

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

探討金針菇免疫調節蛋白減緩卵白蛋白及IL-17誘發具抗類固醇
的慢性氣喘之嗜中性球發炎及其氣道重組機轉(第3年)

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 104-2314-B-040-015-MY3
執行期間：106年08月01日至107年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學系

計畫主持人：呂克桓
共同主持人：柯俊良
計畫參與人員：碩士級-專任助理：李育慈
 博士班研究生-兼任助理：李育慈

中華民國 107 年 10 月 30 日

中文摘要：氣喘是一種非常複雜的氣道發炎病症，通常認為是由輔助型第二型T細胞誘發抗原特異性IgE及嗜酸性白血球大量增加所造成的。然而最近研究在一些類固醇頑固型的慢性氣喘病患中不只嗜酸性白血球高且嗜中性白血球也高。然而這類病患可能與輔助型Th17細胞所分泌的IL-17為主，導致嗜中性白血球的發炎。我們研究團隊之前發現在急性期氣喘動物實驗中，FIP-fve能使細胞趨向Th1發展進而減緩OVA所誘發之Th2細胞激素的產生。

本研究我們將透過一套已建立之OVA誘導長期慢性氣喘動物模式，利用收集氣道沖洗液及劉氏染色確定其特徵主要增加嗜中性白血球而不是嗜酸性白血球，並透過其他分子實驗方式分析，進一步評估FIP-fve是否能治療慢性氣喘

首先利用小鼠全身肺功能檢驗分析儀器分析氣道過度反應；並以酵素免疫連結分析小鼠體內氣道沖洗液及血清中的IL-4, IFN-r, IL-5, IL-6, IL-23, Foxp3, IL-22 和 IL17；病理切片配合FOXP3、RORrt 等螢光染色。最後，我們將分析FIP-fve對於Treg所分泌TGF-β影響Th17細胞後IL-22所參與的氣道重塑等機制。

本研究從類固醇頑固型慢性氣喘中所牽涉不同的路徑，來尋求新的治療策略。經由本研究計畫完成，有助於類固醇頑固型的慢性氣喘所造成的嗜中性白血球參與的發炎反應及氣道重塑等機轉的釐清，應可提供新的治療方向。

中文關鍵詞：慢性氣喘、FIP-fve、嗜中性球、IL-17

英文摘要：Asthma is a heterogeneous inflammatory disorder of the airway. Th2 response is usually contributed to high levels of allergen-specific IgE and eosinophilic airway inflammation. Recently, several findings demonstrated that neutrophils, not eosinophils, are the major inflammatory cells in chronic asthma patients with steroid-resistant. Th17 producing IL17 axis result in neutrophil inflammation and IL13/IL22 induce airway remodeling. FIP-fve that exhibits anti-inflammatory properties on OVA-induced acute airway inflammation.

The proposal will focus on the mechanisms of IL-17 axis, and their immuno-microenvironment in chronic asthma with corticosteroid-resistant.

In the study, we will have established the chronic asthma model with corticosteroid-resistant. We will evaluate the potential therapeutic role of FIP-fve and corticosteroid in a new chronic asthma mouse model characterized by increased neutrophils in BALF cells rather than eosinophils using Liu's staining. The effect of FIP-fve or corticosteroid on OVA induced AHR was measured using a whole-body barometric plethysmography. Airway inflammation was evaluated by IL-4, IFN-r, IL-5, IL-6, IL-22, IL-23, Foxp3 and IL17 in the BALF and in the serum that were assessed using ELISA analysis. To assess pathological changes, lung tissue sections were stained with hematoxylin&eosin (H&E). Immunofluorescence

microscopy of CD4T-cell clones fixed and stained with antibodies specific for FOXP3 and ROR γ t. DAPI was used to counterstain the nuclei, and we will further investigate whether FIP-fve reduce IL-22-induced airway remodeling through the Treg/Th17 resulting in TGF- β pathway in the airway remodeling. The novel treatment strategies for chronic asthma with corticosteroid-resistant could involve in many pathways. Upon the completion of this proposal, we will provide a new direction for treatment of corticosteroid resistant asthma by enhancing neutrophils-mediated inflammation and tissue remodeling.

英文關鍵詞：Chronic asthma, FIP-fve, neutrophils inflammation, IL-17

科技部補助專題研究計畫成果報告

(期中進度報告/期末報告)

探討金針菇免疫調節蛋白減緩卵白蛋白及 IL-17 誘發具抗類固醇的 慢性氣喘之嗜中性球發炎及其氣道重組機轉

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 104-2314-B-040-015-MY3

執行期間：104年8月1日至107年7月31日

執行機構及系所：中山醫學大學醫學系

計畫主持人：呂克桓

共同主持人：柯俊良

計畫參與人員：李育慈

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 __ 份：

執行國際合作與移地研究心得報告

出席國際學術會議心得報告

出國參訪及考察心得報告

中 華 民 國 107 年 10 月

目錄

中文摘要	I
英文摘要	II
前言	1
研究動機與目的	1
文獻探討	1
研究方法	3
結果與討論	6
討論	9
圖表說明	13
參考文獻	30
專題研究計畫成果自評表	36
專題研究計畫交果彙整表	37

中文摘要

氣喘是一種非常複雜的氣道發炎病症，通常認為是由輔助型第二型T細胞誘發抗原特異性IgE及嗜酸性白血球大量增加所造成的。然而最近研究在一些類固醇頑固型的慢性氣喘病患中不只嗜酸性白血球高且嗜中性白血球也高。然而這類病患可能與輔助型Th17細胞所分泌的IL-17為主，導致嗜中性白血球的發炎。我們研究團隊之前發現在急性期氣喘動物實驗中，FIP-fve能使細胞趨向Th1發展進而減緩OVA所誘發之Th2 細胞激素的產生。

本研究我們將透過一套已建立之OVA誘導長期慢性氣喘動物模式，利用收集氣道沖洗液及劉氏染色確定其特徵主要增加嗜中性白血球而不是嗜酸性白血球，並透過其他分子實驗方式分析，進一步評估FIP-fve是否能治療慢性氣喘

首先利用小鼠全身肺功能檢驗分析儀器分析氣道過度反應；並以酵素免疫連結分析小鼠體內氣道沖洗液及血清中的IL-4, IFN- γ , IL-5, IL-6, IL-23, Foxp3, IL-22 和 IL17；病理切片配合FOXP3、ROR γ t 等螢光染色。最後，我們將分析FIP-fve對於Treg所分泌TGF- β 影響Th17細胞後IL-22所參與的氣道重塑等機制。

本研究從類固醇頑固型慢性氣喘中所牽涉不同的路徑，來尋求新的治療策略。經由本研究計畫完成，有助於類固醇頑固型的慢性氣喘所造成的嗜中性白血球參與的發炎反應及氣道重塑等機轉的釐清，應可提供新的治療方向。

關鍵字：慢性氣喘、FIP-fve、嗜中性球、IL-17

英文摘要

Asthma is a heterogeneous inflammatory disorder of the airway. Th2 response is usually contributed to high levels of allergen-specific IgE and eosinophilic airway inflammation. Recently, several findings demonstrated that neutrophils, not eosinophils, are the major inflammatory cells in chronic asthma patients with steroid-resistant. Th17 producing IL17 axis result in neutrophil inflammation and IL13/IL22 induce airway remodeling. FIP-fve that exhibits anti-inflammatory properties on OVA-induced acute airway inflammation.

The proposal will focus on the mechanisms of IL-17 axis, and their immuno-microenvironment in chronic asthma with corticosteroid-resistant.

In the study, we will have established the chronic asthma model with corticosteroid-resistant. We will evaluate the potential therapeutic role of FIP-fve and corticosteroid in a new chronic asthma mouse model characterized by increased neutrophils in BALF cells rather than eosinophils using Liu's staining. The effect of FIP-fve or corticosteroid on OVA induced AHR was measured using a whole-body barometric plethysmography. Airway inflammation was evaluated by IL-4, IFN- γ , IL-5, IL-6, IL-22, IL-23, Foxp3 and IL17 in the BALF and in the serum that were assessed using ELISA analysis. To assess pathological changes, lung tissue sections were stained with hematoxylin&eosin (H&E). Immunofluorescence microscopy of CD4T-cell clones fixed and stained with antibodies specific for FOXP3 and ROR γ t. DAPI was used to counterstain the nuclei, and we will further investigate whether FIP-fve reduce IL-22-induced airway remodeling through the Treg/Th17 resulting in TGF- β pathway in the airway remodeling.

The novel treatment strategies for chronic asthma with corticosteroid-resistant could involve in many pathways. Upon the completion of this proposal, we will provide a new direction for treatment of corticosteroid resistant asthma by enhancing neutrophils-mediated inflammation and tissue remodeling.

Keywords: Chronic asthma, FIP-fve, neutrophils inflammation, IL-17

前言

氣喘是一種反覆發作且可逆的肺部空氣通道 (airway) 阻塞疾病，屬於一種慢性呼吸道發炎的症候，但在氣喘急性發作期卻有可能嚴重到導致死亡。引起氣喘的原因很多，如遺傳因素、長期接觸各種過敏原、空氣污染等等皆為重要因素。而由於人類文明進展所造成的環境及空氣污染，更是讓人類氣喘的發生率非但沒有因科學的進步而降低，反而有逐年攀升的傾向，因此氣喘的預防及治療已成為當代重要的醫學研究課題 (1)。

近年來氣喘發生率無論在何年齡層皆持續的快速增加，然而抗類固醇藥物的急/慢性氣喘也隨之增加，因此針對氣喘藥物所做的研究也愈來愈多並且不斷的被開發出來。然而針對氣喘較新穎之研究亦發現，氣喘疾病的成因及惡化已不再是僅限於 Th1/Th2 細胞激素分泌不平衡所致，目前認為氣喘疾病的成因與惡化可能與 IL17、IL-23、Th17、Th22 及 Treg 細胞/細胞激素調控有關。然本研究想探討這類細胞激素，在免疫微環境中其上下游路徑的表現。

研究動機與目的

有鑒於現今臨床對於氣喘、過敏性疾病的用藥，主要仍是依賴類固醇類藥物，但抗類固醇藥物問題的存在已是不容被忽視。先前針對金針菇免疫調節蛋白對於抗發炎所做的研究指出，FIP-fve 是一項極具改善效果的調節蛋白，因此本研究想藉由雞卵蛋白 OVA 所誘發的小鼠氣喘模式來進一步研究。

本研究共分為二個階段：第一階段為 FIP-fve 對於急慢性氣喘動物模式的影響、第二階則是針對 FIP-fve 對於 IL-17 上下游相關路徑所誘發 eosinophils 發炎的影響，並確定 FIP-fve 或 corticosteroid 在慢性氣喘中氣道重塑相關的 MMPs、膠原蛋白及黏素等相關導致肺纖維化前趨物質的變化。

文獻探討

氣喘

根據目前針對氣喘所做的研究顯示，氣喘是一種反覆發作且複雜的慢性呼吸道發炎疾病，包括嗜伊紅性白血球 (Eosinophil)、肥大細胞 (mast cell)、T 淋巴球 (T lymphocytes) 都參與其中，此外呼吸道黏膜水腫、黏液的過度分泌以及呼吸道的過度充氣反應都是主要表現。而在長期反覆發作的狀態下，呼吸道上皮脫落、杯狀細胞及粘膜下腺體增生、氣道平滑肌肥大增生、支氣管血管增生等呼吸道重塑現象，更增添氣喘控制的難度。在先前研究中發現，氣喘患者的呼吸道中會有大量的 T 細胞 (T lymphocytes) 浸潤 (2)，而肺泡沖洗液 (bronchoalveolar lavage fluid) 與肺分泌物中，可能存在能夠調節控制發炎反應的趨化激素 (chemokines) 和細胞激素 (cytokines) (3)。

根據先前研究，Th1 細胞能夠產生 IFN- γ (interferon- γ) 和 IL-2，Th1 細胞會幫助殺手細胞，並透過 interferon- γ 活化巨噬細胞，這對於細胞的防禦功能有著極大的重要性；而 Th2 細胞則會產生 IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-13，這類細胞激素則與過敏發炎的機制有關 (4)。此外，氣喘發炎反應中，Th1 細胞所分泌的 IFN- γ 會抑制 Th2 細胞的分化及 IgE 的合成，因此在缺乏 IFN- γ 的情況下，會有加重過敏發炎反應的現象。而 IL-5 可刺激嗜伊紅性白血球的分化、成熟及存活，而 IL-4 和 IL-13 則可以結合到 B 細胞上的受體，促進 B 細胞產生 IgE (3-5)。臨床上也證實，氣喘患者的血清中存有高濃度的 IgE (5)，由上述眾多研究我們可以得知，氣喘疾病可能是由於體內各種激素分泌失去平衡所導致，因此若能改變體內的微環境便可能有機會改善此類疾病的發生。

值得一提的是，目前已有許多較新的臨床與基礎研究皆指出過敏性氣喘在實質上會比單純的

Th1/Th2 免疫機制不平衡所導致的氣喘更為多向性且更加複雜 (6)。這些研究中發現，氣喘病患的肺部中常見非 Th2 相關因子的存在，如 IL-17、neutrophils 等；且這些現象卻特別常見於具有 corticosteroid-resistant 的患者或嚴重氣喘患者身上 (6, 7)，另外文獻中也指出，當致敏小鼠再次受到過敏原的刺激後呼吸道會出現大量的 neutrophils 而非 eosinophil，這樣的結果也與嚴重的呼吸過度反應具有相關性 (6, 7)。

分泌 IL-17 的 Th17 細胞既不是 Th1 也不是 Th2 細胞，這樣的結果與原先 Th1 / Th2 不平衡而誘發氣喘的說法是不一致的。Th17 細胞分泌 IL-1 β ，IL-6，IL-17，IL-21，IL-22，IL-23 和 TGF- β (7)。根據先前研究指出，IL-17 會作用於多種細胞上，如 neutrophils、內皮細胞、上皮細胞以及纖維細胞。此外 IL-17 已被證實是主要募集和活化 neutrophils 的細胞激素，而 IL-17 也與肺部 neutrophils 的遷移浸潤有關 (8) 且其可以誘發呼吸道平滑肌的收縮與增生 (9)。在以 Th17 缺陷小鼠的研究中 (9)，其對於由家塵蟎和雞卵蛋白所誘發的呼吸道過度反應以及呼吸道重塑現象有顯著的改善。

目前在臨床上吸入性皮質類固醇被廣泛的使用於治療氣喘患者。然而，但類固醇用藥的副作用及全身性的不良反應是不容被忽視的，因為這類用藥它們可能會長期使用於嬰兒、兒童和老年人的身上 (10)。根據研究統計氣喘疾病的死亡率有向上攀升的趨勢而當嚴重氣喘是以多重形式的狀態存在著，或具 corticosteroid-resistant 的氣喘使用單一類固醇藥物是很難治癒的 (10-13)。因此針對這類氣喘疾病的深入研究與開發較無副作用之新藥物是必須的。

在我們先前的研究中發現，金針菇免疫調節蛋白 FIP-fve 可以抑制來自於人類呼吸道融合病毒所造成的發炎與其病毒的複製 (14)。研究中也發現 FIP-fve 明顯減少了上述模型中 neutrophils 的產生 (14)。另外，在我們先前的研究 FIP-fve 對急性期塵蟎致敏模式的影響以及其他 FIP-fve 相關研究發現，FIP-fve 可能是藉由維持 Th1 / Th2 平衡，降低發炎細胞的增生進而改善發炎的現象 (15, 16)。

金針菇免疫調節蛋白

依據國人的飲食習慣，各種菇類(真菌類)是經常食用的食材之一。而這些真菌類在經歷許多研究後已被作為保健食品和藥物之用 (17)。

本研究中所使用的金針菇免疫調節蛋白(fungal immunomodulatory peptide-fve, FIP-fve)是於 1995 年由林榮耀院士與柯俊良教授研究團隊自新鮮的金針菇萃取出來具有免疫調節功能的純蛋白 (32)。根據研究指出 FIP-fve 與由靈芝 FIP-gts 所萃取出來的蛋白於結構上有 70% 的相似性且當中有 61.4% 是相同的 (18)。在過去針對 FIP-fve 的研究中發現 FIP-fve 可以刺激人類末梢血液單核球細胞(Human Peripheral Blood Mononuclear cells)使之顯著產生 IFN- γ (19)，此外先前也有研究指出給予服用 FIP-fve 的小鼠可以減緩腸胃道過敏的現象 (16)，因此藉由 FIP-fve 可能具有調節 Th1/Th2 細胞的特性，我們先前已針對 FIP-fve 與急性期塵蟎致敏氣喘進行研究其結果發現 (15)，在致敏小鼠之實驗模式下，將小鼠餵食 FIP-fve 可以顯著減緩呼吸道過度反應(AHR)之現象，此外透過生化值之分析亦發現，餵食 FIP-fve 的塵蟎致敏鼠，血清中之 IgE 含量有顯著下降之趨勢，然這是致敏疾病中治療之重要的表現之一 (20)。據研究發現 FIP-fve 能使致敏鼠體內的 IFN- γ 會有顯著上升的現象，而對於會使發炎及致敏反應嚴重惡化的 Th2 細胞激素，如 IL-4、IL-5、IL-13 等細胞激素都有顯著被抑制。呼吸道發炎及過敏疾病之另一項重要標的為 eosinophils 於呼吸道中的

浸潤現象，在經由 FIP-fve 餵食後的塵蹣致敏鼠具有改善呼吸道發炎細胞浸潤之效果。

研究方法

● 實驗動物

BALB/c 小鼠，雌性，週齡約 6~8 週，購自國家動物中心，飼養於中山醫學大學動物實驗中心，環境溫度為 22~24°C，相對濕度 55~60%，日夜週期為 12/12 小時。

● FIP-fve 的分離與純化: (Ko, et al.,1995)

金針菇 300 克，洗淨並去除雜質，浸泡於 1 公升的 5% 冰醋酸溶液中，使金針菇完全浸入溶液中，置於冰箱 4°C 至少 1 小時，並於冰上進行下列步驟。用果汁機 (Waring blender) 打成漿狀，將漿液使用 Beckman 冷凍離心機，在 4°C 以 8000rpm (JA14 rotor) 離心 20 分鐘，將上清液用濾紙過濾，並對濾液慢慢加入固體硫酸銨至 90% 飽和濃度，再以 8000rpm 離心 20 分鐘，取沉澱物，用少許二次水溶後，移至透析袋，透析袋須事先以清水軟化並測試有無破洞。於 4°C 下對 10mM Tris HCl, pH 8.0 透析 2 天，每 12 小時更換透析液 1 次。透析完成的蛋白質溶液以 12000rpm 離心 40 分鐘，除去不溶之雜質。將上清液通過預先以 0.05 N NaOH、二次水及 0.05 N 的 HCl 處理再以 10mM Tris HCl, pH 8.0 溶液平衡的 cation-cellulose DE52 管柱先通過蛋白質溶液後並以 10mM Tris HCl, pH 8.0 溶液沖流，再以 0 至 0.5N 的 NaCl 溶於 10mM Tris HCl, pH 8.0 溶液中的沖流液沖出結合在 DE52 管柱上的蛋白質。流速每分鐘 1 毫升。上述管柱所流出的溶液皆以 Gilson fraction collector 自動分液收集器收集。每管約 1.5 毫升，並測其在 280nm 波長的吸收光值。即為蛋白吸收峰，所獲得的 FIP-fve 其純度由 SDS-PAGE 來確定。

● 進行 ovalbumin 致敏模式與施予 FIP-fve

■ 急性期致敏

致敏實驗過程說明如下：從流程開始的第 1~3 天及第 14 天，將含有 0.8 mg Al(OH)₃ (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA) 的生理食鹽水或含有 50ug 雞卵蛋白(chicken ovalbumin, OVA; Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, MO, USA) 及 0.8 mg Al(OH)₃ 的生理食鹽水以腹腔注射 (I.P., intraperitoneal) 的方式打入小鼠體內，每次施打 200 μ l，再於第 14 天時以生理食鹽水或 5% OVA (in saline) 的鼻腔吸入，每隻吸入量為 50ul，並於第 17、21、24、27 天以相同方式給與鼻腔滴定吸入作業，共給予鼻腔滴定吸入 OVA 或生理食鹽水五天，並於第 28 天進行呼吸道過度反應 (Airway hyper-responsiveness, AHR) 測定，待測訂完成後 24 小時內將小鼠犧牲。

■ 施藥時間與劑量

給藥部分共分為兩組，分別於致敏實驗進程中第 1 天至第 14 天連續每日給予口服藥物，或於第 14 天至第 27 天連續每日給予口服藥物，同樣連續給藥 14 天。而前第 1 至 14 天給予口服藥物稱為 pre 組，後 14 至 27 天給藥則稱為 post 組。

■ 慢性期致敏流程

從流程開始的第 1~3 天及第 14 天，將含有 0.8 mg Al(OH)₃ (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA) 的生理食鹽水或含有 50ug 雞卵蛋白(chicken ovalbumin, OVA; Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, MO, USA) 及 0.8 mg Al(OH)₃ 的生理食鹽水以腹腔注射 (I.P., intraperitoneal) 的方式打入小鼠體內，每次施打 200 μ l，再於第 14 天時進行腹腔注射生理食鹽水或 OVA，並進行生理食

鹽水或5% OVA (in saline)的鼻腔吸入，每隻吸入量為50ul，並於第17、21、24、27 天以相同方式給藥，共給予鼻腔吸入藥物五天，隨後於實驗進程之第60、69、71、73、74天以鼻腔吸入方式再次給予OVA，共給予吸入藥物天數五天，最後一次給予OVA吸入於第75天並於第76天進行呼吸道阻力反應的之測定 (Airway hyper-responsiveness, AHR)測定，待測訂完成後24小時內將小鼠犧牲。

實驗共分為四組期分別是：1. Normal Control組、2. Positive Control組、3. Pre-FIP組以及4. Post-FIP組，每組隻數除NC組為5之外，其餘皆為8隻。

■ 施藥時間與劑量

在 FIP-*five* 給藥的方面共分為兩個部份，一為實驗進程第 0 至 14 天及 45 至 60 天共分兩段共 28 天給予口服藥劑，另一組則為實驗進程的第 14 至 28 天及第 60 至 75 天分兩段式給予口服藥劑，給藥天數共為 28 天。

■ 呼吸道阻力測定 (AHR)

第 76 天時進行小鼠呼吸道阻力測定，來觀察小鼠呼吸道收縮狀況。首先將小鼠暴露在不同濃度的 methacholine (Sigma-Aldrich, Inc.)，分別為 0 (saline)、5、10 和 20 mg/ml，以蒸氣吸入(噴霧)的方式處理 3 分鐘，然後將小鼠到裝有呼吸道阻力偵測系統 (BUXCO Electronics, Inc., Wilmington, NC, USA)的腔室中偵測 3 分鐘，由感應器偵測到小鼠呼吸速率及氣流量變化再經由 BioSystem XA 軟體分析後便可得到呼吸道阻力的 Penh 值 (enhanced pause)。

● 血清OVA-specific IgE、IgG1、IgG2a之濃度測定OVA-specific IgE

先以 10ug/ml OVA (溶於 1X PBS) coating 於 96 well 之 ELISA plate (TPP, Trasadingen, Switzerland)，置於 4°C，隔夜後在 37°C 下以 3% BSA (in PBS) 進行 blocking，1 小時後加入待測物於 37°C 作用 1 小時，之後加入 biotinylated rat anti-mouse monoclonal IgE (BD Biosciences) 在 37°C 下作用 1 小時，然後再加入 streptavidin conjugated-HRP 於室溫作用 30 分鐘，最後加入受質溶液使呈色，包含 2 mg o-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD, Sigma-Aldrich) 及 2 ul 30% H₂O₂ 溶於 5 ml 1X phosphate citrate buffer，於室溫下作用 20 分鐘，再以 25 ul 3 M H₂SO₄ 終止反應，然後用 ELISA reader (Sunrise™, TECAN Ltd.) 波長 490 nm 測吸光值。

● 小鼠 IL-4、IL-5、IL-13、IL-17、IL-22、IL-27、TNF- α 、TGF- β 、HMGB1 測定

利用 mouse IL-4、IL-5、IL-13、IL-17、IL-22、IL-27、TGF- β 、HMGB1 ELISA DuoSet R (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) 來偵測肺泡沖洗液及血清中細胞激素的濃度。先使用可辨認 mouse IL-4、IL-5、IL-13、IL-17、IL-22、TNF- α 、TGF- β 、HMGB1 之 rat anti-mouse antibody 的 capture antibody 溶於 1X PBS 後，以 100ul/well 加到 Costarplate (Corning) 置於室溫，隔夜後於室溫條件下進行 1% BSA 的 blocking，1 小時後加入待測物及 standard 作用於室溫 2 小時 (100ul/well)，再加入偵測抗體 (detection antibody) biotinylated goat anti-mouse IL-4、IL-5、IL-13、IL-17、IL-22、TNF- α 、TGF- β 、HMGB1 (100ul/well) 在室溫下反應 2 小時，再以 streptavidin conjugated-HRP (horseradish-peroxidase) 於室溫作用 20 分鐘 (100ul/well)，最後加入 hydrogen peroxide (H₂O₂) 和 tetramethylbenzidine (TMB) 作用於室溫下反應 20 分鐘後使呈色，最後加入 50ul 2N H₂SO₄ 終止反應，用 ELISA reader (Sunrise™, TECAN Ltd.) 波長 450 nm 測吸光值。

- **免疫組織切片**

- **肺臟**

肺臟組織取得後將其分為兩個部分進行實驗，其一做為病理切片之用，另一部分則做為進行後續生化實驗之用。其實驗如下述：

- **HE**

將肺臟取下後馬上浸泡至 10% 之福馬林中使肺臟組織能夠完整浸泡，待一天後包埋切片。切厚度為 5 mm 之蠟塊以 H&E 染色以了解各組致敏小鼠間呼吸道發炎現象之嚴重程度

- **Masson's Trichrome**

將肺臟取下後馬上浸泡至 10% 之福馬林中使肺臟組織能夠完整浸泡，待一天後包埋切片。切厚度為 3 mm 之蠟塊，以及透過 Masson's Trichrome 染色可得知各組致敏小鼠呼吸道重塑之現象是否具有差異。

- **IHC stain**

將肺臟取下後馬上浸泡至 10% 之福馬林中使肺臟組織能夠完整浸泡，待一天後包埋切片。切厚度為 5 mm 之蠟塊，以及透過 IHC stain (STAT 3, IL-17) 染色可得知各組致敏小鼠呼吸道重塑之現象是否具有差異。

- **PCR鑑定**

- **肺臟RNA取得方式**

取得之部分肺臟，將進行RNA萃取作業，透過RNA層級PCR鑑定，以探討FIP-fve於發炎反應中對於標的器官肺臟的影響階段之比較。

取各組小鼠之肺臟實體約 1 至 2 克，剪碎後製於滅菌的研钵中，使用液態氮冷卻硬化並磨成粉末。迅速放置 1.5ml 微量離心管中，加入 1ml 的 RNA 萃取液: Solution D 【4M guanidium thiocyanate, 5 mM β -MSH, 0.3 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 10 % N-lauroyl sarcosine】震盪混合 10 秒，加入 500 μ l 的 phenol : chloroform (v / v = 1 : 1) 震盪混合 10 秒置於冰上 10 分鐘後，離心 12000 rpm, 4°C，吸取上清液並置換乾淨的 1.5 ml 微量離心管中，加入 1/10 體積的 4.4 M 醋酸氨, pH 5.2。再加入等體積的 isopropanol 震盪混合均勻，離心 12000 rpm, 4°C, 15 分鐘。倒掉上清液，再用 75 % 酒精清洗一次，離心 12000 rpm, 4°C，倒掉上清液，以 Speed Vacume 進行抽乾，約 5 分鐘。抽乾的 pellet 加入 30 μ l 不等的 DEPC 處理過的滅菌二次水溶解 RNA。若無法完全溶解則可置於 dry bath 上加熱 50°C 幫助溶解。溶解的 RNA 以 DEPC 處理過的滅菌二次水稀釋 100 倍，測其在 260nm 與 280 nm 波長下的比值，其比值應大於 1.8 以上，並進行反轉錄反應作成 cDNA。其他的 RNA 儲存在 -80°C 冰箱中。

- **PCR鑑定之cDNA 合成 (RT-PCR)**

本實驗使用 Promega RT-PCR kit 作反應。方法如下: 取 1 μ g 的 total RNA，加熱 70°C，10 分鐘後隨即放在冰上冷卻，再加入 25 mM MgCl₂ 4 μ l, Reverse Transcription 10X buffer 2 μ l, 10 mM dNTP Mixture 2 μ l, Recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor 0.5 μ l, AMV Reverse Transcriptase 15 u, Oligo (dT) 15 Primer 0.5 μ g 及 Nuclease-Free Water 補至體積為 20 μ l。於 PCR 儀中進行下列反應: 42°C, 60 分鐘, 99 °C, 5 分鐘及 4°C, 5 分鐘即合成 cDNA。可進行 PCR 反應，或儲於 -20 °C 冰箱中備用。

藉由實驗中所取得之各組小鼠之RNA，透過PCR或Real-Time PCR之實驗可從基因階段來進行探討，使之了解下游階段之細胞激素之變化是否於基因階段已發生改變，進而可進行更深入之研究。

● 統計分析

所有數據皆以軟體 SPSS 進行數據分析，數據皆以 median +/- IQR 呈現，統計則以 Mann-Whitney U test 做為是否具有顯著差異 ($p < 0.05$) 的依據。

結果與討論

急性期與慢性期致敏模式在加入 FIP-fve 後的表現

此部分實驗目的為比較當急慢性致敏模式在納入 FIP-fve 後，是否具有不同的影響性。本階段實驗分組共分為六組其分別是：1. 急性期致敏組 (acute-PC)、2. 慢性期致敏組 (chronic-PC)、3. 急性期 pre 給 FIP-fve 組 (acute-pre FIP) 以及 4. 急性期 post 給 FIP-fve 組 (acute-post FIP)、5. 慢性期 pre 給 FIP-fve 組 (chronic-pre FIP) 以及 6. 慢性期 post 給 FIP-fve 組 (chronic-post FIP)，每組隻數皆為 8 隻。

1. FIP-fve 對於急性期與慢性期致敏模式在血清中 IFN- γ 的劑量反應效應

根據結果顯 (Figure 1) 示在急慢性致敏鼠中，仍舊以 FIP-fve 給予 200ug 時所誘發產生血清中 IFN- γ 的表現量為最高，但於慢性期致敏模式中發現，於 76 天將犧牲的小鼠其血清中 IFN- γ 的表現量是比急性期小鼠在 28 天犧牲時血清中 IFN- γ 的表現量來得少一點，但 FIP-fve 刺激 IFN- γ 的產生量仍是以 200ug 的給予量時為最多，因此根據這個結果，動物實驗 FIP-fve 的給予量依舊維持在 200ug/次。

2. FIP-fve 對於急性期與慢性期致敏模式在 AHR 上的影響

在經過 OVA 急慢性致敏且給予 FIP-fve 的致敏鼠其 AHR 表現如下 (Figure 2)，實驗結果分析以 methacholine 濃度為 20 mg/ml 作用時的紀錄進行分析。依據結果顯示，給予 FIP-fve 的各組無論是在急性期或慢性期都能有效改善呼吸道過度反應的現象。而在給予 FIP-fve 後的各組其表現量差異並不大。

3. FIP-fve 對於急性期與慢性期致敏模式在血清中 IgE 與 IgG2a 的表現

在經 OVA 致敏且給予 FIP-fve 之致敏鼠於犧牲同時採集血液並離心分離血清後，利用 ELISA 來偵測血清中 OVA-specific IgE 與 IgG2a 的濃度 (Figure 3a、Figure 4b)。在這部分的結果中發現給予 FIP-fve 的致敏鼠無論在急性期或慢性期組相較於 OVA 致敏組其 OVA-specific IgE 皆有明顯減少且達統計上顯著差異 ($p = 0.0002$)。另外在 OVA-specific IgG2a 方面 (Figure 3b)，無論在急性期或慢性期給予 FIP-fve 的組別，其血清中都有較高之 OVA-specific IgG2a 含量。

4. FIP-fve 對於急性期與慢性期致敏模式在呼吸道細胞浸潤的影響

在細胞數方面 (Figure 4) 在急性期致敏組給予 FIP-fve 的中在 pre 組與 post 組兩組的部分其細胞量分別為 pre 組 (eosinophils $36.14 \pm 2.737 \times 10^4$ 、neutrophils $24.29 \pm 1.487 \times 10^4$ 、lymphocytes $23.88 \pm 13.62 \times 10^4$ 、monocytes $21.54 \pm 1.426 \times 10^4$)；post 組 (eosinophils $42.32 \pm 2.9154 \times 10^4$ 、neutrophils $27.63 \pm 1.238 \times 10^4$ 、lymphocytes $23.75 \pm 2.119 \times 10^4$ 、monocytes 25.46

$\pm 1.321 \times 10^4$)。而慢性期給予 FIP-fve 的各組其細胞計數結果如下：pre 組 (eosinophils $43.25 \pm 3.801 \times 10^4$ 、neutrophils $25.75 \pm 3.326 \times 10^4$ 、lymphocytes $22.25 \pm 1.109 \times 10^4$ 、monocytes $31.25 \pm 1.28 \times 10^4$)、post 組 (eosinophils $37.214 \pm 2.37 \times 10^4$ 、neutrophils $19.50 \pm 2.52 \times 10^4$ 、lymphocytes $27.00 \pm 0.8165 \times 10^4$ 、monocytes $28.97 \pm 4.562 \times 10^4$)，從這部分的結果我們亦可發現無論是急性期或慢性期 OVA 致敏鼠再給予 FIP-fve 後其肺部細胞浸潤現象都有減少的現象，因此可知 FIP-fve 對於細胞浸潤現象的改善是具有一定效果的。

5. FIP-fve 對於急性期與慢性期致敏模式在 BALF 中各種細胞激素的影響

Th2 細胞激素

利用 ELISA 來測定急性期與慢性期致敏鼠在給予 FIP-fve 後肺泡沖洗液 (Figure 5) 中屬 Th 細胞激素之 IL-4、IL-5 以及 IL-13 的表現量。根據結果顯示給予 FIP-fve 的各組致敏小鼠其 IL-4、IL-5 以及 IL-13 皆有顯著下降。

Th1 細胞激素與 Treg 細胞激素

利用 ELISA 來測定急性期與慢性期致敏鼠在給予 FIP-fve 後肺泡沖洗液中屬 Th1 細胞激素之 IL-12 與 IFN- γ (Figure 6)，以及屬 Treg 細胞激素之 TGF- β 的表現量 (Figure 7)。IL-12 與 IFN- γ 的表現量，從結果中可以得知無論是急性期或慢性期給予 FIP-fve 的致敏鼠表現量皆有明顯的升高。而在 TGF- β 的部分給予 FIP-fve 後的致敏鼠，在急性期是顯著升高的但在慢性期時的表現量則是明顯減少的。

6. FIP-fve 對於急性期與慢性期致敏模式在 BALF 中各種細胞激素的表現 (cytokine array 的分析)

根據研究結果顯示 (Table 1)，急慢性期致敏鼠 BALF 中 IL-16、IL-17、IL-23、IL-27 以及 TNF- α 都是有明顯上升的，於慢性期時的表現量是明顯更高於急性期致敏鼠。給予 FIP-fve 後急性期組在 IL-27 的表現量是明顯的增加，在慢性期組雖然也有顯著的增加但其增加幅度未如急性期高。另外，慢性期部分給予 FIP-fve 後 IL-17、IL-23、TNF- α 、CXCL1 以及 TIMP1 皆有顯著的下降。

這部分的主題主要是探討給予 FIP-fve 後，其對於不同階段致敏鼠在各種呼吸道發炎指標上影響的差異。藉由結果分析可發現，首先是在 FIP-fve 可以誘發 IFN- γ 大量產生的部分，研究以 100ug、200ug 與 400ug 的劑量來進行劑量反應效應的實驗，藉由結果發現 200ug 的 FIP-fve 所誘發 IFN- γ 的表現量與 400ug FIP-fve 的表現量，雖然都相較於 100ug 時高上許多，但仍是以給予 200ug 的 FIP-fve 誘發 IFN- γ 為最高，因此在實驗中仍選定用 200ug 的 FIP-fve 為基準。而藉由這部分的結果可發現 FIP-fve 對於急慢性致敏小鼠在呼吸道過度反應、IgE 的表現量或者是 Th2 細胞激素的表現量上，都是有顯著受到改善的。

FIP-fve 與 corticosteroid 對於慢性期致敏鼠呼吸道發炎與呼吸道重塑的影響

而最後這個部分的結果，是針對 FIP-fve 在慢性期致敏模式下所具有的療效與呼吸道重塑上的改善做分析。並且在此部分更納入臨床藥物 corticosteroid 與 FIP-fve 的療效一同分析。本階段實驗分組共分為六組其分別是：1. Normal Control 組、2. Positive Control 組、3. Pre-cort 組以及 4. Post-cort 組、5. Pre-FIP 組以及 6. Post-FIP 組，每組隻數除 NC 組為 6 之外，其餘皆為 8 隻。

1. FIP-*fve* 與 corticosteroid 對於慢性期致敏鼠在呼吸道過度反應上的影響

在經過 OVA 慢性致敏且給予 FIP-*fve* 或 corticosteroid 的致敏鼠其 AHR 表現如下 (Figure 8)，實驗結果分析以 methacholine 濃度為 20 mg/ml 作用時的紀錄進行分析。依據結果顯示，給予 FIP-*fve* 與 corticosteroid 的各組在慢性期都能有效改善呼吸道過度反應的現象。

2. FIP-*fve* 與 corticosteroid 對於慢性期致敏鼠在血清中 IgE 與 IgG2a 的影響

於小鼠犧牲前採集其血液病分離出血清後，利用 ELISA 來偵測血清中 OVA-specific IgE 與 IgG2a 的濃度 (Figure 9a、Figure 9b)。根據研究結果 OVA-specific IgE 在 OVA 致敏組是明顯的增加，而給予 FIP-*fve* 後則是有顯著下降的。而在 OVA-specific IgG2 部分，PC 組相較於其他組別其血清中之 OVA-specific IgG2a 雖然也是有些許升高，但相較給與 FIP-*fve* 或 corticosteroid 的各組其 OVA-specific IgG2a 上升的量是較少的。

3. FIP-*fve* 與 corticosteroid 能有效改善慢性期致敏鼠呼吸道中的細胞浸潤

在過敏/氣喘的一項肺部特徵，即支氣管內有明顯的發炎細胞浸潤，其中特別顯著增加的為嗜伊紅性白血球，而根據研究結果 (Figure 10) 發現，PC 組細胞計數結果中在各種計數細胞中數目較於其他組別皆明顯高出許多，其特別是以 eosinophils 與 neutrophils 的增加最為顯著。而在給予 FIP-*fve* 和 corticosteroid 兩組其 eosinophils 數目有顯著的減少，同時在 neutrophils 數目也有明顯減少，但以給予 FIP-*fve* 組最顯著。而 post 組其 neutrophils 也有相同現象且更明顯。

4. FIP-*fve* 與 corticosteroid 對於慢性期致敏鼠肺泡沖洗液中 Th1/Th2/Treg 細胞激素表現的影響

Th1 與 Treg 細胞激素

利用 ELISA 來測定肺泡沖洗液中 Th1 cytokines 的表現量 (Figure 11)。根據研究結果顯示給予 FIP-*fve* 的兩組無論是在肺泡沖洗液中其 IL-12 與 IFN- γ 是明顯增加，但在 TGF- β 的表現量則是顯著下降的。而給予 corticosteroid 的兩組雖然 IL-12 與 IFN- γ 也有增加但其增加的表現量未有給予 FIP-*fve* 組別來得多，且給予 corticosteroid 組在 TGF- β 的表現量中，無論是在血清或肺泡沖洗液的結果都是顯著升高的，這部分的結果與 FIP-*fve* 組有極大的差異。

Th2 細胞激素

利用 ELISA 來測定血清及肺泡沖洗液中 Th2 cytokines 的表現量 (Figure 12)。根據研究結果顯示無論是給予 FIP-*fve* 的兩組或是給予 corticosteroid 的兩組，其 Th2 cytokines 的表現量在血清或肺泡沖洗液中相較於 PC 組都是顯著下降的。

5. FIP-*fve* 與 corticosteroid 對於慢性期致敏鼠在血清或肺泡沖洗液中 IL-17, IL-22 及 MMP9 表現的影響

利用 ELISA 來測定血清或肺泡沖洗液中 IL-17, IL-22 以及 MMP9 的表現量 (Table 2)。根據研究結果，PC 致敏小鼠在 IL-17, IL-22 以及 MMP9 都是顯著升高的。而給予 FIP-*fve* 的兩組在 IL-17 與 MMP9 表現量部分都有顯著下降，而 IL-22 的表現量則是更明顯的上升。另外在給予 corticosteroid 的兩組其 IL-17 表現量相較於 PC 組並沒有顯著下降，而 MMP9 雖有下降但在血清部分的下降幅度並未達統計上顯著差異。此外在 IL-22 表現量部分，給予 corticosteroid 的兩組，其 IL-22 的增加幅度與 PC 相近。

6. FIP-*fve* 與 corticosteroid 對於慢性期致敏鼠在脾臟細胞之各種細胞激素的表現

將脾臟細胞以 OVA 在刺激後，利用 ELISA 來測定脾臟細胞上清液中 IL-4、IL-5、IL-12、IL-13、

IL-17、IL-22、TGF- β 及 INF- γ 的表現量(Table 3)。根據研究結果，給予 FIP-*fve* 的兩組其 IL-12、IL-22 及 INF- γ 皆有顯著的增加，而 IL-4、IL-5、IL-13、IL-17 表現量並未有如 PC 組的大量增加現象。而在 TGF- β 部分以 OVA 再刺激脾臟細胞後，僅 PC 組有顯著上升，其他各組表現量差異並不大。

7. FIP-*fve* 與 corticosteroid 對於慢性致敏鼠在呼吸道發炎現象的影響

藉由H&E組織染色的結果 (Figure 13) 來探討FIP-*fve*對於小鼠呼吸道發炎現象的影響。A的部份為NC組，NC組小鼠之呼吸道未有明顯呼吸道發炎的現象。B則為PC組，從這部份的病理切片顯示相較於NC組，PC組的小鼠呼吸道有明顯呼吸道發炎的現象產生，且呼吸道重塑現象明顯。而C至F分別為pre-或post-給予FIP-*fve*或corticosteroid。根據結果顯示，給予FIP-*fve*兩組的小鼠在慢性呼吸道發炎部分是有顯著改善的，而在給予corticosteroid的部分，在慢性呼吸道發炎的動物模式下，其改善呼吸道發炎現象的效果並沒有FIP-*fve*來得好。

8. FIP-*fve* 與 corticosteroid 對於慢性致敏鼠在呼吸道重塑上的影響

在呼吸道重塑的部分 (Figure 14)，是以Masson's trichrome 染色來判斷各組小鼠呼吸道中collagen沈積的狀況。A的部份為NC組，NC組小鼠之呼吸道未有明顯呼吸道重塑或collagen沈積的狀況。B則為PC組，PC組相較於NC組其呼吸道有明顯呼吸道重塑及collagen沈積的狀況，是極為顯著得。而C至F分別為pre-或post-給予FIP-*fve*或corticosteroid。根據結果顯示，給予FIP-*fve*兩組的小鼠在呼吸道重塑及collagen沈積的狀況是有顯著改善的，而在給予corticosteroid的部分，卻發現其呼吸道重塑及collagen沈積的狀況在慢性呼吸道發炎的動物模式下，其嚴重程度與PC組相似。

本節研究主軸是以76天慢性致敏模式為主軸，主要是為探討FIP-*fve*與臨床用藥corticosteroid對於呼吸道重塑現象的影響。根據結果可以發現，FIP-*fve*與corticosteroid對於慢性期發炎反應上的生化值表現量如IgE、Th2細胞激素以及呼吸道過度反應等，都是能達有效改善與抑制的效果。在呼吸道重塑的部分，給予corticosteroid的致敏鼠在呼吸道病理切片上與單純致敏鼠有更嚴重的趨勢，而給予FIP-*fve*的致敏鼠在這部分卻是有明顯改善的結果。此外，給予corticosteroid與FIP-*fve*在IL-17與IL-22的結果上是具有明顯差異的，給予FIP-*fve*的致敏鼠其IL-17是顯著的減少且IL-22是明顯增加的，但這樣的結果在給予corticosteroid的致敏鼠上並沒有發現。另外在TGF- β 部分給予corticosteroid的致敏鼠不管是在血清或肺泡沖洗液中的表現量都是高於給予FIP-*fve*的致敏組，在這部分也是給予corticosteroid與FIP-*fve*所具有的明顯差異。

討論

氣喘一直是世界各地常見的慢性呼吸道疾病，其盛行率是逐年的上升，因此有許多的研究都極力預防或治療氣喘，而目前治療氣喘的藥物是以吸入性類固醇最常見，雖然有研究指出目前可將藥物的副作用降到最低，但是還是有些許的副作用，因此有許多研究開始尋找較天然的食物、益菌來做預防與治療的輔助食/藥品。而根據我們的研究發現由金針菇所萃取而來的金針菇免疫調節蛋白 FIP-*fve*，也可能是一項值得深入探討且開發應用於改善/調節過敏性疾上的一項天然食品。

透過本研究結果發現，急性期與慢性期致敏在各方面數值如：AHR、IgE、細胞激素、細胞浸潤等之狀況確實是有不同的，且金針菇免疫調節蛋白不僅對於急性期致敏的呼吸道過度反應、呼吸道發炎等狀況，甚至在慢性期致敏的呼吸道重塑現象上都能有一定的改善效果。

在 OVA 急性期致敏模式中，FIP-fve 也能有效減緩呼吸道中各種發炎細胞的浸潤，特別在 eosinophils 的數量也能有顯著減少，而誘導 eosinophils 的大量浸潤的狀況 Th2 細胞激素中的 IL-4 與 IL-5 是一大功臣，因據早期研究 (20, 21) 顯示 IL-4、IL-5 的大量產生與血清中 IgE 的產生、eosinophils 的分化與浸潤於肺部等都有極高的相關性。因此這部分可能是因為 FIP-fve 的調解使得 IL-5 減少分泌，進而降低 IL-5 誘導 eosinophils 群聚浸潤於支氣管的能力。在病理切片結果中也同樣呈現給予 FIP-fve 後的致敏鼠呼吸道發炎狀況是有效改善的。藉由這樣的結果可知，FIP-fve 能有效改善 OVA 所誘發的急性期致敏症狀。

先前研究也證實 (22) 氣喘實質上是一種複雜的慢性呼吸道發炎疾病，因此我們將研究從急性期致敏模式改變成慢性期致敏並且探討急慢性期中的差異。依我們的研究結果也顯示，致敏從急性期演變成慢性期時，各項指標是有趨向更嚴重發展的狀況。因此除了急性期過敏症狀需要被改善外，慢性期過敏的這部分也是極需要被改善的。

本研究中建立了具慢性期呼吸道發炎特徵的動物實驗模式，經由 OVA 慢性致敏後的小鼠其呼吸道可能會具有呼吸道發炎、呼吸道重塑、杯狀細胞增生、發炎相關細胞激素上升以及 eosinophil 及 neutrophils 等發炎細胞浸潤等現象。透過研究結果發現，急性期與慢性期動物致敏模式在呼吸道過度反應的部分可以發現，慢性期致敏鼠在呼吸道過敏反應上比起急性期更加嚴重，會造成這樣的結果可能是因為慢性期呼吸道發炎通常會伴隨著呼吸道重塑現象的出現 (23)，而使得呼吸變得更急促且更困難。

在 OVA 急性期與慢性期致敏模式中我們也發現，呼吸道發炎細胞浸潤的狀況也是有所差異的。據臨床上文獻指出 (6, 7) 慢性呼吸道發炎或者是較嚴重的氣喘病患其呼吸道中 neutrophils 的表現量都是較高的，而這部分也在我們的研究中有同樣的結果。慢性期致敏鼠 neutrophils 確實有較急性期致敏鼠來的更高。

而將納入 FIP-fve 於慢性致敏實驗中發現，FIP-fve 不僅能有效改善急性期的呼吸道發炎症狀，FIP-fve 也同樣能有效降低慢性氣喘動物實驗中致敏鼠的呼吸道發炎與呼吸道重塑的現象。

FIP-fve 能夠有效抑制慢性致敏動物實驗中致敏小鼠血清中的 IgE 表現量外，也能明顯降低血清與 BALF 中的 IL-4、IL-5、IL-13、IL-17 以及 TGF- β 的表現量。此外 FIP-fve 也能有效減少慢性期致敏時所產生的細胞浸潤的現象，特別是 eosinophils 及 neutrophils 在肺部中都是明顯減少的。然而這樣的結果與先前(24)針對 FIP-fve 能有效抑制塵蟎急性期致敏發炎反應的結果是相似的。

然而 FIP-fve 在此部分的結果，可能還是與急性期的狀況相似，及 FIP-fve 抑制了 Th2 細胞激素的產生有關，因為 FIP-fve 在慢性期致敏上，同樣減少了 IL-4、IL-5 以及 IL-13 的表現量。

此外，本研究中更值得一提的一部分是，FIP-fve 不僅能減少 eosinophils 的產生外，對於 neutrophils 也能有相當的抑制效果。先前的文獻探討(6, 7)中有提到，慢性呼吸道發炎以及較嚴重的氣喘其 neutrophils 的表現量是高於 eosinophils，且這樣的病患給予類固醇的治療效果是有限的。

依據研究結果亦顯示 FIP-fve 對於抑制 neutrophils 的能力相較 corticosteroid 是更好的。因此，FIP-fve 能具有同時抑制 neutrophils 的產生，這樣的結果對於其過敏性氣喘的治療或許也是一種新的契機。但對於 corticosteroid 是否會無法抑制 neutrophils 甚至誘導更多 neutrophils 肺部的浸潤導致慢性氣喘的更惡化，是需要再更進一步探討。

根據結果 OVA 致敏小鼠給予 FIP-fve 處理後，能使 IFN- γ ，IL-12 與 IL-22 細胞激素顯著增加，

並明顯降低血清和 BALF 中的 IL-17 和 TGF- β 。關於 FIP-fve 能促使 IFN- γ 及 IL-12 大量分泌，這是在先前的多項 FIP-fve 都已確認的(14-16, 18, 19)，然而在 IL-22 表現量的大量產生並同時降低 IL-17 和 TGF- β ，這部分則是研究中新的發現。早期的研究中闡述 Th1，Th17 和 cytotoxic T 細胞 (Tc) 會透過釋放大量的細胞激素如 IFN- γ 和 IL-17 來參與肺部的發炎反應，而 IL-22 也可能與肺部上皮細胞的凋亡有相關性(24-27)。且先前的研究也發現在過敏性氣喘動物實驗中，IL-22 在同時存在 IL-17 時會誘導細胞的大量浸潤，進而使肺部纖維化更惡化。然而，以 IL-17 缺陷鼠進行致敏動物實驗時也會發現，當給予注射 IL-22 是可以改善呼吸道發炎與減少細胞浸潤的現象(26, 27)。此外，也有其他研究指出當 IL-22 在沒有 IL-17 的情況下是屬於抗發炎之細胞激素，但當在 IL-17 存在的情況下 IL-22 將有助於發炎細胞的募集作用(28)。

先前針對 IL-22 的研究也發現，IL-22 可能是透過調節樹突細胞或者抑制上皮細胞中細胞激素和趨化因子的產生而抑制發炎反應的作用(29, 30)。在我們的研究結果中也顯示 FIP-fve 在減緩呼吸道發炎及呼吸道重塑的狀況下，確實抑制了 IL-17 且明顯增加了 IL-22 的表現量。這一點與先前的研究也是相符的，而這樣的結果在給予 corticosteroid 的兩組是沒有的。

其他關於 IL-22 的研究(31-33)也曾提到 IL-22 在氣喘患者的血清中會有較高的表現量，且其表現量與氣喘的嚴重程度呈正相關；另外也有研究指出，以 IL-22 基因缺陷小鼠進行致敏實驗後，其呼吸道發炎反而是減少的，且 IL-22 可能也與平滑肌的增生具有相關性。因此，根據文獻的闡述 IL-22 似乎在過敏性呼吸道發炎和呼吸道重塑中可能是具有雙重作用。在我們的研究中，FIP-fve 確實可以增加 IL-22 且同時抑制 IL17 並改善慢性期的呼吸道發炎和重塑，但其機制尚不清楚。因此，FIP-fve 是否為透過 IL-22 的調節而改善呼吸道發炎和重塑，這部分尚需要在做更進一步的研究釐清。

根據本研究的結果也發現 FIP-fve 在急性期致敏過程中會誘導產生大量的 IL-27，而 IL-27 根據先前的文獻指出 (34, 35) IL-27 是產生 IFN- γ 的一項重要因子且其對於過敏氣喘疾病可能具有相當的影響力。雖然也有研究 (36) 指出 IL-27 會大量的在氣喘病患的血清中產生，所以 IL-27 是否也如 IL-22 一樣具有雙重作用是值得更進一步研究的，而 FIP-fve 是透過什麼樣的機制調控 IL-22 與 IL-27 也是需要再進一步的證實。

TGF- β 在呼吸道重塑的作用中是一直是一個重要的研究焦點，一般多認為 TGF- β 在呼吸道重塑過程中主要參與了上皮細胞的變化、呼吸道平滑肌與血管的增生(37, 38)。而在我們的研究中發現 FIP-fve 可以有效的降低 TGF- β 的產生，但給予 corticosteroid 的組別 TGF- β 的表現量仍與 PC 組差不多。

根據較新針對 TGF- β 的研究 (39, 40, 41) 也發現，TGF- β 在慢性呼吸道發炎及呼吸道重塑甚至於與氣喘更加惡化的部分 TGF- β 是脫不了關係的。而這些研究也同樣發現 TGF- β 在受 corticosteroid 治療後仍是無法下降且 corticosteroid 也無法改善呼吸道重塑的問題；同樣的結果也在我們研究中給予 corticosteroid 致敏鼠組別中出現。而給予 FIP-fve 的致敏鼠不僅降低了 TGF- β 的表現量其更改善了呼吸道重塑的症狀。

呼吸道重塑現象容易使得慢性呼吸道發炎、氣喘以及 COPD 患者置身於危險中 (42)。因此若我們想改善或減緩這類疾病並降低死亡率，那麼對抗呼吸道重塑藥物的研究是極為需要的。先前研究中也發現，corticosteroid 確實可以在急性期減少呼吸道發炎現象，但長期使用下 corticosteroid 並不能有效改善呼吸道重塑的狀態 (42)。然而在本研究中，corticosteroid 也確實減少了呼吸道發

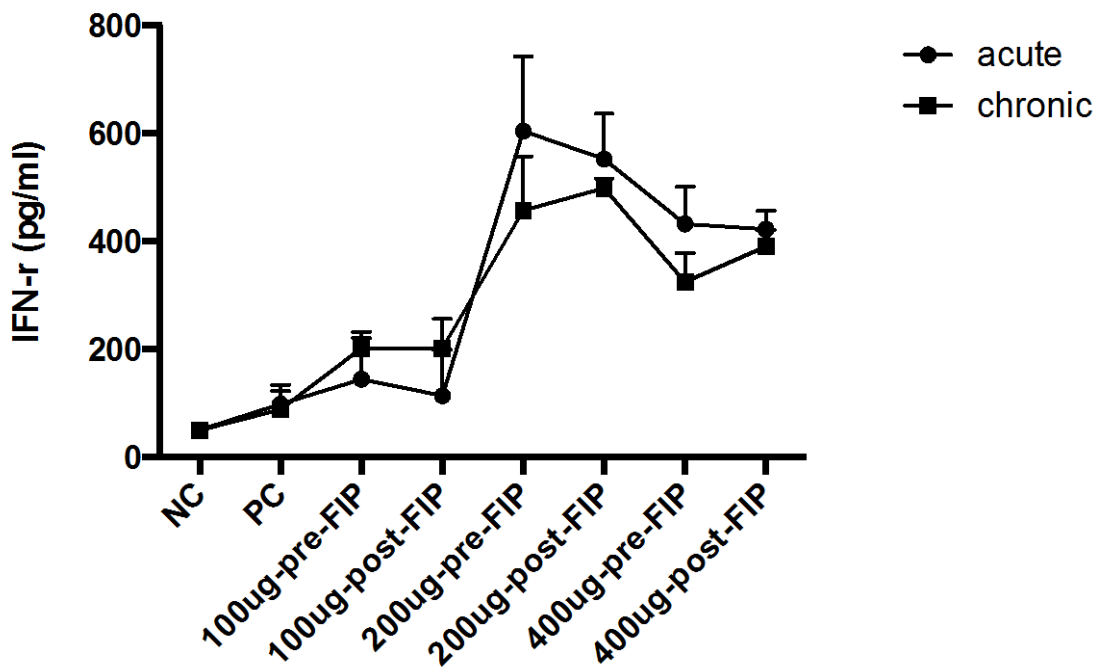
炎，這樣的結果與之前的研究相似，但給予 corticosteroid 的致敏小鼠卻反而有極嚴重的呼吸道重塑現象的產生。給予 FIP-fve 的 2 組小鼠不僅降低了呼吸道發炎現象，也同時改善了呼吸道重塑。這樣的結果再次顯示 FIP-fve 對於慢性呼吸道致敏是具有高度調節能力。

目前對氣喘及其他過敏性疾病的研究，有許多是致力於發展以各種可能的微生物（如益生菌、乳酸菌等）來調節 Th1 與 Th2 細胞的發展（43），或者開發各種免疫製劑與藥物。FIP-fve 是由新鮮金針菇所萃取而來的純化蛋白，其相較於其他新興開發藥物、製劑而言是更具優勢的（44, 45）。

總和上述，氣喘確實是一種複雜的疾病。經由本研究的研究結果證實，FIP-fve 不僅可以在急性發炎其具有抗發炎的作用，還可以減緩慢性呼吸道發炎及呼吸道重塑的現象，因此 FIP-fve 可能可以發展成為過敏性呼吸道疾病的附加或補充療法。

圖表說明

Figure 1

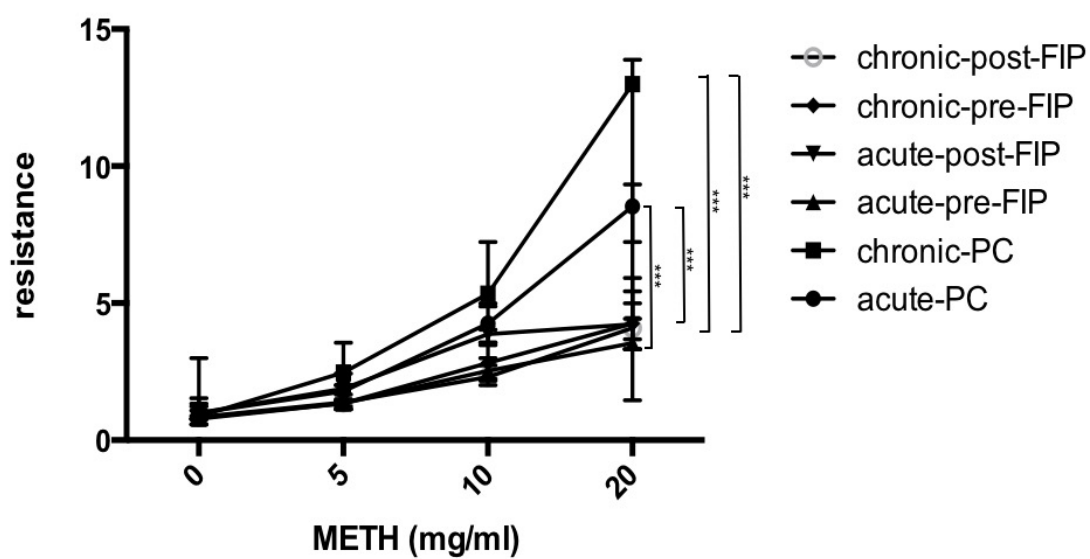


FIP-fve 對於急性期與慢性期致敏模式血清中 IFN- γ 的劑量反應效應

FIP-fve 與 IFN- γ 的劑量反應效應，是以不同劑量的 FIP-fve 進行實驗後，經由抽血所得到。而

所使用的 FIP-fve 劑量分別為 100ug、200ug 以及 400ug。

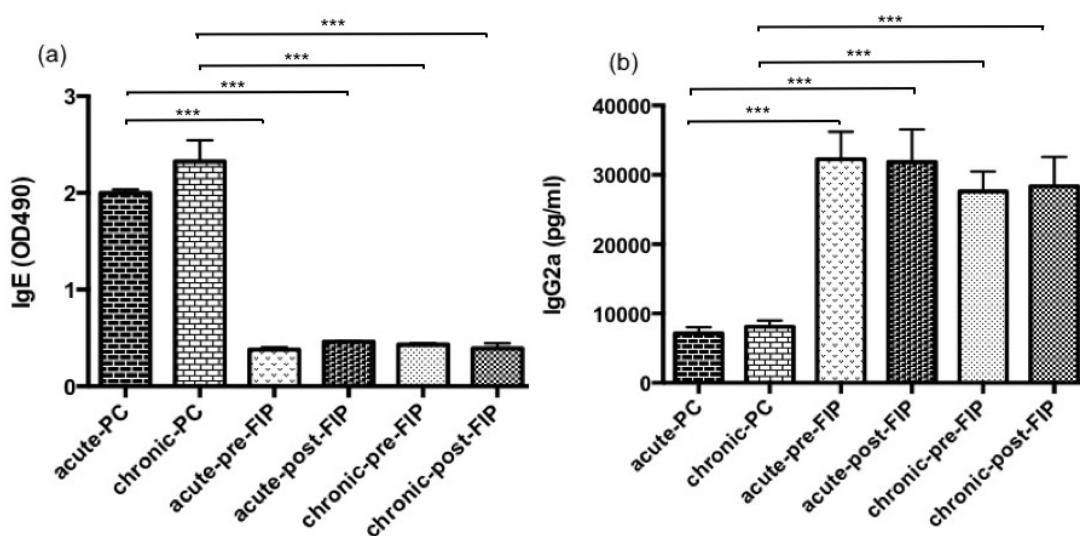
Figure 2



FIP-fve 對於急性期與慢性期致敏模式在 AHR 上的影響

於測定前先給予小不同濃度之 methacholine，其 methacholine 給予量分別為 0、5mg、10mg、20mg，隨後偵測在各劑量中小鼠之 AHR 表現值。數據皆以 median +/- IQR 呈現。（*為 $p \leq 0.05$ 、**為 $p \leq 0.01$ 而***則為 $p \leq 0.001$ ）。

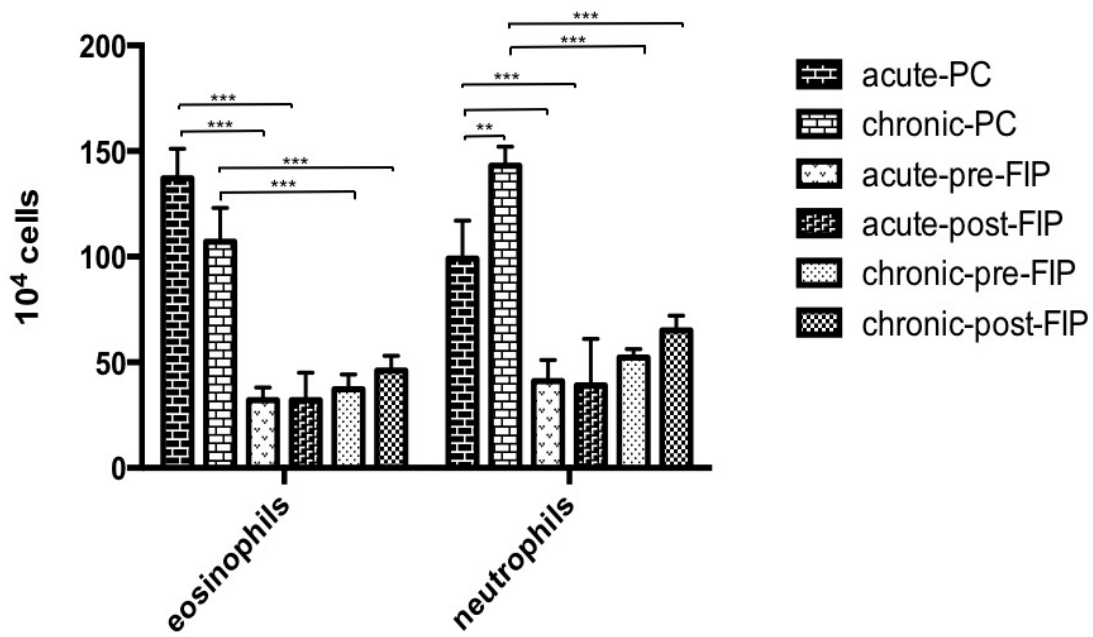
Figure 3



FIP-fve 對於急性期與慢性期致敏模式在血清中 IgE 與 IgG2a 的表現

於犧牲小鼠當天採集小鼠血液並離心取得血清，以 ELISA 進行偵測。Figure 3a 為各組血清中 IgE 表現量，Figure 3b 則為各組 IgG2a 之表現量。數據皆以 median +/- IQR 呈現。（*為 $p \leq 0.05$ 、**為 $p \leq 0.01$ 而***則為 $p \leq 0.001$ ）。

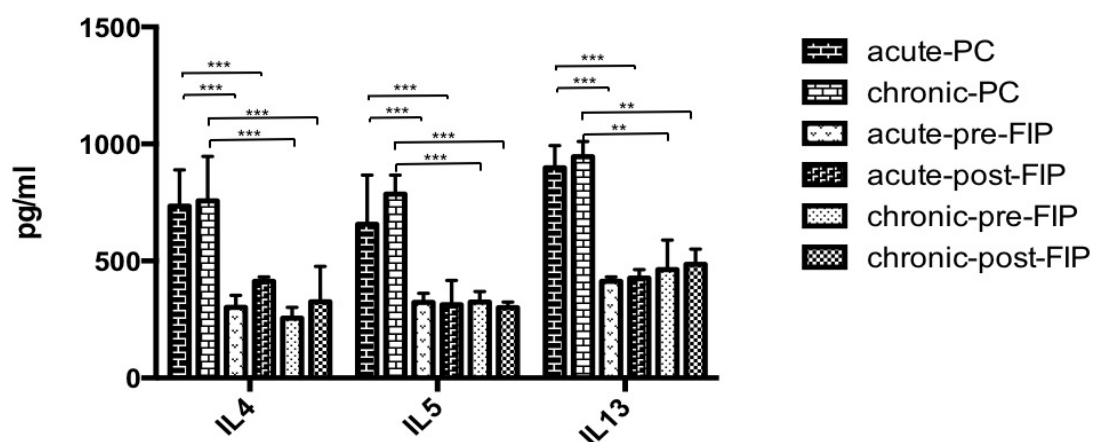
Figure 4



FIP-fve 對於急性期與慢性期致敏模式在呼吸道細胞浸潤的影響

各組小鼠犧牲後以生理食鹽水沖洗各組小鼠之肺泡，在將肺泡沖洗液中的細胞藉由 cytopspin 離心將細胞打在玻片上，以 Liu's stain 進行染色並計數細胞。數據皆以 median +/- IQR 呈現。(* 為 $p \leq 0.05$ 、** 為 $p \leq 0.01$ 而 *** 則為 $p \leq 0.001$)。

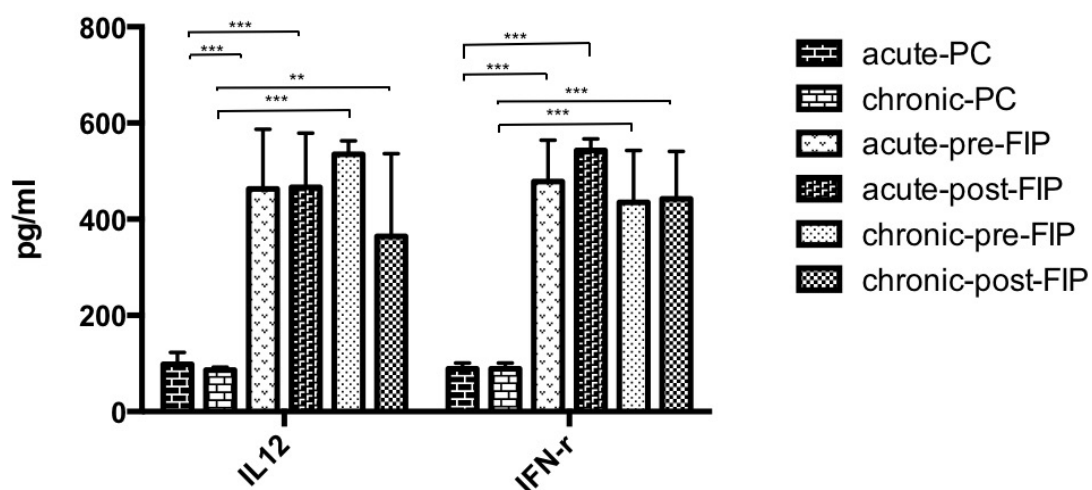
Figure 5



FIP-fve 對於急性期與慢性期致敏模式 BALF 中 Th2 胞激素的影響

將各組小鼠犧牲後以生理食鹽水沖洗各組小鼠之肺泡，並將取得之沖洗液離心取上清液後使用 ELISA 進行 Th2 細胞激素中 IL-4、IL-5 以及 IL-13 的偵測。數據皆以 median +/- IQR 呈現。(* 為 $p \leq 0.05$ 、** 為 $p \leq 0.01$ 而***則為 $p \leq 0.001$)。

Figure 6



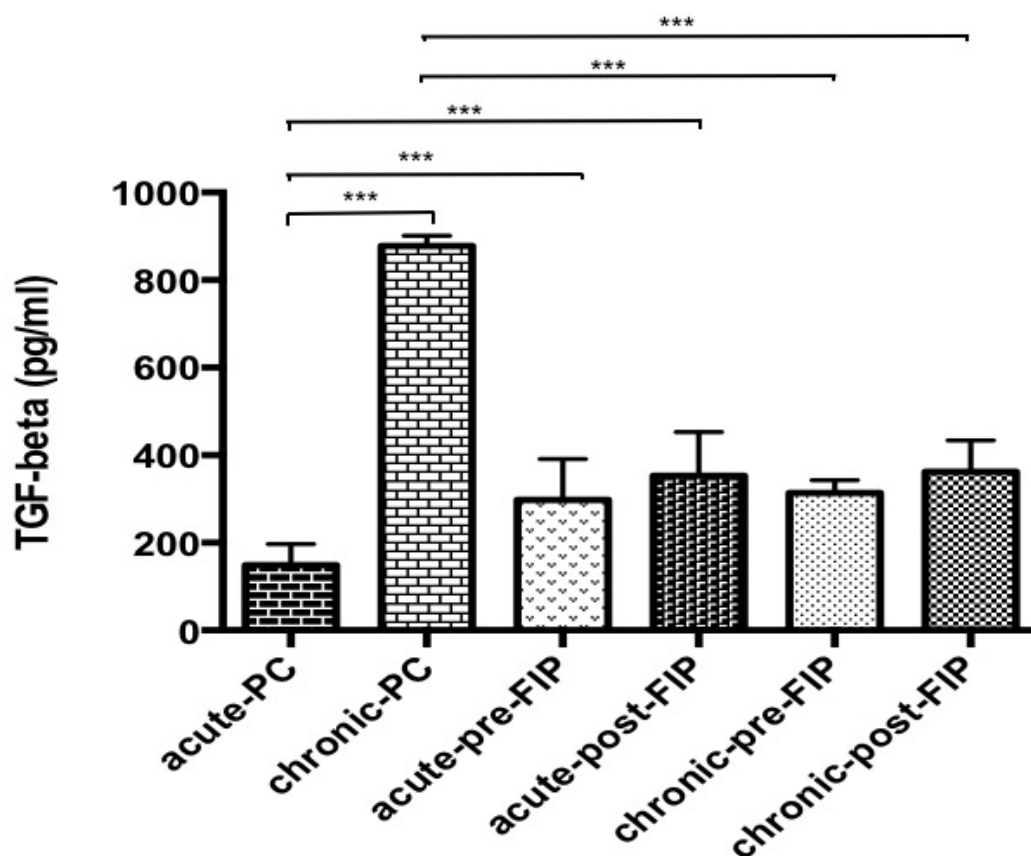
FIP-fve 對於急性期與慢性期致敏模式 BALF 中 Th1 胞激素的影響

將各組小鼠犧牲後以生理食鹽水沖洗各組小鼠之肺泡，並將取得之沖洗液離心取上清液後使

用 ELISA 進行 Th1 細胞激素中 IL-12 以及 IFN- γ 的偵測。數據皆以 median +/- IQR 呈現。(*為 p \leq

0.05、**為 p \leq 0.01 而***則為 p \leq 0.001)。

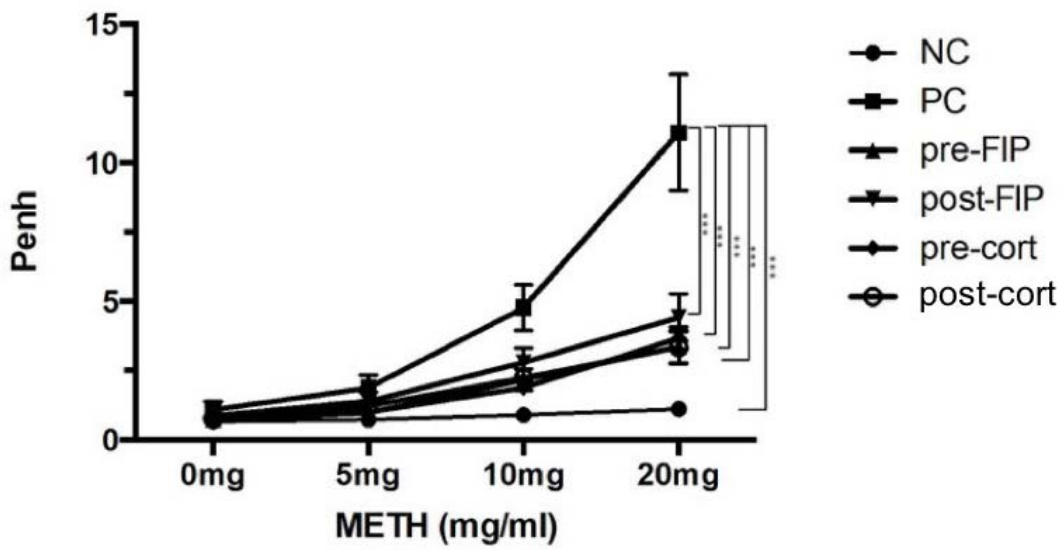
Figure 7



FIP-fve 對於急性期與慢性期致敏模式 BALF 中 TGF-β 的影響

將各組小鼠犧牲後以生理食鹽水沖洗各組小鼠之肺泡，並將取得之沖洗液離心取上清液後使用 ELISA 進行 TGF-β 的偵測。數據皆以 median +/- IQR 呈現。（*為 $p \leq 0.05$ 、**為 $p \leq 0.01$ 而***則為 $p \leq 0.001$ ）。

Figure 8

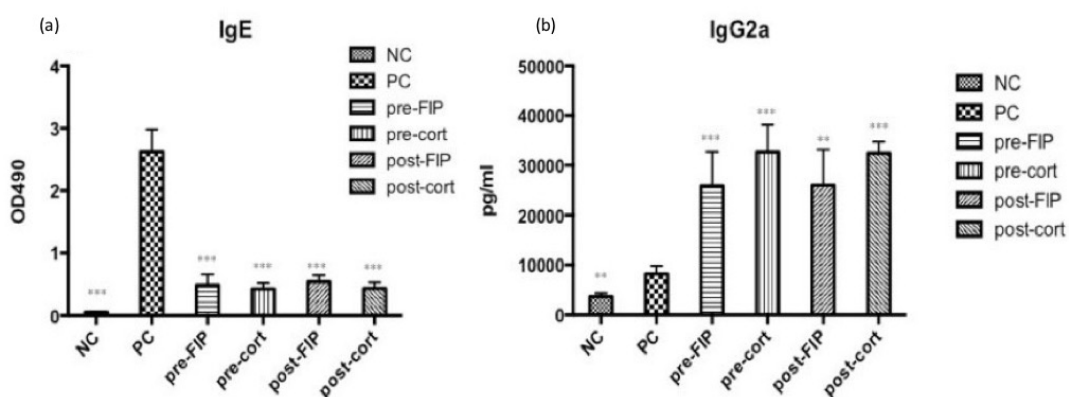


FIP-fve 與 corticosteroid 對慢性期致敏鼠在呼吸道過度反應上的影響

測定前先給予小不同濃度之 methacholine，其 methacholine 給予量分別為 0、5mg、10mg、20mg，隨後偵測在各劑量中小鼠之 AHR 表現值。數據皆以 median +/- IQR 呈現。（*為 $p \leq 0.05$ 、**為 $p \leq 0.01$ 而***則為 $p \leq 0.001$ ）。

未致敏鼠之標記為 (◆)，致敏組為(■)，pre- 或 post-FIP-fve 組為(▲, *) 而 pre- 或 post-corticosteroid 組為 (X, ●)。

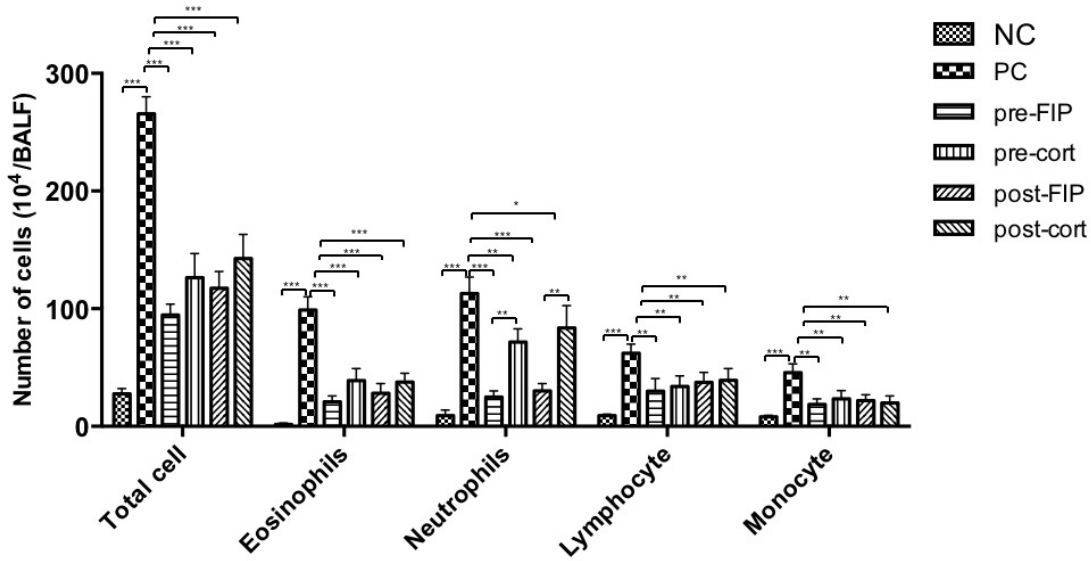
Figure 9



FIP-fve 與 corticosteroid 對慢性期致敏鼠血清中 IgE 與 IgG2a 的影響

於犧牲小鼠當天採集小鼠血液並離心取得血清，以 ELISA 進行偵測。Figure 9a 為各組血清中 IgE 表現量，Figure 9b 則為各組 IgG2a 之表現量。數據皆以 median +/- IQR 呈現。（*為 $p \leq 0.05$ 、**為 $p \leq 0.01$ 而***則為 $p \leq 0.001$ ）。

Figure 10



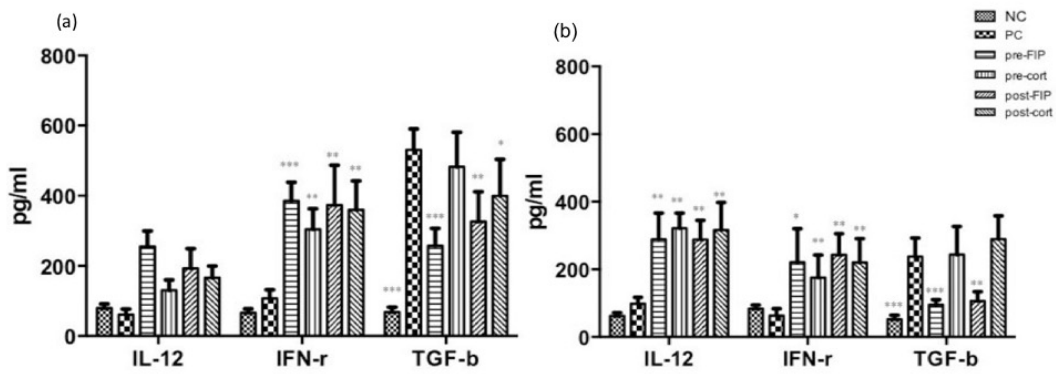
FIP-fve 與 corticosteroid 能有效改善慢性期致敏鼠呼吸道的細胞浸潤

各組小鼠犧牲後以生理食鹽水沖洗各組小鼠之肺泡，在將肺泡沖洗液中的細胞藉由 cytospin

離心將細胞打在玻片上，以 Liu's stain 進行染色並計數細胞。數據皆以 median +/- IQR 呈現。(* 為

$p \leq 0.05$ 、** 為 $p \leq 0.01$ 而***則為 $p \leq 0.001$)。

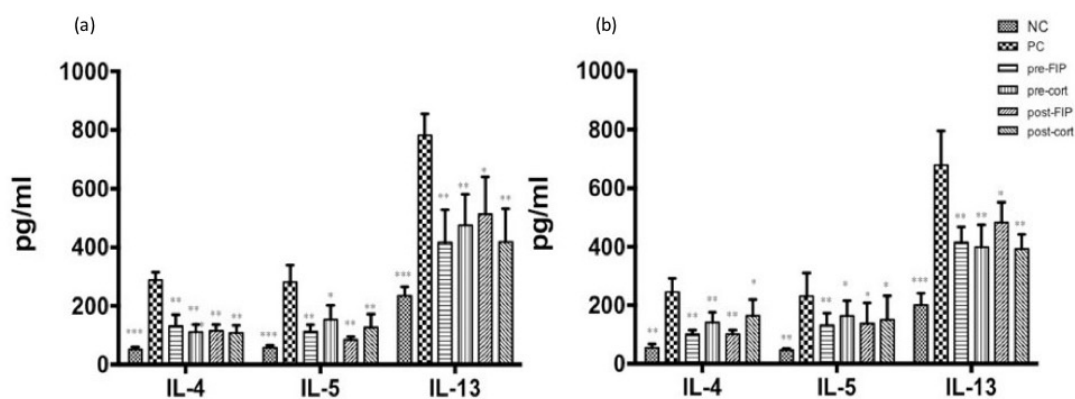
Figure 11



FIP-fve 與 corticosteroid 對慢性期致敏鼠血清與肺泡沖洗液中 Th1 細胞激素及 TGF-β 表現量的影響

將各組小鼠犧牲後取得其血液並離心取得血清，另外以生理食鹽水沖洗各組小鼠之肺泡，並將取得之沖洗液離心取上清液後使用 ELISA 進行 IL-12、IFN-γ 及 TGF-β 的偵測。數據皆以 median +/- IQR 呈現。（*為 $p \leq 0.05$ 、**為 $p \leq 0.01$ 而***則為 $p \leq 0.001$ ）。

Figure 12

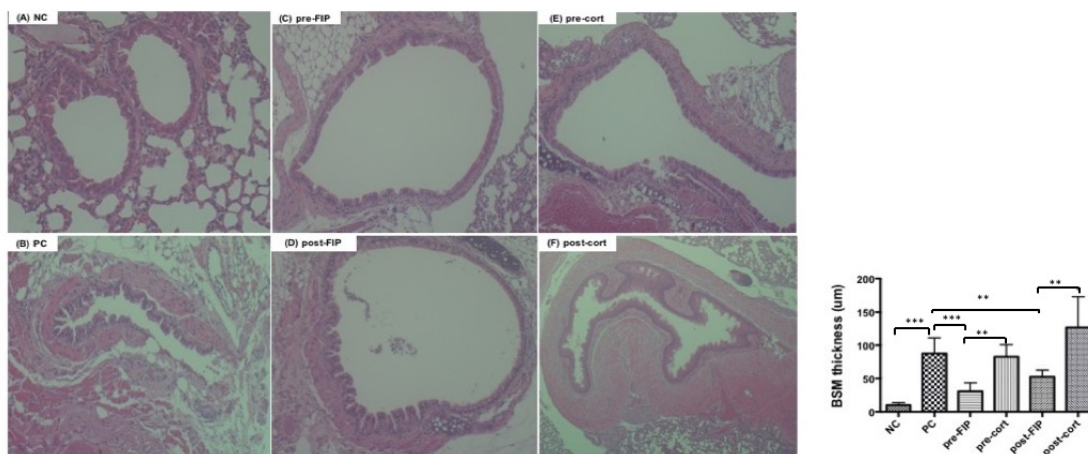


FIP-fve 與 corticosteroid 對慢性期致敏鼠血清與肺泡沖洗液中 Th2 細胞激素的影響

將各組小鼠犧牲後取得其血液並離心取得血清，另外以生理食鹽水沖洗各組小鼠之肺泡，並將取得之沖洗液離心取上清液後使用 ELISA 進行 IL-4、IL-5 及 IL-13 的偵測。數據皆以 median +/- IQR 呈現。（*為 $p \leq 0.05$ 、**為 $p \leq 0.01$ 而***則為 $p \leq 0.001$ ）。

。

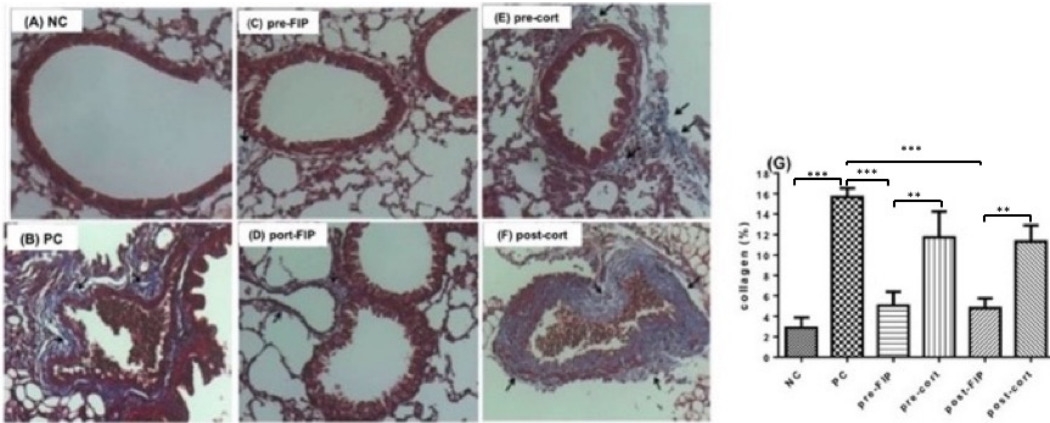
Figure 13



FIP-fve 與 corticosteroid 對於慢性致敏鼠在呼吸道發炎現象的影響

肺臟組織於小鼠 76 天犧牲後取下浸泡於福馬林中，並經由 H&E 染色以判定呼吸道發炎的現象。圖(A)為未致敏組、圖(B) 為致敏組、圖(C) 與圖(E) 為前給 FIP-fve 或 corticosteroid，圖(D) 與圖(F) 為前給 FIP-fve 或 corticosteroid。圖(G) 將 H&E 染色以圖片軟體量化後的統計數值分析。數據皆以 median +/- IQR 呈現。（*為 $p \leq 0.05$ 、**為 $p \leq 0.01$ 而***則為 $p \leq 0.001$ ）。

Figure 14



FIP-fve 與 corticosteroid 對於慢性致敏鼠在呼吸道重塑上的影響

肺臟組織於小鼠 76 天犧牲後取下浸泡於福馬林中，並經由 Masson's trichrome 染色以判定呼吸道發炎的现象。圖(A)為未致敏組、圖(B) 為致敏組、圖(C) 與圖(E) 為前給 FIP-fve 或 corticosteroid，圖(D) 與圖(F) 為前給 FIP-fve 或 corticosteroid。圖(G) 將 H&E 染色以圖片軟體量化後的統計數值分析。數據皆以 median +/- IQR 呈現。(*為 $p \leq 0.05$ 、**為 $p \leq 0.01$ 而***則為 $p \leq 0.001$)。

Table

Table 1. The effects of the FIP-fve treatment on several cytokines expression in the BALF. Data points represent the median +/- IQR of the individual mouse groups.

Group Samples	acute-PC (n=8)	chronic-PC (n=8)	acute-pre-FIP (n=8)	acute-post-FIP (n=8)	chronic-pre-FIP (n=8)	chronic-post-FIP (n=8)
IL-16 (pg/ml)	3040.4±14.24+++	15643.1±32.25	5577.36±23.4*	3065±12.53	9365±54.32+	10027.31±97.43
IL-17 (pg/ml)	589.67±12.42+++	3535±26.83	431.34±21.7*	517.89±6.35	418.33±25.36++	380.62±46.2+++
IL-23 (pg/ml)	1168.42±3.26+++	14137.73±88.32	2712.48±21.52*	2128.94±15.68*	6841.69±9.42++	7609.31±25.26++
IL-27 (pg/ml)	482.02.17.32+	1011.88±3.74	4832.38±43.22***	3564.8±10.35***	2663.53±31.52+	2263.84±17.5+
TNF-a (pg/ml)	1866.94±10.3+++	12155.49±95.32	1448.91±12.14***	1456.38±1.14*	1302.56±19.34+++	1673.83±7.52+++
CXCL1 (pg/ml)	3602.38±3.55+++	11440.05±38.78	2339.91±40.36	1209.37±5.51**	5761.89±9.24+++	8466.28±13.09++
TIMP1 (pg/ml)	2339.41±7.42+++	14002.28±73.74	1371.02±20.77*	1453.46±37.22*	3387.85±10.11+++	3674.31±81.21+++

BALF was obtained from the acute/chronic-PC, acute-pre-/post-FIP or chronic-pre-/post-FIP groups. The statistical analyses compared acute-PC group represented as: * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p <0.001; analyses compared chronic-PC group represented as: + p < 0.05, ++ p < 0.01, +++p <0.001

Table 2. The effects of the FIP-fve or corticosteroid treatment on IL-17, IL-22, and MMP9 expression in the serum and BALF. Data points represent the median +/- IQR of the individual mouse groups.

(a) Serum

Group Samples	NC (n=6)	PC (n=8)	pre-FIP (n=8)	pre-cort (n=8)	post-FIP (n=8)	post-cort (n=8)
IL-17 (pg/ml)	38.0±5.598***	230.17±63.73	63.71±12.02***	202.0±72.52	113.0±39.22**	203.29±32.94
IL-22 (pg/ml)	19.75±7.6***	216.83±63.24	452.43±111.33**	238.14±68.76	363.43±146.32**	254.06±25.82
MMP9 (ng/ml)	0.08±0.02***	2.59±0.37	0.99±0.13***	1.41±0.23	1.04±0.07**	1.36±0.35*

Serum was obtained from the NC, PC, pre-/post-FIP or pre-/post-cort groups. The statistical analyses compared PC group Represented as: * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p < 0.001.

(b) BALF

Group Samples	NC (n=6)	PC (n=8)	pre-FIP (n=8)	pre-cort (n=8)	post-FIP (n=8)	post-cort (n=8)
IL-17 (pg/ml)	41.0±15.41***	250.5±78.71	102.14±18.17**	273.0±99.4	127.0±48.44**	266.29±95.22
IL-22 (pg/ml)	13.5±5.3***	276.33±92.43	500.14±99.46***	168.29±43.5*	380.57±118.21*	149.57±57.0*
MMP9 (ng/ml)	0.06±0.01***	2.18±0.74	0.67±0.12***	1.22±0.28*	1.07±0.32**	1.05±0.07**

BALF was obtained from the NC, PC, pre-/post-FIP or pre-/post-cort groups. The statistical analyses compared PC group represented as: * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p < 0.001

Table 3. The effects of the FIP-fve or corticosteroid treatment on IL-4·IL-5·IL-12·IL-13·IL-17·IL-22·TGF- β and INF- γ expression in the splenocyte supernatant. Data points represent the median +/- IQR of the individual mouse groups.

Group Samples	NC (n=6)	PC (n=8)	pre-FIP (n=8)	pre-cort (n=8)	post-FIP (n=8)	post-cort (n=8)
IL-4 (pg/ml)	35.87±3.37***	326.64±26.21	97.54±6.64**	101.21±33.56*	54.32±24.31***	197.34±41.21**
IL-5 (pg/ml)	23.79±1.13**	277.43±19.75	78.53±10.45**	67.67±13.45**	113.57±34.54**	97.81±6.43**
IL-12 (pg/ml)	62.33±14.53**	107.32±87.54	378.11±25.36**	136.53±15.32	465.32±89.64***	86.32±44.34
IL-13 (pg/ml)	23.37±2.1***	334.75±53.48	87.74±23.1**	103.42±35.21**	76.34±27.5**	118.2±37.67**
IL-17 (pg/ml)	16.34±0.98***	167.32±34.1	57.32±1.33**	123.55.5±34.42	52.98±16.11*	89.27±21.54*
IL-22 (pg/ml)	7.89±3.35***	151.32±76.43	324.58±66.79**	103.12±74.13	235.91±34.29*	114.37±18.95
TGF- β (pg/ml)	33.21±1.18***	243.17±11.34	55.32±17.3	101.21±65.32	78.22±3.42	63.46±35.1
INF- γ (pg/ml)	42.42±16.23	32.53±1.07	232.52±25.23***	187.72±35.21*	342.52±46.35***	87.42±053.67

Serum was obtained from the NC, PC, pre-/post-FIP or pre-/post-cort groups. The statistical analyses compared PC group Represented as: * p < 0.05, ** p < 0.01, ***p < 0.001.

參考文獻

1. 呂克桓、謝貴雄, 台北市學童過敏病 11 年間之變化. 中兒醫誌, 1988. **29**: p. 6.
2. Strachan, D.P. and D.G. Cook, *Health effects of passive smoking. 6. Parental smoking and childhood asthma: longitudinal and case-control studies.* Thorax, 1998. **53**(3): p. 204-12.
3. Kawayama, T., et al., *Effects of inhaled ciclesonide on circulating T-helper type 1/T-helper type 2 cells in atopic asthmatics after allergen challenge.* Clin Exp Allergy, 2006. **36**(11): p. 1417-24.
4. Nakajima, H. and K. Takatsu, *Role of cytokines in allergic airway inflammation.* Int Arch Allergy Immunol, 2007. **142**(4): p. 265-73.
5. Secrist, H., et al., *Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals.* J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2123-30.
6. Wilson RH, Whitehead GS, Nakano H, Free ME, Kolls JK, Cook DN. Allergic sensitization through the airway primes Th17-dependent neutrophilia and airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180(8):720-30.
7. Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007; 13(2):139-45.
8. Kudo M, Melton AC, Chen C, Engler MB, Huang KE, Ren X, et. al. IL-17A produced by $\alpha\beta$ T cells drives airway hyper-responsiveness in mice and enhances mouse and human airway smooth muscle contraction. *Nat Med* 2012; 18(4):547-54.

9. Zhao J, Lloyd CM, Noble A. Th17 responses in chronic allergic airway inflammation abrogate regulatory T-cell-mediated tolerance and contribute to airway remodeling. *Mucosal Immunol* 2013; 6(2):335-46.
10. Chung K., Wenzel SE, Brozek JL, Bush A, Castro, Sterk PJ, *et. al.* International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma. *Eur Respir J* 2014; 43(2):343-73.
11. Lipworth BJ. Archives of internal medicine., Systemic adverse effects of inhaled corticosteroid therapy: A systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 1999; 159(9):941-55.
12. Umetsu DT, DeKruyff RH. The regulation of allergy and asthma. *Immunol Rev* 2006; 212:238-55.
13. Koga H, Miyahara N, Fuchimoto Y, Ikeda G, Waseda K, Ono K, *et. al.* Inhibition of neutrophil elastase attenuates airway hyperresponsiveness and inflammation in a mouse model of secondary allergen challenge: neutrophil elastase inhibition attenuates allergic airway responses. *Respir Res* 2013; 14(1):8.
14. Chang YC, Chow YH, Sun HL, Liu YF, Lee YT, Lue KH, *et. al.* Alleviation of respiratory syncytial virus replication and inflammation by fungal immunomodulatory protein FIP-fve from *Flammulina velutipes*. *Antiviral Res* 2014; 110:124-31.
15. Chang YC, Hsiao YM, Hung SC, Chen YW, Ou CC, Chang WT, Lue KH, Ko JL. Alleviation of *Dermatophagoides microceras*-induced allergy by an immunomodulatory protein, FIP-fve, from *Flammulina velutipes* in mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2015;79(1):88-96.

16. Hsieh KY, Hsu CI, Lin JY, Tsai CC, Lin RH. Oral administration of an edible-mushroom-derived protein inhibits the development of food-allergic reactions in mice. *Clin Exp Allergy* 2003; 33(11):1595-602.
17. El Enshasy HA, Hatti-Kaul R. Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. *Trends Biotechnol.* 2013; 23: 668-77.
18. Ko JL, Hsu CI, Lin RH, Kao CL, Lin JY. (1995). A new fungal immunomodulatory protein, FIP-fve isolated from the edible mushroom, *Flammulina velutipes* and its complete amino acid sequence. *Eur. J. Biochem.* 228 : 244-9.
19. Ou CC, Hsiao YM, Wu WJ, Tasy GJ, Ko JL, Lin MY. FIP-fve stimulates interferon-gamma production via modulation of calcium release and PKC-alpha activation. *J Agric Food Chem.* 2009; 57(22): 11008-13.
20. Oettgen HC, Geha RS. IgE in asthma and atopy: cellular and molecular connections. *J Clin Invest* 1999; 104:829-35.
21. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:701-38.
22. Barnes, P.J. et al Drugs for asthma. *Br J Pharmacol* (2006)147 Suppl 1, S297-303.
23. Qian J, Xu Y, Yu Z. Budesonide and Calcitriol Synergistically Inhibit Airway Remodeling in Asthmatic Mice. *Can Respir J.* 2018.
24. Di Meglio P, Perera GK, Nestle FO. The multitasking organ: recent insights into skin immune function. *Immunity* 2011; 35:857-69.

25. Larche M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111(3):450-63.
26. Pennino D, Bhavsar PK, Effner R, Avitabile S, Venn P, Quaranta M, et al. IL-22 suppresses IFN- γ -mediated lung inflammation in asthmatic patients. *J Allergy Clin* 2013; 131(2):562-70.
27. Besnard AG, Sabat R, Dumoutier L, Renauld JC, Willart M, Lambrecht B, et al. Dual Role of IL-22 in allergic airway inflammation and its cross-talk with IL-17A. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183(9):1153-63.
28. Sonnenberg GF, Nair MG, Kirn TJ, Zaph C, Fouser LA, Artis D. Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J Exp Med* 2010; 207(6):1293-305.
29. Takahashi K, Hirose K, Kawashima S, Niwa Y, Wakashin H, Iwata A, et al. IL-22 attenuates IL-25 production by lung epithelial cells and inhibits antigen-induced eosinophilic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2011; 128(5):1067-76.
30. Taube C, Tertilt C, Gyülveszi G, Dehzad N, Kreymborg K, Schneeweiss K, et al. IL-22 is produced by innate lymphoid cells and limits inflammation in allergic airway disease. *PLoS One*. 2011; 6(7):e21799.
31. Besnard AG, Sabat R, Dumoutier L, Renauld JC, Willart M, Lambrecht B, et al. Dual Role of IL-22 in allergic airway inflammation and its cross-talk with IL-17A. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011; 183(9):1153-63.
32. Zhao Y, Yang J, Gao YD, Guo W. Th17 immunity in patients with allergic asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; 151(4):297-307.

33. Chang Y, Al-Alwan L, Risse PA, Roussel L, Rousseau S, Halayko AJ, TH17 cytokines induce human airway smooth muscle cell migration. *J Allergy Clin Immunol.* 2011; 127(4):1046-53.
34. Adan Chari Jirmo, Kathleen Daluege, Christine Happle, Melanie Albrecht, Anna-Maria Dittrich, Mandy Busse, Anika Habener, Jelena Skuljec, Gesine Hansen. IL-27 Is Essential for Suppression of Experimental Allergic Asthma by the TLR7/8 Agonist R848 (Resiquimod). *J Immunol.* 2016; 197(11): 4219–4227.
35. Xiaoqiong Su, Jue Pan, Fengxi Bai, Honglei Yuan, Nian Dong, Dandan Li, Xiangdong Wang, Zhihong Chen. IL-27 attenuates airway inflammation in a mouse asthma model via the STAT1 and GADD45 γ /p38 MAPK pathways. *J Transl Med.* 2016; 14: 283.
36. Xie M, Mustovich AT, Jiang Y, Trudeau JB, Ray A, Ray P, Hu H, Holguin F, Freeman B, Wenzel SE. IL-27 and type 2 immunity in asthmatic patients: association with severity, CXCL9, and signal transducer and activator of transcription signaling. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;135(2):386-94.
37. Rabih Halwani, Saleh Al-Muhsen, Al-Jahdali H, Hamid Q. Role of Transforming Growth Factor- β in Airway Remodeling in Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 44(2):127–33.
38. Al-Alawi M, Hassan T, Chotirmall SH. Transforming growth factor β and severe asthma: A perfect storm. *Respir Med* 2014; 108(10):1409-23.
39. Volkov A, Hagner S, Löser S, Alnahas S, Raifer H, Hellhund A, Garn H, Steinhoff U. β 5i subunit deficiency of the immunoproteasome leads to reduced Th2 response in OVA induced acute asthma. *PLoS One.* 2013; 8(4):e60565.
40. W. Manuyakorn, “Airway remodelling in asthma: role for mechanical forces,” *Asia Pacific*

Allergy, vol. 4, no. 1, pp. 19–24, 2014.

41. B. N. Davis, A. C. Hilyard, G. Lagna, and A. Hata, “SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation,” *Nature*, vol. 454, no. 7200, pp. 56–61, 2008.
42. R. J. Homer and J. A. Elias, “Airway remodeling in asthma: therapeutic implications of mechanisms,” *Physiology*, vol. 20, no. 1, pp. 28–35, 2005.
43. Chen JC, Tsai CC, Hsieh CC, Lan A, Huang CC, Leu SF. Multispecies probiotics combination prevents ovalbumin-induced airway hyperreactivity in mice. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2018.
44. Holt PG. A potential vaccine strategy for asthma and allied atopic diseases during early childhood. *Lancet* 1994; 344:456 – 8.
45. Roy K, Mao HQ, Huang SK, Leong KW. Oral gene delivery with chitosan – DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat Med* 1999; 5:387 – 91.

科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

■達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形(請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊)

論文：■已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利：已獲得 申請中 無

技轉：已技轉 洽談中

無

其他：(以 200 字為限)

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以 500 字為限）。

根據本篇的結果顯示，口服 FIP-fve 之慢性期致敏小鼠能有效的達到減緩致敏的症狀，且對於呼吸道重塑之現象亦具有有效改善的效果。然 FIP-fve 對於 IL-17 及 STAT3 也具有相當的控制力。因此綜合研究結果認為，FIP-fve 或許能作為一項具一定效果之替代/輔助性治療方式。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： ■否 是，建議提供機關_____

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現：■否 是

說明：(以 150 字為限)

科技部補助專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：		計畫編號：					
計畫名稱：							
成果項目		量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)			
國內	學術性論文	期刊論文		1	篇	Journal of Microbiology, Immunology and Infection Volume 51, Issue 5, October 2018, Pages 598-607	
		研討會論文					
		專書			本	請附專書資訊。	
		專書論文			章	請附專書論文資訊。	
		技術報告			篇		
		其他			篇		
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中		件	請附佐證資料，如申請案號。
				已獲得			請附佐證資料，如獲證案號。
			新型/設計專利				
		商標權					
		營業秘密					
		積體電路電路布局權					
		著作權					
		品種權					
	其他						
技術移轉	件數			件			
	收入			千元	1. 依「科技部科學技術研究發展成果歸屬及運用辦法」第2條規定，研發成果收入係指執行研究發展之單位因管理及運用研發成果所獲得之授權金、權利金、價金、股權或其他權益。 2. 請註明合約金額。		
國外	學術性論文	期刊論文			篇	請附期刊資訊。	
		研討會論文					

		專書		本	請附專書資訊。	
		專書論文		章	請附專書論文資訊。	
		技術報告		篇		
		其他		篇		
	智慧財產權 及成果	專利權	發明專利	申請中	件	請附佐證資料，如申請案號。
				已獲得		請附佐證資料，如獲證案號。
			新型/設計專利			
		商標權				
		營業秘密				
		積體電路電路布局權				
		著作權				
		品種權				
	其他					
	技術移轉	件數		件		
收入			千元	<ol style="list-style-type: none"> 依「科技部科學技術研究發展成果歸屬及運用辦法」第2條規定，研發成果收入係指執行研究發展之單位因管理及運用研發成果所獲得之授權金、權利金、價金、股權或其他權益。 請註明合約金額。 		
參與計畫人力	本國籍	大專生		人次		
		碩士生				
		博士生				
		博士後研究員				
		專任助理				
	非本國籍	大專生				
		碩士生				
		博士生				
		博士後研究員				
		專任助理				
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)						

104年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：呂克桓		計畫編號：104-2314-B-040-015-MY3				
計畫名稱：探討金針菇免疫調節蛋白減緩卵白蛋白及IL-17誘發具抗類固醇的慢性氣喘之嗜中性球發炎及其氣道重組機轉						
成果項目		量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)		
國內	學術性論文	期刊論文	1	篇	Journal of Microbiology, Immunology and Infection Volume 51, Issue 5, October 2018, Pages 598-607	
		研討會論文	0			
		專書	0	本		
		專書論文	0	章		
		技術報告	0	篇		
		其他	0	篇		
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	
				已獲得	0	
			新型/設計專利	0		
		商標權	0			
		營業秘密	0	件		
		積體電路電路布局權	0			
		著作權	0			
		品種權	0			
	其他	0				
	技術移轉	件數	0	件		
		收入	0	千元		
	國外	學術性論文	期刊論文	0	篇	
			研討會論文	0		
			專書	0	本	
專書論文			0	章		
技術報告			0	篇		
其他			0	篇		
智慧財產權及成果		專利權	發明專利	申請中	0	
				已獲得	0	
			新型/設計專利	0		
		商標權	0	件		
		營業秘密	0			
		積體電路電路布局權	0			

		著作權	0		
		品種權	0		
		其他	0		
	技術移轉	件數	0	件	
		收入	0	千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生	0	人次	
		碩士生	0		
		博士生	1		兼任助理-中山醫學大學研究所博士班學生李育慈
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
	非本國籍	大專生	0		
		碩士生	0		
		博士生	0		
		博士後研究員	0		
		專任助理	0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)					

科技部補助專題研究計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現（簡要敘述成果是否具有政策應用參考價值及具影響公共利益之重大發現）或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形（請於其他欄註明專利及技轉之證號、合約、申請及洽談等詳細資訊）

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以200字為限）

目前已完成發表之SCI文章一篇，相關訊息如下：

Journal of Microbiology, Immunology and Infection. Volume 51, Issue 5, October 2018, Pages 598-607

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，以500字為限）

根據本篇的結果顯示，口服 FIP-fve之慢性期致敏小鼠能有效的達到減緩致敏的症狀，且對於呼吸道重塑之現象亦具有有效改善的效果。然FIP-fve對於IL-17及STAT3也具有相當的控制力。因此綜合研究結果認為，FIP-fve或許能作為一項具一定效果之替代/輔助性治療方式。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值： 否 是，建議提供機關

（勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關）

本研究具影響公共利益之重大發現： 否 是

說明：（以150字為限）