

# 目錄

第 1 章	前言 .....	1
第 2 章	文獻探討 .....	6
第 3 章	研究方法 .....	32
第 4 章	結果 .....	43
第 5 章	討論 .....	61
第 6 章	結論 .....	65
第 7 章	參考文獻 .....	88



## 圖目錄

圖 4.1 檢體 total RNA 品質測定	
48	
圖 4.2 基因放大後的 RNA 品質測定	
49	
圖 4.3 正常體質對照組 (CY5) 比對 寒證氣喘組 (CY3) 之晶片影像	50
圖 4.4 熱證氣喘組 (CY5) 比對 正常體質 (CY3) 對照組之晶片影像	51
圖 4.5 寒證氣喘組 (CY5) vs 熱證氣喘組 (CY3) 晶片影像	52

## 表目錄

表 3.1	兒科支氣管氣喘寒熱證型診斷表	33
表 3.2	晶片樣本	40
表 4.1	寒證氣喘組的收案對象資料	43
表 4.2	熱證氣喘組的收案對象資料	44
表 4.3	正常體質對照組的收案對象資料	45
表 4.4	寡核苷酸晶片所分析之寒證氣喘樣本資料	46
表 4.5	寡核苷酸晶片所分析之熱證氣喘樣本資料	46
表 4.6	寡核苷酸晶片所分析之正常體質對照組樣本資料	47
表 4.7	寒證氣喘組比對正常體質對照組經t-test檢定後 顯著差異的表達基因共有 170 個	66
表 4.8	寒證氣喘的可能基因及其調控路徑	53

表 4.9 熱證氣喘組比對正常體質對照組 比值大於 2 的差異基因共 80 個	71
表 4.10 熱證氣喘組比對正常體質對照組 比值小於 0.5 的差異基因共 21 個	73
表 4.11 熱證氣喘組比對正常體質對照組經t-test檢定後 有顯著差異的表達基因共 266 個	74
表 4.12 熱證氣喘的可能基因及其調控路徑	55
表 4.13 熱證氣喘組比對正常體質對照組顯著差異基因表現量	58
表 4.14 寒證氣喘組比對熱證氣喘組 比值大於 2 或小於 0.5 的差異基因共 11 個	82
表 4.15 寒證氣喘組比對熱證氣喘組經t-test檢定後 有顯著差異的表達基因共 137 個	83
表 4.16 寒熱證型的可能基因及其調控路徑	59
表 4.17 寒證氣喘組比對熱證氣喘組顯著差異基因表現量比較	60

# 第 1 章 前言

## 1.1 研究背景

氣喘是全球性的重大公共衛生問題，從1970年來，許多報告都指出，全世界氣喘病的罹病率持續在增加，病情轉趨嚴重，住院率和死亡率也隨著增高。根據美國國家衛生院於1997年的報告中指出，全世界的人口中約有百分之三十到五十具有遺傳性過敏體質<sup>1、2</sup>。

在台灣地區約有百分之四十的國中國小學童具有遺傳性過敏體質。台灣處於亞熱帶地區，因氣候潮濕，罹患過敏性疾病甚多，其中以過敏性鼻炎與氣喘最為常見。

自1974年至1994年，台北市做過四次大規模的調查，以7-15歲的學童為對象。結果發現：台北市學童氣喘病發生率在1974年為1.30%，然後快速增加，1985年為5.08%，1991年為5.80%，到1994年底高達10.79%，20年間增加超過八倍<sup>3</sup>。目前全世界有一億人口罹患氣喘，其盛行率在兒童有逐漸增加趨勢，另外，氣喘發作的年齡也有往下發展的跡象。由此可見，對於氣喘研究的具有相當的重要性及急迫性。

氣喘是小兒常見疾病，它是一種由免疫遺傳和環境因素等共同作用所引起的多基因遺傳疾病，孩童時期的氣喘是相當難診斷，特別是三歲以下的孩童，陣發性的喘鳴聲及咳嗽是最普遍的症狀。在五歲以前，氣喘的診斷大多只是根據綜合病患的症狀及理學檢查結果的臨床判斷。氣喘經常被誤診，因而導致不適當的治療。

中醫兒科辨證的特點，是注重辨識寒熱二證。因此在寒熱二證的辨證上必須準確無誤，否則在治療用藥上則差之毫厘，失之千里。在診法種類上，小兒診法的特點在於望法，內容包含望神色、望形態、察二便、觀舌診、看指紋等<sup>4</sup>。

寒熱是陰陽的表徵，是八綱的重要內容，貫穿於中醫理法方藥的全部過程。辨證是中醫臨床最重要的一項，也是中醫臨床最具特色和最為重要的一環。臨床上要得滿意的療效必須辨證準確。

氣喘是一種由遺傳因素和環境因素共同導致的多基因遺傳病，其發病呈現明顯的家族聚集現象<sup>5、6、7</sup>。先前認為氣喘是一種遺傳疾病；然而經研究評估後認為 40~60% 可歸因於遺傳因子<sup>8</sup>，此理與中醫學很早就認識到體質的差異所導致的疾病的易感性和多樣性不謀而合；但目前仍難以理解氣喘遺傳的精確模式。

同一種疾病，在不同的人有著不同的表現；而對於不同的疾病，往往也會有相同的證型，這說明「證」是客觀存在的。因此，似乎

可以從基因層次來探討中醫學的證型。受到不同的病因刺激和影響，體內會有不同的基因表現；也有可能是在不同的致病因素下，對於同一種基因而言，它會有著不同的表現量。

分子生物學對現代醫學的影響深遠，基因診斷是運用分子生物學比較成功的一個分支。隨著人類基因組織計畫的快速推進和基因診斷的不斷完善，越來越多的疾病也必將通過基因診斷來提高正確性和速度。看到分子生物學對現在醫學產生了如此大的推動力，吾人也在期盼著它對中醫學產生革命性的影響。

雖然，中醫學在認識身體功能變化上積累了豐富的經驗，但是通過感官的直觀觀察畢竟是宏觀的、表象的，疾病的過程錯綜複雜、瞬息萬變，四診搜集的資料在可靠性方面往往受到病童的表達、耐受能力、醫生學識水準、觀察詳略等多種主觀、客觀因素干擾，使證的診斷標準難以統一。因此，研究證的客觀指標正是實現辨證“規範化”，提高辨證效率。

千禧年不僅意味著新世紀的來臨，在生命科學的研究上，亦寫下了可與人類登陸月球狀舉相提並論的一頁，美國柯林頓總統與英國萊爾首相於2000年6月26日連袂宣佈基因輿圖草稿已近完成。於邁入21世紀後的3月，人類基因體計畫再度發表基因解碼完成的訊息。這項成就對人類的醫藥應用將造成極大的衝擊；在未來數十年

間，以基因方法預測個人對於疾病的風險及對藥物的反應將成為醫藥界的主流。

基因晶片具有在單一雜交步驟，可檢測幾千種不同表現之 mRNA，利用基因晶片技術，可應用於不同條件如健康與否、證型以及用藥之有無或前後等。它可在單一的雜交步驟，同時測得數千不同 mRNA 的量，以作組織細胞基因表現不同之分析，因此對於中醫藥治療研究非常有利。通過對足夠數量的同一病性患者的基因表現進行分析，建立證型的基因表現數據庫，再相關組合便可建立證型基因。

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<sup>9</sup>、<sup>10</sup>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。

DNA 微陣列 (DNA microarray) 是生物技術中最具潛力的，利

用生物晶片來分析相關中醫證型之基因表現，以期了解人體體質與相關基因表現的關係，未來人類可將個人獨特的基因密碼紀錄在智慧卡中，讓醫師能依照每個病人獨特的基因模式來開立處方或施行治療，在中醫藥的觀點來說，這即是個人不同“體質”或“證型”的一個指標；更廣義上來推演，中藥對不同“體質”或“證型”之人體有效性，更能以基於個人基因體之不同而有其生物之區別性。辨証論治是中醫的特色和核心，在中醫學的現代研究中，辨證必須準確無誤。而生物晶片正舉足輕重的角色。

## 1.2 研究目的

本研究試圖利用《兒科氣喘寒熱證型診斷表》篩選出具寒熱證型代表性的兩大氣喘族群患者及健康兒童，抽取其週邊血液單核球細胞的 RNA，經由基因晶片技術分析小兒寒證氣喘及小兒熱證氣喘基因表現之不同，以期將晶片診斷應用於兒科氣喘診斷上。

本研究通過對同一證型患者的基因表現進行分析，並建立小兒氣喘證型的基因表現資料庫，再透過本研究比對寒證氣喘與熱證氣喘基因，由於此二族群的共同條件為氣喘患者，經篩選所得到的差異基因，可視為寒性證型及熱證證型的候選基因。

## 第 2 章 文獻探討

### 2.1 氣喘的致病機轉

目前已知氣喘致病的機轉是因支氣管壁慢性發炎而導致氣流阻滯及增加氣道反應，因此造成支氣管在受到各種刺激時變窄。

#### 2.1.1 氣喘之氣道炎症反應

過敏性氣喘是一種慢性呼吸道的疾病，其主要的特徵包括：

- ( 1 ) 可逆性呼吸道阻塞 (reversible airflow obstruction) ，使得呼吸變得困難。
- ( 2 ) 呼吸道發炎 (airway inflammation)<sup>11</sup> ，呼吸道粘膜腫脹，黏液分泌增加。
- ( 3 ) 呼吸道過敏反應性 (airway hyperresponsiveness ; AHR)<sup>12</sup> ，然而反覆暴露於過敏原時，由於反覆的發炎反應，促使呼吸道纖維化和平滑肌增厚，造成呼吸道重塑 (remodeling)<sup>13</sup> 。

## 2.1.2 氣喘之免疫機制

過敏性氣喘是呼吸道發炎反應，推測可能受基因（genetic factors）<sup>14</sup> 和環境<sup>15</sup> 刺激相互作用，或者免疫系統中TH1和TH2反應不平衡所導致。人類T淋巴細胞有兩類：輔助第一型T細胞（Helper T cells，Th1細胞）產生的介白質IL-12及干擾素（interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ ），促進殺死細菌、黴菌及受到病毒感染的細胞。輔助第二型T細胞（Th2）及其產生的IL-4、IL-5、IL-9及IL-13與B細胞經由對應的抗原－特異性的細胞受體作用，促進抗體轉變（isotype switching），產生抗原－特異性IgE抗體。

其中T細胞產生IL-4及IL-5，活化嗜酸性白血球。而生成的抗原－特異性IgE抗體，會接連在肥大細胞（Mast Cell）及嗜鹼性細胞，偏向抗寄生蟲及過敏的反應<sup>16</sup>。因此CD4<sup>+</sup>T細胞和氣喘及其他過敏疾病有密切關係。人初期氣喘病時Th1和Th2型的介白質都有表現<sup>17</sup><sup>18</sup>。過敏性氣喘主要是Th-2介白質<sup>19</sup>長期受過敏原刺激後，含活化CD4<sup>+</sup>Th2型的細胞產生IL-4，刺激B細胞製造過敏原特異性E型免疫球蛋白抗體（IgE）。

肥大細胞活化所釋放組織胺（histamine）、白三烯素（leukotriene；LTD<sub>4</sub>）及前列腺素D<sub>2</sub>（prostaglandin D<sub>2</sub>）及血小板活化因子（platelet activating factor, PAF）引起血管通透性增加，呼吸道

平滑肌收縮，進而出現過敏性氣喘的症狀，由於這些作用在接觸過敏原後一小時內發生，因此稱為過敏反應的急性徵候 (acute responses)<sup>20</sup>。

而後大量發炎細胞如淋巴球，大多是 CD4<sup>+</sup> 型的細胞、嗜酸性白血球、嗜中性白血球、單核球和巨噬細胞陸續浸潤到組織間隙<sup>21</sup>，引起過敏反應中的遲發反應。嗜中性白血球、單核球和巨噬細胞等也都會釋放過氧化物及蛋白酵素<sup>22</sup>，或嗜酸性白血球相關物質，例如 major basic protein 來破壞氣管組織，尤其是上皮細胞<sup>23</sup>。在過敏原反覆刺激下則會形成細胞的持續浸潤及介質的持續釋放，反覆發作的結果，會造成病人呼吸道狹窄，阻塞及敏感度大增，成為慢性氣喘狀態 (chronic symptoms)<sup>24</sup>。

總括而言，過敏性氣喘是一程慢性的呼吸道發炎現象。但是對於過敏原進入過敏兒體內後，是如何造成過敏性發炎和致敏作用，目前仍未完全了解完整機轉。過敏原活化特異性 Th2 細胞是致敏的關鍵；呼吸道的其他細胞如肺泡巨噬細胞 (alveolar macrophage)，上皮細胞 (epithelial cell) 及樹突細胞 (dendritic cell) 及肥大細胞對於過敏體質個體的致敏作用扮演決定性的角色。

在發炎的氣道處尚可見肌纖維母細胞的增生和膠原纖維合成的增加等的支氣管週邊纖維化的形成<sup>25</sup>。因此呼吸道發炎反應對於

過敏反應的發生將有促進及加強的效果<sup>26</sup>。IgE 會與主要分佈於黏膜下層的肥大細胞（mast cell）或嗜鹼性白血球的 IgE 接受器（FcεRI）結合，當相同過敏原再次進入體內，會與這些特異性 IgE 結合，令肥大細胞活化，導致細胞膜上的基質大量釋放花生油烯酸（arachidonic acid），並經由 cyclo-oxygenase pathway 代謝形成前列腺素（prostaglandin；PGE2）。對空氣中的灰塵及所引起的過敏反應會因前列腺素 E2 而加重。

## 2.2 中醫文獻探討

在傳統中醫方面，氣喘屬於哮喘範疇。在定義上有廣義及狹義兩種，廣義的哮喘包括心肺多種疾病，狹氣的哮喘則僅指支氣管氣喘而言。依據《中醫內科學》<sup>27</sup> 中關於哮喘的定義是“哮喘是由於宿痰伏肺，遇誘因或感邪引觸，以致痰阻氣道，肺失肅降，氣道拘急所致的發作性痰鳴氣喘疾患”。

歷代醫家對哮喘的認識，在不同時代的醫籍中，對其症狀、病因病機都有相當的記載，只是冠以相應的不同名稱。

如《黃帝內經·素問·陰陽別論》：“陰爭於內，陽擾於外，魄汗未藏，四逆而起，起則熏肺，使人喘鳴。”

《黃帝內經·素問·通評虛實論》：“乳子中風熱，喘鳴肩息

… 。”

《黃帝內經·素問·太陰陽明論》：“犯賊風虛邪者陽受之，  
…陽受之則入六腑，…入六腑則身熱，不時臥，上為喘呼。”

漢·張仲景《傷寒論》：“喘家作，桂枝加厚朴杏子佳。” 漢  
·張仲景《金匱要略·咳嗽上氣》：“咳而上氣，喉中水雞聲，射  
干麻黃湯主之。”

隋·巢元方《諸病源候論》：“上氣鳴息候”、“呷嗽候”、  
“上氣喉中如水雞鳴候”。“肺主於氣，邪乘於肺則肺脹，脹則肺  
管不利，不利則氣道澀，故氣上喘逆，鳴息不通”。“其胸膈痰飲  
多者，嗽則氣動於痰，上搏咽喉之間，痰氣相擊，隨嗽動息，呼呷  
” “肺病令人上氣。兼胸膈痰滿，氣行壅滯，喘息不調，致咽喉有  
聲，如水雞之鳴也。有聲謂之呷嗽。”

唐·王燾《外台秘要·卷九·久咳坐臥不得方》：“久患氣嗽，  
發時奔喘，坐臥不得，並喉裏呀聲，氣欲絕。”

哮喘之名於宋·王執中於《針灸資生經》首次提出：“因與人  
治哮喘，只繆（刺）肺俞，不繆他穴。“凡有喘與哮者，為按肺俞  
無不酸痛，皆為繆刺肺俞，令灸而愈。

宋·許叔微《普濟本事方·卷一》：“凡遇天陰欲作雨便發，

甚至坐臥不得，飲食不進，此乃肺竅中積有冷痰，乘天陰寒氣從背、口鼻而入，則肺脹作聲。此病有苦至終身者，亦有母子相傳者。”

元·朱丹溪將喘與哮分別述於《丹溪治法心要·卷二·喘第二十》和《丹溪治法心要·卷二·哮第二十一》。丹溪始以哮喘作為獨立病名成篇，並對其治法、用藥原則等做了具體的論述，哮喘的病名便從此時期正式產生。

明·虞搏《醫學正傳·哮喘》“喘以氣息言，哮以聲響言”，“喘促喉中如水雞響者，謂之哮；氣促而連續不能以息者，謂之喘。”

明·王肯堂《證治準繩》：“喘者，促促氣急，喝喝息數，張口擡肩，搖身擷肚”，“哮與喘相類，但不似喘開口出氣之多，…以胸中痰多，結於喉間，與氣相搏，隨其呼吸呀呷於喉中作聲，…待哮出喉間之痰去，則聲稍息；若味不節，其胸中未盡之痰複與新味相結，哮必更作。”

明·秦景明《證因脈治》：“哮與喘的主要區別，在於哮是發作性疾病。每發六、七日，輕則三、四日。或一月，或半月，起居失慎，則舊病復發。”

總結從《黃帝內經》至明清歷代醫家對哮喘的論述不難發現，致病的因素都圍繞在痰飲上，病位則與肺脾腎有關，在病理性質上

認為發作期以邪實為主，緩解期以正虛為主，治療以發時治標，緩解時治本為原則，區分寒熱虛實，分別施治。根據前人基礎，使歷代醫家踵其腳步，累積多治療經驗，提供後世臨床與研究助益良多。

## 2.3 氣喘的中醫證治分類

氣喘在發作時，中醫證治分類主要分成寒性氣喘與熱性氣喘二大證型。寒證氣喘和熱證氣喘皆以呼吸喘促、喉中有痰鳴聲為特徵的，倘若分辨不出寒與熱，則立法用藥便無從措手，不是犯“寒寒”之忌便是犯“熱熱”之戒，直接影響療效，不能及時解除病人的痛苦<sup>28</sup>。然而氣喘發病急驟，來勢洶洶，治療時以攻伐邪氣為當務之急，故以辨別氣喘的寒熱性質至關重大。臨床掌握痰邪就算抓住了氣喘徵結所在，進一步的工作則是分辨痰濁的寒熱性質了。這就是氣喘首先分別寒熱。

氣喘但在發作之際，不論是寒證氣喘還是熱證氣喘，都不會有大量的痰被咳吐出來，一俟痰濁被大量地咳出，氣道得以通暢則氣喘隨之緩解。再則兒科問診相當困難，因此診斷時辨別痰的數量性狀顏色的變化是很困難的，應該從其他方面找依據。進行鑑別診斷時則需要從其他症狀的表現上尋找或確定痰濁的寒熱性質。圍繞著氣喘的主要病因病機，從多方面旁證，並根據蒐集到的病因資料而

確定氣喘的寒熱性質，是中醫經常採用的有效方法和手段。

### 2.3.1 寒性氣喘

寒性氣喘之症狀及分析如下：喘憋氣逆，喉中哮鳴有聲—寒痰伏肺，遇寒觸發，痰升氣阻，壅塞氣道，肺失升降。胸膈滿悶如塞，咳不甚，咯痰量少—肺氣閉鬱，不得宣暢。痰色白、稀薄而有泡沫，或呈黏沫狀—痰從寒化為飲。面色晦滯帶青，形寒怕冷—陰盛於內，陽氣不得宣達。口不渴，或渴喜熱飲—病因於寒，內無鬱熱。天冷或受寒易發—外寒引動伏飲。或兼惡寒發熱，頭疼身痛，脈浮緊—兼有風寒表證。舌苔白滑，脈弦緊—寒痰內盛。治法：溫肺散寒，化痰平喘。方藥：小青龍湯加減。

### 2.3.2 熱性氣喘

熱性氣喘之症狀及分析如下：喘而氣粗息湧，喉中痰鳴如吼，胸高脅脹，咳嗆陣作—痰熱壅肺，肺失清肅，肺氣上逆，阻塞氣道。咯痰黏著稠厚，排吐不利，或黃或白—熱蒸液聚生痰，痰熱膠結於肺。煩悶不安，汗出，面赤，口苦—痰火鬱蒸所致。口渴喜飲，不惡寒，汗少，頭痛等表證—感受風寒觸發，故見外寒內熱之候。舌質紅，苔黃膩，脈滑數—痰熱內盛之徵。治法：清熱宣肺，化痰定喘。方藥：定喘湯加減。

## 2.4 小兒的生理病理特點

中醫兒科認為小兒生理特點主要有兩個方面：臟腑嬌嫩，形氣未充；生機蓬勃，發育迅速。相對應的病理特點主要有發病容易，傳變迅速；臟氣清靈，易驅康復。

### 2.4.1 生理特點

小兒臟腑嬌嫩，形氣未充和生機蓬勃，發育迅速之生理特點，正是古代醫家稚陰稚陽和純陽之體的概括<sup>29</sup>。

#### （1）臟腑嬌嫩，形氣未充

歷代醫家把五臟六腑的發育不全和脆弱不定稱為臟腑嬌嫩，把小兒形體結構生理功能未完善稱為形氣未充。按照陰陽概括為陰陽兩氣均屬不足，處於稚陰稚陽階段。

#### （2）生機蓬勃，發育迅速

生機蓬勃，發育迅速是指小兒生長發育處於蓬勃發展，日新月異勢態，表現在小兒體重、身長、語言、動作等方面，使形體結構、生理功能不斷趨於成熟完善，且年齡越小，速度越快。古代醫家概括之為純陽之體或體屬純陽。純陽之意一方面是指小兒生長生機蓬勃，發育迅速，相對自身感到陰不足，需

不斷補給充實，即陽常有餘，陰常不足；另一方面表現在小兒患病以熱病為多。

## 2.4.2 病理特點

### (1) 發病容易，傳變迅速

陰常有餘，陽常不足，表現在小兒患病初期的發熱、口渴、尿黃等陽熱症，即使是外感風寒也因純陽之體易於熱化而轉為熱症。傳變迅速表現在易寒易熱，易虛易實，即寒症轉化為熱症，熱症轉化為寒症，實證轉虛，虛中有實。

### (2) 臟氣清靈，易驅康復

小兒少情志傷害，病因單純，又小兒為純陽之體生機蓬勃，發育迅速，只要明確診斷，治療及時正確，易于康復。正如明·《景岳全書》所說：“其臟氣清靈，隨拔隨應，但能確得其本而撮取之，則一時可愈。”

## 2.5 中醫兒科辨證的特點

小兒在診法種類上與成人相似，由於小兒陰陽稚弱、臟腑嬌嫩，故小兒四診難以用全。例如小兒不會言語，問診都來自父母或照顧者；故問診不全。聞診範圍較小，改變不甚明顯。由於小兒寸口

短小，脈息未辨，故小兒脈診難分三部九候、二十八脈，因而小兒脈診不全。所以小兒診法的特點在於望法，內容包含望神色、望形態、察二便、觀舌診、看指紋等。

中醫以四診合參為主要方法診斷疾病。四診為望聞問切之統稱。小兒不能正確表達病情，易哭鬧影響脈診準確性，故問診切診難以實行，才以望診為主。面色紅多屬熱症，面色白多屬虛症、寒症。

兒科辨證的另一特點，是注重辨識寒熱二證。由於小兒體屬純陽，加上小兒臟氣清靈、活力充沛、抗邪迅速竭盡全力，故小兒病證易從陽化、熱化，因此在寒熱二證的辨證上必須準確無誤，否則在治療用藥上則差之毫厘，失之千里。

《黃帝內經·靈樞·五變》篇中黃帝詢問“一時遇風，同時得病，其病各異”的原因，少俞以“木之陰陽，尚有堅脆……堅者則剛，脆者則易傷，況其材木之不同，皮之厚薄，汁之多少，而各異耶”的類比作為解答：“夫木之早花先生葉者，遇春霜烈風，則花落而葉萎；久曝大旱，則…；凡此五者，各有所傷，況于人乎！”

渣·《醫宗金鑑》也認為：“人感受邪氣之一，因其形臟不同，或從寒化，或從熱化，或從實化，故多端而不齊也。”由於對“邪氣”難以深入區分，中醫學更注重機體反應性的差異所造成的症狀體徵的不同，中醫辨證論治方法就是在觀察到相同疾病，不同的臨

床表現、病程經過和預後以及相同藥物不同療效等現象的基礎上建立起來的。

綜合以上所述，對於不同證型的氣喘及其相關基因方面的研究有利於我們從基因層次篩選高危險人群，通過改善環境預防氣喘發作；根據研究結果提供早期診斷及診斷。

## 2.6 兒科寒熱證型診斷因子制定

寒熱是陰陽的基本表徵，是八綱的重要內容，貫穿于中醫理法方藥之全過程。在辨證方面，有的中醫強調經驗性，有的則有明顯的主觀性，有的醫生理論認識片面化，表現為在收集四診資料時，由於診斷尺度把握不一致，結果同一病人在不同的醫生辨識為不同的症候，處方各異，同一病證其病機不因多歧，而辨證結論卻各個不同，足以反映出辨證本身帶有很大的主觀性和不確定性，這也是臨床上療效欠佳的一個重要原因<sup>30</sup>。

中醫證型診斷標準多採用會議、教材所定證型標準，但這些常常是羅列一系列症狀，並未給出診斷條件，是根據古今經驗而非根據證型的流行病學調查制定，缺乏客觀性和可操作性，不利於證型的客觀化研究，希望未來可從事氣喘證候的大規模流行病學調查，以得出可靠的診斷標準<sup>31</sup>。

支氣管氣喘，其病理特點是痰濁互結，阻塞氣道，肺氣噴郁，升降不利。本病一年四季都可發生，尤以寒冬季節，及氣候急劇變化時發病較多。病因：多因身體素虛，肺有伏痰又遇外感風寒、精神刺激抑鬱、環境驟變、吸入粉塵以及飲食等因素，皆可觸動肺內伏痰而誘發本病。當發作時，痰隨氣動，氣因痰阻，相互擦撞，阻塞氣道，影響肺氣就降而發生哮喘。症狀：突然發作、呼吸急促、胸悶氣粗，喉間有哮鳴音、喘息不得平臥。多呈陣發性發作或伴有煩躁、咳痰面色蒼白、青紫、出汗，甚則神智不清等症狀，臨床上一般分為急性發作期和慢性緩解期兩類，前者病變在肺，症分寒熱；後者累及脾腎，三臟皆虛<sup>32</sup>。

小兒寒證哮喘的主要症狀：咳嗽、氣喘、痰少色白多沫、喉間哮鳴、四肢欠溫、形寒無汗、鼻塞清涕、痰淡苔薄或白膩和脈浮緊稍數<sup>33</sup>。小兒熱證哮喘的主要症狀：呼吸氣促、喉中有哮鳴之聲、氣粗如涌、胸高煩悶、痰黃黏稠、面紅自汗、口渴喜飲、舌紅苔膩和脈滑數。

氣喘、哮吼、喉中痰鳴、咳嗽等四症在痰熱蘊肺、寒痰伏肺證型出現的頻率較高，故可擬為哮喘各型之主症評定。口乾是痰熱蘊肺的重要症狀信息。舌紅、苔黃，可作為痰熱蘊肺的次要症狀信息。痰白清稀、形寒怕冷、口淡、喜熱飲、舌胖、舌淡白可作為寒痰伏

肺的重要症狀信息<sup>34</sup>。

臨床上寒證常見證候有惡寒怕冷、喜溫，口淡不渴，小便清長，大便稀溏，痰、涎、面色白，苔白潤，脈遲或緊<sup>35</sup>。熱證常見證候有發熱、惡熱、喜涼，口渴欲飲，煩躁不寧，尿黃，便結，痰，面赤，舌紅，苔黃，脈數等。

中醫證型診斷標準多採用會議、教材所定證型標準，但這些常常是羅列一系列症狀，並未給出診斷條件，是根據古今經驗而非根據證型的流行病學調查制定，缺乏客觀性和可操作性，不利於證型的客觀化研究，希望設計《兒科氣喘寒熱證型診斷表》，以得出可靠的診斷標準<sup>36</sup>。

## 2.7 生物晶片概述

### 2.7.1 前言

基因晶片在分子生物學、人類基因組學前瞻性研究中有著革命性的意義<sup>37</sup>。當今世界生物資訊學迅速發展，數學模型、聚類分析、大規模計算，均運用于基因晶片資料庫的研究。新方法不斷湧現和多學科的交叉，對於中醫複雜證候的研究是從未有過的利器。西元2000年6月26日，集合了美、英、法、德、日和中國的數百名科學

家，以及美國的瑟雷拉公司（Celera）的加入所組成的「人類基因體計劃」研究團隊，宣佈完成了人類基因體草圖，破解了大約30億個 DNA 密碼，這項科學家們原預估要在2005年才會完成的重要成就，立即轟動全球，並被喻為與人類「登月計劃」同樣重要的科學研究成果。

人類基因解碼讓我們對遺傳物質有了以下的了解：

### 1. 人類基因分佈（Distribution）

哺乳類之染色體分佈有密有疏，某些部份巷擁擠的城市，基因都擠在一起，而其他部分卻像人煙稀少的沙漠，基因間的距離很寬而且多半是沒有功能的垃圾 DNA（與生成蛋白質無關）。這點與早先研究的物種如阿拉伯芥、果蠅及線蟲不同，他們的基因與圖是均勻分布的。

### 2. 品質（Quality）

雖然確切的數字尚待進一步探討，人類基因數已略估為3萬至3.5萬，結果顯示人類基因的數目僅比果蠅及線蟲多一倍，人類較其他物種之複雜實無法以基因的數目來表示，原先設想每個基因產生一種蛋白質，但人類基因實是物盡其用，一條基因平均可以產生三種蛋白質。

### 3. 蛋白質學 ( Proteomics )

人類及脊椎動物的蛋白質與圖較無脊椎動物要複雜許多，人類基因可製造的蛋白質數量及種類，遠超過低等生物。蛋白質的大規模分析，將在後基因時代加強基因功能的了解。

### 4. 比較基因學 ( Comparative Genomics )

科學家已在人類基因與圖的研究中，確認了 200 個以上的人類基因是由細菌「傳染」過來的，相似的基因在無脊椎動物（如果蠅、線蟲及酵母）中不曾發現，這些基因可能是演化成脊椎動物時才導入的，而且是來自多種不同的細菌。

### 5. 進化基因學 ( Evolutionary Genomics )

人類基因與圖中重覆的序列（垃圾基因）可提供回溯至 8 億年前的古老紀錄，科學家利用它們作為追溯的工具，經由探究其來源及時間，可建立垃圾基因的族譜。人類約有一半的基因是「垃圾基因」，同時，在過去 5 千萬年中，這些垃圾基因的活動力似乎越來越少，但在啮齒類中卻無此減少的現象。

### 6. 性染色體及變異 ( Sex Chromosomes and Mutation )

可能由於精子形成過程中有較多次的細胞分裂，男性突變的機會為女性的兩倍。

## 7. 單一核苷酸多型性 ( Single Nucleotide Polymorphisms )

在基因輿圖中發現了 140 萬個單一核苷酸差異點，也確認了其位置，可用以來探索疾病成因及追溯人類歷史。此外亦發現，人類的相似性可達 99.9% ，而其間些微的差異是與種族無關的，在不同族群間並無具科學依據的分野。

當基因結構逐漸明白，科學家必須利用電腦技術來探討進一步的基因功能，即「基因解碼」，因此，一項結合資訊科學與基因的學問就此誕生，我們稱之為「生物資訊學」。

由於生物晶片是加速解碼的工具，隨著人類基因密碼出爐及生物資訊學日漸發達，因此有人認為下個世紀生物晶片將取代半導體晶片，成為產業新主流。

### 2.7.2 生物晶片概述

生物晶片 ( Biochip ) 係指於矽片、玻璃、塑膠等材質上，利用微電子、微機械等技術來製成應用於生物化學分析的產品，作用對象可以為基因、蛋白質或細胞組織等。其主要特點為分析可信度及精確性高、分析速度快，僅需少量樣品及試劑，即可獲得整體性的實驗數據<sup>38</sup>。

生物晶片的概念起源於1980年代後期，至今已有許多重大成果，

如基因晶片 (Genechip ，又稱為 DNAchip or Microarray) 、蛋白質晶片 (Proteinchip) 、微流體晶片 (Microfluidics) 及實驗室晶片 (Lab-on-a-chip) 等；其中由於基因晶片的技術發展較為成熟，所以一般所謂的生物晶片通常是指「DNA 晶片」。

迄今為止，絕大多數的生物晶片都是 DNA 晶片，所以製作晶片的方法也是多為 DNA 晶片設計的，目前 DNA 晶片有兩類。

( 1 ) 用微量點樣技術製作 cDNA 點陣晶片

( 2 ) 片上原位合成寡核苷酸晶片

寡核苷酸晶採用了多項先進的製程，例如：

( 1 ) 利用組合化學的原理安排各寡核苷酸的位置。

( 2 ) 用表面化學的方法處理及衍生化晶片 ( 玻璃片、矽晶片 ) 表面，使核苷酸能固定在其上，並耐受合成循環中某些試劑的侵蝕。

( 3 ) 用光導向平面印刷技術，使晶片表面可用屏蔽物選擇性地使不同位置受光罩去保護，進而可定點合成寡核苷酸中的各個鹼基。

( 4 ) 應用雜合的方式，經過去保護、活化、偶合 capping 和氧化等步驟逐個連接上各個核苷酸。

(5) 晶片雜交和反應，根據Watson和 Crick 提出的 DNA 雙股螺旋原理而發展的核酸鏈間分子雜交的技術，是晶片檢測的關鍵步驟。

在此步驟中發生目標樣品核酸與探針之間的選擇性反應。反應雙方中總有一方固定在晶片上，而另一方則是標記後通過流路或加樣至晶片上，晶片雜交中固定在晶片上的往往是成千上萬的探針，而與之雜交的是經過標記（同位素或螢光）的樣品核酸。此目標樣品核酸往往需經過PCR擴增或選殖或反轉錄（mRNA），同位素或螢光標記則是在擴增或反轉錄過程中進行，標記的目標核酸與固定探針在經過試驗確定的嚴謹條件下進行分子雜交。

### 2.7.3 晶片的檢測和結果運算

晶片結果的判讀要依據標記的報告分子種類來設計判讀裝置。最早用於膠膜晶片的是同位素標記法，需經過曝光、顯影，然後用具有尋找位置功能的掃描器掃讀。

螢光標記是生物晶片使用最多也是最成功的一種檢測方法，它沒有同位素的使用限制，應用雷射作為激發光源的共聚焦掃描裝置，具有極高的分辨能力可以定量測讀結果，並可以有極高的靈敏度和定位功能，已被普遍地使用於晶片雜交結果判讀。

晶片雜交後的掃描測讀首先是將晶片置入掃描儀，採集各雜交點的螢光訊號位置、螢光強弱，雙色螢光測定則分別測讀兩種螢光強度，然後再用軟體進行電腦運算，可以得出以下資料：螢光點位置（也就是基因部位）直方圖和分布曲線、背景螢光強度等。

#### 2.7.4 生物晶片的軟體系統和資料處理

生物晶片可在一片晶片上有成千上萬個點，每個點對應一個基因或生物資訊，經掃描得到的圖像需要進行數值化處理才能得到每個樣點的雜交的訊號值；需要有一個專門的軟體系統來管理晶片資料，對於晶片數據分析及相關基因資訊還需透過INTERNET生物資訊網的連接與查詢。一個完整的生物晶片配套軟體應該包括生物晶片掃描儀控制軟體、生物晶片的圖像處理軟體、資料萃取或統計分析軟體、晶片表現基因的網際網路上檢索和表現基因資料庫分析。

掃描得到的圖像雖然已經是數位文件，但還沒有得到各樣點的訊號值、背景值和訊號比等訊息，必須藉由圖像處理萃取得到各樣點的資料訊息，供進一步的統計分析。

常用的雙色螢光標記為 CY3( 激發光為綠色 ) 和 CY5( 激發光為紅色 )。由於生物晶片的製作、雜交、清洗和測定過程中難免有灰塵的污染，樣品中核酸、蛋白質、細胞和組織碎片的污染，或者

片基本身的不均勻性以及生物晶片掃描儀本身的系統雜訊，掃描得到的圖像有的並不乾淨，存在較大的雜質亮點或部分區域的污染。有的軟體還設計了對圖像作平滑處理的功能。

晶片圖像中各樣點的訊號值包括了樣品的真正訊號和背景值，在獲得樣點訊號前必須先扣除背景值。背景值的確對生物晶片的資料有較大的影響，直接影響每個樣點的資料。

背景值確定後，樣點的訊號便可以計算了。最常用的方式是將套住樣點圓內各像素訊號值減去背景值即為該樣點的真正訊號值。樣點訊號確定後便可以訊號資料進一步處理分析了。但對於雙色螢光標記的晶片還需要對晶片進行標準化處理，獲得比例訊息。

晶片實驗中，由於影響實驗結果的因素較多，晶片實驗的重複性並不令人滿意，這就造成了多次實驗中各晶片資料不一樣，無法將幾個晶片實驗結果進行直接比較。另外，雙色螢光標記的晶片得到的兩個螢光圖像由於螢光染料的不同螢光、激發的能量不一致、激發的效率不同、光檢測器的增益不同，其訊號值也不一樣，直接將兩個圖像作比例計算是不合適的。因此，必須將晶片資料進行標準化處理。

雖然標準化的方法被所有的生物軟體採用，但至今尚無一種理想的標準化方法。最好的標準化方法是對不同晶片或同一晶片不同

螢光圖像每次掃描時將掃描儀的增益和動態範圍都調得一樣，這是最理想化的，但實際操作是很困難的，對一般研究者是難以做到的。標準化計算完畢後便可以求雙色螢光晶片圖像的比例訊息了。基因表現研究中比例訊息代表了兩個不同樣品表現mRNA的層次。

從生物晶片的圖像分析中得到大量的資料，這些資料是枯燥無味的、難以理解的。如果沒有專門的軟體系統，要理解這些資料，從中獲得有用的訊息，研究者可以從UniGene<sup>39</sup>、dbEST<sup>40</sup>、GeneBank<sup>41</sup>等公共資料庫網站連接。

生物學分析是根據生物晶片資料處理與資訊獲得的結果，結合實驗設計、病理學、分子生物學、遺傳學、藥理學等生物學知識做出相關判斷。為了了解人類生物學奧秘，因此晶片資料的處理與獲得顯得尤為重要。

## 2.8 氣喘的分子遺傳學概述

氣喘是小兒常見疾病，它是一種由免疫遺傳和環境因素等共同作用所引起的多基因遺傳疾病。包括 HLA 抗原基因 (位於 6P)，T 細胞抗原受體  $\alpha/\delta$  鏈基因 (14q 11.2)，細胞因子基因家族 (5q31-32) 及 IgE 高親合力受體  $\beta$  鏈單位基因 (11q13)，這些研究結果顯示，這些基因 (多態性、突變或異常表達) 與哮喘有一定相關

性存在<sup>42</sup>。

### 2.8.1 染色體 11q13與親合性的 IgE 受體 (FcR)

國外隨機的基因研究中顯示染色體 11q13 與特應性有關<sup>43</sup>。而大陸學者發現 IgE 反應性與 D11S533 之間可能存在密切聯繫，D11S533 基因位於 11q13.3-13.4；提示 FcR1 與呼吸道過度反應性有關，而不是與特應性有關<sup>44</sup>。

### 2.8.2 染色體 5q 與細胞因子的基因族

某些研究發現，控制 IgE 和呼吸道過度反應性的基因位點存在于染色體 5q31 成簇的細胞因子基因簇中<sup>45</sup>。細胞因子成簇編碼于 5q，包括多種介白素 (IL-3，IL-4，IL-5，IL-9，IL-12，IL-13)、CM-CSF、FGFR，它們均在氣喘發病中起重要作用<sup>46</sup>。

對日本 68 個家族的 306 位成員進行研究，結果表明，哮喘基因在染色體 5q31-33 上與基因標記 IL-4 基因、IL-9 基因及 D5S393 存在連鎖，且這些特應性位點與兒童哮喘的發病相關聯<sup>47</sup>。

### 2.8.3 染色體 14q連鎖與 T細胞抗原受體 (TCR)

已發現 14qTCR 的  $\alpha$  區和特異性 IgE 反應連鎖，這一區域也含有 TCR 基因的  $\delta$  鏈，它在  $\alpha$  位點內，因此它們也是連鎖的候選基

因<sup>48</sup>。這種連鎖是在兩個獨立人群中發現的，符合染色體隱性遺傳，臨床研究表明，染色體 14q32 上的免疫球蛋白重鏈基因與特異性及非特異性兒童哮喘存在一定關係<sup>49</sup>。

其他哮喘相關基因：塵蟎的特異性抗原呈遞需要特異性 HLA 的 DR 和 DQ 基因產物<sup>50</sup>。大陸學者趙曉音等利用常染色體上的 253 個微衛星標記及 X 染色體上的 16 個微衛星標記物對澳大利亞西部的 80 個哮喘家系進行了全基因掃描。結果提示，第 4、7、13、16 號染色體上也可能存在哮喘易感基因<sup>51</sup>。

#### 2.8.4 染色體 6p 與人類主要組織相容性複合體

人類主要組織相容性複合體(MHC)即 HLA，定位于第六號染色體短臂 6p 的位置，全長 3600kb(3.6Mb)，按照染色體端粒向著絲點方向，HLA 基因座中，其中 128 個為功能性基因，96 個為假基因<sup>52</sup>。在 128 個功能性基因中，39.8% 的基因和免疫系統有關，特別是 HLA-II 類區域中幾乎所有基因均顯示與免疫系統有關<sup>53</sup>。HLA-II 基因與哮喘的關係十分密切，但存在種族差異<sup>54</sup>。

## 2.9 中醫證型基因研究

《素問·金匱真言論》云：藏于精者，春不病溫。精對於人體

的生長、發育、衰老等具有決定性作用。精的本質可能就是基因組中編碼的所有基因序列<sup>55</sup>。

基因晶片運用範圍雖然日益廣泛，但用于系統寒熱研究思路實驗並不多見。國外探索與冷刺激相關基因主要在較低層次的生物和動物實驗，如冷休克基因研究多見于細菌<sup>56</sup>；探索將小鼠處死經冷凍後大腦的基因表達等研究<sup>57</sup>。由於與冷基因相關基因太複雜，檢索 OMIM<sup>58</sup>，既往也沒有基因晶片及相應的數學方法，故難以系統地展開研究，難以深層次地揭示其規律。

假設虛寒證與一組基因異常表達相關，精選典型虛寒證患者，運用基因晶片獲得虛寒證龐大的生物訊息和成千上萬的基因表達圖譜，是可以實現對虛寒證及症狀組合與基因表達譜的相關性研究，揭示虛寒證基因組的規律<sup>59</sup>。進而探討虛寒證的基因診斷指標和療效的分子評價。基因表達圖譜實際上從mRNA層次反映了細胞或組織特異性和表達模式，與臨床上出現的症狀和體質有著必然性的內在關係。運用大規模、高通量的基因表達檢驗技術，對大量的同一病位或病性疾病狀態下的各類組織和細胞mRNA進行定量分析，編製基因表達譜，經過生物資訊和統計學的比較分析，發現其基因表達的相同或相似之處，總結各辨證要素的基因特點，就可以建立辨證要素（病位、病性）的基因表達譜數據庫，再將病位與病性的基

因表達譜相互結合就構成疾病證型的特定的基因表達譜數據庫，以此作為辨證分型的規範化標準。建立證型基因表達譜數據庫是可行的<sup>60</sup>。因此，應儘快發展氣喘證型基因表達譜數據庫的結構研究。

## 第 3 章 研究方法

### 3.1 研究架構

本研究可分為兩大部分，首先嘗試設計《兒科支氣管氣喘寒熱證型診斷表》，透過病案問卷的收集研究，試圖建立小兒氣喘寒熱證型之診斷標準。並藉由寡核苷酸晶片的技術探討寒證、熱證的兒科氣喘患者基因表現之異同。

### 3.2 設計兒科氣喘寒熱證型診斷表

參考支氣管氣喘寒證、熱證相關診斷標準<sup>61、62</sup> 和相關文獻<sup>63、64</sup>，設計十四項寒證、熱證診斷因子（如表 3.1 所示）。

表 3.1 兒科支氣管氣喘寒熱證型診斷表

姓名：\_\_\_\_\_ 病歷號碼：\_\_\_\_\_ 生日：\_\_年\_\_月\_\_日 年齡：\_\_歲\_\_月  
 性別：男 女 陳述者：\_\_\_\_\_ 問卷填寫時間：\_\_年\_\_月\_\_日  
 住址：\_\_\_\_\_ 電話：\_\_\_\_\_

	熱證診斷因子	寒證診斷因子
1.痰	黃： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度 稠： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度	泡沫狀： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度 清稀： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度
2.面	面赤： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度	面色蒼白： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度
3.目	目赤： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度	
4.背		背冷： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度
5.大便	便秘： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度	便稀軟或便溏： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度
6.小便	溲黃味臭： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度	小便清長： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度
7.體溫	怕熱： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度	畏寒肢冷： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度
8.口乾	口乾： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度	<input type="checkbox"/> 口不乾苦(1分) <input type="checkbox"/> 口淡(2分) <input type="checkbox"/> 時吐涎沫或時唾口水(3分)
9.喜好		喜熱飲： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度
10.口苦	口苦： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度	
11.唇	唇紅乾燥： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度	唇色淡： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度
12.苔	苔黃或黃膩或黃燥： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度 苔少： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度	苔白潤多津： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度
13.舌質	舌質紅： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度 舌質絳： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度 舌尖紅： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度	舌質淡白： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度 舌質胖： <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 輕度 <input type="checkbox"/> 中度 <input type="checkbox"/> 重度
14.脈	<input type="checkbox"/> 滑數或弦數(1分)	<input type="checkbox"/> 沉細或沉緩或弱脈或遲脈(2分)

計分方式： 無：(0分) 輕度：(1分) 中度：(2分) 重度：(3分)

熱證氣喘診斷標準：熱證診斷因子總得分 $\geq$ 五分

寒證氣喘診斷標準：寒證診斷因子總得分 $\geq$ 三分

### **3.2.1 證型診斷標準**

按症狀的嚴重程度分為無、輕度、中度、重度共四級；其中無為0分、輕度為1分、中度為2分、重度為3分，進行分級計分。以《兒科支氣管氣喘寒熱證型診斷表》熱症診斷因子總得分大於等於5分為小兒氣喘熱證證型之診斷標準。

以《兒科支氣管氣喘寒熱證型診斷表》寒症診斷因子總得分大於等於3分以上為小兒氣喘寒證證型之診斷標準。

## **3.3 研究對象**

研究對象來源為中國醫藥大學醫學中心 兒童醫院過敏免疫風濕科2歲至13歲的門診患者。分別收案氣喘病童及正常體質健康兒童。

## **3.4 氣喘兒童診斷標準**

經由過敏免疫風濕科專科醫師依病史、症狀及過敏免疫檢查診斷確定為支氣管氣喘病者。

### **3.4.1 收案標準 ( inclusion criteria )**

- ( 1 ) 血清中 IgE 總量上升 ( 超過 200 ku/ml )
- ( 2 ) 血清中對專一性過敏原塵蟎之抗體上升 ( CAP-specific IgE 超過 2ku/ml )
- ( 3 ) 使用支氣管擴張劑具有明顯療效

### **3.4.2 排除標準 ( Exclusion Criteria )**

- ( 1 ) 近三個月內曾使用類固醇類藥物
- ( 2 ) 近一個月內曾接受減敏治療
- ( 3 ) 罹患其他肺系疾病

### **3.5 正常體質兒童診斷標準**

- ( 1 ) 無過敏性疾病
- ( 2 ) 目前無罹患疾病且身體健康
- ( 3 ) 血清中 IgE 總量小於 200 ku/ml
- ( 4 ) 血清中對專一性過敏原塵蟎之抗體 0 級  
( CAP-specific IgE 小於 0.35 ku/ml )

且經《兒科支氣管氣喘寒熱證型診斷表》診斷後，熱證診斷因子總得分小於五分且寒證診斷因子總得分小於三分者；即體質不特別偏寒或偏熱為正常體質。

### 3.6 樣本製備

對收案兒童根據《兒科支氣管氣喘寒熱證型診斷表》逐一問診辨證評分並同時抽取 10 ml 週邊血液，且於四小時內完成週邊血液單核球之 mRNA 萃取及保存，待收案結束後分別選擇寒證組及熱證組當中總得分最高的病患及正常兒童的 mRNA 檢體作為後續寡核苷酸晶片的分析樣本。

#### 3.6.1 週邊血液單核球 ( PBMC )

- ↓ 抽取研究對象的週邊靜脈血 10 ml 置於 EDTA ( ethylenediaminetetraacetate ) 試管中混合均勻
- ↓ 將血液於室溫離心 1500 rpm , 15 mins.
- ↓ 將檢體移至 lamina flow 中操作，吸取血清，分裝於 1.5 毫升微量離心管內保存於 -80 °C 冷凍櫃中
- ↓ 將 EDTA 管中剩下來的檢體加入 HBSS ( Hank's Balanced Salt Solution ) 至 7.5 cc，緩慢抽吸使血球均勻懸浮

↓ 取 5 cc Ficoll-Paque™ PLUS ( Amersham Biosciences ) 加至新的 15 cc 試管中

↓ 將混合 HBSS 的血液順著管壁緩慢加到 Ficoll 表面，加入時將試管微傾，之後離心 3000 rpm，30 mins

↓ 離心後試管中液體會分為四層，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），吸取由上數來的第二層；即 PBMC（peripheral blood mononucleic cell）至 15 cc 試管中，並加入 HBSS 使總體積至 10 ml，離心 3000 rpm，20 mins.

↓ 倒去上清液，並加入 HBSS 使總體積至 10 ml，混合後離心 3000 rpm，20 mins.

↓ 倒去上清液，底部白色沉澱物即為 PBMC

### **3.6.2 RNA Extaction**

↓ 將以 Ficoll 抽取的 PBMC

↓ 1 ml Rezol™ C&T ( Total RNA Extraction Reagent for Cella

and Tissue ) → 以試管震盪器混合均勻 → 裝於 1.5 毫升微量離心管

↓ 室溫靜置 5 mins

↓ 200 µl chloroform → 以試管震盪器混合呈均勻粉紅色

↓ 室溫靜置 2 mins

↓ 離心 12000 xg 4 °C 15 mins

↓ 取上清液

↓ 加等體積 Isopropanol™ Forma Scientific → 均勻混合

↓ 保存於 -80 °C 冷凍櫃中

### 3.7 研究工具

研究樣本的 mRNA 檢體送達台大基因微陣列核心實驗室，由其提供晶片相關服務。透過其相關生物資訊核心設施協助後續微陣列

分析：執行數據之初步分析，例如註解、正規化等。

### 3.8 微陣列晶片雜交法

本研究所採用之晶片是由臺大基因微陣列核心實驗室所提供服務的人類寡核苷酸晶片，每個基因片段約長150bp, 每片晶片可檢測13000個以上基因，基本的實驗步驟亦參照其方法。目標樣本的標記方式則採用 SuperScript™ Indirect cDNA Labeling System。

依照《兒科支氣管氣喘寒熱證型診斷表》總得分將研究對象分為寒證、熱證及正常體質三組，選擇寒證組及熱證組當中《兒科支氣管氣喘寒熱證型診斷表》總得分最高的病患及正常體質對照組的 mRNA 檢體作為後續寡核苷酸晶片的分析樣本。

以雙色螢光標記（CY3 激發光為綠色，CY5 激發光為紅色）進行兩兩分組樣本的基因比對。

其中第一組：寒證氣喘樣本比對熱證氣喘樣本的晶片共 4 片；第二組：正常體質樣本比對寒證氣喘樣本的晶片共 2 片；第三組：熱證氣喘樣本比對正常體質樣本的晶片共 4 片（如表 3.1 所示）。

表 3.2 晶片樣本

組別	晶片編號	Array 1(CY5 紅色)	Array 2(CY3 綠色)
第一組	2	寒證氣喘 A7	熱證氣喘 A14
	3	寒證氣喘 A6	熱證氣喘 A11
	4	寒證氣喘 A7	熱證氣喘 A4
	5	寒證氣喘 A6	熱證氣喘 A2
第二組	6	正常兒童 A17	寒證氣喘 A7
	10	正常兒童 A15	寒證氣喘 A6
第三組	1	熱證氣喘 A11	正常兒童 A15
	7	熱證氣喘 A14	正常兒童 A17
	8	熱證氣喘 A4	正常兒童 A17
	9	熱證氣喘 A2	正常兒童 A15

### 3.9 訊號判讀

雙色螢光標記的晶片經清洗並吹乾後，將晶片放入螢光掃描機進行影像擷取及螢光值分析。將每個點可得到兩個螢光值所呈現的影像，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標準化（normalization）而得到，此訊號的計算方式為：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，比較不同樣品間之基因表現差異。

### 3.10 統計方法

本研究的十片晶片共分為三組，分別是第一組：寒證氣喘樣本

比對熱證氣喘樣本；第二組：正常體質樣本比對寒證氣喘樣本；第三組：熱證氣喘樣本比對正常體質樣本，將這三組掃描所得的各基因表現的螢光強度數值分別列於三個 Excel 工作表。

將各組工作表中CY3、CY5小於1的強度數值以1取代，篩選出比值（Ratio）大於2、或小於0.5的差異基因。

將這三組掃描所得的各基因表現的螢光強度數值所列的三個 Excel 工作表：第一組：寒證氣喘樣本比對熱證氣喘樣本、第二組：正常體質樣本比對寒證氣喘樣本、第三組：熱證氣喘樣本比對正常體質樣本，將各組工作表中CY3、CY5小於1的強度數值以1取代，分別以t-test試算，篩選出P值小於0.05的基因。

### 3.11 晶片數據分析

將三組工作表以t-test試算，篩選出P值小於0.05的 Accession Number 欄位複製貼於中興大學陳健尉老師實驗室所開發之線上生物資訊分析軟體<sup>65</sup>進行 BioCarta Pathway 的搜尋，試圖篩選寒熱氣喘證型相關的可能基因及其調控途徑。



## 第 4 章 結果

### 4.1 臨床資料

經中國醫藥大學醫學中心 兒童醫院過敏免疫風科門診收案，共收22例，當中寒證氣喘有 2 例（如表 4.1 所示）、熱證氣喘有10例（如表 4.2 所示）、正常體質有 3 例（如表 4.3 所示）。

表 4.1 寒證氣喘組的收案對象資料

案例編號	性別	年齡 (歲)	寒證診斷因子總得分	IgE (IU/ml)	Der p
A6	女	9	4	1775	6+
A7	女	8	3	2094	6+
平均	2 女	9	4	1935	6+

表 4.2 熱證氣喘組的收案對象資料

案例編號	性別	年齡 (歲)	熱證診斷因子總得分	IgE (IU/ml)	Der p
A2	男	13	10	457	5+
A3	男	9	12	207	6+
A4	男	7	12	626	6+
A8	女	6	6	1910	6+
A10	女	13	6	4477	6+
A11	男	5	16	576	6+
A12	女	7	11	396	6+
A14	女	11	10	722	6+
A22	男	10	6	2834	6+
A23	男	13	7	976	6+
平均	4女6男	9	10	1318	6+

表 4.3 正常體質對照組的收案對象資料

案例編號	性別	年齡 (歲)	寒證診斷因子總得分	熱證診斷因子總得分	IgE (IU/ml)	Der p
A13	男	4	0	1	24.9	0+
A15	女	4	3	1	52.4	0+
A17	女	2	1	1	46.3	0+
平均	2女1男	3	1.3	1	41.2	0+

## 4.2 RNA 品質與基因放大

分別篩選寒證組的兩個案例及熱證組當中總得分最高的四個案例及正常兒童對照組兩個案例的週邊血液單核球mRNA檢體（如表 4.4 、表 4.5 、表 4.6 所示），作為後續寡核苷酸晶片分析樣本。

表 4.4 寡核苷酸晶片所分析之寒證氣喘樣本資料

案例編號	性別	年齡 (歲)	寒證診斷因子總得分	IgE (IU/ml)	Der p
A6	女	9	4	1775	6+
A7	女	8	3	2094	6+
平均	2 女	9	4	1935	6+

表 4.5 寡核苷酸晶片所分析之熱證氣喘樣本資料

案例編號	性別	年齡 (歲)	熱證診斷因子總得分	IgE (IU/ml)	Der p
A2	男	13	10	457	5+
A4	男	7	12	626	6+
A11	男	5	16	576	6+
A14	女	11	10	722	6+
平均	1 女 3 男	9	12	595	6+

表 4.6 寡核苷酸晶片所分析之正常體質對照組樣本資料

案例編號	性別	年齡 (歲)	寒證診斷因子 總得分	熱證診斷因子 總得分	IgE (IU/ml)	Der p
A15	女	4	1	3	52.4	0+
A17	女	2	1	1	46.3	0+
平均	2女	3	1	2	49.4	0+

以美國安捷倫公司的微流體晶片進行mRNA基因放大並確認mRNA的品質（如圖 4.1~ 圖 4.2 所示）。

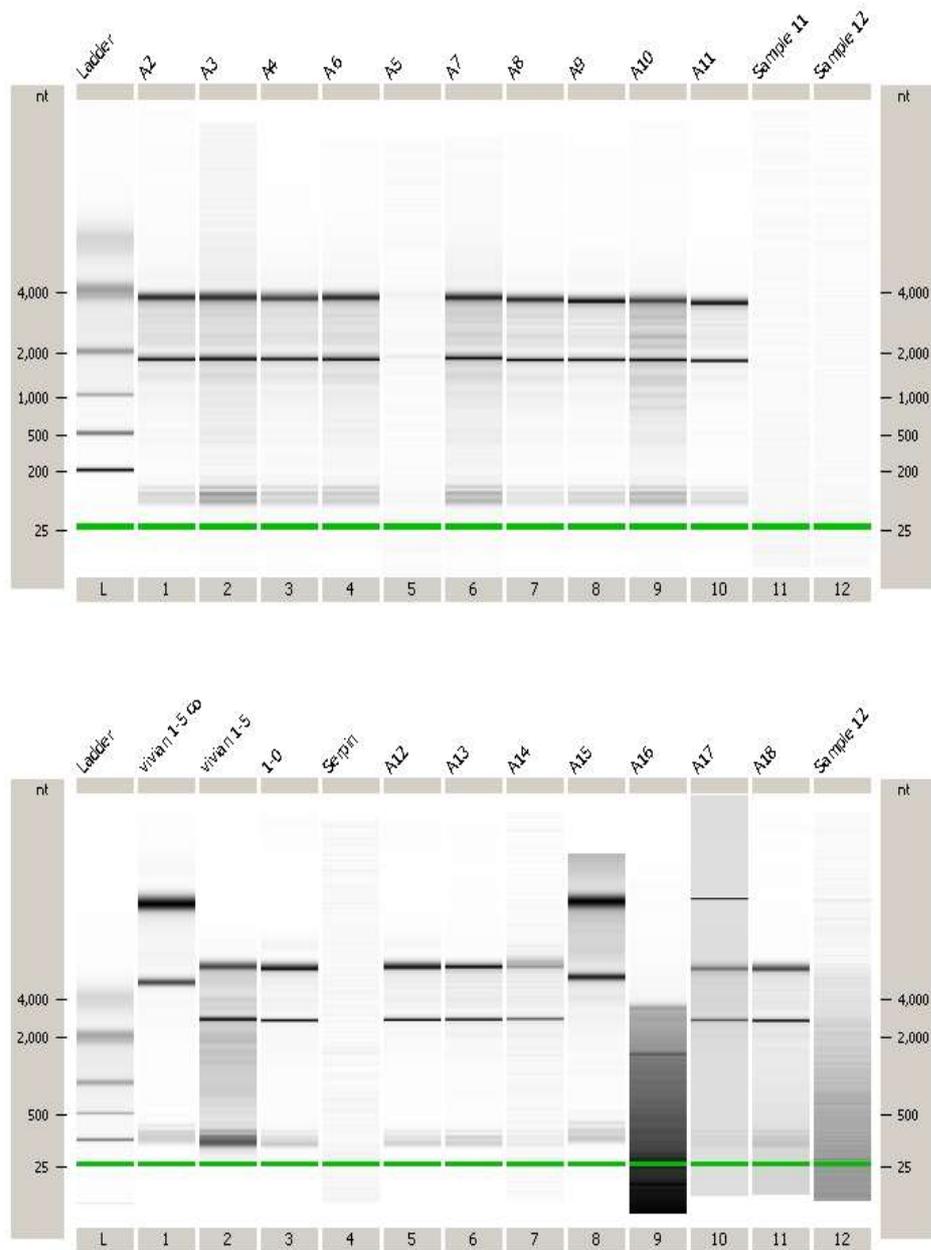


圖 4.1 檢體 total RNA 品質測定

其中 A5 檢體之 total RNA 因呈現未能 18S、28S 兩條色帶，品質不良，故此檢體無法採用於後續的晶片分析。

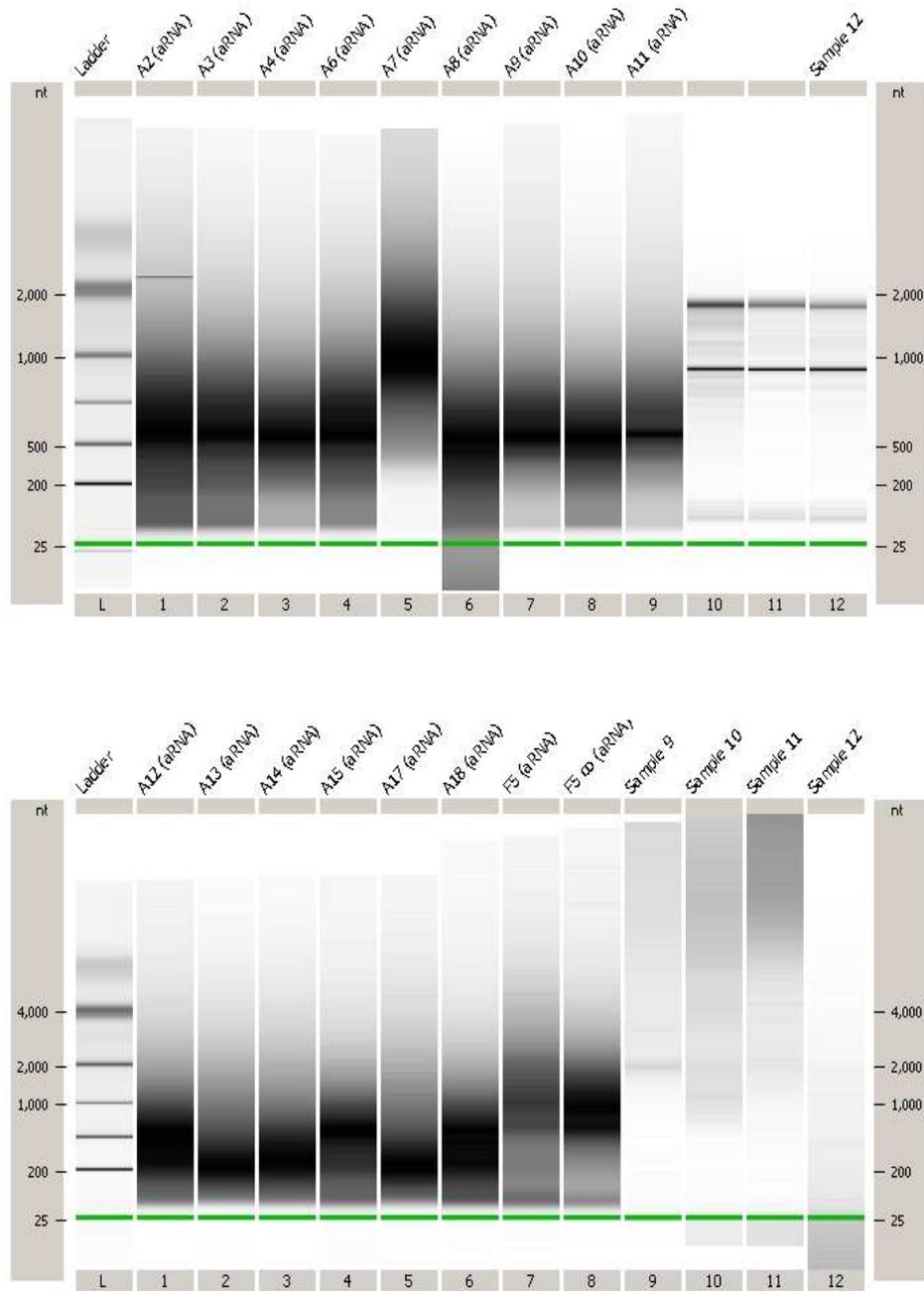


圖 4.2 基因放大後的 RNA 品質測定

在螢光標記前以微流體晶片放大 RNA (aRNA)，再對照 Affymetrix 公司晶片以確定放大後的核酸品質，正常樣本呈現 smear 狀。

### 4.3 晶片掃描影像

以雙色螢光標記（CY3激發光為綠色，CY5激發光為紅色）標記欲比對的樣本（如表 3.2 所示）經雜合後，放入螢光掃描機進行影像擷取及螢光值分析。將每個點可得到兩個螢光值所呈現的影像。

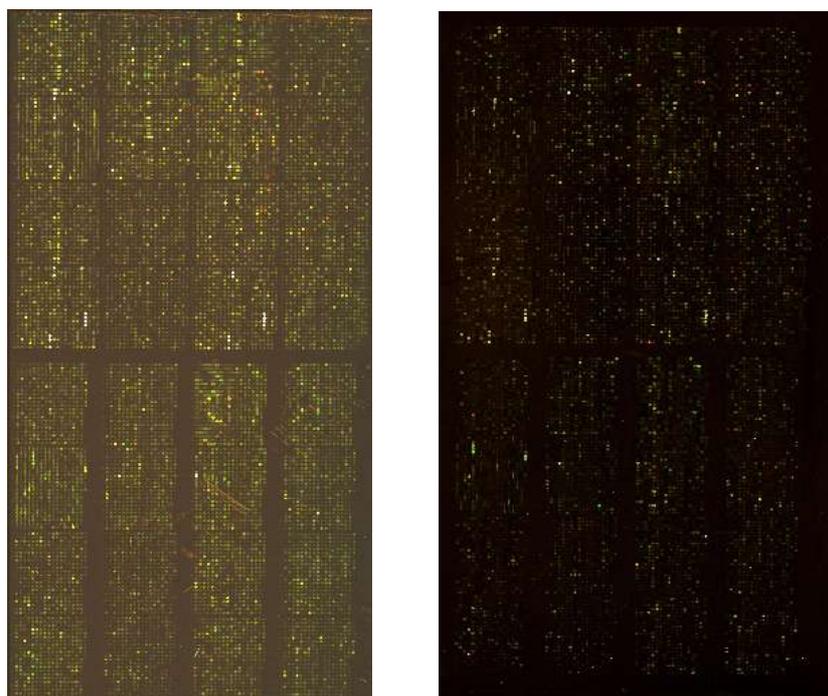


圖 4.3 正常體質對照組（CY5）比對寒證氣喘組（CY3）之晶片影像

由左至右為 chip6 、 chip10 ，本研究所採用之晶片共分12個區塊，

每一區塊的陣列有  $22 \times 22$  個點，每個點可得到兩個螢光值所呈現的影像，對照探針相對位置，即可得知每個基因表現的強度。

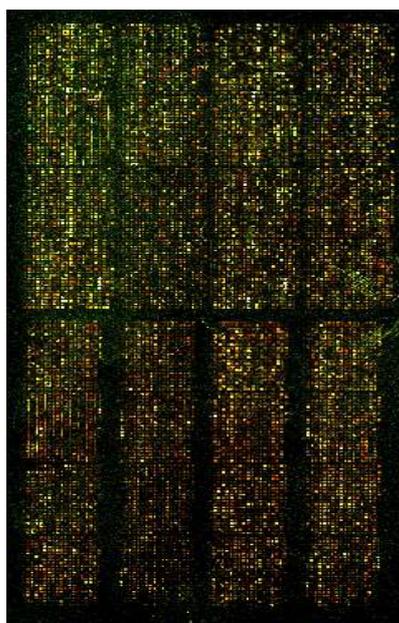
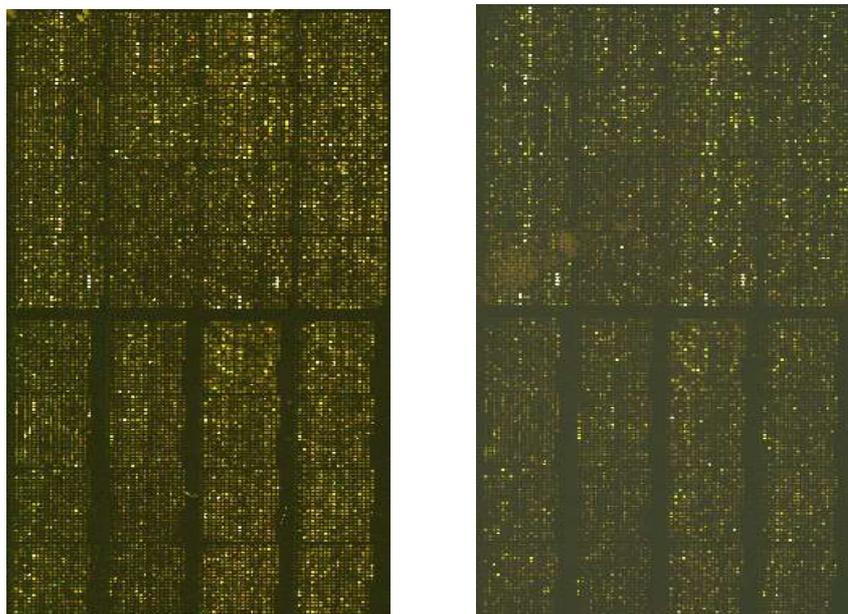
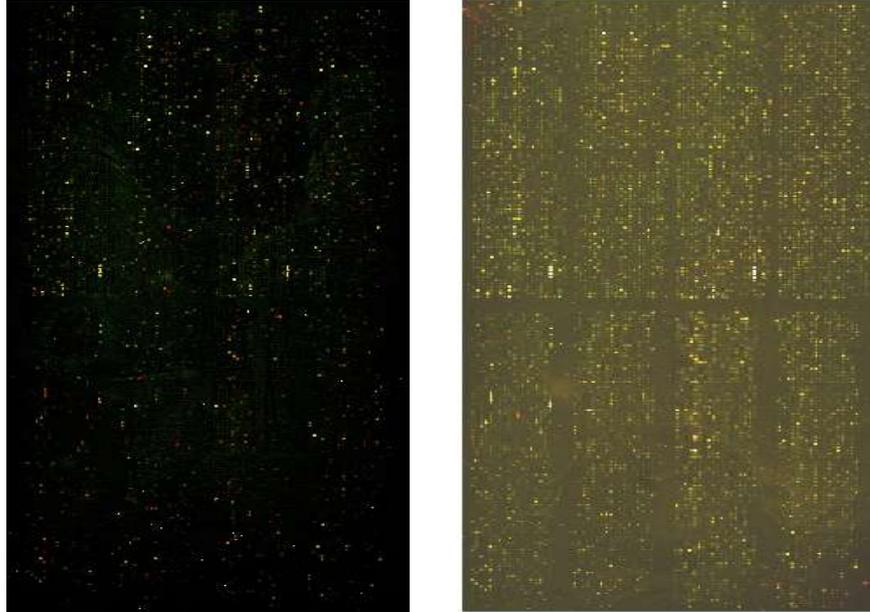


圖 4.4 熱證氣喘組 (CY5) 比對正常體質 (CY3) 對照組之晶

## 片影像

上排由左至右為 chip1 、 chip7 ，下排為 chip8 ，雜合後呈色偏紅的點所對應的基因為熱證氣喘樣本表達較強的基因。反之，呈色偏綠的點所對應的基因為正常體質樣本表達較強的基因。



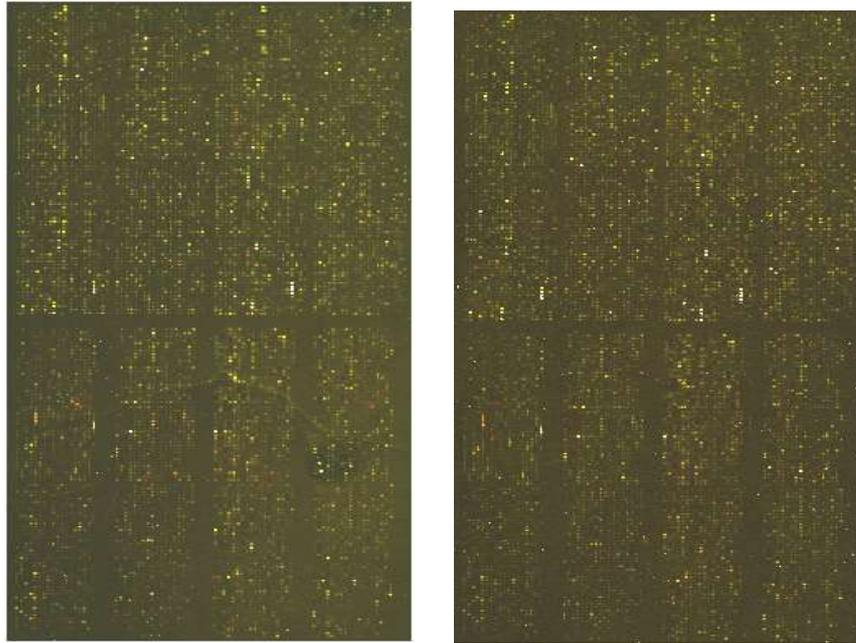


圖 4.5 寒證氣喘組 (CY5) vs 熱證氣喘組 (CY3) 晶片影像

上排由左至右為 chip2 、 chip3 ，下排左至右為 chip4 、 chip5 。雜合後呈色偏紅的點所對應的基因為寒證氣喘樣本表達較強的基因；反之，呈色偏綠的點所對應的基因為熱證氣喘樣本表達較強的基因。

#### 4.4 微陣列晶片數據分析

寒證氣喘組比對正常體質對照組的晶片數值經比對其比值大於 2 或小於 0.5 者的基因大於 2800 個，基因個數太大，故不列出。t-test 檢定後，得到 P 值小於 0.05 者 170 個。（如表 4.7 所示；在第

66頁)。

在表 4.7 中所示的寒證氣喘組比對正常體質對照組有顯著差異的表達基因共 170 個，透過 internet 資料庫搜尋出 5 個基因（基因編號 Accession Number：X68550、NM 000284、M12824、L15006、Y15723）及其調控路徑，其餘 165 個基因並未在此資料庫中搜尋出相關路徑。M12824 與 alanine 代謝路徑相關，表 4.8 列出與中醫寒證氣喘臨床表現的可能基因及其調控路徑。

表 4.8 寒證氣喘的可能基因及其調控路徑

Accession Number	調控路徑	路徑說明
X68550	h asbcell pathway	由抗原活化 B Cell
	h bbcell pathway	B Cell 活化
	h cd40 pathway	CD40L 訊息傳遞路徑
	h nkt pathway	在 T-cell 的極化中選擇表達 chemokine receptors Th1/Th2 的分化
	h th1th2 pathway	

M12824	h il17 pathway	IL 17 訊息傳遞路徑
	h shm pathway	藉 cytokine 調節造血功能
	h tcytotoxic pathway	T Cytotoxic Cell 的表面分子
L15006	h ctla4 pathway	T Cell 的活化訊息傳遞路徑
Y15723	h racc pathway	血管內皮系統的離子通道

其中 M12824 在寒證氣喘組基因表現量明顯高於正常體質對照組；X68550、NM 000284、L15006、Y15723 在寒證氣喘組基

因表現量明顯低於正常體質對照組。

熱證氣喘組比對正常體質對照組比值大於 2 的差異基因共 80 個（如表 4.9 所示；在第 71 頁），比值小於 0.5 的差異基因共 21 個（如表 4.10 所示；在第 73 頁）；經 t-test 檢定後表達上有顯著差異的基因共 266 個（如表 4.11 所示；在第 11 頁），透過 internet 資料庫搜尋出 17 個基因（基因編號：AF090318、AF188747、NM000362、Y14768、NM017617、NM004530、M96577、NM001324、AX023365、X93499、NM000734、L42542、NM006267、Y15723、U72649、AJ271408、X04688）及其調控路徑，其餘 249 個基因並未在此資料庫<sup>66</sup> 中搜尋出相關路徑。表 4.12 列出與熱證氣喘臨床表現的可能基因及其調控路徑；其中 NM001324、X93499、NM000734、NM006267、AJ271408、X04688 在熱證氣喘組基因表現量高於正常體質對照組；AF090318、AF188747、NM000362、Y14768、NM017617、NM004530、M96577、AX023365、L42542、Y15723、U72649 在熱證氣喘組基因表現量低於正常體質對照組（如表 4.13 所示）。

表 4.12 熱證氣喘的可能基因及其調控路徑

Accession Number	調控路徑	路徑說明
Y14768	h cdMac pathway	鎘金屬誘發 DNA 合成及 macrophage 複製
	h Lair pathway	與局部急性發炎反應相關
	h cytokine pathway	Cytokine Network
	h inflam pathway	Cytokines 及發炎反應
	h il10 pathway	IL-10 的抗發炎訊息傳導
	h nthi pathway	NFκB 活化
	h nfkb pathway	NFκB 訊息傳遞路徑

Y14768	h pml pathway	藉 PML 調節轉錄的活化
	h il1r pathway	藉 IL 1 R 訊息轉譯
M96577	h g1 pathway	細胞週期：G1/S 限制點
	h fbw7 pathway	Cyclin E Destruction pathway: 細胞週期 G1/S 過渡相關
	h cellcycle pathway	細胞週期 G1/S 過渡相關
	h skp2e2f pathway	E2F1 Destruction pathway: 轉錄因子與細胞週期 G1/S 過渡相關
	h RacCycD pathway	細胞週期 G1/S 過渡相關
	h p27 pathway	調節 p27 磷酸化表現與細胞週期 G1/S 過渡相關
	h il2rb pathway	IL-2 Receptor Beta Chain: 活化 T cell

	h ets pathway	Macrophage 分化時上調
MN 000734	h CSK pathway	T Cell Receptor 訊息轉錄
	h ctl pathway	Cytotoxic T lymphocytes (CTLs) 相關的免疫反應
	h il17 pathway	IL 17 訊息傳遞路徑
	h il12 pathway	Th1 中 IL 12 訊息傳遞路徑
	h tob1 pathway	調節 T Cell 的活化
	h tcr pathway	T Cell Receptor 訊息傳遞路徑
	h tcytotoxic pathway	T Cytotoxic 表面分子
	h thelper pathway	T Helper Cell 表面分子
AX023365	h inflam pathway	Cytokines 及發炎反應
	h dc pathway	藉 Dendritic cell 調控 TH1、TH2 的發展
	h nkt pathway	在 T-cell 的極化中選擇表達 chemokine receptors
	h eosinophils pathway	過敏反應中 Eosinophils 的角色

表4.13 熱證氣喘組比對正常體質對照組顯著差異基因表現量

基因表現量	
熱證氣喘 > 正常體質	熱證氣喘 < 正常體質
NM 001324	AF090318
X93499	AF188747
NM000734	NM 000362
NM 006267	Y14768
AJ271408	NM 017617
X04688	NM 004530
	M96577
	AX023365
	L42542

	Y15723
	U72649

寒證氣喘組比對熱證氣喘組比值大於 2 或比值小於 0.5 的差異基因共 11 個（如表 4.14 所示；在第 82 頁）；經 t-test 檢定後有顯著差異的表達基因共 137 個（如表 4.15 所示；在第 83 頁），透過 internet 資料庫搜尋出 8 個基因（基因編號：NM 004355、M96577、AJ293866、NM 006164、M15330、AF147204、L13616、NM 004417）及其相關路徑（如表 4.16 所示），其餘 129 個基因並未在此資料庫中搜尋出相關路徑。

其中 L13616、AJ293866、M15330、AF147204 在寒證氣喘組中基因表現量明顯高於熱證氣喘組；NM 004355、M96577、NM 006164、NM 004417 在寒證氣喘組基因表現量明顯低於熱證氣喘組（如表 4.17 所示）。

表 4.16 寒熱證型的可能基因及其調控路徑

Accession Number	調控路徑	路徑說明
M96577	h g1 pathway	細胞週期：G1/S 限制點 <sup>67</sup>
	h fbw7 pathway	Cyclin E Destruction pathwa:細胞週期 G1/S 過渡相關
	h celcycle pathway	細胞週期 G1/S 過渡相關

	h skp2e2f pathway	E2F1 Destruction pathway:轉錄因子與細胞週期 G1/S 過渡相關
	h RacCycD pathway	細胞週期 G1/S 過渡相關
	h p27 pathway	調節 p27 磷酸化表現與細胞週期 G1/S 過渡相關
	h il2rb pathway	IL-2 Receptor Beta Chain:活化 T cell
	h ets pathway	Macrophage 分化時上調
L13616	h CCR3 pathway	CCR3 signaling in Eosinophils
	h cxcr4 pathway	CXCR4 訊息傳遞路徑
	h pten pathway	細胞週期的阻斷及細胞凋亡
	h ach pathway	調節細胞凋亡
	h tff pathway	肌肉細胞修復

NM 004417	h vegf pathway	組織缺氧及血管內皮生長因子
	h cd40 pathway	CD40L 訊息傳遞路徑
	h nthi pathway	NFκB 活化
	h tnfr2 pathway	TNFR2 訊息傳遞路徑
M15330	h il5 pathway	IL 5 訊息傳遞路徑
	h nthi pathway	NFκB 活化
	h il1r pathway	藉 IL 1 R 訊息轉譯
AF147204	h cxcr4 pathway	CXCR4 訊息傳遞路徑
	h Ccr5 pathway	Macrophage 中 CCR5 訊息傳遞
	h nkt pathway	在 T-cell 的極化中選擇表達 chemokine receptors

表 4.17 寒證氣喘組比對熱證氣喘組顯著差異基因表現量比較

基因表現量	
寒證氣喘 > 熱證氣喘	寒證氣喘 < 熱證氣喘
L13616	NM 004355
AJ293866	M96577
M15330	NM 006164

AF147204	NM 004417
----------	-----------

## 第 5 章 討論

兒科自古云為啞科，臨床上四診很難用全，而本研究所設計《兒科支氣管氣喘寒熱證型診斷表》，當中涵蓋14大項的診斷因子，確實有助於臨床中醫師的寒熱辨證；但是在兒科收案診斷上卻不易根據此14大項的診斷因子逐一診斷，尤其在問“痰”一項，孩童多不會吐痰或即使會吐痰亦不易描述痰的形、質、色、量等，故在寒熱辨證上尚須由其他診斷因子找尋辨證依據。應對病情的全部表現加以分析，尤其是惡寒與發熱的症狀及對寒熱的喜惡，口渴與否，面色的赤白，二便，舌象、脈象等為辨證的主要依據。

《兒科支氣管氣喘寒熱證型診斷表》總得分的統計上是就確實完成問診的部分加以計分；未完成問診部分則不納入計分。待收案結束後分別選擇寒證組及熱證組當中總得分最高的病患及正常兒童的mRNA檢體作為後續寡核苷酸晶片的分析樣本。

本研究中發現氣喘病童在證型分佈上多屬於熱證氣喘，符合古人經驗，古代醫家認為小兒為純陽之體或體屬純陽，小兒患病以熱病為多。

透過寡核苷酸晶片技術比對寒證氣喘組與正常體質對照組基因再進行篩選得到具特殊功能或調控路徑的基因有 5 個（基因編號：X68550、NM 000284、M12824、L15006、Y15723），此五個基因的表達除了可能與氣喘具有關聯性，亦可能影響氣喘患者的證型表現，使其傾向表現寒證氣喘證型。當中 X68550 基因名：tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 5 (hyper-IgM syndrome)，產物為 CD40 Ligand 可透過 h asbcell pathway、h bbcell pathway 參與 B Cell 活化<sup>68</sup>；透過 h cd40 pathway、h nkt pathway 參與 T Cell 的活化，並可透過 h th1th2 pathway 參與 Th1/Th2 的分化。CD40 Ligand 與呼吸道變形有關<sup>69</sup>，使氣喘兒童血清總 Ig E 量上升<sup>70</sup>。

L13616 基因名為 Human focal adhesion kinase (FAK) mRNA, complete cds，學者研究發現其 kinase 結構影響 B Cell、T Cell 的表現<sup>71</sup>。此基因參與細胞凋亡路徑，並與組織缺氧及血管內皮生長因子路徑相關，而它在寒證氣喘組中的基因表現量明顯高於熱證氣喘組，臨床上寒證常見證候有惡寒怕冷、喜溫、面色白、脈遲或緊；兩者的關聯性值得進一步研究。

本研究透過比對熱證氣喘組與正常體質對照組，經篩選得到具特殊功能或調控路徑的基因有 17 個，此群基因的表達除了可能與氣

喘具有關聯性，亦可能影響氣喘患者的證型表現，使其傾向表現熱證氣喘證型。當中 Y14768 基因名：Homo sapiens DNA, cosmid clones TN62 and TN82，是 AIF-1 gene（allograft inflammatory factor-1<sup>72</sup>），主要參與 Cytokine 相關的發炎反應，日本學者研究其基因多樣性與支氣管氣喘有關<sup>73</sup>，此基因參與 NFκB 的活化，目前醫藥界皆將抑制 NFκB 路徑視為抗發炎藥物的核心<sup>74</sup>。過敏性氣喘是一種慢性的呼吸道發炎現象，中醫的熱證廣義而言也是一種發炎現象，又因氣喘是發作性疾病，是以邪熱亢盛為特徵的，故可將表 4.12 篩選所得之 Y14768 基因視為熱證氣喘的候選基因，從事進一步研究。

本研究透過比對寒證氣喘與熱證氣喘樣本的基因，由於此二族群的共同條件為氣喘患者，經篩選得到具特殊功能或調控路徑的基因有 8 個，可視為寒性證型及熱證證型的候選基因。研究觀察發現 L13616、AJ293866、M15330、AF147204 此四個基因在寒證氣喘組的表現量較熱證氣喘組大，NM 004355、M96577、NM 006164、NM 004417 此四個基因在熱證氣喘組的表現量較寒證氣喘組大，暗示此八個基因的表達與中醫的寒性證型、熱性證型具關聯性。

M96577 基因名是 E2F transcription factor 1，為 pRB-binding

protein mRNA<sup>75</sup>，位於染色體 20q11.2，研究發現 interferon-gamma (IFN-gamma) 藉此路徑抑制支氣管平滑肌細胞增生<sup>76</sup>，此基因在熱證氣喘比對正常對照組中被篩選出來；同時亦在寒熱兩組比對中被篩選出來。M96577 在正常體質對照組基因表現量明顯高於熱證氣喘組；在熱證氣喘組基因表現量明顯高於寒證氣喘組。表示 M96577 除了與氣喘過敏反應有關，亦有可能是決定寒熱證型的可能基因。但能否單憑此基因來區分寒熱證型則須更大規模的樣本數才能推論。

根據研究結果顯示寒、熱證氣喘病確實存在不同的基因表現及調控路徑；中醫的寒性證型、熱性證型也確實存在不同的基因表現及調控路徑；未來仍需進一步以 Real-time PCR 驗證這群可能基因確實存在於不同的氣喘族群中。並可將擴大研究樣本規模，由從基因層次為中醫辨證論治提供現代科學依據。

## 第 6 章 結論

設計《兒科支氣管氣喘寒熱證型診斷表》，利用此表篩選典型寒證、熱證氣喘患者及正常體質兒童。以其周邊血液單核球的mRNA為樣本，利用寡核苷酸晶片技術進行分組樣本的基因比對。比對寒證氣喘組與正常體質組樣本，經t-test檢定後有顯著差異的表達基因共 170 個，透過線上生物資訊分析軟體搜尋後發現當中包含 5 個具特殊功能或調控路徑的基因；此 5 個基因的表達除了與氣喘相關，亦可能影響患者的證型表現，使其傾向表現寒證氣喘證型。比對熱證氣喘組與正常體質組樣本，有顯著差異的表達基因共 266 個，當中包含 17 個具特殊功能或調控路徑的基因，此 17 個基因的表達除了與氣喘具有關聯性，亦可能使氣喘患者傾向表現熱證氣喘證型。比對寒證氣喘組與熱證氣喘組樣本，有顯著差異的表達基因共 137 個，當中包含 8 個具特殊功能或調控路徑的基因，由於此二族群的共同條件為氣喘患者，暗示此 8 個基因的表達與中醫的寒性證型、熱性證型具關聯性。證實寒、熱證氣喘病確實存在不同的基因表現及調控路徑；中醫的寒性證型、熱性證型也確實存在不同的基因表現及調控路徑；未來可擴大研究樣本規模，由從基因層次為中醫辨證論

治提供現代科學依據。











































## 第 7 章 參考文獻

- <sup>1</sup> Croner S, Kjellman N-IM. Natural history of bronchial asthma in childhood : A prospective study from birth up to 12-14 years of age. *Allergy*. 1992;47:150.
- <sup>2</sup> Lucas SR, Platts-Mills TA. Physical activity and exercise in asthma: relevance to etiology and treatment. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 May;115(5):928.
- <sup>3</sup> 呂克恒，謝貴雄：過去20年臺灣過敏罹病患率之增加。中兒醫誌。1995；36；151.
- <sup>4</sup> 胡景瑞，侯樹平：中醫兒科辨證指導。人民衛生出版社。1999；2.
- <sup>5</sup> Gao PS, Huang SK. Genetic aspects of asthma. *Panminerva Med*. 2004 Jun;46(2):121.
- <sup>6</sup> Malerba G, Pignatti PF. A review of asthma genetics: gene expression studies and recent candidates. *J Appl Genet*. 2005;46(1):93.
- <sup>7</sup> Izuhara K, Yanagihara Y, Hamasaki N, Shirakawa T, Hopkin JM. Atopy and the human IL-4 receptor alpha chain. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Jul;106(1 Pt 2):S65.

- <sup>8</sup> Manian P. Genetics of asthma: a review. *Chest*. 1997;112:1397.
- <sup>9</sup> Jeffrey SS, Lonning PE, Hillner BE. Genomics-based prognosis and therapeutic prediction in breast cancer. *J Natl Compr Canc Netw*. 2005 May;3(3):291.
- <sup>10</sup> Zingoni A, Soto H, Hedrick JA. The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells. *J Immunol*. 1998; 161:547
- <sup>11</sup> Busse WW. Mechanisms and advances in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105(S):593.
- <sup>12</sup> Zingoni A, Soto H, Hedrick JA. The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells. *J Immunol*. 1998;161:547.
- <sup>13</sup> Kornai M, Tanaka H, Masuda T, Nagao K, Ishizaki M, Sawada M, Nagai H. Role of Th2 responses in the development of allergen-induced airway remodelling in a murine model of allergic asthma. *B J Pharmacol*. 2003;138:912.
- <sup>14</sup> Bames NC, Marsh DG. The genetics and complexity of allergy and asthma. *Immunology Today*. 1997;19:325.
- <sup>15</sup> Lee NA. The macroimportance of the pulmonary immune microenvironment. *Am Journal Respir Cell Mol Biol*. 1999.21:298.

- <sup>16</sup> Smart JM, Kemp AS. Increased Th1 and Th2 allergen-induced cytokine responses in children with atopic disease. *Clin Exp Allergy*. 2002;32:796.
- <sup>17</sup> Anderson GP. The immunobiology of early asthma. *Med J Aust*. 2002;177(S):47.
- <sup>18</sup> Shen JJ, Lin CJ, Huang JL, Hsieh KH, Kuo ML. The effect of liu-wei-di-huang wan on cytokine gene expression from human peripheral blood lymphocytes. *Am J Chin Med*. 2003;31:247.
- <sup>19</sup> Akpinarli A, Guc D, Kalayci O, Yigitbas E, Ozon A. Increased interleukin-4 and decreased interferon gamma production in children with asthma: function of atopy or asthma? *J Asthma*. 2002;165(39)159.
- <sup>20</sup> Hart PH. Regulation of the inflammatory response in asthma by mast cell products. *Immunol Cell Biol*. 2001;79:149
- <sup>21</sup> Taube C, Dakhama A, Takeda K, Nick JA, Gelfand EW.. Allergen-specific early neutrophil infiltration after allergen challenge in a murine model. *Chest*. 2003;123(S):410.
- <sup>22</sup> Meurs H, Maarsingh H, Zaagsma J.. Arginase and asthma : nove insights into nitric oxide homeostasis and airway hyperresponsiveness. *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24:450.
- <sup>23</sup> Chung KF. Airway smooth muscle cells : contributing to and regulating airway mucosal inflammation. *Eur Respiratory J* 2000;15:961.

- <sup>24</sup> Nelson HS. The importance of allergens in the development of asthma and the persistence of symptoms. *Dis Mon* 2001;47:5.
- <sup>25</sup> Brighling CE, Bardding P, Symon FA, Holgate ST.. Mast-cell infiltration or airway smooth muscle in asthma. *New Engl J Med*. 2002;246:1699.
- <sup>26</sup> Mattoli S. Allergen-induced generation of mediators in the mucosa. *Environmental Health Perspectives*. 2001;109:553.
- <sup>27</sup> 王永炎、魯兆麟：中醫內科學。人民衛生出版社。1999；164.
- <sup>28</sup> 馮光波：中醫內科鑑別診斷要點。人民衛生出版社。2003；107.
- <sup>29</sup> 郭華明：中醫兒科學入門。汕頭大學出版社。2002；5.
- <sup>30</sup> 王米渠、吳斌、嚴石林、王剛、許錦文：論虛寒證基因蕊片及生物訊息的高起點切入研究。遼寧中醫雜誌。2003；30（3）：169.
- <sup>31</sup> 陳鵬：基因多態性與中醫辨證關係研究的回顧與思考。中國中西醫結合雜誌，2003；23（11）：853
- <sup>32</sup> 漆浩、張瑞賢：現代中醫藥文庫·臨床應用系列；兒科卷。學苑出版社，2002；51
- <sup>33</sup> 郭華明：中醫兒科學入門。汕頭大學出版社。2002；73
- <sup>34</sup> 史鎖芳、閻婕、李彤：支氣管哮喘發作期中醫辨證回顧性調查報告。南京中醫藥大學學報，2003 Jan；19（1）18.

- <sup>35</sup> 朱文鋒：中醫診斷學。人民衛生出版社。1999；513.
- <sup>36</sup> 王米渠、馮韜、嚴石林、王剛：五例寒證的宏觀療效及基因表達譜芯片分析研究。浙江中醫藥學報。2003 Nov；27（6）：60.
- <sup>37</sup> Whitw KP. Microarray Analysis of Drosophila Development During Metamorphosis. J Appl Genet. 2002;43(3):269.
- <sup>38</sup> 馬立人、蔣中華：生物晶片。九州圖書文物有限公司。2003；5.
- <sup>39</sup> [www.ncbi.nlm.nih.gov/Unigene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Unigene)
- <sup>40</sup> [www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST)
- <sup>41</sup> [www.ncbi.nlm.nih.gov/GeneBank/index.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GeneBank/index.html)
- <sup>42</sup> 偉杰：哮喘的基因治療。國外醫學呼吸系統分冊。2000；20（1）：1.
- <sup>43</sup> 秦建華、王鸞升：哮喘遺傳與基因調控研究進展。國外醫學兒科雜誌分冊。1999；26(1)：4.
- <sup>44</sup> Van HL, Harrap S B, Wong ZY. Linkage of high affinity IgE receptor gene with bronchial hypereactivity, even in the absence of atopy. Lancet. 1995;346:1262.
- <sup>45</sup> Wang JY, Wang LM, Lin CG, Chang AC, Wu LS. Association study using combination analysis of SNP and STRP markers: CD14 promoter polymorphism and IgE level in Taiwanese asthma children. J Hum Genet. 2005;50(1):36.

- <sup>46</sup> Huang JL. Asthma severity and genetics in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2005 Jun;38(3):158.
- <sup>47</sup> Noguchi E, Hibasaki SM, Arinam LT. Evidence for linkage between asthma and atopy in childhood and chromosome 5q31-q33 in a Japanese population. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997;156:1390.
- <sup>48</sup> 陳竺：人類基因組計畫與兒科遺傳性疾病。臨床綜合雜誌。1999；37（9）：528。
- <sup>49</sup> Oxelius VA. Imbalanced switch of the IGHG (immunoglobulin constant heavy G chain) Gm(bfn) genes in atopic childhood asthma. *Allergy.* 2000 Nov;55(11):1063.
- <sup>50</sup> Schubert MS, Hutcheson PS, Graff RJ, Santiago L, Slavin RG. HLA-DQB1 \*03 in allergic fungal sinusitis and other chronic hypertrophic rhinosinusitis disorders. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Dec;114(6):1376-83.
- <sup>51</sup> 趙曉英、江載芳、申昆玲：哮喘的基因研究。國外醫學兒科分冊。1999；26（1）：1。
- <sup>52</sup> Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SP. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med.* 1988; 319: 525.
- <sup>53</sup> Shiina T, Inoko H. HLA gene region and its diversity *Nippon Rinsho.* 2005 Apr;63(S)4:293.
- <sup>54</sup> 頗明亮 丘長春：HLA-II 類基因與支氣管哮喘遺傳易感性及研究對策。濱州醫學院學報。2001；24（5）：451。

- <sup>55</sup> 熊杰、常淑楓、石學敏：基因蕊片技術在中醫領域的應用。天津中醫學院院報。2004；23（2）：95.
- <sup>56</sup> Kobayashi HM. Appearance of a stress-response protein , phage-shock protein A , in Escherichia coli exposed to hydrophobic organic solvents Microbiology. 1998;144:353.
- <sup>57</sup> Trotter SA, Brill LB, Bennett JP. Stability of gene expression in post mortem brain revealed by cDNA gene array analysis. Brain Res. 2002;942(1)2:120.
- <sup>58</sup> [http : //www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi ?](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?)
- <sup>59</sup> 王米渠、張敬遠、丁維俊等：寒證基因蕊片數據庫的聚類分析方法研究。中國中醫基礎學雜誌。2002；8（12）：62.
- <sup>60</sup> 陳鵬：基因多態性與中醫辨證相關性研究的回顧與思考。中國中西醫結合雜誌。2003 Nov；23（11）：852.
- <sup>61</sup> 張鳳娥、瞿岳云、蘇筱玲：中醫藥科學前沿問題。山西中醫學院學報。2002；3（3）：1.
- <sup>62</sup> 姚乃禮：中醫內科證候辨析與應用。人民衛生出版社。2004；283
- <sup>63</sup> 楊維益：中醫內科脾氣虛證量化診斷標準研究。遼寧中醫雜誌。1996；23（5）：195.
- <sup>64</sup> 嚴石林、李煒弘、王米渠：寒證辨證因子等級量化操作標診的研究。中國中醫藥信息雜誌。2002；9（8）：64.

- <sup>65</sup> Liu CC, Chen WS, Yang PC, Chang PC, Chen JW. Using an Artificial Neural Network to Predict Specific Oligonucleotide Based on Unique Marker Database, in submitted. 2005 Feb 3;
- <sup>66</sup> <http://www.biocarta.com/index.asp>
- <sup>67</sup> Schimke RT, Kung A, Sherwood SS, Sheridan J, Sharma R. Life, death and genomic change in perturbed cell cycles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1994 Aug 30;345(1313):311.
- <sup>68</sup> Ryzhov S, Goldstein AE, Matafonov A, Zeng D, Biaggioni I, Feoktistov I. Adenosine-activated mast cells induce IgE synthesis by B lymphocytes: an A2B-mediated process involving Th2 cytokines IL-4 and IL-13 with implications for asthma. *J Immunol.* 2004;172(12):7726.
- <sup>69</sup> Murakawa T, Kerklo MN. Simultaneous LFA-1 and CD40 ligand antagonism prevents airway remodeling in orthotopic airway transplantation: implications for the role of respiratory epithelium as a modulator of fibrosis. *J Immunol.* 2005;174(7):3869.
- <sup>70</sup> Zhang XY, Wang YQ, Correlation analysis of CD40L expression of peripheral T lymphocytes and serum level of IgE in children with allergic asthma *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 2003 Feb;41(2):149.
- <sup>71</sup> Whitney GS, Chan PY, Blake J, Cosand WL, Neubauer MG, Aruffo A, Kanner SB. Human T and B lymphocytes express a structurally conserved focal adhesion kinase, pp125FAK. *DNA Cell Biol.* 1993 Nov;12(9):823.

<sup>72</sup>[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?  
db=nucleotide&val=3805800](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=3805800)

- <sup>73</sup> Migita O, Noguchi E, Koga M, Jian Z, Shibasaki M, Migita T, Ito S, Ichikawa K, Matsui A, Arinami T. Haplotype analysis of a 100 kb region spanning TNF-LTA identifies a polymorphism in the LTA promoter region that is associated with atopic asthma susceptibility in Japan. *Clin Exp Allergy*. 2005 Jun;35(6):790.
- <sup>74</sup> Strasser EM. The relationship between the anti-inflammatory effects of curcumin and cellular glutathione content in myelomonocytic cells. *Biochem Pharmacol*. 2005 Jul 4 ;
- <sup>75</sup> Helin, K., Lees, J.A. A cDNA encoding a pRB-binding protein with properties of the transcription factor E2F. *Cell*. 1992;70 (2):337.
- <sup>76</sup> Amrani Y, Tliba O, Choubey D, Huang CD, Krymskaya VP, Eszterhas A, Lazaar AL, Panettieri RA. IFN-gamma inhibits human airway smooth muscle cell proliferation by modulating the E2F-1/Rb pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003 Jun;284(6):1063.



# **Transcription Analysis in Asthmatic Children with Han Zheng or Re Zheng by Oligonucleotide Microarray**

Fang-Hui Wei

Major professor: Shung-Te Kao

Institute of Chinese Medical Science, China Medical University

**Background:** Allergic asthma is a chronic inflammatory disease of lungs. It is also a common disease in pediatrics. Asthma results from a complex interplay between genetic and environmental factors. According to traditional Chinese medicine, allergic asthma can be differentiated between Han Zheng and Re Zheng.

**Objective:** To Analyze the gene expression in Asthmatic children with Han Zheng or Re Zheng using oligonucleotide microarray.

**Methods:** Firstly, we designed a pediatrician examination chart for allergic asthma of Han Zheng or Re Zheng. Based on the chart, we recruited typical patients with Han Zheng or Re Zheng asthma. Healthy children were considered as normal controls. Patients' mRNAs in their peripheral blood were used for microarray analysis. More than 13,000 genes were compared. Pathway of the differentially expressed genes with the bioinformation software on line was investigated.

**Result:** We found there were 170 differentially expressed genes between Han Zheng asthma group ( $n = 2$ ) and control group ( $n = 2$ ), including 5 genes with associated pathway ( $P < 0.05$ ). There were 226 differentially expressed genes between Re Zheng asthma group ( $n = 4$ ) and the controls ( $n = 4$ ), including 17 genes with associated pathway ( $P < 0.05$ ). There were 137 differentially expressed genes between Han Zheng asthma group ( $n = 4$ ) and Re Zheng asthma group ( $n = 4$ ), including 8 genes with associated pathway ( $P < 0.05$ ).





1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76