



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I565949 B

(45)公告日：中華民國 106 (2017) 年 01 月 11 日

(21)申請案號：102148857

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 12 月 27 日

(51)Int. Cl.：

G01N33/50 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

(71)申請人：高雄醫學大學(中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72)發明人：王姿乃 WANG, TSUNAI(TW)；葛應欽 KO, YINGCHIN(TW)；吳沼漭 WU, CHAO CHIEN(TW)；黃明賢 HUANG, MING SHYAN(TW)；林孟志 LIN, MENG CHIH(TW)

(74)代理人：蔡清福

(56)參考文獻：

王姿乃，Eotaxin1 與 CCR3 基因對血清 IgE、eotaxin1 濃度及氣喘之影響，科技部學術補助專題研究計畫，民國 94 年 10 月 27 日。

TAYLOR R.F.H. et al., Betel-nut chewing and asthma, The Lancet 1992; 339: 1134-36.

Gordon Dent et al., "Contribution of Eotaxin-1 to Eosinophil Chemotactic Activity of Moderate and Severe Asthmatic Sputum", American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, Vol. 169, No. 10 (2004), pp. 1110-1117.

李錫銘，Formoterol 及 salmeterol 在支氣管上皮細胞上抑制 eotaxin-1 的效果，嘉南藥理科技大學生物科技系碩士論文，96 年 07 月。

審查人員：張榮興

申請專利範圍項數：4 項 圖式數：2 共 21 頁

(54)名稱

評估氣喘和肺功能的方法

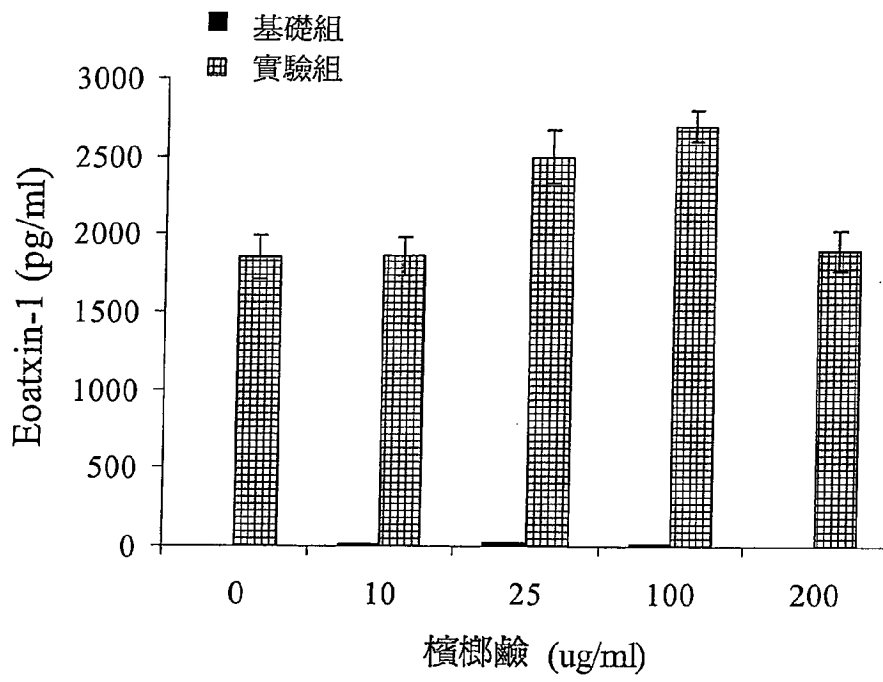
METHOD FOR ASSESSING ASTHMA AND LUNG FUNCTION

(57)摘要

本案提供一種評估一檳榔嚼食者是否患有氣喘或具有罹患氣喘的高風險的方法，該方法包含：由一檳榔嚼食者取得一樣品；於體外測定一嗜酸細胞活化趨化因子-1(eotaxin-1)或檳榔鹼在該樣品內的一濃度；以及比較該濃度與一標準品濃度，若該濃度高於該標準品濃度，則表示該檳榔嚼食者患有氣喘或具有罹患氣喘的高風險，且肺功能可能有惡化的情形。

A method for assessing whether a subject chewing betel suffers from asthma or has higher risk of asthma is provided. The method includes steps of obtaining a sample from the subject, detecting a concentration of eotaxin-1 or arecoline in the sample in vitro, and comparing the concentration with a standard concentration. If the detected concentration is higher than the standard concentration, it is determined that the subject chewing betel suffers from asthma or has higher risk of asthma, and may have lower predicted value of lung function.

指定代表圖：



第一圖

公告本

發明摘要

※ 申請案號：102148857

※ 申請日：102.12.27

※IPC 分類：G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

評估氣喘和肺功能的方法/ Method for assessing asthma and lung function

【中文】

本案提供一種評估一檳榔嚼食者是否患有氣喘或具有罹患氣喘的高風險的方法，該方法包含：由一檳榔嚼食者取得一樣品；於體外測定一嗜酸細胞活化趨化因子-1(eotaxin-1)或檳榔鹼在該樣品內的一濃度；以及比較該濃度與一標準品濃度，若該濃度高於該標準品濃度，則表示該檳榔嚼食者患有氣喘或具有罹患氣喘的高風險，且肺功能可能有惡化的情形。

【英文】

A method for assessing whether a subject chewing betel suffers from asthma or has higher risk of asthma is provided. The method includes steps of obtaining a sample from the subject, detecting a concentration of eotaxin-1 or arecoline in the sample in vitro, and comparing the concentration with a standard concentration. If the detected concentration is higher than the standard concentration, it is determined that the subject chewing betel suffers from asthma or has higher risk of asthma, and may have lower predicted value of lung function.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

評估氣喘和肺功能的方法/ Method for assessing asthma and lung function

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種評估氣喘和肺功能的方法，特別是指一種評估檳榔嚼食者的氣喘和肺功能的方法。

【先前技術】

【0002】 檳榔是一種估計世界各地約 6 億人所使用的常見物質，特別是印度、南太平洋群島和東南亞。檳榔也被在美國、英國和歐洲的亞洲移民人口廣泛使用。

【0003】 檳榔中所含的生物鹼主要是檳榔鹼和檳榔次鹼，其中檳榔鹼(其為一種膽鹼生物鹼)構成 0.15-0.67%檳榔咀嚼物的乾重。檳榔鹼和檳榔次鹼已被作為嚼檳榔習慣的暴露生物標記，且嚼食檳榔是大家公認的口腔癌的獨立干擾因子。

【0004】 氣喘是一些趨化激素介導的一種慢性炎症性疾病。嗜酸細胞活化趨化因子-1(eotaxin-1)屬於 CC 趨化激素家族，當呼吸道受到過敏物刺激時，能夠有效的將嗜酸性粒細胞動員至呼吸道中，是氣喘病因上的一個重要角色。醫師多以臨床診斷和肺功能檢查來診斷氣喘，且目前有非常多的藥物可供治療氣喘。依據全球氣喘創議組織 (Global Initiative For asthma, GINA) 所公佈氣喘診療指引，目前多以控制患者的氣喘狀態為基本原則。然而，由於氣喘的致病機轉十分複雜，其同時牽涉遺傳因子和環境因

子，所以在治療的過程中常常會發現，同樣劑量的藥物給不同的病人，有些病人對藥物的反應並不是很好，有些卻可達到很好的控制。因此，仍有約四分之一的病患在治療後仍無法達到治療指引中所定義的控制狀態。

【0001】 目前已知氣喘患者若繼續嚼食檳榔將使氣喘症狀加重，但是很少有研究調查嚼食檳榔和氣喘之間的關係。若能由特定的物質檢測推知檳榔嚼食者的氣喘罹患風險或肺功能狀態，更甚至透過了解檳榔和氣喘之間的關係而可以特定的藥物來控制檳榔嚼食者的氣喘狀態，這實為檳榔嚼食者的福音。

【0002】 職是之故，申請人鑑於上述等習知技術中所產生之缺失，乃經悉心設計與研究，並一本鍥而不捨之精神，終構思出本案「評估氣喘和肺功能的方法」，以下為本案之簡要說明。

【發明內容】

【0003】 本發明是第一個提出 eotaxin-1 涉及檳榔鹼與氣喘間相關性的研究，並提出可透過 eotaxin-1 血中蛋白與檳榔鹼來評估檳榔使用者罹患氣喘風險與肺功能惡化程度。

【0004】 本案之目的之一為提供一種評估一檳榔嚼食者是否患有氣喘的方法，該方法包含：由一檳榔嚼食者取得一樣品；於體外測定一嗜酸細胞活化趨化因子-1(eotaxin-1)或檳榔鹼在該樣品內的一濃度；以及比較該濃度與一標準品濃度，若該濃度高於該標準品濃度，則表示該檳榔嚼食者患有氣喘。

【0005】 本案之另一目的為提供一種評估一檳榔嚼食者是否具有罹患氣喘的高風險的方法，該方法包含：由一檳榔嚼食者取得一樣品；於體外測定一嗜酸細胞活化趨化因子-1(eotaxin-1)或檳榔鹼在該樣品內的一濃度；以及比較該濃度與一標準品濃度，若

該濃度高於該標準品濃度，則表示該檳榔嚼食者具有罹患氣喘的高風險。

【0006】 本案之另一目的為提供一種嗜酸細胞活化趨化因子-1(eotaxin-1)之用途，其係用於以前述的方法評估一檳榔嚼食者是否患有氣喘。

【0007】 本案之再一目的為提供一種評估患有氣喘的一檳榔嚼食者的一肺功能的方法。該方法包含如下步驟：由該檳榔嚼食者取得一體內樣品；於體外測得在該體內樣品內一檳榔鹼的一濃度；以及根據該濃度決定該肺功能。

【0008】 本案之再一目的為提供一種檳榔鹼之用途，其係用於以前述的方法評估患有氣喘的一檳榔嚼食者的一肺功能。

【0009】 本案之再一目的為提供一種嗜酸細胞活化趨化因子-1(eotaxin-1)抑制劑之用途，其係用於作為患有氣喘的一檳榔嚼食者的一藥劑。

【0010】 本案得藉由下列詳細說明，俾得更深入之了解：

【圖式簡單說明】

【0011】 第一圖顯示培養的真皮纖維母細胞中，TNF- α 和 IL-4 存在/不存在的情況下，不同濃度的檳榔鹼對 eotaxin-1 的影響。 $* p=0.01$ 。實驗組表示用 50 ng/ml 的 IL-4 和 100ng/ml 的 TNF- α 來處理纖維母細胞 72 小時；基礎組表示纖維母細胞未經 IL-4 和 TNF- α 誘導，僅以不同濃度的檳榔鹼處理。

【0012】 第二圖顯示培養的牙齦纖維母細胞中，TNF- α 和 IL-4 存在/不存在的情況下，不同濃度的檳榔鹼對 eotaxin-1 的影響。 $* p=0.03$ 。實驗組表示用 50 ng/ml 的 IL-4 和 100ng/ml 的 TNF- α 來處理纖維母細胞 72 小時；基礎組表示纖維母細胞未經 IL-4 和 TNF- α 誘導，僅以不同濃度的檳榔鹼處理。

【實施方式】

【0013】 本案的方法將可由以下的實施例說明而得到充分瞭解，並使得熟習本技藝之人士可以據以完成。然本案之實施型態並不以下列實施例為限。

【0014】 本發明的統計分析

【0015】 兩組是採用 χ^2 和 t 檢驗來進行比較，以評估統計上的顯著性。由於血清特異性免疫球蛋白 E (IgE)、高靈敏度 C 反應蛋白(HS-CRP)、檳榔鹼、檳榔次鹼和 eotaxin-1 表現量的偏斜分佈，因而取其表現量的對數。為了控制潛在干擾因子的影響，針對每一個干擾因子採用邏輯迴歸來計算校正後的勝算比(勝算比，OR)和 95%的信賴區間。使用單因子變異數分析和最小顯著差異性 (LSD) 多重比較檢驗來比較嚼食檳榔或不嚼檳榔的實驗組(罹患氣喘者)和對照組(未罹患氣喘者)的四組，並比較以不同劑量的檳榔鹼處理的細胞間的 eotaxin-1 的釋放。本案是計算皮爾森相關係數 (r 值) 來評估檳榔鹼、檳榔次鹼和肺功能之間的關聯。本發明人群歸因成分是以如下公式進行估計：試驗組中嚼檳榔的頻率 $\times [(\text{勝算比}-1) / \text{勝算比}]$ ，其中針對嚼檳榔對氣喘的影響的勝算比是基於多重邏輯迴歸模型來評估。此外，本發明還使用套裝軟體 SPSS14.0 來進行統計分析。

【0016】 請參閱第一表，其為 600 個氣喘研究對象組成的實驗組和 1200 個無氣喘研究對象組成的控制組之間的特徵比較。在統計分析前，總 IgE 量以對數轉換，以滿足常態分佈的假設。免疫球蛋白 IgE 已被證實是引起氣喘和過敏的疾病標的，由第一表可知，相較於控制組，實驗組確實顯著地具有較高的 IgE 量。在兩組之間，酒精的攝取與否並沒有顯著差異，但是抽菸和嚼食檳

榔的比例都是實驗組高於控制組，此外在 BMI 方面兩組也有顯著差異。

第一表

	實驗組 (n=600)	控制組 (n=1200)	p 值
男性/女性	255/345	510/690	1.00
平均(SD)年齡	52.49±14.55	51.98±13.08	0.47
平均(SD) IgE (U/ml)	259.0±609.5	122.5±289.0	<0.001
平均(SD) BMI (kg/m ²)	25.66±4.20	23.76±3.51	<0.001
氣喘臨床病徵			
第一次診斷的平均(SD)年齡	44.92±18.22	-	
在過去 12 個月：			
夜間醒來喘息(%)	231(38.5%)	-	
發作超過 1 次/每週(%)	287 (47.8%)	-	
入院或急診(%)	78 (13.0%)	-	
第一次嚼食檳榔和診斷出氣喘之間的平均(SD)期間(年)	18.62±14.49	-	
喝酒(%)			
否	500 (83.5%)	1002 (84.4%)	0.656
是	99 (16.6%)	185 (15.6%)	
抽菸(%)			
否	454 (75.9%)	932 (77.8%)	0.001
是	144 (24.1%)	189 (15.8%)	
嚼食檳榔 (%)			
否	532 (88.7%)	1115 (92.9%)	0.003
是	68 (11.3%)	85 (7.1%)	

【0017】 請參考第二表，其為檳榔嚼食與氣喘之間經校正的關聯性的邏輯迴歸分析。表中 eotaxin-1 的濃度檢測可以透過可進行蛋白質定量的套組、包裝產品、試劑等本領域技術人員所熟知的產品達成。在第二表中校正的潛在干擾因子包含：年齡、性別、BMI 和抽菸，經校正後，相對於從未食用檳榔的控制組而言，以

前和當前的檳榔嚼食者患有氣喘的風險分別為控制組的 1.60 和 2.05 倍。由檳榔鹼導致的氣喘的歸因危險度可計算為 0.435(0.77/1.77)。針對所有成人的人群歸因成分的比例為 4.9%[(68/600) × 0.45]，針對男性為 11.7%而針對女性為 1.2%。若將 eotaxin-1 包含於多重邏輯式迴歸分析中，則目前的檳榔嚼食者和氣喘之間的關聯性會顯著減弱。Sobel-Goodman 測試是用來驗證變項之間的關係是否有中介作用，本發明亦以此測試來檢驗 eotaxin-1 是否介導檳榔鹼與氣喘的關聯性，並得到 0.08(p<0.001) 的 Sobel-Goodman 係數。氣喘和檳榔嚼食的迴歸模型(p<0.001)和 log-eotaxin(中介變項)與檳榔嚼食的迴歸模型(p<0.001)在統計上都是顯著的。再者，在 log-eotaxin(中介變項)和檳榔嚼食對於氣喘的多重迴歸中，僅 log-eotaxin 對於氣喘是顯著的(p<0.001)，而檳榔嚼食對於氣喘的顯著性是減弱的(p<0.045)。檳榔嚼食對於氣喘之致病路徑的總效應，約 50.5%是經由 eotaxin-1 的中介效果，並達統計顯著意義。綜合上述可知，eotaxin-1 是介導檳榔鹼與氣喘之間關聯性的重要角色。

第二表

		所有個體 N=1800		兩階段採樣 N=734			
嚼食檳榔	粗估勝算比 (95% CI)	經校正的勝算比 ¹ (95% CI)		Eotaxin-1 量		經校正的勝算比 ² (95% CI)	P 值
		實驗組 平均±SD	Control 平均±SD	實驗組 平均±SD	Control 平均±SD		
無	1	1	1	175.6±71.8	131.5±53.1	1	1
以前嚼食	1.75(1.14-2.69)	1.60(0.95-2.69)	1.60(0.95-2.69)	232.5±126.5	179.6±42.4	2.47(1.04-5.84)	0.040
目前嚼食	1.57(0.94-2.62)	2.05(1.12-3.76)	2.05(1.12-3.76)	223.1±58.5	184.7±55.8	2.58(1.04-6.36)	0.038
無	1	1	1	175.6±71.8	131.5±53.1	1	1
有	1.68(1.20-2.34)	1.77(1.16-2.72)	1.77(1.16-2.72)	228.1±99.6	181.8±47.3	2.52(1.27-4.99)	0.008
中介效果	50.5% ³	p<0.001				1.78(0.85-3.70)	0.12

¹ 針對年齡、性別、BMI 及抽菸進行邏輯式迴歸校正。

² 針對年齡、性別、BMI、抽菸及取對數的 eotaxin-1 量 (隨機選擇 345 個實驗組及 389 個控制組，以測量 eotaxin-1 的量)。

³ eotaxin-1 的中介效果為檳榔嚼食對於氣喘之致炎路徑的總效應中約 50.5% 是經由 eotaxin-1 的作用產生。

第三表

	濃度(平均±SD)		濃度(平均±SD)		ANOVA 一般線性模型 ^b	
	實驗組		控制組		P ^a	P 值
	目前有嚼食檳榔 (n=21)	目前無嚼食檳榔 (n=42)	目前有嚼食檳榔 (n=32)	目前無嚼食檳榔 (n=52)		
檳榔鹼 (ng/ml)	8.67±17.1	0.03±0.12	14.1±39.6	0.26±0.66	<0.001	<0.001
檳榔次鹼 (ng/ml)	40.0±98.6	0.21±0.36	18.0±63.5	0.63±2.11	0.01	0.001
Eotaxin-1 (pg/ml)	229.1±57.4	184.9±60.2	179.3±51.2	164.1±80.4	0.15	0.002
FEV1(%)	77.6±18.0	92.4±17.9	87.0±17.6	93.3±14.9	0.15	0.008
FVC (%)	80.7±18.2	95.8±22.7	97.9±17.9	96.6±15.0	0.77	0.007
IgE (U/ml)	114.6±120.1	236.6±309.2	109.3±148.0	210.9±422.3	0.23	0.09
hs-CRP(mg/L)	1.60±1.76	2.27±3.84	0.94±0.92	1.21±1.22	0.34	0.32
Leptin (µg/ml)	6.23±3.97	5.07±3.69	-	-	-	-
TGF-β1 (µg/ml)	9.30±4.75	10.48±6.35	-	-	-	-

a. 進行最小顯著差異性 (LSD) 多重比較以分別比較四組之間的血漿標記和肺功能。

b. 使用一般線性迴歸透過校正年齡、BMI及抽菸來評估四組與血漿標記之間的關聯性。

【0018】 請參考第三表，其顯示四群研究對象(n=147)的氣喘、檳榔嚼食、血漿中生物標記與肺功能之間已校正干擾因子的關聯性。四群研究對象來自於進一步將實驗組(罹患氣喘者)與控制組(未罹患氣喘者)各自再分為目前有/無嚼食檳榔的兩組。血漿中檳榔鹼和檳榔次鹼的量是以液相色譜法-串聯式質譜(LC-MS-MS)分析法進行評估。檳榔鹼、檳榔次鹼、IgE、hs-CRP、瘦蛋白(leptin)、TGF- β 1 以及 eotaxin-1 的量在統計分析前先取其對數以符合常態分佈的假設。肺功能是以肺功能量計(Spirometry)來檢測，本發明測定的肺功能指標包括用力肺容量(Forced vital capacity, FVC)及用力吐氣時第一秒吐氣量(Forced expired volume in one second, FEV1)，其值是以相對於預測值的百分比(%)來表示。FVC%的正常值為預期值之 80%以上，預期值則是由年齡、性別、身高對照所推算出來的一個預測數值。

【0019】 由第三表可知，在實驗組中，檳榔鹼、檳榔次鹼及 eotaxin-1 的量都是在目前有吃檳榔的群組中顯著較高，而 FEV1% 及 FVC%則是在目前有吃檳榔的群組中顯著下降。再者，基於前述統計分析，證實了 eotaxin-1 是介導檳榔鹼與氣喘之間關聯性的重要角色。因此，本發明可利用 eotaxin-1 的濃度來評估檳榔嚼食者是否患有氣喘，其方法透過如下步驟來執行。首先，取得檳榔嚼食者的血液樣品，並於體外測量 eotaxin-1 在該樣品中的濃度。其次，比較該濃度與一標準品濃度，若該濃度高於該標準品濃度，則表示該檳榔嚼食者患有氣喘，或表示其具有罹患氣喘的高風險。由第三表可知，該標準品的濃度可以來自以下三個群組的其中任一：有氣喘的非檳榔嚼食者、沒有氣喘的檳榔嚼食者及沒有氣喘的非檳榔嚼食者。也就是說，只要一個檳榔嚼食者血液中的

eotaxin-1 濃度高於上述三個群組任一群組血液中的平均 eotaxin-1 濃度，則可判定該檳榔嚼食者患有氣喘，或具有罹患氣喘的高風險。較佳地，可將 147 個研究對象的數據於資料庫中依照干擾因子(即年齡、BMI 及抽菸與否)再加以分類，並在選擇標準品濃度時，考慮被評估者的干擾因子而選擇與其干擾因子相近的數據以作為標準品濃度，則可提高評估的準確率。本方法是透過統計分析來評估檳榔嚼食者是否有罹患氣喘的風險，如能加上下列臨床上的症狀評估將可更確定受評估者是否罹患氣喘：(1)有喘鳴；(2)曾有下列病史：i)咳嗽，夜晚時特別嚴重，ii)反覆喘鳴，iii)反覆呼吸困難，iv)反覆胸悶；(3)症狀多在夜間發生或惡化，導致患者睡眠中斷；(4)症狀發生或惡化跟季節交替有關；(5)有氣喘病和過敏體質的家族史；(6)喘鳴頻率頻繁，一個月超過一次；(7)運動時會引發咳嗽或喘鳴；(8)無呼吸道感染卻會夜咳；(9)任何季節都可能喘鳴發作；(10)超過 3 歲以後，症狀仍然持續存在；及(11)若遇到下列情況，症狀就會出現或特別惡化：有吸入型過敏原(如有毛的動物、塵蹣、蟑螂、黴菌、花粉、菸)、化學物質、藥物(如阿司匹靈、乙型交感神經阻斷劑 (Beta blocker)、運動、強烈的情緒變化及呼吸道感染(尤其是病毒感染，有感冒症狀就會超過 10 天)等。

【0020】 請參考第四表，其顯示檳榔鹼和檳榔次鹼的量對於患有氣喘的嚼食檳榔者的 eotaxin-1 的量和肺功能的關聯性。檳榔鹼、檳榔次鹼和 eotaxin-1 的量在統計分析前先取其對數以符合常態分佈的假設。由表中的 r 係數可知，檳榔鹼對於 eotaxin-1 的量有顯著的正相關，而對於肺功能預測指標 FEV1%及 FVC%有顯著的負相關；以及檳榔次鹼對於 FEV1%及 FVC%也有顯著的負相關。所以，氣喘病人體內檳榔鹼或檳榔次鹼的濃度越高則表示其肺功能越低。以表中 $\beta \pm sd = -1.009 \pm 0.222$ 為例，其意指相對於不吃

檳榔的氣喘病人而言，吃檳榔的氣喘病人的檳榔鹼(ng/ml)每增加 1 ng/ml，肺功能(FEV1%)會下降 1.009%。在本實驗某些研究對象中，有些吃檳榔的氣喘病人的檳榔鹼血液濃度達 40 ng/ml 甚至以上，這表示肺功能(FEV1%)會下降達 40.04%，對肺功能受損有很大影響。

【0021】 根據第四表的數據，本發明提出一種評估患有氣喘的檳榔嚼食者的肺功能的方法，其透過如下步驟來執行。首先，取得檳榔嚼食者的血液樣品，並於體外測量檳榔鹼在該樣品中的濃度。其次，比較該濃度與一標準品濃度，相對於該標準品濃度，所測得濃度每增加 1 ng/ml，該檳榔嚼食者的 FEV1%會下降 1.009%，而 FVC%會下降 0.806%。該標準品的濃度較佳是有氣喘的非檳榔嚼食者血液中的平均檳榔鹼濃度。較佳地，在選擇標準品濃度時，可考慮被評估者的干擾因子而選擇與其干擾因子相近的數據以作為標準品濃度，則可提高評估的準確率。本方法是透過統計分析來評估患有氣喘的檳榔嚼食者的肺功能惡化情況，若搭配臨床上的肺功能測量方式(例如使用肺量計和尖峰呼氣流量(PEF)變異度等)，將可得到更可信賴的評估結果。

【0022】 由於目前已知檳榔鹼構成 0.15-0.67%檳榔咀嚼物的乾重，故本領域技術人員亦可經由簡單實驗而由病患每天吃的檳榔量來推估其血液中檳榔鹼的量。因此，單由病患每天吃的檳榔量來粗估其肺功能的損害情況亦是可能的。

第四表

	氣喘 (n=63)					
	檳榔鹼 (ng/ml)			檳榔次鹼 (ng/ml)		
	$\beta \pm sd$	r*	p 值	$\beta \pm sd$	r*	p 值
Eotaxin-1	1.185 \pm 0.747	0.303	0.02*	0.257 \pm 0.138	0.162	0.23

FEV1 (%)	-1.009±0.222	-0.359	0.004*	-0.169±0.035	-0.370	0.003*
FVC (%)	-0.806±0.283	-0.309	0.02*	-0.139±0.045	-0.303	0.02*

*斯皮爾曼相關係數

【0023】 爲了研究檳榔鹼和 eotaxin-1 的量之間的功能關聯性而進行如下之試驗。首先，從正常人皮膚或口腔的皮膚樣品取得真皮和齒齦纖維母細胞。取得皮膚或牙齦組織、切到 1-2 立方毫米，然後在含有 10%FBS 的 DMEM 培養皿中培養 7 天以收穫纖維細胞。接種第 3 代的人類纖維母細胞。收穫真皮纖維母細胞並以 IL-4 和 TNF- α 進行誘導，IL-4 和 TNF- α 這兩者都是誘導纖維細胞釋放 eotaxin-1 的標準藥劑。用 50 ng/ml 的 IL-4 和 100ng/ml 的 TNF- α （兩者皆來自 Peptotech 公司，Rock Hill, NJ）來處理纖維母細胞 72 小時，以誘導 eotaxin 的釋放。細胞也在第一個 24 小時內以不同濃度(0、10、25、100 及 200 μ g/ml)的檳榔鹼預處理。每個處理條件評估三重複的細胞。最後取細胞的上清液利用 ELISA 法測量 eotaxin-1 的釋放量(平均 \pm SD)。eotaxin-1 的量(平均 \pm SD)是以單因子變異數分析(One Way ANOVA)及 Bonferroni 多重校正檢驗(P 值藉由乘以 10 來調整)來進行分析。結果如第一圖和第二圖所示。

【0024】 由第一圖的結果可知，單獨用 0、10、25、100 和 200 μ g/ml 濃度的檳榔鹼來處理皮膚纖維母細胞，僅會誘導出很少量的 eotaxin-1 釋放（對於任一檳榔鹼測試劑量，eotaxin-1 的量大約介於 0 \pm 0 pg/ml 至 23 \pm 2 pg/ml 的範圍）。然而，在 TNF- α 和 IL-4 的刺激下，相對於 0 μ g/ml 的檳榔鹼處理所產生的 eotaxin-1(1850 \pm 142 pg/ml)，100 μ g/ml 的檳榔鹼處理將顯著地誘導皮膚纖維母細胞產生 eotaxin-1 達 2700 \pm 98 pg/ml(p=0.01，使用 Bonferroni 多重校正檢驗)。

【0025】 因為嚼食的檳榔將直接作用於口腔粘膜而非皮膚，故上述實驗亦以牙齦纖維母細胞來重複，以鞏固因果關係，其結果示於第二圖。由第二圖的結果可知，從 0 到 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度的檳榔鹼都沒有引起 eotaxin-1 釋放(對於任一檳榔鹼測試劑量所測得的 eotaxin-1 都是 0 ± 0 pg/ml)。在 TNF- α 和 IL-4 存在的情況下，相對於 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的檳榔鹼處理所產生的 eotaxin-1 (1044 ± 95 pg/ml)，100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的檳榔鹼處理將顯著地誘導牙齦纖維母細胞產生 eotaxin-1 達 1489 ± 78 pg/ml ($p=0.03$)。第一圖和第二圖的結果都表示在細胞的模式亦證實了檳榔鹼可以增加 eotaxin-1 的表現量。

【0026】 氣喘的致病機轉十分複雜，在過去從未有人研究過檳榔與氣喘間的致病關係。在 GINA 的指引下，氣喘治療原則是完全控制氣喘為基礎，以恢復並且避免病人產生氣喘症狀和呼吸道氣流阻塞。治療氣喘的藥物依據其主要作用機轉可區分為控制藥物(又稱長期預防藥物)和緩解藥物(又稱快速緩解藥物)兩大類。控制藥物是必須長期每日使用的治療藥物，包括抗發炎藥物和長效型的支氣管擴張劑。抗發炎藥物可以中止氣道的發炎反應，而且有預防和壓抑氣道發炎反應的作用，因此可以使氣喘病人惡化頻率減少，慢性症狀減少，肺功能進步，氣道過度反應降低，和生活品質獲得改善。目前使用中的抗發炎藥物主要有類固醇、啞達永樂、nedocromil、緩釋型茶鹼和白三烯調節劑(Leukotriene Modifiers)等，其中以類固醇的療效最佳，它同時具備預防與治療的效果。緩解藥物則主要包含短效或快速作用型的支氣管擴張藥物，它們可迅速地緩解氣喘病人的支氣管收縮現象及其伴隨的急性症狀，例如咳嗽、胸悶、和喘鳴。支氣管擴張劑則包括短效或快速作用型交感神經興奮劑、副交感神經拮抗劑和短效型茶鹼，其中以 β 型交感神經興奮劑為目前被使用最普遍且支氣管擴張作

用最有效的藥物。

【0027】 本發明的試驗證實了 eotaxin-1 是介導檳榔鹼與氣喘之間關聯性的重要角色，具體而言，檳榔嚼食對於氣喘之致病機轉的總效應，約 50.5%是經由 eotaxin-1 的中介效果。對於致病機轉的研究來說，50.5%是相當高的中介效果，對較為複雜的致病機轉而言，很多牽涉因子都只顯示例如 5%的中介效果。因此，在檳榔嚼食者的氣喘控制上，本領域技術人員將理解可特別透過抑制 eotaxin-1 的產生來達到有效控制氣喘的目的。也就是說，eotaxin-1 的抑制劑可用於作為患有氣喘的檳榔嚼食者的藥劑。雖然目前已知有一些 eotaxin-1 抑制劑已用於氣喘的治療(例如 Salmeterol 和 Formoterol，其為長效型 $\beta 2$ 交感神經興奮劑且已廣泛的用於氣喘的吸入性治療)，但是由於氣喘的藥物種類繁多且其選擇還需取決於病患的氣喘控制程度，所以臨床上醫師在選擇藥劑時未必會以 eotaxin-1 抑制劑作為首選。針對檳榔嚼食者，本發明提供臨床上氣喘控制藥物的較佳選擇，其可針對檳榔嚼食者這種特定對象透過抑制 eotaxin-1 來提供較佳的氣喘控制效果。在氣喘的階梯式治療方法中，在第三階(中度持續性氣喘)可以低劑量吸入型類固醇合併長效乙二型交感神經支氣管擴張劑進行治療；在第四階可以中至高劑量吸入型類固醇合併長效乙二型交感神經支氣管擴張劑進行治療。根據臨床研究報告顯示，低劑量的吸入式類固醇加上長效型擴張劑的療效，比單獨使用高劑量的吸入式類固醇更為顯著，亦即合併式療法改善氣喘的效果優於二種藥個別使用。因此，本發明的 eotaxin-1 抑制劑亦可與吸入式類固醇或其他控制藥物合併使用。

【0028】 本發明之其他實施例說明如下。

1. 一種評估一檳榔嚼食者是否患有氣喘或具有罹患氣喘的高風

險的方法，包括下列步驟：由一檳榔嚼食者取得一樣品；於體外測定一嗜酸細胞活化趨化因子-1(eotaxin-1)在該樣品內的一濃度；以及比較該濃度與一標準品濃度，若該濃度高於該標準品濃度，則表示該檳榔嚼食者患有氣喘或具有罹患氣喘的高風險。

2. 一種評估患有氣喘的一檳榔嚼食者的一肺功能的方法，包含：由該檳榔嚼食者取得一體內樣品；於體外測得在該體內樣品內一檳榔鹼的一濃度；以及根據該濃度決定該肺功能。

3. 如實施例第 2 項所述之方法，其中該體內樣品為一血液樣品。

4. 如前述實施例第 2-3 項所述之方法，更包括比較所測得濃度與一標準品濃度。

5. 如前述實施例第 2-4 項所述之方法，更包括相對於該標準品濃度，所測得濃度每增加 1 ng/ml，該檳榔嚼食者的一第一秒吐氣量 (FEV1%) 會下降 1.009%。

6. 如前述實施例第 2-5 項所述之方法，更包括相對於該標準品濃度，所測得濃度每增加 1 ng/ml，該檳榔嚼食者的一用力肺活量 (FVC%) 會下降 0.806%。

7. 如前述實施例第 2-6 項所述之方法，其中該標準品濃度是從患有氣喘的非檳榔嚼食者測得的一檳榔鹼濃度。

8. 一種檳榔鹼之用途，其係用於以前述的方法評估患有氣喘的一檳榔嚼食者的一肺功能。

9. 一種嗜酸細胞活化趨化因子-1(eotaxin-1)之用途，其係用於以前述的方法評估一檳榔嚼食者是否患有氣喘或具有罹患氣喘的高風險。

10. 一種嗜酸細胞活化趨化因子-1(eotaxin-1)抑制劑之用途，其係用於作為患有氣喘的一檳榔嚼食者的一藥劑。

【0029】 上述實施例僅用以說明本發明之示例實施方式，然

而本發明之範圍當不受限於該上述之各項具體實施方式；且本發明得由熟悉技藝之人任施匠思而為諸般修飾，然不脫如附申請範圍所欲保護者。

【符號說明】

【0030】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

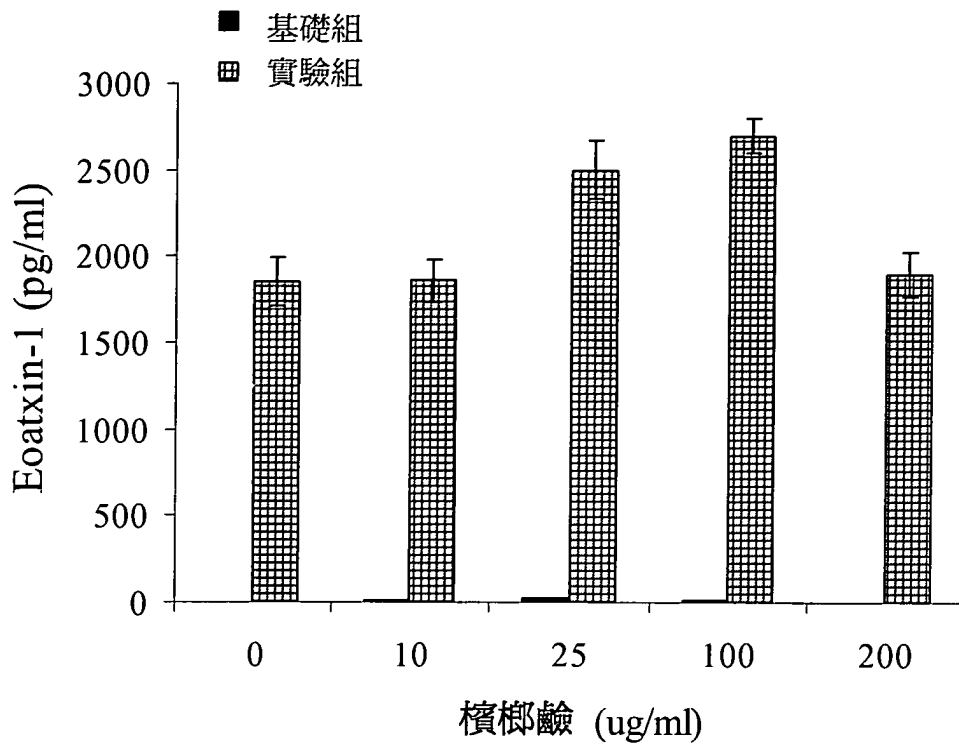
國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

【序列表】 (請換頁單獨記載)

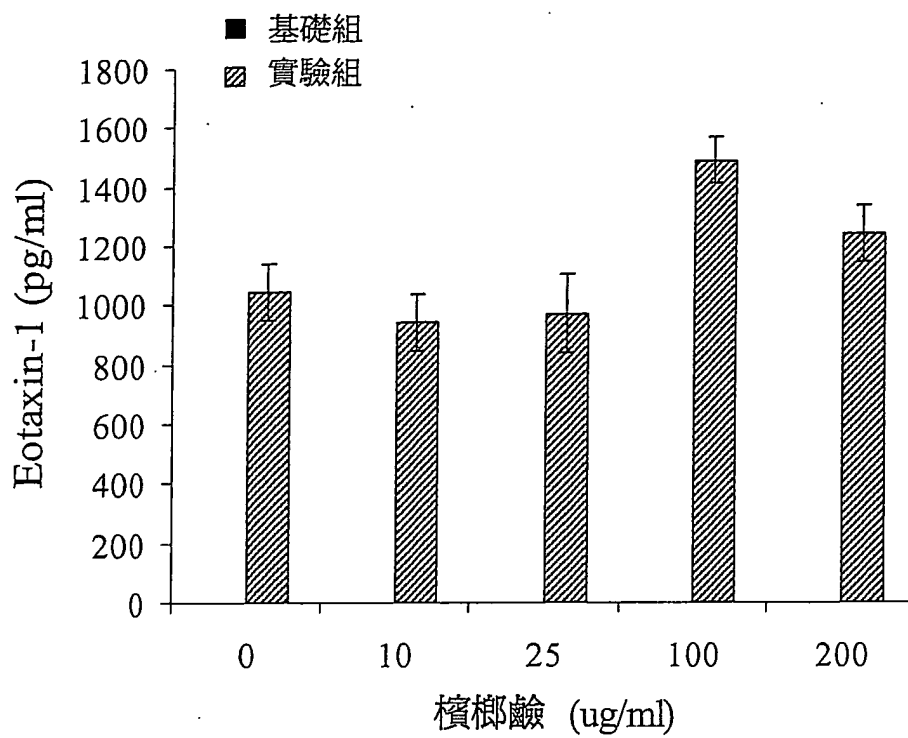
申請專利範圍

1. 一種評估一檳榔嚼食者是否患有氣喘的方法，包括下列步驟：
 - 由一檳榔嚼食者取得一樣品；
 - 於體外測定一嗜酸細胞活化趨化因子-1(eotaxin-1)在該樣品內的一濃度；以及
 - 比較該濃度與一標準品濃度，
 - 若該濃度高於該標準品濃度，則表示該檳榔嚼食者患有氣喘。
2. 一種評估一檳榔嚼食者是否具有罹患氣喘的高風險的方法，包括下列步驟：
 - 由一檳榔嚼食者取得一樣品；
 - 於體外測定一嗜酸細胞活化趨化因子-1(eotaxin-1)在該樣品內的一濃度；以及
 - 比較該濃度與一標準品濃度，
 - 若該濃度高於該標準品濃度，則表示該檳榔嚼食者具有罹患氣喘的高風險。
3. 一種嗜酸細胞活化趨化因子-1(eotaxin-1)之用途，其係用於以申請專利範圍第1項所述的方法評估一檳榔嚼食者是否患有氣喘。
4. 一種嗜酸細胞活化趨化因子-1(eotaxin-1)抑制劑之用途，其係用於作為患有氣喘的一檳榔嚼食者的一藥劑。

圖式



第一圖



第二圖