

# 目 錄

	頁次
壹、中文摘要	6
貳、英文摘要	7
參、縮寫表	9
肆、前言	
一、靈芝簡介	11
二、松杉靈芝免疫調節功能蛋白 (FIP-gts)	16
三、松杉靈芝免疫調節功能蛋白具有的生理活性	17
四、體內與細胞激素相關之免疫反應	18
五、IFN- $\gamma$ 的相關調控機制	20
六、過敏性氣喘與衛生假說	21
七、研究動機	24
伍、實驗材料與方法	
一、儀器	26
二、藥品	27
三、質體	28
四、實驗動物來源	28
五、實驗方法	

1. 在大腸桿菌中表現融合蛋白重組 FIP-gts 與純化	29
2. SDS-聚丙烯醯胺板膠電泳法	30
3. 流式細胞儀分析細胞週期	32
4. 細胞激素之活性測定	36
5. Western blot (西方點墨法)	40
6. 塵蟎蛋白 <i>Der p</i> 的粗萃取	43
7. 重組塵蟎蛋白 <i>Der p</i> II 的構築與製備	43
8. 塵蟎致敏動物模式的建立	50
陸、結果	
一、大腸桿菌中重組 FIP-gts 的表現與純化	53
二、 <i>reFIP-gts</i> 免疫調節功能活性之分析—促進細胞增生	53
(1)處理 FIP-gts 對 HPBMCs 細胞分期的影響	53
(2)FIP-gts 誘導 HPBMCs 增生需透過的訊息傳遞途徑	54
三、 <i>reFIP-gts</i> 免疫調節功能活性之分析—釋出細胞激素	55
(1)處理 FIP-gts 對 HPBMCs 產生 IFN- $\gamma$ 的影響	55
(2)處理 FIP-gts 對 HPBMCs 產生 IL-4 的影響	56
四、FIP-gts 刺激 HPBMCs 產生 IFN- $\gamma$ 的標的細胞	56
(1)處理 FIP-gts 對 T 細胞之細胞分期的影響	57
(2)FIP-gts 誘導 T 細胞增生需透過的訊息傳遞途徑	57
(3)處理 FIP-gts 對 T 細胞產生 IFN- $\gamma$ 的影響	58
五、探討 FIP-gts 誘發細胞激素之訊息傳遞途徑	58
(1)與調控產生 IFN- $\gamma$ 相關之訊息傳遞途徑	58

(2)與調控產生 IL-4 相關之訊息傳遞途徑	59
(3)在 HPBMCs 中 FIP- <i>gts</i> 活化 PI 3-kinase 的情形	60
(4)在 HPBMCs 中 FIP- <i>gts</i> 活化 MAP kinase 的情形	60
六、本研究中二種致敏用之 <i>Der p</i> 蛋白	61
(1)利用 native <i>Der p</i> 萃取出純化 <i>Der p</i> 粗蛋白液	61
(2)在大腸桿菌中表現 <i>reDer p</i> II <sub>1-129</sub> 重組蛋白	62
七、致敏小鼠之動物實驗	63
(1)小鼠血液中之白血球分類計數判斷法則	64
(2)分析致敏小鼠血液中之白血球分類計數	65
(3)致敏小鼠血清與 BAL 液中細胞激素與 IgE 的改變	66
(4)致敏小鼠脾臟細胞再次於體外以 FIP- <i>gts</i> 刺激後細胞激素的變化	66
(5)在 HPBMCs 中 <i>Der p</i> 粗蛋白液活化 COX-2 的情形	67
(6)餵食 FIP- <i>gts</i> 後小鼠體重的變化	68
柒、討論	69
捌、圖目錄	
圖 1 pGEX4T-1-FIP- <i>gts</i> 之構築、表現與純化	83
圖 2 處理不同濃度與不同時間 FIP- <i>gts</i> 對 HPBMCs 細胞週期的影響	84
圖 3 不同抑制劑對於 FIP- <i>gts</i> 誘導 HPBMCs 增生的影響	85
圖 4 處理不同濃度與不同時間 FIP- <i>gts</i> 對 HPBMCs 誘發產生 IFN- $\gamma$ 的影響	86
圖 5 處理不同濃度與不同時間 FIP- <i>gts</i> 對 HPBMCs 誘發產生 IL-4 的影響	87

圖 6	處理不同濃度與不同時間 FIP-gts 對 T 細胞之細胞週期的影響	88
圖 7	不同抑制劑對於 FIP-gts 誘導 T 細胞增生的影響	89
圖 8	處理不同濃度與不同時間 FIP-gts 對 T 細胞誘發產生 IFN- $\gamma$ 的影響	90
圖 9	不同抑制劑對於 FIP-gts 誘導 HPBMCs 產生 IFN- $\gamma$ 的影響	91
圖 10	處理不同濃度 LY294002 對於 FIP-gts 誘導 HPBMC 產生 IFN- $\gamma$ 的影響	92
圖 11	不同抑制劑對於 FIP-gts 誘導 HPBMCs 產生 IL-4 的影響	93
圖 12	不同抑制劑對於 FIP-gts 誘導 T 細胞產生 IFN- $\gamma$ 的影響	94
圖 13	FIP-gts 活化 HPBMCs 中 Akt 的情形	95
圖 14	FIP-gts 活化 HPBMCs 中 GSK-3 $\beta$ 的情形	96
圖 15	FIP-gts 活化 HPBMCs 中 p38 MAPK 的情形	97
圖 16	FIP-gts 活化 HPBMCs 中 ERK 1/2 的情形	98
圖 17	FIP-gts 活化 HPBMCs 中 COX-2 的情形	99
圖 18	<i>Der p</i> 誘導 HPBMCs 中 IL-4 產生的情形	100
圖 19	<i>Der p</i> 粗蛋白萃取液之製備流程說明圖	101
圖 20	pGEX4T-1- <i>Der p</i> II <sub>1-129</sub> 之構築、表現與純化	102
圖 20	<i>Der p</i> 噴霧致敏用之噴霧器	103
圖 22	Balb/c 小鼠血液中白血球之型態	104
圖 23	<i>Der p</i> 粗蛋白致敏之 Balb/c 小鼠血液中的白血球分類計數	105

圖 24	<i>Der p</i> 粗蛋白致敏之 Balb/c 小鼠脾臟細胞於體外再次以 FIP- <i>gts</i> 刺激對於產生 IFN- $\gamma$ 的影響	106
圖 25	<i>Der p</i> 粗蛋白致敏之 Balb/c 小鼠脾臟細胞於體外再次以 FIP- <i>gts</i> 刺激對於產生 IL-4 的影響	107
圖 26	重組 <i>Der p</i> II <sub>1-129</sub> 致敏之 Balb/c 小鼠血液中的白血球分類計數	108
圖 27	重組 <i>Der p</i> II <sub>1-129</sub> 致敏之 Balb/c 小鼠 BAL 液中 total IgE 的含量	109
圖 28	餵食 <i>reFIP-gts</i> 對於 Balb/c 小鼠體重的影響	110
	玖、參考文獻	111

## 中文摘要

先前由松杉靈芝(*Ganoderma tsugae*)當中發現的真菌類免疫調節蛋白 FIP-*gts* (Fungal Immunomodulatory Protein)，在此研究中我們利用重組蛋白工程在大腸桿菌中表現並純化得 *reFIP-gts*。利用 PI 染色與流式細胞儀分析，發現 FIP-*gts* 可促使 HPBMCs (Human peripheral blood mononuclear cells) 的細胞週期由 G0/G1 期進入 S 期進而造成細胞增生，而預先處理 PI 3-kinase (phosphatidylinositol 3-kinase) 專一性抑制劑 LY294002 則可抑制由 FIP-*gts* 所誘導之 S 期的增加。另一方面分析 FIP-*gts* 誘導 HPBMCs 產生的細胞激素時，發現 IFN- $\gamma$  持續大量表現；而預先處理 LY294002 亦可抑制 FIP-*gts* 誘導之 IFN- $\gamma$  的表現；此外以 Western blot 方式證實，以 FIP-*gts* 處理 HPBMCs 後會磷酸化而活化 PI 3-kinase 的下游基因 Akt，由此顯示 PI 3-kinase 在 FIP-*gts* 活化 HPBMCs 的過程中扮演一個相當重要的角色。另一方面，評估 FIP-*gts* 對於家塵蟎(*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Der p*) 致敏性氣喘(Allergic asthma)的減敏效果。初步發現餵食二週 FIP-*gts* 後 Balb/c 小鼠的脾臟細胞於體外若再以 FIP-*gts* 刺激後，反而不會誘發 IFN- $\gamma$  的表現；而利用白血球分類計數 (Differential Leucocyte Counting, DLC)，發現致敏後 Balb/c 小鼠血液中之嗜鹼性球比例增加，而在餵食 FIP-*gts* 後會逐漸降低至正常範圍。然而遺憾的是我們在致敏小鼠體內無法測得血液中嗜酸性球的增加或是血清中 total IgE 的增加。本研究證實了 FIP-*gts* 調控 HPBMCs 的增生與誘導 HPBMCs 產生 IFN- $\gamma$  的機制是透過 PI 3-kinase 的訊息途徑；雖然在 *Der p* 致敏之動物實驗一直無法觀察到明顯誘發小鼠氣喘的病徵，但發現餵食 FIP-*gts* 後會改變 Balb/c 小鼠體內的免疫反應，顯示其確實具有發展成調整免疫系統之健康食品的潛能。

## Abstract

In this study, we expressed and purified the fungal immunomodulatory protein (FIP-*gts*) in *E. coli*. Using PI staining and flow cytometry, we found that FIP-*gts* promoted cell cycle progression from G0/G1 phase to S phase in HPBMCs. Pre-treatment of LY294002, a specific inhibitor of PI 3-kinase, was abolished the increased S phase induced by FIP-*gts*. Analyzing the cytokines induced by FIP-*gts*, IFN- $\gamma$  persistent expressed significantly. Pre-treatment of LY294002 was also inhibited the secretion of IFN- $\gamma$  stimulated by FIP-*gts* in HPBMCs. Moreover our results demonstrated that Akt, a downstream effector of phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase), was phosphorylated and activated by FIP-*gts*. It indicated that PI 3-kinase play an important role in the process of HPBMCs activation induced by FIP-*gts*. On the other part, developing allergen of house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*)-sensitized animal model, we evaluated whether FIP-*gts* could attenuate the symptoms of allergic asthma. The expression of IFN- $\gamma$  in the splenocytes of Balb/c mice after feeding with FIP-*gts* for two weeks restimulated with FIP-*gts* was not increased but decreased instead. Using Differential Leucocyte Counting (DLC), we found that after sensitized with *Der p* increased the percentage of basophils in Balb/c mice blood, after fed with FIP-*gts* the basophils decreased to normal level. Unfortunately, we did not observe the percentage of eosinophils and total IgE were increased in asthma Balb/c mice. Our study demonstrated that FIP-*gts* regulated the proliferation of HPBMCs and induced the secretion of IFN- $\gamma$  in HPBMCs via PI 3-kinase activation. Though we did not observed the symptoms of allergic asthma in *Der p*-sensitized mice, fed with FIP-*gts* could truly modify the immune response in

Balb/c mice. It is suggested that FIP-*gts* may be as a health food with immunodulatory function.



## 縮寫表

1. AHR	: Airway Hyperresponsivenss
2. Amp	: Ampicillin
3. AP-1	: Activator protein complex-1
4. APC	: Antigen presenting cell
5. BAL	: Bronchoalveolar lavage
6. bp	: Base pair
7. CDK	: Cyclin-dependent protein kinase
8. CD	: Cluster of differentiation
9. CKI	: Cyclin-specific kinase inhibitor
10. COX	: Cyclooxygenase
11. <i>Der p</i>	: <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
12. <i>Der f</i>	: <i>Dermatophagoides farinae</i>
13. DEPC	: Diethyl pyrocarbonate
14. DMSO	: Dimethyl sulfoxide
15. dNTP	: Deoxyribonucleotide triphosphate
16. DTT	: Dithiothreitol
17. EDTA	: Ethylene diamine tetraacetic acid
18. ELISA	: Enzyme-linked immunoabsorbent assay
19. ERK	: Extracellular signal-regulated protein kinase
20. FIP- <i>fve</i>	: Fungal immnomodulatory protein- <i>Flammulina velutipes</i>
21. FIP- <i>gts</i>	: Fungal immnomodulatory protein- <i>Ganoderma tsugae</i>
22. GSK-3	: Glycogen synthase kinase-3
23. GST	: Glutathione s-transferase
24. HPBMCs	: Human peripheral bolld lymphocytes
25. HPV	: Human papillomavirus
26. Ig	: Immunoglobulin
27. IFN- $\gamma$	: Interferon- $\gamma$
28. IL-12	: Interleukin-12
29. IPTG	: Isopropyl-D-thiogalactopyranoside
30. JNK	: The c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase
31. kDa	: Kilo-dalton
32. LZ-8	: Ling-Zhi-8, <i>Ganoderma lucidium</i>
33. MACS	: Magnetic-activated cell sorting
34. MAPK	: Mitogen-activated protein kinase
35. MHC	: Major histocompatibility complex

36. MSH	: $\beta$ -mercaptoethanol
37. NF- $\kappa$ B	: Nuclear factor $\kappa$ B
38. NF-AT	: Nuclear factor of activated T cells
39. NOS2	: Inducible nitric oxide synthase
40. nt	: Nucleotide
41. OVA	: Ovalbumin
42. p38	: Protein 38
43. PAGE	: Polyacrylamide gel electrophoresis
44. PCNA	: Proliferating cell nuclear antigen
45. PCR	: Polymerase chain reaction
46. PG	: Prostaglandin
47. PHA	: Phytoagglutinin
48. PI	: Propidium iodide
49. PI 3-kinase	: Phosphatidylinositol 3-kinase
50. PKC	: Protein kinase C
51. PVDF	: Polyvinylidene difluoride membrane
52. re	: Recombinant
53. RT-PCR	: Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
54. SDS	: Sodium dodecyl sulfate
55. SLE	: Systemic Lupus Erythematosus
56. STAT	: Signal transducers and activators of transcription
57. TEMED	: N,N,N',N'-Tetramethylethylene diamine
58. Tc	: Cytotoxic T cells
59. TCR	: T cell receptor
60. Th	: Helper T cells
61. TNF- $\alpha$	: Tumor necrosis factor- $\alpha$
62. Tris	: Tris ( hydroxymethyl ) -aminomethane
63. X-gal	: 5-Bromo-4-chloro-indolyl- $\beta$ -D-galactoside

## 前言

自古以來，靈芝在國人的心目中，一直都是具有神秘色彩的稀有珍貴藥材，不論加官晉爵之太上良藥、民間故事之祖傳秘方，乃至於近代提倡之保健食品，無一不見其蹤影，對維持人體健康有莫大作用。根據我國最著名的藥學典籍《神農本草經》之記載，靈芝是排列在「上藥」中最高位的上上之藥。「上藥」又稱為神藥，也就是養生之藥，即使長期大量服用，也全無副作用，且能立刻調整體質，將體質正常化，對於惡疾，常有驚人之功效。

由過去 20 年的藥理研究已證實，靈芝具有鎮痛、鎮靜、鎮咳、強心、降血壓、降血糖等活性，並具有抗過敏 (Chen et al., 1992)、保護肝臟功能 (Lin et al., 1993)、抗腫瘤及增強免疫力，但大多局限於粗萃取物研究 (Horner et al., 1993)，如多醣體；或小分子化合物的研究 (Kawagishi et al., 1993)，如三帖類。直到 1989 年日本明治製藥從赤芝 (*Ganoderma lucidum*) 中純化得一免疫調節功能蛋白，Ling Zhi-8 (LZ-8) (Kino et al., 1989)。

靈芝是一種大型的高等真菌，隸屬真菌界擔子菌門，全擔子孢子菌亞綱，無褶菌目，靈芝科，屬於靈芝屬 (*Ganoderma* sp.)。靈芝科靈芝屬最重要特徵為具有卵形、黃褐色、雙層壁的擔孢子；在其屬內的分種則有賴於靈芝菇體（子實體）的外部形態和內部構造。由於菇類的子實體是長期適應環境演化與完成特定繁殖功能的組合，因此在靈芝異種間的子實體中，無論就外部形態和內部解剖構造上皆有很大的差異。台灣大學植物病理學系系主任 曾顯雄 教授指出，靈芝科下分四屬：靈芝屬 (*Ganoderma*)、假芝屬 (*Amauroderma*)、雞冠孢芝屬 (*Haddowia*)、及網孢芝屬 (*Humphreya*)。其中靈芝屬下又分三個亞屬。靈芝屬中國大陸有 76 種，而台灣曾有 12 種靈芝屬成員被記載，包括 *Ganoderma applanatum*、*G. australe*、*G.*

*boninense*、*G. formosanum*、*G. fornicatum*、*G. japonicum*、*G. lucidum*、*G. microsporum*、*G. rugosum*、*G. tropicum*、*G. tsunodas*、*G. weberianum*。赤芝 (*G. lucidum*) 較為常見，而 *G. formosanum* 及 *G. microsporum* 為台灣之特有種。在目前已知靈芝屬菌株中依 許瑞祥 博士論文 (Hseu et al., 1996)，以 random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD) 分析方法，分離區別鑑定有 *G. applanatum.*, *G. formosanum.*, *G. fornicatum.*, *G. lucidium*, *G. tropicum* 及 *G. tsugae* 等數種靈芝。每種菌種間的免疫調節活性差異極大，目前 *G. lucidium* 及 *G. tsugae* 已被證實具有免疫調節功能 (Kino et al., 1989; Lin et al., 1997)。

自 1970 年代開始，經由現代科技大量人工栽培，並利用西方科學的研究模式，逐漸褪去其神秘面紗。靈芝的主成分包含碳水化合物、三帖類 (Triterpenoids)、蛋白質、核酸類衍生物及一些元素。

碳水化合物有高分子多醣體 (Polysaccharide)、葡多醣 (Glucan)、靈芝多醣 (Ganoderan) (Hikino et al., 1985); 北京醫科大學在 1990 年開始進行的系列研究顯示，赤芝多醣體 GI-PS 可以增強毒殺性 T 細胞的作用，有助於消滅體內被病毒感染的細胞，因而降低其轉形成惡性腫瘤細胞的機率 (Cao and Lin, 2003)，1997 年 Wang 等人亦指出，由新鮮 *G. lucidium* 子實體中所純化之多醣體 (PS)，會使巨噬細胞大量表現 interleukin (IL)-1 $\beta$ 、tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  與 IL-6，以及 T 淋巴球亦大量表現 interferon (IFN)- $\gamma$ ，此外亦發現此種含有上述細胞激素之 mononuclear cell 細胞培養液 (PSG-MNC-CM) 具有抑制 leukemic 細胞株的 proliferation 與 clonogenicity (Wang et al., 1997)。以 DNA labeling 與 gel electrophoresis 方法分析得知處理 PSG-MNC-CM 會明顯使 leukemic-cell 發生細胞凋亡。以抗體中和法則可進一步得知 PSG-MNC-CM 中主要執行抗腫瘤作用者為

TNF- $\alpha$  與 IFN- $\gamma$ ，此二種細胞激素可協同作用以抑制 leukemic-cell 的生長 (Wang et al., 1997)。此外亦有報導指出，赤芝多醣體 (GLP)可顯著舒緩 Balb/c 小鼠因感染 *Mycobacterium bovis* BCG 所導致的肝腫脹，並降低小鼠血清中 alanine aminotransferase (ALT)的釋出與 nitric oxide (NO)的產生，進而改善因 BCG 感染產生的慢性與急性發炎之病理變化，也就是免疫性肝損傷 (Zhang et al., 2002)。由此可知靈芝多醣體確實具有抗癌防癌及保護肝臟的功效。

三帖類物質是導致靈芝具有苦味的主要原因。帖類化合物(terpenoid)是由 isoprene 為基本單元所構成之天然物質，依照構成單元的數目不同而有不同的命名，而三帖類是由六個 isoprene 單元所構成，骨架含碳數為 30 之天然物。目前所知三帖類的種類在靈芝種中，已發現將近有二百多種。在其他植物中亦含有三帖類，但是靈芝含有特殊三帖類（特稱為「靈芝酸」），有靈芝酸 (Ganoderic acid)、赤芝酸 (Lucidenic acid)、赤芝酮 (Lucidone)、赤靈酸 (Ganodermic acid)等，為其他植物所沒有；靈芝中所含三帖類的主要功能為：抑制癌細胞生長、抑制組織胺釋放、防止過敏、促進肝功能、促進血小板凝集、以及降血脂，預防中老年人發生心血管方面的疾病。目前研究證實靈芝中的三帖類物質具有抗發炎 (Patocka, 1999) 與 Anti-complement activity (Min et al., 2001)；2002 年亦有報導指出，由 *G. lucidum* 子實體中萃取的三帖類萃取物，能抑制小鼠脾臟植入 Lewis lung carcinoma (LLC)後的脾臟 primary solid 腫瘤生長、liver metastasis 與肝中的 secondary metastatic 腫瘤生長；此外在體內模式中，充分給予 vascular endothelial growth factor (VEGF)與 heparin (肝素)的情況下，此三帖類萃取物亦能抑制血管增生 (angiogenesis)；由此推論由 *G. lucidum* 所萃取出之 triterpenoid fraction 可能是透過抑制腫瘤所誘發之血管增生，而達到抗腫瘤與抗轉移的作用 (Kimura et al., 2002)。

核酸類衍生物有核糖核甘酸 (RNA)、腺嘌呤 (Adenine)、尿嘧啶(Uracil) 與腺甘 (Adenosine)。Adenosine 為靈芝中具抑制血小板凝集作用的主要成份，可防止血栓的形成 (Shimizu et al., 1985)。

元素類則包括鉀、鈣、磷、鎂與有機鍍。

蛋白質類則包含醣蛋白 (Glycoprotein)與 1989 年 Kino 等人由赤芝 (*G. lucidum*)中發現之小分子蛋白質 LZ-8 (Ling Zhi-8)；在 2002 年 Wang 等人在 *G. lucidum* 的水溶性萃取出物中發現一含有 fucose 的醣蛋白萃取出物，其具有刺激脾臟細胞增生與細胞激素表現的功能，利用 selective proteolysis 與 glycosidic cleavage 進一步研究後發現，此一含有 fucose 的 polysaccharide fraction 能刺激細胞激素的表現，尤其是 IL-1、IL-2 與 INF- $\gamma$  (Wang et al., 2002)。而 LZ-8 靈芝蛋白與 PHA (phytoagglutinin)及其他 lectin 類 mitogen 相似，亦具有 mitogenic 能力，以  $^3\text{H}$ -thymidine 測量人類周邊血液淋巴球的 DNA 合成量時，在 1 至 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的濃度下，可促進淋巴細胞增生達最高點，再進一步分析後發現，其增生效果主要在 T 淋巴球，但需要 monocyte 的參與；此外以 ELISA 方式可測得 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-2 與 IL-1 $\beta$  的生成量增加 (Haak-Frendscho et al., 1993)；此外利用 fluorescein- conjugated CD25 mAb 染細胞表面 IL-2 receptor，配合 flow cytometer 觀察後，發現 LZ-8 亦可正調控 IL-2 receptor 的表現，而上述五種分子皆與淋巴細胞的活化與增生息息相關；此外 LZ-8 亦能促進 ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1)的表現，及增加 CD2 的表現，促進人類 T 細胞形成 rosette，故此靈芝免疫調節蛋白可藉由調節 immunocompetent cell 上之細胞黏著分子 (adhesion molecular)來表現其藥性(Miyasaka et al., 1992)。因此認為 LZ-8 是一種 immunomodulating agent (免疫調節作用劑)，並視為研發新藥之利器。

這種藉由提供訊號啟動細胞原有能力，以提升自我免疫能力達到抗病

作用的概念，正如同生物反應修飾劑 (Biological response modifiers, BRMs) (Fuggetta et al., 1990)，一群可藉著調控宿主防禦系統，對抗腫瘤或免疫疾病的物質。這些物質與一般天然抗癌藥物作用機制不同，一般天然抗癌藥物多是抑制細胞中 DNA、RNA 及蛋白質的合成，而 BRMs 通常會結合至細胞表面專一受體，經由一系列 cascade 如：interferons、tumor necrosis factor 等細胞激素的增加，或引發抗體或補體的產生，進而達到提升體內免疫系統的能力，這群 BRMs 統稱為 immunomodulating agents。其來源各不相同，已知有四類，第一類為微生物及天然物分離得來，在微生物中以 *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin (BCG) 已被開發應用在臨床試驗，可作為結核病 (Tuberculosis, TB) 的疫苗 (Dietrich et al., 2003)，天然物中則有屬於  $\beta$ -glucan 的 Lentinan (Chen et al., 2003) 等。第二類是人工合成物，如：muramyl dipeptide。第三類自抗癌藥物中發現的，如：cyclophosphamide (Ueno et al., 1994)。及目前發現之第四類，如由蕈類純化所得之蛋白，具有免疫調節功能且具有相當程度類似的胺基酸序列，這類蛋白質命名為真菌類免疫調節蛋白質 (Fungal immunomodulatory protein, FIP) (Hsu, 1996; Lin et al., 1997)，同時它們亦是一種 lectin (植物凝集素)，如：靈芝蛋白 LZ-8、金針菇蛋白 FIP-*fve* 及草菇中的 FIP-*vvo*。

一般而言，親糖蛋白質 (lectin) 具有二個糖結合位置，靠其上的糖類與細胞表面結合，並且具有凝集紅血球的能力。在一些屬於擔子菌綱的真菌中，從其子實體或菌絲體中可純化出一些親糖蛋白質 (lectins)，會促進淋巴球的增殖，如金針菇 (FIP-*fve*)、草菇 (FIP-*vvo*)；相反的，有些則會抑制淋巴球的增殖，如松茸科的田頭菇 (*Agrocybe aegerita*)、猴頭菇 (*Hericium erinaceum*) 等 (Lin, 1996)。這些親糖蛋白質皆具有細胞凝集的能力。蕈類中的親糖蛋白質，其蛋白質上所結合的糖類多不相同，如：猴頭菇上的糖類是屬於 sialic acid 結合 (Kawagishi et al., 1994)，*Laetiporus sulfurens* 是

N-acetylglucosamine 結合 (Konska et al., 1994), 這些醣類可能可以促進細胞表面受體的結合。在醫學上親醣蛋白質具有免疫調節 (immunomodulatory) 及保護肝臟 (hepatoprotective) 的活性, 可能是由於其具有刺激細胞增生、促進細胞激素釋出以及清除自由基 (free radical) 的功能 (Lin et al., 1993)。由 mistletoe 分離出的親醣蛋白, 其為一種  $\beta$ -galactoside 專一性的親醣蛋白質 (Gabiuss et al., 1992), 不論在體外或體內皆會促進細胞激素的表現; 在 Balb/c 小鼠試驗中, 對於 tumor colonization 有抑制腫瘤生成; 可促進人類 TNF- $\alpha$ , IL-1 的增加, 具有免疫調節能力 (Irimura et al., 1990)。大部份這類親醣蛋白質具有凝集血球細胞的作用, 但其生理功能尚未清楚。而親醣蛋白質對於免疫調節功能方面, 不同種親醣蛋白質與不同種抗體或細胞結合能力亦不大相同, 如: *Agaricus bisporus* 會與 IgA 結合 (Iraozqui et al., 1997); bovine conglutinin 與 IgG 結合 (O'Donoghue et al., 1993); L-selectin 促使 neutrophils 凝集 (Tandon and Diamond, 1998); 由 *C. albicans* 純化出之 manoprotein 可促進人類單核球細胞增生 (Ausiello et al., 1986)。

### 松杉靈芝免疫調節功能蛋白 (*Fungal immunodulatory protein, FIP-gts*)

我國繼日本之後, 在台大生化暨分生所及中研院院士 林榮耀 博士的指導下, 也由松杉靈芝 (*Ganoderma tsugae*) 菌絲體當中純化得一免疫調節蛋白, 將之命名為真菌免疫調節蛋白質, FIP-gts (Lin et al., 1997), 本實驗室亦曾嘗試自其子實體當中純化 FIP-gts, 但發現子實體內所取得之蛋白質並無免疫調節功能, 唯有在菌絲體中所萃取得蛋白質才具有功能, 並已利用遺傳工程方式選殖此蛋白之基因, 經比對後發現此基因之 DNA 序列與 *Ganoderma lucidum* 中的 LZ-8 序列相同, 且活性相同, 證實此二種蛋白質為同種蛋白質。FIP-gts 在經蛋白水解酵素水解後, 利用自動胺基酸分析儀得知含有 110 個胺基酸, 並其序列與免疫球蛋白重鏈 (variable region of



immunoglobulin heavy chain, IgV<sub>H</sub>)有很高的相似性。經由 Garnier 方法分析二級結構可知，FIP-*gts* 具有二個  $\alpha$ -helices、七個  $\beta$ -sheets 及一個  $\beta$ -turn 之構造；在分析其分子量時發現，以膠體過濾管柱 (gel filtration)分析為 26 kDa，但若以 SDS-PAGE 分析則為 13 kDa，最後以 20  $\mu$ M 的 glutaraldehyde (蛋白連接劑) 連接後，證實 FIP-*gts* 可形成大約 26 kDa 的雙聚體 (homodimer)。

此外，台大醫事技術研究所 許瓊瑛 碩士論文中提出 (Hsu, 1996)，以淋巴球增生反應 (Blast-formation stimulatory activity assay, BFSA)，目前共篩出三種菇類蛋白，除了松杉靈芝之外尚有金針菇 (*Flammulina velutipes*) 及草菇 (*Volvarellia volvacea*) 之凝血蛋白部分具有免疫調節活性，其分子量皆約為 13 kDa，且均不含有組胺酸 (histidine)、半胱胺酸 (cysteine) 及甲硫胺酸 (methionine)，而含微量的醣類，屬於親醣蛋白質的一種。此外這些醣類已證實與免疫調節活性無關，並且三者之凝集活性不會被任何已知之單醣或多醣類所抑制。自靈芝、草菇、金針菇當中所純化出之蛋白質，其胺基酸有 44% 相同性，42% 的相似性。其中金針菇當中所發現的免疫調節蛋白 (FIP-*fv*) 與 FIP-*gts* 及免疫球蛋白的重鏈區之蛋白結構有相當程度的相似性 (約 71%)，其中 61.4% 相同及 9.6% 相似，且二級結構多為  $\beta$ -Sheet 的結構 (Ko et al., 1995)。

### 松杉靈芝免疫調節功能蛋白具有的生理活性

經進一步研究其免疫調節機制，由先前的研究證實，靈芝免疫調節功能蛋白質會活化人類周邊血液單核球 (human peripheral blood mononuclear cells; HPBMCs)，並能夠促進 HPBMCs 與小鼠脾臟細胞的增生 (van der Hem et al., 1995)，測量其對於人類淋巴球細胞增殖能力時，以  $^3\text{H}$ -thymidine 測量 DNA 之合成量，並以 PHA 作為對照組，結果發現 FIP-*gts* 只要 5 微

克/毫升 ( $\mu\text{g/ml}$ )即可達到促進人類淋巴球細胞最高的細胞增殖量 (Hsu, 1996)，而與其及相似的金針菇蛋白 FIP-*five* 濃度則須至 100 微克/毫升，並且在使用 Dyna-bead 細胞分離系統，將 non-B 與 non-T 細胞分離後，發現 FIP-gts 只有在 Non-B 細胞群中具有細胞增生能力。

### 體內與細胞激素相關之免疫反應

近年來的研究發現，複雜的免疫調控，主要是由淋巴球(lymphocytes)、抗原呈獻細胞 (antigen presenting cell, APC)等許多種類的細胞交互作用而完成，尤其是所分泌出來的細胞激素更是扮演重要角色。在外來抗原入侵後，APC 把抗原分解成小片段經確認後，利用結合在不同的主組織相容性複合物 (major histocompatibility complex, MHC) 分子上呈獻至 APC 細胞的表面，藉著標的細胞表面的受體 (receptors)而作用到標的細胞，刺激其分泌一些激素，以產生應有的免疫調控作用；如帶有 CD8 標記之 T 細胞，其受體 (T cell receptor, TCR) 能辨認與 MHC I 結合的專一性抗原而活化，其主要功能為「執行細胞毒殺作用」(Tc cell)，將病原菌擄獲，並予以吞噬分解達到抗菌的功能 (Labuda et al., 2000)；而帶有 CD4 標記的 T 細胞，則能辨識 MHC II 上之抗原後進一步活化，其主要功能為「輔助」或「誘發」免疫反應 (Th cell)，其中又分為  $\text{CD4}^+$  Th1 及  $\text{CD4}^+$  Th2 二種亞群，Th1 細胞可分泌 IFN- $\gamma$ 、IL-2、TNF- $\beta$  等細胞激素而產生消腫、抗過敏、抗發炎等免疫效果，但若作用到 Th2 細胞，則會分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10 及 IL-13 等細胞激素，能促進抗體的產生尤其是 IgE，其免疫效果與 Th1 細胞產生的作用互相拮抗後，使體內傾向於其中一種免疫反應。

干擾素 Interferons 則是由三種成員所組成的家族性細胞激素，共分為 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  及 IFN- $\gamma$ 。而 IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$  又稱第一型干擾素，可抑制細胞生長 (Sanceau et al., 2000)，臨床上對一些罕見癌症，如：腎細胞癌或毛樣

細胞白血病 (hairy cell leukaemia) 具有療效，特別是 IFN- $\alpha$  亦能有效抑制病毒的增生 (Deng et al., 2001)；而 IFN- $\gamma$  又稱第二型干擾素，是由 25 kDa 的雙體 (homodimer) 所形成大小為 50 kDa 的醣蛋白，可被 IL-12、PHA、concanavalin A (con A) (Cippitelli et al., 1995)、Lipopolysaccharide (LPS) (Nick et al., 1996)、phorbol ester 及 calcium ionophores 所刺激產生 (Croll et al., 1987)。在免疫相關的研究中，IFN- $\gamma$  扮演著抑制腫瘤及參與免疫反應的一種重要細胞激素，如 IL-12 可以促使自然殺手細胞 (nature killer cell, NK cell) 及 T 細胞產生高量的 IFN- $\gamma$  (Ye et al., 1995)。另有研究指出巨噬細胞亦會經由 IL-12 誘發產生 IFN- $\gamma$  (Puddu et al., 1997)。在遭受病原菌感染，如 *Listeria monocytogenes* 入侵，會活化樹狀細胞 (Dendritic cells) 及巨噬細胞產生大量 IFN- $\gamma$  (Fukao et al., 2002) 以保護個體。在哺乳類動物的免疫系統中這些細胞激素能快速產生，主要是受到病原體侵入時，IL-12 及 IL-4 會誘導 naïve CD<sub>4</sub><sup>+</sup> T cells 快速分化為 Th1 及 Th2 cells (Banchereau and Steinman, 1998)；而兩者間的調控關係為：Th1 type cytokines 會抑制 Th2 type cells 所產生的 cytokines；而 Th2 type cytokines 亦會抑制 Th1 type cytokine 產生，即兩條分化路徑會彼此抑制合成。

IFN- $\gamma$  是由免疫細胞活化到某程度後所產生的，其可以增加抗原呈獻細胞 APC<sub>S</sub> 的功能，使侵入的病原體能有效的被巨噬細胞辨識並吞噬，所以 IFN- $\gamma$  也被稱為巨噬細胞的活化因子之一 (Delgado and Ganea, 2000)。有研究指出在 *in vivo* 實驗中，具有正常免疫系統的老鼠受到 *Toxoplasma gondii* 的感染後會產生大量的 IFN- $\gamma$  以提高抗病毒的作用 (Cai et al., 2000)。IFN- $\gamma$  除了有抗病毒的功能以外，對於其所衍生或調控的下游基因表現也有類似的功能。如 IFN- $\gamma$  可調控 PKR (dsRNA-dependent protein kinase) 的表現 (Cheshire et al., 1999)，以及 2-5A Synthetase 的合成，IFN- $\gamma$  透過 2-5A Synthetase 作用會合成 RNase L，使部分蛋白質的 ssRNA 被切開

而抑制合成以達到 antiviral 的目的，而此反應在一般情形下是呈現 OFF 狀態。唯有受到病毒入侵時才會啟動，故 IFN- $\gamma$  具有使某些細胞的生長受到抑制或走向細胞凋亡的功能，以免於受到感染或癌細胞的擴散 (Stark et al., 1998)。

### IFN- $\gamma$ 的相關調控機制

在哺乳細胞中，有很多與發炎有關的細胞激素的作用都與 mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway 的訊號傳遞路徑有關。MAPK pathway 屬於 serine/threonine protein kinase，包括三個主要成員：分別為 p38、ERK (extracellular signal-regulated protein kinase) 及 JNK (the c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase)。許多研究指出，在 T cell 中 MAPK pathway 會參與 IFN- $\gamma$  調控基因的表現，其中有多篇研究指出 p38 MAPK pathway 居中扮演重要的角色 (Rincon et al., 1998)。JNK 又稱作 SAPKs (stress-activated protein kinase)，會經由一些與發炎反應有關的細胞激素，如 TNF 與 IL-1 $\beta$ ，或環境壓力的因素，如 UV、X-rays、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及一些 growth factor 的刺激所活化。ERK 又稱 p44/p42 MAPK，一般認為其主要功能為調控細胞分化與增生，可被兩種訊息傳遞路徑所活化。一種是藉由生長、營養因子，另一種則是鈣離子進入細胞內藉由接受體活化 Ras、Raf、MEK 等訊息傳遞路徑而活化 p42/p44 MAP Kinase (Seger and Krebs, 1995)，MAP kinase 活化時會進入細胞核影響基因的表現，以執行細胞生長、分化、存活及死亡等訊號 (Ip and Davis, 1998)。有研究顯示，在免疫反應中的 T 細胞活化程序，MAP kinase 扮演重要的關鍵點，例如在胸腺中 ERK 具有參與促使 T 細胞活化的能力，但在發炎反應上 ERK pathway 的研究仍較少，但也有報導說明 TNF 與 IL-6 可以活化 ERK 與 p38 MAP kinase 進而引發各種相關的反應 (Carter et al., 1999)。而 MAPK pathway 一旦被活化後，會直接進到細胞核

中，活化相關的轉錄調節因子，表現相關的基因，如 IFN- $\gamma$ 。曾有研究證明，有許多的轉錄因子會透過 p38 MAP kinase pathway 調控 IFN- $\gamma$  的表現。

有許多研究指出 Phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase)亦與細胞增生密不可分，PI 3-kinase 是一個能直接將細胞內脂質訊息傳導途徑與部分具有激酶活性的蛋白作連結的酵素 (Kim et al., 2001)，並參與許多和細胞生長、轉形、分化、存活及胰島素作用有關的調控，目前已知可經由其下游的 Akt Ser/Thr kinase (protein kinase B)將訊息繼續往下傳，最後可造成抗細胞凋亡的效應 (Toker et al., 1994; Vanhaesebroeck et al., 1997)，其可被下列數種方式活化：一是當 growth factor 結合至 receptor protein tyrosine kinase 後，可將訊息傳給 p85 PI 3-Kinase，隨之活化 p110 PI 3-Kinase，將 PIP<sub>2</sub> 轉變成 PIP<sub>3</sub>；二為與活化態的 Ras 結合後，不只可以活化 PI 3-kinase 的 catalytic domain (p110) 並能穩定其在膜上的位置 (Vivanco and Sawyers, 2002)。2001 年 Kim 等人指出，PI 3-kinase 的抑制劑無論是 wortmannin 或 LY294002 皆會減少巨嗜細胞株 RAW 264.7 的細胞增生；在處理 wortmannin 與 LY294002 十二小時後，會使非同期生長的細胞 (asynchronously growing cells)發生 cell cycle arrest 而造成抑制細胞增生的現象。此外，wortmannin 與 LY294002 皆能抑制由 phorbol 12-myristate 13-acetate 所引發之巨噬細胞增生。因此認為在調節 RAW 264.7 生長中 PI 3-kinase 扮演重要的角色，而 protein kinase C 則亦一個 PI 3-kinase 的下游 effector (Kim et al., 2001)。

### **過敏性氣喘 (Allergic asthma)與衛生假說 (Hygiene Hypothesis)**

過敏性氣喘 (Allergic asthma)是一種常見的慢性呼吸道發炎疾病，其主要症狀有四：1. 支氣管過度反應 (Airway hypersensitive reaction, AHR)，2. 黏膜分泌物增加，以上二種會造成呼吸困難，3. 病人血清中

IgE 抗體濃度增加，4. 肺部嗜酸性白血球細胞數目上升(Bochner et al., 1994)。由氣喘病人的呼吸道檢體中培養具有特異性的 T 細胞株，分析其所分泌的 cytokine 種類，發現這些細胞株多屬於 Th2 細胞 (Del Prete et al., 1993)。目前所知，在初次接觸過敏原，會刺激 B 淋巴球分泌 IgE 抗體進而結合至肥大細胞 (mast cell)與 basophils 上，待再次暴露，具有 IgE receptors 的肥大細胞及 basophils 即可辨識並結合此過敏原，導致肥大細胞的去顆粒反應(degranulation)，進而釋出一些發炎介質，如 histamine、leukotrienes 及 prostaglandins 等(Lichtenstein and Bochner, 1991)。目前在臨床上使用治療氣喘的藥物，分為支氣管擴張劑（包括抗乙醯膽鹼 (ipratropium bromide)）(Chhabra and Pandey, 2002)、乙二型交感神經興奮劑 ( $\beta$ 2-adrenergic drug)與茶鹼 (theophylline)製劑 (Galant, 1990) 以及抗發炎藥物(如：類固醇，有 glucocorticoids (Jaffuel et al., 1999)與 corticosteroids (Townley and Suliaman, 1987))二種。雖然這些藥物能有效治療過敏性氣喘，但在過去十幾年間，罹患人數仍然不斷增加，目前全世界有一億人口罹患氣喘病，其盛行率在兒童有逐漸增加的趨勢。根據已故台大醫院小兒科 謝貴雄教授調查民國 63 年至 83 年間，大台北地區十萬名國小學童過敏病的罹病率，氣喘病由 1.3 %增加至 10.79 %，而過敏性鼻炎更由 6 %增加至 33 %。

目前較引人注意的解釋是『hygiene hypothesis (衛生假說)』，也就是『在越清潔的環境當中，幼年時期受到的感染越少，則可能導致過敏性疾病罹患率的增加』來說明 (Zuany-Amorim et al., 2002)，以免疫學而言，則是由二種表現不同細胞激素的功能性 T 細胞 (T helper 1, T helper 2) 之間的平衡加以解釋，目前認為早期的細菌或病毒感染會使體內的免疫系統偏向 Th1，而抵銷 Th2 細胞的過敏反應；反之，若細菌感染的機會降低，則造成體內的 Th1 反應較弱，而產生過度的 Th2 反應，以致於過敏反應的增加

(Yazdanbakhsh et al., 2002)。

Lee 等人在 2000 年指出，台灣引起兒童過敏病之常見的吸入性過敏原，如塵蟎(*Dermatophagoides pteronyssinus* 與 *Dermatophagoides farinae*)、蟑螂、羽毛、黴菌 (*Aspergillus* 與 *Penicillium*)和花粉等。食物過敏原則有蟹類、牛奶與蛋白 (Lee et al., 2000)，其中 90 %以上的小兒氣喘體質發作之過敏原當中以塵蟎最多。有鑑於台灣過敏性氣喘患者的主要空氣過敏原多為塵蟎，且其引起氣喘患者的 IgE 非常高(Lai et al., 2002)，且 IL-4 亦會上升高及 eosinophils 較多，這型患者體內的免疫反應多偏向進行 Th2 路徑 (Yssel et al., 1992)。有鑑於此，若是能調節體內的免疫反應使其偏向於 Th1，或許能夠治療甚至是預防過敏性疾病的發生；而本實驗所表現之靈芝免疫調節蛋白 FIP-gts 即具有促使細胞大量產生 IFN- $\gamma$  此種 Th1 cytokine 的功能，所以我們提出大膽的假設，或許此蛋白能應用在過敏性氣喘的治療或預防。

## 研究動機

多年來醫界都知道香菇、靈芝等真菌類中，富含具有強化免疫功能的多醣體，目前發現其中亦含有具有免疫調節活性的蛋白質，利用重組蛋白工程將此蛋白的基因選殖至大腸桿菌中，大量純化出重組 FIP-gts。已知此靈芝免疫調節功能蛋白雖在 *in vitro* 試驗及 Balb/c 小鼠以腹腔注射試驗中皆已證實具有免疫調節功能，可刺激人類週邊血淋巴球細胞與 Balb/c 小鼠脾臟細胞增生以及產生大量 IFN- $\gamma$ ，同時也由鏈聚合連鎖反應(PCR)證實，該免疫調節蛋白質具有促進 IL-2、IL-4 及 IFN- $\gamma$  之 mRNA 的轉錄。故本研究另一目的為，以 FIP-gts 對於 IFN- $\gamma$  表現量做為標的，作為評估經由遺傳工程表現 FIP-gts 的免疫調節活性功能，並監控其活性。

近年來訊息傳遞之研究十分熱門且極具重要性，其對於細胞接受外在刺激時，胞內各個層面由基因到蛋白質表現、能量運作及代謝甚至是抵抗侵略者的機制能有更進一步的了解。因此探討此 FIP-gts 靈芝免疫調節蛋白透過何種訊息傳遞來表現其免疫調節功能，期望藉此進一步認識靈芝免疫調節蛋白，並評估其在體內除了調節免疫力之外，是否尚具有其他未被發現的功能。本實驗著重在探討 FIP-gts 誘導 IFN- $\gamma$  產生與淋巴細胞增生時的傳訊機制，初步以 p38 MAPK、MEK 以及 PI 3-kinase 的專一性抑制劑加以釐清其作用機制。

而過敏性氣喘一直是大家關心的事，目前許多減緩氣喘病症或改善過敏體質的方法皆是使用藥物加以控制，如支氣管擴張劑或類固醇。然而 FIP-gts 具有促使人類週邊血液淋巴球與小鼠脾臟細胞大量產生 IFN- $\gamma$ ，若能利用此種屬於 Th1 細胞激素的大量表現與 Th2 反應產生拮抗，進而改變與調整體內的免疫反應，應能達到減敏的效果；基於上述理由，我們期望評估此 FIP-gts 免疫調節蛋白是否具有發展成預防或改善塵蟎氣喘之保健



食品。為了能模擬實際接觸抗原的途徑，本實驗排除先前台大免疫所建立的塵蟎蛋白氣管滴入模式，改採塵蟎噴霧致敏氣喘模式，希望對於國內氣喘病的防治能有些微幫助。

# 材料與方法

## 一、儀器:

1. Alpha Innotech Corporation MultiImage™ Light Cabinet
2. Beckman JM 2 Centrifuge
3. BECTON DICKINSON FACSCalibur
4. BIO-RAD Model 550 microplate reader
5. BRANSON SONIFIER 250
6. CHRIST ALPHA1-4 Freeze Dryer
7. ELISA washer: NICHIMATE Washer
8. EYELA micro tube pump MP-3
9. Firstek Scientific B206 water bath
10. Firstek Scientific orbital shaking incubator
11. Forma Scientific water-jacketed incubator
12. Genepure Technology digital dry bath
13. Genepure Technology digital cooler
14. Gilson fraction collector FC203B
15. Heraeus Biofuge fresco Centrifuge
16. Hermle 2323k centrifuge
17. Hofer mighty small II SE250/SE260
18. Laminar flow: HIGH TEN SCIENTIFIC CORPORATION
19. Major Science MP-250 power supply
20. Olympus CK40
21. Pharmacia Ultrospec® 2100 *pro* UV/Visible spectrophometer
22. Pharmacia Biotech Hofer Semiphor Transfer
23. Pharmacia Biotech power supply EPS301

24. pH meter: JENCO microcomputer pH/mV/TEMP METER 6171
25. Rocker-3D Gyraory
26. Savant Speed Vaccum SC110

## 二、藥品:

### 1. 酵素:

Pro-Taq enzyme 購自波仕特, Thrombin、DNase 購自 Roche。T4 DNA ligase、*EcoRI*、*BamHI* 購自 TakaRa。Lysozyme、RNase A 購自 Sigma。

### 2. 載體:

yT&A 購自益生生技公司。pGEX4T-1 購自 Pharmacia Biotec。

### 3. 抗體:

p38、phospho p38、ERK、phospho ERK、AKT、phospho AKT、Anti-rabbit IgG-HRP 皆購自 Cell signaling。COX-2 購自 CAYMAN。Anti-mouse IgG-HRP 購自 chemicon。

### 4. 抑制劑: SB203580 (p38 MAP kinase)、LY294002 (PI 3-kinase)、U0126 (MEK)、PD98059 (MEK)購自 Promega。SB216763 (GSK-3) 購自 TOCRIS。Wortmannin (PI-3 kinase)購自 Sigma。

### 5. 藥品:

RPMI-1640、FBS (Foetal Bovine serum)、L-glutamine、penicillin-streptomycin、Trypsin、sodium pyruvate 購自 GIBCO。Ficoll、Tween 20、Glutathion-Sepharose 4 Fast Flow 購自 Pharmacia。ECL 購自 NEN。Coomassie Brilliant Blue R-250、PHA-L、LPS、NaHCO<sub>3</sub>、DMSO、MOPS、TEMED、DTT、β-mercaptoethanol、DEPC、APS、PMSF、Leupeptin、ethidium bromide、isopropanol 購自 Sigma。Formamide、37%formaldehyde、

acetic acid 購自 Merck。IPTG、x-gal 購自 MD Bio, Inc.。agarose、BSA(定量蛋白之標準品)購自 Promega。Ampicillin 購自 Roche。Acrylamide 購自 Amresco。TMB 購自 ZYMED。Tris-base 購自 USB。BSA(定量蛋白之標準品)購自 Santa Cruz Biotechnology 公司。DNA 100bp ladder markers 購自真興實業。Stripping buffer 購自騰達行。Bio-Rad protein assay reagent 購自 Bio-Rad 公司。

6. Kit:

Clontech kit (K3002-1)購自騰達行。ELISA human IFN- $\gamma$  kit (Cat no: DY 285)、ELISA mouse IFN- $\gamma$  kit (Cat no: DY 485)、ELISA mouse IL-4 kit (Cat no: DY 404)購自 R&D。ELISA human IL-4 kit (Cat no: 555194)、mouse IgE kit (Cat no: 555248)購自 Pharmingen。BandPrep KD-08Kit 購自真興實業股份有限公司。Gene-Spin Miniprep Purification kit 購自 Protech 公司。

7. 其他: X-光底片購自 FujiFilm。Hybond-P PVDF membrane 購自 Pharmacia。

三、質體:

S<sub>2</sub>R-含 Derp II 基因之質體由台北國泰醫院過敏免疫科主任 蔡肇基 醫師提供。

四、實驗動物來源:

BALB/c ByJ mice 購自國科會動物中心。

# 實驗方法

## 一、在大腸桿菌中表現融合蛋白重組 FIP-gts 與純化:

### (1) 在大腸桿菌中表現融合蛋白

在大腸桿菌中表現融合蛋白的純化步驟如下:於前一天先製備 2 管菌液每管約 3 ml LB，作為大量表現菌液的菌種，再製備含有 Ampicillin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )之 LB broth 共 2 公升，取 40 g LB Broth 溶於二次水中攪拌均勻再加入 1M  $\text{MgSO}_4$  20 ml，最後補二次水到 2 L，並分裝到 4 個大錐形瓶中，每瓶 500 ml，以  $121^\circ\text{C}$ ，15 lb 滅菌 20 分鐘，待冷卻後加入 Amp (50 mg/ml)，在各錐形瓶中加 500  $\mu\text{l}$  並混合均勻，再加入上述預先製備的小量菌種，每瓶加入 1.5 ml，於  $37^\circ\text{C}$  培養箱中震盪培養 3 至 4 小時，直到  $\text{OD}_{600}$  吸光值大於 0.5 即表示增菌已足夠。由於在表現載體上有 GST 基因，故此時每瓶各加入 250  $\mu\text{l}$  的 1 M IPTG 予以刺激，並更改培養箱溫度為  $30^\circ\text{C}$  繼續震盪培養達 3 小時，再將菌液以  $4^\circ\text{C}$ ，9500 rpm 離心 20 分鐘後，取 60 ml resuspension buffer (需現配) 【10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 60mg Lysozyme】將菌液沉澱物再懸浮，於  $37^\circ\text{C}$  水浴槽中作用 15 分鐘，即置於  $-80^\circ\text{C}$ 。隔日於  $37^\circ\text{C}$  水浴回溫後，再用超音波均質機在冰上打破細胞，每次約 10 秒，每次間隔 10 分鐘預冷，反覆共 6 次。之後加入 DNase (10 mg/ml)及 RNase A (10 mg/ml)各 40  $\mu\text{l}$ ，於  $37^\circ\text{C}$  水浴槽中作用 15 分鐘，以  $4^\circ\text{C}$ ，12000 rpm 離心 20 分鐘，小心吸出上清液準備通管柱 Glutathion Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia)。此時需預留少量約 500  $\mu\text{l}$  的粗萃取液作為 SDS-聚丙烯電泳膠分析用以及測量粗蛋白液的  $\text{OD}_{280}$  總濃度使用。

### (2)融合蛋白的純化

以 50 ml 的 PBS 緩衝液【150 mM NaCl, 16 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3】清洗 Glutathion sepharose 4 Fast Flow column (約 2 ml), 再以 50 ml 含 1 mM DTT 的 PBS 緩衝液平衡管柱, 接著通入菌液上清液, 再以 50 ml 的 PBS 緩衝液沖洗出無法專一附著於管柱上的蛋白質後, 測量 OD<sub>280</sub> 吸光值低於 0.05 後, 即可再加入 elution buffer 沖流約 50 ml【5 mM reduced form Glutathione, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0】把融合蛋白競爭下來, 以分液收集器收集每管約 2 ml, 並測其在 280 nm 波長的吸光值, 可得一蛋白吸收峰, 其純度可由 SDS-聚丙烯電泳進行分析。

### (3)重組 FIP-*gts* 的純化

將 OD 值大於 0.5 的蛋白液收集起來, 每 1 mg 融合蛋白以 0.2 Unit Thrombin (Roche)酵素於 22°C 水浴下作用 48 小時, 以切斷 GST 與 FIP-*gts* 間之鍵結, 並於當中取少量樣品跑 SDS-PAGE 確定純化效果, 若尚未切完全, 則持續補充 Thrombin。利用 25 kDa 分子篩(Centri/Por), 在 4°C 下以 5000 Xg 離心 10 分鐘後, 再加入 1 ml 二次水至上層, 相同的條件離心共二次, 以進一步沖出殘留於上層之 FIP-*gts*, 收集下層液, 再以 10 kDa 分子篩 (Amicon, MILLIPORE, Centricon Plus-20), 在 4°C 下以 5000 Xg 離心 10 分鐘以濃縮蛋白液, 所獲得的 *reFIP-gts* 純度可利用 SDS-聚丙烯電泳進行分析。

## 二、SDS-聚丙烯醯胺板膠電泳法 (SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis) (Laemmli, 1970)

### (1)SDS-聚丙烯醯胺板膠電泳法之製備

先製備 10 ml 15 % 下膠:依序加入 3.15 ml 的二次水;2.5 ml 的 1.5M Tris, pH 8.8; 3.75 ml 的 29:1 acrylamide-bis-acrylamide; 0.1 ml 的 10 % SDS、

0.5 ml 的 1 % APS (ammonium persulfate )、TEMED 6.7  $\mu$ l 混合均勻後，緩緩加入 1.0 mm 厚度的 Hoffer SE250 直立式電泳膠台座中，加到約距膠台頂端 2.5 公分處，加水以壓平下膠並靜置約 30 分鐘後，再開始製備 3 % 上膠，依序加入 3.54 ml 的二次水；1.5 ml 的 0.5 M Tris, pH 6.8；0.45 ml 的 29:1 acrylamide-bis acrylamide；0.06 ml 的 10 % SDS；0.3 ml 1% APS 與 15  $\mu$ l 的 TEMED 混合均勻後，緩緩加入下膠已凝的直立式電泳槽膠台座中，隨即插入 1.0 mm 厚度的梳狀膠片(comb)，靜置約 30 分鐘後待凝固小心取出梳狀膠片，所留下的凹槽可作為注入樣品之用。

### (2)SDS-PAGE 電泳樣品的製備

將定量後之蛋白溶液混合 2 倍樣本緩衝液【4 ml 的 10% SDS；0.5 ml 的 2 M Tris-HCl, pH 6.8；2 ml 的 100% Glycerol；1 ml 的 14.3M  $\beta$ -mercaptoethanol；最後補二次水至 10 ml 混合均勻後，加入 0.05 毫克的溴酚藍 Bromophenol blue】，以 95  $^{\circ}$ C 加熱 5 分鐘 (目的使蛋白變性)，再立即放入冰上冷卻，避免蛋白結構再度恢復。

### (3)SDS-PAGE 之電泳操作

將製備好的膠片先用 1 倍 Tris-glycine running buffer 小心填滿 (以蓋過 well 為原則)，之後先以 80 伏特電壓分析電泳 20 分鐘使樣品能堆積到上下膠交接處即距膠片頂端 3 公分處，再改以 100 伏特分析電泳 2 小時。

### (4)染色液、退色液與乾膠液的製備

染色液製備如下:取 1.25 克 Coomassie brilliant blue R-250，溶於 227 ml 甲醇及 46 ml 醋酸，再加入二次水至 500 ml，混合均勻後，過濾備用。退色液製備如下: 取 75 ml 醋酸及 50 ml 甲醇再加入二次水至 1000 ml，混合均

勻後備用。乾膠液製備如下：取 300 ml 甲醇及 2 ml glycerol 再加入 300 ml 二次水，混合均勻後備用。

### (5) 染色與褪色

將分析完的膠小心取下，置於盤中進行染色，放在染色液中至少 30 分鐘，倒出染色液，再換成褪色液，更換數次並加入拭手紙以吸附染料，隔夜後便可見凝膠上蛋白所在處會呈現藍色。

### (6) 乾膠

準備一片乾膠用之壓克力板（長寬皆須比膠片大約 5 公分），將玻璃紙裁切成比壓克力板四邊略大 2 公分的大小，共二片。將退染後的膠片移至乾膠液當中浸泡 30 分鐘。依序在裝滿乾膠液的盒子中放入一張玻璃紙、膠片、另一張玻璃紙，小心將氣泡趕出，最後蓋上壓克力板，並注意膠片周圍沒有氣泡後，以長尾夾將玻璃紙連同膠片一起固定在壓克力板上，置於通風處風乾，待完全乾燥後，即可將膠片取下保存。

## 三、流式細胞儀分析細胞週期

### (1) 人類週邊淋巴球(HPBMCs)之取得 (Thiele et al., 1983)

使用含有 EDTA 抗凝血劑的真空抽血管抽取正常健康人(約 25 歲)的全血，使用 Ficoll-Hypaque gradient 方式分離淋巴球，方式如下：在無菌操作台中，將等量的全血小心吸取到含有 Ficoll-Paque® Plus (Pharmacia) 溶液上層，速度緩慢約 0.5 ml/秒，以不將二種液體之介面打破為原則。1500 rpm 離心 30 分鐘後，小心吸取中間一層的 Buffy coat 淋巴球層，以 10 ml 1 倍 PBS 【0.8% NaCl；0.002 % KCl，0.14 % Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>；0.02 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>】清洗淋巴球，再以 1000 rpm 離心 10 分鐘，倒掉上清液，重覆清洗兩次。將清



洗後的淋巴球培養於 10% FBS RPMI-1640 【90 % RPMI medium ; 10 % FBS ; 0.2 % sodium bicarbonate ; 0.03 % L-glutamine ; 100 unit/ml penicillin / streptomycin】的培養液中，並以細胞計數器於顯微鏡下計算活細胞的數目。

### (2)小鼠脾臟細胞之取得 ( mouse spleen cell )

由國科會所購得之 6~8 週大的 Balb/c mice (♂)，以二氧化碳方式犧牲後，經 75 %酒精消毒，小心將脾臟完整取下，置於含有 1 倍 PBS 的 dish 中，再移至無菌操作台用 1 倍 PBS 大量沖洗，以滅過菌的載玻片利用其磨砂的部份以磨碎脾臟，並以 1 倍 PBS 再懸浮，此細胞懸浮液經 800 rpm 離心 10 分鐘後，倒掉上清液，將此脾臟細胞以 1 倍 RBC lysis buffer 【取 4.13g 的  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ; 0.5g 的  $\text{NaHCO}_3$  及 0.03g 的 EDTA ; 溶於滅菌二次水至 500 ml 後再利用 0.22  $\mu\text{m}$  的過濾膜予以過濾，儲於 4°C 冰箱中】，1 倍 RBC lysis buffer 的使用量約每個脾臟 1 ml，經振盪 30 秒後於 37°C 下靜置 5 分鐘，將紅血球溶解掉，再加入 2 ml 1 倍 PBS，800 rpm 離心 10 分鐘，倒掉上清液，細胞再以 1 倍 PBS 清洗，800 rpm 離心 10 分鐘。重覆此清洗步驟兩次。最後將細胞培養於 RPMI 1640 中並以細胞計數器於顯微鏡下計算細胞的數目。

### (3)Pan T 細胞之取得

本分離技術採用 Miltenyi Biotec 之 MACS Pan T Cell Isolation Kit，搭配 LS Separation Columns 使用。利用含有 CD11b、CD16、CD19、CD36 與 CD56 抗體的 cocktail 加上磁珠，配合具有磁力的管柱吸住磁珠，以『負篩選法』將未吸附之 pan T 標的細胞沖出並收集。

[1]分離 pan T 細胞：負篩選法

以 Ficoll-paque gradient 方式分離出 HPBMCs，並以 1 倍 PBS 清洗二次及細胞計數後，將細胞移至 1.5 ml 微量離心管中，以 1000 rpm 離心 5 分鐘，盡可能把上清液完全吸除，以每  $10^7$  個細胞溶於 80  $\mu$ l 的 MACS buffer 【0.5 % BSA；2 mM EDTA 溶於 1 倍 PBS 中】，再以每  $10^7$  個細胞加入 20  $\mu$ l 的 Hapten-Ab cocktail 混合均勻，在 6~12 °C 冰箱中作用 10 分鐘後，以 1000 rpm 離心 5 分鐘並取 1 ml MACS buffer 清洗細胞二次，以每  $10^7$  個細胞加入 80  $\mu$ l 的 MACS buffer 與 20  $\mu$ l 的 MACS Anti-Hapten MicroBeads，混合均勻，在 6~12 °C 冰箱中作用 15 分鐘後，以 1000 rpm 離心 5 分鐘並取 1 ml MACS buffer 清洗細胞一次，隨後以每  $10^8$  個細胞溶於 500  $\mu$ l 的 MACS buffer 中。將 LS column 架設於 MACS 磁板上，以 3 ml MACS buffer 潤濕管柱後，加入細胞懸浮液，此時須以乾淨之 15 ml 離心管收集細胞沖流液，再以 3 ml MACS buffer 將殘餘之標的細胞洗下 (須收集)，共 4 次，之後將管柱由磁板上取下，利用所附之活塞將 non-T 細胞擠出，並收集於另一離心管中，作為鑑別純度之對照組。

## [2]pan T 細胞之純度鑑別

為確定所得之 pan T 細胞純度為何，將 pan T 細胞與 non-T 細胞以每  $10^7$  個細胞溶於 100  $\mu$ l 的 MACS buffer 中，並移至褐色 1.5 ml 離心管，以每  $10^7$  個細胞加入 10  $\mu$ l 的 FITC-conjugated CD3 Antibody，混合均勻，在 6~12 °C 冰箱中作用 10 分鐘後，以 1000 rpm 離心 5 分鐘，每  $10^7$  個細胞以 200  $\mu$ l 的 MACS buffer 清洗，細胞以  $1 \times 10^6$ /ml 的濃度再懸浮於 MACS buffer 中，將細胞通過 40  $\mu$ m nylon mesh 濾去聚集的細胞，以免阻塞流式細胞儀之樣品吸入孔，把單細胞懸浮液收集在流式細胞儀專用管中，準備上機。流式細胞儀與分析軟體之使

用，將於後作詳加敘述，不同的是，此純度鑑別使用之染劑為 FITC，故儀器偵測之波長範圍須設定為 520 nm 之綠色螢光波長。

#### (4) *reFIP-gts* 處理 HPBMC 的濃度關係

將 HPBMC 計數成  $2 \times 10^6/\text{ml}$ 、小鼠脾臟細胞計數成  $4 \times 10^6/\text{ml}$ 、pan T cell 計數成  $1 \times 10^6/\text{ml}$ ，以每孔加入 1 ml 細胞懸浮液，種植於 12 well plate 中，再依序加入不同濃度的 *reFIP-gts* 分別為 0、0.5、1.0、2.0、4.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  及以 PHA-L 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  作為對照組。混合均勻後置於  $37^\circ\text{C}$  培養箱中培養 24、36、48、60、72 小時。在欲觀察之時間點，將細胞液移至 15 ml 離心管中，以 1200 rpm 離心 5 分鐘，收集上清細胞培養液，此細胞培養液以 ELISA 進行細胞激素之分析；細胞則用 PBS 清洗後用 70 %酒精固定，以流式細胞儀分析細胞週期，其方法待後敘述。

#### (5) HPBMCs 預先處理抑制劑後，再以 *reFIP-gts* 刺激

將 HPBMCs 計數成每個 well 含有  $2 \times 10^6/\text{ml}$ 、小鼠脾臟細胞計數為  $4 \times 10^6/\text{ml}$ 、pan T cell 計數成  $1 \times 10^6/\text{ml}$ ，並種植於 12 孔培養盤中，依序加入 DMSO 10  $\mu\text{l}/\text{well}$ 、p38 專一性抑制劑 SB203580 10  $\mu\text{M}$ 、PI3-kinase 抑制劑 LY294002 50  $\mu\text{M}$ 、wortmannin 50 nM、GSK-3 抑制劑 SB216763 50  $\mu\text{M}$  及 MEK 抑制劑 U0126 10  $\mu\text{M}$ 、PD58095 50  $\mu\text{M}$  到各 well 中，混合均勻後置於  $37^\circ\text{C}$  培養箱中培養 1 小時後，每 well 中再加入 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 *reFIP-gts* 混合均勻，置於  $37^\circ\text{C}$  培養箱中培養 24、48、72 小時。在欲觀察之時間點，將細胞液移至 15 ml 離心管中，以 1200 rpm 離心 5 分鐘，收集上清細胞培養液，此細胞培養液以 ELISA 進行細胞激素之分析；細胞則用 PBS 清洗後用 70 %酒精固定，以流式細胞儀分析細胞週期。

## (6) 細胞之固定與染色

將欲分析之細胞以 5 ml 冰的 1 倍 PBS 清洗，1200 rpm 離心 5 分鐘，共洗二次，並在最後將上清液小心吸乾，緩緩加入 1 ml 之  $-20^{\circ}\text{C}$ ，70 % 酒精以固定細胞，必須邊搖邊加，以增加固定效果，置於  $4^{\circ}\text{C}$ ，隔天再次以 5 ml 冰的 1 倍 PBS 清洗二次，並吸乾離心後之上清液，加入 1 ml propidium iodide mixer 【1 % Triton X-100, 0.5 mg/ml RNase A, 4  $\mu\text{g/ml}$  propidium iodide，需避光】混合均勻，室溫作用 30 分鐘使 PI 染上 DNA，將細胞通過 40  $\mu\text{m}$  nylon mesh 濾去聚集的細胞，以免阻塞流式細胞儀之樣品吸入孔，把單細胞懸浮液收集在流式細胞儀專用管中，準備上機。

## (7) 儀器操作與軟體分析

為偵測細胞內 DNA 含量，本實驗使用 Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS) 系統，以流式細胞儀 (FACSCalibur, BECTON DICKINSON) 作分析。利用壓力將待測細胞在鞘液的包圍之下呈單行排列，依次通過雷射照射區，由雷射光源激發出 488 nm 波長的光波打在細胞上，會依細胞的不同特性而產生不同的螢光與光散射，在雷射光束垂直的  $90^{\circ}$  位置收集紅色螢光訊號 (617 nm)，可偵測細胞中染上 PI 的 DNA 含量，藉此將不同 DNA 含量的細胞以 CELLQuest 軟體作紀錄。每秒測量約 90-120 個細胞，每組測量 10,000 的細胞。最後再利用 ModFit 3.0 版軟體，將處於不同細胞週期的細胞數百分比作區別與統計分析。

## 四、細胞激素之活性測定

### (1) human 與 mouse IFN- $\gamma$ 之測定

本實驗使用 R&D 之 duoset kit 操作方法，首先取 100  $\mu\text{l}$  溶於 1 倍 PBS

【137 mM NaCl ; 2.7 mM KCl ; 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,pH 7.4 , 利用 0.22 μm 過濾膜予以過濾】之 anti-human IFN-γ capture antibodies (4 μg/ml)或 anti-mouse IFN-γ capture antibodies (4 μg/ml) coating 96 孔盤，包上保鮮膜，目的在隔離外界的異物侵入，於室溫下靜置一晚，第二天早上使用微孔盤清洗機以 1 倍 PBS 含有 0.05 % Tween20 之清洗液清洗清洗三次，將多餘或未固定在盤子底部的 capture antibodies 移去，以清洗液盤時，每次 350 μl/well，並於最後一次將各 well 中的液體吸取乾淨。進行 Blocking 步驟，將各 well 加入 350 μl 的 Blocking buffer 【1 % skim milk、5 % sucrose 及 0.05 % NaN<sub>3</sub> 溶於 1 倍 PBS】，於室溫下靜置 1 小時，之後再以微孔盤清洗機清洗盤子，以清洗液清洗三次，每次 350 μl/well，並於最後一次將各 well 中的液體吸取乾淨。接著可進行細胞激素的測定，若無法立即使用可以用保鮮膜包住平放在於 4°C 冰箱中備用，以不超過 1 星期為佳。立即使用時則取細胞經處理刺激後所收下來的細胞培養液 100 μl/well 以及用 reagent diluent 【Tris-buffered Saline 即 20 mM Trizma base, 150 mM NaCl 調 pH=7.2 再加入 0.1 % BSA 及 0.05 % Tween 20 混合均勻】稀釋後的 IFN-γ 標準品於 96 孔盤中，在室溫下培養 2 小時，之後用微孔盤清洗機清洗。以清洗液清洗三次，每次 300 μl/well，並於最後一次將各 well 中的液體吸取乾淨。再加入 detection antibodies，以 reagent diluent 稀釋，(mouse 為 400 ng/ml, human 為 100 ng/ml ; 100 μl/well) 在室溫下培養 2 小時後再用微孔盤清洗機以洗液清洗三次，每次 300 μl/well，再加入 Streptavidin-HRP 並以 reagent diluent 稀釋 (稀釋比例為 1:100)，用量為 100 μl/well，於室溫靜置並且須避光 30 分鐘，再用微孔盤清洗機以洗液清洗三次，每次 300 μl/well，再加入呈色劑 tetramethylbenzidine (TMB，購自 ZYMED) 100 μl/well 亦須於室溫之下避光 30 分鐘；發色劑(chromogen)本來為無色的物質，但經過配位體上的酵素作用即 streptavidin-conjugated HRP (HRP : horseradish peroxidase) 的催化後，此時樣品會由透明轉為水藍

色；最後加入 stop solution 【2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>】 50 µl/well 作用 5 分鐘，此時樣品會由水藍色轉為黃色。最後以微孔盤讀值機在波長 450 nm 下測吸光值。每次實驗皆有三重覆並且與標準檢量線比較，以測得樣品濃度之計算。標準品 recombinant human IFN- $\gamma$  標準品 及 recombinant mouse IFN- $\gamma$  標準品由 R&D duoset system kit 提供。製備 recombinant human IFN- $\gamma$  標準品的標準檢量線方式如下：先取 0.5 ml 的 reagent diluent 將粉末狀的 recombinant human IFN- $\gamma$  標準品充分溶解，濃度為 70 ng/ml，再分裝儲存於-20°C 冰箱中備用，並避免反覆解凍冷凍。將 70 ng/ml 的 recombinant human IFN- $\gamma$  標準品與 reagent diluent 依不同濃度系列稀釋成 1000 pg/ml、500 pg/ml、250 pg/ml、125 pg/ml、62.5 pg/ml、31.25 pg/ml、15.625 pg/ml。每個濃度均有三重覆並以 100 µl/well 加入 96 孔盤內。而 recombinant mouse IFN- $\gamma$  標準品則由 0.5 ml 的 reagent diluent 將粉末狀的 recombinant mouse IFN- $\gamma$  標準品充分溶解，濃度為 100 ng/ml，再與 reagent diluent 依不同濃度系列稀釋成 2000 pg/ml、1000 pg/ml、500 pg/ml、250 pg/ml、125 pg/ml、62.5 pg/ml 及 31.25 pg/ml。每個濃度均有三重覆並取 100 µl/well 加入 96 孔盤內。其作用方式同上所述，便可計算得到 recombinant human IFN- $\gamma$  及 recombinant mouse IFN- $\gamma$  的標準檢量線及公式，並將細胞上清液經 ELISA 分析所得吸光值帶入標準品的公式，即可換算出細胞受刺激後所誘發之 IFN- $\gamma$  的量。

## (2)mouse IL-4 之測定

使用 R&D 之 duoset kit 操作方法，與測量 mouse IFN- $\gamma$  方法略同，只有 reagent diluent 的配方為 1 % BSA 溶於 1 倍 PBS 中，不用 Tris-buffered Saline 且不含 0.05 % Tween 20。

### (3)human IL-4 測定

使用 Pharmingen human IL-4 ELISA kit 操作方法，首先取 48  $\mu$ l anti-human IL-4 capture antibodies 溶於 coating buffer【0.1 M Carbonate, pH 9.5; 配方為 0.84 g  $\text{NaHCO}_3$  加 0.356 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶於 100 ml 滅菌水】中 coating 96 孔盤，包上保鮮膜，於 4°C 下靜置一晚，第二天早上使用微孔盤清洗機以 1 倍 PBS 含有 0.05 % Tween20 之清洗液清洗三次，每次 350  $\mu$ l/well，並於最後一次將各 well 中的液體吸取乾淨。進行 Blocking 步驟，將各 well 加入 300  $\mu$ l 的 Assay Diluent (購自 Pharmingen)，於室溫下靜置 1 小時，之後再以微孔盤清洗機清洗盤子，以清洗液清洗三次，每次 350  $\mu$ l/well，並於最後一次將各 well 中的液體吸取乾淨。取待測之細胞培養液 100  $\mu$ l/well 以及用 Assay Diluent 稀釋後的 IL-4 標準品於 96 孔盤中，在室溫下培養 2 小時，之後用微孔盤清洗機清洗。以清洗液清洗五次，每次 350  $\mu$ l/well，並於最後一次將各 well 中的液體吸取乾淨。再加入以 Assay Diluent 稀釋之 detection antibodies 與 Avidin-HRP 混和液，在室溫下作用 1 小時後再用微孔盤清洗機以洗液清洗七次，每次 350  $\mu$ l/well，再加入呈色劑 Biotin-TMB (A 劑與 B 劑 1 比 1 混和，購自 Pharmingen) 100  $\mu$ l/well 須於室溫下避光 30 分鐘；最後加入 stop solution【2 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 】50  $\mu$ l/well 作用 5 分鐘，最後以微孔盤讀值機在波長 450 nm 下測吸光值。每次實驗皆有三重覆並且與標準檢量線比較，以測得樣品濃度之計算。標準品 recombinant human IL-4 標準品由 Pharmingen kit 提供。製備 recombinant human IFN- $\gamma$  標準品的標準檢量線方式如下：將 115 ng/ml 的 recombinant human IL-4 標準品與 Assay Diluent 依不同濃度系列稀釋成 1000 pg/ml、500 pg/ml、250 pg/ml、125 pg/ml、62.5 pg/ml、31.25 pg/ml、15.625 pg/ml。每個濃度均有三重覆並以 100 $\mu$ l/well 加入 96 孔盤內。其作用方式同上所述，便可計算得到 recombinant human IL-4 的標準檢量線及公式，並將細胞上清液經 ELISA 分析所得吸光

值帶入標準品的公式，即可換算出細胞受刺激後所誘發之 IL-4 的量。

## 五、Western blot(西方點墨法)

### (1) 樣品製備

取年約 25 歲之健康成人的全血 60 ml，以 Ficoll-paque 分離淋巴球，以 1500 rpm 離心 30 分鐘後，小心吸取中間一層的 Buffy coat 淋巴球並以 1 倍 PBS 溶液清洗二次後，再懸浮於不含血清的 RPMI-1640 培養液中，以細胞計數器調整成  $1 \times 10^7$  cell/ml 後種於 1.5 ml 微量離心管中。以 FIP-gts 2  $\mu\text{g/ml}$  加入各微量離心管中，處理時間分別為 0、1、5、10、20、40 分鐘。處理時間一到立即以 1200 rpm 離心 5 分鐘，去除上清液加入 100  $\mu\text{l}$  的細胞均質緩衝液【10 mM EDTA；10 mM EGTA；5 mM NaF；10 % glycerol；1 mM DTT；400 mM KCl；0.4 % Triton X-100；20 mM sodium  $\beta$ -glycerophosphate；0.1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ；1 mM PMSF/DMSO；3  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin；2  $\mu\text{g/ml}$  pepstatin A；2  $\mu\text{g/ml}$  Leupeptin；1 倍 phosphatase inhibitor cocktail I (Sigma,P 2850)；1 倍 phosphatase inhibitor cocktail II (Sigma,P 5726)】，使細胞溶解，置於冰上待全部樣品皆以製備完畢後再以超音波均質機在 4°C 下將細胞完全打破，反覆兩次每次間隔 10 分鐘以上，之後再離心 12000 rpm，4°C，20 分鐘，小心吸取上清液，存放置另一乾淨滅過菌的 1.5 ml 微量離心管中並進行蛋白質定量。必須注意的是為防止 phosphatase 將磷酸根去除而無法偵測到，從加藥完成將細胞離心下來，至加入 2 倍 SDS 樣本緩衝液，並以 95°C 加熱的過程，需在二小時內完成。

### (2) 蛋白濃度定量分析

使用 Bio-Rad 試劑測蛋白濃度。先以 1 比 4 比例將 Bio-Rad reagent 與二次水稀釋混合完全，此為 Bio-Rad 蛋白質偵測試劑。接著取得測物即細



胞上清液 2  $\mu\text{l}$  與已經稀釋的 Bio-Rad 蛋白質偵測試劑 498  $\mu\text{l}$  混合均勻，於 1.5 ml 微量離心管中在 37°C 中作用 20 分鐘後，以分光光度儀於波長 595 nm 測吸光值，再與標準品 (bovine serum albumin ; BSA) 比較以求得待測物的蛋白濃度( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )。標準品 BSA 的測試方法為，分別取 2  $\mu\text{g}$ 、4  $\mu\text{g}$ 、6  $\mu\text{g}$ 、8  $\mu\text{g}$  及 10  $\mu\text{g}$  的 BSA 加入已稀釋的 Bio-Rad 蛋白質偵測試劑 498  $\mu\text{l}$ 、496  $\mu\text{l}$ 、494  $\mu\text{l}$ 、492  $\mu\text{l}$ 、490  $\mu\text{l}$  混合均勻，於 1.5 ml 微量離心管中在 37°C 中作用 20 分鐘後，同樣以分光光度儀於波長 595 nm 測吸光值，所得到的吸光值與不同濃度的標準品比較，可以得到檢量線的公式，將蛋白質上清液即樣品的吸光值帶入該公式並乘上稀釋倍數，則可得到蛋白質樣品的真實濃度。

### (3)SDS-聚丙烯醯胺板膠電泳之轉漬

將樣品以 SDS-聚丙烯醯胺板膠電泳法分析，並在電泳分析完畢前 10 分鐘，先準備一張大小相當的 Hybond-P membrane (Pharmacia)，須用甲醇浸潤一下約 15 秒，改以二次水清洗 10 分鐘，再浸泡於 transfer buffer 【20 % methanol ; 192 mM Glycine ; 25 mM Tris-HCl ,pH 9.2】中約 1 分鐘備用。將分析完畢的電泳片小心取下，在半乾式轉漬器：Hoefler Semiphor Transfer 上，依序放上 3 張事先的浸好 transfer buffer 的 3M 濾紙、transfer buffer 浸潤過的 Hybond-P membrane，電泳片、另外 3 張浸好 transfer buffer 的 3M 濾紙，利用以半乾式轉漬法在電源供應器：Pharmacia Biotech power supply EPS 301，以每平方公分 2 mA 電流的條件下進行 60 分鐘，使膠上的蛋白質由負極往正極的方向轉移到 Hybond-P membrane。將 transfer 好的 Hybond-P membrane 浸泡在含有 5 %脫脂奶粉的 1 倍 TTBS buffer 【50 mM Tris , 0.2 %Tween 20 , 150 mM NaCl, pH 7.5】中，於室溫下 shaking 1 小時，進行 blocking。

#### (4) 抗體作用及偵測方法

將已 blocking 完成的 Hybond-P membrane 分別加入專一性的一級抗體。利用含有 5 % BSA 的 1 倍 TTBS buffer 稀釋下列一級多株(polyclonal) 抗體: anti-rabbit IgG-HRP 的 p38 (1:1000, Cell Signaling #9212)、phospho-38 (1:1000, Cell Signaling #9211)、ERK (1:1000, Cell Signaling #9102)、Akt (1:1000, Cell Signaling #9272)、phospho-Akt Ser<sup>473</sup> (1:1000, Cell Signaling #9271)、phospho-GSK-3 $\beta$  Ser<sup>9</sup> (1:1000, Cell Signaling #9336)、COX-2(1:1000, Cayman #160106)等;用含 5 % 脫脂奶粉的 1 倍 TTBS buffer 稀釋下列一級抗體: anti-mouse IgG-HRP 的 phospho-ERK (1:2000, Cell Signaling #9106)。於 4°C 下 shaking 一個晚上(至少 16 小時)。隔天取出 membrane, 一級抗體以 1:100 的比例加入 2 % 的 sodium azide 作為防腐劑後可回收重複使用, 接著以 100 ml 5 % 脫脂奶粉之 1 倍 TTBS buffer 在室溫下清洗 membrane 2 次, 每次 10 分鐘, 再用 100 ml 的 1 倍 TTBS buffer 在相同條件下室溫清洗 2 次, 每次 10 分鐘。再以 5 % 脫脂奶粉之 1 倍 TTBS buffer 稀釋含有 anti-rabbit IgG-HRP 的二級抗體 (1:5000, Cell Signaling #7074)或 anti-mouse IgG-HRP 的二級抗體(1:5000, Chemicon AP124P), 於室溫下震盪作用一小時, 重覆上述之清洗步驟。利用 E.C.L. 呈色劑 (NEN, NEL105), 以 1:1 的方式加入 Enhanced luminol reagent 與 Oxidizing reagent 混合均勻, 將 membrane 的正面朝下放入裝有呈色劑的盒子中作用 5 分鐘, 以催化 HRP 呈色, 並將螢光呈現在 X-光底片上, 曝光時間約 3~5 分鐘, 再以顯影劑及定影劑將影像洗出。

## 六、塵蟎蛋白 *Der p* 的粗萃取

本實驗使用之塵蟎粗萃取物為 Allergon 公司之產品；在玻璃均質研磨器 (homogenizer, WHEATON, USA) 中加入 2 ml 冰的 1 倍 PBS 緩衝液，秤取 0.05 g 的 *Dermatophagoides pteronyssinus* 塵蟎粗萃取物倒入其中，在冰上小心研磨，直到溶液呈褐黃色並且當中無顆粒狀完全均質化為止，將研磨液移至玻璃離心管中，加入 4 ml 乙醚充分混合均勻，在 4°C，3000 rpm 離心 5 分鐘後，溶液會分為三層，由上至下依序是乙醚層、*Der p* 混合物層以及黃色之 *Der p* 粗蛋白層，以無菌滴管小心吸取最下層之 *Der p* 粗蛋白液移至 50 ml 離心管中，傾斜凍入 -80°C 冰箱中以增加液面表面積，待完全凍結後即可開始進行真空冷凍乾燥，將乙醚完全吹乾，把乾燥完成的粉末以 2 ml 滅菌水溶解，再以 4°C，5000 rpm 離心 10 分鐘，以微量吸取器小心吸出上清液 (即為塵蟎之粗蛋白液) 至乾淨的微量離心管中進行蛋白之定量與保存。

## 七、重組塵蟎蛋白 *Der p* II<sub>1-129</sub> 的構築與製備

### (1) 鏈聚合酵素連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

由於 S<sub>2</sub>R (*Der p* II) plasmid DNA 上並無限制酵素切位，故利用分生技術，將 *Der p* II 基因選殖並構築於適合表現蛋白之載體上。取 1 μl *Der p* II plasmid DNA 作為模板，加入 5 μl 的 Pro-Taq 10X PCR buffer；2 μl 的 10 mM dNTP；1 μl 的 Pro-Taq enzyme；2 μl 的 10 pmole primer I (含 *Bam*HI 限制酵素切位的 *Der p* II start，其序列如下：AGGATCCGATCAAGTCGATGTCAAAGATTG) 及 2 μl 的 10 pmole primer II (含 *Eco*RI 限制酵素切位的 *Der p* II end，其序列如下：GGAATTCTTAATCGCGGATTTTAGCATGAG)，最後加滅菌水到最終體積

50  $\mu$ l，並在 PCR 儀器中設定下列條件：先 94°C 加熱 5 分鐘，再以 94°C 1 分鐘、60°C 1 分鐘、72°C 2 分鐘，重複 35 個循環後，72°C 10 分鐘，最後停在 4°C，作用完畢取 10  $\mu$ l 以 1.5 % agarose gel 進行電泳分析。

## (2)凝膠洋菜瓊脂(agarose gel 的電泳分析)

### [1] 1.5 % agarose gel 的製備方法:

取 0.45 克的 agarose powder 加入 30 ml 的 0.5 倍 TBE buffer 中【40 mM Tris-Borate, pH 8.0, 1 mM EDTA】混合均勻後於微波爐中加熱 2 分鐘至凝膠呈現透明，待溫度稍下降後倒入平面膠體製備槽中，其上並放置一片梳狀膠片(comb)，待完全凝固後小心取出梳狀膠片，其所留下的凹槽可作為注入樣品加入之用。

### [2]電泳操作:

將 1.5 % agarose gel 置於電泳槽中，注入 0.5 倍 TBE buffer 並使其蓋過膠體，將 PCR 產物與適當量的 6 倍 loading dye buffer (0.25 % Bromophenol blue, 0.25 % Xylene Cyanol FF, 30 % Glycerol) 混合均勻後，注入膠片的凹形槽中，接上電源以 120 伏特電壓使 DNA 由負極向正極移動。約 40 分鐘後取出膠片，放置於含有 5  $\mu$ g/ml 的 ethidium bromide (EtBr)中浸染 5 分鐘，由於 ethidium bromide 具有嵌在 DNA 上的特性，所以操作時應小心謹慎不要觸摸到皮膚。並將 agarose gel 於紫外光中觀察橘紅色的 DNA 片段。

## (3)由 Agarose gel 回收 DNA 片段 (Elution)

將 PCR 產物經由 1.5 % agarose gel 的電泳分析後，用紫外燈(波長 360 nm)確定 DNA 片段的膠體的位置，再利用一把銳利的刀片切下含有 DNA

片段的膠體，放入 1.5 ml 微量離心管中，再使用 BandPrep KD-08 Kit 回收 agarose gel 中的 DNA 片段。BandPrep KD-08Kit 中含有 A1、A2、A3 buffer 成份由於並未公開，因此不作贅述。回收 DNA 片段的實驗步驟如下：取 A1 buffer 400-800  $\mu$ l 不等的 buffer (400  $\mu$ l 的 A1 buffer 可溶解 100 mg agarose gel) 至含有 agarose gel 的 1.5 ml 微量離心管中，再用 60°C dry bath 溶解 gel 約 5 至 10 分鐘，當中須不時將微量離心管上下搖動，直到 agarose gel 完全溶解為止，之後加入 BandPrep resin 10  $\mu$ l (由於 BandPrep resin 會沉澱，所以使用前須先混合均勻再以微量吸取器吸取)，加入 BandPrep resin 後將 1.5 ml 微量離心管上下倒置，混合均勻，靜置於室溫下 10 分鐘，再於室溫下進行離心 12000 rpm，1 分鐘。使用微量吸取器將上清液儘量移除丟棄，之後加入 1 ml 的已事先稀釋的 wash buffer (按照 A3: Ethanol: 滅菌二次水 = 1:3:2 的比例稀釋而成)。將沉澱物打散清洗，再於室溫下離心 12000 rpm，1 分鐘，以微量吸取器小心將上清液去除，加入 120  $\mu$ l 的 A2 buffer 混合均勻，於 60°C dry bath 放置 1 分鐘，再以 12000 rpm 離心 1 分鐘，小心將上清液移至 1.5 ml 乾淨的微量離心管中 (此時溶液中含有回收的 DNA)，加入 250  $\mu$ l 的 95% Ethanol 及 3 M NaOAc 10  $\mu$ l 混合均勻後，置於 -80°C 冰箱 20 分鐘，目的在促進 DNA 沉澱；之後取出在 4°C 下 12000 rpm 離心 20 分鐘，小心移除上清液，再用 500  $\mu$ l 的 75% Ethanol 清洗 DNA pellet 二次，以洗去殘留的鹽類；最後以 Speed Vacuumed 真空乾燥機進行抽乾後，加入滅過菌的二次水 30  $\mu$ l 以溶解 DNA，完成後之回收 DNA 產物可儲存在 -20°C 冰箱中備用。

#### (4) PCR 產物接合反應 (Ligation reaction)

以 plasmid DNA 當模板進行 PCR，產物經由 *Bam*HI 及 *Eco*RI 限制酵素水解後，進行 1.5% agarose gel 電泳分析確認大小片段無誤後，進行回

收並與益生生技公司的產品：yT&A vector 進行接合反應，反應中所含之反應試劑集體積如下：

<u>內容物</u>	<u>體積</u>
T4 DNA ligase buffer A(含 10 mM ATP)	1 $\mu$ l
T4 DNA ligase buffer B	1 $\mu$ l
yT&A vector (25 ng/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
PCR 產物	5 $\mu$ l
YEA T4 DNA ligase (3U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

在 cooler bath 下於 4°C 作用隔夜。PCR 產物最好在 16 小時內與 yT&A vector 進行接合反應效果較好，因為由 Pro-Taq 所進行的 PCR 反應，其產物分別在兩端會多出一個 A base，會與 yT&A vector 兩端上的 T base 互相黏合以增加接合作用。而接合完成的產物則可進行轉形作用。

#### (5)轉形作用(Transformation)

##### [1]勝任菌體(Competent Bacterial Cells)製備

製備 Competent Bacterial Cells 方法如下:在 37°C 下培養單一菌落的大腸桿菌 (XL10-Gold™ strain, Stragene) 於 3 ml 的 LB 培養液【LB 配方: Trypton 10 克，Yeast extract 5 克，NaCl 10 克，1 M MgSO<sub>4</sub> 10 ml，補二次水至 1 公升，pH 7.0】中 shaking 約 16 小時後，再將 3 ml 的菌液加入 100 ml 的 LB 培養液中，於 37°C 下培養 3~5 小時，在 4°C 下以 7000 rpm 離心 15 分鐘，將上清液倒掉，沉澱物加入 20 ml 的 Transformation buffer【10 mM MOPs，100 mM CaCl<sub>2</sub>，30 mM glucose 及 15 % Glycerol，pH6.5，濕滅】混合均勻再次以 4°C，7000 rpm 離心 15 分鐘，倒掉上清液，加入 10 ml 的 Transformation buffer 輕輕將菌體

懸浮，在無菌操作台上以每 200  $\mu$ l 分裝至乾淨的 1.5 ml 微量離心管中，將菌液置於冰上 30 分鐘，隨後換到 -20°C 冰箱置放 30 分鐘，之後儲存在 -80°C 冰箱中備用。

[2]轉形作用的步驟:

自 -80°C 取出勝任菌體 (Competent Bacterial Cells) 200  $\mu$ l 置於冰上回溫 5 分鐘，加入 5  $\mu$ l 接合完成的 DNA (ligation mixture，轉形前可先以 1.5 % 洋菜膠電泳分析，確定接合成功)，輕輕注入後，置於冰上 30 分鐘，再以 42°C dry bath 加熱 1 分鐘，目的為進行熱休克效應 (Heat Shock) 並立即放回冰上，加入 800  $\mu$ l 的 LB 培養液，在 37°C 培養箱中震盪 1 小時，此時將含有 LB agar 之培養皿置於 37°C 培養箱中回溫備用，震盪完畢將已轉形之勝任細胞菌液以 12000 rpm 離心 1 分鐘，小心去除上清液，再加入 200  $\mu$ l LB 培養液再懸浮。由於 yT&A vector 上含有  $\beta$ -gal 基因，因此在塗抹前先分別加入 20  $\mu$ l，100 mM 的 Isopropyl- $\beta$ -thioalactopyranoside (IPTG) 及 10  $\mu$ l 10 % X-gal (溶於 N,N'-Dimethylformamide) 在 LB Amp<sup>+</sup> agar plate (50  $\mu$ g Ampicillin / 1 ml LB，固體培養皿成份則為 500 ml LB 加 7.5 克 agar) 上均勻塗開，待完全乾再將菌液塗抹至 LB Amp<sup>+</sup> agar plate 上，於 37°C 培養箱中培養 14 小時。隔天培養皿上會出現藍、白兩種顏色的菌落，使用已經滅過菌的牙籤挑選白色菌落(白色菌落表示載體可能嵌入 DNA 中，藍色則否)並接種於含有 3 ml 的 LB Amp<sup>+</sup> 培養液試管中，在 37°C 培養箱中震盪一晚，之後將菌液取出準備抽取菌中的質體 DNA。

#### (6)質體 DNA 的微量抽取

本實驗使用 Protech 公司之 Gene-Spin<sup>TM</sup> Miniprep Purification Kit 將質

體 DNA 從菌中分離，其中含有 solution I、II、III、wash buffer 和 Gene-Spin spin columns，成份並未公開。其分離步驟如下：先將菌液倒入 1.5 ml 微量離心管中，以 12000 rpm 離心 1 分鐘，小心去除上清液後，加入 200  $\mu$ l solution I 將沉澱物再懸浮，再加入 200  $\mu$ l solution II 小心翻轉微量離心管五到六次，使溶液均勻混合逐漸呈現透明狀，再加入 200  $\mu$ l solution III 小心翻轉微量離心管混合均勻，此時溶液中出現白色棉絮狀物體為 genomic DNA，以 12000 rpm 離心 5 分鐘後小心吸取上清液至 spin column 中，注意避免吸到 genomic DNA；將 spin column 置入 collection tube，以 8000 rpm 離心 1 分鐘 spin down 後，倒掉 collection tube 中的濾液，再加入 700  $\mu$ l wash buffer 清洗 column 共二次，最後倒掉 collection tube 中的濾液，以 8000 rpm 離心 3 分鐘，以除去殘留之微量 ethanol，並將 spin column 置於 60°C 加熱 5~10 分鐘，以蒸乾 ethanol；最後將 spin column 移至全新滅過菌的 1.5 ml 微量離心管中，小心加入 30  $\mu$ l 的二次水（預先以 60°C 加熱），8000 rpm 離心 2~3 分鐘將 DNA elute 出來，可重複加水以得到較多的 DNA，但必須注意的是 DNA 濃度會被稀釋。抽出之 plasmid DNA 即準備進行限制酵素反應。

#### (7)限制酵素反應確定接合作用

<u>內容物</u>	<u>體積</u>
10X Buffer K	2 $\mu$ l
<i>Bam</i> H1(15U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
<i>Eco</i> R1(1U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	10 $\mu$ l
plasmid DNA	6 $\mu$ l



於 37°C 下作用 2 小時，再進行洋菜膠電泳分析，確定是否切出質體及嵌入的 DNA 片段的大小。

#### (8) 質體 DNA 的中量抽取

質體經由限制酵素作用後，再經由 agarose gel 電泳分析，觀察 DNA 片段大小出現的情形，若所切下來的 DNA 位置與先前 PCR 的產物大小相同，則表示 PCR 產物極有可能已嵌入於載體上。因此必須進行核酸定序分析 (由波仕特公司進行) 來作進一步的確認。但所分析的質體 DNA 須經由 Clontech kit 的方法作中量抽取與純化，其中含有 S1、S2、S3、N2、N3 及 N5 buffer，其成份並未公開。質體 DNA 的中量抽取步驟如下：取可能含有嵌入 DNA 的菌液 100  $\mu$ l 加入含有 LB Amp<sup>+</sup> (50  $\mu$ g Ampicillin/ml LB) 液體培養液 100 ml 中，在 37°C 震盪培養一晚，於 4°C 7000 rpm 離心 20 分鐘，將上清液倒掉，加入 S1 buffer (含有 RNase A) 4 ml，用滅菌之塑膠滴管將沉澱物再懸浮，再加入 S2 buffer 4 ml，輕輕上下翻轉離心管 6 至 8 次以混合均勻，靜置於室溫勿超過 5 分鐘，之後再加入 S3 buffer 4 ml (須先置於冰上預冷)，輕輕混合均勻後置於冰上 5 分鐘，以 12000 rpm 離心 20 分鐘 4°C，小心取上清液並以所附之濾紙過濾，收集所得濾液起來，準備通管柱純化。在通管柱之前，管柱須先經前處理，先以 2 ml N2 buffer 潤濕管柱，目的在於平衡管柱內樹脂離子的濃度，待其完全通過後，再加入濾液，待濾液完全通過，再加入 N3 buffer 4 ml 加以清洗，重複此清洗步驟，共洗二次，此時加入 N5 buffer 5 ml，使其通過管柱，並且務必收集沖出之液體，將其以 800  $\mu$ l 分裝至 8 個 1.5 ml 微量離心管中，再分別加入 560  $\mu$ l 的 isopropanol 混合均勻，置於 -20°C 10 分鐘以幫助沉澱 DNA，12000 rpm 離心 20 分鐘，4°C，小心倒掉上清液，再以 1 ml 75 % 酒精清洗 DNA 沉澱物，12000 rpm 離心 5 分鐘，4°C，共二次，吸除上清液以真空乾燥機抽乾。

最後用 100  $\mu$ l 的滅菌二次水溶解質體 DNA，完全溶解後使用分光光譜分析儀於 260 nm 波長下測量吸光值，以計算所抽得之質體 DNA 濃度。

【公式:  $\mu\text{g/ml DNA} = \text{吸光值(OD}_{260\text{ nm}}) * 50 \mu\text{g/ml} * \text{稀釋倍數}$ 】

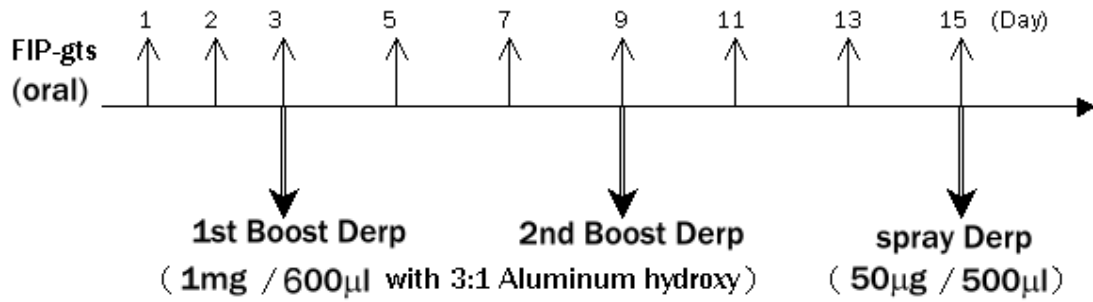
#### (9) 選殖適當之表現載體與菌體

將核酸定序分析完成並確定無誤的質體 DNA，再次利用限制酵素 *Bam*HI 及 *Eco*RI 切出嵌入之 *Der*p II 基因，並將 Pharmacia 之 pGEX4T-1 (具有 Glutathione-S-transferase 基因之表現載體) 亦以上述二種酵素切出缺口，以進行另一次的接合作用，方法如下: 取 10 倍 T4 DNA ligase buffer 2  $\mu$ l，限制酵素作用過之 pGEX4T-1 vector 與 *Der*p II 基因 (約 1:5)，T4 DNA ligase 1  $\mu$ l，補二次水至 20  $\mu$ l，在 cooler bath 下於 4 $^{\circ}$ C 作用隔夜。在經過 agarose gel 電泳確定接合後，轉形至 BL-21 表現菌體中，並進行 *reDer* p II 融合蛋白表現與純化。

### 八、塵蟎致敏動物模式的建立

#### (1) *Der* p 粗蛋白之致敏程序

將 400  $\mu$ l 含有 1 mg 之 *Der* p 粗蛋白液輔以 3:1 之佐劑 (aluminum hydroxide) 於 4 $^{\circ}$ C 的 shaker 均勻混合 30 分鐘後，以腹腔注射 (intraperitoneal, i.p.) 的方式給予每隻 Balb/c 小鼠，注射時間為開始餵食 *reFIP-gts* 蛋白後的第三天，並於第九天再以腹腔注射追加第二劑 *Der* p (1 mg) 輔以 aluminum hydroxide (3:1)。在第 15 天時，每隻小鼠以 50  $\mu$ g 之 *Der* p 粗蛋白液進行噴霧，噴霧期間約為三分鐘內將 500  $\mu$ l *Der* p 粗蛋白液噴完；實驗期間每二天餵食一次 *reFIP-gts* 蛋白，時間表如下頁：



## (2)採集小鼠檢體

### [1]血液與血清

將欲犧牲之 Balb/c 小鼠腹腔注射 100 µl 濃度為 65 mg/ml 之 pentobarbitol，使小鼠麻醉至昏死狀態，開胸，以 rinse 過 EDTA 之針頭與針筒作心臟採血，並立即製作血液抹片，待劉氏染色；其它血液檢體則以 4°C，6000 rpm 離心 5 分鐘，小心吸取上層血清移至 1.5 ml 微量離心管中，保存於-20°C，待 ELISA 分析。

### [2]血液抹片之劉氏染色

待血液抹片風乾後，滴上 Liu A 約 0.8~1 ml 使溶液佈滿血液檢體，染色 15 秒；再緩慢滴加 Liu B 約 1.5 ml 充滿整個玻片，輕輕搖晃玻片使二種染劑混合，並注意勿使染劑溢出玻片外，染色 30 秒後，染劑液面出現金屬光澤，立即以少量自來水輕輕沖洗玻片背面，待自然風乾後，即可在油鏡下觀察白血球型態。良好的染色血液樣本會呈現淡褐色，太紅或太藍都可能影響白血球種類的判讀。

### [3]肺部沖洗液(BAL)之取得

從小鼠體內小心將整個氣管、肺臟連同心臟一起取出，利用縫線小心將心臟與肺臟連接處結紮，將預先減去針頭尖端之 3 ml 針筒裝入 1 ml

滅過菌的 1 倍 PBS 緩衝液，小心把針頭插入氣管中約 0.7 cm，再以縫線綁緊氣管與針頭，以免因滑動而使針頭脫落，一手用鑷子夾緊縫線處，一手將針筒中的 PBS 緩緩推入小鼠肺臟中，推入時一邊推一邊吸，分段式將 1 ml PBS 全部擠入，輕拍肺臟後再將 PBS 全部吸回針筒中，並紀錄收回的毫升數，以計算回收率。將取得之 BAL 以 800 rpm 離心 10 分鐘，吸出上清液凍於-20°C 待 ELISA 偵測其中之 IgE。細胞沉澱物則滴於玻片上作劉氏染色觀察細胞型態。

#### [4]Total IgE 之 ELISA 偵測

使用 Pharmingen mouse IgE kit 操作方法。

# 結果

## 一、大腸桿菌中重組 FIP-*gts* 的表現與純化

將已構築完成含有 FIP-*gts* coding region 的 pGEX 4T-1 表現載體(圖一 A),轉形至大腸桿菌 TG-1 中表現,並利用 glutathione-Sepharose 4 Fast Flow 親和性管柱純化重組 FIP-*gts* 融合蛋白。由於須供應動物實驗餵食小鼠,故將 500 毫升菌液量提升為二公升以大量表現,經增菌、以 IPTG 刺激、離心並破菌後所得之粗蛋白液,再通入 glutathione Sepharose 親和性管柱。由於此表現融合蛋白的過程中,每二公升菌液約可取得 24 mg 的融合蛋白(圖一 B)。接下來進一步使用 Thrombin 將 Glutathione S transferase 與重組蛋白間的鍵結切去,利用內含 25 kDa molecular weight cut 的分子篩離心管,在 4 °C 以 5000 Xg 離心 10 分鐘,之後加入滅菌水重複上述離心步驟,直到將 26 kDa 的 GST 與 13 kDa 的重組 FIP-*gts* 分離開,則能得到較純的重組 FIP-*gts* 約 9 mg (圖一 C)。

## 二、*reFIP-gts* 免疫調節功能活性之分析—促進細胞增生

### (1) 處理不同時間與不同濃度的 FIP-*gts* 對 HPBMC 細胞分期的影響

本實驗的目的有二,一是確定經純化步驟的重組 FIP-*gts* 是否尚具有誘導 HPBMCs 增生的能力;二為利用 propidium iodide (PI)與細胞內 DNA 的專一性鍵結,搭配流式細胞儀偵測細胞週期中的 S phase,以觀察正處於合成 DNA 的細胞百分比。

首先將 HPBMCs 細胞數調整為  $2 \times 10^6$  cells/ml,加入稀釋成各種標的濃度( $\mu\text{g/ml}$ )的 FIP-*gts*,並以 10  $\mu\text{g/ml}$  的 PHA 作為陽性對照組。結果發現,未經過任何處理的 HPBMCs 大多處於分化完全的狀態,故

G1/G0 期高達 92 至 94 %，相對的 S 期比例非常低只有 1 到 2 %，而 G2/M 期佔 2.6 至 5.4 % (圖二)；但若處理 FIP-gts 後，細胞中 S 期的百分比會隨著處理 FIP-gts 的濃度增加而逐漸升高，在觀察 36 小時的時間點，處理 0.5、1.0、2.0 至 4.0  $\mu\text{g/ml}$  FIP-gts 細胞的 S 期依序增加為 4.95 %、8.03 %、16.95 %到 27.94 %；並伴隨著 G1 期由 89.7 %、85.19 %、77.16 %至 65.68 %逐漸降低；在處理相同濃度不同時間的條件，亦可見隨著 FIP-gts 處理時間的增加，S 期的百分比亦會隨之逐漸升高，在以 2  $\mu\text{g/ml}$  FIP-gts 處理 24、36、48、60 小時，細胞的 S 期依序為 2.2 %、16.95 %、23.79 %到 26.35 %；且 G1 期由 90.23 %、77.16 %、65.57 %至 62.45 %逐漸降低；而 G2/M 期亦至 7.57%增加至 11.2%，此結果表示細胞有增殖現象，而不是 S phase 的停滯現象。

## (2) FIP-gts 誘導 HPBMCs 增生需透過的訊息傳遞途徑

此外，本實驗欲了解 FIP-gts 究竟是透過何種機制誘導 HPBMCs 增生，其中需要哪些訊息傳遞途徑的參與？故利用許多不同的專一性抑制劑作初步探討。已知 SB203580、LY294002 與 U0126 分別為 p38 MAP kinase、PI 3-kinase 及 MEK 的專一性抑制劑，並不會影響其他種類 kinase 的活性。其作用原理分別是：SB203580 可與 ATP 競爭 p38 MAPK 的 ATP binding site (Young et al., 1997)；LY294002 亦是競爭 PI 3-kinase 中 catalytic subunit 上的 ATP binding site (Stein and Waterfield, 2000)；而 U0126 與 PD98059 相同，都屬於 ATP 與 ERK (二者皆是 MEK 的 substrates) 的非競爭型抑制劑 (Favata et al., 1998)。分別取 10  $\mu\text{M}$  SB203580、50  $\mu\text{M}$  LY294002 與 10  $\mu\text{M}$  U0126 預先處理 HPBMCs 一小時後，再加入 2  $\mu\text{g/ml}$  的 FIP-gts 共同處理 24、48、72 小時，同樣以流式細胞儀分析細胞週期 (圖三 A)。結果發現，HPBMCs 在單獨處理

FIP-*gts*，觀察加藥 48 小時後，細胞的 S 期會由 2.2 % 明顯增加至 23.79 %，在 72 小時甚至多達 38.5 %；但若預先處理 LY294002 抑制 PI 3-kinase 的活性後再加入 FIP-*gts* 48 小時後，與抑制劑的溶劑 DMSO 相比，細胞的 S 期由 19.36 % 降低至 9.3 %（以 student T test 計算得  $p < 0.05$ ），具有統計上的意義；推論 PI 3-kinase 在 FIP-*gts* 誘導 HPBMCs 的增生中扮演著極重要的角色。而預先處理 U0126 與 SB203580 組，雖在 48 小時細胞的 S 期並無明顯下降，但到了 72 小時，與 DMSO 組相比亦出現了抑制作用，雖然抑制效果仍不及 LY294002 顯著，但有趣的是 SB203580 在 72 小時的抑制作用亦達到 13.13 %，而 U0126 也有 18.63 % 的抑制效果。

### 三、*reFIP-gts* 免疫調節功能活性之分析—釋出細胞激素

已知 FIP-*gts* 能誘導 HPBMCs 增加許多細胞激素的表現，如 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  與 IL-2 (Haak-Frendscho et al., 1993)。因此本實驗的目的為確定經由大腸桿菌表現的重組 FIP-*gts* 是否具有誘導 HPBMCs 產生細胞激素的能力，如 IFN- $\gamma$ ，以及先前的研究 (Lin, 1996) 中顯示，FIP-*gts* 除了能增加 IFN- $\gamma$  的轉錄之外，亦會使 IL-4 的 mRNA 表現量增加，故以 ELISA 方式觀察 IL-4 蛋白層面的表現情形。

#### (1) 處理不同時間與不同濃度 FIP-*gts* 對 HPBMC 產生 IFN- $\gamma$ 的影響

將稀釋成各種濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 的 FIP-*gts* 與 10  $\mu\text{g/ml}$  的 PHA 加入  $4 \times 10^6$  cells/ml 的 HPBMCs 中，培養 24、36、48、60、72 小時後，以 ELISA 偵測細胞培養上清液中 IFN- $\gamma$  的含量。在處理濃度方面，以 0、0.5、1、2、4  $\mu\text{g/ml}$  的 FIP-*gts* 處理 HPBMCs 48 小時後，測得之 IFN- $\gamma$  含量由 0、3241、3541、3901 增加到 4486 pg/ml；而時間上若以 2  $\mu\text{g/ml}$  的 FIP-*gts*

處理 HPBMCs 24、36、48、60、72 小時後，測得之 IFN- $\gamma$  含量由 2856、3566、3901、4281 到 4766 pg/ml，結果顯示 IFN- $\gamma$  分泌量確實會隨著 FIP-*gts* 處理的濃度或時間的增加而逐漸升高，這與之前的研究吻合 (Hsu, 1996) (圖四)。

## (2) 處理不同時間與不同濃度 FIP-*gts* 對 HPBMC 產生 IL-4 的影響

分析方法同 IFN- $\gamma$ 。結果發現雖然 FIP-*gts* 確實會誘導 IL-4 的產生，並且具有 dose-dependent 的關係隨劑量增加而上升，如以 0、0.5、1、2、4  $\mu$ g/ml 的 FIP-*gts* 處理 HPBMCs 24 小時後，測得之 IL-4 含量由 35、93、266、411 到 498 pg/ml；但值得注意的是不論是何種濃度的 FIP-*gts*，隨著處理時間的延長，IL-4 的產量卻會逐漸降低，例如以 2  $\mu$ g/ml 的 FIP-*gts* 處理 HPBMCs 24、36、48、60、72 小時後，測得之 IL-4 含量由 411、436、292、195 到 128 pg/ml (圖五)，顯示 FIP-*gts* 誘導 IL-4 產生似乎屬於較前期且短暫的，不同於 IFN- $\gamma$  到 72 小時還可測得極高的含量，並且 IL-4 的量明顯低於 IFN- $\gamma$ 。

## 四、 FIP-*gts* 刺激 HPBMCs 當中產生 IFN- $\gamma$ 的標的細胞

一般而言產生 IFN- $\gamma$  的細胞有 NK cell、macrophage、dendritic cells 及 Th cells，為了進一步找尋 FIP-*gts* 作用的 target cell，並且已知大多數的 mitogen 會透過 T cell receptor (TCR) 活化 T 細胞 (Ohtsuka et al., 1996)，故大膽假設 FIP-*gts* 誘導細胞增生與釋放細胞激素的標的細胞正是 T 細胞。因此利用磁珠分離系統 MACS 中的負篩選法，將 HPBMCs 當中帶有 CD11b、CD16、CD19、CD36 及 CD56 等 cell surface marker 的細胞除掉，如：B cells、monocyte、NK cells、dendritic cells、early erythroid cells、platelets 與 basophils 等細胞，而剩下 T 細胞。利用 hapten- conjugated 單株抗體雞



尾酒 (含 anti-CD11b rat IgG2b、anti-CD16 mouse IgM、anti-CD19 mouse IgG1、anti-CD36 mouse IgG2a 及 anti-CD56 mouse IgG1 等抗體) 與上述細胞結合，再加入 coating anti-hapten 之磁珠，將欲去除之細胞接上磁珠，再通入具有磁場的管柱使磁珠及其上的細胞吸附於管柱上，以分流出未與抗體結合的 pan T cells。若欲測量純度則可將沖流出之細胞，再以 FITC-conjugated anti-CD3 搭配流式細胞儀作分離純度的確認。由圖六 A 可知，未經 MACS 分離的 HPBMCs 在以 FITC-conjugated anti-CD3 抗體偵測後，可區分出 negative 與 positive 二群，分別約佔 40% 及 60%；而我們欲純化之 pan T cells 為 FITC positive 群，經過分離後可得到約 90% 的 CD3-FITC positive T cells。但若要更精確評估 T 細胞的純度，觀察是否有任何 non-T cells (如 leukocytes 或稀有 erythroid cells) 的殘留，則須再加入 conjugated 其他非 FITC 之螢光物質的 anti-CD45，此時欲得之 T cells 為 double positive，以此可更精確判斷 T 細胞的純度。

#### (1) 處理不同時間與不同濃度的 FIP-gts 對 T 細胞的細胞分期之影響

將分離並確認純度為 90% 的 pan T cells 細胞數調整為  $1 \times 10^6$  cells/ml，以與 HPBMCs 相同的方式分析細胞週期 (圖六 B 及 C)。結果發現，pan T cells 亦會隨著 FIP-gts 刺激濃度的增加而增加 S 期的百分比，但是效果只有約 HPBMCs 的一半，即 HPBMCs 在 2  $\mu$ g/ml FIP-gts 處理 48 小時後，S phase 可達 23.79%，然而相同的條件下，pan T cells 的 S phase 只有上升至 10.83%。

#### (2) FIP-gts 誘導 pan T cell 增生需透過的訊息傳遞途徑

此外，亦利用預先處理不同種類的抑制劑，進一步觀察有哪些訊息傳遞與 FIP-gts 誘導 pan T cells 增生有關 (圖七 A 及 B)。結果與 HPBMCs

相似，預先處理 LY294002 後，再予以 FIP-gts 刺激 72 小時，亦會明顯抑制細胞 S phase 的增加。不同的是，在 pan T cells 當中，處理 U0126 似乎比 LY294002 更能有效抑制 S phase 的增加。在觀察加入 2  $\mu\text{g/ml}$  的 FIP-gts 48 小時後，pan T cells 的 S 期為 10.83 %，而預先處理 DMSO 之對照組的 S 期為 2.96 %，SB203580 組之 S 期為 2.19 %，而 LY294002 組為 3.27 %，但是預先處理 U0126 組之 S 期只有 1.57 %，與 DMSO 組相比約下降的 50 %。有趣的是，不論是單獨處理 FIP-gts，或是預先處理 SB203580 與 U0126 組的 G2/M phase 皆約為 9 到 10 %，唯有 LY294002 組的 G2/M phase 只有 3.54 %。

### (3) 處理不同時間與不同濃度 FIP-gts 對 T 細胞產生 IFN- $\gamma$ 的影響

結果與 HPBMCs 相似，FIP-gts 刺激 T 細胞產生 IFN- $\gamma$  的作用，無論不同濃度的 FIP-gts (0、0.5、1、2、4  $\mu\text{g/ml}$ ) 在 48 小時刺激 pan T cells 產生 IFN- $\gamma$  的量為 91.38、134.5、227.42、338.88 及 352.83  $\text{pg/ml}$ ，或是 2  $\mu\text{g/ml}$  的 FIP-gts 刺激 24、48、72 小時後 IFN- $\gamma$  的量 218.67、338.88 及 462.83  $\text{pg/ml}$ ，皆具有隨著處理 FIP-gts 的濃度或時間的增加而增加 IFN- $\gamma$  產生的關係，只是產生的量與 HPBMCs 相比低很多 (圖八)。

## 五、 探討 FIP-gts 誘發細胞激素之訊息傳遞途徑

### (1) 與調控產生 IFN- $\gamma$ 相關之訊息傳遞途徑

由先前的實驗已證實重組 FIP-gts 確實可以誘發 HPBMCs 產生 IFN- $\gamma$  (圖四)，但其調控的作用機制尚不清楚。因此本實驗藉由預先處理許多不同訊息傳遞途徑之專一性抑制劑，作初步篩選，觀察有哪些訊息途徑參與 FIP-gts 誘發 IFN- $\gamma$  的產生。由於在觀察細胞的增生時，發現 LY294002 的抑制效果極顯著，推論 PI 3-kinase 在調控 FIP-gts 的免

疫調節活性上扮演重要的角色，因此使用的抑制劑除了先前介紹的 SB203580、LY294002 與 U0126 外，亦加入另一種 PI 3-kinase 抑制劑 wortmannin 及其 Akt 下游基因 GSK-3 的抑制劑 SB216763，還有另一種 MEK 之專一性抑制劑 PD98059。結果發現除了 LY294002 的抑制效果極顯著之外（在 48 小時由 4626 pg/ml 降低至 701 pg/ml），其他幾種抑制劑對於抑制 FIP-gts 誘導 HPBMCs 產生 IFN- $\gamma$  的效果似乎不明顯（圖九）。

為了進一步證實 PI 3-kinase 對於 FIP-gts 誘導 IFN- $\gamma$  產生的重要性，亦利用不同濃度的 LY294002 作前處理，發現在單獨處理 2  $\mu$ g/ml 的 FIP-gts 48 小時後測得之 IFN- $\gamma$  含量為 3971.9 pg/ml，而 pre-treat 不同濃度 LY294002 (6.25、12.5、25 及 50  $\mu$ M) 後，IFN- $\gamma$  量由 2276.3、911.3、426.3 降至 284.7 pg/ml，可知隨著加入的 LY294002 濃度越高，細胞培養上清液當中的 IFN- $\gamma$  含量會遞減（圖十）。

然而在 pan T cells 中亦可觀察到 LY294002 抑制 IFN- $\gamma$  產生的情形（圖十二），由 338.88 降至 91.79 pg/ml (48 小時)；但值得注意的是，處理 U0126 亦可抑制 IFN- $\gamma$  的產生 (116.58 pg/ml)。

## (2) 與調控產生 IL-4 相關之訊息傳遞途徑

雖然 IL-4 的產生量並不高，但我們亦利用上述六種抑制劑，探討 FIP-gts 在誘導 IL-4 產生過程中的訊息傳遞（圖十一）。在不加任何抑制劑 2  $\mu$ g/ml 的 FIP-gts 處理 HPBMCs 24、48、72 小時後 IL-4 的量依次為 414、359、168.7 pg/ml，而在處理 50  $\mu$ M 的 LY294002 抑制 PI 3-kinase 的活性後，測得的 IL-4 量亦減少，在 24、48、72 小時分別為 134.5、127.8、124.5 pg/ml；而同樣是 PI 3-kinase 抑制劑的 wortmannin，抑制

效果並不持久，在 24、48、72 小時分別為 88.4、121.3、186.6 pg/ml，似乎只有在 48 小時內有作用，到了 72 小時 IL-4 的含量與對照組差不多。有趣的是，不論是 U0126 或是 PD98059，加入這二種 MEK 的專一性抑制劑後，在 HPBMCs 中 FIP-*gts* 誘導產生的 IL-4 皆有先增加隨後又遞減的趨勢。

### (3)在 HPBMCs 中 FIP-*gts* 活化 PI 3-kinase 的情形

由上述實驗可知，在 HPBMCs 中 FIP-*gts* 不論是促進細胞增生或是產生細胞激素，PI 3-kinase 皆扮演著相當重要的角色，因此除了利用專一性抑制劑來探討之外，亦用 Western blot 進一步確定處理 FIP-*gts* 後 HPBMCs 當中與 PI 3-kinase 有關的蛋白是否被活化？首先觀察 PI 3-kinase 的下游基因 Akt (又稱 PKB)的活化情形。以 anti-phospho-Akt Ser<sup>473</sup> 的抗體偵測 HPBMCs 的細胞萃取液，由圖十三 A 可看出，處理 FIP-*gts* 確實會短暫地增加磷酸化 Akt 的表現；B 圖則是預先處理一小時 LY294002 抑制 PI 3-kinase 活性後，再予以 2 µg/ml FIP-*gts* 刺激 40 分鐘，則磷酸化 Akt 的表現會完全被抑制。

除了磷酸化 Akt 的表現，我們也進一步觀察 Akt 的下游 effector，GSK-3β (glycogen synthase kinase-3β)磷酸化的情形。實驗結果發現磷酸化 GSK-3β 的表現確實增加且持久，到 60 分鐘都可觀察得到 (圖十四)。由此可再次證實，在 HPBMCs 中 FIP-*gts* 會透過 PI 3-kinase 表現其免疫調節功能。奇怪的是，若以 LY294002 抑制 PI 3-kinase 的活性，磷酸化 GSK-3β 的表現並無明顯降低的現象。

### (4)在 HPBMCs 中 FIP-*gts* 活化 MAP kinase 的情形

此外，我們亦觀察 HPBMCs 在處理 FIP-*gts* 後是否會活化其中的

MAP kinase 活性？由圖十五中得知，p38 MAPK 會短暫地活化，在 5 分鐘可達到磷酸化的高峰。ERK 的活化情形與 p38 MAPK 類似（圖十六 A），圖十六 B 則是以不同濃度的 FIP-gts 處理 HPBMCs 十分鐘觀察磷酸化 ERK 的表現，可得到一 dose-dependent 的關係。若進一步使用專一性抑制劑則發現，加入 U0126 抑制 MEK 的活性後，FIP-gts 誘導的 ERK 活性亦會被抑制；然而加入 SB203580 似乎無法抑制 FIP-gts 誘導的磷酸化 p38（圖十五，十六 A）。

## 六、製備二種 *Der p* 蛋白致敏小鼠

由先前的實驗證實在大腸桿菌中表現的 *reFIP-gts* 確實具有免疫調節功能，可促進 HPBMCs 的增生並誘導大量的 IFN- $\gamma$  產生，因此推論 *reFIP-gts* 在體內能藉由大量產生 IFN- $\gamma$  誘導體內的免疫反應走向 Th1 而降低 Th2 反應，進一步達到減敏的效果。而一般而言常見的過敏原不外乎塵蟎、花粉、蟑螂等。分析 *Dermatophagoides pteronyssinus* 之水溶性蛋白萃取物再以免疫電泳法可區分出 51 種抗原；其中 11 種抗原可以和家塵蟎過敏病人血清之 IgE 作反應，此 11 種抗原即為過敏原(Krilis et al., 1984)。在進一步分析這些過敏原與過敏病人的相關性之後，發現 *Der p I*、*Der p II* 和 *Der p V* 為最主要的過敏原(van der Zee et al., 1988)。其中 *Der p II* 主要是存在於家塵蟎的消化道及排泄物中，由 129 個氨基酸構成，分子量約 14 kDa (Chua et al., 1990)。因此我們利用由 Allergon 公司購得之天然塵蟎萃取物中萃取 *Der p* 粗蛋白液，以及利用遺傳工程由大腸桿菌中表現 *reDer p II*<sub>1-129</sub> 重組蛋白等二種物質作為致敏 Balb/c 小鼠的致敏原。

### (1) 利用 native *Der p* 萃取物純化 *Der p* 粗蛋白液

由 Allergon 公司購得 1 克之 *Der p* 塵蟎萃取物，其中含有 596 隻塵

蟎，利用丙酮洗去雜質後真空乾燥，純度高達 98%，另外 2% 為 medium particles。將 0.05 克的塵蟎混合 PBS 研磨至完全均質化後加入乙醚，此時由於 PBS 與乙醚的比重不同故會形成一清晰介面，必須震盪均勻後馬上置入離心機中離心，否則介面會立即恢復。離心後容液分為三層，最上層之透明無色液體是乙醚層其中包含塵蟎中的一些非極性物質（如：脂質）、最下層的黃色容液為粗蛋白層，中間呈固態的部分為塵蟎經磨碎後的雜質層（如：皮屑）；取出粗蛋白液傾斜凍於-80°C 是為了增加在冷凍乾燥時的表面積，待完全凍結後要立刻進行真空冷凍乾燥，將其中的水溶液及乙醚利用三相點原理，在低溫與低壓的環境之下直接變成氣體昇華去掉，若有些微溶解，則在乾燥過程中極易產生泡泡而使蛋白變性。以滅菌水溶解乾燥完全的 *Der p* 粗蛋白粉末後尚須離心，將變性的蛋白去除，即可得到用來致敏小鼠之 *Der p* 粗蛋白液，經過 Bio-Rad 蛋白定量後得知約有 18 mg 的 *Der p* 粗蛋白（圖十九）。

## (2) 在大腸桿菌中表現 *reDer p* II<sub>1-129</sub> 重組蛋白

本實驗是利用國泰醫院過敏免疫科 蔡肇基 主任所提供之含有 *Der p* II 基因的 plasmid，利用已設計完成的二段含有 *Bam*H I 與 *Eco*R I 限制酶切位的 primers，配合波仕特生技公司之 pro-Taq enzyme 進行 PCR 增幅，得到約 387bp 大小的 *Der p* II 第 1 至第 129 胺基酸的全長基因加上限制酶切位的片段，及增幅的 PCR 產物兩端上保留各一個 A base。由於此實驗的主要目的為後續純化重組 *reDer p* II<sub>1-129</sub> 蛋白，故將 *Der p* II<sub>1-129</sub> 的 PCR 產物接到由益生生技公司發展的 yT & A vector 上，由於此載體在 3' 及 5' 端上各有一個 T base，因此可將 PCR 產物與 yT & A vector 利用 T4 DNA ligase 進行 ligation。為確保接合的位置正確與否，會將 ligation product 以在 primer 上先設計含 *Bam*H I 及 *Eco*RI 序列的限

制酶先行切下，會切成 insert 片段 387bp 及 yT & A vector 片段。確定位置正確後，將此 ligation product 送至波仕特生技公司進行 DNA 序列的比對。Der p II<sub>1-129</sub> 的基因選殖與胺基酸序列與之前的文獻相同 (Chua et al., 1990)。

而另外為了能 Der p II<sub>1-129</sub> 基因可以在大腸桿菌中表現，因此將確定序列的 insert fragment 再由 yT & A vector 上切下，並改接到 pGEX4T-1 vector 上，其大小約 4.8 kb，同樣也以 *Bam*HI 及 *Eco*RI 限制酵素切下以確定接合進去的片段位置無誤 (圖二十 B)。將已構築好的含有 Der p II<sub>1-129</sub> coding region 的 pGEX4T-1 expression vector (圖二十 A)，轉形到大腸桿菌 BL-21 中進行融合蛋白表現，表現與純化方式與 *reFIP-gts* 相同 (圖二十 C 與 D)。但是所得之 *reDer p II<sub>1-129</sub>* 相較於 *reFIP-gts* 並不多，或許是 *Der p II* 蛋白在此表現系統中容易形成 inclusion body 而被離心沉澱至 pellet 中損失掉。

## 七、致敏小鼠之動物實驗

為了探討 *FIP-gts* 是否具有預防過敏性氣喘的發生或減敏的功效，故在致敏小鼠的動物實驗中，以先餵食二天不同劑量的 *FIP-gts* 後再進行 *Der p* 致敏，致敏步驟採用每隔六天腹腔注射一次混有佐劑之 1 mg *Der p* 抗原，佐劑與抗原的體積比為 1 比 3，共 boost 二次，最後利用噴霧器模擬正常情況下過敏原的暴露途徑予以刺激小鼠產生過敏反應，噴霧濃度為 50 µg/500 µl *Der p* 溶液，期間為時三分鐘 (圖二十一)；並在過程中每二天以胃管給予小鼠一定劑量的 *FIP-gts*。在噴霧後 24 小時犧牲小鼠，作心臟採血、BAL 沖洗液並取出脾臟。

我們觀察的生化指標有：(1) 將血液抹片與 BAL 抹片作白血球分類計

數，觀察其中嗜中性球、嗜酸性球、嗜鹼性球、淋巴球及單核球的百分比。

(2) 以 ELISA 測量血清中所含之 IFN- $\gamma$ 、IL-4、total IgE 與 *Der p*-specific IgE 的含量，以及 BAL 中 IgE 的含量。(3) 將取得的小鼠脾臟細胞在 *in vitro* 條件下再次以 *Der p* 或 FIP-gts 刺激 48 小時，以 ELISA 測量細胞培養液中 IFN- $\gamma$  與 IL-4 的含量。

#### (1) 小鼠血液中之白血球分類計數判斷法則

在圖二十二當中為 Balb/c 小鼠血液中白血球的型態，由於嗜鹼性球在一般血液檢體中並不常見，故只列舉出其他四種的白血球的圖片。以下簡述此五種白血球的判別方法：嗜中性球 (Neutrophils) 直徑約在 10 到 15  $\mu\text{m}$ ，在 leukocytes 中約占 10 到 40 %，其主要特徵為具有分葉的細胞核，一般而言約 2 到 5 葉，故亦稱 polymorphonuclear leukocytes；細胞質常呈現粉紅色或灰色，因其細胞質中含有許多呈中性的顆粒而不易染色。在 extravascular tissue 中的功能為 scavengers，可清除入侵體內的細菌及其他生物。嗜酸性球 (Eosinophils) 約 10 到 15  $\mu\text{m}$  大小，正常情況下在週邊血液中的含量約 0 到 4 %。細胞核常為二分葉，由於細胞質中含有許多嗜酸性顆粒，可被曙紅 (eosin) 染成亮紅色，故在染色後細胞質內充滿亮橘紅色顆粒為其主要特徵，其主要功能如同 phagocytes 可消滅侵入組織中的寄生蟲，且在過敏反應中扮演重要的角色。嗜鹼性球 (Basophils) 直徑約 10 到 15  $\mu\text{m}$ 。在 leukocytes 中只占 0.5 到 1.0 %，因此在一般血液抹片中極難發現，核具有 2 到 3 葉的分葉，但其分葉形式大多與 neutrophils 不同。細胞質中充滿暗紫色顆粒。與 eosinophils 相同可作為 phagocyte，但功能與肥胖細胞 (mast cells) 較相似，因其特殊顆粒中含有 histamine 與 heparin，故在急性發炎反應的起始期中扮演重要的角色。淋巴球 (Lymphocytes) 從 9 到 14  $\mu\text{m}$  皆有，但大多與紅



血球一般大小，佔 55 到 90%，核呈卵圓形，染色質極為緊密，與其他白血球相比淋巴球的核有很多黑點看起來髒髒的；細胞質的部分很少，呈淡藍色。分為 T 淋巴球與 B 淋巴球，然而在血液抹片中看起來都相同無法分辨。某些淋巴球會轉移到結締組織中變成漿細胞 (plasma cells)。單核球 (Monocytes) 約 12 到 20  $\mu\text{m}$ ，體積相當大，佔 3 到 8%，此種巨大的白血球在染色後有一顏色很淺的核，常呈馬蹄形或腎形，染色質成不規則狀且通常看不到核仁。細胞質的面積很大且染色時常有空泡 (是為液泡所在)，由此特徵可區別 monocytes 與大型的 lymphocytes。Monocytes 會轉移至結締組織中變成巨噬細胞 (macrophages)。

## (2) 分析致敏小鼠血液中之白血球分類計數

### a. 以 *Der p* 粗蛋白萃取液致敏小鼠

由圖二十三中可發現，在對照組小鼠的血液中，basophils 與 eosinophils 的含量都很少，只有約 0 到 2 % 以內，而 neutrophils 有 30.8 %、lymphocyte 有 60 %、monocyte 有 7.8 %，若是經過 *Der p* 致敏的小鼠其 eosinophils 平均值增加至 2.6 %，甚至其中有一隻小鼠高達 6 %；且 neutrophils 的比例由 30.8 % 增加至 56.3 %，lymphocyte 卻由 60 % 降低至 37.8 %。但若同時給予 2  $\mu\text{g}$  FIP-gts 的小鼠與單獨處理 *Der p* 組相比，其 neutrophils 含量可恢復至 37.8 %，lymphocyte 可增加至 48.3 %，雖然 eosinophils 的量無法降低，但可以得知 FIP-gts 在小鼠體內確實能產生作用，似乎能抵抗胃酸的侵蝕。

### b. 以重組 *Der p* II<sub>1-129</sub> 致敏小鼠

而若以重組 *Der p* II<sub>1-129</sub> 致敏小鼠後發現，basophils 由 1.2 % 加至 3.4 %，並且隨著餵食 FIP-gts 後又逐漸降低(圖二十六)；而 eosinophils

亦由 1.8 % 增加至 2.8 %，在共同餵食 0.4  $\mu\text{g}$  FIP-gts 的小鼠血液中達到最高 4.6 %，而在餵食 2.0  $\mu\text{g}$  FIP-gts 時又降至 3.5 %。由以上二種與發炎有關之白血球含量比例顯示，*Der p* II<sub>1-129</sub> 重組蛋白比 *Der p* 粗蛋白萃取液致敏小鼠的效果好很多，並且餵食小鼠 FIP-gts 似乎可以降低由 *Der p* II 過敏原引起之嗜鹼性球與嗜酸性球過多。此外 neutrophils 比例由 24.4 % 在致敏後增加至 34 % 到 37.8%，比對照組多約 10 %，而 lymphocyte 則由 72.2 % 降低至 56.8 %。另一方面，若是只餵食 2.0  $\mu\text{g}$  FIP-gts 而不給予致敏的小鼠血液中之白血球比例皆與對照組相似（圖二十三與二十六）。

### (3) 致敏小鼠血清與 BAL 中細胞激素與 IgE 的變化

不幸地以 *Der p* 粗蛋白萃取液致敏小鼠的方式中，無論在小鼠血清或是 BAL 中皆無法測得 IFN- $\gamma$ 、IL-4、total IgE 與 *Der p*-specific IgE 的含量 (data not shown)。但在以重組蛋白 *Der p* II<sub>1-129</sub> 致敏小鼠後則可測得些許 IgE 的表現量（圖二十七）。

### (4) 小鼠脾臟細胞於體外以 *Der p* 或 FIP-gts 再次刺激的細胞激素變化

欲探討經過 *Der p* 致敏或長期餵食 FIP-gts 的小鼠，其體內的免疫反應是否會受影響，因此將其脾臟細胞於體外再次給予 *Der p* 或 FIP-gts 刺激，觀察 IFN- $\gamma$  與 IL-4 的變化。意外發現，長期餵食 2  $\mu\text{g}$  FIP-gts 的小鼠其脾臟細胞在體外再以 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的 FIP-gts 刺激時，幾乎不會產生 IFN- $\gamma$  (只有 81.9  $\text{pg}/\text{ml}$ ，幾乎為 basal level)，而對照組的脾臟細胞以 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  FIP-gts 刺激時還是可以產生約 463.8  $\text{pg}/\text{ml}$  的 IFN- $\gamma$ ；令人驚訝的是，若是經過 *Der p* 致敏後的小鼠，其脾臟細胞產生 IFN- $\gamma$  的量約有 1100.7  $\text{pg}/\text{ml}$ ，比對照組高出幾乎有 2.5 倍之多（圖二十四）。然而此五

組脾臟細胞在體外給予 *Der p* 處理後皆沒有測得 IFN- $\gamma$  的改變量 (皆小於 85 pg/ml)。

遺憾的是，當經過 *Der p* 致敏的小鼠脾臟細胞在體外再次以 *Der p* 刺激後，並沒有測得 IL-4 的分泌，其他四組亦然 (皆小於 40 pg/ml) (圖二十五)；而體外刺激 FIP-gts 後 IL-4 的改變情形與 IFN- $\gamma$  相似，在餵食 2  $\mu$ g FIP-gts 後的小鼠，其脾臟細胞再以 2  $\mu$ g/ml 的 FIP-gts 在體外刺激 48 小時後產生 IL-4 的量只有 50.2 pg/ml，比對照組的小鼠脾臟產生的 IL-4 (133.6 pg/ml) 還要低很多，而雖然經過 *Der p* 致敏後的小鼠脾臟組產生 IL-4 的量 (381.4 pg/ml) 明顯比其他二組還要多，但共同餵食 0.5 及 2  $\mu$ g FIP-gts 組的 IL-4 分別為、422.7 與 185.4 pg/ml，可看出經過 *Der p* 致敏但有餵食 2  $\mu$ g FIP-gts 的小鼠體內產生 IL-4 的量似乎可回復至與對照組的量相近。

#### (5) 在 HPBMCs 中 *Der p* 粗蛋白萃取液活化 COX-2 的情形

由上述實驗可知，我們所純化的 *Der p* 粗蛋白萃取液似乎沒有很好的致敏效果，不僅沒有觀察到小鼠出現過敏症狀、eosinophils 數目沒有明顯增加、刺激 IL-4 的量亦不多，並且在血清中亦沒有測得 total IgE 或是 *Der p*-specific IgE，故利用體外的分析方式偵測 *Der p* 粗蛋白萃取液的活性。再者由於 COX-2 的表現與發炎反應密切相關 (Peebles et al., 2000)，並且為了了解我們所純化之 *Der p* 粗蛋白的活性，故利用 *in vitro* 方式進行分析。將細胞數調整為  $4 \times 10^6$  cell/ml 之後，加入不同濃度的 *Der p* 粗蛋白，及不同濃度 *Der p* 共同處理 2  $\mu$ g/ml FIP-gts 培養 16 小時，收取細胞培養上清液，利用 ELISA 偵測其中 IL-4 的表現，並萃取細胞 total protein，以 western blot 觀察 COX-2 的表現，二者並行作為 double check。結果發現 *Der p* 粗蛋白誘導 HPBMCs 產生 COX-2 的表現量極

低，要用到 20  $\mu\text{g}$ ；令人意外的是 FIP-*gts* 誘導 HPBMCs 產生的 COX-2 表現量很高 (圖十七 A)，在以 ELISA 偵測 IL-4 含量時亦可見一類似的效果(圖十八)。若進一步用不同濃度的 FIP-*gts* 處理 HPBMCs 16 小時後，觀察 COX-2 的表現，可得到一 dose-dependent 的關係。因此意外發現 FIP-*gts* 亦具有誘導 HPBMCs 表現 COX-2 的能力。

#### (6) 餵食 FIP-*gt* 後小鼠的體重變化

在進行實驗的過程中發現，餵食 2  $\mu\text{g}$  FIP-*gts* 的小鼠似乎比其他四組胖，在體重紀錄表 (圖二十六)中亦可看出，只有餵食 2  $\mu\text{g}$  FIP-*gts* 的小鼠在犧牲當天的體重為 31.7 克，比對照組多出 3.6 克，約增加了 13 % ( $p < 0.05$ )。

## 討論

由松杉靈芝 (*Ganoderma tsugae*) 菌絲體中純化的免疫調節功能蛋白—FIP-gts 具有誘發人類週邊血液單核球的增生，並能促使 Th1 cytokine—IFN- $\gamma$  大量表現 (Hsu, 1996)。

在觀察 FIP-gts 誘導 HPBMCs 增生方面，改用分析細胞週期的分式，可知原本已分化完全的人類週邊血液淋巴細胞其細胞週期絕大多數都是 G1 期，S 期與 G2/M 期幾乎不超過 5%；但處理了 FIP-gts 之後，可觀察到在 36 小時 S 期即明顯增加，G2/M 期在 48 小時後亦增加約一倍，代表著 FIP-gts 誘發產生之 S phase 增加並非使細胞發生 S phase arrest 而是促進細胞週期的 progression，使分化完全的 HPBMC 細胞再次進入細胞週期的循環當中開始合成 DNA 進行細胞增生，這與之前的研究吻合 (Hsu, 1996)。此種利用 PI 與 DNA 的專一性鍵結，再以 Flow cytometer 偵測細胞當中螢光含量的方式，可以取代  $^3\text{H}$ -Thymidine incorporation 使用放射線物質所產生的危險性，亦能避免 MTT assay 在操作過程中因顆粒溶解不均勻所產生的誤差，除此之外還可以監控細胞的 G1 phase 及 G2/M phase，確實是一個極簡便的分析方法。

除此之外，利用預先處理 HPBMCs 許多訊息傳遞的專一性抑制劑將細胞當中某種訊息傳遞抑制後，再予以 FIP-gts 刺激可發現，若以 LY294002 抑制 PI 3-kinase 活性後，FIP-gts 誘發的 HPBMCs 細胞增生效應則不明顯，由此可知 PI 3-kinase 在 FIP-gts 誘導 HPBMCs 增生中扮演很重要的角色。有報導指出，PI 3-kinase 在誘導 T 細胞活化上極為重要，當正常 T 細胞受到外界刺激時，會經由 TCR ( T cell receptor ) 或 CD28 將 PI 3-kinase 磷酸化，進而傳遞一連串的訊息反應 (Ward et al., 1996)；PI 3-kinase 可活化其下游基因 Akt，活化的 Akt 再透過正調控 MDM2、mTOR、NF- $\kappa$ B 或負調

控 GSK-3 $\beta$ 、FKHR、BAD 等活性，藉以調節細胞的生長、存活與增生，此外 PI 3-kinase 本身亦可透過 Akt-independent 方式，調節 SGK、RAC1/CDC42 與 PKC。

有報導指出 Akt 可藉由負調控 CKIs (如 p27<sup>KIP1</sup> 與 p21<sup>WAF1/CIP1</sup>) 的表現 (Graff et al., 2000) 與 GSK-3 $\beta$  的活性促使細胞增生。Akt 可以將 forkhead transcription factor (FKHR-L1) 磷酸化進而抑制 *CDKN1B* 基因轉錄出 p27<sup>KIP1</sup> (Dijkers et al., 2000)；亦可將 p21<sup>WAF1</sup> 的 Thr<sup>145</sup> 處磷酸化，使 p21<sup>WAF1</sup> 不能與 PCNA 形成 complex，而無法進一步抑制 DNA 的複製；另一方面在 cell cycle 的調控上，cyclinD 與 cyclin E 會分別與 CDK2 與 CDK4 結合，進而驅使細胞通過 G1 phase；而 cyclin A 與 CDK2 的結合則可驅使細胞通過 S phase，然而 Akt 活化後會降低 p21<sup>WAF1</sup> 與 CDK2、CDK4 結合而削減了 p21<sup>WAF1</sup> 抑制 CDK2 活性的能力，促使 cell cycle 的 progression (Rossig et al., 2001)；而 Akt 將 GSK-3 $\beta$  磷酸化後，會抑制 GSK-3 $\beta$  的活性。GSK-3 $\beta$  是一種 serine/threonine protein kinase 與葡萄糖代謝有關的酵素，亦與調節細胞週期及細胞增生有關 (Doble and Woodgett, 2003)，因為 GSK-3 $\beta$  也是 cyclin D1 kinase (Vivanco and Sawyers, 2002)。GSK-3 $\beta$  將 cyclin D1 磷酸化後，會使 cyclin D1 被 proteasome 降解掉，而 cyclin D1 對於細胞週期中的 G1/S phase transition 極為重要 (Diehl et al., 1998)，故活化的 Akt 能抑制 GSK-3 $\beta$  的活性，阻止 cyclin D1 被分解掉，而達到促進細胞週期 G1 phase 到 S phase 的 progression。由此可證實 PI 3-kinase 在調節細胞增生上的確扮演著相當重要的角色。而在我們的 Western blot 實驗中，以 FIP-gts 刺激 HPBMCs 後確實可見 Akt 與 GSK-3 $\beta$  的磷酸化；但令人費解的是在 LY294002 抑制 PI 3-kinase 活性後，Akt 磷酸化的情形會消失，然而 GSK-3 $\beta$  卻不會，因此 FIP-gts 或許尚會透過其他未知的訊息造成 GSK-3 $\beta$  的磷酸化，但此推測仍待進一步證實。

在探討 FIP-*gts* 誘導 HPBMCs 產生細胞激素的實驗中發現，IFN- $\gamma$  分泌量確實會隨著 FIP-*gts* 處理的濃度或時間的增加而逐漸升高，並且 IL-4 亦有些許表現，這與之前的研究吻合 (Lin, 1996)。但值得注意的是不論是何種濃度的 FIP-*gts*，隨著處理時間的延長，IL-4 的產量卻會逐漸降低，不同於 IFN- $\gamma$  到 72 小時還可測得極高的含量，顯示 FIP-*gts* 誘導 IL-4 產生似乎屬於較前期且短暫的，培養時間一久取而代之的是細胞開始大量的產生 IFN- $\gamma$ ；並且雖然 FIP-*gts* 會誘導 HPBMCs 產生 IL-4 但其產量與 IFN- $\gamma$  相差很多，所以 FIP-*gts* 刺激產生的細胞激素較偏向 Th1 的活化。

有許多研究說明 IFN- $\gamma$  的表現與 p38 MAP kinase signaling pathway 有關，Rincon 等人發現利用 SB203580 抑制 p38 MAP kinase 的活性後，會抑制產生 IFN- $\gamma$  卻不會抑制 Th2 細胞產生 IL-4 (Rincon et al., 1998)，在 2000 年亦有報導指出，IL-12 會活化 MAPK 的上游 kinase MKK 3/6 與 p38 MAP kinase 卻不會活化 p44/42 (ERK1/2)或是 stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase MAPK，並且說明在活化的 T 細胞或 Th1 細胞中 IL-12 必須活化 p38 MAPK 進而誘導 IFN- $\gamma$  的表現與分泌。然而我們初步以抑制劑探討其訊息傳遞時，發現 FIP-*gts* 似乎主要不是透過 p38 MAP kinase 及 ERK pathway，而是透過 PI 3-kinase pathway 大量誘發 IFN- $\gamma$  產生，這與另一種跟 FIP-*gts* 的功能及蛋白結構相似之金針菇免疫調節蛋白 FIP-*fve* 誘導 IFN- $\gamma$  的機制不同，在本實驗室先前的研究發現 FIP-*fve* 會透過 p38 MAPK 產生 IFN- $\gamma$  (Tang, 2001)。

有報導指出 T 細胞上的 TCR 可經由 PI 3-kinase 活化 PLC 與 Ras (Ward et al., 1996)；Ras 可將訊息傳給 kinase cascades 及下游的 ERK、JNK pathway。而 PLC (phospholipase C)所產生 phospholipid 二級訊息，可進一步活化 PKC 與更下游的 calcineurin/nuclear factor of activated T cells (NF-AT)

pathway (Ohteki et al., 2000)；此外亦有報導指出，當 Th1 細胞受到 T cell receptor-CD3 complex 活化時會誘發轉錄因子 NF-AT，進而誘導某些基因的表現，如 IL-2、TNF- $\alpha$  及 IFN- $\gamma$  等，而 FIP-*gts* 亦會促使上述三種細胞激素的表現 (Hsu, 1996; Lin, 1996; Miyasaka et al., 1992)，故 FIP-*gts* 誘導 IFN- $\gamma$  的表現，可能與 NF-AT 調控基因表現有關。而 NF-AT complex 是由 NF-ATp 與 AP-1 組成，NF-ATp 平時存在於細胞質中，一但細胞內鈣離子濃度增加時才會進入核中；而核中 AP-1 的活化則與 protein kinase C (PKC) 有關。此篇報導中 Rooney 等人指出，活化的 Th2 細胞中，唯有只含 NF-ATp 而不具有 AP-1 的 NF-AT complex 才能誘發 IL-4 基因的表現，也就是缺乏 AP-1 (即"AP-1-less")的 NF-AT complex 對於 IL-4 promoter 才具有專一性。因此推論 NF-ATp 是一個調節 Th1 與 Th2 cytokine 基因的 common regulatory factor，而 PKC-dependent factors (如 AP-1)的參與與否才是決定走向 Th1 或 Th2 基因表現的關鍵 (Rooney et al., 1994)。

而我們的實驗中發現 IL-4 在 FIP-*gts* 刺激的早期有表現但隨後又遞減，伴隨著 IFN- $\gamma$  的逐漸增多，因此我們推論或許在早期的訊息傳遞中，由於 AP-1 的表現較晚，所以有較多的"AP-1-less"的 NF-AT complex 在刺激初期促使 IL-4 的表現，等到 AP-1 的表現增多後才誘導出 Th1 的基因表現，不過此點仍待進一步分析 AP-1 表現的實驗加以證實。除此之外，在 2002 年有報導指出，IFN- $\gamma$  會藉由誘發 IRF-1 與 IRF-2 結合到三個不同的 IL-4 promoter 上作為 transcriptional repressors 直接抑制 IL-4 的基因表現 (Elser et al., 2002)，利用此 IFN- $\gamma$  與 Th2 cytokine IL-4 間的負回饋，在 Th1 與 Th2 反應間的消長平衡關係中提供了另一重要機制；亦能說明在受到 FIP-*gts* 刺激一段時間後，隨著 IFN- $\gamma$  逐漸增多 IL-4 的量卻逐漸減少。

在 Iniguez 等人於 1999 年的報導指出，無論是正常人類 T 淋巴球或是



Jurkat T cell 在受到 TCR/CD3 或 PMA 活化時皆會表現 COX-2 的 mRNA 與蛋白，並且 COX-2 的 mRNA 在活化的早期（約刺激後一小時）就已出現，基於此點 Iniguez 等人認為 COX-2 是一個 early T cell activation gene。一般認為 Cyclooxygenase (COX) 是合成 prostaglandin 及 thromboxanes 的關鍵酵素，目前所知 PGD<sub>2</sub>、PGF<sub>2</sub>α 及 thromboxanes 與呼吸道收縮有關，而 PGI<sub>2</sub> 具有鬆弛呼吸道的作用，然而有關於 PGE<sub>2</sub> 對於過敏性氣喘所引發起發炎反應的研究還不清楚，在過去的研究中指出 PGE<sub>2</sub> 具有氣管保護的作用，但另外有研究指出其有助於 Th2 cytokine 的產生，與 Th2 發炎反應較有關聯(Peebles et al., 2000)，因此是大多數非類固醇類抗發炎藥物的作用目標。但在 Iniguez 等人發表的文章中指出，在處理了 COX-2 專一性抑制劑（如：NS398 或 Celecoxib）會嚴重減少 T 細胞活化之後早期與晚期的反應，包括 CD25 與 CD71 的表現，IL-2、TNF-α、IFN-γ 的產生，甚至是 T 細胞的增生；但卻不會影響 CD69 (an immediate early gene) 的表現。並且 COX-2 抑制劑也會抑制 IL-2 promoter 與 TNF-α promoter 啟動之 reporter gene 的轉錄，而與 NF-κB 及 NF-AT 有關的 enhancers 所促進的轉錄亦會受到抑制 (Iniguez et al., 1999)。而我們亦觀察到 HPBMCs 在予以 FIP-gts 刺激 16 小時之後也測得 COX-2 與 IL-4 的表現，如此看來 FIP-gts 確實具有活化 T 細胞的能力，另一方面這或許是另一個說明為何在處理 FIP-gts 的早期會測得 IL-4 表現的原因。除此之外值得注意的是，在 HPBMCs 當中 FIP-gts 誘導產生的 COX-2 表現量很高，但本實驗室在進行肺癌細胞株 A549 及 H1299 的研究時，發現 FIP-gts 促進 COX-2 的產生並不明顯 (data not shown)。

目前大多數的研究都是說明細胞受到 IFN-γ 的刺激後會透過活化 PI 3-kinase pathway 調控下游基因的活性，如：IFN-γ 可藉由 PI 3-kinase/Akt pathway 將 STAT 1<sup>Ser727</sup> 處磷酸化 (STAT 為 Signal Transducers and Activators of Transcription)，使 STAT 1 形成 dimer 進入核中啟動相關基因的表現

(Nguyen et al., 2001)，亦可經由 PI 3-kinase 但卻不透過 STAT 1 訊息傳遞途徑調節 IFN- $\gamma$  促使 monocyte 進行 adhesion (Navarro et al., 2003)。然而在本研究中發現，FIP-gts 是透過 PI 3-kinase 調控 IFN- $\gamma$  的產生。在 2003 年日本的 Yoneda 等人指出，NK cells 處理 fractalkine (一種 chemokines) 後亦會透過 PI 3-Kinase 和 protein tyrosine kinases 明顯增加 IFN- $\gamma$  的表現 (Yoneda et al., 2003)。這似乎表示 PI 3-kinase 與 IFN- $\gamma$  之間的相互關係極為密切也相當複雜，而二者之間是否具有負回饋機制值得深入探討。

一般而言產生 IFN- $\gamma$  的細胞有 NK cell、macrophage、dendritic cells 及 Th cells，為了進一步找尋 FIP-gts 作用的 target cell，並且已知大多數的 mitogen 會透過 T cell receptor (TCR) 活化 T 細胞 (Ohtsuka et al., 1996)，故大膽假設 FIP-gts 誘導細胞增生與釋放細胞激素的標的細胞正是 T 細胞。因此利用磁珠分離系統 MACS 中的負篩選法，將 HPBMCs 當中的 B cells、monocyte、NK cells、dendritic cells、early erythroid cells、platelets 與 basophils 去除後，剩下幾乎是 T 細胞的部分 (稱為「泛 T 細胞」，pan T cells)。在分析細胞週期時，發現 pan T cells 亦會隨著 FIP-gts 刺激濃度的增加而增加 S 期的百分比，但是效果不到 HPBMCs 的一半，即  $2 \times 10^6$  cells/ml 的 HPBMCs 在  $2 \mu\text{g/ml}$  FIP-gts 處理 48 小時後，S phase 可達 23.79%，然而相同的刺激條件下， $1 \times 10^6$  cells/ml 的 pan T cells 的 S phase 只增加至 10.83%，由於一般認為在 total HPBMCs 當中 T 細胞的比例約佔 50%，故若與預測相符 T 細胞是主要的標的細胞時，應以半數的 pan T cells 即可達到全數 HPBMCs 的效果，但卻發現細胞增生的效果只有不到一半；在研究 LZ-8 的報導中指出，在  $^3\text{H}$ -Thymidine incorporation 方式偵測 LZ-8 誘導 MNC (human peripheral mononuclear cells) 細胞增生實驗中，若將與 sheep erythrocytes 形成 rosetting 的 T 淋巴球以 aminoethylisothiuronium bromide 分離出來後再加入 LZ-8，則幾乎測不到增生效果，推測 LZ-8 誘導 MNC

細胞增生必須有 monocyte 的參與 (van der Hem et al., 1995)。而我們在 MACS 分離過程中，亦將 monocyte 去除掉，這可能是造成 pan T cells 之 S 期無明顯增加的原因之一。

此外除了以 Th1 反應抑制 Th2 反應之外，有報導指出，*Mycobacterium* (SRP299) 亦可抑制過敏性發炎反映，但在皮下注射 *Mycobacterium* 並以 OVA 致敏後，分析小鼠脾臟細胞產生細胞激素後發現，刺激 SRP299 並沒有增加 Th1 cytokine 的表現 (包括 IFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-12)，而 Th2 cytokine 的表現 (包括 IL-4、IL-5、IL-10) 卻被抑制，利用許多不同的抗體配合 Flow cytometry 與動物實驗分析後發現，刺激 SRP299 後會透過產生一種具抗原專一性的 CD4<sup>+</sup> CD45RB<sup>Lo</sup> 的調節性 T 細胞 (regulatory T cell) 來預防氣道發炎，並且這種專一性的抑制反應是間接透過 IL-10 及 transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 所調控的 (Zuany-Amorim et al., 2002)。

然而在 Pan T cells 中，處理 U0126 似乎比 LY294002 更能有效抑制 S phase 的增加，並且測量 IFN- $\gamma$  時亦看到除了 LY294002 之外，U0126 也有抑制 IFN- $\gamma$  產生的作用。似乎是因抑制了 cell proliferation 使細胞數目降低，故測得之 IFN- $\gamma$  量也降低。此外有趣的是，不論加入 U0126 或是 PD98059 這二種 MEK 的專一性抑制劑後，在 HPBMCs 中 FIP-*gts* 誘導產生的 IL-4 反而有增加的趨勢，此點仍待進一步探討其中的作用機制。

有報導中指出 T 細胞的活化需要 co-stimulatory 分子與 TCR/CD3 complex 結合，進而引發許多訊息傳遞，使許多 transcription factors (如 NF- $\kappa$ B 及 NF-AT) 快速進入核中誘導某些基因的表現，如 IL-2、TNF- $\alpha$  及 IFN- $\gamma$ ，Girdlestone 等人發現，人類週邊血液 T 淋巴球或 Jurkat cells 受到 phorbol dibutyrate 與 PHA 刺激後不到二個小時，會活化含有 STAT 1 的 DNA-binding factor，若加入 cyclosporin A 抑制蛋白合成時，此 STAT 1

factor 會明顯減少，表示當起始訊息促使蛋白質合成後，在合成蛋白的過程中會活化 STAT 1 factor。因此，T lymphocyte populations 在受到 phorbol dibutyrate 與 PHA 刺激，促使 IFN- $\gamma$  合成的過程與產生的 IFN- $\gamma$  皆會活化 STAT1。因此 Jurkat cells 與 IFN- $\gamma$  的關係屬於 autocrine loop，也就是既會產生 IFN- $\gamma$  又會受到 IFN- $\gamma$  刺激而活化，然而在近來的報導指出 Th1 細胞缺乏活化 STAT 1 的 IFN- $\gamma$  receptor chain，因此似乎在 mononuclear cell cultures 中接受 IFN- $\gamma$  刺激而活化的細胞很可能與合成 IFN- $\gamma$  的細胞不同 (Girdlestone and Wing, 1996)。

家塵蟎 *Dermatophagoides pteronyssinus* 是家塵中常見的蟎類，經過數十年的研究發現家塵蟎和過敏反應的發生有相當大的關聯性，如鼻炎 (rhinitis)、氣喘 (bronchial asthma)、濕疹 (eczema) 等，在臨床報告中指出，家塵蟎的抗原是家塵中重要的過敏原，為導致人類過敏疾病發生的重要因子 (Kuehr et al., 1995)。有許多研究探討家塵蟎過敏原引起過敏疾病的機制，其中有報告指出家塵蟎過敏原具有蛋白酶的活性，可以切開 CD23 分子 (低親合性 IgE 受體)，而 CD23 的 37、33、25 k Da 片段又具有促進 B 細胞生長並增加 IgE 生成的活性，因此會促使過敏反應的發生 (Hewitt et al., 1995)。而由過敏病人血液中分離淋巴球作培養，發現家塵蟎特異性 T 細胞大部分屬於 Th2 型，若利用純化的 *Der p* I 和 *Der p* II 進行氣喘病患特異性的 T 細胞篩選，亦發現其細胞株為 Th2 型 (Yssel et al., 1992)，因此我們大膽假設 FIP-gts 具有抑制 Th2 免疫反應的功能，也就是在餵食 FIP-gts 之後以塵蟎致敏原致敏小鼠，此時小鼠體內的免疫反應偏向 Th1，故較不容易產生 Th2 反應而達到減敏的效果。

起先我們所用的 *Der p* 致敏動物模式是參考 黎煥耀 教授於 1996 年發表的方式 (Yu et al., 1996)，將 CFA (Complete Freund's Adjuvant) 與 40  $\mu$ g

*Der p 1* 比 1 混成 50  $\mu$ l 以皮下注射施打於小鼠尾巴，並於 14 天之後以 50  $\mu$ l 的 *Der p* (1 mg/ml) 溶液噴霧致敏，噴霧後約 30 分鐘進行眼窩採血分析嗜酸性球的比例，發現並無增加；故在 24 小時後再次噴霧並取血，亦無法偵測到 total IgE。之後有報導指出齧齒類動物在施打 Complete Freund's Adjuvant 後便不能誘發自體免疫疾病的發生，原因是 CFA 會透過調控 inducible nitric oxide synthase (NOS2) 而改變體內的免疫反應 (Kahn et al., 2001)，因此我們將佐劑換成 Aluminum hydroxide 改為腹腔注射，並且在第一次注射過敏原與噴霧 challenge 的二週期間再追加一次過敏原，形成在第 3、9 天腹腔注射過敏原，第 15 天執行噴霧 challenge，加上我們所使用的過敏原為 *Der p* 粗蛋白萃取物，因此將過敏原增加為 1 mg 之 *Der p* 粗蛋白液與 Aluminum hydroxide 混成 600  $\mu$ l，過敏原噴霧量則維持不變為 50  $\mu$ g。

在其他小鼠致敏模式中，Hsu 等人發現 Balb/c 小鼠腹腔注射一劑 *Der p* V 加 Aluminum hydroxide，並在 21 天後吸入 *Der p* V 會引起嗜酸性球浸潤為主的肺部發炎反應及支氣管過度反應 (Airway Hyperresponsiveness, AHR) (Hseu, 1996)。Lee 等人利用 *Der p* I 過敏原，以 Pertussis toxin 作為佐劑，給予 C57BL/6 小鼠三次腹腔注射，每次間隔二週，小鼠血清中 *Der p* I -specific IgE 上升，並在小鼠吸入 *Der p* I 後會引起肺部發炎反應 (Lee et al., 1999)。而台大免疫所 林佑津 的碩士論文當中提出的動物模式中亦採用家塵蟎過敏原 *Der p* II 致敏 Balb/c 小鼠 (Lin, 2001)，在第 0 天及第 24 天腹腔注射 30  $\mu$ g *Der p* II 輔以 4 mg 胃乳，並在第 31、33 天以呼吸道滴入方式使小鼠吸入 *Der p* II。其中在第 31 天以 ELISA 偵測血清中 total IgE 與 *Der p*-specific IgE 皆有增加，並且肺部 IL-4 mRNA 表現量上升；而在滴入 *Der p* II 後測量小鼠支氣管過度反應 (AHR) 時，若小鼠吸入 50 mg/ml methacholine 時有較高的 Penh (enhanced pause) 值，顯示出現氣喘反應，且

以組織切片觀察病理現象時，可見肺部有淋巴細胞與嗜酸性球的浸潤。而我們由於設備不足並沒有測量小鼠的 AHR 反應，亦尚未觀察組織切片的病理變化是一大遺憾之處。

除了家塵蟎過敏原，一般常使用的動物模式是利用腹腔注射 OVA (ovalbumin)輔以 aluminum hydroxide，在測得血清 IgE 明顯增加後 12 天再以 aerosolized OVA 進行 challenge，challenge 後 4 到 8 小時在骨髓與週邊血液中嗜酸性球的數量有些為增加，但在肺組織與 bronchoalveolar lavage (BAL) fluid 中只觀察到幾個；challenge 24 小時後，骨髓中的嗜酸性球明顯減少，而此時在肺部的 perivascular 與 peribronchial 區域嗜酸性球數量到達高峰；而 challenge 48 小時後在 BAL fluid 發現高量的嗜酸性球，約占 BAL 液中所有細胞的 80% (Kung et al., 1994)。由此可知以 OVA 致敏小鼠後，亦可引起小鼠的過敏反應，不僅能在血清中測得 OVA-specific IgE 的增加，並能觀察到肺部大量嗜酸性球浸潤及氣喘反應 (Mizuki et al., 2001)。

由上述許多種致敏方式中，皆能觀察到小鼠血液當中嗜酸性球、抗原專一性 IgE 的增加，甚至產生 AHR 反應，然而我們在二種塵蟎致敏動物模式上，一直都無法觀察到小鼠在致敏原的噴霧 challenge 之下，有明顯的「氣喘」病徵，也就是呼吸急促或黏膜分泌物增加等表現。在利用 *Der p* 粗蛋白萃取液致敏小鼠後，測量血清中 total IgE 與 *Der p*-specific IgE 沒有明顯增加的情形，而血液中的嗜酸性球亦沒有顯著增加。但在重組蛋白 *Der p* II<sub>1-129</sub> 致敏方式中發現，測量 BAL 液中的 total IgE 含量有些為增加，而 basophils 由 1.2 % 增加到 3.4 %，隨著餵食 0.4 與 2.0  $\mu$ g 的 FIP-*gts* 後又逐漸降回 2.6 % 及 1.8 %。由於在與 IgE 有關之第一型過敏反應中，mast cells 和 basophils 扮演相當重要的角色，其表面皆會表現 IgE 的高親合性受器 (Fc  $\epsilon$  RI)，在與 IgE 結合後會被活化，進而釋出與發炎有關之介質，甚至

分泌 IL-4 促使 B 細胞產生更多的 IgE (Wedemeyer and Galli, 2000)。因此在改以重組 *Der p* II<sub>1-129</sub> 蛋白致敏小鼠後，發現在血液中的 basophils 與 BAL 中的 IgE 皆會增加，代表著以重組 *Der p* II<sub>1-129</sub> 蛋白的致敏效果似乎比使用 *Der p* 粗蛋白萃取液要好，然而為何還是無法觀察到 eosinophils 的顯著增加，在 2003 年有報導指出經過一次 OVA 致敏 14 天後，以 OVA-challenged 24 或 48 小時後，是觀察 BAL 中 RNA 的表現量與病理組織學的時機；若要測量血清中 IgE 的變化與定量氣道上皮黏膜物質的改變，如嗜酸性球的分佈，則必須在致敏後第 14、24 天給予二次 challenge (Jan et al., 2003)。而我們使用的模式只有 challenge 一次，或許因為暴露抗原次數不足故無法測得 eosinophils 的增加，而 basophils 與發炎初期的過敏反應較有關，因此一次 challenge 即可測出變化。另一方面在其他的致敏模式中，致敏過程約 14-21 天有的甚至長達 31 天才 challenge 過敏原，而我們則只有 12 天 (致敏二次)，或許因此致敏期間不夠長，小鼠體內產生的抗原專一性 IgE 不夠多，並且我們使用一次 challenge 模式，不足的 IgE 加上不足的 challenge，使得引發的過敏反應不明顯；再者由於我們所使用的噴霧器一次只能進行單隻小鼠噴霧作業，故使用的噴霧時間為 3 分鐘，而有報導指出須持續噴霧約 30 分鐘 (Jan et al., 2003)，以上或許是我們的塵蟎致敏動物模式沒有觀察到 *Der p*-specific IgE 增加以及 *Der p* 誘導之 eosinophilia 的原因。

雖然塵蟎致敏模式沒能觀察到誘發小鼠之過敏反應，但有趣的是不論在 *Der p* 粗蛋白萃取液致敏方式或是重組蛋白 *Der p* II<sub>1-129</sub> 致敏方式，皆可發現致敏後小鼠週邊血液中的 neutrophils 比例比對照組增加了 16 % 與 9.6 %。一般而言，在初期參與發炎反應的細胞主要為 neutrophils，可吞食並摧毀入侵之外來物質，因此腹腔注射 *Der p* 後或許會藉由血液中 neutrophils 增多而將注入之抗原清除。

此外我們發現在餵食 FIP-gts 後的小鼠摸起來比較胖，經測量後亦可觀察出餵食後小鼠的體重比對照組增加了約 13 % ( $P < 0.05$ )，由此推測 FIP-gts 似乎能夠抵抗 pH 值極低的胃部環境避免蛋白變性，進入腸道吸收至小鼠體內。而由體外實驗已證實 FIP-gts 可刺激人類週邊血液單核球與小鼠脾臟細胞表現 IFN- $\gamma$  (Hsu, 1996)，因此進一步測量餵食後小鼠血清中 IFN- $\gamma$  的含量，結果發現在餵食二週 FIP-gts 後的小鼠血清中之 IFN- $\gamma$  含量雖然沒有明顯增加的情形 (data not show)，但有趣的是，若將餵食 FIP-gts 後小鼠的脾臟細胞在體外再次給予 FIP-gts 刺激後，IFN- $\gamma$  的表現明顯比對照組 (463.8 pg/ml) 減少許多只有 81.9 pg/ml，而未餵食過 FIP-gts 但以 *Der p* 粗蛋白致敏過的小鼠脾臟細胞分泌的 IFN- $\gamma$  卻比對照組高出約一倍 (1100.7 pg/ml)，相同的情形在測量 IL-4 時亦可發現，這或許是因為經過 *Der p* 致敏後的小鼠體內免疫反應偏向於 Th2 原因，但是 *Der p* 粗蛋白誘發的 Th2 免疫反應並不顯著，此點在分析血液中之白血球比例與 total IgE 時已得證實，因此是否在微量 Th2 的環境之下，具有加強 FIP-gts 免疫調節功能的因素，甚至是在過敏體質的人體中 FIP-gts 是否具有扭轉 Th2 與 Th1 間的平衡，是日後值得探討的課題，如此可評估 FIP-gts 用於治療過敏性疾病的可行性。

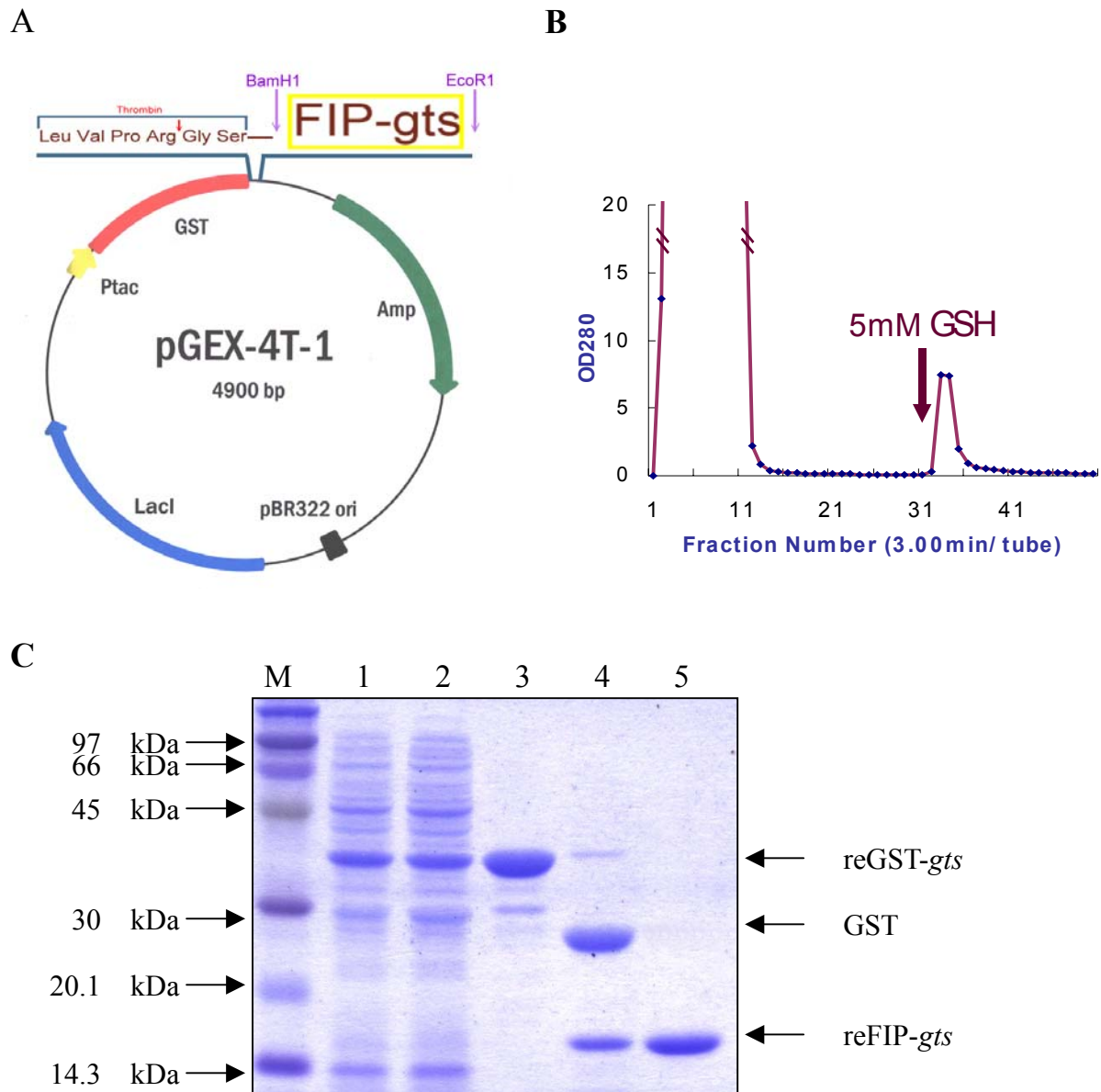
除了應用在過敏性疾病的防治，已有許多研究報導探討與 FIP-gts 具有相同序列的 LZ-8，在許多免疫失序疾病中所扮演的角色。在 Kino 等人的系列報導中指出，不論是以皮下注射或腹腔注射牛血清蛋白(BSA)，並再第 17 天靜脈注射 BSA 誘發 CFW 老鼠引起過敏性反應，若在上述期間，每週注射二次 LZ-8，可明顯抑制由 BSA 所引發之全身性過敏反應(Systemic Anaphylaxis Reaction)以及 Arthus reaction(Kino et al., 1989)，顯示 LZ-8 在體內具有免疫抑制能力(immuno-suppressive activity)；其研究團隊亦發現，腹腔注射 LZ-8 後，會使以 hepatitis B surface antigen (HBs Ag)刺激的



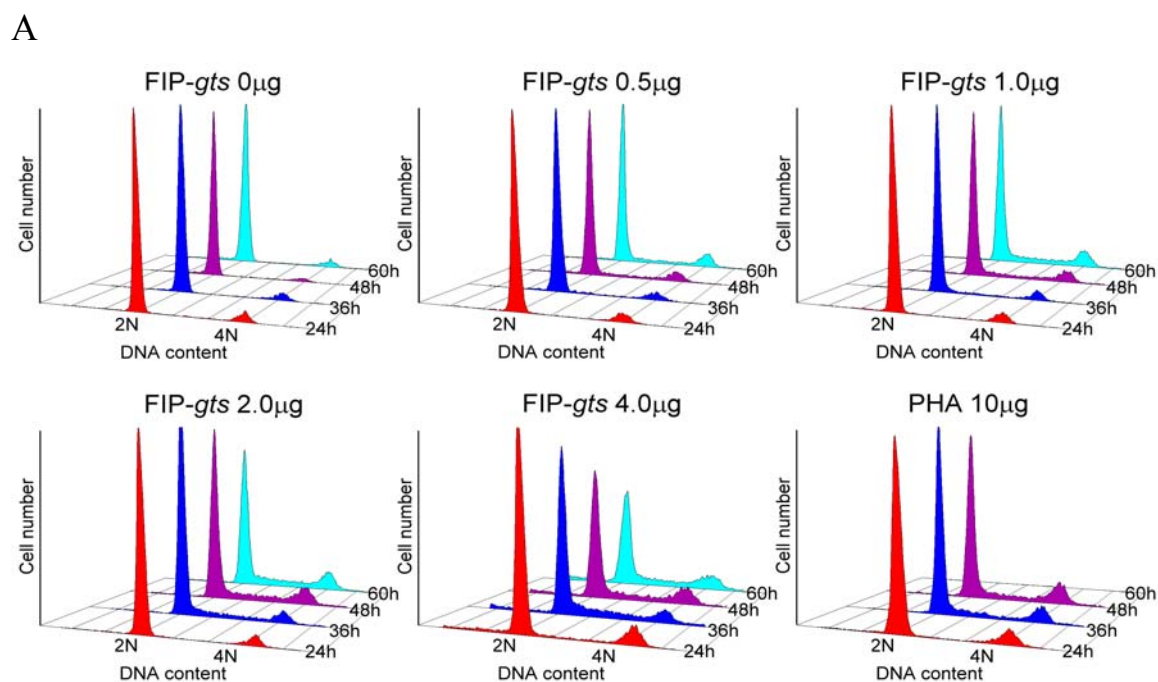
小鼠體內產生的 HBs Ag 抗體減少 83.3-96.8%，這種免疫抑制能力，或許可以說明 LZ-8 是透過阻擋具抗原專一性之抗體 (antigen-specific antibody) 的形成，而防止 systemic anaphylaxis 與 Arthus reactions 的發生(Kino et al., 1991)。在 1990 年，Kino 等人亦利用非肥胖症糖尿病 (NOD)小鼠探討 LZ-8 預防第一型 (胰島素依賴型)糖尿病的免疫抑制效果，此種糖尿病的成因為自體免疫而將胰臟內產生胰島素的  $\beta$  細胞殺死，使體內代謝葡萄糖之胰島素不足所導致，結果發現非肥胖症糖尿病小鼠(NOD mice)在每週腹腔注射二次 LZ-8 後，可防止 insulinitis，並發現小鼠的 insulin producing cells 的數目接近正常，能完全阻止自體免疫糖尿病的發生 (Kino et al., 1990)，然而在對照組中的小鼠到了 42 週齡時，若以血糖濃度高於 11 mmol/l 與尿糖濃度大於 2+二種標準作判斷，則糖尿病發生率逐漸增加至 70%與 60%。利用分析 T 細胞亞群進一步探討 LZ-8 在 NOD 小鼠的作用機制，發現處理 LZ-8 會增加 L3T4'/Lyt-2+的比例 (Kino et al., 1990)。

由上述種種研究顯示，利用此種靈芝蛋白 (不論是 *Ganoderma lucidium* 中 LZ-8 或是 *Ganoderma tsugae* 中的 FIP-gts) 的免疫調節功能可以輔正體內的過度免疫反應，加以預防或治療目前罹患率日趨增加的過敏性疾病，以及許多自體免疫疾病如紅斑性狼瘡 (Systemic Lupus Erythematosus, SLE)、類風濕性關節炎 (Rheumatoid arthritis, RA)，或是由病毒所引起之疾病如 AIDS、RSV (Respiratory syncytial virus)。

## 圖表說明



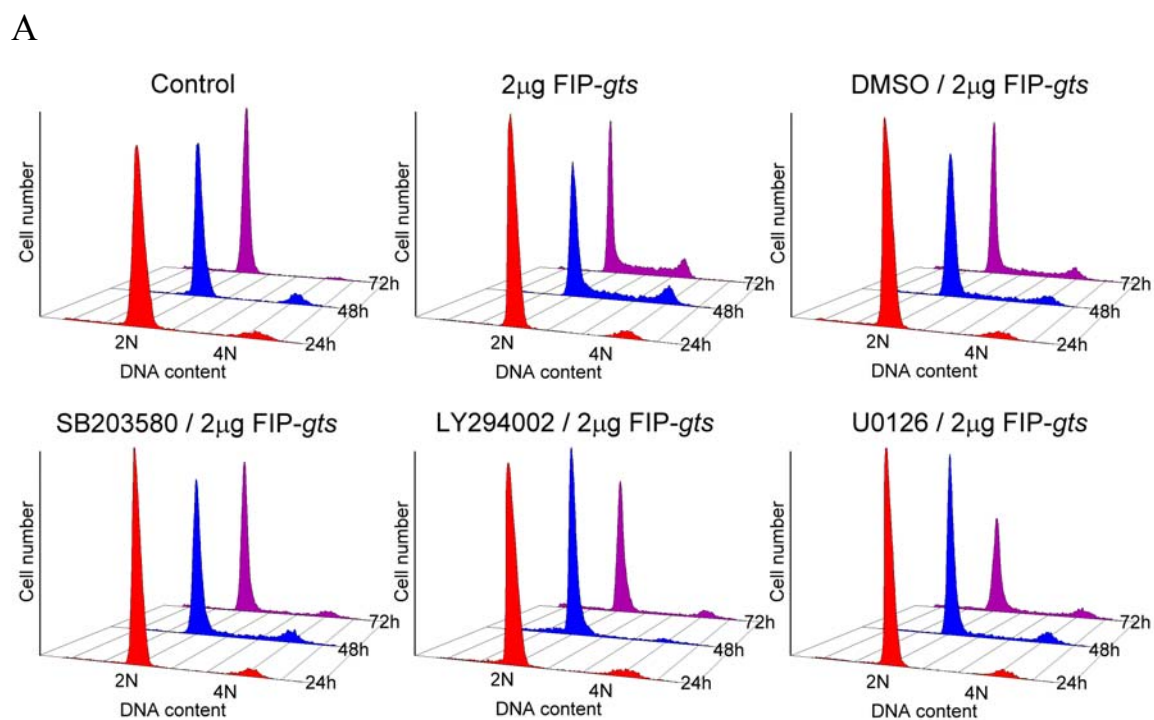
**Fig. 1. Construction of the expression plasmid pGEX-FIP-*gts* and purified recombinant FIP-*gts*.** (A) The gene map of pGEX4T-1 plasmid in BL-21. (B) The fusion protein was purified by affinity chromatograph with a glutathione-Sepharose 4 Fast Flow column. (C) SDS-PAGE analysis of the fusion protein and purified *reFIP-gts*.



**B**

Time		FIP-gts					PHA
		0 μg	0.5 μg	1 μg	2 μg	4 μg	10 μg
G1 phase (%)	24 hr	92.38	90.85	90.63	90.23	81.25	85.12
	36 hr	94.01	89.70	85.19	77.16	65.68	72.64
	48 hr	94.77	79.58	73.25	65.57	63.78	65.48
	60 hr	94.28	74.62	66.66	62.45	59.54	--
S phase (%)	24 hr	2.20	2.27	1.59	2.20	5.81	3.08
	36 hr	1.60	4.95	8.03	16.95	27.94	17.24
	48 hr	2.60	11.94	17.67	23.79	22.97	20.29
	60 hr	1.88	14.66	22.07	26.35	26.57	--
G2/M phase (%)	24 hr	5.42	6.88	7.79	7.57	12.93	11.80
	36 hr	4.40	5.35	6.78	5.89	6.58	10.12
	48 hr	2.62	8.48	9.08	10.64	13.25	14.23
	60 hr	3.84	10.71	11.27	11.20	13.88	--

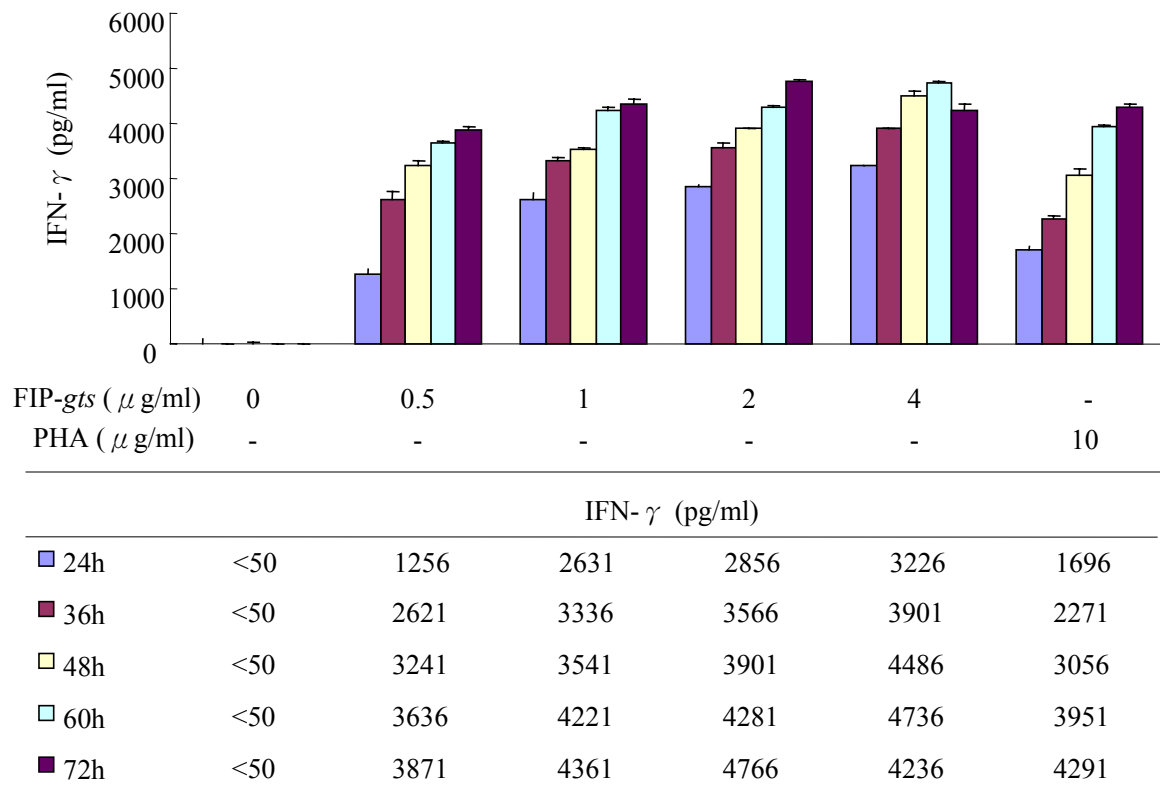
**Fig. 2. Different dose and time course of effect of FIP-gts on cell cycle progression in HPBMCs.** Cells were resuspended in 5% RPMI-1640 medium at  $2 \times 10^6$  cells/ml. PHA (10 μg/ml) was positive control. **(A)** Cells were detected by Flow cytometer and acquired by Cellquest. **(B)** Acquisition were analyzed and quantified by ModFit LT 3.0.



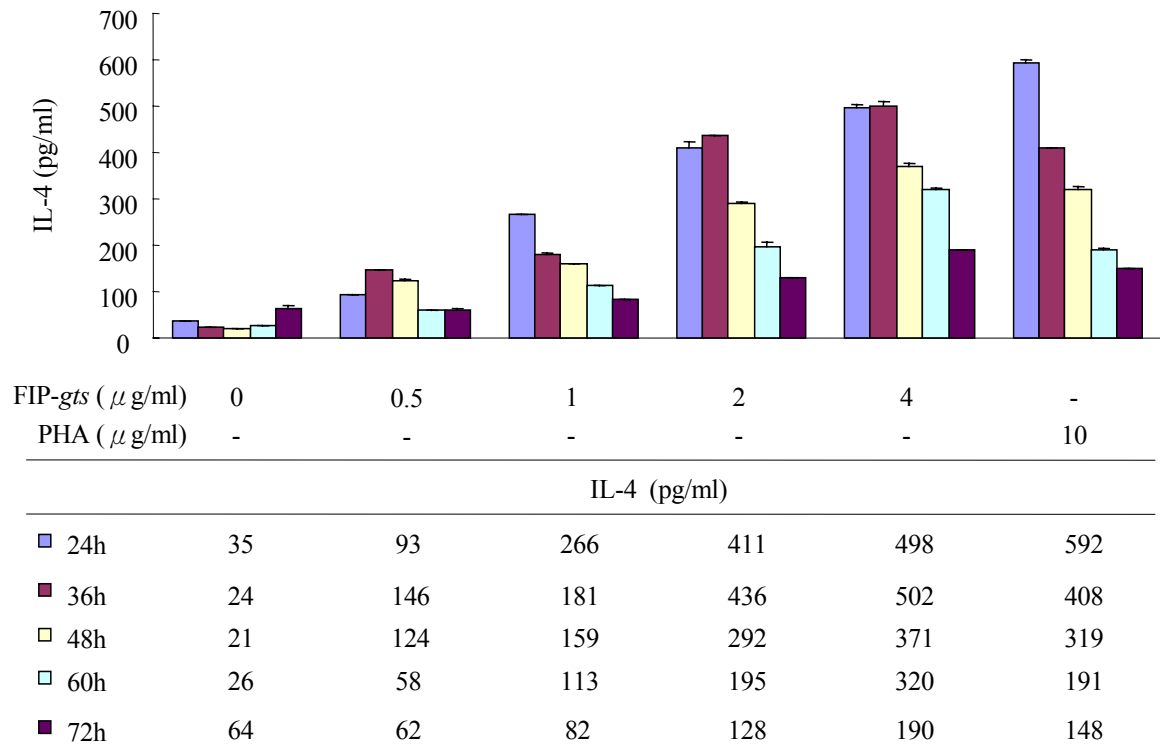
**B**

	Time	Control	FIP-gts	Pre-treat with inhibitors / 2 µg FIP-gts			
			(2 µg)	DMSO	SB203580	LY294002	U0126
G1 phase (%)	24 hr	92.38	90.23	92.22	92.12	90.27	92.41
	48 hr	94.77	65.57	74.31	73.14	88.19	77.17
	72 hr	94.80	52.60	66.08	81.09	79.55	70.28
S phase (%)	24 hr	2.20	2.20	1.79	1.34	2.54	1.41
	48 hr	2.60	23.79	19.36	18.17	9.30*	14.75
	72 hr	3.11	38.50	27.06	13.13	12.78	18.63
G2/M phase (%)	24 hr	5.42	7.57	6.00	6.54	7.19	6.16
	48 hr	2.62	10.64	6.33	8.69	2.51	8.08
	72 hr	2.10	11.00	6.86	5.78	7.67	11.09

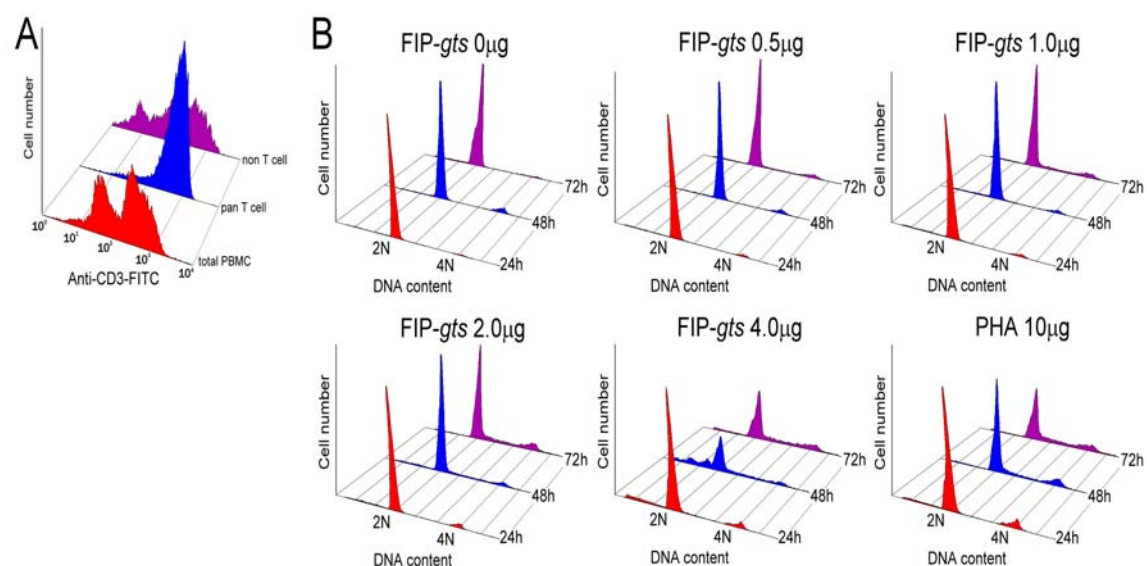
**Fig. 3. Various types of inhibitors effect on FIP-gts-induced cell proliferation.** HPBMCs were resuspended in 5% RPMI-1640 medium at  $2 \times 10^6$  cells/ml then pre-treat with various types of inhibitors for 1 hour, following stimulated by 2 µg/ml FIP-gts for 24, 48 and 72 hours. **(A)** Cells were detected by Flow cytometer and acquired by Cellquest. **(B)** Acquisition were analyzed and quantified by ModFit LT 3.0.



**Fig. 4. FIP-*gts* stimulated IFN- $\gamma$  production in HPBMC.** Cells were resuspended in 5% RPMI-1640 medium at  $4 \times 10^6$  cells/ml. PHA (10  $\mu$ g/ml) was positive control. Culture supernatant fluids were assayed by ELISA and results expressed as pg/ml.



**Fig. 5. FIP-gts stimulated IL-4 production in HPBMC.** Cells were resuspended in 5% RPMI-1640 medium at  $4 \times 10^6$  cells/ml. PHA (10  $\mu$ g/ml) was positive control. Culture supernatant fluids were assayed by ELISA and results expressed as pg/ml.



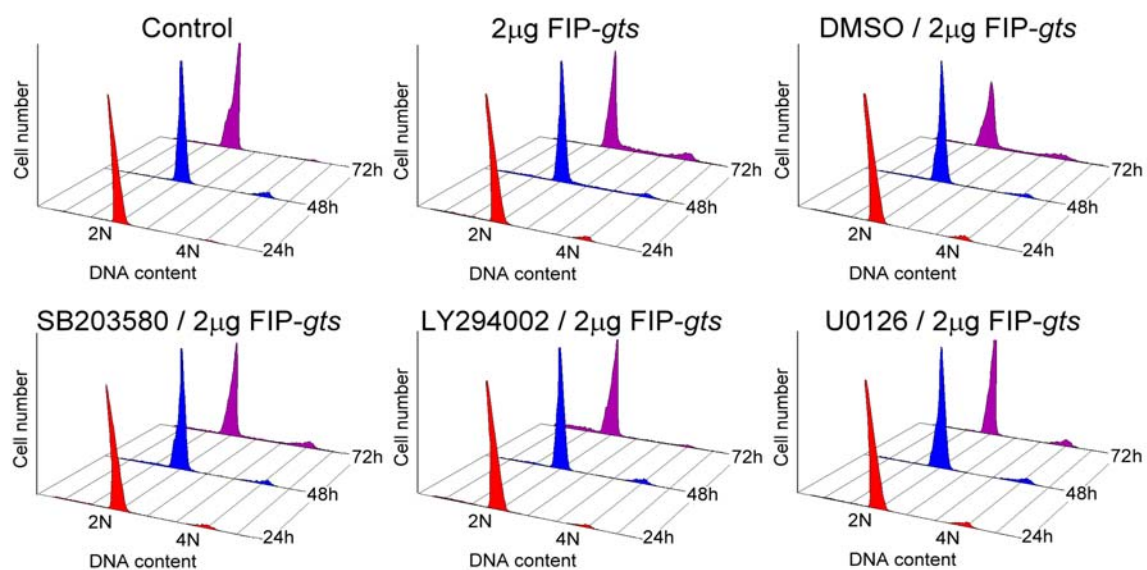
**C**

	Time	FIP-gts					PHA
		0 μg	0.5 μg	1 μg	2 μg	4 μg	10 μg
G1 phase (%)	24 hr	97.74	95.75	93.96	91.56	88.38	85.47
	48 hr	92.06	92.75	93.08	84.54	65.81	71.97
	72 hr	96.39	87.67	80.32	70.60	62.89	60.48
S phase (%)	24 hr	0.55	1.00	1.55	1.76	3.57	1.49
	48 hr	0.71	0.92	2.27	10.83	27.07	16.37
	72 hr	1.46	6.31	13.12	20.07	25.38	28.05
G2/M phase (%)	24 hr	1.71	3.26	4.49	6.68	8.05	13.04
	48 hr	7.23	6.33	4.65	4.62	7.13	11.66
	72 hr	2.16	3.02	6.56	9.34	11.72	11.47

**Fig. 6. Different dose and time course of effect of FIP-gts on cell cycle progression in pan T cells. (A)** Total PBMC isolated by MACS magnetic separation column were labeled anti-CD3-FITC, and examined the purity by Flow cytometer. Pan T cells were resuspended in 5% RPMI-1640 medium at  $1 \times 10^6$  cells/ml. **(B)** Cells were detected by Flow cytometer and acquired by Cellquest. **(C)** Acquisition were analyzed and quantified by ModFit LT 3.0.



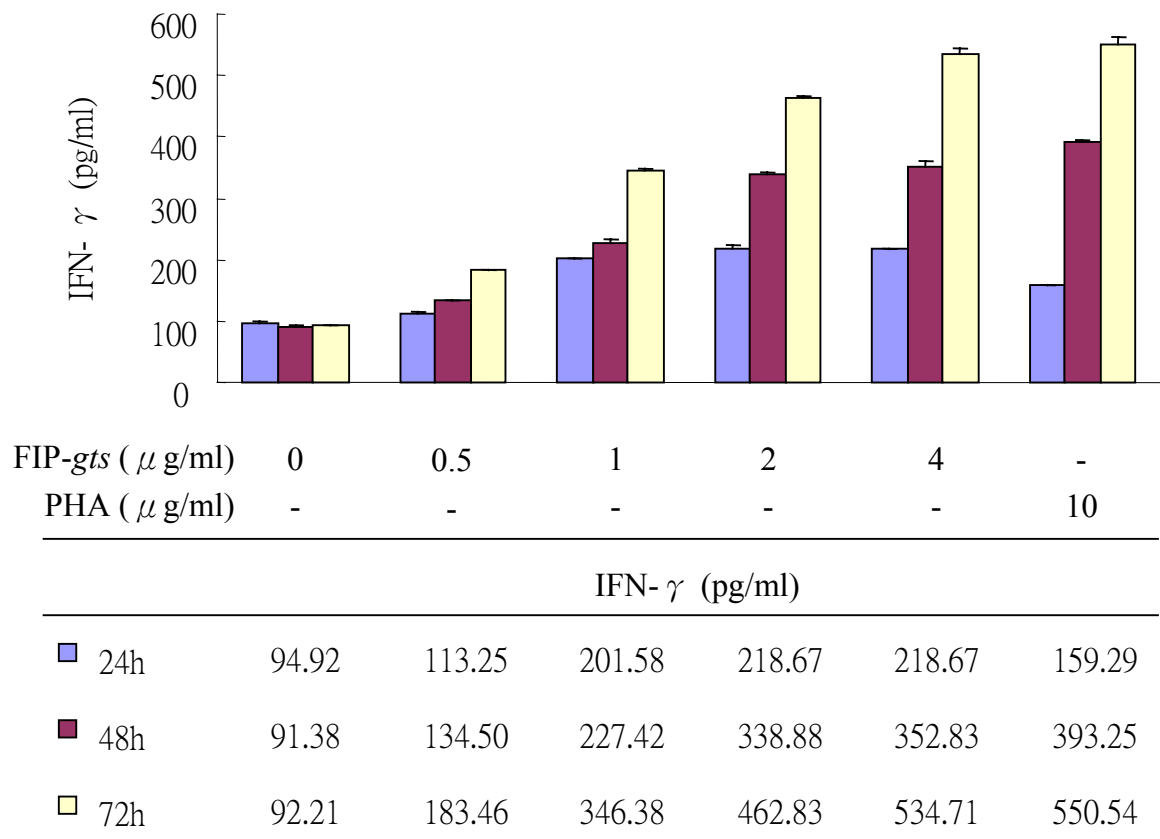
A



B

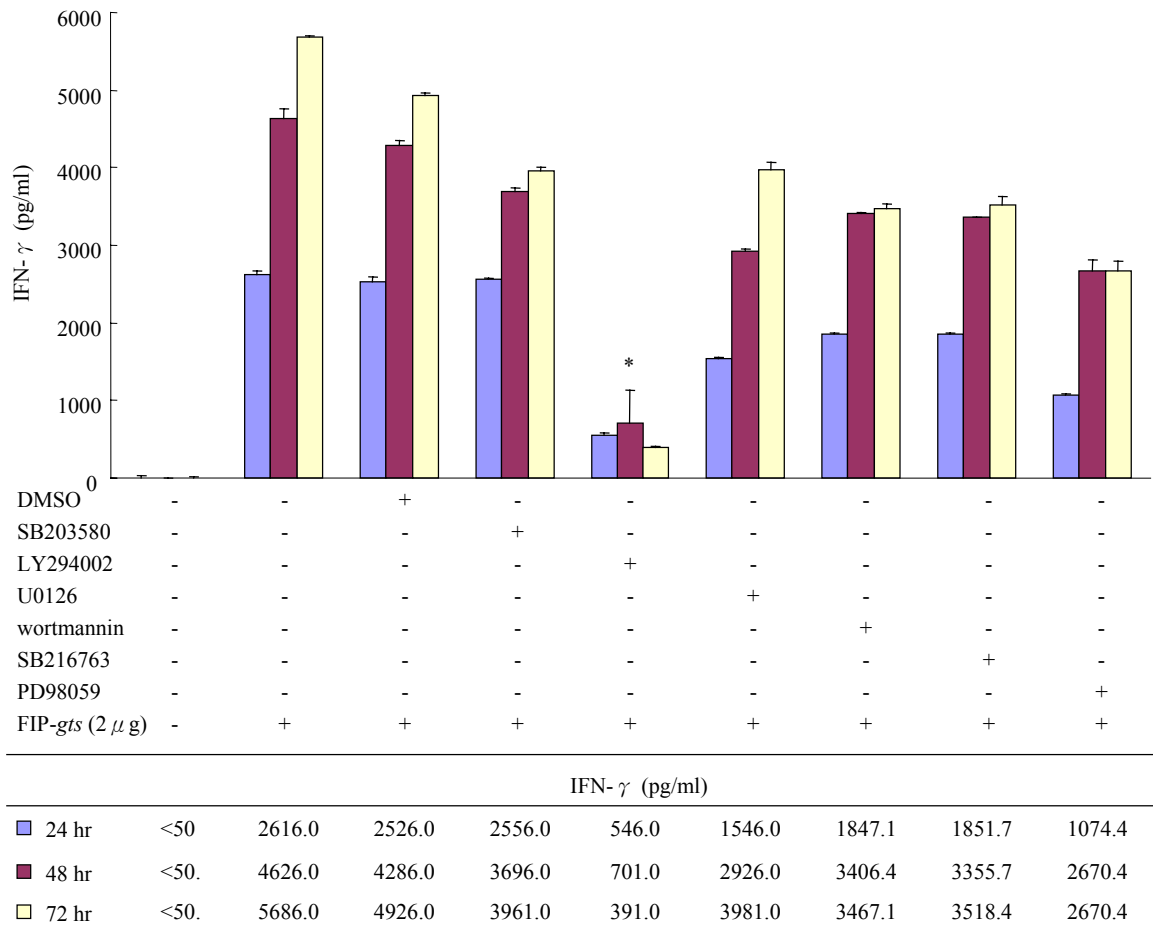
	Time	Control	FIP-gts (2 µg)	Pre-treat with inhibitors / 2 µg FIP-gts			
				DMSO	SB203580	LY294002	U0126
G1 phase (%)	24 hr	97.74	91.56	92.68	92.55	93.66	91.62
	48 hr	92.06	84.54	91.42	90.61	90.29	90.33
	72 hr	96.39	70.60	76.43	80.59	91.44	87.51
S phase (%)	24 hr	0.55	1.76	1.00	1.38	1.58	0.94
	48 hr	0.71	10.83	2.96	2.19	3.27	1.57
	72 hr	1.46	20.07	12.75	8.79	5.03	2.15
G2/M phase (%)	24 hr	1.71	6.68	6.32	6.06	4.76	7.44
	48 hr	7.23	4.62	5.62	7.19	6.43	8.10
	72 hr	2.16	9.34	10.82	10.61	3.54	10.34

**Fig. 7. Various types of inhibitors effect on FIP-gts-induced cell proliferation.** Pan T cells were resuspended at  $1 \times 10^6$  cells/ml in 5% RPMI-1640 medium then pre-treat with various types of inhibitors for 1 hour, following stimulated by 2 µg/ml FIP-gts for 24, 48 and 72 hours. **(A)** Cells were detected by Flow cytometer and acquired by Cellquest. **(B)** Acquisition were analyzed and quantified by ModFit LT 3.0.

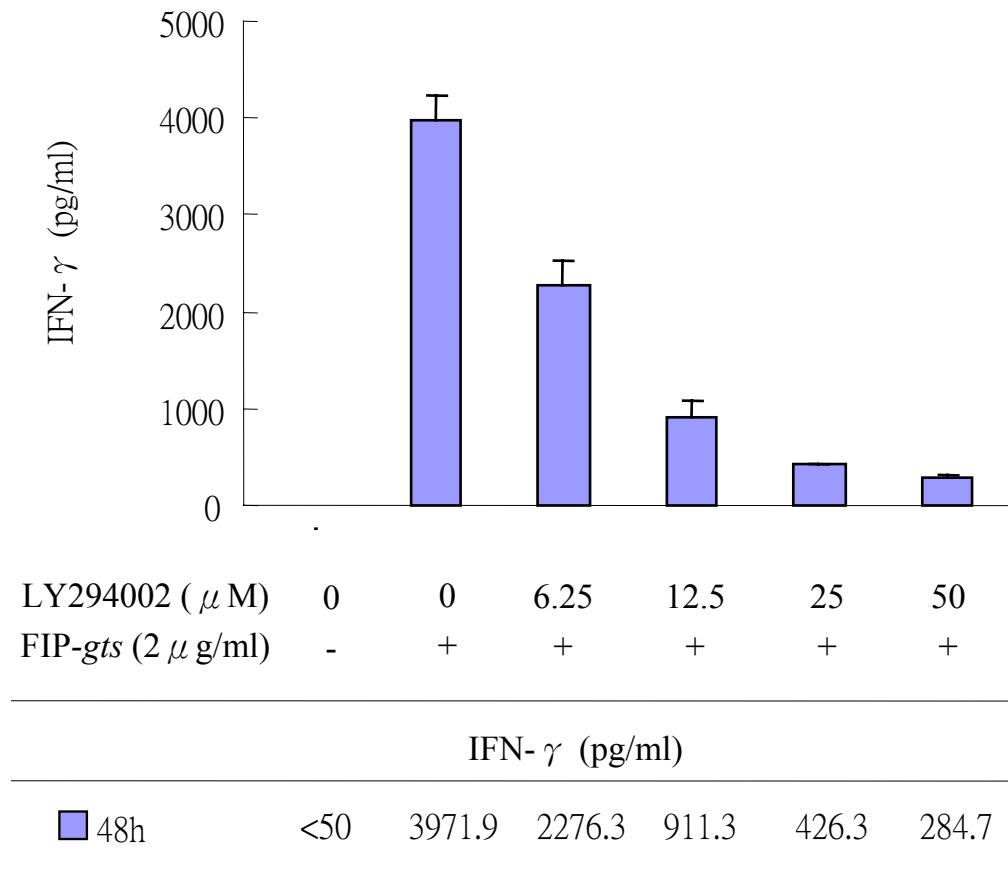


**Fig. 8. Production of IFN- $\gamma$  stimulated by FIP-gts in pan T cells.**

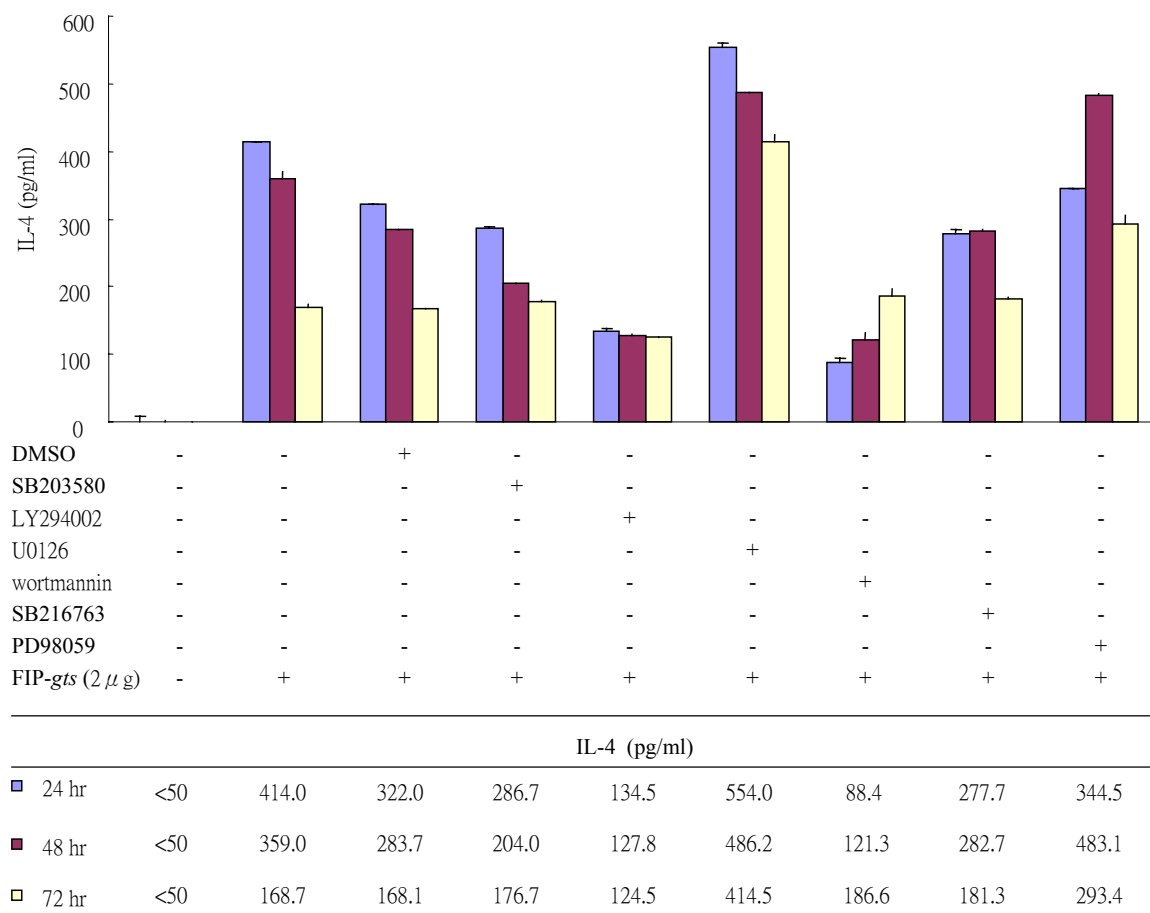
Cells were resuspended in 5% RPMI-1640 medium at  $1 \times 10^6$  cells/ml. PHA (10  $\mu$ g/ml) was positive control. Culture supernatant fluids were assayed by ELISA and results expressed as pg/ml.



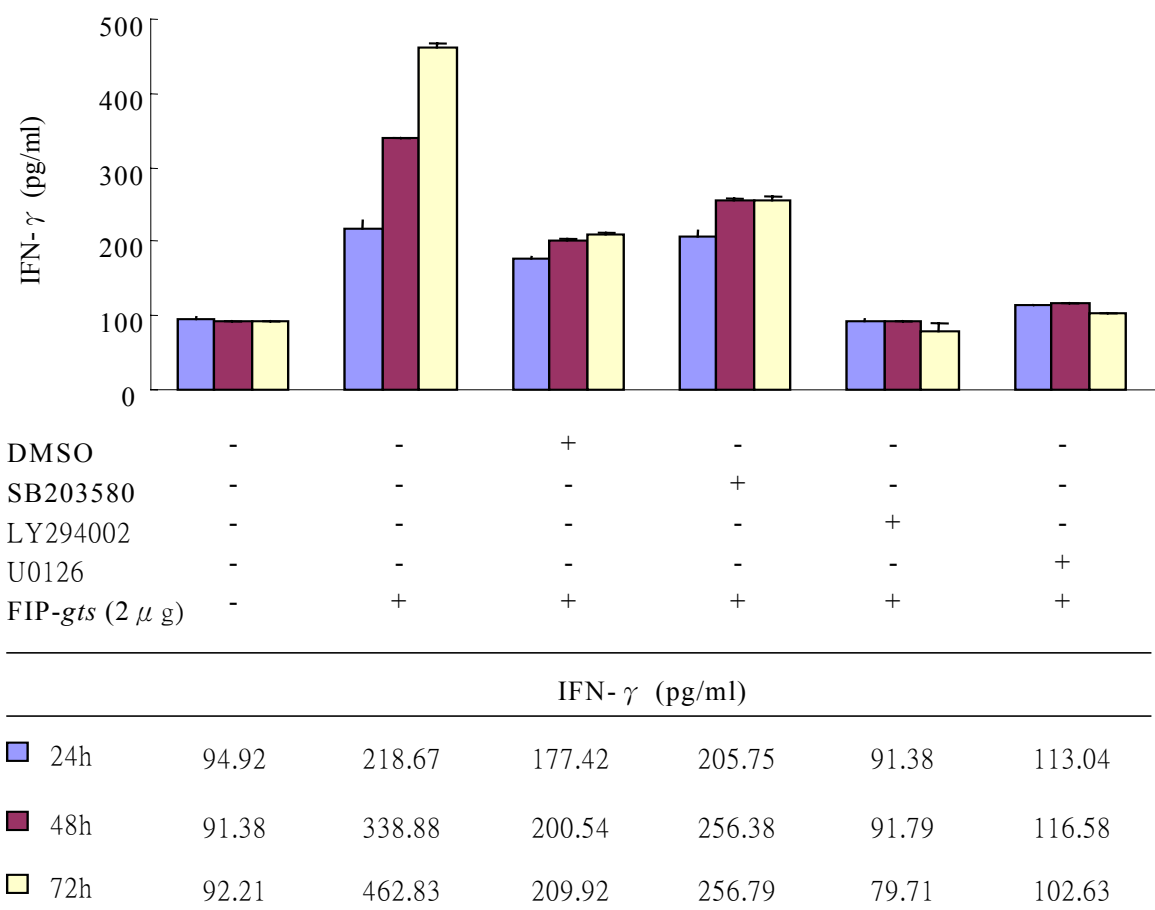
**Fig. 9. Various type of inhibitors effect on the FIP-gts-induced IFN- $\gamma$  secretion in HPBMCs.** Cells ( $4 \times 10^6$  cells/ml) were pre-treated with various type of inhibitors for 1 hour then stimulated by  $2 \mu\text{g/ml}$  FIP-gts for 24, 48 and 72 hours.



**Fig. 10. Different dose of LY294002 effect on FIP-gts-induced IFN- $\gamma$  secretion in HPBMCs.** Cells ( $4 \times 10^6$  cells/ml) were pre-treated with indicated dose of LY294002 for 1 hour then stimulated by 2  $\mu$ g/ml FIP-gts for 48 hours.

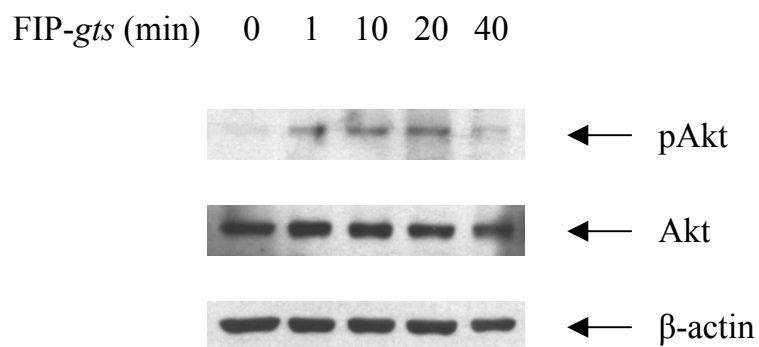


**Fig. 11. Various type of inhibitors effect on FIP-gts-induced IL-4 secretion in HPBMCs.** Cells ( $4 \times 10^6$  cells/ml) were pre-treated with various type of inhibitors for 1 hour then stimulated by  $2 \mu\text{g/ml}$  FIP-gts for 24, 48 and 72 hours.

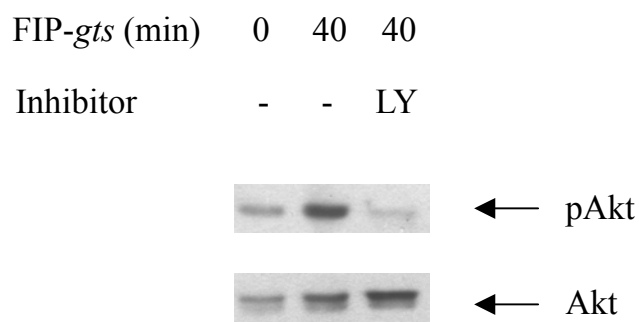


**Fig. 12. Various type of inhibitors effect on FIP-gts-induced IFN- $\gamma$  secretion in pan T cells.** Cells ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were pre-treated with various type of inhibitors for 1 hour then stimulated by 2  $\mu$ g/ml FIP-gts for 24, 48 and 72 hours.

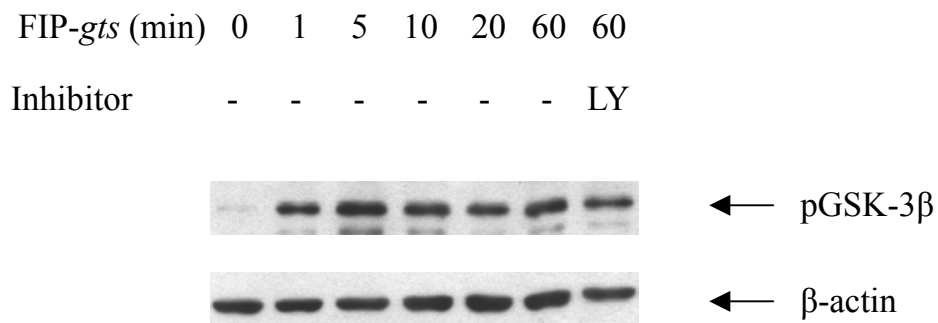
A



B

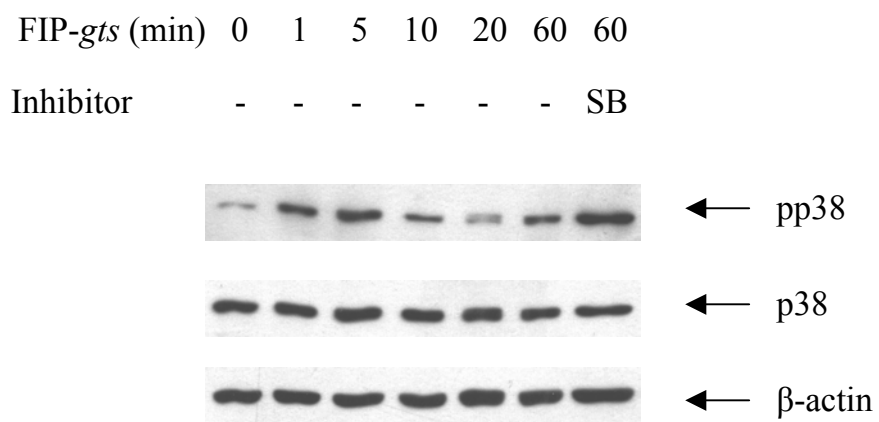


**Fig. 13. Akt, a downstream effector of PI 3-kinase, activated by FIP-*gts* in HPBMCs.** Cells ( $1 \times 10^7$  cells/ml) were treated with FIP-*gts* ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) for various time intervals as indicated. Cell lysates with equal amounts of proteins were subjected to Western blot with anti-phospho-Akt antibody. (LY, LY294002, PI 3-kinase inhibitor)



**Fig. 14. GSK-3 $\beta$ , a downstream effector of Akt, was phosphorylated by FIP-*gts* in HPBMCs.** Cells ( $1 \times 10^7$  cells/ml) were treated with FIP-*gts* ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) for various time intervals as indicated. Cell lysates with equal amounts of proteins were subjected to Western blot with anti-phospho-GSK-3 $\beta$  antibody.

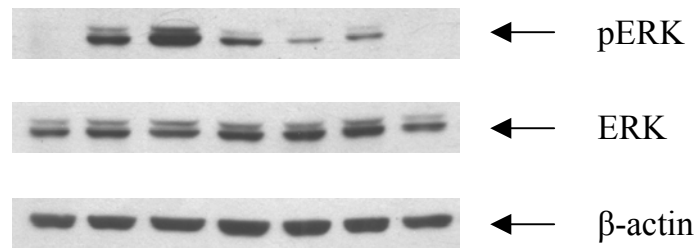




**Fig. 15. Activation of p38 MAPK by FIP-*gts* in HPBMCs.** Cells ( $1 \times 10^7$  cells/ml) were treated with FIP-*gts* ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) for various time intervals as indicated. Cell lysates with equal amounts of proteins were subjected to Western blot with anti-phospho-p38 antibody. (SB, SB203580, p38 MAP kinase inhibitor)

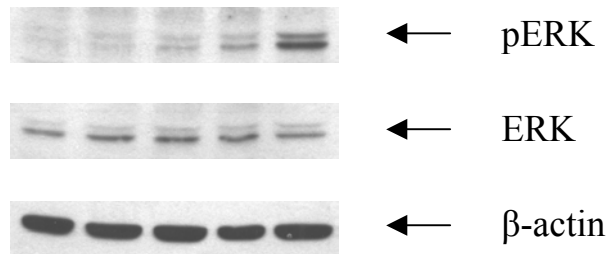
A

FIP- <i>gts</i> (min)	0	1	5	10	20	60	60
Inhibitor	-	-	-	-	-	-	U0126



B

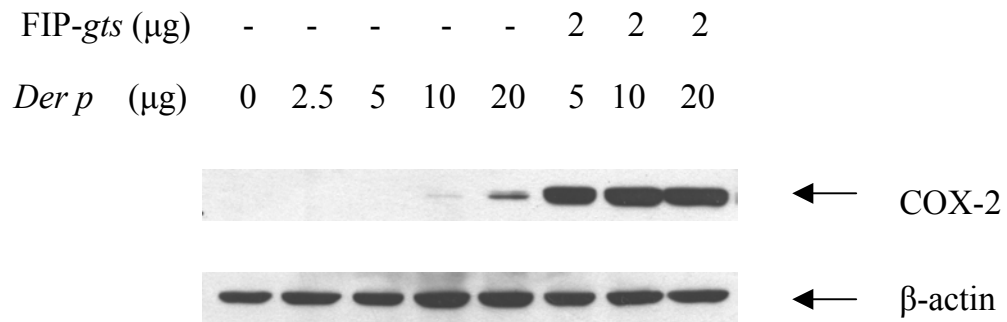
FIP- <i>gts</i> (μg)	0	0.5	1	2	4
----------------------	---	-----	---	---	---



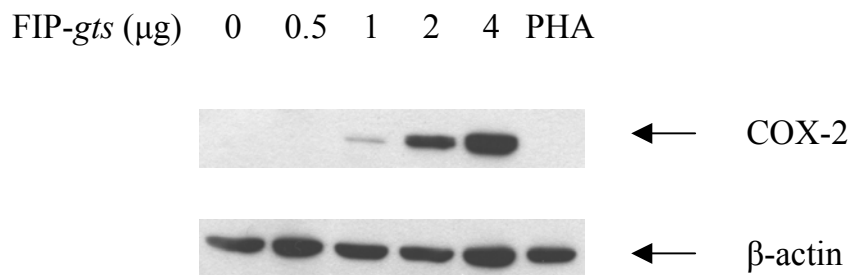
**Fig. 16. Activation of ERK1/2 by FIP-*gts* in HPBMCs.**

(A) Cells ( $1 \times 10^7$  cells/ml) were treated with FIP-*gts* ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) for various time intervals as indicated. (B) Different dose of FIP-*gts* stimulated for 10 min in HPBMCs. Cell lysates with equal amounts of proteins were subjected to Western blot with anti-phospho-ERK antibody. (U0126, MEK inhibitor)

A

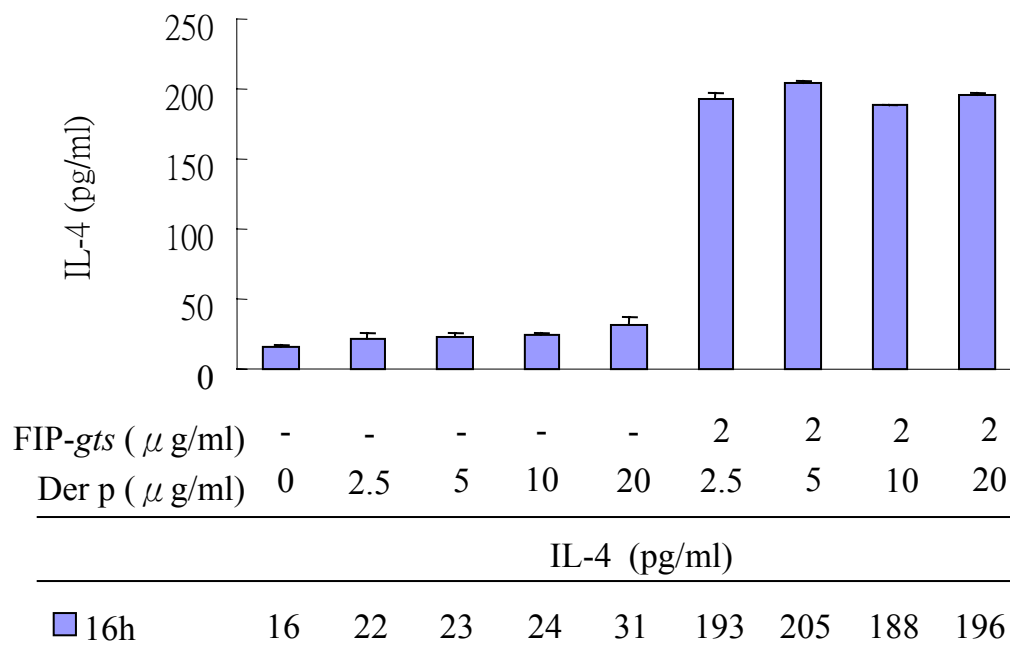


B

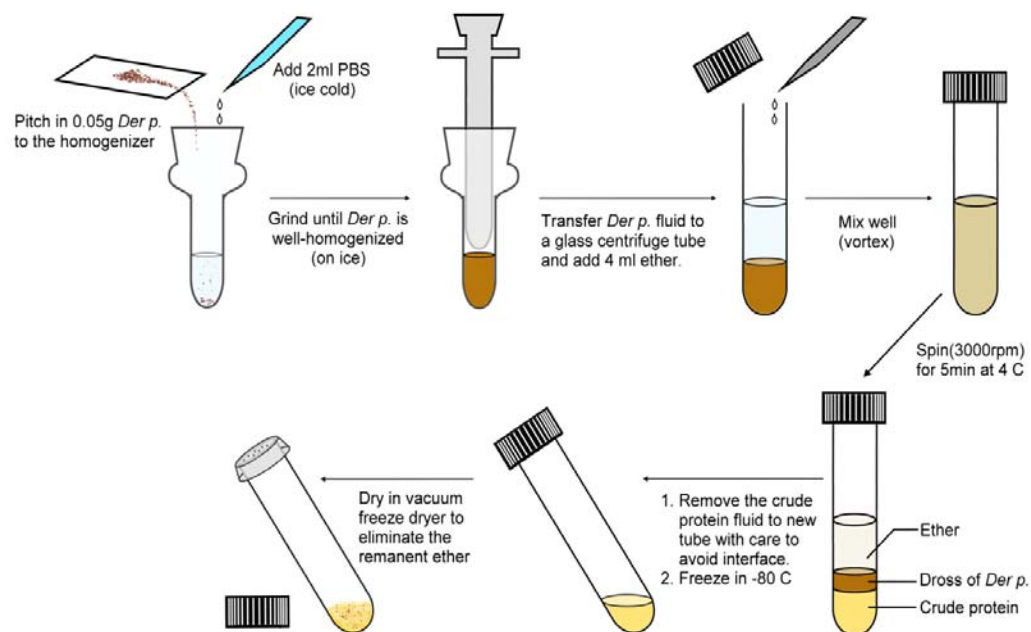


**Fig. 17. Increased expression of COX-2 by FIP-*gts* in HPBMCs.**

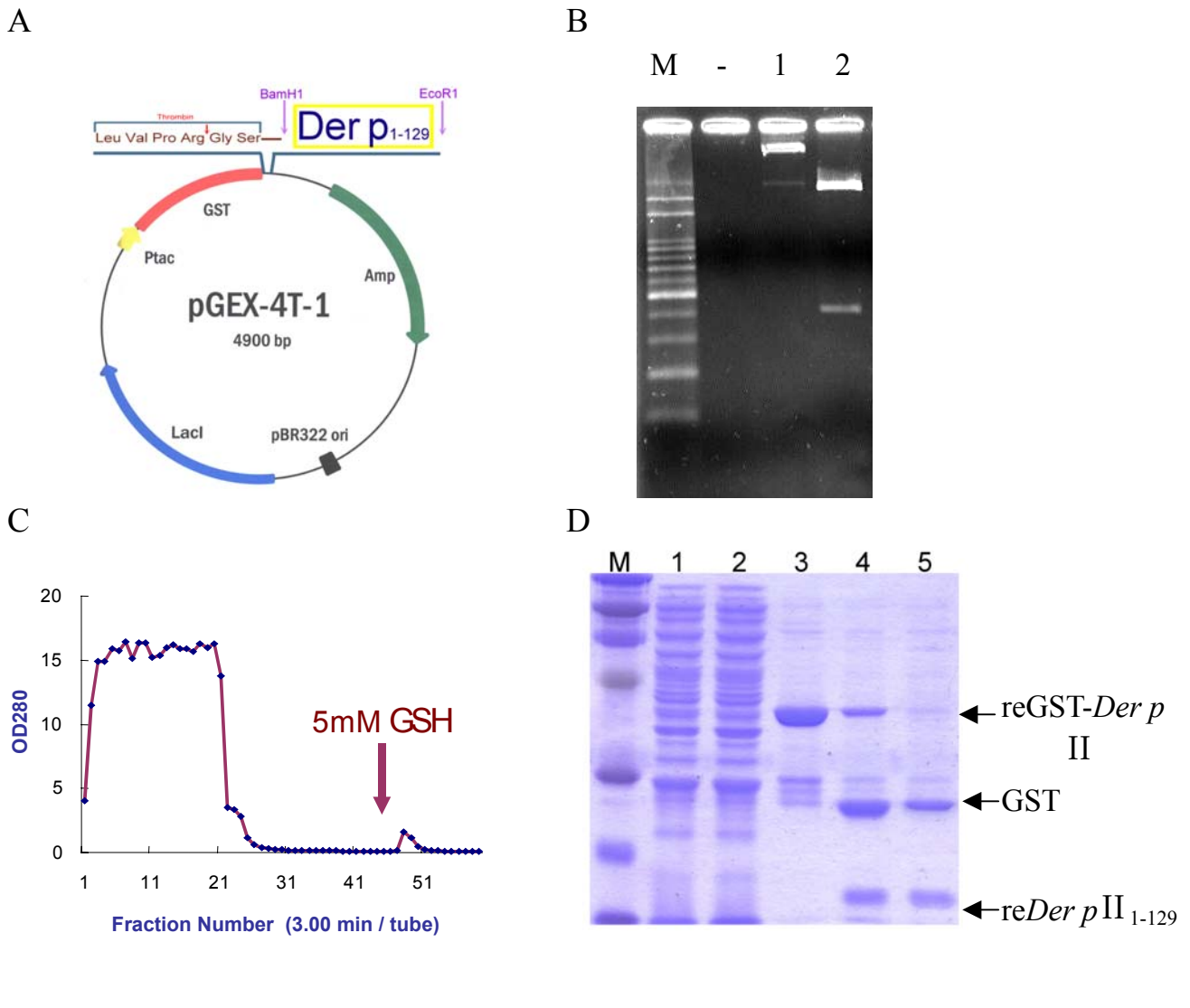
(A) Cells ( $4 \times 10^6$  cells/ml) were treated with *Der p* crude protein from native *Der p* of various dose as indicated present or absent of 2 μg/ml FIP-*gts* for 16 hours. (B) Different dose of FIP-*gts* stimulated for 16 hours. Cell lysates with equal amounts of proteins were subjected to Western blot with monoclonal anti-COX-2 antibody.



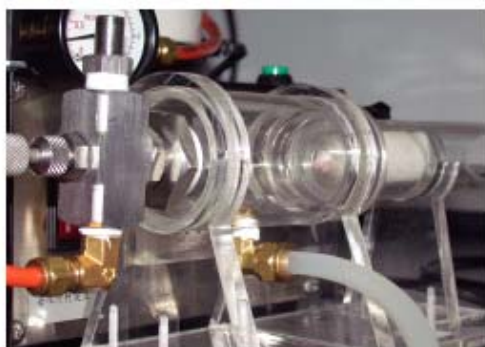
**Fig. 18. Production of IL-4 by *Der p* in HPBMCs.** Cells ( $4 \times 10^6$  cells/ml) were treated with *Der p* crude protein from native *Der p* of various dose as indicated present or absent of 2 μg/ml FIP-gts for 16 hours. Culture medium were assayed by ELISA and results expressed as pg/ml.



**Fig. 19. Preparation of *Der p* crude protein extract.** Homogenized *Der p* extracts (0.05 g) of *Dermatophagoides pteronyssinus* in 2 ml PBS, and extracted the soluble crude protein with 4 ml ether. The freeze-dried *Der p* crude protein powder was dissolved in ddH<sub>2</sub>O, after Bio-Rad quantification, the *Der p* crude protein we extracted was about 0.018 gram.

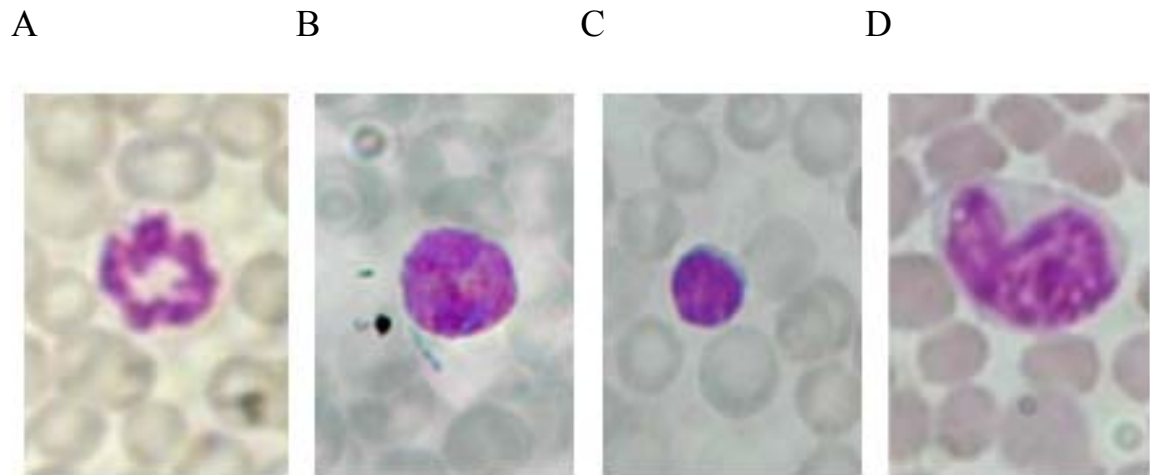


**Fig. 20. Construction of the expression plasmid pGEX-Der p II in BL-21 and purified the *reDer p II*<sub>1-129</sub>.** (A) The gene mapping of pGEX 4T-1 containing Der p II coding region 1-129 amino acid. (B) Electrophoresis of pGEX 4T-1 Der p II<sub>1-129</sub> ligation products digested by *Bam*HI and *Eco*RI in 1.5% agarose gel. Lane M: 100 bp DNA marker; lane 1: pGEX-Der p II<sub>1-129</sub> ligation product; lane 2: product digested by restriction enzyme. (C) The fusion protein was purified by affinity chromatograph with a glutathione-Sepharose 4 Fast Flow column. (D) SDS-PAGE analysis of the fusion protein and purified *reDer p II*<sub>1-129</sub>.



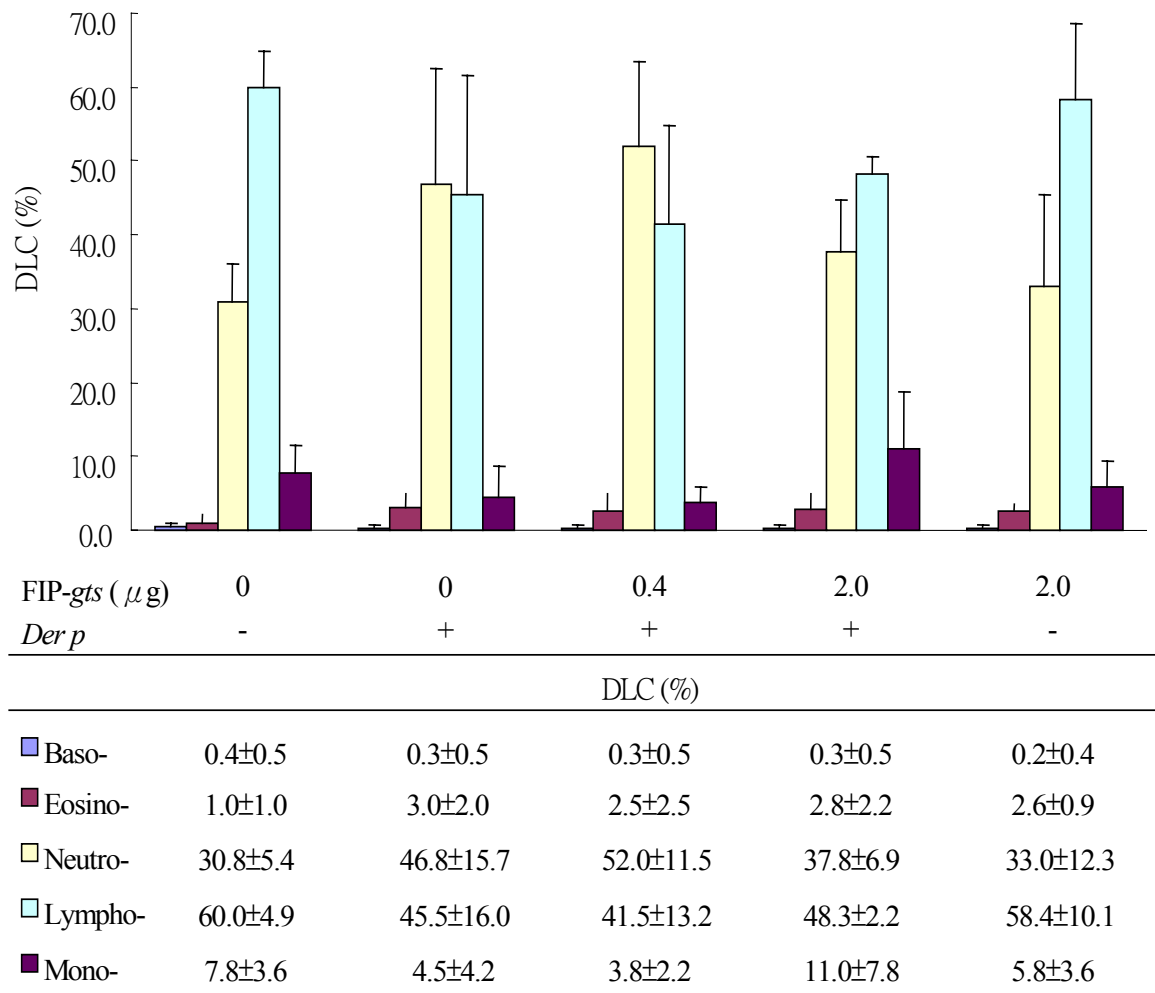
**Fig. 21. The sprayer of *Der p* crude extract and *reDer p*  $\Pi_{1-129}$ .**

In order to induced airway hypersensitivity in Balb/c mice in a nature exposure manner, we designed a spraying system could provided a constant amount of *Der p* protein solution to sensitized mice in the plastic chamber at a fixed time interval.

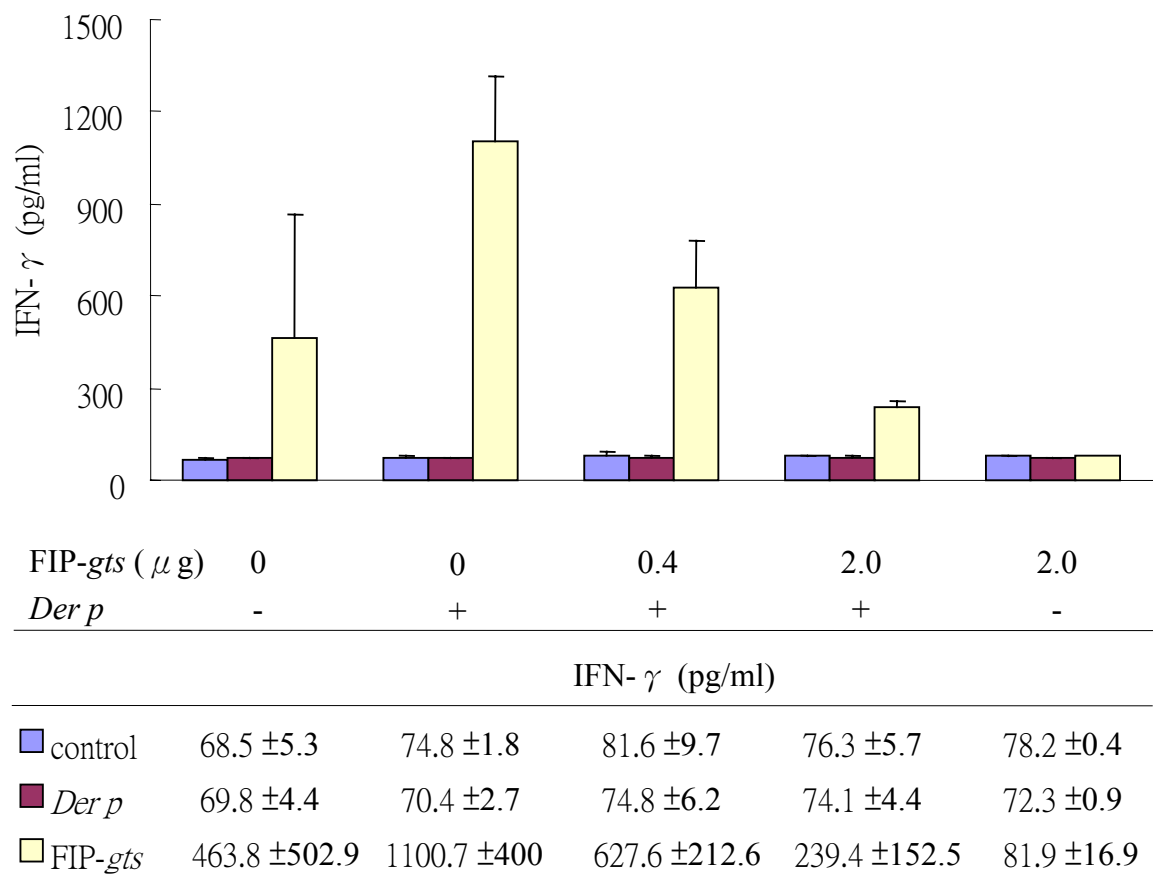


**Fig. 22. The morphology of various white blood cells in Balb/c mice peripheral blood.** Total blood smear was manufactured immediately when scarifying Balb/c mice. Using Liu A and Liu B solution stained the WBCs. (A) Neutrophil, (B)Eosinophil, (C)Lymphocyte and (D)Monocyte.

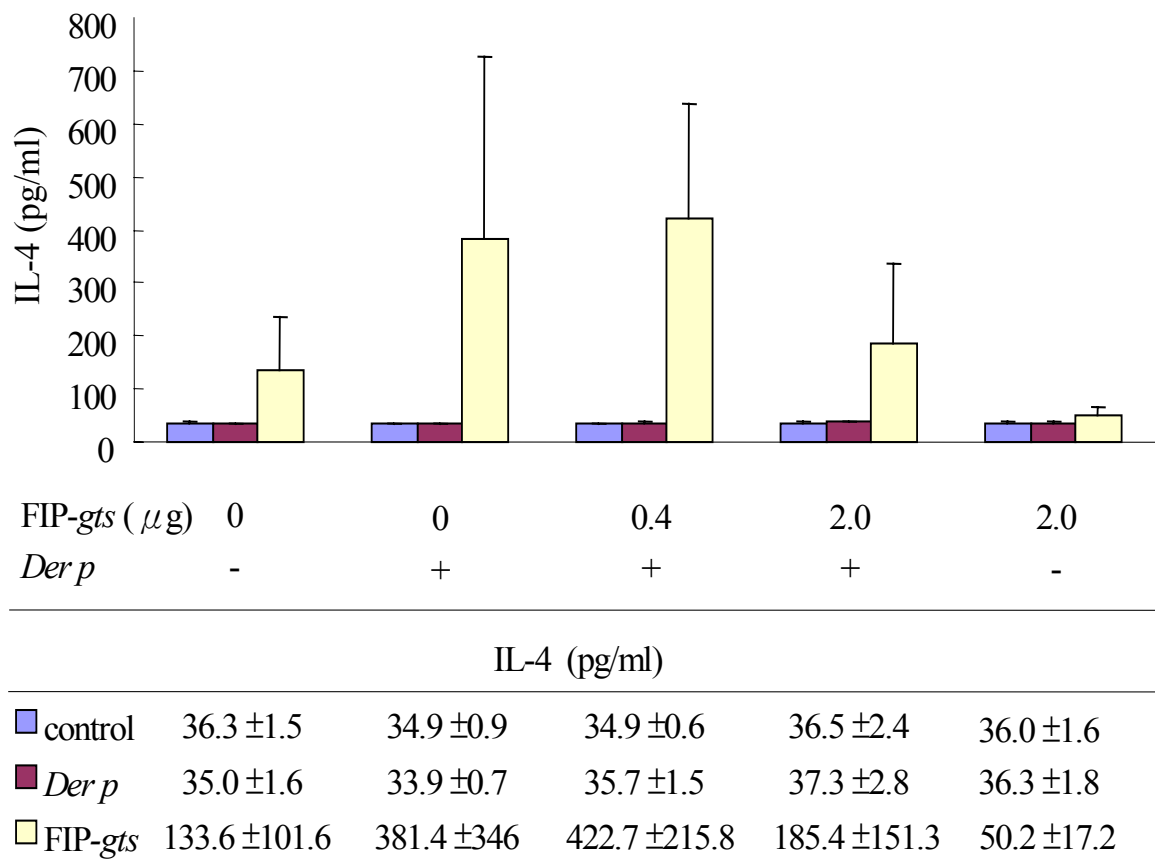




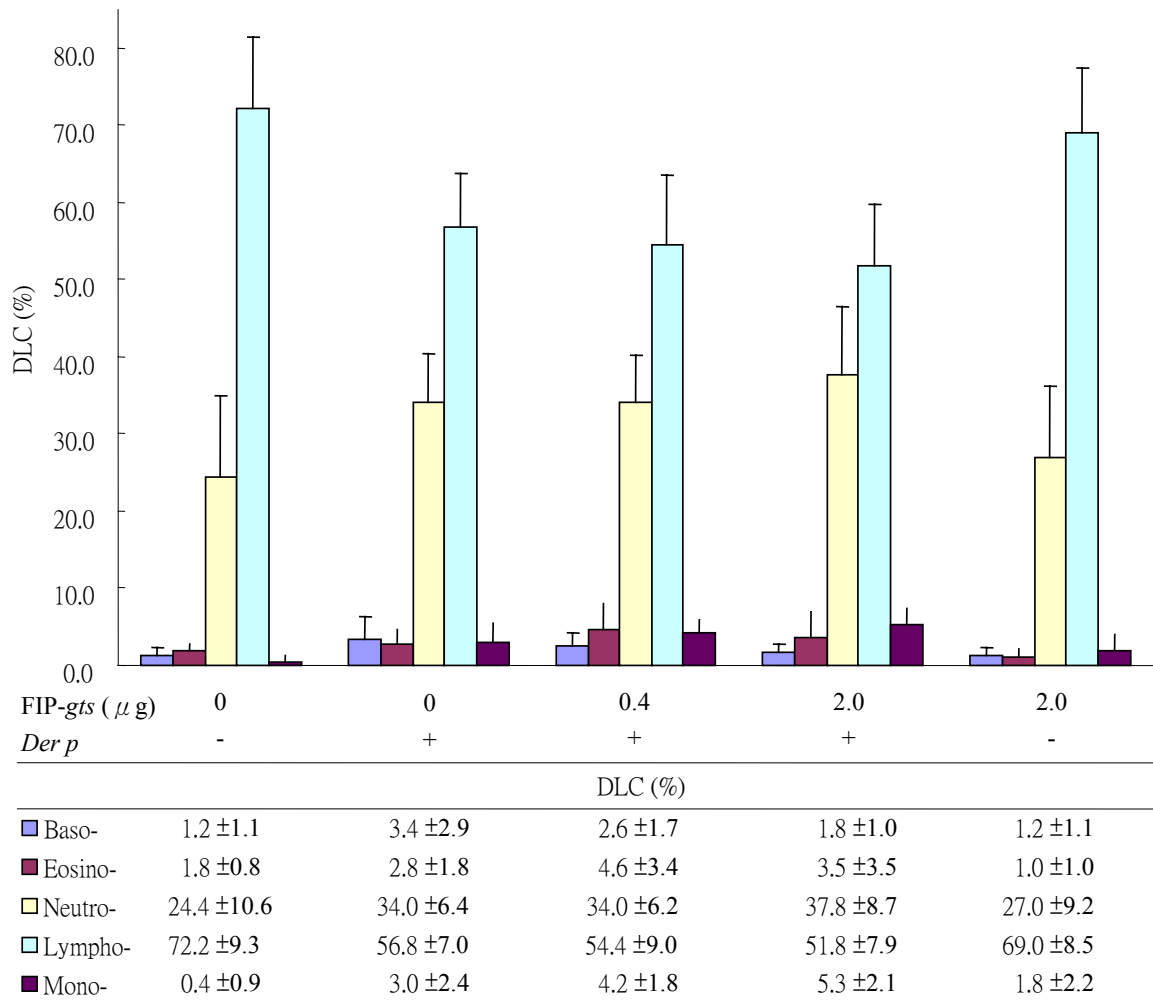
**Fig. 23. The differential leucocyte counting (DLC) of Balb/c mice sensitized with native *Der p* crude protein extract.** Assessing leukocytes in *Der p* crude extract sensitized mice by the relative numbers of the various WBCs in the peripheral blood with qualitative evaluation of the morphology. The morphologic identification of a consecutive series of WBCs, by eye, results in a differential count, in which the relative number of each cell is expressed as a percentage.



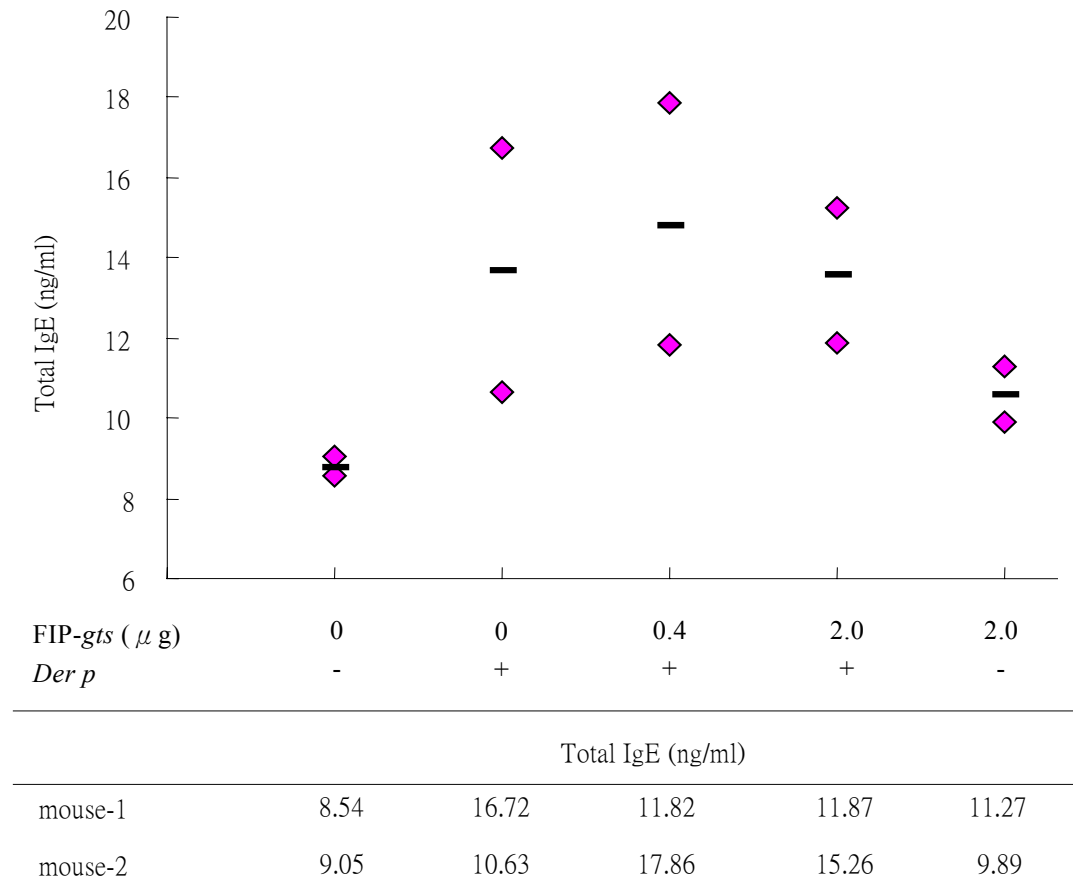
**Fig. 24. Measured IFN- $\gamma$  in *Der p*-sensitized Balb/c mice splenocyte re-stimulated with FIP-*gts* or *Der p* extract.** Isolated the splenocyte of sensitized mice and cultured in 5% RPMI-1640 medium at  $6 \times 10^6$  cells/ml, then re-stimulated with 10  $\mu$ g/ml *Der p* or 2  $\mu$ g/ml FIP-*gts*. Supernatants were harvested after 48 hours in culture and analyzed for IFN- $\gamma$  production.



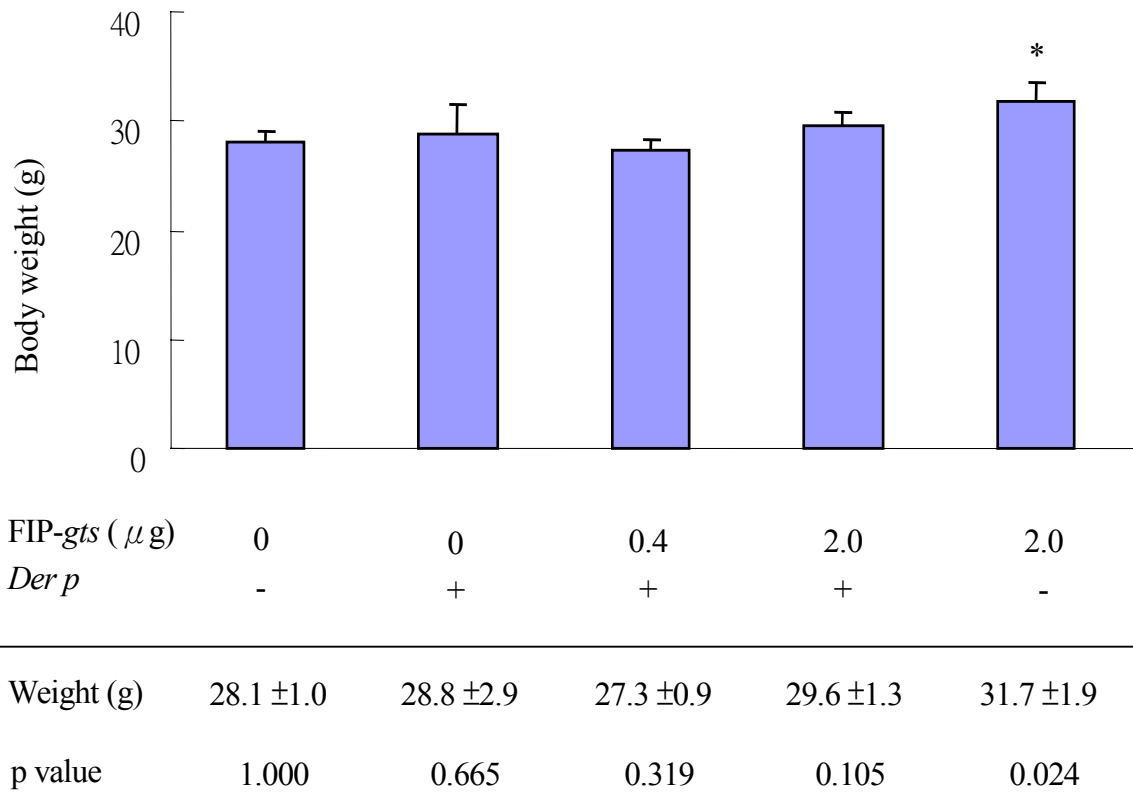
**Fig. 25. Measured IL-4 in *Der p*-sensitized Balb/c mice splenocyte re-stimulated with FIP-gts or *Der p* extract.** Isolated the splenocyte of sensitized mice and cultured in 5% RPMI-1640 medium at  $6 \times 10^6$  cells/ml, then re-stimulated with 10  $\mu$ g/ml *Der p* or 2  $\mu$ g/ml FIP-gts. Supernatants were harvested after 48 hours in culture and analyzed for IL-4 production.



**Fig. 26. The differential leucocyte counting (DLC) of Balb/c mice sensitized by recombinant *Der p* II<sub>1-129</sub> protein.** Assessing leukocytes in *reDer p* II<sub>1-129</sub> sensitized mice by the relative numbers of the various WBCs in the peripheral blood with qualitative evaluation of the morphology. The morphologic identification of a consecutive series of WBCs, by eye, results in a differential count, in which the relative number of each cell is expressed as a percentage.



**Fig. 27. The production of total IgE in *reDer p*  $\Pi_{1-129}$ -sensitized mice.** After sensitized and challenged with *reDer p*  $\Pi_{1-129}$ , Balb/c mice were sacrificed. The trachea was cannulated and the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid was collected by injected 0.8 ml PBS three times into the lung. Total IgE were assessed using ELISA kit (Pharmingen) and results expressed as ng/ml.



**Fig. 28. The increasing body weight of Balb/c mice feed with FIP-gts.** After fed Balb/c mice on FIP-gts for two weeks, we measured the body weight for each group. (\*  $p < 0.05$ , student T test )

## 參考文獻

- Ausiello, C.M., Spagnoli, G.C., Boccanera, M., Casalnuovo, I., Malavasi, F., Casciani, C.U. and Cassone, A. (1986) Proliferation of human peripheral blood mononuclear cells induced by *Candida albicans* and its cell wall fractions. *J Med Microbiol*, **22**, 195-202.
- Banchereau, J. and Steinman, R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, **392**, 245-252.
- Bochner, B.S., Udem, B.J. and Lichtenstein, L.M. (1994) Immunological aspects of allergic asthma. *Annu Rev Immunol*, **12**, 295-335.
- Cai, G., Radzanowski, T., Villegas, E.N., Kastelein, R. and Hunter, C.A. (2000) Identification of STAT4-dependent and independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*, **165**, 2619-2627.
- Cao, L.Z. and Lin, Z.B. (2003) Regulatory effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on cytotoxic T-lymphocytes induced by dendritic cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin*, **24**, 321-326.
- Carter, A.B., Monick, M.M. and Hunninghake, G.W. (1999) Both Erk and p38 kinases are necessary for cytokine gene transcription. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **20**, 751-758.
- Chen, H.L., Li, D.F., Chang, B.Y., Gong, L.M., Piao, X.S., Yi, G.F. and Zhang, J.X. (2003) Effects of lentinan on broiler splenocyte proliferation, interleukin-2 production, and signal transduction. *Poult Sci*, **82**, 760-766.
- Chen, H.Y., Chen, C.H., Yeh, M.Y., Wu, J.S., Yazama, K. and Mikami, Y. (1992) In vivo anti-candidal activity induced by traditional Chinese herbal medicine, *Ganoderma lucidum*. *Jpn. J. Med. Mycol.*, **33**, 505-512.
- Cheshire, J.L., Williams, B.R. and Baldwin, A.S., Jr. (1999) Involvement of double-stranded RNA-activated protein kinase in the synergistic activation of nuclear factor-kappaB by tumor necrosis factor-alpha and gamma-interferon in preneuronal cells. *J Biol Chem*, **274**, 4801-4806.
- Chhabra, S.K. and Pandey, K.K. (2002) Comparison of acute bronchodilator effects of inhaled ipratropium bromide and salbutamol in bronchial asthma. *J Asthma*, **39**, 375-381.
- Chua, K.Y., Doyle, C.R., Simpson, R.J., Turner, K.J., Stewart, G.A. and Thomas, W.R. (1990) Isolation of cDNA coding for the major mite allergen Der p II by IgE plaque immunoassay. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, **91**, 118-123.

- Cippitelli, M., Sica, A., Viggiano, V., Ye, J., Ghosh, P., Birrer, M.J. and Young, H.A. (1995) Negative transcriptional regulation of the interferon-gamma promoter by glucocorticoids and dominant negative mutants of c-Jun. *J Biol Chem*, **270**, 12548-12556.
- Croll, A.D., Siggins, K.W., Morris, A.G. and Pither, J.M. (1987) The induction of IFN-gamma production and m-RNAs of interleukin 2 and IFN-gamma by phorbol esters and a calcium ionophore. *Biochem Biophys Res Commun*, **146**, 927-933.
- Del Prete, G.F., De Carli, M., D'Elios, M.M., Maestrelli, P., Ricci, M., Fabbri, L. and Romagnani, S. (1993) Allergen exposure induces the activation of allergen-specific Th2 cells in the airway mucosa of patients with allergic respiratory disorders. *Eur J Immunol*, **23**, 1445-1449.
- Delgado, M. and Ganea, D. (2000) Inhibition of IFN-gamma-induced janus kinase-1-STAT1 activation in macrophages by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *J Immunol*, **165**, 3051-3057.
- Deng, L., Zhou, Y., Peng, X., Deng, H., Deng, Y. and Yao, J. (2001) [Serum markers and pathological evaluation in hepatitis fibrosis of chronic hepatitis B treated with interferon alpha]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, **9 Suppl**, 66-67.
- Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F. and Sherr, C.J. (1998) Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev*, **12**, 3499-3511.
- Dietrich, G., Viret, J.F. and Hess, J. (2003) Novel vaccination strategies based on recombinant Mycobacterium bovis BCG. *Int J Med Microbiol*, **292**, 441-451.
- Dijkers, P.F., Medema, R.H., Pals, C., Banerji, L., Thomas, N.S., Lam, E.W., Burgering, B.M., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., Koenderman, L. and Coffey, P.J. (2000) Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Mol Cell Biol*, **20**, 9138-9148.
- Doble, B.W. and Woodgett, J.R. (2003) GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci*, **116**, 1175-1186.
- Elser, B., Lohoff, M., Kock, S., Giaisi, M., Kirchhoff, S., Krammer, P.H. and Li-Weber, M. (2002) IFN-gamma represses IL-4 expression via IRF-1 and IRF-2. *Immunity*, **17**, 703-712.
- Favata, M.F., Horiuchi, K.Y., Manos, E.J., Daulerio, A.J., Stradley, D.A., Feeser, W.S., Van Dyk, D.E., Pitts, W.J., Earl, R.A., Hobbs, F., Copeland, R.A.,



- Magolda, R.L., Scherle, P.A. and Trzaskos, J.M. (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*, **273**, 18623-18632.
- Fuggetta, M.P., D'Onofrio, C. and Bonmassar, E. (1990) Role of biological response modifiers in immunochemotherapy of solid tumors and retroviral-induced leukemia. *Ann Ist Super Sanita*, **26**, 385-395.
- Fukao, T., Tanabe, M., Terauchi, Y., Ota, T., Matsuda, S., Asano, T., Kadowaki, T., Takeuchi, T. and Koyasu, S. (2002) PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. *Nat Immunol*, **3**, 875-881.
- Gabius, H.J., Walzel, H., Joshi, S.S., Kruip, J., Kojima, S., Gerke, V., Kratzin, H. and Gabius, S. (1992) The immunomodulatory beta-galactoside-specific lectin from mistletoe: partial sequence analysis, cell and tissue binding, and impact on intracellular biosignalling of monocytic leukemia cells. *Anticancer Res*, **12**, 669-675.
- Galant, S.P. (1990) Treatment of asthma. New and time-tested strategies. *Postgrad Med*, **87**, 229-236.
- Girdlestone, J. and Wing, M. (1996) Autocrine activation by interferon-gamma of STAT factors following T cell activation. *Eur J Immunol*, **26**, 704-709.
- Graff, J.R., Konicek, B.W., McNulty, A.M., Wang, Z., Houck, K., Allen, S., Paul, J.D., Hbaliu, A., Goode, R.G., Sandusky, G.E., Vessella, R.L. and Neubauer, B.L. (2000) Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27Kip1 expression. *J Biol Chem*, **275**, 24500-24505.
- Haak-Frendscho, M., Kino, K., Sone, T. and Jardieu, P. (1993) Ling Zhi-8: a novel T cell mitogen induces cytokine production and upregulation of ICAM-1 expression. *Cell Immunol*, **150**, 101-113.
- Hewitt, C.R., Brown, A.P., Hart, B.J. and Pritchard, D.I. (1995) A major house dust mite allergen disrupts the immunoglobulin E network by selectively cleaving CD23: innate protection by antiproteases. *J Exp Med*, **182**, 1537-1544.
- Hikino, H., Konno, C., Mirin, Y. and Hayashi, T. (1985) Isolation and hypoglycemic activity of ganoderans A and B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Med*, 339-340.
- Horner, W.E., Helbling, A. and Lehrer, S.B. (1993) Basidiomycete allergens: comparison of three *Ganoderma* species. *Allergy*, **48**, 110-116.
- Hseu, R.S. (1996) Prevention and Treatment of Allergic Diseases by Direct

- Allergen-gene Transfer. *Department of Microbiology*. National Taiwan University, Taipei.
- Hseu, R.S., Wang, H.H., Wang, H.F. and Moncalvo, J.M. (1996) Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by random amplified polymorphic DNA-PCR compared with grouping on the basis of internal transcribed spacer sequences. *Appl Environ Microbiol*, **62**, 1354-1363.
- Hsu, C.-i. (1996) Study on the Fungal Immunomodulatory Proteins. *Department of Medical Technology, college of medicine*. National Taiwan University, Taipei.
- Iniguez, M.A., Punzon, C. and Fresno, M. (1999) Induction of cyclooxygenase-2 on activated T lymphocytes: regulation of T cell activation by cyclooxygenase-2 inhibitors. *J Immunol*, **163**, 111-119.
- Ip, Y.T. and Davis, R.J. (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 205-219.
- Irazoqui, F.J., Zalazar, F.E., Nores, G.A. and Vides, M.A. (1997) Agaricus bisporus lectin binds mainly O-glycans but also N-glycans of human IgA subclasses. *Glycoconj J*, **14**, 313-319.
- Irimura, T., McIsaac, A.M., Carlson, D.A., Yagita, M., Grimm, E.A., Menter, D.G., Ota, D.M. and Clary, K.R. (1990) Soluble factor in normal tissues that stimulates high-molecular-weight sialoglycoprotein production by human colon carcinoma cells. *Cancer Res*, **50**, 3331-3338.
- Jaffuel, D., Mathieu, M., Godard, P., Michel, F.B. and Demoly, P. (1999) [Mechanism of action of glucocorticoids in asthma]. *Rev Mal Respir*, **16**, 431-442.
- Jan, T.R., Farraj, A.K., Harkema, J.R. and Kaminski, N.E. (2003) Attenuation of the ovalbumin-induced allergic airway response by cannabinoid treatment in A/J mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, **188**, 24-35.
- Kahn, D.A., Archer, D.C., Gold, D.P. and Kelly, C.J. (2001) Adjuvant immunotherapy is dependent on inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med*, **193**, 1261-1268.
- Kawagishi, H., Fukuhara, F., Sazuka, M., Kawashima, A., Mitsubori, T. and Tomita, T. (1993) 5'-Deoxy-5'-methylsulphinyladenine, a platelet aggregation inhibitor from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, **32**, 239-241.
- Kawagishi, H., Mori, H., Uno, A., Kimura, A. and Chiba, S. (1994) A sialic acid-binding lectin from the mushroom *Herichium erinaceum*. *FEBS Lett*,

340, 56-58.

- Kim, H.M., Yim, H.G., Yoon, H.S., Park, S.T., Jeung, J.Y., Lee, K.N., Baek, S.H., Song, Y.S., Oh, G.J., Kim, N.S. and An, N.H. (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase regulates proliferation of RAW 264.7 macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, **23**, 355-365.
- Kimura, Y., Taniguchi, M. and Baba, K. (2002) Antitumor and antimetastatic effects on liver of triterpenoid fractions of *Ganoderma lucidum*: mechanism of action and isolation of an active substance. *Anticancer Res*, **22**, 3309-3318.
- Kino, K., Mizumoto, K., Sone, T., Yamaji, T., Watanabe, J., Yamashita, A., Yamaoka, K., Shimizu, K., Ko, K. and Tsunoo, H. (1990) An immunomodulating protein, Ling Zhi-8 (LZ-8) prevents insulinitis in non-obese diabetic mice. *Diabetologia*, **33**, 713-718.
- Kino, K., Sone, T., Watanabe, J., Yamashita, A., Tsuboi, H., Miyajima, H. and Tsunoo, H. (1991) Immunomodulator, LZ-8, prevents antibody production in mice. *Int J Immunopharmacol*, **13**, 1109-1115.
- Kino, K., Yamashita, A., Yamaoka, K., Watanabe, J., Tanaka, S., Ko, K., Shimizu, K. and Tsunoo, H. (1989) Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidum*. *J Biol Chem*, **264**, 472-478.
- Ko, J.L., Hsu, C.I., Lin, R.H., Kao, C.L. and Lin, J.Y. (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**, 244-249.
- Konska, G., Guillot, J., Dusser, M., Damez, M. and Botton, B. (1994) Isolation and characterization of an N-acetyllactosamine-binding lectin from the mushroom *Laetiporus sulfureus*. *J Biochem (Tokyo)*, **116**, 519-523.
- Krilis, S., Baldo, B.A., Sutton, R. and Basten, A. (1984) Antigens and allergens from the common house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. Part I. Demonstration of multiple allergens by immunochemical and biologic analyses. *J Allergy Clin Immunol*, **74**, 132-141.
- Kuehr, J., Frischer, T., Meinert, R., Barth, R., Schraub, S., Urbanek, R., Karmaus, W. and Forster, J. (1995) Sensitization to mite allergens is a risk factor for early and late onset of asthma and for persistence of asthmatic signs in children. *J Allergy Clin Immunol*, **95**, 655-662.
- Kung, T.T., Jones, H., Adams, G.K., 3rd, Umland, S.P., Kreutner, W., Egan, R.W., Chapman, R.W. and Watnick, A.S. (1994) Characterization of a murine model of allergic pulmonary inflammation. *Int Arch Allergy*

- Immunol*, **105**, 83-90.
- Labuda, T., Sundstedt, A. and Dohlsten, M. (2000) Selective induction of p38 mitogen-activated protein kinase activity following A6H co-stimulation in primary human CD4(+) T cells. *Int Immunol*, **12**, 253-261.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lai, C.L., Shyur, S.D., Wu, C.Y., Chang, C.L. and Chu, S.H. (2002) Specific IgE to 5 different major house dust mites among asthmatic children. *Acta Paediatr Taiwan*, **43**, 265-270.
- Lee, C.S., Tang, R.B. and Chung, R.L. (2000) The evaluation of allergens and allergic diseases in children. *J Microbiol Immunol Infect*, **33**, 227-232.
- Lee, Y.L., Fu, C.L., Ye, Y.L. and Chiang, B.L. (1999) 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*, **49**, 229-236.
- Lichtenstein, L.M. and Bochner, B.S. (1991) The role of basophils in asthma. *Ann N Y Acad Sci*, **629**, 48-61.
- Lin, J.M., Lin, C.C., Chiu, H.F., Yang, J.J. and Lee, S.G. (1993) Evaluation of the anti-inflammatory and liver-protective effects of anoectochilus formosanus, ganoderma lucidum and gynostemma pentaphyllum in rats. *Am J Chin Med*, **21**, 59-69.
- Lin, W.H. (1996) Molecular cloning, expression and site-directed mutagenesis of fungal immunomodulatory protein, FIP-gts, from ganoderma tsugae. *Graduated Institute of Biochemistry and Molecularbiology, college of medicine*. National Taiwan University, Taipei.
- Lin, W.H., Hung, C.H., Hsu, C.I. and Lin, J.Y. (1997) Dimerization of the N-terminal amphipathic alpha-helix domain of the fungal immunomodulatory protein from Ganoderma tsugae (Fip-gts) defined by a yeast two-hybrid system and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, **272**, 20044-20048.
- Lin, Y.-C. (2001) The Influence of Der p 2-induced Th2 Response on Host Defense against Intracellular Pathogen. *Graduate Institute of Immunology, College of Medicine*. National Taiwan University, Taipei.
- Min, B.S., Gao, J.J., Hattori, M., Lee, H.K. and Kim, Y.H. (2001) Anticomplement activity of terpenoids from the spores of Ganoderma lucidum. *Planta Med*, **67**, 811-814.
- Miyasaka, N., Inoue, H., Totsuka, T., Koike, R., Kino, K. and Tsunoo, H. (1992) An immunomodulatory protein, Ling Zhi-8, facilitates cellular

- interaction through modulation of adhesion molecules. *Biochem Biophys Res Commun*, **186**, 385-390.
- Mizuki, D., Miura, T., Sasaki, S., Mizuki, M., Madarame, H. and Nakane, A. (2001) Interference between host resistance to *Listeria monocytogenes* infection and ovalbumin-induced allergic responses in mice. *Infect Immun*, **69**, 1883-1888.
- Navarro, A., Anand-Apte, B., Tanabe, Y., Feldman, G. and Lerner, A.C. (2003) A PI-3 kinase-dependent, Stat1-independent signaling pathway regulates interferon-stimulated monocyte adhesion. *J Leukoc Biol*, **73**, 540-545.
- Nguyen, H., Ramana, C.V., Bayes, J. and Stark, G.R. (2001) Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in interferon-gamma-dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression. *J Biol Chem*, **276**, 33361-33368.
- Nick, J.A., Avdi, N.J., Gerwins, P., Johnson, G.L. and Worthen, G.S. (1996) Activation of a p38 mitogen-activated protein kinase in human neutrophils by lipopolysaccharide. *J Immunol*, **156**, 4867-4875.
- O'Donoghue, G.V., Okarma, T.B. and Lee, Y.M. (1993) An immune complex selective affinity column utilizing site-specific attachment of bovine conglutinin. *Anal Biochem*, **213**, 310-317.
- Ohteki, T., Parsons, M., Zakarian, A., Jones, R.G., Nguyen, L.T., Woodgett, J.R. and Ohashi, P.S. (2000) Negative regulation of T cell proliferation and interleukin 2 production by the serine threonine kinase GSK-3. *J Exp Med*, **192**, 99-104.
- Ohtsuka, T., Kaziro, Y. and Satoh, T. (1996) Analysis of the T-cell activation signaling pathway mediated by tyrosine kinases, protein kinase C, and Ras protein, which is modulated by intracellular cyclic AMP. *Biochim Biophys Acta*, **1310**, 223-232.
- Patocka, J. (1999) Anti-inflammatory triterpenoids from mysterious mushroom *Ganoderma lucidum* and their potential possibility in modern medicine. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, **42**, 123-125.
- Peebles, R.S., Jr., Dworski, R., Collins, R.D., Jarzecka, K., Mitchell, D.B., Graham, B.S. and Sheller, J.R. (2000) Cyclooxygenase inhibition increases interleukin 5 and interleukin 13 production and airway hyperresponsiveness in allergic mice. *Am J Respir Crit Care Med*, **162**, 676-681.
- Puddu, P., Fantuzzi, L., Borghi, P., Varano, B., Rainaldi, G., Guillemard, E., Malorni, W., Nicaise, P., Wolf, S.F., Belardelli, F. and Gessani, S. (1997) IL-12 induces IFN-gamma expression and secretion in mouse peritoneal

- macrophages. *J Immunol*, **159**, 3490-3497.
- Rincon, M., Enslin, H., Raugeaud, J., Recht, M., Zapton, T., Su, M.S., Penix, L.A., Davis, R.J. and Flavell, R.A. (1998) Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *Embo J*, **17**, 2817-2829.
- Rooney, J.W., Hodge, M.R., McCaffrey, P.G., Rao, A. and Glimcher, L.H. (1994) A common factor regulates both Th1- and Th2-specific cytokine gene expression. *Embo J*, **13**, 625-633.
- Rossig, L., Jadidi, A.S., Urbich, C., Badorff, C., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S. (2001) Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol Cell Biol*, **21**, 5644-5657.
- Sanceau, J., Hiscott, J., Delattre, O. and Wietzerbin, J. (2000) IFN-beta induces serine phosphorylation of Stat-1 in Ewing's sarcoma cells and mediates apoptosis via induction of IRF-1 and activation of caspase-7. *Oncogene*, **19**, 3372-3383.
- Seger, R. and Krebs, E.G. (1995) The MAPK signaling cascade. *Faseb J*, **9**, 726-735.
- Shimizu, A., Yano, T., Saito, Y. and Inada, Y. (1985) Isolation of an inhibitor of platelet aggregation from a fungus, *Ganoderma lucidum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **33**, 3012-3015.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. and Schreiber, R.D. (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*, **67**, 227-264.
- Stein, R.C. and Waterfield, M.D. (2000) PI3-kinase inhibition: a target for drug development? *Mol Med Today*, **6**, 347-357.
- Tandon, P. and Diamond, S.L. (1998) Kinetics of beta2-integrin and L-selectin bonding during neutrophil aggregation in shear flow. *Biophys J*, **75**, 3163-3178.
- Tang, S.-C. (2001) Regulation of Interferon-gamma by the Immunomodulatory protein from *Flammulina velutipes*. *Institute of Toxicology*. Chung Shan Medical University, Taichung.
- Thiele, D.L., Kurosaka, M. and Lipsky, P.E. (1983) Phenotype of the accessory cell necessary for mitogen-stimulated T and B cell responses in human peripheral blood: delineation by its sensitivity to the lysosomotropic agent, L-leucine methyl ester. *J Immunol*, **131**, 2282-2290.
- Toker, A., Meyer, M., Reddy, K.K., Falck, J.R., Aneja, R., Aneja, S., Parra, A., Burns, D.J., Ballas, L.M. and Cantley, L.C. (1994) Activation of protein

- kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3. *J Biol Chem*, **269**, 32358-32367.
- Townley, R.G. and Suliaman, F. (1987) The mechanism of corticosteroids in treating asthma. *Ann Allergy*, **58**, 1-6.
- Ueno, Y., Kohgo, Y., Sakamaki, S., Itoh, Y., Takahashi, M., Hirayama, Y. and Niitsu, Y. (1994) Immunochemotherapy in B-16-melanoma-cell-transplanted mice with combinations of interleukin-2, cyclophosphamide, and PSK. *Oncology*, **51**, 296-302.
- van der Hem, L.G., van der Vliet, J.A., Bocken, C.F., Kino, K., Hoitsma, A.J. and Tax, W.J. (1995) Ling Zhi-8: studies of a new immunomodulating agent. *Transplantation*, **60**, 438-443.
- van der Zee, J.S., van Swieten, P., Jansen, H.M. and Aalberse, R.C. (1988) Skin tests and histamine release with P1-depleted Dermatophagoides pteronyssinus body extracts and purified P1. *J Allergy Clin Immunol*, **81**, 884-896.
- Vanhaesebroeck, B., Welham, M.J., Kotani, K., Stein, R., Warne, P.H., Zvelebil, M.J., Higashi, K., Volinia, S., Downward, J. and Waterfield, M.D. (1997) P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4330-4335.
- Vivanco, I. and Sawyers, C.L. (2002) The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*, **2**, 489-501.
- Wang, S.Y., Hsu, M.L., Hsu, H.C., Tzeng, C.H., Lee, S.S., Shiao, M.S. and Ho, C.K. (1997) The anti-tumor effect of Ganoderma lucidum is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *Int J Cancer*, **70**, 699-705.
- Wang, Y.Y., Khoo, K.H., Chen, S.T., Lin, C.C., Wong, C.H. and Lin, C.H. (2002) Studies on the immuno-modulating and antitumor activities of Ganoderma lucidum (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analyses of a fucose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities. *Bioorg Med Chem*, **10**, 1057-1062.
- Ward, S.G., June, C.H. and Olive, D. (1996) PI 3-kinase: a pivotal pathway in T-cell activation? *Immunol Today*, **17**, 187-197.
- Wedemeyer, J. and Galli, S.J. (2000) Mast cells and basophils in acquired immunity. *Br Med Bull*, **56**, 936-955.
- Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P.G. and van Ree, R. (2002) Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science*, **296**, 490-494.
- Ye, J., Ortaldo, J.R., Conlon, K., Winkler-Pickett, R. and Young, H.A. (1995) Cellular and molecular mechanisms of IFN-gamma production induced

- by IL-2 and IL-12 in a human NK cell line. *J Leukoc Biol*, **58**, 225-233.
- Yoneda, O., Imai, T., Nishimura, M., Miyaji, M., Mimori, T., Okazaki, T., Domae, N., Fujimoto, H., Minami, Y., Kono, T., Bloom, E.T. and Umehara, H. (2003) Membrane-bound form of fractalkine induces IFN-gamma production by NK cells. *Eur J Immunol*, **33**, 53-58.
- Young, P.R., McLaughlin, M.M., Kumar, S., Kassis, S., Doyle, M.L., McNulty, D., Gallagher, T.F., Fisher, S., McDonnell, P.C., Carr, S.A., Huddleston, M.J., Seibel, G., Porter, T.G., Livi, G.P., Adams, J.L. and Lee, J.C. (1997) Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J Biol Chem*, **272**, 12116-12121.
- Yssel, H., Johnson, K.E., Schneider, P.V., Wideman, J., Terr, A., Kastelein, R. and De Vries, J.E. (1992) T cell activation-inducing epitopes of the house dust mite allergen Der p I. Proliferation and lymphokine production patterns by Der p I-specific CD4+ T cell clones. *J Immunol*, **148**, 738-745.
- Yu, C.K., Lee, S.C., Wang, J.Y., Hsiue, T.R. and Lei, H.Y. (1996) Early-type hypersensitivity-associated airway inflammation and eosinophilia induced by *Dermatophagoides farinae* in sensitized mice. *J Immunol*, **156**, 1923-1930.
- Zhang, G.L., Wang, Y.H., Ni, W., Teng, H.L. and Lin, Z.B. (2002) Hepatoprotective role of *Ganoderma lucidum* polysaccharide against BCG-induced immune liver injury in mice. *World J Gastroenterol*, **8**, 728-733.
- Zuany-Amorim, C., Sawicka, E., Manlius, C., Le Moine, A., Brunet, L.R., Kemeny, D.M., Bowen, G., Rook, G. and Walker, C. (2002) Suppression of airway eosinophilia by killed *Mycobacterium vaccae*-induced allergen-specific regulatory T-cells. *Nat Med*, **8**, 625-629.