

科技部補助專題研究計畫成果報告 期末報告

評估靈芝免疫調節蛋白減緩肺癌上皮間質型轉換及輔助化學療法與誘發細胞自體吞噬之機轉(第3年)

計畫類別：個別型計畫
計畫編號：MOST 103-2320-B-040-003-MY3
執行期間：105年08月01日至106年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：柯俊良

計畫參與人員：碩士級-專任助理：侯婷譯
博士後研究-博士後研究：吳芝嫻
博士後研究-博士後研究：辛翌綸

中華民國 106 年 08 月 02 日

中文摘要：歐洲紫杉醇（商品名：Taxotere®）為世界常用的輔助化療之化療藥劑，然而Docetaxel會造成骨髓抑制的不良影響，包括：嗜中性白血球低下症和貧血。真菌免疫調節蛋白FIP-fve與FIP-gts分別來自金針菇與松杉靈芝中純化及選殖，過去文獻指出，免疫調節蛋白具有抗癌的功效。本研究計畫我們探討FIP-fve與FIP-gts降低肺癌細胞或docetaxel導致之骨髓損傷與骨質疏鬆。從動物實驗之血液常規檢查結果顯示，Docetaxel組出現嗜中性白血球低下及貧血。FIP-gts可減緩Docetaxel所誘發的白血球低下。透過組織染色發現，FIP-fve與FIP-gts可顯著減緩Docetaxel所造成的腸損傷，且FIP-fve與FIP-gts可有效減緩Docetaxel所誘發的骨髓中脂肪細胞數目。使用3D微電腦斷層掃描進行骨小樑定量分析，Docetaxel組較於控制組明顯降低骨體積百分比、骨小樑數目、骨表面密度及增加骨小樑間距，表示Docetaxel會造成骨損傷及增加骨質疏鬆的風險。FIP-fve與FIP-gts可顯著減緩Docetaxel所降低的骨體積百分比、骨小樑數目及骨表面密度。經由酵素連結免疫吸附分析法發現，相較於Docetaxel組，Docetaxel結合FIP-gts共同處理組小鼠血漿中G-CSF含量顯著較高。在人類週邊血單核球細胞實驗中也發現FIP-fve與FIP-gts均可刺激G-CSF之mRNA表現。另外，FIP-fve與FIP-gts均可抑制A459肺癌細胞之存活。透過RT-PCR與ELISA發現，FIP-fve與FIP-gts均可以減少A459參與肺癌誘導骨吸收病變的單核細胞趨化蛋白-1表現量，顯示FIP-fve與FIP-gts可能可減緩肺癌所誘導的骨病變。本研究首次發現FIP-fve及FIP-gts具有減緩Docetaxel所誘發的不良副作用之功效。因此，我們認為FIP-fve及FIP-gts具有發展成Docetaxel輔助藥物之潛能。

中文關鍵詞：靈芝免疫調節蛋白、嗜中性白血球低下症、顆粒性白血球群落刺激因子(G-CSF)、骨損傷

英文摘要：Docetaxel (TaxotereR) has emerged as a prime chemotherapeutic agent in adjuvant chemotherapy worldwide. However, the most common adverse effect of Docetaxel is myelosuppression, include neutropenia and anemia. Fungal Immunomodulatory Proteins of Flammulina velutipes and Ganoderma tsugaeare were called FIP-fve and FIP-gts, respectively. In previous study, immunomodulatory protein has anti-tumor activity. In this study, we investigated that FIP-fve and FIP-gts-induced decreases in lung cancer or docetaxel-mediated bone marrow damage and osteoporosis. In animal model, complete blood count reveals neutropenia and anemia. Moreover, FIP-gts but not FIP-fve can reverse docetaxel-induced neutropenia. As compared to Control group, histological sections of intestine shows that villous length was decrease in Docetaxel group, Docetaxel combined with FIP-fve and Docetaxel combined with FIP-gts, respectively. Consequences, FIP-fve and FIP-gts significantly decreased docetaxel-induced intestine damage. Moreover, numbers of adipocytewas significantly increased in Docetaxel group as compared to Control group in bone

marrow. FIP-fve and FIP-gts can decrease docetaxel-induced adipocyte in bone marrow. Quantification of trabecular bone percent bone volume, trabecular number, bone surface density, and trabecular separation analyzed by on 3D micro-CT analysis. This is reason that Docetaxel induced bone damage and increase osteoporosis risk. Moreover FIP-fve and FIP-gts significantly reversed docetaxel-decreased percent bone volume, trabecular number and bone surface density. On the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), total plasma Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) concentration was significantly increased in Docetaxel + FIP-gts group as compared to Docetaxel group. Both of FIP-fve and FIP-gts can stimulate G-CSF mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells (hPBMCs) by RT-PCR and inhibit A549 cell survival by MTT assay. Both of FIP-fve and FIP-gts reduce

英文關鍵詞：Ganoderma immunomodulatory protein, Neutropenia、Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)、Bone damage

科技部補助專題研究計畫(期末報告)

評估靈芝免疫調節蛋白減緩肺癌上皮間質型轉換及輔助化學療法與誘發細胞自體吞噬之機轉
Investigations of the Mechanisms of Alleviated Epithelial-Mesenchymal Transition, Chemotherapeutic
Prevention and Autophagy Induction by Ganoderma Immunomodulatory Proteins

計畫編號：103-2320-B-040-003-MY3

執行期限：2014.08.01 至 2017.07.31

計畫主持人：中山醫學大學醫學研究所 柯俊良教授

中文摘要

歐洲紫杉醇 (商品名:Taxotere®)為世界常用的輔助化療之化療藥劑,然而 Docetaxel 會造成骨髓抑制的不良影響,包括:嗜中性白血球低下症和貧血。真菌免疫調節蛋白 FIP-*fve* 與 FIP-*gts* 分別來自金針菇與松杉靈芝中純化及選殖,過去文獻指出,免疫調節蛋白具有抗癌的功效。本研究計畫我們探討 FIP-*fve* 與 FIP-*gts* 降低肺癌細胞或 docetaxel 導致之骨髓損傷與骨質疏鬆。從動物實驗之血液常規檢查結果顯示,Docetaxel 組出現嗜中性白血球低下及貧血。FIP-*gts* 可減緩 Docetaxel 所誘發的白血球低下。透過組織染色發現,FIP-*fve* 與 FIP-*gts* 可顯著減緩 Docetaxel 所造成的腸損傷,且 FIP-*fve* 與 FIP-*gts* 可有效減緩 Docetaxel 所誘發的骨髓中脂肪細胞數目。使用 3D 微電腦斷層掃描進行骨小樑定量分析,Docetaxel 組較於控制組明顯降低骨體積百分比、骨小樑數目、骨表面密度及增加骨小樑間距,表示 Docetaxel 會造成骨損傷及增加骨質疏鬆的風險。FIP-*fve* 與 FIP-*gts* 可顯著減緩 Docetaxel 所降低的骨體積百分比、骨小樑數目及骨表面密度。經由酵素連結免疫吸附分析法發現,相較於 Docetaxel 組,Docetaxel 結合 FIP-*gts* 共同處理組小鼠血漿中 G-CSF 含量顯著較高。在人類週邊血單核球細胞實驗中也發現 FIP-*fve* 與 FIP-*gts* 均可刺激 G-CSF 之 mRNA 表現。另外,FIP-*fve* 與 FIP-*gts* 均可抑制 A459 肺癌細胞之存活。透過 RT-PCR 與 ELISA 發現,FIP-*fve* 與 FIP-*gts* 均可以減少 A459 參與肺癌誘導骨吸收病變的單核細胞趨化蛋白-1 表現量,顯示 FIP-*fve* 與 FIP-*gts* 可能可減緩肺癌所誘導的骨病變。本研究首次發現

FIP-*fve* 及 FIP-*gts* 具有減緩 Docetaxel 所誘發的不良副作用之功效。因此,我們認為 FIP-*fve* 及 FIP-*gts* 具有發展成 Docetaxel 輔助藥物之潛能。

關鍵詞: 靈芝免疫調節蛋白、嗜中性白血球低下症、顆粒性白血球群落刺激因子(G-CSF)、骨損傷

英文摘要

Docetaxel (Taxotere®) has emerged as a prime chemotherapeutic agent in adjuvant chemotherapy worldwide. However, the most common adverse effect of Docetaxel is myelosuppression, include neutropenia and anemia. Fungal Immunomodulatory Proteins of *Flammulina velutipes* and *Ganoderma tsugaeare* were called FIP-*fve* and FIP-*gts*, respectively. In previous study, immunomodulatory protein has anti-tumor activity. In this study, we investigated that FIP-*fve* and FIP-*gts*-induced decreases in lung cancer or docetaxel-mediated bone marrow damage and osteoporosis. In animal model, complete blood count reveals neutropenia and anemia. Moreover, FIP-*gts* but not FIP-*fve* can reverse docetaxel-induced neutropenia. As compared to Control group, histological sections of intestine shows that villous length was decrease in Docetaxel group, Docetaxel combined with FIP-*fve* and Docetaxel combined with FIP-*fve*, respectively. Consequences, FIP-*fve* and FIP-*gts* significantly decreased docetaxel-induced intestine damage.

Moreover, numbers of adipocytes were significantly increased in Docetaxel group as compared to Control group in bone marrow. FIP-*fve* and FIP-*gts* can decrease docetaxel-induced adipocyte in bone marrow. Quantification of trabecular bone percent bone volume, trabecular number, bone surface density, and trabecular separation analyzed by on 3D micro-CT analysis. This is reason that Docetaxel induced bone damage and increase osteoporosis risk. Moreover FIP-*fve* and FIP-*gts* significantly reversed docetaxel-decreased percent bone volume, trabecular number and bone surface density. On the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), total plasma Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) concentration was significantly increased in Docetaxel + FIP-*gts* group as compared to Docetaxel group. Both of FIP-*fve* and FIP-*gts* can stimulate G-CSF mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells (hPBMCs) by RT-PCR and inhibit A549 cell survival by MTT assay. Both of FIP-*fve* and FIP-*gts* reduce the mRNA expression of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), which promotes lung cancer-induced bone resorptive lesions in A549 lung cancer cells by RT-PCR and ELISA. This is the first study to reveal the novel function of FIP-*fve* and FIP-*gts* in mitigating docetaxel-induced adverse side effects. Therefore, we suggest that FIP-*fve* and FIP-*gts* may be potential adjuvants of docetaxel.

Keywords: Ganoderma immunomodulatory protein, Neutropenia、Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)、Bone damage

前言

根據世界衛生組織統計，近二十年來全世界的癌症死亡率正快速上升，其中以肺癌的死亡率增加最快。預計在未來 20 年中，估計每年癌症病例將由 2012 年的 1400 萬上升到 2200 萬。對

於肺癌發生的真正原因目前尚未完全明瞭，但對導致肺癌之危險因素；如外來因素(抽煙、空氣污染)及遺傳因子已有相當的了解。肺癌根據其生物特性和臨床表現分為小細胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)和非小細胞肺癌(non-small cell lung carcinoma, NSCLC)兩大類，而非小型細胞肺癌又可區分為：腺癌(adenocarcinoma)、鱗狀細胞癌(squamous 或 epidermoid)與大細胞癌(large cell carcinoma)三種類型。小細胞肺癌約佔 12~15%，非小細胞肺癌則佔 85~88% (1)。

小細胞肺癌生長快速，很快就會發生擴散轉移，但是它對化學及放射線治療相當敏感，因此治療以全身性的化學藥物療法為主，有八成以上的反應率。可惜的是經治療緩解後，大多數病例在兩年內會復發，復發後即對治療產生抗藥性。相對於小細胞肺癌，非小細胞肺癌的生長較緩，轉移也較慢，雖然如此，在診斷時可經開刀的早期病例僅約四分之一，而可切除的病例不過 15~18%，術後發生轉移或復發的機率甚高，而不能開刀的病例對化學藥物及放射線治療大多不敏感。由於上述原因，肺癌病人的預後普遍不佳，五年的存活率低於 15%，因此許多學者致力於研究肺癌的治療方式及效果。化療過程中，常伴隨著許多的副作用，例如：骨髓毒性(Myelotoxicity)中的嗜中性白血球低下(Neutropenia)、貧血(Anemia)與血小板減少(Thrombocytopenia)等(2, 3)，另外還有出現噁心(Nausea)、嘔吐(Vomiting) (4, 5)與厭食(Anorexia) (6)，而讓病患治療效果不彰，甚至排斥治療，

從赤芝中萃取的真菌免疫調節蛋白(Fungal immunomodulatory protein, FIP)具有抗腫瘤能力後，陸續有許多免疫蛋白從不同蕈類物種分離出來，包含：*Ganoderma lucidum* (LZ-8/FIP-glu)、*Ganoderma tsugae* (FIP-gts)、*Flammulina velutipes* (FIP-fve)、*Volvariella volvacea* (FIP-vvo)、*Ganoderma japonicum* (FIP-gja)、*Ganoderma microsporum* (FIP-gmi/GMI)、*Ganoderma sinensis* (FIP-gsi)、*Trametes versicolor* (FIP-tvc)與 *Nectria hematococca* (FIP-nha)等(7)。文獻指出，靈芝免疫調節蛋白具有抗癌的功效(8)，FIP-glu 透過

AKT/NF- κ B 訊息傳遞路徑抑制乳癌細胞之生長與增生(9)與抑制雌激素接受體(10)，FIP-glu 能有效降低乳癌病患中過度活化 EGFR 且具 Erlotinib 抗藥性之腫瘤細胞的細胞存活率、細胞增生、細胞轉移與侵襲，並增加細胞對 Erlotinib 藥物之敏感性(11)。來自 *Ganoderma atrum* 的重組蛋白 FIP-gat 可促進乳癌細胞之生長抑制與細胞凋亡(12)，近期新發現的真菌免疫調節蛋白 FIP-dsq2 (*Dichomitus squalens*) 透過促進細胞凋亡與抑制轉移作用，進而減緩肺癌 A549 細胞的癌細胞特性(13)。雖已知靈芝免疫調節蛋白具有調控免疫作用之功能，但未有文獻報導，靈芝免疫調節蛋白對癌症病患化療副作用之影響，例如：化療所造成的白血球低下、骨損傷與骨密度下降等。

臨床常用之輔助化療用藥歐洲紫杉醇 Docetaxel (商品名為 Taxotere[®])，屬於紫杉醇類 (taxanes) 的抗癌化療藥物，西元 1989 年 Robert A Holton 從歐洲紫杉 (European yew tree, *Taxus baccata*) 的針葉中大量存在的 10-deacetylbaccatin III 經化學合成而得(14)。Docetaxel 能讓兩個要分開的細胞無法分離，以阻止分裂快速與活動旺盛的癌細胞生長，美國食品藥物管理局 (FDA) 證實，Docetaxel 可用於乳癌、頭頸癌、胃癌、賀爾蒙抗性的前列腺癌與非小細胞肺癌(15)。日本臨床運用 gemcitabine 合併 Docetaxel 治療骨肉瘤與軟組織肉瘤，發現治療成效高且患者存活期長(16)，但是 Docetaxel 常在抑制癌細胞生長的同時也影響了體內分泌旺盛的正常細胞、血液細胞、黏膜細胞與毛囊細胞，而造成治療副作用，包括：骨髓毒性 (Myelotoxicity)(17)、嗜中性白血球低下、貧血與血小板減少(2, 3)、周邊神經異常、過敏反應、噁心、嘔吐(4, 5)與厭食(6) 等，進而影響病患生活品質而降低治療效果。

因此，我們欲釐清真菌免疫調節蛋白是否具有趨緩化療藥物所造成的副作用，進而改善臨床病患的不良反應。

顆粒性白血球群落刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF) 會刺激顆粒球 (18)，視為造血細胞生長因子 (haematopoietic-cell growth factors)。G-CSF 可刺激骨髓性細胞

(myeloid cells) 生長的細胞激素，能調節造血幹細胞的增殖、分化、功能，協助髓性祖細胞分化 (19, 20)。臨床上常使用 G-CSF 來預防和改善接受化療之患者的嚴重血液副作用(21)。美國臨床腫瘤醫學會 (The American Society of Clinical Oncology; ASCO) 建議 G-CSF 可做為白血球生長因子之使用(22)；歐洲癌症研究與治療組織 (The European Organisation for Research and Treatment of Cancer, EORTC) 也有針對多數癌症使用化療藥物搭配 G-CSF 輔助治療進行探討，建立使用指南(23-25)。

研究目的

Docetaxel 降低白血球數量與導致骨質傷害，導致病患接受化療後，增加感染風險，而骨質傷害不只對病患的生活產生影響，更可能增加癌細胞骨轉移的風險。本計畫研究靈芝免疫調節蛋白能減緩 Docetaxel 導致之骨與骨髓損傷，在臨床上可減少病患感染風險，延長藥物治療期，改善病患生活品質與預後。

研究方法

一、反轉錄聚合酶連鎖反應 (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)

細胞經藥物處理後，依據 RareRNA (真興) 使用步驟萃取 RNA，接著運用 High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, 4368813) 合成 cDNA。完成合成 cDNA 後，取 1 μ l cDNA 作為 template，加入 10x PCR buffer 5 μ l、2 μ l 10 mM dNTPs、2 μ l sense primer (10 μ M)、2 μ l antisense primer (10 μ M) 及 1 μ l Pro-Taq DNA polymerase (5 單位/ μ l)，並補二次蒸餾水至總體積為 50 μ l。使用的引子序列如下：G-CSF Forward 5'-CCTCCCATCTGCAGAGCTTCCTG-3' 和 Reverse 5'-CCCACGTGGGAGACCTGATACTC-3'；IL-20 Forward 5'-ATGAAAGCCTCTAGTCTTGC-3' 和 Reverse 5'-CTGTCTCCTCCATCCATTGC-3'；RANKL Forward 5'-GGTTCATATAAAGTGTAGTCTGTC-3' 和 Reverse 5'-GAGACCTCGATGC

TGATTCCTC-3' ; OPG Forward 5'-CGCTCGTG TTTCTGGACATCTCC-3'和 Reverse 5'-AGGTAG CGCCCTTCCTTGCATTC-3' ; MCP-1 Forward 5'-GCTCATAGCAGCCACCTTCATTC-3'和 Reverse 5'-AGCTGCAGATTCTTGGGTTGTGG-3' ; β -actin Forward 5'- TCATCACCATTGGCAA TGAG-3'和 Reverse 5'- CACTGTGTTGGCGTAC AGGT-3' 。

三、動物試驗

(一)動物與藥劑

雄性 BALB/c ByJNarl mice 週齡約 6~8 週購自國家實驗動物中心，經中山醫學大學實驗動物照護及使用委員會審查同意，動物實驗申請表暨同意書編號 IACUC Approval NO: 947。

化療藥物 Docetaxel (商品名: 剋癌易注射劑, Taxotere[®])，其來源購自賽諾菲安萬特股份有限公司 (Sanofi Taiwan Co., Ltd) ; FIP-*fve* 為金針菇蛋白經離子交換樹脂管柱分離純化而得 ; FIP-*gts* 為酵母菌表現之重組蛋白，商品名: Lzip，含有 2% FIP-*gts* (益生生技開發股份有限公司)。

(二) 動物試驗流程

將小鼠隨機分成四組，分別為: Control 組 (不施打 Docetaxel，每天餵食 PBS)、Docetaxel 組 (Docetaxel 1time/week，每天餵食 PBS)、Docetaxel + FIP-*fve* 組 (Docetaxel 1 time/week，每天餵食 FIP-*fve*) 與 Docetaxel + FIP-*gts* 組 (Docetaxel 1 time/week，每天餵食 FIP-*gts* /Lzip solution)。

實驗前三天開始進行預處理，每天使用經滅菌的餵管餵食 PBS (100 μ l /mouse)、FIP-*fve* (10 mg/kg)、FIP-*gts* (2 g/kg); 在實驗第 1、8、15 天 (即每週一次) 以尾靜脈注射方式施打化療藥物 Docetaxel (30 mg/kg); 並於第 4 與 11 天 (即每次施打 Docetaxel 後第三天) 進行眼窩採血，並使用全自動血液分析儀 (Sysmex KX-21) 進行血液常規分析; 於實驗第 18 天以二氧化碳方式犧牲，無施打任何麻醉藥劑，再以下腔大靜脈採血法收集血液進行血液常規檢查 (Complete Blood Count, CBC) 及透過 ELISA 檢測小鼠血漿 (Plasma) 中 G-CSF 之含量。

(三) 動物檢體之分析

小鼠犧牲後，腸道採收集空腸部分，移除排泄物，並各別獨立保存於中性福馬林，接著委託力沛有限公司進行包埋、切片及組織染色。腸道部分使用病理組織 H&E stain。骨頭部分收集小鼠下肢股骨與下肢脛骨，以 70% 酒精或中性福馬林之固定覆蓋; 置於 70% 酒精的股骨隨後送交台灣小鼠診所進行骨小樑及骨密度分析，其測定儀是使用高解析度活體微型電腦斷層儀 (Skyscan 1076) 進行骨小樑及骨礦物密度 (BMD) 分析，骨礦物密度的範圍為骨幹中段 1.5 mm，包含皮質骨與骨髓腔部位; 骨小樑的定位條件是於生長板以下，距離生長板 0.4 mm，選取 1.5 mm 做分析; 置於中性福馬林的股骨送交力沛有限公司進行包埋、切片及組織染色。小鼠股骨包埋製備前需使用 10% EDTA 進行脫鈣處理，隨後將檢體放入密閉式組織脫水機 (Leica ASP300 S) 中進行組織處理，之後進行包埋、切片及組織染色。

五、刺激前成骨細胞分化 (Definition of preosteoblast)

刺激前成骨細胞分化之標準刺激物為在培養液中添加抗壞血酸 (Ascorbic acid, Vitamin C) 與 β -甘油磷酸鹽 (β -glycerophosphate)。抗壞血酸溶液配製如下: 秤量抗壞血酸粉末 500 mg 溶於 10 mL 的 ddH₂O，混和均勻後再經 0.22 μ m 的 filter 過濾之，過濾後的抗壞血酸溶液分裝至 eppendorf，須注意此藥品試劑需避光保存於 -20 $^{\circ}$ C。 β -甘油磷酸鹽溶液配製如下: 秤量 4.32 g 的 β -glycerophosphate 溶於 20 mL 的 ddH₂O，混和均勻後再經 0.22 μ m 的 filter 過濾之，過濾後的 β -甘油磷酸鹽溶液分裝至 eppendorf，冷凍保存於 -20 $^{\circ}$ C。

將 MC3T3-E1 (Preosteoblast) 計數後，種植 1×10^4 顆細胞於 24 well dish 中，每組 4 重複，種植 2 盤 (一盤將進行鹼性磷酸酶染色，另一盤進行鹼性磷酸酶活性測定)。待隔日 (約 18 小時) 細胞貼盤，移除舊的培養液，加入下列各組新的條件性培養液進行刺激。Control 組為不進行刺激分化的前成骨細胞，其條件性培養液為 MEM- α 培養液 (內含 10% FBS 和 100 U/mL P/S); Positive Control

組為進行刺激後會分化為成骨細胞，其條件性培養液為於 MEM- α 培養液(內含 10% FBS 和 100 U/mL P/S)中再添加 50 μ g/mL 的 Ascorbic acid 及 10 mM 的 β -glycerophosphate 進行培養。另外 FIP-*fve* 組與 FIP-*gts* 組之條件性培養液同 Positive Control 組，只需額外添加 3.8 μ M 的 FIP-*fve* 或 FIP-*gts*，其目的為與 Positive Control 組相較，視 FIP-*fve* 與 FIP-*gts* 是否可促進 Preosteoblast 分化成 Osteoblast。試驗期間培養條件與一般繼代培養時相同，一樣放置於含有 5% CO₂ 的 37°C 恆溫細胞培養箱內培養，每隔 48 小時更換一次符合各組所需的新鮮條件性培養液，共需更換三次。更換第三次刺激條件性培養液後 48 小時試驗結束，即可進行鹼性磷酸酶染色與鹼性磷酸酶活性測定，其目的在確認於不同條件性培養液下，其刺激 Preosteoblast 分化成 Osteoblast 之成效。

結果與討論

計畫第 1 年與第 2 年研究成果內容已繳交，本期末報告僅呈現第 3 年研究結果，研究數據已投稿於 *Journal of Functional Food*

一、FIP-*fve* 與 FIP-*gts* 對施打 Docetaxel 的小鼠之影響

(一) 體重變化

實驗前各組小鼠體重約為 20 公克，經三次 Docetaxel 施打(次/週)及每天餵食 FIP-*fve* 或 FIP-*gts* 同步進行輔助治療，比較犧牲當天各組小鼠體重之變化。結果顯示，Docetaxel 組小鼠的體重相較於 Control 組有顯著的下降($p < 0.05$)。相較於 Docetaxel 組，Docetaxel + FIP-*fve* 組的體重無明顯差異，而 Docetaxel + FIP-*gts* 組相較於 Docetaxel 組，其體重有顯著的下降($p < 0.05$) (Figure 1)。

(二) 血液分析

經三次施打 Docetaxel (次/週)後，採取小鼠下腔大靜脈血液進行分析。結果顯示，Docetaxel 組小鼠的白血球、紅血球、血紅素、血球容積比及淋巴球數皆較 Control 組有顯著下降($p < 0.01$)；相較於 Docetaxel 組，Docetaxel + FIP-*fve* 組的血紅素含量有顯著上升($p < 0.01$)；Docetaxel +

FIP-*gts* 組小鼠相較於 Docetaxel 組，其白血球及淋巴球數目均有顯著上升($p < 0.05$) (Table 1)。

(三) 血漿中 G-CSF 表現量

血液離心後，取上清液以 ELISA 檢測小鼠血漿中 G-CSF 表現量。結果顯示，Control 組血漿中之 G-CSF 表現量為 146.35 ± 33.87 μ g/mL，Docetaxel 組為 304.09 ± 163.54 μ g/mL。相較於 Control 組，Docetaxel 組 G-CSF 表現量有顯著增加($p < 0.05$)。Docetaxel + FIP-*fve* 組之 G-CSF 表現量為 219.61 ± 55.36 μ g/mL，Docetaxel + FIP-*gts* 組則高達 605.64 ± 320.47 μ g/mL。相較於 Docetaxel 組，Docetaxel + FIP-*gts* 組之 G-CSF 表現量有顯著性增加 ($p < 0.05$) (Figure 2)。

(四) 腸道變化

收集小鼠空腸置於 10% 中性福馬林固定並以石蠟包埋，隨後進行 H&E stain。運用顯微鏡觀察與 NIS-Elements D 3.2 影像軟體定量絨毛長度進行分析，結果顯示，Control 組空腸絨毛明顯纖長且完整；Docetaxel 組相較於 Control 組的絨毛明顯受到破壞，型態較為短小，其絨毛長度的萎縮程度在定量統計上有顯著差異($p < 0.001$)；相較於 Docetaxel 組，Docetaxel + FIP-*fve* 組與 Docetaxel + FIP-*gts* 組的絨毛完整性較佳且較纖長，絨毛長度在定量統計上具顯著差異($p < 0.001$) (Figure 2)。由上述結果說明，Docetaxel + FIP-*fve* 組與 Docetaxel + FIP-*gts* 組可降低 Docetaxel 所造成的腸損傷，因此，FIP-*fve* 與 FIP-*gts* 具有保護腸道絨毛或可促進腸絨毛修復之潛能。

(五) 骨頭分析之骨損傷

小鼠的下肢股骨與下肢脛骨 70% 酒精固定後，委託台灣小鼠診所透過高解析度活體微型電腦斷層儀進行骨小樑及骨密度分析。脛骨的 3D 影像分析結果顯示，Control 組之脛骨結構完整及緻密性較佳；Docetaxel 組的脛骨相較 Control 組鬆散，空洞比列較多；Docetaxel + FIP-*fve* 組與 Docetaxel + FIP-*gts* 組的脛骨空洞比例較 Docetaxel 組小，鬆散程度較不嚴重(Figure 4A)。

另外，比較小鼠脛骨橫切，Control 組的脛骨橫切面較為完整緻密；相較於 Control 組，Docetaxel 組的脛骨橫切面中間空洞多且空洞區

塊的面積較大；相較於 Docetaxel 組，Docetaxel + FIP-*fve* 組與 Docetaxel + FIP-*gts* 組之脛骨橫切面空洞的比例較小，其影像與 Control 組相似 (Figure 4B)。比較小鼠股骨遠端和脛骨近端的縱剖面圖，Docetaxel 組的脛骨近端相較 Control 組有明顯空洞化現象；FIP-*fve* 與 FIP-*gts* 能趨緩 Docetaxel 所誘導的脛骨近端空洞化，其空洞的面積較小 (Figure 4C)。

在骨小樑定量的分析結果顯示，四組小鼠之間的骨密度 (bone mineral density, BMD)、骨小樑厚度 (Trabecular thickness, Tb.Th) 與骨表面積體積比 (Bone surface/volume ratio, BS/BV) 並無顯著差異。相較於 Control 組，Docetaxel 組的骨體積百分比 (Percent bone volume, BV/TV)、骨小樑數目 (Trabecular number, Tb.N) 與骨表面密度 (Bone surface density, BS/TV) 均顯著下降 ($p < 0.005$)，而 Docetaxel 組的骨小樑間距 (Trabecular separation, Tb.Sp) 及結構模型指數 (Structure model index, SMI) 較 Control 組顯著增加 ($p < 0.005$)；相較於 Docetaxel 組，FIP-*fve* 與 FIP-*gts* 組均顯著提高骨體積百分比、骨小樑數目與骨表面密度 ($p < 0.05$) (Table 3)。

(六) 骨頭分析之骨髓脂肪空泡現象

小鼠下肢股骨與下肢脛骨以中性福馬林固定，經包埋、切片及進行 H&E stain，藉由顯微鏡觀察並比較各組小鼠脛骨的骨髓脂肪空泡數目。結果顯示，相較於 Control 組，Docetaxel 組的小鼠脛骨之骨髓脂肪空泡數目明顯增加，達統計上顯著差異 ($p < 0.001$)；相較於，FIP-*fve* 與 FIP-*gts* 能趨緩 Docetaxel 所造成的骨髓脂肪空泡現象，脛骨的骨髓脂肪空泡數目明顯較少，達統計上顯著差異 ($p < 0.01$) (Figure 5A 與 5B)。

二、FIP-*fve* 與 FIP-*gts* 之成骨細胞分化試驗

Preosteoblast 分化成 Osteoblast 需進行三次條件性培養液刺激，每隔兩天更換一次條件性培養液，進行 ALP activity stain。掃描的細胞圖像顯示，相較於 Control 組 (MEM- α 培養液，無分化)，Positive Control 組 (MEM- α 培養液含 vitamin C 與 β -glycerophosphate 進行刺激培養) 的細胞中有明顯紅色沉澱；運用 (3.8 μ M) 與 FIP-*gts* (1.2 μ M)

進行單次刺激與三次刺激，單次刺激為與第一次條件性培養液共同處理，三次刺激為與每次條件性培養液共同處理，結果顯示，相較於 Positive Control 組，FIP-*fve* 與 FIP-*gts* 組別細胞的 ALP activity stain 均無顯著紅色沉澱，表示無刺激成骨細胞生成 (Figure 6A)。

ALP activity stain 後，細胞在顯微鏡下的圖像顯示，Positive Control 組的細胞中較 Control 組有明顯紅色沉澱，表示成骨細胞有 ALP 表現；相較於 Positive Control 組，在一般 MEM- α 培養液中加入 FIP-*fve* (3.8 μ M) 或 FIP-*gts* (1.2 μ M) 未觀察到紅色沉澱；在 Positive Control 組相同條件性培養液中加入 FIP-*fve* (3.8 μ M) 或 FIP-*gts* (1.2 μ M)，則細胞中無紅色沉澱 (Figure 11B)。

另外，以 ALP activity assay 分析鹼性磷酸酶活性，實驗結果發現，相較於 Control 組，Positive Control 組鹼性磷酸酶活性為 Control 組的三倍；相較於 Positive Control 組，在一般 MEM- α 培養液中單加 FIP-*fve* (3.8 μ M) 或 FIP-*gts* (1.2 μ M) 及在與 Positive Control 組相同條件性培養液中額外再添加 FIP-*fve* (3.8 μ M) 或 FIP-*gts* (1.2 μ M) 之鹼性磷酸酶活性均為比 Positive Control 組高，其活性與 Control 組較為接近 (Figure 6C)。綜合以上結果說明，Positive Control 組有顯著的紅色沉澱表現及有鹼性磷酸酶活性，證實 Positive Control 組的確有誘發分化成功，而 FIP-*fve* 或 FIP-*gts* 並無促進 Preosteoblast 分化成 Osteoblast 之功效。

三、分析 FIP-*fve* 或 FIP-*gts* 結合 Docetaxel 共同處理對 A549 肺癌細胞存活率之影響

以 MTT 方式比較 Docetaxel 與 FIP-*fve* 或 FIP-*gts* 結合 Docetaxel 共同處理對 A549 細胞存活率之影響。結果顯示，對 A549 細胞分別處理不同濃度的 Docetaxel (0、5、10 與 20 nM)，其細胞存活率分別為 100、63、54 與 38%。而對 A549 細胞處理低劑量 FIP-*fve* (3.8 μ M) 結合 Docetaxel (0、5、10 與 20 nM)，其細胞存活率分別為 96、58、51 與 43%；處理高劑量 FIP-*fve* (15.3 μ M) 結合 Docetaxel (0、5、10 與 20 nM)，其細胞存活率則分別為 83、57、53 與 44%。另外對 A549 細胞處理 FIP-*gts* (1.2 μ M) 結合 Docetaxel (0、5、10 與

20 nM),其細胞存活率分別為 98、63、54 與 29% ; 而在處理高劑量 FIP-*gts* (1.2 μ M)結合 Docetaxel (0、5、10 與 20 nM),其細胞存活率分別為 73、45、44 與 33% (Figure 7)。由以上結果說明,FIP-*fve* 或 FIP-*gts* 結合 Docetaxel 共同處理,對 A549 肺癌細胞存活率無協同作用 (synergistic effect)。

四、FIP-*fve* 或 FIP-*gts* 對 IL-20、IFN- γ 及 G-CSF mRNA 之影響

(一) 不同時間點之 mRNA 變化

對人類週邊血單核球加入 FIP-*fve* (0 與 15.2 μ M)或 FIP-*gts* (0 與 0.3 μ M),比較其 IL-20、IFN- γ 及 G-CSF mRNA 在不同時間點之變化。結果顯示,在刺激後的 12 小時,相較於 Control 組,加了 FIP-*fve* 及 FIP-*gts* 會刺激 IL-20 mRNA 表現量上升,且隨著時間增加,IL-20 mRNA 表現量則隨之下降;在第 12 小時,相較於 Control 組,FIP-*fve* 及 FIP-*gts* 會刺激 IFN- γ 的表現,處理 FIP-*gts* 組 72 小時會隨著處理時間增加而增加 IFN- γ 的表現量,而 FIP-*fve* 的 IFN- γ mRNA 表現量增加至 48 小時為高峰。另外在 hG-CSF mRNA 表現量上,相較於 Control 組, FIP-*gts* 可刺激 hG-CSF mRNA 的表現量,在 12 小時為高峰;而 FIP-*fve* 的 hG-CSF mRNA 表現量在 24 小時為高峰(Figure 8A)。

(二) 不同劑量之 mRNA 變化

對人類週邊血單核球分別處理不同劑量的 FIP-*fve* (0、3.8 與 7.6 μ M)或 FIP-*gts* (0、0.075 與 0.3 μ M),比較其 IL-20、IFN- γ 及 G-CSF mRNA 之變化。結果顯示,細胞經 24 小時處理後,相較於 Control 組,FIP-*fve* 及 FIP-*gts* 高低劑量均可刺激 IL-20、IFN- γ 及 G-CSF mRNA 表現量增加,且表現量隨著處理劑量增加而上升(Figure 8B);整體而言,處理 48 小時相對於處理 24 小時,IL-20 及 G-CSF mRNA 表現會隨著處理時間增長而降低表現量,培養 48 小時細胞的 IFN- γ mRNA 表現量均較 24 小時高。

五、FIP-*fve* 或 FIP-*gts* 結合 Docetaxel 共同處理對 hPBMCs 中 OPG 及 RANKL 之影響

比較人類週邊血單核球細胞分別單一處理 FIP-*fve*、FIP-*gts*、Docetaxel 或 FIP-*fve*、FIP-*gts*

結合 Docetaxel 共同處理 48 小時,其 OPG 及 RANKL mRNA 之變化。結果顯示,相較於 Control 組,單處理 FIP-*fve*、FIP-*gts*、Docetaxel 或 FIP-*fve*、FIP-*gts* 結合 Docetaxel 共同處理均會減少 OPG mRNA 之表現量。另外相較於 Control 組,單處理 Docetaxel 會顯著降低 RANKL mRNA 之表現 (Figure 9)。由以上結果推測,Docetaxel 所導致的骨損傷可能不是透過增加骨再吸收 (Bone resorption)。

六、FIP-*fve* 或 FIP-*gts* 結合 Docetaxel 共同處理對 A549 肺癌細胞中 MCP-1 之影響

(一) 以 RT-PCR 偵測 MCP-1 mRNA 之變化

對 A549 肺癌細胞單處理的 FIP-*fve* (3.8 與 7.6 μ M)、FIP-*gts* (0.3 與 1.2 μ M)、Docetaxel (10 nM) 或 FIP-*fve* (3.8 與 7.6 μ M)、FIP-*gts* (0.3 與 1.2 μ M) 結合 Docetaxel 共同處理,比較其 MCP-1 mRNA 之變化。相較於 Control 組,對 A549 單處理高劑量的 FIP-*fve* (7.6 μ M)或 FIP-*gts* (1.2 μ M),MCP-1 mRNA 表現量有顯著下降。而相較於單處理 Docetaxel, FIP-*gts* 結合 Docetaxel 共同處理其 MCP-1 mRNA 表現量也有顯著下降 (Figure 10A)。

(二) 以 ELISA 偵測細胞培養液之 MCP-1 變化

收集 A549 肺癌細胞單處理的 FIP-*fve* (3.8 與 7.6 μ M)、FIP-*gts* (0.3 與 1.2 μ M)、Docetaxel (10 nM) 或 FIP-*fve* (3.8 與 7.6 μ M)、FIP-*gts* (0.3 與 1.2 μ M) 結合 Docetaxel 共同處理之細胞培養液,透過 ELISA 偵測其細胞培養液中 MCP-1 之差異。結果顯示,相較於 Control 組,單處理的 FIP-*fve* (3.8 與 7.6 μ M)或 FIP-*gts* (0.3 與 1.2 μ M) 其 MCP-1 表現量均顯著下降 ($p < 0.005$)。而單處理 Docetaxel (10 nM),相較於 Control 組其 MCP-1 表現量有顯著上升 ($p < 0.005$)。但相較於單處理 Docetaxel (10 nM),FIP-*fve* (3.8 與 7.6 μ M) 或 FIP-*gts* (0.3 與 1.2 μ M) 結合 Docetaxel 共同處理均仍可降低 MCP-1 表現量($p < 0.005$) (Figure 10B)。

Figures

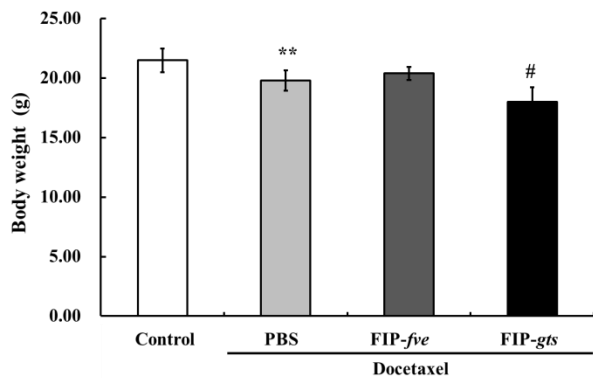


Figure 1. Body weight of the whole body in FIP-*fve* and FIP-*gts* treated mice after after intravenous (IV) injection of docetaxel. Body weight of Control Group, Docetaxel Group, Docetaxel+FIP-*fve* Group, and Docetaxel+FIP-*gts* Group. ** $P < 0.01$ versus Control Group; # $P < 0.05$ compared with the group treated with docetaxel alone. Data presented as means \pm SD, $n=5$ mice in each group.

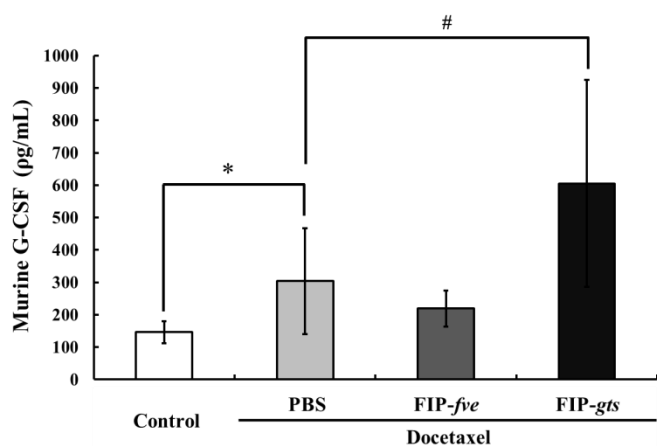
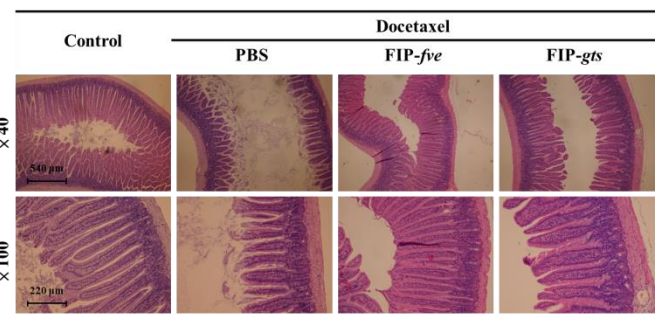


Figure 2. Total plasma G-CSF concentrations were determined with ELISA. Murine G-CSF concentration ($\mu\text{g/mL}$) in Control mice ($n=3$), Docetaxel mice ($n=5$), Docetaxel+ FIP-*fve* mice ($n=5$), and Docetaxel+FIP-*gts* mice ($n=4$). * $P < 0.05$ versus Control Group; # $P < 0.05$ compared with the group treated with docetaxel alone. Data presented as means \pm SD.

(A)



(B)

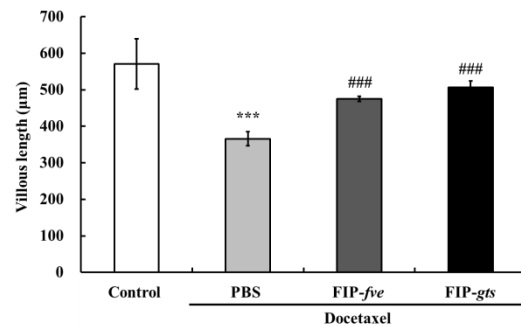
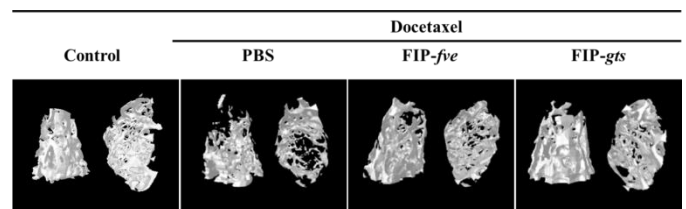


Figure 3. Morphology of the mice villus after treatment with PBS, FIP-*fve* or FIP-*gts* followed by co-treatment with docetaxel. (A) Histological images of villus by Hematoxylin and eosin stain were observed under microscope. The villi were severely damaged in the Docetaxel+PBS Group, evidencing the toxicity of Docetaxel to intestinal mucosa. In contrast, the structural integrity of villus were maintained in the samples from the Docetaxel+FIP-*fve* and Docetaxel+FIP-*gts* Groups. (B) Quantification of villus in FIP-*fve* and FIP-*gts* treated mice after injected (IV) Docetaxel. *** $P < 0.001$ versus Control Group; ### $P < 0.001$ compared with the group treated with docetaxel alone. Data presented as means \pm SD.

(A)



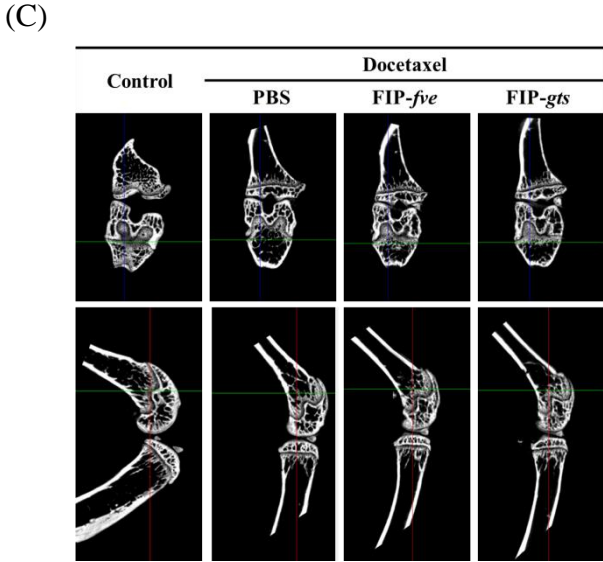
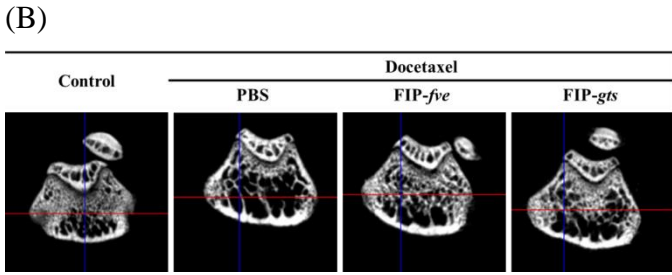


Figure 4. Micro CT-3D image analysis of the Tibia. (A) The analyzing results of mice Tibia with micro-CT 3D images of Control, Docetaxel, Docetaxel + FIP-*fve* and Docetaxel +FIP-*gts*. The tibia sample from the Docetaxel+PBS Group is much more osteo-porous than the Control Group. (B) The cross-section view of mice' knee in FIP-*fve* and FIP-*gts* treated mice after injected (IV) Docetaxel. (C) The longitudinal section view of mice' distal femur and proximal tibia in FIP-*fve* and FIP-*gts* treated mice after injected (IV) Docetaxel.

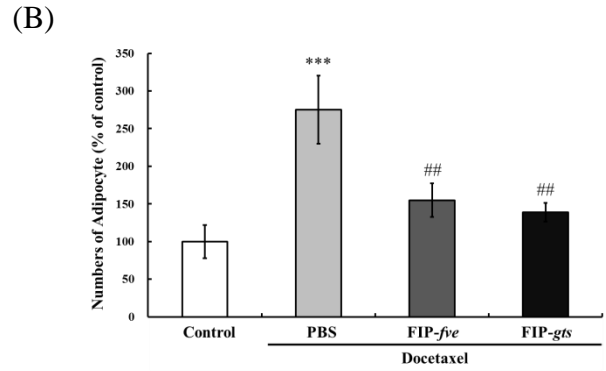
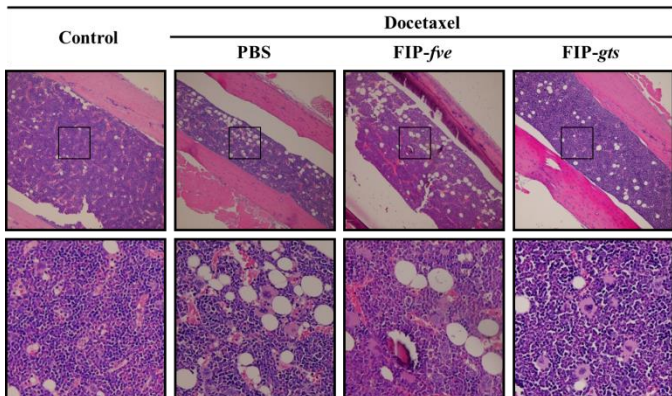
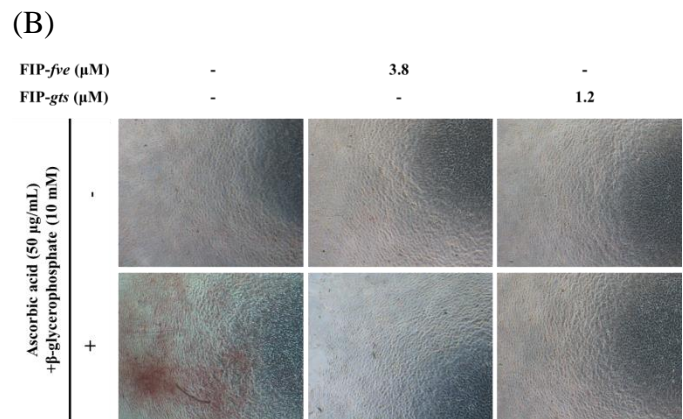
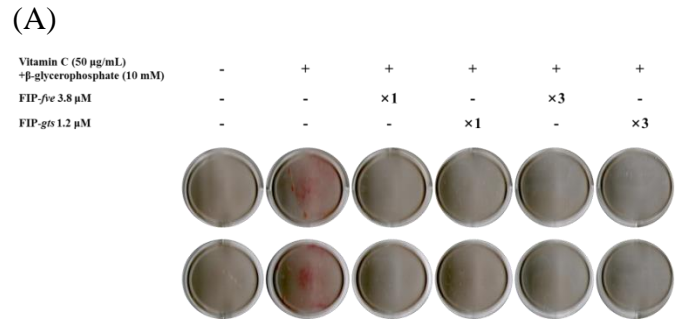


Figure 5. Effects of Docetaxel on bone marrow adipogenesis potential *in vivo*. (A) Hematoxylin and eosin stain (H&E stain) of tibial in a control mice and mice treated with PBS, FIP-*fve* or FIP-*gts* followed by co-treatment with Docetaxel. Total pixel area is 345×345. (B) The numbers of adipocyte was counted under a dissecting microscope. *** $P < 0.001$ versus Control Group; ## $P < 0.01$ compared with the group treated with docetaxel alone. Data presented as means \pm SD.



(C)

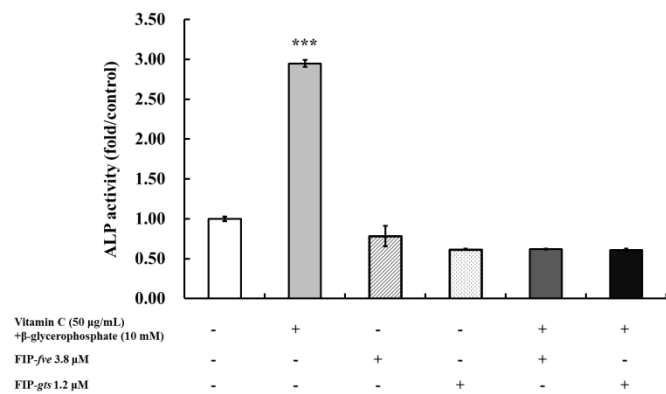
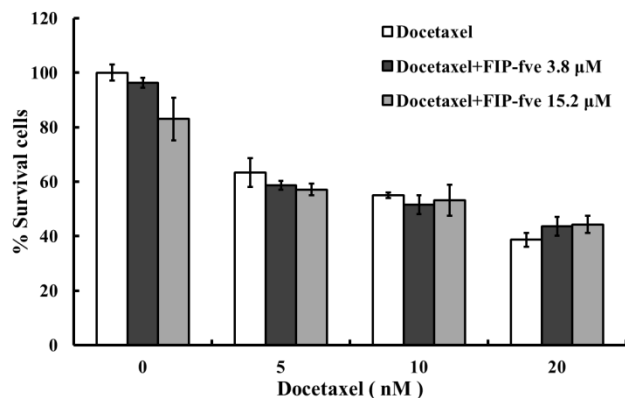


Figure 6. Effect of FIP-*fve* and FIP-*gts* on preosteoblast differentiation. (A) MC3T3 (1×10^4 cells/well of 24 wells dish) differentiation were stimulated with vitamin C (50 µg/mL) and β-glycerophosphate (10 mM) on Days 1, 3 and 5. The “×1” indicates FIP-*fve* or FIP-*gts* treatment for once on Day 1. The “×3” indicates FIP-*fve* or FIP-*gts* treatment for 3 times on Days 1, 3 and 5. On Day 7, ALP stain was used to examine preosteoblast differentiation. (B) MC3T3 (1×10^4 cells/well of 24 wells dish) differentiation were stimulated with FIP-*fve* /FIP-*gts* combined with or without vitamin C and β-glycerophosphate. The preosteoblast differentiation was investigated by ALP stain. (C) ALP was quantified by ALP activity assay. *** $P < 0.001$ versus Control Group.

(A)



(B)

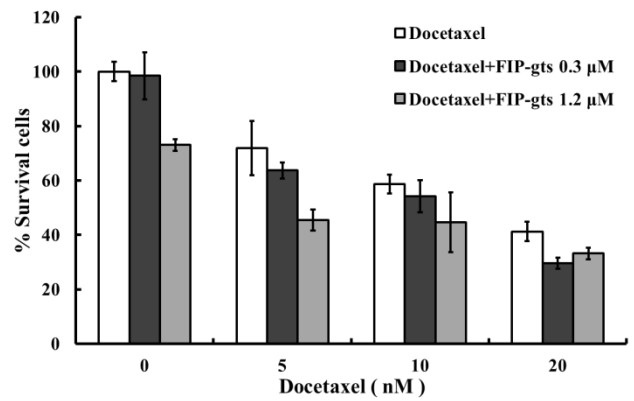
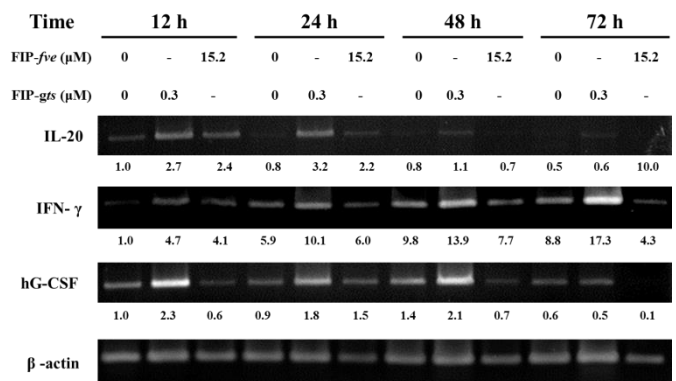


Figure 7. Effects of Docetaxel combined with FIPs on cell survival were analyzed by MTT assay. (A) A549 (3×10^3 cells/well of 96 wells dish) were treated with various concentration of Docetaxel (0, 10 nM) combined with FIP-*fve* (0, 3.8, 15.2 µM) for 48 h. (B) A549 (3×10^3 cells/well of 96 wells dish) were treated with various concentration of Docetaxel (0, 10 nM) combined with FIP-*gts* (0, 0.3, 1.2 µM) for 48 h.

(A)



(B)

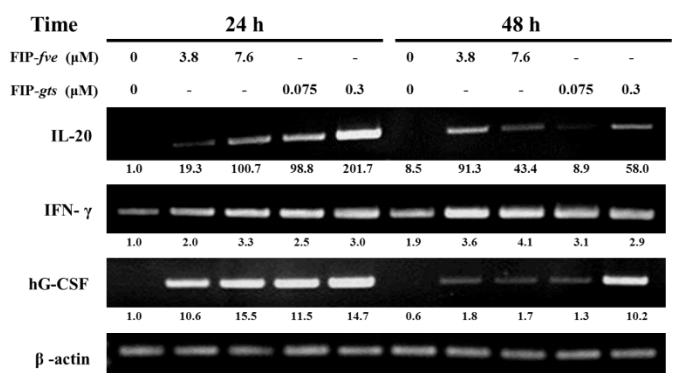


Figure 8. Effect of FIP-*fve* and FIP-*gts* on IL-20 and G-CSF expression. (A) HPBMC (2×10^6 cells/well of 24 wells dish) were treated with

FIP-*fve* (0, 3.8 μ M) or FIP-*gts* (0, 0.3 μ M) for various time periods (12, 24, 48, and 72 h). (B) HPBMC (2×10^6 cells/well of 24 wells dish) were treated with various concentration of FIP-*fve* (0, 3.8, 7.6 μ M) or FIP-*gts* (0, 0.075, 0.3 μ M) for 24 and 48 h. The total RNA was reverse-transcribed into cDNA, and the expression of IL-20, IFN- γ , G-CSF, and β -actin were analyzed by PCR.

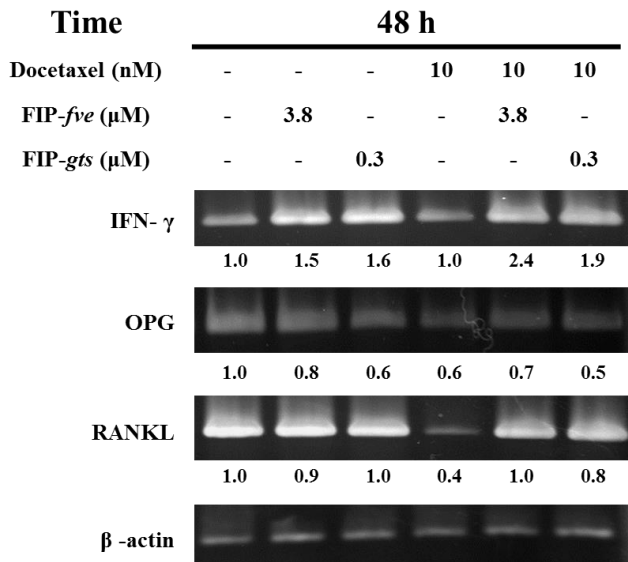
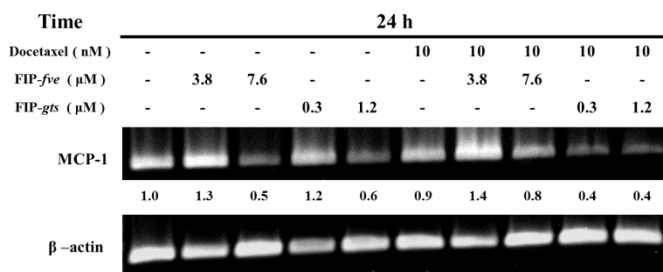


Figure 9. Effect of Docetaxel combined with FIPs on OPG and RANKL expression. HPBMC (2×10^6 cells/well of 24 wells dish) were treated with various concentration of Docetaxel (0, 10 nM) combined with FIP-*fve* (0, 3.8 μ M) or FIP-*gts* (0, 0.3 μ M) for 48 h. The total RNA was reverse-transcribed into cDNA, and the expression of IFN- γ , OPG, RANKL, and β -actin were analyzed by PCR.

(A)



(B)

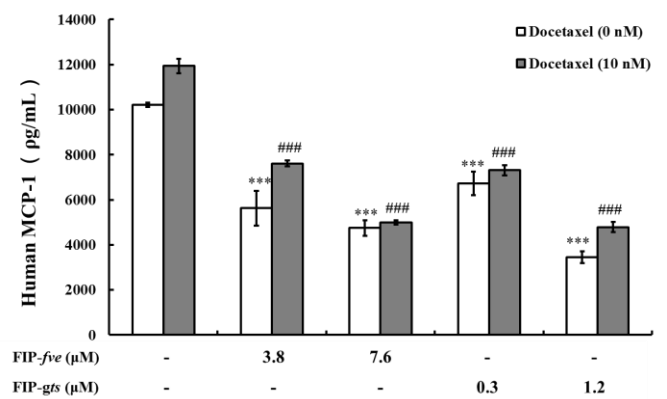


Figure 10. Effect of Docetaxel combined with FIPs on MCP-1 expression. (A) A549 cells (5×10^5 cells/60 mm dish) were treated with various concentration of Docetaxel (0, 10 nM) combined with FIP-*fve* (0, 3.8, 7.2 μ M) or FIP-*gts* (0, 0.3, 1.2 μ M) for 24 h. (B) Cultured A549 cells (5×10^5 cells/60 mm dish) were treated with various concentration of Docetaxel (0, 10 nM) combined with FIP-*fve* (0, 3.8, 7.2 μ M) or FIP-*gts* (0, 0.3, 1.2 μ M) in DMEM supplemented with 10% FBS for 24 h. Conditioned media were subjected to ELISA to measure amounts of secreted MCP-1 (mean value from three independent experiments). Data are presented as means \pm SD. *** $p < 0.005$ versus group of control (untreated docetaxel). ### $p < 0.005$ versus group of docetaxel alone.

Tables

		Docetaxel			
		Control	PBS	FIP- <i>fve</i>	FIP- <i>gts</i>
WBC	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6.29 \pm 1.19	3.40 \pm 0.74 ^{**}	4.30 \pm 0.68	5.81 \pm 1.64 [#]
RBC	($\times 10^6/\mu\text{L}$)	9.19 \pm 0.52	8.06 \pm 0.43 [*]	8.65 \pm 0.53	8.16 \pm 0.52
HGB	(g/dL)	13.69 \pm 0.78	11.95 \pm 0.59 [*]	13.08 \pm 0.46 [#]	12.21 \pm 0.99
HCT	(%)	46.85 \pm 2.52	40.87 \pm 2.13 [*]	44.33 \pm 2.77	41.33 \pm 3.04
MCV	(fL)	51.00 \pm 0.28	50.68 \pm 0.42	51.25 \pm 0.28	50.62 \pm 1.14
MCH	(pg)	14.92 \pm 0.25	14.84 \pm 0.15	15.15 \pm 0.52	14.94 \pm 0.53
MCHC	(g/dL)	29.26 \pm 0.40	29.25 \pm 0.09	29.56 \pm 1.08	29.54 \pm 0.37
PLT	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	527.00 \pm 181.31	377.17 \pm 142.49	684.47 \pm 214.03	552.33 \pm 360.61
LYM%		75.68 \pm 7.92	72.40 \pm 6.72	66.28 \pm 7.52	61.47 \pm 13.94
LYM#	($\times 10^3/\mu\text{L}$)	4.70 \pm 0.90	2.44 \pm 0.50 ^{**}	2.82 \pm 0.36	3.41 \pm 0.49 [#]
RDW	(fL)	28.90 \pm 0.30	29.14 \pm 0.64	29.66 \pm 0.64	30.08 \pm 1.43
MPV	(fL)	6.35 \pm 0.23	6.60 \pm 0.28	6.57 \pm 0.23	6.54 \pm 0.29

WBC : white blood cells; RBC : red blood cells; HGB : hemoglobin; HCT : hematocrit; MCV : mean cell volume; MCH : mean corpuscular hemoglobin content; MCHC : mean corpuscular hemoglobin concentration; PLT : platelets; LYM : lymphocyte; RDW : red cell distribution width; MPV : mean platelet volume.

Table 1. Impaired blood cell recovery in FIP-*fve* and FIP-*gts* treated mice after injected (i.v.) Docetaxel.

Complete blood counts (CBC) of PBS, Docetaxel (30 mg/kg) +PBS, Docetaxel +FIP-*fve* (10 mg/kg), or Docetaxel +FIP-*gts* (2 g/kg) after injected Docetaxel three times on day18. ^{**}P<0.01 versus group of control (untreated docetaxel). The symbol (#) and (# #) indicates P<0.05 and P<0.01 versus group of docetaxel alone with Mann - Whitney U test, respectively. N=5 in each group. Data are presented as means \pm SD

Table 2. Effects of docetaxel combined with FIPs on bone microarchitecture indices in mice measured by micro-CT.

	BMD	Percent	Trabecular	Trabecular	Trabecular	Structure	Bone surface	Bone surface
	mean	bone volume	thickness	Separation	number	model index	/ volume ratio	density
	g/cm³	BV/TV	Tb.Th	Tb.Sp	Tb.N	SMI	BS/BV	BS/TV
		%	mm	mm	mm⁻¹		mm⁻¹	mm⁻¹
Control	1.127 ± 0.129	21.82 ± 1.10	0.070 ± 0.005	0.207 ± 0.019	3.116 ± 0.255	1.66 ± 0.06	55.94 ± 4.13	12.201 ± 0.997
Docetaxel +PBS	1.116 ± 0.181	11.35 ± 3.32 ^{**}	0.068 ± 0.004	0.379 ± 0.109 ^{**}	1.657 ± 0.454 ^{**}	2.03 ± 0.16 ^{**}	61.18 ± 5.32	6.818 ± 1.674 ^{**}
Docetaxel +FIP-<i>fve</i>	1.204 ± 0.078	17.36 ± 2.30 [#]	0.072 ± 0.006	0.268 ± 0.091	2.413 ± 0.316 [#]	1.92 ± 0.07	56.44 ± 5.28	9.761 ± 1.256 [#]
Docetaxel +FIP-<i>gts</i>	1.107 ± 0.205	18.56 ± 2.89 ^{##}	0.077 ± 0.012	0.263 ± 0.059	2.477 ± 0.547	1.92 ± 0.23	53.45 ± 7.35	9.916 ± 1.866

Quantification of trabecular bone in Control mice and mice treated with PBS, FIP-*fve* or FIP-*gts* followed by cotreatment with Docetaxel. ^{**}*P* < 0.01 versus group of control (untreated docetaxel). The symbol ([#]) and (^{##}) indicates *P* < 0.05 and *P* < 0.01 versus group of docetaxel alone with Mann–Whitney U test, respectively. N=5 in each group. Data are presented as means ± SD.

► 研究成果已發表著作

1. Lun Hsin, Chu-Chyn Ou, Ming-Fang Wu, Ming-Shiou Jan, Yi-Min Hsiao, Ching-Hsiung Lin*, and Jiunn-Liang Ko* GMI, an immunomodulatory protein from *Ganoderma microsporum*, potentiates cisplatin-induced apoptosis via autophagy in lung cancer cells. *Molecular Pharmaceutics*. 2015 May 4;12(5):1534-43. DOI: 10.1021/mp500840z. (2015 Impact factor: 4.384, PHARMACOLOGY & PHARMACY, Ranking: #29/255)
2. Chu-Chyn Ou, Yi-Min Hsiao, Ting-Yi Hou, Ming-Fang Wu, Jiunn-Liang Ko* Fungal immunomodulatory proteins alleviate docetaxel-induced adverse effects. *Journal of Functional Food* (2015) 19: 451-463.
3. I-Lun Hsin, Shao-Chuan Wang, Jian-Ri Li, Tsai-Chun Ciou, Chih-Hsien Wu, Hung-Ming Wu, Jiunn-Liang Ko* Immunomodulatory proteins FIP-gts and chloroquine induce caspase-independent cell death via autophagy for resensitizing cisplatin-resistant urothelial cancer cells. *Phytomedicine*. (2016) Dec 1; 23(13): 1566-1573.
4. Chih-Hsien Wu, Yu-Wen Lin, Tzu-Fan Wu, Jiunn-Liang Ko*, Po-Hui Wang* (2016). Clinical implication of voltage-dependent anion channel 1 in uterine cervical cancer and its action on cervical cancer cells. *Oncotarget*; 7(4):4210-25.
5. Hui-Shan Chen, Wei-Heng Hung, Jiunn-Liang Ko, Po-Kuei Hsu, Chia-Chuan Liu, Shiao-Chi Wu, Ching-Hsiung Lin, and Bing-Yen Wang. (2016) Impact of Treatment Modalities on Survival of Patients With Locoregional

Esophageal Squamous-Cell Carcinoma in Taiwan. *Medicine (Baltimore)* 95(10) e3018.

6. Ko, J.L., Tsai, C.H., Liu, T.C., Lin, M.Y., Lin, H.L., Ou, C.C.. (2016) Differential effects of grape juice on gastric emptying and renal function from cisplatin-induced acute adverse toxicity. *Hum Exp Toxicol*; 35(8):808-17.
7. Lin, S. H., Wang, B. Y., Lin, C. H., Chien, P. J., Wu, Y. F., Ko, J. L.*, Chen, J. J.* (2016) Chidamide alleviates TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cell lines. *Mol Biol Rep.*; 43(7):687-95.
8. Wang, Bing-Yen, Huang, Jing-Yang, Hung, Wei-Heng, Lin, Ching-Hsiung, Lin, Sheng-Hao, Liaw, Yung-Po, Ko, Jiunn-Liang*. (2016) Impact on survival on interval between surgery and adjuvant chemotherapy in completely resected stage IB-IIIa lung cancer. *PLoS One.*; 11(11):e0163809.

參考文獻

1. Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med*. 2008;359:1367-80.
2. Vadhan-Raj S. Management of chemotherapy-induced thrombocytopenia: current status of thrombopoietic agents. *Seminars in hematology*. 2009;46:S26-32.
3. Kalinka-Warzocho E, Plazas JG, Mineur L, Salek T, Hendlisz A, Decosta L, et al. Chemotherapy treatment patterns and neutropenia management in gastric cancer. *Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association*. 2014.
4. Hesketh PJ. Chemotherapy-induced nausea and vomiting. *The New England journal of medicine*. 2008;358:2482-94.
5. Navari RM, Nagy CK, Gray SE. The use of olanzapine versus metoclopramide for the treatment of breakthrough chemotherapy-induced nausea and

- vomiting in patients receiving highly emetogenic chemotherapy. Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer. 2013;21:1655-63.
6. Sinno MH, Coquerel Q, Boukhattala N, Coeffier M, Gallas S, Terashi M, et al. Chemotherapy-induced anorexia is accompanied by activation of brain pathways signaling dehydration. *Physiology & behavior*. 2010;101:639-48.
7. El Enshasy HA, Hatti-Kaul R. Mushroom immunomodulators: unique molecules with unlimited applications. *Trends Biotechnol*. 2013;31:668-77.
8. Li S, Jiang Z, Xu W, Xie Y, Zhao L, Tang X, et al. FIP-sch2, a new fungal immunomodulatory protein from *Stachybotrys chlorohalonata*, suppresses proliferation and migration in lung cancer cells. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017;101:3227-35.
9. Jiang J, Slivova V, Harvey K, Valachovicova T, Sliva D. *Ganoderma lucidum* suppresses growth of breast cancer cells through the inhibition of Akt/NF-kappaB signaling. *Nutr Cancer*. 2004;49:209-16.
10. Jiang J, Slivova V, Sliva D. *Ganoderma lucidum* inhibits proliferation of human breast cancer cells by down-regulation of estrogen receptor and NF-kappaB signaling. *Int J Oncol*. 2006;29:695-703.
11. Suarez-Arroyo IJ, Rios-Fuller TJ, Feliz-Mosquea YR, Lacourt-Ventura M, Leal-Alvarez DJ, Maldonado-Martinez G, et al. *Ganoderma lucidum* Combined with the EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor, Erlotinib Synergize to Reduce Inflammatory Breast Cancer Progression. *J Cancer*. 2016;7:500-11.
12. Xu H, Kong YY, Chen X, Guo MY, Bai XH, Lu YJ, et al. Recombinant FIP-gat, a Fungal Immunomodulatory Protein from *Ganoderma atrum*, Induces Growth Inhibition and Cell Death in Breast Cancer Cells. *J Agric Food Chem*. 2016;64:2690-8.
13. Li S, Jiang Z, Sun L, Liu X, Huang Y, Wang F, et al. Characterization of a new fungal immunomodulatory protein, FIP-dsq2 from *Dichomitus squalens*. *J Biotechnol*. 2017;246:45-51.
14. de Weger VA, Beijnen JH, Schellens JH. Cellular and clinical pharmacology of the taxanes docetaxel and paclitaxel--a review. *Anti-cancer drugs*. 2014;25:488-94.
15. Li A, Wei ZJ, Ding H, Tang HS, Zhou HX, Yao X, et al. Docetaxel versus docetaxel plus cisplatin for non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Oncotarget*. 2017.
16. Takahashi M, Komine K, Imai H, Okada Y, Saijo K, Shirota H, et al. Efficacy and safety of gemcitabine plus docetaxel in Japanese patients with unresectable or recurrent bone and soft tissue sarcoma: Results from a single-institutional analysis. *PloS one*. 2017;12:e0176972.
17. Park B, Vemulapalli RC, Gupta A, Shreve ME, Rees DA. Docetaxel-Induced Systemic Sclerosis with Internal Organ Involvement Masquerading as Congestive Heart Failure. *Case reports in immunology*. 2017;2017:4249157.
18. Burgess AW, Metcalf D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood*. 1980;56:947-58.
19. Newburger PE. IL6 to the rescue. *Blood*. 2008;111:3914-5.
20. Cornish AL, Campbell IK, McKenzie BS, Chatfield S, Wicks IP. G-CSF and GM-CSF as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nature reviews Rheumatology*. 2009;5:554-9.
21. Paul M, Ram R, Kugler E, Farbman L, Peck A, Leibovici L, et al. Subcutaneous versus intravenous granulocyte colony stimulating factor for the treatment of neutropenia in hospitalized hemato-oncological patients: randomized controlled

trial. American journal of hematology. 2014;89:243-8.

22. Smith TJ, Khatcheressian J, Lyman GH, Ozer H, Armitage JO, Balducci L, et al. 2006 update of recommendations for the use of white blood cell growth factors: an evidence-based clinical practice guideline. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2006;24:3187-205.

23. Aapro MS, Cameron DA, Pettengell R, Bohlius J, Crawford J, Ellis M, et al. EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphomas and solid tumours. European journal of cancer. 2006;42:2433-53.

24. Repetto L, Biganzoli L, Koehne CH, Luebbe AS, Soubeyran P, Tjan-Heijnen VC, et al. EORTC Cancer in the Elderly Task Force guidelines for the use of colony-stimulating factors in elderly patients with cancer. European journal of cancer. 2003;39:2264-72.

25. Aapro MS, Bohlius J, Cameron DA, Dal Lago L, Donnelly JP, Kearney N, et al. 2010 update of EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphoproliferative disorders and solid tumours. European journal of cancer. 2011;47:8-32.

103年度專題研究計畫成果彙整表

計畫主持人：柯俊良			計畫編號：103-2320-B-040-003-MY3				
計畫名稱：評估靈芝免疫調節蛋白減緩肺癌上皮間質型轉換及輔助化學療法與誘發細胞自體吞噬之機轉							
成果項目			量化	單位	質化 (說明：各成果項目請附佐證資料或細項說明，如期刊名稱、年份、卷期、起訖頁數、證號...等)		
國內	學術性論文	期刊論文		0	篇		
		研討會論文		0			
		專書		0		本	
		專書論文		0		章	
		技術報告		0		篇	
		其他		0		篇	
	智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件	
				已獲得	0		
			新型/設計專利		0		
		商標權		0			
		營業秘密		0			
		積體電路電路布局權		0			
		著作權		0			
		品種權		0			
		其他		0			
	技術移轉	件數		0	件		
		收入		0	千元		
	國外	學術性論文	期刊論文		3	篇	<p>1. I-Lun Hsin, Chu-Chyn Ou, Ming-Fang Wu, Ming-Shiou Jan, Yi-Min Hsiao, Ching-Hsiung Lin*, and Jiunn-Liang Ko* GMI, an immunomodulatory protein from Ganoderma microsporum, potentiates cisplatin-induced apoptosis via autophagy in lung cancer cells. Molecular Pharmaceutics. 2015 May 4;12(5):1534-43. DOI: 10.1021/mp500840z.</p> <p>2. Chu-Chyn Ou, Yi-Min Hsiao, Ting-Yi Hou, Ming-Fang Wu, Jiunn-Liang Ko Fungal immunomodulatory proteins alleviate docetaxel-induced adverse effects. Journal of Functional Food (2015) 19: 451-463.</p> <p>3. I-Lun Hsin, Shao-Chuan Wang, Jian-Ri Li, Tsai-Chun Ciou, Chih-</p>

						Hsien Wu, Hung-Ming Wu, Jiunn-Liang Ko Immunomodulatory proteins FIP-gts and chloroquine induce caspase-independent cell death via autophagy for resensitizing cisplatin-resistant urothelial cancer cells. Phytomedicine. (2016) Dec 1; 23(13): 1566-1573.
	研討會論文			0		
	專書			0	本	
	專書論文			0	章	
	技術報告			0	篇	
	其他			0	篇	
智慧財產權及成果	專利權	發明專利	申請中	0	件	
			已獲得	0		
		新型/設計專利	0			
	商標權		0			
	營業秘密		0			
	積體電路電路布局權		0			
	著作權		0			
	品種權		0			
	其他		0			
技術移轉	件數			0	件	
	收入			0	千元	
參與計畫人力	本國籍	大專生		0	人次	
		碩士生		0		
		博士生		0		
		博士後研究員		1		辛翌綸博士參與計畫9個月；吳芝嫻博士參與計畫2年
		專任助理		1		侯婷譯碩士參與計畫1年
	非本國籍	大專生		0		
		碩士生		0		
		博士生		0		
		博士後研究員		0		
		專任助理		0		
其他成果 (無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)						

科技部補助專題研究計畫成果自評表

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

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以100字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

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

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以200字為限）

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

1. 近年來環境汙染與食安問題日益嚴重，飲食中可能攝取致癌物氯化鎳，累積於人體之中增加組織纖維化與致癌的危險性。本計畫證實靈芝免疫調節蛋白抑制氯化鎳促腫瘤惡性演進能力，詳細釐清GMI減緩氯化鎳誘發之 EMT 並抑制原位肺癌轉移之機轉，為學界提供防治的方法，並證實開發靈芝免疫調節蛋白為保健防癌的功效。

2. 計劃證實靈芝免疫調節蛋白具輔助Cisplatin 藥效的能力，證實靈芝免疫調節蛋白成為化療佐劑之潛力，為病患提升治療效果與生活品質提供新方向。

3. 本計畫發現靈芝免疫調節蛋白能減緩Docetaxel 導致之骨與骨髓損傷，在臨床上可減少病患因白血球缺乏症導致之感染風險，延長Docetaxel 治療期，改善病患生活品質與預後。

4. 靈芝免疫調節蛋白減緩Docetaxel導致之骨流失之機制，未來可延伸至防治老化導致之骨質疏鬆症。

4. 主要發現

本研究具有政策應用參考價值：否 是，建議提供機關
(勾選「是」者，請列舉建議可提供施政參考之業務主管機關)

本研究具影響公共利益之重大發現：否 是

說明：(以150字為限)