

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

金針菇免疫調節蛋白FIP-five 對氣喘小鼠體內免疫環境、IL-22與IL-17的影響

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 103-2314-B-040-009-
執行期間：103年08月01日至104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

處理方式：

1. 公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢
2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否
3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考：否

中華民國 104 年 10 月 21 日

中文摘要：在過去二十年間，氣喘疾病的發生率持續快速增加中。隨著越來越多人投入氣喘的研究，應用於治療過敏氣喘疾病的新藥劑因此不斷被開發出來。話雖如此，但目前已知的藥物僅能提供疾病症狀的部分舒解。因此往後的目標仍需藉由瞭解其複雜的機制，以開發更多具功效的藥物來遏止氣喘的發炎反應產生，甚至更進一步可以回復已損傷重塑過的肺組織。目前的研究發現，白三醯素對於整個氣喘的病理變化佔有重要的角色。另外也有些研究發現一些中草藥及食物的萃取物，對於抑制氣喘氣道重塑的過程，具有調控輔助的功能。

根據研究團隊先前已發表之研究證實，金針菇免疫調節蛋白 FIP (fungal immunomodulatory peptide) -fve 對於致敏小鼠呼吸道之發炎反應具有顯著的抑制作用，不僅能減緩呼吸道過度反應現象(AHR)，亦能使致敏小鼠體內Th2細胞激素分泌減少，並且顯著減少致敏現象標的細胞Eosinophils之產生。於本次研究更加深入探討於發炎與致敏體內之免疫微環境中，FIP-fve究竟是透過何種機制影響整體免疫反應，此研究將探討FIP-fve在各種介白質RNA層級中之表現差異，並且探討其於Th1、Th2、Treg、Th17以及Th22免疫細胞中之各種反應與影響以完整描繪出FIP-fve在致敏反應中對急性發炎與慢性發炎之分子傳遞機制與相關影響。

本研究中，我們將BALB/C的母鼠，經過第1天與第14天的腹腔注射蛋清蛋白以及第14天與第25-27天給予經鼻的蛋清蛋白後，氣喘模組將會建立成功。我們隨機選擇致敏的老鼠，依照實驗時程分組的不同，分別於氣喘模組建立過程的第1天至第14天，或是呼吸道發炎組建立過程的第14天至第27天，以餵食針餵食FIP-fv。此外，研究中更納入慢性期之研究，將實驗氣喘模組轉為76天慢性致敏流程並於實驗進程的第14、17、21、24、27及60、69、71、73、74及75天給予經鼻的蛋清蛋白後建立慢性氣喘模組。另外目前已知具有抗發炎效果，且廣泛應用於臨床的類固醇，也將會選擇一組致敏之老鼠於上述時程給予餵食，當作治療成效的參考指標。

依據最近我們初步研究得知，確定FIP-fve在老鼠的氣喘模組中，無論是急性期或慢性期具有顯著治療的效果外且FIP-fve對於呼吸道膠原蛋白沈積似乎亦具有減緩的效果，因此藉由此一模式進行深入探討，FIP-fve對於致敏小鼠的分子訊號傳遞機制以及對於體內免疫微環境與IL-17、IL-22之影響，以徹底了解急慢性期致敏小鼠體內微環境及各種細胞激素與chemokine的變化與差異，以期為發炎與致敏氣喘疾病找尋更完善的治療與預防方式。

中文關鍵詞：急慢性期致敏、金針菇免疫調節蛋白、細胞激素、驅化因子

英文摘要：As we known today, asthma is a repeated chronic inflammatory disease. It is characterized by a complex response of pulmonary eosinophilia, edema, mucus hypersecretion, and airway hyperreactivity (AHR). Under the condition of long term asthma, airway remodeling may develop by increased goblet cells, subepithelial fibrosis, airway smooth muscle mass increased and vascular hyperplasia. These make asthma control more difficult. According to recent research about asthma, leukotriene got

important role in whole pathologic change of asthma. Our previous data show that fungal immunomodulatory peptide-fve (FIP-fve) could suppress AHR response, induced Th1 and Treg cytokine, and reduced Th2 cytokine, and in our preliminary result also show that FIP-fve could reduce collagen precipitation. We would examine the role of FIP-fve and compare leukotriene receptor antagonist (montelukast) in a mouse asthma model after allergen-induced acute and chronic lung inflammation and airway remodeling. Female BALB/c mice, after intraperitoneal ovalbumin sensitization on Days 1 and 14, received intranasal OVA on Days 14 and Days 25-27. The mouse asthma model was set up. The sensitized mice were divided into different group according to the course of designed airway change. Different groups of sensitized mice received FIP-fve or corticosteroid via intragastric feeding on Day 1-14. The other groups of sensitized mice received same drugs on Day 14-27. Moreover, the chronic stage in this asthma animal model was received intranasal OVA on Days 14, 17, 21, 24, 27, 60, 69, 71, 73, 74 and 75 the chronic model was set up.

In this experiment, we will evaluate the effect of FIP-fve on Th17 and Th22 and further evaluate the molecule environment and signal transduction of FIP-fve and montelukast on asthma treatment. According to those objects we will detect RNA levels of interleukins and analysis with molecule environment, signal transduction, cytokine and chemokine expression Th1, Th2, Treg, Th17 and Th22 immune cells.

英文關鍵詞： acute/chronic allergy, FIP-fve, cytokine, chemokine

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)

金針菇免疫調節蛋白 FIP-fve 對氣喘小鼠體內免疫環境、 IL-22 與 IL-17 的影響

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：MOST 103-2314-B-040 -009 -

執行期間：103 年 8 月 1 日至 104 年 7 月 31 日

執行機構及系所：

計畫主持人：呂克桓

共同主持人：柯俊良

計畫參與人員：

本計畫除繳交成果報告外，另含下列出國報告，共 0 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

期末報告處理方式：

1. 公開方式：

非列管計畫亦不具下列情形，立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

2. 「本研究」是否已有嚴重損及公共利益之發現：否 是

3. 「本報告」是否建議提供政府單位施政參考 否 是，_____（請列舉提供之單位；本部不經審議，依勾選逕予轉送）

中 華 民 國 104 年 10 月 20 日

目錄

中文摘要	I
英文摘要	II
背景介紹	1
材料方法	4
結果	12
結論與討論	20
參考文獻	23

中文摘要

在過去二十年間，氣喘疾病的發生率持續快速增加中。隨著越來越多人投入氣喘的研究，應用於治療過敏氣喘疾病的新藥劑因此不斷被開發出來。話雖如此，但目前已知的藥物僅能提供疾病症狀的部分舒解。因此往後的目標仍需藉由瞭解其複雜的機制，以開發更多具功效的藥物來遏止氣喘的發炎反應產生，甚至更進一步可以回復已損傷重塑過的肺組織。目前的研究發現，白三醯素對於整個氣喘的病理變化佔有重要的角色。另外也有些研究發現一些中草藥及食物的萃取物，對於抑制氣喘氣道重塑的過程，具有調控輔助的功能。

根據研究團隊先前已發表之研究證實，金針菇免疫調節蛋白 FIP(fungal immunomodulatory peptide)-fve 對於致敏小鼠呼吸道之發炎反應具有顯著的抑制作用，不僅能減緩呼吸道過度反應現象(AHR)，亦能使致敏小鼠體內 Th2 細胞激素分泌減少，並且顯著減少致敏現象標的細胞 Eosinophils 之產生。於本次研究更加深入探討於發炎與致敏體內之免疫微環境中，FIP-fve 究竟是透過何種機制影響整體免疫反應，此研究將探討 FIP-fve 在各種介白質 RNA 層級中之表現差異，並且探討其於 Th1、Th2、Treg、Th17 以及 Th22 免疫細胞中之各種反應與影響以完整描繪出 FIP-fve 在致敏反應中對急性發炎與慢性發炎之分子傳遞機制與相關影響。

本研究中，我們將 BALB/C 的母鼠，經過第 1 天與第 14 天的腹腔注射蛋清蛋白以及第 14 天與第 25-27 天給予經鼻的蛋清蛋白後，氣喘模組將會建立成功。我們隨機選擇致敏的老鼠，依照實驗時程分組的不同，分別於氣喘模組建立過程的第 1 天至第 14 天，或是呼吸道發炎組建立過程的第 14 天至第 27 天，以餵食針餵食 FIP-fv。此外，研究中更納入慢性期之研究，將實驗氣喘模組轉為 76 天慢性致敏流程並於實驗進程的第 14、17、21、24、27 及 60、69、71、73、74 及 75 天給予經鼻的蛋清蛋白後建立慢性氣喘模組。另外目前已知具有抗發炎效果，且廣泛應用於臨床的類固醇，也將會選擇一組致敏之老鼠於上述時程給予餵食，當作治療成效的參考指標。

依據最近我們初步研究得知，確定 FIP-fve 在老鼠的氣喘模組中，無論是急性期或慢性期具有顯著治療的效果外且 FIP-fve 對於呼吸道膠原蛋白沈積似乎亦具有減緩的效果，因此藉由此一模式進行深入探討，FIP-fve 對於致敏小鼠的分子訊號傳遞機制以及對於體內免疫微環境與 IL-17，IL-22 之影響，以徹底了解急慢性期致敏小鼠體內微環境及各種細胞激素與 chemokine 的變化與差異，以期為發炎與致敏氣喘疾病找尋更完善的治療與預防方式。

關鍵詞：急慢性期致敏、金針菇免疫調節蛋白、細胞激素、驅化因子

Abstract

The incidence of asthma has increased substantially in the last two decades. New medication is developed rapidly in recent years to apply to allergic asthma, since lots of people have investigated about these. However, now existing drugs just offer partial relief of symptoms in such disease. The goal of future is to understand the complicated mechanism of asthma, and develop more effective drugs for suppressing the inflammatory response in asthma. Even we can then reverse the damaged lung tissue after airway remodeling. As we known today, asthma is a repeated chronic inflammatory disease. It is characterized by a complex response of pulmonary eosinophilia, edema, mucus hypersecretion, and airway hyperreactivity (AHR). Under the condition of long term asthma, airway remodeling may develop by increased goblet cells, subepithelial fibrosis, airway smooth muscle mass increased and vascular hyperplasia. These make asthma control more difficult. According to recent research about asthma, leukotriene got important role in whole pathologic change of asthma.

Our previous data show that fungal immunomodulatory peptide-fve (FIP-fve) could suppress AHR response, induced Th1 and Treg cytokine, and reduced Th2 cytokine, and in our preliminary result also show that FIP-fve could reduce collagen precipitation. We would examine the role of FIP-fve and compare leukotriene receptor antagonist (montelukast) in a mouse asthma model after allergen-induced acute and chronic lung inflammation and airway remodeling. Female BALB/c mice, after intraperitoneal ovalbumin sensitization on Days 1 and 14, received intranasal OVA on Days 14 and Days 25-27. The mouse asthma model was set up. The sensitized mice were divided into different group according to the course of designed airway change. Different groups of sensitized mice received FIP-fve or corticosteroid via intragastric feeding on Day 1-14. The other groups of sensitized mice received same drugs on Day 14-27. Moreover, the chronic stage in this asthma animal model was received intranasal OVA on Days 14, 17, 21, 24, 27, 60, 69, 71, 73, 74 and 75 the chronic model was set up.

In this experiment, we will evaluate the effect of FIP-fve on Th17 and Th22 and further evaluate the molecule environment and signal transduction of FIP-fve and montelukast on asthma treatment. According to those objects we will detect RNA levels of interleukins and analysis with molecule environment, signal transduction, cytokine and chemokine expression Th1, Th2, Treg, Th17 and Th22 immune cells.

Keyword: acute/chronic allergy, FIP-fve, cytokine, chemokine

背景介紹

氣喘是一種慢性氣道發炎反應的疾病，發作時可能相當嚴重甚至會致命，是世界各國重要的大眾健康問題。在過去的二十年間，氣喘疾病的發生率持續快速的增加中。因此氣喘儼然已成為全球性的公共衛生問題。自1970年開始，許多報告都指出，全世界氣喘病的發生率持續在增加且病情愈趨嚴重，住院率和死亡率也隨著增高。另外，根據研究指出台灣地區約有百分之四十的國中國小學童具有遺傳性過敏體質，且台灣處於亞熱帶地區，氣候溫暖且潮濕，因而導致罹患過敏性疾病者甚多，這其中就以過敏性鼻炎與氣喘最為常見，且根據衛生署2008年台灣十大死因統計顯示慢性下呼吸道疾病(包含氣喘等病)名列第七位(1)。

最近國內一些研究從1974年至2009年針對台北市學童所進行的研究指出：台北市學童的氣喘病盛行率在1974年時為1.30%，隨後快速增加，在1985年為5.08%，1991年為5.80%，1994年底升高達到了10.79%，於2002年持續攀升至19.2%，直至近期2009年之調查更發現氣喘病的盛行率以高達20.30% (2-4)，這樣研究結果顯示，在過去的三十五年間氣喘盛行率增加超過十五倍。目前全世界約有一億人口罹患氣喘(4)，其盛行率在兒童也有逐漸增加的趨勢，且氣喘發作的年齡也有向下發展的跡象。因此面對這樣的現象針對氣喘的研究已是迫在眉梢。

根據目前已知的研究顯示，氣喘是一種複雜反覆慢性呼吸道發炎的疾病，病理上的變化包括有肺部嗜伊紅性白血球(Eosinophil; Eos)的浸潤、黏膜水腫、黏液的過度分泌以及呼吸道的過度反應。而在長期氣喘的狀態下，呼吸道會產生杯狀細胞、平滑肌肉組織、血管等增生的呼吸道重塑現象，因而增加控制氣喘的困難度。另外，前人的研究中也發現，在支氣管肺泡沖洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF)和肺部的分泌物中，存在有可以調控發炎反應的細胞激素(cytokines)和趨化激素(chemokines) (5)。先前的研究中亦發現，氣喘病人的呼吸道中會有大量的T細胞浸潤(6, 7)，因此根據這些研究結果有研究者認為CD4⁺ T cell 在氣喘上扮演著相當重要的角色(8)。另外，目前已知的相關研究中也顯示IL-12 (interleukine-12)有助於CD4⁺ T cells 分化成Th1細胞(9); IL-4則可促使Th2細胞分化(10)。在Th1細胞方面其能夠產生IL-2和IFN- γ (interferon- γ)，這對於防禦功能上是存在極大的重要性；而Th2細胞則會產生IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-13，經研究指出這類細胞激素則與過敏性發炎的機制有關，亦有研究指出Th1細胞和Th2細胞所產生的細胞激素具有互相拮抗的作用(11)。承上所述，在氣喘的過敏性發炎反應中主要被認同的機轉是免疫調控不平衡所致，其中由Th1細胞所分泌的IFN- γ 特別被受到重視，因為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

過敏性發炎反應發生的可能性。而 Th2 細胞所產生的 IL-4 和 IL-13 則可以結合到 B 細胞上的受器，促進 B 細胞產生 IgE(12)；IL-5 則是刺激嗜伊紅性白血球的分化、成熟及存活的重要因子(13)，也具有吸引嗜伊紅性白血球到呼吸道的功能(14)。在臨床上也證實，氣喘病人的一項主要特徵是血清中的具有高濃度的 IgE 含量，而這方面也在流行病學的研究上獲得認同(15)。另外，根據國內氣喘診療指引指出肥大細胞 (mast cells)和嗜伊紅性白血球在過敏性氣喘中亦為主要的作用細胞，其主要原因是肥大細胞可以透過 IgE-dependent 的機制使其活化，血液中 IgE 會和肥大細胞上的 IgE receptors (Fc ϵ RI)結合，當過敏原進入之後會和肥大細胞上的 IgE 結合，然後導致肥大細胞釋放出組織胺(histamine)、前列腺素 D2 (prostaglandin D2, PGD2)、白三烯素 C4 (leukotriene C4, LTC4)和血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF)等介質會導致支氣管平滑肌收縮，呼吸困難和血管通透性增加(16)，這種早期反應發生非常快速，只需接觸過敏原後數分鐘就發生，而長期氣喘患者的主要特徵就是在呼吸道有大量的嗜伊紅性白血球的浸潤 (17)。

而根據研究團隊先前的研究發現，金針菇免疫調節蛋白 FIP-*fve* 對於人類周邊血的淋巴球細胞 (human peripheral blood mononuclear cells; HPBMCs)具有增殖的作用，以 3H-thymidine 測其 DNA 合成量，並以 phytoagglutinin (PHA)作為對照組。結果發現 FIP-*fve* 在 100 μ g/ml 濃度時可達到細胞最高的增殖量(21)。另外，將 Balb/c 老鼠以皮下注射方式注入 bovine serum albumin(BSA)，其會引起 systemic anaphylaxis 特徵是老鼠的兩腳會痙攣並向外側攤開，而有預先處理 FIP-*fve* 的實驗組則對於此過敏性休克反應具有明顯的抑制作用(23)。而將老鼠的脾臟細胞，經 FIP-*fve* 蛋白質預先處理不同濃度後，再抽取其 RNA 以 RT-PCR 方式做增幅反應，結果發現隨著 FIP-*fve* 處理的濃度增加，所誘導的 IL-2、及 TNF- α (tumor-necrosis factor α)的基因轉錄作用也有增加的趨勢(17)。另外也有研究指出 FIP-*fve* 具有降低 Balb/c 老鼠由 Compound 48/80(為一種發炎物，可釋出組織胺酸)所引起的老鼠後腳腫脹反應的能力(17)。然而 FIP-*fve* 最明顯的功能則是可以使 Balb/c 老鼠的脾臟細胞以及正常人類周邊血的淋巴球細胞，經過 48 小時的處理後，會有明顯的 IFN- γ 的增加(21)，雖然其所誘發的機制及相關的調控功能並不清楚，但是 IFN- γ 對於 IgE 及肥大細胞等所引起的過敏反應是具有抑制的能力，可以減少發炎反應的過度表現(15)。由於先前針對氣喘之研究亦發現，IFN- γ 會抑制 Th2 細胞的分化及 IgE 的合成，而 Th2 細胞所產生的 IL-4 和 IL-13 則可以結合到 B 細胞上的受器，促進 B 細胞產生 IgE(14)；IL-5 則是刺激嗜伊紅性白血球的分化、成熟及存活的重要因子(15)，也具有吸引嗜伊紅性白血球到呼吸道的功能(16-19)，因此研究中將透過 RNA 層級之分析探討 Interleukins 之改變並且藉由 ConA、LPS 與 OVA 再次刺激致敏小鼠

之脾臟細胞，探討FIP-fve在致敏小鼠體內是透過何路徑誘發IFN- γ 的生成以及對於T與B細胞反應之影響與其可能透過何路徑帶動下游細胞激素之改變。

而先前結果中另有FIP-fve在急性期致敏小鼠模式中，具有誘發Treg細胞激素中之TGF- β 的產生，然而，許多研究指出由Treg細胞所分泌之TGF- β 在呼吸道重塑現象中扮演著極重要的角色，當發炎反應反覆發生的時候，TGF- β 將失去控制的增量分泌進而使得呼吸道重塑現象趨於嚴重(20-22)，而對於氣喘病患而言急性期症狀的改善是必須的，但對於呼吸道重塑現象的治療也是勢在必行的研究主題，因若能改善呼吸道重塑現象的惡化，其對於氣喘病患而言實屬更重要的一環，因此針對FIP-fve對於TGF- β 所產生的影響仍是必須進行深入性探討，而為何FIP-fve於急性期會驅動致敏小鼠TGF- β 上升之反應此現象與先前大部分研究有顯著之差異，因此在本研究中將納為重點討論對象。

綜合先前研究團隊的結果，FIP-fve確實能夠有效減少致敏的發生已是被確立的，因此針對這一點我們進行了更進一步的研究，當將致敏進程延長後，致敏小鼠便會開始產生呼吸道重塑之現象，而此一現象也是目前臨床上氣喘藥物無法改善的部分，然而根據研究結果顯示，在慢性致敏小鼠中服用FIP-fve似乎具有減緩呼吸道重塑的現象，而這也是更需要進行進一步研究的原因之一。

除上述研究結果之外，我們更發現急性期與慢性期致敏過程中所有誘發之細胞激素可能有所不同，根據先前氣喘研究結果，氣喘疾病的致病過程中最主要會引起Th2細胞激素的過度分泌，而使之Th1/Th2免疫調節不平衡所致，但根據研究團隊的進一步研究發現，在致敏過程中確實會誘發大量的Th2細胞激素的增生，但卻不僅僅只是這類細胞激素會影響致敏的惡化更有其他如IL17、IL16、IL22等等之其他細胞激素，都似乎會直接或間接影響致敏的症狀；此外，我們更初步的發現在急性期與慢性期的致敏過程中其被誘發之細胞激素除Th2細胞激素外，隨致敏進程的不同所誘發的細胞激素與chemokine也有及極大的差別，而這一點也是我們急需更加深入研究的目標。

為求精確研究分析急性期與慢性期致敏在免疫微環境上的差異，我們將致敏流程分為28天急性期致敏與76天慢性期致敏後，收取各種檢體進行分生與生化學之分析，以期能完整了解不同時期致敏的差異，使之對於臨床上有所幫助。

另外，我們亦將在兩種不同時期致敏過程中納入了FIP-fve、過敏氣喘之新藥montelukast(MK)來一同進行作用機制之探討，並使用臨床上之類固醇用藥作為治療之對照組。然於研究中使用montelukast與類固醇藥物進行探究之目的有二，其一，montelukast為治療過敏疾病之有效新興藥物，而其為白三烯素受體拮抗劑之藥物，此藥物是透過阻止白三烯與其受體結合而改善過敏發炎反應，將其與FIP-fve進行

比較以了解兩種新興物質對於發炎反應上的差異與優缺點效應；其二，將目前臨床上使用之類固醇藥物納入比較，主要將類固醇藥物當作一對照組以做為療效成果上之判斷。

材料與方法

● 動物實驗部分

本研究之動物實驗使用 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。

進行 ovalbumin 致敏模式與施予 FIP-*fve*

實驗分組

本研究實驗共將實驗組別分為八組，其分別為控制組(Normal Control 組, NC 組)、致敏組(Positive Control 組, PC 組)、前給類固醇、FIP-*fve*、MK(montelukast)以及後給類固醇、FIP-*fve*、MK(montelukast)。

致敏流程

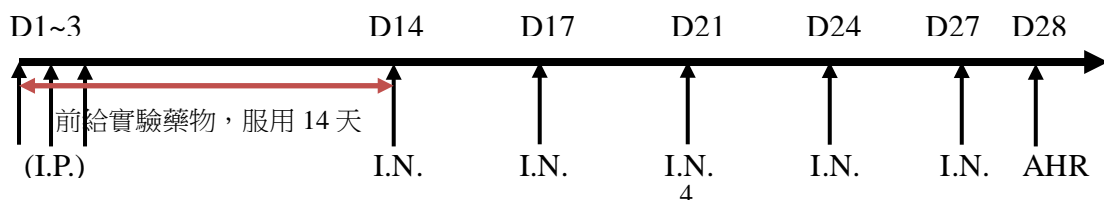
從實驗進程開始的第 1~3 天及第 14 天，將含有 0.8 mg Al(OH)₃ (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA)的生理食鹽水或含有 50ug 雞卵蛋白(chicken ovalbumin, OVA; Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, MO, USA)及 0.8 mg Al(OH)₃ 的生理食鹽水以腹腔注射(I.P., intraperitoneal)的方式打入小鼠體內，每次施打 200 μ l，再於第 14 天時進行腹腔注射生理食鹽水或 OVA，並進行生理食鹽水或 5% OVA (in saline)的鼻腔吸入，每隻吸入量為 50ul，並於第 17、20、23、27 天以相同方式給藥，共給予鼻腔吸入藥物五天，並於第 28 天進行呼吸道過度反應反應的之測定 (Airway hyper-responsiveness, AHR)測定，待測訂完成後 24 小時內將小鼠犧牲。

施藥時間與劑量

在FIP-*fve*給藥的方面共分為兩個部份，一為在致敏過程中的第1天至第14天連續每天給藥，另一組則為致敏過程中的第14天至第27天連續每天兩組，其分組方式如下：

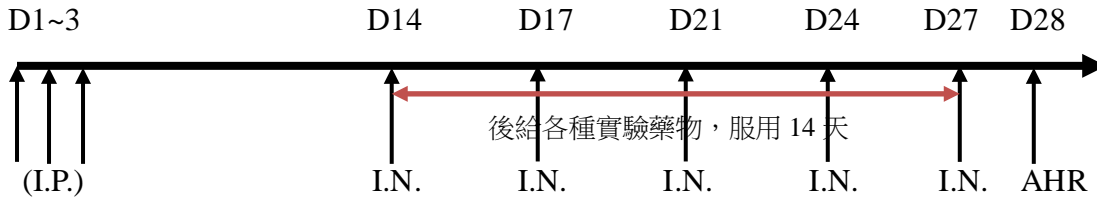
(a) 前給類固醇、FIP-*fve*

依據 OVA 致敏流程進行實驗，並於第 1 天至第 14 天連續每日給予各組小鼠口服藥物，連續給藥 14 天後停止給予口服並持續進行致敏之相關步驟，隨後於實驗進程的第 28 天進行呼吸道過度反應反應測定(AHR)，待測定完成後 24 小時內將小鼠犧牲，其施行過程如下圖：



(b) 後給類固醇、FIP-*fve*

依據 OVA 致敏流程進行實驗，並於第 14 天至第 27 天連續每日給予各組小鼠口服藥物，連續給藥 14 天後停止給予口服並持續進行致敏之相關步驟，隨後於實驗進程的第 28 天進行呼吸道過度反應測定(AHR)，待測定完成後 24 小時內將小鼠犧牲，其施行過程如下圖：

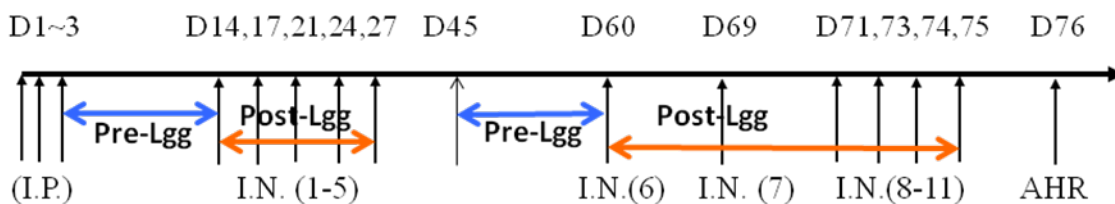


慢性期致敏流程

從實驗進程開始的第 0 天及第 15 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 μl，再於第 15 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 25 至 28，及 60、69、71 與 73 天以相同方式給藥，共給予鼻腔吸入藥物八天，並於第 104 天進行呼吸道過度反應反應的之測定 (Airway hyper-responsiveness, AHR)測定，待測訂完成後 24 小時內將小鼠犧牲。

前或後給類固醇、FIP-*fve*

依據 OVA 致敏流程進行實驗，前給要組於第 1 天至第 14 天與第 45 天至 60 天連續每日給予各組小鼠口服藥物，連續給藥共 2 階段 14 天；後給要組則於第 14 天至 27 天與第 60 天至 75 天，連續給藥共 2 階段 14 天，其中 14、17、21、24、27 及 60、69、71、73、74 及 75 天進行致敏之相關步驟，隨後於實驗進程的第 76 天進行呼吸道過度反應反應測定(AHR)，待測定完成後 24 小時內將小鼠犧牲，其施行過程如下圖：



呼吸道過度反應測定 (AHR)

第 28 天或第 76 天時進行小鼠呼吸道過度反應測定，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過度反應偵測系統 (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過度反應的 Penh 值 (enhanced pause)。

小鼠血液樣本採集

在開始進行實驗前、實驗進行至第 14 天時以及犧牲小鼠當天進行採血，前兩次採血是以眼窩採血方式來進行，在小鼠犧牲當日的採血則是以麻醉藥麻醉後，進行下腔靜脈採血法採取全生血液，然後於 4°C 離心、離心轉速 3300 rpm、離心時間 10 分鐘，經離心後取出血清並放置於-80°C 冰箱備用。取得之血清將作為日後檢測各項細胞激素之檢體。

肺泡沖洗(BALF)及細胞處理

(a) 肺泡沖洗

準備 3 ml 的生理食鹽水，分兩次進行肺泡之沖洗：取 1 ml 生理食鹽水沖洗小鼠肺泡後，mixed 後取出 100ul 進行 cytopsin，其餘者皆以 2000rpm 離心 5 分鐘後，取上清液置於-80°C 冰箱備用。取得之肺泡沖洗液將取部分作為 cytopsin 之樣本，其餘之肺泡沖洗液將作為各種細胞激素檢測之檢體。

(b) 細胞染色

將已處理好之肺泡沖洗液之細胞，利用 Shandon Cytospin 4 (Thermo Shandon, Inc., Pittsburg, PA, USA)以 4000 rpm 5 分鐘的條件下將細胞離心至 polysine-coated 玻片上，接著將載有細胞之玻片先以 95% 酒精浸泡後，再以 H&E stain 來染色待封片後依照型態學區分嗜伊紅性白血球、淋巴球和單核球。

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：

■ 肺臟組織病理切片處理

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。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，以及透過Masson's Trichome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。

■ 肺臟RNA之取得

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。

◆ RNA取得方式：

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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C, 15 分鐘。倒掉上清液，再用75 % 酒精清洗一次，離心12000 rpm, 4 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C, 60 分鐘, 99 $^{\circ}$ C, 5 分鐘及4 $^{\circ}$ C, 5 分鐘即合成cDNA。可進行PCR 反應，或儲於-20 $^{\circ}$ 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。

血清中OVA-specific IgE、IgG2a之濃度測定

先以10ug/ml OVA (溶於1X PBS) coating於96 well 之ELISA plate (TPP, Trasadingen, Switzerland), 置於4 $^{\circ}$ C, coating over night, 隔天以wash buffer (0.1% Tween 20) 將多餘未coating至96孔盤上之OVA清洗乾淨，隨後在37 $^{\circ}$ C下以3 % BSA (in PBS)進行blocking之動作，1小時後先進行清洗之動作而後加入待測物並置於37 $^{\circ}$ C中作用2小時，與清洗後加入biotinylated rat anti-mouse monoclonal IgE (BD Biosciences)並於

37°C 下作用1小時，然後再加入streptavidin conjugated-HRP 於室溫下作用45分鐘，最後加入受質溶液使之呈色，其溶液包含2mg 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，最後使用ELISA reader (Sunrise™, TECAN Ltd.)波長為490 nm測定其吸光值。

透過血清中之OVA-specific IgE、IgG2a之濃度測定，可是之了解各組致敏小鼠之致敏狀況之研究程度，以及其是否具有Th1細胞免疫反應。

小鼠血清及肺泡沖洗液之IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17、IL-22、TGF-β及INF-γ之濃度測定

利用mouse ELISA Quantikine (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) 來偵測mouse IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17、IL-22、TGF-β及INF-γ在血清及肺泡沖洗液裡的濃度。首先將欲使用之試劑、sample被置好並放置於室溫下回溫備用，隨後於96孔盤中加入50ul的稀釋液，隨後在盤中加入50ul的sample並做充分的混合，之後於室溫下作用2小時，作用2小時後以wash buffer進行清洗的動作(wash buffer 400ul/well, 5 times) 清洗後以紙巾擦乾，而後於每個well中加入100ul的IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17、IL-22、TGF-β及INF-γ conjugate 並於室溫下作用2小時，2小時作用完成後依先前清洗的方式進行清洗動作，之後於每個well中加入100ul substrate solution於室溫下作用30分鐘且需避光，於作用完成後在每個well中加入100ul的3N H₂SO₄ 終止反應，隨後以ELISA reader (Sunrise™,TECAN Ltd., Mannedorf, Switzerland)波長450 nm 進行吸光值的測定。

將與Th1/Th2細胞相關之細胞激素進行檢測，藉由此檢測實驗可使之了解各種藥物對於致敏小鼠之預防或治療上之反應為何，並可透過此研究所得之結果獲得進一步研究之方向及想法。此外，根據較新的研究發現，由Th17和Th22細胞所分泌的IL-17和IL-22與氣喘疾病以及其造成之呼吸道重塑現象具有高度相關性，因此本研究擬增加IL-17和IL-22濃度的檢測，並合併比較其他相關細胞激素檢測結果作探討，以其找出更完整且正確之氣喘疾病與呼吸道重塑現象之原因。

MMP家族之檢測

利用ELISA DuoSet (R&D Systems, Inc.)來檢測MMP3(matrix metalloproteinase-3)和MMP9(matrix metalloproteinase-9)在肺泡沖洗液裡的濃度，其步驟依廠商所提供之流程進行並與檢測細胞激素的方法相似。

本研究之 MMP(matrix metalloproteinase)檢測，將其焦點放於 MMP9 與 MMP3 以及 TIMP1 (TIMP

metallopeptidase inhibitor 1)，其因根據先前之研究指出，當過敏發炎疾病形成慢性發炎時所造成的重塑現象，其中 MMP9 具有扮演了極重要的角色，當 MMP9 大量被分泌時其 collage 增生之現象亦會趨於嚴重，而另有研究亦指出 MMP3 與 MMP9 之分泌若能平衡則對於發炎部位之重塑現象能獲得改善，因此本研究將透過 MMP3 與 MMP9 之檢測並與病理切變結果進行呼吸道重塑現象之探討。

此外，根據研究指出 TIMP1 是一種抑制 MMP9 的激素，透過 TIMP1 的可能具有能夠抑制細胞外間質的破壞，也因此而造成細胞外間質的沈積與基底模的變厚，因此當臨床上氣喘患者的肺泡灌洗液中，除了發現 MMP9 的增加外，TIMP1 也會有明顯增加的現象，但 MMP9 與 TIMP1 的比值卻是下降的。因此，在本研究將納入 TIMP1 一同探討，MMP 與 TIMP1 與氣喘疾病與呼吸道重塑間的相關性。

Cytokine array & Chemokine偵測

使用 R&D Systems 之 Cytokine & Chemokine array kit 進行偵測實驗，此實驗將使用小鼠之血清與肺泡沖洗液進行分析，於 Cytokine & Chemokine array 中的判讀片上共有 45 種細胞激素藉由此實驗能得知各種細胞激素在不同致敏進程下的表現狀態，使之能更進一步進行探討分

● **細胞實驗部分**

✓ **Primary culture**

Primary culture 實驗，是使用致敏小鼠之脾臟經研磨後取得脾臟細胞並將取得之脾臟細胞分做兩等份，一，直接進行皮臟細胞 FOXP3 染色並透過流式細胞儀判定 FOXP3 表現結果，另一則做為培養用之脾臟細胞，以進行後續細胞實驗。

■ **流式細胞儀之 Foxp3 細胞鑑定**

小鼠犧牲後取脾臟置於 5 ml PBS，利用無菌磨砂玻片將脾臟磨碎，再以 1600 rpm 離心 5 分鐘後，去除上清液並將沉降之細胞拍散，加入 5 ml RBC lysis buffer 作用 5 分鐘後，再加入 10 ml 的 PBS，然後以 1600 rpm 離心 5 分鐘後去除上清液並將細胞拍散，再加入 10 ml 的 PBS 然後以無菌之濾網使其通過，然後以細胞計數盤計算脾臟細胞數。於細胞計數後並將細胞進行 Foxp3 細胞染色，並透過流式細胞儀來進行 Foxp3 細胞測定，於此細胞染色中，亦會染上 CD4/CD8/CD25，已進行更正確之鑑定。

根據我們先前的研究指出，於致敏小鼠中其 TGF- β 之含量有顯著上升的現象，然而 TGF- β 是所屬於 Treg 細胞所分泌而來，而透過 CD4/CD25/ Foxp3 的鑑定，可用來探討 Treg 細胞是否確實於過敏疾病中亦扮演著重要角色，並且將此結果與 Th22 細胞流式細胞儀分析之結果進行比較，以進行更深入之探討及了解。

■ 脾臟細胞的培養

小鼠犧牲後取脾臟置於5 ml PBS，利用無菌磨砂玻片將脾臟磨碎，再以1600 rpm 離心5 分鐘後，去除上清液並將沉降之細胞拍散，加入5 ml RBC lysis buffer 作用5 分鐘後，再加入10 ml 的PBS，然後以1600 rpm 離心5 分鐘後去除上清液並將細胞拍散，再加入10 ml 的PBS 然後以無菌之濾網使其通過，然後以細胞計數盤計算脾臟細胞數。最後將脾臟細胞以RPMI 1640 (含有10 % FBS (fetal bovine serum)、2 mM L-glutamine、100 U/ml penicillin、100 U/ml streptomycin)進行細胞培養，最後使細胞濃度為 5×10^6 cells/ml來進行下列實驗。

■ Con A、LPS或OVA之共同培養

分別以2 μ g/ml Con A (Concanavalin A, Sigma-Aldrich, Inc.)或LPS(lipopolysaccharide, Sigma-Aldrich, Inc.)、100 μ g/ml BSA(bovine serum albumin, Sigma-Aldrich, Inc.)或100 μ g/ml OVA刺激，將細胞置於5 % CO₂，37°C 的培養箱培養，以Con A、LPS或OVA培養6 天後收集細胞培養液，以1500rpm 離心10 分鐘取上清液，置於-80°C 冰櫃中備用，另將剩餘之細胞進行RNA之萃取，並經由PCR分析細胞RNA層級之表現結果。此部分結果將與肺臟組織之RNA層級測定結果共同比較。

脾臟細胞與ConA、LPS或OVA共同培養之設計原由，Con A的刺激後能使得T細胞產生增生之現象，而LPS的刺激則會使得B細胞之產生，且B細胞對於抗原挑戰時所引起之反應會使其產生IgE，進而誘發出更多Th2細胞激素之產生，因此藉由此實驗方式所得到之上清液進行各種細胞激素之檢測可作為探討Th1/Th2細胞於致敏小鼠脾臟表象狀況之依據，然而藉由脾臟細胞之記憶作用當脾臟細胞再次受到OVA之刺激後，是否會與動物實驗時期具有相同的免疫反應狀況也是一值得分析之重點。

此一階段實驗將分為以下各組：

1. 未經致敏小鼠/致敏之脾臟細胞-共同培養ConA、LPS以及OVA。
2. 未經致敏小鼠/致敏之脾臟細胞-於進行ConA、LPS以及OVA培養前，先給予FIP-fve刺激。
3. 未經致敏小鼠/致敏之脾臟細胞-於進行ConA、LPS以及OVA培養後，在給予FIP-fve刺激。

將小鼠脾臟細胞分組培養後，並作後續細胞激素以及抽取RNA進行PCR分析，以進一步了解FIP-fve在分子機制上的影響。

■ 脾臟細胞上清液之細胞激素測定

將取得之脾臟細胞上清液，依照廠商提供之各種細胞激素檢測方式進行ELISA測定，所測定之細胞激素與BALF和血清相同共有十項分別是IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17、IL-22、TGF-

β 及 INF- γ 。於測定後將此部分結果與BALF、血清所得之結果進行分析比較。

■ 培養後脾臟細胞-PCR分析

將培養液去除後，加入1 ml Tri Reagent 於培養盤中，並將細胞反覆抽吸沖散隨後收集至1.5 ml 離心管，室溫下靜置十分鐘，加入200 μ l 的Chloroform，以均質震盪機震盪數十秒後，室溫下靜置十五分鐘後，以4°C，12,000 rpm 離心15分鐘。將上清液移至新離心管中，加入500 μ l 的isopropanol，充分混合後於室溫下靜置十五分鐘，再以4°C，12,000 rpm 離心15分鐘。此時可見白色沉澱物於離心管底部。去除液體部分，留下離心沉澱物，加入預冷的75% ethanol 500 μ l，再離心5分鐘，去除ethanol 並室溫空氣乾燥後，加入去RNase 水溶解沉澱物，於-80°C 儲存備用。

將進行ConA、LPS與OVA共同培養後，其上層液收集作cytokine分析，脾臟細胞取出並抽取其RNA進行PCR分析，並與致敏小鼠肺部組織所得之PCR結果進行探討與比較，以進一步RNA層級中脾臟細胞與肺部組織間之差異。

■ 培養後脾臟細胞-流式細胞儀之Foxp3細胞鑑定

將培養後之脾臟細胞進行Foxp3細胞染色，並透過流式細胞儀來進行Foxp3細胞測定，於此細胞染色中，亦會染上CD4/CD8/CD25，已進行更正確之鑑定。

此階段之研究結果，將與經未培養之脾臟細胞Foxp3細胞鑑定結果進行比較，以分析兩者間之改變與差異。

統計分析

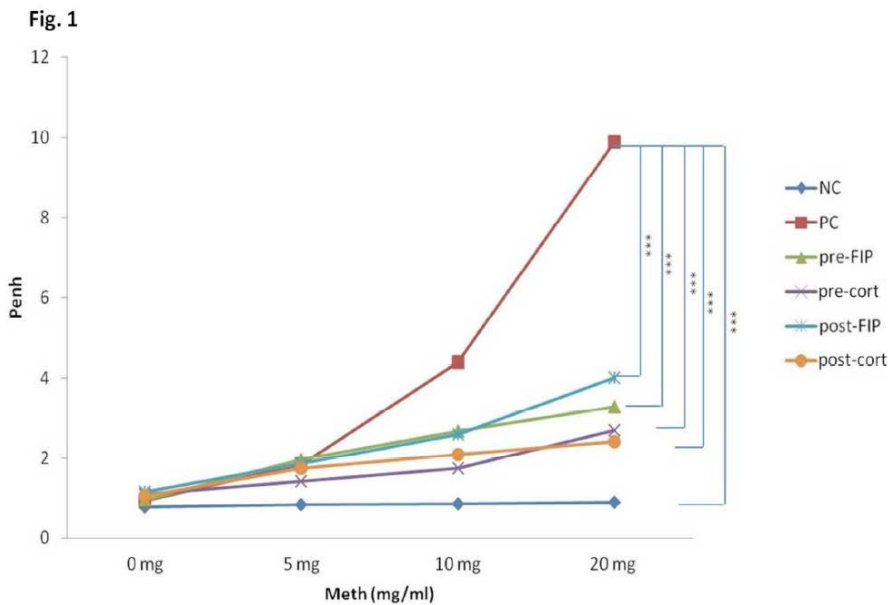
所有數據皆以軟體 SPSS 進行數據分析，數據皆以 mean \pm SE 呈現，統計則以 Mann-Whitney test 做為是否具有顯著差異 ($p < 0.05$) 的依據。

結果

FIP-fve 對氣喘小鼠體內微環境之作用 此階段共有五部分之結果，分別為呼吸過度反應(AHR)部份、血清 IgE/IgG2a 測試、細胞計數(BALF)、細胞激素測試以及病理切片部份之結果，其結果如下：

FIP-fve or corticosteroid affected AHR

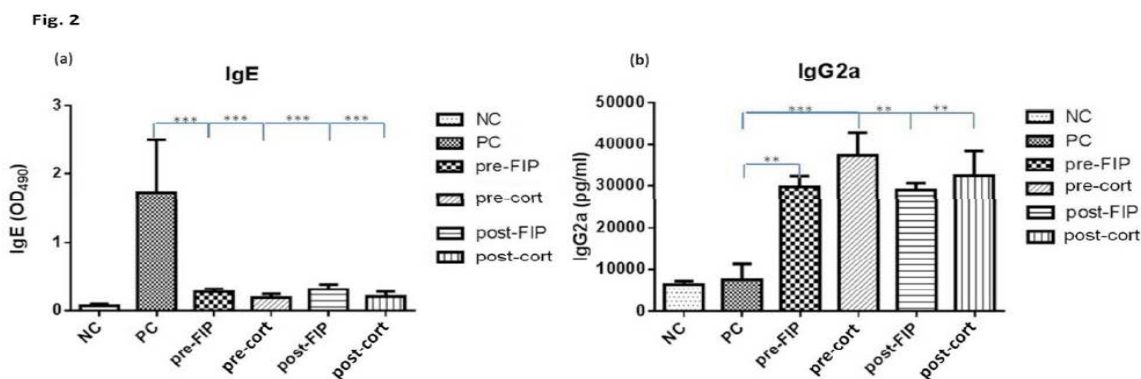
在AHR部分的結果，單純以OVA 致敏的PC 組其Penh 值曲線明顯的升高(Fig. 1)，PC 組與NC組相比，PC 組有明顯增加呼吸道過度反應的現象且達統計上顯著意義($p \leq 0.01$)。在實驗進程pre 或post (給予 *FIP-fve* 或 corticosteroid)給予口服藥物之致敏鼠其Penh值相於OVA 致敏組，在methacholine 濃度為20 mg/ml 時有明顯降低其Penh 值得現象且亦達到統計上顯著意義($p \leq 0.01$)。



The female BALB/c mice received normal saline (normal control group) or were sensitized/challenged with OVA \pm treatment with *FIP-fve* or a corticosteroid during the challenge phase. The airway hyperactivity (AHR) to methacholine was assessed with the Buxco system to record enhanced pauses (Penh). The Penh value in the PC (■) group was higher than the other groups. However, in the oral pre- and post-*FIP-fve* (▲, *) and pre- and post-corticosteroid (×, ●) groups the penh values were significantly decreased. The NC (◆) group was lower than all other groups.

FIP-*fve* or corticosteroid treatment on the reversal of allergen-induced serum ovalbumin-specific antibodies in serum

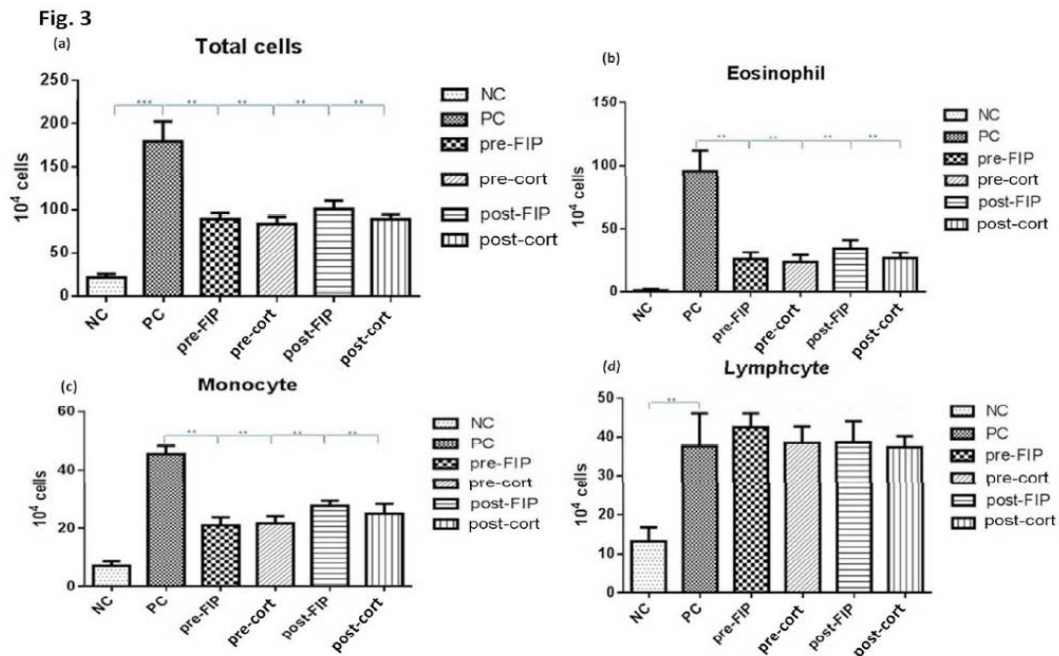
在小鼠犧牲同時採集其血液病分離出血清後，利用ELISA 來偵測血清中OVA-specific IgE (Fig.2a)、IgG2a (Fig.2b)的濃度。在這部分的結果中發現PC組、pre 組和post 組的血清中在OVA-specific IgE 方面，pre-FIP, pre-cort 與post-FIP, post-cort 相較於OVA 致敏組OVA-specific IgE 皆有明顯減少且達統計上顯著差異($p \leq 0.001$)。另外在OVA-specific IgG2a 方面，其結果亦與急性期相同pre-FIP 與post-FIP 組於血清中都有較高之OVA-specific IgG2a 含量。



Serums in OVA-specific-IgE and OVA-specific-IgG2a concentrations were obtained from the NC group and the OVA sensitized/challenged mice (PC) or mice treated with FIP-*fve* and a corticosteroid. Fig. 2(a) There was significant expression of OVA-specific-IgE in the PC group, and a decrease in the pre- and post- treated with FIP-*fve* and corticosteroid groups. Fig. 2(b) the OVA-specific-IgG2a expression in serum, the groups treated with FIP-*fve* and a corticosteroid had significant increases. The statistical analysis compared OVA-treated mice and is represented as: ** $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

FIP-*fve* or corticosteroid treatment affected infiltrating cells of the lungs

在細胞數方面在PC 組的部分其total cell量(圖3a)相較於各組皆有顯著增加的現象，即表示其呼吸道具大量的細胞浸潤。而在pre 與post 的四組，無論是在total cell、eosinophil與monocyte相較於PC組皆有顯著減少的狀況，且達統計上的顯著差異。



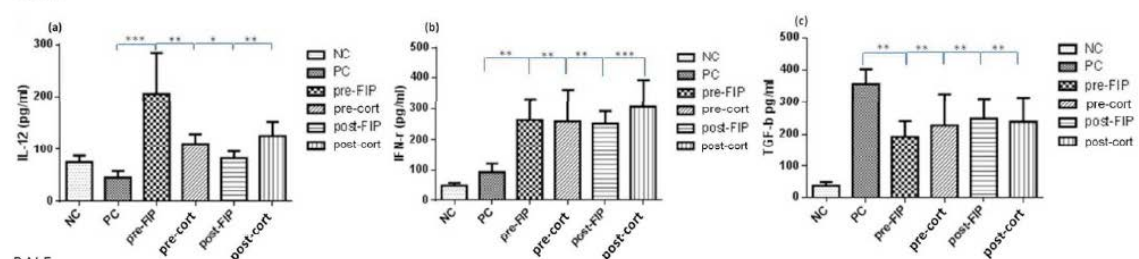
All cells counts were obtained from the NC group and the OVA sensitized/challenged mice (PC) or mice treated with FIP-*fve* and a corticosteroid. The total cells and inflammatory cells were counted ($\times 10^4$) from the BALF in millimeters by morphometric evaluations of cytopsin preparations. In the total cell count in the BALF, a large number of cells were expressed in the BALF of the PC group. However, the total cells in the BALF of groups treated with FIP-*fve* and a corticosteroid were decreased. The eosinophil is the hallmark of asthma; in the PC group the eosinophils significantly increased compared to groups treated with FIP-*fve* and a corticosteroid. The statistical analysis compared OVA-treated mice and is represented as: ** $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

FIP-*fve* or corticosteroid treatment affected cytokines in serum or BALF (Th1)

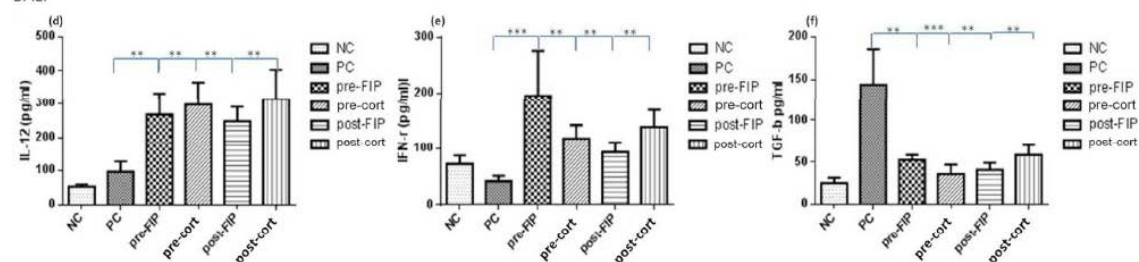
利用ELISA 來測定血清及肺泡沖洗液(圖4)中由Th1 與Treg 細胞所分泌的細胞激素IFN- γ 和TGF- β 的表現量，在TGF- β 部份其無論是在血清部分亦或是BALF 中所得的結果皆可以明顯的看到PC 組所產生的量是明顯高於NC 組 ($p \leq 0.001$)，而其它給予口服各種藥物之致敏鼠，無論是pre 或post之實驗進程給藥，其各組血清與BALF 中所含有之TGF- β 相較於PC 組皆有顯著減少 ($p \leq 0.001$)。而在IL-12與IFN- γ 部份其無論是在血清部分亦或是BALF 中所得的結果皆可以明顯的看到PC 組所產生的量是明顯低於NC 組 ($p > 0.001$)，而其它給予口服各種藥物之致敏鼠，無論是pre 或post 之實驗進程給藥，其各組血清與BALF 中所含有之IFN- γ 相較於PC 組皆有顯著的增加 ($p \leq 0.001$)，且給予FIP-*fve*組相較於corticosteroid似乎也有更高的表現量。

Fig. 4

Serum



BALF

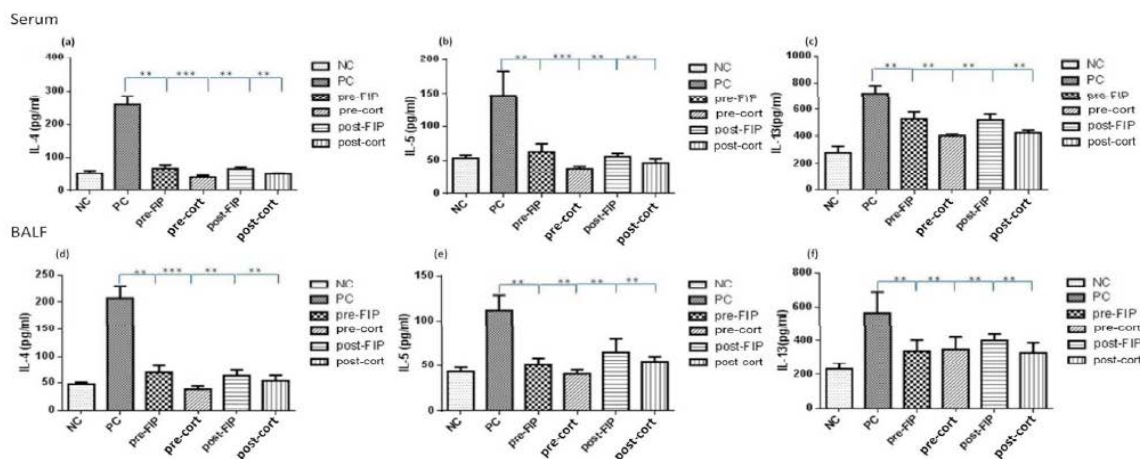


Th1 and Treg cytokine concentrations in the serum and BALF were obtained from the NC group and OVA sensitized/challenged mice (PC) or the mice treated with FIP-*fve* and a corticosteroid. Fig. 4(a-c) the Th1 (IL-12, IFN- γ) and Treg (TGF- β) cytokines detected in the serum, and Fig. 4(d-f) the Th1 and Treg cytokines detected in the BALF. The Th1 cytokines in the serum and BALF were significantly increased in the groups treated with FIP-*fve* and a corticosteroid compared with the PC group. However, in the oral FIP-*fve* and corticosteroid groups the Treg cytokine in the serum and BALF was decreased compared with the PC group. The statistical analysis compared OVA-treated mice and is represented as: ** $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

FIP-*fve* or corticosteroid treatment affected cytokines in serum or BALF (Th2)

利用ELISA 來測定血清及肺泡沖洗液(圖5)中由Th2 細胞所分泌的細胞激素IL-4、IL-5、IL-13的表現量。無論是在血清部分亦或是BALF 中所得的結果都可以明顯的看到PC 組所產生之各種Th2 細胞激素相較於其他各組都是明顯增高的($p \leq 0.001$),而其它給予口服各種藥物之致敏鼠,無論是pre 或 post 之實驗進程給予FIP-*fve*或corticosteroid,其各組血清與BALF 中所含有之Th2 細胞激素相較於PC 組皆有顯著減少 ($p \leq 0.001$)。

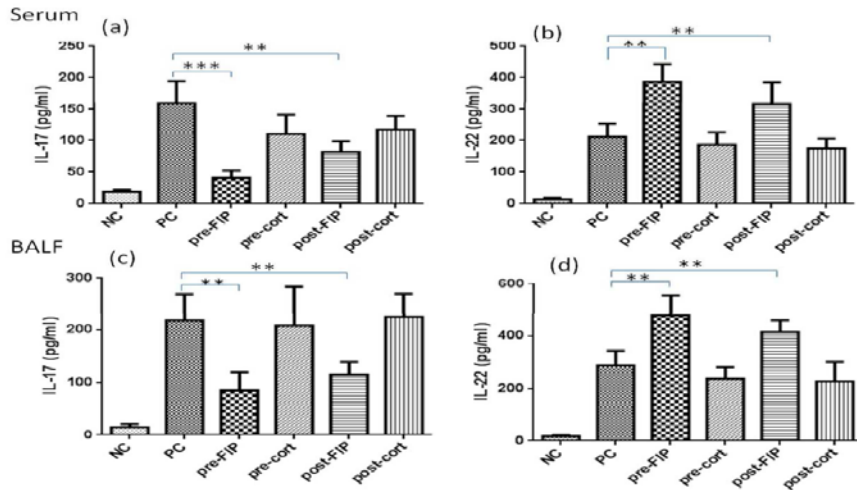
Fig. 5



Th2 cytokine concentrations in the serum and BALF were obtained from the NC group and OVA sensitized/challenged mice (PC) or the mice treated with FIP-*fve* and a corticosteroid. Fig. 5(a) the Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) cytokines detected in the serum, and Fig. 5(b) detected in the BALF. The Th2 cytokines in the serum and BALF in groups treated with FIP-*fve* and a corticosteroid were significantly decreased compared with the PC group. The statistical analysis compared OVA-treated mice and is represented as: ** $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

FIP-*fve* or corticosteroid treatment affected cytokines in serum or BALF (IL17/IL22)

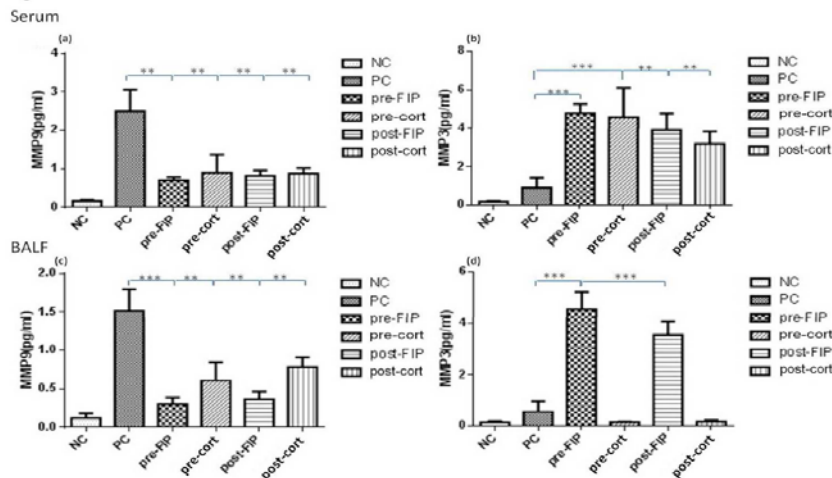
利用ELISA 來測定血清及肺泡沖洗液(圖6)中由Th17 細胞與Th22細胞所分泌的細胞激素IL-17與IL-22的表現量。根據結果可以發現PC組於IL-17的表現量是高於其他組別,而在IL-22的表現量則是有減少的現象。而給予FIP-*fve*或corticosteroid藥物的頭與後發現,給予FIP-*fve*的組別其IL-17的表現量會下降($p \leq 0.001$)且IL-22會有上升的趨勢($p \leq 0.001$),但給予corticosteroid的組別則無這樣的差異性存在。

Fig. 6

Serum was obtained on day 76 from the normal control group and the OVA-sensitized mice in the absence of the pre-/post-FIP or pre-/post-cort, which was detected with **ELISA**. The PC group showed less IL-22 expression in the serum. However, groups treated orally with FIP had significantly increased IL-22 expression compared with the PC group. The PC group showed more IL-17 expression in the serum. However, groups treated orally with FIP had significantly decreased IL-17 expression compared with the PC group. The statistical analyses compared OVA-treated mice and are represented as: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

FIP-fve or corticosteroid treatment affected MMP9 and MMP3 in serum or BALF

利用ELISA 來測定血清及肺泡沖洗液(圖7)中MMP9與MMP3的表現量。根據先前研究指出，呼吸道重塑現象與MMP9的表現量有高度相關性，而根據結果亦可以發現PC組的MMP9表現相較於其他各組有相當高表現量，而給予藥物後的各組其MMP9則皆有顯著下降($p \leq 0.001$)。另外在MMP3的部份，給予FIP-fve的組別在BALF的表現中有顯著的上升，其他組別則無此現象。

Fig. 7

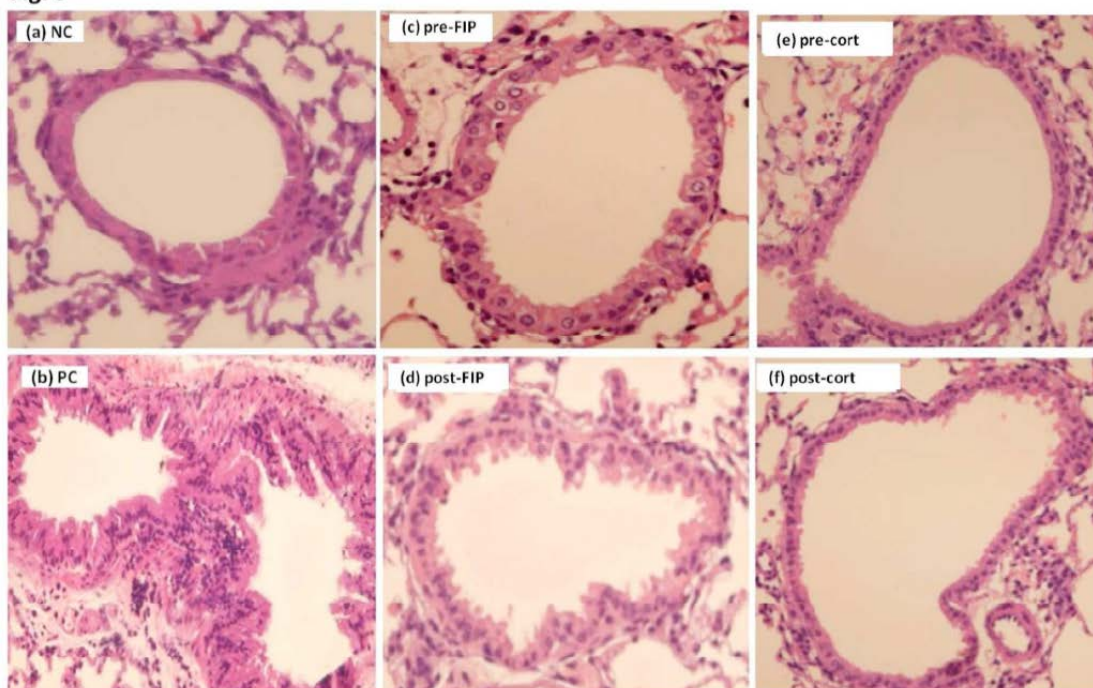
The concentrations of MMP9 and MMP3 in the serum and BALF were obtained from the NC group and OVA

sensitized/challenged mice (PC) in the absence or presence of FIP-*fve* and a corticosteroid. Fig. 7(a, b) the MMP9 and MMP3 detected in the serum and Fig. 7(c, d) in BALF. The MMP9 levels in the serum and BALF of groups treated with FIP-*fve* and a corticosteroid were significantly decreased compared with the PC group. Moreover, the MMP3 levels in the groups treated orally with FIP-*fve* and a corticosteroid were significantly increased in the serum and only oral FIP-*fve* increased significantly in BALF. The statistical analysis compared OVA-treated mice and is represented as: ** $p < 0.05$; *** $p < 0.001$.

FIP-fve or corticosteroid treatment affected lung inflammation

根據這部份小鼠肺臟病理切片(圖8)的結果顯示，圖8a 為NC 組，即所有用藥皆以生理食鹽水代替，圖8b 的部份為PC 組，圖8c 為pre-*fve* 組，圖8e則為pre-cort組，圖8d為post-FIP-*fve*與8f為post-cort。pre與post 給予各種藥物之致敏小鼠其呼吸道發炎的現象相較於PC 組皆有較輕微的現象產生；而這部份

Fig. 8



的結果與氣道阻力(AHR)所獲得的結果相符，此部份結果與急性期結果是相同的。

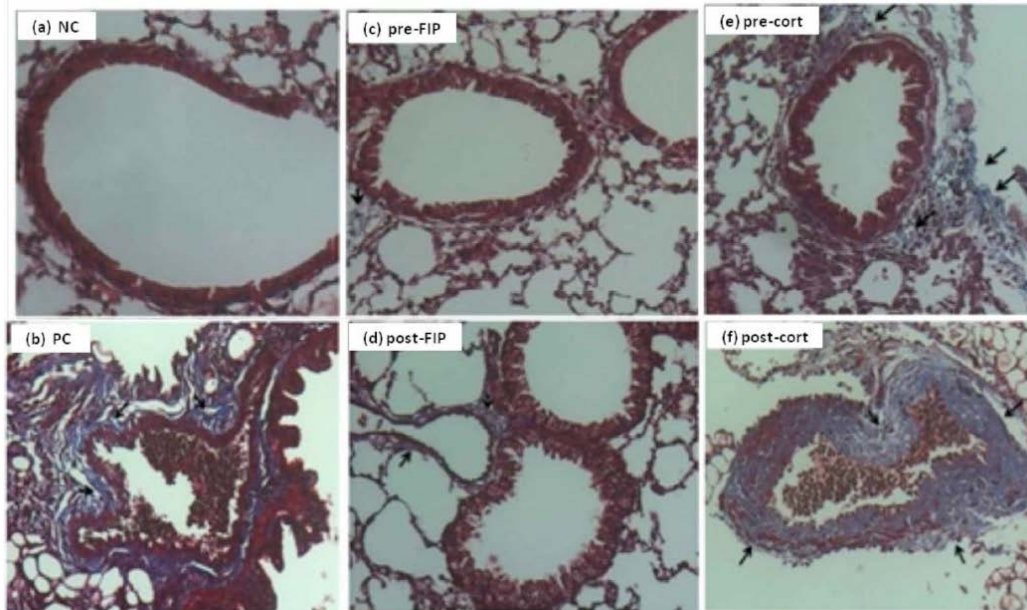
Lung tissue samples were obtained on day 76 to determine airway inflammation. Fig. 8(a) the NC group 8(b) the OVA sensitized/challenged mice (PC), 8(c) and 8(e) the groups pre-treated with FIP-*fve* or a corticosteroid respectively 8(d) and 8(f) the groups post-treated with a corticosteroid or FIP-*fve* which were stained with **hematoxylin and eosin**. The PC group showed severe inflammation in the airway. However, groups treated orally with FIP-*fve* and a corticosteroid had significantly decreased airway inflammation compared with the

PC group.

FIP-fve treatment affected collagen precipitation in lung tissue

根據這部份小鼠肺臟病理切片(圖9)的結果顯示是以**Masson's trichrome**進行染色所獲得。圖9a 為NC組，圖9b 的部份為PC 組，圖9c 為pre-fve 組，圖9e則為pre-cort組，圖9d為post-FIP-fve與9f為post-cort。在PC組部分其膠原蛋白的沉澱是非常嚴重(藍色)，而給予FIP-fve組在這部分皆有顯著的改善，但給予corticosteroid 組，不論是何時給藥膠原蛋白沉澱現象皆未有改善的效果。

Fig. 9



Lung tissues for detection of airway remodeling and collagen precipitation were obtained on day 76. Fig. 9(a) the NC group 9(b) the OVA sensitized/challenged mice (PC), 9(c) and 9(e), the groups pre-treated with FIP-fve or a corticosteroid respectively. 9(d) and 9(f) the groups post-treated with a corticosteroid or FIP-fve which were stained with **Masson's trichrome**. The PC group showed more collagen precipitation in the airway. However, groups treated orally with FIP-fve and a corticosteroid showed significantly less collagen compared with the PC group. The NC group also showed less collagen in the airway.

結論與討論

氣喘是一種複雜的慢性呼吸道發炎疾病，在現今的社會裏其盛行率更不斷的向上攀升(2, 3)，然而目前臨床上有許多針對氣喘疾病的治療藥物如吸入性類固醇(corticosteroids)、 β 2型交感神經興奮劑(β 2-agonist)、茶鹼(theophylline)和白三烯素拮抗劑 (leukotriene antagonists)等。其中以吸入性類固醇為最有效控制氣喘及改善肺功能的方法，但這些藥物不論是單獨使用或合併其他治療，除了具有副作用外，也常無法達到將疾病根治的效果(23)。另外，導致氣喘疾病的原因目前主要被認同的原因是免疫機致不平衡所致(23, 24)，氣喘疾病的病理變化上主要有肺部嗜伊紅性白血球的浸潤、黏膜水腫、黏液的過度分泌以及呼吸道的過度反應且在長期氣喘的狀態下，呼吸道會產生杯狀細胞、平滑肌肉組織、血管等增生的呼吸道重塑現象，因而增加控制氣喘的困難度(25, 26)。

根據先前的研究(26)指出過敏原的暴露可能會使得Th1/Th2免疫機制的平衡發展有所改變且免疫系統可能會趨向Th2反應，而臨床上Th1/Th2失衡可能會產生過敏或氣喘等症狀。研究中指出(26)Th1和Th2分化前是來自於同樣的先驅T細胞，其皆來自於naive CD4 T淋巴細胞，隨著環境的刺激後分化成Th1或Th2細胞。Th2細胞的分化可能是因為環境過敏原或微生物刺激了原本已存在的IL-4而使得naive Th細胞朝向Th2發展，被活化的Th2細胞會產生interleukin(IL) -4、IL-5、IL-13，而伴隨而來的反應是促使B細胞產生IgE、嗜伊紅性白血球的活化以及黏液的產生(27, 28)。此外當naive Th細胞受到IL-12刺激後便會朝向Th1的方向發展，而被活化的Th1細胞則會分泌出IFN- γ 。

現今的研究亦發現Th2的細胞激素可能為誘導過敏或氣喘疾病發生的重要因子，這些細胞激素有IL-4、IL-13、及IL-5。另外，在Th1細胞激素中的IFN- γ 被發現其會與Th2細胞激素共存，特別是在慢性過敏性發炎上，然而Th2反應提高所造成的免疫反應結果可能是由於Th1細胞免疫反應受到抑制，但這方面的免疫反應仍須有進一步的研究證實。

近幾年來兒童過敏性疾病的盛行率日漸增加且特別是在工業化國家(29-32)，而為了改善這樣的現象可能需要減少兒童對於過敏原的暴露以及更好的感染控制以減少過敏性疾病的發生(33-37)。根據研究(26)亦指出減少微生物的暴露可以減低T細胞朝向Th2細胞的發展，但微生物的暴露是否為主要造成T細胞朝向Th2細胞發展的主因仍須進一步研究。在過敏性發炎中會產生Th2細胞激素其包含IL-4、IL-13和IL-5且伴隨而來的反應則有嗜伊紅性白血球的活化以及IgE的產生，而Th1細胞中所分泌之IFN- γ 被認為可以調節Th2細胞之免疫反應，且IFN- γ 不僅可以抑制Th2細胞產生的IL-4而且還可以抑制IL-4對B細胞的作用，特別是在抑制B細胞產生IgE的部分。

在國人及日本人的日常飲食中金針菇是一種常見的食品，且近年來研究顯示藉由金針菇所萃取出來的免疫調節蛋白對於人類週邊淋巴球細胞及小鼠皮臟細胞有刺激增殖活性，並可誘發增強免疫細胞中的細胞激素增生如IL-2與IFN- γ ，且可減少發炎時的水腫現象(38)。因此，本研究利用雞卵蛋白(OVA)所誘發的小鼠氣喘模型來研究金針菇萃取物(FIP-*five*)，是否能藉由其增強細胞激素的能效來逆轉免疫調控不平衡的動物氣喘模式並期待能達到預防或治療的目的。

根據研究結果顯示，相較於單純接受OVA致敏之小鼠而言，口服FIP-*five*能有效減緩致敏小鼠之呼吸道過度反應的現象，且不論是於實驗進程的前或後給予口服FIP-*five*之致敏小鼠，其皆能有效降低致敏小鼠之呼吸道過度反應的現象。另外，在肺部組織病理切片的部份，根據研究結果亦能發現有給予口服FIP-*five*之致敏小鼠，其支氣管壁發炎現象有獲得明顯的改善，而這樣的結果也與先前研究指出FIP-*five*可以減少發炎反應的表現一致(12)，根據上述FIP-*five*除了能降低呼吸道過度反應的現象外亦能達到減緩支氣管發炎的狀態，因此在未來治療氣喘的發展上FIP-*five*可望能用做有效治療氣喘的天然藥物。而在FIP-*five*對細胞浸潤的影響從細胞計數的結果可發現口服FIP-*five*之致敏小鼠其細胞浸潤的現象也有明顯減少，特別是在嗜伊紅性白血球的部份，另外，口服FIP-*five*亦能使浸潤於肺部之總細胞量有明顯減少的現象，其可能是透過IL-5造成嗜伊紅性白血球的凋亡(39)而減少了其在肺部中的浸潤現象。在細胞激素方面，根據先前的研究指出FIP-*five*具有使IFN- γ 增加的效果(38)，而這在本研究中也發現有給予口服FIP-*five*之致敏小鼠中，其細胞激素中的IFN- γ 含量亦有增加的現象，而在單純給予OVA致敏的小鼠中其IFN- γ 的含量則是相當的低，這樣的結果也與臨床上之氣喘病人具有較低含量的IFN- γ 相符(40, 41)，此外根據其他相關之研究結果(42-45)也顯示IFN- γ 的增加是可以抑制Th2細胞激素的分泌以使之降低呼吸道發炎等現象。另外，在IL-4的部分，口服FIP-*five*亦能有效的降低IL-4在血清及BALF中的含量，但對於單純給予OVA的致敏小鼠而言其IL-4在血清及BALF中的含量是較高的，而這在先前的研究中亦有提到氣喘產生與較高的IL-4含量是有相關的，因為IL-4可以結合到B細胞上的受器，促進B細胞產生IgE (3)，所以可能是因為口服FIP-*five*減少了IL-4的產生而使得的呼吸道過度反應及呼吸道發炎程度降低。而在TGF- β 的部分，根據先前研究指TGF- β 對於呼吸道過度反應以及氣喘狀態具有負回饋的作用，意即在產生呼吸道過度反應及氣喘的狀態下TGF- β 也會伴隨著產生然而當TGF- β 的含量過多時便會對於過敏發炎相關的細胞產生抑制生長的現象(13)，而在本研究中我們發現口服FIP-*five*小鼠血清中的TGF- β 濃度有明顯增加現象，而服用FIP-*five*的致敏小鼠亦有明顯減低致敏發炎症狀，因此我們亦認為TGF- β 在呼吸道過度反應現象以及氣喘疾病上扮演著重要角色。

此外，根據研究結果亦發現，給予口服FIP-*fve*的小鼠，其IL-17與IL-22細胞激素的表現量已有顯著改驗，亦即給予FIP-*fve*之致敏其IL-17皆有顯著下降且IL-22則有明顯上升之現象，而根據先前研究指出，IL-17與IL-22的表現量與呼吸道重塑具有相關性，因此口服FIP-*fve*是否是藉由調控IL-17與IL-22而減緩呼吸道重塑現象，這部分則需再進一步的研究來釐清與證實。

在血清部分的結果，根據OVA-specific antibodies的檢測顯示，單純給予OVA致敏的小鼠中其IgE的含量是相當高的，而這也與臨床上氣喘病人之血清中具有的高IgE含量的特徵是一致的(4)，而我們也能發現到有給予口服FIP-*fve*之致敏小鼠其血清中之IgE含量則有明顯減少的現象，且根據先前的研究中(3)指出細胞激素中的IFN- γ 可以抑制Th2細胞的分化及IgE的合成，且在臨床上被診斷有氣喘疾病的病患亦有較低的IFN- γ 表現量(33,45)，因此本篇研究的結果口服FIP-*fve*所產生較高的IFN- γ 是可能具有抑制IgE產生的療效，而在IgG2a部分口服FIP-*fve*無論是前或後給予都能使得血清中的IgG2a表現量有明顯的升高。另外，先前研究亦提到口服FIP-*fve*能夠有效的抑制血清中IgE含量的產生(45)，而本研究的結果也於先前研究相符；此外有研究更進一步探討FIP-*fve*對於T細胞分子調控機制上的影響，FIP-*fve*此蛋白可以藉由口服方式來服用且保持其活性但其他蛋白質藥物無法如此使用，也因此使得FIP-*fve*可以刺激體內免疫反應的活化，但其更進一步的詳細機制仍需要深入研究。

根據本篇的結果顯示，給予口服FIP-*fve*之致敏小鼠能有效的達到減緩致敏的症狀，且無論是在呼吸道過度反應、支氣管發炎現象，或血清中IgE含量等現象，皆能達到減緩或抑制的效果，然而這樣的結果也與先前針對FIP-*fve*所做的研究中得知其具有抗發炎及促使細胞激素IFN- γ 含量增生的結果相同，但針對FIP-*fve*對於免疫細胞的分子作用機制目前仍未達徹底的了解，因此尚須再進一步的深入研究，且針對FIP-*fve*對於預防氣喘或其他過敏性疾病之最佳劑量及其完整療效或可能發生之安全性上之問題亦須做進一步的研究與證明而這部分也將作為日後的研究方向。

參考文獻

1. Reid G, Sanders ME, Gaskins HR, Gibson GR, Mercenier A, Rastall R, Roberfroid M, Rowland I, Cherbut C, Klaenhammer TR. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *J Clin Gastroenterol* 2003;37:105–118.
2. Perdigon G, Alvarez S, Rachid M, Agüero G, Gobbato N. Immune system stimulation by probiotics. *J Dairy Sci* 1995;78:1597–1606
3. Trorii A, Torii S, Fjiwara S, Tanaka H, Inagaki N, Nagai H. *Lactobacillus acidophilus* strain L-92 regulates the production of Th1 cytokines as well as Th2 cytokines, *Allergy International*, 2005, 56:3, 293-301.
4. Wu WF; Wan KS; Wang SJ; Yang W; Liu WL., Prevalence, severity, and time trends of allergic conditions in 6-to-7-year-old schoolchildren in Taipei. *J Invest Allergol Clin Immunol*. **2011**, 21, 556-62.
5. Von der Weid T, Ibnou-Zekri N, Pfeifer A. Novel probiotics for the management of allergic inflammation. *Digestive and Liver Disease* 2002, 34(2), S25-S28.
6. Peng GC, Hsu CH. The efficacy and safety of heat-killed *Lactobacillus paracasei* for treatment of perennial allergic rhinitis induced by house-dust mite. *Pediatr Allergy Immunol* 2005;16: 433–438.
7. Wang MF, Lin HC, Wang YY, Hsu CH. Treatment of perennial allergic rhinitis with lactic acid bacteria. *Pediatr Allergy Immunol* 2004;15:152–158.
8. Tamura M, Shikina T, Morihana T, Hayama M, Kajimoto O, Sakamoto A, Kajimoto Y, Watanabe O, Nonaka C, Shida K, Nanno M. Effects of probiotics on allergic rhinitis induced by Japanese Cedar pollen: randomized double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;143:75–82.
9. Forecasted state-specific estimates of self-reported asthma prevalence--United States, 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 1998;47(47):1022-5
10. Beasley R, Crane J, Lai CK, Pearce N. Prevalence and etiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 ;105(2 Pt 2):S466-72.
11. von Mutius E. The environmental predictors of allergic disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 ;105(1 Pt 1):9-19
12. Ko JL, Hsu CI, Lin RH, Kao CL, Lin JY. A new fungal immunomodulatory protein, FIP-fve isolated from

- the edible mushroom, *Flammulina velutipes* and its complete amino acid sequence. *Eur J Biochem.* 1995; 228(2):244-9.
13. Lee YT, Lee SS, Sun HL, Lu KH, Ku MS, Sheu JN, Ko JL, Lue KH., Effect of the fungal immunomodulatory protein FIP-fve on airway inflammation and cytokine production in mouse asthma model. *Cytokine.* 2013; 61(1): 237-44.
14. Pauwels R. The relationship between airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness. *Clin Exp Allergy.* 1989;19:395-8.
15. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma: from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1720-45
16. Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;105:651-63
17. Kotimbo, T. C., P. Ernst, and Q. A. Hamid. Interleukin-13 and interleukin-4 are coexpressed in atopic asthma. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 1996; 108:368
18. Ying, S., M. Humbert, J. Barkans, C. J. Corrigan, R. Pfister, G. Menz, M. Larche, D. S. Robinson, S. R. Durham, and A. B. Kay. Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4⁺ and CD8⁺ T cells, eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics. *J. Immunol.* 1997; 158:3539.
19. Krug, N., J. Madden, A. E. Redington, P. Lackie, R. Djukanovic, U. Schauer, S. T. Halgate, A. J. Frew, and P. H. Howarth. T-cell cytokine profile evaluated at the single cells level in BAL and blood in allergic asthma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1996; 14:319.
20. Azhar Shaida FRCS, Guy Kenyon MD, Jagdish Devalia PhD, Robert J. Davies MD, Thomas T. MacDonald PhD, FRCPath and Sylvia L. F. Pender PhD : Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the nasal mucosa of patients with perennial allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:791-6.
21. Kelly EA, Jarjour NN. Role of matrix metalloproteinases in asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 2003 ;9:28-33.
22. Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:S28-S38.
23. Barnes, P.J. et al Drugs for asthma. *Br J Pharmacol* 2006; 147 Suppl : S297-303.
24. Robinson DS. Th-2 cytokines in allergic disease. *Br Med Bull.* 2000;56(4): 956-968.

25. 29. Ulrik CS. Outcome of asthma: longitudinal changes in lung function. *Eur Respir J*. Apr 1999; 13 (4):904-918.
26. 30. Busse WW, Lemanske RF, Jr. Asthma. *N Engl J Med*. Feb 1 2001; 344(5): 350-362.
27. 31. Ly P, Ngoc, Diane R. Gold, Arthur O. Tzianabos, Scott T. Weiss, Juan C. Celedon. Cytokines, allergy, and asthma. *Allergy and Clinical Immunology* 2005; 5:161–166
28. 32. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994;12:227–257
29. 33. Akdis CA, Blaser K, Akdis M. Genes of tolerance. *Allergy* 2004; 59:897–913
30. 34. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *Lancet* 1998; 351:1225–1232.
31. 35. Aberg N, Hesselmar B, Aberg B, Eriksson B. Increase of asthma, allergic rhinitis and eczema in Swedish schoolchildren between 1979 and 1991. *Clin Exp Allergy* 1995; 25:815–819.
32. 36. Celedon JC, Soto-Quiros ME, Hanson LA, Weiss ST. The relationship among markers of allergy, asthma, allergic rhinitis, and eczema in Costa Rica. *Pediatr Allergy Immunol* 2002; 13:91–97.
33. 37. Ninan TK, Russell G. Respiratory symptoms and atopy in Aberdeen schoolchildren: evidence from two surveys 25 years apart. *BMJ* 1992; 304:873–875.
34. 38. Braun-Fahrlander C, Gassner M, Grize L, et al. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:28–34.
35. 39. Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999; 354:541–545.
36. 40. Sepp E, Julge K, Vasar M, et al. Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants. *Acta Paediatr* 1997; 86:956–961.
37. 41. Ernst P, Cormier Y. Relative scarcity of asthma and atopy among rural adolescents raised on a farm. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1563–1566.
38. 42. 許瓊瑛. 真菌類免疫調節蛋白之研究，國立台灣大學醫學院醫事技術研究所碩士論文。1996
39. 43. Hsieh CW, Lan JLi, Meng Q, Cheng YW, Huang HM, Tsai JJ. Eosinophil Apoptosis Induced by Fungal Immunomodulatory Peptide-fve via Reducing IL-5a Receptor J *Formos Med Assoc* 2007; 106; No 1 44. obinson DS.

Th-2 cytokines in allergic disease. *Br Med Bull.* 2000;56(4): 956-968.

40. 45. Flaishon L, Topilski I, Shoseyov D, et al. Cutting edge: anti-inflammatory properties of low levels of IFN-gamma. *J Immunol.* Apr 15 2002;168(8): 3707-3711.
41. 46. Zhao LL., A. Linden, et al. IL-12 regulates bone marrow eosinophilia and airway eotaxin levels induced by airway allergen exposure. *Allergy* 2000; 55(8): 749-56.
42. 47. Lee YL., Fu CL., et al. Administration of interleukin-12 prevents mite Der p 1 allergen-IgE antibody production and airway eosinophil infiltration in an animal model of airway inflammation. *Scand J Immunol* 1999 ;49(3): 229-36.
43. 48.49. Flaishon L, Topilski I, Shoseyov D, et al. Cutting edge: anti-inflammatory properties of low levels of IFN-gamma. *J Immunol.* Apr 15 2002;168(8): 3707-3711.
44. 50. Akpinarli A, Guc D, Kalayci O, Yigitbas E, Ozon A. Increased interleukin-4 and decreased interferon gamma production in children with asthma: function of atopy or asthma? *J Asthma.* Apr 2002;39(2):159-165
45. Hsieh K.Y., Hsuw C.I., Linw J.Y., Tsaiz C.C., Lin R.H. Oral administration of an edible-mushroom-derived protein inhibits the development of food-allergic reactions in mice. *Clinical and Experimental Allergy.* July 2003; 33:1595–1602.

科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

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（簡要敘述成果是否有嚴重損及公共利益之發現）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：

- 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 100 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），如已有嚴重損及公共利益之發現，請簡述可能損及之相關程度（以 500 字為限）

1. 金針菇在台灣是相當普遍且便宜的食用菇類，而由其萃取出之純化免疫調節蛋白，使用在氣喘氣道重塑的動物實驗上，若有治療或輔助治療以達到回復正常組織的功効的話，則對於氣喘治療上又多了一樣選擇，對於國產食品的推廣以及日後大規模的人體試驗會很有幫助。

2. 藉由此氣喘動物模式建立，可以提供將來更多的相關實驗進行。

科技部補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2015/10/21

科技部補助計畫	計畫名稱: 金針菇免疫調節蛋白FIP-fve 對氣喘小鼠體內免疫環境、IL-22與IL-17的影響
	計畫主持人: 呂克桓
	計畫編號: 103-2314-B-040-009- 學門領域: 小兒科
無研發成果推廣資料	

103年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：呂克桓		計畫編號：103-2314-B-040-009-				計畫名稱：金針菇免疫調節蛋白FIP-fve 對氣喘小鼠體內免疫環境、IL-22與IL-17的影響	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明： 如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	0	1	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
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。）		無					

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

科技部補助專題研究計畫成果報告自評表

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：

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100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）

1. 金針菇在台灣是相當普遍且便宜的食用菇類，而由其萃取出之純化免疫調節蛋白，使用在氣喘氣道重塑的動物實驗上，若有治療或輔助治療以達到回復正常組織的功効的話，則對於氣喘治療上又多了一樣選擇，對於國產食品的推廣以及日後大規模的人體試驗會很有幫助。

2. 藉由此氣喘動物模式建立，可以提供將來更多的相關實驗進行。