

國立交通大學

生化工程研究所 生物科技學院

碩士論文

抗腫瘤之紫蘇、藿香、防風、刺五加葉和石蓮花萃出物對

人類肝腫瘤細胞 **HepG2** 基因表現樣態之影響

Effect of *Perilla frutescens*, *Agastache rugosa*,

***Saposhnikovia divaricatae*, *Acanthopanax senticosus* L.**

and *Echeveria elegans* antitumor herbal extracts on the

gene expression pattern of HepG2 cells

研究生：古家禎

指導教授：林志生 博士

中華民國九十六年十二月

抗腫瘤之紫蘇、藿香、防風、刺五加葉和石蓮花萃出物對人類肝腫瘤細胞
HepG2 基因表現樣態之影響

**Effect of *Perilla frutescens*, *Agastache rugosa*, *Saposhnikovia divaricatae*,
Acanthopanax senticosus L. and *Echeveria elegans* antitumor herbal extracts
on the gene expression pattern of HepG2 cells**

研究生：古家禎

Student : Chia-Chen Ku

指導教授：林志生 博士

Advisor : Chih-Sheng Lin Ph.D.

國立交通大學
生化工程研究所
生物科技學院
碩士論文

A Thesis

Submitted to Institute of Biochemical Engineering

College of Biological Science and Technology

National Chiao Tung University

in partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master in

Institute of Biochemical Engineering

December 2007

Hsinchu, Taiwan, Republic of China

中華民國九十六年十二月

抗腫瘤之紫蘇、霍香、防風、刺五加葉和石蓮花萃出物對人類肝腫瘤細胞 HepG2 基因表現樣態之影響

研究生：古家禎

指導教授：林志生 博士

生 化 工 程 研 究 所
生 物 科 技 學 院
國 立 交 通 大 學

中文摘要

近幾年微陣列技術以應用獨特的基因表現樣態，並結合特定細胞內的反應來提供一個快速的檢測方法。許多天然植物來源的產品已經被證實具有抗癌能力。因此傳統中草藥的應用可以增加對於預防與治療疾病的研究。處理癌症主要治療的方法，包括誘發不正常細胞產生凋亡作用。所以我們嘗試作細胞層面的探討以及 cDNA 微陣列技術，來篩選可以抑制癌症細胞增生與致使癌細胞產生凋亡作用的中草藥萃出物。

製備紫蘇、霍香、防風、刺五加葉、石蓮花及七層塔的水萃出物，並用來評估對於人類肝癌細胞株 HepG2 抑制生長的影響。應用 MTT 細胞存活分析來測量六種中草藥萃出物對於抵抗癌細胞的增生能力。並以 Annexin V-FITC 與 PI 螢光染色分析偵測細胞凋亡作用。分離細胞 total mRNA 後，分別使用 cyanine 3-dUTP 標定 PBS 處理的細胞 mRNA，而 cyanine 5-dUTP 標定經中草藥萃出物處理後的細胞 mRNA。應用含有 7,680 個 spots 的晶片，研究經中草藥萃出物處理 HepG2 細胞的基因調節。晶片掃描後，以 GeneCluster 軟體作資料分析。

經多種濃度的中草藥萃出物處理 72 小時後，確立可抑制 HepG2 細胞生長的中草藥濃度。紫蘇、霍香、防風、刺五加葉及石蓮花抑制細胞生長 50% 的濃度依序為 100、300、400、400 及 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。刺五加葉與防風對於誘發 HepG2 細胞產生凋亡作用經流式細胞儀分析，凋亡細胞族群 ($\text{PI}^-/\text{AnnexinV}^+$) 的百分比依序為 $15.8 \pm 0.8\%$ 與 $21.4 \pm 0.9\%$ ($P < 0.001$)。以 Tukey 公正顯著差異法、鄧氏新多變測驗法及最小顯著差異法的變異

數分析結果，顯示霍香與刺五加葉對於 HepG2 的處理，具有相似的基因表現。

Spearman's 等級相關係數 (r) 分析結果也指出經中草藥水萃出物處理後所誘發的基因表現樣態中，以霍香與刺五加葉具有高相關性 ($r = 0.8$)。cDNA 微陣列的群集分析結果為多數基因表現與細胞凋亡、細胞增生及 Cytochrome P450 superfamily 有關。許多基因具有低表現量，尤其是與細胞增生相關的基因。比較逐步叢集分析法，自組圖分析法對於五種中草藥萃出物所誘發的基因表現樣態更具備良好的分群能力。分析的結果可以讓我們增加對於中草藥抗癌能力的瞭解。此外細胞毒性與微陣列的結果可以定義經防風、刺五加葉、紫蘇、霍香及石蓮花萃出物處理 HepG2 細胞後，抵抗癌細胞增生的能力與細胞凋亡相關的基因。因此在治療肝癌上，這些關於中草藥萃出物的研究發現，使其具有純化為試劑的價值。

中草藥萃出物對於 HepG2 細胞的抗腫瘤效用，於某種程度上可抑制癌細胞的增生。在 cDNA 微陣列中，此研究提供一個在 cytochrome P450 superfamily、細胞增生及細胞凋亡作用上，可能是抑制與肝臟方面相關的基因表現樣態之開端。根據樣態而比較群集分析的結果，自組圖分析更適合用來運算及分類與抗腫瘤有關的基因表現樣態。研究 cDNA 微陣列可幫助瞭解中草藥萃出物在生理活動層面上的意義。

**Effect of *Perilla frutescens*, *Agastache rugosa*, *Saposhnikovia divaricatae*,
Acanthopanax senticosus L. and *Echeveria elegans* antitumor herbal extracts
on the gene expression pattern of HepG2 cells**

Graduate Student: Chia-Chen Ku

Advisor: Chih-Sheng Lin Ph.D.

Institute of Biochemical Engineering
College of Biological Science and Technology
National Chiao Tung University

Abstract

In recent years, microarray technology provides a rapid method to associate specific cellular responses with unique gene expression patterns. Many natural plant source products have demonstrated that including anticancer ability. Moreover, traditional herbs application is increasing in investigation into prevention or treatment in the disease. The main therapeutic approach of cancer treatments is inducing abnormal cells apoptosis. Therefore, we attempt to screen herbal extracts that can inhibit cancer proliferation and lead cancer cells to apoptosis by the cellular studies and cDNA microarray technology.

Herbal extracts, *Perilla frutescens*, *Agastache rugosa*, *Saposhnikovia divaricatae*, *Acanthopanax senticosus* L., *Echeveria elegans*, and *Salvia Plebeia* R. Brown were prepared and used to evaluate the effect of growth inhibition on human hepatoma HepG2 cells. MTT cell viability assay was used to measure the antiproliferative effects of six herbal extracts. Apoptosis was detected by Annexin V-FITC and PI fluorescent staining assay. After total mRNA isolation, mRNAs from PBS-treated cells were labeled with cyanine 3-dUTP and mRNAs from the herbal extracts treated cells were labeled separately with cyanine 5-dUTP. The chip contains 7,680 spots were used for studying the gene regulation in HepG2 cells treated with herbal extracts. The slides were scanned and the data were analysed by GeneCluster software.

The growth of HepG2 cells in the presence of various concentrations of herbal extracts for 72 h were determined. The growth inhibition (IC_{50}) of *P. frutescens*, *A. rugosa*, *S. divaricatae*, *A. senticosus L.* and *E. elegans* were about 100, 300, 400, 400 and 400 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Significant induction of apoptosis was observed in the HepG2 cells treated with *A. senticosus L.*, and *S. divaricatae* extract by flow cytometric analysis, and the fraction of apoptosis cells ($PI^-/AnnexinV^+$) were as following $15.8 \pm 0.8\%$ and $21.4 \pm 0.9\%$, respectively ($P < 0.001$). ANOVA analysis of Tukey's honest significant difference, Duncan's new multiple range test and least significant difference test, *A. rugosa* and *A. senticosus L.* had similar gene expression in HepG2 cells. The spearman correlation coefficients (r) were calculated for the gene expression levels of these herbal extracts treatment, and high correlation value was between *A. rugosa* and *A. senticosus L.* ($r = 0.8$). The clustering results of cDNA microarray indicated that the expression of numerous genes associated with the apoptosis, proliferation, and Cytochrome P450 superfamily. Most gene expression levels were down-regulation, especially in proliferation-related genes. Compared with the k-mean analysis, the SOM analysis in five herbal extracts had good ability of grouping genes. The result may improve our understanding of the actions of herbs with anti-tumor activities. Additionally, the cytotoxicity and microarray results enabled the apoptosis-associated genes that are responsible for the anti-proliferative activities of *S. divaricatae*, *A. senticosus L.*, *P. frutescens*, *A. rugosa* and *E. elegans* extracts in HepG2 cells to be identified. Moreover, these findings revealed that herbal extracts are the material with potential to be purified as an agent for treating hepatocellular carcinoma.

The anti-tumor effects of herbal extracts on HepG2 cells are due in part to inhibition of cancer cells proliferation. Our study provided a preliminary profile of gene expression may be related to suppress hepatic expression of cytochrome P450

superfamily, proliferation and apoptosis in cDNA microarray. According to the profile, we compared with cluster analysis, and SOM was more suitable to use in assaying the gene expression profiles associated with the anti-tumor. Such cDNA microarray studies can help to identifying herbal extracts in physiological activities.



誌 謝

承蒙指導教授林志生老師在本論文撰寫的過程中細心指導，幫助愚昧與不才的我順利完成學業，在平時的研究中，總以科學的角度切入探討，使我獲益良多，在此致上最深的感謝與敬意。由衷感謝生物科技學院的大家長毛仁淡教授對我的關懷與照顧，除了協助完成論文外，還諄諄教誨我要面對挫折與困難，學習以正確的態度去面對人生。而口試期間，承蒙廖光文教授用心的提點學生在研究上不足的地方，您謹慎思密的研究態度，更是我要學習的目標。

在此感謝實驗室建龍學長、俊旭學長及琦斐學姐，在研究上給予的指導與幫忙，更感謝一路支持我繼續學業的瑞萍與俊嘉賢伉儷的照顧與關心，在我人生最低潮的時候拉我一把，也感謝元平、豐鵬、千雅及實驗室學弟妹的協助與包容。

對於東海大學一直很照顧與關心著我的劉琳琳老師、洪連懌老師與楊錫昆主任，在此也致上最深的感謝與敬意。感謝台大醫學院符文美教授的關心與照顧，更感激台大醫院林至芄醫師與陳倩儀醫師賢伉儷的幫忙與包容，讓我內心充滿感動！還有要謝謝麗瑛學姐、明城學長、奕廷學長及右穎學長，好友宇淇、麗君、瑋倫、慈安、秉筠、蕙如、妍青、宜慧、琇雯、金蓉、家珍、志瑋、家銘、宇昕、緒民、博群、念組、宏文、維捷、明景及奉庭，同儕翊維、美婷、惠君、宏輝及愛雁，學弟妹欣怡、珮綾、尚燁、智恆、如珊、政文、欣彬及昱丞的幫忙與支持。更感謝葉連發先生、李成衍先生與范宜輝先生在實驗上的協助，讓我更能順利進行研究。

最後把這篇論文獻給我至愛的家人，還有一路陪我成長的世杰，非常感謝我的父母一路上的支持與關懷，這份感動與感謝再多的言語也無法形容，以此篇論文表達最誠摯的感激與祝福！

古家禎 謹誌
交通大學生物科技學院
生化工程研究所
中華民國九十六年十二月

總目錄

| | 頁次 |
|----------------------------|-----|
| 中文摘要..... | i |
| 英文摘要..... | iii |
| 誌謝..... | vi |
| 總目錄..... | vii |
| 圖目錄..... | ix |
| 表目錄..... | x |
| 附表目錄..... | xi |
| | |
| 壹、緒論..... | 001 |
| 一、DNA 微陣列晶片之原理與發展..... | 001 |
| 二、DNA 微陣列晶片在生物醫學上之應用..... | 004 |
| 三、科學中草藥的發展..... | 005 |
| 四、中草藥在抗腫瘤與抗癌之研究近況..... | 006 |
| 五、DNA 微陣列於中草藥研發上的運用..... | 013 |
| | |
| 貳、材料與方法..... | 014 |
| 一、中草藥水萃出物製備方法..... | 014 |
| 二、細胞培養與處理方法..... | 014 |
| 三、細胞存活率測試..... | 015 |
| 四、RNA 製備..... | 015 |
| 五、cDNA 微陣列分析..... | 017 |
| 六、Annexin V-FITC 螢光染色..... | 020 |

| | |
|----------------|-----|
| 參、結果與討論..... | 023 |
| 一、細胞存活率測試..... | 023 |
| 二、微陣列分析..... | 024 |
| 三、細胞凋亡分析..... | 034 |
| 肆、結 論..... | 037 |
| 伍、參考文獻..... | 040 |
| 圖..... | 056 |
| 表..... | 072 |
| 附錄..... | 088 |



圖 目 錄

| | 頁次 |
|---|-----|
| 圖 1-1、細胞凋亡的途徑..... | 056 |
| 圖 2-1、cDNA 微陣列分析流程圖..... | 057 |
| 圖 3-1、中草藥水萃出物處理 HepG2 的細胞存活率分析..... | 058 |
| 圖 3-2、經 GenePix 螢光掃瞄機擷取 cDNA 微陣列的影像..... | 059 |
| 圖 3-3、不同中草藥處理的微陣列 Cy5/Cy3 比值之標準常態分佈..... | 061 |
| 圖 3-4、不同中草藥處理對於基因表現樣態之逐步叢集分析結果..... | 063 |
| 圖 3-5、五種中草藥處理所誘發基因表現樣態之自組圖分析結果..... | 065 |
| 圖 3-6、不同中草藥處理 HepG2 細胞 72 小時後的流式細胞儀分析結果..... | 068 |
| 圖 3-7、以流式細胞儀分析中草藥水萃出物處理後 PI-AnnexinV+與 PI+AnnexinV+ 族群的結果..... | 071 |

表 目 錄

| | 頁次 |
|--|-----|
| 表 1-1、微陣列晶片的分析方法..... | 072 |
| 表 1-2、科學中草藥的研究發展..... | 073 |
| 表 1-3、應用中草藥的抗癌研究..... | 074 |
| 表 1-4、應用微陣列分析的中草藥研究..... | 078 |
| 表 3-1、不同中草藥處理的基因表現樣態 Cy5/Cy3 之偏態係數與峰值係數 | 080 |
| 表 3-2、不同中草藥處理的基因表現樣態 spearman 相關係數..... | 081 |
| 表 3-3、以五種不同中草藥處理的基因表現樣態 ANOVA 分析結果..... | 082 |
| 表 3-4、細胞凋亡作用相關的基因表現樣態..... | 083 |
| 表 3-5、細胞增生相關的基因表現樣態..... | 085 |
| 表 3-6、Cytochrome P450 superfamily 相關的基因表現樣態..... | 087 |

附 錄

| | 頁次 |
|---|-----|
| 附錄表 1、基因名稱對照..... | 088 |
| 附錄表 2、論文中所提及之運算公式列表..... | 092 |
| 附錄表 3、本研究中所運用之運算公式列表..... | 093 |
| 附錄圖 1、細胞凋亡途徑中抗癌藥物處理 HepG2 細胞的基因表現樣態..... | 095 |
| 附錄圖 2、細胞增生途徑中抗癌藥物處理 HepG2 細胞的基因表現樣態..... | 096 |
| 附錄圖 3、肝臟代謝途徑中抗癌藥物處理 HepG2 細胞的 Cytochrome P450 family 基因表現樣態..... | 097 |



壹、緒 論

一、DNA 微陣列晶片之原理與發展

1. DNA 微陣列晶片的應用原理

傳統的核酸分子雜交技術（例如 Northern blot 或 Southern blot）所耗費的人工、時間與效力不足以應付大量基因信息的產生，基因晶片為近幾年興起的一項生物技術，可以將生物中許多不連續的分析過程，移植到固相的晶片上進行，並且使其連續化和微型化 [Kallioniemi et al., 1992; Schena et al., 1995; Shalon et al., 1996]。生物晶片在廣義的定義上是指與生物有關的分子（例如：基因、蛋白質、碳水化合物或細胞組織），利用微小的面積且高密度的排列方法，將探針定位在經過特殊處理的塑膠、矽片或玻璃材質上，依照植入微陣列晶片上物質的不同，可以分為基因晶片與蛋白質晶片，應用最廣泛的 DNA 微陣列晶片，主要是把已知序列的單股 DNA 分子（DNA 探針），以打點的方式附著固定在玻璃晶片或其他固體上，另一段未知且有興趣的 DNA 片段（標的 DNA）以螢光標定的方式偵測並進行資料分析。基因晶片技術又稱作 DNA 微陣列（DNA microarray）或是 DNA 微陣列晶片，也稱為生物晶片（biological chip 或 biochip）。微陣列分析可以使用 RNA 的樣品同時測量數千個基因的表現，經過微陣列的實驗分析，可以解開許多重要的生物現象，如：基因表現樣式、藉由相同途徑調節的基因群與比較兩種不同的實驗狀況 [Garrigues et al., 2005]。經由兩種不同的狀況處理細胞後所萃取出 mRNA，經過反轉錄作用成 cDNA 時，通常會標定上兩種不同顏色的螢光物質（例如 cyanine 3-dUTP [Cy3] 與 cyanine 5-dUTP [Cy5]）。混合標的上不同螢光的 cDNA，同時與有規律地排列並固定於玻璃片上的基因或表達序列標籤（expressed sequence tags; EST）結構作競爭性雜合作用（comparative hybridization），由 Cy3 或 Cy5 標的上的目標物（target）在每一個基因的 spot 上所激發出的光分別為綠色與紅色，再以螢

光掃描器（鐳射共聚焦螢光檢測系統）對晶片進行掃描並讀取訊號，每一個 spot 所散發出的螢光訊號還需要經過電腦軟體系統定量數值，並比較和檢測那些特定位置的 DNA 有增加（gain）或減少（deletion），從而迅速得出所要的資訊。背景值的擷取通常由 spot 周圍的面積取決，而 Cy3 與 Cy5 的訊號強度會扣除掉背景值。最後，每一個基因的表現數值會經過 \log_2 運算的比值會用來表示對照組與實驗組間相關基因的表現量 [Quackenbush, 2001]。經由 \log 的運算後，在同一個基準點上，高表現與低表現的數值相互作比較。

2. DNA 微陣列的發展

1990 年代初，人類基因體計畫與分子生物的發展奠定基因晶片技術的形成，史丹佛大學 Brown 教授實驗室發明第一塊應用玻璃材質的基因微陣列晶片 [Schena et al., 1995]，基因晶片是因應人類基因體計畫完成後所衍生出來的產品，主要是利用為處理技術，把基因黏著於玻璃片上，同時可以處理上萬個基因的點漬晶片，全面且大量的偵測基因表現樣式。為了因應不同的研究領域，也需要擴展生物晶片的領域，從植入晶片上的探針不同又可以分 cDNA 晶片與寡核苷酸（oligonucleotide）晶片 [Afshari et al., 1999; Peixoto et al., 2006]。cDNA 晶片為利用反轉錄方式所產生的互補 DNA，以打點的方式植入尼龍材質的薄膜或玻璃玻片上。寡核苷酸晶片為在晶片上直接合成寡核苷酸或是將合成好的寡核苷酸植入並固定在尼龍材質的薄膜或玻璃玻片上。藉由測定樣本中不同的 mRNA 濃度，可以探討基因的表現情況，細胞製造越多的 mRNA，就有可能產生越多與之相對應的蛋白質，以基因的表現量來間接研究蛋白質的種類與數量。利用 cDNA 或寡核苷酸微陣列的研究可以同時進行兩種生物樣本的實驗和觀察很多基因的表現或抑制程度，對照組和實驗組的兩兩比較，可以在同一時間完成，主要用於腫瘤的 DNA 測序、基因表達、突變、診斷、藥物篩選和遺傳圖譜等研究 [Tamayo et al., 1999; Takeo et al., 2001; Lee et al., 2002; Hong et al., 2003; Huang and Hazlett, 2003; Taniuchi et al., 2005; Staal et al., 2006]。隨著微陣列技術的研究和應用急劇增加，日益

增多的資料，處理與分析方法都值得我們討論，癌細胞在抗癌藥物的處理下的反應機制，以及哪些癌細胞能夠發生反應，哪些不能，也都是我們必須探討的問題，而微陣列的研究最終還是會朝著臨床的方向發展。

3. DNA 微陣列的資料分析

(1) 微陣列的影像處理：造成微陣列分析的低再現性影響的因子很多，包含收集細胞的狀況、生物變異性、mRNA 的品質、打 spot 的狀況和雜合作用。研究者在碰到螢光的背景值或非由 cDNA 雜合作用所產生的螢光數值時，會經由校正螢光或是正規化 (normalization) 資料來提高正確性。背景值所造成的偏差會藉由扣除 spot 圈選以外的範圍面積所測得的螢光數值，通常這個區域的螢光背景值是會與 spot 內的面積有重疊的狀況，校正由特定螢光差異性所造成的偏差，最簡化的正規化方法是讓 Cy3 與 Cy5 訊號具有一樣的總平均強度，此方法是基於細胞狀態下大部分的基因表現樣式是不改變的。如果背景值顯著的重疊在 spot 內 (spot-localized)，就不能以減去背景值來做為提高 spot 準確定的方法，因為精確的微陣列掃描器技術不能將同一 spot 內的背景值螢光與經過雜合作用後產生的螢光分開。因此，如果有此狀況發生，就算是經過正規化的處理，這種誤差還是會存在於資料分析中 [Martinez et al., 2003]。微陣列分析正規化是平衡兩種標定螢光物質的螢光強度，主要目標是移除實驗時所產生的誤差。造成螢光數值偏差的原因包含不一樣螢光標物質標的效率、對光的敏感性與掃描器的設定。一般對於正規化方法的使用如：對於所有基因作廣泛的正規化、持續表現或無變化的管家基因 (housekeeping gene) 正規化及控制組 (internal controls) 正規化 [Quackenbush, 2002]。但是這些正規化的方法還是不夠恰當，因為螢光標的物的誤差與 spot 的密度與在微陣列上的空間為置有關 [Lee, 2002]。

(2) 微陣列的資料分析：cDNA 微陣列能在同一時間平行檢測大規模的基因分子資訊，並比較每個基因的調節，可以同時反映出基因調節變化途徑。在生物學上，比較基因間

的表現可以提供對於研究癌症重要的線索，微陣列分析技術可以讓收集千個以上的基因表現變成可能，許多傳統的技術仍然具有限制，因為需要大量的 mRNA 樣品來測量少數基因的表現 [Garrigues et al., 2005]。微陣列的分析中，叢集分析方法是直接比較樣本中各指標之間的性質，將性質相近的歸為一類，性質差異較大的歸為另一類，常用的分析方法有系統叢集分析 (hierarchical clustering)、逐步叢集分析 (k-mean clustering)、自組圖分析 (self organizing maps; SOM) 及主成分分析 (principal component analysis) (表 1-1)，其中逐步叢集分析主要是輸入 K 值後，將資料分為 K 群，但並無考慮基因間的相關性，而是基因間的距離最為分類依據。而自組圖分析，主要提供由資料中取出 N 個最明顯的基因表現樣式來執行一大量的資料的整理，因此相似的基因表現樣式在自組圖分析中會被分為同一類 [Tamayo et al, 1999]。

二、DNA 微陣列晶片在生物醫學上之應用

傳統的毒理學和分子生物學研究著重於以臨床化學或組織學觀察細胞或是組織的改變，但是 cDNA 微陣列的技術可以應用在經過毒物或是抗癌藥物 (如：中草藥) 處理後的細胞或是組織，並同時可觀察大量的基因表現情況，此主要以基因的表現樣式 (expression pattern) 結果，這包含特定的酵素活動或是特殊的訊息傳遞途徑的調控，也是特定的毒物或是中草藥的特性。微陣列的複雜性在處理過程中增加變化性，也可以提供對於藥物毒性的機制瞭解價值。此外，基因表現樣式可以正確的定義與預測特定的毒性指標 (toxicity endpoint) 並優先排列 (lead prioritization)，這可以提供非常有利的篩選工具 [Rodi et al., 1999; Pennie, 2000; Steiner and Anderson, 2000]。癌症的發生常伴隨著遺傳物質的改變，這些變化可能是經由增加致癌基因 (oncogenes) 或是減少腫瘤抑制基因 (tumor suppressor genes) 的表現，進而導致病變。基因的突變也會造成癌症的發生，這些基因上的突變可以利用寡核苷酸微陣列來偵測；而由這些病變基因造成之異常基因表現，可以利用 DNA 微陣列來分析。也有使用 DNA 微陣列分析來比

較同種細胞內兩種狀態之間的差異，此為所有蛋白質編碼基因表現樣式之間的關係 [Schena et al., 1995; Shalon et al., 1996]。對於癌症的檢測利用 DNA 微陣列來分析各種相關基因的表現，對於癌症初期篩檢，除了提供快速檢測技術外，也可以瞭解致病的遺傳因子，更能快速且正確地診斷病因，作早期的防範，且可藉由瞭解基因表現樣式的改變來推測細胞內的變化，進而找出損傷的原因 [Burczynski et al., 2000; Hong et al., 2003]。在醫學臨床的研究上，研發新藥是需要檢驗眾多生物檢體與化學合成物，微陣列晶片已成為生醫檢驗及新藥開發的方法之一 [Iizuka et al., 2003; Hara et al., 2005; Rho et al., 2005; Yang et al., 2005]。微陣列晶片應用在生物醫學方面的有微血液感測晶片，可以測量與分析血液中的各種成分 [Oh et al., 2005]，也開發出檢測癌症、地中海型貧血、乾癱性關節炎及風濕性關節炎等晶片 [Hong et al., 2003; Bang-Ce et al., 2004; Batliwalla et al., 2005; Tsubaki et al., 2005]。製藥公司為了能降低開發新藥的費用，因此在學術性質和產業界的實驗室中，努力使用 DNA 微陣列分析來研究於以藥物處理多種組織樣品後的效果分析，還有以 DNA 微陣列分析來研究特定毒性的特殊 RNA 表現樣式，並用來區別不同種類的毒物特性 [Hong, 2003]。

三、科學中草藥的發展

科學中草藥統稱來說是透過對藥材炮製、萃取的科學化品質管制，製成便於口服的劑型，改善傳統中草藥調製煎煮費時且攜帶不易的缺點，科學中草藥又稱濃縮中藥，指以科學的方法精選藥材，透過 GMP 製造流程及精密儀器的分析檢驗，經過煎煮、萃取、濃縮、噴霧及造粒等流程，再製成濃縮顆粒、錠劑及粉末等製劑，使每一批次的藥品品質完全一致。在講求健康與自然的時代裡，從天然物中研發新藥來防治人類疾病，已經成為醫藥界的主流，並以藥用植物作為醫療資源之一，德國與中國皆具有系統性的使用藥用植物，各類植物中所發現具有抗病及防癌的天然物質統稱植物化學藥品。美國於 1944 年通過營養補助品健康及教育法案 (dietary supplement health and education act;

DSHEA) 開始引起全世界對於中草藥的注意。1950 年代已經開始研究中草藥的單一成分 (表 1-2)。最早將中草藥單一成分用於癌症方面的研究，是把 Primin、Plumbagin 與 Maytenin 應用皮膚癌的治療上 [Melo et al., 1974]。1990 年代分生技術發展成熟，中草藥除了用於抑制癌細胞生長外，並探討基因表現的機制；藥物對於癌細胞的處理，追求緩和且不傷害正常細胞的方式進行 [Yang et al., 1996]。美國食品藥物管理局 (FDA) 在 1997 年公布植物性產品規範草案 (guidance on botanical products)，首次將植物性藥品納入管理，也讓製藥界開始重視中草藥，很多生技公司 (例如：順天堂藥廠與中天生技公司) 開發中草藥的產品目標是通過 FDA 的認證而可以讓產品流通性更國際化。銀杏是最普及的單味藥，全世界的銀杏品種將近 10 種，德國人用十幾年的時間找出穩定且療效最好的銀杏葉品種，開發穩定的製藥品質與過程 [DeFeudis et al., 2003]，而德國政府核准的標準銀杏萃出物為 GBE 761，證實可治療阿茲海默疾病 [Kanowski et al., 1996]，並由銀杏所含的三百多種化學成分中，確立出主要的活性成分為黃酮類與 terpenes [Le Bars and Kastelan, 2000]。2000 年代微陣列晶片技術發展成熟，並應用在作為篩選中草藥所誘發產生表現的基因 [Lee et al., 2002]。

四、中草藥在抗腫瘤與抗癌之研究近況

1. 應用於抗腫瘤與抗癌研究之中草藥

許多國家廣泛的使用中草藥來治療疾病，其中包含腫瘤與癌症，許多民間使用傳說中可以抗癌的草藥萃出物的正確性已經被證實，包含冬蟲夏草 (*Cordyceps sinensis* Sacc.)、白芍 (*Paeoniae Radix*)、防風 (*Saposhnikovia divaricata*)、金線蓮 (*Anoectochilus formosanus*)、刺五加葉 (*Acanthopanax senticosus*)、紅豆杉 (*Taxus mairei*)、洛神花 (*Hibiscus sabdariffa*)、粉防己 (*Stephania tetrandra* S. Moore)、茯苓 (*Poria cocos* Wolf)、柴胡 (*Radix Bupleuri*)、紫蘇 (*Perilla frutescens*)、黃耆 (*Astragali Radix*)、銀杏 (*Ginkgo biloba*)、藹香 (*Agastache rugosa*) 及靈芝 (*Ganoderma lucidum*)

(表 1-3)。冬蟲夏草屬於滋補藥草，含有豐富的蟲草素、核酸、游離脂肪酸、甘露糖醇、蛋白質，可以治療肝炎與心臟病，強化免疫系統，具有抗氧化功能可以抗衰老 [Yoshida et al., 1989; Zhu et al., 1998.]。白芍是中國傳統的中草藥毛茛科植物芍藥 (*Paeonia lactiflora Pallas*) 乾燥根，在中國與日本被廣泛用來治療肝臟疾病的傳統藥方，早期的研究指出白芍可以抑制由化學藥品(可造成多種氧化性 DNA 損傷)所誘發的氧化性 DNA 分裂，所以白芍不只具有抗癌的功效，還是抗衰老與抗致癌作用的藥物，白芍的萃出物可以經由血管內皮依賴性血管擴張 (endothelium-dependent vasodilator) 的影響，改善主動脈的血流量並且抑制血栓形成與血小板凝集 [Goto et al., 1996]。此外白芍水萃出物可以抑制 HepG2 與 Hep3B 細胞株的生長，由白芍萃出物所誘發的細胞凋亡作用主要是以 p53 的途徑發生，經過 cDNA 微陣列分析與 RT-PCR 的實驗證實，可能是改變了 BNIP3、ZK1、RAD23 及 HSPD1 基因表現 [Lee et al., 2002]。防風乾燥的根部為亞洲天然的中草藥，主要當成發汗劑、止痛劑及退熱劑來使用，應用於治療一般的感冒、頭痛及關節痛，防風含有揮發油及有機酸等成分，有明顯的免疫增生及抗過敏的作用。由防風萃取的歐前胡素 (imperatorin) 與 1-甲基苯乙妥因 (deltoin) 可抑制 NO 的產生，而避免 NO 對人體所產生的傷害 [Wang et al., 1999]。金線蓮為珍貴的民間用藥，墨綠色葉面成嵌著金線脈紋，金線之名因此而得。全草味甘性涼且清熱退火，可降低膽固醇、防止血壓上升及強化肝臟機能，所含的 plumbagin 成分，可誘發乳腺癌細胞 MCF-7 產生細胞凋亡作用 [Yang et al., 2004]。刺五加葉為一種傳統的天然草藥，作為補藥與抗風濕病，主要應用在慢性支氣管炎、高血壓、抗緊迫及缺血性心臟病 [Nishibe et al., 1990; Fujikawa et al., 1996]。肥大細胞 (mast cells) 合成與分泌化學性的傳遞物在過敏性反應中扮演重要的角色，而刺五加可以抑制腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α ; TNF- α) 所產生肥大細胞依賴性的發炎反應 [Yi et al., 2001]；但可以增加肺癌病人血液中 TNF- α 的活性，來抵抗癌細胞 [Huang et al., 2005]；由刺五加葉中所分離的 glycoprotein 可降低經酒精對於肝臟細胞所造成的肝毒傷害，並增加抗氧化酶的活性 [Choi et al., 2006]。紅豆杉又稱紫杉，所含紫杉鹼 (taxine) 有抗腫瘤活性及細胞毒性，紅豆杉所含的 taxumairol A 可抑制人類腫瘤細胞株 KB-16、A-549 及 HT-29 生長 [Shen

et al., 1996]。而 taxumairols U 與 taxumairols V 可抑制人類肝腫瘤細胞的生長 [Shen et al., 2001]。洛神花常用於解熱與平衡身體的酸鹼值，成分中的 Hibiscus protocatechuic acid、花青素及多酚類萃出物，可抑制小鼠的皮膚腫瘤與人類 HL-60 細胞的生長，並具有抗氧化作用 [Tseng et al., 1998; Tseng et al., 2000]；誘發人類胃癌細胞進行細胞凋亡 [Lin et al., 2005]。粉防己的根被當作中國的草藥來治療關節炎 (arthritis)、矽肺病 (silicosis) 與高血壓已經有數十年了，粉防己鹼 (tetrandrine) 為雙苄基異喹啉類生物鹼 (bisbenzylisoquinoline alkaloid)，主要從粉防己根部萃取出來，已經被證實可以抑制人類 HeLa 細胞的分化 [Teh et al., 1991]，且可以抑制小鼠的腹水腫瘤 [Kuroda et al., 1976]，還可以誘發人類白血病 U937 細胞的凋亡 [Lai et al., 1998]，除此之外，粉防己鹼 (tetrandrine) 還可以抑制人類肝癌細胞株 HepG2 細胞的生長，誘發產生細胞凋亡的作用 [Yoo et al., 2002]。茯苓含有多醣體、Pachymic acid、3-O-acetyl-16 alpha-hydroxytrametenolic acid、poricoic acid B 與 beta-glucan PCM3-II 可以抑制小鼠的腫瘤 [Kanayama et al., 1986]，抑制皮膚腫瘤與免疫反應 [Kaminaga et al., 1996]，抑制人類乳癌細胞株 MCF-7 生長並誘發細胞凋亡作用 [Zhang et al., 2006]。柴胡含有皂素、RBlaii、Bupleurum scorzonerifolium 與 KY88，可以抑制小鼠肉瘤生長 [Haranaka et al., 1985; Kok et al., 1995; Chow et al., 2004]，對人類肺癌細胞株 A549 與肝癌細胞株 (HB8064) 具有抑制增殖與誘發產生凋亡作用 [Cheng et al., 2003; Hsu et al., 2004]。紫蘇含有 Nelignans、luteolinu、Rosmarinic acid 及 triterpene acids，對於 macrophage 細胞株 RAW 264.7 與皮膚腫瘤有抑制生長的效果 [Ryu et al., 2002; Ueda et al., 2002; Ueda et al., 2003]；並可降低受到 aflatoxin B1 或 ochratoxin A 處理 HepG2 細胞後，所導致的傷害 [Osakabe et al., 2002; Renzulli et al., 2004; Osakabe et al., 2004]。黃耆有利尿、降壓、抗腎炎的作用，含有 juzentaihoto 成分，可以抗腫瘤 [Aburada et al., 1983]，並抑制膀胱癌 [Kurashige et al., 1999] 與胃癌細胞 [Lin et al., 2003] 生長。銀杏含有黃酮類、terpenoid、flavonol glycosides 與 terpene lactones，具有抗氧化能力 [Dubey et al., 2004]，也可抑制乳癌細胞、神經膠質瘤及肝癌細胞株的增殖 [DeFeudis et al., 2003; Pretner et al., 2006]。霍香屬於唇形花科 (Labiatae) 含有多種

黃酮類 (flavonoids) 與主要成分槲皮素 (quercetin)，可以抑制由 TNF-K 所誘發的 VCAM-1 基因表現。動脈硬化為一種慢性發炎疾病，在動脈粥樣硬化的病理生理學上，腫瘤壞死因子所誘發 VCAM-1 表現為早期的症狀，研究指出槲皮素可以抑制腫瘤壞死因子所誘發 VCAM-1 的表現 [Hong et al., 2001]。靈芝富含維他命、纖維與氨基酸，可以活化多醣體促進人體免疫功能 [Sliva, 2004; Yuen and Gohel, 2005]，除了靈芝本身所含的 triterpene 可以抑制人類肝癌細胞株 Huh-7 的生長 [Lin et al., 2003]，在乳癌與前列腺癌細胞中，也可抑制細胞附著與轉移 [Sliva, 2003]。

此外補中益氣湯 (Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang; BZYQT) 為中國傳統的複方中草藥，可抑制人類肝癌細胞株 (Hep3B、HepG2 及 HA22T) 的生長，在中國已經使用於多種癌症的治療，體內與體外試驗指出補中益氣湯可以抑制肝癌後期病人癌細胞的蔓延，經細胞週期與 DNA 片段分析，可以抑制肝癌細胞的生長，細胞週期停滯於 G0/G1 期的現象，並抑制 DNA 合成並誘發細胞凋亡作用。肝細胞的死亡與多種肝臟失調疾病與肝臟功能退化有密切的關係 [Kao et al., 2001]。

2. 中草藥與肝癌研究的結合

(1) 肝癌簡介：近幾年來惡性腫瘤以高居我國十大死亡原因之首，其中以肝腫瘤佔國人惡性腫瘤死亡的最主要病症，行政院衛生署 (<http://www.doh.gov.tw>) 統計民國九十三年台灣地區主要死亡原因，肝癌為第二大死亡原因，死亡人數超過萬人，其中在女性致死的惡性疾病中排名第二，在男性則高居第一，肝癌通常指原發性肝細胞癌

(hepatocellular carcinoma; HCC)，也被簡稱作肝癌 (hepatoma)，是最為常見的肝癌種類，在成人肝癌中約佔 80-90%，肝細胞癌源自肝細胞中一個或少量的肝細胞惡性變化產生的腫瘤，通常發生在肝臟因硬化而受損的人身上，肝癌為世界上常見的惡性腫瘤之一，也為常見具致命性的癌症 [Wanebo and Vezeridis, 1993]。肝癌為一種實質性的惡性腫瘤，在初期並無特殊的徵兆，當患者摸到有硬塊時，通常已經進入病程的晚期了，

目前，臨床上對於肝癌的治療仍以手術為主，但病人復發率約有 40%，因此，侵入式的治療方式仍無法很有效的對抗此一疾病，在全球很多地區，包含東亞與南非，在肝臟實質（parenchyma）中，因為轉移、肝硬化及其他病理上的改變，經過外科手術引起的反應仍然具有相當大的挑戰以及治療上的問題，所以建立更有效的治療方法來降低因為肝癌所引發的死亡是非常重要的 [Kennedy et al., 2004]。

(2) 應用中草藥治療肝癌：對於肝癌的治療分為化學藥物的治療以及天然藥物的治療，在化學藥物的治療上亦面臨了瓶頸，肝癌對於現行使用的抗癌藥物其敏感性都不高，癌症用藥多是以造成細胞壞死的途徑來殺死癌細胞，結果亦會使正常的細胞大量死亡，導致病患在治療的過程中，身體面臨極大的挑戰。為了尋求一個有效且安全的治療藥物，許多研究著手於天然藥物的研究，如：可以誘發 HepG2 細胞進行細胞凋亡的木犀草素（Luteolin，為一種天然的黃酮類）[Ko et al., 2005]、去氫駱駝蓬鹼（Harmine）由駱駝蓬（*Peganum harmala*）萃取出來，應用在抗癌治療上 [Chen et al., 2005]。由天然植物中純化有效的抗癌化合物，並結合日前臨床上所用的抗癌藥物來治療病患，降低抗癌藥物劑量，已減少副作用，又能達到有效的抗癌作用，但部分成果仍屬初步研究，尤其在機轉的建立上，仍有許多未知。人類肝癌細胞株 HepG2 細胞常被當作酒精 [Neuman et al., 1993; Neuman et al., 1995; Harries et al., 2001] 與四氯化碳（carbon tetrachloride; CCl₄）[Dai and Cederbaum, 1995; Harries et al., 2001] 誘發肝臟受損研究的良好模式，除此之外也廣被應用於細胞毒性測試 [Guillouzo, 1998; Hong, 2003]，所以被選用來作本次論文上的研究，因為 HepG2 細胞具有正常肝細胞的表型與基因特性但不帶有病毒感染性，所以常被拿來作為體外的實驗系統 [Sassa et al., 1987]。另外 HepG2 細胞可以表現很多正常人類肝臟功能，如：cytochrome P450-dependent mixed function oxidase (MFO) 的反應進行 [Limbosch, 1983; Dawson et al., 1985; Darlington et al., 1987] 與 glucuronic acid 的結合反應 [Diamond et al., 1980; Neuman et al., 1995; Shear et al., 1995]，因此 HepG2 細胞時常被用來作為肝癌或是肝功能上的研究。

(3) 抗腫瘤與抗癌的方法之一誘發細胞死亡：細胞死亡主要的機制可分細胞壞死和細

胞凋亡兩種。細胞壞死 (necrosis)：主要發生於一群相鄰的細胞，通常是較嚴重的物理化學傷害所造成，主要是伴隨 ATP 耗盡，細胞通透性發生改變而使細胞膨脹或破裂，使細胞內的胞器釋出，並造成溶體 (lysosome) 釋放出各種分解酵素和細胞激素 (cytokines) 等物質，而使週遭組織受傷引起發炎反應 [Wyllie, 1980; Eguchi et al., 1997; Leist et al., 1997]。細胞凋亡 (apoptosis; programmed cell death) 為細胞在正常發展上必要的一個生理過程 (圖 1-1)，主要功效是維持組織生理的平衡與參與免疫防禦系統，在癌症的預防與治療的過程中，細胞凋亡為重要的因子，主要發生在單一細胞，通常伴隨細胞皺縮、細胞核濃縮、細胞膜翻轉、核小體連接部位上 DNA 的斷裂 (internucleosomal DNA cleavage) 及細胞質芽胞中含有未損壞的胞器，最後細胞分解成許多具有完整細胞膜的凋亡小體，因為凋亡小體的細胞膜仍完整，所以含有細胞分解後有毒物質並不會釋放出細胞外，因此周圍的組織可以避免發炎和傷害。[Wyllie, 1980; Radford, 1986; Wood and Youle, 1994; Fadok et al., 1992; Liu et al., 1996; Nagata, 1997]。但在細胞發生凋亡的而造成細胞形態學改變以前，粒線體即發生某些功能改變 (例如活性氧產生增多與膜電位下降)，所以粒線體可能參與了細胞凋亡的啟動和調節。而已有研究指出粒線體釋放的 cytochrome C 是誘導細胞凋亡的重要信號分子 [Liu et al., 1996]。Cytochrome C 從粒線體釋放而進入細胞質後，在 dATP 存在的狀況下與 Apaf-1 結合並啟動 Caspase-9，再啟動 Caspase-3 而導致細胞凋亡的發生 [Zou et al., 1997]。

在細胞形態與組織病理學上比較細胞凋亡與細胞壞死的不同。細胞凋亡經常由接受器-調節訊號 (receptor-regulatory signal) 所引發，如：荷爾蒙、細胞激素與生長因子 [Bursch et al., 1994; Chisari, 1995; Hayashi, 1998]。雖然細胞凋亡最初認為是一種正常細胞生理上的死亡現象，但在病理上也和病毒引起的慢性肝炎與猛爆性肝炎所造成的細胞死亡有關。藉由細胞凋亡來抗腫瘤，並應用在慢性肝炎與肝癌的治療，已經在動物模式與臨床治療上被證實 [Kerr, 1965; Kerr et al., 1972]。應用於肝細胞與肝癌細胞上，細胞凋亡的誘發物質已被研究出來的有醋酸環丙孕酮 (cyproterone acetate) [Bursch et

al., 1984]、二甲基亞硝胺 (dimethylnitrosamine) [Pritchard and Butler, 1989]、轉化生長因子 (transforming growth factor; TGF) [Lin and Chou, 1992]、環己烯胺 (cycloheximide) [Ledda-Columbano et al, 1992] 及 7H-二苯甲 (c,g) 亞氨基二亞苯 (7H-Dibenzol[c,g]carbazole; DBC) [O'Brien et al., 2000]。許多研究證實細胞凋亡與細胞壞死的發生和起始細胞密度與最初藥物處理的濃度有密切相關 [Bonfoco et al., 1995; Yeung et al., 1999]。肝細胞的死亡與許多肝功能障礙與肝功能退化的發病機制有關 [Kerr et al., 1972; Kerr et al., 1994; Hayashi, 1998]。

細胞凋亡為一個高度調節且需依賴能量來去除組織多餘或受損的細胞。漿膜為一個明顯且容易受傷的部位，當功能或是結構改變危及到漿膜的生理機能可以導致細胞死亡。大量的文獻研究漿膜的改變與許多可能會危及細胞完整性的關鍵變化中，而導致 Ca^{2+} 流入有關 [McConkey et al., 1989; Xu et al., 2001]。因此，在 Ca^{2+} 調控的過程中，會發生染色質的核小體上 DNA 的斷裂與細胞核蛋白的片段化 [Santella and Carafoli, 1997]。細胞內的鈣增加時，導致膜的變化也許與一般對於許多種細胞的死亡所接受的假說有牽連 [Kanduc et al., 2002]。發生在淋巴細胞或是其他細胞（如：肝細胞）所導致的細胞死亡中，蛋白質的抑制或 RNA 的合成作用為不可或缺的事情。在細胞凋亡過程中，細胞核與其內的 DNA 是重要的研究領域。並非所有 DNA 結合的複合物皆會誘發細胞死亡的產生，反而是蛋白質合成的抑制物（例如 cycloheximide）或 RNA 合成抑制物（例如 actinomycin D）才會誘發大規模的細胞凋亡現象 [Martin et al., 1990]。這些 TRADD、FADD/MORT、RIP、FLICE/MACH 及 TRAFs 基因與 TNF 接受器中 p60 與 p80 結構有關，另外也和 TNF 接受器 superfamily 有關 [Darnay and Aggarwal, 1997; Heyninck and Beyaert, 2001]。TNF 接受器相關因子和死亡區同系物為兩種不同家族的蛋白質。前致死基因包含 p53、ced-3/ICE proteases 及 Bax 家族，抗致死基因包括 ced-9/Bcl-2 及腺病毒蛋白質 E1B [Bromme and Holtz, 1996; Trump et al., 1997; Strater and Moller, 2000]。

五、DNA 微陣列於中草藥研發上的運用

基因微陣列晶片於 1990 年代發明，利用 cDNA 微陣列可以同時觀察很多基因的表現或抑制程度，除了用於偵測腫瘤 DNA 測序、基因突變、藥物篩選和遺傳圖譜的研究外。2000 年代初微陣列技術發展成熟，應用 DNA 微陣列在中草藥的研發，已是新的趨勢；癌細胞在中藥物的處理下的反應機制，以及哪些癌細胞能夠發生反應，哪些不能，也都是我們都可以迅速的從微陣列結果中作大範圍基因研究。科學中草藥裡，白芍、石斛(*Herba Dendrobii*)、金線蓮、牡丹皮(*Moutan Cortex Radicis*)、養肝丸(*Yan-gan-wan*)及黃連(*Coptidis rhizome*)的研究，已經被應用在 DNA 微陣列層面(表 1-4)，含有數百個凋亡基因的 DNA 微陣列，被應用在篩選經白芍處理後的 HepG2 細胞所誘發的基因表現 [Lee et al., 2002]。含有 16 種石斛屬 ITS1-5.8S-ITS2 序列的微陣列晶片，鑑別不同石斛物種 (*Dendrobium species*) [Zhang et al., 2003]。應用 9,600 基因的 DNA 微陣列偵測金線蓮在乳腺癌細胞 MCF-7 的基因表現，並發現金線蓮可以誘發 caspase 8 與 cytochrome c 基因高表現 [Yang et al., 2004]。牡丹皮可以減緩 PC12 細胞經過氧化氫處理後的傷害，經 DNA 微陣列偵測後，發現 HO 與 COMT 基因具有高表現量 [Rho et al., 2005]。養肝丸可以治療經 CCl₄ 誘發肝臟病變的小鼠，由 DNA 微陣列分析後，發現養肝丸可以抑制 CYP4A10 與 CYP4A14 基因在肝臟的表現 [Yang et al., 2005]。應用低密度的微陣列晶片，偵測以黃連處理的乳癌細胞株 MCF-7 與 MDA-MB-231，分析後發現增加 IFN- β 與 TNF- α 基因表現樣式 [Kang et al., 2005]。DNA 微陣列晶片在中草藥功能評估上，可以將體外試驗中經初步篩選具抗癌作用之中草藥萃出物用以處理癌細胞，再利用晶片檢測癌細胞中基因表現的變化，最後經由基因表現的結果來判讀中草藥療效的潛能與可能發生效能的轉機。

貳、材料與方法

一、中草藥水萃出物製備方法

由中藥房購得六種中草藥，分別為霍香 (*Agastaches rugosa*)、紫蘇 (*Perilla frutescens*)、防風 (*Saposhnikovia divaricatae*)、七層塔 (*Salvia Plebeia R. Brown*)、刺五加葉 (*Acanthopanax Senticosus L.*) 及石蓮花 (*Echeveria elegans*)。以上述六種中草藥個別用於萃取。個別秤取中草藥 50 公克浸泡於 1 L MQH₂O 中，加熱至 100°C 持續熬煮 1 小時，用抽氣過濾裝置過濾後，分別收集中草藥水萃出物之濾液，再經 5,000 rpm 離心 10 分鐘，取水溶液以冷凍乾燥機將其分別製成中草藥水萃出物粉末，放置保存於乾燥箱中保存備用。中草藥水萃出物的配製，秤取中草藥粉末 0.1 公克溶解於 10 mL 磷酸緩衝液 (phosphate buffered saline; PBS, pH 7.4)，經 0.22 μm Millipore filter 過濾後，儲放於-20°C 冰箱，使用前預熱至室溫。

二、細胞培養與處理方法

人類肝癌細胞株 HepG2 (ATCC CRL-10741; FIRDI, Hsinchu, Taiwan)，以含有 10% fetal bovine serum (FBS)、2 mM L-glutamine、Earle's BSS adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate、0.1 mM non-essential amino acids、1.0 mM sodium pyruvate、100 units/mL of penicillin 及 100 μg/mL of streptomycin 的 Minimum Essential Medium (MEM) 細胞培養液 (pH 7.4) 於 37°C 含有 5% CO₂ 的培養箱中培養。

當細胞生長的密度約 80-90% 滿時，進行繼代培養，移除細胞液，以 5 mL DPBS 浸洗，再以 0.5% trypsin-EDTA 溶液使細胞游離，以 1,000 rpm 室溫離心 5 分鐘後，移除懸浮液，細胞以 MEM 細胞培養液重新懸浮，逢機取少量細胞液以 trypan blue 染色，使用

血球計數器計算細胞數量，再取適量的細胞數至培養皿繼續培養，隔夜培養讓細胞可以修復及黏貼於培養皿表面，更換MEM細胞培養液，以進行以下實驗。

三、細胞存活率測試 (MTT cytotoxicity assay)

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 分析法為一種簡單且非放射性的快速呈色法 [Mossman, 1983]，主要應用在96-well細胞培養盤，其原理主要依靠粒線體中琥珀酸去氫酵素 (succinate dehydrogenase) 的作用將MTT的tetrazolium環還原為formazan，反應過程中，水溶性的黃色MTT會轉變為藍紫色的formazan結晶，MTT形成formazan的結晶僅在存活細胞中進行，且formazan形成量與細胞存活的數目呈正比，所以常被用來測定細胞的存活率，利用DMSO可以將formazan結晶溶出，並於550 nm波長下測定吸光值即可分析細胞存活率 [Hansen et. al., 1989]。以PBS溶解15 mg/mL MTT，再經0.22 μm Millipore filter過濾後，儲存於-20°C冰箱備用。

首先將HepG2細胞 (1×10^4 cells/well) 培養於96-well細胞培養盤中 (100 μL MEM細胞培養液中含有10% FBS) 12小時，以100 μL /well PBS浸洗細胞後，加入含有中草藥水萃出物與10% FBS的MEM細胞培養液，放入37°C培養箱處理72小時後，加入10 μL /well MTT (lot 66H5033; Sigma, Saint Louis, MO)；於37°C且含有5% 的CO₂培養箱培養4小時後，以PBS浸洗細胞後，加入100 μL /well DMSO溶解藍紫色formazan結晶 (加入DMSO後1小時內測定吸光值)，於室溫震搖30分鐘後，以免疫酵素分析儀 (Microplate Reader; BIO-RAD Model 3550) 讀取波長550 nm下之吸光值。

四、RNA製備

1. RNA萃取：HepG2細胞經過中草藥水萃出物處理後，為了修復其所受的損傷，會有許多基因開始轉錄、轉譯蛋白質來進行修復，要觀察基因表現可以從細胞的mRNA量來

判定，要抽取細胞的mRNA首先要把細胞內的total RNA抽取出來。以不同的中草藥水萃出物處理HepG2細胞72小時後，以5 mL PBS浸洗細胞兩次，每盤細胞加入1 mL TriSoltion Reagent (Cat No.TS100-plus; Gene Mark, Taipei, Taiwan) 把細胞溶解，並把溶液轉移至1.5 mL離心管，接著加入0.2 mL氯仿並充分混合，靜置室溫5分鐘，以4°C、12,000 x g離心15分鐘，藉由氯仿與TriSoltion Reagent中的苯酚使溶液中的蛋白質、DNA與RNA分層（依序為有機層、中間層與水層），將上清液抽取至新的離心管中，並加入等量體積的異丙醇，靜置室溫10分鐘，以4°C、12,000 x g離心10分鐘，移除上清液，加入1 mL 75%酒精進行酒精沉降法，以4°C、12,000 x g離心5分鐘，移除上清液，將沉澱物抽乾後，加入50 µL DEPC H₂O (diethylpyrocarbonate, RNase-free water)，保存於-80°C冰箱備用。

2. RNA 電泳膠的製備與電泳：秤取 1 公克的洋菜膠 (agarose) 粉末，置入含有 72.4 mL 的 MQH₂O 與 10 mL 的 10 X MAE (0.4 M MOPS、1 M CH₃COONa 及 0.01 M EDTA) 溶液中，混和均勻後，加熱使其完全溶解，待冷卻至約 60°C 時，加入 17.6 mL 甲醛混和均勻後倒入模型中。取 10 µL RNA 樣品加入 10 µL denature buffer (含有 1 µL 10 X MAE、2µL 甲醛及 7 µL 甲醯胺)混和均勻後，置於 65°C 乾浴槽 10 分鐘，加入 2 µL loading buffer (含有 50% glycerol、1 µM EDTA、0.4% bromophenol blue 及 0.4% xylene cyanol)，再進行 80V 電泳 1.5 小時 (電泳溶液為 1 X MAE) 後，將膠體置於 0.02% ethidium bromide 溶液中染色 5 分鐘，再浸置於 MQH₂O 中並輕微搖擺震盪至膠體中多餘的 ethidium bromide 去除為止，並經膠體置於 UV 燈箱上照相分析。

3. RNA Cleanup：以 RNeasy Mini Protocol for RNA Cleanup kit (cat. No.74104; Qiagen, Valencia, CA) 進行 RNA Cleanup，將 Total RNA 以 DEPC H₂O 稀釋體積至 100 µL，加入 350 µL Buffer RLT 與 250 µL 100% ethanol 充分混合，將混合液移至組

裝好 2 mL collection tube 的 RNeasy mini column 中，以 11,000 rpm 離心 15 秒，移除下層液，加入 0.5 mL Buffer RPE 潤洗 column 中的 RNeasy silica-gel membrane，以 11,000 rpm 離心 2 分鐘，重複潤洗兩次後，將 column 移至新的 2 mL collection tube 以 11,000 rpm 離心 1 分鐘，於 column 中直接加入 30 μ L DEPC H₂O 於 RNeasy silica-gel membrane 上，靜置室溫 30 分鐘後，column 移至新的 1.5 mL 離心管，以 11,000 rpm 離心 2 分鐘，將收集 RNA 儲放於 -80°C 冰箱備用。

五、cDNA 微陣列分析

主要的實驗流程 (圖 2-1) 為由經中草藥與 PBS 處理後的 HepG2 細胞中萃取 RNA 後，在進行 RT-PCR 中標的上 Cy3 或 Cy5 螢光物質，再與 cDNA 微陣列作雜合作用，以 GenePix 掃描器由晶片上擷取資料後，使用 Cluster 3.0 作資料的分析。

1. 晶片前處理：將含有 7,680 個 spots 的人類 cDNA slides (UniversoChip 8K-1; AsiaBioinnovations Co., Newark, CA) 面朝下的放置在含有 1 X SSC 溶液與飽和水蒸氣的恆溼槽 (humid chamber) 中約 5-15 分鐘直到晶片上的 spots 飽和，迅速將 slides 放置在加熱板 (70~80°C) 2-3 秒使水氣蒸發，放入 Stratalinker 中，接著將 slides 上的 cDNA spots 以 65 mJ UV 光照射，slides 放入 slide rack 以 0.2% SDS 溶液慢速震盪 10 分鐘，再置於 2 L ddH₂O 上下浸洗 10 次後，放入 95°C ddH₂O 中 2 分鐘，快速將 slides 拿起放入 100% ethanol 慢速震盪 5 分鐘，以 1,000 rpm 離心 5 分鐘，將 slides 快速放入保存盒中，放入乾燥箱中備用。

2. cDNA 螢光探針製作 (以 Cy3 或 Cy5 標的 cDNA targets)：HepG2 細胞經過 PBS 與不同中草藥水萃出物處理 72 小時後，抽出 total RNAs，以 Cy3 標的對照組 RNAs (HepG2

細胞以 PBS 處理)，而以 Cy5 標的實驗組 RNAs (HepG2 細胞以不同中草藥處理)。Cy3 與 Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 為螢光標的物，所有的反應需要在避光的環境下進行。

取 30 μg RNA，加入 1 μL Oligo-dT (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 以 DEPC H₂O 補充體積至 15 μL ，混合液放置於 70°C 處理 10 分鐘後，迅速放在冰上，再加入 1 μL dNTP 混合液 (含有 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP 及 8.5 mM dTTP)、6 μL 5 X first-strand buffer (250 mM Tris-HCl: pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)、3 μL 0.1M DTT (0.1 M)、2 μL Superscript II (200 U/ μL ; partNo53030; Invitrogen, Carlsbad, CA) 與 3 μL 的 Cy3-dUTP 或 Cy 5-dUTP (1 mM) 均勻混合後，放置 42°C 作用 3 小時。作用完成後置於冰上 10 分鐘，加入 15 μL 0.1 N NaOH 及 2 mM EDTA 的混合液，並於 65°C 作用 30 分鐘後，迅速置於冰上 5 分鐘，再加入 15 μL 0.1 N HCl，將標的好的 ss-cDNA (single-stranded cDNAs) 以 PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany) 純化，步驟包含將標的好的 ss cDNA 緩緩加入 320 μL buffer PB 中，再將混合液移至組裝好 2 mL collection tube 的 RNeasy mini column 中，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘後，加入 600 μL wash buffer PE，以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，直接加入 30 μL Buffer EB (10mM Tris-Cl, pH 8.5) 潤洗 column 中的 RNeasy silica-gel membrane，再以 13,000 rpm 離心 1 分鐘，收集含有標的螢光的 ss cDNA 探針濾液。測量波長 260 nm 下標的好的 ss cDNA 體積，並以波長 550 nm (Cy3) 及波長 650 nm (Cy5) 下檢測螢光強度。

3. cDNA 微陣列雜合作用：將 30 μL 標的螢光的 ss cDNA 探針中，依序加入 6 μL 20 X SSC、0.5 μL 10% SDS 及 6 μL 含有 20 μg Cot1 human DNA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Cat No.15279-011; Invitrogen)、20 μg polyA RNA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, No.P9403; Sigma) 及 20 μg tRNA (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; No.15401-011, Gibco-BRL) 的混合液。將探針以 100°C 加熱 2 分鐘後，迅速置於冰上，以 13,000 rpm 離心 5 分鐘，小心吸取標的螢光的 ss cDNA 探針於含有 cDNA 的微陣列玻片上，緩慢小心蓋上 24 mm \times 50 mm 蓋玻片 (避免氣泡產生)，

放置玻片於可維持濕度的 slide chamber 中，放置 60°C 水浴槽 16 小時，進行 cDNA 微陣列雜合作用。

經過 16 小時的 cDNA 微陣列雜合作用，首先將微陣列玻片快速輕放入裝有 400 mL 60°C 的 2 X SSC 與 0.03% SDS 混合液的染缸中，使蓋玻片輕輕滑落，將 slides 以 rack 固定，置入 400 mL 的 2 X SSC 與 0.03% SDS 混合液，以室溫震盪清洗 10 分鐘，400 mL 1 X SSC 溶液震盪清洗 5 分鐘，400 mL 0.2 X SSC 溶液震盪清洗 5 分鐘，400 mL 0.1 X SSC 溶液震盪清洗 5 分鐘後，以 1,000 rpm 離心 5 分鐘去除 slide 上的水分。

4. cDNA 微陣列的掃瞄：經過雜合作用的 cDNA 微陣列以 GenePix 4,000A 掃瞄器 (Axon Instruments Inc., Foster City, CA) 掃瞄，使用的激發波長為 635 nm (Cy5) 與 532 nm (Cy3) 兩種波段的雷射，經由光電倍增管 (photo multiplier tubes; PMT) 轉換為高解析度 (10 micron pixel) 的影像，調整波長 635 nm 與 532 nm 的光電倍增管的強度 (100 to 1,000 V)，來平衡 Cy5 與 Cy3 這兩種不同螢光染劑的強度，並對於傳統灰階 (tagged image file format; TIFF) 的影像檔限制飽和度，從 cDNA 微陣列上擷取的影像以含有完整的自動影像處理系統 Axon GenPix Pro-4.0 軟體 (Axon Instruments Inc.) 分析，可以作快速的影像分析並將影像轉換成一整批的數據模式，主要的特性包含 spots 的尋找與定位、估計干擾訊號及縮小資料在操作過程中的失誤，在資料分析中，每一 spot 的原始訊號會減去背景值，軟體在訊號太弱的數值也會標上“Flag”，正規化 Cy5 與 Cy3，並將 Cy5/Cy3 的數值與全部微陣列資料作比較。

5. 群集分析 (cluster analysis)：由 Eisen 實驗室 (<http://www.genome.wi.mit.edu>) 開發的 cluster 3.0 程式為一個具有區分性、凝聚性、多重選擇性的群集 (clustering) 分析方法，主要應用在分析微陣列中基因的表現。此程式在每一個微陣列實驗中，提供正規化每一基因的數值，主要是使用晶片上所有基因數值平均值的比值作為正規化的標

準並過濾資料。由每一實驗組中平均這些數值，並估計同樣基因的數值平均，在特定的狀況下會有些表現相關的基因具有再現性。全部基因的表現量經過與基準數值比較後，作有意義的調整，篩選後的比值再利用 \log_2 的轉換來量化基因的表現。平均聯結 (average linkage) 的系統叢集分析可以進行組織基因表現的資料。2D Cluster analysis 的方法 [Alon et al., 1999; Lee, 2002] 不只可以組織每一基因間的關連性，作基因間的重新排列，也可對於每一微陣列間的基因表現數值作分析。基因表現樣式的數值經過由 Eisen 實驗室所提供的 TreeView 軟體 (<http://www.genome.wi.mit.edu>) 分析後，可以把比較不同基因間表現量的相關性以樹狀圖表示。自組圖分析 (self-organizing maps; SOMs) 主要是以含有相同資料數的參考向量為主，作一個連續的分割，被分割的部分在一個預設變數的幾何學結構 (geometrical configuration) 中，例如二維網格 (two-dimensional grid)。分配基因到被分割的部分，主要是隨機挑選基因，再放入對於基因表現趨勢最相關的參考向量中。最後，基因由最相似的基於參考來被放置到適合的分割部分 [Sherlock, 2000; Lee, 2002]。自組圖分析法為數學上 Cluster analysis 的一種，尤其適合將多方面資料分類，以及辨識具複雜獨特性的資料。逐步叢集分析 (k-means clustering) 與自組圖分析方法相似，主要是將參考向量 (reference vectors) 分為數個部分，但每一部份並不互相直接影響。使用逐步叢集分析與自組圖分析方法可以更能組織每一個叢集作系統叢集分析。Cluster 3.0 程式可以執行計算分析使資料具體化，此軟體著重在樣式的表現高於基因表現的絕對數值。

六、Annexin V-FITC 螢光染色

經由凋亡途徑而走向死亡一途的細胞，因過程中會將細胞膜內帶負價的磷脂質翻轉於細胞膜外，Annexin V (分子量 35~36 KD) 為一種二價鈣離子依賴性磷脂質結合蛋白，屬於近幾年發現的 annexins 蛋白質家族，含有抗凝血的特質，對於帶負價的磷脂質 (例如 phosphatidylserine) 具有高結合力的鍵結，但對於 phosphatidylcholine 與

sphingomyeline 為低親和性，所以可以用來偵測凋亡的細胞。

Annexin V 經由 FITC 螢光的標定，再以流式細胞儀分析每顆細胞的狀態，可以對產生細胞凋亡作用的細胞作定量與定義。以 FITC-Annexin V (綠色螢光) 與 propidium iodide (紅色螢光) 同時染細胞可以區分出未受損的活細胞 (FITC⁻/PI⁻)、細胞凋亡早期細胞 (FITC⁺/PI⁻) 及細胞凋亡晚期或細胞壞死的細胞 (FITC⁺/PI⁺)。而實驗中使用的 Partec CyFlow (CyFlow®SL, Peak Technology Co. Ltd., Münster, Germany) 細胞流式儀具有 FL1 (525nm)、FL2 (575nm) 與 FL3 (630nm)，參考使用的螢光標的物 PI 的 excitation wave (342nm, 495nm) 與 emission wave (639nm)；以及 Annexin V excitation wave (490nm) 與 emission wave (519nm)，因此選擇以 FL1 作為 X 軸 (Annexin V)，FL3 作為 Y 軸 (PI) 來作細胞的 gating。

使用 Annexin V 細胞凋亡測試劑組 (Cat No:FC007P; Gene Research Lab. Co. Ltd., Taipei, Taiwan) 來分析中草藥萃出物對於 HepG2 細胞的影響，先將 HepG2 細胞 (3×10^5 /well) 培養於 6-well 細胞培養盤中 (2 mL MEM 細胞培養液中含有 10% FBS) 12 小時，以 2 mL/well PBS 浸洗細胞後，加入含有中草藥水萃出物與 10% FBS 的 MEM 細胞培養液，放入含 37°C 含有 5% CO₂ 培養箱處理 72 小時後，以 0.5 mL 0.5% 的 trypsin-EDTA 溶液使細胞游離，再以 1,000 rpm 室溫離心 5 分鐘後，移除懸浮液，細胞 pellets 藉由冰 HBSS 溶液重新懸浮細胞並清洗兩次，加入 1 X Solution A (1×10^6 cells/mL; annexin V binding buffer)，經 200 x g 室溫下離心 5 分鐘，去除懸浮液，加入 100 μ L 的 1 X Solution A (1×10^6 cells/0.1mL) 重新懸浮細胞後，再加入 2 μ L 的 Solution B (標定上 FITC 的 annexin V 的抗體) 與 5 μ L 的 Solution C (PI)，均勻的混和後，避光置於室溫 15 分鐘，加入 1 mL 的 Solution E (running buffer)，並以 Partec CyFlow 流式細胞儀分析，並以 Partec FloMax 程式分析 FL1(525 nm)與 FL3(630 nm) 的細胞資料，最後以 WinMDI (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry) 程式 (<http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/software/Winmdi.htm>) 分析 2 維統計圖。

本論文中實驗的 threshold 判斷是以 Kit 所附的 Solution D (apoptosis inducer) 作為 positive control 來區分 Annexin V+/PI+ (late apoptotic or necrotic cells)、Annexin V-/PI+ (damaged cells)、Annexin V+/PI- (apoptotic cells) 及 Annexin V-/PI- (live cells) 等四類細胞，調整 threshold 倍數的判別，先以無加藥處理且 unstain 的 HepG2 細胞先 gating SSC 與 FSC 散射光譜圖中的 R 區域，而經 Argon (488 nm) 激發後，來作 R 區域中的 PI (FL3/630nm) 與 Annexin V (FL1/525nm) 的判別，而 FL1 與 FL3 二維圖的 R1 (PI+/Annexin V+) 與 R2 (PI-/Annexin V+) 區域的劃分，為 HepG2 細胞經 apoptotic inducer 處理後，以 PI stain 區分 FL3，再以 Annexin V stain 來區分 FL1，最後 gating R1 與 R2 區域。FITC 所標定的 Annexin V 經激發後，呈現綠色螢光，而 PI 為紅色螢光可標定 DNA (一般用為檢測細胞週期)，可與 Annexin V 搭配來區分不同狀態的細胞，作為後續研究的細胞分類依據。



參、結果與討論

一、細胞存活率測試

使用紫蘇、霍香、防風、刺五加葉、石蓮花及七層塔等六種中草藥的水萃出物處理人類肝癌細胞 HepG2，來測試抑制細胞增生作用的效果影響。經過以濃度分別為 0、25、50、100、200、400 及 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的中草藥水萃出物處理 HepG2 細胞 72 小時，同時以 PBS 處理的細胞為對照組，再使用 MTT 測定 HepG2 細胞的存活率。圖 3-1 所示為六種不同中草藥水萃出物的不同濃度處理，抑制 HepG2 細胞增生的結果。在濃度為 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理下，抑制 HepG2 細胞生長的效率分別為霍香 $39.0 \pm 2.5\%$ 、紫蘇 $51.4 \pm 1.9\%$ 、防風 $30.3 \pm 2.4\%$ 、石蓮花 $28.9 \pm 2.0\%$ 、刺五加葉 $31.2 \pm 1.8\%$ 及七層塔 $7.86 \pm 1.2\%$ ；在濃度為 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下，抑制 HepG2 細胞生長的效率依序分別為霍香 $57.3 \pm 2.3\%$ 、紫蘇 $78.5 \pm 1.8\%$ 、防風 $51.3 \pm 2.2\%$ 、石蓮花 $50.4 \pm 2.1\%$ 、刺五加葉 $50.2 \pm 2.0\%$ 及七層塔 $19.8 \pm 1.3\%$ 。在六種中草藥水萃出物中，七層塔對於 HepG2 細胞生長抑制的效果比其他五種中草藥低，所以取紫蘇、霍香、防風、刺五加葉及石蓮花的抑制細胞生長 50% 的濃度依序約為 100、300、400、400 及 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 進行 cDNA 微陣列分析。在篩選抗癌中草藥的效應評估上，包含以下三項：(1) 提升個體免疫力以殺死癌細胞或抑制癌細胞，提升個體免疫力的指標應為激活 B 細胞或 T 細胞增生或分化的能力 [Chen et al., 1995]；(2) 抑制癌細胞生長 [Yoo, 2002]；(3) 令癌細胞發生細胞凋亡作用 [Bonfoco et al., 1995; Yeung et al., 1999]。近幾年來，中草藥對於抑制肝癌細胞生長的研究，漸漸受到重視，白芍對於抑制 HepG2 與 Hep3B 細胞生長的 IC_{50} 分別約為 4.6 與 4.4 mg/mL [Lee et al., 2002]；粉防己鹼抑制 HepG2 細胞生長的 IC_{50} 約為 9 μM [Yoo et al., 2002]，皆用於探討中草藥誘使肝癌細胞產生 DNA 片段化的情況，此外探究基因的表現，除了使用傳統的 PCR 技術之外，也可以利用接下來所使用的 cDNA 微陣列分析，並在短時間內同時檢測成千上萬個基因的表現。

二、微陣列分析

1. 微陣列影像

微陣列技術的發展可以同時偵測上千個或上萬個基因的表現，人類 UniversoChip 8K-1 的 cDNA 基因晶片 (AsiaBioinnovations Co., Newark, CA) 含有 7,680 個基因或 EST 序列，用來分析 HepG2 細胞經由中草藥水萃出物處理後的基因表現圖譜 (gene expression profile)。以紫蘇、藿香、防風、刺五加葉，石蓮花及 PBS (對照組) 處理 HepG2 細胞 72 小時，抽取細胞 total mRNAs，經 RT-PCR 標的上螢光 Cy3 (對照組 total RNAs) 或 Cy5 (實驗組 total RNAs)，在 cDNA 基因晶片上進行競爭性雜合作用後，以自動影像處理系統 Axon GenPix Pro-4.0 軟體掃瞄，擷取 cDNA 基因晶片上 7,680 個 spots 的 Cy3 與 Cy5 表現的數值，約 50% 個基因被篩選出來作為 Cluster 程式分析，探討以不同中草藥處理肝癌細胞 72 小時後的基因表現樣式。篩選的條件主要先扣除 spots 的螢光亮度小於晶片背景值與飽和點 (Cy3 與 Cy5 的數值超過儀器所能測量的範圍)，並刪除晶片上有污損的 spots，自動影像處理系統 Axon GenPix Pro-4.0 軟體會在有不同污損的情況下，圈選適當 spot 的圓形範圍，當影像訊號高時，訊號範圍圈選，可以讓影像的擷取正確性提高 (圖 3-2D)，但是當有影像出現污損或背景值高的狀況出現時 (圖 3-2E)，分析軟體會圈選出訊號低 spots 的位置，且會把污損或具有雜質干擾的 spots 也作訊號擷取，而造成結果誤差的產生，在本研究中，為了避免此狀況產生，所以會先把這些區域所涵蓋的 spots 刪除，並留下訊號強度大於 Cy3 (532 nm) 與 Cy5 (635 nm) 螢光背景值加 2 倍標準差 ($\% > B_{532} + 2SD$ 或 $\% > B_{635} + 2SD$) 的 spots。圖 3-2A-C 為 cDNA 微陣列分析五種中草藥處理 HepG2 細胞中，紫蘇、藿香與刺五加葉處理後基因表現的影像結果，圖 3-2B 中，基因晶片影像的右下角具有雜質亮點造成區域的污染為 cDNA 微陣列實驗過程中的會發生的問題之一 [Martinez et al., 2003]，再進行篩選與正規化的處理前，會刪除此區域所涵蓋 spots 的 Cy3 與 Cy5 數值。在五種

不同中草藥水萃出物處理的晶片影像中，發現微陣列矩陣中（圖 3-2F-H）具有晶片本身所產生的誤差，因為不同的處理下，影像的結果卻幾近相同，分析前也刪除此區域的 spots。飽和點或是經灰塵所造成的污染、樣品的污染及片基本身的不均勻性，而使掃描出的影像存在較大的雜質亮點或部分區域的污染，會避免放入微陣列分析中，因為由影像分析所擷取出的資料需要以前處理的方式來扣除訊號較弱的 spots，再經正規化來移除許多掃描系統上可能帶來的誤差，才繼續做後續的 Cluster analysis [Leung and Cavalieri, 2003]。

2. 微陣列正規化

微陣列分析正規化是平衡兩種標定螢光物質的螢光強度，主要目標是移除實驗時所產生的誤差 [Martinez et al., 2003]。為了降低錯誤機率，並且有效率的完成與合理的說明大量基因數值，所以對每一個基因作 Cy3 與 Cy5 數值的過濾篩選與正規化處理。使用雙色螢光標記的微陣列實驗中，激發能量、激發效率以及為微陣列背景值皆為影響實驗結果的原因，因此不會直接計算圖像間擷取的影像結果，因此會將結果資料進行正規化處理再做後續的統計分析，以總值標準化法（公式一）取得標準化係數，再以雙色螢光訊號比例值（公式二）來代表基因表現的層次，資料經 Cluster 3.0 Manual 以 \log_2 的轉換後，高表現和低表現的基因數值可以在同一基準點上作比較 [Quackenbush, 2002]，原始比例為 1 以下的數值，取 \log_2 後為負值，原始比例 1 以上的數值，在取 \log_2 後為正值（在 Java TreeView 軟體所繪製的樹狀圖中，負值以綠色表示，正值以紅色表示）。由紫蘇、藿香、防風、刺五加葉及石蓮花水萃出物處理 HepG2 細胞的 cDNA 微陣列影像結果所擷取的 Cy3 與 Cy5 數值，晶片上 7,680 個 spots 經過過濾篩選後，平均 4,000 個基因做正規化的過程，為每一個基因 Cy3 與 Cy5 數值個別經過 \log 轉換後，再放入 Cluster 3.0 程式分析。

3. 標準常態分佈分析

常態分佈 (normal distribution) 又稱高斯分佈 (Gaussian distribution) 在數據分析上較容易處理，且圖形為鐘形曲線 (bell-shaped curve) 再加上對稱性，很適合當做母體之機率模式。由中央極限定理 (central limit theorem) 可知常態分佈可當做實驗族群的近似分佈。分佈是變項中所有數值出現次數的分佈情形，以橫軸為變項數值，縱軸為出現頻率的座標圖呈現，而標準常態分佈是以平均值為中心，標準差為座標軸所繪之常態分佈圖，可表示整體數值的分佈狀況。經過五種中草藥水萃出物處理的微陣列數值，比較經正規化處理後，再以標準化運算基因間 Cy5/Cy3 比值的標準常態分佈數值 (例如平均值為 0，變數為 1) 結果於圖 3-3，在常態分佈計算時 (公式三) 以 μ 為 0 而 σ 為 1 時的圖形，在 SAS 分析結果所舉列的數值中，偏態係數 (skewness) 表示資料分佈是否對稱。越偏向常態分佈 (分佈圖形會比較對稱) 則數值越趨近 0；峰值係數 (kurtosis) 表示分佈圖整體分佈呈現狀況，越偏向常態分佈 (分佈圖形會比較高狹) 則數值也亦趨近於 0，不同中草藥處理的偏態係數經 SAS (strategic applications system) 程式分析結果為紫蘇 0.52、霍香 4.79、防風 7.67、刺五加葉 3.81 及石蓮花 0.06，峰值係數為紫蘇 0.06、霍香 59.15、防風 123.93、刺五加葉 48.39 及石蓮花 0.08 (表 3-1)。當偏態係數的殘差 (residuals) 接近零或等於零時，由線性模式中可得到最小的偏態係數 [Durbin and Rocke, 2003]，主要意指在線性模式的分析下，當偏態係數的殘差越接近零時，偏態係數也越小，而整體數值的分佈趨勢也越符合常態分佈，而殘差在統計學上的定義為觀察值與預測值的差，因此殘差數值越大時表示誤差越大，而線性模式的分析中，定義為應變數與自變數間具有線性的關係。五種中草藥處理 72 小時後，基因表現樣式標準化後，結果偏態係數皆大於零，基因表現樣式族群的分配偏向右側，而峰值係數皆為正，基因表現樣式族群的分配在常態分佈的鐘形曲線為偏高且窄，霍香、防風與刺五加葉處理後的基因表現族群相較於紫蘇與石蓮花處理的基因表現樣式集中，由常態分佈的結果可知，在霍香、防風及刺五加葉處理的微陣列分析中，比起紫蘇或石蓮花處理的微陣列分析，更具有相似的分佈圖。數值間相關性的分析與基因的表

現有關 [Covell et al., 2003]，分析的結果可以反映出整個基因族群調控的分佈趨勢。

4. 相關係數與 ANOVA 分析

使用 SAS 程式檢測資料點的分佈是否集中或分散，對於不同中草藥處理後，基因表現樣式的數值分佈情況，以 spearman 相關係數來分析五種不同中草藥處理後基因表現變化的相關性 (表 3-2)，列出不同中草藥處理結果間的相關係數，因此可以做兩兩微陣列結果間相關性的探討，以 SAS 程式進行 sperman 相關係數分析，分析結果以棋盤式方格來表示兩兩中草藥間的相關性，相關係為正的表示兩種中草藥對於處理 HepG2 細胞所造成的基因調節趨勢雷同 (一同增加或一同減少的趨勢)，相關係數越高兩者間的趨勢越相近。其中霍香與紫蘇處理後，誘發的基因表現樣式的相關係數為 0.72，刺五加葉與紫蘇處理後，基因表現樣式的相關係數為 0.71，而霍香與刺五加葉處理後，基因表現樣式的相關係數更高達 0.80，具有高度正相關。再應用 SAS 程式中的單因子變異數分析 (the analysis of variance; ANOVA) 來分析中草藥處理後基因表現樣式間的差異，結果 $Pr (> F)$ 值 < 0.001 ，指出五種不同中草藥的處理對於基因表現樣式變化的影響極顯著不完全相同 (***) (此單因子變異數分析是以 SAS 跑出的結果來寫，並無列表，此檢定方法所跑出的結果，可以看出五種不同中草藥的處理顯著不完全相同)，以 SAS 程式檢測資料集中或分散的方法探討主要為前文所提到的常態分佈圖的分析，而最後以 ANOVA 進行單因子變異數分析，主要是探討不同中草藥處理間，引發基因表現的趨勢是否可以歸類為一組，處理均值差異比較的方法很多，利用 SAS 程式檢測並綜合前面所列的數值分佈結果，以圖 3-3 的常態分佈圖、偏態係數及峰值係數的結果來說明資料點的分佈。以 Tukey 公正顯著差異法 (Tukey's honest significant difference; HSD)、鄧氏新多變測驗法 (Duncan's new multiple range test; MRT) 與最小顯著差異值 (least significant difference test; LSD) 檢測不同中草藥處理後的基因表現樣式間的差異性比較 (表 3-3)，三種分析方式分別歸納個別五組數據間的相關性，Tukey 分群的结果指出，紫蘇與刺五加葉處理後的基因表現樣式為一群，刺五加葉與霍香處理後產生

的基因表現樣式為一群；而鄧氏測驗法與最小顯著差異值測試的結果皆指出刺五加葉與霍香為一群。五種中草藥中，霍香與刺五加葉所誘發 HepG2 細胞產生的基因表現樣式趨勢相似。ANOVA 的結果比較相關係數分析的結果，刺五加葉與霍香；刺五加葉與紫蘇，皆具有高度正相關，且被分為一群。為了探討不同基因以及不同中草藥處理之間的關連性，除了以 SAS 程式中的 ANOVA 與相關係數分析外，還有對於基因表現樣式的分析方法是以逐步叢集分析方法 [Koggalage and Halgamuge, 2004] 與自組圖分析 [Tamayo et al., 1999; Covell et al., 2003; Garrigues et al., 2005] 來探討基因彼此之間表現的相關性，逐步叢集分析法是把基因表現樣式的數值作一個分類，獨立的數值間並無階層 (hierarchy) 上的關係；自組圖分析方法是將數值投入一個預設變數的幾何學結構，數值間具有關連性，此兩種方法皆屬於把相似的基因表現作 clustering 與視覺化 (visualization)。

5. 逐步叢集分析

微陣列的分析方法中的叢集分析是直接比較樣本中各指標間的差異，把相同性質的歸為一類，差異較大的歸為另外一類。逐步叢集分析方法為給定分群的參數後，每一個數值視為獨立無相關連性的個體，將資料投入分群 [Tavazoie et al., 1999]，分析五種中草藥水萃出物處理 HepG2 細胞後，cDNA 微陣列上每一個基因表現樣式強度的叢集結果，以 Java TreeView 軟體顯示樹狀圖於圖 3-4。每一種中草藥水萃出物處理後，約有 7,000 個或以上的基因表現樣式被偵測到，經過多重的篩選分析及正規化處理後的基因，以平均 4,000 個基因經 log 的轉換後，作逐步叢集分析，分為 20 群叢集。每一個基因的表現量以綠色表示 Cy5/Cy3 的比值為負，而紅色表示 Cy5/Cy3 的比值為正。每一個叢集中的基因平均樣式以 Y 軸表示，而 X 軸為不同的中草藥水萃出物處理。圖示中的 A 至 E 分別為以紫蘇、霍香、防風、刺五加葉及石蓮花處理 72 小時。為了要觀察五種中草藥處理後，基因表現的趨勢，每一個基因的表現量經由基因叢集的方式中的逐步叢集分析方法來尋找最佳叢集的分類。分析結果可以顯示基因族群的分布，計算數值

間矩陣 (matrix) 的距離。由叢集 1 至 20 中，每一個叢集中的基因數目依序為 169、455、72、271、165、15、16、117、174、417、119、540、249、213、289、9、172、35、303 及 200。比較叢集 1 至 20 中，叢集 3、5、6、7 及 16 具有相似的平均基因表現樣式，尤其是在刺五加葉與防風處理後平均基因表現比值比起其他三種中草藥水萃出物的處理來的高。叢集 11、14 與 20 的基因表現趨勢相近，五種中草藥處理中，以防風處理的 HepG2 細胞的平均基因表現樣式最高。在叢集 4、12 及 18 中，刺五加葉水萃出物處理後的基因表現相近，且比其他四種中草藥所誘發的平均基因表現樣式低，而防風處理後平均基因表現樣式高於其餘中草藥水萃出物的處理。

6. 自組圖分析

自組圖分析法與逐步叢集分析法相似，皆為叢集分析方法的一種，自組圖分析法由 Teuvo Kohonen 在 1980 年提出，早期應用在基因組的分析 [Chu et al., 1998; Tamayo et al., 1999]，自組圖分析主要是在二維的空間中，決定 X 與 Y 的參數值，在將要分析的基因引入並分群。分析五種不同中草藥對於基因表現樣式間的影響，投入經篩選、過濾及正規化後平均約 4,000 個的基因做自組圖分析 (4×5 SOM)，分為 20 個叢集，結果以 Java TreeView 軟體畫出分佈的樹狀圖 (圖 3-5)。每一個叢集的基因數量 (相關係數) 依序為 230 (0.6)、137 (0.6)、57 (0.8)、49 (0.6)、140 (0.3)、943 (0.5)、578 (0.4)、186 (0.6)、197 (0.5)、206 (0.3)、247 (0.3)、158 (0.6)、174 (0.6)、184 (0.4)、73 (0.3)、72 (0.6)、68 (0.6)、139 (0.5)、37 (0.8) 及 125 (0.3)。為了簡易的表示分類叢集中，基因表現樣式的變化，將每一個叢集中的基因平均樣式以 Y 軸表示；而 X 軸表示不同的中草藥水萃出物處理，圖中的 A 至 E 分別為以五種不同中草藥處理 HepG2 細胞 72 小時。每一個基因表現樣式的變化經由自組圖叢集分類的方式來獲得最佳叢集的分類。比較分類叢集 1 至 20 中，叢集 1、2、3、4、8、12、13、16、17 及 19 達到高度正相關 (相關係數 0.6 以上)，其中叢集 3 與叢集 19 相關係數為 0.8 以上，其他的叢集雖然未達 0.6 以上，但仍具有中度正相關 (0.3 以上)。分類在同

一叢集的基因，具有相似的平均基因表現樣式，比較以逐步叢集分析與自組圖分析間的差異，逐步分析法為獨立變數間的分析，依照所給的群數做分類，計算變數與變數間的距離，將最適合分類在同一叢集的變數歸為一類；而自組圖分析是以變數間的相關係數做一分類的依據，雖然由 Java TreeView 軟體所顯示樹狀圖中，無明顯的分類標記，但叢集與叢集間的相關係數可以由程式中點選得知。不同基因表現樣式間的變化差異，經由樹狀圖來表示每個基因間的相關性。

7. 基因表現

中草藥物對於肝癌細胞的處理，不論是抑制生長或誘發細胞凋亡作用皆為複雜的細胞生理作用，由多條生理生化途徑交叉串連構成 [Fadok et al., 1992; Liu et al., 1996; Nagata, 1997]，透過少數幾個基因表現儘管可說明中草藥抗癌效應可能產生的途徑，但微陣列的分析同時提供上萬個基因的偵測，更可以推測細胞生理途徑中，上下游基因的表現機制。在許多基因的功能性種類中，基因表現樣式常被探討，對於細胞凋亡、細胞增生、細胞壞死及細胞死亡相關的基因經過 Cluster 3.0 程式的分析後，作基因表現樣式的討論。表 3-4 為與細胞凋亡作用相關的基因表現樣式，經過叢集分析後，基因表現樣式的 Cy5/Cy3 數值列於表中，主要分為三個基因群，第一群基因群為具有低表現量（ $Cy5/Cy3 < 0.5$ ；綠色表示）的細胞凋亡作用相關的基因，含有 UBE2M、CFLAR、PLINP-1、UBE2I、PSMA6 及 RELA 等基因。第二群基因為具有高表現（ $Cy5/Cy3 > 2.0$ ；紅色表示）的細胞凋亡作用相關基因，含有 BID、MLC-B、FASTK、PSMB6、PSMB8、PSMB1 及 E2F4 等基因。第三群基因為與細胞凋亡途徑相關的基因，包含 BAK1、BCL2、BCL2L2、BIK、BNIP3L、CASP3、CASP8、CASP9、CFLAR、FADD 及 FAIM2 等基因。使用五種中草藥分別處理後，在細胞凋亡作用相關基因中具有低表現量的 RELA 為 NF- κ B p65 subunit，而 PSMA6 為 proteasome subunit- α -type-6。B 型肝炎病毒基因轉殖小鼠（HBx transgenic mice；p21-HBx）的腫瘤細胞經 2-DE 分析後，PSMA6、PSMB4、PSMC2 與 PSMD12 具有高表現量 [Cui et al., 2006]。NF- κ B 為啟動促進腫

瘤及腫瘤血管成長之蛋白質表達的一種轉錄因子，也可阻礙細胞凋亡作用，造成癌細胞不滅的延續，HepG2 經 interferon- α (IFN α) 或酒精處理後，會使 NF- κ B 活化，藉由 TNF α 或 NF- κ B 和 IFN α 的結合物可以讓 I κ B α 快速分解，IFN α 可以增加 HepG2 細胞對於 TNF α 活化的靈敏度，並增加單核球炎症性的細胞激素，尤其是 IL-2 的產生 [Szabo et al., 2001]，癌細胞中會大量表現 NF- κ B 而刺激生長，而 I κ B α 在癌細胞中為低表現量（與正常肝細胞比較），p50 (NF- κ B1) 與 p65 (RelA) 為 NF- κ B 的 subunit，肝癌細胞 SMMC7721 中轉殖入突變的 I κ B α (mI κ B α) 質體，可以抑制 NF- κ B 活性與癌細胞的生長 [Wang et al., 2003]。在豬隻血管中注射 Doxorubicin 後 24 小時，HSP72 (heat shock protein 72) 在肝臟中大量表現，但 NF- κ B p65 並無明顯的表現，於 stop-flow 化學治療結束，30 分鐘時，NF- κ B p65 的濃度為最高點，然後在 6 小時內，緩慢的下降 [Lu et al., 2005]。經紫蘇與刺五加葉分別處理後，具有高表現的 FASTK 為 FAST kinase，在 Fas 途徑的細胞凋亡作用，FASTK 會被快速的活化，當 FASTK 被快速的去磷酸化時，會伴隨 TIA1 (細胞核中 RNA 的結合蛋白質，含有細胞凋亡作用的 effector) 的磷酸化，而 TIA1 的磷酸化反應會在 DNA 發生片段化之前產生，所以被當作傳遞細胞凋亡訊息給下游基因的角色 [Tian et al., 1995]。應用含有 588 個基因的 cDNA 微陣列偵測結腸腺窩腺腫瘤基因表現，與細胞凋亡作用相關的基因 FASTK 與 p53 為低表現量，細胞增生相關基因 p21-rac1 (ras-oncogene 相關基因) 與 MAPK p38 α 為具有高表現量的基因 [Lechner et al., 2003]。在逐步叢集分析中，大多與細胞凋亡途徑相關的基因分類於叢集 2 與叢集 10 中。大部分歸類於這兩個叢集的基因表現樣式低，但在其他分類的叢集中，如叢集 14 也可以發現表現量高的基因；而在自組圖分析中，跟細胞凋亡途徑相關的基因大多分類於叢集 7 及 6，也是屬於基因表現樣式低的族群，但在叢集 11 中，也具有跟細胞凋亡途徑相關，但表現量高的基因。不同中草藥水萃出物處理後，所引發的基因表現機能具有不同的基因表現樣式的變化。

表 3-5 為與細胞增生相關的基因表現樣式，具有低表現量基因的為 LMO4、PRDM4、PTHLH、PBEF、ANK2、ANK3、DLG5、LGALS2、SIPA1、SST、PA26

及 PTCH。高表現的基因有 CTBP1、GRN、SCGN、TFDP1、FLJ22169、TPD52L2 及 DRIM。表現量不變的基因有 LRP5。分別以紫蘇與藿香處理後，在細胞增生相關基因中具高表現量的 GRN 為 granulin，生長因子 granulin-epithelin precursor (GEP) 在肝癌細胞中，為高表現的基因，在 RNA 與蛋白質層面上，比起正常肝細胞皆具有高度的表現，在 Hep3B 細胞中，也證實 GEP 蛋白質濃度降低會使細胞增生效率減少 [Cheung et al., 2004]。使用五種中草藥分別處理 HepG2 後，具有低表現量的 DLG5 為 discs-large (*Drosophila*) homolog 5，與人類同源的果蠅 *dlg* 腫瘤抑制基因又稱為 *P-dlg*，除了腦之外，在胎盤與許多種腺細胞中會表現，*P-dlg* 蛋白質存在於細胞膜與細胞質中，在正常前列腺組織的上皮腺細胞中表現，但不會在前列腺癌細胞中表現 [Nakamura et al., 1998]。hDlg5 為 MAGUKs (membrane-associated guanylate kinase homologs) 家族成員之一，在乳癌細胞 MCF-7 中為主要黃體激素的目標基因，使用合成的黃體激素 MPA (medroxyprogesterone acetate) 處理 MCF-7、T47D 與 ZR-75-1 細胞後，hDlg5 mRNA 快速且明顯的增加 [Purmonen et al., 2002]。胰臟導管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma; PDAC) 中 DLG5 具有高表現量，降低內源性的 DLG5 可以有效的抑制 PDAC 細胞的生長 [Taniuchi et al., 2005]。細胞增生有關的基因在逐步叢集分析中多分類於叢集 2、9、10、12 及 17；比較在自組圖分析中所分類的叢集，與細胞增生相關的基因表現樣式，具有低表現的基因大多於叢集 7，而具高表現量的基因大多分類於叢集 11 與 20，其他與細胞增生相關的基因也大部分在叢集 7 與 6 中。

藥物大都會藉由肝臟的代謝而轉變為較親水性，然後再由腎臟或膽汁排出體外。許多致癌物需要代謝酶啟動後，才能與細胞的大分子起反應，因此這些代謝酶的基因多態性和變異對癌症有重要的影響。基因的多態性存在於許多代謝酶中，肝臟代謝 I 期中扮演重要角色的 Cytochrome P450 基因(例如 CYP1A1、CYP1A2、CYP2D6 及 CYP2E1) [Yu et al., 1995]。Cytochrome P450-2E1 (CYP2E1) 是 Cytochrome P450 家族中的主要成員，主要表現於肝臟。CYP2E1 可以被乙醇誘導活化，參與小分子物質(例如亞硝酸、乙醇、苯及 CCl₄) 的代謝作用。CYP2E1 基因或是酶活性的改變，會影響對身

體的毒性和致癌性 [Maezawa et al., 1994]。Cytochrome P450 superfamily 相關的基因表現樣式列於表 3-6，經五種不同中草藥水萃出物處理後，基因表現樣式低的有 CYP2C9 與 CYP2J2。表現量高的基因有 CYP27A1、CYP1A1 及 CYP2S1。表現量不變的有 CYP2C8。經過紫蘇、霍香或刺五加葉水萃出物處理後，基因表現樣式低的有 CYP11B1、CYP2A6 及 CYP4B1。在紫蘇、霍香、防風與刺五加葉處理後，具有低表現量的 CYP2C9 為 cytochrome P450-family 2-subfamily C-polypeptide 9，研究指出在肝癌細胞中，Cytochrome P450 基因表現的活性很低，常伴隨少量的肝臟轉錄因子 (C/EBP α 最為常見)，在 HepG2 細胞中植入帶有 Zn-inducible metallothionein promoter 的 C/EBP α vector，使 C/EBP α 基因功能啟動，伴隨 CYP2 家族 (CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6) mRNA 增加，因此推論轉錄因子可以控制在肝臟中 CYP 基因的表現 [Jover et al., 1998]。早期在 HepG2 細胞上使用 RT-PCR 的技術，研究經藥物處理後 CYP3A mRNA 的表現，更進一步的研究，有利用 RT-competitive PCR 探討經 rifampicin (RFP) 處理的 HepG2 細胞，可以誘發 CYP3A4，CYP2C9，CYP2E1 與 CYP1A2 的表現，經過長時間的處理 (120 小時)，CYP3A4 與 CYP2C9 基因具有高表現 [Sumida et al., 2000]。經過防風、霍香與刺五加葉處理後，具有高表現量的 CYP1A1 為 cytochrome P450-family 1-subfamily A-polypeptide 1，在 HepG2 細胞的研究上，有經多環芳香族 B[a]P-7,8-dihydrodiol 處理後，所誘發的細胞凋亡作用，和刺激 hydrocarbon (Ah) 接受器活性與誘發 CYP1A1 基因表現有關 [Chen et al., 2003]。經 tocotrienols (vitamin E 的主要成分之一，已被證實可以抑制小鼠的肝癌與肺癌) 中的 δ -tocotrienols 處理的人類肝癌細胞株 HepG2，可以抑制生長，並使 CYP1A1 基因具有高表現 [Wada et al., 2005]。近來更有利用 cDNA 微陣列 (具有 600 個與毒物學方面相關的基因) 分析經多環芳香族處理後，並以 ^{32}P 標定探針，經影像與數據分析，具有高表現量的 CYP1A1、CYP1A2 與 CYP2D6 為高度相關的基因 [Staal et al., 2006]。在基因逐步叢集分析結果中，基因大多分類於叢集 8、10 及 15 中；自組圖分析的結果，大部分的 Cytochrome P450 基因屬於叢集 1、6 及 7。許多中草藥已被用來作抗癌研究，粉防己鹼可抑制 HepG2 細胞生長，並誘發產生細胞凋亡的作用 [Yoo et al., 2002]。補

中益氣湯可以抑制肝癌細胞的生長，使細胞週期停滯於 G0/G1 期（抑制 DNA 合成）並誘發細胞凋亡作用 [Kao et al., 2001]。綠茶含有天然化合物黃烷醇（flavanol），主要的多酚成分 epigallocatechin-3-gallate（EGCG）可以預防酒精誘發的肝臟傷害，並對抗因 CYP2E1-dependent 產生的氧化傷害以及抑制人類 CYP2E1 基因在 HepG2 細胞中過度表現 [Jimenez-Lpoez and Cederbaum, 2004]。白芍水萃出物可抑制 HepG2 細胞生長，誘發細胞凋亡作用主要是以 p53 的途徑發生，其中 BNIP3 具有高的基因表現樣式，而 ZK1、RAD23 及 HSPD1 基因表現低 [Lee et al., 2002]。藿香含有黃酮類成分，可以抑制由 TNF-K 所誘發的 VCAM-1 基因表現 [Hong et al., 2001]。使用五種不同中草藥對於 HepG2 細胞的處理，所誘發的細胞凋亡、細胞增生及影響肝臟代謝的 Cytochrome P450 基因表現的變化不盡相同，但中草藥所含的有效的抗癌物質值得被進一步研究。

三、細胞凋亡分析：Annexin V-FITC 螢光染色

細胞毒性分析常用來測量細胞的死亡與分析細胞的表現，可以偵測在細胞表型發生改變前，早期的細胞毒性訊號。此外在同一家族或是分類的特殊基因也具有不同調節功能，例如細胞壞死、細胞增生與細胞死亡相關的基因表現。壞死的細胞會產生細胞質空泡形成、細胞核膨脹及細胞漿磨與細胞核破裂。比照凋亡的細胞，具有細胞皺縮、染色質聚集成團與細胞核內 DNA 片段化。中草藥應用於抑制癌細胞生長與誘發細胞凋亡作用是兩種不同的機制，因為中草藥所含的有效成分眾多，每一種有效成分對於抗癌所走的途徑也不一樣，對於基因表現的調控也錯綜複雜，一般民間服用中草藥強調藥性溫和，但相對作用的時間也長 [Lee et al., 2002; Shan and Li, 2002; Yoo et al., 2002]。

將經過中草藥處理的細胞以 Annexin V-FITC 與 PI 作螢光染色，藉由流式細胞儀分析後，結果以 WinMDI 程式圖示。在細胞進行凋亡作用時，大規模的凋亡細胞足以與原始細胞群分開，圖 3-6 中，SSCXFSC 圖主要是由細胞的型態與大小來觀察其變化，而

圖右側的二維統計圖是顯示帶有 Annexin V 與 PI 螢光訊號的細胞族群。將 HepG2 肝癌細胞經 PBS 或不同濃度的中草藥處理 72 小時後，經流式細胞儀分析結果來計算 R1 (PI+AnnexinV+) 與 R2 (PI-AnnexinV+) 的百分比。經中草藥處理後，R2 區域的百分比明顯比 control 組多 (圖 3-7)，除了正常細胞生理代謝所造成的死亡外，處理藥物的細胞有一部分也誘發生理途徑改經由凋亡作用而瓦解，經過長時間具有抗癌功效的中草藥水萃出物處理後，可誘發 HepG2 細胞產生細胞凋亡，本研究中發現，細胞分佈的群落在 FL1 與 FL3 圖中，有偏向左上角的趨勢，且經處理的細胞分佈較 control 組的細胞分散，而在血癌 K562/ADM 細胞 [Kong X. et al., 2006]、HL-60 細胞 [Kluza J. et al., 2002] 與卵巢癌細胞 [Coley HM. et al., 2006] 也有此現象。中草藥常對癌細胞做長時間的處理，白毛藤 (Solanum lyratum Thumb) 用於人類肝癌細胞 BEL-7404 的處理為 72 小時，誘使細胞凋亡作用 [Shan and Li, 2002]。

細胞凋亡為一種較溫和的細胞死亡途徑，也是控制著細胞去除的機制，所造成的細胞死亡是個別地，對於去除前腫瘤細胞 (Preneoplastic cells) 和腫瘤細胞 (Neoplastic cells) 是重要的調節者。以不同濃度的中草藥水萃出物進行 HepG2 細胞處理，偵測細胞凋亡的狀況，以流式細胞儀區分凋亡細胞的族群，並以 WinMDI 軟體分析凋亡細胞所佔的百分比。圖 3-7 為以流式細胞儀分析細胞分佈的結果，依照細胞間狀態的不同，分別計算 R1 (P+/A+) 與 R2 (P-/A+) 區域的細胞百分比，R1 的結果為 control 組 $13.2 \pm 0.3\%$ 、紫蘇 R1 為 $14.3 \pm 3.0\%$ 、藿香 $16.3 \pm 1.5\%$ 、防風 $12.7 \pm 0.9\%$ 、刺五加葉 $18.3 \pm 0.5\%$ 及石蓮花 $14.0 \pm 0.5\%$ ；R2 的結果為 control 組 $5.0 \pm 1.4\%$ 、紫蘇 $10.9 \pm 1.3\%$ 、藿香 $6.5 \pm 0.4\%$ 、防風 $21.4 \pm 0.9\%$ 、刺五加葉 $15.8 \pm 0.8\%$ 及石蓮花 $9.3 \pm 0.3\%$ 。在 control 組中，可以看出細胞經 72 小時長時間的處理後，本身的代謝作用會所造成部分細胞的老化死亡，在所使用的五種中草藥中，刺五加葉處理的結果除了 R1 區域明顯增加外，R2 也明顯高過 control 組，而防風處理 HepG2 細胞的效果，R2 超過 20%，為五種中草藥水萃出物中 R2 區域數值最高的，此與 cDNA 微陣列分析結果，防風在細胞凋亡相關基因中具有高表現量的趨勢一致 (表 3-4) 有明顯的抗癌效果。

啟動癌細胞凋亡作用機轉，這種藉由調控抗癌細胞基因表現以殺死癌細胞的策略，似乎是開發抗癌中草藥較可行的途徑之一。以中草藥處理後，R2 區域的群落比 control 組有明顯增加，以紫蘇、防風與刺五加葉處理的結果更達 control 組的兩倍以上。白芍水萃出物被證實可抑制 HepG2 與 Hep3B 細胞株生長，主要是以 p53 的途徑發生誘發的肝細胞產生凋亡作用 [Lee et al., 2002]。刺五加葉可增加肺癌病人血液中 TNF- α 的活性，來抵抗癌細胞 [Huang et al., 2005]。粉防己鹼可抑制 HepG2 細胞生長，誘發產生細胞凋亡的作用 [Yoo et al., 2002]。柴胡中的 KY88 成分對人類肝癌細胞株 HB8064 具有抑制增殖與誘發產生凋亡作用 [Cheng et al., 2003; Hsu et al., 2004]。紫蘇可降低受到 aflatoxin B1 或 ochratoxin A 處理 HepG2 細胞後的傷害 [Osakabe et al., 2002; Renzulli et al., 2004; Osakabe et al., 2004]。銀杏也可抑制乳癌細胞、神經膠質瘤及肝癌細胞株的增殖 [DeFeudis et al., 2003; Pretner et al., 2006]。靈芝含有的 triterpene 可抑制人類肝癌細胞株 Huh-7 的生長 [Lin et al., 2003]。補中益氣湯可抑制肝癌後期病人癌細胞的蔓延，利用細胞週期與 DNA 片段分析，可使癌細胞週期停滯於 G0/G1 期來抑制肝癌細胞的生長，並抑制 DNA 合成與誘發細胞凋亡作用 [Kao et al., 2001]。在肝癌研究上，已經廣泛的利用中草藥萃出物來處理肝癌細胞，除了可篩選與評估抗癌中草藥的效應外，還可更進一步利用 DNA 微陣列分析來檢測與探討基因層面的變化。

肆、結 論

中草藥的水萃出物對於細胞增生的影響也許與細胞凋亡的機制有關，從中草藥分離所得到的有效抗癌成份，抗癌與抗腫瘤的機制主要為細胞毒活性（直接殺傷癌細胞或抑制癌細胞生長，而達到抗癌的功效） [Hong et al., 2001; Yoo et al., 2002] 與免疫機制反應（提高身體的免疫反應，而達到抗癌作用） [Yi et al., 2001]。中藥可以直接殺傷癌細胞，調節身體免疫反應，抑制肝癌細胞增生，誘導肝癌細胞進行凋亡作用，抑制肝癌所產生的癌前病變等作用機制，達到防治肝癌的目的 [Kao et al., 2001]。因中草藥藥性溫和較無毒性的特質，本研究主要應用是將具有抗癌效果的中草藥水萃出物處理肝癌細胞株 HepG2 細胞後，經過 cDNA 微陣列分析後，找出與抗癌機制相關的基因表現結果，再經過細胞凋亡螢光染色的試驗後，看不同中草藥對於細胞凋亡途徑的影響。細胞毒性的測試結果表明中草藥水萃出物確有殺傷肝癌細胞的作用；並抑制 HepG2 細胞生長，紫蘇、藿香、防風、刺五加葉及石蓮花水萃出物在濃度為 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，抑制肝癌細胞生長的百分比可以達到 30% 以上，在濃度為 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，抑制生長的效果更可以達到 50% 以上，此結果表明此五種中藥水萃出物具有抑制肝癌細胞生長的作用。

肝細胞癌變的演化過程中涉及大量的癌基因突變、缺失、擴增及抑癌基因失活等異常表達資訊，利用 cDNA 微陣列高效、快速的檢測方法闡明肝癌的發病機制及其早期診治具有重要價值，使用含有 7,680 個基因及 EST 序列的基因晶片來作經中草藥水萃出物處理 72 小時後 cDNA 微陣列分析，經過系統叢集分析方法可以組織基因並產生樹狀圖，來表示具有相似的基因表現樣式 [Chu et al, 1998]。經過基因表現樣式的正規化與標準常態分佈後的結果，藿香、防風及刺五加葉的處理，具有相近的常態分佈，但紫蘇與石蓮花處理後，偏態係數與峰值係數皆小於 1，基因表現的狀況更貼近常態分佈， [Durbin and Rocke, 2003]。系統叢集分析可以將紫蘇、藿香、防風、刺五加葉及石蓮花水萃出物處理後，基因的表現情況作一個具組織性整合，畫出可以代表所有基因之間

關連性的樹狀圖，結果可以看出霍香、刺五加葉及紫蘇處理具有相似的基因表現趨勢，而在常態分佈分析結果中，經過刺五加葉及霍香處理後的基因表現樣式族群分佈相近（偏態係數：刺五加葉 3.81 與霍香 4.79；峰值係數：刺五加葉 48.39 與霍香 59.15），另檢測不同中草藥處理後的基因表現樣式差異性，Tukey 公正顯著差異法分群結果將紫蘇與刺五加葉處理後的基因表現樣式歸類為一群，刺五加葉與霍香處理後產生的基因表現樣式分類為一群，鄧氏新多變域測驗法指出刺五加葉與霍香歸一群，最小顯著差異值分析法也將刺五加葉與霍香為一群；在防風的處理下，基因的表現與其他四種中草藥水萃出物處理相較下，具有較高表現量，在常態分佈的分析結果中，偏態係數（7.67）與峰值係數（123.93）為五種中草藥中最高的。以常態分佈分析、單因子變異數分析與系統叢集分析法的結果，皆可以檢測出不同中草藥處理的基因表現趨勢是否具有相似性。逐步叢集分析法為依照給定的群數作獨立變數間的叢集分類，而自組圖分析可以將相似的基因表現樣式依基因間的相關性被分為同一類 [Tamayo et al, 1999]。在此研究中，逐步叢集分析被用來組織經過中草藥水萃出物處理 72 小時後每一個基因表現樣式所產生的龐大資料，並比較不同基因間的表現量，逐步叢集分析之後，將基因分為 20 個叢集，在具有相似平均基因表現的叢集 3、5、6、7 及 16 中，刺五加葉與防風處理的平均基因表現較高。另外叢集 11、14 及 20 的基因表現也具有相似趨勢，五種中草藥處理中，以防風具有較高平均基因表現樣式，此與系統叢集分析方法所畫出的樹狀圖分佈中，基因表現樣式的趨勢具有相同的結果。在自組圖分析中，所分類的 20 個叢集具有中度以上 (>0.3) 的正相關，叢集 11、12 及 13 具有相似的平均基因表現，刺五加葉處理後的平均基因表現較高，叢集 14 與 15 中，石蓮花處理的平均基因表現樣式較高。基因表現樣式主要探討細胞凋亡、細胞增生及 Cytochrome P450 superfamily 相關的基因，經過逐步叢集分析後，大多的基因座落於叢集 2、8、10 及 12；但經自組圖分析後，細胞凋亡途徑相關的基因大部分被分於叢集 6 與 7 中。不同的中草藥水萃出物，所含有的有效抗癌物質不同，所引發的基因表現趨勢也不同，但是在抗癌目的，除了殺死癌細胞，或抑制癌細胞生長外，主要的還是希望對人體所造成的負面影響能夠降至最低，溫和且危害性低的自然生理途徑為細胞凋亡作用，在生物體生長與死亡的發展中，調節細

胞族群的細胞數目來維持平衡，為細胞群在體內平衡的重要機制，也是除去因為感染或是潛在的腫瘤細胞的一個重要的過程，細胞凋亡為細胞死亡的其中一種途徑，藉由本質上或非本質上的刺激來激發一個內生性的細胞自殺的過程。所以在本研究中，最後透過 Annexin V-FITC 與 PI 作螢光染色，探討中草藥水萃出物對於誘發 HepG2 細胞的凋亡作用，結果指出經過 72 小時後的處理後，在 PI-AnnexinV+ (R2) 結果中，防風及刺五加葉在誘發細胞凋亡的產生上，可達 control 組的三倍以上，尤其是防風的處理，可以達到 control 組的四倍以上，在細胞群落的變化討論上，在同樣的 gating 條件下，所做相對數值的探討，經統計後以防風以及刺五加葉處理的結果較偏向致使 HepG2 細胞走向細胞凋亡的途徑，此結果再對照論文中表 3-4 的結果，可支持 cDNA 微陣列分析的結果。

綜合上面的結果我們可以推測紫蘇、藿香、防風、刺五加葉及石蓮花水萃出物，對於 HepG2 細胞具有抑制其生長的作用，經由 cDNA 微陣列分析後，與細胞凋亡、細胞增生及 Cytochrome P450 superfamily 相關的基因上，表現量高的基因 FASTK、GRN 及 CYP1A1。低表現量的基因 PSMA6、RELA、DLG5 及 CYP2C9。這些經由中草藥處理 HepG2 細胞所造成的基因表現樣式變化都值得我們去探討，不同中草藥水萃出物所引發的細胞生理途徑，因為含有的成分不同，所走的途徑或許相似，但是最終的目的皆為抗癌。這些基因在中草藥水萃出物對抗癌的效應中，佔有重要的地位，值得我們再進一步的探討與研究。

伍、參考文獻

- Aburada M, Takeda S, Ito E, Nakamura M, and Hosoya E. 1983. Protective effects of juzentaihoto, dried decoctum of 10 Chinese herbs mixture, upon the adverse effects of mitomycin C in mice. *Journal of Pharmacobio-Dynamics* 6:1000-1004.
- Afshari CA, Nuwaysir EF, and Barrett JC. 1999. Application of complementary DNA microarray technology to carcinogen identification, toxicology, and drug safety evaluation. *Cancer Research* 59:4759-4760.
- Alon U, Barkai N, Notterman DA, Gish K, Ybarra S, Mack D, and Levine AJ. 1999. Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96:6745-6750.
- Bang-Ce Y, Hongqiong L, Zhuanfong Z, Zhengsong L, and Jianling G. 2004. Simultaneous detection of alpha-thalassemia and beta-thalassemia by oligonucleotide microarray. *Haematologica* 89:1010-1012.
- Banno N, Akihisa T, Tokuda H, Yasukawa K, Higashihara H, Ukiya M, Watanabe K, Kimura Y, Hasegawa J, and Nishino H. 2004. Triterpene acids from the leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 68:85-90.
- Batliwalla FM, Li W, Ritchlin CT, Xiao X, Brenner M, Laragione T, Shao T, Durham R, Kemshetti S, Schwarz E, Coe R, Kern M, Baechler EC, Behrens TW, Gregersen PK, and Gulko PS. 2005. Microarray analyses of peripheral blood cells identifies unique gene expression signature in psoriatic arthritis. *Molecular Medicine* 11:21-29.
- Bonfoco E, Krainc D, Ankarcona M, Nicotera P, and Lipton SA. 1995. Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92:7162-7166.
- Bromme HJ, and Holtz J. 1996. Apoptosis in the heart: when and why? *Molecular and Cellular Biochemistry* 164:261-275.
- Burczynski ME, McMillian M, Ciervo J, Li L, Parker JB, Dunn RT 2nd, Hicken S, Farr S, and Johnson MD. 2000. Toxicogenomics-based discrimination of toxic

- mechanism in HepG2 human hepatoma cells. *Toxicological Sciences* 58:399-415.
- Bursch W, Grasl-Kraupp B, Ellinger A, Torok L, Kienzl H, Mullauer L, and Schulte-Hermann R. 1994. Active cell death: role in hepatocarcinogenesis and subtypes. *Biochemistry and Cell Biology* 72:669-675.
- Bursch W, Lauer B, Timmermann-Trosiener I, Barthel G, Schuppler J, and Schulte-Hermann R. 1984. Controlled death (apoptosis) of normal and putative preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters. *Carcinogenesis* 5:453-458.
- Chan WK, Lam DT, Law HK, Wong WT, Koo MW, Lau AS, Lau YL, and Chan GC. 2005. Ganoderma lucidum mycelium and spore extracts as natural adjuvants for immunotherapy. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 11:1047-1057.
- Chang YC, Huang HP, Hsu JD, Yang SF, and Wang CJ. 2005. Hibiscus anthocyanins rich extract-induced apoptotic cell death in human promyelocytic leukemia cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 205:201-212.
- Cheng YL, Chang WL, Lee SC, Liu YG, Lin HC, Chen CJ, Yen CY, Yu DS, Lin SZ, and Harn HJ. 2003. Acetone extract of Bupleurum scorzonerifolium inhibits proliferation of A549 human lung cancer cells via inducing apoptosis and suppressing telomerase activity. *Life Science* 73:2383-2394.
- Chen LZ, Feng XW, and Zhou JH. 1995. Effects of Rehmannia glutinosa polysaccharide b on T-lymphocytes in mice bearing sarcoma 180. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 16:337-40.
- Chen Q, Chao R, Chen H, Hou X, Yan H, Zhou S, Peng W, and Xu A. 2005. Antitumor and neurotoxic effects of novel harmine derivatives and structure-activity relationship analysis. *International Journal of Cancer* 114:675-682.
- Chen S, Nguyen N, Tamura K, Karin M, and Tukey RH. 2003. The role of the Ah receptor and p38 in benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-induced apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 278:19526-19533.
- Cheung ST, Wong SY, Leung KL, Chen X, So S, Ng IO, and Fan ST. 2004. Granulin-epithelin precursor overexpression promotes growth and invasion of hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research* 10:7629-7636.
- Chisari FV. 1995. Hepatitis B virus transgenic mice: insights into the virus and the disease. *Hepatology* 22:1316-1325.
- Choi JS, Yoon TJ, Kang KR, Lee KH, Kim WH, Suh YH, Song J, and Jung MH. 2006.

- Glycoprotein isolated from *Acanthopanax senticosus* protects against hepatotoxicity induced by acute and chronic alcohol treatment. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29:306-314.
- Chow LW, Loo WT, Sham JS, and Cheung MN. 2004. Radix bupleuri containing compound (KY88 liver-livo) induces apoptosis and production of interleukin-4 and tumor necrosis factor-alpha in liver cancer cells in vitro. *American Journal of Chinese Medicine* 32:185-193.
- Chu S, DeRisi J, Eisen M, Mulholland J, Botstein D, Brown PO, and Herskowitz I. 1998. The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* 282:699-705.
- Coley HM, Christine FS, Abi AA, Helmut M, and Hilary T. 2006. Receptor tyrosine kinase (RTK) inhibition is effective in chemosensitising EGFR-expressing drug resistant human ovarian cancer cell lines when used in combination with cytotoxic agents. *Biochemical Pharmacology* 72:941-948.
- Covell DG., Wallqvist A, Rabow AA, and Thanki N. 2003. Molecular classification of cancer: unsupervised self-organizing map analysis of gene expression microarray data. *Molecular Cancer Therapeutics* 2:317-332.
- Cui F, Wang Y, Wang J, Wei K, Hu J, Liu F, Wang H, Zhao X, Zhang X, and Yang X. 2006. The up-regulation of proteasome subunits and lysosomal proteases in hepatocellular carcinomas of the HBx gene knockin transgenic mice. *Proteomics* 6:498-504.
- Dai Y, and Cederbaum AI. 1995. Inactivation and degradation of human cytochrome P4502E1 by CCl4 in a transfected HepG2 cell line. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 275:1614-1622.
- Darlington GJ, Kelly JH, and Buffone GJ. 1987. Growth and hepatospectrum gene expression of human hepatoma cells in a defined medium. *In Vitro Cell Development and Biology* 23:349-354.
- Darnay BG, and Aggarwal BB. 1997. Early events in TNF signaling: a story of associations and dissociations. *Journal of Leukocyte Biology* 61:559-566.
- Dawson JR, Adams DJ, and Wolf CR. 1985. Induction of drug metabolizing enzymes in human liver cell line Hep G2. *FEBS Letters* 183:219-222.
- DeFeudis FV, Papadopoulos V, and Drieu K. 2003. Ginkgo biloba extracts and cancer: a research area in its infancy. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 17:405-417.

- Diamond L, Kruszewski F, Aden DP, Knowles BB, and Baird WM. 1980. Metabolic activation of benzo(a)pyrene by a human hepatoma cell line. *Carcinogenesis* 1:871-875.
- Dubey AK, Shankar PR, Upadhyaya D, and Deshpande VY. 2004. Ginkgo biloba-an appraisal. *Kathmandu University Medical Journal* 2:225-9.
- Dufour JF and Clavien PA. 2005. *Signaling Pathways in Liver Diseases*. Springer.
- Durbin B, and Rocke DM. 2003. Estimation of transformation parameters for microarray data. *Bioinformatics* 19:1360-1367.
- Eguchi Y, Shimizu S, and Tsujimoto Y. 1997. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Research* 57:1835-1840.
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, and Henson PM. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of Immunology* 148:2207-2216.
- Fujikawa T, Yamaguchi A, Morita I, Takeda H, and Nishibe S. 1996. Protective effects of *Acanthopanax senticosus* harms from Hokkaido and its components on gastric ulcer in restrained cold water stressed rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 19:1227-1230.
- Garrigues GE, Cho DR, Rubash HE, Goldring SR, Herndon JH, and Shanbhag AS. 2005. Gene expression clustering using self-organizing maps: analysis of the macrophage response to particulate biomaterials. *Biomaterials* 26:2933-2945.
- Goto H, Shimada Y, Akechi Y, Kohta K, Hattori M, and Terasawa K. 1996. Endothelium-dependent vasodilator effect of extract prepared from the roots of *Paeonia lactiflora* on isolated rat aorta. *Planta Medica* 62:436-439.
- Guillouzo A. 1998. Liver cell models in vitro toxicology. *Environmental Health Perspectives* 106:511-532.
- Hansen MB, Nielsen SE, and Berg KJ. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Immunology Methods* 119:203-210.
- Hara A, Iizuka N, Hamamoto Y, Uchimura S, Miyamoto T, Tsunedomi R, Miyamoto K, Hazama S, Okita K, and Oka M. 2005. Molecular dissection of a medicinal herb with anti-tumor activity by oligonucleotide microarray. *Life Science* 77:991-1002.
- Haranaka K, Satomi N, Sakurai A, Haranaka R, Okada N, and Kobayashi M. 1985.

- Antitumor activities and tumor necrosis factor producibility of traditional Chinese medicines and crude drugs. *Cancer Immunology Immunotherapy* 20:1-5.
- Harries HM, Fletcher ST, Duggan CM, and Baker VA. 2001. The use of genomics technology to investigate gene expression changes in cultured human liver cells. *Toxicology in Vitro* 15:399-405.
- Hayashi N. 1998. Apoptosis in liver disease. *Internal Medicine* 37:191-192.
- Heyninck K, and Beyaert R. 2001. Crosstalk between NF-kappaB-activating and apoptosis-inducing proteins of the TNF-receptor complex. *Molecular and Cellular Biology Research Communication* 4:259-265.
- Hong JJ, Choi JH, Oh SR, Lee HK, Park JH, Lee KY, Kim JJ, Jeong TS, and Oh GT. 2001. Inhibition of cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression; possible mechanism for anti-atherogenic effect of *Agastache rugosa*. *FEBS Letters* 495:142-147.
- Hong Y, Muller UR, and Lai F. 2003. Discriminating two classes of toxicants through expression analysis of HepG2 cells with DNA arrays. *Toxicology in Vitro* 17:85-92.
- Hou DX, Tong X, Terahara N, Luo D, and Fujii M. 2005. Delphinidin 3-sambubioside, a Hibiscus anthocyanin, induces apoptosis in human leukemia cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 440:101-109.
- Hsu YL, Kuo PL, Weng TC, Yen MH, Chiang LC, and Lin CC. 2004. The antiproliferative activity of saponin-enriched fraction from *Bupleurum Kaoi* is through Fas-dependent apoptotic pathway in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27:1112-1115.
- Huang DB, Ran RZ, and Yu ZF. 2005. Effect of *Acanthopanax senticosus* injection on the activities of human tumor necrosis factor and natural killer cell in blood in the patients with lung cancer. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 30:621-624.
- Huang X, and Hazlett LD. 2003 Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* corneal infection using an oligonucleotide microarray. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 44:3409-3416.
- Iizuka N, Oka M, Yamamoto K, Tangoku A, Miyamoto K, Miyamoto T, Uchimura S, Hamamoto Y, and Okita K. 2003. Identification of common or distinct genes related to antitumor activities of a medicinal herb and its major component by oligonucleotide microarray. *International Journal of Cancer* 107:666-672.

- Jacobson MD, and McCarthy N. 2002. Apoptosis: the molecular biology of programmed cell death. Oxford. p11.
- Jimenez-Lpoez JM, and Cederbaum AI. 2004. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate protects HepG2 cells against CYP2E1-dependent toxicity. *Free Radical Biology and Medicine* 36:359-370.
- Jover R, Bort R, Gomez-Lechon MJ, and Castell JV. 1998. Re-expression of C/EBP alpha induces CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genes in HepG2 cells. *FEBS Letters* 431:227-230.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, and Finkel D. 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258:818-821.
- Kaminaga T, Yasukawa K, Kanno H, Tai T, Nunoura Y, and Takido M. 1996. Inhibitory effects of lanostane-type triterpene acids, the components of *Poria cocos*, on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology* 53:382-385.
- Kanayama H, Togami M, Adachi N, Fukai Y, and Okumoto T. 1986. Studies on the antitumor active polysaccharides from the mycelia of *Poria cocos* Wolf. III. Antitumor activity against mouse tumors. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* 106:307-312.
- Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacroce R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, and Farber E. 2002. Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *International Journal of Oncology* 21:165-170.
- Kang JX, Liu J, Wang J, He C, and Li FP. 2005. The extract of huanglian, a medicinal herb, induces cell growth arrest and apoptosis by upregulation of interferon-beta and TNF-alpha in human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 26:1934-1939.
- Kanowski S, Herrmann WM, Stephan K, Wierich W, and Horr R. 1996. Proof of efficacy of the ginkgo biloba special extract EGb 761 in outpatients suffering from mild to moderate primary degenerative dementia of the Alzheimer type or multi-infarct dementia. *Pharmacopsychiatry* 29:47-56.
- Kao ST, Yeh CC, Hsieh CC, Yang MD, Lee MR, Liu HS, and Lin JG. 2001. The Chinese medicine Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang inhibited proliferation of hepatoma cell lines by inducing apoptosis via G0/G1 arrest. *Life Science* 69:1485-1496.
- Kennedy AS, Nutting C, Coldwell D, Gaiser J, and Drachenberg C. 2004. Pathologic

- response and microdosimetry of (90)Y microspheres in man: review of four explanted whole livers. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 60:1552-1563.
- Kerr JF. 1965. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *Journal of Pathology and Bacteriology* 90:419-435.
- Kerr JF, Winterford CM, and Harmon BV. 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73:2013-2026.
- Kerr JF, Wyllie AH, and Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26:239-257.
- Kluza J, Amelie L, Nicole W, Marie-Paule H, Stephane L, Alain P, John AH and Christian B. 2002. Induction of apoptosis in HL-60 leukemia and B16 melanoma cells by the acronycine derivative S23906-1. *Biochemical Pharmacology* 63:1443-1452.
- Koggalage R, and Halgamuge S. 2004. Reducing the number of training samples for fast support vector machine classification. *Neural Information Processing – Letters and Reviews* 2:57-65.
- Kok LDS, Wong CK, Leung KN, Tsang SF, Fung KP, and Choy YM. 1995. Activation of the anti-tumor effector cells by *Radix bupleuri*. *Immunopharmacology* 30:79-87.
- Kong X, Haitao G, Lijuan H, Limei S, and Zhili L. 2006. Induction of apoptosis in K562/ADM cells by gamma-linolenic acid involves lipid peroxidation and activation of caspase-3. *Chemico-Biological Interactions* 162:140-148.
- Ko SG, Kim HP, Jin DH, Bae HS, Kim SH, Park CH, and Lee JW. 2005. *Saussurea lappa* induces G2-growth arrest and apoptosis in AGS gastric cancer cells. *Cancer Letters* 220:11-19.
- Kurashige S, Akuzawa Y, and Endo F. 1999. Effects of astragali radix extract on carcinogenesis, cytokine production, and cytotoxicity in mice treated with a carcinogen, N-butyl-N'-butanolnitrosoamine. *Cancer Investigation* 17:30-35.
- Kuroda H, Nakazawa S, Katagiri K, Shiratori O, and Kozuka M. 1976. Antitumor effect of bisbenzylisoquinoline alkaloids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 24:2413-2420.
- Kuroda K, Akao M, Kanisawa M, and Miyaki K. 1976. Inhibitory effect of *Capsella bursa-pastoris* extract on growth of Ehrlich solid tumor in mice. *Cancer*

- Research 36:1900-1903.
- Kuroda K, and Akao M. 1981. Antitumor and anti-intoxication activities of fumaric acid in cultured cells. *Gann Monograph on Cancer Research* 72:777-82.
- Lai YL, Chen YJ, Wu TY, Wang SY, Chang KH, Chung CH, and Chen ML. 1998. Induction of apoptosis in human leukemic U937 cells by tetrandrine. *Anticancer Drugs* 9:77-81.
- Le Bars PL, and Kastelan J. 2000. Efficacy and safety of a Ginkgo biloba extract. *Public Health Nutrition* 3:495-499.
- Lechner S, Muller-Ladner U, Renke B, Scholmerich J, Ruschoff J, and Kullmann F. 2003. Gene expression pattern of laser microdissected colonic crypts of adenomas with low grade dysplasia. *Gut* 52:1148-1153.
- Ledda-Columbano GM, Coni P, Faa G, Manenti G, and Columbano A. 1992. Rapid induction of apoptosis in rat liver by cycloheximide. *American Journal of Pathology* 140:545-549.
- Lee HK, Oh SR, Kim JI, Kim JW, and Lee CO. 1995. Agastakinone, a new cytotoxic diterpenoid quinone from *Agastache rugosa*. *Journal of Natural Products* 58:1718-1721.
- Lee PD. 2002. Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome Research* 12:292-297.
- Lee SM, Li ML, Tse YC, Leung SC, Lee MM, Tsui SK, Fung KP, Lee CY, and Waye MM. 2002. *Paeoniae Radix*, a Chinese herbal extract, inhibit hepatoma cells growth by inducing apoptosis in a p53 independent pathway. *Life Science* 71:2267-2277.
- Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, and Nicotera P. 1997. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *The Journal of Experimental Medicine* 185:1481-1486.
- Leung YF, and Cavalieri D. 2003. Fundamentals of cDNA microarray data analysis. *TRENDS in Genetics* 19:649-659.
- Limbosch S. 1983. Benzo(a)pyrene and aldrin metabolizing activities in cultured human and rat hepatoma cell line. *Journal of the National Cancer Institute* 71:281-286.
- Lin HH, Huang HP, Huang CC, Chen JH, and Wang CJ. 2005 Hibiscus polyphenol-rich extract induces apoptosis in human gastric carcinoma cells via

p53 phosphorylation and p38 MAPK/FasL cascade pathway. *Molecular Carcinogenesis* 43:86-99.

- Lin JK, and Chou CK. 1992. In vitro apoptosis in the human hepatoma cell line induced by transforming growth factor beta 1. *Cancer Research* 52:385-388.
- Lin J, Dong HF, Oppenheim JJ, and Howard OM. 2003. Effects of astragali radix on the growth of different cancer cell lines. *World Journal of Gastroenterology* 9:670-673.
- Lin SB, Li CH, Lee SS, and Kan LS. 2003. Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest. *Life Science* 72:2381-2390.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, and Wang X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome C. *Cell* 86:147-157.
- Lu H, Zhu ZG, Yao XX, Zhao R, Yan C, Zhang Y, Liu BY, Yin HR, and Lin YZ. 2005. Hepatic preconditioning of doxorubicin in stop-flow chemotherapy: NF-kappaB /IkkappaB-alpha pathway and expression of HSP72. *World Journal of Gastroenterol* 11:2136-2141.
- Maezawa Y, Yamauchi M, and Toda G. 1994. Association between restriction fragment length polymorphism of the human cytochrome P450IIE1 gene and susceptibility to alcoholic liver cirrhosis. *Gastroenterology* 89:561-565.
- Martin SJ, Lennon SV, Bonham AM, and Cotter TG. 1990. Induction of apoptosis (programmed cell death) in human leukemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis. *The Journal of Immunology* 145:1859-1867.
- Martinez MJ, Aragon AD, Rodriguez AL, Weber JM, Timlin JA, Sinclair MB, Haaland DM, and Werner-Washburne M. 2003. Identification and removal of contaminating fluorescence from commercial and in-house printed DNA microarrays. *Nucleic Acids Research* 31:e18.
- McConkey DJ, Hartzell P, Nicotera P, and Orrenius S. 1989. Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 3:1843-1849.
- Melo AM, Jardim ML, De Santana CF, Lacet Y, Lobo Filho J, and De Lima e Ivan Leoncio OG. 1974. First observations on the topical use of Primin, Plumbagin and Maytenin in patients with skin cancer. *Revista do Instituto de Antibióticos*

14:9-16.

- Mossman T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunol Methods* 65:55-63.
- Nagata S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* 88:355-365.
- Nakamura H, Sudo T, Tsuiki H, Miyake H, Morisaki T, Sasaki J, Masuko N, Kochi M, Ushio Y, and Saya H. 1998. Identification of a novel human homolog of the *Drosophila* dlg, P-dlg, specifically expressed in the gland tissues and interacting with p55. *FEBS Letters* 433:63-67.
- Neuman MG, Koren G, and Tiribelli C. 1993. In vitro assessment of the ethanol-induced hepatotoxicity on HepG2 cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 197:932-941.
- Neuman MG, Cameron RG, Shear NH, Bellentani S, and Tiribelli C. 1995. Effect of tauroursodeoxycholic and ursodeoxycholic acid on ethanol-induced cell injuries in the human HepG2 cell line. *Gastroenterology* 109:555-563.
- Nishibe S, Kinoshita H, Takeda H, and Okano G. 1990. Phenolic compounds from stem bark of *Acanthopanax senticosus* and their pharmacological effect in chronic swining stressed rats. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 38:1763-1765.
- O'Brien T, Babcock, G., Cornelius, J., Dingeldein, M., Talaska, G., Warshawsky, D, and Mitchell, K. 2000. A Comparison of Apoptosis and Necrosis Induced by Hepatotoxins in HepG2 Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 164:280-290.
- Oh BK, Robbins ME, Nablo BJ, and Schoenfisch MH. 2005. Miniaturized glucose biosensor modified with a nitric oxide-releasing xerogel microarray. *Biosensors and Bioelectronics* 21:749-757.
- Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Sanbongi C, Kato Y, Osawa T, and Yoshikawa T. 2002. Rosmarinic acid, a major polyphenolic component of *Perilla frutescens*, reduces lipopolydacccharide (LPS)-induced liver injury in D-galactosamine (D-GalN)-sensitized mice. *Free Radical Biology and Medicine* 33:798-806.
- Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, and Yoshikawa T. 2004. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis* 25:549-557.
- Peixoto BR, Vencio RZ, Egidio CM, Mota-Vieira L, Verjovski-Almeida S, and Reis EM.

2006. Evaluation of reference-based two-color methods for measurement of gene expression ratios using spotted cDNA microarrays. *BMC Genomics* 7:35-47.
- Pennie WD. 2000. Use of cDNA microarrays to probe and understand the toxicological consequences of altered gene expression. *Toxicology Letters* 112-113:473-477.
- Pretner E, Amri H, Li W, Brown R, Lin CS, Makariou E, Defeudis FV, Drieu K, and Papadopoulos V. 2006. Cancer-related overexpression of the peripheral-type benzodiazepine receptor and cytostatic anticancer effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761). *Anticancer Research* 26:9-22.
- Pritchard DJ, and Butler WH. 1989. Apoptosis-the mechanism of cell death in dimethy- nitrosamine-induced hepatotoxicity. *Journal of Pathology* 158(3):253-260.
- Purmonen S, Ahola TM, Pennanen P, Aksenov N, Zhuang YH, Tuohimaa P, and Ylikomi T. 2002. HDLG5/KIAA0583, encoding a MAGUK-family protein, is a primary progesterone target gene in breast cancer cells. *International Journal of Cancer* 102:1-6.
- Quackenbush J. 2001. Computational analysis of microarray data. *Nature Reviews Genetics* 2:418-427.
- Quackenbush J. 2002. Microarray data normalization and transformation. *Nature Reviews Genetics* 32:496-501.
- Radford IR. 1986. Evidence for a general relationship between the induced level of DNA double-strand breakage and cell-killing after X-irradiation of mammalian cells. *International Journal of Radiation Biology* 49:611-620.
- Renzulli C, Galvano F, Pierdomenico L, Speroni E, and Guerra MC. 2004. Effects of rosmarinic acid against aflatoxin B1 and ochratoxin-A-induced cell damage in a human hepatoma cell line (Hep G2). *Journal of Applied Toxicology* 24:289-296.
- Rho S, Chung HS, Kang M, Lee E, Cho C, Kim H, Park S, Kim HY, Hong M, Shin M, and Bae H. 2005. Inhibition of production of reactive oxygen species and gene expression profile by treatment of ethanol extract of Moutan Cortex Radicis in oxidative stressed PC12 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 28:661-666.
- Rodi CP, Bunch RT, Curtiss SW, Kier LD, Cabonce MA, Davila JC, Mitchell MD, Alden CL, and Morris DL. 1999. Revolution through genomics in investigative and discovery toxicology. *Toxicologic Pathology* 27:107-110.

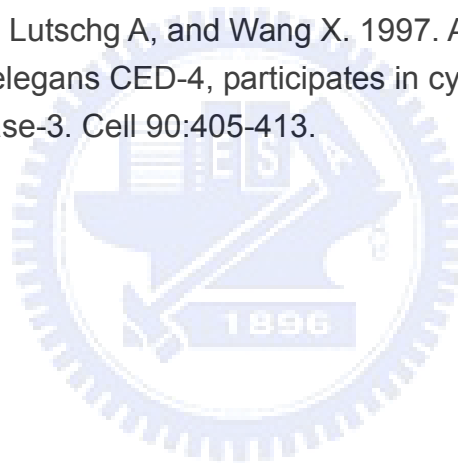
- Ryu JH, Son HJ, Lee SH, and Sohn DH. 2002. Two neolignans from *Perilla frutescens* and their inhibition of nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α expression in murine macrophage cell line RAW 264.7. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 12:649-651.
- Santella L, and Carafoli E. 1997. Calcium signaling in the cell nucleus. *FASEB Journal* 11:1091-1109.
- Sassa S, Sugita O, Galbraith RA, and Kappas A. 1987. Drug metabolism by the human hepatoma cell, Hep G2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 143:52-57.
- Schena M, Shalon D, Davis RW, and Brown PO. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467-470.
- Shalon D, Smith SJ, and Brown PO. 1996. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Research* 6:639-645.
- Shan CM, and Li J. 2002. Study of apoptosis in human liver cancers. *World Journal of Gastroenterology* 8:247-252.
- Shear NH, Malkiewicz I, Klein D, Randor S, Koren G, and Neuman MG. 1995. Acetaminophen-induced toxicity to keratinocytes and to hepatocytes in vitro is diminished by Silymarin. *Skin Pharmacology* 8:45-56.
- Shen YC, Tai HR, and Chen CY. 1996. New taxane diterpenoids from the roots of *Taxus mairei*. *Journal of Natural Products* 59:173-176.
- Shen YC, Prakash CV, Chen YJ, Hwang JF, Kuo YH, and Chen CY. 2001. Taxane diterpenoids from the stem bark of *Taxus mairei*. *Journal of Natural Products* 64:950-952.
- Sherlock G. 2000. Analysis of large-scale gene expression data. *Current Opinion in Immunology* 12:201-205.
- Sliva D. 2003 *Ganoderma lucidum* (Reishi) in cancer treatment. *Integrative Cancer Therapies* 2:358-364.
- Sliva D. 2004 Cellular and physiological effects of *Ganoderma lucidum* (Reishi). *Mini reviews in medicinal chemistry* 4:873-879.
- Sparreboom A, Cox MC, Acharya MR, and Figg WD. 2004. Herbal remedies in the United States: potential adverse interactions with anticancer agents. *Journal of Clinical Oncology* 22:2489-2503.

- Staal YC, van Herwijnen MH, van Schooten FJ, and van Delft JH. 2006. Modulation of gene expression and DNA adduct formation in HepG2 cells by polycyclic aromatic hydrocarbons with different carcinogenic potencies. *Carcinogenesis*. 27:646-655.
- Steiner S, and Anderson NL. 2000. Expression profiling in toxicology potentials and limitations. *Toxicology Letters* 112-113:467-471.
- Strater J, and Moller P. 2000. Expression and function of death receptors and their natural ligands in the intestine. *Annals of the New York Academy of Sciences* 915:162-170.
- Sumida A, Fukuen S, Yamamoto I, Matsuda H, Naohara M, and Azuma J. 2000. Quantitative analysis of constitutive and inducible CYPs mRNA expression in the HepG2 cell line using reverse transcription-competitive PCR. *Biochemical and biophysical research communications* 267:756-760.
- Szabo G, Catalano D, Bellerose G, and Mandrekar P. 2001. Interferon alpha and alcohol augment nuclear regulatory factor-kappaB activation in HepG2 cells, and interferon alpha increases pro-inflammatory cytokine production. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 25:1188-1197.
- Takeo S, Arai H, Kusano N, Harada T, Furuya T, Kawauchi S, Oga A, Hirano T, Yoshida T, Okita K, and Sasaki K. 2001. Examination of oncogene amplification by genomic DNA microarray in hepatocellular carcinomas: comparison with comparative genomic hybridization analysis. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 130:127-132.
- Tamayo P, Slonim D, Mesirov J, Zhu Q, Kitareewan S, Dmitrovsky E, Lander ES, and Golub TR. 1999. Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96:2907-2912.
- Taniuchi K, Nakagawa H, Nakamura T, Eguchi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Katagiri T, and Nakamura Y. 2005. Down-regulation of RAB6KIFL/KIF20A, a kinesin involved with membrane trafficking of discs large homologue 5, can attenuate growth of pancreatic cancer cell. *Cancer Research* 65:105-112.
- Tavazoie S, Hughes JD, Campbell MJ, Cho RJ, and Church GM. 1999. Systematic determination of genetic network architecture. *Nature Genetics* 22:281-285.
- Taylor A, Carmichael N, McKenna GF, and Burlage HM. 1951. Inhibition of the growth of egg cultivated tumor tissue by extracts of *Cooperia pedunculata* Herb. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 77:841-843.

- Teh BS, Chen P, Lavin MF, Seow WK, and Thong YH. 1991. Demonstration of the induction of apoptosis (programmed cell death) by tetrandrine, a novel anti-inflammatory agent. *International Journal of Immunopharmacology* 13:1117-1126.
- Tian Q, Taupin J, Elledge S, Robertson M, and Anderson P. 1995. Fas-activated serine/threonine kinase (FAST) phosphorylates TIA-1 during Fas-mediated apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine* 182:865-874.
- Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, and Phelps PC. 1997. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicologic Pathology* 25:82-88.
- Tseng TH, Hsu JD, Lo MH, Chu CY, Chou FP, Huang CL, and Wang CJ. 1998. Inhibitory effect of Hibiscus protocatechuic acid on tumor promotion in mouse skin. *Cancer Letters* 126:199-207.
- Tseng TH, Kao TW, Chu CY, Chou FP, Lin WL, and Wang CJ. 2000. Induction of apoptosis by hibiscus protocatechuic acid in human leukemia cells via reduction of retinoblastoma (RB) phosphorylation and Bcl-2 expression. *Biochemical Pharmacology* 60:307-315.
- Tsubaki T, Arita N, Kawakami T, Shiratsuchi T, Yamamoto H, Takubo N, Yamada K, Nakata S, Yamamoto S, and Nose M. 2005. Characterization of histopathology and gene-expression profiles of synovitis in early rheumatoid arthritis using targeted biopsy specimens. *Arthritis Research and Therapy* 7:825-836.
- Ueda H, Yamazaki C, and Yamazaki M. 2002. Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25:1197-1202.
- Ueda H, Yamazaki C, and Yamazaki M. 2003. Inhibitory effect of *Perilla* leaf extract and luteolin on mouse skin tumor promotion. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 26:560-563.
- Wada S, Satomi Y, Murakoshi M, Noguchi N, Yoshikawa T, and Nishino H. 2005. Tumor suppressive effects of tocotrienol in vivo and in vitro. *Cancer Letters* 229:181-191.
- Wanebo HJ, and Vezeridis MP. 1993. Hepatoma. *Journal of Surgical Oncology* 3:40-45.
- Wang CC, Chen LG, and Yang LL. 1999. Inducible nitric oxide synthase inhibitor of the Chinese herb I. *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. *Cancer Letters* 145:151-157.
- Wang J, Huang Q, and Chen M. 2003. The role of NF-kappaB in hepatocellular carcinoma cell. *Chinese Medical Journal* 116:747-752.

- Wood KA, and Youle RJ. 1994. Apoptosis and free radicals. *Annals of the New York Academy of Sciences* 738:400-407.
- Wyllie AH. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284:555-556.
- Xu K, Tavernarakis N, and Driscoll M. 2001. Necrotic cell death in *C. elegans* requires the function of calreticulin and regulators of Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum. *Neuron* 31:957-971.
- Yang H, Wang X, and Yu L. 1996. The antitumor activity of elemene is associated with apoptosis. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 18:169-172.
- Yang MD, Deng QG, Chen S, Xiong S, Koop D, and Tsukamoto H. 2005. Hepatoprotective mechanisms of Yan-gan-wan. *Hepatology Research* 32:202-212.
- Yang NS, Shyur LF, Chen CH, Wang SY, and Tzeng CM. 2004. Medicinal herb extract and a single-compound drug confer similar complex pharmacogenomic activities in mcf-7 cells. *Journal of Biomedical Science* 11:418-422.
- Yeung TK, Germond C, Chen X, and Wang Z. 1999. The mode of action of taxol: Apoptosis at low concentration and necrosis at high concentration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 263:398-404.
- Yeung KY, and Ruzzo WL. 2001. Principal component analysis for clustering gene expression data. *Bioinformatics* 17:763-774.
- Yi JM, Kim MS, Seo SW, Lee KN, Yook CS, and Kim HM. 2001. *Acanthopanax senticosus* root inhibits mast cell-dependent anaphylaxis. *Clinica Chimica Acta* 312:163-168.
- Yoo SM, Oh SH, Lee SJ, Lee BW, Ko WG, Moon CK, and Lee BH. 2002. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by tetrandrine in HepG2 cells. *Journal of Ethnopharmacology* 81:225-229.
- Yoshida J, Takamura S, Yamaguchi N, Ren LJ, Chen H, Koshimura S, and Suzuki S. 1989. Antitumor activity of an extract of *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. against murine tumor cell lines. *The Japanese Journal of Experimental Medicine* 59:157-161.
- Yu MW, Gladek-Yarborough A, Chiamprasert S, Santella RM, Liaw YF, and Chen CJ. 1995. Cytochrome P450 2E1 and glutathione S-transferase M1 polymorphisms and susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 109:1266-1273.
- Yuen JW, and Gohel MD. 2005. Anticancer effects of *Ganoderma lucidum*: a review of

- scientific evidence. *Nutrition and Cancer* 53:11-17.
- Zhang YB, Wang J, Wang ZT, But PP, and Shaw PC. 2003. DNA microarray for identification of the herb of dendrobium species from Chinese medicinal formulations. *Planta Medica* 69:1172-1174.
- Zhang M, Chiu LC, Cheung PC, and Ooi VE. 2006. Growth-inhibitory effects of a beta-glucan from the mycelium of *Poria cocos* on human breast carcinoma MCF-7 cells: cell-cycle arrest and apoptosis induction. *Oncology Reports* 15:637-643.
- Zhu JS, Halpern GM, and Jones K. 1998. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis*: part I. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 4:289-303.
- Zhu JS, Halpern GM, and Jones K. 1998. The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis*: part II. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 4:429-457.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, and Wang X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome C-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90:405-413.



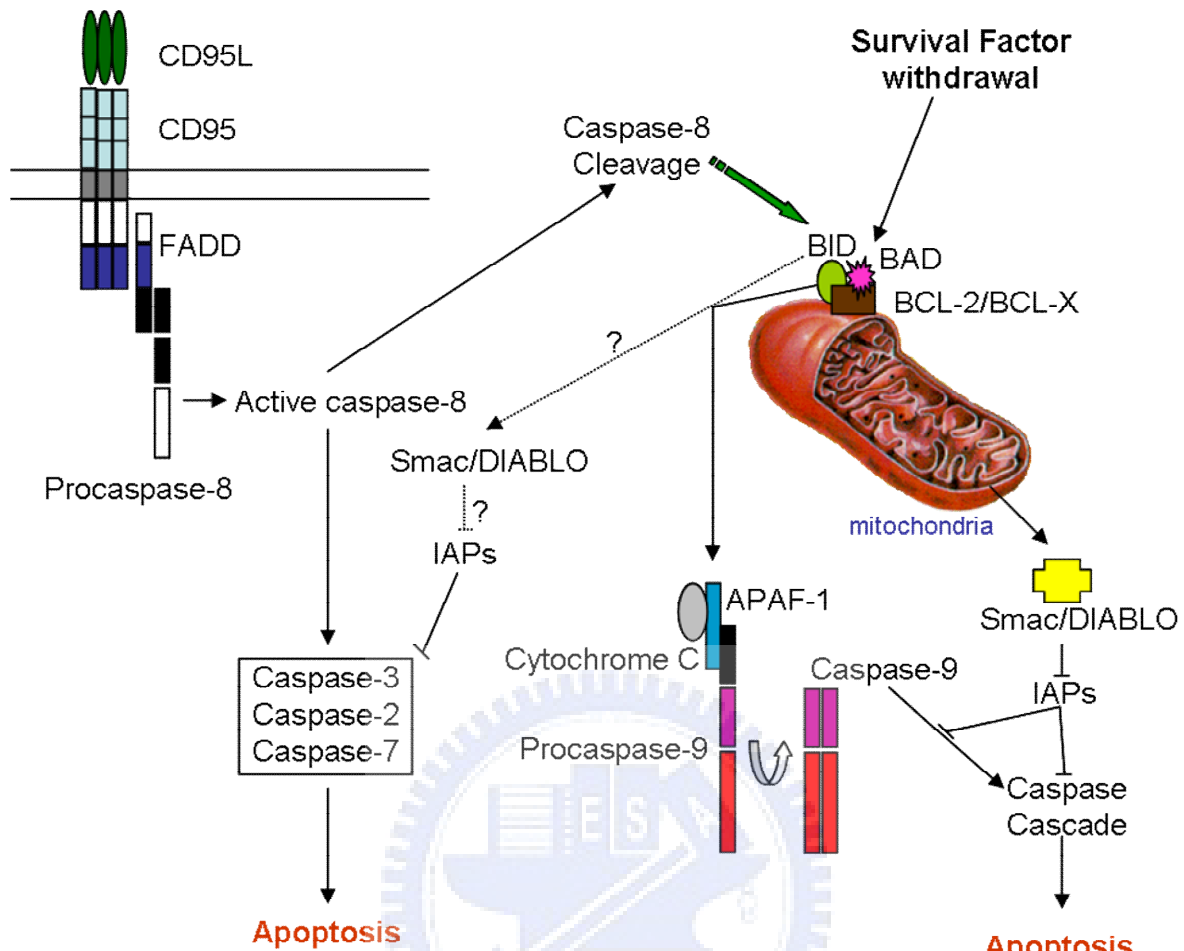


Figure 1-1. Pathway of apoptosis.

圖 1-1、細胞凋亡的途徑。細胞凋亡的過程可分為兩種，第一種為通過腫瘤壞死因子（Tumor necrosis factor; TNF）受體家族的受體與配體結合，在 Fas 死亡蛋白（Fas-associated death domain protein）的協助下，受體不斷的在細胞質中收集 Procaspase 8，引發 Caspase 3, 6 和 7 作用，進而引起細胞程序性的死亡；另外一個途徑為 DNA 損傷激發腫瘤抑制基因後，接著刺激 Bcl-2 家族中於細胞凋亡前起作用的成員（例如 Bax 或 Bad）的表現，導致粒線體內外膜間的物质釋放（例如 cytochrome C、Smac/DIABLO），Cytochrome C 與細胞質中的 APAF-1 以及 procaspase 9 共同組成凋亡體（即為 caspase 9 的活化形式），接著引發 Caspase 3, 6 和 7 作用，並進行細胞凋亡作用，最後細胞慢慢地縮小，由巨噬細胞吞噬 [Jacobson et al., 2002]。

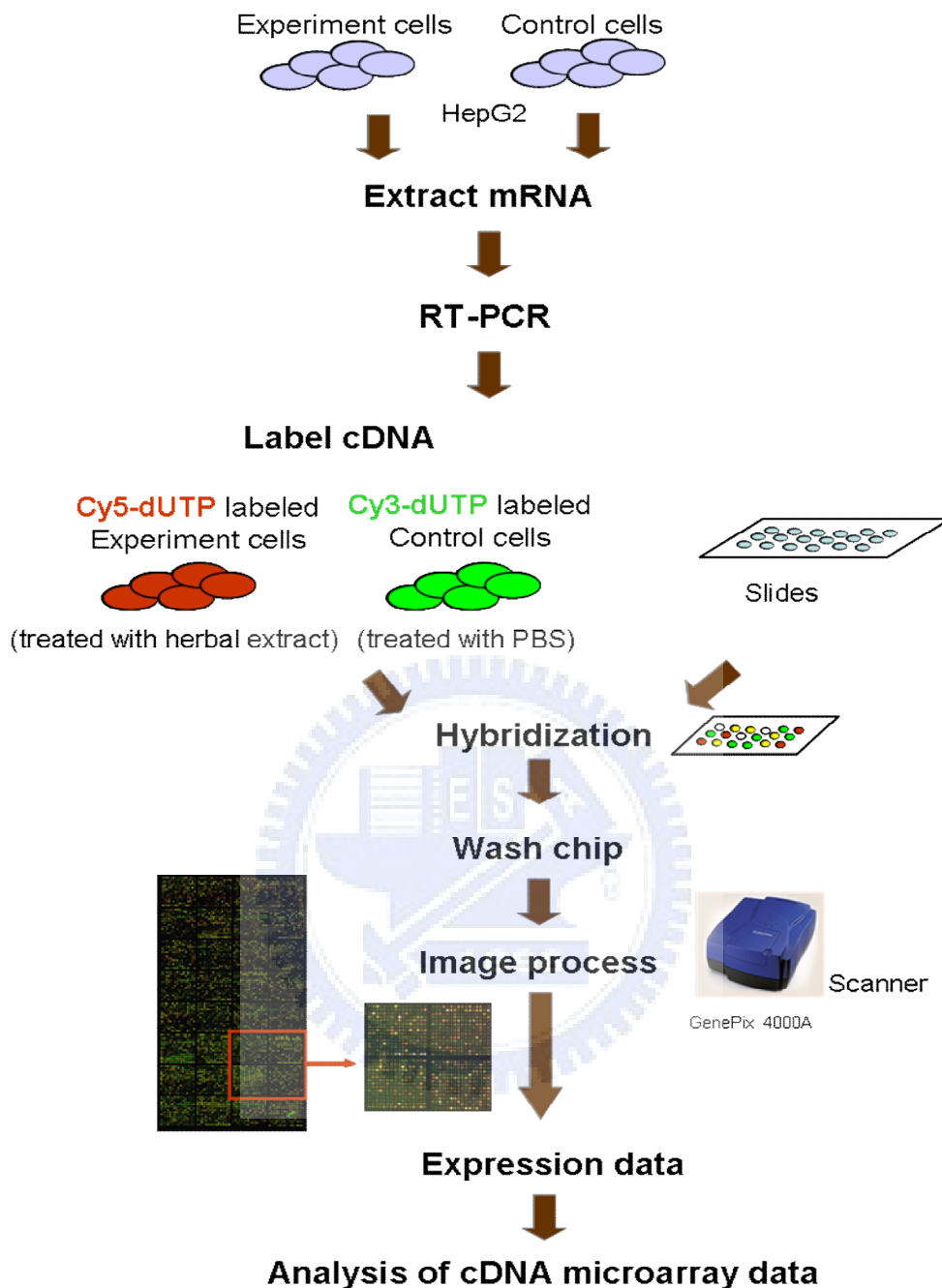


Figure 2-1. Flow chart of cDNA microarray analysis.

圖 2-1、cDNA 微陣列分析流程圖。經過不同中草藥水萃出物處理 HepG2 細胞 72 小時後，萃取的 mRNA 以 RT-PCR 標定上 Cy3-dUTP (PBS 處理 HepG2 細胞) 或 Cy5-dUTP (中草藥水萃出物處理 HepG2 細胞)，標定好的 cDNA 探針在含有 7,680 個 spots 的 cDNA 微陣列晶片上進行 16 小時的競爭性雜合作用，清洗作用完成的 cDNA 微陣列後，再以 GenePix 4000A 掃描器擷取晶片上的影像 (左下角)，由得到的微陣列影像 (含有 32 個 15×16 的矩陣) 分別取得每一 spot 的 Cy3 數值、Cy3 背景值、Cy5 數值及 Cy5 背景值，經過篩選過濾與標準化的步驟後，經過對數轉換，並以 Cluster 3.0 程式分析基因表現樣式。

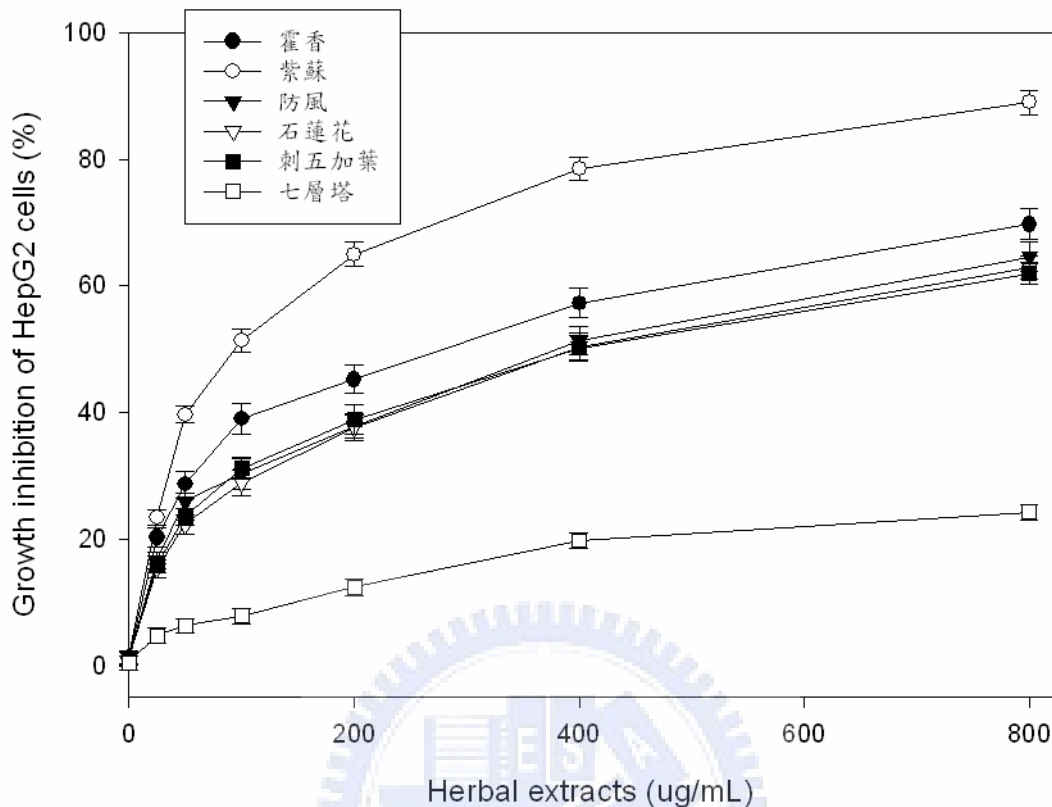


Figure 3-1. MTT cytotoxicity assay about the effect of herbal extracts on HepG2 cell growth.

圖 3-1、中草藥水萃出物處理 HepG2 的細胞存活率分析。以不同濃度的霍香、紫蘇、防風、石蓮花、刺五加葉及七層塔水萃出物處理 HepG2 細胞後，作為細胞存活率的分析。HepG2 細胞 (3×10^4 /well) 以濃度為 0、25、50、100、200、400 及 800 $\mu\text{g/mL}$ 的紫蘇、霍香、防風、刺五加葉、石蓮花及七層塔水萃出物於 96-well 細胞培養盤中處理 72 小時，並以 PBS 處理細胞為對照組，Y 軸為抑制 HepG2 細胞生長的百分率，X 軸為不同中草藥水萃出物的濃度。使用六種中草藥水萃出物，當中草藥水萃出物濃度為 100 $\mu\text{g/mL}$ 時，抑制細胞生長的百分比為霍香 $39.0 \pm 2.5\%$ 、紫蘇 $51.4 \pm 1.9\%$ 、防風 $30.3 \pm 2.4\%$ 、石蓮花 $28.9 \pm 2.0\%$ 、刺五加葉 $31.2 \pm 1.8\%$ 及七層塔 $7.9 \pm 1.2\%$ ，在濃度為 400 $\mu\text{g/mL}$ 時，抑制細胞生長的百分比為霍香 $57.3 \pm 2.3\%$ 、紫蘇 $78.5 \pm 1.8\%$ 、防風 $51.3 \pm 2.2\%$ 、石蓮花 $50.4 \pm 2.1\%$ 、刺五加葉 $50.2 \pm 2.0\%$ 及七層塔 $19.8 \pm 1.3\%$ (平均值 \pm 標準偏差)。取紫蘇、霍香、防風、刺五加葉與石蓮花，在 IC_{50} 的濃度下，進行 HepG2 的 cDNA 微陣列分析。

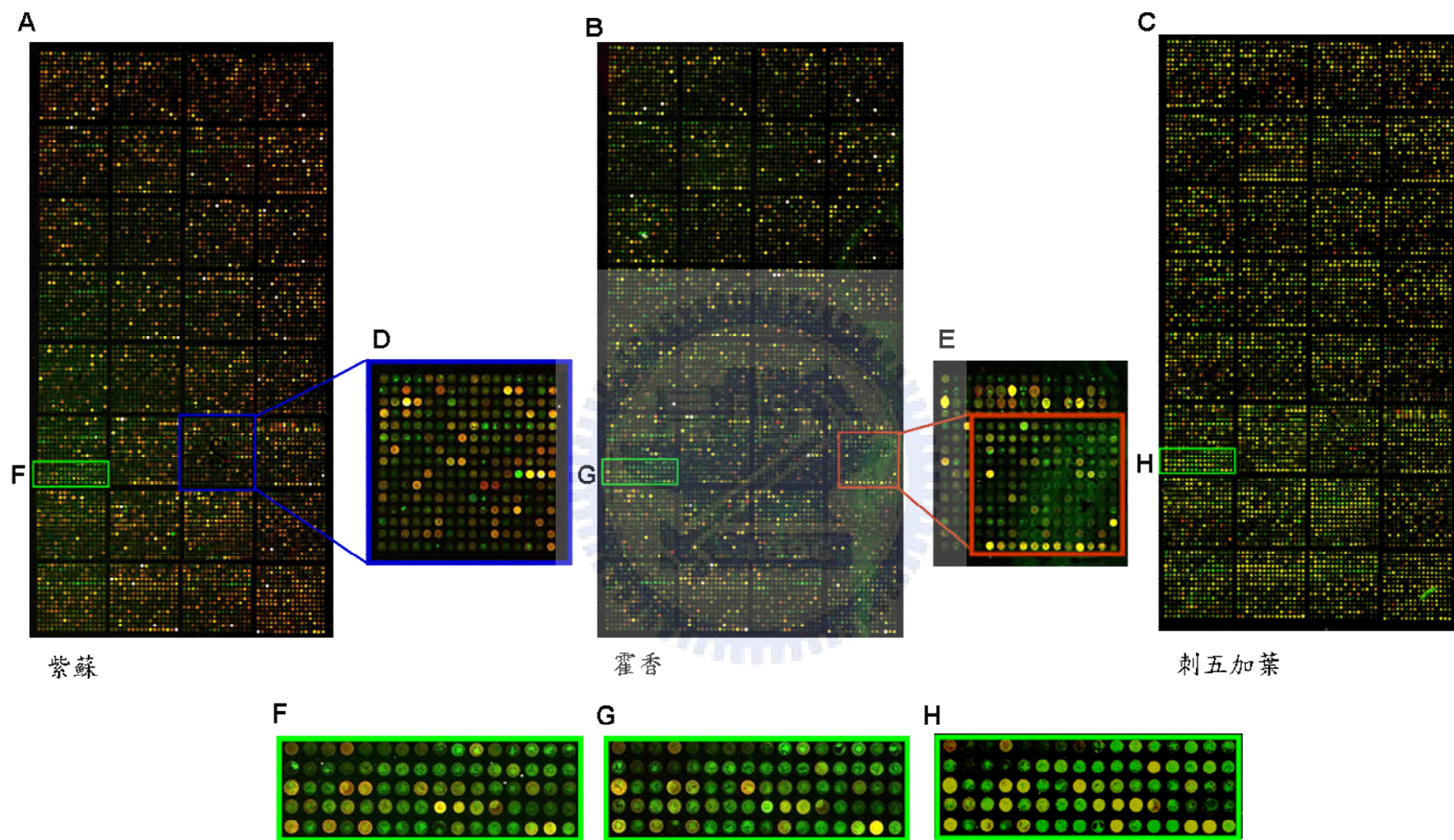


圖3-2

Figure 3-2. Images in cDNA microarray images have shown after GenePix fluorescent scanning.

圖 3-2、經 GenePix 螢光掃描機擷取 cDNA 微陣列的影像。HepG2 細胞以不同濃度的紫蘇 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、霍香 (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、防風 (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、刺五加葉 (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、石蓮花 (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及 PBS (對照組) 分別處理 72 小時後, 抽取細胞中的 Total mRNA, 經過 RT-PCR 分別標定上螢光 Cy5-dUTP (實驗組) 與 Cy3-dUTP (對照組), 於含有 7,680 個 spot 的 cDNA 微陣列晶片上進行競爭性雜合作用, 以 GenePix 4.0 螢光掃描機擷取微陣列的影像, 並換算微陣列上每一個 spot 所擷取出來的數值, 彙整為基因表現樣式的資料庫, 擷取的資料中, 刪除數值小於背景值的 spot 與飽和點, 留下平均約 4,000 個基因表現樣式的 Cy5/Cy3 比值做之後的分析。圖中所示為分別經過紫蘇 (A)、霍香 (B) 及刺五加葉 (C) 處理後的 HepG2 細胞 total mRNA 經過 cDNA 微陣列晶片分析影像。在微陣列分析的過程中, 污損的 spot 為常發生的問題之一, 霍香處理的微陣列影像中所框出區塊, 為經競爭性雜合作用後, 在晶片上產生的污損區塊, (E) 為放大的影像, 在晶片資料分析中, 會刪除涵蓋在此區塊的 spot 數值, 紫蘇處理的微陣列影像中, 藍色區塊為含有飽和點的矩陣, 在 (D) 為放大的影像中, 除了飽和點之外, 其他 spot 的影像清晰且形狀完整, 可以經影像擷取與篩選後, 進行 cDNA 微陣列資料分析。在分析微陣列影像的過程中也發現, 晶片本身的問題, 三片晶片所框出綠色區域 (分別由 F 紫蘇、G 霍香與 H 刺五加葉處理的結果) 基因表現樣式的結果相同, 可由分析過程中去除此區塊的 spot, 並減少實驗誤差。

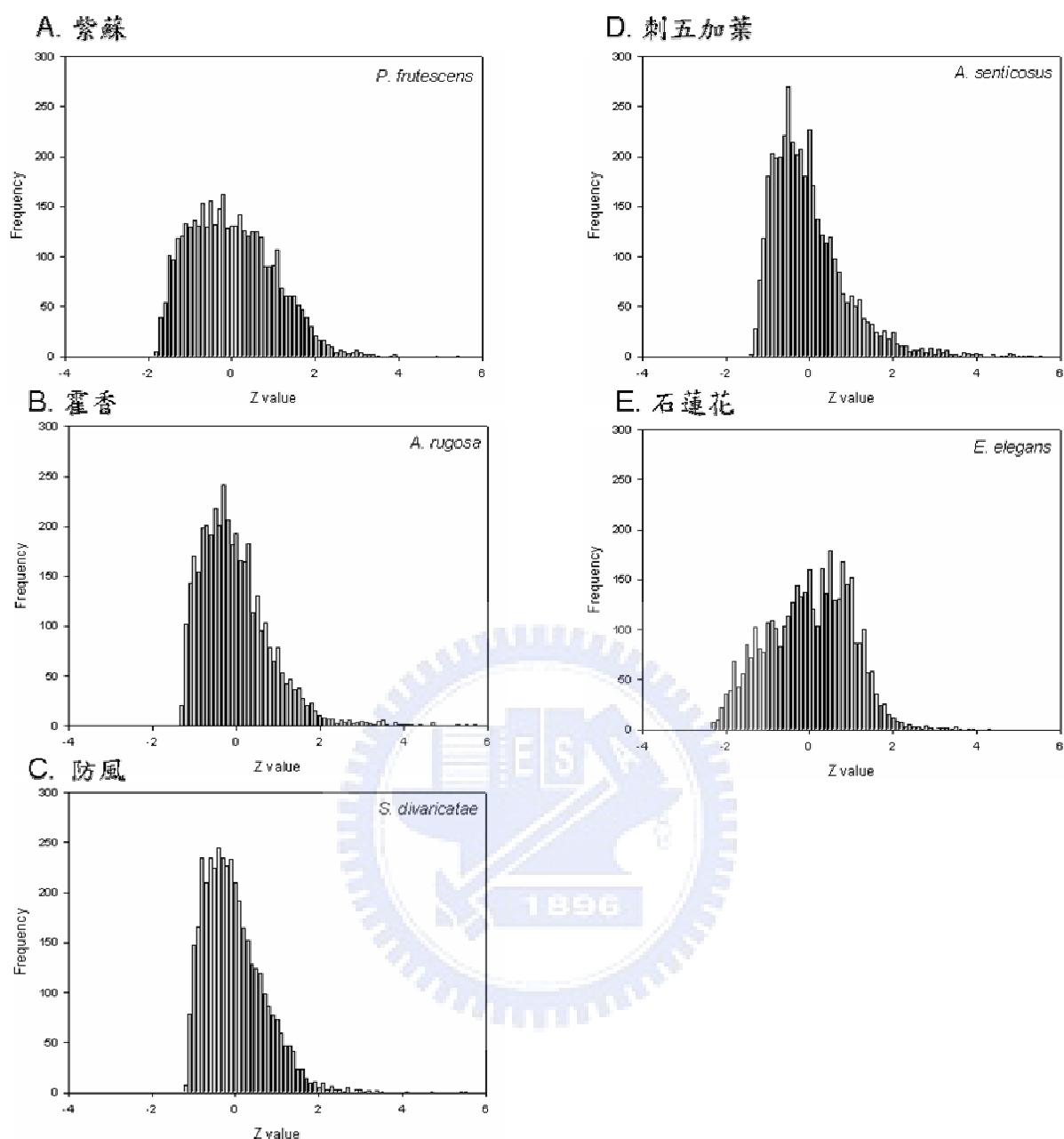


Figure 3-3. Standard normal distribution graphs of microarray Cy5/Cy3 ratio by different herbal extracts treatment.

圖 3-3、不同中草藥處理的微陣列 Cy5/Cy3 比值的標準常態分佈。分別經過紫蘇 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、霍香 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、防風 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、刺五加葉 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及石蓮花 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理 72 小時的微陣列數值，比較經正規化處理後，比較基因間 Cy5/Cy3 比值的標準常態分佈數值。經 SAS (strategic applications system) 程式分析後，不同中草藥處理的偏態係數依序為紫蘇 0.52、霍香 4.79、防風 7.67、刺五加葉 3.81 及石蓮花 0.06，峰值係數依序為 0.06、59.15、123.93、48.39 及 0.08 (表 3-1)。不同基因表現樣式經標準化後，偏態係數皆大於零，標準常態分佈的結果為基因表現樣式族群的分配偏向右側，

而峰值係數皆為正，基因表現樣式族群的分配在常態分佈中的鍾形曲線為偏高且窄，在五種不同中草藥處理的結果中，霍香、防風與刺五加葉處理後的標準常態分佈數值顯示，這三種中草藥處理比紫蘇與石蓮花處理後的基因表現族群集中，由常態分佈的結果可知，在霍香、防風及刺五加葉處理的微陣列分析中，比起紫蘇或石蓮花處理的微陣列分析，更具有相似的標準常態分佈圖。



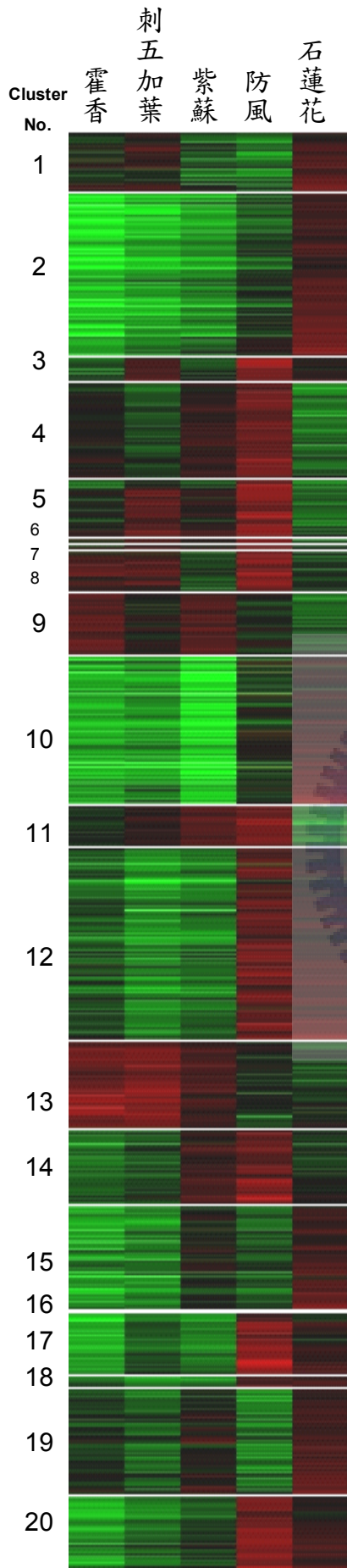


圖 3-4

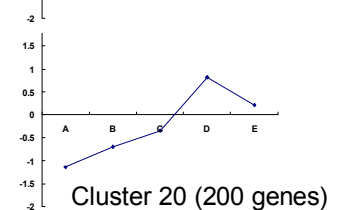
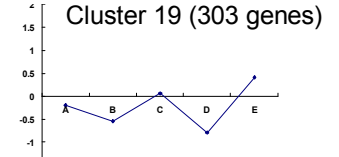
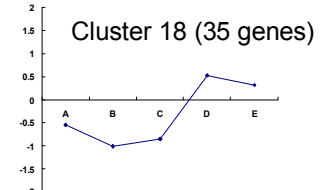
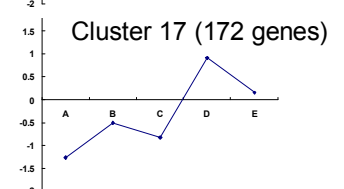
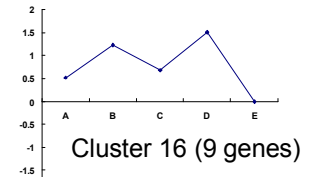
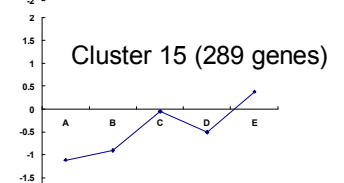
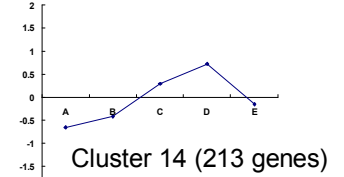
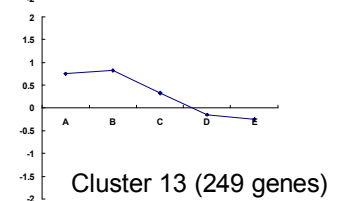
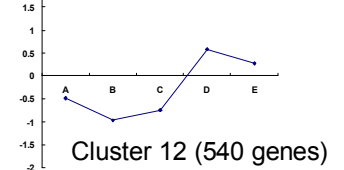
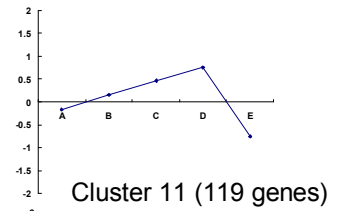
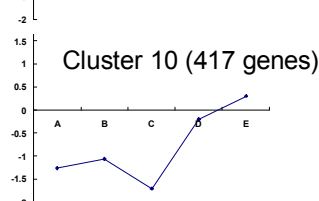
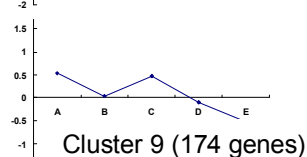
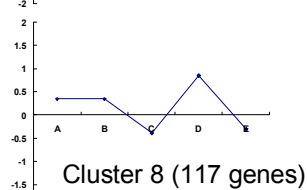
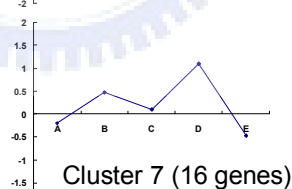
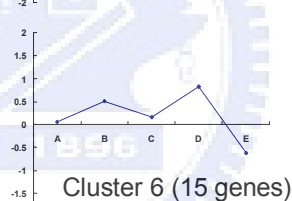
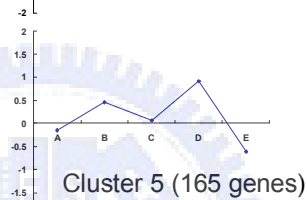
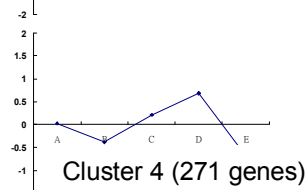
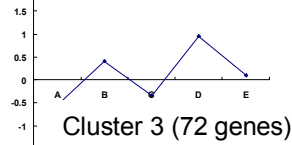
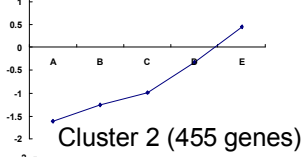
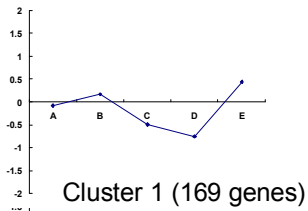
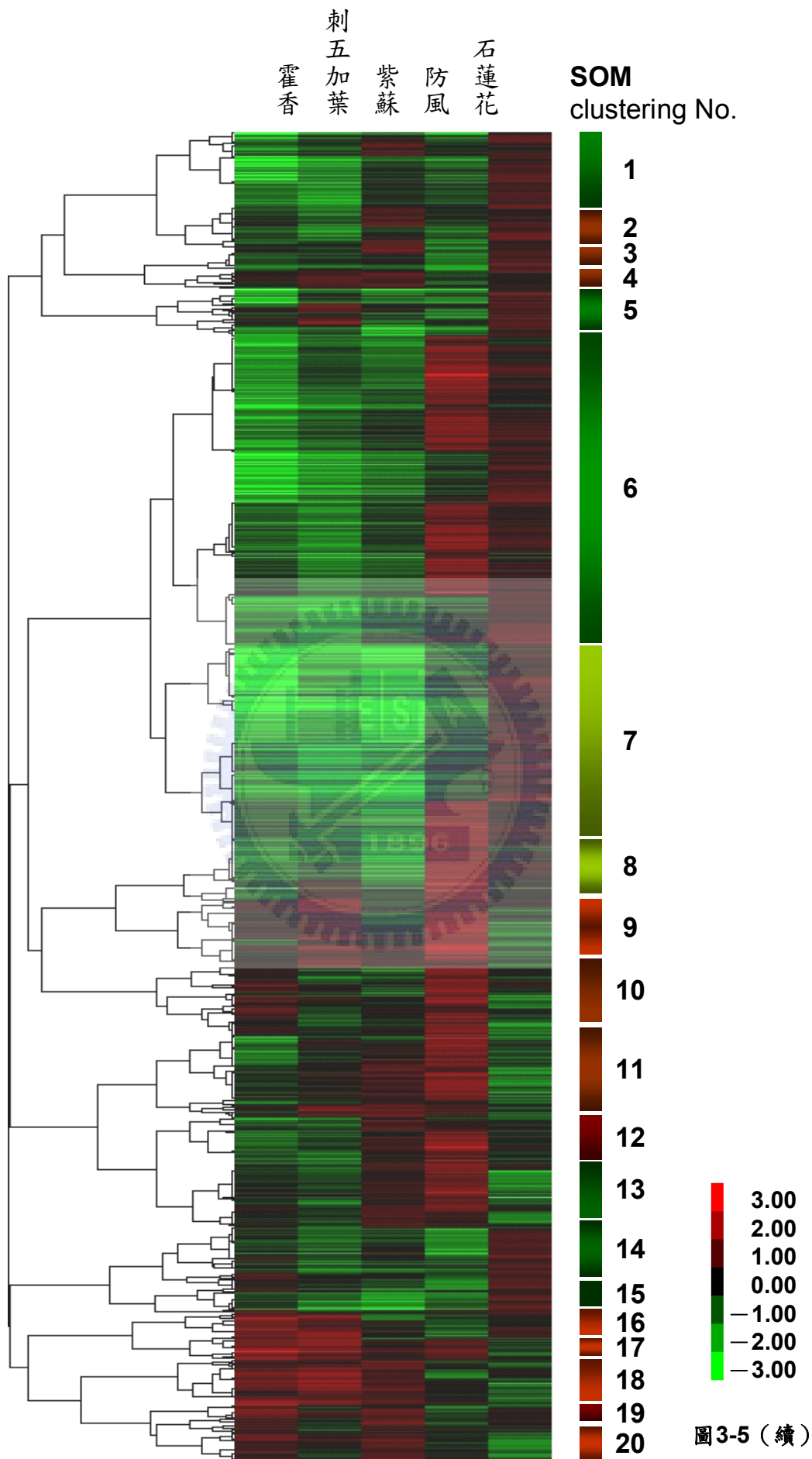


Figure 3-4. K-mean clustering results of gene expression pattern with different herbal extracts treatment.

圖 3-4、不同中草藥處理對於基因表現樣式之逐步叢集分析結果。分析 HepG2 細胞經五種不同中草藥水萃出物處理後，約 7,000 個以上基因表現樣式經多重篩選、過濾與標準化後，平均約 4,000 個基因經對數轉換後，以 Cluster 3.0 程式作逐步叢集分析，可以顯示出基因表現的變化量，主要分為 20 群叢集，並以 Java TreeView 軟體顯示分析結果（樹狀圖）。圖中的基因表現樣式以綠色表示 Cy5/Cy3 的比值為負，而紅色表示 Cy5/Cy3 的比值為正，左圖中 A-E 分別為紫蘇 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、霍香 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、防風 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、刺五加葉 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及石蓮花 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 處理 72 小時。圖示是每一個叢集中的基因平均樣式以 Y 軸表示，而 X 軸為不同的中草藥水萃出物處理。叢集 1-20 中基因數目依序為 169、455、72、271、165、15、16、117、174、417、119、540、249、213、289、9、172、35、303 及 200。





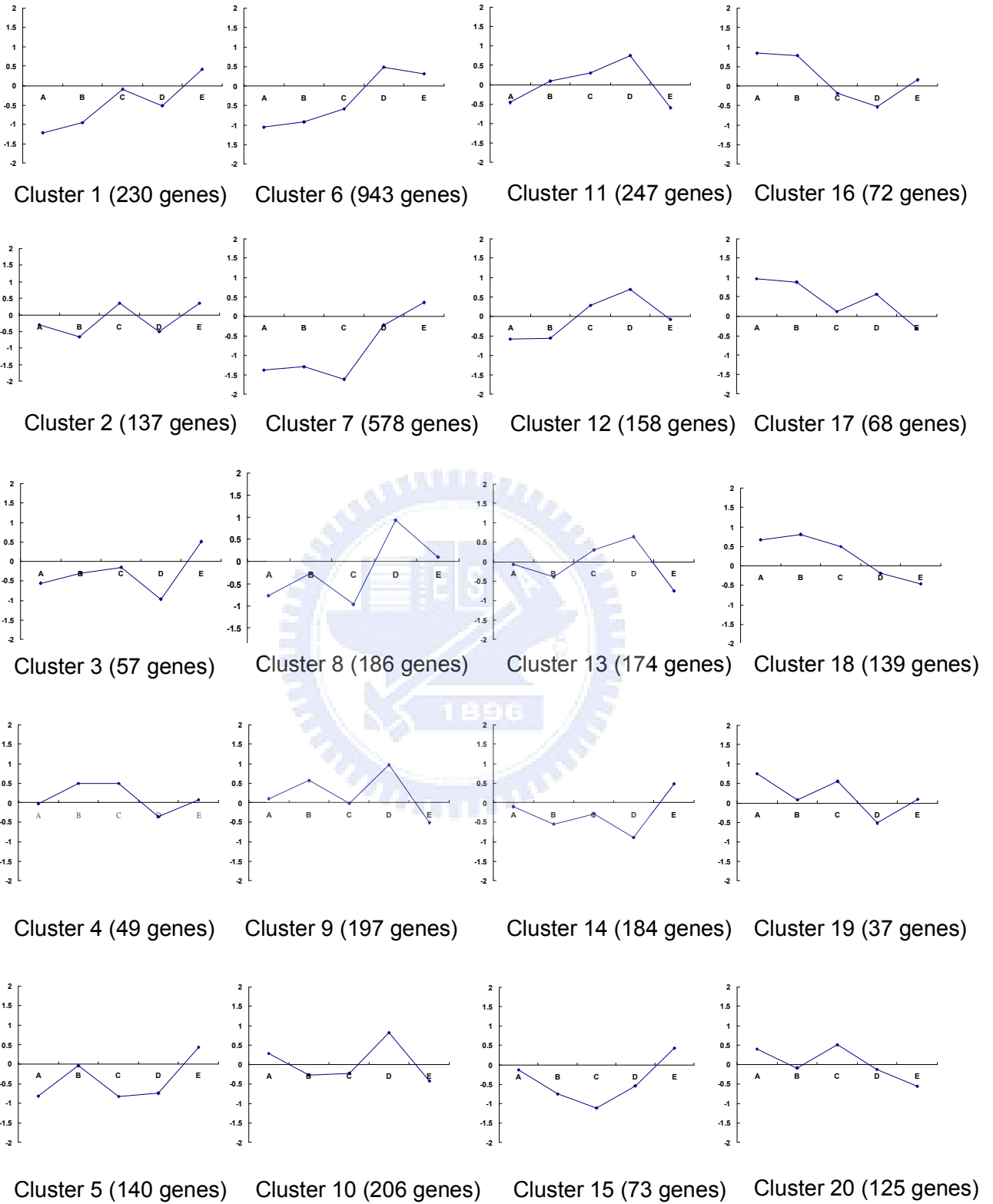


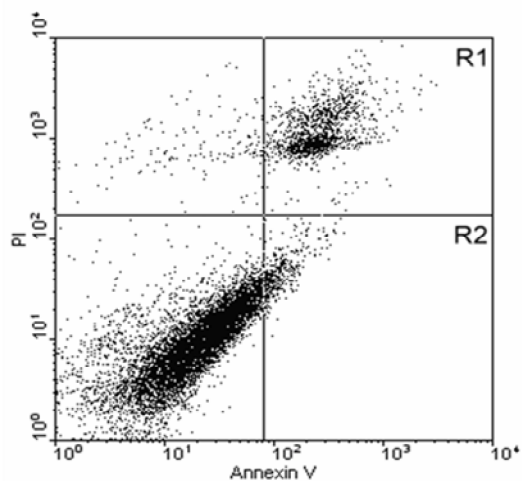
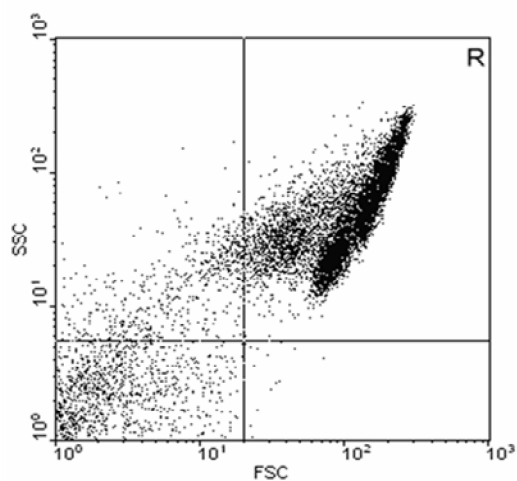
圖 3-5

Figure 3-5. SOM clustering results of gene expression pattern were inducing by five herbal extracts treatment.

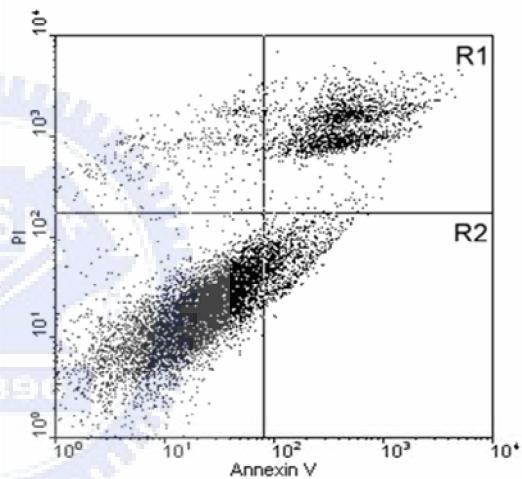
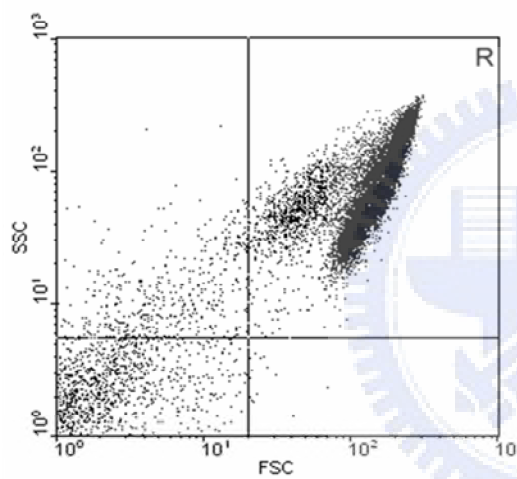
圖 3-5、五種中草藥處理所誘發基因表現樣式之自組圖分析結果。分析紫蘇、霍香、防風、刺五加葉與石蓮花處理 HepG2 細胞 72 小時後，對於不同基因表現樣式間的影響，7,680 個 spots 經篩選、過濾及標準化後，以平均約 4,000 個的基因做自組圖分析 (4×5 SOM)，以基因間的相關性主要分為 20 個叢集，自組圖分析的結果以 Java TreeView 軟體畫出分佈的樹狀圖，於圖所列為叢集 1-20 (皆大於相關係數 0.3，中度正相關)。1-20 叢集內的所屬基因數量 (相關係數) 依序分別為 230 (0.6)、137 (0.6)、57 (0.8)、49 (0.6)、140 (0.3)、943 (0.5)、578 (0.4)、186 (0.6)、197 (0.5)、206 (0.3)、247 (0.3)、158 (0.6)、174 (0.6)、184 (0.4)、73 (0.3)、72 (0.6)、68 (0.6)、139 (0.5)、37 (0.8) 及 125 (0.3)。探討每一叢集中基因表現樣式的變化，並將每一個叢集中的基因平均樣式以 Y 軸表示；而 X 軸上 A-E 分別為以紫蘇、霍香、防風、刺五加葉及石蓮花處理 HepG2 細胞 72 小時後，基因表現樣式的平均數值。



A. Control



B. 紫蘇



C. 藿香

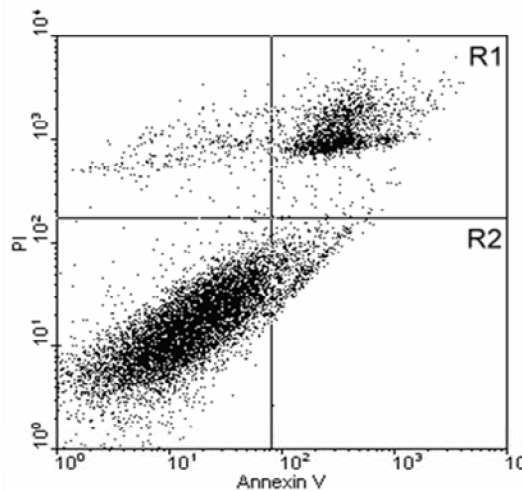
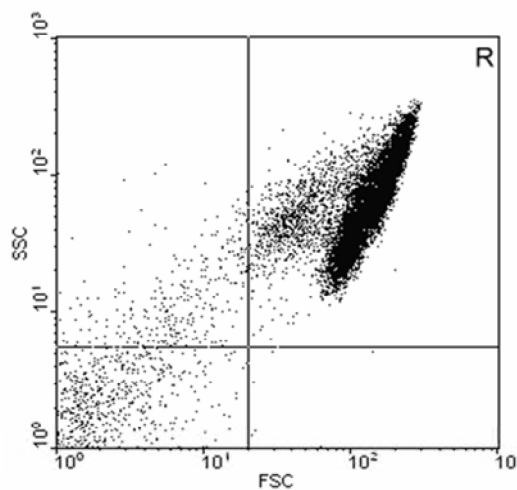
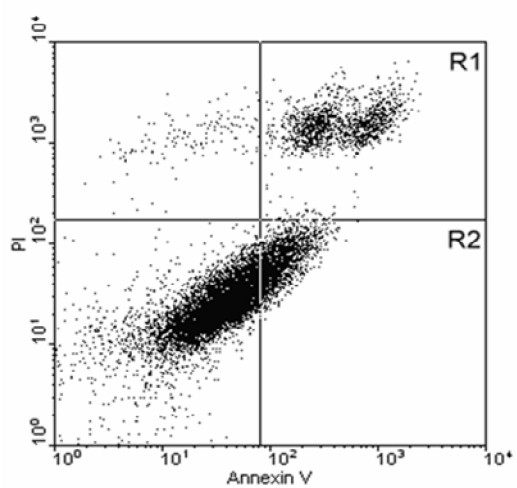
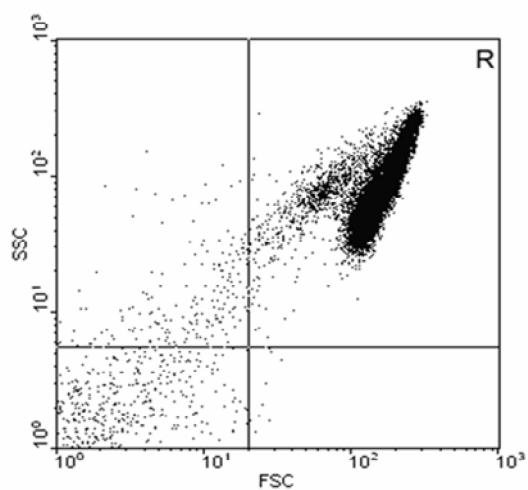
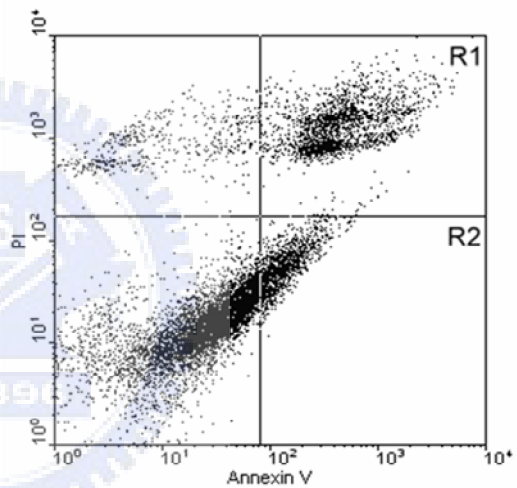
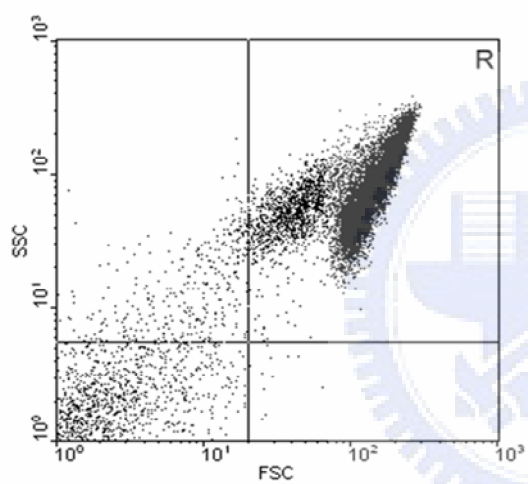


圖3-6 (續)

D. 防風



E. 刺五加葉



F. 石蓮花

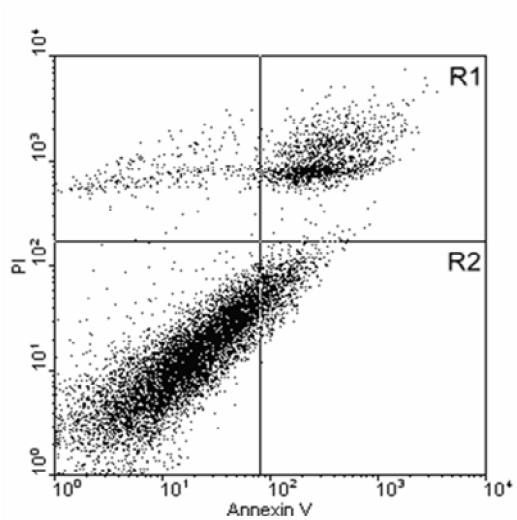
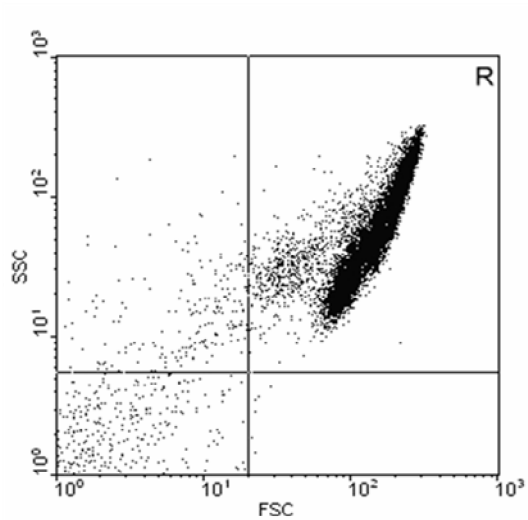


圖3-6

Figure 3-6. The flow cytometry analysis results of the different herbal extracts treatment in HepG2 cells for 72 h.

圖 3-6、不同中草藥處理 HepG2 細胞 72 小時後的流式細胞儀分析結果。HepG2 細胞 (2×10^5 /well) 置於 6 well 細胞培養盤，經 PBS (control 組) 或不同濃度的中草藥處理 72 小時後，以流式細胞儀分析細胞族群，以二維統計圖表示結果，依序為 control 組 (A)、紫蘇 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (B)、霍香 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (C)、防風 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (D)、刺五加葉 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (E) 及石蓮花 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (F)，分別估計 R1 (PI+/AnnexinV+) 與 R2 (PI-/AnnexinV+) 來計算細胞族群分佈的百分比。在不同中草藥處理後，R2 區域顯著的比 control 組多。



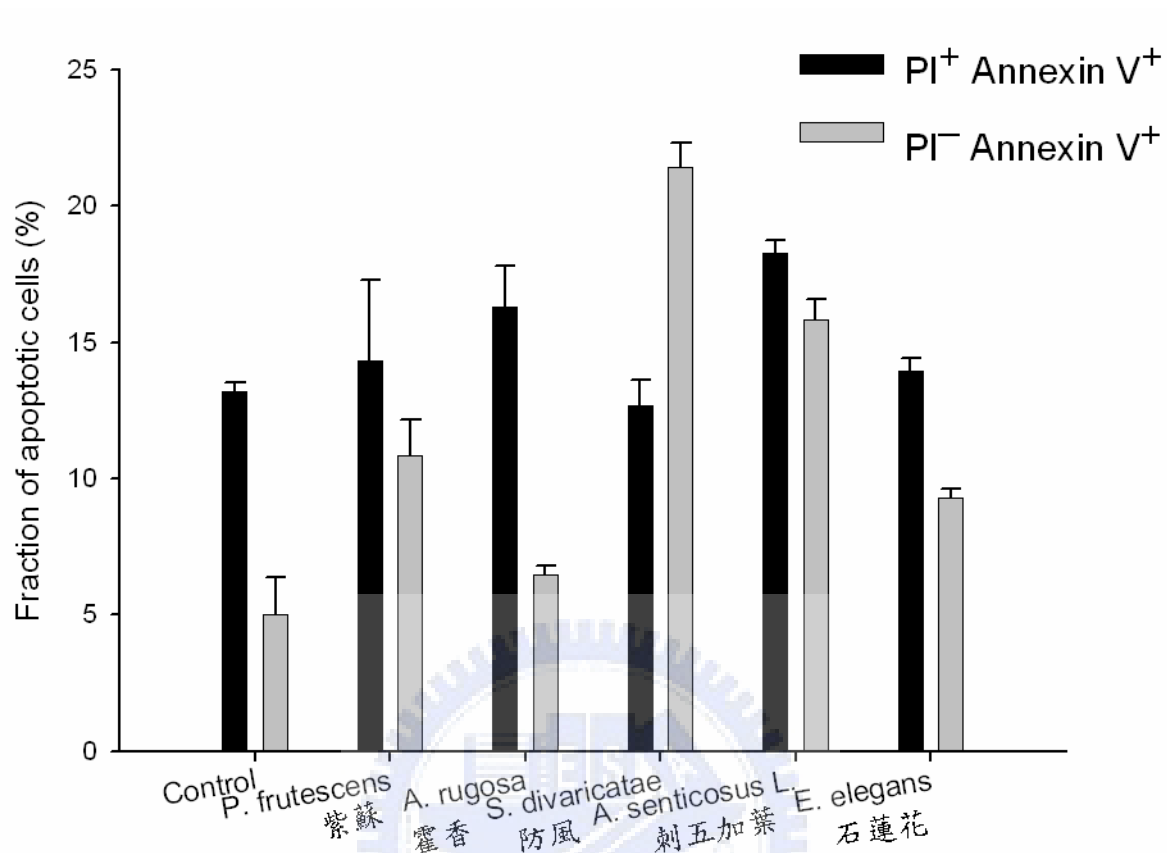


Figure 3-7. The flow cytometry results of PI-AnnexinV⁺ and PI⁺AnnexinV⁺ populations in herbal extracts treatment.

圖 3-7、以流式細胞儀分析中草藥水萃出物處理後 PI-AnnexinV⁺與 PI⁺AnnexinV⁺族群的結果。HepG2 細胞 (2×10^5 /well) 培養於 6-well 細胞培養盤中，經過 PBS 及紫蘇、霍香、防風、刺五加葉與石蓮花處理 72 小時後，以 PI 與 AnnexinV 標記，再使用流式細胞儀分析細胞的族群，擷取 R1 (PI⁺AnnexinV⁺) 與 R2 (PI-AnnexinV⁺) 區域分別計算細胞數目，並使用 WinMDI 軟體估計細胞所佔的百分比。運算之結果以直方統計圖來比較不同中草藥處理後對於 HepG2 細胞所產生的影響。經處理 72 小時後，R2 的結果為對照組 $5.0 \pm 1.4\%$ (R1 為 13.2 ± 0.3)、紫蘇 $10.9 \pm 1.3\%$ (R1 為 14.3 ± 3.0)、霍香 $6.5 \pm 0.4\%$ (R1 為 16.3 ± 1.5)、防風 $21.4 \pm 0.9\%$ (R1 為 12.7 ± 0.9)、刺五加葉 $15.8 \pm 0.8\%$ (R1 為 18.3 ± 0.5) 及石蓮花 $9.3 \pm 0.3\%$ (R1 為 14.0 ± 0.5)。

Table 1-1. Analysis methods of cDNA microarray.

表 1-1、微陣列晶片的分析方法。

| 分析方法 | 原理 | 優點 | 缺點 |
|---|--|-------------------------|---------------------------------|
| 系統叢集分析 (Hierarchical Clustering) | 將資料點放入有嚴格等級的子集中，最接近的資料點分為一群，並用一個新點（兩點的平均值）來代替，其他點以同樣的處理，直到最後成為一個點。 | 適合用於具有層級性的資料結構。 | 不適用於分析相似基因表現的複雜資料。 |
| 逐步叢集分析 (k-mean clustering) | 輸入 K 值將資料群隨機分為 K 個叢集，接著計算每個叢集的平均值，並隨機選擇一個資料點，將此資料點加入平均值與該點數值最接近的叢集，並重新計算叢集的平均值，計算至沒有資料改變叢集時，達到叢集內的變異最小，叢集間的變異最大。 | 可以分類相似基因。 | 視資料為獨立個體，資料之間並無關連性。 |
| 自組圖分析 (Self Organizing Maps) | 為另一種形式的逐步分析，但保存相鄰叢集間的關係。 | 易於觀察與理解，精確度由於其他叢集分析方法。 | 當高維空間轉變成低維時，只能保留與高維相鄰叢集相關的某些成分。 |
| 主成分分析 (Principal Component Analysis) | 將 M 個變量進行線性組合，得到 M 個互相獨立且沒有缺失的新變量（綜合變量）。 | 可分析資料變化較大的點及變化的範圍，簡化資料。 | 簡化資料維度的過程中（即降低變數個數），會喪失少部分資訊。 |

（參考文獻：Tamayo et. al., 1999., Yeung and Ruzzo, 2001)

Table 1-2. Development and study in scientific herbs.

表 1-2、科學中草藥的研究發展。

| 年代 | 應用層面 | 研究摘要 |
|-----------|------------------------------|---|
| 1950~1970 | 由中草藥中分離單一成分。 | 最早應用中草藥的研究報告為 1951 年 Taylor 等人應用 <i>Cooperia pedunculata</i> Herb。 |
| 1971~1990 | 由萃取的單一成分應用在抗腫瘤與抗癌研究。 | <p>1974 年 Melo 等人最早應用中草藥的單一成分於癌症，將 Primin (<i>Miconia sp.</i> 植物中萃取)，Plumbagin (<i>Plumbago scandens</i> 中萃取) 與 Maytenin (<i>Maytenus sp.</i> 中萃取) 應用皮膚癌上。1976 年 Kuroda 等人使用薺菜萃出物用於抑制 Ehrlich 腫瘤的生長。</p> <p>進入八 0 年代，中草藥的研究仍以抗癌抗腫瘤為主，列如：1981 年 Kuroda 與 Akao 從 <i>Capsella bursa-pastoris</i> herb 中萃取出反丁烯二酸用來抑制 Ehrlich 腫瘤的生長。</p> |
| 1991~2000 | 應用中草藥誘導腫瘤或癌細胞產生細胞凋亡作用。 | 由 Yang 等人在 1996 年提出由 <i>Rhizoma Zedoariae</i> 中草藥中萃取出 Elemene，可以抑制 HL-60 的增殖，並誘發 HL-60 細胞產生細胞凋亡作用。 |
| 2001~ | 應用 DNA 微陣列偵測經中草藥處理後所誘發的基因表現。 | 2002 年 Lee 等使用白芍處理人類肝癌細胞株 HepG2 與 Hep3B，發現具有抑制癌細胞生長並應用含有 384 個與細胞凋亡相關基因的微陣列分析基因表現。 |

Table 1-3. Anticancer studies in using herbs.

表 1-3、應用中草藥的抗癌研究。

| 中草藥名 | 活性成分與研究成果 |
|--|--|
| 冬蟲夏草 (<i>Cordyceps sinensis</i> Sacc.) | 冬蟲夏草水萃出物可以刺激 T 淋巴細胞增生，與桃仁並用治療肝炎後肝硬化，增加淋巴細胞轉換率及自然殺手細胞功能 [Yoshida et al., 1989]。可清除氧自由基、抗衰老、抗動脈粥狀化，用來治療心臟病、肝炎、免疫系統與神經系統 [Zhu et al., 1998]。 |
| 白芍 (<i>Paeoniae Radix</i>) | 白芍水萃出物可抑制 HepG2 與 Hep3B 細胞株的生長，並誘發肝癌細胞產生凋亡作用，主要是以 p53 途徑發生，經過 cDNA 微陣列分析與 RT-PCR 的實驗證實，可能是改變了 BNIP3、ZK1、RAD23 及 HSPD1 基因表現 [Lee et al., 2002]。 |
| 防風 (<i>Saposhnikovia divaricata</i>) | 防風中的歐前胡素 (imperatorin) 與 1—甲基苯乙妥因 (deltoin) 可抑制 NO 的產生 [Wang et al., 1999]。 |
| 金線蓮 (<i>Anoectochilus formosanus</i>) | 由金線蓮中萃取的 plumbagin 可以誘發乳腺癌細胞 MCF-7 中 caspase 8 與 cytochrome c 基因的高表現，達到抗癌的效果 [Yang et al., 2004]。 |
| 刺五加葉 (<i>Acanthopanax senticosus</i>) | 刺五加可以抑制 TNF- α 所產生肥大細胞依賴性的發炎反應 [Yi et al., 2001]。注射刺五加的肺癌病人持續 21 天，增加血液中自然殺手細胞與 TNF 的活性對抗癌細胞 [Huang et al., 2005]。由刺五加分離出來的 30 kDa GF-AS (glycoprotein) 可降低經酒精處理後所造成的肝毒傷害，也增加抗氧化酶的活性 [Choi et al., 2006]。 |
| 洛神花 (<i>Hibiscus sabdariffa</i>) | 洛神花分離的 Hibiscus protocatechuic acid 可抑制小鼠的皮膚腫瘤，並具有抗氧化作用。並以降低 retinoblastoma 的磷酸化反應與抑制 Bcl-2 的表現，來抑制人類 HL-60 細胞的生長，並產生細胞凋亡 [Tseng et al., 1998; Tseng et al., 2000]。洛神花多酚類萃出物可以使人類胃癌細胞經由 p53 與 p38 MAPK/FasL cascade 途徑，進行細胞凋亡作用 [Lin et al., 2005]。花青素 (anthocyanins) 為洛神花的成分之一，可以使人類 HL-60 細胞經 p38-FasL 及 Bid 途徑產生細胞凋亡作用，主要是增加 p38 磷酸化作用，使 c-Jun 與 cytochrome c 釋放，並使 tBid、Fas 及 FasL |

| | |
|--|--|
| | <p>基因表現 [Chang et al., 2005]。Delphinidin 3-sambubioside 為洛神花青素的一種，可以抑制人類 HL-60 細胞生長，活化 caspase-3、-8 及 -9，cytochrome c 由粒線體釋放至細胞質中，使 HL-60 產生細胞凋亡作用 [Hou et al., 2005]。</p> |
| <p>紅豆杉 (<i>Taxus mairei</i>)</p> | <p>由紅豆杉中分離的 taxumairol A 可以抑制人類腫瘤細胞株 KB-16、A-549 及 HT-29 的生長。而 taxumairols U (1) 與 taxumairols V (2) 可以抑制人類肝腫瘤細胞的生長 [Shen et al., 1996; Shen et al., 2001]。</p> |
| <p>粉防己 (<i>Stephania tetrandra</i> S. moore)</p> | <p>粉防己鹼可以抑制小鼠的腹水腫瘤，誘發人類白血病 U937 細胞的凋亡，並可以抑制 HeLa 細胞的分化與人類肝癌細胞株 HepG2 細胞的生長，進而誘發產生細胞凋亡的作用 [Kuroda et al., 1976; Teh et al., 1991; Lai et al., 1998; Yoo et al., 2002]。</p> |
| <p>茯苓 (<i>Poria cocos</i>)</p> | <p>茯苓可以活化多醣體抑制小鼠的腫瘤 [Kanayama et al., 1986]。Pachymic acid、3-O-acetyl-16 alpha-hydroxytrametenolic acid 與 poricoic acid B 是由茯苓分離出的成分，可以抑制免疫反應與皮膚腫瘤 [Kaminaga et al., 1996]。由茯苓水萃出物純化的 beta-glucan PCM3-II 可以抑制人類乳癌細胞株 MCF-7 的增殖並誘發產生細胞凋亡作用，主要是經由耗盡 Bcl-2 蛋白質，使 MCF-7 細胞中的 Bax/Bcl-2 比值提高，達到抗癌的效果 [Zhang et al., 2006]。</p> |
| <p>柴胡 (<i>Radix bupleuri</i>)</p> | <p>柴胡可以讓帶有 Ehrlich 腫瘤的小鼠 TNF 活性增強 [Haranaka et al., 1985]。由柴胡萃取出來的 RBlaii 可以有效的抑制小鼠的肉瘤，活化巨噬細胞與自然殺手細胞，達到抗腫瘤的效果 [Kok et al., 1995]。Bupleurum scorzonerifolium (AE-BS) 由柴胡丙酮萃出物所分離的成分可以抑制人類肺癌細胞株 A549 的增殖，並誘導癌細胞產生細胞凋亡作用。柴胡所含的皂素 (saponin) 也可以誘導肺癌細胞株 A549 進行 Fas 途徑細胞凋亡 [Cheng et al., 2003; Hsu et al., 2004]。由柴胡甲醇萃出物分離的 KY88 可以抑制肝癌細胞株 (HB8064) 生長，並誘發產生細胞凋亡作用，主要是活化 interleukin-4 與 TNF-α 達到抗癌的成效 [Chow et al., 2004]。</p> |

| | |
|---|---|
| <p>銀杏 (<i>Ginkgo biloba</i>)</p> | <p>由所含的三百多種化學成分中，確立出主要的活性成分為類黃酮與 terpenes [Le Bars and Kastelan, 2000]。銀杏可以誘發 cytochrome p450 isozymes 與 transporter P-glycoprotein 的活性 [Sparreboom et al., 2004]。所含的黃酮類與 terpenoid 成分可以抗氧化及清除自由基能力，也可抑制乳癌細胞的增殖 [DeFeudis et al., 2003]。而另外含有的 flavonol glycosides 與 terpene lactones 成分，也可以降低冠狀動脈疾病所造成的自由基傷害，對心血管系統具調節作用 [Dubey et al., 2004]。銀杏可以降低 PBR (peripheral-type benzodiazepine receptor; 與細胞增生有關) mRNA 濃度，並抑制乳癌細胞、神經膠質瘤及肝癌細胞株的增殖 [Pretner et al., 2006]。</p> |
| <p>紫蘇 (<i>Perilla frutescens</i>)</p> | <p>由紫蘇甲醇萃出物中分離 Nelignans 可以抑制鼠科 macrophage 細胞株 RAW 264.7 中 TNF-α 的表現與 NO 的合成 [Ryu et al., 2002]。紫蘇水萃出物以及所含的 luteolinu 可以抑制 TNF-α 的表現與免疫反應，也可抑制由 7,12-dimethylbenz [a]anthracene (DMBA) 與 12-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) 處理小鼠後，所導致的皮膚腫瘤 [Ueda et al., 2002; Ueda et al., 2003]。Rosmarinic acid 為紫蘇所含主要的多酚類，在 D-GaIN 導致過敏的小鼠中，可以降低因受到內毒素 (脂多醣體: LPS) 處理後所造成的肝臟傷害；也可降低受到 aflatoxin B1 或 ochratoxin A 處理 HepG2 細胞後所導致的傷害，並減少過氧化物的產生，減少 DNA 片段化的產生，抑制 caspase-3 的活化。另外在由 DMBA 或 TPA 所導致的皮膚癌小鼠上，也證實可以經由抑制表皮發炎所產生的免疫反應與清除過氧化基來達到抗癌的效果 [Osakabe et al., 2002; Renzulli et al., 2004; Osakabe et al., 2004]。紫蘇的酒精萃出物中分離 triterpene acids，可以抑制 TPA 誘發的免疫反應，抗發炎與抗腫瘤的功效 [Banno et al., 2004]。</p> |
| <p>黃耆 (<i>Astragali radix</i>)</p> | <p>黃耆中含有 jumentaihoto，可以抗腫瘤 [Aburada et al., 1983]。黃耆萃出物可以抑制小鼠膀胱癌細胞生長，產生細胞激素與毒殺癌細胞的作用 [Kurashige et al., 1999]。黃耆水萃出物可以抑制人類胃癌細胞株 AGS 與 KATO III 的生長，但未誘發胃癌細胞產生細胞凋亡作用 [Lin et al., 2003]。</p> |
| <p>藿香 (<i>Agastache</i>)</p> | <p>由藿香中所萃取出的 agastaquinone 對於人類癌細胞株 (A549、SK-OV-3、SK-MEL-2、XF498 及 HCT15) 具有抑制生長的效果 [Lee et al., 1995]。藿香中的黃酮類與檫寧可以抑制由 TNF-K</p> |

| | |
|------------------------------------|---|
| <i>rugosa</i>) | 所誘發的 VCAM-1 基因表現 [Hong et al., 2001]。 |
| 靈芝 (<i>Ganoderma lucidum</i>) | <p>靈芝含有的 triterpene 可以抑制人類肝癌細胞株 Huh-7 的生長，主要降低調節細胞生長的蛋白質 kinase C，並活化 JNK 與 p38 MAP kinases [Lin et al., 2003]。靈芝可以抑制 urokinase-type plasminogen activator(uPA)與 uPAR 的接受器，進而抑制 NF-κB 與 AP-1，在乳癌與前列腺癌細胞中可以抑制細胞附著與轉移 [Sliva, 2003]。靈芝富含維他命、纖維與氨基酸，可以活化多醣體促進人體免疫功能、激發巨噬細胞及 T 淋巴細胞，產生大量與抗腫瘤有關的細胞激素 [Sliva, 2004; Yuen and Gohel, 2005]。靈芝菌絲萃出物可以促進周圍血管單核細胞與單核白血球的增殖，與靈芝孢子萃出物皆可刺激 Th1 與 Th2 細胞激素 mRNA 的表現，但靈芝菌絲萃出物藉由使 CD40、CD80 及 CD86 高表現與減少螢光異硫氰化物-葡萄聚糖 (fluorescein isothiocyanate-dextran) 產生內噬作用，而加快樹狀細胞的成熟 [Chan et al., 2005]。</p> |



Table 1-4. Microarray analysis application in studying herbs.

表 1-4、應用微陣列分析的中草藥研究。

| 中草藥名 | 微陣列資訊 | 研究成果 |
|--|---|--|
| 白芍 (<i>Paeoniae radix</i>) | OpArrays 細胞凋亡 DNA 微陣列 (為 Operon 公司生產, 含人類 384 基因)。 | HepG2 細胞經芍藥處理後, 可誘發 BNIP3 基因高表現, 但 ZK1, RAD23B 及 HSPD1 具有低的基因表現樣式 [Lee et al., 2002]。 |
| 石斛 (<i>Herba dendrobii</i>) | DNA 微陣列 | 微陣列上含有 16 種石斛屬的 ITS1-5.8S-ITS2 序列, 可鑑別不同石斛物種 (<i>Dendrobium species</i>) [Zhang et al., 2003]。 |
| 金線蓮 (<i>Anoectochilus formosanus</i>) | DNA 微陣列 (含有 9,600 基因, 材質 nylon membrane)。 | 偵測金線蓮與單一成分 plumbagin 在乳腺癌細胞 MCF-7 的基因表現, 金線蓮可使 caspase 8 與 cytochrome c 具高表現 [Yang et al., 2004]。 |
| 牡丹皮 (<i>Moutan Cortex Radicis</i>) | Affymetrix DNA 微陣列 (為寡核苷酸晶片)。 | 使用牡丹皮處理 PC12 細胞 (過氧化氫作前處理), 經微陣列偵測基因表現結果, 可誘發 HO 與 COMT 基因具有高表現量來對抗過氧化氫對 PC12 細胞的傷害 [Rho et al., 2005]。 |
| 養肝丸 (<i>Yan-gan-wan</i>) | Affymetrix DNA 微陣列。 | 以 CCl ₄ 誘發小鼠肝臟病變並分別以養肝丸或安慰劑(澱粉類)餵食, 由 DNA 微陣列分析結果得知養肝丸對於 CYP2E1 或 GSH 的基因表現無影響, 但可以抑制 CYP4A10 與 CYP4A14 基因表現 [Yang et al., 2005]。 |
| 黃連 (<i>Coptidis rhizome</i>) | Affymetrix huU95A DNA 微陣列 (為人類寡核苷酸晶片, 含 11,000 基因)。 | 偵測以黃連與黃連素處理的胰臟癌細胞, 定義 33 個基因的表現 [Iizuka et al., 2003]。 |

| | | |
|--|--|---|
| | <p>Affymetrix huU95A DNA 微陣列 (為人類寡核苷酸晶片, 含 12,600 基因)。</p> | <p>高密度微陣列偵測經黃連或 8 種單一成分處理胰臟癌細胞株 YPK1~ YPK6、Panc-1 及 MiaPaCa-2, 定義 27 個基因 (23 個基因表現樣式成正相關, 4 個成負相關) [Hara et al., 2005]。</p> |
| | <p>DNA 微陣列 (為人類寡核苷酸晶片, 含 96 個與癌症相關基因)。</p> | <p>低密度微陣列偵測經黃連處理的人類乳癌細胞株 MCF-7 與 MDA-MB-231, 前者可增加 IFN-β 與 TNF-α 基因表現樣式 [Kang et al., 2005]。</p> |



Table 3-1. Skewness and Kurtosis of gene expression patterns in Cy5/Cy3 ratio with different herbal extracts treatment.

表 3-1、不同中草藥處理的基因表現樣式 Cy5/Cy3 之偏態係數與峰值係數。

| 中草藥名 | 偏態係數 (skewness) * | 峰值係數 (kurtosis) ** |
|--|-------------------|--------------------|
| 紫蘇 (<i>Perilla frutescens</i>) | 0.52 | 0.06 |
| 霍香 (<i>Agastaches rugosa</i>) | 4.79 | 59.15 |
| 防風 (<i>Saposhnikovia divaricatae</i>) | 7.67 | 123.93 |
| 刺五加葉 (<i>Acanthopanax senticosus</i> L.) | 3.81 | 48.39 |
| 石蓮花 (<i>Echeveria elegans</i>) | 0.06 | 0.08 |

*：偏態係數可顯示出分佈的族群為分配向右 (> 0) 或向左 (< 0)。

**：峰值係數可顯示族群分配為窄 (+, 數值越高越窄) 或平 (-, 數值越低越平)。

Table 3-2. Spearman correlation coefficient of gene expression patterns in different herbal extracts treatment.

表 3-2、不同中草藥處理的基因表現樣式 spearman 相關係數。

| | 紫蘇 | 藿香 | 防風 | 刺五加葉 | 石蓮花 |
|------|-------|-------------|-------|-------------|-------|
| 紫蘇 | 1.00 | 0.72 | 0.29 | 0.71 | -0.03 |
| 藿香 | 0.72 | 1.00 | 0.29 | 0.80 | -0.02 |
| 防風 | 0.29 | 0.29 | 1.00 | 0.37 | -0.03 |
| 刺五加葉 | 0.71 | 0.80 | 0.37 | 1.00 | -0.02 |
| 石蓮花 | -0.03 | -0.02 | -0.03 | -0.02 | 1.00 |

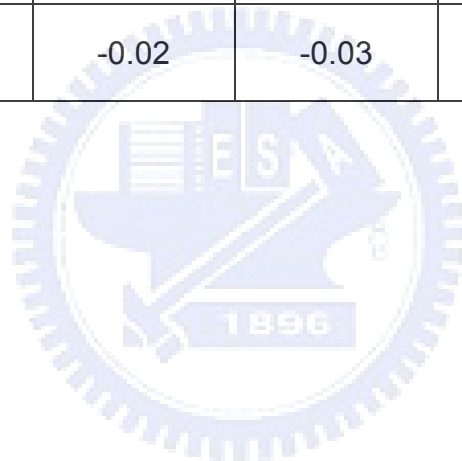


Table 3-3. ANOVA analysis results of gene expression patterns with five herbal extracts treatment.

表 3-3、以五種不同中草藥處理的基因表現樣式 ANOVA 分析結果。

| 中草藥名 | Tukey Grouping | Duncan Grouping | LSD Grouping |
|------|----------------|-----------------|--------------|
| 防風 | A | A | A |
| 石蓮花 | B | B | B |
| 紫蘇 | C | C | C |
| 刺五加葉 | C, D | D | D |
| 霍香 | D | D | D |

Tukey Grouping : Tukey 公正顯著差異法的分群結果。

Duncan Grouping : 鄧氏新多變域測驗法的分群結果。

LSD Grouping : 最小顯著差異值的分群結果。

A-D : 經 SAS 統計軟體分析後的分類，具相同字母的分為一類。

Table 3-4. Gene expression patterns of apoptosis.

表 3-4、細胞凋亡作用相關的基因表現樣式。

| GenBank Accession no. | Gene name* | Cluster no.** | | Function Category | 紫蘇 | 藿香 | 防風 | 刺五 加葉 | 石蓮 花 |
|--------------------------|---------------|---------------|----|-------------------------------------|------|------|------|----------|---------|
| 低表現量的細胞凋亡相關基因 | | | | | | | | | |
| AA449119 | UBE2M | 2 | 6 | apoptosis | 0.50 | 0.40 | 0.66 | 0.47 | 0.98 |
| N35070 | TNFSF12 | 2 | 6 | cytokine/apoptosis/membrane protein | 0.46 | 0.35 | 0.65 | 0.32 | 1.47 |
| AA987627 | TNFRSF17 | 2 | 7 | receptor membrane/apoptosis | 0.22 | 0.18 | 0.59 | 0.23 | 1.35 |
| AA293570 | TNFRSF6 | 2 | 6 | apoptosis/receptor/inflammation | 0.37 | 0.30 | 0.52 | 0.30 | 1.13 |
| AA205392 | PLINP-1 | 2 | 6 | apoptosis | 0.35 | 0.18 | 0.55 | 0.27 | 0.70 |
| AA487197 | UBE2I | 2 | 6 | apoptosis/ligase | 0.43 | 0.32 | 0.60 | 0.30 | 0.71 |
| AA443546 | RELA | 2 | 6 | apoptosis/transcription factor | 0.33 | 0.12 | 0.46 | 0.23 | 0.50 |
| AA453766 | CFLAR | 10 | 7 | apoptosis | 0.24 | 0.27 | 0.36 | 0.28 | 0.98 |
| AA047319 | PSMA6 | 10 | 7 | apoptosis/protease | 0.09 | 0.11 | 0.29 | 0.12 | 0.45 |
| R37937 | CRADD | 12 | 6 | apoptosis | 0.36 | 0.23 | 0.80 | 0.22 | 0.65 |
| 高表現量的細胞凋亡相關基因 | | | | | | | | | |
| AA181300 | PSMB8 | 3 | 8 | apoptosis/protease | 1.45 | 1.05 | 3.46 | 1.90 | 1.49 |
| W72310 | FASTK | 5 | 11 | apoptosis/kinase | 2.21 | 1.24 | 1.77 | 2.29 | 1.59 |
| AA190401 | BID | 8 | 9 | apoptosis | 1.00 | 1.22 | 3.33 | 2.21 | 1.08 |
| AA433807 | TNFAIP3 | 11 | 11 | apoptosis | 1.78 | 0.98 | 2.84 | 1.53 | 0.68 |
| AA448641 | E2F4 | 13 | 18 | apoptosis/transcription factor | 1.49 | 2.01 | 1.22 | 2.05 | 1.34 |
| AA487253 | MLC-B | 14 | 12 | apoptosis | 1.74 | 1.32 | 3.90 | 1.36 | 1.5 |
| 細胞凋亡相關基因 | | | | | | | | | |
| W61100 | BCL2 | 2 | 6 | oncogene/apoptosis | 0.43 | 0.17 | 0.61 | 0.19 | 1.56 |
| H54628 | TNFSF10 | 2 | 6 | cytokine/apoptosis/membrane protein | 0.20 | 0.12 | 0.50 | 0.13 | 1.69 |
| AA156940 | PDCD5 | 3 | 8 | apoptosis | 1.00 | 0.48 | 2.29 | 1.13 | 1.05 |
| AA024655 | DAPK1 | 4 | 13 | apoptosis/kinase | 1.31 | 0.79 | 1.25 | 0.44 | 0.58 |
| AA455281 | DAD1 | 4 | 12 | apoptosis/transferase | 0.89 | 0.69 | 1.26 | 0.68 | 0.69 |
| H52672 | BAK1 | 4 | 13 | apoptosis | 1.46 | 0.95 | 2.89 | 0.90 | 0.46 |

| | | | | | | | | | |
|----------|--------|----|----|--------------------------------|------|------|------|------|------|
| R15301 | DEDD | 5 | 11 | apoptosis/DNA binding | 1.24 | 0.95 | 1.88 | 1.45 | 1.06 |
| AA291322 | BIK | 8 | 10 | apoptosis | 0.88 | 1.03 | 1.84 | 0.91 | 0.89 |
| AA702174 | BIRC2 | 10 | 7 | apoptosis | 0.16 | 0.25 | 0.53 | 0.25 | 1.78 |
| AA457705 | IER3 | 10 | 5 | apoptosis | 0.25 | 0.71 | 0.78 | 2.08 | 1.55 |
| AA465697 | BNIP3L | 10 | 7 | tumor suppression/apoptosis | 0.35 | 0.46 | 0.69 | 0.53 | 1.68 |
| AA430751 | FADD | 10 | 7 | apoptosis | 0.49 | 0.76 | 2.48 | 0.95 | 0.95 |
| R26621 | FAIM2 | 10 | 7 | apoptosis | 0.07 | 0.07 | 0.17 | 0.08 | 1.97 |
| AA454588 | BCL2L2 | 12 | 7 | apoptosis | 0.51 | 0.68 | 1.32 | 0.52 | 0.9 |
| T68758 | PSMB1 | 12 | 6 | apoptosis/protease | 1.46 | 1.57 | 1.63 | 1.34 | 1.59 |
| AA458861 | DAP | 13 | 18 | apoptosis | 2.04 | 1.37 | 1.36 | 1.84 | 0.57 |
| AA458861 | DAP | 13 | 4 | apoptosis | 1.82 | 0.90 | 0.93 | 1.18 | 0.93 |
| AA070997 | PSMB6 | 14 | 11 | apoptosis/protease | 1.98 | 1.53 | 1.86 | 1.59 | 1.58 |
| AA432000 | CASP8 | 14 | 12 | apoptosis/protease | 0.81 | 0.44 | 2.94 | 0.62 | 0.62 |
| AA011445 | CASP3 | 15 | 1 | apoptosis/protease | 0.87 | 0.54 | 0.68 | 0.42 | 1 |
| AA916906 | TRADD | 16 | 9 | apoptosis | 0.96 | 1.14 | 2.43 | 1.29 | 0.87 |
| AW073366 | DEDD | 18 | 7 | apoptosis | 0.36 | 0.44 | 0.56 | 0.23 | 1.65 |
| AA281152 | CASP9 | 20 | 6 | apoptosis/protease | 0.73 | 0.52 | 2.03 | 0.67 | 0.73 |
| N71003 | PDCD4 | 20 | 6 | apoptosis | 0.43 | 0.26 | 1.81 | 0.39 | 0.44 |
| AA004823 | DATF1 | 20 | 6 | apoptosis/transcription factor | 0.47 | 0.28 | 2.33 | 0.46 | 1.47 |

紅色：Cy5/Cy3 > 2.0 ；

綠色：Cy5/Cy3 < 0.5 ；

Cy5：(F635 mean – B635 median) ；

Cy3：(F532 mean – B532 median) ；

*：參照附表 1。

**：藍色為逐步叢集分析法 (K-mean clustering) 分類的基因表現族群；

粉紅色為自組圖分析法 (SOM) 分類的基因表現族群。

Table 3-5. Gene expression patterns of cell proliferation.

表 3-5、細胞增生相關的基因表現樣式。

| GenBank Accession no. | Gene name* | Cluster no.** | | Function Category | 紫蘇 | 藿香 | 防風 | 刺五 加葉 | 石蓮 花 |
|--------------------------|---------------|------------------|----|---|------|------|-------|----------|---------|
| 低表現量的細胞增生相關基因 | | | | | | | | | |
| H27986 | LMO4 | 1 | 16 | transcription factor/cell proliferation | 0.16 | 0.44 | 0.27 | 0.78 | 0.40 |
| AA074438 | PRDM4 | 2 | 6 | transcription factor/tumor suppression/cell proliferation | 0.27 | 0.17 | 0.43 | 0.24 | 0.85 |
| AA131538 | PTHLH | 2 | 7 | cell proliferation/oncogenesis/ | 0.21 | 0.20 | 0.35 | 0.29 | 0.90 |
| AA489629 | PBEF | 2 | 6 | cytokine/cell proliferation | 0.26 | 0.17 | 0.84 | 0.25 | 0.92 |
| AA782337 | ANK2 | 2 | 7 | membrane protein/cytoskeletal | 0.21 | 0.11 | 0.37 | 0.29 | 1.11 |
| AA677185 | ANK3 | 2 | 7 | membrane protein | 0.26 | 0.08 | 1.01 | 0.30 | 1.28 |
| AA478949 | DLG5 | 4 | 13 | tumor suppression/cell proliferation | 0.39 | 0.38 | 0.50 | 0.35 | 0.23 |
| AA872397 | LGALS2 | 4 | 13 | binding protein/cell proliferation | 1.32 | 0.70 | 1.01 | 0.40 | 0.36 |
| AA159936 | SIPA1 | 5 | 11 | membrane protein/cell proliferation | 0.33 | 0.13 | 1.13 | 0.35 | 0.29 |
| AA001218 | SOCS3 | 10 | 7 | Binding protein/inhibitor/cell proliferation/apoptosis | 0.22 | 0.43 | 0.83 | 0.76 | 0.91 |
| R51912 | SST | 10 | 7 | cell matrix protein/cell proliferation/apoptosis/synaptic ransmission | 0.30 | 0.44 | 0.61 | 0.33 | 1.15 |
| AA447661 | PA26 | 12 | 7 | cell cycle/stress response/cell proliferation | 0.07 | 0.08 | 0.25 | 0.05 | 0.60 |
| AA029308 | MTCP1 | 14 | 11 | cell cycle | 0.57 | 0.27 | 0.55 | 0.38 | 0.37 |
| AA427818 | HMGA2 | 15 | 1 | transcription factor/cell proliferation | 0.91 | 0.26 | 0.43 | 0.21 | 1.05 |
| N74593 | FLJ11848 | 15 | 1 | cell proliferation/inhibitor | 0.76 | 0.46 | 0.62 | 0.43 | 1.44 |
| AA461110 | MGC5560 | 17 | 8 | cell matrix protein/cell proliferation | 0.14 | 0.14 | 0.80 | 0.44 | 0.74 |
| AA169807 | PTCH | 17 | 6 | tumor suppression/receptor/cell proliferation | 0.25 | 0.21 | 1.42 | 0.41 | 1.37 |
| 高表現量的細胞增生相關基因 | | | | | | | | | |
| AI927284 | LGALS1 | 4 | 13 | adhesion/regulatory | 1.64 | 1.46 | 13.44 | 1.45 | 0.85 |
| AI870530 | MAPK11 | 5 | 11 | enzyme | 1.47 | 1.09 | 2.51 | 1.60 | 1.19 |
| H13622 | EPS8 | 9 | 20 | cell matrix protein/cell proliferation | 1.39 | 2.05 | 1.29 | 1.17 | 0.83 |
| AA431832 | GRN | 9 | 20 | growth factor/cell proliferation | 2.08 | 2.22 | 1.16 | 1.69 | 1.09 |
| AA464152 | QSCN6 | 11 | 11 | cell cycle/cell proliferation | 1.81 | 1.32 | 2.01 | 1.62 | 0.77 |
| AA775803 | PRDX1 | 11 | 11 | peroxidase/cell proliferation/antigen | 1.95 | 1.81 | 2.36 | 1.87 | 1.26 |

| | | | | | | | | | |
|-----------------|----------|----|----|--|------|------|------|------|------|
| W46439 | TFDP1 | 12 | 7 | transcription factor/cell cycle/cell proliferation | 1.44 | 1.56 | 1.62 | 1.31 | 2.05 |
| AA459390 | FLJ22169 | 13 | 18 | binding protein/cell proliferation | 1.77 | 1.71 | 1.19 | 2.54 | 0.62 |
| R06254 | TPD52L2 | 16 | 11 | cell matrix protein/cell proliferation | 1.74 | 1.06 | 1.54 | 2.04 | 1.22 |
| 細胞增生相關基因 | | | | | | | | | |
| T73090 | SLC22A3 | 2 | 7 | cell matrix protein/cell proliferation/ | 0.41 | 0.17 | 1.09 | 1.08 | 1.54 |
| R25095 | TNFSF4 | 2 | 6 | membrane protein/ cell proliferation | 0.48 | 0.39 | 1.52 | 0.29 | 1.74 |
| H98620 | SYNPR | 5 | 11 | cell cycle/cell proliferation/apoptosis/tumor suppression | 0.88 | 0.49 | 1.08 | 0.88 | 0.73 |
| AA630328 | LGALS3 | 8 | 10 | binding protein/cell proliferation | 1.16 | 1.75 | 1.96 | 1.26 | 1.25 |
| AA279114 | LRP5 | 9 | 20 | receptor/cell proliferation | 1.15 | 1.17 | 0.88 | 1.10 | 0.81 |
| AA478268 | CTBP1 | 9 | 20 | binding protein/cell proliferation | 1.68 | 1.69 | 1.14 | 1.64 | 1.09 |
| R14422 | SCGN | 9 | 18 | binding protein | 1.66 | 1.50 | 1.16 | 1.50 | 1.44 |
| AA461110 | MGC5560 | 10 | 8 | cell matrix protein/cell proliferation | 0.26 | 0.29 | 2.17 | 0.38 | 1.18 |
| AA131585 | JUND | 10 | 7 | oncogene/transcription factor/apoptosis/cell proliferation | 0.77 | 0.91 | 1.56 | 1.46 | 1.59 |
| N20338 | LYPLA1 | 10 | 7 | cell matrix protein/cell proliferation | 0.39 | 0.50 | 2.81 | 0.50 | 1.78 |
| H84982 | CHES1 | 10 | 7 | cell cycle/transcription factor/DNA repair | 0.22 | 0.54 | 0.72 | 0.7 | 0.76 |
| H80214 | TIMP1 | 12 | 6 | cell proliferation/inhibitor | 0.59 | 0.57 | 1.68 | 0.36 | 1.04 |
| AA443577 | TNFSF13 | 12 | 6 | cytokine/cell proliferation | 0.82 | 0.86 | 1.90 | 0.68 | 1.10 |
| H79306 | PDGFRA | 12 | 7 | receptor/kinase/cell proliferation | 0.53 | 0.79 | 1.83 | 0.54 | 1.63 |
| AA608988 | TSPY | 15 | 1 | cell matrix protein/ cell proliferation/ ncogenesis/ spermatogenesis | 2.07 | 0.98 | 1.37 | 1.05 | 1.64 |
| AA464049 | ANK1 | 15 | 1 | membrane protein | 1.54 | 0.69 | 1.16 | 0.93 | 1.66 |
| W44684 | MPP3 | 17 | 6 | kinase/membrane protein | 0.51 | 0.32 | 1.70 | 0.60 | 1.04 |
| W47090 | CDK9 | 17 | 6 | cell cycle/kinase/cell proliferation/transcription | 0.67 | 0.54 | 2.84 | 0.84 | 1.34 |
| AA460330 | LOC96626 | 17 | 6 | cell proliferation | 0.25 | 0.23 | 1.74 | 0.40 | 1.56 |
| AA011414 | FGA | 19 | 2 | cell matrix protein/cell adhesion/cell proliferation | 2.09 | 0.69 | 0.3 | 0.53 | 0.90 |
| N58318 | DRIM | 19 | 2 | cell matrix protein/cell proliferation | 1.52 | 1.48 | 1.20 | 1.04 | 1.68 |
| T73090 | SLC22A3 | 19 | 2 | cell matrix protein/cell proliferation/blood coagulation | 1.79 | 1.20 | 0.42 | 0.20 | 1.65 |

*：參照附表一。 **：藍色為逐步叢集分析法（K-mean clustering）分類的基因表現族群；粉紅色為自組圖分析法（SOM）分類的基因表現族群。

紅色：Cy5/Cy3 > 2.0；綠色：Cy5/Cy3 < 0.5；Cy5：(F635 mean – B635 median)；Cy3：(F532 mean – B532 median)；

Table 3-6. Gene expression patterns of cytochrome P450 superfamily.

表 3-6、Cytochrome P450 superfamily 相關的基因表現樣式。

| GenBank Accession no. | Gene name* | Cluster no.** | | Function Category | 紫蘇 | 藿香 | 防風 | 刺五 加葉 | 石蓮 花 |
|---|------------|---------------|----|----------------------------|------|------|------|----------|---------|
| 低表現量的 Cytochrome P450 superfamily 基因 | | | | | | | | | |
| AA884709 | CYP11B1 | 2 | 7 | m-hydroxylase | 0.30 | 0.15 | 0.79 | 0.32 | 1.41 |
| R89491 | CYP2C9 | 15 | 1 | m-monoxygenase | 0.45 | 0.09 | 0.42 | 0.34 | 1.02 |
| H09425 | CYP2J2 | 15 | 1 | m-hydroxylase | 0.53 | 0.08 | 0.37 | 0.23 | 0.70 |
| 高表現量的 Cytochrome P450 superfamily 基因 | | | | | | | | | |
| AA418907 | CYP1A1 | 8 | 17 | m-hydroxylase | 0.72 | 3.15 | 2.47 | 2.66 | 1.05 |
| AA971278 | CYP2S1 | 8 | 10 | m-hydroxylase | 0.77 | 1.83 | 2.12 | 1.70 | 1.39 |
| Cytochrome P450 superfamily 基因 | | | | | | | | | |
| AA928708 | CYP8B1 | 4 | 13 | m-hydroxylase | 1.67 | 0.63 | 0.71 | 0.42 | 0.4 |
| AI401776 | CYP4F8 | 8 | 9 | m-hydroxylase | 0.81 | 1.02 | 2.79 | 1.36 | 0.99 |
| N66957 | CYP27A1 | 9 | 20 | m-hydroxylase | 1.76 | 2.44 | 0.86 | 1.42 | 0.4 |
| R51021 | CYP26A1 | 10 | 8 | m-hydroxylase | 0.4 | 0.43 | 2.2 | 0.67 | 1.35 |
| AI222585 | CYP27B1 | 10 | 7 | m-hydroxylase | 0.26 | 0.49 | 1.22 | 0.71 | 1.46 |
| T50790 | CYP2A6 | 10 | 7 | m-monoxygenase | 0.26 | 0.35 | 0.52 | 0.32 | 1.6 |
| N53136 | CYP2C8 | 12 | 6 | m-hydroxylase | 0.95 | 1.19 | 1.48 | 0.71 | 1.43 |
| AA291484 | CYP4B1 | 12 | 6 | m-hydroxylase | 0.38 | 0.39 | 2.11 | 0.19 | 0.84 |
| AI927693 | CYP4F3 | 14 | 11 | m-hydroxylase | 1.1 | 0.35 | 2.01 | 0.9 | 0.67 |
| AA477781 | CYP51A1 | 14 | 11 | m-demethylase | 0.89 | 0.21 | 2.01 | 0.79 | 0.68 |
| R92425 | CYP3A5 | 15 | 1 | m-monoxygenase | 0.95 | 0.41 | 0.85 | 0.60 | 1.66 |
| R91077 | CYP3A7 | 15 | 1 | m-hydroxylase | 1.39 | 0.4 | 0.71 | 0.70 | 1.97 |
| T49041 | CYP19A1 | 17 | 6 | m-monoxygenase/transporter | 0.84 | 0.77 | 3.00 | 0.96 | 1.59 |
| T68287 | CYP2B6 | 17 | 6 | m-hydroxylase | 0.82 | 0.76 | 1.70 | 1.13 | 1.49 |
| H05935 | CYP27A1 | 19 | 14 | m-hydroxylase | 1.87 | 1.97 | 0.91 | 1.59 | 1.92 |

*：參照附表一。**：藍色為逐步叢集分析法（K-mean clustering）分類的基因表現族群；粉紅色為自組圖分析法（SOM）分類的基因表現族群。

紅色：Cy5/Cy3 > 2.0；綠色：Cy5/Cy3 < 0.5；Cy5：(F635 mean – B635 median)；Cy3：(F532 mean – B532 median)。

附 錄

附錄表 1、基因名稱對照表 (gene abbreviation and full name table)。

| GenBank Accession no. | Gene name | Gene full name |
|--------------------------------------|------------------|---|
| AA001218 | SOCS3 | suppressor of cytokine signaling 3 |
| AA004823 | DATF1 | death associated transcription factor 1 |
| AA011414 | FGA | fibrinogen- A alpha polypeptide |
| AA011445 | CASP3 | caspase 3- apoptosis-related cysteine protease |
| AA024655 | DAPK1 | death-associated protein kinase 1 |
| AA029308 | MTCP1 | mature T-cell proliferation 1 |
| AA047319 | PSMA6 | proteasome (prosome- macropain) subunit- alpha type- 6 |
| AA070997 | PSMB6 | proteasome (prosome- macropain) subunit- beta type- 6 |
| AA074438 | PRDM4 | PR domain containing 4 |
| AA131538 | PTH1H | parathyroid hormone-like hormone |
| AA131585 | JUND | jun D proto-oncogene |
| AA156940 | PDCD5 | programmed cell death 5 |
| AA159936 | SIPA1 | signal-induced proliferation-associated gene 1 |
| AA169807 | PTCH | patched homolog (Drosophila) |
| AA181300 | PSMB8 | proteasome (prosome- macropain) subunit- beta type- 8 (large multifunctional protease 7) |
| AA190401 | BID | BH3 interacting domain death agonist |
| AA205392 | PLINP-1 | papillomavirus L2 interacting nuclear protein 1 |
| AA279114 | LRP5 | low density lipoprotein receptor-related protein 5 |
| AA281152 | CASP9 | caspase 9- apoptosis-related cysteine protease |
| AA291322 | BIK | BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing) |
| AA291484 | CYP4B1 | cytochrome P450- family 4- subfamily B- polypeptide 1 |
| AA293570 | TNFRSF6 | tumor necrosis factor receptor superfamily- member 6 |
| AA418907 | CYP1A1 | cytochrome P450- family 1- subfamily A- polypeptide 1 |
| AA427818 | HMGA2 | high mobility group AT-hook 2 |
| AA430751 | FADD | Fas (TNFRSF6)-associated via death domain |
| AA431832 | GRN | granulin |
| AA432000 | CASP8 | caspase 8- apoptosis-related cysteine protease |
| AA433807 | TNFAIP3 | tumor necrosis factor- alpha-induced protein 3 |

| | | |
|----------|----------|--|
| AA443546 | RELA | v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A-nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3- p65 (avian) |
| AA443577 | TNFSF13 | tumor necrosis factor (ligand) superfamily- member 13 |
| AA447661 | PA26 | p53 regulated PA26 nuclear protein |
| AA448641 | E2F4 | E2F transcription factor 4- p107/p130-binding |
| AA449119 | UBE2M | ubiquitin-conjugating enzyme E2M (UBC12 homolog-yeast) |
| AA453766 | CFLAR | CASP8 and FADD-like apoptosis regulator |
| AA454588 | BCL2L2 | BCL2-like 2 |
| AA455281 | DAD1 | defender against cell death 1 |
| AA457705 | IER3 | immediate early response 3 |
| AA458861 | DAP | death-associated protein |
| AA459390 | FLJ22169 | hypothetical protein FLJ22169 |
| AA460330 | LOC96626 | pinch-2 |
| AA461110 | MGC5560 | hypothetical protein MGC5560 |
| AA464049 | ANK1 | ankyrin 1- erythrocytic |
| AA464152 | QSCN6 | quiescin Q6 |
| AA465697 | BNIP3L | BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like |
| AA477781 | CYP51A1 | cytochrome P450- family 51- subfamily A- polypeptide 1 |
| AA478268 | CTBP1 | C-terminal binding protein 1 |
| AA478949 | DLG5 | discs- large (Drosophila) homolog 5 |
| AA487197 | UBE2I | ubiquitin-conjugating enzyme E2I (UBC9 homolog-yeast) |
| AA487253 | MLC-B | myosin regulatory light chain |
| AA489629 | PBEF | pre-B-cell colony-enhancing factor |
| AA608988 | TSPY | testis specific protein- Y-linked |
| AA630328 | LGALS3 | lectin- galactoside-binding- soluble- 3 (galectin 3) |
| AA677185 | ANK3 | ankyrin 3- node of Ranvier (ankyrin G) |
| AA702174 | BIRC2 | baculoviral IAP repeat-containing 2 |
| AA775803 | PRDX1 | peroxiredoxin 1 |
| AA782337 | ANK2 | ankyrin 2- neuronal |
| AA872397 | LGALS2 | lectin- galactoside-binding- soluble- 2 (galectin 2) |
| AA884709 | CYP11B1 | cytochrome P450- family 11- subfamily B- polypeptide 1 |
| AA916906 | TRADD | TNFRSF1A-associated via death domain |
| AA928708 | CYP8B1 | cytochrome P450- family 8- subfamily B- polypeptide 1 |
| AA971278 | CYP2S1 | cytochrome P450- family 2- subfamily S- polypeptide 1 |

| | | |
|----------|----------|--|
| AA987627 | TNFRSF17 | tumor necrosis factor receptor superfamily- member 17 |
| AI222585 | CYP27B1 | cytochrome P450- family 27- subfamily B- polypeptide 1 |
| AI401776 | CYP4F8 | cytochrome P450- family 4- subfamily F- polypeptide 8 |
| AI870530 | MAPK11 | mitogen-activated protein kinase 11 |
| AI927284 | LGALS1 | lectin- galactoside-binding- soluble- 1 (galectin 1) |
| AI927693 | CYP4F3 | cytochrome P450- family 4- subfamily F- polypeptide 3 |
| AW073366 | DEDD | death effector domain containing |
| H05935 | CYP27A1 | cytochrome P450- family 27- subfamily A- polypeptide 1 |
| H09425 | CYP2J2 | cytochrome P450- family 2- subfamily J- polypeptide 2 |
| H13622 | EPS8 | epidermal growth factor receptor pathway substrate 8 |
| H27986 | LMO4 | LIM domain only 4 |
| H52672 | BAK1 | BCL2-antagonist/killer 1 |
| H54628 | TNFSF10 | tumor necrosis factor (ligand) superfamily- member 10 |
| H79306 | PDGFRA | platelet-derived growth factor receptor- alpha polypeptide |
| H80214 | TIMP1 | tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (erythroid potentiating activity- collagenase inhibitor) |
| H84982 | CHES1 | checkpoint suppressor 1 |
| H98620 | SYNPR | synaptoporin |
| N20338 | LYPLA1 | lysophospholipase I |
| N35070 | TNFSF12 | tumor necrosis factor (ligand) superfamily- member 12 |
| N53136 | CYP2C8 | cytochrome P450- family 2- subfamily C- polypeptide 8 |
| N58318 | DRIM | down-regulated in metastasis |
| N66957 | CYP27A1 | cytochrome P450- family 27- subfamily A- polypeptide 1 |
| N71003 | PDCD4 | programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor) |
| N74593 | FLJ11848 | hypothetical protein FLJ11848 |
| R06254 | TPD52L2 | tumor protein D52-like 2 |
| R14422 | SCGN | secretagogin- EF-hand calcium binding protein |
| R15301 | DEDD | death effector domain containing |
| R25095 | TNFSF4 | tumor necrosis factor (ligand) superfamily- member 4 (tax-transcriptionally activated glycoprotein 1- 34kDa) |
| R26621 | FAIM2 | Fas apoptotic inhibitory molecule 2 |
| R37937 | CRADD | CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain |
| R51021 | CYP26A1 | cytochrome P450- family 26- subfamily A- polypeptide 1 |
| R51912 | SST | somatostatin |
| R89491 | CYP2C9 | cytochrome P450- family 2- subfamily C- polypeptide 9 |

| | | |
|--------|---------|--|
| R91077 | CYP3A7 | cytochrome P450- family 3- subfamily A- polypeptide 7 |
| R92425 | CYP3A5 | cytochrome P450- family 3- subfamily A- polypeptide 5 |
| T49041 | CYP19A1 | cytochrome P450- family 19- subfamily A- polypeptide 1 |
| T50790 | CYP2A6 | cytochrome P450- family 2- subfamily A- polypeptide 6 |
| T68287 | CYP2B6 | cytochrome P450- family 2- subfamily B- polypeptide 6 |
| T68758 | PSMB1 | proteasome (prosome- macropain) subunit- beta type- 1 |
| T73090 | SLC22A3 | solute carrier family 22 (extraneuronal monoamine transporter)- member 3 |
| W44684 | MPP3 | membrane protein- palmitoylated 3 (MAGUK p55 subfamily member 3) |
| W46439 | TFDP1 | transcription factor Dp-1 |
| W47090 | CDK9 | cyclin-dependent kinase 9 (CDC2-related kinase) |
| W61100 | BCL2 | B-cell CLL/lymphoma 2 |
| W72310 | FASTK | FAST kinase |



附錄表2、論文中所提及之運算公式列表 (List of equations used in thesis)。

| | |
|------------|---|
| <p>公式一</p> | $\text{標準化係數} = \frac{\sum_i^n (\text{訊號值} - \text{背景值})_{\text{Cy5圖像樣點}}}{\sum_j^n (\text{訊號值} - \text{背景值})_{\text{Cy3圖像樣點}}}$ <p>(i: Cy5 圖像的樣點; j: Cy3 圖像的樣點; n: 晶片中樣點的數目。)</p> |
| <p>公式二</p> | $\text{雙色螢光訊號比值} = \frac{(\text{訊號值} - \text{背景值})_{\text{Cy5圖像樣點}}}{(\text{訊號值} - \text{背景質})_{\text{Cy3圖像樣點}} \times \text{標準化係數}}$ |
| <p>公式三</p> |  <p>Normal Distribution</p> $f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2}x^2}$ <p>2.5% 13.5% 34.1% 34.1% 13.5% 2.5%</p> <p>$\mu - 1.96\sigma$ $\mu - \sigma$ μ $\mu + \sigma$ $\mu + 1.96\sigma$</p> <p>(http://www.pt.ntu.edu.tw/hmchai/SAS/SASdescriptive/SASnormality.htm)</p> |

附錄表3、本研究中所運用之運算公式列表 (List of equations used in this study)。

| 分析方法 | 運算公式 | 說明 |
|--|--|---|
| 平方和 (sum of square) | $SS = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - x_{..}^2 / n$ | $x_{..} = \sum x_i$ ， \bar{x} 為其平均值。 |
| | $SS = \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2$ | 此為族群的平方和， μ 為族群的平均值。 |
| 均方 (mean square) | $S^2 = SS / (n-1)$ | $(n-1)$ 為自由度 (degree of freedom)。 |
| 標準偏差 (standard deviation) | $S = SD = \sqrt{S^2}$ | 為均方開方根取其正值。 |
| 變方 (Variance) | $\sigma^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2 = \frac{1}{N} \left[\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2 / N \right]$ | N 為觀測值個數， μ 為族群的平均值。 |
| 標準化值 (standard normal variate) | $Z = \frac{x - \mu}{SD} = \frac{x - \mu}{\sigma}$ | x 為變數； μ 為族群平均數； σ 為標準差 (SD)。 |
| Spearman's 等級相關係數 (Spearman's rank correlation coefficient) | $r_s = \frac{\sum_{i=1}^n (x_{ri} - \bar{x}_r)(y_{ri} - \bar{y}_r)}{\sqrt{[\sum_{i=1}^n (x_{ri} - \bar{x}_r)^2] \cdot [\sum_{i=1}^n (y_{ri} - \bar{y}_r)^2]}}$ | (x_{ri}, y_{ri}) 是第 i 個觀察數值的等級。 |
| 學生氏 t 分佈 (Student's t-distribution) | $t = \frac{\bar{x} - \mu}{\sqrt{S^2 / n}} = \frac{\bar{x} - \mu}{S / \sqrt{n}}$ | 若族群變方 (σ^2) 未知，以樣品均方 (S^2) 代替， \bar{x} 為平均值， μ 為族群平均值， n 為樣品數。 |
| 單因子變異數分析 (one way ANOVA) | $SST = SS_t + SSE$ $\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_{..})^2 = n \sum_{i=1}^m (\bar{x}_{i.} - \bar{x}_{..})^2 + \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_{i.})^2$ | 除以自由度得到各項均方。 MST 為總均方， |

| | | |
|----------------------------------|---|--|
| | 自由度： $mn - 1 = (m - 1) + m(n - 1)$ $MST = SST / (mn - 1)$ ； $MS_t = SS_t / (m - 1)$ ； $MSE = SSE / m(n - 1)$ | MSt 處理均方， MSE 誤差均方。 |
| 最小顯著差異法 (LSD) | $LDS_{\alpha/2} = t_{\alpha/2, \nu} \sqrt{MSE \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)}$ | α 為錯誤率， ν 為 自由度， n 為樣品 數。 |
| | $LSD_{\alpha/2} = t_{\alpha/2, \nu} \sqrt{\frac{2MSE}{n}}$ | 當 $n_i = n_j = n$ 時。 |
| 鄧氏新多變測驗法 (MRT) | $D_r = Q_{r, \alpha, \nu} \sqrt{\frac{MSE}{n}}$ | r 為處理均值按 大小排序後，在 比較兩處理間之 處理數， Q 為臨 界值。 |
| Tukey 公正顯著差 異法 (HSD) | $T_\alpha = Q_{\alpha, m, \nu} \sqrt{\frac{MSE}{2} \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}$ | m 為全部處理 數， Q 為臨界 值， n 為樣品數。 |
| 平衡係數 (balance coefficient) | $\frac{\sum_{i=1}^n (I_{ai} - B_{ai})}{\sum_{i=1}^n (I_{bi} - B_{bi})}$ | I 為微陣列中基 因的 intensity， B 為微陣列中背景 值的 intensity， a 為微陣列 A， b 為 微陣列 B， n 為微 陣列上基因的個 數。 |
| 正規化 (normalization) | $\log_2 \frac{R}{G} \Rightarrow \log_2 \frac{R}{G} - C = \log_2 \frac{R}{(kG)}$ $R = kG ; k = \frac{\sum R_i}{\sum G_i}$ | C 為特殊基因設 定的 log ratios 中 位數或平均值， k 為 total intensity。 |

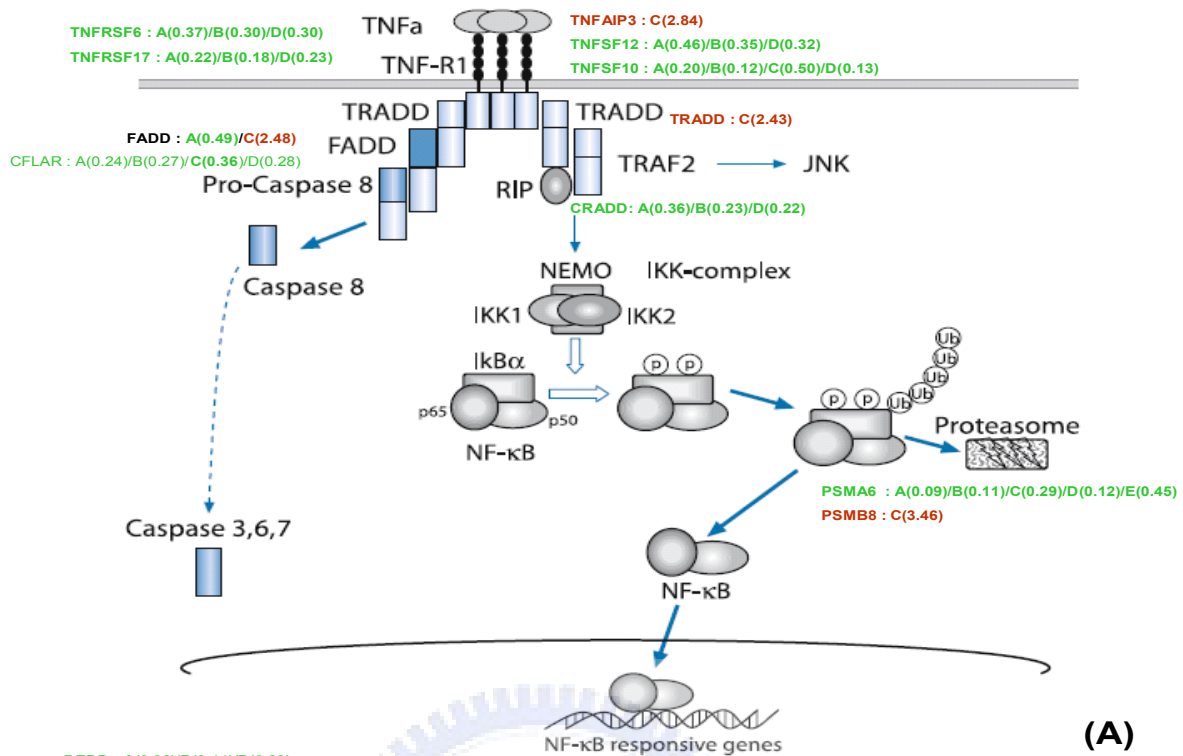
(參考資料：生物檢定統計法，沈明來著，2000)

ANOVA：the analysis of variance。

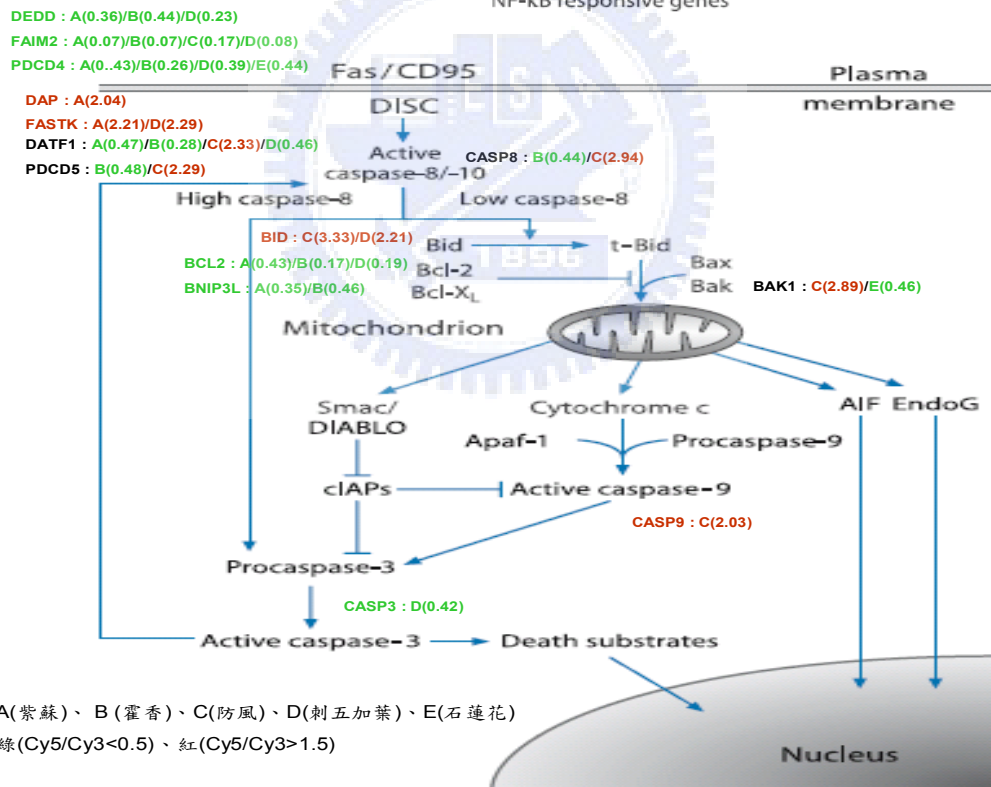
LSD：least significant difference test。

MRT：Duncan's new multiple range test。

HSD：Tukey's honest significant difference。



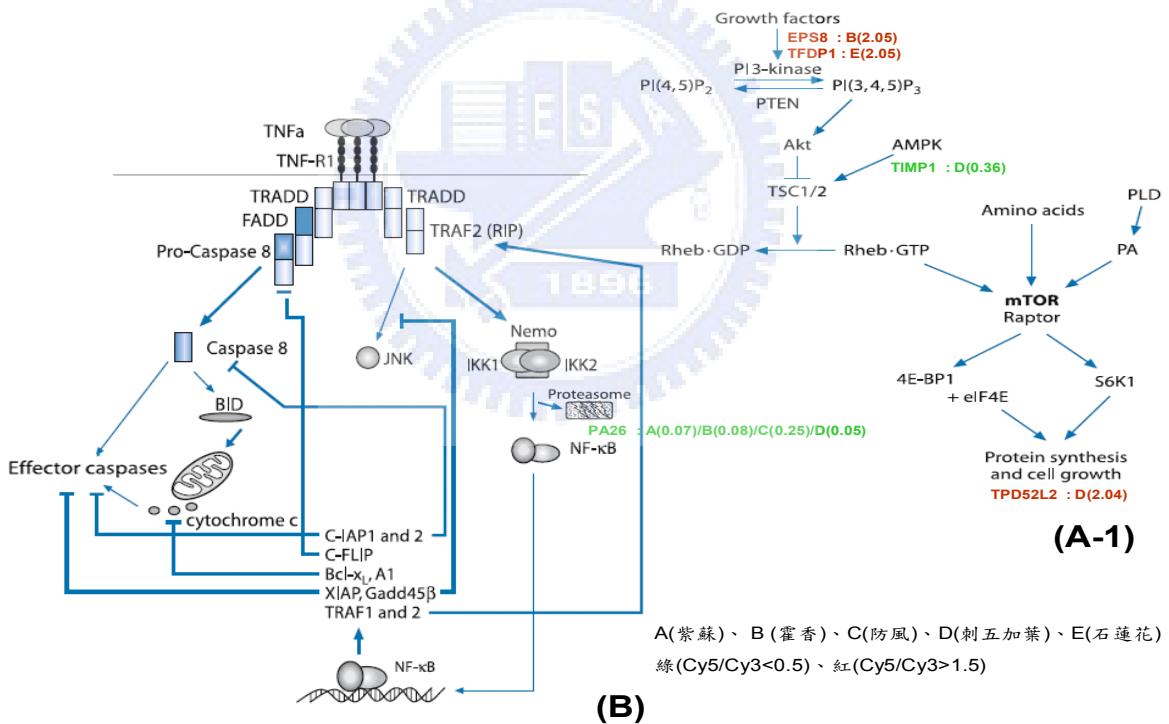
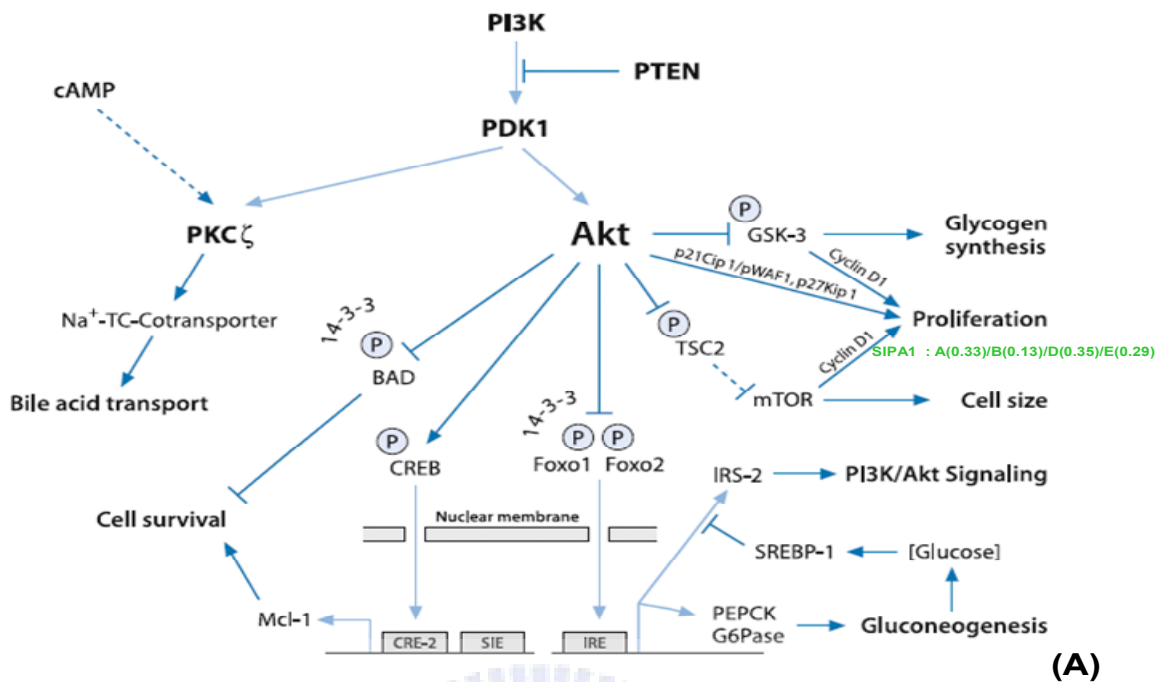
(A)



(B)

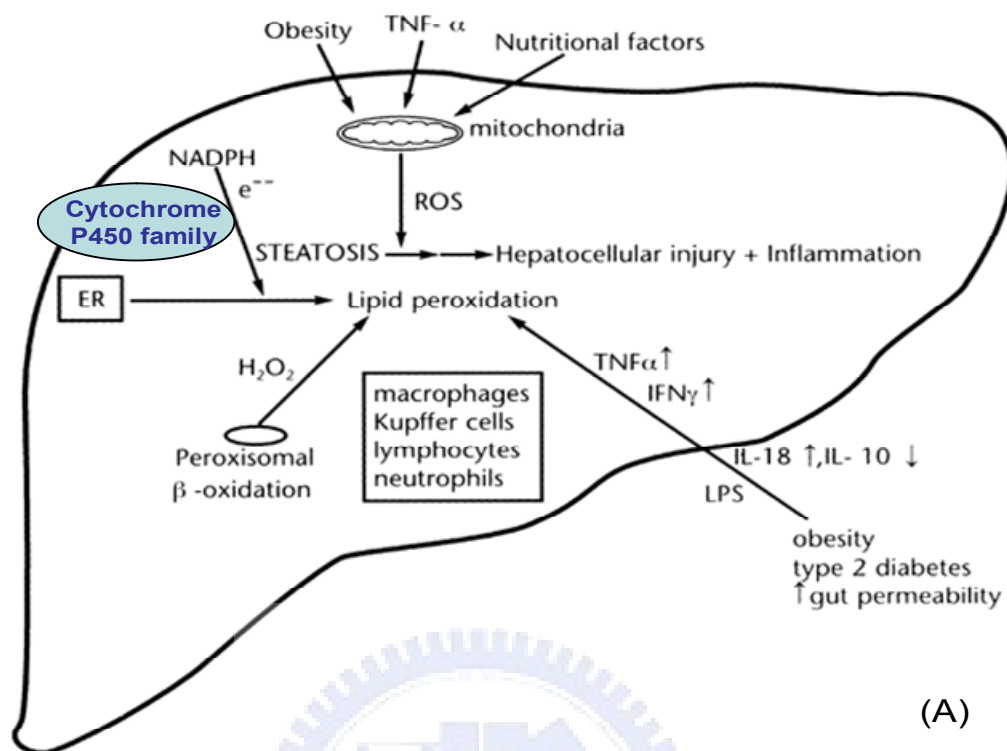
A(紫蘇)、B(藿香)、C(防風)、D(刺五加葉)、E(石蓮花)
 綠(Cy5/Cy3<0.5)、紅(Cy5/Cy3>1.5)

附錄圖 1、細胞凋亡途徑中抗癌藥物處理 HepG2 細胞的基因表現樣態 (Gene expression patterns of HepG2 cells treated with antitumor herbal extracts in apoptosis pathway)。 (A) NF- κ B 基因傳遞途徑中，藉由 TNF-dependent 的基因信號傳遞而使 caspases 活化所產生的細胞凋亡作用。(B)為 Fas/CD95-mediated 之細胞凋亡途徑 [Dufour and Clavien, 2005]。

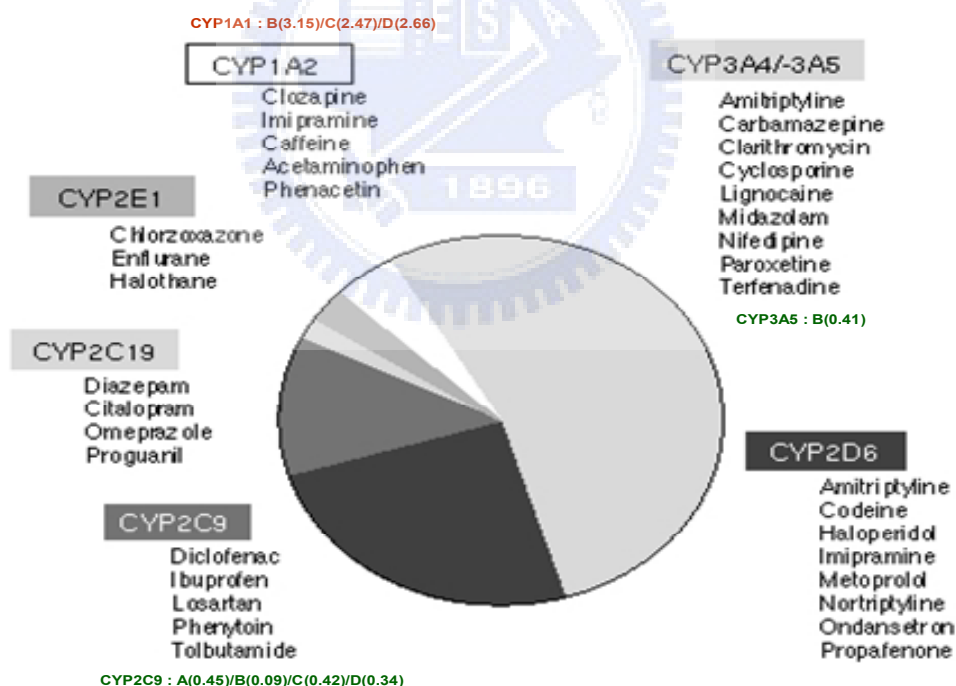


附錄圖 2、細胞增生途徑中抗癌藥物處理 HepG2 細胞的基因表現樣態 (Gene expression patterns of HepG2 cells treated with antitumor herbal extracts in cell proliferation pathway)。

(A) 在 liver-specific 的生物反應中的 PI3K/Akt 基因表現途徑。(A-1)為 mTOR (mammalian target of rapamycin) 信號調節途徑。(B) 藉由 TNF 途徑的交互影響來誘導 NF- κ B 目標基因而調節抗凋亡功能 [Dufour and Clavien, 2005]。



(A)



(B)

A(紫蘇)、B(藿香)、C(防風)、D(刺五加葉)、E(石蓮花)
 綠(Cy5/Cy3<0.5)、紅(Cy5/Cy3>1.5)

附錄圖 3、肝臟代謝途徑中抗癌藥物處理 HepG2 細胞的 Cytochrome P450 family 基因表現樣態 (Cytochrome P450 family gene expression patterns of HepG2 cells treated with antitumor herbal extracts in liver metabolic pathway)。

(A)肝臟代謝途徑中，P450 family 基因扮演的角色。(B)列舉 P450 family 基因及其功能。

(<http://www.thieme-connect.com/bilder/sld/200101/sld00093.02>、http://www.chiro.org/nutrition/FULL/Detoxification_Fig3.jpg)