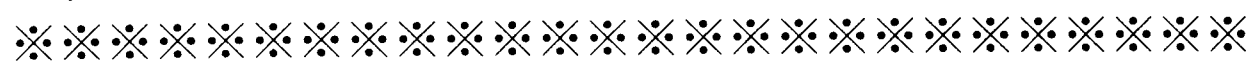


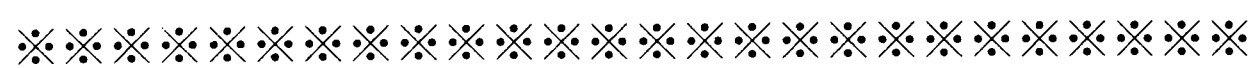
附件：封面格式

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告



## 真菌類免疫調節功能蛋白質對干擾素- $\gamma$ 基因的表現調控

Expression of Interferon- $\gamma$  regulated by fungal immunomodulatory proteins



計畫類別：個別型計畫      整合型計畫

計畫編號：NSC 89-2320-B-040-012

執行期間：88年 9月 1日至 89年 7月 31日

計畫主持人：柯俊良

共同主持人：

計畫參與人員：

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：中山醫學院毒理所

中華民國 89年 10月 27日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

真菌類免疫調節功能蛋白質對干擾素- $\gamma$  基因的表現調控

## Expression of Interferon- $\gamma$ regulated by fungal immunomodulatory proteins

計畫編號：NSC 89-2320-B-040-012

執行期限：88 年 9 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：柯俊良 中山醫學院毒理所

### 一、中文摘要

真菌類免疫調節功能蛋白質(Fungal Immunomodulatory Proteins, FIPs)可以刺激 T 淋巴球細胞增殖，減低 compound 48/80 發炎反應，且會促進 IFN- $\gamma$  的大量表現。本計劃主要發現自金針菇純化所得的 FIP 不論在老鼠 spleen，或人類周邊血細胞皆誘發大量 IFN- $\gamma$  表現，並同時也會誘發 interferon- $\gamma$  所調控的 NO 產生。且研究 FIPs 是經何種途徑誘導 IFN- $\gamma$  產生，結果 FIP 可能是間接透過 p38 活化，進而結合到 IFN- $\gamma$  promoter 區位，所以將以 Western blot 偵測 FIPs 會增加 p38 蛋白的 6 倍表現量影響。好像是透過 p38 的表現已 Western blot 證實誘發 p38 產生。本計劃並自 CD4+ T 細胞株中，構築 IFN- $\gamma$  promoter(543 bp)並具有螢光(Luciferase)報告基因的質體，藉由網站預估分析 IFN- $\gamma$  promoter 的 transcription factor binding site 進而轉染過的細胞中 luciferase 活性，來了解 FIPs 與 IFN- $\gamma$  promoter 調控關係，並知道其 promoter 區位的序列何者重要。

**關鍵詞：**IFN- $\gamma$ 、FIP-fve、p38、NO

### Abstract

The immunomodulatory activity of FIPs were demonstrated by their stimulatory activity toward human peripheral blood lymphocytes, and its anti-inflammatory of compound 48/80 stimulated edema. FIPs were found to enhance the transcriptional expression and translation expression of Interferon- $\gamma$  and Interleukine-2. FIPs can induce the IFN- $\gamma$  expression toward human peripheral blood mononuclear cells

(PBMCs) and mice spleen cells. FIPs also induced the production of NO from the downstream of interferon- $\gamma$  regulated. Inducible gene expression in eukaryotes is mainly controlled by the activity of transcriptional activator proteins, such as p38. We will investigate the 6 fold induction of p38 Western blot. IFN- $\gamma$  promoter (543 bp) was ligated into pGL-3 luciferase reporter gene. In the present study, we will characterize a regulatory element in the human interferon- $\gamma$  promoter by FIPs. Transient transfection of IFN- $\gamma$  promoter-reporter gene construct in the human T cell line Jurkat cells will exhibit that FIPs stimulated the transcription of IFN- $\gamma$  promoter driven luciferase gene.

**Keywords:** IFN- $\gamma$ , FIP-fve, luciferase

### 二、緣由與目的

Interferon gamma (Interferon  $\gamma$ ) 為干擾素之一。是由染色體 12 所產生的，並由 146 個氨基酸所組成。經由轉譯作用後成為 20 及 25 kDa 大小的單一醣蛋白；因其為雙套體所以所見的干擾素- $\gamma$  大小為 40-50kDa。干擾素- $\gamma$  是由淋巴細胞(活化至某程度的 T 細胞及自然殺手細胞 NK cell)在受到免疫刺激時所產生的，進而增加抗原呈獻細胞的功能，再加上干擾素- $\gamma$  也會誘使第 II 類 MHC 分子增加，會使 T 細胞更進一步活化。所以干擾素- $\gamma$  可以說是一種的正向迴饋訊號。

干擾素- $\gamma$  的誘發如間白素(IL-2)一般可以被 phytohaemagglutinin (PHA), concanavalin A (con A), bacterial lipopolysaccharide (LPS), phorbol ester, 及 calcium ionophores

所刺激增生。干擾素- $\gamma$  的主要功能是會活化巨噬細胞而且可以提高巨噬細胞呈獻抗原的能力，並且調節 B 細胞的分化及一些抗病毒的作用，所以干擾素- $\gamma$  是活化、加強免疫系統中不可或缺的抗病毒性細胞激素。釐清其 FIPs 透過改變何種蛋白量的訊息傳遞而誘發 IFN- $\gamma$  表現量增加。

### 三、材料與方法

#### (一) 真菌類免疫調節蛋白質純化[1]

金針菇或靈芝子實體 400 克，洗淨並除去雜質，浸泡於含有 0.05 M  $\beta$ -mercaptoethanol 1 升 5 % 冰醋酸溶液中，抽氣使金針菇完全浸入溶液中，置於冷房 12 小時，並於冷房下進行下列步驟。用果汁機 (Waring blender) 打成漿狀，將漿液使用 Beckman J2-21 M/E 冷凍離心機，在 4 °C 以 10,000 rpm (JA-14 rotor) 離心 20 分鐘，將上清液用玻璃棉過濾，並對濾液慢慢加入固體硫酸銨至 95 % 飽和濃度。再以 35,000 xg 離心 20 分鐘，取沈澱物，用少許蒸餾水溶後，移至透析袋，於 4 °C 下，對 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 透析 36 小時，並換 4 次上述緩衝液。透析完全之蛋白質溶液以 20,000 xg 離心 10 分鐘，除去不溶之雜質，將上清液通過預先以 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 緩衝液平衡過的 DEAE-cellulose DE52 管柱 (2.2x 10 公分)。先以 200 毫升緩衝液沖流後，再以 0 至 0.5 N 氯化鈉沖流出結合在 DEAE 管柱上蛋白質。上述管柱所流出之溶液皆以 Advantec 分液收集器，每管收集 5 毫升，並測其在 280 nm 波長的吸收。如圖三所示可得一為未結合在 DEAE 管柱及另一為結合在 DEAE 管柱的蛋白吸收峰，經凝血活性測定後，得知第一個未結合在 DEAE 管柱上的蛋白吸收峰具凝血活性。收集此吸收峰蛋白質溶液，以 95 % 硫酸銨飽和濃度沈澱，經 35,000 xg 離心 20 分鐘，將沈澱物移入透析袋中，對 10 mM 醋酸鈉溶液，pH 5.2 透析 48 小時，更換四次緩衝液。該

蛋白透析液經 20,000 xg 離心 10 分鐘去除在透析中所產生的沉澱物，並將上清液通過預先以 10 mM 醋酸鈉溶液，pH 5.2 平衡過的 CM-cellulose CM 52 管柱 (2.2x 10 公分)。先以上述醋酸鈉溶液沖洗出無法結合於管柱上的蛋白質，再以 0 至 0.5 N 氯化鈉直線沖洗結合於管柱上的蛋白質。將有活性部份對醋酸鈉溶液透析，並通過預先以 10 mM, pH 5.0 醋酸鈉溶液，平衡過的 Pharmacia 公司出產的 FPLC Mono S HR 5/5 管柱。先以 20 毫升相同上述醋酸鈉溶液沖流後，以 0 至 0.5 N 的氯化鈉溶於 10 mM, pH 5.0 醋酸鈉溶液中沖出結合管柱的蛋白質，每 1 毫升收集一管，可得一蛋白吸收峰，所獲得的 FIP-*five* 其純度由 HPLC 及 SDS-PAGE 來分析。

#### (二) PCR 增幅 IFN- $\gamma$ promoter 反應

取 0.5 微克的 Jurkat T 細胞的 cDNA，加入 5 微升 10 X PCR 緩衝液 (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 25 mM 氯化鎂, 500 mM 氯化鉀, 0.1 % gelatin), 2 微升的 10 mM dNTPs, 和各 10 pmole 的具有限制切位 pIFN 引子 (primer), 其引子分別為 IFN- $\gamma$  HindIII; : CCAAGCTTGCTGCACC TCCTCTGGCTGCTG, 及 IFN- $\gamma$  P3NheI: TAGTAGCTCTAGAGCAATTTGAACTTGT; PCR 條件加熱 95 °C, 4 分鐘, 最後加入 0.5 微升的 *Taq* DNA polymerase (5 單位/微升)。反應條件: 94 °C, 0.5 分鐘, 57 °C, 0.5 分鐘, 72 °C, 1.5 分鐘, 上述條件進行 35 cycles, 72 °C 反應 10 分鐘, 作用完畢後取 20 微升進行 1.5 % Agarose gel 電泳分析。預期得到 1.36 kb 的 DNA 片段。

#### (三) PCR 產物接合反應

PIFN 的產物經 agarose gel 回收後，經 Klenow 酵素反應後，使這片段末端成 cohesive end, 再和 pBCSK+ vector (經 *Sma*I digestion) 作接合反應。進行轉形實驗 (transformation), 以 IPTG 誘導及 X-gal 與 ampicillin 篩選白色菌落, 分離其質體, 經限制反應 (*Eco*RI 及 *Bam*HI) 初步確認插入的 DNA 片段大小, 並進行 DNA 定序, 在改以 *Nhe*I 及 *Hind*III digest 此質體的 insert DNA 片段成 Stick end 再和 pGL-3

vector (經 *NheI* 及 *XhoI* digestion) 作接合反應。取 DNA:Vector 3:1 的量，加入 4 微升 5X ligation 緩衝液(150 mM Tris-HCl pH 7.8, 50 mM 氯化鎂 50 mM DTT, 5 mM ATP, 25 % pEG), 和 1 微升 T4 DNA ligase (1 單位/微升)加二次蒸餾水至 20 微升，16 °C 反應 12 小時後即可進行轉形作用 (transformation)。

(三) 構築 pIFN-r promoter 之載體 pGL-3(ligation mixture)

(1) 勝任菌體 (Competent bacterial cells) 之製備：

選取單一菌落的大腸桿菌 DH5 $\alpha$ ，於 5 毫升的 LB+Ap(每毫升含 100 微克 ampicillin)培養液中，於 37 °C 培養 12 小時。取 0.5 毫升菌液至 500 毫升的培養液中，於 37 °C 振盪培養 6 小時後，在 4 °C 離心 8,000 rpm (Beckman JA-14 rotor) 5 分鐘，取得菌體沈澱，以 35 毫升的 transformation 緩衝液(10 mM MOPS, 100 mM 氯化鈣, 30 mM dextrose 和 15 % 甘油, pH 6.5)懸浮菌體。4 °C 離心 8,000 rpm 5 分鐘，得到菌體沈澱，再以 20 毫升的 transformation 緩衝液 懸浮菌體，置於冰浴中 1 小時後，分裝儲存於零下 70°C 冰箱。

(2) 轉形作用之步驟：取 competent 菌體 200 微升，加入 10 微升含有 pIFN-r cDNA 之載體 pGL-3(ligation mixture)，混合後，置於冰浴上 30 分鐘後，再置於 42 °C 水浴中 1 分鐘，使行熱休克效應(heat shock)。最後加入 200 微升的 LB 培養液於 37 °C 培養 15 分鐘，取不同體積之反應液(15, 50, 150 微升)至 Eppendorf 管中。混合後塗抹至 LB+Ap agar plate (每毫升含 50 微克的 ampicillin)，置於 37 °C 培養箱培養，第二天挑選菌落 (菌落表示載體已嵌入 DNA) 於 3 毫升 LB+Ap 培養液的試管中，37 °C 振盪培養過夜。

(四) ELISA 分析

利用 sandwich 酵素免疫分析法。利用 R&D Duoset ELISA kit 測量。使用 96 孔平底盤培養管壁先固著抗人類或老鼠 cytokine 抗體，此乃專一性的單株抗體，然後加入各

種不同濃度之 standard 即所收集培養之上清液，放在 ELISA shaker 上，室溫作用 2 小時，再以磷酸緩衝液洗三次，利用 ELISA washer 沖去未反應之檢體，此時若檢體中有 cytokine，則可與固著相對應之抗體結合，不會沖掉。加入羊抗老鼠免疫球蛋白之抗體，此抗體連接 HRP (horseradish peroxidase) 酵素，放在 ELISA shaker 上，室溫作用二小時，以磷酸緩衝液洗三次，再加入 TMB substrate，於室溫呈色 20 分鐘，再以 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 終止反應，於波長 450 nm 讀取吸光值，利用內差法分析檢體中 cytokine 濃度。

(五) Western blot analysis 西方墨點分析

檢體經 SDS-PAGE 分離後，移轉到 Immobilon P membrane 上，先以 5 % BSA(bovine serum albumin)溶於 PBS 中，37°C 反應 1 小時，再以 1% BSA 稀釋一次抗體(p38, 1000 倍)，4°C 反應 4 小時以上，然後再以含 0.5 % Tween-20 之 PBS 清洗半小時，再於 37°C 下進行二次抗體反應(2000 倍 goat anti-rabbit IgG)一小時，再次清洗後加入螢光呈色劑(ECL)反應 3 分鐘，室溫避光狀態下，以 X 光底片曝光 30 秒，沖洗底片，以 densitometer 定量分析。

#### 四、結果與討論

干擾素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN-r) 在免疫系統中具有多種生物活性，主要是由活化 T 細胞，巨大顆粒淋巴細胞及巨噬細胞[4]。在初期 IFN-r 及細胞激素-12(IL-12)參與 T 細胞分化成輔助 T1 細胞(Th1)並製造 IL-2，淋巴毒素及 IFN-r。相反的，會抑制 Th2 細胞的增殖與分化，所以抑制產生 IL-4、IL-5、IL-6 及 IL-10[5]。IFN-r 可以透過促進 protein kinase 合成，抑制 eIF-2，所以病毒的 capsid 無法合成，亦或透過促進 2'5'-polyadenylate synthetase(2-5A)，參與 ATP 轉換成 2',5'-polyadenylate polymer，因而活化 endonuclease 而分解病毒 mRNA。所以，IFN-r 可以抑制病毒複製[6]。IFN-r

與 IgG 的 Fc 受體有非常強的親和性，經由 IFN-r 增加受體(Fc)表現，可促進 phagocyte 細胞毒性及 large granular lymphocyte 增殖，所以可破壞一些抗體所在的標的細胞，可能可應用於治療 AIDS[7]。

當 IFN-r 基因受破壞，其免疫細胞許多功能亦受破壞，特別是在缺乏 IFN-r 老鼠，不能製造巨噬細胞產生抗微生物產物及減少組織相容抗原第 II 型(MHC II)表現，亦減少自然殺手細胞(NK)活性，對細胞致病原產生病理變化[8]。所以 IFN-r 在免疫系統中，對抗致病原扮演重要角色。

有些抑制 IFN-r 產生，像一些 immunosuppression agents 如：cyclosporin A, corticosteroids, prostaglandin 可透過結合到 IFN-r promoter 的 silence 區域而抑制 IFN-r 轉錄產生[9]。

T 細胞活化可導致許多 cytokines 產生，而一些 cytokine 基因表現，至於會增加 IFN-r 表現量的，如：IL-2, Lysophosphatidylcholine 等。增加 IFN-r 基因轉錄表現量可能受下列途徑所調控 (一)NF-kB 與 NFAT(nuclear factor activated T cells)轉錄因子對於活化 T 細胞所誘發的細胞激素產生是扮演著重要樞紐角色。又 NF-kB 與 NFAT 會促進 IFN-r 基因啟動區表現，並發現在 IFN 的 Intron 區位中分析得 C-Rel 結合區位，可能為一 enhancer 區域[10]，可藉由 NF-kB 與 NFAT 結合到此 C3-區域，而促進 IFN-r 基因轉錄。Lysophosphatidylcholine 也可以透過其調控 IFN-r 的 promoter 而促進人類 T 淋巴球細胞誘導產生 IFN-r 產生[11]，而 IFN-r 會抑制平滑肌細胞增生及膠原合成。本研究所構築出 IFN-r 接合於 luc 報告基因的質體 (*p IFN-r-luc*) 全長為 5391 bp，包括 IFN-r promoter 的長度為 543 bp(圖三)。經由 <http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/signal> 網站分析得含四段 response element，可受 NF-1、Cre-B、TFIID 及 E2F 等 transcription 基因調控而轉錄活化。

## 五、參考文獻

1. 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 the edible mushroom, *Flammulina velutipes* and its complete amino acid sequence. *Eur. J. Biochem.* 228, 244-249.
2. Young, H. A., and Hardy, K. J. (1990) Interferon-gamma: producer cells, activation stimuli, and molecular genetic regulation. *Pharmacol. Ther.* 45(1):137-51.
3. Stark, G. R., Kerr, I. M., Williams, B. R. G., Silverman, R. H., and Schreiber, R. D.(1998) How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 227-264.
4. Wong, G. H. W., Krowka, J. F., Stites, D. P. and Greddel, D. V. (1988) In vitro anti-HIV activities of TNF- $\alpha$  and IFN-r. *J. Immunol.* 140, 120-
5. Meurs, E. F., Watanabe, Y., Kadereit, s., Barber, G. N., Katze, M. G., et al., (1992) *J. Virol.*, 66: 5805-14.
6. Boehm, U., Klamp, t., Groot, M., and Howard, J. C. (1997) *Annu. Rev. Immunol.* 15, 749-795.
7. Cippitelli, M., Sica, A., Viggiano, V., Ye, J., ghosh, P., Birrer, M. J., and Young, H. A. (1995) Negative transcriptional regulation of the interferon-r promoter by glucocorticoids and dominant negative mutants of c-Jun. *J. Biol. Chem.*, 270, 12548-12556.
8. Sica, A., Dorman, L., Viggiano, v., Cippitelli, M., Ghosh, P., Rice, N., and Young, H. A. (1997) Interaction of NF-kB and NFAT with the Interferon-r promoter. *J. Biol. Chem.*, 272, 30412-30420.
9. Nishi, E., Kume, N., Ueno, Y., Ochi, H., Moriwaki, H., Kita, T. (1998) Lysophosphatidylcholine enhances cytokine induced interferon gamma expression in human T lymphocytes. *Circul. Res.*, 83, 508-515.
10. Northrop, J. P., Ho, S, N., Chen, L., Thomas, D. J., Timmerman, L. A., Nolan, G, P., Admon, A., and

Crabtree, G. R. (1994) NF-AT components defined family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature*, 369, 497-503.

11. Henkel, T., Machleidt, T., Alkalay, I., Kronke, M., Ben-Neriah, Y., and Baeuerle, P. A. (1993) Rapid proteolysis of I $\kappa$ B- $\alpha$  is necessary for activation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature* 365, 182-185.

六、圖表

Fig. 1. Production of interferon-r in human PBMC stimulated with FIP-fve for 48 hr.

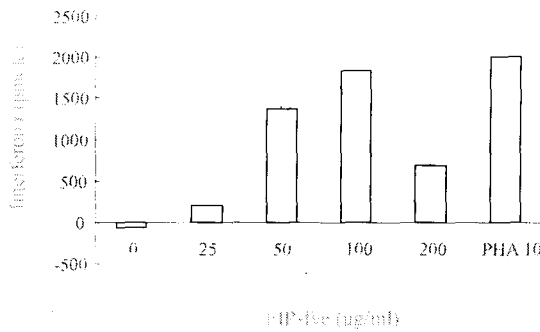


Fig. 2. Production of interferon-r in mouse spleen cells stimulated by FIP-fve for 48 hr.

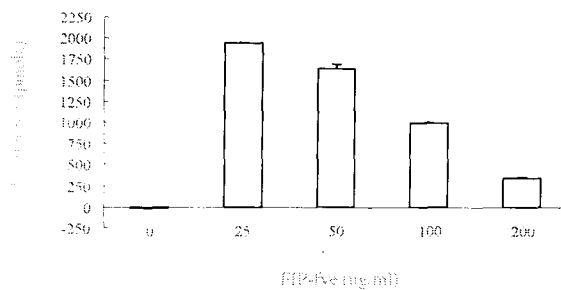


Fig. 3. Production of NO in mouse spleen cells stimulated by various concentration of FIP-fve for 48 hr.

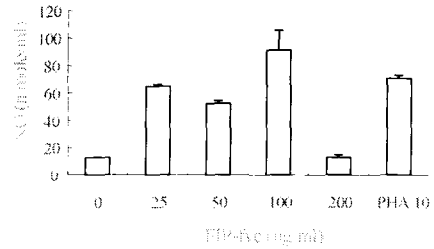
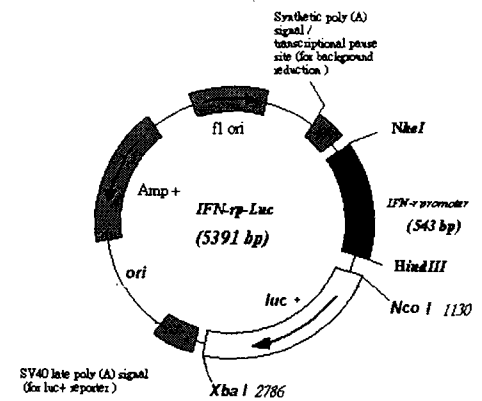


Fig. 4. Western blot for p38 by FIP-fve.



FIP-fve (ug)	0	25	50	100	200	PHA 10
Ratio	1	2.572	2.22	6.66	2.24	1.5



TCTAGAGCAATTTGAAACTTGTGGTAGATATTTTACTAACCAACTCTGAT  
E2F  
GAAGGACTTCCTCACCAAATGTTCTTTTAAACCGCATTCTTCTCTGCTT  
TCTGGTCATTTGCAAGAAAAATTTTAAAAGGCTGCCCTTTGTTAAAGGTT  
E2F  
TGAGAGGCCCTAGAATTCGTTTTTCACTTGTTCCEAACCAAGCAAAT  
IRF-2  
GATCAATGTGCTTTGTGAATGAAGAGTCAACATTTTACCAGGGCGAAGTG  
E2F  
GGGAGGTACAAAAAATTTCCAGTCTTGAATGGTGTGAAGTAAAAGTGC  
CTCAAAGAATCCCACCAGAATGGCACAGGTGGGCATAATGGGTCTGTCTC  
ATCGTCAAAGGACCCAAGGAGTCTAAAGGAACTCTAACTACAACACCCA  
Cre-B  
AATGCCACAAAACCTTAGTTATTAATACAAAATATCATCCCTGCCTATCT  
GTCACCATCTCATCTTAAAAAACTTGTGAAAATACGTAATCCTCAGGAGA  
TFIID  
CTTCAATTAGGTATAAATACCAGCAGCCAGAGGAGGTGCAGC