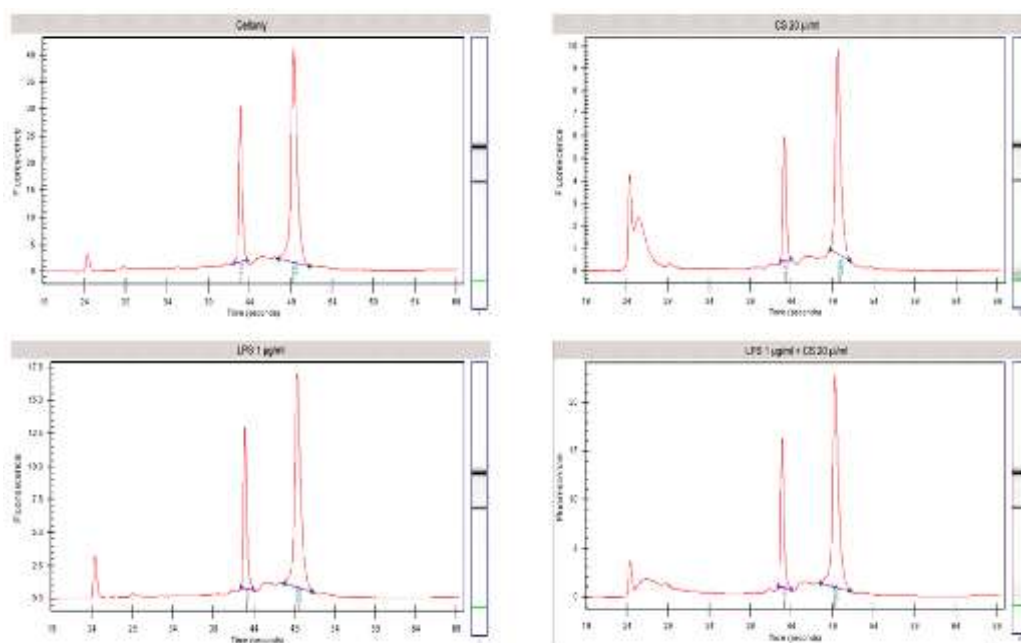
1996, 184:1413-1424.

40. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000, 18:767-811.
41. Hartgers FC, Figdor CG, Adema GJ. Towards a molecular understanding of dendritic cell immunobiology. *Immunol Today* 2000, 21:542-545.
42. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996, 196(2):137-151.
43. Koh JH, Yu KW, Suh HJ, Choi YM, Ahn TS. Activation of macrophages and the intestinal immune system by an orally administered decoction from cultured mycelia of *Cordyceps sinensis*. *Biosci. Biotechnol Biochem* 2002, 66:407-411.
44. Al-Shahrour F, Díaz-Uriarte R, Dopazo J. FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics* 2004, 20: 578-580.
45. Shahed AR, Kim SI, Shoskes DA. Down-regulation of apoptotic and inflammatory genes by *Cordyceps sinensis* extract in rat kidney following ischemia/reperfusion. *Transplant Proc* 2001, 33(6):2986-2987.
46. Kim KD, Choi SC, Noh YW, Kim JW, Paik SG, Yang Y, Kim K 2nd, Lim JS. Impaired responses of leukemic dendritic cells derived from a human myeloid cell line to LPS stimulation. *Exp Mol Med* 2006, 38(1):72-84.
47. Law HK, Cheung CY, Ng HY, Sia SF, Chan YO, Luk W, Nicholls JM, Peiris JS, Lau YL. Chemokine up-regulation in SARS-coronavirus-infected, monocyte-derived human dendritic cells. *Blood* 2005, 106(7):2366-74.
48. Nakahara T, Urabe K, Fukagawa S, Uchi H, Inaba K, Furue M, Moroi Y. Engagement of human monocyte-derived dendritic cells into interleukin (IL)-12 producers by IL-1beta + interferon (IFN)-gamma. *Clin Exp Immunol* 2005, 139(3):476-482.

捌、圖、表



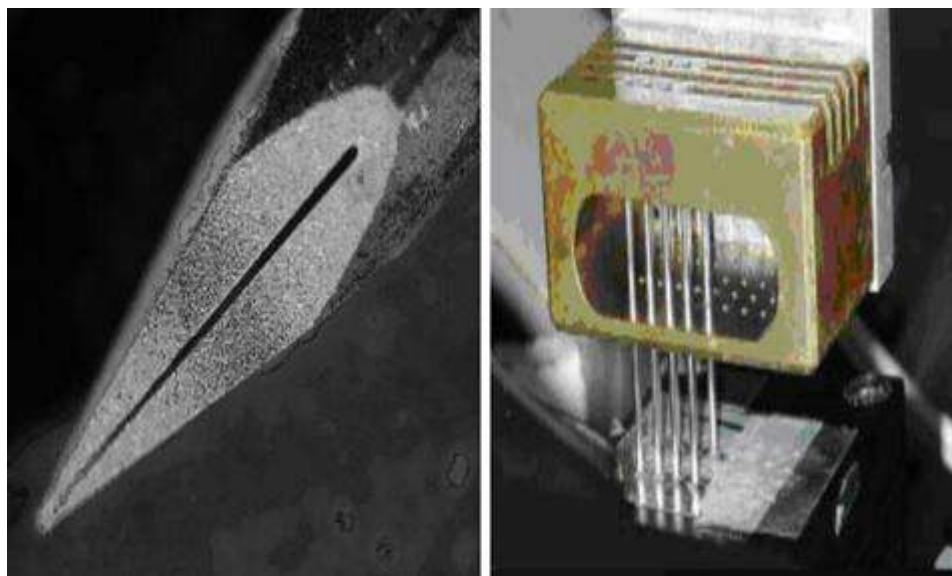
圖一 基因晶片迴圈設計，在迴圈實驗中使用10片基因晶片評估5個實驗樣本間的差異，Control對Control為內部控制組。樹突狀細胞培養第六天，分別給予或不給予LPS及不同濃度之冬蟲夏草水萃液，刺激48小時進行基因晶片實驗。(CS20：樹突狀細胞給予冬蟲夏草20 μ l/ml；LPS：樹突狀細胞給予脂多醣1 μ g/ml)。



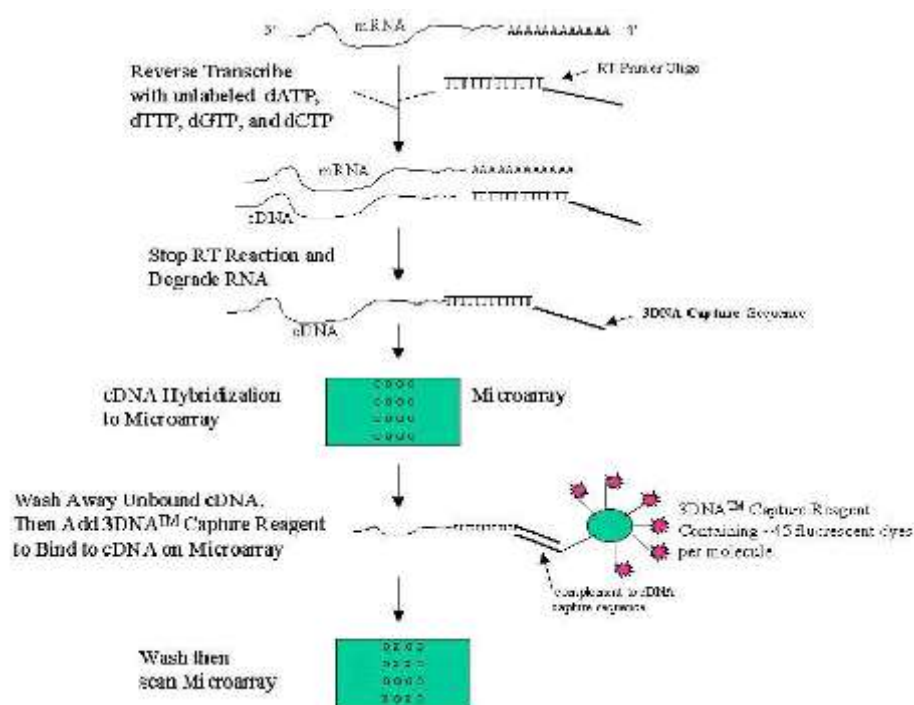
圖二 本實驗在基因晶片所使用的RNA，經RNA毛細管電泳 (Agilent RNA 6000 LabChip) 確認RNA之品質，其RNA品質良好。



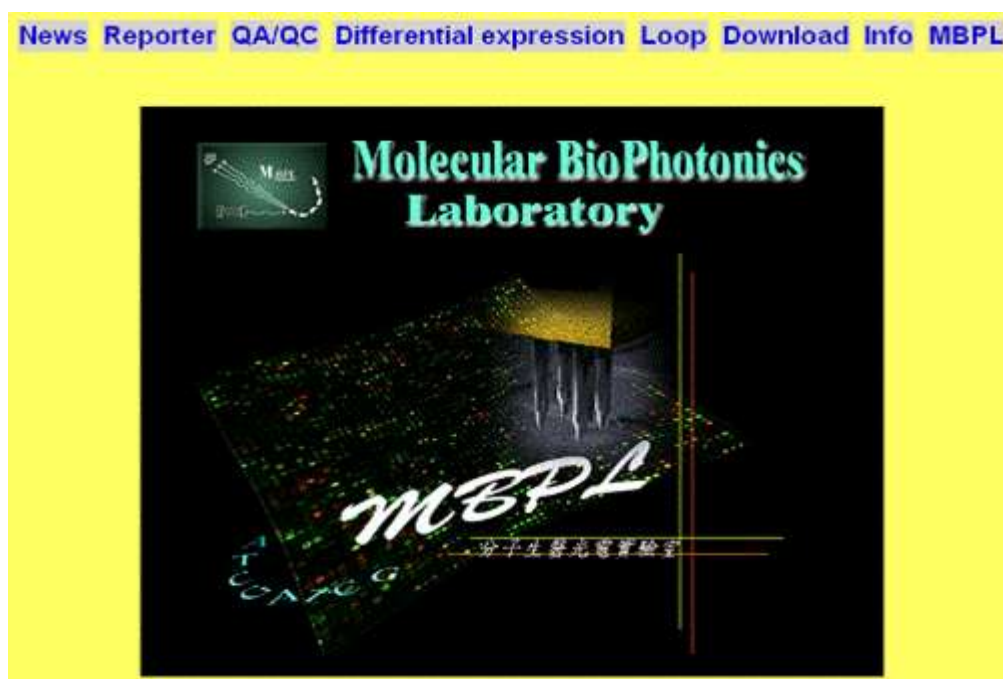
圖三 Brown型基因晶片系統，以目前的技術可以在一片22 mm ×75 mm大小的玻片上點印超過三萬點的探針。(1) X 軸平面(2) Y 軸(3) Z 軸(4) 針座(5) 超音波震盪器(6) 玻片(7) 384 孔盤。



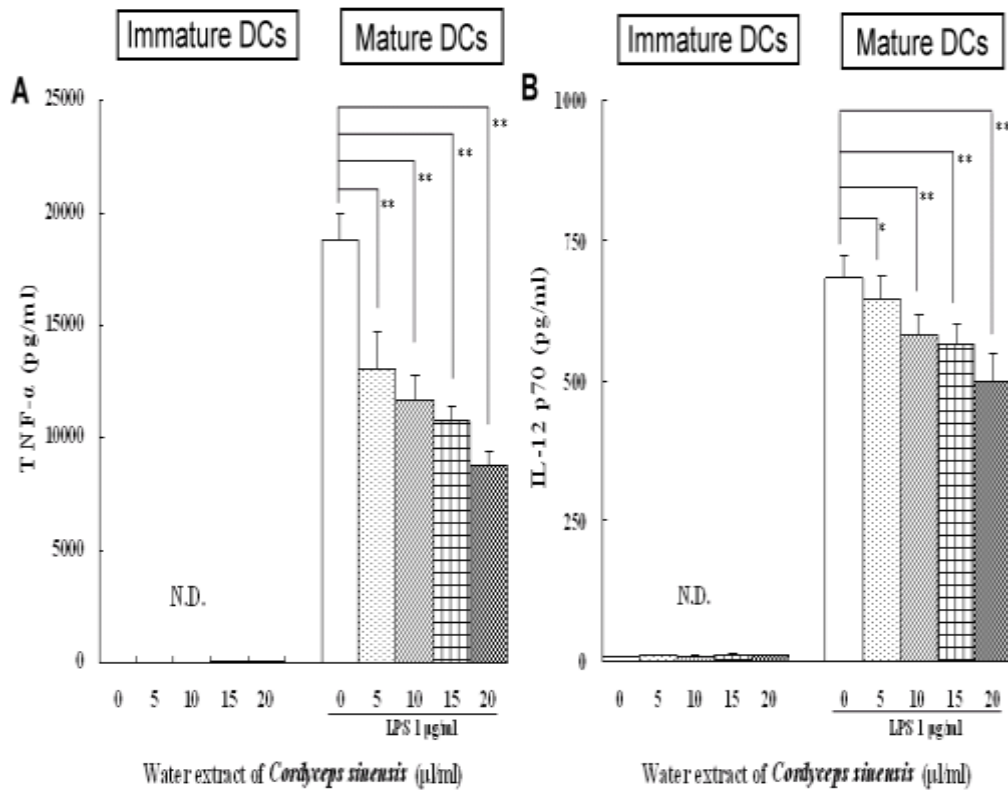
圖四 左圖為點印用之狹縫針。右圖為微陣列點印系統之針座，本實驗室一次可以同時使用48根針進行點印工作。



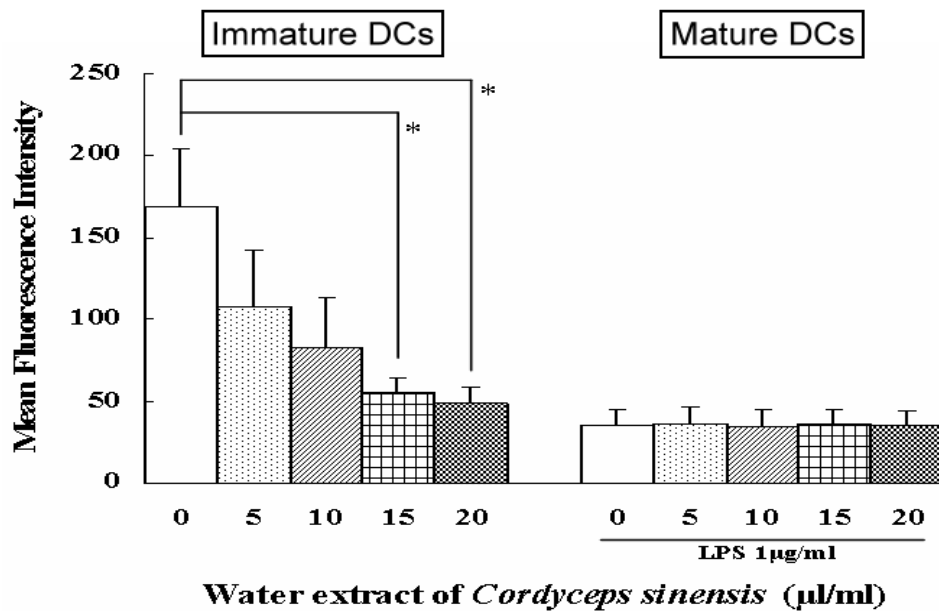
圖五 非直接標記法原理，以寡腺苷鏈進行第一次雜合反應，再以3 DNA擷取序列的互補序列進行第二次雜合反應。



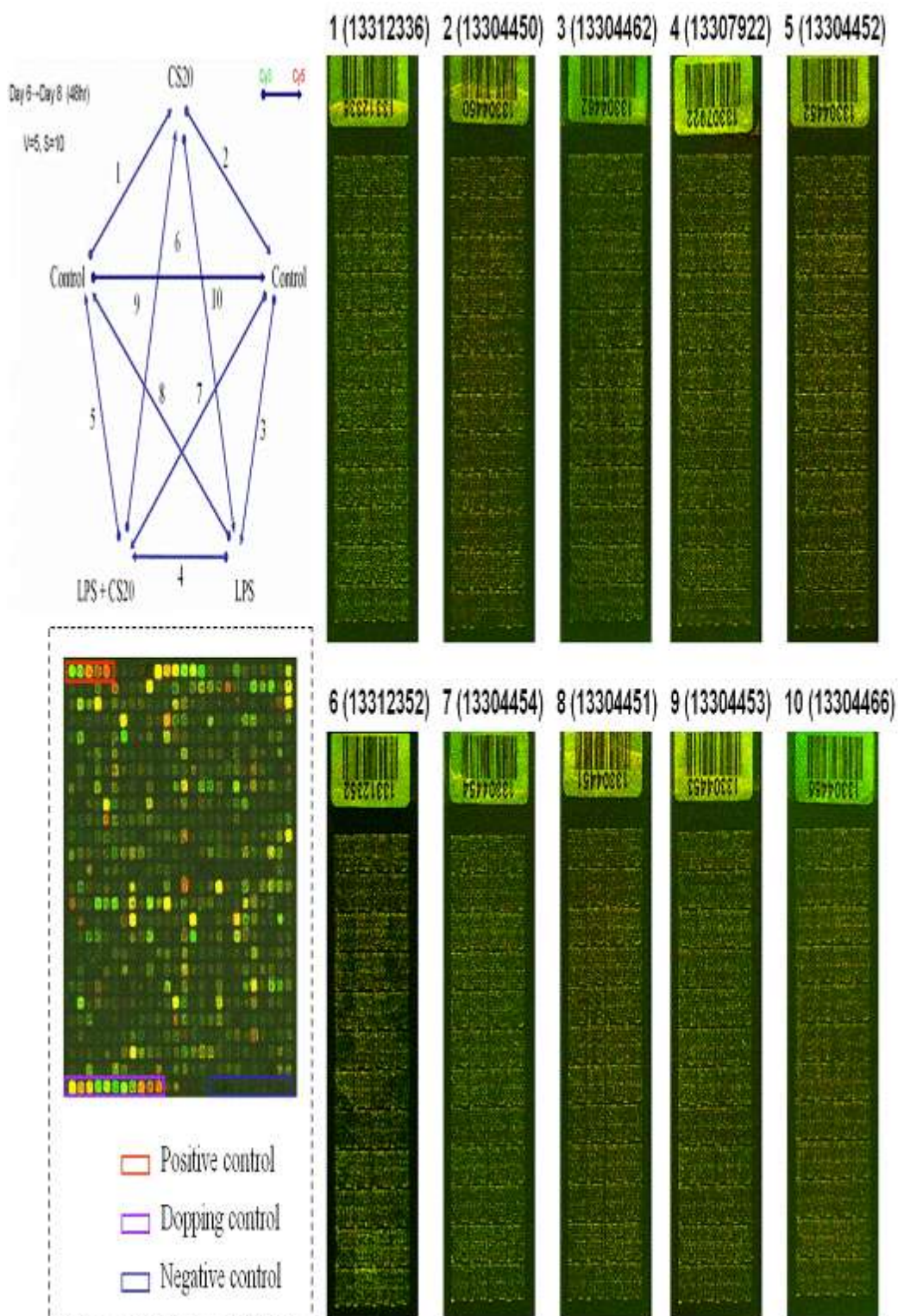
圖六 本研究團隊建立之基因晶片的實驗數據資料庫（MBPL Microarray Database，<http://140.114.106.16/base/>）。



圖七 冬蟲夏草水萃液對未成熟樹突狀細胞及成熟的樹突狀細胞分泌細胞激素之影響。A圖為TNF- α 的結果；B圖為IL-12p70的結果。*表示 $p<0.05$ ；**表示 $p<0.01$ 。



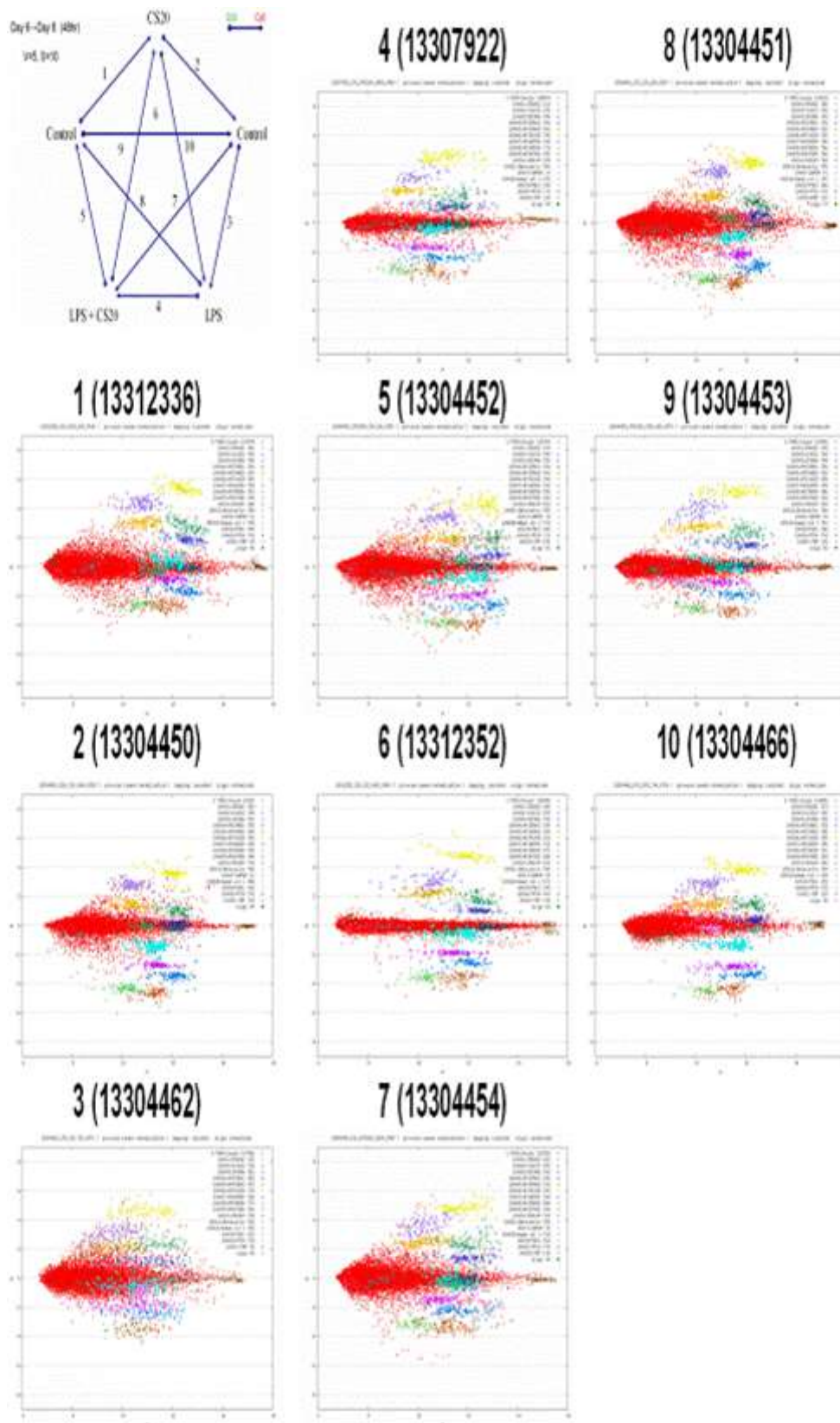
圖八 冬蟲夏草水萃液對未成熟樹突狀細胞及成熟的樹突狀細胞吞噬能力之影響。*表示 $p<0.05$ 。



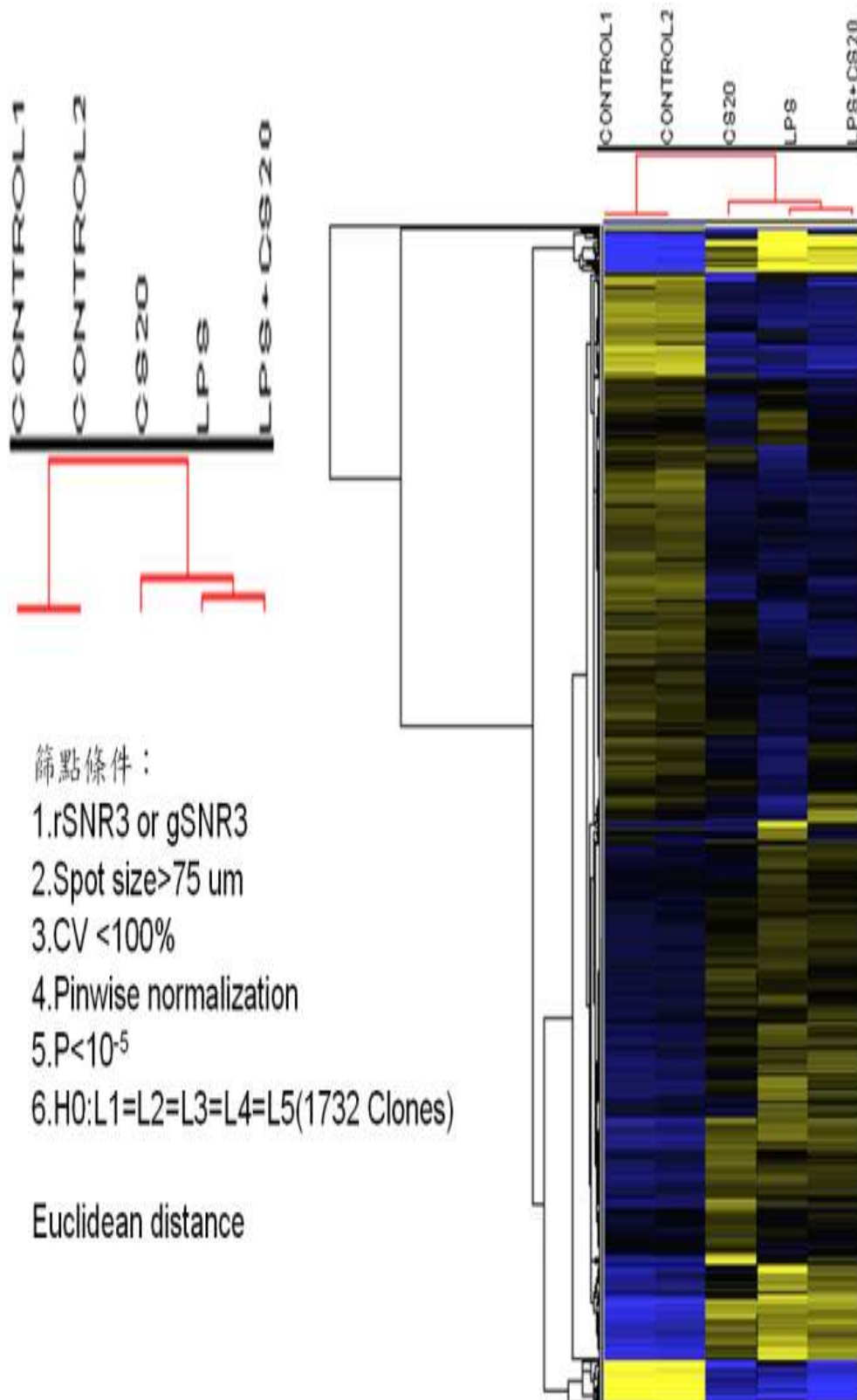
圖九 基因晶片原始影像圖，每片有32448個點，含7334個clones各四重覆、陽性對照組、陰性對照組及實驗的外加控制組。



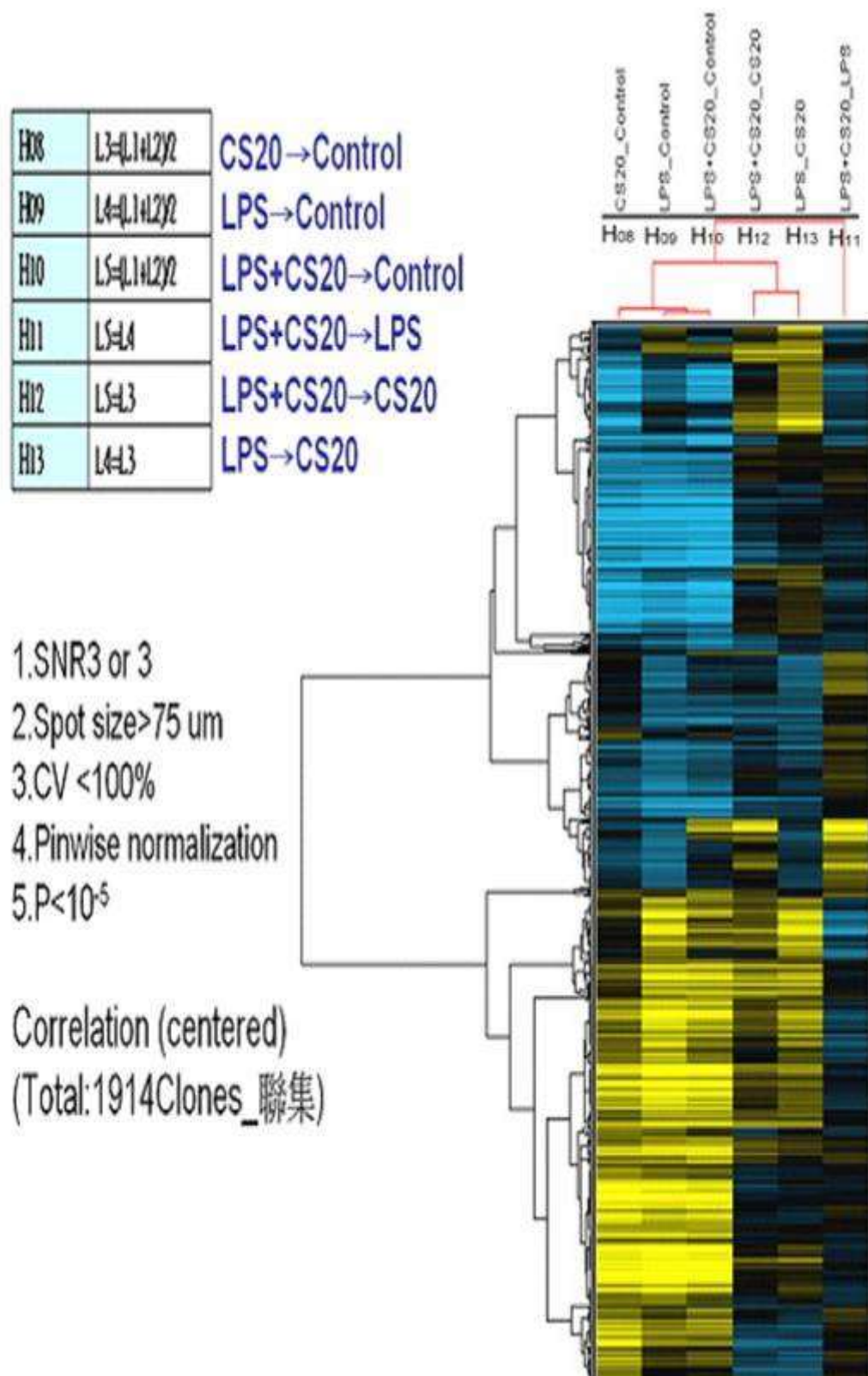
圖十 利用GenePix Pro 6.0 軟體 (Axon Instruments)進行圈點工作，我們採用不規則圈點的方式（避免點不規則所造成的誤差），並分析影像檔。



圖十一 基因晶片M-A圖，紅色為基因的分佈（7334個clones各四重覆），其他色彩為實驗的外加控制組（不同倍率的表現）。

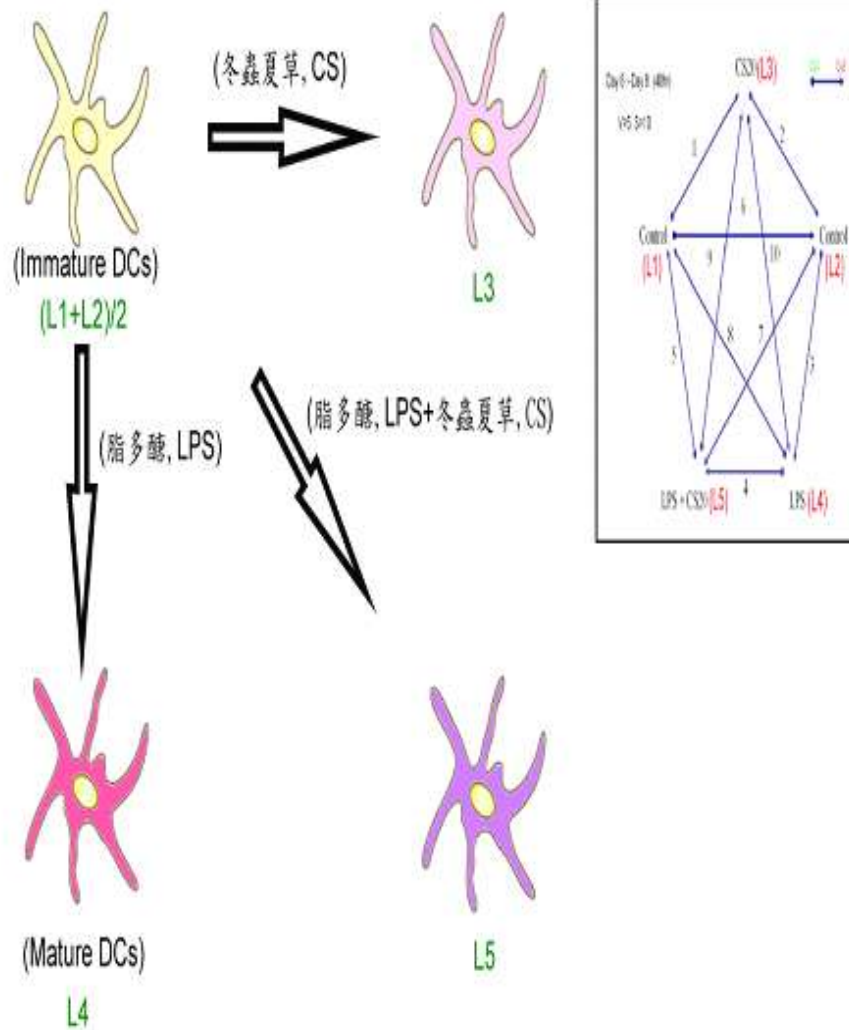


圖十二 利用群集分析的方法，找出五個樣本間的相關性。



圖十三 利用群集分析的方法，找出五個樣本間所帶來的生物效應之相關性。

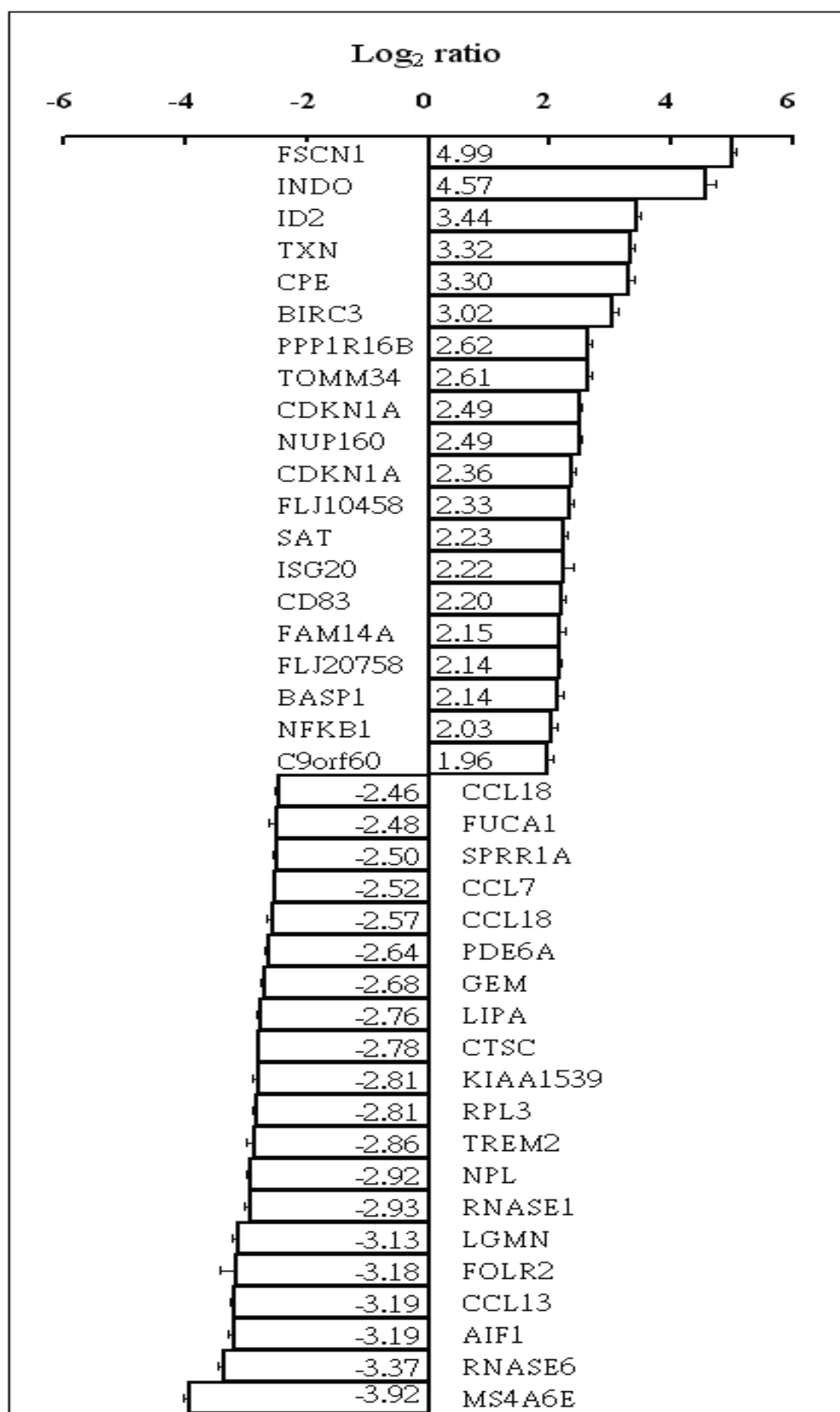
DC day6



L1~L5為迴圈設計內的樣本

H₀₈: L3-((L1+L2)/2) 評估冬蟲夏草對未成熟的樹突狀細胞基因表現之影響H₀₉: L4-((L1+L2)/2) 評估成熟的樹突狀細胞與未成熟樹突狀細胞基因表現之差異H₁₀: L5-((L1+L2)/2) 評估冬蟲夏草對樹突狀細胞分化成熟其基因表現之影響H₁₁: L5-L4 評估冬蟲夏草對成熟樹突狀細胞基因表現之影響H₁₂: L5-L3 評估冬蟲夏草在成熟與未成熟樹突狀細胞間基因表現之差異H₁₃: L4-L3 評估成熟的樹突狀細胞與冬蟲夏草處理未成熟樹突狀細胞間基因表現之差異

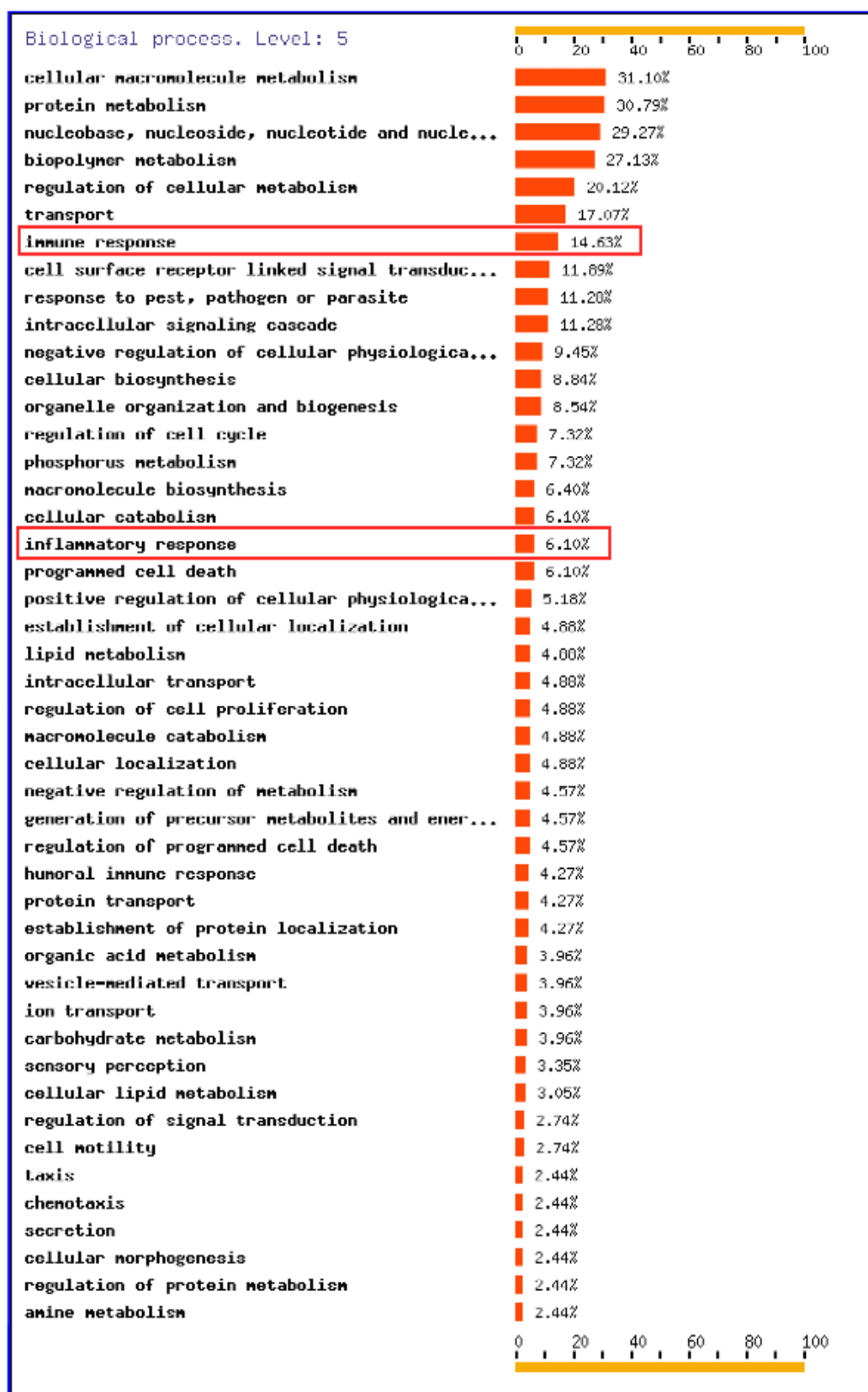
圖十四 實驗設計略圖，全盤性探討冬蟲夏草水萃液由未成熟的樹突狀細胞到成熟的樹突狀細胞免疫功能之影響。



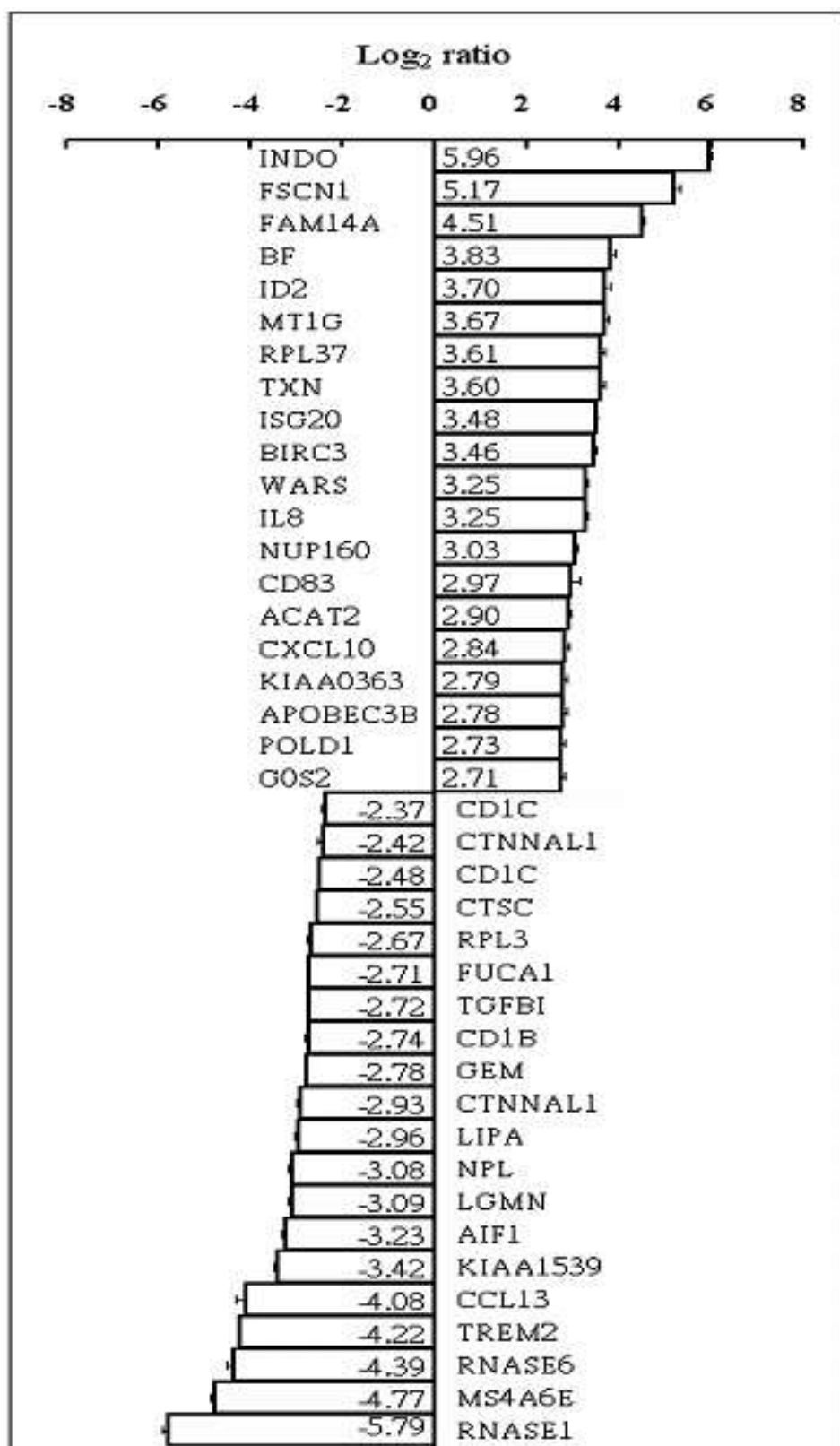
圖十五 冬蟲夏草水萃液對未成熟樹突狀細胞基因表現之影響，正調控與負調控最顯著的前 20 個基因。（Hypothesis 08:L3=(L1+L2)/2）



圖十六 分析基因晶片上7334個基因，其在生物過程類的分類比例。



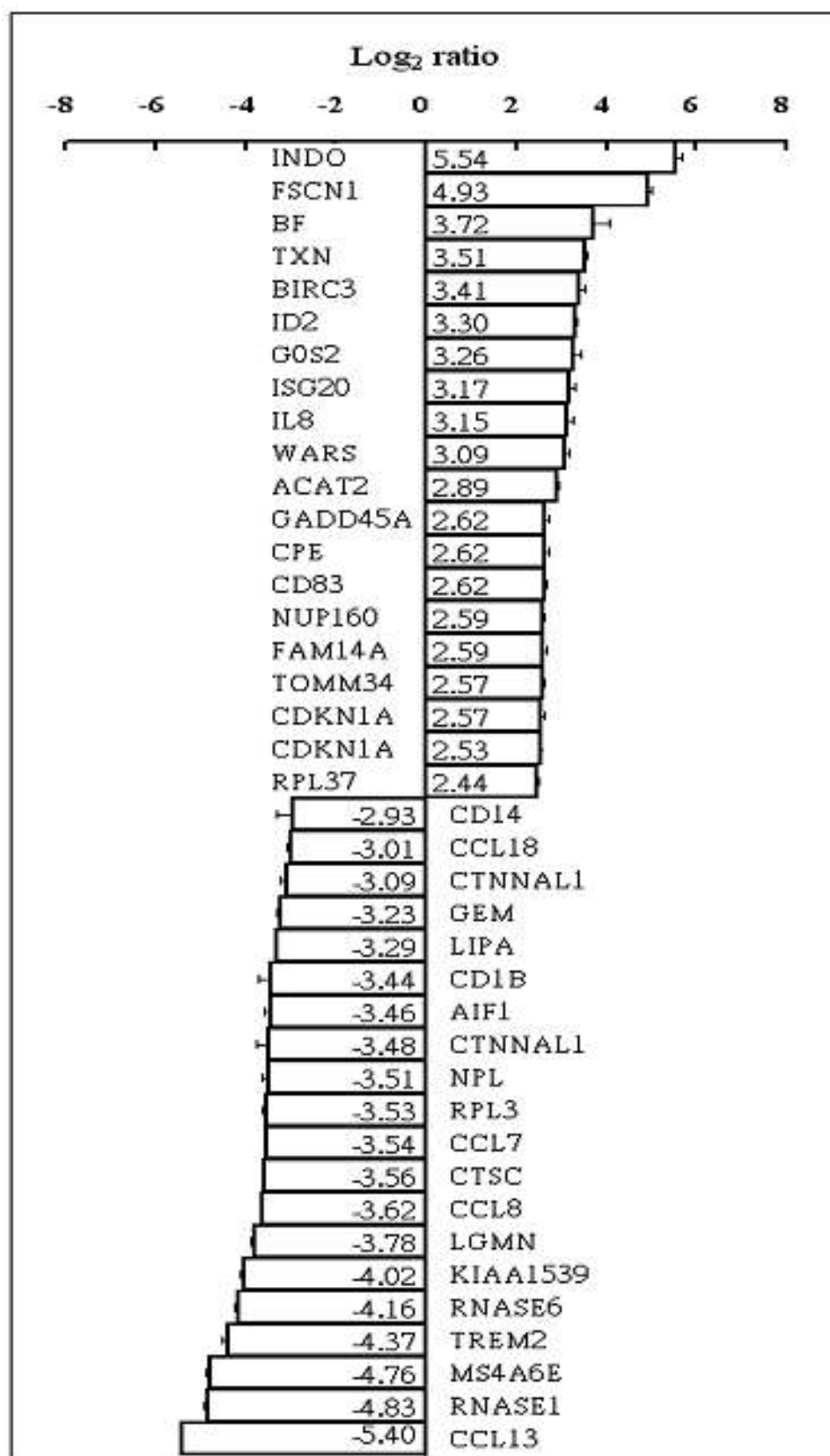
圖十七 分析冬蟲夏草水萃液對未成熟樹突狀細胞有顯著調控的基因，其在生物過程類的分類比例。



圖十八 成熟樹突狀細胞（脂多醣處理過的）與未成熟樹突狀細胞間基因表現之影響，正調控與負調控最顯著的前20個基因。
 （Hypothesis 09:L4=(L1+L2)/2）



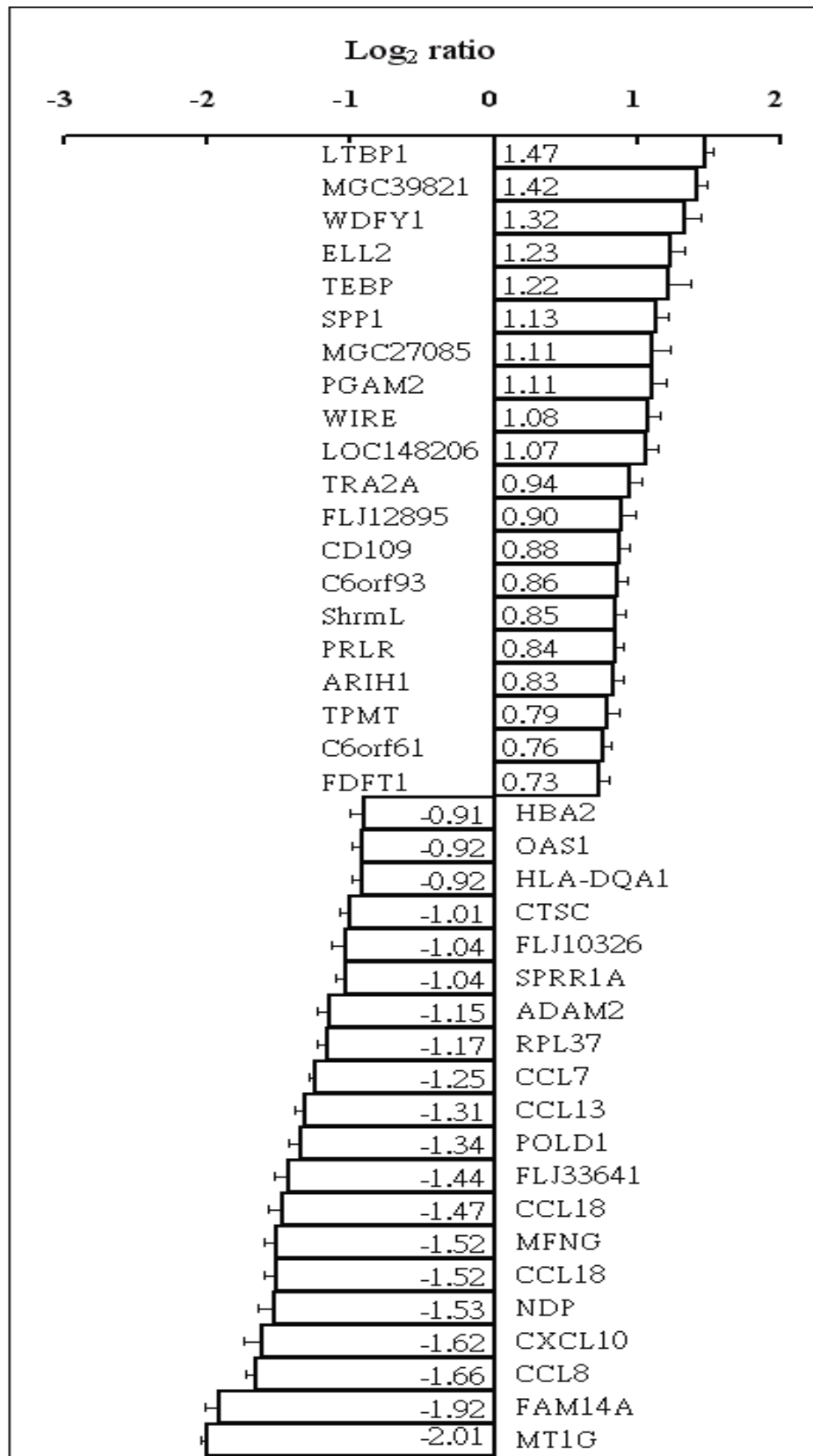
圖十九 分析成熟的樹突狀細胞與未成熟樹突狀細胞間有顯著調控的基因，其在生物過程類的分類比例。



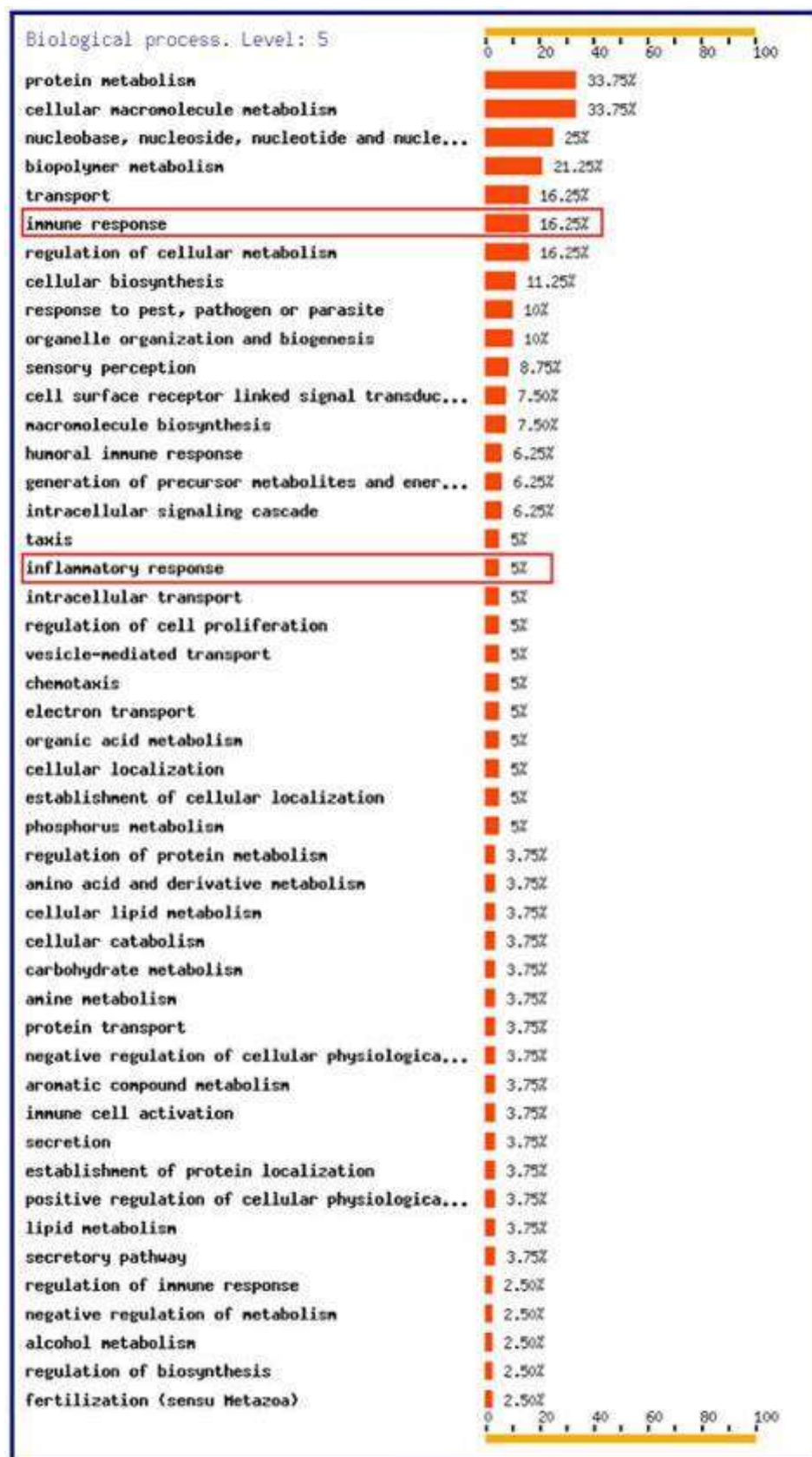
圖二十 冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟間基因表現之影響，正調控與負調控最顯著的前20個基因。（Hypothesis 10:L5=(L1+L2)/2）



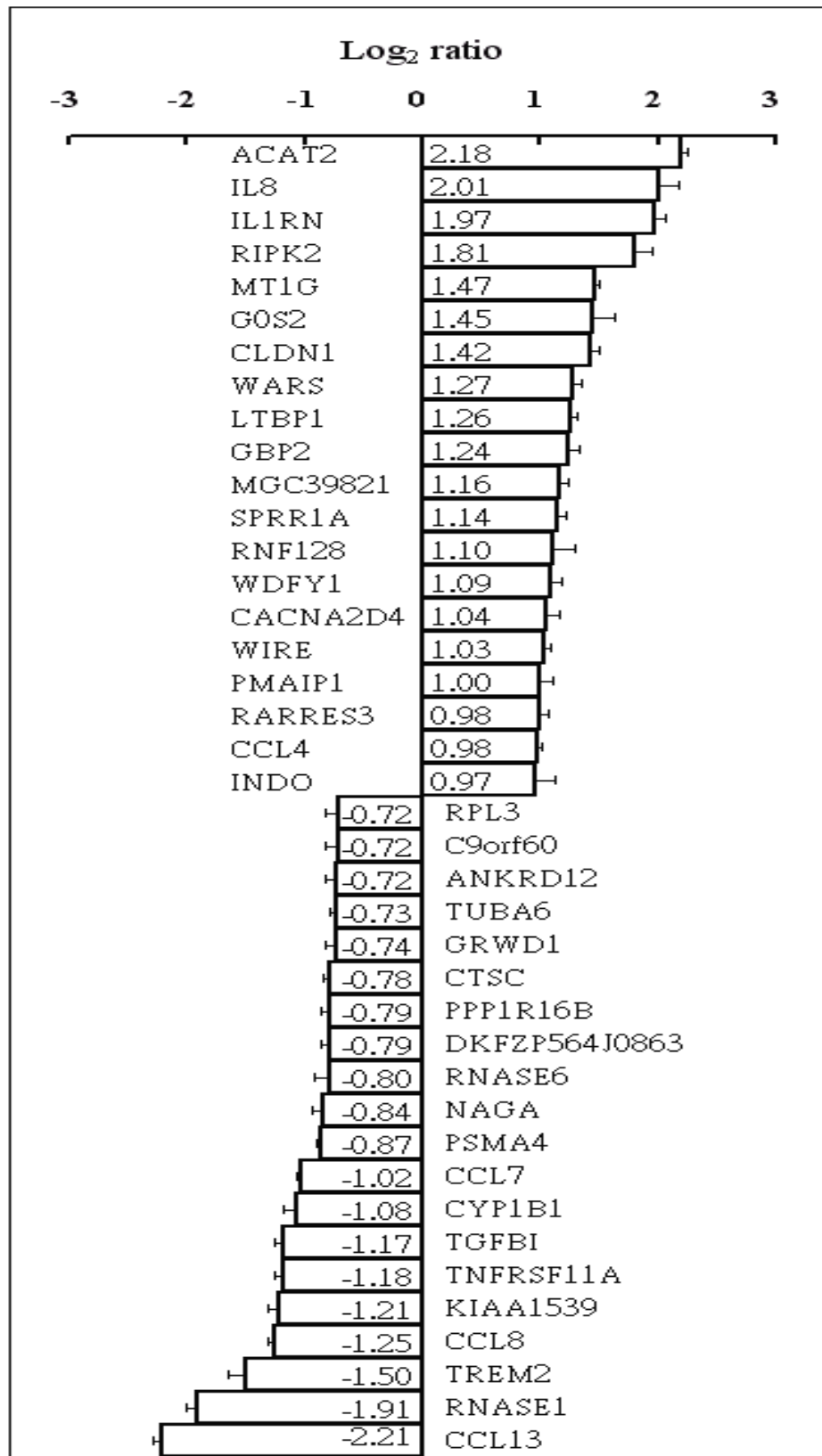
圖二十一 分析冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟間有顯著調控的基因，其在生物過程類的分類比例。



圖二十二 冬蟲夏草水萃液對成熟樹突狀細胞間基因表現之影響，正調控與負調控最顯著的前20個基因。（Hypothesis 11:L5=L4）



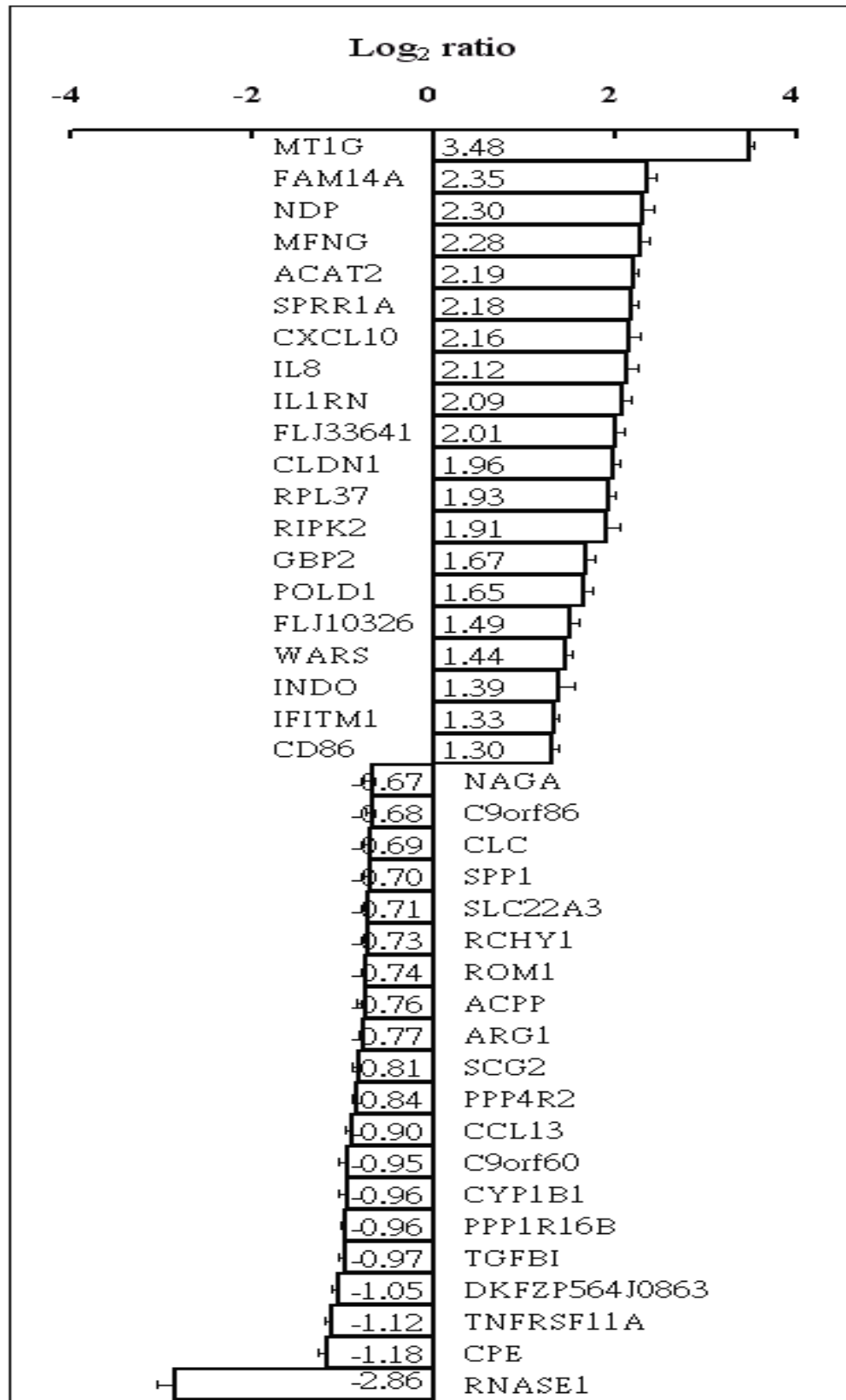
圖二十三 分析冬蟲夏草水萃液對成熟樹突狀細胞間有顯著調控的基因，其在生物過程類的分類比例。



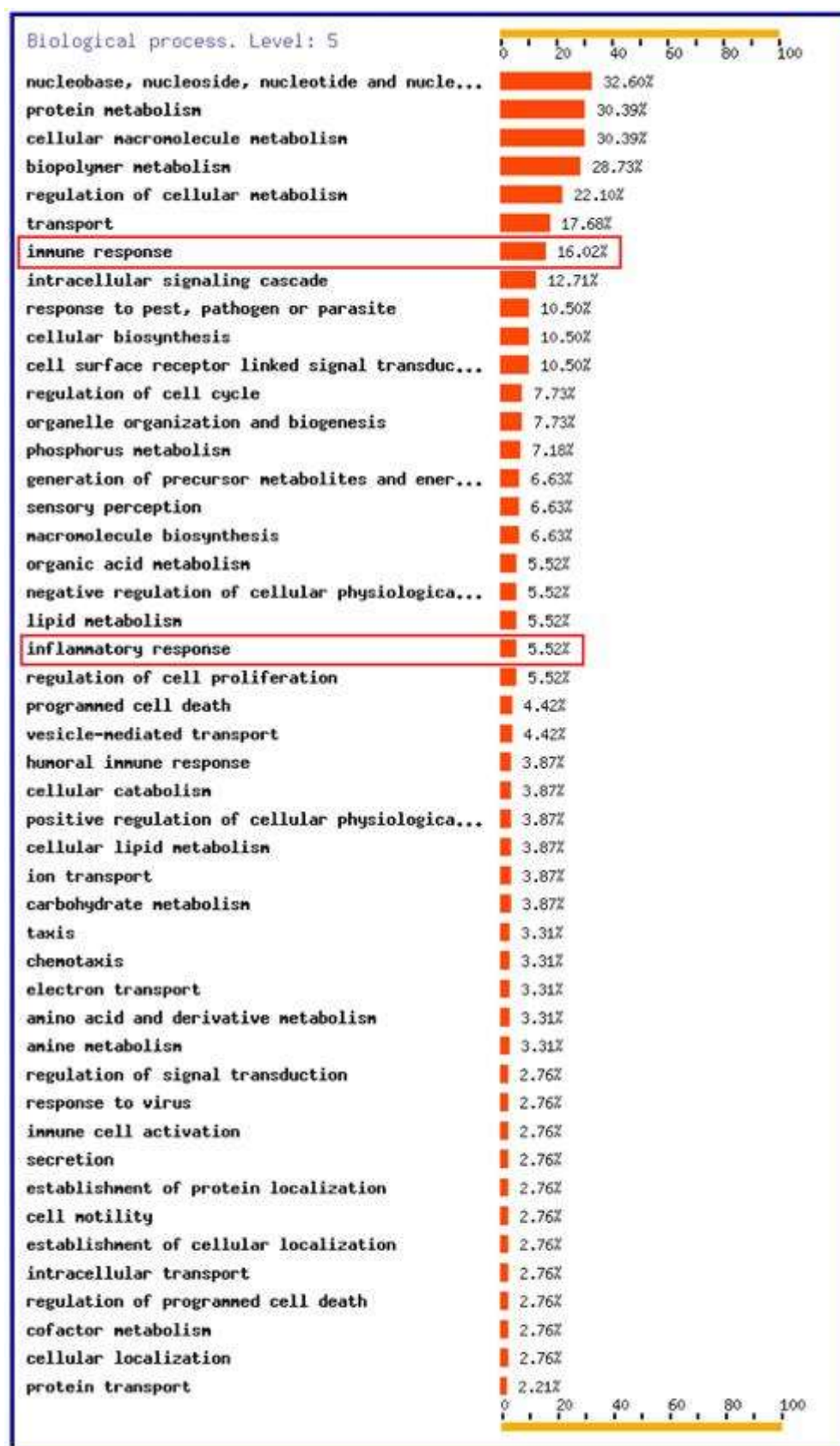
圖二十四 冬蟲夏草水萃液對成熟樹突狀細胞與未成熟樹突狀細胞間基因表現之影響，正調控與負調控最顯著的前20個基因。(Hypothesis 12:L5=L3)



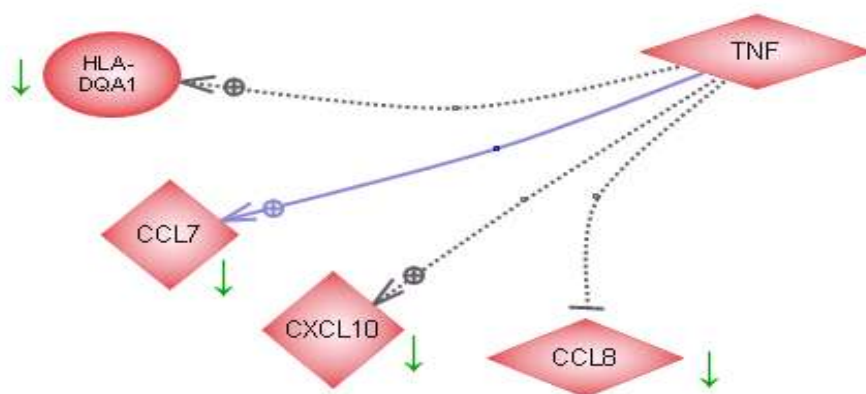
圖二十五 分析冬蟲夏草水萃液對成熟樹突狀細胞與未成熟樹突狀細胞間有顯著調控的基因，其在生物過程類的分類比例。



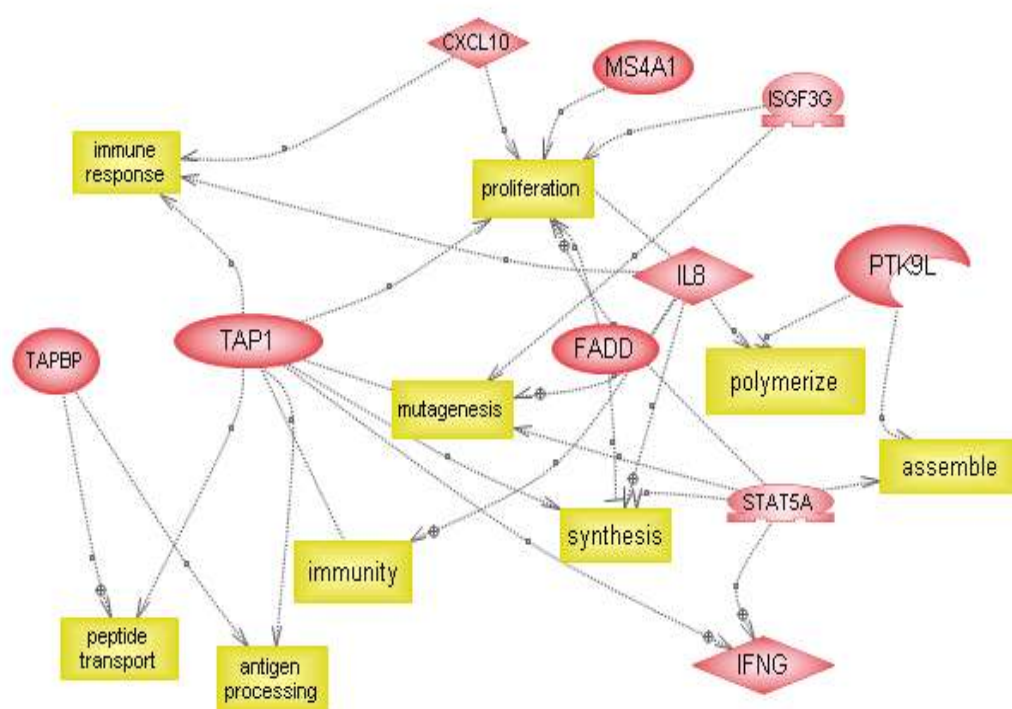
圖二十六 成熟樹突狀細胞與冬蟲夏草水萃液處理過之未成熟樹突狀細胞間基因表現之影響，正調控與負調控最顯著的前20個基因。（Hypothesis 13:L4=L3）



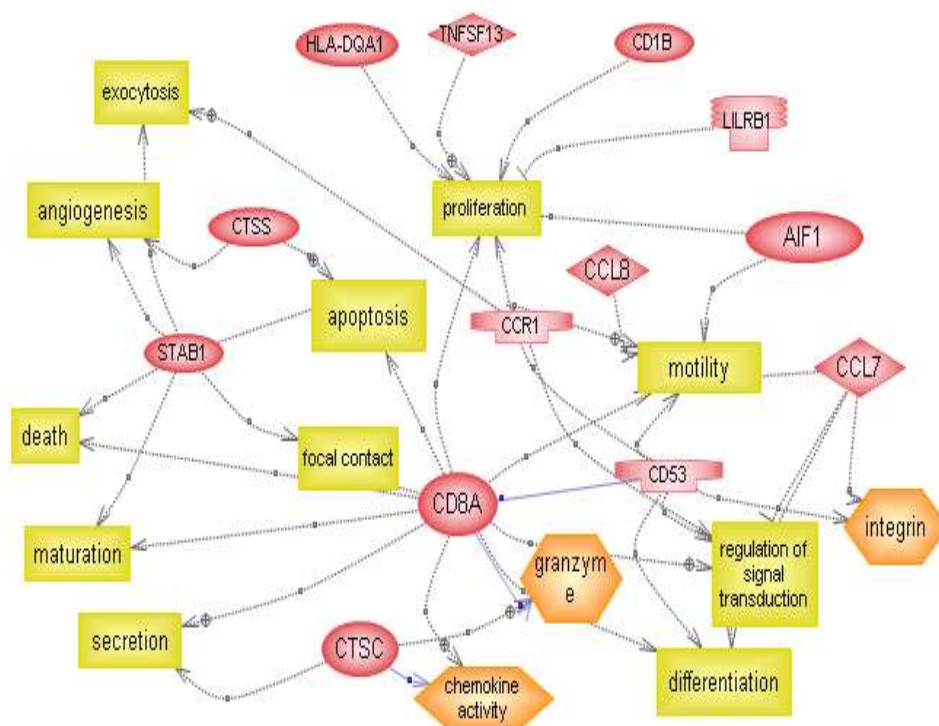
圖二十七 分析成熟樹突狀細胞與冬蟲夏草水萃液處理過之未成熟樹突狀細胞間有顯著調控的基因，其在生物過程類的分類比例。



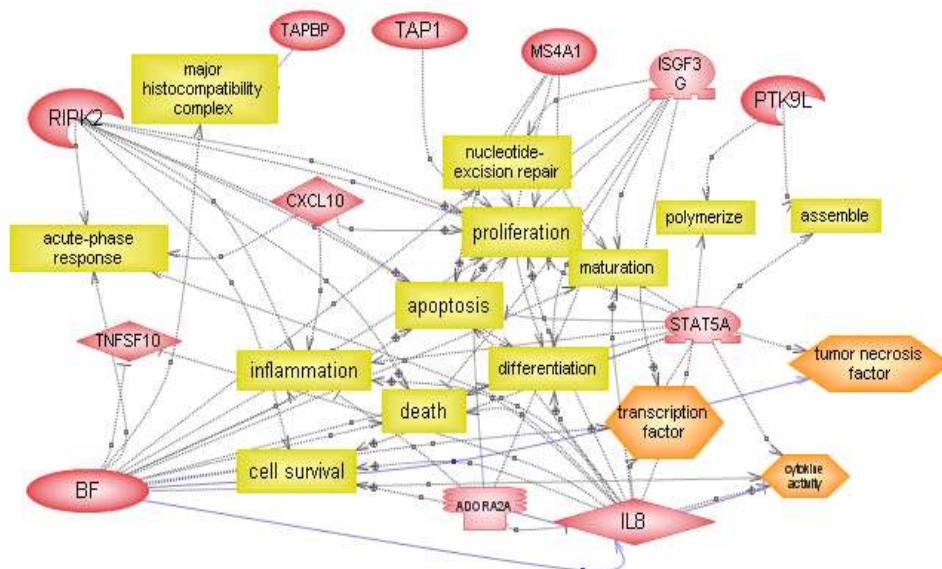
圖二十八 評估冬蟲夏草水萃液對成熟的樹突狀細胞基因表現上與免疫系統調節相關的基因，其與TNF- α 基因間的關係。



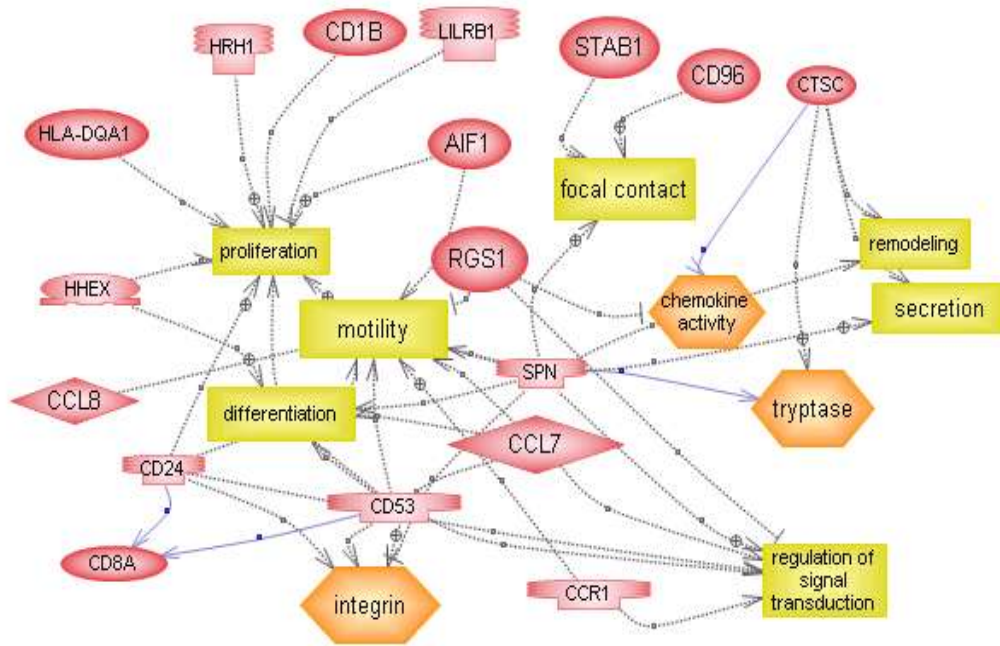
圖二十九 評估冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞與免疫系統調節相關正調控的基因，其參與的功能評估。紅色為基因；橘色與黃色表示基因影響的功能評估。（Hypothesis 08:L3=(L1+L2)/2）



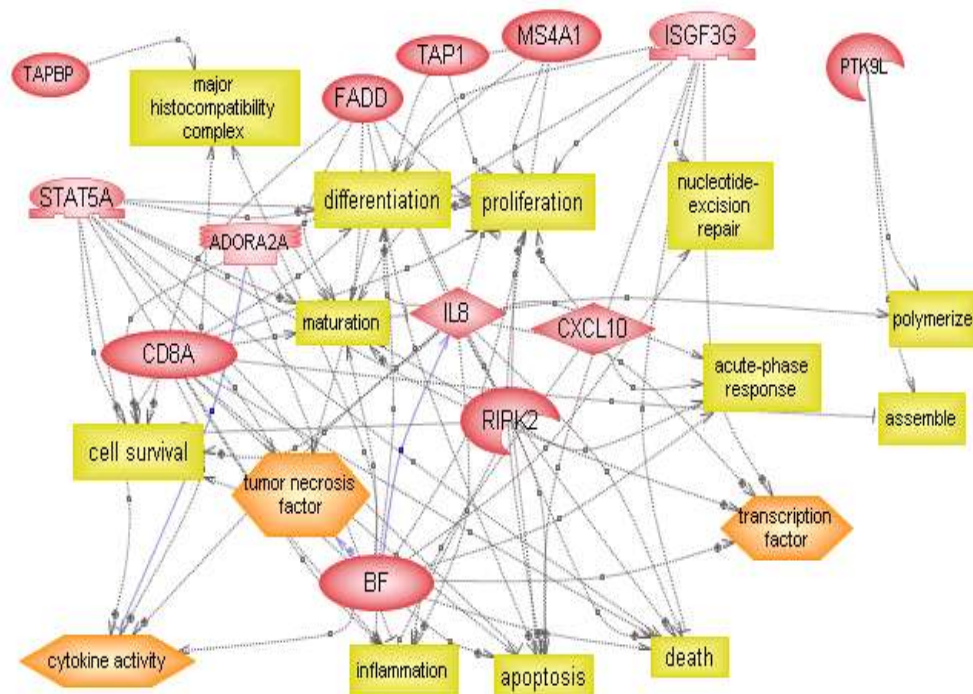
圖三十 評估冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞與免疫系統調節相關負調控的基因，其參與的功能評估。紅色為基因；橘色與黃色表示基因影響的功能評估。（Hypothesis 08:L3=(L1+L2)/2）



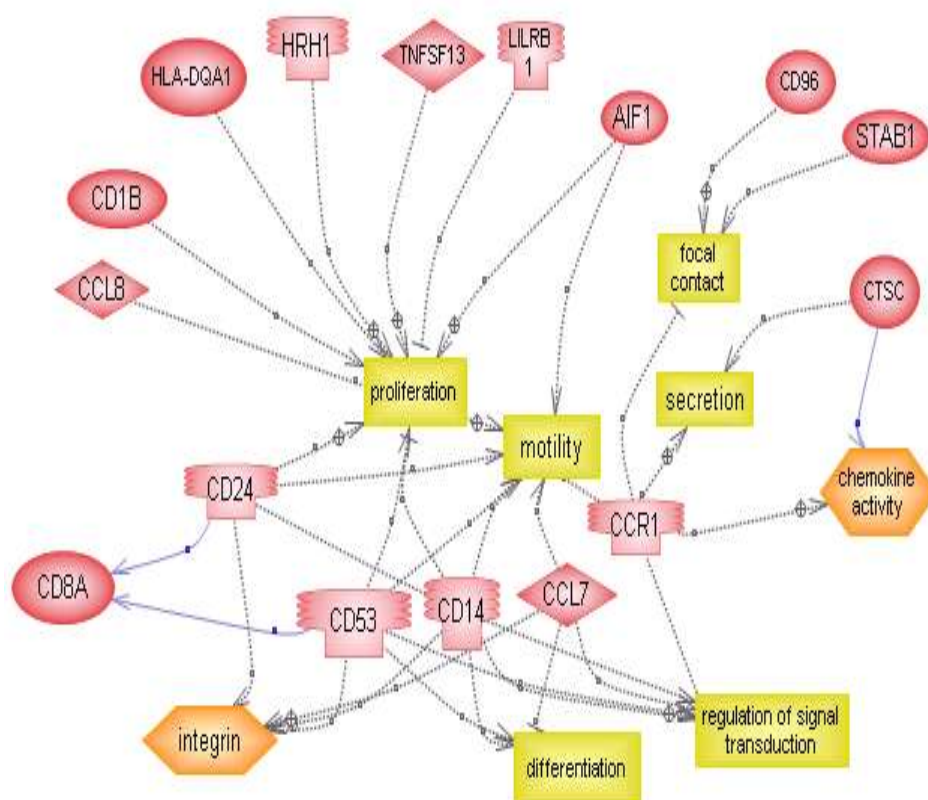
圖三十一 評估成熟的樹突狀細胞與未成熟的樹突狀細胞間免疫系統調節相關正調控的基因，其參與的功能評估。紅色為基因；橘色與黃色表示基因影響的功能評估。（Hypothesis 09:L4=(L1+L2)/2）



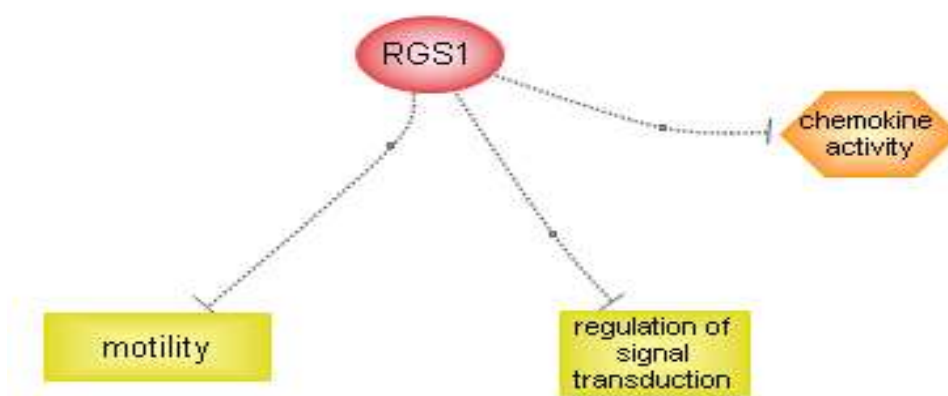
圖三十二 評估成熟的樹突狀細胞與未成熟的樹突狀細胞間免疫系統調節相關負調控的基因，其參與的功能評估。紅色為基因；橘色與黃色表示基因影響的功能評估。（Hypothesis 09:L4=(L1+L2)/2）



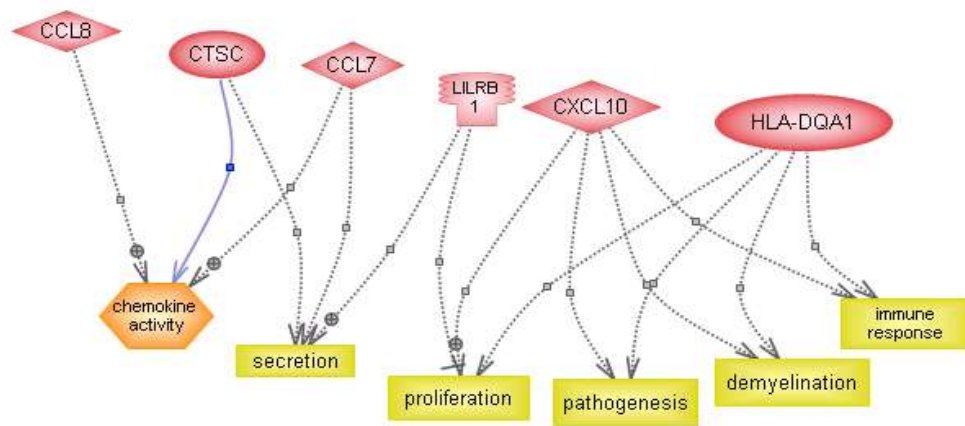
圖三十三 評估冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟之基因表現與免疫系統調節相關正調控的基因，其參與的功能評估。紅色為基因；橘色與黃色表示基因影響的功能評估。（Hypothesis 10:L5=(L1+L2)/2）



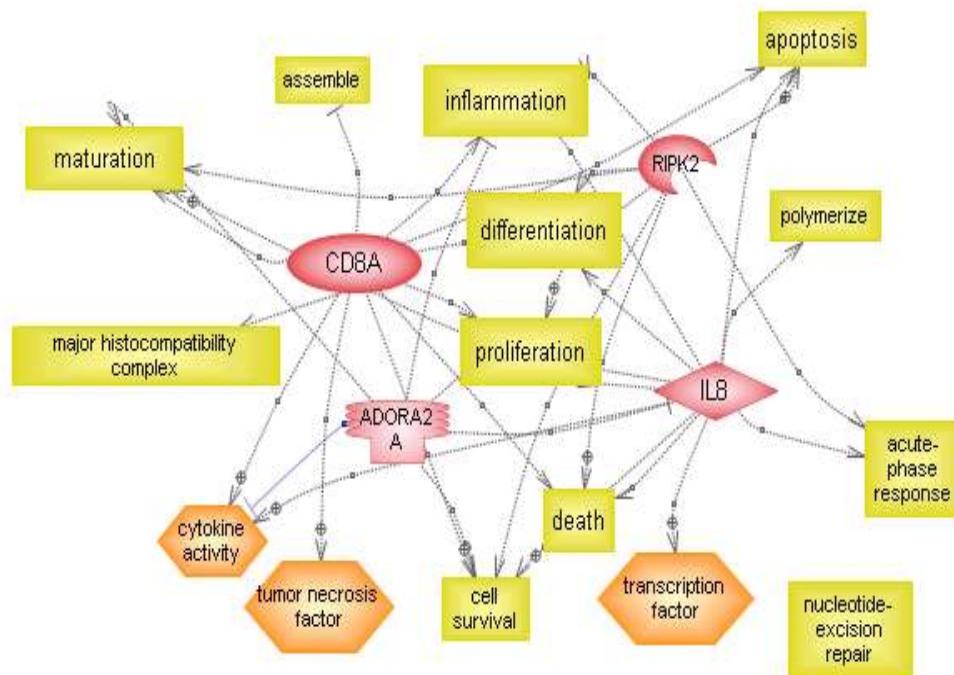
圖三十四 評估冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟之基因表現與免疫系統調節相關負調控的基因，其參與的功能評估。紅色為基因；橘色與黃色表示基因影響的功能評估。
(Hypothesis 10: $L5 = (L1 + L2) / 2$)



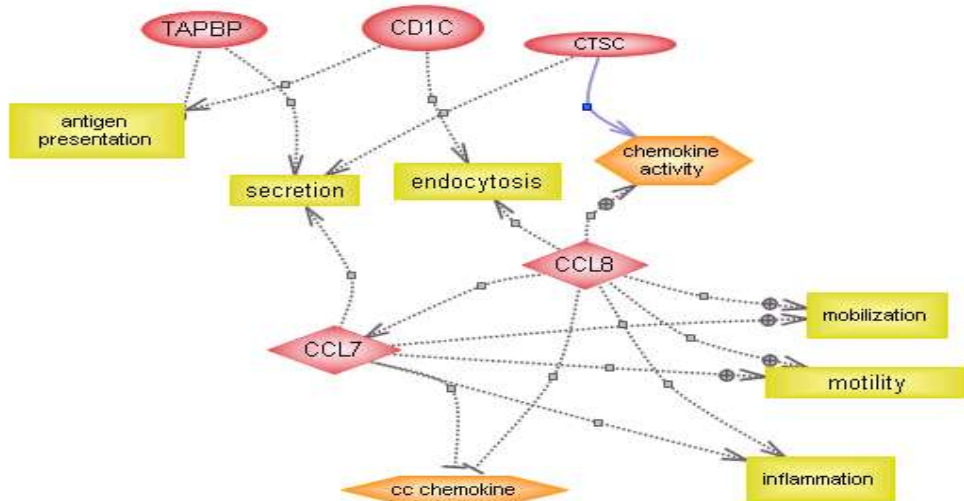
圖三十五 評估冬蟲夏草水萃液對成熟的樹突狀細胞之基因表現與免疫系統調節相關正調控的基因，其參與的功能評估。紅色為基因；橘色與黃色表示基因影響的功能評估。
(Hypothesis 11: $L5 - L4$)



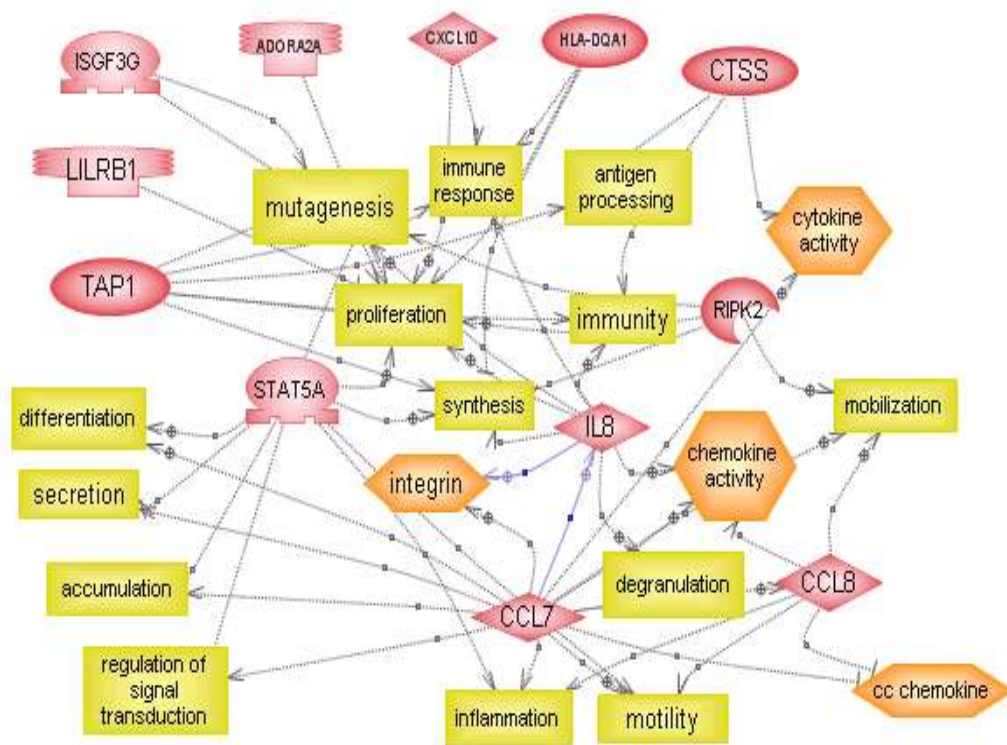
圖三十六 評估冬蟲夏草水萃液對成熟的樹突狀細胞之基因表現與免疫系統調節相關負調控的基因，其參與的功能評估。紅色為基因；橘色與黃色表示基因影響的功能評估。（Hypothesis 11:L5-L4）



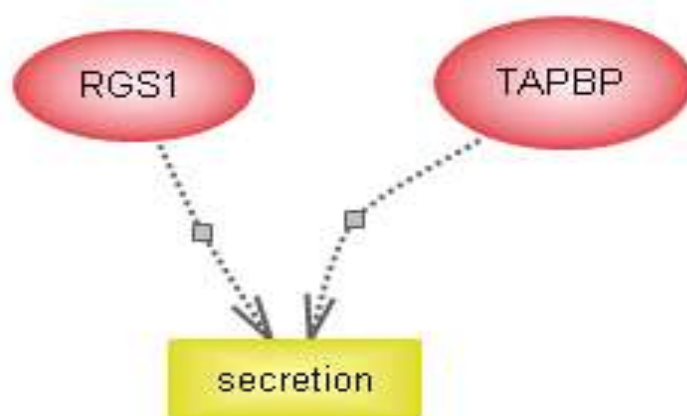
圖三十七 評估冬蟲夏草水萃液在成熟與未成熟的樹突狀細胞間基因表現，其與免疫系統調節相關正調控的基因，其參與的功能評估。紅色為基因；橘色與黃色表示基因影響的功能評估。（Hypothesis 12: L5-L3）



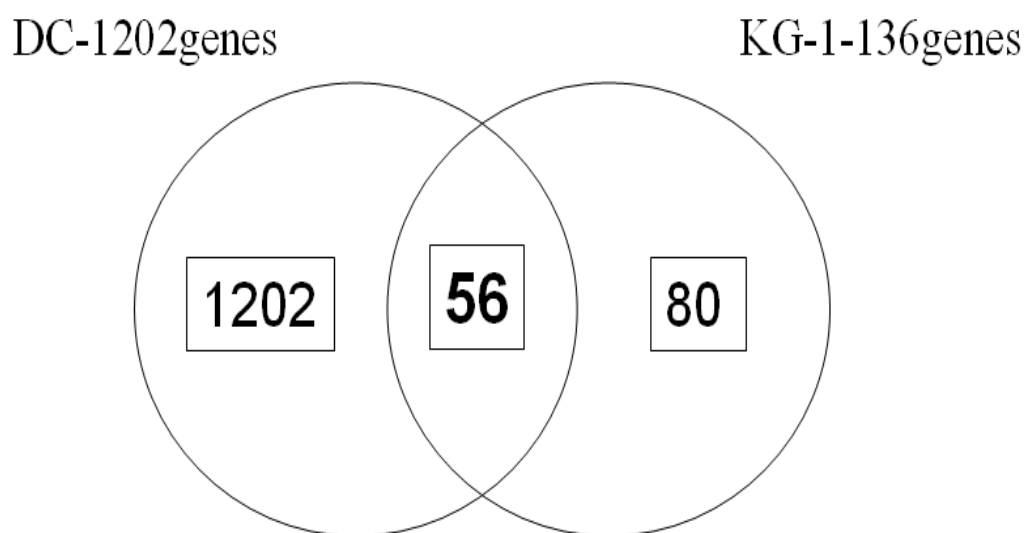
圖三十八 評估冬蟲夏草水萃液在成熟與未成熟的樹突狀細胞間基因表現，其與免疫系統調節相關負調控的基因，其參與的功能評估。紅色為基因；橘色與黃色表示基因影響的功能評估。（Hypothesis 12: L5-L3）



圖三十九 評估成熟的樹突狀細胞與冬蟲夏草水萃液處理未成熟的樹突狀細胞間基因表現，其與免疫系統調節相關正調控的基因，其參與的功能評估。紅色為基因；橘色與黃色表示基因影響的功能評估。（Hypothesis 13:L4-L3）



圖四十 評估成熟的樹突狀細胞與冬蟲夏草水萃液處理未成熟的樹突狀細胞間基因表現，其與免疫系統調節相關負調控的基因，其參與的功能評估。紅色為基因；橘色與黃色表示基因影響的功能評估。（Hypothesis 13:L4-L3）

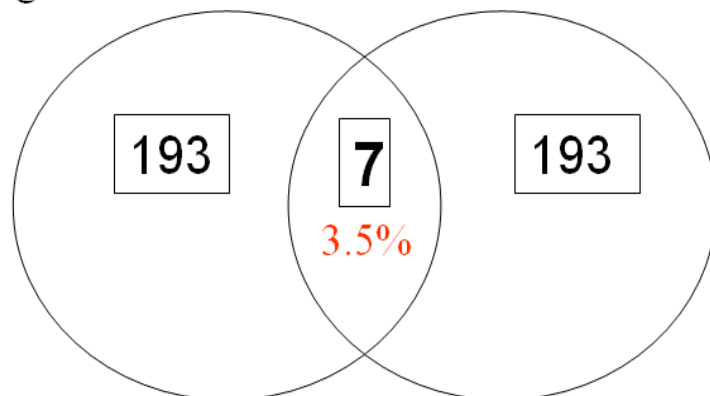


圖四十一 比較冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞與人類白血病細胞株（KG-1 cell line）的基因表現之差異。（未成熟的樹突狀細胞得到1202個受到顯著調控的基因，人類白血病細胞株(KG-1 cell line)得到136個受到顯著調控的基因)

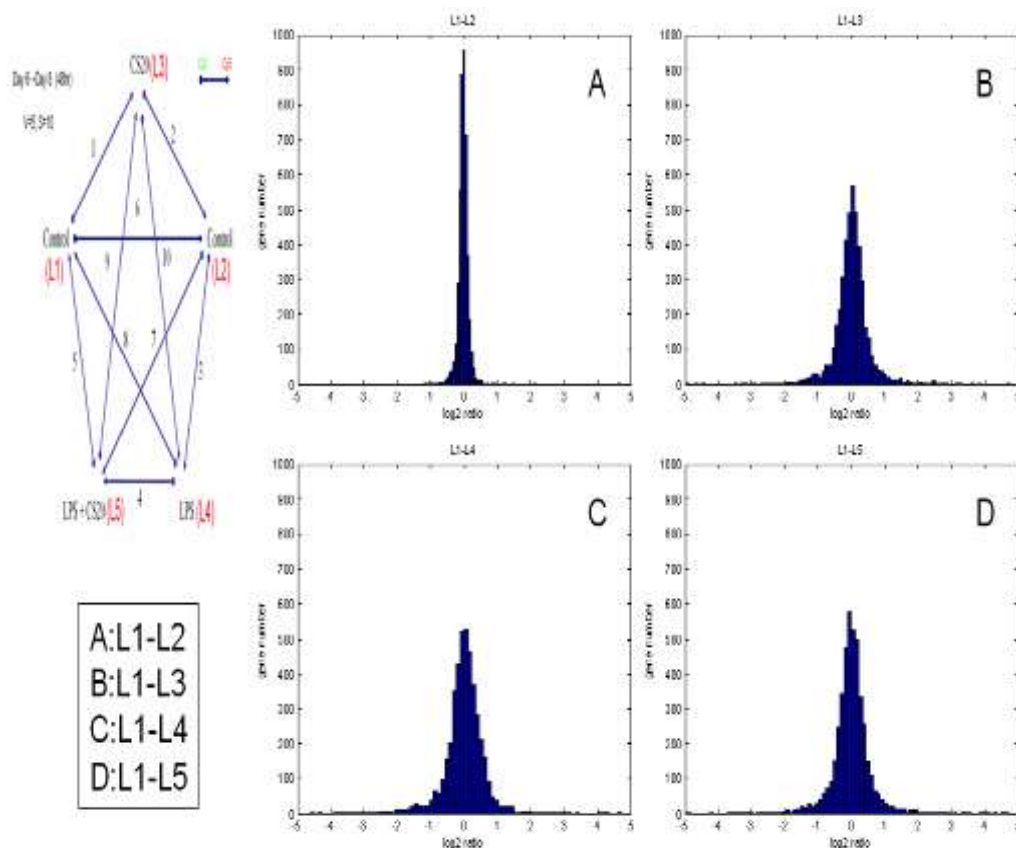
表現量正負調控各前100個基因

DC-200genes

KG-1-200genes



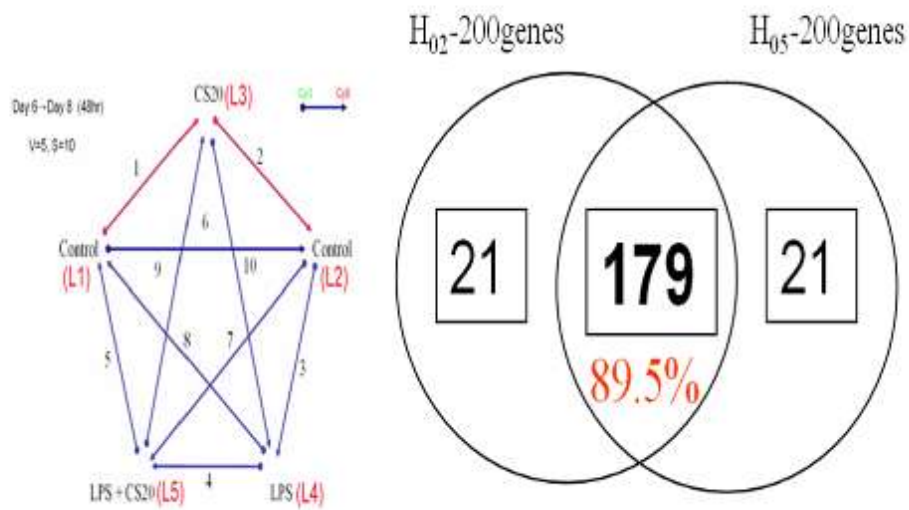
圖四十二 比較冬蟲夏草水萃液對未成熟的樹突狀細胞與人類白血病細胞株（KG-1 cell line）的基因表現之差異，將兩次實驗所得到基因表現量最高之正負調控各100個基因進行比對。



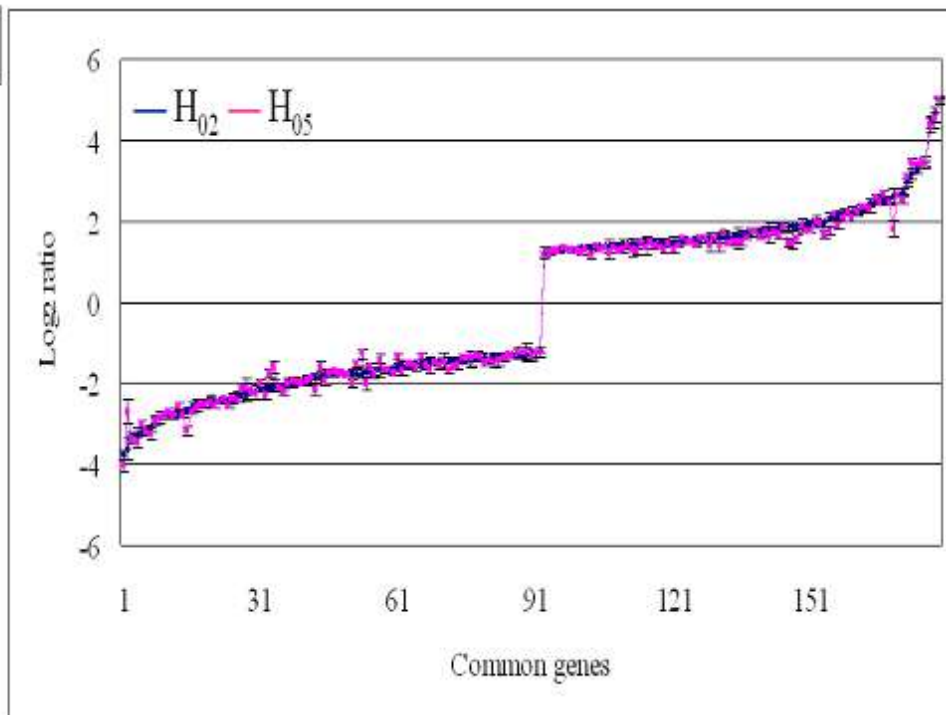
圖四十三 比較內部控制組（圖A，相同生物樣本）與其餘實驗組間（圖B、C、D）基因表現的結果。

A

表現量正負調控各前100個基因



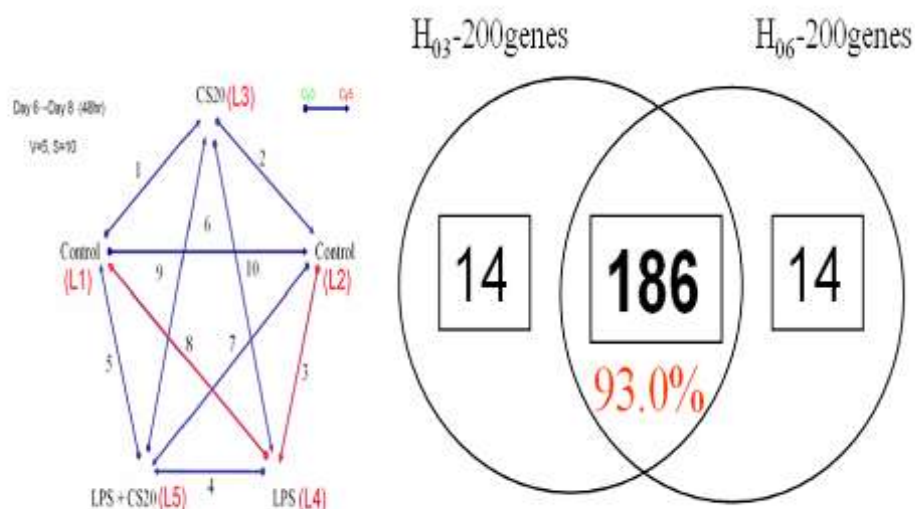
B



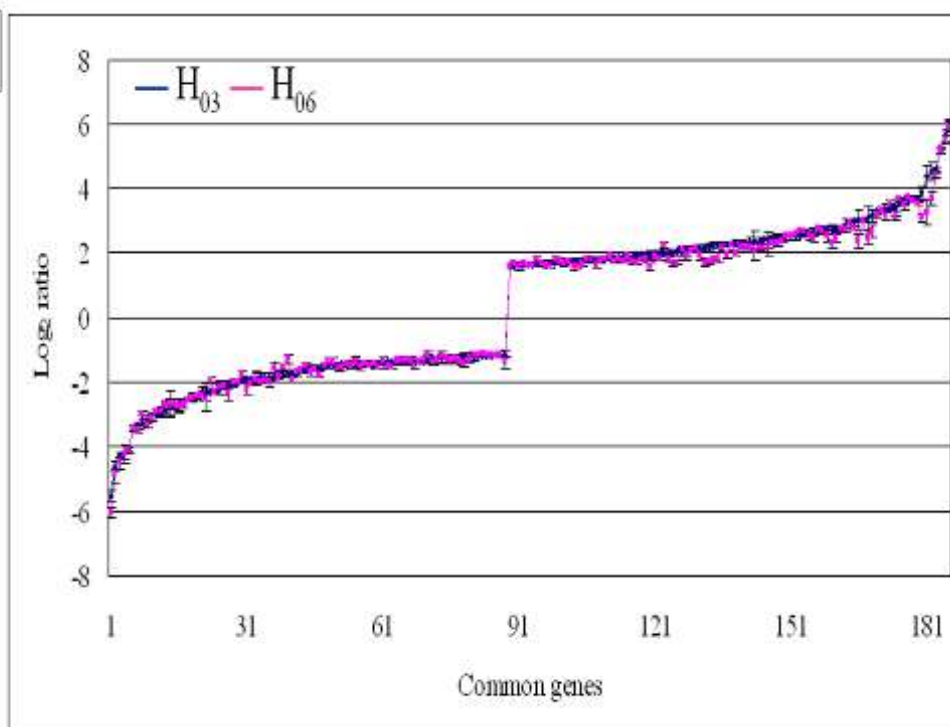
圖四十四 利用迴圈設計中dye swap的實驗，來評估我們實驗的準確度。圖A，第一組dye swap，L1對L3，L3對L2，L1、L2是完全相同的樣本，經由hypothesis 2及hypothesis 5計算。我們將表現量正負調控各前100個基因進行比較，其中有179個基因交集，比例佔89.5%。圖B，進一步分析這179個交集的基因，以 H_{02} 所選出的基因，由負調控至正調控排序並與 H_{05} 所選出的基因比較，我們可以看到100%正負調控的一致性及很好的重複性。

A

表現量正負調控各前100個基因



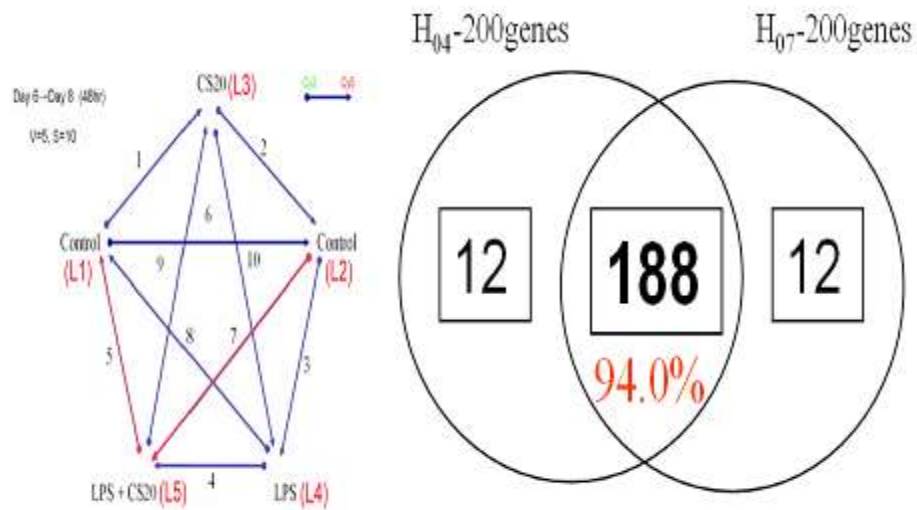
B



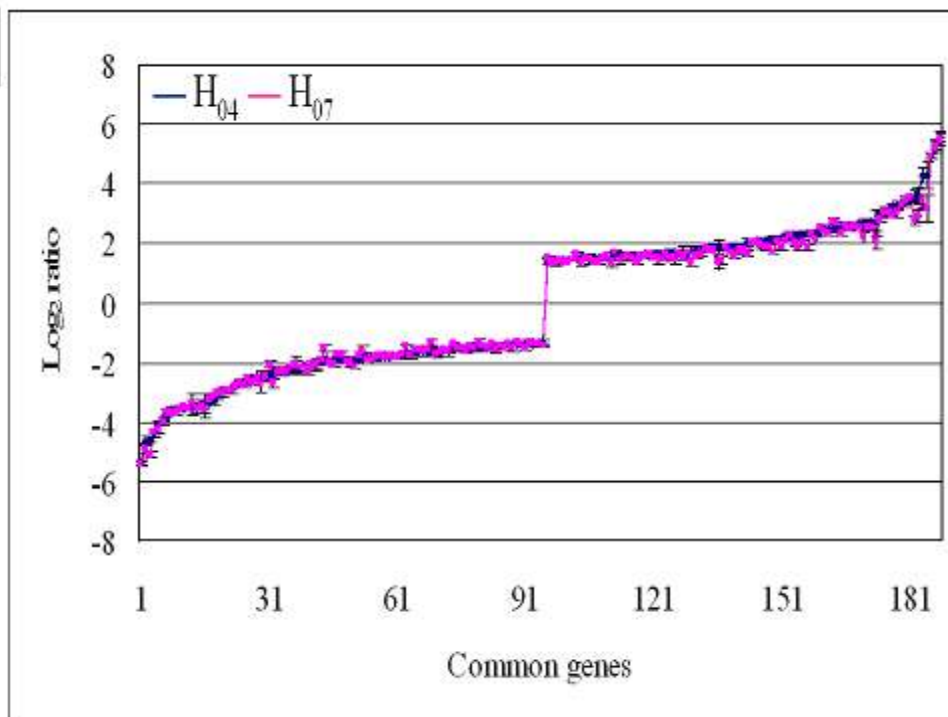
圖四十五 利用迴圈設計中dye swap的實驗，來評估我們實驗的準確度。圖A，第二組dye swap，L1對L4，L4對L2，L1、L2是完全相同的樣本，經由hypothesis 3及hypothesis 6計算。我們將表現量正負調控各前100個基因進行比較，其中有186個基因交集，比例佔93.0%。圖B，進一步分析這186個交集的基因，以 H_{03} 所選出的基因，由負調控至正調控排序並與 H_{06} 所選出的基因比較，我們可以看到100%正負調控的一致性及很好的重複性。

A

表現量正負調控各前100個基因



B



圖四十六 利用迴圈設計中dye swap的實驗，來評估我們實驗的準確度。圖A，第二組dye swap，L1對L5，L5對L2，L1、L2是完全相同的樣本，經由hypothesis 4及hypothesis 7計算。我們將表現量正負調控各前100個基因進行比較，其中有186個基因交集，比例佔94.0%。圖B，進一步分析這188個交集的基因，以 H_{04} 所選出的基因，由負調控至正調控排序並與 H_{07} 所選出的基因比較，我們可以看到100%正負調控的一致性及很好的重複性。

表一 通過篩選條件篩選出在各個虛無假設下基因數。(SNR>3, CV% 小於100%, 點的直徑大於75 μm , F-檢定門檻為 $p<0.00001$)

Hypothesis	Formula	Genes
All data		4484
H00	$L1=L2=L3=L4=L5$	1732
H01	$L1=L2$	2
H02	$L3-L1=0$	1089
H03	$L4-L1=0$	1396
H04	$L5-L1=0$	1223
H05	$L3-L2=0$	995
H06	$L4-L2=0$	1223
H07	$L5-L2=0$	1095
H08	$L3=(L1+L2)/2$	1202
H09	$L4=(L1+L2)/2$	1486
H10	$L5=(L1+L2)/2$	1318
H11	$L5=L4$	319
H12	$L5=L3$	364
H13	$L4=L3$	598

表二 冬蟲夏草水萃液對未成熟樹突狀細胞，在基因表現上與免疫系統調節相關的基因。共有48個基因，正調控有19個；負調控有29個。

Gene name	Log ₂ ratio	Title	Unigene
CD83	2.20±0.04	CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily)	Hs.484703
NFKB1	2.03±0.08	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	Hs.431926
IL1R1	1.53±0.05	Interleukin 1 receptor, type I	Hs.516249
ABCF1	1.28±0.03	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1	Hs.9573
TAPBP	1.20±0.04	TAP binding protein (tapasin)	Hs.370937
IL8	1.14±0.12	Interleukin 8	Hs.624
ADAR	1.08±0.07	Adenosine deaminase, RNA-specific	Hs.12341
STAT5A	1.01±0.10	Signal transducer and activator of transcription 5A	Hs.437058
CD86	0.79±0.06	CD86 antigen (CD28 antigen ligand 2, B7-2 antigen)	Hs.171182
CXCL10	0.68±0.10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Hs.413924
TAP1	0.56±0.08	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	Hs.352018
PTK9L	0.54±0.04	PTK9L protein tyrosine kinase 9-like (A6-related protein)	Hs.436439
C3	0.46±0.06	Complement component 3	Hs.529053
CD8A	0.41±0.04	CD8 antigen, alpha polypeptide (p32)	Hs.85258
C9	0.40±0.05	Complement component 9	Hs.1290
ISGF3G	0.31±0.06	Interferon-stimulated transcription factor 3, gamma 48kDa	Hs.1706
IL6R	0.31±0.05	Interleukin 6 receptor	Hs.135087
MS4A1	0.29±0.04	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	Hs.438040
FADD	0.28±0.05	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	Hs.86131
IL2RB	-0.27±0.04	Interleukin 2 receptor, beta	Hs.474787
ITGB1	-0.34±0.05	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	Hs.429052
LILRB1	-0.50±0.06	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3	Hs.149924
HRH1	-0.53±0.07	Histamine receptor H1	Hs.1570
DOCK2	-0.53±0.06	Dedicator of cytokinesis 2	Hs.325528
NR3C1	-0.59±0.06	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)	Hs.122926
IFIT1	-0.66±0.06	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	Hs.20315
NCK1	-0.67±0.05	NCK adaptor protein 1	Hs.477693
CEBPB	-0.71±0.09	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	Hs.517106
TNFSF13	-0.74±0.09	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12	Hs.54673
CD53	-0.80±0.05	CD53 antigen	Hs.443057
TOLLIP	-0.80±0.04	Toll interacting protein	Hs.368527
LCF2	-0.84±0.08	Lymphocyte cytosolic protein 2 (SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa)	Hs.304475
HLA-DPB1	-0.98±0.12	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	Hs.485130
STAB1	-1.03±0.08	Stabilin 1	Hs.301989
HDAC4	-1.09±0.04	Histone deacetylase 4	Hs.20516
CYBB	-1.22±0.11	Cytochrome b-245, beta polypeptide (chronic granulomatous disease)	Hs.292356
HLA-DQA1	-1.36±0.06	Major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	Hs.387679
CD163	-1.41±0.05	CD163 antigen	Hs.504641
CTSS	-1.67±0.06	Cathepsin S	Hs.181301
CD1C	-1.88±0.15	CD1C antigen, c polypeptide	Hs.1311
CD1B	-2.18±0.20	CD1b antigen	Hs.1310
CCR1	-2.21±0.16	Chemokine (C-C motif) receptor 1	Hs.301921
CCL8	-2.37±0.06	Chemokine (C-C motif) ligand 8	Hs.271387
CCL18	-2.46±0.07	Chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)	Hs.143961
CCL7	-2.52±0.04	Chemokine (C-C motif) ligand 7	Hs.251526
GEM	-2.68±0.07	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	Hs.345139
CTSC	-2.78±0.06	Cathepsin C	Hs.128065
AIF1	-3.19±0.10	Allograft inflammatory factor 1	Hs.76364

表三 冬蟲夏草水萃液對未成熟樹突狀細胞，在基因表現上與發炎反應相關的基因。共有20個基因，正調控有7個；負調控有13個。

Gene_name	Log ₂ ratio	Title	Unigene
NFKB1	2.03±0.08	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	Hs.431926
IL1R1	1.53±0.05	Interleukin 1 receptor, type I	Hs.516249
ABCF1	1.28±0.03	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1	Hs.9573
IL8	1.14±0.12	Interleukin 8	Hs.624
CXCL10	0.68±0.10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Hs.413924
PTK9L	0.54±0.04	PTK9L protein tyrosine kinase 9-like (A6-related protein)	Hs.436439
C3	0.46±0.06	Complement component 3	Hs.529053
HRH1	-0.53±0.07	Histamine receptor H1	Hs.1570
DOCK2	-0.53±0.06	Dedicator of cytokinesis 2	Hs.325528
NR3C1	1.591±0.06	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)	Hs.122926
CEBPB	-0.71±0.09	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	Hs.517106
TOLLIP	-0.80±0.04	Toll interacting protein	Hs.368527
STAB1	-1.03±0.08	Stabilin 1	Hs.301989
HDAC4	-1.90±0.04	Histone deacetylase 4	Hs.20516
CYBB	-1.22±0.11	Cytochrome b-245, beta polypeptide (chronic granulomatous disease)	Hs.292356
CCR1	-2.21±0.16	Chemokine (C-C motif) receptor 1	Hs.301921
CCL8	-2.37±0.06	Chemokine (C-C motif) ligand 8	Hs.271387
CCL7	-2.52±0.04	Chemokine (C-C motif) ligand 7	Hs.251526
CCL18	-2.57±0.09	Chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)	Hs.143961
AIF1	-3.19±0.10	Allograft inflammatory factor 1	Hs.76364

表四 成熟的樹突狀細胞對未成熟樹突狀細胞，在基因表現上與免疫系統調節相關的基因。共有57個基因，正調控有25個；負調控有32個。

Gene_name	Log ₂ ratio	Title	Unigene
BF	3.83±0.26	B-factor, properdin	Hs.69771
IL8	3.25±0.11	Interleukin 8	Hs.624
CD83	2.97±0.04	CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily)	Hs.484703
CXCL10	2.84±0.10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Hs.413924
RIPK2	2.52±0.12	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	Hs.103755
IFIT1	2.30±0.16	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	Hs.20315
NFKB1	2.26±0.08	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	Hs.431926
CD86	2.09±0.06	CD86 antigen (CD28 antigen ligand 2, B7-2 antigen)	Hs.171182
STAT5A	1.59±0.09	Signal transducer and activator of transcription 5A	Hs.437058
C9	1.49±0.05	Complement component 9	Hs.1290
IL1R1	1.46±0.05	Interleukin 1 receptor, type I	Hs.516249
ABCF1	1.38±0.03	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1	Hs.9573
TRIM22	1.28±0.06	Tripartite motif-containing 22	Hs.501778
ADAR	1.17±0.07	Adenosine deaminase, RNA-specific	Hs.12341
ADORA2A	1.07±0.07	Adenosine A2a receptor	Hs.197029
TAP1	1.07±0.08	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	Hs.352018
TAPBP	1.04±0.08	TAP binding protein (tapasin)	Hs.370937
C3	0.90±0.05	Complement component 3	Hs.529053
ISGF3G	0.87±0.06	Interferon-stimulated transcription factor 3, gamma 48kDa	Hs.1706
TNFSF10	0.73±0.10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	Hs.478275
CD8A	0.56±0.04	CD8 antigen, alpha polypeptide (p32)	Hs.85258
PTK9L	0.52±0.04	PTK9L protein tyrosine kinase 9-like (A6-related protein)	Hs.436439
IL6R	0.30±0.05	Interleukin 6 receptor	Hs.135087
MS4A1	0.23±0.04	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	Hs.438040
ANXA11	0.20±0.03	Annexin A11	Hs.530291
CD96	-0.27±0.05	CD96 antigen	Hs.142023
HHEX	-0.36±0.06	Hematopoietically expressed homeobox	Hs.118651
RGS1	-0.38±0.05	Regulator of G-protein signalling 1	Hs.75256
CTSW	-0.39±0.06	Cathepsin W (lymphopain)	Hs.416848
NR3C1	-0.41±0.05	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)	Hs.122926
CD24	-0.42±0.06	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	Hs.375108
HRH1	-0.42±0.07	Histamine receptor H1	Hs.1570
CD53	-0.50±0.05	CD53 antigen	Hs.443057
HLA-DQA1	-0.59±0.06	Major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	Hs.387679
SPN	-0.60±0.07	Sialophorin (gpL115, leukosialin, CD43)	Hs.461934
ITGB1	-0.63±0.05	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSR12)	Hs.429052
LILRB1	-0.63±0.07	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3	Hs.149924
DOCK2	-0.64±0.07	Dedicator of cytokinesis 2	Hs.325528
CLC	-0.71±0.07	Charcot-Leyden crystal protein	Hs.889
CTSS	-0.78±0.06	Cathepsin S	Hs.181301
CYBB	-0.90±0.13	Cytochrome b-245, beta polypeptide (chronic granulomatous disease)	Hs.292356
HDAC4	-0.90±0.04	Histone deacetylase 4	Hs.20516
DKFZP564J0863	-0.97±0.06	DKFZP564J0863 protein	Hs.356719
STAB1	-1.00±0.09	Stablin 1	Hs.301989
TNFSF13	-1.03±0.11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12	Hs.54673
TOLLIP	-1.18±0.04	Toll interacting protein	Hs.368527
HLA-DPB1	-1.24±0.14	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	Hs.485130
CCL18	-1.27±0.07	Chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)	Hs.143961
CD163	-1.51±0.10	CD163 antigen	Hs.504641
CCR1	-1.90±0.17	Chemokine (C-C motif) receptor 1	Hs.301921
CCL8	-1.96±0.06	Chemokine (C-C motif) ligand 8	Hs.271387
CCL7	-2.29±0.04	Chemokine (C-C motif) ligand 7	Hs.251526
CD1C	-2.37±0.14	CD1C antigen, c polypeptide	Hs.1311
CTSC	-2.55±0.06	Cathepsin C	Hs.128065
CD1B	-2.74±0.32	CD1b antigen	Hs.1310
GEM	-2.78±0.09	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	Hs.345139
AIF1	-3.23±0.11	Allograft inflammatory factor 1	Hs.76364

表五 成熟的樹突狀細胞對未成熟樹突狀細胞，在基因表現上與與發炎反應相關的基因。共有21個基因，正調控有9個；負調控有12個。

Gene_name	Log ₂ ratio	Title	Unigene
IL8	3.25±0.11	Interleukin 8	Hs.624
CXCL10	2.84±0.10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Hs.413924
RIPK2	2.52±0.12	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	Hs.103755
NFKB1	2.26±0.08	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	Hs.431926
IL1R1	1.46±0.05	Interleukin 1 receptor, type I	Hs.516249
ABCF1	1.38±0.03	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1	Hs.9573
ADORA2A	1.07±0.07	Adenosine A2a receptor	Hs.197029
C3	0.90±0.05	Complement component 3	Hs.529053
PTK9L	0.52±0.04	PTK9L protein tyrosine kinase 9-like (A6-related protein)	Hs.436439
NR3C1	-0.41±0.05	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)	Hs.122926
HRH1	-0.42±0.07	Histamine receptor H1	Hs.1570
DOCK2	-0.64±0.07	Dedicator of cytokinesis 2	Hs.325528
CYBB	-0.90±0.13	Cytochrome b-245, beta polypeptide (chronic granulomatous disease)	Hs.292356
HDAC4	-0.90±0.04	Histone deacetylase 4	Hs.20516
STAB1	-1.00±0.09	Stabilin 1	Hs.301989
TOLLIP	-1.18±0.04	Toll interacting protein	Hs.368527
CCL18	-1.54±0.09	Chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)	Hs.143961
CCR1	-1.90±0.17	Chemokine (C-C motif) receptor 1	Hs.301921
CCL8	-1.96±0.06	Chemokine (C-C motif) ligand 8	Hs.271387
CCL7	-2.29±0.04	Chemokine (C-C motif) ligand 7	Hs.251526
AIF1	-3.23±0.11	Allograft inflammatory factor 1	Hs.76364

表六 冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟，在基因表現上與免疫系統調節相關的基因。共有54個基因，正調控有22個；負調控有32個。

Gene_name	Log ₂ ratio	Title	Unigene
BF	3.84±0.35	B-factor, properdin	Hs.69771
IL8	3.17±0.13	Interleukin 8	Hs.624
CD83	2.62±0.05	CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily)	Hs.484703
RIPK2	2.42±0.12	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	Hs.103755
NFKB1	2.27±0.09	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	Hs.431926
CD86	1.53±0.06	CD86 antigen (CD28 antigen ligand 2, B7-2 antigen)	Hs.171182
IL1R1	1.43±0.05	Interleukin 1 receptor, type 1	Hs.516249
STAT5A	1.40±0.10	Signal transducer and activator of transcription 5A	Hs.437058
ABCF1	1.23±0.04	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1	Hs.9573
CXCL10	1.22±0.10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Hs.413924
TAP1	1.03±0.08	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	Hs.352018
TRIM22	0.97±0.05	Tripartite motif-containing 22	Hs.501778
C9	0.94±0.06	Complement component 9	Hs.1290
TAPBP	0.91±0.04	TAP binding protein (tapasin)	Hs.370937
ADAR	0.91±0.07	Adenosine deaminase, RNA-specific	Hs.12341
ADORA2A	0.90±0.06	Adenosine A2a receptor	Hs.197029
CD8A	0.72±0.04	CD8 antigen, alpha polypeptide (p32)	Hs.85258
C3	0.66±0.06	Complement component 3	Hs.529053
ISGF3G	0.63±0.06	Interferon-stimulated transcription factor 3, gamma 48kDa	Hs.1706
PTK9L	0.51±0.04	PTK9L protein tyrosine kinase 9-like (A6-related protein)	Hs.436439
FADD	0.31±0.05	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	Hs.86131
MS4A1	0.25±0.04	Membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	Hs.438040
CD96	-0.29±0.05	CD96 antigen	Hs.142023
NCK1	-0.39±0.05	NCK adaptor protein 1	Hs.477693
CLC	-0.43±0.07	Charcot-Leyden crystal protein	Hs.889
CD24	-0.44±0.06	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	Hs.375108
NR3C1	-0.49±0.06	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)	Hs.122926
MAPK14	-0.51±0.08	Mitogen-activated protein kinase 14	Hs.485233
LILRB1	-0.60±0.07	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3	Hs.149924
HRH1	-0.60±0.06	Histamine receptor H1	Hs.1570
ITGB1	-0.60±0.05	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	Hs.429052
IFIT1	-0.70±0.06	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	Hs.20315
DOCK2	-0.71±0.07	Dedicator of cytokinesis 2	Hs.325528
DKFZP564J0863	-0.71±0.06	DKFZP564J0863 protein	Hs.356719
CD53	-0.74±0.05	CD53 antigen	Hs.443057
HDAC4	-1.00±0.04	Histone deacetylase 4	Hs.20516
TOLLIP	-1.05±0.04	Toll interacting protein	Hs.368527
STAB1	-1.07±0.08	Stabilin 1	Hs.301989
TNFSF13	-1.11±0.13	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12	Hs.54673
CYBB	-1.16±0.13	Cytochrome b-245, beta polypeptide (chronic granulomatous disease)	Hs.292356
HLA-DPB1	-1.38±0.15	Major histocompatibility complex, class II, DP beta 1	Hs.485130
HLA-DQA1	-1.47±0.06	Major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	Hs.387679
CTSS	-1.53±0.05	Cathepsin S	Hs.181301
CD163	-1.59±0.06	CD163 antigen	Hs.504641
CD1C	-2.06±0.14	CD1C antigen, c polypeptide	Hs.1311
CCR1	-2.35±0.15	Chemokine (C-C motif) receptor 1	Hs.301921
CCL18	-2.71±0.07	Chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)	Hs.143961
CD14	-2.92±0.38	CD14 antigen	Hs.163867
GEM	-3.09±0.07	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	Hs.345139
CD1B	-3.29±0.29	CD1b antigen	Hs.1310
AlF1	-3.44±0.14	Allograft inflammatory factor 1	Hs.76364
CCL7	-3.53±0.04	Chemokine (C-C motif) ligand 7	Hs.251526
CTSC	-3.54±0.06	Cathepsin C	Hs.128065
CCL8	-3.56±0.06	Chemokine (C-C motif) ligand 8	Hs.271387

表七 冬蟲夏草水萃液對樹突狀細胞分化成熟，在基因表現上與發炎反應相關的基因。共有22個基因，正調控有9個；負調控有13個。

Gene_name	Log ₂ ratio	Title	Unigene
IL8	3.15±0.13	Interleukin 8	Hs.624
RIPK2	2.42±0.12	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	Hs.103755
NFKB1	2.25±0.09	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	Hs.431926
IL1R1	1.41±0.05	Interleukin 1 receptor, type I	Hs.516249
ABCF1	1.22±0.04	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1	Hs.9573
CXCL10	1.21±0.10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Hs.413924
ADORA2A	0.90±0.06	Adenosine A2a receptor	Hs.197029
C3	0.66±0.06	Complement component 3	Hs.529053
PTK9L	0.51±0.04	PTK9L protein tyrosine kinase 9-like (A6-related protein)	Hs.436439
NR3C1	-0.49±0.06	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)	Hs.122926
HRH1	-0.60±0.06	Histamine receptor H1	Hs.1570
DOCK2	-0.71±0.07	Dedicator of cytokinesis 2	Hs.325528
HDAC4	-1.00±0.04	Histone deacetylase 4	Hs.20516
TOLLIP	-1.06±0.04	Toll interacting protein	Hs.368527
STAB1	-1.07±0.08	Stabilin 1	Hs.301989
CYBB	-1.16±0.13	Cytochrome b-245, beta polypeptide (chronic granulomatous disease)	Hs.292356
CCR1	-2.47±0.15	Chemokine (C-C motif) receptor 1	Hs.301921
CCL18	-2.79±0.07	Chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)	Hs.143961
CD14	-2.93±0.38	CD14 antigen	Hs.163867
AIF1	-3.46±0.14	Allograft inflammatory factor 1	Hs.76364
CCL7	-3.54±0.04	Chemokine (C-C motif) ligand 7	Hs.251526
CCL8	-3.62±0.06	Chemokine (C-C motif) ligand 8	Hs.271387

表八 冬蟲夏草水萃液對成熟的樹突狀細胞，在基因表現上與免疫系統調節相關的基因。共有13個基因，正調控有1個；負調控有12個。

Gene_name	Log ₂ ratio	Title	Unigene
RGS1	0.40±0.06	Regulator of G-protein signalling 1	Hs.75256
CD83	-0.35±0.05	CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily)	Hs.484703
NCK1	-0.36±0.06	NCK adaptor protein 1	Hs.477693
CD86	-0.56±0.07	CD86 antigen (CD28 antigen ligand 2, B7-2 antigen)	Hs.171182
C9	-0.57±0.06	Complement component 9	Hs.1290
CTSS	-0.76±0.07	Cathepsin S	Hs.181301
LILRB1	-0.88±0.08	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3	Hs.149924
HLA-DQA1	-0.92±0.07	Major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	Hs.387679
CTSC	-1.01±0.06	Cathepsin C	Hs.128065
CCL7	-1.25±0.04	Chemokine (C-C motif) ligand 7	Hs.251526
CCL18	-1.52±0.08	Chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)	Hs.143961
CXCL10	-1.62±0.12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Hs.413924
CCL8	-1.66±0.06	Chemokine (C-C motif) ligand 8	Hs.271387

表九 冬蟲夏草水萃液對成熟的樹突狀細胞，在基因表現上與發炎反應相關的基因。共有4個基因，皆為負調控。

Gene_name	Log ₂ ratio	Title	Unigene
CCL7	-1.25±0.04	Chemokine (C-C motif) ligand 7	Hs.251526
CCL18	-1.52±0.08	Chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)	Hs.143961
CXCL10	-1.62±0.12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Hs.413924
CCL8	-1.66±0.12	Chemokine (C-C motif) ligand 8	Hs.271387

表十 冬蟲夏草水萃液在成熟與未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異，其與免疫系統調節相關的基因。共有17個基因，正調控有8個；負調控有9個。

Gene_name	Log ₂ ratio	Title	Unigene
IL8	2.01±0.16	Interleukin 8	Hs.624
RIPK2	1.81±0.15	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	Hs.103755
CD86	0.73±0.07	CD86 antigen (CD28 antigen ligand 2, B7-2 antigen)	Hs.171182
TRIM22	0.72±0.06	Tripartite motif-containing 22	Hs.501778
C9	0.51±0.07	Complement component 9	Hs.1290
ADORA2A	0.51±0.08	Adenosine A2a receptor	Hs.197029
CD83	0.42±0.05	CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily)	Hs.484703
CD8A	0.31±0.04	CD8 antigen, alpha polypeptide (p32)	Hs.85258
TOLLIP	-0.26±0.05	Toll interacting protein	Hs.368527
TAPBP	-0.29±0.05	TAP binding protein (tapasin)	Hs.370937
CD74	-0.51±0.08	CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen-associated)	Hs.436568
GEM	-0.56±0.08	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	Hs.345139
CD1C	-0.65±0.11	CD1C antigen, c polypeptide	Hs.1311
CTSC	-0.78±0.07	Cathepsin C	Hs.128065
DKFZP564J0863	-0.79±0.07	DKFZP564J0863 protein	Hs.356719
CCL7	-1.02±0.04	Chemokine (C-C motif) ligand 7	Hs.251526
CCL8	-1.25±0.07	Chemokine (C-C motif) ligand 8	Hs.271387

表十一 冬蟲夏草水萃液在成熟與未成熟的樹突狀細胞間基因表現之差異，其與發炎反應相關的基因。共有7個基因，正調控有3個；負調控有4個。

Gene_name	Log ₂ ratio	Title	Unigene
IL8	2.01±0.16	Interleukin 8	Hs.624
RIPK2	1.81±0.15	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	Hs.103755
ADORA2A	0.51±0.08	Adenosine A2a receptor	Hs.197029
TOLLIP	-0.26±0.05	Toll interacting protein	Hs.368527
CD74	-0.51±0.08	CD74 antigen (invariant polypeptide of major histocompatibility complex, class II antigen-associated)	Hs.436568
CCL7	-1.02±0.04	Chemokine (C-C motif) ligand 7	Hs.251526
CCL8	-1.25±0.07	Chemokine (C-C motif) ligand 8	Hs.271387

表十二 成熟樹突狀細胞與冬蟲夏草水萃液處理過之未成熟樹突狀細胞間基因表現之差異，其與免疫系統調節相關的基因。共有29個基因，正調控有22個；負調控有7個。

Gene_name	Log ₂ ratio	Title	Unigene
CXCL10	2.16±0.11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Hs.413924
IL8	2.12±0.13	Interleukin 8	Hs.624
RIPK2	1.91±0.13	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	Hs.103755
CD86	1.30±0.07	CD86 antigen (CD28 antigen ligand 2, B7-2 antigen)	Hs.171182
CCL18	1.19±0.08	Chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)	Hs.143961
LILRB1	1.13±0.07	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3	Hs.149924
C9	1.08±0.06	Complement component 9	Hs.1290
TRIM22	1.02±0.06	Tripartite motif-containing 22	Hs.501778
CTSS	0.90±0.06	Cathepsin S	Hs.181301
HLA-DQA1	0.77±0.07	Major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1	Hs.387679
CD83	0.77±0.05	CD83 antigen (activated B lymphocytes, immunoglobulin superfamily)	Hs.484703
CEBPB	0.75±0.09	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	Hs.517106
TNFSF10	0.74±0.10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	Hs.478275
ADORA2A	0.68±0.07	Adenosine A2a receptor	Hs.197029
NCK1	0.64±0.06	NCK adaptor protein 1	Hs.477693
STAT5A	0.58±0.11	Signal transducer and activator of transcription 5A	Hs.437058
ISGF3G	0.56±0.06	Interferon-stimulated transcription factor 3, gamma 48kDa	Hs.1706
LCF2	0.55±0.09	Lymphocyte cytosolic protein 2 (SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa)	Hs.304475
TAP1	0.51±0.09	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	Hs.352018
C3	0.45±0.06	Complement component 3	Hs.529053
CCL8	0.41±0.07	Chemokine (C-C motif) ligand 8	Hs.271387
CCL7	0.23±0.04	Chemokine (C-C motif) ligand 7	Hs.251526
ITGB1	-0.29±0.05	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	Hs.429052
TAPBP	-0.32±0.05	TAP binding protein (tapasin)	Hs.370937
RGS1	-0.37±0.06	Regulator of G-protein signalling 1	Hs.75256
TOLLIP	-0.38±0.05	Toll interacting protein	Hs.368527
CTSW	-0.45±0.07	Cathepsin W (lymphopain)	Hs.416848
CLC	-0.69±0.08	Charcot-Leyden crystal protein	Hs.889
DKFZP564J0863	-1.05±0.07	DKFZP564J0863 protein	Hs.356719

表十二 成熟樹突狀細胞與冬蟲夏草水萃液處理過之未成熟樹突狀細胞間基因表現之差異，其與發炎反應相關的基因。共有10個基因，正調控有9個；負調控有1個。

Gene_name	Log ₂ ratio	Title	Unigene
CXCL10	2.16±0.11	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	Hs.143961
IL8	2.12±0.13	Interleukin 8	Hs.529053
RIPK2	1.91±0.13	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	Hs.197029
CCL18	1.03±0.10	Chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)	Hs.624
CEBPB	0.75±0.09	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	Hs.103755
ADORA2A	0.68±0.07	Adenosine A2a receptor	Hs.251526
C3	0.45±0.06	Complement component 3	Hs.517106
CCL8	0.41±0.07	Chemokine (C-C motif) ligand 8	Hs.271387
CCL7	0.23±0.04	Chemokine (C-C motif) ligand 7	Hs.368527
TOLLIP	-0.38±0.05	Toll interacting protein	Hs.413924

