

計畫編號：CCMP92-RD-116

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

許志楨

國立清華大學

摘 要

由於醫學科技的進步，中醫藥科學化已經是時代的趨勢。然而中草藥的成份複雜，對於單味藥或傳統方劑的生產品質需要做有效的監控。另外，對於其藥理機制需要在分子生物的層次做定量的了解，以達到實驗科學的客觀驗證。為了用嚴謹的科學方法來研究中草藥，本計畫利用高效液相層析法（High Performance Liquid Chromatography, HPLC）和感應耦合電漿質譜儀（Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer, ICPMS），對中草藥產品品質及批次間之均一性做嚴格的監控。本計畫之目的是要利用 cDNA 微陣列（cDNA microarray）來建立一個分子生物層級的中草藥分析技術平台。希望藉此計畫的完成，確立一套以科學化的方法來分析中草藥對細胞基因表現圖譜（gene expression pattern）之影響，並進而歸納出相對於該中草藥之標記基因（marker genes）。希望能據此以定量的方式，可靠且有效的了解中草藥之藥理機制。經由此技術平台的建立，將來對各種中草藥的分析研究，皆可依循本計畫所建立之規範（包含中草藥有機/無機成份之標準化、中草藥對細胞株在分子生物層級的分析，及所應用的統計分析方法）一一加以研究。

本計畫第二年，我們完成了以下幾項目標：（1）以冬蟲夏草處理 KG-1 細胞後，分別在兩天、四天及八天時抽取細胞的 RNA。進行螢光標示顏色對調（Dye Swap）的 cDNA 微陣列實驗。（2）利用統計的分析方法進行初步的基因表現圖譜分析並加以檢討。（3）依據檢討結果，修正改進有機/無機化合物標準化流程，並選取兩種不同來源的天然冬蟲夏草（青海冬蟲夏草與西藏冬蟲夏草）以進行後續之分析研究。（4）以統計方法針對 cDNA 微陣列實驗進行

迴圈設計 (Loop Design) 及進行基因晶片實驗。(5) 以統計方法分析上述實驗結果，並初步歸納出相對於實驗性分析標的物-冬蟲夏草的標記基因。

關鍵詞：中草藥、cDNA 微陣列技術、基因表現圖譜、標記基因、冬蟲夏草

Number: CCMP92-RD-116

Constructing a Chinese Medicine Molecular Analysis Platform by Utilizing cDNA Microarray

Jih-Yang Hsu

National Tsing-Hua University

ABSTRACT

Modernization of traditional Chinese medicine has provoked great interests from bio-medical researchers globally. However, significant difficulties are associated with quality control of the multi-component herbal mixtures. Stringent quality control is the first and essential step to experimentally evaluate the pharmacological activities of traditional Chinese herbal medicine at the molecular level. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) and ICPMS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer) were implemented as stringent quality control systems to monitor the organic- and inorganic-chemical compositions of Chinese herbal medicine. This procedure assures the uniformity between different batches of herbal mixtures for the cDNA microarray experiments. The ultimate goal of this proposal is to construct a molecular-level, analytical platform by utilizing cDNA microarray technology. As the completion of this platform, we expect to establish a standard scientific protocol for analyzing the effect of Chinese herbal medicine on cellular gene expression pattern. Thus, the potential pharmacological mechanisms could be assessed more accurately and effectively. This analytical platform, including organic- and inorganic-chemical analysis, cDNA microarray technology and statistical methods, could be applied to the investigation of a variety of

different Chinese herbal medicines.

In the second year of study, we have accomplished the following tasks: (1) Total RNA was extracted from KG-1 cells treated with *Cordyceps sinensis* for 2, 4, and 8 days. Dye swap cDNA microarray experiments were performed on these samples. (2) The patterns of global gene expression were analyzed by statistical methods. (3) Organic- and inorganic- standardization protocols were further amended according to the microarray results. *Cordyceps sinensis* samples of two different geological origins were chosen for the following study. (4) Loop design protocol was used for major microarray experiments. (5) Microarray results were examined by statistical methods and marker genes that are specifically regulated by *Cordyceps sinensis* were identified.

Keywords : Chinese herbal medicine, cDNA microarray technology, gene expression profile, marker genes, *Cordyceps sinensis* (CS)

壹、前言

中草藥之成份極為複雜，距離完整的有機/無機成份分析尚有一段很長的路要走。然而我們目前可利用 cDNA 微陣列分析某一中草藥對細胞之基因表現差異之影響，並進而選取一些相對於該中草藥之標記基因來定義歸類該中草藥。如此變數可減少很多，並且因為是從分子層級的生物效應來分析、定義，這將對其藥理的了解也有很大的幫助。

如前所述，傳統中草藥方劑是由不同藥材組成，其中所含的有機物及無機物的成分複雜。為了用嚴謹的科學方法來研究中草藥對細胞基因表現的影響，本計畫利用高效液相層析法和感應耦合電漿質譜儀。對中草藥產品品質及批次間之均一性做嚴格的監控。目前分析中草藥的方法中，以高效液相層析法最為普遍，同時層析法也是最主要的定量分析方法⁽¹⁾。由於本實驗計畫並非要分離及確認中草藥的活性成分。因此，我們希望能使用高效液相層析法得到特定中草藥主要成分的化學指紋 (chemical fingerprint)，而不去鑑定每一種主要化學物質。我們稱這個程序為“有機化合物標準化” (organic chemical standardization)。我們了解中草藥有機物之成份極為複雜且變異非常大，所以這一部份我們將會訂得比較寬鬆。主要是過濾差異極大的樣本。將來中草藥成份分析更精進時，當採用本技術平台時，亦可調整其嚴格度。感應耦合電漿質譜儀用來偵測中草藥方劑內所含的微量元素⁽²⁾。依據每一帖方劑內各種微量元素的種類及含量，我們可以得到其獨特的微量元素指紋 (trace element fingerprint)。同樣的，每一批中草藥方劑內所得到的微量元素指紋必須落在一組限定的範圍內。我們稱這個程序為“無機化合物標準化” (inorganic chemical standardization)。

本計畫選取不同產地 (青海與西藏) 的天然冬蟲夏草做為實驗的分析標的物。經過“有機化合物標準化”以及“無機化合物標準化”的選材標準程序後，我們以不同劑量的冬蟲夏草菌絲體水萃液 (含零劑量之控制組) 加入細胞培養液中。然後，在不同的時間點分別萃取細胞的 mRNA 以分析比較它們的基因表現圖譜之異同。在我們實驗性的研究對象—中藥方劑單方冬蟲夏草之 cDNA 微陣列實驗中，我們將以不同來源的天然冬蟲夏草做為基因表現圖譜差異分析的研究對象。

綜合而言，本計畫所要達成之總目標為利用 cDNA 微陣列 (cDNA microarray) 來建立一個分子生物層級的中草藥分析技術平台。希望藉此計畫的完成，確立一套以科學化的方法來分析中草藥對細胞基因表現

圖譜之影響，並進而歸納出相對於該中草藥之標記基因。希望能據此以定量的方式，可靠且有效的了解中草藥之藥理機制。經由此技術平台的建立，將來對各種中草藥的分析研究，皆可依循本計畫所建立之規範(包含中草藥有機無機成份之標準化、中草藥對細胞株在分子生物層級的分析，以及所應用的統計分析方法)一一加以研究。在建立此平台的過程中，我們選定使用冬蟲夏草做為樣本，主要有兩個原因：(A)為了瞭解此分析平台的敏感度，我們將天然冬蟲夏草樣本又區分為子座、菌核與全蟲三個部份。將此視為成份差異性小的樣本(可由 HPLC 圖譜之相似性證明)。樣本間成份的差異性隨著產地的不同(青海與西藏)以及使用發酵菌絲體而遞增。(B)當我們歸納出天然冬蟲夏草的標記基因之後，將來可以再進一步把目前不同品種的冬蟲夏草菌絲體(如中國彎頸黴、蝙蝠蛾擬青黴、中國被毛孢…等)的標記基因做歸納，並與天然冬蟲夏草的標記基因做比對。據此，將可提供做為研究冬蟲夏草藥理機制的參考。對於天然冬蟲夏草或者是發酵菌絲體的藥效，在本研究計畫中將無法提供直接具體的答案。這一部份的問題是許多研究中草藥的學者以及臨床中醫師很有興趣的課題。對於藥效的研究，需要從動物實驗或臨床試驗的結果才能得到直接具體的答案。但是中草藥方對於生物體所產生的藥效，仍需要再進一步以基因調控的角度去觀察，才能更明確的瞭解其藥理機制。因此，利用 cDNA 微陣列所建立的分析平台，將可以做為：(1) 中草藥品質標準化的評估方法；(2) 提供中草藥調控細胞基因表現的資訊，以做為進一步研究藥理機制的參考。

目前我們使用的樣品來源為兩種不同產地的天然冬蟲夏草。其中對於發酵冬蟲夏草菌絲體的研究，雖然已經有數篇發表在期刊的論文證實某些品種的菌絲體具有抗氧化活性、提昇睪丸酮的量、以及活化巨噬細胞與小腸免疫系統的功能，但是其臨床藥效仍未被證實。因此到目前為止，發酵冬蟲夏草菌絲體並無法宣稱具有藥效。天然冬蟲夏草的藥效則於中國古籍中已有記載。例如在清朝汪昂所著的《本草備要》中描述：「冬蟲夏草，甘平，保肺益腎，止血化痰，止勞咳。」此外，期刊論文也證實天然冬蟲夏草具有抗氧化活性、免疫調節、以及抑制肝纖維化的功能。雖然並無臨床研究的論文支持其藥效，但是天然冬蟲夏草的藥效已經經過數百年的臨床使用以及多部中國古典藥籍的記載。因此，經過與臨床中醫師和研究冬蟲夏草多年的學者討論的結果，我們認為天然冬蟲夏草具有臨床的藥效。雖然如此，中國古籍上所記載的「肺」與「腎」所描述的人體系統並不與目前西方醫學所使用的名詞「肺臟(Lung)」與「腎臟(Kidney)」相同。因此，冬蟲夏草所具有的藥效，仍需要以

現代的實驗科技以及進一步的臨床試驗，才能確定其藥效是作用在人體的哪些系統或器官。

貳、材料與方法

一、細胞株及樣品的選擇與製備

(一) 細胞株的選擇

關於在細胞株的選擇上，由於本計畫將特別注意免疫相關基因的活性，因此我們選取與免疫系統有關的細胞株，來觀察其對中草藥方劑的基因表現圖譜的差異。人類急性骨髓性白血病（AML）細胞株—KG-1，除了對於外來的刺激會產生基因或蛋白質表現上的反應（激化免疫基因、釋放 cytokine）之外，還會在某些條件下進行細胞的分化，成為類樹突狀細胞(Dendritic-like cell)^(3,4)。由此可見，KG-1 細胞株對於外來的刺激十分敏感，而且可以用來觀察許多不同細胞反應時免疫基因表現圖譜的差異，因此相當符合本計畫的需求。

KG-1 是一種人類急性骨髓性白血病（AML）的細胞株，之前的期刊論文發現 KG-1 細胞會對外來刺激產生基因以及蛋白質表現上的差異。此外，KG-1 會在某些條件下進行細胞的分化，成為類樹突狀細胞（Dendritic-like cell）。因此，KG-1 細胞也被一些研究人員當作是一種可用來替代研究樹突狀細胞功能的細胞株。依據我們所收集到的文獻資料顯示：被研究人員用來替代研究樹突狀細胞功能的人類細胞株包括 KG-1 及 MUTZ-3 等。其中 MUTZ-3 只有一篇期刊論文曾發表此種細胞株經過特殊的培養基培養後可以分化成為類樹突狀細胞。但是因為其培養方式特殊且相關文獻稀少，所以我們不採用此細胞株。KG-1 細胞則已經有數篇期刊論文對其分化為類樹突狀細胞的培養方法及細胞特性有詳細的研究，而且培養方式較為容易，因此我們認為利用 KG-1 細胞株當作本研究的細胞株是一個最好的測試系統。

(二) 冬蟲夏草樣品之選擇及萃取方法

在清朝趙學敏所著的〔本草綱目拾遺〕中記載：「夏草冬蟲乃感陰陽二氣而生，夏至一陰生，故靜而為草，冬至一陽生，故動而為蟲，以其得陰陽之氣全也，故能治諸虛百損。」中國古代醫家對冬蟲夏草的菌核（蟲）與子座（草）的觀察是用天地陰陽的原理來解釋，認為菌核與子座各吸收了陽氣與陰氣。因此，要發揮其藥效，則要二者同時服用。

依據台灣大學許瑞祥教授的研究結果發現：從不同產地收集到的天然冬蟲夏草樣本，其菌核與子座具有相同的 18S rRNA 基因核酸序列，這表示不同產地來源及蟲體的不同部位所取得的冬蟲夏草樣本，是同一物種的真菌所構成。雖然如此，天然蟲草菌核內的菌絲體與構成子座的菌絲體之生長環境與條件有相當的差異性，因此，子座與菌核所含的化學成份（多醣類、蛋白質、脂肪、核苷酸及代謝產物等）及其所造成的生物反應是否也會有所不同，則需要進一步的實驗去證明。

我們選取採集自中國青海及西藏的天然冬蟲夏草，做為實驗的樣品。我們將請合作實驗室-台灣大學許瑞祥教授為我們做不同產地的天然冬蟲夏草（青海、西藏）品種的鑑定。許瑞祥教授實驗室將採用 18S rRNA 基因定序的方法來鑑定我們手邊所有樣品的菌種。依據最近幾篇期刊論文的結論，冬蟲夏草無性世代的菌種只有一種：中國被毛孢（*Hirsutella Sinensis*）。因此，我們將依 18S rRNA 基因的序列來界定天然冬蟲夏草及冬蟲夏草菌絲體是否為中國被毛孢，或是其他的真菌。

冬蟲夏草的服用方式，一般而言有下列數種：(1)磨成粉末吞食；(2)水煎服食；(3)浸酒飲用；(4)與雞鴨魚肉燉食。由此可初步瞭解，在臨床上無論是使用極性或是非極性溶液去萃取都有使用。此外，期刊論文上對於研究冬蟲夏草時所採取的萃取方式包括了以極性溶液、非極性溶液、或是兩者都採用。我們採用了高溫水萃的方式來提取冬蟲夏草的成份是基於以下的原因：冬蟲夏草對人類免疫力的提昇效用，是目前十分受重視的研究課題。而且我們所使用的細胞株 KG-1 也有機會可以對此問題做深入的探討。多醣類化合物常被認為與提昇免疫力有相關。我們希望提取出來的成份是以多醣類化合物為主。高溫水萃是常被用來提取多醣類化合物的萃取方式，且在多篇期刊論文上也用此方式來提取冬蟲夏草的成份。因此，我們採用高溫水萃。

固態的天然冬蟲夏草樣本則使用研磨機磨至細微粉末。然後取 2g 的冬蟲夏草樣本粉末溶於 40mL 的去離子水中。置於 90°C 水浴中高溫萃取 2 小時。待樣品冷卻後，離心 3,000rpm 15 分鐘，取出上清液，使用 0.45 μ m 的濾膜過濾後再使用 0.22 μ m 的濾膜過濾。把過濾後的冬蟲夏草水萃液分裝至 1.5mL 的 eppendorf tube 內，冰凍於零下 20°C 的冰箱內保存。

二、樣品之前置分析及鑑定

(一) 高效液相層析儀

中草藥方劑含有許多不同的有機及無機成分。此外，在製備的過程中常帶有非活性成分的雜質及其他干擾因子。為了把大部分的雜質去除，在進行高效液相層析法分析之前必須先經過前處理的步驟。一般而言，高效液相層析法因具有分離完全、樣品用量少、靈敏度高、再現性好、分析時間短及操作簡單等優點。因此為達到有效監控中草藥方劑品質的目的，本計畫利用高效液相層析法 (HPLC) 配合 UV/Vis 測定技術，進行中草藥製品內各種主要有機成分，及其大約濃度分布情形的鑑定。如前所述的，我們了解中草藥有機物之成份極為複雜且變異非常大，所以這一部份我們將會訂得比較寬鬆。主要是過濾差異極大的樣本。將來中草藥成份分析更精進時，當採用本技術平台時，亦可調整其嚴格度。

(二) 感應偶合電漿質譜儀

中草藥方劑所含之重金屬元素，多屬微量之範圍。一般而言，中草藥物質成份的組成十分複雜。因此分析工作要有相當的準確度與精密度。其中的有機物質，經常會成為在檢測微量元素時的基質干擾。此外，待測元素之濃度相當微量，在分析過程中易因污染導入或待測元素吸附於管壁，而影響分析結果之準確性。基於上述的理由，在進行實際的樣品分析時，需要選擇適當的樣品前處理技術，以去除干擾。並配合高靈敏度之偵測儀器，以量測低濃度之微量元素。

密閉式微波消化技術是一成熟之樣品消化技術。比起傳統上開放式之傳統加熱板消化法，具有試劑使用量少，少樣品量 (-0.5g)、不易導入污染，消化時間短 (30-60min) 等優點。密閉式微波消化技術具有良好之消化效率。許多干擾基質大多在微波消化過程中都可分解。因此消化後之樣品溶液，只需經過簡單的趕酸處理，即可上機測定。經秤取適當樣品於消化瓶中，以不同配方之酸液進行消化後，再添加 2mL 之 H_2O_2 進行趕酸至近乾，再以 1% HNO_3 稀釋至 25mL，再進行上機測定。在消化過程與儀器測定過程均需有品質管制之動作，以確保分析數據之品質。利用密閉式微波消化配合 ICPMS，來進行中草藥微量元素

之分析，結合了密閉式微波消化技術的諸多特點：減少消化試劑、縮短消化時間、避免揮發性元素漏失及減少污染導入。與 ICPMS 之快速、多元素同時分析、偵測極限低、線性範圍廣等強大優點，對於中草藥元素的微量元素分析，勢必是一適當的分析方法。

(三) 冬蟲夏草品種鑑定

18S rRNA 基因具有高複製數目以及在物種演化過程中據高保留性。因此，18S rRNA 基因常被用來做為物種鑑定分析。本計畫分析樣品中 18S rRNA 基因是否與已知的冬蟲夏草特殊基因序列相同，做為鑑定冬蟲夏草樣品物種的參考依據^(5,6)。

三、以 cDNA 微陣列實驗進行分子生物層級之基因圖譜分析

將 KG-1 細胞離心 1,500rpm 10 分鐘，去除上清液。以 10mL 滅菌之 PBS 緩衝液清洗 KG-1 細胞兩次。離心 1,500rpm 10 分鐘，去除上清液。加入 1mL TRIZOL 試劑，經震盪後離心。加入 0.2mL Chloroform，震盪後離心 13,000rpm 20 分鐘(4°C)。取出上清液至於新的 1.5 mL eppendorf 管內，加入 0.5mL Isopropanol，混合均勻後離心 13,000 rpm 30 分鐘(4°C)，去除上清液。加入 1 mL 75%酒精清洗，離心 13,000rpm 10 分鐘(4°C)，去除上清液並將沉澱物乾燥。加入 10 μ L Rnase-free water 重新溶解沉澱物。將實驗組和控制組的 total RNA 各取 100 μ g 分別經逆轉錄過程製成 cDNA 並標定上不同的螢光分子。之後，所有標的物加入 0.1N NaOH，置於 65°C 水浴 30 分鐘以分解 RNA，再加入 0.1N HCl 中和之。標的物經過 Microcon 30 (Millipore) 純化以去除未參與逆轉錄反應的螢光分子。接著將每個時間點實驗組和對照組的 cDNA 均勻混合，並加入雜合反應溶液以進行雜合反應。在進行雜合反應之前，玻片必須經過後處理，以中和 poly-L-lysine 的正電，避免標的物和 poly-L-lysine 產生非專一性結合。進行雜合反應時，將標的物均勻地覆蓋在已點有探針的玻片上。接著放入特製的金屬容器中，並置於 65°C 的水浴槽中 16 小時，使標的物能與探針充分進行雜合反應。

將反應完成的玻片，經過清洗 (wash) 除去未參與雜合反應的標的物。本研究利用 Axon 4000 B 掃描系統掃描玻片上的螢光訊號。取得影像檔之後，利用 GenePix 5.0 軟體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；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）小於 2 的基因。依上述所選到的基因，對其強度進行局部加權散佈圖修勻法（Locally Weighted Scatterplot Smoother, Lowess）的數據標準化（Normalization）。

參、結果

一、以冬蟲夏草處理 KG-1 細胞後，分別在兩天、四天及八天時抽取細胞的 RNA，進行螢光標示顏色對調 (Dye Swap) 的 cDNA 微陣列實驗

為了瞭解冬蟲夏草對 KG-1 細胞基因表現的影響，在去年第一期的計畫之中，我們以不同濃度的冬蟲夏草萃取液處理 KG-1 細胞，發現以 20 μ L/mL (v/v) 的量，能造成明顯的細胞生物效應—抑制 KG-1 細胞生長 (實驗總共進行八天，每兩天數一次細胞數目)。在此實驗中我們發現細胞生長的抑制效應隨著時間的增長而成正比例增加。然而，發生最明顯的細胞生物效應的時間點，並不一定代表在此時間點也會造成最明顯的基因表現調控效應。因此，我們以 20 μ L/mL (v/v) 的冬蟲夏草萃取液處理 KG-1，並在不同的時間點 (兩天、四天或八天) 抽取細胞的 total RNA，用來進行 cDNA 微陣列的實驗。目的是為了要瞭解在哪一個時間點，冬蟲夏草萃取液對 KG-1 細胞基因表現的調控幅度最大。

為了解答這次實驗所要探討的問題，許文郁教授依據統計學上實驗設計的學理，做了以下的實驗設計。圖 1 是這組實驗的設計方式：利用參考組設計 (Reference Design) 的方法，將三個時間點的實驗以螢光標示顏色對調 (Dye Swap) 的方式重複操作，總共使用 6 片基因晶片，所使用的晶片分別以 A (兩天)、B (兩天；螢光標示顏色對調)、C (四天)、D (四天；螢光標示顏色對調)、E (八天)、F (八天；螢光標示顏色對調) 標示。KG-1 細胞分別培養在 6 個細胞培養瓶 (Flask) 中，在其中三個細胞培養瓶的培養基 (Medium) 內加入 20 μ L/mL (v/v) 的冬蟲夏草水萃液，當作實驗組。另外 3 個細胞培養瓶則不加入冬蟲夏草水萃液，當作控制組。2 天後 (第 2 天) 將 1 瓶控制組細胞和 1 瓶實驗組細胞取出，抽取 RNA。這兩個樣本就是用來進行 A 晶片與 B 晶片的微陣列實驗。將其餘 4 瓶細胞置換新的培養基，其中 2 瓶實驗組的培養基內再重新加入 20 μ L/mL(v/v) 的冬蟲夏草水萃液。2 天後 (第 4 天) 將 1 瓶控制組細胞和 1 瓶實驗組細胞取出，抽取 RNA。這兩個樣本就是用來進行 C 晶片與 D 晶片的微陣列實驗。將其餘 2 瓶細胞置換新的培養基，其中實驗組的培養基內再重新加入 20 μ L/mL (v/v) 的冬蟲夏草水萃液。2 天後 (第 6 天) 再將這 2 瓶細胞置換新的培養基，其中實驗組的培養基內再重新

加入 20 μ L/mL (v/v) 的冬蟲夏草水萃液。2 天後 (第 8 天) 將這 2 瓶細胞取出, 抽取 RNA。這兩個樣本就是用來進行 E 晶片與 F 晶片的微陣列實驗。

二、利用統計的分析方法進行初步的基因表現圖譜分析並加以檢討

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

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 32,448 個點 (Spot) 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 代表 Add, $A = 1/2 \log_2 R + 1/2 \log_2 G$)。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 MA 圖。依據原始數據畫出的 MA 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。在一系列微陣列實驗的最開始, 為了評估實驗系統誤差的情形是否在可容忍的範圍內, 我們利用相同的 mRNA 樣本分別標示紅色螢光以及綠色螢光, 進行至少一次的微陣列實驗。由於實驗的樣本完全

相同，因此我們可以預估微陣列的結果應該是沒有表現比例的差異，通常此種實驗被稱為模擬實驗 (Mock Experiment)。我們使用控制組細胞 (未受到冬蟲夏草萃取液處理的 KG-1 細胞) 的 RNA 來進行模擬實驗。圖 2 的左圖是模擬實驗原始數據的 MA 圖。可以看到圖形最左邊的點群有朝下方彎曲的趨勢。這是低螢光訊號區域的綠色螢光較強所造成的系統誤差，此種系統誤差可以用數據標準化 (Normalization) 的處理來消除。經過局部加權散佈圖修勻法 (Locally Weighted Scatterplot Smoother, Lowess) 標準化處理之後的 MA 圖是圖 2 的右圖，由此圖可見數據點群的 A 值是分散開來，而 M 值則是對 0 對稱且其數值是在一個很小的範圍之內。依據圖 2 的結果，我們可以有信心的證明本實驗室微陣列實驗的系統誤差狀況是在可容忍的範圍之內。由上述圖 1 實驗設計的 6 片晶片進行 cDNA 微陣列實驗的結果，每一片晶片得到 32,448 點的數據，經由我們這個研究團隊自己寫的程式分析得到 cDNA 微陣列初步分析結果。圖 3 到圖 8 的左圖是原始數據的 MA 圖。經過局部加權散佈圖修勻法標準化處理之後的 MA 圖是圖 3 到圖 8 的右圖。

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。圖 2 到圖 7 的右圖是經過局部加權散佈圖修勻法處理過後的 MA 圖。很明顯的，局部加權散佈圖修勻法可以有效的將左圖上點群朝下方彎曲的趨勢修正回來，使得修正後的

MA 圖對 Y 軸為 0 的線對稱。經由圖 2 到圖 7 圖形的資訊，我們觀察到這些圖形並沒有明顯不對稱或是十分突兀的地方，由此可以得知此實驗的 6 片晶片的結果具有相當的可信度。

(二) 利用螢光標示顏色對調 (Dye Swap) 的實驗結果篩選出表現有明顯差異的基因

螢光標示顏色對調的實驗與模擬實驗有所不同，模擬實驗使用完全相同的 RNA 樣本分別標示紅色螢光與綠色螢光之後進行雜合反應。螢光標示顏色對調的實驗使用兩種不同的 RNA 樣本來進行雜合反應。例如：樣本 1 使用未受冬蟲夏草處理的 KG-1 細胞的 RNA，樣本 2 使用受冬蟲夏草處理 2 天的 KG-1 細胞的 RNA。在 A 晶片的實驗中，樣本 1 標示紅色螢光，樣本 2 標示綠色螢光，進行雜合反應。在 B 晶片的實驗中，樣本 1 標示綠色螢光，樣本 2 標示紅色螢光，進行雜合反應。A 晶片與 B 晶片稱為螢光標示顏色對調的實驗。

由於在兩片螢光標示顏色對調的晶片實驗中的不同點是 RNA 樣本標示的螢光顏色對調。因此，某基因 X 表現的相對比例如果在其中一片為 3，則在另一片的結果應該是接近 0.333 (或 1/3)。換言之，對於同一個基因的數值，在這兩片晶片的結果應該有 R/G 比例互成倒數的現象。當我們將 R/G 的值取以 2 為底的對數時，螢光標示顏色對調的兩組數據應該是呈現相反的正負號，但其數值的絕對值應該十分接近 (例如：X 基因在 A 晶片的 R/G 值為 3，則 $\log_2 3 = 1.585$ ；X 基因在 B 晶片的 R/G 值為 0.333， $\log_2 0.333 = -1.585$ ；而且 $\log_2 3 = -\log_2 0.33333 = 1.585$)。

利用此特性，我們可以將螢光標示顏色對調的兩片晶片上基因表現數據有對調的基因挑出來。在總數 7,334 種基因之中，A 與 B 晶片的分析結果得到有 2,030 種基因有數據對調的現象；C 與 D 晶片得到 1,812 種基因有數據對調的現象；E 與 F 晶片得到 1,876 種基因有數據對調的現象。比較本實驗室所點印到晶片上的 7,334 種基因，這些實驗分別得到有 27.8% (第 2 天，A 與 B 晶片)，24.7% (第 4 天，C 與 D 晶片) 及 25.6% (第 8 天，E 與 F 晶片) 的基因有數據對調的現象。其他沒有被觀察到數據對調的基因可分為兩類：

1. 有些基因在 KG-1 細胞中並不會被表現，因此沒有 RNA 可被

偵測到。據估計，細胞內總數約 3 萬五千種基因中約有 40% 會因細胞所需而被表現。其他 60% 的基因屬於功能特異性的基因，只有在不同組織器官內，或者非常規需求時（例如：細胞凋亡）才會被表現。這些未被表現基因的螢光強度值與實驗背景值無明顯差異，在數據處理時就會被去除。

2. 有些基因在此實驗中有被表現，但因冬蟲夏草並不會調控其表現量，所以其 R/G 值會很接近 1。對於這種很接近 1 的 R/G 值，微陣列實驗的結果不一定會在螢光標示顏色對調的晶片表現數據對調的現象。

接著，我們希望從以上的結果挑選出再現性強的數據，利用更嚴格的標準去除誤差較大的數據。我們針對有對調現象的基因再進一步篩選，將每一種有對調現象的基因在兩片螢光標示顏色對調的晶片中之 R/G 值互相比較。同一組螢光標示顏色對調實驗的兩個 R/G 值在取以 2 為底的對數之後，其絕對值的差異必須在 2 以內。換言之，我們只挑選兩片螢光標示顏色對調的晶片上同一種基因的 R/G 比例差異在 4 倍之內的數據。A 與 B 晶片的分析結果得到有 1,283 種基因符合此篩選標準；C 與 D 晶片得到 1,146 種基因符合此篩選標準；E 與 F 晶片得到 1,233 種基因符合此篩選標準。若將 3 組實驗做交集，則有 141 種基因符合此篩選標準。這表示以前述兩種標準篩選後，有 141 種基因同時在 3 個不同的時間點（2 天、4 天及 8 天）都會受到冬蟲夏草的調控。這表示第 2 天的實驗結果所觀察到受冬蟲夏草調控的基因之中，有 11%（141/1,283）也在其他時間點受到調控；第 4 天有 12.3%（141/1,146）；第 8 天有 11.4%（141/1,233）。從這個結果得知：受到冬蟲夏草調控的基因種類或者受調控的方式，會隨著受冬蟲夏草處理的時間而有所差異。其中只有大約 11% 左右的基因，在 8 天的觀察期之中都受到冬蟲夏草調控。

如果將篩選條件再提高到：同一組實驗的兩個以 2 為底的對數的絕對值差異必須在 1 以內。換言之，兩片螢光標示顏色對調的晶片上同一種基因的 R/G 比例差異在 2 倍以內。A 與 B 晶片的分析結果得到有 751 種基因符合此篩選標準；C 與 D 晶片得到 640 種基因符合此篩選標準；E 與 F 晶片得到 756 種基因符合此篩選標準。若將 3 組實驗做交集，則有 37 種基因符合此篩選標準。這表示以前述兩種標準篩選後，有 37 種基因同時在 3 個不

同的時間點（2天、4天及8天）都會受到冬蟲夏草的調控。依據這樣的方式，我們可以發揮螢光標示顏色對調這種實驗設計的特性，很有信心的將可信度高的數據篩選出來。

(三) 利用階層式群集分析 (Hierarchical Clustering Analysis) 選出微陣列實驗的最佳時間點

當我們將可信度高的數據篩選出來之後，就可以利用群集分析選出最佳時間點，以進行之後的微陣列實驗。由上述 B 的部分，我們以兩種不同嚴格程度的標準分別挑出了 141 種基因以及 37 種基因，將之歸類為：同時在 3 個不同時間點（2 天、4 天及 8 天）都會受到冬蟲夏草調控的基因。依據這些基因調控的方式及相對比例，我們可以利用群集分析的方法計算出這 3 個不同時間點（2 天、4 天及 8 天）微陣列實驗結果的相似程度，以及兩兩之間的距離關係。我們分別以 37 種基因以及 141 種基因的微陣列結果來進行階層式群集分析。（我們目前先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 6 個實驗之間的距離之後，再用 Michael Eisen 教授所提供的免費的繪圖軟體 TreeView 呈現如圖 9 的結果。

圖 9 的結果是以雙方向群集分析 (Two-Way Clustering) 的方式來呈現。縱向有 6 個直行條紋圖分別代表 6 片晶片實驗，條紋圖上方有標示實驗的晶片英文代碼及實驗天數。在標示上方的線條圖表示 6 個實驗結果經過群集分析之後，所歸納出的距離關係。當我們輸入基因的相對表現結果進行群集分析之前，為了還原螢光標示顏色對調實驗的結果，使得兩片螢光標示顏色對調晶片的結果在群集分析中代表兩個同樣的實驗，我們利用數學運算的方法將 B、D 及 F 晶片的 R/G 值取倒數。如此，我們預期兩片螢光標示顏色對調晶片的結果應該要被歸類在一起（距離最短）。圖 9 的左圖橫向有 141 條橫列，分別代表 141 種基因在 6 片晶片實驗中的相對表現狀況。這是依照 141 種基因在 6 片晶片實驗所得到的 $\log_2(R/G)$ 進行階層式群集分析的結果（同樣的，右圖是以 37 種基因的結果來分析）。在此圖中每一條橫列由 6 個填滿紅色、綠色或黑色的格子所組成，代表一種基因在 6 片晶片

實驗中的相對表現狀況。如果其 $\log_2(R/G)$ 值為正值（紅光強度高於綠光強度），則以紅色格子顯示。紅光強度高於綠光強度的程度愈高，格子的顏色就愈鮮紅。如果其 $\log_2(R/G)$ 值為負值（綠光強度高於紅光強度），則以綠色格子顯示。綠光強度高於紅光強度的程度愈高，格子的顏色就愈鮮綠。如果其 $\log_2(R/G)$ 接近 0，則格子的顏色就會接近黑色。圖 9 的左圖是依據 141 種基因的相對表現結果來分析。圖 9 的右圖是依據 37 種基因的相對表現結果來分析。如前所述，我們已經利用數學運算的方法將螢光標示顏色對調實驗的結果還原成兩個相同的實驗。我們得到以下的結論：

1. 從圖 9 左右兩張圖形上方的線條圖，我們得到的結論是：A 與 B 的結果很接近、C 與 D 的結果很接近、E 與 F 的結果很接近。這是合理的結果。由此種分析也可以間接驗證這些螢光標示顏色對調晶片實驗結果的可信度。此外，當我們將數據的篩選標準提高時，比較左圖與右圖上方的線條圖，顯示 3 組螢光標示顏色對調實驗的兩片晶片間的距離在右圖都有明顯的縮短。這表示我們將篩選標準提高之後所挑選出來的 37 種基因，其數據的可信度提高，因此使得螢光標示顏色對調實驗的兩片晶片結果更為一致。此外，隨著螢光標示顏色對調實驗晶片間的距離縮短，第 4 天與第 8 天結果之間的距離也縮短。這進一步證實：第 4 天與第 8 天之間的結果相似度高。然而第 2 天與其他實驗之間的距離卻增長。顯示出第 2 天的結果的確是差異性大的結果。
2. 從彩色的群聚分析圖的顏色分布，我們觀察到第 4 天的結果（C 與 D）與第 8 天（E 與 F）的結果之間的顏色分布較接近，第 2 天（A 與 B）結果的顏色分布則與其他天數的顏色分布有明顯的不同。這表示第 4 天與第 8 天的實驗結果相似性高，而與第 2 天的結果則相似度低。很有趣的是第 2 天的紅綠顏色分布幾乎與第 4 天及第 8 天的紅綠顏色分布相反。表示這些基因在第 2 天的調控方式恰好與第 4 天及第 8 天相反。我們仍然不知道造成此現象的機制，但這必然是一個有趣的問題，值得再進一步研究。
3. 圖 9 的左圖及右圖依照紅綠顏色的分布，可將圖形大致分為兩大部分（以黃色虛線區分）。被分類在黃色虛線上方的基因群，

在第2天實驗的兩片晶片中大多數為紅光較強，然而在第4天與第8天的結果則大多是綠光較強。被分類在黃色虛線下方的基因群的表現，恰好與黃色虛線上方基因群的表現相反。這個結果顯示冬蟲夏草對 KG-1 細胞基因表現的影響隨著時間會有明顯的差異。在我們實驗設計所觀察的時間範圍內，第2天與第4天之間是一個重要的分界。從第4天到第8天的結果並無明顯差異。

我們較有興趣的部分在於冬蟲夏草對於細胞較長期、與免疫有關的基因調控。經過以上的實驗結果，發現第2天的結果與之後的時間點（第4天與第8天）有很大的差異，而且第4天與第8天的結果相似性很高，所以我們挑選第4天做為冬蟲夏草微陣列實驗的時間點。

三、依據檢討結果，修正改進有機/無機化合物標準化流程，並選取兩種不同來源的天然冬蟲夏草（青海冬蟲夏草與西藏冬蟲夏草）以進行後續之分析研究

依據此初步的 cDNA 微陣列分析結果，我們也重新檢討了之前有機/無機化合物標準化流程。去年第一期的有機/無機化合物標準化流程顯示：由初步的有機/無機分析結果可以用來作為區分天然冬蟲夏草與市售冬蟲夏草菌絲體產品的參考。然而，對於天然冬蟲夏草之間的區分仍然不是十分明確。因此，我們重新量測了天然冬蟲夏草以及冬蟲夏草菌絲體的有機/無機化合物含量，重新定義「微量元素圖譜」以及「HPLC 圖譜」，並且據此訂出了調整過的分析流程。

(一) 修正改進無機化合物標準化流程

天然冬蟲夏草及冬蟲夏草菌絲體固體樣品經過磨粉以及密閉式微波消化技術的前處理之後，使用感應耦合電漿質譜儀來偵測其中所含的微量金屬元素含量。在本實驗中我們使用了兩種來源不同的天然冬蟲夏草樣品（產自青海及西藏）。此兩種天然冬蟲夏草樣品是在台北市迪化街的中藥房購買。依據藥商的陳述，我們購買了兩種外觀不同的冬蟲夏草樣本，分別被認定為出產自青海及西藏，其中青海的樣品蟲體較小，西藏的樣品則蟲體較大且飽滿。此兩種樣品經過合作實驗室許瑞祥教授的 DNA 鑑定之後，證實都與“中國被毛孢”的 18S rRNA 基因有 99% 以上的相同序列，所以都是真品冬蟲夏草。然而，DNA 鑑定並無法鑑別

不同產地的天然冬蟲夏草。因為無法從其基因序列辨識冬蟲夏草的產地。

依據另一個合作實驗室楊末雄教授的研究經驗，許多中草藥都可以利用量測微量元素的方式來歸納出其產地為何。因為中草藥所含的「微量元素圖譜」與其生長環境有密切的關係。在第一年的實驗中，我們已經與楊末雄教授合作，分別對同一種產地冬蟲夏草的子座、菌核與全蟲做過微量元素的量測，並且得到三種樣品間所含的微量元素仍有些微差異的結論。由於同種產地冬蟲夏草樣品的不同部位都能偵測出微量元素含量的差異，因此我們假設不同產地來源的天然冬蟲夏草樣品可能含有獨特的「微量元素圖譜」，可用來區分其產地。此外，接下來的實驗中，我們希望以兩種產地的冬蟲夏草來做為微陣列實驗的樣本，因此確定我們所購買的冬蟲夏草，是否真的如藥商所言來自兩個不同產地，成了一個重要的問題。

我們請許瑞祥教授提供一隻在青海國營店所購買產自青海的冬蟲夏草樣本 (Qinghai 1)，並請託西藏喇嘛從西康的集散地購買了數隻產自西藏的冬蟲夏草樣本 (Tibet 1)。這兩種確定產地的樣本做為微量元素實驗的標準品。此外，除了在迪化街購買的兩種冬蟲夏草樣本 (Qinghai 2 及 Tibet 2) 之外，我們也在市面上購買了數種冬蟲夏草菌絲體的產品 (CG、MEL、CS-4 及 TT)，一併進行此項實驗。微量元素的實驗結果如表 1，總共偵測了 Na、K、Ca、Mg、Fe、Al、Mn、As、Cr、Cu、Pb、Sr、Zn 等十三種常用來檢測中草藥的微量元素。從表 1 中的數字並無法立即看出不同冬蟲夏草樣品間的異同。因此我們將此原始數據做了一個轉換：把 Tibet 1 樣品的微量元素含量全部假定為 1，再將所有其他樣本所含的同一種微量元素的數據與 Tibet 1 樣品的微量元素數據相比。由此所得到的相對含量表如表 2 所示。經過此種轉換之後，利用階層式群聚分析法來計算不同樣品間的差異程度，結果圖 10 所示。從圖示結果可以看到不同產地的天然冬蟲夏草 (確定產地的 Tibet 1 與 Qinghai 1) 被歸類在不同的小群中。此外，Tibet 1 與 Tibet 2 被歸類在一起，同樣的 Qinghai 1 與 Qinghai 2 也被歸類在一起，這兩小群又被歸類在同一個大群之中。可見這 4 種天然冬蟲夏草所含的「微量元素圖譜」最相近。此外冬蟲夏草菌絲體產品 CG 的距離與天然冬蟲夏草之間較近，

然後是 CS4 與 MEL 的小群，而 TT 的距離最遠。

依據冬蟲夏草微量元素圖譜進行群聚分析結果得到 Tibet 1 與 Tibet 2 被歸類在一起以及 Qinghai 1 與 Qinghai 2 被歸類在一起。這個證據支持我們在迪化街購買的冬蟲夏草樣品的生長環境與確定產地冬蟲夏草樣品的生長環境所含的微量元素族群有正相關。因此也間接證明了迪化街購買的冬蟲夏草樣品很可能產自西藏及青海。由此結果可知，我們使用十三種微量元素含量所組成的「微量元素圖譜」可以用來做為檢測中草藥產地的另一種驗證。本年度無機化合物標準化的實驗流程與去年度比較並無明顯更改，然而對於「微量元素圖譜」的分析則有顯著的不同及改進。利用「微量元素圖譜」進行階層式群聚分析法，可以有效的鑑別不同產地的天然冬蟲夏草樣品。

(二) 修正改進有機化合物標準化流程

在第一年的研究中，我們將青海冬蟲夏草分為全蟲、菌核、及子座等三個樣本，分別測得其 HPLC 圖譜。我們觀察到全蟲、菌核、及子座等三個樣本的 HPLC 圖譜，相當類似。我們可以判定：這三個樣本的主要化學成份類似。由此實驗可知，使用高效液相層析法可以鑑定出成份類似，但又不完全相同的樣本。因此，若冬蟲夏草樣品間化學成份的差異小，則使用高溫萃取之後的水萃液做為高效液相層析法的樣本，可以忠實的呈現樣品間化學成份之組合具有高度的相似性。今年的 HPLC 實驗，我們採用了較新的 HPLC 儀器，新的 HPLC 管柱以及利用電腦軟體處理 UV 偵測數據，因此解析度比去年的結果更清晰。

本年度的研究中，我們進一步加入一種天然的冬蟲夏草樣品以及四種市售的冬蟲夏草菌絲體產品。進行了這些樣本的 HPLC 量測之後，我們可以得到不同來源冬蟲夏草樣品的「HPLC 圖譜」（如圖 11 到圖 20）。如同去年的方式，我們將西藏及青海出產的天然冬蟲夏草分為全蟲、菌核及子座等三個部分。圖 11 到圖 13 是青海冬蟲夏草樣品，分別為子座、菌核及全蟲的「HPLC 圖譜」。從這三個圖譜中我們觀察到全蟲、菌核、及子座等三個樣本的 HPLC 圖譜，相當類似。這部份的結果與去年的結果一致。然而在菌核及全蟲的 HPLC 圖譜中有一個 Peak，在子座的 HPLC 圖譜中並沒有如此明顯（紅色的箭頭所示）。圖 14 到圖 16 是西藏冬蟲夏草樣品，分別為子座、菌核及全蟲的「HPLC 圖譜」。

西藏冬蟲夏草樣品的全蟲、菌核及子座等三個樣本的 HPLC 圖譜，相當類似。這部份的結果進一步證實了去年研究的結論：天然冬蟲夏草無論其產地，菌核與子座所含的大部分主要化學成份類似。然而同樣的，在菌核及全蟲的 HPLC 圖譜中有一個相當明顯的 Peak，而在子座的 HPLC 圖譜中並沒有如此明顯的 Peak 出現（紅色的箭頭所示）。這個結果再次證實，不論天然冬蟲夏草的產地為何，有某些主要化學成份主要出現在菌核部分，但是這些化學成份並沒有以同樣的比例出現在子座的部分。此外，在清朝趙學敏所著的〔本草綱目拾遺〕中記載：「夏草冬蟲乃感陰陽二氣而生，夏至一陰生，故靜而為草，冬至一陽生，故動而為蟲，以其得陰陽之氣全也，故能治諸虛百損」。中國古代醫家對冬蟲夏草的菌核（蟲）與子座（草）的觀察是用天地陰陽的原理來解釋，認為菌核與子座各吸收了陽氣與陰氣。因此，要發揮其藥效，則要二者同時服用。由以上的資訊得知：雖然冬蟲夏草樣品的不同部位的主要化學成份類似，但是仍有些微差異。這些差異是否會造成對細胞基因表現調控的不同，這是一個有趣的問題。因此我們將把西藏和青海出產的天然冬蟲夏草各分為全蟲、菌核及子座等三個樣本來進行微陣列實驗。希望能對此以科學的證據提出新的驗證。

從圖 11 到圖 16 得知相同來源的冬蟲夏草樣品的 HPLC 圖譜的相似度高於不同來源的樣品。圖 11 到圖 13（都是青海冬蟲夏草樣品）的相似度高；圖 14 到圖 16（都是西藏冬蟲夏草樣品）的相似度高。但青海與西藏冬蟲夏草樣品之間的相似度就不及樣品內的相似度高（比較圖 13 與圖 16）。四種市售冬蟲夏草菌絲體之間的差異頗大，並與天然冬蟲夏草的相似度也不高。由此得知，市售冬蟲夏草菌絲體由於菌種不同，發酵培養的方式與培養基也有差異，造成其有機化合物的含量、種類都有顯著不同。

四、天然冬蟲夏草之品種鑑定

18S rRNA 基因具有高複製數目以及在物種演化過程中具高保留性。因此，18S rRNA 基因常被用來做為物種鑑定分析。許瑞祥教授已完成定序不同冬蟲夏草品種的 18S rRNA 基因中 NS3-NS6 區間的核酸序列。並已將核酸序列資料登錄於基因資料庫（EMBL）。本計畫定序冬蟲夏草樣品 18S rRNA 基因中 NS3-NS6 區間的核酸序列。並用來與基因資料庫（EMBL）內的冬蟲夏草基因序列做比對，分析樣品中

18S rRNA 基因是否與已知的冬蟲夏草特殊基因序列相同，做為鑑定冬蟲夏草樣品物種的參考依據。經由許瑞祥教授的基因定序鑑定後，證實我們所使用的天然冬蟲夏草樣品（包括 Tibet 1、Tibet 2、Qinghai 1 及 Qinghai 2）與中國被毛孢的基因序列有 99% 以上的相似性，因此證實這些樣品的品種是中國被毛孢。

五、以統計方法針對 cDNA 微陣列實驗進行迴圈設計（Loop Design）及進行基因晶片實驗

完成了以上的準備實驗之後，我們選出了所要使用的冬蟲夏草樣品（西藏與青海冬蟲夏草），確定了研究的標的物是將冬蟲夏草樣品再區分為子座、菌核及全蟲等三種。此外也完成了品種鑑定以及建立了「微量元素圖譜」及「HPLC 圖譜」、確定了冬蟲夏草的萃取方式與濃度、利用微陣列實驗篩選出最佳的時間點等。接著，就是進行最重要的微陣列實驗。

為了有效的運用微陣列資源以及達到更精確的資訊分析，我們在進行微陣列實驗之前都會與清華大學統計所許文郁教授作詳細的討論，直到達成最好的實驗設計。本次的微陣列實驗設計經過許文郁教授及其研究生的設計，我們使用迴圈設計的方法來進行微陣列實驗。總共有 7 種樣品，包括未受處理的 KG-1 細胞以及受到青海子座、青海菌核、青海全蟲、西藏子座、西藏菌核或西藏全蟲處理 4 天的 KG-1 細胞。另外，我們將青海全蟲的樣本做二重複，目的是要當作內部控制組（Internal Control）。因此總共有 8 個實驗點，我們使用 16 片晶片來進行這整組的微陣列實驗，迴圈設計圖如圖 21。這個迴圈設計圖的文字標示說明如下：Q 代表青海；T 代表西藏；FB 代表子座；W 代表菌核；CS 代表全蟲；Control 代表未受冬蟲夏草處理的控制組。將之合併使用 QFB 代表青海子座；QW 代表青海蟲體，其餘依此類推。數字代表所使用晶片的代號，總共使用 16 片晶片。QFB ●¹→ QCS 表示以代號 1 號的晶片進行微陣列實驗，所使用的樣本分別為 QFB（受青海子座水萃液處理 4 天的 KG-1 細胞）：標示 Cy3 綠光螢光染劑，以及 QCS（受青海全蟲水萃液處理 4 天的 KG-1 細胞）：標示 Cy5 紅光螢光染劑。相對於一般實驗所使用的參考設計（Reference Design），利用迴圈設計的方式來進行微陣列實驗有以下的優點：

（一）參考設計中，每一個實驗點都要與參考組（或稱控制組）實驗比較，然後再利用這相同的立足點來互相比較。通常參考組實驗唯

一的目的就是為整組實驗提供一個互相比較的立足點。我們真正有興趣的還是在不同實驗點結果的互相比較。然而在參考設計中，參考組實驗卻進行了最多次，幾乎把一半的實驗資源都用在參考組實驗上。迴圈設計可以改善這個缺點。如圖 21 中的參考組實驗為 Control，在此實驗中與所有其他的實驗點所佔用相同的資源。

- (二) 參考設計中不同實驗點結果的互相比較一定要經過參考組實驗。真正有興趣的實驗點之間則沒有直接的實驗比較。迴圈設計中許多實驗點實驗可以直接的互相比較（如圖 21），如此可以減少因為間接比較實驗結果所帶來的隨機誤差（Random Error）。
- (三) 參考設計中除了直接的實驗比較之外，實驗結果也有許多間接的比較方式。例如以圖 21 中青海全蟲（QW）與西藏全蟲（TW）的比較為例子。雖然這兩組實驗並沒有直接比較，但可以經由 QW 對 Control，再由 Control 對 TW 來間接比較，或者經由 QW 對 QCS，再由 QCS 對 TW 來間接比較。此種間接比較的路徑在 QW 與 TW 之間有數種方式。有了這個優點，實驗點之間的互相比較可能路徑增多，可以減少隨機誤差。在迴圈設計的數據處理中可以利用不同路徑來計算基因的相對表現量，提高數據的可信度。

六、以統計方法分析上述微陣列實驗結果，並歸納出相對於實驗性分析標的物-冬蟲夏草的標記基因

依據第 5 部分的迴圈實驗設計，我們已經完成了冬蟲夏草基因微陣列實驗，16 片基因晶片產生了 519,168 筆數據（16 x 32448），目前我們以許文郁老師所設計撰寫的程式來分析這次的迴圈設計數據，已經有了一些初步的結果（如表 3）。在迴圈設計的計算中，由於 8 個樣品的 16 個實驗形成了一個對稱的迴圈，因此每一個樣本的數據在迴圈中所佔的比重一致。我們將每個樣本在迴圈實驗中與其他樣本的相對表現量定義為： λ （或 lambda）。某個基因的 λ_1 值表示這個基因在樣本 1 中相對於 8 個樣本標準值的相對表現量。此外，這個基因在 8 個樣本中所有的 λ 值相加等於 0（ $\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \lambda_4 + \lambda_5 + \lambda_6 + \lambda_7 + \lambda_8 = 0$ ）。因為我們只關心某個基因在樣本 1 中與其他樣本的相對表現量，所以這樣的計算可以視為一種標準化的過程。若要計算某基因在某兩個樣本之間的相對表現量，只要把這個基因的兩個 λ 值相減即可。因此由表 3，如果我們要知道基因 2 在第 3 號樣本

與第 4 號樣本間的差異，只要將 lambda 3 減去 lambda 4 即可。經由此種計算方式，如果我們希望得知青海冬蟲夏草與 Control 樣本之間的差異，可以用 lambda 3 減去 lambda 8，得到如表 4 的結果。在此實驗設計中樣本 3 及樣本 4 同樣都是青海全蟲。此外，樣本 7 是西藏全蟲。為了選取出天然冬蟲夏草所共同調控的基因，我們將此三種樣本所挑選出來的基因做交集，結果選出 20 種基因做為初步篩選的冬蟲夏草標記基因（如表 5）。此 20 種基因分別為 HBB、CD69、ZNF593、ZNF324、PPP1R2、GEM、NKTR、STAT1、ARFIP1、PPP1R12B、PL6、FLJ22625、PTE1、LOC387980、KIAA0317、ENSA、ATP2B4、RBM16 及 GSTO1 等。其中 FLJ22625、LOC387980、PL6 及 KIAA0317 是未知功能的 EST clone。HBB 是血紅素蛋白。ZNF593 和 ZNF324 為 Zinc Finger Protein，此類蛋白質通常會與 DNA 結合，但此兩種蛋白質的功能仍未知。ARFIP1 與高爾基氏體的分泌功能相關。PPP1R2 及 PPP1R12B 與蛋白質去磷酸酶的功能相關。GEM 蛋白參與細胞訊息傳遞。PTE1 的功能與細胞內脂肪酸的代謝相關。STAT1 是一種重要的 Transcription Factor。CD69 是一種白血球細胞的訊息傳遞接受器（Receptor），與白血球細胞免疫功能的調節有關。NKTR 是一種對 Nature Killer Cell 目標認識功能相關的蛋白。

從以上的資訊中並不容易得知調控這些蛋白質的表現與細胞內的功能機制有何種關係。我們利用 IobionLab 公司所出產的 PathwayAssit 軟體，輸入這 20 種基因。得到一些初步的可能機制（如圖 22 及圖 23）。圖 22 顯示 STAT1 及 CD69 的基因表現同時受到數種基因的調控，包括 IL3、IL5、PRKCA、SRC、CSF2、INFA1 及 INFG 等。其中 IL3、IL5、INFA1 及 INFG 是與免疫功能相關的基因。PRKCA、SRC、CSF2 等則與細胞訊息傳遞相關。由此我們可以進一步研究是否 STAT1 及 CD69 的基因表現調控與 KG-1 細胞的免疫功能相關。圖 23 則顯示出 STAT1 及 CD69 這兩種基因同時調控細胞凋亡（Apoptosis）的現象有關，並且可以回饋調控 INFG 的基因表現。當完成了此部份的分析之後，我們將以這些標記基因做為執行第三年度計畫之基礎。

肆、討論

一、以冬蟲夏草處理 KG-1 細胞後，分別在兩天、四天及八天時抽取細胞的 RNA，進行螢光標示顏色對調 (Dye Swap) 的 cDNA 微陣列實驗

人體偵測到病菌入侵時所產生的免疫反應為：先天性免疫反應 (Innate Immune Response) 和適應性免疫反應 (Adaptive Immune Response) (或稱為抗原專一性免疫反應)。樹突狀細胞在體內所扮演的角色，是做為免疫系統先天性免疫與抗原專一性免疫反應的橋樑。當人體受到外來病菌入侵時，分布在各組織器官的前趨樹突狀細胞 (Precursor DC) 和未成熟樹突狀細胞 (Immature DC) 將會立即偵測到，並且經由吞噬作用 (Phagocytosis) 把病菌分解。接著，未成熟樹突狀細胞將帶著病菌的抗原，移動到淋巴器官 (Lymphoid Organ)。把病菌的抗原呈現 (Antigen Presentation) 給 T 細胞 (CD4+ T-Helper Cells)，活化了由 T 細胞所調控的適應性免疫反應。在這個過程之中，未成熟樹突狀細胞也同時進行成熟的過程 (Maturation)，成為成熟的樹突狀細胞 (Mature DC)。此外，前驅樹突狀細胞在偵測到病菌入侵時，也同時會分泌細胞激素 (Cytokines) 和化學趨素 (Chemokines)，使得巨噬細胞 (Macrophages)、嗜中性球 (Eosinophile) 和自然殺手細胞 (Natural Killer Cells) 被吸引到受侵害的組織，並且在此受到細胞激素的影響而活化，這個過程則活化了由吞噬細胞 (Phagocytes) 所調控的先天性免疫反應。由此可知，樹突狀細胞都參與了這兩類免疫反應的調控。

關於在細胞株的選擇上，由於本計畫將特別注意免疫相關基因的活性，因此我們選取與免疫系統有關的細胞株，來觀察其對中草藥方劑的基因表現圖譜的差異。人類急性骨髓性白血病 (AML) 細胞株 - KG-1，除了對於外來的刺激會產生基因或蛋白質表現上的反應 (活化免疫基因、釋放細胞激素) 之外，還會在細胞激素 (IL-4 及 GM-CSF) 的刺激下進行細胞的分化，成為未成熟的類樹突狀細胞 (Dendritic-like cell) 其細胞表面抗原的表現以及巨噬 (Phagocytosis) 的功能都與樹突狀細胞 (Dendritic cell) 類似。此外，KG-1 細胞株也像未成熟樹突狀細胞一般會受到 LPS (Lipopolysaccharide) 的刺激而進一步分化為成熟的類樹突狀細胞。由於樹突狀細胞的取得困難且不易培養，因此 KG-1 細胞株被研究人員用來做為取代樹突狀細胞的實驗細胞株。由

此可見，KG-1 細胞株對於外來的刺激十分敏感，而且是與免疫系統有關的細胞株。因此相當符合本計畫的需求。我們以 20 μ L/mL (v/v) 的冬蟲夏草萃取液處理 KG-1，並在不同的時間點（兩天、四天或八天）抽取細胞的 total RNA，用來進行 cDNA 微陣列的實驗。目的是為了要瞭解在哪一個時間點，冬蟲夏草萃取液對 KG-1 細胞基因表現的調控幅度最大。

為了解答這次實驗所要探討的問題，許文郁教授利用參考組設計 (Reference Design) 的方法，將三個時間點的實驗以螢光標示顏色對調 (Dye Swap) 的方式重複操作。完成雜合反應 (Hybridization) 之後經由雷射掃描儀來掃描基因晶片，每一片晶片我們得到 32,448 個點 (Spot) 的數據。這些數據經過局部加權散佈圖修勻法 (Locally Weighted Scatterplot Smoother, Lowess) 標準化處理來消除系統誤差。之後我們利用螢光標示顏色對調 (Dye Swap) 的實驗結果篩選出表現有明顯差異的基因。利用這些統計學的方法，我們可以篩選出可信度高的基因群，以這些基因群的表現調控數據經由群集分析選出最佳時間點，以進行之後的微陣列實驗。我們發現第 2 天的實驗結果與之後的時間點（第 4 天與第 8 天）有很大的差異，而且第 4 天與第 8 天的結果相似性很高，所以我們挑選第 4 天做為冬蟲夏草微陣列實驗的時間點。

在此實驗中雖然我們的目的是要選出最佳的微陣列實驗時間點，然而我們也將進一步分析在不同時間點冬蟲夏草所調控的基因群以及調控的方式是否與其對細胞生物的影響有關？在此我們利用參考組設計的方法而非迴圈設計的方法，原因是我們所希望獲得的資訊是要比較不同時間點的實驗組與控制組之間的差異。對於三個實驗組之間的差異並非此實驗的研究重點。螢光標示顏色對調 (Dye Swap) 的實驗結果可用來做為篩選可信度高的基因，將參考組設計的微陣列實驗中不可信的基因去除。這些實驗設計乃是依據我們希望得到哪種資訊而定，並且在實驗進行之前就已經有詳細的規劃。如此才能夠以最有效率的方式來進行微陣列實驗結果的分析。

二、依據檢討結果，修正改進有機/無機化合物標準化流程，並選取兩種不同來源的天然冬蟲夏草（青海冬蟲夏草與西藏冬蟲夏草）以進行後續之分析研究

依據此初步的 cDNA 微陣列分析結果，我們也重新檢討了之前有機/無機化合物標準化流程。在本實驗中我們使用了兩種來源不同的

天然冬蟲夏草樣品（產自青海及西藏）。此兩種天然冬蟲夏草樣品是在台北市迪化街的中藥房購買。依據藥商的陳述，我們購買了兩種外觀不同的冬蟲夏草樣本，分別被認定為出產自青海及西藏，其中青海的樣品蟲體較小，西藏的樣品則蟲體較大且飽滿。此兩種樣品經過合作實驗室許瑞祥教授的 DNA 鑑定之後，證實都與“中國被毛孢”的 18S rRNA 基因有 99% 以上的相同序列，所以都是真品冬蟲夏草。然而，DNA 鑑定並無法鑑別不同產地的天然冬蟲夏草。因為無法從其基因序列辨識冬蟲夏草的產地。依據合作實驗室楊末雄教授的研究經驗，許多中草藥都可以利用量測微量元素的方式來歸納出其產地為何。因為中草藥所含的「微量元素圖譜」與其生長環境有密切的關係。我們假設不同產地來源的天然冬蟲夏草樣品可能含有獨特的「微量元素圖譜」，可用來區分其產地。我們請許瑞祥教授提供一隻在青海國營店所購買產自青海的冬蟲夏草樣本（Qinghai 1），並請託西藏喇嘛從西康的集散地購買了數隻產自西藏的冬蟲夏草樣本（Tibet 1）。這兩種確定產地的樣本做為微量元素實驗的標準品。此外，除了在迪化街購買的兩種冬蟲夏草樣本（Qinghai 2 及 Tibet 2）之外，我們也在市面上購買了數種冬蟲夏草菌絲體的產品（CG、MEL、CS-4 及 TT），一併進行此項實驗。

我們總共偵測了 Na、K、Ca、Mg、Fe、Al、Mn、As、Cr、Cu、Pb、Sr、Zn 等十三種常用來檢測中草藥的微量元素。利用階層式群聚分析法來計算不同樣品間的差異程度。從圖示結果可以看到不同產地的天然冬蟲夏草（確定產地的 Tibet 1 與 Qinghai 1）被歸類在不同的小群中。此外，Tibet 1 與 Tibet 2 被歸類在一起，同樣的 Qinghai 1 與 Qinghai 2 也被歸類在一起，這兩小群又被歸類在同一個大群之中。可見這 4 種天然冬蟲夏草所含的「微量元素圖譜」最相近。此外冬蟲夏草菌絲體產品 CG 的距離與天然冬蟲夏草之間較近，然後是 CS4 與 MEL 的小群，而 TT 的距離最遠。由此結果可知，我們使用十三種微量元素含量所組成的「微量元素圖譜」可以用來做為檢測中草藥產地的另一種驗證。本年度無機化合物標準化的實驗流程與去年度比較並無明顯更改，然而對於「微量元素圖譜」的分析則有顯著的不同及改進。利用「微量元素圖譜」進行階層式群聚分析法，可以有效的鑑別不同產地的天然冬蟲夏草樣品。

我們將西藏及青海出產的天然冬蟲夏草分為全蟲、菌核、及子座等三個部分。本年度的研究中，我們進一步加入一種天然的冬蟲夏草

樣品以及四種市售的冬蟲夏草菌絲體產品。進行了這些樣本的 HPLC 量測之後，我們可以得到不同來源冬蟲夏草樣品的「HPLC 圖譜」(如圖 11 到圖 20)。圖 11 到圖 13 是青海冬蟲夏草樣品，分別為子座、菌核及全蟲的「HPLC 圖譜」。從這三個圖譜中我們觀察到全蟲、菌核及子座等三個樣本的 HPLC 圖譜，相當類似。這部份的結果與去年的結果一致。然而在菌核及全蟲的 HPLC 圖譜中有一個 Peak，在子座的 HPLC 圖譜中並沒有如此明顯(紅色的箭頭所示)。西藏冬蟲夏草樣品的 HPLC 圖譜結果也與青海冬蟲夏草相似。天然冬蟲夏草無論其產地，菌核與子座所含的大部分主要化學成份類似。然而同樣的，在菌核及全蟲的 HPLC 圖譜中有一個相當明顯的 Peak，而在子座的 HPLC 圖譜中並沒有如此明顯的 Peak 出現(紅色的箭頭所示)。這個結果再次證實，不論天然冬蟲夏草的產地為何，有某些主要化學成份主要出現在菌核部分，但是這些化學成份並沒有以同樣的比例出現在子座的部分。由以上的資訊得知：雖然冬蟲夏草樣本的不同部位的主要化學成份類似，但是仍有些微差異。這些差異是否會造成對細胞基因表現調控的不同，這是一個有趣的問題。因此我們將把西藏和青海出產的天然冬蟲夏草各分為全蟲、菌核及子座等三個樣本來進行微陣列實驗。希望能對此以科學的證據提出新的驗證。由此可知，HPLC 圖譜結果可與微陣列實驗結果相互驗證比較：是否化學指紋圖譜相似的樣品就會有較相近的基因表現調控圖譜。

三、冬蟲夏草之品種鑑定

本計畫定序冬蟲夏草樣品 18S rRNA 基因中 NS3-NS6 區間的核酸序列。並用來與基因資料庫(EMBL)內的冬蟲夏草基因序列做比對，分析樣品中 18S rRNA 基因是否與已知的冬蟲夏草特殊基因序列相同，做為鑑定冬蟲夏草樣品物種的參考依據。經由許瑞祥教授的基因定序鑑定後，證實我們所使用的天然冬蟲夏草樣品(包括 Tibet 1、Tibet 2、Qinghai 1 及 Qinghai 2)與中國被毛孢的基因序列有 99%以上的相似性，因此證實這些樣品的品種是中國被毛孢。基原鑑定是最基本也是最重要的品質管制步驟。本計畫協同主持人台灣大學生物科技系許瑞祥教授是冬蟲夏草基原鑑定的專家，基因資料庫(EMBL)內的冬蟲夏草 18S rRNA 基因序列有許多是許瑞祥教授所提供(請參見參考文獻 5 及 6，許瑞祥教授所發表的文獻中對於冬蟲夏草的基因鑑定以及其在 EMBL 基因資料庫內的登錄編號有詳細的資料)。我們所有的冬蟲夏草樣品都經由許瑞祥教授進行基因序列做比對並確

定為中國被毛孢之後才進行一系列的生物及化學實驗。

四、以統計方法針對 cDNA 微陣列實驗進行迴圈設計 (Loop Design) 及進行基因晶片實驗

完成了以上的準備實驗之後，我們選出了所要使用的冬蟲夏草樣品（西藏與青海冬蟲夏草），確定了研究的標的物是將冬蟲夏草樣品再區分為子座、菌核及全蟲等三種。此外也完成了品種鑑定以及建立了「微量元素圖譜」及「HPLC 圖譜」、確定了冬蟲夏草的萃取方式與濃度、利用微陣列實驗篩選出最佳的時間點等。接著，就是進行最重要的微陣列實驗。

本次的微陣列實驗設計經過許文郁教授及其研究生的設計，我們使用迴圈設計的方法來進行微陣列實驗。總共有 7 種樣品，包括未受處理的 KG-1 細胞以及受到青海子座、青海菌核、青海全蟲、西藏子座、西藏菌核或西藏全蟲處理 4 天的 KG-1 細胞。另外，我們將青海全蟲的樣本做二重複，目的是要當作內部控制組 (Internal Control)。因此總共有 8 個實驗點，我們使用 16 片晶片來進行這整組的微陣列實驗，迴圈設計圖如圖 21。

相對於一般實驗所使用的參考設計 (Reference Design)，利用迴圈設計的方式來進行微陣列實驗有以下的優點：

- (一) 設計中，每一個實驗點都要與參考組（或稱控制組）實驗比較，然後再利用這相同的立足點來互相比較。通常參考組實驗唯一的目的就是為整組實驗提供一個互相比較的立足點。我們真正有興趣的還是在不同實驗點結果的互相比較。然而在參考設計中，參考組實驗卻進行了最多次，幾乎把一半的實驗資源都用在參考組實驗上。迴圈設計可以改善這個缺點。如圖 21 中的參考組實驗為 Control，在此實驗中與所有其他的實驗點所佔用相同的資源。
- (二) 參考設計中不同實驗點結果的互相比較一定要經過參考組實驗。真正有興趣的實驗點之間則沒有直接的實驗比較。迴圈設計中許多實驗點實驗可以直接的互相比較（如圖 21），如此可以減少因為間接比較實驗結果所帶來的隨機誤差 (Random Error)。
- (三) 參考設計中除了直接的實驗比較之外，實驗結果也有許多間接的比較方式。例如以圖 21 中青海全蟲 (QW) 與西藏全蟲 (TW) 的比較為例子。雖然這兩組實驗並沒有直接比較，但可以經由 QW 對 Control，再由 Control 對 TW 來間接比較，或者經由 QW

對 QCS，再由 QCS 對 TW 來間接比較。此種間接比較的路徑在 QW 與 TW 之間有數種方式。有了這個優點，實驗點之間的互相比較可能路徑增多，可以減少隨機誤差。在迴圈設計的數據處理中可以利用不同路徑來計算基因的相對表現量，提高數據的可信度。

以統計方法分析上述微陣列實驗結果，我們初步歸納出冬蟲夏草的標記基因。在此實驗設計中樣本 3 及樣本 4 同樣都是青海全蟲。此外，樣本 7 是西藏全蟲。為了選取出天然冬蟲夏草所共同調控的基因，我們將此三種樣本所挑選出來的基因做交集，結果選出 20 種基因做為初步篩選的冬蟲夏草標記基因（如表 5）。此 20 種基因分別為 HBB、CD69、ZNF593、ZNF324、PPP1R2、GEM、NKTR、STAT1、ARFIP1、PPP1R12B、PL6、FLJ22625、PTE1、LOC387980、KIAA0317、ENSA、ATP2B4、RBM16 及 GSTO1 等。其中 FLJ22625、LOC387980、PL6 及 KIAA0317 是未知功能的 EST clone。HBB 是血紅素蛋白。ZNF593 和 ZNF324 為 Zinc Finger Protein，此類蛋白質通常會與 DNA 結合，但此兩種蛋白質的功能仍未知。ARFIP1 與高爾基氏體的分泌功能相關。PPP1R2 及 PPP1R12B 與蛋白質去磷酸酶的功能相關。GEM 蛋白參與細胞訊息傳遞。PTE1 的功能與細胞內脂肪酸的代謝相關。STAT1 是一種重要的 Transcription Factor。CD69 是一種白血球細胞的訊息傳遞接受器（Receptor），與白血球細胞免疫功能的調節有關。NKTR 是一種對 Nature Killer Cell 目標認識功能相關的蛋白。從以上的資訊中並不容易得知調控這些蛋白質的表現與細胞內的功能機制有何種關係。我們利用 IobionLab 公司所出產的 PathwayAssit 軟體，輸入這 20 種基因。得到一些初步的可能機制（如圖 22 及圖 23）。圖 22 顯示 STAT1 及 CD69 的基因表現同時受到數種基因的調控，包括 IL3、IL5、PRKCA、SRC、CSF2、INFA1 及 INFG 等。其中 IL3、IL5、INFA1 及 INFG 是與免疫功能相關的基因。PRKCA、SRC、CSF2 等則與細胞訊息傳遞相關。由此我們可以進一步研究是否 STAT1 及 CD69 的基因表現調控與 KG-1 細胞的免疫功能相關。圖 23 則顯示出 STAT1 及 CD69 這兩種基因同時調控細胞凋亡（Apoptosis）的現象有關，並且可以回饋調控 INFG 的基因表現。

初步歸納出的冬蟲夏草標記基因是由 cDNA 微陣列的結果獲得，在第三年的研究計畫中我們正在進行 Real-Time PCR 的實驗，希望能進一步的驗證 cDNA 微陣列的結果，並將經由驗證後的基因群定

義為冬蟲夏草的標記基因。然而在此 cDNA 微陣列實驗結果中我們經由統計的計算發現 CD69 基因的表現在所有冬蟲夏草樣本中都有受到明顯的調控，並且此基因數值的誤差也相當低，所以這是相當可信的數據。此外單因子變異數分析 (F-test) 也顯示出 CD69 基因表現明顯的受到冬蟲夏草樣本的調控。在所有樣本中 CD69 基因的表現都受到冬蟲夏草樣本的影響而上調 (Up Regulation)。因此我們將依據冬蟲夏草對 CD69 基因的調控來探討可能的生物機制。

CD69 是一種白血球細胞的訊息傳遞接受器 (Receptor)，與白血球細胞免疫功能的調節有關。此外，CD69 是一種早期 T 細胞的表面抗原，T 細胞或由骨髓衍生的早期母細胞受到刺激而活化時其 CD69 表現會被刺激上調。經由動物實驗結果得知 CD69 上調後會正向調控 (上調) INFG (Interferon gamma) 的表現。INFG 表現量增加將會抑制自體免疫反應 (Autoimmune Reactivity) 以及發炎反應 (Inflammation)⁽⁸⁾。因此 CD69 被認為是一種會抑制自體免疫反應的基因。

在有關冬蟲夏草的研究中已經有三篇文獻指出冬蟲夏草萃取物對於實驗動物的自體免疫反應有緩解以及促進存活率的生物效應⁽⁹⁻¹¹⁾。然而，此種冬蟲夏草所造成的生物效應是由哪一種 (或哪些) 基因所媒介仍是未知。由 cDNA 微陣列實驗的結果可以進一步的篩選出可能參與抑制自體免疫反應的基因可能有哪些。在此實驗結果中依據統計學的分析我們已經可以將 cDNA 微陣列實驗的結果拿來分析，並篩選出有信心的基因。我們最終仍將經由 Real-Time PCR 的驗證。然而此分析所得到的初步標記基因中最有信心受調控的基因 -CD69 已經顯示出可與之前動物實驗結果相互驗證的結果。我們將在第三年的研究中用 Real-Time PCR 的技術一一驗證 cDNA 微陣列實驗的結果，並歸納出最終的冬蟲夏草標記基因。由此再進一步探討微陣列實驗結果與冬蟲夏草生物功能之間的關係。

伍、結論與建議

本計畫第二年，我們完成了以下幾項目標：(1) 以冬蟲夏草處理 KG-1 細胞後，分別在兩天、四天及八天時抽取細胞的 RNA。進行螢光標示顏色對調 (Dye Swap) 的 cDNA 微陣列實驗。(2) 利用統計的分析方法進行初步的基因表現圖譜分析並加以檢討。(3) 依據檢討結果，修正改進有機/無機化合物標準化流程，並選取兩種不同來源的天然冬蟲夏草 (青海冬蟲夏草與西藏冬蟲夏草) 以進行後續之分析研究。(4) 以統計方法針對 cDNA 微陣列實驗進行迴圈設計 (Loop Design) 及進行基因晶片實驗。(5) 以統計方法分析上述實驗結果，並將初步歸納出相對於實驗性分析標的物-冬蟲夏草的標記基因。在此成果報告中，我們已將上述的結果一一呈現。

本計畫全程為三年計畫，其總目標為利用 cDNA 微陣列來建構分子生物層級的中草藥分析平台。第一年我們完成了中草藥品質監控的標準流程，並初步完成了 cDNA 微陣列系統的穩定性測試。第二年我們利用微陣列實驗挑選出了最佳的實驗時間點，並且進一步修正有機/無機化合物標準化的分析流程。我們選取產自青海及西藏的天然冬蟲夏草做為實驗的樣品，同時完成了這些樣品的菌種鑑定、微量元素圖譜分析以及 HPLC 圖譜分析。依據迴圈設計的方式，我們完成了冬蟲夏草處理 KG-1 細胞株的微陣列實驗，並且初步篩選出冬蟲夏草的標記基因。希望能在接下來第三年的計畫中，繼續完成對微陣列實驗結果更完整的分析，並且將所選出的標記基因以多重複的方式點印在晶片上，完成對冬蟲夏草晶片的 cDNA 微陣列實驗及統計分析，進而進一步深入探討冬蟲夏草的可能藥理機制。

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 CCMP92-RD-116 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. Liu SY, Woo SO, Koh HL. HPLC and GC-MS screening of Chinese proprietary medicine for undeclared therapeutic substances. *J Pharm Biomed Anal* 2001; 24, 983-92.
2. Lozak A, Soltys K, Ostapczuk P, Fijalek Z. Determination of selected trace elements in herbs and their infusions. *Sci Total Environ* 2002; 289, 33-40.
3. Koeffler HP and Golde DW. Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood* 1980, 56, 344-50.
4. St. Louis DC, Woodcock JB, Fransozo G, Blair PJ, Carlson LM, Murillo M, Wells MR, Williams AJ, Smoot DS, Kaushal S, Grimes JL, Harlan DM, Chute JP, June CH, Siebenlist U, Lee KP. Evidence for distinct intracellular signaling pathways in CD34+ progenitor to dendritic cell differentiation from a human cell line model. *J Immunol*. 1999, 162, 3237-48.
5. Chen CS and Hseu RS. Differentiation of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. Specimen using restriction fragment length polymorphism of 18S rRNA gene. *J Chinese Agric Chem Soci*. 1999, 37, 533-45.
6. 許瑞祥、陳志昇、凌啟鴻。冬蟲夏草（*Cordyceps sinensis*）無性世代菌種之確認。2002，13，474-80。
7. Li SP, Su ZR, Dong TTX, Tsim KWK. The fruiting body and its caterpillar host of *Cordyceps sinensis* show close resemblance in main constituents and anti-oxidation activity. *Phytomedicine*. 2002, 9, 319-24.
8. Dorfman DM and Shahsafaei A. CD69 expression correlates with expression of other markers of Th1 T cell differentiation in peripheral T cell lymphomas. *Hum Pathol*. 2002, 33, 330-334.
9. 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, 12, 57-62.
10. Yang LY, Chen A, Kuo YC, Lin CY. Efficacy of a pure compound H1-A extracted from *Cordyceps sinensis* on autoimmune disease of MRL lpr/lpr mice. *J Lab Clin Med*. 1999, 134, 492-500.
11. Yang LY, Huang WJ, Hsieh HG, Lin CY. H1-A extracted from *Cordyceps*

sinensis suppresses the proliferation of human mesangial cells and promotes apoptosis, probably by inhibiting the tyrosine phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-XL. *J Lab Clin Med.* 2003, 141, 74-83.

柒、圖表

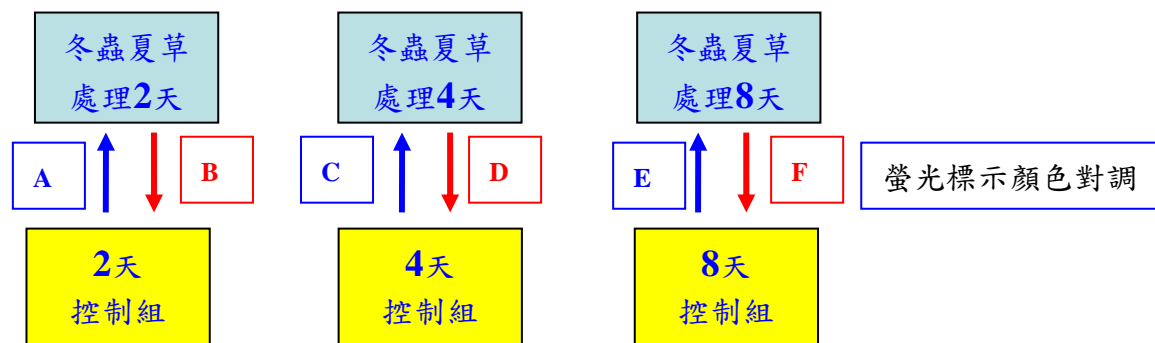


圖 1 利用參考組設計 (Reference Design)，將三個時間點的實驗以螢光標示顏色對調 (Dye Swap) 的方式重複操作，所使用的 6 片晶片分別以 A、B、C、D、E、F 標示。

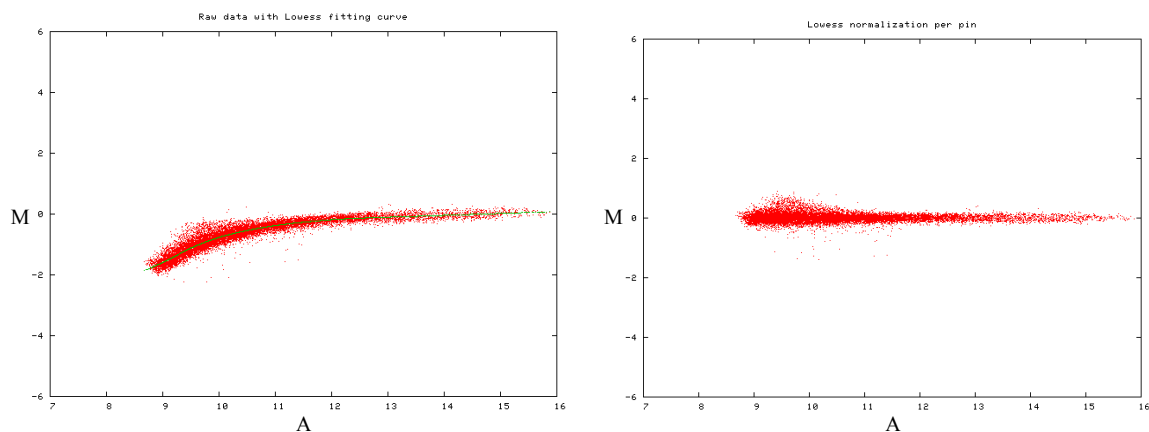


圖 2 未受冬蟲夏草萃取液處理的 KG-1 細胞進行模仿實驗 (Mock Experiment) 的微陣列數據分析。左圖為原始數據的 MA 圖；右圖為經過 Lowess 標準化之後的 MA 圖。

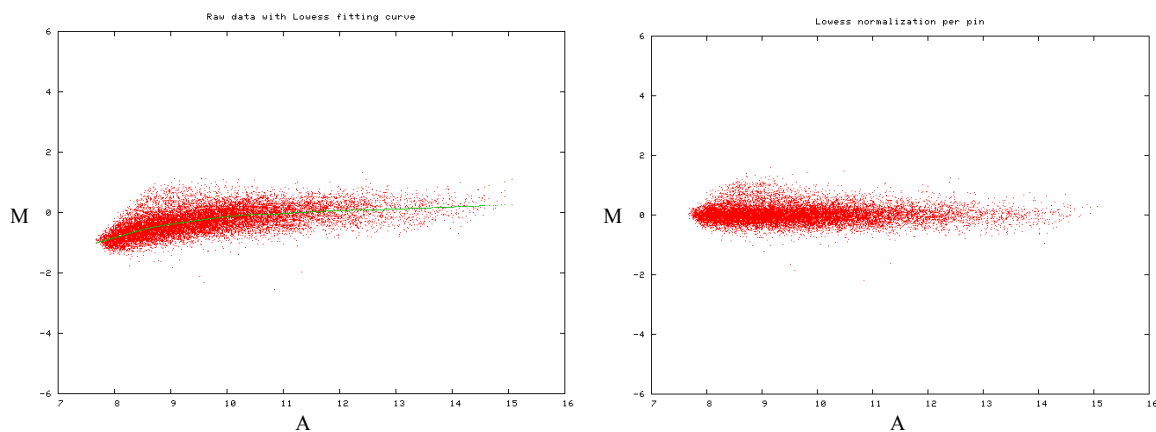


圖 3 受到冬蟲夏草萃取液處理 2 天的實驗組相對於 2 天控制組實驗晶片 A 的微陣列數據分析。左圖為原始數據的 MA 圖；右圖為經過 Lowess 標準化之後的 MA 圖。

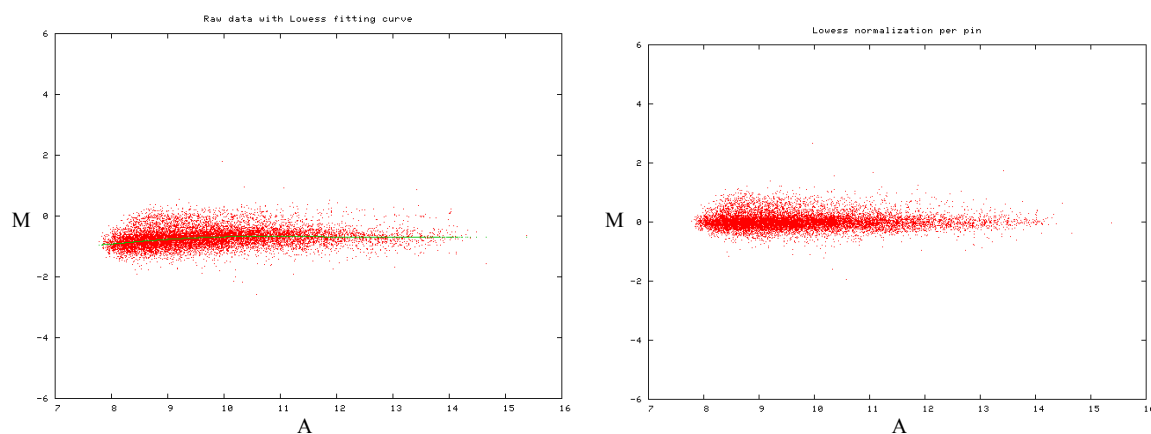


圖 4 受到冬蟲夏草萃取液處理 2 天的實驗組相對於 2 天控制組實驗晶片 B (Dye Swap) 的微陣列數據分析。左圖為原始數據的 MA 圖；右圖為經過 Lowess 標準化之後的 MA 圖。

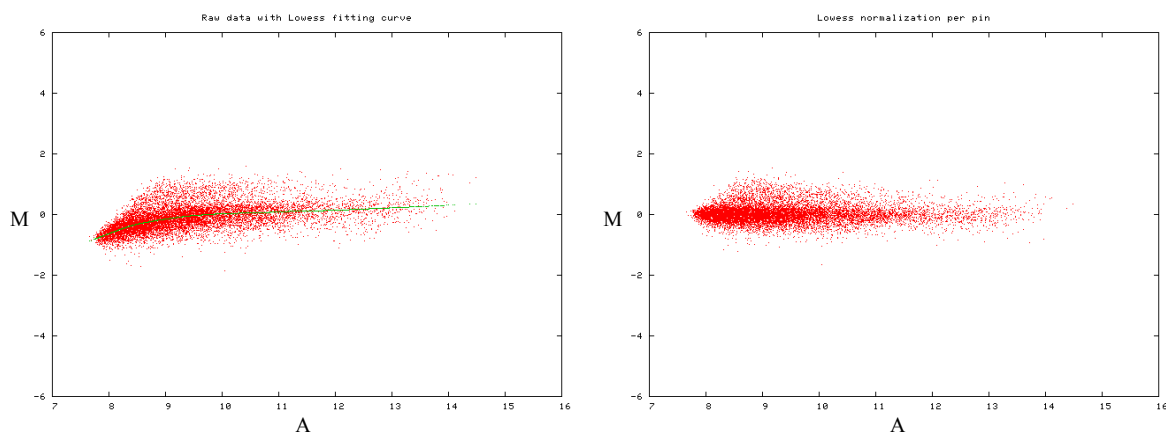


圖 5 受到冬蟲夏草萃取液處理 4 天的實驗組相對於 4 天控制組實驗晶片 C 的微陣列數據分析。左圖為原始數據的 MA 圖；右圖為經過 Lowess 標準化之後的 MA 圖。

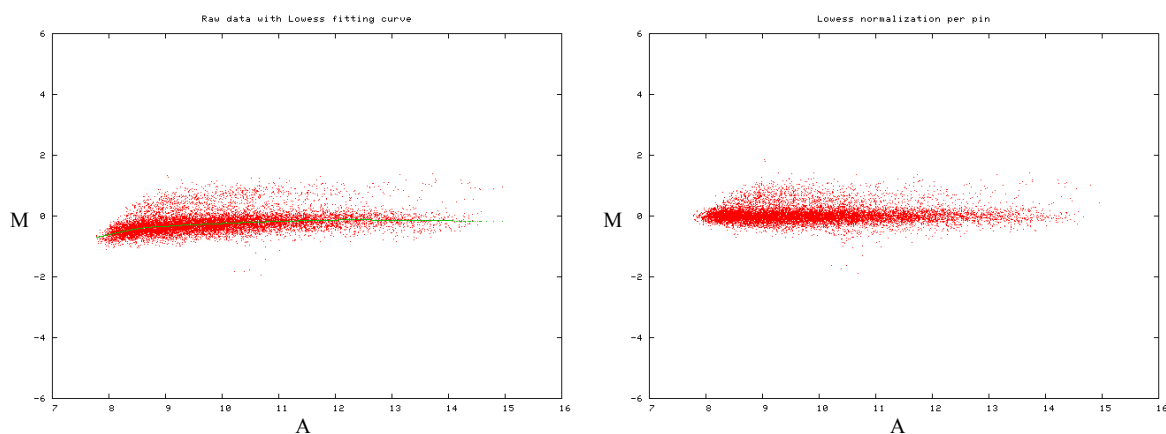


圖 6 受到冬蟲夏草萃取液處理 4 天的實驗組相對於 4 天控制組實驗晶片 D (Dye Swap) 的微陣列數據分析。左圖為原始數據的 MA 圖；右圖為經過 Lowess 標準化之後的 MA 圖。

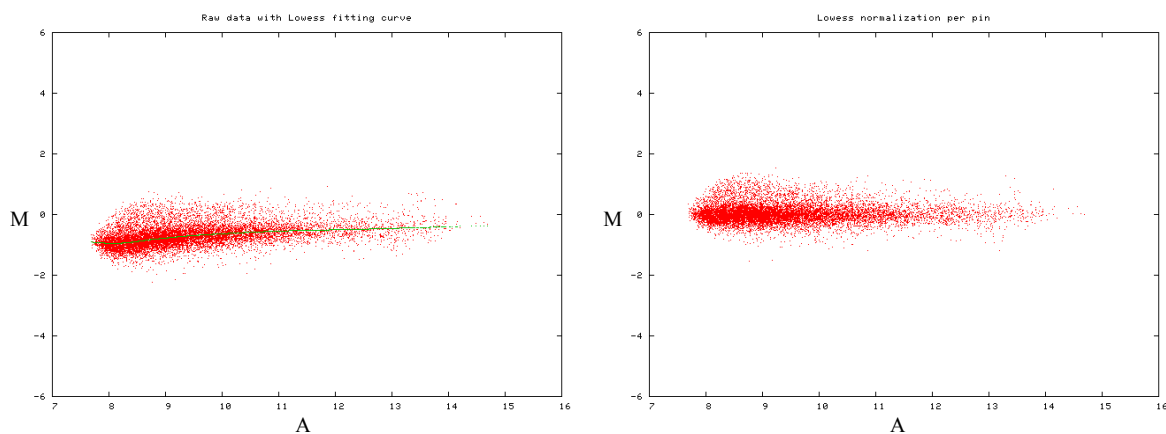


圖 7 受到冬蟲夏草萃取液處理 8 天的實驗組相對於 8 天控制組實驗晶片 E 的微陣列數據分析。左圖為原始數據的 MA 圖；右圖為經過 Lowess 標準化之後的 MA 圖。

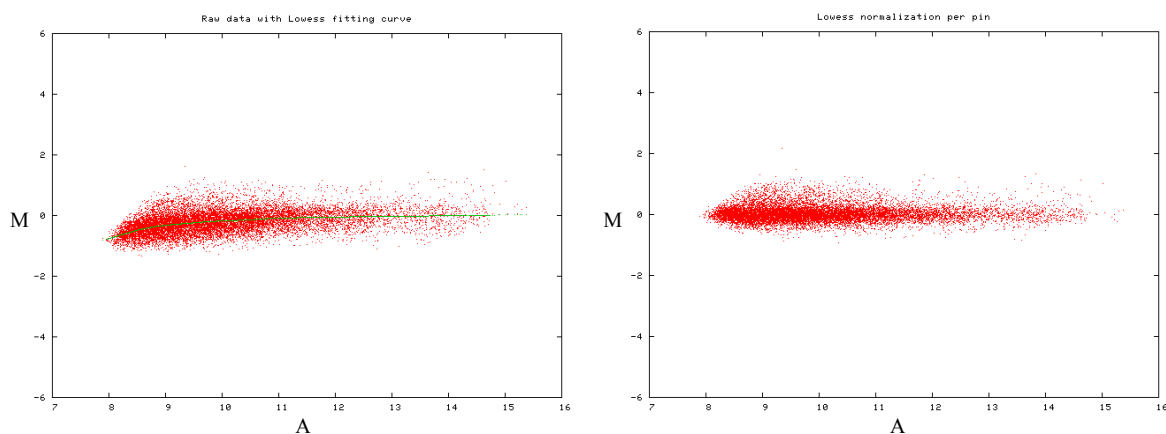


圖 8 受到冬蟲夏草萃取液處理 8 天的實驗組相對於 8 天控制組實驗晶片 F (Dye Swap) 的微陣列數據分析。左圖為原始數據的 MA 圖；右圖為經過 Lowess 標準化之後的 MA 圖。

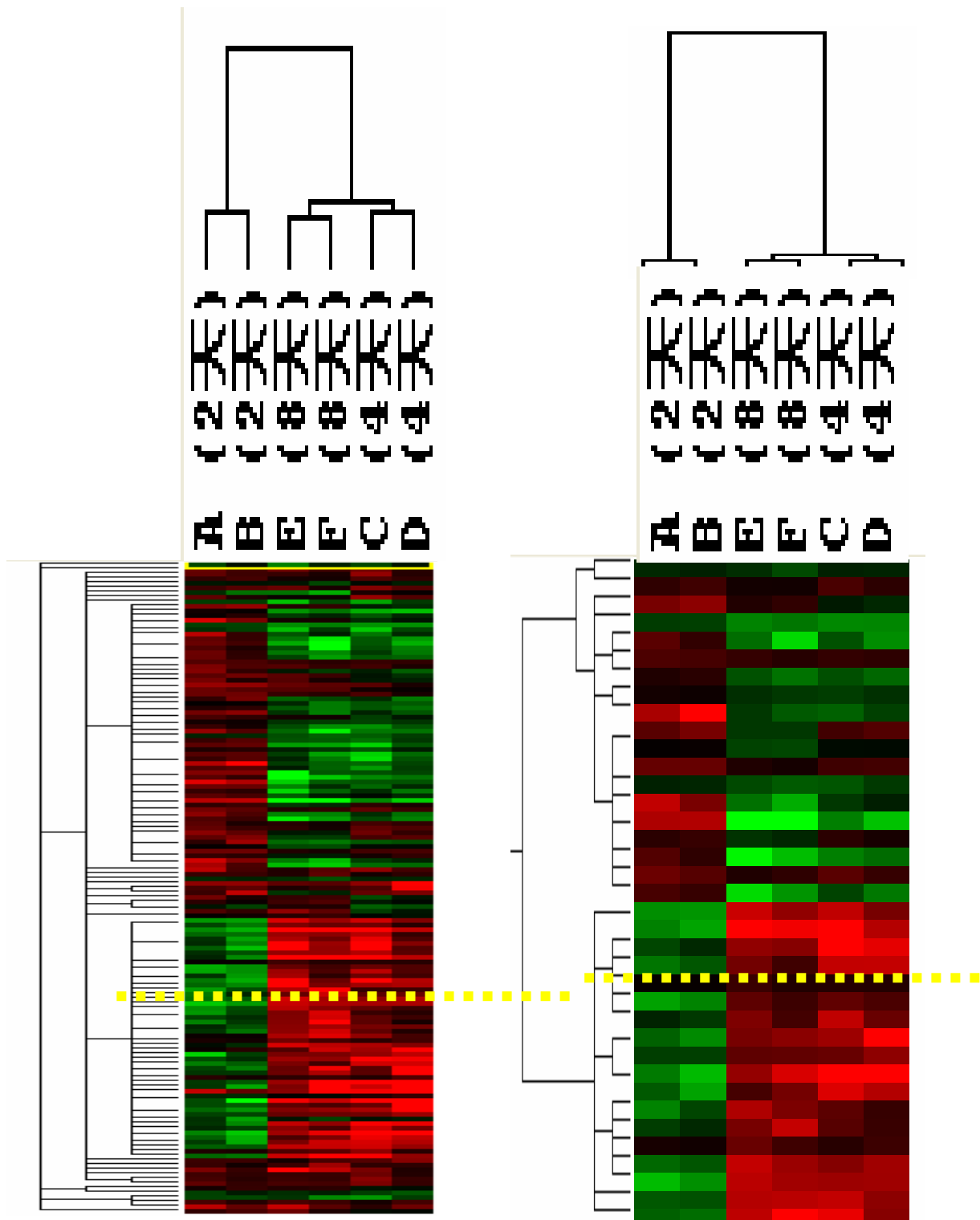


圖 9 左圖為依照篩選出來的 141 種基因進行階層式群集分析 (Hierarchical Clustering Analysis) 所得到的結果。右圖為依照更嚴格的標準篩選出來的 37 種基因進行階層式群集分析所得到的結果。

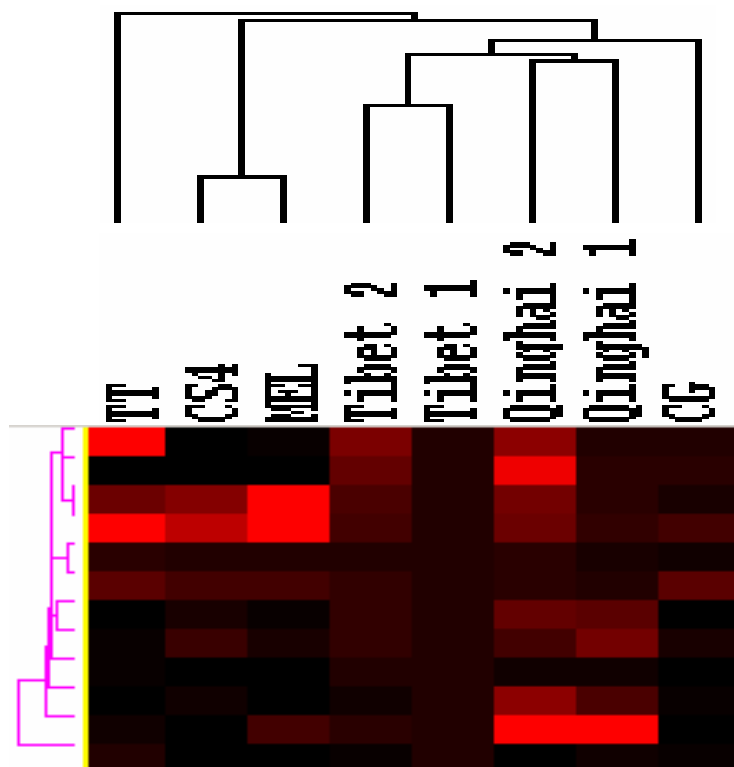


圖 10 依據各種冬蟲夏草樣本微量元素相對含量進行階層式群聚分析所得到的結果。

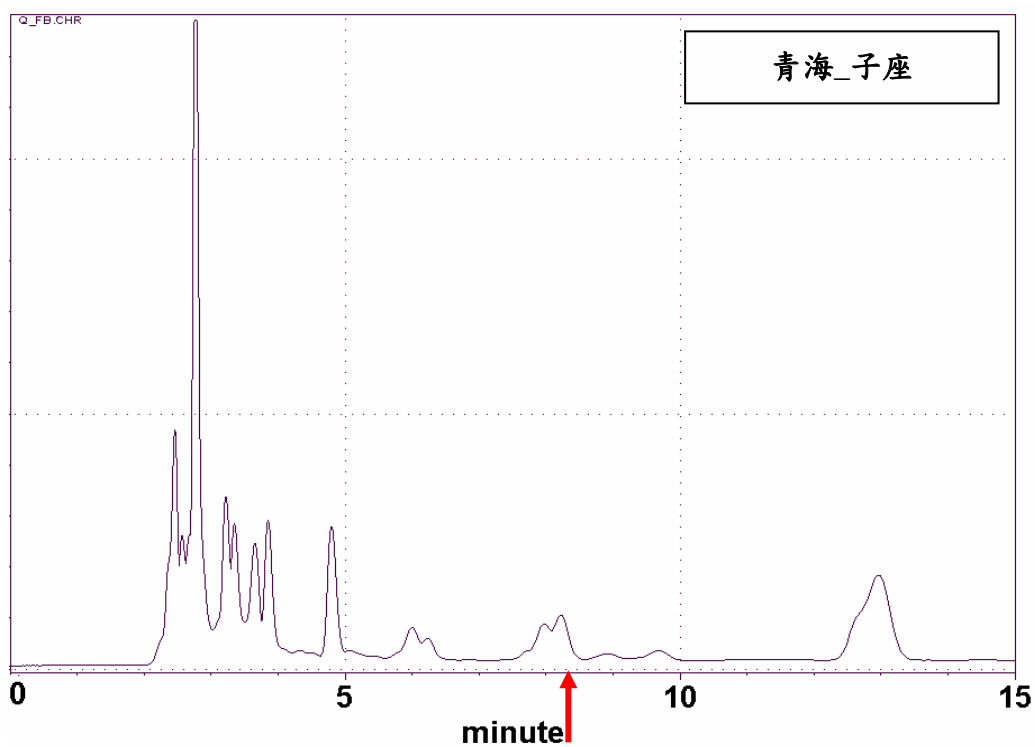


圖 11 青海冬蟲夏草子座之 HPLC 圖譜。

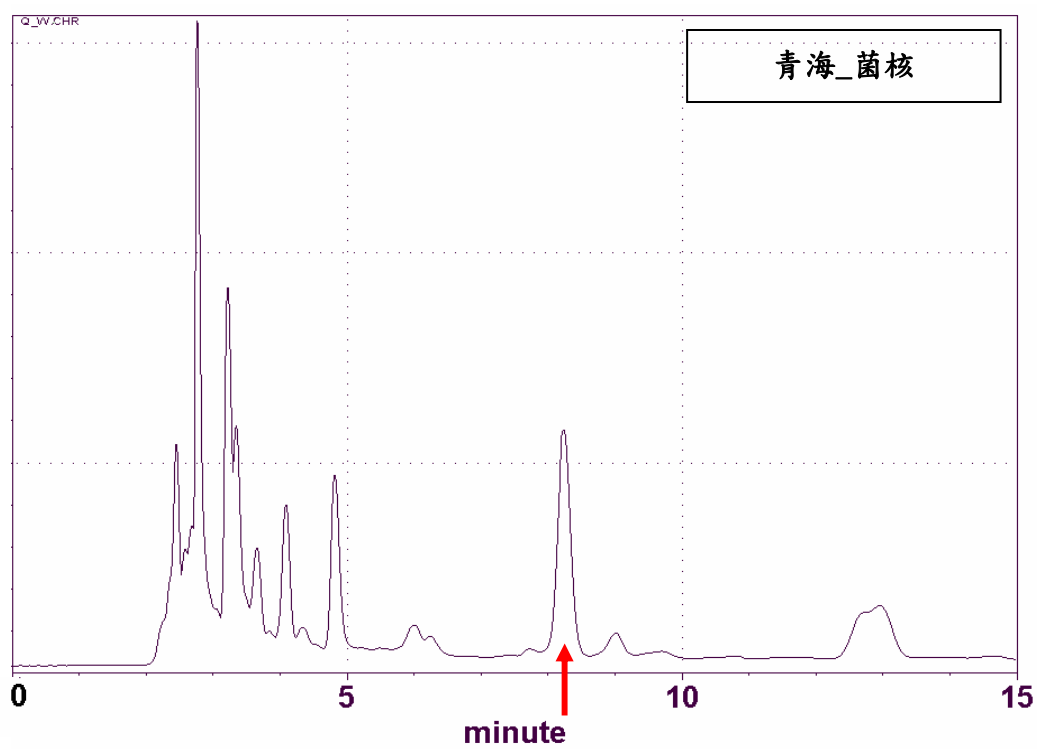


圖 12 青海冬蟲夏草菌核之 HPLC 圖譜。

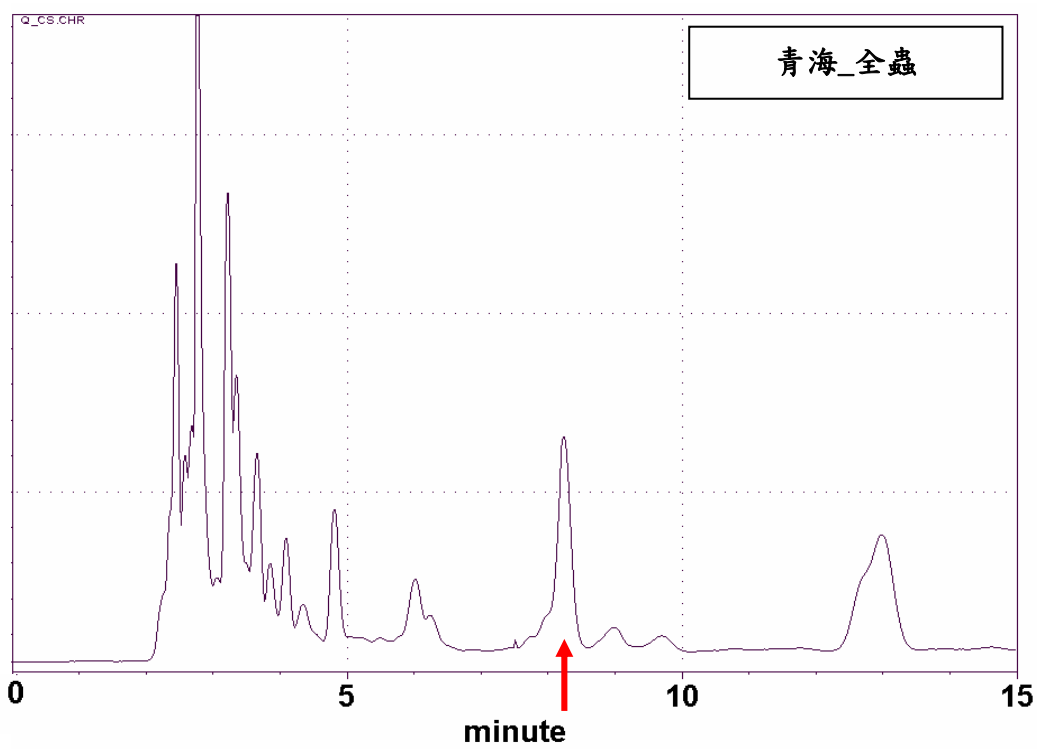


圖 13 青海冬蟲夏草全蟲之 HPLC 圖譜。

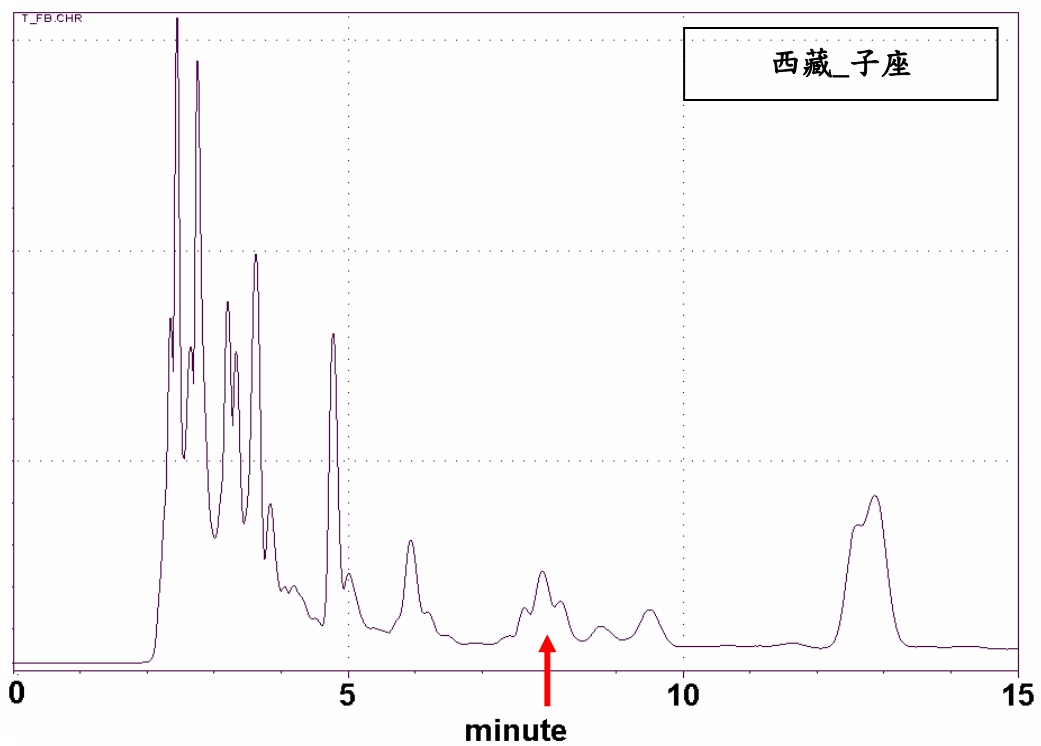


圖 14 西藏冬蟲夏草子座之 HPLC 圖譜。

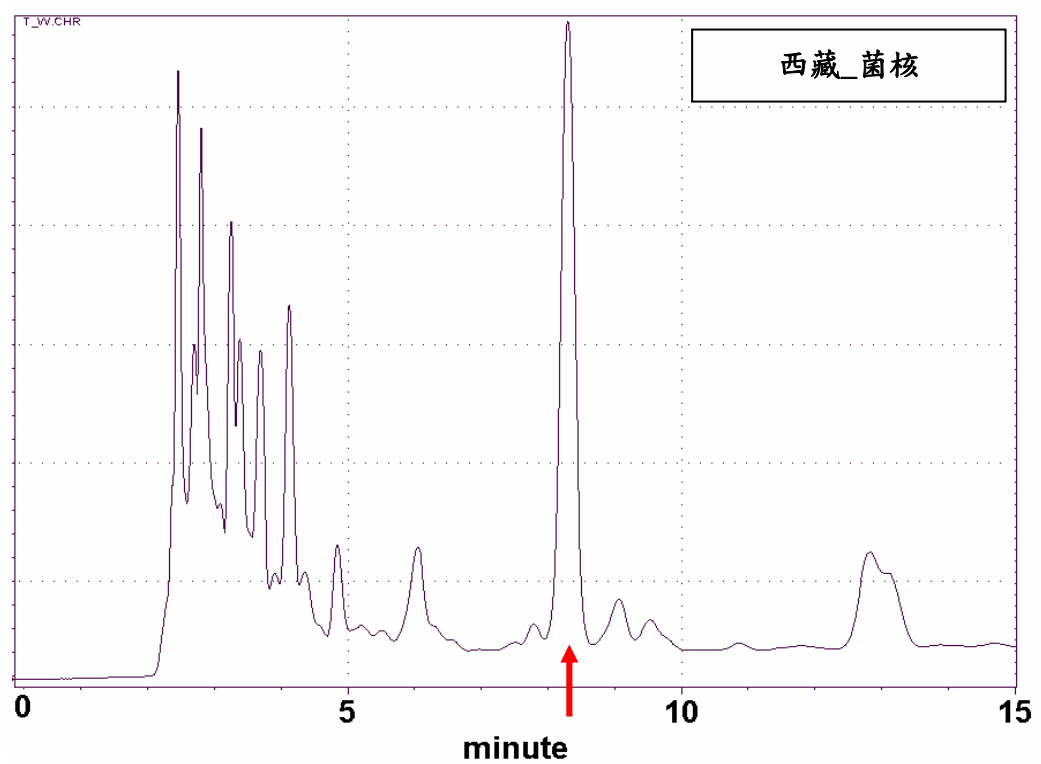


圖 15 西藏冬蟲夏草菌核之 HPLC 圖譜。

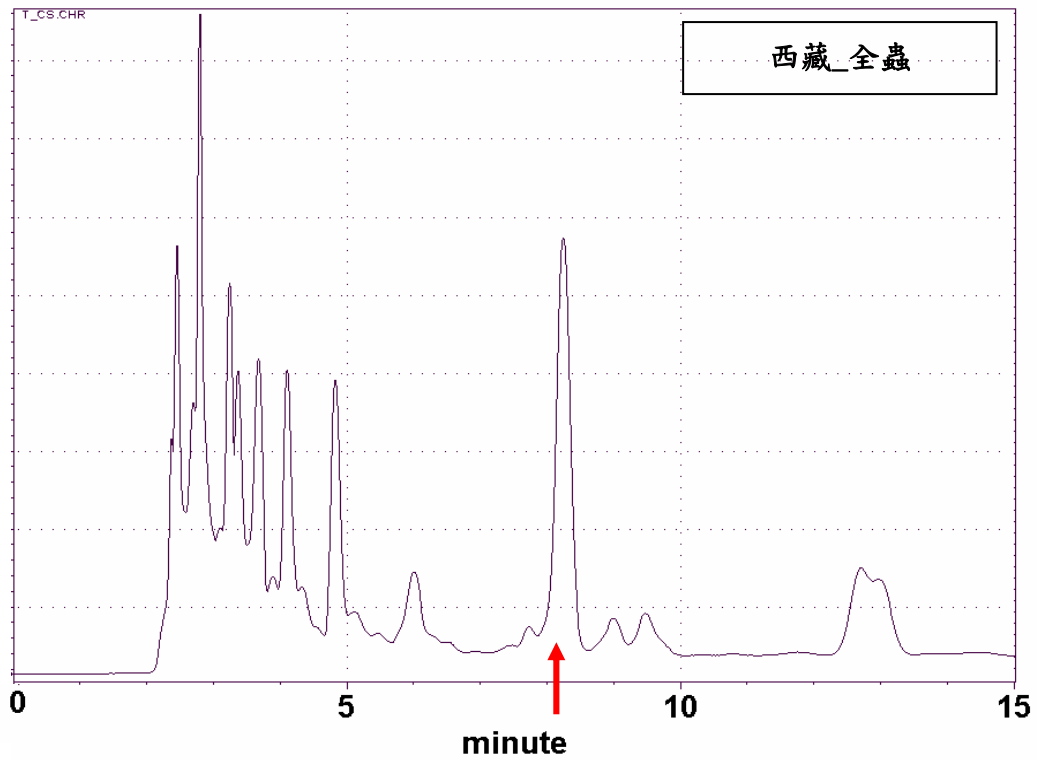


圖 16 西藏冬蟲夏草全蟲之 HPLC 圖譜。

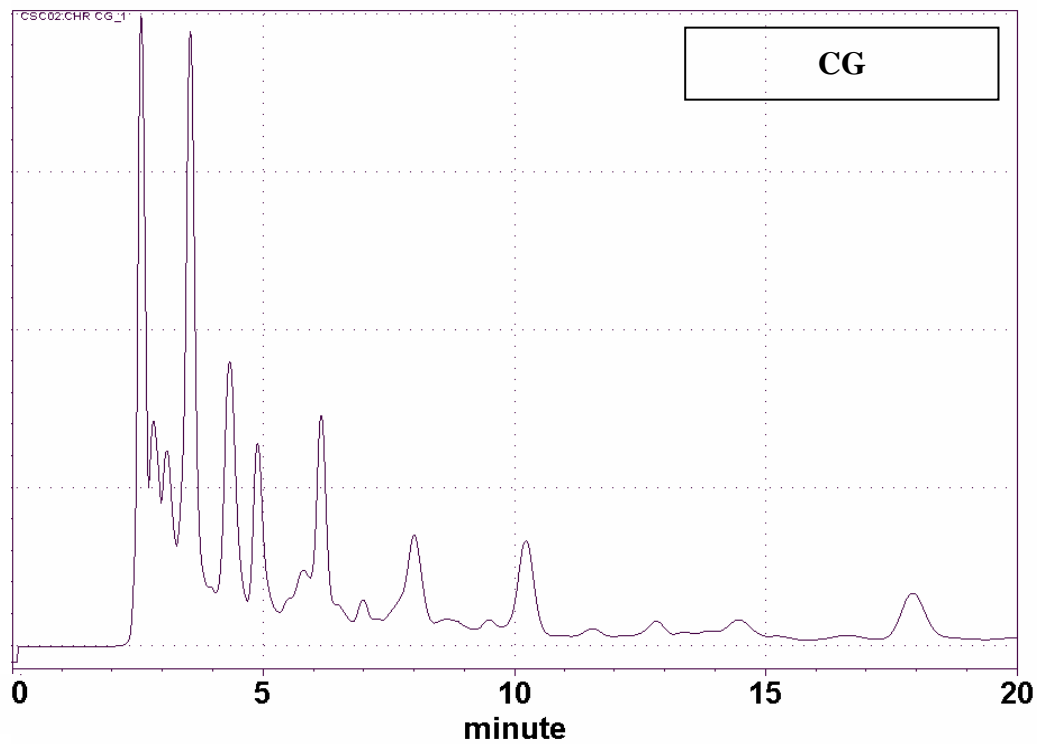


圖 17 CG 公司冬蟲夏草菌絲體產品之 HPLC 圖譜。

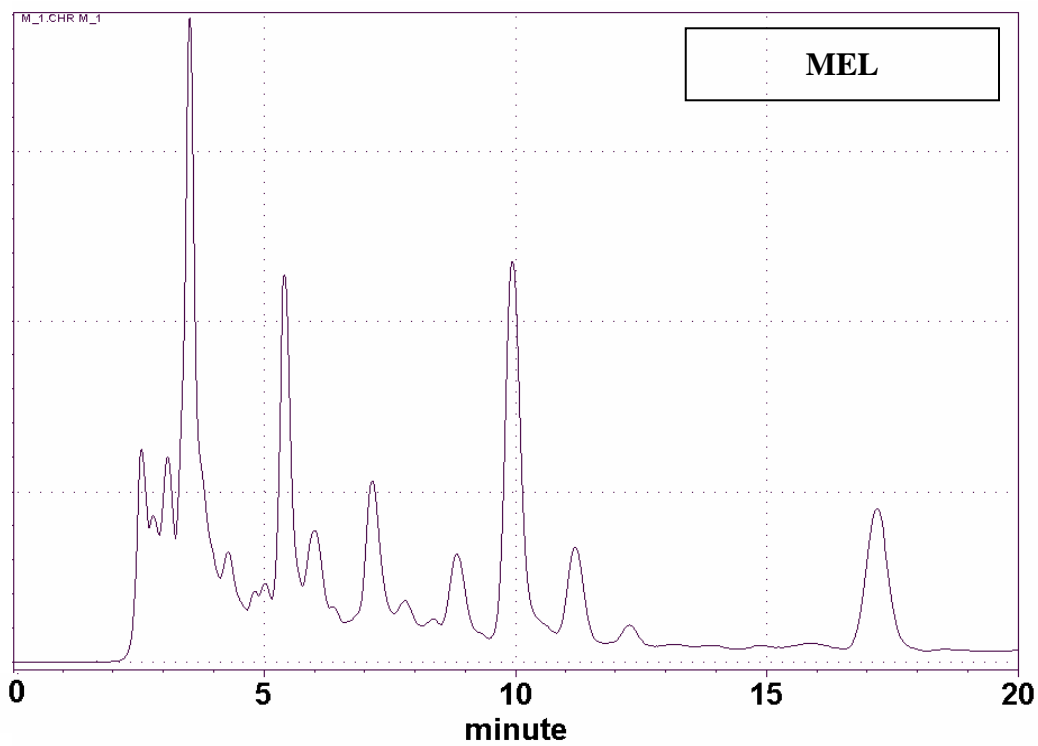


圖 18 MEL 公司冬蟲夏草菌絲體產品之 HPLC 圖譜。

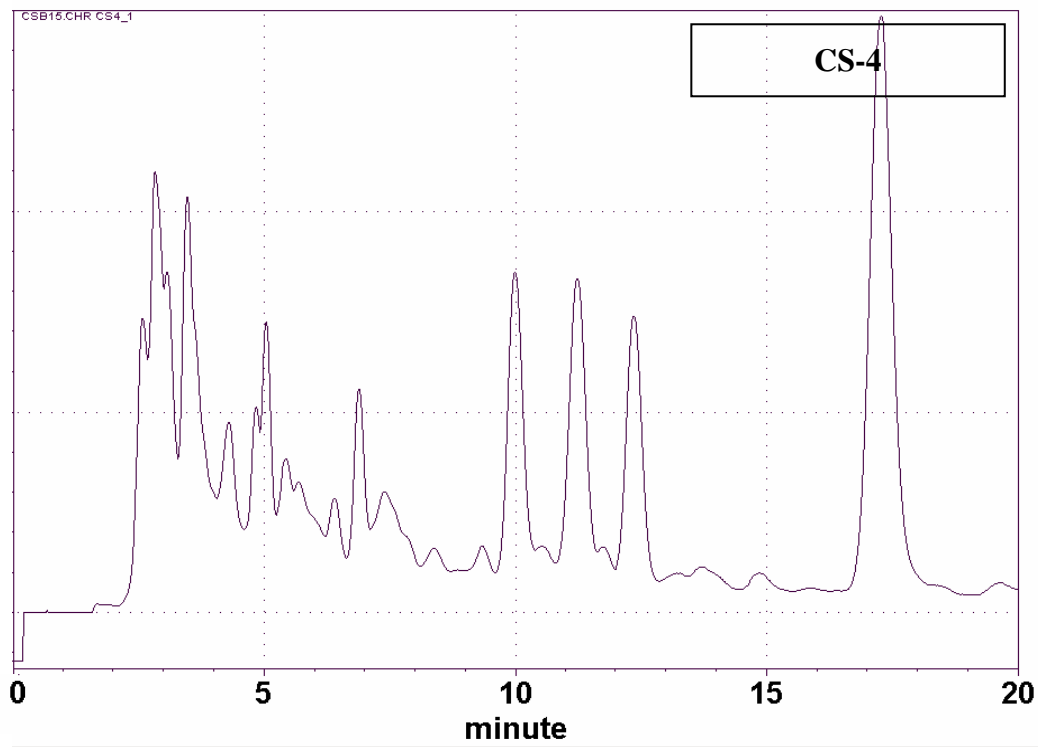


圖 19 CS-4 公司冬蟲夏草菌絲體產品之 HPLC 圖譜。

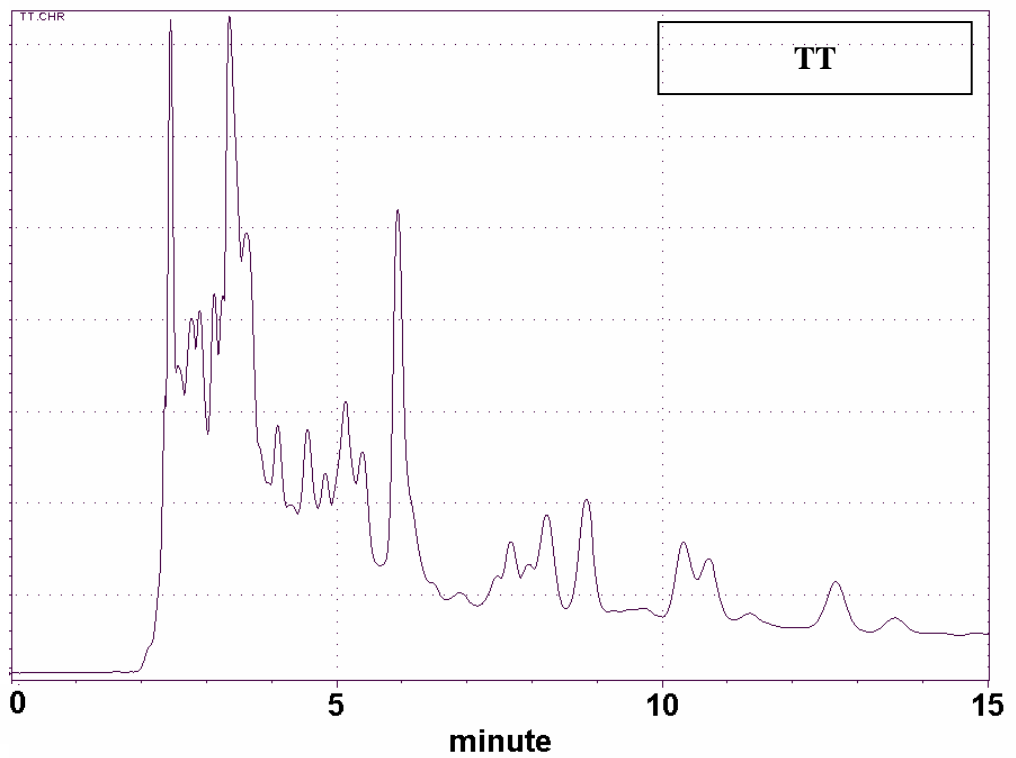


圖 20 TT 公司冬蟲夏草菌絲體產品之 HPLC 圖譜。

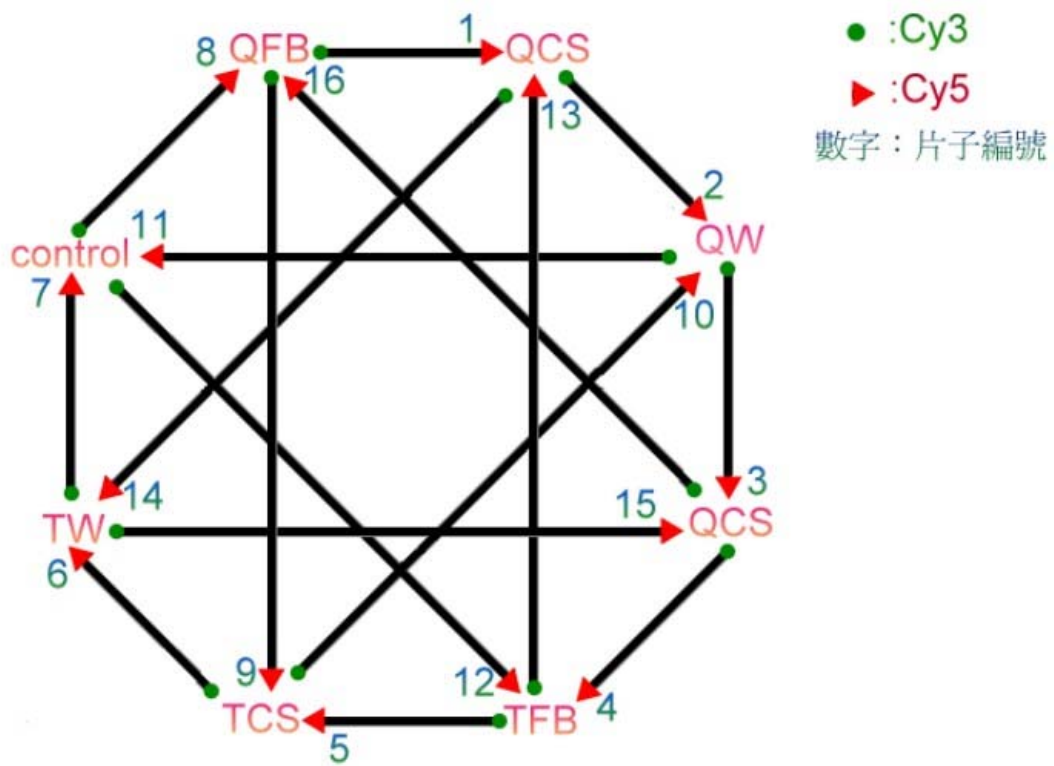


圖 21 冬蟲夏草微陣列實驗的迴圈設計圖，總共有 8 個實驗點以及使用 16 片晶片。

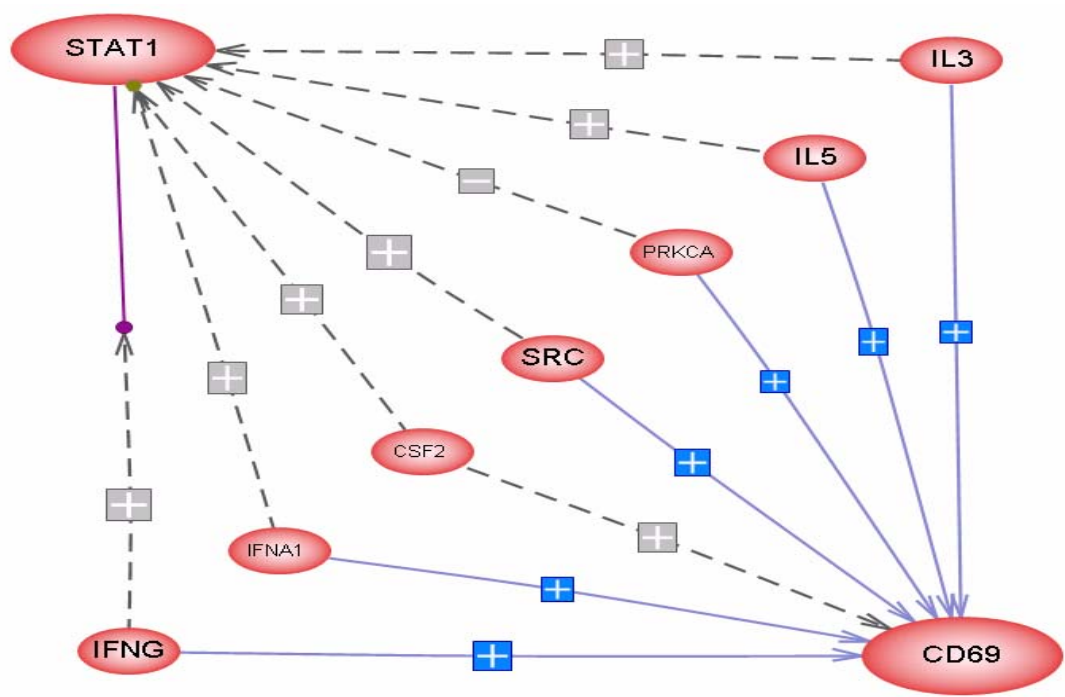


圖 22 STAT1 及 CD69 這兩種基因的表現同時受到七種基因的調控。

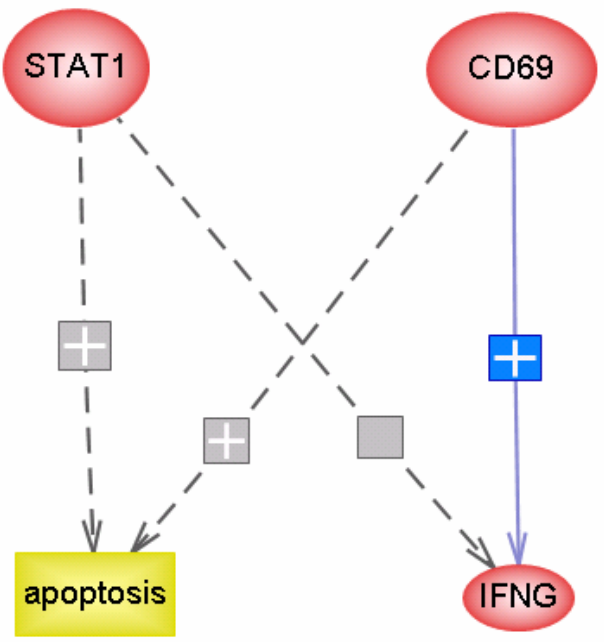


圖 23 STAT1 及 CD69 這兩種基因同時調控細胞凋亡的現象及 IFNG 基因的表現。

表 1 天然冬蟲夏草以及冬蟲夏草菌絲體的微量元素含量表。

Element	Conc. (ug/g)							
	Tibet 1	Qinghai 1	Tibet 2	Qinghai 2	CG	MEL	CS-4	TT
Na	457.25	1707.00	428.89	1838.16	516.92	211.86	<0.00031	8417.82
K	6293.29	9020.00	7166.67	7789.47	1677.02	12304.03	12271.24	16683.91
Ca	353.35	667.00	512.22	1151.32	718.34	3106.99	1925.93	3595.40
Mg	1320.35	1500.00	1400.00	10355.26	1473.80	1673.73	1568.63	3632.18
Fe	209.96	304.00	722.22	428.95	158.84	179.56	349.67	51.72
Al	242.42	349.00	651.11	719.74	19.65	84.22	216.23	37.36
Mn	35.17	9.00	23.33	7.89	10.14	3.71	5.99	36.21
As	1.96	5.75	2.65	13.45	2.65	0.31	0.32	0.43
Cr	0.28	0.35	5.35	2.72	<0.024	0.60	<0.024	0.15
Cu	9.21	8.96	7.80	11.46	4.76	9.15	10.64	12.40
Pb	0.28	0.13	0.60	1.12	0.12	<0.0046	0.17	<0.0049
Sr	1.55	3.41	2.13	5.34	1.41	12.72	5.90	4.89
Zn	127.71	124.80	76.11	62.37	26.36	8.42	10.13	31.03

表 2 以 Tibet 1 冬蟲夏草樣本各種微量元素含量當作 1，其他冬蟲夏草樣本所測出的微量元素含量都與 Tibet 1 比較，得到的微量元素相對含量表。

Element	Conc. (ug/g)							
	Tibet 1	Qinghai 1	Tibet 2	Qinghai 2	CG	MEL	CS-4	TT
Na	1.00	3.73	0.94	4.02	1.13	0.46	0	18.41
K	1.00	1.43	1.14	1.24	2.67	1.96	1.949893	2.65
Ca	1.00	1.89	1.45	3.26	2.03	8.79	5.4504	10.18
Mg	1.00	1.14	1.06	7.84	1.12	1.27	1.188042	2.75
Fe	1.00	1.45	3.44	2.04	0.76	0.86	1.665454	0.25
Al	1.00	1.44	2.69	2.97	0.08	0.35	0.891953	0.15
Mn	1.00	0.26	0.66	0.22	0.29	0.11	0.170337	1.03
As	1.00	2.94	1.36	6.88	1.36	0.16	0.16346	0.22
Cr	1.00	1.23	18.78	9.55	0.00	2.10	0	0.53
Cu	1.00	0.97	0.85	1.24	0.52	0.99	1.155739	1.35
Pb	1.00	0.47	2.17	4.06	0.44	0.00	0.612901	0.00
Sr	1.00	2.21	1.38	3.46	0.91	8.22	3.816875	3.16
Zn	1.00	0.98	0.60	0.49	0.21	0.07	0.079329	0.24

表 3 cDNA 微陣列實驗數據經過迴圈設計的計算後得到的 lambda 值。每一種基因有 8 個 lambda 值，分別代表在 8 種樣本中此基因表現量相對於標準值的差異。

No.	lambda 1	lambda2	lambda3	lambda4	lambda5	lambda6	lambda7	lambda8
2	0.01395	-0.02219	-0.00075	0.005678	0.010905	0.006715	0.002863	-0.01717
3	-0.05339	0.093222	0.140784	0.176181	-0.1376	-0.07098	-0.0812	-0.06701
4	-0.12306	0.013287	0.034455	0.003959	0.052678	0.008156	0.06426	-0.05374
5	0.091135	-0.02239	0.0115	0.020914	-0.05278	-0.03928	0.038061	-0.04716
8	0.136784	-0.02888	0.050538	-0.05327	-0.14668	-0.02827	0.067589	0.002191
9	0.142435	-0.02539	-0.06182	-0.0435	-0.02899	0.020027	0.063006	-0.06576
15	-0.09438	-0.00974	0.042523	0.012105	-0.04209	-0.00408	0.130189	-0.03453
16	0.075091	-0.01441	-0.04033	-0.00409	-0.09633	0.026102	0.075708	-0.02174
17	0.043928	-0.03165	0.008796	-0.00835	-0.03236	0.009524	0.051114	-0.041
18	0.175161	-0.01826	-0.01725	0.006004	0.019661	0.054403	0.054849	-0.27457
19	-0.04057	-0.01454	-0.08113	0.002339	0.068955	0.130529	-0.02976	-0.03582
20	0.01391	-0.10167	0.002621	0.038957	0.009621	-0.00304	0.060879	-0.02128
21	0.064561	-0.06924	-0.0735	-0.04228	0.053276	0.035982	0.067127	-0.03592
24	-0.06027	-0.0666	-0.08995	-0.04949	0.04771	0.097321	0.063447	0.05783
25	0.051245	-0.05972	0.003092	-0.07479	0.049236	-0.01095	0.036967	0.004923
26	-0.00367	-0.04321	-0.01049	0.009861	0.026001	0.058972	0.00876	-0.04621
27	-0.02694	-0.04661	-0.02107	-0.03503	-0.04314	0.117866	0.080088	-0.02516
29	0.090792	-0.05656	-0.03497	0.006564	-0.05884	-0.00364	0.017289	0.039375
30	-0.09558	0.22753	-0.06799	-0.01889	-0.16642	-0.16682	0.261057	0.027111
31	-0.50403	0.133602	0.1455	-0.00186	-0.23552	-0.34139	0.607623	0.19608
32	-0.00071	-0.01297	-0.03246	-0.02842	-0.06646	0.034876	0.065842	0.040309
33	-0.00401	-0.02028	-0.00304	-0.01489	-0.07739	0.045641	0.032848	0.041119
34	-0.04131	-0.0044	-0.01505	-0.02981	0.087269	0.0746	-0.02282	-0.04848
35	0.179978	-0.04542	-0.04542	-0.02072	-0.09764	0.014841	-0.01148	0.02586
36	0.007238	-0.04351	-0.02283	0.049291	0.031757	-0.0263	0.006842	-0.00248
37	-0.00738	-0.00627	-0.05949	0.019122	-0.05067	0.007246	0.086164	0.011273
40	0.038996	-0.038	0.001149	-0.00546	0.015162	0.02069	0.03887	-0.0714
41	0.029604	-0.01665	-0.01186	-0.03394	-0.02179	0.030418	0.060828	-0.03661
43	-0.06333	0.001859	0.036638	0.02629	0.010195	-0.01316	-0.02716	0.02866
44	-0.09724	-0.0039	-0.02807	0.009095	-0.04286	0.090528	0.026846	0.045611
45	0.030119	-0.0474	0.048776	0.032698	0.138535	-0.0161	-0.16892	-0.01771
46	-0.09614	0.080759	0.065774	0.130848	-0.14075	-0.03742	-0.03253	0.029469
47	0.159354	-0.02841	-0.06102	-0.07529	-0.04976	0.005876	0.07403	-0.02479
48	-0.05257	0.067565	0.030126	0.042424	-0.10351	-0.07864	0.1129	-0.01829

表 4 cDNA 微陣列實驗數據經過迴圈設計的計算後得到的 lambda 值。經由不同樣品 lambda 值相減可以得到在不同樣本中基因表現量的差異。

No.	lambda3 - lambda8	lambda4 - lambda8	lambda7 - lambda8	sigma
2	0.016411263	0.022843446	0.02002822	0.11542102
3	0.207792388	0.243189768	-0.014191095	0.14891252
4	0.088192471	0.057696621	0.11799739	0.090378317
5	0.058655981	0.068070458	0.085217245	0.10562803
8	0.048346987	-0.05546374	0.065397282	0.13587682
9	0.003940787	0.022256837	0.128766583	0.10690007
15	0.077055056	0.046636828	0.164721172	0.16857306
16	-0.018598153	0.017643037	0.097443558	0.14283603
17	0.049796665	0.032651889	0.092114586	0.090327026
18	0.257316371	0.28057176	0.32941613	0.13802878
19	-0.045312195	0.038160878	0.006066636	0.13833277
20	0.02390317	0.060239506	0.082160964	0.1232515
21	-0.037582345	-0.006361502	0.103046933	0.090437053
24	-0.147775506	-0.107318418	0.005617132	0.118107
25	-0.00183083	-0.079710454	0.032044209	0.15667152
26	0.035720015	0.056073054	0.054972515	0.11855656
27	0.004096006	-0.009865782	0.105251554	0.21498889
29	-0.074347993	-0.032811488	-0.022086441	0.11108836
30	-0.095101083	-0.045998511	0.233945782	0.2758819
31	-0.050579468	-0.197943016	0.411542962	0.63430612
32	-0.072774073	-0.068733541	0.025532266	0.12600236
33	-0.044161966	-0.056005294	-0.00827058	0.14766404
34	0.033428265	0.018668196	0.025665307	0.23487314
35	-0.071277769	-0.046579015	-0.037343838	0.12880501
36	-0.020352271	0.051772075	0.009323469	0.17532889
37	-0.070763806	0.007849413	0.074891226	0.11684575
40	0.072553537	0.065941293	0.110274536	0.14812448
41	0.024746112	0.002666522	0.097435537	0.16258155
43	0.007977959	-0.002370197	-0.055818321	0.09959585
44	-0.073685082	-0.036516172	-0.018764965	0.16729994
45	0.066481495	0.05040355	-0.151212599	0.33522601
46	0.036305098	0.101379629	-0.062001341	0.15233269
47	-0.03622834	-0.050499013	0.098817864	0.1166635
48	0.048416398	0.06071404	0.131189841	0.22010805

表 5 經由進一步的篩選之後得到 20 種基因為冬蟲夏草的初步標記基因。

No.	Hs. Number	Gene Name	lambda 3 - lambda 8	lambda 4 - lambda 8	lambda 7 - lambda 8	sigma
134	Hs.155376	HBB	0.403986705	0.431851944	0.292204531	0.115023
173	Hs.82401	CD69	1.094505882	1.127544892	0.443303072	0.233879
492	Hs.102419	ZNF593	0.525622141	0.758516461	0.680947931	0.144739
1016	Hs.296365	ZNF324	0.891247291	0.634611117	0.808194571	0.257968
1910	Hs.473191	(Not Found)	0.530226585	0.314764225	0.311684025	0.258415
2176	Hs.267819	PPP1R2	-0.737839368	-0.76883885	-0.72970473	0.099678
2226	Hs.79022	GEM	0.42651843	1.55675249	0.39577885	0.355651
2250	Hs.369815	NKTR	0.53729073	0.853813989	1.26925091	0.10534
2732	Hs.21486	STAT1	0.335987641	0.456398674	0.366020435	0.126887
2745	Hs.416089	ARFIP1	-0.329920046	-0.29529611	-0.38138721	0.156526
3339	Hs.45719	PPP1R12B	-0.433943732	-0.4052458	-0.63831832	0.115045
3725	Hs.91566	PL6	-0.407941533	-0.33678295	-0.30814488	0.16316
3934	Hs.106534	FLJ22625	0.562741153	0.480453527	0.613403053	0.159363
4165	Hs.444776	PTE1	-0.591243429	-0.61065851	-0.47449058	0.126767
4184	Hs.116014	LOC387980	-1.170363181	-1.20171631	-0.87879423	0.062658
4386	Hs.434432	KIAA0317	-0.309758889	-0.28416769	-0.36477441	0.12178
4841	Hs.511916	ENSA	-0.349238324	-0.3442659	-0.44596682	0.121134
5050	Hs.343522	ATP2B4	0.916891831	1.020813351	1.577640911	0.474055
5735	Hs.3737	RBM16	-0.39273992	-0.44947826	-0.52217016	0.189883
5952	Hs.11465	GSTO1	0.454526537	0.395174286	0.502508023	0.230528