

使用微陣列生物晶片探討過敏性氣喘 中醫寒熱證型與基因表現的關係

游明謙^{1,2} 呂春美³ 陳雅惠⁴ 蕭龔⁴ 陳康正⁴ 黃瓚珽⁴ 王櫻諭⁴ 許清祥^{1,5}

¹中國醫藥學院 中醫研究所

中國醫藥學院附設醫院 ²中西合作醫療中心 ³中醫部 ⁵小兒科

台中

⁴晶宇生物科技實業股份有限公司

新竹

(2002年1月16日受理, 2002年3月5日收校訂稿, 2002年3月7日接受刊載)

由於近年來對過敏性氣喘致病機轉的了解, 認為氣喘的發生與環境因子及多基因的遺傳有關。已有許多研究證實傳統中藥對免疫調節有一定的作用, 但目前卻很少有中藥經過嚴謹的臨床試驗證實對氣喘病人有效, 主要原因可能是臨床試驗並未加入中醫“辨證論治”的精神。但中醫的“證”到目前卻沒有明確的定義及量化的標準。因此本研究嘗試在過敏性氣喘的病人中, 依據望、聞、問、切的原則, 用八綱辨證之寒熱為主體, 設計出熱證評分表來量化病人熱證的嚴重度, 再利用微陣列的方法選取與氣喘相關的 30 種基因, 比較熱證程度不同的病人其各種基因表達之差異。結果發現 guanylate binding protein 1 (GBP1) 與熱證評分的相關性最為顯著 ($P = 0.072$), 且為負相關。若將病人之熱證嚴重度分成明顯熱證 (11-15 分)、微熱證 (6-10 分) 及非熱證 (1-5 分) 三型, 再比較各種基因表現之差異, 可以發現第二型輔助 T 細胞類之細胞間白素 4、細胞間白素 13 及 RANTES 的基因表現在明顯熱證的病人高於非熱證型之病人。因此, 我們認為臨床上過敏性氣喘的病人中, 是否存在二群不同證型或體質的病人, 在熱證明顯時, 細胞間白素 4、細胞間白素 13 及 RANTES 的基因表現上升而 GBP-1 基因的表現下降; 相反的, 在非熱證型中, GBP-1 基因的表現上升而細胞間白素 4、細胞間白素 13 及 RANTES 的基因表現下降, 但是否能用這些基因表現之差異來完全解釋過敏性氣喘病人之寒熱證型, 則需要做更大規模的研究並找尋更多可能與中醫證型有關的基因進一步研究。

關鍵詞：過敏性氣喘, 熱證, 生物晶片, 微陣列。

聯絡人：許清祥，中國醫藥學院附設醫院，台中市育德路 2 號，電話：(04) 22052121 轉 4163，傳真：(04)22032798，E-mail: hsumd736@ms67.hinet.net。

前 言

近年來全球過敏性氣喘的盛行率及嚴重度不斷地上升，台灣也不例外^{1,2}，隨著現代科技對氣喘研究的了解，雖然不斷有新的突破與發展，但臨床上對氣喘病的治療，仍有很大的努力空間，而全球對另類醫療的需求也不斷地增加³。傳統中醫對疾病治療方法之思考模式，必須透過望、聞、問、切，依個別病人辨證而論治。若完全不用“辨證”的精神去治氣喘，等於是沒有使用中醫的診斷精華，因此希望用中醫方劑成功治療氣喘，可能會面臨中醫藥無效的窘境，例如過去學者使用六味地黃丸治療氣喘的大規模研究⁴，雖然在體外試驗、動物實驗中都有一定的療效，但最終的人體試驗卻效果不佳，因為六味地黃丸或許可以治療一部分體質適合的氣喘病人，但卻無法完全適用於所有的氣喘病人。因此，“辨證論治”是將來發展中醫藥不可迴避的問題。

近年來不論是單味藥或中藥複方在氣喘病人的臨床治療上，仍扮演重要的角色^{5,6}，各種體內或體外的實驗也不斷證實中藥對免疫調節有一定的作用^{7,8}，但是為何目前還沒有一個有效的方劑可以用來治療大部分的氣喘病人，主要的原因還是“辨證”的迷思，因此，我們必須對中醫的“證”有現代化的了解，才能提供未來中醫藥臨床試驗的正確發展，造福更多的氣喘病人。過去曾有不少學者對過敏性疾病病人的辨證分型做過研究^{9,10}，我們也曾對過敏性鼻炎、氣喘的臨床證型做過分析，結果發現“熱證”與病人血清中之嗜伊紅性陽離子蛋白 (eosinophil cationic protein) 有強烈的正相關¹¹。嗜伊紅性陽離子蛋白是氣喘晚期 (late phase) 嗜伊紅性細胞所釋於出的毒性物質，目前用於評估氣喘病人之預後及嚴重度，屬於蛋白質的層次。但是在基因層次到底有那些基因的表現有增加或減少，則需要進一步的研究。因此，我們針對影響細胞激素 Th1/Th2 平衡的基因，用微陣列 (microarray) 的方式，試圖在過敏性氣喘的病人中，依中醫傳統辨證的方式，探討“熱證”的病人其相關基因表現的差異，希望進一步對氣喘病人“熱證”的機轉有更清楚的認識。

材料與方法

一、研究對象

以民國 90 年一月至五月，在台灣中部地區教學醫院過敏症特別門診，篩選出典型對塵 過敏之氣喘病患共 52 人，診斷標準 (inclusion criteria) 如下：

(1) 血清中 IgE 總量上升 (超過 100 ku/ml) (2) 對常見過敏原皮膚試驗呈陽性反應 (3) 血清中對專一性過敏原塵 之抗體上升 (CAP-specific IgE 超過 2ku/ml) (4) 吸入支氣管擴張劑後肺功能可逆性上升 15% 以上 (positive bronchodilator test)

二、中醫辨證

依傳統中醫望、聞、問、切的辨證方式將 52 位典型過敏性氣喘的病人進行熱證評分，評分標準如表 1。

問診中之口渴喜冷飲、大便祕結、小便黃等症狀，依其發生頻率，分為“時常發生”、“偶爾發生”或“無此症

Table 1. heat-Zheng scoring

| 熱證 | 嚴重度 | 評分 |
|-------|-----|----|
| 口渴喜冷飲 | 時常 | 2 |
| | 偶爾 | 1 |
| | 無 | 0 |
| 大便秘結 | 時常 | 2 |
| | 偶爾 | 1 |
| | 無 | 0 |
| 小便黃 | 時常 | 2 |
| | 偶爾 | 1 |
| | 無 | 0 |
| 面紅 | 明顯 | 2 |
| | 稍微 | 1 |
| | 無 | 0 |
| 唇紅 | 明顯 | 2 |
| | 稍微 | 1 |
| | 無 | 0 |
| 目赤 | 明顯 | 2 |
| | 稍微 | 1 |
| | 無 | 0 |
| 舌質紅 | 明顯 | 2 |
| | 稍微 | 1 |
| | 無 | 0 |
| 舌苔 | 黃膩 | 2 |
| | 薄黃 | 1 |
| | 不黃 | 0 |
| 總 分 | | |

狀”，分別給予 2 分、1 分及 0 分。望診中之面紅、唇紅、目赤、舌質紅、苔黃膩則依明顯、稍微及無分別給予 2 分、1 分及 0 分。再依其熱證評分的高低將病患分成熱證明顯（11~15 分）、微熱證（6~10 分）及非熱證（0~5 分）三組。

三、欲測量基因之選取(candidate genes)

- (一)細胞激素 (cytokines)：細胞間白素 4 (interleukin 4 ; IL-4)、細胞間白素 6 (interleukin 6 ; IL-6)、細胞間白素 9 (interleukin 9 ; IL-9)、細胞間白素 10 (interleukin 10 ; IL-10)、細胞間白素 13 (interleukin 13 ; IL-13)；干擾素 γ (interferon γ ; INF- γ)、細胞間白素 12 (interleukin 12 ; IL-12)、細胞間白素 15 (interleukin 15 ; IL-15)、細胞間白素 18 (interleukin 18 ; IL-18)。
- (二)接受體(receptors)：細胞間白素 4 接受器 α (interleukin 4 receptor α ; IL-4 R α)，細胞間白素 5 接受器 α (interleukin 5 receptor α ; IL-5 R α)；細胞間白素 12 接受器 β (interleukin 12 receptor β ; IL-12 R β)、細胞間白素 15 接受器 α (interleukin 15 receptor α ; IL-15 R α)、細胞間白素 18 接受器 α (interleukin 18

receptor α ; IL-18 R α)。

(三)轉錄因子(transcription factors) : GATA-binding protein 1 (GATA-1)、GATA-binding protein 3 (GATA-3)、signal transducer and activator of transcription 1 (STAT-1)、signal transducer and activator of transcription 2 (STAT-2)、signal transducer and activator of transcription 4 (STAT-4)、signal transducer and activator of transcription 6 (STAT-6)。

(四)訊息分子(signaling molecules) : guanylate binding protein 1 (GBP-1)。

(五)趨化激素/黏粘分子(chemokines/adhesion molecules) : integrin alpha 6 (ITGA-6)、integrin alpha 7 (ITGA-7)、eotaxin、RANTES、intercellular adhesion molecule 2 (ICAM-2)、chemokine receptor 1(CCR1)、chemokine receptor 3 (CCR3)、chemokine receptor 5 (CCR5)、chemokine receptor 7 (CCR7)、CD30 (Th2 membrane marker)。

四、周邊血製備及 RNA 抽取

(一)周邊血製備

使用 EDTA 血液收集管，採血量為 3~5 ml，將 EDTA 管內血液沿管壁加入含有 5 ml Ficoll-Paque 的離心管中，進行離心 (2500 rpm, 20 分鐘)，離心管內溶液會分為 4 層，由上而下依次為血漿 (黃色)、中間層 (白色)、Ficoll-Paque (透明)、紅血球 (紅色)，將血漿取出分裝於 1.5 毫升微量離心管內保存於 -20°C，中間層取出一道新的 15 毫升離心管並加入已滅菌之磷酸緩衝液 (phosphate buffer solution; PBS) 洗滌，再離心後將上清液倒掉，並加入已滅菌等張磷酸緩衝液洗滌一次，離心條件為 1500 rpm, 10 分鐘。將上清液倒掉並倒扣，使水分盡量去除，然後加入 300 μ l 已滅菌之磷酸緩衝液使細胞形成懸浮液，吸取至 2.0 毫升的微量離心管內，加入 5 倍體積的細胞保存劑，保存於 -20°C 的環境，準備進行 RNA 抽取。

(二) RNA 抽取

將細胞離心下來去除保存劑，離心條件為 4°C，4000 g 15 分鐘，加入 1 毫升 TRIZOL 試劑，並經震盪器震盪將細胞打破，然後離心並在室溫下靜置 5 分鐘，加入 0.2 毫升 CHCl_3 ，經震盪器震盪 1 分鐘，離心將已打破的細胞與 RNA (位於 CHCl_3 層) 分離，離心條件為 4°C，14000 g 15 分鐘，將上清液取出移到新的 1.5 毫升微量離心管中，加入 0.5 毫升 isopropanol 混合均勻，置於 -20°C 約 20 分鐘後離心 (4°C，14000 g 15 分鐘)，將上清液倒掉，用 75% 酒精稍微清洗沉澱物後再離心 (4°C，14000 g 5 分鐘)，將上清液去除並將沉澱物乾燥，再加入 20 μ l RNase-free water 形成懸浮液，藉由光譜偵測儀計算 RNA 濃度 (260 nm/280 nm)。

(三) cDNA 製備及 Cy5 標定 (labeling)

首先配製二倍反轉錄標定混合液 (Reverse transcription labeling mixture)，保存於 -20°C 備用，取 8 μ l total RNA 與 2 μ l oligo poly-dT (12-18-mer，濃度為 0.1 μ g/ μ L) 混合均勻，置於 70°C 10 分鐘，然後取出置於冰上 2 分鐘，在暗室中將下列試劑加入上述步驟的材料中，並混合均勻，再加入 Cy5-dUTP (1mM; 3 μ l); SuperScript II (200 U/ μ l; 2 μ l); Rnasin (1 μ l)。將上述混合物置於 42°C 的培養箱中 2 小時進行反轉錄，然後加入 1.5 μ l 20 mM

EDTA，使反轉錄反應停止，加入 1.5 μ l 500 mM NaOH 並於 70°C 加熱 10 分鐘將 RNA 分解 (degrade)，加入 1.5 μ l 500 mM HCl，中和多餘的 NaOH，將完成的材料移至 ProbeQuant G-50 Micro Column，除去反轉錄反應後剩餘之 Cy5，將 Cy5-labeled 產物避光保存於 -20°C。

五、微陣列晶片雜交法(Method of the Microarray assay)

將所挑選的 30 個基因 clone 經聚合酵素連鎖反應放大後，將其產物溶於點片溶液 (spotting buffer) 中，即完成探針 (probe) 的配製。將探針於 95°C、3 分鐘進行變性 (denature) 後，利用點片機 (spotting machine) 將探針點於玻璃載體上，並利用紫外光將探針 cross-link 於載體上。

晶片先藉由 n-methyl-pyrilidinone/ succinic anhydride/ sodium borate 及 5X SSC/ 0.1% SDS/ 1% BSA 兩個步驟的前處理，阻礙玻璃載體表面活性基團的作用，以減少非專一性的雜交產生，降低背景值。接著將標的物 (前述經反轉錄反應且接上 Cy5 螢光基團的病人檢體) 與雜交溶液 (50% formamide/0.2% SDS/10X SSC) 等體積混合，95°C、5 分鐘加熱變性，並利用離心迅速冷卻後，滴於點片區域，於雜交槽 (hybridization chamber) 內 42°C 下雜交反應 18 小時。雜交反應完成後，利用 1X SSC/0.1% SDS、0.1X SSC/0.1% SDS 及 0.1X SSC 三種溶液進行清洗步驟，將多餘的樣品及非專一性的雜交去除。

六、訊號判讀

晶片清洗並吹乾後，將晶片放入螢光掃描機進行影像擷取及螢光值分析。將每個點螢光值對照探針相對位置配置圖，即可得知每個基因表現的強度。

數據是藉由各個基因表現量與 GAPDH 表現量的比值大小作為數據的標準化 (normalization)，因此訊號的計算方式為：先利用 GenePix™ Pro 3.0 (Axon Instruments, Inc.) 將各基因表現的螢光強度數值化後，再將各個基因數值化的螢光度扣除背景值，再除以 GAPDH 強度 (亦扣除背景值) 後，不同樣品間之基因表現差異再與此值做比較。

晶片上有使用 mouse cDNA (ATBS) 及 plants DNA (RbCL) 當成 negative control，而且每個基因都有雙重複 (duplicate)，因此數據在計算時，是取兩點的平均值，若兩點差異過大時，便捨棄此組實驗結果，重新實驗以確保數據的正確性。此外，當雜交結果背景值不均勻或螢光訊號過低而造成訊號分析誤判的情況時，亦會重複實驗。

七、統計方法

本研究資料乃利用 SPSS 8.01 版統計軟體進行統計分析比較，根據資料特性及研究目的將資料以皮爾森相關分析 (Pearson Correlation) 及多變項迴歸分析 (Multiples Linear Regression) 進行資料分析，藉以得知各基因型與臨床醫療指標 (如 FEV₁、ECP、IgE...等) 及寒、熱證之相關情形，並進一步利用各基因型之表現數值對寒、熱證結果進行預估，以提供臨床上診斷及評估之依據。依熱證評分的嚴重度將病人分成明顯熱證 (11~15 分)、微熱證 (6~10 分) 及非熱證 (0~5 分) 三組，再與各基因表現之量以 ANOVA 的方式進行

統計。

結 果

一、研究對象之基本資料及辨證分型

本研究所討論典型對塵 過敏之氣喘病人共 52 人，男性 28 人，女性 24 人。平均年齡為 21 歲 (6~68 歲)，熱證的評分平均為 7.4 分 (範圍從 2 分到 14 分)。若依其熱證評分的高低將病患分成明顯熱證 (11~15 分)、微熱證 (6~10 分) 及非熱證 (0~5 分) 三組，病患分別有 10 人、23 人及 18 人。所有病人之 total IgE、周邊嗜伊紅性白血球數目 (Eosinophil count)、cap-specific IgE 數值如表 2。

二、利用微陣列晶片定量氣喘病人之基因表現

干擾素(interferon- γ ; INF- γ) 細胞間白素 12 (interleukin 12; IL-12)、細胞間白素 15 (interleukin 15; IL-15)、細胞間白素 18 (interleukin 18; IL-18)、細胞間白素 12 接受器 β (interleukin 12 receptor β ; IL-12 R β)、細胞間白素 15 接受器 α (interleukin 15 receptor α ; IL-15 R α)、細胞間白素 18 接受器 α (interleukin 18 receptor α ; IL-18 R α)、ITGA6 等以第一型輔助 T 細胞(Th1-like CD4)為主的基因表現如表 3。

細胞間白素 4 (interleukin 4; IL-4)、細胞間白素 6 (interleukin 6; IL-6)、細胞間白素 9 (interleukin 9; IL-9)、細胞間白素 10 (interleukin 10; IL-10)、細胞間白素 13 (interleukin 13; IL-13)、細胞間白素 4 接受器 α (interleukin 4 receptor α ; IL-4 R α)、細胞間白素 5 接受器 α (interleukin 5 receptor α ; IL-5 R α)、STAT4、STAT6、GATA3、MCP3、MUC2、CD30 等以第二型輔助 T 細胞 (Th2-like CD4) 為主的基因表現如表 4。

Table 2. basic data of 52 patients

| Index | Mean \pm SD | Range |
|--------------------------------|---------------------|----------|
| 年齡 | 21.13 \pm 16.67 | 7-68 |
| 熱證評分 | 7.39 \pm 3.07 | 2-14 |
| Aas 評分 | 2.20 \pm 1.24 | 1-5 |
| 用藥量表 | 2.00 \pm 2.11 | 0-7 |
| 肺功能(FEV ₁) | 70.09 \pm 12.41 | 30-89 |
| 第一秒鐘最大吐氣量 | | |
| 類固醇用量 | 0.54 \pm 1.38 | 0-4 |
| Dp-specific IgE (ku/ml) | 46.53 \pm 41.17 | 0.34-101 |
| Eos. Count (/mm ³) | 412.71 \pm 323.51 | 18-1317 |
| ECP(mg/l) | 28.14 \pm 29.80 | 1.99-165 |

Table 3. Distribution of Th1 Gene expression

| Gene | Mean \pm SD (Ratio for GAPDH) | Range |
|---------------------|------------------------------------|-----------|
| GBP1 | 0.41 \pm 0.26 | 0.09-1.44 |
| IL12 receptor beta | 0.01 \pm 0.01 | 0.00-0.05 |
| IL18 receptor alpha | 0.02 \pm 0.02 | 0.00-0.08 |

| | | |
|---------------------|-----------|------------|
| ITGA6 | 0.07±0.06 | 0.00-0.32 |
| IL15 | 1.79±5.96 | 0.13-42.75 |
| Interferon γ | 1.70±6.91 | 0.24-50.50 |

Table 4. Distribution of TH2 Gene expression

| Gene | Mean \pm SD (Ratio for GAPDH) | Range |
|--------------------|------------------------------------|-------------|
| IL4 | 11.82±45.71 | 0.40-262.15 |
| IL6 | 1.00±3.59 | 0.07-26.20 |
| IL10 | 0.04±0.18 | 0.00-1.33 |
| IL 13 | 3.51±13.94 | 0.45-101.83 |
| IL4 receptor alpha | 0.49±2.74 | 0.01-19.83 |
| IL5 receptor alpha | 0.02±0.05 | 0.00-0.33 |
| Eotaxin | 0.01±0.03 | 0.00-0.17 |
| RANTES | 10.72±39.05 | 0.57-224.50 |
| STAT1 | 0.50±1.78 | 0.00±13.00 |
| STAT2 | 0.11±0.39 | 0.00±2.83 |
| STAT4 | 0.18±0.80 | 0.00-5.83 |
| STAT6 | 0.15±0.12 | 0.00-0.83 |
| GATA1 | 1.51±4.60 | 0.02-32.05 |
| GATA3 | 0.12±0.41 | 0.00-3.00 |
| CD 30 | 2.34±6.87 | 0.13-0.49 |



Note. used by pearson correlation, $r = -0.254$ (* $P < 0.1$)

Fig. 1. Correlation of heat-Zheng scoring and GBP-1 gene expression.

三、熱證評分與各基因表現之相關

將 52 位病患的各種基因表現之資料以皮爾森相關分析 (Pearson correlation) 與熱證評分進行統計分析比

較，結果發現所有的基因中以 guanylate binding protein 1 (GBP1)與熱證評分的相關性最為顯著 ($P = 0.072$)，且為負相關 (Fig. 1)。其餘的基因與熱證評分則無明顯相關。

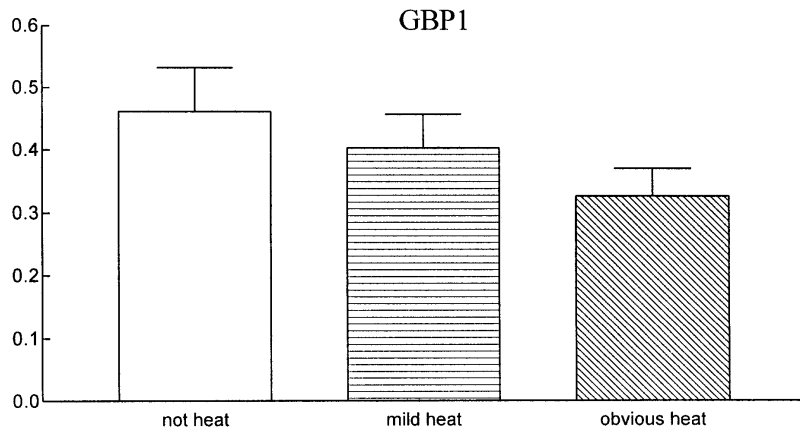


Fig. 2. Gene expression of GBP-1 between three different heat-Zheng patients.

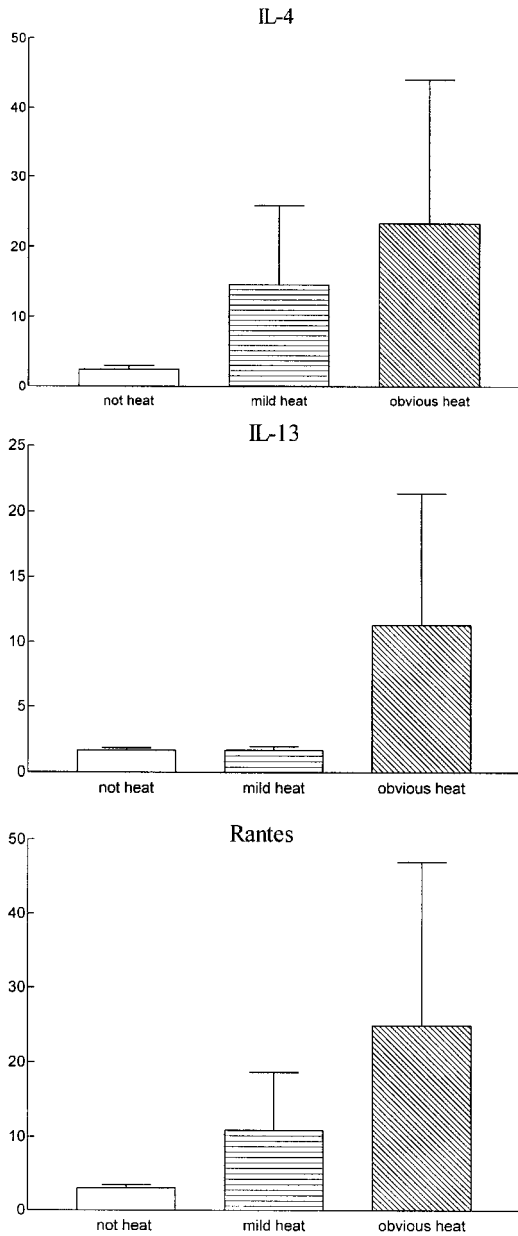


Fig. 3. Gene expression of IL-t, IL-13, RANTES between three different heat-Zheng patients.

四、不同程度熱證評分與 Th1/Th2 基因表現之差異

為了將中醫辨證量化，中醫熱證已經用評分的方式來表現，但大部分的基因表現與熱證評分的相關性並不明顯。因此，我們將病人依熱證評分的高低分層，依次分為明顯熱證（11~15分）、微熱證（6~10分）及非熱證（0~5分）三組，再依 ANOVA 的統計方式比較各種基因表現量之差異，結果發現明顯熱證之病人群在 Th2 相關之 IL-4、IL-13 及 RANTES 三個基因之表現遠高於非熱證之病人（Fig. 3）。相反的，在非熱證之病人中，Th1 相關之 guanylate binding protein 1 (GBP1) 基因表現量則高於明顯熱證之病人（Fig. 2）。

討 論

過敏性氣喘是一個與多基因相關的複雜疾病^{12,13}，目前認為主要的致病機轉是個體對環境中無害的過敏原（innocuous allergen）產生過度反應，尤其是塵，藉由 IgE 與肥大細胞（mast cell）上的高親和力接受體（high affinity FcεRI）交叉鍵結（cross-linking）後，肥大細胞釋放組織胺(histamine)及其它發炎物質如前列腺素（prostaglandin）、白稀三酸（leukotriene）等，造成可逆性呼吸道平滑肌收縮及腺體分泌增加，臨床上引起哮喘、胸悶、咳嗽、呼吸困難及氣道過度反應（bronchial hyperresponsiveness; BHR）等症狀¹⁴。晚期的發炎反應則因為細胞激素的參與，以嗜伊紅性白血球及第二型輔助性淋巴球（Th2-like lymphocyte）為主，如此慢性、反覆性的呼吸道發炎^{15,16}，最後會造成上皮細胞損傷、基底膜增厚及間質膠原蛋白堆積等呼吸道重塑（airway remodeling）的現象¹⁷。

微陣列晶片（microarray）是以雜交（hybridization）為基礎發展出用以偵測基因表現的技術，它可以同時快速、準確的分析數以千計的基因訊息，該技術是將大量探針分子固定在支持物上，與標記的樣品分子進行雜交，並用適當的偵測系統加以檢測，根據每個探針分子的雜交訊號強度，得知樣品中基因表現的種類與數量。這種技術可運用於醫學基礎研究如病理機轉的研究，亦可作為臨床上疾病的篩檢、治療效果的評估及新藥的開發^{18,19}等。由於它能快速分析處理龐大而複雜的訊息，因此是研究過敏性氣喘等多基因相關疾病最有力的工具之一²⁰⁻²²。過敏和自體免疫性疾病都與 Th1, Th2 細胞激素的平衡有關，因此本研究參考 Lars Rogge 等人所發表的 Transcript imaging of the development of human T helper cells using oligonucleotide arrays²³。挑選出影響 Th1, Th2 細胞激素平衡最有相關的基因，做最原始的參考。

傳統醫學以“辨證”為核心的思想，認為不同的個體在不同的狀態下，可能因為先天“稟賦”的差異，加上後天飲食習慣及外在環境的影響而產生不同的證型，雖然同樣是過敏性氣喘，但卻有熱證盛和非熱證型的差異，是否也都是不同基因在不同條件下，隨時間空間而有選擇性的表達上升或下降。根據我們過去的研究，認為過敏性疾病人之證型，以八綱辨證中之寒、熱來區分較明顯，也較容易定量，我們也發現“熱證”與過敏性病人血清中之嗜伊紅性陽離子蛋白（eosinophil cationic protein）有強烈的正相關¹¹。目前也有學者認為“證”的形成原因之一，可能是因為某些基因表達的改變所造成的病理變化²⁴，但目前為止尚無利用微陣列為工具探討中醫證型之研究，因此本研究將病人的周邊血樣本，抽取 mRNA 並製備成 cDNA，再嘗試使用微陣列晶片的方法²⁵測得各種基因表達之差異，希望能以更科學的方式來表現中醫之證型。

中醫的證型由於缺乏清楚的定義，不容易被量化，因此無法普遍地被應用，尤其臨床上要研究病人的中醫證型時，不同的醫師可能會有不同的認知，而有不同的辨證^{9,10}，這樣反而造成一種模糊而變成研究中的干擾因子。因此本研究所設計的熱證評分表，將臨床上認為屬於熱證的症狀及徵候，依其嚴重度加以量化，再將所有的分數相加後得到每個病人的熱證評分。在 52 位典型過敏性氣喘的病人中，抽取周邊血後分離細胞，再抽取 mRNA 製備成 cDNA 後，以微陣列 (microarray) 的方式，將病人的熱證評分與所選取的 30 個氣喘相關基因做一比對，希望能在氣喘病人中發現與熱證相關的基因表達改變。結果發現 GBP-1 與熱證呈負相關 (Fig. 1)，也就是當病人的熱證明顯時，GBP-1 基因的表達下降。相反的，在氣喘病人 GBP-1 表達上升時，熱證就變得不明顯，屬於非熱證型，雖然尚未達到明顯的統計差異，但卻有此趨勢，可能因為本研究的樣本數還太少，也有可能是熱證中還有實熱虛熱之別，但這必須進一步實驗證明。

GBP-1 是 INF- γ 的訊息分子 (signaling factor)，以改變 Th1/Th2 平衡的角度來看，當病人 GBP-1 的表現上升時，INF- γ 增加其分泌，免疫系統傾向第一型輔助細胞活化，在本研究中，GBP-1 基因表現較高之過敏性氣喘病人，在中醫辨證時，熱證評分和 GBP-1 基因表現較高之過敏性氣喘病人似乎是完全不同的證型，是否能單用寒熱證型來劃分這兩群病人，則需要更大量的樣本數及臨床經驗才能進一步正確的推論。相反的，從 Fig.3 可以看出第二型輔助細胞 (Th2-like T cell) 相關之細胞激素，其基因之表達以 IL-4 和 IL-13 與熱證的相關性較顯著，尤其將病人以熱證評分高低來分析時，可以看出在熱證顯著的病人中，IL-4 和 IL-13 的基因表達皆高於非熱證型之病人，趨化激素 (chemokines) 中以 RANTES 也有類似的正相關。

納入本研究之過敏性氣喘病人中，皆是對塵 明顯過敏，體質也都是偏向 IgE 上升的過敏體質，免疫細胞應該是傾向第二型輔助細胞顯著的情況，但病人各種基因的表達仍有部分差異，熱證顯著之氣喘病人其第二型輔助細胞類之基因 (IL-4、IL-13、RANTES) 表達有上升的趨勢。相反的，當熱證不明顯之非熱證型，則是第一型輔助細胞類之基因 (GBP-1) 表達上升，雖然 Th1/Th2 的平衡常以中醫的陰陽來解釋，是否在傾向第二型輔助細胞體質之過敏性氣喘病人中也有二群不同的病人，就如同中醫陰陽理論中之陰中有陽、陽中有陰。但是除了用寒熱證型來解釋外，八綱中之虛實是否也有參與，這需要尋找更多的基因，做更進一步的研究。

由於氣喘與多基因及環境因子都有關係，因此，最好能找到一迴歸方程式，能以各種基因表現的上升或下降來預測氣喘病人的發病情形，由中醫的寒熱辨證，是否也能預測某些基因的表達有所改變，除此之外，可以從病人各種基因表達之不同，推測病人在此時期之中醫證型，這樣即使不懂得中醫複雜之辨證邏輯，也可以更正確的使用中藥。進一步，若找出有意義的基因，必須要再將這些基因定序，並再找尋是否有多型性 (polymorphism) 的存在，或許可以發現更多符合科學價值的中醫內涵，將中醫的辨證論治徹底的現代化與科學化。

參考資料

1. Woodruff PG, Fahy JV. Asthma: prevalence, pathogenesis and prospects for novel therapies. JAMA 286: 395-98, 2001.

2. Beasley R, Crane J, Lai CK and Pearce N. Prevalence and etiology of asthma. *J. Allergy Clin Immunol.* 105: S466-72, 2000.
3. Irwin Z, Donald PT. Alternative medicine for allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 106: 603-14, 2000.
4. Hsieh KH. Evaluation of efficacy of traditional Chinese medicines in the treatment of childhood bronchial asthma: clinical trial, immunological tests and animal study. Taiwan Asthma Study Group. *Pediatr Allergy Immunol.* 7: 130-40, 1996.
5. Li XM, Huang CK, Zhang TF, Teper AA, Srivastava K, Schofield BH and Sampson HA. The Chinese herbal medicine formula MSSM-002 suppresses allergic airway hyperreactivity and modulates TH1/TH2 responses in murine model of allergic asthma. *J. Allergy Clin Immunol.* 106: 660-68, 2000.
6. Huntley A and Erst E. Herbal medicines for asthma: a systematic review. *Thorax.* 55:925-29,2000.
7. Natalija N, Jorg H, Stefan K, Lothar S, Jean-Pierre A and Thomas B. Standardized extracts from Chinese herbs induce IL-10 production in human monocyte-derived dendritic cells and alter their differentiation in vitro. *J Allergy Clin Immunol* 108: 588-93, 2001.
8. 許清祥、徐昫耀、李明憲，中醫平喘方劑對於過敏原特異性呼吸道發炎反應的作用機轉評估，*中醫藥雜誌* 11：111-121，2000。
9. 蔡順輝，中藥清鼻散治療小兒過敏性鼻炎之研究。*中醫藥雜誌* 6：27-36，1995。
10. 葉慧昌、游熙明、陳榮洲，過敏性鼻炎之中醫辨證分型研究。*中國醫藥學院雜誌* 5：21-26，1996。
11. 游明謙、許清祥、羅綸謙、楊舒渝、李克成、張恆鴻，過敏性鼻炎中醫證型與血清嗜伊紅性陽離子蛋白之關係。*中國醫藥學院雜誌* 8：19-26，1999。
12. Hakonarson H and Wjst M. Current concepts on the genetics of asthma. *Curr Opin Pediatr.* 13: 267-77, 2001.
13. Cookson WO and Moffatt MF. Genetics of asthma and allergic disease. *Hum Mol Genet* 9: 2359-64, 2000.
14. Oettgen HC and Geha RS. IgE regulation and roles in asthma pathogenesis. *J. Allergy Clin Immunol.* 107: 429-440, 2001.
15. Das J, Chen CH, Yang L, Cohn L, Ray P and Ray A. A critical role for NF-kappa B in GATA3 expression and Th2 differentiation in allergic airway inflammation. *Nat Immunol.* 2: 45-50, 2001.
16. Stirling RG and Chung KF. New immunological approaches and cytokine targets in asthma and allergy. *Eur Respir J* 16: 1158-74, 2000.
17. Wilson JW and Bamford TL Assessing the evidence for remodelling of the airway in asthma *Pulm Pharmacol Ther* 14:229-47,2001.
18. Debouck C, Goodfellow PN. DNA microarrays in drug discovery and development. *Nature genetics supplement* 21:48-50,1999.
19. Xiang CC and Chen Y. cDNA microarray technology and its applications. *Biotech Adv* 18: 35-46, 2000.
20. Brusche MH, Brutsche IC, Wood P, Brass A, Norrison N, Rattay M, Mogulkoc N, Simler N., Craven M, Xustovic A, Egan JJG and Woodcock A. Apoptosis signals in atopy and asthma measured with cDNA array. *Clin Exp Immunol* 123:181-187, 2001.

21. Brusche MH, Brutsche IC, Wood P, Mogulkoc N, Mogulkoc N, Custovic A, Egan J and Woodcock A. B-cell isotype control in atopy and asthma assessed with cDNA array technology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Pysiol* 280: L627-637, 2001.
22. Wiesch DG and Meyers DA Strategies for analyzing genotype-phenotype relationships in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 105: S482-86, 2000.
23. Rogge L, Bianchi E, Biffi M, Bono E, Chang SYP, Alexander H, Santini C, Ferrari G, Sinigaglia L, Neeb M, Mous J, Sinigaglia F and Certa U Transcript imaging of the development of human T helper cells using oligonucleotide arrays. *Nature Genetics* 25: 96-101 2000.
24. 李杰芬, 基因組學發展對中醫證實質研究的啟示, 上海中醫藥雜誌, 2:11-13, 2001。
25. Hegde P, Qi R, Abernathy K, Gay C, Dharap S, Gaspard R, Hughes JE, Snesrud E, Lee N and Quackenbush J A Concise Guide to cDNA Microarray Analysis *BioTechniques* 29:548-62 2001.

J Chin Med 13(2): 97-109, 2002

GENE EXPRESSION IN HEAT ZHENG OF ALLERGIC ASTHMA BY MICROARRAY BIOCHIP

Min-Chien Yu^{1,2}, Chun-Mei Lu³, Ya-Hui Chen⁴, Martin-Hsiung Hsiao⁴, Kang-Jehng Chen⁴, Ping-Ting Huang⁴, Ying-Yu Wang⁴ and Ching-Hsaing Hsu^{1,5}

¹*Institute of Chinese Medical Sciences, China Medical College*

²*Institute for integration of Traditional Chinese and Western Medicine,*

³*Department of Chinese Medicine,*

⁵*Department of Pediatric, China Medical College Hospital,*

Taichung, Taiwan

⁴*DR.Chip Biotechnology Incorporation*

Hsinchu, Taiwan

(Received 16th January 2002, revised Ms received 5th March 2002, accepted 7th March 2002)

The prevalence and severity of allergic asthma had been increasing in recent decades. The pathogenesis of asthma was more clearly now. Asthma was a multiple genetic complex disease and related to environmental factors. There were many studies showed traditional Chinese medicines (TCM) work in immunomodulation. So far, TCM is not effective proven in clinical trials. The main reason is that we can not treat a patient by TCM without patterns (Zheng) identification. But the definition of "Zheng" is still not clear now and lack of scientific standards. Thus limited the use and developing of TCM. Therefore, our study tried to quantitate and score the "heat-Zheng" allergic asthma patients according to the principle of observation-inspection, listening-smelling, inquiry and pulsation. We selected 30 asthma related genes and tried to compare the difference of gene expression between different heat scoring patients. Our results showed that there was a negative correlation between guanylate binding protein 1 (GBP-1) and heat-Zheng scoring ($P = 0.072$). If we stratified the heat-Zheng allergic asthma patients into three groups, obvious heat-Zheng (11-15), mild heat-Zheng (6-10) and not heat-Zheng (1-5), according to the severity of heat-Zheng scoring. The gene expression of Th-2 like cytokines (interleukin 4, interleukin 13) and chemotactic factor (RANTES) were increased in obvious heat-Zheng patients compared with not heat-Zheng patients. Therefore, whether we can identify two kinds of different allergic asthma patients by the score of heat-Zheng. The gene expressions of IL-4, IL-13, RANTES were up regulated in obvious heat-Zheng patients and down regulated in GBP-1. Oppositely, expression of GBP-1 gene was up regulated in not heat-Zheng patients and down regulation of IL-4, IL-13 and RANTES genes. We should search more and more genes to identified the relationship between "heat-Zheng" and genes expression in the future.

Key words: Heat Zheng, Allergic asthma, Biochip, Microarray.

Correspondence to: Ching-Hsaing Hsu, Pediatric department of China Medical College Hospital, No.2 Yuh-Der Rd., Taichung, Taiwan. TEL:(04)22052121 ext 4163, FAX:(04) 22032798, E-mail: hsumd736@ms67.hinet.net