

中國醫藥學院中西醫結合研究所 碩士論文

編號：GHCWM90-8909

指導教授：陳光偉 副教授

共同指導教授：林昭庚 教授

：張永賢 教授

：陳方周 博士

：徐松鋌 博士

論文題目

DNA 微陣列分析六味地黃丸和桂附八味丸
培養腎細胞株基因表達之不同

**MICROARRAY ANALYSIS OF GENES DIFFERENTIALLY EXPRESSED
IN HEK 293 CELLS CULTURED IN
Rehmannia Six and Eight Formula**

研究生：蔡文廷



中華民國九十一年六月四日

中國醫藥學院中西醫結合研究所 碩士論文

編號：GHCWM90-8909

指導教授：陳光偉 副教授

共同指導教授：林昭庚 教授

：張永賢 教授

：陳方周 博士

：徐松錕 博士

論文題目

DNA 微陣列分析六味地黃丸和桂附八味丸
培養腎細胞株基因表達之不同

**MICROARRAY ANALYSIS OF GENES DIFFERENTIALLY EXPRESSED
IN HEK 293 CELLS CULTURED IN
Rehmannia Six and Eight Formula**

研究生：蔡文廷

中華民國九十一年六月四日

中國醫藥學院碩士班研究生
論文指導教授推薦書

中西醫結合研究所，_____君所提之論文

_____ (題目)，

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授_____ (簽章)

中華民國 _____ 年 _____ 月 _____ 日

中國醫藥學院碩士班研究生
論文口試委員審定書

中西醫結合研究所，_____君所提之論文

_____ (題目)，

經本委員會審議，認為符合碩士資格標準。

論文口試委員會

委員_____ (簽章)

所長_____

中華民國

年

月

日

目 錄

目錄	-----	
圖目錄	-----	
表目錄	-----	
謝辭	-----	
中文摘要	-----	
第一章 前言	-----	1
第二章 文獻探討	-----	3
第三章 材料與方法	-----	14
第四章 結果	-----	25
第五章 討論	-----	30
第六章 結論	-----	36
圖表	-----	26
參考文獻	-----	37
英文摘要	-----	44
縮寫與中英對照	-----	45
作者簡歷	-----	46

圖目錄

1. 圖 1: DNA 基因晶片萃取兩種待比較細胞 mRNA 偵測基因表達操作
 步驟-----24
2. 圖 2: 桂附八味丸與六味地黃丸培養腎細胞株萃取 mRNA 基因晶片
 雜交呈色圖-----28
3. 圖 3: 桂附八味丸與六味地黃丸培養腎細胞株萃取 mRNA 基因晶片
 雜交呈色圖-----28
4. 圖 4: 六味地黃丸培養胚胎腎細胞株基因表達上調和下降掃描譜---29
5. 圖 5: 桂附八味丸培養胚胎腎細胞株基因表達上調和下降掃描譜---29

表目錄

1. 表 1. Genes that increase under Rehmannia Eight Formula treatment
(compare to the Rehmannia Six Formula)detected by DNA microarray
-----26
2. 表 2. Genes that decrease under Rehmannia Eight Formula treatment
(compare to the Rehmannia Six Formula)detected by DNA microarray
-----27

謝 辭

本篇論文能順利完成，完全要感謝陳光偉所長，願意擔任我的指導教授，兩年前很有遠見推動生物技術，引薦到中研院以基因晶片研究中醫藥，同時規定細胞及分子生物學為必修，個人覺得這對本研究的工作幫助很大，所長在整個學習過程中不斷鼓勵及指導，更要感謝徐松錕博士及助理們在實驗方面的許多指導，才得以有初步成果報告。

從事泌尿外科 20 年，在同窗好友環醫所研究生吳聰賢醫師的鼓勵下，報考環醫所時才發覺中西結合所第一次招生，因緣際會進入本所。感謝林昭庚教授、謝慶良所長口試時的推薦，與王廷輔院長樂於栽培後進，到中西醫療結合中心服務。更感謝在這期間授課付出許多心力的老師們，如許朝添、李妙蓉分生教學小組、腫瘤學周寬基博士、臨床試驗李采娟、會統梁文敏、分子藥理陳玉芳、分生實驗江素瑛、中藥藥理蔡輝彥教授等熱心指導與勉勵。同時中西合作中心同仁，在我課業繁忙期間與撰寫論文時，諸多的幫忙衷心感謝他們。

最後感謝家人精神上的鼓勵與不斷的支持，本研究論文受附設醫院經費贊助，在此一併致謝。衷心祝福學校與附設醫院成為世界級一流大學與醫學中心。

中文摘要

慢性腎炎腎衰病人,腎陽虛腎陰虛是中醫臨床常見證型。腎陽虛 cAMP 下降、cGMP 上升、cAMP/cGMP 比值降低,尿中 17 羥皮質類固醇、17 酮類固醇低於正常值。血管緊張素, 醛固酮, 甲狀腺素及 FreeT3 下降, 副交感神經亢奮狀態, 交感神經功能衰減, 線粒體能量代謝細胞色素呼吸酵素活性下降; 而腎陰虛則恰巧相反。

我們因此探討中藥複方培養腎細胞株抽取 mRNA, 用基因晶片分析基因調控有何不同的表達。使用腎陰虛和腎陽虛常用方劑 - 六味地黃丸和桂附八味丸, 濃度每毫升各 0.2 毫克、0.5 毫克或 1 毫克和 DMEM 培養胚胎腎細胞株, 抽取腎細胞 mRNA, 用中研院白果能博士基因晶片, 分析其基因表達調控的影響。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, 其基因表達上調和下降最明顯各有 20 個基因, 其中至少有 3 個向上調控基因, 與線粒體 ATP 合成、生化荷爾蒙變化和臨床證型顯著相一致。1. 細胞色素氧化酶(COX V1b) 向上調控線粒體內膜上呼吸酵素-細胞色素氧化酶活性, 增加線粒體 ATP 合成。2. mevalonate 雙磷酸脫羧酶(MDD)此酵素促進合成酯醇和膽固醇。3. 腺甘磷酸核糖轉化酶(APRT)此酵素缺乏的遺傳疾病, 大都將導致間質性慢性腎炎腎衰。將進一步設計腎陽虛造模動物, 用桂附八味丸餵食後, 取各類細胞 mRNA, 分析是否有類似特殊基因表達型態, 及顯著調控生化變化, 期望對腎陽虛病人基本生物分子活動深一層瞭解, 找到可供診斷腎陽虛基因表達型及有效的治療基因。

關鍵詞：基因晶片；桂附八味丸；基因表達；線粒體能量代謝

第一章 前 言

中藥從秦漢「神農本草經」(221BC-220AC)收藏藥物 365 種，到明朝李時珍「本草綱目」(1368-1662AC)記載藥物 1.892 種，附方 11.096 首，至今翻譯多種語文流傳各國，對人類做出偉大貢獻。東漢張仲景「傷寒論與金匱要略」(150-219AC)從臨床實驗中，集疾病與症型治療處方有 314 首，許多有效方劑至今臨床仍廣為應用。20 世紀西方醫學領導世界潮流，中西醫學理論在哲學基本概念、科學觀和語言等存在著極大差異。要大多數西醫精通中西醫學兩套理論，並在臨床工作加以熟練應用，是不切實際而且也沒有這個必要。假如有方法用現代科學語言，來表達中醫對疾病規律的認識及臨床治病經驗，與現代醫學在同一理論基礎上結合成一體，將使中醫藥為人類健康做出重大貢獻。⁽¹⁻⁴⁾

20 世紀末 10 年，分子生物學及生物技術迅速發展，於 2001.6.26 由美國柯林頓總統與塞雷拉(Celera: Francis Collins and Craig Venter)基因公司，共同宣佈人類基因草圖，象徵功能基因組和蛋白組學為核心的後基因時代來臨，因為生物體或細胞對任何改變將伴隨基因表達型式的改變，許多研究報告清楚顯示，基因表達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 mRNA 水平分析基因表達均可應用，如北方吸乾法、分化展示法、基因表達系列分析法和點吸乾(dot blots)分析法。但這些方法對需同時分析大量表達產物是不合適的，然而基因晶片具有在單一雜交步驟，可檢測幾千種不同表達之 mRNA，且對同一種組織在不同培養條件下，作基因表達的比較特別有效力，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，為中醫藥現代化締造絕佳契機，去揭示中西醫共同的根本理論基礎。⁽⁵⁻¹¹⁾

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達型式的改變。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。⁽¹²⁻¹⁴⁾

台灣第七大死亡原因-腎炎、腎徵候群及腎變性病死亡率，每 10 萬人約 15 人死亡，而慢性腎衰每 10 萬人，每年 5-10 位新患者產生。⁽¹⁵⁾慢性腎炎、腎衰病人，腎陽虛、腎陰虛是中醫臨床常見的辨證分類，已有許多研究顯示其生化指標有顯著不一樣，如腎陽虛 cAMP 下降 cGMP 上升，甲狀腺素及 Free T3 下降，線粒體能量代謝細胞色素呼吸酵素活性下降；而腎陰虛則 cAMP 上升、cGMP 下降，甲狀腺素及 Free T3 上升，線粒體能量代謝細胞色素呼吸酵素活性上升，由於分子生物技術的研究，我們知道這些生生物質的改變均與細胞基因的表達水平息息相關⁽¹⁶⁻²²⁾。

因此本研究以不同濃度六味地黃丸和八味地黃丸，培養胚胎腎細胞株抽取 mRNA，利用基因晶片分析基因表達結果，發現有 3 個基因即細胞色素氧化酶 (COX VIb)、腺甘磷酸核糖轉化酶 (APRT)、mevalonate 雙磷酸脫羧酶 (MDD) 和這些已知生化變化顯著相關⁽²³⁻²⁵⁾。而且在闡明一兩千年名方作用機轉的同時，中西醫生理功能術語，腎陽命門火和線粒體、腎陰和腎上腺及性腺在基因的解讀中得到串聯，命門與三焦在能源 ATP 運輸、與水分代謝上獲得清晰的詮釋。

第二章 文獻探討

第一節 腎陽虛和腎陰虛探討

一. 腎陽虛⁽²⁶⁾

中醫腎虛病理變化有腎陽虛衰，腎氣不固，腎不納氣，腎虛水泛，命門火衰。

1). 典籍說明

素問至真要大論：諸寒收引，皆屬於腎。

類經附翼『真陰論』：元陽不足，或先天稟衰，或勞傷過度，以致命門火衰，不能生土，而為脾胃虛寒，飲食少進，或嘔惡膨脹，或反胃隔塞，或怯寒畏冷，或臍腹多痛，或大便不實，瀉利頻作，或小水自遺，虛淋寒疝，或以寒侵溪谷，而為肢節痺痛，或寒在下焦，而為水邪浮腫。總之，真陽不足者，心神疲氣怯，或心跳不寧，或四肢不收，或眼見邪魔，或陽衰無子等症，俱宜益火之源，以培右腎之元陽。

2). 腎陽虛臨床表現⁽²⁷⁾

畏寒肢冷、腰虛冷痛、面色恍白、夜尿頻多、小便清長或尿少，男子陽萎滑精女子帶下精冷，舌淡邊有齒痕，脈沈弱而遲。

畏寒肢冷：表明全身肢體細胞能量代謝率低下，產熱量減少。

面色恍白、腰虛冷痛：有效循環血容量減少，心臟收縮力減弱，供應腎動脈量減少，腎血流不足。

夜尿頻多、小便清長或尿少：腎血流量減少，微循環血流緩慢，腎小球濾過率增大，腎小管和集合管重吸收減弱，膀胱逼尿肌緊張性增加。

男子陽萎滑精、女子帶下精冷：性激素分泌減少，交感神經興奮性降低，副交感神經活動佔優勢。

舌淡邊有齒痕，脈沈弱而遲：細胞膜鈉活性幫浦降低，細胞腫脹，微循環出現障礙，腎上腺分泌減少，心肌收縮力減弱，血管緊張性降低。

二. 腎陰虛⁽²⁶⁾

1). 典籍說明

素問刺熱論:腎熱病者,先腰痛胛酸,苦渴數飲身熱,熱爭則項痛而強,髓寒且痠,足下熱,腎熱病者,頤先赤。

類經附翼『真陰論』:真陰腎水不足,不能滋溉營衛,漸自衰羸,或虛熱往來,自汗盜汗,或神不守舍,血不歸原,或勞損傷陰,或遺淋不禁,或氣虛昏,或眼花耳聾,或口燥舌乾,或腰酸腿軟。凡精髓內竭,浸液枯涸等證,俱宜速壯水之主,以培左腎之元陰。

2). 腎陰虛臨床表現⁽²⁷⁾

腰膝酸軟,足跟作痛、頭目眩暈、耳鳴如蟬、五心煩熱、舌燥咽乾、舌紅脈細。

腰膝酸軟、足跟作痛表明下部腎、腎上腺和性腺的副交感神經興奮性降低及下肢血流量減少,功能減退。

頭目眩暈、耳鳴如蟬、五心煩熱:頭部全身循環血容量減少,交感神經活性代償增強,手足心及胸口血流量增加。

舌燥咽乾、舌紅脈細:內分泌功能減弱,循環血容量不足。

三. 腎陽虛和腎陰虛血液生化與分生之生理變化

1). 腎陽虛

物質代謝:轉鐵蛋白、纖維蛋白顯著低於正常人。膽固醇降低、三酸甘油脂升高、總蛋白降低。

內分泌:尿中 17 羥皮質類固醇、17 酮類固醇低於正常值。血管緊張素,醛固酮、腎上腺素低於正常對照組,外周血中混合白細胞糖皮質激素受體,明顯低於正常組⁽²⁸⁾。

腎陽虛患者血清甲狀腺素 T_3 、 T_4 、 FT_3 、 FT_4 低於正常人,促甲狀腺激素 TSH 較正常人高,脾腎陽虛患者血清甲狀腺素 T_3 、 T_4 、TSH 均低⁽¹⁷⁾。

微量元素:血清銅、鐵、含量升高,Zn/Cu 值明顯降低,血清鋅值低

於正常對照組，正常人 > 脾陽虛型 > 腎陽虛型 > 脾腎陽虛型。

cAMP 和 cGMP：cAMP 降低，cGMP 偏高，cAMP/cGMP 比值降低。

微循環和血液流變學，末梢溫度低，血流速減慢，血沉較快，動脈管口徑相對變細。

腎功能：血尿素氮 BUN 升高，尿滲透壓降低，尿濃縮功能減退與腎功能損害有正相關。

腎陽虛大鼠下丘腦-垂體-性腺軸功能紊亂，與垂體促性腺細胞線粒體核結構異常，能量供應不足，DNA 轉錄複製功能降低有關；腎陽虛病理切片垂體前葉、甲狀腺、腎上腺、性腺萎縮退化，血液 T3、T4、TSH、Testosterone、E2、FSH、LH 比正常人低，尿中亦同，神經內分泌下丘腦單胺類改變及 PKA、PKC 活性降低，免疫功能 IgG、IL-2、-IFN 下降^(18,19)。

老年大鼠線粒體能量代謝，琥珀酸及 NADH 呼吸鏈呼吸功能-3 態呼吸速度、4 態呼吸速度快及呼吸控制率低，琥珀酸氧化酶與 NADH 氧化酶升高及細胞色素呼吸酵素活性降低，ATPase、 Na^+/k^+ -ATPase 降低及 Mg^{+2} -ATPase 降低，游離鈣下降，丙二醛 MDA 升高，線粒體內膜 ADP/ATP 比值下降⁽²¹⁾。

2). 腎陰虛

cAMP 升高，cGMP 下降，cAMP/cGMP 比值升高，甲狀腺素及 Free T3 升高，腎上腺素高交感神經亢奮狀態，副交感神經功能衰減等。膽固醇升高、三酸甘油脂降低、總蛋白升高。

肝線粒體能量代謝細胞色素呼吸酵素活性上升，線粒體 R3/R4 (3 態呼吸速度)下降、呼吸控制率 RCR(R3/R4)上升，肝線粒體內游離鈣升高，ATPase、 Na^+/k^+ -ATPase 及 Mg^{+2} -ATPase 升高，游離鈣升高，丙二醛 MDA 降低，線粒體內膜 ADP/ATP 比值上升。

第二節 藥物及其功能探討.

一.桂附八味丸和六味地黃丸與腎陽虛和腎陰虛

1).桂附八味丸

東漢張仲景金匱要略:「虛勞腰痛,少腹拘急,小便不利者,八味腎氣丸主之」⁽³¹⁾。

地黃八兩 山藥四兩 山茱萸四兩 澤瀉三兩 茯苓三兩 牡丹皮三兩
桂枝附子炮各一兩,上八味末之,煉蜜和丸,梧子大酒下 15 丸,加至 25 丸日再服。

臨床應用:對慢性腎炎和腎衰證屬“腎陽虛”的首選方。常以肉桂易桂枝,因為肉桂辛甘大熱之品,氣厚純陽,守而不走,專補命門之火,用量一般 3-10 克,附子一般用量 10 克。

腎氣丸製方之義:體現了內經素問:“善補陽者必於陰中求陽,則陽得陰助而生化無窮”的精神,本方雖專溫補命火之劑,但以六味地黃丸滋養腎陰為基礎,使用少量桂附以助腎陽。

2).六味地黃丸

宋錢乙“小兒藥證直訣”:六味地黃湯是滋補腎陰的基礎方劑,對慢性腎炎和慢性腎功能衰竭“腎陰虧虛”者選用本方。

臨床應用:慢性腎炎高血壓型腎陰虛用之較多,因為陰虛易生內熱,常以生地(乾地黃)易熟地,生地性寒,在滋陰補腎,同時兼具清熱之功,且滋膩礙胃之弊亦輕。

生地經久蒸九曬成熟地後,部份多糖和低聚糖可水解成單糖,但降血糖主成分三糖甘幾乎不分解。⁽³²⁾

六味地黃丸製方之義:汪昂『醫方集解』三補三瀉:熟地膩補腎水,有澤瀉宣泄腎濁。山萸肉溫澀肝經,有丹皮清泄肝火。山藥收攝脾經,有茯苓淡滲脾濕。錢氏考慮小兒稚陽之體,無需助陽,於是減去<金匱要略>八味腎氣丸中剛燥的附子、肉桂,專補腎陰。

3) 肉桂⁽³³⁾ 樟科

1. 別名：牡桂、紫桂、大桂、辣桂、桂皮、玉桂。
2. 成分：含揮發油，桂皮油 1% 2 %，主成分為桂皮醛、桂皮酸，並含少量乙酸桂皮酯、乙酸苯丙酯。
3. 性味：味辛甘，性大熱、有小毒。
4. 歸經：入腎、脾、膀胱經。
5. 功能：補元陽、暖脾胃、除積冷，通血脈。
6. 主治：“命門火衰”、肢冷脈微、亡陽虛脫、腹痛泄瀉、寒疝奔豚、腰膝冷痛、經閉癥瘕、陰疽流注及虛陽浮越、上熱下寒等。
7. 肉桂作用溫補腎陽、溫中逐寒，宣導血脈。其性渾厚凝降、守而不走、偏暖下焦、能助腎中陽氣（命門之火）並能納氣歸腎，引火歸元。能補下焦腎中不足的真火（溫補腎陽），更能引火歸元以息無根之火，故稱之能“救陽中之陽”。補益藥多用肉桂。

4) 附子⁽³³⁾ 毛茛科

1. 別名：淡附片、黑附片、制附片
2. 成分：含多種生物鹼，次烏頭鹼、烏頭鹼、新烏頭鹼等。
3. 性味：甘、辛、大熱；有毒。
4. 歸經：心、脾、腎經。
5. 功能：溫陽、散寒、止痛，為“溫補命門之主帥”、回陽救逆之要藥。
6. 主治：亡陽欲脫、“命門火衰”、胸腹寒痛、痺證，陽痿、水腫、尿少、寒結便秘等病證。附子大毒，宜先煎。

第三節 分生技術與醫療應用

一). 基因晶片

1. 依其製法不同可分兩類，1. 寡聚核酸晶片，簡稱核酸晶片：利用半導

體晶片類似製程的光顯影術，光化學反應製造稱之。2. 去氧核糖核酸微陣列：使用自動機械，將聚合酶連鎖反應（PCR）來訊息核糖核酸（mRNA）所反轉錄互補去氧核糖核酸（cDNA），將其以高密度點製而成。

依其基材可分兩類，尼龍薄膜和載玻片；其硬體包括兩部份，排印系統(arrayer) 和掃描系統(scanner)。軟體有控制及操作前述兩個硬體系統、大量基因資料輸入及追蹤實驗結果影像的處理與分析，以及實驗原始數據的處理與初步分析等。

2. 實驗流程:排印系統及 DNA 微陣列製造、典型微陣列介紹、掃描系統及 DNA 微陣列生醫應用

排印系統：

- (1). 選定希望進行研究基因，數目可達一萬個不同基因。
- (2). 將少量已知序列且可以唯一代表個別基因的 DNA 片段約五、六百個鹽基，利用聚合酶連鎖反應法將該片段數量放大。
- (3). 接著利用自動機械手臂系統，點印於經過特殊表面處理過載玻片或薄膜上，用以點印的尖端類似鋼筆圓形針頭，中間有約0.0025mm 狹縫，用以虹吸 DNA 片段溶液，每一點直徑約為 0.15mm 因此在 2×2 cm 平方，可點印約一萬點。
- (4). 每一點代表唯一的一個基因，而每一點約有數千萬個相同的 DNA 片段，這樣的點或 DNA 片段在基因晶片研究中稱之為探針(probe)。掃描系統用以讀取 DNA 微陣列實驗後的結果。

3. 操作：

- 1). 用呈色或螢光物質，對研究生物樣本欲知基因加以染色標誌，稱之為標的物(target)。
- 2). 標的物和 DNA 微陣列進行配對接合反應，稱之為雜交(hybridization)。
- 3). 將沒有配對接合物的生物樣本清除掉。
- 4). 由標的物和那些探針(指在 DNA 微陣列上，已知位置和已知序列的

DNA 片段)配對結合，即可得到生物樣本的基因訊息。

4. 呈色或共軛焦雷射掃描系統設備：兩種不同呈色結合物質或兩部不同波長的高功率雷射、各種減少光雜訊的光學元件系統及濾波片、偵測及轉換放大光電訊號的光電倍增管，一套高精密掃描裝置及控制所有元件的電子裝置。
5. 應用：兩種生物樣本研究實驗，有對照組如健康組和病變組，或有使用藥和無使用藥物組，因有兩種不同呈色或不同波長雷射，故可偵測和激發兩種不同呈色或特定波長的螢光物質，可同時進行不同基因表現模式的分析，對研究具有重大意義，也就是我們可以很方便很可靠的進行比較實驗，目前大多數學者認為基因晶片技術，對基礎生醫研究及臨床診斷治療應用，將會有重大影響。

二). 基因晶片與疾病診斷和治療⁽³⁴⁻³⁸⁾

1. 細胞分生與基因研究方向：

目前臨床診斷和治療都建立在血液生化和病理檢查，將進展到生物化學和分子生物技術，來鑑定導致疾病的潛在基因(含致腫瘤基因)和細胞生化變化。

如神經膠細胞瘤的 4-chain laminin 基因致血管新生和 laminin-8 預測其復發。先天性腎症候群 Finish type 的基因 NPHS1 蛋白產物 nephrin，由胚胎和成人組織分析出其表達。小孩夜間遺尿，基因是最重要的因素，尋找鑑定出基因作為診斷依據。

2. 特殊基因晶片在疾病的迅速診斷、特性治療、和有效預防：

將導致重大變革，利用分化展現生物技術和基因晶片可顯示訊息核醣核酸的基因表達型式的多種變化，而且可用「腎臟基因晶片」(kidney Chip)有效鑑定腎臟病以前不知道的基因，和證實已知基因的新角色，迅速診斷治療。

基因晶片在疾病診斷預防，如女性癌發生率第二位的子宮頸癌，病因

大多數是人類乳突病毒 16、18 型等密碼蛋白 E6、E7，分別與宿主 P53、pRb 基因結合，影響子宮頸 DNA 異常細胞，正常會停止在細胞 G1 週期作 DNA 修補工作，因無法進行修補工作而癌化。

3. 新一代單核苷酸基因多形性 (SNP) 基因圖譜，將促進基因的篩選，可鑑定出單一或多基因參與，導致每個人對疾病易感性的不同。

三). 中醫証型及中藥鑑定複方研究⁽³⁹⁻⁴¹⁾

1. 中醫証的研究:中醫証的出現，是由於某個或某類相關聯基因發生異常所致，國內外已有大量研究，表明中藥對基因表達、修飾有確切的作用，不同的証候-基因表達組應有差異，生物體不論組織細胞功能和外形有多不同，所含都是一整套相同的基因，但基因表達格局不同，不同的基因表達調控有其個性，也有其共性。利用基因晶片檢測不同証的基因表達譜改變，給予不同的治療，實現中醫辨証施治的現代化。
2. 中藥治病機理研究:中藥要令人信服，需用現代生物科技闡明扶正，表現中藥促進某個或某類基因的表達。「藥物基因組學」將應運而生，闡述基因序列變異及其對藥物反應影響的科學。尋求病証結合的突破口-“共同的功能基因”，中西醫兩種不同理論研究的是同一個對象，在一定的結構或功能層次上，必然有其共性的物質基礎。
3. 中藥材鑑定、中藥有效成分的篩選和中藥新藥的開發:每種中藥材 DNA 序列寡核苷酸探針作成基因晶片，可用於中藥材優質品種篩選和監測，檢測有效成分開發新藥。
4. 體質因素研究:WHO 生物醫學家認同“個體化的具體治療”是臨床試驗的最高層次，建立單核苷酸多態性(SNP)為代表的 DNA 序列變異的系統目錄。

第四節 生物能量:命門與線粒體

一. 命門⁽⁴²⁾

1). 難經談論命門、三焦生理功能.

1. 命門者，諸神精之所舍，原氣之所系也，男子以藏精，女子以系胞。 命門者，、、共氣與腎通。
2. 諸十二經脈者，皆系于生氣之原。所謂生氣之原者，謂十二經之根本也，謂腎間動氣也。以五臟六腑之本，十二經脈之根，“呼吸之門”，三焦之原。
3. 三焦者，原氣之別使也，主通行三氣，經歷於五臟六腑。
4. 三焦者，水穀之道路，氣之所終始也。、、有原氣之別焉，主持諸氣，有名而無形。
5. 內經談論三焦生理功能：靈樞本輸篇：三焦者，中瀆之府也，水道出焉，屬膀胱。素問：三焦者，決瀆之官，水道出焉。
6. 中藏經：三焦通利，則內外左右上下皆通也。

2). 景岳全書; 命門余義，求正錄: 三焦、包絡、命門辨.

1. 命門者為，為水火之府，為陰陽之宅，為精氣之海，為生死之竇，此為性命之大本。
2. 五臟之陰氣，非此不能滋，五臟之陽氣，非此不能發。

3). 陳士鐸：

心得命門而神門有主，始可以應物，肝得命門而能傳導，胃腸得命門而能受納，脾得命門而能傳輸，肺得命門而能治節，大腸得命門而能傳導，小腸得命門而布化，腎得命門而作強，三焦得命門而能決瀆，膀胱得命門而收臟，無不借“命門之火”以溫養也。

4). 吳鶴皋：命門真火，所以溫百骸，養臟腑，充九竅。

5). 吳醫匯讀: 命火與腎陽臨床上一致，自古命門治法，亦惟溫補腎陽而已，別無他法。

6). 周省吾: 命門者，人身之真陽，腎中之元陽是也，非另一物也。

二. 線粒體^(43,44)

1). 歷史

1. 1890 Altman 推論這些細胞內大小、外形類似細菌次顆粒，是細胞活動基本單位，稱為 Bioblasts。
2. 1898 Benda 第一次使用 mitochondria 稱之，以表示「線樣顆粒-線粒體」。
3. 1900-1930 細胞學家對其功能意見不一致，但確認為界限清楚的獨特胞器。
4. 1940 鑑定為“細胞能量代謝中心”。
5. 1949 從線粒體證實含琥珀酸氧化酶和細胞色素氧化酶，為脂肪酸氧化作用和檸檬酸環(TCA cycle)所必需。
6. 目前已知線粒體產生維繫細胞生理功能 80%所需能量。

2). 結構

1. 外型: 全由外膜包覆著，內膜內陷皺脊，依各組織細胞能量活動增加表面積安置有氧呼吸的微粒機制，內外膜將其分為內外兩個液狀腔，內側面為母基質，外側為膜間空間。
2. 外膜: 厚為 6nm，成分膽固醇高，磷脂蛋白比例高 (0.8)。
3. 內膜: 厚約 4nm，成分含 100 種以上多太及相當高的蛋白 / 脂質重量比，缺膽固醇。磷脂蛋白比例低 (0.3)，含豐富的罕見脂蛋白 cardiolipin，這些都是細菌細胞膜的特徵。
4. 運輸及通透性: 外膜被認為源自細菌細胞壁，含有 porins 具內部管道的整合蛋白，當打開時對分子量 5000 dalton 粒子保持通透性，如 ATP、NAD、Coenzyme A 分子量少於 1000 dalton 可從胞漿 cytosol 進出到膜間空間，內膜雖有 porins 但是高度不可通透的，幾乎所有分子與離子都需內膜上特殊運送器，才能進入母基質 matrix。

5. 內膜組成結構:是生物“能量活動的關鍵”,除運送器外,大多是合成 ATP 的機制所在位置。呼吸鏈的酶在內膜上電子傳遞過程中將氧化反應的能量轉變成細胞可用形式能 ATP。

3). 功能

1. 線粒體居細胞氧化代謝中心,在碳水化合物分解始於胞漿輸入丙酮酸,被母基質中的丙酮酸脫羧酶,氧化脫羧作用形成乙醯輔酶 A,然後進入三羧酸環 TCA cycle 八個分解步驟,參與反應只琥珀酸脫氫酶緊結在線粒體膜內側,餘均溶於母基質,每一回產生兩分子二氧化碳、三分子還原 NADH 的及一分子 FADH 和一分子 GTP。

2. 氧化代謝下個階段是氧化磷酸化作用,呼吸物質 NADH 和 FADH 經由檸檬酸環產能過程中,藉線粒體內膜上呼吸酵素接受和給與電子 (electron chain transport) 的一系列特殊程序生成 ATP。

複合體 I: NADH-ubiquinone 還原酶,從 NADH 傳送電子到移動的電子攜帶者輔酶 Q,是呼吸酶中最大最不安定的酶複合體。

複合體 II: Succinate-ubiquinone 還原酶,從 Succinate 轉移還原當量到輔酶 Q (Ubiquinone),包含 4 個蛋白次單位,其中一個即是 FADH 聯結 TCA 環,緊結在線粒體膜內側琥珀酸脫氫酶。

複合體 III: Ubiquinone-cytochrome C 還原酶,從結合在膜上 Ubiquinone 傳送電子到氧化的細胞色素 C,是另一個可移動的電子攜帶者,含 11 個次單位呼吸酵素複合體。

複合體 IV: cytochrome C 氧化酶,最終的電子接受者,從還原的細胞色素 C,傳送電子到氧分子形成水,包含 13 個蛋白次單位。

1961 Peter Mitchell 首先提出化學滲透學說 (Chemiosmotic theory): 線粒體內膜三處酶複合體 I、II、III 在電子傳送中,從母基質內釋出質子到內膜外,造成質子濃度差 (proton gradient) 形成

質子驅動力(proton driving force) , 透過複合體 F_1F_0 -ATPase 驅動合成 ATP , 供給胞漿足夠 ATP 維繫細胞生命力和正常細胞功能。

第三章 材料與方法

第一節 材料:

一) 基因晶片 : 中研院 白果能博士提供 9600 點晶片及方法。⁽⁴⁵⁾

cDNA Probe Preparation :

Heat block

Centrifuge

Water bath

Hybridization oven

Heat sealer

RNAzol B(Cat., TEL-TEST, INC; #CS-105)

Oligotex mRNA Mini Kit(Qiagen; 70042)

Hybridization Bags (GibcoBRL; #18278-010)

Easi Seal(Hybaid, cat.No.HBOSSSEZIE)

Microscope Slides(3×2 inch)(Kimble; #75001)

Aerosol Resistant Tips(ART tip)(molecular BIO-Product, #2139)

Random hexamer primer(GibcoBRL; #48190-011)

Reverse transcriptase and 5×buffer(GibcoBRL; #18064-014)

RNase inhibitor (GibcoBRLLL; #110777-019)

Biotin-16-dUTP(Roche; #1558706)

Blocking power for hybridization(Roche; #10096176)

Bovine serum album (Sigma; #A2153)

220X SSC(Amresco)

SDS(Sigma)

Salmon sperm DNA (GibcoBRL; #15632-011)

Human Cot-1 DNA(GibcoBRL; #15279-011)

Poly d(A) 10(10 mer of dA, any primer synthesis company)

Dextran sulfate(Sigma; #D6001)

Anti-digoxigenin-AP Fab fragments(Boehringer Mannheim;
#1093274)

X-gal (GibcoBRL; #15520-018)

Maleic acid (Sigma; #1125)

N-lauroylsarcosine(Sigma; #L5777)

Fast red TR/AS-MX substrate kit(cat. No.34034, PEIRCE)

二) 中藥 : 順天藥廠科學中藥

1. 六味地黃丸: 每 12.0 克中含熟地黃 8.0 克 山藥 4.0 克 山茱萸 4.0 克 澤瀉 3.0 克 茯苓 3.0 克 牡丹皮 3.0 克. 以上生藥製成浸膏 7.2 克. (生藥與浸膏比 $25.0:7.2=3.5:1$) 澱粉 4.8 克
2. 桂附八味丸: 每 12.0 克中含有熟地黃 8.0 克 山藥 4.0 克 山茱萸 4.0 克 澤瀉 3.0 克 茯苓 3.0 克 牡丹皮 3.0 克 肉桂 1.0 克 炮附子 1.0 克. 以上生藥製成浸膏 7.0 克. (生藥與浸膏比 $27.0:7.0=3.9:1$) 澱粉 5.0 克

三) Purify RNA :

1. TRIZOL Reagent (GIBCOBRL, 15596-018)
2. Chloroform
3. Isopropanol
4. Resin
5. 75% ethanol
6. DEPC water

四) Purify mRNA:

Oligo(dT) Cellulose Columns (GIBCOBRL, 15939-010)

五) 1×hybridization buffer:

20×SSC	16ml
1%N-laurylsarcosine	8ml
10%SDS	160 μ l
ddH ₂ O	52ml
filter(0.22 μ m)	
BM blocking powder	0.8g
total	80ml

置於 65°C 使其溶解後,存放於 -20 °C 冰箱中

六) 50%PEG

PEG-8000	10g
add water to	20ml

置於 65 °C 使其溶解,高溫高壓滅菌後,存放於 -20 °C 冰箱中

七) 10×TBS (PH 7.4)

Tris base	12.11g
NaCl	87.66g
add ddH ₂ O to	1000ml

滅菌後即可使用

八) 120mM X-gal

X-gal	100mg
DMF	2ml

存放於-20 °C 冰箱中

九) X-gal Substrate Buffer

10×TBS(PH7.4)	50ml
3mM Potassium Ferrocyanide $K_3 Fe(CN)_6$	0.6335g
3mM Potassium Ferricyanide $K_4 Fe(CN)_6$	0.4939g
1mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.10165g
add H_2O to	500ml

過濾後儲存於-20 °C 冰箱中

十) BM Blocking Dilution Buffer PH 7.5

1 M Maleic acid	100ml
5 M NaCl	30ml
NaOH	7.5g
add H_2O to	1000ml

滅菌後即可使用

十一) 10% Blocking Reagent

Blocking powder	10g
Blocking Dilution Buffer	100ml

置於 70 °C 中使其溶解, 高溫高壓滅菌後存放於 4 °C 冰箱中

十二) 20% Dextran Sulfate

Dextran Sulfate	2g
add H ₂ O to	8ml

滅菌後存放於 -20 °C 冰箱中

十三) DEPC H₂O

Diethyl pyrocarbonate (store in 4 °C)	400μl
H ₂ O	800ml

置於 37 °C 中溫和的搖晃 4 小時, 然後放在 37 °C 中到第二天, 高溫高壓滅菌後, 存放於室溫環境即可

第二節 準備藥品: (10mg/ml)

(一). 中藥製備

1. 將 0.3g 的科學中藥粉末加入 27ml 的培養液 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Hyclone), 以超音波震盪 60 分鐘, 使粉末溶解均勻.
2. 以 3000rpm 的轉速離心 15 分鐘, 將沉渣去除.
3. 用濾紙過濾藥液.

4. 再用 0.45 μm 孔徑的過濾膜過濾藥液.
5. 在無菌操作檯中用 0.22 μm 孔徑的過濾膜過濾藥液.
6. 加入 3ml 的 FBS(Fetal Bovine Serum), 即培養液中含 10% FBS.
7. 加入 Penicillin 及 Streptomycin.
8. 此培養液即可用來處置細胞, 或是儲存在 -20°C

(二). 培養 293 細胞:

1. 使用直徑 150mm 的培養盤及 20ml 的培養液 DMEM 培養 293 細胞.
2. 待細胞達預定數量時, 吸掉培養液.
3. 加入 19.6ml (或 19ml, 或 18ml) 的 DMEM 及 0.4ml (或 1ml, 或 2ml) 已加入中藥之培養液共 20ml.
4. 最後的藥品濃度為: 0.2mg/ml (0.5mg/ml, 1.0mg/ml)
5. 在 37°C 的恆溫箱中培養兩天.

(三). 純化 RNA:

1. 吸掉培養液
2. 加入 2ml 的 TRIZOL reagent.
3. 使 reagent 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 TRIZOL 吸到小型離心管中.
4. 將離心管放置冰上 5 分鐘.
5. 每 1ml 的 TRIZOL 加入 0.2ml 的 chloroform, 震盪 15 秒使其混合均勻.
6. 置於冰上 5 分鐘.
7. 以 12000rpm 的轉速, 4°C 離心 15 分鐘.
8. 液面會分為兩層, 上層為 aqueous phase, 小心的吸出上層液體, 移至新的離心管.

9. 加入 isopropanol (份量為吸出液體總體積的一半).
10. 震盪使混合均勻.
11. 加入 RNA Tack Tm Resin (份量為此時總體積的二十分之一).
12. 震盪 30 秒
13. 離心 1 分鐘(小型桌上型離心機即可).
14. 將上清液吸掉.
15. 用 75%酒精 1ml 清洗:加入酒精後震盪 30 秒使均勻,再離心一分鐘後將上清液去除.
16. 重覆步驟 15 再洗一次.
17. 置於無菌操作檯空氣中乾燥(約 20 分鐘).
18. 加入 DEPC 處理過的水 50 μ l.
19. 震盪均勻後離心以 8000rpm 轉速離心 1 分鐘.
20. 吸出上清液移至新的離心管即得 RNA

(四). 純化 mRNA:

1. 將 total RNA 做酒精沉澱: 加入 5M 的 NaCl 溶液 90 μ l. 及 3ml 的酒精, 放置於 -20 °C 中至隔天.
2. 以 8000rpm 的轉速離心 10 分鐘.
3. 將上清液去除.
4. 置於無菌操作檯中空氣乾燥.
5. 加入 3ml 的 binding buffer
6. 置於 70 °C 5 分鐘.
7. 置於冰上 5 分鐘.
8. 另一方面需同時準備好 column 供使用: 加入 3M 的 NaCl 0.1ml, 滴乾後再加入 4ml 的 binding buffer, 一樣等滴乾後再加入 1ml 的 binding buffer, 留置 0.5ml 在 column 中, 即可供使用或保存於 4 °C

中.

9. 將處置好的 RNA 溶液加入 column 中.
10. 加入 4ml 的 binding buffer 清洗.
11. 用 1.5ml 的 elution buffer 溶出 RNA
12. 將溶出的 RNA 溶液置於 70 °C 5 分鐘, 然後放冰上 5 分鐘, 再置於室溫 20 分鐘.
13. 同時加入 4ml 的 binding buffer 清洗 column 待使用.
14. 在 RNA 溶液中加入 90 μ l 3M 的 NaCl 溶液.
15. 將 RNA 溶液加入已準備好的 column 中.
16. 加入 4ml 的 binding buffer 清洗 column.
17. 用 1.5ml 的 elution buffer 溶出 RNA.
18. 在 RNA 溶液中加入 3M 的 NaCl 溶液 90 μ l 及酒精 3ml.
19. 在 -20 °C 中冰存到第二天.
20. 在 4 °C 以 7000g 離心 20 分鐘.
21. 去除上清液, 加入 75% 的酒精清洗.
22. 在 4 °C 以 7000g 離心 2 分鐘.
23. 去除上清液, 置於無菌操作檯中空氣乾燥 30 分鐘.
24. 以適量 1mM 的 EDTA 溶液(5~50 μ l) 溶出 RNA.

(五). cDNA 探針標記:

1. 混合 2 μ g 的 mRNA 與 Random hexmer (50 μ M) 6 , 並補水至總體積為 28.5
2. 置於 70 °C 10 分鐘使其變性, 然後置於冰上 5 分鐘
3. 標記: 混合以下成份
 - 步驟 2 之 RNA 混合物共 28.5 μ l
 - 5 倍緩衝液 10 μ l

0.1M 的 DTT 5 μ l

dATP, dCTP, dGTP (25mM) 1 μ l

dTTP (2mM) 1 μ l

Biotin-16-dUTP (1mM) 或 Dig-11-dUTP (1mM) 2 μ l

RNAsin (40U/ μ l) 1 μ l

Superscript (200U/ μ l) 1.5 μ l

Total: 50 μ l

4. 將步驟 3. 的混合溶液置於 25 $^{\circ}$ C 的環境中 10 分鐘, 再放到 42 $^{\circ}$ C 中 90 分鐘
5. 將溶液置於 94 $^{\circ}$ C 中 5 分鐘, 以終止反應
6. 加入 3M 的 NaOH 溶液 5.5 μ l, 並置於 50 $^{\circ}$ C 中 30 分鐘
7. 加入 3M 的 CH₃COOH 溶液 5.5 μ l, 並置於 50 $^{\circ}$ C 中 30 分鐘
8. 將下列成份加入溶液中:

H₂O 38 μ l

Ammonia acetate (7.5M) 50 μ l

Glycogen (20 μ g/ μ l) 1 μ l

EtOH 380 μ l

9. 置於 -80 $^{\circ}$ C 中 30 分鐘之後, 以 13000rpm 的轉速離心 15 分鐘
10. 小心的吸掉上清液, 加入 75% 的酒精清洗沉澱物, 以 13000rpm 的轉速離心 10 分鐘
11. 吸掉上清液後, 以真空乾燥 2 到 3 分鐘
12. 加入 20 μ l 的水溶解沉澱物

(六). 雜交反應及呈色

1. 準備雜交膜: 將 Salmon sperm DNA (10 μ g/ μ l) 10 μ l 放在 95 $^{\circ}$ C 中 5 分鐘使其變性, 再加入 5ml 的 1 \times hybridization buffer 中混合,

把雜交膜放入,置於 63 °C 中 1.5 小時以上

2. 準備 DNA 探針:將溶於水的 DNA 探針加入以下成份:

poly d(A) (10 µg/µl) 2 µl

human Cot-1 DNA (10 µg/µl) 2 µl

2×hybridization buffer 45 µl

total:90 µl

將上列混合物放入 95 °C 中使其變性,靜置冰上 5 分鐘,

3. 將混合溶液加在雜交膜正面,然後密封,置於 95 °C 中 3 分鐘,再放置於 63 °C 約 16~18 小時,進行雜交反應
4. 在反應之後,取出雜交膜,以 5ml 的 2 × SSC+0.1%SDS 溶液在室溫環境下輕輕震盪清洗 2 次,每次 5 分鐘
5. 然後以 5ml 的 0.1 × SSC+0.1%SDS 溶液在 63 °C 環境下輕輕震盪清洗 3 次,每次 15 分鐘
6. 將雜交膜置入以下成份的混合溶液中,在室溫中輕輕震盪 1 小時
blocking dilution buffer 4ml
20%dextran sulfate 0.5 ml
10%blocking reagent 0.5ml
total: 5ml
7. 將雜交膜置入以下成份的混合溶液中,在室溫中輕輕震盪 1.5 小時
1×TBS+0.3%BSA(PH 7.4) 4.1ml
10%blocking reagent 0.5ml
50%PEG-8000 0.4ml
Streptavidin β-galactosidase (1.38U/ml) 7.2 µl
Anti-Dig-AP (0.075U/ml) 0.5 µl
Total: 5 ml
8. 將雜交膜以 5ml 的 1 × TBS buffer 在室溫狀態下清洗 3 次,每次 5 分

鐘

9. 呈色 : 將雜交膜置入以下成份的混合溶液中, 在 37 °C 中避光溫和搖晃 45 分鐘

X-gal substrate buffer 4.85ml

X-gal (20mg/ml) 150 μ l

Total: 5ml

10. 以 mini-Q water 清洗乾淨

11. 呈色 : 將雜交膜置入以下成份的混合溶液中, 在室溫中溫和搖晃 45 分鐘

Fast Red TR salt (fresh prepare) 5mg

Substrate Buffer 5 ml

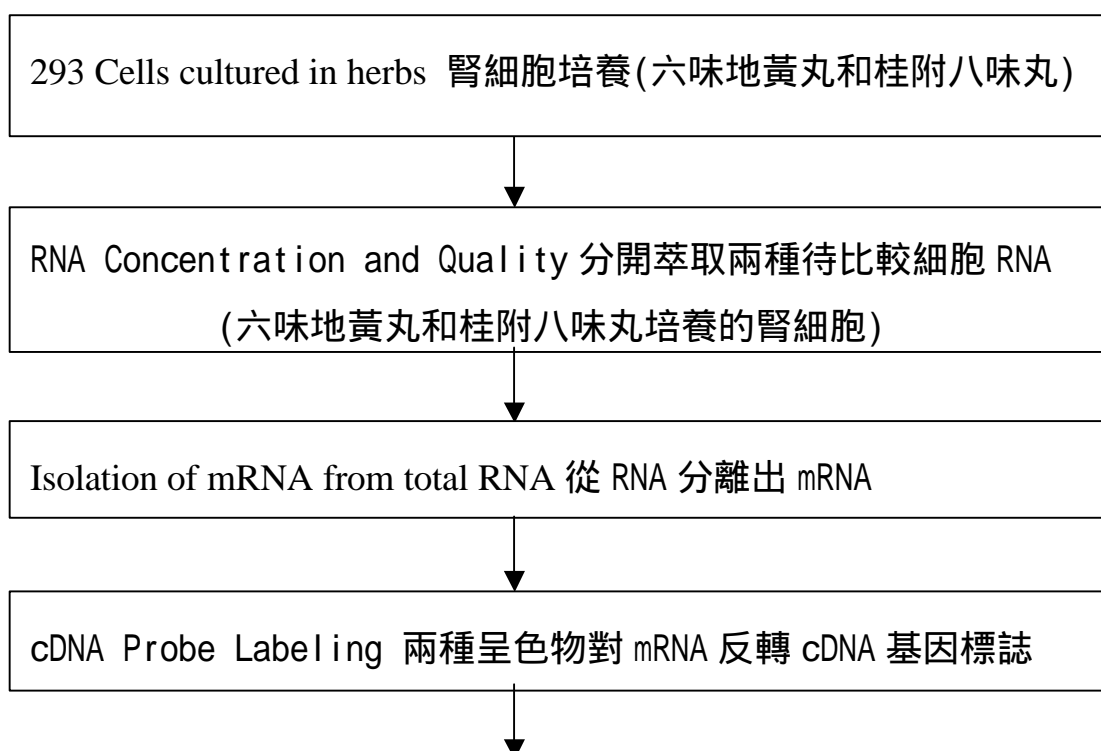
Naphthol AS-Mx Phosphate Concentrate 0.75ml

12. 以 mini-Q water 清洗乾淨

13. 將雜交膜置入 5ml 的 1 \times PBS+20mM EDTA, 在室溫下搖晃 20 分鐘以終止反應

14. 空氣乾燥

(七). 掃描儀: 雜交後晶片呈色掃描, 電腦記錄及影像資料定量分析



Membrane Hybridization and Color Development 兩種呈色標誌
未知 DNA 基因與晶片上已知探子基因進行雜交和呈色反應

Scan and Data Analysis 掃瞄電腦記錄及影像資料定量分析

圖 1:DNA 基因晶片萃取兩種待比較細胞 mRNA 偵測基因表達操作步驟.

第四章 結果

實驗過程中以桂附八味丸培養 293 細胞，觀察到在濃度 0.2mg/ml 時細胞生長情況最佳，而濃度 2mg/ml 培養 48 小時，見到細胞漂浮在培養基表面，顯示無法順利生長。桂附八味丸和六味地黃丸培養 HEK 293 腎細胞株，其基因表達上調最明顯的 20 個基因，數值介於 2.16 到 1.54 (表一)和下降最顯著 20 個基因，數值介於 3.12 到 2.79(表二)。

本表的數值取 \log_2 實驗組/對照組，因此假如數值為 1，則其基因表達為 $2^1=2$ 倍，數值為 2 則其基因表達為 $2^2=4$ 倍，數值為 3 則其基因表達為 $2^3=8$ 倍。

基因表達上調最大的是 Cytochrome c oxidase subunit V_{ib}，其它酵素基因

依序有 Nitrilase 1、 Adenine phosphoribosyltransferase、 Mevalonate (diphospho) decarboxylase、 Caspase 10, apoptosis-related cysteine protease、 Proteins kinase,mitogen-activated,kinase 3(MAP kinase kina) , 共 6 個酵素基因。

下調基因表達抑制最大的是 Human mRNA for KIAA179 gene, partial cds , 其它酵素基因依序有 Carboxypeptidase B2 (plasma)、 Arachidonate 5-lipoxygenase、 Asparaginyl-tRNA synthetase、 Flavin containing monooxygenase 3 , 共 4 個酵素基因。

本實驗上下調控基因，雖然大都在 4-8 倍左右，不若其他文獻報導高達 2^{10} 千倍，但酵素微量變化即可明顯促進化學反應，可能因此桂附八味丸無論在細胞培養，或臨床治療上反應依然相當顯著。

表一：Genes that increase under **Rehmannia Eight Formula** treatment
(compare to the **Rehmannia six Formula**) detected by DNA microarray.

ESTs : expressed sequence tags, the function of these genes are unknown.

Gene	Fold increase
Cytochrome c oxidase subunit Vib	2.16
Pre-B-cell leukemia transcription factor 2	1.96
Neuroblastoma stage 4S gene	1.90
ESTs	1.87
Nitrilase 1	1.76
v-AKT murine thymoma viral oncogene homolog 1	1.75
Homo sapiens mRNA for KIAA0906 protein,partial cds	1.74
Homo sapiens clone 24664 PH-20 homology mRNA,complete cds	1.74
Adenine phosphoribosyltransferase	1.72
Mevalonate(diphospho)decarboxylase	1.68
Microtubule-associated protein tau	1.67
Sp2 transcription factor	1.64
Homo sapiens mRNA for APS, complete cds	1.61
Caspase 10,apoptosis-related cysteine protease	1.60
Homo sapiens clone 24810 mRNA sequence	1.60
ESTs	1.59
H2A histone family, member L	1.56
Proteins kinase,mitogen-activated,kinase (MAP kinase kinase)	1.55
ESTs	1.54
H.sapiens MacMarcks mRNA	1.54

表二：Genes that decrease under **Rehmannia Eight Formula** treatment (compare to the **Rehmannia six Formula**)detected by DNA microarray.

Genes	Fold decrease
Human mRNA for KIAA179 gene, partial cds	-3.12
Carboxypeptidase B2 (plasma)	-3.11
ESTs	-3.03
B-cell CLL/lymphoma 2	-3.02
Arachidonate 5-lipoxygenase	-3.01
Protein kinase, mitogen-activated 6(extracellular signal)	-2.99
homeo box 11(T-cell lymphoma 3-associated breakpoint)	-3.01
cell division cycle 27	-2.93
ESTs	-2.88
ESTs	-2.87
v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 1	-2.86
ESTs	-2.85
Faciogenital dysplasia (Aarskog-Scott syndrome)	-2.84
Homo sapiens clone 192 Rer 1 mRNA, complete cds	-2.83
Asparaginyl-tRNA synthetase	-2.82
Flavin containing monooxygenase 3	-2.81
Inhibitor of DNA binding 1,dominant negative helix-loop-hel	-2.80
Human Chromosome 16 BAC clone CIT987SK-A-735G6	-2.79
zinc finger protein 42(myeloid-specific retinoic acid-resp serum amyloid A1)	-2.79

第五章 討 論

我們起初對實驗中不同濃度桂附八味丸，探討培養 293 細胞影響，為何濃度 0.2mg/ml 細胞生長情況最佳，而僅 2mg/ml 細胞就凋亡無法順利生長感到疑惑，為何補益調養藥不如抗癌藥，後來在線粒體呼吸酵素基因調控，其中所蘊含深奧意義因而得到揭曉。應驗了內經素問陰陽應象大論：「壯火食氣，少火生氣。」瞭解到肉桂性味：味辛甘，性『大熱、有小毒』；附子性味：味甘辛，性『大熱、有毒』。更感佩經方用藥體認之深、臨床觀察之細心，製劑用丸不用湯者：『丸者緩也、湯者蕩也』，療效歷千年而不衰於此得到印證。

Cytochrome oxidase V1b(COXV1b)從人類骨骼肌基因庫解離出，由於在不同組織如肝、骨骼肌、纖維母細胞和 MOLT 細胞之 COXV1b 基因，其轉錄約 500 核苷酸 RNA，在北方吸乾實驗的單一雜交帶，所表達的都呈穩定狀態，故推論本基因功能無組織特異性^(23,46-48)。因此桂附八味丸對於全身細胞，都能向上調控線粒體能量代謝，使位於線粒體內膜上呼吸酵素複合物 IV，即細胞色素氧化酶活性增加，促進呼吸鏈複合物 V (ATPase)合成 ATP，增加身體細胞能源，達到腎陽虛主證“畏寒肢冷”之治療目的。

中醫內經「陽虛則外寒，陰虛則內熱」：『陽虛』顯示致病機轉在細胞電廠 ATP 合成不足-『線粒體功能低下-Hypomitochondrism.』，因此導致細胞漿內環核苷酸(cAMP)下降。身體內橫紋肌所含線粒體最多(四肢軀幹慢肌能源以線粒體為主而心肌線粒體佔胞漿一半以上)，肌肉產能嚴重不足，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『線粒體功能亢進-Hypermitochondrism.』，線粒體 ATP 合成增加送到胞漿內，透過細胞膜上腺甘環化酶(Adenylyl cyclase)生成

環腺核苷酸，因此陰虛者環腺核苷酸增加，肝臟為體內主要製造工廠且含線粒體次多，因此臨症表現出『內熱』。臨床上糖尿病腎病變，雖然血糖高甚至膽固醇、三酸甘油脂高，但是細胞膜上酪胺酸激酶接受器(RTK)，缺乏胰島素啟動細胞內磷脂肌醇 3 氫氧激酶(PI3K)，無法啟動細胞膜上葡萄糖輸送器(glucose transporter)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^(49,44)，正合乎王冰所謂『益水之源，以制陽光。』

1979 鄭安 等 發表環腺核苷酸 cAMP 正常值 23.9 ± 5.3 Pmol/ml，範圍是 14.9 - 39 Pmol/ml，環鳥核苷酸 cGMP 正常值 6.2 ± 2.2 Pmol/ml，範圍是 1.2 - 9.6 Pmol/ml；1981 王明春等發表環腺核苷酸男性正常值 25.01 ± 1.49 Pmol/ml，女性正常值 22.36 ± 2.0 Pmol/ml。肝癌病人血中 cAMP 顯著降低，cGMP 則顯著偏高，病程愈發展改變愈明顯，Granner 報告大鼠肝癌中的 cAMP 含量僅正常肝細胞的 1/10。肺癌病人生存期發現和血中 cAMP 也有正相關，由於 cAMP 是細胞訊息傳遞第二信使，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 cAMP，啟動蛋白激酶 PKA，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 R 和 R 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，R 亞基的過度表達則細胞無限制生長，促細胞惡性轉化與癌腫形成，桂附八味丸治療癌症陽虛時^(50,51)，也許在調節 cAMP 降低所造成的失衡，有助於細胞的良性分化，誠如王冰所謂『益火之源，以消陰翳。』趙偉康等對老年大鼠肝線粒體能量代謝及其調控機制的研究⁽²¹⁾，在腎陰虛組琥珀酸和 NADH 氧化酶下降，而細胞色素氧化酶活性升高，腎陽虛組大鼠肝線粒體，琥珀酸和 NADH 氧化酶升高，細胞色素氧化酶活性下降；而脂質代謝過氧化產物丙二醛(MDA)含量明顯高於腎陰虛組，因細

胞色素氧化酶活性下降，複合體 I 還原態增高，易產生自身氧化呼吸鏈電子傳遞溢出，估計氧化磷酸化呼吸鏈產能過程中，有 3-5% 氧形成過氧化氫而非水，氧自由基電子傳遞溢出，很容易造成線粒體 mtDNA 損傷變異，線粒體 mtDNA 缺乏核 DNA 所具有的修補系統，因此線粒體 mtDNA 變異是核 DNA 的 10-16 倍以上⁽⁴⁴⁾，易引起 mtDNA 片段缺失，由于 mtDNA 參與密碼呼吸鏈酶蛋白次單位的合成，如複合體 I 的 7 個次單位、複合體 II 的 13 個次單位和複合體 III 的 2 個次單位，因此造成蛋白次單位合成障礙，同時受精卵線粒體來自卵而非精虫，每個線粒體含許多複製 mtDNA，每個受精卵有幾千個線粒體，無法期待其複製均一致。在神經肌肉細胞可能堆積了許多突變 mtDNA，推測可能是成年時期才發作常見疾病，如巴金氏病(Parkinson's)、阿茲海漠氏病(Alzheimer's)、孃廷頓氏病(Huntington's)之病因⁽⁴⁴⁾。許多研究認為線粒體 mtDNA 損傷，是細胞衰老和死亡的分子基礎，會使細胞正常功能線粒體數減少，細胞能量不足從而發生一系列衰老變化，尤其 ATP 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、自由基生成與線粒體損傷的惡性循環。1969 杜克大學 Joe McCord 和 Irwin Fridovich 發現超氧化歧酶 (superoxide dimutase SOD)⁽⁴⁴⁾，其唯一任務即破壞氧自由基，正常線粒體氧化代謝才形成超氧化歧酶，腎陽虛呼吸鏈胞色素氧化酶活性減低，則超氧化歧酶形成下降。王傳社等實驗小鼠延緩衰老機理的比較⁽³⁰⁾，桂附八味丸增加超氧化歧酶活性、降低過氧化脂質(LPO)改善自由基代謝、調整免疫功能、改善腎小球基底膜厚度(GBM)及間質炎症等，抗衰老作用明顯優于六味地黃丸，中醫衰老腎虛特徵確為陰陽兩虛並存但偏于陽虛，命門火衰。

Mevalonate diphosphodecarboxylase (MDD) 位於細胞 Peroxisomes 內，在肝細胞促進 Mevalonic acid 合成酯醇 (sterol) 和膽固醇 (cholesterol)，膽固醇和蛋白質、磷脂類、三酸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(Androsterone)睪丸酮(Testosterone)或女性賀爾蒙(Estrone)、雌二醇(Estradiol)；在腎上腺合成腎上腺皮質脂酮(Corticosterone)、皮質醇(cortisol)、可體松(Cortisone)及醛固酮(Aldosterone)。提升腎陽虛血中低下性賀爾蒙、腎上腺皮質激素和醛固酮，因而達到治療作用^(24,52-55)。金匱要略“腎氣丸”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，以六味地黃丸滋養腎陰為基礎，僅用少量桂附以助腎陽，從基因表達層面說明了，COXV1b 提升老年人線粒體能量代謝；MDD 加強皮質激素和性荷爾蒙產生之機轉；生化層面上環核甘酸、性賀爾蒙、腎上腺皮質激素和醛固酮得到了矯正；臨床證型層面上畏寒肢冷等腎陽虛症狀獲得了改善，基因、生化與證型三者得到了串聯。

中醫對“腎”生理功能主生殖生長過程描述，最早見於內經素問上古天真論：女子七歲腎氣盛，齒更髮長。二七而天癸至，任脈通，太衝脈盛，月事以時下故有子。三七腎氣平均，故真牙生而長極。丈夫八歲腎氣實，髮長齒更。二八腎氣盛，天癸至，精氣溢瀉，陰陽和故能有子。三八腎氣平均，筋骨勁強，故真牙生而長極。五八腎氣衰，髮墮齒槁。七八、、腎臟衰，形體皆極。難經開始分左為腎，右為命門；“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”。脈經引〈脈法贊〉：腎與命門，俱出尺脈。宋 陳無擇：“左腎為腎藏，其府膀胱；右腎為命門，其府三焦”。到明朝 虞搏認為兩腎固為真元之根本，雖為水藏而實為相火寓乎其中，兩腎可總稱命門。張景岳認為：命門居兩腎之中，即人身之太極，由太極以生兩儀，而水火具焉。基因層面由 COXV1b 和 MDD 一起共同調控細胞能量、和內分泌腺軸腎上腺與性腺，得以瞭解歷代醫家治療腎虛，其臨床體會分腎陽命門與腎陰深具意義。而且兩千年前難經說：『生氣之原，十二經之根，腎間動氣，五臟六腑之本，十二經脈之根，“呼吸之門”，“三焦之原”』，說明了命

門“呼吸之門”，為線粒體 COX1b 掌控細胞色素氧化酶，促進氧氣接受電子生成水，即三焦水及輸送水所需能量 ATP 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，腠裡毫毛其應。』『元氣走三焦，肅膜腠裡。』說明了三焦輸送線粒體能量代謝產生的水分，經“線粒體膜和細胞膜”到組織液，進入淋巴血液循環(上中下三焦)，由腎膀胱排出。宋 陳無擇：左腎為腎藏，其府膀胱；右腎為命門，其府三焦，臟者藏也，府者受納傳輸、瀉而不藏。難經又說：『三焦者，原氣之別使也，主通行三氣，經歷於五臟六腑』。說明水分輸送的同時攜帶了能源 ATP，驚嘆其生理功能描述如此週全，「水分代謝」透過如此綿密細緻的機制，與環環相扣的途徑，這就是臨床上糖尿病腎病變水腫或肝硬化腹水，西醫利尿劑無效時，中醫臨床使用溫陽宣肺氣、疏通腠裡行皮裡膜外，益氣健脾鞏固療效，發揮利尿消腫的效果。^(56,57)

Adenine phosphoribosyltransferase(APRT)腺甘磷酸核糖轉化酶，目前冰島、美國報導此酵素缺乏家族遺傳疾病，大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，腺甘磷酸核糖轉化酶和中醫腎氣、慢性腎炎腎衰關係有待研究。^(25,58)

Nitrilase 1：此酵素鍵解 nitrile 形成酸和銨(ammonium)，亦催化醯胺(amide)水解成酸和銨，代謝關係有待研究。⁽⁵⁹⁾

MAP kinase kinase(MAPKK)：cAMP 啟動蛋白激酶(PKA)，需要 MAPKK 參與傳訊到 MAPK，再啟動細胞核基因轉錄，調控細胞核 DNA 增殖與分化。^(60,61)

Caspase 10,apoptosis-related cysteine protease 293 細胞培養，為何濃度 0.2mg/ml 細胞生長情況最佳，而僅 2mg/ml 細胞就凋亡，中藥濃度及培養時間 48 小時、24 小時或 12 小時，影響細胞生長與凋亡，是否和本基因表達程度相關，有待進一步研究。

肉桂作用：能助腎中陽氣（命門之火）並能納氣歸腎，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線粒體能量代謝，使位於線粒體內膜上呼吸酵素細胞色素氧化酶活性增加。而且這些有意義基因需再作 RT-PCR，確認其基因功能及 mRNA 表達量，是下一步必須研究的課題。DNA 微陣列分析基因表達層面，使用在中藥複方與証型研究才剛開始，我們需要收集更多有效資料，包括找出新基因以及對基因功能正確及更新的認識。

我們將很快進行謹慎的動物造模研究，再對此有意義的 3 個基因(COX V1b, MDD, APRT)和其生化指標相關變化關係加以探討，期望能對腎陽虛、腎陰虛的基本生物分子變化有深度瞭解，同時期望建立中醫辨證的基因証型，使基因晶片用於臨床診斷上。

第六章 結 論

桂附八味丸培養 293 細胞基因表達上調和下降最多的 20 個基因，其中 3-4 個基因有顯著意義。Cytochrome oxidase V1b 向上調控線粒體內膜上呼吸酵素-細胞色素氧化酶活性增加，增加線粒體 ATP 合成。

Mevalonate diphosphodecarboxylase(MDD) 調 控 酵 素 於 細 胞 Peroxisomes 內，促進合成酯醇和膽固醇。

Adenine phosphoribosyltransferase(APRT)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。

MAP kinase kina 在 cAMP 啟動蛋白激酶(PKA)，需要 MAPKK 參與調控細胞核 DNA 增殖與分化。

中醫診斷腎的疾病，從經驗中分為兩個層面，由脈分左腎右命門、證分腎陽虛和腎陰虛，生命之門-腎陽、命門火就如同線粒體能源的供應，對於細胞身體生存那麼重要，腎陰涵蓋內分泌腺軸腎上腺、性腺、腎藏，對於細胞身體生長發育居主導功能。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和線粒體、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。

DNA 微陣列分析基因表達層面，使用在中藥複方與証型研究才剛開始，我們需要收集更多有效資料，包括找出新基因以及對基因功能正確及更新的認識。

參 考 文 獻

1. 左言富:入世後中醫藥科技面臨的機遇、挑戰與對策.南京中醫藥大學學報.2000;16(6):321-325
2. 王傳,陳可冀:中西結合臨床研究的思路與方法.中國中西結合雜誌.2000.Feb;20(2):136-137.
3. 于爾辛:中西醫結合學.上海醫科大學出版社.第一版.1996:2-5,23-33.
4. 許建陽,李占平,李梅:關於中醫學現代化的思考.中國中醫基礎醫學雜誌.2001;7(3):175-176.
5. Charlie C.Xiang, Yidong :c DNA Microarray technology and its applications.Biotechnology.Advances 2000;18:35-46.
6. Cynthia A. Afshari, Emile F. Nuwaysir, and J.Carl Barrett.: Application of Complementary DNA Microarray Technology to Carcinogen Identification, Toxicology,and Drug Safety Evaluation.Prospectives in Cancer Research.1999;59:4759-4760.
7. Javed K, LaoH.S,Michael LB, Yidong C,Jeffrey MT, Paul SM.: Expression profiling in cancer using cDNA microarrays, Electrophoresis.1999;20:223-229.
8. Christine Debouck & Peter N. Goodfellow.:DNA microarrays, in drug discovery and development. Nature genetics supplement.1999;21:48-50.
9. Chistina A H, Carsten R and Jacques R.:Monitoring gene expression using DNA microarrays. Current Opinion in Microbiology.2000;3:285-291.
10. Nicole L.W.van H., Oscar V.,Adele M.M.L.van H., Esther J. Kok, Ad Peijnenburg, Asaph A.,Arjen J.van T.,Jaap K: The

application of DNA microarrays in gene expression analysis.
J of Biotech.2001;78:271-280.

11. 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 20 周年大會論文集.2001:140-141.
12. 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.2001;7(1):78-81.
13. 朱文鋒:辨証統一體系的創立.中國中醫基礎醫學雜誌.2001;7(4):244-246.
14. 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.2001;8(21):621-623.
15. 陳拱北預防醫學基金會:公共衛生學.巨流圖書公司:1997;第一版:39.
16. 焦淑芳,喻紅:溫陽通腑降濁法治療慢性腎衰竭陽虛濁毒證療效觀察.湖南中醫學院學報.2001;21(2):51-52.
17. 青姚,張志哲:腎陽虛患者血清甲狀腺激素水平變化及溫補腎陽的療效觀察.深圳中西醫結合雜誌.2001;11(5):0271-0272.
18. 宋春風,馬洪駿,呂佩源,尹桂山:補腎中藥對腎陽虛大鼠垂體-睪丸超微結構的影響.中醫藥研究.2001;17(4):45-46.
19. 宋春風,呂佩源,尹桂山:腎陽虛證的中西醫結合研究概況.中國中醫基礎醫學雜誌.2001;(7):556-559.
20. 劉旭光,宋開源,劉雨星,余曙光,魏焦祿:陰虛、陽虛模型大鼠體溫晝夜節律參數差異的研究.中國中醫基礎醫學雜誌.2001;7(1):71-73.
21. 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.2000;7(3):31-34.
22. 薛莎,湯學軍,馬威,馬利,管竟環,吳文莉,曹陽,李軍:右歸丸對家兔

- 腎陽證生化指標及皮質醇的影響.JTCM 實驗研究 2001;42(7):434-437.
23. Taanman JW, Scharge C, Ponne NJ, Das AT, Bolhuis PA, de Vries H, Agsterrible E.: Isolation of cDNA encoding subunit VIb of cytochrome c oxidase and steady-state levels of coxVIb mRNA in different tissues. Gene 1990;93(2):285-291.
 24. Bonanno J B, Edo C, Eswar N, Pieper U, Romanowski MJ, Ilyin V, Gerchman SE, Kycia H, Studier FW, Sali A, Burly SK.: Structural genomics of enzymes involved in sterol/isoprenoid biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98(23):12896-901.
 25. Benedetto B, Madden R, kurbanov A, Braden G, Freeman J, Lipkowitz GS: Adenine phosphoribosyltransferase deficiency and renal allograft dysfunction. Am J Kidney Dis 2001;37(5):E37.
 26. 戴新民. 中醫診斷學. 臺灣啟業書局有限公司. 再版 1986:299-302.
 27. 陳華. 中醫的科學原理. 台灣商務印書館. 第一版 1999: 67-68, 167, 196-198.
 28. 李東濤, 田濟遠, 王守海等: 陽虛的內在實質研究回顧與展望. 現代中西醫結合雜誌. 2000;9(13), 1213-15.
 29. 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作用的研究. 中國實驗方劑學雜誌. 2001;7(5)16-18.
 30. 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, 北京軍事醫學科學出版社. 第四冊. 1996:193-201.
 31. 余無言. 金匱要略前義. 文光圖書公司. 第一版. 1970:94.

32. 葉定江,張世臣,陳奇.中藥炮製學上海科學技術出版社.第一版.
1998:239
33. 曾立崑.本草新用途.人民軍醫出版社.第一版 1999:193-196.
34. Li-Li Hsiao, Robin L S, Robert L H, Steven RG.: Prospective use of DNA microarrays for evaluating renal function and disease. Current Opinion in Nephrology and Hypertension. 2000;9:253-258.
35. Robert E B, F J Montz. Human papilloma virus: Molecular biology and screening application in cervical neoplasia- a primer for primary care physicians. Prim care update Ob/Gyns.1998;5:238-246.
36. Alexander von G, Henritte S, Elke H, Hans E and Soren R. The genetics of enuresis: A Review. The Journal of Urology.2001;166: 2438-2443.
37. David AA, Kulkarni P, Iwao W, et al.:Future Molecular Approaches to the Diagnosis and Treatment of Glomerular Disease. Seminars in Nephrology 2000;20:20-31.
38. Julia YL, Alexander JL, Anna L, William HY, Mary SR, Jeffrey HM, Lydia MS, Alexander VL, and Keith LB.: Overexpression of chain-containing laminins in human glial tumors identified by gene microarray analysis. Cancer Reserch 20 01;61:5601-5610.
39. 趙學軍,李任先,郎建英.:論証的研究思路.中國中醫基礎醫學雜誌.2001;7(6):401-402.
40. 李勁平,王培訓:基因蕊片在中醫藥研究中的應用.中醫雜誌 JTCM. 2001;12(42):750-75
41. 唐辰龍.中醫學.上海醫科大學出版社.第一版.1996:31.
42. 戴新民.腎的研究.臺灣啟業書局有限公司.再版 1986:2-10.

43. Josephine S, Modica-Napolitano and Keshav K S: Mitochondria as targets for detection and treatment of cancer. Expert reviews in molecular medicine 2002;Apr.(www.expertreviews.org).
44. Gerald Karp. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments. 2nd Edition.1999,USA,John Wiley & Sons inco: 25,198-209 ; 157-158,658-663,675-677 ; 212-213 ; 36.
45. Chen JJW, Wu R, Yan PC, Huang JY, Sher YP, Han MH, Kao WC, Lee PJ, Chiu TF, Chang F, Chu YW, Wu CW, Peck K: Profiling expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection Genomics.1998;51:313-324.
46. Carrero-Valenzuela RD, Quan F, Lightowlers R, Kennaway NG, Litt M, Forte M.:Human cytochrome c oxidase subunit V1b: characterization and mapping of a multigene family.Gene 1991 Jun;102(2):229-36.
47. Taanman J W, Scharge C, Bokma F, Reuvekamp P,Agsteribbe E, De Vries H.:Nucleotide sequence of the last exon of the gene for human cytochrome c oxidase subunit V1b and its flanking regions. Biochem Biophys Acta 1991 Jun;1089(2):283-5.
48. Ohtsu K, Nakazono M, Tsutsumi N, Hirai A. :Characterization and expression of the gene for cytochrome c oxidase subunit V1b(COX6b) from rice and Arabidopsis thaliana. Gene 2001 Feb;264(2):233-9.
49. 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.2001;7(5):16-18.

50. 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.2001;32(1):35-36.
51. 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.2000;15(3):10-11.
52. Yang D, Shipman LW, Roessner CA, Scott AI, Sacchettini JC. Structure of the methanococcus jannaschii mevalonate kinase - a member of the GHMP kinase superfamily. J Biol Chem 2001 Dec;(epub ahead of print)
53. Sakakura Y, Shimano H, Sone H, Takahashi H, Inoue N, Toyoshima H, Suzuki S, Yamada N, Inoue K.:Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. Biochem Biophys Res Commun 2001;286 (2):176-83.
54. Olivier LM, Krisans SK.:Peroxisomal protein targeting and identification of Peroxisomal targeting signals in cholesterol biosynthetic enzymes. Biochim Biophys Acta 2000; 1529(1-3):89-102.
55. Olivier LM, Kovacs W, Masuda K, Keller GA, Krisans SK. Identification of Peroxisomal targeting signals in cholesterol biosynthetic enzymes. AA-CoA thiolase, hmg-coa synthase, MPPD, and FPP synthase. J Lipid Res 2000;41(12): 1921-35.
56. 時振聲,時氏中醫腎臟病學.北京中國醫藥科技出版社.第一版.1997: 43-50.
57. 魏連波,葉任高,陳旭紅,李智軍,呂瑞和,樂圖: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.2000; 20(2):99-101.

58. Edvardsson V, Palsson R, Olafsson I, Hjaltadottir G, Laxdal T. Clinical features and genotype of adenine phosphoriboxyl transferase deficiency in Iceland. *Am J Kidney Dis.*2001;38 (5):473-80.
59. Kobayashi M, Goda M, Shimizu S.:Nitrilase catalyzes amide hydrolysis as well as nitrile hydrolysis. *Biochem Biophys Res Commun.*1999;255(2):549.
60. Kostic TS, Tomic M, Andric SA, Stojilkovic SS.: Calcium-independent and cAMP-dependent modulation of soluble guanylyl cyclase activity by G-protein-coupled receptors in pituitary cells. *J Biol Chem.*2002 Feb;(epub ahead of print)
61. Shell SA, Fix C, Olejniczak D, Gram-Humphrey N, Walker WH. Regulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response binding protein(CREB) expression by Sp1 the mammalian testis. *Bio Reprod.*2002 Mar;66(3):659-66.

Abstract

Objective: This research was to analyze gene expression of 293cell line cultured in

herbs by using DNA microarray to detect mRNA. **Methods :** The human embryonic kidney (HEK) cell line (293cell) cultured in two groups, 0.2mg/ml, 0.5mg/ml and 1mg/ml of Liu Wei Di Huang Wan and Ba Wei Di Huang Wan. For this, mRNA from 293 cell cultured in DMEM was analyzed by DNA microarray. Analyses of 293cell mRNA by using Dr Peck Konan microarray. **Results :** To indicate that Cortex Cinnamomi and Radix Acconiti in Ba Wei Di Huang Wan modulated the expression of several genes. The gene expression revealed changes in 40 genes, up and down regulation each 20 genes, and found 3 significant up regulated genes (Cytochrome oxidase V1b, Mevalonate diphosphodecarboxylase, Adenine phosphoribosyltransferase).

Conclusion : The kidney ying or yan deficiency is used to find in chronic renal insufficiency or renal failure. Many researches shows the kidney yan deficiency decreased in c-AMP, thyroxin, free T3 , cytochrome c oxidase in mitochondrial energy metabolism and increased c-GMP but ying deficiency is opposite. Our results revealed Ba Wei Di Huang Wan to effect at least 3 up regulated genes to modulated the effects to be compatible with the ATP synthesis in mitochondria, hormone changes in blood and correct the clinical pictures. Microarray technology may provide new understanding of the fundamental moleculobiological activity of how the Chinese hot herbs affect the development and function of individual cells and set up the gene expression patterns of the Chinese medical ying-yan theory after to induct animal study in the next step.

Key words: DNA microarray; Chinese herb; gene expression.

Mitochondrial energy metabolism.

縮寫	英文	中文
1.AC	Adenylyl cyclase	腺甘環化酶
2.APRT	Adenine phosphoribosyltransferase	腺甘磷酸核糖轉化酶
3.ATP	Adenine triphosphate	腺甘三磷酸
4.ATPase	Adenine triphosphatase	腺甘三磷酸酶
5.cAMP	cyclic Adenosine monophosphate	環(腺)核甘酸
6.COX VIb	Cytochrome oxidase V1b	細胞色素氧化酶
7.cGMP	cyclic Guanine monophosphate	環鳥核甘酸
8.GBM	Glomerular basement membrane	腎小球基底膜
9.LPO	Lipid peroxidase	過氧化脂質
10.MAPK	Mitogen-activated protein kinase	有絲原啟動蛋白激酶
11.MDD	Mevalonate diphosphodecarboxylase	M 雙磷酸脫羧酶
12.mRNA	messenger ribonucleic acid	訊息核糖核酸
13.mt DNA	mitochondrial deoxyribonucleic acid	線粒體去氧核糖核酸
14.PI (3)K	phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase	磷脂肌醇 3 氫氧激酶
15.PKA	protein kinase A	蛋白激酶 A
16.RTK	Receptor tyrosine kinase	酪胺酸激酶接受器
17. RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction--	反轉錄聚合酶連鎖反應
18.SNP	Single nucleotide polymorphism	單核甘酸多態性
19.SOD	Superoxide dimutase	超氧化歧酶
20.TCA cycle	Tricarboxylic acid cycle	檸檬酸環或三羧酸環

作者簡歷

學歷：私立中國醫藥學院中醫學系	59.9- 66.6
中國醫藥學院中西結合研究所	89.9-91.6
經歷：1)台北市立和平醫院實習醫師	65.7-66.6
2)空軍防砲少尉醫療組組長	67.3-68.8
3)台北市私立博仁綜合醫院外科住院醫師	68.8-69.2
4)台北市立中興醫院泌尿科住院醫師	69.2-72.5
5)台北縣三重縣立醫院外科主治醫師	72.5-73.5
6)台中市私立仁愛綜合醫院外科主治醫師	73.5-75.3
7) 台北縣陽德綜合醫院副院長	75.4-75.7
8)台中縣沙鹿童綜合醫院泌尿科主治醫師	75.8-76.7
9)台中市順天綜合醫院外科主任	76.8-85.7
10)台中市私立慈濟中醫診所主治醫師	85.7-88.2
11)台中市長祿中醫診所院長	88.3-88.5
12)台中市中國附設醫院中西合作醫療中心主治醫師	88.9-91.6
現任:嘉義大林慈濟綜合醫院中醫科主任	91.7
其它：1)66 年考試院中醫師檢覈考試及格	
2)67 年考試院西醫師檢覈考試及格	
3)72 年考試院公共衛生醫師特考及格	
4)77-82 年台北榮民總醫院短期講習訓練	
5)82 年度台中市優良醫師表揚	
6)中國醫藥學院臨床兼任講師	
7)中華民國泌尿科醫學會專科醫師	
8)中華民國中西整合醫學會永久會員	
9)中華民國針灸學會會員	

