

編號：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總報告

許志樞

國立清華大學

### 摘要

本三年計畫的目標為建立一個整合性的指紋圖譜平台（Integrated fingerprinting platform）來作為中草藥標準化的依據。首先，我們使用分子基因圖譜分析（Molecular genetic fingerprint）來確定中草藥樣本冬蟲夏草的菌種。接著，利用一連串的化學分析來建立冬蟲夏草樣本的有機及無機化學指紋圖譜（Chemical fingerprint），以檢測冬蟲夏草樣本間化學成分的相似程度以及評估食用冬蟲夏草安全性。最後，我們進行了迴圈設計（Loop design）的微陣列實驗，並以統計的方法來分析冬蟲夏草的微陣列指紋圖譜（Microarray fingerprint）。此微陣列實驗的結果並進一步的以統計方法以及同步定量聚合反應（Real-time quantitative PCR）來驗證。我們也篩選出冬蟲夏草的標記基因並探討其可能的藥理機制。在此，我們證實了：一個經過嚴謹設計並驗證過的 cDNA 微陣列技術平台，可以有效的區分出化學成分十分類似的中草藥樣本。這個整合性的指紋圖譜平台可以作為研究中草藥的標準化的流程，並且可作為將來中醫藥臨床研究的參考。

關鍵詞：冬蟲夏草、cDNA 微陣列、分子基因圖譜、化學指紋圖譜、標記基因

Number: CCMP92-RD-116、CCMP93-RD-105

# Constructing a Chinese Medicine Molecular Analysis Platform by Utilizing cDNA Microarray

Jih-Yang Hsu

National Tsing-Hua University

## ABSTRACT

In this three-year study, we aim to develop a standardization protocol for the study of Chinese herbal formulas by integrating three fingerprinting platforms. First, we performed molecular genetic fingerprinting study to assure the authenticity of *C. sinensis* samples. Then, a series of organic and inorganic chemical fingerprinting analysis were carried out to monitor the similarity of chemical profiles between samples and to evaluate the safety of *C. sinensis* raw material. Finally, a set of loop-design microarray experiments was conducted and microarray fingerprints of various *Cordyceps* samples were analyzed by statistical calculation. The quality of microarray data was confirmed by both statistical methods and real-time PCR experiment. Specific *C. sinensis* marker genes are identified and the underlying pharmacological mechanisms are discussed. Here, we further demonstrated that a carefully designed and validated microarray fingerprinting platform is able to molecularly differentiate distinct *C. sinensis* samples with minute chemical differences. This integrated fingerprinting platform could be implemented to the standardization as well as the future *in vivo* study on traditional Chinese herbal formulas.

Keywords : *Cordyceps sinensis*, cDNA microarray, molecular genetic fingerprinting, chemical fingerprinting, marker genes, standardization

## 壹、前言

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。由於醫學科技的進步，中醫藥科學化已經是時代的趨勢。本計畫之目的即是要利用 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，以及所應用的統計分析方法) 一一加以研究。

本計畫第一年的研究中，我們已經利用分子基因圖譜 (Molecular Genetic Fingerprint) 鑑定出冬蟲夏草的菌種。此外，也初步以高效液相層析法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 以及感應耦合電漿質譜儀 (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer, ICPMS) 來偵測冬蟲夏草所含的有機與無機化學成分。本計畫第二年的研究利用 cDNA 微陣列技術篩選出青海及西藏出產的天然冬蟲夏草之標記基因。此外，也依據 cDNA 微陣列的結果重新檢討並改進有機與無機化合物標準化的流程。在本計畫第三年的研究中，我們依據之前的結果進行更深入的有機化學圖譜分析，並篩選出 15 個 HPLC 的主要波峰作為區分不同樣本間的化學指紋圖譜 (Chemical Fingerprints)。此外，我們利用統計分析的方法進一步分析 cDNA 微陣列的結果，以更嚴謹的定義歸納出冬蟲夏草的標記基因，並利用此微陣列指紋圖譜 (Microarray Fingerprints) 來鑑別不同萃取部位與不同產地樣品之間的相似程度。為了驗證 cDNA 微陣列的結果，我們進行同步定量聚合鏈反應 (Real-time quantitative PCR)，並以統計方法來比較此兩種技術所測得的結果之間的一致性。

在這三年的計畫中，我們利用分子基因圖譜、化學指紋圖譜、以及微陣列指紋圖譜，將中草藥冬蟲夏草做詳細的分析。主要的目的有二：一、利用 cDNA 微陣列技術鑑別出冬蟲夏草的標記基因與探討其可能的藥理機制。二、建立一個整合性的指紋圖譜平台 (Integrated Fingerprinting Platform)，希望提供作為將來中草藥標準化的參考。

## 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）。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。本研究的協同主持人--台灣大學許瑞祥教授進行了冬蟲夏草樣本的菌種鑑定。許瑞祥教授實驗室採用 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，我們依 18S rRNA 基因的序列來界定冬蟲夏草樣本是否為中國被毛孢。

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 $\mu$ m 的濾膜過濾後再使用 0.22 $\mu$ m 的濾膜過濾。把過濾後的冬蟲夏草萃取液分裝至 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) 紫外光/可見光光譜儀分析

我們使用 HITACHI 雙光束全自動掃描紫外光/可見光分光光譜儀來進行冬蟲夏草萃取液的吸收光譜掃描。掃描的範圍從波長 190nm 到 1,100nm。因為冬蟲夏草萃取液對上述範圍的光波只有在紫外光有吸收波峰（如圖 1），所以在本研究報告中只有顯示 220nm 到 370nm 範圍內的吸收圖。

### (二) 高效液相層析儀分析（HPLC）

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。

高效液相層析法的分析是使用 HITACHI L-2130 的幫浦及使用 HITACHI L-7400 的紫外光偵測器。分離管柱為 VERCOPAK 公司的 Inertsil 7 ODS-3 C18 (4.6mm x 250mm, 5 $\mu$ m 粒徑)。移動相使用 20mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，流速為每分鐘 1mL。我們取 20 $\mu$ L 的冬蟲夏草萃取液注入 HPLC 分析儀內並分別以 230nm、260nm 以及 310nm 等三個紫外光波長來偵測冬蟲夏草萃取液內所含的有機化合物圖譜。

### (三) 感應耦合電漿質譜儀分析（ICP-MS）

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感應耦合電漿質譜儀，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，與感應耦合電漿質譜儀之快速、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。

#### (四) 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。

### 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，經振盪後離心。加入 0.2mL Chloroform，振盪後離心 13,000rpm 20 分鐘 ( $4^{\circ}C$ )。取出上清液至於新的 1.5mL eppendorf 管內，加入 0.5mL Isopropanol，混合均勻後離心 13,000rpm 30 分鐘 ( $4^{\circ}C$ )，去除上清液。加入 1mL 75%酒精清洗，離心 13,000rpm 10 分鐘 ( $4^{\circ}C$ )，去除上清液並將沉澱物乾燥。加入 10 $\mu$ 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  $\mu$ 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  $65^{\circ}C$  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璃片上。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，經過清洗除去未參與雜合反應的標的物。本研究利用 Axon 4000B 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)。

#### 四、同步定量聚合鏈反應分析

本研究的同步定量聚合鏈反應是委請：基因體醫學國家型科技計畫-微陣列及基因表現分析核心實驗室來執行，使用的儀器為 ABI Prism 7900-HT。實驗所使用的試劑為直接向 ABI 公司訂購的 TaqMan AOD probe set。實驗過程是依據 ABI 公司所提供的條件來進行同步定量聚合鏈反應。

## 參、結果

### 一、冬蟲夏草樣本的分子基因圖譜分析

經由外觀以及組織學上的辨認，目前有大於 400 種真菌被歸類於蟲草屬(*Cordyceps* spp.)。由於冬蟲夏草是一種珍貴的中藥材，因此市面上可發現贗品以及其他同屬的真菌類蟲草，以「冬蟲夏草」之名販售。為了證實本實驗所使用的樣本為真實的冬蟲夏草，我們同時進行了兩項驗證：(一)請本研究的協同主持人：中國醫藥大學張永勳所長協助做外觀以及組織學上的辨認。(二)請本研究的協同主持人：台灣大學許瑞祥教授進行分子基因圖譜的鑑定(如圖 2)。兩項結果均確認本實驗所用的樣本的確是真的冬蟲夏草：*Cordyceps sinensis*。

### 二、冬蟲夏草樣本的化學圖譜分析

#### (一)無機化學圖譜鑑定

本研究的協同主持人：清華大學楊末雄教授以感應耦合電漿質譜儀量來測冬蟲夏草樣本的微量金屬含量。實驗樣本為青海以及西藏冬蟲夏草粉末，總共偵測 13 種不同的微量元素，其中包含 11 種必須微量元素(Na, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cr, Cu, Ni, Sr, Zn)以及 2 種毒性微量元素(As 與 Pb)。實驗結果如表 1，冬蟲夏草含有數種高量的必須微量元素：K、Mg、Fe、Na、Ca、Al 與 Zn。Ni、Cr 與 Sr 的含量則相對較少。毒性微量元素 As 與 Pb 的含量都非常低，仍在安全的範圍內(衛生署尚未建立冬蟲夏草所含毒性重金屬元素的最高限量)。

#### (二)有機化學圖譜鑑定

我們將樣本依據產地以及部位進一步區分為：青海子座(QFB)、青海蟲體(QW)、青海全蟲(QCS)、西藏子座(TFB)、西藏蟲體(TW)及西藏全蟲(TCS)等 6 種。蟲體的頭部因為包含有子實體與蟲體，所以被去除，不屬於上述的任何樣品之中。這些樣本經過研磨成細粉後以 90°C 的高溫水萃 2 小時，取得冬蟲夏草萃取液來進行一系列的實驗。

為了先初步觀察冬蟲夏草樣本萃取液的大略有機化合物在紫外光與可見光波長範圍的吸收狀況，我們使用紫外光/可見光光譜儀來做全波長掃描。所得的結果如圖 1 所示，冬蟲夏草萃取液只有在紫外光波長範圍內有吸收。因此，接下來的光譜圖只有

在紫外光波長範圍 220nm 到 370nm。如圖 3 與圖 4 所示，冬蟲夏草子實體（包含青海 QFB 以及西藏 TFB）有兩個主要吸光波峰，分別為 260nm 以及 310nm。冬蟲夏草蟲體（包含青海 QW 以及西藏 TW）則只有一個主要吸光波峰，為 260nm。因為全蟲包含子實體與蟲體兩個部分，因此在 260nm 以及 310nm 都有主要吸光波峰，但其 310nm 的主要吸光波峰高度則明顯低於子實體。此結果顯示子實體所含的化合物與蟲體所含的化合物，並不完全相同。

為了進一步分析冬蟲夏草萃取液的有機化合物圖譜，我們進行了 HPLC 的分析。參考自紫外光吸收光譜的結果，我們選取 230nm、260nm 以及 310nm 波長的吸收來偵測其 HPLC 層析圖。230nm 的 HPLC 層析圖顯示(圖 5 - 圖 6):在滯留時間(Retention time)第 10 分鐘時蟲體萃取液(QW 與 TW)有一明顯的吸收波峰，而子實體萃取液(QFB 與 TFB)只有一小吸收波峰。蟲體、子實體與全蟲萃取液在 260nm 的 HPLC 層析圖(圖 7 - 圖 8)則並無明顯差異。310nm 的 HPLC 吸收圖譜(圖 9 - 圖 10)顯示:在滯留時間第 9.3 分鐘時子實體萃取液有一個明顯的主要吸收波峰，其大小約為 500 到 800mV。而在蟲體 310nm 吸收圖譜的相對位置只有一個小吸收波峰，其大小只有 50mV 左右。這個結果證實了前述紫外光吸收光譜的結果，並且進一步指出子實體與蟲體在 310nm 的吸收差異，主要源自於單一個吸收波峰。從這個吸收波峰的完整性來判斷，這可能是單一種有機化合物。綜合這三種不同波長的 HPLC 層析圖，除了以上所指出的明顯差異之外，蟲體、子實體與全蟲萃取液的 HPLC 層析圖間並無十分顯著的不同。從巨觀而言，要分辨出這 6 種冬蟲夏草萃取液的有機化學圖譜的異同，並不容易。因此，我們將上述 3 種不同波長的 HPLC 吸收圖譜做一綜合分析。從這些吸收波峰中，依據在各圖譜中的波峰面積，我們選取出 15 個主要吸收波峰，作為不同冬蟲夏草萃取液的有機化學圖譜。依據其吸收面積佔總吸收面積的比率，我們將此數值以階層式叢集法(Hierarchical clustering)進行分析，結果顯示(圖 11):產地間有機化合物圖譜的差異大於部位間的差異。

### 三、冬蟲夏草樣本的 cDNA 微陣列圖譜分析


#### (一)冬蟲夏草萃取液對 KG-1 細胞株的影響

為了利用 cDNA 微陣列實驗進行分子生物層級之基因圖譜分析，需要有生物效應之表型 (Phenotype) 做為選取萃取液濃度的依據。因此，我們以冬蟲夏草萃取液對 KG-1 的細胞生長速率的影響做為其生物效應之表型。我們將天然冬蟲夏草分為菌核 (W)、子座 (FB) 及全蟲 (CS) 等三個實驗，分別以高溫萃取 (如前材料與方法所述)，再以三種不同濃度 (2 $\mu$ L/mL, 10 $\mu$ L/mL, 20 $\mu$ L/mL; final concentration) 之萃取液、及二次水之控制組混入 KG-1 的細胞培養液內。每經兩天 (48 小時)，即更換新鮮的細胞培養液及冬蟲夏草萃取液，並且使用 Coulter Counter 細胞計數器分別在第 2、4、6、8 天測得細胞的數目。為了清楚的顯示實驗組與控制組細胞數目的差異，我們把每次實驗的控制組細胞數定為百分之百，再將實驗組的細胞數除以控制組的細胞數得到百分比 (結果如圖 12)。

由圖 12 的結果可知，20 $\mu$ L/mL 濃度的菌核 (W)、子座 (FB) 及全蟲 (CS) 等三組實驗，隨著冬蟲夏草萃取液處理時間的增長，實驗組的細胞數目逐漸少於控制組的細胞數目。其中又以子座 (FB) 部分的萃取液對 KG-1 細胞的影響最為顯著。到第八天時，實驗組細胞數只有控制組細胞數的 40% 左右。

## (二) 微陣列實驗的迴圈設計 (Loop Design)

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)，並且將冬蟲夏草樣本再區分為子座、菌核及全蟲等三種。萃取液的濃度也選定為 20 $\mu$ L/mL。

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 (QCS1 及 QCS2)，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，迴圈設計如圖 13。數字代表所使用晶片的代號，總共使用 16 片晶片。QFB  QCS 1 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

青海子實體萃取液處理 4 天的 KG-1 細胞)：標示 Cy3 綠光螢光染劑，以及 QCS 1 (受青海全蟲萃取液處理 4 天的 KG-1 細胞)：標示 Cy5 紅光螢光染劑。

### (三) 冬蟲夏草樣本的微陣列圖譜

我們依據迴圈設計進行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 32,448)。這些數據經由影像軟體以及使用本實驗室所撰寫的微陣列數據分析軟體的篩選，刪除訊雜比 (Signal to noise ratio) 過小的數據。接著以許文郁教授所設計撰寫的程式來分析 cDNA 微陣列的數據。經由 ANOVA 的統計方法，以虛無假設 (Null hypothesis) 的模式來計算。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： $\lambda$  (或  $\lambda$ )。某個基因的  $\lambda_1$  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  $\lambda$  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  $\lambda$  值相減即可。

### (四) 篩選冬蟲夏草標記基因群

依據第三年成果報告中所詳述的統計學計算，我們篩選出 100 個冬蟲夏草標記基因群 (如表 2)。本研究中我們所定義的「冬蟲夏草標記基因群」是一群受冬蟲夏草樣本顯著調控的基因，而且無論樣本的產地或部位不同，其受調控的方式 (上調或下調) 都應該相同。從圖 14 的叢集分析結果，我們的確發現這 100 個冬蟲夏草標記基因在經過不同的冬蟲夏草樣本處理後，基因表現皆一致上調或下調。因此，這個結果證明了利用嚴謹的實驗設計與統計分析，我們有能力從三千多個可分析的基因群中篩選出 100 個受到顯著調控的基因群，而且經這個標記基因群的共同受調控方式符合生物學上的預期。在本論文中將只針對  $H_0: (\lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 + \lambda_4 + \lambda_5 + \lambda_6 + \lambda_7) - \lambda_8 = 0$  這個虛無假設討論，我們也列出其他 14 種虛無假設都有其特殊的篩選目的，其結果也相當值得更進一步的探討。由此可知，微陣列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。

### (五) 同步定量聚合反應驗證微陣列實驗結果

一般基因晶片實驗之結果會以其他核酸定量之方法來評估其準確度，北方墨點法及同步定量聚合反應為最常用之方法。同步定量聚合反應分析利用即時螢光定量，結合 PCR 的靈敏度為目前最精準的核酸定量及基因表現偵測技術之一。

我們從上述 100 種冬蟲夏草標記基因群中選出 CD69、STAT1、CGI-01、STAT5A、PRDX1、PLAB、LST1、SLC3A2 以及持家基因 (House-keeping gene)  $\beta$ -actin 等 9 種基因進行同步定量聚合反應，來驗證微陣列實驗的結果。將基因晶片實驗所選取出之標記基因，向 ABI 公司訂購 TaqMan AOD primer set。共進行 9 個基因、8 個樣本、三重複。經由位於陽明大學的同步定量聚合反應核心實驗室進行反應後得到數據。其中 PLAB 基因的同步定量聚合反應結果的  $C_T$  值大於 34，已經屬於同步定量聚合反應的可信範圍外，所以 PLAB 基因的數據被排除。

由同步定量聚合鏈反應可得知各基因之  $C_T$  值，可以分別求出每種基因的實驗組 (受不同冬蟲夏草萃取液處理過) 對控制組 (無冬蟲夏草萃取液處理) 之基因表現相對值 ( $\Delta C_T$  值)。7 種基因的  $\Delta C_T$  值分別與持家基因  $\beta$ -actin 的  $\Delta C_T$  值比較，得到  $-\Delta \Delta C_T$  值 (相當於 log ratio)。我們將同步定量聚合反應的結果 ( $-\Delta \Delta C_T$  值) 與微陣列的結果 (log ratio) 作圖比較，由圖 15 到圖 21 的結果可知：同步定量聚合反應與微陣列的結果相當接近。由於此兩種結果的計算方式不同，所以這兩種數據的誤差計算方式也不同。為了使同步定量聚合反應與微陣列的數據誤差可以比較，許文郁教授提供以下的公式來做為兩種數據間的誤差傳遞公式。

公式一為同步定量聚合反應結果與誤差的計算。其中  $x_1$ 、 $x_2$  與  $x_3$  代表基因 A 在樣本 1 之三重複  $C_T$  值； $x_1'$ 、 $x_2'$  與  $x_3'$  代表持家基因在樣本 1 之三重複  $C_T$  值； $y_1$ 、 $y_2$  與  $y_3$  代表 A 基因在控制組之三重複  $C_T$  值； $y_1'$ 、 $y_2'$  與  $y_3'$  代表持家基因在控制組之三重複  $C_T$  值。由公式二可以求得基因 A 在樣本 1 對控制組之  $\Delta C_T$  值與其誤差傳遞後之誤差估計值 ( $\log_2 \text{ratio} \pm \text{SEM}$ )

	A 基因	持家基因
樣本一	$X_1, X_2, X_3$ $(\mu_x, S_x^2)$	$X_1', X_2', X_3'$ $(\mu_{x'}, S_{x'}^2)$
控制組	$Y_1, Y_2, Y_3$ $(\mu_y, S_y^2)$	$Y_1', Y_2', Y_3'$ $(\mu_{y'}, S_{y'}^2)$

$$[(\mu_x - \mu_{x'}) - (\mu_y - \mu_{y'})] \pm \sqrt{\frac{(S_x^2 + S_{x'}^2 + S_y^2 + S_{y'}^2)}{3}}$$

(公式一)

所得的誤差數值可與微陣列結果來比較，微陣列結果與誤差的計算可寫成公式二：

$$(\lambda_x - \lambda_y) \pm \sigma$$

(公式二)

經由以上數值的計算，兩種方法的誤差結果都已經以誤差槓 (error bar) 表示在圖 15 到圖 21 中。

為了進一步分析同步定量聚合反應與微陣列實驗結果之間的一致性，我們做進一步的數值相關性分析 (Correlation analysis)，圖 22 顯示這兩種方法所得的結果間的相關係數  $R=0.83$  及  $R^2=0.69$  ( $n=49$ )。

## 肆、討論

### 一、冬蟲夏草樣本的分子基因圖譜分析

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。結果顯示本研究的冬蟲夏草樣本菌種為中國被毛孢。

### 二、冬蟲夏草樣本的化學圖譜分析

#### (一) 無機化學圖譜鑑定

中草藥材含有許多種微量金屬元素，其中的必須微量元素 (Essential trace elements) 是人體健康所需，在體內扮演著催化生化反應的角色。而毒性微量元素 (Toxic trace elements) 則是因為中草藥材受到生長環境污染的影響，所吸收到的微量金屬。這些毒性微量元素經常是造成服用中草藥中毒的主要原因。因此，檢測中草藥材所含的各種微量元素，乃是一種中草藥標準化的重要流程。一方面可以讓中醫師更安全的使用中草藥材，另一方面可以進一步探討必須微量元素在不同方劑內可能產生的藥理機制。

本研究利用感應耦合電漿質譜儀來定量冬蟲夏草所含的各種必須以及毒性金屬元素，並初步建立了冬蟲夏草的無機化學指紋圖譜。中草藥材 (植物或真菌) 內的微量元素種類以及含量與其生長環境有密切的關係。因此，研究人員曾經藉著定量真菌所含的毒性金屬元素來偵測環境受到重金屬污染的狀況。此外，研究報告指出：產地不同的同種植物所含的微量金屬元素也會有所差異。由此可知，所謂的「道地藥材」除了藥材本身的有機化合物組成可能受到環境影響之外，其微量元素的組成也會受到產地的影響。這種無機元素組成的差異可能進一步影響到臨床的藥效。由本研究的結果可知：不同的冬蟲夏草樣本 (青海與西藏)



所含的無機元素組成並不完全相同（如表 1）。

另一個分析中藥材無機元素組成時應注意的事項為：不同中藥材採收後的處理程序可能影響其無機元素組成。例如：用鹽醃製過的中藥材，其 Na 的含量就無法做為參考。

## (二) 有機化學圖譜鑑定

依據紫外光吸收光譜的結果，冬蟲夏草子實體與蟲體之間有化學成分的差異。子實體在 260nm 以及 320nm 各有一個主要的吸收波峰，而蟲體只在 260nm 有主要的吸收波峰。經由進一步的 HPLC 分析發現：在 310nm 的波段，子實體與蟲體間主要化學組成的差異在於單一主要吸收峰。這個結果顯示：單一化學物質造成子實體與蟲體間 310nm 紫外光光譜的差異。本研究團隊對於此結果正在進行更深入的化學分析，希望能進一步了解這個物質的分子成分。依據上述的結果我們推論可能造成子實體與蟲體之間此種化學成分差異的原因如下：

因為子實體生長於地面上，會受到陽光的照射，而且冬蟲夏草是產自 3,000 到 5,000 公尺的高原上，其所可能接受到的紫外光更為強烈。地表附近的生物體受到紫外光的傷害最主要是來自 UVB 的波段（280nm 到 320nm 之間）。已經有期刊論文指出：為了避免紫外光照射導致生物體的傷害，某些真菌類生物會製造可吸收 UVB 波段的化學物質。本研究結果顯示：冬蟲夏草子實體含有單一化學物質對於 UVB 波段（310nm）的紫外光有強烈的吸收。因此，我們推論：冬蟲夏草可能會製造某種化學成分來吸收 UVB 波段的紫外光，其功能之一為避免強烈的紫外光照射導致菌絲體的傷害。此推論是否真確仍待接續的研究來驗證。有趣的是，我們的發現與清朝趙學敏〔本草綱目拾遺〕中的論述有其相似之處：「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。」。亦即冬蟲夏草的子實體與蟲體內的菌絲可能因生長環境的差異（子實體為地上部；蟲體為地下部）而含有不同的化學組成，因此造成不同的生物效應。

由 230nm、260nm 以及 310nm 的 HPLC 層析圖中，我們選出了 15 個主要吸收波峰，並依據每個吸收波峰相對於整體層析圖的面積比率來代表各種冬蟲夏草樣本的有機化合物圖譜。類似

的分析方法也曾經被其他研究人員用來做為鑑別物種或產地的依據。經過階層式叢集分析之後，結果顯示：不同冬蟲夏草萃取液之間的差異可被分類為兩個主要的群組，其中 TFB、TCS 與 TW 被歸類為同一組；而 QFB、QCS 與 QW 被歸類為另一組。此結果指出：雖然本研究發現子實體與蟲體樣本間有化學組成的差異，但是整體而言，不同產地所造成的化學組成差異大於不同部位所造成的差異。這個結論可以間接支持清朝汪昂〔本草備要〕所記載的：「冬蟲夏草，甘平，保肺益腎，止血化痰，已勞嗽。四川嘉定府所產者最佳，雲南、貴州所產者次之。」中關於產地的差異可能造成療效的不同。但是化學組成的不同並不能直接推論就一定會造成生物反應的差異。因此，希望對生物反應做評估就需要進一步以生物系統來進行實驗。微陣列圖譜分析（Microarray fingerprinting）或稱為基因表現反應圖譜分析（Responsive gene expression profiling）就是以此為目的。

### 三、冬蟲夏草樣本的 cDNA 微陣列圖譜分析

#### （一）冬蟲夏草萃取液對 KG-1 細胞株的影響

為了探討冬蟲夏草萃取液是否造成 KG-1 細胞的死亡，在進行細胞計數實驗的同時，我們將每一次實驗的細胞取出，以 Trypan Blue 染色，利用染料會滲入死細胞中而呈色，而活細胞因細胞膜完整，染料無法滲入而不會呈色的原理，來估計死細胞所佔的比例。實驗的結果顯示，每一次實驗（包括實驗組以及控制組）的死細胞比例都少於 5%（data not shown）。因此，冬蟲夏草萃取液造成的實驗組細胞數目比控制組少的原因，並不是因為產生細胞毒性的結果。此外，隨著時間的經過，實驗組的細胞數目也有增加（如下表，細胞濃度單位為：細胞數目/mL）。可見，實驗組的細胞仍能生長分裂，並且死細胞的比例也沒有增加。由此結果，我們認為冬蟲夏草萃取液隨著濃度與時間的增加會抑制 KG-1 細胞的生長。

對於細胞生長抑制的效應，其中又以子座（FB）部分的萃取液對 KG-1 細胞的生長抑制最為顯著。到第八天時，子座（FB）部分的萃取液會抑制 KG-1 細胞生長速率至控制組細胞的 40% 左右。參考第 2 部份（有機化合物標準化）實驗的結果，我們依據 HPLC 層析圖的分析，估計三種樣品間的大約相對濃度：菌核（W）：全蟲（CS）：子座（FB）約是 1.00：1.12：2.16。由此可

知，子座所含的有機化合物濃度是三種樣品中最高的。在此部份的細胞實驗中，我們觀察到對 KG-1 細胞的生長抑制效應也是：子座 (FB) > 全蟲 (CS) > 菌核 (W)。然而，在冬蟲夏草樣品的無機化合物組成中並沒有觀察到此種關係。因此，我們推論：冬蟲夏草菌絲體萃取液抑制 KG-1 細胞的作用與其有機化合物組成的濃度有成正比的關係。是否在萃取液中的某些有機化合物造成細胞生長抑制，則是一個值得深入探討的問題。

## (二) 微陣列實驗的迴圈設計 (Loop Design)

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：

1. 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。
2. 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)。
3. 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 13 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 1，再由 QCS 1 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。

## (三) 同步定量聚合反應驗證微陣列實驗結果

由圖 15 到圖 21 的結果可以得知：同步定量聚合反應與微陣列的結果相當接近。本研究的微陣列實驗總共有 7 種冬蟲夏草樣本 (其中 QCS1 與 QCS2 為相同的樣本做為內部控制組)，選出

8種基因中進行同步定量聚合反應。在扣除同步定量聚合反應不可信的數據（PLAB 基因）之後，總共有 49 筆數據。以這 49 筆數據做進一步的數值相關性分析（Correlation analysis），圖 22 顯示這兩種方法所得的結果間的相關係數  $R=0.83$  及  $R^2=0.69$ （ $n=49$ ）。目前與微陣列相關的期刊論文中，有如此分析的並不多，我們查詢了其中一篇發表於 *Physiological Genomics* 期刊的論文有做類似的分析，作者從 32 筆數據做相關性分析得到相關係數為  $R=0.63$  及  $R^2=0.39$ （ $n=32$ ）。由於我們使用迴圈設計來進行微陣列實驗，使得實驗組的數據在整組實驗中的比重增加。此外，在迴圈中額外加入一個相同的樣本做為內部控制組，可藉以評估數據的可信度並且以內部控制組的數據為準，排除誤差過大的數據。

## 伍、結論與建議

本三年計畫的目標為建立一個整合性的指紋圖譜平台（Integrated fingerprinting platform）來作為中草藥標準化的依據。本研究已經完成此整合性指紋圖譜平台，其中包括：分子基因圖譜分析（Molecular genetic fingerprint）、有機及無機化學指紋圖譜分析（Chemical fingerprint）以及微陣列指紋圖譜（Microarray fingerprint）。這個整合性的指紋圖譜平台可以作為研究中草藥的標準化的流程，並且可作為將來中醫藥臨床研究的參考。

在這三年的研究中非常感謝行政院衛生署中醫藥委員會的支持，我們才得以全力以赴。此外，也要感謝所有審查員們的指導，使得我們在這個研究過程中能得到許多寶貴的意見。目前，這個研究的成果已經接近完成期刊論文的撰寫，將在近期內投稿國際的學術期刊，希望這個整合性指紋圖譜平台的研究成果能得到西方科學界的關注，進一步使得中醫藥的成果被更廣泛的接受。

## 誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP93-RD-105 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. Li M., Regulation of immune gene synthesis in mice by cixichunbao granule. *Zhong Yao Tong Bao.* 11 (12), 52-4 (1986).
2. Hong M., Effects of aging and ginsenoside on atrial natriuretic peptide gene expression. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 71 (3), 140-3 (1991).
3. Tian ZG., Yang GZ., Promoting effect of panaxatriol ginsenoside on gene expression of human interleukin-1. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 14 (2), 159-61 (1993).
4. Kim MY., Lee KY., Lee SK., Inductive effect of ginsenoside-Rg1 on tyrosine aminotransferase gene expression in rat primary hepatocyte cultures. *Biochem Mol Biol Int.* 34 (4), 845-51 (1994).
5. Kang SY., Lee KY., Lee SK., Ginsenoside-Rg1 regulates the induction of tyrosine aminotransferase gene transcription in rat hepatocyte cultures. *Biochem Biophys Res Commun.* 205 (3), 1696-701 (1994).
6. Chung E., Lee KY., Lee YJ., Lee YH., Lee SK., Ginsenoside Rg1 down-regulates glucocorticoid receptor and displays synergistic effects with cAMP. *Steroids.* 63 (7-8), 421-4 (1998).
7. Liu M., Zhang JT., Immunoregulatory effects of ginsenoside Rg1 in aged rats. *Yao Xue Xue Bao.* 30 (11), 818-23 (1995).
8. Chang JY., Yang TY., Chang CP., Chang JG., The effect of “chi-han (hot nature)” Chinese herbs on the secretion of IL-1 beta and TNF-alpha by mononuclear cells. *Kaohsiung J Med Sci.* 12 (1), 18-24 (1996).
9. Yonekura K., Kawakita T., Saito Y., Suzuki A., Nomoto K., Augmentation of host resistance to *Listeria monocytogenes* infection by a traditional Chinese medicine, ren-shen-yang-rong-tang (Japanese name: ninjin-youei-to). *J Immunopharmacol Immunotoxicol.* 14 (1-2) 165-90 (1992).
10. Ma J., Li Y., Ye Q., Li J., Hua Y., Ju D., Zhang D., Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. *J Agric Food Chem.* 48 5220-5 (2000).
11. Peng HW., Huang YT., Chen CF., Tsai TH., Validation of liquid chromatographic method in herbal medicine analysis. *J Chin Med.* 8(4) 237-44 (1997).

12. Liu SY., Woo SO., Koh HL., HPLC and GC-MS screening of Chinese proprietary medicine for undeclared therapeutic substances. *J Pharm Biomed Ana.* 24 983-92 (2001).
13. Olsson I., Gullberg U., Ivhed I., Nilsson K., Induction of differentiation of the human histiocytic lymphoma cell line U-937 by 1 alpha, 25-dihydroxycholecalciferol. *Cancer Res.* 43 (12 Pt1) 5862-7 (1983).
14. Harris P. and Ralph P., Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J Leukocyte Biology* 37(4) 407-22 (1985).
15. Jacobs JP., Jones CM., Baille JP., Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* 227(254) 168-70 (1970).

## 柒、圖表

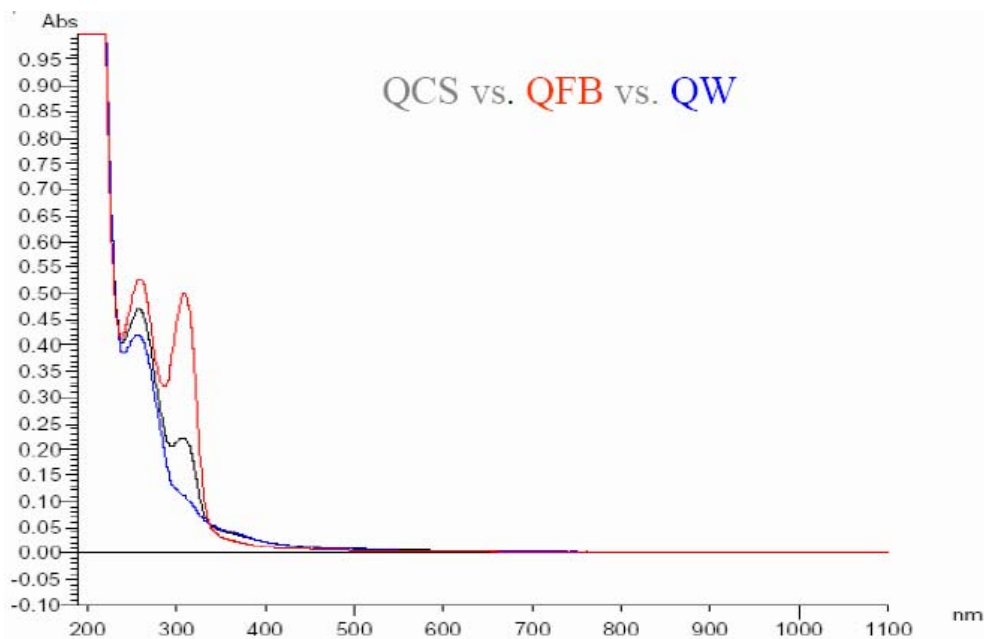


圖 1 冬蟲夏草萃取液的紫外光與可見光的全光譜掃描圖。(在之後的圖示中我們都會使用以下的因文簡稱來代表各種冬蟲夏草的樣本。QCS：青海全蟲萃取液；QFB：青海子實體萃取液；QW：青海蟲體萃取液；TCS：西藏全蟲萃取液；TFB：西藏子實體萃取液；TW：西藏蟲體萃取液。)

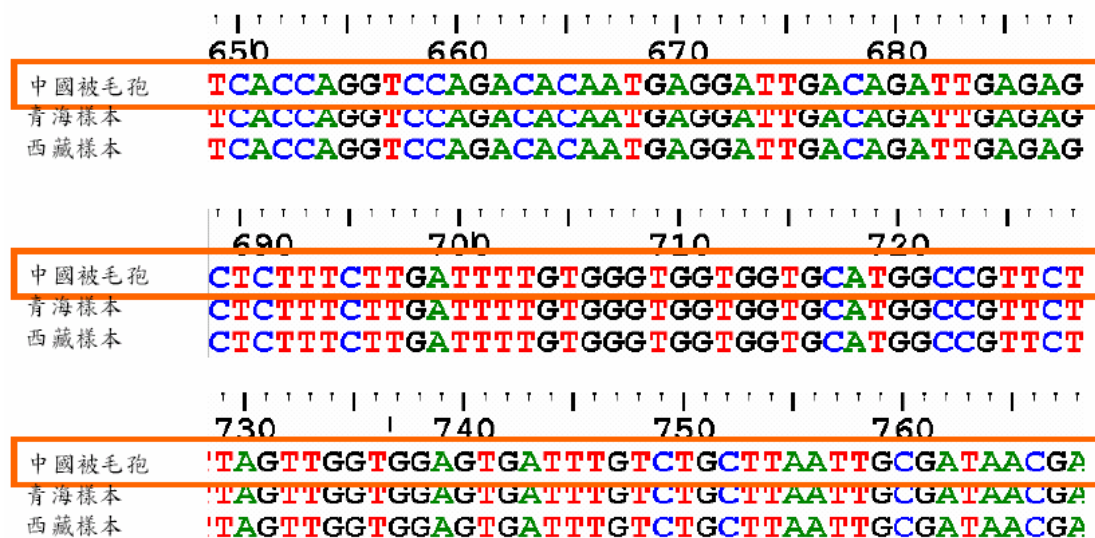


圖 2 冬蟲夏草樣本的分子基因圖譜的鑑定。



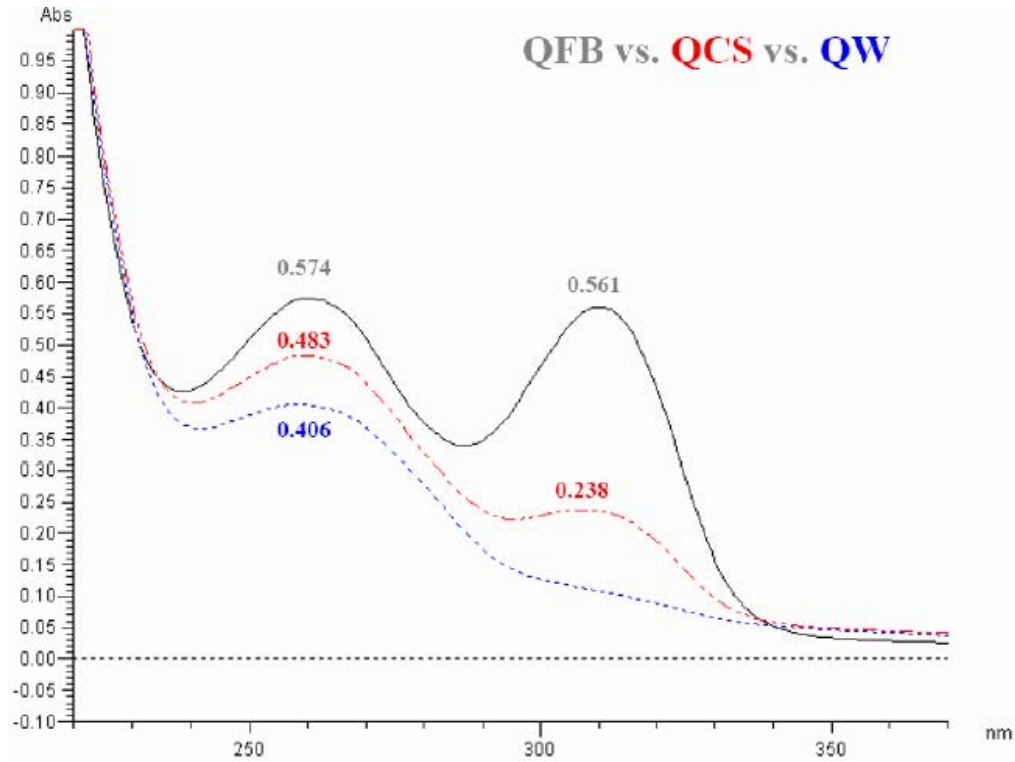


圖 3 青海冬蟲夏草樣本的紫外光吸收光譜圖 (220nm 到 370nm)。

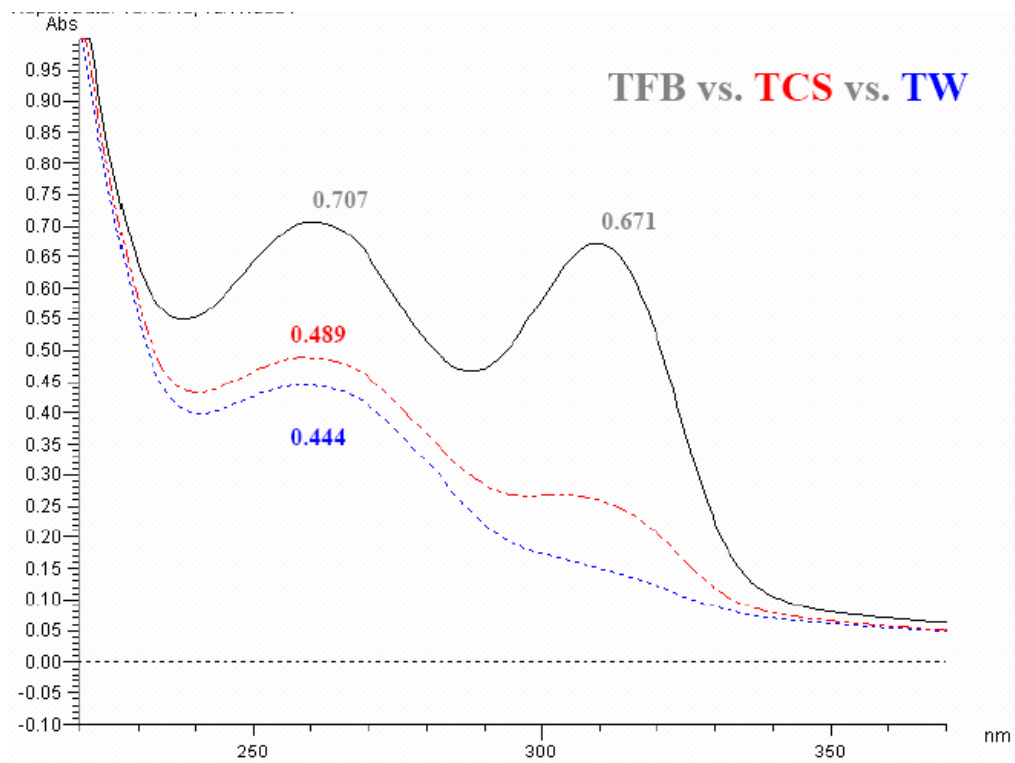


圖 4 西藏冬蟲夏草樣本的紫外光吸收光譜圖 (220nm 到 370nm)。

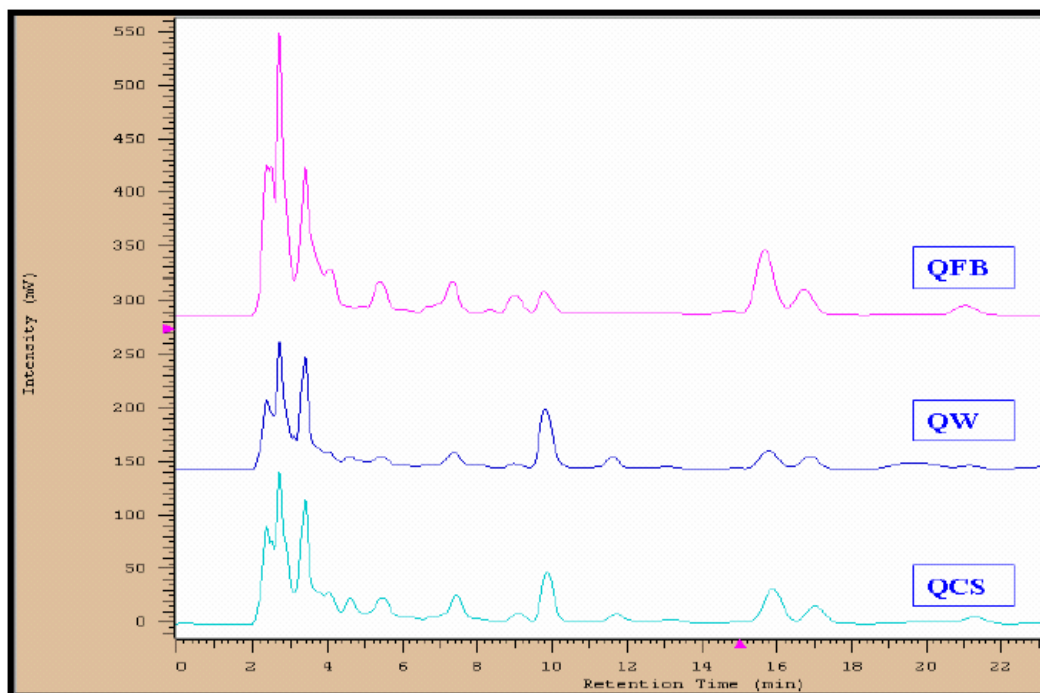


圖 5 青海冬蟲夏草樣本在 230nm 波長的 HPLC 層析圖。

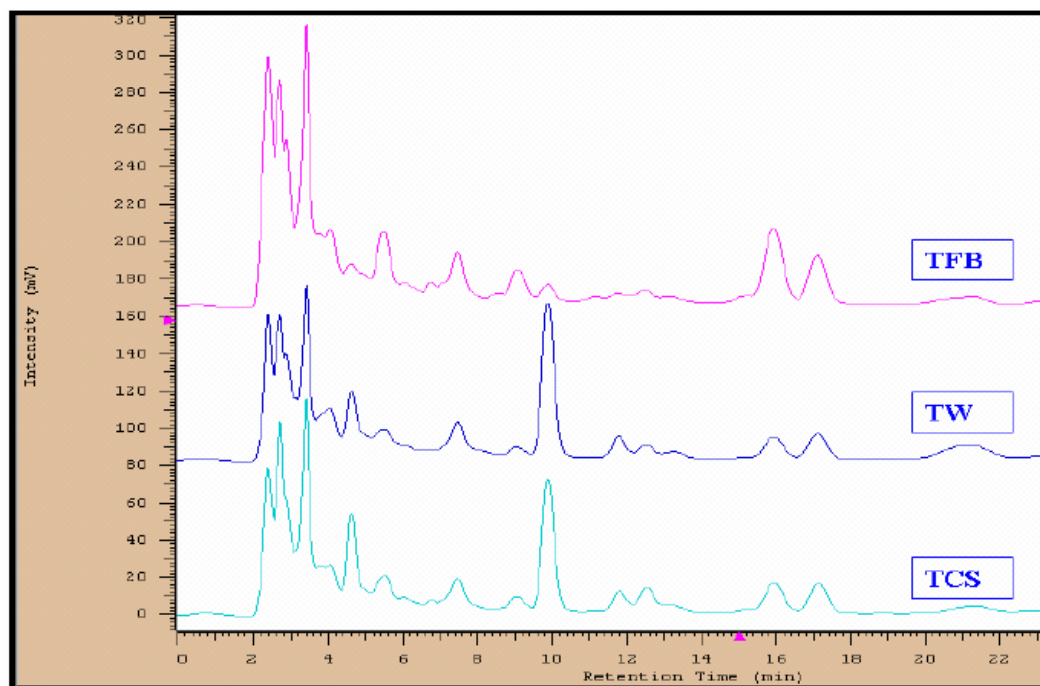


圖 6 西藏冬蟲夏草樣本在 230nm 波長的 HPLC 層析圖。

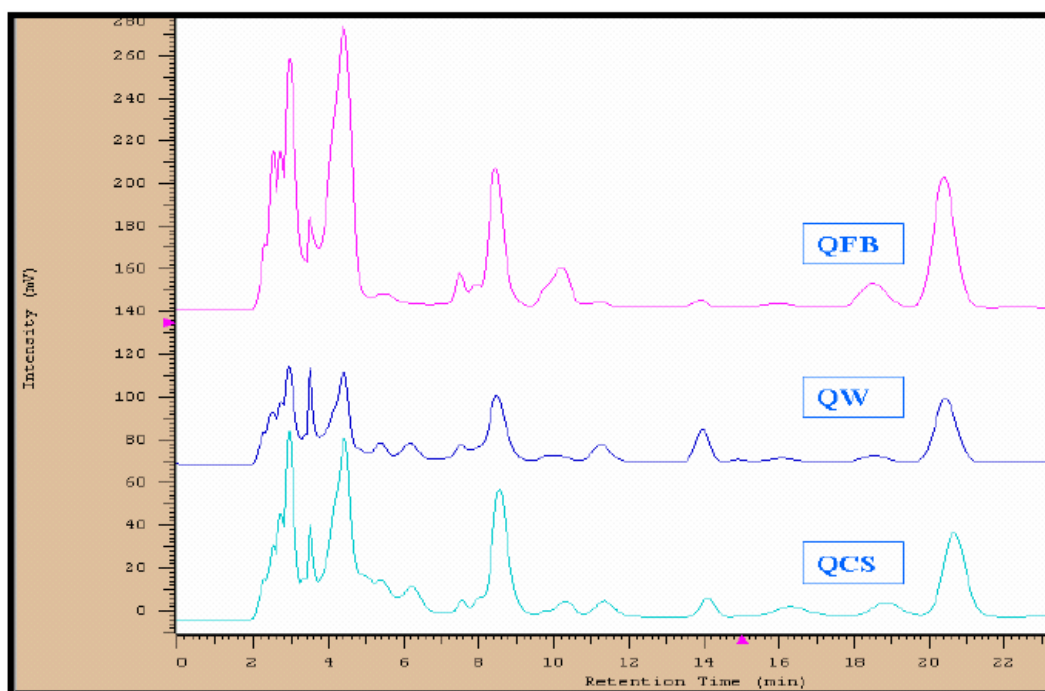


圖 7 青海冬蟲夏草樣本在 260nm 波長的 HPLC 層析圖。

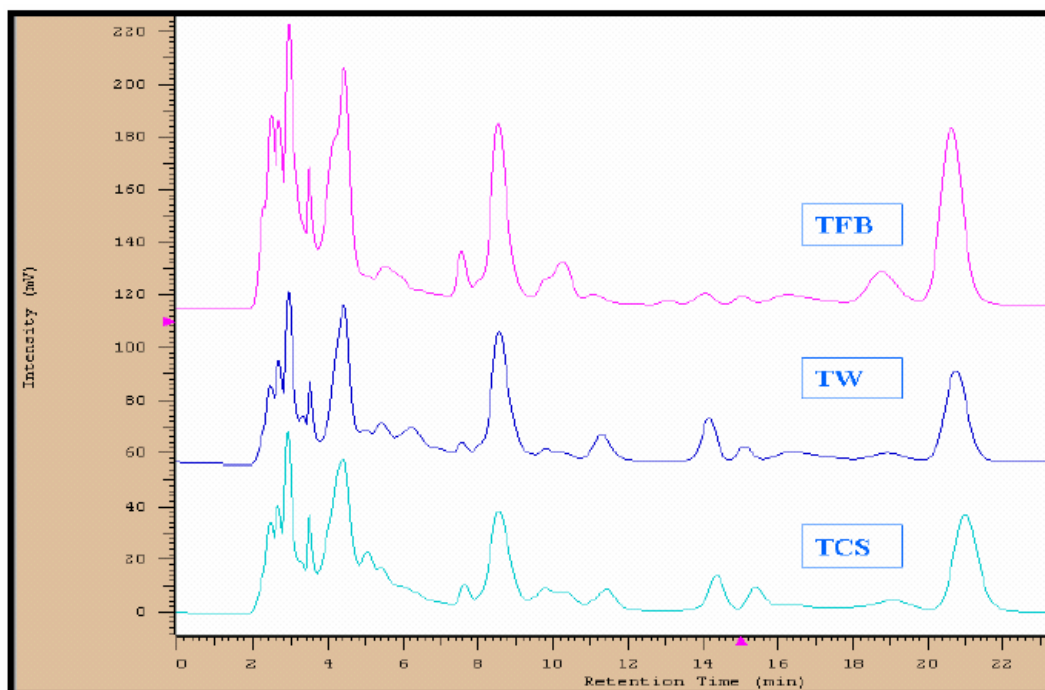


圖 8 西藏冬蟲夏草樣本在 260nm 波長的 HPLC 層析圖。

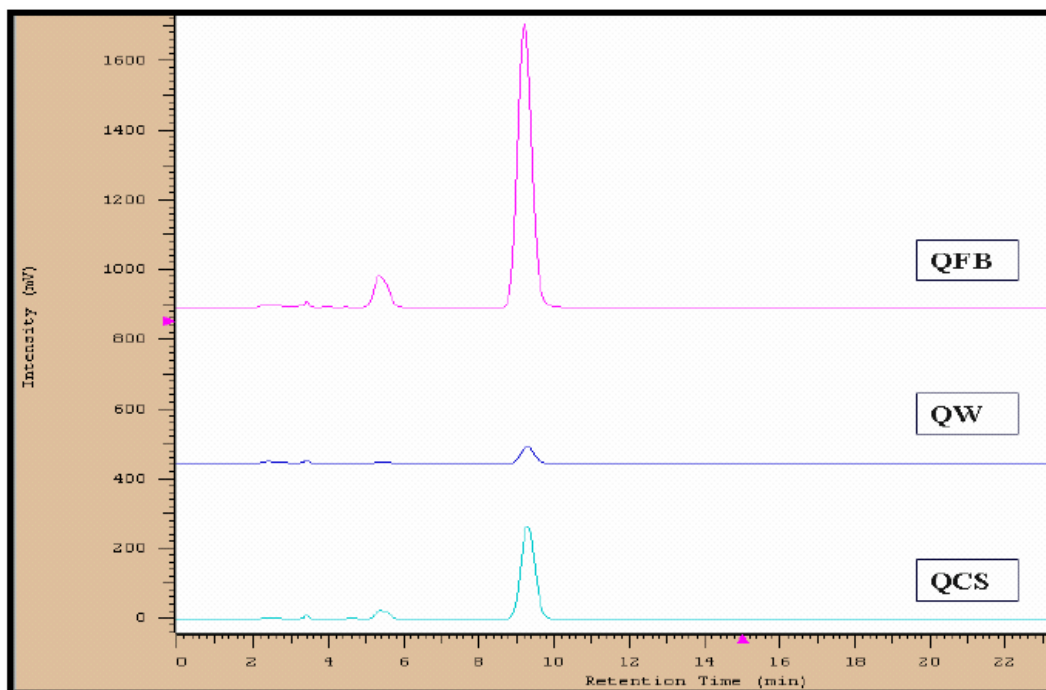


圖 9 青海冬蟲夏草樣本在 310nm 波長的 HPLC 層析圖。

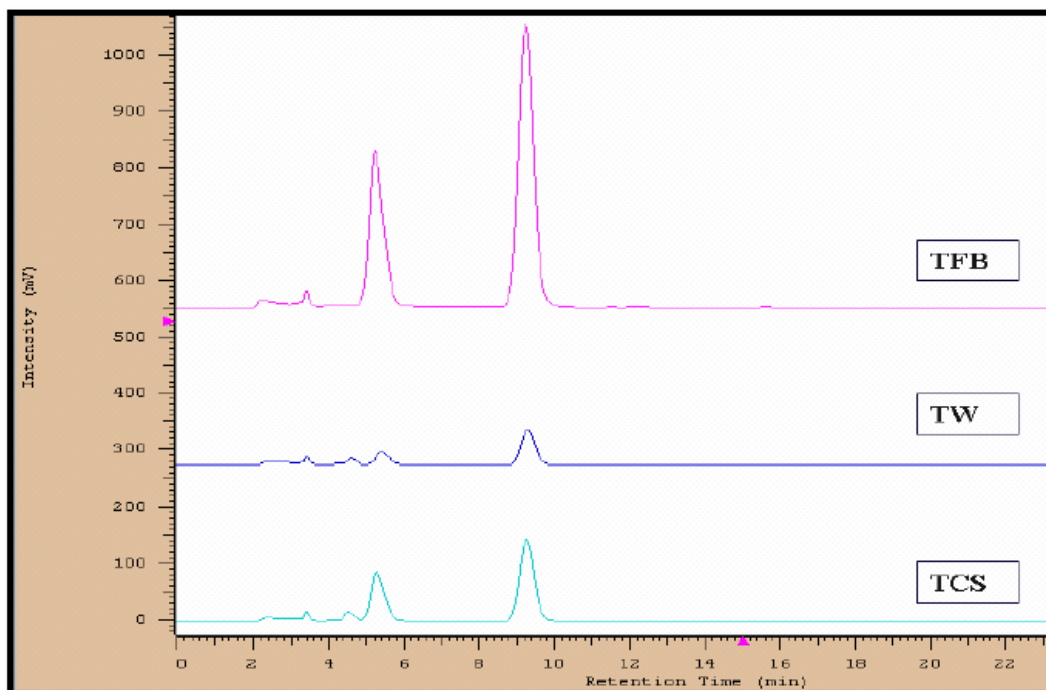


圖 10 西藏冬蟲夏草樣本在 310nm 波長的 HPLC 層析圖。

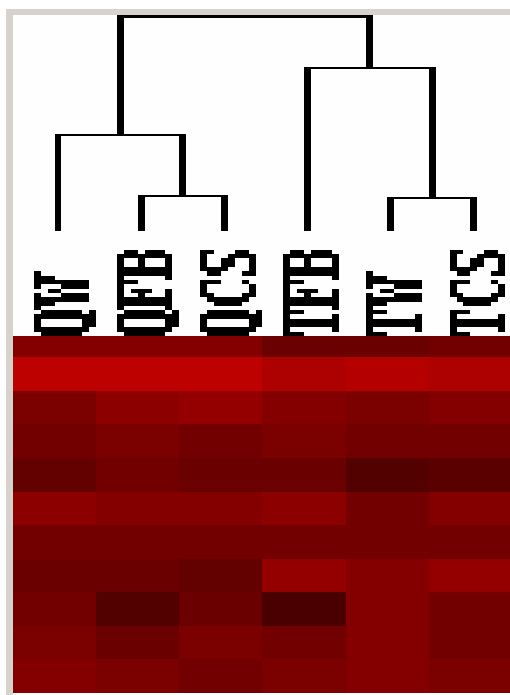


圖 11 以階層式叢集法 (Hierarchical clustering) 分析各種冬蟲夏草萃取液的有機化學圖譜。

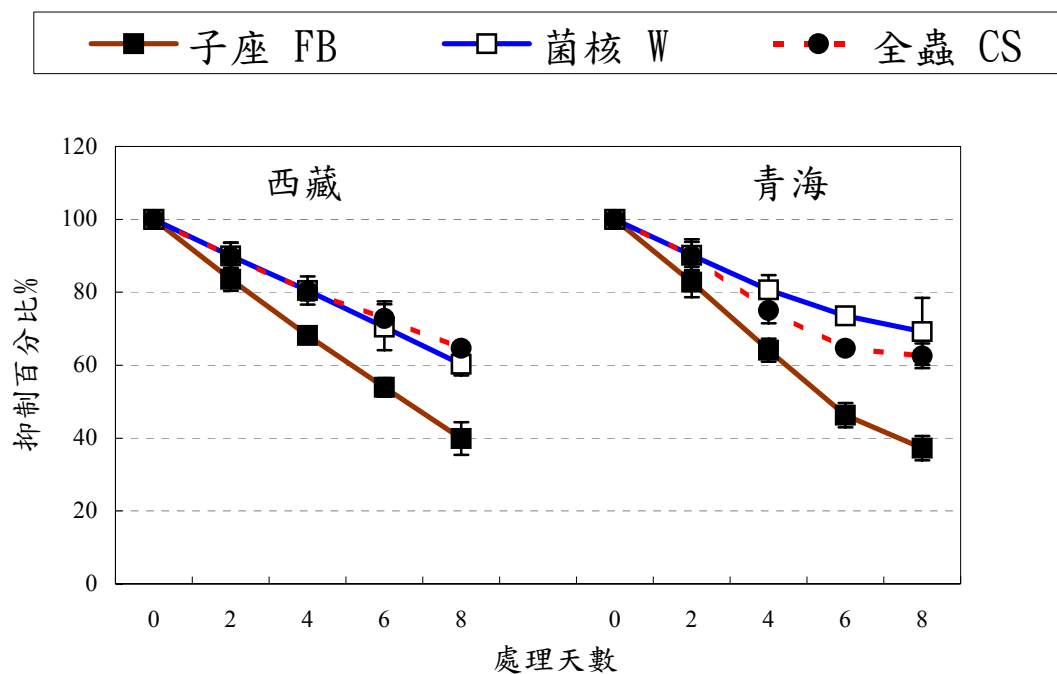


圖 12 各種冬蟲夏草萃取液對 KG-1 細胞的生長抑制圖。

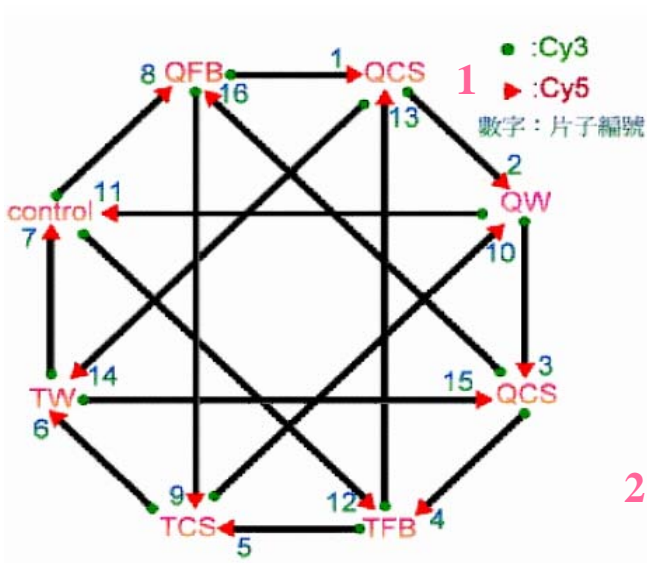


圖 13 微陣列實驗的迴圈設計圖。

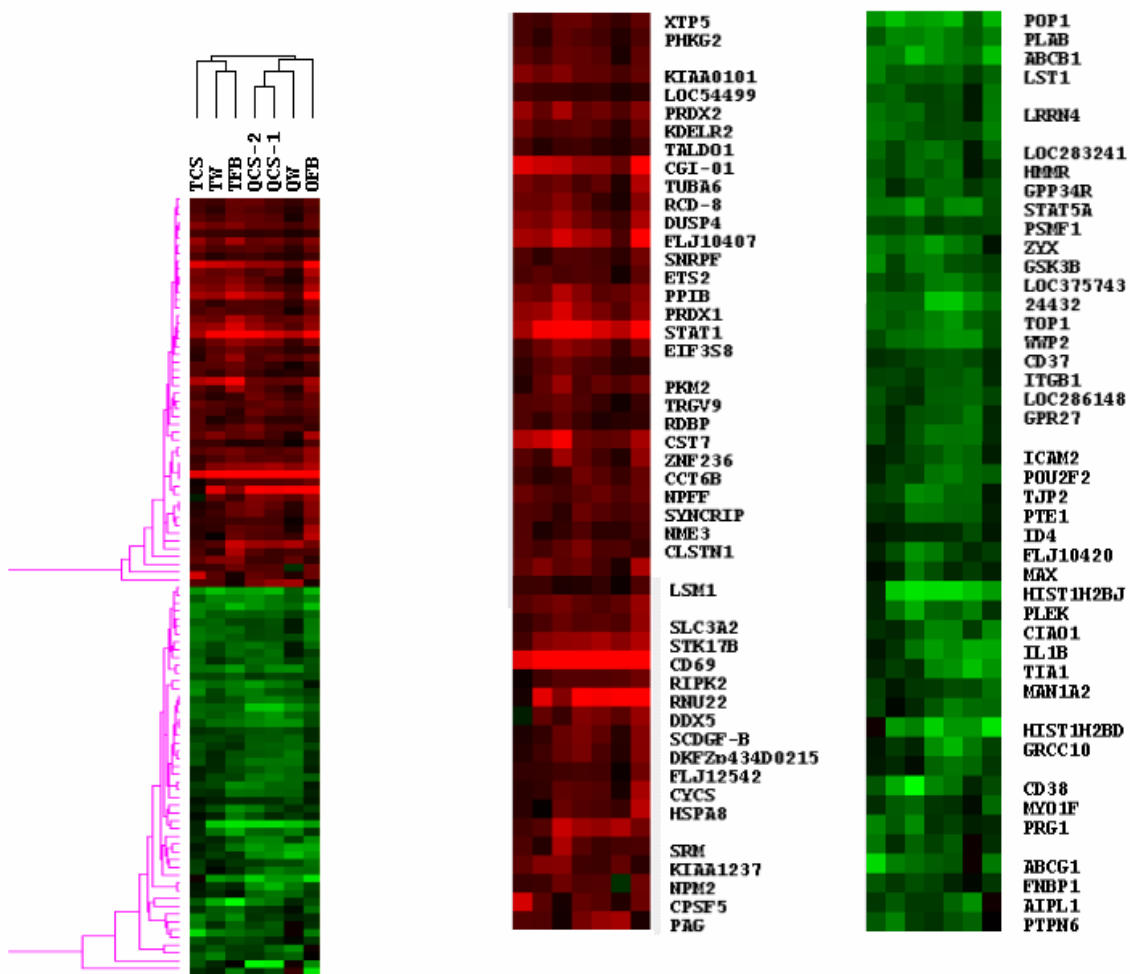


圖 14 100 個冬蟲夏草標記基因的微陣列圖譜之叢集分析圖。

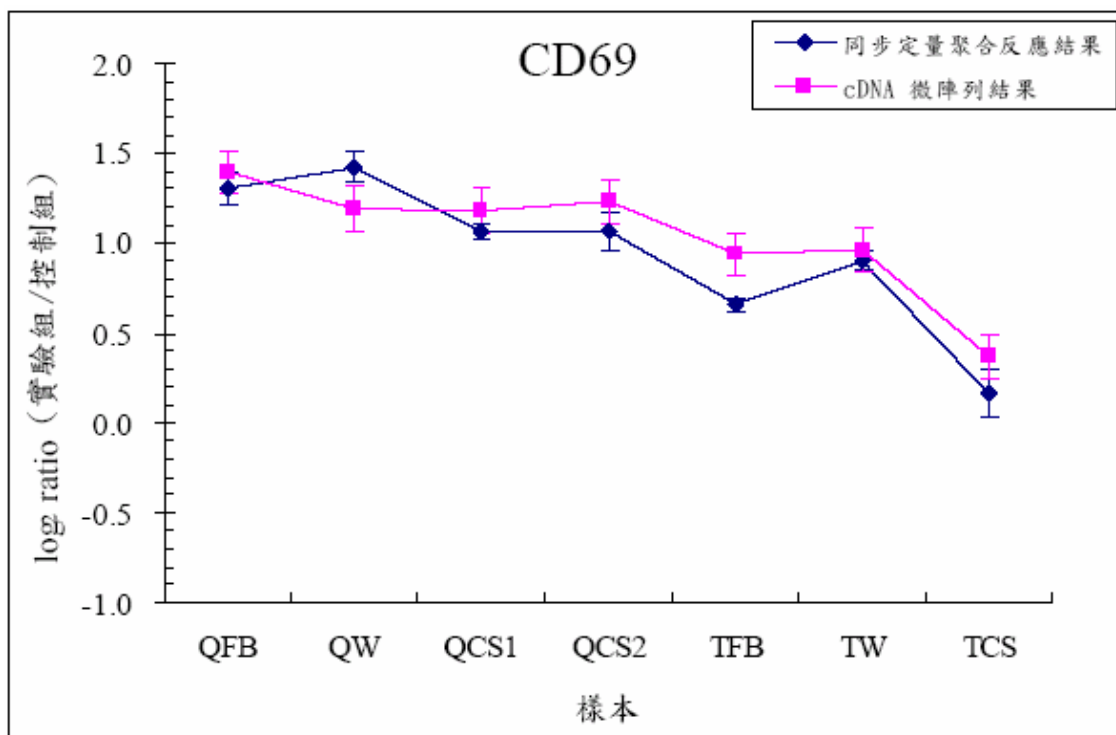


圖 15 CD69 基因的同步定量聚合反應與 cDNA 微陣列結果比較圖。

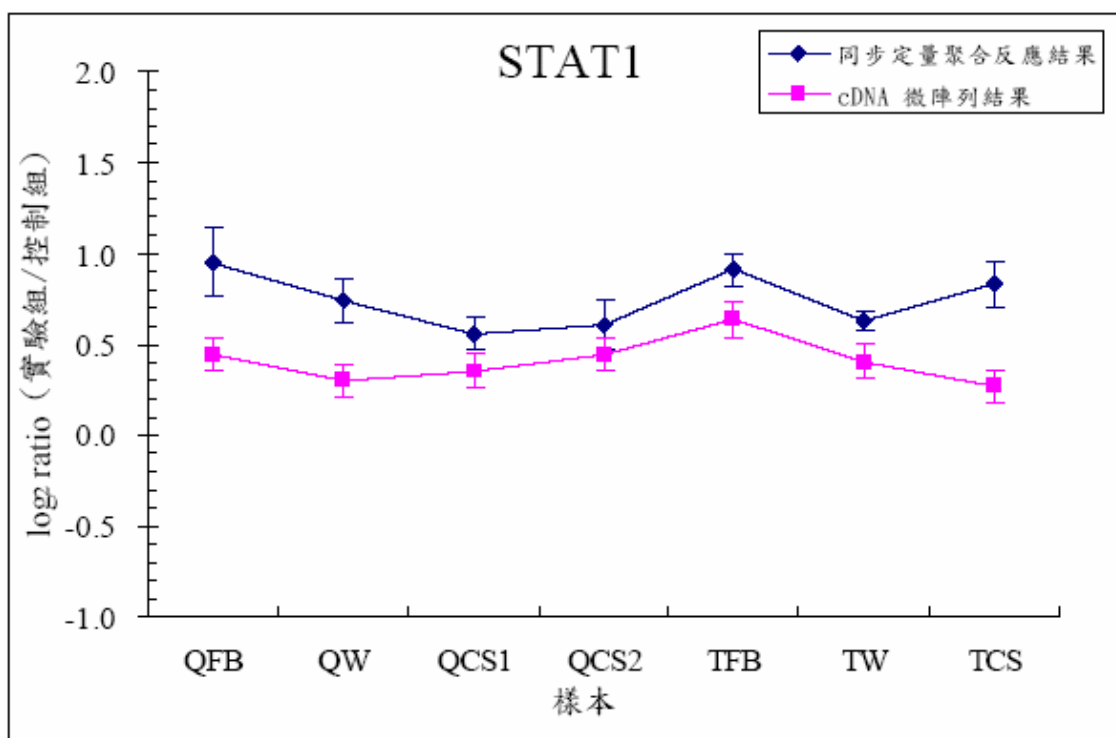


圖 16 STAT1 基因的同步定量聚合反應與 cDNA 微陣列結果比較圖。

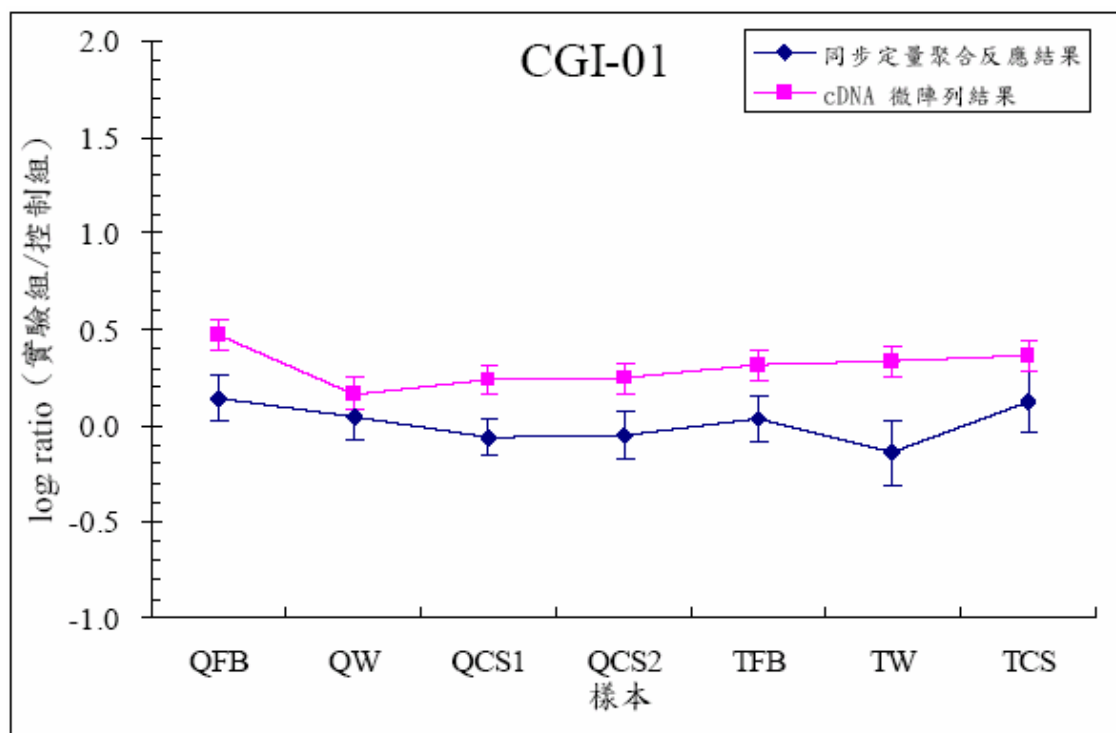


圖 17 CGI-01 基因的同步定量聚合反應與 cDNA 微陣列結果比較圖。

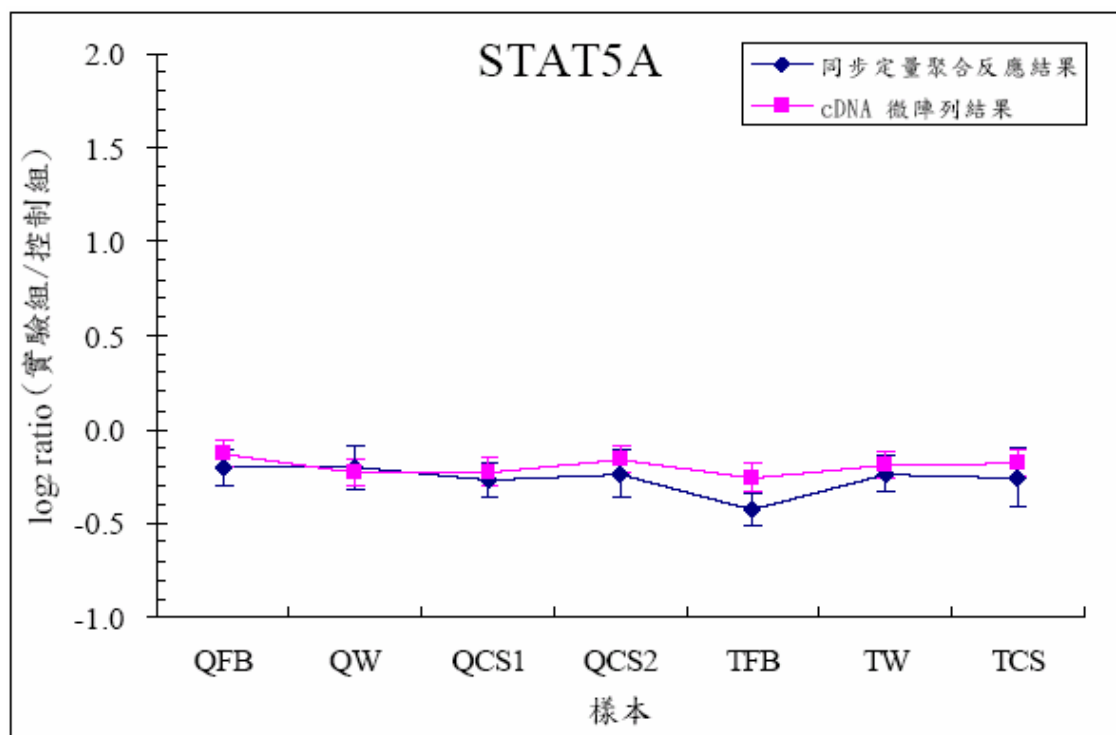


圖 18 STAT-5A 基因的同步定量聚合反應與 cDNA 微陣列結果比較圖。



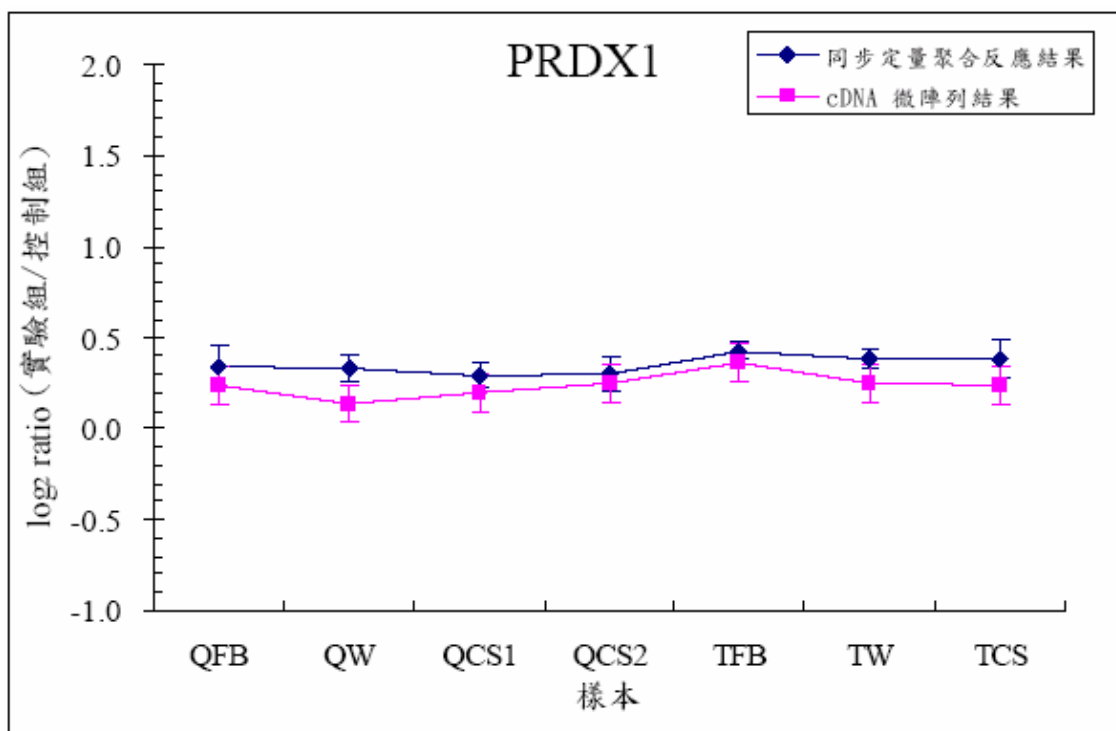


圖 19 PRDX-1 基因的同步定量聚合反應與 cDNA 微陣列結果比較圖。

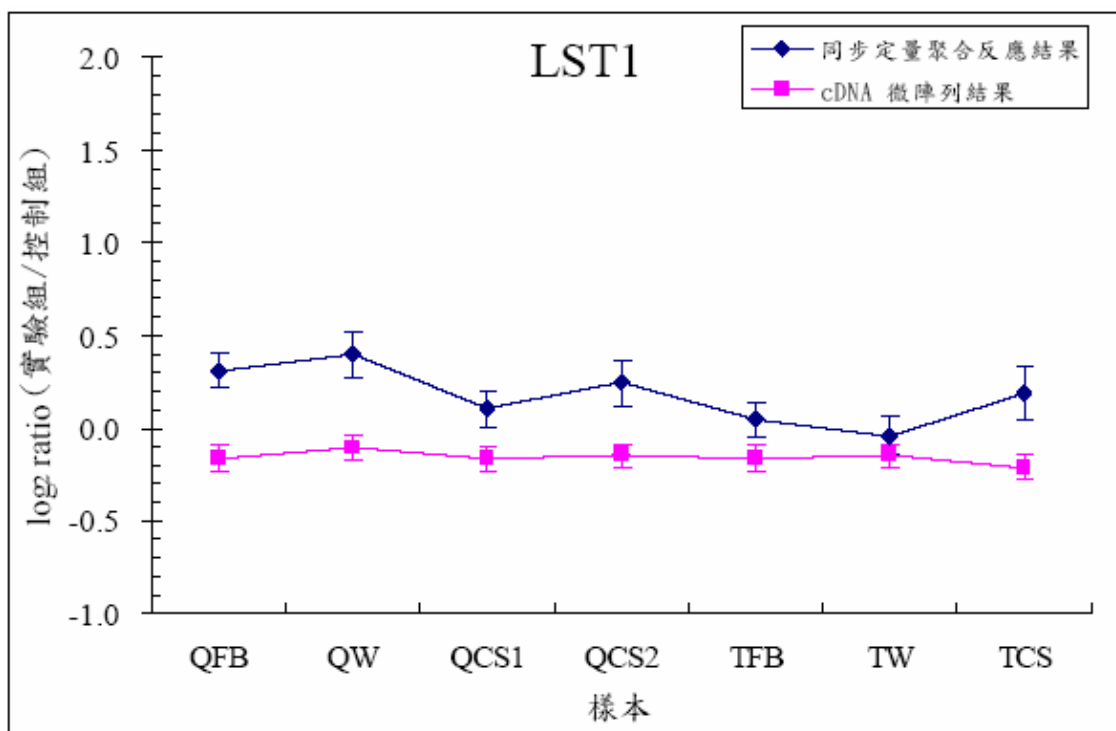


圖 20 LST1 基因的同步定量聚合反應與 cDNA 微陣列結果比較圖。

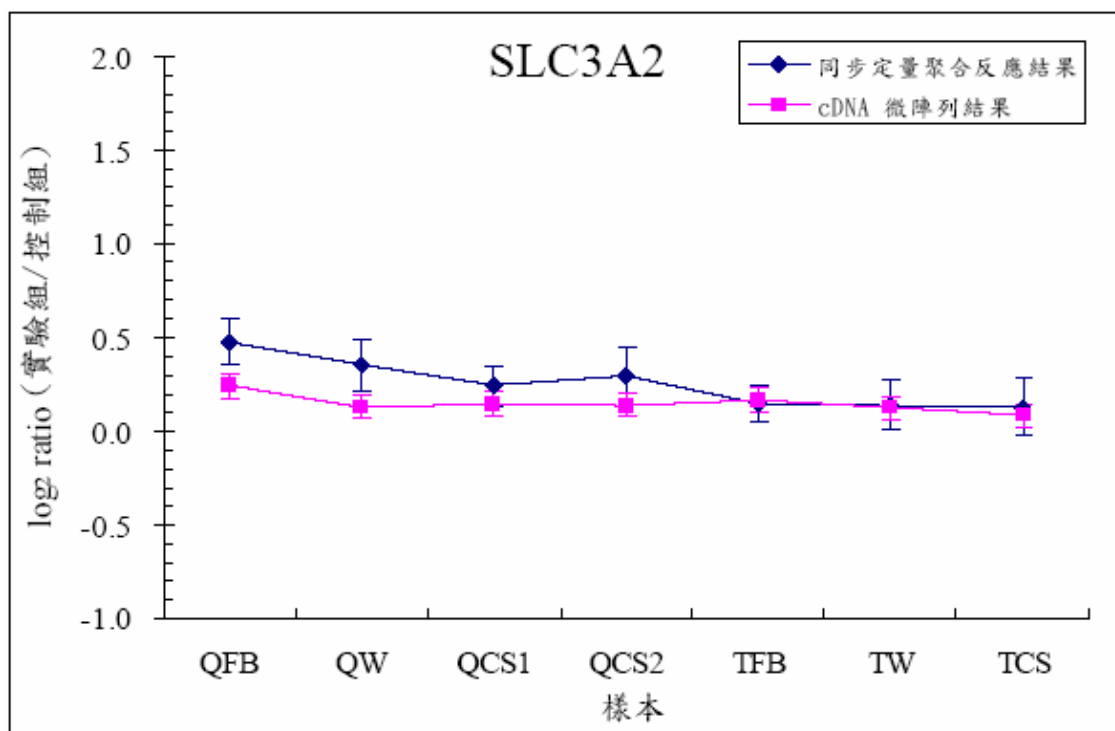


圖 21 SLC3A2 基因的同步定量聚合反應與 cDNA 微陣列結果比較圖。

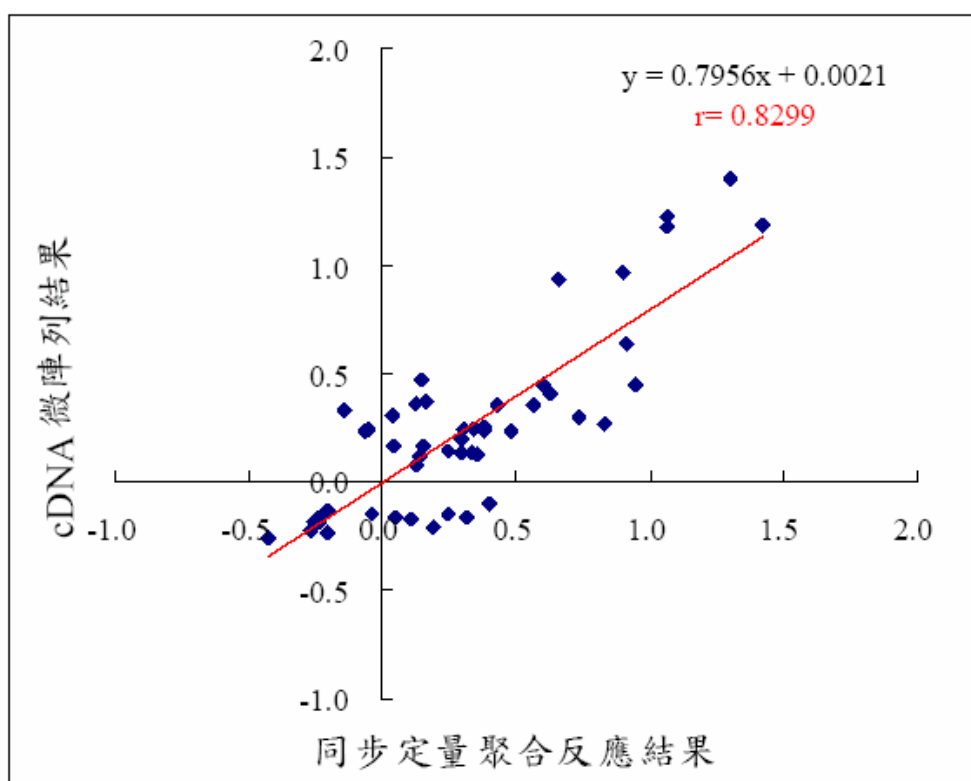


圖 22 七種基因的同步定量聚合反應與 cDNA 微陣列結果之數值相關性分析圖。

表1 青海與西藏冬蟲夏草的微量元素含量表。

元素	濃度 (μg/g)			
	青海 1	青海 2	西藏 1	西藏 2
Na	1707.00	1838.16	457.25	428.89
K	9020.00	7789.47	6293.29	7166.67
Ca	667.00	1151.32	353.35	512.22
Mg	1500.00	10355.26	1320.35	1400.00
Fe	304.00	428.95	209.96	722.22
Al	349.00	719.74	242.42	651.11
Mn	9.00	7.89	35.17	23.33
As	5.75	13.45	1.96	2.65
Cr	0.35	2.72	0.28	5.35
Cu	8.96	11.46	9.21	7.80
Ni	< 0.014	0.59	< 0.0074	< 0.015
Pb	0.13	1.12	0.28	0.60
Sr	3.41	5.34	1.55	2.13
Zn	124.80	62.37	127.71	76.11

表 2 冬蟲夏草標記基因表 (1 到 50)。紅色箭頭表示基因表現上調，綠色箭頭表示基因表現下調。

次序	基因名稱	功能簡述	F值	調控
1	CD69	CD69 antigen (p60, early T-cell activation antigen)	382.3	↑
2	STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	272.7	↑
3	CGI-01	CGI-01 protein	206.8	↑
4	RNU22	RNA, U22 small nucleolar	143.3	↑
5	STAT5A	signal transducer and activator of transcription 5A	112.7	↓
6	KIAA0101	KIAA0101 gene product	81.0	↑
7	TIA1	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein	78.4	↓
8	HIST1H2BJ	histone 1, H2bj	74.8	↓
9	PRDX1	peroxiredoxin 1	67.7	↑
10	PIIB	peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)	61.7	↑
11	PLAB	prostate differentiation factor	60.2	↓
12	STK17B	serine/threonine kinase 17b (apoptosis-inducing)	56.4	↑
13	LST1	leukocyte specific transcript 1	51.1	↓
14	IL1B	interleukin 1, beta	50.8	↓
15	LOC375743	similar to CG3073-PA	50.6	↓
16		unknown	47.8	↑
17	SLC3A2	solute carrier family 3 , member 2	47.7	↑
18	WWP2	Nedd-4-like ubiquitin-protein ligase	46.9	↓
19	TOP1	topoisomerase (DNA) I	45.2	↓
20	CST7	cystatin F (leukocystatin)	45.1	↑
21	SNRPF	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide F	43.8	↑
22	DUSP4	dual specificity phosphatase 4	43.4	↑
23	24432	hypothetical protein 24432	43.1	↓
24	DDX5	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5	41.6	
25	POU2F2	POU domain, class 2, transcription factor 2	39.1	↓
26	TUBA6	tubulin alpha 6	37.8	↑
27	HSPA8	heat shock 70kDa protein 8	37.2	↑
28	TRGV9	T cell receptor gamma variable 9	36.8	↑
29	POP1	processing of precursors 1	36.3	↓
30		unknown	35.7	↑
31	PTE1	peroxisomal acyl-CoA thioesterase	35.0	↓
32	KDEL2	KDEL endoplasmic reticulum protein retention receptor 2	34.7	↑
33	PHKG2	phosphorylase kinase, gamma 2 (testis)	34.6	↑
34	HMMR	hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	34.2	↓
35	NPFF	neuropeptide FF-amide peptide precursor	33.8	↑
36	PKM2	pyruvate kinase, muscle	33.8	↑
37	DKFZp434D0215	SH3 domain protein D19	33.7	↑
38	PRDX2	peroxiredoxin 2	33.3	↑
39	ITGB1	integrin, beta 1 ( antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	33.0	↓
40	GSK3B	glycogen synthase kinase 3 beta	32.8	↓
41	ZYX	zyxin	32.6	↓
42	GPP34R	GPP34-related protein	32.5	↓
43	PAG	phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains	32.5	↑
44	LOC283241	hypothetical protein LOC283241	32.3	↓
45	RIPK2	receptor-interacting serine-threonine kinase 2	32.0	↑
46	CD38	CD38 antigen (p45)	31.7	↓
47	FLJ10407	hypothetical protein FLJ10407	31.4	↑
48	HIST1H2BD	histone 1, H2bd	30.9	
49		unknown	30.6	↓
50		unknown	30.2	↑

表2 (續) 冬蟲夏草標記基因表 (51 到 100)。

次序	基因名稱	功能簡述	F值	調控
51	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	30.1	↓
52	RCD-8	autoantigen	30.0	↑
53	PRG1	proteoglycan 1, secretory granule	29.6	↓
54	CIAO1	WD40 protein Ciao1	29.5	↓
55	CLSTN1	calsyntenin 1	29.2	↑
56	FLJ12542	hypothetical protein FLJ12542	29.2	↑
57		Homo sapiens cDNA FLJ26466 fis, clone KDN04258	28.6	↓
58	RDBP	RD RNA binding protein	28.4	↑
59	MAN1A2	mannosidase, alpha, class 1A, member 2	28.0	↓
60	EIF3S8	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8, 110kDa	28.0	↑
61	NPM2	nucleophosmin/nucleoplasmin, 2	27.7	
62	TJP2	tight junction protein 2 (zona occludens 2)	27.7	↓
63	ETS2	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)	27.7	↑
64	PLEK	pleckstrin	27.5	↓
65	SCDGF-B	spinal cord-derived growth factor-B	27.5	↑
66	XTP5	minor histocompatibility antigen HA-8	27.3	↑
67	LSM1	LSM1 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	27.0	↑
68	CCT6B	chaperonin containing TCP1, subunit 6B (zeta 2)	26.9	↑
69	SYNCRIP	synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	26.4	↑
70		unknown	26.4	↑
71	LOC54499	putative membrane protein	26.2	↑
72	ZNF236	zinc finger protein 236	26.1	↑
73	FNBP1	formin binding protein 1	25.9	↓
74	ABCG1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	25.7	
75	GRCC10	likely ortholog of mouse gene rich cluster, C10 gene	25.6	↓
76	CYCS	cytochrome c, somatic	25.2	↑
77		unknown	25.2	↓
78		Homo sapiens full length insert cDNA clone YW29A12	25.1	↓
79	PTPN6	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	24.8	
80	SRM	spermidine synthase	24.7	↑
81	LRRN4	leucine rich repeat neuronal 4	23.8	↓
82		unknown	23.8	
83	PSMF1	proteasome (prosome, macropain) inhibitor subunit 1 (PI31)	23.6	↓
84	AIPL1	aryl hydrocarbon receptor interacting protein-like 1	23.5	
85	TALDO1	transaldolase 1	23.2	↑
86	CPSF5	cleavage and polyadenylation specific factor 5, 25 kDa	23.1	↑
87	NME3	non-metastatic cells 3, protein expressed in	23.0	↑
88	LOC286148	hypothetical protein LOC286148	22.8	↓
89		Homo sapiens transcribed sequences	22.5	↓
90	FLJ10420	hypothetical protein FLJ10420	22.5	↓
91	KIAA1237	KIAA1237 protein	22.4	↑
92	MYO1F	myosin IF	21.7	↓
93		Homo sapiens clone PSA.S.60 T-cell receptor beta chain mRNA	21.7	↑
94	ICAM2	intercellular adhesion molecule 2	21.7	↓
95	ID4	inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	21.4	↓
96	CD37	CD37 antigen	21.4	↓
97	PPIL2	peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 2	21.4	↓
98		unknown	21.3	↓
99	GPR27	G protein-coupled receptor 27	21.1	↓
100	MAX	MAX protein	21.1	↓

