

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

金針菇萃取物預防及治療氣喘老鼠模式的急慢性期表現(第 3年) 研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 98-2314-B-040-002-MY3
執行期間：100年08月01日至101年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學系

計畫主持人：呂克桓
共同主持人：柯俊良、楊順發、孫海倫
計畫參與人員：博士班研究生-兼任助理人員：李育慈

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 101年09月29日

中文摘要：氣喘的形成可能與 Th1/Th2 細胞激素分泌不平衡有關，且經研究指出氣喘為 Th2 細胞激素分泌過多所發展而成。由金針菇所萃取出來之免疫調節蛋白 FIP-fve，其被證實可以誘發 Th1 細胞激素中 IFN- γ 的產生。然而經由研究證實，於急性期之呼吸道發炎之動物實驗模型中，口服金針菇免疫調節蛋白確實能夠使得 OVA 所引起之呼吸道過敏現象達到抑制的效果，因此在進一步之研究是想藉由口服金針菇免疫調節蛋白來探討於 OVA 所引起的慢性呼吸道發炎過程中是否亦存在著預防或治療之效果，進而探討金針菇免疫調節蛋白在呼吸道重塑現象上所扮演的角色。

本研究所使用之慢性 OVA 引起之呼吸道過敏動物模式是依據 OVA 引起之急性呼吸道過敏動物模式所衍生而來，此慢性實驗模式共經歷天數有 104 天。本研究使用 BALB/c 母鼠以雞卵蛋白 (chicken ovalbumin, OVA) 誘發小鼠產生致敏及呼吸道發炎現象，本研究於實驗中的第 1 天及第 14 天進行 OVA 腹腔注射並於第 25、26、27、28 天進行第一次之 OVA 鼻腔吸入動作，隨後於第 46、60、69、71、73、74 天進行第二次 OVA 鼻腔吸入，最後於第 103 天進行第三次 OVA 鼻腔吸入之動作並於第 104 天偵測 AHR 後將實驗小鼠犧牲，此動物實驗模式已建立完成。此外本研究將致敏小鼠隨機分為 2 組，一組將 FIP-fve 餵食於實驗進程第 74 天至第 103 天連續 28 天給予 FIP-fve，此組的意義為探究 FIP-fve 對於慢性呼吸道發炎疾病上是否具有治療及亦致呼吸道重塑的效果，另一組則為實驗進程第 1 天至第 14 天連續 14 天及第 35 天至 50 天連續 14 天給予致敏小鼠 FIP-fve，此組別則為探究 FIP-fve 對於慢性呼吸道發炎疾病接觸過敏前的是先投藥是否具有預防之效果。而本研究之對照組是以生理食鹽水進行並做為非致敏小鼠之對照。

根據研究結果顯示，OVA 致敏小鼠具有的明顯呼吸道發炎反應現象會經由前後給予口服 FIP-fve 而受到抑制。呼吸道過度反應現象是藉由 methacholine 刺激致敏小鼠後所獲得。而無論是前或後給予口服 FIP-fve 都能回復呼吸道過度反應現象。另外在致敏小鼠的血清及肺泡沖洗液中 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 其 IgE、IL-4、IL-15、IL-13、TGF- β 都有明顯增加而 IFN- γ 則有明顯減少的現象，但這些現象在前後給予口服 FIP-fve 的致敏小鼠中都會獲得改善。

本研究可發現口服 FIP-fve 對於 OVA 引起的慢性呼吸道發炎反應具有抗發炎的效果，而口服 FIP-fve 對於過敏性呼吸道疾病可能是一項很好的替代性治療方式。

中文關鍵詞： 氣喘、慢性呼吸道發炎、嗜伊紅性白血球、金針菇免疫調節蛋白、FIP-fve

英文摘要： The incidence of asthma has increased substantially in the last two decades. New medication is developed rapidly in recent years to apply to allergic asthma, since lots of people have investigated about these. However, now existing drugs just offer partial relief of symptoms in such disease. The goal of feature is to understand the complicated mechanism of asthma, and develop more effective drugs for suppressing the inflammatory response in asthma. Even we can then reverse the damaged lung tissue after airway remodeling.

As we known today, asthma is a repeated chronic inflammatory disease. It is characterized by a complex response of pulmonary eosinophilia, edema, mucus hypersecretion, and airway hyperreactivity. Under the condition of long term asthma, airway remodeling may develop by increased goblet cells, subepithelial fibrosis, airway smooth muscle mass increased and vascular hyperplasia. These make asthma control more difficult. According to recent research about asthma, leukotriene got important role in whole pathologic change of asthma. Other studies also found the immunomodulatory activity of some purified Chinese herbs and foods in suppressing airway remodeling.

We would examine the role of leukotriene receptor antagonist and agent of edible golden needle mushroom extract—FIP (fungal immunomodulatory peptide) - fve in a mouse asthma model after allergen-induced chronic lung inflammation and airway remodeling. Female BALB/c mice, after intraperitoneal ovalbumin sensitization on Days 1 and 14, received intranasal OVA on Days 14 and Days 25-27. The mouse asthma model was set up. Airway remodeling model was then set up following by intranasal OVA on Days 46, 60, 69, 71 and 73. The sensitized mice were divided into different group according to the course of designed airway change. Different groups of sensitized mice received Montelukast (leukotriene receptor

antagonist), FIP-fve via intragastric feeding on Day 1-14 and Day 35-50. The other groups of sensitized mice received same drugs as above mention or in combination of FIP-fve with the other 2 drugs on Day 74-104. In this experiment, we will evaluate the efficacy of Montelukast or FIP-fve on asthma treatment. We will also evaluate the effect of drugs on reversing the established remodeling airway to normal airway tissue.

英文關鍵詞： Asthma, Chronic airway inflammation, Eosinophil, FIP-fve

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

期中進度報告
期末報告

金針菇萃取物預防及治療氣喘老鼠模式的急慢性期表現

計畫類別：個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 98-2314-B-040-002-MY3

執行期間：98年8月1日至101年7月31日

執行機構及系所：中山醫學大學醫學系、中山醫學大學醫學研究所

計畫主持人：呂克桓教授

共同主持人：柯俊良教授

計畫參與人員：孫海倫副教授、楊順發教授

本計畫除繳交成果報告外，另須繳交以下出國報告：

- 赴國外移地研究心得報告
- 赴大陸地區移地研究心得報告
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文
- 國際合作研究計畫國外研究報告

處理方式：除列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

中華民國 101 年 9 月 28 日

目錄

1. 目錄	I
2. 中文摘要	II
3. 英文摘要	III
4. 前言	P.1
5. 研究目的	P.1
6. 文獻探討	P.1
7. 研究方法	P.5
8. 結果	P.7
9. 討論	P.11
10.圖表說明	P.14
11.參考文獻	P.25
12.計畫成果自評表	P.28

中文摘要

氣喘的形成可能與 Th1/Th2 細胞激素分泌不平衡有關，且經研究指出氣喘為 Th2 細胞激素分泌過多所發展而成。由金針菇所萃取出來之免疫調節蛋白 FIP-*fve*，其被證實可以誘發 Th1 細胞激素中 IFN- γ 的產生。然而經由研究證實，於急性期之呼吸道發炎之動物實驗模型中，口服金針菇免疫調節蛋白確實能夠使得 OVA 所引起之呼吸道過敏現象達到抑制的效果，因此在進一步之研究是想藉由口服金針菇免疫調節蛋白來探討於 OVA 所引起的慢性呼吸道發炎過程中是否亦存在著預防或治療之效果，進而探討金針菇免疫調節蛋白在呼吸道重塑現象上所扮演的角色。

本研究所使用之慢性 OVA 引起之呼吸道過敏動物模式是依據 OVA 引起之急性呼吸道過敏動物模式所衍生而來，此慢性實驗模式共經歷天數有 104 天。本研究使用 BALB/c 母鼠以雞卵蛋白 (chicken ovalbumin, OVA) 誘發小鼠產生致敏及呼吸道發炎現象，本研究於實驗中的第 1 天及第 14 天進行 OVA 腹腔注射並於第 25、26、27、28 天進行第一次之 OVA 鼻腔吸入動作，隨後於第 46、60、69、71、73、74 天進行第二次 OVA 鼻腔吸入，最後於第 103 天進行第三次 OVA 鼻腔吸入之動作並於第 104 天偵測 AHR 後將實驗小鼠犧牲，此動物實驗模式已建立完成。此外本研究將致敏小鼠隨機分為 2 組，一組將 FIP-*fve* 餵食於實驗進程第 74 天至第 103 天連續 28 天給予 FIP-*fve*，此組的意義為探究 FIP-*fve* 對於慢性呼吸道發炎疾病上是否具有治療及亦致呼吸道重塑的效果，另一組則為實驗進程第 1 天至第 14 天連續 14 天及第 35 天至 50 天連續 14 天給予致敏小鼠 FIP-*fve*，此組別則為探究 FIP-*fve* 對於慢性呼吸道發炎疾病接觸過敏前的是先投藥是否具有預防之效果。而本研究之對照組是以生理食鹽水進行並做為非致敏小鼠之對照。

根據研究結果顯示，OVA 致敏小鼠具有的明顯呼吸道發炎反應現象會經由前後給予口服 FIP-*fve* 而受到抑制。呼吸道過度反應現象是藉由 methacholine 刺激致敏小鼠後所獲得。而無論是前或後給予口服 FIP-*fve* 都能回復呼吸道過度反應現象。另外在致敏小鼠的血清及肺泡沖洗液中 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 其 IgE、IL-4、IL-15、IL-13、TGF- β 都有明顯增加而 IFN- γ 則有明顯減少的現象，但這些現象在前後給予口服 FIP-*fve* 的致敏小鼠中都會獲得改善。

本研究可發現口服 FIP-*fve* 對於 OVA 引起的慢性呼吸道發炎反應具有抗發炎的效果，而口服 FIP-*fve* 對於過敏性呼吸道疾病可能是一項很好的替代性治療方式。

關鍵字：氣喘、慢性呼吸道發炎、嗜伊紅性白血球、金針菇免疫調節蛋白、FIP-*fve*

英文摘要

The incidence of asthma has increased substantially in the last two decades. New medication is developed rapidly in recent years to apply to allergic asthma, since lots of people have investigated about these. However, now existing drugs just offer partial relief of symptoms in such disease. The goal of feature is to understand the complicated mechanism of asthma, and develop more effective drugs for suppressing the inflammatory response in asthma. Even we can then reverse the damaged lung tissue after airway remodeling.

As we known today, asthma is a repeated chronic inflammatory disease. It is characterized by a complex response of pulmonary eosinophilia, edema, mucus hypersecretion, and airway hyperreactivity. Under the condition of long term asthma, airway remodeling may develop by increased goblet cells, subepithelial fibrosis, airway smooth muscle mass increased and vascular hyperplasia. These make asthma control more difficult. According to recent research about asthma, leukotriene got important role in whole pathologic change of asthma. Other studies also found the immunomodulatory activity of some purified Chinese herbs and foods in suppressing airway remodeling.

We would examine the role of leukotriene receptor antagonist and agent of edible golden needle mushroom extract—FIP (fungal immunomodulatory peptide) –fve in a mouse asthma model after allergen-induced chronic lung inflammation and airway remodeling. Female BALB/c mice, after intraperitoneal ovalbumin sensitization on Days 1 and 14, received intranasal OVA on Days14 and Days 25-27. The mouse asthma model was set up. Airway remodeling model was then set up following by intranasal OVA on Days 46, 60, 69, 71 and 73. The sensitized mice were divided into different group according to the course of designed airway change. Different groups of sensitized mice received Montelukast (leukotriene receptor antagonist), FIP-fve via intragastric feeding on Day 1-14 and Day 35-50. The other groups of sensitized mice received same drugs as above mention or in combination of FIP-fve with the other 2 drugs on Day 74-104. In this experiment, we will evaluate the efficacy of Montelukast or FIP-fve on asthma treatment. We will also evaluate the effect of drugs on reversing the established remodeling airway to normal airway tissue.

Keyword: Asthma, Chronic airway inflammation, Eosinophil, FIP-fve

一、前言

近年來氣喘的發生率持續的快速增加，因此針對氣喘所做的研究也愈來愈多而治療過敏氣喘的新藥也不斷的被開發出來，而目前對於氣喘的治療藥物多以症狀緩解為主，此外在未來則是以了解氣喘的完整機制以及發展有效抑制氣喘發炎反應之藥物為主要目標。目前針對金針菇免疫調節蛋白(fungal immunomodulatory protein-five, FIP-five)的研究指出，金針菇免疫調節蛋白是由新鮮金針菇萃取而來，而此蛋白具有抗腫瘤、抗病毒、抗菌以及降低膽固醇等活性，另外研究中亦顯示此蛋白具有刺激人類周邊血淋球細胞以及增強免疫細胞中的細胞激素如 IL-2 與 IFN- γ 。因此在本研究中我們想了解金針菇免疫調節蛋白對於致敏小鼠模型中呼吸道發炎反應的影響。

二、研究目的

目前常用於治療氣喘的藥物，其作用大部分以減緩急性症狀為主且仍具有副作用，所以希望透過從金針菇中所萃取出來的天然物質，來發展出有效且低副作用的治療氣喘藥物。因此，本研究藉由雞卵蛋白 (chicken ovalbumin, OVA)所誘發的小鼠氣喘模式來研究金針菇調節蛋白(FIP-five)是否可以減緩氣喘症狀，並可被用來作為治療氣喘的藥物，其中並搭配現行臨床用藥皮直類固醇、新藥欣流於實驗進程中一同探討金針菇免疫調節蛋白於過敏氣喘急性慢性進程中之預防及治療效果。

三、文獻探討

➤ 氣喘

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

有一項從1974年至1994年針對台北市學童所進行的研究指出：台北市學童的氣喘病發生率在1974年時為1.30%，隨後快速增加，在1985年為5.08%，1991年為5.80%，然後到了1994年底竟高達了10.79%，這樣研究結果顯示，在過去的二十年間氣喘發生率增加超過八倍。目前全世界約有一億人口罹患氣喘，其盛行率在兒童也有逐漸增加的趨勢，且氣喘發作的年齡也有向下發展的跡象。因此面對這樣的現象針對氣喘的研究已是迫在眉梢。

現今已知的觀念，氣喘是一種複雜反覆慢性發炎的疾病，病理上的變化包括有肺部嗜伊紅性白血球的浸潤、黏膜水腫、黏液的過度分泌以及呼吸道的過度反應。而在長期氣喘的狀態下，呼吸道會產生杯狀細胞、平滑肌肉組織、血管等增生的呼吸道重塑現象，因而增加控制氣喘的困難度。另外在前人的研究中也發現，在支氣管肺泡沖洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF)和肺部的分泌物中，存在有可以調控發炎反應的細胞激素(cytokines)和趨化激素(chemokines) (1)。而在先前的研究中也發現，氣喘病人的呼吸道中會有大量的T細胞浸潤(2, 3)，因此根據這些研究結果有研究者認為CD4⁺ T cell 在氣喘上扮演著相當重要的角色 (4)。另外在目前已知的相關研究中也顯示IL-12 (interleukine-12)有助於CD4⁺ T cells 分化成Th1細胞 (5)；IL-4 則可促使Th2細胞分化(6)。另外在Th1細胞方面其能夠產生IL-2和IFN- γ (interferon- γ)，這對於防禦功能上是存在極大的重要性；而Th2細胞 則會產生IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-13，經研究指出這類細胞激素則與過敏性發炎的機制有關，亦有研究指出Th1細胞和Th2

細胞所產生的細胞激素具有互相拮抗的作用 (7)。承上述所說，在氣喘的過敏性發炎反應中主要被認同的機轉是免疫調控不平衡所致，其中由Th1 細胞所分泌的IFN- γ 特別被受到重視，因為IFN- γ 會抑制Th2細胞的分化及IgE 的合成，因此在缺乏IFN- γ 的情況下，會有加重過敏性發炎反應發生的可能性。而Th2細胞所產生的IL-4 和IL-13 則可以結合到B細胞上的受器，促進B 細胞產生IgE (8)；IL-5 則是刺激嗜伊紅性白血球的分化、成熟及存活的重要因子 (9)，也具有吸引嗜伊紅性白血球到呼吸道的功能 (10)。在臨床上也證實，氣喘病人的一項主要特徵是血清中的具有高濃度的IgE含量，而這方面也在流行病學的研究上獲得認同(11)。另外根據國內氣喘診療指引指出肥大細胞 (mast cells)和嗜伊紅性白血球在過敏性氣喘中亦為主要的作用細胞，其主要原因是肥大細胞可以透過IgE-dependent的機制使其活化，血液中IgE會和肥大細胞上的IgE receptors (Fc ϵ RI)結合，當過敏原進入之後會和肥大細胞上的IgE結合，然後導致肥大細胞釋放出組織胺(histamine)、前列腺素D2 (prostaglandin D2, PGD2)、白三烯素C4 (leukotriene C4, LTC4)和血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF)等介質會導致支氣管平滑肌收縮，呼吸困難和血管通透性增加(12)，這種早期反應發生非常快速，只需接觸過敏原後數分鐘就發生，而長期氣喘患者的主要特徵就是在呼吸道有大量的嗜伊紅性白血球的浸潤 (13)。

根據上述所提到之研究指出，在氣喘的過敏性反應中IFN- γ 的分泌是相當被重視的一塊，因為其能抑制IgE的生成，然而前人的研究中也發現金針菇調節功能蛋白(FIP-five) 可以使Balb/c 老鼠的脾臟細胞以及正常人類周邊血的淋巴球細胞(HPBMC)，經過48 小時的處理後，會有明顯的IFN- γ 的增加 (55)，雖然其所誘發的機制及相關的調控功能並不清楚，但是IFN- γ 對於IgE及肥大細胞等所引起的過敏反應是具有抑制的能力，可以減少發炎反應的過度表現 (14)。

因此本實驗的目的是希望藉由金針菇調節蛋白能促進IFN- γ 大量生產的功效，看其是否能達到抑制小鼠氣喘的結果。

➤ 氣喘的致病機轉

根據目前已知的研究所得之，氣喘的致病機轉是由於支氣管壁的慢性發炎所導致的氣流阻滯及劇烈的氣道反應，因此造成了支氣管在受到各種刺激時變得狹窄。

■ 氣喘之氣道炎症反應

過敏性氣喘是一種慢性的呼吸道疾病，其主要的特徵有：

- (1) 呼吸道發炎(airway inflammation)，呼吸道黏膜腫脹，黏液分泌的增加。
- (2) 呼吸道過度反應性(airway hyperresponsiveness；AHR)，當呼吸道反覆暴露於過敏原時，因為反覆的發炎反應，而促使呼吸道纖維化和平滑肌增厚，所造成的呼吸道重塑(remodeling)現象。
- (3) 可逆性呼吸道阻塞(reversible airflow obstruction)，這將使得呼吸變得困難。

■ 氣喘之免疫機制

過敏性氣喘是呼吸道的發炎反應，根據研究所示這可能是受基因 (genetic factors) 和環境刺激的相互作用所產生，或者是免疫系統中Th1和Th2反應不平衡所導致。人類T淋巴細胞可分為兩類：第一型輔助T細胞(Th1細胞)所產生的細胞激素為IL-12及IFN- γ ，其可以促進清除細菌、黴菌及排除受到病毒感染細胞。而第二型輔助T細胞(Th2細胞)其所產生的細胞激素為IL-4、IL-5、IL-9及IL-13，這些細胞激素會與B細胞經由對應的antigen-specific 受體產生作用，促進抗體的轉變(isotype switching)而產生antigen-specific-IgE抗體。另外Th2細胞所產生IL-4及IL-5，經先前研究顯示其會活化嗜伊紅性白血球。另外Th2細胞所生成的antigen-specific-IgE抗體，會接連在肥大細胞及嗜鹼性細胞上其偏向抗寄生蟲及過敏的反應。根據這些結果可認為CD4⁺ T細胞和氣喘以及其他過敏疾病有密切的關係。過敏性氣喘主要是Th2中的IL-19長期受到過敏的原刺激後，活化了Th2細胞產生IL-4並刺激B細胞製造antigen-specific-IgE抗體所致。

肥大細胞活化所釋放出的組織胺、白三烯素及前列腺素D2及血小板活化因子可以引起血管通透性的增加和呼吸道平滑肌的收縮，進而出現過敏性氣喘的症狀，這些作用在接觸過敏原後一小時內發生，因此稱為過敏反應的急性徵候(acute responses)。而後大量發炎細胞如淋巴球，大多是CD4⁺型的細胞、嗜伊紅性白血球、嗜中性白血球、單核球和巨噬細胞會陸續地浸潤到支氣管的組織間隙，引起過敏反應中的遲發反應。嗜中性白血球、單核球和巨噬細胞等也都會釋放過氧化物及蛋白酵素，或嗜伊紅性白血球的相關物質來破壞氣管組織。在過敏原反覆的刺激下便會形成細胞的持續浸潤以及介質釋放，而其反覆發作的結果，會造成病人呼吸道狹窄、阻塞及敏感度遽增，成為慢性氣喘狀態(chronic symptoms)。

總而言之，過敏性氣喘是一程慢性的呼吸道發炎現象。但是對於過敏原進入具過敏體質者體內後，是如何造成過敏性發炎和致敏的作用，目前整體機轉尚未能完全了解。過敏原活化特異性Th2細胞是致敏的關鍵；呼吸道的其他細胞如肺泡巨噬細胞(alveolar macrophage)，上皮細胞(epithelial cell)及樹突細胞(dendritic cell)及肥大細胞對於過敏體質的致敏作用扮演決定性的角色。

根據國內氣喘醫療指南指出，在氣喘發炎的呼吸道到處可見到肌纖維母細胞的增生和膠原纖維合成的增加等支氣管週邊纖維化之現象。所以呼吸道發炎反應對於過敏反應的發生將有促進與加強的效果。IgE 會與分佈於黏膜下層的肥大細胞或嗜鹼性白血球的IgE 接受器(Fc ϵ RI) 結合，當相同過敏原再次進入體內，會與這些特異性IgE結合，使肥大細胞活化，導致細胞膜上的基質大量釋放花生油烯酸(arachidonic acid)，並經由cyclo-oxygenase pathway 代謝形成前列腺素(prostaglandin; PGE2)。對空氣中的灰塵及所引起的過敏反應會因前列腺素E2 而加重hypo-oxygenase pathway。

➤ 氣喘的治療

目前醫療上對於氣喘疾病的治療，以抑制呼吸道發炎反應與症狀緩解的支氣管擴張劑為主要方法，其治療方式包括有吸入性類固醇(corticosteroids)、 β_2 型交感神經興奮劑(β_2 -agonist)、茶鹼(theophylline)和白三烯素拮抗劑(leukotriene antagonists)等。其中以吸入性類固醇為最有效控制氣喘及改善肺功能的方法，但這些藥物不論是單獨使用或合併其他治療，除了具有潛在的副作用外，也常無法根治疾病(15)。

➤ 現行臨床上用藥

➤ 皮酯類類固醇 (Corticosteroids)

類固醇俗稱「美國仙丹」，其全名為葡萄糖皮質類固醇。治療氣喘的類固醇，可分為吸入性皮質類固醇與口服或注射皮質類固醇。吸入性皮質類固醇是目前最有效的控制氣喘藥物，病人使用超過1個月以上可降低氣喘病人呼吸道的發炎現象，長期使用則可進一步改善氣喘病人呼吸道的敏感現象。因此，病人長期使用吸入性皮質類固醇，可大幅改善肺功能、降低呼吸道的敏感、減低氣喘的症狀、降低氣喘惡化的次數與嚴重程度，從而改善生活的品質。所以，所有氣喘病人，如有持續性的症狀，皆得使用吸入性皮質類固醇。對嚴重持續性的氣喘病人，則得使用口服或注射的類固醇，才能有效的控制氣喘。口服比注射好，選擇的藥物則為 prednisolone, prednisone 或 methylprednisolone，而且最好於早上服用。當症狀改善後，得降低劑量，再完全停用，並以吸入皮質類固醇來維持。有些嚴重持續性的氣喘病人，無法完全停用口服的類固醇，此時可以隔日服用方式，來降低長期服用類固醇的副作用。口服類固醇對於急性的嚴重氣喘發作也很有幫助，早期服用可防止嚴重氣喘的發生。但是目前市面上可用的吸入性皮質類固醇的藥效很強，吸用後大部分藥物經由肺部吸收，雖有部分藥物進入血液中而產生全身性的作用，而目前的證據顯示，在長期吸入高劑量的皮質類固醇，則會產生全身性的副作用。吸入性皮質類固醇，可產生局部的不良反應，包括口咽念珠菌感染、聲音嘶啞與局部刺激導致的咳嗽，而在全身性的副作用方面則包括皮膚變薄、易於瘀血、骨質疏鬆、腎上腺功能的抑制等。因此針對氣喘藥物所造成的不良副作用所帶來的影響新興無副作用治療藥物研發及改良是勢在必行的。

➤ 白三烯拮抗劑 (leukotriene antagonists)

白三烯類 (Leukotrienes, LTS) 是強效的炎前介質，參與發炎、哮喘、休克等的發病過程。因此阻斷 LTS 的合成或阻斷 LTS 與其受體的結合成為治療的重要方向。白三烯受體拮抗劑 (LTRAs) 是近年來研究、發展的新興非類固醇抗發炎藥物，以下對 LTRAs 在支氣管哮喘中的應用做簡單敘述。細胞磷脂膜產生的花生四烯酸 (AA) 通過環氧化酶 (COX) 和 5-脂氧化酶 (5-LOX) 2 個關鍵作用的酶代謝途徑分別參與前列腺素 (PGI₂、PGE₂)、血栓素 (TXA₂) 和 LTS 的生物合成。大多數的 LTS 是依存於發炎細胞 (嗜酸性細胞、肥大細胞、嗜鹼性細胞或巨噬細胞) 中的脂氧化酶而產生的，AA 通過 5-、12-和 15-脂氧化酶代謝為氧化二十碳烯酸 (5-HPETE) 經脫水酶迅速轉換為不穩定的環氧化物白三烯 (LTA₄)，於水解酶或谷胱甘肽-5-轉移酶的作用下，轉換為二羥酸白三烯 B₄ (LTB₄)，或在白三烯 CD₄ (LTC₄) 合成酶作用下與谷胱甘肽結合生成白三烯 C₄ (LTS₄)，後者再被主動轉運出細胞，在 α-谷氨酰轉肽酶作用下使谷胱甘肽降解一半而產生成白三烯 D₄ (LTD₄)。LTD₄ 在脫肽酶作用下進一步代謝為半胱氨酸衍生物白三烯 E₄ (LTE₄)。白三烯作用於標靶組織的受體，可引起平滑肌收縮、毛細血管壁滲出、水腫和趨化反應等。作用於支氣管管壁，可引起：(1) 支氣管平滑肌收縮，支氣管管徑變窄，氣道內阻力明顯增高，其效力比組織胺強 100~1000 倍，比乙酰膽鹼強 20000 倍；(2) 使氣管和支氣管壁毛細血管通透性增加，滲出增多，蛋白質和水份滲出引起粘膜水腫。(3) 刺激支氣管壁粘液腺體分泌增加，並降低粘膜纖毛的清除能力；(4) 增加支氣管發炎細胞的浸潤，趨勢化嗜酸細胞，使發炎細胞在嗜酸細胞中有廣泛浸潤，導致氣道對炎症高敏反應和對發炎效應敏感性增高；(5) 使冠狀動脈痙攣，引起心肌缺血，收縮力下降，並誘發腦血管痙攣或水腫。

對正常人或哮喘患者吸入氣霧劑後分離支氣管的離體和在體內的研究都有表明，LTC₄ 和 LTD₄ 使正常人和哮喘患者的大、小氣道都有收縮。研究還表明，哮喘患者體內的 LTS 增加，與受體結合後所產生的平滑肌收縮、氣道水腫和炎性細胞活性改變等皆與哮喘的症狀有關。因此，抑制 LTS 的合成途徑或拮抗 LTS 受體均可有效地防治哮喘。目前相應產生的製劑有 LTS 的合成酶抑制劑，5-脂氧化酶抑制劑或 LTRAs。

目前已上市和臨床應用的 LTRAs 主要有 Zafirlukast, Acolate、Pranlukast 和欣流 Montelukast, Singulair。LTRAs。

➤ 藥物不良反應和安全性

LTRAs 的耐受性好，近幾年進行的大規模臨床試驗，證實 LTRAs 與安慰劑相比，具有顯著的臨床療效，長期使用未發現明顯的副作用，耐受性好，在兒童亦非常有效、安全。沒有發生死亡和嚴重不良反應的報道。服用 Zafirlukast 後有 5.3% 的人發生不良反應，而服用安慰劑後有 6.3% 的人發生了不良反應。其中以頭痛、胃炎、咽炎、鼻炎等較為常見。129 例哮喘患者服用 Montelukast 6 周後反應發生率為 6.1%，安慰組為 5.0%，所有不良反應均較輕微，停藥後自然消失。據報道 Zafirlukast 還與一種罕見的被稱為嗜酸細胞浸潤性食管炎綜合征 (Churg-Strauss) 的致命症狀相關，雖然其發病率極低，但應引起注意。在服用 Zafirlukast 期間，AST、ALT 可能升高，通常表現短暫，可能是肝毒性的早期表現。但如有肝功能不全或出現惡心、嘔吐、肝腫大及黃疸，應測定肝功能。

➤ LTRAs 應用原則

(1) 在治療急性哮喘上 LTRAs 的療效尚未確定，暫不宜應用於急性發作的治療，不宜突然代替腎上腺皮質激素，也不適用解除哮喘急性發作時的支氣管痙攣。(2) LTRAs 起效慢，作用相當於色甘酸鈉，一般連續應用 4 周才見效，有蓄積性，僅適用於輕、中度哮喘和穩定期的控制，或合併應用以減少腎上腺皮質激素和 β₂ 受體激動劑的劑量。尤其適用於合併過敏性鼻炎的哮喘及用於預防運動哮喘和阿斯匹林哮喘。(3) 在治療哮喘上不宜單獨應用，對 12 歲以下兒童、妊娠及哺乳期應慎用。(4) 體外試驗表明，高濃度 Zafirlukast 可抑制肝細胞色素 P 450 1A2，競爭抑制氨茶鹼的分解，而使

茶鹼血濃度升高，在與茶鹼合用時，應監測茶鹼的血漿藥物濃度。

綜上所述，LTRAs 作為治療哮喘的新型選擇藥物，具有安全、有效、耐用、客觀存在性好、副作用少等優點，適用於輕、中度哮喘患者，可減少腎上腺皮質激素用量，雖然與腎上腺皮質激素， β_2 受體激動劑比較，作用遜色于兩者，但長期臨床應用觀察，可產生相似的作用，特別是對吸入高劑量腎上腺皮質激素仍不能滿意控制癥狀、對腎上腺皮質激素產生抵抗的患者，加用 LTRAs 是一種有效、合理的選擇。然而此類藥物仍屬於合成之化學成分藥物若能研發或發現天然抗發炎、治療過敏之藥物對此類病患而言實為福音。

➤ 金針菇調節功能蛋白 (*Fungal immunomodulatory protein*)

金針菇 (*Flammulina velutipes*) 為一種可食性常見的蕈類植物，之前由台大生化研究所 林榮耀博士的實驗室已建立出由金針菇、靈芝及草菇等子實體純化出蛋白的方式，並且將靈芝、草菇及金針菇所純化的蛋白分別命名為 FIP-gts、FIP-vvo 及 FIP-fve。本實驗室將金針菇的子實體經由陽離子交換樹脂純化後，可以得到一個大小約 115 個胺基酸而且具有調節功能的金針菇蛋白(*Fungal immunomodulatory protein*; FIP-fve)。其在結構上及胺基酸序列上都與靈芝的一種(*Ganoderma ssp.*)純化出來的功能蛋白極為相似(16)，已知兩者的胺基酸序列具有 61.4 % 的相同性，即有 70 個胺基酸與靈芝相同，此外另有 9.6 % 是屬於可置換的相似胺基酸(16)。

➤ 金針菇免疫調節蛋白具有的生理活性

由先前關於 FIP-fve 的研究顯示 FIP-fve 對於人類周邊血的淋巴球細胞(human peripheral blood mononuclear cells; HPBMCs) 具有增殖的作用，以 3H-thymidine 測其 DNA 合成量，並以 phytoagglutinin (PHA) 作為對照組。結果發現 FIP-fve 在 100 μ g/ml 濃度時可達到細胞最高的增殖量(56)。另外，將 Balb/c 老鼠以皮下注射方式注入 bovine serum albumin (BSA)，其會引起 systemic anaphylaxis 特徵是老鼠的兩腳會痙攣並向外側攤開，而有預先處理 FIP-fve 的實驗組則對於此過敏性休克反應具有明顯的抑制作用(56)。而將老鼠的脾臟細胞，經 FIP-fve 蛋白質預先處理不同濃度後，再抽取其 RNA 以 RT-PCR 方式做增幅反應，結果發現隨著 FIP-fve 處理的濃度增加，所誘導的 IL-2、及 TNF- α (tumor-necrosis factor α) 的基因轉錄作用也有增加的趨勢(16)。

另外也有研究指出 FIP-fve 具有降低 Balb/c 老鼠由 Compound 48/80 (為一種發炎物，可釋出組織胺酸) 所引起的老鼠後腳腫脹反應的能力(16)。然而 FIP-fve 最明顯的功能則是可以使 Balb/c 老鼠的脾臟細胞以及正常人類周邊血的淋巴球細胞，經過 48 小時的處理後，會有明顯的 IFN- γ 的增加(56)，雖然其所誘發的機制及相關的調控功能並不清楚，但是 IFN- γ 對於 IgE 及肥大細胞等所引起的過敏反應是具有抑制的能力，可以減少發炎反應的過度表現(14)。

四、研究方法

➤ 實驗動物

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

➤ FIP-fve 的分離與純化: (Ko, et al., 1995)

金針菇 300 克，洗淨並去除雜質，浸泡於 1 公升的 5% 冰醋酸溶液中，使金針菇完全浸入溶液中，置於冰箱 4 $^{\circ}$ C 至少 1 小時，並於冰上進行下列步驟。用果汁機 (Waring blender) 打成漿狀，將漿液使用 Beckman 冷凍離心機，在 4 $^{\circ}$ C 以 8000rpm (JA14 rotor) 離心 20 分鐘，將上清液用濾紙過濾，並對濾液慢慢加入固體硫酸銨至 90% 飽和濃度，再以 8000rpm 離心 20 分鐘，取沉澱物，用少許二次水溶後，移至透析袋，透析袋須事先以清水軟化並測試有無破洞。於 4 $^{\circ}$ C 下對 10mM Tris HCl, pH 8.0 透析 2 天，每 12 小時更換透析液 1 次。透析完成的蛋白質溶液以 12000rpm 離心 40 分鐘，除去不溶之雜質。將

上清液通過預先以 0.05 N NaOH、二次水及 0.05 N 的 HCl 處理再以 10mM Tris HCl, pH8.0 溶液平衡的 cation-cellulose DE52 管柱先通過蛋白質溶液後並以 10mM Tris HCl, pH 8.0 溶液沖流,再以 0 至 0.5N 的 NaCl 溶於 10mM Tris HCl, pH 8.0 溶液中的沖流液沖出結合在 DE52 管柱上的蛋白質。流速每分鐘 1 毫升。上述管柱所流出的溶液皆以 Gilson fraction collector 自動分液收集器收集。每管約 1.5 毫升,並測其在 280nm 波長的吸收光值。即為蛋白吸收峰,所獲得的 FIP-*five* 其純度由 SDS-PAGE 來確定。

➤ 進行 ovalbumin 致敏模式與施予 FIP-*five*

■ 致敏流程(圖1a, b, c)-急性期致敏動物實驗實驗流程

從流程開始的第 1~3 天及第 14 天,將含有 0.8 mg Al(OH)₃ (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA)的生理食鹽水或含有 50ug 雞卵蛋白(chicken ovalbumin, OVA; Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, MO, USA)及 0.8 mg Al(OH)₃ 的生理食鹽水以腹腔注射(I.P., intraperitoneal)的方式打入小鼠體內,每次施打 200 μ l,再於第 14 天時進行腹腔注射生理食鹽水或 OVA,並進行生理食鹽水或 5% OVA (in saline)的鼻腔吸入,每隻吸入量為 50ul,並於第 17、20、23、27 天一相同方式給藥,共給予鼻腔吸入藥物五天,並於第 28 天進行呼吸道阻力反應的之測定 (Airway hyper-responsiveness, AHR)測定,待測訂完成後 24 小時內將小鼠犧牲。

■ 致敏流程(圖1d, e)-慢性期致敏動物實驗實驗流程

從流程開始的第 1~3 天及第 14 天,將含有 0.8 mg Al(OH)₃ (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA)的生理食鹽水或含有 50ug 雞卵蛋白(chicken ovalbumin, OVA; Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, MO, USA)及 0.8 mg Al(OH)₃ 的生理食鹽水以腹腔注射(I.P., intraperitoneal)的方式打入小鼠體內,每次施打 200 μ l,再於第 14 天時進行腹腔注射生理食鹽水或 OVA,並進行生理食鹽水或 5% OVA (in saline)的鼻腔吸入,每隻吸入量為 50ul,並於第 17、20、24、27 天以相同方式給藥,共給予鼻腔吸入藥物五天,隨後於實驗進程之第 60、69、71、73、74 天以鼻腔吸入方式再次給予 OVA,共給予吸入藥物天數五天,最後一次給予 OVA 吸入於第 103 天並於第 104 天進行呼吸道阻力反應的之測定 (Airway hyper-responsiveness, AHR)測定,待測訂完成後 24 小時內將小鼠犧牲。

■ 施藥時間與劑量

在 FIP-*five* 給藥的方面共分為兩個部份,一為在致敏過程中的第 0 天至第 13 天連續每天給藥,另一組則為致敏過程中的第 14 天至第 27 天連續每天兩組,其示意圖如圖 1b (pre FIP-*five*)與 1c (post FIP-*five*);此外,慢性期致敏小鼠之給藥流程其示意於圖 1e,慢性期小鼠給予金針菇免疫調節蛋白即其他口服藥劑可分為兩組,一組為實驗進程第 74 天至 103 天共連續 28 天給予口服藥劑,另一組則為實驗進程的第 1 至 14 天及第 60 至 73 天分兩段是給予口服藥劑,給藥天數共為 28 天。

■ 呼吸道阻力測定 (AHR)

第 28 天時進行小鼠呼吸道阻力測定,來觀察小鼠呼吸道收縮狀況。首先將小鼠暴露在不同濃度的 methacholine (Sigma-Aldrich, Inc.),分別為 0 (saline)、5、10 和 20 mg/ml,以蒸氣吸入(噴霧)的方式處理 3 分鐘,然後將小鼠到裝有呼吸道阻力偵測系統 (BUXCO Electronics, Inc., Wilmington, NC, USA)的腔室中偵測 3 分鐘,由感應器偵測到小鼠呼吸速率及氣流量變化再經由 BioSystem XA 軟體分析後便可得到呼吸道阻力的 Penh 值 (enhanced pause)。

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

先以 10ug/ml OVA (溶於 1X PBS) coating 於 96 well 之 ELISA plate (TPP, Trasadingen, Switzerland),置於 4°C,隔夜後在 37°C 下以 3% BSA (in PBS)進行 blocking,1 小時後加入待測物於 37°C 作用 1 小時,之後加入 biotinylated rat anti-mouse monoclonal IgE (BD Biosciences)在 37°C 下作用 1 小時,然後再加入 streptavidin conjugated-HRP 於室溫作用 30 分鐘,最後加入受質溶液使呈色,包含 2 mg

o-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD, Sigma-Aldrich)及 2 ul 30 % H₂O₂ 溶於 5 ml 1X phosphate citrate buffer，於室溫下作用 20 分鐘，再以 25 ul 3 M H₂SO₄ 終止反應，然後用 ELISA reader (Sunrise™, TECAN Ltd.)波長 490 nm 測吸光值。

➤ 小鼠 IL-4、IL-5、IL-10、IL-12、IL-13、TGF-β 及 INF-γ 濃度測定

利用 mouse IL-4、IL-5、IL-10、IL-12、IL-13、TGF-β、INF-γ ELISA DuoSet R (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)來偵測肺泡沖洗液及血清中細胞激素的濃度。先使用可辨認 mouse IL-4、IL-5、IL-10、IL-12、IL-13、TGF-β、INF-γ 之 rat anti-mouse antibody 的 capture antibody 溶於 1X PBS 後，以 100ul/well 加到 Costarplate (Corning)置於室溫，隔夜後於室溫條件下進行 1 % BSA 的 blocking，1 小時後加入待測物及 standard 作用於室溫 2 小時(100ul/well)，再加入偵測抗體(detection antibody) biotinylated goat anti-mouse IL-4、IL-5、IL-10、IL-12、IL-13、TGF-β、INF-γ antibody (100ul/well) 在室溫下反應 2 小時，再以 streptavidin conjugated-HRP (horseradish-peroxidase) 於室溫作用 20 分鐘 (100ul/well)，最後加入 hydrogen peroxide (H₂O₂)和 tetramethylbenzidine (TMB)作用於室溫下反應 20 分鐘後使呈色，最後加入 50ul 2N H₂SO₄ 終止反應，用 ELISA reader (Sunrise™, TECAN Ltd.)波長 450 nm 測吸光值。

➤ 統計分析

所有數據皆以軟體 SPSS 進行數據分析，數據皆以 mean±SE 呈現，統計則以 Student' s t test 做為是否具有顯著差異 ($p < 0.05$)的依據。

五、結果

FIP-*five*對氣喘小鼠之作用

此階段共有五部分之結果，分別為呼吸過度反應(AHR)部份、血清 IgE/IgG2a 測試、細胞計數(BALF)、細胞激素測試以及病理切片部份之結果，其結果如下：

➤ FIP-*five* 能有效降低呼吸道過度反應

■ 急性期 penh 結果

首先在致敏過程後所測試的 AHR，單純以 OVA 致敏的 PC 組其 Penh 值曲線明顯的升高(圖 2)，尤其是在 methacholine 濃度為 20 mg/ml 作用時，PC 組與對照組相比，PC 組有明顯增加呼吸道過度反應的現象且達統計上顯著意義($p = 0.0005$)。在 pre 組部分其 Penh 與 PC 組相較之下，在 methacholine 濃度為 20 mg/ml 時有明顯降低其 Penh 值得現象且亦達到統計上顯著意義($p < 0.0001$)，另外，post 組相較於 PC 組也有顯著降低 Penh 的現象且亦達到統計上顯著意義($p < 0.0001$)。但在 pre 組與 post 組的比較下，兩組的差異經統計檢定兩組的差異並沒有達到統計上的顯著意義($p = 0.1281$)。根據上述結果顯示 FIP-*five* 無論是在第 0 至 14 天給予或第 14 天至 27 天給予都能有效減緩呼吸道過度反應的症狀。

■ 慢性期 penh 結果

首先在致敏過程後所測試的 AHR，單純以 OVA 致敏的 PC 組其 Penh 值曲線明顯的升高(圖 8)，尤其是在 methacholine 濃度為 20 mg/ml 作用時，PC 組與對照組相比，PC 組有明顯增加呼吸道過度反應的現象且達統計上顯著意義($p = 0.0005$)。在實驗進程 pre 或 post (圖 8a/8b)給予口服藥物之致敏鼠其 Penh 值相於 OVA 致敏組，在 methacholine 濃度為 20 mg/ml 時有明顯降低其 Penh 值得現象且亦達到統計上顯著意義($p < 0.0001$)。

➤ 小鼠血清中 OVA-specific antibodies 的表現

■ 急性期結果

在小鼠犧牲同時採集其血液病分離出血清後，利用 ELISA 來偵測血清中 OVA-specific IgE (圖 3a)、

IgG2a(圖 3b)的濃度。在這部分的結果中發現 PC 組、pre 組和 post 組的血清中在 OVA-specific IgE 方面，pre 組(OD490nm = 0.24 ± 0.0183)與 post 組(OD490nm = 0.263 ± 0.0190)比 PC 組 (OD490nm = 0.58 ± 0.024)皆有明顯減少的 OVA-specific IgE 表現且達統計上顯著差異(pre $p = 0.0003$; post $p = 0.0002$)，但 pre 組和 post 組相比則沒有顯著的差異($p = 0.4634$)。在 OVA-specific IgG2a 方面，可以發現 pre 組 (21733 ± 802.2 unit)和與 PC 組 (8888 ± 262.2 unit) 相比，血清裡的 OVA-specific IgG2a 含量有明顯增加的趨勢，且達統計上顯著差異($p = 0.0003$)，另外，post 組(16281 ± 884.8 unit)之 IgG2a 含量也較 PC 組高亦達統計上顯著意義($p = 0.0002$)，而 pre 組與 post 組相比，post 組的 OVA-specific IgG2a 表現量較 pre 組減少且達統計上顯著差異($p = 0.0022$)。

■ 慢性期結果

在小鼠犧牲同時採集其血液病分離出血清後，利用 ELISA 來偵測血清中 OVA-specific IgE (圖 3c)、IgG2a (圖 9)的濃度。在這部分的結果中發現 PC 組、pre 組和 post 組的血清中在 OVA-specific IgE 方面，pre-FIP 與 post-FIP 相較於 OVA 致敏組 OVA-specific IgE 皆有明顯減少且達統計上顯著差異($p = 0.0002$)。另外在 OVA-specific IgG2a 方面，其結果亦與急性期相同 pre-FIP 與 post-FIP 組於血清中都有較高之 OVA-specific IgG2a 含量。

➤ FIP-five 能有效減少細胞於小鼠呼吸道浸潤的現象

■ 急性期結果

在細胞數方面(圖 4a)在 NC 組的部分其總細胞量有 $30.80 \pm 3.007 \times 10^4$ ，其中包含的細胞分別有嗜伊紅性白血球 $1.00 \pm 0.633 \times 10^4$ 、淋巴球 $1.800 \pm 0.86 \times 10^4$ 、單核球 $24.40 \pm 2.421 \times 10^4$ ；而在 PC 組的部分可以發現有大量的細胞浸潤($129.8 \pm 3.034 \times 10^4$ ，其中包含的細胞有嗜伊紅性白血球 $49.13 \pm 1.797 \times 10^4$ 、淋巴球 $42.38 \pm 1.546 \times 10^4$ 、單核球 $37.63 \pm 1.523 \times 10^4$ ，另外，在 pre 組與 post 組兩組的部分其細胞量分別為 pre 組(總細胞量 $86.14 \pm 2.755 \times 10^4$ 、嗜伊紅性白血球 $24.29 \pm 2.407 \times 10^4$ 、淋巴球 $19.71 \pm 12.67 \times 10^4$ 、單核球 $41.71 \pm 1.686 \times 10^4$)；post 組(總細胞量 $92.00 \pm 2.934 \times 10^4$ 、嗜伊紅性白血球 $27.63 \pm 1.238 \times 10^4$ 、淋巴球 $23.75 \pm 2.119 \times 10^4$ 、單核球 $40.13 \pm 1.608 \times 10^4$)，從這部分的結果我們亦可發現無論是 pre 組或 post 組的肺部細胞浸潤現象都相較於 PC 組都有減少的現象，其中在總細胞量及嗜伊紅性白血球的數量上 pre 組與 post 組兩組相較於 PC 組都有達統計上的顯著差異，而在淋巴球部分相較於 PC 組減少的現象，且達統計上的顯著差異，但在單核球的部分相較於 PC 組有略多的現象，但未達統計上的明顯差異。

■ 慢性期結果

在細胞數方面(圖 10)在 NC 組的部分其總細胞量有 $22.5 \pm 2.102 \times 10^4$ ，其中包含的細胞分別有嗜伊紅性白血球 $1.750 \pm 0.4787 \times 10^4$ 、淋巴球 $6.750 \pm 0.853 \times 10^4$ 、單核球 $14.00 \pm 1.780 \times 10^4$ ；而在 PC 組的部分可以發現有大量的細胞浸潤($169.3 \pm 5.558 \times 10^4$ ，其中包含的細胞有嗜伊紅性白血球 $89.5 \pm 4.518 \times 10^4$ 、淋巴球 $45.25 \pm 1.652 \times 10^4$ 、單核球 $34.50 \pm 2.754 \times 10^4$ ，另外，在 pre 組與 post 組各組部分其細胞量分別為 pre-FIP 組(總細胞量 $91.25 \pm 3.924 \times 10^4$ 、嗜伊紅性白血球 $25.75 \pm 3.326 \times 10^4$ 、淋巴球 $22.25 \pm 1.109 \times 10^4$ 、單核球 $43.25 \pm 1.750 \times 10^4$)、pre-MK 組(總細胞量 $113.3 \pm 2.496 \times 10^4$ 、嗜伊紅性白血球 $38.75 \pm 3.351 \times 10^4$ 、淋巴球 $26.25 \pm 1.109 \times 10^4$ 、單核球 $48.25 \pm 2.529 \times 10^4$)、pre-FM 組(總細胞量 $84.25 \pm 1.887 \times 10^4$ 、嗜伊紅性白血球 $19.25 \pm 0.8539 \times 10^4$ 、淋巴球 $23.00 \pm 1.291 \times 10^4$ 、單核球 $42.00 \pm 2.582 \times 10^4$)、pre-pred 組(總細胞量 $86.75 \pm 4.211 \times 10^4$ 、嗜伊紅性白血球 $26.25 \pm 2.496 \times 10^4$ 、淋巴球 $21.50 \pm 1.555 \times 10^4$ 、單核球 $39.00 \pm 2.677 \times 10^4$)；post-FIP 組(總細胞量 $106.0 \pm 2.160 \times 10^4$ 、嗜伊紅性白血球 $37.50 \pm 2.723 \times 10^4$ 、淋巴球 $27.00 \pm 0.8165 \times 10^4$ 、單核球 $41.50 \pm 1.190 \times 10^4$)、post-MK 組(總細胞量 $107.3 \pm 3.705 \times 10^4$ 、嗜伊紅性白血球 $36.75 \pm 5.836 \times 10^4$ 、淋巴球 $27.00 \pm 0.7071 \times 10^4$ 、單核球 43.50

$\pm 5.909 \times 10^4$)、post-FM 組(總細胞量 $93.75 \pm 1.931 \times 10^4$ 、嗜伊紅性白血球 $30.25 \pm 1.250 \times 10^4$ 、淋巴球 $24.00 \pm 1.080 \times 10^4$ 、單核球 $39.50 \pm 0.5000 \times 10^4$)、post-pred 組(總細胞量 $86.25 \pm 2.428 \times 10^4$ 、嗜伊紅性白血球 $25.50 \pm 2.661 \times 10^4$ 、淋巴球 $24.50 \pm 1.323 \times 10^4$ 、單核球 $36.25 \pm 1.548 \times 10^4$)，從這部分的結果我們亦可發現無論是 pre 組或 post 組的肺部細胞浸潤現象都相較於 PC 組都有減少的現象，而其中總細胞量及嗜伊紅性白血球的數量上無論是在 pre 或 post 的各組別上其細胞減少值較於 PC 組都有達統計上的顯著差異，此一部分的結果與急性期之小鼠細報計數結果相同。

➤ FIP-*fve*能降低小鼠血清及肺部沖洗液裡Th2 cytokine之表現

■ 急性期結果

利用 ELISA 來測定血清(圖 5a)及肺泡沖洗液(圖 5d)中 IL-4 的表現量。從血清部分的結果中可以明顯的看到 PC 組的 IL-4 比起 NC 組有較高的表現量且達統計上顯著差異($p = 0.0016$)，而此兩組 IL-4 表現量與 NC 組相比 pre-FIP 組未達統計上顯著差異($p = 0.149$)，而 post-FIP 組則有達統計上顯著差異($p = 0.042$)，另外，將口服 FIP-*fve* 之兩組與 PC 組的表現量相比此兩組皆有較低的 IL-4 表現量且達統計上顯著差異($p = 0.0003$; $p = 0.0003$)。而將 pre-FIP 組與 post-FIP 組兩組相比則發現 pre-FIP 組之 IL-4 表現量較低但未達統計上顯著意義($p = 0.4817$)。另外，從肺泡沖洗液的結果中亦可發現與血清結果相同的趨勢 PC 組的 IL-4 比起 NC 組有較高的表現量且達統計上顯著差異($p = 0.001$)，而此兩組 IL-4 表現量與 NC 組相比皆未達統計上顯著差異($p = 0.232$; $p = 0.41$)。

利用 ELISA 來測定血清(圖 5b)及肺泡沖洗液中 IL-5 (圖 5e)的表現量。從血清部分的結果中可以明顯的看到 PC 組的 IL-5 比起 NC 組有較高的表現量且達統計上顯著差異($p = 0.0043$)，而在 pre-FIP 組和 post-FIP 組的 IL-5 表現量與 NC 組相比皆高於 NC 組且達統計上顯著差異($p = 0.0057$, $p = 0.0043$)，而與 PC 組之表現量相比則有給予 FIP-*fve* 的兩組 IL-5 皆低於 PC 組且達統計上顯著差異($p = 0.0003$, $p = 0.0002$)。另外，從肺泡沖洗液之結果中則發現與血清測定相同之結果其 PC 組的 IL-5 比起 NC 組有較高的表現量且達統計上顯著差異($p = 0.0001$)，而在 pre-FIP 組和 post-FIP 組的 IL-5 表現量與 NC 組相比皆高於 NC 組且達統計上顯著差異($p = 0.018$, $p = 0.0036$)，而與 PC 組之表現量相比則有給予 FIP-*fve* 的兩組 IL-5 皆低於 PC 組且達統計上顯著差異($p = 0.036$, $p = 0.018$)。

利用 ELISA 來測定血清(圖 5c)及肺泡沖洗液(圖 5f)中 IL-13 的表現量。從血清部分的結果中可以明顯的看到 PC 組的 IL-13 比起 NC 組有較高的表現量且達統計上顯著差異($p = 0.001$)，另外，將口服 FIP-*fve* 之兩組與 PC 組的表現量相比此兩組皆有較低的 IL-13 表現量且達統計上顯著差異($p = 0.05$)。而將 pre-FIP 組與 post-FIP 組兩組相比則發現 pre-FIP 組之 IL-13 表現量較低但未達統計上顯著意義。另外，從肺泡沖洗液的結果中亦可發現與血清結果相同的趨勢 PC 組的 IL-13 比起 NC 組有較高的表現量且達統計上顯著差異($p = 0.001$)，而此兩組 IL-13 表現量與 NC 組相比皆未達統計上顯著差異。

■ 慢性期結果

利用 ELISA 來測定血清及肺泡沖洗液(圖 11)中由 Th2 細胞所分泌的細胞激素 IL-4、IL-5、IL-13 的表現量。無論是在血清部分亦或是 BALF 中所得的結果都可以明顯的看到 PC 組所產生之各種 Th2 細胞激素相較於 NC 組都是明顯增高的($p = 0.001$)，而其它給予口服各種藥物之致敏鼠，無論是 pre 或 post 之實驗進程給藥，其各組血清與 BALF 中所含有之 Th2 細胞激素相較於 PC 組皆有顯著減少 ($p > 0.001$)。

➤ FIP-*fve*能增加小鼠血清及肺部沖洗液裡Treg 、Th1 cytokine之表現

■ 急性期結果

利用 ELISA 來測定血清(圖 6a)及肺泡沖洗液(圖 6c)中 TGF- β 的表現量。首先從血清部分的結果中

可以明顯的看到 PC 組的 TGF- β 比起 NC 組有較高的表現量且達統計上顯著差異($p = 0.0031$)，而將 pre-FIP 組及 post-FIP 組與 PC 組之表現量相比時其表現量皆高於 PC 組且達統計上顯著差異($p = 0.0014$, $p = 0.0009$)。另外，在肺部沖洗液中的結果亦與血清中的結果相似，NC 組 TGF- β 表現量與 PC 組相比後 NC 組表現量明顯低於 PC 組且達統計上顯著差異($p = 0.0043$)；另外，將 pre-FIP 組和 post-FIP 組的 TGF- β 表現量與 PC 組相比其表現量皆高於 PC 組亦達統計上顯著差異($p = 0.0092$; $p = 0.023$)。將小鼠之血清(圖 6b)及肺部沖洗液(圖 6d)藉由 ELISA 來測定其中 IFN- γ 的表現量。從結果中可以明顯的看到 PC 組無論是在血清中或肺部沖洗液中的 IFN- γ 含量比起 NC 組皆有較低的表現量且達統計上顯著差異($p = 0.0016$, $p = 0.0016$)，而在 pre-FIP 組和 post-FIP 組的 IFN- γ 表現量部分，此兩組之 IFN- γ 表現量無論是在血清或肺部沖洗液中都較 PC 組高且達統計上顯著差異($\text{serum } p = 0.0003/0.0002$; $\text{BALF } p = 0.0003/0.0002$)。

■ 慢性期結果

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

➤ FIP-fve 能有效減少小鼠呼吸道之發炎現象

■ 急性期結果

根據這部份小鼠肺臟病理切片(圖 7)的結果顯示，首先在圖 7a 的部份為 NC 組，即所有用藥皆以生理食鹽水代替，由這部份的資料顯示控制組小鼠之呼吸道未有明顯呼吸道發炎的現象。在圖 7b 的部份則為 PC 組，從這部份的病理切片顯示相較於控制組，PC 組的小鼠呼吸道有明顯呼吸道發炎的現象產生。圖 7c 為 pre 組從病理切片的結果顯示，pre 組小鼠呼吸道發炎的現象相較於 PC 組有較輕微的現象產生。另外，在圖 7d 的部份為 post 組，此組織小鼠呼吸道發炎現象相較於 PC 組亦有較輕微的現象產生，但相較於 pre 組則發炎現象的差異並不明顯；而這部份的結果與氣道阻力(AHR)所獲得的結果相符。

■ 慢性期結果

根據這部份小鼠肺臟病理切片(圖 14)的結果顯示，圖 14a 為慢性致敏組之 NC 組，即所有用藥皆以生理食鹽水代替，圖 14b 的部份則為慢性致敏組之 PC 組，圖 14c 為慢性致敏組之 pre-fve 組，圖 14d 則為慢性致敏組之 pre-MK 組，圖 14e 則為慢性致敏組之 pre-FM 組，圖 14f 則為慢性致敏組之 pre-pred 組，圖 14g 則為慢性致敏組之 post-fve 組，圖 14h 則為慢性致敏組之 post-MK 組，圖 14i 則為慢性致敏組之 post-FM 組，圖 14j 則為慢性致敏組之 post-pred 組。pre 與 post 給予各種藥物之致敏小鼠其呼吸道發炎的現象相較於 PC 組皆有較輕微的現象產生；而這部份的結果與氣道阻力(AHR)所獲得的結果相符，此部份結果與急性期結果是相同的。

➤ FIP-fve 小鼠血清及肺部沖洗液之 MMP9、MMP3 之表現量

利用 ELISA 來測定血清及肺泡沖洗液中 MMP9 的表現量(圖 13a)。首先從血清部分的結果中可以明顯的看到 PC 組的 MMP9 比起 NC 組有較高的表現量且達統計上顯著差異($p = 0.001$)，而將 pre-FIP 組及 post-FIP 組與 PC 組之表現量相比時其表現量皆低於 PC 組且達統計上顯著差異。另外，在肺部沖洗液中的結果亦與血清中的結果相似，NC 組 MMP9 表現量與 PC 組相比後 NC 組表現量明顯低於 PC 組且達統計上顯著差異($p = 0.05$)；另外，將 pre-FIP 組和 post-FIP 組的 MMP9 表現量與 PC 組相比其表

現量皆高於 PC 組亦達統計上顯著差異。

將小鼠之血清及肺部沖洗液藉由 ELISA 來測定其中 MMP3 的表現量(圖 13b)。從血清部分的結果中可以明顯的看到 PC 組的 MMP3 比起 NC 組有較高的表現量且達統計上顯著差異($p = 0.001$)，而將 pre-FIP 組及 post-FIP 組與 PC 組之表現量相比時其表現量皆高於 PC 組且達統計上顯著差異。另外，在肺部沖洗液中的則無法偵測到 MMP3 之相關結果。

六、討論

氣喘是一種複雜的慢性呼吸道發炎疾病，在現今的社會裏其盛行率更不斷的向上攀升(2, 3)，然而目前臨床上有許多針對氣喘疾病的治療藥物如吸入性類固醇(corticosteroids)、 β 2型交感神經興奮劑(β 2-agonist)、茶鹼(theophylline)和白三烯素拮抗劑 (leukotriene antagonists)等。其中以吸入性類固醇為最有效控制氣喘及改善肺功能的方法，但這些藥物不論是單獨使用或合併其他治療，除了具有副作用外，也常無法達到將疾病根治的效果(27)。另外，導致氣喘疾病的原因目前主要被認同的原因是免疫機致不平衡所致(27, 28)，氣喘疾病的病理變化上主要有肺部嗜伊紅性白血球的浸潤、黏膜水腫、黏液的過度分泌以及呼吸道的過度反應且在長期氣喘的狀態下，呼吸道會產生杯狀細胞、平滑肌肉組織、血管等增生的呼吸道重塑現象，因而增加控制氣喘的困難度(29, 30)。

根據先前的研究(30)指出過敏原的暴露可能會使得Th1/Th2免疫機制的平衡發展有所改變且免疫系統可能會趨向Th2反應，而臨床上Th1/Th2失衡可能會產生過敏或氣喘等症狀。研究中指出(30)Th1和Th2分化前是來自於同樣的先驅T細胞，其皆來自於naïve CD4 T淋巴細胞，隨著環境的刺激後分化成Th1或Th2細胞。Th2細胞的分化可能是因為環境過敏原或微生物刺激了原本已存在的IL-4而使得naïve Th細胞朝向Th2發展，被活化的Th2細胞會產生interleukin(IL) -4、IL-5、IL-13，而伴隨而來的反應是促使B細胞產生IgE、嗜伊紅性白血球的活化以及黏液的產生(31, 32)。此外當naïve Th細胞受到IL-12刺激後便會朝向Th1的方向發展，而被活化的Th1細胞則會分泌出IFN- γ 。

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

近幾年來兒童過敏性疾病的盛行率日漸增加且特別是在工業化國家(33-36)，而為了改善這樣的現象可能需要減少兒童對於過敏原的暴露以及更好的感染控制以減少過敏性疾病的發生(37-41)。根據研究(30)亦指出減少微生物的暴露可以減低T細胞朝向Th2細胞的發展，但微生物的暴露是否為主要造成T細胞朝向Th2細胞發展的主因仍須進一步研究。在過敏性發炎中會產生Th2細胞激素其包含IL-4、IL-13和IL-5且伴隨而來的反應則有嗜伊紅性白血球的活化以及IgE的產生，而Th1細胞中所分泌之IFN- γ 被認為可以調節Th2細胞之免疫反應，且IFN- γ 不僅可以抑制Th2細胞產生的IL-4而且還可以抑制IL-4對B細胞的作用，特別是在抑制B細胞產生IgE的部分。

在國人及日本人的日常飲食中金針菇是一種常見的食品，且近年來研究顯示藉由金針菇所萃取出來的免疫調節蛋白對於人類週邊淋巴球細胞及小鼠皮臟細胞有刺激增殖活性，並可誘發增強免疫細胞中的細胞激素增生如IL-2與IFN- γ ，且可減少發炎時的水腫現象(42)。因此，本研究利用雞卵蛋白(OVA)所誘發的小鼠氣喘模型來研究金針菇萃取物(FIP-*fve*)，是否能藉由其增強細胞激素的能效來逆轉免疫調控不平衡的動物氣喘模式並期待能達到預防或治療的目的。

根據研究結果顯示，相較於單純接受OVA致敏之小鼠而言，口服FIP-*fve*能有效減緩致敏小鼠之呼吸道過度反應的現象，且不論是於實驗進程的前14天給予口服FIP-*fve*之致敏小鼠或實驗進程後14天給予口服FIP-*fve*之致敏小鼠，其皆能有效降低致敏小鼠之呼吸道過度反應的現象。另外，在肺部組織病

理切片的部份，根據研究結果亦能發現有給予口服FIP-*fve*之致敏小鼠，其支氣管壁發炎現象有獲得明顯的改善，而這樣的結果也與先前研究指出FIP-*fve*可以減少發炎反應的表現一致(22)，根據上述FIP-*fve*除了能降低呼吸道過度反應的現象外亦能達到減緩支氣管發炎的狀態，因此在未來治療氣喘的發展上FIP-*fve*可望能用做有效治療氣喘的天然藥物。而在FIP-*fve*對細胞浸潤的影響從細胞計數的結果可發現口服FIP-*fve*之致敏小鼠其細胞浸潤的現象也有明顯減少，特別是在嗜伊紅性白血球的部份，另外，口服FIP-*fve*亦能使浸潤於肺部之總細胞量有明顯減少的現象，其可能是透過IL-5造成嗜伊紅性白血球的凋亡(43)而減少了其在肺部中的浸潤現象。

在細胞激素方面，根據先前的研究指出FIP-*fve*具有使IFN- γ 增加的效果(42)，而這在本研究中也發現有給予口服FIP-*fve*之致敏小鼠中，其細胞激素中的IFN- γ 含量亦有增加的現象，而在單純給予OVA致敏的小鼠中其IFN- γ 的含量則是相當的低，這樣的結果也與臨床上之氣喘病人具有較低含量的IFN- γ 相符(44, 45)，此外根據其他相關之研究結果(46-48)也顯示IFN- γ 的增加是可以抑制Th2細胞激素的分泌以使之降低呼吸道發炎等現象。另外，在IL-4的部分，口服FIP-*fve*亦能有效的降低IL-4在血清及BALF中的含量，但對於單純給予OVA的致敏小鼠而言其IL-4在血清及BALF中的含量是較高的，而這在先前的研究中亦有提到氣喘產生與較高的IL-4含量是有相關的，因為IL-4可以結合到B細胞上的受器，促進B細胞產生IgE (8, 11)，所以可能是因為口服FIP-*fve*減少了IL-4的產生而使得的呼吸道過度反應及呼吸道發炎程度降低。而在TGF- β 的部分，根據先前研究指TGF- β 對於呼吸道過度反應以及氣喘狀態具有負回饋的作用，意即在產生呼吸道過度反應及氣喘的狀態下TGF- β 也會伴隨著產生然而當TGF- β 的含量過多時便會對於過敏發炎相關的細胞產生抑制生長的現象(17-20)，而在本研究中我們發現口服FIP-*fve*小鼠血清中的TGF- β 濃度有明顯增加現象，而服用FIP-*fve*的致敏小鼠亦有明顯減低致敏發炎症狀，因此我們亦認為TGF- β 在呼吸道過度反應現象以及氣喘疾病上扮演著重要角色。

在血清部分的結果，根據OVA-specific antibodies的檢測顯示，單純給予OVA致敏的小鼠中其IgE的含量是相當高的，而這也與臨床上氣喘病人之血清中具有的高IgE含量的特徵是一致的(13)，而我們也能發現到有給予口服FIP-*fve*之致敏小鼠其血清中之IgE含量則有明顯減少的現象，且根據先前的研究中(11)指出細胞激素中的IFN- γ 可以抑制Th2細胞的分化及IgE的合成，且在臨床上被診斷有氣喘疾病的病患亦有較低的IFN- γ 表現量(49,50)，因此本篇研究的結果口服FIP-*fve*所產生較高的IFN- γ 是可能具有抑制IgE產生的療效，而在IgG2a部分口服FIP-*fve*無論是前或後給予都能使得血清中的IgG2a表現量有明顯的升高。

另外，研究中發現，在致敏進程的第1天到第14天給予口服FIP-*fve*對於減少支氣管發炎現象及呼吸道過度反應的現象會比致敏進程中的第14天到第27天給予口服FIP-*fve*的小鼠有較好的效果，雖然無論是前或後給予口服FIP-*fve*都具有減緩的效果但根據研究結果顯示口服FIP-*fve*在預防上的效果可能會更好。

根據先前的研究指出，口服FIP-*fve*對於食物引起的過敏具有抑制的現象，口服FIP-*fve*可能可以使得T細胞朝向Th1發展進而影響過敏免疫反應，而這樣結果可能對於食物過敏或其他免疫疾病能有預防或治療的效果(51)。另外，先前研究亦提到口服FIP-*fve*能夠有效的抑制血清中IgE含量的產生(51)，而本研究的結果也於先前研究相符；此外有研究更進一步探討FIP-*fve*對於T細胞分子調控機制上的影響，FIP-*fve*此蛋白可以藉由口服方式來服用且保持其活性但其他蛋白質藥物無法如此使用，也因此使得FIP-*fve*可以刺激體內免疫反應的活化，但其更進一步的詳細機制仍需要深入研究(51)。

另外，目前對氣喘及其他過敏性疾病的研究，可能的方向是致力於以各種可能的微生物(如益生菌)來刺激Th1細胞來抑制Th2細胞的發展所形成的疫苗或藥物(52, 53)，但對於這些以微生物所發展出來的疫苗或藥物可能較有安全性上的考量，而FIP-*fve*是由金針菇所萃取獲得因此以口服FIP-*fve*作為預防性藥物可能較具有優勢(54, 55)。

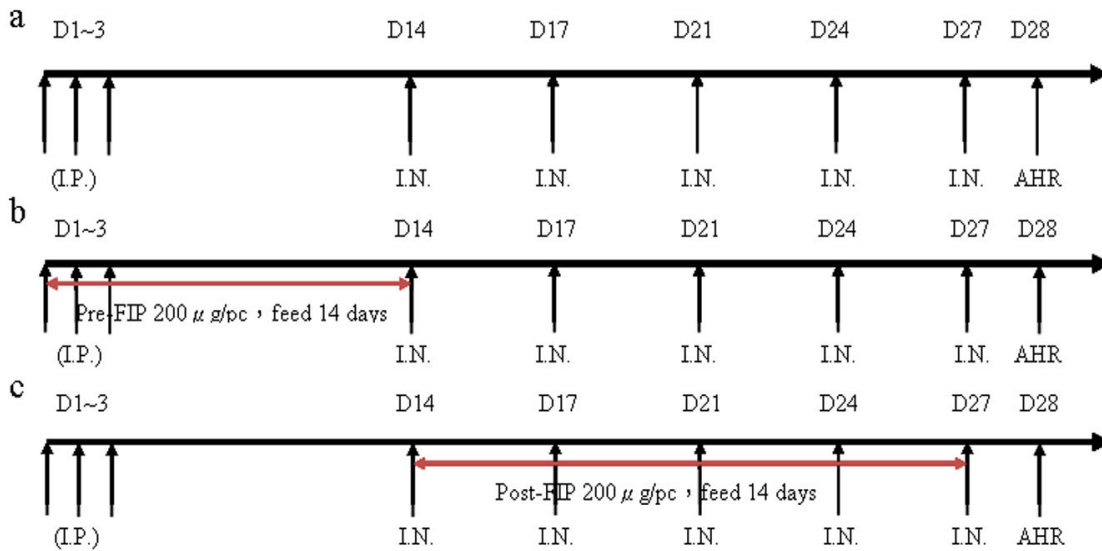
目前臨床上對於氣喘或過敏疾病上的用藥多以干擾素為主但這些藥物多少都具有副作用(56)，然而在本篇研究中雖有發現口服FIP-*five*之小鼠雖有體重減輕之狀況但此現象在停止用藥後便會解除(結果未顯示)且未觀察到任何影響致敏小鼠之其他生理狀況且在其他生化檢測值上並未發現與未使用FIP-*five*之小鼠具有明顯差異，而關於體重減輕及回復的現象亦在其他關於FIP-*five*之研究發現(51)但此狀況亦無對研究造成明顯差異。

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

急慢性動物致敏小鼠實驗結果與圖表

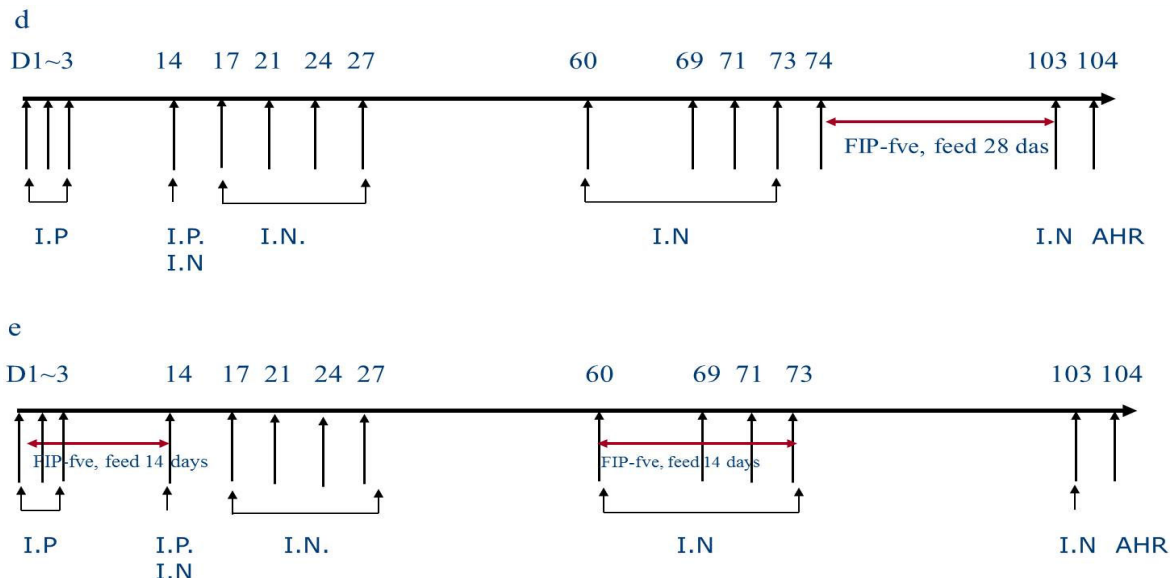
圖 1 小鼠致敏流程.

✓ 急性期致敏流程



以 OVA 進行小鼠進行致敏之流程。於第 1~3 天及第 14 天給予腹腔注射(intraperitoneal, I.P.)分別給予生理食鹽水或雞卵蛋白 OVA，並於第 14、17、21、24、27 天以鼻腔投藥(intranasal, I.N.)方式給與生理食鹽水或 3%雞卵蛋白。第 28 天進行呼吸道過度反應測試(airway hyperresponsiveness, AHR)，於 AHR 測試完成後 24 小時內犧牲(第 29 天)。此外並於致敏流程進行的第 1 至 14 天(圖 1b)或第 14 至 27 天(圖 1c)每天以胃管灌食方式給予 FIP-fve，使用劑量為每隻小鼠 200 μ g。

✓ 慢性期致敏流程

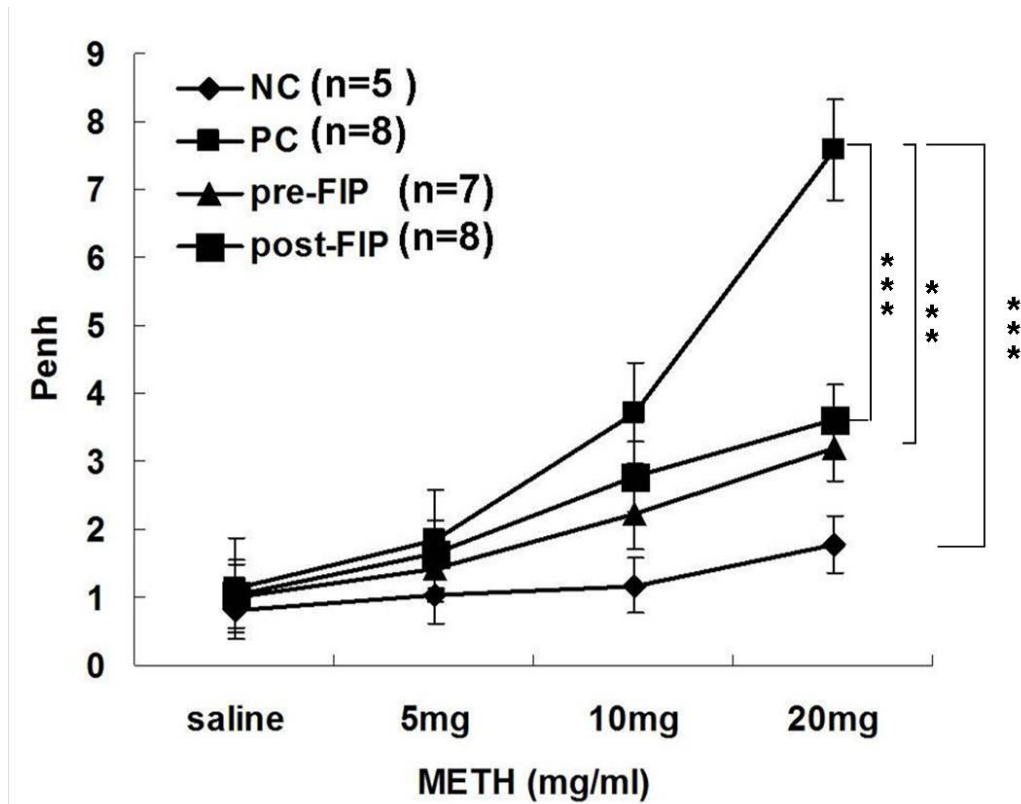


慢性致敏流程。於第 1~3 天及第 14 天給予腹腔注射(intraperitoneal, I.P.)分別給予生理食鹽水或雞卵蛋白 OVA，並於第 14、17、21、24、27、60、69、71、73、74、103 以鼻腔投藥(intranasal, I.N.)方式給與生理食鹽水或 3%雞卵蛋白，並於第 104 天進行呼吸道過度反應測試(airway hyperresponsiveness, AHR)，於 AHR 測試完成後 24 小時內犧牲(第 105 天)。此外並於致敏流程進行的第 1 至 14 天及第 60 到 73 天(圖 1d)或第 74 天至 103 天(圖 1e)，每天以胃管灌食方式給予 FIP-fve，使用劑量為每隻小鼠 200 μ g。

各組實驗結果圖示

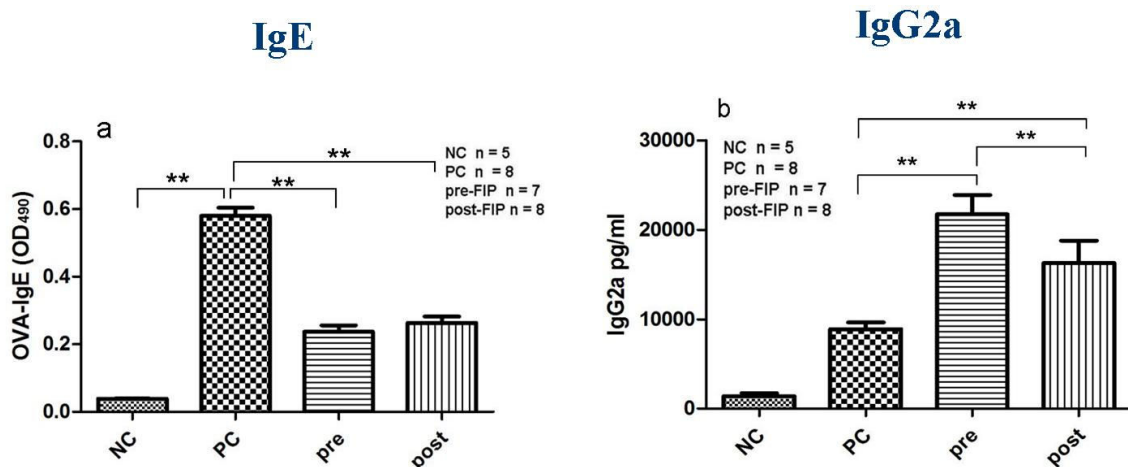
✓ 急性期結果

圖 2. AHR (呼吸道過度反應)於各組別中的表現情形



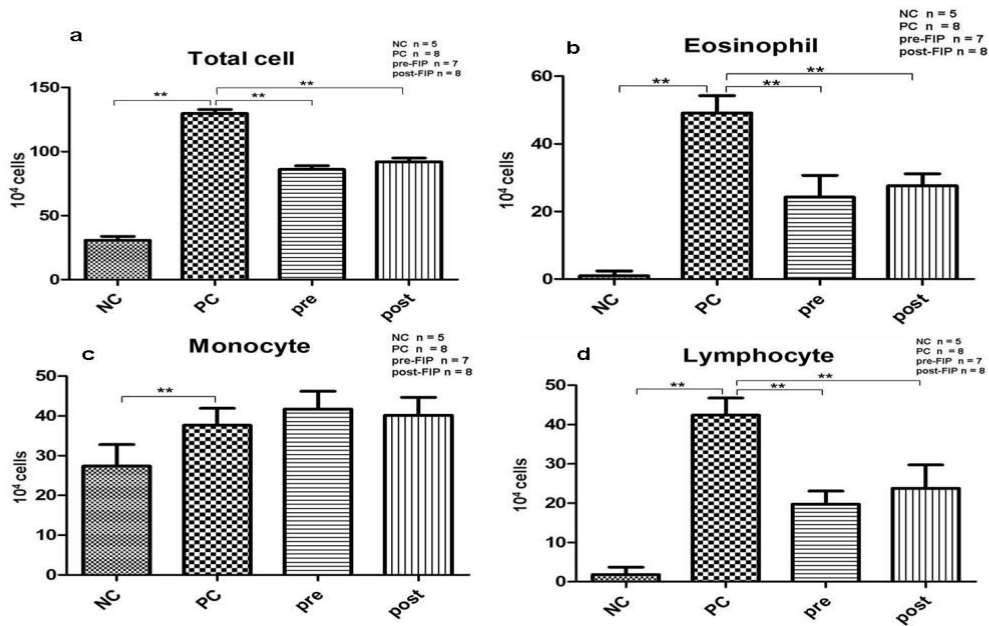
測定前先給予小不同濃度之methacholine蒸氣，其methacholine給予量分別為0、5mg、10mg、20mg，隨後偵測在各劑量中小鼠之Penh值。 (***)為 $p \leq 0.001$ ，顯著差異的結果皆為各組與PC組比較獲得)。

圖 3. IgE 與 IgG2a 於各組小鼠血清中之表現量



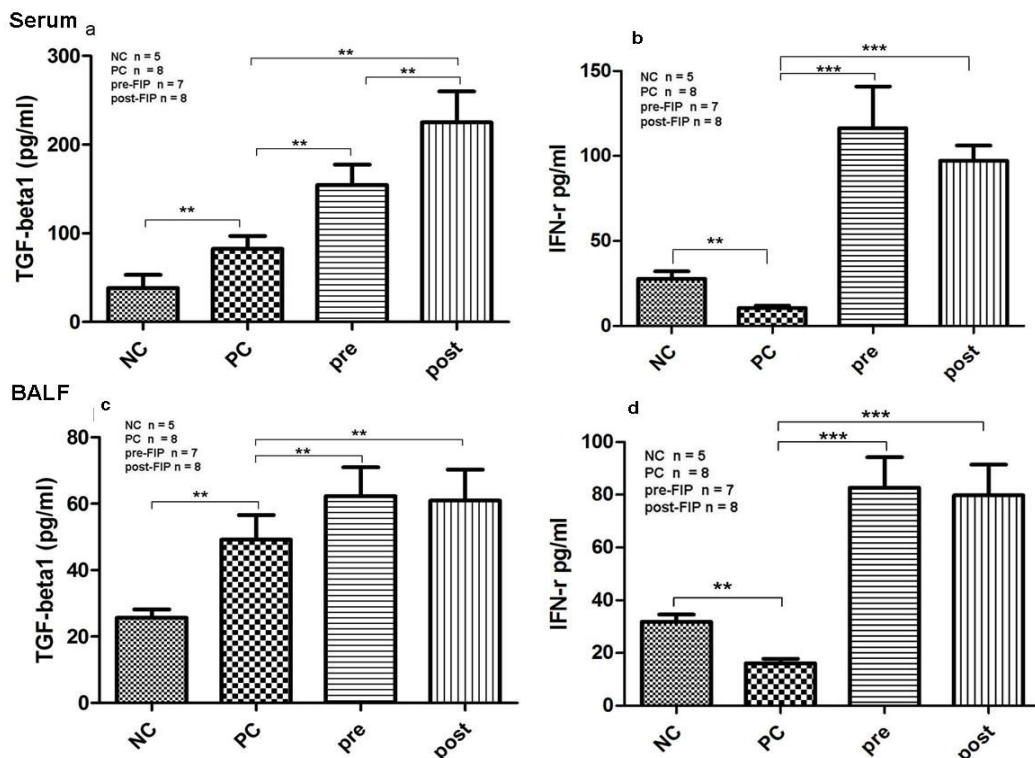
於犧牲小鼠當天採集小鼠血液並離心取得血清，以ELISA進行偵測。圖3a為各組血清中IgE表現量，圖3b則為各組IgG2a之表現量。數據皆以mean ± SE呈現。 (**為 $p \leq 0.01$ ，顯著差異的結果皆為各組與PC組比較獲得)。

圖 4. 各種發炎細胞於各組小鼠肺泡中洗中之表現量 (10^4)



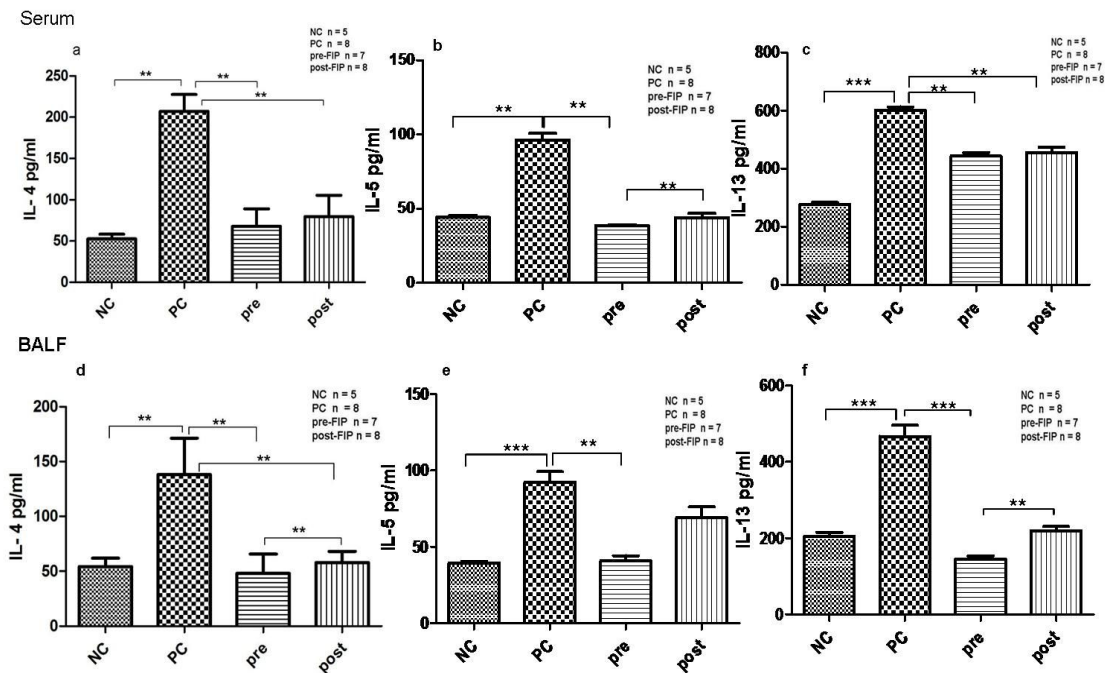
於犧牲小鼠後以生理食鹽水沖洗各組小鼠之肺泡，在將肺泡沖洗液中的細胞藉由 cytopspin 離心將細胞打在玻片上，以 Liu's stain 進行染色並計數細胞。數據皆以 mean \pm SE 呈現。(**為 $p \leq 0.01$ ，顯著差異的結果皆為各組與 PC 組比較獲得)。

圖 5. Th1 and Treg cytokne ($IFN-\gamma$, $TGF-\beta$)在各組小鼠血清與 BALF 中之表現量



於犧牲小鼠當天採集小鼠血液並離心取得血清，以 ELISA 進行偵測。圖 5a/b 為各組血清中 $IFN-\gamma$, $TGF-\beta$ 表現量，圖 5c/d 則為各組 BALF 中 $IFN-\gamma$, $TGF-\beta$ 之表現量。數據皆以 mean \pm SE 呈現。(**為 $p \leq 0.01$ ，顯著差異的結果皆為各組與 PC 組比較獲得)。

圖 6. Th2 (IL-4, IL-5, IL-13)在各組小鼠血清與 BALF 中之表現量



於犧牲小鼠當天採集小鼠血液並離心取得血清，以 ELISA 進行偵測。

圖 6a/b/c 為各組血清中 IL-4, IL-5, IL-13 表現量，圖 6d/e/f 則為各組 BALF 中 IL-4, IL-5, IL-13 之表現量。數據皆以 mean \pm SE 呈現。(**為 $p \leq 0.01$ ，顯著差異的結果皆為各組與 PC 組比較獲得)。

圖 7. 各組別小鼠之病理切片圖

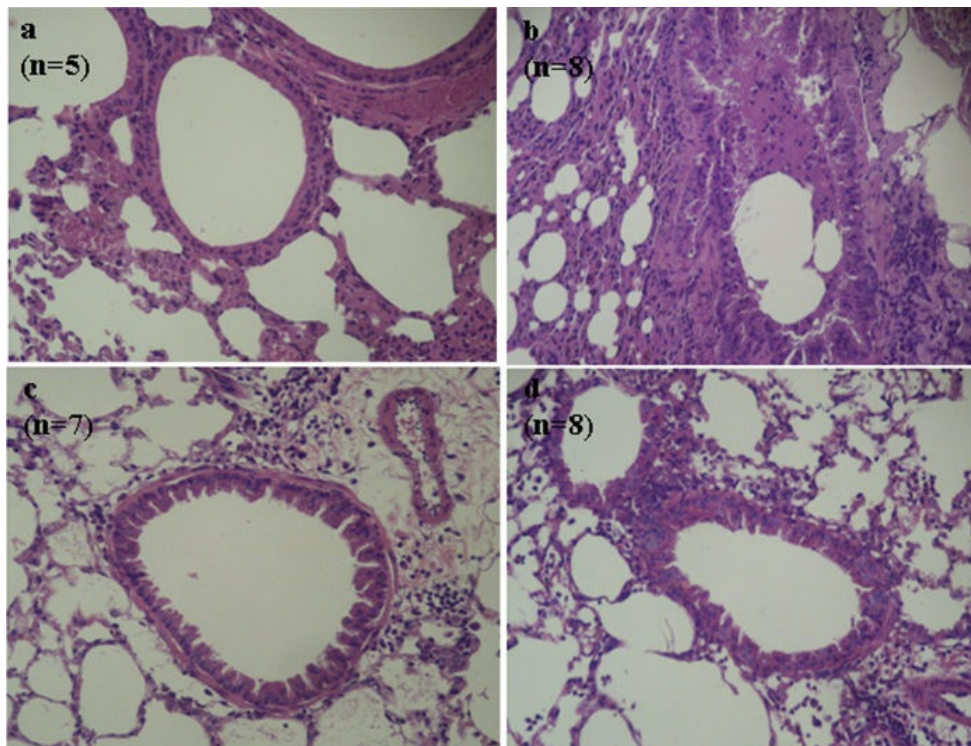
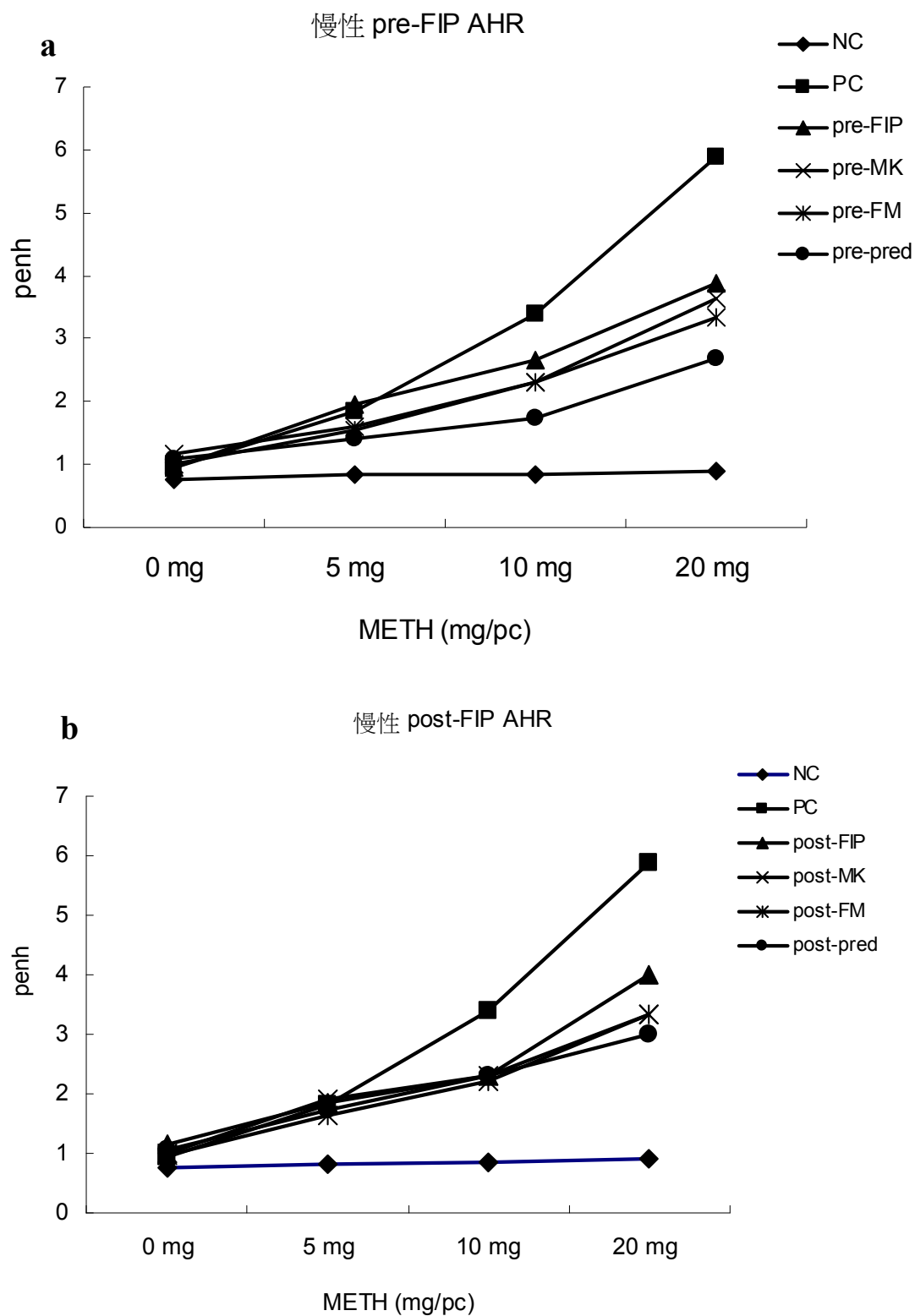


圖 a 為 NC 組，即所有用藥皆以生理食鹽水代替，圖 b 的部份則為 PC 組，圖 c 為 pre 組，而圖 d 則為為 post 組。以上切片製作皆在取得小鼠肺臟後徹底浸泡於 10% 之福馬林中，而後精蠟塊製做步驟後切片以 H&E 染色。

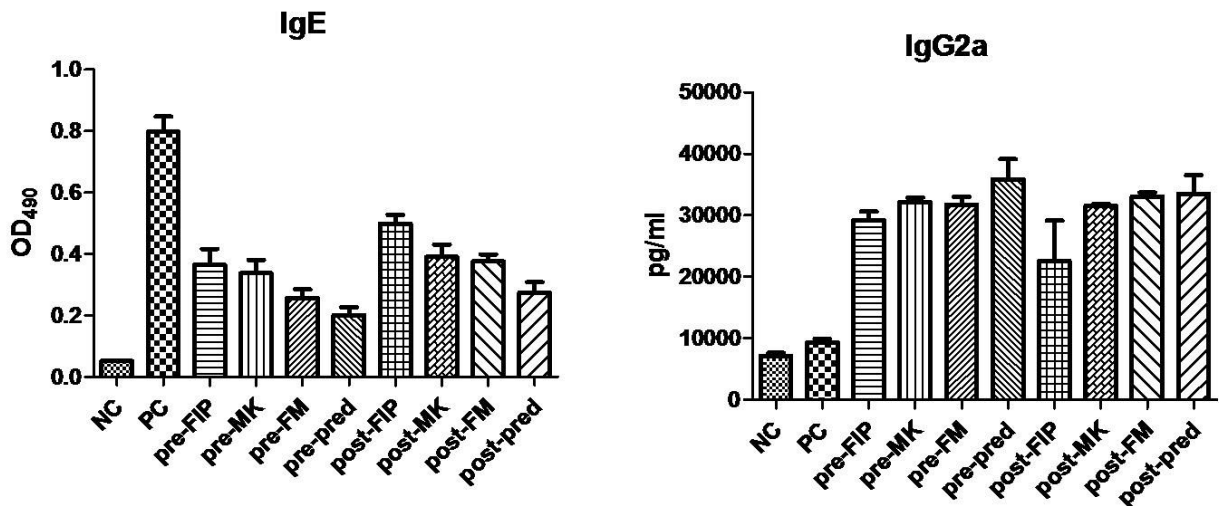
✓ 慢性期結果

圖 8. AHR (呼吸道過度反應)於各組別中的表現情形



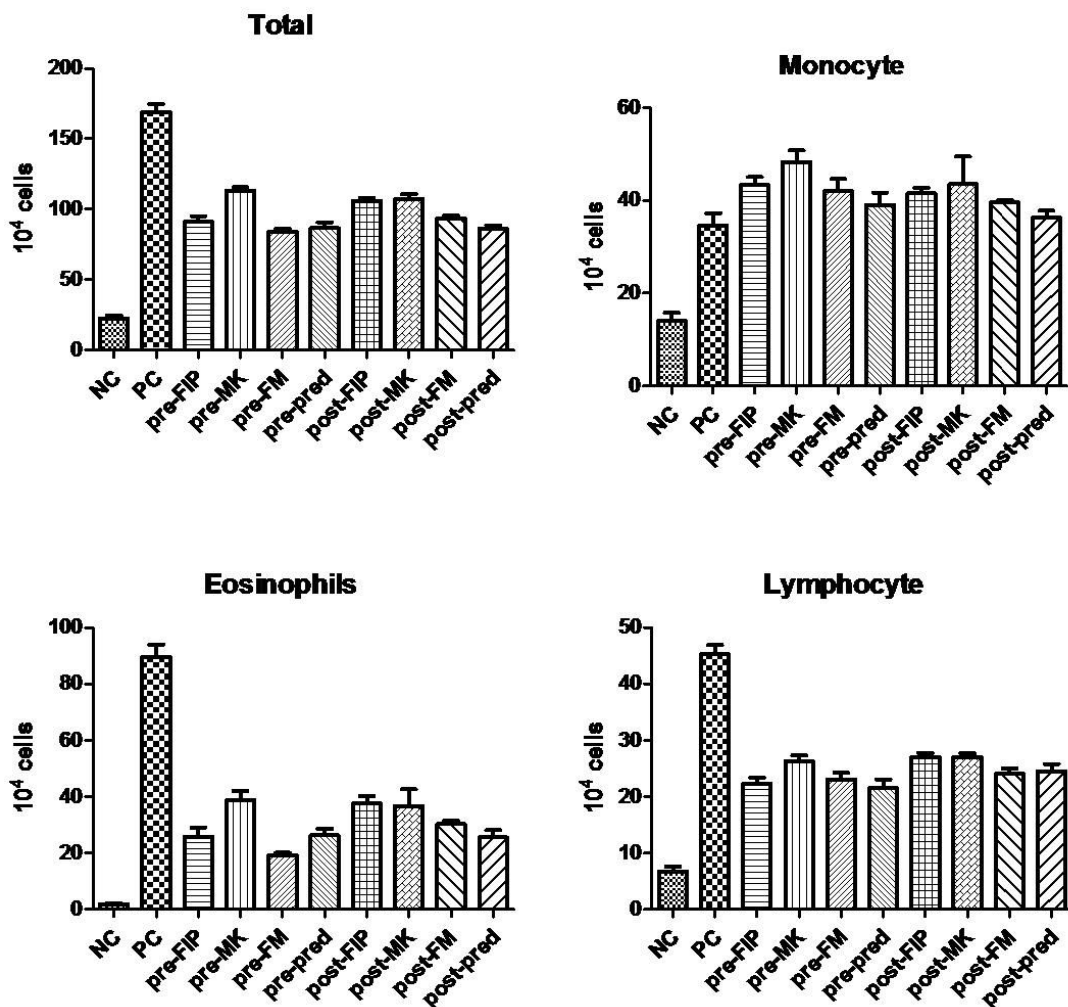
測定前先給予小不同濃度之methacholine蒸氣，其methacholine給予量分別為0、5mg、10mg、20mg，隨後偵測在各劑量中小鼠之Penh值。

圖 9. IgE 與 IgG2a 於各組小鼠血清中之表現量



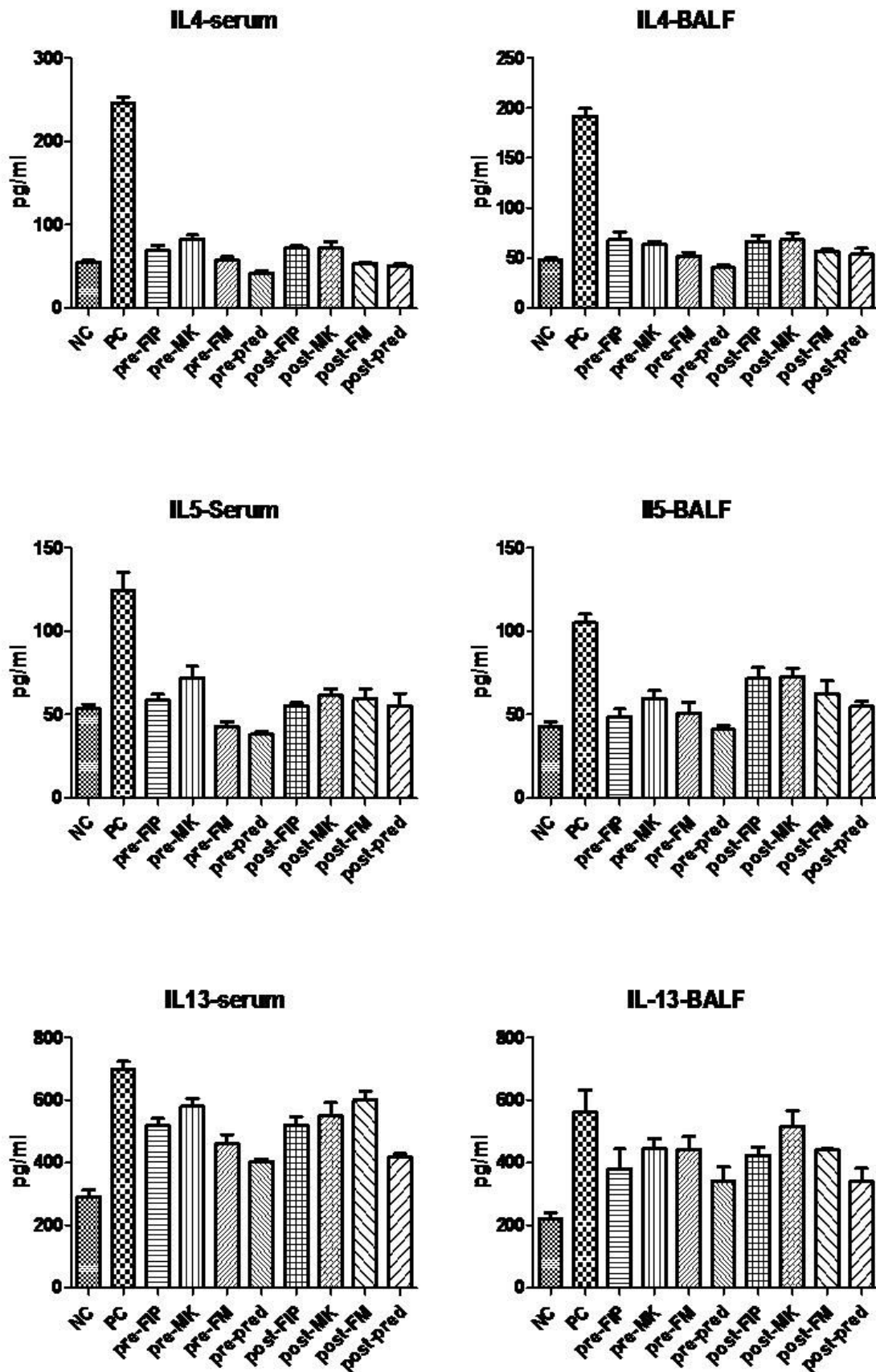
於犧牲小鼠當天採集小鼠血液並離心取得血清，以 ELISA 進行偵測。圖 3 為各組血清中 IgE/IgG2a 表現量。數據皆以 mean \pm SE 呈現。

圖 10. 各種發炎細胞於各組小鼠肺泡中洗中之表現量 (10^4)



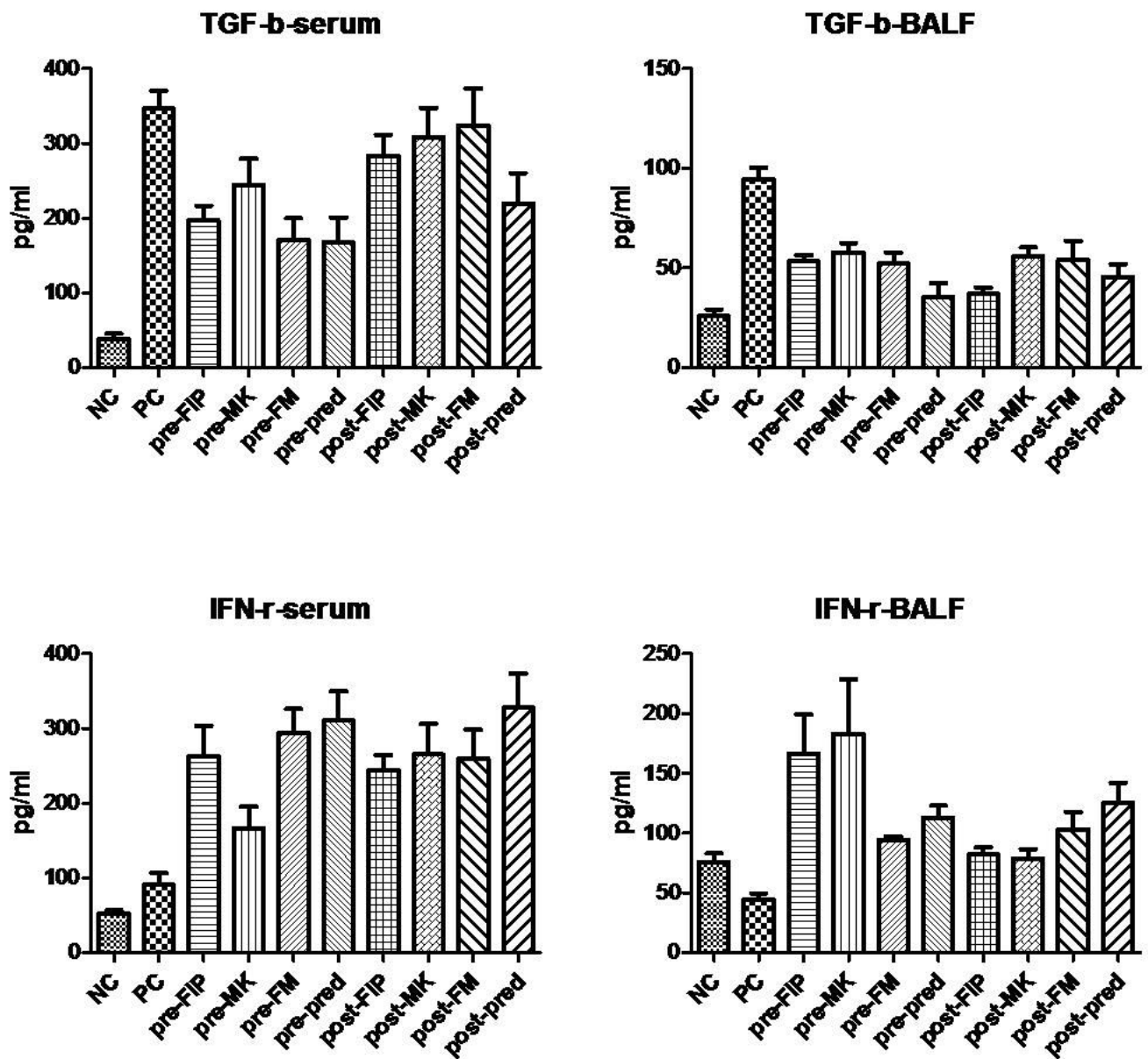
於犧牲小鼠後以生理食鹽水沖洗各組小鼠之肺泡，在將肺泡沖洗液中的細胞藉由 cytopsin 離心將細胞打在玻片上，以 Liu's stain 進行染色並計數細胞。數據皆以 mean \pm SE 呈現。

圖 11. Th2 (IL-4, IL-5, IL-13)在各組小鼠血清與 BALF 中之表現量



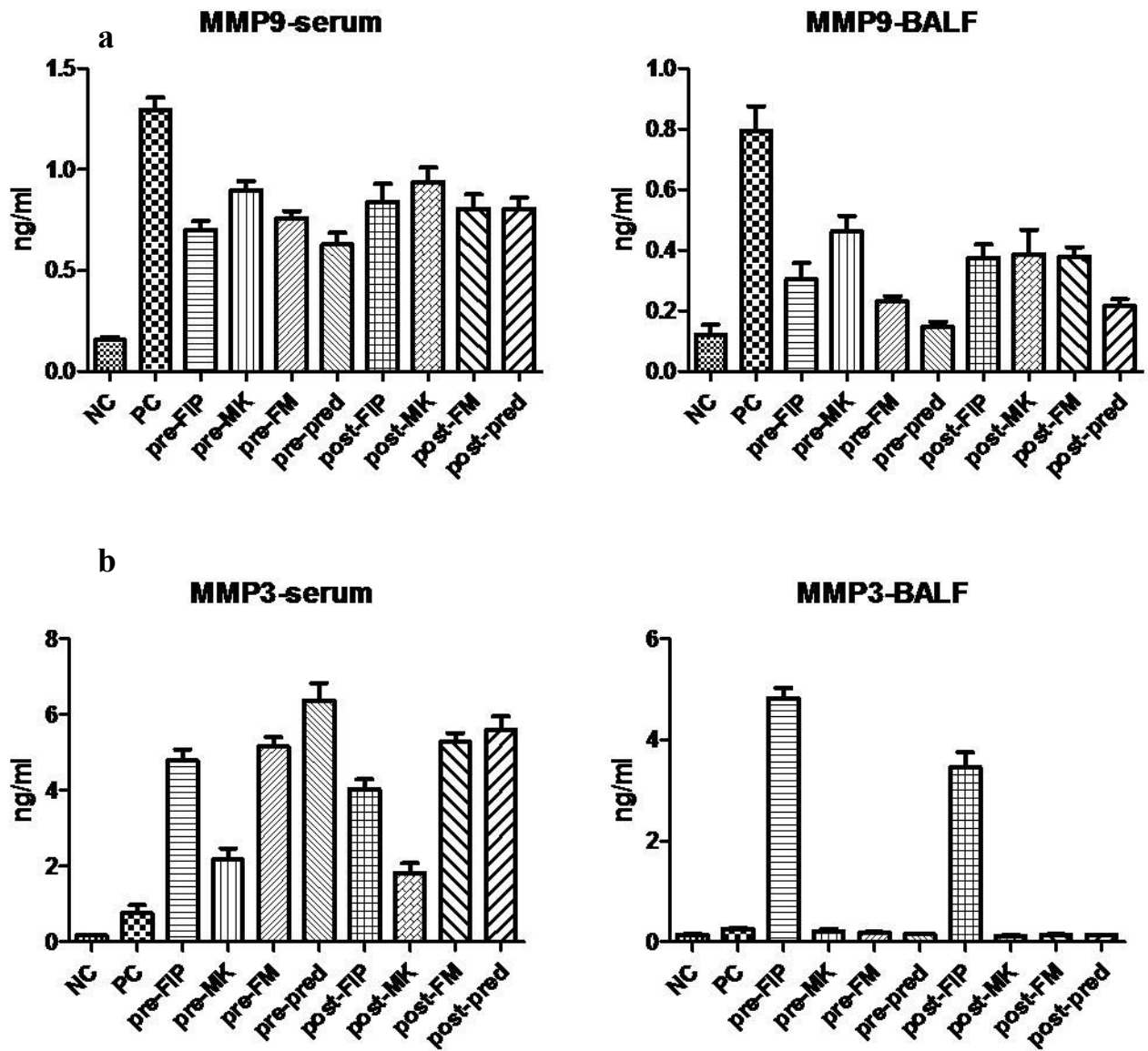
於犧牲小鼠當天採集小鼠血液並離心取得血清，以 ELISA 進行偵測。
圖 11 為各組血清與 BALF 中 IL-4, IL-5, IL-13 之表現量。

圖 12. Th1 and Treg cytokine (IFN- γ , TGF- β)在各組小鼠血清與 BALF 中之表現量



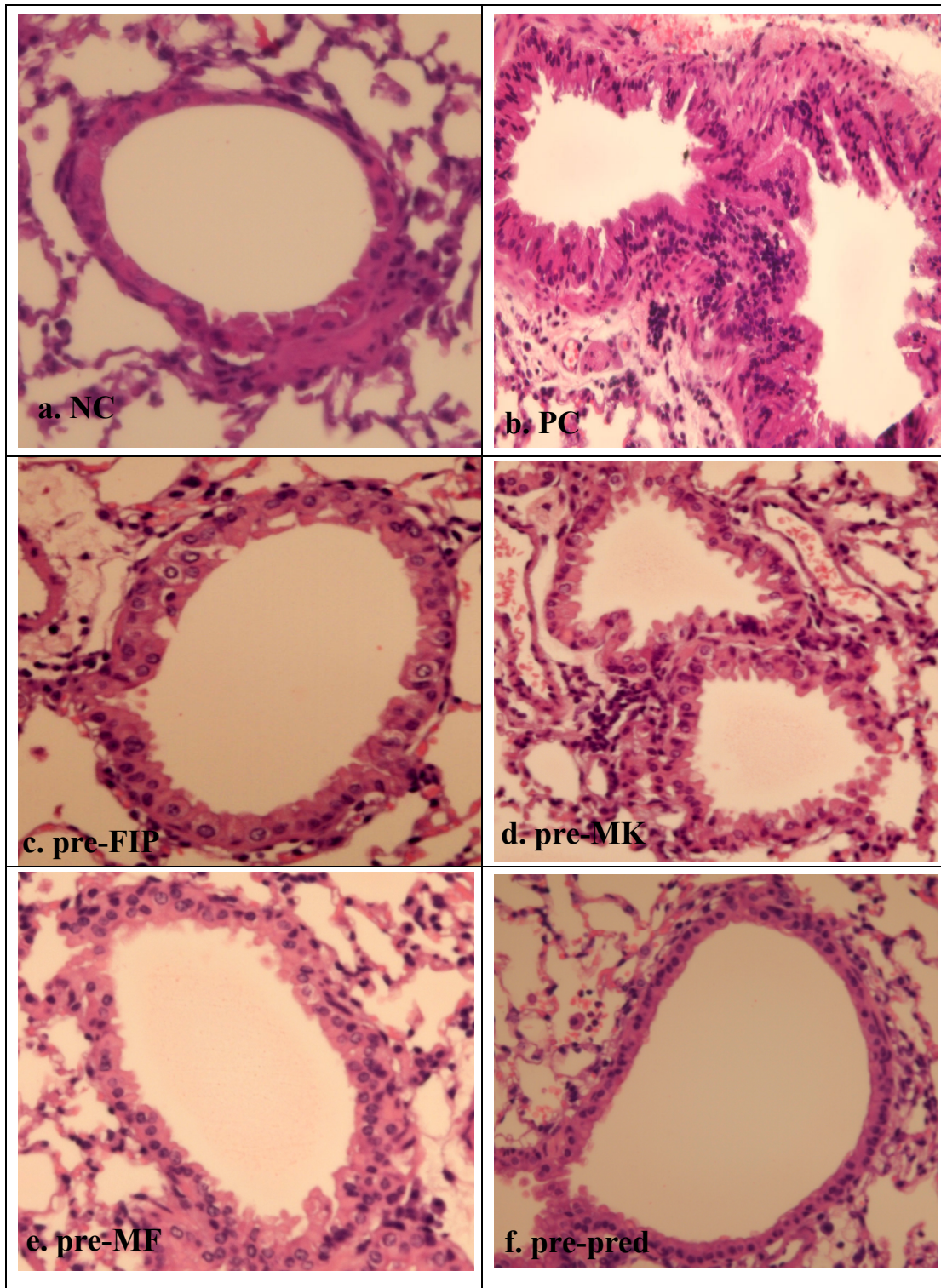
於犧牲小鼠當天採集小鼠血液並離心取得血清，以 ELISA 進行偵測。
圖 12 為各組血清與 BALF 中 IFN- γ , TGF- β 之表現量。

圖 13. 各組小鼠之 MMP9、MMP3 之表現量



於犧牲小鼠當天採集小鼠血液並離心取得血清，以 ELISA 進行偵測。
圖 13 為各組血清與 BALF 中 MMP9, MMP3 之表現量。

圖 14. 各組小鼠之病理切片圖



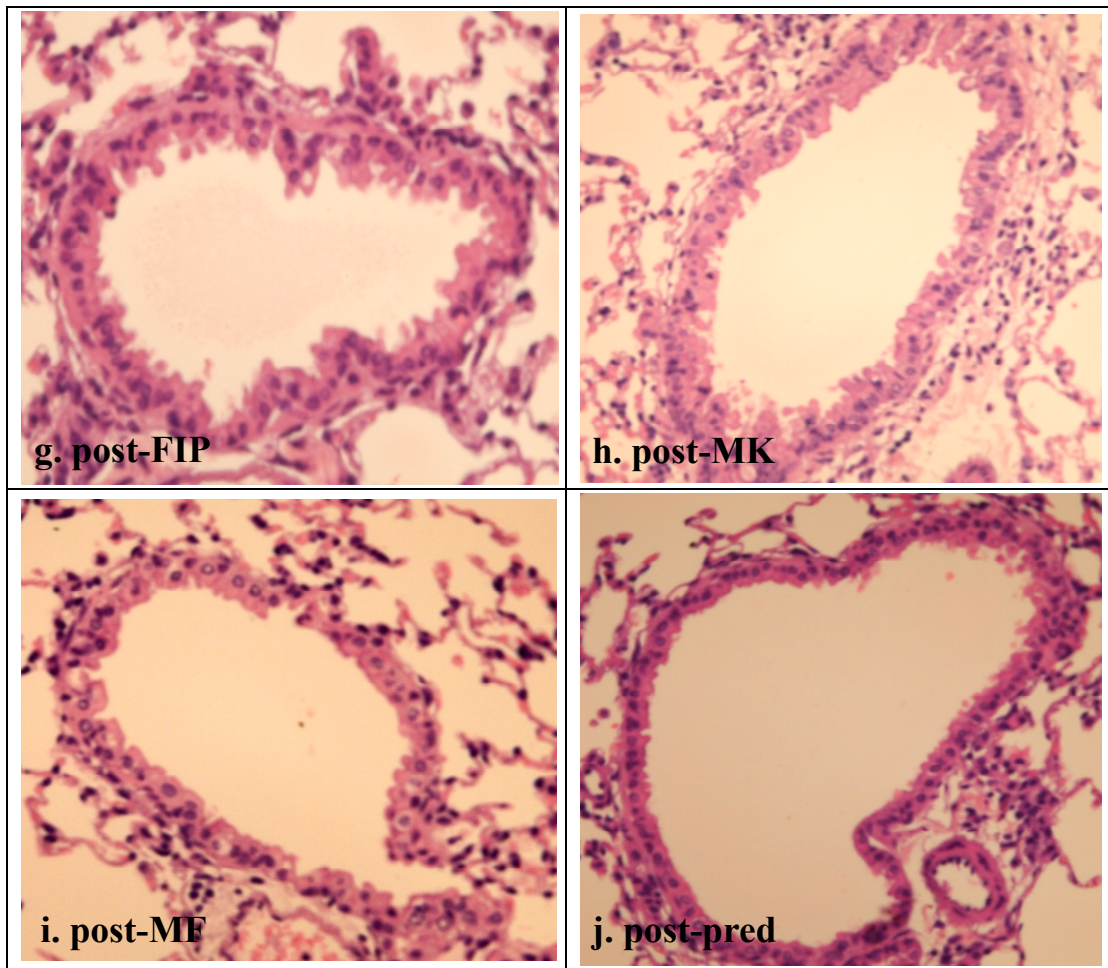


圖 14a 為慢性致敏組之 NC 組，即所有用藥皆以生理食鹽水代替，圖 14b 的部份則為慢性致敏組之 PC 組，圖 14c 為慢性致敏組之 pre-fve 組，圖 14d 則為慢性致敏組之 pre-MK 組，圖 14e 則為慢性致敏組之 pre-FM 組，圖 14f 則為慢性致敏組之 pre-pred 組，圖 14g 則為慢性致敏組之 post-fve 組，圖 14h 則為慢性致敏組之 post-MK 組，圖 14g 則為慢性致敏組之 post-FM 組，圖 14i 則為慢性致敏組之 post-FM 組，圖 14j 則為慢性致敏組之 post-pred 組。以上切片製作皆在取得小鼠肺臟後徹底浸泡於 10% 之福馬林中，而後精蠟塊製做步驟後切片以 H&E 染色。

七、參考文獻

1. 行政院衛生署網站 <http://www.doh.gov.tw/>
2. Hsieh KH, Shen JJ. Prevalence of childhood asthma in Taipei, Taiwan, and other Asian Pacific countries. *J Asthma*. 1988; 25(2): 73-82.
3. 謝貴雄. 小兒氣喘病之預防和處理。中華民國小兒科醫學會雜誌， 1995; 36(B): 9-20。
4. Chung, K. F., and Barnes, P. J. Cytokines in asthma. *Thorax* 1999; 54:825-857.
5. Pin, I., Gibson, P. G., Kolendowicz, R., Girgis-Gabardo, A., Denburg, J. A., Hargreave, F. E., and Dolovich, J. Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992;47: 25-29.
6. Sedgwick, J. B., Calhoun, W. J., Gleich, G. J., Kita, H., Abrams, J. S., Schwartz, L. B., Volovitz, B., Ben-Yaakov, M., and Busse, W. W. Immediate and late airway response of allergic rhinitis patients to segmental antigen challenge. Characterization of eosinophil and mast cell mediators. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144, 1274-1281.
7. Wills-Karp, M. Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:255-281.
8. Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., and Murphy, K. M. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993; 260: 547-549.
9. Seder, R. A., Paul, W. E., Davis, M. M., and Fazekas de St Groth, B. The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med* 1992; 176: 1091-1098.
10. Busse, W. W., and Lemanske, R. F., Jr. Asthma. *N Engl J Med* 2001; 344:350-362.
11. Romagnani, S. Regulation and deregulation of human IgE synthesis. *Immunol Today* 1990; 11:316-321.
12. Sutton, B. J., and Gould, H. J. The human IgE network. *Nature* 1993;366: 421-428.
13. Walker, C., Bode, E., Boer, L., Hansel, T. T., Blaser, K., and Virchow, J. C., Jr. Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146:109-115.
14. Burrows, B., Martinez, F. D., Halonen, M., Barbee, R. A., and Cline, M. G. Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens. *N Engl J Med* 1989; 320:271-277.
15. Metcalfe, D. D., Baram, D., and Mekori, Y. A. Mast cells. *Physiol Rev* 1999;77:1033-1079.
16. Wardlaw, A. J., Dunnette, S., Gleich, G. J., Collins, J. V., and Kay, A. B. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in subjects with mild asthma. Relationship to bronchial hyperreactivity. *Am Rev Respir Dis* 1988;137, 62-69.
17. Akdis CA, Blaser K, Akdis M. Genes of tolerance. *Allergy* 2004; 59:897-913
18. Chen W, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of peripheral CD4tCD25- naive T cells to CD4tCD25t regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003; 198:1875-1886.
19. Akdis M, Verhagen J, Taylor A, et al. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 2004; 199:1567-1575.

20. Weiss ST. Eat dirt—the hygiene hypothesis and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002;347:930–931.
21. Manal M., Biniyam W., Moiz B., Thomas M.. (2000). Induction of interferon-gamma in human gingival fibroblasts challenged with phytohaemagglutinin. *CYTOKINE*. 12:368-373
22. Mitsuaki K., Tsuruta S. and Yoshida T., (1999). IL-4 production by PBMCs on stimulation with mite allergen is correlated with the level of serum IgE antibody against mite in children with bronchial asthma. *J. Allergy Clin. Immun.* 105 : 327-32
23. Ulrik CS. Outcome of asthma: longitudinal changes in lung function. *Eur Respir J*. Apr 1999; 13 (4): 904-918.
24. Busse WW, Lemanske RF, Jr. Asthma. *N Engl J Med*. Feb 1 2001; 344(5): 350-362.
25. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today*. Jun 1997; 18(6):263-266.
26. Allen JE, Maizels RM. Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma? *Immunol Today*. Aug 1997; 18(8): 387-392.
27. Barnes, P.J. et al Drugs for asthma. *Br J Pharmacol* 2006; 147 Suppl : S297-303.
28. Robinson DS. Th-2 cytokines in allergic disease. *Br Med Bull*. 2000;56(4): 956-968.
29. Ulrik CS. Outcome of asthma: longitudinal changes in lung function. *Eur Respir J*. Apr 1999; 13 (4): 904-918.
30. Busse WW, Lemanske RF, Jr. Asthma. *N Engl J Med*. Feb 1 2001; 344(5): 350-362.
31. Ly P, Ngoc, Diane R. Gold, Arthur O. Tzianabos, Scott T. Weiss, Juan C. Celedón. Cytokines, allergy, and asthma. *Allergy and Clinical Immunology* 2005; 5:161–166
32. Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:227–257
33. Akdis CA, Blaser K, Akdis M. Genes of tolerance. *Allergy* 2004; 59:897–913
34. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. *Lancet* 1998; 351:1225–1232.
35. Aberg N, Hesselmar B, Aberg B, Eriksson B. Increase of asthma, allergic rhinitis and eczema in Swedish schoolchildren between 1979 and 1991. *Clin Exp Allergy* 1995; 25:815–819.
36. Celedon JC, Soto-Quiros ME, Hanson LA, Weiss ST. The relationship among markers of allergy, asthma, allergic rhinitis, and eczema in Costa Rica. *Pediatr Allergy Immunol* 2002; 13:91–97.
37. Ninan TK, Russell G. Respiratory symptoms and atopy in Aberdeen schoolchildren: evidence from two surveys 25 years apart. *BMJ* 1992; 304:873–875.
38. Braun-Fahrlander C, Gassner M, Grize L, et al. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. SCARPOL team. Swiss Study on Childhood Allergy and Respiratory Symptoms with Respect to Air Pollution. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:28–34.
39. Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999; 354:541–545.
40. Sepp E, Julge K, Vasar M, et al. Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants. *Acta Paediatr* 1997; 86:956–961.
41. Ernst P, Cormier Y. Relative scarcity of asthma and atopy among rural adolescents raised on a farm. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1563–1566.

42. 許瓊瑛. 真菌類免疫調節蛋白之研究，國立台灣大學醫學院醫事技術研究所碩士論文。1996
43. Hsieh CW, Lan JLi, Meng Q, Cheng YW, Huang HM, Tsai JJ. Eosinophil Apoptosis Induced by Fungal Immunomodulatory Peptide-fve via Reducing IL-5a Receptor J Formos Med Assoc 2007; 106; No 1
44. obinson DS. Th-2 cytokines in allergic disease. Br Med Bull. 2000;56(4): 956-968.
45. Flaishon L, Topilski I, Shoseyov D, et al. Cutting edge: anti-inflammatory properties of low levels of IFN-gamma. J Immunol. Apr 15 2002;168(8): 3707-3711.
46. Zhao LL., A. Linden, et al. IL-12 regulates bone marrow eosinophilia and airway eotaxin levels induced by airway allergen exposure. Allergy 2000; 55(8): 749-56.
47. Lee YL., Fu CL., et al. Administration of interleukin-12 prevents mite Der p 1 allergen-IgE antibody production and airway eosinophil infiltration in an animal model of airway inflammation. Scand J Immunol 1999 ;49(3): 229-36.
48. Lee YL, Fu CL., et al. Administration of interleukin-12 exerts a therapeutic instead of a long-term preventive effect on mite Der p I allergen-induced animal model of airway inflammation. Immunology 1999; 97(2): 232-40.
49. Flaishon L, Topilski I, Shoseyov D, et al. Cutting edge: anti-inflammatory properties of low levels of IFN-gamma. J Immunol. Apr 15 2002;168(8): 3707-3711.
50. Akpinarli A, Guc D, Kalayci O, Yigitbas E, Ozon A. Increased interleukin-4 and decreased interferon gamma production in children with asthma: function of atopy or asthma? J Asthma. Apr 2002; 39(2):159-165
51. Hsieh K.Y., Hsuw C.I., Linw J.Y., Tsaiz C.C., Lin R.H. Oral administration of an edible-mushroom-derived protein inhibits the development of food-allergic reactions in mice. Clinical and Experimental Allergy. July 2003; 33:1595–1602.
52. Herz U, Gerhold K, Gruber C et al. BCG infection suppresses allergic sensitization and development of increased airway reactivity in an animal model. J Allergy Clin Immunol 1998; 102:867–74.
53. Zuany-Amorim C, Manlius C, Trifilieff A et al. Long-term protective and antigen-specific effect of heat-killed Mycobacterium vaccae in a murine model of allergic pulmonary inflammation. J Immunol 2002; 169:1492–9.
54. Holt PG. A potential vaccine strategy for asthma and allied atopic diseases during early childhood. Lancet 1994; 344:456–8.
55. Roy K, Mao HQ, Huang SK, Leong KW. Oral gene delivery with chitosan–DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. Nat Med 1999; 5:387–91.
56. Gutterman JU. Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:1198–205

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

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

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

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

根據本篇的結果顯示，給予口服 FIP-fve 之致敏小鼠能有效的達到減緩致敏的症狀，且無論是在呼吸道過度反應、支氣管發炎現象，或血清中 IgE 含量等現象，皆能達到減緩或抑制的效果，然而這樣的結果也與先前針對 FIP-fve 所做的研究中得知其具有抗發炎及促使細胞激素 IFN- γ 含量增生的結果相同，然依此次研究成果而言口服 FIP-fve 對於 OVA 引起的呼吸道發炎反應具有抗發炎的效果，而口服 FIP-fve 對於過敏性呼吸道疾病可能是一項很好的替代性治療方式。

此外，本研究結果已投稿至國外期刊 Cytokine 且於 Acknowledgments 中載明本研究由計畫編號 NSC 98-2314-B-040-002-MY3 之國科會計畫補助，此研究已於 101 年 9 月 26 日獲得 Accept 之通知，其他刊登相關訊息尚待通知。

國科會補助計畫衍生研發成果推廣資料表

日期:2012/09/28

國科會補助計畫	計畫名稱: 金針菇萃取物預防及治療氣喘老鼠模式的急慢性期表現
	計畫主持人: 呂克桓
	計畫編號: 98-2314-B-040-002-MY3 學門領域: 小兒科
無研發成果推廣資料	

98 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：呂克桓		計畫編號：98-2314-B-040-002-MY3				計畫名稱：金針菇萃取物預防及治療氣喘老鼠模式的急慢性期表現	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	口頭報告，發表於2010年之中華免疫學會
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	1	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	1	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		
國外	論文著作	期刊論文	1	0	100%	篇	發表一篇期刊論文於 Cytokine
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p style="text-align: center;">其他成果</p> <p>(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。)</p>	<p style="text-align: center;">無</p>
---	--------------------------------------

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

國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

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

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表 未發表之文稿 撰寫中 無

專利： 已獲得 申請中 無

技轉： 已技轉 洽談中 無

其他：（以 100 字為限）

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

根據本篇的結果顯示，給予口服 FIP-fve 之致敏小鼠能有效的達到減緩致敏的症狀，且無論是在呼吸道過度反應、支氣管發炎現象，或血清中 IgE 含量等現象，皆能達到減緩或抑制的效果，然而這樣的結果也與先前針對 FIP-fve 所做的研究中得知其具有抗發炎及促使細胞激素 IFN- γ 含量增生的結果相同，然依此次研究成果而言口服 FIP-fve 對於 OVA 引起的呼吸道發炎反應具有抗發炎的效果，而口服 FIP-fve 對於過敏性呼吸道疾病可能是一項很好的替代性治療方式。

此外，本研究結果已投稿至國外期刊 Cytokine 且於 Acknowledgments 中載明本研究由計畫編號 NSC 98-2314-B-040-002-MY3 之國科會計畫補助，此研究已於 101 年 9 月 26 日獲得 Accept 之通知，其他刊登相關訊息尚待通知。