

基因晶片分析六味地黃丸和桂附八味丸培養腎細胞株基因之不同表現

蔡文廷 陳光偉 林昭庚 張永賢 徐松鋁

中國醫藥大學中西結合研究所

台中市

慈濟大林綜合醫院中醫科

嘉義縣

中國醫藥大學附設醫院中西醫療合作中心

台中市

中央研究院生醫所

台北市

年 月 日受理， 年 月 日收校訂稿， 年 月 日接受刊載

由於中醫臨床治療腎病分腎陰虛和腎陽虛，本研究嘗試利用基因晶片分析其治療中藥複方，在培養腎細胞株後抽取 ，探討基因有何不同之表現。藉腎陰虛和腎陽虛常用方劑 - 六味地黃丸和桂附八味丸，和 培養胚胎腎細胞株，抽取培養腎細胞 ，用中研院白果能博士之基因晶片，作呈色掃描基因表現圖譜分析。結果在六味地黃丸加上，肉桂、附子兩味熱性中藥後之桂附八味丸之圖譜分析，其基因表現上調和下降各有 個基因，其中 個基因有顯著意義。

()

() ()。

結論： 個向上調控基因，影響內分泌恆定之生化荷爾蒙變化與粒線體能量代謝，和臨床證型顯著相一致。 向上調控粒線體內膜上呼吸酵素，即細胞色素氧化 增加，促進粒線體 合成。 酵素於細胞質 內，促進合成酯醇和膽固醇。 此酵素缺乏的遺傳疾病，大都將導致間質性慢性腎炎腎衰。由以上基因調控瞭解到桂附八味丸治療之機轉，同時中西醫生理功能術語，在基因的解讀中腎陽命門火、腎主納氣和粒線體；腎陰和腎上腺及性腺得到串聯。命門與三焦清晰闡明了人體內組織細胞水分與能量的產生、輸送和代謝。

關鍵詞：基因晶片，中藥，基因表現，粒線體能量代謝，內分泌恆定。

前言

慢性腎炎、腎衰病人，腎陽虛腎陰虛是中醫臨床常見的辨證診斷分類，已有許多研究顯示其生化指標有顯著不一樣，如腎陽虛 下降， 上升，甲狀腺素 下降；而腎陰虛則 上升， 下降，甲狀腺素、 上升。老年大鼠肝粒線體能量代謝及其調控機制的研究，在腎陰虛組琥珀酸和 氧化酶下降，而細胞色素氧化酶活性升高；腎陽虛組肝粒線體，琥珀酸和 氧化酶升高，而細胞色素氧化酶活性下降，脂質代謝過氧化產物丙二醛（ ）含量明顯高于腎陰虛。中醫理論認為疾病主要是機體整體功能失調，證是疾病發展過程中某一階段的病機概括，是生物體對環境相應外因的反應狀態，隨病證發展而相應變化，證型則是對複雜的病因、病機、病態、病勢作概括性歸納分類，其根本即源於細胞基因表現型式的改變。基於這樣的認識，在後基因時代從細胞分子水平，揭示中藥複方在辨證論治的作用機理是可以實現的。

生物體或細胞對任何改變伴隨自基因表現型式的改變，許多研究報告清楚顯示，基因表現和調控分析在中藥對生物體影響是很重要的，而許多生物技術在 水平分析基因表現均可應用，如北方點法、分化展示法、基因表現系列分析法和點塊分析法。但這些方法對需同時分析大量表現產物是不合適的，然而基因晶片具有在單一雜交步驟，可檢測幾千種不同表現之 ，且對同一種組織在不同培養條件下，作基因表現的比較特別有效力，利用基因晶片技術，應用於不同條件如健康與否、腎陽虛或腎陰虛以及用藥之有無，可在單一的雜交步驟，同時測得數千不同 的量，作組織細胞基因表現不同之分析，因此對於涉及多成分、多靶點、多途徑的中藥複方治療研究非常有利，去揭示中西醫共同的根本理論基礎。

材料與方法

一、中藥複方（購自順天堂濃縮科學中藥）

六味地黃丸：每 克中含熟地黃 克 山藥 克 山茱萸 克 澤瀉 克 茯苓 克 牡丹皮 克。

以上生藥製成浸膏 克（生藥與浸膏比 ； ）澱粉 克。

桂附八味丸：每 克中含有熟地黃 克 山藥 克 山茱萸 克 澤瀉 克 茯苓 克 牡丹皮 克 肉桂 克 炮附子 克。

以上生藥製成浸膏 克（生藥與浸膏比 ； ）澱粉 克。

中藥製備：將 的科學中藥粉末加入 的培養液 （ ），以超音波震盪 分鐘使粉末溶解均勻。以 的轉速離心 分鐘將沉渣去除。

用濾紙過濾藥液，再用 μ 孔徑的過濾膜過濾藥液，在無菌操作檯中用 μ 孔徑的過濾膜過濾藥液，加入 的 （ ），即培養液中含 。加入 及 ，此培養液即可用來處置細胞或是儲存在 。

二、培養 293 細胞

使用直徑 的培養盤及 的培養液 培養 細胞 待細胞達預定數量時吸掉培養液。加入 (或 ,或)的 及 (或 ,或)已加入中藥之培養液共 。最後的藥品濃度為： (或 ,或)，在 ° 的恆溫箱中培養兩天。

三、純化 RNA

吸掉培養液加入 的 ，使 在培養盤表面平均分佈，與細胞混合並儘快將與細胞混合好之 吸到小型離心管中。將離心管放置冰上 分鐘，每 的 加入 的 ，震盪 秒使其混合均勻置於冰上 分鐘，以 的轉速 ° 離心 分鐘。液面會分為兩層上層為 ，小心的吸出上層液體移至新的離心管，加入 (份量為吸出液體總體積的一半)，震盪使混合均勻加入 (份量為此時總體積的二十分之一)，震盪 秒離心 分鐘。將上清液吸掉，用 酒精 清洗加入酒精後震盪 秒，使均勻再離心一分鐘後將上清液去除，重覆 酒精 步驟再洗一次，置於無菌操作檯空氣中乾燥約 分鐘，加入 處理過的水 μ ，震盪均勻後離心以 轉速離心 分鐘，吸出上清液移至新的離心管即得 。

四、純化 mRNA

將 做酒精沉澱：加入 的 溶液 μ 及 的酒精放置於 ° 中至隔天，以 的轉速離心 分鐘，將上清液去除置於無菌操作檯中空氣乾燥，加入 的 ，置於 ° 、 分鐘及置於冰上 分鐘。(另一方面需同時準備好 供使用)，將處置好的 溶液加入 中，加入 的 清洗，用 的 溶出 ，將溶出的 溶液置於 ° 、

○

(三)

1

佳佳

能

能

Table 1. Genes that increase under eight-herb soup treatment (compare to the six-herb soup) detected by DNA microarray. ESTs : expressed sequence tags, the function of these genes are unknown

Table 2. Genes that decrease under eight-herb soup treatment (compare to the six-herb soup) detected by DNA microarray

臨床上即表現『外寒』。『陰虛』顯示細胞內葡萄糖、脂肪酸或胺基酸不足，致『粒線體功能亢進』，粒線體增加 合成送到細胞漿內，透過細胞膜上腺苷環酶（ ）生成環腺核苷酸（ ），因此陰虛者環腺核苷酸增加，肝臟為體內生化合成工廠且含粒線體次多，臨症表現出『內熱』。

臨床上糖尿病腎病變，血糖高甚至膽固醇、三甘油脂高，但細胞膜上酪胺酸激酶接受器（ ），缺乏胰島素啟動細胞內磷肌醇激酶（ ），無法啟動細胞膜上葡萄糖輸送器增加，因此細胞內葡萄糖低、甚至脂肪酸或胺基酸不足，故常見陰虛內熱證型，六味地黃丸治療糖尿病陰虛內熱 ，正合乎王冰所謂『益水之源，以制陽光。』

鄭安堃等發表環腺核苷酸 正常值 $\pm$ ，環鳥核苷酸 正常值 $\pm$ ； 王明春等發表環腺核苷酸男性正常值 $\pm$ ，女性正常值 $\pm$ 。

由於 是細胞內訊息傳遞第二信使，在細胞膜上腺苷環化酶接到細胞外第一信使荷爾蒙（增昇糖素、腎上腺素等）信息而激活 ，啟動蛋白激酶 ，在肝細胞分解肝糖為葡萄糖和抑制肝糖合成，另外催化亞基和作用各異的調節亞基構成，催化亞基可使許多蛋白質產生磷酸化反應，而調節亞基的 和 型，則分別調控細胞核基因增殖與分化過程，二者功能的平衡是維持細胞正常生長與分化的前提， 亞基的過度表現則細胞無限制生長，促細胞惡性轉化與癌腫形成，桂附八味丸治療癌症陽虛時 ，也許在調節 降低所造成的失衡時，有助於細胞的良性分化，誠如王冰所謂『益火之源，以消陰翳。』

杜克大學 和 ，發現超氧化歧酶（ ） 唯一任務即破壞氧自由基，正常粒線體氧化代謝才形成超氧化歧酶。腎陽虛呼吸鏈細胞色素氧化酶活性減低，則超氧化歧酶形成下降，易產生自身氧化呼吸鏈電子傳遞溢出，造成粒線體 損傷變異，而 缺乏核 的修補系統，因此 變異是核 的 倍以上。在神經肌肉細胞可能堆積了許多突變 ，推測可能是成年時期才發作常見疾病，如巴金氏病（ ） 阿茲海默氏病（ ） 孿廷頓氏病（ ）之病因。許多研究認為粒線體 損傷，是細胞衰老和死亡的分子基礎，尤其 能量代謝旺盛的腦部和心臟，首先出現功能衰退，形成衰老過程、自由基生成與粒線體損傷的惡性循環。王傳社等實驗小鼠延緩衰老機理的比較，桂附八味丸增加超氧化歧酶活性、降低過氧化脂質改善自由基代謝、調整免疫功能、改善腎小球基底膜厚度及間質炎症等，抗衰老作用明顯優於六味地黃丸 。

（ ）位於細胞質 內，在肝細胞促進 合成酯醇和膽固醇；膽固醇和蛋白質、磷脂類、三甘油脂一起形成脂蛋白，從血中送到睪丸或卵巢，合成男性賀爾蒙、睪丸酮或女性賀爾蒙、雌二醇；在腎上腺合成皮質脂酮、皮質醇、可體松及醛固酮。桂附八味丸提升腎陽虛血中低下性賀爾蒙、腎上腺皮質激素和醛固酮，達到治療作用 。

金匱要略 腎氣丸 以六味地黃丸滋養腎陰為基礎，僅用少量桂附以助腎陽，發揮了內經素問 善補陽者，必於陰中求陽，則陽得陰助而生化無窮 之醫理，從基因表現層面說明了， 提升老年人粒線體能量代謝； 加強皮質激素和性荷爾蒙產生之機轉；生化上環核苷酸、性賀爾蒙、腎上腺皮質激素和醛固酮得到了矯正；臨床上腎陽虛證型畏寒肢冷等症狀獲得改善，基因、生化與證型三者得到了串聯。

中醫腎生理功能主藏精、主水、主納氣。從難經始分左為腎，右命門；命門者，精神之所舍也，原氣之所系也，男子以藏精，女子以系胞，其氣與腎通。基因層面由 和 一起共同調控細胞能量、和內分泌腺軸腎上腺與性腺，得以瞭解歷代醫家臨床治療腎虛，其體會分腎陽命門與腎陰意義。而且兩千年前難經說：『所謂生氣之原者，謂十二經之根本也，謂腎間動氣也，五臟六腑之本，十二經脈之根，呼吸之門，三焦之原』，說明粒線體 掌控細胞色素氧化酶，促進氫質子與氧氣接受電子生成水，即三焦輸送水所需能量 的源頭。內經素問所謂：『三焦者，決瀆之官，水道出焉。』內經靈樞：『腎合三焦膀胱，三焦膀胱者，腠理毫毛其應。』『元氣走三焦，盲膜腠裡。』說明三焦輸送粒線體能量代謝產生的水分，經粒線體膜和細胞膜到組織液，進入淋巴血液循環（上中下三焦），由腎膀胱排出。臨床上糖尿病腎病變水腫或肝硬化腹水，西醫利尿劑效果不佳時，中醫使用溫陽宣肺、開腠裡行皮裡膜外，益氣健脾，可發揮全身細胞利水消腫的效果。而粒線體有氧呼吸能量代謝，同時說明了腎主納氣之生理意義。

（ ）腺苷磷酸核糖轉化酶，在冰島、美國缺乏此酵素家族遺傳疾病，都將導致慢性腎炎腎衰，甚至換腎後亦同樣發生間質性腎炎，酵素 和中醫腎氣、慢性腎炎腎衰關係有待研究。

：此酵素鍵解 形成酸和銨（ ），亦催化醯胺（ ）水解成酸和銨，代謝關係有待研究。

（ ）： 啟動蛋白激酶（ ），需要 參與傳訊到 ，再啟動細胞核基因轉錄，調控細胞核 增殖與分化。

肉桂助腎中陽氣並納氣歸腎，引火歸元；附子主治亡陽欲脫、命門火衰，溫補命門之主帥、回陽救逆之要藥。因此肉桂附子何種成分調控粒線體能量代謝，使呼吸酵素細胞色素氧化酶活性增加，且這些基因表現的 確認，其基因功能及 表現量需進一步研究。

結 論

桂附八味丸培養 細胞基因表現上調和下降最多的 個基因，其中 個基因有顯著意義。

向上調控粒線體內膜上呼吸酵素，即細胞色素氧化酶活性增加，促進粒線體合成。

（ ）調控細胞 內此酵素，促進合成酯醇和膽固醇。
（ ）此酵素缺乏的遺傳疾病，大都將導致間質性慢性腎炎腎衰，有顯著臨床意義。

中醫診斷腎病，由經驗中分兩個層面，脈分左腎右命門、證分腎陽虛和腎陰虛，腎陽、命門火代表粒線體能源的供應，對生命存在相當重要。腎陰涵蓋內分泌腺軸腎上腺、性腺、腎藏，對身體生長發育居主導功能。由基因調控有助於瞭解桂附八味丸治療機轉，同時中西醫生理功能術語，在基因的解讀中對腎陽

命門火和粒線體、腎陰和腎上腺及性腺得到串聯，命門與三焦清晰闡明了水分與能量的產生、輸送和代謝關係。

誌 謝

本研究承蒙中國醫藥學院附設醫院醫研部經費贊助，中央研究院生醫所助理陳音璇小姐、林宇星先生協助於此一並致謝。

參考文獻

- 李東濤、田濟遠、王守海，陽虛的內在實質研究回顧與展望，現代中西醫結合雜誌：，。
- 李勁平、王培訓、基因芯片在中醫藥研究中的應用，中醫雜誌：，。王忠、王階、王永炎，後基因組時代中醫証候組學研究的思考，中國中西醫結合雜誌：，。
- 趙偉康、周志東、金國琴，老年期腎陰陽虛損大鼠的線粒體能量代謝及其調控機制的研究，中國中醫基礎醫學雜誌：，。
- 嚴燦、吳偉康、李艷，從人類基因組計畫探討新世紀中醫藥發展之路。中國中西醫結合學會周年大會論文集，。
- 錢彥方，加強臨床研究是中醫發展的內在動力，中國中醫基礎醫學雜誌：，。
- 朱文鋒，辨証統一體系的創立，中國中醫基礎醫學雜誌：，。
- 王忠、王階、王永炎，後基因組時代中醫証候組學研究的思考，中國中西醫結合雜誌：，。

傅萬山、丁伯平、楊解人，六味地黃丸對甲亢型腎陰虛大鼠滋陰的研究，中國實驗方劑學雜誌： ， 。

張建敏、黃克希，溫腎補陽法治療腫瘤的理論基礎與臨床運用，福建中醫藥： ， 。

彭世橋、王耀獻，溫腎陽法治療消渴的源流及運用，河南中醫藥學刊： ， 。

&

王傳社、李順成，桂附八味丸和六味地黃丸延緩衰老機理的比較，中藥藥理與臨床研究進展第四冊，北京軍事醫學科學出版社，北京， ， 。

魏連波、葉任高、陳旭紅、李智軍、呂瑞和、奕圖，中西結合治療老年人原發性腎病綜合征臨床觀察，中國中西醫結合雜誌： ， 。

桂附八味丸培養腎細胞之基因表現

，

蔡文廷 陳光偉 林昭庚 張永賢

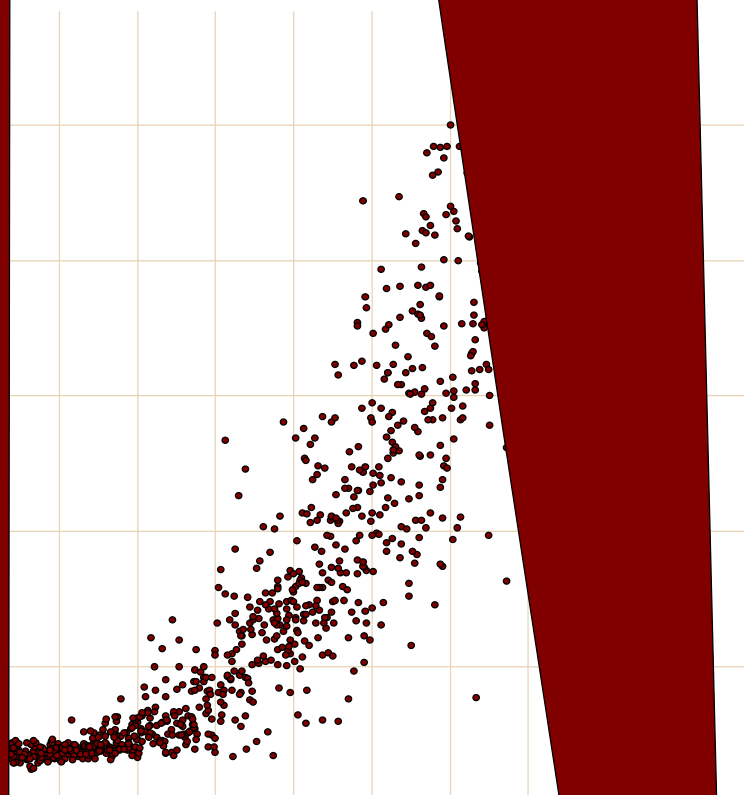


圖 1：桂附八味丸

圖 2：六味地黃丸

I M CROARRAY ANALYSIS OF GENES DIFFERENTIALLY EXPRESSED IN HEK 293 CELLS CULTURED IN REHMANNASAX AND EIGHT FORMULAE

¹*Institute of Chinese and Western Medicine Integration,
Tai-Chung, Taiwan*

²*Buddhist Dalin Tzu Chi General Hospital,
Chia-Yi, Taiwan*

³*China Medical University Hospital,
Tai-Chung, Taiwan*

⁴*Institute of Biomedical science, Academia Sinica,
Taipei, Taiwan*

(Received 19 December 2002, revised Ms received 27 March 2003, accepted 14 August 2003)

Key words

Correspondence to