

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

松杉靈芝免疫調節蛋白誘發內質網壓力及轉譯後修飾與抑制肺癌細胞端粒酶活性關係之研究(第3年)
研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 96-2314-B-040-014-MY3
執行期間：98年08月01日至99年07月31日
執行單位：中山醫學大學醫學分子毒理學研究所

計畫主持人：柯俊良

計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理人員：蕭月婕
博士班研究生-兼任助理人員：辛翌綸
博士班研究生-兼任助理人員：湯曉君

處理方式：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 99 年 10 月 25 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

松杉靈芝免疫調節蛋白誘發內質網壓力及轉譯後修飾與抑制肺癌細胞端粒
酶活性關係之研究

Investigation of the relationships between telomerase activity inhibition, ER stress and posttranslational modification by reFIP-*gts* in Human Lung Cancer Cells

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：96-2314-B-040-014-MY3

執行期間：96年8月1日至99年7月31日

計畫主持人：柯俊良

共同主持人：

計畫參與人員：辛翌綸 湯曉君 蕭月婕

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
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

執行單位：中山醫學大學

中 華 民 國 99 年 10 月 22 日

附件二

可供推廣之研發成果資料表

可申請專利

可技術移轉

日期：__年__月__日

國科會補助計畫	計畫名稱：松杉靈芝免疫調節蛋白誘發內質網壓力及轉譯後修飾與細胞端粒酶活性關係之研究 計畫主持人：柯俊良 計畫編號：96-2314-B-040-014-MY3 學門領域：環境醫學
技術/創作名稱	
發明人/創作人	
技術說明	中文： (100~500 字)
	英文：

可利用之產業 及 可開發之產品	
技術特點	
推廣及運用的價值	

- ※ 1.每項研發成果請填寫一式二份，一份隨成果報告送繳本會，一份送 貴單位
研發成果推廣單位（如技術移轉中心）。
- ※ 2.本項研發成果若尚未申請專利，請勿揭露可申請專利之主要內容。
- ※ 3.本表若不敷使用，請自行影印使用。

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

松杉靈芝免疫調節蛋白誘發內質網壓力及轉譯後修飾與抑制肺癌細胞端粒酶活性關係之研究
Investigation of the relationships between telomerase activity inhibition, ER stress and posttranslational modification by reFIP-gts in Human Lung Cancer Cells

計畫編號：NSC 96-2314-B-040-014-MY3

執行期限：96 年 8 月 1 日至 99 年 7 月 31 日

主持人：柯俊良 中山醫學大學 醫學分子毒理所

中文摘要：

本實驗室主要以遺傳工程方式重組松杉靈芝免疫調節蛋白質 reFIP-gts，將此基因選殖並純化其蛋白質。本實驗首先使用報導基因實驗分析，發現 reFIP-gts 可有效抑制 hTERT 啟動子活性。進一步使用西方點墨法及 EMSA 分析得知 reFIP-gts 是透過抑制轉錄因子 C-myc 對 hTERT 啟動子的結合能力，而抑制端粒酶表現與活性。我們進一步發現靈芝免疫調節蛋白 reFIP-gts 可於肺癌細胞中誘發細胞自體吞噬反映。reFIP-gts 可促使細胞自噬標的基因 Beclin-1 mRNA 表現量增加與 LC3 蛋白轉變。以細胞內鈣離子螯合劑 BAPTA-AM 證實 reFIP-gts 是透過鈣離子訊息傳遞路徑來誘發細胞自噬發生。我們也觀察到 reFIP-gts 能增加 A549 細胞對 cisplatin 的感受性。於動物實驗中，reFIP-gts 確實能抑制腫瘤的生長。綜合以上結果，reFIP-gts 確實為擁有抑制肺癌的能力。

Key words: 靈芝免疫調節蛋白，肺癌，細胞自噬

英文摘要

Purified recombinant Fungal Immunomodulatory Protein from *Ganoderma tsugae* (reFIP-gts) has anti-telomerase effects in human lung adenocarcinoma A549 cells. However, how reFIP-gts affects hTERT expression remains unclear. After treated with reFIP-gts, hTERT promoter activity was downregulated. Further, deletion of E-box on hTERT promoter can reverse the inhibition effect by reFIP-gts. With electrophoretic mobility shift assays and Western blotting, we demonstrated that in response to reFIP-gts, binding of c-myc transcriptional factor to the E-box sequence on the hTERT promoter is inhibited. These results show that reFIP-gts inhibits transcriptional regulation of hTERT via a c-myc-responsive element-dependent mechanism. In addition, we found that reFIP-gts induced autophagy in lung cancer cells. Using western blot, reFIP-gts increased Beclin-1 mRNA expression and LC3 conversion in a concentration-dependent manner. Cytoplasmic calcium chelator BAPTA-AM was used to prove that reFIP-gts promotes autophagy via calcium-mediated signaling pathway. We found that reFIP-gts increased susceptibility to cisplatin in CaLu-1 cells. In an in vivo mouse model, A549 cells treated with

reFIP-gts grown significantly slower than the cells treated with PBS alone. The data suggest that lung cancer tumorigenesis inhibition by *reFIP-gts* may constitute a powerful new strategy for chemoprevention and antineoplastic therapy.

Key words: fungal immunomodulatory protein, Lung cancer, autophagy

緒言:

在許多癌症中可偵測到端粒酶活性，而除了幹細胞、淋巴球、角質細胞及造血原細胞外，而一般正常組織及細胞中通常偵測不到此酵素活性。在 NSCLC 病人其端粒酶活性與高度的細胞增殖速率及惡化程度有關。因此推測端粒酶活性是肺癌其中一重要的預後因子，特別是端粒酶活性低的其預後表現較佳。所以端粒酶的活性控制可能是發展新型治療癌症策略的主要標的之一。而一般端粒酶調控已非常清楚，特別是 hTERT (telomerase reverse transcriptase subunit) 的 mRNA 在腫瘤組織表現很高而正常組織表現特別低，而 hTR 及 hTEP 則不論在正常組織或腫瘤組織其表現量皆一致。而將 hTERT 基因轉殖進入不會表現端粒酶活性的細胞株，則足以表現出其酵素活性。因此，推測 hTERT 的轉錄活化可能是主要調控端粒酶的決定步驟。

了解端粒酶的調控機制有助於抗腫瘤藥物發展，已有許多研究學者針對端粒酶的調控機制設計一系列的抑制端粒酶活性的抑制劑包括(1)專一性抑制 hTERT 蛋白和 hTERT mRNA 如小分子化合物 BIBR1532 影響蛋白活化位置(El-Daly et al, 2005)和 siRNA 抑制 mRNA 表現(Kosciolek et al, 2003)。(2)專一性抑制 hTR (RNA component of telomerase) 如 antisens 小分子化合物

GRN163(Ozawa et al, 2004)。(3)抑制 hTERT 的轉錄因子如 Porphyrins (TMPyP4), Nmi protein 和 BRCA1 抑制 c-Myc(Grand et al, 2002; Li et al, 2002), Tamoxifen 抑制 estrogens 進而影響 hTERT 啟動子活性(Wang et al, 2002)。(4)改變 chromatin 結構而抑制 hTERT 啟動子活性如 5-Azacytidine(Guilleret & Benhattar, 2003)和 Tricostatin A (Suenaga et al, 2002)。(5)影響端粒酶轉譯後修飾如 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin 抑制 hsp90 chaperone protein 與端粒酶結合而抑制端粒酶活性(Villa et al, 2003)。(6)影響端粒序列的結構如 BRACO-19 (G-quartet interactive ligands)會鍵結至端粒末端導致結構改變造成端粒酶無法延伸端粒序列長度，促使端粒序列縮短(Burger et al, 2005; Gomez et al, 2003; Gomez et al, 2004; Riou et al, 2002)。

細胞自噬(autophagy)與細胞凋亡(apoptosis)皆為計畫性細胞死亡(programmed cell death)，細胞凋亡所導致的細胞死亡，是染色體損壞與細胞核濃縮造成；細胞自噬則是其細胞核幾乎沒有損傷，而是細胞胞器大量的降解(Bredesen et al, 2006)。造成細胞自噬的因子很多，包含細胞飢餓(starvation)、低氧或高溫的環境，或是細胞中有受損的胞器、蛋白質的累積及微生物感染，都可能使細胞走向細胞自噬(Lin et al, 1997)。一些細胞壓力如內質網壓力等也會造成細胞自噬(Lin et al, 1997)。細胞自噬的過程首先是細胞質中的物質會被雙層膜所包裹而形成液泡，稱為 autophagosome，此 autophagosome 會進一步停靠(docking)在細胞中溶酶體(lysosome)的膜壁上(Baehrecke, 2005)，並與溶酶體融合(fusion)，形成 autolysosome(Chen et al, 2008; Criollo et al, 2007; Levine, 2007)，此時被包覆的物質會被溶酶體中的水解酶所降解。正常狀態下，細胞可經由胰島素接受器(insulin receptor)刺激 Class I PI3K，活化 mTOR (mammalian Target of Rapamycin)而抑制細胞自噬，但是當細胞處於養分不足的飢餓狀態時，mTOR 活性被抑制，使細胞自噬作用得以發

生，產生autolysosome消化細胞中的一些物質，如蛋白質與受損胞器，進而產生胺機酸及脂肪酸，提供細胞製造蛋白質與ATP以利細胞生存。在一些狀況下，細胞自噬會導致細胞死亡，如在氧化壓力(oxidative stress)下，活性氧分子(reactive oxygen species, ROS)會引發細胞自噬，還有內質網壓力造成之細胞自噬現象皆會造成細胞死亡(Chen et al, 2008; Hoyer-Hansen & Jaattela, 2007; Levine, 2007)。現已知道一些形成autophagosome所必須的基因，如細胞自噬特定蛋白(autophagy specific protein)atg5、atg6 (beclin-1)與atg7等。細胞自噬與細胞凋亡(apoptosis)不同之處主要在於細胞凋亡必定會使細胞走向死亡，而在某些情況下細胞自噬會減緩細胞凋亡的作用，也有發現atg5遭切割後，細胞凋亡會有活化的情形。但有許多已知會觸發或是抑制細胞凋亡之因子或訊息傳遞，對細胞自噬也有相同的作用(Chen et al, 2008; Levine, 2007)。從癌症的角度來看的話，已知癌細胞會產生許多突變導致對細胞凋亡產生抗性，因此是否可以利用細胞自噬達到治療癌症的效果，是相當值得探討的方法。

實驗步驟

一、重組靈芝免疫調節蛋白(reFIP-gts)與純化:

(1) 在大腸桿菌中表現融合蛋白

在大腸桿菌中表現融合蛋白的純化步驟如下:於前一天先製備2管菌液每管約3 ml LB，作為大量表現菌液的菌種，再製備含有Ampicillin (50 µg/ml, Roche 835242)之LB broth包含Bacto™ Trptone (BD 211705) 20 g; Bacto™ Yeast Extract (BD Cat.no. 212750) 10 g; NaCl (Merck 1.064045000) 20 g, 溶於二次水中攪拌均勻再加入1M MgSO₄ (WAKO 131-00405) 20 ml, 最後補二次水到2 L, 並分裝到4個大錐形瓶中, 每瓶500 ml, 以121°C, 15 lb滅菌20分鐘, 待冷卻後加入

Amp (50 mg/ml), 在各錐形瓶中加500 µl並混合均勻, 再加入上述預先製備的小量菌種, 每瓶加入1.5 ml, 於37°C培養箱中震盪培養3至4小時, 直到OD₆₀₀吸光值大於0.5即表示增菌已足夠。由於在表現載體上有GST基因, 故此時每瓶各加入250 µl的1 M IPTG(MD Bio, Inc MB1008)予以刺激, 並更改培養箱溫度為25°C繼續震盪培養達3小時, 再將菌液以4°C, 9500 rpm離心20分鐘後, 取60 ml resuspension buffer (需現配) 【10 mM Tris-HCl (USB 75825), pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ (Sigma M-2393), 1 mM DTT(Pharmacia 17-1318-02), 60mg Lysozyme(Sigma L-7651)】將菌液沉澱物再懸浮, 於37°C水浴槽中作用15分鐘, 即置於-80°C。隔日於37°C水浴回溫後, 再用高壓破細胞儀破細胞。之後加入DNase (10 mg/ml, Roche 104159)及RNase A (10 mg/ml, Sigma R-4875)各40 µl, 於37°C水浴槽中作用15分鐘, 以4°C, 12000 rpm離心20分鐘, 小心吸出上清液準備通管柱 Glutathion Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia)。此時需預留少量約500 µl的粗萃取液作為SDS-聚丙烯電泳膠分析用以及測量粗蛋白液的OD₂₈₀總濃度使用。

(2)融合蛋白的純化

先以50 ml的PBS緩衝液【150 mM NaCl, 16 mM Na₂HPO₄ (MERCK 1.06574)、4 mM NaH₂PO₄(WAKO 192-02815), pH 7.3】清洗 Glutathion sepharose 4 Fast Flow column (約2 ml), 再以50 ml含1 mM DTT的PBS緩衝液平衡管柱, 接著通入菌液上清液, 再以50 ml的PBS緩衝液沖洗出無法專一附著於管柱上的蛋白質後, 測量OD₂₈₀吸光值低於0.05後, 即可再加入elution buffer沖流約50 ml 【5 mM reduced form Glutathione (Sigma G-4251), 50 mM Tris-HCl, pH 8.0】把融合蛋白競爭下來, 以分液收集器收集每管約2 ml, 並測其在280 nm波長的吸光值, 可得一蛋白吸收峰, 其純度可由SDS-聚丙烯電泳進行分析。

(3)重組靈芝免疫調節蛋白(reFIP-gts)的純化

將OD值大於0.5的蛋白液收集起來, 每1 mg融合蛋白以0.2 Unit Thrombin (Roche 84892726)酵素於22°C水浴下作用48小時, 以切斷GST與FIP-gts間之鍵結, 並於當中取少量樣品跑SDS-PAGE確認是否切除完成把FIP-gts和GST分離完成。若尚未切

完全，則持續補充 Thrombin。以 10mM NaOAc pH5.4 透析一天，用 Regenerated Cellulose Tubular Membrane /Nominal MWCO:6000~8000 (Cellu Sep,8030-23)的透析袋，透析液以冰的 2M NaOAc 當 stock 來配製且 12 小時更換一次，用保鮮膜覆蓋。透析一天後將蛋白液取置離心管，以 12000 rpm 轉速 4°C 下離心 20 分鐘，收集上清液。通 Column 前先測蛋白濃度以 10mM NaOAc 當 Blank。本次通 Column 為 CM Sepharose™ Flast Flow (Amersham Biosciences, 17-0719-01) 10 ml。首先以 10mM NaOAc pH5.4 清洗管柱，設定為 1.5 分鐘/管。接著加入蛋白液(第 1 管至第 12 管)，通完後加入 10mM NaOAc 將殘餘蛋白液排空(第 13 管至第 38 管)，最後再以 0.5N NaCl 濃度梯度以鹽橋方式將管柱上的蛋白競爭排出(第 39 管至第 125 管)。將分離管收集至冰上，以分光光譜儀吸光值 280nm 偵測，可得一蛋白吸收峰，其純度可由 SDS-聚丙烯電泳進行分析。

二、Transient transfection 和 Reporter gene assay

(1) 質體 DNA 的轉染

本實驗所使用的細胞株為 A549 的肺癌細胞株。轉染方法乃採取 DiEthylAmino-Ethyl (DEAE)-dextran 方式來進行 (Lopata et al, 1984)。將細胞種至 24 well plate，細胞數目為 1×10^5 /well，靜置於 37°C 培養箱培養時間至少要超過 20 小時。轉染時將不同片斷的質體 DNA pGL-3-tert-p548，pGL-3-tert-p212，pGL-3-tert-p196，pGL-3-tert-p177 濃度皆為 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 和 β -gal (0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 各取 1 μl 分別加入 DEAE-dextran (Amersham Pharmacia, 17-0350-01, 5 mg/ml) 5 μl 最後用 TBS-D buffer (200 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 24.7 mM Tris, 0.1% Dextrose (Sigma, G-6152)) 將體積補至 150 μl vortex 5 秒，接著細胞用 1x PBS 清洗細胞兩次，之後用 TBS-D buffer 清洗一次，再加入 150 μl 的 DNA mixture 於 24 well plate 內緩慢滴入並搖晃以

利均勻分佈，靜置於 37°C 培養箱 45 分鐘。用 TBS-D buffer 緩緩清洗一次，再用 1x PBS 清洗細胞一次。接著加入 1 ml 含有 100 μM Chloroquine diphosphate (Sigma, C-6628) 培養液，靜置於 37°C 培養箱 5 小時。吸掉培養液，用 serum-free DMEM 清洗細胞 3 次，最後加入 2 ml 10% FBS-DMEM 培養 18 小時，接著分別處理不同濃度 FIP-gts 於細胞內時間為 24 小時。移去細胞培養液並以 PBS 清洗二次，加入 1x Report Lysis buffer (Promega, E397A) 於室溫下反應 5 分鐘後，並於 -80°C 靜置 15 分鐘及冰上解凍，共 3 次，並以微量吸取器將細胞反覆沖下，吸至新的 1.5 ml 微量離心管中，再以 4°C 離心 13000 rpm，30 分鐘，取上清液至新的 1.5 ml 微量離心管中作之後實驗。

(2) β -galactosidase 活性測定

β -galactosidase 活性可做為 transfection 效率。取細胞萃取液 50 μl 與 2 x Assay buffer (200 mM Sodium phosphate buffer, pH7.3; 2 mM MgCl_2 ; 100 mM β -mercaptoethanol; O-Nitrophenyl β -O-Galactopyranoside (Sigma, N-1127))，混合均勻，置於 37°C 作用 90 分鐘，若有表現 β -galactosidase 則細胞萃取液會逐漸呈現黃色，注意不可飽和，然後再加入 500 μl 1 M Na_2CO_3 (WAKO, 199-01585) 終止反應，此黃色產物在 420 nm 下可測得吸光值。

(3) Luciferase 活性測定

於 pGL-3 載體含有 luciferase 基因，因此 hTERT promoter 轉錄活性的強弱由 luciferase 活性來呈現。luciferase 活性由冷光測定儀進行分析，使用 substrate (20 mM Tricine, Sigma T9784; 1.07 mM $\text{Mg}(\text{CO}_3)_4(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Sigma M5671; 2.67 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, WAKO 131-00405; 0.1 mM EDTA, Sigma E9884; 33.3 mM DTT, Amersham 17-1318 02; 270 μM Coenzyme A, Sigma C3144; 470 μM Luciferin, Promega E1601; 530 μM ATP, Roche 127523) 來偵測。首先取細胞萃取液 20 μl 至 96-well 盤，在測定時加入 substrate。使用

冷光分析儀 (Tropix -PR717) 來偵測 luciferase活性轉錄活性。

三、EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)

取細胞以 8×10^5 數目種植至100 mm培養皿中，在37°C細胞培養箱中培養16小時，經加以不同濃度的FIP-gts處理約48小時後，將細胞收下。首先將舊的培養液移除，並以1x PBS清洗兩次，再以0.9 ml HEGD緩衝液 (25 mM HEPES, 1.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glycerol, pH= 7.6; 0.5 mM PMSF, 10 ug/ml leupeptin, 10 ug/ml pepstatin) 中以0.9 ml HEGD緩衝液(25 mM HEPES, 1.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glycerol, pH 7.6; 1X Protease inhibitor cocktail)刮下細胞，以低速離心於4°C 7000 rpm (Eppendorf centrifuge 5415 R) 5分鐘後，取細胞沉澱物加入0.5 ml HEG (HEGD without glycerol)混合均勻後，以玻璃細胞研磨器 (micro tissue grinder, Wheaton 公司)研磨細胞約40下，離心於4°C 7000 rpm 10分鐘後去除上層液，於細胞沉澱物中加入100 μ l HEGD-KCl (HEGD buffer含有0.5 M KCl) 混合均勻後，在4°C緩慢振盪1小時，再離心於4°C 14000 rpm 30分鐘後收集上清液，並以Bio-Rad protein assay定量蛋白量；取10 μ g的核蛋白與上述研究所確認的response element進行EMSA分析(Weng et al, 2004)。之後，使用PIERCE出品的GEL Shift assay kit，依序加入4 μ l的5x binding buffer、1 μ l (1 μ g)的poly d(I-C)、1 μ l (1 μ g)的poly L-lysine、再加入2 μ l的100 pmole已標定Biotin之Response Element DNA片段，其餘補水至20 μ l，混合後作用於室溫 (25°C) 15分鐘便可進行直立式電泳操作。至於抗體測定的條件，首先抗體先與核蛋白在室溫下反應30分鐘之後再與已標定Biotin之Response Element DNA片段進行反應。本實驗選用

Hoefler之直立式電泳槽，其步驟如下：首先製備6% native gel，依序加入二次水6ml、10X TBE buffer 1 ml、40% acrylamide-bis acrylamide 1.5 ml、Glycerol 1 ml、1% ammonium persulfate 0.5 ml、TEMED 15 μ l混合均勻後，然後緩緩加入1.0mm厚度的直立式電泳槽膠台座中，然後將梳狀膠片(comb)放入，待凝固後小心取出梳狀膠片，所留下的凹槽可做為樣品加入之用。將製備好凝固的膠，先用0.5x TBE running buffer填滿，再將先前已作用好的samples與5 μ l的loading buffer混合均勻，然後緩緩注入至native gel的凹槽中，用80伏特約跑120分鐘，直到樣品接近底部即可停止。在膠快跑完的前10分鐘，準備一張大小恰當的Nylon membrane (Boehringer Mannheim GmbH 1209299)，先用0.25x TBE buffer浸泡10分鐘；將膠卸下之後，同時與nylon membrane及兩片濾紙一起浸在transfer 緩衝溶液中 (使DNA/protein由負極往正極移動)，利用濕式轉漬法以400毫安培60分鐘，將膠上的DNA轉移到nylon membrane上。將transfer好的nylon membrane先經由UV cross linker以 1200 mJ 5分鐘後，使用PIERCE detection kit顯像，其步驟如下：先將membrane浸泡於wash buffer 2分鐘，再將membrane浸於9 ml的blocking buffer震盪15分鐘後，取10微升的HRP與新的blocking buffer 5 ml混合，然後將membrane放入其中，震盪15分鐘後，取出membrane，置於1x washing buffer中震盪5分鐘後，倒掉再清洗一共4次，之後再將membrane放置於Equilibration buffer中振盪5分鐘，再與substrate (Luminol與Peroxide各取1ml混合)作用5分鐘後，再以X光底片 (Kodak Science Imaging Film)感光1~5分鐘後即可顯影。

四、反轉錄酶鏈聚合酶連鎖反應(RT-PCR)

RNA純化：

移除舊培養液，加入1 ml Rare RNA (GENEPURE TECHNOLOGY CO., Taichung, Taiwan.)之後上下搖晃均勻，放置室溫5分鐘。吸

取液體至新的微量離心管，加入 300 μ l 的 chloroform (MERCK, 1.02445.2500) 劇烈振盪混合 20 秒，置於冰上 5 分鐘後，離心 13000 rpm，4 $^{\circ}$ C，5 分鐘。吸取上清液並置換乾淨的 1.5 ml 微量離心管中，加入等體積的 isopropanol (Sigma I-9516) 振盪混合 20 秒，離心 13000 rpm，4 $^{\circ}$ C，5 分鐘。倒掉上清液，再用 75% 酒精清洗一次，離心 13000 rpm，4 $^{\circ}$ C，倒掉上清液，以 Speed Vacume 進行抽乾，約 5 分鐘。抽乾的 pellet 處理 30 μ l RNase-Free DNase (Promega) 37 $^{\circ}$ C，作用 20 分鐘。接著補 RNase free ddH₂O 至 200 μ l，再加入 acid phenol (AMRESCO, 0981-400ml)/ chloroform (1:1) 200 μ l，vortex 20 秒，離心 13000 rpm，4 $^{\circ}$ C，5 分鐘，小心拿，取上清液 180 μ l，加入等體積 Isopropanol，vortex 20 秒，離心 13000 rpm，4 $^{\circ}$ C，5 分鐘，75% Alcohol 清先，用真空乾燥 Dry 乾，溶 TE buffer 40 μ l。偵測在 260nm 與 280nm 波長下的比值，其比值應大於 1.8 以上，並取 2 μ g RNA 進行反轉錄反應作成 cDNA。其他的 RNA 儲存在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中。

cDNA 的合成 (RT-PCR)：

本實驗使用 promega RT-PCR kit 作反應。方法如下：取 2 μ g 的 total RNA 加熱 70 $^{\circ}$ C、10 分鐘後隨即放置冰浴中冷卻，再加入 5 \times MMLV buffer 4 μ l，10mM dNTP Mixture 2 μ l，Recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor 0.5 μ l，MMLV Reverse transcriptase 0.5 μ l，Oligo (dT)₁₅ Primer (0.5 μ g/ μ l) 1 μ l 及 Nuclease-Free Water 補至最終體積為 20 μ l。於 PCR 儀中進行下列反應：72 $^{\circ}$ C、10 分鐘，42 $^{\circ}$ C、90 分鐘，72 $^{\circ}$ C、10 分鐘及 4 $^{\circ}$ C 即合成 cDNA。可進行 PCR 反應，或儲存於 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中備用。

PCR (鏈聚合酶鏈鎖反應)：

取 1 μ l cDNA，加入 10 \times PCR buffer 5 μ l，2 μ l

的 10mM dNTPs，及各 2 μ l 的 10 pmole 引子分別為 HT-CS₁ 及 HT-CS₂ 其 PCR 產物為 328 bp 大小。 β -actin 的 5' 端及 3' 端引子 (primer) 當內對照組 (internal control)，並加二次蒸餾水至 50 μ l，最後加入 0.5 μ l 的 Hi-Taq DNA polymerase (5 unit/ μ l)。反應條件：94 $^{\circ}$ C、5 分鐘；94 $^{\circ}$ C、1 分鐘；54 $^{\circ}$ C、1 分鐘；72 $^{\circ}$ C、2 分鐘，上述條件進行 30 cycles、72 $^{\circ}$ C 反應 10 分鐘，作用結束後取 10 μ l 進行 1.5% agarose gel 電泳分析。

五、西方點墨法 (Western Blot)

取細胞以 5 \times 10⁵ 數目種植至 60 mm 培養皿中，在 37 $^{\circ}$ C 細胞培養箱中培養 16 小時，經加以不同濃度的 reFIP-gts 處理約 48 小時後，將便可將細胞收下。先以 PBS 清洗二次，去除上清液加入 100 μ l 的細胞均質緩衝液使細胞溶解，置於冰上待全部樣品皆以製備完畢後再以超音波均質機在 4 $^{\circ}$ C 下將細胞完全打破，反覆兩次每次間隔 10 分鐘以上，之後再以 4 $^{\circ}$ C 離心機轉速為 12000 rpm 離心 20 分鐘，小心吸取上清液，存放置另一乾淨滅菌的 1.5 ml 微量離心管中並進行蛋白質定量。使用 Bio-Rad protein assay (#500-0006) 測蛋白濃度。接下來將樣品以 SDS-聚丙烯醯胺板膠電泳法分析，並在電泳分析完畢前 20 分鐘，先準備一張大小相當的 Hybond-P membrane (Pharmacia)，須用甲醇浸潤一下約 15 秒，改以二次水清洗 10 分鐘，再浸泡於 transfer buffer 中約 10 分鐘備用。將分析完畢的電泳片小心取下，在半乾式轉漬器：Hofer Semiphor Transfer 上，依序放上 3 張事先的浸好 transfer buffer 的 3M 濾紙和 transfer buffer 浸潤過的 Hybond-P membrane，電泳片、另外 3 張浸好 transfer buffer 的 3M 濾紙，利用以半乾式轉漬法在電源供應器：Pharmacia Biotech power supply EPS 301，以每平方公分 3 mA 電流的條件下進行 60 分鐘，使膠上的蛋白質由負極往正極的方向轉移到 Hybond-P membrane。將 transfer 好的 Hybond-P membrane 浸泡在含有 5% 脫脂奶粉的 1 倍 TTBS buffer 中，於室溫下 shaking 1 小時，進行 blocking。將已 blocking 完成的 Hybond-P membrane 分別加入專一性的一級抗體。利用含有 3% 脫脂奶粉 TTBS buffer 稀釋下列一級多株 (polyclonal) 抗體：monoclonal anti-LC3 (AM1800a, Abgent), polyclonal anti-PARP (#9542,

Cell signaling), and monoclonal anti- β -actin (AC-40, Sigma)於 4 °C 下搖晃一個晚上 (至少 16 小時)。隔天取出轉漬膜，一級抗體以 1:100 的比例加入 2% 的 sodium azide 作為防腐劑後可回收重複使用，接著以 100 ml 3% 脫脂奶粉之 1 倍 TTBS buffer 在室溫下清洗轉漬膜 2 次，每次 10 分鐘，再用 100 ml 的 1 倍 TTBS buffer 在相同條件下室溫清洗 2 次，每次 10 分鐘。再以 3 % 脫脂奶粉之 1 倍 TTBS buffer 稀釋含有 anti-rabbit IgG-HRP(1 : 5000, Cell Signaling #7074)和 anti-mouse IgG-HRP (1:10000 Santa Cruz Biotechnology, Inc.)的二級抗體於室溫下震盪作用 1 小時，重覆上述之清洗步驟。利用 E.C.L.呈色劑，以 1:1 的方式加入 Enhanced luminol reagent 與 Oxidizing reagent 混合均勻，將 membrane 的正面朝下放入裝有呈色劑的盒子中作用 5 分鐘，以催化 HRP 呈色，並將螢光呈現在 X-光底片上，曝光時間約 3~5 分鐘，再以顯影劑及定影劑將影像沖洗出。

六、GFP-LC3質體轉染細胞觀察 autophagosomes

於進行轉染作用之前二小時，將細胞更換新鮮培養液，使細胞呈現活化之最佳狀態。將要進行轉染之 GFP-LC3 質體 DNA 製備好，依每 μg 質體 DNA 加入 2 μl jetPEI Cationic polymer transfection reagent 與 48 μl 之 NaCl (150 mM)之混合液，震盪混合均勻之後，靜置 30 分鐘，之後將混合液加入細胞培養盤中，培養 24 小時後，加入不同濃度之 REFIP-GTS 處理 48 小時。將玻片取出，用冰的 1X PBS 清洗 2 次，加 100 μl 4% paraformaldehyde 固定細胞 20 分鐘，室溫。用 1 X wash buffer 清洗 2 次，最後用 70% 甘油封片(蓋玻片四角先塗一點指甲油，等 5 分鐘後再用牙籤將玻片四周塗上指甲油，待乾後用共軛焦螢光顯微鏡觀察。

七、MTT assay

MTT assay 是常用於測定細胞存活率的分析方法。主要是根據細胞膜通透性發生改變來

進行的檢測，MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)為一種水溶性，呈黃色的 tetrazolium 鹽類。此鹽類若與細胞粒線體內部去氫酵素(dehydrogenase)作用，其鹽類結構中的 tetrazolium ring 會被切斷，形成紫色非水溶性沈澱物 formazan

(1-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-formazan)堆積在細胞中，以 DMSO 溶液溶解，利用 ELISA reader 來分析，在波長 570 nm 下測其吸光值，若吸光值愈大，則表示細胞存活率愈高。因為只有活細胞才具有活性的粒線體酵素，故所測得的吸光值與活細胞數量成正比關係。

首先種 A549 細胞 5×10^3 於 96 孔盤，隔天，將舊的培養液移除，預先處理 NAC (10mM) 1 個小時後，在處理 Curcumin 不同濃度(0、20、40、60、80mM) 48 小時後，以 1X PBS wash 3 次，加入每 well 含 90 μl 1-10%FBS-medium 和 10 μl MTT (total 100 μl /well)，Incubator 37°C，CO₂，靜置 3 個小時，將培養液移除，加入 100ml DMSO 搖 10min，ELISA reader 偵測其吸光值強弱，評估細胞存活率。測定波長 570nm 的吸光值。最後將所測到的吸光值變化繪製成濃度與存活率的相關曲線圖，藉以評估 Curcumin 對於 A549 細胞株的毒性評估。(註：未處理 cells 為 100%，所有 data 做 3 次以上。)

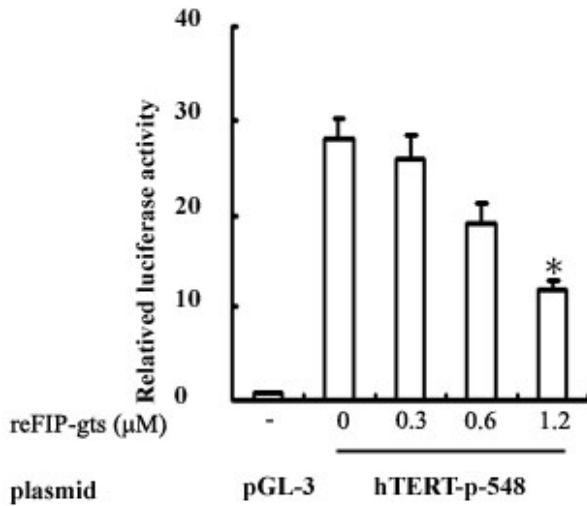
八、動物腫瘤實驗

將懸浮於 1 X PBS 之 A549 癌細胞 (1×10^7 cell/75 μl /mouse) 與等體積之 9.2 mg/ml 的 MatriGel(BD Biosciences 354234, 10mg/ml 10 ml) 混合均勻，利用皮下注射方式 (1×10^7 cell/150 μl /mouse)將癌細胞種植於 Balb/c 母鼠背部左側。7 天後，老鼠固定一周 1 次腹腔注射 PBS 及 reFIP-gts (19.2 和 38.4 mg/kg body weight)，三週後為四天一次，每三天利用測量尺紀錄腫瘤大小，換算公式為 $\pi/6 \times \text{長度} \times \text{寬度}^2$ (106) 所得值即為腫瘤大小，第 30 天犧牲並取出腫瘤。

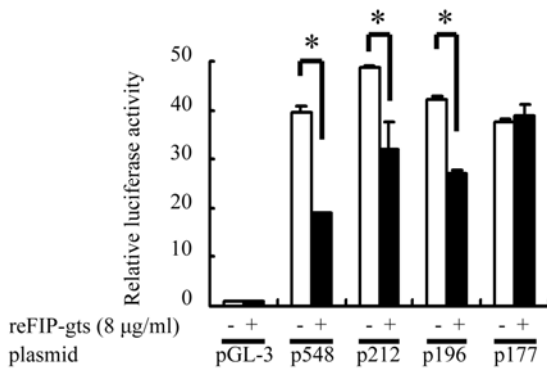
實驗結果:

1. 重組靈芝免疫調節蛋白(reFIP-gts)抑制端粒酶啟動子活性。

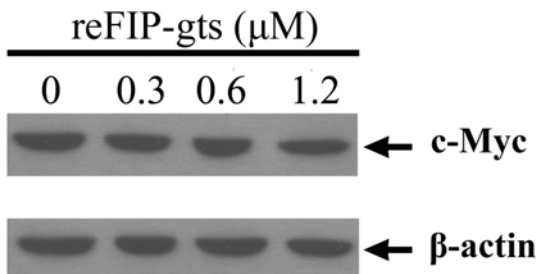
(A)



(B)



(C)



(D)

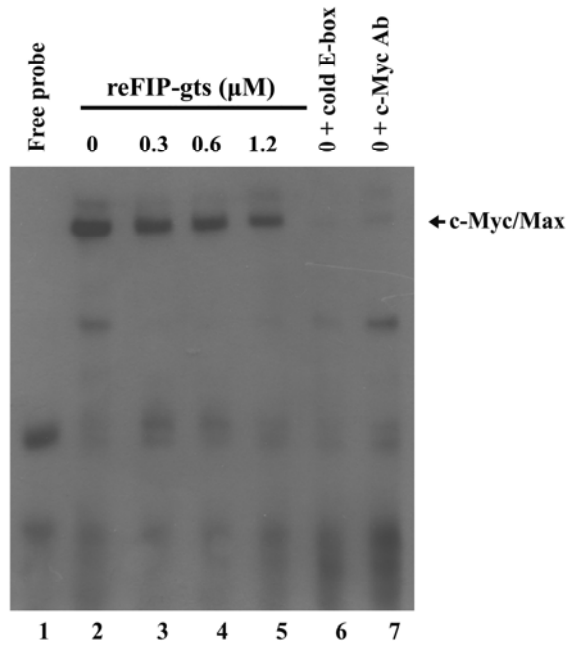


Figure 1. reFIP-gts 在 hTERT 啟動子區域上的分子調控

(A) 將 A549 細胞分盤至 24 well plate(1×10^5 個/well)中 37°C 培養 16 小時後，將 hTERT-p-548、pGL-3 和 β -gal 質體 DNA 以 DEAE-dextran 方式轉染至 A549 細胞作用 5 小時，接著處理不同濃度 reFIP-gts (0, 0.3, 0.6 和 1.2 μ M) 24 小時，並求其相對螢光酵素活性表現(Relative luciferase activity)。每組實驗須三重複，並求其相對螢光酵素活性表現。

(B) 將 A549 細胞分盤至 24 well plate(1×10^5 個/well)中 37°C 培養 16 小時後，將 hTERT-p-548、hTERT-p-212、hTERT-p-196、hTERT-p-177、pGL-3 和 β -gal 質體 DNA 轉染至 A549 細胞作用 5 小時，接著處理 reFIP-gts 1.2 μ M 24 小時，並求其相對螢光酵素活性表現(Relative luciferase activity)。每組實驗須三重複，並求其相對螢光酵素活性表現。

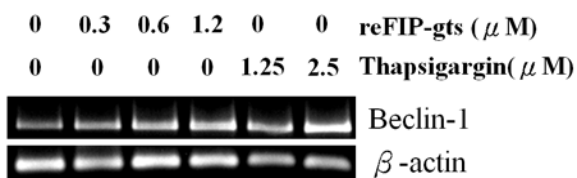
(C) 將 A549 細胞以 5×10^5 個細胞數分盤至 60 mm dish 中 37°C 培養 16 小時後，處理不同濃度 reFIP-gts (0, 0.3, 0.6 和 1.2 μ M) 48 小時，取 50 μ g 的細胞蛋白萃取物並利用 10% 的 SDS PAGE 進行分析，並利用專一性偵測 c-Myc 的抗體分析在細

胞中的表現量。β-actin 蛋白當作 internal control。

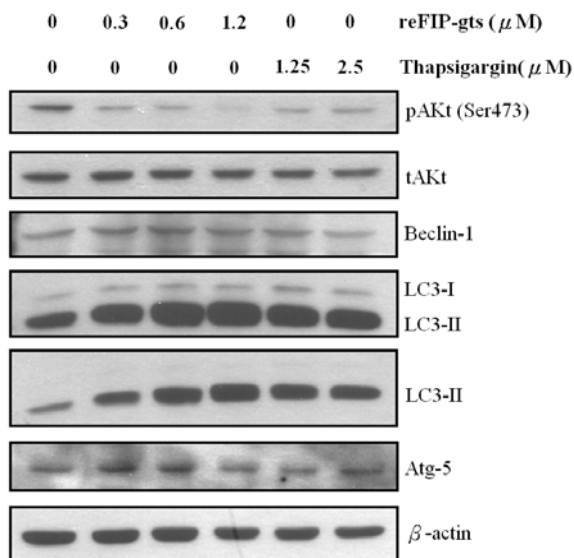
(D) 將 A549 細胞以 1.5×10^6 個細胞數分盤至 10 mm dish 中 37°C 培養 16 小時後，處理不同濃度 reFIP-gts (0, 0.3, 0.6 和 1.2 μM) 48 小時，萃取細胞核蛋白並利用 EMSA 進行分析。探針為 biotin 鍵結的 E-box，此序列描述在材料與方法內。

2. 靈芝免疫調節蛋白誘發肺癌細胞產生細胞自吞噬

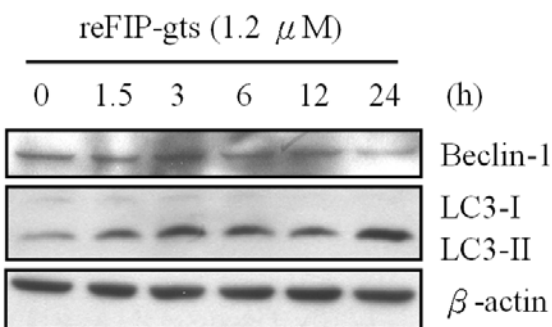
(A)



(B)



(C)



(D)

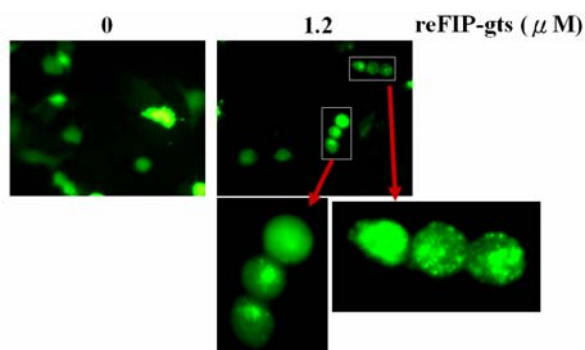


Figure 2. 靈芝免疫調節蛋白 reFIP-gts 誘發細胞自噬現象

(A) 將 A549 細胞以 5×10^5 個細胞數分盤至 60 mm dish 中 37°C 培養 16 小時後，處理不同濃度 reFIP-gts (0, 0.3, 0.6 和 1.2 μM) 及 Thapsigargin (1.25 與 2.5 μM) 48 小時，抽取 total RNA 並進行 RT-PCR。β-actin 為 internal control。

(B) 將 A549 細胞以 5×10^5 個細胞數分盤至 60 mm dish 中 37°C 培養 16 小時後，處理不同濃度 reFIP-gts (0, 0.3, 0.6 和 1.2 μM) 及 Thapsigargin (1.25 與 2.5 μM) 48 小時，取 50 μg 的細胞蛋白萃取物並利用 12% 的 SDS PAGE 進行分析，並利用專一性偵測 pAkt、Akt、Beclin-1、LC3、ATG-5 的抗體分析在細胞中的表現量。β-actin 蛋白當作 internal control。

(C) 將 A549 細胞以 5×10^5 個細胞數分盤至 60 mm dish 中 37°C 培養 16 小時後，處理 1.2 μM reFIP-gts 0、1.5、3、6、12、24 小時，取 50 μg 的細胞蛋白萃取物並利用 12% 的 SDS PAGE 進行分析，並利用專一性偵測 p53 與 LC3 的抗體分析在細胞中的表現量。β-actin 蛋白當作 internal control。

(D) 將 A549 細胞分盤至 6 well plate (2×10^5 個/well) 中 37°C 培養 16 小時後，將帶有 GFP-LC3 之質體 DNA 以 jetPEI 方式轉染至 A549 細胞作用 24 小時，接著處理不同濃度 reFIP-gts (0, 0.3, 0.6 和 1.2 μM) 48 小時，將細胞固定封片後以螢光顯微鏡觀察

3. reFIP-GTS 透過鈣離子訊息傳遞路徑

誘發細胞自噬現象

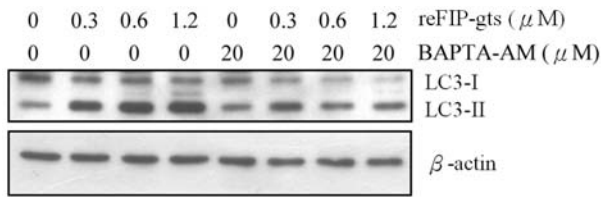


Figure 3. 鈣離子螯和劑抑制 reFIP-gts 導致的 LC3-II 增加

將 A549 細胞以 5×10^5 個細胞數分盤至 60 mm dish 中 37°C 培養 16 小時後，先以 20 μM BAPTA-AM 前處理 1 小時，再處理不同濃度之 REFIP-GTS (0, 0.3, 0.6 和 1.2 μM) 48 小時，取 50 μg 的細胞蛋白萃取物進行分析，並利用專一性偵測 LC3 的抗體分析在細胞中的表現量。β-actin 蛋白當作 internal control。

4. reFIP-gts 增加 CaLu-1 細胞對 cisplatin 的感受性

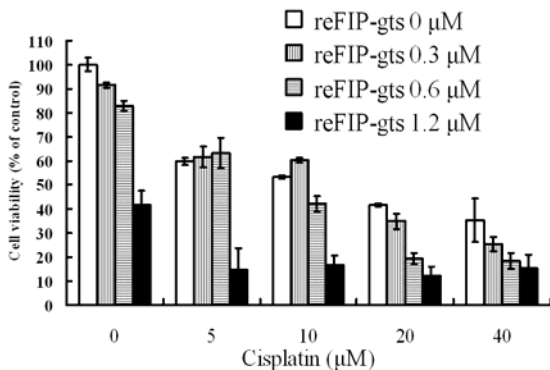


Figure 4. 以 reFIP-gts 與 cisplatin 共同處理 CaLu-1 細胞

將 CaLu-1 細胞以 5×10^3 個細胞數分盤至 96 well dish 中 37°C 培養 16 小時後，共同處理不同濃度之 Cisplatin (0, 5, 10, 20, 40 μM) 與 reFIP-gts (0, 0.3, 0.6 和 1.2 μM) 48 小時，之後以 MTT assay 分析細胞存活率。

5. 重組靈芝免疫調節蛋白(reFIP-gts)抑制裸鼠腫瘤的形成

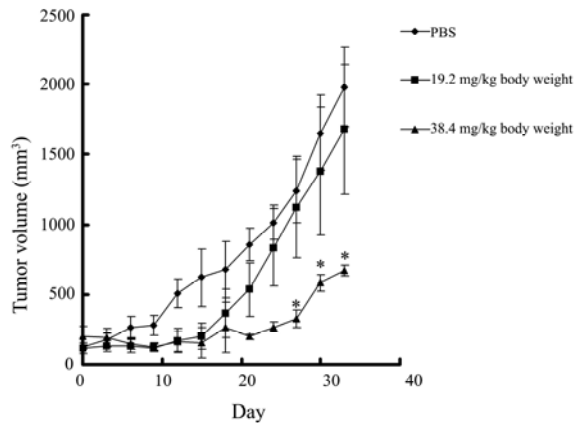


Figure 5. 以動物模式分析 reFIP-gts 抑制腫瘤生成的能力

將懸浮於 1 X PBS 之 A549 癌細胞 (1×10^7 cell/75μl/mouse) 與等體積之 9.2 mg/ml 的 MatriGel 混合均勻，利用皮下注射方式 (1×10^7 cell/150μl/mouse) 將癌細胞種植於 Balb/c 母鼠背部左側。7 天後，老鼠固定一周 1 次腹腔注射 PBS 及 reFIP-gts (19.2 和 38.4 mg/kg body weight)，三週後為四天一次，每三天利用測量尺紀錄腫瘤大小，換算公式為 $3.14 \times \text{長度} \times \text{寬度}$ ，所得值即為腫瘤大小，第 30 天犧牲並取出腫瘤。

討論:

調控端粒酶活性是屬於多元性和複雜性，由前者實驗發現 hTERT mRNA 會被 reFIP-gts 有所抑制，表示屬於基因轉錄層次上的調控。由 Luciferase assay 也證實 reFIP-gts 抑制 hTERT 啟動子的轉錄活性，因此由上述的研究結果說明 reFIP-gts 主要是抑制 hTERT 轉錄活性進而抑制染色體端粒酶的活性。接著利用 promoter deletion 方式發現 reFIP-gts 主要作用在-196~-177 位置，據 Horikawa 等人在 1999 年發表人類端粒反轉錄酶啟動子區域中在-196~-177 為 E-box site 主要是 bHLHZ 蛋白家族所結合的區域，其中 c-Myc 為轉錄因子會直接影響 hTERT 轉錄活化。然而我們發現 reFIP-gts 並不會影響 c-Myc 蛋白的表現量而我們利用 in vitro binding assay (EMSA)和 in vivo binding assay (Chromatin immunoprecipitation)皆證實 c-Myc 蛋白明顯降低與 E-box 結合能力。雖然缺少 E-box 的區域 hTERT 啟動子 (hTERT-p-177)的活性明顯下降，但其活性仍高於控制組(pGL-載體)，顯示仍有其他轉錄因子可能直接或間接活化 hTERT 啟動子。這些現象與其他癌細胞株如 C33A、ME180、HeLa 和 SiHa 細胞所發現的結果相似(Takakura et al, 1999)。

近幾年誘發細胞自噬成為熱門的藥物開發方向，包含抗癌藥物等等(Rubinsztein et al, 2007)。由我們的結果清楚發現，靈芝免疫調節蛋白具有誘發肺癌細胞發生細胞自噬的能力。已知有許多路徑與啟動細胞自噬有關，其中最被廣泛研究的就是 PI3K/Akt/mTOR 路徑(Hung et al, 2009)。reFIP-gts 能抑制肺癌細胞中 pAkt 的表現量，即能有效抑制 Akt 的活化，因此免疫調節蛋白 reFIP-gts 可能是透過抑制 Akt 而導致細胞自噬的發生。此外內質網壓力與細胞中鈣離子兩者都是刺激細胞自噬的重要因子

(Ogata et al, 2006; Sakaki et al, 2008)。在先前的研究中，我們已證實 reFIP-gts 會進入細胞並堆積在內質網，並造成內質網壓力使鈣離子由內質網釋出，增加細胞質中鈣離子濃度。我們以細胞中鈣離子螯和劑 BAPTA-AM 抑制細胞中鈣離子的作用，明顯降低 reFIP-gts 造成的 LC3-II 增加。由此結果我們可以得知 reFIP-gts 是透過增加細胞中鈣離子來誘發細胞自噬。綜合先前與上述的結果，靈芝蛋白能透過刺激內質網壓力並增加細胞質鈣離子濃度，造成抑制端粒酶活性的作用，並且也透過此同一路徑，來誘發細胞自噬的產生。這使我們想進一步探討抑制端粒酶活性與細胞自噬兩者間是否有相關性。細胞自噬是細胞中重要的蛋白質品質管控機制(Mathew et al, 2009)，因此靈芝可能是透過細胞自噬來直接降解端粒酶或是端粒酶的上游調控因子，這仍需進一步的實驗證實。Cisplatin 是許多癌症治療的基底用藥，但因為其副作用高，會導致病患生理極度不適，因此在不減少藥效的情況下，開發佐劑藥物降低 cisplatin 用量是相當重要的。我們以 reFIP-gts 與 cisplatin 共同處理 CaLu-1 肺癌細胞，發現 reFIP-gts 能有效增加 cisplatin 的毒殺能力。詳細的機制仍需進一步探討。

以上所設計的實驗都是以細胞模式來探討，因此我們進一步利用活體實驗-裸鼠模式來驗證。結果發現 reFIP-gts 在高劑量下(38.4 mg/kg)能有效抑制腫瘤的生長(腫瘤體積降低 2.9 倍)，因此我們是第一個證實靈芝免疫蛋白具有抑制腫瘤生成的能力。

誌謝:

through rescuing of Sp1 reduction in A549 cells.
Mutat Res **688**(1-2): 72-77

感謝國科會

96-2314-B-040-014-MY3 計劃提供此

研究經費

以下為已發表著作

1. Liao CH, Hsiao YM, Sheu GT, Chang JT, Wang PH, Wu MF, Shieh GJ, Hsu CP, Ko JL (2007) Nuclear translocation of telomerase reverse transcriptase and calcium signaling in repression of telomerase activity in human lung cancer cells by fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae*. *Biochem Pharmacol* **74**(10): 1541-1554
2. Liao CH, Hsiao YM, Lin CH, Yeh CS, Wang JC, Ni CH, Hsu CP, Ko JL (2008) Induction of premature senescence in human lung cancer by fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae*. *Food Chem Toxicol* **46**(5): 1851-1859
3. Tang SC, Sheu GT, Wong RH, Huang CY, Weng MW, Lee LW, Hsu CP, Ko JL (2010) Expression of glutathione S-transferase M2 in stage I/II non-small cell lung cancer and alleviation of DNA damage exposure to benzo[a]pyrene. *Toxicol Lett* **192**(3): 316-323
4. Hsin IL, Sheu GT, Chen HH, Chiu LY, Wang HD, Chan HW, Hsu CP, Ko JL (2010) N-acetyl cysteine mitigates curcumin-mediated telomerase inhibition

参考文献

- Baehrecke EH (2005) Autophagy: dual roles in life and death? *Nature reviews* **6**(6): 505-510
- Bredesen DE, Rao RV, Mehlen P (2006) Cell death in the nervous system. *Nature* **443**(7113): 796-802
- Burger AM, Dai F, Schultes CM, Reszka AP, Moore MJ, Double JA, Neidle S (2005) The G-quadruplex-interactive molecule BRACO-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function. *Cancer Res* **65**(4): 1489-1496
- Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, Israels SJ, Gibson SB (2008) Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell death and differentiation* **15**(1): 171-182
- Criollo A, Maiuri MC, Tasmir E, Vitale I, Fiebig AA, Andrews D, Molgo J, Diaz J, Lavandro S, Harper F, Pierron G, di Stefano D, Rizzuto R, Szabadkai G, Kroemer G (2007) Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor. *Cell death and differentiation* **14**(5): 1029-1039
- El-Daly H, Kull M, Zimmermann S, Pantic M, Waller CF, Martens UM (2005) Selective cytotoxicity and telomere damage in leukemia cells using the telomerase inhibitor BIBR1532. *Blood* **105**(4): 1742-1749
- Falchetti ML, Levi A, Molinari P, Verna R, D'Ambrosio E (1998) Increased sensitivity and reproducibility of TRAP assay by avoiding direct primers interaction. *Nucleic Acids Res* **26**(3): 862-863
- Gomez D, Aouali N, Londono-Vallejo A, Lacroix L, Megnin-Chanet F, Lemarteleur T, Douarre C, Shin-ya K, Mailliet P, Trentesaux C, Morjani H, Mergny JL, Riou JF (2003) Resistance to the short term antiproliferative activity of the G-quadruplex ligand 12459 is associated with telomerase overexpression and telomere capping alteration. *J Biol Chem* **278**(50): 50554-50562
- Gomez D, Lemarteleur T, Lacroix L, Mailliet P, Mergny JL, Riou JF (2004) Telomerase downregulation induced by the G-quadruplex ligand 12459 in A549 cells is mediated by hTERT RNA alternative splicing. *Nucleic Acids Res* **32**(1): 371-379
- Grand CL, Han H, Munoz RM, Weitman S, Von Hoff DD, Hurley LH, Bearss DJ (2002) The cationic porphyrin TMPyP4 down-regulates c-MYC and human telomerase reverse transcriptase expression and inhibits tumor growth in vivo. *Mol Cancer Ther* **1**(8): 565-573
- Guilleret I, Benhattar J (2003) Demethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter reduced hTERT expression and telomerase activity and shortened telomeres. *Exp Cell Res* **289**(2): 326-334
- Hoyer-Hansen M, Jaattela M (2007) Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell death and differentiation* **14**(9): 1576-1582
- Hung JY, Hsu YL, Li CT, Ko YC, Ni WC, Huang MS, Kuo PL (2009) 6-Shogaol, an active constituent of dietary ginger, induces autophagy by inhibiting the AKT/mTOR pathway in human non-small cell lung cancer A549 cells. *J Agric Food Chem* **57**(20): 9809-9816
- Kosciolek BA, Kalantidis K, Tabler M, Rowley PT (2003) Inhibition of telomerase activity in human cancer cells by RNA interference. *Mol Cancer Ther* **2**(3): 209-216
- Levine B (2007) Cell biology: autophagy and cancer.

- Nature* **446**(7137): 745-747
- Li H, Lee TH, Avraham H (2002) A novel tricomplex of BRCA1, Nmi, and c-Myc inhibits c-Myc-induced human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT) promoter activity in breast cancer. *J Biol Chem* **277**(23): 20965-20973
- Lin WH, Hung CH, Hsu CI, Lin JY (1997) Dimerization of the N-terminal amphipathic alpha-helix domain of the fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae* (Fip-gts) defined by a yeast two-hybrid system and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* **272**(32): 20044-20048
- Lopata MA, Cleveland DW, Sollner-Webb B (1984) High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucleic Acids Res* **12**(14): 5707-5717
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G (2007) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(9): 741-752
- Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, Bray K, Reddy A, Bhanot G, Gelinas C, Dipaola RS, Karantza-Wadsworth V, White E (2009) Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* **137**(6): 1062-1075
- Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, Murakami T, Taniguchi M, Tanii I, Yoshinaga K, Shiosaka S, Hammarback JA, Urano F, Imaizumi K (2006) Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* **26**(24): 9220-9231
- Ozawa T, Gryaznov SM, Hu LJ, Pongracz K, Santos RA, Bollen AW, Lamborn KR, Deen DF (2004) Antitumor effects of specific telomerase inhibitor GRN163 in human glioblastoma xenografts. *Neuro-oncol* **6**(3): 218-226
- Riou JF, Guittat L, Mailliet P, Laoui A, Renou E, Petitgenet O, Megnin-Chanet F, Helene C, Mergny JL (2002) Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(5): 2672-2677
- Rubinsztein DC, Gestwicki JE, Murphy LO, Klionsky DJ (2007) Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov* **6**(4): 304-312
- Sakaki K, Wu J, Kaufman RJ (2008) Protein kinase Ctheta is required for autophagy in response to stress in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **283**(22): 15370-15380
- Suenaga M, Soda H, Oka M, Yamaguchi A, Nakatomi K, Shiozawa K, Kawabata S, Kasai T, Yamada Y, Kamihira S, Tei C, Kohno S (2002) Histone deacetylase inhibitors suppress telomerase reverse transcriptase mRNA expression in prostate cancer cells. *Int J Cancer* **97**(5): 621-625
- Takakura M, Kyo S, Kanaya T, Hirano H, Takeda J, Yutsudo M, Inoue M (1999) Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Res* **59**(3): 551-557
- Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Vitale I, Djavaheri-Mergny M, D'Amelio M, Criollo A, Morselli E, Zhu C, Harper F, Nannmark U, Samara C, Pinton P, Vicencio JM, Carnuccio R, Moll UM, Madeo F, Paterlini-Brechot P, Rizzuto R, Szabadkai G, Pierron G, Blomgren K, Tavernarakis N, Codogno

P, Cecconi F, Kroemer G (2008) Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* **10**(6): 676-687

Villa R, Folini M, Porta CD, Valentini A, Pennati M, Daidone MG, Zaffaroni N (2003) Inhibition of telomerase activity by geldanamycin and 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin in human melanoma cells. *Carcinogenesis* **24**(5): 851-859

Wang Z, Kyo S, Maida Y, Takakura M, Tanaka M, Yatabe N, Kanaya T, Nakamura M, Koike K, Hisamoto K, Ohmichi M, Inoue M (2002) Tamoxifen regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression differently in breast and endometrial cancer cells. *Oncogene* **21**(22): 3517-3524

Weng MW, Hsiao YM, Chen CJ, Wang JP, Chen WC, Ko JL (2004) Benzo[a]pyrene diol epoxide up-regulates COX-2 expression through NF-kappaB in rat astrocytes. *Toxicol Lett* **151**(2): 345-355

Yang C, Kaushal V, Shah SV, Kaushal GP (2008) Autophagy is associated with apoptosis in cisplatin injury to renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **294**(4): F777-787

無研發成果推廣資料

96 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：柯俊良			計畫編號：96-2314-B-040-014-MY3				
計畫名稱：松杉靈芝免疫調節蛋白誘發內質網壓力及轉譯後修飾與抑制肺癌細胞端粒酶活性關係之研究							
成果項目			量化			單位	備註（質化說明： 如數個計畫共同 成果、成果列為 該期刊之封面故 事...等）
			實際已達成 數（被接受 或已發表）	預期總達成 數(含實際已 達成數)	本計畫實 際貢獻百 分比		
國內	論文著作	期刊論文	0	0	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	100%		
		研討會論文	0	0	100%		
		專書	0	0	100%		
	專利	申請中件數	0	0	100%	件	
		已獲得件數	0	0	100%		
	技術移轉	件數	0	0	100%	件	
		權利金	0	0	100%	千元	
	參與計畫人力 （本國籍）	碩士生	0	0	100%	人次	
		博士生	0	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	0	0	100%		

<p>國外</p>	<p>論文著作</p>	<p>期刊論文</p>	<p>4</p>	<p>3</p>	<p>100%</p>	<p>篇</p> <p>1. Liao CH, Hsiao YM, Sheu GT, Chang JT, Wang PH, Wu MF, Shieh GJ, Hsu CP, Ko JL (2007) Nuclear translocation of telomerase reverse transcriptase and calcium signaling in repression of telomerase activity in human lung cancer cells by fungal immunomodulatory protein from Ganoderma tsugae. Biochem Pharmacol 74(10): 1541-1554</p> <p>2. Liao CH, Hsiao YM, Lin CH, Yeh CS, Wang JC, Ni CH, Hsu CP, Ko JL (2008) Induction of premature senescence in human lung cancer by fungal immunomodulatory protein from Ganoderma tsugae. Food Chem Toxicol 46(5): 1851-1859</p> <p>3. Tang SC, Sheu GT, Wong RH, Huang CY, Weng MW, Lee LW, Hsu CP, Ko JL (2010) Expression of glutathione S-transferase M2 in stage I/II non-small cell lung cancer and alleviation of DNA damage exposure to benzo[a]pyrene. Toxicol Lett 192(3): 316-323</p> <p>4. Hsin IL, Sheu GT, Chen HH, Chiu LY, Wang HD, Chen</p>
-----------	-------------	-------------	----------	----------	-------------	---

		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>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。)</p>	協助益生生技股份有限公司進行產品開發之評估						
--	-----------------------	--	--	--	--	--	--

	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）

1. 2007Biochem Pharmacol74(10):1541-1554

2. 2008Food Chem Toxicol46(5):1851-1859

3. 2010Toxicol Lett192(3):316-323

4. 2010Mutat Res688(1-2):72-77

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）

本實驗室主要以遺傳工程方式重組松杉靈芝免疫調節蛋白質 reFIP-gts，將此基因選殖並純化其蛋白質。本實驗首先使用報導基因實驗分析，發現 reFIP-gts 可有效抑制 hTERT 啟動子活性。進一步使用西方點墨法及 EMSA 分析得知 reFIP-gts 是透過抑制轉錄因子 C-myc 對 hTERT 啟動子的結合能力，而抑制端粒酶表現與活性。我們進一步發現靈芝免疫調節蛋白 reFIP-gts 可於肺癌細胞中誘發細胞自體吞噬反映。reFIP-gts 可促使細胞自噬標的基因 Beclin-1 mRNA 表現量增加與 LC3 蛋白轉變。以細胞內鈣離子螯合劑 BAPTA-AM 證實 reFIP-gts 是透過鈣離子訊息傳遞路徑來誘發細胞自噬發生。我們也觀察到 reFIP-gts 能增加 A549 細胞對 cisplatin 的感受性。於動物實驗中，reFIP-gts 確實能抑制腫瘤的生長。綜合以上結果，reFIP-gts 確實為擁有抑制肺癌的能力。